

分子酶学

陈惠黎 李文杰 编著

医学生物化学丛书

分子酶学

陈惠黎

(上海第一医学院生物化学教研室)

李文杰

编著

(中国科学院上海生物化学研究所)

人民卫生出版社

医学生物化学丛书

分子酶学

陈惠黎 李文杰 编著

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

人民卫生出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

850×1168 毫米 32 开本 15 印张 4 插页 398 千字

1983年12月第1版 1983年12月第1版第1次印刷

印数：00,001—7,320

统一书号：14048·4511 定价：2.40元

〔科技新书目 57 — 68〕

《医学生物化学丛书》出版说明

《医用生物化学》作为医学院校师生和临床医生学习生物化学的参考书，自1979年出版后受到读者的好评与鼓励。但是，生物化学领域进展十分迅速，近年来无论是基础生化理论，或是联系到医学实践的知识，都有很大的发展，出现了不少新观点或新的突破，书中有许多内容需要更新补充。另一方面，本书编写时，由于受当时思想的束缚，有不少重要的生物化学基础理论知识未能予以充分阐明，这是我们一直引以为憾的。因此，经过酝酿准备，我们着手对此书作全面修订。为了适应当前教学、科研、医疗对生物化学的广泛需要，力求及时反映国内外的成就和进展，决定将《医用生物化学》改为一套**《医学生物化学丛书》**，分册陆续出版。丛书暂定为八册，每一分册有一主题，由上海第一医学院、大连医学院、山东医学院和北京医学院的生物化学教研室分工负责编写。

为了编好这套丛书，成立了**《医学生物化学丛书》编写委员会**，由顾天爵、张昌颖、陈惠黎、李茂深、林钧材、王明运等同志组成，负责审定各分册的主题及编写内容。

丛书仍会有一些不够完善之处，恳望广大读者提供宝贵意见。丛书的出版，如能对读者有参考价值，编者将感到十分高兴。

《医学生物化学丛书》编委会

一九八三年三月

前 言

酶学是生物化学的一个重要分支，也是分子生物学的一个重要领域。有关酶学的知识已渗透到细胞生物学、生理学、遗传学、微生物学、药理学、诊断学、卫生学和临床医学的各门学科中。不论从事生物科学和医学教学和科研的教师、学生、科研人员或临床医务工作者，都迫切需要一本适合于医学方面的酶学参考书，这就是促使我们写作本书的动力。

随着医学科学的发展，人们越来越感到基础理论的重要性。故本书以酶学中最主要的基本理论为重点，从分子水平来阐述酶的结构、性质和功能；有关酶提纯、测定等有关方法学的内容不再叙述，故本书名为《分子酶学》。另一方面，在各章内容中，尽量结合医学实际，使理论为实践服务，最后以“血清酶”一章概括酶学在临床诊断中的应用。

本书为《医学生物化学丛书》之一。因此，为了避免与丛书其他分册的重复，凡与蛋白质、物质代谢、血液等分册重复的部分尽量予以精简。

为便于读者理解、接受，本书在叙述上力求简明，在公式推导上力求详细。尽量列举一些具体的例子并配合表格、曲线或示意图，来说明某些比较抽象的理论。在每章最后列出一些主要参考文献，以便需要深入学习的读者进一步阅读。

由于我们的水平有限，本书难免有不妥或错误之处，希望读者予以批评指正。

陈惠黎 李文杰

1982年6月

目 录

第一章	酶的物理化学·····	1
第二章	酶的结构与功能·····	51
第三章	辅酶和辅因子·····	130
第四章	底物动力学·····	177
第五章	酶的抑制作用·····	228
第六章	酶的别构效应·····	313
第七章	同工酶·····	367
第八章	血清酶·····	425

注意：书末有勘误表

第一章 酶的物理化学

第一节 酶-底物复合体·····	2
一、酶-底物复合体的存在·····	3
二、酶-底物复合体中的结合键·····	4
(一) 离子键·····	4
(二) 氢键·····	5
(三) 范德华键·····	8
三、酶-底物复合体的光谱变化·····	9
(一) 过氧化物酶类·····	9
(二) 脱氢酶类·····	10
(三) 色氨酸合成酶·····	11
四、酶和底物关系的理论·····	12
(一) 锁和钥理论——刚性模板模式·····	12
(二) 诱导契合理论——挠性模式·····	12
第二节 酶的专一性·····	13
一、立体化学专一性·····	13
(一) 光学专一性·····	14
(二) 几何专一性·····	15
二、非立体化学专一性·····	16
(一) 键专一性·····	17
(二) 基团专一性·····	17
(三) 绝对专一性·····	17
三、两类专一性的重叠·····	18
第三节 酶的热力学和酶变性·····	18
一、温度对酶作用的效应·····	19
(一) “最适”温度·····	19
(二) 活化能及其生物学意义·····	20
(三) 活化能的测定·····	21

二、酶蛋白的变性和酶的失活·····	22
(一) 酶蛋白变性的物理化学变化和微观改变·····	23
(二) 引起酶蛋白变性的原因·····	24
第四节 氢离子浓度对酶促反应的影响·····	26
一、最适 pH·····	27
(一) 最适 pH 曲线·····	27
(二) 最适 pH 现象的解释·····	27
二、pH 对游离酶或酶-底物复合体的效应·····	28
(一) 游离酶的电离作用·····	28
(二) 酶-底物复合体的电离作用·····	32
(三) 游离酶和酶底物复合体两者的电离作用·····	37
三、底物的电离作用·····	40
第五节 氧化还原与酶作用·····	42
一、氧化还原电位·····	42
二、pH 对氧化还原电位的效应·····	44
三、一价和二价电子转移·····	46
四、自由能和氧化还原电位之间的关系·····	47

酶是生物催化剂，具有一般催化剂的特性，但酶又是蛋白质，和一般催化剂有所不同。因此，为了熟悉酶这个生物催化剂的催化原理和其他性质，首先必须了解它的物理化学性质，包括酶-底物复合体的连接方式和光谱变化、酶的底物专一性、酶的热力学、氢离子浓度对酶促反应的影响以及酶促反应中的氧化还原等问题，这是学习以下各章的基础。

第一节 酶-底物复合体

在所有的酶促反应中，第一步就是酶和底物以非共价键结合而形成所谓的酶-底物复合体 (ES complex)。底物是结合在酶的特定功能区域——活性中心上的。此复合体并能逆向解离回到游离的底物和酶。因此，反应是可逆的。这样，在达到平衡时，

其反应是：



大部分酶和底物的结合有很高的选择性，也就是专一性 (specificity, 也称特异性)。这种结合反应的速率与酶和底物两者的性质均有关系，但是，无论在什么条件下测定这种结合速率，都是非常快的，因为这种平衡反应能在极短的时间内完成。

一、酶-底物复合体的存在

ES 复合体的概念，约在 1902 年已经有人提出，后来证明这种观点是正确的。关于 ES 复合体的存在，现在已有许多方法可以证实：

1. 首先，ES 复合体可以直接用电子显微镜观察到或用 X-射线结晶学方法检测到。例如，核酸和其聚合酶的复合体可以在电子显微镜照片中得到证实。羧肽酶 A 的一种底物甘氨酸-L-酪氨酸和酶的相互作用及其作用位置的详细信息也已从 ES 复合体的 X-线衍射研究中得到 (见本章第三节)。

