

酶动力学

恩格尔·P.C 著(英)

· 生物学研究概说 ·

酶 动 力 学

(英) P. C. 恩格尔 著

孙冠文 译

科 学 出 版 社

1 9 8 1

内 容 简 介

本书主要内容是介绍各种因素对酶促反应速度的影响，一底物动力学和多底物动力学，非线性动力学与别构控制等等。本书可供从事生化研究的科技人员和有关大专院校师生参考。

P. C. Engel
Outline Studies in Biology
ENZYME KINETICS
Chapman and Hall 1977

· 生物学研究概说 ·

酶 动 力 学

[英] P. C. 恩格尔 著
孙冠文 译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1981年3月第 一 版 开本：787×1092 1/32
1981年3月第一次印刷 印张：3 5/8
印数：0001—3,600 字数：81,000

统一书号：13031·1500

本社书号：2062·13—10

定价：0.58 元

译 者 的 话

酶是具有高度选择性的生物催化剂。酶学在现代生物化学中占有重要地位。酶动力学是酶学的核心问题之一。它主要探讨各种因素对酶促反应速度的影响、动力学方程的设计、各种动力学模型的建立和检验以及酶活力的别构控制等等,通过这些研究来阐明酶促反应机制。

长期以来,由于酶动力学研究涉及到很多复杂的高等数学问题,常常妨碍了非专业研究人员的学习和掌握。本书作者英国谢菲尔德大学生物化学系 P.C. 恩格尔博士,以其渊博的知识和精辟的分析,完全采用稳态法处理,自始至终运用初等数学,深入浅出地讨论了酶动力学的主要论题,同时还简要地介绍了最新研究进展,使初学者容易入门,使研究者能得到启发。作者在书末附有这方面的主要参考文献,供读者作深入探讨时参考。

在本书的翻译过程中,曾得到袁翰青教授的热情鼓励与支持;何忠效同志对译稿提出过一些宝贵修改意见,在此谨向他们表示衷心感谢。

由于译者水平有限,译文中难免还存在某些缺点错误,希望从事这方面研究和教学的专家、老师及广大读者同志们批评指正。

孙冠文

一九七九年五月于北京

目 录

第一章	引言	1
第二章	一底物动力学	10
第三章	抑制剂, 激活剂与钝化剂	25
第四章	pH 影响	38
第五章	多底物动力学	48
第六章	King 和 Altman 法	86
第七章	非线性动力学与别构作用概念	92

第一章 引言

1.1 关于这本书

这本书并不想作全面的论述，也不打算与这一类的书籍竞争。编写这本书的目的是为了帮助那些不熟悉酶动力学的人，也就是说包括 90% 左右的生物化学学生，实在地说，还包括大多数的见习生物化学家。他们常常把酶动力学看成象学习拉丁文或象锻炼性格的冷水浴一样困难，并且学习后会很快地忘掉。由于酶动力学常常充满着许多望而生畏的符号和许多复杂的运算，使初学者甚至在学习之前就心情沮丧。但是，我相信，酶动力学的大部分内容是可以定性的探讨和理解的。虽然也需要用到代数学，但这只是为了对要说明的结论提供精确的论证。以这种方式接近论题容易掌握，这样各种符号也能够反映出真正的含意。

我也希望通过这本书将使怀疑者相信，酶动力学不仅对热心于该学科研究的学者，而且对于大多数生物化学家来说，都是非常重要的。

1.2 酶是什么？

生物化学是在解决 Liebig 和 Pasteur 关于发酵本质的著名论战中产生的。化学家认为，发酵显然是化学过程；而生物学家把这个过程看作是证据确凿的生物学过程。当然，二者都是对的，然而在当时他们都看不到这两种观点实际上是一致的。后来 Buchner 兄弟证明一种活的有机体即酵母所产生的非生命无细胞抽提物，能使糖类发酵。在这以后很长的时

期里，许多研究者都证明这是由于抽提物中含有许多高效的催化剂，其中每种都具有高度的专一性，只能催化葡萄糖分解反应中的一个步骤，并且证明类似的催化剂，或者称作酶，也存在于所有的生物体中。

长期以来，人们对酶的化学本质存在着争议。Willstätter曾以过氧化物酶进行研究，他选择的这种酶的催化效率如此之高，以致于使他认为该活性制剂是无蛋白质的。相反，Sumner的结晶脲酶却有着适度的活力，使批评者又把催化作用归因于制剂中含有高活力的微量杂质，而不是纯的蛋白质本身。由于分级分离技术的改进，科学家能够纯化不同来源的数百种酶，终于得到结论：所有的酶都是蛋白质。

