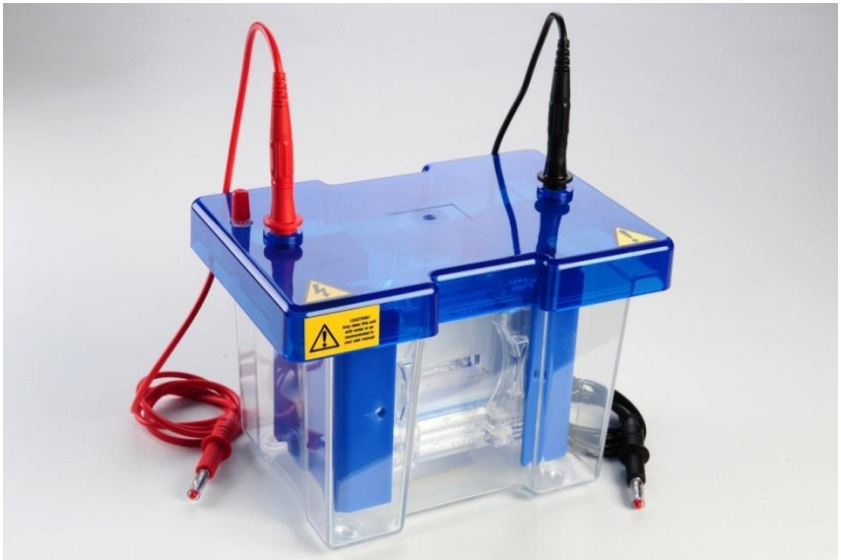
Cuba Vertical de Eletroforese



Manual do Usuário

ÍNDICE

1. Informações Gerais ____ *4*

1.1. Informações e Contatos do Distribuidor ____ **4**

1.2. Número de Registro na Anvisa ____ **4**

1.3. Responsável Técnico ____ **4**

1.4. Sobre este manual ____ **4**

2. Garantia ____ *4*

3. Informações de Segurança ____ *5*

4. Cuidados e Manutenção ____ *6*

5. Condições do Ambiente ____ *7*

6. Conteúdo da Embalagem ____ *7*

7. Preparando o Reservatório da Cuba Vertical de Eletroforese ____ *8*

7.1 Encaixe dos Cabos/Eletrodos ____ **8**

8. Usando o Sistema de Moldagem de Gel ____ *8*

8.1. Moldagem Vertical de Gel ____ **10**

8.2. Preparo do Gel ____ **12**

8.3. Seleção do Gel ____ **12**

8.4. Derramamento do Gel ____ **14**

8.4.1. Para Géis de Empilhamento ____ 14

8.4.2. Para Géis de Concentração ____ 15

8.5. Preparo de Amostras de Proteína Desnaturada para Carregamento ____ **15**

8.5.1. Preparação e Carregamento das Amostras _____ 16

9. Ensaio do Gel_____ 17

10. Soluções de Estoque para Géis SDS_____ 18

11. Acessórios _____ 20

12. Considerações Finais _____ 21

1. Informações Gerais

1.1. Informações e Contatos do Distribuidor

Kasvi Importação e Distribuição de Produtos para Laboratórios Ltda.
Avenida Rui Barbosa, 5525, Bloco B, Galpão 3 e 4
São José dos Pinhais/PR – CEP 83040-0900
CNPJ: 13.324.282/0001-24
Tel: (041) 3535-0900
Fax: (041) 3535-0901
DDG: 0800-726-0508
E-mail: kasvi@kasvi.com.br
Site: www.kasvi.com.br

1.2. Número de Registro na Anvisa

Produto não passível de regulamentação na Anvisa.

1.3. Responsável Técnico

Ayná S. Mendes
CRBio/PR: 66772/07-D

1.4. Sobre este manual

Este manual descreve os componentes, sua funcionalidade e a intenção de uso da Cuba Vertical de Eletroforese.

