

酶学 及其研究技术

Enzymology and Research Technology

陈清西 编著



厦门大学出版社
XIAMEN UNIVERSITY PRESS

酶学及其研究技术

Enzymology and Research Technology

陈清西 编著

厦门大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

酶学及其研究技术/陈清西编著. —厦门:厦门大学出版社, 2010. 7

ISBN 978-7-5615-3634-6

I. ①酶… II. ①陈… III. ①酶学-研究 IV. ①Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 150456 号

厦门大学出版社出版发行

(地址:厦门市软件园二期望海路 39 号 邮编:361008)

<http://www.xmupress.com>

[xmup @ public. xm. fj. cn](mailto:xmup@public.xm.fj.cn)

南平市武夷美彩印中心印刷

2010 年 8 月 1 版 2010 年 8 月第 1 次印刷

开本:787×1092 1/16 印张:20 字数:512 千字

定价:38.00 元

如有印装质量问题请与承印厂调换

前 言

随着生物化学与分子生物学的迅速发展,各学科之间的相互渗透更加广泛,酶的理论研究和应用研究都取得了突破性的进展。目前,国内外关于酶学方面的参考书有一些,但是,就酶学这个研究发展十分快速的学科而言,国内有关酶学的著作实在太少,远远不能满足酶学研究和酶学教学的需要。笔者1985年研究生毕业后,一直从事酶学的教学和科研工作,先后在国内学术刊物发表了230篇有关酶学的研究论文,其中SCI论文92篇。在酶学教学中,深感酶学教学参考书的紧缺。为此,笔者根据自己在酶学的教学和科研中累积的经验,编著了本书。在编写过程中,笔者力求结合本科生、硕士生的酶学教学以及科研方法,从最基本的原理出发,引用实例来阐明酶学的研究技术和方法,进而逐步展开讨论。

本书系统介绍现代酶学研究的原理及技术路线,主要围绕酶的分离纯化、理化性质、酶促反应动力学、热力学、失活动力学、化学修饰动力学、变性动力学、酶活力调控、酶活性中心功能基团性质、酶结构与功能、酶抑制剂的分子设计与改造及酶制剂的生产应用等。本书的特色是将科研成果有机地融合起来,并以几种海洋动物酶的研究为实例贯穿到相应的各个章节。

本书理论基础和实验技能并重,强调实验设计技能、操作技巧,适合作为本科生、研究生的教学与科研参考书。

本书是在硕士生“酶的结构与催化机理”和本科生“酶化学”的教学实践中不断充实完善的。在本书的编写中,得到王勤、石艳老师以及博士生谢晓兰、张继平、冷波、康劲翮、宋康康、邱凌、韩鹏等的大力支持和协助,在此表示衷心的感谢。

陈清西

2010年4月厦门大学

目 录

第一章 概论	(1)
第一节 酶的概念和酶学研究的重要性	(1)
一、酶是什么	(1)
二、酶学研究的重要性	(1)
三、酶学研究历史	(2)
四、现代酶学概况	(3)
第二节 酶的组成及结构特点	(4)
一、酶的化学本质	(4)
二、酶蛋白亚基数的组成特点分类	(4)
三、酶的组成分类	(4)
四、酶的辅助因子	(5)
第三节 酶的分类与命名	(5)
一、习惯命名法	(5)
二、国际系统命名法	(6)
三、国际系统分类法	(6)
第四节 酶作为催化剂的特点	(9)
一、酶与一般催化剂比较的共性	(9)
二、酶作为催化剂的显著特性	(10)
第五节 酶的专一性	(12)
一、酶的专一性分类	(12)
二、几种蛋白酶的专一性	(13)
第二章 酶的分离纯化	(17)
第一节 酶分离纯化的一般原则	(17)
一、确立酶活力测定方法	(17)
二、原材料的选择与处理	(17)
三、酶的纯化方法	(18)
四、酶的纯度鉴定	(18)
第二节 酶的提取	(19)
一、生物材料的破碎	(19)
二、酶的抽提	(20)
第三节 酶的纯化	(21)
一、沉淀法	(22)
二、离子交换柱层析技术	(25)
三、凝胶过滤柱层析法	(28)
四、亲和层析	(31)
五、其他分离纯化方法	(32)
六、酶纯化方法的选择与实验设计	(33)

