

PRUEBA SELECTIVA PARA LA PROVISIÓN DE PLAZAS DE LA ESCALA DE TÉCNICOS ESPECIALISTAS DE VARIAS ESPECIALIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA (R-1337/2018) DE 27 DE DICIEMBRE DE 2018.

EJERCICIO ÚNICO: SEGUNDA PARTE

ESPECIALIDAD: BIOLOGÍA MOLECULAR

SUPUESTO 1

Se está investigando la expresión de un gen de estudio –mediante un ensayo de PCR a tiempo real- en un **tejido tumoral (condición experimental)** en relación a su expresión en el mismo **tejido sano libre de neoplasia (condición calibradora de referencia)**. Para ello, se aplica el método de $\Delta\Delta C_T$ para la cuantificación relativa de los niveles de expresión de dicho gen.

Tras la extracción del ARN y su retrotranscripción, se valida con éxito el ensayo mediante el cálculo de los valores de C_T de las diluciones seriadas del ADNc obtenido. Se establece que no hay diferencias significativas en las eficiencias de los distintos procesos de PCR, que se realizan a partir del ADNc procedente de las dos condiciones del ensayo (experimental y calibradora).

Después de la validación, se obtienen las curvas de amplificación (**gráficas 1, 2 y 3**) que conducen a la cuantificación relativa de la expresión génica (**gráfica 5**). Las gráficas 2 y 3 muestran las curvas de amplificación del **gen endógeno** (gen interno de referencia) y del **gen de estudio**, respectivamente. Dichas curvas se representan conjuntamente en la gráfica 1, para una mejor visión del conjunto. También se muestra la curva de disociación térmica del gen de estudio (**gráfica 4**).

Con la información precedente y la contenida en las gráficas, se plantean las siguientes 11 preguntas con respuestas alternativas. Por favor, **seleccione en cada caso la única respuesta correcta entre las cuatro posibles**:

- 1.- En las gráficas 1 y 2, se observa que las curvas de amplificación del gen endógeno se superponen en la fase exponencial para las distintas condiciones de ensayo, por tanto:
 - a.- Su elección como endógeno ha sido acertada, ya que su expresión es estable al comparar las dos condiciones de ensayo.
 - b.- Su elección como endógeno ha sido inapropiada, ya que su expresión es estable al comparar las dos condiciones de ensayo.
 - c.- Aunque su expresión es estable, su valor de C_T (= 25,3) es demasiado bajo para lo que se espera de un endógeno.
 - d.- Aunque su expresión es estable, su valor de C_T (= 25,3) es demasiado alto para lo que se espera de un endógeno.

- 2.- En la gráfica 2, indique qué representa la letra A de la izquierda:
- La fase exponencial de la curva.
 - La fase lineal de la curva.
 - La línea base.
 - La fase plateau.
- 3.- En las gráficas 2 y 3, se establece el threshold o umbral en un valor de incremento de fluorescencia (ΔRn) de 0,2, dentro de:
- La fase exponencial de la curva.
 - La fase lineal de la curva.
 - La línea base.
 - La fase plateau.
- 4.- Respecto al gen de estudio, de las gráficas 1 y 3 se infiere que:
- Su valor de C_T es menor en el tejido sano y, por tanto, se expresa más en este tejido.
 - Su valor de C_T es menor en el tejido sano y, por tanto, se expresa menos en este tejido.
 - Su valor de C_T es mayor en el tejido tumoral y, por tanto, se expresa más en este tejido.
 - Su valor de C_T es menor en el tejido tumoral y, por tanto, se expresa más en este tejido.
- 5.- A partir las gráficas 2 y 3 se obtienen los valores de C_T , que son: $C_T = 25,3$ para el gen endógeno (en ambas condiciones, tejido sano y tumoral); $C_T = 26,3$ para el gen de estudio en el tejido sano; y $C_T = 27,3$ para el gen de estudio en el tejido tumoral. Según estos valores, indique el valor de ΔC_T en la condición experimental:
- $\Delta C_T = 0,5$.
 - $\Delta C_T = 1$.
 - $\Delta C_T = 2$.
 - $\Delta C_T = 3$.
- 6.- A partir las gráficas 2 y 3 se obtienen los valores de C_T , que son: $C_T = 25,3$ para el gen endógeno (en ambas condiciones, tejido sano y tumoral); $C_T = 26,3$ para el gen de estudio en el tejido sano; y $C_T = 27,3$ para el gen de estudio en el tejido tumoral. Según estos valores, indique el valor de ΔC_T en la condición calibradora de referencia:
- $\Delta C_T = 0,5$.
 - $\Delta C_T = 1$.
 - $\Delta C_T = 2$.
 - $\Delta C_T = 3$.

