

## ACTIVITE DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASE

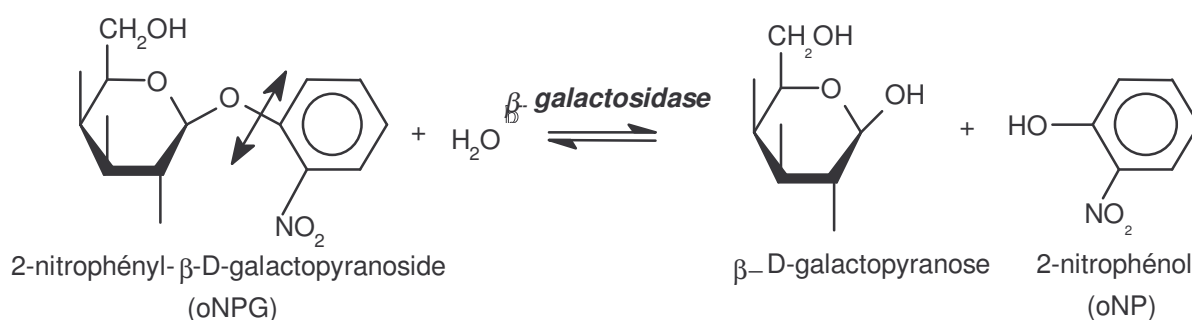
### *Méthodes de mesure de vitesses de réaction $[P] = f(t)$*

« Doser » une enzyme revient à déterminer dans certaines conditions la vitesse initiale de la réaction catalysée. Le but de cette manipulation est d'étudier les deux techniques de détermination de vitesses initiales.

#### 1. LA $\beta$ -GALACTOSIDASE

La  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase, E.C. 3.2.1.23) d'*Escherichia coli* catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose. Ayant une spécificité large, elle hydrolyse aussi les  $\beta$ -galactosides (substrats synthétiques) comme le 2-nitrophényl- $\beta$ -D-galactoside (oNPG) ou le 4-nitrophényl  $\beta$ -D galactoside (pNPG).

Le 2-nitrophénol (oNP) formé dans le cas de l'hydrolyse de l'oNPG est jaune en milieu alcalin et présente un maximum d'absorption vers 410 - 415 nm.



La mesure de l'absorbance du produit formé à 415 nm permet de suivre en **continu** l'apparition du 2-nitrophénol en fonction du temps ( $A_{415} = f(t)$ ).

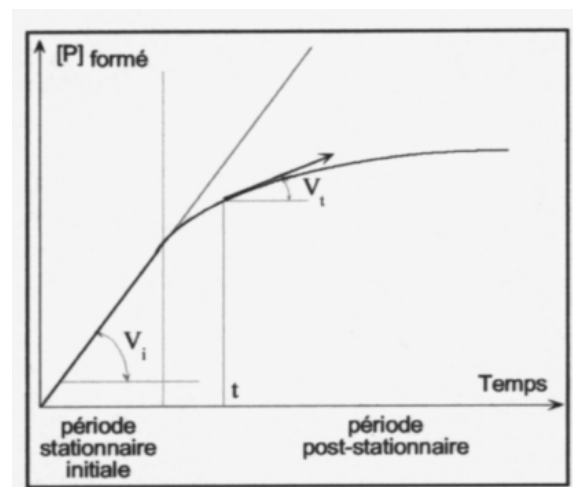
La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme tétramérique constituée de 4 sous-unités identiques, inactives séparément. Les ions Mg<sup>2+</sup> stabilisent les associations entre les sous-unités et le 2-mercaptoéthanol (ou  $\beta$ -ME), en maintenant les groupements thiols à l'état réduit, empêche la formation de dimères inactifs et constitue ainsi un conservateur de l'activité.

#### 2. MÉTHODES DE DÉTERMINATION D'UNE VITESSE DE RÉACTION

Deux techniques différentes peuvent être utilisées :

- une **technique en continu** que l'on peut mettre en œuvre, par exemple, quand le produit formé ou le substrat disparu présentent des caractéristiques d'absorption particulières : la vitesse initiale est alors déterminée à partir de la pente de la partie linéaire initiale de la courbe obtenue.
- une **technique par points** (ou méthode discrète) : la réaction est arrêtée à différents temps en inactivant l'enzyme. Le produit formé ou le substrat disparu est alors dosé (par exemple avec une réaction colorée). Cette technique est la seule possible quand substrat et produit ne possèdent pas de caractéristiques spectrophotométriques particulières.

Quand on connaît la durée de la période stationnaire, il est possible de ne réaliser que **deux points** (d'où le nom : technique en 2 points).



### 3. CONDITIONS DE MESURES D'UNE VITESSE

Pour pouvoir mesurer la vitesse initiale avec une bonne approximation il faut se trouver dans la zone où la vitesse est constante pendant un temps suffisamment long (2 à 5 min), ce que l'on peut aisément vérifier en enregistrant en continu l'apparition du produit formé (oNP).

L'activité de l'enzyme est très sensible aux variations de température, de pH, de force ionique : il faut opérer en **cuve thermostatée** ( $\theta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), en milieu correctement **tamponné** (tampon phosphate  $0,05\text{ mol.L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) et en présence d'activateur ( $\text{Mg}^{2+}$ ) et d'un protecteur des groupements thiols : le 2-mercaptoéthanol ( $\beta\text{-ME}$ ).

