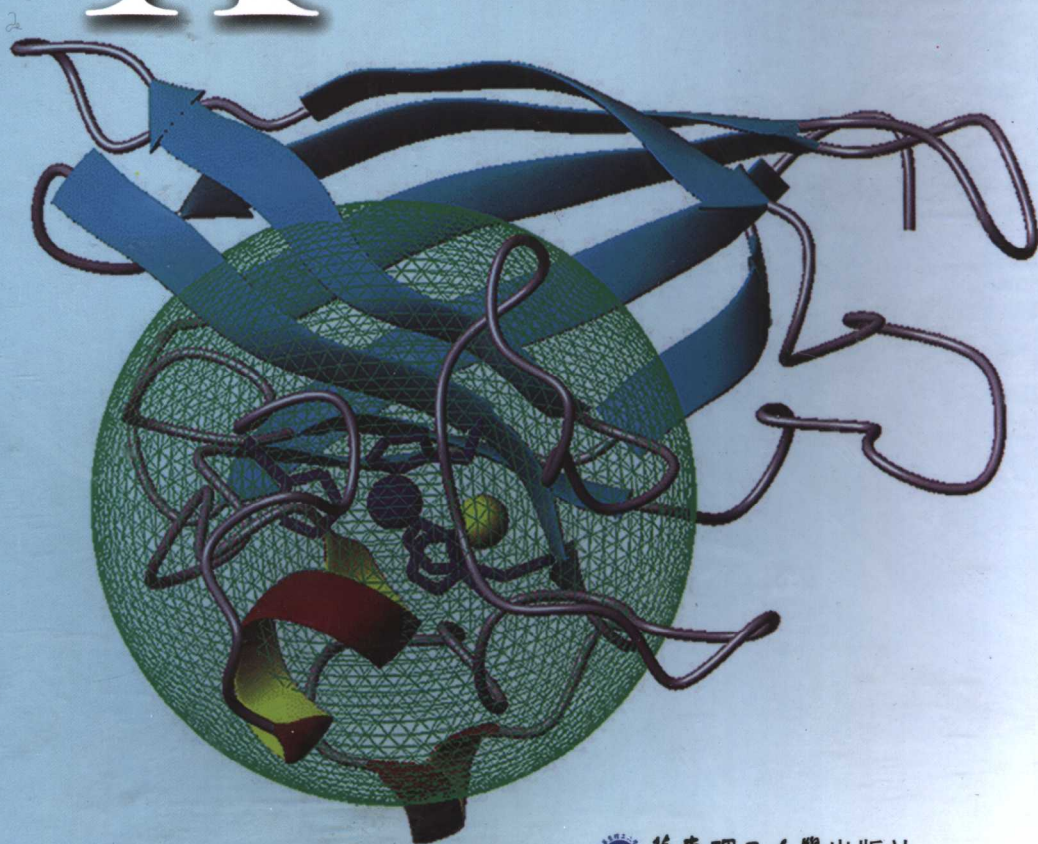


现代酶学

(第二版)

袁勤生 主编

XIANDAI MEIXUE



华东理工大学出版社
EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

现代酶学

(第二版)

袁勤生 主编

图书在版编目(CIP)数据

现代酶学/袁勤生主编. —2版. —上海:华东理工大学出版社, 2007. 8

ISBN 978-7-5628-2091-8

I. 现... II. 袁... III. 酶学 IV. Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 078131 号

现代酶学(第二版)

主 编 / 袁勤生

责任编辑 / 钱四海

封面设计 / 王晓迪

责任校对 / 李 晔 金慧娟

出版发行 / 华东理工大学出版社

地址:上海市梅陇路 130 号, 200237

电话:(021)64250306(营销部)

传真:(021)64252707

网址:www.hdlgpress.com.cn

印 刷 / 常熟华顺印刷有限公司

开 本 / 787mm×1092mm 1/16

印 张 / 34.25 插页 2

字 数 / 753 千字

版 次 / 2001 年 9 月第 1 版

2007 年 8 月第 2 版

印 次 / 2007 年 8 月第 1 次

印 数 / 3001—7050 册

书 号 / ISBN 978-7-5628-2091-8/TQ·117

定 价 / 58.00 元

(本书如有印装质量问题,请到出版社营销部调换。)



