

临床酶学检验

寇中琛 谭国庆 编 著
林永齐 张 莹 审 阅

吉林医学院

临 床 酶 学 检 验

寇中琛 谭国庆 编 著

林永齐 张 莹 审 阅

吉 林 医 学 院

编 者 的 话

临床酶学检验是医学检验的重要组成部分，在临床医学中对疾病的诊断、治疗、预后判断等有着十分重要的价值，发挥着越来越大的作用。近年来，随着酶学理论及实验技术的迅速发展，出现了许多新理论和新技术，许多新技术已应用于临床酶学检验，从而提高了医学检验水平，推动了临床医学的发展。

一九八四年我们编写了《临床酶学检验》一书，在我校医学检验系、全国检验理论进修班等班级教学中使用，受到了同学和许多同行的热烈欢迎和较好评价，为了加速医学检验队伍的培养，提高检验工作质量，满足广大检验工作者的需要，我们对原《临床酶学检验》一书进行了修改，增添了一些内容。全书共分八章，即：酶的一般知识；临床酶学分析方法的动力学基础；临床酶学分析法的基本原理；临床常用酶的性质及检测方法。酶法检测某些底物、辅酶等物质所用酶试剂及检测方法；同工酶；血清酶；酶活力的测定。

本书在编著过程中承蒙吉林大学林永齐教授、吉林医学院检验系张莹副教授认真审阅，并提出了许多宝贵意见；白求恩医科大学麦荫乔教授在百忙中为本书作序；在编写过程中生化教研室褚应士副教授也给予了热情的支持和鼓励并提出了许多宝贵意见；书中插图及图中提字均由李亚云、苏庆山二同志完成。在此一并致以衷心的感谢。

由于酶学进展十分迅速，涉及的学科相当广泛，加之编者的学识水平和经验有限，书中缺点错误在所难免，恳请读者批评指正。

编 者

一九八七年十二月

目 录

第一章 酶的一般知识	1
第一节 酶是催化剂	1
第二节 酶的分子组成	1
第三节 酶作用的特异性	1
第四节 酶的分类	2
第五节 酶可作为分析试剂	2
第二章 临床酶学分析方法的动力学基础	4
第一节 单底物反应动力学	4
一、单底物动力学方程的导出及适用条件	4
二、动力学参数的意义及其求取	6
第二节 多底物反应动力学	9
一、酶促反应按底物级数的分类	9
二、多底物反应动力学的表示法及分类	10
三、多底物反应动力学参数 K_m 及 V_m 的求取	12
第三节 影响酶促反应的因素	15
一、酶浓度的影响	15
二、底物浓度的影响	16
三、产物的影响	16
四、pH 的影响	17
五、温度的影响	20
六、抑制剂的影响	21
七、激活剂的影响	28
第三章 临床酶学分析法的基本原理	29
第一节 测定酶浓度的方法及检测技术	29
一、测活法	29
二、测蛋白法	33
第二节 用酶作试剂测定底物、辅酶、激动剂、抑制剂的方法及技术	33
一、总变化量法	33
二、动力学法	34
第三节 酶活性测定方法中底物浓度、指示酶、辅助酶加入量的确定	34
一、底物的选择及浓度的确定	35
二、偶联法测定酶活性方法中指示酶及辅助酶加入量的确定	39
第四节 用酶法测定底物时酶试剂加入量的确定	41

一、单酶反应定量法酶量的确定	41
二、指示酶反应偶联定量法酶量的确定	42
第五节 影响酶学分析法的条件选择及控制	44
一、温度	44
二、pH与缓冲剂	45
三、效应物	45
四、样品量	45
第六节 酶法自动分析	45
一、概述	45
二、自动化分析的原理	46
三、临床自动化仪器(简介)	48
第四章 临床常用酶的性质及检测方法	50
第一节 谷草转氨酶(GOT,E.C.2.6.1.1.)	50
一、一般性质	50
二、测定方法	50
第二节 谷丙转氨酶(GPT,E.C.2.6.1.2.)	51
一、一般性质	51
二、测定方法	51
第三节 碱性磷酸酶(ALP,AKP,E.C.3.1.3.1.)	51
一、一般性质	51
二、测定方法	52
第四节 酸性磷酸酶(ACP,E.C.3.3.1.2.)	52
一、一般性质	52
二、测定方法	52
第五节 肌酸激酶(CK,E.C.2.7.3.2.)	53
一、一般性质	53
二、测定方法	53
第六节 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6PDH,E.C.1.1.1.4.9)	54
一、一般性质	54
二、测定方法	54
第七节 α -淀粉酶(AMY,E.C.3.2.1.1.)	55
一、一般性质	55
二、测定方法	55
第八节 乳酸脱氢酶(LDH,E.C.1.1.1.27)	56
一、一般性质	56
二、测定方法	56
第九节 α -羟丁酸脱氢酶(HBDH,E.C.1.1.1.27)	57
一、一般性质	57