7.- A partir las gráficas 2 y 3 se obtienen los valores de C_T , que son: $C_T = 25,3$ para el gen endógeno (en ambas condiciones, tejido sano y tumoral); $C_T = 26,3$ para el gen de estudio en el tejido sano; y $C_T = 27,3$ para el gen de estudio en el tejido tumoral. Según estos valores, indique el valor de $\Delta\Delta C_T$ en la condición experimental:

- a.- $\Delta\Delta C_T = 0.$
- b.- $\Delta\Delta C_T = 1.$
- c.- $\Delta\Delta C_T = 2.$
- d.- $\Delta\Delta C_T = 3.$

8.- A partir las gráficas 2 y 3 se obtienen los valores de C_T , que son: $C_T = 25,3$ para el gen endógeno (en ambas condiciones, tejido sano y tumoral); $C_T = 26,3$ para el gen de estudio en el tejido sano; y $C_T = 27,3$ para el gen de estudio en el tejido tumoral. Según estos valores, indique el valor de $\Delta\Delta C_T$ en la condición calibradora de referencia:

- a.- $\Delta\Delta C_T = 0.$
- b.- $\Delta\Delta C_T = 1.$
- c.- $\Delta\Delta C_T = 2.$
- d.- $\Delta\Delta C_T = 3.$

9.- La inclusión de una curva de disociación térmica (Melt Curve Plot; gráfica 4) en el ensayo, nos informa de que el reactivo utilizado ha sido:

- a.- Una sonda TaqMan con FAM como fluorocromo y TAMRA como quencher.
- b.- Una sonda TaqMan con VIC como fluorocromo y TAMRA como quencher.
- c.- SYBR Green.
- d.- Una sonda TaqMan con FAM como fluorocromo pero sin quencher.

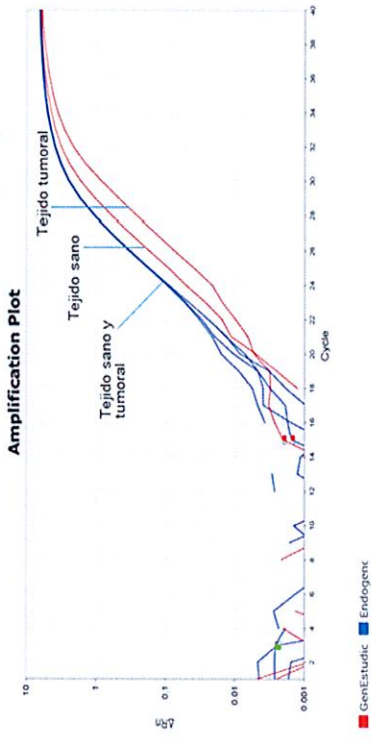
10.- Respecto a los valores de cuantificación relativa (RQ) expresados en la gráfica 5:

- a.- El valor de 1 (I) se corresponde con la expresión del gen de estudio en la condición experimental.
- b.- El valor de 0,5 (II) se corresponde con la expresión del gen de estudio en la condición calibradora de referencia.
- c.- El valor de 1 (I) se corresponde con la expresión del gen endógeno en la condición experimental.
- d.- El valor de 0,5 (II) se corresponde con la expresión del gen de estudio en la condición experimental.

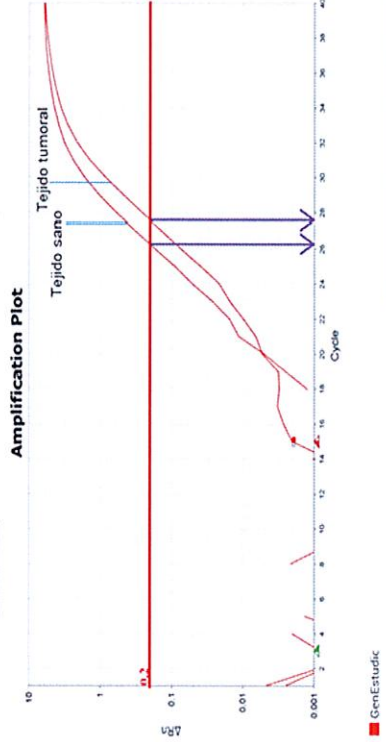
11.- Respecto a los valores de cuantificación relativa (RQ) expresados en la gráfica 5, se obtienen a partir de la fórmula:

