



CONCURSO PÚBLICO 2014 - EDITAL Nº 342/2013

TÉCNICO DE LABORATÓRIO
BIOTECNOLOGIA - ANÁLISE DE PROTEÍNAS

PROVA PRÁTICA/DISCURSIVA

Leia com atenção as Instruções

1. Você recebeu do fiscal um **caderno de respostas da prova prática/discursiva** e este **caderno de questões**.
2. É sua responsabilidade verificar se o nome do cargo informado neste **caderno de questões** corresponde ao nome do cargo informado em seu **caderno de respostas**.
3. Você dispõe de **4 (quatro)** horas para realizar a prova, incluindo a escrita no **caderno de respostas**.
4. Somente depois de decorrida uma hora do início da prova o candidato poderá entregar o seu **caderno de respostas** e retirar-se da sala de prova (Edital 342/2013).
5. Somente será permitido levar seu **caderno de questões** faltando uma hora para o término estabelecido para o fim da prova (Edital 342/2013).
6. Após o término de sua prova, entregue obrigatoriamente o seu **caderno de respostas** ao fiscal.
7. É terminantemente vedado copiar respostas, em qualquer fase do concurso público (Edital 342/2013).
8. Os 3 (três) últimos candidatos de cada sala somente poderão ser liberados juntos (Edital 342/2013).
9. Se você precisar de algum esclarecimento, consulte o fiscal.

Somente após autorização para o início da prova:

1. Verifique, neste **caderno de questões**, se a numeração das questões e a paginação estão corretas.
2. Verifique, no **caderno de respostas**, se existem espaços suficientes para a transcrição das respostas de todas as **questões** existentes neste **caderno de questões**.

Cronograma Previsto - Prova Prática/Discursiva

Divulgação do resultado preliminar da Prova Prática/Discursiva	21/05/2014
Divulgação da imagem do Caderno de Questões da Prova Prática/Discursiva	21/05/2014
Interposição de recursos contra o resultado preliminar da Prova Prática/Discursiva	22 e 23/05/2014
Divulgação do resultado do julgamento dos recursos contra as questões e o resultado preliminar da Prova Prática/Discursiva	10/06/2014
Divulgação do resultado final da Prova Prática/Discursiva	10/06/2014

QUESTÃO 1

Apresenta-se abaixo um protocolo para preparação de géis SDS-PAGE a ser utilizado em uma análise de confirmação de rEPO e análogos. O método utiliza a técnica de *Western-blotting*.

Preparação do gel SDS-Page	Gel de resolução (10%) – 6,65 mL solução de acrilamida/bisacrilamida + 5 mL tampão tris HCl pH 8,8 + 200 µL SDS 10% + 8mL água MilliQ, degaseificar o sistema por 10 min, adicionar 100 µL de persulfato de amônio 10%, adicionar 6,7 µL de TEMED.
	Gel de empilhamento (4%) -1,33 mL solução de acrilamida/bisacrilamida + 2,5 mL tampão tris HCl pH 6,8+ 100 µL SDS 10% + 6 mL água MilliQ, degaseificar o sistema por 10 min, adicionar 50µL de persulfato de amônio 10%, adicionar 5 µL de TEMED.
Pré-tratamento da amostra e controles	Adicionar em um microtubo 1 µL de tampão de tratamento de amostra para cada 1µL de amostra ou controle. Aquecer a 95°C por 5 min. Centrifugar.
Eletroforese	Adicionar o tampão de corrida. Adicionar as amostras. Conectar a fonte a 200V (constante) por 1h.
Primeira transferência	Lavar o gel com tampão de transferência. Montar o sistema de transferência. Condição de operação 137 mA por 30 min.
Tratamento da primeira membrana de transferência	Incubar a 1ª membrana com DTT 5mM a 37°C por 45 min. Lavar a 1ª membrana com PBS por 1min (2x). Incubar com leite a 5 % em PBS, 45 min, temperatura ambiente. Lavar com PBS/ <i>tween</i> por 2 min (4x). Incubar a membrana com anticorpo monoclonal (30 µL + 6 mL leite a 5% em PBS+ 24mL PBS) por 1h à temperatura ambiente. Lavar com leite 0,5% em PBS por 10 min. Lavar a membrana com PBS/ <i>tween</i> por 2 min (3x).
Segunda transferência	Lavar a segunda membrana com metanol por 2 min . Transferir a 137 mA (constante) por 10 min.
Tratamento da membrana de segunda transferência	Lavar a membrana com PBS por 1 min. Incubar com leite em PBS a 5% por 45 min à temperatura ambiente. Lavar com PBS/ <i>tween</i> por 2 min (4X). Incubar com o anticorpo secundário (15µL anticorpo policlonal+ 8mL de leite a 5% em PBS + 32mL de PBS) – 1h à temperatura ambiente. Lavar com leite 0,5% em PBS por 10 min (3x). Lavar com PBS/ <i>tween</i> por 2 min. Incubar por 1h à temperatura ambiente com 8mL leite 5% em PBS e 32 mL PBS + 15µL estreptavidina peroxidase. Lavar com PBS adicionar reagentes de quimiluminescência, realizar a captura de imagens.