第三节 酶活力的测定	(34)
一、酶活力测定的一般原则	(34)
二、初速度	(35)
三、酶活力单位	(35)
四、酶活力测定的主要方法	(36)
第四节 酶制剂的浓缩、干燥及保存	(38)
一、浓缩的主要方法	(38)
二、保存	(39)
第五节 酶纯度的鉴定技术	(39)
一、酶纯度的评价	(39)
二、电泳法	(39)
三、其他方法	(41)
第六节 酶的分离纯化应用实例	(41)
一、青蟹碱性磷酸酶	(41)
二、南美白对虾 N-乙酰 β -D-氨基葡萄糖苷酶	(44)
第三章 酶的理化性质研究	(48)
第一节 酶亚基数及分子量的测定	(48)
一、酶蛋白亚基数及亚基分子量的测定原理与方法	(48)
二、酶蛋白总分子量的测定原理与方法	(51)
第二节 酶的等电点测定	(52)
一、等电点测定的原理	(52)
二、等电聚焦电泳技术	(53)
第三节 酶的氨基酸组成	(55)
一、氨基酸组成分析	(55)
二、特殊氨基酸含量的测定	(57)
三、酰胺含量的测定	(58)
第四节 糖基酶中糖的组成与连接方式的研究	(59)
一、糖蛋白的分析	(60)
二、糖蛋白中糖成分的分析	(61)
三、糖基连接方式的研究	(61)
第五节 几种海洋动物酶的理化性质的研究实例	(63)
一、锯缘青蟹碱性磷酸酶的理化性质研究	(63)
二、南美白对虾 N-乙酰 β -D-氨基葡萄糖苷酶的理化性质研究	(68)
第四章 酶催化的动力学性质研究	(73)
第一节 酶促反应的基本动力学	(73)
一、Michaelis-Menten 方程的建立	(73)
二、Briggs-Haldane 修正的 Michaelis-Menten 方程	(74)
三、关于 Michaelis-Menten 方程的讨论	(76)
四、米氏常数 K_m 的意义	(78)
五、米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_m 的图解法测定	(79)
六、米氏方程的积分形式	(81)
第二节 King-Altman 方法推导速度方程	(84)

一、用稳态法推导动力学方程的基本步骤	(84)
二、King-Altman 图像法推导动力学方程	(85)
三、Wang 和 Hanes 结构法则	(91)
第三节 酶浓度对反应速度的影响	(91)
第四节 产物浓度对酶促反应的影响	(92)
一、产物对酶初速度的影响的动力学	(92)
二、可逆反应的 Haldane 关系式	(93)
第五节 高底物浓度对酶活力的影响	(94)
一、动力学模型建立	(94)
二、动力学方程的推导	(95)
第五章 酶的抑制剂	(99)
第一节 酶抑制剂的类型	(99)
一、酶抑制剂两大类型	(99)
二、区别可逆抑制剂与不可逆抑制剂的实验设计与操作	(101)
第二节 不可逆的抑制剂	(103)
一、非专一性的不可逆抑制剂	(103)
二、专一性不可逆抑制剂	(105)
第三节 可逆抑制剂作用的动力学	(108)
一、竞争性抑制作用的动力学	(108)
二、非竞争性抑制作用的动力学	(113)
三、反竞争性抑制作用的动力学	(116)
四、混合型抑制作用的动力学	(118)
第六章 pH 对酶活力的影响	(124)
第一节 pH 对酶催化的效应	(124)
一、酶促反应的最适 pH	(124)
二、酶的 pH 稳定性	(126)
第二节 pH 对酶可逆作用的动力学	(127)
一、酶活性中心可解离基团的解离常数	(127)
二、pH 影响酶活性中心解离基团的动力学模型的建立	(127)
三、酶活性中心解离基团的解离常数的测定	(129)
第三节 有机溶剂对酶活性中心解离基团的微扰作用	(132)
第四节 pH 对酶效应研究的实例	(133)
一、pH 对青蟹碱性磷酸酶(ALPase)催化 pNPP 水解反应的效应	(133)
二、酶活性中心解离基团解离常数的测定	(134)
第七章 温度对酶活力的影响	(137)
第一节 温度对酶催化反应的影响	(137)
一、酶促反应的最适温度	(137)
二、酶的热稳定性	(138)
第二节 温度对酶催化反应速度常数的影响	(139)
一、温度与速度常数	(139)
二、酶促反应的热力学参数的测定	(140)
第三节 温度对酶催化反应速度常数的影响	(141)