Este manual tem a finalidade de auxiliar os usuários na operação correta e segura da Cuba Vertical de Eletroforese. Vários avisos e observações estão inclusas neste manual para enfatizar instruções importantes.

2. Garantia

A Kasvi garante que a Cuba Vertical de Eletroforese em condições normais de operação, não apresenta defeitos de material ou mão-de-obra por um período de 12 meses a partir da data de compra. Esta garantia exclui danos resultantes de transporte, mau uso, descuido, ou negligência. A

responsabilidade da Kasvi referente à garantia do produto é limitada ao recebimento de evidências de que o defeito encontrado está dentro dos termos de garantia citados acima. Todas as reivindicações em relação à garantia devem ser apresentadas dentro de um ano a partir do recebimento desta unidade.

3. Informações de Segurança

Quando usada corretamente, a Cuba Vertical de Eletroforese não apresenta risco à saúde.

No entanto, essas unidades podem apresentar níveis perigosos de eletricidade e devem ser operadas apenas por pessoal qualificado, seguindo as orientações estabelecidas neste manual de instruções.

Qualquer pessoa que pretenda utilizar esse equipamento deve ler completamente o manual.

A Cuba Vertical de Eletroforese nunca deve ser usada sem a tampa de segurança. Além disso, não deve ser usada se houver qualquer sinal de dano ao reservatório externo ou à tampa.

Quando em solução, a acrilamida é uma neurotoxina poderosa.

Géis polimerizados podem conter solução não polimerizada. Portanto, utilizar luvas de proteção e vestuário adequado.

Estas unidades cumprem com seguintes as diretivas de segurança obrigatória:

- 73/23/EEC;
- DIRETRIZ DE BAIXA TENSÃO: IEC 1010-1:1990;
- EMENDAS 1:1992 EN 61010-1:1993/BS EN 61010-1:1993

4. Cuidados e Manutenção

O melhor método de limpeza para a **Cuba Vertical de Eletroforese** é a utilização de água morna e com detergente neutro. Água com temperatura acima de 60°C pode danificar a unidade e seus componentes.

O reservatório deve ser bem enxaguado com água morna ou com água destilada para evitar o acúmulo de sais, com bastante cuidado para não danificar os eletrodos. A limpeza pesada não é necessária e nem recomendada. Preferencialmente, deixar secar naturalmente antes de usar.

Para a limpeza, utilizar apenas:

- Água morna com um pouco de sabão ou com detergente neutro.
- Os detergentes compatíveis são: detergente líquido comum (para lavar louças), hidrocarbonetos hexano e alifático. Não deixar detergentes nas cubas por mais de 30 minutos.

Para evitar danos irreversíveis, nunca utilizar os seguintes agentes de limpeza:

- Acetona
- Fenol
- Clorofórmio
- Tetracloreto de carbono
- Metanol
- Etanol
- Álcool isopropílico
- Alcalinos.

Descontaminação de RNase:

- Limpar a cuba com detergente neutro, conforme descrito acima.
- Lavar com peróxido de hidrogênio (H2O2) 3%, por 10 minutos.
- Enxaguar com 0,1% de DEPC (dietilpirocarbonato), tratado em água destilada.

CUIDADO: Há suspeitas de que o DEPC é cancerígeno. Tome todos os cuidados necessários ao utilizá-lo.

Além das substâncias já mencionadas, é possível usar o produto RNaseZAP™ (Ambion). Leia as instruções para uso desta substância em reservatórios acrílicos para gel.

5. Condições do Ambiente

- Altitude máxima: 2.000m.
- Temperatura: entre 4°C e 65°C.
- Umidade relativa: máx. 80% para temperaturas de até 31°C com redução linear para 50% de umidade relativa a 40°C.
- Utilização em ambientes internos.

Este dispositivo é classificado com GRAU DE POLUIÇÃO 2, de acordo com a norma IEC 664: "Normalmente só ocorre poluição não condutiva". Às vezes, no entanto, pode-se esperar condutividade temporária causada por condensação.