2. 在形成 ES 复合体以后，酶的物理性质，例如酶的溶解度或热稳定性常会有所改变。

3. 在形成 ES 复合体后，许多酶和底物的光谱性质会发生变化，正象脱氧血红蛋白与氧结合后的吸收光谱也发生变化一样。如果酶含有有色的辅基，这些变化尤其显著 (详见三、酶-底物复合体的光谱变化)。

4. ES 复合体有时可以分离提纯。设有一种酶，能催化下列反应，即 $A + B \rightleftharpoons C$ ，如果酶对 A 有足够高的亲和力，并且在混合物中又没有 B 存在，就有可能分离出一种 EA 复合体。

5. 当酶的浓度恒定时，反应速率随着底物浓度的增加而增加，直至达到最大速率，即在足够高的底物浓度时，催化部位都被饱和，因而反应速率达到一个极大值。这是存在 ES 复合体的最古老也是最普通的证据。相反地，非催化反应并不显示这种饱和效应。

二、酶-底物复合体中的结合键

生物体系中可逆的分子间相互作用，包括酶和底物的可逆结合是通过三种不同类型的键来中介的。即离子键、氢键和范德华 (van der Waals) 键。这三种基本的非共价键对几何形状的要求、其强度和专一性方面都有不同。而且，它们可以由于水的存在而受到不同方式的影响。

(一) 离子键

底物上一个带电荷的基团能与酶上一种带相反电荷的基团作用，这种静电相互作用力称为离子键 (ionic bond)，也叫做盐键合 (salt linkage) 盐桥 (salt bridge) 或离子对 (ion pair)。例如，一个带负电的底物能够与酶蛋白上赖氨酸或精氨酸残基上带正电荷的侧链形成一种离子键。酶蛋白上肽链的末端氨基以及组氨酸残基的咪唑基 (如介质的 pH 能使它们带正电荷) 对于带负电荷的底物也可形成强力的离子键。对于一种带正电的底物，则酶上的形成离子键的强力部位是天冬氨酸和谷氨酸带负电荷的羧基以及多肽链的末端羧基。

羧肽酶 A 可以裂解蛋白质肽链的羧基末端残基。其底物甘氨酸-L-酪氨酸上带负电荷的末端羧基与酶蛋白的精氨酸残基上带有正电荷的胍 (guanidinium) 基团之间的相互作用 (图 1-1) 是离子键的一个典型例子。这一对带相反电荷的基团之间的距离为 $2.8 \text{ \AA}$ 。

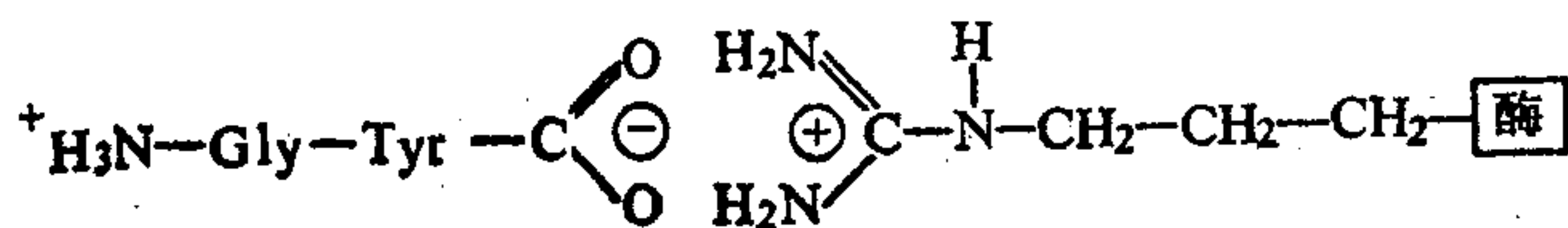


图 1-1 离子键

离子键的强度可用库伦定律 (Coulomb's law) 来表示:

$$F = \frac{q_1 q_2}{r^2 D}$$

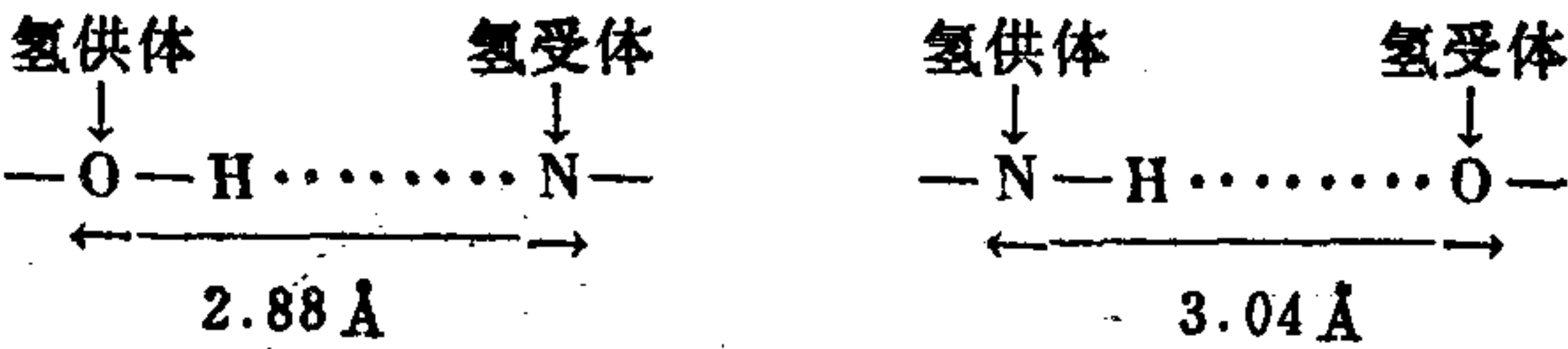
其中 q_1 和 q_2 是两类基团所带的电荷， r 是它们之间的距离

离，D是介质的介电常数。在真空中（D=1）静电相互作用最强，而在象水这样一种介质中最弱。

(二) 氢键

许多底物不带电荷，但是他们却能以很高的亲和力专一性地与酶结合，这种相互作用是由于氢键（hydrogen bond）在起作用。

1. 氢键的性质 在一个氢键中，氢原子是由另二个原子所共享的。与氢原子连接得较紧一些的那个原子称为氢供体，而另一原子则称为氢受体。受体原子具有部分负电荷就可吸引氢原子。事实上，氢键可认为是质子从酸（氢供体）转移至碱（氢受体）的一种中间状态。简言之，氢键是三个“成员”组成的一个组合：