- a.- $2^{-\Delta\Delta CT}$
- b.- $2^{+\Delta\Delta CT}$
- c.- $2 \times 2^{-\Delta\Delta CT}$
- d.- $4 \times 2^{-\Delta\Delta CT}$

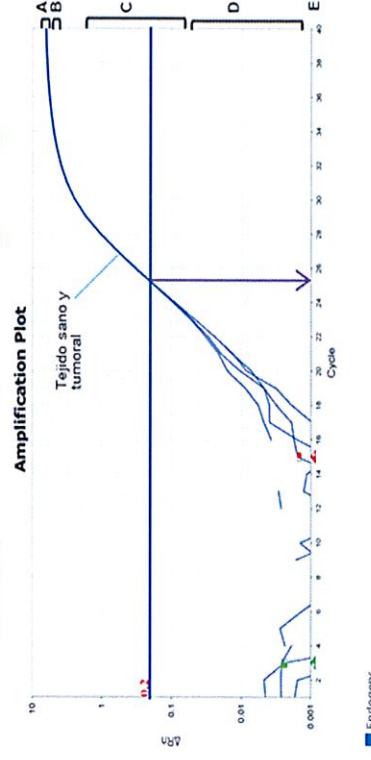
Gráfica 1: curvas de amplificación del gen endógeno y del gen de estudio



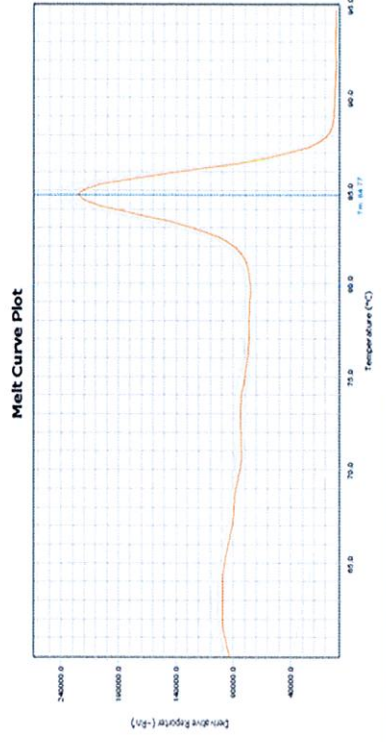
Gráfica 3: curvas de amplificación del gen de estudio



Gráfica 2: curvas de amplificación del gen endógeno



Gráfica 4: curva de disociación térmica del gen de estudio



Gráfica 5: Expresión del gen de estudio en la condición calibradora de referencia (tejido sano) y en la condición experimental (tejido tumoral)



PRUEBA SELECTIVA PARA LA PROVISIÓN DE PLAZAS DE LA ESCALA DE TÉCNICOS ESPECIALISTAS DE VARIAS ESPECIALIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA (R-1337/2018) DE 27 DE DICIEMBRE DE 2018.

EJERCICIO ÚNICO: SEGUNDA PARTE

ESPECIALIDAD: BIOLOGÍA MOLECULAR

SUPUESTO 2

Se han recibido 2,5 millones de células de la línea celular humana HeLa, para realizar una autenticación de la misma mediante dos procedimientos complementarios:

- “DNA Barcode” mediante secuenciación de ADN Sanger.
- Genotipado mediante análisis de microsatélites.

En primer lugar, se realizan en paralelo cuatro procedimientos de extracción del ADN de las células, para determinar cuál de ellos permite obtener un ADN de mejor calidad. A continuación, se mide el ADN obtenido en cada uno de los procedimientos mediante espectrofotometría ultravioleta, obteniéndose los siguientes resultados:

| Procedimiento | [ADN] (ng/μl) | A260/280 | A260/230 |
|-----------------|---------------|----------|----------|
| Kit comercial 1 | 310,7 | 0,56 | 1,40 |
| Kit comercial 2 | 318,6 | 2,00 | 1,85 |
| Kit comercial 3 | 320,2 | 1,58 | 1,50 |
| Chelex-100 | 410,4 | 1,86 | 0,48 |

[ADN]: concentración de ADN.

A260/280: relación de la absorbancia a 260 frente a la absorbancia a 280.

