

Enzyme Kinetics
Catalysis and Control

酶动力学
催化作用和调控作用

Daniel Lee Purich

Enzyme Kinetics Catalysis and Control

酶动力学：催化作用和调控作用

By

Daniel Lee Purich

Department of Biochemistry and Molecular Biology

University of Florida College of Medicine

Gainesville, Florida

科学出版社

北 京

图字:01-2011-5218 号

This is an annotated version of

Enzyme Kinetics Catalysis and Control

By Daniel Lee Purich

ISBN: 978-0-12-380924-7

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

酶动力学:催化作用和调控作用=Enzyme Kinetics Catalysis and Control;英文/(美)普里策(Purich, D. L.)主编. —北京:科学出版社,2012

ISBN 978-7-03-032898-4

I. ①酶… II. ①普… III. ①酶学:化学动力学-英文 IV. ①Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 244348 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:58

字数:1 376 000

定价:198.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)



最新、最好、最详尽的酶动力学理论和实验参考书

——评《酶动力学：催化作用和调控作用》

(Enzyme Kinetics Catalysis and Control)

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)

Daniel Lee Purich 博士是美国佛罗里达大学医学院生物化学与分子生物学教授。他是酶动力学和机械力酶 (mechanoenzymes) 专家, 发表了 160 多篇关于酶、微管和肌动蛋白作用机理的文章和述评。Purich 在加利福尼亚大学圣塔芭芭拉分校和佛罗里达大学讲授酶动力学原理近 40 年, 此外, 还在遍布美国和欧洲的大学和制药公司讲授酶动力学的短期课程。他还是《生物化学杂志》(Journal of Biological Chemistry) 和《生物化学与生物物理文献》(Archives of Biochemistry and Biophysics) 这两个杂志的编委、国家卫生研究院生物化学研究组成员以及国家卫生研究院物理生物化学研究组的奠基人。他编辑了《酶学方法》(Methods in Enzymology) 系列丛书 6 卷酶动力学和机理专著和 3 个版本 (1983、1996、2009) 的《现代酶动力学和机理》(Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism) 以及 3 卷《酶学进展》(Advances in Enzymology)。Purich 教授还是《生物化学动力学手册》(Handbook of Biochemical Kinetics) 和《酶参考》(Enzyme Reference) 两本书的领衔作者。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)。这些成就证明, Daniel L. 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。作为生命活动的主要“推动者”, 酶是所有生物体的动力, 积极发挥着数不清的体内必需的作用, 包括细胞内和细胞间的物质、能量和信息的流动。几乎在每一个细胞活动过程中, 一个或多个酶发挥着不可缺少的作用。酶还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。酶动力学研究能揭示生命的节奏, 阐明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。D. L. Purich 教授编写的《酶动力学：催化作用和调控作用》(Enzyme Kinetics Catalysis and Control) 于 2010 年由 Elsevier 集团出版, 为酶学研究领域的宝库又增添了新的武器。这本书介绍并阐明了使酶科学兴旺发达一个多世纪的酶学原理及其最好的实验技术。为了让分子生命科学家、化学家、物理学家和工程师能全面参与, 本书开辟了化学动力学、活性部位化学、酶分析技术和抑制剂设计等方

面的论题。本书引用了 2600 多篇经典的和最新文献，重点放在稳态动力学和瞬态动力学上。书中前所未有的一章是单分子酶动力学和生物力产生，因此，对生物化学、化学、分子生物学、生物工程学、药理学、植物科学和化学工程学等方面的研究生和高级研究人员来说，本书是最新、最详尽的单卷本酶学参考书。该书有如下几个明显的特点：

（一）精心准备 水到渠成

本书是在作者近 40 年的教学生涯基础上，经过 7 年的努力才编写成功的。在了解到很多学生在研究生毕业多年后仍然保留和使用作者的课堂笔记后，作者决定写一本严格的有详细解释的参考书。写这本参考书的目的是介绍和解释把酶学推向先进水平的动力学原理，使学生阅读和理解过去和现在的研究成果，并且通过应用这些原理及阐明新的原理进一步推动酶学的发展。一直在努力给学生打好牢固的蕴藏在酶学中的化学原理方面的基础，从而使他们能深切体会和理解酶学的魅力。作者在下述课程中发展和巩固了自己关于酶催化和调控作用的想法：Chem 242，生物系统的化学方面；Chem 252，酶动力学和机理。作者在加州大学圣巴巴拉分校化学系年年讲授这两门课程，共讲了 11 年之久。其他论题是在过去 24 年里在佛罗里达大学讲授下述课程开发的：BCH 6206，高级代谢作用；BCH6740，物理生物化学和结构生物学；BCH 7515，分子生命科学中的动态过程。作者认为，当你提供了合乎逻辑的解释，特别是一开始就逐步地进行引导，那么即使背景差异很大的学生也能很容易地理解、鉴赏和应用酶动力学理论的逻辑。