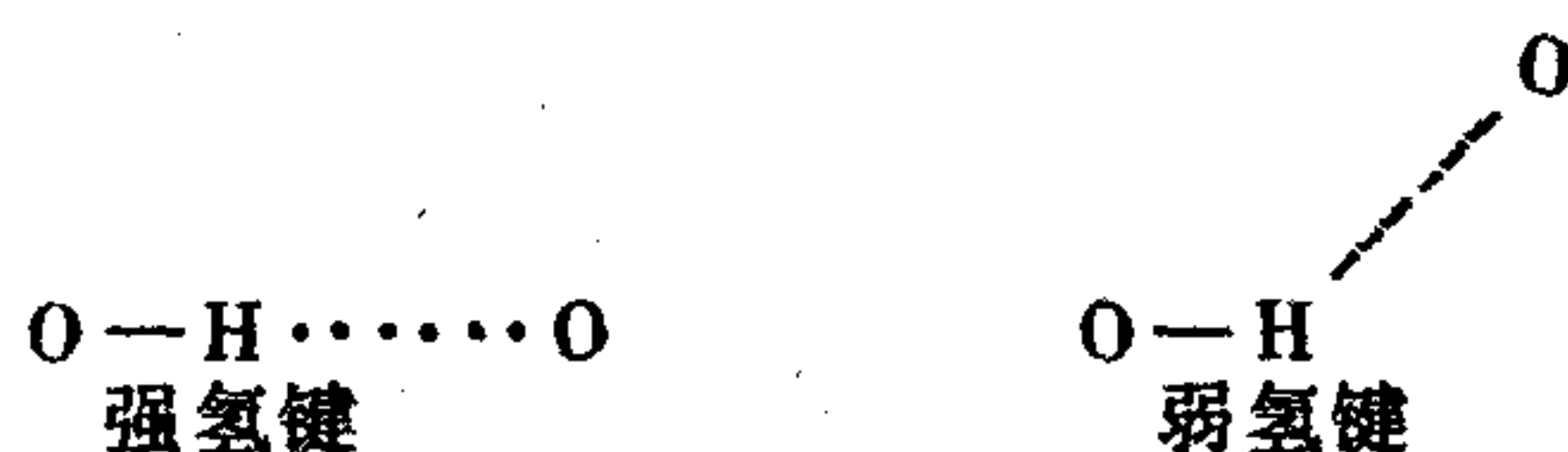
生物系统中的氢键中的供体原子是与氢原子共价连接的氧原子或氮原子。它们形成氢键的种类及键长列于表 1-1。键能的范围约为 3~7 千卡/克分子。氢键比下述 van der Waals 键要强一

表 1-1 典型的氢键距离

键	距离(Å)
O—H·····O	2.70
O—H·····O ⁻	2.63
O—H·····N	2.88
N—H·····O	3.04
N ⁺ —H·····O	2.93
N—H·····N	3.10

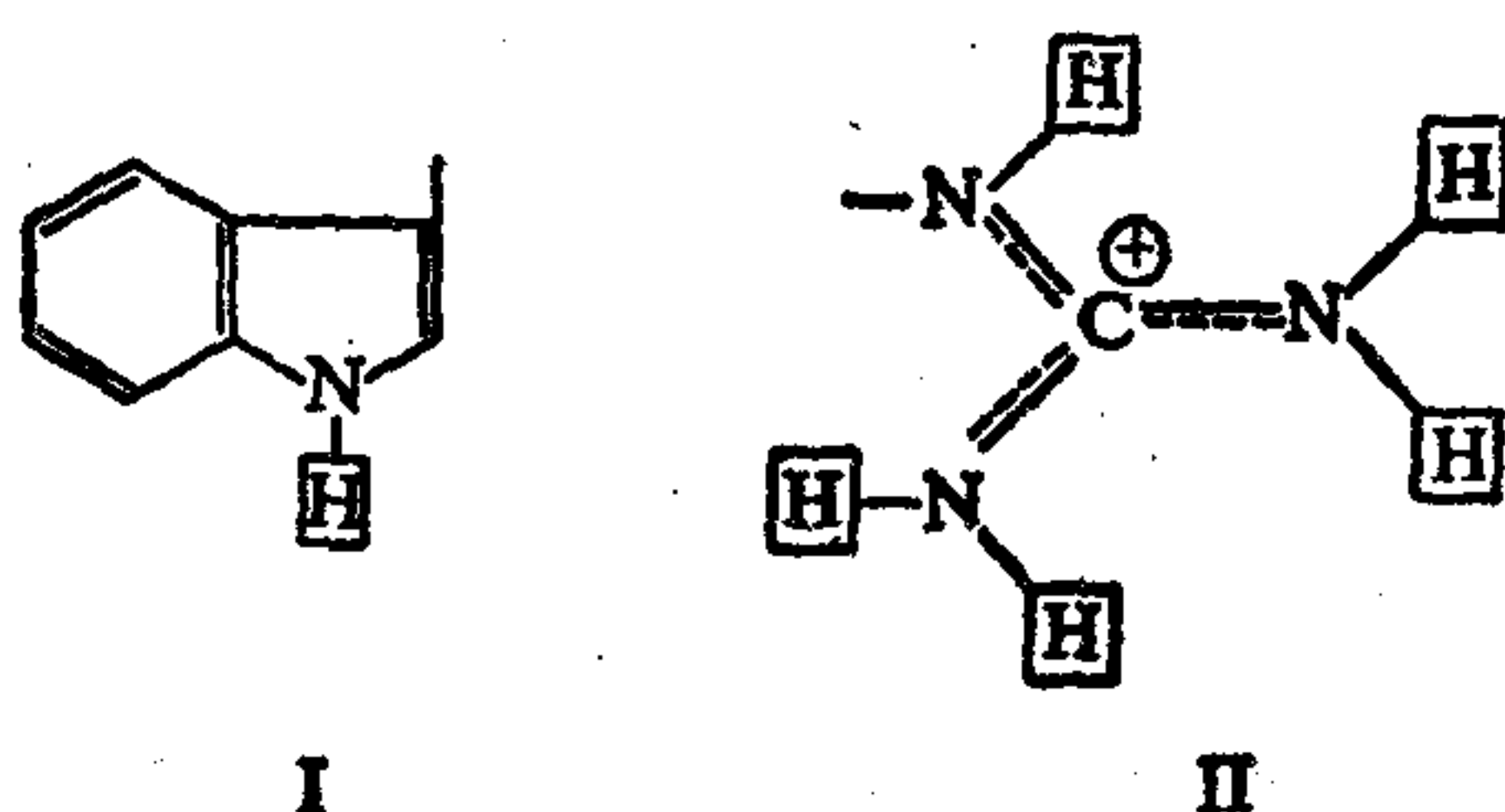
些，但比共价键要弱得多。氢键的长度介于共价键长和 van der Waals 键长之间。氢键的一个重要特点是它们具有高度的方向性。

当供体原子、氢和受体原子处于一直线时，则形成的氢键最强。如果受体原子与氢的连线以及供体原子和氢的连线成交角时，则氢键就弱得多。



2. 蛋白质肽链的侧链按氢供体或氢受体分类 蛋白质富于以氢键相连的潜力 (hydrogen-bonding potentiality), 其氨基酸侧链以及肽主链能形成许多不同种类的氢键。事实上, 二十种基本氨基酸中的十一种能通过侧链形成氢键。可以把这些残基按照形成氢键的种类分为三类:

(1) 色氨酸和精氨酸的侧链仅能作为氢键的供体 (图 1-2)。



H 提供作氢键的氢

图 1-2 色氨酸 (I) 和精氨酸 (II) 的氢供体基团

(2) 天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸和苏氨酸的侧链既能作为氢供体, 又能作为氢受体 (图 1-3), 肽键的基团亦然, —NH— 可作为氢供体, 而 —CO— 可作为氢受体。

