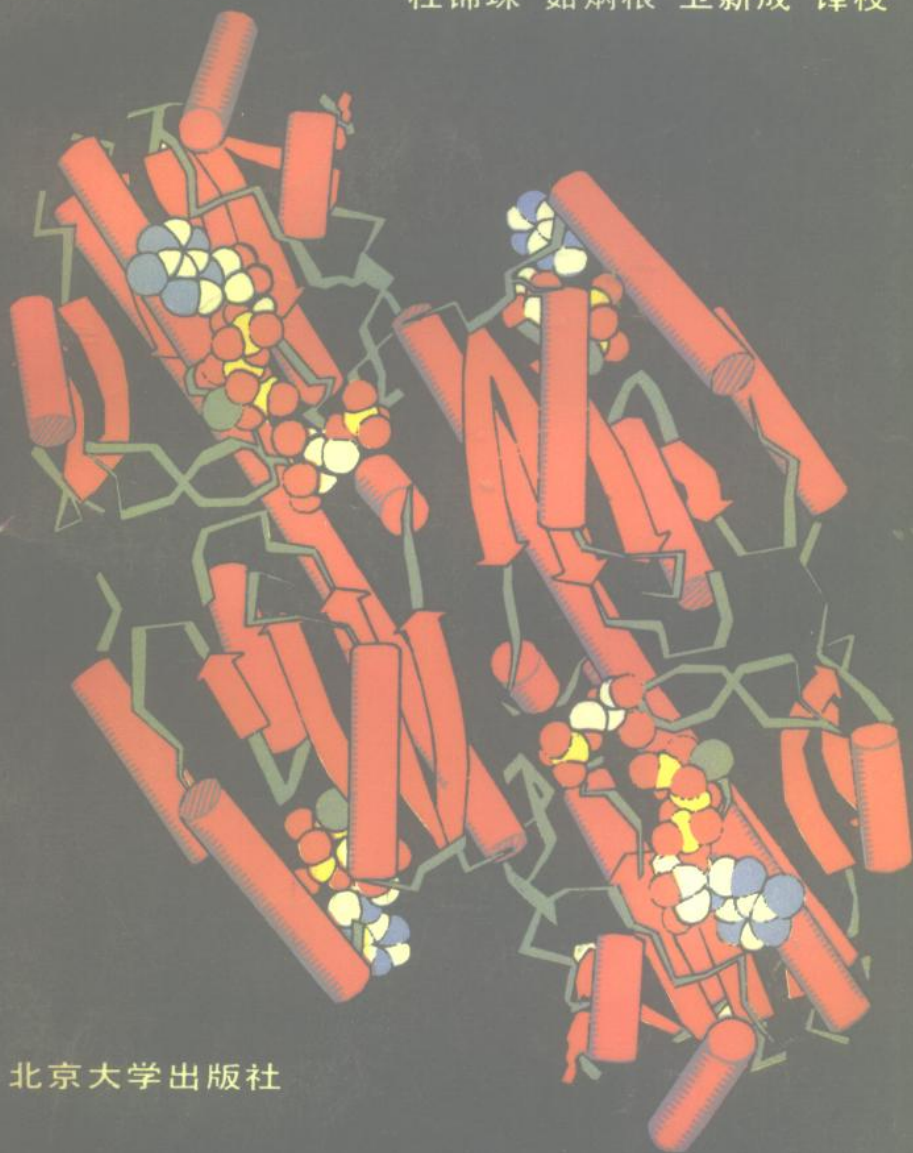


酶的结构和作用机制

〔英〕ALAN FERSHT

杜锦珠 茹炳根 卫新成 译校



北京大学出版社

酶的结构和作用机制

〔英〕ALAN PERSHT

杜锦珠 茹炳根 卫新成 译校



北林图 A00061295



北京大学出版社

内 容 简 介

本书全面介绍酶的结构和酶的催化作用之间的关系,这是当今生物化学、分子生物学研究最活跃的领域之一。其特点是用最现代的酶学方面的研究成果来系统地、科学地阐明酶的催化机制,这次新版本共分十五章,不但介绍酶的立体化学方法、高度专一性的不可逆抑制剂、蛋白质动力学,而且增添了目前酶学研究中的近代技术——酶的基因工程和蛋白质工程这一章。在全书最后一章还增补了几个重要酶的结构与机制方面的资料。所以本书重点突出,内容新颖,并且资料充实、数据准确、图表精细、语言生动,每章都附有最新的参考文献。