A260/230: relación de la absorbancia a 260 frente a la absorbancia a 230.

Por favor, a partir de los datos de la tabla anterior responda a las siguientes cuestiones con respuestas alternativas. **Seleccione en cada caso la única respuesta correcta entre las cuatro posibles:**

- 1.- ¿Cuál de los cuatro procedimientos de extracción rinde un ADN más contaminado con proteínas?:
 - a.- Kit comercial 1.
 - b.- Kit comercial 2.
 - c.- Kit comercial 3.
 - d.- Chelex-100.

2.- ¿Cuál de los cuatro procedimientos de extracción rinde un ADN más contaminado con sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos?:

- a.- Kit comercial 1.
- b.- Kit comercial 2.
- c.- Kit comercial 3.
- d.- Chelex-100.

3.- ¿Cuál de los cuatro procedimientos de extracción rinde un ADN con pureza más óptima?:

- a.- Kit comercial 1.
- b.- Kit comercial 2.
- c.- Kit comercial 3.
- d.- Chelex-100.

A partir de la muestra de mejor calidad, se llevan a cabo los protocolos necesarios para realizar, por un lado, una secuenciación de ADN tipo Sanger y, por otro, un análisis de fragmentos de ADN (estudio de microsatélites). Ambos procesos terminan en un analizador genético, que integra la electroforesis capilar con la detección de los fluorocromos incorporados previamente a las moléculas de ADN durante amplificaciones por PCR (dichas amplificaciones forman parte de los respectivos y oportunos protocolos de cada proceso).

Las gráficas numeradas del 1 al 4 muestran las emisiones de fluorescencia recogidas por el analizador genético. Obsérvelas con atención antes de leer las siguientes preguntas con respuestas alternativas. Por favor, **seleccione en cada caso la única respuesta correcta entre las cuatro posibles**:

4.- ¿Cuál de las cuatro gráficas se corresponde con el dato bruto (raw data) de una secuencia de ADN tipo Sanger, en el que aparecen todas las emisiones de fluorescencia recogidas a lo largo de la electroforesis?:

- a.- La gráfica 1.
- b.- La gráfica 2.
- c.- La gráfica 3.
- d.- La gráfica 4.