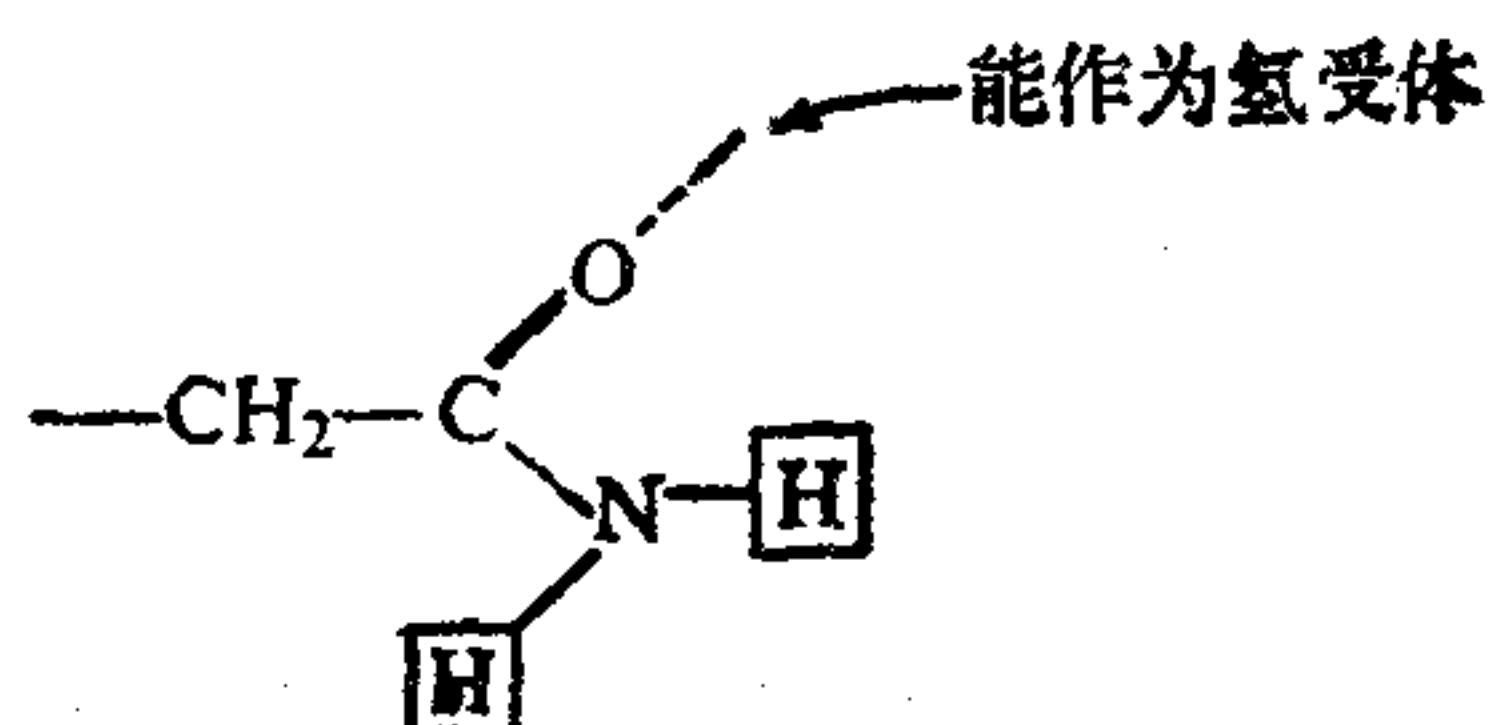


图 1-3 天冬酰胺或谷氨酰胺形成氢键的基团

(9) 赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸、酪氨酸和组氨酸则依 pH 而改变。这些侧链基团在某一个 pH 范围内可兼作氢键的受体和供体，但在另一 pH 值时，则仅可作受体或作供体（但不能同时用作二者）。以天冬氨酸和谷氨酸的侧链为例（图 1-4），这些可电离的基团和其他基团以氢键相连的模式是随着 pH 而定的。

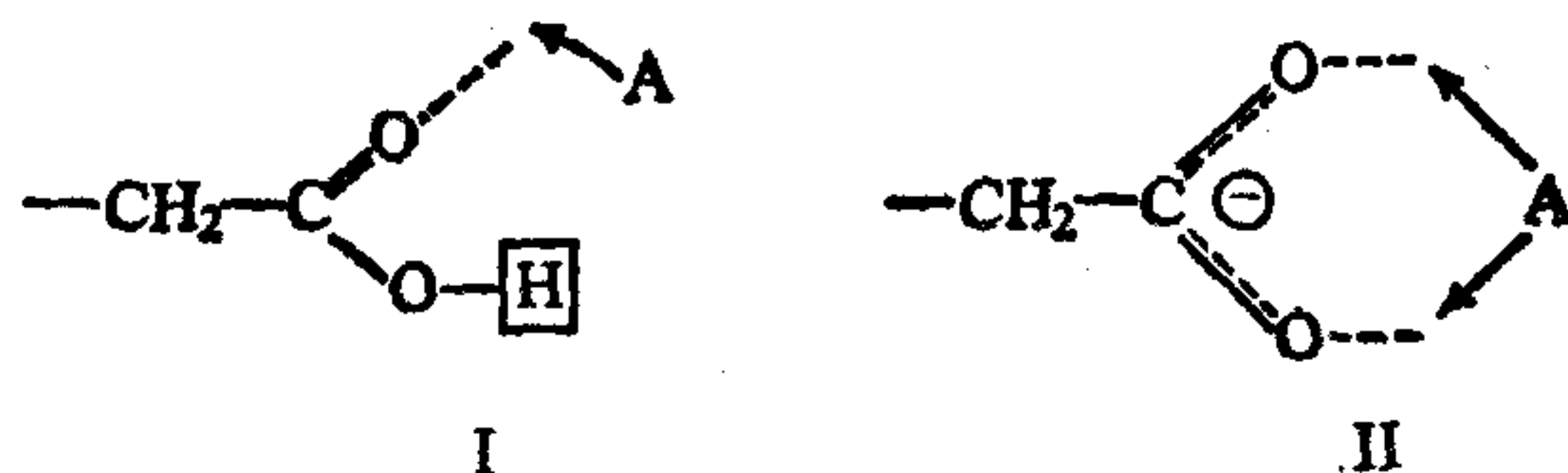
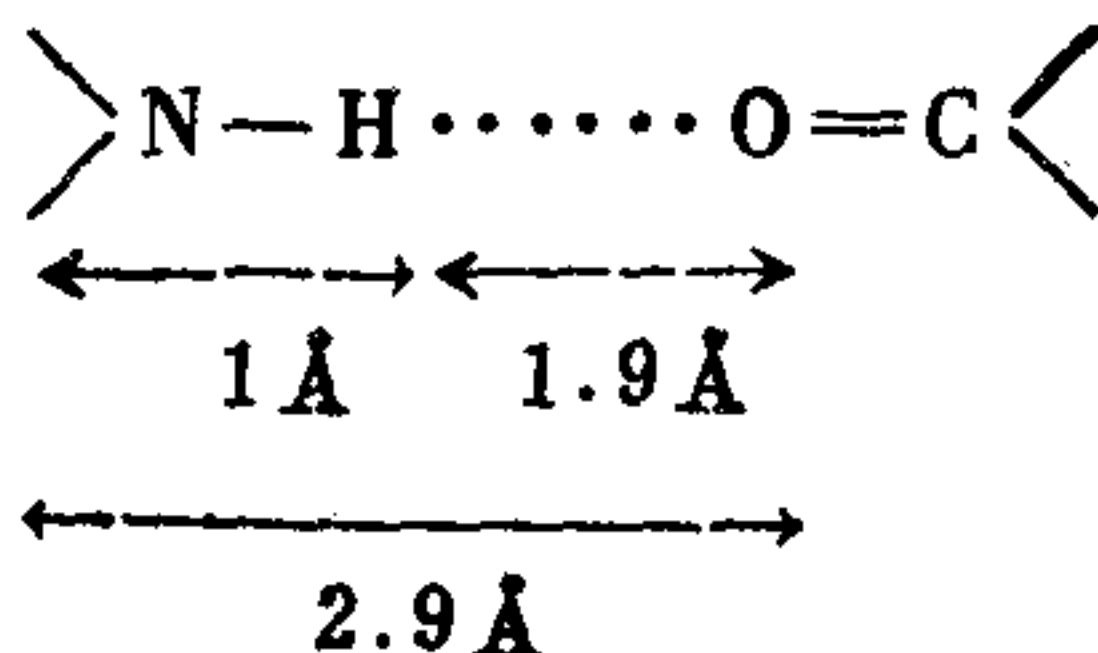


