



TP 1 D'ENZYMOLOGIE	Extraction des peroxydases de navet et des épinards et mesure de leurs Activités spécifiques
---------------------------	---

Lieu : laboratoire BPC

Nombre de séances : 2 séances de 2H chacune

Séance 1 : Extraction et dosage des protéines

Séance 2 : Mesure de l'activité enzymatique et expression des résultats

I. Matériels et réactifs (voir annexe)

II. Extraction de l'enzyme

1. Laver et couper le matériel végétal en petits morceaux.
2. Peser et broyer ou mixer 20g de navets dans 100 ml d'eau distillée glacée avec un broyeur ou un mixeur électrique.
3. Filtrer le broyat sur de la gaze ou sur papier filtre
4. Centrifuger le filtrat obtenu pendant 10 min à 4000 rpm.
5. Récupérer le surnageant qui contient la peroxydase et le conserver à froid (4°).

III. Réalisation de la Gamme étalon BSA

La gamme étalon pour le dosage des protéines sera réalisée en suivant les indications du tableau suivant :

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Solution BSA 1mg/ml (µl)	0	10	20	30	40	50	60
Extrait enzymatique (µl)	0	0	0	0	0	0	0
Tampon (µl)	100	90	80	70	60	50	40
Réactif colorant (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Absorbance à 595 nm							

IV. Mesure des quantités des protéines obtenues dans les extraits enzymatiques

a) Diluer l'extrait obtenu aux 1/1 , 1/10 , 1/50 et 1 /100 comme suit :

E_B 1/1 : extrait non dilué

E₁₀ : extrait dilué au 1/10 : 1 volume de E_B + 9 volumes d'eau

E₅₀ : extrait dilué au 1/50 : 1 volume de E₁₀ + 4 volumes d'eau

E₁₀₀ : extrait dilué au 1/100 : 1 volume de E₁₀ + 9 volumes d'eau

b) Réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau :

	T0	T E _B	T E ₁₀	T E ₅₀	T E ₁₀₀
Tampon (μl)	100	80	80	80	80
Extrait enzymatique (μl)	0	20	20	20	20
Réactif colorant (ml)	1	1	1	1	1
Absorbance à 595 nm					

V. *Mesure de l'activité enzymatique*

L'activité enzymatique dans les extraits obtenus sera mesurée pour 3 concentrations d'extraits d'enzyme comme indiqué dans le tableau suivant :

	T0	T E ₁₀₀	T E ₁₀	T E _B
Gaiacol 2 ‰	1ml	1ml	1ml	
H2O2 0.3%	1ml	1ml	1ml	
Tampon phosphate	100μl	80μl	80μl	80μl
Extrait enzymatique	0μl	20μl	20μl	20μl
Incuber 10 à 20 min à l'obscurité				
Abs à 470nm				

RESULTATS :

1. *Tracer la courbe d'étalonnage de la BSA*
2. *Déterminer la quantité de protéine dans l'extrait obtenu en mg/ml*
3. *Déterminer la quantité d'enzyme dans l'extrait obtenu en U/ml*
4. *En déduire l'activité spécifique de l'enzyme extraite en U/mg de protéine*

ANNEXE

<i>Matériels pour l'extraction de l'enzyme</i>	<i>Matériels pour le dosage de protéines</i>	<i>Matériels pour mesure de l'activité enzymatique</i>
<ul style="list-style-type: none"> ● Navet ● Eau distillée glacée ● Bécher 100 ml ● Entonnoir ● Erlenmeyer 100ml ● Papier filtre ou de la gaze ● Tube de centrifugation ● Tubes pour conserver l'extrait obtenu ● Papier essuie-tout ● Pissette contenant l'eau ● Mixeur ou broyeur ● Centrifugeuse à 4°C 	<ul style="list-style-type: none"> ● Extrait enzymatique conservé à 4°C ● Tampon phosphate ● Solution BSA 1mg/ml ● Réactif de Bradford ● Tubes Eppendorf ● Micropipette 100µl ● Micropipette 1000µl ● Emboue jaunes ● Emboue bleus ● Cuve pour mesure d'absorbance ● Spectrophotomètre visible 	<ul style="list-style-type: none"> ● Extrait enzymatique conservé à 4°C ● Tampon phosphate ● Gaïacol 2⁰/₀₀ ● H₂O₂ 0,3% ● Tubes Eppendorf ou tube à essai ● Micropipette 100µl ou 200 µl ● Micropipette 1000µl ● Emboue jaunes ● Emboue bleus ● Cuve pour mesure d'absorbance ● Spectrophotomètre visible