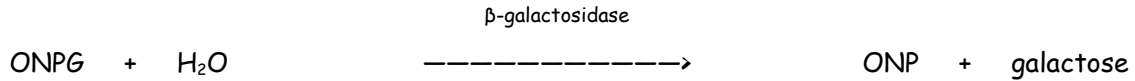


Suivi d'une réaction enzymatique et mise en évidence d'un comportement Michaélien : étude avec la β -galactosidase de *E. Coli* lors de la catalyse de l'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG)

Il s'agit d'étudier la β -galactosidase de *E. Coli* (EC 3.2.1.23) et de montrer un comportement Michaélien lors de la catalyse de l'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG) en 2-nitrophénol (ONP) et β -D-galactopyranose (galactose).

La réaction catalysée étudiée est donc :



L'eau est le solvant, tout se passe comme si on étudiait une réaction à un substrat, l'ONPG, et deux produits, l'ONP et le galactose. L'ONP présente des caractéristiques d'absorption moléculaire dans le visible très intéressantes qui permettent le suivi des cinétiques des réactions catalysées par photométrie d'absorption dans le visible. Le travail proposé comporte trois parties :

- Préalable : Caractéristiques spectrophotométriques de l'ONP et de l'ONPG. Hydrolyse spontanée éventuelle de l'ONPG
- Différentes méthodes pour suivre la réaction enzymatique d'hydrolyse de l'ONPG ;
- Comportement Michaélien de la β -galactosidase.

Dans la suite, c'est la même préparation enzymatique β -galactosidase de *E. Coli* conservée à 0-4°C qui devra être utilisée. La solution de β -galactosidase mise en œuvre est une solution commerciale diluée en tampon P (il s'agit d'obtenir des variations d'absorbance vers 0,8 à 0,12 par minute en manipulation B.1 (pour ne pas obtenir de trop fortes absorbances), soit une dilution théorique au 1/500 pour une solution commerciale type annoncée à 1500 U/mL) et conservée à 0 - 4 °C.

Première partie (A).

Préalable : Caractéristiques spectrophotométriques de l'ONP et de l'ONPG. Hydrolyse spontanée éventuelle de l'ONPG

A.1) Etude des spectres d'absorption moléculaire visible de l'ONP et de l'ONPG à différents pH

Introduire dans une cuve de spectrophotométrie :

- 0,5 mL d'ONP 0,5 mM ou d'ONPG 4mM (solutions dans de l'eau, préparation extemporanée pour l'ONPG);
- 2 mL de tampon de pH donné.

Établir le spectre d'absorption de 340 à 640 nm contre le tampon (qui en fait n'absorbe pas aux longueurs d'ondes étudiées).

Les tampons disponibles sont les suivants : tampon acide acétique-acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 ; tampon phosphate sodique 0,1 M pH 7 plus 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L et MgCl₂ 1 mmol/L ; tampon tris-HCl 0,1 M pH 8,2 ; tampon tétraborate de sodium 0,1 M pH 9,2.

Compte-rendu : Les 8 spectres annotés sur une figure unique commentée.

A.2) Coefficient d'absorbance spécifique de l'ONP à 420 nm dans deux conditions qui seront utilisées pour les cinétiques enzymatiques ultérieures

A.2.1) à 37°C, en tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7 (4,692 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 11,605 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) plus 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L et MgCl_2 1 mmol/L (tampon P)

tube	0	1	2	3	4	5
ONP $5 \cdot 10^{-4}$ M dans le tampon P, en mL	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Tampon P en ml	3	2,8	2,6	2,4	2,2	2
Lectures à 420 nm, à 37°C, contre le tube 0						
Résultats d'une manipulation (absorbances 420 nm)	0	0,073	0,145	0,221	0,291	0,368

Compte-rendu :

- formules de l'ONP et de l'ONPG ;
- justification de la valeur 420 nm. Résultats expérimentaux ;
- calcul du coefficient d'absorbance spécifique de l'ONP (ϵ_{ONP}) en $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ et $\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ dans les conditions étudiées.

A.2.2) En tampon identique à celui de A.2.1 puis ajout de carbonate de sodium et EDTA, à température ambiante

tube	0	1	2	3	4	5
ONP $5 \cdot 10^{-4}$ M dans le tampon P, en mL	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
tampon P en ml	3	2,8	2,6	2,4	2,2	2
solution Na_2CO_3 1M et EDTA 4mM, en mL	1	1	1	1	1	1
Lectures à 420 nm, à température ambiante, contre tube 0						
Résultats d'une manipulation (absorbances 420 nm)	0	0,115	0,232	0,344	0,461	0,577

Mesurer le pH dans un tube.

