科爱传播
KE'AI COMMUNICATIONS

·导读版·

实验室解决方案

易于使用

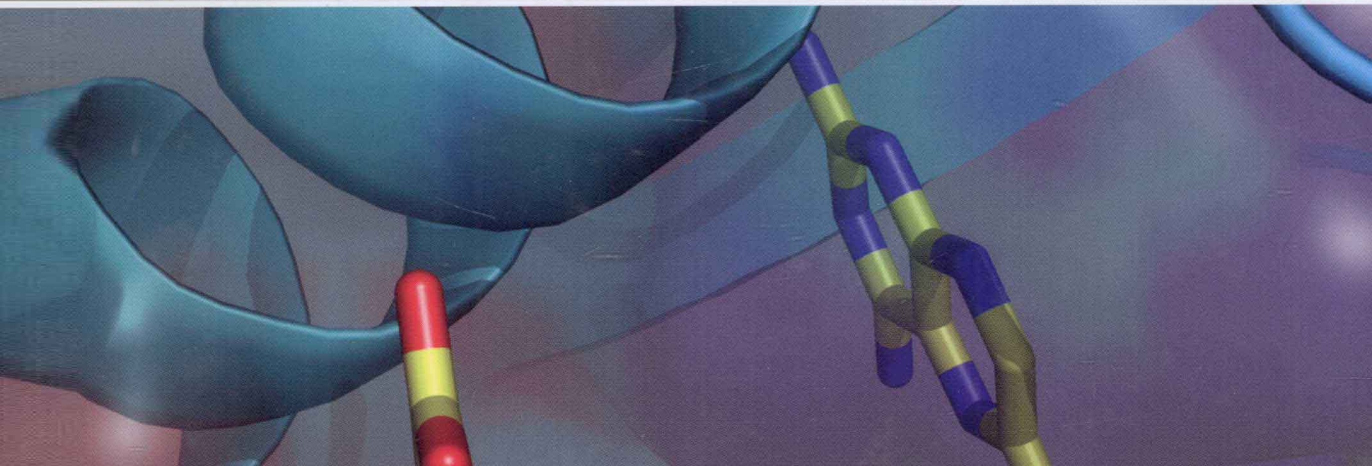
值得信赖

专业权威

# 现代酶动力学和机理（原著第3版）

# Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism (Third Edition)

Daniel Lee Purich



ELSEVIER
原版引进

科学出版社

实验室解决方案

# Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism

**(Third Edition)**

# 现代酶动力学和机理

(原著第3版)

阜阳师范学院图书馆
★
藏书

Edited by
**Daniel Lee Purich**
*Professor of Biochemistry and Molecular Biology*
*University of Florida, College of Medicine*
*Gainesville, Florida, USA*

科学出版社
北京

图字:01-2011-5217 号

This is an annotated version of
**Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism, 3rd Edition**
By Daniel Lee Purich

ISBN: 978-0-12-378608-1
Copyright © 2010 Elsevier Inc.

All rights reserved.
No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

AUTHORIZED EDITION FOR SALE IN P. R. CHINA ONLY
本版本只限于在中华人民共和国境内销售

**图书在版编目(CIP)数据**

现代酶动力学和机理=Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism:第 3 版:英文/(美)珀里奇(Purich,D. L.)编著. 一北京:科学出版社,2011
("实验室解决方案"系列丛书)
ISBN 978-7-03-032528-0

Ⅰ.①现… Ⅱ.①珀… Ⅲ.①酶学:动力学-英文 Ⅳ.①550.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 206009 号

责任编辑:孙红梅/责任印制:钱玉芬
封面设计:耕者设计工作室

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717
http://www.sciencep.com
双青印刷厂 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2012 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16
2012 年 1 月第一次印刷 印张:44 1/4 插页:1
字数:1 050 000
**定价:188.00 元**
(如有印装质量问题,我社负责调换)

# 一本设计、执行和分析动力学实验的好书

## ——评《现代酶动力学和机理》

## (Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism)

**罗贵民**

(吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室，长春，130012，E-mail:gmluo@jlu.edu.cn)