本书可作为高等院校有关专业的参考教材,并可供从事有关领域的科研工作者参考学习。

Alan Fersht

Enzyme structure and mechanism

W. H. Freeman and Company (2ed., 1985)

酶的结构和作用机制

[英] ALAN FERSHT

杜锦珠 茹炳根 卫新成 译校

责任编辑:李慧兰

北京大学出版社出版

(北京大学校内)

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

850×1168毫米 32开本 15.75印张 395千字

1991年6月第一版 1991年6月第一次印刷

印数:0001—4,000册

ISBN 7-301-01388-4/Q·47

定价:8.70元

译 序

该书出版于 1985 年,重点介绍酶的结构(主要是立体结构)和酶的催化作用之间的关系,较详细地阐明酶的催化机制。该书内容新颖而丰富,与有关这方面已出版的同类书籍相比,它自有某些特色,如该书偏重于阐明酶的结构与催化作用的机制,内容较新,与其第一版相比(1977 年)又增加了不少新的内容,除在某些章节上增补了如立体化学方法、高度专一性的不可逆抑制剂、调节代谢途径的酶、蛋白质结构的动态方面资料和有关蛋白质分子进化等外,还根据近代基因工程技术的发展增设了新的一章,即“蛋白质工程”。另外还增加了不少资料和数据。此外,该书编写的章节分得很细,条理清楚,采引了不少有关新的参考文献。

该书适宜作为高校有关专业的参考教材,可供广大师生、研究生使用;也同样适宜有关科学工作者在研究工作中作参考之用。

尤其在当前,国内有关这方面的书籍出版很少,远远不能满足广大读者的需要,而该书在国外也属刚出版,据了解已获得有关专家的好评,并被推荐作为攻读博士学位研究生的主要参考书之一。因而,我们希望在国内能尽快出版,以供有关方面的需要。

译 者
1987 年

序 言

我们现在已进入一个酶学的新的黄金时代。这犹如 60 到 70 年代的 X 射线蛋白质结晶学以及在 80 年代的重组 DNA 技术,它们改变了整个人们的观念。多产的酶基因克隆使一些众所周知的酶的研究更为容易,也使以前已被确认的而又不易得到的酶有可能拿到了。更令人兴奋的是通过熟练地使用酶基因使我们有能力为剪裁酶的结构和改变酶的活性而开辟新的前景。特殊氨基酸残基可通过定位诱变来进行改变。甚至整个基因组都可被合成,它们的基因产物也可被表达。

第二版增加一章蛋白质工程(第十四章)来综述这些方面的发展。还有新增两章(第八和九章)来阐明在立体化学方法和设计高度特异的不可逆抑制剂方面的新进展。此外,本书到出版为止,某些章节已重新编排,特别是第一章,已增加了有关蛋白质结构的动态方面的讨论和蛋白质进化的近代观念方面的内容。还有别构蛋白质这章(第十章)也增加了包括那些调节代谢途径的酶的特殊实例方面的内容。

我十分感谢某些同事为之作了十分有价值的评论,特别是第八章中,约翰·科福斯先生所作的评论。

艾伦·弗斯塔
伦敦, 1984

第一版 序 言

在过去 20 年间, X 射线结晶学、瞬变动力学方面的发展, 以及化学催化方面的研究已使我们对酶的催化和机制的看法发生了革命性的变化。本书意图就是为那些参加化学和生物化学课程学习的高年级大学生和研究生提供这些发展的概况。本书在哲理方面主要立足于阐明酶与它的底物之间的相互作用如何导致酶的催化作用和专一性, 以及结构和机制之间的相互关系。该书强调的实验方法包括那些酶作为分子的直接研究方面。例如, 特别强调的是前稳态动力学, 在这里酶被底物定量地结合, 并可直接观察到酶-结合中间物。对多底物酶的稳态动力学和辅酶及辅助因子的一些化学细节只能给以粗略的讨论。

在编写本书中还有两个指导原则。首先是讨论一般原理和采用特殊酶作为实例的思想 [虽然避免重复更多的动力学方面的理论章节, 但是大多数举例仍列于个别章节(七)之内]。其次是突出那些难以援引证据的相关实例时, 却又要避免猜测和含糊的证据。因此, 一些化学机制的讨论细节通常局限于那些三级结构已被 X 射线结晶学所阐明了的酶。同样, 别构蛋白质的理论方面的讨论也更多地局限于血红蛋白, 因为它是阐明正协同效应的相互作用的本质方面所援用的良好证据的唯一实例。

