

陈石根 编著  
周润琦

复旦大学出版社

# 酶学

E N Z Y M O L O G Y

E N Z Y M O L O G Y E N Z Y M O L O G Y E N Z Y M O L O G Y

E N Z Y M O L O G

# 酶 学

陈石根 周润琦 编著

复旦大学出版社

**图书在版编目(CIP)数据**

酶学/陈石根,周润琦编著. —上海:复旦大学出版社,2001.2  
ISBN 7-309-02574-1

I. 酶… I. ①陈…②周… II. 酶学-基本知识  
N. Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 31525 号

---

**出版发行** 复旦大学出版社  
上海市国权路 579 号 200433  
86-21-65102941(发行部) 86-21-65642892(编辑部)  
fupnet@fudanpress.com http://www.fudanpress.com

**经销** 新华书店上海发行所

**印刷** 复旦大学印刷厂

**开本** 787×1092 1/16

**印张** 27

**字数** 690 千

**版次** 2001 年 2 月第一版 2001 年 2 月第一次印刷

**印数** 1—3 000

**定价** 41.00 元

---

如有印装质量问题,请向复旦大学出版社发行部调换。

版权所有 侵权必究

## 内 容 提 要

全书共分 5 部分:概论、酶的生产与制剂、酶反应动力学及其应用、酶的作用原理、酶的生物学。共分 11 章,系统地阐述了酶的基本知识、基础理论和近代酶学研究方法与技术。

本书是以 60 年代我国著名科学家邹承鲁教授和伍钦荣教授的讲义为蓝本编写而成,并经再版,力求反映酶学的最新进展,强调理论与实践的结合。

本书适合于各大专院校生物学的研究人员、教师以及学生的教学及参考用书。

100150/06



## 序<sup>①</sup>

当代生物学的热点是结构生物学,自20世纪90年代以来至少已经有五种新的结构生物学专业期刊,它们是:*J. Structural Biology*, 1990; *Current Opinions, Structural Biology*, 1991; *Macromolecular Structure*, 1991; *Structure*, 1993; 以及由 *Nature* 1994年新推出的 *Structural Biology* 专刊。其中特别值得注意的是已有几十年历史的 *J. Structural Biology* 的几次更名。该刊创刊时的刊名是 *J. Ultrastructure*, 主要发表用电子显微镜观察生物精细结构的研究论文,后来随着分子生物学成为生物学的主流,1972年更名为 *J. Molecular Structure Research*, 1990年又改为现名,应该说该刊三次改名在一定程度上反映了生物学发展的方向。

从上述几种主要结构生物学期刊论文内容分析,大部分是从蛋白质结构(主要是三维结构)分析阐明其生物学功能。此外,还有一些新刊以蛋白质为主题,其中最重要的有 *Proteins, Structure, Function and Genetics* 及 *Protein Science*。这两种刊物虽然创刊时间不长,但在生物化学与分子生物学领域的学术刊物中已经颇有影响,其 *Impact Factor* 都已经超过了以核酸为主题的主要专业刊物 *Nucleic Acid Research*。这些客观事实都说明蛋白质是当前生物化学与分子生物学范围内最有影响和最为活跃的领域。如果说,生物大分子研究的主流20世纪50年代从蛋白质转向了核酸,那么,现在可以说又从核酸转回蛋白质了。国际性的蛋白质学会在1989年成立时曾宣称蛋白质研究的第二个黄金时代已经开始,实在是符合近年来学科发展实际情况的。

*Ribozyme* 的发现虽然说明核酸也可以有酶活性,但个别事例并没有改变几乎所有的酶都是蛋白质的事实。蛋白质研究的第二个黄金时代也必然包括酶的研究作为其中最重要的组成部分之一。我国蛋白质和酶的研究是有基础的,但是科学发展极为迅速,研究手段日新月异,新的研究成果不断涌现,对我国生物学研究和教学工作者来说,实在是需要一本综合论述酶学研究的书。这本书的出版满足了这一需要。本书编者是在有关领域内有多年教学经验的科学家,从而保证了本书的质量。近年来,我国科学家和一些外国华裔科学家,已经在酶学领域内做出了不少极为重要的贡献,多数已在国际上知名的刊物上发表,有的甚至已被收入在国外出版的教科书和专著中。作为在国内出版的一本酶学教科书,本书似应对我国自己的贡献给以足够的重视。这一点希望能在再版时有所补充。

邹承鲁

1997年3月10日

---

① 本书书稿完成后,送请中国科学院院士、中国科学院生物学部主任、中国分子生物学与生物化学学会理事长邹承鲁教授审阅,承蒙邹老写此序言。

## 修改版前言

本书是酶学第一版(湖南科学技术出版社, 1987)的修改本。第一版受到了读者们的热烈欢迎, 很快销售告罄, 作者和出版社都不断收到大学生、研究生及科技工作者的来信, 要求添印供应或修改供应。为报谢读者们的希望, 作者决定修订再版。

酶学和其他学科一样, 近年来进展极为迅速, 新概念、新理论、新方法日新月异, Ribozyme、抗体酶、Hybrid enzyme 的发现, 蛋白激酶、含水有机溶剂介质系统中的酶促反应的深入研究与认识, PCR 技术、体外转录及体外翻译系统的建立, 融合基因表达产物“标签”分离法、Streamline 的开发, 基因工程、蛋白质工程的普及与应用, 都在酶学的进一步发展中起着十分重要的作用, 这些将在修改版中加以补充介绍。

鉴于酶学文献资料的不断涌现, 也由于本书篇幅的限制, 因此, 在再版时拟略去原版中各具体章节的文献, 而在各章后推荐一些相关论题的评述性资料供读者进一步深入阅读参考。

本书在编写过程中主要参考了下列书籍和有关杂志, 并在相应的章节引用了其中的一些图表, 在此对有关书籍和杂志的作者们以及出版公司致以谢意。

参考的主要图书:

- Price, N. C. & Sterens, L., *Fundamentals of Enzymology*, Oxford, New York, 1980  
Suelter, C. H., *A Practical Guide to Enzymology*, John Wiley & Sons Inc., 1985  
Wiseman, A., *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2nd ed., Ellis Horwood Ltd., 1985  
Walker, J. M. & Gingold, E. B., *Molecular Biology and Biotechnology*, Burlington House, London, 1985  
Alberts, B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. & Waston, J. D., *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., Garland Publishing Inc. New York & London, 1994  
Murray, R. K. Granner, D. K. Rayes, P. A. & Rodwell, V. W., *Harper's Biochemistry (A Lange Medical Book)*, 21st ed., Appleton & Lange, Norwalk Connocitcul/San Matco, Colifonia, 1988

陈石根 周润琦

1996. 11. 25 于复旦

## 第一版前言

随着分子生物学与生物技术的迅速发展,各学科间日益普遍地相互渗透,酶(学)的应用也愈来愈广泛、深入。为了适应这种形势,许多准备和正在从事酶学研究和应用的学生、教师以及有关的科技人员需要一本较为全面的酶学基础教材与参考书,本书编写的目的就是希望能满足这一要求。

本书系统地介绍了酶学的基础理论、基础知识和基础研究方法,并在此基础上力图展现现代酶学概貌,反映近年来的进展。

本书在叙述上力求简明扼要,并配以适当的图表进行说明;在动力学讨论方面避免繁复的公式推导,但力求说清楚各关系式的意义、特点与应用;本书选用了大量的参考文献,以备读者为深入了解某些问题进一步查索。

本书是以60年代我国著名科学家邹承鲁教授和伍钦荣教授在复旦大学兼职教授酶学时的讲义为蓝本编写而成。邹承鲁教授为培养下一代酶学工作者作出了卓越的贡献,他早年编写的讲义与大纲至今仍然闪烁着他对酶学的深刻认识与智慧,为此,作者们对他表示由衷的敬意。30多年来酶学有了非常显著的进展,本书力图将现代酶学成就充实进去,但限于作者水平,可能消化不透,理解不深,希望专家、读者指正。

陈石根 周润琦  
1986.7 于复旦大学

# 目 录

第一部分 概论	1
第一章 酶和酶学	1
第一节 酶是生物催化剂	1
一、酶是催化剂	1
二、酶是一种特殊的催化剂	1
三、酶是生物催化剂	6
第二节 酶(学)与生产实践	7
一、酶制剂的应用	7
二、酶分析的应用	10
三、酶生物学知识的应用	12
第三节 酶学与基础理论	14
一、酶学和现代化学	14
二、酶学与分子生物学	14
第四节 酶学的发展历史	15
第二章 酶的分类与命名	17
第一节 酶的分类命名原则	17
第二节 各类酶及其辅助因子	18
一、氧化还原酶类	18
二、转移酶类	24
三、水解酶类	31
四、解(合)酶类	38
五、异构酶类	39
六、合成酶类	41
第三节 酶的多形性与同工酶	42
第四节 其他习惯归类命名法	44
一、单体酶和寡聚酶	44
二、恒态酶和调节酶	44
三、多酶复合物(多酶系统)	46
四、胞内酶、胞外酶和“外向酶”	47
第五节 维生素和辅酶物质	47

<b>第二部分 酶的生产与制剂</b> .....	50
<b>第三章 酶的生产、改造与模拟</b> .....	50
<b>第一节 酶的发酵生产</b> .....	50
一、产酶菌的获得 .....	50
二、产酶菌的培养 .....	52
<b>第二节 提高酶发酵产量的方法</b> .....	55
一、酶的合成调控机制 .....	55
二、通过条件控制提高酶产量 .....	58
三、通过基因突变提高酶产量 .....	59
四、通过体内基因重组提高酶产量 .....	61
五、通过体外基因重组提高酶产量 .....	64
六、其他提高酶产量的方法 .....	73
<b>第三节 动植物原料和细胞培养</b> .....	74
一、动植物原料 .....	74
二、细胞培养 .....	75
<b>第四节 酶的改造</b> .....	75
一、酶在应用中可能出现的问题与对策 .....	75
二、化学修饰 .....	76
三、变性、诱导与构象重建 .....	77
四、蛋白质工程 .....	78
<b>第五节 酶的模拟</b> .....	82
<b>第六节 其他类型生物催化剂</b> .....	83
一、RNA 型的催化剂 .....	83
二、抗体酶 .....	87
三、寡核苷酸引导的人工内切核酸酶 .....	88
<b>第四章 酶的分离纯化与制剂</b> .....	91
<b>第一节 酶分离纯化工作的基本原则</b> .....	91
<b>第二节 酶的抽提</b> .....	92
一、预处理和破细胞 .....	92
二、抽提 .....	93
三、浓缩 .....	94
<b>第三节 酶的纯化原理与方法</b> .....	95
一、根据溶解度不同进行的纯化 .....	96
二、按照分子大小进行的纯化 .....	100
三、建立在电学解离性质进行的纯化 .....	106
四、利用专一亲和作用进行的纯化 .....	118
五、高效液相层析 .....	126
六、根据稳定性差别建立的纯化 .....	127

七、结晶 .....	128
八、纯化方法的排列顺序 .....	129
第四节 酶的纯度与产量 .....	129
一、活力测定 .....	129
二、纯化方法与条件的比较标准 .....	130
三、纯度的标准 .....	130
第五节 酶的剂型与保存 .....	131
一、酶的剂型 .....	131
二、酶的稳定性与保存 .....	132
<b>第五章 固定化酶和固定化细胞 .....</b>	<b>135</b>
第一节 酶和细胞的固定化 .....	135
一、酶的固定化方法 .....	135
二、辅酶及偶联酶系的固定化 .....	145
三、固定化细胞 .....	148
四、酶活性调节物质的同时固定化 .....	151
第二节 固定化酶和固定化细胞的性质 .....	152
一、固定化对酶活性及酶反应系统的影响 .....	152
二、固定化对酶稳定性的影响 .....	154
三、固定化对细胞性质的影响 .....	155
第三节 固定化酶的应用 .....	156
一、固定化酶在工农业生产上的应用 .....	156
二、固定化酶在医药治疗上的应用 .....	157
三、固定化酶在分析化学中的应用 .....	159
四、固定化酶与基础理论 .....	160
<b>第三部分 酶反应动力学及其应用 .....</b>	<b>163</b>
<b>第六章 酶反应动力学 .....</b>	<b>163</b>
第一节 酶反应动力学体系 .....	163
第二节 酶(促)反应基本动力学关系 .....	166
一、米氏方程的推导 .....	166
二、米氏方程的物理意义 .....	171
三、米氏方程的某些重要表达形式及图形 .....	174
四、米氏方程的适用范围 .....	176
第三节 抑制剂对酶反应的影响 .....	183
一、抑制类型 .....	183
二、可逆抑制的动力学 .....	184
三、可逆抑制和不可逆抑制的相似性 .....	187
四、抑制与活化 .....	188
五、过渡态底物类似物 .....	189

六、几种类型的抑制剂	191
第四节 pH 对酶反应的影响	192
一、酸、碱对酶稳定性的影响	192
二、pH 对酶活力的影响	193
三、研究 pH 对酶反应影响的意义	197
第五节 温度对酶反应的影响	199
一、酶反应的“最适温度”	199
二、温度对酶反应速度的影响	199
三、温度与酶反应历程	202
四、酶的热稳定性	203
第六节 固定化酶催化反应动力学	204
一、研究固定化酶反应动力学的意义	204
二、固定化酶的动力学参数和性态	204
第七节 含水有机溶剂介质系统中的酶促反应性态	214
<b>第七章 酶分析</b>	221
第一节 酶活力测定	221
一、终点法	221
二、动力学法	222
第二节 酶法分析	237
一、动力学分析法	237
二、总变量分析法	238
第三节 酶标免疫分析	240
一、原理与方法	240
二、酶标免疫分析中的几个问题	243
第四节 酶循环分析法	245
一、酶循环分析法原理	245
二、酶循环分析法动力学	245
第五节 固定化酶在酶分析中的应用	247
一、酶(膜)电极	248
二、酶管感应分析器	249
第六节 酶分析的自动化问题	250
一、初速度法	250
二、固定浓度法	251
三、固定时间法	251
<b>第八章 酶反应器</b>	254
第一节 酶的应用形式	254
一、完整细胞	254
二、溶液酶	254
三、固定化酶	255

第二节 酶反应器	257
一、酶反应器类型	257
二、酶反应器的选择	259
三、酶反应器的有关动力学问题	260
第三节 酶反应条件	267
一、转化率和产率	267
二、酶反应条件的选择与目标函数	268
三、多酶反应器的条件控制	271
第四节 酶反应器的应用	272
一、氨基酰化酶在生产 L-氨基酸上的应用	272
二、固定化菌体在生产 L-门冬氨酸上的应用	276
三、应用连续流双酶反应器生产 L-丙氨酸	277
第五节 酶工程的现状与前景	279
<b>第四部分 酶的作用原理</b>	<b>283</b>
<b>第九章 酶的催化原理</b>	<b>283</b>
第一节 酶催化功能的结构基础	283
一、酶的相对分子质量测定	283
二、酶的氨基酸组成测定	284
三、酶的一级结构测定	285
四、酶的二级、三级结构测定	287
五、酶的四级结构测定	289
六、活性中心的测定	290
第二节 酶反应历程与方式	298
一、酶-底物络合物的检测	298
二、酶反应方式与反应历程	301
第三节 酶的作用专一性机制	304
一、酶的刚性与“锁和钥匙”学说	305
二、酶的柔顺性与“诱导契合”学说	305
三、扭曲与过渡态学说	307
第四节 酶反应的催化机制	308
一、张变、扭曲效应	309
二、酸碱催化	310
三、共价催化	312
四、静电催化	313
五、多元催化与协同效应	313
六、微环境效应	314
七、邻近效应与定向效应	314
<b>第十章 酶作用的调节原理</b>	<b>317</b>



第一节	通过共价结构改变进行的调节	317
一、	不可逆的共价调节	317
二、	可逆的共价调节	321
第二节	通过聚合(结合)解离进行的调节	332
一、	聚合解离调节	332
二、	结合解离调节	333
第三节	别构调节	334
一、	别构调节的基本特征	334
二、	别构调节的几种模式学说	338
三、	别构酶的实验研究	344
四、	滞后效应与记忆酶	348
五、	别构调节的生理意义	349
<b>第五部分</b>	<b>酶的生物学</b>	<b>351</b>
<b>第十一章</b>	<b>酶的生物学</b>	<b>351</b>
第一节	酶和细胞结构	351
一、	细胞结构	351
二、	酶(或酶系统)在细胞中的定位研究	355
三、	各细胞器中酶的分布	357
第二节	酶在生物体内的功能	359
一、	执行某种具体的生理功能	359
二、	担负保卫清除任务	360
三、	协同激素等起信号传递与放大作用	361
四、	催化代谢反应	365
第三节	酶和代谢调节	393
一、	代谢系统中酶的结构与组织	393
二、	代谢系统的区划化及其相互联系	397
三、	同工酶	400
四、	酶与代谢活性调节	400
五、	酶合成水平上的调节与酶的周转	407
第四节	酶生物学知识的应用	413
一、	酶生物学知识和医学实践的关系	413
二、	酶生物学知识在农业生产上的应用	413
三、	酶生物学知识与发酵工业	414

# 第一部分 概 论

## 第一章 酶和酶学

地球上到处有生命,从参天的大树到显微镜下才能看到的细菌、病毒,从天上飞的鸟到水中游的鱼,形形色色,种类繁多。但是不管生物如何多种多样,凡有生命的地方几乎都有酶(enzyme),都需要酶。酶和生命活动密切相关,它几乎参与了所有的生命活动、生命过程。

酶在生产实践中同样起着十分重要的作用,推动着生产的发展和人类文明的进步,它几乎渗入了人们生活的各个领域。

酶的发现和应用可溯源到千百年前,但酶的本质直到近几十年才被逐渐认识。

酶学(Enzymology)是研究酶的性质、酶的作用规律、酶的结构和作用原理、酶的生物学功能及酶的应用的科学。学习酶学就是为了更好地了解酶、掌握酶,使酶更好地为人民所用。

### 第一节 酶是生物催化剂<sup>(1-4)</sup>

#### 一、酶是催化剂

催化剂(catalyst)是一类能改变反应速度,但不改变反应性质、反应方向和反应平衡点,而且本身在反应后也不发生变化的外因因素。例如,核酸水解为核苷酸,蛋白质水解为氨基酸,淀粉水解为葡萄糖,就其热力学性质而言,这些反应完全能够进行,而且甚至可以达到彻底水解的程度;但是,在通常情况下,这些反应进行得极为缓慢。为了加速反应,必须加入某些外因因素,例如,少量的酸、碱或酶。酸、碱和酶在这个过程中本身不消耗,它们起的就是催化剂的作用。

那么,酶和酸、碱有什么不同呢?

#### 二、酶是一种特殊的催化剂

酶和酸、碱等无机或有机的催化剂相比,其特点是:

##### 1. 酶是高效催化剂

(1) 酶能在温和条件下,例如,常温、常压和近中性的 pH 条件下,大大加速反应;

(2) 在可比较的情况下,酶的催化效率相对其他类型的催化剂而言,可达  $10^7 \sim 10^{12}$  倍。

以  $H_2O_2$  分解为例:



以铁离子催化,反应速度为  $5.6 \times 10^{-4} \text{ mol}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ;

以血红素催化,接近  $6.0 \times 10^{-1} \text{ mol}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ;

而以过氧化氢酶催化时,可达  $3.5 \times 10^6 \text{ mol}/(\text{mol}\cdot\text{s})$ 。

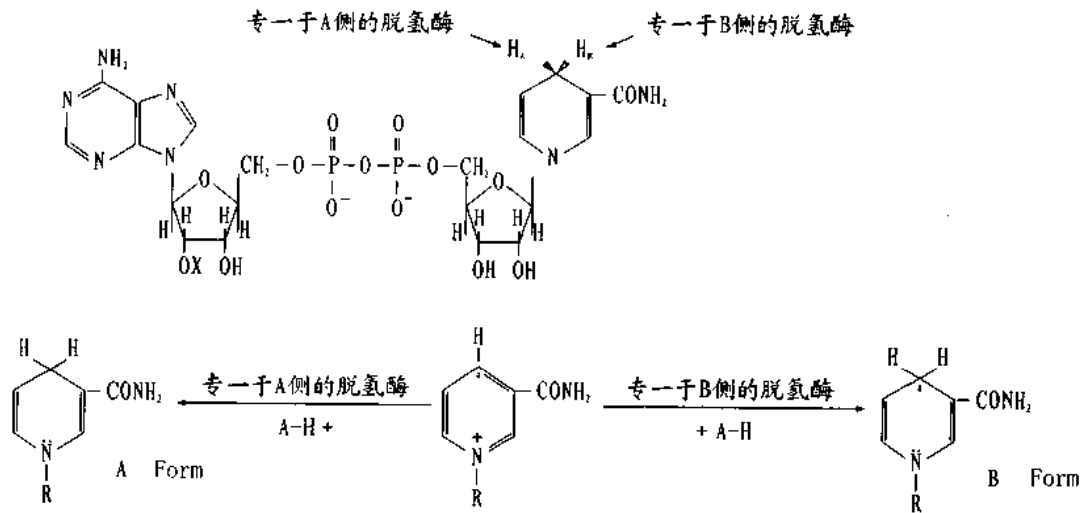
## 2. 酶具有高的作用专一性

所谓高的作用专一性 (specificity), 乃是指酶通常只能催化一种或一类反应, 作用一种或一类极为相似的物质。以谷氨酸可能进行的几种反应为例:

- (1) L-谷氨酸 + NAD(P)<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$   $\alpha$ -酮戊二酸 + NH<sub>3</sub> + NAD(P)H
- (2) L-谷氨酸 + 草酰乙酸  $\rightleftharpoons$   $\alpha$ -酮戊二酸 + L-门冬氨酸
- (3) L-谷氨酸  $\rightleftharpoons$   $\gamma$ -氨基丁酸 + CO<sub>2</sub>
- (4) L-谷氨酸  $\rightleftharpoons$  D-谷氨酸

这些反应如果用吡哆醛和铜催化, 则后面三种反应, 即反应 (2)–(4) 都能加速; 但用酶催化时, 则不同的反应需要不同的酶: (1) 需用谷氨酸脱氢酶; (2) 需用谷草转氨酶; (3) 需用谷氨酸脱羧酶; (4) 需谷氨酸异构酶。酶的这种性质称为酶的反应专一性。类似地, 如果将谷氨酸换成其他氨基酸, 那么, 采用的酶也须作相应的更改, 这种性质称为酶的底物专一性 (注意: 酶学中反应物称为底物 (substrate))。在底物专一性方面, 有的酶显示“绝对”专一

(A)



(B)

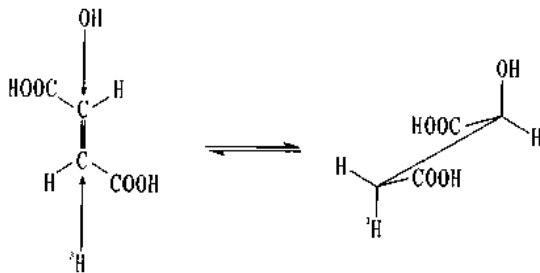
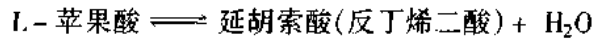


图 1.1 NAD(P) 的尼克酰胺环及脱氢酶表现的潜手性专一性 (A)  
延胡索酸酶表现的潜手性专一性 (B)

性;不过,更多的酶表现相对专一性,即容许底物分子上有小的变动。底物专一性的一个重要特征就是酶对底物的立体异构体和顺反异构体具有高度选择能力,表现立体专一性(stereospecificity)和顺反专一性(cis-trans specificity),就是说,当酶作用的底物和形成的产物具有立体异构体或顺反异构体时,酶能够加以识别,并选择地催化其中之一进行反应或催化其中之一形成。例如,L-谷氨酸脱氢酶只能作用L-谷氨酸或催化L-谷氨酸形成,而非D-谷氨酸。又如,延胡索酸酶催化的反应:



该酶在反应式的一端专一于反丁烯二酸,而在另一端专一于L-苹果酸。值得特别提到的是,大多数脱氢酶对尼克酰胺核苷酸辅酶NAD(P)<sup>+</sup>或者NAD(P)H中的尼克酰胺环第四位碳原子(C-4)上的两个氢表现特殊的立体专一性,称为潜手性(prochirality)专一性。虽然尼克酰胺环上的C-4既非不对称碳,也无顺反异构特征,但脱氢酶却都能专一地识别并作用这个碳原子上两个氢中的一个。正因为这个原故,以尼克酰胺核苷酸为辅酶的脱氢酶可以此分为A,B两型,如图1.1(A);潜手性专一性也可在脱氢酶以外的其他酶反应中观察到,例如延胡索酸酶对L-苹果酸就表现这种专一性(图1.1(B))。

酶具有高度的作用专一性也表现在某些酶能及时地修正其催化过程中产生的错误(proof-reading or editing)。例如,DNA聚合酶I能识别并除去错配的核苷酸,从而保证了DNA复制时的误参率在 $10^{-8} \sim 10^{-10}$ 以下;类似地,氨(基)酰-tRNA合成酶也能自动地消除其作用过程中误活化的氨基酸,从而使蛋白质合成时的氨基酸错误参入率低于 $10^{-4}$ 。

酶的这些催化特点和它的化学本质有关。

### 3. 酶的化学本质是蛋白质

酶的化学本质是蛋白质的根据有:

(1) 酶是高分子胶体物质,而且是两性电解质,在电场中酶能像其他蛋白质一样泳动,酶的活性-pH曲线和两性离子的解离曲线相似;

(2) 导致蛋白质变性的因素,如酸、碱、热、紫外线、表面活性剂、重金属盐以及其他蛋白质变性剂,也往往能使酶失效;

(3) 酶通常都能被蛋白水解酶水解而丧失活性;

(4) 对所有已经高度纯化、而且达到均一程度的酶进行组成分析,都表明:它们或者是单纯的蛋白质,或者是蛋白质与小分子物质构成的络合物;

(5) 根据核酸酶(RNase)的一级结构,人们已从氨基酸开始人工合成了具有相同催化活性的蛋白质产物。

在已知的酶中,许多酶进行催化时需要有助因子(cofactor)参加。辅助因子通常是一些小分子物质,可大致分为两类:辅酶物质(coenzyme)和活化剂(activator)。这两类物质的主要区别是:

(1) 辅酶在结构上多是较为复杂的有机分子,其中极大部分是B族维生素衍生物,如尼克酰胺核苷酸、黄素核苷酸及硫胺素焦磷酸等。某些辅酶结构中包含金属,如含铁的血色素。个别辅酶本身就是金属离子,如酰化酶中的钴。而活化剂则往往是一些简单的离子化合物,如 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 等。

(2) 酶(蛋白)分子与辅酶分子之间通常有一定的比例关系,通过透析等方法除去辅酶物质后,酶活性就会降低、甚至失去活力;而活化剂和酶之间则没有严格的比例关系,其作用主要是提高酶的活力,没有它,酶也有某种程度的催化能力。活化剂的有效浓度一般为  $10^{-5}$  mol/L ~  $10^{-3}$  mol/L,大于  $10^{-3}$  mol/L 时还可能抑制酶的活性。对于需要辅酶物质的酶来说,包含辅酶物质的酶称为全酶(holoenzyme),除去辅酶物质后的蛋白质部分则称为酶蛋白(apoenzyme);辅助因子相对酶蛋白来说,有时称为配基(ligand)。

(3) 酶对活化剂的选择性一般不高,相似的离子常可替代,例如,  $Mn^{2+}$  就可替代  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$  等可替代  $Zn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  等。辅酶物质则不然,它们以特定方式参与相应的酶反应,不能相互替代。辅酶物质根据其作用方式及其与酶蛋白结合的紧密程度,又可进一步分为三类:载体底物(carrier substrate)、辅酶和辅基(prosthetic group)(表 1.1)。

表 1.1 载体底物、辅酶、辅基

类 型	载体底物	辅 酶	辅 基
化学性质	小 分 子 有 机 化 合 物		
作用方式	参 加 反 应	催 化 剂 的 组 成 部 分	
与 酶 组 合	松		紧
例	NAD(P) <sup>+</sup>	硫胺素焦磷酸	FMN, FAD

辅酶物质本身也有弱的催化能力,但其催化效率远不能和酶相比,例如,血红素是过氧化氢酶的辅基,但它的催化效率只不过是过氧化氢酶的百万分之一。同时,其作用选择性也很低,只有在与酶蛋白结合以后,才表现出高度专一的催化活性,例如,磷酸吡哆醛可催化上述与谷氨酸有关的多种反应;然而,只有和特定的蛋白质结合后,它们才能形成各种具有高度专一性的酶,如谷氨酸脱羧酶、谷草转氨酶等。这说明:即使是需要辅酶物质的酶,蛋白质仍然是酶高效和高度专一催化特性的主导因素。

酶的化学本质是蛋白质的观念在本世纪 70 年代后期、特别是 80 年代初期,由于某些发现而受到了强有力的冲击。因为某些酶,如核糖核酸酶 P (RNase P)、1,4- $\alpha$ -糖原支链酶(1,4- $\alpha$ -D-glucan 6- $\alpha$ (1,4- $\alpha$ -)glucan transferase)、磷酸果糖激酶等,在其结构成分中除了蛋白质外,还包含 RNA,而且, RNA 成分在催化过程中起着不可或缺的作用,以 RNase P 为例,它是催化 tRNA 前体 5'-端成熟的内切核酸酶,由 77% 的 RNA 和 23% 的蛋白质组成。Altman 等发现:该酶能经受胰蛋白酶的作用,但在微球菌核酸酶或核糖核酸酶 A 处理后失去活性;通过柱层析或电泳可将其蛋白质和 RNA(M1 RNA)成分分开,得到的蛋白质和 RNA 在 10 mmol/L  $Mg^{2+}$  存在条件下,单独都不表现 RNase P 的活性,但重组后活性立即恢复,说明 M1 RNA 和 RNase P 活性有十分密切的关系。不过,当时在观念上尚未突破酶是唯一的生物催化剂的基本框架。只有到了 80 年代,由于 Cech 等的发现,才使人们对 RNA 在催化过程中的作用有了认识上的根本改变。

Cech 等在研究 rRNA 前体加工成熟为 26S rRNA 的过程中发现:① 某些原生动物,如四膜虫(Tetrahymena),在它们的 rDNA 中,有的包含插入顺序(intervening sequence, IVS),例如, *T. Thermophica* 的 rDNA IVS 为 413 个碱基对,但 *T. Pigmentia* 8ALP 的 rDNA 中没有 IVS,说明 IVS 与四膜虫的生存无关。② 四膜虫的细胞核在低浓度的一价阳离子体系中能

转录合成 rRNA 前体,生成的 rRNA 前体在  $75 \text{ mmol/L } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $5 \sim 10 \text{ mmol/L MgCl}_2$  以及  $1 \mu\text{mol/L}$  鸟核苷化合物(如 GTP、GDP、GMP 或 GR 等)存在的条件下具有自我剪接(splicing)的转录后加工成熟能力,即先从前体切下 IVS,余下的主体部分再连接形成成熟的 rRNA;游离出来的 IVS 被先后去掉一个包含 15 个碱基的核苷酸片段和一个包含 4 个碱基的核苷酸片段,分别形成环状(C)和线性(L)的 C-15、L-15、C-19、L-19 IVS。引人注意的是,rRNA 前体的这种自我剪接能力可经受 SDS-酚的抽提、SDS 存在条件下的煮沸以及蛋白酶的处理。③ 为了排除 rRNA 前体中可能带有痕量的蛋白质性质的酶发挥作用,将包含有 IVS 的 rDNA 与 Lac UV5 在体外进行了重组,重组子再克隆于大肠杆菌 EK 系,得到的 DNA 中包含:Lac UV5 的 35 个碱基对、rRNA 5'-端外显子 261 个碱基对、IVS 413 个碱基对和 rRNA 3'-端外显子 624 个碱基对。然后再以此 DNA 作为模板,用大肠杆菌 RNA 聚合酶 I 在体外进行转录。结果表明这样得到的 rRNA 前体同样具有自我剪接成熟的能力。根据这些事实,Cech 等认为,该 rRNA 前体本身就具有自我催化能力,是一种 RNA 性质的生物催化剂。以后的研究又进一步证明,L-19 IVS 还具有磷酸酯酶、磷酸二酯酶、核酸酶以及核苷酸转移酶等多种催化活性。

继 Cech 等人的工作之后,Altman 和 Pace 两家实验室也同时完成了另一项重要的进展,他们发现:① RNase P 层析或电泳分离后得到的 M1 RNA 组分在大于  $20 \text{ mmol/L Mg}^{2+}$  条件下,或在  $10 \text{ mmol/L Mg}^{2+}$  和  $1 \text{ mmol/L}$  亚精胺存在条件下,和 RNaseP 同样,也具有催化 tRNA 前体 5'-端成熟的活性;② 将 M1 RNA 的基因在体外进行转录,可得到包含 413~414 个碱基的转录产物 RNA,该 RNA 产物同样能催化 tRNA 前体的 5'-端成熟。这些说明 M1 RNA 本身就具有 RNase P 的活性,本身就是一种生物催化剂。

此后又有许多类似的报道。到现在为止,这种催化 RNA 前体加工成熟的 RNA 催化剂至少已发现四种类型:① 异体催化的剪切(trimming)加工,如上述 RNase P 中的 M1 RNA 催化的 tRNA 前体 5'-端成熟;② 自身催化的剪切加工,如植物类病毒 RNA、卫星 RNA 等进行的滚筒式复制的最后一步加工;③ I 型内含子的自我剪接,如四膜虫 rRNA 前体的加工;④ II 型内含子的自我剪接加工,某些 mRNA 前体的加工属之。所有这些事实说明,某些 RNA 的确具有催化活性。为了和蛋白质性质的生物催化剂——酶(ENZYME)相区别,Cech 等将他们发现的 RNA 性质的生物催化剂称为 RIBOZYME。

RNA 型生物催化剂的发现应该说是现代生物学中的一个重大突破,因为:第一,它表明 RNA 除了作为遗传信息的载体外,还可能具有其他生物学功能;第二,它表明除了蛋白质性质的酶外,还可能存在着其他类型的生物催化剂;第三,为分子生物学研究、特别是为 RNA 的研究提供了又一种新工具;第四,为探索地球上最早的生命物质、研究地球上最早的生命起源提供了一种新的信息,也就是说,提供了又一条新的、值得考虑的重要线索。因为以后人们又陆续发现 Ribozyme 还具有核苷酸聚合酶的活性,即具有自我复制的活性;特别是最近又发现,蛋白质合成中的关键一步——肽键形成也是由 23S 核糖体 RNA 催化进行的;而且,Ribozyme 的衍生物还能催化甲硫氨酰-tRNA 水解,因此,Cech 等认为,第一个氨酰-tRNA 也可能就是在 RNA 催化下形成的。此外,Ribozyme 的作用底物虽然绝大多数是 RNA,但近年来越来越多地发现了其他一些能为 Ribozyme 作用的物质,例如,氨基酸酯、多糖和 DNA 等。正因为这些发现具有巨大理论与实践意义,Cech 和 Altman 在 1989 年度获得了诺贝尔化学奖。

近年来,不仅有大量 RNA 催化剂的研究,也出现了 DNA 具有催化活性的报道。

但是,应该指出的是, RNA 性质的催化剂的发现,甚至 DNA 催化剂的出现,都未否定“酶的化学本质是蛋白质”的结论。因为:第一,现在已知的酶基本上都是蛋白质性质的,或以蛋白质为主导核心成分;第二,“酶是蛋白质性质的生物催化剂”这一概念并不排斥还存在着其他类型的生物催化剂。

### 三、酶是生物催化剂

#### 1. 所有的酶都是由生物体产生的

已知的酶都是由生物体合成的,反之,几乎所有的生物都能合成酶,甚至病毒也是这样。有的病毒包括腺病毒、痘病毒等 DNA 病毒和反转录病毒、劳氏肉瘤病毒、呼肠孤病毒等 RNA 病毒,它们本身就能合成多种酶,如 RNA 聚合酶、反向转录酶以及 DNA 甲基转移酶等;有的病毒本身虽然不包含酶,但带有合成某些酶的基因,在感染寄主后能利用寄主的转录、翻译系统,合成其复制过程中所需要的各种酶,如噬菌体等属于这种类型。当然,也还有一些病毒目前尚未发现它们能够合成酶,或者带有编码酶的基因。

对于病毒来说,它们合成的或编码的各种酶起着三种作用。以 T<sub>4</sub>噬菌体为例,它至少编码 30 种以上的酶,通过这些酶,保证了 T<sub>4</sub>噬菌体在感染了大肠杆菌后:① 优先、快速地复制自身的染色体 DNA;② 选择地降解寄主的 DNA;③ 能够改变寄主的 RNA 聚合酶,使之在感染的不同阶段里能选择性地转录噬菌体的相应基因。再例如,有一些较小的病毒,如 SV40、Φ-174 等,它们本身带有酶的遗传信息虽然很少,主要依靠寄主的酶系来完成自身的蛋白质与核酸的合成。但即使如此,这些病毒仍能编码一些酶或蛋白质来选择性地引发自身 DNA 的合成。

#### 2. 酶和生命活动密切相关

##### (1) 酶参与了生物体内所有的生命活动和生命过程

酶在生物体内发挥四种类型的作用:① 执行具体的生理机能。例如,肌球蛋白具有 ATP 酶的活性,它和肌动蛋白共同完成肌肉收缩任务;又如,乙酰胆碱酯酶能水解乙酰胆碱,参与神经传导。② 清除有害物质,起着保卫作用。例如,限制性内切核酸酶,能选择性地水解外源 DNA,抵制外源物质的入侵;又如,超氧歧化酶,能破坏超氧负离子(O<sup>-</sup>),防止脂质过氧化;再如,细胞色素 P-450,能催化某些物质的加氧羟化,促进药物、毒物进行生化转化。③ 协同激素等生理活性物质在体内发挥信号转换、传递和放大作用,调节生理过程和生命活动。例如,腺苷酸环化酶,它存在于肾上腺素受体的细胞膜上,当它接受上述受体传达来的激素信号后,就会催化 cAMP 生成,后者再和蛋白激酶、糖原磷酸化酶以及糖原合成酶等组合,协同发挥作用,形成级联反应系统(cascade),将微量的激素信号加以转化、放大,调节糖类的代谢水平,以满足生理活动的需要。④ 催化代谢反应,建立各种各样代谢途径和代谢体系。

生物有两个基本特征:① 都由核酸、蛋白质等生命物质组成;② 都需要不断地进行新陈代谢。这两者之间有着密切的联系,其中,核酸是最根本的生命物质,决定生物的特性和发展方向;蛋白质(包括酶)是体内最活跃的物质,通过它,机体实现各种生理活动。核酸通过酶等的作用进行自我复制,进行转录和翻译,将它密码的遗传信息表达翻译成相应的蛋白

质和酶;酶再催化糖、脂肪等进行代谢,为各种生命活动,包括各种物质的分解与合成代谢,提供能量。因此,在生物体内代谢反应和代谢途径虽然错综复杂,但是,最主要的是两类:生命物质的复制与合成和能量的生成与转换。而在所有这些代谢过程中,酶都起着关键的作用,没有酶,代谢就不可能有条不紊、高速地进行。

### (2) 酶的组成和分布是生物进化与组织功能分化的基础

生命物质的复制与合成和能量的生成与转换为一切生物所必需,因此,不论是动物、植物,还是微生物都具有与此相关的酶系和辅酶。但是,另一方面,不同生物又都有各自特征的代谢途径和代谢产物,因此,也有各自特征的酶系和酶谱。所以,即使是同类生物,酶的组成与分布也有明显的种属差异。例如,精氨酸酶只存在于排尿素动物的肝脏内;排尿酸的动物则没有。而且,就是同种生物,各种组织内酶的分布也有所不同,例如,肝脏是氨基酸代谢与尿素形成的主要场所,因此,精氨酸酶几乎全部集中于肝脏。不仅如此,即使是同一组织中的同一类酶,由于生长发育阶段的不同,由于功能需要和所处的环境不同,酶的含量也可能有显著差异。例如,与三羧酸循环、氧化磷酸化有关的酶系在心肌中的含量就远比骨骼肌为高,而与酵解有关的酶,如醛缩酶等则恰恰相反。而且,为适应特定功能的需要,甚至在同一细胞内,乃至同一细胞器内,酶的组成和分布也不是均一的。例如,呼吸链中与氧化磷酸化有关酶系就主要集中于线粒体内膜上;并且,这些酶在内膜中的分布也有一定规律。

### (3) 酶能在多种水平上进行调节以适应生命活动的需要

生物机体在长期的进化过程中,为适应外界条件的千变万化,保证生命活动的正常进行,不论在酶的合成水平上,还是在酶的结构、活性水平上都已形成了一整套调节机制。一般来说,和生长发育有关的“恒态酶”多通过酶的合成机构进行调节;而和“快反应”有关的代谢关键酶则多在酶的结构、活性水平上进行调节;或者通过这两种方式共同调节。所以,酶不仅通过它本身的作用,通过它的分布,而且也通过它的动态调节来满足生命的各种需要。

综上所述,对于酶,可以这样定义:酶是一种高效、高度专一、和生命活动密切相关的、蛋白质性质的生物催化剂。

## 第二节 酶(学)与生产实践<sup>(5-8)</sup>

酶(学)和工农业生产与医学实践有着密切的关系,可概括为三个方面:

### 一、酶制剂的应用

这是应用最早,效益最显著,研究也十分活跃的一个方面。

#### 1. 酶制剂在工农业生产上的应用

酶制剂首先可用于加工生产。例如,用相应的水解酶水解淀粉、蛋白质和核酸以生产葡萄糖、氨基酸和核苷酸;用核苷磷酸基转移酶使肌苷磷酸化生产肌苷酸;用葡萄糖异构酶转化葡萄糖为果糖;用青霉素酰胺酶水解天然青霉素合成新型青霉素;用无色杆菌来源的蛋白酶或胰蛋白酶水解、更换猪型胰岛素 B 链羧基端的 Ala 为 Thr,使之改造为人型胰岛素;用金属蛋白酶合成低热量、高甜度的新型甜味二肽 Aspartame 等。

其次,可用于改进产品质量。例如,用脂肪酶水解乳脂为低级脂肪酸,使之增加奶油风



味;用果胶酶澄清果汁、果酒;用橙皮苷酶消除罐头白浊;用柚苷酶、花青苷酶使果汁脱苦去色;用葡萄糖苷酶、醛氧化酶等去除大豆生臭;还可在食品中添加葡萄糖氧化酶用以抗氧化,添加溶菌酶用以杀菌防腐。

酶制剂也可用于革新工艺。例如,纺织工业利用淀粉酶褪浆,不仅能节省化工原料、缩短工艺时间,还可减轻劳动强度,提高产品质量;制革工业应用蛋白酶等,既能加速皮革浸水、软化、脱毛等过程,又可从根本上改变旧工艺脏、累、臭的状况;至于加酶洗涤剂,它的优点是洗涤时间短、去污力强、能延长纺织品寿命。值得提到的还有近年开发的酶法氧化乙烯、丙烯制备环氧乙烷、丙烷的工艺。环氧乙烷、丙烷是合成洗涤剂、合成树脂等的重要工业原料,这条新的工艺路线不仅可免除旧工艺需要高温、高压、容易爆炸、三废严重等缺点,而且投资少、效益高,副产品还是可食用的纯果糖。

此外,酶制剂也能在三废处理上发挥很大作用,现在的趋势是应用固定化酶或固定化微生物处理法代替传统采用的微生物曝气法。例如,用固定化的假单胞杆菌脱卤酶处理废弃塑料;用固定化的混合微生物去除有机磷残留;又例如,将从茄病镰刀霉中分离出来的分解氰化物的酶系作成固定化酶柱,据报道,氰含量高达 2 000 ppm 的废水只需通过该酶柱一次,就能将其中的氰全部去除。

酶制剂在工农业生产上应用的主要问题是:寻找更合适的酶源,降低酶的生产成本,制成安全、有效的剂型和建立优化的高产工艺条件。

## 2. 酶制剂在医疗实践上的应用

现在用于医疗实践的酶有以下类型:

(1) 消化酶。这是最早的医用酶,包括蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶等水解酶。后来发现有色人种多缺乏乳糖酶,婴幼儿在摄取牛奶时不易消化而下痢,因此有时也包括乳糖酶。消化酶的问题是如何将上述各种酶以合理的配比,做成适于各种要求的、稳定的剂型。

(2) 消炎酶。人们很早就已经知道蛋白酶具有消炎作用,例如,临床上采用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、菠萝蛋白酶等治疗炎症和浮肿疾患,以清除坏死组织。作为消炎酶的还有核酸酶、溶菌酶等。链激酶、尿激酶、尿酸酶也可划属消炎酶。前两者可用于移去凝血块,治疗血栓静脉炎等;后者可用以分解尿酸,治疗关节炎。消炎酶的需求量正迅速上升,有超过消化酶之势。

(3) 抗肿瘤酶。和其他抗肿瘤药物的治疗机制完全不同。以 L-门冬酰胺酶治疗白血病为例。在正常细胞中由于具有合成 L-门冬酰胺的相关酶类,因此可从 L-门冬氨酸、L-谷氨酰胺和  $\alpha$ -酮基琥珀酸酰胺等直接合成细胞所需要的 L-门冬酰胺;但是,白血病肿瘤细胞不同,它们缺乏这些酶,而必须通过血液循环从正常细胞获取所需的 L-门冬酰胺。因此,对于白血病患者来说,如果给他们投注 L-门冬酰胺酶,并切断 L-门冬酰胺的外源供应,这些肿瘤细胞就会由于缺少必要的 L-门冬酰胺而“饿死”,从而达到治疗的目的。同理,据报道,谷氨酰胺酶、精氨酸酶、丝氨酸脱水酶、苯丙氨酸氨解酶和亮氨酸脱氢酶等也具有抗肿瘤作用。类似地,喋呤脱氨酶由于能使喋呤、叶酸等脱氨,切断嘧啶核苷酸等的供应,因而,同样有抗肿瘤活性。

(4) 遗传缺失疾患治疗酶。现在已知由于酶基因缺失而引起的遗传病至少有 10 种以上。从理论上说,治疗的办法有三种:一是通过遗传学手段在染色体基因组中补进所需要

的缺失基因,这一方面目前已有一些转基因成功的例证,但从技术角度而言尚难广泛应用;二是供给患者特种食物,即在该种食物中不包含、同时在机体摄入后也不会转化为所缺失的酶的底物成分,这一办法相当复杂而且代价高昂;第三种途径是向患者提供所缺失的酶,这一设想已在 1964 年开始实验,主要用于治疗溶酶体有关的酶缺失疾患。例如,用淀粉葡萄糖苷酶治疗糖原堆积症已获得成功;又如,用 PEG 修饰的牛肠腺苷脱氨酶治疗免疫缺陷病已经 FDA 批准用于临床。

(5) 其他治疗酶。包括用超氧歧化酶(SOD)来消除超氧负离子,防止脂质过氧化;用透明质酸酶提高毛细管的通透性,增进药物的吸收效果;用右旋糖酐酶防止龋齿等。

药物酶是一个十分重要、而且有广阔前景的领域,但目前还远未达到预期的水平,特别是以注射方式使用的药物酶还存在着一些急需解决的问题,例如:作为异体蛋白在体内易引起免疫反应;容易被降解、被代谢,药效期短;酶制剂本身的纯度不高,杂质可能导致某些副作用;如何将药物定向地分布到所需要的组织细胞中去等。药物酶的发展方向之一是微型胶囊化(microencapsulation);另一则是制成酶的衍生物。例如,可将酶包埋固定于水溶性或水不溶性高分子载体中,也可将酶包埋于血影细胞(erythrocyte ghost)或脂质体(liposome)中,这样既能使酶和免疫系统、蛋白酶等隔开,将酶保护起来,同时也有助于被细胞吸收。某些情况下,还可在脂质体等载体上引入一定的基团起导向作用,以便将药物酶引向相应的靶部位。还有一种发展趋势就是将相应的药物酶固定后,组成“人工脏器”用于治疗先天性酶缺失及组织功能衰竭等所引起的疾患。

### 3. 酶制剂工业状况

酶制剂工业近十年来发展十分迅速,1974 年全世界酶制剂销售总量不过 4 000 万美元,但 1984 年已增长到近 4 亿美元,1993 年达 10 亿美元,至 1997 年为 15 亿美元。和其他产业一样,国际酶制剂市场竞争也非常激烈,不断兼并、扩建、重组,整个格局最终趋于垄断。据 1985 年统计,世界上酶制剂生产厂约 25 家,集中于西欧和美国,其中 9 家公司的产值占世界的 90%,其余 16 家占 10%;控制世界市场的是丹麦的 NOVO Nordisk、荷兰的 Gist - Brocade 和美国/芬兰的 Genencor Inter;但是在 1995 年后,Genencor Inter 先后兼并了 Gist - Brocade 和比利时的 Solvag,NOVO Nordisk 也收买了 Shova Derhom,从而使 NOVO Nordisk 和 Genencor Inter 最终垄断了世界绝大部分酶制剂的生产和销售,这两家 1997 年的销售额达 11 亿美元,占世界市场的 70%以上;特别是 NOVO Nordisk,如果说,世界市场今后几年的销售额大约以 7%~8%的速度增长的话,那么,NOVO Nordisk 预测将保持 10%~15%的增长速度。表 1.2 列举了近十年来国际酶制剂市场的销售额和其中各种工业用酶所占有的比率。至于我国酶

表 1.2 近十年国际酶制剂的销售额和各种工业用酶所占的比率

年 份	1974	1984	1993	1995	1996	1997
总销售额(亿美元)	0.4	4	10	11	13	15
洗涤剂用酶(%)			40	37	34	38
淀粉加工用酶(%)			12	11	12	11
纺织工业用酶(%)			13	13	11	9
其他(%)			35	39	43	42

制剂工业,近十年虽有很大发展,据 1996 年的统计,酶制剂的产量是 24 万吨,但这个数字和发达国家相比相距甚远。

## 二、酶分析的应用

酶分析(enzyme analysis)是通过酶反应速度的测定以达到临床检验和化学分析目的的一类分析。包括两种类型:一是以酶为分析对象的分析,称为活力测定(enzyme assay);二是以酶为分析工具的分析,又称为酶法分析(enzymatic analysis)。这两类分析在原理和方法上基本相同。

### 1. 酶活力测定

在科学研究、工农业生产和医学实践中经常要进行酶的活力测定,因为机体的机能状况、产品质量的好坏常会在某种或某些酶的含量和活性上得到反映,而这些只有通过活性测定才能确定,因此酶活力测定具有重要的理论与实用意义。这类分析现已广泛用于临床辅助诊断。

酶在细胞内合成,各种组织细胞都有体现各自特征的标志酶,这些酶在正常情况下,很少渗出细胞。但当机体发生病变时,它们在组织和体液内的活性就会发生变化,因此,人们可通过检定其中某些酶的活力作为早期诊断、鉴别诊断以及预后的参考。以体液内的酶活力为例,引起其改变大致有以下几种原因:① 组织病变导致膜平衡的破坏,如谷草转氨酶(GOT)在心肌中含量最高,但心肌梗死情况下,细胞透性增大,因而患者的血清中 GOT 显著升高,高峰时可达正常值的 10 倍以上。② 细胞病变引起合成机能异常,例如,一种称为“血浆特异酶”的卵磷脂胆固醇转酰基酶(LCAT),它是在肝细胞中合成的,而后分泌到血液中发挥作用,肝炎患者此酶合成下降,因而它在血清中的水平低于正常。③ 疾病导致酶的分泌排出受阻,使酶转而流入血液中,因此血清中酶的活性水平改变。如梗阻性黄疸或癌转移至肝脏使胆管阻塞,故而血清中碱性磷酸酯酶升高。④ 药物直接影响酶活性,如有机磷能不可逆地抑制血清中乙酰胆碱酯酶。

酶用于临床诊断有一定参考价值,但存在一个根本性的问题,即特异性不高。例如:血清淀粉酶常作为急性胰腺炎的诊断指标,然而,唾液腺炎、急性腮腺炎、穿孔性肠膜炎,特别是十二指肠溃疡等疾患都可能引起血清淀粉酶升高。解决的办法有:① 进一步寻找组织特异酶;② 测定同工酶酶谱,有些酶虽然不是组织特异的,但同一种酶在不同组织中往往表现为不同的同工酶谱,可通过电泳等方式加以鉴别;③ 进行酶谱比较,或同时测定两种或多种酶,或进行血液酶和尿液酶比较。例如,同时测定 GOT/GPT(谷丙转氨酶);又例如,急性胰腺炎初期血清淀粉酶升高,后期尿液酶升高;而慢性胰腺炎、胰肠癌则主要是尿液酶变化。

酶活力测定的发展方向:① 简便化,制成各种检定纸片,如市售的 Bactostrip 就是用 2,3,4-三苯基四唑浸渍的纸片作成的细菌检定纸片,该纸片在细菌还原酶作用下生成红色,根据颜色的改变可以判断细菌的污染情况;② 自动化,这在需要进行大量测定时特别重要,包括从加样、反应、检测到数据处理的全自动化测定与从加样、反应、检测到纪录的半自动测定,前一种类型的测定仪每小时可检测 1 200 个左右的样品。

## 2. 酶法分析

这是借助酶高效、高度专一的催化作用,以酶作为分析试剂或分析工具进行的一类分析,可用以检测样品(如食品、药物以及体液等)中某种物质的含量。测定的范围很广,凡是与酶反应有关的物质,如酶的底物、辅助因子、甚至酶的抑制剂等都能采用这类分析方法。在具体实施时,只需根据待分析对象选择一种适宜的“工具酶”,并在该分析对象存在条件下进行反应,然后借助物理方法或化学方法跟踪检测,最后根据待测对象与酶反应的关系,将测得的结果进行动力学分析处理,就可以求知所要检测的物质的含量。例如,要测定发酵液中某氨基酸的含量,可选择专一于该氨基酸的脱羧酶作为工具酶进行催化。在这种情况下,被测对象是酶的底物,所以根据酶反应过程中放出的  $\text{CO}_2$ ,就可计算出该氨基酸的含量。

和一般化学分析法相比,酶法分析的特点是它具有较高的选择性,在待分析对象与其他相似物质混杂的复杂系统中能直接通过酶的专一性选择地催化待测物进行反应,然后根据测得的反应速度或酶活性与待测成分的对应相关性,求知待测成分的含量,从而免除了一般化学分析需要事先进行的一系列萃取和精制预处理,同时不受类似物的干扰,能简便地获得可靠的结果。此外,某些物质如辅酶 A、有机磷等有时很难找到,甚至根本没有直接、简便的纯化学分析法可供选用,这种情况下却能借助酶法分析加以解决。

酶法分析的主要问题是需要有适宜的、高纯度、高比活力的工具酶,因而所需的代价也较大。其次,如上所述,工具酶在酶法分析中仅起一种温和而专一的预处理作用,最终仍需采用化学方法或物理化学方法进行检测,因此,酶法分析本身需要不断地吸取分析化学,特别是近代仪器分析的先进成果来武装自己,发展自己。

酶法分析的发展趋势是:① 简便化,作成“检测试纸”等应用形式。例如,可将葡萄糖氧化酶、过氧化物酶和邻联茴香胺类的色源底物组合在一起并固定于滤纸上制成尿糖试纸,检测时只要将这种试纸在病人小便中浸湿,根据一定时间后产生的颜色深浅,即可估测出其中葡萄糖的含量。② 微量化、连续化和自动化。通常的办法是将工具酶制成酶电极,或将工具酶固定化制成酶管或酶柱并和检测装置偶联,例如,临床上现在发展的一种葡萄糖氧化酶电极,只要通过观测氧阴极上氧含量的变化,就可简便地检知体液中微量的葡萄糖。

## 3. 酶免疫分析(Enzyme Immunoassay, EIA)

在 70 年代初,从免疫化学发展出了一种称为“酶标免疫”的分析方法,它是将免疫学的专一性和酶的高效催化能力有机地结合在一起,建立的一种高度特异、灵敏的分析方法。酶标免疫分析法是以酶作为标记物质,标记抗原(或抗体),作成酶标抗原(或抗体),然后根据待测抗体(或抗原)与酶标抗原(或抗体)专一、定量的结合关系,通过测定结合后的标记酶活力,就可计算出抗体(或抗原)的含量。

酶标免疫分析法和荧光免疫分析法或放射免疫分析法相比,优点是:不需要特殊复杂的设备和仪器;灵敏度高;重复性好;对健康无害。因此,近年来受到极大的重视。这种方法现在已扩展到许多学科领域,检测对象不仅是抗原或抗体,也包括许多药物、激素和抗生素,甚至是酶本身。

### 三、酶生物学知识的应用

作为生物催化剂,酶和生命活动密切相关。一方面,酶在体内的活性水平反映了生物的生理状况;另一方面,如果控制机体内酶的活性水平,就能对生物的机能活动作出相应的调整。因此,了解酶的生物学规律和知识对于生产实践有着极为重要的意义。例如,在工农业生产中,特别是在发酵生产中,通过对外界条件的控制或遗传因子的改造,进行代谢调控,就有可能提高产量;在医学和农业上,根据机体正常与病理情况下酶或酶系的活性变化,就有可能找出发病的原因,从而指导药物的筛选和应用。

#### 1. 提高发酵代谢产物的产量

(1) 添加酶的抑制剂。以柠檬酸的生产为例。在柠檬酸的发酵生产中往往会伴随形成一定量的异柠檬酸,这是因为菌体内同时存在有顺乌头酸酶的原故,这种酶能使部分柠檬酸转化为异柠檬酸。为此,如果在发酵系统中添加氟乙酸等抑制剂,或在培养基中限制 Fe 的供应,使顺乌头酸酶的活力受到抑制,就可能减少异柠檬酸的生成,提高柠檬酸的产量。基于同样的道理,通过诱变获得了对氟乙酸敏感的突变株,结果柠檬酸产率也同样得到了显著的提高。

(2) 控制代谢系统中的关键酶。以赖氨酸的生产为例。赖氨酸可采用多种菌株进行生产,其中较常用的为黄色棒状短杆菌。在这种细菌的赖氨酸合成调节机构中,赖氨酸和苏氨酸对该代谢途径中的第一个酶,即门冬氨酸激酶表现协同性反馈抑制效应;但和大肠杆菌不同,赖氨酸对分枝途径的第一个酶——二氢吡啶羧酸合成酶无反馈调控作用。根据这一特点,显然只要通过控制苏氨酸的浓度,克服协同性反馈抑制,赖氨酸就可大量合成。基于这一认识,诱变获得了高丝氨酸脱氢酶缺失的变异株(不能合成苏氨酸)!在进行该营养缺陷型变异株的培养时,如果同时限制外源苏氨酸和甲硫氨酸的供应,那么赖氨酸的产量可提高到 40 g/L 以上。

(3) 添加酶制剂。仍以发酵生产为例,在发酵过程中,如果向体系中添加某些酶制剂,增大菌体细胞的通透性,促进产物的分泌,克服反馈抑制,就应能使产量显著提高;事实也表明,通过这条途径往往可获得预期的效果。例如,用嗜氨小杆菌生产谷氨酸,以 7% 的甜菜糖蜜为碳源时,如果在发酵 10 h 后添加 0.08% 的溶菌酶,则 48 h 后,谷氨酸产量可提高 6 倍;如果在发酵 4 h 后添加 10 u/ml 的脂肪酶,则 48 h 后的产量可提高 12 倍。

#### 2. 药物、农药、毒物和解毒药物的设计

现在应用的许多药物和农药,事实上都是酶的抑制剂,它们的作用是抑制代谢途径中的“关键酶”,或者防止异常代谢出现,或者造成菌、虫、“害”的代谢和机能紊乱,从而达到消除病害,恢复健康的目的。例如,高血压是人类常见的疾病,在体内最强的升压物质之一是血管紧张素,而这种物质是由血管紧张素原通过血管紧张素原转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)催化生成的,因此,如果能设法抑制 ACE,那么就可能控制高血压。ACE 是一种羧基端解二肽酶,结构上和羧肽酶 A 相似,也是含锌蛋白;已知羧肽酶 A 的抑制剂是一种苄基丁二酸;而肽酶的强大抑制剂的末端氨基酸多为脯氨酸。为此,有人最初设计了丁二酰脯氨酸,实验表明它能抑制 ACE,但是一种较弱的竞争性抑制剂,后来将巯基取代了原有羧基,

它的抑制能力大大增强,达到  $K_i = 1.7 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ ,而且可以口服,这就是现在常用的一种控制高血压药物:开博通(Captopril)。又例如,为人熟知的常用磺胺药,它是根据某些细菌在代谢途径中,特别是在核酸合成代谢中需要以对氨基苯甲酸为核心成分的叶酸辅酶;磺胺是对氨基苯甲酸的类似物,它能竞争性地抑制上述叶酸辅酶参与的反应,从而达到抑制细菌生长,治疗疾病的目的。再例如,有机磷药物,它的作用机理是能强烈地抑制乙酰胆碱酯酶,引起动物的生理失调,最后导致动物死亡。根据对该酶结构功能的研究,现在已经设计、制造出多种高亲和力、高度专一的有机磷化合物,它们都是高效的毒物。而解毒药物如解磷定等,则是基于同样机理,从“相反的方向”竞争性地将有机磷化合物从酶上拉下来,使酶从抑制中解脱出来,恢复正常的生理功能。酶的抑制剂和国防事业也直接关联,例如,有机磷毒物最初就是战争中发明出来的一种神经毒气(nerve gas),而现在用的解磷定等也正是当时适应国防需要而设计出来的解毒药物。类似地,二巯基丙醇也是当时英国用来对付发泡糜烂性的“路易斯”毒气产生的解毒药物,故称为“英国抗路易斯(British anti-Lewisite, BAL)”。

现在已经能制造许多强有力的农药或治疗药物,它们对菌、虫、杂草和病理组织如癌细胞都有着强烈的抑制、杀伤作用。但是,又往往都缺乏选择性,在杀死菌、虫、杂草、癌细胞等的同时,也可能伤害到正常的作物和正常的组织细胞,或者残留下来影响人畜健康,从而限制了它们的应用。这就是人们正在努力探索解决的药物专一性问题。途径之一同样是利用酶的生物学知识,即根据不同生物体中酶或酶系的特征差异、正常和病理组织中酶或酶系的特征差异来设计、制造高专一性的农药和治疗药物。例如,一种称为 DCPA (3,4-二氯丙酰替苯胺)的除草剂,它能有效地杀死稗草,但却不伤害它的“近亲”——稻,原因就在于稻的茎叶中有能分解 DCPA 的水解酶,而稗草中没有。又例如,人们根据某些癌细胞中酯酶的活力远低于正常组织的特点,设计了 2,2-二(2-氧乙硫)乙酸乙酯,这种药物能抑制肿瘤生长,但进入正常细胞后就会被迅速水解,化为低毒物质后代谢排出,因此,它能“专攻”某些癌细胞,用于治疗何杰金氏病及乳房癌等,临床表明具有良好疗效。再例如,艾滋病(AIDS)的防治是当前颇受人们关注的重大问题,现努力正从各个角度寻求专一的治疗办法,其中也包括设计和寻找某些关键酶的抑制剂,例如,已知在 AIDS 病毒(human immunodeficiency virus, HIV-1)的增殖、加工成熟以及侵染过程需要反向转录酶和特殊的蛋白酶,根据这些酶的结构特点,人们已分别设计了二脱氧次黄嘌呤(ddi)与含乙烯的寡肽等作为专一的治疗药物。

一般地说,只要能够找出不同生物间、正常和病理细胞间的酶和酶系统的特征差异,就可能在强有力的抑制剂上加上“导弹”形成“生物导弹(biomissile)”,使药物直达靶细胞,从而达到选择性地发挥作用的的目的。

酶的生物学知识也有助于解决药物和农药的耐药性问题。例如,长期使用卡那霉素,就可能在带有 R 因子的细菌体内诱导出卡那霉素磷酸激酶或转乙酰基酶,分别作用卡那霉素的 3'-OH 基形成磷酸酯衍生物,或作用 6'-NH<sub>2</sub>形成酰胺衍生物,导致卡那霉素失效,产生耐药性。显然,了解到耐药性形成的原因,将这种药物的相应基团改造成上述酶不能作用的衍生物后,就有可能提高该药物的抗耐药性的能力。

酶(学),正在生产实践中发挥着很重要的作用,而且蕴藏着巨大的潜力。随着酶学的发展,它的应用也必将跃入更新的境界,展现更加宽广的前景。

### 第三节 酶学与基础理论<sup>(9-11)</sup>

酶(学)和基础理论的关系表现在两个方面:

#### 一、酶学和现代化学

现代化学已经形成了一个完整的反应理论体系。它不仅为酶(促)反应动力学规律的建立、酶催化机理的阐明奠定了基础,也为酶学的进一步发展提供了依据,为新的酶学理论提供了有机反应实验模型,因此酶学的进步和现代化学有着十分密切的关系。