近25年来，美国佛罗里达大学医学院生物化学与分子生物学系教授Daniel Lee Purich一直位居生物化学研究的最前沿。他被授予了1977～1982年的国家卫生研究院职业发展研究奖、1977年Plous教学奖（美国加州大学圣塔芭芭拉校园教学成果奖）；1982～1985年为国家卫生研究院生物化学研究组成员；1981～1986年担任生物化学杂志编委会编委。他一直是美国纽约科学院、生化学会、美国细胞生物学学会、美国化学学会、生物化学家协会的成员。Purich博士是佛罗里达大学医学院生物化学与分子生物学系主席。他撰写和编辑了大量的科学出版物。他最近出版的2本新著是《酶动力学——催化作用和调控作用》(Enzyme Kinetics: Catalysis & Control）和《现代酶动力学和机理（原著第三版）》(Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism，3rd)。这些成就证明，Daniel Lee Purich教授是一位资深酶动力学研究专家，在这个领域颇具权威性。

酶学是生物化学与分子生物学研究的重要组成部分，对酶学基础及应用基础问题的探讨，将促进对生命本质的深刻认识。作为生命活动的主要“推动者”，酶是许多重要的药物作用靶点和非常有用的合成反应催化剂。酶催化过程的动力学研究揭示了酶催化反应的速度关系和酶调控的基本机制，为催化过程特别是重要药物的合理设计提供了强有力的理论支持。然而，在我国，动力学研究方面的学术专著并不多。2004年化学工业出版社出版了加拿大科学家马兰戈尼撰写的《酶催化动力学——方法与应用》，2010年厦门大学出版社出版了陈清西的《酶学及其研究技术》算是最新的专著了。美国佛罗里达大学医学院生物化学与分子生物学系教授Daniel Lee Purich编写的《现代酶动力学和机理》(Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism，3rd）第三版于2009年由Elsevier公司出版。与前2本著作不同，这本书是由数十位活跃在教学、科研第一线的有经验的科学家参与撰写，最后由Purich教授编辑而成，其第一版和第二版分别于1983年和1996年出版。和前2版相比，新版内容有很多更新和扩充，既有理论，更有具体实例和实验忠告，为学生提供了理想的教科书，也为研究酶动力学的科研人员提供了可靠的实验室解决方案。该书有如下几个明显的特点。

1. 系统、全面

本书整合了系列经典酶学专著“酶学方法（Methods in Enzymology)”第63、64、87、249、308、354卷中的关键章节，描述了酶学研究中基本的、广泛应用的方法。这

些方法同样适用于新发现的酶和药用酶。全书共分 4 个部分 20 章。从初始速度理论和方法、酶的抑制剂、酶反应中间物的检测、酶过程的同位素探针等方面系统全面地将动力学的基本理论知识与设计、执行和分析酶动力学实验技术有机地融为一体，使学生获得全方位的酶动力学研究方面的知识。

2. 科学、前沿

本书有 28 位专家参与写作。他们世界知名、实战经验丰富，涉及生物化学、分子生物学、细胞生物学和化学等不同的学科领域。他们大部分来自美国学术医疗中心及瑞典，还有美国的大学，例如，加州大学柏克利分校、爱荷华大学、北卡罗莱纳大学教堂山分校和佛罗里达大学。这些作者大多参与了本书第 2 版的编写。第 2 版与第 3 版的时间间隔为 13 年，这期间酶反应动力学研究无疑取得了长足进展，因此，原作者在第 3 版中都做了更新，使有关知识处于前沿状态。例如定点突变技术用于研究酶的催化作用；用电喷雾质谱在线快速混合技术研究酶反应的预稳态动力学；位置同位素交换作为检测酶作用的探针；酶的过渡态分析等新内容。有的章节用具体酶作为实例说明新方法的实际应用。

3. 综合、实用

作为“实验室解决方案”系列丛书的一本，本书提供的方法是本领域世界一流科学家呈献的经得起时间检验的技术，易于使用、值得信赖和尊重，本书各章都由本领域的短小精悍的评论和易于实际操作的实验方案组成，而且只要有可能，都由原作者对该章彻底更新，使其包括新研究成果、新文献和中肯的提示。每一章开头有描述当前进展的内容，保持前沿性，还有概括性总结本章内容的结语。Purich 教授编写的附录是一套精心选择的问答题，对阅读中遇到的难点问题均有详尽的解答，这些材料无疑便于读者更好地了解和掌握本书的重点内容。

