



SUPUESTO PRÁCTICO 1

Se desea realizar un estudio de toxicidad del bisfenol A (BPA, $PM = 228.29$ g/mol, solubilidad en agua 120 mg/L a 25 °C y muy soluble en ácido acético, benceno y etanol) en el que se quiere analizar la supervivencia a 96h y estudiar los cambios en dos actividades enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo, la glutatión-S-transferasa (GST) y la catalasa. También se quiere hacer un Western Blot para detectar la Hsp70. El organismo que se va a utilizar es el *Chironomus riparius*, un insecto con larva acuática con varios test de toxicidad reconocidos por la Organización de Cooperación y Desarrollo (OCDE) y la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (USEPA).

PREGUNTAS

1º Cuestión 1:

Las concentraciones que se van a utilizar en el estudio de supervivencia van de 10 mg/L a 10 ng/L, con cambios en un orden de magnitud entre ellas. Explique cómo haría el experimento para evaluar la supervivencia.

El estudio de supervivencia permite obtener la curva-dosis respuesta. 10 mg/L corresponden a 10^6 ng/L por lo que es necesario preparar seis recipientes distintos para las seis concentraciones a utilizar (10 ng/L, 100 ng/L, 10^3 ng/L, 10^4 ng/L, 10^5 ng/L y 10^6 ng/L). El BPA es poco soluble en agua y se requiere un volumen pequeño para la exposición. Se prepara una solución stock en un solvente (etanol ya que el ácido acético modifica el pH y el benceno es muy tóxico). Por tanto, es necesario añadir también un control y un control con solvente como referencias.

La solución en cada caso se prepara a partir de la solución stock. Para añadir la misma cantidad de solvente en todos los casos, la solución stock se diluye de forma seriada. La stock se prepara a 10 mg/mL y se hace una dilución 1:1000, manteniendo el nivel de etanol en el 0.1%. En el control con solvente se añade la misma cantidad de etanol.

Se preparan recipientes para tres réplicas de cada tratamiento y se añade el medio en cada uno de ellos. Se transfiere el mismo número de individuos en cada recipiente y se añade la solución. La duración de la exposición varía en función del estudio pero el rango oscila entre 24h y 96h.

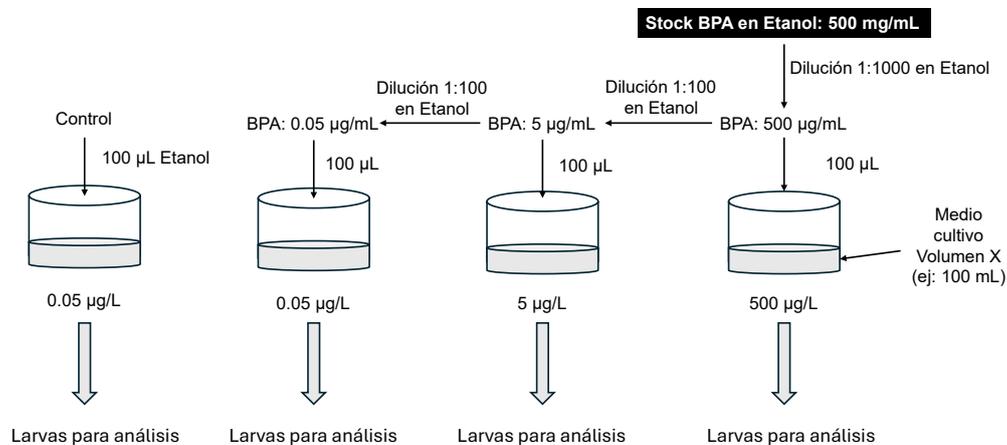
2º Cuestión 2:

Explique cómo obtendría la LC50 a 24h del BPA.

Aprovechando el experimento de la primera cuestión, se cuentan los individuos muertos a las 24 en cada recipiente y se realiza una curva dosis-respuesta. Esto se puede hacer gráficamente incluyendo el porcentaje de fallecidos (o supervivientes) en el eje de ordenadas y el logaritmo de la concentración en el eje de abscisas. Interpolando el valor del 50% de supervivientes (o fallecidos) se obtiene el logaritmo de la concentración. Haciendo el antilogaritmo se obtiene el valor de la concentración. También se puede obtener utilizando los datos en programas informáticos.

3º Cuestión 3:

Realice un esquema gráfico del diseño experimental de la exposición para obtener las muestras a analizar en los ensayos enzimáticos. Se quiere realizar un experimento en el que se analicen tres concentraciones diferentes con dos órdenes de magnitud de diferencia entre ellas, siendo la máxima 500 µg/L.



4º Cuestión 4:

Debe partir de una solución stock de BPA 100 mM. Razone qué solvente usaría.

