

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: MICROSCOPIA

SUPUESTO 1

Una investigadora de la UMU necesita hacer un estudio de algas adheridas a material rocoso. Se dirige al Servicio de Microscopía para solicitar la utilización del microscopio electrónico de barrido. La investigadora quiere adquirir imágenes de alta resolución y realizar un estudio de microanálisis para medir calcio y sodio. Ante esta solicitud, qué actuaciones debemos hacer:

- A) Lo primero que tenemos que hacer es preparar las muestras y como hay material biológico esto lleva consigo varios pasos antes de poder observar en el microscopio.
- 1.- La fijación del material es muy importante en el procesado de las muestras. Indique la respuesta correcta relacionada con este primer paso de fijación.
- a.- Hay que fijar la muestra a temperatura ambiente para no dañar la ultraestructura.
 - b.- Se deben utilizar fijadores que contengan etanol al 70%.
 - c.- Se debe utilizar un fijador diluido en un tampón que no lleve ni calcio ni sodio.
 - d.- Se debe fijar en glutaraldehído en tampón fosfato o tampón fosfato salino.
- 2.- Una vez fijadas las muestras ¿Cuál sería el paso siguiente? indique la respuesta correcta.
- a.- Las muestras deben deshidratarse sólo en etanol al 70%.
 - b.- Las muestras deben ser desecadas en estufa a 40°C.
 - c.- Deben someterse al proceso de deshidratación y secado.
 - d.- Recubrir las muestras para hacerlas conductivas.
- 3.- Antes de introducir las muestras en un microscopio electrónico de barrido ¿Qué debe hacer? indique la respuesta correcta.
- a.- Estar bien orientadas y colocadas sobre un soporte que sea conductivo.
 - b.- Ser incluidas en resina epoxi y pulidas.
 - c.- Ser colocadas sobre filtros que soporten los electrones.
 - d.- Poner siempre en soportes de aluminio recubiertos con carbón.

- 4.- Indique otro paso imprescindible en el tratamiento de las muestras antes de introducir las en el microscopio. Indique la respuesta correcta.
- a.- Colocarlas sobre un portaobjetos especial.
 - b.- Deben ser cortadas y pulidas.
 - c.- No debe realizar ningún tratamiento.
 - d.- Deben recubrirse con material conductor.
- 5.- Indicar la afirmación correcta. Las muestras pueden ser observadas en un microscopio con filamento de tungsteno o con un microscopio de emisión de campo.
- a.- Con los dos tipos de microscopio se trabaja igual.
 - b.- Con el microscopio de emisión de campo tenemos que trabajar siempre a bajo kilovoltaje.
 - c.- Con el microscopio de filamento de tungsteno se pueden hacer mejores imágenes que con el de emisión de campo porque nos permite trabajar a 20kV.
 - d.- El microscopio de emisión de campo permite obtener imágenes a alta resolución porque tiene un haz de electrones más fino y más electrones por campo.

B) Una vez que hemos visto las muestras y hemos adquirido imágenes necesitamos hacer un microanálisis de nuestro material.

- 6.- En referencia a la realización del estudio de microanálisis. Indica la afirmación correcta:
- a.- El material una vez fijado se puede introducir en el microscopio y se hace el microanálisis.
 - b.- Las muestras no pueden ser deshidratadas porque pierden la forma.
 - c.- Las muestras deben de tratarse del mismo modo que para obtener imágenes.
 - d.- El material debe recubrirse con carbón para ver todos los elementos que hay sin solapamiento.
- 7.- ¿Qué condiciones debe tener el microscopio para hacer el estudio de microanálisis? señale la respuesta incorrecta:
- a.- El microscopio tiene que tener las mismas condiciones de altura y kilovoltaje que para la adquisición de imágenes.
 - b.- El microscopio debe tener el kilovoltaje adecuado para obtener los elementos que buscamos.
 - c.- La pletina se debe fijar a la altura donde el detector obtenga su mejor rendimiento.
 - d.- Para obtener un buen análisis hay que tener en cuenta el tiempo muerto.

