



PRUEBAS SELECTIVAS PARA INGRESO COMO PERSONAL LABORAL FIJO

GRUPO PROFESIONAL: M3

ESPECIALIDAD: INVESTIGACIÓN

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

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 BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

EJERCICIO 1

SaiS es una proteína con una estructura primaria bien conservada en procariotas que incluye un dominio S1. Los valores teóricos de masa molecular y punto isoeléctrico apenas varían entre especies: 250-260 kDa y 11.5-12.0, respectivamente. Quieres caracterizar SaiS en *Examplobacterium sextilus*, una bacteria recién descubierta con alto potencial biotecnológico. Explica concisa y razonadamente cómo llevarías a cabo las siguientes cuatro tareas concretas relacionadas con el proyecto:

1) El genoma de *E. sextilus* acaba de secuenciarse, pero aún no tiene anotado ningún marco abierto de lectura. (5 puntos.)

- ¿Cómo identificarías el ortólogo del gen *saiS* en *E. sextilus* mediante análisis bioinformático?
- Una vez identificado, y también usando análisis bioinformático, ¿cómo podrías aumentar tu confianza en que el gen que has identificado sea el ortólogo de *saiS*?

2) El genoma de *E. sextilus* está ya anotado, y comienzas ahora la caracterización de SaiS en esta bacteria. Dispones de un anticuerpo comercial monoclonal procedente de ratón, subtipo IgG1, obtenido frente a SaiS de otra bacteria. Quieres comprobar si este anticuerpo es capaz de reconocer a SaiS de *E. sextilus*. (5 puntos.)

- ¿Qué abordaje/s experimental/es emplearías? Razona tu respuesta.
- Teniendo en cuenta la masa molecular de SaiS, ¿necesitarías modificar algún aspecto del/los protocolo/s habituale/s?

3) Has confirmado que, efectivamente, el anticuerpo comercial reconoce la proteína SaiS endógena de *E. sextilus*. Ahora quieres purificar SaiS nativa en cantidades suficientes para estudios funcionales. Has comprobado que SaiS no es proclive a la adición de etiquetas en su secuencia para su posterior purificación, por lo que necesariamente debes purificar la proteína endógena a partir de extractos de *E. sextilus* mediante cromatografía líquida. Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas de SaiS: (5 p.)

- Enumera qué tipos de cromatografía son, en principio, las más idóneas. Razona la respuesta.
- Describe brevemente cómo eluirías la proteína en cada caso.
- ¿Cómo seguirías la purificación?

4) Finalmente, planteas la hipótesis de que, en *E. sextilus*, SaiS se une específicamente a un subconjunto específico de ARNs entre los que se encuentra un transcrito llamado *rokU* pero no otro denominado *sitA*. ¿Qué técnica emplearías para confirmar tu hipótesis?



Enumera los pasos a seguir y menciona controles y precauciones especiales que deberías tener en cuenta. (5 p.)

EJERCICIO 2

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, cómo 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 p.)

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. 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, pH=8. Indique también como cuantificaría el rendimiento final de ADN. (3 p.)

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 p.)

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 p.)

