## Quiz – Préparation des échantillons pour la polymérisation en chaîne (PCR)

*Les réponses sont disponibles à la fin de ce document.*

On veut amplifier un segment d’ADN. Voici la concentration ou quantité finale à utiliser recommandée par le manufacturier dans un volume de 50 µl pour effectuer la PCR.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Constituants | Concentration ou quantité initiale | Concentration ou quantité finale |
| Tampon de la polymérase | 10 X | 1 X |
| Amorce 5’ à 3’ | 10 µM | 1 µM |
| Amorce 3’ à 5’ | 10 µM | 1 µM |
| DNT | 40 mM | 0,2 mM chaque (0,8 mM) |
| Polymérase | 5 U/µl | 1,25 U |
| ADN | Dosage | 0,25 µg |
| Eau |  | Selon les volumes des autres constituants |
| Volume final |  | 50 µl |

Le dosage de l’ADN donne une concentration de 215 ng/µl (0,215 µg/µl).

Déterminer la quantité de chacun des constituants à placer dans le tube pour effectuer la réaction en tenant compte que le volume final sera de 50 µl.

**Réponses**

*Tampon de la polymérase*

C1 = 10 X C1 x V1 = C2 x V2

C2 = 1 X V1= 1X x 50 µl

V1 = ? 10 X

V2 = 50 µl = 5 µl

*Amorces 5’ à 3’*

C1 = 10 µM C1 x V1 = C2 x V2

C2 = 1 µM V1 = 1 µM x 50 µl

V1 = ? 10 µM

V2 = 50 µl = 5 µl

*Amorces 3’ à 5’*

C1 = 10 µM C1 x V1 = C2 x V2

C2 = 1 µM V1 = 1 µM x 50 µl

V1 = ? 10 µM

V2 = 50 µl = 5 µl

*dNTP*

C1 = 40 mM C1 x V1 = C2 x V2

C2 = 0,8 mM V1= 0,8 mM x 50 µl

V1 = ? 40 mM

V2 = 50 µl = 1 µl

*Polymérase*

Concentration de l’enzyme = 5 U/µl

On veut obtenir une quantité de 1,25 U

Si on place 1 µl, on a 5 U

 5 U = 1 µl

1,25 U x µl

x = 0,25 µl

*ADN*

Concentration de l’ADN = 0,215 µg/µl

On veut obtenir une quantité de 0,25 µg

Si on place 1 µl, on a 0,215 µg

0,215 µg = 1 µl

 0,25 µg x µl

x = 1,16 µl

Note : On placera 1,25 µl pour faciliter le pipetage, car ce volume ne dépasse pas les 0,5 µg maximum d’ADN qu’on peut placer pour effectuer la réaction de PCR.

*Eau*

Les volumes obtenus lors des calculs subséquents permettront de déterminer le volume d’eau à ajouter afin d’obtenir un volume final de 50 µl.

|  |  |
| --- | --- |
| **Constituants** | **Volume µl** |
| Tampon de la polymérase | 5 |
| Amorce 5’ à 3’ | 5 |
| Amorce 3’ à 5’  | 5 |
| dNTP | *1* |
| Polymérase | 0,25 |
| ADN | 1,25 |
| **Volume total (excluant l’eau)** | **17,5** |

En additionnant chacun des constituants présents dans le tube, on obtient un volume de 17,5 µl. Puisqu’on veut obtenir un volume final de 50 µl on soustraira ce volume de 50 (50 µl - 17,5 µl). Ainsi, il faudra ajouter 32,5 µl d’eau.