作者简介

袁勤生，教授，博士生导师，1940年6月生，江苏武进人。1964年毕业于上海科技大学生物物理化学系，毕业后留校任教；1972年调入华东化工学院（现华东理工大学）工作；1985年晋升副教授，1990年晋升教授。曾任华东理工大学生物工程学院院长、教授、博士生导师。主要兼职有：国家新药研究与开发专家委员；国家新药评审委员（生物制品）；国家药典委员（2000年版）；中国药学会理

事，中国生化与生物技术药物学会主任委员；中国生化与分子生物学会常务理事，中国工业生化与分子生物学分会理事长；上海生化药物学会名誉主任委员；中国生化制药工业协会特聘专家委员；《中国生化药物杂志》、《药物生物技术》副主编，以及《中国生化与分子生物学报》等多家杂志的编委。

袁勤生教授的主要业务专长为：酶与酶工程、生化与生物技术及应用生化。近年来出版的著作及教材有：《生化药物药品集》，参编，上海科技出版社（1983）；《酶工程》，参编，化工出版社（1991）；《生化制药工艺学》，主要编委，中国医药科技出版社（1994）；《应用酶学》，主编，华东理工大学出版社；《现代酶学》，主编，华东理工大学出版社（2001）；《化工大辞典》，分编主任，化工出版社（2003）；《酶与酶工程》，主编，华东理工大学出版社（2005）；《实用生物制药学》，副主编，人民卫生出版社（2007）。

袁勤生教授长期以来从事生化及应用生化的教学和科研，尤其在酶与酶工程、生物医药等领域颇有建树；在国内外重要刊物共发表论文三百余篇，有多项专利及省部级科技成果。袁勤生教授自20世纪80年代起就致力于超氧化物歧化酶（SOD）及生物技术产品的研究与开发，多次主持和组织全国性学术会议，为我国生化事业做出了巨大的贡献。由于袁勤生教授在教学和科研上的杰出贡献，1992年起获得国务院授予的政府特殊津贴，1994年被美国ABI权威机构收载入国际名人录，2001年中国药学会和中国药学发展基金会授予他首届“中国药物发展奖”提名奖。

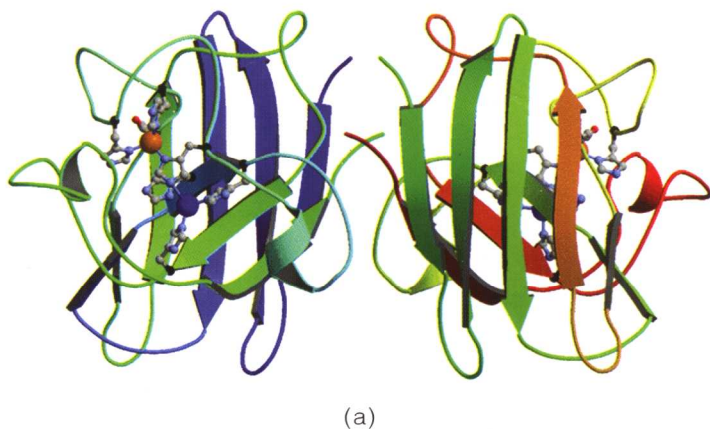
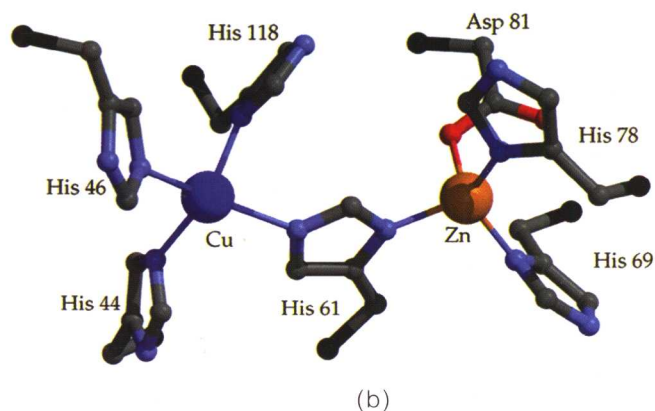