现代化学虽然使人们能够大量获得各种性能优异的物质。可是,当前采用的化学反应大都需要相当猛烈的反应条件,而且反应过程常常伴随着产生其他副产品。以工业合成氨为例,反应往往要求几百度的高温、数百个大气压(高压法达 700 个以上的大气压),这样既不安全,又要消耗大量能源。反之,地球上的固氮生物却能在常温、常压下,每年从空气中将 1 亿吨左右的氮固定下来。这里的关键在于生物固氮是在固氮酶的催化下进行的。因此,阐明固氮酶的催化机理,无疑会对化学工业和催化理论产生重大的影响。

酶的作用原理包括两个范畴:催化机制和调节机制。调节机制在现代化学中目前还未深入触及,因此,酶作用调节原理的揭示也必将进一步充实现代化学理论。

#### 二、酶学与分子生物学

##### 1. 酶是分子生物学有力的研究工具

分子生物学的任务是要从分子水平上阐明生命的本质和规律。核酸和蛋白质是生命的物质基础,因此,研究核酸、蛋白质的结构与功能关系是分子生物学的一个中心课题。酶,可以在这一课题中发挥十分重要的作用。以核酸、蛋白质的一级结构测定为例: Sanger 等在 1955 年首先完成了由 51 个氨基酸组成的胰岛素的一级结构测定,并为蛋白质结构分析奠定了坚实的基础,从而使数以百计的蛋白质(包括酶)的一级结构测定得以迅速解决。而在这种测定中,第一步就是采用胰蛋白酶、葡萄球菌蛋白酶以及化学方法等将待测蛋白质进行专一性的部分水解,使之片断化,然后借助“二甲氨基茚磺酰氯 - Edman 顺序降解法”进行片段的氨基酸序列测定,最后再通过“片段重叠法”确定整个蛋白质分子的结构序列。与此相对应的,核酸的结构分析比蛋白质的难度要高,因为核酸的分子大,而且核苷酸单体种类少,所以,过去几十年这方面的研究进展较为缓慢。70 年代后期,由于新技术、新方法的应用,特别是由于某些专一性的工具酶的出现以及它们的巧妙应用,核酸结构的研究才有了重大突破。在 DNA 的测定方面,现在有 Sanger 和 Maxam 与 Gilbert 以及我国学者们分别发展的各种方法,通过它们就能在短时间内完成大分子 DNA 全部一级结构测定。DNA 测定的战略不同于蛋白质,它不是通过直接测定 DNA 片段中的核苷酸顺序,而是先用不同方法进行专一性处理以分别得到四种核苷酸结尾的片段,然后再根据它们的长短,从聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱自下而上地依次读出核苷酸的排列顺序。就具体方法而言,这种序列测定可大体分为两种类型:酶法和化学法。这些方法和与之相关的其他方法如足印法(foot - printing)等的第一步一般都要将<sup>32</sup>P 标记的 DNA 通过酶法,例如,用适宜的限制性内切核酸酶进行水解;应用酶法测序时,还需要用 DNA 聚合酶合成各种核苷酸片段。至于 RNA 的结构测定,有两

类方法:其一是用类似于蛋白质分析的片段重叠法。另一则是借鉴于 DNA 分析采用的直读法,也就是先用聚核苷酸激酶将<sup>32</sup>P 标记到待测 RNA 的 5' - 末端,然后再用高专一的 RNase T、RNase U、RNase A 和 RNase I 等酶切成各种相应的片段,最后再通过电泳进行分析;或利用依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶或者反向转录酶合成一系列对应的、不同链长的 RNA 或 DNA 片段,然后进行电泳分析。除了核酸的一级结构测定外,酶,在绘制基因地图,进行基因定位、体外基因重组(即基因工程)以及蛋白质的定位突变等研究与应用中也是非常重要的有效工具。

## 2. 酶是分子生物学的重要研究对象

酶是具有催化功能的蛋白质,因此它也是分子生物学的重要研究对象。酶的分子生物学就是要从酶的分子水平出发探讨生命的本质与规律。它包括以下方面的内容:酶的结构与功能;酶与细胞结构;酶和生命活动、生命过程;酶与代谢调节;酶和生物的生长发育、生物进化;以及酶与疾病等。

## 第四节 酶学的发展历史<sup>(12—13)</sup>

酶学一般认为始于 1887 年 Buchner 的发现,因为它表明酶能够以溶解的、有活性的状态从破碎的细胞中分离出来,从而推动了酶的分离及其理化性质的进一步探讨,也促进了各种与生命过程有关酶系统的深入研究。

以后,酶学沿着两个方向发展,一是从 1894 年 Takamine 等开始的酶的应用研究。这个领域的工作者将酶的合成调节理论应用于酶的生产获得了明显的成效,他们采用酶的各种分离纯化技术制备了不同规格的酶制剂,发展了固定化酶技术,并将它们投入了不同规模的生产。同时根据酶反应动力学理论,运用化学工程的成果建立了多种类型的酶反应器。酶工程实际上也就是这一基础上逐渐形成和发展起来的。

另一方面,则是从事理论探讨,其中有的侧重于酶的物理化学性质与催化性质的研究,例如:Summer 和 Northrop 等为酶的分离纯化开辟了道路;Sanger、Moore 和 Stein 等建立了蛋白质一级结构测定方法;Kendrew 和 Perutz 以及 Phillips 发展了 X - 衍射晶体分析技术,并将它用于蛋白质、酶的结构与功能的研究;Michaelis 和 Menten 等为酶反应动力学打下了坚实的基础;Fischer 和 Koshland 等提出了酶作用的锁和钥匙学说及诱导契合学说。这些研究使人们对酶有了更深入的认识。另一方面,也有相当多的学者更侧重于酶的生物学研究,例如: Hill 和 Meyerhof 等确立了糖酵解系统;Krebs 等建立了三羧酸循环;Jacob、Lwoff 和 Monod 提出了酶合成调节机制——操纵子学说;Claude、Palade 及 de Duve 探讨了真核生物体内细胞器的结构和功能;Temin 和 Baltimore 发现了反向转录酶;Arbert、Smith 和 Nathans 对限制性内切核酸酶的作用及应用作了奠基的工作;Michell 揭示了氧化磷酸化的机制,提出了化学渗透学说;Koshland 和 Monod 等对别构酶的调节机制作了系统研究,分别提出了对称齐变学说和序变学说。这些研究为酶的分子生物学建立了一座座里程碑,有力地推动了酶学的发展。但不管是应用研究,或是酶的物理化学性质、催化性质的研究,还是酶的生物学研究,它们都不是孤立的,而是相互关联、相互渗透、相互促进的。

现代酶学正沿着两个方向:酶的分子生物学和酶工程(学)在发展。酶分子生物学的任



务则是要更深入地揭示酶的结构和功能的关系,酶的催化机制与调节机制;揭示酶和生命活动的关系;进一步设计酶、改造酶;在基因水平上进行酶的调节和控制。酶工程(学)的任务是要解决如何更经济有效地进行酶的生产、制备与应用,将基因工程、分子生物学成果用于酶的生产,进一步开发固定化酶技术与酶反应器。

## 参考文献

### 一、酶是生物催化剂

- (1) Radzicka A, Welfenden R. *Science*, 1995, **267**:90
- (2) Corey MJ, Corey E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**(21):11 428
- (3) Uessugi, S. *化学と生物*, 1997, **50**(7):970
- (4) Li Y, Sen D. *Biochemistry*, 1997, **36**(18):5 589

### 二、酶(学)与生产实践

- (5) Neidleman SL. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1992, **3**(2):119; 1994, **5**(2):206
- (6) Fabor K, Franssen MCR. *Trends Biotechnol.*, 1993, **11**(11):461
- (7) Tarbit MH, Bayliss MK. *Biochem. Soc. Trans.*, 1993, **21**(4):1 018
- (8) Godfred T, West S(eds). *Industrial Enzymology: The Application of Enzyme in Industry*. New York: Stockton Press, 1996

### 三、酶学与基础理论

- (9) Turner MK. *Trends Biotechnol.*, 1995, **13**(5):173
- (10) Kuchner O, Arnold FH. *ibid.*, 1997, **15**(12):523
- (11) Flynn DL, Abood NA & Holwerda BC, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997, **1**(2):190

### 四、酶学的发展历史

- (12) Colin JS. *Enzyme Chemistry: impact and Applications*, 2nd ed.. London: Capman and Hall, 1990
- (13) Cannon WR, Singleton SF & Benkovic SJ. *Nat. Struct. Biol.*, 1996, **3**(10):821

## 第二章 酶的分类与命名

酶的种类很多。有人估计,每个大肠杆菌细胞中包含的蛋白质约 3 000 种,其中大部分是酶;高等真核生物每个细胞中包含的蛋白质约 50 000 种,其中主要的也是酶。然而到目前为止,已经确认的酶却很少。根据国际生化联合会酶委员会的统计,1961 年已知酶的总数为 712 种,1964 年 875 种,1972 年增至 1 770 种,1975 年为 1 974 种,1978 年公布的数字为 2 122 种;按当时的发展趋势 Clark 估计,1980 年可能接近 3 000 种。但是,截至 1997 年为止的累计数也仅 3 700 种(表 2.1)。

表 2.1 已知酶历年增长统计

资料来源与年份	已知酶数量
<i>Report of the Enzyme Commission</i> (1961)	712
<i>Enzyme Nomenclature</i> (1964)	874
<i>Enzyme Nomenclature</i> (1972)	1 770
<i>Enzyme Nomenclature</i> (1978)	2 122
<i>Supplements 1 - 4</i>	2 252
<i>Enzyme Nomenclature</i> (1984)	2 477
<i>Supplements 1 - 3 (Eur. J. Biochem.)</i> (1990)	2 966
<i>Enzyme Nomenclature</i> (1992)	3 169
<i>Supplement 1 - 4 (Eur. J. Biochem.)</i> (1997)	3 702

### 第一节 酶的分类命名原则<sup>(1)</sup>

为了更有效地研究酶、应用酶,人们曾提出了各种分类命名办法,但现在普遍接受的是国际生化联合会酶委员会推荐的系统,主要内容如下:

#### 1. 根据酶的催化作用类型,将已知酶分为六大类

##### (1) 氧化还原酶类 (Oxidoreductases)



##### (2) 转移酶类 (Transferases)



##### (3) 水解酶类 (Hydrolases)



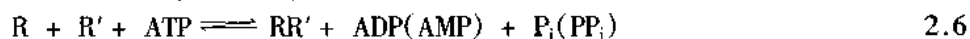
##### (4) 解(合)酶类 (Lyases)



##### (5) 异构酶类 (Isomerases)



### (6) 合成酶类 (Ligases 或 Synthetases)



在每一大类中,再根据更具体的酶反应(包括底物)性质进一步分成若干亚类和亚亚类。例如,在氧化还原酶类中,根据氢或电子供体的性质可分成 20 个亚类,在每个亚类中根据受体的性质又再分成若干个亚亚类。

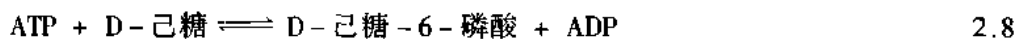
### 2. 对每一种酶同时采用系统命名和习惯命名两种命名系统命名

这两种命名系统在形式上很相似,都包括两部分:底物和作用类型,即都取“××底物 + ××反应类型 + 酶”的形式,其中,酶以词尾“-ase”表示。在系统命名(systematic name)中这两部分都要求十分详尽,而且要严格按照国际理论和应用化学委员会规定的命名规则命名;如果是双分子反应,那么两种底物的名称都必须列入,并在两者间加冒号“:”隔开。这种命名在描写酶的催化性质上清楚而且确切,但是太繁复,不便。习惯命名(trivial name)中这两部分都可简化,适于日常使用。例如,催化下述两种反应的酶按系统命名与习惯命名两种系统进行命名时分别为:



醇: NAD 氧化还原酶 (alcohol : NAD oxidoreductase)

醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase)



ATP: D-己糖 6-磷酸转移酶(ATP : D-hexose 6-phosphotransferase)

己糖激酶 (hexokinase)

但是习惯命名往往不够精确,有时还可能造成误解。如激酶可指磷酸转移酶,也可用于某些蛋白水解酶的命名。为此,酶委员会将习惯命名进行了审核,在规范化后现作为推荐命名(recommended name)推出,供日常使用。

### 3. 用四个数字(标码)(EC number)标记每一种酶

如醇脱氢酶的标码是 EC 1.1.1.1,己糖激酶的是 EC 2.7.1.1。其中 EC 表示酶委员会系统(Enzyme Commission),前三个数字依次分别表示酶所属大类、亚类和亚亚类,根据这三个数字可以判断出酶的催化类型和催化性质。第四个数字表示该酶在亚亚类中占有的位置,因此,有了四个数字就能确定具体的酶。

酶委员会还建议,在发表论文时,论题有关的主要酶在第一次提到时应写出它的标码、系统命名、习惯命名和来源,然后再用系统命名或习惯命名叙述。

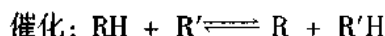
## 第二节 各类酶及其辅助因子<sup>(2-15)</sup>

### 一、氧化还原酶类

这类酶催化氧化还原反应,包括参与催化氢和/或电子从中间代谢产物转移到氧整个过程的各各种酶,也包括促成某些物质进行氧化还原转化的各各种酶。已知的数量和转移酶类、水解酶类大致相近。这类酶在生物的氧化产能、解毒以及在某些生理活性物质的形成等过程中起着很重要的作用。在生产实践中,它的应用仅次于水解酶类。氧化还原酶反应一般

都需要辅酶物质参加,而且这些辅酶物质在反应过程中往往伴随光学或电学性质的变化,这一点常用于该酶类的检测。为讨论简便起见,通常按习惯分类法分为四个“亚”类:

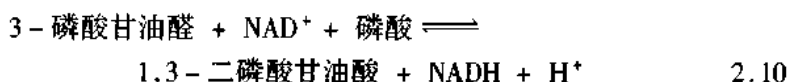
### 1. 脱氢酶



2.9

绝大部分脱氢酶(hydrogenase)需要尼克酰胺核苷酸为辅助因子。作为辅酶物质的尼克酰胺核苷酸有两种: NAD(H) (nicotinamide adenine dinucleotide) 和 NADP(H) (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)。不同的脱氢酶对它们的专一要求不同,参与分解代谢的脱氢酶通常要求 NAD(H), 而和还原性合成代谢有关的脱氢酶则往往专一于 NADP(H)。但也有一些酶对两者都没有严格的选择要求,例如,谷氨酸脱氢酶根据它们的来源不同就分别表现上述三种不同的专一特征。

尼克酰胺核苷酸和酶的结合不很紧密,既像底物,又像载体,它们能将两种相关的脱氢酶连结起来,起受氢、供氢的转氢作用,因此称为载体底物。例如,在体内能将甘油醛磷酸脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, EC 1.2.1.12)与乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, EC 1.1.1.28)连结起来进行糖酵解循环:



尼克酰胺核苷酸的结构和它作为辅酶参与反应的方式如图 2.1。

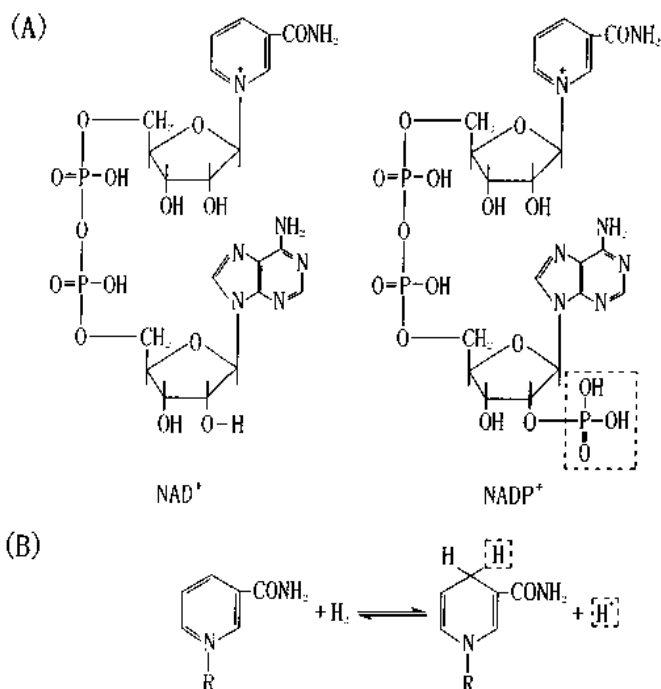


图 2.1 尼克酰胺核苷酸的结构 (A)

尼克酰胺核苷酸辅酶参加反应的方式 (B)

氧化还原反应是在尼克酰胺环上进行的。在氧化状态时,尼克酰胺环中的 N 为 4 价,

因此应写成  $\text{NAD(P)}^+$ ；而还原后则应写成  $\text{NAD(P)H}$ 。脱氢酶催化 H 加到尼克酰胺环 C-4 上时表现潜手性(prochirality) 立体专一性,说明在反应过程中底物和辅酶在脱氢酶的活性中心上是定位(向)地结合的。

尼克酰胺核苷酸辅酶的氧化型和还原型不同,还原型在 340 nm 具有强吸收峰;用 260 nm 或 340 nm 光激发时,在 460 nm 产生蓝白色荧光;而氧化型则否(图 2.2)。还原型易被酸破坏;氧化型相反,它在碱中不稳定。此外, $\text{NAD(P)H}$  还能被光和氧转化,致使它不能为脱氢酶所利用。

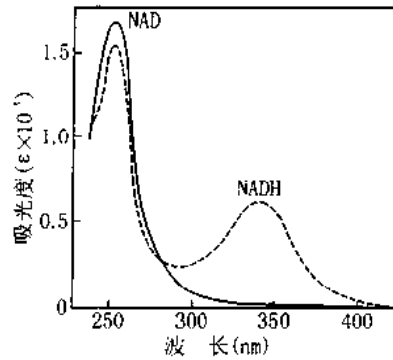
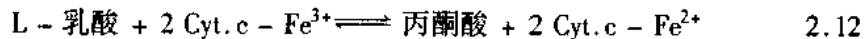


图 2.2 尼克酰胺核苷酸的吸收光谱

少数脱氢酶能利用  $\text{NAD(P)}$  以外的物质为受体,如乳酸脱氢酶(EC 1.1.2.3)能以细胞色素 c (Cyt. c) 为氢受体。

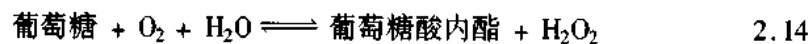


## 2. 氧化酶



这类氧化酶的特点是:第一,产物之一是  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;第二,需黄素核苷酸 FMN(flavin mononucleotide)或 FAD(flavin adenine dinucleotide)为辅基。由于酶蛋白和黄素辅基结合得很紧,故这类酶有时又称为黄素蛋白。

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, EC 1.1.3.4)属于这一类型,每个酶分子中包含两个 FAD 分子,催化:



黄素核苷酸的结构与反应方式如图 2.3。

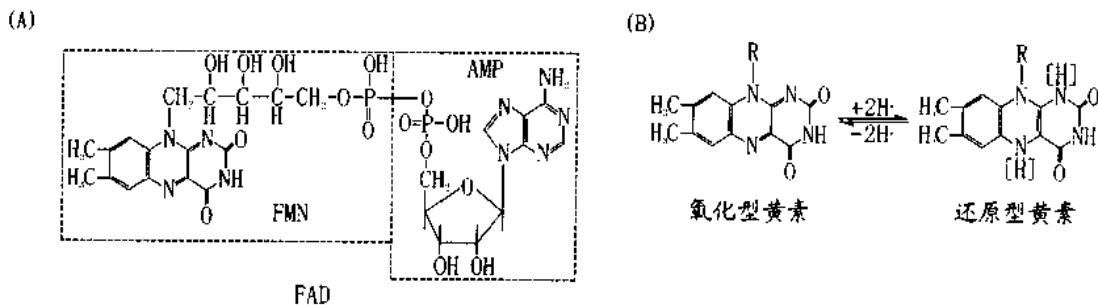
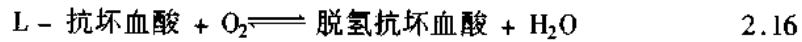


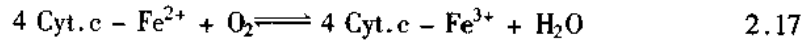
图 2.3 FMN 与 FAD 的结构(A)与参与反应的方式(B)



这类氧化酶的作用产物之一是  $\text{H}_2\text{O}$ , 而不是  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。包括两种类型: 一类为金属蛋白, 如抗坏血酸氧化酶(ascorbate oxidase, EC 1.10.3.3), 含铜, 催化:



另一类为细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, EC 1.9.3.1), 催化:



细胞色素氧化酶是许多需氧生物中的末端氧化酶, 它与脱氢酶、电子传递体等组成呼吸链, 在生物氧化、氧化磷酸化等过程中起着十分重要的作用。它在化学组成上也是一种细胞色素(cytochrome, Cyt.)。

细胞色素是一些以血红素为辅基的蛋白。血红素是含铁的卟啉络合物, 它通过铁离子价的可逆变化而参与电子传递。血红素的卟啉有相同的基本骨架, 但侧链基团各异, 因而可形成不同的血红素; 特定的蛋白和各自相应的血红素结合则形成不同的细胞色素。细胞色素根据它们在可见光区和近紫外区的三条吸收带( $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ )、特别是其还原型的 $\alpha$ 带, 可分成四类(表 2.2)。

表 2.2 细胞色素分类

细胞色素	吡啶亚铁(血红素)细胞色素在碱性溶液中的 $\alpha$ 带	丙酮-HCl处理的细胞色素在醚中的溶解性
a	580 nm ~ 590 nm	可溶
b	556 nm ~ 558 nm	可溶
c	549 nm ~ 551 nm	不溶
d	600 nm ~ 620 nm	可溶

在 C 类细胞色素中值得提到的是 Cyt.c 和 Cyt.c1, 它们是呼吸链组成中主要的电子传递体。Cyt.c 已经分离纯化, 其蛋白部分的一级结构已完全测定, 并在各类生物中作了系统的比较进化生化研究, 它是唯一以共价键将蛋白质和血红素结合起来的细胞色素, 图 2.4 示其结构和吸收光谱。

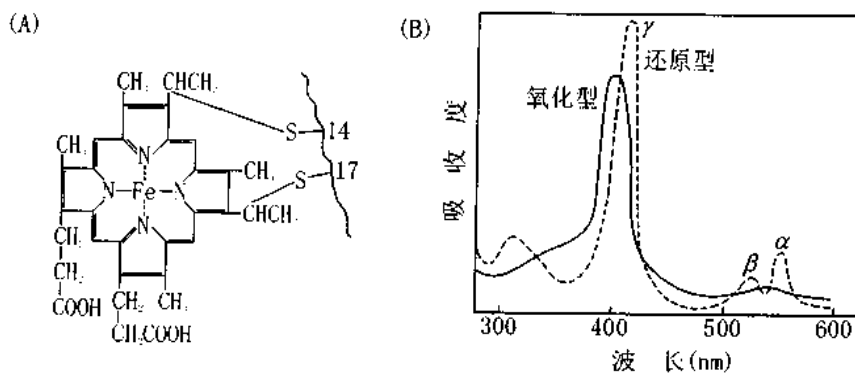
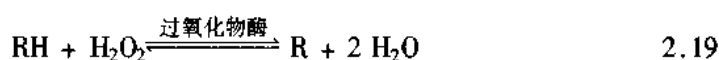
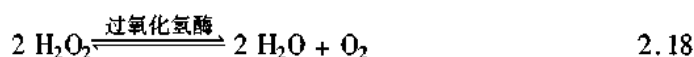


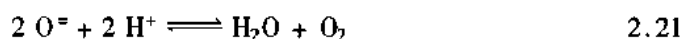
图 2.4 细胞色素 C 的结构(A)及其吸收光谱(B)

### 3. 过氧化物酶

这类酶催化以  $H_2O_2$  等作为氧化剂的氧化还原反应,存在于高等生物的过氧酶体中,担负  $H_2O_2$  和过氧化物的分解与转化任务。其中有的以血红素为辅基,例如过氧化物酶(peroxidase, EC 1.11.1.7)和过氧化氢酶(catalase, EC 1.11.1.6);有的以 FAD 为辅基,如 NAD(P)过氧化物酶(NAD(P) peroxidase, EC 1.11.1.2);至于谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, EC 1.11.1.9),有的是含硒的蛋白,有的不含硒,但它们都能以  $H_2O_2$  以外的其他过氧化物为氧化剂。例如,能还原脂肪酸过氧化物为羟基衍生物的谷胱甘肽过氧化物酶,它能和磷脂酶 A 一起协同清除脂质过氧化物,其中磷脂酶 A 的作用是促使脂肪酸过氧化物从膜脂释放出来便于谷胱甘肽过氧化物酶进一步作用。几种主要的过氧化物酶反应如下:



值得提到的还有一种和阻断过氧化物生成有关的特殊氧化酶,习惯命名称为超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1),催化:



其作用是清除超氧负离子自由基;后者是带有不配对电子的氧分子,异常活跃,可与多种生物分子反应,引发脂质过氧化,造成膜损伤,使 DNA 断裂,导致基因突变,与炎症、衰老、肿瘤等有密切关系,因此该酶十分引人注目。

### 4. 氧合酶

和氧化酶不同,氧合酶(oxygenase)催化氧原子直接参入有机分子。酶委员会根据反应系统中氢供体的数目将它分为两个“亚亚”类。

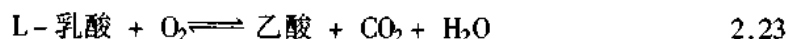
(1) 作用一种供体(EC 1.13. - )者,包括:

① 催化两个氧原子参入(EC 1.13.11. - )者,如儿茶酚 1,2-双氧合酶(catechol 1,2-dioxygenase, EC 1.13.11.1),催化:



这类酶需铁离子或 NADP 等作为辅助因子,反应过程往往伴随开环。

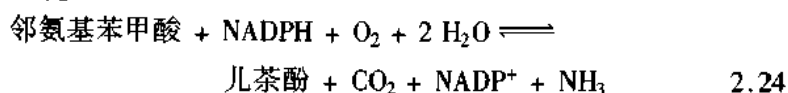
② 催化一个氧原子参入(EC 1.13.12- )者,如乳酸 2-单氧合酶(lactate 2-monooxygenase, EC 1.13.12.4):



这类酶有的是黄素蛋白,反应过程包含脱羧。

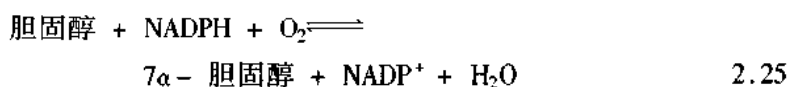
(2) 作用两种供体(EC 1.14. - )者,包括:

① 催化两个原子参入(EC 1.14.11. - 或 EC 1.14.12- )者,如邻氨基苯甲酸 1,2-双氧合酶(anthranilate 1,2-dioxygenase, EC 1.14.12.1),催化:

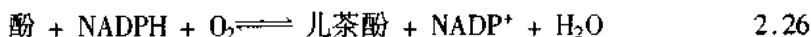


这类酶中有的有黄素蛋白,反应过程中可能伴随羟化、脱氨、脱羧或开环。

② 催化一个氧原子参与( EC 1.14.13. - )者,例如,胆固醇7 $\alpha$ -单氧合酶(cholesterol 7 $\alpha$ -monooxygenase, EC 1.14.13.17):



又如,酚2-单氧合酶(phenol 2-monooxygenase, EC 1.14.13.7),催化:



催化这些反应的酶,由于反应过程中伴随着羟基的形成,故又称羟化酶(hydroxylase);它们中有许多是黄素蛋白,有一些是含铁或含铜蛋白,也有些是细胞色素,如细胞色素P-450。羟化反应很重要,在机体内参与生理活性物质的形成和转化,促进药物和毒物的代谢;在生产中用于药物的合成和改造。

### 5. 中间电子传递体

除了上述几类主要的氧化还原酶外,值得提到的,还有一类称为“中间电子传递体”(electron transfer or transport system)的物质,它们通过自身的氧化还原将脱氢酶和氧化酶连接起来组成呼吸链,在生物氧化和氧化磷酸化过程中发挥重要的作用。“中间电子传递体”现在知道至少包括以下组成成分:黄素蛋白、铁硫蛋白、细胞色素以及一些脂溶性维生素。

#### (1) 黄素蛋白

参与催化三种类型的氧化还原反应:一是氧化反应;二是氧合反应;第三是作为中间电子传递体,催化H<sup>+</sup>从NADPH或其他底物转移至线粒体呼吸链某一受体,这一类中间电子传递体现已划属脱氢酶,如NADPH脱氢酶(醌)(NADPH dehydrogenase(quinone), EC 1.6.99.2):



又如琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, EC 1.3.99.2),催化:



#### (2) 铁硫蛋白(iron-sulphur protein)

具有氧化还原功能的含铁蛋白有三种类型:一是血红素蛋白,如过氧化物酶;二是单纯含铁蛋白,如某些氧合酶;第三是铁硫蛋白。铁硫蛋白是铁与蛋白质含硫的配位体结合的一种蛋白质。铁硫蛋白有两种类型:简单铁硫蛋白和复合铁硫蛋白。简单铁硫蛋白仅仅包含一个或几个Fe-S丛(iron-sulphur cluster)(图2.5),下分红氧还蛋白、铁氧还蛋白及其他三类。复合铁硫蛋白带有外加的活性基团如黄素、血红素等。

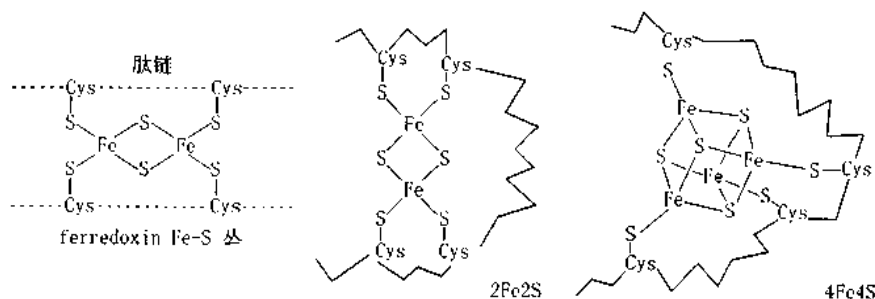


图 2.5 铁硫蛋白与 Fe-S 丛



### (3) 细胞色素

参与氧化还原反应的细胞色素也有三种类型：氧化酶、氧合酶和中间电子传递体。作为电子传递体的，有 Cyt. b, Cyt. c 和 Cyt. c1 等。

### (4) 脂溶性维生素

作为电子传递体最重要的是辅酶 Q (CoQ), 又称泛醌 (ubiquinone), 其结构和维生素 E、K 相似, 相对分子质量约 900, 还原型于 290 nm、氧化型于 275 nm 有吸收峰; 和其他电子传递体不同, 它不与特定的某蛋白质结合, 和 NAD 一样, 通过醌酚结构的可逆改变往返传递电子 (图 2.6)。

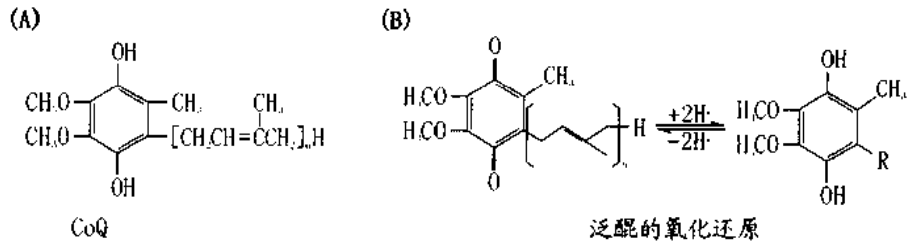


图 2.6 泛醌结构 (A) 及其氧化还原 (B)

## 二、转移酶类

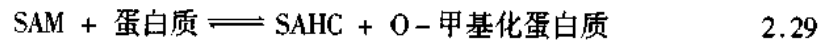
转移酶类催化各种功能基团从一种化合物转移到另一化合物。它们在生物机体内起着许多重要作用：① 参与核酸、蛋白质、糖及脂肪的代谢, 不仅参与核苷酸、氨基酸等单体的合成, 也直接参与核酸、蛋白质等生物大分子的生物合成, 并为糖、脂肪酸的分解与合成代谢准备各种关键性的中间代谢物; ② 催化某些生理活性物质如辅酶、激素及抗生素等的合成与转化; ③ 促成某些生物大分子从潜态转入功能状态。这类酶大部分需要辅酶物质, 但它们在反应过程中一般不伴随光学或电学性质的变化, 故不能进行反应的直接跟踪与检测。根据转移基团的性质, 转移酶类分为八个亚类。

### 1. 一碳基转移酶

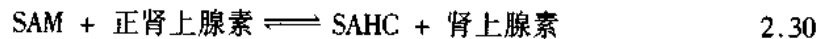
这类酶有多种很重要的生物学功能, 包括四个亚亚类:

#### (1) 甲基转移酶

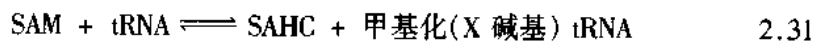
它们和许多生理活性物质的形成有关, 绝大多数要求腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 与腺苷同型半胱氨酸 (S-adenosylhomocysteine, SAHC) 为甲基供受体。例如, 蛋白质 O-甲基化酶 (protein O-methyltransferase, EC 2.1.1.24), 该酶催化:



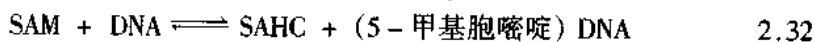
正肾上腺素甲基化酶 (noradrenalin N-methyltransferase, EC 2.1.1.28):



又如 tRNA (X 碱基) 甲基化酶 (tRNA (x base) methylase, EC 2.1.1.29-36):



DNA (胞嘧啶 5-) 甲基化酶 (DNA (cytosine 5-) methylase, EC 2.1.1.37):



DNA 甲基化酶近年来颇受人们注意, 因为它可能与基因的表达调控、细胞的衰老与癌

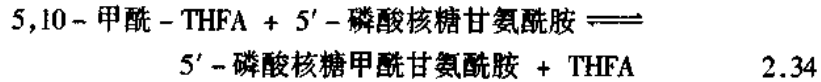
变等有关。

值得提到的是,这一亚亚类中还有少数酶以亚甲-四氢叶酸(Methylene tetrahydrofolic acid, THFA)和二氢叶酸(dihydrofolic acid, DHFA)为甲基供受体,其中较重要者如胸苷酸合成酶(thymilate synthase, EC 2.1.1.45):

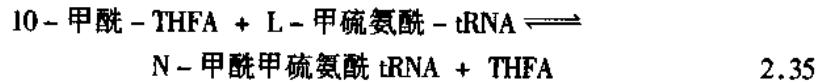


(2) 羟甲基、甲酰基转移酶

这类酶有的在嘌呤核苷酸及肽链合成中起着重要作用,如磷酸核糖甘氨酸转甲酰基酶(phosphoribosylglycinamide formyltransferase, EC 2.1.2.2):



甲硫氨酰-tRNA 转甲酰基酶(methionyl-tRNA formyltransferase EC 2.1.2.9):



这一亚亚类的酶都需要四氢叶酸作为辅助因子。

叶酸(folic acid)又称辅酶 F(CoF),是 B 族维生素的衍生物,有几种形式,但只有通过以 NADPH 为辅酶的四氢叶酸脱氢酶(THFA dehydrogenase, EC 1.5.1.3)的作用使 DHFA 还原为 THFA 后才能起辅酶作用。THFA 的结构及其衍生物如图 2.7。

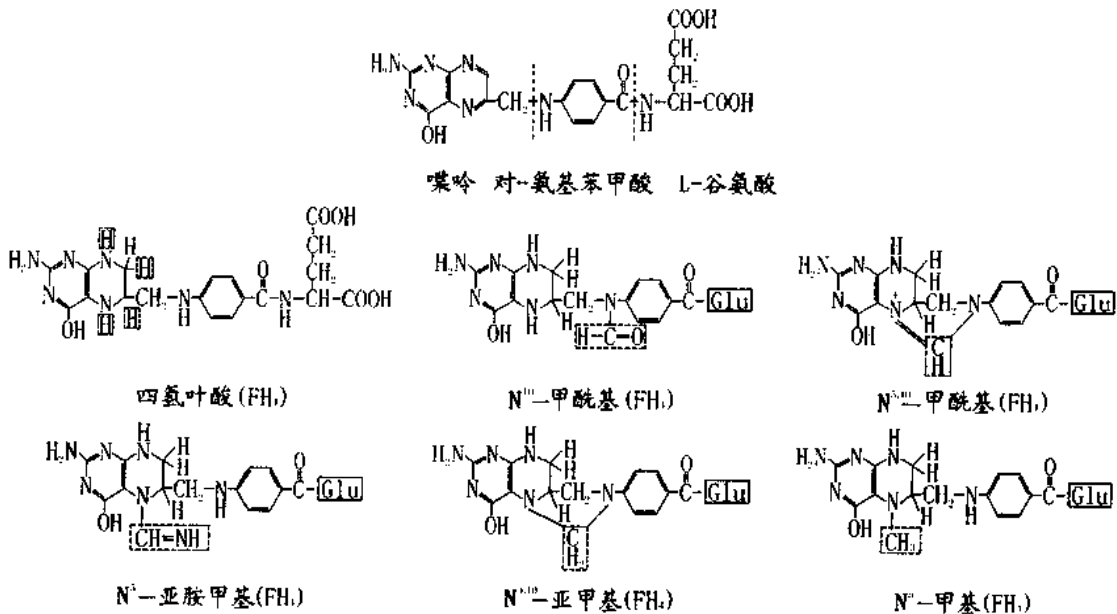


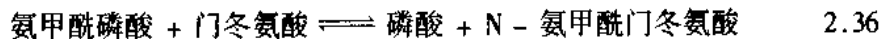
图 2.7 叶酸及其衍生物包括 THFA 的结构

值得提到的是:① 转移反应是在 N<sup>5</sup>、N<sup>10</sup>位上进行的;② 在其结构中包含一个对氨基苯甲酸成分。由于这一亚亚类中有一些酶在核苷酸,特别是 dTMP 的合成反应过程中需要 THFA 参加,因此人们设计了许多对氨基苯甲酸的类似物,如甲基氨基喋呤、磺胺类药物,以干扰细菌的核酸代谢、抑制微生物的生长和肿瘤的发展。

(3) 羧基、氨甲酰基转移酶

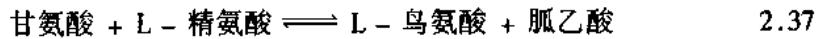
这一亚亚类不需要特殊的辅酶。其中,门冬氨酸氨甲酰基转移酶(aspartate carbamyl-

transferase, EC 2.1.3.2)是嘧啶核苷酸合成的关键酶。



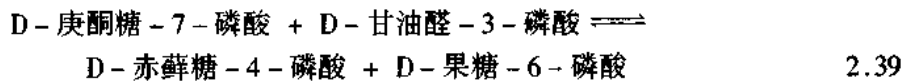
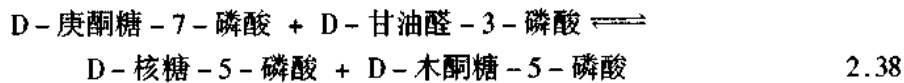
#### (4) 咪基转移酶

这一亚类也不需要辅酶,如甘氨酸转咪基酶(glycine amidino-transferase, EC 2.1.4.1):



### 2. 酮醛基转移酶

包括两种酶:转酮酶(transketolase, EC 2.2.1.1)和转醛酶(transaldolase EC 2.2.1.2)它们是光合作用和戊糖支路代谢中十分重要的酶。其中转酮酶催化的是羟乙醛基转移,而转醛酶催化的是二羟丙酮基转移。



### 3. 酰基转移酶

催化酰基转移,如乙酰 CoA 转乙酰基酶(acetyl-CoA acetyltransferase, EC 2.3.1.9),催化:



这一亚类几乎都需要辅酶 A(CoA) 作为辅助因子,CoA 是泛酸的衍生物,结构如图 2.8。其活性基为 -SH,能与羧基形成硫酯键,为酶催化酰基转移时提供“把手”。这一亚类的酶关系到脂肪、糖及蛋白质代谢,在生理上很重要。

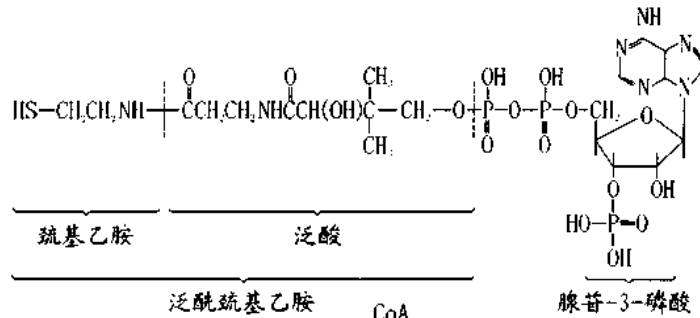


图 2.8 CoA 的结构

这一亚类中的还有肽酰转移酶(peptidyl transferase, EC 2.3.2.12),它是翻译过程中催化肽链延伸的关键酶之一。

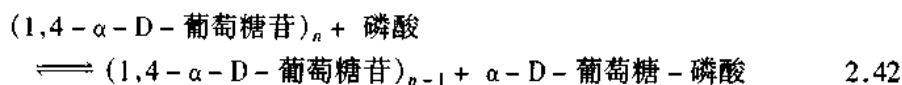


### 4. 糖苷基转移酶

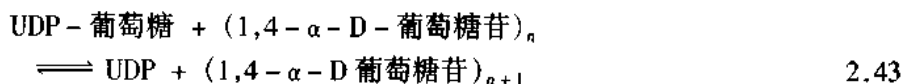
催化己糖基或戊糖基转移,包括两个亚亚类。它们催化糖苷基自磷酸酯中转出,或自糖

苷化合物转至磷酸,这类酶在习惯上通称“磷酸化酶(phosphorylase)”。

糖苷基转移酶中有的与糖代谢有关,如糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, EC 2.4.1.1),催化:



糖原(淀粉)合成酶(glycogen(starch) synthetase, EC 2.4.1.11),催化:



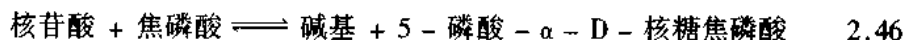
有的和药物代谢有关,如 UDP 葡萄糖醛酸基转移酶(UDP glucuronyl transferase, EC 2.4.1.17),催化:



有的参与核苷及核苷酸形成,如核苷磷酸化酶(nucleoside phosphorylase, EC 2.4.2.1-6),催化:



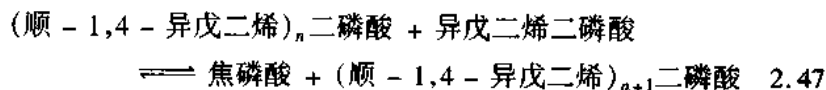
又如碱基磷酸核糖基转移酶(base phosphoribosyl transferase, EC 2.4.2.7-12),或称核苷酸焦磷酸化酶(nucleotid pyrophosphorylase),催化:



值得注意的有两点:①和磷酸化酶类似,催化后一反应的酶(EC 2.4.2.7-12)称为“焦磷酸化酶”或“焦磷酸解酶”,催化核糖基转移并导致单核苷酸形成与分解;还有一类焦磷酸化酶(EC 2.7.7.-)则不同,EC 2.7.7.-者催化磷酸基转移,并导致二核苷酸形成。②式 2.46 的产物 5-磷酸- $\alpha$ -D-核糖焦磷酸通常以 PRPP(phosphoribosyl-1-pyrophosphate)表示,它是嘌呤核苷酸生物合成的出发物质,也是嘧啶核苷酸合成的重要中间环节。

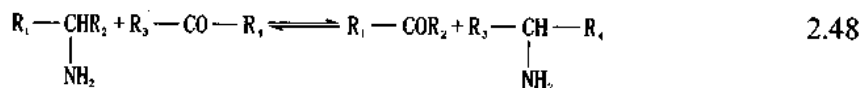
### 5. 烃基转移酶

这类酶催化烃基和烃基衍生物转移,它们和异戊二烯类物质、某些维生素等的形成有关,如橡胶烯丙基转移酶,催化:



### 6. 含氮基转移酶

这一亚类除了一种咪基转移酶外,大都与氨基酸代谢有关,反应通式是:



这类酶通常需要磷酸吡哆醛为辅酶。磷酸吡哆醛是维生素 B 的衍生物,它除了参与氨基转移酶反应外,也是脱羧酶反应及消旋酶反应的辅酶。其结构和参与反应的方式如图 2.9。一般反应过程中先要形成活泼的 Schiff 碱,然后再根据酶的催化类型进行相应的下一步反应。 $-\text{N}=\text{CH}-$ 是 Schiff 碱的关键结构部分。

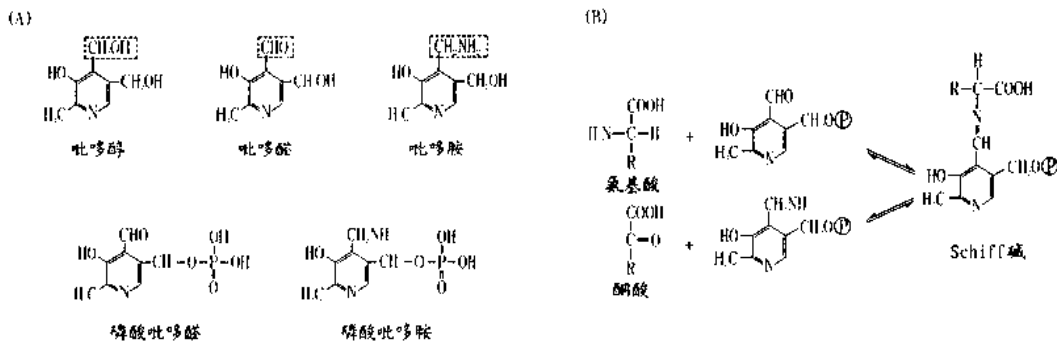
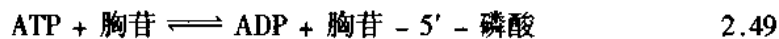


图 2.9 磷酸吡哆醛的有关衍生物 (A)  
磷酸吡哆醛参与的转氨反应及 Schiff 碱 (B)

### 7. 含磷基转移酶

这一亚类除了参与糖的中间代谢外( EC 2.7.1.1 - 19 等), 还和核酸的代谢密切相关(如 EC 2.7.1.21 等), 能直接介入核酸的复制合成与转录( EC 2.7.7.6 - 7); 并能促成许多生理活性物质如辅酶( EC 2.7.1.22 - 26; EC 2.7.4.3 - 16; EC 2.7.7.1 - 2) 等的形成; 也和某些大分子从“潜态”转化为功能状态( EC 2.7.1.37 - 38) 有关。

其中有的催化以 ATP (仅有一种以 GTP) 为供体的磷酸基转移, 这类酶在习惯上称为“激酶”, 但应注意不要和催化酶原激活的蛋白水解酶(如肠激酶、尿激酶等) 相混淆。例如, 胸苷激酶( thymidine kinase, EC 2.7.1.21) 催化:



它是嘧啶核苷酸代谢补救途径( salvage pathway) 的关键酶。

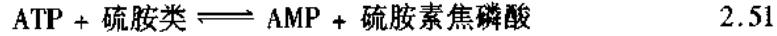
再如, 蛋白激酶( protein kinase, EC 2.7.1.31), 催化:



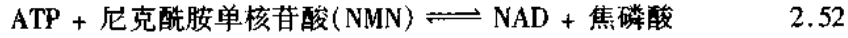
蛋白激酶是一个大家族, 在整个基因组中约有 1% 的基因编码蛋白激酶, 目前已发现的蛋白激酶已达百余种, 它们中有的能和第二信使 cAMP、Ca<sup>2+</sup>、-CaM(钙调蛋白) 和 cGMP 等偶联, 起激素信号的转化、传导和放大作用; 有的能接受第二信使 DAG(二酰基甘油) 的信息, 控制细胞的增殖, 生长和分化。这些蛋白激酶催化的蛋白质磷酸化都发生在丝氨酸或苏氨酸残基上。还有一类蛋白激酶催化蛋白质中的酪氨酸磷酸化, 通常也称为“酪氨酸激酶”。它们的一个特点就是能作为受体直接传递外界信号, 包括作为胰岛素和某些生长因子如 EGF、PDGF 等的受体, 也包括作为某些致癌因子的受体, 这些因子由癌基因编码, 能促使细胞发生癌变。

蛋白激酶以及与之对应的磷酸化蛋白磷酸酯酶是近代生物化学与分子生物学研究的热点。这两种酶共同完成蛋白质的可逆磷酸化。一般认为, 蛋白质的可逆磷酸化是生物活性调控的一种基本机制, 通过这种机制, 细胞能对内、外各种信号因子作出相应的响应, 调节生化过程和生理机能, 控制基因的表达, 细胞的生长和分化; 类似地, 致癌基因和抗癌基因也是通过这种机制促进细胞的癌变和(逆)转化。正因为如此, 在蛋白质的可逆磷酸化研究中作出过卓越贡献的 Edwin Krebs 和 Edmon Fischer 获得了 1992 年度的诺贝尔生理学 and 医学奖。

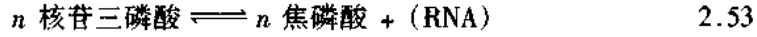
有的催化焦磷酸基转移, 如硫胺素焦磷酸激酶( thiamine pyrophosphokinase, EC 2.7.6.2), 催化:



还有的催化核苷酰转移,如 NMN 腺苷酰转移酶 (NMN adenylyltransferase, EC 2.7.7.1), 催化:



RNA 核苷酰转移酶 (RNA nucleotidyltransferase, EC 2.7.7.4), 该酶就是通常所谓的 RNA 聚合酶 (RNA polymerase), 催化 RNA 合成:



RNA 聚合酶有两种类型。一是依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶, 担负转录任务。该酶以 DNA 为模板, 在四种核苷三磷酸存在条件下, 催化与模板核苷酸序列相对应的 RNA 合成。原核生物中的 RNA 聚合酶能催化各种类别的 RNA 合成, 分子量大约 450 000, 由核心酶 (core enzyme) 和  $\sigma$  因子组成, 核心酶包括四种亚基 ( $\alpha_2\beta\beta'$ ), 具有催化活性;  $\sigma$  因子的作用是识别 DNA 分子上的 RNA 合成起始信号; 噬菌体 T<sub>7</sub> 的 RNA 聚合酶有所不同, 它仅由单链组成; 至于真核生物的 RNA 聚合酶则较复杂, 根据它们在细胞内的位置、合成的 RNA 类型及对抑制剂  $\alpha$ -鹅膏蕈碱的敏感程度分为 I、II、III 三种类型 (表 2.3)。

表 2.3 真核生物中的 RNA 聚合酶

酶	I	II	III
	RNA 聚合酶	不均一 RNA 聚合酶	小分子 RNA 聚合酶
细胞内位置	核仁	核质	核质
转录产物	r RNA	m RNA	tRNA, 5S RNA
$\alpha$ -鹅膏蕈碱抑制	$> 10^{-3}$ mol/L	$10^{-9} - 10^{-5}$ mol/L	$10^{-5} - 10^{-4}$ mol/L

第二种类型为依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶, 存在于 RNA 病毒, 担负病毒 RNA 的复制。这类酶复杂多样, 以噬菌体 Q $\beta$  复制酶为例, 它由四个亚基组成, 其中三个来自宿主, 一个由该噬菌体 RNA 所编码, 在感染过程产生, 具有复制 Q $\beta$ RNA 的能力。近年来, 随着人们对 RNA 认识的深入, 需要合成大量 RNA 作为进一步研究的实验材料, 因而, 体外合成 RNA 的工作也就提上了日程, 人们曾寄希望于 Q $\beta$ RNA 聚合酶, 因为它的催化效率非常高, 但是该酶有很严格的作用专一性要求, 从而限制了它的应用。所以, 目前仍多采用 T7 RNA 聚合酶或 SP6 RNA 聚合酶。

DNA 核苷酰转移酶 (DNA nucleotidyltransferase, EC 2.7.7.7), 这就是通常所说的 DNA 聚合酶, 催化 DNA 合成:



DNA 聚合酶也有两种类型, 一是依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶, 它的任务是担负 DNA 的复制, 即以 DNA 为模板, 在引物、四种脱氧核苷三磷酸以及  $\text{Mg}^{2+}$  等存在条件下, 催化脱氧核苷酸添加到 DNA 链的 3'-羟基端, 合成方向为 5'→3', 大肠杆菌的 DNA 聚合酶研究得较清楚, 包括 I、II、III 三种类型 (表 2.4)。

其中大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (又称 Kornberg 酶), 相对分子质量 109 000, 除了聚合酶活性外, 同时具有 3'→5'、5'→3' 两种外切核酸酶的活性, 故能剪切除去合成过程中误参的核苷酸; 如果用枯草杆菌蛋白酶处理, 可得到两个片段, 大的称为 Klenow 片段, 相对分子质量 76 000, 具有聚合酶活性和 3'→5' 外切酶活性; 小的相对分子质量 34 000, 具有 5'→3' 外切

酶活性。真核生物的 DNA 聚合酶和大肠杆菌者基本相似,但不具有核酸酶活性,而且较为复杂(表 2.5)。

表 2.4 大肠杆菌 DNA 聚合酶

酶	酶 活 性			相对分子质量 × 1 000	分子数/菌
	5'→3'聚合	5'→3'外切	3'→5'外切		
I	+	+	+	109	400
II	-	+	+	120	
III	+	+	+	140	10

表 2.5 真核生物 DNA 聚合酶

酶	细胞内位置	主要功能	相对分子质量(× 1 000)
I	核	核 DNA 复制	140
II	核	核 DNA 修复	40
III	线粒体	线粒体 DNA 复制	150

还有一种类型是依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶,即常称的“反向转录酶(reverse transcriptase)”,存在于反转病毒(retrovirus)中,能以 RNA 或 DNA 为模板,要求带有 3' - OH 末端的 RNA 为引物,催化脱氧核苷三磷酸沿 5'→3' 方向合成 DNA,该酶同时具有 RNase H 外切酶活力,能消化 RNA - DNA 杂交物中的 RNA 链。鸟肉瘤病毒的反转录酶已经纯化,由两种亚基组成,其一具有上述两种催化活性,另一则与引物 RNA 结合有关。后来发现没有被反转病毒感染的正常细胞中也有这种酶。

近年来发现,反转录酶在功能上和依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶相互关联,因此推测,它可能在进化上起着联系 DNA 世界与 RNA 世界的作用。

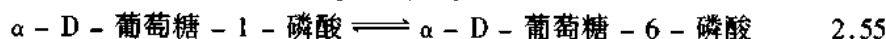
反转录酶和医学实践也有着密切关系。由于反转录酶对于某些 RNA 病毒[例如引起艾滋病(AIDS)的病毒 HIV - 1]的复制起着十分关键的作用,因此,人们设计了各种反转录酶的抑制剂作为药物,如 AZT 等用以防治这种病毒的感染。

由于分子生物学研究和医学实践的需要,常常要在体外合成大量的基因或 DNA 片段拷贝,所以,后来发展了一种称为 PCR(polymerase chain reaction)的 DNA 扩增技术。它实际上是一种反复进行的 DNA 体外合成循环过程,包括:模板 DNA 链热变性解链(94℃ × 1');引物与 DNA 互补链退火(54℃ × 2');DNA 链的合成延伸(72℃ × 5');再热变性解链,退火,合成延伸,如此循环,则 DNA 片段的拷贝数以 2<sup>n</sup> 的指数形式不断增加。在 PCR 发展的早期,链反应是用 Klenow 片段催化的,但该酶对热很不稳定,容易失效,须连续补加新鲜的酶,而且得到的产物不均一,限制了它的应用;后来从 *Thermus aquaticus* 中纯化到一种耐热的 DNA 聚合酶,称为 Taq 聚合酶,用它催化 PCR,能简便、高效地完成靶序列的扩增,从而使 PCR 跃迁到一个新水平。PCR 被认为是分子生物学中一项革命性的技术,现正广泛用于分子生物学、医学、考古学以及司法等各个领域,起着积极的推动作用。最近又发现 Taq DNA 聚合酶和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 一样也包含反转录酶活性,从而又进一步发展了一种新的 PCR 程序(RT - PCR),使原来的方法更简便,应用更广。由于 PCR 是一种效益丰厚的新技术,也

因此引起过一场专利权官司,最后,在 1991 年经裁决 Kary Mullis 和他所在的 Cetus 公司获得了这份权益。

在反转录酶的讨论中还有一种酶值得提到就是所谓“端粒酶 (telomerase)”,它是以反转录方式催化端粒 (telomere) DNA 合成的酶类。所谓端粒 DNA 是指真核细胞染色体末端的线性 DNA 序列。近年来的研究表明,端粒 DNA 在决定细胞的生命,与细胞的自然凋亡和细胞的癌变有着密切关系,因为胚系细胞可以重建和延长端粒 DNA,保持染色体的稳定,晚期的肿瘤细胞也如此;反之,体细胞则随 DNA 复制次数增加,端粒 DNA 逐渐缩短。端粒酶的活性与上述情况正好一致。端粒酶和反转录酶不同,它由 RNA 和蛋白质组成,并依赖于自身的 RNA 作为模板通过反转录而合成 DNA;如果用 RNase H 事先处理该酶时,端粒酶将失去活性。端粒酶也是人们注意的热点之一,因为希望通过控制它来解决一些生物学和医学的难题。

属于这一亚类的还有变位酶,它们催化磷酸基团在同一分子的不同碳原子间进行转移,如葡萄糖磷酸变位酶 (glucose-1-phosphate phosphodismutase, EC 2.7.1.41):



### 8. 含硫基团转移酶

如草酰乙酸 CoA 转移酶 (oxalate CoA transferase, EC 2.8.3.2), 催化:



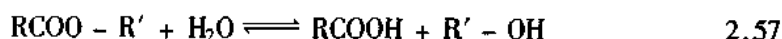
## 三、水解酶类

这类酶在体内担负降解任务,其中许多酶集中于溶酶体。它们是目前应用最广的一类酶。一般不需要辅酶物质,但无机离子对某些水解酶的活性有一定影响。习惯命名时常采用“底物 + 酶”的形式,即省去其中的“作用类型”,例如,淀粉酶、脂肪酶等。为了区别起见,有时要加上酶的来源,如胃蛋白酶、胰蛋白酶等。根据水解键的类型,分为九个亚类。

### 1. 酯酶

催化各种酯键水解。

(1) 羧酸酯酶 催化:



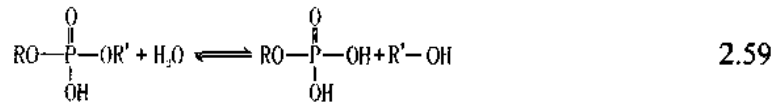
常见者如脂肪酶 (triacylglycerol lipase, EC 3.1.1.3), 催化甘油三酯水解为甘油二酯和脂肪酸,为  $Ca^{2+}$  激活,专一性较低。磷脂酶 (phospholipase, EC 3.1.1.4-5) A、B 也属于羧酸酯酶,以卵磷脂的水解为例 (图 2.10), 磷脂酶 A (包括  $A_1, A_2$ ) 作用后产生溶血卵磷脂和一分子不饱和脂肪酸 (脂肪酶和磷脂酶一般优先作用由伯醇形成的酯键), 磷脂酶 B (也称溶血卵磷脂酶) 再移去剩下的一个脂肪酸,人们认为它们是蛇毒和蜂毒中的毒性成分之一。至于磷脂酶 C、D, 它们属于磷酸酯酶。

这一亚类中还有与神经传导有关的乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, EC 3.1.1.7), 催化:



(2) 磷酸酯酶 催化:





磷酸酯酶分为磷酸单酯酶(底物中 R = H) 和磷酸二酯酶。

磷酸单酯酶中常见的有: 专一性低的碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1)和酸性磷酸酯酶(acid phosphatase, EC 3.1.3.2); 专一性较高的 5' - 核苷酸酶(5' - nucleotidase, EC 3.1.3.5)以及 3' - 核苷酸酶(3' - nucleotidase, EC 3.1.3.6)等。还有在前面提到过的有重要生理意义的磷酸化蛋白磷酸酯酶。

在磷酸二酯酶中除了上述的磷脂酶 C、D 外, 也包括来源于蛇毒等的 5' - 磷酸二酯酶, 来源于脾脏等的 3' - 磷酸二酯酶等一系列核酸酶。表 2.6 列举了某些重要的核酸水解酶。

表 2.6 某些重要的核酸水解酶

酶	专一要求	底物	产物	应用
RNase T, N, U	由 G 构成的 3' - 磷酸二酯键	单链 RNA	寡核苷酸 + 3' - NMP	RNA 结构分析
RNase U <sub>2</sub>	由 A 构成的 3' - 磷酸二酯键	单链 RNA	寡核苷酸 + 3' - NMP	RNA 结构分析
RNase I	由 A、G、U 构成的 3' - 磷酸二酯键	单链 RNA	寡核苷酸 + 3' - NMP	RNA 结构分析
RNase A	由嘧啶碱基构成的 3' - 磷酸二酯键	单链 RNA	寡核苷酸 + 3' - NMP	RNA 结构分析
核酸酶 S		RNA 单链 DNA	5' - 单核苷酸	基因工程
核酸酶 BAL-31		单链或双链 DNA	5' - 单核苷酸	基因工程、分子生物学
外切核酸酶 I		变性、单链 DNA	5' - 单核苷酸	
λ - 外切核酸酶		DNA	3' → 5' 单链化	基因工程
外切核酸酶 III		DNA	5' → 3' 单链化	
RNase H	DNA - RNA 中 RNA 的片断	DNA、RNA 杂合体	除去 DNA 中 RNA 链	
DNA 聚合酶 I		DNA	3' → 5' 外切 5' → 3' 外切	分子生物学研究
DNase I		DNA	寡核苷酸 + 5' - NMP	分子生物学研究
DNase II		DNA	寡核苷酸 + 3' - NMP	分子生物学研究
微球菌核酸酶		DNA	寡核苷酸 + 3' - NMP	分子生物学研究
II 型限制性内切核酸酶	4~6 核苷酸(回文结构)顺序	DNA	平头或粘性末端	分子生物学研究与基因工程

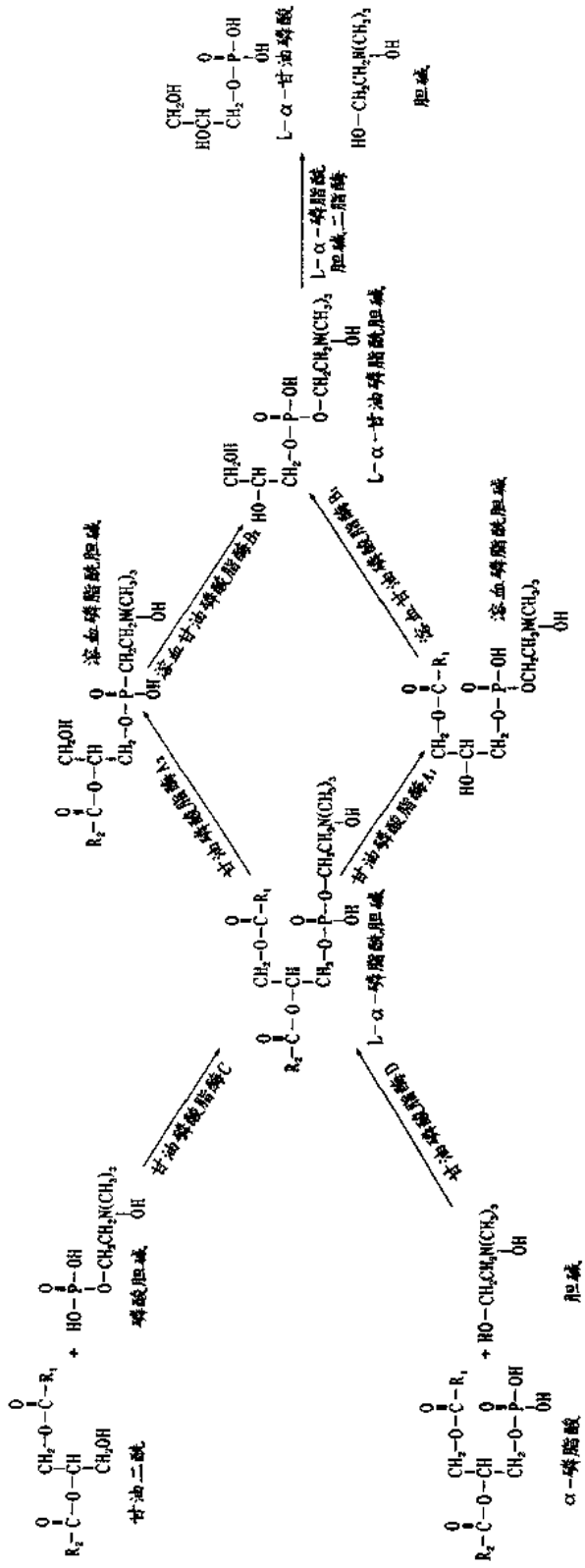


图 2.10 卵磷脂的水解(箭头指处为相应的酶作用点)  
A、B、C、D 分别为磷脂酶 A、B、C、D

核酸酶的研究对分子生物学及基因工程等的发展起着极为重要的作用,其中尤其突出的是限制性内切核酸酶的发现与应用。正因为如此,在限制性内切核酸酶的创始性研究工作中,作出了出色的贡献的 Albert, Smith 和 Nathans 三位教授获得了 1978 年度的诺贝尔医学奖。这个领域的研究发展十分迅速,Roberts 在 1982 年统计时,已发现的限制性内切核酸酶的总数为 355 种,显示 85 种不同的专一要求。根据其活性及亚基组成,特别是它对辅助因子的要求、专一识别序列及作用位点的情况,限制性内切核酸酶可分为 3 种类型(表 2.7),其中 II 型最为重要。

