

Utilisation d'Excel : Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme Michaelienne

N1 : Niveau normal ; N2 Niveau supérieur; N3 niveau expert

La β galactosidase hydrolyse l'ONPG avec libération de d'ONP qui est jaune en milieu alcalin et absorbe à 420 nm.

Bonus : A l'aide de Chems sketch, écrire cette réaction en donnant les formules chimiques **N1**

La vitesse initiale de la réaction (v_i) en fonction de concentrations en substrat variables, est mesurée par la technique par points

Le protocole est le suivant :

- Volume réactionnel pour la réaction enzymatique : $V_{MR} = 3 \text{ mL}$
- Volume d'enzyme : $V_{Enz} = 200 \mu\text{L}$
- Volume final de lecture après arrêt de la réaction est $V_f = 4 \text{ mL}$

Tube N°	0	1	2	3	4	5	6
oNPG pH7 à 2,5 mmol.L ⁻¹	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
Tampon pH7 en mL	2,8	2,6	2,4	2,2	2	1,8	1,6
Préchauffer 5 min à 30°C							
β galactosidase	200 μL – homogénéiser immédiatement						
Incuber à 30°C pendant 2 min exactement							
Na ₂ CO ₃ à 1 mol.L ⁻¹	1 mL – homogénéiser immédiatement						
A ($\lambda = 415 \text{ nm}$)	0	0.186	0.271	0.326	0.349	0.369	0.387

REMARQUE : La concentration en enzyme est constante.

1. Sur une feuille Excel, recopier le tableau ci-dessous à l'identique (Mise en forme sur Excel) **N1**

[oNPG] sol mère en mmol.L-1						
Tube	V_{oNPG} mL	A ($\lambda=415 \text{ nm}$) pour 2 min	[oNPG] mmol.L ⁻¹	V_i $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{L}^{-1}$	$1/[\text{oNPG}]$ L.mmol ⁻¹	$1/V_i$ $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{L}^{-1}$
1						
2						
3						
4						
5						
6						

2. Compléter ce tableau où seul les cases blanches seront à remplir. Les cases vertes contiendront des formules. **N1**

Remarque : La vitesse de réaction v_i sera exprimée en utilisant la formule de calcul suivante :

$$v_i = \frac{\Delta A}{t(s)} \times \frac{V_f}{V_{MR}} \times \frac{1}{\epsilon.l} \times 10^6 (\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{L}^{-1})$$

Donnée :

$$\epsilon_{ONP}^{415} = 4580 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

Utiliser des fonctions conditions pour que les cases vertes soient vides, quand les cases blanches le sont (pas de 0 ou de #DIV/0!). **N2**

3. Tracer la courbe de Lineweaver-Burk puis déterminer, à l'aide de formule, V_{max} et K_m . **N1**
Placer sur la courbe double inverse, les points V_{max} et K_m . **N2**
4. Rajouter des options : possibilités de faire varier tous les paramètres : Volume milieu réactionnel, volume d'enzyme, volume total, durée de la cinétique
Pour ces options des choix seront proposés
Pour l'option durée, les unités de temps pourront être choisies ce qui entraînera la modifications des unités dans tout les tableaux **N3**
5. Réaliser le graphique $V_i = f([ONPG])$ **N1**, et placer sur celui-ci V_{max} et K_m **N2**
6. A la fin de votre travail, tester votre feuille de calcul avec la deuxième série de valeurs donnée dans ce tableau

Tube	V_{ONPG} mL	A ($\lambda=415$ nm) pour 2 min
1	0,2	0,202
2	0,4	0,289
3	0,6	0,321
4	0,8	0,348
5	1	0,364
6	1,2	0,386

Les résultats attendus sont les suivants :

K_m mmol.L^{-1}	0,213688788
V_{max} $\mu\text{mol.s}^{-1}.\text{L}^{-1}$	1,123583164