



生化分析

李元宗 常文保 编著



高等教育出版社

生 化 分 析

李元宗 常文保 编著

高等教育出版社

内容提要

本书是北京大学生化分析教研组以教学实践为基础,参考国内外有关书目,结合自身多年从事的科学研究编写的生化分析教材。内容包括:酶法分析、蛋白质分析、免疫分析、核酸分析、氨基酸分析、糖分析、生物大分子分离纯化技术七章。

本书适用于生化专业作为本科教材或化学及相关专业作为研究生教材。

图书在版编目(CIP)数据

生化分析/李元宗,常文保编著. —北京:高等教育出版社, 2003.1

ISBN 7-04-011175-6

I. 生... II. ①李...②常... III. 生物化学-化学分析 IV. Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 039421 号

生化分析

李元宗 常文保 编著

出版发行 高等教育出版社

社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号

邮政编码 100009

传 真 010-64014048

购书热线 010-64054588

免费咨询 800-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

经 销 新华书店北京发行所

印 刷 煤炭工业出版社印刷厂

开 本 787×960 1/16

印 张 19.75

字 数 360 000

版 次 2003 年 1 月第 1 版

印 次 2003 年 1 月第 1 次印刷

定 价 30.80 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

前 言

随着自然科学的发展,学科交叉已成为其发展的主流之一,而探索生命的奥秘可以说是这一发展趋势的一个典型代表。如何从分子水平来研究生命过程,给当代科学家们提出了新的挑战,也展现了一个可以大有作为的新天地。近年来许多从事化学研究的科学工作者将重点转移到与此相关的领域。显而易见,生物化学分析(简称生化分析)是科学家达到自己追求目标的手段。并且,理科化学教学指导委员会已将其列为化学系本科生的教学基本内容之一。为适应这一潮流,北京大学化学系1992年为本科生开设了生物化学课,作为必修基础课之一,同年为硕士研究生开设了生物化学分析课。早在1994年,在西安召开的全国分析化学教学建设组工作会议上,就将生物化学分析列入了教材建设项目。而将为生物化学分析课编写的讲义提高到一本教材正式出版,是一件十分繁重的任务。为此,我们经过了多年的努力,包括请教专家、征求学生意见,也融进了我们多年从事免疫分析、酶法分析、核酸分析等等的成果和体会。现在把它整理后写成这本书,希望能对从事生化分析或相关领域研究的学生或研究人员有所帮助。

生化分析是一门内容非常广泛的学科,本书将主要介绍最为基本的内容。按我们的理解生化分析应该包括生命活性物质的分析和利用生物化学技术(如:酶法分析、免疫分析及核酸分子杂交分析等)所进行的分析,对于生物活性物质的分析,本书选取了蛋白质、核酸、氨基酸及糖作为代表,对它们的分析进行了介绍,生物活性物质的种类还有很多,限于篇幅所限,难以全面介绍。本书对生化分析及一般分析化学都很重要的分析技术(如:光谱分析、色谱分析等)不做讨论,必要时读者可参考有关的书。本书在写作中注意从分析原理、研究现状到发展趋势,并在每章的后面列出一些参考书或文献以便读者进一步阅读。

本书系初次编写,错漏和不当之处在所难免,十分欢迎广大读者批评指正。

作者

2002年1月

于北京大学

目 录

第 1 章 酶法分析	1
1.1 酶及酶催化反应	1
1.1.1 酶活性的概念	2
1.1.2 酶催化反应的类型及酶的编号	2
1.1.3 酶催化反应的特性	5
1.1.4 酶催化反应的动力学	6
1.1.5 影响酶催化反应的因素	13
1.2 酶法分析的检测技术	16
1.2.1 酶活性的测定	17
1.2.2 底物的测定	18
1.2.3 抑制剂及活化剂的测定	19
1.2.4 酶的检测方法	20
1.3 酶固定化技术与酶传感器	22
1.3.1 酶固定化方法	22
1.3.2 酶电极	25
1.3.3 流动系统中的固定化酶	32
1.3.4 固定化酶在分析流动系统中的应用	33
1.4 酶活性测定的应用	38
1.4.1 细胞内酶活性的测定	38
1.4.2 工业过程及产品中酶的测定	40
1.4.3 酶在生化分析中应用的发展趋势	45
参考文献	47
第 2 章 蛋白质分析	48
2.1 蛋白质的分类及结构	48
2.1.1 蛋白质的基本组成单位——氨基酸的结构	48
2.1.2 多肽的结构	48
2.1.3 蛋白质的分类	50
2.2 蛋白质分析的意义	56
2.3 蛋白质分析方法	57
2.3.1 光谱法	58
2.3.2 化学方法	60
2.3.3 染料结合法	63
2.3.4 分离及生物分析法	67