6. Conteúdo da Embalagem

- 01 Cuba Vertical de Eletroforese
- 01 Manual do Usuário

As unidades apresentam: um reservatório, uma tampa, um módulo interno, eletrodos, e os seguintes acessórios:

Placas de Vidro	2 Placas de vidro para moldagem do gel, com espaçadores de 1mm. 2 Placas de vidro entalhadas 1 placa *dummy*
Pentes	2 pentes (1mm) para 12 amostras
Base de Moldagem	1 base de moldagem para Cuba
Pacote de Resfriamento	1 unidade

Cabos	1 par de cabos de conexão
CVS10KEY	1 unidade
Parafuso	4 unidades

7. Preparando o Reservatório da Cuba Vertical de Eletroforese

7.1 Encaixe dos Cabos/Eletrodos

1. Observar a posição da tampa da cuba. Isto indicará a polaridade e orientação correta dos cabos: o preto é negativo e o vermelho é positivo.
2. Remover a tampa da cuba. Observar que, se a tampa não for removida, o encaixe dos cabos poderá soltar o plugue dourado e danificar o eletrodo.
3. Nos orifícios designados, rosquear os cabos da melhor forma possível, de modo que não haja espaço entre a tampa e o encaixe do cabo.
4. Recolocar a tampa.

*A **Cuba Vertical de Eletroforese** está pronta para uso.*

8. Usando o Sistema de Moldagem de Gel

1. Limpar o conjunto de placas de vidro para cada gel, primeiro com água destilada e, então, com etanol 70%. Um conjunto de placas de gel é constituído de uma placa de vidro dentado e uma placa de vidro liso, com espaçadores fixos. Ao usar um conjunto triplo, são necessárias duas placas dentadas, um conjunto de espaçadores independentes e um conjunto de placas de vidro liso com espaçadores fixos. A placa lisa deve ser colocada na parte mais externa, seguida por uma placa dentada, espaçadores independentes e, então, uma segunda placa dentada. Como alternativa, são disponíveis placas dentadas com espaçadores fixos. Todos os acessórios, placas de vidro, módulos e base para moldagem devem estar completamente secos durante a

montagem. Componentes úmidos podem ficar desalinhados e provocar vazamentos.

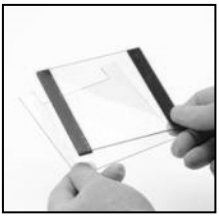
AVISO: Limpar o vidro com movimentos circulares e firmes.

2. Montar as placas de vidro de forma que o fundo das placas e os espaçadores estejam perfeitamente alinhados. Para conjuntos triplos, os espaçadores independentes levem estar bem alinhados, sendo que este alinhamento é melhor quando feito com um espaçador pequeno ou com um pente para afastar os espaçadores. Placas de vidro dentadas com espaçadores fixos não necessitam alinhamento manual.
3. A placa de inserção de gel contém barras de pressão que propiciam pressão uniforme sobre as placas de vidro e permitem transferência de pressão uniforme dos parafusos sobre a borda de vedação da placa de vidro, garantindo vedação completa. Certificar-se de que as barras de pressão estão abertas de acordo com a espessura do espaçador utilizado. A barra pode ser aberta soltando os parafusos. Ao usar um conjunto de vidro triplo, é necessário que as barras de pressão estejam na posição de abertura total.
4. Colocar a placa de inserção de gel sobre uma superfície plana. (Ainda não a colocar na base de moldagem.)
5. Inserir as placas de vidro na placa de inserção de gel e apertar totalmente os parafusos das barras de pressão, primeiro na parte superior e depois na parte inferior. Apertar de totalmente e de forma uniforme o parafuso, certificando-se para não balançar a cuba. Quando o ensaio é realizado com apenas um gel, a placa *dummy* deve ser usada na segunda posição e deve estar totalmente travada. Neste ponto, verificar se as bordas inferiores dos espaçadores e das placas de vidro estão bem alinhadas.
6. Colocar a placa de inserção de gel na base de moldagem de forma que os pinos sejam encaixados nos seus respectivos orifícios e que seus puxadores fiquem virados para baixo. Pode ser necessário pressionar um pouco o Módulo Interno para inserir os pinos.

