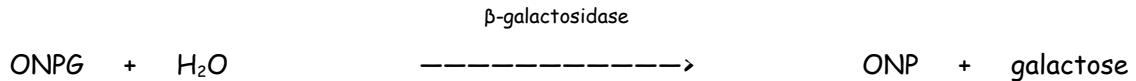


**Suivi d'une réaction enzymatique et mise en évidence d'un comportement Michaélien : étude avec la  $\beta$ -galactosidase de *E. Coli* lors de la catalyse de l'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG)**

Il s'agit d'étudier la  $\beta$ -galactosidase de *E. Coli* (EC 3.2.1.23) et de montrer un comportement Michaélien lors de la catalyse de l'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) en 2-nitrophénol (ONP) et  $\beta$ -D-galactopyranose (galactose).

La réaction catalysée étudiée est donc :



L'eau est le solvant, tout se passe comme si on étudiait une réaction à un substrat, l'ONPG, et deux produits, l'ONP et le galactose. L'ONP présente des caractéristiques d'absorption moléculaire dans le visible très intéressantes qui permettent le suivi des cinétiques des réactions catalysées par photométrie d'absorption dans le visible. Le travail proposé comporte trois parties :

- Préalable : Caractéristiques spectrophotométriques de l'ONP et de l'ONPG. Hydrolyse spontanée éventuelle de l'ONPG
- Différentes méthodes pour suivre la réaction enzymatique d'hydrolyse de l'ONPG ;
- Comportement Michaélien de la  $\beta$ -galactosidase

**Première partie (A).**

**Préalable : Caractéristiques spectrophotométriques de l'ONP et de l'ONPG. Hydrolyse spontanée éventuelle de l'ONPG**

**A.1) Etude des spectres d'absorption moléculaire visible de l'ONP et de l'ONPG à différents pH**

Introduire dans une cuve de spectrophotométrie :

- 0,5 mL d'ONP 0,5 mM ou d'ONPG 4mM (solutions dans de l'eau, préparation extemporanée pour l'ONPG);
- 2 mL de tampon de pH donné.

Établir le spectre d'absorption de 340 à 640 nm contre le tampon (qui en fait n'absorbe pas aux longueurs d'ondes étudiées).

Les tampons disponibles sont les suivants : tampon acide acétique-acétate de sodium 0,1 M pH 4,5 ; tampon phosphate sodique 0,1 M pH 7 plus 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L et MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L ; tampon tris-HCl 0,1 M pH 8,2 ; tampon tétraborate de sodium 0,1 M pH 9,2.

Compte-rendu : Les 8 spectres annotés sur une figure unique commentée.

**A.2) Coefficient d'absorbance spécifique de l'ONP à 420 nm dans deux conditions qui seront utilisées pour les cinétiques enzymatiques ultérieures**

A.2.1) à 37°C, en tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7 ( 4,692 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O + 11,605 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) plus 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L et MgCl<sub>2</sub> 1 mmol/L (tampon P)

tube	0	1	2	3	4	5
ONP 5.10 <sup>-4</sup> M dans le tampon P, en mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Tampon P en ml	3	2.8	2.6	2.4	2.2	2
Lectures à 420 nm, à 37°C, contre le tube 0						
Résultats d'une manipulation (absorbances 420 nm)	0	0,073	0,145	0,221	0,291	0,368

Compte-rendu :

- formules de l'ONP et de l'ONPG ;
- justification de la valeur 420 nm. Résultats expérimentaux ;
- calcul du coefficient d'absorbance spécifique de l'ONP ( $\epsilon_{\text{ONP}}$ ) en  $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$  et  $\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  dans les conditions étudiées.

A.2.2) En tampon identique à celui de A.2.1 puis ajout de carbonate de sodium et EDTA, à température ambiante

tube	0	1	2	3	4	5
ONP $5 \cdot 10^{-4}$ M dans le tampon P, en mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
tampon P en ml	3	2.8	2.6	2.4	2.2	2
solution $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 1M et EDTA 4mM, en mL	1	1	1	1	1	1
Lectures à 420 nm, à température ambiante, contre tube 0						
Résultats d'une manipulation (absorbances 420 nm)	0	0,115	0,232	0,344	0,461	0,577

Mesurer le pH dans un tube.