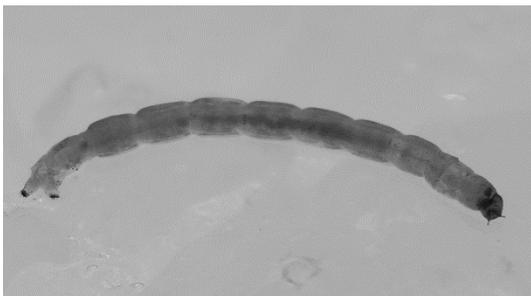
De los tres indicados, el ácido acético modificaría el pH por lo que no conviene usarlo. El benceno es un compuesto orgánico pero es tóxico y apolar. El más adecuado es el etanol ya que se mezcla bien con el agua y si se añade en bajas concentraciones, tiene toxicidad limitada.

5º Cuestión 5:

Plantee como prepararía las soluciones del experimento para que el volumen de solvente sea idéntico en todos los tratamientos y sabiendo que el volumen final del medio de cultivo es de 50mL.

Una solución 100 mM de BPA corresponde a una concentración de 22.82 mg/mL. Se diluye para tener 1 mL de una concentración 5 mg/mL tomando 219 μ L y añadiendo 781 μ L de etanol. Esta solución se diluye 1:100 para obtener una 0.05 mg/mL y esta, a su vez, se diluye 1:100 para obtener una solución 0.0005 mg/mL. Se añaden 5 μ L de la solución 5 mg/mL al medio para obtener la concentración de 500 μ g/L (dilución 1:10000). Se hace lo mismo con las otras dos soluciones y las dos concentraciones correspondientes. Al control con solvente se le añaden 5 μ L de etanol.

6º Cuestión 6:



Se utilizan larvas de cuarto estadio de *Chironomus riparius*, que tienen un tamaño de aproximadamente 0.8 cm (ver imagen). Para extraer las proteínas debe preparar un tampón de extracción cuya composición es:

10 mM HEPES pH 7.9, 400 mM NaCl, 0.1 mM EGTA pH 8.0, 0.5 mM DTT (añadir fresco) y 5% glicerol. Además, en el momento de uso se

añade PMSF para una concentración final 0.5 mM. Si las concentraciones de las soluciones stock son las que se indican en la tabla, explique cómo prepararía 200 mL de esta solución.

	[Stock]		[Stock]
HEPES pH 7.9	100 mM	DTT (fresco)	100 mM
NaCl	4 M	Glicerol	
EGTA pH 8.0	10 mM	PMSF (añadir en el momento)	50 mM

En un vaso de precipitado con imán y agitación se añaden 100 mL de agua destilada. A continuación se añaden 20 mL de HEPES pH 7.9, 20 mL de NaCl, 2 mL de EGTA pH 8.0, 1 mL de DTT, 10 mL de glicerol y 2 mL de PMSF. Una vez mezclado todo, se usaría un matraz aforado para enrasar a 200 mL (55 mL de agua destilada).



7º Cuestión 7:

Este tampón se utiliza para obtener un extracto proteico. ¿Cómo realizaría la extracción para conservar la actividad de las enzimas en el proceso?

La extracción se puede hacer de varias formas. La más sencilla es homogeneizando la muestra y utilizando el método de congelar 5 minutos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y dejar descongelar. Una vez realizado este proceso de congelación-descongelación tres veces, se centrifuga la muestra en frío para precipitar los restos celulares. La centrifugación se realiza durante 10-30 minutos. Se toma el sobrenadante y se guarda congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

8º Cuestión 8:

Para evaluar la actividad enzimática requiere conocer la concentración de proteínas y se va a hacer por medio del método de Bradford. Se requiere hacer una curva estándar, ¿cómo la realizaría?

Una curva estándar se realiza utilizando un patrón conocido (en el caso de proteínas, el más frecuente es seroalbúmina bovina) del que se hacen varias diluciones con concentración conocida. Una vez realizadas las diluciones, se añade el agente que permitirá detectar las proteínas. Las concentraciones de proteína patrón oscila entre 2000 mg/mL y 125 mg/mL.

9º Cuestión 9:

El ensayo de la GST se realiza con 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (CDNB) pero se desconoce su absorptividad molar (coeficiente de extinción molar). ¿Cómo podría obtenerse de forma experimental?

Para obtener el coeficiente de extinción molar (ϵ) se puede medir en el espectrofotómetro a la longitud de onda adecuada y utilizar la ley Beer-Lambert, según la cual la absorbancia de una muestra a una determinada longitud de onda es proporcional a la concentración de la sustancia absorbente y a la longitud de camino que la luz recorre en la muestra. Sabiendo el paso óptico de la cubeta que se use, la concentración que se pone de CDNB y la absorbancia es posible obtener ϵ .



10º Cuestión 10:

Se quiere realizar el análisis de la GST en una placa de 96 pocillos y medir en un lector de placas. La absorbancia se mide a 340 nm cada minuto durante un total de 6 minutos. ¿Cómo obtendría la actividad específica de la enzima si la unidad final es $\mu\text{mol/ml/min}$?

