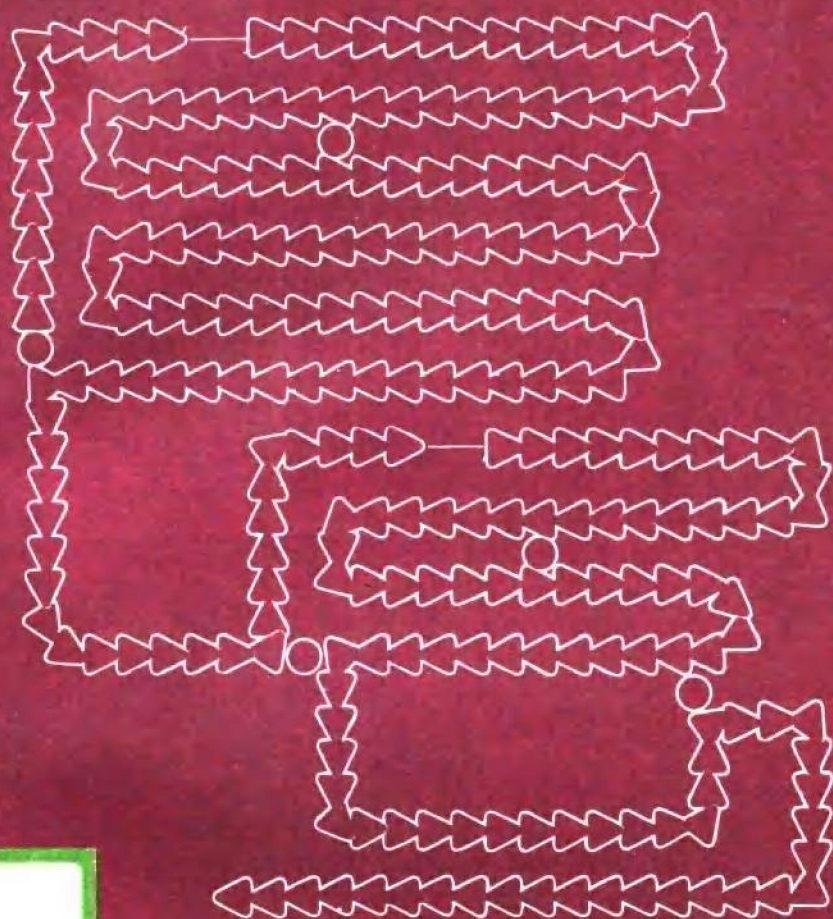


金长振 著

酶学

的理论与实际



北京科学技术出版社

ENZYMOLOGY



香港雪谷出版社

Principles and Practice

酶学的理论与实际

金长振 著

*

北京科学技术出版社

(北京西直门外南路19号)

香港雪谷出版社

出版

(香港新界龙珠岛F2座2楼4号)

新华书店首都发行所发行 各地新华书店经售

河北省蔚县 印刷厂印刷

*

850×1168毫米 32开本 10.75印张 280千字

1989年9月第一版 1989年9月第一次印刷

印数1—8000册

ISBN 7-5304-0573-X/R·72 定价：7.10元

内 容 简 介

本书系美国华盛顿大学金长振教授,根据他多年积累的酶学教学和科研经验,并结合他近年在北京医科大学主讲酶学的讲义撰著而成。本书全面介绍了酶的分离与提纯、酶的结构与功能、酶的反应动力学及反应机理等,并就酶活性的测定及酶在医药学上的应用作了深入的分析 and 阐述。本书特点是注重理论与实际并重,取材新颖,为我国出版的篇幅内容最丰富的酶学专著。是一本适合于生物学科和医药学科研究生、大学生、科研工作者和教师,学习研究酶学和进行酶学实验的重要参考书。

