

代·谢·调·控

王鄂生 编著



科学出版社

Q591.9

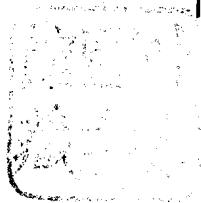
3

3

代谢调控

王鄂生 编著

高等教育出版社



B

668624

内 容 提 要

本书分五篇(共14章),第一篇酶活性调控,包括限制反应与调节酶、代谢调节的模式、别构调节的分子基础、可逆的共价修饰与酶活性调节和限制性水解与生理功能的启动共5章。第二篇膜与代谢调节。第三篇原核生物基因活性的调控:操纵子控制、多价调控和染色体外遗传成分与调节(第7—9章)。第四篇真核生物基因活性的调控:真核生物基因组、断裂基因、真核生物基因表达的调控和激素与代谢调控(第10—13章)。第五篇代谢调控与实践。

本书侧重代谢调控的类型和基本原理、给读者以必要的、系统的有关基础理论知识,并且尽可能将有关代谢调控的最新成就汇入有关章节,适当联系工农医实践。

本书为综合性大学、师范大学生化专业的专业课教材,也可供生物系、化学系、环保系、轻工业学院、医科大学、农业大学等的本科生和研究生、教师和科技工作者参考。

责任编辑 谭丽霞

代 谢 调 控

王鄂生 编著

*

高等教育出版社出版

高等教育出版社照排中心照排

新华书店北京发行所发行

北京印刷一厂印装

*

开本787×1092 1/16 印张26.25 字数600 000

1990年2月第1版 1990年2月第1次印刷

印数0 001—1180

ISBN7-04-002099-8/Q·126

定价6.30元

前 言

随着代谢途径研究的深入,发现了反馈调节,特别是酶的别构动力学指出了多种酶活性调节的基本类型。伴随着分子生物学的掘起,已能从分子水平上阐明一些原核生物、真核生物基因调控的机理;膜蛋白与生物合成、物质转运及其调控也日趋了解。然而这些资料是分散存在的,国内外一直缺乏系统的代谢调控的专业教材,为此,编者近几年来怀着这个目的,着手这门课的教学和教材的编写,同时由于这本书早已列入1981—1985教材编写规划,它一直在鞭策着编者,本书第二篇生物膜的调控第6章生物膜与代谢调控特邀申宗侯老师编写。于是1984年提出了初稿,并经复旦大学沈仁权教授审阅。当年底在北京师范大学由吴国利教授主持和召开了审稿会,参加审稿会的有北京大学李建武教授、复旦大学陈石根副教授、吉林大学黄承芳副教授、北京师范大学颜卉君副教授、中山大学张维钦副教授、南开大学蒋谷人副教授等对初稿提出了许多宝贵的意见和建议。1986—1987年又吸收了一些国外有关的专著和教材。1987年完成清稿后,承蒙吴国利、李建武二位教授在百忙中详细审阅、高教出版社本书责任编辑谭丽霞同志付出了辛勤的劳动,进行了大量细致的工作,马永胜老师大力支援为本书添锦,绘出近300张插图。在此一并表示衷心的感谢。

尽管编者力求理成一个代谢调控的体系,各篇章又自成体系,从分子水平上反映调控的理论和最新动态,术语尽管规范化,但是限于编者的水平和能力,错误、取材、立意不当之处在所难免,望读者勿吝指正。

编 者

1988年8月

目 录

绪言	(1)	第 8 章 原核生物基因表达的 多价调控	(215)
第 1 篇 酶活性调控		第 9 章 原核生物染色体外遗传 成分及其调控	(232)
第 1 章 限速反应与酶活性调控	(4)	第 4 篇 真核生物基因活性的调控	
第 2 章 酶活性调节的类型	(28)	第 10 章 真核细胞基因组	(258)
第 3 章 别构调节的分子基础	(47)	第 11 章 真核生物基因活性的调节 ...	(281)
第 4 章 共价修饰与酶活性调节	(88)	第 12 章 真核生物基因表达的调控 ...	(305)
第 5 章 限制性蛋白水解作用与 酶活性调节	(115)	第 13 章 激素对代谢的调控	(341)
第 2 篇 生物膜的调控		第 5 篇 代谢调控在实践中的应用	
第 6 章 生物膜与代谢调控	(144)	第 14 章 代谢调控与实践	(389)
第 3 篇 原核生物基因活性的调控			
第 7 章 操纵子的调控	(166)		

绪 言

代谢调控是研究生物体内生命物质相互制约、彼此协调及其控制规律的科学。它的主要任务是揭示各类型调节的分子基础，并阐明调节过程与机能相联系的机理。它的目的是利用代谢调节的原理和规律来改造生物，设计产品，防治疾病，为工农业生产服务，为人类谋福利，促进健康。

