

SEGUNDO EJERCICIO

PROCESO SELECTIVO CONVOCADO POR LA RESOLUCIÓN UCA/REC178GER/2019, DE 2 DE DICIEMBRE DE 2019, DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ POR LA QUE SE CONVOCA PROCESO SELECTIVO PARA CUBRIR UNA PLAZA DE PERSONAL LABORAL FIJO DE ADMINISTRACIÓN Y SERVICIOS DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ.

SUPUESTO PRÁCTICO 1 (4,0 puntos)

Microscopía óptica de fluorescencia y confocal.

Un doctorando, en su primer año, te entrega unas preparaciones con varios procedimientos, para que obtengas fotografías de ellas y saber cuál escoger.

Preparación 1 (tejido nervioso, 20 μ m): anti c-fos marcado con Alexa 488; Subunidad B de la toxina colérica con Diaminobencidina; DAPI.

Preparación 2 (tejido nervioso, 20 μ m): anti c-fos marcado con FITC; Subunidad B de la toxina colérica con Alexa 514; DAPI.

Preparación 3 (tejido nervioso, 20 μ m): anti c-fos amplificado con Avidina Biotina/peroxidasa (cromógeno VIP); Subunidad B de la toxina colérica con Alexa 514; DAPI.

Preparación 4 (tejido nervioso, 20 μ m): anti c-fos amplificado con Avidina Biotina/peroxidasa (cromógeno VIP); Subunidad B de la toxina colérica con Alexa 633; DAPI.

Conteste razonadamente a las siguientes cuestiones:

- a.- ¿Qué tipo de microscopio emplearías en cada preparación? ¿Por qué?. (1,0 punto)
- b.- Indica los problemas que esperas encontrarte en cada una de las preparaciones. (1,0 punto)
- c.- Frente a los posibles problemas para la observación y la captura de imágenes que puedan presentar cada muestra ¿Qué solución/es le ofrecerías al doctorando?. (1,0 punto)
- d.- ¿Qué configuración ajustarías en el microscopio? Indique los modos de excitación y captura de imagen que utilizaría justificando sus respuestas. (Ver información adicional) (1,0 punto)

INFORMACIÓN ADICIONAL:

Recuerda: c-fos es un factor de transcripción que actúa como marcador de actividad neuronal y la Subunidad B de la toxina colérica es un marcador retrógrado neuronal.

Microscopio de epifluorescencia: Lámpara de mercurio de amplio espectro. Lámpara halógena. Cubo dicroico 1: 425-445 (absorción); 460-510 (emisión); Cubo dicroico 2: 340-390 (absorción); 420 (emisión); Cubo dicroico 3: 510-550 (absorción); 590 (emisión). Óptica objetivos Plan Apo Fluo 20X, 40X, 63X y 100X (aceite). Contraste de fase.

Microscopio confocal: Láser HeNe 633 nm, láser HeNe 543nm, láser HeNe 488 nm y láser Ar 351nm, 364. Óptica objetivos Plan Apo Fluo 20X, 40X (aceite), 63X (aceite) y 100X (aceite). Modos de captura imagen simple, en bloque (z-stack); secuencial; promediado (average), FRAP, FRET. Unidad de fluorescencia: Lámpara de mercurio de amplio espectro. Lámpara halógena. Cubo dicroico 1: 415-440 (absorción); 450 (emisión); Cubo dicroico 2: 510-550 (absorción); 560 (emisión). Contraste de fase.

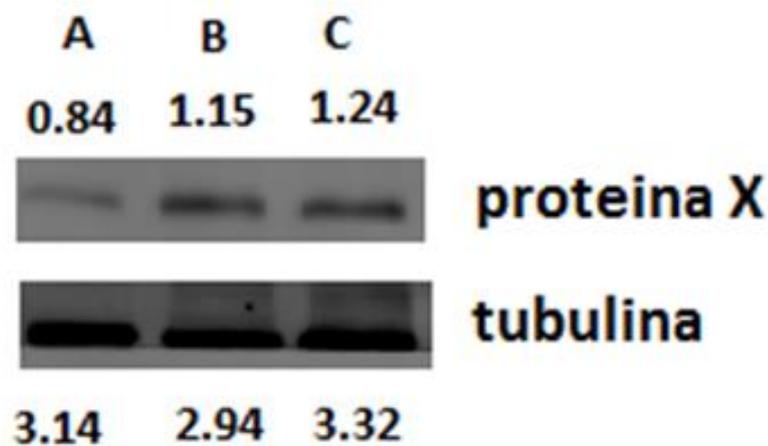
SUPUESTO PRÁCTICO 2 (2,0 puntos)

Captura de imágenes y cuantificación de señal.

- ¿Es posible una cuantificación relativa de una proteína en dos extractos proteicos distintos utilizando exclusivamente un anticuerpo primario contra la proteína de interés? Justifique su respuesta. (0,5 puntos)

- ¿Tiene importancia la saturación de la señal en una imagen en la cuantificación mediante western-blot? Explíquelo razonadamente. (0,5 puntos)

- Al llevar a cabo un western blot para analizar las diferencias de expresión de la proteína X en tres muestras distintas, se obtuvo la siguiente imagen, en la que se pueden observar las bandas de la proteína X en las tres muestras y también las bandas correspondientes a la tubulina que se usó como control de carga. Teniendo en cuenta las intensidades registradas con el programa ImageJ que se indican en la figura, ¿en cuál de las tres muestras (A, B o C) habría mayor expresión de la proteína X?. (1,0 punto)



SUPUESTO PRÁCTICO 3 (4,0 puntos)

Análisis de la expresión génica y RT-qPCR

Se ha evaluado mediante RT-qPCR la expresión de dos genes de interés en 3 individuos a los que se les ha suministrado una dieta. Se han tomado muestras a las 9:00, 15:00, 21:00 y 03:00. Las muestras se han valorado por triplicado y se han llevado como control **NTC** (Non Template Control) y **IRC** (Inter-Run Calibrator). Se ha hecho una carrera de PCR para cada hora de muestreo, incluyendo la valoración de dos genes de referencia. Los valores de Cq obtenidos están incluidos en la hoja Excel que se adjunta en el archivo de la memoria USB:

Indique en la misma hoja Excel, con los cálculos correspondientes indicados en las celdas, los siguientes datos:

- 1- Calcule los valores promedios de las réplicas para cada una de las muestras analizadas en cada hora. *(0,8 puntos)*
- 2- Corrija los valores de Cq obtenidos, si considera que es necesario, indicando cual es la corrección. Explique a qué se debe la corrección utilizada. *(0,8 puntos)*
- 3- Calcule los valores de Delta-Cq para cada gen de interés, indicando cómo lo ha calculado. *(0,8 puntos)*
- 4- Calcule los valores de la desviación estándar y del error estándar. *(0,8 puntos)*
- 5- Represente con el diagrama que considere más adecuado los valores de expresión de cada gen a lo largo del tiempo, incluyendo las barras de errores para cada valor. *(0,8 puntos)*