



**PRUEBAS SELECTIVAS PARA INGRESO COMO PERSONAL
LABORAL FIJO**

GRUPO PROFESIONAL: M3

ESPECIALIDAD: INVESTIGACIÓN

**PROGRAMA: TÉCNICAS DE LABORATORIO EN BIOQUÍMICA,
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

EJERCICIO PRÁCTICO

INSTRUCCIONES:

1. **No abra este cuestionario hasta que se lo indiquen.**
2. Este examen consta de tres casos prácticos, deberá **elegir dos de ellos.**
3. El tiempo de realización de este ejercicio es de **tres horas.**

GRUPO PROFESIONAL: M3

ESPECIALIDAD: INVESTIGACIÓN

PROGRAMA: TÉCNICAS DE LABORATORIO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Ejercicio 1:

En diferentes zonas de un hospital se identifican varios pacientes que muestran síntomas de infección respiratoria grave. Se sospecha que la infección es causada por una bacteria aerobia que crece bien en una gran variedad de medios de cultivo y que la cepa implicada en dicha infección porta en su genoma una variante alélica en el gen *penA* (2,4kb de fase de lectura) que ha sido previamente caracterizado por otros laboratorios y cuya secuencia es bien conocida y está depositada en las bases de datos. La proteína codificada por el gen *penA* está implicada en el desarrollo de resistencia a antibióticos. Los investigadores observan que esta variante es causante de resistencia a la zeocina.

1. Indique, de forma esquematizada y con un razonamiento breve, como procedería a la obtención de muestras procedentes de tres puntos diferentes del hospital (mobiliario de habitación, sistema de aireación y sistema de agua sanitaria), así como al cultivo de las bacterias presentes en las muestras y a la determinación de su sensibilidad a antibióticos. (4 puntos)

2. Una vez identificada la bacteria entre las diferentes muestras. Se selecciona uno de los aislados y se procede a determinar la secuencia nucleotídica del gen *penA* en dicha cepa. (6 puntos).
Describa los pasos a seguir para:

a) Realizar la extracción del DNA bacteriano. Describa esencialmente el procedimiento describiendo los pasos básicos hasta conseguir una muestra de DNA bacteriano en solución 10mM Tris HCl, 1mM EDTA pH8, indique también como cuantificaría el rendimiento final de ADN. (3 puntos)

b) Realizar la amplificación por técnicas de PCR de la región codificante del gen *penA*. Incluya número y las características de los cebadores para la amplificación y posterior secuenciación del fragmento, así como los materiales y equipamiento que se precise. Mencione también los controles necesarios para determinar, tras el envío a secuenciar de las diferentes muestras, los posibles cambios en la secuencia nucleotídica que se identifiquen en la región codificante del gen *penA* en la cepa aislada causante del fenotipo de resistencia a antibiótico. (3 puntos)

3. El análisis de las secuencias recibidas muestran que la mutación del gen *penA* causante del fenotipo de resistencia a antibióticos genera una diana de restricción para la enzima HindIII. La amplificación mediante PCR con oligonucleótidos específicos, denominados PenAUP y PenADW, del fragmento del gen *penA* que contiene la mutación tiene un tamaño total de 600 pb y genera dos fragmentos de 150 pb y 450 pb tras su digestión con HindIII. Tras el análisis por amplificación y digestión de muestras de varios pacientes que muestran síntomas de infección, obtenemos los



siguientes resultados en un gel de electroforesis. Indique razonadamente qué pacientes podrían estar infectados con la bacteria patógena. (4 puntos)