一、酶活性中心解离基团的标准热焓	(141)
二、酶促反应的热力学常数测定实例	(141)
三、酶活性中心解离基团的解离热焓测定实例	(142)
第四节 酶的热失活动力学	(143)
一、经典的酶热失活研究方法	(143)
二、酶失活过程中的底物反应动力学方法	(144)
三、酶的热失活表观速度常数的测定	(146)
四、酶热失活的微观速度常数的测定	(146)
第八章 酶的多底物动力学	(149)
第一节 术语	(149)
一、多底物催化反应历程的 Cleland 表示法	(149)
二、多底物反应的酶中间物	(150)
三、多底物反应历程的分类	(150)
四、多底物反应的动力学参数表示法	(150)
五、多底物反应机理的图形表示法	(150)
第二节 Ordered Bi Bi 机理	(151)
一、反应模型的 Cleland 表示法	(151)
二、动力学方程的推导(King-Altman 推导法)	(152)
三、反应速度方程用动力学常数表示的基本方法	(153)
四、作图法求解动力学参数	(154)
第三节 Random Bi Bi 机理	(155)
第四节 Ping Pong Bi Bi 机理	(156)
第五节 多底物反应机理的判断	(158)
第六节 产物的抑制作用机理的判断	(158)
一、有序双双反应(Ordered Bi Bi)的产物抑制作用的判断	(158)
二、乒乓双双反应(Ping Pong Bi Bi)的产物抑制作用的判断	(159)
三、Cleland 的产物抑制作用的判断规则	(160)
第九章 酶功能基团的化学修饰	(166)
第一节 化学修饰的原理	(166)
一、影响酶的功能基团反应活性的主要因素	(166)
二、修饰剂反应性的决定因素	(168)
第二节 采用非特异性试剂对酶功能基团进行修饰	(169)
一、特殊氨基酸残基的化学修饰	(169)
二、修饰剂和修饰反应条件的选择	(175)
第三节 亲和标记和差示标记	(177)
一、亲和标记法的原理	(177)
二、差示标记法的原理	(178)
第四节 酶活性中心必需基团数的测定	(178)
一、酶修饰失活动力学	(178)
二、酶修饰失活速度常数比较法判断必需基团数(Ray-Koshland 方法)	(180)
三、邹氏图解法求必需基团数	(181)
第十章 酶的分子结构基础及催化作用机理	(185)

第一节 酶分子的结构基础	(185)
一、酶分子的结构特点	(185)
二、酶活性功能基团的分析	(187)
三、结构层次	(188)
四、一级结构决定高级结构	(189)
五、一级结构与酶活力的关系	(191)
第二节 酶与底物的结合机理	(193)
一、锁钥学说(lock and key thoery)	(193)
二、“三点附着”理论	(193)
三、诱导契合学说(induced-fit hypothesis)	(194)
第三节 酶活性中心的柔曲性	(195)
一、酶的活性丧失和酶分子整体构象变化的关系	(195)
二、酶活性部位的柔性	(198)
第四节 过渡态和活化能	(198)
一、基本概念	(198)
二、酶和底物的结合作用	(199)
三、降低活化能的方式	(200)
第五节 酶催化机理	(200)
一、邻近效应(proximity)和定向效应(orientation)	(200)
二、底物形变和产生电子张力(strain, distortion)	(201)
三、酸碱催化(acid-base catalysis)和产生质子转移通路	(202)
四、共价催化(covalent catalysis)	(203)
五、酶活性中心微环境的作用	(203)
第六节 几种酶作用机理的实例	(204)
一、溶菌酶(lysozyme)	(204)
二、胰凝乳蛋白酶	(206)
三、羧基肽酶 A	(209)
四、乙酰胆碱酯酶	(211)
第十一章 酶抑制剂的设计与应用	(214)
第一节 酶抑制剂的设计原理	(214)
一、酶催化机理的抑制剂设计	(214)
二、基于酶晶体结构的抑制剂设计	(215)
三、计算机辅助设计	(215)
第二节 芳香酶(Aromatase)抑制剂的设计与应用	(216)
一、传统的芳香酶抑制剂	(216)
二、新型芳香酶抑制剂的设计	(217)
第三节 酪氨酸酶(tyrosinase)抑制剂的设计与应用	(221)
一、酶活性中心的结构	(222)
二、酪氨酸酶的催化机制	(222)
三、酪氨酸酶抑制剂的类型与设计	(223)
第四节 乙酰胆碱酯酶(AChE)抑制剂的设计与应用	(235)
一、乙酰胆碱酯酶结构特点	(235)

二、乙酰胆碱酯酶的抑制剂	(235)
第五节 环加氧酶选择性抑制剂的设计与应用	(239)
一、现有的选择性 COX-2 抑制剂	(239)
二、新型 COX-2 选择性抑制剂的设计	(239)
第六节 β -内酰胺酶(β -lactamase)抑制剂的设计与应用	(246)
一、常见的 β -内酰胺酶抑制剂类型与特点	(246)
二、金属 β -内酰胺酶类的抑制剂	(250)
第十二章 酶分子构象的研究技术	(252)
第一节 紫外光谱分析法	(252)
一、酶的紫外吸收光谱	(253)
二、酶的紫外吸收差光谱	(253)
三、二阶导数谱	(255)
第二节 圆二色性光谱(CD 光谱)	(255)
一、圆二色性光谱产生的原理	(256)
二、蛋白质圆二色性光谱特征	(256)
三、圆二色性光谱测定的实例	(258)
第三节 荧光光谱	(259)
一、荧光产生的机制	(259)
二、荧光发射光谱	(260)
三、酶蛋白的外源荧光	(262)
四、荧光偏振	(262)
五、荧光光谱参数测量	(263)
六、实验考虑	(264)
第四节 质谱	(265)
第五节 傅立叶变换红外光谱(FTIR)	(266)
第六节 锯缘青蟹碱性磷酸酶在盐酸胍溶液中的失活作用动力学	(268)
一、酶在盐酸胍溶液中的失活动力学模型的建立	(268)
二、酶在盐酸胍溶液中的失活动力学常数求法	(268)
三、酶在盐酸胍溶液中的失活动力学的微观速度常数测定	(269)
四、酶在盐酸胍变性过程中去折叠的速度常数的测定	(270)
第十三章 多酶体系及调节酶	(273)
第一节 多酶体系的种类	(273)
一、可溶性的多酶体系	(273)
二、结构化的多酶体系	(273)
三、在细胞器上有定位关系的多酶体系	(275)
第二节 多酶体系的研究方法	(275)
一、对酶促反应中间物的测定	(275)
二、模拟实验	(275)
三、同位素跟踪研究	(275)
四、动力学法研究	(275)
第三节 多酶体系的调控	(276)
一、酶浓度对反应速度的影响	(276)

