

华东理工大学研究生教育基金资助项目 ◀

*Modern Enzymology*

# 现代酶学

袁勤生 主编

华东理工大学出版社

华东理工大学研究生教育基金资助项目

# 现 代 酶 学

袁勤生 主编

华东理工大学出版社

**图书在版编目(CIP)数据**

现代酶学/袁勤生主编. —上海:华东理工大学出版社, 2001. 9

(华东理工大学研究生教育基金资助项目)

ISBN 7-5628-1139-3

I. 现... II. 袁... III. 酶学 IV. Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 23520 号

华东理工大学研究生教育基金资助项目

**现代酶学**

主编 袁勤生

|                          |                           |             |                 |
|--------------------------|---------------------------|-------------|-----------------|
| 出版                       | 华东理工大学出版社                 | 开本          | 890 × 1240 1/16 |
| 社址                       | 上海市梅陇路 130 号              | 印张          | 23.75           |
| 邮政                       | 邮编 200237 电话(021)64250306 | 字数          | 573 千字          |
| 网址                       | www.hdlgpress.com.cn      | 版次          | 2001 年 9 月第 1 版 |
| 经销                       | 新华书店上海发行所                 | 印次          | 2001 年 9 月第 1 次 |
| 印刷                       | 常熟印刷二厂印刷                  | 印数          | 1-3000 册        |
| ISBN 7-5628-1139-3/TQ·79 |                           | 定价: 38.00 元 |                 |



---

## 作者简介

袁勤生，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）；卫生部药典委员（90版）；中国药学会理事；中国生化药物学会主任委员；中国生化与分子生物学学会常务理事；中国工业生化专业委员会主任委员；上海药学会常务理事；上海生化药物学会主任委员；中国生化制药工业协会专家委员；《中国生化药物杂志》副主编等。

袁勤生教授长期以来从事生物化学及应用生化的教学与研究，尤其在酶的结构与功能、药用酶及生物医药等领域颇有建树；在国内外重要刊物上发表论文150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SOD及生物技术产品的研究和开发，多次主持和组织全国性学术会议，为我国SOD及其生物技术产品的研究和应用作出了贡献。由于袁勤生教授在教学和科研上的杰出贡献，1994年被美国ABI权威机构收载入国际名人录。

## 内 容 提 要

本书是根据华东理工大学研究生专业讲义《酶学》的基本内容,经多次修改补充编写而成的。主要内容有:酶的分离工程;酶作用动力学;酶的作用机制;酶的活性调节与转换;同工酶;核酶;抗体酶;模拟酶;气体酶学;非水介质中的酶反应;酶的分子工程;细胞信息传导与酶;氧自由基与酶及酶化学修饰动力学等。全书共分 14 章,各章均附有较多的文献和图表。

本书主要用作生命科学领域研究生的教材,也可作为在该领域中从事科学研究和教学工作的人员的参考书。

## 本书编委会

|    |     |                          |
|----|-----|--------------------------|
| 主编 | 袁勤生 | 教授 (华东理工大学生物工程学院应用生物学系)  |
| 编委 | 赵 健 | 副教授 (华东理工大学生物工程学院应用生物学系) |
|    | 李文杰 | 教授 (中科院上海生物化学与细胞研究所)     |
|    | 周海梦 | 教授 (清华大学生命科学与技术系)        |
|    | 陈惠黎 | 教授 (复旦大学基础医学院)           |
|    | 崔玉敏 | 副教授 (华东理工大学生物化学研究所)      |
|    | 胡红雨 | 博士 (中科院上海生物化学与细胞研究所)     |

# 前 言

近年来,随着生物化学与分子生物学的迅猛发展,酶的理论研究和应用研究都取得了突破性的进展。为满足人们对酶研究、教学和实际应用研究的需要,我们以华东理工大学硕士研究生专业讲义《酶学》为主要内容,经多次修改和补充编写成此书。由于酶涉及的领域十分宽广,故我们在编写过程中对章节的安排、内容的新颖性、深度和广度等方面都作了适当的调整。本书力求在重点介绍酶的基础理论和实际应用的基础上,努力描绘现代酶学的概貌和特点,并反映酶学近年来研究的最新进展。

本书共分 14 章,其中第一章“酶的分离工程”是根据我本人主编的《应用酶学》中“酶的分离与纯化”一章改写的;第二章至第四章由华东理工大学赵健副教授编写,其中“酶活性部位柔性”一节由中科院上海生化所胡红雨博士编写;第十章由崔玉敏副教授编写;第九章和第十三章由中科院上海生化所李文杰教授编写;第十二章由清华大学生命科学与技术系周海梦教授编写;第十四章由上海医科大学陈惠黎教授编写;其余由我本人编写。在此要特别指出的是,我编写的第六至第八章是我当年与王维育副教授共同为研究生所讲授的部分内容,现在他业已退休,我在此向他表示衷心感谢!在此我还要感谢在本书编写过程中给我帮助的专家、教授及我的学生。