（二）系统全面 富有创新

由于化学家、工程师和生理学家也对酶动力学原理和实验特别感兴趣，所以这本书介绍了基本的背景资料，使他们顺畅地理解生物化学和有机化学原理。随着分子生命科学的出现，也涌现出一代全新的生物物理学家与结构生物学家。为了方便他们使用这本书，作者在第一次提及某个酶时，大多列出了这个酶催化的反应，也提供了生化现象的附加的描述和对调节概念的解释，这些可能是化学、工程学和物理学专业的学生在他们的课程里所看不到的。本书始终强调动力学模型的建立。第 1 章介绍了酶催化的历史和范围，以及酶反应速度加强理论，而第 2 章提供了酶活性中心的化学基础。接下来的九章重点放在了酶动力学的核心议题上：第 3 章的重点是化学动力学的基本原理；第 4 章重点在于酶反应速度测量；第 5 章是单底物酶反应的初始速度理论；第 6 章是多底物酶反应的初始速度行为；第 7 章是影响酶活性的各种因素；第 8 章是酶的可逆和不可逆抑制作用；第 9 章重点是利用同位素揭示不可见的酶催化作用；第 10 章是快速反应技术；第 11 章是酶的协同性和酶动力学的调控；而第 12 章和第 13 章在酶动力学书籍中是独特的，分别涵盖了单分子酶动力学和那些产生力量的机械力酶的反应动力学。这些内容既包括基础理论，又有酶动力学的核心议题，更有创新性的最后两章，使学生获得全方位的酶动力学研究方面的知识。机械力酶的反应动力学是作者与 Richard Dickinson

教授共同提出的新议题。这本参考书率先推出一个完全集成的新概念——能量酶型机械力酶 (mechnoenzymes)，并且描述了动力学如何揭示能量酶型反应的基本特征。

(三) 旁征博引 综合实用

为了让读者直接访问关于酶动力学的研究文献，本书引用了 2600 多篇原始研究报告和评述文章。每章的结尾还提供了进一步阅读的参考文献，以使有兴趣的读者进一步深入研究。虽然这本书设计为全面的参考书，但仍然适合于作为酶动力学和酶学的专题课程。本书的部分章节的范围和细节对于课堂教学而言似有百科全书的性质，但这些章节在实验室和编写研究报告及出版物时应该是一种宝贵的资源。书末附录中的名词术语词典为更好地阅读理解本书内容提供了方便。读者可以登录 www.kbooks.cn 查阅、下载本书彩图。总之，时间会证明，这是一本酶动力学领域的权威性的经典著作。

前 言

我开始从事酶学研究时，我所信崇的读物只有 Dixon 和 Webb 合著的《酶》(Enzymes) 和《酶学方法》(Methods in Enzymology) 头 10 卷。这些资源，对丰富我的实验经验和培养我的学术思想都卓有成效，但它们往往还尚存不足，那其实是因为当时的研究人员对酶动力学、催化作用和调控作用缺乏全面的认识。随着中心代谢途径的完美确立和分子生物学大纲的出现，一代生物化学家建立了现代酶学科，这些生物化学家包括我的导师 Herb Fromm 和 Earl Stadtman 以及他们的导师 Paul Boyer 和 Fritz Lipmann。认识到需求一本综合性多卷本酶动力学专著以后，在创始编辑 Nate Kaplan 和 Sydney Colowick 以及科学出版社主任 Jim Barskyd 的热情鼓励下，30 年前我被授权编写《酶学方法》(Methods in Enzymology) 中的 6 卷《酶动力学和机理》(Enzyme Kinetics and Mechanism) 子系列丛书。最近，我寻求完成一部单卷本的酶动力学参考书，以满足生物化学家、分子生物学家以及物理科学家和工程师们企望了解酶如何工作的愿望。我曾承诺，自己将用 7 年时间完成这部书的写作任务，并且希望这部书将被证明是易于理解的、趣味性的、知识性的、特别实用的书。我还记得从物理学和工艺学进入酶学科的那些人的需求，并为他们另外添加了典型酶动力学书中所缺少的基础信息。

生物化学、分子生物学和细胞生物学之所以致力于了解酶是如何工作的，仅仅是因为酶是所有生物体的动力，积极发挥着数不清的体内必需的作用，包括细胞内和细胞间的物质、能量和信息的流动。几乎在每一个细胞过程研究中，一个或多个酶将发挥不可缺少的作用，而且正是因为认识到这一点才激发起对酶作用的广泛兴趣。目前估计酶催化的反应约有 2 万个。尽管某些代谢过程具有普遍性，但生物体还是按照自己的一套独特的选择性压力在进化。在这方面，在任何两个物种中催化相同反应的酶可能有不同的氨基酸序列，并且同样不太可能表现出相同的催化性能（例如，底物专一性、催化效率、灵敏度、代谢终产物等）。由于物种的数量很容易超过 30 万，所以，任何一种单个酶，例如己糖激酶或乙醇脱氢酶，一定具有无数的独特的分子形式，特别是在任何一个有机体中发现有组织特异性同工酶时更是如此。任何单一酶的突变都有可能影响完整的代谢途径的性能，甚至损害整个机体的健康。因此，尽管人们可以得出有关新陈代谢一般的推论，然而各种生命形式的生理学一定能在某种程度上反映酶的广泛的多样性，而且，研究酶动力学特性的空间之广是惊人的。

