

# ANNEXE

## Préparation d'un extrait brut de phosphatase alcaline d' *E. coli*

- La phosphatase alcaline est chez *E. coli* réprimée par le phosphate. Sauf si l'on dispose d'une souche constitutive, les cellules doivent être cultivées sur un milieu contenant très peu de phosphate, par exemple le « milieu minimum TRIS » suivant :  
pour 1 litre :

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	→	2 g	
$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	→	0,2 g	
$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	→	1 mg	
KCl	→	75 mg	
Phosphate	→	$5 \cdot 10^{-5}$ moles	
Glucose	→	5 g	

dans un tampon Tris-HCl\*  
pH 7,4 ; 0,1 mol/l

- \* préparation du tampon Tris-HCl :

pour 1 litre : 500 ml de Tris base à 0,2 mol/l  
444 ml de HCl à 0,2 mol/l  
eau déminéralisée qsp

- La phosphatase alcaline est localisée chez *E. coli* dans le périplasme.

On peut tirer profit de cette propriété pour préparer sans lyse significative des cellules, un extrait dans lequel l'enzyme représente un pourcentage élevé (de l'ordre de 20 %) des protéines.

A cet effet, trois protocoles possibles sont proposés ci-dessous, à partir d'une culture d'une nuit à 37 °C.

### PROTOCOLE 1 – Extraction par le lysozyme-EDTA en milieu isotonique

Après centrifugation et lavage par un tampon Tris (pH 7,4, 10 mmol/l), les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris pH 8 à 33 mmol/l contenant 20 % de saccharose et placées à 4 °C. Après addition de 0,01 volume d'EDTA pH 8 à 0,1 mol/l, on ajoute 1 µl par ml de lysozyme à 5 mg/ml et l'on maintient une agitation douce. La formation de sphéroplastes est suivie en testant périodiquement la fragilité osmotique des cellules. Pour cela prélever 0,1 ml de suspension dans 1 ml d'eau déminéralisée et lire l'absorbance à 600 nm. Lorsque cette absorbance ne décroît plus, centrifuger la suspension 10 minutes à 15 000 g, à 4 °C. Le surnageant constitue l'extrait brut.

## PROTOCOLE 2 – *Extraction par choc osmotique*

Remettre en suspension les cellules dans 1/4 du volume de culture dans un tampon Tris-HCl pH 8,1 à 0,3 mol/l contenant 20 % de saccharose et de l'EDTA à 1 mmol/l.

Laisser 10 minutes à température ambiante.

Centrifuger (3 000 g, 5 minutes), enlever le surnageant et remettre en suspension les cellules par agitation (Vortex) dans le liquide résiduel.

Ajouter 1/4 du volume de culture initial de solution glacée de  $MgCl_2$  à 0,5 mmol/l et bien mélanger. Laisser 10 minutes dans la glace. Lors du passage en milieu hypotonique, les cellules se réhydratent. L'entrée d'eau « plaque » la membrane contre la paroi et « chasse » à l'extérieur les protéines périplasmiques.

Centrifuger à 15 000 g pendant 10 minutes à 4 °C.

Le surnageant constitue l'extrait brut.

## PROTOCOLE 3 – *Extraction par dénaturation réversible*

La phosphatase alcaline d'*E. coli* est un dimère dont les sous-unités peuvent être dissociées et dénaturées à pH 2 : elles diffusent alors dans le milieu. La dénaturation est réversible.

Après centrifugation et lavage de la culture par du tampon Tris pH 7,4 à 10 mmol/l, les cellules sont remises en suspension dans 2 % du volume initial de solution d'HCl à 0,05 mol/l et agitées à 23 °C pendant 10 minutes.

Centrifuger à 4 000 g pendant 30 minutes à 4 °C.

Le surnageant à pH 1,8 est neutralisé par ajout de KOH à 1 mol/l.

Ajouter 1/100<sup>ème</sup> du volume de tampon Tris-HCl pH 7,4 à 1 mol/l contenant  $ZnCl_2$  à 5 mmol/l et  $MgCl_2$  à 100 mmol/l.

Laisser l'enzyme se renaturer pendant 1 heure environ.