所列参考文献倾向于那些最近代的评论或能提供具有更广泛的文献目录的文献。之所以给予那些原始文献是为了维持历史的观点来看问题。用作说明的实例都引自 MRC 分子生物学实验室的档案资料是因为对方备有现存可援用的资料而又能保证统一的质量。提到本书, 我应该感谢安妮特·莱顿, 她为本书特别作了些插图, 同时, 她也为我曾去搜查档案资料的那个实验室的其他成

员提供插图。

我应特别感谢 W. P. 詹克斯、H. B. F. 狄克逊、H. 戈特弗莱德、K. F. 蒂普顿和 R. S. 马尔弗,他们为整个手稿作了严格的评论和注释。我也应感谢 M. F. 珀罗兹和 D. M. 布洛,他们为个别章节作了评论。我要感谢皇家学会、美国化学会、康奈尔大学出版社、学会出版社、约翰·怀利和阿伦 R. 莉斯,感谢他们允许再版一些插图。

A. F.

剑桥, 1977

目 录

第一章 酶的三维结构	1
A. 蛋白质的一级结构	2
B. 酶的三维结构	5
1. X 射线衍射法	5
2. 结构上的组建单元	8
3. 由组建单元装配蛋白质	11
4. 由一级结构预测三级结构	15
C. 酶的多样性	17
1. 酶族的分支进化	18
2. 趋向进化	22
3. 趋向或分支?	23
4. 脱氢酶和结构域 ^[53]	23
5. 根据基因片段的融合决定蛋白质的演变?	25
D. 酶-底物复合物的结构	26
1. 关于检验酶-底物复合物的方法	27
2. 例1: 丝氨酸蛋白酶	28
3. 例 2: 溶菌酶	31
E. 蛋白质的柔性和构象的易变性	33
1. 酶的晶体结构和溶液结构在实质上是相同的吗?	33
2. 在蛋白质中观察到的柔性和运动模式 ^[100,101]	34
F. 更高级的机构——多酶复合物	40
1. 双头酶和不同活性的非共价结合	40
2. 丙酮酸脱氢酶复合物	41
3. 多重活性和多酶复合物的推论	42
第二章 化学催化	49
A. 过渡态理论 ^[1-4]	49
1. 过渡态理论的重要意义和应用	51
2. Hammond 假设 ^[9]	52
B. 催化原理	53

1. 需要进行催化的地点、原因和方法	53
2. 一般酸-碱催化	56
3. 分子内催化: 酶上某个基团的“有效浓度”	59
4. 酶: 分子内催化反应和有效浓度的理论基础	62
5. “轨道操纵” ^[21]	66
6. 静电催化	67
7. 金属离子催化 ^[29]	71
C. 共价催化	73
1. 通过形成 Schiff 碱的亲电催化 ^[41]	73
2. 磷酸吡哆醛—亲电催化 ^[41, 48]	75
3. 硫胺素焦磷酸——亲电催化	79
4. 亲核催化	81
5. 酶催化有关的一些因素概要	82
D. 结构与反应活性的关系	82
1. 在羰基上的亲核攻击	83
2. 确定亲核性和离去基团能力的因素	87
3. 线性自由能关系曲线在酶反应中的应用	92
E. 微观可逆性原理或细致平衡原理	94
F. 动力学等价原理	95
G. 动力学同位素效应 ^[65]	97
1. 一级同位素效应	97
2. 二级同位素效应	100
3. 溶剂同位素效应	100

第三章 酶动力学的基本方程式 104

A. 稳态动力学	104
1. 实验基础: Michaelis-Menten 方程式 ^[1]	104
2. 解释单底物反应的动力学现象: Michaelis-Menten 机制	106
3. Michaelis-Menten 机制的延伸和修正	107
B. Michaelis-Menten 参数的意义	110
1. k_{cat} 的含义: 催化常数	110
2. K_M 的含义: 真实的平衡常数和表观的平衡常数	110
3. k_{cat}/K_M 的含义: 专一性常数	112
C. 数据的图解表示法	113
D. 抑制作用	114
1. 竞争性抑制作用	114
2. 非竞争性抑制, 反竞争性抑制和混合型抑制	115