表 2.7 限制性内切核酸酶的分类

	I 型	II 型	III 型
酶活性	多种酶活性:限制修饰和 ATPase	一种酶活性:限制或修饰	二种酶活性:限制和修饰
限制与修饰作用	相互排斥	分开反应	同时进行
酶蛋白组成	3 种亚基	1 种亚基	2 种亚基
限制酶活性的辅助因子	SAM, ATP, Mg <sup>2+</sup>	ATP	Mg <sup>2+</sup>
专一识别顺序	无对称性规律如 SB 要求: TGANTGCT	专一于具有旋转对称性的 4~6 个核苷酸组成的回文结构	无对称性规律,如 SPI 要求: AGAGC
限制酶作用位点	随机,离识别顺序可达到 1 000bp	识别顺序内	离识别顺序 5' - 端可达 24~26bp
修饰酶活性的辅助因子	*SAM(ATP, Mg <sup>2+</sup> )	SAM	SAM(ATP, Mg <sup>2+</sup> )

\* SAM: 腺苷甲硫氨酸

## 2. 糖苷酶

这类酶催化各种类型的糖苷化合物水解,分为三个亚亚类。

这一类酶应用最广泛,常见的如:

### (1) 淀粉酶( amylase)

催化淀粉中葡萄糖苷键水解,包括四种作用类型。

①  $\alpha$ -淀粉酶。能任意切断、也能绕过分支点切断淀粉分子中的  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键,但不能水解支链淀粉中的  $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷键,也不能水解分支点邻近的  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键。作用的结果,长链淀粉裂解为短链糊精,糊精再继续水解,产物为  $\alpha$ -麦芽糖和少量葡萄糖。

②  $\beta$ -淀粉酶。作用从非还原端开始,顺次切断  $\alpha$ -1,4-键,遇分支点时则停止反应,产物是  $\beta$ -型的极限糊精和  $\beta$ -型的麦芽糖。这种酶仅在高等植物中找到。

③ 葡萄糖淀粉酶。又称为糖化酶,从淀粉的非还原端开始顺次切开  $\alpha$ -1,4-键,产生  $\alpha$ -葡萄糖;也能作用  $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷键。只存在于微生物中。

④ 异淀粉酶。切断  $\alpha$ -1,6-葡萄糖苷键,形成短段直链淀粉。

### (2) 纤维素酶(cellulase)

催化  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键水解的一类酶。实际上包括三种成分: C<sub>1</sub>、C<sub>x</sub>和  $\beta$ -葡萄糖苷酶。C<sub>1</sub>的作用可能是打断纤维素链间的氢键,使天然的纤维素成为单链状的纤维素分子;C<sub>x</sub>则进一步催化这种单链状纤维素分子水解,生成纤维二糖; $\beta$ -葡萄糖苷酶,即纤维二糖酶,

能分解纤维二糖为葡萄糖。

### (3) 半纤维素酶

也是一类酶的总称。半纤维素通常是指构成植物细胞壁的多糖成分中,除去纤维素、果胶外的戊聚糖、己聚糖等。因此,半纤维素酶包括多种酶,分析表明至少包括木聚糖酶、阿拉伯聚糖酶等类型。实际上,一般应用的纤维素酶制剂中往往混有半纤维素酶成分。它也可能是“植物组织裂解酶”的主要组成之一。

### (4) 果胶酶(pectinase)

分解植物细胞间质 - 果胶质的一类酶。包括催化果胶分解为果胶酸的果胶酯酶(PE)和聚半乳糖醛酸酶(PG)。果胶酸酯是半乳糖醛酸以  $\alpha-1,4$  - 键连接成的直链多糖酯衍生物;聚半乳糖醛酸酶的作用则是水解切断其间的  $\alpha-1,4$  - 键,又可分端解酶和内切酶两种类型。

### (5) 其他常用、常见的糖苷酶

① 溶菌酶:水解粘多糖、粘多肽中 N-乙酰胞壁酸(NAM)和 N-乙酰氨基- $\alpha$ -脱氧-D-葡萄糖(NAG)间的  $\beta-1,4$  连接。

② 右旋糖酐酶:催化  $\alpha-1,6$ -葡萄糖苷键水解。

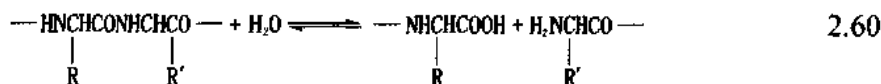
③ 蜜二糖酶:催化棉子糖水解为半乳糖与蔗糖。

④ 蔗糖酶:水解蔗糖为果糖及葡萄糖。

此外还有柚苷酶、橙皮苷酶、花青苷酶等。

## 3. 肽酶

催化:



根据肽酶(peptidase)的作用方式,可分为端(解)肽酶和内(切)肽酶。前者简称肽酶,如羧肽酶、氨肽酶,它们分别从肽链游离的羧基端或游离的氨基端切下末端氨基酸;后者通常称为蛋白酶(proteinase;或 protease),切断蛋白质分子内部肽键,使蛋白质分子变成小分子多肽,也作用某些小肽或肽的衍生物。肽酶对它们水解的肽键邻近的基团有一定的专一性要求。例如,羧肽酶和氨肽酶分别要求作用的肽键邻近有自由的羧基和自由的氨基;胰蛋白酶则要求它的水解肽键的羧基端为碱基氨基酸,如赖氨酰-、精氨酰-;而胰凝乳蛋白酶则要求是芳香族氨基酸,如酪氨酰-、色氨酰-等。

表 2.8 列举了某些肽酶的专一性要求。

肽酶是分布极广的一类酶。动物蛋白酶通常以无活性的酶原状态存在,在生理活动需要时再活化,活化过程往往是借助其他蛋白水解酶或本身的作用,切去一部分肽链而完成的,这种作用称为酶原激活(zymogen activation)。参与酶原激活的蛋白水解酶称为激酶,如肠激酶(enterokinase)、凝血酶原激酶(thrombokinase)等。胃蛋白酶、胰蛋白酶以及羧肽酶等消化酶在分泌后也通过酶原激活转变为有消化功能的活性酶。溶血酶原、凝血酶原等则是在生理需要时,通过多种紧密相关的酶以级联催化方式实现酶原激活的。在动物细胞内还存在一类组织蛋白酶,它们要求在半胱氨酸等物质存在时才有活力,可能主要起保卫、清理作用。

有些植物如木瓜、菠萝、无花果等果实中含有大量的蛋白酶,它们在细胞的可溶性蛋白中占有很大的比例,纯度相当高。微生物蛋白酶大多数为细胞外酶,不同微生物产生的蛋白酶,其性质和种类很不相同,而且往往是多种酶的混合物。某些菌(例如放线菌)的蛋白酶制剂几乎能将蛋白质一直水解到氨基酸。

表 2.8 某些常见肽酶的专一性要求

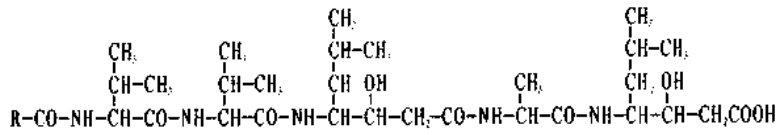
酶	来源	主要作用位点	其他作用位点
氨基肽酶	动物酵母 细菌等	各种残基的 N-末端	有酯酶活性
羧基肽酶 A	胰脏	除 Arg、Lys、Pro 外的 C-末端	
羧基肽酶 B	胰脏	Lys 或 Arg 的 C-末端	
胰凝乳蛋白酶	胰脏	Tyr-、Trp-、Phe-、Leu-	Met-、Asn-、Gln-
胰蛋白酶	胰脏	Arg-、Lys-	
凝血酶	血浆	Arg-	
溶血纤蛋白酶	血浆	Lys- > Arg-	
葡萄球菌蛋白酶(V8)	葡萄球菌	Asp-	
枯草杆菌蛋白酶	枯草杆菌	各种肽链	
尿激酶	肾	Arg-Val	
木瓜蛋白酶	木瓜	Arg-、Lys-、Phe-X-	
菠萝蛋白酶	菠萝	Lys-、Ala-、Tyr-、Gly-	
胃蛋白酶	胃粘膜	Phe-、Leu-	
链霉菌中性蛋白酶(Pronase)	链霉菌	疏水氨基酸构成的肽链	

肽酶根据它们作用的最适 pH,可分成中性、碱性和酸性三类;根据它们的活性部位的特点又可分为巯基蛋白酶、丝氨酸蛋白酶等;也有的蛋白酶需要金属离子,称为金属蛋白酶。

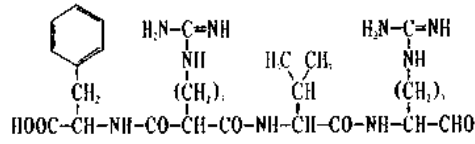
肽酶除了能水解肽键外,也能作用酯键、酰胺键,甚至还能催化转肽以及肽链的合成。它的应用十分广泛,在工农业中可用于加工生产,改进产品质量,革新工艺,处理三废;在医学实践中可用作消化酶、消炎酶等。

肽酶在机体内参与许多重要的生理过程,而且往往和相应的抑制剂同时存在,共同调节生理机能,这种平衡一旦破坏,就会导致机能失调和疾病发生。肽酶抑制剂中有许多是生物体合成的大分子物质,也有许多是化学合成的小分子化合物,在图 2.11 中列举了某些肽酶抑制剂。

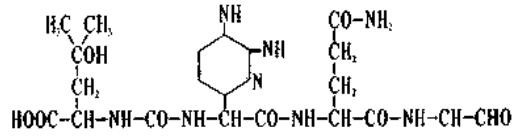
肽酶抑制剂有着广泛应用,许多抑制剂已用作治疗药物,如用于高血压治疗的开博通(Captopril)。在艾滋病治疗上,人们发现 HIV-1 蛋白酶和其他反转病毒的蛋白酶一样,在病毒的包装、成熟、复制和感染能力等方面都具有重要作用,例如,它能专一地切割 Pr 55<sup>gag</sup>、Pr 160<sup>gag-pol</sup>,产生核心蛋白 P24、P15、P7、P6、蛋白酶、反转录酶和整合酶。因此,如能抑制该病毒的蛋白酶,HIV-1 就不能成熟,没有侵染能力。HIV-1 的蛋白酶属 Asp 酶系,相对分子质量 11 kD,由 99 个氨基酸组成,该酶已结晶并已确定其空间结构;含乙烯的寡肽可作为该酶专一的抑制剂,强力地抑制 HIV-1 在 T 淋巴细胞中的增殖, $K_i$ 为纳克(ng)水平,相对应的 pepstatin(Asp 酶系的专一抑制剂)的  $K_i$ 为毫克(mg)级,而且未发现对宿主细胞有任何毒性。



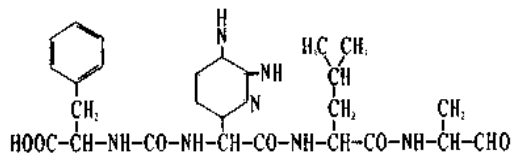
胃酶抑制剂  
(pepstalin)



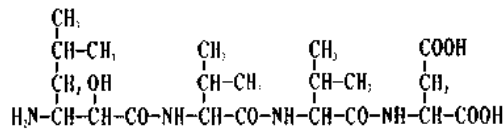
抗胰酶  
(antipain)



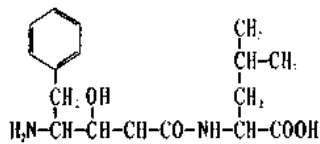
弹性蛋白酶抑制剂  
(elastainal)



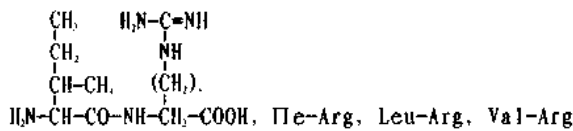
糜蛋白酶抑制剂  
(chymastatin)



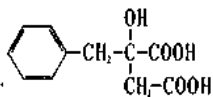
氨肽酶A抑制剂  
(amastatin)



氨肽酶B抑制剂  
(bestatin)



氨肽酶抑制剂  
( $\alpha$ -氨酰精氨酸)



羧肽酶A抑制剂  
( $\beta$ -苯甲酰苹果酸)

图 2.11 某些肽酶抑制剂

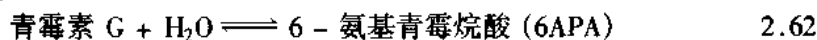
#### 4. 作用肽键以外的 C—N 键的酶

这一亚类中常见的有:

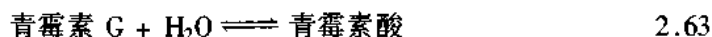
门冬酰胺酶(asparaginase, EC 3.5.1.1), 催化:



青霉素酰胺酶(penicillinaminase, EC 3.5.2.6), 催化:



青霉素( $\beta$ -内酰胺)酶, 催化:

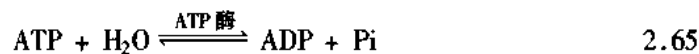


AMP 脱氨酶(adenylic deaminase, EC 3.5.4.6), 催化:



#### 5. 其他各亚类

(1) 水解酸酐键亚类, 如:



(2) 水解碳碳键亚类, 如:



(3) 水解卤键亚类, 如:



### 四、解(合)酶类

这类酶催化底物进行非水解性、非氧化性分解, 在生物合成中起着十分重要的作用。反应的特点是, 反应式的一端有两种底物参加, 另一端为一种底物。系统命名为“底物 $\times\times$ 基团-解酶”。习惯命名有各种形式, 如: $\times\times$ 基解酶; 水合酶(也称 $\times\times$ 底物酶), 合酶等。包括五个亚类。

#### 1. 分解碳碳键亚类

包括羧基解酶和醛酮基解酶。

(1) 羧基解酶

羧基解酶又称为脱羧酶(decarboxylase), 如:



催化氨基酸脱羧的酶要求磷酸吡哆醛为辅酶, 反应机制如图 2.9。催化 $\alpha$ -酮酸脱羧者要求硫胺素焦磷酸(thioamine pyrophosphate, TPP)为辅酶, 其结构如图 2.12。

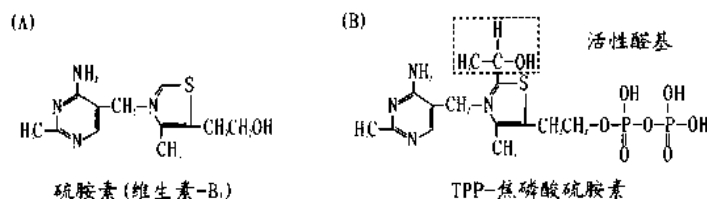


图 2.12 硫胺素焦磷酸的结构

## (2) 醛酮基解酶

醛基解酶中有的在糖代谢中起着十分重要的作用,如醛缩酶(aldolase, EC 4.1.2.13),催化己糖分解为丙糖,是糖酵解循环的关键酶之一:



酮基解酶大多和二羧酸或三羧酸的合成有关,参与三羧酸循环与乙醛酸循环。如柠檬酸解酶(citrate lyase, EC 4.1.3.6),也称柠檬酸酶(citrase),催化:

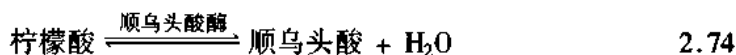


与此相似的还有柠檬酸合酶(citrate synthase, EC 4.1.3.8),也称缩合酶(condensing enzyme),草酰乙酸转乙酰酶(oxaloacetate transacetase),催化:



## 2. 分解碳氧键亚类

这一亚类催化水分子加到反应物的双键上, 或者从反应物中分出水分子同时形成双键。这一亚类有的称为“××水合酶”,有时略去“水合”两字。常见的如:

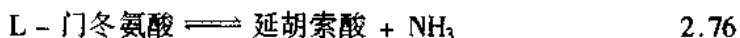


某些酶催化羟基氨基酸脱水反应,其反应过程中往往伴随脱氨反应,如:



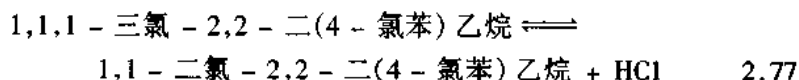
## 3. 分解碳氮键亚类

包括催化非氧化性、非水解性脱氨反应的酶,如天门冬氨酸酶(asparase, EC 4.3.1.13):



## 4. 分解碳硫键、碳卤键二亚类

后一亚类如 DTT 脱氯化氢酶,催化:



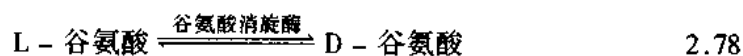
## 五、异构酶类

这类酶催化分子异构化,为进一步代谢作准备,包括六个亚类。



### 1. 消旋酶和差向异构酶(又称变旋酶)

如谷氨酸消旋酶和醛糖-1-差向异构酶,它们分别催化:



消旋酶和差向异构酶的区别在于,它们作用的底物分子中,前者仅包含一个不对称碳原子,后者则包含两个或者两个以上不对称碳原子。

### 2. 顺反异构酶

如视黄醛异构酶催化:



### 3. 醛酮异构酶

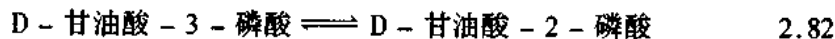
如木糖酮醇异构酶(xylose isomerase, 5.3.1.5),催化:



其中, *Pseudomonas hydrophila*, *Lactobacillus bravis* 来源者具有 D-葡萄糖异构酶活性,现用于高果糖浆的生产。

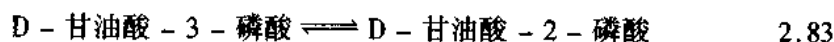
### 4. 分子内转移酶

如磷酸甘油变位酶催化:

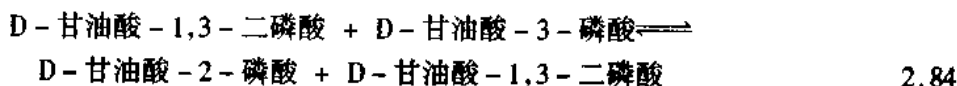


异构酶类的变位酶和转移酶类的变位酶在催化机制上有些不同,前者不需要辅助因子,而后者却要求相应的中介物质。

变位反应:



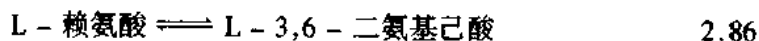
转移反应:



在这一亚类中,值得提到的还有一些催化甲基和氨基在分子内进行重排转移的变位酶。例如谷氨酸变位酶,催化:



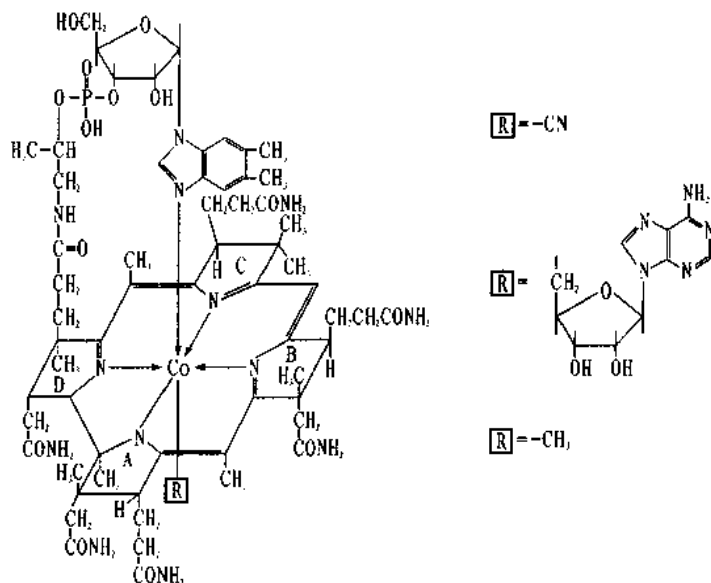
又如赖氨酸-2,3-氨基变位酶,催化:



这类酶中有很多要求钴胺酰胺为辅助因子,后者是维生素 B<sub>12</sub>的衍生物,结构如图 2.13 所示,分子内包含一个钴离子,故又称钴胺辅酶(cobamide coenzyme)。

值得指出的是钴胺也是某些解酶反应的辅酶,如甘油脱水酶、乙醇胺脱氢酶,但是更重要的可能还在于,它也参与四氢叶酸转甲基酶反应,由于这一反应能使 N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-亚甲四氢叶酸还原酶催化 N<sup>5</sup>-甲基四氢叶酸再生为四氢叶酸、N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-亚甲四氢叶酸,而上述还原反

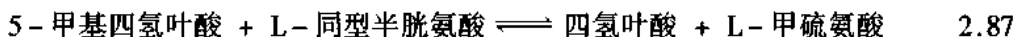
应不可逆,从而保证了胸腺嘧啶核苷酸正常合成;反之,维生素 B<sub>12</sub>缺乏就可能和叶酸缺乏相似的结果。



维生素 - B<sub>12</sub> 和钴胺辅酶

图 2.13 钴胺辅酶的结构

四氢叶酸甲基转移酶催化的反应如下:



## 六、合成酶类

这一大类酶关系到许多重要的生命物质的合成,包括五个亚类。其催化反应的共同特点是:都需要 ATP 等高能磷酸酯作为 R、R' 结合的能源;此外,这类酶中有许多还需要金属离子作为辅助因子,如 Mg<sup>2+</sup> 等。

### 1. 催化碳氧键形成亚类

它们和蛋白质合成有关,全部为催化氨基酸 - tRNA 形成的氨基酸 - tRNA 合成酶 (aminoacyl synthetase),如丙氨酸 - tRNA 合成酶,催化:



这类酶能专一地识别对应于不同氨基酸的 tRNA,而且非常精确,这可能和 tRNA 大分子与酶分子具有多点结合有关;它们也能专一地识别氨基酸,但选择性不如对 tRNA 那样精确;不过即使是结合了错误的氨基酸,由于此类酶同时具有水解酶活性,能很快地除去错误的氨基酸加以修正。其催化机制如下:



错配的氨基酸<sub>1</sub>-tRNA<sub>2</sub> 很不稳定,易为酶催化分解。

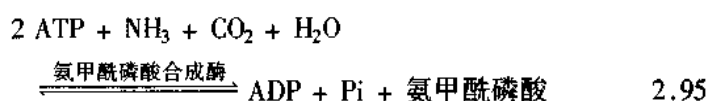
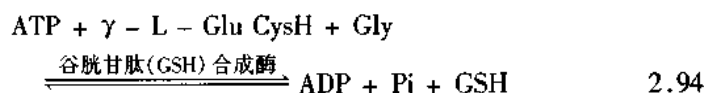
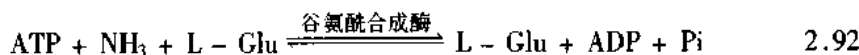
## 2. 催化碳硫键形成亚类

这一亚类与酰基 CoA 形成及脂肪酸代谢有关,如乙酰 CoA 合成酶,催化:



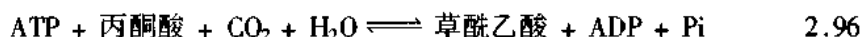
## 3. 催化碳氮键形成亚类

这一亚类关系到酰胺、肽、核苷酸以及某些生理活性物质的转化与形成,如:



## 4. 催化碳碳键形成亚类

这一亚类需要生物素作为辅助因子,如丙酮酸羧化酶,催化:



生物素的结构及其参与羧化过程的作用方式如图 2.14:

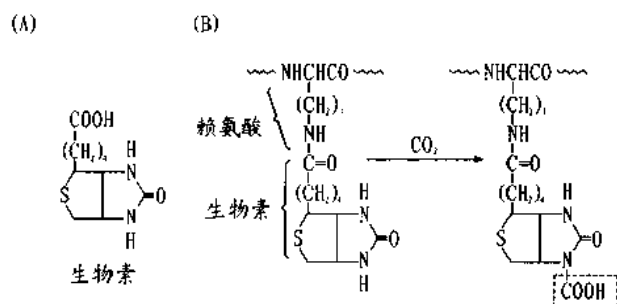
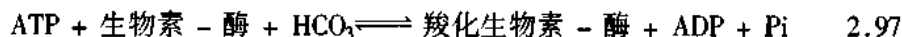


图 2.14 生物素的结构 (A) 及其参与羧化过程的作用方式 (B)

羧化酶反应的机制如下:



## 第三节 酶的多形性与同工酶<sup>(16-17)</sup>

有很多酶催化相同的反应,但其结构和物理化学性质(包括某些催化特性)往往有所不同,这种现象称为酶的多形性(enzyme polymorphism or multiplicity)。例如,从酵母和肝脏都可分离得到醇脱氢酶,但是,这些不同来源的酶在分子结构和物理化学性质上都不相同,它们互称为同工异源酶(xenozyme)。随着生化分离技术的进一步发展,发现在同一生物的不同

组织器官中,甚至在同一细胞中也存在这类似的情况。如人的前列腺中和红血球中的酸性磷酸酶、细胞质中和线粒体中的苹果酸脱氢酶,就是一些催化相同反应,但结构、性质有所差异的酶,人们将它们统称为同工多形酶,也称为同工酶(isoenzyme, isozyme)。根据同工酶的形成原因,国际生化联合会酶委员会在 1976 年将这种同工多形性现象归纳为六种类型(表 2.9),并将前三类划属同工酶范畴;同时对同工酶作出如下定义:在同一生物体中,催化相同反应,但结构基因不同,因而酶的一级结构、酶的物理化学性质以及酶的其他性质都可能有所差异的酶称为同工酶。

表 2.9 酶的同工多形性类型

	酶的同工多形性形成原因	例
1	不同基因编码的蛋白质	细胞质和线粒体 MDH, LDH <sub>1</sub> , LDH <sub>5</sub>
2	两条或多条肽链以非共价键的方式形成的杂聚体	LDH <sub>2</sub> , LDH <sub>3</sub> , LDH <sub>4</sub>
3	等位基因突变的蛋白质	人类的 G-6-PDH
4a	能和其他基因结合的蛋白质	磷酸化酶 a, b
4b	从一条多肽链衍生的蛋白质	从胰凝乳蛋白酶原衍生出来的各种胰凝乳蛋白酶
5	单亚基聚合形成各种多聚体	相对分子质量 1 000 000 与 250 000 的 GLuDH
6	不同构象的蛋白质	酶的各种别构形式

在表 2.9 中,第一类为不同基因编码的蛋白质,这类同工酶之所以都能催化相同反应,一种可能是这些酶来自共同的祖先基因,但在进化过程中由于基因突变,导致酶的一级结构上发生了某些不影响催化活性的变化,这种现象称为分化进化(divergent evolution);另一种可能是它们虽有不同的祖先基因,但是在进化过程中由于基因突变,使编码不同蛋白质的基因形成了某些可以催化相同反应的结构部分,这种现象称为趋同进化(covergent evolution)。显然这两种类型的同工酶在结构和物理化学性质上可能十分相似,也可能相距很远。

第三类是等位基因发生了突变的蛋白质,在其一级结构上仅有个别氨基酸残基不同,因此这类酶在性质上通常十分相似,也称为等位基因酶(allozyme)。

第二类则是第一类和第三类的杂聚体。

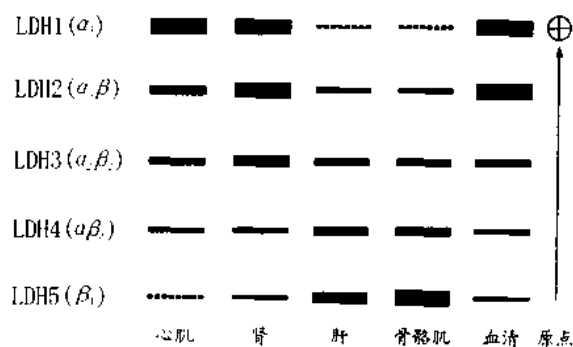


图 2.15 乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱

同工酶可以通过多种方法加以鉴别,例如:活性测定、一级结构分析、层析和电泳分析,对底物、抑制剂和辅助因子的亲和性测定,以及对热或化学变性剂的稳定性测定等。但最常用的是电泳,因为这种方法对样品的纯度要求不高,分辨率强,简便快速。采用电泳分析时,

各种同工酶可以根据其电泳谱带的排列(如图 2.15),依次自正极向负极编码,如 LDH<sub>1</sub>、LDH<sub>2</sub>……有时还可进行更细的编码,如 1a, 1b……以磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucosmutase PGM, EC 2.7.5.1)为例,该酶至少有 50 种以上的同工酶,除了须给予上述编码外,有时还应注明突变的等位基因号码。

关于同工酶和同功酶的译名问题,过去曾用后一名称,现在则多倾向于前者。主要是因为酶的分子结构不但决定了它的催化性质,也决定了它的效率、和细胞结构及其相关效应物(包括调控因子)的相互关系,及对外界条件改变做出反应的能力,这就是说,同工酶在机体内虽然催化相同反应,做相同的工作,但由于其结构与性质不同,它们在生命活动中发挥的作用、具有的功能就可能有所差别。正因为如此,同工酶在酶的生物学研究和临床检验、以及在病理与治疗机制的探讨中都有着十分重要的地位。

除了遗传因素可使生物体内的酶产生多形性外,酶的多形性也可能来自酶蛋白合成后的修饰、解离聚合或构象改变。虽然这种多形性现象同样是机体适应机能需要的一种调节方式,也是机体功能状况的一种反映指标,但是一般不将它们归属同工酶范畴。

#### 第四节 其他习惯归类命名法<sup>(18-20)</sup>

在酶学发展过程中,为研究方便,也建立了某些习惯的归类命名法。

##### 一、单体酶和寡聚酶

根据酶组成特点可将已知的酶分为:单体酶和寡聚酶。

单体酶仅由单条肽链组成,相对分子质量 13 000 ~ 35 000,不能再解离成更小的组成单位。其中许多是催化水解反应的酶,一般不需要辅助因子。

在单体酶中有一些是蛋白水解酶,它们多以无活性的酶原形式合成,在需要时再水解除去部分肽链转变为有活性的酶。

已知的酶绝大多数是寡聚酶,由相同或者不同的亚基组成,它们包含两条或多条肽链,相对分子质量通常超过 35 000。例如,糖酵解有关的酶都是包含 2 ~ 4 个亚基的寡聚酶。在寡聚酶中有许多是代谢途径中的关键酶,它们的活性可通过多种方式,特别是通过别构机制进行调节。

##### 二、恒态酶和调节酶

酶,根据它在代谢中所处的地位、含量与活性情况,也可以分成:恒态酶(static enzyme)与调节酶(regulative enzyme)。

恒态酶是指那些构成代谢途径和物质转化体系的基本组成成分,在细胞中的含量相对恒定,其活性仅受反应动力学系统本身的组成因素调节。

调节酶是指在代谢途径和物质转化体系中起调节作用的关键酶,它们的含量与活性常因机体的机能状况而不同。按照其活性调节方式又可分为三种类型:潜态酶(latent enzyme),别构酶(allosteric enzyme)和多功能酶(multifunctional enzyme)。

### 1. 潜态酶

潜态酶是指那些通常以无活性的酶原状态存在,而在机能需要时再转变为活性状态的酶。这种激活调节一般以级联催化方式(cascade processes)进行。包括两种类型:一是不可逆的共价调节(irreversible covalent regulation),即所谓的酶原激活。除了前述消化性的蛋白水解酶外,也包括那些具有生理功能的蛋白水解酶,例如凝血酶、溶血纤蛋白酶和补体等都是通过这种方式调节的;二是可逆共价调节(reversible covalent regulation),包括磷酸化/脱磷酸化、乙酰化/脱乙酰化、腺苷酰化/脱腺苷酰化、尿苷酰化/脱尿苷酰化以及甲基化/脱甲基化等。

### 2. 别构酶

别构酶,这些酶在结构上除了具有能和底物相结合、并催化底物进行反应的活性中心外,还具有能和效应物(effector)相结合的调节中心。它们的催化活性通过调节中心接受效应物调控。别构酶往往位于代谢途径的第一步或代谢分支途径的第一步,并受代谢途径尾产物的反馈调控(feedback regulation)。例如,大肠杆菌的苏氨酸脱氨酶,它是大肠杆菌从苏氨酸合成异亮氨酸途径中的一个关键酶,除受 L- 异亮氨酸的反馈抑制,也受 L- 缬氨酸活化。

别构酶的另一特点,就是它有着和恒态酶不同的动力学性态。

值得提到的还有,就是在有的生物机体中,别构酶可能由两种或两种以上的同工酶组成,例如,大肠杆菌从门冬氨酸到赖氨酸的生物合成途径中的关键酶——门冬氨酸激酶就由三种同工酶组成,分别受不同的尾产物调节控制(图 2.16)。

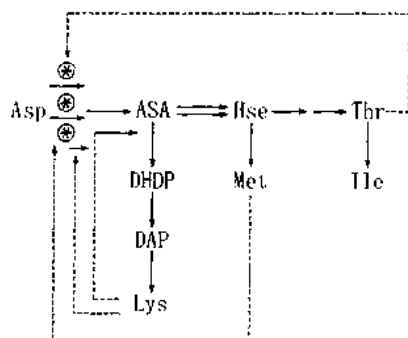
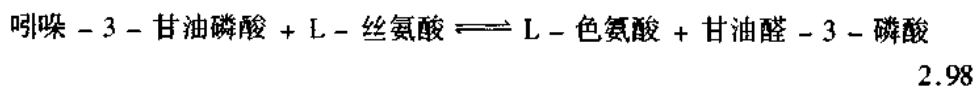


图 2.16 大肠杆菌赖氨酸生物合成途径的别构调节

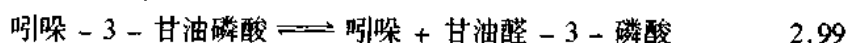
.....→反馈抑制或阻遏; \* 门冬氨酸激酶

### 3. 多功能酶

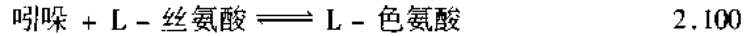
多功能酶是指具有一种以上催化活性的酶,它们有的是由不同亚基组成,例如,大肠杆菌的色氨酸合成酶,催化如下反应:



该酶由两种亚基组成:  $\alpha_2\beta_2$ 。  $\alpha$  亚基相对分子质量为 29 000,催化:

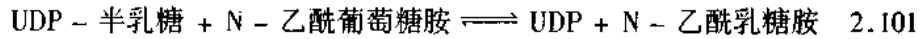


$\beta$  亚基的相对分子质量为 90 000,催化:

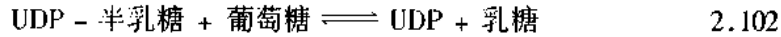


粗糙链孢霉来源的色氨酸合成酶也能催化上述反应,但它仅由两个相对分子质量 75 000 的相同亚基组成( $A_2$ ),这种多功能酶可能是由于两种亚基  $\alpha$  和  $\beta$  的基因发生了相互融合的结果。

关于多功能酶还有两点值得提到,一是亚基的结合可能导致酶催化专一性发生某些改变,如乳糖合成酶,它由无催化活性的  $\alpha$ -乳清蛋白与半乳糖苷转移酶组成,后者单独存在时催化:



而当它和  $\alpha$ -乳清蛋白结合后则能催化乳糖形成:

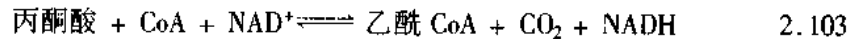


二是某些别构酶也可能是多功能酶,如大肠杆菌门冬氨酸激酶(AK),它同时具有高丝氨酸脱氢酶(HDH)的活性,其中 I 型 AK-HDH 相对分子质量为 350 000,由 6 个相等大小的亚基组成;而 II 型的 AK-HDH 是由相对分子质量 170 000 的亚基组成的四聚体。

### 三、多酶复合物(多酶系统)

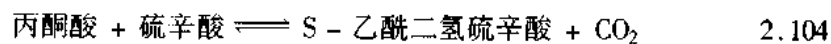
多功能酶集不同催化活性于一身,有两方面的意义:一是调节功能,即能在不同的条件下表现不同的催化作用;二是能使催化连续反应的活性中心邻近化从而提高催化效率,例如,用色氨酸合成酶的亚基  $\alpha_2$  与亚基  $\beta_2$  混合催化,其效率仅为该酶( $\alpha_2\beta_2$ ) 的 5% 以下。

和色氨酸合成酶相类似,有些酶更复杂,能在更大规模的水平上将催化多个连续反应步骤的酶活性集于一身。根据酶委员会命名系统,这些酶称为多酶复合物或多酶系统(multienzyme complex or multienzyme system)。以大肠杆菌来源的丙酮酸脱氢酶为例,催化:

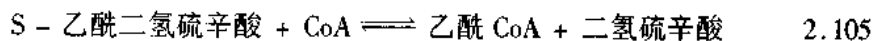


由大约 60 条肽链组成,相对分子质量约 4 600 000,包括相关联的三种酶活性:

$E_1$ , 丙酮酸脱氢酶(脱羧),需要 TPP 为辅酶,催化:



$E_2$ , 二氢硫辛酸转乙酰基酶,催化:



$E_3$ , 二氢硫辛酸还原酶,催化:



丙酮酸脱氢酶是一个直径约 30nm 的多面体,其中,8 个  $E_2$ (三聚体)形成核心,12 个  $E_1$ (二聚体)组成 12 个边,24 个  $E_3$ (二聚体)分布于其表面(图 2.17)。

关于多酶系统或多酶复合物有几点值得指出:

(1) 多酶复合物各组成成分的结合强度可能差别很大,上述丙酮酸脱氢酶结合力就较弱,而  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶和脂肪酸合成酶中的各成分间相互作用则很强。如果多酶复合物的各组成成分间仅以次级键彼此联结,则形成的复合物称为多酶蛋白(multienzyme protein);如果其间是由于基因融合,彼此间以共价键结合,则称为多酶多肽(multienzyme polypeptide)。

(2) 在催化活性上没有直接联系的酶也可能组成多酶复合物,如在肌肉中的磷酸化酶 b 和丙氨酸转氨酶就可能形成复合物,而且,它们的活性也同样为代谢物如 AMP 等所影响。

(3) 在细胞内各种多酶复合物还可能通过和细胞膜或细胞器结合在一起,从而通过相互邻近组成高效的物质或能量代谢系统。

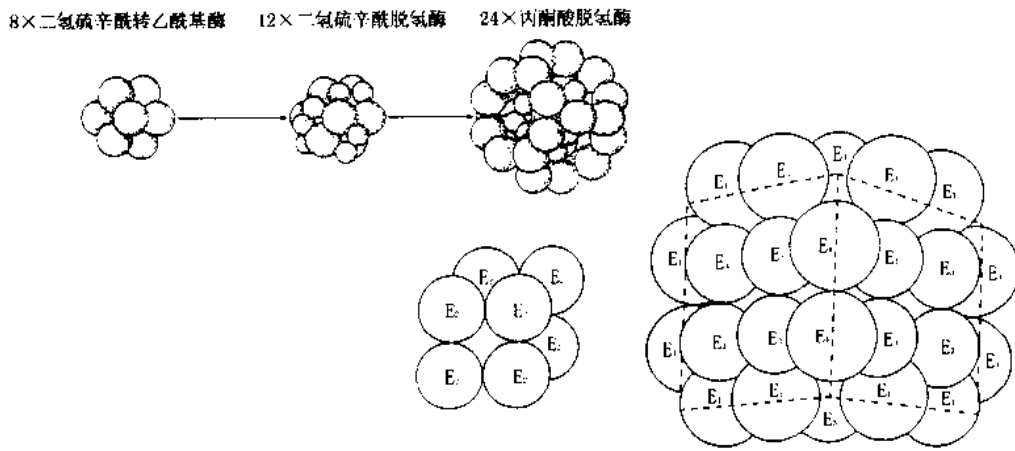


图 2.17 丙酮酸脱氢酶的结构

#### 四、胞内酶、胞外酶和“外向酶”

根据酶合成后分布的位置,通常将酶分为胞内酶(intracellular enzyme)和胞外酶(extracellular enzyme)。胞内酶在合成后仍留在细胞内发挥作用,根据它们是否与细胞膜或细胞器结合,又可分为结酶(desmoenzyme)和溶酶(lyoenzyme)。胞外酶是指那些在合成后分泌到细胞外发挥作用的酶。

值得提到的是“ectoenzyme”,在某些文献中将它译为胞外酶,但它和通常所说的胞外酶不同,它是一种和细胞膜结合的酶,其活性中心位于细胞的外表面,指向细胞外空间,作用尚不完全清楚。

### 第五节 维生素和辅酶物质<sup>(21)</sup>

生物体内的物质大体可分为两种类型:基本代谢物和代谢调节物。前者是代谢的主体,量大;后者则在代谢中起调节作用,量微,但作用大。调节物质主要有两类:激素和维生素。激素一般由生物体自身产生,而维生素,有些生物可能自己合成,而另外一些则需要从其他生物材料取得。

维生素是一些小分子物质,它们的化学结构多种多样,可分为两种类型:脂溶性和水溶性。维生素的生理功能主要是作为特定的辅酶。根据是:

(1) 已知的辅酶物质都是维生素或它的衍生物,而且主要是水溶性维生素的衍生物(表 2.10)。

(2) 维生素所引起的缺乏症和维生素作为辅酶的作用相关,即和代谢途径中相应的酶反应受阻相关。

(3) 抗代谢物多是一些维生素的类似物,而且也是需要相应辅酶物质的酶强有力的竞争性抑制剂。



表 2.10 某些维生素与辅酶的关系

辅 酶	功 能	相关的维生素
NAD / NADP	转移 H <sup>+</sup> , e <sup>-</sup>	尼克酸 (PP)
FMN / FAD	转移 H <sup>+</sup> , e <sup>-</sup>	核黄素 (B)
CoQ	转移 e <sup>-</sup>	泛醌
THFA	转-碳基	叶酸
CoA	转酰基、脂肪代谢	泛酸
磷酸吡哆醛	转氨脱羧消旋	B <sub>6</sub>
硫胺素焦磷酸	氧化脱羧, 醛基转移	B <sub>1</sub>
钴胺酰胺	转甲基	B <sub>12</sub>
生物素	羧化	生物素 (H)

辅酶物质基本上都是维生素的衍生物,大多数辅酶物质的结构中还包含核苷酸或核苷酸类似物,特别是 AMP。从前面的讨论中可以看到,这些辅酶分子中的功能基团一般都在非核苷酸部分,如 NADP 中的尼克酰胺部分、黄素核苷酸的异咯嗪部分、还有 CoA 的半胱酰胺部分等。现在认为,核苷酸部分的作用主要是参与辅酶和酶蛋白的联系。支持这一说法的事实是:生物素、吡哆醛和硫辛酸等辅酶不具有核苷酸部分,它们都需要通过共价键和蛋白质的 Lys-NH 相连。例如,生物素通过其羧基、吡哆醛通过其醛基和 Lys 的 ε-NH 相连形成共价键。而具有核苷酸部分的辅酶却可通过嘌呤环和蛋白质的侧链基的相互作用,以非共价键将辅酶固着于酶。核苷酸部分的另一个作用可能是将辅酶分子的功能基团通过“诱导契合”机制引入酶分子的活性中心区域参与催化反应,例如, NMN 不能作为脱氢酶的辅酶,但如果同时存在 AMP,它就可代替 NAD/NAD(P) 发挥作用。

## 参 考 文 献

### 一、酶的分类命名原则

(1) International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Nomenclature Committee. Enzyme Nomenclature. San Diego: Academic Press, 1992

### 二、各类酶及其辅助因子

- (2) Gennis RB. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, **28**(5):536
- (3) Hufton SE, Jenning IG & Cotton RG. *Biochem. J.*, 1995, **311**(Pt.2):353
- (4) Rosen DR. *Science*, 1988, **237**:1 452
- (5) 敖世洲主编. 蛋白可逆磷酸化对细胞活动的调节. 上海:科学技术出版社, 1994
- (6) Roder RG. *Methods Enzymol.*, 1996, **273**:165
- (7) Paabo S. *Nature*, 1991, **350**:6
- (8) Sirims S, Cotlsching DE. *Science*, 1994, **266**:21
- (9) Jeltsch A, Wenz C, Wende W et al, *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**(7):235

- (10) Warren MJ, Scott AI. *Trends Biochem. Sci.*, 1990, **15**(12):486
- (11) Nduwimana J, Fuenet L, Dorval I et al. *Ann. Biol. Clin.*, 1995, **53**(5):251
- (12) Knop M, Schiffer HH, Rupp S et al. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1993, **5**(6):990
- (13) van der Werf MJ, van der Tweel WJ, Kamphuis J et al. *Trends Biotechnol.*, 1994, **12**(3):

- (14) Bhosal SH, Rao MB & Deshpande VV. *Microbiol. Rev.*, 1996, **60**(2):280
- (15) Griffith OW, MulCahy RT. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1999, **73**:209

### 三、酶的多形性与同工酶

- (16) Reavo JA. *Physiol. Rev.*, 1995, **74**(4):725
- (17) Sudo. 日本临床, 1995, **53**(5):1 119

### 四、其他的习惯归类命名法

- (18) Swift S, Stewart GS. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1991, **9**:229
- (19) Bulow L, Mosback K. *Trends Biotechnol.*, 1991, **9**(7):226
- (20) Jez JM, Bennett MJ, Schlegel BP et al. *Biochem. J.*, 1997, **326**(pt.3):625

### 五、维生素和辅酶物质

- (21) Ludwig ML, Matthews RG. *Ann. Rev. Biochem.*, 1997, **66**:269

## 第二部分 酶的生产与制剂

### 第三章 酶的生产、改造与模拟

酶,可以通过两条途径获得,一是化学合成,包括酶的化学全合成、酶类似物和模拟酶的化学合成;一是生物合成,即从生物中提制。继我国在 1964 年率先从氨基酸出发,以化学法全合成了具有生物活性的胰岛素以后,1969 年 Gutte & Merrifield 也通过化学方法人工合成了活性的核糖核酸酶,而且还发展了一整套固相合成肽的自动化技术。这些成果既证明了酶等的化学本质是蛋白质,也说明人们可以通过化学的方法在实验室中合成包括酶在内的各种生命物质。但是,从经济和技术等角度而言,用这条途径来进行酶的生产还比较遥远。因此,直接从生物制取酶还是现今最主要的办法。

在酶制剂工业发展早期,酶多取自动植物原料,但是它们的生长周期长、同时还受地理、气候和季节等各种因素的限制,不适于大规模工业生产。所以,近年来都转向采用微生物发酵制取,它的优点是:(1)种类繁多,凡是动植物体内有的酶几乎都能从微生物中找到,并可根椐应用特点和要求,筛选出最佳的产酶菌株;(2)繁殖快,发酵周期短,培养简便,能通过控制培养条件大幅度提高酶的产量;(3)微生物具有较强的适应能力,可采用各种遗传变异手段,培育出新的、更理想菌株。

#### 第一节 酶的发酵生产<sup>(1-5)</sup>

##### 一、产酶菌的获得

###### 1. 生产菌的要求

(1) 不是致病菌,在系统发生上与病原体无关,也不产生毒素。这一点对食品用酶和药用酶尤为重耍。在采用新的产酶菌株时,一般应先有大量的病理、毒理或动物饲喂实验数据作为依据。现在已经过某些国家和国际机构,特别是 FDA (Food and Drug Administration) 鉴定、审核后认为可用于食品工业和医药工业的生产菌有:枯草杆菌(*Bac. subtilis*)、黑曲霉(*Asp. niger*)、米曲霉(*Asp. oryzae*)、啤酒酵母(*Sac. cereusia*)、脆壁酵母(*Sac. fragieis*)。

(2) 不易变异退化、不易感染噬菌体。

(3) 产酶量高,酶的性能符合应用需要,而且最好是产胞外酶的菌株。

(4) 能利用廉价原料,发酵周期短,容易培养。

产酶菌,除了可从菌种保存机构如 ATCC (American Type Culture Collection) 和有关研究部门获得外,一般都要通过筛选(screening)得到。筛选包括以下环节:菌样采集,菌种分离、纯化和生产性能检定。

## 2. 菌样的采集

产酶菌的分布大体有如下规律：

(1) 相近菌种,它们产生的酶在性质上一般相近或相似,例如,从地衣芽孢杆菌得到的蛋白酶就和从淀粉液化芽孢杆菌得到的很相似,因为两者是近缘菌;反之,不相关的菌种,它们的酶或酶系则往往不同。

(2) 胞外酶的稳定性和最适反应条件通常和菌的最适生长条件一致。例如,嗜碱性枯草杆菌来源的蛋白酶,其作用最适 pH 就比嗜中性地衣芽孢杆菌来源的蛋白酶高出几个 pH 单位;同样,从耐热的凝结芽孢杆菌得到  $\alpha$ -淀粉酶,其作用的温度范围,可比常温淀粉液化芽孢杆菌来源者高 10℃左右。但是胞内酶,它们的热稳定性常比该菌的最适生长温度要稍低一些,这可能和细胞内环境对酶的保护作用有关。

(3) 为获得能够降解某种物质的产酶菌株,一般可从该物质比较丰富的地方寻找。例如,包含木质素酶、纤维素酶等的菌株在森林和木材堆积的地方较丰富;分解尿酸的产酶菌株可从鸡棚、鸡粪堆中分离;而要降解某些合成物质的产酶菌则往往能在污水处理处得到。

菌样采集后,通常还要进行一些“富集”预处理,例如,在较高温度条件培养一定时间,或使用高选择性生长培养基培养一定时间,以升高所需要菌种的数量。然后再进行菌种的分离、纯化。

## 3. 菌种的分离、纯化

和其他生产菌一样,产酶菌也可采用平板划线法或直接稀释法分离、纯化。

## 4. 菌种生产性能的检定

包括初筛和复筛。初筛是从已分离出来的菌种中挑出包含目的酶的菌株,复筛是在初筛基础上筛选产酶量高、性能更符合要求的菌株。初筛要求检出方法快速、简便;复筛则要求测定方法相对地准确。

初筛多采用平板培养透明圈法。例如,筛选水解酶的生产菌,可以该酶的底物作为平板培养基的主要碳源或氮源。这种情况下,如果某菌株包含所需要的酶,那么经过一段时间的培养后,就会在该菌落的周围形成一透明的水解圈(clearing or lysis zone)。从透明圈的大小可大致判断出菌株的产酶能力;通过比较不同培养条件下透明圈的大小还可大体了解该菌对培养条件的要求。有时透明圈不明显,可在培养结束时加入底物的沉淀剂,使未分解的底物析出,这样透明圈就能更清晰地衬托出来。另一种办法是以接上色素的“色原底物”(chromogenic substrate)作为平板培养基的主要碳源或氮源;如果是产酶菌,那么在它生长繁殖时,就会将其周围的色原底物水解,释放出色素或接有色素的单体,形成澄明透亮的颜色光环,更便于迅速检出。表 3.1 是某些常用的筛检培养介质。

复筛是将初筛出来的产酶能力较强的菌移入三角瓶内振荡培养,然后用生产上常规的测定方法对培养产物进行分析检定,从中找出产酶量最高、性能上更符合要求的菌株。由于摇瓶条件和发酵罐条件大致接近,所以测得的结果一般能反映产酶菌实际的生产能力。

表 3.1 某些常用的筛检细胞外酶与膜结合酶的培养介质

酶	底物	试剂	备注
淀粉酶	淀粉/糖原	碘溶液	红色透明圈
$\alpha$ -淀粉酶	蓝色淀粉		浅蓝色光环
纤维素酶	蓝色纤维素 滤纸		浅蓝色光环 滤纸崩解
几丁质酶	几丁质		不溶性几丁质的透明圈
$\alpha$ -葡萄糖苷酶	对硝基- $\alpha$ -D-葡萄糖苷		黄色菌落与透明圈
$\alpha$ -葡聚糖酶	1,3- $\alpha$ /1,6- $\alpha$ -葡聚糖		不溶性葡聚糖的透明圈
1,3- $\beta$ -葡聚糖酶	凉薯	苯胺兰	浅蓝色透明圈
支链淀粉酶	菊粉	乙醇或丙酮	透明圈
果胶酯酶	果胶或多聚半乳糖醛酸	溴代十六甲胺	透明圈
细胞壁解酶	细胞壁		透明圈
蛋白酶	脱脂奶 胶原	硫酸胺	透明圈
DNA 酶	DNA	HCl	透明圈
	DNA	甲基绿	粉红色光环
RNA 酶	RNA	HCl	透明圈
	RNA	吡啶	UV 下荧光绿背景, 菌落暗
脂肪酶	Tween		不透明斑
青霉素 $\beta$ -内酰胺酶	青霉素	聚乙烯醇/1 <sub>2</sub>	暗绿背景下呈蓝色

## 二、产酶菌的培养

### 1. 菌种的保存与制备

微生物的优良性状和菌种的保存方法与保存条件有着直接关系。

在种子制备时应注意:

- (1) 防止污染, 尽量减少转移的次数, 如直接用固体斜面菌种接种种子瓶;
- (2) 避免对种子培养基进行长时间高热灭菌, 以防对种子产生不良影响。

### 2. 培养方法

(1) 曲式培养。又称表面培养(surface culture), 也称为(半)固体培养(semisolid culture), 即以麸皮、米糠等为原料, 再加入适量无机盐和水(通常 50% 左右)作为培养基进行的一种培养。曲式培养中, 最简单的是浅盘培养(tray culture), 培养基的厚度一般不超过 5cm。其次是转鼓培养(rotating drum culture), 培养基量大, 培养过程中借助转鼓不停地翻动, 以利充分通气。近年来则多用通风式厚层培养(high heap culture, 或 deep culture), 培养基厚度可达 20cm~30cm, 通过送风输氧。曲式培养设备简单, 便于推广, 并特别适于霉菌类的培养。因为菌丝体在这种培养基中能较好地伸展、生长, 产酶率也比较高。例如, 曲霉和毛霉生产淀粉酶和蛋白酶, 青霉和曲霉生产果胶酶, 木霉生产纤维素酶等至今许多地方仍然沿用这种方式。但是曲式培养也有一些缺点, 如: 物料利用不完全, 劳动量大, 易染菌, 而且不适于胞内酶的生产。

(2) 液体培养。又称浸没式培养(submerged culture), 这是采用液体培养基, 在发酵罐内进行的一种搅拌通气培养, 是目前酶制剂和其他发酵产品生产的主要培养方式。液体发酵需要一定的设备和技术条件, 动力消耗也较大, 但是原料利用率和产量都较高, 而且培养条

件容易控制。液体培养通常采用批量式,也有人主张在酶的生产中尝试另外两种方式:①分段式培养(two-steps culture,或 sequential culture)是根据生产菌在生长阶段(trophophase)和产酶阶段(idiophase)对培养条件要求不同加以区别对待进行的一种培养。例如,以灰色链霉菌生产 $\alpha$ -甘露糖糖苷酶为例,该菌可先用丰富培养基在28℃进行培养,使菌体充分生长。17小时后,分离取出菌体,洗净,再转入含有酵母 $\alpha$ -聚甘露糖作为诱导物的稀盐培养液中进行培养,让酶大量诱导合成。这样,18~24小时后, $\alpha$ -甘露糖糖苷酶的浓度就能达到最高水平,产量远高于批量式发酵。由于是一种“针对性”的培养,营养物质浪费少,有人认为对酶生产来说它是很有前途的一种培养方式;但也有异议,因为从总体看,这种培养获得的产量不一定最高,而且不适于大规模生产。②连续发酵(continuous culture)即先将菌体培养至某一生长阶段,例如,对数期,然后一方面连续添加新鲜的培养基,另一方面又不断地以相同速度放出培养产物。添加和放出速度应与生长产酶速度一致,使菌体始终处于恒态条件下生长和产酶。连续发酵的优点是可以大大提高劳动生产率,同时还可能打破酶合成过程中的反馈阻遏,使产酶率显著提高。例如,用野生型的铜绿色极毛杆菌生产酰胺酶,乙酰胺等可以诱导它的合成,但乙酸等能阻遏其产生。在乙酰胺等诱导物存在条件下进行批量式发酵时,产酶率为每毫克菌体每分钟产酶5u~10u;但如果在同样条件下进行连续发酵,那么产酶率可提高12倍以上。连续发酵的关键是如何避免染菌和菌株变异。连续发酵现也常用于突变株筛选。

### 3. 培养条件

培养条件关系到菌的生长、繁殖,也影响酶的合成,因此,在选择发酵条件,既要考虑到菌的生长需要,又应兼顾到酶的形成要求,并在两者间作出权衡、选择。一般的办法总是先确定菌生长的最适条件,然后再调整各种因素,以期同时满足酶合成的需求。

#### (1) 培养基组成

在培养条件中,培养基组成对菌的生长和酶的合成都有着最直接的影响。

**碳源** 碳源是菌体细胞组成的原料,也是菌体生长发育必需的能源物质。各种微生物利用碳源的能力很不相同,有的可利用多种碳源生长和产酶;有的却只有利用特定的碳源才能进行酶的合成。例如,链霉菌生产葡萄糖异构酶需要D-木糖或木聚糖;假丝酵母生产脂肪酶却只能利用葡萄糖。一般地说,生产分解代谢有关的酶类,不宜使用葡萄糖等易被利用的碳源为培养基,也不宜提供太丰富的碳源营养,否则可能导致分解代谢产物阻遏。某些碳源是酶的诱导物,选择适宜的碳源既可提高相应酶的产量,也有利于定向地促进某些酶的合成,如淀粉可诱导淀粉酶的生成。

**氮源** 它是菌体蛋白质和核酸的重要组成原料。各种微生物对氮源的利用情况相当复杂,有的菌,例如,用桔青霉生产5'-磷酸二酯酶,菌的生长和产酶都以有机氮效果为好;有的菌,却倾向利用无机氮,例如,以黑曲霉生产淀粉酶,用硝酸盐可使其产酶率显著提高;还有一类情况,菌的生长和产酶要求不同,例如,有机氮可促进绿色木霉生长,而铵盐或硝酸盐却有利于其纤维素酶的合成。此外,氮源的具体性质,使用的浓度都能对菌的生长和酶的形成带来不同程度的影响。

碳氮比,在某些情况下,对菌的生长和产酶也有直接关系。例如,较低的碳氮比(C/N)常有利于蛋白酶产量的提高,但是这种条件下,发酵后期培养基的pH往往会向碱侧偏移;

反过来,又会阻遏蛋白酶的积累,因此选择并控制适宜的碳氮比也是提高酶产量的一个重要因素。

**金属离子及其对应的阴离子** 这些离子或者直接参与细胞物质的组成,或者作为酶的活性组成部分与活化剂发挥作用。在酶的形成过程中,它们可能起促进作用,也可能起阻遏作用。例如, $\text{Co}^{2+}$ 能促进葡萄糖异构酶的生成,而 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 等的影响却相反。值得注意的是,离子的性质和浓度常具有关键的意义,例如, $\text{Co}^{2+}$ 浓度小于 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时,能显著提高葡萄糖异构酶的产量,但当大于 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时,它的效应却是阻遏; $\text{F}^-$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 等在 $10^{-4} \text{ mol/L}$ 时,对 $\alpha$ -淀粉酶的产量没有明显影响,但达到 $10^{-3} \text{ mol/L}$ 时,却能促进 $\alpha$ -淀粉酶的形成。至于离子性质,对Na的化合物而言, $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 的促进作用最大;对氟的化合物而言, $\text{CaF}_2$ 促进作用最显著; $\text{Cl}^-$ 和 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,它们常起阻遏作用。由于在自来水和原料中通常都含有一定量的上述离子,因此一般不需要另外添加,但它们的影响值得重视。

**生长因子** 它们是一些微量有机物质,主要的是些B族维生素。起两种作用,一是对微生物代谢活动起调节作用,在产酶菌的培养过程中,如果添加含有某种生长因子的物质,常可使酶产量大大提高。例如,在培养基中添加大豆酒精抽提物,可使米曲霉的蛋白酶产量提高近2倍,使泡盛酒曲霉的脂肪酶产量提高约1.5倍。二是作为辅酶的构成成分,影响酶的活性,某些产酶菌在缺乏它们的培养基中虽然可以生长得很好,而且同样可以合成酶蛋白,但是形成的酶却可能不具有活性。在玉米浆、酵母膏和麦芽浸液等天然物质中通常也含有这些生长因子,故也不需要另外添加。

**pH** 培养基的酸碱度对产酶往往有很大的影响。概括地说,相当多的水解酶,产酶的最适pH与酶作用的最适pH相近;不过,有些水解酶和氧化酶,其产酶率最高的pH和酶作用的最适pH相距甚远。很多微生物能同时产生几种相关的酶,改变培养基的pH,可能影响到各种酶的合成比例。例如,用黑曲霉生产淀粉酶,当pH近中性时, $\alpha$ -淀粉酶活力高,而糖化酶合成较少;反之,pH偏酸时,糖化酶产量上升,而 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖苷转移酶的合成下降。有些酶在其催化过程中能引起介质酸碱度改变,培养基的pH通常有利于那些能产生中和介质产物的酶类生成。例如,大肠杆菌在高的pH条件下,合成的主要是氨基酸脱羧酶;反之,低的pH条件却有利于氨基酸脱氨酶的形成。培养基的pH和培养基组成往往有关,特别是培养基组成成分的生理性质对它有很大的影响。例如,碳氮比就能在培养过程中引起介质的pH发生很不相同的变化。又例如,硫酸铵是生理酸性的氮源,而硝酸钠是生理碱性氮源,它们作为氮源被消耗以后,留下的对应离子会显著地引起培养基的pH改变。

**湿度** 湿度对于固体发酵比较重要,它直接影响产酶率,也与产酶达到高峰的时间有关。不过,由于菌和酶的种类繁多,难以找出一定的规律。

有人作过估计,培养基的成本可能占到发酵成本的70%左右,因此在考虑培养基组成时,除了上述各种影响外,原料的价格也是十分重要的因素。关于培养基的配方,可以通过多种实验分析,如正交法、化学工程法、连续培养化学恒态法等加以确定。

(2) **通气量**。由于大多数产酶菌是好气菌,因此调节通气量对提高酶产量往往有直接意义。一般地说,采用液体深层发酵时,较小的通气量有利于霉菌的孢子萌发和菌体生长,而较大的通气量则常可促进酶的形成。固体发酵似有不同的规律,菌体生长通常要求通以空气,而较小的通气量却能显著提高酶的产量。

(3) 培养温度。培养温度不仅能影响菌的生长,也能影响酶的合成。大多数情况是,产酶菌在低于最适生长温度条件下培养时,酶产量比较高。例如,用酱油曲霉生产酸性或/和碱性蛋白酶,28℃ 培养时的产量比 40℃ 培养时高 2~3 倍;并以 20℃ 培养产量最高。但应注意产酶的最适温度可能因发酵方式不同而略有差别。

另一方面,培养温度也可能直接影响酶合成后的稳定性,特别是酶的耐热性。例如,用凝结芽孢杆菌生产  $\alpha$ -淀粉酶,如果是在 55℃ 培养,则形成的  $\alpha$ -淀粉酶即使在 90℃ 中保温 60min,酶活力仅损失 10%~12%;但是,如果是在 35℃ 培养,产生的  $\alpha$ -淀粉酶经过同样的处理后,酶的活力将只保留 10% 左右。

#### 4. 采酶时机

除了上述各种因素能影响酶的产量外,在生产中掌握适宜的采收时机也极为重要。对于大多数胞外酶来说,酶的合成和菌体的生长有大致平行的关系,生长停止时,酶产量达到最大;继续培养酶产量往往会以不同的速度逐渐下降。例如,用链霉菌生产葡萄糖异构酶,菌体的生长在 20h 左右达到最高水平,而 25h 以后生长停止,酶产量也在 20~25h 达到顶峰,然后下降;又例如,用重组的枯草杆菌生产溶葡萄球菌酶,培养 15h 左右达到产酶高峰,菌生长也趋于稳定;16h 后,酶产量迅速下降。这和蛋白酶活性升高有关,通过在适宜时间添加葡萄糖,以分解代谢产物阻遏蛋白水解酶的生成,有助于产酶曲线平台区的延伸。值得特别提到的是,代谢途径中的关键酶和突变生成的酶一般比较容易被降解。

