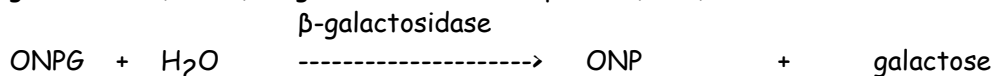


Etude de la β -galactosidase de *E. Coli* : étude de la cinétique d'inactivation à 54°C

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 54°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 std-0	Tube std-4
<ul style="list-style-type: none"> - 1560 μL de tampon P et 800 μL d'ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P. - 800 μL de solution d'arrêt (carbonate de sodium 1M + EDTA 4 mM). - 40μL de solution de β-galactosidase. - Homogénéiser. 	<ul style="list-style-type: none"> - 1560 μL de tampon P et 800 μL d'ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P, équilibration à 37°C. - 40 μL de solution de β-galactosidase. - Homogénéiser (temps zéro de réaction). - Arrêter au bout de 4 min par 800 μL de solution d'arrêt.
<p>Lire à 415 nm contre le tube « std-0 ». Par convention, 1 unité d'enzyme (UL) catalyse 1 μmol d'ONPG par minute dans le standard.</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.

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 54°C

Voir aussi l'organigramme présenté plus loin.

La préparation enzymatique β -galactosidase de départ est à conserver à 0-4°C (solution commerciale à 1500 U/mL diluée au 6/75 en tampon P, 20 μL pour une manipulation).

Préparer une série de 9 tubes (numérotés z0, z1,5, z2,5, z5, z7, z10, z12, z15, z18) contenant chacun 1560 μL de tampon P et 800 μL d'ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P et équilibrer à 37°C. Ces tubes seront utilisés pour mesurer les activités résiduelles selon le standard de mesure d'activité.

Porter la préparation enzymatique à 15°C. Préchauffer à 54°C un tube chargé de 780 μL de tampon P. Préparer un chronomètre. Ajouter 20 μL de préparation enzymatique, homogénéiser très très rapidement et préservé absolument la température de 54°C et déclencher le temps zéro des opérations environ 15 secondes après le mélange. Puis travailler selon :

Temps	40 μL d'enzyme à 54°C à transférer dans le tube z_i à 37°C ; homogénéisation immédiate, température 37°C à préserver pour 4 min de cinétique	Ajout de 800 μL de solution d'arrêt dans le tube z_i et homogénéisation	
0	z0		Une fois les cinétiques arrêtées (4min à 37°C), les tubes sont lus à 415 nm contre le tube std-0 (de standard d'activité!) comme présenté en introduction lors de la définition du standard de mesure d'activité.
1,5 min	z1,5		
2,5 min	z2,5		
4 min		z0	
5 min	z5		
5,5 min		Z1,5	
6,5 min		Z2,5	
7 min	z7		
9 min		z5	
10 min	z10		
11 min		z7	
12 min	z12		
14 min		z10	
15 min	z15		
16 min		z12	
18 min	z18		
19 min		z15	
22 min		z18	

Notes :

- si on considère que la préparation enzymatique est à 10°C et que le tampon est bien à 54°C. Introduire 20 μL dans 780 μL conduit à une température de mélange d'environ $(20 \cdot 10 + 780 \cdot 54) / 800 = 52,9^\circ\text{C}$. En microtube de 1,5 mL, en bloc chauffant à sec, on pourra considérer que la remontée à 54°C est réalisée en 15 s et qu'on a pas trop perdu d'enzyme. On pourrait faire mieux introduisant un volume plus faible de préparation enzymatique de départ plus concentrée dans plus de tampon à 54°C. C'est une question de compromis en tenant compte du coût de la manipulation et du matériel disponible ...

- Lors du transfert de 40 μL d'enzyme à 56°C dans 2360 μL de milieu de réaction à 37°C, la température passe à $(40 \cdot 56 + 2360 \cdot 37) / 2400 = 37,3^\circ\text{C}$. On peut considérer qu'en travaillant en bloc chauffant à sec à 37°C, on réalise un passage immédiat de 54°C au standard d'activité à 37°C.

