

TP3 ETUDES CINETIQUES DE LA β -GALACTOSIDASE D' A. ORYZAE.

OBJECTIF : étudier l'influence de 2 paramètres sur la vitesse de la réaction enzymatique.

1. ORGANIGRAMME

Conditions opératoires pour les manipulations 1 et 2 :

pH 5; $[Mg^{2+}] = 1 \text{ mmol/L}$; β ME = 10 mmol/L
volume du milieu réactionnel : 1,5 mL
Cinétique 2 points : $\Delta t = 2$ minutes d'incubation à 30°C
Arrêt par addition de 1 mL de Na_2CO_3
Volume de lecture au spectrophotomètre = 2,5 mL
 $\lambda = 420 \text{ nm}$ $\epsilon_{ONPG} = 4500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

- (1) Influence de la concentration en ONPG sur la vitesse initiale
ONPG variable β galactosidase = 50 μ L
- (2) Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale maximale
 $[ONPG] = 4 \text{ mmol/L}$ β galactosidase variable
- (3) Mesure de l'activité de la β galactosidase d' E.coli par cinétique continue
ONPG saturant β galactosidase E.coli = 50 μ L

2. REACTIFS

Tp5 10X	tampon acétate pH 5; 0,5 mol/L
Tp5-Mg- β ME	tampon acétate pH 5; 0,05 mol/L; + Mg^{2+} à 1,5 mmol/L + β ME à 15 mmol/L (préparation extemporanée pour les manips 3.1 et 3.2)
Mg^{2+}	$MgCl_2$ à 10^{-1} mol/L (cf TP précédent)
β ME	2-mercaptoéthanol à 0,3 mol/L
ONPG	à $2 \cdot 10^{-2}$ mol/L en eau déminéralisée
Na_2CO_3	à 1 mol/L EDTA
β gal Aspergillus	en Tp5 0,05 M d'une solution commerciale de β galactosidase d'A. oryzae 10 mg dans 50 mL (~3 mL par élève) réactif à conserver dans la glace
Tp7 10X	Tampon phosphate de potassium pH 7; 0,5 mol/L (cf TP précédent)
Tp7-Mg- β ME	Tp7 0,05 M + Mg^{2+} à 1,5 mmol/L + β ME à 15 mmol/L (préparation extemporanée)
β gal E. coli	dilution au 1/500ème en Tp7-Mg- β ME d'une suspension commerciale de β galactosidase d'E.Coli à environ 1500UI/mL

Rappel : β -mercapto-éthanol concentré (R : 22. 24. 36/37/38 : S : 23. 36. 45) : réactif à manipuler sous la hotte : reboucher immédiatement ; solution diluée à 0,3 mol/L prendre les mêmes précautions

3. MANIPULATIONS

3.1. Influence de la concentration en ONPG sur la vitesse initiale

Procédure opératoire :

Tp5-Mg- β ME	=>	0,95 mL
ONPG	=>	x mL

eau déminéralisée	=>	(0,5-x) mL qsp 1,45 mL
-------------------	----	---------------------------

Homogénéisation au vortex ; préincubation (environ) 5 minutes

β galactosidase	=>	50 μ L	homogénéisation (Vortex)
-----------------------	----	------------	--------------------------

$\Delta t = 2$ minutes

Na_2CO_3	=>	1 mL	homogénéisation (Vortex)
--------------------------	----	------	--------------------------

Gamme de concentration en substrat : x mL d'ONPG à 2.10^{-2} mol/L avec x = 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,06 ; 0,08 ; 0,10 ; 0,15 ; 0,20 ; 0,25 ; 0,30

Préparer une série de tubes à essai selon la procédure opératoire décrite précédemment.

Après la pré-incubation, les réactions seront effectuées en lots de/tubes, ou plus, en décalant de 20 secondes les additions dans chaque tube selon l'exemple ci-dessous :

	addition de				addition de			
	β galactosidase				Na_2CO_3			
tube 1	X				X			
tube 2		X				X		
tube 3			X				X	
tube 4				X				X
....								
t en min : ss	0	0:20	0:40	1:00	2:00	2:20	2:40	3:00

Problème du Blanc-réactifs (t = 0 dans la méthode en 2 points) = ?? ? (pb : V_{substrat} varie) => tampon Tp5-Mg- β ME + Na_2CO_3 (+ β galactosidase) ??

Lecture à 420 nm après avoir réalisé les 12 tubes; discussion : faut-il conserver les tubes dans la glace avant lecture ???

3.2. Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale maximale

Procédure opératoire :

ONPG	=>	0,3 mL	
Tp5-Mg- β ME	=>	0,90 mL	
eau déminéralisée	=>	(300 - y) μ L	préincubés 5 minutes

β galactosidase	=>	y μ L	homogénéisation
-----------------------	----	-----------	-----------------

$\Delta t = 2$ minutes

Na_2CO_3	=>	1 mL	homogénéisation (Vortex)
--------------------------	----	------	--------------------------

Prises d'essai d'enzyme: y μ L de β galactosidase avec y = 10 ; 20 ; 30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 80 ; 100

Préparer une série de tubes à essais selon la procédure opératoire ci-dessus.

Les réactions seront effectuées en 2 série de 4 tubes en décalant dans chaque série les additions d'enzyme de 20 secondes.

Blanc-réactifs = ???	0,3 mL d' ONPG
Pb : V_E varie	+ 0,9 mL de Tp5
Test d'hydrolyse du substrat :	+ 0,3 mL eau déminéralisée
-->laisser environ 7 minutes à 30°C	+ 1 mL de Na_2CO_3

4. EXPLOITATION DES RESULTATS

4.1. $V_i = f$ [ONPG]

- Etablir un tableau de mesures avec les concentrations en ONPG en mmol/L et les vitesses initiales exprimées en $\Delta A/\text{minute}$.
- « Tracer la courbe » $\Delta A/\text{minute} = f$ ([ONPG]) à l'aide d'un logiciel; commenter son allure, y repérer les points entachés d'erreur expérimentale, effectuer une première estimation approchée de K_M et V_m .
- Tracer la courbe en coordonnées inverses et déterminer K_M et V_m (exprimée en $\Delta A/\text{minute}$) sans tenir compte, pour le tracé de la droite, des points repérés comme entachés d'erreur (Ne pas oublier de tenir compte du biais introduit par cette représentation).
- A partir de la V_m déterminée, exprimée en $\Delta A/\text{minute}$, calculer la concentration d'activité catalytique de la suspension enzymatique du commerce, à exprimer :
en U (unités) /mL de solution enzymatique

4.2. $V_m = f$ ([E])

- Vérifier si la concentration en ONPG utilisée est saturante
- Tracer la courbe $\Delta A/\text{minute} = f$ (vol de β galactosidase) et la commenter.
- A partir de cette courbe, des calculs de V_m en mol/L/s et des données ci-dessous, déterminer la constante catalytique (ou k_3 ou k_{cat} ou activité molaire spécifique) de la réaction dans les conditions opératoires, exprimée en s^{-1} .

DONNEES :

La solution d'enzyme a une concentration en protéines de 0,2 mg/mL; le pourcentage de pureté de la β galactosidase y est voisin de 85%; la β galactosidase d'*A. oryzae* est une enzyme d'une masse molaire de 105 Kdalton.