Descrição do Almoarifado

Materiais	Reagentes
Pipetas automáticas de volume variável (µL): P5, P10, P20, P50, P100, P200, P1000	Tris (PM=121,14 mol.g ⁻¹)
Balões volumétricos: 25, 50, 100, 500 e 1000 mL	SDS
Becker: 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mL	HCl (solução 0,1 M)
Pipetas volumétricas de vidro: 5, 10, 25, 50, 100 mL	Acrilamida/bisacrilamida
Pipetas graduadas: 25 e 50 mL	Persulfato de amônio
Espátulas	TEMED
Buretas 25mL e 50 mL	n-butanol hidratado
Placas e cubas para eletroforese	Ditiotreitol (DTT) – solução 1,2 M
Bastões de vidro	PBS (tampão fosfato salino)
Funis	Leite em pó desnatado
Balança analítica	<i>Tween</i>
Eletrodo de medição de pH (e tampões necessários)	Anticorpos monoclonal e policlonal
Vidro de relógio	Ácido acético
	Estreptavidinaperoxidase

Com base no protocolo a ser realizado e nos itens disponíveis no almoxarifado, pede-se:

Item A) Descreva todo o procedimento adotado na preparação de 500 mL do tampão Tris-HCl 1,5M pH 6,8.

Item B) Qual o volume de uma solução 1,2M de DTT deve ser aliqüotada para preparar 100 mL de uma solução 5 mM.

Item C) Qual(ais) procedimento(s) de segurança deve(m) ser adotados para o preparo dos géis de acrilamida? Justifique.

Item D) Qual pipeta automática seria mais indicada para adicionar os 30 μ L de anticorpo monoclonal? Justifique.

Item E) Se durante a realização do protocolo o técnico adicionasse 30 μ L do anticorpo policlonal ao invés do anticorpo monoclonal, e sem perceber o erro fosse até o final do procedimento, o que seria esperado como resultado? Justifique.

Item F) Explique o princípio envolvido na técnica de *western blotting*.

Item G) Observe a Figura 1. Trata-se de uma imagem tipicamente obtida através da técnica de SDS-PAGE, utilizando o corante azul de comassie como revelador. A que correspondem os sinais grifados (*lane 1*) na Figura 1? Qual a relevância dos sinais observados nesse *lane* na interpretação dos resultados?