El ensayo supone medir la absorbancia inicial y la final. El valor de μmol se refiere al producto que se mide a 340 nm por lo que la diferencia de absorbancia entre el valor inicial y el final proporciona la concentración (utilizando la ley de Beer-Lambert). El valor de mL se refiere a la cantidad de muestra utilizada por lo que sabiendo el volumen se puede conocer el total por mL. Por último, el tiempo viene definido por los 6 minutos por lo que el valor obtenido debe ser dividido entre 6 para conocer la actividad por minuto.

11º Cuestión 11:

En el análisis de la catalasa se debe medir a 240 nm. En este caso, ¿será mejor utilizar una cubeta de plástico o de una de cuarzo? Razone su respuesta.

Sería mejor utilizar una cubeta de cuarzo ya que no absorbe a 240 nm mientras que el plástico tiene aditivos que pueden absorber a esa longitud de onda y dificultar la medición.

12º Cuestión 12:

En el ensayo de la catalasa se va a utilizar peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , $\text{PM}=34.01 \text{ g/mol}$) como sustrato. La concentración final a utilizar es de 5 mM y se parte de una solución de al 30% w/v de H_2O_2 . Calcule la cantidad de H_2O_2 que hay que añadir para un volumen final de 100 mL de solución.

Una solución al 30% w/v de H_2O_2 corresponde a una solución 8.82 M ya que:

$$(\%(\text{w/v}) * 10)/\text{PM} = (30*10)/34.01=8.82 \text{ M}$$

Donde el % se obtiene del bote de reactivo que se usa (30% en este caso). Se multiplica por 10 porque serían 30 g por 100 mL, con lo que para un litro serían 300 g/L. Se divide por el peso molecular y se obtiene la concentración en mol/L (M).

Para obtener una concentración de 5 mM en 100 mL sería: $(5 \text{ mM} * 100 \text{ mL})/8820 \text{ mM} = 0.056 \text{ mL}$ (56 μL).

13º Cuestión 13:

Para realizar el Western Blot deben hacerse los geles en los que correr las proteínas. Calcule la concentración final en los geles de acrilamida que se utilizarán, partiendo de los datos que se muestran en la tabla de las soluciones de partida y las cantidades empleadas en la preparación del gel.

	Solución de partida	Cantidad empleada	Concentración final
Agua		5.6 mL	-
Tris pH 8.8	3 M	1.25 mL	375 mM
SDS	20%	50 μ L	0.1%
Solución Acrilamida/Bisacrilamida	30%	3 mL	9%
Persulfato NH_4^+	10 %	100 μ L	0.1%
TEMED	100%	5 μ L	0.05%

14º Cuestión 14:

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de nylon. Tras finalizar la transferencia, ¿cómo valoraría la eficiencia de la transferencia de las proteínas a la membrana? Explique el procedimiento que utilizaría.

La transferencia se puede evaluar tiñendo la membrana con una tinción reversible, como la solución de Ponceau, o tiñendo el gel con Commasie para determinar las proteínas que quedan en el gel.

15º Cuestión 15:

Una vez incubada la membrana con los anticuerpos primario y secundario es necesario revelar la señal. ¿Qué método/s conoce para revelar la hibridación de los anticuerpos a la proteína de interés?

La señal se puede detectar por medios colorimétricos en los que la enzima acoplada al anticuerpo secundario reacciona con los productos que se añaden y genera un precipitado en el lugar donde se encuentra. La otra posibilidad es utilizando un sustrato fluorescente que genera luz y se puede detectar por medio de película fotosensible o a través de medios digitales.



SUPUESTO PRÁCTICO 2

Se desea estudiar los efectos sobre la expresión génica de un producto químico. Para ello se exponen durante 24 horas larvas de *Chironomus riparius* a distintas concentraciones del tóxico. La expresión génica se va a analizar estudiando los cambios que ocurren en la actividad transcripcional de diez genes y dos genes de referencia. Sin embargo, falta por describir uno de los genes que se quiere estudiar.

PREGUNTAS

1º Cuestión 1:

En la base de datos de transcriptomas de *Chironomus riparius* se ha localizado por comparación con la secuencia de *Drosophila melanogaster* una secuencia que puede corresponder a la del gen que se quiere identificar. La secuencia se indica a continuación. Se han diseñado dos oligonucleótidos, **Forward** y **Reverse**, que se emplearán en pasos posteriores.

- Subraye en la secuencia la posición en la que se anillarían estos oligonucleótidos en la secuencia de ADN.
- Indique el tamaño del fragmento de ADN que se encuentra entre ambos.
- Deduzca la temperatura de fusión (T_m) que asignaría a cada uno de los oligonucleótidos (de forma aproximada). Razone su respuesta.