二、测定方法	57
第十节 γ -谷氨酰转移酶 (γ -GT, E.C.2.3.2.2)	57
一、一般性质	57
二、测定方法	57
第十一节 乙酰胆碱酯酶 (AChE, E.C.3.1.1.7) 胆碱酯酶 (ChE, E.C.3.1.1.8)	58
一、一般性质	58
二、测定方法	58
第十二节 5'-核苷酶 (5'-NT, E.C.3.1.3.5)	59
一、一般性质	59
二、测定方法	59
第十三节 单胺氧化酶 (MAO, E.C.1.4.3.4)	59
一、一般性质	59
二、测定方法	59
第十四节 醛缩酶 (ALD, E.C.4.1.2.13)	60
一、一般性质	60
二、测定方法	60
第十五节 精氨酸琥珀酸裂解酶 (ASAL, E.C.4.3.2.1)	60
一、一般性质	60
二、测定方法	60
第五章 酶法检测某些底物、辅酶等物质所用酶试剂及检测方法	62
第一节 概述	62
第二节 β -D-葡萄糖	62
第三节 尿酸	63
第四节 肌酸、肌酐	63
第五节 氨	64
第六节 胆固醇	64
第七节 甘油三酯	64
第八节 乙酰辅酶A	65
第九节 镁离子	65
第六章 同工酶	66
第一节 概论	66
第二节 同工酶的分类及命名	66
一、同工酶的分类	66
二、同工酶的命名	68
第三节 同工酶的生理意义及检测作用	68
一、同工酶的生理意义	68
二、同工酶检测的作用	68
第四节 同工酶潜在肿瘤组织的变化	70

一、同工酶谱改变的类型	70
二、癌瘤时同工酶谱改变的生物学意义	71
第五节 同工酶的鉴定	72
一、电泳法	72
二、层析法	76
三、免疫学法	76
四、动力学法	77
第六节 临床常用同工酶	78
一、乳酸脱氢酶同工酶	78
二、肌酸激酶同工酶	82
三、谷草转氨酶同工酶	84
四、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶同工酶	87
五、 γ -谷氨酰转氨酶同工酶	89
六、碱性磷酸酶同工酶	91
七、酸性磷酸酶同工酶	94
八、 α -淀粉酶同工酶	96
九、醛缩酶同工酶	98
十、5'-核苷酸磷酸二酯酶同工酶	100
十一、丙酮酸激酶同工酶	100
第七章 血清酶	104
第一节 血清酶的来源和去路	104
一、血清酶的来源	104
二、血清酶的去路	105
第二节 血清酶的生理差异	105
一、性别	106
二、年龄	106
三、运动	106
四、饮食	106
五、妊娠	106
第三节 影响血清酶活力测定的因素	106
一、溶血	106
二、抗凝剂	107
三、样品储存	107
四、试剂和方法	107
第四节 疾病时血清酶活力改变的机理	108
一、酶合成异常	108
二、从细胞释入血清的速度	108
三、从血清中清除的速度	108

