

Trois extractions de la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli*. Analyse et comparaison des extraits obtenus par mesure des rendements d'extraction et des activités spécifiques et par SDS-PAGE

La phosphatase alcaline d'*E. Coli* (PhoA) (EC 3.1.3.1) est une enzyme à activité phosphomonoestérasique. La phosphatase alcaline de *E. Coli* est une enzyme dimérique, de masse moléculaire 89 000. Elle est particulièrement thermostable ; elle résiste parfaitement à un traitement prolongé à plus de 85°C alors que la plupart des protéines de *E. Coli* totalement dénaturées sont alors coagulées, précipitées. Les ions Zn^{2+} sont nécessaires à son activité et elle est activée par les ions Mg^{2+} . Le substrat choisi pour les mesures cinétiques est le sel disodique du 4-nitrophénylphosphate (PNPP) dont l'hydrolyse conduit au 4-nitrophénol (PNP) dosable par photométrie d'absorption moléculaire à 405 nm.

La manipulation comprend :

- extractions de la PhoA de *E. Coli* : par lyse aux ultra sons ou après traitement au lysozyme, ou par choc osmotique ;
- traitement des extraits à 85°C pour purification partielle;
- étude des extraits obtenus par mesures des rendements d'extraction et des activités spécifiques ;
- analyse SDS-PAGE des différentes fractions obtenues à chaque étape.

1. Extractions de la phosphatase alcaline de *E. Coli*

La souche productrice de phosphatase alcaline utilisée est un mutant constitutif. La synthèse de l'enzyme n'est pas réprimée par la présence de phosphates dans le milieu de culture, ce qui évite de devoir la cultiver dans un milieu synthétique sans phosphates inorganiques et en présence d'esters phosphoriques.

On travaille à partir d'une à partir d'une culture de 18 heures, aérée, agitée 37°C, sur milieu 2YT (en fermenteur 2L). Milieu 2YT : extrait de levure à 16 g/L, tryptone à 10 g/L, NaCl à 5 g/L, ajusté à pH 7 avant emploi.

Remarques pour la suite. Les remises en suspension des cellules seront effectuées en dissociant les culots avec le cône d'une pipette automatique (cône bleu), puis par aspirations refoulements. Tout matériel contaminé sera suivre la filière des déchets biologiques.

1.1 Extraction par lyse aux ultrasons

Centrifuger à 3 000 g pendant 10 minutes 8 tubes de 40 mL de culture et éliminer le surnageant. Respecter les règles de gestion conforme des déchets microbiologiques avec le matériel et les solutions contaminés.

Regrouper et mettre en suspension les culots dans 320/6 = 60 mL de tampon final Tris-Mg-Zn (c'est le tampon d'enzymologie décrit au paragraphe 3).

Lyser aux ultrasons (port du casque anti-bruit obligatoire). Par exemple avec un sonicateur 400W, 20 kHz, sonde de 6 mm : pour 20 mL de suspension concentrée, 5 cycles de sonications de 2 minutes, 1 seconde sur 2, à puissance 30 % , refroidissement dans la glace entre chaque cycle si l'échauffement est important. En fait, la PhoA est thermostable et les échauffements sont ainsi peu nuisibles (ne pas abuser cependant ...).

Centrifuger le lysat 10 minutes à 4000 g (ou mieux à 13 000 g, éventuellement par petites fractions de plus faibles volumes). On divise finalement en fractions aliquotes de 1,5 mL = fraction « PhoA-sonication ». Evaluer le volume total obtenu.

Compte-rendu : rappeler en 2-3 lignes le phénomène physique intervenant lors d'une lyse aux ultrasons.

1.2 Extraction par traitement EDTA/détergent/lysozyme

- Centrifuger 30 mL de culture pendant 10 minutes à 3 000 g, à 4°C. Éliminer le surnageant dans de l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension dans 1,5 mL de tampon Tris-EDTA-TritonX-100 en associant avec un transfert quantitatif en tube de centrifugation de 2 mL.
- Ajouter 150 μ L de préparation lysozyme 10x. Digérer une heure à 30°C (on peut stocker au réfrigérateur pendant une nuit ...).

- Le milieu obtenu est très visqueux (à cause de l'ADN génomique). Il faut réduire la viscosité (casser l'ADN) par passages répétés à travers une aiguille de seringue (taille 21) avant de passer à l'étape ultérieure de centrifugation (sinon la séparation en culot/surnageant ne se réalisera pas).
- Centrifuger 5 minutes à 13 000 g à 4°C.
- Récupérer le surnageant dans un tube propre. Ajouter 150 µL de solution MgCl₂ 2 mmol/L, ZnCl₂ 2 mmol/L, homogénéiser.
- On obtient « l'extrait PhoA-lyso ». Evaluer le volume obtenu.

