**Principes de la détermination spectrophotométrique de l’ADN** Un spectrophotomètre utilise la transmission de la lumière à travers une solution pour déterminer la concentration d’un soluté à l’intérieur de la solution. L’appareil fonctionne suivant un principe simple dans lequel de la lumière d’une longueur d’onde connue traverse un échantillon et où la quantité d’énergie lumineuse transmise est mesurée à l’aide d’une cellule photoélectrique placée de l’autre côté de l’échantillon. Comme le montre la Figure 4, la conception du spectrophotomètre à simple faisceau implique l’utilisation d’une source lumineuse, d’un prisme, d’un support d’échantillon et d’une cellule photoélectrique. Les mécanismes électriques ou mécanismes adéquats pour contrôler l’intensité d’éclairage, la longueur d’onde et la conversion d’énergie reçue au niveau de la cellule photoélectrique à diverses tensions sont reliés à chacun des composants. La fluctuation des tensions s’affiche ensuite sur une échelle exprimée en mètres ou est enregistrée sur un ordinateur à l’aide d’une connexion en vue d’un examen ultérieur.



Toutes les molécules absorbent de l’énergie radiante à une longueur d’onde spécifique à partir de laquelle il est possible d’extrapoler la concentration d’un soluté à l’intérieur d’une solution. Selon la loi de Beer-Lambert, il existe une relation linéaire entre l’absorption A (également appelée densité optique, DO) et la concentration de la macromolécule qui est donnée par l’équation suivante : A = OD = εlc,

1. **ε:** est égal au coefficient d’extinction molaire, m-1mol-1.l
2. **c:** indique la concentration, mol.m-3
3. **l :** représente la longueur de parcours de la cuvette, en général = 1cm

 Les protéines et les acides nucléiques absorbent la lumière dans la plage des ultraviolets dans des longueurs d’onde comprises entre 210 et 300 nm. Comme expliqué précédemment, l’absorbance maximale de solutions ADN et ARN est fixée à 260 nm, tandis que l’absorbance maximale de solutions à base de protéines est de 280 nm. Dès lors, tant les solutions d’ADN que les solutions d’ARN absorbent partiellement la lumière à 280 nm, tandis que les solutions de protéines l’absorbent partiellement à 260 nm. Le ratio entre les valeurs à 260 nm et à 280 nm (A260/A280) fournit une estimation du degré de pureté des acides nucléiques. Des préparations pures d’ADN et d’ARN ont des valeurs à A260/A280 de 1,8 et 2,0 respectivement. Sur une longueur de parcours de 10 mm avec une longueur d’onde de 260 nm, l’absorption A = 1 correspond à environ 50 µg/ml de dsADN, environ 37 µg/ml de ssADN, 40 µg/ml d’ARN ou environ 30 µg/ml d’oligonucléotides. En cas de contamination par une protéine, le rapport A260/A280 sera nettement inférieur aux valeurs données ci-dessus et une quantification précise de la quantité d’acide nucléique ne pourra être envisagée. Une absorbance de 325 nm peut être utilisée pour indiquer la présence de débris dans la solution ou révéler que la cuvette elle-même est sale

**2- mode opératoire**

**Matériels :**

-spectrophotomètre

- Cuve de 1 ml

- Pipettes 1000µl + 10µl

- eau distillée

**Méthodes :**

1. Mettre 1000 µl d’eau distillée dans une cuve pour mesurer le zéro expérimental
2. Ajouter 10 µl d’ADN dans un tube contenant 990 µl d’eau distillée . vortexer bien le mélange et le transverser dans une cuve
3. Apres avoir fait le zéro sur la cuve d’eau distillée, mesurer la DO à 260nm
4. Fait le zéro une autre fois à 280 nm et mesurer ensuite la DO
5. Calculer le rapport DO260/DO280 pour évaluer la pureté de l’ADN.