

B41 ETUDE FONCTIONNELLE DES PROTÉINES 1

TRAVAUX PRATIQUES

ETUDE CINÉTIQUE DE LA β -GALACTOSIDASE D'*Aspergillus Oryzae*

Modalités de l'enseignement :

12h CM, 13h TD, 10h TP

Modalités de Contrôle des Connaissances :

Travaux pratiques (30 %), Contrôle continu 70 %)

Connaissances Préalables :

Biochimie des protéines, thermochimie, chimie des solutions, cinétique chimique éventuellement.

Chapitre 1

Informations nécessaires au bon fonctionnement des Travaux Pratiques

I RECOMMANDATIONS

A Avant les Travaux Pratiques

Vous devez, avant de venir en séance :

- Revoir vos TP de biochimie de L1
- Lire les manipulations à effectuer et faire un organigramme des expériences
- Prévoir les volumes de tampon nécessaires

B Matériel

Pour les séances de Travaux Pratiques, vous devez apporter votre polycopié de TP, votre cahier de laboratoire, une blouse blanche, un feutre - marqueur pour le verre, une calculatrice et des feuilles de papier millimétré.

Les cheveux doivent être attachés, les chaussures doivent protéger les pieds (pas de chaussures ouvertes), rien ne doit être mis dans la bouche (pas de chewing-gum notamment), les téléphones portables sont éteints. En outre, les étudiants présentant une allergie au latex doivent se procurer des gants de vinyle (en supermarché) pour pouvoir manipuler les produits dangereux.

II CONNAISSANCE DES PRODUITS CHIMIQUES ET DES RISQUES

Actuellement, il existe des centaines de milliers de substances organiques et de produits minéraux. Parmi eux, près de 50 000 présentent, à divers degrés, un danger pour la

santé et la sécurité des manipulateurs. Les risques associés aux produits chimiques sont essentiellement de deux ordres : d'une part ces produits peuvent avoir une action néfaste sur l'organisme et c'est alors leur toxicité qui intervient ; d'autre part ces produits sont souvent inflammables.

A Contamination par les substances dangereuses

Les substances dangereuses peuvent :

1. contaminer la peau et les yeux par contact
2. contaminer l'air, sous forme de poussière, fumée, gaz, vapeur et aérosol
3. être portées à la bouche par méprise ou par les mains souillées.

Les substances dangereuses peuvent entrer dans l'organisme par plusieurs voies à la fois :

1. La voie respiratoire : les gaz, poussières, vapeurs, fumées pénétrant par inhalation dans les poumons et de là dans le sang
2. La voie digestive : les solides ou liquides sont avalés dissous et réabsorbés au niveau du tube digestif plus ou moins totalement
3. La voie cutanée : les liquides ou les gaz pénètrent dans l'organisme à travers la peau.

B Risques des substances dangereuses

Chaque substance dangereuse a ses risques particuliers. Ces risques peuvent être classés en se basant sur la nature des effets. La réglementation classe les diverses substances en :

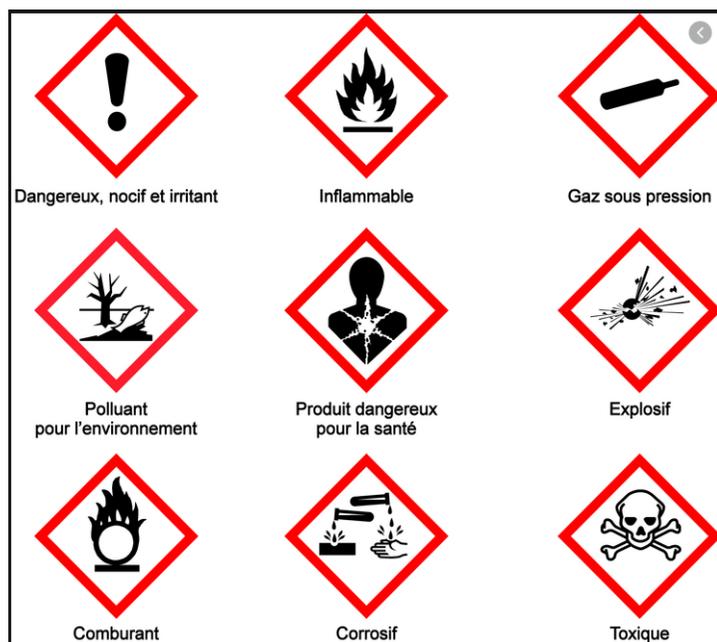


FIGURE 1.1 – Pictogrammes produits chimiques

Une mesure importante qui permet de travailler en sécurité avec des substances dangereuses est la mise au point d'un système d'identification et d'information efficace qui doit permettre d'identifier rapidement les substances, de noter les risques dus à ces produits et de recommander des mesures préventives. Des listes de substances dangereuses sont décrites avec leurs noms, symboles de dangers éventuels, catégories de risques : phrases R (risques) et S (sécurité). Dans la salle de travaux pratiques vous avez un classeur avec les fiches de risques de tous les produits utilisés.