序

酶是生物体中司职新陈代谢最重要的物质,酶学则是研究酶及酶如何催化代谢反应的科学。由生物体中分离出来的酶已将近两千种,酶学方法(Methods in Enzymology)也发行将近两百卷,但是酶的许多特异性质和功能迄今仍尚未澈底了解。本书先就酶的分离提纯作较为详细的讨论,然后再将酶的结构,酶动力学及酶促反应机理分章各作概括地论述。随后更就体内酶体系的复杂关系和代谢作用尽可能地作出确切的解释,务使在理论及实际两方面都兼顾到。若欲对某些问题作更深入地探讨,可进一步查阅书中所列的参考文献,自己去钻研实验,求得答案。

本书承北京医科大学杜国光教授详予校订,谨此致谢。

凡例:

1. 本书中文名词主要根据英汉生物化学词典及英汉化学化工词汇二书(均科学出版社出版)。如无适当的中文名词,即采用英文原名。
2. 人名一律采用外文原名,无中文译名
3. 本书所用单位尽量采用 S. I. 单位,有些地方仍使用习用单位,以符合实用。
4. 本书主要参考书目如下:
 - (1) Dixon, M. , Webb, E. C. , Thorne, C. J. R. and Tipton, K. F. , *Enzymes*, 3rd Edition. Longman, London, 1979.
 - (2) Price, N. C. and Stevens, L. , *Fundamentals of Enzymology*, Oxford University Press, Oxford, 1982.
 - (3) Fersht, A. , *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd Edition, Freeman, New York, 1985.
 - (4) Lowry, O. H. and Passonneau, J. V. , *A Flexible System of Enzymatic Analysis*, Academic, New York, 1972.
 - (5) Blackburn, S. , *Enzyme Structure and Function*, Marcel Dekker, New York, 1976.
 - (6) Scopes, R. K. , *Protein Purification, Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, 1982.
 - (7) Saier, M. H. Jr. , *Enzymes in Metabolic Pathways*, Harper & Row, New York, 1987.
5. 所有参考文献均在引用处页下注明。

目 录

1 绪 论	1
1-1 酶的特性	1
1-2 酶的史程	2
1-3 酶的命名及分类	3
2 酶的分离与提纯	7
2-1 制酶的要点	8
2-2 酶源选材	8
2-2-1 含酶量	8
2-2-2 可用量	9
2-2-3 比较研究	9
2-2-4 亚细胞	9
2-3 匀 浆	9
2-3-1 动物细胞	9
2-3-2 植物、真菌及细菌	10
2-4 制酶的实际操作方法与设备	10
2-4-1 基本设备、特殊材料与试剂	11
2-4-2 酶的分离方法	12
2-4-3 根据酶分子大小轻重设计的分离方法	13
2-4-3-1 离心分离	13
2-4-3-2 凝胶过滤	14
2-4-3-3 透析及超滤	18
2-4-4 按分子荷电的正负多少设计的分离方法	21

2-4-4-1 离子交换层析	21
2-4-4-2 电 泳	25
2-4-4-3 等电聚焦	26
2-4-5 调整酶溶解度的分离方法	27
2-4-5-1 调整 pH	28
2-4-5-2 调整离子强度	28
2-4-5-3 降低介电常数	29
2-4-6 按酶分子亲和部位的特性设计的分离方法	30
2-4-6-1 亲和层析	30
2-4-6-2 亲和洗脱	35
2-4-7 其他方法	36
2-4-7-1 染料配体层析	36
2-4-7-2 免疫吸附层析	38
2-4-7-3 无机吸附层析	40
2-4-7-4 疏水吸附层析	40
2-4-7-5 液相层析	41
2-4-7-6 加热变性	43
2-4-8 方法的选择	43
2-5 酶纯度的测定	44
2-5-1 电 泳	44
2-5-2 酶纯度的其他分析法	48
2-6 酶分离提纯的实例	49
2-6-1 由人胎盘中提取雌二醇 17 β -脱氢酶	50
2-6-2 由刀豆中提取脲酶	51
2-6-3 由红面包霉菌中提取芳香多酶体系	52
3 酶的结构	54
3-1 酶分子量的测定	54
3-1-1 超速离心法	55
3-1-1-1 沉降速度法	55
3-1-1-2 沉降平衡法	56
3-1-2 凝胶过滤法	58
3-1-3 SDS-凝胶电泳法	58
3-1-4 氨基酸顺序法	60