参考文献	68
第3章 免疫分析	69
3.1 抗原、抗体及其反应	71
3.1.1 抗原	71
3.1.2 抗体	76
3.1.3 抗原与抗体的反应	92
3.2 免疫分析中的分离方法	96
3.2.1 免疫分析对分离技术的要求	97
3.2.2 分离方法的分类	97
3.2.3 免疫学分系统	98
3.3 免疫分析方法的建立及其优化	102
3.3.1 免疫分析中的抗体位点占据原理	102
3.3.2 分析条件的优化	106
3.3.3 免疫分析方法的分类	109
3.4 酶免疫分析(Enzyme Immunoassay)	112
3.4.1 酶标记试剂	114
3.4.2 游离标记物与与抗体结合的标记物的分离	116
3.4.3 固定相的选择	116
3.4.4 影响酶免疫分析的因素	117
3.4.5 酶免疫分析应用举例(酶免疫分析试纸用于吗啡的分析)	119
3.5 荧光免疫分析	122
3.5.1 荧光标记物	122
3.5.2 生物体液中荧光测定的局限性	124
3.5.3 荧光免疫分析的仪器	125
3.5.4 均相荧光免疫分析	125
3.5.5 非均相荧光免疫分析	129
3.6 免疫分析在毒物学方面的应用	135
3.6.1 方法及技术	135
3.6.2 分析毒物学方面的应用	136
3.7 免疫分析发展的趋势	139
3.7.1 基因工程抗体	139
3.7.2 生物素-亲和素(Biotin-(Streptavidin)Avidin Couple,简称ABC)体系的 多重标记	141
3.7.3 自动化和实用的免疫分析法	142
3.7.4 基于温敏水凝胶的相分离免疫分析	144
参考文献	144
第4章 核酸分析	146
4.1 脱氧核糖核酸及核糖核酸的结构	146

4.1.1 碱基、核苷及核苷酸	147
4.1.2 DNA 的结构	148
4.1.3 RNA 的结构	151
4.2 核酸的定量及结构分析	152
4.2.1 免疫化学法	152
4.2.2 色谱及电泳法	156
4.2.3 光谱法	156
4.3 小分子与核酸相互作用的研究	164
4.3.1 小分子与核酸的相互作用模式	165
4.3.2 小分子药物与核酸的相互作用	170
4.3.3 核酸小分子探针的研究	172
4.4 DNA 序列的测定	176
4.4.1 人类基因组项目 (Human Genome Project)	177
4.4.2 特异性化学裂解法快速测定 DNA 序列	177
4.4.3 Sanger 链终止 DNA 测序法	181
4.4.4 高效毛细管凝胶电泳及超薄板凝胶电泳	182
4.4.5 非凝胶 DNA 测序研究进展	184
4.5 核酸分子杂交分析与基因诊断	187
4.5.1 核酸分子杂交的概念及原理	187
4.5.2 基因诊断的原理、意义	187
4.5.3 基因诊断的途径	189
4.5.4 基因探针 (包括放射性及非放射性同位素标记法)	190
4.5.5 探针的标记	197
4.5.6 基因诊断的实验技术和方法	203
参考文献	210
第 5 章 氨基酸分析	211
5.1 氨基酸的基本结构及性质	211
5.1.1 氨基酸的分类	213
5.1.2 氨基酸的异构化	213
5.1.3 氨基酸的离子特性	214
5.1.4 氨基酸在生物体内的转化	217
5.1.5 肽	218
5.2 氨基酸的定量斑点分析	220
5.2.1 斑点显色分析法	220
5.2.2 斑点荧光分析法	220
5.3 色谱方法	221
5.3.1 离子交换色谱法	221
5.3.2 反相色谱分析法	224