Compte-rendu :

- résultats expérimentaux ;
- calcul du coefficient d'absorbance spécifique de l'ONP ( $\epsilon_{\text{ONP}}$ ) en  $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$  et  $\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$  dans les conditions étudiées.

A.3) Hydrolyse spontanée de l'ONPG dans deux conditions qui seront utilisées pour les cinétiques enzymatiques ultérieures

A.3.1) Hydrolyse spontanée de l'ONPG à 37°C en tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7 37 °C plus 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L et  $\text{MgCl}_2$  1 mmol/L (tampon P)

Dans une cuve pour spectrophotométrie, introduire 1,5 mL d'ONPG  $4 \cdot 10^{-3}$  M en tampon P et 1,5 mL de tampon P (solutions préalablement portées à 37°C). Suivre l'évolution de l'absorbance à 37°C, à 420 nm pendant 10 minutes (en mode acquisition de données, une mesure toute les minutes).

Compte-rendu : résultats expérimentaux, analyse et conclusion.

A.3.2) Hydrolyse spontanée de l'ONPG à température ambiante, en tampon identique à celui de A.2.1 puis ajout de carbonate de sodium et EDTA

Dans un tube à hémolyse, introduire 1,5 mL d'ONPG  $4 \cdot 10^{-3}$  M en tampon P puis 1,5 mL de tampon P puis 1 mL de solution  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M et EDTA 4mM. Mesurer l'absorbance aux temps 1, 5, 8, 12 et 15 minutes contre un témoin convenable, à température ambiante, à 420 nm.

Compte-rendu : résultats expérimentaux, analyse et conclusion.

**Deuxième partie (B).**

**Différentes méthodes pour suivre la réaction enzymatique d'hydrolyse de l'ONPG**

Dans la suite des TP, pour montrer le comportement Michaélien de la  $\beta$ -galactosidase, il sera nécessaire de mesurer des vitesses initiales d'hydrolyse de l'ONPG et ce à différentes concentrations

en ONPG dans le milieu réactionnel de catalyse. Il s'agit dans cette deuxième partie de se familiariser techniquement avec plusieurs méthodes pour le suivi des réactions enzymatiques.

La solution de  $\beta$ -galactosidase mise en œuvre est une solution commerciale diluée en tampon P (il s'agit d'obtenir des variations d'absorbance vers  $<0,100$  par minute en manipulation B.1 (pour ne pas obtenir de trop fortes absorbances), soit une dilution théorique au 1/500 pour une solution commerciale type annoncée à 1500 U/mL) et conservée à 0 - 4 °C.

Compte-rendu : justifier la présence de 2-mercaptoéthanol dans le tampon P.

### **B.1) Suivi en continu**

*Définition de « Suivi en continu dans le milieu réactionnel » : quand on « peut » mesurer directement en temps réel un signal de concentration en substrat ou en produit dans le milieu réactionnel de catalyse.*

Utiliser un poste de travail proposant une réserve de tampon P et d'ONPG  $4.10^{-3}$  mol/L en tampon P équilibrés à 37°C. Régler la thermostatisation du spectrophotomètre à 37°C, la longueur d'onde à 420 nm et réaliser un zéro convenable. Régler l'acquisition informatique des absorbances en mode cinétique pour une durée de 5 minutes et une acquisition toute les 5 secondes.