L'étiquette sur tout emballage ou récipient doit comporter les indications suivantes :

1. le nom de la substance
2. les mentions spécifiques de danger et/ou les symboles qui s'y rapportent
3. les phrases mentionnant les risques particuliers dérivant de ces dangers : Phrases R (risques)
4. les phrases mentionnant les conseils de prudence destinés à pallier tous ces risques : Phrases S (sécurité)
5. le nom et l'adresse du fabricant ou de toute autre personne qui met cette substance à la disposition des utilisateurs.

C Consignes de sécurité

D'une façon générale, il est préférable d'éliminer le risque ou au moins de circonscrire le risque à la source. Il est essentiel de prendre des mesures de prévention matérielle et d'utiliser des moyens de protection. Au cours des manipulations de chimie, manipuler toujours au-dessus de la table : les souliers ne résistent pas à l'action des produits chimiques !

La manipulation des produits dangereux doit être entourée de toutes les précautions nécessaires :

1. Porter des lunettes de protection.
2. Indiquer au marqueur indélébile sur chaque récipient la nature de la substance qu'il contient.
3. Ne jamais pipeter à la bouche. Porter des gants lors de la manipulation de produits corrosifs ou hautement toxiques par contact (produits allergisants).
4. Travailler si possible sous une hotte ventilée pour les produits volatils toxiques par inhalation, ou pour toute réaction susceptible de dégager des gaz toxiques, et loin d'une source de chaleur ou d'électricité statique.
5. Ne jamais jeter à l'évier des solvants toxiques ou inflammables.
6. Se laver soigneusement les mains après la manipulation des produits toxiques.
7. Ne jamais fumer, boire, manger, dans la salle de travaux pratiques.

Après chaque manipulation, videz dans les « bidons déchets » réservés à cet effet tout vos récipients souillés et nettoyez toute votre verrerie sans oublier les inscriptions aux marqueurs.

Nettoyez soigneusement la paillasse ou la table quand des produits chimiques y sont tombés. Prenez un chiffon ou un papier, éventuellement tenu avec une pince pour protéger les doigts.

Ranger comme à l'initial votre paillasse et débrancher les appareils électriques.

III UTILISATION DU MATÉRIEL À DISPOSITION

A la micropipette

La micropipette est un outil de précision qu'il faut utiliser avec précaution afin de ne pas l'endommager. Chaque micropipette a une gamme d'utilisation pour un prélèvement précis : p5000 (1000-5000 μL), p1000 (200-1000 μL), p200 (20-200 μL), p100 (20-100 μL), p20 (2-20 μL). L'utilisation se fait dans un ordre précis :

- Débloquer la bague et régler le volume à prélever
- Re-bloquer la bague
- Mettez le cône adapté à la micro-pipette
- Appuyez sur le piston jusqu'au premier cran
- Plonger dans le liquide et remonter précautionneusement le piston pour ne pas absorber d'air et changer le volume
- Appuyer sur le piston pour vider jusqu'au premier cran, puis un fois tout vider, enlever la dernière goutte en appuyant au delà de ce cran. **ATTENTION :IL EST INTERDIT DE FAIRE DES ALLER RETOUR VIFS AVEC LE PISTON POUR SOIT-DISANT TOUT VIDER. CELA FAIT REMONTER LE LIQUIDE DANS LA PIPETTE MAIS NE VIDE PAS LE CÔNE DANS LE TUBE.**

Il est interdit de se promener dans la salle avec une pipette remplie de liquide, de retourner la micropipette "pour voir si c'est bien rempli".

B le spectrophotomètre

Le spectrophotomètre est un instrument qui mesure l'absorption de la lumière. C'est un instrument qui coûte cher, merci de la respecter. Le spectrophotomètre doit être **étalonné avant chaque série de mesure**. En effet, la luminosité de la lampe diminue régulièrement avec le temps : **faire le "zéro" du spectrophotomètre consiste à lui faire mesurer la lumière de départ. Pour cela, laisser le spectrophotomètre vide** (pas de cuve, pas de cuve avec de l'eau, pas de cuve avec le blanc d'expérience) et ce, afin de bien comprendre la fonction de chaque étape de manipulation.

Attention, il est interdit de remplir les cuves au dessus du spectrophotomètre.