图1: 牛Cu,ZnSOD结构示意图。

(a) 以带状表示的二级结构显示的自然二聚体高级结构示意图(带状箭头表示 β -折叠, 原子Cu(蓝色)和Zn(橘黄色))



(b) 金属的位点及与 His61 形成的桥键的特写

图1

图2: 细胞质MnSOD或FeSOD结构示意图。两个相同的MnSOD单体通过Mn金属结合位点结合的同二聚体的结构。实验证实Mn和Fe均可作为辅因子激活酶

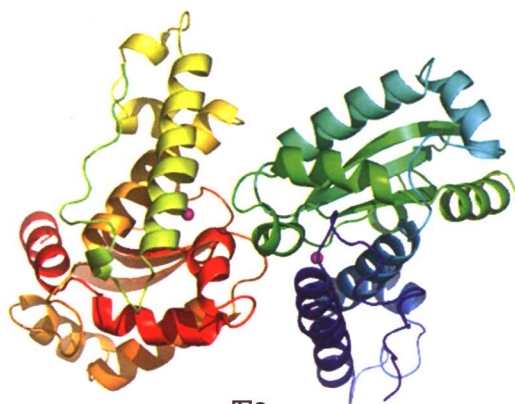


图2

图3: MnSOD活性中心, 一个重叠氟化的野生型MnSOD以及以灰色球描述的活性中心氢键图解

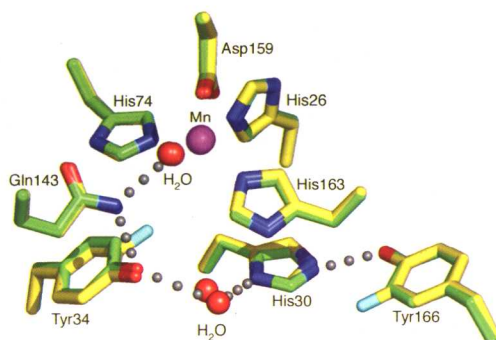


图3

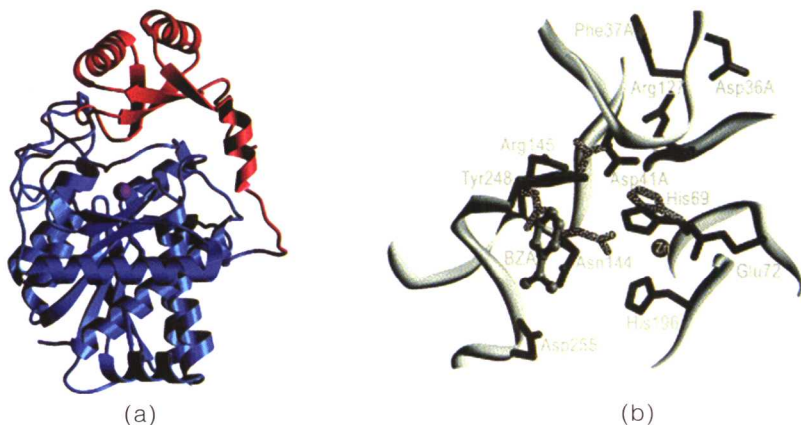


图4

细胞质MnSOD或FeSOD结构示意图。

(a) 酶原包括两个明显的结构域：前导肽结构部分以红色表示，活性酶部分以深蓝色表示；如图所示的人PCPB的整体结构用二级结构元素表示（带状表示 α -螺旋，带状箭头表示 β -折叠，无规卷曲以无规线条表示，锌离子以红紫色球表示）

