

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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

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

Réponses

Tampon D

$$C1 = 6 X$$

$$C2 = 1 X$$

$$V1 = ?$$

$$V2 = 50 \mu\text{l}$$

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$V1 = \frac{1 X \times 50 \mu\text{l}}{6 X} \\ = 8,3 \mu\text{l}$$

BSA

$$C1 = 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$C2 = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$V1 = ?$$

$$V2 = 50 \mu\text{l}$$

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$V1 = \frac{0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 50 \mu\text{l}}{10 \mu\text{g}/\mu\text{l}} \\ = 0,5 \mu\text{l}$$

ADN

Concentration de l'ADN = 0,126 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

On veut obtenir une quantité de 1 μg

Si on place 1 μl , on a 0,126 μg

$$\frac{0,126 \mu\text{g}}{1 \mu\text{g}} = \frac{1 \mu\text{l}}{x \mu\text{l}}$$

$$x = \frac{1 \mu\text{g} \times 1 \mu\text{l}}{0,126 \mu\text{g}}$$

$$x = 7,94 \text{ (on placera } 8 \mu\text{l)}$$

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

$$\frac{5 \text{ U}}{1 \text{ U}} = \frac{1 \text{ } \mu\text{l}}{x \text{ } \mu\text{l}}$$

$$x = \frac{1 \text{ U} \times 1 \text{ } \mu\text{l}}{5 \text{ U}}$$

$$x = 0,2 \text{ } \mu\text{l} (1 \text{ U})$$

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

$$x = 0,2 \text{ } \mu\text{l} \times 5 \text{ U}$$

$$x = 1 \text{ } \mu\text{l}$$

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.