由于本人水平有限,书中难免存在不妥和错误,恳切希望广大读者、专家批评指正。

袁勤生

2001 年 7 月

# 目 录

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 1 酶的分离工程 .....                                         | 1  |
| 1.1 酶分离纯化的一般原则 .....                                   | 1  |
| 1.1.1 建立一个可靠和快速的测活方法 .....                             | 1  |
| 1.1.2 酶原料的选择 .....                                     | 1  |
| 1.1.3 酶的提取 .....                                       | 1  |
| 1.1.4 酶的提纯 .....                                       | 2  |
| 1.1.5 酶的纯度检验 .....                                     | 2  |
| 1.2 酶提取方法的选择 .....                                     | 2  |
| 1.2.1 生物材料的破碎 .....                                    | 2  |
| 1.2.2 抽提方法 .....                                       | 4  |
| 1.3 酶纯化方法的选择 .....                                     | 4  |
| 1.3.1 调节酶溶解度的方法 .....                                  | 4  |
| 1.3.2 根据酶分子大小、形状不同的分离方法 .....                          | 6  |
| 1.3.3 根据酶分子电荷性质的方法 .....                               | 7  |
| 1.3.4 根据酶分子专一性结合的方法 .....                              | 9  |
| 1.3.5 其他分离方法 .....                                     | 14 |
| 1.3.6 酶纯化方法的选择 .....                                   | 15 |
| 1.4 酶纯度的评价 .....                                       | 16 |
| 1.4.1 酶纯度的检验 .....                                     | 16 |
| 1.4.2 酶催化活性的检验 .....                                   | 18 |
| 1.4.3 酶活性部位滴定 .....                                    | 18 |
| 2 酶作用动力学 .....                                         | 19 |
| 2.1 酶的基本动力学 .....                                      | 19 |
| 2.1.1 Michaelis - Menten 方程 .....                      | 19 |
| 2.1.2 Briggs - Haldane 修饰的 Michaelis - Menten 方程 ..... | 20 |
| 2.1.3 米氏方程的意义 .....                                    | 21 |
| 2.1.4 米氏方程中 $K_m$ , $V_{max}$ 的测定 .....                | 22 |
| 2.1.5 可逆反应的 Haldane 关系式 .....                          | 25 |
| 2.2 King - Altman 法推导酶动力学方程 .....                      | 25 |
| 2.3 酶的抑制动力学 .....                                      | 31 |
| 2.3.1 酶的可逆抑制 .....                                     | 31 |
| 2.3.2 酶的不可逆抑制 .....                                    | 37 |
| 2.3.3 酶抑制剂的设计及研究进展 .....                               | 44 |
| 2.4 pH 值和温度对酶作用的影响 .....                               | 48 |

|       |                         |     |
|-------|-------------------------|-----|
| 2.4.1 | pH 值对酶作用的影响 .....       | 48  |
| 2.4.2 | 温度对酶作用的影响 .....         | 55  |
| 2.5   | 酶作用于多底物时的动力学 .....      | 57  |
| 2.5.1 | 酶促反应按底物数分类 .....        | 57  |
| 2.5.2 | 多底物反应动力学分类 .....        | 58  |
| 2.5.3 | Cleland 命名和表示法 .....    | 59  |
| 2.5.4 | 双底物反应恒态动力学 .....        | 60  |
| 2.5.5 | 多底物反应机制的鉴别 .....        | 65  |
| 2.6   | 稳态前动力学 .....            | 69  |
| 2.6.1 | 酶反应的分析 .....            | 69  |
| 2.6.2 | 流管法 .....               | 70  |
| 2.6.3 | 弛豫时谱法 .....             | 71  |
| 2.6.4 | 恒态前动力学 .....            | 72  |
| 3     | 酶的作用机制 .....            | 77  |
| 3.1   | 酶催化的化学机制 .....          | 77  |
| 3.1.1 | 酸碱催化 .....              | 78  |
| 3.1.2 | 共价催化 .....              | 78  |
| 3.1.3 | 多元催化 .....              | 79  |
| 3.1.4 | 金属离子催化 .....            | 79  |
| 3.1.5 | 微观可逆原理 .....            | 79  |
| 3.2   | 酶催化的专一性与高效性 .....       | 80  |
| 3.2.1 | 过渡态和活化能 .....           | 80  |
| 3.2.2 | 酶和底物的结合作用 .....         | 81  |
| 3.2.3 | 邻近和定向效应 .....           | 81  |
| 3.2.4 | 底物的形变和酶的诱导契合模型 .....    | 83  |
| 3.2.5 | 微环境的影响 .....            | 84  |
| 3.3   | 酶的活性部位柔性的假说 .....       | 84  |
| 3.3.1 | 酶的活性丧失和整体构象变化的关系 .....  | 85  |
| 3.3.2 | 酶活性部位的柔性 .....          | 86  |
| 3.3.3 | 酶活性部位柔性和整体结构刚性的实例 ..... | 86  |
| 3.4   | 辅因子在酶促反应中的作用 .....      | 87  |
| 3.4.1 | 金属激活酶和金属酶 .....         | 87  |
| 3.4.2 | 辅酶 .....                | 90  |
| 3.5   | 酶作用机制的研究方法 .....        | 98  |
| 3.5.1 | 动力学研究 .....             | 98  |
| 3.5.2 | “捕捉”酶-底物复合物 .....       | 100 |
| 3.5.3 | X-射线晶体衍射法 .....         | 100 |
| 3.5.4 | 质谱法 .....               | 101 |
| 3.5.5 | 氨基酸侧链的化学修饰 .....        | 101 |
| 3.5.6 | 定点突变 .....              | 103 |
| 3.6   | 酶反应机制实例 .....           | 107 |
| 3.6.1 | 丝氨酸蛋白酶 .....            | 107 |
| 3.6.2 | 乳酸脱氢酶 .....             | 119 |