(b) 人PCPB活性中心立体结构示意图：侧链的重要残基以棒状模型表示。以球棍模型表示的一个苄胺结构分子位于羧肽酶原B结构中，表示出活性中心的裂隙

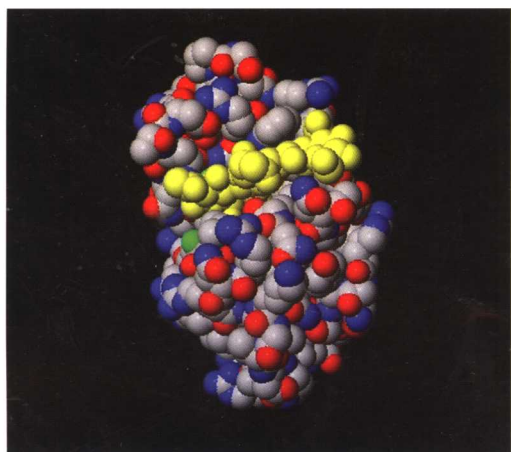


图5

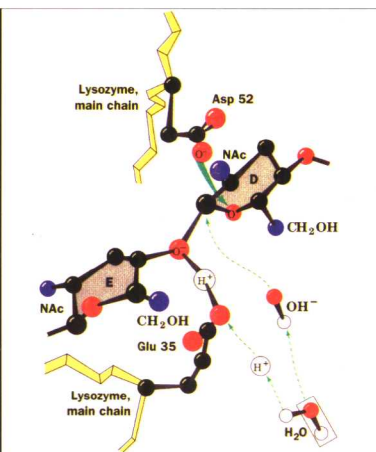


图6

溶菌酶结构及其作用机理。图5：溶菌酶有一个长的裂隙可以结合多糖的六个残基（黄色），溶菌酶的活性中心的氨基酸残基Glu35和Asp652以绿色表示。图6：溶菌酶催化机理示意图。

注：封面图示为单体SOD水溶液结构，11Å半径球代表由于SOD中Cu(II)诱导的顺磁扩展致使 ^1H NMR信号不能检测的区域。

该图来源于 ^{13}C Direct Detection Experiments on the Paramagnetic Oxidized Monomeric Copper, Zinc Superoxide Dismutase Wolfgang Bermel, Ivano Bertini, Isabella C. Felli, Rainer Kümmerle, and Roberta Pierattelli J. Am. Chem. Soc.; 2003; 125(52) pp 16423 – 16429

本书编委会

- 主 编** 袁勤生 (华东理工大学, 教授)
- 副主编** 赵 健 (华东理工大学, 副教授)
- 许建和 (华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 教授)
- 编 委** (以姓氏笔画为序)
- 王富军 (上海中医药大学, 副教授)
- 李素霞 (华东理工大学, 副教授)
- 李文杰 (中国科学院上海生化与细胞研究所, 研究员)
- 陈惠黎 (复旦大学基础学院, 教授)
- 张兴群 (东华大学生物工程系, 副教授)
- 范立强 (华东理工大学, 副教授)
- 周海梦 (清华大学生命科学与技术系, 教授)
- 胡红雨 (中国科学院上海生化与细胞研究所, 研究员)
- 赵 健 (华东理工大学, 副教授)
- 袁勤生 (华东理工大学, 教授)

第二版前言

随着生命科学和酶技术的飞速发展,酶学内容已获得极大的扩充。现代酶学亦非纯粹的学科,它与基因工程、蛋白质工程、细胞工程、发酵工程及现代生物技术密切相关,共同形成了互相渗透、交叉的不可分割的整体。在已进入 21 世纪的今天,深入探讨现代酶学的过去、今天和明天是十分有意义的。

本书是在原《现代酶学》和《酶与酶工程》基础上,为适应当代研究生、科技工作者的需要而重新编写的专业书籍,本书除保留原书的基本内容外,还增加了许多新的内容,由于现代酶学涉及内容十分广泛,故我们在编写过程中对章节的安排、内容的新颖性、深度和广度作了适当的调整,力求本书在介绍酶学基础的同时,努力描绘现代酶学的概貌和特点,并反映这个领域的最新进展。

全书共分 22 章,第 1 章至第 9 章为酶学的基础部分,这是了解酶和认识酶的基本前提。其余章节是本书的重点和研究热点,主要内容有:非水介质中的酶反应,酶的分子工程,核酶,抗体酶,模拟酶,分子印迹酶,自由基与酶,气体酶学,酶的组合生物催化,酶的定向进化及蛋白酶抑制剂的设计。在内容编排上,既有最基础的酶技术,又有酶学研究的热点和最新研究进展。

本书的参编者大都是原《现代酶学》、《酶与酶工程》的编委,部分是特邀编委,他们大部分是该领域内的专家,都承担着繁重的教学和科研任务,挤出时间参与本书的撰写工作。编者的许多在读研究生也积极参与了书稿的电脑输入、图表制作及文稿的校对工作,因此本书是集体智慧的结晶,也是集体创作的成果。由于杂务繁忙及学术水平有限,书中难免出现错漏或不足,恳切希望广大读者批评指正。