### 4. MANIPULATION

#### 4.1. Conditions de la réaction

- $V_r = 3\text{ mL}$  (volume réactionnel)
- $V_t = 5\text{ mL}$  (volume total : **méthode par points**)
- température  $\theta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$
- $\text{pH} = 7$  (tampon phosphate  $0,05\text{ mol.L}^{-1}$ )
- Substrat :  $[\text{oNPG}]_{\text{cuve}} = [\text{S}]_0 = 0,33\text{ mmol.L}^{-1}$  (en solution dans tampon phosphate)
- Activateur :  $[\text{Mg}^{2+}] = 1\text{ mmol.L}^{-1}$
- (Protecteur : [2-mercaptoéthanol] =  $10\text{ mmol.L}^{-1}$ )
- Suspension d'enzyme :  $V_e = 200\text{ }\mu\text{L}$  (conservée dans la glace)

#### 4.2. Enregistrement en continu de la courbe $[P] = f(t)$

Choix du matériel :

- Spectrophotomètre thermostaté ( $\theta = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) + **chronomètre**

Composition du tube (cuve) pour l'enregistrement de l'apparition de l'oNP en continu :

- oNPG ( $\text{pH} 7$  à  $2,5\text{ mmol.L}^{-1}$ ) : 0,4 mL
- Tampon phosphate  $\text{pH} 7$  (avec  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\beta\text{-ME}$ ) : 2,4 mL

Préchauffer  $\approx 5\text{ min}$  à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  puis régler le zéro du spectrophotomètre.

Ajouter  $200\text{ }\mu\text{L}$  de la suspension de  $\beta$ -galactosidase, homogénéiser **rapidement par retournements** puis enregistrer les variations d'absorbance à  $415\text{ nm}$  pendant **15 min**.

#### 4.3. Méthode par points

Numéroter 10 tubes à essai et placer :

- oNPG ( $\text{pH} 7 - 2,5\text{ mmol.L}^{-1}$ ) 0,4 mL
- Tampon phosphate  $\text{pH} 7$  2,4 mL

Préchauffer au bain thermostaté à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min.

Ajouter  $V_e = 200\text{ }\mu\text{L}$  de  $\beta$ -galactosidase et **2 mL** de réactif d'arrêt ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à  $1\text{ mol.L}^{-1}$  qui amène le  $\text{pH}$  à environ 11) selon les temps du tableau suivant :

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
200 $\mu\text{L}$ $\beta$ -gal à $t = \dots$ (min)	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5
2 mL $\text{Na}_2\text{CO}_3$ à $t = \dots$ (min)	20	17,5	15	12,5	11	9,5	8	6,5	6	5,5
Temps d'incubation (min)	<b>20</b>	<b>17</b>	<b>14</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
A ( $\lambda = 415\text{ nm}$ )										
$C_{\text{oNP}}$ milieu réactionnel ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )										

Toute cette manipulation se réalise dans un bain-marie thermostaté.

**PREVOIR UN *BLANC* QUI CONTIENT TOUT, MAIS POUR LEQUEL L'ENZYME A ETE AJOUTEE APRES LE REACTIF D'ARRET.**

Dans cette méthode, l'addition du réactif d'arrêt dilue le milieu réactionnel d'un facteur de dilution  $Fd = \frac{V_t}{V_r} = \frac{5}{3}$ . Donc :  $C_{oNP} \text{ tube } \times \frac{V_t}{V_r} = C_{oNP} \text{ mr (milieu réactionnel)}$

**5. RÉSULTATS**

**5.1. Mesure en continu : A = f(temps)**

A partir de la pente  $\Delta A/\text{min}$  obtenue par la technique de mesure en continu, déterminer  $V_i$  exprimée en variation d'absorbance par min et en  $\mu\text{mol d'oNP formé} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$  de milieu réactionnel.

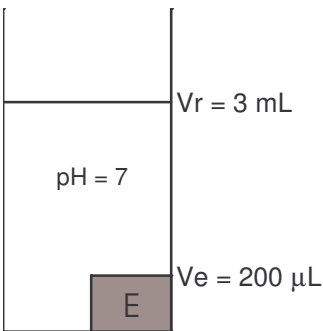
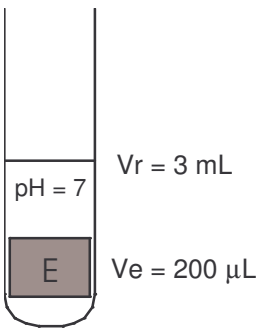
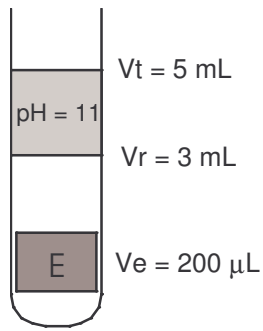
**Donnée :**  $\epsilon_{oNP} \approx 2120 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à **pH = 7** et  $\lambda = 415 \text{ nm}$  ( $212 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{m}^2$ ).

**5.2. Mesure par points : A = f(temps)**

Tracer la courbe  $C_{oNP} = f(\text{temps})$ . Déterminer la vitesse initiale  $V_i$  en  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  sur le graphe.

Un calcul est bien sûr possible par régression (dans la partie linéaire) sur la calculatrice. Comparer les valeurs obtenues par les 2 techniques.

Déterminer le pourcentage de substrat hydrolysé en fin de mesure :  $\frac{[S]_0 - [S]_{20}}{[S]_0} \times 100$

Méthode en continu	Méthode par points	
		
$\epsilon_{415nm}^{oNP} \approx 2120 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ <b>pH = 7</b>	$\epsilon_{415nm}^{oNP} = 4580 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ <b>pH = 11</b>	