优良菌种的筛选、适宜培养条件的确定是获得高酶产量的重要措施,但是单靠这些办法往往不够,为使酶产量有一个飞跃,还需要另外一些更有效的办法。

## 第二节 提高酶发酵产量的方法<sup>(6-16)</sup>

正常情况下,酶产量受其合成调节机制的控制,要大幅度提高酶产量就必须设法打破这种调控机制。

### 一、酶的合成调控机制

酶和其他蛋白质一样,它的合成可在复制(replication)、转录(transcription)和翻译(translation)等各种水平上进行调节控制。对于原核生物(prokaryote)来说,由于其转录和翻译过程紧密关联,因此,只要控制转录,也就可控制酶的合成。原核生物的转录调节机制现在普遍接受的是操纵子模型。

#### 1. 操纵子(operon)

操纵子包括两个部分:一是荷载着有关酶的结构密码,决定酶的结构和性质的结构基因(structure gene);在代谢功能上相互关联的酶,其结构基因常集中在操纵子 DNA 链的一个或几个特定区段内,组成多顺反子(polycistran)。另一是由操纵基因(operator)和启动基因(promotor)等组成的调控部分。图 3.1 为大肠杆菌的乳糖操纵子(Lac 操纵子)的结构示意图。这是个较简单的操纵子模型,其中  $z$ 、 $y$  和  $a$  分别代表与乳糖代谢有关的三种酶的结构基因;它们和操纵基因等共同组成一个基因表达调控单位。操纵基因在操纵子中起“开关”



作用,当开关“开启”时,附着在启动基因上的依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶(DNA dependent RNA polymerase, DDRP)就能通过这一开关,沿着结构基因移动,并以结构基因为模板进行转录,合成相应的 mRNA; 而后 mRNA 再转入翻译,合成有关的蛋白质或酶。反之,当操纵基因“关闭”时,DDRP 的移动就会受到阻遏,结构基因无法实现其模板作用,当然也就不能合成相应的蛋白质或酶。操纵基因的开、关又受调节基因(regulatory gene)的控制。调节基因编码调节蛋白,调节蛋白大多表现阻遏作用(repression),故称为阻遏蛋白(repressor)。在某些酶的合成调节机制中,阻遏蛋白能直接和操纵基因结合,阻遏转录的进行;而在另一些酶的合成调节机制中,阻遏蛋白本身不能直接和操纵基因结合,只有在相应的效应物存在条件下,两者结合形成阻遏蛋白-效应物络合物以后,才能进一步与操纵基因结合,使之关闭;这种效应物称为辅阻遏物(co-repressor)。

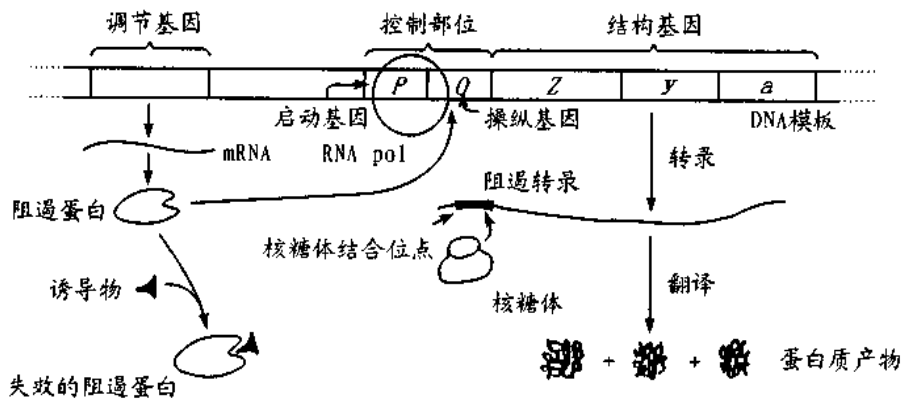


图 3.1 大肠杆菌乳糖操纵子(Lac 操纵子)的结构示意图

操纵子是酶合成调控的结构基础。结构基因决定酶的结构和性质,但不影响酶的合成速度和水平;对特定的酶而言,其合成水平的调节要通过控制结构基因以外的其他基因部分(如操纵基因等)实现。调节方式有两种:诱导和阻遏。

## 2. 诱导和阻遏

某些酶在通常情况下不合成或者合成甚少,但加入“诱导物(inducer)”后,就能大量合成,这种现象称为诱导(induction)。诱导的机制是:调节系统中调节基因编码的调节蛋白(阻遏蛋白)是一类别构蛋白,一方面能直接和操纵基因结合,阻遏酶的合成;另一方面,它们也能和诱导物结合,结合后构象发生改变,失去和操纵基因结合的能力,使“开关”打开。因此,加入诱导物时能诱导酶大量合成。参与分解代谢的(catabolic)酶,如淀粉酶、纤维素酶等受这种方式调节。

另一种调节方式称为阻遏。阻遏有两种类型:尾产物(反馈)阻遏和分解代谢产物阻遏。尾产物阻遏(end product repression)是指在生物的生长发育过程中,原以一定速度合成的某些酶,当这些酶催化生成的产物积累到某种浓度水平并能满足需要时,这些酶的合成就会受到阻遏,这就叫尾产物阻遏,也称为反馈阻遏(feedback repression)。尾产物阻遏的机制可能是阻遏蛋白本身没有和操纵基因结合的能力,因而在通常情况下不会构成阻遏;但是,这种阻遏蛋白能以酶反应的尾产物为效应物,即辅阻遏物,与之结合,产生别构效应,形成能和操纵

基因结合的阻遏蛋白—尾产物络合物,阻遏酶的合成。参与合成代谢的(anabolic)酶受这类调节方式控制。某些参与分解代谢的酶也可能受尾产物阻遏调控。

分解代谢产物阻遏(catabolite repression)是指有些酶,特别是参与分解代谢的酶,当细胞在容易被利用的碳源(如葡萄糖)上生长时,其合成受到的阻遏,这种现象,也称为葡萄糖效应(glucose effect)。分解代谢产物阻遏的机制较复杂,原因之一可能和启动基因与 DDRP 的结合有关。因为转录速度取决于启动基因的强弱以及它和 DDRP 的结合速度,而它和 DDRP 的结合又与某些因子,例如 cAMP 有关。cAMP 是“分解代谢产物(基因)活化蛋白”(catabolite (gene) activation protein, CAP) 或者说“cAMP 受体蛋白”(cAMP receptor protein, CRP) 活化的必要因子。某些实验表明,在进行转录时,只有当 CAP 被 cAMP 活化并一起进入到启动基因的某结合位点以后,DDRP 才能附着到启动基因上去,催化转录的进行。葡萄糖等碳源的某种分解代谢产物“X”,由于能影响 cAMP 的合成与分解,导致 cAMP 浓度下降,无法形成有效的 cAMP - CAP 络合物,故而能够阻遏转录的进行。反之,如果加入 cAMP,阻遏就能得到减轻或解除。但这种解释可能不是分解代谢产物阻遏的全部机制,因为也有一些例证说明分解代谢产物阻遏与 cAMP 无关。

真核生物的蛋白质合成调节机构和原核生物基本相同,但更加复杂。图 3.2 为真核生物的蛋白质合成调节机构示意图。不同之处是:① DNA 和组蛋白等结合在一起,以染色质(chromatin)形式存在,在复制和转录时受组蛋白等的调控;② 每个结构基因都有自己的启动基因等调控系统,独立进行转录,不形成多顺反子,其结构基因中包含不编码氨基酸的插入序列(intervening sequence),称为内含子(intron),相对应的编码序列称为外显子(extron);③ 似乎没有和操纵基因相对应的“开关”,DDRP 一旦和启动基因结合后就能开始转录,这种结合受一种称为促进子(enhancer)的 DNA 序列调控;④ 形成的 mRNA 要经过“戴帽”(即在

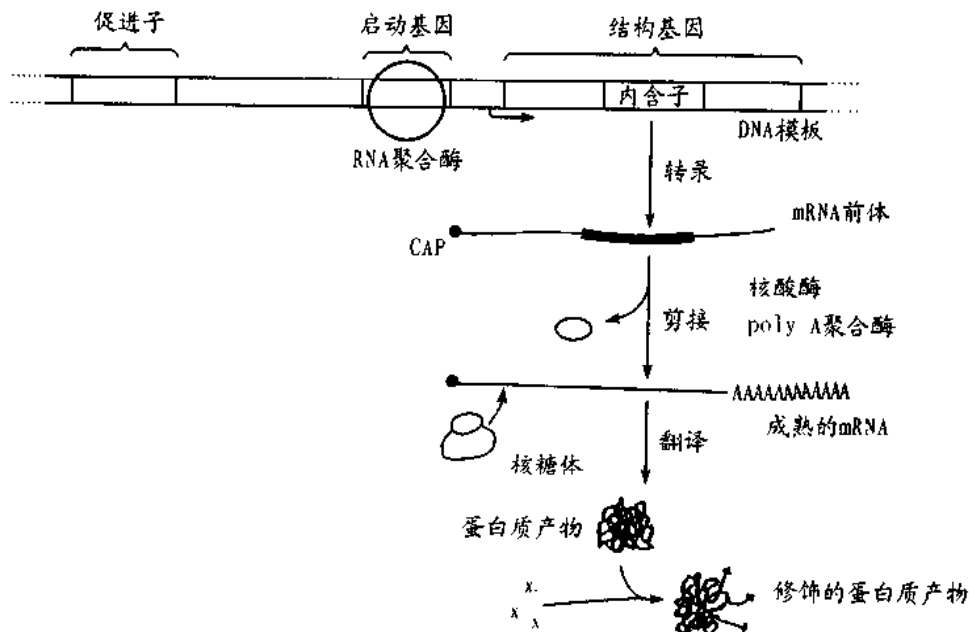


图 3.2 真核生物转录、翻译调节机构示意图

5' - 端接上 pppG)、修剪(trimming 和 clipping)、加尾(即在 3' - 端添加 poly A 序列)以及剪接(splicing, 移除内含子)等转录后加工过程;⑤ 翻译后形成的蛋白质还有活化、添加辅基、糖苷化以及形成多亚基结构等翻译后加工程序。

### 3. 打破酶合成调节机构限制的方法

酶合成调节机构的作用是生物机体将体内的合成原料与能量最经济有效地用于合成生命最需要的物质的保证。但是,从应用的目的出发,则应设法打破这种调节控制,以期使某些酶的产量大幅度地提高。事实上,已有的报道表明,在采取相应的措施后,参与分解代谢的酶类,其产量可有上千倍的变化;而参与合成代谢的酶类,其产量也能有百倍之悬殊。打破这种调节可从内、外两方面入手。

- (1) 条件控制: 如添加诱导物、降低阻遏物浓度;
- (2) 遗传控制: 如基因突变、基因重组;
- (3) 其他

## 二、通过条件控制提高酶产量

### 1. 添加诱导物

这种办法仅适用于可诱导的酶类,但产生的效果有时十分显著。关键在于选择适宜的诱导物和诱导物浓度。诱导物,以前认为酶的底物是首选的对象,但事实上底物不一定都有诱导作用,反之,不能作为底物者有时却能诱导酶大量生成。现在的认识是,强有力的诱导物首先是那些难以代谢的底物类似物。例如,异丙基- $\beta$ -D- 巯基半乳糖,虽不易被 $\beta$ - 半乳糖苷酶作用,但却是极好的诱导物,可使该酶的产量提高近千倍,甚至达到细胞合成蛋白总量的百分之几。其次,也可以是底物或诱导物的前体,如犬尿氨酸虽能诱导犬尿氨酸酶,而它的前体色氨酸的诱导效果更佳。此外,对于许多分泌到细胞外发挥作用的分解代谢酶来说,它们催化生成的产物也往往具有强的诱导能力。例如,纤维素可诱导纤维素酶,但是真正起诱导作用的似乎还是它作用的产物: 纤维二糖。

值得指出的是,诱导和阻遏之间没有绝对的界限,许多诱导物在某些情况下起的是诱导作用,但在另外一些情况下却可能导致阻遏,这里问题的关键在于诱导物的浓度。例如,纤维二糖的浓度维持在 0.05 mg/ml 以下时,它能诱导纤维素酶大量形成;但是如果它的浓度升高 100 倍,纤维素酶的生成就会显著地受到阻遏。这种浓度效应也同样反映在底物及其类似物上,当培养基中的底物浓度很高而且易被分解时,则往往会引起酶的分解代谢产物阻遏;反之,如果将底物作成难以代谢的衍生物,或者将底物以十分缓慢的速度逐渐加入,常可有效地诱导酶的生成。例如,将纤维素或蔗糖作成棕榈酸酯或醋酸酯,它们就能分别诱导纤维素酶和蔗糖酶,使这些酶的产量增加几十倍甚至上百倍。

诱导物浓度对酶诱导形成的速度也有一定影响,在起诱导作用的浓度范围内,酶的诱导生成速度正比于诱导物的浓度;但是,浓度继续增大时,酶的诱导生成速度的上升趋势就会逐渐减缓,最后达到一饱和值。

在加入诱导物后,通常要经过一个极短暂的潜伏期(例如几分钟),诱导才会出现;反之,当诱导物除去后诱导也会立即停止,这种现象称为“去诱导”。诱导和其他培养条件一般没有直接关系,但是,在诱导培养时,通过控制培养的 pH 有时也可选择性地诱导某种酶的生

成。例如,氨基酸脱羧酶的诱导合成随 pH 升高而不断增加;而氨基酸脱氨酶恰恰相反。酶诱导生成的温度系数似乎相当高,但最适的诱导温度通常低于菌的最适生长温度。

## 2. 通过降低阻遏物浓度提高酶产量

阻遏可由分解代谢产物引起,也可因酶反应的尾产物积累而产生,因此控制这二种产物的生成与积累常能提高酶的产量。通用的原则是,应避免采用过于丰富的培养基和避免使用易被利用的碳源;并设法阻止效应物的形成,降低培养基中效应物的浓度。

对受分解代谢产物阻遏的酶来说,限制碳源或相应生长因子的供应尤为重要。例如,用液化气单孢菌生产多聚半乳糖醛酸反式消去酶,该酶被半乳糖醛酸以及易被利用的其他碳源所阻遏。因此,如果以缓慢的速度添加多聚半乳糖醛酸,并限制其他碳源的供应,那么该酶的产量可提高近千倍。

对于合成代谢的酶,有两种办法解决尾产物阻遏,一是在培养基内添加尾产物类似物或添加阻止尾产物形成的抑制剂。例如,在培养基中加入  $\alpha$ -噻唑丙氨酸,可使参与组氨酸合成的 10 种酶的产量提高约 30 倍。第二种办法是采用营养缺陷型突变菌株(auxotrophic mutant),并限制其生长必需因子的供应。例如,限制组氨酸营养缺陷型变异株的组氨酸供应,可使其和组氨酸合成有关的 10 种酶解除阻遏,产量提高 25 倍左右;又如,采用大肠杆菌硫酸胺缺陷型变异株并限制硫酸胺供应,同样可解除与硫酸胺合成有关的 4 种酶的阻遏,其中磷酸硫酸胺素焦磷酸解酶的产量可升高约 1 000 倍。类似地,也可让营养缺陷型变异株在基本培养基上缓慢生长,例如,将嘧啶缺陷型变异株在基本培养基上培养,这样与嘧啶合成有关的门冬氨酸转氨甲酰酶的产量可升高 500 倍。此外,还可给营养缺陷型变异株供应较难同化的生长因子前体或衍生物,例如,在大肠杆菌尿嘧啶缺陷型变异株的培养基中不加尿嘧啶,而供应二氢乳清酸,结果使与嘧啶生物合成有关的 6 种酶避免了尾产物阻遏。

通过条件控制提高酶产量是一种比较直接、有效的途径,但是要找到适宜的诱导物和找到降低(辅)阻遏物浓度的有效方法与条件往往不易,而且成本也较高,因此人们更倾向于从遗传控制着手,以期从根本上改造菌种(株),“一劳永逸”。

## 三、通过基因突变提高酶产量

基因突变(gene mutation)可发生在结构基因上,也可发生在操纵子其他部位上。前者往往导致酶的结构和性质改变,而后者则通常引起酶产量升高或降低。根据酶的合成调节机制,基因突变后有两种情况可使酶的产量提高,一是从诱导型(inductive 或 adaptive)转变成组成型(constitutive),即获得的突变株在没有诱导物存在条件下,酶产量也能达到诱导的水平,这种突变称为“组成型突变”;二是阻遏型(repressive)变为去阻遏型,这种情况下,突变株在通常引起阻遏的条件下,酶产量也能达到没有阻遏的水平。

基因突变可自发地发生,但几率很小,故在实际工作中还需采取某些方法进行诱变:  
① 物理方法,包括紫外线、 $\gamma$ -射线( $Co-60$ )及快中子辐射等,它们的作用是直接引起核酸分子中四种脱氧核苷酸,特别是 C、T 发生氧化变化,造成 DNA 损伤和畸变。  
② 化学方法,根据其诱变机制分为三种类型:  
a. 5-溴尿嘧啶等,这类诱变剂能通过代谢参入到 DNA 中引起突变,因而对代谢处于停顿状态的细胞来说没有作用;  
b. 亚硝胍等,这类诱变剂能直接和 DNA 中的 A、C、G 等反应而导致突变;  
c. 吡啶黄染料等,它们能引起 DNA 链中核苷酸

的插入或缺失而造成移码突变。在生产中用得较多的是紫外线照射、亚硝胍处理等。实践表明,经常更换使用不同的诱变手段,控制适度的突变率,其效果比连续使用同一手段或过高、过低的突变率要好。

物理、化学诱变,特别是用亚硝胍处理等虽然可取得很好的效果,但却潜在着致癌(carcinogenesis)的危险,而且多次使用后,某些微生物对它们还会产生明显的抗性,因此近年来人们的注意力开始转向生物学方法,即采用转座子(transposon)为诱变因子。转座子是一种编码与转座有关蛋白的 DNA 片段,能在基因组的许多位点上插入,导致高极性突变。现常使用的如 Tn-5,它具有卡那霉素的抗性基因,能专一性较低地迅速插入染色体。

基因突变是使微生物获得新性状、培育高产菌株的一种有力手段。它的发展方向是如何提高突变的专一性,例如,通过 NTG 等进行选择性诱变或通过蛋白质工程进行定位突变。

在采用基因突变育种时,一个十分重要的问题是必须同时建立一种快速有效的筛检方法,以便能将具有前途的突变株及时不漏地筛选出来。

### 1. 组成型变异株的筛检

办法之一是直接将诱变后的产酶菌接种于以低诱导力的诱导物为主要碳源或氮源的培养基上进行培养,并适当限制这种诱导物的供应量,或另外添加诱导抑制剂,在这种条件下,凡是能够增殖的菌株一般都是组成型突变株。例如,将诱变后的大肠杆菌在恒定的低乳糖培养基中培养,结果筛出了不需要诱导物的产 $\beta$ -半乳糖苷酶的组成型突变株,该酶的产量可达到细胞内合成蛋白总量的 25%。

第二种办法是将诱变后的产酶菌株在含有诱导物 and 不含诱导物的培养基上交替培养。例如,第一个周期用葡萄糖培养基培养,这种情况下,生长的菌中占优势的虽然是诱导型亲株,但组成型也同时得到了扩增;然后,再转到乳糖培养基上进行培养,此时无疑对组成型突变株的生长更为有利,因为它不像诱导型需要诱导时间,而是能直接利用乳糖。重复这种交替培养,可使组成型变异株最终获得绝对优势。

### 2. 抗分解代谢产物阻遏型变异株的筛检

对于酶制剂工业来说,在很多情况下要得到一种不引起分解代谢产物阻遏而又经济的碳源往往不易,因此,如果能够得到一种抗分解代谢产物阻遏的变异株就很有意义。其筛检办法有两种:

(1) 以目的酶的底物为唯一氮源。例如,将诱变后的产气杆菌接种于含有葡萄糖和以组氨酸为唯一氮源的培养基上培养,这种情况下,可得到产组氨酸酶的抗葡萄糖效应变异株。

(2) 将诱变后的产酶菌株在含有葡萄糖和不含葡萄糖的培养基上交替培养。例如,先将诱变后的大肠杆菌在葡萄糖培养基上培养,以抑制利用其他碳源的菌株,然后再将长出来的菌株转移至别的碳源培养基上培养。这样,抗分解代谢阻遏的菌株最初虽然可能生长迟缓,但经过反复交替培养、增殖后,可最终得到抗性变异株。

### 3. 抗尾产物阻遏型变异株的筛检

通常采用的办法是在诱变后的产酶菌株培养基中,加入在结构上和尾产物相类似的毒性抗代谢物。例如,用三氟亮氨酸筛选出来的变异株,亮氨酸合成酶的产量比亲本高 10 倍;

用刀豆氨酸筛选出来的变异株,其精氨酸合成酶的产量比亲本高 30 倍。

和通过条件控制进行调节的办法相比,基因突变由于能较经济地从根本上改造菌的特性、并引入新的生物学性状,因此成了 60—70 年代用于提高酶等发酵产品产量的常用手段。它的缺点是:预见性小、工作量大。与基因突变不同,基因重组(gene recombination)根据的原理是,如果酶的基因拷贝数越多,控制其表达的启动子愈强,表达愈有效,那么这种酶的产量也应该越高。因此如果设法增加目的酶的基因拷贝数,并将其置于强的表达控制系统之下,那么就可以定向地育成高产菌株。基因重组包括体内基因重组和体外基因重组。

#### 四、通过体内基因重组提高酶产量

体内基因重组(gene recombination in vivo),包括通过接合、转导、转化等方法进行的少数或者个别基因的重组;也包括通过原生质融合进行的整个染色体的重组。图 3.3 为各种体内基因重组的示意图。

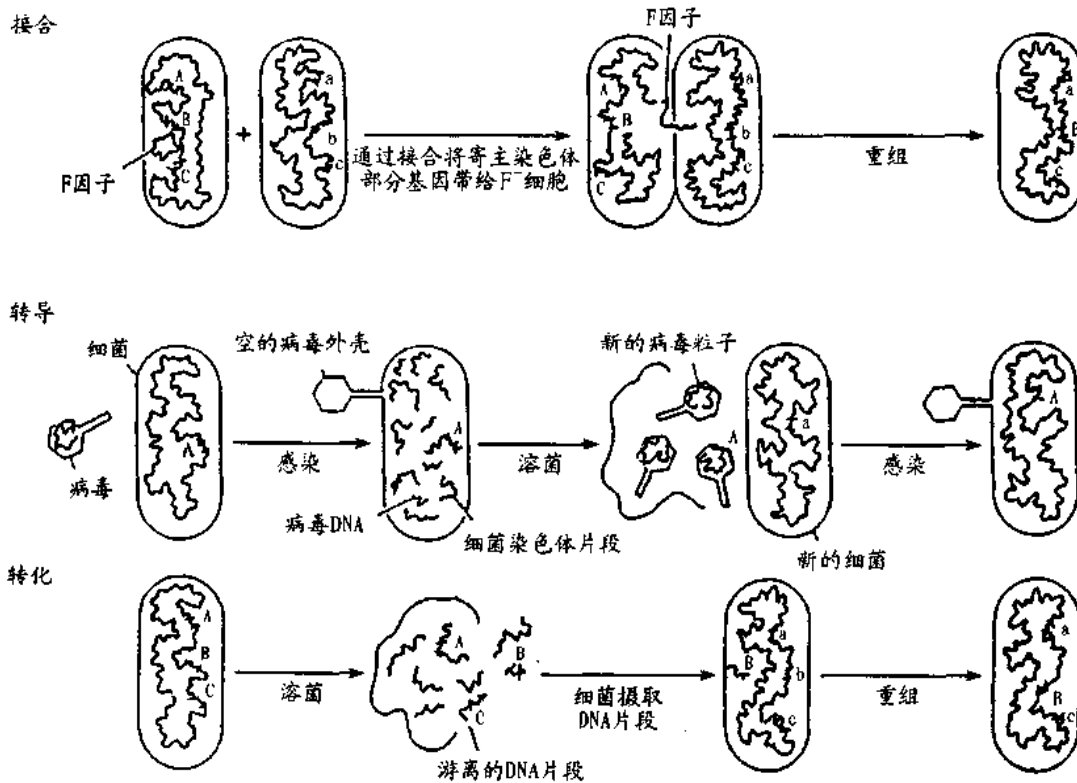


图 3.3 各种体内基因重组示意图

##### 1. 接合

许多肠道细菌体内,含有一些染色体外的 DNA 片段,称为质粒(plasmid)。质粒带有某些遗传信息,能整合到染色体 DNA 中,也能脱离染色体而独立存在,独立进行复制,还可通过细胞间的接触由一个细胞转移到另一细胞——在这种情况下供体细胞仍保留“原来”的质粒,而受体细胞则增加一个质粒。有趣的是,有些质粒在脱离染色体时,还能将染色体的部

分基因带下转移到另一细胞改变受体细胞的基因组成。例如,在大肠杆菌中有一种称为致育因子(fertility factor, F 因子)的质粒,过去称之为“附加体”(episome)。F 因子的遗传学特点之一是它能决定大肠杆菌是否产生表面纤毛,从而决定细胞是否可以相互接合(conjugation)。根据菌体内是否存在 F 因子及 F 因子存在的状态,大肠杆菌分为三种类型:F<sup>-</sup>、F<sup>+</sup>和 Hfr。F<sup>-</sup>细菌接受 F 因子后变为 F<sup>+</sup>细菌;F 因子如果插入染色体中,F<sup>+</sup>细菌就转变为 Hfr 细菌。F 因子插入染色体后又可脱离,而且脱离时还能将其连接的部分染色体基因带下,插入的位置不同,带下的基因也异。在接合过程中,F 因子携带的部分基因进入受体细胞后,一般不和受体细胞的染色体发生交换,而是与 F 因子连接作为杂因子存在,并伴随 F 因子一起进行复制,这样繁殖起来的具有杂因子的菌株,称为 F'菌株。F'菌株中的 F 因子和它连接的基因在一定条件下也可重新插入染色体,而后再脱离并再带下更多相应的基因。

现在对大肠杆菌的遗传学背景已经有了比较全面的了解,而且也已经获得可以携带染色体上任何部分基因的 F 因子,因此,可望借助 F 因子的接合、整合、脱离和再接合的反复进行,来提高相应酶的产量。例如, $\beta$ -半乳糖苷酶和门冬氨酸转氨甲酰酶就曾通过这种方法使产量得到了显著提高。

## 2. 噬菌体转导(phage transduction)

噬菌体有烈性(virulent)和温和性(temperate)之分。前者如 T<sub>偶</sub>噬菌体,它们感染细菌后,就能导致细菌解体破裂。温和性噬菌体如  $\lambda$ 、 $\phi$ 80 等,它们感染细菌后,不引起细胞破裂,而是进行“溶源化(lysogenization)”:噬菌体的基因直接参入到细菌的染色体中,和寄主的染色体基因连接,并伴随染色体基因进行协同复制,但不形成成熟的噬菌体,而是以一种“原噬菌体(prophage)”形式潜伏下来。带有原噬菌体的细菌称为溶源化细菌。原噬菌体在一定条件,如紫外线照射下,也可被诱发烈性化,脱离染色体不再进行协同复制,而形成成熟的噬菌体,导致细菌破裂;然后再感染新的细菌,或溶源化,或导致细胞破裂。和接合相似,原噬菌体脱离染色体时,也可能带下部分染色体基因,在再度感染细菌时,就会使相应的基因从一个菌株转导到另一菌株。有些噬菌体插入的位置一定,例如, $\lambda$ -噬菌体插入大肠杆菌 K-12 染色体中时,它的位置就在乳糖代谢有关酶的基因旁边,所以能转导这些酶的基因,这种转导称为“限制性转导”。但是,有些噬菌体能转导许多不同位点的基因,这种转导称为“普遍性转导”。限制性转导多造成杂因子,而普遍性转导则可导致重组体出现。转导反复进行,可使相应的基因拷贝数目增加,从而提高酶的产量。

现在已经可以得到能携带大肠杆菌染色体上任何基因的转导噬菌体。

## 3. 转化

某些细菌,如枯草杆菌,能从培养基中吸收外源 DNA 片段,如果这些 DNA 片段和细菌 DNA 有高度同源性,两者间就可能发生重组,从而改变受体的遗传性状,这种现象称为“转化”(transformation)。DNA 间的同源性愈高,形成的转化子一般也愈稳定。

在体内基因重组方法中,根据已有报道,转化可能是提高酶产量最为有效的一种方法。这种方法,在  $\alpha$ -淀粉酶产酶菌株的选育中获得了显著的成功。以枯草杆菌为例,野生型菌株 Marberg 的淀粉酶基因在处于调节基因 *amyR1* 的控制下时,酶产量为 10u/ml;通过转化分别导入高产突变株的调节基因 *amyR3* 和与分泌有关的基因 *pap* 后,得到的菌株淀粉酶

产量各为野生型的 5 倍与 3 倍;而引入 *pap* 基因的菌株,其蛋白酶的产量也为野生型的 3 倍;有趣的是,如果通过转化将这两个基因导入同一菌株,那么产生的效果将不是简单的相加,而接近相乘——提高了产量约 14 倍。通过转化将各种突变基因组合起来,最后得到的转化菌株的淀粉酶产量甚至可达到原始菌株的 1 500 倍,即 15 000 u/ml(表 3.2)。

表 3.2 通过转化引入调节基因等对 *B. Subtilis*  $\alpha$ -淀粉酶合成的影响

基 因							$\alpha$ -淀粉酶 相对产量
<i>amy R1</i>	<i>amy R3</i>	<i>tm A7</i>	<i>amy S</i>	<i>PAp</i>	C108	N-26	
+							1
+				+			2
	+						5
	+			+			14
	+	+					20
	+		+	+			20
	+	+	+	+			120
	+	+	+	+	+		700
	+	+	+	+	+	+	1 500

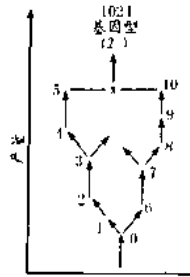


图 3.4 菌种改进效果示意图

近年的工作表明,采用脂质体(liposome)包埋基因进行转化常有助于提高转化效率。这对遗传背景不甚清楚,但在工业上又十分重要的微生物来说特别有意义。

接合、转导和转化实际上都是一种基因转移(gene transfer)过程,如果将基因突变和基因转移结合起来,那么不仅可以获得大量新的突变株,而且往往也可能使所需要的酶的产量大幅度提高(图 3.4)。

#### 4. 原生质融合

从技术本身而言,基因突变和基因转移都能构建出高产菌株,但并非对所有生物都行之有效,故而又发展了原生质融合(protoptast fusion)。这是一种将异种细胞染色体相互融合形成新的杂种细胞的技术,其原理示意于图 3.5。该技术最初用于动物细胞生产单克隆抗体,以后才逐渐引入微生物和植物细胞。由于和动物细胞不同,微生物与植物细胞具有细胞壁,因此必须先用相应的酶加以处理,使之形成裸露的原生质体(protoptast),然后,再在聚乙二醇和  $Ca^{2+}$  等存在的条件下进行融合。融合后,如果两个染色体有大的同源性,那么将发生基因重组;有时甚至可将多种来源的染色体或基因进行重组。由于是两个或多个完整的基因组汇合在一起,因而重组的频率很高,提高产量的潜力很大。

原生质体还可和脂质体进行融合,从而有效地导入大分子 DNA。这种技术可用于各种



革兰氏阳性菌包括芽孢杆菌、黄色短杆菌等,也可用于链霉菌等;此法曾大幅度提高了枯草杆菌与地衣芽孢杆菌中性蛋白酶的产量。

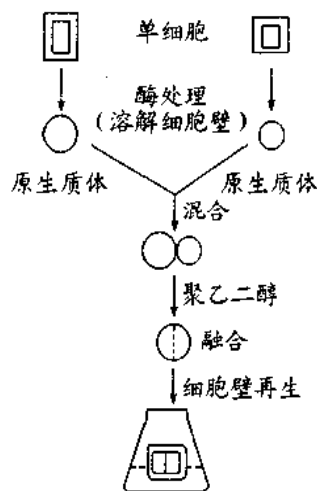


图 3.5 原生质融合技术示意图

## 五、通过体外基因重组提高酶产量

体外基因重组(gene recombination in vitro),简称 DNA 重组技术(recombinant DNA technique),或基因工程(gene engineering)。它是用酶学方法将外源基因与载体 DNA 在体外进行重组,然后将形成的重组子转化到受体细胞,使所需要的外源基因在受体细胞中复制表达,从而达到改造生物遗传特性目的的一种技术与方法。与基因突变相比,它具有更大的预见性和主动性。而且也不像体内基因重组那样,易受种间不相容性的限制,可在远缘的 DNA 分子间进行杂交,并能通过载、受体系统的选择,合理的重组设计,使目的基因得到高效表达,因此是一种十分有用的技术,受到人们的特别重视。应用这种技术时应考虑以下问题。

### 1. 目的基因

目的基因可通过以下方法获得:基因片段物理分离法;DNA 片段单链化酶切除法;目的基因片段亲和保护酶切法;DNA 片段转化分离法;mRNA 亲和分离法;mRNA 反向转录法和 DNA 片段化学合成法等。其中前三种方法仅限于特殊情况应用,第四种也称为鸟枪(shotgun)法,它和第五种方法具有较大的普遍适用性。不过,为使真核基因能在原核细胞中得到表达,一般认为最好采用 mRNA 反向转录法,此法如果与特殊的载体质粒结合,将 cDNA 直接参入到载体,则更为有效。但是,近年来随着人工合成 DNA 技术的进步,人们更倾向于选择最后一条途径,因为反向转录法有一些缺点:① 要获得十分纯净的 mRNA 很难;② 合成的 cDNA 往往缺少 5'-末端;③ 反转录过程常可能出现随机终止;④ 有时还需要外加某些接头序列(linker)。人工合成法则不然,它可以根据受体细胞转录、翻译系统的特点,选择最佳的密码子,合成人们所需要的任何序列,包括重组需要的 linker 在内的全序列。

## 2. 载体

目的基因,特别是真核基因,如果直接进行转化,效率一般很低。为了将异源基因引入受体细胞,并使之能在其中进行复制、表达,通常需要借助载体。载体应符合下述要求:对一种限制性内切核酸酶只有少数(1~2个)切点;带有特殊标记,例如,抗药性标记,能指示重组子的转入;在重组后,即连接了异源 DNA 后不失去扩增能力;拷贝数目多(所谓“松弛型”);容易分离;安全;最好是高效表达载体(expression vector)。

常用的载体有两大类:质粒和噬菌体。在前一大类中,适用于大肠杆菌的有 pBR 332、pOP 1 以及温度诱导的“脱缰质粒(runaway plasmid)”如 pKN 410 等,适用于枯草杆菌的有 pUB 110(Km<sup>r</sup>)、pE 194(Em<sup>r</sup>) 和一些既能用于大肠杆菌又能用于枯草杆菌转化的“穿梭质粒(shuttle vector)”,如 pHV 14 等,用于酵母菌的有 2 $\mu$  DNA 和某些穿梭质粒 HV 2 等。在后一大类中,用于大肠杆菌者有  $\lambda$ gt、 $\lambda$ B、Charon 等,可用于枯草杆菌者有 p11 和  $\phi$ 105 等。此外,还有噬菌体  $\lambda$ DNA 和质粒 DNA 等共建的载体,如 pKC 14 等。

## 3. 工具酶

在基因工程工作中要用到多种工具酶。其中最基本的是限制性内切核酸酶(restriction endonuclease)、脱氧核苷酸末端转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase)、反转录酶(reverse transcriptase)、核酸酶 S<sub>I</sub>(nuclease S<sub>I</sub>)和 DNA 连接酶(DNA ligase),过去认为还需要  $\lambda$ -5'外切核酸酶( $\lambda$ -5'exonuclease)和 DNA 聚合酶 I(polymerase I)等。限制性内切核酸酶是一类能识别特定核苷酸序列,并专一地切断双链 DNA 的内切核酸酶。根据其专一性(专一识别序列与酶切位点)及对辅助因子的要求等特点分为三类:Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型。用于基因工程的是Ⅱ型的限制性内切核酸酶,它们能识别 4~6 个核苷酸组成的回文结构序列(palindrome),或通过“错切”方式产生带粘性末端(sticky 或 cohesive end)的 DNA 片段,或通过“平切”方式形成带平头末端(flush 或 blunt end)的 DNA 片段。限制性内切核酸酶在目的基因的分离、重组子构建以及整个分子生物学研究中都是十分有用的工具酶。脱氧核苷酸末端转移酶催化脱氧核苷酸连接到 DNA 3'-OH 末端,在基因工程中用以形成人工粘性末端。过去认为这种酶仅在被作用的 DNA 链的 3'-OH 末端相对另一链的 5'-端突出时才能进行催化。后来发现,如果用 Co<sup>2+</sup>代替 Mg<sup>2+</sup>作为辅助因子时,这种酶不仅能催化脱氧核苷酸转移到突出的 3'-OH 末端,即使对平头的 DNA 和 5'-端突出的 DNA 也都能发挥作用,因而可免去对  $\lambda$ -5'外切核酸酶等的需要。DNA 连接酶催化 DNA 的 3'-OH 末端与 5'-磷酸端形成磷酸二酯键,是 DNA 重组工作中不可缺少的关键酶。通常应用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶,因为它既能催化粘性末端连接,也能催化平头末端连接,并且只要求以 ATP 作为辅助因子;而与此相对应的大肠杆菌 DNA 连接酶却只能催化粘性末端连接,同时要求 NAD 作为辅助因子。为使真核基因能在原核细胞中表达,过去认为,目的基因最好从 mRNA 反向转录得到,为此,还需要有反向转录酶和核酸酶 S<sub>I</sub>等(核酸酶 S<sub>I</sub>可用核酸酶 Bal 31 代替)。如果采用人工合成基因,那么这些酶显然可以节省。以前认为,在加尾粘接时,由于两端添加的核苷酸数目不等,可能造成单链缺口,故需要用 DNA 聚合酶 I 催化填补。后来发现,这一工作在受体细胞中会自动进行,因此也可省却。

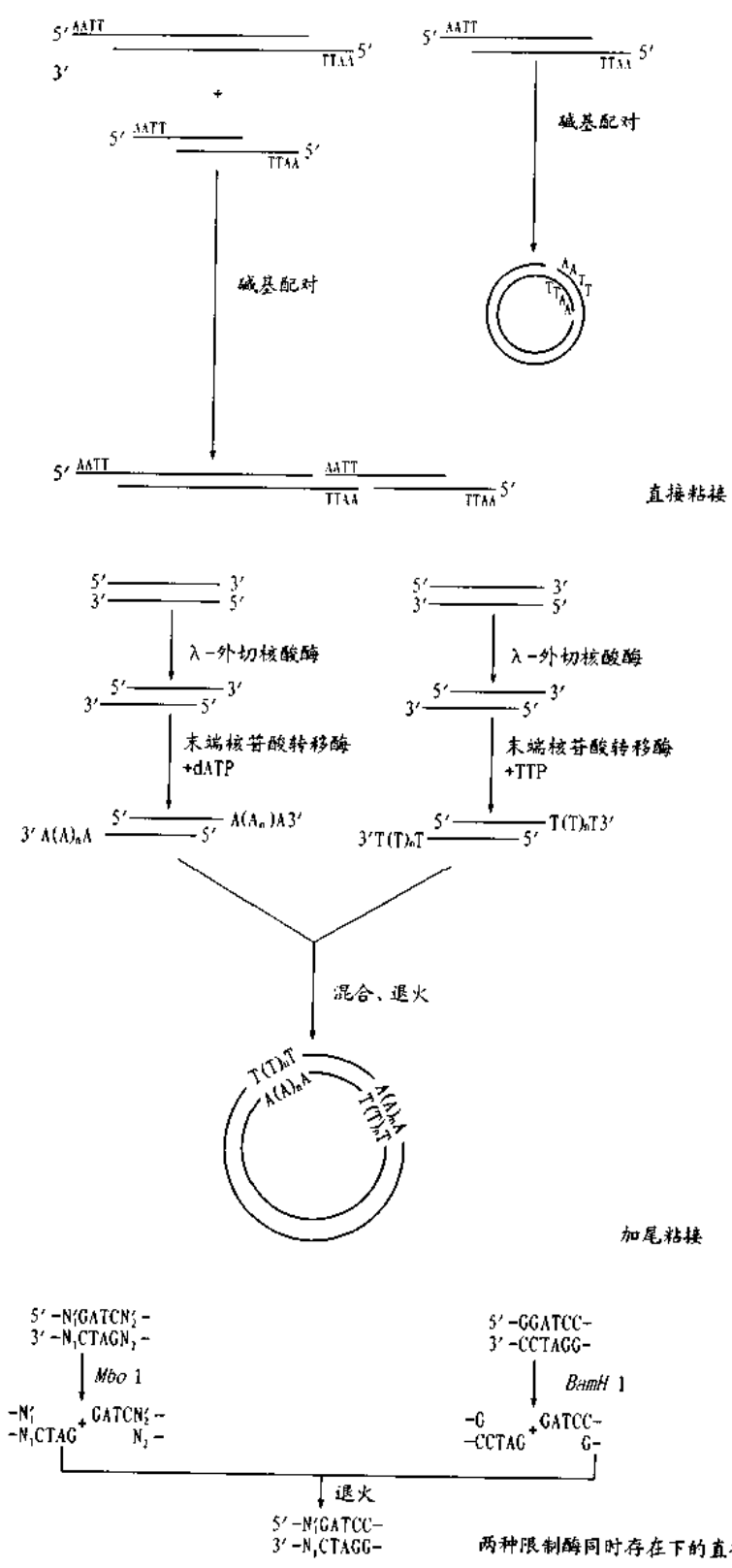


图 3.6 基因重组的三种粘接方法示意图

#### 4. 基因重组

这是关键的一步,包括两类重组方法:直接粘接法和加尾粘接法。前者简便,但易产生自身连接,无效重组率高,特别是外源 DNA 片段大于 18 kb 时更是如此;后者无效组合率低,但要用到多种工具酶。为了提高直接粘接法的有效重组率,可以采用在识别和作用的核苷酸序列专一性上有部分共同要求的两种限制性内切核酸酶,例如,限制酶 *Bgl* II 的识别作用序列为 GGATCC, *Bam*HI 的识别作用序列为 AGATCT,用它们分别处理目的基因 DNA 和载体 DNA,然后再在这两种限制酶同时存在的情况下用连接酶进行连接。图 3.6 示为上述三种重组方法。

#### 5. 重组子转化

进行重组子转化时,先要选择适宜的受体细胞,这种细胞应具有以下特点:能够接受外源 DNA,例如,选择限制-修饰系统缺失的菌株,使外源的 DNA 进入细胞后不致被分解;在标记上与载体相对应;有利于表达,如选择核糖体对 mRNA 识别专一性较低的突变株;安全。

最常用的受体细胞是大肠杆菌,它的优点是遗传背景清楚,有成套的载、受体系统可供各种基因进行稳定、高效的克隆、表达;缺点是该菌属于革兰氏阴性菌,表达产物除少数能分泌到培养介质和细胞周质外,通常都积累于胞质内,有时还可能形成无活力的不溶性包含体(include body),从而给产物的分离纯化带来困难,此外,还往往有内毒素(endotoxin)和热源脂多糖(pyrogenic lipopolysaccharide)污染之虞。不过,近年来随着纯化技术的进步,“周质酶”、“包含体酶”的分离已经不是十分困难的问题,在某种意义上,有时甚至更有利于纯化。其次是枯草杆菌,它们已广泛用于许多工业酶的生产,优点是它们属非病原性的土壤微生物,没有热原物质等问题,表达产物可直接分泌到培养介质,但是其遗传背景不如大肠杆菌清楚,而且往往包含大量蛋白水解酶,常导致表达产物降解。第三是酵母,它的优点是无热源物质等的污染,也可构建成分泌型受体菌株,而且能进行翻译后加工,如糖苷化等,适于真核基因的表达;缺点是表达水平一般较低。除此之外,近年来人们的注意力也开始转向动、植物细胞,因为它们能有效地进行翻译后加工,以天然构象形式将表达产物分泌出来,同时无微生物表达后可能带来的各种问题,但培养不易,产量较低,成本高。

其次要选取易被感受的生理状态,并加适宜的处理以提高转化效率。对大肠杆菌、假单胞杆菌来说,常用  $\text{CaCl}_2$  处理法,这种情况下  $1 \mu\text{g}$  的 DNA 一般可获得  $10^7$  个左右的转化子;如用  $\lambda$ -DNA 为载体,则在转化前应先用蛋白外壳进行包装(packaging),这样感染率可达  $10^7 \sim 10^8/\mu\text{g}$  DNA。对于枯草杆菌来说,由于其转化率普遍较低,并且转化率随单体占有的百分比而不同,同时,开环的和线性的 DNA 都不具有转化能力,因此仅选取感受态往往不够,一般多先用溶菌酶处理使之变为原生质体,然后再在聚乙二醇存在条件下进行转化。这种情况下,转化效率可达  $10^7/\mu\text{g}$  DNA,而且开环和线性 DNA 都能转化。酵母和放线菌亦多采用原生质体法。酵母可以先用  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Cs}^+$  等处理,然后再在聚乙二醇存在条件下进行转化,转化效率为  $10^4/\mu\text{g}$  DNA。对于真核生物的转基因,现在除了应用病毒载体外,已发展了诸如微注射(microinjection)、电脉冲(electropulse)、脂质体包埋等技术,再加上其他处理,可以获得高效的转化。

转化后的菌落先接种于含有(标记)抗生素的培养基上培养,选出抗性菌株;再进行扩大培养,增殖,鉴定采收。

### 6. 基因表达及相关问题

重组子进入受体细胞后,先通过 DDDP、DDRP 进行复制、转录,形成 mRNA,然后 mRNA 再在核糖体上进行翻译,合成相应的蛋白质,完成基因克隆、表达过程。但是,要使引入的基因得到高效表达,在构建重组子时必须考虑以下问题。

(1) 为了使外源基因得到高效表达,应在适当的位置上放置一个强的启动基因(启动子, promoter),即一个能为受体细胞 DDRP 转录识别的起始信号序列(-35 与 -10, Prinbow box)。例如,引入 *lac* 启动子、*trp* 启动子或由它们组建的 *tac I* 或 *tac II*。其次,还应在 mRNA 起始密码子上游端 3~12 个碱基处放置一个能为受体细胞核糖体识别的 SD 序列(Shine-Dalgarno sequence),该序列由 3~9 个碱基组成,它能和核糖体的 16S rRNA 的 3'-端互补(图 3.7),保证 mRNA 有一适宜的二级结构,能与 30S 亚基形成络合物,引发蛋白质合成。各种受体细胞要求的启动子与 SD 序列可能不同。对同类生物来说,原来的启动子和 SD 序列常可直接发挥作用;要使芽孢杆菌与酵母的基因在大肠杆菌内表达,一般也不需要特别的处理;但高等真核生物基因,则必须引入相应的启动子和 SD 序列才能在大肠杆菌中表达。启动子与 SD 序列和起始密码子 AUG 间的距离对转录有很大影响,有时甚至可能引起近百倍的差别。

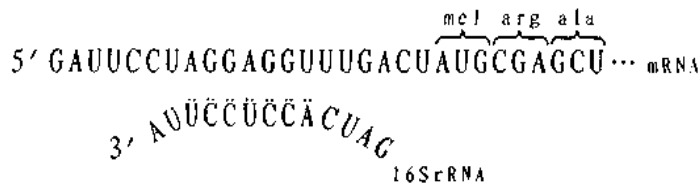


图 3.7 SD 序列与 16S rRNA

图 3.8 显示如何调整外源基因起始密码子和启动子与 SD 序列间的距离,从而达到能在大肠杆菌中高效表达的一般方法。其中关键的一步是借助一种外切核酸酶进行修剪以便在两者间形成一个包含不同核苷酸长度的混合系统。

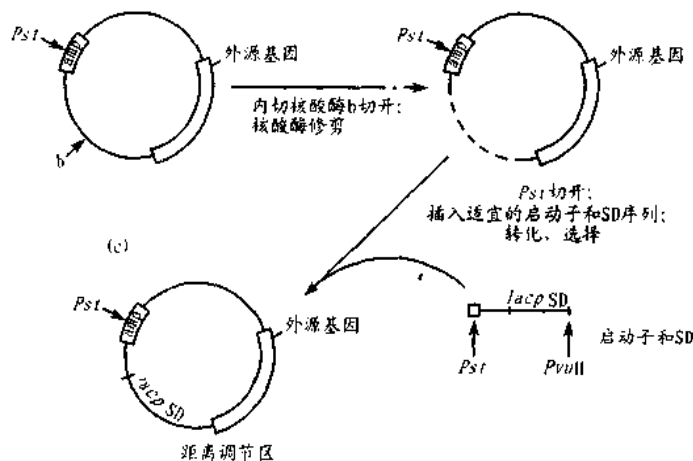


图 3.8 调整启动子、SD 与外源基因起始密码子间的距离

(2) 选择适宜的表达方式。外源基因可采用两种方式表达：一是以“天然蛋白(native protein)”形式直接表达，即将目的基因直接连接于适宜的启动子与 SD 序列后进行表达，表达产物无需加工就是天然蛋白。但是在构建重组子时，起始密码子 AUG 前端必须有一适宜的序列能为限制性内切核酸酶作用，并需保证 AUG 和启动子与 SD 序列间有适宜的距离。

另一种是以“融合蛋白(fusion protein)”的形式表达，即将目的基因连接于受体细胞(或载体)的某基因下游，或该基因 N- 端部分序列的下游，然后借助该基因的表达带动目的基因的表达，因而得到的表达产物是一融合蛋白，即在目的蛋白的 N- 端前面还附有别的蛋白或肽段。这种表达方式的优点是：目的基因处于受体或载体基因的调节系统控制之下，表达效率较高，产物较稳定，表达产物能作成分泌型；同时外加的肽段还可作为“标签”(tag)用于进行产物的亲和纯化。采用融合基因表达方式的一个重要问题就是如何将目的蛋白从表达产物中分离出来。一般地说，如果目的蛋白内部不含有 Met，那么，可以采用 CNBr 化学断裂法；否则就必须在目的基因前插入一段适当的接头(linker)，以便在表达后借助位点专一的或序列专一的肽酶从 linker 处切出目的蛋白；表 3.3 列举了某些可用的肽断裂方法。

表 3.3 融合蛋白的某些位点专一的肽断裂方法

酶或化学试剂	专一的断裂位点	断裂条件
羧肽酶 A	除 R,K 结尾的 C- 末端	pH 8 的缓冲液
羧肽酶 B	R,K 结尾的 C- 末端	pH 8 的缓冲液
胰蛋白酶	X-K-R- -X	pH 7 的缓冲液
肠激酶	X-D-D-D-K- -X	pH 7 的缓冲液
凝血因子 Xa	X-I-E-G-R- -X	pH 7 的缓冲液
胺原酶	P-X- -G-P-X	pH 7 的缓冲液
凝血酶	X-G-V-R-G-P-R- -X	pH 8 的缓冲液
CNBr	X-M- -X	70% 甲酸
酸	X-D- -P-X	70% 甲酸,加热
2-(2-硝苯亚磺酰)-3-甲溴吡啶 啉(BNPS-甲基吡啶)	X-W- -X	50% 乙酸
羟胺	X-N- -G-X	pH 9,加热

(3) 保持载体的稳定性。载体,特别是重组质粒,常易出现载体(基因)丢失现象。有两种情况：一是质粒在细胞分裂过程中产生了不等分配,称为“分离不稳定性”(segregational instability)。这种情况可采用抗生素选择压法(antibiotic selection pressure)解决,也就是在培养基中添加载体“标记”抗生素,使质粒丢失的菌体无法生存。二是基因结构发生了改变,即“结构不稳定性”(structural instability)。这种情况较复杂,有人报道可通过控制培养条件、调整菌体的生长速度加以解决。

(4) 表达产物的分泌。基因表达产物合成后,或停留于细胞质中,或结合于质膜,组成细胞内酶;或穿过质膜,外输到细胞周质或培养介质中成为细胞外酶,这就是所谓“分泌”(secretion)。革兰氏阳性菌和阴性菌不同,后者细胞外有一层细胞壁屏障,分泌蛋白一般止于周质,不能进入培养介质,成为“周质酶”或“周质蛋白”;而前者则由于没有细胞壁的阻碍,表达产物可直接进入培养介质,称为“外泌”(excretion)。从生产角度而言,外泌显然最为有利,这也是人们喜欢采用芽孢杆菌等作为生产菌的原因之一。要使表达产物能够分泌,通常应该在产物的 N- 末端添加一段由 10 个左右亲水氨基酸和相继 20~30 个疏水氨基酸组成

的信号肽。在实践中,为了使表达产物成为分泌型的,对于大肠杆菌,通常的办法是在目的基因的 N-末端接上一段青霉素酶、磷酸酯酶或外膜蛋白(ompA)的信号肽序列;对于枯草杆菌,则往往接上一段  $\alpha$ -淀粉酶基因序列或地衣芽孢杆菌的青霉素酶基因信号肽序列。图 3.9 为某些信号肽序列及信号肽引导的分泌机制。

	亲水部分	疏水部分
$\lambda$ -阻遏蛋白	MetMetIleThrLeuArgLys	LeuProLeuAlaValAlaValAlaAlaGlyValMetSerAlaGlnAlaMetAla ↓ Val
麦芽糖结合蛋白	MetLysIleLysThrGlyAlaArg	IleLeuAlaLeuSerAlaLeuThrThrMetMetPheSerAlaSerAlaLeuAla ↓ Lys
核蛋白	MetLysAlaThrLys	LeuValLeuGlyAlaValIleLeuGlySerThrLeuLeuAlaGly ↓ Cys
$\beta$ -内酰胺酶	MetSerIleGlnHisPheArg	ValAlaLeuIleProPhePheAlaAlaPheCysLeuProValPheAla ↓ His
f <sub>1</sub> 噬菌体外壳蛋白	MetLysLysSerLeuValLeuLys	AlaSerValAlaValAlaThrLeuValProMetLeuSerPheAla ↓ Ala
f <sub>2</sub> 噬菌体外壳蛋白	MetLysLys	LeuLeuPheAlaIleProLeuValValProPheTyrSerHisSer ↓ Ala
ompA 蛋白质	MetLysLys	ThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaGlyPheAlaThrValAlaGlnAla ↓ Ala
$\beta$ -内酰胺酶 ( <i>B. licheniformis</i> )	MetLysLeuTryPheSerThrLeuLysLeuLysLys	AlaAlaAlaValLeuLeuPheSerCysValAlaLeuAlaGlyCysAlaAsnAsoGlnThrAsuAla ↓ Ser

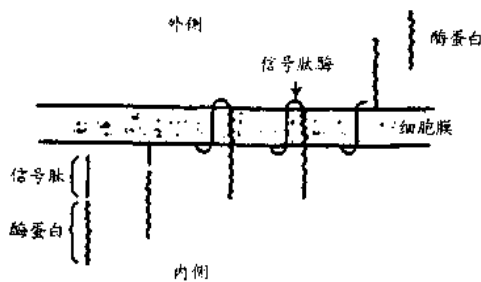


图 3.9 信号肽及信号肽引导的分泌机制

为了获得外泌蛋白,有三种办法可供考虑:一是突变,即通过突变筛选出对那些影响细胞壁结构的抗生素如环丝氨酸、新生霉素、氨基苄和多烯(kabasidine)等具有抗性的突变株,这些菌株一般是超产、高分泌型的;但是应注意其中许多外膜“渗漏型”(leaky)的突变株,其物理性能往往太弱。二是与外膜蛋白如 OmpF 做成融合蛋白。三是引入能诱发大肠杆菌细胞壁通透性增大的 *kil* 基因。

值得提到的是,分泌实际上是蛋白质合成后的一种定域运转(transportion)方式;DNA 重组技术既可赋予表达产物以分泌性质,同时也是研究运转机制的有用手段。

(5) 保证异体蛋白在受体细胞内的稳定性。现在已知在大肠杆菌内至少有八种以上的蛋白酶可以分解酪蛋白、胰岛素等异体蛋白,外源基因表达产物作为异体蛋白也同样面临这一问题。解决的办法有三种:一是选择蛋白酶基因缺失的变异株作为受体细胞,如 *lon*-变异株;二是同时克隆蛋白酶的抑制剂基因,例如,  $T_4$  的 *Pin* 基因;三是促进基因表达产物的加速分泌。

## 7. 基因工程在酶生产中的应用

基因工程在酶的生产中可以发挥以下几个方面的作用。

(1) 提高微生物中原有酶的产量。例如,将大肠杆菌色氨酸操纵子和质粒 ColE1 重组、克隆,使其拷贝数目增至 20~30 个,这样,与色氨酸合成有关酶的产量可增大近 30 倍;又如,将 T<sub>4</sub> DNA 连接酶的基因和 λ-噬菌体重组克隆,可使该酶在大肠杆菌内的产量达到新合成的可溶性蛋白总量的 5%;再如,将地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶基因克隆于枯草杆菌后,酶产量增大了 2 500 倍。

(2) 用微生物表达、生产动物或植物的酶基因。例如,将人尿激酶 mRNA 通过反转录成 cDNA,再与 pBR 322 和 β-半乳糖苷酶基因重组克隆,结果人尿激酶基因在大肠杆菌中得到了表达;又如将组织型的溶血纤酶原激活剂(tPA)基因和色氨酸启动子连接,克隆于大肠杆菌中,结果该激活因子不仅可在细菌中产生,而且其产量达到 80 μg/L 培养液,相当于 2 400 分子/细胞的产量。反之,也可通过转基因手段将微生物的酶基因或酶的抑制剂基因转入动植物细胞中,使之产生抗(病)菌抗虫能力。例如,将溶葡萄球菌酶基因转入小鼠体内,表达后用以抵抗金黄色葡萄球菌的感染;再如,将蛋白酶抑制剂基因转入植物体内以育成抗虫植株。

(3) 构建“多酶复合物”或“多酶系统”。已知许多生化过程、生化产物的合成、加工与分解往往需要通过多种酶的连续、协同催化才能完成。如果将这些酶组在一起,构建一个“多酶复合物”或“多酶系统”,那么,由于“临近效应(proximity)”和“定向效应(orientation)”,不仅可以大大缩短底物的迁移时间(transport time)和平衡过渡时间(transient time)而加速反应的进行,同时也可使反应的平衡导向产物的形成。构建的方法有三种:固定化法、交联法和基因重组融合基因表达法(图 3.10)。相对前面两种方法,第三种方法的特点是不需要后加工,融合基因表达产物均一(homogeneous),但在构建过程中要考虑两个问题:融合的各基因都应进入读框;融合的各基因表达产物应都能形成正常的有活性的高级结构,为此,它们之间应有适宜的间隔距离,例如 2~10 个氨基酸残基间隔。已报道的这种多酶复合物有 β-半乳糖苷酶/半乳糖苷脱氢酶/半乳糖苷激酶,牛肝微粒体 P-450/酵母 NADPH-Cyt. P 450 还原酶组成的甾体转化酶系等。

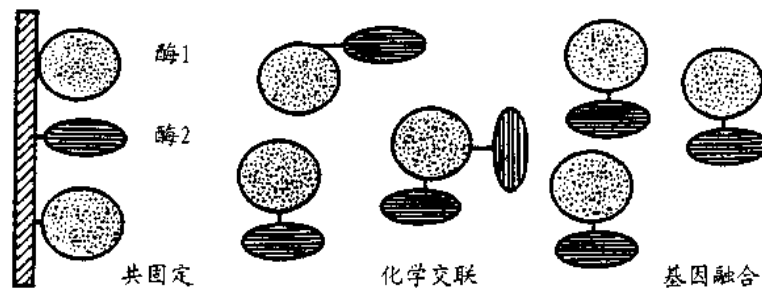


图 3.10 三种多酶复合物人工构建法示意图

(4) 通过移除、添加或置换基因中的某些碱基或碱基序列,然后克隆表达进行酶分子改造。例如,将 DNA 聚合酶 I 的基因断裂,取相当于 Klenow 片段的碱基序列和 λpL 启动基因连接,再克隆到大肠杆菌,结果每克湿菌体可生产 1 mg 以上的 Klenow 片段。这种片段仅保



留聚合酶活力,但不含 5'→3' 外切核酸酶活性。再如,热不稳定酶,通过与耐热酶基因在核苷酸序列上的同源重叠部分进行“分子杂交”,结果杂交后的表达产物在耐热性上显著提高。应用 DNA 重组技术进行酶或蛋白质分子改造的一个十分重要的发展就是通常所说的蛋白质工程,也称为定点突变(site - directed mutagenesis),相对其他方法而言,它是一种最有预见性的定向改造技术。

#### 8. 体外基因重组某些相关领域的开发

(1) PCR 的开发与应用。PCR,聚合酶链反应 (polymerase chain reaction) 是一种在体外进行的基因或 DNA 片段高效扩增技术。它能在适宜的引物(primer)和脱氧核苷三磷酸存在条件下,以特定的基因或 DNA 片段为模板,借助 DNA 聚合酶在体外合成相应的 DNA。当反应反复进行时,目的基因或目的 DNA 片段的拷贝数就能大量扩增( $2^n$ ,其中  $n$  为反应重复的次数)。PCR 过程如图 3.11。

PCR 有两个重要的特点:一是不受样品纯度(只要不包含 DNA 聚合酶的抑制剂)以及作为模板的 DNA 是否分解的影响,可以用体液、细胞,甚至木乃伊材料为样品,因而能广泛应用于临床诊断、法医学以及古生物学研究;二是 PCR 不仅可在体外高效地克隆特定的 DNA 序列,也可通过导入适当修饰的引物在体外进行定位突变。

PCR 的基本概念是 Khorana 在 1972 年提出的,但是当时采用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段,由于该片段不耐热,反应只能在 37℃ 进行,因而扩增效率和特异性都很低。直到 1985 年, Mullis 推出了完整的 PCR 程序,继而 Cetus 公司又将它应用于人  $\beta$ -珠蛋白 DNA 的扩增和镰刀形贫血症的产前诊断。虽然在开始时,他们也是采用 Klenow 片段,但以后开发了耐热性 Taq 聚合酶(最适温度 75℃),扩增效率和复制专一性才得以大大提高。

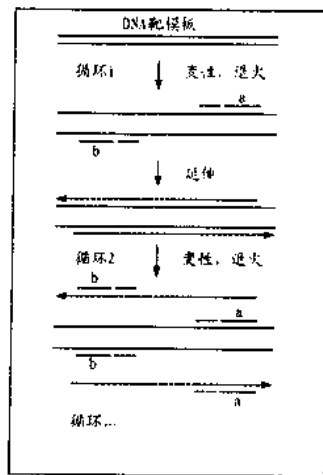


图 3.11 PCR 示意图

近年来发现, Taq DNA 聚合酶同时具有反转录酶的活性,从而又开发了 RT-PCR 技术,即能以 RNA 为模板进行 DNA 的体外扩增。

PCR 技术发展十分迅速,1985 年仅有三篇报道,1989 年已急剧地升至 476 篇。PCR 不仅有力地推动了分子生物学的进步,而且也带来了颇丰的经济效益,因此引发了 Cetus 公司

与杜邦公司的权益之争,现在 Cetus 公司已获得该项技术的专利权。

(2) 基因体外连续表达系统的开发。无细胞翻译系统约在 30 年前就已经建立,但该系统操作持续的时间一般少于一个小时;而且产率很低,每条 mRNA 链仅能形成二三条肽链。近年来, Spirin 等开发了一个新的体外翻译系统,它的特点是一方面连续地流加氨基酸、ATP 和 GTP,同时又不不断地移除新合成的肽链。这个体系能持续操作 100 h 以上,每条 mRNA 分子可产生数以百计的蛋白质拷贝。随后,他们又做了进一步发展,其流加成分扩大为四种——NTP、PEP、氨基酸和质粒 DNA,将体外转录与体外翻译偶联在一起,因而不需要预先获得大量 mRNA,就能直接从质粒 DNA 基因合成相应的蛋白质。例如,采用这一体系, $\beta$ -内酰胺酶和二氢叶酸还原酶的合成可以持续 55 h 以上。Spirin 系统除了表 3.4 所示的特点外,还有许多其他的优点:产物可以达到制备量的水平;没有降解和形成包含体等问题;无脱氨、氧化、水解之虞;没有内毒素、感染原等的污染。可为医药应用、科学研究提供高质量的蛋白质样品。