7. Com os puxadores dos pinos virados para baixo, girá-los em 180°. Recomenda-se colocar os pinos em direções opostas em relação ao outro. Não os gire demais, pois isto poderá empurrar as placas de vidro para cima e o conjunto ficará mais propenso a vazamentos.

Agora, a unidade está pronta para a colocação e preparação do gel.

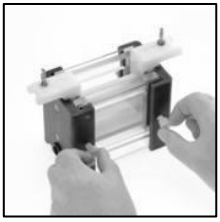
8.1. Moldagem Vertical de Gel



1. Juntar as placas de vidro com espaçadores com as placas dentadas.

2. Inserir na barra de pressão **interna** a placa de vidro dentada tocando a vedação e o módulo em uma superfície plana, **longe da base de moldagem.**

A. Opção de Versão com Parafuso

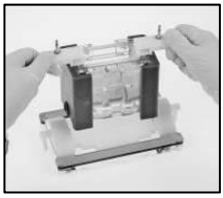


3A. Apertar totalmente os parafusos, certificando-se de não balançar a unidade.

4A. Inserir na base de moldagem. Empurrar os pinos nos orifícios. Girar os pinos a 180° ou até que estejam apertados. Não apertar demais.

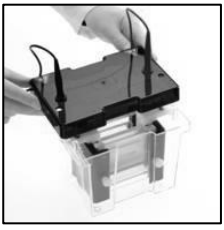
B. Opção Versão com Grampo Deslizante

3B. Deslizar totalmente os grampos, cuidando para não balançar a unidade



4B. Inserir na base de moldagem. Empurrar os pinos nos orifícios e girá-los a 180° ou até travá-los. Não apertar demais.

1. Despejar a solução de gel e aguardar o seu resfriamento. Em seguida, inserir o gel de empilhamento (*stacking gel*) e o pente.



2. Após a solidificação, transferir para o reservatório e preencher as camadas internas e externas.

8.2. Preparo do Gel

1. É sempre recomendado trabalhar com soluções em estoque, que permitirão a conveniência de adições e pouparão tempo durante a preparação do gel. Verificar no Capítulo 5 a lista de soluções para géis SDS PAGE, que devem ser preparadas antes do uso. Para mais informações sobre a fórmula do gel natural e as condições de funcionamento, consulte um manual do laboratório. O protocolo abaixo é fornecido para a utilização das soluções em estoque já mencionadas. Ele deve ser ajustado caso sejam utilizadas outras soluções estoque ou fórmulas de gel.
2. A Tabela 1, a seguir, mostra o volume total de solução de gel necessária. As demais tabelas trazem as quantidades de gel e as soluções para dois blocos de 1mm de gel, sendo assim, são necessários ajustes para corrida de um ou de mais de dois blocos de gel e para espaçadores com espessura de 0,75, 1,5 ou 2mm.

Tabela 1

Cuba Vertical de Eletroforese	
Bandeja	**Volume total para gel de 1mm.**
Para géis de diferentes espessuras, multiplicar as quantidades abaixo pelo tamanho do espaçador.	
Única – um gel, uma placa dummy	7.5mL
Dupla – dois géis	15mL
Placa Tripla – quatro géis	30mL

8.3. Seleção do Gel

Cuidar ao selecionar o tamanho do poro do gel a ser usado.

O tamanho do poro ou % de gel determina a capacidade de migração do gel, de acordo com o tamanho das proteínas.

Consulte a **Tabela 2** a seguir, que detalha qual a porcentagem de gel a ser usado para separar os tamanhos indicados de proteínas.