- 8.- El investigador quiere hacer microanálisis para ver sodio y calcio para ello ¿Qué debemos hacer? señale la respuesta correcta
- Trabajar con una diferencia de potencial 25 kV.
 - Ver que aparece el pico de sodio a 4 keV y el pico de calcio 1.5 keV (kiloelectron voltio) en el espectro de emisión.
 - Debemos poner la muestra altura adecuada y trabajar a una diferencia de potencial de 10 kV para ver el sodio y el calcio.
 - El sodio y el calcio son elementos ligeros y aparecen en la zona derecha del espectro.
- 9.- ¿Se puede realizar el estudio de microanálisis tanto con el microscopio de barrido de tungsteno (SEM) como en el de emisión de campo (FESEM)? Señale la respuesta incorrecta.
- El microscopio SEM tiene la posibilidad de poner el kilovoltaje y la distancia de trabajo necesaria para realizar estudios de microanálisis.
 - El detector de rayos X puede instalarse en ambos tipos de microscopios SEM y FESEM.
 - El microscopio FESEM tiene un haz muy fino y esto es un problema para la emisión de rayos X.
 - El microanálisis es una técnica que permite hacer el estudio de composición química elemental de distintas zonas de una muestra.
- 10.- El investigador quiere hacer imágenes de alta resolución y para ello es necesario tener en cuenta varias cuestiones. Indique la afirmación incorrecta.
- Que el material tenga bien conservada su ultraestructura, para ello tiene que estar bien orientado y recubierto con material conductor.
 - Como paso previo, el material ha tenido que ser fijado, deshidratado, secado y recubierto con material conductor como el oro.
 - El microscopio debe tener el filamento bien saturado para tener la máxima emisión.
 - Es fundamental que el kilovoltaje y la distancia de trabajo sean los adecuados.
- 11.- También necesita obtener imágenes a bajos aumentos para ver panorámicas ¿Qué ajustes debemos realizar en el microscopio? marque la respuesta incorrecta:
- El microscopio debe tener el filamento bien saturado para tener la máxima emisión.
 - Tenemos que poner una altura mínima entre el detector y la muestra para poder subir el kilovoltaje.
 - Debemos subir aumentos para enfocar bien y después bajar hasta los aumentos deseados.
 - Para trabajar a bajos aumentos la corrección de astigmatismo no es tan crítica.

SUPUESTO 2

Dos investigadores de la Universidad de Murcia traen al Servicio de Microscopía muestras para analizarlas con microscopía electrónica de barrido y transmisión. El objetivo es realizar estudios morfológicos básicos e inmunocitoquímica para microscopía electrónica de transmisión y también realizar estudios con microscopía electrónica de barrido. El material recibido es una suspensión celular y fragmentos de material vegetal y muestras de riñón de rata. A lo largo de todo el supuesto se plantean las distintas peticiones que nos solicitan y se pregunta cómo proceder en cada caso.

- A) Para procesar las muestras debemos realizar varias actuaciones, el procesamiento adecuado de la muestras objeto de estudio ya que tenemos muestras de 3 tipos: suspensión celular, material vegetal y muestras de riñón de rata.
- 1.- Si cuando recibimos el material viene sin fijar el primer paso a seguir es, indique la respuesta incorrecta.
 - a.- Fijar las muestras con glutaraldehído al 25% a 4°C durante 4-5 horas.
 - b.- Comprobar que la suspensión celular está en forma de pellet antes de fijarla.
 - c.- Determinar si el tamaño de los fragmentos de las muestras de vegetal y riñón son adecuados para la fijación.
 - d.- Preguntar a los investigadores con qué técnicas quieren analizar las distintas muestras.