Compte-rendu :

- résultats expérimentaux ;
- calcul du coefficient d'absorbance spécifique de l'ONP (ϵ_{ONP}) en $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ et $\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ dans les conditions étudiées.

A.3) Hydrolyse spontanée de l'ONPG dans deux conditions qui seront utilisées pour les cinétiques enzymatiques ultérieures

A.3.1) Hydrolyse spontanée de l'ONPG à 37°C en tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7 37 °C plus 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L et MgCl_2 1 mmol/L (tampon P)

Dans une cuve pour spectrophotométrie, introduire 1,5 mL d'ONPG $4 \cdot 10^{-3}$ M en tampon P et 1,5 mL de tampon P (solutions préalablement portées à 37°C). Suivre l'évolution de l'absorbance à 37°C, à 420 nm pendant 10 minutes (en mode acquisition de données, une mesure toute les minutes).

Compte-rendu : résultats expérimentaux, analyse et conclusion.

A.3.2) Hydrolyse spontanée de l'ONPG à température ambiante, en tampon identique à celui de A.2.1 puis ajout de carbonate de sodium et EDTA

Dans un tube à hémolyse, introduire 1,5 mL d'ONPG $4 \cdot 10^{-3}$ M en tampon P puis 1,5 mL de tampon P puis 1 mL de solution Na_2CO_3 1M et EDTA 4mM. Mesurer l'absorbance aux temps 1, 5, 8, 12 et 15 minutes contre un témoin convenable, à température ambiante, à 420 nm.

Compte-rendu : résultats expérimentaux, analyse et conclusion.

Deuxième partie (B).

Différentes méthodes pour suivre la réaction enzymatique d'hydrolyse de l'ONPG

Dans la suite, en partie C, pour montrer le comportement Michaélien de la β -galactosidase, il sera nécessaire de mesurer des vitesses initiales d'hydrolyse de l'ONPG et ce à différentes concentrations en ONPG dans le milieu réactionnel de catalyse. Il s'agit dans partie B de se familiariser techniquement avec plusieurs méthodes pour le suivi des réactions enzymatiques.

Compte-rendu : justifier la présence de 2-mercaptoéthanol dans le tampon P.

Note technique. Dans la suite, l'équilibration des milieux à la température choisie de 37°C est fondamentale. Prévoir 15 minutes.

B.1) Suivi en continu

Définition de « Suivi en continu dans le milieu réactionnel » : quand on mesure directement en temps réel un signal de concentration en substrat ou en produit dans le milieu réactionnel de catalyse.

Utiliser un poste de travail proposant une réserve de tampon P et d'ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P équilibrés à 37°C. Régler la thermostatisation du spectrophotomètre à 37°C, la longueur d'onde à 420 nm et réaliser un zéro convenable. Régler l'acquisition informatique des absorbances en mode cinétique pour une durée de 5 minutes et une acquisition toute les 5 secondes.

Dans une cuve pour photométrie préalablement équilibrée à 37°C :

- Tampon P équilibré à 37°C -----> 0,950 mL
- ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P, équilibré à 37°C -----> 2,000 mL
- Laisser la température s'équilibrer.
- Solution de β -galactosidase à 0-4°C -----> 0,050 mL

La réaction est déclenchée par l'ajout d'enzyme. Après homogénéisation immédiate (idéalement avec un micro agitateur, cuve en place, ou à défaut par retournements), suivre la réaction en continu à 420 nm. L'abaissement de température du milieu réactionnel lors de l'ajout du faible volume d'enzyme à 0-4°C est négligé (un calcul montre qu'il est de 0,5°C).

Compte-rendu :

- réglage du "zéro" du spectrophotomètre , graphique des résultats expérimentaux et indication de la concentration en ONPG dans le milieu réactionnel ;
- durée de la période de vitesse initiale (v_i). Formule $v_i = f(\epsilon_l, l, \Delta A/\Delta t)$ avec ϵ_l : différence de coef. d'absorbance spécifique molaire entre l'ONP et l'ONPG à 420 nm dans le milieu réactionnel (pH 7,0) , l : trajet optique , $\Delta A/\Delta t$ variation d'absorbance par unité de temps. Calcul de v_i ;
- Est-on en V_{max} sachant que $K_m \neq 0,15$ mmol/L ?