细胞内源性调节 一个活细胞内，生命物质共聚万千，据估计一个大肠杆菌染色体 DNA 约含 400 万个核苷酸对，用于编码一个含 500 个氨基酸多肽的基因约有 3000 个。而人体估计含有 5—10 万种蛋白质，包括酶，还有激素、神经的参与，可以想象其代谢之复杂。然而一个细胞内物质代谢的转换，犹如一个自动化的工厂。各种基因、结构蛋白、酶系统和代谢物等高度组织，各种代谢反应错综复杂，但它们相互制约，彼此协调，且随细胞内外条件的变化而迅速改变代谢反应的速度、方向和流量，既不使代谢物堆积而造成浪费，也不致因代谢物的缺损而供不应求，且保持各种代谢物的浓度相对稳定和动态平衡，如此细胞得以生长。由此看来，细胞内必有一套合理、精确、经济和高效的代谢机构。

活细胞对外界反应的自我调节 活细胞的一个重要的特点，是它对细胞内外信号和刺激作出灵敏的应答并进行自我调节。广义地说，细胞可能受到各种特异或非特异信号的作用，这些信号是：光量子、离子、代谢物、激素、神经等。当遇到信号时，细胞可以调整自己的酶活性水平、基因表达的水平，给出正调节(激活)或负调节(抑制)。从简单的离子通道(如 Ca^{2+} 泵等)的开放，到代谢途径酶(系)活性之间的平衡、以至复杂的一组基因的表达或几个组基因活性之间的平衡，都各自有着一套自我调节的机制，如此细胞在环境中得以适应。

代谢调控与其他学科的关系 在某种意义上来说，细胞的分化意味着基因按时间、空间的程序连续地或不连续地表达，和细胞内活性成分(蛋白因子、酶分子)与信号分子在不同水平上相互作用，基因的表达与酶活性受到不同水平(转录、翻译)和不同的方式的控制，因而表现出一部分细胞特异地分化，一部分细胞活性被抑制。因此，代谢调节与发育生物学密切相关。遗传学的最终目的是要弄清遗传的机理，而遗传基因和性状的显性表达，隐性的潜伏都是代谢物、酶、基因之间相互作用、相互调控的结果，由此代谢调控与遗传学密切联系。信号分子能够影响细胞活性的性质，改变细胞活动的程序，甚至改变整个细胞原有的代谢调控的关系(如癌细胞就是这样)，逆转细胞的功能，导致全部代谢失去控制，于是癌变和疾病来临。许多遗传疾病都与代谢失调，酶基因的缺失有关，可见代谢调控与癌的生物分子生物学和医学密切联系。此外，代谢调控与内分泌学、分子分类学、细胞生物学、微生物学、动物生理学、植物生理学和生物物理学等无不有关。

代谢调控与生产实践 揭示生物体内自我(动)调节的规律，不仅有助于揭开生命之谜，而且有助于农业、发酵和医疗工业的生产和医疗事业的发展。反馈调节的原理早已应用于发酵

工业，目前的抗菌素，氨基酸和核苷酸等发酵产品的产率比过去已有较大幅度的提高，应用于医疗可以改善疾病的症状，如尿嘧啶合成的反馈抑制原理已能用于改善先天性(近亲结婚)婴儿遗传贫血症的症状。激素受体和中间体 cAMP 的作用原理，可用来防治内分泌异常疾病(如受体病)等。同样脂代谢调节机制将用来控制动脉粥样硬化，有助于冠心病的治疗。光呼吸抑制理论的阐明，可以指导人们培育出抑制光呼吸的新品系，将有可能使农作物增产50%。基因调控规律已能指导基因工程技术的创新，和高产工程菌的构建，让细菌生产珍贵的药物。总之，代谢调控的研究可以在我国的国民经济建设中作出越来越大的贡献。

代谢调节需要回答的主要问题 (1)代谢途径中的酶对外来信号是怎样作出应答，以调节代谢的速度与流量的？(2)同一条途径或几条途径之间的代谢物和酶分子，通过何种调节方式使之保持代谢平衡状态的？(3)酶活性调节到底有多少类型？(4)基因怎样被启开、关闭？何种条件，什么信号使它全开或部分启开？(5)体内调节剂分子，如一些蛋白因子、激素抗体等和各种 RNA 在数量上、质量上(指 DNA 片段的特异序列)怎样进行调整？(6)在一定的环境条件下，基因和酶等怎样接受特定的信号和刺激而按时间、空间的程序进行表达的？(7)到底有多少基因活性调控的类型，它的分子基础为何？(8)与机能相联系的调节机制已被揭示出多少种？等等。然而，目前的研究对上述问题还只能作出部分的回答。

为此本书围绕代谢调控这一分支领域，给读者以必要的基础理论。本书共分四篇：第一篇酶活性调控，分五章叙述：限速反应与酶活性调节；酶活性调节的类型；别构调节的分子基础；共价修饰和限制性水解作用与酶调节。第二篇生物膜与代谢调节。主要讨论膜结构、膜的功能、膜蛋白与代谢调节和膜蛋白生物合成的调节。第三篇原核生物基因活性的调控包括操纵子的控制、多价调控和染色体外遗传成分的调控。第四篇真核生物基因活性的调控，分四章讨论，即真核生物基因组；断裂基因；真核生物基因表达的调控；激素与代谢调控。最后以代谢调节与实践结尾。