2. Travail à réaliser

- ✓ Manipulation présentée au paragraphe 1.
- ✓ Compte-rendu :
 - ✓ résultats expérimentaux ;
 - ✓ graphe direct activité résiduelle = f(temps de séjour à 54°C) ;
 - ✓ traitement des résultats expérimentaux pour un modèle de cinétique d'inactivation d'ordre 1 (c'est à dire en $\ln(\text{activité}) = f(\text{temps de séjour à } 54^\circ\text{C})$ et graphe direct en coordonnées semi-log) ;
 - ✓ conclusion (avec calcul de durée de 1/2 vie et temps de réduction décimale).

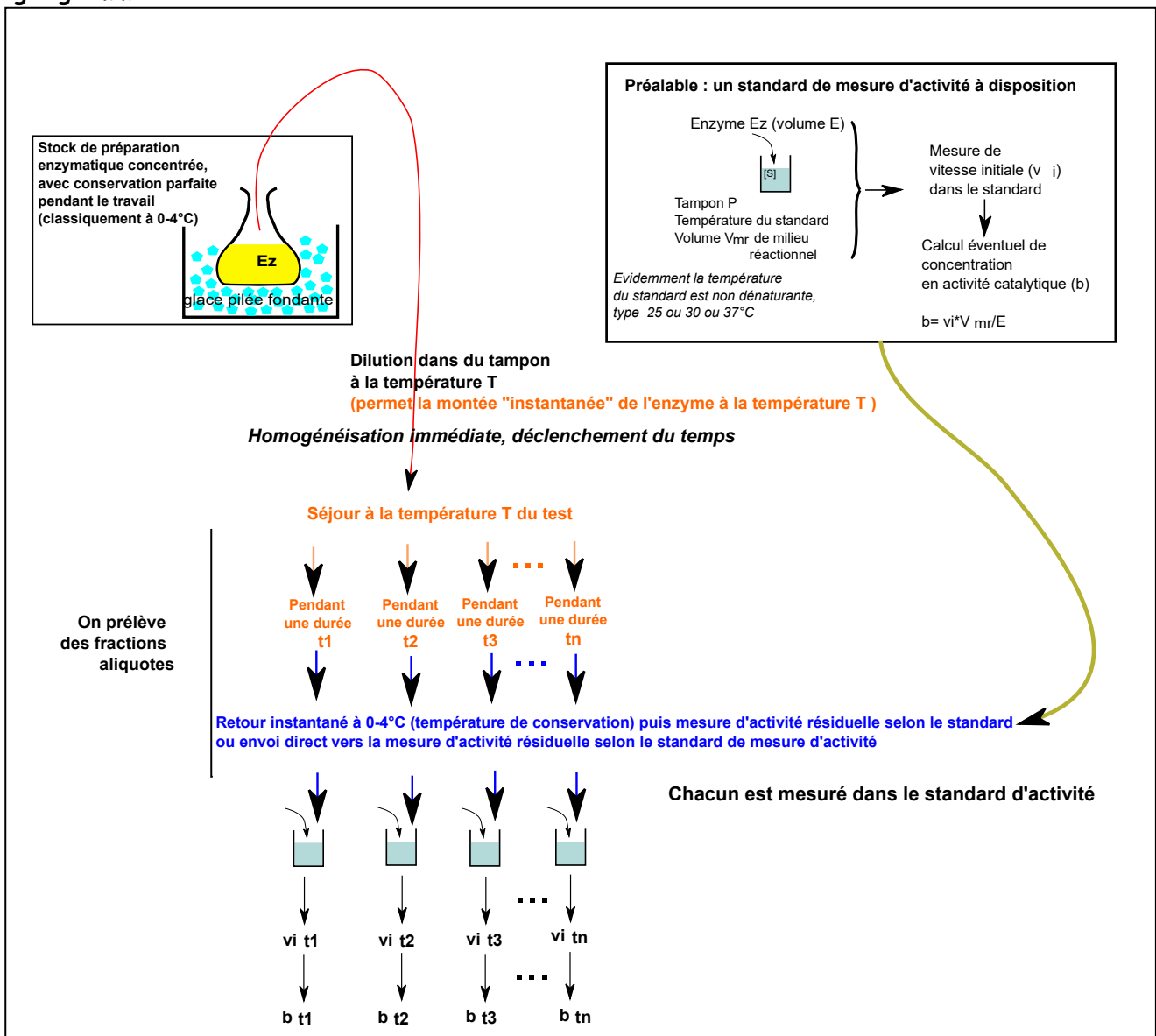
Risques, sécurité, déchets

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.

Organigramme



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