蛋白质代表两种意思，即遗传蓝图的表达和这种表达的含义。蛋白质的合成需要酶。这种显然是似非而是的论点产生了使人魅惑的关于生命起源的问题。这就是蛋白质的专一性，也就是说它们有选择的识别分子的能力，这赋予了生命以方向性和次序。正因为酶不仅能识别物质，而且还能在化学上转化它们，所以酶形成一类颇为特殊的蛋白质，这就使生物能够积极地适应和利用其周围环境，而不仅仅是作为预先形成物质的消极增大。况且，我们称之为代谢的酶促反应网络受到使之产生最少废物的精巧的控制，而关键调节酶的特性构成这一控制系统的重要部分。

从酶的结构研究使我们首先得到了组成蛋白质链的氨基酸残基“一级”线性序列，以后又应用了X射线结晶图的研究，至少对某一些蛋白质来说可以得到这种线状链的三维空间排列的清晰图象。不过这还只是一个静态的图，因此，我们要提出下一个问题。

1.3 什么是酶动力学?

酶动力学是在作用过程中研究酶。由于酶促反应具有极高的速度,这就大大有助于这一研究。例如,我们要研究一种含血红素的蛋白质——血红蛋白和过氧化氢酶。血红蛋白能结合氧。一分钟内它可以结合和释放许多氧分子,但还留下一些氧分子,并且在一瞬间,只有一个氧分子能够同某一个血红素中心结合。过氧化氢酶是一种有累加效应的酶。仅仅只有一个 H_2O_2 分子同一个血红素结合,但当结合以后它就可发生反应,所以我们就观察到氧的迅速产生——每个酶分子每分钟大概催化产生一百万个氧分子。

酶动力学的任务就是系统地分析这些过程,包括反应速度对于底物浓度、pH、温度、离子强度和其他有关变量的依赖关系的研究。

酶动力学的研究结果显然具有分类学价值。使我们有可能对一种酶进行分类和特性鉴定。例如,己糖激酶和葡萄糖激酶,这两种酶都能催化 ATP 对葡萄糖的磷酸化作用;无疑地,在不久的将来,我们将会精确地阐明这两种蛋白质在细微结构上的差异,但是,代谢生物学家对己糖激酶和葡萄糖激酶的长期兴趣是从认识它们的功能性差别(即动力学差别)而产生的。

再引证另一个例子,对细菌培养基有选择性地控制营养物可以刺激酶的演变^[1,2]。根据这些酶的动力学特性,可以把这类突变种的酶迅速地鉴别出来。

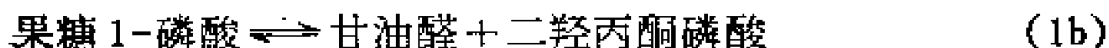
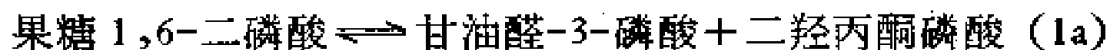
要合理地把酶作为一种工具,如科学研究、临床诊断或食品分析中特殊代谢产物的测定^[3],就需要有关酶动力学特性的坚实知识。纯化的酶在生化工程中的应用也在不断增加^[4]。酶“反应器”,(在此反应器中,酶分子是以共价结合于固体支

持物上)可以用来进行无副反应的合成。这些反应器的设计显然也是动力学的问题。

有时候扰乱酶的正常功能是有益的,这常常可以通过选择性地使用“对准活性部位”的不可逆抑制剂而得以实现。对这种抑制剂的研究工作是从军事上使用神经毒气而开始的,从那以后这一研究工作对于试图建立合理的药理学显得十分重要。迄今为止,事实上大多数的化学治疗药物是偶然发现的,而许多药物实际上是酶的抑制剂。一旦它们的作用部位鉴定清楚,就可以加以系统的改良,正象使用抗抑郁药单胺氧化酶抑制剂那样^[5]。一种抑制剂效力的直接研究,当然是要依靠酶动力学测量的(见第三章)。