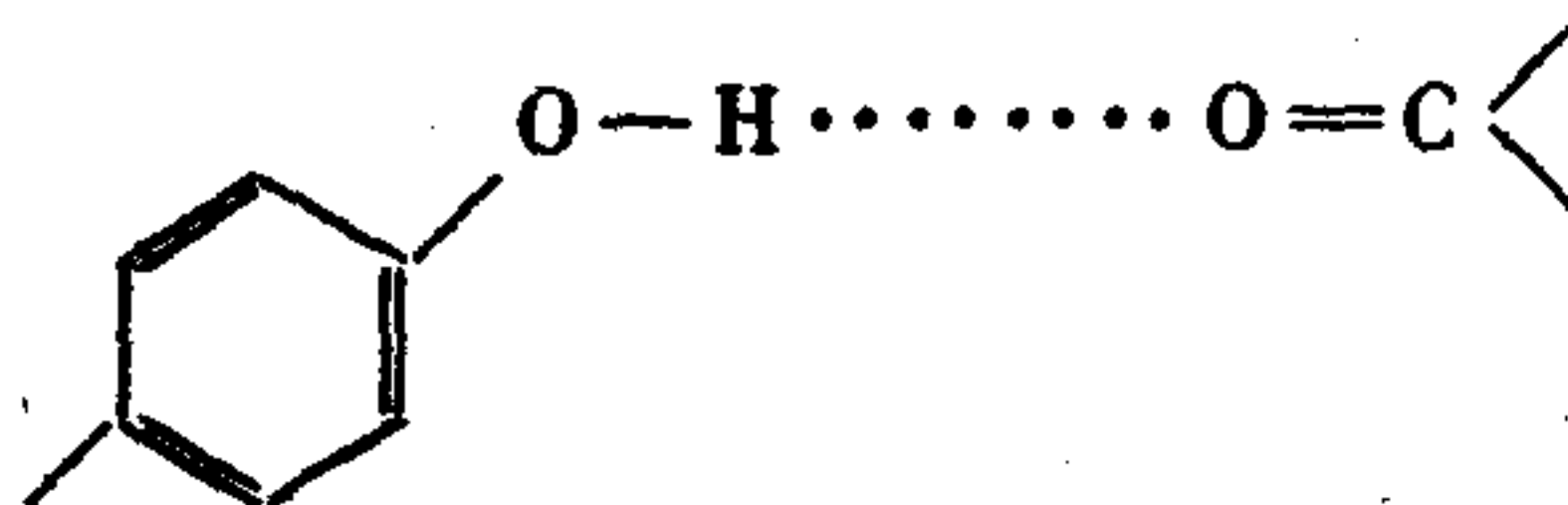
图 1-4 天冬氨酸和谷氨酸侧链的电离与氢键的形成

I: 天冬氨酸或谷氨酸的质子化 (Protonated) 型 II: 天冬氨酸或谷氨酸的电离型 A: 能作为氢受体之处

3. 一些具体例子 在很多酶蛋白二级结构的 α -螺旋中，肽链的 $-NH$ 和 $-CO$ 基团就是彼此以氢键相连的。氮原子是氢供体，而氧原子是氢受体。氮原子和氧原子间的距离是 $2.9 \text{ \AA}$ ，氢原子到氮原子比到氧原子近 $0.9 \text{ \AA}$ ：