第 1 篇 酶活性调控

第 1 章 限速反应与酶活性调控

1.1 概述	(4)	1.4.1 改变非平衡反应底物的浓度	(15)
1.2 非平衡态与调节	(6)	1.4.2 起调节作用的因子	(16)
1.2.1 非平衡态	(6)	1.4.2.1 $[S]_a$ 与调节	(16)
1.2.2 稳态	(6)	1.4.2.2 $[E]_a$ 与调节	(17)
1.2.3 非平衡态与限速酶	(7)	1.4.2.3 效应物对酶活性的影响	(17)
1.3 限速步骤的确证	(7)	1.4.2.4 区域化与调节	(18)
1.3.1 非平衡反应的鉴别	(7)	1.4.3 调节酶性质的研究	(19)
1.3.2 质量作用比的测定	(7)	1.4.4 调节理论的设想与验证	(19)
1.3.2.1 平衡常数的测定	(8)	1.5 酶活性调节因子的类型	(20)
1.3.2.2 质量作用比的测定	(9)	1.5.1 辅助因子的有效性	(20)
1.3.3 反应速率的测定	(11)	1.5.2 产物的移去	(20)
1.3.4 最大酶活性的测定	(12)	1.5.3 近平衡反应的调节	(21)
1.3.5 综合考虑	(13)	1.6 代谢流动的调节	(22)
1.3.6 中间代谢物的加入	(13)	1.6.1 代谢流动的概念	(23)
1.3.7 交叉作图法	(13)	1.6.2 流动传送的控制	(23)
1.3.8 中间代谢物的分析	(14)	1.6.3 调节剂与终末调节反应	(24)
1.4 调节酶及其鉴定	(15)	1.6.4 代谢调节的灵敏度	(25)

第 1 篇 酶活性调控

生物有机体具有控制自我代谢过程以应答细胞内外信号和环境变化的能力。这种控制过程就是生物调节 (bioregulation)。如果将各种各级生物调节统一在分子水平上,可把它归纳为两大类调节机制:酶活性调节、酶合成调节。后者涉及到控制酶合成的基因调控机制(见第三篇第 7 章)。本篇酶活性调控包括(1)别构控制,是酶活性调节的核心;(2)酶的解离与聚合;(3)可逆的共价修饰;(4)不可逆共价修饰(主要讨论限制水解作用)。

为了便于理解本篇内容,作如下安排。第 1 章限速反应与酶活性调节,是认识代谢调节的起点和基础;第 2 章概括地介绍各种各样的调节模式,重点在反馈别构调节;第 3 章别构调节的分子基础,不仅是酶活性调节的基础,而且还是膜转运和基因表达调控等的共同基础。第 4 章、第 5 章分别专门讨论可逆共价修饰和不可逆共价修饰即限制性水解与生理功能的启动。

第 1 章 限速反应与酶活性调控

本章要点:

(1)只有整个代谢途径中存在着限速反应(或非平衡反应),代谢物的流动方向才是单向性的,才具有调节代谢反应的意义;(2)通过对非平衡反应的鉴定、质量作用比的测定帮助我们找到代谢途径中那一步可能存在限速反应和调节酶(限速酶);(3)研究代谢途径控制步骤的调节酶应当把握住下面几点:①提纯并鉴定调节酶,此酶是否有 S 行为和脱敏作用。②找到那些影响代谢控制点上的抑扬调节剂(modulator)。但应考虑下列因素:在体内或细胞反应系统中的底物的可利用性、辅因子的有效性、产物有否移走。由于它与某些代谢反应相偶联,所以近平衡反应也能控制代谢流量。(4)代谢流动调节是定量水平的调节,目前刚起步研究,亦略加介绍。

1.1 概 述

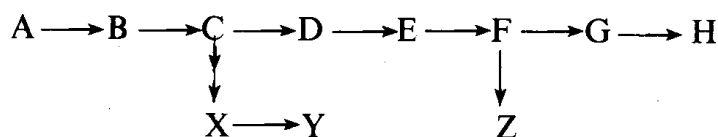
代谢途径是由一系列使底物转变为产物的酶促反应所组成的代谢链。由于 30—50 年代各种技术的应用,体内各种代谢途径的基本酶促反应,业已基本阐明,这些技术与方法是:(1)加入该途径特异的抑制剂,然后对积累的中间物进行鉴定;(2)对加入可能的中间物进一步转

变为产物的鉴定；(3)放射性标记底物(或中间物)在代谢途径中分布情况的研究；(4)分离途径中各个酶，并从化学上阐明每一个反应；(5)利用遗传学的方法，特别是营养缺陷型鉴定的研究。也由于40—60年代对个别酶的动力学性质的深入研究，以及对中间代谢物的几种简便的酶学检查方法的发展，为代谢调控，特别是酶活性调控这一新领域开拓了道路，并奠定了良好的理论基础和技术条件。