C le pHmètre

Pour chaque utilisation du pHmètre, il faut :

- enlever la petite bouteille ET son bouchon
- rincer à l'eau distillé l'électrode de verre
- conserver l'électrode de verre dans l'eau distillée entre deux mesures
- sécher l'électrode avec un papier filtre avant de la plonger dans la solution à mesurer
- rincer

Chapitre 2

Étude cinétique de la β -galactosidase d'*Aspergillus Oryzae*

La β -galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase, E.C. 3.2.1.23) d'*Aspergillus oryzae* est un enzyme tétramérique constitué de 4 sous-unités identiques, inactives séparément. Les ions Mg^{2+} stabilisent les associations entre les sous-unités et le 2- β -mercaptoéthanol, en maintenant les groupements thiols à l'état réduit, empêche la formation de dimères inactifs et constitue ainsi un conservateur de l'activité. La β -galactosidase catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose. Ayant une spécificité large, elle hydrolyse aussi les β -galactosides (substrats synthétiques) comme le 2-nitrophényl β -D galactoside (oNPG) ou le 4-nitrophényl β -D galactoside (pNPG). Le 2-nitrophénol (oNP) ou le 4-nitrophénol formé dans le cas de l'hydrolyse de l'oNPG ou du pNPG est jaune en milieu alcalin et présente un maximum d'absorption vers 420 nm. La mesure de l'absorbance du produit formé à 420 nm permet de suivre en continu l'apparition du 2-nitrophénol ou du 4-nitrophénol en fonction du temps ($A_{420} = f(t)$).

inhibiteurs.

Les expériences sont réalisées au cours de trois séances de 3h. Le contenu théorique nécessaire à la compréhension des travaux pratiques fait parti du cours magistral et des travaux dirigés associés à ce TP. Néanmoins, pour chaque expérience des rappels brefs sont donnés.

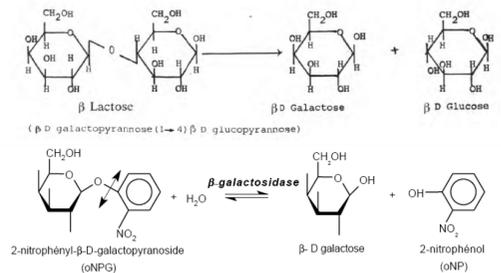


FIGURE 2.1 – Les réactions catalysées par la β -galactosidase. A gauche, la réaction physiologique et à droite la réaction avec un substrat synthétique qui libère un produit coloré à pH basique

Les substrats synthétiques permettent d'étudier les paramètres cinétiques de l'enzyme : constante de vitesse, constante de Mickaëlis, activité spécifique ainsi que l'effet des

I MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES : SÉANCE 1 (3H)

La moitié de la classe utilisera l'oNPG comme substrat, l'autre utilisera le pNPG. Chaque binôme traitera ses résultats et ceux d'un binôme utilisant l'autre substrat. Pour toutes les séances, chaque binôme garde la même paillasse, le même couple Produit/substrat, le même spectrophotomètre et le même bain marie. Les bains-marie sont réglés définitivement au premier TP du premier groupe et la température ne doit plus être touchée

A Préparation des solutions :

1 Tampon acétate-acide acétique : réalisé par l'équipe technique cette année

Un tampon acétate-acide acétique (0,1M; KCl 0,01M, $MgCl_2$ 0,001M, pH=4,5) est nécessaire au bon fonctionnement de l'enzyme. Pour le réaliser :

- calibrer le pHmètre selon les indications posées à côté de l'instrument (voire utilisation pHmètre au chapitre 1).
- remplir un bécher avec 250mL d'acide acétique et une éprouvette avec 250 mL d'acétate
- plonger l'électrode dans le bécher sans agitation
- ajouter l'acétate jusqu'à obtenir un pH de 4,5 (environ 200mL d'acétate) puis enlever l'électrode.
- peser la bonne masse de KCl et de $MgCl_2$ dans deux sabots, vider les sabots dans le bécher (pour bien nettoyer le sabot prélever de la solution du bécher)
- après dissolution, transvaser la solution dans une fiole de 500mL
- compléter la fiole avec une solution contenant le même rapport acétate/acide acétique (exemple : j'ai mis 250mL d'acide acétique et 200mL d'acétate, alors j'ai $\frac{200 \times 100}{450} = 44,44\%$ d'acétate et 56 % d'acide acétique; je fais un mélange dans une éprouvette avec 44mL d'acétate et 56mL d'acide acétique, j'agite et j'utilise ce mélange pour compléter ma fiole)

2 Préparation produits, substrats et enzyme

Selon les paillasses, sera à disposition : de l'oNP (produit) et de l'oNPG (substrat) ou du pNP (Produit) et du pNPG substrat.

Le pNP doit être dilué cinq fois à partir d'une solution mère (10^{-3} M) pour fabriquer une solution filles ($2 \cdot 10^{-4}$ M). Pour cela, mettre dans une fiole de 50mL, 10mL de la solution mère (deux fois 5mL à la p5000) et compléter à l'eau distillée (pour 4 binômes).

L'oNP (10^{-3} M), oNPG (0,008M) et le pNPG (0,008M) sont utilisés à la concentration mère fournie.