所有酶的主要特征都是具有催化作用，要表征一种酶的特性就要考察和测定这种酶的依赖时间的反应过程。一种分析复杂的酶系统的催化机制的方法是确定在整个反应过程中各个步骤发生的时间，即追求所谓的“动力学”。这个策略可让研究者评估从一个步骤转换到下一步骤的结构上和能量上的决定因素。通过确定时间线上的空隙，可以考虑存在其他合适的中间体的可能性，并最终确定所有初级反应的机制。动力学是一个需要高度分析能力和智能的学科，它深深扎根于化学和物理学中，而且，酶化学家直观地创造性地应用化学家和物理学家的工具来研究生物过程。酶动力学家同样可以利用物理

有机化学，结构化学和光谱学的成就将酶机制解剖成按时间排序的各个步骤。动力学的具有说服力的逻辑也体现了科学方法严格地应用于分子生命科学，特别是生物化学和生物物理学、分子和细胞生物学以及药理学、免疫学，甚至神经系统科学。总之，酶动力学揭示生命的节奏，从光合作用中几乎瞬时的光子吸收到弗罗斯特所谓的“无烟燃烧缓慢的衰减”现象尽在其中。

我写这本参考书的目的是介绍和解释把酶学推向先进水平的动力学原理，使学生阅读和理解过去和现在的研究成果，并且通过应用这些原理及阐明新的原理，进一步推动酶学的发展。在我 35 年多的教学生涯中，我一直在努力给学生打好牢固的蕴藏在酶学中的化学原理方面的基础，从而使他们能深切体会和理解酶学的魅力。这就要求理解基础化学动力学，正确评价初始速度和快速反应技术解决问题的能力及其应用范围、动力学同位素效应的起源和变构效应的壮阔。以 Herb Fromm 教授在爱荷华州立大学讲授的为时一学期的酶动力学课程的课堂记录笔记和 Earl Stadtman 在国家卫生研究院讲授的令人尊敬的生物化学课程中使用的笔记为开端，我在下述课程中发展和巩固了自己关于酶催化和调控作用的想法：Chem 242，生物系统的化学方面、Chem 252，酶动力学和机理。我在加州大学圣巴巴拉分校化学系年年讲这两门课程，总共讲了 11 年之久。其他论题是我于过去 24 年里在佛罗里达大学讲授下述课程开发的：BCH 6206，高级代谢作用；BCH 6740，物理生物化学和结构生物学；BCH 7515，分子生命科学中的动态过程。我还在几个药物公司和其他大学讲授过酶动力学的短期课程。我的经验是，当你提供了合乎逻辑的解释，特别是一开始就逐步地进行引导，那么即使背景差异很大的学生也能很容易地理解、鉴赏和应用酶动力学理论的逻辑。

由于化学家、工程师和生理学家也对酶动力学原理和实验特别感兴趣，所以这本书还介绍了基本的背景资料，以使他们顺畅地理解生物化学和有机化学原理。随着分子生命科学的出现，也涌现出一代全新的生物物理学家与结构生物学家。为了方便他们使用这本书，我在第一次提及某个酶时，大多列出了这个酶催化的反应，也提供了生化现象的附加的描述和对调节概念的解释，这些可能是化学、工程学和物理学专业的学生在他们的课程里所看不到的。

一些生物化学专业的学生可能终身对酶动力学怀有激情。我的经验表明，几乎所有的分子生命科学家会受益于深刻理解动力学原理及其在测试模型中的精确性。了解到很多学生在研究生毕业多年后仍然保留和使用我的课程笔记，这促使我写一本严格的有详细解释的参考书。虽然这本书设计为全面的参考书，但仍然适合于作为酶动力学和酶学的专题课程。本书的部分章节的范围和细节对于课堂教学而言似有百科全书的性质，但这些章节在实验室和编写研究报告和出版物的中应该是一种宝贵的资源。

酶动力学包括的实验方法，每一个都适合于特定的任务或时间域。抛开技术而言，暗藏的玄机是开发定量分析目标酶的模型。动力学模型显然是由多个反应组合而成，要表征每一个反应物，也需要速度常数和平衡常数来规范它们之间的相互作用。本书始终强调动力学模型的建立。第 1 章介绍了酶催化的历史和范围，以及酶速度加强理论，而第 2 章提供了酶活性中心的化学基础。接下来的九章重点放在我认为是酶动力学的核心议题上：第 3 章的重点是化学动力学的基本原理；第 4 章重点在于酶反应速度测量；第 5 章是单底物酶反应的初始速度理论；第 6 章是多底物酶反应的初始速度行为；第 7 章

是影响酶活性的各种因素；第 8 章是酶的可逆和不可逆抑制作用；第 9 章重点是利用同位素揭示不可见的酶催化作用；第 10 章是快速反应技术；第 11 章是酶的协同性和酶动力学的调控；而第 12 和 13 章在酶动力学书籍中是独特的，分别涵盖了单分子酶动力学和那些产生力量的机械力酶的反应动力学。