表 3.4 Spirin 系统和其他体外翻译系统的比较

特 点	Spirin 系统	其他体外翻译系统
表达系统	非细胞	非细胞
mRNA 需要情况	少量	大量
底物供应	连续供应	一次且固定
产物的产生	连续生成	一次且固定
循环操作时间	100 h 以上	1 h 或更短
一个 mRNA 合成的蛋白质分子的拷贝数	数百个	1~2 个
肽产率 (pmol 肽 / (pmol mRNA · hr))	$\geq 5$ ; 可持续进行 40h 以上	1~2; 大约于 1h 进入平台
总产率 (ug/ml 提取液)	$\geq 200$	$\leq 1$

## 六、其他提高酶产量的方法

### 1. 添加表面活性剂

很早以前,人们就观察到低浓度的表面活性剂对某些细菌的生长有促进作用。后来,又发现许多表面活性剂还能提高酶的产量,特别是有利于霉菌胞外酶的产生,而且它们对菌和酶没有太大的专一性。例如,在培养基中加入 0.1% Tween 80,就能使木霉菌的纤维素酶产量提高约 20 倍,使蔗糖酶的产量提高 16 倍。

通常用于提高酶产量的表面活性剂多是非离子型的,如 Tween 80、Triton X-100 等。它们对微生物没有毒性,或者毒性极小,产酶促进效果也因菌和酶而有所不同。某些阴离子型的表面活性剂,如油酸等,它们对微生物有一定的毒性,但对某些酶的增产作用常比非离子型者更为显著。例如,油酸甚至可使绿色木霉的纤维素酶产量提高将近 100 倍。至于阳离子型的表面活性剂,可能因为它们对细胞的毒性太大,未见有用于提高酶产量的报道。

应用表面活性剂作为产酶促进剂时,浓度十分重要,一般都有一个最高极限。酶产量增加的幅度没有一定的规律,通常情况下产量较低的菌和产量较低的酶,在添加表面活性剂以后,产量可以明显增加;而产量原来较高者,增产幅度一般较小,但也有例外,如绿色木霉生产纤维素酶,产量虽然原来就很高,而在添加表面活性剂的情况下,仍然可使产量提高一倍左右。

表面活性剂提高酶产量的机制,特别是对胞外酶来说,可能是因为它们能增大细胞膜的通透性。正常情况下,菌的细胞膜通透性不同,因此,释放酶的能力也有差异,表面活性剂有助于提高其通透性,有助于打破细胞中酶合成的“反馈平衡”,故而酶产量能大幅度提高。这种理论可以说明很多现象,但也有一些事实难以解释,例如,许多表面活性剂都能提高细胞通透性,可是在提高酶产量上发挥的作用却又明显不同,而且不显示平行关系。

## 2. 其他酶促进剂

除了表面活性剂外,添加某些物质也往往能提高酶产量。例如,在桔青霉的培养基中加入植酸钙镁,可使5'-磷酸二酯酶的产量增大10~20倍。

# 第三节 动植物原料和细胞培养<sup>(17-18)</sup>

## 一、动植物原料

酶的主要来源现在虽已转向微生物,但有时还要考虑动、植物材料,因为某些酶不一定都能找到适宜的生产菌,而且某些情况下微生物来源的酶并不完全符合应用要求,此外还有一个动、植物材料的综合利用问题。

采用动、植物材料应考虑以下因素。

### 1. 取材

同一种酶在不同生物、不同组织中含量往往差异很大,而且纯化的难易程度也可能很不相同,故有一个取材问题。例如, $\beta$ -葡萄糖醛酸酶在六种动物的三种组织中活性相差可达几百倍。又如,动物的胰、脾、肝中尽管都含有丰富的磷酸单酯酶,但是在这些组织中同时也含有大量的磷酸二酯酶,有碍磷酸单酯酶的提纯;反之,前列腺中单酯酶含量虽然较低,但几乎不含二酯酶,因而用作该酶提取材料更为有利。

### 2. 取材时机

在体内,酶一般都有一定的半寿期,有的寿命很长,有的却极为短暂,特别是那些参与代谢调节的酶,因此有一个选择取材时机问题。这一点在采用植物材料时更为突出,酶含量常因季节而明显变化,如黄豆芽的植酸酶以种子萌发期最高。

### 3. 预处理

与取材时机相关的一个问题,就是获得材料后必须立即进行处理或采取适当措施加以保存。这一点对动物材料尤其重要,因为组织细胞一经破坏,溶酶体就会释放大量的组织蛋白酶对蛋白质等进行分解,所以材料一旦取出就必须马上使用;完整组织采下后,如不马上使用,就应直接冻存。此外,对于动物材料而言,可先让其饥饿一下,减少糖原或脂类的摄入量,常有利于酶的分离。例如,从鸽肝提取乙酰化酶,一般就先经过这种处理。

但是,直接利用动、植物材料来进行酶生产,酶的产量通常不可能太高,因为酶和蛋白质在各组织器官中存在着相应的机构保持协调平衡,故而人们逐渐将注意力转向组织培养或细胞培养。

## 二、细胞培养

细胞培养,现阶段主要用于制备疫苗和激素等药物;近年来随着组织培养技术的迅速发展,表明某些动植物酶也可能通过培养细胞获得(表 3.5)。

组织培养和微生物发酵一样,可以采用液体通气培养,培养也同样要求供给适当的碳源、氮源和无机盐等,但也有其自身的特点和要求。培养植物细胞时往往需要加入一些生长调节因子之类的物质,如肌醇、尼克酸等。而在培养动物细胞时,为避免微生物污染,通常要添加抗生素物质;为促进细胞生长繁殖,除了要加入氨基酸、核苷酸、维生素等外,一般还需采用动物血清(5%~10%,V/V)作为培养介质,但是,近年来已开发无血清培养;此外,由于动物细胞不具有细胞壁,比较娇嫩,容易损伤,大多数动物细胞在培养时还需要解决一个贴壁依赖性(anchorage dependent)问题,需要有特殊的培养装置和设备,如固定化用的微载体等。

表 3.5 通过动、植物细胞培养可能生产的酶类

来源	酶		
动物培养细胞	门冬酰胺酶	胃蛋白酶	尿激酶
	胶原酶	凝乳酶	凝血因子 VI
	细胞色素 P450	胰蛋白酶	VII
	透明质酸酶	酪氨酸羟化酶	X
植物培养细胞	木瓜蛋白酶	菠萝蛋白酶	蒜氨酸酶(allinase)
	洋葱风味酶(onion flavour enzyme)		

细胞培养似乎也同样存在着酶的合成诱导和阻遏现象,因而可通过代谢物改变酶的合成量,添加表面活性剂亦能显著地提高酶的产量。许多酶的产量在培养细胞中一般比原来机体细胞分泌的还多,有些酶甚至能达到微生物的产酶水平。但是,真核细胞中酶的合成调节机制毕竟远比原核细胞者复杂。除了复制、转录和翻译水平的调节外,还有组织器官水平、细胞水平、转录后、翻译后等水平的调节,核和染色体水平的调节,以及神经递质、激素水平的调节和日夜周期等调节。培养细胞同样如此。

利用动、植物细胞,特别是利用动物细胞来生产食品工业用酶或医用酶可以避免微生物毒素的污染。因此,如果有一天能解决组织细胞的大量培养和调节问题,它将是一条十分有意义的生产途径。

## 第四节 酶的改造<sup>(19-22)</sup>

由于通过化学合成来进行酶的生产在目前还比较困难,而应用生物来源的酶又往往存在这种或那种问题。为满足生产实践的需要,人们也在设法通过各种方式对现有酶进行改造,以期提高它们的应用价值。在某种意义上酶的改造也属于酶的生产范畴,而且其重要性甚至不亚于酶的生产本身。

### 一、酶在应用中可能出现的问题与对策

天然酶具有高效而且高度专一的催化特性,并已广泛应用于各个领域,但它们并非完美无缺,表现在:第一,酶的活性、作用专一性和作用最适条件常不能适应生产工艺的要求;第

二,酶是蛋白质,容易变性失效,一般经不起高温、强酸、强碱、有机溶剂以及时间等的考验;第三,注入体内,作为异体蛋白,有难于吸收、易引起免疫反应和易被识别降解之虞。酶的改造就是要针对这些问题采取相应的对策。酶的改造最直接的是从酶分子的化学结构水平上进行改造,有人称之为“酶分子工程”。它包括:调整酶的活性结构,改变酶的作用微环境;引入氢键、疏水键、盐桥,加固酶的活性结构的刚性和强度;建立选择性屏障,避免直接和免疫系统、蛋白水解酶系统接触等。酶分子的改造既可弥补天然蛋白的不足,也可赋予酶某些更优良性状,因此受到人们的广泛注意。

用于酶分子改造的方法大体有三类:① 化学修饰法(chemical modification);② 变性诱导构象重建法(denaturation - induction - reconstruction),或称解链复性构象重建法(unfolding - refolding);③ 建立在基因工程基础上的基因定位突变法,即蛋白质工程(protein engineering)。目前使用最多的是化学修饰法。

## 二、化学修饰

化学修饰可以是共价修饰,也可以是非共价修饰;可以是专一性修饰,也可以是非专一性修饰;可以针对活性中心部位,也可以着眼于活性中心以外的残基;可以在侧链上进行,也可以在主链上进行。

### 1. 通过化学修饰改造酶的作用特性

这是酶改造的第一个目标,包括改变酶的活性、作用专一性、对效应物的响应性能以及对辅助因子的要求等。例如,用纤维蛋白的专一性单克隆抗体修饰尿激酶,结果该酶的溶血栓活性提高了 100 倍;用醋酸酐修饰羧肽酶的 tyr,结果升高了它的酯酶活性,却降低了它的肽酶活性;又如,用聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)修饰脂肪酶、 $\alpha$ -凝乳蛋白酶,结果修饰后,这两种酶都能溶于有机溶剂,而且能分别催化酯和肽的合成。但是,由于修饰的对象、修饰的部位以及反应的条件不同,修饰的结果往往有很大的差异,目前还难以理出一个共同的规律来。

除了侧链基团的取代可以产生有益的结果外,对酶的肽链进行限制性的水解,有时也能收到意想不到的效果。例如,分别用胰蛋白酶或枯草杆菌蛋白酶处理门冬氨酸酶,结果都使后者的活性升高了约 5 倍;而且,有趣的是,上述两种蛋白酶的专一性很不相同,但引出的活性改变情况却大体相同。

修饰也可在辅助因子上进行。例如,用 PEG 修饰 NAD,然后再与相应的脱氢酶偶联,结果  $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$  的反应性能和再生速度都显著加快。又如,以配基置换的办法,用钴取代羧肽酶活性必需的锌,结果肽酶活性和酯酶活性都升高;但如用锰或镉取代锌时,其酯酶活性升高,肽酶活性却下降。

修饰也可改变酶的其他性状,例如,溶菌酶乙酰化或葡萄糖苷化后,它的膜透过性增大,被肠吸收的性能加速;又如,用  $\text{Fe}_2\text{O}_3 - \text{PEG}$  修饰尿激酶后,结果可定向地使该酶运转到血栓患处。

### 2. 通过化学修饰提高酶的稳定性

这是酶改造的第二个目标,为了提高酶的稳定性,可引入亲水基,增强酶与介质的亲水

性,也可进行分子内、分子间的交联,加固酶的活性结构。例如,用乙醛酸修饰 $\alpha$ -凝乳蛋白酶的表面氨基,形成强亲水性的一 $\text{NHCH}_2\text{COOH}$ 后,该酶对 $60^\circ\text{C}$ 热处理的稳定性增高了1 000倍;用戊二醛修饰磷酸化酶,结果改进了该酶在耐热、抗冷方面的性能;又如,将淀粉酶做成聚碳酸酯卤化物后,该酶可以经受住长时间的高温处理。

### 3. 通过化学修饰扩大体内应用可能性

化学修饰的第三个目标是要防止酶在体内可能遇到的非专一性降解,减少和消除免疫原性或抗原性,以利于医疗应用。为达到此目的,可以采用小分子试剂进行修饰。例如,用亚硝酸脱去门冬酰胺酶N-末端异亮氨酸的氨基与赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基,经这种处理后,酶的活力不变,但它在体内半寿期比天然酶长两倍,疗效显著提高。更多的情况是采用水溶性大分子,特别是用PEG进行保护性修饰,使之与免疫系统和蛋白水解系统隔离。例如,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、L-谷氨酰胺酶、L-门冬酰胺酶、尿酸酶等用PEG修饰后,完全消除了酶的抗原性和免疫原性,减慢了它们在动物血液循环中被清除的速度,酶的活力可保存15%~45%。而腺苷脱氨酶用PEG修饰后,已被FDA批准用于治疗小孩由于该酶缺失而引起的综合免疫缺陷症。

## 三、变性、诱导与构象重建

如果说化学修饰是在一级结构上对酶分子进行的改造,那么,变性诱导构象重建则是在酶的高级结构上进行的一种调整。1967年Anfinson用还原剂和脲处理RNase,使其4对—S—S—还原为8个—SH,肽链变性松散;然后再除去变性因素,并缓缓地进行—SH的重氧化和肽链复性。按照排列组合计算,由8个—SH重新形成4对—S—S—有 $105[8! / (2^4 \cdot 4!)]$ 种可能,也就是说,肽链重新折叠可形成105种可能的结构。但是,实际上这种变性的RNase在复性过程中,仅按热力学的可能性恢复到天然活性构象(图3.12)。这一实验事实,一方面说明蛋白质的一级结构决定了它的高级结构;另一方面也为酶的稳定化、酶的保存以及酶的改造提供了一种新的途径。特别是以后人们又发现,如果复性是在非天然条件下进行或在有底物类似物、抑制剂等存在的条件下进行,那么,酶将折叠成所需要的特殊结构,产生新的性状,这就是变性诱导构象重建修饰的原理。例如,在核糖核酸酶复性时,如果加入竞争性抑制剂丙酸,结果形成的修饰产物具有酸性磷酸酯酶活性。又如,胰蛋白酶复性时,如果选取在 $50^\circ\text{C}$ 进行,那么,修饰后酶的稳定性比天然酶和在 $20^\circ\text{C}$ 复性的酶要高5倍。

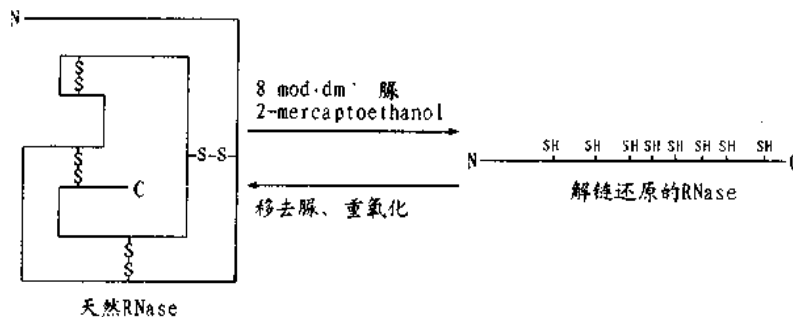


图 3.12 RNase 的变性、复性示意图

基于类似的原理,近年来 Keyes 实验室发展了一种称为“BIO-SYN-CAT™”的技术,它能使某些原来不具有酶活性的蛋白质转化为具有某种催化构象、催化活性的修饰蛋白(catalytic conformationally modified protein, CCMP),这种技术包括三个基本环节:微扰(perturb);诱导(induce)和修饰(modify);交联(crosslinking)(图 3.13)。

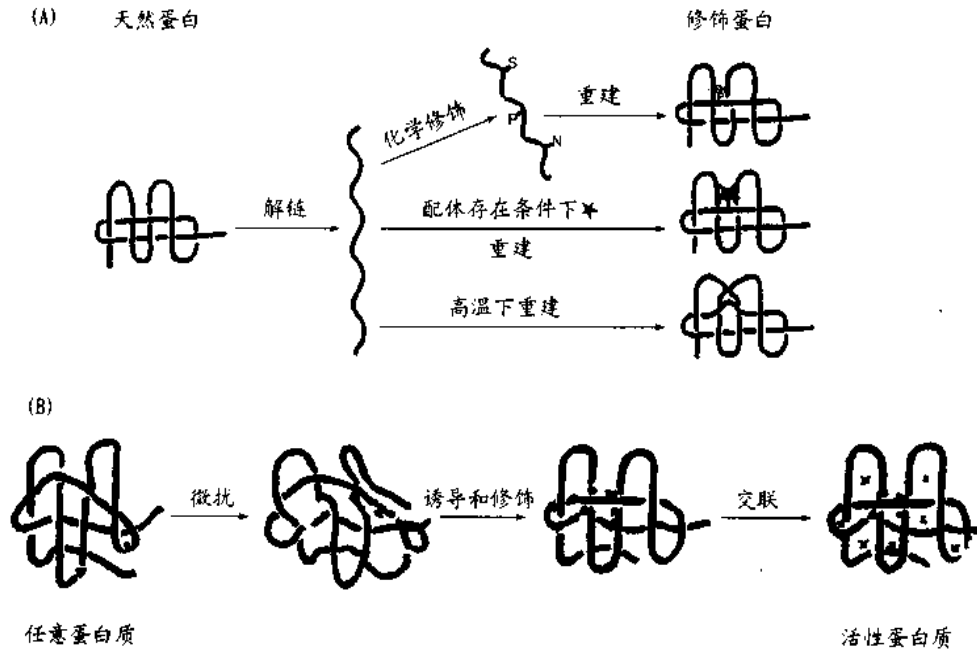


图 3.13 变性诱导构象原理示意图(A)

BIO-SYN-CAT™原理示意图(B)

例如,以血清白蛋白为出发物质,可先在 pH 3 的条件下使之微扰松散,然后加入诱导修饰物(如吡啶),并缓缓调整 pH 至中性,让其逐渐重新折叠形成某特定构象,再以双功能或多功能试剂(如戊二醛)进行冻结(frozen in),稳定新的结构,结果这样获得的产物具有酯酶活性。该实验室先后用这种方法从牛血清白蛋白获得了 RNase、SOD 等活性产物,从刀豆蛋白(ConA)、己糖激酶得到了葡萄糖异构酶、氟磷酸酯酶等活性产物。该技术据称具有简便易行、成本低、活性高以及结构稳定等优点,但是否普遍适用尚有待检验。

#### 四、蛋白质工程

蛋白质工程,又称为第二代基因工程,它是以重组 DNA 技术为基础,结合 X-衍射分析技术、蛋白质溶液构象理论及计算机辅助设计(computer aid protein design, CAPD)发展起来的一种定点定位修饰技术体系,也是在基因水平上进行蛋白质改造的一种技术科学。图 3.14 为其示意图。

通过蛋白质工程改造基因,即改变基因中核苷酸,方法有多种,例如:

(1) 化学全合成法。即根据原基因序列进行全化学合成,仅在定位修饰的部位作出相应的改变。此法的优点是可在多点上同时进行定点(位)突变,缺点是它的成本及人工付出太高。

(2) 限制性内切核酸酶酶切片取代法。即先将原基因中需修饰的片段用限制酶切出,同时用化学法合成相对应的修饰片段,再通过连接酶将修饰片段装入原基因中。这种方法的关键是要在待修饰的部位能够找到适当的限制酶切序列。

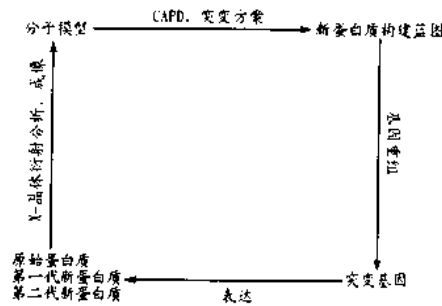
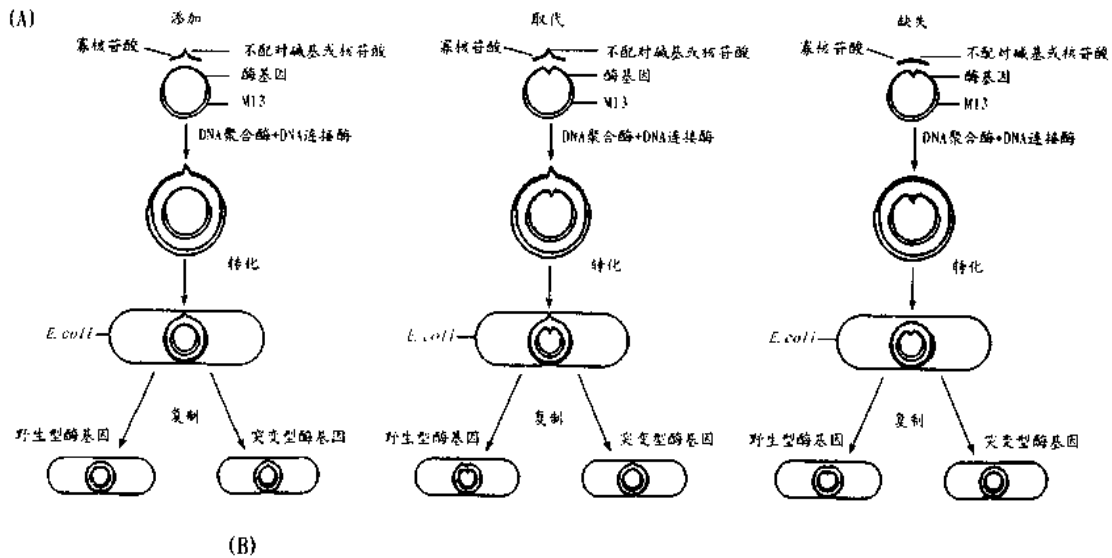


图 3.14 蛋白质工程原理示意图(A)  
蛋白质工程体系示意图(B)

(3) 寡核苷酸引物指导的定点突变。采用这种方法时,要利用噬菌体 M13 的单链化和双链化互变,图 3.15 为其原理与过程示意图,即:先将原基因克隆到 M13 中(单链化),同时合成一段在待修饰部位作了改变的寡核苷酸引物,两者退火,再通过 Klenow 酶延伸,连接酶催化成环,然后转染大肠杆菌,进行扩增,筛选分离突变体。这是一种普遍适用的方法,既可改变、也可添加或删除原基因中的核苷酸或核苷酸片段。

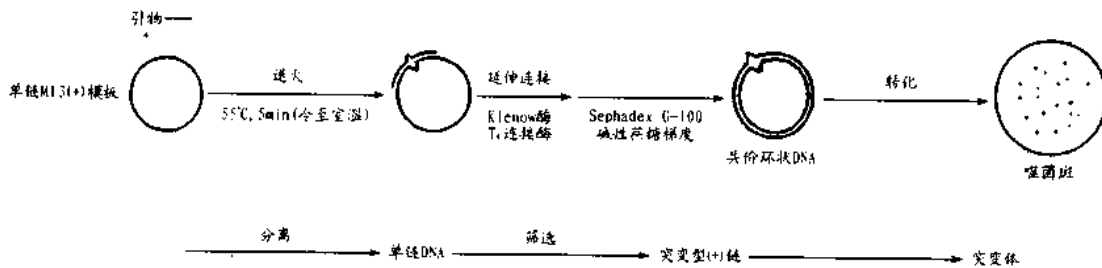


图 3.15 寡核苷酸指导的定点突变



(4) 盒式突变(cassette mutation)法。这种方法是在方法(3)的基础上发展起来的,它的特点是能在同一位点上同时作出多种突变选择。图 3.16 为其原理和程序示意图。先将原基因克隆于 M13 中,作成单链重组噬菌体 DNA。另外再合成一段寡核苷酸引物,这段引物基本上可与模板 DNA 互补,只是在两处有小的改动:一是缺少包括待修饰点在内的一短段核苷酸序列;一是在此引物的两端有适合的限制酶(如 *Kpn* I 和 *Pst* I) 专一识别和作用的序列。将此引物和 M13 重组 DNA 退火,用 Klenow 酶与连接酶制成共价闭环 DNA,然后将此闭环 DNA 再克隆到另一载体,并用上述限制酶处理作成缺口。同时再合成一系列适于缺口的寡核苷酸片段,它的序列与原基因相同,但在待修饰点上用不同的核苷酸取代。将此寡核苷酸片段混合物通过连接酶分别插入缺口,转化、筛选、分离。这样在同一突变点上一次就可得到多种突变株。在上述方法的基础上,近年来又有了许多新的发展,如双引物系统等。

蛋白质工程并不限于单个氨基酸的取代、缺失或插入,这种修饰也可以是一个肽段序列。随着蛋白质化学的发展,现在认识到,整个蛋白质分子还可划分出一个个结构(功能)域;同样,蛋白质工程修饰也可扩展到结构域的水平。

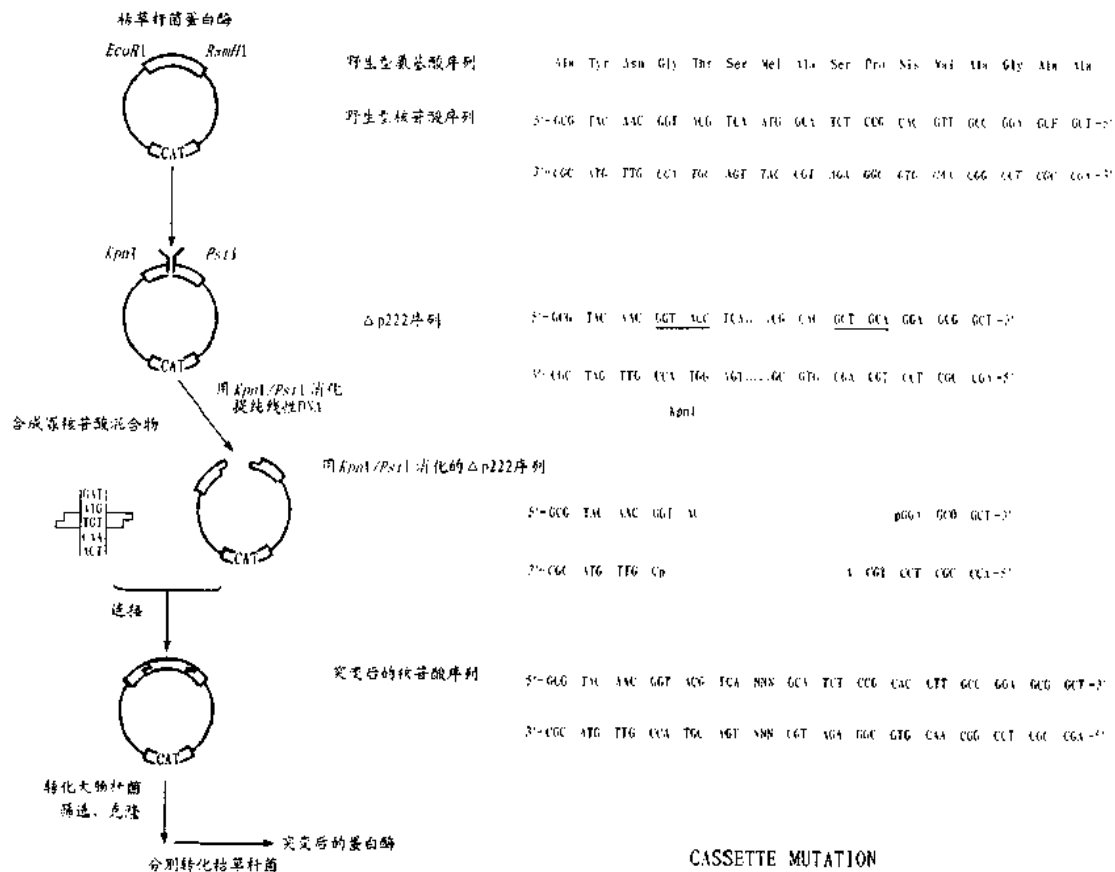


图 3.16 盒式突变原理示意图

蛋白质工程有两个方面的应用:一是用于阐明蛋白质结构和功能关系,一是进行蛋白质的定向改造。开始阶段的应用主要为探讨蛋白质结构和功能,但是到现在酶的定点定位改造方面也已显示出它的应用潜力。例如,将嗜热脂肪芽孢杆菌酪氨酸-tRNA 合成酶 51 位苏氨酸替换成脯氨酸后,该酶对底物的亲和力显著升高,其表现二级反应速度常数( $k_{cat}/$

$K_m$ )可上升 25 倍。这种对底物亲和力的影响常因取代的氨基酸而不同,以胰蛋白酶为例,它的 216 位和 226 位 Gly 分别替换成 Ala 后,对应地引起了对精氨酸-底物和对赖氨酸-底物的  $k_{cat}/K_m$  的升高。又例如,将  $T_4$ 溶菌酶的 3-Ile 更换成 3-Cys,再经氧化,与 97-Cys 形成二硫键后,其热稳定性大大提高;同样, $\beta$ -内酰胺酶的 70-Ser 换成 70-Cys 后,它对胰蛋白酶水解的抵抗力可升高 3 倍。

蛋白质工程在酶的改造方面目前研究比较系统的例子是组织型血纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)。

tPA 是一种血栓溶解药物,能激活血纤维蛋白溶酶原,活化后的血纤维蛋白溶酶能水解凝集的血纤维蛋白。属于这一类的激酶还有:链激酶(streptokinase, SK),该酶来源于溶血性链球菌,应用时有异体蛋白问题;尿激酶(urokinase, UK),此酶以酶原形式合成,一旦活化,具有强的激活血纤维蛋白溶酶原的能力,长时间使用则会引起“系统活化”,产生出血现象。tPA 则不同,虽然,它是以活性酶的形式存在,但活力低,只有当它与血纤维蛋白(fibrin, Fb)、血纤维蛋白溶酶原(plasminogen, Pln)形成三元络合物后,在 Fb 的促进下,才起活化作用。tPA 和 Fb 有很强的亲和能力,因此,不会产生“系统活化”与出血。

tPA 使用时存在的问题是:第一,易为纤维蛋白溶酶原激活剂的抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI)所抑制;第二,易为细胞膜特异性受体所识别而清除;第三,由于上述两种原因而长期大剂量投药时,也会造成出血现象。

tPA 是由 527 个氨基酸组成的、分子量 67kD 的糖蛋白;以单链形式合成,在血纤维蛋白溶酶(plasmin, P)的作用下,从 Arg-275 与 Ile-276 处断裂,形成双链;单链和双链激活 Pln 的效率相同,但是单链与 Fb 的亲合力更强,半寿期更长,而且受 PAI 的抑制较弱。双链分子又可分成重链(也称 A 链)和轻链(也称 B 链)。重链位于 N-端(1-275),参与对 Fb 的结合,是作用专一性的决定部位,由三个结构域组成:指形区(1-43)(finger domain, F 区),在低浓度 Fb 条件下,参与和 Fb 结合;表皮生长因子区(44-91)(epidermal growth factor domain, E 区),是肝细胞膜受体识别部位,缺失 E 区的 tPA,在体内的半寿期明显延长;三角区(kingdomain, K 区),tPA 中有两个 K 区:  $K_1$ (92-173),包括 Asn-X-Ser/Thr 序列,能和聚甘露糖等结合,使 tPA 糖苷化;  $K_2$ (180-261),与 Fb 有高亲和力,是和 Fb 结合的主要结构域,也是 tPA 受血纤维蛋白激活的关键部位。轻链位于 C-端(276-527),是激活 Pln 的催化活性部位,属于 Ser 蛋白酶,能和 PAI 结合,使 tPA 受到抑制。图 3.17 示 tPA、尿激酶及溶血酶原结构和凝血与溶血因子的相互关系。

改造 tPA、提高 tPA 的医用价值的目标是:减少抑制;延长半寿期;加强与血纤维蛋白的亲合力,提高酶活性。采用的办法是:定位突变,融合杂交,添加与血纤维蛋白结合的其他因素。

定位突变包括个别氨基酸的取代,例如:Asn117 用 Gln 取代,导致糖苷化受阻,tPA 的半寿期延长 3 倍;Gln42 为 Asn,His44 为 Glu,Asn 117 为 Gln 取代,它们在投药后 60 min,其血内浓度高于对照约 40 倍。又例如:tPA 的 296 与 302 氨基酸是 PAI 的结合位点,包含三个带正电的氨基酸,如果除去这些氨基酸,改造后的酶在体外被 PAI 抑制的反应速度常数下降 465 倍;同样,如果将它们换成带负电的氨基酸,那么这种抑制还可进一步降低,达 2 000 倍左右。定位突变也包括某些结构域的消去与取代,例如,移去  $K_1$ 区或 E 区,可使清除速度降低达 40 倍;另一方面,如果用  $K_2$ 代替上述两区,那么,改造后的酶活性将升高。

第二类办法是融合杂交,例如,作成 tPA/uPA 或 Pln/tPA 等各种类型的杂交体。不过已获得的杂交体,无论是酶活性或是酶的半寿期都未得到明显的改变。

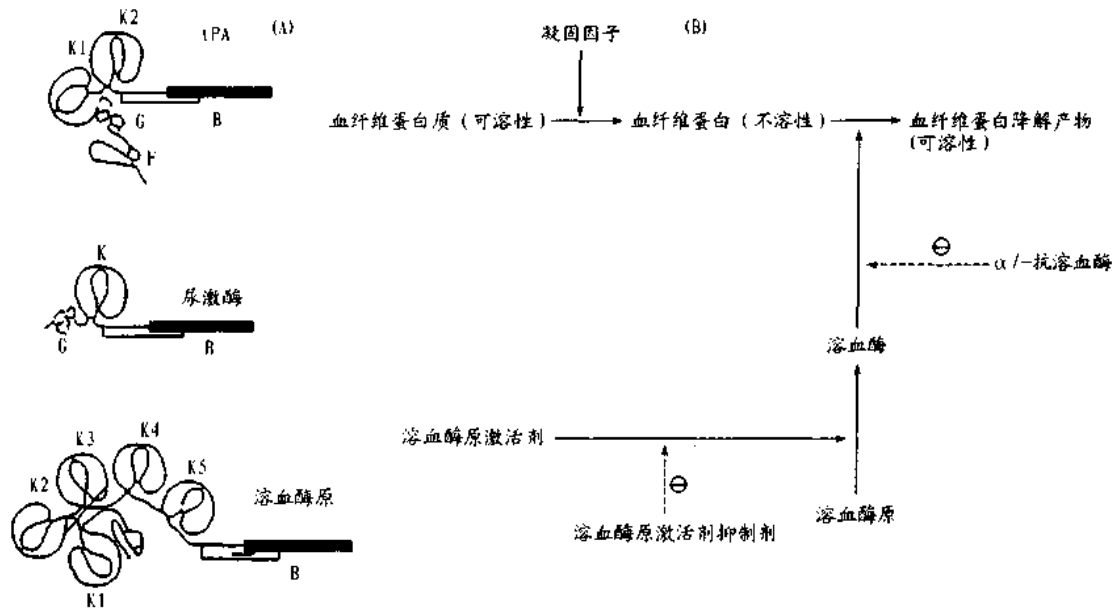


图 3.17 tPA、尿激酶、溶血酶原的结构(A)  
凝血与溶血因子的相互关系(B)

第三种办法是将专一于血纤维蛋白的抗体,或者同时专一于血纤维蛋白和 tPA 的抗体与 tPA 或 uPA-B(即 U-B)链融合,组成各种杂交体。例如,将抗 Fb 的单克隆抗体 5978 与 uPA-B 链融合,则表达产物对 Fb 有较高的亲和力,能显著减低系统活化,有较长的半寿期和较高的活性。实际上这也是一种结构域的定位取代。

## 第五节 酶的模拟<sup>(23)</sup>

所谓模拟酶(mimic enzyme)就是根据酶的作用原理,模拟酶的活性中心和催化机制,用化学合成方法制成的高效、高选择性、结构较简单、稳定性较高的新型催化剂,也称酶的合成类似物(synthetic enzyme)。

酶所以能催化底物进行高效转化,现在认为,是因为酶能和底物结合形成活性中间络合物,变分子间效应为分子内效应,通过邻近效应、定向效应,降低了反应系统的负熵;再通过诱导契合将基态底物转变为过渡态底物,同时通过共价催化、酸碱催化等机制,降低了反应活化能,才得以使底物进行转化。

酶所以能表现其高效、高专一的催化特性是因为它是蛋白质。作为高分子的蛋白质,它能够通过特定的构象将肽链中有关的氨基酸侧链基团组织在一起,形成具有高度选择性,并有利于降低反应系统负熵、降低反应活化能的活性结构,即所谓的活性中心。活性中心包括决定酶反应专一性的结合基团和直接参与催化的催化基团。因此在构建模拟酶时,一般都要以高分子化合物、高分子聚合物或络合了金属的高分子聚合物为母体,并在适宜的部位引入相应的疏水基,作成能容纳底物、适于和底物结合的口袋(pocket)与网兜(basket),同时

在适宜的位置引入担负催化功能的催化基团。

最简单的模拟酶无疑是利用现有的酶或蛋白质作为母体,在此基础上再引入相应的催化基团。例如,以木瓜蛋白酶为出发点,在它的 Cys - 25 上共价偶联溴酰黄素衍生物,结果形成的产物具有很高的氧化还原活性;又如,以肌红蛋白为母体,在它的 His - 上连接钌(II)氨络合物,结果产物也具有强的氧化活性,而且其催化效率为钌氨咪唑的 200 倍,比钌氨和去掉了血红素的肌红蛋白组成的络合物高 100 倍。显然,这些衍生物在某种意义上也可看作是酶的化学修饰产物。

其次,也可以参照酶的活性结构合成一些简单的小肽作为模拟酶。例如,有人合成了一个非天然的 34 肽,它与单链 DNA 有高的亲和性,其二聚体具有核糖核酸酶活力。

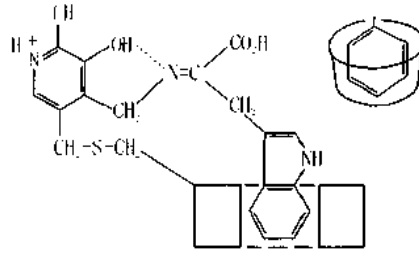


图 3.18 模拟酶示例

但更多的模拟酶是以合成高分子聚合物为母体的,例如,以相对分子质量 4 万~6 万的聚乙烯亚胺为母体,然后在其骨架氮上引入十二烷基作为结合基团,引入咪唑基作为催化基团,这样构建成的模拟酶和正常的酶一样,能与芳香硫酸酯形成酶-底物络合物,并能催化酯进行水解,它催化 2-羟-5-硝基苯硫酸酯水解的速度为游离咪唑基催化速度的 1 012 倍,比袋鼠肝脏来源的 A 型芳香硫酸酯酶还要快百倍以上。又例如,以环糊精为母体(图 3.18),利用它的疏水腔作为酶活性中心结合区,在模拟胰凝乳蛋白酶时,可在适当位点上引入羟基、羧基和咪唑基作成“电力接续系统”,这样获得的产物具有与天然酶相同数量级的催化活性,但有更高的 pH 和温度稳定性。

构建氧化酶的模拟酶时,可采用金属络合物或金属卟啉化合物,前者如三价铁离子与三乙烯四胺的络合物,它具有过氧化氢酶的活性水平,但结构比血红素简单。后者如 2,6-二氯苯基四卟啉锰络合物,它是模拟细胞色素 P450 的特点而设计的,在加入催化量的咪唑条件下,可催化烷烃环化和烯烃环氧化,环氧化效率可达 90% 以上;如果再引入极性“口袋”或“筐柄”结构,可使烯烃进行不对称环氧化,显示立体专一性。进一步修饰后还可改善其区域选择性和稳定性。

模拟酶的研究近年来虽取得了较大的进展,但是总的说来,现阶段得到的模拟酶无论在催化效率,还是在专一性上都较差,要达到应用水平尚需有一大的突破才行。

## 第六节 其他类型生物催化剂<sup>(24-29)</sup>

### 一、RNA 型的催化剂

自从 Cech 和 Altman 开创性的发现后,人们又相继观察到多种 RNA (如线粒体 RNA,

mRNA 等)的前体由 RNA 催化加工成熟。现在已知的 Ribozyme 可大致分为两种类型: 剪切 (trimming)型和剪接(splicing)型。前者又分为两类: 异体催化型,或称分子间(in trans)催化型,如 RNaseP 的 M1 RNA;自身催化型,或称分子内(in cis)催化型,如植物类病毒,拟病毒 RNA 和卫星 RNA。后者又分为 I 型和 II 型: I 型,如四膜虫 28S rRNA 的前体中 IVS, I 型 IVS 中包含有约 70 个核苷酸组成的核心结构,它的催化需要鸟苷参与,通过鸟苷的 3' - 羟基作为亲核试剂攻击 5' - 的剪接点;II 型包括参与核 mRNA 前体加工的 RNA,它不需要鸟苷参与,而以 IVS 中腺苷酸的 2' - 羟基作为亲核试剂攻击 5' - 的剪接点,形成套缢状 RNA (lariat RNA) 产物。它们的催化方式如图 3.19。

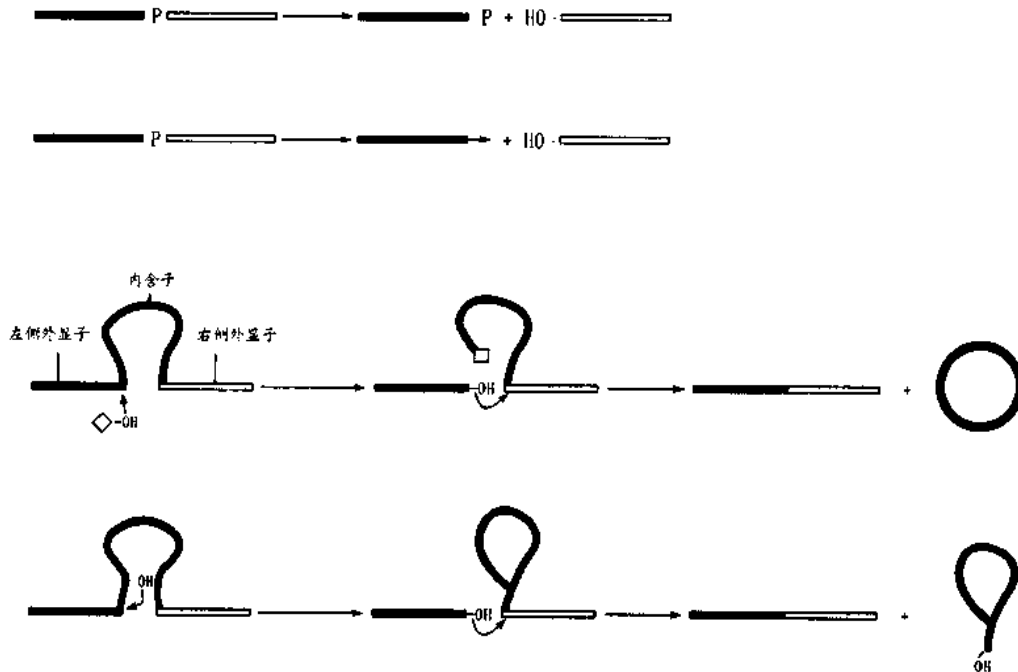


图 3.19 RNA 催化的各种 RNA 转录后加工

从已有资料看,自身催化剪切型 Ribozyme 似乎最有应用前景,因为对它的剪切机制和分子结构要求已经有所了解,从而可以针对病毒核酸、不良基因或恶性基因人工设计、合成相应的各种 RNA 或 DNA 片段作为 Ribozyme 或 Ribozyme 基因,定向(位)地剪切病毒核酸或不良基因以及它们的转录中间产物,抑制它们的表达,进行疾病治疗。

Ribozyme 需要有特定的二级结构才能表现其催化活性,对于那些催化自身剪切的 Ribozyme 来说,有两种模型可用来描写这种结构要求:一是由 Symons 等提出的“锤头状模型 (hammer-head model)”;另一是 Hample 等提出的“发夹模型 (hairpin model)”。按锤头状模型,其催化的主体部分包括三个配对的茎区 (stem) 和 11~13 个高度保守的核苷酸序列,具有这种结构的 RNA,其靶链中的 NUX 的磷酸二酯键特别脆弱,易分解,其中, N 可以是 A, C, G, U 中的任何一种, X 可以是 A, C, U, 但不能是 G;这个主体部分的两侧为可与底物互补的核苷酸序列,它们的作用是将催化结构导入相应的靶部位。Symons, Uhlenback 等人先后在各自的实验室合成了多种核苷酸片段,它们可以分别作为 Ribozyme 的主体结构和相应的底物结构部分。图 3.20(B) 列举了各种锤头状结构设计,其中, Haseloff 和 Gerlach 的设计特

别有应用价值(c),(d),在他们设计合成的核苷酸片段里包含了 Symons 模型的全部主体结构,而对立的底物结构部分,即 NUX 的靶序列,可以分离存在。

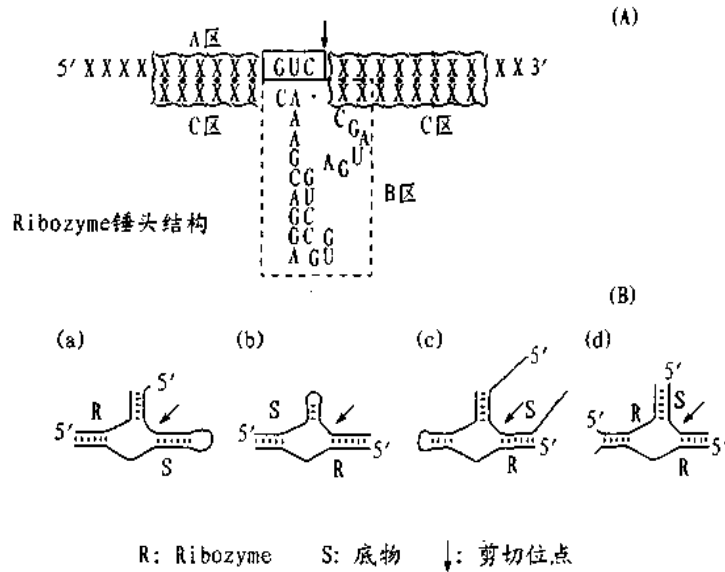


图 3.20 锤头状模型(A)及各种设计(B)

根据锤头模型,Haseloff & Gerlach 以氯霉素乙酰基转移酶(CAT) mRNA 为对象,设计的 Ribozyme 可在体外切割 CAT 基因的转录产物。其他实验室也针对 HIV - gag 基因和 5' - LTR 分别设计了相应的 Ribozyme,表明它们都能在体外接近生理条件下切割目标 RNA。也有人针对 HIV - I RNA tat 基因及 tat - rev (TR) 基因设计了相应的 Ribozyme,然后克隆入人 T-淋巴细胞后,使 HIV 感染后的发病时间至少推迟了 10 天。

发夹模型是根据能量计算和碱基取代实验提出的,它认为主体结构应包含四个配对的茎区和一个环状结构。切割催化部位的核苷酸序列为 5'AGAA3',位于环区,对应的底物具有 5'GUC3'序列,也位于环区,切割发生在 GUC5' 端。因此,Hample 曾针对 HIV - I 及 TMV 等的 RNA 片段设计了相应的 Ribozyme,同样,表明能切割各自的目标 RNA。

Ribozyme,如同 DNA 限制性内切核酸酶(restriction endonucleases)一样,可应用于 RNA 重组、RNA 图谱分析等工作中,因而也将大大地推动分子生物学研究的发展;也可以通过控制基因表达,定向(位)地切割不良基因、异常基因和病毒基因等的转录产物,从基因水平上控制和治疗遗传病、病毒病乃至癌症,在生物医学、生物工程学中发挥重要作用。为此,澳大利亚和法国决定联合开展这类“基因剪”的研究,Cech 等也因此于 1991 年获得了 Ribozyme 的专利权,现美国生化公司已有商业用的 Ribozyme 产品。

Ribozyme 的应用前景十分广阔、诱人,但也存在一些问题有待解决:一是切割效率较低,Ribozyme 水解 RNA 的速度为每分钟 2 次,为了获得更高效的 Ribozyme,现在的办法是采用“RNA 分子进化技术(molecular evolution technique)”进行离体筛选(selection in vitro)。这种技术就是在进行 Ribozyme 合成时,对估计起重要功能的位点或片段,用两种、三种、或四种混合核苷酸替代原来的单种核苷酸,然后通过引物延伸、转录、转录产物分离、反转录、克隆、再转录,最后筛选出活性最高的 Ribozyme。

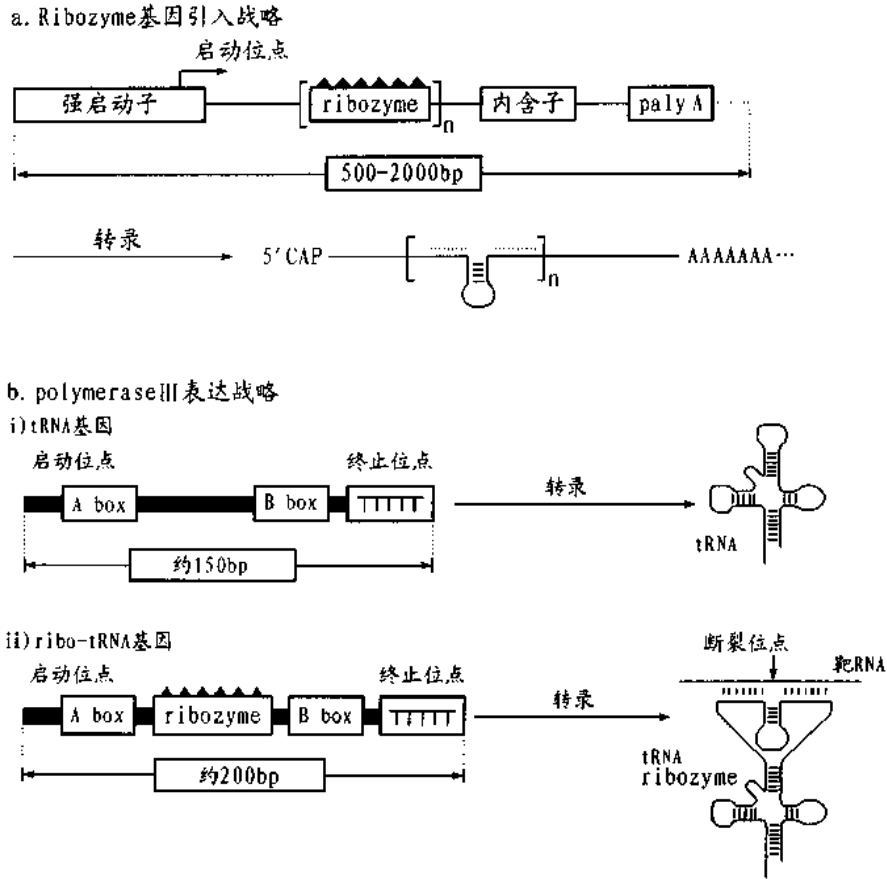


图 3.21 Ribozyme 表达战略

第二个问题是如何引入体内,一般有两种办法:一是在体外合成 Ribozyme 分子,然后导入体内。其中 Ribozyme 可通过噬菌体 RNA 聚合酶从模板 DNA 转录得到,也可化学合成。关于导入细胞,可通过 DOTMA 阳离子脂质体介导转染,也可通过电穿孔、微注射、磷酸钙沉淀以及核酸直接注射等完成。这些方法存在的问题是:外源的 Ribozyme 仅能发挥短期效应,因为导入的 Ribozyme 很快就会被降解。另一种办法是体外构建一个编码 Ribozyme 的基因,导入体内后,或通过聚合酶 I 系统,或通过聚合酶 III 系统转录形成(图 3.21)。在前一种情况下要求基因较大,1 000 ~ 5 000 bp,一个基因可得到 20 ~ 30 个 Ribozyme;后一种情况基因较小,低于 200 bp。这种办法的优点是:Ribozyme 基因可遗传至子代细胞,一个 Ribozyme 基因可产生大量的 Ribozyme,因而效应是长久的。

第三个问题是 Ribozyme 的稳定性,由于 Ribozyme 较小,在体内很易被核酸酶非专一性降解。对此,有两种可采用办法:一是用修饰了的磷酸构建核酸链,如用甲基磷酸、硫代磷酸,二是用  $\alpha$ -核糖替代天然的  $\beta$ -核糖。

RNA 型催化剂(Ribozyme)的发现,突破了酶是唯一的生物催化剂的传统概念;此后,人们又开发了另一类生物催化剂,即催化性的(单克隆)抗体(catalytic monoclonal antibody, cat(M)AB),亦称抗体酶(abzyme)。

## 二、抗体酶

抗体由两条轻(L)链和两条重链(H)组成。通过蛋白酶水解为抗原结合片段(anti - gen binding fragment, Fab)与可结晶片段(crystallizable fragment, Fc);抗原的结合位点位于 H 和 L 链的 N-端的可变区(variable region, V), 后者约由 110 个氨基酸构成;其中 H 链又包含 4 个超变区段,L 链包含 3 个超变区段。可变区的多样性加上不同 H 链与 L 链的组合就可产生  $10^8$  以上种抗体分子,也就是说能识别、结合  $10^8$  种以上的抗原分子,从而构成了生物学和医学上的数量最庞大的、最重要的一类受体。事实上,生物机体对各种物质,诸如核酸、蛋白质、多糖等天然大分子,甾体、前列腺素等天然生理活性物质,苯胺等人工合成的小分子,都能形成相应的抗体。但是,由于抗体来源不同,即产生抗体的细胞的多样性,使获得的抗体制剂往往不均一,这样就给抗体研究的进一步深入带来了困难。杂交瘤技术的开发,单克隆抗体的制备,解决了这一问题,从而大大地推动了分子免疫学的发展,使人们有可能大量地获得均一的高亲和力抗体,同时也为抗体酶的研究提供了可能。

按照现代酶学理论,酶首先要和底物结合,使底物向过渡态转化,然后再在催化基团的作用下促进底物进行反应。免疫反应和酶反应十分相似,抗体也能专一地、高亲和力地和抗原物质(和底物等统称配体)结合,然后再促使抗原发生各种变化。现在,如果能适当地改变抗体与抗原结合部位的微环境,并在适当的部位引入相应的催化基团,那么就有可能使抗体变为具有催化性能的抗体酶了。

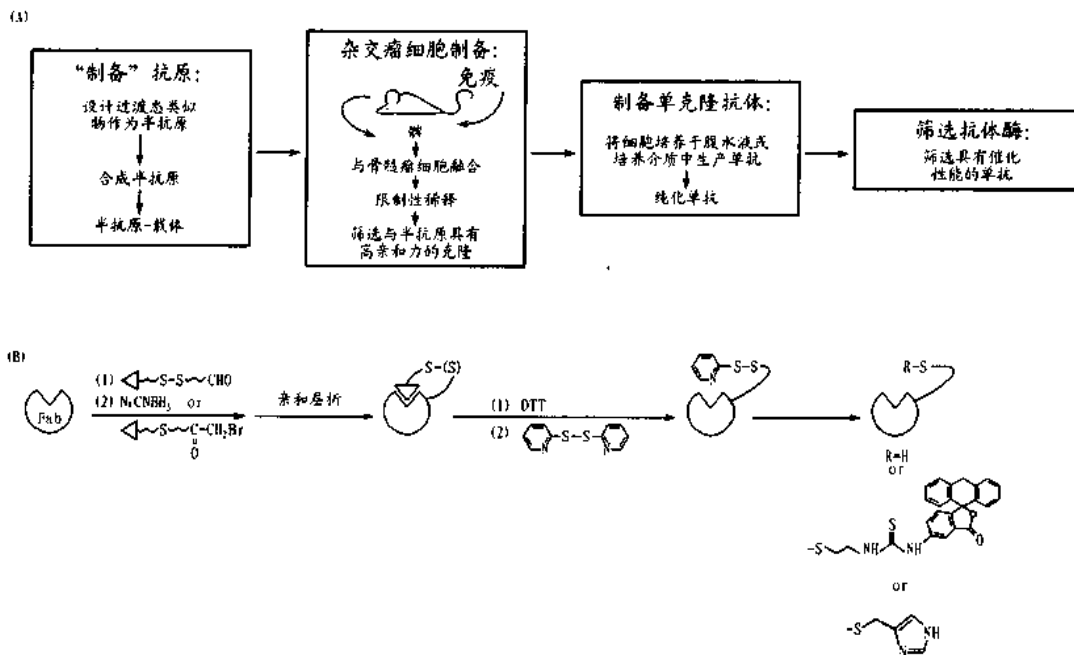


图 3.22 半抗原诱导抗体酶生成(A)  
化学法在抗原结合部位导入催化基团(B)

为了获得抗体酶有两条可供选择的途径:一是采用过渡态的底物类似物(transition state analogue)诱导。如图 3.22(A)所示,先设计和制备过渡态的底物类似物,以它作为半抗原(hapten),再和载体蛋白质一起免疫动物,然后分出脾细胞,进而和骨髓瘤细胞融合,选出对



半抗原具有高亲和力的克隆,使之在培养介质中生长扩增,最后选择、纯化产生的具有催化活性的单克隆抗体。此法的关键是要设计和获得适当的过渡态底物类似物作为半抗原。另一途径则是在现有的抗体基础上,通过化学修饰的办法或通过蛋白质工程的办法向其配体结合部位导入催化基团。图 3.22(B)是化学法导入催化基团的步骤,包括:① 将半抗原和一定链长的、一端为醛基(-CHO)的二硫化合物连接;② 将形成的络合物与专一于半抗原的抗体进行亲和反应,半抗原将和抗原结合部位结合,而-CHO 将和适当位点的氨基反应;③ 用连有催化基团(如咪唑基)的二硫化合物取代半抗原。

催化性单克隆抗体的研制是今日免疫学和酶化学研究的一个热点,因为它的研制成功可能为分子生物学和生物化学提供有力的研究工具,在医学上为新型药物的合成,在工业上为催化非天然产物的转化提供新的有效催化剂。

和从天然酶衍生出了修饰酶(modified enzyme)与模拟酶一样,从上述两类新型的生物催化剂也开发出了相应的具有催化活性的核苷酸与蛋白质衍生物,它们同样可在基础理论研究和生产实践中发挥重要作用。

### 三、寡核苷酸引导的人工内切核酸酶

寡核苷酸引导的人工内切核酸酶(oligonucleotide directed article endonuclease),或者说反义核酸引导的内切核酸酶(antisense RNA directed endonuclease)是从 Ribozyme 衍生出来的一类新型催化剂,也称“杂交酶(hybride enzyme)”。

这种人工内切核酸酶由两部分组成(图 3.23):一是互补于靶核酸链的寡核苷酸链,通过它,该“酶”被引至靶部位;一是与寡核苷酸链 5'端连接的断裂因子(cleaving reagent)。寡核苷酸链可以是 RNA 链,可以是 DNA 链,也可以是能专一地和核酸结合的蛋白质,如阻遏蛋白。靶核酸可以是 RNA,也可以是单链或双链的 DNA。为了使寡核苷酸链或蛋白质能和靶核酸链形成稳定的络合物,通常在它们的 3'端还可偶联一个嵌合因子。断裂因子或者是金属螯合物(metal chelate),如 Fe-EDTA、Ca-二氮杂菲络合物,它们的作用主要是对脱氧核糖的 C<sub>1'</sub>或/和 C<sub>4'</sub>进行氧化攻击,导致磷酸二酯键断裂;或者是光活性基团,如卟啉化合物、叠氮苯甲酰化合物、核黄素衍生物等,在 UV 或可见光处理后能与靶部位发生交联,后者在吡啶存在情况下会发生断裂;当然,也可以是核酸酶如 RNase 与 DNase。

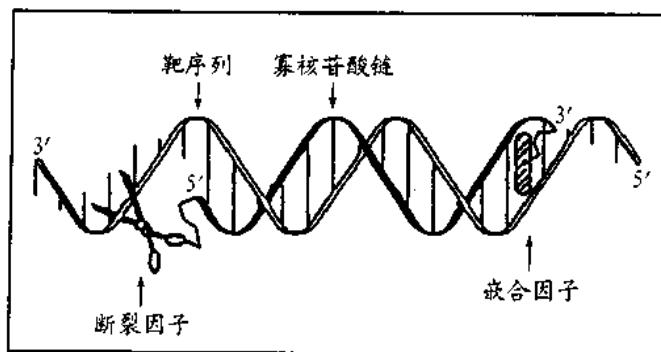


图 3.23 人工内切核酸酶结构示意图

和 Ribozyme 一样,寡核苷酸或蛋白质引导的人工内切核酸酶也存在着活性、导入和稳定性的问题,还有一个作用专一性的问题,因为断裂因子会发生摆动,所以得到的产物不是

单一谱带。但尽管如此,随着这些问题的解决,它的应用前景将是十分广阔的。

## 参 考 文 献

### 一、酶的发酵生产

- (1) Wolfgang Gerhartz. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Weinheim: VCH, 1990
- (2) Babu RR, Satynaragana T. *J. Sci. Ind. Res.*, 1996, **55**(5-6):464
- (3) Penstein AS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1996, **792**:91
- (4) Daugulis AJ. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1994, **5**(2):192
- (5) Soheper TH, Lammers F. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1994, **5**(2):187

### 二、提高酶发酵产量的方法

- (6) Chaplin MF, Bucke C. *Enzyme Technology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992
- (7) Eun HM. *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*. San Diego: Academic Press, 1996
- (8) Mildvan AS, Weber DJ & Kuliopulas A. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **294**(2):327
- (9) 刘启光, 吴冥. *生物化学与生物物理学进展*, 1989, **16**(6):425
- (10) Sassenfeld HM. *Trends Biotechnol.*, 1990, **8**:88
- (11) Sherwood R. *Trends Biotechnol.*, 1991, **9**:1
- (12) Summers D K. *TIBTECH.*, 1991, **9**:273
- (13) Bulow L, Moshach K. *TIBTECH.*, 1991, **9**:226
- (14) Olsen O, Borisas R & Simon O. *Mol. Gen. Genet.*, 1991, **225**:177
- (15) Thomas WM. *Biochemistry*, 1991, **30**:7 601
- (16) Ratten SS. *TIBTECH.*, 1990, **8**:275

### 三、动植物原料和细胞培养

- (17) Spier RE. *Adv. Biochem. Eng.*, 1990, **14**:119
- (18) Yabusaki Y. *Biochimie*, 1995, **77**(7-8):594

### 四、酶的改造

- (19) Eyzaguirr J. *Biol. Res.*, 1996, **29**(1):1
- (20) Soler G, Blanco RM, Fernandez - Lafuente R et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1995, **750**:  
2 349
- (21) Mereno - Hagelsieb G, Soberon X. *Biol. Res.*, 1996, **29**(1):27
- (22) Mendel D, Comish VW & Schultz PG. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1995, **24**:  
433

## 五、酶的模拟

(23) Okamoto M. *J. Biotechnol.* 1992, **24**(1):109

## 六、其他类型的生物催化剂

(24) Chen Z, Sosa MG, Yamatten ES et al. *Gene*, 1994, **194**:33

(25) Breaker RR, Joyce GF. *TIBTECH.*, 1994, **12**:268

(26) Castanotto D, Rossi JJ & Sarver N. *Adv. Pharmacol.*, 1994, **25**:289

(27) 平竹润, 小田顺一. *化学と生物*, 1993, **31**(9):613

(28) Helence G. *TIBTECH.*, 1989, **7**:310

(29) Haner R, Hall J. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1997, **7**(4):423

## 第四章 酶的分离纯化与制剂

1926年 Sumner 制备了第一个结晶酶,自此以后,酶的分离纯化工作进展很快,到现在已有数以百计的酶制成了结晶,相当数量的酶达到了高度纯净,并根据酶的作用特点、物理化学性质等发展了各种类型的分离纯化方法、试剂和设备。但是,由于酶和它的来源不同,也由于与之共存的高分子物质的复杂多样,因此要使一种酶达到高度纯净,往往需要多种方法协同发挥作用才有可能。

### 第一节 酶分离纯化工作的基本原则<sup>(1)</sup>

酶分离纯化的最终目的就是要获得高度纯净的酶制剂,整个工作包括三个基本环节:抽提(extraction)、纯化(purification)和制剂(preparation)。抽提是要将酶从原料中抽提出来作成酶溶液;纯化则是要将酶和杂质分离开来,或者选择地将酶从包含杂质的溶液中分离出来,或者选择地将杂质从酶溶液中移除出去;制剂则是要将纯化的酶作成一定形式的制剂。

为了能够成功地进行酶的分离纯化,应注意以下问题。

#### 1. 防止酶变性失效(denaturation - deactivation)

防止酶的变性失效是酶的分离纯化工作中非常重要的问题,这一点在纯化的后期尤为突出。一般地说,凡是用以预防蛋白质变性失效的方法与措施都应考虑用于酶的分离纯化工作。包括:

(1) 除了少数例外,所有操作都必须在低温条件下进行,特别是在有机溶剂存在的情况下更应小心;

(2) 大多数酶在  $\text{pH} < 4$  或  $\text{pH} > 10$  的情况下不稳定,应控制整个系统不要过酸、过碱同时要避免在调整  $\text{pH}$  时产生局部酸碱过量;

(3) 酶和其他蛋白一样,常易在溶液表面或界面处形成薄膜而变性,故操作时要尽量减少泡沫形成;

(4) 重金属等能引起酶失效,有机溶剂能使酶变性,微生物污染以及蛋白水解酶的存在都能使酶分解破坏,所有这些必须高度重视。

#### 2. 选择有效的纯化方法

理论上,凡用于蛋白质分离纯化的一切方法都同样适用于酶,但实际上,对于酶的分离纯化来说,它还有更大的选择余地。因为:

(1) 酶纯化的最终目的是要将酶以外的一切杂质(包括其他酶)尽可能地除去,因而,容许在不破坏待纯化的“目的酶”的限度内,使用各种“激烈”手段。

(2) 由于酶和它作用的底物、它的抑制剂等具有高的亲和性,因此可应用各种亲和分离

法；而且，当这些物质存在时，酶的理化性质和稳定性往往会发生一些有利的变化，这样又扩大了纯化方法与纯化条件的选择范围。

### 3. 酶活性测定贯穿纯化过程的始终

酶活性测定应贯穿于整个纯化过程的始终。酶具有催化活性，通过检测酶活性可以跟踪酶的来龙去脉，为酶的抽提、纯化以及制剂过程中选择适当的方法与条件提供直接的依据。也就是说，从原料开始，整个过程中每一步都要进行比活力与总活力的检测与比较，这样，我们就能知道在某一步骤中可采用些什么方法与什么条件，它们分别使酶的纯度提高了多少，回收了多少酶，从而决定其取舍。

## 第二节 酶的抽提<sup>(2-4)</sup>

抽提的要求是要将尽可能多的酶、尽量少的杂质从原料引入溶液。抽提包括以下环节。

### 一、预处理和破细胞

在着手酶的提取前，通常应先对酶的原料进行适当的预处理(pretreatment)，例如：动物材料要先剔除结缔组织、脂肪组织；油质种子最好先用乙醚等脱脂；种子研磨前应去壳，以免丹宁等物质着色污染；对于微生物材料则应将菌体和发酵介质加以分离。而且在这些预处理后，尽可能以非常新鲜的状态直接应用，否则，应将完整材料立即冰冻保存。

酶，根据它的分布可分为细胞内酶(intracellular enzyme)和细胞外酶(extracellular enzyme)。细胞外酶在合成以后就直接分泌到介质中，因而没有破细胞问题；而细胞内酶却只有在细胞破裂后才能释放出来，而且抽提效果往往和酶在细胞内的分布位置、存在状态以及细胞破碎的程度有关。“周质酶”(periplasmic enzyme)通常只需将外层细胞壁或膜破坏后就可释放；“膜结合酶”(membrane-binding enzyme)则往往还有一个切断酶与颗粒体或膜的连结问题；有些情况下，蛋白质或酶在合成以后，以无活性的状态作为“包含体”(inclusion body)形式积累，在分出包含体后还有一个蛋白质复性的问题。

破细胞(cell disruption)，动、植物材料通常用绞肉机作成组织糜，如果需要破碎得更彻底些，可用高速组织捣碎器(Waring blender)捣碎，或者加砂研磨。高速捣碎器操作简便、破碎效果高，但易引起局部温度过高，导致酶失效，故必须考虑酶的特点谨慎使用。加砂研磨，特别是用玻璃粉或氧化铝代替砂时，要注意有时也可能发生吸附变性。在上述机械处理后，为了有利于下一步抽提，可进一步作成丙酮干粉，或者进行反复冰冻溶解处理。量少时，某些组织还可采取匀浆器(homogenizer)将细胞研磨破碎得更细更彻底。

“丙酮干粉”(acetone powder)处理法也适用于微生物材料，一般程序是先将材料粉碎、分散，然后在0℃以下的低温条件下，加入5~10倍预先冷至约-20℃的丙酮，迅速搅拌均匀，随即过滤，最后低温干燥，研磨过筛。丙酮处理一方面能有效地破坏细胞壁(膜)，另一方面由于丙酮是有机溶剂，这种处理也有利于除去大量脂类物质，以免它在以后的步骤产生干扰，同时这种处理还能使某些膜结合酶易于溶解。此外，丙酮干粉含水量低，便于保存。但是应注意的是丙酮可能引起某些酶变性失效，有些酶则根本不能采用此法。

微生物，由于种类不同，来源不同，处理的方法与难易程度也有些差异。霉菌通常比较

容易对付,通过机械剪切、研磨或者加细胞壁溶解酶就能解决。对于细菌,少量的材料可用超声波破碎器和溶菌酶等处理,大量材料可用丙酮干粉法,或用自溶法(*autolysis*)。所谓自溶,就是将浓的菌体悬液在适宜的温度与 pH 条件下直接保温,或加甲苯、乙酸乙酯以及其他溶剂一起保温一定时间,让菌体自溶液化。此法有人认为不是好方法,理由是:第一,自溶液中成分十分复杂;第二,有破坏目的酶的危险。在工业生产中,细菌材料还可以用细菌磨或挤榨器等处理。至于酵母细胞,由于其壁厚较难对付,过去多用自溶法,后来采用的办法有:① 细胞壁溶解酶处理法;② 稀盐溶液振荡法;③ 冷热破壁法。

## 二、抽提

细胞破碎后,可采用两种方式进行抽提:一是“普遍”抽提;二是选择性抽提,即先后用不同溶剂进行选择性的抽提。例如,用不同浓度的乙醇选择性抽提肝匀浆中的酶。如果目的酶集中于细胞器或包含体,则可先通过差别离心将这些颗粒体从细胞匀浆中分离出来,然后再将酶从细胞器中抽提出来,或将酶复性释放出来。

由于大多数酶属于球蛋白类,一般都溶于稀盐、稀酸或稀碱的水溶液。但抽提液的具体组成和抽提条件的选择则取决于酶的溶解性、稳定性以及如何最有利于切断酶和其他物质的联系。

### 1. pH

首先应考虑的是酶的酸碱稳定性,选择的 pH 不能超出酶的稳定范围。其次,从最佳的抽提效果而言,选择的 pH 最好远离目的酶的等电点。也就是说,酶如果是酸性蛋白质,则宜用碱性溶液抽提,反之,碱性蛋白质宜用酸性溶液。例如,从肌肉中抽提甘油醛-3-磷酸脱氢酶,以稀碱溶液效果最好,产量较高;胰蛋白酶的抽提,通常选用 0.125 mol/L 的硫酸,这是因为除了考虑到酶的稳定性、溶解性外,这种抽提条件下溶入的杂质也较少。最后,考虑到有利于切断酶和细胞内其他成分间可能有的联系,通常以选用 pH4~6 为佳。

### 2. 盐

大多数蛋白质在低浓度的盐溶液中有较大的溶解度,所以,抽提液一般采用等渗盐溶液,最普通的有 0.020~0.050 mol/L 的磷酸缓冲液,0.15 mol/L NaCl 溶液等。焦磷酸钠溶液和柠檬酸钠缓冲液,由于有助于切断酶和其他物质的联系,并有螯合某些金属的作用,因此用得也很多。某些报道表明,少数情况下,如抽提霉菌脂肪酶,用水的效果亦佳,这可能与低渗可破坏细胞结构有关。

### 3. 温度

通常,抽提温度多控制在 0℃~4℃ 左右。如果待纯化的酶比较稳定,则可以例外。例如,胃蛋白酶就可在 37℃ 条件下保温抽提。

### 4. 其他

在破细胞时,某些亚细胞结构也往往受到损伤,这样就可能给抽提系统带来各种不稳定因素。因此,有时在抽提液中还需要加入某些物质。例如,为防止蛋白酶的破坏性水解作用

可加入苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 为防止氧化等因素的影响可加入半胱氨酸、DTT(dithiothreitol)以及惰性蛋白和底物等。

概言之,在细胞壁(膜)破碎以后,溶酶(“浆质酶”, lyoenzyme)一般不难抽提;至于膜结合酶(也称“结酶”, desmoenzyme),其中有的结合不太紧密,在颗粒体结构受损时就能释放出来,抽提也不难,例如: $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶、延胡索酸酶等可用缓冲液抽提;细胞色素 c 可用 0.145 mol/L 的三氯醋酸抽提。但是,也有些和颗粒体结合得十分紧密的酶,它们常以脂蛋白络合物形式存在。这些酶中有的在做成丙酮粉末以后就可抽出,有的则需要使用较强烈的手段,用正丁醇等处理。正丁醇的特点是兼具高度的亲水性和亲脂性(特别是磷脂),能破坏酶与脂蛋白间的连结使酶进入溶液,我国生物化学家邹承鲁教授等很早就曾用此法抽提并研究了琥珀酸脱氢酶。近年来广泛采用的还有各种表面活性剂和去污剂,如胆酸盐、Triton、Tween、Teepol 等,它们常用于抽提呼吸链系统的酶系。此外,还可使用促溶试剂,如过氯酸等。最后,也有些情况需使用脂肪酶、核酸酶、蛋白酶等处理后才能使酶释放出来。

抽提液的用量通常为原料量的 1~5 倍,有时为了提高抽提效果,要进行反复抽提,这样,液量就可能大些。

抽提后的细胞残渣或发酵液的固体成分一般可用离心法或压滤法除去,植物原料的抽提液在冷室中放置过夜往往就会自动澄清。某些情况下,在进行抽提液离心前,加入氢氧化铝凝胶或磷酸钙胶等物质,常有助于除去悬浮的胶体物质。近年来为了使分离纯化工作简化,开发了一种将抽提液的分离和相继的纯化步骤结合在一起的技术,称为“扩展床吸附层析”(expanded bed adsorption chromatography)。通过这一技术人们可以直接从含有颗粒体的物料,如发酵液、细胞破碎液中截获所需要的蛋白质或酶,移去颗粒成分,从而免除了离心、过滤,甚至浓缩等繁复的下游(downstream)步骤。这种技术从原理上言实际上就是一种“流动”(fluidization)吸附分离。但是,它需要采用特殊的吸附剂和专门设计的柱装置,商品称为“STREAMLINE”。在这一系统的操作过程中吸附剂始终处于悬浮状态,物料流输入扩展床后,推动吸附颗粒向上,没有回流,靶蛋白被吸附,而细胞碎片、细小颗粒和其他杂质则无阻滞地流出;吸附完成后,被吸附的靶蛋白可再反向洗出。

### 三、浓缩

抽提液和发酵液中酶的浓度一般都很低,所以在进行纯化前往往须先加以浓缩(concentration),这样一方面可使每一步的回收率升高,同时,酶和蛋白质在浓溶液中的稳定性也往往较高。常用的浓缩的方法有以下几种。

#### 1. 蒸发

一般的减压蒸发浓缩除了效率低、费时外,有时还要加热,并且可能产生泡沫,易使蛋白质变性失效,因此,不能用于稳定性较差的酶。同时,蒸发过程还可能出现增色现象,影响产品的质量。

过去实验室中也采用超蒸发浓缩法,即让暖空气流通过冷的酶溶液表面,或让暖空气流通过装有酶液的透析袋使之加速蒸发,但此法效率不佳。

工业生产上现在应用较多的是薄膜蒸发浓缩,即将待浓缩的酶溶液在高度真空条件下变成极薄的液膜,并使之与大面积热空气接触,让其中的水分瞬时蒸发而达到浓缩的目的。

由于水分蒸发时能带走部分热量,所以,只要真空条件好,酶在浓缩过程中实际受到的热作用不强,因而可用于热敏性酶类的浓缩。薄膜蒸发浓缩器有三种形式:升膜、降膜和刮板。对于较粘稠的样品,后一种形式似乎更为适合,不过薄膜浓缩常会带来增色现象。

#### 2. 超过滤(ultrafiltration)

这是在加压情况下,将待浓缩液通过一层只容许水分子和小分子选择性透过的微孔超滤膜,而将酶等大分子被滞留,从而达到浓缩目的的一种技术。这种方法的优点是:没有热破坏;没有相变化;保持原来的离子强度和 pH;如果膜选择适当,浓缩过程还可能同时进行粗分,成本也不高,故为人们所乐用。超过滤可用于小量样品,也可用于工业生产规模,现在已有各种超过滤装置可供选择。

#### 3. 胶过滤(gel filtration)

这是利用葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 或 G-50 等能吸水膨润,而酶等大分子被排阻于胶外的原理进行的一种浓缩。通常采用“静态”方式,应用这种方法时,可将干胶直接加入样品溶液,胶吸水膨润一定时间后,再借助过滤或离心等办法分出浓缩的酶溶液。胶过滤浓缩法的优点是:条件温和,操作简便,也没有 pH 与离子强度等的改变。

#### 4. 反复冻融(freeze-thawing)

此法的原理是溶液相对纯水,会发生融点升高、冰点降低的现象。实施时可采用两种方式进行:一是先将溶液冻成冰块,然后使之缓缓溶解,这样,几乎不含蛋白质和酶的冰块就将浮于液面,而酶等则融解并集中于下层溶液(至原体积的四分之一左右);另一种则是先让酶溶液缓缓冻凝,尔后再移去形成的冰块。冻融浓缩的主要问题是,浓缩过程可能会发生离子强度与 pH 的变化,从而导致酶失效,其次是需要大功率的致冷设备。

#### 5. 其他

如聚乙二醇浓缩法等,它们一般只能用于小量样品,而且成本很高。

### 第三节 酶的纯化原理与方法<sup>(5-15)</sup>

在抽提液中,除了目的酶以外,通常不可避免地杂有其他小分子和大分子物质。其中,小分子杂质在相继的纯化步骤中一般会自然地除去,因此比较容易解决;大分子物质包括核酸、粘多糖和其他蛋白质。核酸和粘多糖往往会干扰以后的纯化,特别是细菌等的抽提液中常含有大量核酸,最好预先除去。核酸可加硫酸链酶素、聚乙烯亚胺、鱼精蛋白或  $MnCl_2$  等使之沉淀移去,必要时也可使用核酸酶。粘多糖则常用醋酸铅、乙醇、丹宁酸和离子型表面活性剂等处理解决,有时也可用酶。这些杂质移除后,余下来的就是杂蛋白。纯化的主要工作,同时也是比较困难的工作,就是要将酶从杂蛋白中分离出来。

酶与杂蛋白的分离,可参照已有的方法,也可另外设计和建立新的工艺流程。但为了获得较理想的分离效果应注意以下问题:

(1) 工作前应对所要纯化的酶的理化性质如溶解度、分子大小、电学解离性质和酶的稳



定性等有一个较全面的了解,这样,就可以知道应选择哪些方法与条件,而应避免哪些处理,以及在什么情况下酶比杂蛋白更稳定而能加以利用。

(2) 判断选择的方法与条件是否适当,始终应以活力测定为准则。一个好的步骤应该是比活力(纯度)提高大、总活力回收高,而且重现性好。一般地说,纯化过程中不宜重复相同的步骤和条件,因为这样只能使酶的总活力下降,而不能使酶的纯度进一步上升。

(3) 要严格控制操作条件,这样,一方面可保证高的重复率,另一方面又可防止酶的变性失效,特别是随着酶逐渐纯净、杂蛋白逐渐移除、溶液中的蛋白浓度逐渐下降,蛋白质间的相互保护作用随之减小,酶的稳定性也因之降低,这一点尤为重要。

现有纯化方法都是以酶与杂蛋白在理化性质、稳定性上的差异以及酶的生物特性为依据而建立起来的,包括:

(1) 根据溶解度的不同,有盐析法、有机溶剂沉淀法、共沉淀法及选择性沉淀法等。

(2) 根据分子大小的差别,有胶过滤(层析)法、超过滤法及超离心法等。

(3) 根据电学、解离性质,有吸附(层析)法、离子交换层析法、电泳法以及集层析与电泳之长的聚焦层析法等。

(4) 基于酶和底物、辅助因子以及抑制剂间具有专一的亲和作用特点而建立的各种亲和分离法等。

(5) 利用稳定性差异而建立的选择性热变性法、酸碱变性法和表面变性法。

值得提到的是,在这些方法中往往同时有两种或多种因素在起作用。

## 一、根据溶解度不同进行的纯化

### 1. 盐析法

盐析法是古老的,但也是目前仍广泛采用的方法。

盐析法根据的原理是:球蛋白类在低盐浓度的溶液中,溶解度随盐离子强度升高而增大,表现“盐溶(salting in)”特性。但是当盐浓度继续升高,并超过某一上限时,其溶解度又会先后以不同速度下降,分别“盐析(salting out)”沉淀析出。盐析纯化法就是根据酶和杂蛋白在高盐浓度的溶液中溶解度差别而建立的一种纯化方法。

在盐析条件下,蛋白质的溶解度与溶液的离子强度间有如下的关系:

$$\log S = \beta - K_{so} \cdot I^{①} \quad 4.1$$

$S$  为蛋白质的溶解度;  $I$  为溶液的离子强度;  $\beta$  为蛋白质在纯水( $I=0$ )中溶解度  $S$  的(外推)对数值,它取决于蛋白质的种类,也与溶液的温度和 pH 值有关;  $K_{so}$  称为盐析常数,主要由蛋白质的性质与盐的种类决定。

为了获得较好的盐析效果,应控制下述因素。

(1) pH: 控制盐析 pH 可以提高纯化效果,如甘油醛-3-磷酸脱氢酶在某一盐浓度下可通过改变 pH 而达到纯化。但一般来说, pH 可选择的范围不大。大多数情况,盐析的 pH 直接接近待纯酶的等电点。有些情况,酶和杂蛋白能形成某种结合,从而干扰盐析分离。此时如控制  $\text{pH} < 5$  或  $\text{pH} > 6$ , 使它们带相同电荷可以减少络合物形成,这样盐析效果常会有些改

① 离子强度有两种表示方法:  $I = 1/2 \sum Z^2 \cdot C$  或  $\mu = 1/2 \sum Z^2 \cdot C'$ ,  $Z$  为离子的价数,  $C$  为摩尔浓度(mol/L),  $C'$  为质量摩尔浓度(mol/kg); 在 1 mol 以下,  $\mu = I$ 。

善,但应注意在这种条件下酶的稳定性与盐的溶解度。

(2) 盐:在纯化的最初阶段,盐性质的影响不一定很明显,但是随着酶的纯度提高,盐的特征效应就可能突出出来。一般地说, $K_{so}$ 越大,效果越好。实践表明,就阳离子而言,一价盐通常比二价盐有效;而阴离子则相反,二价盐比一价盐好。符合这种条件的盐有硫酸铵、硫酸钠等。硫酸铵最常用,它的最大优点是:溶解度大,溶解的温度系数小( $0^{\circ}\text{C}$ ,  $706\text{g/L}$ ;  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $767\text{g/L}$ ),即使是在低温的溶解度范围内,几乎所有蛋白质都能盐析出来。

用硫酸铵进行盐析时,溶液的盐浓度通常以饱和度表示,即以饱和溶液中盐的饱和度为100%,即相当于  $4\text{ mol/L}$ ( $0^{\circ}\text{C}$ )进行计算。调整溶液的盐浓度有两种方式,当蛋白质溶液体积不太大,而要达到的盐浓度又不太高时,为防止加盐过程中产生局部浓度过高,最好添加饱和硫酸铵溶液,加入量可按式计算:

$$V = V_0[(S_2 - S_1)/(1 - S_2)] \quad 4.2$$

$V$  和  $V_0$  分别为应加入的硫酸铵饱和溶液体积与蛋白溶液原有体积;  $S_2$  和  $S_1$  为要达到的和原有的硫酸铵饱和度。浓的硫酸铵溶液的 pH 通常是  $4.5 \sim 5.5$ , 调节 pH 可用硫酸或氨水。测定溶液的 pH 时,一般应先稀释 10 倍左右,然后再用 pH 试纸或 pH 计测定。另一种情况是蛋白质溶液原来体积已经很大,而要达到的盐浓度又很高,此时则以加固体硫酸铵为宜,加入量可通过计算,也可以直接查表(表 4.1)。加固体较为经济,也较方便,但所用的固体应充分研细,并在不断搅拌下缓缓加入,以避免局部过浓,同时要防止泡沫大量生成。

表 4.1 盐析法溶液的硫酸铵饱和度调整表

		硫酸铵的最终浓度(%饱和度)																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
		1 L 样品中加入硫酸铵的量(g)																
样品中硫酸铵的初始浓度(%饱和度)	0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55											33	67	103	141	179	264	353
	60												34	69	105	143	227	314
	65													34	70	107	190	275
	70														35	72	153	237
75															36	115	198	
80																77	157	
90																	79	

(3) 温度:从酶的稳定性和溶解度而言,盐析温度以控制在 4℃ 为宜。

(4) 蛋白质浓度:这是一个十分重要、而又常被忽视的因素。它一方面能影响盐析效果的重现性,因为蛋白浓度不同,分级分离范围也往往会发生一些变动;另一方面,蛋白浓度在 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下,盐析沉淀一般很困难,有时甚至根本不能形成沉淀。在 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 1 $\text{mg}/\text{ml}$  范围内,沉淀虽能生成,但时间较长,而且回收率往往不高。为了获得较好的盐析效果,蛋白浓度应在 1  $\text{mg}/\text{ml}$  以上。

(5) 盐析操作:盐析沉淀通常至少要近一小时才能完成,沉淀可通过离心或压滤和母液分离。盐浓度低时,离心比较容易,而过滤较难;浓度较高时,需要高速离心,但过滤较易。盐析如果在碱性条件下进行,而盐浓度又很高(譬如大于 50% S)时,盐析物常常不易离心沉降,有时还可能出现上浮现象。为使以后的纯化具有较好的重现性,盐析后沉淀中夹带的母液应尽量除尽。

获得盐析沉淀后,可将其溶于适当的缓冲液中,并除去不溶蛋白,这样相当于又一次纯化。有时也可用不同盐浓度的溶液对沉淀进行分级的溶解。

盐析法的优点是:简便、安全(大多数蛋白质在高浓度盐溶液中相当稳定)、重现性好。其缺点是:分辨率低,纯度提高不显著,同时还常常有脱盐问题。

盐析法的一个发展就是和层析技术相结合形成盐析层析法(salting out chromatography),即以琼脂糖等非极性物质为柱层析的支持体,在高盐浓度条件下将样品中的蛋白质盐析吸附下来,然后再梯度地降低盐浓度,使酶和杂蛋白分别洗脱出来。这种技术的优点是纯化量大,重复性好,分辨率较高。

## 2. 有机溶剂沉淀法

此法的原理是,不同的蛋白质需要加入不同量的有机溶剂才能使它们分别从溶液中沉淀析出。有机溶剂在这个过程中主要作用是降低溶液的介电常数,因为分子间的静电引力和溶剂的介电常数成反比,加入有机溶剂,蛋白质分子间的引力增加,溶解度降低。有机溶剂的另一作用可能是部分地引起蛋白质脱水而沉淀。不过,蛋白质溶解度和有机溶剂浓度之间目前还没有一个可用的关系式。

进行有机溶剂沉淀处理时,应考虑以下因素。

(1) 温度:这是最重要的因素,因为大多数蛋白质遇到有机溶剂很不稳定,特别是温度较高(例如室温)的情况下,极易变性失效,故操作应在 0℃ 以下进行。有机溶剂也必须预先冷却到 -20℃ ~ -15℃,并在搅拌下缓慢加入。沉淀析出后应尽快地在低温下离心分离,获得的沉淀还应立即用冷的缓冲液溶解,以降低有机溶剂的浓度。个别酶对有机溶剂比较不敏感,比较稳定,此时可在较高温度(如室温)下进行操作,以便除去较多的杂蛋白。

(2) pH:由于蛋白质处于等电点时溶解度最低,故有机溶剂沉淀也多选在靠近目的酶的等电点 pH 条件下进行。例如,“肌肉酶”的分离在 pH 6.5 时效果较好。pH 调整通常选用 0.05 mol/L 的缓冲液。

(3) 离子和离子强度:中性盐在多数情况下能增大蛋白质的溶解度,并能减少变性影响。在进行有机溶剂的分级沉淀时,如果适当地添加某些中性盐,例如,5% ~ 10% 的硫酸铵,往往有助于提高分离效果。但盐的浓度一般不宜超过 0.05 mol/L,否则沉淀不好,甚至

沉淀全无,同时有机溶剂消耗也多。

在进行有机溶剂沉淀时,也可利用多价阳离子效应,即在向酶溶液加入有机溶剂时,可将溶液的 pH 调整到略高于目的蛋白质的等电点,使之带有负电荷,然后再添加少量(0.005~0.02 mol/L)的多价阳离子,例如  $Zn^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$  等,由于这些离子能和阴离子蛋白质形成络合物,降低其溶解度,从而可减少有机溶剂的用量,同时也可提高分离的分辨效果。但是,应注意磷酸盐存在的情况下不能用  $Zn^{2+}$  以免导致磷酸锌沉淀形成。

(4) 有机溶剂:用于蛋白质纯化的有机溶剂中,丙酮的分离效果最好,引起失效的情况也较少。除丙酮外,乙醇和甲醇等也常用。有机溶剂浓度通常以百分体积比表示,加入量可按下式计算:

$$V = V_0 \cdot (S_2 - S_1) / (S - S_2) \quad 4.3$$

其中,  $V$  和  $V_0$  分别为应加入的有机溶剂体积和原溶液的体积,  $S$ 、 $S_1$  和  $S_2$  分别为待加的有机溶剂、原来溶液中含有的有机溶剂和溶液所要达到的有机溶剂的百分浓度。

有机溶剂沉淀法的优点是:分辨率高,溶剂容易除去。缺点是酶在有机溶剂中一般不稳定,易引起变性失效。

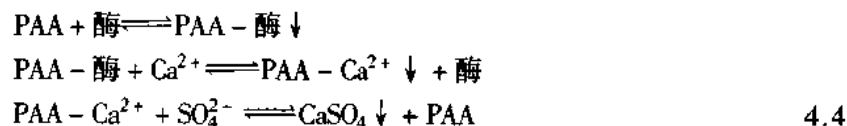
### 3. 共沉淀法

这是利用离子型表面活性剂如 SDS(十二烷基磺酸钠)、非离子型聚合物如聚乙二醇、聚乙烯亚胺以及丹宁酸、硫酸链霉素等,在一定条件下能与蛋白质直接或间接地形成络合物,使蛋白质沉淀析出,然后再用适当方法使需要的酶溶解出来,除去杂蛋白和沉淀剂,从而达到纯化目的的方法。

以聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)纯化限制性内切核酸酶 RE. *EcoR* I 为例。在 RE. *EcoR* I 生产菌 *E. coli* K-12 1100 菌株的超声波破碎离心上清液中,包含着大量的 DNA 和杂蛋白。PEI 在 0.2 mol/L KCl 的条件下,能和 DNA 以及与之相关的蛋白质一起凝聚沉淀析出;但当 KCl 的浓度升至 0.6 mol/L 时,虽然 PEI 与 DNA 及杂蛋白仍处于沉淀状态,而 RE. *EcoR* I 却能重新溶解,因此可将酶和杂蛋白分离开来,使 RE. *EcoR* I 得到初步纯化。

### 4. 选择性沉淀法

某些多聚电解质如聚丙烯酸、硫酸糊精以及磷、砷、硅的钨、钼、钒等的杂多酸常能在极低的浓度条件下,选择性地和某种或某类酶结合沉淀析出,其选择性的机制尚不清楚。以聚丙烯酸(polyacrylic acid, PAA)纯化溶菌酶为例,相对分子质量近 9 000 或近 300 000 的 PAA 聚合物对某些蛋白酶、磷酸酯酶和溶菌酶等有选择性沉淀效果,故可用于这些酶的纯化:



### 5. 等电点沉淀法

等电点沉淀根据的原理是,蛋白质的溶解度随分子间引力增大而变小,当其他条件相同时,分子间的引力在蛋白质处于等电点状态最大,因而容易沉淀析出。由于蛋白质在等电点时仍有一定的溶解度,沉淀往往不完全,故而一般很少单独使用,更多的是用作其他沉淀法

中一个组合条件。例如,用于除去杂蛋白,因为在某种 pH 条件下,样品中不仅会使处于等电点状态的蛋白质沉淀,对于等电点两侧、带相反电荷的杂质也可能因形成复合物而沉淀,从而可除去大量杂蛋白。纯化动物材料抽提液中的酶时,就可先将 pH 调整至 5 左右,待放置片刻后,核蛋白等颗粒杂质就会沉淀析出,使酶溶液达到“一步澄清”。又例如,纯化血清胆碱酯酶时,可先将 pH 调至 2.8~3.0,除去酸性杂蛋白。值得顺便提到,调整溶液的 pH 时,应选用具有相同离子的酸、碱或缓冲液。

## 6. 液-液分离法

如果说,上面介绍的方法是利用溶解度差别进行的,那么,从广义上说,它们都是以分配系数的不同为基础的纯化方法,属于“固-液”类型;与此相对应的,近年来也开发了“液-液”类型的分离法,这种方法又称为双相(水溶液)分离法(aqueous two-phase separation)。它实际上就是利用酶和杂蛋白在不相混溶(的多聚体形成)的两相系统中分配系数不同而达到纯化目的的方法。以聚乙二醇(PEG)和右旋糖酐(dextran)形成的两相系统为例,在这样的双相系统中,上相主要是 PEG,下相主要的是 dextran,分配系数  $K$  定义为:

$$K = \frac{C_{\uparrow}}{C_{\downarrow}} \quad 4.5$$

其中  $C_{\uparrow}$  和  $C_{\downarrow}$  分别为酶或蛋白质在上相和下相中的浓度。酶和蛋白质的  $K$  通常介于 0.1 与 0 之间。由于这种分配服从 Brønstedt 方程:

$$\ln K = \frac{\lambda \cdot M}{k_B \cdot T} \quad 4.6$$

其中,  $M$  为待纯化物质的分子量,  $\lambda$  为系统的特性系数,  $k_B$  为 Boltzmann 常数,  $T$  为绝对温度。通过选择和控制两相系统中多聚物的种类与浓度、系统的 pH、离子和离子强度以及温度,就有可能使酶和杂蛋白达到很好的分离。这种方法的优点是:条件温和,适于大量样品的纯化;但成本高,纯化后还须除去介质带来的多聚物。

## 二、按照分子大小进行的纯化

### 1. 胶过滤(层析)法

胶过滤(层析)法(gel filtration or gel permeation chromatography)是 Porath 和 Flodin 最早建立的,现在已广泛用于生物大分子的纯化。

这种方法的原理如图 4.1 所示。它通常以柱层析的方式进行。柱中填充分子筛介质,常用于生物大分子分离的分子筛介质是具有一定孔径的球状凝胶物质。层析柱中装入(选择好的)适当孔径的凝胶物质以后,加入待纯化样品,再用适当的溶剂或缓冲液使样品在柱中自上而下地扩展。这样,样品中的各种分子将按其分子大小表现不同的层析性态而分离。大于凝胶孔径的分子由于不能进入胶粒内部,只能沿胶粒间隙扩展,因而走的是一条较“直”的“路”,表现出较快的移动速度;反之,小于凝胶孔径的分子,由于它们能自由进出胶粒内外,按照分子热运动的规律,其运动轨迹“迂回曲折”,因此,表现为较慢的下移速度。所以,待纯化样品通过一定长度的层析柱后,不同大小的分子都将按先后顺序依次流出,彼此分开,达到纯化目的。由于某些分子被排阻在胶粒外,故这种层析又称为胶排阻层析(gel exclusion chromatography)。

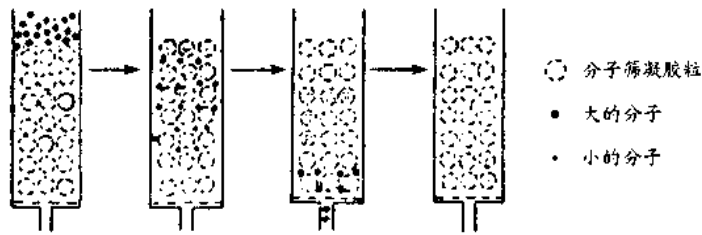


图 4.1 胶过滤法分离原理

为了使胶过滤有较好的分离效果,应考虑以下问题。

(1) 胶的选择

作为分子筛的凝胶是由亲水的线状聚合物通过交联剂交联,或通过聚合物自身缔合组成的、具有网眼结构的胶粒物质。网眼孔径大小由交联程度和聚合物的浓度决定。最常用的凝胶有如下几类:

① 葡聚糖凝胶,是相对分子质量从几万到几十万的葡聚糖通过环氧氯丙烷交联而成的网状结构物质,可用于相对分子质量 1 000 ~ 500 000 分子的分离。以商品 Sephadex G- 为例,G- 后的数字为胶膨润时吸水量的 10 倍,如 G- 25 就表示该胶物质每 1 g 能吸水 2.5 ml,这个数字越大,说明吸水量越高,孔径也越大,更适合于较大分子的分离。表 4.2 是各种 Sephadex 的特性数据。另一类商品为 Sephadex LH-,它和 G- 类型不同,是兼具亲脂性和亲水性的凝胶,可用于脂类化合物的分离。此外还有一种类型称为 Sephacyl S-,它是通过 N,N'- 甲叉双丙烯酰胺交联形成的烯丙基葡聚糖,可用于水溶液系统,也适合于有机溶剂或高浓度氢键解离试剂存在的系统。

表 4.2 各种 Sephadex 葡聚糖分子筛凝胶

类型	颗粒直径 μm	工作范围	工作范围	吸水值 (ml/g 干胶)	床体积 (ml/g 干胶)	溶胀时间	
		球状分子 (MW)	线状分子 (MW)			20℃	100℃
G-10	40 ~ 120	< 700	< 700	1.0	2 ~ 3	3	1
G-15	40 ~ 120	< 1 500	< 1 500	1.5	2.5 ~ 3.5	3	1
G-25	300 ~ 1 000	1 000 ~ 6 000	100 ~ 5 000	2.5	4 ~ 6	6	2
G-50	300 ~ 1 000	1 500 ~ 30 000	500 ~ 30 000	5.0	9 ~ 11	6	2
G-75	120 ~ 1 000	3 000 ~ 70 000	1 000 ~ 50 000	7.5	12 ~ 15	24	3
G-100	120 ~ 1 000	4 000 ~ 150 000	1 000 ~ 100 000	10.0	15 ~ 20	48	5
G-150	120 ~ 1 000	5 000 ~ 400 000	1 000 ~ 150 000	15.0	20 ~ 30	72	5
G-200	120 ~ 1 000	5 000 ~ 800 000	1 000 ~ 200 000	20.0	30 ~ 40	72	5

② 聚丙烯酰胺凝胶,是丙烯酰胺与交联剂 N,N'- 甲叉双丙烯酰胺共聚得到的交联凝胶物质。以商品 Bio-Gel P- 为例,P- 后的数字乘 1 000,表示该胶可用于分离的最高相对分子质量(亦即排阻的相对分子质量)。聚丙烯酰胺凝胶适合于分离的范围和葡聚糖凝胶大致相同。表 4.3 是各种 Bio-Gel P- 的特性数据。

表 4.3 各种 Bio-Gel 聚丙烯酰胺分子筛凝胶

类型	颗粒直径 ( $\mu\text{m}$ )	工作范围 (MW)	吸水值 (ml/g 干胶)	床体积 (ml/g 干胶)	溶胀时间	
					20°C	100°C
					(小时)	
Bio-Gel P-2	40~150	200~2 000	1.5	3.0	2~4	2
Bio-Gel P-4	40~150	800~4 000	2.4	4.8	2~4	2
Bio-Gel P-6	40~150	1 000~6 000	3.7	7.4	2~4	2
Bio-Gel P-10	40~150	1 500~20 000	4.5	9.0	2~4	2
Bio-Gel P-30	40~150	2 500~40 000	5.7	11.4	10~12	3
Bio-Gel P-60	40~150	3 000~60 000	7.2	14.4	10~12	3
Bio-Gel P-100	40~150	5 000~100 000	7.5	15.0	24	5
Bio-Gel P-150	40~150	15 000~150 000	9.2	18.4	24	5
Bio-Gel P-200	40~150	30 000~200 000	14.7	29.4	48	5
Bio-Gel P-300	40~150	60 000~400 000	18.0	36	48	5

③ 琼脂糖凝胶,是琼脂抽去琼脂胶等后得到的 D-半乳糖和 3,6-脱水半乳糖相间排列组成的链状多糖。和上述两种凝胶不同,琼脂糖凝胶不包含另外的交联物质,是通过琼脂糖本身缔合而成的网眼结构物质,孔径大小由胶的浓度决定。以商品 Sepharose 为例,2B、4B 和 6B 等分别表示琼脂糖含量为 2%、4% 和 6%。这类凝胶的孔径都比较大,适于相对分子质量较大的物质如病毒、细胞颗粒体和 DNA 等的分离。表 4.4 列举了 Sepharose 的有关特性数据。琼脂糖凝胶还有另外两种商品,一为 Bio-Gel A-,它是琼脂糖与丙烯酰胺的交联胶,可用于有氢键分解试剂存在的情况,而且有较致密的孔径,适用于蛋白质的分离。另一为 Sepharose CL,它是在强碱性条件下和 3,3-二溴丙醇反应的产物,适用于有机溶剂和氢键分解试剂存在的情况。

表 4.4 某些 Sepharose 琼脂糖分子筛凝胶

类型	琼脂糖浓度 (%)	颗粒直径 ( $\mu\text{m}$ )	工作范围 (MW)
Sepharose 6B	6	40~210	$1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$
Sepharose 4B	4	40~190	$6 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$
Sepharose 2B	2	60~250	$7 \times 10^4 \sim 4 \times 10^7$
Sepharose CL 6B	6		$1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$
Sepharose CL 4B	4		$6 \times 10^4 \sim 2 \times 10^7$
Sepharose CL 2B	2		$7 \times 10^4 \sim 4 \times 10^7$
Bio-Gel A	0.5 m	10	$< 10^4 \sim 0.5 \times 10^6$
Bio-Gel A	1.5 m	8	$< 10^4 \sim 1 \times 10^6$
Bio-Gel A	5.0 m	6	$1 \times 10^4 \sim 5.5 \times 10^6$
Bio-Gel A	10.0 m	4	$4 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$
Bio-Gel A	50.0 m	2	$1 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^7$
Bio-Gel A	150.0 m	1	$1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^8$

上述各类凝胶都有很高的亲水性,能在水中膨润。膨润后的凝胶具有一定的弹性和硬度,并有很高的化学稳定性,在盐和碱溶液中都很稳定,可应用于4~9的pH范围;但是,如果在pH 2以下的酸性条件下长时间处理,则有水解破坏的可能。此外,它们对氧化剂也较敏感。上述胶都没有易于解离的基团,因此很少非专一性吸附。Sephacryl, Sepharose CL和Bio-Gel A相对Sephadex与Sepharose而言,在化学稳定性与机械强度上都有所增强,因而适用面更广。

胶过滤(层析)法在酶的纯化工作中有三种类型的应用:浓缩、族分(包括脱盐、更换缓冲系统以及分离底物和产物分离等)和分级分离。前两种应用通常选择小孔径胶如Sephadex G-25,因为它们有较好的机械强度和流动特性,并足以对付相对分子质量在5000以下的分子。至于分级分离,则须根据待纯化样品来选用胶,不过,如果使用低排阻极限的胶Sephadex G-75,那么,所需要获得的组分可较早地流出,而且有助于提高回收率和减少稀释,同时这类胶的硬度也较好,可得到较大的流速。

至于胶粒大小,不同凝胶有各自的规格。以Sephadex G-为例,它有四种等级:超细、细、中粗和粗。随着胶粒变细,分离效果(即分辨率)也升高;但是若按层析的流速,粗粒级为好。通常实验室工作中,族分可用中粗或粗级胶粒,常规的分级分离则一般用细级胶粒,而超细级胶粒多用于分析性的工作。

#### (2) 柱层析的基本过程与要求。

柱层析是十分常用的纯化方式。

柱层析一般包括如下环节:层析介质的平衡、装柱、加样、扩展(包括洗涤和洗脱)以及与此同时进行的流出液成分(蛋白质或酶活性)的检测和分部收集。

柱层析的结果通常以洗脱曲线的形式表示,即以流出液中的蛋白质浓度(如 $A_{280}$ )或酶活力相对洗脱(液)体积( $V_e$ )的图形(图4.2)表示。

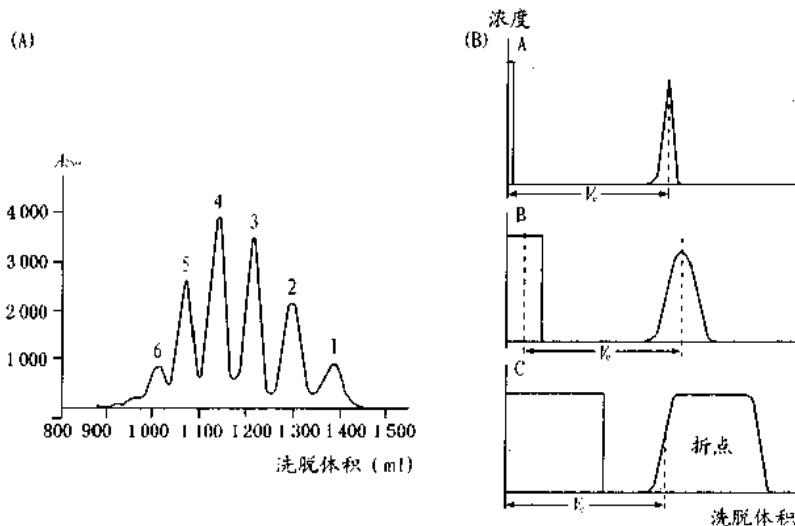


图4.2 柱层析洗脱曲线(A) 洗脱体积( $V_e$ )的确定方法(B)

衡量柱层析分离效果的标准是:分辨率高,回收率大,稀释度小和速度快。

分辨率可用 $R_S$ 权衡:

$$R_S = \text{两峰带间距离} / \text{峰带宽}$$

4.7



$R_s = 1.2$  时,通常认为基本达到了分离要求。

一般地说,分辨率取决于柱长( $l$ ):

$$R_s \sim l \quad 4.8$$

柱长又决定流速,柱太长时,流速不好:

$$f = P \cdot r^2 / l \quad 4.9$$

$f$  为流速,  $P$  为压强,  $r$  为柱半径。柱半径又决定柱大小,柱太小时,可能产生柱壁效应,出现拖尾现象;柱太大时,可能产生稀释效应以及峰形不均匀。所以,柱的内径与柱长应有适当的比例,常用的比例为  $1/20 \sim 1/40$ , 或  $1/50 \sim 1/100$ 。

对柱的结构也有一定要求,例如,为了减小稀释和避免分离组分的重混,柱介质支持板下的出口处“死体积”应尽量小,“死体积”一般在柱体积的  $0.1\%$  以下。

### (3) 胶的处理与胶用量

凝胶一经选定,就应将它们放在水中或其他适当的溶剂中进行膨润平衡,如果使用的胶膨润不充分,层析效果往往不好,且不易重复,流速也差。一般交联度高的胶达到完全膨润的时间短,而交联度低的大孔径胶则需要很长时间,沸水浴常可加速达到平衡。应注意,膨润时不宜使用磁力搅拌,以免珠粒破碎。

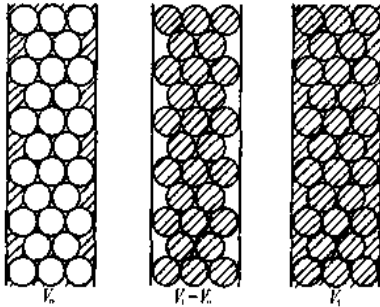


图 4.3  $V_t$  与  $V_0$  等的关系

当膨润平衡完成后,就可取一定量的胶填充层析柱。胶用量通常以床体积  $V_t$  表示,  $V_t$  与胶的应用类型有关,也和样品体积( $V_s$ )有关。

图 4.3 示  $V_t$  与  $V_0$ 、 $V_i$  等的关系。其中,  $V_0$  和  $V_i$  分别为胶(粒)外和胶(粒)内液体的体积,  $V_g$  为胶粒构成物质本身的体积。

$$V_t = V_0 + V_i + V_g \quad 4.10$$

层析柱一旦建成,就可加样,然后用适当的溶剂进行扩展洗脱。各种溶质分子通过层析柱流出的洗脱体积

$V_e$  有下述关系式表示:

$$V_e = V_0 + K_p V_i \quad \left( K_p = \frac{V_e - V_0}{V_i} \right) \quad 4.11$$

$K_p$  为溶质在胶内外的分配系数,即表示溶质分子自由出入胶内外、在胶内外分配的百分比。 $K_p$  的大小和胶过滤应用类型有关,也和待分离的分子大小以及使用的凝胶种类有关。就族分来说,例如,用 Sephadex G-25 分离血清蛋白与 NaCl(脱盐!),其中, Sephadex G-25 的排阻范围是 5 000,由于 NaCl 分子能自由出入胶粒内外,故而  $K_p = 1$ ;而血清白蛋白(相对分子质量为 67 000)则完全被排阻于胶粒外,因此,  $K_p = 0$ 。

$$\text{对于 NaCl 来说, } V_{e\text{NaCl}} = V_0 + V_i \quad 4.12$$

$$\text{而对于血清白蛋白, } V_{e\text{白蛋白}} = V_0 \quad 4.13$$

要使上述两成分的洗脱峰带完全不重叠(参见图 4.4),那么应该:

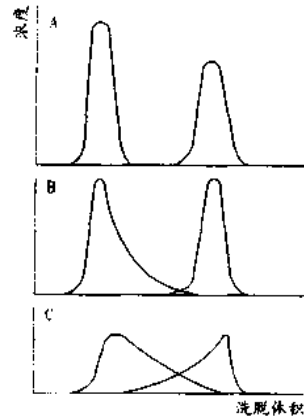


图 4.4 样品体积  $V_s$  与分离效果

$$V_s < V_i, \text{即: } V_s < (V_{e\text{NaCl}} - V_{e\text{白蛋白}}) \quad 4.14$$

由于  $V_i$  和床体积比 ( $V_i$ ) 约为 30% 左右,所以在族分应用中,胶用量以控制在样品量(指体积)的 3~4 倍为佳。

但是对于分级分离来说,通常使用 G-75 以上的胶,而待分离物质的相对分子质量差别相对很小,  $K_p$  差别也很小,有时仅 0.1 左右(表 4.5),因此:

$$V_s < 0.1V_i \quad 4.15$$

这就是说,这种情况下胶的用量应为样品量的 40 倍左右。

表 4.5 某些酶应用葡聚糖凝胶分离的  $K_p$  值

酶	$K_d$ 胶				
	G-25	G-50	G-75	G-100	G-200
胰蛋白酶	0	0	0.3	0.5	0.7
胰凝乳蛋白酶	0	0	0.3	0.5	0.7
胃蛋白酶	0	0	0.3	-	-
细胞色素 C	0	0	0.4	0.7	-
核糖核酸酶	0	0	0.4	-	-
脂肪酶	0	0	0.12	0.31	0.5

#### (4) 其他有关问题

① 样品。胶过滤(层析)法与样品浓度没有太大的关系,即使是在蛋白浓度达到 75 mg/ml 的情况下也无明显影响。但样品中如含有粘性成分,则分离效果可能改变。

② 扩展洗脱液。洗脱液组成一般不直接影响胶过滤的分辨率。通常,不带电荷的物质可用蒸馏水洗脱;荷电溶质可用 Tris-HCl、磷酸盐之类的缓冲液,离子强度应控制在 0.02 mol/L 左右,pH 由酶的稳定性及溶解度决定。如果层析产品接下来要进行冰冻干燥,则可采用挥发性的缓冲液,如醋酸铵、重碳酸铵和乙二胺醋酸盐等。

③ 胶的再生与保存。胶过滤在每个分离过程结束后,由于胶本身没有什么变化,一般不需要特殊的再生处理,经过蒸馏水、稀盐或缓冲液洗涤后又可继续使用;如有尘粒污染可用反向上行法漂洗;如有微量的非专一性的交换或吸附,则可先用 0.1 N HCl 或 0.1 N NaOH 处理,然后再用蒸馏水洗至中性。为防止微生物污染,可用 0.02%  $\text{NaN}_3$  流洗,但应注意到  $\text{NaN}_3$  可能对某些酶有抑制作用。洗净的胶,通常可以膨润状态置于冷室中长时间保存。

表 4.6 几种常用脱盐方法的比较

比较内容	胶过滤法	透析法	真空纤维反透析
简便性	简易	简易	简易
脱盐效率	一般接近 100%	可能达 100%	约 95%
可靠性	完全可靠	有损漏之虞	有损漏之虞
成本	便宜	便宜	昂贵
速度	通常 15 min 可完成 100% 脱盐	非常慢,可能需数日	最佳情况 20 min,可完成 95% 的脱盐
蛋白回收	可接近 100%	低浓度时有吸附损失之虞	< 70%
小分子回收	~ 100%	常不可能	常不可能
稀释程度	取决于加样量	小	小
寿命	> 1000 次,1~2 年	一次	~ 50 次,4 个月

胶过滤有三类应用:浓缩已于前一节讨论;族分,主要是脱盐,脱盐也是酶的分离纯化工作常需解决的问题,表 4.6 列举和对比了几种脱盐方法,从中可以看出,胶过滤法在各个方面都略胜一筹;但是,胶过滤法主要的应用还是分级分离纯化。

胶过滤法特点是:不受 pH、盐和温度等的影响,操作条件温和、简便,而且勿需特殊的再生处理,适于各种分子的分离。

## 2. 筛膜分离法

筛膜分离法,即超过滤分离法(ultrafiltration),这是利用微孔超滤膜仅能选择性地透过一定大小的分子而达到分离目的的一类方法。此法操作简单,条件也温和,但是只能达到粗分的要求。

## 3. 超离心分离法(ultracentrifusion)

这是利用样品中大小不同的分子在相对离心力场达 80 000 ~ 250 000 g 的条件下分布不同而进行的一种分离纯化方法。

但是,此法主要用于病毒、细胞颗粒体等的制备,对于分子量较小的酶或蛋白质分离效果一般不佳,分辨率不高而且费时。

## 三、建立在电学解离性质进行的纯化

### 1. 吸附交换(层析)(adsorption)分离法

这也是最常用的一类纯化方法。原理如图 4.5 所示,它是利用样品中待纯化分子和杂质分子与吸附剂间的吸附能力与解吸性质不同而建立的分离纯化方法。这类分离或以静态方式进行,或以层析方式进行。但不管采用什么方式,一般都包括三个基本环节:加样吸附、洗涤和洗脱。实际上,其中每一个环节都包含着目的蛋白质(或酶)和杂蛋白的分离,因此是一种十分有效的纯化方法。

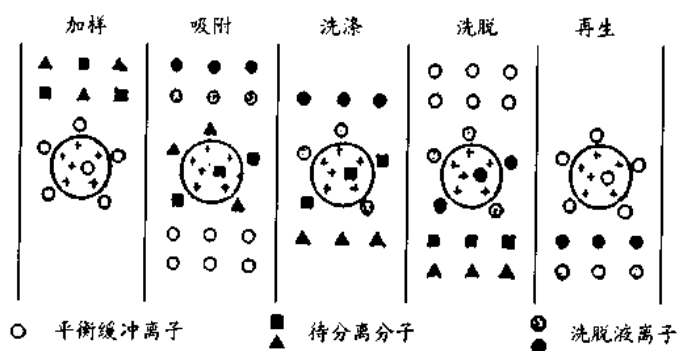


图 4.5 吸附交换分离法原理示意图

根据吸附机制的不同,吸附剂可分为三种类型:“传统”物理吸附剂、羟基磷灰石吸附剂和离子交换吸附剂。

#### (1) 物理吸附

传统的物理吸附(physical adsorption)剂常用的有白土、氧化铝和磷酸钙胶等。其中白土

是具有强吸附力的一类粘土,以硅酸铝为主要成分,包括皂土、高岭土和活性白土等;氧化铝根据制备方法不同有多种成品,用得较多的是 Cr 胶;磷酸钙胶可从氧化钙和磷酸三钠直接制备。

物理吸附的机制不很清楚,一般认为它是通过吸附剂分子和样品分子间的界面范德华力相互作用引起的,因而选择性不强,预见性较小,往往需要试验才能确定。这类吸附剂应用很早,但没有得到更大的发展,原因可能也就在于此。

物理吸附通常以静态方式进行。吸附剂需要经过预先洗涤和活化处理,然后在低盐浓度、弱酸性或近中性条件下进行吸附,例如,采用 0.005 ~ 0.01 mol/L、pH 5.0 ~ 6.5 的磷酸缓冲液作为吸附介质。在吸附后,如果被吸附的酶不能被水或吸附介质洗脱下来,则可将吸附了酶的吸附剂直接分散在水中或上述介质中,进行洗涤以除去杂质。物理吸附的酶一般可在弱碱性条件下,例如用 pH 7.6 的磷酸缓冲液将它洗脱下来;如果此时酶仍不能洗下,那么可用更高离子强度的溶液,例如,含 10% 硫酸铵 pH 7.6 的磷酸缓冲液。洗脱液量不宜过大,最好不超过吸附剂的体积。操作时,通常少量分批式的洗脱比一次洗脱效果要好。

操作时,为了使纯化的效果好些,可先加适量的吸附剂吸附杂蛋白,这种情况下加入的吸附剂(用量)甚至容许有 5 ~ 10% 左右的酶损失。除去这份吸附剂后,再加入一定量新鲜吸附剂吸附酶,此时吸附剂用量应该少些,同样也容许在溶液中保留 10% 左右的酶,以免大量杂蛋白跟着吸附下来。

物理吸附也可以柱层析方式进行,但是,用凝胶作为吸附剂时,由于它的粒子较细,直接用它装柱流速往往太慢。为此,通常总是以 1 份胶加 3 ~ 5 份纤维素粉混匀后装柱,并在适于吸附的条件进行平衡;待酶吸附后,再以梯度方式或阶梯方式改变缓冲液的 pH 或盐浓度进行洗涤或洗脱。

### (2) 羟基磷灰石吸附

羟基磷灰石(hydroxylapatite, HA)在 50 年代末开始应用于酶的纯化,但直到 1973 年才解决了该吸附剂的高均一、高流速和高吸附容量的大量制备,使它的应用日益普及。

羟基磷灰石是一种微晶型的磷酸钙制品。其吸附原理通常认为是由于这种晶体表面的钙离子能和蛋白质的负电性基团相互作用,而磷酸基团则能和正电性基团结合。如果在系统中有对钙亲和力更强的离子,如柠檬酸盐等存在时,羟基磷灰石对蛋白质的吸附能力就会显著下降,但其他盐如 NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub> 等,即使浓度很高,甚至在 1 mol/L NaCl 中,也不会影响蛋白质的负电性基团和钙离子之间的结合。反之,这些盐可以大大降低正电性基团的作用,也就是说在高盐浓度的溶液中,羟基磷灰石可用来吸附酸性或中性蛋白,而排除碱性蛋白,这样就可以省去吸附前的脱盐透析平衡。羟基磷灰石对蛋白质的吸附容量比较高,在一般吸附操作条件下可达 50 g/L 床体积。

羟基磷灰石吸附通常在低离子强度、中性或弱酸性条件(如 0.001 mol/L 磷酸缓冲液 pH 6.8 的平衡溶液)下进行。但应注意羟基磷灰石的等电点可能因制备方法而显著不同(pH 6.5 ~ 10.0)。羟基磷灰石吸附多采用柱层析方式,如果用静态吸附方式,则应有一段吸附平衡时间,如半小时左右。洗脱一般借助升高磷酸缓冲液的离子强度,例如应用 0.01 ~ 0.5 mol/L 的磷酸缓冲液。如果被吸附物质能完全洗脱下来,那么该吸附剂可反复使用 3 ~ 4 次;若有不可逆吸附,则可对 1 mol/L EDTA pH 8 透析,或用 0.1 N NaOH、或用 1 N HCl 洗涤。

### (3) 离子交换(ion exchange)吸附

这类吸附是通过蛋白质的解离基团与离子交换剂的解离基团之间的相互作用完成的。由于各种蛋白质和离子交换剂在不同条件下有相应不同的解离状态,因此选择适当的交换剂、控制交换和洗脱条件,就可能将酶和杂蛋白分离开来。


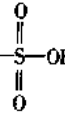
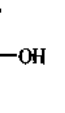
离子交换剂包括两个部分:母体和离子交换基。作为母体的有:树脂、纤维素和凝胶等。离子交换树脂是以聚苯乙烯树脂等为母体,再导入相应的解离基团而成,具有疏水的基本骨架,易导致蛋白变性,交换容量也低,一般只有以羟基为解离基团的弱酸性树脂,如 Amberlite IRC-50、国产的 724 树脂等用于某些碱性蛋白的纯化。个别对酸碱较稳定的酶也曾用强酸性或强碱型的交换树脂,但很少。近年来大孔型交换树脂出现,应用面可能扩大。

离子交换纤维素是目前酶的纯化工作中用得较多的交换剂,它是以亲水的纤维素为母体,引入相应的交换基团后制成的。交换容量较大(一般 0.2~1.0 毫克当量/克干胶),交换速度也较高;缺点是易随交换介质的 pH、离子强度改变而发生膨胀、收缩,同时粒子较细,柱层析时流速小。

离子交换凝胶以葡聚糖凝胶或琼脂糖凝胶为母体,导入相应的交换基团后制成。它的应用日益增多,交换容量较交换纤维素还要大(2.5~4.5 毫克当量/克干胶),同时具有分子筛的作用;和纤维素一样,缺点也是易随缓冲液 pH 和离子强度的不同而改变其交换容量、容积和流速。Sephacrose CL、Bio-Gel 无此缺点,而且有较均一的大小。

离子交换基是交换剂表现功能的基础,它的性质决定着交换剂的类型与强弱。带阳电荷解离基的交换剂在离子交换过程中能吸附荷阴电的离子,故称为阴离子交换剂;反之,带阴电荷解离基的交换剂可对付荷阳电的离子,称为阳离子交换剂。常用的交换基如表 4.7。

表 4.7 某些常用的交换基

	名称	结构式
<b>I. 阴离子交换基</b>		
弱碱性交换基	PAB(P-Aminobenzyl)	$\text{—OCH}_2\text{—}$  $\text{—NH}_2$
中强碱性交换基	AE(Aminethyl)	$\text{—OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$
	DEAE(Diethylaminoethyl)	$\text{—OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
强碱性交换基	TEAE(Triethylaminoethyl)	$\text{—OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
	QAE(Quaternaryaminoethyl)	$\text{—C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$   $\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2$
<b>II. 阳离子交换基</b>		
弱酸性交换基	CM(Carboxymethyl)	$\text{—OCH}_2\text{COOH}$
中强酸性交换基	P(phosphate)	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{—O—P—OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
强酸性交换基	SE(Sulfoethyl)	$\text{—OCH}_2\text{CH}_2\text{—}$ 
	SP(Sulfopropyl)	$\text{—OC}_2\text{H}_5\text{—}$ 

进行离子交换吸附时,应考虑以下因素。

① 选择适当的离子交换剂。

第一,究竟选择阳离子交换剂,还是选择阴离子交换剂?

这个问题取决于目的酶或蛋白质的稳定性。对于仅带有单一电荷的物质来说,只有一种选择,即采用带有相反电荷的交换剂;因为酶和蛋白质是两性电解质,则既可选用阳离子交换剂,也可选用阴离子交换剂。根据目的酶的  $pK$  和介质的  $pH$ ,它可以带正电,也可以携带负电,所以这种情况下,一个重要的决定因素就是酶的稳定性(图 4.6):

一般规律是:

- a. 如果目的酶在低于其  $pI$ (等电点)的  $pH$  条件下稳定,可选用阳离子交换剂;
- b. 如果目的酶在高于其  $pI$  的  $pH$  条件下稳定,宜采用阴离子交换剂;
- c. 如果目的酶在高于和低于其  $pI$  的  $pH$  条件下都稳定,那么两种交换剂都可。

第二,究竟选择强型交换剂,还是弱型交换剂?