La β -galactosidase est fournie à 50mg/L et doit être diluée 5 fois (10mg/L final). Pour cela, mettre dans une fiole de 50mL, 10mL de la solution mère (deux fois 5mL à la p5000) et compléter au tampon acétate, acide acétique (pour 1 binôme). **La β -galactosidase doit être conservée en permanence dans la glace!**

B Obtention du coefficient d'extinction molaire des produits oNP et pNP (1h30)

1 Objectif

La réaction de la β -galactosidase sur les substrats synthétiques libère des produits colorés. L'absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration en produits d'après la loi de Beer-Lambert (tant que le détecteur du spectrophotomètre ne sature pas soit en dessous d'une absorbance égale à 1) : $A = \epsilon l C$. Pour obtenir ce coefficient d'extinction molaire et calculer par la suite la quantité de produit formé lors de la réaction enzymatique, une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions que la réaction enzymatique.

2 Protocole

- Préparer dans 8 huit tubes des concentrations croissantes en produit (oNP ou pNP) selon le tableau 1. Ne pas changer de manipulateur en cours de préparation.
- Vortexer et incuber à 30°C pendant 5mn afin de mettre le produit à température
- **APPELER UN ENSEIGNANT POUR QU'IL VOUS EXPLIQUE LA PROCÉDURE EN DÉTAIL POUR LA SUITE**
- Lancer le chrono en ajoutent 1mL de β -galactosidase dans le tube 1, vortexer et remettez à 30°C
- A 30s, ajouter 1mL de β -galactosidase dans le tube 2, vortexer et remettez à 30°
- A 60s, idem pour le tube 3, à 1mn pour le tube 4 ect ...
- A 5mn ajoutez 1mL de Na_2CO_3 dans le tube 1 (arrêt de la réaction) vortexer
- A 5mn30 ajoutez 1mL de Na_2CO_3 (1M) dans le tube 2 (arrêt de la réaction) vortexer
- A 6mn, idem pour le tube 3, à 6mn30 pour le tube 4 ect ...
- Faites le zéro du spectrophotomètre avec l'espace destiné à la cuve "vide"
- Mesurer l'absorbance de chaque tube. Si vous aller du tube 1 au tube 8, ce n'est pas la peine de rincer la cuve entre deux mesures (concentrations croissantes).

Si l'absorbance du dernier tube est supérieure à 1, n'utilisez pas cette valeur. Si l'absorbance de plusieurs tubes est supérieur à un : **diluez toute la gamme par deux en mettant dans la cuve à chaque fois 1mL de mélange et 1mL de NaOH.**

3 Traitement des données

- calculez $(oNP)_0$ ou $(pNP)_0$ dans chaque tube.
- calculez ΔA en soustrayant l'absorbance du blanc de manipulation (tube1) à l'absorbance de chaque tube (A1-A1; A2-A1 ...). Le blanc de manipulation mesure l'absorbance de tous réactifs en dehors du produit d'intérêt. Rentrez vos résultats dans le tableau à la fin du polycopié.

TABLE 2.1 – Gamme étalon

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 (mL)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,4	1,2	1
Solution d'oNP (10^{-3} M) ou pNP (2.10^{-4} M) (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
Préchauffer à 30°C 5 min								
Appeler un enseignant pour démonstration								
Solution de β -galactosidase (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Incuber 5 min exactement à 30°C								
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Mesurer l'absorbance à 420 nm								

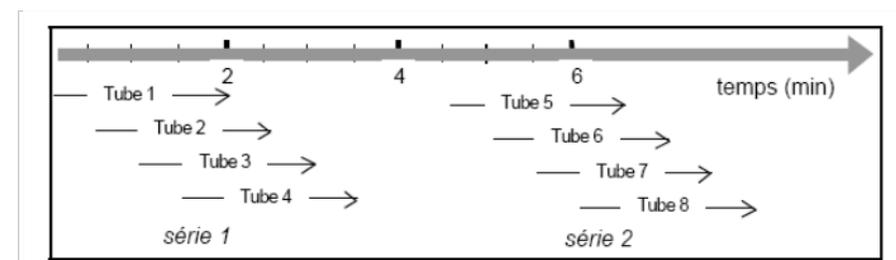


FIGURE 2.2 – Organisation des tubes pour mesurer la vitesse de réaction en point final

- Tracez le graphique $\Delta A = f(oNP \text{ ou } pNP)$.
- Calculez l'équation de la droite moyenne à la main (cf TP B21) et à la calculatrice. La calculatrice vous donne le coefficient de corrélation (r^2) qui doit être supérieur à 0,998.

Si le coefficient est trop bas :

- essayez d'enlever un point qui semble mal placé (sauf le dernier) et estimez de nouveau le r^2
- refaites la manipulation jusqu'à obtention d'une gamme correcte
- La droite moyenne obtenue passe **OBLIGATOIREMENT PAR ZERO** et sa pente est $a = \epsilon l$

C Mesure de la durée de la phase stationnaire de réaction (1h30)

1 Objectif

La phase stationnaire est une étape durant laquelle la vitesse de réaction est constante. Elle a lieu en début de réaction et cette vitesse de la phase stationnaire est la vitesse initiale de réaction. Cette phase est identifiée par une droite sur le graphique Produit = f(temps).