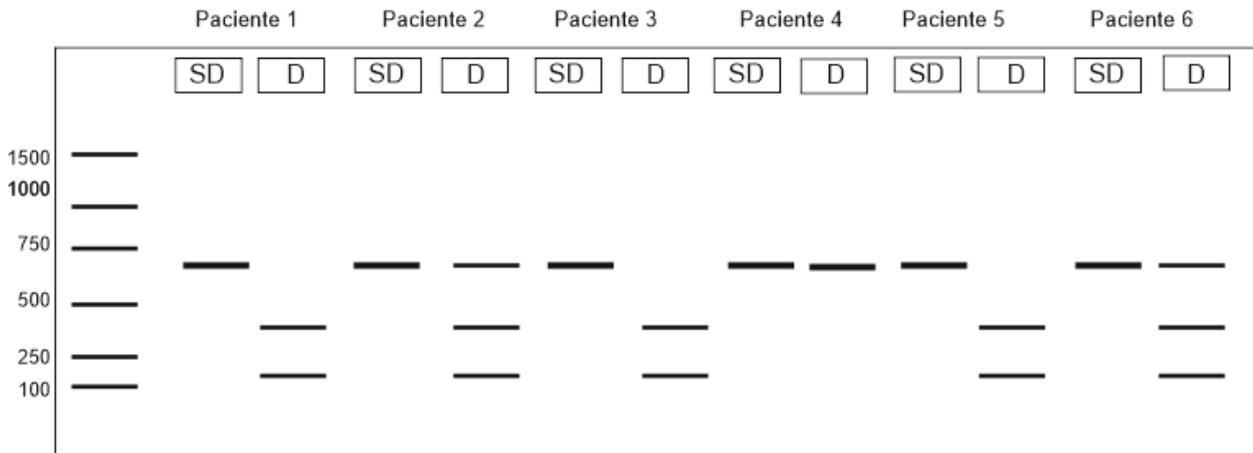
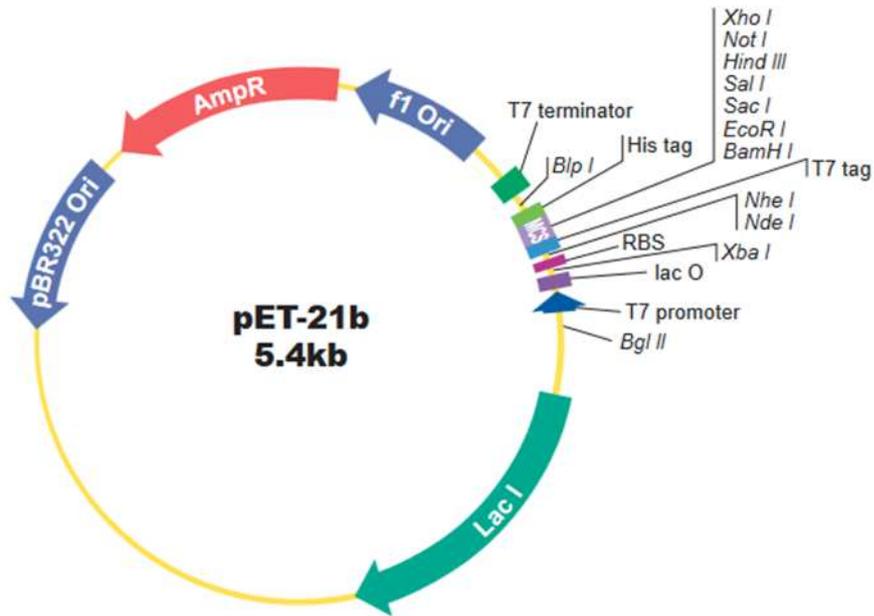


Figura 1. SD indica sin digerir, D digerido con HindIII.

4. Queremos realizar la expresión de la proteína codificada en el gen *penA* en la bacteria *E. coli*. Para ello se requiere introducir la secuencia codificante del gen *penA* en el plásmido de expresión pET-21b. (6 puntos)

a) Diseñe un protocolo para obtener un plásmido recombinante que sirva para expresar la proteína PenA con una cola de histidinas en la cepa adecuada de *E. coli* a partir del promotor T7. Tenga en cuenta las dianas de restricción presentes en el sitio de multiclonaje del plásmido que se indican en el diagrama de abajo y sabiendo que la secuencia nucleotídica del gen *PenA* carece de la diana EcoRI, aunque posee dianas únicas para las enzimas de restricción BamHI y NotI a 700pb y 1,2kb, respectivamente, del ATG iniciador de *penA*: (2 puntos)



Bgl II T7 promoter lac operator *Xho I* rbs
 --- AGA TCT CGA TCC CGC GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA ATT GTG AGC GGA TAA CAA TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT
Nde I *Nhe I* T7 tag *BamH I* *EcoR I* *Sac I* *Sal I* *Hind III* *Not I* *Xho I* His tag
 ATA CAT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CCG AAT TCG AGC TCC GTC GAC AAG CTT GCG GCC GCA CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC TGA
 M A S M T G G Q Q M G R D P N S S V D K L A A A L E H H H H H H H Stop
Bgl I T7 terminator
 GAT CCG GCT GCT AAC AAA GCC CGA AAG GAA GCT GAG TTG GCT GCT GCC ACC GCT GAG CAA TAA CTA GCA TAA CCC CTT GGG GCC TCT AAA CGG GTC TTG AGG GGT TTT TTG ---

b) Describa como procedería para la transformación de la cepa más adecuada de *E. coli* con este vector y la selección de transformantes teniendo en cuenta que la proteína PenA-6xHis puede expresarse y es completamente funcional. (2 puntos)

c) Describa sucintamente los pasos esenciales para proceder a la expresión de la proteína PenA-6xHis y para su purificación. (2 puntos)



Ejercicio 2:

Un investigador quiere caracterizar la localización intracelular de dos proteínas (PDK1 y Akt) y su posible interacción. Para eso dispone de tres tipos de células (1) en las que PDK1 se expresa con GFP; (2) en las que Akt se expresa con mCherry; (3) en las que expresa simultáneamente PDK1-GFP y Akt-mCherry.

