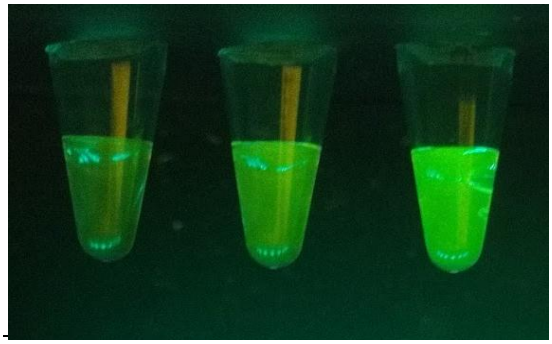
KIT FLUORESCENCE DES ENZYMES

Ref : ENZYMFLUO

Modifiée le 28/09/2020

Traduction et adaptation de la notice de MINIPCR



A RECEPTION DU COLIS :

☑ **Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous

☑ **Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :

Ouvrir le carton, 🌡 Placer les éléments suivants au réfrigérateur à 4°C 🌡

Réactifs	Volume inclus dans le kit	Quantité nécessaire par groupe	stockage
Substrat concentré	35 µl	**Ne pas utiliser pur : à mélanger avec le tampon 1**	4˚C
Tampon 1	1.5 ml	150 µl après l'avoir mélangé au substrat concentré	
1X solution de Beta-Galactosidase	800 µl	80 µl	
Tampon de dilution	1.5 ml	150 µl	
500 mM Lactose	500 µl	50 µl	
500 mM Sucrose			
100 mM NaOH			
4X Solution enzymatique	100 µl	10 µl	
40 µM Fluoresceine	1000 µl	100 µl	

Microtubes à PCR

Microtubes type ependorf (50)

Les réactifs doivent être utilisés dans les 2 mois suivant leur réception.

Tous les composants de ce kit sont sans danger. Les règles de manipulations en kit s'appliquent toutefois (le port de gants, lunettes et blouse est conseillé). Tous les résidus peuvent être jetés à l'évier.

MATERIEL ET CONSOMMABLES NECESSAIRES

Thermocycleur MINIPCR ou autre marque
visionneuse de fluorescence P51 MINIPCR ou cuve à électrophorèse BLUEGEL ou transilluminateur
Micropipettes : 2-20 et 20-200 µL + cônes
Bac réfrigérant

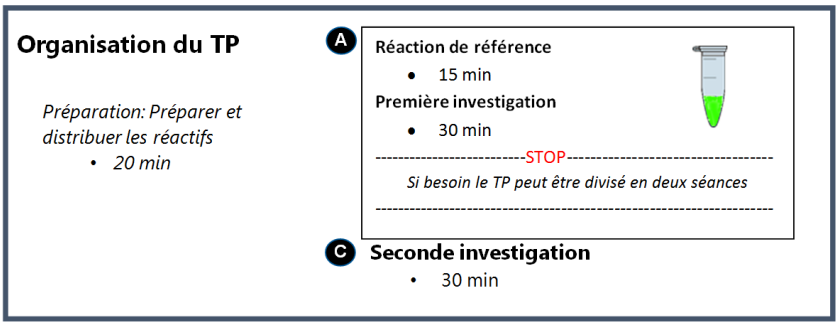
AUTRE MATERIEL NECESSAIRE :

- Chronomètre ou téléphone avec fonctions de chronométrage
- Appareil photo ou téléphone avec fonction photo pour l'enregistrement des résultats
- Gants de kit jetables
- Lunettes de protection
- Marqueur permanent (la pointe fine est préférable)
- Petit gobelet pour l'élimination des matières
- Papier pH (facultatif)

ORGANISATION DE LA SEANCE

Dans ce kit, tous les binômes commenceront par effectuer la même "réaction de référence". À partir de là, les binômes effectueront l'une des quatre enquêtes indépendantes. Nous avons fourni suffisamment de réactifs pour que chaque groupe d'élèves puisse poursuivre deux des quatre enquêtes selon une approche centrée sur l'élève. L'ensemble du kit peut être réalisé en deux séances de 45 minutes en classe ou en une seule séance d'une heure et demie. Si vous souhaitez réaliser le kit en une seule séance, nous recommandons que les binômes d'élèves ne réalisent qu'une seule enquête. Comme il s'agit d'une enquête basée sur l'investigation, les estimations de temps peuvent varier selon le groupe.

Une fois que la réaction de référence est terminée, les activités suivantes peuvent être menées indépendamment les unes des autres.



1. Objectifs cognitifs

Ce kit est structuré en quatre enquêtes. Dans chaque enquête, les élèves explorent l'effet d'un facteur différent sur le taux de réaction enzymatique. Les quatre facteurs qui peuvent être explorés dans ce kit sont : le pH, la température, la concentration des enzymes et des substrats, et l'inhibition compétitive. Ce kit fournit suffisamment de réactifs pour 32 élèves (16 binômes) afin que chacun puisse poursuivre au moins deux de ces recherches.

Chaque groupe commencera par créer une série de dilutions de fluorescéine à utiliser comme échelle visuelle standard. Les binômes utiliseront ensuite l'enzyme β-galactosidase pour catalyser la libération de la fluorescéine en solution à partir d'une molécule de substrat. Les élèves mesureront d'abord le taux de réaction de base, puis seront invités à concevoir leurs propres expériences pour étudier comment le changement de différentes conditions affecte la fonction de la β-galactosidase, mesurée par la vitesse à laquelle la fluorescence augmente en solution.

Vous pouvez choisir de laisser les élèves choisir librement les recherches qu'ils vont mener, d'assigner à différents binômes des recherches différentes ou de ne faire qu'une ou deux des activités en classe.

Si les enseignants préfèrent un ensemble d'instructions plus traditionnelles, étape par étape, pour chaque recherche, celles-ci sont incluses dans cette notice, en plus des questions plus traditionnelles posées avant et pendant le kit.

2. **Guide rapide : Activités préparatoires** *(pour 16 binômes)*

Les réactifs sont stables à température ambiante pendant au moins 72 heures ou pendant le temps de préparation, bien qu'il soit recommandé de les réfrigérer et de les protéger de la lumière.
Il est recommandé de porter des gants et des lunettes de protection pendant toute la durée de ce TP.

Le substrat est fourni à une concentration 100 fois supérieure à celle nécessaire pour la réaction "standard". Comme certaines recherches nécessiteront de modifier la concentration du substrat, nous recommandons de distribuer la solution de substrat sous forme de solutions mères 2X que les élèves pourront diluer davantage.

