

TP 8

Etude cinétique de la Béta galactosidase

Les objectifs de cette séance :

- Savoir réaliser une réaction enzymatique en fonction du temps et faire le lien avec la vitesse initiale.**
- Faire des cinétiques enzymatiques en fonctions des concentrations en substrat et en fonctions des inhibiteurs.**
- Réaliser des droites de corrélations en lien avec les mathématiques.**

Quelques précautions pour cette manipulation

Cette manipulation exige un soin constant : L'enzyme est fragile, des impuretés peuvent affecter son activité (verrerie sale). Il faut conserver votre solution stock d'enzyme dans la glace en dehors des moments d'utilisation. L'oNPG est un réactif coûteux : vous pouvez le détériorer complètement en introduisant par mégarde une pipette ayant touché la solution enzymatique.

Au cours des tests, il faut donc ajouter l'enzyme au dernier moment.

I Etude cinétique de la Béta galactosidase.

EC 3.2.1.23

I.1 Test préalable.

Etudier la réaction enzymatique de la Béta galactosidase (en double).
Se souvenir du TP précédent pour bien réaliser la manipulation.

Manipulation

ONPG à 0.75g.L^{-1} de tampon TS	0.5 ml
Tampon TS pH=7.3	0.4 ml
Placer pendant 5 minutes les tubes à 30°C .	
Enzyme	0.1 ml
(Cette solution est déjà diluée 10 fois)	

Au bout d'un temps fixé, 10 minutes, arrêter la réaction par 1 ml de carbonate de Na 1M: lire l'absorbance à 420nm contre un témoin sans enzyme.

Questions pour cette manipulation.

I.11 Noter les absorbances.

I.12 Expliquer comment vous faites le blanc.

I.13 Quel est le rôle du carbonate de Na dans cette manipulation ?

I.14 Expliquer le rôle de ce test.

I.15 Calculer l'activité de 1ml d'enzyme non diluée en nanokatal.

I.2 Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse de la réaction.

Préparer 3 séries de tubes à hémolyses numérotées de la façon suivante :

Série 1	10	11	12	13	14	15	16
Série 2	20	21	22	23	24	25	26
Série 3	30	31	32	33	34	35	36

Ajouter dans tous les tubes 1 ml de carbonate à 1M.

Ajouter dans les tubes 10,20 et 30

Tampon TS 0,85 ml
oNPG (0,75 g.L-1) 0,15 ml

⇒ Ces tubes serviront de témoins colorimétriques pour les lectures d'absorbance.

Dans un grand portoir allant au bain marie à 30°C, placer trois tubes à essais (Ce ne sont pas des tubes plastiques) numérotés E1, E2 et E3 contenant

E1	1.5 ml d'oNPG(0,75 g.L-1)	8,25 ml de tampon TS
E2	1.5 ml d'oNPG(0,75 g.L-1)	8 ml de tampon TS
E3	1.5 ml d'oNPG(0,75 g.L-1)	7,5 ml de tampon TS

Préparer 3 pipettes de 1 ml

Placer les tubes à essais dans le bain marie pendant 5 minutes.

Voir l'enseignant pour l'explication de cette manipulation.

Ajouter dans E1 0.25ml d'enzyme à t=0, remuer, déclencher le chronomètre et à t=30s, faire un prélèvement de 1ml pour le placer dans le tube 11.

Ajouter dans E2 0.5 ml d'enzyme à t= 1min puis -----.

Ajouter dans E3 1 ml d'enzyme à t=2 min puis -----.

Faire des prélèvements à 5, 10, 15, 20, 30 et 45 minutes.

Faire une lecture des absorbances à 420 nm contre un blanc.

Expliquer la notion de blanc dans cette démarche

I.3 Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de la réaction.

Faire varier la concentration d'oNPG en conservant une durée et une concentration en enzyme constantes.

Manipulation

Disposer dans des tubes numérotés les volumes d'oNPG et de tampon TS.

Série 1	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Tampon TS ml	0.9	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7	0.8	0.85	0.86	0.88
oNPG en ml 1.5g.L ⁻¹	-	0.7	0.6	0.5	0.4	0.2	0.1	0.05	0.04	0.02

Placer cette série de tubes à 30 °C Attendre 5 minutes, puis additionner 0.1 ml d'enzyme en commençant par le tube 10 puis après 30 secondes dans le tube 11 et ainsi de suite.

Après 10 minutes arrêter la réaction enzymatique avec 1ml de carbonate de Na 1M selon les modalités précédentes.

Questions pour cette manipulation.

I.21 Noter les absorbances pour cette étude.

I.22 Tracer le graphe $1/v = K_M/V_M \times 1/[S] + 1/V_M$ sur une feuille de papier millimétré. Tracer pour les tubes 13, 14, 15, 16, 17, 18 et 19. Donner les vitesses en M.mn⁻¹ et les concentrations en M.

Détailler les calculs sur votre copie pour les points de cette droite. Veiller au soin du tracé.

I.23 Donner un titre à ce graphe.