3-2 酶的一级结构	60
3-2-1 一级结构的测定法	61
3-2-1-1 氨基酸的成份	62
3-2-1-2 氨基酸分析所遇到的问题	63
3-2-2 由相关的 DNA 顺序决定的酶分子的一级结构法	63
3-2-3 多肽链的断开	66
3-2-4 肽段的分离	67
3-2-5 纯肽段顺序的测定	67
3-2-5-1 N-端氨基酸测定法	67
3-2-5-2 C-端氨基酸测定法	68
3-2-5-3 肽链顺序的依次测定法	68
3-2-5-4 肽顺序自动测定仪	69
3-2-5-5 肽顺序的排列及全顺序的决定	70
3-2-5-6 测定肽顺序可能遇到的几个问题	70
3-2-6 全肽链顺序测定的实例	71
3-3 酶的二级和三级结构	76
3-3-1 酶分子结构的要素	77
3-3-1-1 酰胺键	77
3-3-1-2 α -螺旋	77
3-3-1-3 β -折叠片	78
3-3-1-4 β -转角	78
3-3-2 酶分子结构的特点	79
3-3-3 稳定酶分子折叠结构的几种力量	82
3-3-3-1 氢 键	82
3-3-3-2 静电引力	82
3-3-3-3 Van der Waals 力	82
3-3-3-4 疏水引力	83
3-3-4 牛 α -胰凝乳蛋白酶的结构	83
3-3-5 甘油醛磷酸脱氢酶的结构	85
3-4 酶的四级结构	85
3-4-1 亚基的类型及数目	85
3-4-2 亚基的组合方式	86
3-4-3 亚基间的组合力量	86
3-5 酶的 X 射线结晶分析学	87

3-5-1	结晶的培养	87
3-5-2	结晶的初步 X 射线衍射分析法	90
3-5-3	X 射线衍射法的精细分析	95
3-6	酶分子三维结构的展开与重新折叠	97
4	酶动力学	99
4-1	酶动力学的数据	99
4-2	恒态时酶促反应动力学的基本理论	101
4-2-1	Michaelis-Menten 公式	101
4-2-2	K_m 的特征	103
4-2-3	Michaelis-Menten 公式的运用	104
4-2-4	K_m 的求法	105
4-2-4-1	Lineweaver-Burk 图解法	105
4-2-4-2	Eadie-Hofstee 图解法	106
4-2-5	只有一种底物但情况比较复杂的酶促反应	107
4-2-5-1	多种活性中间物	107
4-2-5-2	底物的抑制	107
4-2-5-3	多个活性部位	108
4-3	pH 对酶促反应速度的影响	108
4-4	温度对酶促反应速度的影响	110
4-5	酶浓度对酶促反应速度的影响	110
4-6	激活剂对酶促反应速度的影响	111
4-6-1	离子	111
4-6-2	小分子有机化合物	111
4-6-3	激活酶	111
4-7	酶的抑制	112
4-7-1	不可逆抑制	112
4-7-2	可逆抑制	112
4-7-2-1	竞争性抑制	112
4-7-2-2	非竞争性抑制	113
4-7-2-3	反竞争性抑制	114
4-7-2-4	需活化后才能发挥作用的不可逆抑制剂	114
4-7-3	可逆抑制的动力学	116
4-7-3-1	竞争性抑制	116