四、酶排泄障碍·····	108
第五节 血清酶活力测定的选择和评价·····	109
一、灵敏度·····	109
二、特异性·····	109
第六节 同工酶谱分析在临床上的应用·····	109
一、同工酶在诊断急性心肌梗塞中的应用·····	109
二、同工酶在诊断肝胆疾病中的应用·····	111
三、同工酶谱在肿瘤诊断中的应用·····	113
第八章 酶活力测定·····	117
第一节 谷草转氨酶 (GOT,AST) 测定·····	117
一、赖氏比色法·····	117
二、酶偶联测定法·····	119
第二节 谷丙转氨酶 (GPT,ALT) 测定·····	120
一、赖氏比色法·····	120
二、酶偶联测定法·····	122
第三节 碱性磷酸酶 (ALP,AKP) 测定·····	124
一、磷酸苯二钠法·····	124
二、对硝基酚法·····	126
第四节 酸性磷酸酶 (ACP) 测定·····	128
一、磷酸苯二钠法·····	128
二、磷酸麝香草酚胺法·····	129
第五节 肌酸激酶 (CK) 测定·····	130
一、总活力测定·····	130
二、同工酶测定·····	134
第六节 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6-PDH) 测定·····	135
一、总活力测定·····	135
二、同工酶测定·····	138
第七节 淀粉酶 (AMY) 测定·····	139
第八节 乳酸脱氢酶 (LDH) 测定·····	140
一、总活力测定·····	140
二、同工酶测定·····	143
第九节 α -羟丁酸脱氢酶 (HBDH) 测定·····	145
第十节 γ -谷氨酰转移酶测定 (γ -GT)·····	147
一、重氮试剂比色法·····	147
二、对硝基苯胺法·····	148
第十一节 胆碱酯酶 (CHE) 测定·····	149
一、血清胆碱酯酶测定·····	149
二、全血胆碱酯酶测定·····	151

第十二节	5'-核苷酸酶 (5'-NT) 测定	152
第十三节	单胺氧化酶 (MAO) 测定	154
第十四节	醛缩酶 (ALD) 测定	156
第十五节	精氨酸琥珀酸裂解酶 (ASAL) 测定	158
附 录		
一、	各种商品酶的稳定性	161
二、	各种体液酶的稳定性	163
三、	某些酶的米氏常数	164
四、	常用缓冲液	168
五、	层析法的数据	173

第一章 酶的一般知识

第一节 酶是催化剂

酶是由生物体内产生的具有催化活性的一类蛋白质，这类蛋白质表现出特异的催化功能。因此把酶叫生物催化剂。酶和一般催化剂一样，在相对浓度很低的情况下，仅能影响化学反应速度，而不改变反应的平衡点，并在反应前后本身不发生变化。酶与一般化学催化剂的不同点是，催化效率比一般催化剂高 $10^6 \sim 10^{13}$ 倍，远远超出一般催化剂的催化能力，一般催化剂为小分子，而酶是蛋白质，具有蛋白质的共性，在温度较高或酸碱度过大或过小的条件下，容易变性或分解，从而丧失催化活性。

第二节 酶的分子组成

酶和其它蛋白质一样，可根据其化学组成为单纯酶和结合酶两类。

单纯酶水解后只产生氨基酸。一般水解酶类，如胃蛋白酶、唾液淀粉酶、胰蛋白酶和胰脂肪酶等均属单纯酶类。酶分子中除蛋白质（酶蛋白）部分外，还含有非蛋白质物质的酶，称为结合酶。一些氧化还原酶如乳酸脱氢酶，转移酶如转氨酶则属于结合酶。结合酶分子中的非蛋白质部分，又称为酶的辅助因子或辅酶。多数辅酶是一些低分子有机化合物，有些还含有金属离子，或两者兼有。金属离子主要有 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mo^{+6} 等。辅酶的种类很多，在酶学检验中应用最多的辅酶有辅酶Ⅰ和辅酶Ⅱ，它有氧化型(NAD^+ , NADP^+)和还原型(NADH , NADPH)两种形式。 NADH 和 NADPH 在340nm波长处有特异吸收峰， NAD^+ 和 NADP^+ 则没有。所以凡是有辅酶Ⅰ或辅酶Ⅱ参加的氧化还原酶类反应时，可用340nm光吸收的变化计算酶的活性。有些酶促反应时没有辅酶Ⅰ或辅酶Ⅱ参加反应，但是如果产物中有可以被氧化还原的物质，则另外加入可使此产物氧化还原的酶以及辅酶Ⅰ或辅酶Ⅱ作为试剂，就可以根据340nm吸光度的变化间接的表示酶的活性。