	Secuencia
Forward	5' AATGAATTGATGGATG 3'
Reverse	5' TTTCAACTTGGAGCTC 3'

a) Secuencia (de 5' a 3')

```

ATTCAGAAA CAAAATGGAA TATTTCAATG AAGCTTATCG CATGATTGTT 050
GATAATGCTA ATGGATTGGG AATCGATAGT GCCATTCAAC AAAAATTGAG 100
AGAATTCTCA GGCCGAGTAG TTCCAAAAGT CATTGATGAC TACACGAGTG 150
CCATTAAAGG ATTTTCGTGTC CTCAACCATG GAGATTTTTA TACGCGCAAC 200
ATTTTCTTTA AGTACAAGGG AAATGAATTG ATGGATGTTT TGTTTGTGTA 250
CTTCCAAAAT GCCGTCATCG GAACACCACT AATTGACTTA TTCTATTTCC 300
TTCAAACATC CGTTGCTGTT AATGTACTTG CATCGTCACG TGATGAATTG 350
ATTTACTTTT ATCACGATGC ACTTTCAACA ATGCTTCAA GCTTGGGCTT 400
TAAAGGACAA TTTCTTCAT TAAATGAGCT CCAAGTTGAA ATGCTTAAAC 450
GCAGCAGTAT GGAACTTTTT TTCAGTTTAA CCCTTGGACC ATACTTGAGA 500
ATTCCAGAGC CAAGAGTCAT TACAGCTGTG CAGCCTTCAC TCTACAAAGA 550
GGCATACTTG CAACAACCTA AGAATCATGG AAAAACAGTA CTGTCCATGT 600
CCAAGGACTT TATTCAGGAC AATTGAAAAG ATTCGATGCT TTAAGTACTC 650
TTGACTACAC AGGCGATGAA AGCCGCATTC GAGGTA 686
  
```

NOTA: se obtiene el reverso complementario del reverse para poder localizarlo en la secuencia: GAGCTCCAAGTTGAAA

b) Tamaño del fragmento en (pb)

220 pb

c) Temperatura de fusión o desnaturalización (Tm)

Forward	42 °C
Reverse	46 °C

Por cada par A-T se cuentan dos grados y por cada par G-C se considera que son necesarios 4 grados para separar el par. Se suma el total.

Forward: 11 A/T y 5 G/C = $11 \cdot 2 + 5 \cdot 4 = 42 \text{ °C}$

Reverse: 9 A/T y 7 G/C = $9 \cdot 2 + 7 \cdot 4 = 46 \text{ °C}$

2º Cuestión 2:

Para amplificar el fragmento y poder clonarlo se va a utilizar ADN complementario. Explique cómo se hace la retrotranscripción y qué se necesita para llevar a cabo la reacción.

La retrotranscripción se hace con la enzima transcriptasa inversa, que utiliza el molde de RNA como base para sintetizar cDNA. Para realizar la reacción se necesita RNA, un cebador (puede ser un oligonucleótido específico, un oligo dT o hexámeros al azar, dependiendo de para qué se use posteriormente el cDNA), el buffer con las sales necesarias para que se de la reacción, desoxinucleótidos (para sintetizar el nuevo

cDNA), la retrotranscriptasa y, opcionalmente, un inhibidor de RNAsa para prevenir la degradación del RNA durante la retrotranscripción.

3º Cuestión 3:

El ADNc se usa en PCR para amplificar el fragmento de interés. Comente qué temperaturas tienen los distintos pasos del programa que debe utilizar en la PCR. Tenga en cuenta los datos de la cuestión 1 para hacer el programa de la PCR.

El programa de PCR consta de tres pasos básicos: desnaturalización, alineamiento y elongación. Para la desnaturalización se realiza un paso de pocos segundos a 95 °C. El alineamiento de los oligonucleótidos con el fragmento de interés se hace a una temperatura por debajo de la temperatura de fusión. En este caso, como el forward tiene 42 °C, el alineamiento se hace por debajo de esa temperatura (aproximadamente unos 5 °C por debajo). El último paso es la elongación, que se hace a la temperatura de la enzima que se use. Lo habitual es usar 70-72 °C, pero depende de la polimerasa termoestable que se use.

4º Cuestión 4:

Tras haber amplificado el fragmento, se desea clonar el mismo en un plásmido para poder secuenciarlo y confirmar qué es el fragmento de interés. ¿Qué pasos hay que realizar para clonar el fragmento y disponer del plásmido en cantidad suficiente para poder realizar la secuenciación?

Para poder clonar el fragmento se debe cortar el plásmido con una enzima de restricción que permita los extremos romos. Una vez hecho esto, se pone en contacto con el fragmento en presencia de una ligasa, que une los fragmentos. Tras ligar el fragmento al plásmido, se hace una transformación que consiste en introducir el plásmido en una bacteria. El plásmido incluye alguna resistencia a antibiótico y/o un elemento que permite distinguir las bacterias que lo llevan. Una vez seleccionada la bacteria que lo lleva, se crece en medio de cultivo en presencia del antibiótico. Tras crecer la bacteria se procede a extraer el DNA del plásmido.