4-7-3-2 非竞争性抑制	118
4-7-3-3 反竞争性抑制	119
4-7-3-4 各类可逆抑制反应的比较	121
4-8 两种底物的酶促反应	122
4-8-1 顺序反应机理	122
4-8-2 随机反应机理	125
4-8-3 乒乓反应机理	126
4-9 三种底物的酶促反应	129
4-10 恒态前的酶动力学	129
4-10-1 酶促反应常数	129
4-10-2 截流法	130
4-10-3 止流法	130
4-10-4 光激法	130
4-10-5 反应速度常数 k 的测量	131
4-10-6 酶促反应中活性中间物的检测	132
5 酶活性的测定与保持	133
5-1 影响酶活性测定的因素	133
5-1-1 底物浓度、激活剂及抑制剂	133
5-1-2 pH、离子强度及温度	136
5-2 中止反应法测定酶活性	137
5-2-1 中止反应法	137
5-2-1-1 恒温反应	138
5-2-1-2 产物的测量	138
5-3 连续法测定酶活性	140
5-3-1 非偶联的连续法	140
5-3-2 偶联的连续法	140
5-3-3 中止法及连续法的比较	142
5-4 酶活性的保持	143
5-4-1 缓冲液和 pH 的控制	143
5-4-2 温度	144
5-4-3 辅因子	144
5-4-4 酶多聚体的防止	144
5-4-5 稳定剂的添加	145

5-4-6	蛋白酶水解的防止	146
5-4-7	重金属抑制的防止	147
5-4-8	高盐溶液的酶沉淀或酶结晶	147
5-5	蛋白质浓度的测定	147
5-5-1	紫外线吸收法	148
5-5-2	Lowry 法	148
5-5-3	Bradford 法	148
5-5-4	双缩脲法	149
5-5-5	Kjeldahl 定氮法	149
5-5-6	沉淀定量法	149
5-6	酶活性测定的实例	149
5-6-1	雌二醇 17 β -脱氢酶的酶活性测定	149
5-6-2	脲酶的酶活性测定	151
6	酶促反应机理	152
6-1	酶促反应的本质	152
6-1-1	酶促反应的过渡态	152
6-1-2	酶的逼近及定位功能	154
6-1-3	酸碱催化	155
6-1-4	共价催化	157
6-1-5	底物的变形或扭曲	158
6-1-6	催化环境的改变	158
6-1-7	人工合成酶	159
6-2	酶促反应机理的实验测定	160
6-2-1	动力学研究	160
6-2-1-1	变更底物的浓度	160
6-2-1-2	底物结构的变化	160
6-2-1-3	可逆抑制	161
6-2-1-4	pH 的变更	161
6-2-1-5	恒态前的反应动力学	162
6-2-1-6	总结由酶动力学研究所得到的反应机理信息	164
6-2-2	中间物的侦测	164
6-2-3	X 射线结晶衍射法	164
6-2-4	氨基酸侧链的化学修饰	165

6-2-4-1	反应特殊的化学修饰	166
6-2-4-2	活性特异的氨基酸的修饰	167
6-2-4-3	亲和标记	168
6-2-4-4	化学修饰结果的诠释	169
6-3	酶促反应机理的实例	169
6-3-1	胰凝乳蛋白酶	170
6-3-1-1	胰凝乳蛋白酶的结构及功能概述	170
6-3-1-2	X 射线结晶衍射研究	171
6-3-1-3	中间物的侦测	174
6-3-1-4	氨基酸侧链的化学修饰	175
6-3-1-5	胰凝乳蛋白酶的反应机理	176
6-3-1-6	胰凝乳蛋白酶与其他蛋白酶在反应机理上的相同之处	177
6-3-2	丙糖磷酸异构酶	178
6-3-2-1	X 射线结晶衍射法的研究	179
6-3-2-2	底物的同位素标记	180
6-3-2-3	亲和标记	182
6-3-2-4	丙糖磷酸异构酶的催化机理	183
6-3-3	果糖二磷酸醛缩酶	183
6-3-3-1	动力学研究	184
6-3-3-2	中间物的检测	184
6-3-3-3	氨基酸侧链的化学修饰	185
6-3-3-4	果糖二磷酸醛缩酶的反应机理	187
6-3-4	乳酸脱氢酶	187
6-3-4-1	动力学研究	188
6-3-4-2	X 射线结晶衍射法的研究	189
6-3-4-3	氨基酸侧链的化学修饰	192
6-4	总 结	193
7	代谢过程酶活性的调控	195
7-1	酶本身活性的调控	195
7-1-1	改变酶本身的共价式结构来调控酶的活性	195
7-1-1-1	在调控酶活性时酶的共价式结构的改变是不可逆的	195
7-1-1-2	由共价式的可逆变化来调控酶的活性	198
7-1-2	配体调控酶	200