第三节 酶作用的特异性

酶作用的物质称为底物（亦称为基质或作用物）。酶的特异性是指酶对底物的严格选择性。一种酶只能作用于一类化合物或作用于一定的化学键，以促进一定的化学变化，生成一定的产物。这种现象称为酶作用的特异性。但酶的种类很多，各种酶的特异性在程度上又有很大的差别，一般分为三类：一类是某些酶对底物的要求特别严格，一种酶只能催化一种底物进行一定的反应，例如脲酶、琥珀酸脱氢酶等。这种严格的特异性称为酶的绝对特异性；另一类是有些酶对底物的要求不太严格，一种酶能作用于一类化合物或一种化学键。例如：磷酸酶，对一般磷酸酯都有作用，无论是甘油的、醇的或是酚的磷酸酯，均可被磷酸酶水

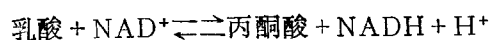
解。这种不严格的特异性称为相对特异性；最后一类是一种酶只能作用于底物的两种异构体之一，而不能作用其对应体或顺反异构体，这种现象称为立体异构特异性。例如，L-氨基酸氧化酶只能作用于L-氨基酸而不能作用于D-氨基酸。

第四节 酶的分类

酶可按照其催化反应或反应的类型进行分类。国际系统分类中分类的原则是将所有酶促反应按性质分为六大类。每一种酶的编号由四个数字组成，数字之间用“.”符号分开，编号之前冠以E.C（酶学委员会的缩写）。编号的第一个数字指明该酶属于六大类酶中的哪一类；第二个数字标明所属的亚类；第三个数字指示该酶所属的亚-亚类；第四个数字表明该酶在亚-亚类中的排号。

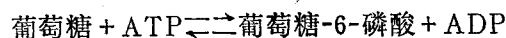
一、氧化还原酶类

这类酶能催化氢氧原子或电子从一种底物转移到另一种底物上。例如乳酸脱氢酶（E.C.1.1.1.27）



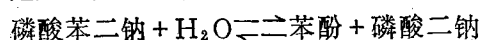
二、转移酶类

这些酶催化一个底物中的特定基团转移到另一个底物中去。例如己糖激酶（E.C.2.7.1.1）



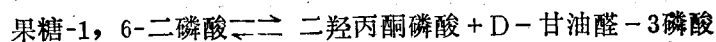
三、水解酶类

这是一些催化水解反应的酶。例如硷性磷酸酶（E.C.3.1.3.1）。



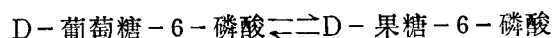
四、裂解酶类

这类酶催化C—C、C—O、C—N或S—S键发生简单裂解，但不是水解。例如醛缩酶（E.C.4.1.2.13）



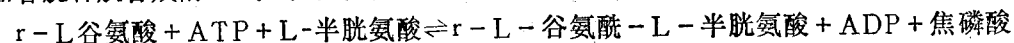
五、异构酶类

这类酶催化底物分子内进行的重排反应，例如，磷酸葡萄糖异构酶（E.C.5.3.1.9）



六、连接酶

这类酶催化生成C—O、C—S、C—N或C—C键，并伴随三磷酸腺苷（ATP）的裂解。例如谷胱甘肽合成酶（E.C.6.3.2.3）



第五节 酶可作为分析试剂

酶的特异性及其在低浓度下能催化底物反应的能力，对化学分析有很大的用处。酶的催化反应早已用于底物、激活剂、抑制剂及酶本身的测定。

在酶本身的测定中，一些偶联法常采用指示酶或辅助酶参加反应，参加酶促反应的指示酶及辅助酶是以试剂的形式加入到反应系统中的，例如，用偶联法测谷丙转氨酶，其中乳酸脱氢酶（指示酶）则是作为试剂加入的。再如，偶联法测肌酸激酶，其己糖激酶（辅助酶）也是作为试剂加入到反应系统中的。

用酶作为试剂测定底物浓度的方法是十分有前途的方法，它具有准确而迅速的优点。目前已广泛地应用到临床生化检验中，例如用葡萄糖氧化酶及过氧化物酶测定血液中的葡萄糖，用胆固醇酯酶及胆固醇氧化酶测定血液中胆固醇，用尿酸酶检测尿酸的含量等，目前已有数十种底物已采用酶法检测。