为了让读者直接访问关于酶动力学的研究文献，本书引用了 2600 多篇原始研究报告和评述文章。即使如此，引用的参考文献列表肯定不够完整，我要向那些没有被包含在内的贡献卓越的科学家道歉。对于书中值得进一步研究的部分，我也欢迎给予评论、更正和增加必要的内容。只要有可能，我就会试图引用别人的观点，而且，我将会第一个告诉人们，在酶学的科研领域里钻研和学习的人，永远都是一名学生，极少数会被称为大师。人类的弱点就是常常意识不到自己的无知，这个明显的不足几乎显现于所有学术领域中。对于我无法充分地解释某个重要概念或误解了别人的结果，我提前道歉，并欢迎改进的建议。

正如 2001 年我在《生化科学动向》(26 卷, 417 页) 指出的那样，生物催化作用并不要求共价键的破坏和形成：一些类底物和类产物的状态仅在非共价键合作用上有所不同。因此，我重新定义酶是催化化学键（包括共价键和非共价键）的形成和破坏的生物制剂。我还建议需要将催化所谓 ATP 酶或 GTP 酶反应的特殊酶归类为一类新酶，这类酶能将共价键能转换为机械能。在所有已知的情况下，这些所谓的能量酶（*energase*）反应可用一种机制来描述，这种机制有一个或多个能源驱动的亲调制结合作用，很像 ATP 依赖的肌动嵌蛋白（*actoclampin*），Richard Dickinson 教授和我最近称其为是产生力量的机制，负责细胞蠕动。这本参考书率先推出一个完全集成的新概念——能量酶型机械力酶（*mechnoenzymes*），并且描述了动力学如何揭示能量酶型反应的基本特征。

在写作本书的过程中，我受惠于很多朋友的意见和建议，特别是我博士和博士后期间的实验室合作伙伴 Fred Rudolph 和 Charles Y. Huang，以及 Bryce Plapp, Jeremy Knowles 和 Dan Koshland。（Fred、Jeremy 和 Dan 的去世是酶学界的巨大损失）。我同样高兴地感谢我的佛罗里达大学的同事，尤其是与我合作写作其他图书的 Linda Bloom 和 David Silverman 以及 R. Donald Allison 教授。我同样感谢 Giulio Magni、Silverio Ruggieri 和 Nadia Raffaelli 教授将意大利安科纳的马尔凯理工大学生物工程生物化学研究院建设成为远离家乡并备受欢迎的知识和文化家园。在这本书中提出的许多思想都是先在安科纳构思、孕育和（或）试验，那是在安科纳度过的非常愉快的时日。最后，我很感激我的学生和博士后科学家。在美国加州大学和佛罗里达大学的教室里我教过他们，实际上，他们也教了我。他们的执着和有见地的问题令我作为一名教师、化学家、分子生命科学家的职业生涯更加厚重而富有意义。

我十分伤感地得知，我的博士后导师 Earl R. Stadtman 最近逝世了。他是一位高尚的科学家，能不知不觉地让他的所有学生都沉迷于酶学和代谢调控。

Elsevier 出版集团的 Jacqueline Holding 和 Caroline Johnson 的熟练协助和我的得力学生 Mathew Neu 的文字编辑加工使我的手稿很快变成这本参考书。我也感谢我合作伙伴 Li Lu 在我奋力写书期间给予的理解和不断的鼓励。

最重要的是，我感谢 Herbert J. Fromm 教授，在他的实验室，我开始了我的研究

生涯。我惊叹于他的工作理念，他的工作重点和力度，和他对科学的持久兴奋和激情。他的多底物酶动力学机制的开创性研究和他的不朽著作《初始速度酶动力学》（Initial Rate Enzyme Kinetics）鼓舞了一代科学家将研究酶动力学和机理作为他们追求的职业。为了赞誉他在人品和职业操守上的高风亮节以及我们 40 多年的友谊，我谦恭地为他献上这本书。

Daniel L. Purich

2009 年 10 月

盖恩斯维尔，佛罗里达

（罗贵民 译）

When I first pursued bench research on enzymes, my only trusted companions were *ENZYMES* by Dixon & Webb and the first ten volumes of *METHODS IN ENZYMOLOGY*. As effective as these resources were at guiding my inexperienced hands and schooling my thoughts, they were, more often than not, insufficient – simply because researchers of that time lacked a comprehensive view of enzyme kinetics, catalysis and control. With the central metabolic pathways already well defined and with the broad outlines of molecular biology emerging, modern enzyme science was established by a generation of biochemists that included my mentors Herb Fromm and Earl Stadtman and their mentors Paul Boyer and Fritz Lipmann. Recognizing a need for a comprehensive multi-volume treatise on enzyme kinetics, and with considerable encouragement from the founding editors Nate Kaplan and Sydney Colowick as well as Academic Press president Jim Barsky, I was privileged thirty years ago to initiate what has become the six-volume *Enzyme Kinetics & Mechanism* sub-series in *METHODS IN ENZYMOLOGY*. More recently, I sought to produce a single-volume enzyme kinetics reference that might serve the needs of biochemists, molecular life scientists, as well as physical scientists and engineers with an interest in learning how enzymes work. I undertook what became a seven-year task of writing a single-authored reference that I hoped would prove to be accessible, interesting, informative, and, above all, useful. I also had in mind the needs of those who come to enzyme science from physics and engineering, and for them, I included additional basic information not typically found in enzyme kinetics books.