7-1-2-1	调控酶的实验根据	200
7-1-2-2	调控酶性能的几种理论模型	202
7-2	代谢过程的调控	206
7-2-1	概 论	206
7-2-2	信号的放大	207
7-2-2-1	底物循环	208
7-2-2-2	互相转换的酶循环	209
7-2-3	代谢过程各调控环节的决定	209
7-2-3-1	调控节点的测出	210
7-2-3-2	调控酶的断定	210
7-3	代谢过程调控的实例	211
7-3-1	糖酵解过程的调控	213
7-3-1-1	6-磷酸果糖激酶酶活性的调控	213
7-3-1-2	己糖激酶活性的调控	213
7-3-2	糖原代谢的调控	214
7-3-2-1	磷酸化酶活性的调控	215
7-3-2-2	体内配体的浓度	215
7-3-2-3	磷酸化酶的级联机理	216
7-3-2-4	磷酸化酶的暂停活动	216
7-3-2-5	糖原合酶的调控	216
8	生物体中的多酶体系	219
8-1	多酶体系的组成	219
8-2	大肠杆菌 RNA 核苷酸转移酶	220
8-2-1	RNA 核苷酸转移酶的结构	220
8-2-2	由 RNA 核苷酸转移酶和 DNA 的结合来发动转录作用	221
8-2-3	转录的伸延及终止	222
8-2-4	RNA 核苷酸转移酶各个亚基所担任的角色	223
8-3	多酶体系的形成及分离	224
8-4	多酶蛋白的性质	225
8-5	丙酮酸脱氢酶多酶体系	226
8-5-1	大肠杆菌丙酮酸脱氢酶多酶体系的分离与结构	227
8-5-2	反应机理	230
8-5-3	大肠杆菌丙酮酸脱氢酶体系的调控	231

8-5-4 哺乳动物组织中的丙酮酸脱氢酶体系	231
8-6 大肠杆菌色氨酸合酶体系	232
8-6-1 色氨酸合酶体系的结构	235
8-6-2 反应机理	236
8-7 生物合成芳香氨基酸的多酶体系	237
8-8 结 论	239
9 细胞中的酶	241
9-1 细胞里的区域化	242
9-1-1 亚细胞器的分离	242
9-1-2 细胞核	244
9-1-3 线粒体	245
9-1-4 溶酶体	247
9-1-5 内质网	250
9-1-6 胞液	251
9-2 代谢途径的区域化	253
9-2-1 肝中糖类及脂肪酸类代谢的区域化	253
9-2-1-1 糖原及脂肪酸代谢过程各有关酶的区划	253
9-2-1-2 各代谢途径间的相互联系	255
9-2-1-3 尼克酰胺辅因子、腺嘌呤核苷酸及辅酶 A 在细胞中的位置	255
9-2-2 红面包霉菌中精氨酸及鸟氨酸代谢的区域化	260
9-3 细胞膜中的酶	262
9-3-1 膜的功用	263
9-3-2 线粒体甘油 3-磷酸脱氢酶	263
9-3-3 肌浆网中的腺苷三磷酸酶	264
9-3-4 腺苷酸环化酶	265
9-4 体内的酶与底物浓度	268
9-4-1 细胞内大分子化合物的浓度	268
9-4-2 细胞中酶的联合作用	269
9-4-2-1 果糖二磷酸醛缩酶及甘油醛 3-磷酸脱氢酶	269
9-4-2-2 柠檬酸合酶、苹果酸脱氢酶与天冬氨酸氨基转移酶	270
9-4-2-3 精氨酸酶及鸟氨酸氨甲酰转移酶	270
9-4-3 酶和底物的相对浓度	271