***Note : Assurez-vous que le substrat concentré est complètement décongelé avant de l'utiliser.**

- Ajouter le "substrat concentré" au "tampon 1" pour obtenir un **substrat 2X**
  - Ajouter 30 µl de "Substrat concentré" au flacon étiqueté "Tampon 1".
  - Fermer le bouchon et secouer plusieurs fois pour mélanger.
  - *Le "Substrat concentré" est expédié en petit volume de 35 µl. Nous recommandons de le centrifuger avant de l'ouvrir pour s'assurer qu'aucun liquide ne soit perdu.*

- Aliquoter les réactifs dans des microtubes de 1,5 ml étiquetés. Chaque groupe aura besoin des réactifs suivants :
  - Substrat 2X (Substrat concentré mélangé au tampon 1) : 75 µl
  - 1X β-galactosidase (étiquette "1X Enzyme" ou "1X β-gal", 1 tube par groupe.) : 40 µl
  - Tampon de dilution : 75 µl
  - 40 µM Fluorescein : 50 µl

- En outre, les binômes effectuant les enquêtes suivantes auront besoin de ces réactifs supplémentaires
  - Pour les élèves qui étudient la dépendance au pH
    - 100 mM NaOH (étiquette "NaOH") : 25 µl
    - Pour les élèves qui étudient la concentration des enzymes
    - Solution enzymatique 4X (étiquette "4X Enzyme". 1 tube par groupe.) : 5 µl
  - Pour les élèves qui étudient l'inhibition de la compétition
    - 500 mM de solution de lactose (étiquette "Lactose". 1 tube par groupe.) : 25 µl
    - Solution de saccharose 500 mM (Étiquette "saccharose". 1 tube par groupe.) : 25 µl
  - Distribuez les tubes par groupe.
    - Tubes 200 µl :5-10 tubes par groupe selon l'enquête.

3. **Synopsis**

Ce kit permet aux élèves d'étudier l'activité enzymatique et les conditions qui l'affectent. Dans des conditions optimales, les enzymes catalysent ou accélèrent la vitesse des réactions chimiques. Cela se résume généralement à la conversion d'un ou plusieurs substrats en un ou plusieurs produits, alors que l'enzyme elle-même n'est pas modifiée dans la réaction. Ce kit utilise un substrat qui consiste en une molécule fluorescente, la fluorescéine, liée à deux monosaccharides de galactose. Le substrat n'est pas fluorescent, mais lorsque les molécules de galactose sont éliminées par hydrolyse, la fluorescéine, un produit de la réaction, devient fluorescente sous une lumière bleue. L'observation de l'intensité de la fluorescence de la solution au fil du temps permet aux élèves d'observer la progression de la réaction, et en enregistrant la luminosité relative au fil du temps, les élèves peuvent quantifier l'effet de différents facteurs sur l'efficacité des enzymes.

Les élèves utiliseront une approche de recherche pour étudier comment différentes conditions influencent l'activité enzymatique. Tout d'abord, les élèves recevront des instructions étape par étape pour observer la réaction standard dans des conditions de température ambiante. Ensuite, ils concevront leurs propres approches expérimentales pour étudier comment les conditions suivantes affectent la vitesse de réaction :

- Température - pH
- Concentration - Inhibition de la concurrence

Ce kit fournit suffisamment de réactifs pour huit binômes afin que chacun puisse étudier au moins deux des conditions énumérées ci-dessus.

Ce kit est conçu pour être facilement modifié et applicable à des élèves allant du collège au lycée. C'est également une excellente option pour le kit de biologie AP 13 : Activité enzymatique.

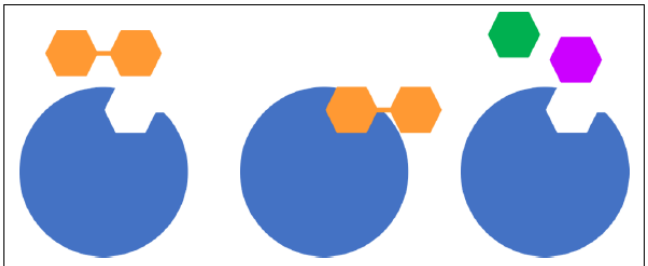
4. **Contexte et signification**

Lorsque nous pensons à la vie, nous pensons à des processus dynamiques : changement, croissance, mouvement. Pour nombre de ces processus, les molécules les plus centrales sont des enzymes - des protéines qui catalysent (accélèrent) les réactions chimiques. Les enzymes travaillent dans des voies pour décomposer ou construire des molécules, elles digèrent votre nourriture, elles génèrent le mouvement du corps, elles transportent les molécules dans et hors des cellules, elles répliquent et transcrivent votre ADN. Si vous pouvez penser à un processus ou à une action qui se déroule activement dans la cellule, une enzyme est probablement au centre de ce processus. En fait, le rôle premier de l'ADN est de porter les instructions pour la fabrication des protéines, au premier rang desquelles les enzymes. Sans ces molécules, la vie telle que nous la connaissons n'existerait pas.

Les enzymes sont des protéines, et comme toutes les protéines, les enzymes sont des polymères constitués de monomères d'acides aminés qui sont pliés en formes tridimensionnelles précises. Les enzymes fonctionnent en se liant très spécifiquement à une ou plusieurs molécules, appelées substrat. Le site sur l'enzyme où le substrat se lie est connu comme le site actif. Lorsqu'il est lié à un site actif, le substrat est orienté de telle manière qu'une réaction chimique est plus susceptible de se produire. En tant que catalyseurs, les enzymes accélèrent les réactions chimiques en diminuant la quantité d'énergie nécessaire au démarrage de la réaction. Les enzymes ne provoquent pas de réactions qui n'auraient pas lieu autrement ; elles les accélèrent simplement - souvent de manière significative. Certaines enzymes peuvent accélérer en quelques millisecondes des réactions qui pourraient autrement prendre des millions d'années.

Dans une réaction catalysée par des enzymes, les substrats sont modifiés par la réaction, mais pas l'enzyme. Cela signifie que la même enzyme peut catalyser une réaction de façon répétée tant qu'il y a un substrat avec lequel elle peut réagir. Le substrat, cependant, est modifié de façon permanente dans la réaction.

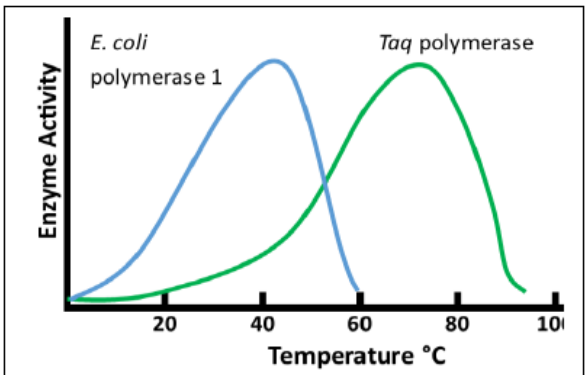
Les enzymes fonctionnent généralement mieux dans les environnements physiologiques très spécifiques où elles remplissent leurs rôles biologiques. En effet, l'évolution a façonné chaque type d'enzyme pour qu'il fonctionne de manière optimale dans les conditions dans lesquelles il se trouve habituellement, et les enzymes ont tendance à être très sensibles aux changements de ces conditions. Des facteurs tels que le pH, la température, la concentration et d'autres molécules présentes en solution peuvent avoir des effets profonds sur l'efficacité d'une enzyme. L'effet de chacun de ces facteurs est examiné ci-dessous.



In an enzyme catalyzed reaction, the substrate (orange) fits into the active site of the enzyme (blue) due to the unique shape and chemical properties of the active site. The substrate is changed by the reaction, but the enzyme is not.