5.3.3 气相色谱法 (GC)	226
5.3.4 氨基酸的电泳分析法	227
5.4 基于氨基酸选择性反应的分析方法	228
5.4.1 显色分析法	228
5.4.2 荧光方法	228
5.4.3 微生物方法	228
5.4.4 酶分析法	229
5.5 氨基酸分析中存在的问题及发展趋势	230
参考文献	231
第 6 章 糖的分析	232
6.1 糖的结构	232
6.2 糖的化学分析法	233
6.2.1 羰基的反应	234
6.2.2 多糖的结构分析	235
6.3 糖的酶法分析	239
6.3.1 基于葡萄糖氧化酶的葡萄糖分析	239
6.3.2 基于葡萄糖脱氢酶或己糖激酶的葡萄糖分析法	241
6.3.3 其它己糖分析方法	242
6.4 糖混合物的分离鉴定	243
6.4.1 纸色谱及薄层色谱法	243
6.4.2 气相色谱法	244
6.4.3 高效液相色谱法 (HPLC)	246
6.4.4 高效毛细管电泳法 (HPCE)	246
参考文献	247
第 7 章 生物大分子分离纯化技术	248
7.1 生物样品的常规分离纯化方法	248
7.1.1 透析	248
7.1.2 微过滤	250
7.1.3 盐析法	251
7.1.4 冷冻干燥	252
7.1.5 离心	253
7.2 生化分析样品的准备与预处理	257
7.2.1 样品的类型、采集及保存	257
7.2.2 酶样品的准备	260
7.3 电泳法	264
7.3.1 基本原理	264
7.3.2 影响电泳分离的因素	265
7.3.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳	266

7.3.4 琼脂糖凝胶电泳·····	272
7.3.5 高效毛细管电泳·····	276
7.4 液相色谱法·····	287
7.4.1 排阻色谱·····	288
7.4.2 亲和层析·····	293
7.4.3 离子交换色谱·····	296
7.4.4 反相及疏水作用色谱法·····	298
7.4.5 液-液分配色谱·····	298
7.4.6 场流分级分离法·····	299
7.4.7 灌注层析法·····	299
参考文献·····	302

第1章 酶法分析

酶是生物体内产生的、具有催化功能的蛋白质。酶的这一定义应当这样理解:所有的酶都是蛋白质,但不能说所有的蛋白质都是酶,只有具有催化功能的蛋白质才称为酶。既然酶是蛋白质,就由氨基酸组成,并且具有两性电解质的性质,具有一、二、三、四级结构;酶是一种生物催化剂,具有催化剂的共性:酶可以降低生化反应的活化能,使活化分子数大大增加,故少量的酶即可大大加快反应速度;只改变反应速度而不改变反应的平衡点,即酶加速达到平衡而不改变平衡的位置,它不能催化热力学上不能进行的反应;酶参加生化反应前后无变化,故可以重复使用。与化学催化剂相比,酶具有以下特性:

(1) 来源不同,酶来自生物体。目前,人们尚无法用有机化学方法合成酶分子。酶是活细胞产生的蛋白质,它不像化学催化剂往往要求高温、高压,而是在较温和的条件下进行催化反应,如常温、常压和中性的 pH 环境。

(2) 酶催化效率非常高,比化学催化剂高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。

(3) 酶具有高度的特异性,酶对其催化的对象有高度的选择性,也即酶的底物专一性。所谓“底物”(substrate),就是接受酶的作用引起化学反应的物质。通常将被酶作用的物质称为该酶的底物。一种酶只作用于一种或一类底物,酶催化反应几乎没有副产物,这就是酶的特异性。

(4) 酶易失活,酶与化学催化剂相比更加脆弱。凡能使蛋白质变性的因素,如高温、强酸、强碱、重金属盐或紫外线照射均能使其失去催化活性。另外,对结合蛋白质一类的酶,若将其辅助因子(小分子物质或重金属离子)除去,酶也失去活性。

分析化学家们充分注意到了酶的这些特性,特别是利用了酶促反应的高度专一性与分析化学的研究思路相结合,建立起了很有特色的酶分析方法,已经得到了广泛的应用。

1.1 酶及酶催化反应

酶法分析基于酶催化的反应,酶活性及酶催化的反应受各种因素的影响,只有对它们的一般规律有了较深的理解,才能很好地控制酶催化的反应,以得到可靠的分析数据。下面分别介绍酶活性及酶催化的反应。