代谢调节现象 比较早就观察到：(1)许多代谢途径内存在着限速反应与限速酶；(2)途径之间具有补偿功能；(3)真核细胞的酶往往组织化、区域化以隔离分布来控制代谢；(4)有的酶具有别位的协同效应；酶的共价修饰、聚合解离与活性调节有关；(5)同工酶、多功能酶的存在表明酶活性调节存在着多样的形式；(6)乳糖操纵子控制半乳糖分解代谢酶系的合成，另一些操纵子控制着生物合成代谢的酶系。这属于酶合成的基因调节。所以广义的代谢调节包括酶活性调节、酶合成的基因调节。近年来还包括细胞内一些功能上许多蛋白质(酶)之间的调节，即文献上出现的细胞调节(cellular regulation)属于这种讨论范围。本篇仅仅讨论代谢途径中酶活性调节。

限速反应与调节 整个细胞内每个代谢途径中不仅依一定的方向进行，而且还随内外条件的改变而加以调整，以避免某种代谢物过剩，以至由此导致生命活动的紊乱。它们采取什么方式来调节？(见第2章)。从一条途径来看，它由好几个酶催化的连续反应所完成，它们中各步反应速度并非相等，整个反应取决于最慢反应的一步，这个反应就是该途径的限速反应。催化此慢反应的酶便是限速酶。一般地说每个途径可能只有一个限速反应步骤，几条途径含一个以上的限速步骤，有可能有一个以上的限速酶。这种酶具有生理功能之一就是调节该途径或该组代谢途径的反应速度，控制某一分支途径的流量。

限速反应不是固定不变的，它可能随条件改变而变化，譬如，底物、营养条件的改变；激素的有无、效应物浓度的高低，特别是各种效应物比值的改变、辅因子的改变、代谢物、产物在膜内外转运情况的改变等，其限速反应的位置也会发生改变，有可能在一条途径中出现具有两个以上生理功能的酶。以下分支途径为：



可以看成五个途径：即(1)A→C；(2)C→F；(3)F→H；(4)C→Y；(5)F→Z。每一条途径都有其本身的限速反应，譬如酵解途径(EMP)包括从葡萄糖到丙酮酸(或乳酸)的多步有序反应，在它们之间又有分支步骤，如葡萄糖-6-磷酸，它可转变为糖原，又可变回葡萄糖，也可以进入己糖磷酸支路。提供戊糖，由此葡萄糖沿酵解路线至丙酮酸至少通过了两条可被控制的途径，即一条从葡萄糖→葡萄糖-6-磷酸，另一条由葡萄糖-6-磷酸→磷酸丙糖。显然，它们都有各自的限速反应。催化这些限速反应的酶就是以后研究得知的调节酶，如己糖激酶，磷酸甘油变位酶。

如欲研究酶活性的调节，首先要找到整个途径中的限速反应步骤，并加以鉴别。第二，应当把控制这段反应的酶分离出来，并确定它是否为一个调节酶。第三，通过酶的动力学研究，探知该酶受哪些因素的调节，有否调节专一性？第四，研究其调节的机理。

1.2 非平衡态与调节

在探测途径中的限速步骤之前，还必须了解限速步骤与非平衡反应的关系。如所周知，在一个化学平衡体系中正反应与逆反应的速度相等，此时自由能没有变化，两个相反方向代谢反应也都没有净流量，此时处于稳定状态。然而这对于生物体来说，平衡状态没有能量的价值。因为能量的释放、吸收、转化及利用都为生命活动所必需，没有能量也就没有生命过程。而在构成动态体系的代谢途径，物质和能量两者都朝一个特定的方向移动。这样，总的过程总是偏离平衡态的。只有途径中存在非平衡反应，代谢途径才将是单向性的。按照热力学的观点，那些以部分热能散失的反应才是驱动物质在代谢途径中流量的原动力。但并不是细胞内所有反应都是远离平衡的。事实上，某些步骤的反应似乎十分接近平衡，但就整个代谢过程必须是非平衡的，才具有限制与调节反应速度的意义。

1.2.1 非平衡态

一个偏离平衡的过程，在其朝向平衡态的同时，要经历一个负的自由能的变化，并以热的形式损失于环境周围，由此反应得以进行直到大量的反应物转变为产物为止。一个反应(或代谢途径)方向的单向性取决于部分可作为热能丢失的自由能，但是并非所有可被利用的能都被丢失掉，其中一部分可被截获用于细胞的反应，例如糖酵解途径中某些反应(图1-1)。如果这个途径处于平衡态或非常接近于平衡，那么葡萄糖转变为乳酸时，所释放的能量将全部转移至ATP分子上。可是当反应处于平衡时，并没有净流量通过此途径，当然也就不会有ATP的净合成。

为了保证葡萄糖向乳酸生成方向的单向性，该途径必须是偏离平衡的。而且其间一部分被释放的化学能以热量形式散失掉，一部分被用于ATP的合成。如果在另一种情况下，尽管也远离平衡，但它全部能量却以热的形式散失掉，没有任何ATP的净合成，这对于生物来说没有什么价值。应当指出的是，体内一条途径所进行的速度并非一定都由偏离平衡程度所决定的。还可能受到一些与偏离平衡无数量关系的其他因素所支配。