Much of biochemistry as well as molecular and cell biology is devoted to understanding how enzymes work, simply because enzymes are the verbs in all biotic sentences—actively playing countless roles so essential for the flow of matter, energy and information within and among cells. It follows then that, during the course of virtually any study of a cellular process, one or more enzymes will play an indispensable part, and it is that realization that motivates widespread fascination about enzyme action. Current estimates put the number of unique enzyme-catalyzed reactions in the neighborhood twenty thousand, and despite the universality of certain metabolic processes, organisms have evolved in response to their own unique set of selective pressures. In this respect, enzymes catalyzing the same reaction in any two species probably have different amino acid sequences and are likewise

unlikely to exhibit identical catalytic properties (*e.g.*, substrate specificity, catalytic efficiency, sensitivity to metabolic end-products, *etc.*). With the number of species easily exceeding 300,000, there must be countless unique molecular forms of any single enzyme, say hexokinase or alcohol dehydrogenase, especially when one includes the tissue-specific isozymes found in any single organism. A mutation in any single enzyme has the potential to affect the performance of complete metabolic pathways or even impair the health of an entire organism. Thus, while one can draw general inferences about metabolism, the physiology of various life forms must to some extent reflect this robust diversity of enzymes, and the universe of enzymes available for kinetic characterization is astonishingly vast.

The cardinal feature of every enzyme is catalysis, and any endeavor to characterize the properties of an enzyme requires the examination and determination of its time-dependent processes. One approach for analyzing the catalytic mechanics of complex enzyme systems is to determine the chronology of discrete steps within the overall process—a pursuit called “kinetics.” This strategy allows an investigator to assess the structural and energetic determinants of transitions from one step to the next. By identifying voids in the time-line, one considers the possibility of other likely intermediates and ultimately identifies all elementary reactions of a mechanism. Kinetics is a highly analytical and intellectual enterprise that is deeply rooted in chemistry and physics, and enzyme chemists have intuitively and inventively honed the tools of chemists and physicists to investigate biological processes. Enzyme kineticists have likewise gainfully exploited advances in physical organic chemistry, structural chemistry, and spectroscopy to dissect enzyme mechanisms into their constituent time-ordered steps. The persuasive logic of kinetics also exemplifies the rigorous application of the scientific method in the molecular life sciences, especially biochemistry and biophysics, molecular and cell biology, as well as pharmacology, immunology, and even neuroscience. In short, enzyme kinetics discloses Life’s rhythms—from the virtually instantaneous photon absorption in photosynthesis to what Frost called “the slow smokeless burning of decay.”

My goal in writing this reference book was to present and explain the kinetic principles that have advanced enzyme science so that students can understand past and current research publications and can advance the field by applying these principles and by inventing new ones. Over my thirty-

five years of lecturing, I have attempted to give voice to the beauty of enzyme science by providing graduate students with a solid grounding in its underlying chemical principles. The latter requires comprehension of basic chemical kinetics, appreciation of the power and scope of initial-rate and fast-reaction techniques, the origins of kinetic isotope effects, as well as the grandeur of allostery. Beginning with my hand-copied notes from Herb Fromm's semester-long course on enzyme kinetics at Iowa State University as well as the notes Earl Stadtman used in his revered biochemistry course at NIH, I developed and consolidated my own ideas about enzyme catalysis and control in Chem 242: *Chemical Aspects of Biological Systems* and Chem 252: *Enzyme Kinetics and Mechanism*, courses I presented annually over my 11-year tenure in the Department of Chemistry at the University of California Santa Barbara. Other topics were developed in BCH 6206: *Advanced Metabolism*; BCH 6740: *Physical Biochemistry & Structural Biology*; and BCH 7515: *Dynamic Processes in the Molecular Life Sciences*, courses offered over the past 24 years here at the University of Florida. I have also presented short courses on enzyme kinetics at several pharmaceutical firms and foreign universities. My experience is that students from remarkably diverse backgrounds can readily comprehend, appreciate, and apply the logic of enzyme kinetic theory, especially when provided with logical explanations and aided initially by step-by-step derivations.

Because the principles and practices of enzyme kinetics are also of great interest to chemists, engineers and physicists, this book also presents basic background information that should allow them to fill gaps in their understanding of biochemical and organochemical principles. As they discover the molecular life sciences, an entirely new generation of biophysicists and structural biologists has emerged. To facilitate their use of this book, I have also indicated the catalyzed chemical reactions upon first mention of most enzymes. I also provided additional descriptions of biochemical phenomena and explanations of regulatory concepts that students of chemistry, engineering and physics may not otherwise encounter in their coursework.