Composition du tampon Tris-EDTA-TritonX-100 : tampon Tris-HCl à 0,1 mol/L et pH 8,2 + TritonX-100 0,025% + EDTA à 2 mmol/L.

Composition de la préparation lysozyme 10x : lysozyme (35 000 U/mg) à 10 mg/mL en eau distillée ou en tampon Tris-EDTA-TritonX-100. Solubilisation douce, stockage 0-4 °C.

Compte-rendu : présenter succinctement les rôles de l'EDTA, du TritonX-100 et du Lysozyme dans le mode opératoire ci-dessus. Pourquoi ajoute-t-on 150 µL de solution MgCl₂ 2 mmol/L, ZnCl₂ 2 mmol/L en dernière étape ?

1.3 Extraction par choc osmotique

L'enzyme, de localisation périplasmique, est extraite sans lyse cellulaire par choc osmotique.

Après séjour en milieu hyper-osmotique, en présence d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) qui fragilise la membrane externe (chélation des cations stabilisateurs), les cellules sont remises en suspension en milieu hypo-osmotique. L'entrée d'eau consécutive provoque alors une expulsion des protéines périplasmiques.

Utiliser une fraction aliquote de la culture homogénéisée de 18 heures aérobie sur milieu 2YT fournie pour réaliser une extraction selon le mode opératoire présenté ci-dessous.

- Centrifuger 30 mL de culture fournie homogénéisée pendant 10 minutes à 3000 g, à 4°C. Éliminer le surnageant dans de l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension dans 1,5 mL (travailler en micro-tube pour centrifugation de 2 mL) de tampon Tris-saccharose-EDTA. Laisser séjourner 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger 5 minutes à environ 2500 g à 4°C. Éliminer le surnageant dans de l'eau de Javel.
- Remettre les cellules en suspension dans 1,5 mL de tampon hypo-osmotique Tris-Mg glacé. Laisser séjourner 10 minutes dans la glace.
- Centrifuger 5 minutes à 13 000g.
- Récupérer le surnageant dans un tube propre. Il constitue « l'extrait PhoA-osmo ». Evaluer le volume total obtenu.

Composition du tampon Tris-saccharose-EDTA : tampon Tris-HCl à 0,3 mol/L et pH 8,2 + saccharose à 200 g/L + EDTA à 1 mmol/L.

Composition du tampon Tris-Mg : tampon Tris-HCl à 10 mmol/L et pH 8,2 + MgCl₂ à 0,5 mmol/L.

2. Purification des extraits PhoA par traitement thermique

On va mettre à profit la propriété remarquable de thermostabilité de la PhoA de coli.

2.1 Purification de « l'extrait PhoA-sonication » par traitement thermique

Porter 750 µL d'extrait 15 minutes à 87°C en vue de précipiter les protéines non thermostables (Tube bien fermé pour éviter l'évaporation. Après le traitement thermique, on peut refroidir à 4°C pour condenser la vapeur). Centrifuger 10 minutes en microfuge (13 à 20 000 g) et récupérer le surnageant en tube microfuge. On obtient ainsi la préparation nommée « PhoA-sonictemp ».

2.2 Purification de « l'extrait PhoA-lyso » par traitement thermique

Traiter 750 µL d'extrait PhoA-lyso selon un mode opératoire identique à celui du paragraphe 2.1.. On obtient alors la préparations dénommée « PhoA-lysotemp ».

2.3 Purification de « l'extrait PhoA- osmo » par traitement thermique

Traiter 750 μL d'extrait PhoA-osmo selon un mode opératoire identique à celui du paragraphe 2.1. On obtient alors la préparation dénommée « PhoA-osmotemp ».

Compte-rendu : pourquoi espère-t-on purifier la PhoA grâce au traitement thermique ? Quel est l'intérêt de la centrifugation réalisée après le traitement thermique ?

3. Mesures des rendements d'extraction, mesures des activités spécifiques

3.1 Déterminations des concentrations en activité catalytique des différents extraits et préparations PhoA, calcul des rendements d'extractions

Une unité de phosphatase alcaline est définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant une micromole de PNPP dans les conditions proposées.

Utiliser la méthode en 2 points présentée par le mode opératoire ci-dessous.