5º Cuestión 5:

Tras confirmar que el fragmento corresponde a la secuencia que interesa, se plantea realizar una hibridación in situ para localizar el mismo en los cromosomas politénicos de *Chironomus riparius*. A continuación, se muestra el protocolo de hibridación *in situ*. Ordene de forma correcta los pasos que se le indican en la tabla de los pasos del protocolo desordenado:



Indique los pasos (con el número que aparece en la tabla posterior) en orden correcto.

HIBRIDACION IN SITU

A.- Preparación de la muestra a hibridar	C.- Hibridación de la sonda
13, 4	16, 7, 5, 2
B.- Aislamiento y marcaje de la sonda	D.- Detección de la sonda
10, 8, 9, 1, 12, 6	11, 3, 14, 15

1	Aislamiento de la banda del plásmido correspondiente a la sonda.
2	Añadir la mezcla de reacción de la sonda marcada a la preparación, colocar el cubreobjetos e incubar durante toda la noche a 37 °C.
3	Aplicar 15 µl de estreptavidina-FITC 1:100 en PBT (1xPBS, 1% BSA, 0.1% Tween 20) e incubar durante treinta minutos a 37 °C.
4	Deshidratar la preparación en etanol absoluto. Se puede almacenar hasta su uso de esta forma.
5	Deshidratar la preparación en una serie de etanol (30%-50%-70%-95%) y dejar secar al aire.
6	Desnaturalizar la sonda, preparar la mezcla de reacción de la sonda marcada y conservar congelada hasta su utilización.
7	Desnaturalizar los cromosomas incubando en 2xSSC a 80 °C durante treinta minutos, en 0.1 N NaOH durante noventa segundos y lavando treinta segundos en 2xSSC.
8	Digestión del plásmido que contiene el fragmento de interés
9	Electroforesis
10	Extracción del ADN de plásmido
11	Levantar el cubreobjetos, lavar cinco minutos con 2xSSC a TA y con PBS durante 10 minutos.
12	Marcaje de la sonda por <i>Nick-translation</i> con biotina.
13	Realizar la preparación en etanol-acético 3:1.
14	Realizar tres lavados de cinco minutos cada uno en 1xPBS e incubar dos minutos con DAPI (1:20000) disuelto en 1xPBS.
15	Realizar un lavado de cinco minutos con 1xPBS y montar la preparación con Prolong (Antifading). Observar al microscopio
16	Rehidratar la preparación en una serie de etanol (70%-50%-30%), 0.1xSSC y 2xSSC.

6º Cuestión 6:

Para evaluar la expresión génica primero se debe aislar el ARN. Explique cómo haría el aislamiento del ARN del organismo.

El RNA se puede aislar utilizando diversos kits pero el método más extendido actualmente es el de isotiocianato de guanidinio. El material se homogeneiza en una solución con isotiocianato de guanidinio, que es una sal caotrópica. Se añade

posteriormente cloroformo y se agita, dejando unos minutos que actúe la solución facilitando la separación del RNA de las proteínas. Posteriormente se centrifuga y se recoge la fase acuosa. A esta fase se le añade isopropanol para precipitar el RNA. Una vez precipitado, el RNA se resuspende tras un lavado con etanol 70% en agua tratada con dietilpirocarbonato, agua ultrapura o la solución que se desee. En algunos kits la extracción se hace con columnas que retienen el RNA y luego se eluye de la columna con agua.

7º Cuestión 7:

Una vez aislado el ARN se debe cuantificar. ¿Cómo realizaría la cuantificación? Explique los criterios para saber la calidad del ARN y si es adecuado para emplearlo en técnicas posteriores.

El RNA se cuantifica en espectrofotómetro. Se mide a 260 nm para saber la cantidad de RNA que hay. A cada unidad de absorbancia se ha demostrado empíricamente que le corresponden 33 microgramos de RNA. Además se mide a 230 nm y a 280 nm. La relación 260/230 debe ser mayor de 2. La absorbancia a 230 nm indica la cantidad de solvente orgánico que se puede haber arrastrado durante la extracción. La relación 260/280 debe ser aproximadamente 2. La absorbancia a 280 nm indica la cantidad de proteínas que se han arrastrado durante la extracción. Para conocer la integridad del RNA se puede realizar una electroforesis en agarosa y ver que está íntegro, lo que se observa por ausencia de degradación y la presencia de las bandas correspondientes al RNA ribosómico.

8º Cuestión 8:

Como en la cuestión 2, se realiza la retrotranscripción del ARN para obtener el ADNc. En este caso, se va a emplear en el proceso de PCR en tiempo real. Indique qué elementos va a necesitar para realizar la PCR en tiempo real además del ADNc.

Para la PCR en tiempo real se precisa de una DNA polimerasa termoestable, oligonucleótidos del gen de interés, desoxirribonucleótidos, el cDNA, presencia de Mg en la concentración adecuada y un fluoróforo. Si la detección es inespecífica, se utiliza una molécula como el SYBR-green, que se une al DNA de doble hebra de manera inespecífica y permite detectar cualquier fragmento que se haya amplificado. Si se utilizan sondas u oligonucleótidos marcados, se pueden usar diversos fluoróforos de manera simultánea.



