

TP5 ETUDES CINÉTIQUES DE LA β -GALACTOSIDASE D' A. ORYZAE (2)

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

1. ORGANIGRAMME

Conditions opératoires pour l'ensemble de la manipulations:

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

$\lambda = 420 \text{ nm}$ $\epsilon_{ONP} = 4500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

(1) Détermination des constantes cinétiques en absence d'inhibiteur :

ONPG variable

β galactosidase = 50 μ L

(2) Détermination des constantes cinétiques en présence d'inhibiteur :

ONPG variable

β galactosidase = 50 μ L

Inhibiteur = 200 μ L

2. REACTIFS

| | |
|-----------------------|--|
| Tp5 10X | tampon acétate pH 5; 0,5 mol/L |
| Mg^{2+} | $MgCl_2$ à 10^{-2} mol/L (cf TP précédent) |
| β ME | 2-mercaptoéthanol à 0,3 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) |
| ONPG | à $2 \cdot 10^{-2}$ mol/L en eau déminéralisée |
| Na_2CO_3 | à 1 mol/L |
| β galactosidase | solution de β galactosidase d'A. Oryzae à 0,2mg/mL en Tp5 réactif à conserver dans la glace |
| ONPTG | ortho-nitro-phényl-1-thio- β -D-galactoside à 15mmol/L |
| Inhibiteur X | 0,1mol/L en eau déminéralisée |

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 ₂ CO 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 ; 0,40 ; 0,50

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

Après la pré-incubation, les réactions seront effectuées en lots de 4 tubes, ou plus, en décalant de 20 secondes les additions dans chaque tube selon l'exemple ci-dessous :

| | addition de | | | | addition de | | | |
|---------------|----------------|------|------|------|---------------------------------|------|------|------|
| | βgalactosidase | | | | Na ₂ CO 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-βME + Na₂CO₃ (incubation 7min à 30°C ?? avec substrat??) (+ (βgalactosidase) ??

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

3.2. Influence d'inhibiteur sur les constantes cinétiques

Procédure opératoire :

| | | | |
|-------------------|----|----------------|--------------------------|
| Tp5-Mg-βME | => | 0,95 mL | |
| ONPG | => | x mL | |
| inhibiteur | => | y mL | |
| eau déminéralisée | => | 0,5 - (x+y) μL | qsp 1,45 mL |
| | | | homogénéisation (Vortex) |
| | | | préincubés 5 minutes |

| | | | |
|----------------|----|-------|-----------------|
| βgalactosidase | => | 50 μL | homogénéisation |
|----------------|----|-------|-----------------|

Δt = 2 minutes à 30°C

| | | | |
|---------------------------------|----|------|-----------------|
| Na ₂ CO ₃ | => | 1 mL | homogénéisation |
|---------------------------------|----|------|-----------------|

Blanc-réactifs : tampon Tp5-Mg-βME + Na₂CO₃

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.

En présence d'inhibiteur : y = 0,200mL de solution X ou ONPTG.

Remarque si l'inhibiteur X est utilisé (solution visqueuse), homogénéiser plusieurs secondes avant la préincubation.

4. EXPLOITATION DES RESULTATS

4.1. $V_i = f$ [ONPG]

- Établir 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 du logiciel Regressi; 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 graphiquement 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
 - en nanokatal/mL de solution enzymatique

4.2. Influence des inhibiteurs sur les constantes cinétiques

- Regrouper l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus dans un tableau.
- Tracer la courbe $\Delta A/\text{minute} = f$ (ONPG), avec inhibiteur, puis superposer sur un même graphique avec la courbe sans inhibiteur. De même pour les représentations en coordonnées inverses.
- Déterminer les constantes cinétiques K_M^{app} et V_m^{app} en présence d'inhibiteur.
- Préciser le type d'inhibition. En déduire la constante d'inhibition (K_i) de l'inhibiteur utilisé.