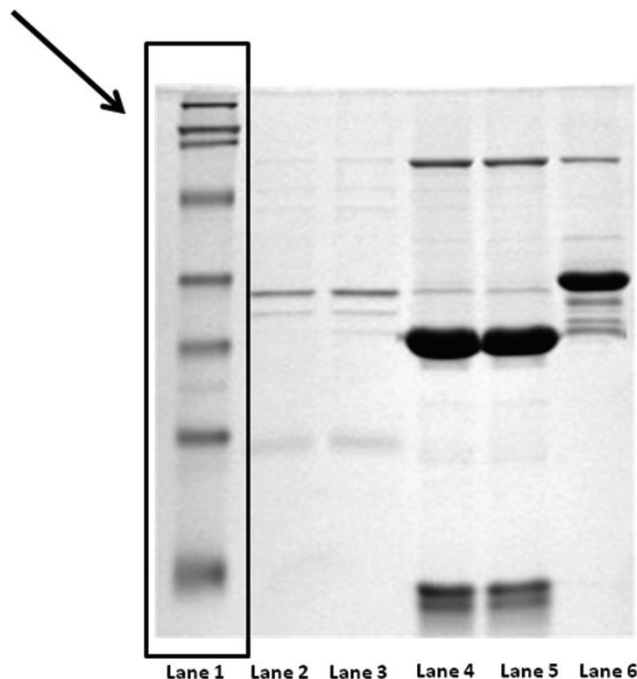


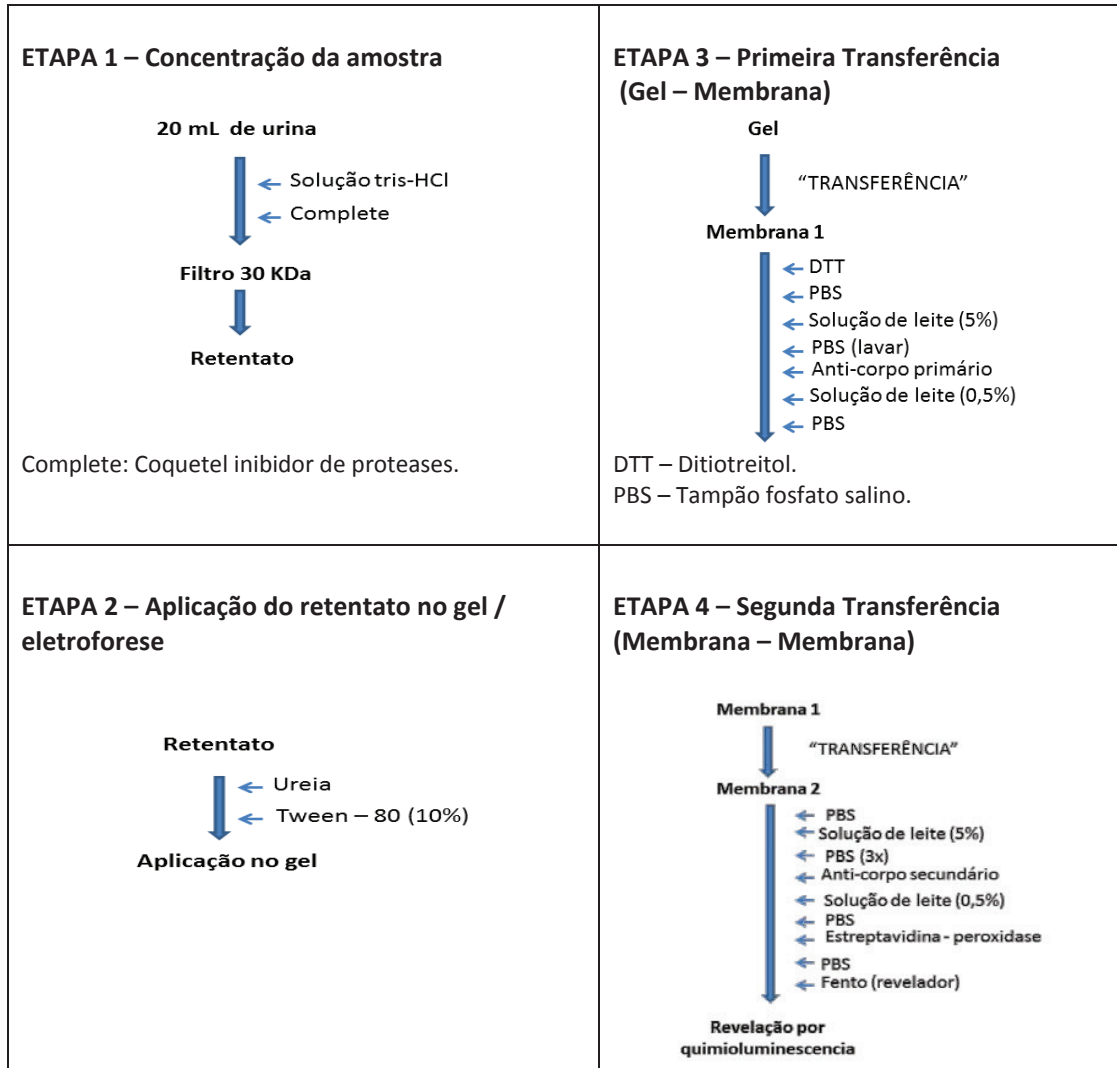
Figura 1. Imagem tipicamente obtida através da técnica de SDS-PAGE utilizando azul de comassie como revelador.

QUESTÃO 2

O esquema 1 representa um procedimento genérico para a detecção das diferentes formas de proteínas conhecidas como eritropoietinas recombinantes. O método é baseado na técnica de eletroforese por focalização isoeétrica (IEF). O procedimento total pode ser dividido didaticamente em quatro etapas:

- Etapa 1: Concentração da amostra / obtenção do retentato.
- Etapa 2: Aplicação do retentato / eletroforese.
- Etapa 3: Primeira transferência.
- Etapa 4: Segunda transferência / revelação.

Esquema 1. Esquema resumido do método de análise de eritropoietina por focalização isoeétrica apresentado didaticamente dividido em quatro etapas.



Item A) Descreva a função dos reagentes: solução *complete*, uréia, DTT e estreptavidina peroxidase.

Item B) O que é ponto isoeétrico?

Item C) Redija um texto com até 50 palavras sobre a técnica de IEF em que fique evidente seu princípio utilizando as seguintes palavras em qualquer ordem: proteína, anfólito, ponto isoeétrico, migração, pH.

Item D) Descreva a função do anfólito na análise por focalização isoeétrica.

Item E) Qual a função da solução de leite do procedimento apresentado? (Etapas 3 e 4).

RASCUNHO

RASQUINHO

RASTRO

RASQUINHO

RASTRO

RASQUINHO



UFRJ