1.2.2 稳态

这里所说的稳态，是指任一条代谢途径其底物的净利用率等于输出的速率。实际上，细胞内的稳态远比一个化学反应系统中的动力学稳态复杂，因为生物有机体是一个能够与环境进行物质的和能量的变换的体系，即开放体系。相反，非生物是一个不与环境变换物质和能量

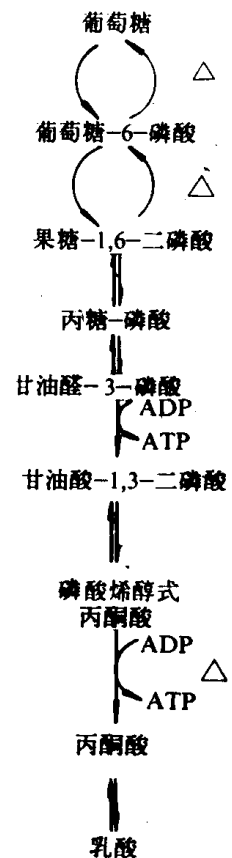


图1-1 糖酵解途径的非平衡反应△

以至最终达到平衡的封闭的体系。开放的代谢途径从其所处的微环境得到底物，通过代谢途径一系列反应所形成的最终产物又不断输出至微环境(如CO₂和H₂O等)，如此构成一个稳态。

1.2.3 非平衡态与限速酶

在正常的代谢途径中，慢反应就是限速反应，此限速反应的逆反应速率很小，甚至等于零，而向前反应的速率接近于代谢途径的净速率。由于代谢途径一系列反应所释放的总热能是均匀地由各个单个反应提供的。所以在此条件下，全部反应都是稍离平衡的。但实际上，代谢途径的序列反应只有那么几个甚至只有一个反应是远离平衡的。大多数的反应就象经流水坝一样，其流量受到该点的控制。从已经研究过的分支途径来看，分支点上往往正是一个远离平衡的非平衡反应，所有经流此慢反应一步的流量都要受到控制，由此限速步骤便成了代谢物流量的控制点。例如嘌呤核苷酸GMP和AMP合成途径正是这样。在体内除了限速反应本身起着流量控制作用以外，更重要的是处于该限制反应的限速酶的参与。所谓限速酶从本质上来讲大多是调节酶、或别构酶，这将在后续章节中讨论。

1.3 限速步骤的确证

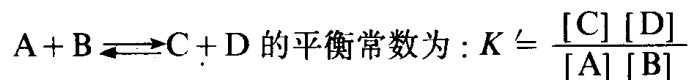
1.3.1 非平衡反应的鉴别

要了解一条途径是否有调节作用，首先要确证哪一步是限速反应，然后探测影响催化限速反应的调节酶活性的因子。在检测限速步骤时，有两点值得考虑的：一是限速反应在整个代谢途径中是慢反应，而且它的逆反应速率很小，甚至等于零，所以在这样的途径中找到非平衡的反应就有可能鉴别出限速反应来；第二，限速步骤向前反应的速率接近于代谢途径流量的净速率，测定这样的途径净流量中的反应才有意义。

非平衡反应的鉴别大致采用两种方法：一是比较平衡常数与质量作用比。二是测定最大酶活性。

1.3.2 质量作用比的测定

质量作用比(mass action ratio,简称MAR)是指在给定的条件下，产物浓度和底物浓度之比。如欲通过质量作用比测定的数据来判断途径中某反应是否为限速反应，还必须与平衡常数相比较方能作出判断。以下反应



在大多数实验中，平衡常数是从非无限稀释的底物和产物浓度计算而得的，因此，这种计算的常数实则为表观常数K'。如果浓度接近于无限稀释，或者反应单向接近于完成的程度，平衡时底物浓度极小，以致难于测定，就可以把从浓度换算出来的底物与底物的热力学数据——活度，

代入上式便可得到热力学平衡常数 K'_{eq} 。

由于酶是一种催化剂,因此它不能改变反应平衡的位置。假如一个酶催化细胞内的一个平衡反应(或近平衡反应),那么,产物/底物浓度比值将接近于该反应的表观常数 K' ;如果酶所催化的反应不是处于平衡状态,质量作用比和 K' 两个值不相同;如果MAR明显地小于 K' ;这表明该反应是远离平衡的,即它是一个非平衡(不可逆)的反应。虽然还没有找到确切的规律,但就一般的限速反应的酶而言,其MAR比 K' 小2—4个数量级,就可能是一个非平衡酶(限速酶)。

