**Module : Biologie moléculaire**

**Niveau : Master 2**

**Spécialité : Biochimie**

**Série de TD N° 3**

**Sur l’extraction et la purification des acides nucléiques**

**Exercice 1 :**

Trois plasmides sont purifiés pour être utilisés comme vecteurs d’expression dans des cellules eucaryotes. On mesure leur absorbance à 260 et 280 nm après dilution au 1/50ème dans l’eau. Les résultats obtenus pour les trois solutions contenant les plasmides a, b et c sont :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Solution  | ƛ (nm) |  |  |
| 260 | 280 |  |
| DO a | 0.901 | 0.541 |  |
| DO b | 0.557 | 0.273 |  |
| DO c | 0.865 | 0.471 |  |

1. Pourquoi mesure-t-on la DO à 260 et 280 nm ? Sachant qu’une unité d’absorbance correspond à une concentration de 50 μg/ml. Commentez les résultats et calculez la concentration en μg de plasmide/μl des solutions a, b et c.

**Exercice 2 :**

1- Le dosage d'une solution d'ADN par spectroscopie à 260 nm indique une absorbance (DO) de 0,78. Quelle est la quantité d'ADN contenue dans 15μl de cette solution?

Rappel : ADN : 1DO = 50 ng/μl

ADN dénaturé : 1DO = 37 ng/μl

2- La concentration d'une solution d'ADN est déterminée par spectroscopie UV.

La valeur de DO mesurée est de 0,456. Parmi les propositions suivantes, répondre par vrai ou faux en justifiant brièvement les réponses.

a- La longueur d'onde utilisée pour réaliser ce dosage est de 260 nm car les groupements phosphates de l’ADN sont responsables de l'absorbance dans l’UV

b- Sachant que la DO de cette même solution mesurée à la longueur d'onde de 280 nm est de 0.230, on peut considérer que cette solution n'est pas contaminée par des protéines

c- La concentration en ADN de cette solution est de 109.65 mg/l.

**Exercice 3 :** Interprétation de l'extraction de l'ADN plasmidique par lyse alcaline:
Les techniques les plus courantes de l'extraction et la purification de l'**ADN des plasmides** par lyse alcaline ont des noms abrégés selon 'miniprep', 'midiprep' et 'maxiprep' (selon le volume de laculture bactérienne). Le but consiste à faire une extraction rapide de l'ADN du plasmide (ADN plasmidique) afin de faire une analyse par digestion *via* les **enzymes de restriction** et la séparation par **électrophorèse**. Les digestions servent à vérifier un clone et/ou établir une **carte de restriction**.
Expliquer les différentes étapes de l'extraction de l'ADN plasmidique par **lyse alcaline** comme résumée dans la figure ci contre.