While enzyme kinetics might become a life-long and fulfilling passion for a few biochemistry students, my experiences suggest that virtually all molecular life scientists can benefit from a solid understanding of kinetic principles and their rigor in testing rival models. Learning that many students retained and used my course notes well beyond their graduate student years inspired me to write a rigorous, yet thoroughly explained, reference book. While designed as a comprehensive reference, the book may be suitable for special topics courses in enzyme kinetics and enzymology. While the scope and detail of some sections may prove to be too encyclopedic for classroom presentation, such sections should be a valuable resource in the laboratory and in preparation of research reports and publications.

Enzyme kinetics encompasses a spectrum of experimental approaches, each suited to a particular task or time domain. Irrespective of the technique, the underlying motivation is to develop quantitative models for analyzing an enzyme of interest. Model building in kinetics is manifested as a multi-reaction scheme comprised of all reacting species identified and the rate constants and equilibrium constants needed to define their interactions. Models are stressed throughout this reference. Chapter 1 introduces the history and scope of enzyme catalysis as well as theories of enzyme rate enhancement, and Chapter 2 provides a foundation in the chemistry of enzyme active sites. The next nine chapters focus on what I consider to be the core topics of enzyme kinetics: Chapter 3 on the basic principles of chemical kinetics; Chapter 4 on making enzyme rate measurements; Chapter 5 on initial-rate theory of one-substrate enzymes; Chapter 6 on initial rate behavior of multi-substrate enzymes; Chapter 7 on a myriad of factors influencing enzyme activity; Chapter 8 on reversible and irreversible enzyme inhibition; Chapter 9 on using isotopes to uncover otherwise invisible aspects of enzyme catalysis; Chapter 10 on fast reaction techniques; Chapter 11 on enzyme cooperativity and regulatory enzyme kinetics; and Chapters 12 and 13, which are unique among enzyme kinetic books, respectively covering single-molecule enzyme kinetics and those mechanoenzymatic reactions that generate force.

To provide direct access to the research literature on enzyme kinetics, over 2,600 original research reports and reviews are cited. Even so, this list of references is necessarily incomplete, and I apologize to those scientists whose outstanding contributions could not be included. I also welcome comments, corrections, needed additions, and suggestions for papers meriting further study. Wherever possible, I have attempted to give full attribution to the ideas of others, and I will be the first to say that a student of enzymology is always a student, and rarely a master. Human frailty is such that we too often do not know what we do not know, a failing evident in nearly every scholarly enterprise. For the instances where I have failed to explain an important concept adequately or have misinterpreted the findings of others, I apologize in advance and would welcome suggestions for improvement.

As I pointed out in 2001 (*Trends in Biochemical Sciences* 26, 417), biological catalysis need not require the making/breaking of covalent bonds: some substrate-like and product-like states differ only with respect to their non-covalent bonding interactions. Accordingly, I redefined an enzyme as a biological agent that catalyzes the making/breaking of *chemical* bonds, a term that includes both covalent and noncovalent bonds. I also suggested that a new enzyme class is needed to classify nearly every so-called ATPase or GTPase reaction as specialized enzymes that transduce covalent bond energy into mechanical work. In every known case, these so-called *energase* reactions can be

written in terms of a mechanism having one or more energy-driven, affinity-modulated binding interaction, much like the ATP dependent actoclampin motor that Professor Richard Dickinson and I recently proposed is the force-generating mechanism responsible for cell crawling. This reference book is the first to introduce a fully integrated treatment of energase-type mechanoenzymes and to describe how kineticists have discovered fundamental features of energase-type reactions.

Over my many years writing this book, I benefitted from the advice and suggestions from many friends, especially my pre- and post-doctoral lab partners, Fred Rudolph and Charles Y. Huang, as well as Bryce Plapp, Jeremy Knowles and Dan Koshland. (Fred's, Jeremy's and Dan's passing represent an immense loss for all of enzymology.) I am likewise delighted to acknowledge my University of Florida colleagues, especially Professors Linda Bloom and David Silverman as well as R. Donald Allison, my coauthor on other book projects. I likewise thank Professors Giulio Magni, Silverio Ruggieri, and Nadia Raffaelli, for making the Istituto di Biotecnologie Biochimiche at the Università Polytecnica delle Marche in Ancona, Italy such a welcoming intellectual and cultural home away from home. Many ideas presented in this book were first conceived, nurtured and/or tested during what are always pleasant stays in Ancona. Finally, I am indebted to the students and postdoctoral scientists, whom I have taught and who in return have taught me, both in my laboratory as well as in classrooms at the University of California and

University of Florida. Their persistent and insightful questions have given focus and meaning to my career as a teacher, chemist, and molecular life scientist.

I also note with sadness the recent passing of my post-doctoral mentor Earl R. Stadtman, a magnificent scientist who quietly imbued in all his students a fascination for enzymology and metabolic regulation.

