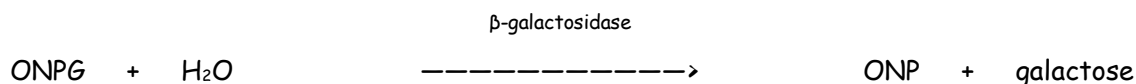


Etude de la β -galactosidase de *E. Coli* : mise en évidence d'un comportement Michaélien lors de l'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG)

Il s'agit d'étudier la β -galactosidase de *E. Coli* (EC 3.2.1.23) et de montrer un comportement Michaélien lors de 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

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 7,0 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 415 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 plus 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L et MgCl₂ 1 mmol/L (tampon P)

tube	0	1	2	3	4	5
ONP 5.10 ⁻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 415 nm, à 37°C, contre le tube 0						

Compte-rendu :

- formules de l'ONP et de l'ONPG ;
- justification de la valeur 415 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 415 nm, à température ambiante, contre tube 0						

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 ultérieuresA.3.1) Hydrolyse spontanée de l'ONPG à 37°C en tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7 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 ou (37°C)). Suivre l'évolution de l'absorbance à 37°C, à 415 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 415 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 des TP, 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 cette deuxième partie de se familiariser techniquement avec plusieurs méthodes pour le suivi des réactions.

La solution de β -galactosidase mise en oeuvre est une solution commerciale à 1500 U/mL diluée en tampon P (il s'agit d'obtenir des variations d'absorbance vers 0,050 par minute en manipulation B.1, soit une dilution théorique au 1/1000) et conservée à 0 - 4 °C.

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

B.1) Suivi en continu

Utiliser un poste de travail proposant une réserve de tampon P et d'ONPG $4 \cdot 10^{-3}$ mol/L en tampon P équilibrés à 37°C. Régler la thermostatisation du spectrophotomètre à 37°C, la longueur d'onde à 415 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 :

- Tampon P équilibré à 37°C : -----> 0,95 mL

- ONPG $4 \cdot 10^{-3}$ mol/L en tampon P, équilibré à 37°C -----> 2 mL

Laisser la température s'équilibrer.

- Solution de β -galactosidase à 0-4°C : -----> 0,05 mL

La réaction est déclenchée par l'ajout d'enzyme. Après homogénéisation immédiate (idéalement avec un microagitateur cuve en place ou à défaut par retournements), suivre la réaction en continu à 415 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 $v_i = f(\epsilon_7, l, \Delta A/\Delta t)$ avec ϵ_7 : différence de coef. d'absorbance spécifique molaire entre l'ONP et l'ONPG à 415 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

- 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 mL de solution ONPG en tampon P
 - 3,8 mL de tampon P
 préchauffer à 37°C (demande plusieurs minutes)
- Déclencher par ajout de 0,2 mL de solution β -galactosidase à 0 - 4°C . Homogénéiser. La cinétique se déroule à 37°C
- Aux temps 0,1,2,3,5,10,15 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 415 nm contre de l'eau distillée

Compte-rendu :

- graphique des résultats expérimentaux et indication de la concentration en ONPG dans le milieu réactionnel ;

- solution de β -galactosidase à 0-4°C 0,05 mL ;
- lectures à 415 nm.

Données :

- Km 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

Km 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 2 minutes pour des mesures confortables, il est déconseillé de réaliser des mesures avec moins de 50 μ L d'ONPG dans un milieu réactionnel.

tube n°	0	1	2	3	4	5
Tampon P en mL	2.95	2.90	2.90	2.90	2.90	2.90
ONPG 4.10 ⁻³ mol/L en tampon P en mL	0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
préchauffer 5 minutes à 37°C						
Solution de β -galactosidase en mL	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Incubation à 37°C en minutes	0	1	2	3	4	5
Réactif d'arrêt en mL	1	1	1	1	1	1

Dans le tube 0, l'enzyme sera introduit après le réactif d'arrêt. Lectures à 415 nm.

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

tube n°	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon P en mL	2.95	2.90	2.85	2,80	2.75	2.65	2.45	2.25	1.95
ONPG 4.10 ⁻³ mol/L en tampon P en mL	0	0,05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.5	0.7	1
préincuber 5 minutes à 37°C									
Solution de β -galactosidase en mL	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
incuber à 37°C pendant exactement t minutes (cf. paragraphe C.2.1)									
Réactif d'arrêt en mL	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Lectures à 415 nm.

Données :

- Km attendu # 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 dans les conditions opératoires et que la solution d'arrêt n'hydrolysait pas l'ONPG.

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