第二章 临床酶学分析方法的动力学基础

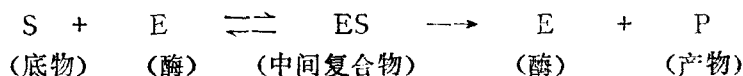
酶的动力学主要讨论影响酶催化反应速度的各种因素，当然最重要的因素是酶的浓度，配体浓度（底物、产物、抑制剂和激活剂），pH、离子强度和温度。

酶促反应动力学是以化学反应动力学为基础，因此它遵守化学反应动力学的一般规律，但酶促反应又有其自身的特点，又服从于特有的规律。酶促反应根据底物多少分为单底物反应动力学及多底物反应动力学。

第一节 单底物反应动力学

一、单底物动力学方程的导出及适用条件

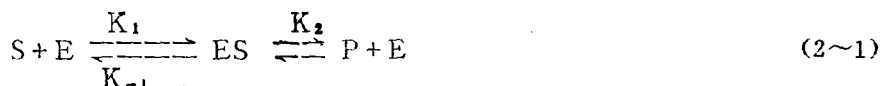
单底物动力学即单底物-单产物系统（ $S \rightleftharpoons P$ 系统）。这是最简单的系统。根据 Henri 的“酶-底物中间复合物”的假说，酶与底物的关系为：



其动力学（或速度）方程，可用下列两种方法导出。

（一）迅速平衡法（Henri-Michaelis-Menten）

1913年，Michaelis-Menten根据Henri的中间产物学说，加以数学处理：



式中 k_1 、 k_{-1} 分别为 $E + S \rightleftharpoons ES$ 正逆反应两方向的速度常数，而 k_2 为 ES 形成 $P + E$ 的速度常数。

Michaelis—Menten在推导其速度方程时，作了以下三个方面的假设：（1）测定速度为反应的初速度（通常指 S 的消耗量占原始浓度的5%以内），（2）底物浓度 $[S]$ 显著地超过酶的浓度 $[E]$ ，即 $[S] \gg [E]$ ；（3） ES 解离成 $E + S$ 的速度显著快于 ES 形成 $P + E$ 的速度，即 $k_{-1} \gg k_2$ ，或者说， $E + S \rightleftharpoons ES$ 的可逆反应在测定初速度 V 的时间内，迅速达到平衡，而小量 P 的生成不影响这个平衡。这就是“迅速平衡学说”。以此三点为基本条件设：

$ES \rightleftharpoons E + S$ 的解离常数为 K_s ，则

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (2-2)$$

若 E 的原始浓度为 $[E_0]$ ，平衡时， $[E] = [E_0] - [ES]$

根据假设（2）此时形成 ES 所消耗的 S 可以忽略不计，因而 $[S]$ 保持不变，由（2-2）式则有

$$[ES]K_s = [E][S] = ([E_0] - [ES])[S] \quad (2\sim3)$$

经整理可得:

$$[ES](K_s + [S]) = [E_0][S] \quad (2\sim4)$$

反应的初速度取决于ES的浓度[ES]即:

$$V = K_2[ES] \quad (2\sim5)$$

当全部E都转变成ES时, $[ES] = [E_0]$

此时速度达最大值即 $V = V_m$, V_m 表示最大速度。

根据 (2~5) 式

$$V_m = K_2[ES] = K_2[E_0] \quad (2\sim6)$$

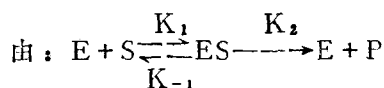
将 (2~5) 和 (2~6) 式代入式 (2~4) 可得:

$$V = \frac{V_m[S]}{K_s + [S]} \quad \text{或} \quad V = \frac{V_m}{1 + \frac{[S]}{K_s}} \quad (2\sim7)$$

这就是Henri-Michaelis-Menten方程, 简称为米氏方程, 也称单底物反应的动力学方程。

(二) 稳态法 (Brigg-Haldane)