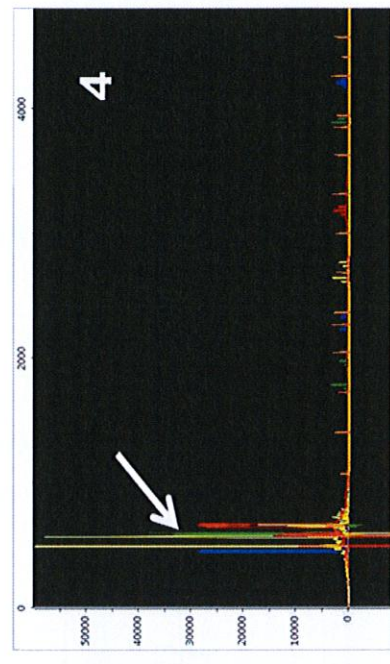
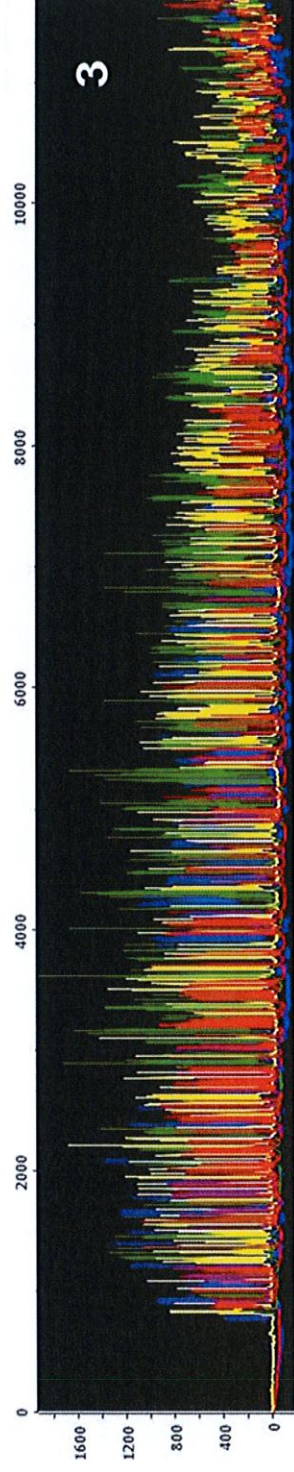
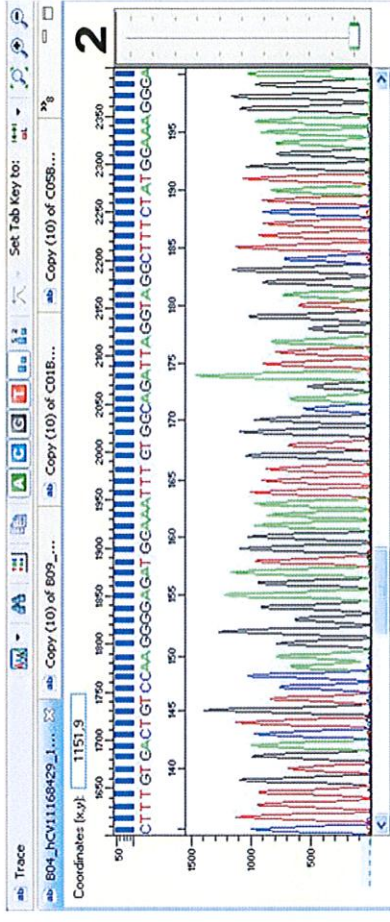
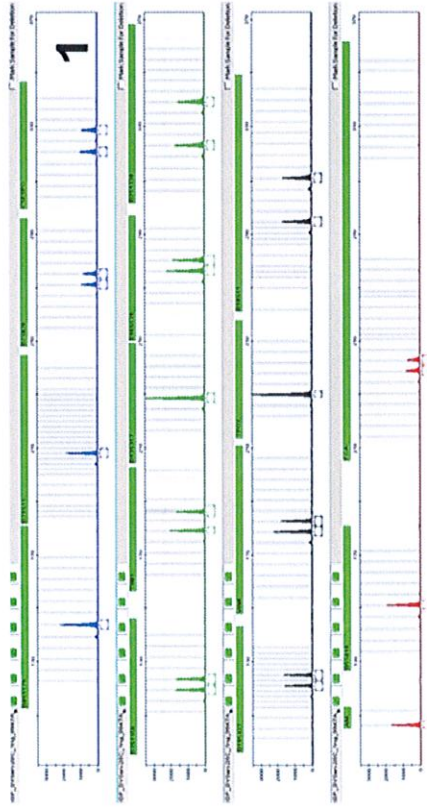
5.- ¿Cuál de las cuatro gráficas se corresponde con el dato bruto (raw data) de un análisis de fragmentos de ADN (microsatélites), en el que aparecen todas las emisiones de fluorescencia recogidas a lo largo de la electroforesis?:

- a.- La gráfica 1.
- b.- La gráfica 2.
- c.- La gráfica 3.
- d.- La gráfica 4.

- 6.- ¿Cuál de las cuatro gráficas se corresponde con el electroferograma de una secuencia de ADN tipo Sanger, en el que se muestran las emisiones de fluorescencia procesadas?:
- La gráfica 1.
 - La gráfica 2.
 - La gráfica 3.
 - La gráfica 4.
- 7.- ¿Cuál de las cuatro gráficas se corresponde con el electroferograma de un análisis de fragmentos de ADN (microsatélites), en el que se muestran las emisiones de fluorescencia procesadas?:
- La gráfica 1.
 - La gráfica 2.
 - La gráfica 3.
 - La gráfica 4.
- 8.- Los fluorocromos en la secuenciación de Sanger van unidos a:
- Los didesoxinucleósidos trifosfatos o terminadores de cadena, que se utilizan en la PCR con un único cebador previa a la electroforesis capilar.
 - Al cebador forward, que se utiliza en la PCR previa a la electroforesis capilar.
 - Al cebador reverse, que se utiliza en la PCR previa a la electroforesis capilar.
 - A la ADN-polimerasa, que se utiliza en la PCR previa a la electroforesis capilar.
- 9.- La flecha blanca conspicua de la gráfica 4 señala:
- Los didesoxinucleósidos trifosfatos o terminadores de cadena con marcaje fluorescente, que no se han incorporado al ADN amplificado durante la PCR previa a la electroforesis capilar.
 - Los cebadores con marcaje fluorescente sobrantes de la PCR previa a la electroforesis capilar.
 - Un artefacto conocido como stutter peak o banda tartamuda propio del análisis de microsatélites.
 - Un artefacto conocido como dye blobs propio de la secuenciación Sanger.
- 10.- La gráfica 5 muestra las emisiones de fluorescencia de una escalera alélica que se corrió a la vez que la muestra que dio lugar a la gráfica 1, pero en un capilar distinto del analizador genético. Utilice dicha escalera alélica para establecer los alelo(s) del marcador CSF1PO (para facilitar este trabajo se muestra también la gráfica 1 ampliada):
- Alelo 15.
 - Alelo 17.
 - Alelos 10 y 12.
 - Alelo 11.