Tabela 2

Porcentagem de Acrilamida	Faixa de separação
5 %	60 - 220 KD
7.5 %	30 - 120 KD
10 %	20 - 75 KD
12%	17 – 65 KD
15 %	15 -45 KD
17.5%	12 – 30 KD

Preparar as soluções de gel conforme as tabelas a seguir. Os volumes de solução dados a seguir são o padrão para soluções de estoque. Elas devem ser misturadas delicadamente para evitar a formação de bolhas, que poderão inibir a polimerização pela remoção dos radicais livres.

TABELA 3: Preparação do gel de concentração para dois géis 10x10cm com espaçadores de 1mm

Solução	5 %	7.5%	10 %	12%	15 %	17.5%
Água destilada	8.7ml	7.5ml	6.3ml	5.25 ml	3.75ml	2.5ml
Solução estoque	2.5ml	3.75ml	5ml	6ml	7.5ml	8.75ml

de acrilamida 30%						
Solução TRIS de Resolução 4X	3.75ml	3.75ml	3.75 ml	3.75 ml	3.75m l	3.75ml
Persulfato de Amônia 10%	150µl	150µl	150µl	150µl	150µl	150µl

8.4. Derramamento do Gel

8.4.1. Para Géis de Empilhamento

1. Inserir o pente nas placas de vidro e marcar 1cm abaixo da ponta dos dentes do pente. Isto indica o local para adicionar a solução de gel.
2. Adicionar 15µL de TEMED à solução de gel, misturar bem, evitando a formação de bolhas.
3. Preencher novamente as placas de vidro, sempre evitando a formação de bolhas. O preenchimento deve ser feito de forma rápida, antes que o gel se torne muito viscoso devido ao TEMED.
4. Com cuidado, acrescentar 1mL de Isobutanol, Isopropanol ou água destilada ao gel. Ao usar água destilada, cuidar para não misturá-la à solução de gel.
5. Deixar a solução de gel polimerizar. Geralmente, isto leva em torno de 15 minutos, mas pode variar de acordo com os reagentes usados. Se levar mais tempo, utilize soluções de estoque mais frescas, ou adicione mais APS e TEMED.
6. Preparar o gel de empilhamento seguindo as instruções da Tabela 5 (abaixo). As soluções de estoque estão informadas no Capítulo 5 deste manual.

Tabela 5

Solução	Cuba Vertical de Eletroforese
Água destilada	4.2mL

Solução estoque de acrilamida 30%	0.65mL
Solução Tris de Gel Concentrado 4X	1.6mL
Persulfato de Amônio 10%	67µL

7. Misturar delicadamente a solução de gel concentrada, evitando a formação de bolhas.
8. Descartar o líquido sobrenadante e enxaguar o gel com água destilada.
9. Adicionar 6,7µl de TEMED à solução de gel concentrada, misturar bem. Usar uma pipeta Pasteur para encher totalmente as placas de vidro com a solução de gel de empilhamento.
10. Inserir cuidadosamente o pente, certificando-se de que não há bolhas de ar presas nas pontas dos dentes, pois poderão inibir a progressão da amostra.
11. Deixar o gel de concentração polimerizar por 30 minutos.

8.4.2. Para Géis de Concentração

1. Adicionar 15µl de TEMED à solução de gel, misturar bem, evitando a formação de bolhas.
2. Preencher novamente as placas de vidro, sempre evitando a formação de bolhas. O preenchimento deve ser feito de forma rápida, antes que o gel se torne muito viscoso devido ao TEMED.
3. Inserir cuidadosamente o pente, certificando-se de que não há bolhas de ar presas nas pontas dos dentes, pois poderão inibir a progressão da amostra.
4. Deixar a solução de gel polimerizar. Geralmente, isto leva em torno de 15 minutos, mas pode variar de acordo com os reagentes usados. Se levar mais tempo, utilize soluções de estoque mais frescas, ou adicione mais APS e TEMED.