此外，酶蛋白中酪氨酸的 $-OH$ 基和 $-CO$ 基团间也会形成氢键：



氢键在底物与酶结合中的作用可用胰核糖核酸酶与底物的尿苷 (uridine) 部分的连接来说明。这里涉及三种氢键(图 1-5)：

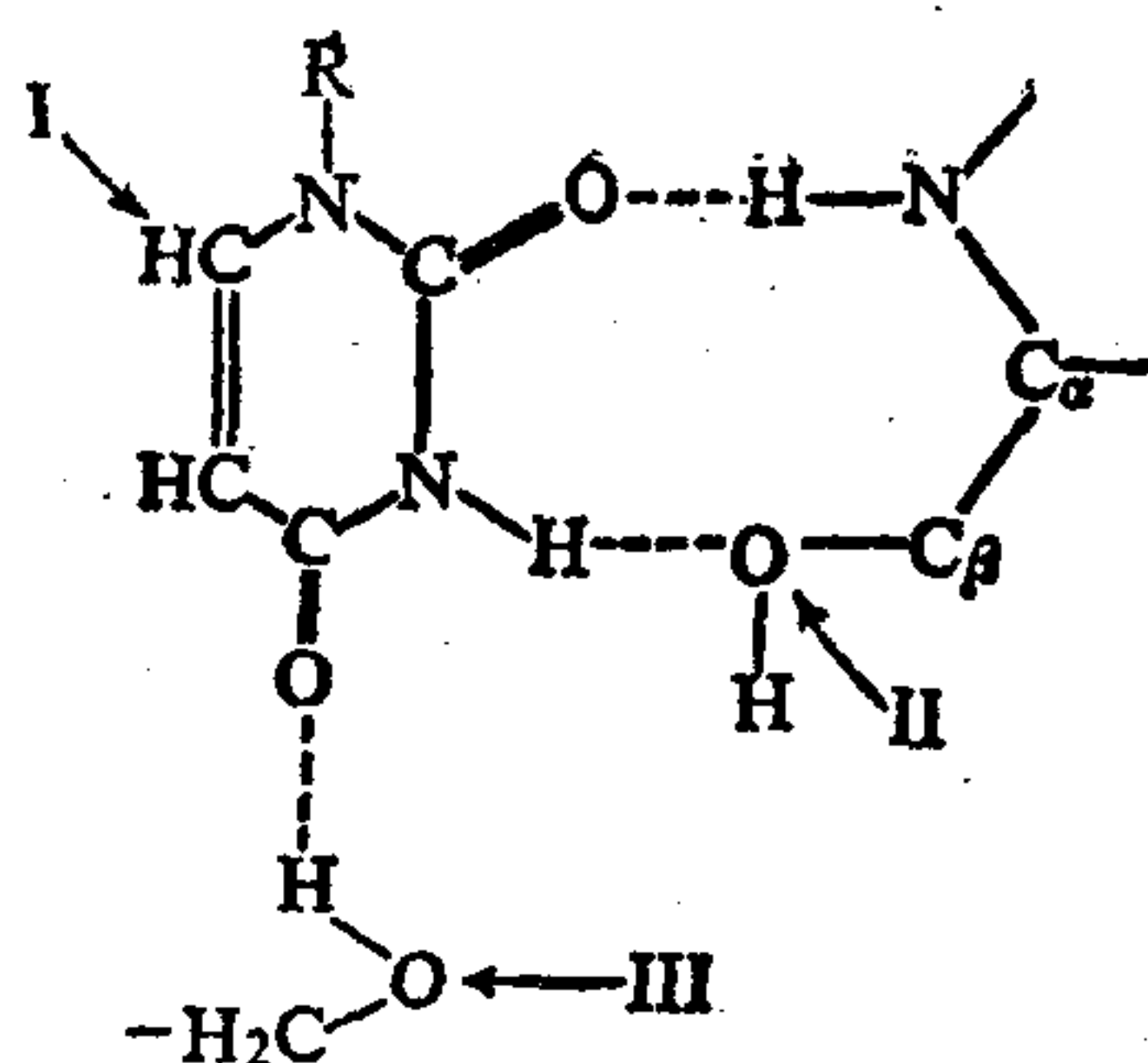


图 1-5 核糖核酸酶与底物中尿苷
借氢键的连接

I: 底物的尿苷环 II: 酶的苏氨酸侧链
III: 酶的丝氨酸侧链

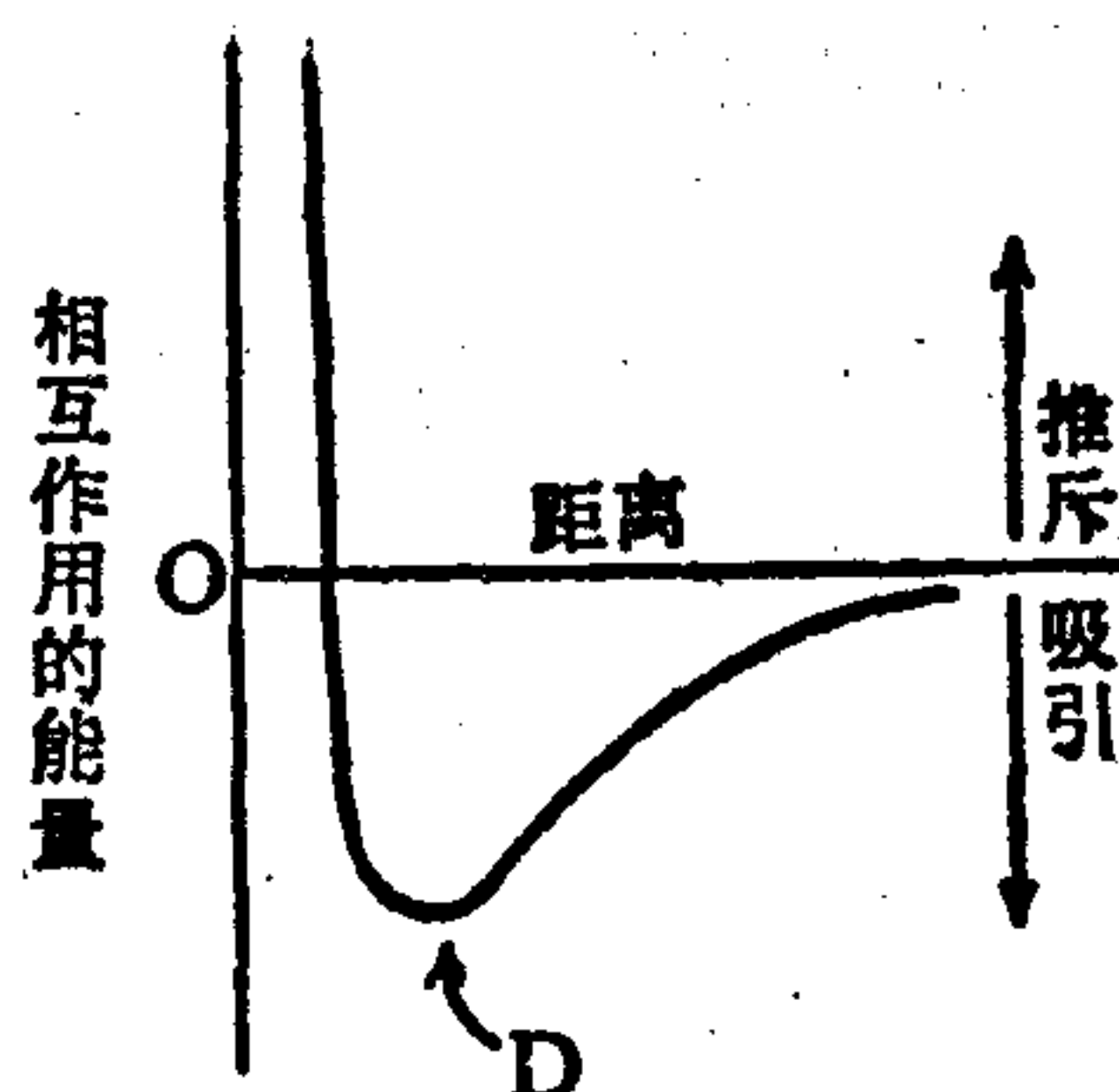


图 1-6 van der Waals 相互作用的
能量是两原子之间距离的函数

D 为 van der Waals 接触距离

(1) 尿苷环上的 $-C=O$ 基团之一以氢键与酶蛋白肽链的 $-N-H$ 相连。

(2) 尿苷环上的 $-N-H$ 基团以氢键与酶上苏氨酸残基的 $-OH$ 相连。

(3) 尿苷环上的另一 $-C=O$ 以氢键与酶丝氨酸残基的 $-OH$ 基团相连。

(三) 范德华键

任何二个原子之间相距约 $3\sim 4\text{ \AA}$ 时,就存在一种非专一的吸引力,这种相互作用,称为范德华 (Van der Waals) 键。它比离子键和氢键要弱些,专一性也小些,但在生物学中的重要性并不小。Van der Waals 键的基础就是围绕着原子的电荷随着时间而改变的分布。在任何一瞬间,电荷的分布不是完全对称的,这种围绕一个原子的电荷在一瞬间的不对称性将会改变其邻近原子的电子分布。当一对原子离得较近时,它们之间的吸引力增加,直到它们被 Van der Waals 接触距离 (contact distance, D) 所分开为止。在更短的距离处,因为外层的电子云互相重叠,故极强的排斥力占优势 (图 1-6)。例如,氧原子和碳原子间的接触距离是 $3.4\text{ \AA}$,此值是把 O 和 C 原子的接触半径 1.4 和 $2.0\text{ \AA}$ 相加而得 (表 1-2)。

表 1-2 原子的 Van der Waals 接触半径

原子	半径(Å)
H	1.2
C	2.0
N	1.5
O	1.4
S	1.85
P	1.9

一对原子的 Van der Waals 键能约为 1 千卡/克分子。这比氢键或离子键（它们约在 3~7 千卡/克分子范围内）要弱得多。这样，一个单一的 Van der Waals 键简直是无足轻重的，其强度仅比在室温时分子的平均热能 (thermal energy) 略高。Van der Waals 键在连接上的作用只有当许多底物原子同时接近许多酶原子时才有意义。当一对

原子间的距离比他们的接触距离甚至只大 1 Å 时，Van der Waals 键就很快地消失。许多底物原子能与一个酶的许多原子相互作用，但只有当它们的外形相适配时才行。换言之，底物和酶之间的有效 van der Waals 作用，只有在它们处于立体互补 (steric complementarity) 时才能发生。这样，虽然在一种单一的 Van der Waals 相互作用中并不存在专一性，但当同时形成大量的 Van der Waals 键时就出现了专一性。比 Van der Waals 接触距离更近的原子间的排斥力也和吸引力一样在专一性的产生上起重要作用。

三、酶-底物复合体的光谱变化

因 ES 复合体太不稳定并较难分离，因此不宜采取通常的有机化学方法，而必须在溶液中用一些物理技术研究。除在本节中所述的电子显微镜和 X-射线衍射法外，研究 ES 复合体主要采取特种分光光度法和荧光光谱法。下面简单地介绍一些酶的 ES 复合体的光谱变化。