2 Protocole

- Dans un erlenmeyer de 100mL, verser 20mL de tampon acétate 0,1M pH 4,5 et 20mL d'oNPG ou pNPG 0,008 M.
- Pré-incuber 5 min à 30 ° C.
- Préparer 11 tubes à essais contenant 1 mL de carbonate de sodium (Na_2CO_3 1M)
- Ajouter 10mL de *beta*-galactosidase dans l'erlenmeyer et agiter en laissant celui-ci à 30 ° C.
- Effectuer un prélèvement de 1 mL toutes les min de 0 à 10min et le mettre dans les tubes à essais avec le carbonate de sodium, vortexer immédiatement. Attention soyez rapide pour le prélèvement t=0 (ajoutez l'enzyme, lancez le chrono, mélanger rapidement, prélevez)
- Lire l'absorbance à 420nm

- A partir de $\Delta(A)$ et en utilisant la loi de Beer-Lambert obtenue lors de l'établissement de la gamme étalon, calculez $(oNPG)_{cuve}$ ou en $(pNPG)_{cuve}$
- Tenez compte de la dilution réalisée en ajoutant le Na_2CO_3 dans le tube pour calculer $(oNPG)_{reactionnel}$ ou $(pNPG)_{reactionnel}$.
- Tracez le graphique $(oNPG)_{reactionnel} = f(t)$ ou $(pNPG)_{reactionnel} = f(t)$
- Déterminez la durée de la phase stationnaire, tracez la droite correspondante, donnez son équation et déterminez V_i

Attention : si le début de votre graphique semble former des "vagues", c'est que vous n'avez pas assez bien mélangé votre échantillon au moment de l'ajout de l'enzyme. Recommencez.

TABLE 2.2 – Apparition du produit en fonction du temps

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temps (mn)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mélange réactionnel	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mesurer l'absorbance à 280nm											

3 Traitement des données

- Rentez vos données dans le tableau à la fin du polycopié
- calculez $\Delta(A)$ en soustrayant l'absorbance du blanc de manipulation (tube1) à l'absorbance de chaque tube (A1-A1 ; A2-A1 ...). Le blanc de manipulation mesure l'absorbance de tous réactifs en dehors du produit d'intérêt. Rentez vos résultats dans le tableau à la fin du polycopié.

II ÉTUDE DE LA VITESSE DE RÉACTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN SUBSTRAT : SÉANCE 1 (1H30)

L'étude de la variation de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat permet de déterminer les deux paramètres caractéristiques d'une enzyme Michaëlienne : K_M et V_{max} . La connaissance de V_{max} permet de déterminer la constantes catalytique de la réaction de la β -galactosidase. La technique utilisée pour déterminer la vitesse de la réaction sur les substrats synthétiques est une technique en point final : la concentration en produit oNP ou pNP est mesurée au bout d'exactly 5mn de réaction.

1 Objectif

L'objectif est d'obtenir la courbe de Micaëlis $V_i = f(S_0)$ et de déterminer ainsi les paramètres cinétiques.

A Protocole

La protocole est le même que pour la gamme étalon à ceci près que le produit est remplacé par le substrat. Une réaction d'hydrolyse de ce substrat (oNPG ou pNPG) en produits (galactose et oNP ou pNP) a donc lieu. Le respect des 5mn exactes de réaction est essentiel.

- Préparer dans 8 huit tubes des concentrations croissantes en substrat (oNPG ou pNPG) selon le tableau 1. Ne pas changer de manipulateur en cours de préparation.
- Vortexer et incuber à 30 ° C pendant 5mn afin de mettre le produit à température
- Lancer le chrono en ajoutent 1mL de β -galactosidase dans le tube 1, vortexer et remettez à 30 ° C
- A 30s, ajouter 1mL de β -galactosidase dans le tube 2, vortexer et remettez à 30 ° C
- A 60s, idem pour le tube 3, à 1mn pour le tube 4 ect ...
- A 5mn ajoutez 1mL de Na_2CO_3 dans le tube 1 (arrêt de la réaction) vortexer
- A 5mn30 ajoutez 1mL de Na_2CO_3 (1M) dans le tube 2 (arrêt de la réaction) vortexer
- A 6mn, idem pour le tube 3, à 6mn30 pour le tube 4 ect ...
- Faites le zéro du spectrophotomètre avec l'espace destiné à la cuve "vide"
- Mesurer l'absorbance de chaque tube. Si vous aller du tube 1 au tube 8, ce n'est pas la peine de rincer la cuve entre deux mesures (concentrations croissantes).