本书的第一部分内容较多，共 9 章，约占全书的一半。这部分交代了有关酶反应初始速度的基本理论和方法。从初始速度和同位素交换速度方程的导出开始，包括设计酶初始速度分析中的实际问题；偶联酶分析中的技术；设计、分析竞争型动力学模型识别实验中的回归分析，实验误差和统计标准；酶反应进程曲线的非线性回归分析；pH 和温度对酶的影响；酶功能的协调性，强调了定点突变技术是研究酶催化作用的有力工具。

本书的第二部分共 3 章，介绍了可逆酶反应抑制剂在阐明酶作用机理中的作用以及亲和标记在研究酶结构功能中的应用，还特别描述了酶失活剂与酶的催化机理的关系。

本书的第三部分共 3 章，重点介绍如何检测酶反应中间物，包括瞬变动力学法研究酶作用机理；以聚合酶和三磷酸腺苷酶为例，描述了化学淬灭-流动法用于酶反应中间物和酶作用机理的检测。专门介绍了用电喷雾质谱在线快速混合技术研究酶反应的预稳态动力学。

本书的第四部分共 5 章，专门介绍同位素技术在阐明酶催化作用中的应用。这些技术包括：同位素交换法；位置同位素交换法；动力学同位素效应。这里详细介绍了这些方法在研究酶的过渡态及其类似物中的应用，以及过渡态和抑制剂识别的计算方法。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

本书描述的方法在下述情况下特别有用：1）考察新发现酶的催化行为；2）考察定向进化酶突变体的动力学行为；3）设计并优化新奇的治疗用药物。作为忙碌的研究人员的必需工具，本书将帮助读者设计、执行和分析酶的动力学实验，既能为初学者，也能为专业科学家提供最好的实验方法和应用这些技术的忠告，以及适合其实验室的具体方法。因此，这是一套思路清晰、步骤明确和操作性强的实验方案，能指引读者应对酶研究的挑战。本书不仅是酶学研究生的理想教材，也是专业科学家，特别是药物设计研究人员的必备工具书。

# 前　言

对酶的动力学模型及其化学机理的阐明总是源自于对设计和完成特有的酶反应速度实验的执着兴趣。熟悉酶学的人会直接领略到设计酶实验所带来的挑战和满足。富有经验的酶学家对于具有完美构思的实验和了解个别酶“化学个性”研究的细枝末节总是那么激动不已并心驰神往。而在动力学研究中，只有有效的动力学理论和可靠的动力学实验技术才是对理论性预测最富有助益的。本书中的各章原来发表在“酶动力学和机理”子系列丛书中，包含了“酶学方法”中的 63、64、87、249、308 和 354 等各卷。这些章节是最有用和经久不衰的理论资源，也是应用系统动力学测试酶的催化和调控作用的最佳实验指导。事实上，其中很多作者在创建动力学理论和/或确立其长远的用途中确实起到了至关重要的作用。我确信，通过阅读这本新编辑的书中的各个章节，酶动力学专业的学生和对更广泛的分子生命科学感兴趣的学生将从本书每一章节所呈现的智慧和经验中受益。

Daniel Purich

（罗贵民 译）

# CONTRIBUTORS

*Numbers in parentheses indicate the pages on which the authors' contributions begin.*

**R. Donald Allison** (35, 451), Department of Biochemistry & Molecular Biology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida 32610-0245, USA

**Bennett W. Baugher** (55), Department of Biochemistry Rice University, Houston Texas 77001

**Robert S. Beissner** (55), Department of Rice University, Houston Texas 77001

**Paul J. Berti** (571), Department of Chemistry, Department of Biochemistry & Biomedical Science McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

**Benjamin B. Braunheim** (609), Department of Physiology and Biophysics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York 10461

**Henry B. F. Dixon**✠ (123), Department of Biochemistry, Trinity College, Dublin 2, Ireland

**Donald J. Douglas** (433), Department of Chemistry, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z1

**Ronald G. Duggleby** (95), Department of Biochemistry, Centre for Structure, Function, and Engineering, University of Queensland, Brisbane, Queensland 4072, Australia

**Carol A. Fierke** (373), Department of Biochemistry, College of Medicine, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710

**Herbert J. Fromm** (279), Department of Biochemistry and Biophysics, Iowa State University, Ames, Iowa 50011

**Gordon G. Hammes** (373), Department of Biochemistry, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina 27710

**Charles Y. Huang** (1), Laboratory of Biochemistry, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892, USA

**Kenneth A. Johnson** (407), Department of Chemistry and Biochemistry, Institute for Cell and Molecular Biology, University of Texas, Austin, TX 78735, USA