9º Cuestión 9:

Se van a estudiar 10 genes y dos genes de referencia. Comente los criterios que utilizaría para seleccionar un gen como gen de referencia para PCR en tiempo real.

Un gen de referencia debe cumplir el requerimiento de no variar con las condiciones de estudio y estar en suficiente cantidad como para poder detectarse sin problemas. Se debe comprobar que el gen no ve modificada su actividad por las condiciones estudiadas.

10º Cuestión 10:

La PCR en tiempo real se realiza en una placa de 96 pocillos. Esta puede tener los pocillos blancos, transparentes o negros. Razone porqué selecciona un tipo de placa u otro para hacer la PCR en tiempo real.

La elección de la placa depende de la señal que se espere. Al detectarse luz, la placa transparente permite que la luz se dirija en todas las direcciones y solo aquella que se dirige al sensor se detecta. En la placa negra, las paredes actúan absorbiendo la señal por lo que hay una disminución de la señal. La placa blanca, en cambio, refleja la luz maximizando la luz que llega al sensor y favoreciendo la detección de señales más bajas. La elección de una u otra depende del gen y las condiciones a estudiar.

11º Cuestión 11:

Teniendo en cuenta que se van a utilizar diez genes problema y dos genes de referencia, ¿cuántas muestras se podrían emplear en cada placa de 96 pocillos si se incluyen duplicados de cada gen? Razone la respuesta.

La placa tiene 96 pocillos. Si se utilizan duplicados significa que dos pocillos llevan la misma muestra. En total son 12 genes, con lo que son 24 pocillos por muestra. El total de muestras que se puede hacer simultáneamente con los 12 genes es de 4 ya que cada muestra necesita 24 pocillos ($96/24 = 4$)

12º Cuestión 12:

Para rellenar la placa se realiza una máster mix. Calcule los volúmenes de cada componente que necesita para la mezcla de reacción que necesitaría si se prepara un total de 1 mL. El volumen final en el pocillo es de 10 microlitros. La concentración final (en cada pocillo) y la concentración stock de cada elemento son:



	Stock	Final
Cl ₂ Mg	25 mM	2 mM
Enzima	100 u	0.2 u
EvaGreen	20X	0.5X
Tampón	10X	1X

Para preparar un mililitro de solución se necesitan:

Cl₂Mg – 80 µL

Enzima – 20 u

EvaGreen – 25 µL

Tampón – 100 µL

13º Cuestión 13:

Los oligonucleótidos necesarios para realizar la PCR en tiempo real se encuentran en una solución stock de 10 µM. La concentración final es de 250 nM. ¿Qué volumen hay que añadir de cada oligonucleótido a cada pocillo?

Si el stock es 10 µM y la concentración es 250 nM, supone que es 0.25 µM. Hay que diluir el stock 1:40 por lo que hay que añadir a cada pocillo un total de 0.25 µL por cada oligonucleótido

14º Cuestión 14:

Como se ha indicado en la cuestión 11, el número de muestras depende del número de genes. De acuerdo con el número de muestras que haya decidido que se deben incluir, ¿cómo plantearía la carga de la placa para minimizar el error de pipeteo? Recuerde que tiene una máster mix, los oligonucleótidos y los ADNc de las muestras.

La forma más sencilla de cargar la placa es añadir primero los oligonucleótidos a cada pocillo y luego dividir la master mix en 4 partes iguales. A cada parte se le añade una de las muestras y se carga a partir de cada una ellas los 24 pocillos correspondientes.

15º Cuestión 15:

Los resultados de la PCR en tiempo real que se obtienen son los Cq (o Ct) de cada muestra y de cada gen. El análisis se realiza aplicando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Suponiendo los datos que se indican a continuación, indique cómo se calcula la expresión relativa del gen en la glándula salival respecto a los ganglios cerebroideos de la larva.

Tejido	Ct Gen problema	Ct Gen referencia
<i>Gánglios cerebroideos</i>	30.72	23.70
	30.34	23.56
	30.58	23.47
	30.50	23.65
	30.43	23.69
	30.34	23.68
	<i>Media</i>	30.49 ± 0.15
<i>Glándula salival</i>	27.06	22.76
	27.03	22.61
	27.03	22.62
	27.10	22.60
	26.99	22.61
	26.94	22.76
	<i>Media</i>	27.03 ± 0.06

El método $\Delta\Delta$ supone una doble normalización, primero con el valor de referencia control y luego con el gen de referencia. En este caso, se usa la media como referencia para comparar todas las muestras. Primero se realiza la resta de cada Ct respecto a la media, tanto en el gen de referencia como en el control. Luego se procede a dividir cada valor del gen de estudio entre el gen de referencia y se hace la normalización entre los datos. En este caso se considera que la eficiencia es del 100% y se hace entonces la potencia en base 2 del dato obtenido para el gen de estudio.