Si l'absorbance d'un tubes est supérieur à 1 ou supérieur à la plus forte valeur d'absorbance obtenue dans la gamme étalon : **diluez toute la gamme par deux en mettant dans la cuve à chaque fois 1mL de mélange et 1mL de Na_2CO_3 .**

1 Traitement des données

- calculez $(oNPG)_0$ ou $(pNPG)_0$ dans chaque tube (S_0)
- calculez ΔA en soustrayant l'absorbance du blanc de manipulation (tube1) à l'absorbance de chaque tube (A1-A1 ; A2-A1 ...). Le blanc de manipulation mesure l'absorbance de tous réactifs en dehors du produit d'intérêt. Rentrez vos résultats dans le tableau à la fin du polycopié.
- A partir de ΔA et en utilisant la loi de Beer-Lambert obtenue lors de l'établissement de la gamme étalon, calculez $(oNP)_{cuve}$ ou en $(pNP)_{cuve}$
- Tenez compte de la dilution réalisée en ajoutant le Na_2CO_3 dans le tube pour calculer $(oNP)_{reactionnel}$ ou $(pNP)_{reactionnel}$.
- Maintenant que vous connaissez la concentration en produit formé en 5mn, calculez la vitesse de réaction V_i
- Tracez le graphique $\frac{1}{V_i} = f(\frac{1}{S_0})$
- Calculez les constantes cinétiques de la réaction sur le substrat que vous avez étudié.
- Récupérez les résultats d'un groupe travaillant sur l'autre substrat afin de comparer ces constantes

TABLE 2.3 – Vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 (mL)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,4	1,2	1
Solution d'oNPG ou pNPG (8.10^{-3} M) (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
Préchauffer à 30 ° C 5 min								
Solution de β -galactosidase (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Incuber 5min exactement à 30 ° C								
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Mesurer l'absorbance à 420nm								

III ÉTUDE DE LA VITESSE DE RÉACTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN ENZYME SÉANCE 2 : 1H

A refaire les stocks de solution si besoin (30mn)

Se reporter à la partie de préparation des solutions de β -galactosidase .

1 Objectif

L'étude de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en enzyme permet d'obtenir l'activité spécifique si et seulement si le substrat est à saturation. L'activité spécifique est obtenue en utilisant la pente de la droite $V_i = f((E)_0)$.

2 Protocole

Le protocole est identique à celui réaliser pour la mesure de la vitesse de réaction à différentes concentrations en substrat à ceci près que la concentration en substrat est fixe mais que les quantités d'enzymes ajoutées varient. Il est important de bien préparer deux micro-pipettes pour prélever l'enzyme.

- Préparer dans 8 huit tubes une concentration constante en substrat (oNPG ou pNPG) selon le tableau 1. Ne pas changer de manipulateur en cours de préparation.
- Vortexer et incuber à 30 ° C pendant 5mn afin de mettre le produit à température
- Lancer le chrono pour le tube 1 puis en ajouter des quantités croissantes de β -galactosidase dans chaque tube toutes les 30s.
- Faites le zéro du spectrophotomètre avec l'espace destiné à la cuve "vide"
- Mesurer l'absorbance de chaque tube. Si vous aller du tube 1 au tube 9, ce n'est pas la peine de rincer la cuve entre deux mesures (concentrations croissantes).

Si l'absorbance d'un tubes est supérieure à 1 ou supérieure à la plus forte valeur d'absorbance obtenue dans la gamme étalon : **diluez toute la gamme par deux en mettant dans la cuve à chaque fois 1mL de mélange et 1mL de Na_2CO_3 .**

3 Traitement des données

- calculez $(oNPG)_0$ ou $(pNPG)_0$ dans chaque tube (S_0)
- calculez ΔA en soustrayant l'absorbance du blanc de manipulation (tube1) à l'absorbance de chaque tube (A1-A1; A2-A1 ...). Le blanc de manipulation mesure l'absorbance de tous réactifs en dehors du produit d'intérêt. Rentez vos résultats dans le tableau à la fin du photocopié.
- A partir de ΔA et en utilisant la loi de Beer-Lambert obtenue lors de l'établissement de la gamme étalon, calculez $(oNP)_{cuve}$ ou en $(pNP)_{cuve}$
- Tenez compte de la dilution réalisée en ajoutant le Na_2CO_3 dans le tube pour calculer $(oNP)_{reactionnel}$ ou $(pNP)_{reactionnel}$.

TABLE 2.4 – Vitesse de réaction en fonction de la concentration en enzyme

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 (mL)	2	1,95	1,9	1,8	1,6	1,4	1,2	1	0,8
Solution d'oNPG ou pNPG (8.10^{-3} M) (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Préchauffer à 30 ° C 5 min									
Solution de β -galactosidase (mL)	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
Incuber 5 min exactement à 30 ° C									
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mesurer l'absorbance à 420 nm									

- Maintenant que vous connaissez la concentration en produit formé en 5mn, calculez la vitesse de réaction V_i
- Tracez le graphique $V_i = f(E_0)$ (calculer équation de la droite moyenne et le r^2)
- Calculez l'activité spécifique (en U/mg) de la solution d'enzyme à partir de la pente de la droite obtenue
- Récupérez les résultats d'un groupe travaillant sur l'autre substrat afin de comparer cette activité
- l'activité spécifique théorique indiquée par le fournisseur et comparer

IV ÉTUDE DE L'EFFET DU MALTOSE SUR LA CINÉTIQUE DE LA β -GALACTOSIDASE : SÉANCE 2 (3H)

A refaire les stocks de solution si besoin (30mn)

Se reporter à la partie de préparation des solutions de β -galactosidase .