(一) 过氧化物酶类

铁卟啉酶是研究 ES 复合体最合适的模型。首先，这种酶都很容易结晶(例如过氧化氢酶)。其次，因含有铁卟啉辅基，它们全都具有强烈的吸收光谱，其中在 400nm 处有一条吸收带，称为 Soret 带。当酶分子中含有碱基配位的羟高铁血红素 (base-coordinated hematin) 时，此带特别明显，具有一个 1.4×10^5 数量

级的克分子消光系数。其中细胞色素类的光谱具有很强的特征，甚至可能在活细胞内研究其 ES 复合体的存在。

过氧化氢酶或过氧化物酶与底物过氧化氢生成的最初复合体曾被称为复合体 I，其吸收光谱见图 1-7。值得注意的是，一些没有酶活力的铁卟啉蛋白质，如血红蛋白和肌红蛋白，并不形成复合体 I。复合体 II 是从复合体 I 衍生出来的第二个复合体，其吸收光谱又和复合体 I 不同，其峰值略向长波移动。

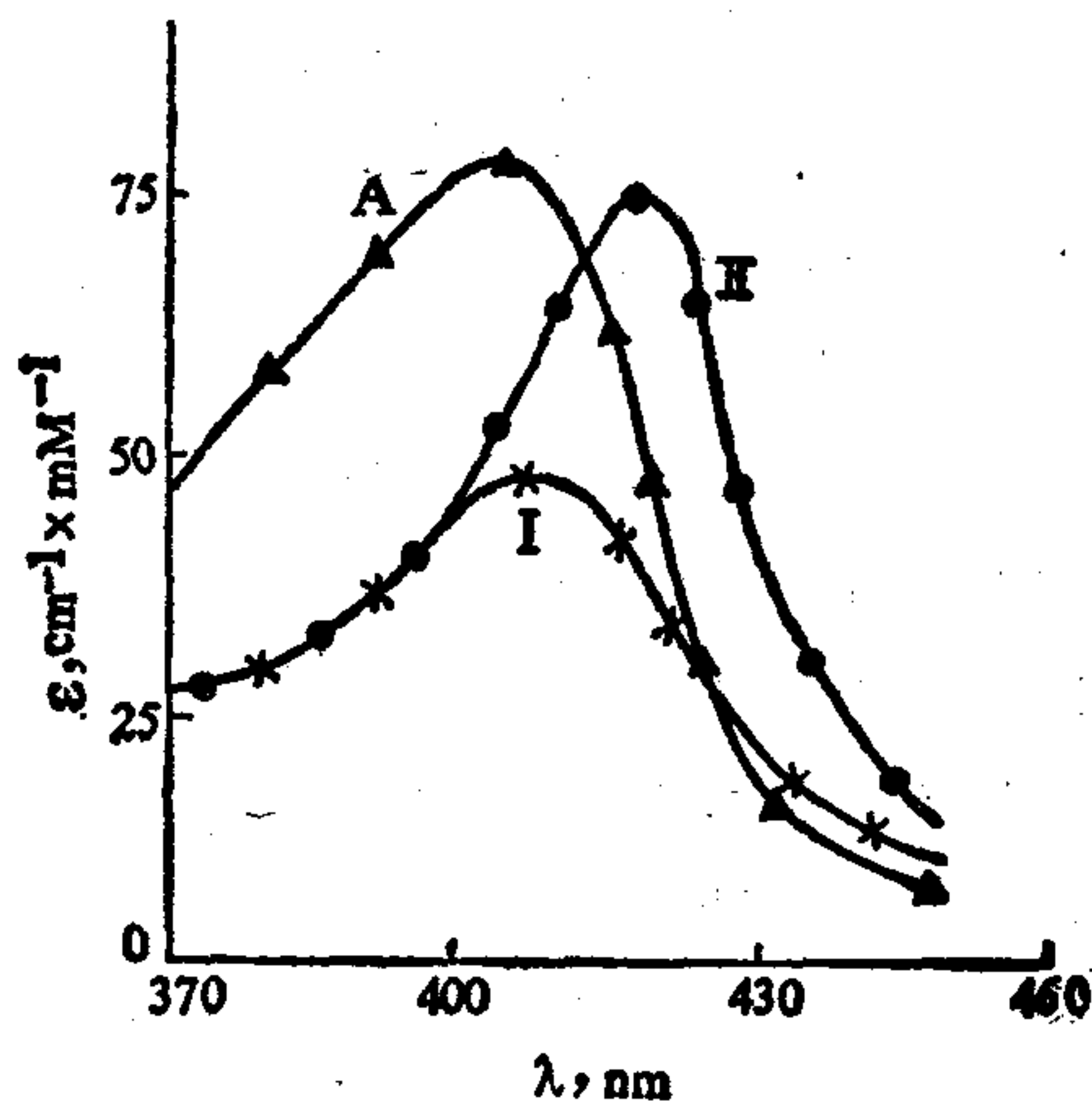


图 1-7 游离的辣根过氧化物酶 (曲线 A) 与过氧化氢的复合体 I (曲线 I) 和复合体 II (曲线 II) 的 Soret 带的光谱

(二) 脱氢酶类

当结晶的肝脏醇脱氢酶 (ADH) 加入等克分子的 NADH 时，NADH 的吸收光谱会发生改变。从图 1-8 可见，游离的 NADH 在 340nm 处有一个较宽的吸收高峰，当 NADH 与醇脱氢酶结合后，其吸收光带就移向紫外，而在 328nm 处有一等消光点 (isobestic point)。所谓等消光点就是同一种物质，当具有几种不同形态 (例如氧化态和还原态、游离态和复合态等) 时，其各别光吸收曲线的相交点。这种相交点可以是一个也可以多个。醇脱氢酶与 NADH 的复合体是一克分子酶和 2 克分子