Dans une cuve pour photométrie :

- Tampon P équilibré à 37°C : -----> 0,95 mL
  - ONPG  $4.10^{-3}$  mol/L en tampon P, équilibré à 37°C -----> 2 mL
- Laisser la température s'équilibrer.
- Solution de  $\beta$ -galactosidase à 0-4°C : -----> 0,05 mL

La réaction est déclenchée par l'ajout d'enzyme. Après homogénéisation immédiate (idéalement avec un microagitateur cuve en place ou à défaut par retournements), suivre la réaction en continu à 420 nm. L'abaissement de température du milieu réactionnel lors de l'ajout du faible volume d'enzyme à 0-4°C est négligé (un calcul montre qu'il est de 0,5°C)

Compte-rendu :

- réglage du "zéro" du spectrophotomètre , graphique des résultats expérimentaux et indication de la concentration en ONPG dans le milieu réactionnel ;
- durée de la période de vitesse initiale ( $v_i$ ). Formule  $v_i = f(\epsilon_l, l, \Delta A/\Delta t)$  avec  $\epsilon_l$  : différence de coef. d'absorbance spécifique molaire entre l'ONP et l'ONPG à 420 nm dans le milieu réactionnel (pH 7,0) ,  $l$  : trajet optique ,  $\Delta A/\Delta t$  variation d'absorbance par unité de temps. Calcul de  $v_i$  ;
- Est-on en  $V_{max}$  sachant que  $K_m \neq 0,15$  mmol/L ?

### **B.2) Suivi par points par prélèvements**

*Définition de « suivi par points par prélèvements dans le milieu réactionnel » : quand on prélève des fractions aliquotes du milieu réactionnel de catalyse à différents temps et qu'on mélange avec une solution d'arrêt et de révélation du substrat ou du produit »*

- Préparer 7 semi-microcuves contenant 0,333 mL de solution d'arrêt carbonate de sodium 1M + EDTA 4 mM (une servira pour le témoin sans enzyme)
- Introduire dans un petit erlen :
  - 8 mL de solution ONPG en tampon P
  - 3,8 mL de tampon P

préchauffer à 37°C (demande plusieurs minutes)
- Déclencher par ajout de 0,2 mL de solution  $\beta$ -galactosidase à 0 - 4°C . Homogénéiser. La cinétique se déroule à 37°C
- Aux temps 0,1, 2, 3, 5, 7, 10 minutes, des prises de 1ml de milieu réactionnel sont réalisées et transférées immédiatement dans les cuves. Il faut homogénéiser instantanément par retournement (pas très simple avec des semi-microcuves)
- Lire à 420 nm contre de l'eau distillée

Compte-rendu :

- graphique des résultats expérimentaux et indication de la concentration en ONPG dans le milieu réactionnel ;
- durée de la période de vitesse initiale ( $v_i$ ). Formule  $v_i = f(\epsilon_{11}, l, \Delta A/\Delta t, V_p, V_l)$  avec  $\epsilon_{11}$  : différence de coef. d'absorbance spécifique molaire entre l'ONP et l'ONPG à 420 nm dans le milieu d'arrêt (pH 11) ,  $l$  : trajet optique ,  $\Delta A/\Delta t$  variation d'absorbance par unité de temps,  $V_l$  : volume du milieu lu et  $V_p$  : volume de chaque prélèvement. Calcul de  $v_i$  ;
- Justification de la composition de la solution d'arrêt.

**B.3) Suivi par « tubes 2 points » décalés**

*Définition de « suivi en méthode 2 points » : quand on réalise 2 milieux réactionnels de catalyse identiques qui sont arrêtés et révélés à 2 temps différents (en général 0 et t).*

Tube 0	5 tubes essai à 37°C
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,95 mL de tampon P.</li> <li>- 2 mL d'ONPG <math>4.10^{-3}</math> mol/L en tampon P.</li> <li>- 1ml de solution d'arrêt ( carbonate de sodium 1M + EDTA 4 mM).</li> <li>- 0,05 mL de solution de <math>\beta</math>-galactosidase.</li> <li>- Homogénéiser.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,95 mL de tampon P équilibré à 37°C.</li> <li>- 2 mL d'ONPG <math>4.10^{-3}</math> mol/L en tampon P équilibré à 37°C.</li> <li>- 0,05 mL de solution de <math>\beta</math>-galactosidase.</li> <li>- Homogénéiser (temps zéro de réaction).</li> <li>- Arrêter au bout de t min par 1ml de solution d'arrêt. Avec t= 1, 2, 3, 5, 7 minutes.</li> <li>- Procéder en tubes décalés pour optimiser la durée de la manipulation.</li> </ul>
Lire à 420 nm contre le tube « 0 »	

