

TP 8

Détermination de l'activité spécifique d'une enzyme.

Les objectifs de cette séance :

- Apprendre à faire une réaction enzymatique.**
- Adapter les manipulations de chimie en TP de biologie.**
- Savoir faire des préparations de produits.**
- Utiliser de la verrerie en fonction des besoins**
- Faire un dosage protéique.**
- Savoir calculer une activité enzymatique et une activité spécifique.**

I Quelques définitions :

L'activité d'une préparation enzymatique est exprimée en nanokatal.

Une nanokatal mesure l'activité de l'enzyme qui a libérée une nanomole de produit ou qui transforme une nanomole de substrat en une seconde à 30°C dans les conditions optimales d'action.

L'activité spécifique est rapportée à 1mg d'enzyme mesuré par un dosage de protéine.

II Le travail de cette séquence de TP

L'enzyme étudiée est la Béta Galactosidase dont on suit son action sur un substrat de synthèse l'orthonitrophényl-B -D-galactopyrannoside : oNPG (PM=301) à la concentration de 0.75g.L-1 dans le tampon standard (TS) à pH 7,5.

L'enzyme est dosée par la méthode de Bradford (1976).

III En enzymologie, il faut préparer des tampons qui permettent aux enzymes de fonctionner correctement.

Avant de commencer le travail en enzymologie il faut :

1 Préparer 50 ml de phosphate 100mM. Phosphate monobasique anhydre.

Il faut peser _____g

2 Préparer 100 ml de tampon phosphate 100 mM en préparant 100ml de solution phosphate dibasique anhydre et ajuster le pH à 7.3 en rajoutant quelques gouttes de la solution précédente.

Il faut peser _____g

3 Préparer 50ml de Na₂CO₃ 1M
Cette solution bloque la réaction enzymatique.

Il faut peser _____g

Pour gagner en rapidité les solutions seront préparées par Caroline.

IV Manipulation.

IV.1 Etude du l'ion oNP, produit de l'enzyme.

- Préciser l'intérêt d'étudier cet ion. _____.

- Préparer 50 ml d'une solution 1mM d'orthonitrophénol dans le mélange tampon TS/Na₂CO₃.(Volume/Volume)

=> Il faut peser : _____mg

- Diluer 5 fois, avec précision, une partie de la solution précédente à l'aide du tampon Na₂CO₃.

=> Expliquer la dilution : _____.

-Tracer le spectre d'absorption entre 600 et 350 nm.

=> Déterminer les cuves à utiliser : _____.

- Déterminer la longueur d'onde du maximum d'absorption de l'ion étudié et donner l'absorbance à cette longueur d'onde.

=> _____nm et A= _____.

IV.2 Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'ion oNP.

- A partir du mélange tampon TS/Na₂CO₃, préparée une gamme de solution d'oNP (Prendre la solution déjà diluée 5 fois).

=> Expliquer la notion de gamme de concentration.

Voir l'enseignant pour l'explication et faire le lien avec le TD de biochimie.

- Lire l'absorbance à 420 nm pour cette gamme contre un blanc.

=> Préciser la notion de blanc.

- Tracer la courbe A= f(c) et déduire le coefficient d'extinction molaire de l'ion orthonitrophénate.

=> Coef= _____mol⁻¹ cm⁻¹ L

IV.3 Mesure de l'activité enzymatique de la B galactosidase

Etudier la réaction enzymatique de la Béta galactosidase.

ONPG à 0.75 g.L⁻¹ de tampon TS
Tampon TS pH=7.3
Placer pendant 5 minutes les tubes à 30°C.
Enzyme
(Cette solution enzymatique est diluée 10 fois)

Protocole de la manipulation

Préparer dans des tubes à hémolyses les produits suivants.

Tableau pour la préparation de la réaction enzymatique. Solution en ml.

Tampon TS	Mg 2+	Enzyme
1.3	0.1	0.1
1.3	0.1	0.1
1.2	0.1	0.2
1.2	0.1	0.2
1.1	0.1	0.3
1.1	0.1	0.3

Vous laissez quelques minutes ces tubes à 30 °C

Puis rajouter toutes les 30 secondes 0.5 mL de d'oNPG à 0.75 g.L⁻¹
(Demander l'explication à l'enseignant pour bien réussir le test)

Après 10 minutes précises: arrêter la réaction en ajoutant 1 ml de Na₂CO₃.

V réactionnel 2m+1ml=3ml.

Lecture de l'absorbance à 420 nm.