1.1.1 酶活性的概念

由于酶是一种蛋白质催化剂,它的催化活性易受环境因素的影响,在储存过程中会失活,所以一般很难得到非常纯的酶。对一般的化学试剂,其纯度一般在90%~100%之间,而对于酶制剂,其纯度通常在1%~5%之间。同时,由于大多数酶的分子量是未知的,所以,酶量通常很难用经典单位,如质量、体积或物质的量浓度来表示。酶的量一般用酶活性单位或酶活力(Enzyme Activity)来表示。酶的活性是指其催化一定的反应的能力。酶的活性单位(Activity Unit)指的是在一定条件下,单位时间内底物的减少量或产物的增加量。也即酶量的多少以酶的催化能力来度量,实际上是通过测定酶的催化反应的速度来表达。酶活力的测定是研究酶的特性、进行酶制剂的生产及研究其应用时的一项必不可少的指标。在对酶的前期研究工作中,由于对同一种酶采用不同的测定方法时所得的结果不同,对活性单位的定义也不同,这使得不同实验室所得到的结果无法进行比较。为了解决这一问题,1961年第五届国际生化会议采纳了IUPAC及国际生化协会酶委员会推荐的酶国际单位IU(International Unit)的定义:即在特定条件下1min内将1 μ mol的底物转化为产物所需酶的量,这样一个酶的量就叫1IU的酶。在报导酶的活性时应采用固定的温度(建议用25℃)、pH和底物的浓度。酶的国际单位虽是一个统一的标准,但使用并不普遍,一是不如习惯用法方便,二是在某些测活性方法中难以办到。对于酶的制剂则常用每毫升或每升溶液中酶的活性单位数(IU/ml; IU/l)来表示。1973年国际酶学委员会推荐了一个新的标准国际酶活性单位卡达尔(Katal),1Katal定义为1s内将1mol底物转化为产物所需酶的量,它与国际单位IU之间的关系为:

$$1 \text{ Kat} = 1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = 60 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} = 60 \times 10^6 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} = 6 \times 10^7 \text{ IU};$$
$$1 \text{ nKat} = 0.06 \text{ IU}$$

酶的比活性(Specific Activity)又叫比活力,定义为每毫克酶蛋白所具有的催化活性,即IU/mg(蛋白质)。比活性越高,酶纯度愈高或酶的活性结构保持的愈好。用比活性进行酶制剂间相对活性的比较或酶制剂纯度的检测比较方便。

1.1.2 酶催化反应的类型及酶的编号

根据酶所催化的反应类型,可将其分为六大类,在每种大的类型下,根据参与反应的底物、辅酶、或基团可进一步分类。这六大类如表1-1所示:

每种具体的酶的分类编号都由四位编码的数字组成,编号之前均冠以EC,每位数的意义如下:

酶的名称(EC W.X.Y.Z)

表 1-1 酶的国际分类表(大类及部分亚类)

酶的类型	部分亚类
氧化还原酶(Oxidoreductases) (亚类表示底物中发生反应的供体基团的性质)	1. 作用于供体的 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH—OH} \end{array}$ 2. 作用于供体的醛基或酮基 3. 作用于供体的 —HC—CH— 4. 作用于供体的 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH—NH}_2 \end{array}$ 5. 作用于供体的 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH—NH—} \end{array}$ 6. 作用于 NADH 或 NADPH
转移酶(Transferases) (亚类表示底物中被转移基团的性质)	1. 转移一碳基团 2. 转移醛基或酮基 3. 转移酰基 4. 转移糖苷基 5. 转移甲基以外的烷基或芳基 6. 转移含氮基团 7. 转移磷酸基 8. 转移含硫基团
水解酶(Hydrolases) (亚类表示被水解的键的类型)	1. 水解酯键 2. 水解糖苷键 3. 水解醚键 4. 水解肽键 5. 水解其它 C—N 键 6. 水解酸酐键
裂合酶(Lyases) (亚类表示分裂下来的基团与残余分子间的键的类型)	1. C—C 2. C—O 3. C—N 4. C—S 5. C—X(X= 卤素原子) 6. P—O
异构化酶(Isomerases) (亚类表示异构的类型)	1. 消旋及差向异构酶 2. 顺反异构酶 3. 分子内氧化还原酶 4. 分子内转移酶 5. 分子内裂合酶
连接酶(Ligases) (亚类表示新形成的键的类型)	1. C—O 2. C—S 3. C—N 4. C—C 5. 磷酸酯键