1925年Brigg和Haldane认为, 许多酶的催化效力很强, 当ES形成后, 随即迅速地转变成产物P, 而释出E, 认为Michaelis-Menten的所谓快速平衡在 $K_2 > K_{-1}$ 时, 就不成立了, 因此提出了一个“稳态学说”, 认为在测定初速度的过程中, $[S]$ 减少, $[P]$ 增加, 而中间复合物ES在开始时升高, 可在相当一段时期内保持浓度的恒定, ES生成的速度和ES消失的速度相等, 形成动态平衡, 即所谓“稳态”。Brigg-Haldane在推导动力学方程时, 保留了Michaelis—Menten的(1), (2)点假设, 以“稳态”代替其第三点“平衡”的假设。



$$\text{ES的生成速度 } V^+ = \frac{d[ES]}{dt} = K_1[E][S] \quad (2\sim8)$$

$$\text{ES的消失速度 } V^- = -\frac{d[ES]}{dt} = K_{-1}[ES] + K_2[ES] \quad (2\sim9)$$

当处于稳态时, ES生成和消失的速度相等, 即

$$K_1[E][S] = K_{-1}[ES] + K_2[ES] = (K_{-1} + K_2)[ES] \quad (2\sim10)$$

将 $[E] = [E_0] - [ES]$ 代入式 (2~10), 则

$$K_1([E_0] - [ES])[S] = (K_{-1} + K_2)[ES] \\ [E_0][S] - [ES][S] = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}[ES] \quad (2\sim11)$$

$$\text{令 } \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} = K_m \quad (K_m \text{ 为米氏常数})$$

(2~11) 式写为

$$[E_0][S] - [ES][S] = K_m [ES]$$

$$[E_0][S] = K_m [ES] + [ES][S] = [ES](K_m + [S]) \quad (2\sim12)$$

同样用 $V_m = K_2 [E_0]$, $V = K_2 [ES]$ 代入式 (2~12)

则得动力学方程

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad \text{或} \quad V = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (2\sim13)$$

式 (2~7) 与 (2~13) 在形式上完全一样, 只是用 K_m 代替了 K_s 。式 (2~13) 在实际应用中更有普遍意义, 所以在今后应用动力学方程时, 采用 (2~13) 式。

应用动力学方程时应注意: 酶的反应速度必须是初速度, 即底物消耗在 5% 以内。方程

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

中的 $[S]$ 是酶促反应体系中的最终浓度。

二、动力学参数的意义及其求取

(一) K_m

K_m 是酶的特征性常数, 当 pH、温度和离子强度等因素不变时, K_m 是比较恒定的。纯度不同的同一种酶如果杂质中不含有可引起底物发生其他变化的蛋白质, 其 K_m 也相差不大。其数值一般在 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 的数量级范围内, 其单位用 mol/L 或 mmol/L 表示。

K_m 值在酶法分析中及代谢中均有重要意义, 这里仅对在临床酶学分析法中的几点意义加以讨论。

1. 已知某个酶的 K_m , 可以计算出在某一底物浓度时, 其反应速度相当于 V_m 的百分率。例如当 $[S] = 3K_m$ 时, 代入式 (2~13) 可得:

$$V = \frac{V_m \cdot 3K_m}{K_m + 3K_m} = \frac{3}{4} V_m = 0.75 V_m$$

2. 在测定酶活性时, 如果要使测得的初速度基本上接近 V_m 值, 而过量的底物又不至于抑制酶活性时, 一般 $[S]$ 值需为 K_m 值的 10 倍以上。

3. K_m 也可视为酶活性中心被底物占据一半时所需要的底物浓度。当 K_m 已知时, 任何底物浓度对酶活性中心被底物的饱和分数可由下式求出:

$$f_{ES} = \frac{V}{V_m} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (1\sim14)$$

4. 当不同结构的酶蛋白催化同一底物进行相同的反应时, 这些不同的酶蛋白称为同工酶。同工酶有原级和次级之分, 原级同工酶对同一底物的 K_m 往往是不同的, 而次级同工酶对同一底物的 K_m 常常是相同的, 故 K_m 的测定可以鉴别不同来源 (如不同组织或同一组织不同亚细胞组分) 提取的催化相同反应的酶是原级还是次级同工酶? 拟或是同一酶? 因不同来源的同一种酶的 K_m 是相同的。