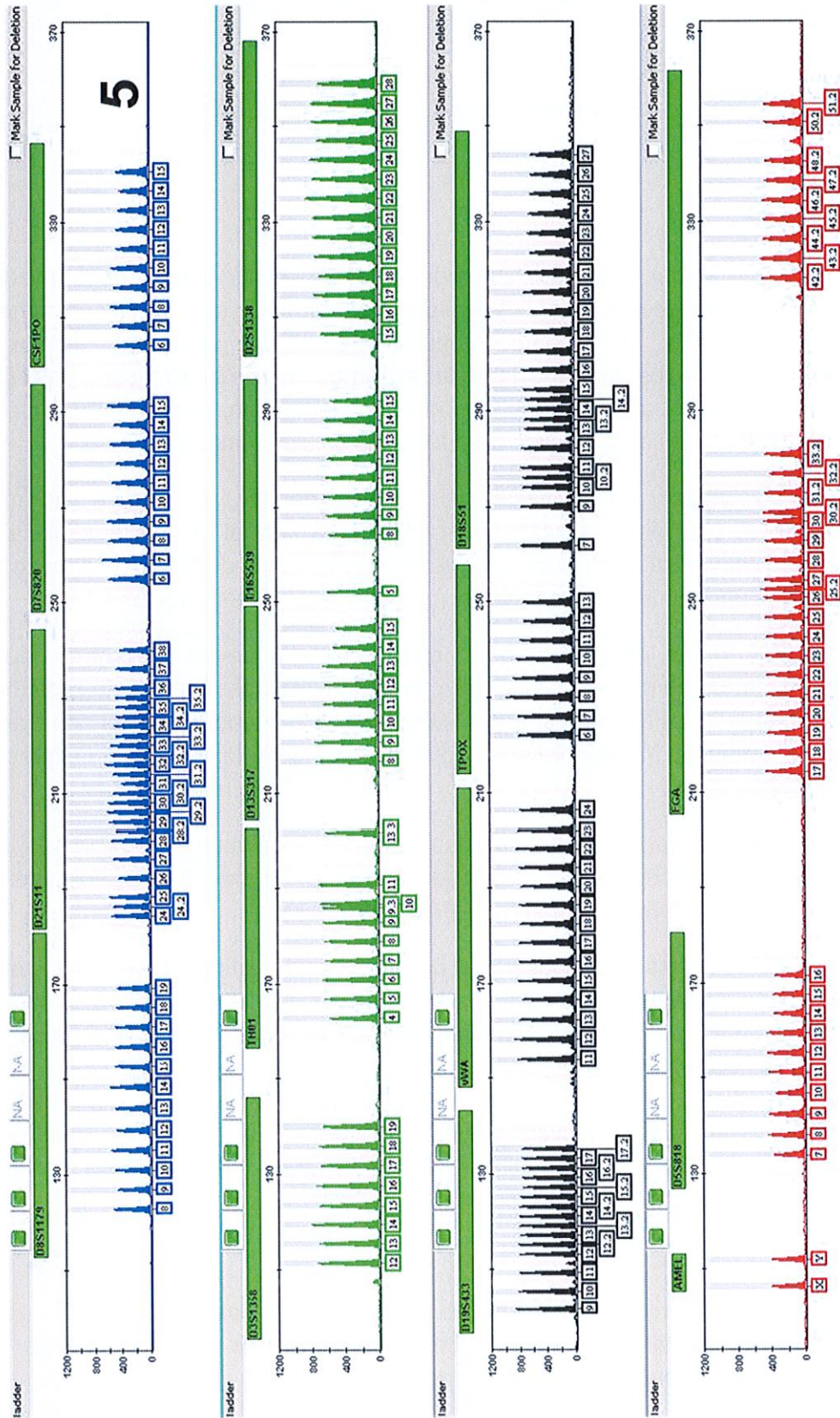
11.- La gráfica 5 muestra las emisiones de fluorescencia de una escalera alélica que se corrió a la vez que la muestra que dio lugar a la gráfica 1, pero en un capilar distinto del analizador genético. Utilice dicha escalera alélica para establecer los alelo(s) del marcador TPOX (para facilitar este trabajo se muestra también la gráfica 1 ampliada):

- a.- Alelos 13 y 14.
- b.- Alelo 8 y 9.3.
- c.- Alelos 23 y 24.
- d.- Alelo 8.