EC——是 Enzyme Commission (酶学委员会)之缩写;

W——指出催化反应的类型(1~6);

X——指出该酶属于哪一个亚类,即指出参与反应的一般底物及基团;

Y——指出该酶属于哪一个亚-亚类,即指出催化反应特殊的底物或辅酶;

Z——指出该酶在亚-亚类中的编号,即酶的系统编号(与酶被发现的早晚及来源有关)。

例如:醇脱氢酶(EC 1.1.1.1),其中第一个“1”代表氧化还原酶类;第二个“1”代表以 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-OH} \end{array}$ 基为供体的酶类;第三个“1”代表 NAD 或 NADP 为受体;而第四个“1”则与具体的酶相关,它是同一类酶的顺序编号,一般与其发现的

表 1-2 临床常用酶的命名及分类

EC 编号	习惯用名	普通缩写	标准缩写	系统命名
1.1.1.27	乳酸脱氢酶	LDH	LD	L-乳酸:NAD ⁺ 氧化还原酶
1.1.1.30	α -羟丁酸脱氢酶	HBDH	HBH	D-3-羟丁酸:NAD ⁺ 氧化还原酶
1.1.1.49	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	G-6-PDH	G6PD	D-葡萄糖-6-磷酸:NADP ⁺ 氧化还原酶
1.4.1.3	谷氨酸脱氢酶	GDH	GLDH	L-谷氨酸:NAD(P) ⁺ 氧化还原酶
1.16.3.1	亚铁氧化酶	CP	CP	亚铁:氧化还原酶
2.3.2.2	γ -谷酰转移酶	GGTP	GGT	(γ -谷氨酰)肽:氨基酸 γ -谷氨酰转移酶
2.6.1.2	丙氨酸氨基转移酶	GPT	ALT	L-丙氨酸: α -酮戊二酸转氨酶
2.6.1.10	门冬氨酸氨基转移酶	GOT	AST	L-天冬氨酸: α -酮戊二酸转氨酶
2.7.3.2	肌酸激酶	CPK	CK	ATP:肌酸 N-磷酸转移酶
3.1.1.3	脂肪酶	LPS	LPS	三酰基甘油酯酰基水解酶
3.1.1.8	胆碱酯酶	CHS	CHS	酰基胆碱酰基水解酶
3.1.3.1	碱性磷酸酯酶	ALP	ALP	正磷酸单酯磷酸水解酶(碱性条件)
3.1.3.2	酸性磷酸酯酶	ACP	ACP	正磷酸单酯磷酸水解酶(酸性条件)
3.1.3.5	5'-核苷酸酶	NTP	5'NT	5'-核糖核苷酸磷酸水解酶
3.2.1.1	α -淀粉酶	AMS	AMS	1,4-D-葡聚糖葡萄糖水解酶
3.2.1.30	β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶	NAG	NAG	β -2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖苷乙酰氨基脱氧糖水解酶

先后一致,先发现的序号排在前,后发现的排在后。又如:醛脱氢酶(EC 1.2.1.3);谷丙转氨酶(EC 2.6.1.2);在酶学手册中,都按酶的编号给出了一系列的信息,顺序是:酶的编号、系统名称、习惯名称、反应式、酶的来源、酶的性质等。现将临床常用的酶的命名、缩写与分类举例如表 1-2 所示:

1.1.3 酶催化反应的特性

酶作为一种催化剂,它只加速反应的进程,而不改变反应平衡的位置。酶可以使反应至少加速一百万倍,如碳酸酐酶可使二氧化碳的水合反应加速 10^7 倍。酶对反应的加速是通过形成酶与底物的复合物以降低反应的活化自由能 ΔG 实现的(图 1-1)。这种复合物的形成为反应提供了一条新的途径,它的过渡态能量要比没有酶条件下相应反应所需的能量低得多。

