



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

Cargo:
D-41 Técnico Laboratório - Biotecnologia - Análise de Proteínas

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.

Etapa	Descrição
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 100µL de persulfato de amônio 10%, adicionar 6,7µL 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% + 6mL água MilliQ , degaseificar o sistema por 10 min, adicionar 50µL de persulfato de amônio 10%, adicionar 5µL 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/tween 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/ Tween 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/tween 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/tween 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 quimioluminescência, realizar a captura de imagens.

- Descrição do Almoxarifado

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	Tween
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:



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

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

Chave de Correção	
Item	Qtde de Pontos
a) Pesar 90,855 g de tris (apresentar a descrição das contas)	8
b) Solubilizar esta massa em água, utilizando um Becker	2
c) Calibrar o medidor de pH (descrição)	2
d) Aferir o pH da solução e adicionar solução de HCl 0,1 M até pH 6,8	2
e) Transferir com auxílio de bastão de vidro e funil para um balão volumétrico de 500mL	2
f) Completar o volume para 500 mL com água	2
Total	18

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

Chave de Correção	
Item	Qtde de Pontos
Pipetar 417 μ L de solução 1,2M de DTT	4

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

Chave de Correção	
Item	Qtde de Pontos
a) Além dos EPIs tipicamente recomendados para laboratório, exige-se o uso de luvas e máscara.	2
b) Potencialmente cancerígena	2
Total	4

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

Chave de Correção	
Item	Qtde de Pontos
a) P50	3
b) Volume mais próximo do desejado	2
c) Menor incerteza da medida	3
Total	8

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.

Chave de Correção	
Item	Qtde de Pontos
a) Ausência de bandas específicas no gel	4
b) Afinidade a porções do anticorpo primário e não a proteína de interesse	4
Total	8

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

Chave de Correção	
Item	Qtde de Pontos
a) Separação das proteínas por eletroforese	2
b) Marcação específica da proteína de interesse por afinidade ao anticorpo primário	3
c) Amplificação do sinal pela ligação anticorpo secundário	3
Total	8



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

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?

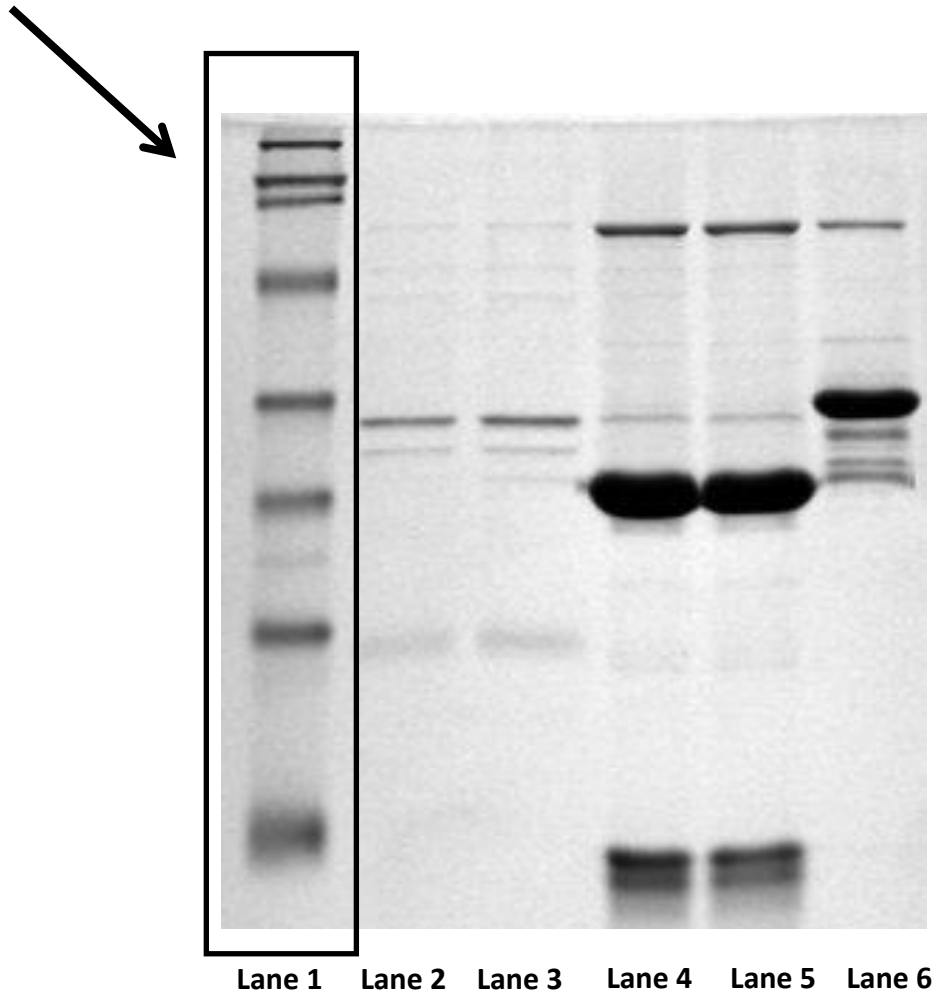


Figura 1. Imagem tipicamente obtida através da técnica de SDS-PAGE utilizando azul de comassie como revelador.