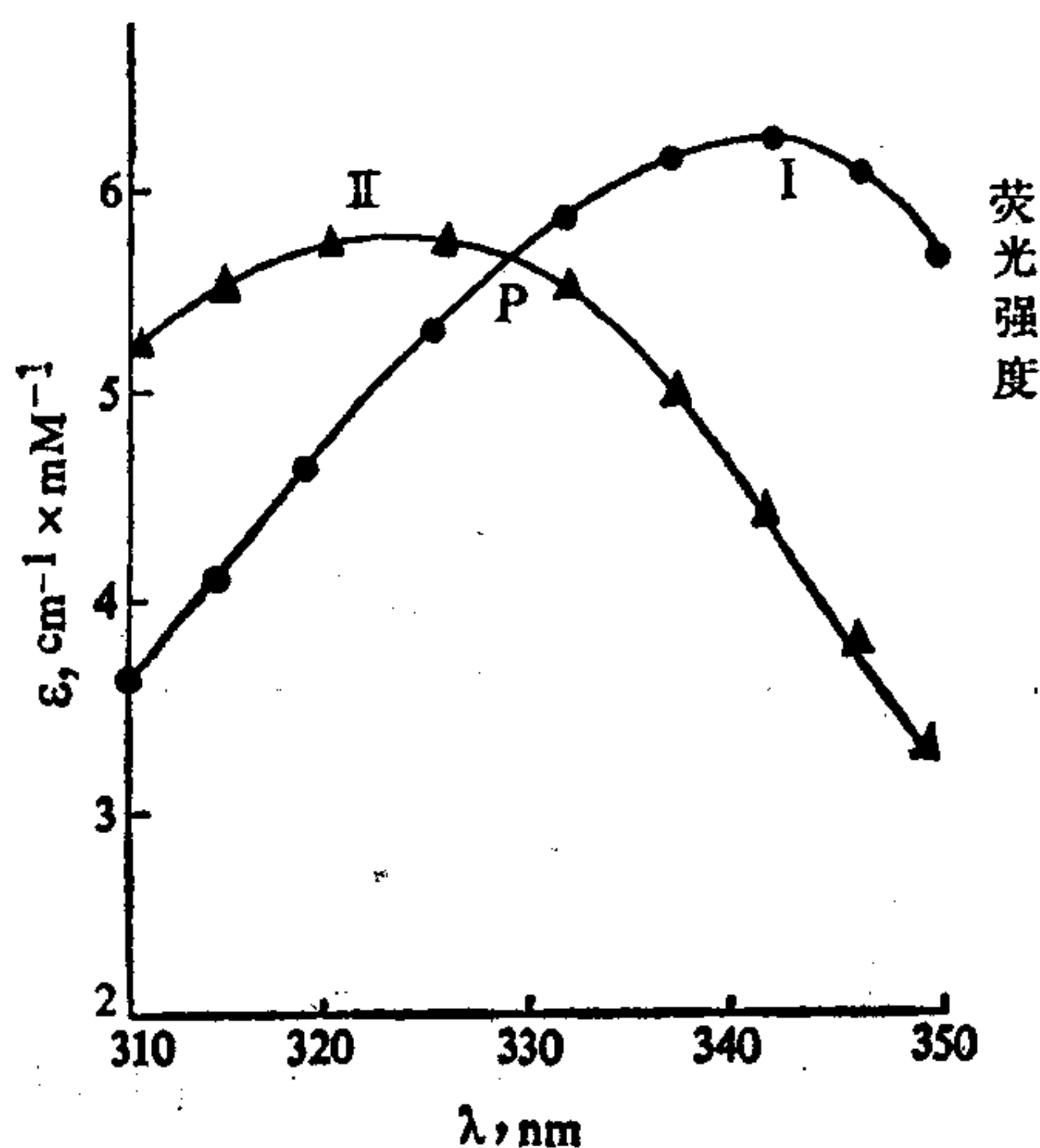


图 1-8 游离的 NADH (曲线 I) 以及醇脱氢酶 NADH 复合体 (曲线 II) 的光谱
P 为等消光点

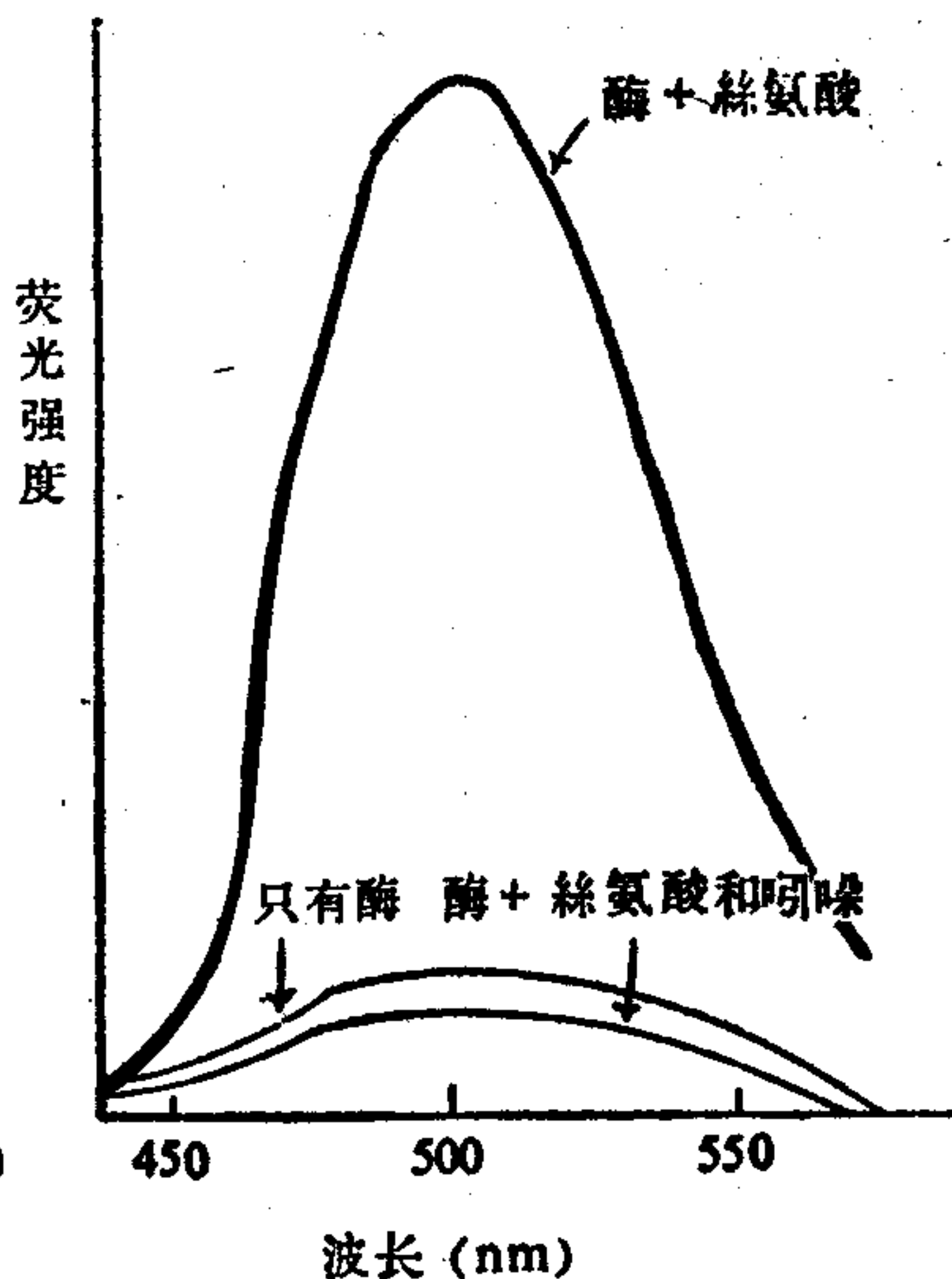


图 1-9 在加入底物丝氨酸和吲哚后, 色氨酸合成酶活性中心中磷酸吡哆醛荧光强度的改变

NADH 的络合物, 即 $\text{ADH} \cdot (\text{NADH})_2$ 。 $\text{ADH} \cdot (\text{NADH})_2$ 复合体在很温和的条件下能与巯基结合剂对氯汞苯甲酸 (PCMB) 作用而分解。当 ADH 与 NADH 分离后, 游离 NADH 的光谱重新出现。因为在 340nm 区域的光吸收唯一地是由 NADH 中的还原吡啶环提供的。因此可以逻辑地认为: 酶的一SH 基团是以某种方式与辅酶分子的还原吡啶环相结合的。

酶与底物结合的另一个证据可以从 3-磷酸甘油醛脱氢酶的独特性质而获得。这个酶需要与一定量的 NAD^+ 结合才能结晶。故获得结晶的本身就是酶与底物结合的证据。

(三) 色氨酸合成酶

细菌的色氨酸合成酶含有一个磷酸吡哆醛辅基, 此酶催化从 L-丝氨酸和吲哚合成 L-色氨酸的反应。当加入 L-丝氨酸至酶中时, 可使磷酸吡哆醛基团的荧光显著增加 (图 1-9)。接着加入第二个底物吲哚时, 就会猝灭这种荧光, 并比酶单独存在时的水平