B.2) Suivi par points par prélèvements

Définition de « suivi par points par prélèvements dans le milieu réactionnel » : quand on prélève des fractions aliquotes du milieu réactionnel de catalyse à différents temps et qu'on mélange avec une solution d'arrêt et de révélation du substrat ou du produit.

- Préparer 7 semi-microcuves contenant 0,333 mL de solution d'arrêt carbonate de sodium 1M + EDTA 4 mM (une servira pour le témoin sans enzyme).
- Introduire dans un petit erlen :
 - 8,00 mL de solution ONPG en tampon P
 - 3,800 mL de tampon P
 - préchauffer à 37°C (par exemple avec un système de flotteur en bain thermostaté, fermeture, durée 15 minutes)
- Déclencher par ajout de 0,200 mL de solution β -galactosidase à 0 - 4°C . Homogénéiser. La cinétique se déroule à 37°C.
- Aux temps 0,1, 2, 3, 5, 7, 10 minutes, des prises de 1ml de milieu réactionnel sont réalisées et

transférées immédiatement dans les cuves. Il faut homogénéiser instantanément par retournement (pas très simple avec des semi-microcuves).

- Lire à 420 nm contre de l'eau distillée.

Compte-rendu :

- graphique des résultats expérimentaux et indication de la concentration en ONPG dans le milieu réactionnel ;
- durée de la période de vitesse initiale (v_i). Formule $v_i = f(\epsilon_{11}, l, \Delta A/\Delta t, V_p, V_l)$ avec ϵ_{11} : différence de coef. d'absorbance spécifique molaire entre l'ONP et l'ONPG à 420 nm dans le milieu d'arrêt (pH 11), l : trajet optique, $\Delta A/\Delta t$ variation d'absorbance par unité de temps, V_l : volume du milieu lu et V_p : volume de chaque prélèvement. Calcul de v_i ;
- Justification de la composition de la solution d'arrêt.

B.3) Suivi par « tubes 2 points » décalés

Définition de « suivi en méthode 2 points » : quand on réalise 2 milieux réactionnels de catalyse identiques qui sont arrêtés et révélés à 2 temps différents (en général 0 et t).

Tube 0	5 tubes à 37°C
<ul style="list-style-type: none"> - 0,760 mL de tampon P. - 1,600 mL d'ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P. - 0,800 ml de solution d'arrêt (carbonate de sodium 1M + EDTA 4 mM). - 0,040 mL de solution de β-galactosidase. - Homogénéiser. 	<ul style="list-style-type: none"> - 0,760 mL de tampon P équilibré à 37°C. - 1,600 mL d'ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P équilibré à 37°C. - 0,040 mL de solution de β-galactosidase. - Homogénéiser (temps zéro de réaction). - Arrêter au bout de t min par 0,800 ml de solution d'arrêt. Avec t= 1, 2, 3, 5, 7 minutes. - Procéder en tubes décalés pour optimiser la durée de la manipulation.
Lire à 420 nm contre le tube « 0 »	

Remarque 1 : en fait chaque tube en « deux points » est équivalent à une méthode par prélèvements pour laquelle un seul prélèvement représentant la totalité du milieu réactionnel serait réalisé !

Remarque 2 : le volume de milieu réactionnel est de 2,4 mL. Il a été choisi car il correspond à un niveau convenable, en tube à hémolyse, pour une bonne thermostatisation avec les blocs à sec utilisés.

Compte-rendu :

- tableau de planification pour manipuler en tubes décalés ;
- graphique des résultats expérimentaux et indication de la concentration en ONPG dans le milieu réactionnel. Commenter le tube témoin ;
- durée de la période de vitesse initiale (v_i). Formule $v_i = f(\epsilon_{13}, l, \Delta A/\Delta t, V_{mc}, V_l)$ avec ϵ_{13} : différence de coef. d'absorbance spécifique molaire entre l'ONP et l'ONPG à 420 nm dans le milieu d'arrêt (pH11), l : trajet optique, $\Delta A/\Delta t$ variation d'absorbance par unité de temps, V_l : volume du milieu lu et V_{mc} : volume de milieu de la réaction catalysée. Calcul de v_i ;
- Bilan : les milieux de catalyse des réactions en B1, B2 et B3 étaient-ils identiques ? Comparer les résultats obtenus en B1, B2 et B3 et conclure.