8.5. Preparo de Amostras de Proteína Desnaturada para Carregamento

As instruções a seguir são destinadas às amostras desnaturadas. Para amostras naturais, consultar as orientações laboratoriais.

1. Preparar as amostras de proteína para carregamento. O volume de amostra depende da capacidade dos poços (Consultar a seção sobre a especificação do Pente).
2. Com um microtubo de centrifugação de 0,5ml ou com outro recipiente conveniente, combine a amostra de proteína e tampão de amostra 4X. É sempre recomendado usar marcadores de proteína em uma das linhas finais para indicar o tamanho das bandas. Estes devem ser preparados de acordo com as instruções dos fabricantes
3. Aquecer as amostras em banho-maria ou no banho seco por 2 minutos para desnaturar as amostras.
4. Centrifugar as amostras por 20 segundos a 12.000 rpm. As amostras de proteína estão prontas para serem carregadas.

8.5.1. Preparação e Carregamento das Amostras

1. Se desejar, ajustar o pacote de refrigeração nas extremidades do reservatório. Este deve ser encaixado com o lado maior posicionado lateralmente com as extremidades do reservatório e pressionado para dentro da cavidade. Observar que, como padrão, um pacote já é fornecido. Pacotes adicionais poderão ser adquiridos.
2. Transferir o módulo interno contendo os géis para o reservatório principal, na orientação correta, conforme indicado - **+ve** no módulo alinhado com **+ve** no reservatório, **-ve** do módulo alinhado com **-ve** no reservatório.
3. Preencher o reservatório com tampão 1X. Consultar no Capítulo 5 deste manual os tampões de ensaio recomendados. A Tabela 6, a seguir, mostra o volume de tampão necessário.

Tabela 6

Volume de Tampão	**Cuba Vertical de Eletroforese**
Mínimo – Os poços do reservatório interno são preenchidos totalmente. O reservatório externo é preenchido somente para irrigar o fundo das placas de vidro. O potencial de resfriamento está no mínimo e	250ml

não afeta a resolução.	
Máximo – Os poços do reservatório interno são preenchidos totalmente. O reservatório externo é preenchido até a linha delimitadora (máximo). O resfriamento é alto, promovendo boa resolução das amostras.	1200ml
Utilizando os pacotes de resfriamento – Os poços do reservatório interno são preenchidos totalmente. Os pacotes de resfriamento são inseridos atrás dos géis. O reservatório externo é preenchido até a linha delimitadora (máximo). O resfriamento está no máximo.	1000ml

4. Carregar as amostras nos poços com uma pipeta, tomando cuidado para não danificar os poços ou induzir a formação de bolhas.
5. Preencher os poços vazios com tampão 1X concentrado.
6. É bom observar a orientação e a ordem das amostras carregadas. Isto é feito observando quais amostras foram carregadas ao lado de cada eletrodo.

9. Ensaio do Gel

1. Tampar o dispositivo e liga-lo à fonte de energia.
2. Consultar a Tabela 7 para as configurações recomendadas da fonte de energia
3. Desligar o dispositivo quando o corante atingir o fundo do gel, ou antes disso, se as suas proteínas estiverem com tamanho abaixo de 4Kd.
4. Remover o módulo de ensaio do gel, mas primeiro despejar o tampão interno no reservatório principal. O tampão pode ser reutilizado, mas isso poderá afetar a qualidade do ensaio.
5. Desprender e levantar gentilmente as placas de vidro, separando-as. Normalmente, o gel vai ficar em uma das placas e poderá ser removido da seguinte forma: primeiro mergulhá-lo em tampão e, então, levantá-

lo delicadamente com uma espátula.

6. O gel agora está pronto para ser corado com *Cromassie* ou corante de prata, ou então as proteínas do gel poderão ser transferidas para uma membrana por *eletroblotting* para identificação específica de bandas e análise posterior.