(Faire plusieurs essais pour garantir les résultats)

IV.4 Dosage des protéines (enzyme): Méthode de Bradford.

Préparation d'une courbe d'étalonnage :

Préparer 50 ml d'une solution de SAB de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$

A partir de la solution précédente, préparer une courbe d'étalonnage de 0 à $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ de protéine :

Pour cela, il faut préparer 11 tubes de 0 à $200 \mu\text{g}$ de protéine dilué dans de l'eau distillé. (**Demander des explications si besoin pour ne pas se tromper**).

Tableau pour la gamme de SAB.

$\mu\text{g ml}^{-1}$		0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
SAB	en ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2
Eau distillée	en ml	2	1.8	1.6	1.4	1.2	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0

Dosage des protéines pour déterminer la concentration en enzyme:

a Prendre $100 \mu\text{L}$ de chaque tube de la gamme puis rajouter 2 ml de réactif de Bradford. (Tube hémolyse)

b Prendre $100 \mu\text{L}$ de l'enzyme (Déjà diluée au 1/10) et rajouter 2 ml de réactif de Bradford. (Faire les essais en double).

Laisser 20 minutes à température ambiante les tubes (**séries a et b**) et les placer à l'obscurité.

Lire l'absorbance à 595 nm en tenant compte d'un blanc.

=> Composition du blanc : _____.

=> Après avoir tracé la courbe d'étalonnage, donner la masse de protéine présente dans la solution enzymatique.

V Résultats.

Donner le spectre de l'orthonitrophénate /2 pts

Tracer la courbe $A = f(c)$ et calculer le coefficient d'extinction molaire de l'ion orthonitrophénate. / 4pts /2 pts

Calculer ce même coefficient d'après la valeur de l'absorbance à 420 nm déterminée au paragraphe 4.1. / 2pts

Déterminer l'activité spécifique de l'enzyme de l'extrait brut de l'enzyme sachant qu'un volume de l'extrait brut a été décongelé et dilué par addition de 20 ml de tampon TS donnant la solution B, solution enzymatique (que vous utilisez pour le TP).

/ 5 pts discussion

/ 5pts résultat final

Principe de la méthode de dosage.

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexation) avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présent dans la ou les protéines.

La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé historiquement à 595 nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

Contrairement aux autres méthodes de mesure des protéines, la méthode de Bradford est moins sensible aux interférences par divers agents présents dans les échantillons de protéine. Elle est toutefois affectée par les détergents, modifiée par le PH, et donne un résultat positif également aux polyphénols hydrosolubles de haut poids moléculaire (tanins).

Quelques limites de cette analyse :

La méthode de Bradford est linéaire sur un intervalle étroit, typiquement de 2 microg/ml à 120 microg/ml, ce qui rend nécessaire des dilutions préliminaires de l'échantillon tissulaire avant analyse.

Les acides aminés, les peptides et les protéines de bas poids moléculaire (<3000 Da) ne sont pas détectés par cette méthode.

Matériel commun

Un bain marie thermostaté à 30 °C
Trois spectrophotomètres.
pH mètre agitateur
gants

Solution commune à ne pas renverser

Echantillon d'enzyme.
2 mercaptoéthanol
Solution de braford
1l de tampon TS + Na₂CO₃

A faire par les préparatrices

Produits sigma à peser.

Tampon monosodique
Tampon disodique
Onp
Na₂CO₃
SAB en poudre

Peser 0.0169g

Sur les paillasses.**Prévoir 5 binômes**

P1000, P100
Fiole jaugée de 100ml et 50 ml
3 flacons pour mettre les solutions
Bécher
Tubes hémolyses
Bouchons pour tubes
Cônes bleus
Cônes jaunes
Eau distillée, papier absorbant.
Poubelle plastiques
Flacons pour mettre les solutions tampons

Grille de correction

Donner le spectre de l'orthonitrophénate /2 pts

Tracer la courbe $A = f(c)$ et calculer le coefficient d'extinction molaire de l'ion orthonitrophénate. / 4pts /2 pts

Calculer ce même coefficient d'après la valeur de l'absorbance à 420 nm déterminée au paragraphe 4.1. / 2pts

Déterminer l'activité spécifique de l'enzyme de l'extrait brut de l'enzyme sachant que qu' un volume de l'extrait brut a été décongelé et dilué par addition de 20 ml de tampon TS donnant la solution B, solution enzymatique que vous utilisez pour le TP
/ 5 pts discussion
/ 5pts résultat final