

### EXERCICE 1 (7 POINTS):

**1-A)** Quelle relation existe-t-il entre I et I<sub>0</sub> et A ? Rappeler la loi de Beer-Lambert. Lorsque la cuve contenant la solution est placée dans un spectroscope, elle reçoit un rayonnement d'intensité I<sub>0</sub>. Une partie de cette lumière incidente notée I<sub>0</sub> est absorbée par le milieu et le reste, noté I, est transmis. L'intensité du rayonnement issu de la cuve est donc inférieure à l'intensité du rayonnement initial (I<sub>0</sub>). (0,5)

La fraction de la lumière incidente absorbée par une substance de concentration C contenue dans une cuve de longueur l est donnée par la loi de Beer-Lambert :  $A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$ . (0,5)

**1-B)** Les concentrations des oligonucléotides. loi de Beer-Lambert :  $A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$ .

O1- 5' AAA AAA AAA AAA AAA AAA 3' (0,5)

$$C = 20,75 * 33 = 684,75 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

O2-5' CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT CCT TTT CCC 3' (0,5)

$$C = 36,96 * 33 = 1219,68 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

O3 -5' CTC AAT TGT AGG TAG TAG TTC 3'(0,5)

$$C = 19,97 * 33 = 659,01 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

**Ou bien**

O1- 5' AAA AAA AAA AAA AAA AAA 3'

$$C = 20,75 * 25,41 = 527.26 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

O2-5' CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT CCT TTT CCC 3'

$$C = 36,96 * 38,18 = 1411.13 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

O3 -5' CTC AAT TGT AGG TAG TAG TTC 3'

$$C = 19,97 * 32,19 = 642.83 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

**2-A)** Les acides nucléiques absorbent dans l'UV à  $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$  (0,5)

**2B)** Les concentrations des oligonucléotides

**Extraction A : QIAamp**

loi de Beer-Lambert :  $A = \log(I_0/I) = \epsilon l C$ .

$$A_{260} = \approx 34$$

$$C = 34 * 33 = 1122 \text{ ng/}\mu\text{l} \text{ (0,5)}$$

**Extraction B : Trizol**

$$A_{260} = \approx 38$$

$$C = 38 * 33 = 1254 \text{ ng/}\mu\text{l} \text{ (0,5)}$$

**3-A)** La pureté des acides nucléiques des deux extractions.

**Extraction A : QIAamp**

$$A_{260} / A_{230} = 2.3. \text{ (0,25)}$$

$$A_{260} / A_{280} = 1.9 \text{ (0,25)}$$

**Extraction B : Trizol**

$$A_{260} / A_{230} = 1.2 \text{ (0,25)}$$

$$A_{260} / A_{280} = 1.3 \text{ (0,25)}$$

**3-B)** La pureté des acides nucléiques des deux extractions. Le spectre et les ratios A<sub>260</sub> /A<sub>230</sub> et A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> des oligonucléotides (extraction Trizol) sont décalés par rapport à l'extraction QIAamp. Le ratio A<sub>260</sub> /A<sub>230</sub> est un indicateur de pureté (un ratio 260 /A<sub>230</sub> compris entre 2 et 2.2 indique une bonne pureté des acides nucléiques. Plusieurs contaminants absorbant à 230 nm proviennent de l'échantillon ou de la purification, comme par exemple le pheno, Trizol et EDTA. (1). Le ratio A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> est compris entre 1.8 et 2 pour l'ADN. Ce ratio est plus souvent utilisé pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques. (1)

**EXERCICE 2 (6 POINTS):** La loi de Berr-Lambert exprime la variation de l'intensité lumineuse en fonction de la distance parcourue dans un milieu transparent. Lorsqu'une lumière monochromatique d'intensité  $I_0$  traverse un milieu homogène, l'intensité de la lumière émergente  $I$  décroît exponentiellement lorsque l'épaisseur  $l$  du milieu absorbant augmente. (0,5 points).  $a$  est une constante appelée coefficient d'absorption, caractéristique du milieu et de la longueur d'onde considérés. Dans le cas des solutions, la loi de Beer fait intervenir les concentrations. Où  $e$  est un coefficient caractéristique de la substance appelé coefficient d'absorbance ( $L mol^{-1} cm^{-1}$ ),  $l$  est l'épaisseur de la cuve (cm) et  $c$  la concentration de la solution (mol/L). Cette loi est vérifiée lorsque la solution est de concentration inférieure à :  $c < 0,1 mol.L^{-1}$ . (0,5 points)

La relation fondamentale utilisée en spectrophotométrie est présentée sous la forme :  $A = \log(I_0/I) = elc$  ( $A$  est l'absorbance ou densité optique)  $e$  est une caractéristique de la molécule. Plus  $e$  sera grand, plus la solution absorbe. (1 points)

**\*) Coefficient d'absorbtion molaire  $e$  : (2 points)**

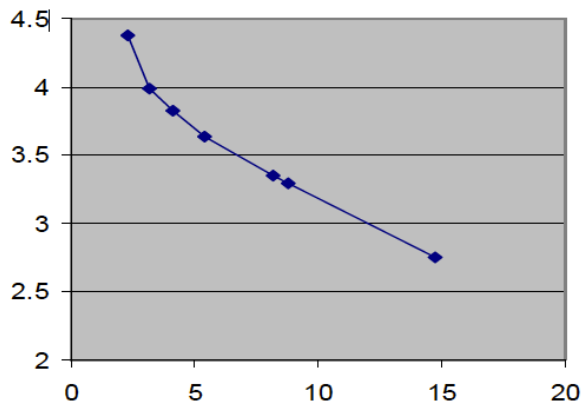
$$e = A/(l C) = 0,02 / 10^{-5} = \underline{2000 L mol^{-1} cm^{-1}}$$

**\*) Concentration maximale que l'on puisse mesurer : (2 points)**

$$C_{max} = A_{max} / (el) = 2 / 2000 = \underline{1 \cdot 10^{-3} mol/L}$$
, valeur très faible

**EXERCICE 3 (7points) :** À l'aide des valeurs du tableau I, tracer la courbe étalon : (4 points)

Log taille (pb) = f(distance de migration)



2) À partir de cette courbe, déduire la taille des fragments issus de la digestion par l'enzyme de restriction Sal I de l'ADN du cosmide recombinant (piste 4). (2 points)

Migration (cm)	Taille (Pb)
2.	14692
3.2	11434
3.6	9165
4.1	7179
6.5	3021
SOMME	45490

3) La somme des tailles des fragments obtenus vous semble-t-elle en accord avec la taille attendue de 48,6 kpb ? La somme est plus faible. Cela peut être dû notamment aux incertitudes qui peuvent être importantes en particulier pour les fragments de grande taille (voir allure courbe) ou à deux bandes très proches qui n'auraient pas été différenciées à la lecture (1points).