 - 2.- En el caso de que las muestras de ambos investigadores estén ya fijadas, que debemos hacer, señalar la afirmación correcta.
 - a.- Ponerlas en tampón cacodilato sódico + sacarosa a 20°C.
 - b.- Preguntar a los investigadores para saber si la fijación ha sido correcta para cada tipo de muestra y técnica requerida.
 - c.- Post-fijar con tetróxido de osmio si son para estudios de inmunocitoquímica.
 - d.- Poner acetato de uranilo a todas las muestras.

- 3.- Indicar la afirmación correcta. Si algunas de las muestras recibidas han sido fijadas adecuadamente, ¿qué debemos tener en cuenta?:
- a.- El soporte en el que recibimos las muestras.
 - b.- El poder de penetración del fijador utilizado y la presión osmótica.
 - c.- La cantidad de fijador utilizado y la molaridad de iones de calcio.
 - d.- Si las muestras se van a analizar en el microscopio electrónico de transmisión o de barrido.
- 4.- El investigador que trae la suspensión celular quiere analizarla por tinción negativa ¿Qué tiene que hacer? Señale la respuesta correcta:
- a.- Fijar la suspensión con glutaraldehído al 10% y hacer un pellet.
 - b.- Se requiere coher una gota de la suspensión, ponerla en una rejilla y teñir con acetato de uranilo 2 %.
 - c.- Fijar con glutaraldehído en tampón PBS para eliminar la suciedad de la suspensión.
 - d.- Lavar con tampón cacodilato sódico y volver a centrifugar.
- 5.- El investigador que ha traído la muestra de riñón necesita realizar secciones ultrafinas para hacer posteriormente inmunomarcaje. ¿Qué procedimiento es el más adecuado para proceder? indica la respuesta correcta:
- a.- Se realizará el proceso habitual para microscopia electrónica de transmisión y se incluirá en resina Spurr.
 - b.- Se procederá a fijar, deshidratar a 60°C e incluir en resina epoxi.
 - c.- Comenzaremos el proceso teniendo en cuenta el tipo de la fijación, y realizaremos la inclusión con resinas acrílicas como LR-White o Lowicryl.
 - d.- Se comenzará la fijación, lavado, deshidratación e inclusión en resina JB-4.
- 6.- En la muestra de riñón donde se quiere hacer inmunomarcaje sobre rejillas también se quiere hacer una técnica inmuno-preembedding para analizarlo por microscopía electrónica de transmisión, indique la respuesta incorrecta.
- a.- Procesar la muestra con una resina tipo LR-White y realizar la técnica inmunocitoquímica sobre las secciones ultrafinas.
 - b.- Fijar el material de forma adecuada para el anticuerpo que se va a utilizar.
 - c.- El inmunomarcaje se realiza antes de la deshidratación e inclusión en la resina.
 - d.- Este tipo de inmunomarcaje es apto para estudios de membranas.

- 7.- La muestra de tejido vegetal la recibimos en PBS y el objetivo es la obtención de secciones ultrafinas para el estudio de su morfología. ¿Cuál sería la actuación a seguir? señala la opción incorrecta:
- a.- Realizaremos la fijación en glutaraldehído y en vacío.
 - b.- Empezaremos la fijación en McDowell a 4°C durante 1-2 horas.
 - c.- La impregnación e inclusión se realizara en resina Spurr o LR-White.
 - d.- Aumentaremos los tiempos tanto de deshidratación como de impregnación.
- 8.- Indique la afirmación incorrecta. El proceso de deshidratación para la inclusión de las muestras vegetales es un proceso que:
- a.- Se hace siempre para sustituir el agua de los tejidos por alcohol.
 - b.- Es necesario aumentar el tiempo, ya que las células vegetales tienen una pared que dificulta la salida y entrada del agente deshidratante.
 - c.- Es un paso muy importante para continuar con el paso siguiente de impregnación.
 - d.- Este proceso logra disminuir los efectos nocivos de la tensión superficial y evitar la retracción del material.
- 9.- Las muestras de suspensión celular recibidas quieren ser estudiadas en microscopía electrónica de barrido ¿Qué protocolo hay que seguir? Señale la respuesta incorrecta:
- a.- Es necesario crecer las células previamente sobre un soporte o filtro.
 - b.- Requieren un proceso previo de sedimentación para retirar el medio de crecimiento y reemplazarlo por glutaraldehído al 2% en tampón fosfato.
 - c.- Se centrifuga entre 100-250g durante 3-10 minutos y se fijan con glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato sódico durante 30 minutos.
 - d.- Este estudio posibilita la observación de estructuras superficiales.
- 10.- Si alguna de las muestras recibidas tuviesen que ser criofijadas para realizar posteriormente técnicas de inmunomarcaje, ¿Cuál de las siguientes sentencias es correcta?
- a.- Es necesario prefijar con formaldehído ya que la criofijación no puede sustituir a la fijación química.
 - b.- La vitrificación va a transformar el agua en su estado amorfo.
 - c.- No infiltraremos en sacarosa hasta que se haya criofijado por completo.
 - d.- En la vitrificación hay que controlar la tasa de refrigeración y la crioprotección pero nunca la presión.