I.24 Déterminer par le graphe les valeurs de K_M et V_M de l'enzyme.

I.25 Donner une définition de K_M et V_M .

Remarque : PM de L'oNPG : 301.

Prendre pour valeur du coefficient d'extinction molaire 4730 M⁻¹.cm⁻¹

I.4 Action d'un inhibiteur sur une cinétique enzymatique.

Faire varier la concentration d'oNPG en conservant une durée et une concentration en enzyme constantes et en ajoutant un inhibiteur.

Manipulation

Disposer dans des tubes numérotés les volumes d'oNPG et de tampon TS et l'inhibiteur.

Série 2	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Tampon TS ml	0.85	0.15	0.25	0.35	0.45	0.65	0.75	0.80	0.81	0.83
oNPG en ml 1.5g.L ⁻¹	-	0.7	0.6	0.5	0.4	0.2	0.1	0.05	0.04	0.02
IPTG en ml 4mM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

Placer cette série de tubes à 30 °C Attendre 5 minutes, puis additionner 0.1 ml d'enzyme en commençant par le tube 10 puis après 30 secondes dans le tube 11 et ainsi de suite. Après 10 minutes arrêter la réaction enzymatique avec 1ml de carbonate de Na 1M selon les modalités précédentes.

Série 3	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Tampon TS ml	0.85	0.15	0.25	0.35	0.45	0.65	0.75	0.80	0.81	0.83
oNPG en ml 1.5g.L ⁻¹	-	0.7	0.6	0.5	0.4	0.2	0.1	0.05	0.04	0.02
IPTG en ml 8mM	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

Placer cette série de tubes à 30 °C Attendre 5 minutes, puis additionner 0.1 ml d'enzyme en commençant par le tube 10 puis après 30 secondes dans le tube 11 et ainsi de suite. Après 10 minutes arrêter la réaction enzymatique avec 1ml de carbonate de Na 1M selon les modalités précédentes.

Questions pour cette manipulation.

I.31 Noter les absorbances pour cette étude et tracer les droites sur le même graphe que pour I.22.

I.32 Expliquer l'action de cet inhibiteur sur l'enzyme. Quels sont les paramètres enzymatiques qui sont influencés. (K_M ou V_M).

I.33 Déterminer le K_I.
Donner les vitesses en M.mn⁻¹ et les concentrations en M pour le graphe.

GRILLE D'ÉVALUATION

Et autoévaluation par les étudiants

Objectifs : Noter le travail réalisé par les étudiants et surtout l'obtention de valeurs demandées.

Activité enzymatique pour 1 ml d'enzyme non diluée. Cf partie I.1

Activité	_____ nanokatal	/2
----------	-----------------	----

Courbe : Absorbance en fonction du temps. Cf partie I.2

3 Courbes		/1.5
Interprétation	Proportionnelle à la concentration en enzyme	/05

Courbes en double inverse. Cf partie I.2 et I.3

Les 3 courbes passent par $1/V_M$ Sinon 1 pt par courbe	/3
--	----

Interprétations graphiques des paramètres cinétiques. A partir du tracé en double inverse

V_M	K_M	K_M série 2	K_M série 3

4 valeurs à déterminer

/8pts

Calculs des paramètres d'inhibition. A partir du tracé en double inverse.

Ki série 2	Ki série 3	Moyenne

/3pts

Interprétation personnelle sur votre travail :

Matériel commun

Un bain marie thermostaté à 30 °C
Trois spectrophotomètres.
pH mètre agitateur
gants

Solution commune à ne pas renverser

Echantillon d'enzyme. 1.5 mg dans 20ml de TS A faire par les préparatrices
1l de tampon TS + Na₂CO₃ A faire par les préparatrices
ONPG 0.75g.l⁻¹ et ONPG 1.5 g.l⁻¹ A faire par les préparatrices
IPTG 2mM et 8 mM A faire par les préparatrices
Un flacon NaOH 1M

Produits sigma à peser par les étudiants

Tampon monosodique
Tampon disodique
Na₂CO₃

Sur les paillasses. Prévoir 5 binômes

P1000, P100 mettre le maximum pour les étudiants
Fiole jaugée de 100ml et 50 ml
3 flacons pour mettre les solutions
Bécher
Tubes hémolyses
Bouchons pour tubes
Cônes bleus
Cônes jaunes
Eau distillée, sopalin
Poubelle plastiques
Flacons pour mettre les solutions tampons

Préparation des solutions tampons par les étudiants. TAMPON TS

-Préparer 50 ml de phosphate 100mM. Phosphate monobasique anhydre.

Peser 0.59 g. A faire par les préparatrices

-Préparer 100 ml de tampon phosphate (tampon final) 100 mM en préparant 100ml de solution phosphate dibasique anhydre et ajuster le pH à 7.3 en rajoutant quelques gouttes de la solution précédente.

Peser 1.42 g. A faire par les préparatrices

Préparation de 50ml de Na₂CO₃ 1M

Peser 8.9 g

Bloque la réaction enzymatique. A faire par les préparatrices