The burden of converting my manuscript into this reference book was lightened through the masterful assistance of Jacqueline Holding and Caroline Johnson at Elsevier as well as the capable copyediting of my student Matthew Neu. I am also grateful to my partner Li Lu for all of her understanding and sustaining encouragement during my struggle to write and illustrate this book.

Above all, I acknowledge Professor Herbert J. Fromm, in whose laboratory I began my research career. I marvel at Herb's work ethic, his focus and intensity, and his sustained excitement and passion for science. Herb's seminal research on multisubstrate enzyme kinetic mechanisms and his timeless book *INITIAL RATE ENZYME KINETICS* inspired a generation of scientists to pursue careers in enzyme kinetics and mechanism. In recognition his high standards of personal and professional conduct as well as our forty-plus years of friendship, I humbly dedicate this book to Herb.

Daniel L. Purich

October, 2009
Gainesville, Florida

目 录

| | |
|------------------------|-----|
| 第 1 章 酶学导论 | 1 |
| 1.1 催化作用 | 5 |
| 1.2 生物催化作用 | 12 |
| 1.3 没动力学的发展 | 15 |
| 1.4 酶机理的概念 | 19 |
| 1.5 解释酶催化作用的效率 | 25 |
| 1.6 酶学的前景 | 34 |
| 第 2 章 活性部位及其化学性质 | 53 |
| 2.1 酶活性部位 | 54 |
| 2.2 影响酶结构稳定性和相互作用的力 | 64 |
| 2.3 活性部位的多样性 | 70 |
| 2.4 酶活性部位中的附加功能基 | 77 |
| 2.5 酶活性部位中的金属离子 | 81 |
| 2.6 作用于聚合体底物的酶的活性部位 | 112 |
| 2.7 酶作用的基础有机化学 | 116 |
| 2.8 检测酶反应中的共价中间物 | 137 |
| 2.9 酶立体化学基础 | 145 |
| 2.10 电子传递反应 | 150 |
| 附录 | 168 |
| 第 3 章 化学动力学基础 | 171 |
| 3.1 化学过程的时间表 | 171 |
| 3.2 经验速度方程 | 172 |
| 3.3 反应速度、级数和分子状态 | 174 |
| 3.4 阐明速度过程的基本策略 | 181 |
| 3.5 复合多阶段(步骤)机理 | 184 |
| 3.6 热能:波茨曼分布定律 | 192 |
| 3.7 反应分子的溶液行为 | 194 |
| 3.8 过渡态理论 | 201 |
| 3.9 化学催化作用 | 203 |
| 3.10 反应配位图 | 207 |
| 3.11 热力学原理 | 210 |
| 3.12 结语 | 214 |
| 第 4 章 测定初始速度和反应参数的实际考虑 | 215 |
| 4.1 初始速度酶分析的设计 | 215 |

| | | |
|--------------|-------------------------------|------------|
| 4.2 | 酶纯化 | 232 |
| 4.3 | 偶联（或辅助）酶分析 | 235 |
| 4.4 | 基础紫外/可见吸收光谱 | 240 |
| 4.5 | 基础荧光光谱 | 243 |
| 4.6 | 用同位素测量反应速度 | 255 |
| 4.7 | 多底物动力学和抑制剂动力学 | 264 |
| 4.8 | 酶速度数据分析 | 265 |
| 4.9 | ATP 依赖酶的使用 | 272 |
| 4.10 | 底物核苷 5'-三磷酸的再生 | 275 |
| 4.11 | 平衡常数测定 | 278 |
| 4.12 | 结语 | 284 |
| 第 5 章 | 单底物酶催化反应的初始速度动力学 | 287 |
| 5.1 | 米凯利斯-门顿处理 | 287 |
| 5.2 | 布利格斯-霍尔丹稳态处理 | 293 |
| 5.3 | 涉及两个或多个中间物的催化作用 | 298 |
| 5.4 | 关于基础动力学参数的附加说明 | 301 |
| 5.5 | 反应进程曲线分析 | 310 |
| 5.6 | 核酶动力学 | 311 |
| 5.7 | 蛋白酶体动力学 | 313 |
| 5.8 | 异构化机理 | 314 |
| 5.9 | 酶对不同底物的同时作用 | 315 |
| 5.10 | 对映体富集和异头专一性 | 316 |
| 5.11 | 两种酶对同一底物的同时作用 | 318 |
| 5.12 | 诱导-契合机理 | 319 |
| 5.13 | 作用于聚合体底物的酶的动力学 | 327 |
| 5.14 | 结语 | 333 |
| 第 6 章 | 多底物酶催化反应的初始速度动力学 | 335 |
| 6.1 | 双底物动力学机理 | 335 |
| 6.2 | 稳态双底物速度方程的导出 | 341 |
| 6.3 | 快速平衡双底物速度方程的导出 | 349 |
| 6.4 | 乒乓机理 | 352 |
| 6.5 | 双底物动力学的图解分析和定量分析 | 359 |
| 6.6 | 三底物酶动力学 | 366 |
| 6.7 | 多底物“异构化 (ISO)”机理 | 370 |
| 6.8 | 显示枝状传递途径的酶的动力学性质 | 372 |
| 6.9 | 结语 | 373 |
| | 附录 | 374 |
| 第 7 章 | 影响酶活力的因素 | 379 |
| 7.1 | 激活剂对酶动力学的影响 | 379 |

