

I. EXTRACTION DE LA MDH A PARTIR D'UNE FEUILLE D'EPINARD

I.1 Extraction des protéines solubles

Rappel : Tampon d'extraction : Tris HCl (100 mM, pH 7,6).

Le broyage des tissus se fait à froid, dans un mortier placé dans un bac contenant de la glace pilée en suivant les étapes :

- Laver délicatement des feuilles d'épinards à l'eau du robinet puis à l'eau distillée.
- Essuyer et couper les feuilles en petits morceaux, en peser 2 g.
- Broyer les 2 g de feuille d'épinard, en présence de sable de Fontainebleau (une pincée), dans 4 mL de milieu d'extraction.
- Après broyage, l'extrait est centrifugé à 10 000 tours pendant 5 minutes. Le surnageant est recueilli et est à nouveau centrifugé à 10 000 tours pendant 5 minutes.

Mettre de côté 500 μ L (dans la glace) du surnageant pour les mesures d'activité : 1QE, $\frac{1}{2}$ QE, 1,5QE et 2QE.

Question 1 : Quel volume de surnageant avez-vous récupéré ?

Question 2 : Que contiennent le culot et le surnageant ?

I.2 Détermination de la quantité de protéines dans l'extrait brut:

Le dosage des protéines totales sera réalisé sur l'extrait brut dilué au $\frac{1}{10}$ ^{ème} et $\frac{1}{20}$ ^{ème} en réalisant une gamme d'étalonnage avec la protéine de référence l'albumine sérique bovine (BSA pour 'Bovine Sérum Albumine) entre 0 et 1000 μ g/mL. La lecture se fera dans un lecteur de plaques (96 puits).

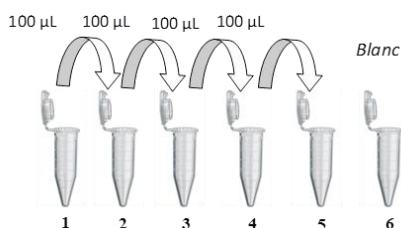
Question 3 : Pour quelle raison effectue-t-on les dilutions au $\frac{1}{10}$ ^{ème} et $\frac{1}{20}$ ^{ème} de l'extrait brut?

Préparation de la Gamme BSA :

Tube 1 : Correspondant à la solution de BSA (1 mg/mL).

Tubes 2-5: Réalisez de dilutions sériées dans l'eau (au $\frac{1}{2}$ à chaque fois) du tube 2 jusqu'au tube 5 : prélevez à chaque fois 100 μ L du tube précédent, diluez avec de l'eau (100 μ L) en mélangeant bien par plusieurs retournements du tube (schéma ci-dessous). Répétez l'opération jusqu'au tube 5.

Tube 6 (blanc) : Déposez 200 μ L d'eau.



Préparation de la solution de réactif BCA (Biorad, des informations sur ce réactif sont dans le doc annexe sur Eprel):

Vous disposez d'une solution **A** et d'une solution **B**.

Mélangez extemporanément 49 vol. **A** avec 1 vol. **B**.

Calculez le volume d'AB à préparer en fonction du nombre de puits (200 μ L seront utilisés pour chaque puits).

Question 4 : Quel est le volume de solution AB ?

Dans une plaque 96 puits:

- Transférez 40 μ L de chaque tube de la gamme et de l'extrait brut en duplicata.
- Ajoutez dans chaque puits 200 μ L de solution AB.
- Incuber la plaque pendant 30 minutes à 37°C.
- Lire l'absorbance à 595 nm et rapportez les valeurs dans le tableau ci-dessous.

Question 5 : Dans le tableau suivant, complétez les concentrations qui manquent pour les tubes 1-6 et notez les absorbances.

	1	2	3	4	5	6 (blanc)	Extrait 1/10 ^{ème} *	Extrait 1/20 ^{ème} *
Concentration BSA ($\mu\text{g/mL}$)	1000							
Absorbance à 595 nm								

- **ATTENTION : les dilutions de l'extrait doivent être réalisées dans l'eau.**

Question 6 : Réalisez le graphe correspondant à cette gamme d'étalonnage (le fournir en annexe).

Question 7 : Quelle est la concentration moyenne en (mg/mL) et en ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) des protéines dans l'extrait brut ?

II. DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA MDH DANS L'EXTRAIT PROTEIQUE (U/mg).

Dans la communauté scientifique et industrielle l'activité spécifique (a_s) d'une enzyme est souvent exprimée en U/mg. Vous devez pouvoir établir cette a_s sur votre préparation d'enzyme.

II.a) Mesure de l'activité (a) expérimentale de la MDH

Pour pouvoir déterminer l' a_s de la préparation, vous devez au départ pouvoir mesurer son activité dans une cuve de mesure.

Pour la détermination d'activité, le tampon d'incubation a la composition suivante : Tris 100 mM ; pH 7,6; DTT 1 mM; EDTA 1 mM.

Question 8 : Pourquoi ajoute-t-on du DTT et EDTA dans le tampon d'incubation alors qu'ils n'étaient pas présents dans le tampon d'extraction ?

Question 9 : Quelle sera la quantité d'enzyme (exprimée en U) nécessaire pour avoir une activité mesurable par spectrophotométrie et qui permettra d'avoir une variation de 0,1 DO/min dans une cuve de 3 mL (U/cuve) ? (Aidez-vous de l'expression de Beer-Lambert pour le calcul)

Question 10 : Si votre préparation d'enzyme contient environ 30 U/ml (voir a_s dans les renseignements de référence), quelle sera la quantité de la solution d'enzyme (exprimée en μL) à introduire dans la cuve pour obtenir l'activité calculée dans la question précédente (DO/min \sim 0,1).

Pensez à proposer les dilutions si nécessaire (les volumes à pipeter doivent être supérieurs à 10 μL) et pensez à les préparer. Les dilutions sont à réaliser dans le tampon d'incubation

PROTOCOLE DE MESURE DE L'ACTIVITE

Afin de déterminer l'activité spécifique vous réalisez 4 mesures d'activité : 1QE ; 1/2QE ; 1,5QE et 2QE (à partir de la solution d'enzyme diluée).

Question 11 : *Quel sera le volume de solution mère d'oxaloacétate dans la cuve ? Justifiez.*

Question 12 : *Quel sera le volume de solution de NADH dans la cuve ? Justifiez.*

Question 13 : *Pourquoi effectuerons-nous plusieurs mesures d'activité ?*

Question 14 : *Quelle sera l'absorbance que vous obtiendrez avec cette concentration de NADH ? (utilisez Beer-Lambert pour répondre).*

Réalisez une première mesure avec la quantité d'enzyme (QE) calculée en μL (extrait **dilué**) et vérifiez que ce QE donne bien une variation d'environ 0,1 DO/min (0,07 - 0,11 Ok). Si ce n'est pas le cas, adaptez en fonction de votre résultat.

Afin de réaliser vos mesures vous devez déterminer les volumes de solutions mères de substrats à introduire dans la cuve.

❖ Remplissez le tableau suivant:

CUVE	1 QE	1/2 QE	1,5 QE	2 QE
Vol d'oxaloacétate (μL) (Sol mère 3,5 mM)				
Vol. de NADH (μL)				

(Sol mère 5 mM)				
Vol. Tampon de mesure (µL) (qsp 3 mL)				
Vol. d'extrait brut ou de la dilution (µL)*				
Activité mesurée dans la cuve (DO/min)				
Activité mesurée dans la cuve (µmol/min)				
Indiquez les mg de protéines dans la cuve**				

*Indiquez les µL de l'extrait brut ou dilué utilisé.

**Utilisez le dosage de protéines dans l'extrait pour calculer les mg de protéine présentes dans les différentes cuves (prenez compte des dilutions).

Question 15 : Fournir en annexe, les graphes correspondant à chaque mesure d'activité en $Abs = f(\text{temps en minutes})$, déterminer la valeur de la pente.

II.b CALCUL DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE (a_s) EXPERIMENTALE EN U/mg

Question 16 : Quelle est l'activité spécifique (a_s) expérimentale de la MDH dans votre extrait protéique. Exprimez les résultats en U/mL et en U/mg.

U/mL =

U/mg protéines =

Question 17 : Comparez cette a_s expérimentale avec les données de référence. Commentez.

Question 18 : A quelle isoforme d'enzyme considérez qui correspond l' a_s expérimentale déterminée ? Commentez.

Question 19 : Donnez une conclusion générale pour ce TP en axant sur les connaissances et compétences acquises.