编 者

2007 年元月

于上海

目 录

第一篇 酶学理论

1 酶与应用酶学	3
1.1 酶学研究概况	3
1.2 从分子水平研究酶的结构与功能	4
1.2.1 酶的分子结构	4
1.2.2 结构与功能的研究	4
1.3 用分子生物学方法改进酶的催化特性及设计新酶	5
1.3.1 酶结构与功能关系研究是关键	5
1.3.2 基因工程酶	5
1.3.3 酶的蛋白质工程构建	5
1.4 构建新酶——核酶、抗体酶、模拟酶、分子印迹酶	6
1.4.1 核酶	6
1.4.2 抗体酶	6
1.4.3 模拟酶	7
1.4.4 分子印迹酶	8
1.5 酶工程中的若干应用热点	8
1.5.1 有机相酶反应	8
1.5.2 组合生物催化	9
1.5.3 生物催化的重要课题——酶法拆分	9
1.5.4 开辟酶或微生物转化合成的新途径	10
1.5.5 开发极端环境条件下的新酶种	11
1.5.6 发挥酶和微生物在环境整治中的作用	11
参考文献	11
2 酶的分类组成及结构特征	13
2.1 酶的分类和命名	13
2.1.1 酶学委员会的分类系统	13
2.1.2 酶学委员会推荐的命名法	17
2.2 酶的组成及结构特征	18
2.3 酶作为催化剂的特点	19
2.3.1 酶催化的高效性	19
2.3.2 酶的专一性	20
2.3.3 酶的调节性	21
2.4 酶的辅(助)因子	23

参考文献	24
3 酶作用动力学和酶的抑制作用	25
3.1 酶的基本动力学	25
3.1.1 Michaelis-Menten 方程	25
3.1.2 Briggs-Haldane 修饰的 Michaelis-Menten 方程	26
3.1.3 米氏方程的意义	27
3.1.4 米氏方程中 K_m , $V_{\max}$ 的测定	28
3.1.5 可逆反应的 Haldane 关系式	30
3.2 King-Altman 法推导酶动力学方程	31
3.3 酶的抑制动力学	36
3.3.1 酶的可逆抑制	36
3.3.2 酶的不可逆抑制	42
参考文献	50
4 酶活性的调节和酶的转换	52
4.1 通过配体诱导酶构象改变的活性调节	52
4.1.1 配体和蛋白质的结合	52
4.1.2 变构酶	60
4.2 通过酶共价结构改变的活性调节	67
4.2.1 共价结构不可逆改变的活性调节	67
4.2.2 共价结构可逆改变的活性调节	69
4.3 代谢途径中酶活性的调节	72
4.3.1 磷酸果糖激酶	72
4.3.2 磷酸化酶	74
4.4 酶的转换	75
4.4.1 酶合成的调节	76
4.4.2 酶降解的调节	76
参考文献	78
5 酶的作用机制	79
5.1 酶催化的化学机制	79
5.1.1 酸碱催化	79
5.1.2 共价催化	80
5.1.3 多元催化	81
5.1.4 金属离子催化	81
5.1.5 微观可逆原理	82
5.2 酶催化的专一性与高效性	83
5.2.1 过渡态和活化能	83
5.2.2 酶和底物的结合作用	84
5.2.3 邻近和定向效应	84
5.2.4 底物的形变和酶的诱导契合模型	86
5.2.5 微环境的影响	87