|          |                          |            |
|----------|--------------------------|------------|
| 3.6.3    | 酪氨酰-tRNA 合成酶 .....       | 123        |
| 3.6.4    | 超氧化物歧化酶 .....            | 127        |
| <b>4</b> | <b>酶活性的调节和酶的转换 .....</b> | <b>133</b> |
| 4.1      | 酶活性调节的多样性 .....          | 133        |
| 4.1.1    | 酶浓度的调节 .....             | 133        |
| 4.1.2    | 激素调节 .....               | 133        |
| 4.1.3    | 共价修饰调节 .....             | 133        |
| 4.1.4    | 限制性蛋白水解作用 .....          | 133        |
| 4.1.5    | 抑制剂和激活剂的调节 .....         | 134        |
| 4.1.6    | 反馈调节 .....               | 134        |
| 4.1.7    | 变构调节 .....               | 134        |
| 4.1.8    | 金属离子和其他小分子化合物的调节 .....   | 134        |
| 4.1.9    | 蛋白质剪接 .....              | 135        |
| 4.2      | 通过配体诱导酶构象改变的活性调节 .....   | 135        |
| 4.2.1    | 配体和蛋白质的结合 .....          | 135        |
| 4.2.2    | 变构酶 .....                | 143        |
| 4.3      | 通过酶共价结构改变的活性调节 .....     | 149        |
| 4.3.1    | 共价结构不可逆改变的活性调节 .....     | 149        |
| 4.3.2    | 共价结构可逆改变的活性调节 .....      | 151        |
| 4.4      | 代谢途径中酶活性的调节 .....        | 154        |
| 4.4.1    | 磷酸果糖激酶 .....             | 154        |
| 4.4.2    | 磷酸化酶 .....               | 156        |
| 4.5      | 酶的转换 .....               | 157        |
| 4.5.1    | 酶合成的调节 .....             | 158        |
| 4.5.2    | 酶降解的调节 .....             | 158        |
| <b>5</b> | <b>同工酶 .....</b>         | <b>160</b> |
| 5.1      | 同工酶的结构基础 .....           | 160        |
| 5.1.1    | 同工酶的一级结构的差异 .....        | 160        |
| 5.1.2    | 构象变化造成同工酶的差异 .....       | 161        |
| 5.1.3    | 同工酶亚基的杂交 .....           | 163        |
| 5.2      | 同工酶与基因 .....             | 164        |
| 5.2.1    | 单基因决定的同工酶 .....          | 164        |
| 5.2.2    | 多基因决定的同工酶 .....          | 164        |
| 5.2.3    | 复等位基因决定的同工酶 .....        | 164        |
| 5.2.4    | 修饰同工酶 .....              | 164        |
| 5.3      | 同工酶的分离、纯化及鉴定 .....       | 165        |
| 5.3.1    | 几种常用分离和测定同工酶的方法 .....    | 165        |
| 5.3.2    | 同工酶类型的鉴别 .....           | 166        |
| 5.4      | 同工酶的应用 .....             | 168        |
| 5.4.1    | 同工酶与临床诊断 .....           | 168        |
| 5.4.2    | 遗传与进化中的同工酶 .....         | 169        |
| 5.4.3    | 代谢调节中的同工酶 .....          | 171        |