在实际工作中,可以在组织内测量出一个底物和产物的浓度。由此计算出[产物]/[底物]的比值。

1.3.2.1.平衡常数的测定

测定一个酶促反应的表观平衡常数 K 的方法有好几种,最简单又广为采用的方法是将反应的底物与适当纯化的酶相混合并使反应达到平衡,如果没有生成或移走底物的反应或形成产物的副反应,此离体系统将及时达到平衡。在此平衡点上的产物浓度与底物浓度的比值 k' 总是一定的(指在特定的温度下)。由于不管起始的[产物]/[底物]比值有多大,酶并不能改变平衡的位置,因此可以直接在适当反应的间隔时间加入蛋白质沉淀剂(如高氯酸)抑制此酶的反应,然后分别测定产物和底物的浓度便可计算出 K 值。

催化葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)与果糖-6-磷酸(F-6-P)互变的葡萄糖磷酸同分异构酶(PGI)的平衡常数,就是依下述方法测定的:将此酶(PGI)制剂加到葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)溶液中,经两个不同时间的间隔再加入三氯乙酸(或盐酸)终止酶反应,然后分别测定葡萄糖-6-磷酸和果糖-6-磷酸的浓度,如果在两个间隔的时间测得的浓度相同,表明已达到平衡,当用各种不同起始浓度的葡萄糖-6-磷酸重复进行实验,并以不同起始浓度的果糖-6-磷酸从逆方向作同样的实验时,此法所得的平均 K 值为0.36。

应用快速、准确测定代谢物浓度的技术,已能测量许多的生化反应 K 值,但是对于那些标准自由能变化很大的反应(即朝一个方向进行到几乎完成的程度) K 值极大;而在平衡时,底物浓度却很小的情况下则它是很难测定的。此时便可用动力学热力学的数据来计算 K' 值。

对于一个单底物酶所催化的反应在计算 K 值所必需的动力学数据是:两个方向催化的最大反应速度(V_{max})和酶对底物或产物的 K_m 值。然后利用Haldane的关系式来计算出 K 值。对于反应 $A \rightleftharpoons B$

$$K \cong \frac{[B]}{[A]} = \frac{V_{max}^{A \rightarrow B} K_m^B}{V_{max}^{B \rightarrow A} K_m^A}$$

也可以利用下式由反应的自由能的变化计算 K 值

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{[\text{产物}]}{[\text{反应物}]} \right)$$

$$\text{平衡时 } K' = \frac{[\text{产物}]}{[\text{反应物}]} \quad \text{且 } \Delta G = 0$$

(即平衡时没有自由能的变化)

$$\text{因此 } \Delta G^\circ = -RT \ln K'$$

例如, 在磷酸果糖激酶(PFK)反应中, ΔG° 是从 ATP 水解的标准自由能与果糖-6-磷酸(F6P), 果糖-1,6-二磷酸在水溶液中形成的标准自由能(间接计算的)两者结合计算的, 对于 PFK 反应 ΔG° 为 -17572.8 焦耳/摩尔。

$$\begin{aligned} \text{因为 } \Delta G^\circ &= -RT \ln K' \\ -17572.8 &= -1.98 \times 310 \times 2.303 \log K' \end{aligned}$$

$$\log K' = \frac{17572.8}{1413.5} = 12.43$$

$$K' = 2.7 \times 10^{12} \text{ (pH7.0, } 37^\circ\text{C)}$$

因此, 在 37°C pH7.0F, PFK 的表观常数约为 10^3 。

应用微量量热法可以直接从酶加到底物中达到平衡时所放出的热量(Q_1)和酶加入到产物达到平衡时所吸收的热量(Q_2)来计算平衡常数, $Q_1/\Delta H$ 或 $-Q_2/\Delta H$ 代表达到平衡时反应物转变为产物之比, 因此

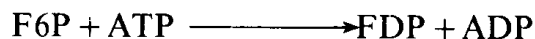
$$K' = \frac{Q_1/\Delta H}{-Q_2/\Delta H} = -\frac{Q_1}{Q_2}$$

这样, 只要在稀溶液中测量出两个热量就能求得平衡常数。

1.3.2.2 质量作用比的测定

在测得酶反应的 K 值之后, 应当着手质量作用比的测定, 以便与之比较。如果 MAR 比 K' 值小并在 2—4 个数量级范围, 就有可能为限速反应。

实际测定质量作用比需要有完整的制备物, 这可以是完整的细胞(如酵母细胞或腹水癌细胞)、灌流的组织(如肌肉或肝脏)、保温的组织切片(如肾皮质或脑皮质)、或是原位的实体组织(如麻醉动物的肝脏)等。操作时, 第一步尽可能快地将组织的制备物冰冻, 以使酶所催化的反应全部同时终止, 并且使所有的代谢物(中间物)保持得象生理状态一样。即把组织很快地夹在两块预冷至液氮温度(-190°C)的铝片之间, 冷冻之后, 冷冻的组织必须在低温下脱蛋白。将冰冻组织在冻结点以下温度(-70°C)下破碎成粉末, 与冷冻的沉淀剂(高氯酸)充分混合, 随着粉末的融化酶几乎立即失活并生成蛋白质沉淀物, 离心即可除去, 中和上清液, 用特异性酶测定法来分析代谢物。经这样的分析, 可以计算出每克组织中所含代谢物毫摩尔数($\text{m}\cdot\text{mol}$)。如果组织中含水量已知(已测定了新鲜组织和干组织的重量), 并测出细胞外液的体积, 则可由此值外推至细胞内水中代谢物的真实浓度, 这个方法得到的是表观细胞内的浓度。假定代谢物均匀分布在整个细胞内, 如此, 对于磷酸果糖激酶(PFK)反应