5.3 酶的活性部位柔性的假说	87
5.3.1 酶的活性丧失和整体构象变化的关系	88
5.3.2 酶活性部位的柔性	88
5.3.3 酶活性部位柔性和整体结构刚性的实例	89
5.4 辅因子在酶促反应中的作用	90
5.4.1 金属激活酶和金属酶	90
5.4.2 辅酶	92
5.5 酶作用机制的研究方法	99
5.5.1 动力学研究	100
5.5.2 “捕捉”酶-底物复合物	101
5.5.3 X射线晶体衍射法	102
5.5.4 质谱法	103
5.5.5 氨基酸侧链的化学修饰	103
5.5.6 定点突变	104
5.6 酶反应机制实例	106
5.6.1 丝氨酸蛋白酶	106
参考文献	115
6 同工酶	116
6.1 同工酶的结构基础	116
6.1.1 同工酶的一级结构的差异	116
6.1.2 构象变化造成同工酶的差异	118
6.1.3 同工酶亚基的杂交	119
6.2 同工酶与基因	120
6.2.1 单基因决定的同工酶	120
6.2.2 多基因决定的同工酶	120
6.2.3 复等位基因决定的同工酶	121
6.2.4 修饰同工酶	121
6.3 同工酶的分离、纯化及鉴定	122
6.3.1 几种常用分离和测定同工酶的方法	122
6.3.2 同工酶类型的鉴别	123
6.4 同工酶的应用	125
6.4.1 同工酶与临床诊断	125
6.4.2 遗传与进化中的同工酶	126
6.4.3 代谢调节中的同工酶	129
6.4.4 肿瘤状态下同工酶谱改变的生物学意义	133
6.4.5 发育与分化中的同工酶	134
参考文献	136
7 酶化学修饰的定量处理及不可逆抑制动力学	137
7.1 Ray-Koshland 方法	137
7.2 邹承鲁作图法	139

7.3 酶化学修饰的动力学机制	147
7.3.1 不可逆反应	147
7.3.2 可逆反应	148
7.3.3 形成中间体复合物	148
7.4 利用失活动力学确定酶配位体解离常数	149
7.4.1 由不可逆失活动力学机制确定酶配体的解离常数	149
7.4.2 存在中间体复合物的失活动力学反应的酶- 配体的解离常数的确定	150
7.4.3 酶化学修饰反应的 pH 效应	151
7.5 酶活性修饰过程中底物反应动力学	152
7.5.1 单底物酶反应, 非配合型抑制剂	152
7.5.2 单底物酶反应, 配合型抑制剂	155
7.5.3 双底物酶反应, 非配合型抑制剂	156
7.5.4 双底物酶反应, 配合型抑制剂	160
7.5.5 可逆抑制剂和不可逆抑制剂的底物竞争性概念的统一	165
7.6 不可逆抑制动力学在其他方面的应用	165
7.6.1 酶脱配体的动力学	165
7.6.2 酶在变性剂中失活的动力学	166
参考文献	169
8 氧自由基与酶	170
8.1 氧自由基在生物体内的作用	170
8.1.1 自由基的生物学意义	170
8.1.2 生命过程中某些重要的自由基反应	170
8.2 生物体内自由基的产生和清除	171
8.2.1 生物体内自由基的产生	172
8.2.2 自由基的清除	178
8.3 生物体内一些重要的抗氧酶	183
8.3.1 超氧化物歧化酶	183
8.3.2 过氧化氢酶	194
8.3.3 谷胱甘肽过氧化物酶	198
8.3.4 谷胱甘肽转硫酶	203
8.3.5 其他过氧化物酶	204
8.3.6 过氧化氢酶与谷胱甘肽过氧化物酶的协同作用	206
参考文献	207
9 酶与细胞的信号转导	208
9.1 细胞膜受体的类型	208
9.1.1 离子通道偶联受体	209
9.1.2 G 蛋白偶联受体	209
9.1.3 酶偶联受体	209
9.2 G 蛋白家族	209

9.2.1	异三聚体 G 蛋白	210
9.2.2	小分子 G 蛋白	212
9.3	产生第二信使的酶	214
9.3.1	核苷酸环化酶	214
9.3.2	产生脂类信号分子的酶	216
9.4	蛋白质激酶	222
9.4.1	环核苷酸依赖性蛋白激酶	222
9.4.2	脂类依赖性蛋白激酶	224
9.4.3	钙调蛋白依赖性蛋白激酶	228
9.4.4	丝裂源激活蛋白激酶信号流中的蛋白激酶家族	230
9.4.5	酪氨酸蛋白激酶	232
参考文献		235