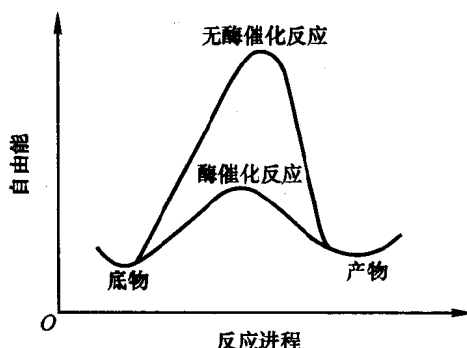


图 1-1 酶通过降低反应的活化自由能加速反应

酶的高效催化活性一般归因于以下四个方面:

(1) 活性中心的化学结构,它可以诱导致使底物的化学键变形或极化,其结果使底物基态的能量提高,因而具有更高的反应活性。

(2) 底物与酶的结合部位对底物的固定化作用,使底物与其它参与化学反应的基团接近,使底物分子进入酶的活性中心区域,因而使很多反应类似于分子内反应,这称之为接近效应(Proximity Effect),其结果是大大提高了活性中心区域的底物有效浓度,使参与反应的基团的有效浓度非常高,因而比一般的分子间反应的速率要高得多。

(3) 使底物正确而有利的定向,这使得进行每一步反应时底物的键只发生最小程度的移动或旋转,因而使反应只需要最低的活化能,另外活性部位合适的电荷分布和有利的几何形状也是影响过渡态能量的两个因素。

(4) 多功能基团间的协同催化作用。酶的上述特性彼此不能分离,共同加

速酶催化反应的速率,使酶成为最强有力的催化剂。

酶所催化的反应对反应的底物来说具有高度的专一性,一种酶通常催化一个单一的反应或一组密切相关的反应。如 DNA 聚合酶 I,它以 DNA 的一条链为模板,用四种 2'-脱氧核苷三磷酸合成模板 DNA 的互补链,合成过程严格按碱基配对原则进行,在新合成的 DNA 链中,核苷酸加入错配的概率低于百万分之一。酶催化反应的高度专一性取决于它与底物形成复合物的高度专一性。底物结合在酶的活性中心。酶的活性中心是结合底物(辅基,如果有辅基的话)以及提供直接参与键的形成和断裂的残基的区域。这些残基称为催化基团。各种酶的活性中心具有一些共同的特点:

(1) 活性部位仅占酶整个体积的一小部分,即酶分子中大多数残基并不与底物接触。值得思考的一个问题是为什么几乎所有的酶都由 100 个以上的氨基酸残基所组成。

(2) 酶的活性部位是一个三维实体,由来自氨基酸序列上不同部位的残基所组成,如溶菌酶活性中心上重要的基团是 129 个氨基酸的线性顺序中第 35、52、62、63 和 101 位残基提供的。正因为如此,天然酶结构的微小变化常常会引起其催化活性的巨大变化。

(3) 酶的三维活性中心是裂缝或裂隙,常是一个疏水的环境,底物就存在于这样的一个环境中。有些氨基酸残基与底物的定向相关,因而与酶的特异性有关,而有些氨基酸残基则参与了催化反应,这些氨基酸也存在于活性三维实体的裂缝中。与催化反应有关的氨基酸残基是离子性的或者说是具有活性的,这些氨基酸包括组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸及谷氨酸和天冬氨酸。另外,溶液中离子的结合,特别是阳离子,也会有助于底物的定位和催化反应的进行。

(4) 底物与酶之间是以一种弱的力结合在一起的,二者复合物的平衡常数可在 $10^{-2} \sim 10^{-8} \text{ mol/l}$ 的范围内变化,对应的相互作用的自由能的变化在 $-12.5 \sim -50 \text{ kJ/mol}$,而共价键自由能的变化范围为 $-209 \sim -460 \text{ kJ/mol}$ 。

(5) 结合的专一性取决于活性中心部位中原子的确定排布方式,也就是说,底物应具有与活性中心相匹配的外形。从近来的发展来看,有些酶的活性中心并不是刚性不变的,而是在与底物结合的过程中可以有所变化,即所谓诱导契合。

1.1.4 酶催化反应的动力学

由于酶反应的专一性和灵敏性,酶在分析化学中有很大的应用潜力。多年来,酶动力学方法已用于测定底物、酶、激活剂和抑制剂。从分析的角度考虑掌握酶反应系统的动力学理论是非常重要的。