Por último, para ver la diferencia relativa entre ellos, se divide el valor medio de los datos obtenidos para la glándula entre el valor medio de los datos obtenidos para el gánglio cerebroideo y se obtiene la relación entre ambos tejidos.

PREGUNTAS DE RESERVA

1º Cuestión 1:

En el laboratorio se utiliza un invertebrado acuático y es necesario preparar medio de cultivo. El medio se prepara a partir de un stock 200X de dos soluciones, la solución I y la solución II. Calcule la cantidad que hay que utilizar de cada producto para preparar las soluciones stock I y II sabiendo que las concentraciones finales en el medio de cultivo son:

Solución I	MW (g·mol ⁻¹)	[Final]
Cl ₂ Ca	110.98	2 mM

Solución II	MW (g·mol ⁻¹)	[Final]
NaHCO ₃	84	0.5 mM
MgSO ₄	120.37	0.77 mM
KCl	74.50	0.08 mM

Para 1 litro:

Solución I: concentración final 0.2219 g (221.9 mg). $0.2219 \cdot 200 = 44.39$ g

Solución II:

NaHCO₃ – concentración final 0.042 g (42 mg). $0.042 \cdot 200 = 8.4$ g

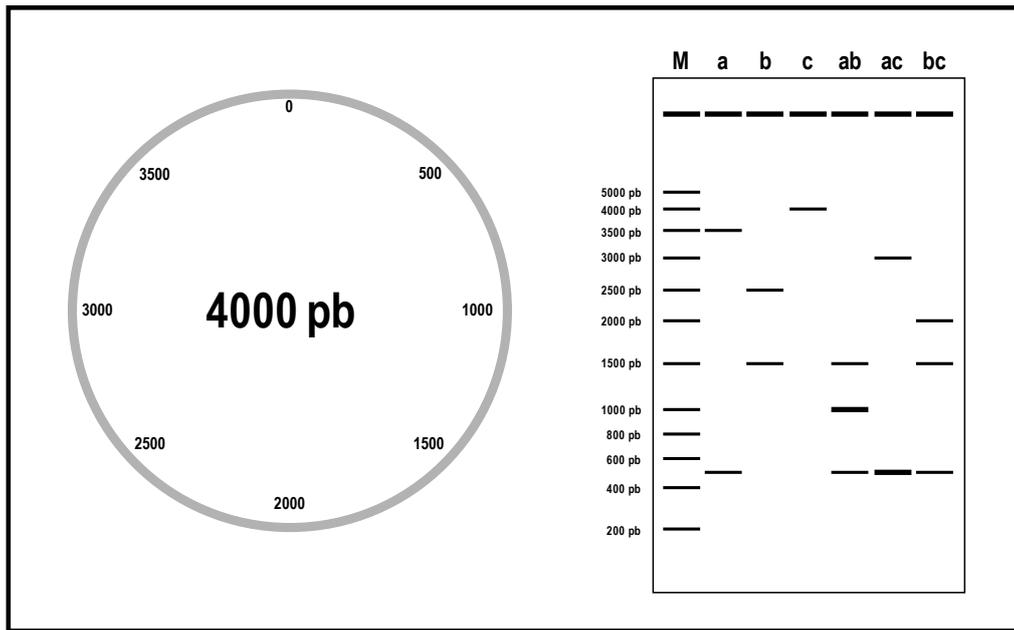
MgSO₄ – concentración final 0.092 g (92.68 mg). $0.092 \cdot 200 = 18.53$ g

KCl – concentración final 0.0059 g (5.96 mg). $0.0059 \cdot 200 = 1.18$ g

2º Cuestión 2:

En el esquema se muestra la imagen de un plásmido que se ha cortado con enzimas de restricción. Realice el mapa de restricción localizando los puntos de corte de **las enzimas A, B y C** a partir de los datos del gel sabiendo que la enzima C tiene un sitio en la posición 2000.

Carril	Material cargado
M	marcador
a	fragmentos de DNA obtenidos al digerir el plásmido con la enzima A.
b	fragmentos de DNA obtenidos al digerir el plásmido con la enzima B.
c	fragmentos de DNA obtenidos al digerir el plásmido con la enzima C.
ab	fragmentos de DNA obtenidos al digerir el plásmido con las enzimas A y B al mismo tiempo.
ac	fragmentos de DNA obtenidos al digerir el plásmido con las enzimas A y C al mismo tiempo.
bc	fragmentos de DNA obtenidos al digerir el plásmido con las enzimas B y C al mismo tiempo.