- 11.- Respecto a las muestras objeto de estudio con el microscopio electrónico señale la opción incorrecta.
- a.- Una vez terminado el procesamiento de la muestra se realiza un corte semifino.
 - b.- Con el corte semifino elegimos la zona de interés y se procede a realizar las secciones ultrafinas.
 - c.- La secciones ultrafinas se realizan con cuchillas especiales de carburo de tungsteno.
 - d.- Las secciones ultrafinas son contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo

SUPUESTO 3

Cómo técnico del Servicio de Microscopía le han encargado el procesamiento de muestras de ovocitos de cobaya. La investigadora le indica que es una muestra muy valiosa por su tratamiento experimental y le solicita la preparación de las muestras, adecuada a los procedimientos óptimos para poder realizar los siguientes estudios:

3.A.- Primera parte

- Detección de inmunomarcaje de la zona pelúcida (ZP), (dispone en el laboratorio de suero normal de cabra, anticuerpos contra ZP producidos en conejo (anti_ZP) y un vial de anti-IgG-conejo producidas en cabra, marcados con fluoresceína, cabra anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa, diaminobencidina (DAB), tampón PBS, H₂O₂, formaldehído y glutaraldehído)
- Posibilidad de obtener imágenes de los cambios de la inmunorreactividad en la ZP en el ovocito a lo largo de todo su volumen, desde el polo cortical al ecuatorial.
- Obtención de una imagen del núcleo marcada con Hoechst 33342.

3B.- Segunda parte

- También desea realizar un estudio ultraestructural convencional de los gránulos corticales presentes en el citoplasma del ovocito.
- Obtener imágenes de calidad, de la superficie del ovocito y matriz de la zona pelúcida para estudiar su textura.

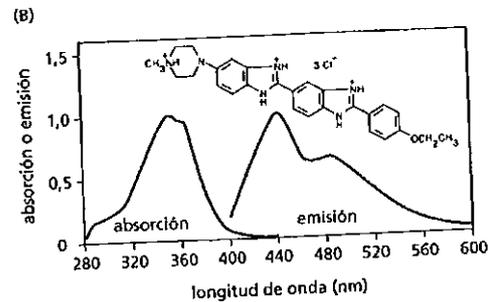
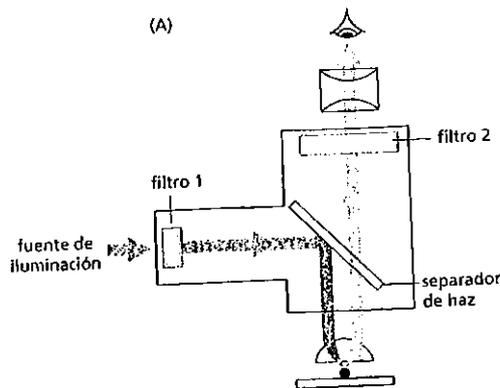
3.A.- Primera parte