二、底物浓度对反应速度的影响	(276)
三、产物的反馈抑制作用	(277)
第四节 别构酶	(278)
一、别构效应与别构酶	(278)
二、别构酶的结构特点	(279)
三、别构酶的动力学特征	(280)
四、别构酶的活力调控机理	(281)
五、别构酶的例子	(283)
六、别构酶对代谢的调控作用	(285)
第五节 同工酶	(286)
一、同工酶的类型	(286)
二、同工酶的亚基组成	(287)
三、同工酶的活性与性质差异	(287)
四、同工酶的分离与鉴定	(288)
五、同工酶的命名	(290)
六、同工酶研究的生物学意义	(291)
七、同工酶的应用	(292)
第十四章 酶活性调控	(294)
第一节 酶活性调节的方式	(294)
一、激素对酶活性的调控	(294)
二、酶浓度的调节	(294)
三、抑制剂和激活剂的调节	(294)
四、酶原激活	(294)
五、共价修饰的调节	(295)
六、别构酶的反馈调节	(295)
七、金属离子和其他小分子化合物的调节	(295)
第二节 通过配体诱导酶构象改变的活性调节	(296)
一、异促协同效应	(296)
二、同促协同效应	(296)
第三节 通过酶的共价结构的改变来调节酶活性	(297)
一、共价结构不可逆改变的活性调节	(297)
二、共价结构可逆改变的活性调节	(298)
附 中英文对照	(302)

第一章 概 论

生命最重要的、最基本的特征是新陈代谢,一切生命活动都是由代谢的正常运转来维持的,而生物代谢中的各种化学反应都是在催化剂的参与下完成的。这类催化剂是由生物体内细胞产生并在各反应中起催化作用的特殊蛋白质,这类蛋白质叫做酶(Enzyme),早期称之为酵素(Ferment)。酶是生命活动的最重要因素,是生命的激动者和调节者,是体内一切化学反应的媒介。它使生命有机体内极其错综复杂的化学反应能够有条不紊地进行,没有酶,代谢就会停止,生命也即停止。可见,酶在整个生命过程中起着十分重要的作用。

第一节 酶的概念和酶学研究的重要性

一、酶是什么

酶(Enzyme)作为一种生物催化剂,是由活细胞产生的具有催化功能的蛋白质。酶存在于所有的活细胞中,控制着细胞的代谢过程。细胞通过酶把各种营养物质转变成能量和新的细胞组成材料,维持细胞生命的重要机能。此外,酶还参与从简单化合物合成复杂生命高分子物质的过程。

酶是具有生物催化功能的生物大分子。所有的生物体在一定的条件下都可以合成多种多样的酶。生物体内的各种生化反应,几乎都是在酶的催化作用下进行的。所以,酶是生命活动的产物,又是生命活动必不可少的条件之一。在一定条件下,酶不仅在生物体内,而且在生物体外也可催化各种生化反应。

对于酶,可以这样定义:酶是一种高效的、高度专一的、和生命活动密切相关的、蛋白质性质的生物催化剂。

二、酶学研究的重要性

酶学(Enzymology)是研究酶的理化性质、作用规律、结构和作用原理、生物学功能及应用的一门学科。其研究内容丰富,涉及面广,并与其他学科有密切的联系,特别是与生物化学、蛋白质化学、生物物理学、物理化学、分子生物学、医学、病理学、毒理学、药理学等,关系甚为密切;同时,在这些领域中也有重要的实际应用价值。学习酶学就是为了更好地了解酶、掌握酶,使酶更好地为人们所用。