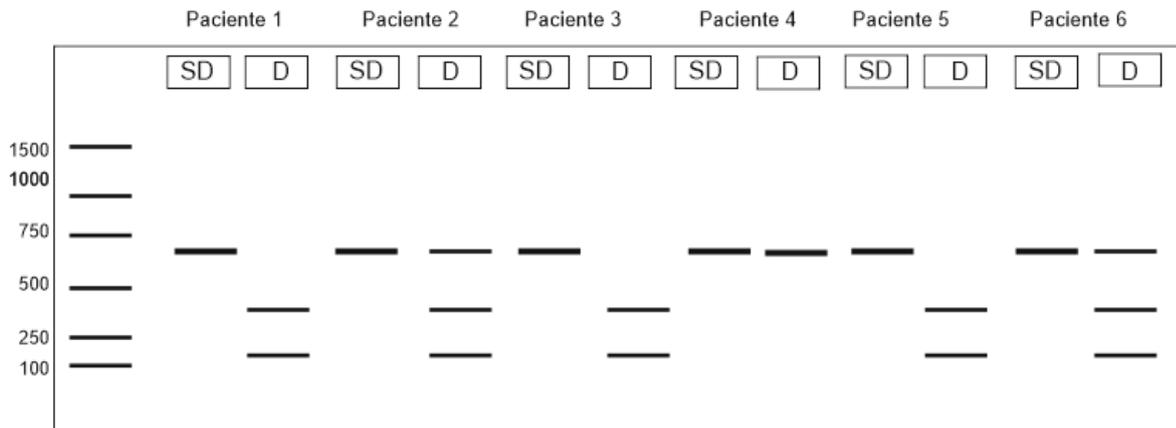
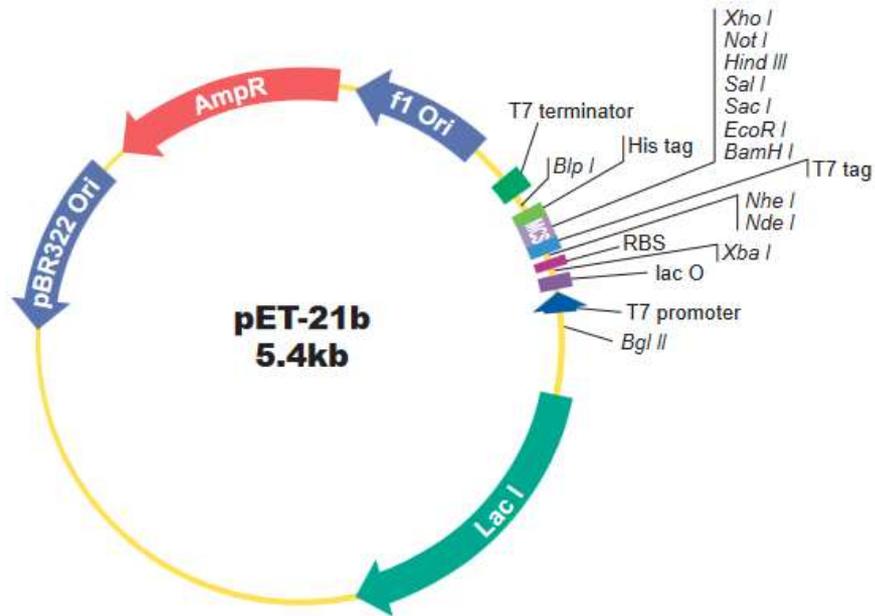


Figura 1. SD indica sin digerir, D digerido con HindIII.

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.

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 p.)



```

      Bgl II          T7 promoter          lac operator          Xba 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          BamHI   EcoRI   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 TGA
      M   A   S   M   T   G   G   Q   Q   M   G   R   D   P   N   S   S   S   V   D   K   L   A   A   A   L   E   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 cómo 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 p.)

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



EJERCICIO 3

Un investigador quiere caracterizar la localización intracelular de dos proteínas (FtsZ y ZipA) y su posible colocalización espacial y temporal. Para ello dispone de tres tipos de células: (1) en las que tiene FtsZ se expresa con GFP; (2) en las que ZipA se expresa con mCherry; (3) en las que expresa simultáneamente FtsZ-GFP y ZipA-mCherry.

El laboratorio tiene a su disposición equipos de microscopia confocal, campo amplio, super-resolución STED y super-resolución STORM. Los microscopios están dotados con láseres y lámparas con las longitudes de onda y cubos de filtros necesarios.

1. El investigador quiere conocer la localización intracelular de FtsZ y ZipA con células vivas y resolución limitada por difracción.
Justifique:
 - 1.1. la técnica microscópica de fluorescencia que usaría para obtener mayor contraste, (1,5p.)
 - 1.2. el tipo de objetivo para maximizar la resolución (agua, aceite o glicerol), (1,5p.)
 - 1.3. la magnificación del objetivo y la apertura numérica aproximada, (1,5p.)
 - 1.4. el tipo de fuente de excitación (láser o lámpara/led), (1,5p.)
 - 1.5. la longitud de onda (el color) de excitación para cada proteína. (1,5p.)
 - 1.6. Describa las características del cubo de filtros que emplearía. (1,5p.)
 - 1.7. ¿Cuál es la resolución aproximada que obtendría en el plano XY? (1,5p.)
2. Durante el experimento observa que las células transformadas con proteína fluorescente son muy brillantes, aunque tienen una morfología inusualmente alargada.
 - 2.1. ¿Cuál es la causa más probable de esa morfología? (1,25 p.)
 - 2.2. ¿Qué aconsejaría al investigador antes de continuar sus experimentos? (1,25 p.)
3. El investigador quiere realizar una tinción para cuantificar la supervivencia de las células al cabo de un tratamiento con un péptido antimicrobiano.
 - 3.1. Describa el modo de funcionamiento de una tinción que marca las células vivas y las células muertas. (1,25 p.)
 - 3.2. Mencione un ejemplo de una pareja de tinciones complementarias vida/muerte. (1,25 p.)
4. El investigador quiere observar las estructuras intracelulares que forma la proteína FtsZ en el anillo con resolución de molécula individual.
Justifique:
 - 4.1. la técnica microscópica de súper-resolución que utilizaría, (1,5 p.)
 - 4.2. el tipo de sondas fluorescentes según la técnica escogida. (1,5 p.)
 - 4.3. ¿Cuál es la máxima resolución que podría alcanzar con la técnica escogida? (1,5 p.)