Température

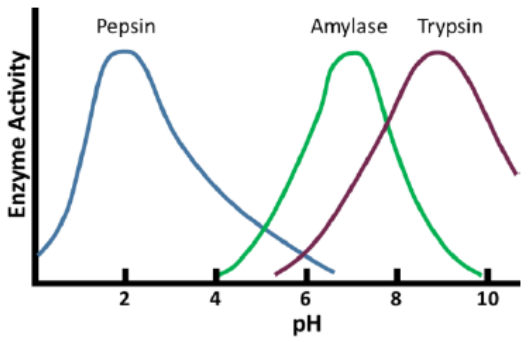
La plupart des enzymes fonctionnent mieux dans une plage de température relativement étroite. En règle générale, lorsqu'un système est trop froid, le manque d'énergie dans le système ralentit les réactions. Plus un système est chaud, plus l'augmentation générale de l'énergie entraîne une accélération des réactions. Cependant, l'ajout d'une quantité excessive de chaleur dans le système peut déstabiliser et modifier la forme de l'enzyme. Si une enzyme est trop chaude pendant trop longtemps, elle peut changer de forme ou se dénaturer de façon permanente, rompant sa conformation tridimensionnelle, ce qui compromet de façon permanente sa capacité à catalyser les réactions. Selon l'organisme dans lequel l'enzyme fonctionne normalement, la quantité d'énergie thermique nécessaire pour dénaturer une enzyme peut varier considérablement. Par exemple, l'ADN polymérase 1 de E. coli et l'ADN polymérase de Thermus aquaticus (Taq) sont toutes deux des ADN polymérases que l'on trouve dans les bactéries. E. coli vit généralement dans les intestins d'autres animaux, et c'est pourquoi les enzymes de E. coli ont tendance à bien fonctionner à environ 37-40° C, soit à peu près la température du corps. Le Thermus aquaticus est un organisme thermophile qui vit dans les sources chaudes, et c'est pourquoi la Taq polymerase fonctionne mieux à des températures supérieures à 70° C, assez chaudes pour vous brûler.



Approximate relative activity of two different polymerase enzymes at different temperatures.

pH

Le pH est une mesure de la quantité relative d'ions hydrogène (H+) chargés positivement et d'ions hydroxyde (OH-) chargés négativement en solution. Les changements de concentration de ces deux ions peuvent influencer les réactions catalysées par les enzymes de deux façons.
Premièrement, le site actif d'une enzyme contient des acides aminés qui vont former des liaisons temporaires avec le substrat. Une augmentation ou une diminution des ions H+ en solution peut interférer avec l'état d'ionisation des acides aminés dans le site actif, en altérant leur charge. Un tel changement affectera grandement la capacité du substrat à se lier au site actif, réduisant ou éliminant la capacité de l'enzyme à catalyser la réaction.
Deuxièmement, la structure tridimensionnelle spécifique d'une enzyme doit être maintenue pour que l'enzyme puisse fonctionner correctement. Cette structure repose sur les liaisons hydrogène entre les acides aminés pour maintenir la stabilité. Les liaisons hydrogène sont des interactions relativement faibles entre les acides aminés polaires. Les ions H+ ou OH- chargés peuvent se lier aux régions polaires des acides aminés, interférant avec leur capacité à se lier à d'autres régions de l'enzyme. En affectant les liaisons hydrogène de cette manière, la structure tridimensionnelle de l'enzyme peut devenir instable et perdre sa capacité catalytique. Une modification trop importante du pH peut entraîner la dénaturation de l'enzyme, altérant de façon permanente sa forme et sa capacité de catalyseur.



Approximate relative activity of three different enzymes at different pH values.

Comme la température, cependant, différentes enzymes ont évolué pour fonctionner de manière optimale dans différentes conditions de pH. La pepsine, par exemple, est une enzyme qui brise les liaisons peptidiques des protéines. La pepsine se trouve dans l'estomac et est donc optimisée pour fonctionner à des valeurs de pH (acide) extrêmement faibles (concentration élevée de H+). En revanche, l'amylase est une enzyme produite dans les glandes salivaires et le pancréas et fonctionne mieux à des valeurs de pH neutres plus typiques du corps (proches de pH 7), en décomposant les amidons en sucres simples. La trypsine, une autre enzyme qui décompose les protéines, est active dans l'intestin grêle et fonctionne mieux à un pH supérieur à 8.

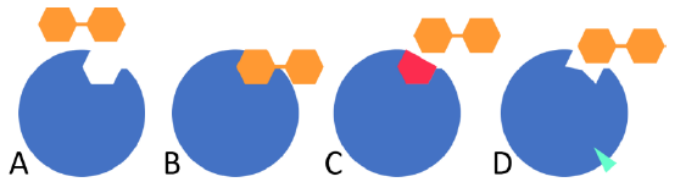
Concentration des enzymes et des substrats

Les enzymes individuelles catalysent des réactions uniques à la fois, de sorte que la vitesse à laquelle une réaction progresse peut dépendre fortement à la fois de la quantité d'enzyme et de substrat en solution.
Les enzymes et les substrats interagissent lorsqu'ils entrent en contact les uns avec les autres dans la bonne conformation. Mais les enzymes et les substrats n'entrent généralement en contact que par un mouvement aléatoire des molécules en solution, appelé mouvement brownien. Plus il y a de molécules d'une enzyme en solution, plus il est fréquent qu'une enzyme et un substrat entrent en contact et réagissent. Moins il y a de molécules d'enzyme en solution, moins cela se produit souvent. C'est pourquoi, en règle générale, pour une quantité donnée de substrat, l'ajout d'un plus grand nombre de molécules

d'enzyme en solution entraîne une réaction plus rapide. Moins il y a de molécules d'enzyme en solution, plus la réaction est lente. Il en va de même pour le substrat. Plus on ajoute de substrat à la solution, plus les enzymes rencontrent les substrats à un rythme élevé, ce qui augmente la vitesse de la réaction. L'ajout d'une quantité suffisante de substrat, cependant, entraînera la saturation des enzymes. Cela se produit lorsqu'il y a tellement de substrat que toutes les molécules d'enzymes disponibles en solution sont liées à un substrat, et dès qu'une enzyme et un substrat réagissent, une nouvelle molécule de substrat se lie à l'enzyme. Dans ces conditions, l'ajout de substrat supplémentaire n'augmentera pas la vitesse de réaction. Abaisser la concentration de substrat en dessous du point de saturation réduira la vitesse de la réaction, car à des concentrations plus faibles, l'enzyme et le substrat seront à nouveau moins susceptibles de se rencontrer en solution.
Lorsqu'une réaction est en cours, la concentration de substrat diminue avec le temps en raison de son traitement par l'enzyme. Par conséquent, la vitesse d'une réaction enzymatique devrait ralentir à mesure qu'elle progresse. C'est pourquoi, lorsqu'ils mesurent les vitesses de réaction, les scientifiques mesurent généralement la vitesse initiale de la réaction, c'est-à-dire la vitesse de la réaction lorsque l'enzyme et le substrat sont d'abord combinés.