地球上到处有生命,从参天大树到显微镜下才能看到的细菌、病毒,从天上飞的鸟到水中游的鱼,形形色色,种类繁多。但是不管生物如何多种多样,凡有生命的地方几乎都有酶,都需要酶。作为生物催化剂,酶和生命活动密切相关。一方面,酶在体内的活性水平反映了生物的生理状况;另一方面,如果控制机体内酶的活性水平,就能对生物的机能活动作出相应的调整。因此,了解酶的生物学规律和知识对于生产实践有着极为重要的意义。例如,在工农业生产中,特别是在发酵生产中,通过对外界条件的控制或遗传因子的改造,进行代谢调控,就有可能提高产量;在医学和农业上,根据机体正常与病理情况下酶或酶系的活性变化,就有可能找出发病原因,从而指导药物的筛选和应用。

酶在生产实践中,推动着生产的发展和人类文明的进步,它几乎渗入了人类生活的各个领域。从这个意义上说,没有酶就没有生命。因此研究酶的结构与功能、酶的理化性质及其催化作用机理,对于阐明生命现象的本质具有十分重要的意义。现代生命科学发展已深入到分子水平,从酶的分子水平去探讨酶与生命活动的关系,探讨酶与代谢调节、疾病、生长发育等的关系,无疑具有重大的科学和实践意义。

酶是分子生物学研究的重要工具,正是由于某些专一性工具酶的出现,才使得核酸一级结构测定有了重要突破。同时正是限制性内切酶的发现,促使了 DNA 重组技术的诞生,推动了基因工程的发展。酶鲜明地体现了生物体系的识别、催化、调节等奇妙功能。酶研究不仅深刻影响生物化学以至整个生物学领域,还刺激了许多化学领域的研究发展。

当今,生物技术已在工业、农业、医药、食品等方面得到广泛应用,并在解决当代资源、能源、环保等多种问题方面起着举足轻重的作用,新兴的生物技术产业已成为当代优先发展的高科技领域之一。作为生物技术的重要组成部分,酶学领域已受到生物化学工作者、工农业以及医药保健工作者的重视。

酶学,正在生产实践中发挥着重要的作用,蕴藏着巨大的潜力。随着酶学的发展,它的应用也必将跃入更新的境界,展现更加宽广的前景。

三、酶学研究历史

人们很早就感觉到酶的存在,早在几千年前,人类就已经在酿酒、制酱、制饴等的过程中,不自觉地利用了酶的催化过程,然而真正认识和利用酶、对酶进行理性探索则是从 19 世纪开始的。

从有记载的资料得知,我国早在 4 000 多年前的夏禹时代,就已盛行酿酒。酒是酵母发酵的产物,是细胞内酶作用的结果。公元 10 世纪左右,我国已能用豆类做酱。豆酱是在霉菌蛋白酶作用下,豆类蛋白质水解所得的产品。约 3 000 年前,古人利用含淀粉酶的麦曲将淀粉降解为麦芽糖,制造了饴糖。用曲治疗消化障碍症也是我国人民的最早发现。曲富含酶和维生素,至今仍是常用的健胃药。春秋战国时代,漆已被广为利用,那时所用的漆是漆树的树脂被漆酶作用的氧化产物。

国外对酶的发现是与发酵分解分不开的。1814 年 Rirchhoff 首先明确地提到了酶的作用,他指出麦芽中含有能使淀粉分解的成分。1833 年,佩恩(Payen)和帕索兹(Persoz)从麦芽的水抽提物中,用乙醇沉淀得到一种可使淀粉水解成可溶性糖的物质,称之为淀粉酶(dia-stase),其意为“分离”,并首先发现了酶的热不稳定性。虽然现在已知他们当时得到的是一种很粗的淀粉酶制剂,但是由于他们采用最简单的抽提、沉淀等提纯方法,得到了一种无细胞制剂,并指出了催化特性和不稳定性,初步触及了酶的一些本质问题,所以有人认为 Payen 和 Persoz 首先发现了酶。1878 年,德国 Kuhne 首先把这类物质称为 enzyme,enzyme 来自希腊文,原意为“在酵母内”,是 Kuhne 建议为了避免 ferment 一词的双重意义:有机酵素(Organized Ferments,指整个微生物细胞)和非有机酵素(Unorganized Ferments,指从有机体得到的抽提物)而引进的。目前除日文杂志中还经常使用 ferment 外,全世界已统一用 enzyme 一词。1896 年德国学者 Buchner 兄弟发现了用石英磨碎的酵母细胞或无细胞滤液能和酵母细胞一样将 1 分子葡萄糖转化为 2 分子乙醇和 2 分子 CO_2 ,他把这种能发酵的蛋白质称为酒化酶(eymase),表明了酶能以溶解状态、有活性状态从破碎细胞中分离出来而非细胞本身,从而说明了上述化学变化是由溶解于细胞液中的酶引起的。此项发现促使了酶的分离和对其理化性质的探讨,促进了对有关各种生命过程中酶系统的研究。一般认为,酶学研究始于 1896 年 Buchner 的发现。