除了这些纯属实践方面的应用之外,通过酶动力学研究,能够阐明酶的作用机制(将在以后几章里论述)和它在整个代谢过程中的位置。在确定一种代谢途径的定量关系时,指出必须酶的存在是不够的。每一种酶也都必须能控制代谢物的可测产率。Tempest 及其合作者^[6]通过证明在几种细菌里谷氨酸脱氢酶的有效活力与其承担的任务完全不相适合,从而对已经公认的一种观点,即关于在细菌中该酶承担着氨同化作用的观点提出了大胆的怀疑。这件事情的结果,使人们发现了一种新的代谢途径和一种新酶——谷氨酸合成酶,该酶在植物中也是很重要的。

作为酶剪裁代谢作用的一个例子,我们可以研究一下肌肉和肝脏的醛缩酶^[7],这两种酶催化反应(1a)和(1b)。



肌肉醛缩酶通过糖酵解途径分解果糖 1,6-二磷酸(反应 1a 的正向反应),因而,它主要与葡萄糖分解代谢有关。但是,肝脏必须制造葡萄糖,并且也处理食入的果糖。这可以首先合成

果糖 1-磷酸,将其分解(反应 1b),再把产生的甘油醛磷酸化,最后把两个丙糖磷酸重结合起来形成果糖 1,6-二磷酸(反应 1a 的逆反应)。比较肝脏和肌肉醛缩酶的动力学证明,肝型醛缩酶更加适应于逆反应,而催化 1b 的正向反应要比肌肉醛缩酶更好。

事情很明显,只有通过研究各个部分的控制特性才能了解代谢的总调节和全过程。因为酶是代谢机器的工作部分,所以它们的特性必然规定了那种机器的性能。我们积累了大量有关各种酶动力学的资料,这才渐渐地摸索出能够满意地描述这个有许多酶参与的整个系统的途径。

1.4 酶要不要提纯?

除非某种酶是纯的,否则就很难确定某一已知的化学转化是由于某个单一酶的作用。在一个反应是连续代谢序列的一个部分时,就更是这样。例如,最初人们曾经认为,脂肪酸的 β -氧化作用可以经过一步反应将饱和脂肪酸转化为 β -羟酸。只是在将各种酶分离开以后,最后才确定这种转化实际上包括被不同的酶催化的脱氢作用和水化作用,并且肯定了这些酶并不是同自由脂肪酸而是同它们的硫酸酯相作用。

一种要研究的酶的底物和产物常常也是另一些酶的底物,这就可能严重地妨碍了细胞粗提取液中酶活力的测定。因此,酶学家们就把研究的目标集中在用各种标准(包括超离心法、电泳法、色谱法、恒比活测定、免疫学测定以及已知的杂质活力的消失等等)来判断都是“纯”的制剂上。

这种研究方法总是有不足之处,它是“非生理学的”方法;在纯化期间,有时用热、有机溶剂、酸或其它烈性试剂进行剧烈的处理,而可能使酶发生不可逆的变化。况且,在离体的条件下,充其量也不过提供一个粗略地接近于体内的环境。提

纯与膜结合的酶，象琥珀酸脱氢酶尤其感到困难：溶解和纯化这种酶所遇到的问题使不同的实验室常常在离体条件下获得具有不同特性的制剂。

这就是生物化学中所固有的不可避免的困难之处，类似于 Heisenberg 的测不准原理。在进行实际研究的时候，我们就可能扰乱或曲解了我们所要研究的问题。但是，我们可以肯定地说，如果我们不去研究，那我们会什么也发现不了。因此，人们总是希望，实验室的细心的研究结果可以大体上接近于体内发生的变化，从而指明整个系统需要做的决定性的实验。近四十多年来生物化学的惊人进展就是这一希望的证实。

此外还值得注意，即体外和体内研究出现的明显不同常常反映出我们对代谢过程掌握得不够，而不是由于我们的纯化方法破坏了酶的性质。哺乳动物谷氨酸脱氢酶就是一个例子。这种纯化的酶不管是用 NAD(H) 还是用 NADP(H) 作辅酶，作用得几乎同样的好，这是那些由烟酰胺核苷酸耦合的酶所具有的特殊性质。然而，多年来却一直认为，在线粒体中这种酶仅仅使用 NADPH 而不使用 NADH 。这种令人惊异的矛盾后来才弄清楚，原来是由于在实验条件下线粒体中两种辅酶的有效性不同，而并不是因为纯化改变了酶的特性^[6]。