|          |                           |            |
|----------|---------------------------|------------|
| 5.4.4    | 肿瘤状态下同工酶谱改变的生物学意义 .....   | 175        |
| 5.4.5    | 发育与分化中的同工酶 .....          | 176        |
| <b>6</b> | <b>核酶 .....</b>           | <b>178</b> |
| 6.1      | 核酶的发现和类别 .....            | 178        |
| 6.2      | 核酶的催化类型 .....             | 179        |
| 6.2.1    | I型内含子的自我剪接 .....          | 179        |
| 6.2.2    | 异体催化剪切型 .....             | 182        |
| 6.2.3    | 自体催化剪切型 .....             | 183        |
| 6.3      | 核酶的应用前景 .....             | 184        |
| 6.3.1    | 作为 RNA 限制性内切酶 .....       | 184        |
| 6.3.2    | 作为抗病因子 .....              | 184        |
| 6.3.3    | 生命起源的探索 .....             | 184        |
| <b>7</b> | <b>抗体酶 .....</b>          | <b>186</b> |
| 7.1      | 酶作用的过渡态及过渡态类似物 .....      | 186        |
| 7.2      | 抗体酶的催化反应 .....            | 186        |
| 7.2.1    | 酰基转移反应 .....              | 187        |
| 7.2.2    | 重排反应 .....                | 187        |
| 7.2.3    | 氧化还原反应 .....              | 187        |
| 7.2.4    | 金属螯合反应 .....              | 188        |
| 7.2.5    | 磷酸酯水解反应 .....             | 188        |
| 7.2.6    | 磺酸酯闭环反应 .....             | 189        |
| 7.2.7    | 光诱导反应 .....               | 189        |
| 7.3      | 抗体酶的制备方法 .....            | 190        |
| 7.3.1    | 拷贝法 .....                 | 190        |
| 7.3.2    | 引入法 .....                 | 190        |
| 7.3.3    | 诱导法 .....                 | 190        |
| 7.4      | 发展前景 .....                | 192        |
| <b>8</b> | <b>模拟酶 .....</b>          | <b>194</b> |
| 8.1      | 环糊精模拟酶 .....              | 194        |
| 8.1.1    | $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶的模拟 ..... | 196        |
| 8.1.2    | 核糖核酸酶的模拟 .....            | 197        |
| 8.1.3    | 转氨酶的模拟 .....              | 198        |
| 8.2      | 冠醚化合物的模拟酶 .....           | 199        |
| 8.2.1    | 水解酶的模拟 .....              | 199        |
| 8.2.2    | 肽合成酶的模拟 .....             | 200        |
| 8.3      | 超氧化物歧化酶(SOD)的模拟 .....     | 200        |
| 8.3.1    | CuZn-SOD 活性中心的模拟 .....    | 201        |
| 8.3.2    | 超氧化物歧化酶的功能模拟 .....        | 201        |
| 8.3.3    | 模拟 Mn-SOD .....           | 201        |
| <b>9</b> | <b>气体酶学 .....</b>         | <b>203</b> |