B Mesure des vitesses de réaction en présence de maltose

1 Objectif

L'objectif de cette expérience est de déterminer le mécanisme d'inhibition du maltose ainsi que sa(s) constante(s) d'inhibition.

2 Protocole

L'expérience est exactement la même que précédemment : la vitesse initiale de réaction est mesurée pour différentes concentration en substrat sauf qu'un millilitre de tampon est remplacé par un millilitre d'une solution de maltose. L'expérience est à ré-itérer trois fois avec trois concentrations en maltose différentes : 0,1M ; 0,25M et 0,5M.

- Préparer dans 8 huit tubes des concentrations croissantes en substrat (oNPG ou pNPG) selon le tableau 1. Ne pas changer de manipulateur en cours de préparation.
- Vortexer et incuber à 30 ° C pendant 5mn afin de mettre le produit à température
- Lancer le chrono en ajoutent 1mL de β -galactosidase dans le tube 1, vortexer et remettez à 30 ° C
- A 30s, ajouter 1mL de β -galactosidase dans le tube 2, vortexer et remettez à 30°
- A 60s, idem pour le tube 3, à 1mn pour le tube 4 ect ...
- A 5mn ajoutez 1mL de Na_2CO_3 dans le tube 1 (arrêt de la réaction) vortexer
- A 5mn30 ajoutez 1mL de Na_2CO_3 (1M) dans le tube 2 (arrêt de la réaction) vortexer
- A 6mn, idem pour le tube 3, à 6mn30 pour le tube 4 ect ...
- Faites le zéro du spectrophotomètre avec l'espace destiné à la cuve "vide"
- Mesurer l'absorbance de chaque tube. Si vous aller du tube 1 au tube 8, ce n'est pas la peine de rincer la cuve entre deux mesures (concentrations croissantes).

Si l'absorbance d'un tubes est supérieur à 1 ou supérieur à la plus forte valeur d'absorbance obtenue dans la gamme étalon : **diluez toute la gamme par deux en mettant dans la cuve à chaque fois 1mL de mélange et 1mL de Na_2CO_3 .**

3 Traitement des données

- calculez $(oNPG)_0$ ou $(pNPG)_0$ (S_0) et en maltose (I_0) dans chaque tube

TABLE 2.5 – Vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 (mL)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,4	0,2	0
Solution d'oNPG ou pNPG ($8 \cdot 10^{-3}$ M) (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
Maltose	1	1	1	1	1	1	1	1
Préchauffer à 30 ° C 5min								
Appeler un enseignement pour démonstration								
Solution de β -galactosidase (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Incuber 5 min exactement à 30 ° C								
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Mesurer l'absorbance à 420nm								

- calculez ΔA en soustrayant l'absorbance du blanc de manipulation (tube1) à l'absorbance de chaque tube (A1-A1; A2-A1 ...). Le blanc de manipulation mesure l'absorbance de tous réactifs en dehors du produit d'intérêt. Rentez vos résultats dans le tableau à la fin du polycopié.
- A partir de ΔA et en utilisant la loi de Beer-Lambert obtenue lors de l'établissement de la gamme étalon, calculez $(oNP)_{cuve}$ ou en $(pNP)_{cuve}$
- Tenez compte de la dilution réalisée en ajoutant le Na_2CO_3 dans le tube pour calculer $(oNP)_{reactionnel}$ ou $(pNP)_{reactionnel}$.
- Maintenant que vous connaissez la concentration en produit formé en 5mn, calculez la vitesse de réaction V_i
- Tracez le graphique $\frac{1}{V_i} = f(\frac{1}{S_0})$ (calculer les équations de la droite moyenne et le r^2) avec trois droites : une pour chaque concentration en maltose afin de déterminer le mécanisme de l'inhibiteur.
- Tracez le(s) graphique(s) secondaires afin d'obtenir la(les) constante(s) d'inhibition.