Inhibition

Les molécules qui peuvent interférer avec l'activité enzymatique sont appelées inhibiteurs. Les inhibiteurs compétitifs agissent en occupant le site actif de l'enzyme, bloquant physiquement la liaison du substrat. Les inhibiteurs non compétitifs se lient à une région de l'enzyme qui est séparée du site actif, ce qui modifie généralement légèrement la conformation de l'enzyme, altérant ainsi la capacité de l'enzyme à catalyser la réaction. Comme les inhibiteurs compétitifs bloquent physiquement le site actif, mais ne modifient pas la structure de l'enzyme, ils peuvent ralentir les réactions, mais n'empêchent généralement pas l'enzyme de catalyser la réaction. Et si un substrat est en concentration beaucoup plus élevée qu'un inhibiteur compétitif, l'inhibiteur aura peu d'effet car le site actif est plus susceptible de rencontrer le substrat que l'inhibiteur. Si l'inhibiteur est en concentration plus élevée que le substrat, il aura plus d'effet, car l'enzyme est plus susceptible d'entrer en contact et de se lier à l'inhibiteur qu'au substrat.



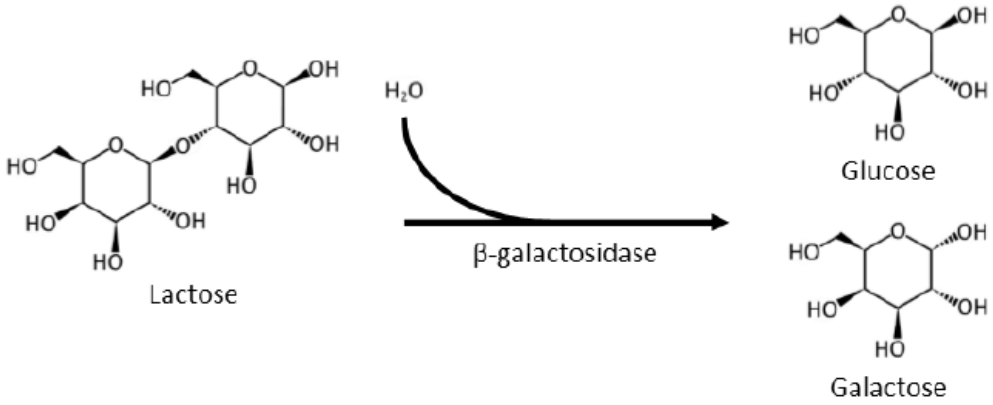
In a typical reaction (B), the substrate fits in the active site of the enzyme because of the unique shape and chemical properties of the active site. In the presence of a competitive inhibitor (C), another molecule binds to the active site, physically blocking the substrate from binding. In non-competitive inhibition (D), a molecule binds to a location on the enzyme separate from the active site, changing the conformation of the active site.

Les inhibiteurs non compétitifs ne sont pas affectés par la concentration du substrat. Comme le substrat et l'inhibiteur se lient à des régions différentes de l'enzyme, la modification de la concentration du substrat n'affecte pas la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme. Avec un inhibiteur non compétitif, même avec de très grandes concentrations de substrat, la réaction sera toujours inhibée.

Dans ce kit, les élèves vont étudier la fonction de la β-galactosidase. La β-galactosidase est un type d'enzyme que l'on trouve dans de nombreux organismes, des bactéries aux humains. Elle catalyse l'hydrolyse de la liaison glycosidique entre le monosaccharide galactose et d'autres glucides. C'est une

forme spécifique de β-galactosidase, la lactase, qui donne aux mammifères la capacité de digérer le lait. À l'intérieur de vous, la lactase brise la liaison glycosidique du sucre primaire du lait, le lactose. Le lactose se compose d'un galactose et d'un monomère de glucose, liés pour former un disaccharide. β-galactosidase brise cette liaison, mais elle brise aussi facilement toute liaison glycosidique entre le galactose et une autre molécule. En effet, le site actif de l'enzyme β-galactosidase se lie uniquement à la partie galactose du substrat et ne dépend pas de la structure des autres composants de la molécule.
Dans ce kit, vous utiliserez l'enzyme β-galactosidase pour catalyser la dégradation d'une molécule qui contient deux monomères de galactose liés à une molécule de fluorescéine. La fluorescéine est une

molécule qui apparaîtra d'un vert fluorescent brillant lorsqu'elle est exposée à la lumière bleue et est couramment utilisée dans les applications biologiques. Mais la fluorescéine ne sera pas fluorescente



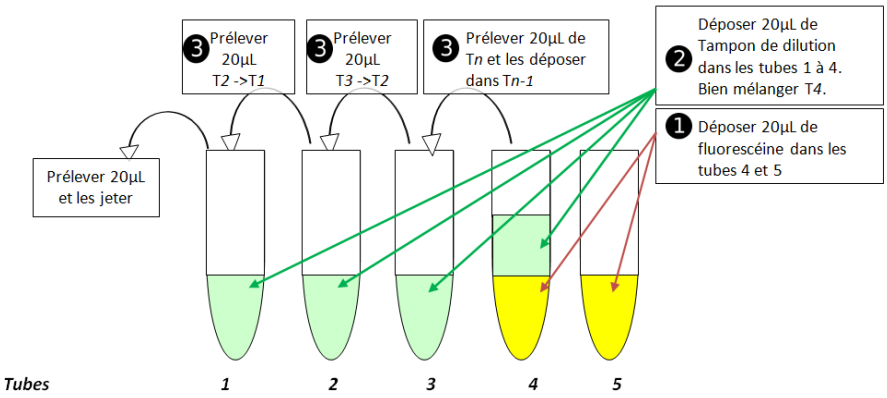
lorsqu'elle sera liée aux deux monomères de galactose dans le substrat ; ce n'est que lorsque les monomères de galactose ne seront plus liés à la fluorescéine que l'on observera une fluorescence.

Pour mesurer la progression de vos réactions, vous comparerez la luminosité de la fluorescence dans votre réaction afin de déterminer la quantité de fluorescéine produite. Pour quantifier la luminosité, vous allez d'abord créer une gamme étalon en utilisant des concentrations connues de fluorescéine. En comparant la luminosité de votre réaction à une gamme étalon de fluorescéine, vous pourrez mesurer la progression relative de la réaction dans le temps et obtenir une estimation de la vitesse de réaction.

Vocabulaire utile :
Enzyme : protéine qui catalyse (accélère) une réaction chimique.
Substrat : La ou les molécules qui réagissent en se liant au site actif des enzymes au cours d'une réaction catalysée par une enzyme.
Produit : Les molécules qui sont formées à partir du réarrangement des liaisons dans le substrat.
Site actif : Emplacement sur une enzyme où elle interagit avec le substrat pour catalyser une réaction.
Inhibiteur : Molécule qui ralentit ou empêche une réaction catalysée par une enzyme.
Inhibiteur non compétitif : Inhibiteur qui se lie à une enzyme à un endroit autre que le site actif, ce qui modifie généralement la conformation de l'enzyme et l'empêche de fonctionner correctement.
Inhibiteur compétitif : Un inhibiteur qui se lie au site actif d'une enzyme, bloquant physiquement l'accès au site actif par le substrat.
Dénaturation : Processus par lequel une molécule organique complexe perd sa structure tridimensionnelle. Lorsqu'une enzyme se dénature, elle n'est plus fonctionnelle.

1) Observer la réaction
   a) Création d'une gamme étalon
      i) Pour mesurer votre réaction, vous aurez besoin d'une série de dilutions normalisées auxquelles comparer vos données.