(F6P, 果糖-6-磷酸; FDP, 果糖-1,6-二磷酸 此时其质量作用比:

$$\text{MAR} = \frac{[\text{FDP}] [\text{ADP}]}{[\text{F6P}] [\text{ATP}]}$$

此值在冰冻组织中测得。以 5m mol/L 葡萄糖溶液灌注离体大鼠心脏，其组织内含物的代谢物列于表 1-1。由这些组织所得的数据计算的质量作用比为 0.029。

表 1-1 离体灌流心脏中 PFK 反应质量作用比

代谢物	组织含量 μ mol/g 干组织	表观浓度 (μ mol/L 细胞内水 μ mol/mL)
果糖 -6- 磷酸	0.154	0.087
果糖 -1,6- 二磷酸	0.042	0.022
ATP	21.70	11.52
ADP	2.49	1.32

$$\text{MAR} = \frac{[\text{FDP}] [\text{ADP}]}{[\text{F6P}] [\text{ATP}]} = \frac{0.022}{0.087} \times \frac{1.32}{11.52} = 0.029$$

由于此反应的表观常数已知为 10^3 数量级，看来这个反应在细胞内是非平衡的。

之所以选择这个反应是因为它的原理清楚，并且实验结果也容易得出肯定的结论。然而有两点是欠周的，第一是用于计算 MAR 所测的代谢物含量与所要讨论的酶周围环境内的代谢物的实际浓度毫无关系。实际上可能由于物理的区域化作用(如线粒体的、或细胞浆的区域化)或化学的区域化作用(如代谢物吸附于蛋白质上)，难于与所计算的数据相符。因为，如果测量到的 ATP 99.9% 在线粒体内，而且 PFK 在细胞浆中，那么细胞内 ATP 有相当大的部分不能用于 PFK 的反应，此时 MAR 将接近于 K' ；由此 PFK 催化的反应可能是一个平衡反应。一个细胞特异地把 99.9% 的 ATP 局限起来，而对 ADP 的分布不发生任何影响，这是不大可能的。这就需要有一个高度选择性的转运过程，而且将要消耗大量的能量；第二，解释 MAR 与 K' 之间数量差别可能是困难的，任何有一定流量的代谢途径及其反应不可能都处于平衡状态。尽管某些反应可能接近于平衡(如偏离平衡 10%)，但某些反应可能远离平衡(如 PFK 反应)。MAR 与 K' 值之间到底要多大的差别才确定一个非平衡反应？似乎 MAR 和 K' 之间相差 20 倍或者更大些才可能是平衡反应。如果两者差别小于此值，又没有其他如最大活性等实验证据的支持则难于作出结论。可认为这是一个非平衡的反应。

另一个例子：丙酮酸激酶

它催化反应如下

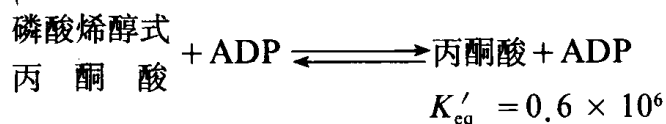


表 1-2 代谢物在肝脏中的浓度

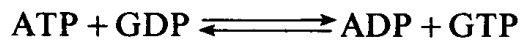
代 谢 物	在肝脏中的浓度 mol/L
磷酸烯醇式丙酮酸	7×10^{-5} mol/L
丙 酮 酸	3×10^{-5} mol/L
ATP	3.75×10^{-3} mol/L
ADP	1.88×10^{-3} mol/L

$$\text{MAR} = \frac{[\text{丙酮酸}][\text{ATP}]}{[\text{磷酸烯醇式丙酮酸}][\text{ADP}]} = \frac{[3 \times 10^{-5}][3.75 \times 10^{-3}]}{[7 \times 10^{-5}][1.88 \times 10^{-3}]}$$

$$= 0.85$$

与 K'_{eq} 相比,说明此反应处于非平衡状态,因此,丙酮酸激酶是一个限速酶。由于这两个值相差很大,可能与别的因素(如区域化等)无关。

第三个例子:核苷二磷酸激酶,它催化如下反应



$K'_{\text{eq}} \approx 1$ 表1-3 核苷酸在肝脏中的浓度

代 谢 物	在肝脏中的浓度 mol/L
ATP	2.36×10^{-3}
ADP	0.97×10^{-3}
GTP	0.63×10^{-3}
GDP	0.21×10^{-3}

$$\text{MAR} = \frac{[\text{ADP}][\text{GTP}]}{[\text{ATP}][\text{GDP}]} = \frac{[0.97 \times 10^{-3}][0.63 \times 10^{-3}]}{[2.36 \times 10^{-3}][0.21 \times 10^{-3}]}$$

$$= 1.23$$

由于 MAR 和 K'_{eq} 值彼此那么接近,所以可以确认这个酶在体内催化的反应处于平衡状态的。

以上几例以 MAR 与 K'_{eq} 之比可以说明或判断该酶促反应是平衡的或非平衡的状态。

1.3.3 反应速率的测定

由于代谢途径的酶大多数组成多酶体系,其间代谢物又很少积累,游离的浓度也很低,或者由于其他因素如区域化效应等。所测结果难于解释,在这种情况下可以采用同位素标记底物,更直接地测定正向和逆向反应的速率。对于单向线型序列的途径 $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow$