第二篇 应用酶学

10	非水介质中的酶催化反应	239
10.1	非水介质酶催化反应及其特征	239
10.2	非水介质中酶的结构与性质	240
10.2.1	非水介质中酶的结构	240
10.2.2	非水介质中的酶学性质	242
10.3	微水有机溶剂体系	244
10.3.1	水的作用及其调控	244
10.3.2	有机溶剂的影响与反应介质工程	250
10.3.3	酶的选择与催化剂工程	254
10.4	“pH 记忆”与“分子印迹”技术	258
10.5	反向胶团的酶学研究	259
10.5.1	反向胶团的形成与酶的包覆	259
10.5.2	反向胶团包覆酶的催化特性	260
10.5.3	反向胶团酶学的应用	261
10.6	水-有机溶剂两相体系	262
10.6.1	两相体系的特点与构成	262
10.6.2	固定化催化剂在两相体系中的应用	262
10.6.3	两相体系的应用	263
10.7	酶在非水介质中的催化反应	263
10.7.1	酶催化反应的类型	263
10.7.2	脂肪酶及其对映体的催化作用原理	267
10.8	应用实例	271
10.8.1	光学活性化合物的制备	271
10.8.2	旋光性高分子	273
10.8.3	功能高分子的合成	274

10.8.4 用于生产精细化工产品的酶	275
参考文献	279
11 酶的化学修饰	281
11.1 设计酶化学修饰的注意点	281
11.2 影响酶化学修饰的主要因素	282
11.2.1 影响酶蛋白功能基的反应性	282
11.2.2 影响修饰剂的反应性	284
11.3 酶化学修饰方法	285
11.3.1 修饰反应专一性的控制	285
11.3.2 修饰程度和修饰部位的测定	287
11.4 酶分子侧链基团的化学修饰	289
11.4.1 几种重要的修饰反应	289
11.4.2 特定氨基酸残基侧链基团的化学修饰	291
11.4.3 化学修饰反应的条件控制	297
11.5 酶的亲和修饰	298
11.5.1 亲和标记	298
11.5.2 外生亲和试剂与光亲和标记	299
11.6 有机大分子对酶的化学修饰	301
11.6.1 聚乙二醇	301
11.6.2 右旋糖酐及右旋糖酐硫酸酯	304
11.6.3 具有生物活性的大分子物质	305
11.6.4 酶的化学交联	307
11.7 酶化学修饰实例——SOD 的化学修饰	307
11.7.1 修饰剂与修饰方法	308
11.7.2 修饰 SOD 的性质	312
11.8 修饰酶的性质及特点	314
11.8.1 热稳定性	314
11.8.2 抗原性	315
11.8.3 最适 pH	316
11.8.4 酶学性质的变化	316
11.8.5 对组织的分布能力变化	317
参考文献	318
12 核酶	320
12.1 核酶的分类	320
12.2 大分子核酶的结构及催化机理	321
12.2.1 I 型内含子的自我剪接	321
12.2.2 II 型内含子的自我剪接	324
12.2.3 RNase P 核酶	325
12.3 小分子核酶的结构及催化机理	326
12.3.1 锤头状核酶	326

12.3.2	发夹状核酶	328
12.3.3	肝炎 δ 病毒 (HDV) 核酶	328
12.3.4	VS 核酶	330
12.4	脱氧核酶	331
12.4.1	具有水解酶活性的脱氧核酶	332
12.4.2	具有 <i>N</i> -糖基化酶活性的脱氧核酶	333
12.4.3	具有连接酶活性的脱氧核酶	333
12.4.4	其他酶活性	334
12.5	核酶的应用	334
12.5.1	抗 HIV 感染	335
12.5.2	抗肝炎病毒感染	335
12.5.3	肿瘤治疗	335
	参考文献	337
13	模拟酶	339
13.1	环糊精模拟酶模型	339
13.1.1	水解酶的模拟	340
13.1.2	核酸酶的模拟	341
13.1.3	转氨酶的模拟	342
13.2	大环聚醚及其模拟酶	342
13.2.1	水解酶的模拟	343
13.2.2	肽合成酶的模拟	344
13.3	膜体系及其模拟酶	345
13.3.1	胶束酶模型	346
13.4	聚合物及其模拟酶	347
13.5	金属卟啉及其模拟酶	348
13.6	肽酶	348
13.7	SOD 的模拟	349
13.7.1	Cu,Zn-SOD 的模拟	349
13.7.2	Mn-SOD 的模拟	350
13.7.3	Fe-SOD 的模拟	350
13.7.4	超氧化物歧化酶的功能模拟	351
	参考文献	351
14	抗体酶	353
14.1	抗体酶诞生的理论基础	353
14.2	抗体酶的制备方法	354
14.2.1	诱导法	354
14.2.2	引入法	355
14.2.3	拷贝法	356
14.2.4	基因工程方法	356
14.3	抗体酶催化的反应类型	357