1.5 测定酶活力的方法

下一个问题是如何最好地测定待研究的酶的活力。人们最终希望研究在各种条件下纯酶的活力，但是，为了纯化酶首先就需要一组方便的、灵敏的、专一的并且可重复进行活力检验的条件。必须选择合适的缓冲液，最可取的当然是酶在其中最稳定的那种缓冲液。如果反应是可逆的，必须决定待测反应的方向。为了核查对酶活力的干扰，应进行对照实验，特别是在提纯过程的最初几步更是必要。但是，在设计一种酶

活力测定方法时，最重要的是选择合适的物理或化学技术使得可以测定诸反应物里某一个的出现或消失情况。选择一种能够连续记录的测定法要比那种从反应混合物中重复取样的方法优越得多。由于这种原因，依赖光学特性(光吸收、荧光或旋光)进行测定的方法应用得最为广泛。假如正常的反应物没有合适的光学特性，那就可以用一种人造发色底物或能产生发色产物的底物代替它。这种方法常常用于水解酶的研究。例如，在胰蛋白酶这种肽链内切酶的情况下，就既不是使用天然底物，也不是使用天然产物作简单可靠的光学测定，而是采用低分子量的“模型”底物，象 N- α - 苄氧羰酰赖氨酸的硝基苯酚酯(水解时它发生很大的光密度变化)，酶也工作得同样好。

人们还设计出一种“偶联测定法”，在此法中，为了形成一种具有可利用的光学特性的最终产物而加入一种或多种辅助酶。因此，催化反应(2)的谷氨酸-草酰乙酸转氨酶，可以由包含在反应混合物中催化反应(3)并消耗 NADH 的苹果酸脱氢酶而很方便地检测出来。当反应(2)一旦产生草酰乙酸，马上就被反应(3)除去，因此我们就可以通过 NADH 的强吸收或荧光下降而检测出这个反应的速度。在这一种测定中，重要的是必须保证，偶联的反应决不能成为限制速度的反应^[9]。



不管采用什么测定方法，反应的时间进程可以绘成曲线；由于底物的浓度不断减少，而产物不断累积，正向净速度减低，在时间趋向无限大时速度接近于零(图 1.1)。在任何给定的时间里，反应的速度是该曲线切线的斜率。大多数的活力测定是基于估算“初速度”，即时间为零时的切线斜率。但是实验测得曲线的切线，常常受到仪器“干扰”的影响而不容易

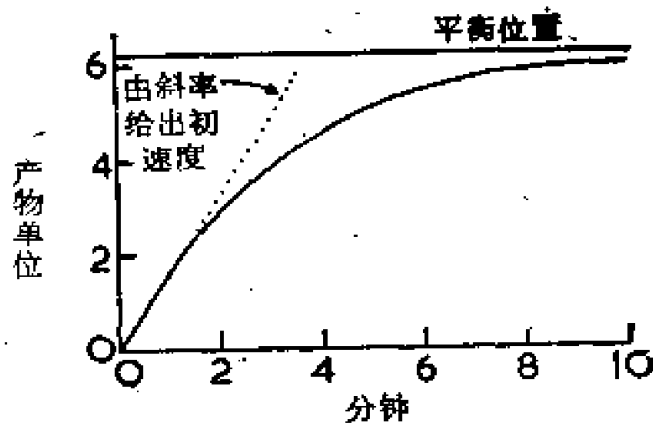


图 1.1 典型的反应-时间进程。

画得准确,因为混合需要时间,所以反应最初几秒钟的结果往往测不到。因此,选择一些条件把曲率减到最小。这常常可简单地通过减少酶浓度和增加检测仪器的灵敏度来达到(图 1.2)。有时候弯曲是由于酶的不稳定性,而不是由于底物耗尽,在这种情况下,刚才提到的那些方法会适得其反。那么,我们必须考虑加入适合的稳定剂,或者需要完全改变缓冲溶液。