20 世纪初,酶学得到迅速发展。一方面发现了很多的酶,并注意到某些酶的作用需要有低分子物质(辅酶)参加;另一方面在物理、化学技术发展的影响下,1913 年 Michaelis 和 Menton 总结前人的工作,根据中间学说提出了酶促反应动力学原理——米氏学说。这一学说的提出,对酶反应机理的研究是一个重要突破。1926 年,Summer 从刀豆中得到脲酶结晶——第一个酶结晶,并证实这种结晶催化尿素水解产生 CO_2 和氨,提出酶的化学本质就是一种蛋白质。但这个观点直到若干年后获得了胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶的结晶才被普遍接受,Summer 因此而获得 1947 年的诺贝尔奖。

现已发现生物体内存在的酶有近 5 000 种,而且每年都有新酶发现。迄今,大约有 1 500 种酶已纯化达到了均一纯度,大约有 200 多种酶得到了结晶。由于蛋白质分析分离技术的飞速发展,特别是在运用 X 射线衍射分析方法后,人们相继弄清了溶菌酶(129 个氨基酸残基)、胰凝乳蛋白酶(245 个氨基酸残基)、羧肽酶(307 个氨基酸残基)、多元淀粉酶 A(460 个氨基酸残基)等的氨基酸序列和酶的催化作用机理。现在对于细胞基本代谢过程中的各种酶,很多已有比较清楚的认识,但有关遗传过程中的酶还有待深入研究。

20 世纪 50—60 年代,发现酶有相当的柔性,因而 Koshland 提出了“诱导契合”理论,以解释酶的催化理论和专一性,同时也搞清了某些酶的催化与生理条件变化有关。1961 年 Monod 及其同事提出了“变构模型”,用以定量解释有些酶的活性可以通过结合小分子(效应物)进行调节,从而提供了认识细胞中许多酶调控作用的基础。

1969 年首次报道了由氨基酸单体化学合成牛胰核糖核酸酶,虽然这是一个很大的进展,但其纯度和活性很低。化学合成只是定性证明了酶和非生物催化剂没有区别。

DNA 重组技术用于酶学研究得到高度重视。用定点突变法在指定位点突变,可以改变酶的催化活性与专一性。这有助于认识酶的作用机制,并为设计特定需要的酶奠定了基础,如乳酸脱氢酶的专一性可以通过在活性部位引入 3 个特定的氨基酸侧链突变成为苹果酸脱氢酶。

除了“经典”酶以外,某些生物分子也有催化活性。早在 1982 年 Cech 小组发现,四膜虫的 rRNA(核糖体核糖核酸)前体能在完全没有蛋白质的情况下进行自我加工,催化得到成熟的 rRNA 产物。就是说,RNA 本身是生物催化剂,称为“ribozyme”,这对酶的传统概念是个严重挑战,提出了酶并不一定是蛋白质的问题。1986 年,Schultz 和 Learner 两个小组同时报道,用事先设计好的过渡态类似物作半抗原,按标准单克隆抗体制备法获得了具有催化活性的抗体,即抗体酶(abzyme)。这一重要突破为酶的结构功能研究和抗体与酶的应用开辟了新的研究领域。

考察酶的研究历程可知,对酶的研究一直是沿着两个方向发展的:理论研究方向和应用研究方向。理论研究包括酶理化性质及催化性质的研究。如酶作用锁钥学说及诱导契合学说的提出,使人们对酶有了更深入的了解;米氏方程的建立开拓了对酶由定性到定量,以及作用机制的探讨,奠定了酶学发展的里程碑;脲酶结晶的获得,不仅弄清了酶的蛋白质本质,而且奠定了现代酶学、蛋白质化学的基础。

当今,酶学研究的任务是要从分子水平深入地揭示酶和生命活动的关系;阐明酶的催化机制和调节机制,探索作为生物大分子的酶蛋白的结构与性质、功能之间的关系。

四、现代酶学概况

现代酶学正沿着两个方向发展:酶的分子生物学和酶工程学。酶分子生物学的任务是要更深入地揭示酶的结构和功能的关系、酶的催化机制与调节机制、揭示酶和生命活动的关系、进一步设计酶、改造酶,在基因水平上进行酶的调节和控制。酶工程学的任务则是要解决如何更经济有效地进行酶的生产、制备与应用,将基因工程、分子生物学成果用于酶的生产,进一步

开发固定化酶技术与酶反应器。

第二节 酶的组成及结构特点

一、酶的化学本质

到目前为止,除了某些具有催化活性的 RNA 和 DNA 外,所发现的酶的化学本质均是蛋白质,有的是简单蛋白质,有的是结合蛋白质。

首先,酶同其他蛋白质一样,由氨基酸组成。酶经酸碱水解后其最终产物为氨基酸。酶分子也同样具有一、二、三、四级结构层次,它也具有两性电解质的性质,在电场中能向相反电极移动。