- 1.- ¿Cómo debe procesar parte de los ovocitos para poder realizar los dos estudios indicados en la primera parte (detección del inmunomarcaje con fluoresceína y ver los cambios de la ZP en todo su volumen)? Indique la respuesta correcta.
 - a.- Fijación en 2% de Glutaraldehído en PBS, inclusión en parafina, corte e inmunotinción (antiZP), anti-IgG revelado con diaminobencidina y observación en microscopio de luz.
 - b.- Fijación en 2% de Glutaraldehído en PBS, PBS, suero normal de cabra, anti-ZP, anti-IgG conjugado con fluoresceína y observación en el microscopio confocal.
 - c.- Fijación en 10% de formaldehído en PBS, anti-IgG conjugado con fluoresceína y observación en microscopio confocal.
 - d.- Fijación en 7% de formaldehído en PBS, inclusión en parafina, cortes de 3 micrómetros, anti-IgG conjugado con fluoresceína, observación en microscopio de fluorescencia convencional.

2.- Para poder realizar la técnica inmunocitoquímica marcando la ZP indique qué combinación de capas de anticuerpos es correcta para poder visualizarse en un microscopio de campo claro. Se indica la secuencia ordenada de pasos del protocolo.

- a.- Bloqueo de la peroxidasa endógena, ratón anti ZP, cabra anti-IgG conejo conjugado con peroxidasa, revelado con DAB, H₂O₂.
- b.- Conejo anti ZP, suero normal de cabra, ratón anti IgG de cobaya conjugada con fluoresceína, revelado con DAB, H₂O₂.
- c.- Bloqueo de la peroxidasa endógena, suero normal de cabra, conejo anti ZP, cabra anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa, revelado con DAB, H₂O₂.
- d.- Bloqueo de la peroxidasa endógena, conejo anti ZP, ratón anti-IgG cobaya conjugada con peroxidasa, revelado con DAB, H₂O₂.

3.- Un microscopio de fluorescencia como el que se muestra esquemáticamente en la figura (A), utiliza dos filtros y un espejo separador de haces (dicroico) para excitar la muestra y capturar la luz fluorescente emitida. Si quisiera observar la fluorescencia de una muestra que ha sido teñida con Hoechst 33342, un colorante de DNA muy utilizado. El espectro de absorción y emisión del Hoechst 33342 se muestra en la figura (B).



¿Cuál de los siguientes filtros comerciales seleccionaría para colocar entre la muestra y el ocular en el microscopio?

- a.- Un filtro que dejara pasar las longitudes de onda entre 300 y 380 nm.
- b.- Un filtro que dejara pasar todas las longitudes de onda por encima de 420 nm.
- c.- Un filtro que dejara pasar las longitudes de onda entre 450 y 490 nm.
- d.- Un filtro que dejara pasar todas las longitudes de onda por encima de 515 nm.