- Étiquetez cinq tubes de 1 à 5
  - Dans le tube 5, ajouter 20 µl de 40 µM de fluorescéine
  - Dans le tube 4, ajouter 20 µl de 40 µM de fluorescéine
  - Ajouter 20 µl de tampon de dilution aux tubes 1-3.
  - Ajouter 20 µl de tampon de dilution au tube 4. Bien mélanger en pipettant de haut en bas.
  - Prélever 20 µl dans le tube 4 et les ajouter au tube 3. Bien mélanger en pipettant de haut en bas.
  - Prélever 20 µl dans le tube 3 et les ajouter au tube 2. Mélangez bien en pipettant de haut en bas.
  - Prélevez 20 µl dans le tube 2 et ajoutez-les au tube 1. Mélangez bien en pipettant de haut en bas.
  - Prélevez 20 µl du tube 1 et jetez-les.
  - Tous les tubes devraient maintenant contenir 20 µl de solution de fluorescéine.



      ii) Placez les cinq tubes dans P51™ ou un autre illuminateur à lumière bleue.
  - Placez les tubes dans P51 par ordre numérique, le tube 1 étant sur le bord et le tube 5 plus près du centre.
  - Il devrait y avoir trois fentes ouvertes dans le P51 pour des tubes supplémentaires ; celles-ci seront nécessaires plus tard.
  - Les tubes 1 à 5 peuvent rester dans l'illuminateur pour le reste de l'expérience.
  - Note : les tubes peuvent se décolorer avec le temps. Évitez d'exposer excessivement ou inutilement à la lumière bleue pour préserver la luminosité. Une quantité suffisante de fluorescéine est fournie à chaque groupe pour refaire cette série de dilutions si nécessaire plus tard au laboratoire.

      iii) Calculer la concentration dans chaque tube de votre gamme étalon.

Tube	1	2	3	4	5
Concentration					40 µM

Les tubes 1 à 5 représentent votre gamme étalon. La fluorescéine qui vous est fournie a été administrée à une concentration de 40 µM. La réaction que vous observerez produira de la fluorescéine en tant que produit. Vous utiliserez votre gamme étalon pour mesurer la quantité de fluorescéine produite au fil du temps.

b) Observer la réaction

i) Étiqueter un seul tube PCR de 200 µl "S".

- Utilisez un marqueur permanent à pointe fine pour écrire sur la paroi latérale du tube.

ii) Ajouter 10 µl de substrat 2X au tube.

- Utilisez une micropipette et assurez-vous que le substrat se trouve au fond du tube et qu'il n'y a pas de bulles.
- Gardez le bouchon du tube ouvert.

iii) Ajouter 10 µl de tampon de dilution pour créer une solution de substrat 1X.

iv) Allumez le site P51™ et placez le tube à l'intérieur.

- Placez le tube dans la prochaine position ouverte après votre gamme étalon (tubes 1-5)
- Assurez-vous que la lumière à l'intérieur du P51™ Viewer est allumée.

v) Ajoutez l'enzyme et observez la réaction.

- Pendant que le tube de substrat est encore dans le P51™, ajoutez 5 µl d'enzyme 1X directement dans la solution de substrat, en pipettant de haut en bas 3-4 fois pour mélanger.
- Fermez le couvercle de P51™ et observez la réaction de près.

En vous basant sur ce que vous avez observé, décrivez ce qui s'est passé dans le tube. Soulignez les termes "enzyme", "substrat" et "produit" dans votre réponse.

c) Mesurer la vitesse de la réaction (réaction de référence)

Maintenant que vous connaissez la réaction, nous allons mesurer sa progression dans le temps.

i) Répétez les étapes 1 à 5 de la partie B en utilisant un nouveau tube de substrat.

ii) Enregistrez la progression de la réaction.

- Cette fois, dès que vous ajoutez l'enzyme dans le tube de substrat, demandez à un membre du groupe de démarrer un chronomètre/chronomètre. Assurez-vous que le voyant P51 est allumé.
- Toutes les 10 secondes, estimez la luminosité de la réaction en la comparant aux cinq tubes de votre série de dilution de fluorescéine.
- Enregistrez vos scores de luminosité dans le tableau de données (page 23)

iii) Vous pouvez essayer de chronométrer la réaction une fois de plus jusqu'à ce que vous soyez à l'aise avec la procédure.

d) Changement d'une variable dans votre réaction - Concentration du substrat (facultatif)

Dans cette partie du TP, vous concevrez des expériences pour voir comment différentes variables affectent le taux d'enzymes. Nous ferons un essai avec la concentration de substrat comme exemple. Cette séquence vous permer de vous familiariser à la conception expérimentale de base avant de se lancer dans la partie de l'activité consacrée à l'expérimentation.

i) Étiqueter un seul tube PCR de 200 µl 0,5X.

- Utilisez un marqueur permanent à pointe fine pour écrire sur la paroi latérale du tube.

ii) Ajouter 5 µl de substrat 2X au tube.

- Utilisez une micropipette et assurez-vous que le substrat se trouve au fond du tube et qu'il n'y a pas de bulles.
- Gardez le bouchon du tube ouvert.

iii) Ajouter 15 µl de tampon de dilution pour créer une solution de substrat 0,5X.

- Pipeter de haut en bas 3-4 fois pour mélanger.
- S'assurer que le substrat se trouve au fond du tube et qu'il ne contient pas de bulles.
- Gardez le bouchon du tube ouvert.

iv) Allumez la visionneuse P51™ ou le système d'illumination (lumière bleue) et placez le tube à l'intérieur.

v) Ajoutez l'enzyme et observez la réaction.

- Ajoutez 5 µl d'enzyme 1X directement dans la solution de substrat, en pipettant brièvement de haut en bas pour mélanger.
- Fermez le couvercle de P51™ et observez la réaction de près.

vi) Enregistrez la progression de la réaction.

- Lorsque vous ajoutez l'enzyme à votre réaction, demandez à votre binôme de lancer un chronomètre.
- Toutes les 10 secondes, estimez la luminosité de la réaction en la comparant aux cinq tubes de votre série de dilution de la fluorescéine (gamme étalon).
- Enregistrez vos données dans le tableau des données.

vii) Comparez vos données à la réaction de référence (point C.)

Expliquez vos observations dans l'espace ci-dessous.

En vous basant sur ce que vous avez observé, décrivez ce qui s'est passé dans le tube. Comparez ces observations à la réaction de référence.

2) Enquête d'investigation

Vous allez maintenant choisir de poursuivre l'une des quatre enquêtes figurant dans le tableau au bas de cette page.

a) Instructions générales

- Pour chaque enquête, utilisez le tableau CER et le tableau des données pour planifier ce que vous allez faire, enregistrer vos résultats et dire ce que vous avez appris. Si vous faites plus d'une enquête, vous aurez besoin de plus d'un tableau CER. Ne commencez pas une enquête avant d'avoir rempli la moitié supérieure de votre tableau RCE.