10 酶医药学	273
10-1 诊断酶学	273
10-1-1 先天性酶缺乏症	274
10-1-2 酶诊断法	276
10-2 酶免疫分析学	276
10-3 酶疗法	278
10-4 酶药学	279
10-4-1 利用酶生产有机化合物	279
10-4-2 生物合成手性化合物	280
10-4-3 酶法合成抗生素	282
10-5 工艺上的酶源	285
10-6 医药用酶	286
10-7 固定酶	287
10-7-1 由消旋的氨基酸制造 L-氨基酸	289
10-7-2 从玉米粉制造糖浆	290
10-7-3 嵌入载体聚丙烯酰胺上的固定化葡萄糖氧化酶	291
10-7-4 固定酶的包胶囊	291
10-7-5 整细胞的固定化	292
10-7-6 固定酶在医药方面的用途	293
10-7-7 固定酶的酶活性测定	295
中文索引	297
英文索引	308

1 绪 论

生物的新陈代谢、繁殖生存包括许多复杂的化学反应,大都需要酶的催化方能完成。我们为了要深窥这些反应的内幕详情,必需从生物体中将酶分离,使反应系统简化,方易于研究。本书第二章将阐述酶的分离提纯方法,并举例加以说明。第三章将讨论酶的结构。第四章将阐述酶动力学。第五章将讨论酶活性的测定与保持,并以第二章的实例说明之。第六章将解释酶作用的机理。第七章将研讨生物的新陈代谢。至此有关酶学的基本各项都已概括的予以说明。其后各章将略述酶的生理作用、多酶体系、及酶在医学药学和工业上的应用等。

1-1 酶的特性

酶基本是蛋白质,主要由二十种氨基酸(Amino acid)组成。和其他蛋白质不同的地方在于它有催化生物化学反应的活性。在各个酶的活性部位(Active site),氨基酸侧链群都各有各自三维结构的方式,因此也各有专擅的活性(Activity),能催化某种独特的化学反应。和某种酶中数目种类都相同的氨基酸如果随意混合,任意排列,甚至整个分子的氨基酸组成和顺序都一样,但三维结构紊乱,肽链中心的构象不对,也还是没有催化活性的。

酶的催化效率极高,每克分子碳酸酐酶(Carbonic anhydrase)每分钟能周转(Turn over) 35,000,000 mole,或每秒钟 600,000 mole 的底物(Substrate),简直快得不可思议。酶的催化作用又有专一性(Specificity),脲酶(Urease)只催化尿素(Urea)的水解反应,甚

至和尿素构造极相近的硫脲(Thiourea),它也不发生催化作用。酶的这些特性都难以用热力学(Thermodynamics),动力学(Kinetics),甚至 X-射线结晶分析学(X-ray crystallography)作圆满的解释。至于酶的催化性质和无机催化反应一样,酶在整个反应过程中,最后并无变化。

和生物体相近的温度与 pH 最适于一般酶的催化作用。例如 NH_3 的合成在植物中由固氮酶(Nitrogenase)来催化,通常在 27°C 和中性 pH 下进行。但工业上由氮和氢来合成 NH_3 ,则要在 700°C 和 900 大气压下,复需要铁作催化剂,反应方能完成。

1-2 酶的史程^{〔1〕}

1837 Berzelius 认为发酵是活的细胞所造成,首先想到催化作用。

1857 Pasteur 认为酒的发酵是酵母(Yeast)细胞活动的结果。细胞如果死掉,就会失去发酵能力。

1878 Kuhne 提出 Enzyme 这个名词,按希腊文是在酵母中(In yeast)的意思。中文先译作酵素,现译作酶。

1897 Buchner 用不含细胞的酵母汁完成发酵。证明酶并无生命,只是一种化学物质。

1913 Michaelis 和 Menten 提出酶动力学原理并演算出 Michaelis-Menten 方程式。

1926 Sumner 从刀豆(Jack bean)中把脲酶分离出来并加以结晶,复证明了脲酶结晶是蛋白质。

1930 Northrop 得到胃蛋白酶(Pepsin)的结晶。

1946 Sumner 和 Northrop 因酶的结晶和对酶的研究得到了 Nobel 奖。

1965 Blake 对溶菌酶(Lysozyme)的结晶作 X-射线衍射分

〔1〕 *FEBS Lett*, Vol. 62, Suppl., Enzymes; 100 years (1976)。