E → ……，如果加入 ^{14}C 标记的 A，那么从 B 到 E 等的每个化合物都依次被 ^{14}C 所标记。如果 A → B 的速率比整个途径净流量快，则 B 中 ^{14}C 的比活性将会迅速提高到 A 的水平。除了处于非平衡状态的反应（即限速反应）外，类似的推理同样适用于各步的反应。限速反应的逆反应速率接近于零，所以它是慢反应。显然由产物到达相应底物之间的同位素平衡也会慢些。因此，实际上只要测定中间产物比活性的变化与时间的关系，就可以找到代谢途径中起控制作用的步骤是哪一步。

例如三羧酸循环（柠檬酸循环）的调节部位是怎样确定的呢？这里略加介绍，过去研究分离酶的性质时，指出了该途径有三个可能的调节部位：一是在柠檬酸合酶处；二是 NAD^+ 专一性的异柠檬酸脱氢酶；三是 α -酮戊二酸脱氢酶系（复合体系），但到底哪一个才是真正的调节部位？从这三个酶的性质来看，情况比较复杂，柠檬酸合酶是三羧酸循环的第一个酶，它的活性高，对底物（乙酰 CoA 和草酰乙酸）的 K_m 值低，受柠檬酸抑制（与草酰乙酸竞争）还受 ATP 抑制，较小程度地受 AMP 的抑制；对 NAD^+ 专一的异柠檬酸脱氢酶，ADP 是激活剂，因它能降低对柠檬酸的 K_m 值，NADH 与 NAD^+ 有明显的竞争作用，ATP 对它也有抑制作用； α -酮戊二酸脱氢酶催化的反应自由能变化很大，并被高比值的 NADH/NAD^+ 和琥珀酰 CoA/CoA 所抑制。再加上分布在线粒体上的三羧酸循环酶系、辅因子、效应物也都比较复杂，还有对柠檬酸、异柠檬酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸和 CoA 的衍生物以及 NAD^+ 、NADH 的分配比值未能确切知道，所以要想从 MAR 的计算来找到限制反应部位，从而找到调节部位是不可能的。因此鉴别非平衡反应的另一条途径是引入 ^{14}C -标记的底物、随后测定中间物比活性变化的时间进程。在灌注的心脏中引入 ^{14}C -乙酸后，乙酰 CoA（和乙酰肉毒碱）的比活性很快上升，而异柠檬酸脱氢酶的比活性上升得很慢，循环中其他中间物的标记说明异柠檬酸脱氢酶这一步有逆反应。这些实验说明循环中的调节作用发生在柠檬酸合酶和 α -酮戊二酸脱氢酶系这两步反应上，而不在 NAD^+ -异柠檬酸脱氢酶这一步。这个实验是基于底物（乙酸）进入三羧酸循环后，测得循环中间物浓度的变化与时间函数关系，从而找到代谢途径中起控制作用的步骤的。将乙酸加到灌注介质中后，心脏中的乙酰 CoA 的浓度在几秒钟内便上升，但在下一个五分钟内柠檬酸的浓度慢慢上升，与此平行的是异柠檬酸、 α -酮戊二酸、谷氨酸也都相应升高，天冬氨酸、苹果酸有一定程度的下降，这与前面所判断的调节作用发生在柠檬酸合酶和 α -酮戊二酸脱氢酶系这两步的结论是相吻合的。通常乙酰 CoA 的增多应当使柠檬酸合酶这一步的流量增加，因此循环的前半圈从草酰乙酸到 α -酮戊二酸的速度比后半圈从 α -酮戊二酸到草酰乙酸的速度快。其原因是 α -酮戊二酸脱氢酶（复合体系中的酶）是种限速酶：这样，同位素标记实验结果与实际情况是相符的。

1.3.4 最大酶活性的测定

对于代谢途径中的非平衡（不可逆）反应的鉴别，往往是根据高活性酶和低活性酶加以区分的，低活性酶类常是细胞中催化不可逆反应的酶。但是实际测定时，应当注意这样一个问题：即所测定出来的低活性酶到底是酶本身就没有足够的活性以催化底物转变为产物直到平衡，还是没有选择好最适条件使得酶未能显示出全部活性？所以在实际测定时，① 必须选择好最适条件以保证测示的酶活性是最大的；② 在试管测定途径中所有的酶或者必要的酶活性应是