- Utilisez les réactions que vous avez déjà complétées comme guide pour concevoir vos expériences.
- Quel que soit le substrat ou la concentration d'enzymes que vous décidez d'utiliser, assurez-vous d'utiliser le même volume pour chaque réaction. Lorsque vous modifiez les concentrations d'une solution, utilisez le tampon de dilution pour égaliser le volume final de vos réactions. Une réaction standard de 25 µl, consistant en 20 µl de solution de substrat 1X plus 5 µl de solution enzymatique 1X, est recommandée comme point de départ pour planifier vos investigations.
- Observez les réactions une à une. N'essayez pas d'exécuter plusieurs réactions simultanément.

La solution de substrat vous est fournie à une concentration de 2X afin que vous puissiez ajouter d'autres solutions à la réaction. Assurez-vous que la concentration finale est celle que vous souhaitez pour votre enquête.

Vous trouverez ci-dessous une liste de réactifs et de matériel que votre professeur mettra à votre disposition pour chaque enquête.

Sensibilité à la température

2X Solution de substrat	150 µl
1X Solution enzymatique	80 µl
Tampon de dilution	150 µl
Bain de glace	
machine miniPCR	
OU	
Bain d'eau chaude	
(40-55°C) et	
Bain d'eau chaude (au-dessus de 75°C)	

Dépendance à l'égard de la concentration

2X Solution de substrat	*150 µl*
1X Solution enzymatique	*80 µl*
Solution enzymatique	4 X *10 µl*
Tampon de dilution	*150 µl*

Sensibilité au pH

2X Solution de substrat	*150 µl*
1X Solution enzymatique	*80 µl*
Tampon de dilution	*150 µl*
100 mM NaOH	*50 µl*

Papier pH (facultatif)

Remarque : les valeurs de pH inférieures à six ne peuvent pas être étudiées dans ce laboratoire, car la fluorescéine ne réagit pas à un pH faible

Inhibition de la concurrence

2X Solution de substrat	*150 µl*
1X Solution enzymatique	*80 µl*
Tampon de dilution	*150 µl*
500 mM Solution de saccharose	*50 µl*
500 mM Solution de lactose	*50 µl*

b) Conseils simples pour chaque enquête

Si les élèves ont des difficultés, vous pouvez utiliser les suggestions suivantes pour les guider.
Pour chaque enquête, nous recommandons de faire environ 4 essais. Cela suffit généralement pour observer une relation claire sans perdre l'intérêt des élèves ou prendre trop de temps en laboratoire.

Il est important de bien mélanger l'enzyme et le substrat. Faites une démonstration de pipettage de haut en bas aux élèves et assurez-vous qu'ils s'exercent à pipeter de haut en bas tout en créant leurs réactions de référence. La première réaction de référence aura probablement une valeur de 2 ou 3 sur l'échelle de 5 points dans les 10 secondes qui suivent.

Parfois, les élèves introduisent une bulle au fond du tube lorsqu'ils ajoutent de l'enzyme. Cela peut rendre plus difficile l'interprétation de la luminosité. Fermer rapidement le bouchon et agiter la solution au fond du tube est un moyen rapide d'enlever la bulle.

Certains élèves peuvent trouver qu'il est plus facile de mélanger le substrat et l'enzyme en dehors du P51 en

1. en ajoutant l'enzyme au substrat,
2. en fermant le bouchon du tube,
3. donner un coup de pouce au tube,
4. en agitant le liquide au fond du tube,
5. le placer rapidement en P51 avant la première lecture.

Si vous utilisez cette approche, il est important de continuer à démarrer le chronomètre lorsque l'enzyme est ajoutée.

Température

- Il est important de modifier la température de l'enzyme et du substrat avant de lancer la réaction, de sorte que lorsque les deux sont mélangés, les conditions soient les mêmes dans les deux solutions.
- Nous avons constaté de nettes différences dans la vitesse de réaction en utilisant les températures suivantes.
- 0° C (bain de glace) - vitesse de réaction lente.
- Température ambiante ~22° C - vitesse de réaction "normale".
- 55° C - vitesse de réaction rapide.
- 75°+ C - dénaturation des enzymes, pas de réaction.
- Pour chaque température, placez un tube contenant 20 µl de substrat 1X et un second tube contenant un peu plus d'enzyme que ce que vous prévoyez d'utiliser (~8 µl) à la température souhaitée pendant plusieurs minutes afin de vous assurer que la température est entièrement atteinte.
- En déplaçant le substrat et l'enzyme vers le P51, les échantillons s'équilibreront lentement à la température ambiante, donc gardez les tubes à la température aussi longtemps que possible et ne les retirez que juste avant de les regarder.

pH

- Pour chaque essai, obtenir 20 µl de substrat 1X en utilisant 10 µl de substrat 2X plus 10 µl d'une combinaison de NaOH 100mM et de tampon de dilution.
- L'utilisation de 10 µl de NaOH 100mM non dilué mélangé au substrat devrait stopper complètement la réaction, ou presque.
- De petites augmentations du pH peuvent provoquer une légère augmentation observable de la vitesse de réaction.
- Utilisez du papier pH (non inclus) pour mesurer les changements de pH dans vos tubes après la réaction. Les changements observables de la vitesse de réaction peuvent se produire avec des différences de pH trop faibles pour être observées à l'aide du papier pH.

Concentration

- Les élèves peuvent choisir d'étudier les changements dans la concentration des enzymes, la concentration des substrats ou les deux.

- L'enzyme est fournie aux élèves dans une concentration de 4X et 1X.
- Une concentration enzymatique plus élevée entraînera une nette augmentation de la vitesse de réaction, mais peut être difficile à mesurer en raison de la vitesse de réaction.
- Nous recommandons d'essayer des réactions en utilisant des enzymes 4X, 1X, .5X et .25X.
- Diluer l'enzyme en plus grande quantité donnera des résultats clairs mais peut entraîner des temps de réaction qui s'allongent de plusieurs minutes.
- Le substrat est fourni dans une concentration de 2X.
- Nous recommandons de créer une série de dilutions 2X du substrat et d'utiliser ensuite 20 µl de substrat dilué avec 5 µl d'enzyme 1X dans chaque réaction.
- Cela permettrait d'observer les réactions avec les substrats 2x, 1X, .5X et .25X.
- La modification de la concentration du substrat modifiera la vitesse de la réaction, mais aussi la quantité totale de produit. Cela signifie que la luminosité finale du tube changera également.
- Les concentrations de substrat inférieures à celles indiquées ci-dessus seront difficiles à mesurer car la quantité totale de produit fluorescent sera très faible.

Inhibition de la concurrence

- Pour chaque essai, créer une réaction de 20 µl en utilisant 10 µl de substrat 2X plus 10 µl d'inhibiteur.
- Le saccharose ne devrait pas ralentir la vitesse de réaction et peut être considéré comme un contrôle négatif car il n'y a pas de galactose monomère dans la molécule de saccharose pour interagir avec le site actif de l'enzyme.
- La solution de lactose devrait ralentir la réaction de manière significative car le lactose contient un monomère de galactose et réagira avec l'enzyme.
- L'inhibition compétitive dépend de la concentration.
- Répétez la réaction après avoir dilué le galactose. Répétez à nouveau en utilisant une concentration différente de substrat.

