## Quiz – Préparation des échantillons pour utilisation des enzymes de restriction

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

On veut linéariser le plasmide pBR322 en utilisant le site de restriction EcoRV. Voici la concentration ou quantité finale à utiliser recommandée par le manufacturier dans un volume de 50 µl :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Constituants | Concentration ou quantité initiale | Concentration ou quantité finale |
| Tampon D | 6 X | 1 X |
| BSA | 10 µg/µl | 0,1 µg/µl |
| ADN |  | 1 µg |
| Enzyme EcoRV | 5 U/µl | 1 U (en excès de 2 à 10 fois) |
| Volume final |  | 50 µl |

Le dosage de l’ADN donne une concentration de 126 ng/µl (0,126 µg/µl).

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

**Réponses**

*Tampon D*

C1 = 6 X C1 x V1 = C2 x V2

C2 = 1 X V1 = 1 X x 50 µl

V1 = ? 6 X

V2 = 50 µl = 8,3 µl

*BSA*

C1 = 10 µg/µl C1 x V1 = C2 x V2

C2 = 0,1 µg/µl V1 = 0,1 µg/µl x 50 µl

V1 = ? 10 µg/µl

V2 = 50 µl = 0,5 µl

*ADN*

Concentration de l’ADN = 0,126 µg/µl

On veut obtenir une quantité de 1 µg

Si on place 1 µl, on a 0,126 µg

0,126 µg = 1 µl

1 µg x µl

x = 1 µg x 1 µl

0,126 µg

x = 7,94 (on placera 8 µl)

*EcoRV*

Concentration de l’enzyme = 5 U/µl

On veut obtenir une quantité de 1 U (en excès de minimum 2 fois à maximum 10 fois)

Si on place 1 µl, on a 5 U

5 U = 1 µl

1 U x µl

x = 1 U x 1 µl

5 U

x = 0,2 µl (1 U)

On veut obtenir les enzymes en excès de 2 à 10 fois, on placera donc 5 U.

x = 0,2 µl x 5 U

x = 1 µl

*Eau*

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

|  |  |
| --- | --- |
| Constituants | Volume µl |
| Tampon D | *8,3* |
| BSA | *0,5* |
| ADN | *8* |
| Enzyme | *1* |
| Volume total (excluant l’eau) | ***17,8*** |

En additionnant chacun des constituants qui sont dans le tube, on obtient un volume de 17,8 µl. Puisqu’on veut obtenir un volume final de 50 µl on soustraira ce volume de 50 (50 µl -17,8 µl). Ainsi, il faudra ajouter 32,2 µl d’eau.