Mode opératoire activité PhoA, méthode 2 points, 2 min

Deux tubes à hémolyse traités en parallèle :

<u>T0 : zéro catalyse PhoA</u>	<u>T2 : 2 min de catalyse PhoA</u>
1 mL de tampon Tris-Mg-Zn et 1 mL de solution PNPP. Équilibrer à 30°C	1 mL de tampon Tris-Mg-Zn et 1 mL de solution PNPP. Équilibrer à 30°C
1 mL de NaOH à 2 mol/L juste après l'arrêt de T2. Suivi immédiatement de 50 μL de préparation PhoA à mesurer.	50 μL de préparation PhoA à mesurer. Incuber 2 minutes exactement à 30°C. Arrêter la réaction en ajoutant 1 mL de NaOH à 2 mol/L.
Lire immédiatement à 405 nm (l'hydrolyse chimique alcaline dans le milieu d'arrêt devenant vite non négligeable). Il est intéressant de mesurer contre un zéro eau distillée.	

Le coefficient spécifique d'absorbance molaire du PNP à 405 nm dans les conditions opératoires est égal à 1750 $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

*Composition du tampon Tris-Mg-Zn : tampon Tris-HCl 200 mmol/L pH 8,2 + MgCl_2 2 mmol/L + ZnCl_2 0,2 mmol/L.
Composition de la solution de PNPP : PNPP à 10 mmol/L (à conserver au congélateur, hydrolyse spontanée non négligeable).*

Compte-rendu :

- Résultats expérimentaux bruts des manipulations de détermination d'activité PhoA.
- Commentaire bref des résultats bruts obtenus (sachant qu'on s'attend à la stabilité thermique de la PhoA)
- Expliquer comment les résultats cinétiques obtenus permettent de calculer des concentrations en activité catalytiques (formules littérales exigées).
- Compléter le tableau de résultats fourni en annexe 1 (= fichier « tp-phoa-extraction-tableauresultats.odt »)

3.2 Détermination des activités spécifiques des extraits et préparations PhoA

Mesurer la concentration en protéines totales de chacune des préparations par méthode au BCA PhoA (on pourrait, en préalable, estimer les concentrations en protéines totales par mesure d'absorbance à 280 nm avec un spectrophotomètre pour nanovolumes. on considère que pour un mélange protéique « moyen », 1 d'absorbance à 280 nm correspond à 1 mg/mL de protéines.).

Dosage des protéines par la méthode au BCA

En milieu alcalin, les protéines réduisent Cu^{2+} en Cu^+ . Le sel de l'acide bicinchoninic (BCA) forme un complexe coloré mesurable à 562 nm avec les ions Cu^+ .

Travailler en micro-plaque 96 puits. Étalonner en **triplicate** selon le tableau ci-dessous.

	TR	1	2	3	4	5
Étalon SAB 0,5 mg/mL en NaCl 0,15 M	0	4 μL	8 μL	12 μL	16 μL	20 μL
eau	20 μL	16 μL	12 μL	8 μL	4 μL	0
Réactif Cu^{2+} /BCA	200 μL					
Protéines par tube réactionnel (q en μg)	0	2	4	6	8	10
Recouvrir la plaque. Homogénéiser sur agitateur de plaque, incuber 40 minutes à 37°C puis remettre à température ambiante.						
Lire les absorbances (A) entre 540 et 590 nm contre le TR. Étalonnage $A = f(q)$ par régression linéaire.						

Réaliser les essais, en même temps que l'étalonnage, en triplicate, selon le tableau ci-dessous

	PhoA-sonication	PhoA-sonictemp	PhoA-lyso	PhoA-lyso temp	PhoA-osmo	PhoA-osmotemp
Dilution préalable au dosage (en NaCl 9g/L)	1/5 (100 μL qsp 500 μL)	1	1/10 (50 qsp 500 μL)	1	1	1
	Puis on passe au dosage					
Essai	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL	8 μL
eau	12 μL	12 μL	12 μL	12 μL	12 μL	12
Réactif Cu^{2+} /BCA	200 μL					
Et traiter comme l'étalonnage, voir ci-dessus.						

Nota Bene. La réalisation de témoins de compensation échantillon est possible mais on montrera des valeurs nulles.

Réactifs Nécessaires :

- étalon sérum albumine bovine à 0,5mg/mL en NaCl 0,15 mol/L
- réactif Cu^{2+} /BCA (préparation du jour) Réactif A : solution commerciale pour dosage des protéines au BCA; Réactif B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 4% ; mélanger 50 V de réactif A (BCA) plus 1 V de réactif B = réactif Cu^{2+} /BCA ; stable la journée.

Compte-rendu :

- Résultats expérimentaux bruts des manipulations de dosage des protéines. Calculs des concentrations en protéines totales des différents extraits.
- Compléter le tableau de résultats fourni en annexe 2 (= fichier « tp-phoa-extraction-tableauresultats.odt »).

4. Analyse SDS-page des extraits et préparations PhoA obtenues

Manipulation qui sera réalisée ultérieurement sur des fractions aliquotes congelées.

Bibliographie : sujet de travaux pratiques de biochimie, agrégation de biochimie-génie biologique, session 1994.