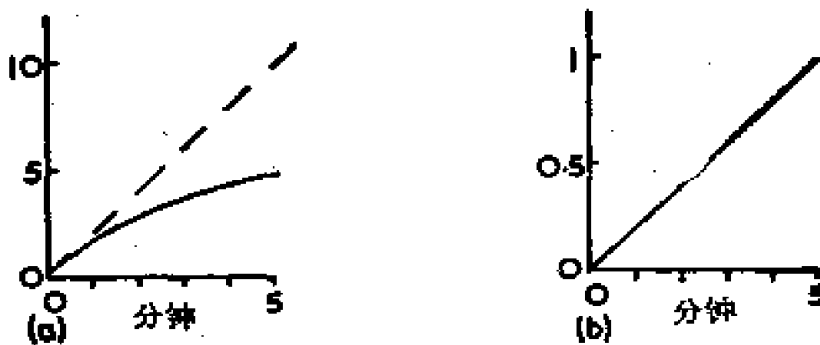


图 1.2 仪器的灵敏度和酶浓度对初速度测定的影响。

(a) 中的曲线对于精确地计算初速度显然是太弯曲了。(b) 表示由于仪器灵敏度增加了 10 倍,因此使时间进程开头的线性部分沿纵轴充分增大,并且由于只加入了 $1/10$ 那样多的酶,所以线性部分也沿着时间轴延伸,而给出了约 45° 斜率的最适图线。

考虑到在不同的实验之间需要进行比较,原始速度必须

换算成“比”速度。对于一种不纯的制剂来说，这包括用蛋白质浓度或加入物质质量的某些其他有关的指示剂去除原始速度。对于一种纯酶来说，若分子量是已知的，则可以用酶的克分子浓度代替。上述两种情况的换算都基于一种重要的假设，即反应速度严格地与酶浓度成正比。这一点必须进行实验。若这种假设与实验结果不符，这可能意味着，酶制剂含有某种抑制剂或激活剂，或者有可能在稀释时它解离为亚基。Dixon 和 Webb (文献[39]，第 62—72 页)讨论了若干明显不成比例的情况。

以前，常常用不合理的和难于理解的单位表示酶活力。国际酶学委员会力图使酶活力的表示方法标准化，推荐了酶活力的国际“单位”，一个国际单位的酶活力，就是指在标准测定条件下，每分钟转化一个微克分子底物的酶量。这一种单位现在得到广泛地应用。在这个基础上，就用每毫克蛋白质的单位数来表示酶的比活力。最近^[40]，酶学委员会提议，用“katal”代替老的“单位”，所谓一个“katal”，就是每秒钟转化一个克分子底物的酶量(1 个国际单位 = 16.67 nkat)。比活力现在以每千克酶蛋白的 katal 数表示。

最后，必须强调指出，不同酶制剂的动力学特性，只有在相同条件下测定时才可以有效地进行比较——当然，以条件的变化作为比较的项目则除外。有时人们声称，两种酶制剂含有动力学上不同的“同功酶”(催化同一反应的不同的蛋白质)。但事实上在不同的温度、pH 值等条件下进行研究的时候，这种比较是没有什么意义的。

本书的其余部分，我们将讨论酶促反应速度的变化，将其作为一个课题本身来讨论，而不是作为技术细节来探讨。从现在起，我们将假定，所有讨论的酶都已经满意地提纯了，并且对活力没有干扰了。

第二章 一底物动力学

2.1 饱和动力学

如果我们研究一个假想的反应 $S \rightarrow P$ ，它服从一级反应动力学，其速度将由下式给出：

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[S]$$

也就是说，在任何给定的时刻形成 P 分子的机率与底物 S 的浓度成正比。同样地，对于一个二级反应 $S + T \rightarrow P + Q$ ，反应速度将与每一种反应物 S 和 T 的浓度成正比：

$$-\frac{d[S]}{dt} = -\frac{d[T]}{dt} = k[S][T]$$

在上述两种情况中，初速度对底物 S 的各种浓度的图线都是直线，在第一种情况下，斜率为 k ，在第二种情况下斜率为 $k[T]$ (图 2.1)。(事实上化学动力学家倾向于使用反应的全部时间进程而不用初速度)。

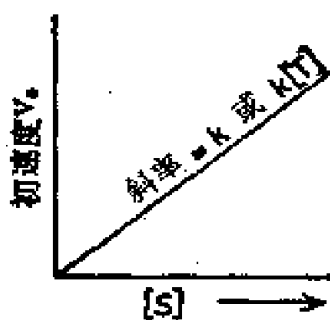


图 2.1 简单的一级或二级化学反应中，初速度与反应物浓度的关系。

假使这些反应是酶促反应，初速度与底物浓度的关系将

是不同的。在低 $[S]$ 值时,速度近似地与 $[S]$ 成比例,但随着 $[S]$ 值增高,速度将逐渐接近一个最大值。这种情况称为饱和作用。初速度对 $[S]$ 作图将是一条双曲线(图 2.2)。