E. 非生产性结合	117
F. $k_{cat}/K_M = k_2/K_S$	118
G. 竞争底物	118
1. Michaelis-Menten 方程式的另一种表示公式	118
2. 竞争底物的专一性	119
H. 可逆性: Haldane 方程式	119
1. 溶液中的平衡	119
2. 酶表面上的平衡	120
I. Michaelis-Menten 方程式的失效	121
J. 多底物体系	121
1. 随机序列机制	121
2. 有序机制	122
3. Theorell-Chance 机制	122
4. 乒乓(或取代酶或双置换)机制	123
K. 有效动力学捷径	124
1. 净速度常数的计算 ^[18]	125
2. 采用过渡时间代替速度常数	126
第四章 酶促反应速度常数的测定和量度	130
第一部分 关于测定方法: 前稳态动力学导论	130
A. 快速混合和取样技术	130
1. 恒流法	130
2. 停流法	131
3. 快速淬灭技术	132
B. 闪光光解	134
C. 松弛法	135
1. 温度跃迁	135
2. 核磁共振	136
D. 前稳态动力学和松弛动力学的分析研究	137
1. 简单指数	137
2. 酶和底物的结合	141
3. 连续反应	142
4. 平行反应	147
5. 温度跃迁的方程式推导	147
6. 两步连续可逆反应的通解	148
7. 前稳态动力学的实验应用	151

E. 酶的绝对浓度	153
1. 活性部位滴定和“突增”的量子	153
2. 突增对底物浓度的依赖性	155
3. 活性部位滴定与速度分析法之比较	156
第二部分 酶促反应过程速度常数的量子	157
A. 速度常数的上限 ^[21]	157
1. 结合和解离	157
2. 化学过程	158
3. 质子传递	158
B. 酶促反应速度常数和限速步骤	160
1. 酶与底物的结合	160
2. 结合可能是 k_{cat}/K_M 的限速步骤	160
3. 酶-底物和酶-产物复合物的解离	163
4. 酶-产物释放可能是 k_{cat} 的限速步骤	163
5. 构象变化	163
第五章 酶催化反应与 pH 的关系	167
A. 简单酸和简单碱的电离作用: 基本方程式	167
1. 通过考察方程式以提出 pK'_a 's 值	170
B. 酶中电离基团对动力学的影响	171
1. 简单理论: Michaelis-Menten 机制	171
2. k_{cat} , k_{cat}/K_M , K_M , 和 $1/K_M$ ^[1,2] 对 pH 的影响	172
3. 关于预测和测定 pK'_a 's 的一个简单规则	173
C. 简单理论的修改和分析	174
1. 修改归因于附加中间产物	174
2. 简单法则的分析: Briggs-Haldane 动力学和限速步骤随着 pH 而变化: 动力学 pK'_a 's ^[4,6-8]	175
3. 动力学和平衡 pK'_a 's 间的实验区别	177
4. 微观 pK'_a 's 和宏观 pK'_a 's	177
D. 酶中表面电荷对其基团 pK'_a 's 的影响	177
E. 数据的图解表示法	179
F. 解说性的实例和实验证据	180
1. 糜蛋白酶活性部位的 pK_a	181
G. 酶中基团的直接滴定	183
1. D_2O 在 pH/pD 和 pK'_a 's 中的作用	183
2. 方法	183

H. 溶液中温度、溶剂极性和离子强度对酶基团的 pK_a 的影响	186
1. 酶中高度受扰的 pK_a 's	187
第六章 实用动力学	190
A. 动力学方法	190
1. 分光光度法	190
2. 荧光分光光度法	191
3. 自动分光光度法和荧光分光光度法操作步骤	192
4. 偶联分析	193
5. 酸碱的自动滴定	194
6. 放射性分析方法	194
B. 由动力学数据作图	197
1. 指数法	197
2. 二级反应	198
3. Michaelis-Menten 动力学	199
C. 酶-配体解离常数的测定	199
1. 动力学	199
2. 平衡透析	200
3. 凝胶过滤平衡 ^[8]	200
4. 超速离心	202
5. 过滤分析 ^[11]	203
6. 光谱法	203
7. 滴定方法	204
D. 以结合数据作图	204
1. 单一结合部位	204
2. 多结合部位	205
附录: 两种常用的液闪剂	205
1. BBOT	205
2. PPO/POPOP	206
第七章 动力学方法检测反应中间物	207
A. 前稳态动力学和稳态动力学的比较	207
1. 中间物的检测: “证据”是什么?	208
B. 胰凝乳蛋白酶: 通过停留分光光度法、稳态动力学和	
分离产物来检测中间物	209
1. 从一种“突增”式产物释放中检测中间物	209
2. 在单一转换条件下, 来自前稳态动力学的形成中间物的证据	210

