

Vous avez besoin de/d'

Échelle d'ADN qui contient des fragments de concentration connue appropriés à un échantillon inconnu.

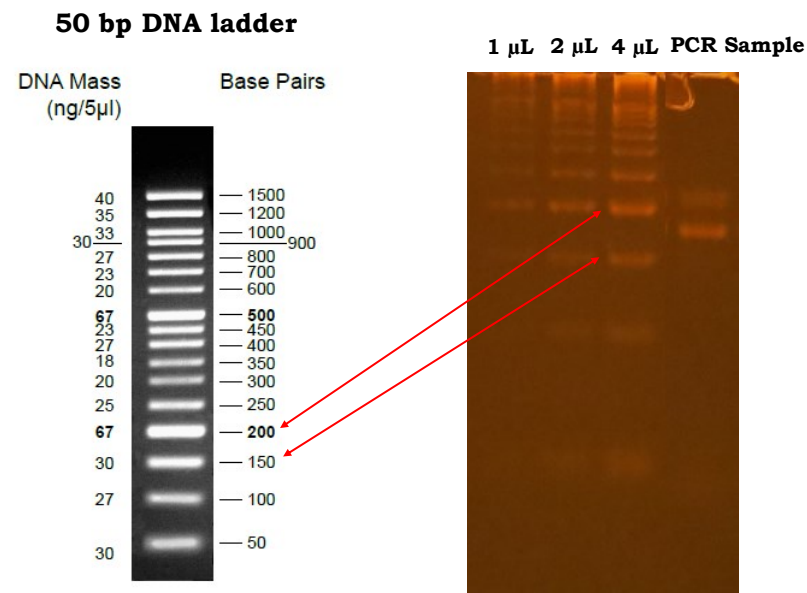
Un gel d'agarose ou hPAGE après électrophorèse avec des échantillons inconnus et des dilutions d'échelle d'ADN.

1. La préparation d'échelle d'ADN et des échantillons

1. Pour un gel hPAGE avec un peigne de gel à 55 puits, chaque puits peut être chargé avec un volume maximal de 4,5 μ L. Charger 1 μ L, 2 μ L et 4 μ L d'une échelle d'ADN appropriée.
2. L'échantillon inconnu (provenant d'une extraction d'ADN génomique ou d'un produit de PCR) nécessitera l'ajout d'un tampon de chargement. Notez le volume d'échantillon et le tampon de chargement ajoutés pour le calcul final.

2. Détermination de la concentration approximative d'ADN post-electrophoresis:

1. Après coloration au bromure d'éthidium, la concentration d'ADN de l'échantillon inconnu peut être estimée par visualisation et comparaison avec l'intensité de la «bande» inconnue et l'intensité des «bandes» des dilutions d'échelle d'ADN (par exemple 50 pb, 100 pb) ou DNA Lambda (48,5 Kb).
2. Les échelles d'ADN contiennent des fragments de concentrations connues répertoriées dans la fiche technique, par ex. 67 ng / 5 μ L. Recalculez la concentration du fragment pour le volume qui a été chargé sur le gel.
3. Après recalcul, la concentration approximative de l'échantillon inconnu peut être estimée. Si l'échantillon a été dilué lors du chargement, cela devra être pris en compte. Voir l'exemple suivant ci-contre.



Un échantillon de PCR (4 μ L) a été analysé sur un gel à 6% (hPAGE) à côté de 4 μ L, 2 μ L et 1 μ L de dilutions d'une échelle de 50 pb. Le gel a été post-coloré avec EtBr.

Pour estimer la concentration de l'échantillon de PCR inconnu, comparez visuellement l'intensité de la bande avec les dilutions d'échelle d'ADN de 50 pb comme suit: En regardant la bande d'échelle de 4 μ L, l'intensité de l'inconnu est inférieure à la bande de 200 pb mais supérieure à la bande de 150 pb.

Les bandes de 200 pb et de 150 pb ont respectivement une concentration de 67 et 30 ng / 5 μ L. Étant donné que 4 μ L d'échelle ont été chargés sur le gel, les concentrations de ces bandes peuvent être calculées pour être respectivement d'environ 53 ng et 24 ng / 4 μ L. L'intensité de l'échantillon inconnu étant plus proche de celle des 53 ng / 4 μ L, on estime que la concentration de l'échantillon PCR inconnu est de 44 ng / 4 μ L ou 11 ng / μ L.

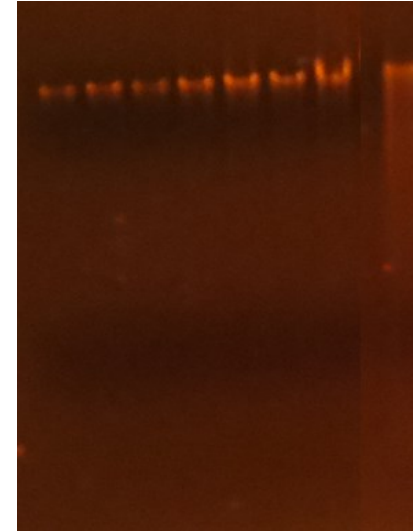
3. Estimation de l'ADN génomique

1. La quantité d'ADN génomique obtenue à partir d'une extraction CTAB peut être estimée par comparaison avec une solution standard d'ADN Lambda¹. DNA Lambda montrera une bande sur un gel d'agarose ou de hPAGE.
2. Préparer des dilutions d'ADN Lambda et des échantillons inconnus comme pour une échelle d'ADN (section 2).
3. La concentration approximative de l'échantillon inconnu peut être estimée. Si l'échantillon a été dilué lors du chargement, cela devra être pris en compte. Voir l'exemple ci-contre:

Remarques:

¹ L'ADN Lambda (non coupé) est fourni en solution et doit donc être expédié à -20 ° C. Si cette norme est requise, veuillez contacter le Kirkhouse Trust.

1.7
2.5
4.2
5.8
8.3
Lambda DNA (ng/μL)
10.8
12.5



Un échantillon d'ADN génomique inconnu (dilué à 1:10) a été analysé sur un gel d'agarose à 0,8% à côté de diverses dilutions d'ADN lambda. Le gel a été post-coloré avec EtBr.

Pour estimer la concentration de l'échantillon d'ADN génomique inconnu, comparer visuellement l'intensité de la bande avec les dilutions d'ADN lambda.

L'intensité de l'échantillon d'ADN génomique inconnu est apparue plus brillante que la bande d'ADN lambda pour 5,8 ng / μL, mais inférieure à la bande pour 8,3 ng / μL

L'échantillon d'ADN génomique inconnu peut être estimé comme suit:

Les deux bandes d'ADN lambda correspondantes ont une concentration de 5,8 et 8,3 ng / μL respectivement. Par conséquent, la concentration approximative de l'échantillon d'ADN génomique inconnu dilué est de 7 ng / μL ou d'un