其次,酶的分子量很大,属于典型的蛋白质分子质量的数量级。其水溶液具有亲水胶体的性质,不能通过透析膜。酶能被胰蛋白酶等降解、失活。

最后,酶也容易受到某些物理的因素(如加热、紫外线照射等)及化学的因素(如酸、碱、有机溶剂、蛋白质变性剂等)的作用而变性或沉淀,丧失酶的活性。

由此可见,凡是蛋白质具有的性质酶也同样具有,但显然,不能说所有蛋白质都是酶,只能说具有催化作用的蛋白质,才称为酶,酶的化学本质是蛋白质。

二、酶蛋白亚基数的组成特点分类

根据酶蛋白分子的特点可将酶分为三类,即:单体酶、寡聚酶和多酶体系。

(1)单体酶(monomeric enzyme):分子中仅含一条多肽链的酶,分子量在 13~35 kD 之间,属于这一类的酶很少,一般都是催化水解反应的酶,如溶菌酶、胰蛋白酶等。

(2)寡聚酶(oligomeric enzyme):由几个甚至几十个亚基组成,这些亚基可以是相同的多肽链,也可以是不同的多肽链。亚基之间不是共价结合,彼此很容易分开。亚基一般无活性,必须互相结合才有活性。寡聚酶的分子量为 35 kD 以上到数百万道尔顿,例如磷酸化酶 a 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶等。

(3)多酶体系(multienzyme system):是由几种酶彼此嵌合形成的复合体,是多种酶进行连续反应的体系。前一反应产物为后一反应的底物,多酶体系有利于一系列反应的连续进行。这类多酶复合体,分子量很高,一般都在几百万道尔顿以上,例如脂肪酸合成中的脂肪酸合成酶复合体。

三、酶的组成分类

因酶的本质为蛋白质,所以和其他蛋白质一样,可以根据其组成成分分为简单蛋白质和结合蛋白质两类。

有些酶,分子中只含氨基酸组成的多肽链(如胃蛋白酶、胰蛋白酶、核酸酶、脲酶等),其活性仅仅决定于它的蛋白质结构,这类酶属于简单蛋白质,称为单纯酶(simple enzyme);另一类酶的成分除了蛋白质外,还有非蛋白质的成分,两者有机地组合在一起才能具有酶活性,这类酶属于结合蛋白质,称为结合酶(conjugated enzyme),其酶蛋白(apoenzyme)与辅助因子(cofactor)结合所形成的具有催化活性的复合物称为“全酶”(holoenzyme),即全酶=酶蛋白+辅助因子,氧化还原酶和转移酶中的许多酶都属于这一类酶。

在催化反应中,酶蛋白与辅助因子所起的作用不同,酶反应的专一性取决于酶蛋白本身,而辅助因子则直接对电子、原子或某些化学基团起传递作用。

四、酶的辅助因子

属于结合蛋白质的酶是由蛋白质部分和非蛋白质部分组成的,非蛋白质部分称为酶的辅助因子(cofactor),它们包括金属离子及有机化合物。它们本身无催化作用,但却是全酶活性所必需的。一般在酶促反应中参与电子、原子的转移(如参与氧化还原反应),或某些功能基团的运输(运载酰基的作用)。根据辅助因子与酶蛋白的结合程度不同,我们可以把辅助因子分为辅酶(coenzyme)和辅基(prosthetic group)两种。辅酶(coenzyme)是指与酶蛋白结合很松驰的辅助因子,可以通过透析或其他方法将它从全酶除去,例如,酵母提取物有催化葡萄糖发酵的能力,透析除去辅助因子 I(CoI)后,酵母提取物就失去了催化能力。另一些辅助因子是以共价键和酶蛋白较牢固地结合在一起的,不易透析除去,这种辅助因子称为辅基(prosthetic group)。例如,细胞色素氧化酶与铁卟啉辅基结合较牢固,辅基卟啉不易除去。所以辅基与辅酶的区别只在于它们与酶蛋白结合的牢固程度不同,并无严格的界限。

辅酶和辅基是酶的一个组成部分,直接参与酶的催化作用,是全酶的成员。在反应后它可以复原,没有发生变化。但另有些非蛋白质化合物,如脱氢酶中的尼克酰胺-腺嘌呤二核苷酸(NAD^+),实际上它并不是酶的一个组成部分,但它是酶催化作用所必需的,它在酶催化反应中起了携带电子、质子和功能基团的作用,因此这类物质通常被称为底物载体(substrate carriers)或辅底物。辅酶、辅基和底物载体存在着本质的差异,其比较结果见表 1-1。

表 1-1 三种辅助因子的比较

	辅酶	辅基	底物载体
化学性质	非蛋白质性质的小分子物质		
与酶蛋白结合程度	松驰	牢固	松驰
能否透析除去	能	不能	能
是否全酶的一个组成成分	是	是	否
在酶反应中的地位	参与催化(酶的地位)		参与反应(底物地位)
例子	羧化酶(TPP)	羧肽酶 A(Zn^{2+})	脱氢酶(NAD^+)