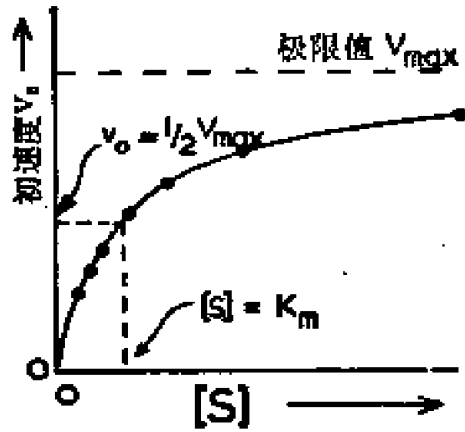
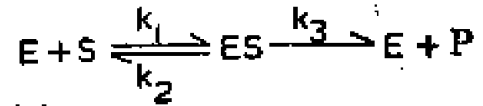
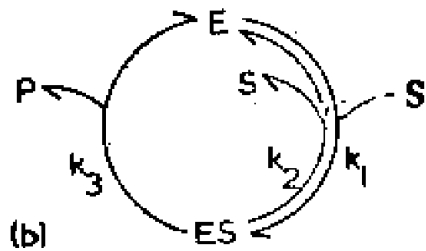


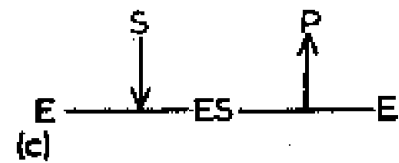
图 2.2 典型的酶促反应中,初速度与底物浓度的关系。



(a)



(b)



(c)

图 2.3 一底物机制的三种不同的表达图式。

对于这种图式意义的解释主要应归功于 A. J. Brown, 他早在 1902 年就曾提出,蔗糖酶能同它的底物形成可化学计算的复合物^[11]。他指出,正是这种复合物,分解出产物的同时再生出游离的酶(图 2.3)。这一图式与经典化学的表面催化图式极为相似。

Brown 的关于存在着一对一的酶-底物复合物的动力学理论,早在酶的化学本性被人们搞清很久以前就提出来了,它比对这种复合物进行光谱测定早 40 年,比通过 X-射线结晶学分析使其“形象化”早 60 年。在这期间,这一概念一直是我們了解生化专一性的基础。除了这些事实以外,正如所有的由动力学得到的结论一样,这一理论也是实验性的,并证明它与很多事实相符,而不只是逻辑上的推理。

为强调催化作用的循环特性,图 2.3a 的反应式也可以用

图 2.3b 式描写,也可以用 Cleland 发展的标记法(图 2.3c)表达,该式强调含酶的复合物而不是化学反应物。

现在在这一机制中,形成 P 的初速度与酶-底物复合物 ES 的浓度成正比。在低 S 浓度时,形成的小量 ES 与 [S] 成正比,从而总速度也与 [S] 成比例。但是当 [S] 升高时, E 与 ES 之间的平衡发生移动,直到实际上所有的酶都以 ES 形式存在,也就是说酶被 S 所“饱和”。在这种情况下酶以全速工作着。一旦 ES 分解释放出 E 和 P,或 E 和 S,就马上有更多的 S 结合上去,再形成酶-底物复合物。因为酶的存在有一个固定的浓度即 e ,所以反应速度不能超过 k_3e (图 2.2)。

整个酶的动力学只不过是上述引进的简单概念的引伸,可以结合到酶上的任何物质把酶分成两种形式或状态,即游离的和复合的。假使人们引进了抑制剂,或反应多于一底物,则不同状态的数目增加,但是基本概念保持不变。

2.2 米氏方程 (Michaelis-Menten 方程)

Michaelis 和 Menten 对一底物的反应式曾作了简单的数学处理^[2]。这种运算基于下述假设条件:

(1) 与底物浓度 [S] 相比,酶的浓度是很小的,所以 ES 的形成不会明显地降低 [S]。这种情况在大多数催化实验中都会遇到。例如,假使底物的浓度是 $10^{-3}M$,而酶的浓度是 $10^{-9}M$,那么很清楚,即使所有的酶都变成了 ES 的形式,这也只能使 [S] 发生微不足道的变化。

(2) 假设 P 的浓度实际上是零。这就是“初速度”假设,这不仅是指起始时刻 P 不存在,而且也暗示在速度测定所必须的时间里形成的产物 P 的量,对于引起明显的可逆反应来说实在是太小了。

(3) 虽然释放产物的一步是快速的,然而把它与 ES 释放