Sitios de corte (entre paréntesis otra posibilidad):

A: 1000, 1500 (3000, 2500)

B: 0, 2500 (0, 1500)

C: 2000

3º Cuestión 3:

Al realizar un ensayo enzimático de GST se obtienen los siguientes datos:

Reading	1	2	3	4	5	6
avg. time [s]	0	60	120	180	240	300
Blank	0.4209	0.4205	0.4222	0.4225	0.4238	0.4253
Blank	0.4209	0.4211	0.4220	0.4224	0.4233	0.4247
C 8H 1	0.5576	0.5603	0.5647	0.5695	0.5733	0.5772
C 8H 1	0.5571	0.5607	0.5649	0.5693	0.5731	0.5782
C 8H 2	0.5453	0.5507	0.5570	0.5628	0.5679	0.5747
C 8H 2	0.5733	0.5786	0.5857	0.5911	0.5968	0.6026
C 8H 3	0.5274	0.5328	0.5390	0.5451	0.5514	0.5584
C 8H 3	0.5540	0.5604	0.5665	0.5726	0.5780	0.5854

El ensayo se ha realizado con un extracto proteico de *Daphnia magna* utilizando 10 microlitros de muestra por pocillo sin diluir excepto en el caso de C 8H 3, que se ha diluido 1:3. Calcule la actividad de cada muestra aplicando la fórmula:

$$\frac{(\Delta A_{340})/\text{min} \times V \text{ (mL)} \times \text{dil}}{\epsilon_{\text{mM}} \times V_{\text{samp}} \text{ (mL)}} = \mu\text{mol/ml/min}$$

Donde:

$$\Delta A_{340}/\text{min} = (A_{340f} - A_{340i})/\text{tiempo de reacción (min)}$$

V (mL): volumen de reacción

Dil: factor de dilución empleado

ϵ : coeficiente de extinción molar ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (5.3 mM^{-1})

V_{samp} (mL): volumen de muestra

Cálculo de los valores (media y substracción de blanco para obtener los datos).

Reading	1	2	3	4	5	6
avg. time [s]	0	60	120	180	240	300
Blank	0.4209	0.4205	0.4222	0.4225	0.4238	0.4253
Blank	0.4209	0.4211	0.422	0.4224	0.4233	0.4247
C 8H 1	0.5576	0.5603	0.5647	0.5695	0.5733	0.5772
C 8H 1	0.5571	0.5607	0.5649	0.5693	0.5731	0.5782
C 8H 2	0.5453	0.5507	0.557	0.5628	0.5679	0.5747
C 8H 2	0.5733	0.5786	0.5857	0.5911	0.5968	0.6026
C 8H 3	0.5274	0.5328	0.539	0.5451	0.5514	0.5584
C 8H 3	0.554	0.5604	0.5665	0.5726	0.578	0.5854
Reading	1	2	3	4	5	6
avg. time [s]	0	60	120	180	240	300
Blank	0.4209	0.4208	0.4221	0.42245	0.42355	0.425
Blank	0.4209	0.4211	0.422	0.4224	0.4233	0.4247
C 8H 1	0.55735	0.5605	0.5648	0.5694	0.5732	0.5777
C 8H 1	0.55735	0.5605	0.5648	0.5694	0.5732	0.5777
C 8H 2	0.5593	0.56465	0.57135	0.57695	0.58235	0.58865
C 8H 2	0.5593	0.56465	0.57135	0.57695	0.58235	0.58865
C 8H 3	0.5407	0.5466	0.55275	0.55885	0.5647	0.5719
C 8H 3	0.5407	0.5466	0.55275	0.55885	0.5647	0.5719
Reading	1	2	3	4	5	6
avg. time [s]	0	60	120	180	240	300
Blank	0.13645	0.1397	0.1427	0.14695	0.14965	0.1527
Blank	0.13645	0.1397	0.1427	0.14695	0.14965	0.1527
C 8H 1	0.13645	0.1397	0.1427	0.14695	0.14965	0.1527
C 8H 1	0.13645	0.1397	0.1427	0.14695	0.14965	0.1527
C 8H 2	0.1384	0.14385	0.14925	0.1545	0.1588	0.16365
C 8H 2	0.1384	0.14385	0.14925	0.1545	0.1588	0.16365
C 8H 3	0.1198	0.1258	0.13065	0.1364	0.14115	0.1469
C 8H 3	0.1198	0.1258	0.13065	0.1364	0.14115	0.1469

Cálculo de la concentración:

Reading	1	2	3	4	5	6
avg. time [s]	0	60	120	180	240	300
Blank	0.13645	0.1397	0.1427	0.14695	0.14965	0.1527
C 8H 1	0.13645	0.1397	0.1427	0.14695	0.14965	0.1527
C 8H 2	0.1384	0.14385	0.14925	0.1545	0.1588	0.16365
C 8H 3	0.1198	0.1258	0.13065	0.1364	0.14115	0.1469

ΔA_{340}	min	Vol	dil	V muestra	ϵ	$(\Delta A_{340})/\text{min} \times V \text{ (mL)} \times \text{dil}$	$\epsilon \text{M} \times V_{\text{samp}} \text{ (mL)}$	$\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$
0.01625	5	0.2	1	0.01	5.3	0.00065	0.053	0.012264151
0.02525	5	0.2	1	0.01	5.3	0.00101	0.053	0.019056604
0.0271	5	0.2	0.3	0.01	5.3	0.0003252	0.053	0.006135849