3B.- Segunda parte

- 4.- Para el estudio ultraestructural convencional ¿Cuál de los siguientes protocolos de preparación de muestra realizaría para obtener una buena fijación, un alto contraste de la muestra y un medio de inclusión adecuado al estudio convencional?
- a.- Fijación en 20% de Glutaraldehido en tampón cacodilato, inclusión en epon.
 - b.- Fijación en 2.5% de Glutaraldehido en tampón cacodilato, 1% OsO₄, inclusión en epon.
 - c.- Fijación en 0.5% de Glutaraldehido en tampón cacodilato, 10 % OsO₄, inclusión en Technovit.
 - d.- Fijación en 2% de Glutaraldehido en PBS, inclusión en epon.
- 5.- Una vez incluida la muestra en el bloque, debe realizar cortes ultrafinos para poder visualizarlos en el microscopio electrónico de transmisión (MET). Señale la respuesta incorrecta sobre el grosor de las secciones ultrafinas.
- a.- El grosor de los cortes se determina según el color de interferencia luminosa que se observa del corte en la balsa de agua, en el cual un color equivale a un cierto espesor del corte.
 - b.- Los cortes más adecuados son los de color gris o plateados.
 - c.- Los cortes óptimos para ser observados al MET deben tener un grosor aproximado de 600 nm.
 - d.- Los cortes más delgados reflejarán la mayor cantidad de luz incidente y serán, en consecuencia, de colores claros, mientras que los cortes más gruesos absorberán una mayor proporción de luz incidente resultando cortes de colores oscuros.
- 6.- Indique la respuesta incorrecta. Durante la obtención de los cortes ultrafinos observamos que cuando pasa el bloque por el filo de la cuchilla se superpone el nuevo corte a los que estaban flotando. ¿A qué se debe esta cuestión?
- a.- El bloque está demasiado blando.
 - b.- El filo tiene rugosidades que no permiten despegar los cortes de él.
 - c.- Los lados del trapecio no están paralelos entre sí.
 - d.- El nivel del líquido es demasiado alto.
- 7.- Los cortes ultrafinos se recogen con rejillas de diferente material y el tamaño del enrejado (mesh). Indique la respuesta correcta relacionada con la utilidad de estas rejillas.
- a.- Un mesh alto indica un tamaño de hueco de la rejilla grande.
 - b.- Las rejillas de níquel se usan para técnicas que supongan un tiempo elevado de incubación en medios acuosos.
 - c.- Las rejillas de cobre son las menos usadas.
 - d.- Cuanto menor tamaño de agujero menor estabilidad de los cortes en estos soportes.

- 8.- Para Obtener imágenes de calidad, de la superficie del ovocito y matriz de la zona pelúcida para estudiar su textura. ¿Cuál de las siguientes técnicas es la óptima para obtener la información solicitada?
- a.- Microscopía laser de barrido confocal.
 - b.- Microscopía electrónica de transmisión.
 - c.- Microscopía electrónica de barrido.
 - d.- Microscopía óptica con contraste interferencial de Nomarski.
- 9.- En procedimientos de preparación de muestras, uno de los métodos de desecación total de la muestra es el punto crítico. Indique en qué consiste. Señale la respuesta correcta.
- a.- Favorecer el secado lo más rápido posible para que la estructura superficial de la muestra no se distorsione.
 - b.- Lograr que los componentes de la muestra que están en fase líquida pasen a fase gaseosa sin sufrir una evaporación directa, es decir, sin atravesar la línea de cambio de fase.
 - c.- Favorecer el secado lo más rápido posible para evitar contracciones de la muestra.
 - d.- Eliminar el agua de las muestras biológicas.
- 10.- Señale la respuesta incorrecta, relacionado con el proceso de "Sputtering":
- a.- El estado excitado de las moléculas de gas entre el cátodo y el ánodo se conoce como plasma.
 - b.- El plasma se caracteriza por una luminiscencia color púrpura cuando se usa gas Argón (Ar).
 - c.- La luminiscencia es producida por la generación de iones negativos y electrones libres durante las colisiones entre las moléculas de gas y los electrones que se mueven dentro de la cámara.
 - d.- Los iones de Argón impactan en la tarjeta del metal (oro, platino, oro/paladio, etc.) y se desprenden átomos de la tarjeta del metal que son atraídos hacia la muestra en la cual quedan depositados.
- 11.- Señale la respuesta incorrecta. Al observar una rejilla al microscopio electrónico de transmisión, aparecen secciones con bandas paralelas de distintos grises ¿A qué se debe este problema en la utramicrotomía?
- a.- Se producen vibraciones entre el bloque y la cuchilla.
 - b.- El filo de la cuchilla tiene estrías.
 - c.- Puede deberse a que el frente del bloque sea demasiado grande.
 - d.- Se debe a falta de ajuste de tornillos de los soportes en el ultramicrotomo.