Emisiones de fluorescencia recogidas en un analizador genético.

Escalera alélica



PRUEBA SELECTIVA PARA LA PROVISIÓN DE PLAZAS DE LA ESCALA DE TÉCNICOS ESPECIALISTAS DE VARIAS ESPECIALIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA (R-1337/2018) DE 27 DE DICIEMBRE DE 2018.

EJERCICIO ÚNICO: SEGUNDA PARTE

ESPECIALIDAD: BIOLOGÍA MOLECULAR

SUPUESTO 3

Un investigador está trabajando con una línea celular tumoral denominada BM. El grupo de investigación está desarrollando un fármaco que afecta únicamente a células tumorales y que, como consecuencia de su actuación, induce a la superproducción de una proteína llamada **proteína Pro** que se almacena en el citosol. Dicha proteína alcanzada una determinada concentración, comienza a inducir a la muerte celular en las células que la producen, las células tumorales.

El investigador ha cultivado dos placas de células BM en las mismas condiciones. A una placa la ha denominado "placa control" y a la otra placa la ha denominado "placa tratada". A la placa tratada le ha añadido 1ml del fármaco y a la placa control, un 1ml del disolvente en el que está disuelto el fármaco.

Tras 6 horas de cultivo, que según ensayos previos con otros fármacos similares, sería un tiempo adecuado para encontrar elevados niveles de proteína Pro, sin que se haya inducido aún la muerte celular, el investigador retira las dos placas de células tumorales del incubador con el objetivo de detectar los niveles de expresión de Pro en ambas placas.

Tras la ruptura de las membranas celulares, y la obtención de la suspensión proteica, el investigador somete un pequeño volumen de muestra de cada una de las placas a una electroforesis de tipo SDS-PAGE.

- 1.- En estas condiciones, indica cuál de las siguientes afirmaciones sobre este tipo de electroforesis es correcta:
 - a.- La movilidad electroforética de todas las proteínas será la misma.
 - b.- Las proteínas migrarán en función de su peso molecular.
 - c.- Las proteínas cargadas positivamente migrarán hacia el ánodo y las cargadas negativamente hacia el cátodo.
 - d.- Al añadir dodecilsulfato sódico, la carga neta de cada una de las proteínas será nula.

Tras comparar los resultados de la electroforesis procedente de la placa tratada respecto a los resultados de la placa control, se observan diferencias entre ambas muestras en los patrones de bandas del gel.

Para tratar de identificar la banda correspondiente a la proteína Pro, el investigador realiza un western blotting.

2.- Respecto al western blotting, indica cuál de las siguientes opciones es la correcta:

- a.- Previamente al western blotting es necesario separar las proteínas según su punto isoeléctrico.
- b.- El gel SDS-PAGE es el más empleado para realizar el western blotting.
- c.- El gel previo al western blotting puede ser de agarosa.
- d.- No es necesario separar las proteínas en un gel como paso previo para realizar un western blotting.

3.- Respecto a los requisitos de la técnica del western blotting, indica la opción correcta:

- a.- La proteína a identificar debe de ser un anticuerpo para poder detectarla por este método.
- b.- Es muy útil en esta clase de ensayo un anticuerpo que se una a la proteína que se pretende identificar.
- c.- Se requiere la presencia de un antígeno que se una a la proteína a detectar.
- d.- Es imprescindible un fluorocromo que sea capaz de unirse directamente a la proteína a identificar.

Teniendo en cuenta todo lo que ha sucedido anteriormente con la muestra, y cumplidos los primeros requerimientos para comenzar el western blotting, el investigador inicia la fase de transferencia de proteínas a la membrana. Para ello necesita varios componentes.

4.- De entre los componentes empleados en esta fase de la técnica, indica el que es incorrecto:

- a.- Una membrana de nylon.
- b.- El tampón de transferencia.
- c.- Un sistema de placas de electrodos.
- d.- Un gel de agarosa.

