

GEMDYC - 512

GemDyc-512 é um padrão interno de peso molecular exigido durante a eletroforese de moléculas fluorescentes de DNA, cuja finalidade é indicar os diferentes tamanhos de fragmentos. O GemDyc-512 não apresenta qualquer desvio na indicação do tamanho do fragmento quando comparado a outros padrões internos e pode ser empregado nos sequenciadores automáticos modelos capilar e de placa de 36cm usando acrilamidas modificadas (Long Ranger/Biowhittaker Molecular Applications ou Page Plus/Amresco).

GemDyc-512 é uma solução estoque que contém uma multiplicidade de 17 fragmentos de DNA com tamanhos distintos variando de 62 a 512 pares de base (Figura 1). O DNA empregado é uma dupla fita assimetricamente marcada com um fluoróforo que substitui o LIZ. A fluorescência é detectada automaticamente tendo como finalidade a determinação do tamanho do fragmento referência misturado com os fragmentos presentes na amostra. Seu emprego é essencial para obtenção de alta precisão na classificação por tamanho dos fragmentos analisados.

USO: O padrão GemDyc-512 deve ser estocado a -20°C. Para o uso descongelar e mantê-lo refrigerado a 4°C. Se o uso não for constante aliquotar em volumes menores e manter congelado. Evite muitos congelamentos e descongelamentos ou freqüente mudanças de temperatura, pois alteram a estabilidade do produto. Ele é sensível à luz.

io em placa de 36cm com gel de acrilamida modificada:

- Homogeneizar o conteúdo do tubo;
- Misturar 0,3 µl do padrão GemDyc-512 com 2,5 µl de tampão formamida/blue dextran (fórmula descrita abaixo);
- Empregar para cada amostra um volume de 3,0 µl a mistura GemDyc-512/tampão formamida-blue dextran;
- Adicionar a um volume máximo de 4,5 µl da amostra;
- Aquecer a 92°C por 2 minutos, colocar em gelo e logo em seguida aplicar no gel.

NOTA:

- A amostra de DNA não deve ser mantida em formamida por muitas horas;
- O blue dextran facilita a visualização na aplicação da amostra no gel, mas seu uso não é necessário.

Para aplicação capilar:

- Homogeneizar o conteúdo do tubo;
- Misturar 0,6 µl do padrão GemDyc-512 com 11,4 µl de formamida ultrapura;
- Adicionar 1 µl do produto de PCR;
- Aquecer a 95°C por 2 minutos, colocar em gelo por 5 minutos e em seguida injetar;

NOTA:

- A amostra de DNA não deve ser mantida em formamida por muitas horas.

Tampão formamida/blue dextran: 0,5 g de blue dextran
500 µl de EDTA 0,5M pH8,0
25 ml de formamida
q.s.p. 35 ml de água deionizada

Figura 1