| | | |
|--------------|---------------------------|------------|
| 7.2 | 金属-核苷酸复合物作为底物 | 391 |
| 7.3 | pH 对酶动力学的影响 | 397 |
| 7.4 | 缓冲液对酶动力学的影响 | 412 |
| 7.5 | 离子强度对酶动力学的影响 | 416 |
| 7.6 | 有机溶剂对酶活力的影响 | 422 |
| 7.7 | 温度对酶动力学的影响 | 425 |
| 7.8 | 压力对酶动力学的影响 | 438 |
| 7.9 | 固定化对酶稳定性和动力学的影响 | 439 |
| 7.10 | 分子聚集产生的非理想状态 | 444 |
| 7.11 | 酶对螯合底物的作用 | 446 |
| 7.12 | 界面催化作用 | 447 |
| 7.13 | 对酶催化作用的校正效应 | 453 |
| 7.14 | 晶体酶的动力学 | 457 |
| 7.15 | 通过定点突变检测酶催化作用 | 460 |
| 7.16 | 结语 | 483 |
| 第 8 章 | 酶抑制剂的动力学行为 | 485 |
| 8.1 | 酶抑制作用的范围和重要性 | 485 |
| 8.2 | 可逆酶抑制作用 | 489 |
| 8.3 | 底物抑制作用 | 506 |
| 8.4 | 产物抑制作用 | 512 |
| 8.5 | 多底物几何学抑制剂 | 523 |
| 8.6 | 过渡态抑制剂 | 525 |
| 8.7 | 紧密结合可逆抑制剂 | 531 |
| 8.8 | 可逆抑制剂效能的测量 | 537 |
| 8.9 | 亲和标记试剂产生的不可逆酶抑制作用 | 539 |
| 8.10 | 光亲和标记酶活性部位 | 547 |
| 8.11 | 基于机理的抑制作用 | 550 |
| 8.12 | 高效酶定向药物的设计 | 558 |
| 8.13 | 结语 | 572 |
| | 建议的读物 | 573 |
| | 来自“酶学方法”系列丛书的其他权威读物 | 574 |
| 第 9 章 | 用同位素检测生物催化作用 | 575 |
| 9.1 | 用同位素界定酶的立体化学 | 576 |
| 9.2 | 为同位素实验标记底物 | 585 |
| 9.3 | 平衡和偏离平衡时的同位素交换 | 586 |
| 9.4 | 同位素俘获法: 酶束缚底物分配动力学 | 603 |
| 9.5 | 位置同位素交换 | 606 |
| 9.6 | 动力学同位素效应 | 607 |
| 9.7 | 测定酶合成和降解速度 | 631 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| 9.8 结语 | 634 |
| 酶学方法丛书“酶动力学和机理”卷的权威读物 | 635 |
| 第 10 章 检测快速酶过程 | 637 |
| 10.1 快速反应技术的范围 | 638 |
| 10.2 流动技术 | 641 |
| 10.3 弛豫动力学 | 656 |
| 10.4 停留和温度跳跃技术是阐明酶催化作用的有力工具 | 669 |
| 10.5 其他弛豫技术 | 672 |
| 10.6 其他快速反应方法 | 674 |
| 10.7 数据分析 | 678 |
| 10.8 结语 | 680 |
| 第 11 章 酶的调节行为 | 685 |
| 11.1 酶调节概述 | 685 |
| 11.2 测量配体结合的一般策略 | 688 |
| 11.3 希尔方程 | 691 |
| 11.4 斯卡查德方程 | 693 |
| 11.5 怀曼的连锁功能分析 | 694 |
| 11.6 蒙诺德-怀曼-钱杰克斯(酶)模型 | 695 |
| 11.7 科什兰-内梅蒂-菲尔默(变构酶)模型 | 699 |
| 11.8 其他协同作用模型 | 707 |
| 11.9 依赖寡聚的酶活力变化 | 709 |
| 11.10 磁滞现象 | 712 |
| 11.11 酶放大级联 | 713 |
| 11.12 底物通道作用 | 718 |
| 11.13 代谢控制分析 | 723 |
| 11.14 结语 | 726 |
| 第 12 章 单分子酶动力学 | 729 |
| 12.1 单分子酶动力学概述 | 729 |
| 12.2 单分子反应速度的演示 | 730 |
| 12.3 单分子酶行为的动力学处理 | 733 |
| 12.4 视频显微镜 | 737 |
| 12.5 光学钳子 | 739 |
| 12.6 原子力显微镜 | 744 |
| 12.7 近场光学显微镜 | 745 |
| 12.8 荧光显微镜 | 746 |
| 12.9 荧光关联光谱(FCS) | 751 |
| 12.10 单分子分析用的“零点-模式”波导 | 757 |
| 12.11 前景 | 758 |