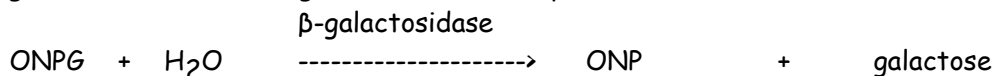


Etude de la β -galactosidase de *E. Coli* : étude de la cinétique d'inactivation à 56°C

La β -galactosidase d'*Escherichia coli* catalyse l'hydrolyse du substrat synthétique 2-nitrophényl- β -galactoside (ONPG) en galactose et 2-nitrophénol (ONP) selon la réaction irréversible :



A pH alcalin, L'ONP absorbe fortement à 415 nm et la réaction peut ainsi être aisément suivie par des mesures d'absorbance. L'ONPG n'absorbe pas. L'enzyme possède un comportement michaélien.

Il s'agit d'étudier la cinétique d'inactivation de l'enzyme exposée à la température de 56°C.

Le standard de mesure de l'activité sera le suivant (voir aussi le TP correspondant au polycopié référencé tp-betagal-initiation-michaelis.odt) :

Tube 0min	Tube 4 min
<ul style="list-style-type: none"> - 1,95 mL de tampon P et 1 mL d'ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P. - 1ml de solution d'arrêt (carbonate de sodium 1M + EDTA 4 mM). - 0,05 mL de solution de β-galactosidase. - Homogénéiser. 	<ul style="list-style-type: none"> - 1,95 mL de tampon P et 1 mL d'ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P, équilibration à 37°C. - 0,05 mL de solution de β-galactosidase. - Homogénéiser (temps zéro de réaction). - Arrêter au bout de 4 min par 1ml de solution d'arrêt. - Procéder en tubes décalés pour optimiser la durée de la manipulation.
<p>Lire à 415 nm contre le tube « 0 ».</p> <p>Par convention, 1 unité locale d'enzyme (UL) catalyse 1 μmol d'ONPG par minute dans le standard local.</p>	

Avec:

- Tampon P désigne un tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7,0 + 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L + MgCl_2 1 mmol/L + substrat ONPG 5 mmol/L.
- Réactif d'arrêt désigne une solution Na_2CO_3 1 mol/L + EDTA 4 mmol/L.

La préparation enzymatique β -galactosidase de départ est à conserver à 0-4°C (solution commerciale à 1500 U/mL diluée au 1/500 en tampon P).

Données : L'ensemble des données établies lors des séances correspondant aux polycopiés référencés tp-betagal-initiation-michaelis.odt et tp-betagal-effettemperature.odt

1. Eléments de mode opératoire pour étudier la cinétique d'inactivation à 56°C

Préparer une série de microtubes à fermeture étanche mais ouverts et **préincubés** dans le bloc de thermostatisation à 56,0°C (de petits tubes éviteront les artefacts d'évaporation).

Préparer à proximité un bac de glace pillée fondante.

On pourra ainsi tester 8 durées d'exposition de la solution enzymatique à 56°C : 2, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 18 minutes. Le volume de solution d'enzyme à utiliser dépend des microtubes utilisés. Pour des raisons économiques, travailler avec du matériel permettant des volumes de 100 μ L.

L'action inactivatrice de la température de 56°C sera stoppée par refroidissement brutal à 0-4°C (glace pilée fondante). Les phénomènes liés à la condensation d'eau sur les parois des tubes après refroidissement sont résolus par centrifugation à 13000g pendant 2 minutes.

L'activité résiduelle pourra alors être mesurée selon le standard à 37°C présenté dans l'introduction.

Il faut évidemment tester aussi la durée « 0 », pas d'exposition à 56°C, référence d'activité.

2. Travail à réaliser

- Manipulation présentée au paragraphe 1
- Compte-rendu :
 - ✓ résultats expérimentaux ;
 - ✓ graphe activité résiduelle = f(temps de séjour à 56°C) ;
 - ✓ traitement des résultats expérimentaux traitant un modèle cinétique d'inactivation d'ordre 1 ;
 - ✓ conclusion.

Risques, sécurité, déchets

Les réactifs utilisés sont fournis prêts à l'emploi.

Le tampon contient du 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L, une concentration qui permet la manipulation du tampon prêt à l'emploi dans les conditions usuelles de laboratoire (consulter les documents de risques et sécurité pour la manipulation du 2-mercaptoéthanol concentré).

La solution d'arrêt est une solution alcaline concentrée, le port des lunettes de sécurité est nécessaire. La charge en EDTA à 4 mM est très faible.

Bibliographie

- G. Durliat, Travaux pratiques avec la β -galactosidase, 1^o partie, L'opéron, 1992:18:3-18
- Agrégation de Biochimie-génie biologique, TP de biochimie, session 1983
- Concours commun « Agro » série A TB, Techniques biochimiques, session 2002
- D. Loncle, Génie enzymatique, Doin éditeur, 1992