Chave de Correção	
Item	Qtde de Pontos
a) Marcador de peso molecular	2,5
b) Identificar as faixas de peso molecular das proteínas de interesse	2,5
Total	5



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

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 isoeletrica (IEF). O procedimento total pode ser dividido didaticamente em quatro etapas:

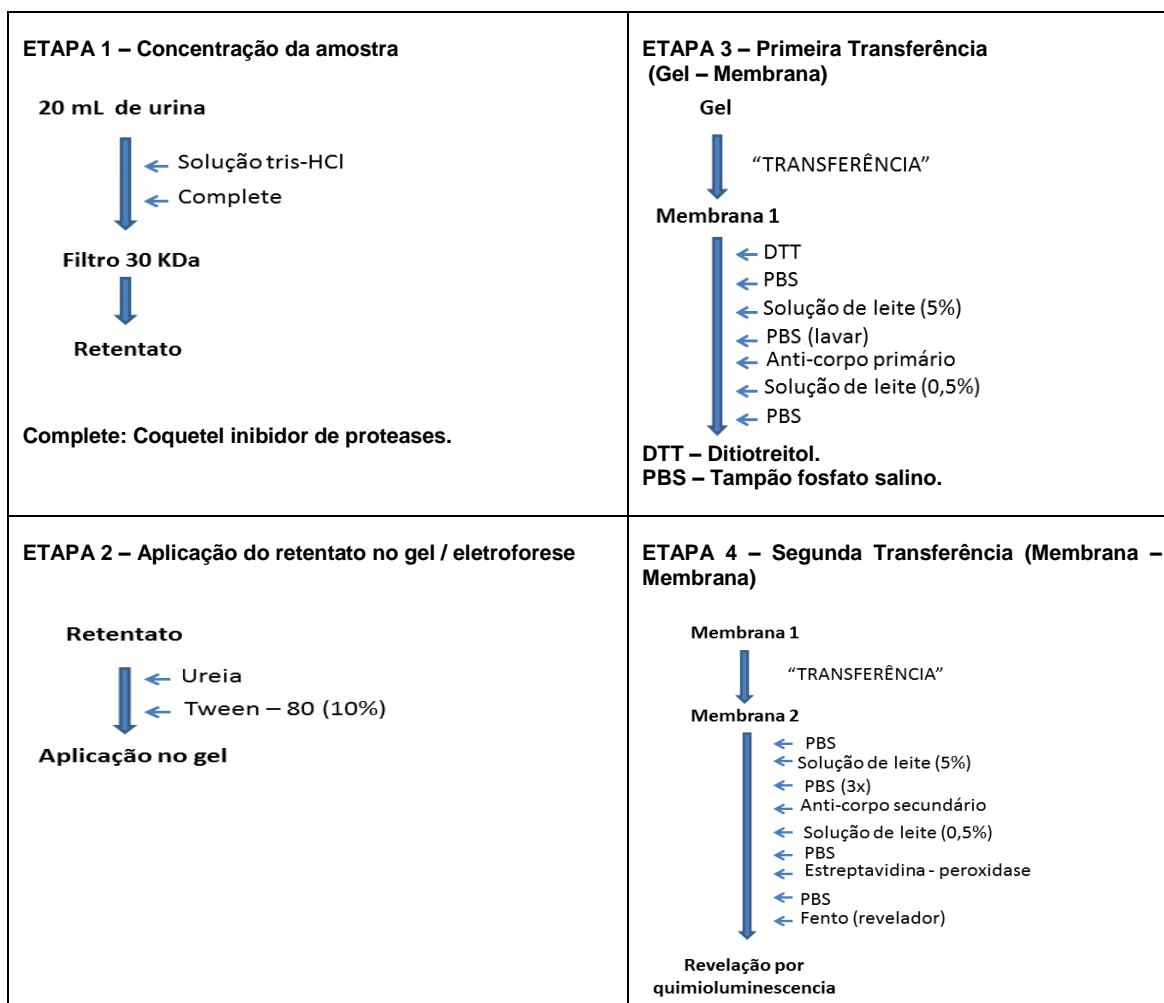
Etapa 1: Concentração da amostra / obtenção do retentato.

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 isoeletrica apresentado didaticamente dividido em quatro etapas.



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

Chave de Correção	
Item	Qtde de Pontos
a) Solução “Complete” – da ação de enzimas urinárias que clivem a cadeia da proteína alvo	2
b) Uréia - agente desnaturante / caotrópico	2
c) DTT – agente redutor	2
d) Estreptavidina-peroxidase - Formação do complexo avidina-biotina/ligação da enzima ao anticorpo secundário/amplificador do sinal	2
Total	8



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Concurso Público para provimento de vagas de cargos Técnico-Administrativos – Edital 342/2013
Chave de Correção da Prova Prática

Item B) O que é ponto isoelétrico?

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
pH no qual a carga global da proteína é nula	10

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 isoelétrico, migração, pH).

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Serão considerados textos que utilizem as palavras sugeridas e que apresentem coerência do ponto de vista técnico.	9

Item D. Descreva a função do anfólito na análise por focalização isoelétrica?

Chave de Correção	
Item	Qtde de Pontos
Distribuem e estabilizam o pH na fita do IEF.	9

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

Chave de Correção	
Resposta	Qtde de Pontos
Diminuir as ligações inespecíficas do anticorpo, melhorando a visualização do resultado final.	9