**Lars Konermann** (433), Department of Chemistry, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada N6A 5B7

**Keith J. Laidler**✠ (177), Department of Chemistry, University of Ottawa, Ottawa, Ontario KIN 9B4, Canada

**Bengt Mannervik** (75), Department of Biochemistry and Organic Chemistry, Uppsala University, Biomedical Center, Box576, SE-75123 Uppsala, Sweden

✠Deceased

**Andrew G. McDonald** (123), Department of Biochemistry, Trinity College, Dublin 2, Ireland

**Leisha S. Mullins** (493), Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, Texas 77843

**Kenneth E. Neet** (227), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chicago Medical School, Rosalind Franklin University of Medicine and Science

**Branko F. Peterman** (177), Department of Chemistry, University of Ottawa, Ottawa, Ontario KIN 9B4, Canada

**Bryce V. Plapp** (199, 301), Department of Biochemistry, Carver College of Medicine, The University of Iowa, Iowa City, IA 52242-1109, USA

**Daniel L. Purich** (35, 451), Department of Biochemistry & Molecular Biology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida 32610-0245, USA

**Frank M. Raushel** (493), Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, Texas 77843

**Frederick B. Rudolph**✠ (55), Department of Biochemistry Rice University, Houston Texas 77001

**Vern L. Schramm** (519), Department of Biochemistry, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York 10461

**Steven D. Schwartz** (609), Departments of Physiology and Biophysics, and Biochemistry, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York 10461

**Richard B. Silverman** (331), Department of Chemistry, Northwestern University, Evanston, Illinois 60208

**Keith F. Tipton** (123), Department of Biochemistry, Trinity College, Dublin 2, Ireland

✠Deceased

# PREFACE

The elucidation of kinetic models and chemical mechanisms is deeply rooted in a keen interest in the design and execution of appropriate rate experiments. Those familiar with enzymology immediately appreciate both the challenge and satisfaction of designing enzyme experiments. Experienced enzymologists invariably convey an excitement and fascination for the details of a well-conceived experiment as well as the task of learning about a particular enzyme's "chemical personality." And in enzyme kinetics, nothing is quite as helpful as a useful kinetic theory and reliable kinetic techniques with which to test theoretical predictions. The chapters presented in this monograph were originally published in the *Enzyme Kinetics and Mechanism* subseries, comprising volumes 63, 64, 87, 249, 308, and 354 of *Methods in Enzymology*. These chapters represent some of the most useful and enduring sources for theory and best-practice advice for the systematic kinetic examination of enzyme catalysis and control. In fact, many of the authors actually played pivotal roles in originating the kinetic theories and/or in establishing their far-reaching utility. By offering these chapters in this newly organized compendium, I am confident that students of enzyme kinetics as well as those interested in broader aspects of the molecular life sciences will benefit from the wisdom and experience embodied in each and every chapter.

Daniel Purich

# 目　　录

编著者
前言

第一部分　起始速度　理论和方法

第一章　初始速度和同位素交换速度方程的导出
Charles Y. Huang
第一节　起始速度方程的导出 …… 4
第二节　同位素交换速度方程的导出 …… 24
第三节　结语 …… 31
附录 …… 32
参考文献 …… 33

第二章　设计酶初始速度分析中的实际问题
R. Donnald Allison and Daniel L. Purich
第一节　绪论与更新 …… 35
第二节　一般实验设计 …… 36
第三节　初始速度的条件 …… 37
第四节　酶的纯度和稳定性 …… 40
第五节　底物纯度 …… 42
第六节　底物浓度的范围 …… 43
第七节　分析方法 …… 46
第八节　测定反应平衡常数 …… 49
第九节　选择缓冲剂 …… 50
第十节　温度控制 …… 51
第十一节　报告初始速度数据 …… 52
第十二节　结语 …… 52
参考文献 …… 53

第三章　偶联酶分析中的技术
F. B. Rudolph, B. W. Baugher, and R. S. Beissner
第一节　理论 …… 56
第二节　实际方面 …… 63
第三节　预防措施 …… 70
第四节　摘要 …… 71