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| 9.1 引言 .....                  | 203        |
| 9.2 氧化一氧化碳的酶 .....            | 203        |
| 9.2.1 羧基养细菌的 CO 脱氢酶 .....     | 204        |
| 9.2.2 硫酸盐还原细菌中的 CO 脱氢酶 .....  | 205        |
| 9.2.3 光养厌氧菌的 CO 脱氢酶 .....     | 205        |
| 9.2.4 甲烷养细菌的甲烷单加氧酶 .....      | 205        |
| 9.2.5 关于氧化 CO 的酶的总结 .....     | 205        |
| 9.3 甲烷单加氧酶的作用 .....           | 206        |
| 9.3.1 甲烷单加氧酶的性质 .....         | 206        |
| 9.3.2 可溶性 MMO 复合体中的电子转移 ..... | 207        |
| 9.3.3 甲烷单加氧酶的底物专一性 .....      | 208        |
| 9.4 固氮酶的作用 .....              | 208        |
| 9.4.1 概述 .....                | 208        |
| 9.4.2 固氮酶的酶学简介 .....          | 208        |
| <b>10 非水介质中的酶催化反应 .....</b>   | <b>210</b> |
| 10.1 非水介质酶催化反应及其特征 .....      | 210        |
| 10.2 微水有机溶剂体系 .....           | 211        |
| 10.2.1 水的作用及其调控 .....         | 211        |
| 10.2.2 有机溶剂的影响与反应介质工程 .....   | 216        |
| 10.2.3 酶的选择与催化剂工程 .....       | 221        |
| 10.3 “pH 记忆”与“分子印迹”技术 .....   | 225        |
| 10.4 反向胶团的酶学研究 .....          | 225        |
| 10.4.1 反向胶团的形成与酶的包覆 .....     | 226        |
| 10.4.2 反向胶团包覆酶的催化特性 .....     | 227        |
| 10.4.3 反向胶团酶学的应用 .....        | 227        |
| 10.5 水-有机溶剂两相体系 .....         | 229        |
| 10.5.1 两相体系的特点与构成 .....       | 229        |
| 10.5.2 固定化催化剂在两相体系中的应用 .....  | 229        |
| 10.5.3 两相体系的应用 .....          | 230        |
| 10.6 非水介质酶催化反应在有机合成中的应用 ..... | 231        |
| 10.6.1 脂肪酶及其对映体选择性催化原理 .....  | 231        |
| 10.6.2 对映体选择性拆分 .....         | 232        |
| 10.6.3 消旋酸的酶促拆分 .....         | 234        |
| 10.6.4 消旋醇的拆分 .....           | 234        |
| 10.6.5 消旋胺的拆分 .....           | 235        |
| 10.6.6 酶促大环内酯的合成 .....        | 235        |
| 10.6.7 区域选择性催化 .....          | 236        |
| 10.6.8 溶剂及催化剂纯度对选择性的影响 .....  | 236        |
| <b>11 酶的分子工程 .....</b>        | <b>238</b> |
| 11.1 设计酶化学修饰的注意点 .....        | 238        |
| 11.1.1 对酶性质的了解 .....          | 238        |
| 11.1.2 对修饰剂的要求 .....          | 239        |

|                                            |            |
|--------------------------------------------|------------|
| 11.1.3 对酶反应条件的选择 .....                     | 239        |
| 11.2 酶分子侧链基团的化学修饰 .....                    | 239        |
| 11.2.1 几种重要的修饰反应 .....                     | 239        |
| 11.2.2 特定氨基酸残基侧链基团的化学修饰 .....              | 241        |
| 11.2.3 化学修饰反应的条件控制 .....                   | 246        |
| 11.3 有机大分子对酶的化学修饰 .....                    | 247        |
| 11.3.1 聚乙二醇 .....                          | 248        |
| 11.3.2 右旋糖酐及右旋糖酐硫酸酯 .....                  | 250        |
| 11.3.3 糖肽 .....                            | 251        |
| 11.3.4 具有生物活性的大分子物质 .....                  | 252        |
| 11.3.5 蛋白质类及其他 .....                       | 253        |
| 11.4 修饰酶的性质及特点 .....                       | 255        |
| 11.4.1 热稳定性 .....                          | 255        |
| 11.4.2 抗原性 .....                           | 256        |
| 11.4.3 体内半衰期 .....                         | 257        |
| 11.4.4 最适 pH .....                         | 257        |
| 11.4.5 酶学性质的变化 .....                       | 258        |
| 11.4.6 对组织的分布能力变化 .....                    | 258        |
| <b>12 酶化学修饰的定量处理及不可逆抑制动力学 .....</b>        | <b>260</b> |
| 12.1 Ray - Koshland 方法 .....               | 260        |
| 12.2 邹承鲁作图法 .....                          | 262        |
| 12.3 酶化学修饰的动力学机制 .....                     | 269        |
| 12.3.1 不可逆反应 .....                         | 269        |
| 12.3.2 可逆反应 .....                          | 270        |
| 12.3.3 形成中间体复合物 .....                      | 270        |
| 12.4 利用失活动力学确定酶-配位体解离常数 .....              | 271        |
| 12.4.1 由不可逆失活动力学机制确定酶-配体的解离常数 .....        | 271        |
| 12.4.2 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 ..... | 273        |
| 12.4.3 酶化学修饰反应的 pH 效应 .....                | 273        |
| 12.5 酶活性修饰过程中底物反应动力学 .....                 | 274        |
| 12.5.1 单底物酶反应,非配合型抑制剂 .....                | 274        |
| 12.5.2 单底物酶反应,配合型抑制剂 .....                 | 276        |
| 12.5.3 双底物酶反应,非配合型抑制剂 .....                | 277        |
| 12.5.4 双底物酶反应,配合型抑制剂 .....                 | 281        |
| 12.5.5 可逆抑制剂和不可逆抑制剂的底物竞争性概念的统一 .....       | 285        |
| 12.6 不可逆抑制动力学在其他方面的应用 .....                | 285        |
| 12.6.1 酶脱配体的动力学 .....                      | 286        |
| 12.6.2 酶在变性剂中失活的动力学 .....                  | 287        |
| <b>13 氧自由基与酶 .....</b>                     | <b>290</b> |
| 13.1 氧自由基在生物体内的作用 .....                    | 290        |
| 13.1.1 自由基的生物学意义 .....                     | 290        |
| 13.1.2 生命过程中某些重要的自由基反应 .....               | 290        |

