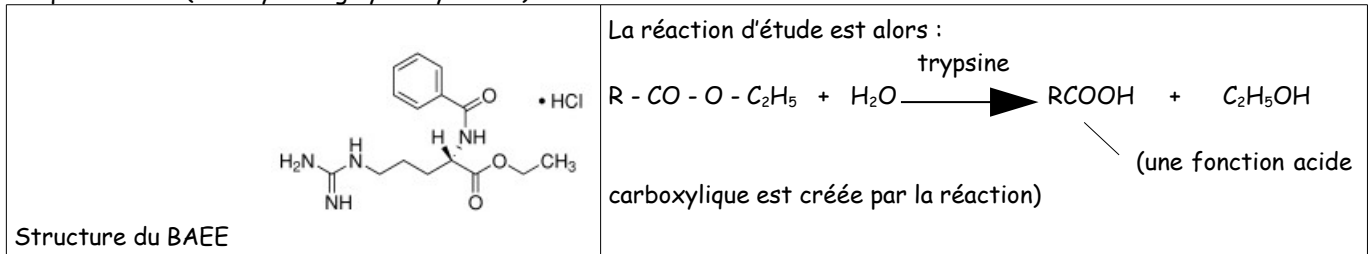


La trypsine : mesure d'activité par méthode dite du pH-stat puis dosage des sites catalytiques et détermination du coefficient catalytique (k₀) pour le substrat BAEE

A) Mesure d'activité trypsine par méthode dite du pH-stat avec substrat BAEE

1. Principe de mesure d'une activité trypsine par méthode du pH-stat

La trypsine (EC. 3.4.21.4) est une endopeptidase de spécificité de coupure côté C de chaîne latérale arginyl ou lysyl. Elle possède également une activité estérasiqque qui peut être aisément mise en évidence en utilisant un substrat synthétique tel que le BAEE (Benzoyl-L-arginyl-éthyl ester).



Le BAEE permet une mesure d'activité catalytique standardisée. Le milieu de réaction est un milieu non tamponné contenant du BAEE saturant et maintenu à pH=8,0. A ce pH, on peut considérer que RCOOH est totalement déprotoné. L'hydrolyse d'un BAEE se traduit ainsi par la libération d'un proton. Le pH est maintenu constant en neutralisant les protons formés, au fur et à mesure de leur apparition, par addition d'une solution aqueuse d'une base forte. Le dosage d'activité est ainsi réalisé en mesurant la vitesse d'ajout de NaOH nécessaire pour maintenir le pH constant à 8,0. C'est un dosage par pH stat. Le standard de température est de 25°C. La solution réactionnelle est une solution aqueuse de KCl 0,2 mol/L.

L'unité trypsine est définie comme une quantité de préparation enzymatique qui hydrolyse une micromole de BAEE par minute dans le standard.

2. Travail à réaliser

On dispose d'une préparation de trypsine dont doit vérifier l'activité spécifique. La préparation est annoncée à 60 U/mg (dans le standard). Un dosage des protéines totales par la méthode du biuret sur une fraction aliquote de la préparation a donné [protéines totales] = 10 mg/mL.

2.1 Mode opératoire

- Étalonnage du pH-mètre. Utiliser les 2 étalons pH fournis.
- Solution de NaOH nécessaire pour réaliser la cinétique en pH_{stat} : prévoir une solution fraîche de NaOH de concentration (c) exactement connue aux alentours de 0,005 mol/L.
- Trypsine à doser : travailler avec une dilution au 1/100 de la préparation de trypsine en KCl 0,2 mol/L. Conserver dans la glace. On travaille donc avec une solution à 0,1 mg/mL en protéines totales.
- Suivi de la cinétique d'hydrolyse du BAEE à pH 8 et 25°C.
Déterminer l'activité de V_{ez} = 1 mL de préparation trypsine 0,1 mg/mL selon les instructions ci-dessous (doubler la manipulation) :
 - Conditionner la semi-microburette avec la solution diluée de NaOH préparée en 3.1. Ajuster le zéro.
 - Introduire dans un bécher à double enveloppe et thermostaté à 25°C :
 - 25 mL de solution BAEE (0,02 mol/L dans KCl 0,2 mol/L) ;
 - 25 mL de solution KCl à 0,2 mol/L ;
 - un barreau aimanté.
 - Plonger les électrodes du pH-mètre ; mettre en route l'agitation ; placer la semi-microburette convenablement.
 - Ajouter 1 mL de la préparation trypsine à mesurer (conservée à 0-4°C puis équilibrée à 25°C). Amener alors le pH à une valeur supérieure à 8,0 (entre 8,10 et 8,50) à l'aide d'un compte-gouttes contenant une solution de NaOH 0,005 mol/L. Travailler le plus rapidement possible.
 - Quand le pH atteint exactement la valeur 8,0, déclencher le chronomètre : c'est le temps zéro des mesures.
 - Ajouter un volume (V₁) de NaOH tel que le pH remonte à une valeur légèrement supérieure à 8,0 (entre 8,10 et 8,50). Lorsque le pH atteint à nouveau la valeur 8,0, noter le temps (t₁).
 - Poursuivre selon le même principe de manière à obtenir 5 à 10 mesures, la durée totale de la détermination n'excédant pas 10 minutes.