5. 测定不同抑制剂对某个酶 K_m 及 V_m 的影响, 可以区别该抑制剂是竞争性还是非竞争性、反竞争性抑制剂。

(二) V_m 和 K_2 的意义

在酶的浓度不变时, 酶对特定底物的 V_m 也不同, pH 和温度、离子强度等介质因素也会

改变 V_m 的数值。当 $[S]$ 为无限大时， $V_m = K_2 [E]$ ，说明 V_m 和 $[E]$ 成线性关系，而直线的斜率为 K_2 。

K_2 代表单位时间内每分子酶所能催化反应的次数，其因次为秒，称为酶的转换率，有时也称为催化常数可用 K_{cat} 表示之。 K_{cat} 越大，表示酶的催化效率越高。转换率的求取可由 $V_m/[E_0]$ 计算。 $[E_0]$ 为酶的物质量浓度（mol/L）。对于由几个亚基组成的寡聚体酶，因每分子酶可有一个以上的活性中心，每个活性中心都可催化1分子底物的转变。此时 $[E_0]$ 应按活性中心的物质量的浓度计算，即：

$$[E_0] \text{ (mol/L)} = \frac{\text{酶的克数}}{\text{酶的分子量}} \times \text{每分子酶的活性中心数。}$$

(三) K_m 和 V_m 的求取

K_m 是酶分子重要的特征性参数，而 V_m 在计算转换率上有一定用途，故对 K_m 和 V_m 的求取就是酶动力学研究中的一个重要课题。

用 $[S] \sim V$ 作图不能准确地获得 V_m 和 K_m 的数据，因 V_m 是一个渐近的极限值，不可能从实验中直接得到；而 K_m 是 $V = \frac{1}{2} V_m$ 时的 $[S]$ 值，也就是 K_m ，而难于准确计算。最好按下面的几种作法处理动力学数据，求得 V_m 和 K_m 。