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| 13.2 生物体内自由基的产生和清除 .....            | 292        |
| 13.2.1 生物体内自由基的产生 .....             | 292        |
| 13.2.2 自由基的清除 .....                 | 297        |
| 13.3 生物体内一些重要的抗氧酶 .....             | 302        |
| 13.3.1 超氧化物歧化酶 .....                | 302        |
| 13.3.2 过氧化氢酶 .....                  | 312        |
| 13.3.3 谷胱甘肽过氧化物酶 .....              | 315        |
| 13.3.4 谷胱甘肽转硫酶 .....                | 321        |
| 13.3.5 其他过氧化物酶 .....                | 322        |
| 13.3.6 过氧化氢酶与谷胱甘肽过氧化物酶的协同作用 .....   | 324        |
| <b>14 参与细胞跨膜信号转导的酶 .....</b>        | <b>326</b> |
| 14.1 参与细胞跨膜信号转导的受体 .....            | 326        |
| 14.1.1 G 蛋白偶联受体 .....               | 326        |
| 14.1.2 酪氨酸蛋白激酶相关受体 .....            | 327        |
| 14.1.3 其他有酶活力的受体 .....              | 327        |
| 14.1.4 尚未确定有酶活力的受体——离子通道受体 .....    | 327        |
| 14.2 G 蛋白家族 .....                   | 327        |
| 14.2.1 异三聚体 G 蛋白 .....              | 327        |
| 14.2.2 小分子 G 蛋白 .....               | 329        |
| 14.3 核苷酸环化酶 .....                   | 331        |
| 14.3.1 腺苷酸环化酶 .....                 | 331        |
| 14.3.2 鸟苷酸环化酶 .....                 | 333        |
| 14.4 产生脂类信号分子的酶 .....               | 333        |
| 14.4.1 磷脂酶类 .....                   | 333        |
| 14.4.2 磷脂酰肌醇激酶 .....                | 337        |
| 14.5 蛋白激酶 .....                     | 338        |
| 14.5.1 环核苷酸依赖性蛋白激酶 .....            | 339        |
| 14.5.2 脂类依赖性蛋白激酶 .....              | 340        |
| 14.5.3 钙调蛋白依赖性蛋白激酶 .....            | 344        |
| 14.5.4 丝裂原激活蛋白激酶信号流中的蛋白激酶家族 .....   | 347        |
| 14.5.5 酪氨酸蛋白激酶 .....                | 349        |
| 14.6 重要的细胞跨膜信号转导通路 .....            | 351        |
| 14.6.1 环腺苷酸介导的跨膜信号转导 .....          | 351        |
| 14.6.2 磷脂酶 C 介导的跨膜信号转导 .....        | 353        |
| 14.6.3 受体酪氨酸蛋白激酶介导的跨膜信号网络 .....     | 357        |
| 14.6.4 异三聚体 G 蛋白介导的跨膜信号网络 .....     | 359        |
| 14.6.5 受体通过非受体型酪氨酸蛋白激酶的跨膜信号转导 ..... | 360        |
| 14.6.6 鞘磷脂酶-神经酰胺介导的跨膜信号转导 .....     | 360        |
| 14.6.7 受体丝氨酸蛋白激酶介导的跨膜信号转导 .....     | 362        |
| 14.6.8 细胞信号转导通路间的对话 .....           | 362        |

# 1 酶的分离工程

酶的分离纯化工作,是酶学研究的基础。酶的纯化过程,就目前而言,还是一门实验科学。一个特定酶的提纯往往需要通过许多次小实验进行摸索,很少有通用的规律可循。酶的纯化过程与一般的蛋白质纯化过程相比,又有其本身独有的特点:一是特定的一种酶在细胞中的含量很少;二是酶可以通过测定活力的方法加以跟踪,前者给纯化带来了困难,而后者却能使我们迅速找出纯化过程的关键所在。

酶的纯化过程一般包括下列步骤。

## 1.1 酶分离纯化的一般原则

### 1.1.1 建立一个可靠和快速的测活方法

测活方法的可靠性主要表现在方法专一、灵敏、精确和简便上。测活方法的高灵敏性、准确性在分离纯化的初始阶段尤为重要,因为如果测活方法不可靠,那么很可能连酶在哪一部位存在,到底有没有该酶这样简单的问题都无法回答。