V COMPTE-RENDU DE TRAVAUX PRATIQUES

A Compte-rendu

Cette année vous rendrez 3 fiches expérimentales chacun (selon le moodle proposé sur moodle) : une fiche avec les expériences préparatoires, une fiche avec la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat et en enzyme et une fiche avec la vitesse de réaction en fonction de la concentration en inhibiteur. Ces fiches doivent contenir :

- Les graphiques (à la main ou par tableur) obtenus correctement annotés et des tableaux bilans avec les constantes si besoin (cf TD)
- L'analyse et l'interprétation des résultats
- La discussion des résultats (comparaison à la littérature incluse).
- Le protocole ainsi que les conditions d'hygiène de sécurité et de protection de l'environnement
- Le Matériel et Méthode (quelques lignes se référer à méthodologie de la rédaction)
- Traitement des données (Supplémental data) : explication de vos différents calculs réparti de façon pertinente entre les trois fiches :
 - gamme étalon : exemple calcul pente moyenne (à la main), exemple de calcul de (P_0) , exemple de calcul de $\Delta(A)$
 - $(P_0) = f(t)$: exemple de calcul de $(P)_0$
 - $(V_0) = f(S_0)$: exemple de calcul de pente moyenne et ordonnée à l'origine moyenne, $(S)_0$, $(V)_0$, K_M ; V_{max} , k_{cat} et E_c
 - $(V_0) = f(E_0)$: exemple de calcul l'activité spécifique
 - $(V_0) = f(S_0)$ en présence inhibiteur : exemple de calcul K_i
- Un graphique réalisé à la main sera rendu en plus des fiches afin que celui-ci soit évalué.

Vous devez référencer les résultats trouvés dans la littérature pour comparer avec vos valeurs en discussion. Vous pouvez utiliser uniquement des livres, des revues scientifiques ou des articles. Pour trouver des revues scientifiques ou des articles, vous pouvez utiliser pubmed. Vous pouvez également utiliser un site spécifique pour l'enzymologie brendaenzyme.com MAIS le site n'est pas une référence, il vous donne accès à un lien vers la référence de chaque résultat. Cela vous évite de lire des articles non pertinents.

Il peut être pertinent de récupérer les résultats d'autres (de tous les) binômes afin d'avoir des analyses statistiquement acceptables. La qualité de vos résultats personnels seront notés à partir des coefficients de corrélation et de vos gestes en TP (pas la peine de tricher sur les chiffres, cela se voit). Votre comportement en travaux pratiques en terme de sécurité, de propreté notamment sera noté par l'encadrant de TP.

B Tableaux à remplir pendant les TP

TABLE 2.6 – Gamme étalon

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 (mL)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,4	1,2	1
Solution d'oNP (10^{-3} M) ou pNP (2.10^{-4} M) (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
Solution de β -galactosidase (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
A(420nm)								
$\Delta A(420nm)$								
(oNP) ou (pNP)								

TABLE 2.7 – Apparition du produit en fonction du temps

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Temps (mn)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mélange réactionnel	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
A(420nm)											
$\Delta A(420nm)$											
(P_{cuve})											
($P_{reactionnel}$)											

TABLE 2.8 – Vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat en absence de Maltose

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 (mL)	2	1,9	1,8	1,7	1,6	1,4	1,2	1
Solution d'oNPG ou pNPG (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
Solution de β -galactosidase (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
($oNPG$) ₀ ou ($pNPG$) ₀ (S_0)								
($\frac{1}{S_0}$)								
A(420nm)								
$\Delta A(420nm)$								
(P_{cuve})								
($P_{reactionnel}$)								
(V_0)								
($\frac{1}{V_0}$)								

TABLE 2.9 – Vitesse de réaction en fonction de la concentration en enzyme

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 (mL)	2	1,95	1,9	1,8	1,6	1,4	1,2	1	0,8
Solution d'oNPG ou pNPG (8.10^{-3} M) (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de β -galactosidase (mL)	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
(E) ₀									
A(420nm)									
$\Delta A(420nm)$									
(P_{cuve})									
($P_{reactionnel}$)									
(V_0)									

TABLE 2.10 – Vitesse de réaction en fonction de la concentration en présence de maltose

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampon acétate 0,1 M, pH 4,5 (mL)	1	0,9	0,8	1,7	0,6	0,4	0,2	0
Solution d'oNPG ou pNPG (mL)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	1
Solution de Maltose(mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de β -galactosidase (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de Na_2CO_3 1M (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1
$(oNPG)_0$ ou $(pNPG)_0$ (S_0)								
$(\frac{1}{S_0})$								
Solution de Maltose(mL)	Maltose 0,1 M							
(Maltose)								
A(420nm)								
$\Delta A(420nm)$								
(P_{cuve})								
$(P_{reactionnel})$								
(V_0)								
$(\frac{1}{V_0})$								
Solution de Maltose(mL)	Maltose 0,25 M							
(Maltose)								
A(420nm)								
$\Delta A(420nm)$								
(P_{cuve})								
$(P_{reactionnel})$								
(V_0)								
$(\frac{1}{V_0})$								
Solution de Maltose(mL)	Maltose 0,5 M							
(Maltose)								
A(420nm)								
$\Delta A(420nm)$								
(P_{cuve})								
$(P_{reactionnel})$								
(V_0)								
$(\frac{1}{V_0})$								