1. 林-贝 (Lineweaver—Burk) 倒数作图法

此法是将米氏方程式等号两边取倒数，变为林-贝氏方程：

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (2\sim15)$$

式(2~15)相当于 $y = ax + b$ ，

$a = \frac{K_m}{V_m}$ ， $x = \frac{1}{[S]}$ ， $b = \frac{1}{V_m}$ 是一直线

方程式， $\frac{1}{V} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图是一条直线，

斜率为 $\frac{K_m}{V_m}$ ，纵轴截距为 $\frac{1}{V_m}$ ，横轴截

距为 $-\frac{1}{K_m}$ （当 $\frac{1}{V} = 0$ ， $\frac{1}{[S]} = -$

$\frac{1}{K_m}$ ）。方程2~15的图形见图2~1。

此法最为常用，但代表 $\frac{1}{[S]}$ 和 $\frac{1}{V}$

数据的点子大多集中在座标的左下方，而低底物浓度的点子又因倒数后误差较大，往往偏离直线较远，从而影响 K_m 和

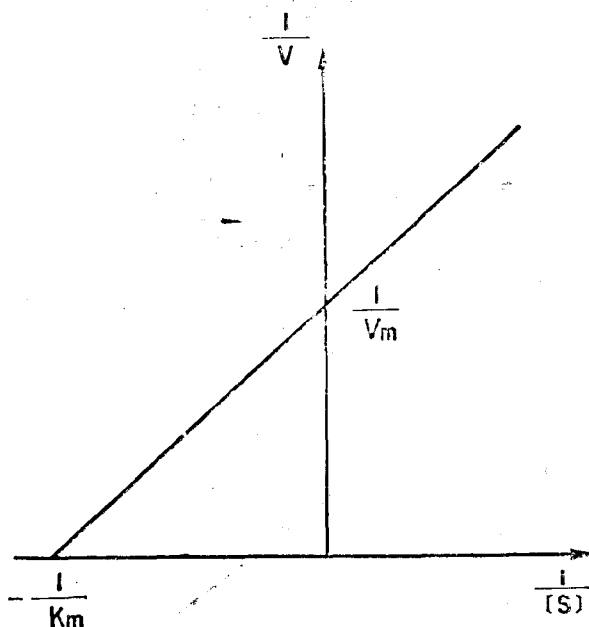


图 2~1 林-贝氏作图法

V_m 的精确测定，最好在设计底物浓度时，将 $\frac{1}{[S]}$ 而非 $[S]$ 配成等差级数，可使点子的

距离比较平均，再配以适当的最小二乘法线性回归分析，就可获得较准确的结果。

2. 其它直线作图法：

除了林-贝氏法以外，还有几个方法在某些情况下可能更方便。如 Hanes-Woolf 法： $\frac{S}{V} \sim S$ 作图，其特点是横轴 S 点分布均匀；还有 Woolf-Augustinsson-Hofstee 作图法： $V \sim V/S$ 作图；Eadie-Scatchard 作图法： $V/S \sim V$ 作图； V 不取倒数。此二法更适合于 V 测定误差较大的实验。

(1) Hanes - Woolf $\frac{S}{V} \sim S$ 作图：

$$\text{对方程 } V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

等式两边取倒数：

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_m [S]} \text{ 经移项得}$$

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{1}{V_m} \cdot [S] \quad (2 \sim 16)$$

以 $\frac{[S]}{V} \sim [S]$ 作图，斜率为

$\frac{1}{V_m}$ ，纵轴截距 $\frac{K_m}{V_m}$ 。当 $\frac{[S]}{V} = 0$ 时，

$[S] = -K_m$ ，所以横轴截距为 $-K_m$ ，其图形见图 2~2。

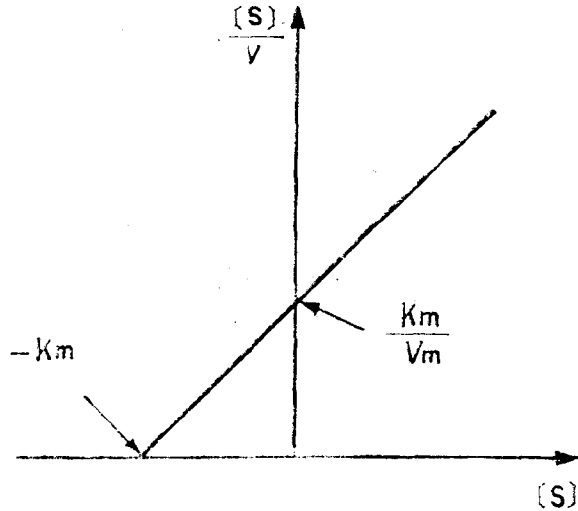


图 2~2 Hanes-Woolf $\frac{[S]}{V} \sim [S]$ 作图

(2) Woolf-Augustinsson-Hofstee $V \sim \frac{V}{[S]}$ 作图：

$$\text{由 } V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_m}{\frac{K_m}{[S]} + 1} \text{ 经转换可有}$$

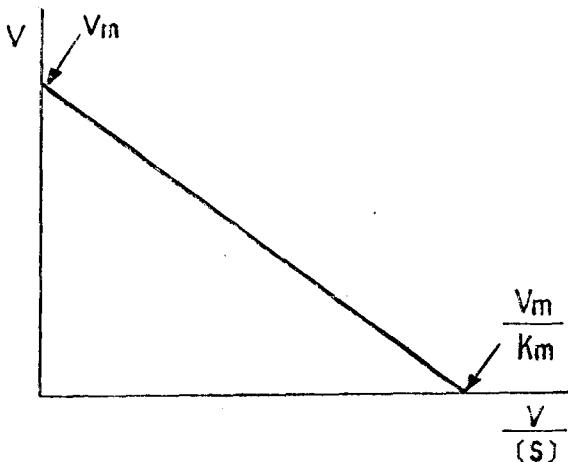


图 2~3 $V \sim V/[S]$ 作图

$$V = -K_m \frac{V}{[S]} + V_m \quad (2 \sim 17)$$

以 $V \sim \frac{V}{[S]}$ 作图，斜率为 $-K_m$ ，

在纵轴上截距为 V_m ，当 $V = 0$ 时 $\frac{V}{[S]} = \frac{V_m}{K_m}$ ，因此，横轴截距为 V_m/K_m 。其图形见图 2~3。

(3) Eadie-Scatchard 的

$\frac{V}{[S]} \sim V$ 作图：

$$\frac{V}{[S]} = -\frac{1}{K_m} V + \frac{V_m}{K_m} \quad (2 \sim 18)$$