El laboratorio tiene a su disposición equipos de microscopía confocal, campo amplio, super-resolución STED y super-resolución STORM/PALM y cámaras con control de temperatura y CO₂. Los microscopios están dotados con láseres y lámparas con las longitudes de onda y cubos de filtros necesarios y control de autofocus.

1. El investigador quiere hacer una reconstrucción 3D de la localización intracelular de PDK1 y Akt en células vivas con resolución limitada por difracción.

Justifique: (1,6 puntos por pregunta)

- a) La técnica microscópica de fluorescencia que usaría para obtener mayor contraste.
- b) El tipo de objetivo para maximizar la resolución (agua, aceite o glicerol).
- c) La magnificación del objetivo y abertura numérica aproximada.
- d) El tipo de fuente de excitación (láser o lámpara/led).
- e) La longitud de onda (el color) de excitación para cada proteína.
- f) Describa las características del cubo de filtros que emplearía.
- g) ¿Cuál es la resolución aproximada que obtendría en el plano XY y en el eje Z?

2. El investigador quiere hacer una secuencia (time-lapse) de 12 horas durante una noche, priorizando la supervivencia de las células durante la adquisición de imagen.

Justifique: (1,4 puntos por pregunta)

- a) La técnica microscópica que usaría.
- b) El material que necesitaría para mantener vivas las células durante el experimento.
- c) El tipo de objetivo de inmersión que usaría: de aceite, de agua o de glicerol.

3. El investigador quiere observar las estructuras intracelulares en las que se localiza la proteína marcada con GFP con resolución 80 nm en el plano y 100 nm en el eje Z. (1,2 puntos por pregunta)

- a) Justifique la técnica microscópica que utilizaría.
- b) Describa a grandes trazos la preparación de la muestra.
- c) Si quiere reducir la resolución a unos 50 nm, ¿qué técnica de procesamiento de imágenes usaría?

4. Finalmente, el investigador quiere observar la interacción en la célula entre las proteínas PDK1-GFP y Akt-mCherry usando un microscopio confocal. Justifique si escogería una técnica de colocalización o metodología FRET (transferencia de energía) (1 punto)



Ejercicio 3:

En un laboratorio de biología molecular y celular, se está llevando a cabo un estudio para investigar las modificaciones post-traduccionales de las proteínas en células de cáncer de mama. Se sospecha que ciertas modificaciones como la fosforilación y la glicosilación pueden desempeñar un papel crucial en la progresión del cáncer.

1. Cita qué técnica de proteómica o diseño experimental se podría utilizar para identificar y caracterizar estas modificaciones. ¿Por qué? (3 puntos)
2. En el caso de utilizar un primer paso de cromatografía líquida y posteriormente espectrometría de masas, ¿qué procedimientos se llevarían a cabo sobre las proteínas antes de la cromatografía líquida para poder analizarlas posteriormente por espectrometría de masas? (3 puntos)
3. Para la separación en la fase cromatográfica se va a utilizar una columna de alta resolución en fase reversa. Explica los principios de este tipo de separación cromatográfica y algún ejemplo de fase estacionaria. (3 puntos)
4. Una vez separadas por HPLC, el hidrolizado de proteínas se someterá a espectrometría de masas para su identificación. Para ello, los fragmentos proteicos obtenidos tras la hidrólisis con tripsina se ionizarán en el espectrómetro de masas. Explica brevemente alguna de las principales diferencias entre ionización tipo electrospray (ESI) e ionización tipo MALDI (Ionización por Desorción Láser Asistida con Matriz). (4 puntos)
5. Durante la espectrometría de masas, los péptidos ionizados se fragmentan y se registra el espectro de masas de los fragmentos. Explica que es un espectro de masas y cómo se representa. (3 puntos)
6. Los espectros de masas se analizan utilizando software especializado y se comparan con bases de datos de secuencias proteicas para identificar las proteínas presentes en las fracciones. Desarrolla brevemente dando ejemplos de tipos de software y bases de datos. (4 puntos)