9. Instructions détaillées pour chaque investigation

Des instructions détaillées peuvent être utilisées par l'enseignant pour se familiariser avec les procédures efficaces qui peuvent être utilisées pendant la partie enquête de ce laboratoire. L'enseignant peut

également choisir de faire suivre ces instructions aux élèves pour une expérience de laboratoire plus clairement définie. Si les élèves suivent ces instructions, il y a suffisamment de réactifs fournis pour chaque groupe afin d'essayer deux des quatre enquêtes.

A. Étude de la température

1) Étiqueter 8 tubes PCR (tubes à paroi mince de 200 µl)
   - Étiqueter les quatre premiers tubes S-A, S-B, S-C et S-D, et les mettre de côté. Ces tubes seront utilisés pour le substrat.
   - Étiquetez les quatre autres tubes E-A, E-B, E-C et E-D. Ces tubes seront utilisés pour l'enzyme.

2) Ajoutez le substrat aux tubes appropriés
   - Ajouter 10 µl de substrat 2X à chaque tube marqué d'un "S".
   - Ajouter 10 µl de tampon de dilution à chaque tube marqué d'un "S".
   - Fermer le bouchon de chaque tube après l'ajout des réactifs.

3) Ajouter l'enzyme dans les tubes appropriés
   - Ajouter 8 µl d'enzyme 1X à chacun des tubes marqués d'un "E".
   - Fermez le bouchon de chaque tube après avoir ajouté les réactifs.

4) Incuber les tubes à différentes températures pendant au moins 2 minutes
   - Placez les deux tubes marqués "A" dans un bain de glace
   - Laissez les deux tubes étiquetés "B" à température ambiante.
   - Incubez les deux tubes marqués "C" à 55°C. Utilisez un thermocycleur miniPCR™ en mode bloc chauffant, un bloc chauffant ou un bain-marie.
   - Incubez les deux tubes marqués "D" à 75°C ou plus. Utilisez un thermocycleur miniPCR™ en mode bloc chauffant, un bloc chauffant ou un bain-marie.

5) Allumez P51™ et transférez rapidement le tube contenant le substrat dans la boîte
   - Ouvrez les bouchons d'un ensemble de tubes et placez rapidement le tube étiqueté "S" (contenant le substrat) dans P51™.
   - Gardez le couvercle de P51™ ouvert.
   - Assurez-vous que la lumière à l'intérieur de la visionneuse de P51™ est allumée.

6) Ajoutez l'enzyme et observez/enregistrez la réaction
   - Ajouter 5 µl d'enzyme du tube marqué E directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
   - Démarrer une minuterie immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.
   - *Si un autre élève est disponible, il peut prendre une vidéo de la réaction.*
   - Fermez le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes par rapport à votre norme visuelle de 5 points.
   - Enregistrez vos observations dans le tableau des données (p. 21)

7) Répétez les étapes 4 et 5 pour les tubes incubés à d'autres températures

B. Enquête sur le pH

L'hydroxyde de sodium (NaOH) est un produit chimique corrosif qui peut causer des dommages à la peau et aux yeux. Il convient de porter des gants et des lunettes de protection à tout moment.

1) Étiqueter 4 tubes PCR (tubes à paroi mince de 200 µl)
   - Étiqueter les tubes A, B, C et D.

2) Ajouter le substrat à chaque tube PCR étiqueté
   - Ajouter 10 µl de substrat 2X à chaque tube.

3) Ajouter le tampon et le NaOH à chaque tube
   - Dans le tube A, ajouter 10,0 µl de tampon de dilution.
   - Dans le tube B, ajouter 6,7 µl de tampon de dilution et 3,3 µl de NaOH. Mélangez à la pipette de haut en bas.
   - Dans le tube C, ajouter 3,3 µl de tampon de dilution et 6,7 µl de NaOH. Mélanger à la pipette en montant et en descendant.
   - Dans le tube D, ajouter 10,0 µl de NaOH. Mélanger à la pipette de haut en bas.
   - Gardez les bouchons des tubes ouverts

4) Allumez P51™ et placez le tube A à l'intérieur
   - Assurez-vous que la lumière à l'intérieur du P51™ Viewer est allumée.

5) Ajoutez l'enzyme et observez la réaction
   - Ajouter 5 µl d'enzyme 1X directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
   - Démarrer une minuterie immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.
   - *Si un autre élève est disponible, il peut prendre une vidéo de la réaction.*
   - Fermez le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes par rapport à votre norme visuelle de 5 points.
   - Enregistrez vos observations dans le tableau des données (p. 21)

6) Répétez les étapes 4 et 5 pour les tubes B, C et D

7) Utilisez du papier pH pour déterminer le pH de vos échantillons.
   - Pipeter 2 µl de solution de chaque tube PCR directement sur un morceau de papier pH. Enregistrez rapidement la valeur du pH car la couleur change lorsque le papier commence à sécher.
   - Utilisez la feuille de référence fournie avec votre papier pH pour enregistrer le pH de chaque solution dans votre bande de tubes.
   - Vous pouvez également déchirer de petits morceaux de papier pH (entre 1 et 2 cm de long) : enroulez-les dans le sens de la longueur (comme un pain à hot-dog ou un taco à coquille souple) pour qu'ils s'insèrent dans les tubes PCR.

Utilisez un embout de pipette supplémentaire pour pousser le papier vers le bas de manière à ce qu'il entre en contact avec le liquide au fond du tube et l'absorbe.

C. Recherche de la concentration des substrats et des enzymes

I. Concentration des substrats

1) Étiqueter 4 tubes PCR (tubes à paroi mince de 200 µl)
- Étiqueter les tubes A, B, C et D.

2) Diluer le substrat concentré dans une série de dilutions en double
- Ajouter 20 µl de substrat 2X au tube A.
- Ajouter 10 µl de substrat 2X et 10 µl de tampon de dilution dans le tube B. Pipeter de haut en bas pour mélanger.
- Ajouter 5 µl de substrat 2X et 15 µl de tampon de dilution dans le tube C. Pipeter de haut en bas pour mélanger.
- Ajouter 2,5 µl de substrat 2X et 17,5 µl de tampon de dilution dans le tube D. Pipeter de haut en bas pour mélanger.

3) Allumez le site P51™ et placez le tube A à l'intérieur.
- Gardez le bouchon du tube ouvert.
- Assurez-vous que la lumière à l'intérieur du P51™ Viewer est allumée.

4) Ajoutez l'enzyme et observez la réaction
- Ajouter 5 µl d'enzyme 1X directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
- Démarrer une minuterie immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.
- *Si un autre élève est disponible, il peut prendre une vidéo de la réaction.*
- Fermez le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes par rapport à votre norme visuelle de 5 points.
- Enregistrez vos observations dans le tableau des données (p. 21)

5) Répétez les étapes 4 et 5 pour les tubes B, C et D

II. Concentration des enzymes

1) Étiqueter 6 tubes PCR (tubes à paroi mince de 200 µl)
- Étiquetez les quatre premiers tubes S-A, S-B, S-C et S-D., et mettez-les de côté.

NB: Ces tubes seront utilisés pour le substrat.

- Étiquetez les deux autres tubes E-.5 et E-.25.

NB: Ces tubes seront utilisés pour l'enzyme.