5.- Tras esta primera fase de transferencia, indica la opción correcta acerca de la secuencia ordenada en que ocurren las fases del western blotting:

- a.- Bloqueo de la membrana, unión del ligando y detección.
- b.- Unión del ligando, bloqueo de la membrana y detección.
- c.- Detección, unión del ligando y bloqueo de la membrana.
- d.- Detección, bloqueo de la membrana y unión del ligando.

6.- Sobre la fase de bloqueo del western blotting, indica qué opción es incorrecta:

- a.- Se puede usar albúmina de suero bovino.
- b.- Se pueden usar detergentes no iónicos.
- c.- Se intentan evitar las uniones inespecíficas a la membrana.
- d.- El bloqueo evita la unión de los anticuerpos entre sí.

Para la fase de detección de la proteína Pro se ha empleado un anticuerpo secundario conjugado a otra sustancia.

- 7.- Del siguiente listado de sustancias que se emplean habitualmente conjugadas con anticuerpos secundarios para el revelado, indica el nombre incorrecto:
- a.- Compuestos fluorescentes.
 - b.- Radioisótopos.
 - c.- Enzimas.
 - d.- Lípidos.

Los resultados del western blotting demuestran que efectivamente, transcurridas 6 horas de cultivo en presencia del fármaco, hay mucha más cantidad de proteína Pro en la muestra tratada que en la control, donde la presencia de Pro es prácticamente nula. El investigador genera entonces más placas de cultivo en idénticas condiciones a las de la placa tratada con el fármaco, con la intención de obtener una suspensión altamente concentrada de proteína Pro.

Tras la obtención del nuevo extracto proteico, el investigador debe realizar una técnica que permita eliminar la mayor parte de las proteínas contaminantes en un único paso y obtener así una suspensión de proteína Pro más pura.

- 8.- Acerca de las técnicas indicadas para esta finalidad, señala del siguiente listado cuál es la opción correcta:
- a.- Cromatografía de afinidad empleando un ligando específico para la proteína Pro.
 - b.- Fraccionamiento subcelular.
 - c.- Cromatografía de filtración en gel.
 - d.- Electroenfoque.

Purificada la proteína, el investigador quiere conocer la concentración de Pro que ha conseguido tras la purificación. Conoce el coeficiente de extinción molar de la proteína, por lo que recurre a técnicas espectrofotométricas para el cálculo de la concentración.

- 9.- Sobre este tipo de técnicas, indica cuál de las siguientes afirmaciones es falsa:
- a.- El cálculo de la concentración de las proteínas a partir del coeficiente de extinción molar es muy útil cuando se trata de disoluciones de una proteína aislada.
 - b.- El triptófano es el aminoácido aromático que presenta un mayor coeficiente de extinción molar a 280nm.
 - c.- El cálculo de la concentración de las proteínas siguiendo la ley de Lambert-Beer se suele emplear en mezclas proteicas complejas.
 - d.- El espectro de absorción de una proteína puede variar como consecuencia de su unión a un ligando.

Se sabe además que de la proteína Pro hay dos isoformas que difieren en un único aminoácido. Las dos isoformas realizan la función esperada, pero a través de mecanismos un poco diferentes. Se sabe también que las dos isoformas no pueden

coexistir en el mismo momento en la célula; por lo que como resultado de la actuación del fármaco, se genera una isoforma u otra.

Para determinar qué isoforma es la que induce el fármaco, el investigador realiza un experimento de espectrometría de masas.

10.- Acerca de la técnica de espectrometría de masas aplicada a proteínas, indica la opción incorrecta:

- a.- No es posible obtener la secuencia completa de los péptidos de la proteína.
- b.- Si se obtiene una secuenciación parcial del péptido, existe la posibilidad de identificar la proteína en las bases de datos.
- c.- La huella peptídica es una estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.
- d.- La etiqueta de secuencia es una estrategia para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

11.- Si el espectrómetro de masas donde se va a realizar el análisis de la proteína Purificada es del ESI-MS/MS, cuál de las siguientes opciones es incorrecta:

- a.- ESI es el tipo de fuente.
- b.- La muestra debe permanecer en estado líquido para su ionización.
- c.- La proteína debe estar en forma de péptidos para su introducción en el espectrómetro de masas.
- d.- En este tipo de sistemas no se pueden incluir cuadrupolos.