Remarque : entre pH 7,5 et 8,5, la capacité catalytique de la trypsine est indépendante du pH.

2.2 Compte-rendu :

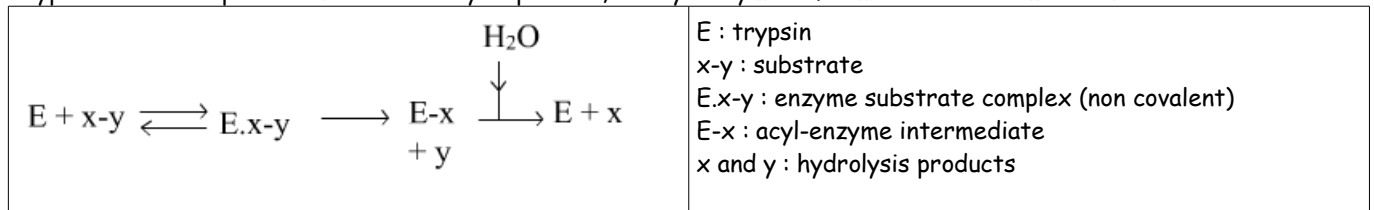
- Remettre les résultats des mesures effectuées sous forme d'un tableau volume de NaOH ajouté en fonction du temps en secondes.
- Remettre les tracé(s) de la (des) courbe(s) volume de solution NaOH versée = f(temps en secondes). Donner le(s) coefficient(s) directeur(s) (débit, F), . Montrer qu'on est en période de vitesse initiale (v_i).
- Pour la préparation trypsin diluée ((0,1 mg/mL)) testée lors de la mesure cinétique en pH_{stat} : donner la formule littérale $v_i = f(F, c, V_{\text{mr}})$, donner la formule littérale $z = f(F, c)$, donner la formule littérale $b = f(F, c, V_{\text{ez}})$. Note : z = symbole de l'activité, b = symbole de la concentration en activité, V_{mr} volume du milieu réactionnel . Poser un système convenable d'unités. Réaliser les applications numériques.
- En déduire la concentration en activité catalytique de la préparation trypsin à 10 mg/mL et son activité spécifique.

Bibliographie :

Travaux pratiques de biochimie, CAPET biochimie, session 1991.
D. Loncle, Génie enzymatique, Doin Editeur, 1992.

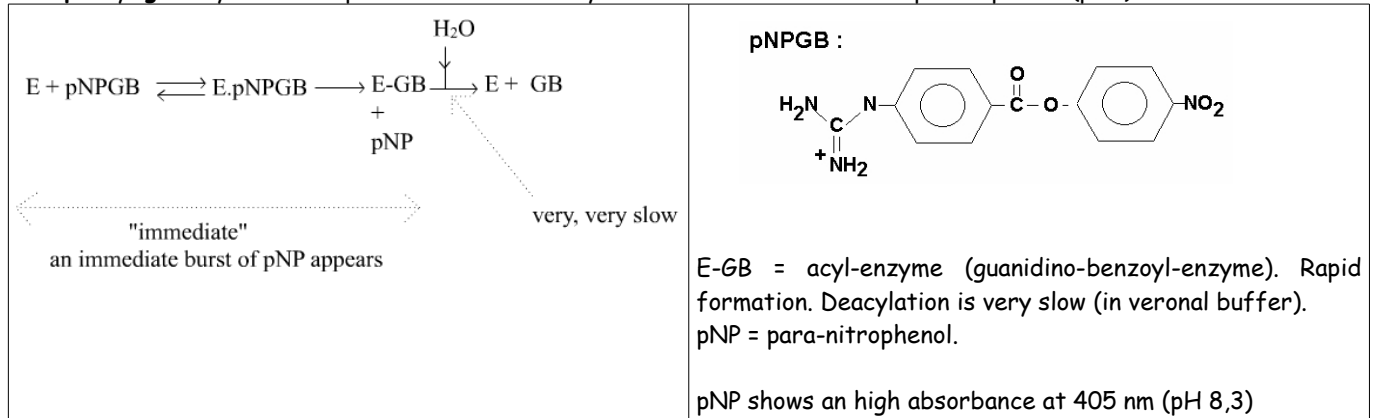
B. Mesure des sites actifs d'une préparation de trypsin

Trypsin is a serine protease. In the catalytic process, an acyl enzyme is formed as an intermediate.



For active site titration of trypsin, substrates have been developed which also form acyl enzyme. However, in these cases, deacylation is very very slow and the amount of first product immediately released (an immediate burst of y) is just equivalent to the enzyme (providing the reagent has enough affinity to convert all active enzyme to acyl enzyme).