3. 通过稳态动力学和分配实验检测酯水解中的酰化酶	214
4. 检测在酰胺和肽水解中的酰化酶 ^[8]	219
5. 分配实验的有效性和某些可能的实验误差	220
C. 用分配和动力学实验检测中间物的其它实例	223
1. 碱性磷酸酶	223
2. 酸性磷酸酶	224
3. β -半乳糖苷酶	225
D. 氨基酰化-tRNA 合成酶: 用淬灭流动、稳态动力学和同位素交换来检测中间物	226
1. 反应机制	226
2. 校对机制	229
E. 检测构象上的变化	233
第八章 酶反应的立体化学	237
A. 光学活性和手性	237
1. 表示法 ^[1,2]	238
2. 酶促和非酶促反应的立体化学之间的差别	240
3. 构象和构型	241
B. 立体专一性酶促反应的实例	242
1. 需 NAD^+ 和 NADP^+ 的氧化和还原	242
2. 延胡索酸酶催化延胡索酸的水合作用的立体化学	243
3. 在醛糖-酮糖异构酶反应中, 顺式烯二醇中间产物的论证	244
4. 将封闭的底物用于测定磷酸果糖激酶的正位异构体的专一性	245
C. 由手性中心构型的停滞或逆转检验中间物	246
1. 亲核反应的立体化学	246
2. 立体化学论证的合理性	247
3. 溶菌酶和 β -半乳糖苷酶反应的中间物	248
D. 手性甲基	248
1. 由次甲基产生的手性甲基与由手性甲基转变的次甲基之间的根本差别	249
2. 手性分析	249
3. 苹果酸合成酶反应的立体化学 ^[18-21]	251
E. 手性磷酸酯 ^[24-27]	253
1. 磷酸基转移化学的示范	253
2. 磷酸衍生物的手性	256
3. 手性磷酸基转移的实例	256

4. 位置同位素交换.....	259
5. 酶促磷酸基转移的立体化学概况.....	260
F. 酶促反应的立体电子控制.....	261
1. 吡哆醛磷酸的反应活性.....	261
2. 蛋白酶反应中的立体电子效应.....	262
第九章 活性部位指导的和被酶激活的不可逆抑制剂	
——“亲和标记”和“自杀抑制剂”	266
A. 蛋白质的化学修饰.....	266
1. 氨基酸侧链的化学反应活性.....	267
B. 活性部位指导的不可逆抑制剂	271
C. 被酶激活的不可逆抑制剂 ^[12-13]	276
1. 吡哆醛磷酸-连接酶	279
2. 单胺氧化酶和黄素蛋白.....	280
第十章 协同配体结合、变构相互作用和调节	283
A. 正协同性.....	283
B. 变构相互作用和协同性的机制	284
1. Monod-Wyman-Changeux (MWC) 协调机制 ^[4]	285
2. Koshland-Némethy-Filmer (KNF) 渐变模型 ^[13]	288
3. 综合模型.....	289
C. 负协同性和半部位反应活性 ^[8,9]	290
D. 协同性的定量分析.....	292
1. Hill 方程: 协同性的测定	292
2. MWC 结合曲线 ^[4]	292
3. KNF 结合曲线	295
4. 协同性的特征测验和 MWC 与 KNF 机制之比较	296
E. 血红蛋白协同结合的分子机制	297
1. 氧协同结合的生理学重要性.....	297
2. 血红蛋白在氧结合作用中的一些原子变化 ^[3,23]	297
3. 血红素的化学模型.....	301
F. 代谢途径的调节	301
G. 磷酸果糖激酶和酵解的控制.....	302
1. R 态的结构.....	306
H. 糖原磷酸化酶和糖原分解的调节 ^[42-44]	307
1. 磷酸化酶的结构.....	309

第十一章 分子间作用力和酶-底物结合能..... 313

- A. 非键合原子间的相互作用..... 313
 - 1. 静电相互作用..... 313
 - 2. 非极性相互作用 (van der Waals 或分散力)..... 314
 - 3. 氢键..... 318
 - 4. 疏水键^[7-9]..... 319
- B. 酶和底物的结合能 322
 - 1. 从动力学来测定结合能的增加..... 323
 - 2. 为什么酶比有机溶剂具有更多的疏水性? 327
 - 3. 摘要..... 328
- C. 熵和结合作用^[24] 328
- D. 蛋白质-蛋白质的相互作用 330