14.3.1	磷酸酯水解反应	358
14.3.2	磺酸酯闭环反应	358
14.3.3	酰基转移反应	359
14.3.4	重排反应	359
14.3.5	氧化-还原反应	360
14.3.6	金属螯合反应	360
14.4	抗体酶的应用	361
14.4.1	有机合成和手性药物拆分	361
14.4.2	前药的应用	362
14.5	抗体酶的研究展望	363
	参考文献	364
15	分子印迹酶	366
15.1	分子印迹概念	366
15.2	分子印迹技术的分类	367
15.2.1	预组织法	367
15.2.2	自组装法	368
15.2.3	自组装和预组织相结合方法	368
15.2.4	金属离子配位方法	369
15.3	分子印迹聚合物的制备	369
15.3.1	分子印迹聚合物的制备方法	369
15.3.2	影响分子印迹聚合物选择性的因素	370
15.4	分子印迹酶应用实例	371
15.4.1	人工合成抗体酶	371
15.4.2	人工模拟受体	373
15.4.3	药物筛选	374
15.4.4	生物印迹酶	376
	参考文献	377
16	组合生物催化	379
16.1	组合生物催化的理论基础和特点	379
16.1.1	理论基础	379
16.1.2	组合生物催化的特点	380
16.2	组合生物催化中的酶	381
16.2.1	生物催化组合合成	381
16.2.2	用于组合生物催化反应的酶的特点	382
16.3	组合生物催化的类型	385
16.3.1	非水介质中的生物催化	385
16.3.2	酶作为组合合成的脱保护工具	386
16.3.3	固定化酶催化	386
16.4	组合生物催化实例	388
16.4.1	构建小分子库	388

16.4.2	构建天然产物库	389
16.4.3	生物催化用于组合库的后合成修饰	392
16.4.4	结论和展望	393
	参考文献	394
17	酶的定向进化	396
17.1	酶的定向进化简介	396
17.1.1	酶分子定向进化的基本原理	396
17.1.2	酶分子定向进化的研究史	398
17.1.3	应用前景	399
17.2	定向进化的策略	400
17.2.1	易错 PCR 技术为代表的无性进化	400
17.2.2	DNA 改组技术为代表的有性进化	401
17.2.3	基因家族之间的同源重组	404
17.3	突变基因文库的构建与筛选	405
17.3.1	构建理想的基因文库要考虑的因素	405
17.3.2	突变体基因的构建策略	406
17.3.3	构建突变基因文库的载体系统	407
17.3.4	文库的筛选	408
17.4	定向进化的应用	411
17.4.1	提高酶分子的催化活力	411
17.4.2	提高酶分子的稳定性	412
17.4.3	提高底物的专一性和增加对新底物催化活力的进化	413
	参考文献	414
18	蛋白酶抑制剂设计与药物	416
18.1	天冬氨酸蛋白酶类抑制剂	416
18.1.1	血管紧张素转化酶	416
18.1.2	HIV 蛋白酶抑制剂的设计	418
18.2	基质金属蛋白酶	423
18.2.1	基质金属蛋白酶抑制剂	424
18.2.2	抑制剂的设计	425
18.3	丝氨酸蛋白酶抑制剂	426
18.3.1	体内凝血过程中丝氨酸蛋白酶抑制剂的作用	426
18.3.2	Xa 因子的抑制剂	426
18.3.3	组合肽库法	427
18.4	半胱氨酸蛋白酶	429
18.4.1	半胱氨酸蛋白酶在人体内的病理学作用	429
18.4.2	溶酶体半胱氨酸蛋白酶(LCP)	430
18.4.3	溶酶体半胱氨酸蛋白酶的结构和作用机理	430
18.4.4	酶原激活	431
18.4.5	溶酶体半胱氨酸蛋白酶的天然抑制剂	432