The proposed method is based on the rapid and stoichiometric p-guanidino-benzoylation of trypsin by para-nitrophenyl-guanidylbenzoate pNPGB as measured by the extent of liberation of p-nitrophenol (pNP).



Reagents

- Veronal buffer : veronal 0,1 M, CaCl_2 20 mM, pH 8,3. (Tris or borate are not used because deacylation rate is not enough slow. **Veronal is very harmful** : Hazard Codes Xn, Risk Statements 22-40-63, Safety Statements 36/37)
- pNPGB substrate : pNPGB 10 mM in dimethylformamide /acetonitrile (1v/4v)
- Trypsin preparation in veronal buffer

Protocol

- The following instructions are for use of 1 mL cells and a single-beam recording spectrophotometer.
- Instrument settings : 405 nm, rate mode (every 20 s for 6 minutes), zero = cuvette with H_2O .
- 20 μL of pNPGB in a cuvette and 0,9 mL of Veronal buffer.
- The optical density is followed for 2 minutes every 20 seconds.
- Then, just at time 2 minutes, 50 μL of trypsin solution is added in the cuvette. As quickly as possible, The solution is mixed by inversion and the cuvette quickly replaced in the instrument. The optical density is followed for 4 minutes every 20 seconds.

After trypsin addition, the optical density increased in a immediate burst, then slowly. The concentration of active enzyme in the cuvette is calculated from the increase in optical density during the burst and the molar extinction coefficient of pNP at 405 nm and pH 8,3 ($\epsilon = 18\,500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Travail demandé

Travailler avec la préparation mère de trypsine fournie (celle à 10 mg /mL). Annoter la phase d'hydrolyse spontanée du pNBGB (détermination de pente) ; annoter la phase de « burst » ; annoter la phase d'hydrolyse enzymatique (et spontanée) en état quasi-stationnaire traduisant une vitesse initiale d'hydrolyse du pNPGB (détermination de pente). Calculer la concentration en sites actifs de la préparation de trypsine en mol/L et mol/mg.

En déduire la valeur du coefficient catalytique de la trypsine sur les substrats BAEE (cf. manipulation (A)) et pNPGB (cf. manipulation (B)) en supposant que les cinétiques ont été réalisées à saturation par le substrat (on a donc $v_i = V_{max} = k_0[E_0]$).

Bibliographie

Chase, Shaw ; Titration of Trypsin, Plasmin, and Thrombin with p-Nitrophenyl p'-Guanidinobenzoate Hcl ; Method in Enzymology (1970) 19, 20-27

C. Vérification du coefficient d'absorbance spécifique molaire du pNP à 405 nm à pH 8,3

Dans la partie B de ce document, l'absorbance spécifique molaire du pNP à 405 nm (un maximum) est annoncée à 18 500 L.mol⁻¹.cm⁻¹ à pH 8,3.

A disposition :

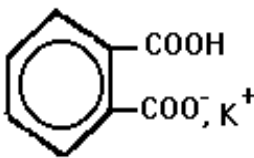
- pNP poudre, pureté >99%, MM 139,11 g/mol et solution de pNP à 1 g/L exactement en Tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,3
- Tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,3
- Matériel courant de laboratoire

Déterminer la valeur du coefficient d'absorbance spécifique molaire du pNP à 405 nm à pH 8,3 avec le spectrophotomètre utilisé pour les manipulations de la partie B de ce document :

- proposer un mode opératoire simple, efficace et économique ;
- réaliser la détermination ;
- rendre compte du mode opératoire et des résultats obtenus.

Document annexe. Préparation d'une solution de NaOH de concentration exactement connue voisine de 0,005 mol/L

Préparer une solution voisine de 0,1 mol/L puis étalonner par pesées successives d'hydrogénophthalate de potassium pur cristallisé anhydre. Diluer exactement au 1/20 (pipette jaugée 2 traits, fiole jaugée).

	<p>Hydrogénophthalate de potassium : MM : 204,22 g/mol, pK_{RCOOH/RCOO-} : 5,1</p> <p>Réaction de l'étalonnage : $RCOOH + OH^- \rightarrow RCOO^- + H_2O$</p> <p>L'hydrogénophthalate de potassium joue le rôle de monoacide faible.</p> <p>A l'équivalence, le bleu de thymol vire à la goutte près. Il en est de même pour la phénophtaléine à condition de travailler en milieu non carbonaté.</p> <p>La zone de virage du bleu de thymol est pH 8.0 à 9.6. Ceci permet de justifier par un calcul simple l'indicateur puisque l'équivalence aura lieu à un pH qui correspondra à celui d'une solution de base faible RCOO⁻ de concentration voisine de 10⁻³ à 10⁻² mol/l dans l'Erlen de dosage dans des conditions habituelles d'étalonnage. Soit pH d'équivalence vers $1/2(14+5,1-3)=8$ à $1/2(14+5,1-2)=8,5$.</p> <p>répétabilité : (?), virage bien visible à la goutte près.</p>
---	--

Attention, les solutions d'hydroxyde de sodium se carbonatent ! :