根据质量作用定律,化学反应的速度与反应试剂浓度的乘积成正比。这表

明对单一组分参加的反应,其反应速度直接与反应试剂的浓度成正比,而对二组分反应,反应速度与两种反应试剂浓度的乘积成正比。这种关系可以表示为:

速度 $\propto k[\text{试剂}]$ 单一试剂反应

速度 $\propto k[\text{试剂}_1][\text{试剂}_2]$ 两种试剂参加的反应

式中 k 为反应速率常数,两个反应分别为一级和二级反应。有时,增加反应试剂的浓度时反应速率并不增加,这样的反应称之为零级反应。

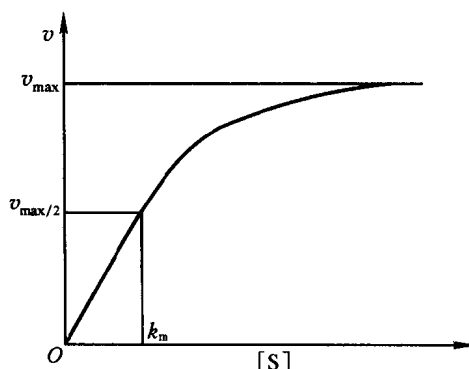
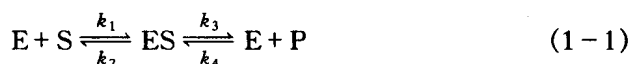


图 1-2 反应速度 v 随底物浓度 $[S]$ 的变化曲线

对于酶反应,其反应动力学的预测是非常复杂的。但在研究底物浓度对反应速度的影响时,总是得到如图 1-2 所示的实验结果。当底物浓度升高时,最初底物的浓度与反应速度成正比,这属于一级反应;当底物的浓度升高到一定的程度时,反应速度不再随底物浓度的增加而增大,这时变成零级反应。对这一实验事实给出最为合理的解释是酶催化反应速度依赖于酶(E)-底物(S)复合物分解形成产物的速度:



由上式可以看出,反应产物的形成只包含一个组分,即 ES 复合物(中间产物),此中间产物可看作是相对稳定的过渡态物质,它进一步分解为产物 P 和游离态酶 E。当底物浓度较低时,反应速度与底物浓度成正比。因而反应表现为一级反应。而高浓度的底物会饱和所有酶的活性位点,使 ES 复合物的浓度为最大,因而表现出最大的反应速度。底物浓度再增加时并不能提高 ES 复合物的浓度,因而反应速度将保持不变,此即零级反应。

米凯利斯 - 门顿动力学方程式

在 1913 年,米凯利斯 L(Leonor Michaelis)和门顿 M(Maud Menten)提出了一个简单的模型来说明这些动力学性质。他们在处理这个问题中的关键被认为是催化过程中一个专一的 ES 复合物是必需的中间产物。在米凯利斯和门顿之后也有一些学者做了进一步有关反应动力学及机理的研究,但都肯定了米凯利斯和门顿所提出的基本概念。米氏模型能说明许多酶的动力学性质。该模型如(1-2)式所示。包含 ES 复合物的这样一个复杂的平衡系统的解离常数就称之为米氏常数 k_m :

$$k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1 + k_4} \quad (1-2)$$

当酶 E 与底物 S 反应时便形成 ES 复合物,该复合物一般分解形成自由的酶和产物 P,但也可以解离为 E 和 S,这里假定产物并不进行逆向反应,这个条件在反应初始阶段产物浓度比较小的情况下是成立的,此时(1-2)式可以转化为(1-3)式:

$$k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (1-3)$$

一般来说很难确定游离的和络合态酶的量,但有可能测定酶的总活性。游离态的酶可以表示为总酶 E 与络合态酶 ES 的差,因此有下列二式:

$$\text{ES 的生成速度} = k_1([E] - [ES])[S] \quad (1-4)$$

$$\text{ES 的解离速度} = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (1-5)$$

由以上各式可以得出:

$$k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{([E] - [ES])[S]}{[ES]} \quad (1-6)$$

上式经整理可得到:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{k_m + [S]} \quad (1-7)$$

按定义,产物形成的速度 v 正比于 ES 复合物的浓度,所以有:

$$v = k_3[ES] \quad (1-8)$$

将(1-8)式代入(1-7)式可以得到(1-9)式:

$$v = \frac{k_3[E][S]}{k_m + [S]} \quad (1-9)$$