Troisième partie (C).

Mise en évidence du comportement Michaélien de la β -galactosidase. Détermination du K_M pour l'ONPG

La solution de β -galactosidase mise en œuvre est une solution commerciale diluée en tampon P et conservée à 0 - 4 °C. Pour évaluer correctement une K_M il faut multiplier les points expérimentaux, particulièrement dans la zone 0,5-4 K_M .

C.1) Mode opératoire avec réalisation de cinétiques suivies en continu dans le milieu réactionnel

- Thermostatisation à une température de 37°C ;
- ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P x mL (x < 2,950 mL) ;
- Tampon P qsp 2,950 mL ;
- solution de β -galactosidase à 0-4°C 0,050 mL ;
- lectures à 420 nm.

Données :

- K_M attendu # 0,15 mmol/L (selon la littérature, dans les conditions expérimentales).
- Compte tenu de la quantité d'enzyme présente dans les essais et compte tenu de la sensibilité des mesures photométriques, il est déconseillé de réaliser des mesures avec moins de 40 μ L d'ONPG dans un milieu réactionnel.

Compte-rendu :

- tableau montrant les différentes concentrations en ONPG testées (au moins 7) et résumant le travail réalisé ; résultats expérimentaux obtenus ; exploitation des résultats.

C.2) Mode opératoire avec réalisation de cinétiques « 2 points »

C.2.1) Détermination de la durée de période initiale sur la plus petite concentration en ONPG testée, travail en tubes décalés

K_M attendu # 0,15 mmol/L (selon la littérature, dans les conditions expérimentales). Compte tenu de la quantité d'enzyme présente dans les essais, compte tenu de la sensibilité des mesures photométriques et compte tenu d'une durée de vitesse initiale qui doit être au moins égale à 1,5-2 minutes pour des mesures confortables, il est déconseillé de réaliser des mesures avec moins de 40 μ L d'ONPG dans un milieu réactionnel.

tube n°	0	1	2	3	4	5
Tampon P en mL	2,360	2,320	2,320	2,320	2,320	2,320
ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P en mL	0	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040
préchauffer 5 minutes à 37°C						
Solution de β -galactosidase en mL	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040
Incubation à 37°C en minutes	0	0,5	1	1,5	2	2,5
Réactif d'arrêt en mL	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800

Dans le tube 0, l'enzyme sera introduit après le réactif d'arrêt. Lectures à 420 nm.

C.2.2 Etude $v_i = f([ONPG])$

tube n°	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon P en mL	2,360	2,320	2,280	2,240	2,200	2,120	1,960	1,800	1,560
ONPG 4.10^{-3} mol/L en tampon P en mL	0	0,040	0,080	0,120	0,160	0,240	0,400	0,560	0,800
pré-incuber 5 minutes à 37°C									
Solution de β -galactosidase en mL	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040	0,040
incuber à 37°C pendant exactement t minutes (cf. paragraphe C.2.1)									
Réactif d'arrêt en mL	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800	0,800

Lectures à 420 nm.

Données :

- Km attendu \approx 0,15 mmol/L (selon la littérature, dans les conditions expérimentales) ;
- on rappelle qu'on a vérifié au préalable que l'ONPG n'était pas hydrolysé de façon spontanée mesurable dans les conditions opératoires et que la solution d'arrêt n'hydrolysait l'ONPG que de façon négligeable dans le temps des mesures.

Compte-rendu :

- tableau montrant les différentes concentrations en ONPG testées et résumant le travail réalisé ;
- résultats expérimentaux obtenus ;
- exploitation des résultats, comparaison avec les résultats du C.1.

C.3 Etude de $v_i = f([\beta\text{-galactosidase}])$, dans le milieu de réaction

Travailler avec une [ONPG] quasi saturante dans le milieu réactionnel.

Tester 4 concentrations en enzyme dans le milieu réactionnel en travaillant avec des dilutions (en tampon P de réaction) au 1/2, au 1/3 et au 1/4 de la préparation enzymatique fournie ou en jouant sur le volume de préparation enzymatique (10, 20, ou 40 μL ...) introduit dans les milieux réactionnels standardisés (3 mL de volume réactionnel total ...)

Compte-rendu :

- mode opératoire choisi ;
- résultats.

Risques, sécurité, déchets

Les réactifs utilisés sont fournis prêts à l'emploi.

Le tampon P 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