一般规律是:

- a. 如果目的酶既可应用强型交换剂,也可以应用弱型,那么应优先考虑选择弱型。
- b. 如果目的酶  $pI$  偏向极端  $pH$ ( $< 6$  或  $> 9$ ),则一般应考虑强型交换剂,因强型交换基能在广泛的  $pH$  范围内保持完全解离状态,而弱型交换基的解离程度及相关的交换容量,因  $pH$  条件而显著不同;弱型的阳离子交换剂在  $pH < 6$  或弱型的阴离子交换剂在  $pH > 9$  时不带电荷,失去交换能力。磺酸基和季胺基分别构成强酸和强碱型交换基,磷酸基和仲胺、叔胺基分属中强度的交换基,羟基、伯胺基等分属弱酸或弱碱型交换剂。

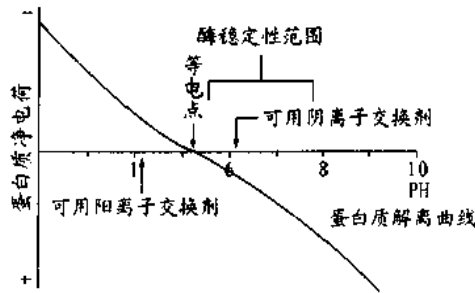


图 4.6 蛋白质的带电荷状况与交换基的选择

DEAE 的  $pK$  值为 9.5,通常主要用于吸附中性和酸性蛋白;当  $pH > 9$  时,应选用 QAE 和 TEAE。同理,CM 的  $pK \approx 4$ ,常用于对付中性和碱性蛋白;当  $pH < 3$  时,则最好选用 SE 或 SP 作为交换剂。

第三,交换容量。

交换容量有两方面的含义:一为总交换容量;一为实效交换容量。前者是指每克干离子交换剂上带有的总交换基数,其中包括潜在的交换基;后者是指特定的实验条件下实际可用于交换的交换基数。实效交换容量和介质的  $pH$ 、离子与离子强度、以及温度等密切相关,也因目的蛋白质分子或酶分子的大小而显著不同。一般地说,离子交换纤维素交换容量小于凝胶,而在离子交换凝胶中,对于 10 000 ~ 100 000 的分子来说以 Sephadex A-50 或 C-50 最好,而对于大于 400 000 的分子,则以 Sephadex A-25 或 C-25 为佳,当然也可选用 Sepharose 或 DEAE-Sephacel。

#### 第四, 流速。

纤维素柱的流速一般低于凝胶, 而凝胶中又以 Sephadex A-25 或 C-25 者为好, Sepharose 交换剂兼有高流速和高交换容量的优点。

② 交换剂的处理。离子交换剂在使用前都必须进行预处理, 以除去各种可溶性杂质, 并将交换基团变成适当的交换型。新交换剂应先在蒸馏水中充分搅拌膨润, 然后, 再用酸、碱反复处理。阳离子交换剂一般是 Na 型, 可先用 10~20 倍量的 1mol/L HCl 浸泡, 使之变成 H 型, 然后水洗至中性, 再用 10 倍量的 1mol/L NaOH 浸泡, 使之回复为 Na 型, 并用水洗至中性。如此反复数次, 最后, 再用 10 倍量 1mol/L HCl 处理成 H 型, 水洗至中性备用。阴离子交换树脂一般是 Cl 型, 可先用 10 倍量 1mol/L NaOH 浸泡变为 OH 型, 然后, 再反复用酸、碱处理, 最后, 使之变为 OH 型。但 OH 型常易吸收 CO<sub>2</sub>, 因此, 最好在临用前定型。纤维素和凝胶对酸、碱的稳定性较差, 特别是对酸敏感, 因此, 酸、碱浓度要低些(如 0.5mol/L), 处理时间要短些(10~20min), 并应立即洗至中性。

离子交换吸附或以静态方式, 或以柱层析方式进行, 不过一般多用后一种方式。不管用什么方式, 吸附前, 预处理好的交换剂一定要用扩展缓冲液充分平衡。平衡的目的是要使整个系统保持恒定的 pH 和离子强度。表 4.8 列举了某些可供选择的缓冲物质和平衡用的 pH。离子强度一般不宜太高, 因为当离子强度等于 0.1 时, pH 达到距离等电点 0.5 个 pH 单位时就可能发生解离; 反之, 也不宜太低, 因为盐对蛋白质有稳定作用。此外, 应用不同的交换剂, 其离子强度适用的范围也不一样。通常情况下, 平衡用的缓冲液离子强度可选择在 0.01~0.05 范围内, 而离子交换凝胶则可容许较高的离子强度。

表 4.8 离子交换层析中可用的缓冲液物质与 pH

离子交换剂	可供选择的缓冲离子	平衡用的 pH
阴离子交换剂	烷基胺, 氨基乙醇, 铵盐, 乙二胺, 咪唑, Tris...	大于 pI 一个 pH 单位
阳离子交换剂	乙酸, 巴比妥, 柠檬酸, 甘氨酸, 磷酸...	小于 pI 一个 pH 单位

③ 离子交换吸附层析。离子交换柱层析所用的柱床高度可比胶过滤小些, 一般的分离 20 cm 已足, 较复杂的样品可以稍长些。

为了使离子交换有好的吸附与解吸效果, 样品的离子组成、离子强度与 pH 都应和平衡缓冲系统一致, 为此, 可让样品先通过 Sephadex G-25 进行胶过滤或先对平衡缓冲液进行透析。而且, 样品量最好控制在总交换容量的 1/4~1/3 水平, 样品的体积也应控制在 1%~5% 床体积。如果交换柱是用来吸附除去样品中的杂质, 而不吸附所要的酶, 则样品体积可以相对大一些。

要使样品中各种蛋白质分子能在交换柱上充分分离开来, 还必须用适宜的缓冲液进行扩展、洗涤和洗脱。洗脱有三种方式: 等温平衡洗脱, 即用平衡缓冲液直接进行扩展洗脱; 阶梯洗脱, 即分段地改变缓冲液的 pH 或者离子强度进行扩展洗脱; 梯度洗脱, 即连续地改变缓冲液的 pH 或者离子强度进行洗脱。后两种方式主要是利用 pH 改变蛋白质和交换基的解离状态, 或利用盐离子竞争性地将蛋白质从交换剂上取代下来。一般情况下, 阶梯洗脱的分离效果优于平衡洗脱, 而梯度洗脱则更好。分离图谱的峰带重叠时, 改用梯度洗脱往往可使重叠现象得到改善。应指出的是, 梯度曲线常因梯度形成器的形状而不同(图 4.7), 一般多用线性梯度。

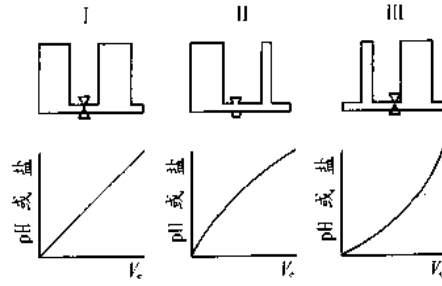


图 4.7 几种梯度类型

离子交换吸附法在应用上是目前仅次于盐析的一种纯化方法。它的适用面广,几乎所有的蛋白都可用此法分离;其次,它具有很高的分辨率。

## 2. 电泳分离法

这是根据各种蛋白质在解离、电学性质上的差异,利用它们在电场中的迁移方向与迁移速度的不同而进行纯化的一类方法。荷电物质在电场中的迁移速度(或泳动率)符合下述规律:

$$\mu = \frac{o}{6\pi\gamma\eta} \quad 4.16$$

$\mu$  为迁移速度,  $o$  为荷电物质所带的净电荷,  $\gamma$  为分子半径,  $\eta$  为介质粘度。因此,电泳分离法除了取决于目的物质的解离电学性质与分子大小以外,也和电泳介质的 pH、离子和离子强度(最适离子强度为 0.02~0.2)等有密切关系。

电泳方法可以达到很高的分辨效果,但在实验放大和样品回收方面有一定困难,因此目前主要用于蛋白质的分析和小规模制备。

常用的电泳可大体分为以下几种类型。

### (1) 自由界面电泳(free electrophoresis)

这是 Tiselius 最早发明的、在胶体溶液与溶剂间形成界面的一种电泳,它的分离效果好,但是需要复杂的设备,故现在仅用于纯酶的均一性检定。

### (2) 区带电泳(zone electrophoresis)

这是在惰性支持物上进行的一类电泳分离、分析法。和前一类电泳相比,它具有简便灵活,无对流扩散,因而可达到完全分离的优点。

① 膜电泳。最简单的区带电泳是膜电泳,以滤纸、醋酸纤维素薄膜等为支持物,简易快速,但分离量很低,只能用于蛋白质分析。它的一种衍生形式称为连续电泳,可用来进行小规模分离,只要保持恒定的液流速度与电压就能达到稳定的分离效果。

② 粉末电泳。第二种区带电泳是粉末电泳,常用的支持物为淀粉、纤维素。淀粉通常做成糊状在水平槽中进行电泳,然后染色定带,最后切下相应的区带,洗脱回收。纤维素粉则往往装柱进行垂直电泳,电泳完毕后再以取代方式连续洗下各成分。粉末电泳有一定的分辨率和分离量,但是上述支持物都有不同程度的可溶性,因而常给酶的回收带来麻烦;同时它们还有一定程度的电渗性,也会降低电泳分离效果。近年来有人企图用聚乙烯氯与 Sephadex 分别取代淀粉和纤维素。

③ 胶电泳(gel electrophoresis)。这种电泳兼具分子筛效应,因而可达到很高的分辨率。



常用的有聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)。

聚丙烯酰胺胶电泳常以不连续方式进行,也就是电泳的胶与缓冲系统都具有不连续性,称为 disc (discontinuous) 电泳。正是由于这种不连续性,导致样品在电泳分离过程中被浓(压)缩成圆盘状 (disc) 薄层,从而显示很高的分辨率。这种电泳胶由三部分组成:样品胶和成层胶 (Spacer 胶或称 Stack 胶),它们的孔径与缓冲介质都相同;分离胶 (Separate 胶或称 Run 胶),它的孔径较小, pH 也不同于前两者。胶中的缓冲离子由易于解离、迁移率大的离子,如  $\text{Cl}^-$  组成,故称为先行离子;电极液缓冲离子 (如 Gly), 在样品胶和成层胶的 pH 条件下,如 pH 6.7,解离度很小 (1% 以下),迁移率也慢,故称为尾随离子;至于样品,它们在样品胶与成层胶中的迁移率通常介于上述两种离子之间。电泳开始后,先行离子超前流动,并在它的后面留下一低离子浓度的低电导区。这种低电导区导致高电位梯度的产生,迫使尾随离子加速泳动,在高、低电位区间构成迁移快的界面,同时样品离子被压缩于界面中形成圆盘状薄层。由于样品各个组成成分所带的电荷不同,迁移率也各有差异,所以,这种圆盘状薄层实际上是由样品中各个组成成分相对应的亚圆盘薄层按迁移率堆叠而成的。当样品离子和尾随离子进入分离胶后,由于其间的 pH 有利于尾随离子的解离,故它的迁移率显著增大,并迅速超越样品离子,导致高的电位梯度消失,样品开始在具有均一电场的分离胶中按照解离状况接受电泳分离。由于分离胶孔径较小,样品同时受到分子筛效应的控制,净电荷相同的蛋白质也能得到进一步分离,故而分辨率很高 (图 4.8)。

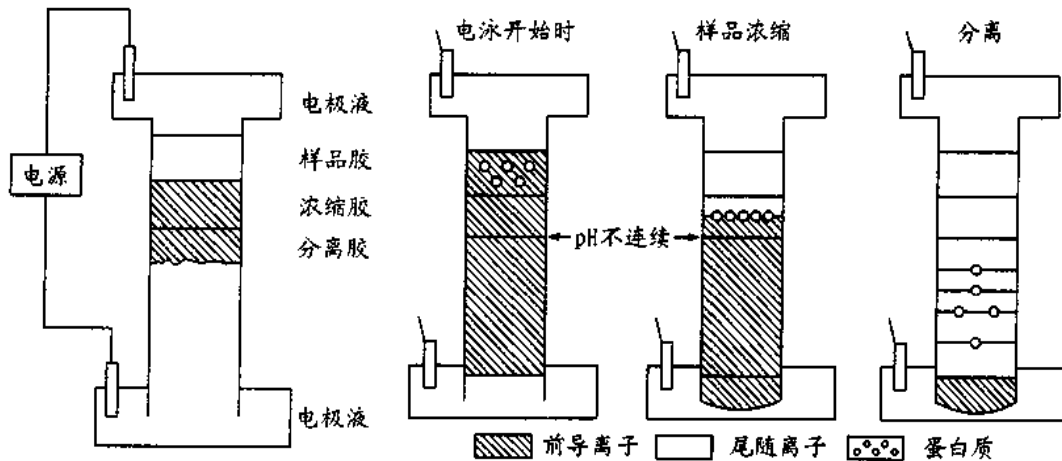


图 4.8 不连续电泳示意图

disc 电泳的突出优点是具有极高的灵敏度和分辨率,因此,是一种十分理想的蛋白质分析方法。但是它在制备应用上还存在局部温度过高、分离量小、回收麻烦等缺点。为此,人们提出了多种改进方案。例如,有人设计了中空圆筒状胶以解决发热和分离量问题;在样品的回收上有人提出直接压出办法,也有人提出电泳洗脱办法。

但是,在 disc 电泳中,蛋白质的迁移率由多种因素决定,如蛋白质的静电荷、大小、分子形状等。为了进一步提高这种电泳的分辨率,又发展了 SDS - 聚丙烯酰胺胶电泳 (SDS - PAGE) 等。SDS (十二烷基磺酸钠) 是一种阴离子去垢剂,它能与蛋白质结合,破坏蛋白质分子内部和分子间以及与其他物质间的次级键联系,使蛋白变性;由于通常每克蛋白质约能结合 1.4 克 SDS,从而,使蛋白质所带的负电荷远超过蛋白质原有电荷数,这样就消除不同蛋

白原有的荷电差异；再加上结合了 SDS 的蛋白质都是椭圆状，没有大的形状差异，因此，蛋白质电泳迁移率仅取决于蛋白质的分子量。所以，SDS - 聚丙烯酰胺胶电泳能用于，而且主要用于蛋白质的纯度分析和分子量测定。

### (3) 等电聚焦电泳(isoelectric focusing)

这是利用两性电解质载体(商品称为 Ampholine)，在电场作用下能形成连续平滑的 pH 梯度，而待分离样品中各组分在电泳过程中，又能按照各自的等电点聚焦到相应的 pH 梯度位置上从而达到分离目的的一类方法。其中，Ampholine 是一种多乙烯多胺与丙烯酸加合反应得到的同系异构体混合物，它们具有相近的 pK 值与 pI 值。从广义来说，这种电泳也是一种自由界面电泳，但是，通常进行这类电泳时都采用蔗糖或甘油等组成的密度梯度溶液防止对流，避免已分离的区带重又回混。等电聚焦电泳的特点是具有非常高的分辨率(等电点仅相差 0.02 个 pH 单位的蛋白也能得到分离)，而且区带清晰，并能告诉人们在待分离或分析的样品中包含哪些等电点的蛋白质，这对于跟踪纯化过程中蛋白质组分的变化很有帮助。但是，它还未能广泛用于大规模纯化，主要原因在于大多数蛋白质在等电点时溶解度下降，易生成沉淀，从而影响了它的分离容量与效果。

等电聚焦的第二个发展是和胶电泳相结合，即以聚丙烯酰胺胶或葡聚糖胶作为支持物进行聚焦胶电泳。其优点是分离量可以增大，而且简便快速，缺点是纯化组分的回收率较为费事。这种方法的另一发展是进行所谓区带对流聚焦电泳，聚焦是在 50 ~ 100 个相互连接的 U 形管中进行，不需要密度梯度和胶抗对流，分离量可明显增大，而且纯化的蛋白质也容易回收。最近，Pharmacia 又推出一种制备性等电聚焦电泳单元(Preparative Iso - Prime™ Multi - Chambered Electrofocusing Unit)，它是采用 pI 选择性等电聚焦膜，将电泳池内的蛋白质按 pI 进行分隔分离，样品量可达 g 级。

等电聚焦电泳的第三个发展则是和层析技术相结合形成聚焦层析。

### 3. 聚焦层析(chromatofocusing)

聚焦层析是根据蛋白质的等电点差别进行层析分离的纯化方法。它不需要特殊的聚焦电泳装置，却兼具等电聚焦电泳的高分辨率和柱层析的简便性两种优点。

聚焦层析的原理是：当用特种的多缓冲液滴定和淋洗填充在层析柱中的特种多缓冲交换剂时，随着这种缓冲液的扩展，就会在层析柱中自上而下地建立起连续的 pH 梯度；将待纯化样品加入该层析柱，其中的蛋白质组分就将随多缓冲液的扩展按各自的等电点聚焦于相应的 pH 区段，并随扩展过程中 pH 梯度的逐渐下移而下降，最后分别从层析柱先后流出，达到分离纯化的目的。因此，这一方法的关键是选用适当的多缓冲交换剂和多缓冲液，以便在层析柱中建立 pH 梯度。通常选用的多缓冲交换剂和多缓冲液是商品 PBE 94 和 Polybuffer 96，它们是缓冲对。其中 PBE 94 是阴离子交换剂，使用时先将它在一定 pH(例如 pH 9)的“起始缓冲液”中平衡，然后装柱；Polybuffer 96 的有效缓冲范围是 pH 9 → pH 6，使用时先将它调整至较低的 pH(例如 pH 7)，作成“极限缓冲液”，然后再用它滴定淋洗层析柱中的多缓冲交换剂。这样，由于两种缓冲因素的相互作用，就会在层析柱中自上而下地形成逐渐增大的 pH(pH 7 ~ 9) 梯度。这种 pH 梯度的形成方式和以梯度混合器形成 pH 梯度的方式，在原理上完全相同。图 4.9 (A) 是聚焦层析与吸附交换层析中形成 pH 梯度的比较示意图。图 4.9 (B) 是聚焦层析中随多缓冲液淋洗扩展时，pH 梯度改变与柱高(h)的关系示意图，曲线

1, 2, 3, ..., n 分别描述了每加入一份多缓冲液时, 上述关系的变化情况。

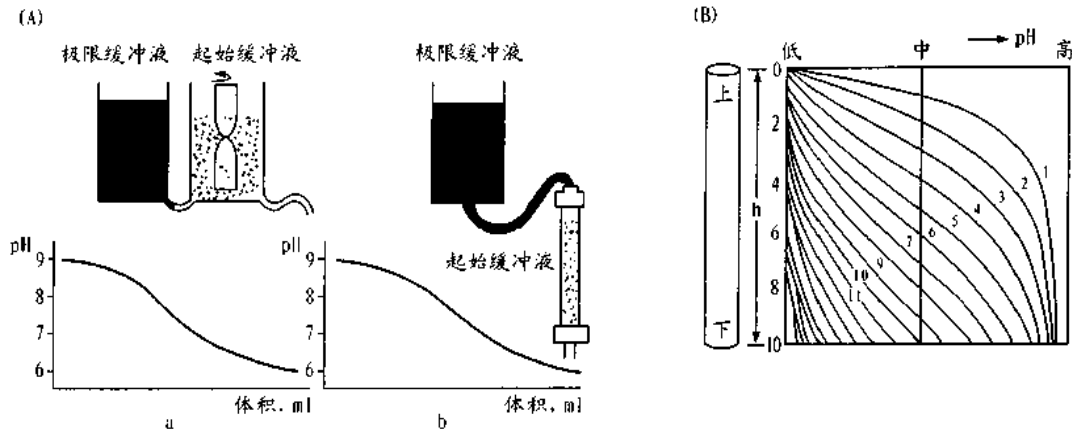


图 4.9 两种 pH 梯度形成方式(A)  
聚焦层析中 pH 梯度与层析柱高的关系(B)

在利用聚焦层析进行蛋白质的分离过程中, 一方面要在层析柱中建立 pH 梯度, 同时也要使被分离的各蛋白质组分在多缓冲液扩展时能按各自的等电点分别聚焦到相应的 pH 区带上。以 PBE 94 和 Polybuffer 96 构成的层析系统为例, 这种柱有两个特点, 一是采用的是阴离子交换剂, 二是 pH 梯度自上而下逐渐增大。当样品加入层析柱后, 对于其中任何一种蛋白质组分来说, 只要它所在位置的 pH 低于其等电点, 它将因解离而带正电, 不与阴离子交换剂结合, 并随多缓冲液淋洗扩展而向下移动, 直到所在位置的 pH 略高于其等电点, 它才从带正电荷变为带负电荷, 被离子交换剂结合而停止移动。但是多缓冲液进一步淋洗扩展时, 它所在位置的 pH 又将要降低到它的等电点以下, 这样它又将继续下移。如此反复地交换结合和解吸, 最后各种蛋白质组分就必然按照各自不同的等电点由高到低而先后被洗出, 从而达到分离的目的。值得提到的是聚焦层析的聚焦效应还有一个特点, 就是任何蛋白质在洗出前, 如果再加入另一份相同的蛋白质, 这份新加入的蛋白质也将与淋洗液以相同的扩展速度而迅速聚焦到相应的蛋白聚焦带上, 然后和它共同洗出。

聚焦层析的实验流程如下:

1. 根据样品等电点选择适宜的多缓冲交换基和多缓冲液;
2. 调整起始缓冲液 pH 至梯度上限, 以该缓冲液平衡多缓冲交换剂; 装柱;
3. 调整多缓冲液 pH 至梯度下限, 以此多缓冲液 5 ~ 10 ml 流过柱;
4. 加样; 以调整至梯度下限之多缓冲液扩展、洗脱; 分部收集并检测洗脱液;
5. 多缓冲交换剂的再生与平衡。

为了获得较好的分离效果, 有一个选择适宜的层析介质与操作条件的问题。

#### (1) 选择适宜的多缓冲交换剂和缓冲液

构成聚焦层析系统最基本的因素是缓冲交换剂和缓冲液。通常用一种缓冲液去滴定另一种不同的缓冲液往往不能产生满意的线性 pH 梯度, 这是由于其缓冲容量常随 pH 而改变的原故。为此, 瑞典 Pharmacia 公司专门生产了相应的多缓冲液和多缓冲交换剂, 它们能在一定的 pH 范围内表现十分均匀的缓冲性能。作为商品的有两组: 一是多缓冲交换剂 PBE 94 和多缓冲液 Polybuffer 96、Polybuffer 74; 一是多缓冲交换剂 PBE 118 和多缓冲液

Pharmalyte pH 8 ~ 10.5。PBE 94 和 PBE 118 是以 Sepharose 6B 为基本骨架,通过醚键偶联了相应的基团而成的阴离子交换剂。有较好的机械性能和流速,不因 pH 的改变影响其床体积;其盐型在 pH 7 时可经受 110℃ ~ 120℃ 高温灭菌;在 pH 3 ~ 12 时对盐和有机溶剂稳定;应用范围分别为 pH 4 ~ 9 和 > pH 9。多缓冲液 Polybuffer 和 Pharmalyte 是两性电解质性质的缓冲液,和 Ampholine 相似,也是相对分子质量不同的多羧基多氨基系列化合物。PBE 7 - 4 能和 Polybuffer 96 与 Polybuffer 74 组合,分别适用于 pH 9 ~ 6 和 pH 7 ~ 4。PBE 118 能和 Pharmalyte 8 ~ 10.5 组合,适用于 pH 9 以上的分离(表 4.9)。多缓冲液通常以液体形式供应,应贮于冷暗处(3℃ ~ 8℃),使用前稀释。上述多缓冲交换剂 - 多缓冲液组合提供了一个大致的 pH 应用范围,即三个左右的 pH 单位,例如, pH 4 ~ 7、6 ~ 9、7 ~ 10.5,一般 pH 4 ~ 9 已足以对付 85% 以上的常见蛋白质。不过,在具体工作中,为了获得好的分离效果,仍然有一个合理选用 pH 梯度范围问题。

表 4.9 多缓冲交换剂与多缓冲液组合

组成成分	多缓冲交换剂	多缓冲液	应用 pH 范围
组合方式	PBE 94	polybuffer 96	pH 9 ~ 6
	PBE 94	polybuffer 74	pH 7 ~ 4
组合方式	PBE 118	Pharmalyte 8 ~ 10.5	> pH 9

### (2) 选择适宜的 pH 梯度范围

如果待分离成分的等电点已知,那么选择的 pH 梯度范围应能使该成分在 pH 梯度的 1/3 ~ 1/2 处洗出(图 4.10),这样,分辨率较高,时间也较经济。如果样品的等电点不清楚,那么,最好以 Polybuffer 74 为最初的选择对象。因为如果待分离成分的等电点高于此范围,则样品将直接流出,很易回收,便于再尝试其他范围。反之,选择的 pH 范围如果高于被分离成分的等电点,则样品将结合于柱上,需用盐才能洗下。更主要的原因还在于大多数蛋白质的等电点都在 pH 7 ~ 4 的范围内。

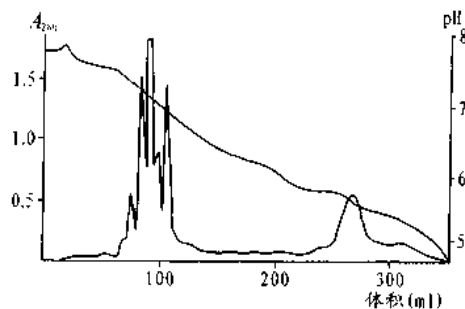


图 4.10 pH 梯度范围的选择

当实验用的 pH 梯度范围确定后,则多缓冲交换剂、起始缓冲液和极限缓冲液就可根据表 4.10 制备。多缓冲交换剂在应用前须先以起始缓冲液充分平衡。值得注意的是,表 4.10 中所用的对应离子为 Cl<sup>-</sup> 或醋酸根。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 会引起 pH 梯度改变,所以缓冲液在使用前应该除气;大气中的 CO<sub>2</sub> 在 pH 5.5 ~ 6.5 的实验条件下也常会使 pH 梯度变得平坦,此时,如果采用醋酸根则效果会较好;但是多缓冲液 Polybuffer 74 不能用醋酸根。除 Cl<sup>-</sup> 或醋酸根外,虽然还可用其他一价阴离子,不过它们的 pK<sub>a</sub> 至少应比 pH 梯度下限低 2 个 pH 单位。

表 4.10 聚焦层析的缓冲液与胶

pH 范围	液	起始缓冲液	洗脱液	稀释系数	近似体积		
					梯度起始前	梯度	总体积
10.5~9	PBE 118	pH 11	—	—	—	—	—
10.5~8	PBE 118	0.025 M 三乙胺-HCl	pH 8.0 Pharmalyte-HCl pH 8~10.5	1:45	1.5	11.5	13.0
10.5~7	PBE 118	0.025 M 三乙胺-HCl	pH 7.0 Pharmalyte-HCl pH 8~10.5	1:45	2.0	11.5	13.5
9~8	PBE 94	pH 9.4 0.025 M 乙醇胺-HCl	pH 8.0 Pharmalyte-HCl pH 8~10.5	1:45	1.5	10.5	12.0
9~7	PBE 94	0.025 M 乙醇胺-HCl	pH 7.0 Polybuffer 96-HCl	1:10	2.0	12.0	14.0
9~6	PBE 94	pH 9.4 0.025 M 乙醇胺-CH <sub>3</sub> COOH	pH 6.0 Polybuffer 96-CH <sub>3</sub> COOH	1:10	1.5	10.5	12.0
8~7	PBE 94	pH 8.3 0.025 M Tris-HCl	pH 7.0 Polybuffer 96-HCl	1:13	1.5	9.0	10.5
8~6	PBE 94	pH 8.3 0.025 M Tris-CH <sub>3</sub> COOH	pH 6.0 Polybuffer 96-CH <sub>3</sub> COOH	1:13	3.0	9.0	12.0
8~5	PBE 94	Tris-CH <sub>3</sub> COOH	pH 5.0 Polybuffer 96 (30%) + Polybuffer 74(70%)-CH <sub>3</sub> COOH	1:10	2.0	8.5	10.5
7~6	PBE 94	pH 7.4 0.025 M 咪唑-CH <sub>3</sub> COOH	pH 6.0 Polybuffer 96-CH <sub>3</sub> COOH	1:13	3.0	7.0	10.0
7~5	PBE 94	pH 7.4 0.025 M 咪唑-HCl	pH 5.0 Polybuffer 74-HCl	1:8	2.5	11.5	14.0
7~4	PBE 94	0.025 M 咪唑-HCl	pH 4.0 Polybuffer 74-HCl	1:8	2.5	11.5	14.0
6~5	PBE 94	pH 6.2 0.025 M 组氨酸-HCl	pH 5.0 Polybuffer 74-HCl	1:10	2.0	8.0	10.0
6~4	PBE 94	0.025 M 组氨酸-HCl	pH 4.0 Polybuffer 74-HCl	1:8	2.0	7.0	9.0
5~4	PBE 94	pH 5.5 0.025 M 咪唑-HCl	pH 4.0 Polybuffer 74-HCl	1:10	3.0	9.0	12.0

(3) 交换剂的用量

交换剂用量和样品量、样品的性质及需要达到的分辨率有关。一般 20 ~ 30 ml 床体积足以对付 1 ~ 200 mg 蛋白质/pH 单位的分离,但实际上适宜的胶用量最好还是通过实验确定。

#### (4) 样品

聚焦层析样品比较重要的问题是它的组成。通常情况下,不能含有大量的盐,离子强度应低于 0.05;样品最好先用起始缓冲液平衡。样品的 pH,在缓冲液的浓度较低时不会引起什么麻烦。样品量和每条层析谱带中的蛋白质量有关,通常可控制在每 10 毫升交换剂床体积 100 毫克左右的蛋白量。样品体积应不宜超过 0.5 床体积。

#### (5) 洗脱

聚焦层析过程会自动形成 pH 梯度,因此不需要特殊的 pH 梯度混合器。但是,第一,起始缓冲液的 pH 通常应高于所需 pH 约 0.4 个单位,这样可以缓和起始缓冲液与洗脱缓冲液相互作用产生的 pH 波动影响。第二,洗脱液的体积和洗脱强度有关。表 4.10 推荐的体积相当于 3 个 pH 单位间隔的 10 倍床体积,pH 梯度间隔缩小,体积也可相应减少。缓冲液强度太大,pH 梯度往往太陡,洗脱峰十分靠近,分辨率受影响;反之,如果强度太低,则洗脱体积大,费时,峰带宽,洗脱液中蛋白质浓度也低。此外,洗脱时,多缓冲液的 pH 间隔不宜超过 3 个 pH 单位。第三,洗脱液流速和要达到的分辨程度有关,通常可控制在 30 ~ 40 ml/h。

#### (6) 多缓冲液和蛋白质组分的分离

在收集的各洗脱液组分中除了蛋白质外,也包含多缓冲液,后者虽不干扰酶的检测,但它可能络合某些金属离子如铜等,因而最好在洗脱后设法将它们除去。比较简单的办法是将固体硫酸铵加入相应的洗脱液组分中,使之达到 80% ~ 100% 饱和度,放置 1 ~ 2 h 后让蛋白质完全沉淀,再离心分出,并用饱和硫酸铵溶液洗涤沉淀,这样可得到不包含多缓冲液的蛋白质。

#### (7) 交换剂的再生与贮存

交换剂在层析完毕后可直接用 2 ~ 3 倍床体积的 1 mol/L NaCl 流洗层析柱,以除去附着在柱上的蛋白质,进行再生。如果还有结合力较强的蛋白质,则可用 0.1 mol/L HCl 洗除,但此时必须立即用高 pH 的溶液中和,并再用适宜 pH 的起始缓冲液平衡。

多缓冲液和多缓冲交换剂一般可贮于 4℃ 左右的暗处,层析后的再生交换剂通常可加 24% 的乙醇防止微生物污染。

聚焦层析是一种十分简便、有效的纯化方法,往往可达到其他物理化学分离方法所不能达到的效果,因而日益为人们所接受。如果和其他方法并用则效果更为显著。

### 4. 快速液相层析 (fast-flow liquid chromatography, FPLC)

这也是一种离子交换层析,它的特点是:所用的离子交换剂是单扩散型的,有大的孔径,排阻相对分子量达到  $10^7$ ;高的结合能力和小的非专一吸附;颗粒的大小均一,预装柱中约有 40% 的空体积,因此有较低的回压和快的流速,是一般离子交换层析的 25 ~ 100 倍;稀释度小,洗脱峰的蛋白浓度是普通离子交换的 10 倍左右。

快速液相层析常用的交换剂有: Mono Q,  $[-CH_2 N^+(CH_3)_3]$ , 是强阴离子型交换剂; Mono S,  $[-CH_2 SO_3^-]$ , 是强阳离子型交换剂; Mono P, 主要用于聚焦层析。

为获得较好的分离效果:① 对于每一种交换剂、每一 pH,使用特定的缓冲系统;② 缓冲液的 pK 值应尽可能接近分离的 pH;③ 在分离时尽可能使用缓冲梯度而不使用盐离子梯度。

#### 5. 疏水层析(hydrophobic chromatography)

根据目的酶和杂蛋白在解离电学性质上的差别,开发了吸附分离法、电泳法和聚焦层析法。基于蛋白质在水溶液中总有一定比例的表面残基是非极性的,例如,有人观察到,在 13 种随机选择的蛋白质中就有 11 种可以吸附到带有疏水基的琼脂糖吸附剂上,人们于是发展了疏水层析法。

疏水层析的主要问题是获得有效的疏水介质或吸附剂,这些介质和吸附剂可通过 3 类反应(图 4.11)将非极性的疏水基团偶联到琼脂糖或 Sepharose 上制成:① 缩水甘油醚(glycidylether  $C_2H_3CH_2OR$ )和琼脂糖反应;② 疏水胺和甲基磺酰氯活化的琼脂糖反应;③ 疏水胺和溴化氰活化的琼脂糖反应。其中第一、第二种方法制得的介质具有较大的稳定性。

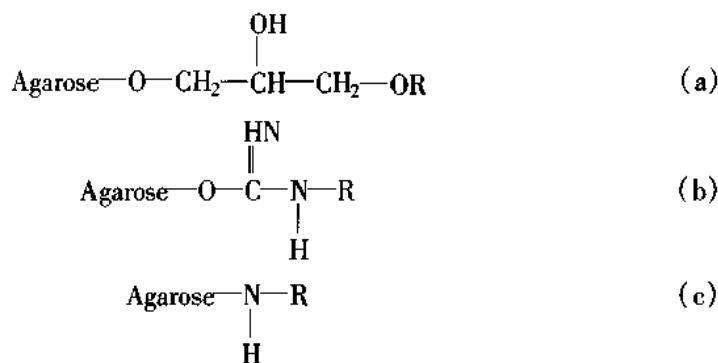


图 4.11 三种疏水层析吸附剂

疏水层析的基础是疏水基间的非极性作用,这种作用力随温度、盐离子(如硫酸铵、磷酸钠)及其浓度而改变,也随甘油、聚乙二醇等的浓度升高而增强;反之,随温度降低、盐离子等浓度的降低而削弱。某些促溶剂 chaotropic)、变性剂如 NaSCN、硫氰胍、脲、乙二醇(> 30%)及去垢剂等也能削弱其相互作用。这些特点都可用于疏水层析的吸附和解吸。

盐析层析也可认为是疏水层析,进行这种层析时可以用 DEAE 纤维素、Celite、硅藻土、Sepharose 4B 和 L-缬氨酰琼脂糖等为吸附剂,然后在 1.5 ~ 3.0 mol/L  $(NH_4)_2SO_4$  或 1 mol/L 磷酸条件下吸附蛋白,再在逐渐降低盐浓度梯度的条件下进行解吸。也可在逐渐提高乙醇(0.75 ~ 1.5 mol/L)或蔗糖(0.6 ~ 1.5 mol/L)或脲(2 ~ 5 mol/L)的浓度条件下进行洗脱。

疏水层析的优点是洗脱手段较多,例如,可以通过降低温度、也可通过降低盐浓度、还可使用乙二醇(0% ~ 50%)或丙二醇(0% ~ 70%)浓度梯度以及过量的 Triton X-100 等进行洗脱。

#### 四、利用专一亲和作用进行的纯化

##### 1. 亲和层析法

亲和层析法是根据生物分子间某种特有的亲和力而建立的一种纯化方法。例如,酶和

它的底物(包括辅助因子)、底物类似物或竞争性抑制剂等(通称为配基, Ligand)通常都具有较高的生物亲和力,能专一而可逆地形成酶-配基络合物。因此,如果将这类配基偶联固定于载体作成亲和层析吸附剂,那么,在将它和含有待纯化酶的样品混合时,它就能迅速而有选择性地从溶液中“抓”出来,达到和其他杂蛋白分离的目的,这就是亲和吸附。如果再设法洗涤除去吸附过程中非专一附着的杂质,则又可得到一次纯化。最后还可用亲和力更强的配基,或促进层析系统的解吸条件选择地将酶从亲和吸附剂上“拉下来”,进行亲和洗脱,这样又可得到一次纯化,故而分辨率很高。这种方法 30 年代就已为人们所采用,例如,用马铃薯淀粉吸附淀粉酶、兔肌磷酸化酶,然后用糖原溶液进行洗脱。但是,亲和层析法仅在 1967 年报道用 BrCN 活化载体的固定化技术得到了迅速发展以后,才得以系统地进行研究和开发。现在,这种方法已成为一种强有力的纯化手段,正在逐渐推广应用,图 4.12 为其原理示意图。

为了取得较好的亲和分离效果,应考虑以下问题:

### (1) 载体

一种适宜的载体首先必须是亲水的,而且必须结构疏松,便于待纯化分子自由地与配基接触;其次必须具有大量可以和配基进行偶联反应的基团;第三最好是惰性的,不和杂蛋白分子产生非专一吸附,同时还要经得起偶联、吸附、洗脱等过程各种 pH、离子强度、温度变化的考验,甚至经得起变性剂如脲、盐酸胍等的反复处理,并在装柱后有良好的流体力学性质。

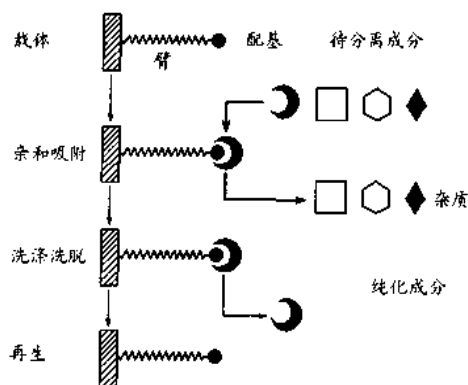


图 4.12 亲和分离原理示意图

根据这些要求,在常见的载体中,聚苯乙烯衍生物由于其骨架高度疏水,使得制成的吸附剂衍生物很难和亲水分子作用,因此,未曾有人用它们作为酶的亲和吸附剂载体。纤维素虽然来源丰富、经济,反应基团也多,但是由于其膨润性能差,蛋白分子很难渗入,可能引起“空间障碍”,所以应用也不多。微孔玻璃需用氧化硅烷为偶联剂,优点是能抗微生物侵蚀,不因有机溶剂、缓冲液组成等的改变而发生结构方面的变化,但有非专一性吸附之弊,因此也少应用。葡聚糖凝胶,其理化性质很好,但作为亲和分离载体孔径还嫌太小,即使采用 G-200,效果也往往不太理想;而且在偶联配基后,膨润度常会进一步下降,同时胶的容量常因 pH、离子强度而改变,故实际应用也有限。聚丙烯酰胺的特点是理化性质稳定,有一定抵抗能力,而且有大量可供偶联应用的酰胺基;但孔径也太小,偶联配基后会进一步收缩,作为亲和分离的载体,它的应用赶不上琼脂糖。至于琼脂糖,它无论在亲水性、反应性能以及机械强度等各个方面都比较理想,并经得起 0.1 mol/L 酸、碱,7 mol/L 脲等较长时间的处理;更



重要的还在于其结构疏松,能让相对分子质量达百万的大分子也能自由通过,而且极少非专一性吸附。在酶的分离中用得最多的是琼脂糖 4B,和葡聚糖一样,它的偶联基团是羟基。

## (2) 配基

亲和层析不限于酶的纯化,也可用于抗原与抗体、核酸以及糖蛋白等的分离,因此,所对应的配基也各种各样。表 4.11 为亲和层析中某些可用的配基物质。

表 4.11 亲和层析中常用作配基的物质

被分离物质	可用作配基的物质
酶	底物,底物类似物,抑制剂,辅助因子
抗体	抗原,病毒,细胞
凝集素	多糖,糖蛋白,细胞表面受体
核酸	互补的碱基序列,组蛋白,核酸聚合酶,核酸结合蛋白
激素、维生素	受体,载体蛋白
细胞	细胞表面专一蛋白,凝集素

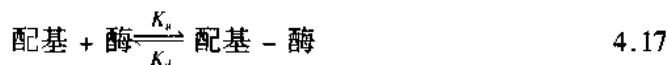
就亲和层析来说,被纯化物质与配基的亲合关系愈专一,分离效果无疑也愈好;但是,这样就需要对每一种纯化物质设计和制备一种相应的配基吸附剂,显然,这不是简便经济的办法。因此,在实际工作中,更多的是采用一些“族”专一性的配基(表 4.12)。

表 4.12 某些常用的“族”专一性配基

配基	专一性	应用	洗脱
蛋白 A -	IgG Fc 区	各种 IgG, IgG 亚类以及碎片等	0.1M HAc pH3.0, 或 0.1M Gly Tyr, pH7.0
ConA -	$\alpha$ -D-葡萄糖苷残基	糖蛋白,膜蛋白,糖脂,多糖等	游离糖(甲基- $\alpha$ -D-葡萄糖苷);脉冲或梯度洗脱(0~0.5 mol/L);或降低 pH 至 3 以下;或用硼酸缓冲液(0.1 mol/L pH6.5)
小扁豆凝集素 -	类似于 Con A,但较弱	膜蛋白,糖蛋白	游离糖(甲基- $\alpha$ -D-葡萄糖苷);脉冲或梯度洗脱(0~0.1 mol/L)
麦胚芽凝集素 -	N-乙酰- $\beta$ -D-葡萄糖胺残基	糖蛋白,多糖细胞(如 T-淋巴细胞)	游离糖(N-乙酰- $\beta$ -D-葡萄糖胺);脉冲或梯度洗脱
蜗牛凝集素	N-乙酰- $\alpha$ -D-半乳糖胺残基	细胞(如 T-淋巴细胞)糖蛋白	同上
poly(U) -	poly A, 寡聚 A -	mRNA, 植物核酸, 干扰素	甲酰胺(90%), 提高温度
poly(A) -	poly, 寡聚 U -	hnRNA, 病毒核酸, mRNA-结合蛋白, RNA 聚合酶, 抗核酸的抗体	甲酰胺(90%)洗脱 RNA, 升高离子强度洗脱蛋白
Lysine -	酸性蛋白	血纤维蛋白溶酶原或血纤维蛋白溶酶原激活剂 rRNA	专一试剂(0.2 mol/L 氨基己酸);升高离子强度(0.05~0.3 mol/L NaCl)
Cibacron 蓝(Blue Dextran)	广泛	广泛范围(>50种);需需要核苷酸的酶;清蛋白;干扰素	游离辅助因子,如 NAD <sup>+</sup> (0~0.2 mol/L);升高离子强度(0~1 mol/L NaCl);降低或升高 pH
5'-AMP 或 2',5'-ADP	NAD 类似物 NADP	需 NAD(P)的脱氢酶;需 ATP 的激酶	游离辅助因子,如 NAD <sup>+</sup> , NADP <sup>+</sup> (0~0.2 mol/L);升高离子强度(达 1 mol/L);降低或升高 pH

作用理想的配基应符合以下要求:

① 它和待纯化成分间有强的亲和力,实际上,吸附和洗脱都由这种亲和作用力决定。亲和力的强度常以解离常数  $K_d$  表示



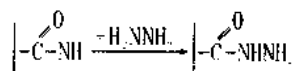
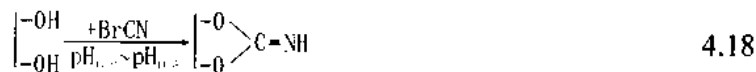
适宜的配基,  $K_d$  的范围应为  $10^{-8} \sim 10^{-4}$  mol/L。如果  $K_d$  太小,例如,  $K_d < 10^{-8}$  mol/L,则酶和配基间的作用力将太强,结合太紧,解吸就会发生困难,可能需要十分激烈的条件才能将其洗下;反之,  $K_d$  太大,例如,  $K_d > 10^{-3}$  mol/L,则结合力非常弱,很难达到完全专一吸附的目的。

② 具有可供偶联固定用的活泼基团,而且它们和固相载体结合后,不会影响或破坏配基和酶间的相互作用。

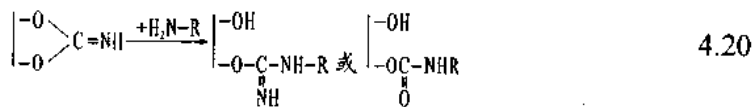
③ 适当的偶联量。偶联量太高则易造成过强的结合,使洗脱困难,同时也可能带来空间障碍和非专一性吸附;但是,当配基的亲和力太小,例如,  $K_d > 10^{-3}$  mol/L 时,亲和吸附容量较低,不利于纯化,此时适当升高配基偶联量将有助于改善分离效果。对于大多数系统来说,配基偶联量以  $1 \sim 20 \mu\text{mol/L}$  膨润胶比较适宜。

### (3) 偶联

为了完成载体和配基之间的偶联,往往先要进行活化。最常用的办法是先将载体偶联基活化。其中,葡聚糖和琼脂糖的糖羟基可用溴化氰反应,使之形成十分活泼的亚氨基碳酸盐衍生物见式 4.18;聚丙烯酰胺的酰胺基可通过水合肼反应将它处理成酰肼衍生物,或者在此基础上再用亚硝酸处理,使之形成叠氮的衍生物见式 4.19。



经过活化处理后,如果配基的偶联基团是伯胺基或芳香胺基,那么,它们可以直接和亚氨基碳酸基或叠氮基反应,完成配基和固相载体的偶联。

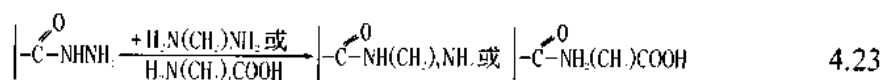


但是,通过这种直接偶联方式得到的亲和吸附剂,往往由于配基和载体间距离太近,而酶的活性部位一般又都在酶分子的深部,因此待纯化酶的结合基团和配基间无法表现亲和作用。为此,通常需要在配基与载体间加上一段短“臂(arm)”,使配基和待纯化酶的结合基团能较好地接近,以改善亲和吸附效果(图 4.13)。

吸附剂	吸附容量	聚丙烯酰胺	琼脂糖
$\left  \begin{array}{c} \text{---NH---} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle \text{---PO}_2 \end{array} \right  \begin{array}{c} \text{T} \\ \text{PO}_2 \end{array}$		0.6	2
$\left  \begin{array}{c} \text{---NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{NH---} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle \text{---PO}_2 \end{array} \right  \begin{array}{c} \text{T} \\ \text{PO}_2 \end{array}$		2	8
$\left  \begin{array}{c} \text{---NHCH}_2\text{CNHCH}_2\text{CNHCH}_2\text{COOH} \\ \text{---NHCH}_2\text{CNHCH}_2\text{CNHCH}_2\text{---} \langle \text{C}_6\text{H}_3(\text{OH}) \rangle \text{---N=N---} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle \text{---PO}_2 \end{array} \right  \begin{array}{c} \text{T} \\ \text{PO}_2 \end{array}$		3	8
$\left  \begin{array}{c} \text{---NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{NH---} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle \text{---PO}_2 \end{array} \right  \begin{array}{c} \text{T} \\ \text{PO}_2 \end{array}$		3	10

图 4.13 亲和层析中“臂”的作用

“臂”的长度必须适中,太短效果不大,太长则可能导致非专一性吸附。“臂”应具备下列特点:有可以和载体及配基进行共价偶联的功能基团;不带电荷但亲水;经得化学处理。可用的“臂”有三类:①碳氢链如 $\alpha,\omega$ -二胺化合物、 $\alpha,\omega$ -氨基羧酸;②聚氨基酸如:聚-DL-丙氨酸、聚-DL-赖氨酸等;③某些天然的蛋白质,如白蛋白等。尤以第一类最常用,它们的氨基能直接和亚氨基碳酸盐或酰肼反应:



臂端的氨基和羧基不活泼,除了带游离羧基或氨基的配基可通过羰二亚胺与相应的氨基或羧基缩合外,大多数情况下,臂末端必须经过再活化后,才能和配基偶联。

#### (4) 吸附和洗脱。

亲和层析和其他层析相似,实验程序包括吸附剂的制备、预处理平衡、装柱、加样吸附、洗涤和洗脱,以及脱盐再生等基本环节。

影响吸附的因素,除了 pH、温度、缓冲液离子及离子强度外,还应考虑亲和吸附剂量(包括配基含量)和样品量间的最适比例,样品量过高或过低都将影响分离效果;样品的体积,和亲和结合力有关,亲和力大时,在胶床的总吸附容量范围内,体积可以大些;结合力弱时,则宜控制于床体积 5% 以内。此外,蛋白浓度应不超过 20~30 mg/ml,浓度太高时,分子倾向于聚集而不利与配基相互作用。第三是柱的长度与大小,这一点在吸附剂亲和力较低时更为重要。第四是流速,除个别例外,流速不宜大于 10 ml/(cm·h)。最后是吸附方式,吸附剂亲和力较强,而样品体积量又大时,可采用静态吸附,因为它的效率较高,而且省时,否则应用层析方式。

洗涤是为了除去非专一吸附的杂质,通常可用平衡缓冲液或其他缓冲液淋洗。

洗脱在整个层析过程中是十分关键的一步。洗脱条件应能削弱酶和亲和吸附剂间的相

互作用,这种条件一般应比在溶液中使酶和配基络合物解离的条件更为强烈。常用的包括非专一性洗脱与专一性洗脱。

非专一性洗脱有:改变温度进行洗脱;

改变 pH 进行洗脱;

改变离子强度进行洗脱;

改变溶剂系统进行洗脱;

加促溶剂;

电泳解吸。

专一性洗脱有:半抗原竞争性洗脱;

抑制剂竞争性洗脱;

底物类似物竞争性洗脱。

但某些情况下,要用到更激烈的手段。

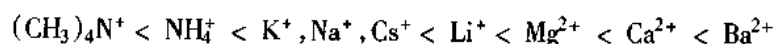
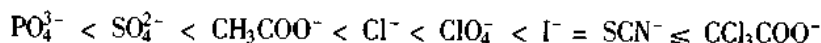
① 非专一性洗脱,主要包括以下内容。

通过改变温度进行的洗脱。这是由于溶质从液相吸附到惰性固相载体是一个放热过程,因此,升高温度能使吸附平衡移向解吸方向。而且,吸附过程愈是放热大,随着温度升高愈易被洗脱。亲和吸附服从这一规律,当被吸附的分子有不同的吸附热( $\Delta H$ )时,通过改变温度就可将它们分别洗脱下来。这种洗脱方法的优点是洗脱液中不需要加入盐类等外来因素。例如,吸附于 AMP-Sephrose 的激酶和脱氢酶类,这种洗脱方式特别有用,通过线性温度梯度洗脱就能达到好的分离。

通过改变 pH 和离子强度进行洗脱。在亲和吸附中有一种重要的作用力就是静电键,因此,在洗脱时,改变 pH 有可能使酶和配基间原有的吸引力转变为排斥力,从而达到选择性解吸洗脱的目的。但是选择的 pH 应不影响酶的稳定性。另一方面也可通过升高介质的离子强度,在吸附剂与酶间造成离子屏蔽来削弱静电作用力,例如,常用 NaCl,一般当小于 1 mol/L NaCl 时就可使酶洗脱下来。但是如果亲和力很大,例如,  $K_d < 10^{-6}$  mol/L 时,促溶剂就可能发挥较大作用。如果遇到多价阳离子参与静电键的形成,最好的办法是用螯合剂来进行解吸。

除了静电作用以外,范德瓦尔力和疏水键在建立专一性吸附中也很重要。为了破坏这种作用力,可通过加入与水相混溶的溶剂,如乙二醇、二甲亚砜、二甲乙亚胺等,降低层析系统的表面张力,降低系统的范德瓦尔力。

促溶离子具有破坏水的结构并削弱疏水键的作用,因而也可用作解吸洗脱剂。促溶离子在免疫亲和层析中应用最多,它们的洗脱效果有如下规律:



② 亲和洗脱。这是一种专一性洗脱,主要用于“族”专一性吸附剂或者结合力较低(如  $10^{-6}$  mol/L  $< K_d < 10^{-4}$  mol/L 的情况。进行这种洗脱时,常采用半抗原、类底物、抑制剂、辅助因子或其他与被吸附的成分有特殊亲和力的物质。它们或者能竞争性地和被吸附物质结合,例如,用 NADH 将激酶或脱氢酶从 5'-AMP-Sephrose 4B 上洗脱下来;或者能竞争性地和配基结合,例如,用游离糖从 Con A-Sephrose 上洗脱糖蛋白。洗脱方式或者通过升高亲

和洗脱剂进行浓度梯度洗脱,或者用几种不同的解吸剂(包括亲和洗脱剂)进行脉冲洗脱。亲和洗脱的选择性较高,但洗脱的稀释度也往往较大,而且即使提高洗脱剂浓度也不能有大的改善。其中的主要原因在于洗脱是由酶-配基络合物的解离速度决定,络合物愈稳定,需要的时间也愈长, $t_{1/2}$ 大约是5~15 min。这种情况下要使95%的酶洗脱下来,就要一个小时或更长的时间。增大洗脱浓度能阻止酶-配基重新结合,而不能改变释放酶所需的时间;另一方面,如让洗脱剂在流出柱前有一段保温时间可部分解决这一问题。

③ 变性、断裂和降解。在常用的洗脱方法无能为力或无法采用时,可以选择较激烈的变性手段,例如,可以加脲、盐酸胍等,在低pH条件下使被吸附的酶构型发生可逆改变而解吸下来。但是,这种洗脱也可能导致不可逆失效,而且即使是可逆变性,随时间延长也可能向不可逆转化,故在洗脱后应立即除去变性剂。

除了变性手段外,也可从偶联方法的选择入手。例如,通过反应形成重氮键或硫酯键,这些键能分别在0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (pH 8.0)的处理下或在中性羟胺的处理(pH 11)下迅速断裂。采用这样的偶联法,在酶被吸附后再用相应的条件进行化学断裂,那么酶就会连同配基很快地从吸附剂上释放出来。

此外,还有一种方法则是通过酶促等方法降解配基或载体。例如,以明胶为载体时,可用胰蛋白消化进行洗脱。

④ 电泳洗脱。如果在某种pH条件下,使被吸附的酶或其他大分子成分处于带电状态,那么让电流通过吸附了上述成分的亲和吸附剂时,相应的成分将根据各自的荷电特点以不同速度向不同电极方向移动,从而达到分离洗脱的目的。这种洗脱方法的特点是:第一,几乎可适用于一切荷电分子的分离,特别对那些结合力较强的亲和吸附,如抗原与抗体、激素与受体特别有效;其次,只要电泳洗脱时间足够长,也可以获得很高的回收率;第三,条件温和。

洗脱结束后有两件事应进行:一是洗脱样品的脱盐和除去不利于酶稳定性的小分子杂质,常用的方法是让洗脱液通过Sephadex G-25;二是吸附柱的再生,通常的办法是先后用10倍于床体积的含有0.5 mol/L NaCl的0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液与含有0.5 mol/L NaCl的0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液洗涤至pH 8.5与pH 4.5,然后用水洗至中性,最后再以起始缓冲液平衡。

## 2. 亲和电泳法

亲和电泳法是将亲和层析与聚丙烯酰胺凝胶电泳结合在一起进行的高分子分离方法。它的原理是,当相应的亲和配基共价偶联于电泳胶上以后,待分离分析的成分将与配基发生亲和作用,在电泳过程中不移动,而其他成分将按各自的电泳淌度而分离开来。进行亲和电泳时需要制备由三部分组成的聚丙烯酰胺胶:

(1) 浓缩成层胶,由厚度约5 mm的大孔胶组成,它的作用和圆盘电泳一样,能将样品浓缩成狭窄的薄层。

(2) 亲和胶,由共价偶联了亲和配基的胶构成,也是约5 mm的大孔胶。

(3) 分离胶,由不带配基的小孔胶组成,长约5~6 cm。

电泳方法及程序和圆盘电泳相似。

亲和电泳法的分离量很小,主要用于分析,特别是用于进行解离常数的测定。

### 3. 融合蛋白亲和分离法 (fusion purification)

亲和分离法专一、简便快速,它同样也可应用于重组 DNA 表达产物的纯化,这就是融合蛋白亲和分离法,也称“Bioseparation”。这种方法的关键是在构建融合基因时,目的基因的 5' - 端或 3' - 端要添加一段编码特殊多肽或蛋白质的 DNA,使其表达产物带上一段纯化用的特殊标签(purification tap)或亲和标签(affinity tap 或 tail),通过标签和相应配基的相互作用,从而达到纯化的目的。

应用融合蛋白进行亲和分离时,首先必须选择适宜的亲和标签和制备带有相应配基的吸附剂;融合蛋白纯化后,接下来还必须考虑如何将目的蛋白从融合蛋白中分离出来。表 4.12 列举了已报道的某些融合蛋白亲和分离的例子。

其中,作为融合蛋白亲和标签的有葡萄球菌 A 蛋白,该蛋白能专一地和免疫球蛋白的恒定区结合;以 A 蛋白为标签的融合蛋白已在大肠杆菌或葡萄球菌中表达,表达产物在中性 pH 条件下可以 IgG - Sepharose 吸附,在降低 pH 或添加 A 蛋白时又能将其洗脱下来,达到纯化的目的。融合蛋白 A 蛋白 - (IGF - I)带有酸不稳定的 Asp - Pro 联结,可在 70% 的甲酸中除去 A 蛋白,获得 IGF - I。A 蛋白中与 IgG 结合的结构域基因可以人工合成,然后与 IGF - I 重组,克隆于大肠杆菌,分泌型的表达产物同样能用 IgG - Sepharose 纯化,由于合成的上述结构域中没有可为羟胺断裂的位点,因此可在 pH 9.0, 45℃ 用羟胺处理,使 A 蛋白与 IGF - I 间联结的 Asn - Gly 断裂,释放目的蛋白。这种方法的好处是:第一,当移去 A 蛋白时不至于在目的蛋白中留下多余的氨基酸残基;第二,切下的结构域部分可以通过 IgG - Sepharose 移去。

作为融合蛋白的亲和标签也可以是 Flag™。Flag™ 是 Hopp 等人设计的,由 8 个氨基酸 NH<sub>2</sub> - Asp - Tyr - Lys - Asp - Asp - Asp - Lys 组成,而 Asp - Asp - Asp - Lys 是肠激酶专一断裂的序列。将 Flag™ 和蛋白载体一起免疫动物,可制成专一于 Flag™ 的单克隆抗体,用于融合蛋白的亲和分离。纯化的产品可再用肠激酶移去标签。Flag 系统已成功地用于与 GM - CSF、IL - 2 重组构建,并在酵母中得到了克隆表达和分泌,同时用亲和分离进行了纯化,用肠激酶移除了标签。

融合蛋白的亲和标签还可以是谷胱甘肽转移酶(GST),因为它能专一地和谷胱甘肽亲和吸附剂结合。以 GST 为标签作成的融合蛋白在纯化后,可用凝血酶或 X<sub>a</sub> 因子移去标签。

融合蛋白亲和纯化法近年来发展非常迅速,并且已逐渐形成一个系统。它的优点是,可对任何一种蛋白设计和构建相应的融合蛋白。但是关键是要同时找到一种合适的断裂方法,使目的蛋白能从融合蛋白中释放出来(参见表 4.13)。

表 4.13 某些通过 Bioseparation 进行纯化的蛋白

目的蛋白	标签	配基 - 吸附剂	吸附条件	洗脱条件	释放系统	其他基因
IGFI	A 蛋白	IgG - Sepharose	0.15 mol/L NaCl, pH 7.6	0.5 mol/L 醋酸	因子 X <sub>a</sub>	HP, B(1)
IGFI	C 蛋白	IgG/hGA			因子 X <sub>a</sub>	HP, B(1)
Urogastrone	poly Arg	S - Sepharose	pH 4-8	NaCl 梯度	羧肽酶 B	HP, B(1)
HIV Tat 蛋白	poly His	Sepharose (Ni <sup>2+</sup> )	pH 8 ± 胍	低 pH 梯度 ± 胍	羧肽酶 A	HP, B(1)
hGH	poly Glu	离子交换			氨基酶 I	
GMCSF	Flag™	抗 Flag™ 单抗	0.15 mol/L NaCl, 1 mmol/L CsCl, pH 7.4	EDTA, pH 7.4 或 0.1 mol/L Gly, pH 7.8	肠激酶	HP, Y(S)

续表

目的蛋白	标签	配基-吸附剂	吸附条件	洗脱条件	释放系统	其他基因
钠因子	氯霉素转乙酰酶	$\beta$ -氨基氯霉素-Sephacse	0.3 mol/L NaCl, pH 7.8	0.5 mmol/L 氯霉素, pH 7.8	凝血酶	
Plasmodium 抗原	谷胱甘肽-S 转移酶	谷胱甘肽-Sephacse	0.15 mol/L NaCl, pH 7.3	还原试剂	凝血酶	HP, B(1)
半乳糖苷酶	聚苯丙氨酸	苯基-Sephacse	1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 mmol/L $\text{CaCl}_2$ , pH 7	乙二醇		B(1)
半乳糖苷酶	聚半胱氨酸	巯基-Sephacse	pH 7.5	还原试剂		B(1)
	麦芽糖结合蛋白	交联淀粉	1% Triton, pH 7.2	10 mmol/L 麦芽糖		B(1)
	纤维素结合结构域	纤维素	pH 7	水		B(1)

#### 4. 其他相关的亲和分离法

除了上述典型的亲和分离法外,还有一些相关或相似的方法。

##### (1) 金属螯合层析(chelate chromatography)

这是基于某些蛋白对重金属离子具有亲和性而发展起来的一种方法,主要用于含咪唑基和巯基蛋白质的分离纯化。常用金属离子的吸附能力大致有如下顺序: $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ 。咪唑基和巯基在中性条件如 pH 6~8 时,能与它们形成相当稳定的络合物;但是,在碱性 pH 中,其他氨基酸侧链也能与之反应,因而降低亲和专一性。

醋酸盐和磷酸缓冲液有利于吸附,而胺、EDTA 等螯合剂则常用于洗脱。

##### (2) 共价层析法(covalent chromatography)

这种方法的原理是,待分离的分子在一定条件下能和配基形成可“逆转”的共价结合。该方法适用于含巯基的蛋白质或酶,因为它们能和活化的巯基化载体发生巯基-二硫基交换反应(thiol-disulfide interchange reaction),并能通过加入小分子巯基化合物如 DTT 或 2-巯基乙醇还原为二硫键而使结合的酶或蛋白质“逆转”释放。

### 五、高效液相层析

高效液相层析(high performance liquid chromatography, HPLC)又称高压液相层析(high pressure liquid chromatography),它是近年来层析技术上的一大进展。此法最初用于非水溶剂中小分子有机化合物的分离,但很快地发展到用于水溶性生物分子的分离;大孔径载体的开发,使它又成了蛋白质和核酸纯化的有力工具。

HPLC 实际上是胶过滤、离子交换层析、疏水层析和亲和层析等技术应用上的一个发展新阶段,它一方面以这些层析的原理为基础,但是有更高的效率、更高的分辨与更快的速度。

对于柱层析来说,载体填料的颗粒愈小,分辨率则愈高,但是,扩展(洗脱)液的流速也愈小。为了改善分辨率和流速,就必须使用高压和机械性能稳定的载体填料以及相应的设备。而作为 HPLC 理想的载体填料应符合下列要求:

- (1) 好的机械性能,可承受大于 1 mm/s 的流速;
- (2) 在广泛的 pH 范围有稳定的化学性能;
- (3) 颗粒大小,5~50  $\mu\text{m}$ ,孔径,30~100  $\mu\text{m}$ ;
- (4) 亲水,高容量;

(5) 球状、易填充、价廉。

最初使用的载体填料是硅(silica),但它的表面与蛋白质等有不相容性,以后用单氯单烷氧硅烷进行处理使表面亲水化,衍生物能很好地吸引蛋白质。硅胶的主要缺点是在  $\text{pH} > 8$  不稳定,后来又发展了在各种  $\text{pH}$  中仍然稳定的衍生物,如 Mono-Q, Mono-S 等,现已广泛用于离子交换层析。

HPLC 除了要有稳定、均一的载体填料外,也要求有特殊的抗压不锈钢层析柱、特制的注射器和输液泵。

HPLC 通常用  $0.4 \text{ cm}$ (直径)  $\times 5 \text{ cm}$  的层析柱,流速  $0.5 \sim 10 \text{ ml/min}$ ,即可获得好的分离效果,如果流速控制在  $0.25 \text{ ml/min}$ ,效果则更好。

HPLC 的主要优点是快速,一般  $15 \text{ min}$  即可完成一次层析分离,一天可进行数次分离。HPLC 现多和计算机偶联,可自动完成复杂的分离。

## 六、根据稳定性差别建立的纯化

酶的活性以酶分子具有特定活性构象为基础,因此在分离纯化过程中一般应避免使用过于激烈的方法与条件以防止酶的变性、失效。选择性变性法是根据酶和杂蛋白在某种条件下稳定性的差别,而采取的一类可一举除去大量杂蛋白的简便纯化方法。

### 1. 选择性热变性(selective heat denaturation)

如果待分离的酶相当耐热,就可采用这一方法,即在严格控制条件下,将酶溶液迅速升温到某一温度(如  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ ),并保温一定时间(如  $10 \text{ min}$ ),而后迅速冷却,这样,大量不耐热的杂蛋白就将变性析出,离心除去后,酶的比活力可能大大上升,而总活力损失可很少损失,或者根本不损失,有时还可能有所提高。例如,从酵母中分离醇脱氢酶,就可采用热变性处理法。个别酶对热特别稳定,如胰蛋白酶、胰核糖核酸酶、溶菌酸等在酸性条件下甚至可加热到  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  而不破坏,这一方法则更为有利。

为了使选择性热变性法有更大的适用范围,可在酶溶液进行热处理前,加入该酶的底物、辅酶、竞争性抑制剂、保护巯基的还原剂,也可加除去金属的螯合剂等,以增大酶和杂蛋白间的耐热性差别,例如,D-氨基酸氧化酶在抑制剂存在时,耐热性会显著上升。

在应用选择性热变性方法时,应该注意严格控制溶液的  $\text{pH}$  和保温时间。在样品溶液有蛋白酶污染的情况下,应用此法应特别谨慎。

### 2. 选择性酸碱变性法

如果在一定温度下,将酶溶液严格控制在酶的稳定  $\text{pH}$  范围内,应用酸、碱处理一定时间,进行选择性变性,同样可达到有效的纯化。但条件控制十分重要。例如,从麦芽中分离  $\beta$ -淀粉酶,在  $\text{pH} 3$  时,只有  $\alpha$ -淀粉酶失效,但是,在  $\text{pH} 3$  以下,则两种淀粉酶都会失效。又如,细胞色素 c 用  $2.5\%$  的三氯乙酸处理,可使大量杂蛋白沉淀,但是这种处理如果时间太长,细胞色素 c 也会变性。

和选择性热变性相比,酸碱变性应用得不多,主要原因可能在于操作较为复杂,而且纯化效果较差。



### 3. 表面变性法

很早就有人利用酶溶液和惰性液体(氯仿)混合振荡,造成选择性表面变性来制备过氧化氢酶、醇脱氢酶和 $\alpha$ -淀粉酶等。振荡处理后通常分成三层:上层为未变性蛋白,第二层为乳浊状变性蛋白,下层为氯仿。这种处理时间通常不宜过长,否则将导致所有蛋白质变性。利用泡沫形成也可达到选择性表面变性的目的,例如,通氯气到磷酸核糖变位酶和核苷磷酸化酶的溶液中,可使变位酶表面变性而纯化磷酸化酶。以后又有人设计了一种表面变性泡沫分离器用于回收有效成分进行酶的纯化,例如,从发酵液中提取链激酶,在 pH 5~7 的条件下,该酶的回收率可达 80%。

应用表面变性法时须控制的因素很多,除了泡沫大小以及泡沫形成的速度外,pH 和温度十分重要。和酸碱变性一样,它的应用面远不如选择性热变性。

总之,选择性变性灵活性很大,如果发挥得当,可能极大地提高酶的纯度。成功的关键在于严格控制条件,除了所选用的主要因素外,还应注意其他因素,其中也包括蛋白浓度,蛋白浓度太低时一般不能应用此法。

## 七、结晶

所谓结晶,是指分子通过氢键、离子键或分子间力,规则且周期性排列的一种固体形式。由于不纯的蛋白溶液、变性的蛋白质不能和酶形成结晶,也由于各种分子形成结晶的条件不同,因此,结晶既是一种酶是否纯净的标志,也是一种分离纯化的手段。

结晶,也是利用酶和杂蛋白在溶解度上不同而进行的一种纯化方法,但是和其他利用溶解度降低的方法不同,它要求以极为缓慢的速度逐渐降低酶的溶解度,使之能从溶解状态以特定的固体形式析出。也就是说,只有使酶溶液极为缓慢地接近结晶的条件,才能使酶结晶析出,否则,酶就可能以无定形的形式直接沉淀出来。为此,通常进行结晶时,或是通过毛细管、或是借助透析方式缓慢地加入硫酸铵等沉淀剂,待溶液呈现微弱的浑浊后,再移入某一适宜温度下静候结晶出现,也可在加入相应的试剂后,再缓慢地改变 pH 和温度,使之逐渐接近结晶条件。结晶往往需要晶核,晶核可以依靠酶溶液自身缓慢形成,也可自外加入;结晶的过程是溶质分子移向晶核,使结晶逐渐长大,因此,结晶需要的时间很不相同,从几小时到几天、数月,甚至要以年计;晶核多,结晶形成虽然较快,但形成的晶体较小。