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

第五节 结语 …… 72
参考文献 …… 72

第四章 设计、分析竞争型动力学模型识别实验中的回归分析，实验误差和统计标准
Bengt Mannervik
第一节 基本概念 …… 75
第二节 识别竞争型数学模型（速度方程） …… 77
第三节 实验设计 …… 83
第四节 实验误差 …… 88
第五节 设计和分析动力学实验指南 …… 91
参考文献 …… 93

第五章 酶反应进程曲线的非线性回归分析
R. G. Duggleby
第一节 导言 …… 95
第二节 简单米氏酶 …… 97
第三节 抑制剂的影响 …… 104
第四节 复杂反应 …… 107
第五节 导出完整速度方程的一般方法 …… 110
第六节 实际考虑 …… 112
第七节 不稳定酶 …… 117
第八节 结论 …… 119
附录 A：回归分析 …… 120
参考文献 …… 122

第六章 pH 对酶的影响
K. F. Tipton, A. G. McDonald, and H. B. F. Dixon
第一节 理论 …… 124
第二节 本方法的局限性 …… 158
第三节 实际方面 …… 159
第四节 pH 研究的实例 …… 165
第五节 前景 …… 171
参考文献 …… 172

第七章 酶动力学中的温度效应
K. J. Laidler and B. F. Peterman
第一节 速度常数的分离 …… 178
第二节 单底物反应的活化能和活化熵 …… 179
第三节 多于一个底物的反应 …… 186

第四节　酶系统中的扩散效应…………………………………………………… 192
第五节　酶失活……………………………………………………………………… 194
参考文献……………………………………………………………………………… 196

**第八章　定向突变：研究酶催化作用的工具**

B. V. Plapp

第一节　更新………………………………………………………………………… 199
第二节　引言………………………………………………………………………… 200
第三节　目的………………………………………………………………………… 201
第四节　注意事项…………………………………………………………………… 201
第五节　策略………………………………………………………………………… 204
第六节　例证………………………………………………………………………… 208
第七节　结语………………………………………………………………………… 222
参考文献……………………………………………………………………………… 223

**第九章　酶作用的协同性：平衡和动力学方面**

K. E. Neet

第一节　新进展……………………………………………………………………… 228
第二节　引言………………………………………………………………………… 230
第三节　图形表示和协同性程度的评价…………………………………………… 233
第四节　曲线拟合法测定参数……………………………………………………… 235
第五节　酶作用协同性机理………………………………………………………… 235
第六节　模型的实验解释…………………………………………………………… 252
第七节　热力学分析协同性、连接和多配体结合………………………………… 261
第八节　配体结合部位和分子内信息传递………………………………………… 263
第九节　其他大分子系统中的协同性……………………………………………… 266
第十节　未来方向…………………………………………………………………… 268
参考文献……………………………………………………………………………… 270

## 第二部分　酶抑制剂作为研究酶催化作用的探针

**第十章　可逆酶抑制剂作为研究酶作用机理的探针**

H. J. Fromm

第一节　引言………………………………………………………………………… 279
第二节　理论………………………………………………………………………… 280
第三节　实际考虑…………………………………………………………………… 289
第四节　举例………………………………………………………………………… 292
第五节　局限性……………………………………………………………………… 297
第六节　结语………………………………………………………………………… 298
参考文献……………………………………………………………………………… 298

**第十一章　应用亲和标记研究酶结构和功能**
B. V. Plapp
第一节　新进展…… 302
第二节　引言…… 302
第三节　亲和标记的使用…… 303
第四节　设计指向活性部位试剂的一些考虑…… 311
第五节　指向活性部位试剂的评价…… 316
第六节　指向活性部位试剂产生的反应加速…… 323
第七节　结语…… 326
参考文献…… 327

**第十二章　基于机理的酶失活剂**
R. B. Silverman
第一节　术语…… 332
第二节　酶失活剂的基础动力学…… 333
第三节　基于机理的酶失活剂的使用…… 336
第四节　基于机理的酶失活剂的标准…… 337
第五节　实验方案…… 339
第六节　应用…… 352
第七节　结论…… 369
参考文献…… 369

## 第三部分　检测酶反应中间物

**第十三章　瞬变动力学法研究酶作用机理**
C. A. Fierke and G. G. Hammes
第一节　引言…… 373
第二节　瞬变动力学理论…… 374
第三节　瞬变动力学的计算机模拟…… 386
第四节　快速混合法…… 387
第五节　弛豫法…… 389
第六节　二氢叶酸还原酶…… 391
第七节　核糖核酸酶 P …… 395
第八节　脂肪酸合成酶…… 399
第九节　结论…… 404
参考文献…… 404

