

**Exercice 1 (7 points) :** En mesurant l'absorbance d'une solution d'acide nucléique pure à 260 nm, on obtient sa concentration à l'aide de l'équation de la loi Beer-Lambert. Le trajet optique des cuves utilisées est de 1 cm. Ces coefficients d'extinction sont listés ci-dessous: ADN simple brin =  $\sim 33 \text{ ng.cm}/\mu\text{l}$ ,      ADN simple brin:  $0,027 (\mu\text{g/mL})\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Oligo sequence	Oligo-specific conversion factor ( $\mu\text{g}/A_{260}$ )	$A_{260}$
AAA AAA AAA AAA AAA AAA	25.41	20.75
/56-FAM/CCC CCT TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT CCC TTT CCC CCT TTT CCC	38.18	36.96
CTC AAT TGT AGG TAC TAC TTC	32.19	19.97

**Questions 1 :**

- A- Quelle relation existe-t-il entre I et I<sub>0</sub> et A ? Rappeler la loi de Beer-Lambert.
- B- Calculer les concentrations des oligonucléotides.

**Question 2 :**

Le Kit QIAamp est un système ayant recours à la technologie des membranes de silice pour l'isolation et purification de l'ADN génomique. La méthode Trizol utilise un produit chimique qui contient de l'isothiocyanate de guanidinium et du phénol.

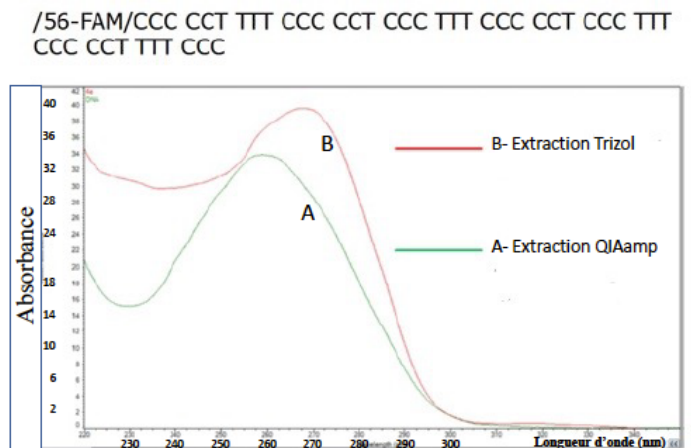
- A- Quelle est la longueur d'onde optimale ( $\lambda_{\text{max}}$ ) pour une analyse quantitative ?
- B- Calculer les concentrations des oligonucléotides.

**Question 3 :**

Plusieurs paramètres basés sur les absorptions spectrophotométriques sont utilisés pour analyser la pureté d'une solution d'acides nucléiques.

- A- Analyser la pureté des acides nucléiques deux extractions.
- B- Interpréter les résultats.

**Figure:** Spectre typique relatif à un dosage d'acides nucléiques. A- Extraction QIAamp. Extraction Trizol.



**Exercice 1 (6 points) :** Les indicateurs colorés acido-basiques, appelés aussi molécules sondes de pH, sont des molécules dont les propriétés spectroscopiques, en général l'absorption dans l'UV-visible, dépend du pH de la solution. Elles présentent l'avantage d'être efficaces à des concentrations très faibles. Cette technique est l'une des rares permettant une mesure de pH dans des volumes inférieurs au  $\text{mm}^3$  et allant jusqu'au  $\text{mm}^3$ . Dans toute la suite la largeur de la cuve est  $l = 1 \text{ cm}$  et le solvant est l'eau. Une solution de colorant de concentration  $C$ , absorbant à une longueur d'onde  $l$  avec un coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$ , est placée dans une cuve de longueur  $l$  à l'intérieur d'un spectromètre UV-visible. A partir du rapport de l'intensité mesurée  $I$  sur l'intensité initiale  $I_0$ , on peut déduire l'absorbance  $A$  ou densité optique.

- 1) Quelle relation existe-t-il entre  $I$ ,  $I_0$  et  $A$  ? Rappeler la loi de Beer-Lambert.
- 2) Une solution de concentration  $C = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$  présente une absorbance de 0,02 dans une cuve de trajet optique de 1 cm. Quel est le coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$  de la molécule ? Quel est son unité ? Sachant qu'il n'est pas possible de mesurer des absorbances supérieures à 2, quelle est la concentration maximale que l'on puisse mesurer ?

### Exercice 3 (7 points) :

L'ADN d'un plasmide de 48,6 kpb a été hydrolysé par l'enzyme de restriction Sal I. Cet ADN est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose (pistes 2 et 4). Un marqueur de taille (l'ADN du phage lambda hydrolysé par l'enzyme de restriction Hind III) est déposé dans les puits 1 et 3. Ce marqueur de taille est un mélange équimolaire de fragments d'ADN de tailles connues. La quantité d'ADN total déposé dans les puits 1 et 2 est le double de celle des puits 3 et 4. Après coloration par le bromure d'éthidium\*\*, l'image suivante est obtenue.

- 1) Tracer la courbe étalon :  $\text{Log taille(pb)} = f(\text{distance de migration})$ .
- 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).
- 3) La somme des tailles des fragments obtenus vous semble-t-elle en accord avec la taille attendue de 48,6 kpb ?

- 1) Tracer la courbe étalon :  $\text{Log taille(pb)} = f(\text{distance de migration})$ .
- 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).
- 3) La somme des tailles des fragments obtenus vous semble-t-elle en accord avec la taille attendue de 48,6 kpb ?