第三节 酶的分类与命名

酶(enzyme)是一种生物催化剂(biocatalyst)。迄今为止已发现生物界 5 000 多种酶。随着生物化学、分子生物学等生命科学的发展,还会发现更多的新酶。过去由于没有一个系统的命名法则,使用的名称都是习惯沿用的,有时就出现一酶多名或一名多酶的混乱现象。为了避免这种混乱,1961 年,由国际生物化学联合会(International Union of Biochemistry, IUB)中的酶学委员会(Enzyme Commission, EC)提出了酶的系统命名法及其分类的报告。1972 年、1978 年和 1984 年又先后三次作了修改、补充,这一系统现在已得到国际上普遍的认可。

一、习惯命名法

1961 年以前使用的酶的名称都是习惯沿用的,成为习惯名(recommended name)。习惯命名法的原则是:

(1)绝大多数酶依据其底物来命名,如催化水解蛋白质的酶称为蛋白酶,催化水解淀粉的酶称为淀粉酶。

(2)某些酶根据其催化的反应性质来命名,如转氨酶是催化一种化合物上的氨基转移至另一化合物上,水解酶催化底物分子水解。

(3)有的酶结合上述两个原则来命名,例如琥珀酸脱氢酶是催化琥珀酸脱氢反应的酶。

(4)在这些命名的基础上有时还加上酶的来源或酶的其他特点,如胃蛋白酶及胰蛋白酶,碱性磷酸酯酶及酸性磷酸酶等。

二、国际系统命名法

按照国际系统命名法原则,每一种酶都应该有一个系统命名法的名称(systematic name)和习惯叫法的名称(即推荐名称 recommended name),习惯名称应该是简单的、便于使用,而系统名称应该是要明确酶的作用底物(substrate)及催化反应性质两个部分。如果有多个底物的,所有的底物都应该写出,中间用冒号隔开。如:草酸氧化酶(习惯名称)写成系统名称时,应将它的两个底物,即“草酸”和“氧”都要列出,并用冒号(“:”)将它们隔开,它所催化的反应的性质为“氧化反应”,也需指明,所以它的系统名称为“草酸:氧氧化酶”。若底物之一为水时,可将水省略不写。如,D-葡萄糖- δ -内酯水解酶不必写成 D-葡萄糖- δ -内酯:水水解酶。此外,底物的构型也应写出。如谷丙转氨酶,其系统名称为 L-丙氨酸: α -酮戊二酸氨基转移酶。

系统命名的原则是相当严格的,一种酶只可能有一个名称,不管其催化的反应是正反应还是逆反应。如催化 L-丙氨酸和 α -酮戊二酸生成 L-谷氨酸和丙酮酸的反应的酶只是称为 L-丙氨酸: α -酮戊二酸氨基转移酶,而不称为 L-谷氨酸:丙酮酸氨基转移酶。

在国际科学文献中,为严格起见,一般使用酶的系统命名,但是因某些酶的系统名称太长,为了方便起见,有时仍可使用酶的习惯名称。在《酶学手册》(Enzyme Handbook, Thoms E. Barm编,1969年)或某些专著中列有酶的一览表,表中包括酶的编号、系统名称、习惯名称、反应式、酶的来源、酶的性质等各项内容,必要时可查阅。

三、国际系统分类法

(一)分类原则

国际系统分类法中分类的原则是:将所有已知的酶按其催化的反应的类型,分为六大类,分别用 1、2、3、4、5、6 的编号来表示,依次为氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂合酶类、异构酶类和合成酶类。每一大类又根据底物分子中被作用的基团或键的特点,分为若干个亚类,每一个亚类又按顺序编成 1、2、3、4……数字。每一个亚类可再分为若干个次亚类,仍用 1、2、3、4……编号。每个次亚类中的具体种酶也用 1、2、3、4……编号,把它们区分开,表明特定酶在该次亚类中的序号。

所以,每一个酶的分类编号是由四个数字组成,数字间由“.”隔开,并在编号之前还冠以 EC(Enzyme Commission,国际酶学委员会的缩写),如碱性磷酸酶,编号为 EC 3.1.3.1。

第一个数字代表该酶属于六大类中的哪一类,3 代表水解酶类;

第二个数字表示该酶属于哪一个亚类,对于氧化酶类这个数字表示氧化反应供体基团的类型,转移酶类表示被转移基团的性质,水解酶类表示水解键的类型,裂解酶类表示被裂解键的类型,异构酶类表示异构作用的类型,连接酶类表示生成键的类型;这里的 1 代表作用的水解键是酯键;

第三个数字表示该酶属于哪一个次亚类,更加精确地表明底物或反应物的性质,这里的 3 代表该酶属于水解酶类中的第 1 亚类的第 3 次亚类,是磷酸酯键。各个数字在不同类、不同亚类中都有不同的含义;