

## Préparation de la $\beta$ -galactosidase

A. A partir d'une enzyme commerciale

1. Caractéristiques de la  $\beta$ -galactosidase :

- 5000 U
- 19 mg
- 280 U/mg de lyophilisat
- 300 U/mg de protéines
- Pureté : 95 %

2. Préparation des solutions « stock » :

**Préparer 1 L de tampon phosphate de potassium 0,05 mol/L pH 7,0 :**

- Solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 0,05 mol/L : 0,432 L
- Solution de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  à 0,05 mol/L : 0,568 L
- $\text{MgCl}_2, 6 \text{H}_2\text{O}$  : 0,305 g
- (2-mercaptoéthanol) : 1,05 mL)

Refroidir à peu près 10 mL de tampon dans la glace.

Pendant ce temps préparer 50 tubes Eppendorf notés : **0,1 mL  $\beta$ -gal : 100 U** **date**  
et les mettre dans la glace pilée, bouchon ouvert.

**Reprendre le flacon de  $\beta$ -gal dans 5 mL de tampon phosphate.**

Répartir 0,1 mL de cette solution d'enzyme dans les 50 tubes Eppendorf précédemment préparés.

Congeler immédiatement.

3. Préparation du substrat : solution d'oNPG à 2,5 mmol/L

Peser exactement  $m_{\text{oNPG}} = 0,151 \text{ g}$  d'oNPG ( $M = 301,26 \text{ g/mol}$ )

Dissoudre en fiole jaugée de 200 mL **dans le tampon phosphate.**

4. Matériel

- P1000 et P200 + cônes
- Fiole jaugée de 50 mL
- Spectrophotomètre thermostaté à 30°C
- Chronomètre
- Micro cuves
- 10 tubes à hémolyse
- Glace pilée

- B. A partir d'une souche d'*Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase<sup>+++</sup>  
Préparer 50 mL de culture d'*E.coli*  $\beta$ -galactosidase<sup>+++</sup> (bouillon de 18 heures). Congeler et décongeler ce bouillon 3 fois de suite. On obtient une solution de  $\beta$ -gal directement utilisable.