第十二章 催化反应中酶-底物互补和结合能的利用..... 333

- A. 催化反应中酶-底物结合能的利用 333
 - 1. 结合能降低 k_{cat}/K_M 的活化能 333
 - 2. 结合作用和化学活化能的相互转化..... 334
 - 3. 酶与过渡态的互补含有 k_{cat}/K_M 处于最高值之意 337
- B. 关于催化反应中酶-过渡态互补中, 结合能利用的实验证据..... 339
 - 1. 经典实验: 修饰的底物的结构-活性相互关系 339
 - 2. 过渡态类似物: 互补性探针^[1,9]..... 339
 - 3. 近代研究: 酶被修饰后的结构-活性实验 344
- C. 最大速度的演变: 过渡态的强结合和底物的弱结合..... 346
 - 1. 在常数 k_{cat}/K_M ^[2] 时, K_M 达到最大值的原理 347
 - 2. 关于 K_M 的实验观测 349
 - 3. 关于达到最大速度的进化完全的酶..... 354
- D. 关于结合能利用的分子机制..... 353
 - 1. 应变..... 354
 - 2. 诱导配合..... 354
 - 3. 非生产性结合..... 356
 - 4. 在专一性上应变、诱导配合及非生产性结合的非重要性 356
 - 5. 关于应变、诱导配合过程的存在和性质有关的实验证据 352
 - 6. 关于应变性质的结论: 应变还是应力? 363
 - 7. 应变、诱导配合和生产性结合之比较 365
- E. 最适速度对中间产物的累积和酶内部平衡的影响..... 365
 - 1. 中间产物的累积..... 365

2. 被平衡的内部平衡.....	366
第十三章 专一性和校对机制	369
A. 对专一性的限制.....	370
1. Michaelis-Menten 动力学	372
2. 一般情况.....	373
3. 相互作用的活性部位.....	375
4. 专一性的立体化学起源.....	376
B. 校正或校对机制	377
1. 蛋白质合成中的校对.....	377
2. 在 DNA 复制中的校对	382
C. 精确度的代价.....	386
1. 校正机制的代价-选择性方程式	387
2. 单一特征识别: $f = f'f''$	389
3. 双特征识别: $f'f'' > f$	390
第十四章 基因工程和酶学: 蛋白质工程	393
A. DNA 的结构和性质	394
1. 复制 DNA: DNA 聚合酶.....	396
2. DNA 内的裂缝可以封闭: DNA 连接酶 ^[43]	398
3. 双股 DNA 可在专一的序列处裂解: 限制性内切酶 ^[3,63]	399
4. DNA 片段可用酶来连接.....	400
5. 通过互补均聚物末端连接 DNA: 末端转移酶 ^[71]	401
6. 经过加工的/分布的聚合作用	401
B. 为扩大生产而克隆酶基因	402
1. 载体.....	404
2. 筛选.....	405
3. 实例.....	406
C. 定位诱变作用.....	406
1. 寡聚核苷酸-定位诱变 ^[21-25]	407
第十五章 精选酶的结构和机制	414
A. 脱氢酶.....	415
1. 醇脱氢酶 ^[73]	418
2. L-乳酸脱氢酶 ^[6,8,38]	423
3. 苹果酸脱氢酶 ^[9]	426
4. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 ^[59,60]	427
5. 关于脱氢酶的一些概括.....	430

B. 蛋白酶	432
1. 丝氨酸蛋白酶	432
2. 巯基蛋白酶	441
3. 锌蛋白酶	445
4. 羧基(天冬氨酰)蛋白酶 ^[108-121]	452
C. 核糖核酸酶	457
1. 酶和酶-底物复合物的结构	459
D. 葡萄球菌核酸酶 ^[223-225]	463
E. 溶菌酶 ^[231-233]	465
1. 正碳离子	466
2. 静电催化和一般酸催化	466
3. 亚部位的结合能	467
F. 碳酸酐酶 ^[259,260]	469
G. 磷酸丙糖异构酶 ^[280-282]	472
1. 氘和氚示踪实验及醛糖-酮糖异构酶的机制	473
2. 酶-底物复合物的结构	475
H. 结尾语	477