Tabela 7

Tensão e Corrente Recomendadas para géis 12%, com espessura de 1mm	Cuba Vertical de Eletroforese
Um gel	90-225V 20-45mA
Dois géis	90-225V 40-90mA
Três géis	90-225V 60-135mA
Quatro géis	90-225V 80-180mA

10. Soluções de Estoque para Géis SDS

❖ **Solução de Estoque Gel Acrilamida 30%**

30.0g Acrilamida
0.8g Metilenobisacrilamida
Água destilada até completar 100mL

❖ **Estoque 4X da solução escolhida de gel tris (1.5M Tris.HCl pH8.8, 04% SDS)**

Para 110mL de água destilada, adicionar 36.4g de Tris Base
Adicionar 8mL de SDS 10%
Ajustar o pH para 8.8 com 1N HCl
Adicionar água destilada para ajustar o volume final até obter 200mL.

❖ **Estoque 4X de tris de concentração (1.5M Tris.HCl pH8.8, 04% SDS)**

Para 110mL de água destilada, adicione 12.12g de Tris base
Adicionar 8mL de SDS 10%
Ajustar o pH para 6.8 com 1N HCl

❖ **Estoque 4X tampão Tris-glicina - SDS**

36g Tris Base
172.8 Glicina
Água destilada até completar 3L

❖ **1X tampão Tris-glicina - SDS**

750mL de tampão Tris-glicina 4X - SDS
30mL de SDS 10%
Água destilada até completar 3L
Adicionar água destilada até obter o volume final de 200mL

❖ **AP 10% (solução persulfato de amônio)**

0.1g Persulfato de amônio
1mL de água destilada

❖ **TEMED**

❖ **Estoque de Tampão 4X Concentrado**

Glicerol 4mL
2mL de 2-mercaptoetanol
1.2g SDS
5mL Tampão Tris 4X
0.03g de Azul de Bromofenol
Fracionar em microtrubos de centrifugação de 1,5mL.
Armazenar a -20°C.

11. Acessórios

Código	Descrição	Volumes (µL) de amostra para gel de 5mm
K34-21	Placas de vidro 10x10 com espaçadores de 1mm anexos. Pacote com 2 unidades.	NA
K34-22	Placa de vidro 2mm de espessura. Pacote com 2 unidades.	NA
K34-23	Pente para 10 amostras, 1mm de largura.	40
K34-24	Pente para 12 amostras, 1mm de largura.	35
K34-25	Pente para 16 amostras, 1mm de largura, compatível com multicanal.	25
K34-26	Placa de vidro cortada com espaçadores de 1mm anexos. Pacote com 2 unidades.	NA
K34-27	Placas de vidro 10x10 com espaçadores de 0.75mm anexos. Pacote com 2 unidades.	NA
K34-28	Placas de vidro 10x10 com espaçadores de 1.5mm anexos. Pacote com 2 unidades	NA
K34-29	Pente para 10 amostras, 0.75mm de largura	30
K34-30	Pente para 20 amostras, 1mm de largura	20
K34-31	Pente para 12 amostras, 1.5mm de largura	50
K34-32	Espaçadores 10cm, 1mm de largura	NA
K34-33	Pente para 10 amostras, 1.5mm de largura	30

K34-34	Pente para 12 amostras, 0.75mm de largura	25
K34-41	Base de moldagem para Cuba K33-10V	NA
K34-42	Tampa sem cabos/ eletrodos para Cuba K33-10V	NA

12. Considerações Finais

- A reprodução de qualquer parte deste manual, em qualquer formato, sem o consentimento por escrito de seu emissor é proibida.

- O conteúdo deste manual está sujeito a alterações sem aviso prévio.

- Todas as providências foram tomadas para garantir a fidelidade do conteúdo deste manual, conforme aprovação técnica. Contudo, caso algum erro seja detectado, a Kasvi deseja ser informada sobre tal.

- Não obstante o acima exposto, a Kasvi não poderá assumir responsabilidade por nenhum erro neste manual ou pelas consequências decorrentes destes.