测定酶活力的方法是否经济,也很重要。如果某种酶的测活试剂昂贵,且难以得到,所需仪器价格又高,那么,除非实验室有足够实力,否则,必须另外选择恰当的测活方法。如在我国,并不是所有实验室都能用放免法、HPLC法、核磁共振(NMR)法等测定酶活的。

酶活力的测定方法越简单,纯化过程中所需等待的时间就越短,就越能够减少酶自然失活给纯化带来的不利影响。可以说,一个好的测活方法的建立,就是整个纯化工作成功的一半。

### 1.1.2 酶原料的选择

通常,为了使纯化过程容易进行,总是选择目的酶含量丰富的原料。当然也要考虑原料的来源、取材方便、经济等因素。例如分离纯化超氧化物歧化酶(SOD)、尽管在动物肝、肾、心等器官内含量十分丰富,而血液中含有量较少,但考虑到取材易、价廉及预处理方便等因素,在实际应用中还是选择红细胞。

目前,利用动、植物细胞体外大规模培养技术,可以大量获得极为珍贵的原材料(例如人参细胞、某些昆虫细胞等),用于酶的分离纯化。利用基因工程重组DNA技术,能够使某些在细胞中含量极微的酶的纯化成为可能。例如,大肠杆菌胞内芳香族氨基酸的合成需要EPSP合成酶(丙酮酰莽草酸磷酸合成酶)的参与。现已分离出这种酶的基因并重组入多拷贝质粒pAT153,将此质粒转入大肠杆菌,产生一种比野生型大肠杆菌株高100倍的含EPSP的合成酶的新菌株。

### 1.1.3 酶的提取

除在体液中提取酶或胞外酶外,一般都要选用适当的方法,将含目的酶的生物组织破碎,促使酶增溶溶解,最大程度地提高抽提液中酶的浓度。

### 1.1.4 酶的提纯

酶的提纯步骤一般可先根据酶分子溶解度的性质,选用适宜的沉淀方法(如盐析、有机溶剂沉淀等),将目的酶分级沉淀,制得粗酶,再根据酶分子的大小、电荷性质、亲和专一性等,应用离心、层析、电泳、结晶等方法,将酶纯化。

评价分离提纯方法好坏的指标有两个:一是总活力的回收率;二是比活力提高的倍数。总活力的回收率,反映了提纯过程酶活力的损失情况,而比活力的提高倍数则反映了纯化方法的效率。纯化后比活力提高越多,总活力损失越少,则纯化效果就越好。实际上,纯化倍数与回收率不可能两者兼顾,应根据具体情况作相应取舍。整个纯化过程可采用表格记录,如表 1-1 所示。

表 1-1 酶的提纯过程记录格式  
(设想的提纯步骤)

| 步 骤                                        | 总体积<br>(ml) | 蛋白浓度<br>(mg/ml) | 蛋白总量<br>(mg) | 酶浓度<br>(u/ml) | 比活力<br>(u/mg)<br>蛋白 | 总活力<br>(u) | 产率<br>(%) | 提纯<br>倍数 |
|--------------------------------------------|-------------|-----------------|--------------|---------------|---------------------|------------|-----------|----------|
| 粗无细胞抽提液                                    | 1000        | 12              | 12 000       | 5             | 0.416               | 5 000      | 100       | 1.00     |
| 50℃热变性除杂蛋白                                 | 1000        | 8               | 8 000        | 4.8           | 0.60                | 4 800      | 96        | 1.44     |
| 硫酸铵分级(30%~50%)饱和度沉淀部分                      | 250         | 3               | 750          | 11.0          | 3.67                | 2 730      | 55        | 8.83     |
| DEAE-凝胶层析 pH 梯度(第 50~60 管)                 | 25          | 9               | 225          | 83            | 9.8                 | 2 200      | 44        | 23.6     |
| 经透析、浓缩                                     | —           | —               | —            | —             | —                   | —          | —         | —        |
| 离子交换层析(DEAE-纤维素)KCl 梯度洗脱,(第 21~31 管)经透析、浓缩 | 5           | 7               | 35           | 364           | 52                  | 1820       | 36.4      | 125      |
| 凝胶过滤葡聚糖凝胶 G-100(第 31~40 管)合并               | 10          | 0.92            | 9.2          | 170           | 185                 | 1 700      | 34        | 444      |
| 羟基磷灰石层析,酸盐梯度(第 15~18 管)合并                  | 4           | 0.75            | 3            | 375           | 500                 | 1 500      | 30        | 1 200    |