2) Diluer l'enzyme
- Ajouter 5 µl d'enzyme 1X et 5 µl de tampon de dilution dans le tube E-.5.
- Ajouter 2,5 µl d'enzyme 1X et 7,55 µl de tampon de dilution dans le tube E-.25.

3) Ajouter le substrat au premier ensemble de tubes étiquetés S-A, S-B, S-C et S-D
- Ajouter 10 µl de substrat 2X à chaque tube marqué d'un "S".
- Ajouter 10 µl de tampon de dilution à chaque tube marqué d'un "S".

4) Placer le tube S-A à l'intérieur de P51
- Assurez-vous que la lumière à l'intérieur du P51 est allumée.
- Gardez le bouchon du tube ouvert

5) Ajouter l'enzyme et observer la réaction
- Ajouter 5 µl d'enzyme 4X directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
- Démarrer une minuterie immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.

NB: Si un autre élève est disponible, il peut prendre une vidéo de la réaction.
- Fermez le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes par rapport à votre norme visuelle de 5 points.
- Enregistrez vos observations dans le tableau des données (p. 21)

6) Répétez les étapes 4 et 5 pour vos autres concentrations d'enzymes
- Au tube S-B, ajouter 5 µl de l'enzyme 1X

NB: Observez la réaction et notez vos résultats.
- Dans le tube S-C, ajoutez 5 µl d'enzyme du tube E-.5.

i. Observez la réaction et enregistrez vos résultats.
- Dans le tube S-D, ajoutez 5 µl de l'enzyme du tube E-.25.

i. Observez la réaction et enregistrez vos résultats.

D. Enquête sur l'inhibition compétitive

1) Étiqueter 3 tubes PCR.
- Étiqueter les tubes N, L et S.

i. N signifie "No Inhibitor" (pas d'inhibiteur)
ii. L est l'abréviation de Lactose
iii. S sera l'abréviation de Sucrose

2) Substrat aliquote
- Ajouter 10 µl de substrat 2X à chaque tube.

3) Ajouter les sucres.
- Ajouter 10 µl de tampon de dilution au tube N et pipeter de haut en bas pour mélanger
- Ajouter 10 µl de solution de lactose au tube L et mélanger à la pipette de haut en bas.
- Ajouter 10 µl de solution de saccharose dans le tube S et mélanger à la pipette de haut en bas.

4) Allumer le P51 et placer le tube N à l'intérieur.
- Assurez-vous que la lumière à l'intérieur de la boîte P51 est allumée.

5) Ajouter l'enzyme et observer la réaction
- Ajouter 5 µl d'enzyme 1X directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
- Démarrer une minuterie immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.

i. Si un autre élève est disponible, il peut prendre une vidéo de la réaction.
- Fermez le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes par rapport à votre norme visuelle de 5 points.
- Enregistrez vos observations dans le tableau des données (p. 21)

6) Répétez les étapes 4 et 5 pour les tubes L et S

III. Questions d'analyse

A. Questions à poser avant la mise en place d'une expérience

1. Dans une réaction catalysée par une enzyme, comment les réactifs sont-ils liés aux produits ?

2. Quel scénario aboutirait à la plus grande quantité de produit total produite, indépendamment du temps ?

a. Beaucoup d'enzyme et un peu de substrat.

b. Beaucoup de substrat et un peu d'enzyme.
Justifiez votre réponse.

3. Si les enzymes ne fonctionnent bien que dans une gamme très étroite de conditions, pourquoi n'est-ce pas un problème pour les enzymes qui fonctionnent dans votre corps ?

4. Décrivez l'importance du site actif d'une enzyme.

5. Que se passe-t-il lorsqu'une enzyme se dénature, et comment cela affecte-t-il la vitesse de réaction ?

6. Regardez les deux graphiques à droite de la page. En ne connaissant que cette information sur une enzyme inconnue, quelle description de l'organisme d'où provient l'enzyme semble la plus probable ?

a. Un oursin qui vit sous la glace de mer sur les côtes de l'Antarctique.

b. Une espèce de bactérie isolée d'une source chaude acide.

c. Une plante adaptée au désert qui vit au bord des plaines salées.

d. Helicobacter pylori, une espèce de bactérie adaptée pour vivre dans l'estomac de certains organismes.
Justifiez votre réponse.

7. Une réaction catalysée par une enzyme peut être arrêtée à la fois en la refroidissant suffisamment et en la chauffant suffisamment. Lequel de ces processus est le plus susceptible d'être réversible ? Justifiez votre réponse.

8. Parfois, la modification du pH ralentit ou arrête une réaction enzymatique, mais la modification du pH lui permet de continuer. D'autres fois, le changement est irréversible. Pouvez-vous penser à ce qui pourrait se produire différemment dans ces deux cas ?

9. Si vous vouliez qu'une réaction se déroule extrêmement rapidement, l'ajout de substrat ou d'enzyme serait-il plus efficace ? Justifiez votre réponse.

10. Dans certaines réactions, les produits de la réaction peuvent également être des inhibiteurs compétitifs. D'après votre connaissance des enzymes, des substrats et des sites actifs, pourquoi pensez-vous que cela pourrait être le cas ?

B. Questions pour après l'expérience

1. Lorsqu'on observe une réaction, à quel moment la réaction semble-t-elle progresser le plus rapidement ? Pourquoi pensez-vous que cela pourrait être le cas ?

Questions sur la température

2. À quelle température la réaction a-t-elle semblé progresser le plus rapidement ?

La plus lente ?

3. Si vous étiez capable d'isoler l'enzyme de votre réaction la plus chaude et de la réessayer à une température différente, quel serait le résultat, selon vous ?

Qu'en est-il de l'enzyme de votre réaction la plus froide ?

Questions sur le pH

4. Comment l'augmentation du pH de la solution a-t-elle affecté la vitesse de réaction enzymatique ?

5. Dans ce laboratoire, vous n'avez pas été en mesure d'abaisser le pH. Si vous l'aviez été, que serait-il arrivé, selon vous ? Justifiez votre réponse.

Questions pour la concentration

6. Qu'est-ce qui semble avoir le plus d'effet sur la vitesse de réaction, la modification de la concentration du substrat ou la modification de la concentration des enzymes ? Expliquez pourquoi vous pensez qu'il en est ainsi.

7. Qu'est-ce qui semble avoir le plus d'effet sur la quantité totale de produit produite dans la réaction ? Expliquez pourquoi vous pensez qu'il en est ainsi.

Questions pour l'inhibition de la concurrence

8. Quelle molécule semble avoir le plus d'effet sur la vitesse de réaction, le saccharose ou le lactose ?

Pourquoi pensez-vous qu'il en soit ainsi ?

9. Imaginez qu'au lieu du lactose, nous ajoutions une autre molécule contenant du galactose, mais que cette nouvelle molécule ne pouvait pas être décomposée par la β-galactosidase. Pensez-vous que cela aurait un effet plus ou moins important sur la vitesse de la réaction ? Justifiez votre réponse.

Tableau CER

Question:	
Hypothèse:	
Preuves provenant de textes ou d'autres sources qui vont dans le sens de votre hypothèse:	Je vais tester cela de la manière suivante:

Conclusion:
Preuves issues d'observations:
Raisonnement (veillez à intégrer les éléments de preuve provenant à la fois du texte et des observations)