**第十四章　聚合酶、三磷酸腺苷酶和酶中间物的快速淬灭动力学分析**
K. A. Johnson
第一节　新进展…… 408
第二节　引言…… 409
第三节　瞬变态动力学分析原理…… 409
第四节　化学淬灭流动法…… 411
第五节　DNA 聚合作用的动力学 …… 414
第六节　三磷酸腺苷酶作用机理…… 421
第七节　检测酶中间物…… 426
第八节　数据分析…… 426
参考文献…… 430

**第十五章　用电喷雾质谱在线快速混合技术研究酶反应的预稳态动力学**
Lars Konermann and D. J. Douglas
第一节　引言…… 433
第二节　电喷雾离子化质谱法…… 435
第三节　电喷雾质谱在线快速混合法监测木聚糖酶的预稳态动力学…… 436
第四节　停留电喷雾质谱法…… 442
第五节　结论…… 445
参考文献…… 446

第四部分　用于酶反应过程的同位素探针

**第十六章　同位素探针法阐明酶催化作用**
D. L. Purich and R. D. Allison
第一节　引言和新进展…… 451
第二节　处于平衡态的系统…… 452
第三节　远离平衡的酶系统…… 479
第四节　影响交换行为的酶相互作用…… 481
第五节　结论…… 488
参考文献…… 489

**第十七章　位置同位素交换作为检测酶作用的探针**
L. S. Mullins and F. M. Raushel
第一节　引言…… 493
第二节　用于位置同位素交换（PIX）的功能基 …… 495
第三节　定性定量方法…… 495
第四节　非标记底物和产物的变异…… 499
第五节　摘要…… 517
参考文献…… 518

## 第十八章　酶的过渡态分析和过渡态类似物

V. L. Schramm


第一节　引言…… 520
第二节　酶的过渡态的本质…… 521
第三节　过渡态结合能…… 522
第四节　经受过渡态分析检验的化学…… 523
第五节　酶过渡态分析的实验步骤和抑制剂设计…… 524
第六节　同位素标记底物的合成：核苷和核苷酸代谢…… 525
第七节　动力学同位素效应的实验测量…… 535
第八节　测量保证因子和结合同位素效应…… 539
第九节　固有动力学同位素效应与过渡态结构的匹配…… 547
第十节　底物和过渡态的分子静电势（MEP）表面…… 558
第十一节　设计过渡态抑制剂…… 560
第十二节　结论…… 567
参考文献…… 567


## 第十九章　由动力学同位素效应测定过渡态

P. J. Berti


第一节　引言…… 572
第二节　理论…… 573
第三节　由动力学同位素效应到过渡态结构的路线…… 581
第四节　摘要…… 606
参考文献…… 606


## 第二十章　过渡态和抑制剂识别的计算方法

B. B. Braunheim and S. D. Schwartz


第一节　引言…… 609
第二节　相似性测量…… 612
第三节　相似性测量结果和讨论…… 619
第四节　神经系统网络…… 620
第五节　分子重要性和海登层量级…… 631
第六节　结论…… 633
参考文献…… 634

**附录…… 637**
**索引…… 669**


（罗贵民 译）

# CONTENTS


Contributors xiii

Preface xv

**PART I Initial Rate Theory and Methods**

**1.** Derivation of Initial-Velocity and Isotope-Exchange Rate Equations

*Charles Y. Huang*

I. Derivation of Initial-Velocity Equations 4
II. Derivation of Isotope-Exchange Rate Equations 24
III. Concluding Remarks 31
Addendum 32
References 33

**2.** Practical Considerations in the Design of Initial Velocity Enzyme Rate Assays

*R. Donald Allison and Daniel L. Purich*

I. Introduction & Update 35
II. General Experimental Design 36
III. The Initial Rate Condition 37
IV. Enzyme Purity and Stability 40
V. Substrate Purity 42
VI. Range of Substrate Levels 43
VII. Analytical Methods 46
VIII. Determination of Reaction Equilibrium Constants 49
IX. Choice of Buffer Agents 50
X. Temperature Control 51
XI. Reporting Initial-Rate Data 52
XII. Concluding Remarks 52
References 53




此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com