### 1.1.5 酶的纯度检验

习惯上,当把酶提纯到一恒定的比活时,即可认为酶已纯化。不过,仍还需要用电泳、层析、离心等方法,对纯化的酶进行纯度检验。如果在相应的方法,达到了单一的区带、斑点或只有一个峰,则认为该酶达到了相应方法的纯度,简称为电泳纯、层析纯等。

酶分子具有复杂而精细的结构。因此,在纯化过程中,应尽量避免可能招致酶变性、失活的不利因素(热、重金属离子、蛋白水解酶、过酸或过碱等等),使酶自始至终保持天然活性构象,以达到最佳的分离效果。

## 1.2 酶提取方法的选择

### 1.2.1 生物材料的破碎

各种生物组织的细胞有着不同的特点,在考虑破碎方法时,要根据细胞性质和处理量,采用合适的方法。表 2-2 列出了常用的细胞破碎方法。

表 1-2 细胞破碎方法

| 技 术                   | 举 例              | 原 理                    |
|-----------------------|------------------|------------------------|
| 温和型                   |                  |                        |
| 溶胞作用                  | 红血球              | 细胞膜渗透压破碎               |
| 酶解                    | 细菌的溶菌酶处理         | 细胞壁被酶解、消化、渗透压导致破碎      |
| 化学溶解/自溶               | 酵母的甲苯抽提          | 细胞壁被部分化学试剂溶解,胞内溶解酶释放   |
| 手工匀浆                  | 肝组织              | 细胞被强制通过狭小的间隙,撕裂细胞壁     |
| 绞碎(磨碎)                | 肝、肌肉等等           | 细胞因剪切力而绞碎              |
| 中等型                   |                  |                        |
| 高速组织捣碎机               | 肌肉组织<br>大部分动植物组织 | 剪切力打破大的细胞,剪切开小的细胞      |
| 加有研磨剂的研磨<br>(石英砂、氧化铝) | 植物组织、细菌          | 微磨擦撕破细胞                |
| 剧烈型                   |                  |                        |
| 法兰西压榨器                | 细菌、植物组织          | 细胞被高压强制通过小孔、剪切力破碎细胞    |
| 超声作用                  | 细胞悬浮液            | 微型高压声波通过剪切力和空穴作用导致细胞破碎 |
| 球磨                    | 细胞悬浮液            | 玻璃珠的快速振动,撕破细胞膜         |
| 高压匀浆泵                 | 细胞悬浮液            | 原理同法兰西压榨器,但规模较大        |

#### 1.2.1.1 机械(匀浆)法

利用机械力的搅拌、剪切、研碎细胞。常用的有高速组织捣碎机(Waring blender)、高压匀浆泵(国外称 Manton - Gaulin)、玻璃或 Teflon 研棒匀浆器(国外称 Potter - Elvehjem homogenizer)、高速球磨机或直接用研钵研磨等。动物组织的细胞器不甚坚固,极易匀浆,一般可将组织剪切成小块,再用匀浆器或高速组织捣碎器将其匀质化。匀浆器一次处理容量约 50mL,高速组织捣碎器容量可达 500~1 000mL 左右。高压匀浆泵非常适用于细菌、真菌(如酵母)的破碎,且处理容量大,一次可处理几升悬浮液,一般循环 2~3 次,足以达到破碎要求。

#### 1.2.1.2 超声波法

超声波是破碎细胞或细胞器的一种有效手段。经过足够时间的超声波处理,细菌和酵母细胞都能得到很好的破碎。若在细胞悬浮液中加入玻璃珠,时间可更短些,一般线粒体经过 125W 超声处理 5min 即可全部崩解。超声波破碎一次处理的量较大,超声效果以探头式超声器较水浴式超声器更佳。超声处理的主要问题是超声空穴局部过热引起酶活性丧失,所以超声振荡处理的时间应尽可能短,容器周围以冰浴冷却处理,尽量减小热效应引起的酶的失活。

#### 1.2.1.3 冻融法

生物组织经冰冻后,细胞胞液结成冰晶,使细胞壁胀破。冻融法所需设备简单,普通家用冰箱的冷冻室即可进行冻融。该法简单易行,但效率不高,需反复几次才能达到预期的破壁效果。如果冻融操作时间过长,更应注意胞内蛋白酶作用引起的后果。一般需在冻融液中加入蛋白酶抑制剂,如 PMSF(苯甲基磺酰氟)、络合剂 EDTA、还原剂 DTT(二硫苏糖醇)等以防破坏目的酶。

#### 1.2.1.4 渗透压法

渗透破碎是破碎细胞最温和的方法之一。细胞在低渗透溶液中由于渗透压的作用,溶胀破碎。如红血球在纯水中会发生破壁溶血现象。但这种方法对具有坚韧的多糖细胞壁的细胞,如植物、细