*Remarque : en fait chaque tube en « deux points » est équivalent à une méthode par prélèvements pour laquelle un seul prélèvement représentant la totalité du milieu réactionnel serait réalisé !*

Compte-rendu :

- tableau de planification pour manipuler en tubes décalés ;
- graphique des résultats expérimentaux et indication de la concentration en ONPG dans le milieu réactionnel. Commenter le tube témoin ;
- durée de la période de vitesse initiale ( $v_i$ ). Formule  $v_i = f(\epsilon_{11}, l, \Delta A/\Delta t, V_{mc}, V_l)$  avec  $\epsilon_{11}$  : différence de coef. d'absorbance spécifique molaire entre l'ONP et l'ONPG à 420 nm dans le milieu d'arrêt (pH11),  $l$  : trajet optique ,  $\Delta A/\Delta t$  variation d'absorbance par unité de temps,  $V_l$  : volume du milieu lu et  $V_{mc}$  : volume de milieu de la réaction catalysée. Calcul de  $v_i$  ;
- Bilan : les milieux de catalyse des réactions en B1, B2 et B3 étaient-ils identiques ? Comparer les résultats obtenus en B1, B2 et B3 et conclure.

**Troisième partie (C).**

**Mise en évidence du comportement Michaélien de la  $\beta$ -galactosidase. Détermination de  $K_M$  pour l'ONPG**

La solution de  $\beta$ -galactosidase mise en œuvre est une solution commerciale diluée en tampon P et conservée à 0 - 4 °C.

Pour évaluer correctement une  $K_m$  il faut multiplier les points expérimentaux, particulièrement dans la zone 0,5-4  $K_m$ .



Données :

- Km attendu # 0,15 mmol/L (selon la littérature, dans les conditions expérimentales) ;
- on rappelle qu'on a vérifié au préalable que l'ONPG n'était pas hydrolysé de façon spontanée mesurable dans les conditions opératoires et que la solution d'arrêt n'hydrolysait l'ONPG que de façon négligeable dans le temps des mesures.

Compte-rendu :

- tableau montrant les différentes concentrations en ONPG testées et résumant le travail réalisé ;
- résultats expérimentaux obtenus ;
- exploitation des résultats, comparaison avec les résultats du C.1.

**C.3 Etude de  $v_i = f([\beta\text{-galactosidase}])$ , dans le milieu de réaction**

Travailler avec une [ONPG] quasi saturante dans le milieu réactionnel.

Tester 4 concentrations en enzyme dans le milieu réactionnel en travaillant avec des dilutions (en tampon P de réaction) au 1/2, au 1/3 et au 1/4 de la préparation enzymatique fournie ou en jouant sur le volume de préparation enzymatique (10, 20, ou 40  $\mu\text{L}$  ...) introduit dans les milieux réactionnels standardisés (3 mL de volume réactionnel total ...)

Compte-rendu :

- mode opératoire choisi ;
- résultats.

---

**Risques, sécurité, déchets**

Les réactifs utilisés sont fournis prêts à l'emploi.

Le tampon P contient du 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L, une concentration qui permet la manipulation du tampon prêt à l'emploi dans les conditions usuelles de laboratoire (consulter les documents de risques et sécurité pour la manipulation du 2-mercaptoéthanol concentré).

La solution d'arrêt est une solution alcaline concentrée, le port des lunettes de sécurité est nécessaire. La charge en EDTA à 4 mM est très faible.

---

**Bibliographie**

- G. Durliat, Travaux pratiques avec la  $\beta$ -galactosidase, 1<sup>o</sup> partie, L'opéron, 1992:18:3-18
- Agrégation de Biochimie-génie biologique, TP de biochimie, session 1983
- Concours commun « Agro » série A TB, Techniques biochimiques, session 2002