为了获得纯净、粒大、收得率又高的结晶,还有两个很重要的因素应注意:

(1) 酶溶液应该达到相当的纯度。除了少数例外,不纯的溶液通常不能得到结晶,因为晶核很快地为杂质所包围掩盖,无法长成晶体。究竟要达到何种纯度才能着手进行结晶?这个问题尚无确定标准,不过在很多情况下,酶溶液如果很纯的话,即使未结晶,也常可观察到某些可结晶的征候,如具有较大的密度、较高的闪烁性、较易分散、颗粒从球形趋向椭圆等。酶溶液如果一旦获得结晶,再结晶一般是很容易成功的。

(2) 酶的浓度要恰到好处。一般以 1%~5% 为宜,最低不宜小于 0.2%,浓度高虽然较易结晶,但如果接近过于饱和,结果往往只能获得大量微晶,难以形成大晶体。酶结晶形成以后,摇动酶溶液多可看到丝状闪烁,用 100~400 倍显微镜观察时,根据结晶的酶和结晶的条件不同,形状也可能多种多样。在偏振光显微镜下,多呈弱的双折射。

## 八、纯化方法的排列顺序

在上述的纯化方法中,过去,沉淀法、吸附法、离子交换法和选择性变性法用得较多,而近年来,胶过滤法、亲和层析法和聚焦层析法应用日益广泛。

至于方法的排列顺序,一般地说,选择性热变性由于能以很小的代价除去大量的杂蛋白,而且不需要引入其他物质,也不增加液体的体积,所以可以放在最先进行。吸附法简便,很多情况下,吸附前不一定要求脱盐,吸附平衡后,通常放置片刻就会澄清,用倾泻、虹吸等办法除去大量母液后,即能转入小体积进行操作,因此亦可考虑安排在前面的步骤进行。结晶由于它要求酶液有相当的纯度,无疑应放在较后的环节。至于其他方法则难以概言,要由实验确定。例如,吸附后常要用盐溶液洗脱,接着用盐析法似乎是有利的,但盐析放在太前面,大液量的脱盐又是件麻烦事;有机溶剂沉淀要求低温快速处理,如果酶液体积大,这种方法往往受设备容量的限制,似不宜放在前面的步骤里,但另一方面,如果酶已经很纯,稳定性也因之随着降低,此时再用有机溶剂处理又有变性之虞;其他如离子交换法、胶过滤法、聚集层析法以及亲和分离法等应用于大体积操作目前还存在一些问题,因此常放在稍后的步骤。但是也不尽然如此,近 20 年来纯化工作有一种趋向就是从一种原料出发,同时进行多种酶的综合分离。例如,有人将 DEAE-纤维素、DEAE-葡聚糖凝胶、胶过滤和羟基磷灰石层析等方法组合起来,从大肠杆菌的抽提液中同时综合分离了 40 种以上的酶,而其起始的步骤就是应用 DEAE-离子交换剂。总之,酶的纯化工作应知己知彼,并在掌握客观规律的基础上,机动灵活地加以应用。

## 第四节 酶的纯度与产量

### 一、活力测定

在酶的抽提和纯化过程中,为了了解所选择的方法和条件是否适宜,每一步骤前后都应进行酶的活力测定,作出总活力与比活力的比较。

如何进行酶的活力测定?将在第七章讨论。如果待分离的酶已有报道,可参考它所采用的测定方法和条件;如果需要另建新的测定系统,那么就得先对该酶的作用、动力学性质等有所了解,据此来选择合适的底物和底物浓度、以及合适的反应 pH 和温度等,同时确定一种相应的测定方法。但不管是哪一种情况,有两点很重要:一是测定用的酶反应时间应选择酶反应的初速度范围内;二是测定用的酶量必须和测得的活性有线性关系。除此以外,纯化过程中的酶活力测定还应考虑三个问题:① 由于测定工作量较大,而且有时“立等”结果,所以要求测定方法快速、简便,而准确度在一定程度上比较次要,甚至可容许 5%~10% 的误差,故常用分光光度法、电学测定法等测定;② 由于分离纯化过程可能丢失辅助因子,因此有时需要在反应系统中加入相应的物质,如煮沸过的抽提液、辅酶、盐或半胱氨酸等;③ 由于纯化过程中引入的某些物质可能对酶的反应和测定有影响或干扰,故有时还应在测定前进行透析或加入螯合剂等。

酶的活力通常采用国际酶委员会规定的单位表示,但是在纯化工作中,为了方便,也可采用自行规定的单位,如直接以光密度值表示。从酶的活力测定得到的直接结果是样品中酶的浓度,即单位数/毫升。但还要由此进一步算出样品中总的单位数,即总活力,以及单位

重量的蛋白质中酶的单位数,即比活力,如单位数/毫克蛋白,或单位数/毫克蛋白氮。要计算比活力还要同时测定酶溶液中的蛋白质含量,常用的方法有:紫外吸收法,此法简便快速,不损耗样品,但干扰因素很多,所以在论文报道中不能用  $A_{280}$  表示;双缩脲法也很简单;酚试剂法虽较繁,但是灵敏度、准确度都比较高;染料结合法,又称 Bradford 法,此法灵敏、简便、快速而且极少干扰,是近年来常用的检测法。蛋白氮通常采用凯氏定氮法。一般地说,比活力愈高,酶的纯度也愈好,但是它不能说明实际的纯净程度是多少。

## 二、纯化方法与条件的比较标准

在酶的分离纯化过程中,总活力用于计算某一抽提或纯化步骤后酶的得率或回收率( $y$ ),而比活力用于计算某一纯化步骤后的纯化效果,即纯度的提高( $e$ )。

$$y = \frac{\text{某步骤后的总活力}}{\text{某步骤前的总活力}}$$

$$e = \frac{\text{某步骤后的比活力}}{\text{某步骤前的比活力}}$$

在抽提和纯化某步中,如果有多种方法或条件可供选择时,究竟采用何者?有人推荐下式进行权衡:

$$\log e = \log E \cdot \log y / \log Y$$

式中, $e$ 和 $y$ 分别表示用某种方法或条件进行一次纯化后纯度的提高与回收率;而 $E$ 和 $Y$ 分别表示用上述方法或条件重复多次后总的纯度提高与总的回收率,这两项是推算出来的。例如,在某一步骤中,A、B两种方法或条件可供选择,用A法重复 $n$ 次以后可得到 $E_a$ 和 $Y_a$ ;如以 $E$ 为标准,采用B法时要得到同样的 $E_a$ ,则需要重复 $m$ 次,由此可算出相应的 $Y_b$ ,比较 $Y_a$ 和 $Y_b$ 就能做出判断。

A 法:	$e$	$y$	B 法:	$e$	$y$
	⋮	⋮		⋮	⋮
	⋮	⋮		⋮	⋮
	$n$ 次	$n$ 次		$m$ 次	$m$ 次
	⋮	⋮		⋮	⋮
	$E$	$Y$		$E_a (= E)$	$Y_b$

在酶的纯化过程中,通常将各个步骤的测定结果列成“收支表”以便进行总结、检查和改进(表 4.14)。

表 4.14 酶纯化各步“收支表”

步骤	酶活力 (U/ml)	蛋白浓度 (mg/ml)	总体积 (ml)	总活力 (U)	总蛋白 (mg)	比活力 (U/mg)	收 率 (%)
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

## 三、纯度的标准

纯度提高和回收率的检定能帮助我们选择纯化方法与纯化条件。但是经过一定的纯化步骤后,为了了解所获得的样品是否均一纯净还要进行纯度检定。酶均一纯净性的鉴定有

以下几种方法。

#### 1. 溶解度法

这是老方法,由于所需样品量较大,已很少采用。

#### 2. 电泳法

常用的有醋酸纤维素薄膜电泳、聚丙烯酰胺不连续胶电泳和聚焦胶电泳,特别是后两者有极高的分辨率。有人认为,如果样品在聚丙烯酰胺胶电泳谱上是单一谱带,就可以看作是均一的了,但是应注意随电泳条件不同,可能出现不同的情况。聚焦胶电泳分辨率高,而且当有杂蛋白存在时,从谱带位置还可了解杂蛋白的解离性质,有利于采取进一步的纯化措施。

#### 3. 超离心法

在高达 65 000 rpm 的离心力场情况下观测离心谱带,根据沉降峰带是否分裂、是否有“肩”、是否对称等可以作出均一与否的判断。

#### 4. 免疫学法

纯化的酶样品在琼脂胶上与相应的抗体进行免疫反应,根据得到的沉降线可以判断样品的纯度。如果此法以免疫电泳的方式进行,则更为灵敏。

## 第五节 酶的剂型与保存

### 一、酶的剂型

为适应各种需要,并考虑到经济和应用效果,酶制剂常以四种剂型供应。

#### 1. 液体酶制剂

这包括稀酶液和浓缩酶液。一般在除去菌体等杂质后,不再纯化而直接制成或加以浓缩。比较经济,但不稳定,而且成分繁杂,只适于就近的某些工业部门如纺织工业等直接应用。

#### 2. 固体酶制剂

这类制剂有的是发酵液经过杀菌后直接浓缩干燥制成,有的是发酵液滤去菌体后喷雾干燥制成,有的则加有淀粉等填充料。这些制剂多用于皮革软化脱毛、水解纤维素等方面。这类制剂中也有的是在发酵液或抽提液除去杂质,并经初步纯化后制成,如用于洗涤剂、药物等生产的酶制剂。用于加工或生产某种产品的制剂,必须去掉其中起干扰作用的杂酶。例如多核苷酸磷酸化酶(PNPase)通常用来合成各种多聚核苷酸(Poly I, Poly C等),如果在酶制剂中仍含有核酸酶或磷酸酯酶,就会破坏多核苷酸链的合成,影响产品质量。

固体粗酶制剂便于运输和短期保存,成本也不高。

### 3. 纯酶制剂

这包括结晶酶在内,通常用作分析试剂或用作医疗药物,要求有较高的纯度。用作分析工具酶时,除了要求没有干扰作用的杂酶存在外,还要求单位重量的酶制剂中酶活性达到一定单位数。用作基因工程的工具酶则要求不含非专一性的核酸酶,或完全不含核酸酶。作为蛋白质结构分析对象的酶必须“绝对的”纯净,而注射用的医用酶则应设法除去热源物质。

热源是染菌后细菌分泌出来的一类毒素,带有这类物质的制剂注射到动物体后,能引起体温升高。热源物质属于糖蛋白,相对分子质量在 10 万以上,因细菌来源不同有小的差异。

热源物质对热相当稳定,往往要通过长时间高温作用,例如,经 180℃ ~ 220℃、两小时以上的处理才会分解;同时很耐酸,不过在碱中,例如 pH > 10, 48 h 的作用下会逐渐破坏;热源物质对氧化剂十分敏感,在新鲜配制的洗液中一小时就可将它除去。除了上述办法外,为了解决热源问题,还可采取以下措施:

(1) 吸附。例如,可用 DEAE 纤维素等阴离子交换剂、磷酸钙、氧化铝凝胶等吸附除去这类物质,也可用活性炭,但它的专一性不高。

(2) 亲和分离。例如,有人已分离出热源抗体,将它做成亲和吸附剂可用以专一地除去热源物质,另外也可用凝集素做成的亲和柱将它吸附除去。

(3) 选择适宜的纯化方法。热源物质具有亲有机溶剂的特点,因此通过有机溶剂纯化获得的产品,热源物质比例较高,而用盐析法纯化的产品则少些。

### 4. 固定化酶制剂

固定化酶制剂是一种有利于保存和应用的剂型,将在下一章进行讨论。

## 二、酶的稳定性与保存

获得酶制剂后,进一步的问题是:如何提高酶的稳定性,延长其有效期。

### 1. 影响酶的稳定性因素

影响酶的稳定性有以下几种因素:

(1) 温度。大多数酶可在低温条件下(0℃ ~ 4℃)使用、处理和保存。但是有些酶,它的高级结构的稳定性与疏水键有关,如粗糙链孢杆菌的谷氨酸脱氢酶、鸡肝线粒体内的丙酮酸羧化酶等,则应慎重。许多酶可在液 N<sub>2</sub> 或 - 80℃ 中冻结保存,如微球菌核酸酶、血清碱性磷酸酯酶等;特别是加入 25% ~ 50% 的甘油或多元醇时这种保护作用更明显,甚至也可用于冷敏的酶。冰冻干燥(lyophilization)是一种好的有效办法,但要注意某些酶在冻干过程有可能失效。

(2) pH 和缓冲液。大多数酶仅在各自特定的 pH 范围内稳定,超越此范围则迅速失效。但是少数低分子量的酶如溶菌酶、核糖核酸酶等在酸性 pH 条件下相当稳定。缓冲液的种类有时也会影响酶的稳定性,如 Tris - HCl 缓冲液在 pH 7.5 以下除了缓冲能力较弱外,还可能抑制某些酶的活性。此外,有些酶在磷酸缓冲液中冻结也会引起失活,值得注意。

(3) 酶蛋白浓度。酶的稳定性虽因酶性质和纯度而异,但是一般情况下,酶蛋白在高浓度时较为稳定,而在低浓度时则易于解离、吸附,甚至易发生表面变性而失效。

(4) 氧。某些酶为巯基酶,可能由于巯基氧化而在空气中逐渐失活。这种情况下加入 1 mmol/L EDTA 或 DTT 等有助于增加其稳定性。

为了保证有较高的稳定性,除了应避免上述不适宜的条件外,最常用的办法是加入某些稳定试剂。

## 2. 稳定酶的某些办法

(1) 添加底物、抑制剂和辅酶。这是现在广泛采用的办法,例如,添加 L-谷氨酸常可稳定 N-甲基谷氨酸合成酶,添加柠檬酸可稳定顺乌头酸酶,添加竞争性抑制剂安息香酸钠或辅基 FAD 可稳定 D-氨基酸酶等。它们的作用可能是通过降低局部的能级水,使处于不稳定状态的扭曲部分转入稳定状态。

(2) 添加 SH-保护剂。如谷胱甘肽、二巯基乙醇(但易自动氧化)和 DDT 等。

(3) 其他。添加某些低分子无机离子,例如  $\text{Ca}^{2+}$  能保护  $\alpha$ -淀粉酶,  $\text{Mn}^{2+}$  能稳定溶菌酶,  $\text{Cl}^-$  能稳定透明质酸酶等,它们的作用机理可能是防止酶的肽链伸展。其次是表面活性剂,例如,许多酶配制于 1% 的苯烷水溶液中,即使在室温条件下其催化活力也能维持相当长的时间。还有高分子化合物如血清白蛋白、多元醇,特别是甘油和蔗糖等是近年来常用的低温保存添加剂。此外,在某些情况下,丙酮、乙醇等有机溶剂也显示一定的稳定作用。最后,为了防止微生物污染,可加入甲苯、苯甲酸和百里酚等,它们对大多数酶通常没有不良影响;当然也可以通过细菌漏斗过滤低温保存。

固体酶制剂稳定性一般较高,它们含水量非常低,有的可在暗冷处保存数月甚至一年以上而不损失活力。热敏性酶多用冷冻干燥法,例如注射用酶等通常都用此法;耐热性酶则往往用喷雾干燥法;至于盐析沉淀和结晶产品或者直接加入固体盐作成“糊”,如“硫酸铵糊”,或在沉淀析出后置于大量冷丙酮中,使之松散,然后抽滤干燥。

作成固定化酶也是另一种提高酶稳定性的好方法。

## 参 考 文 献

### 一、酶分离纯化工作的基本原则

(1) Deutscher UP (ed). *Methods in Enzymology*, Vol, 182. Spiral - Bound, 1997

### 二、酶的抽提

(2) Asenjo JA, Andrews BA. *Bioprocess Technol.*, 1990, 9: 143

(3) Chase HA. *TIBTECH.*, 1994, 12: 296

(4) McCormick DK. *Bio/Technol.*, 1995, 11: 1 059

### 三、酶的纯化原理与方法

(5) Doonan S. *Methods Mol. Biol.*, 1996, 59(1): 1

- (6) Foribio F, Alfama J & Lopez - Barea J. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 1996, **684**(1)  
:7
- (7) Boland MJ, Hesselink PG, Papanichael N et al. *J. Biotechnol.*, 1991, **19**(1):19
- (8) Vilter H. *Bioseparation*, 1990, **1**(3—4):283
- (9) Rightti PG, Bossi A. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 1997, **699**(1—2):105; or  
*Anal. Biochem.*, 1997, **247**(1):1
- (10) Glemza KA. *J. Mol. Recongnit.*, 1990, **3**(3):137
- (11) Rossomando EF. *J. Chromatogr.*, 1991, **566**(2):275
- (12) Sharwood R. *TIBTECH.*, 1990, **9**:1
- (13) Sassenfeild HM. *TIBTECH.*, 1990, **8**:88
- (14) Shimada K, Oet T. *药学杂志(日)* 1991, **111**(4—5):225
- (15) Garavito RM, Picot D & Loll PJ. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1996, **28**(1):13

## 第五章 固定化酶和固定化细胞

固定化酶(immobilized enzyme)是借助物理方法或化学方法将酶固定于水不溶性或者水溶性载体而制成的一种酶制剂形式。最早的固定化酶报道于1953年,但是,直到60年代后期,随着固定化技术的开发才得以迅速发展。1969年固定化氨基酸酰化酶正式用于工业生产。固定化酶的出现为酶制剂在工农业生产和医药实践上的应用开拓了广阔的前景,同时,它对阐明酶在体内的作用方式、作用规律和调节机制也有重要价值。

### 第一节 酶和细胞的固定化<sup>(1-3)</sup>

#### 一、酶的固定化方法

通常采用的固定化方法可大体概括为四种类型:吸附法、共价偶联法、交联法和包埋法。图5.1为上述各种方法的示意图。

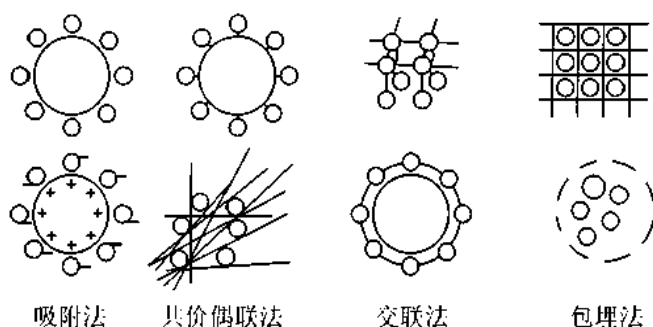


图 5.1 各种固定化方法示意图

#### 1. 吸附法(adsorption)

这是通过载体表面和酶分子表面间的次级键相互作用而达到固定目的的方法。根据吸附剂的特点又分为两种:物理吸附(physical adsorption)和离子交换吸附(ion binding)。

物理吸附是通过氢键、疏水键和 $\pi$ -电子亲和力等物理作用力将酶固定于不溶性载体的方法。常用的载体有:高岭土、皂土、硅胶、氧化铝、磷酸钙胶、微孔玻璃等无机吸附剂,纤维素、胶原、赛洛玢以及火棉胶等有机吸附剂。无机吸附剂的吸附容量一般很低,多在1毫克蛋白每克吸附剂左右;有机吸附剂的吸附容量通常高一些,例如用火棉胶膜吸附木瓜蛋白酶、碱性磷酸酯酶以及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等,吸附容量可达70毫克蛋白每平方米膜;胶原膜对 $\beta$ -D-果糖呋喃苷酶、溶菌酶、脲酶、葡萄糖氧化酶以及青霉素酰胺酶等的吸附容量也可达50毫克蛋白每克胶原膜。无机吸附剂的另一缺点是某些酶常易发生吸附变性,而有机吸附剂则很少产生这种情况,故更受人们注意。



离子交换吸附法是指在适宜的 pH 和离子强度条件下,利用酶的侧链解离基团和离子交换基团的相互作用而达到酶固定化的方法。最常用的交换剂有 CM-纤维素、DEAE-纤维素、DEAE-葡聚糖凝胶等;其他离子交换剂还有各种合成的树脂如 Amberlite XE-97、Dowe X-50 等。离子交换剂的吸附容量一般大于物理吸附剂,约 50~150 毫克蛋白每克载体。第一批商品固定化酶就是将氨基酸酰化酶吸附于 DEAE-纤维素和吸附于 DEAE-葡聚糖作成的。其他的商品固定化酶还有如 DEAE-纤维素吸附的  $\alpha$ -淀粉酶、蔗糖酶等。

吸附法制备固定化酶,在操作上十分简便,而且比较经济,又可分为四类:

(1) 静态法(static procedure)。这是在没有搅拌、没有振摇的情况下,将载体直接加入酶溶液,通过自然吸附、解吸、再吸附等过程制备固定化酶的方法。它的效率最低,需要很长时间,吸附量小且不均匀。

(2) 电沉积法(electrodeposition procedure)。这是在酶溶液中放置两个电极,在电极临近加入载体,接通电源,酶移向电极,并沉积到载体表面的固定化方法。采用这种方法时,要求事先确定载体和酶是否会在电场中分解破坏。在沉积过程中和酶活性、稳定性有关的某些离子如果发生移除、损漏,那么就必须及时补充、替代。

(3) 动力学批量式固定化法(dynamic procedure),也称为混合、振摇装载法(mixing or shaking bath loading)。这是实验室制备常用的方法。和静态法相比,载体和酶溶液混合后要在搅拌下或在摇床连续振摇下完成固定化。此法固定化较为均匀。关键在于控制适当的搅拌或振摇速率,既要破坏酶和载体的结构,又要达到充分混合的目的。

(4) 反应器装载法(reactor loading process)。这是工业上常用的方法,它的特点是将固定化和其后的应用连在一起。即先将载体装于反应器中,再加上酶溶液,然后通过循环流振动方式使酶和载体达到充分混合。这种方法适用于连续流搅拌桶式反应器(CSTR),填充床反应器(PBR)。

吸附法优点是:操作简便,条件温和,吸附剂可再反复使用。但是,酶和载体的吸附力比较弱,容易在不适宜的 pH、高盐浓度、高底物浓度以及高温条件下解吸脱落。因此必须控制好吸附与操作条件。

开发新的载体是解决上述缺点的一种重要途径。例如,开发的 N-羟基琼脂糖衍生物,它能牢固地吸附如黄嘌呤氧化酶、脲酶等多种等电点处于酸性区的酶,这种吸附借助静电力和疏水键等多种因素协同发挥作用,因此,结合十分牢固,甚至可经受 1 mol/L NaCl 的洗脱。又如,现在广泛使用的一些亲和吸附剂,像 Con A-葡聚糖等,它们能专一而强力地吸附糖蛋白,包括蛇毒外切核酸酶和 5'-核苷酸酶等。

某些过渡态金属衍生物、氧化物等能活化载体的表面,可通过螯合作用,将酶偶联起来作成固定化酶。载体多种多样,包括金属、玻璃、几丁质等,过渡态金属最常用的是三价和四价的钛——Ti(III)、Ti(IV)等,它们的吸附容量比对应的载体要强,例如,用氧化钛包被的不锈钢粒(直径 100~200 $\mu$ m)吸附  $\beta$ -半乳糖苷酶,每克吸附剂可吸附 17 毫克蛋白。

此外,也有人根据载体的性质对酶进行适当的化学修饰以增强吸附力。例如,将胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等和丙烯酸与顺丁烯二酸酐的水溶性共聚物进行共价偶联,将淀粉葡萄糖苷酶和乙烯与顺丁烯二酸酐的水溶性共聚物进行共价偶联。这样修饰后得到的多聚阴离子衍生物,再用 DEAE-纤维素或 DEAE-葡聚糖进行吸附,结果,结合力得到了大大增强,吸附容量显著升高,而且相当稳定,使用寿命延长。其中,淀粉葡萄糖苷酶连续使用了 3 个星

期活性也没有明显改变。

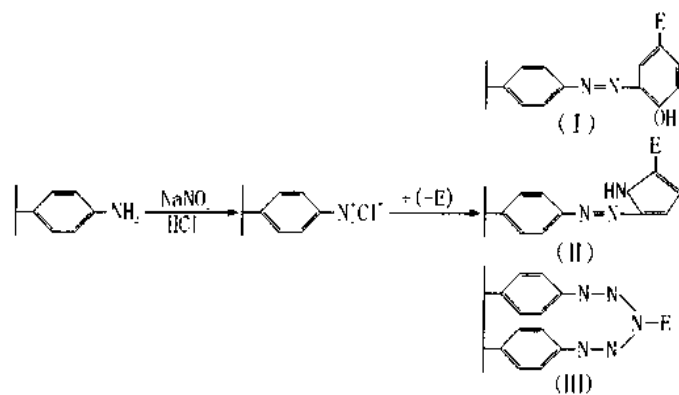
## 2. 共价偶联法 (covalent coupling, or covalent binding)

这是借助共价键将酶的活性非必需侧链基团和载体的功能基团进行偶联制备以固定化酶的方法。如此得到固定化酶结合牢固、稳定性好、利于连续使用,是目前应用和报道得最多的一类方法。共价偶联反应一般比较激烈,易使酶变性失效,应加以注意。进行共价偶联时要考虑以下问题。

(1) 固定化载体。载体直接关系到固定化酶的形成和性质。一般地说,亲水载体在蛋白质的结合量、固定化酶的活力和稳定性上都优于疏水载体,而且亲水基的存在还可以减轻疏水基的有害影响。理想的载体除了须具有好的亲水膨润性以外,还应有以下特点:结构疏松;表面积大;有一定的机械强度;带有在温和条件下可与酶的侧链基团进行共价偶联反应的功能基团;同时最好没有或者很少有非专一性吸附活性。常用的载体有天然高分子衍生物如纤维素、葡聚糖凝胶、琼脂糖等,也有合成的高聚物如聚丙烯酰胺、多聚氨基酸、乙烯与顺丁烯二酸酐的共聚物、聚苯乙烯、尼龙等,还有无机载体如多孔玻璃等。天然高分子衍生物的亲水性较好,但机械性能较差;反之,聚苯乙烯、尼龙和玻璃等有强的机械强度,但有疏水结构的缺点。

(2) 偶联反应 (coupling reaction)。选择什么样的偶联反应取决于载体上的功能基团与酶分子上的非必需侧链基团。一般常用载体上的偶联功能基团有芳香氨基、羟基、羧甲基和氨基等,而酶分子上可用于偶联的基团有游离氨基( $\alpha$ -氨基、赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基和精氨酸的胍基)、酚羟基、巯基、咪唑基和羟基等。在通常情况下,由于载体上的功能基团和酶分子上的侧链基团间不具有直接反应的能力,因此偶联反应前往往需要先进行活化。活化反应通常比较激烈,易导致酶变性失效,故一般总是先使载体上的功能基团活化,然后再在比较温和的条件下将酶和活化了的载体偶联,根据载体的功能基团与酶的侧链基团的性质,常用的活化与偶联反应有:

① 重氮反应 (diazotitation)。这是带芳香氨基载体的主要反应,即载体先用亚硝酸处理成重氮盐衍生物,然后再在温和的条件下和酶分子上相应的基团如酚羟基、咪唑基或氨基直接进行偶联。商品载体 Enzacryl AA 即可采用此反应活化。除此以外,其他载体经过某些处理后也可利用这一反应,例如,多孔玻璃和  $\gamma$ -氨基丙基三乙氧基硅烷一起回流在形成多孔玻璃烷基氨基衍生物后,再用对硝苯甲酰氯处理,并经还原可改变为芳香氨基衍生物,进而也

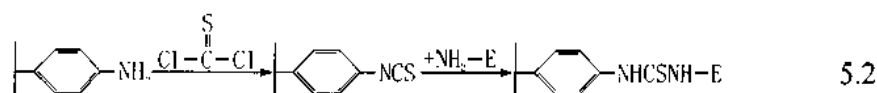


5.1

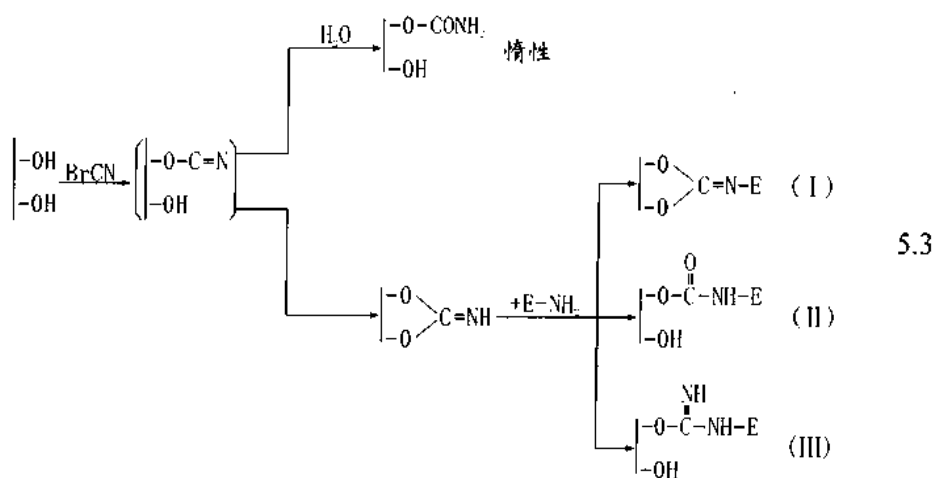
可进行重氮化。再如,带有羟基的载体也可在碱性条件下通过和一种称为对β-硫酸酯乙砷基苯的染料中间体反应,引入芳香氨基后再重氮化。

重氮盐衍生物能和酚羟基、咪唑基、氨基及胍基等迅速而且定量地进行反应,但反应专一性不高,可通过控制 pH 提高反应选择性。值得注意的是,芳香族重氮盐基具有疏水性,倾向于“钻入”蛋白质分子中酪氨酸等集中的疏水区,并在那里进行偶联反应,导致蛋白质变性失效。当载体骨架具有电中性或疏水性时,这种趋向性尤其显著;反之,如果载体骨架改用亲水的极性物质,上述趋疏水区的特性就可相应地削弱。胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的固定化可作为一个代表性例子,当它们偶联到重氮化的电中性载体对氨基苄基纤维素时,产生的固定化酶完全无活性;而当它们偶联到重氮化的苯胺-多孔玻璃上时,得到的固定化酶都具有很高的酶活性。

② 异硫氰酸(或异氰酸)反应(iso(thio)cyanate reaction)。含芳香氨基的载体也可先用硫光气处理成异硫氰酸(或异氰酸)盐的衍生物,这样得到的产物极易在温和条件下和酶分子的氨基反应。由于在中性 pH 条件下优先和α-氨基反应,因此可进行选择性偶联。至于异硫氰酸和异氰酸,前者受到较多注意,因为它比较稳定而且较易制备。



③ 溴化氰-亚氨碳酸基反应(cyanogen bromide-imidocarbonate reaction)。对于带羟基的载体如纤维素、葡聚糖和琼脂糖等来说,这是最常用的反应。在碱性条件下载体羟基和溴化氰反应生成极活泼的亚氨碳酸基,它在弱碱中可直接和酶的氨基进行共价偶联反应:



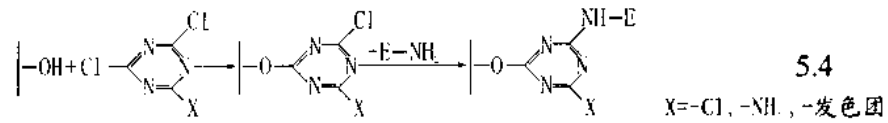
上述反应 5.3 中,异脲(isourea)(III)可能是主要的产物形式。

通过此法得到的固定化酶相对活力一般比较高,而且相当稳定,同时操作简便,故受到普遍欢迎。

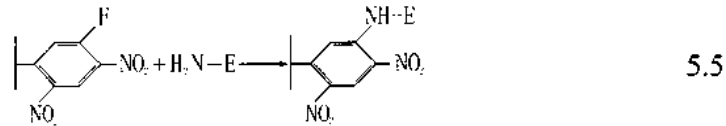
④ 芳香烃化反应(arylation)。含羟基的载体也可在碱性条件下和均三氯三嗪(triazinyl)等反应,在引入活泼的卤素后能直接与酶的氨基、酚羟基或巯基等偶联。

均三氯三嗪等容易大量制备,它们和羟基载体反应后产物带正电荷,有利于和中性或碱性酶偶联固定。另一方面它们几乎可和所有的亲核基反应,因而很少选择性;但如果三嗪环

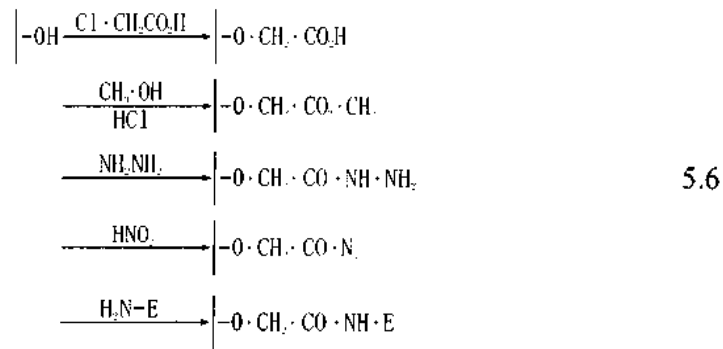
核的取代基增加时,剩下的氯原子反应性能会降低,情况可能改善。



另一类芳香烃化功能基是 5-氟-2,4-硝基苯(5-fluoro-2,4-dinitroanilide),和酶偶联时,控制 pH < 7,可使反应主要限于酶的氨基。这类反应由于具有疏水性,因此同样有钻入蛋白质疏水区的倾向。

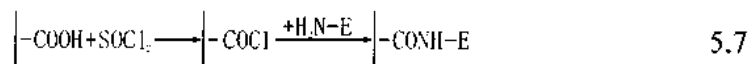


⑤ 叠氮反应(acylazide reaction)。此反应适用于含羟基、羧甲基等的载体,如 CM-纤维素、葡聚糖、聚氨基酸、乙烯-顺丁烯二酸酐共聚物等,也包括 Amberlite IRC-50 等。以羧甲基纤维素为例,可先在酸等作用下转变为叠氮衍生物,这种产物能在低温、pH 7.5~8.5 的情况下和酶的氨基直接偶联。但叠氮衍生物也能和羟基、酚羟基或巯基反应。

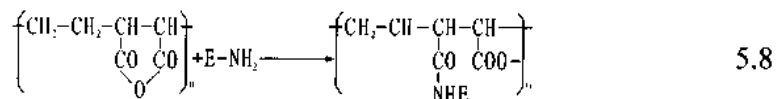


商品 Enzacryl AH 是含酰肼的高聚物,故也可应用此反应。此外,叠氮反应还能用于带酰胺基的载体,如聚丙烯酰胺、尼龙 66(聚酰胺)等。

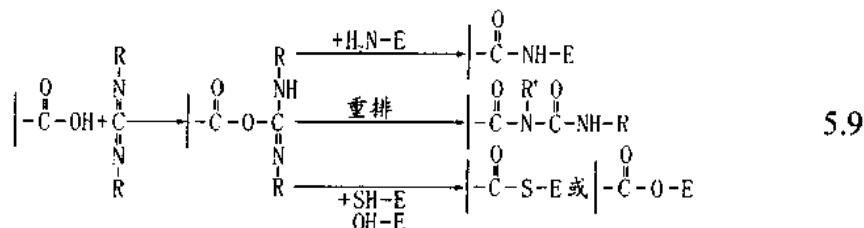
⑥ 酰氯酰化反应(acyl chloride reaction)。含羧基载体酸树脂也可通过氯化亚砷处理生成活泼的酰氯衍生物,然后与酶偶联。



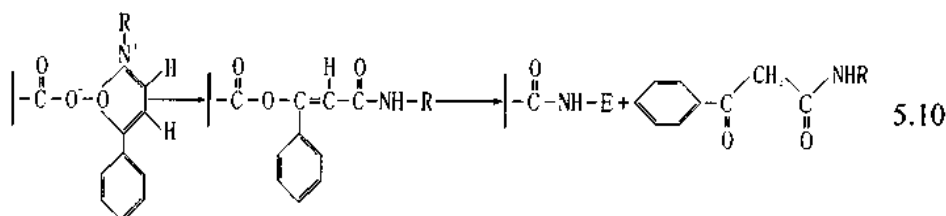
⑦ 酸酐反应(acid anhydride reaction)。乙烯等和顺丁烯二酸酐的共聚物,可通过其活泼的酸酐基直接和酶的氨基偶联。生成的固定化酶一般具有较高的活力。不反应的酸酐因介质中的 OH<sup>-</sup> 离子而自然地水解为游离羧基,故生成的固定化酶处于过量的负电荷包围中,因而其动力学性态及稳定性可能有所改变。



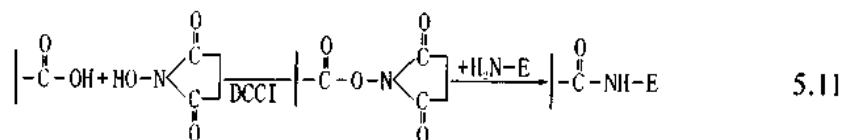
⑧ 缩合反应(condensing reaction)。这是利用羰二亚胺的活化作用,使氨基和羧基直接偶联缩合形成肽键的反应,适用于带羧基或带氨基的载体。在弱酸条件(pH 4.75 ~ 5.00)下,羰二亚胺与羧基反应生成极活泼的 O-酰基异脲衍生物。这种衍生物或者立即重排变为酰基脲,或者立即与氨基缩合成肽键或酰胺键;它也可和其他亲核羟基或巯基反应,但速度慢得多。由于活化的中间产物非常不稳定,故进行偶联反应时,载体、酶和羰二亚胺最好同时混合加入。羰二亚胺已有多种商品。



和羰二亚胺类似的有 N-羟基-5-苯异噁唑衍生物(其磺酸盐称为 Woodwards 试剂 K),它的特点是形成的活化中间产物较稳定,可分离出来在中性条件下进行下一步缩合反应。

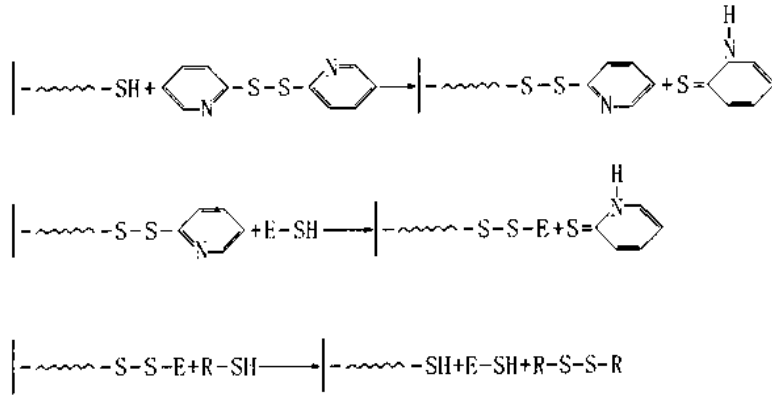


带羧基载体也可在环二己基羰二亚胺(DCCl)存在条件下用 N-羟基琥珀酰亚胺活化,然后在十分温和的条件下和酶的氨基缩合。缩合反应如控制于 pH 6 时,则反应主要选择  $\alpha$ -氨基。



⑨ 巯基-二巯基交换反应(thiol-disulphide interchange)。带巯基或二巯基的载体可通过巯基-二巯基交换反应和酶分子上的非必需巯基偶联。当载体功能基团为巯基时,可先用 2,2'-二吡啶二硫化物处理,使之转成二巯基,生成的中间产物在酸性条件下很易和酶的巯基发生交换反应而偶联,同时释放出  $\alpha$ -巯基吡啶。得到的固定化酶在非还原情况下很稳定;但在大量巯基化合物存在时能逆转,同时载体与酶得到再生。这一特点已应用于“共价亲和层析”。

对于氨基为非必需基团的酶来说,也可采用这一反应。



5.12

(3) 共价偶联反应中的保护措施。化学偶联反应一般比较激烈,为了减少酶在偶联过程中失效,应采取某些保护措施:① 选择适宜的固定化方法与相应的载体,例如采用重氮法时要注意载体的亲水性与疏水性;② 严格控制反应条件,提高反应的专一性,例如使反应局限于 $\alpha$ -氨基,保护 $\epsilon$ -氨基;③ 应用可逆抑制剂或底物,封闭或牵制酶的活性中心与必需基团,避免试剂影响酶的活性构型和相应基团。例如在进行腺三磷酶(ATPase)固定化时,可先用对羟汞苯甲酸(PHMB)将酶的活性巯基保护起来,然后通过叠氮反应将酶偶联于羧甲基纤维素上,在完成固定化以后,再用还原剂使-SH活化,这样可得到高活性的固定化酶。

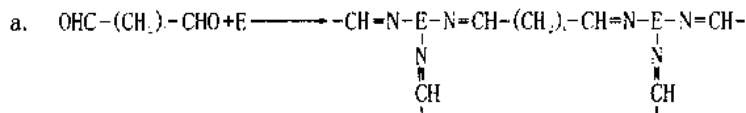
借助“可逆”抑制剂和底物进行的保护措施也同样适用于其他较激烈的方法,如交联法。

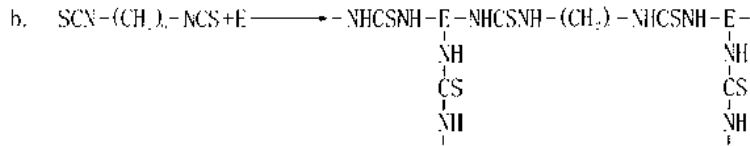
(4) 酶的偶联量。这个问题关系到单位载体上偶联的总酶量与“相对酶活力”间的平衡。所谓“相对酶活力”是指固定化酶和相等蛋白量的原酶活力比。相对酶活力和多种因素有关,例如:固定化载体、固定化方法和固定化条件以及酶反应系统的组成等。当上述因素一定时,它主要受偶联量影响;在偶联量超过一定水平后,由于过多的酶集中于载体的局部,可能造成空间位阻效应,使部分的酶无法表现其真正活性,所以“相对酶活力”往往随偶联酶量的进一步增加而下降。在制备固定化酶时,重要的一点就是要平衡好两者的关系,这对其他类型的固定化方法也有同样重要的意义。

### 3. 交联法(crosslinking)

即利用双功能或多功能试剂(bifunctional or multi-functional reagent)在酶分子间、酶分子与惰性蛋白间或酶分子与载体间进行交联反应,以共价键制备固定化酶的方法。

双功能和多功能试剂根据它们的功能基团相同与不同可分为“同型”和“杂型”两类,前者如戊二醛、苯基二异硫氰、双重氮联苯胺-2-2'-二磺酸,后者如甲苯-2-异氰-4-异硫氰等。其中戊二醛应用最多:





交联反应可能发生在酶分子间,也可能发生于分子内。分子间交联和分子内交联的比例在一定程度上和酶的浓度与交联试剂的浓度有关,也和 pH 与离子强度有关,一般地说,在低的酶浓度下,主要形成分子内交联,交联后酶通常仍保持溶解状态;在浓度升高条件下,分子间的交联比例上升,形成的固定化酶往往变为不溶态。有人报道,当蛋白浓度为 50~200 mg/ml,戊二醛的浓度 0.3%~0.6%时,通过交联形成的固定化酶具有高活性。有人认为,交联试剂和酶的最适比约为 10%(W/W)左右,不过,实际上对不同的酶可能有一些差别,特别是温度、离子强度都会产生一定的影响。

在没有其他物质参与时,仅通过酶分子间交联形成的固定化酶,颗粒一般很小,而且机械性能不佳。少数报道表明,事先用硫酸铵或丙酮等将酶沉淀,然后再进行交联,这样得到的产物,情况可能有所改善,但总的说来都不理想。为克服这一缺点,办法之一是先让酶吸附于载体上,或者包埋于胶内或微囊内,然后再用双功能或多功能试剂进行交联做成固定化酶“网”膜或酶“网”颗粒,这种固定化酶空间位阻效应也较小;另一办法是先让酶和 AE 纤维素、部分水解的尼龙或其他带伯胺基的载体等混合,再用双功能或多功能试剂直接进行“交联偶联”。

交联法操作简便,但交联反应往往比较激烈,许多酶易在固定化过程中失效,酶回收率不高。为此需要采用某些保护措施,例如,在交联反应前先用抑制剂或底物进行专一性掩护,或向交联反应系统中添加惰性蛋白如血清蛋白、明胶等。

另一方面,如果双功能或多功能试剂的功能基团及其链长选择适当,反应条件有利于建立某些分子内交联、或有利于亚基的固定及四级结构的维持,这种情况下,交联反应常可能增进酶的稳定性,甚至升高它们对小分子底物的催化活性。但应注意随着双功能或多功能试剂链的增长,疏水性也随之上升,可能带来一些有害的影响。

#### 4. 包埋法(entrapment)

这是将聚合物的单体和酶溶液混合后,再借助聚合促进剂(包括交联剂)的作用进行聚合,将酶包埋于聚合物中以达到固定化的目的。因为酶本身不参与结合反应,故而一般比较安全。不过,在化学聚合过程中由于自由基的产生、放热以及酶和试剂间可能发生化学反应等,也往往会导致酶失效,所以在选择包埋方法和控制反应条件时仍须注意。包埋法主要有以下几种类型:胶格包埋、微囊包埋和脂质体包埋。胶格包埋是将酶分子分散包埋在聚合的胶格中,微囊包埋是将一定量的酶溶液包在半透性的微孔膜内,而脂质体包埋是将酶包在脂双层结构中。

(1) 胶格包埋(gel (latic) entrapment)。最常用的包埋剂是聚丙烯酰胺凝胶,它以丙烯酰胺为单体、N,N'-甲叉双丙烯酰胺为交联剂聚合而成。进行包埋时,先将酶和丙烯酰胺单体分散于亲水介质中然后再进行聚合。形成的包埋胶或以悬液形式或以冻干粉形式保存。这种胶的包埋容量一般很大(单体 10~100 毫克蛋白每克)。改变单体与交联剂的比例,可控制凝胶孔径的分布范围,从而能改善酶的持留与底物和产物的扩散转移状况。改变单体

的性质,还能调整固定化酶的亲水与亲脂特性。由于孔径分布范围广,聚丙烯酰胺胶包埋可能存在渗漏问题,这一缺点通过升高单体浓度能部分地解决;但单体浓度过高,譬如大于15%时,丙烯酰胺本身将导致酶失效,显著地降低包埋酶的活力。克服上述缺点的另一办法是,包埋与共价偶联相结合。例如,先用含双键的异型亲电子酰化双功能试剂使葡萄糖氧化酶乙烯化,然后再和不饱和单体进行共聚;又如,先将葡萄糖-6-磷酸脱氢酶包埋于丙烯酸酯和丙烯酸的交联胶内,然后再通过羰二亚胺活化载体上的羧基使之与酶共价偶联固定。

除了聚丙烯酰胺胶外,还有某些天然的多聚物也可用于酶的包埋。例如,胶原(gelatin)、K-角叉菜胶(K-carragenan)、海藻酸(alginate)和琼脂(agar)胶等。在制备固定化酶时,可先将这些多聚物溶于含水介质,然后再和酶溶液混合,最后分别通过各种办法使之胶化,形成胶包埋的固定化酶。对于胶原可以添加水不混溶的有机溶剂如丁醇;对于角叉菜胶可以添加氯化钾溶液,然后冷却;对于海藻酸可添加氯化钙溶液,使之作为胶的形式沉淀下来。

(2) 微囊型包埋(microencapsulation)。这是用直径几十微米到几百微米、厚约25nm的半透膜将酶分子进行包埋固定化的方法。半透膜能容许小分子底物和产物自由出入膜内外,由于囊的表面积相对体积的比值大,故物质交换可以进行得十分迅速;另一方面半透膜还能阻止蛋白质分子渗漏和进入,注入体内时既可避免引起免疫过敏反应,同时也可免遭蛋白水解酶的降解,因此具有较大的医学价值。

微囊型包埋有多种方法制备,例如:相分离法(phase separation method)、界面聚合法(interfacial polymerization method)、表面活性剂乳化液膜包埋法(liquid surfactant membrane method)。

相分离法,又称为界面凝聚法(interfacial coacervation)。火棉胶、醋酸纤维素包埋可采用这种方法。界面凝聚法是利用高聚物在水相和有机相的界面上溶解度降低而凝聚,易形成皮膜将酶包埋的方法。例如,先将酶的水溶液在含有硝酸纤维素的乙醚溶液中乳化、分散,然后再加入苯甲酸丁酯,促使硝酸纤维素在酶液液滴周围凝聚,最后用Tween 20破乳化后就得到含酶的火棉胶微囊;再如,先将酶的水溶液和含醋酸纤维素(或其他合成高聚物如聚氯乙烯)的有机溶剂(如二氯甲烷)混合做成乳浊液,然后喷入适宜的沉淀剂内,就可得到包埋酶的纤维。这种纤维表面积和重量的比值高,酶的包埋容量大(蔗糖酶可达1500毫克每克聚合物),稳定性好,控制沉淀条件可调节纤维的孔径,纤维还可做成纸或布,工艺条件温和,也易放大,因此一般认为此法有很大的工业应用潜力;但有些情况下,沉淀剂可能引起酶的失效。

界面聚合法,这是利用在微滴的界面通过加成或缩合反应形成的水不溶性多聚体制成微囊包埋酶的一种方法。尼龙膜包埋酶可用这种方法制备:将亲水单体和疏水单体,例如,将酶和己二胺的水溶液与含癸二酰氯的氯仿或甲苯有机溶剂,加以混合,再加Span乳化,这样两种单体,己二胺和癸二酰氯,就将在水相和有机相的界面上聚合,形成包埋酶的尼龙膜珠粒,用Tween 20破乳化后,即可得到所需要的微囊包埋酶。

表面活性剂乳化液膜包埋法,这是在酶的水溶液中添加表面活性剂,使之乳化形成液膜达到包埋目的的一种方法。这种方法不包含化学反应,简便,而且固定化是可逆的,但有渗漏的可能性。

(3) 脂质体包埋。



酶也可用脂质体(liposome)包埋。脂质体是指具有脂双层结构(liquid bilayer)和一定包裹空间的微球体。

根据制备方法和大小结构的不同大体可分为几种类型:多层囊泡结构(multilamellar vesicles, MLV),这是通过机械振动脂类溶液制成的脂质体,它的特点是不经过超声波等处理,包裹效率(encapsulation efficiency)较高,但俘获容积(captureal volume)大小不一;单层小囊泡(small unilamellar vesicles, SUV),通常由 MLV 经超声波处理制成,这类脂质体小,包裹效率低;单层大囊泡(large unilamellar vesicle, LUV),它的包裹效率很高,是较常用的脂质体;还有一种是通过反相蒸发而形成的 LUV,称为 REV 脂质体,它的体积较大,包裹效率更高。表 5.1 为上述各种囊泡结构的主要特征参数。

表 5.1 各种脂质体的主要特征参数

	MLV	SUV	LUV	REV
直径(nm)	0.2~10	0.02~0.05	0.2~1.0	0.2~0.8
俘获容积( $\mu\text{l}/\text{mg}$ )	4	0.5	9	14
包裹效率(%)	5~15	0.5~1.0	5~15	35~65

LUV 制备方法有多种,如反相蒸发法(reverse-phase evaporation),这是将有机溶剂和被包裹物质混合,用超声波处理,形成 SUV,再在减压蒸发的同时加入待包埋物的水溶液,搅拌后即可形成 LUV;也可用去污剂稀释法(detergent dilution),即在用超声波处理成 SUV 后,加入待包裹物与一定比例的去污剂,然后透析除去去污剂,使脂质分子重排形成 LUV;此外,还可用冷冻干燥法,这种方法是在形成 SUV 后,加入待包裹物质,冻干,然后重新水化形成 LUV。这些方法的包裹效率都可达 50% 或以上。

脂质体主要由磷脂等组成,各种脂的比例能显著影响脂质体的性质。

脂质体的特点是,它具有一定的机械性能,能定向将酶等被包裹物质携带到体内特定部位,然后在那里将被包裹物质释放,特别是现在已经发展了“酸敏脂质体”、“免疫脂质体”和“酸敏免疫脂质体”,这样,其运转具有更大的定向性,因此在药物应用方面受到了人们的重视。

各种固定化方法的优缺点可概括如表 5.2,选择方法时要考虑各种方法的特点,更重要的是应根据具体情况进行测定后作出分析。

表 5.2 各种固定化方法

方法	优点	缺点
吸附法	制作条件温和、简便,成本低,载体再生、可反复使用。	结合力较弱,对 pH、离子强度、温度等因素敏感,酶易脱落,酶装载容量一般较小。
共价偶联法	载体与偶联方法可选择性大;酶的结合力强,非常稳定。	偶联条件激烈,易引起酶失效;成本高;某些偶联试剂有一定的毒性。
交联法	可用的交联试剂多,技术简易;酶的结合力强,稳定性较高。	交联条件较激烈,机械性能较差。
包埋法	包埋材料、包埋方法可选余地大,固定化酶的适用面广,包埋条件较温和。	仅可用于低分子量的底物,不适用于柱系统,常有扩散限制问题,不是所有单体材料与溶剂都适用于各种酶。

## 二、辅酶及偶联酶系的固定化

### 1. 辅酶固定化的意义

辅酶物质有几个特点：① 和相应的酶蛋白有一定的亲和性；② 某些酶需要有相应的辅酶物质才表现活性；③ 辅酶物质本身也有很弱的催化活性，但当它们与特定的高分子物质相结合后催化效力就会大大升高。

将辅酶物质固定于高分子载体后又会产生新的特性，开拓新的应用：① 做成酶的亲和吸附剂；② 为固定化酶提供可循环使用的必需的辅酶物质；③ 制备“人工催化剂”，为研究酶的作用机制及酶在体内的作用规律提供实验模型。

### 2. 辅酶物质的固定化

辅酶物质的固定一般采用载体共价偶联法。在进行辅酶物质的固定化时，十分重要的一点是要保证它们的催化功能基团处于功能状态，特别是在它们与酶蛋白结合后仍处于游离状态。以磷酸吡哆醛(Py)的固定化为例，根据它的催化功能基团(醛基)和它与酶蛋白的结合情况，可用于磷酸吡哆醛固定化的偶联基团如图 5.2 所示有(A)、(B)、(C)三处，与此相应的偶联反应可选择的也有三种。

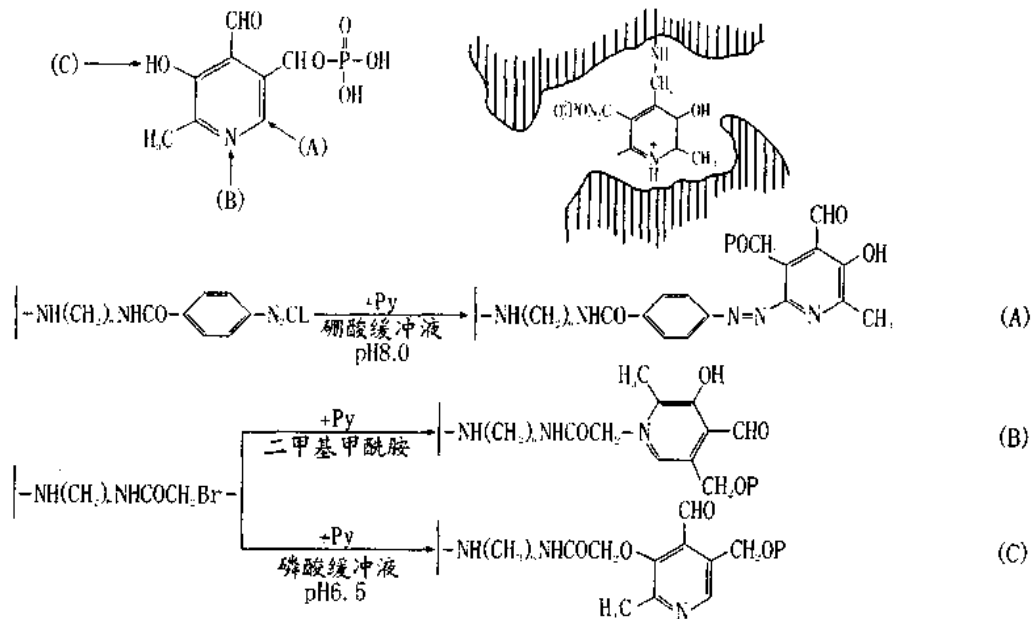


图 5.2 磷酸吡哆醛可用于和载体偶联的基团与反应

再以 NAD(P)的固定为例，它们参与催化反应的功能基团为尼克酰胺环，可用于偶联固定的有：(A)，腺嘌呤核 N<sup>6</sup> 位；(B)，N<sup>8</sup> 位；(C)，核糖 OH 基以及磷酸基(图 5.3)。相应的偶联方式也有三种。

实验表明，作为亲和吸附剂，偶联(A)、(B) 部位优于(C)；作为参与酶反应的固定化辅酶，则偶联 N<sup>6</sup> 位优于 N<sup>8</sup> 位；而且在辅酶与载体间插入烷烃链臂比插入酰基臂好。

在进行辅酶物质的固定化时，通常也可以先将辅酶做成各种衍生物或类似物，然后再结

合到载体上。

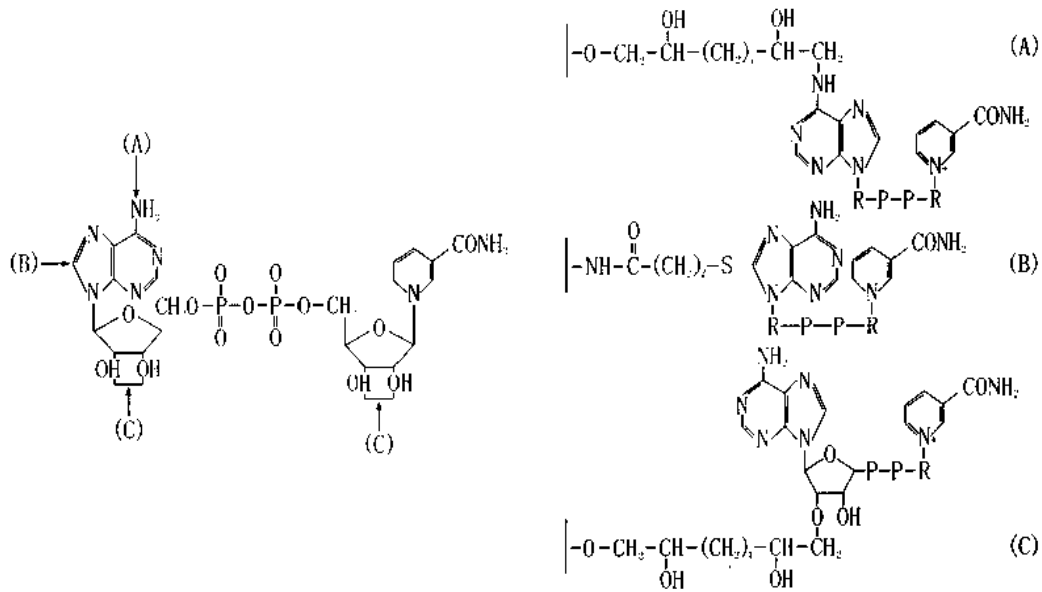


图 5.3 NAD(P)可用于与载体偶联的基团和反应

固定辅酶的载体可以用琼脂糖、纤维素、合成高分子及微孔玻璃等不溶性物质,也可用水溶性葡聚糖、聚氨基酸或聚乙烯亚胺等,还可应用海藻酸等。后一种载体物质能随介质的pH不同在溶解态与不溶态间进行可逆改变。

### 3. 要求辅酶物质的酶的固定化

这类酶的固定化包括两个问题,一是酶的固定化,一是辅酶的滞留。和其他酶一样,这类酶可以直接偶联固定,也可通过辅酶物质对酶蛋白进行亲和吸附固定。以色氨酸吲哚解酶(Tryptophanase, Trpase, EC 4.1.9.9.1)和酪氨酸脱羧酶(L-Tyrosine decarboxylase, TyrDC, EC 4.1.1.2.5)的固定化为例,前者由4个亚基组成,有4个活性中心,后者也由4个亚基组成,但只有2个活性中心。这两种酶催化类似的反应,并都需要磷酸吡哆醛为辅酶;酶蛋白和辅酶结合很弱,易解离, $K^+$ 能促进其间的结合。这两种酶的固定化都可以采用以下三种方法(见图5.4):① CNBr活化结合法;② 重氮反应或烃化反应加臂偶联法;③ 通过磷酸吡哆醛亲和结合法。其中方法③是先将吡哆醛偶联于琼脂糖上,然后再利用它的4位醛基和酶蛋白的 $\epsilon$ -氨基形成 Schiff 碱使酶固定。不过对于这两种酶来说,酶蛋白和吡哆醛的结合力都很弱,因此有时需用  $\text{NaHB}_4$  将 Schiff 碱还原加固。亲和固定法的优点是它对酶蛋白的高级结构影响较小;缺点是由于在亲和结合中要用去酶的一个活性中心,酶将因此失去部分催化能力。Trpase 用这种方法固定化时,其得率为80%,相对活力为60%;而对 TyrDC 来说,相对活力将下降一半以上。所以当酶的活性中心数目较多时,亲和固定是一种可取的方法,但活性中心较少时,直接偶联法则较为有利。

由于酶蛋白和辅酶结合很弱,在这类酶蛋白固定化以后,往往需要另外补充供应辅酶物质,酶才能发挥其正常的催化作用。为了防止辅酶物质的流失,通常的办法是先将它们结合于水溶性载体如葡聚糖等上,然后再和固定化的酶蛋白混合一并放于半透膜内。

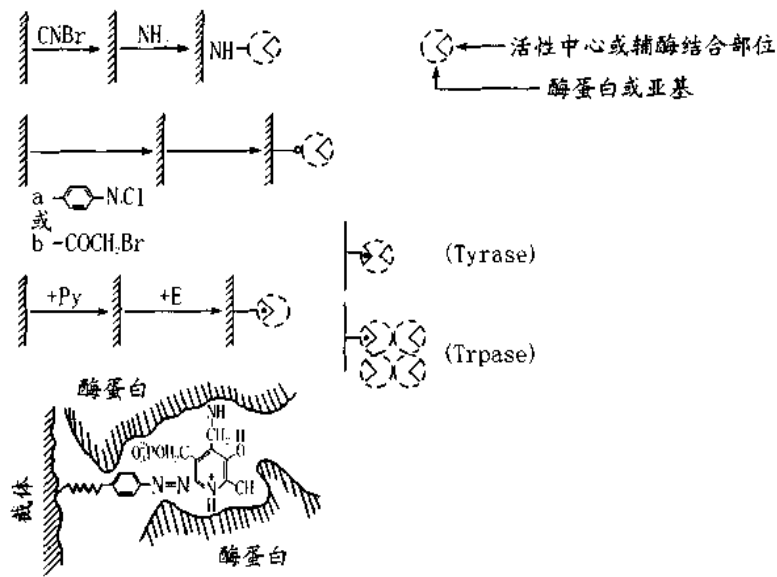


图 5.4 Trpase 与 TyrDC 的三种固定方法

#### 4. 偶联酶系的固定化及辅酶物质的再生系统

建立固定化的偶联多酶系统有两方面的意义：第一，加工生产、分析化验或治疗等应用往往需要多种酶协同完成，固定化的偶联多酶系统是符合这种要求的高效而简便的应用形式；第二，固定化偶联多酶系统是研究酶在机体内性态与代谢调控一种很好的理论与实验模型。

偶联的多酶系统可以通过多种方式进行固定化：① 用胶或微囊进行混合包埋；② 以共价偶联方式共固定于同一载体上；③ 分别固定于不同颗粒或膜结构上。

对于需要辅酶物质的多酶系统来说，它们的偶联通常是先将辅酶物质如 NAD 或 ATP 直接或加臂偶联于水溶性高分子载体（如葡聚糖）上，然后再和固定化了的多酶系统以及相应的辅酶再生酶系一起包埋于胶内或微囊内。图 5.5(A)是由苹果酸脱氢酶(MDH)、乳酸脱氢酶(LDH)和柠檬酸缩合酶(CS)组成的 NAD<sup>+</sup> - NADH 再生偶联酶系统；图 5.5(B)是由乙酰激酶(AK)、谷胱甘肽合成酶(GSHS)组成的 ADP - ATP 再生偶联酶系统。前者可合成柠檬酸，后者可用来合成谷胱甘肽。

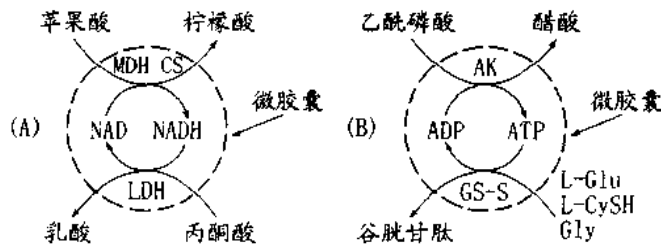


图 5.5 辅酶再生偶联系统示例

此外，也可将辅酶直接偶联于酶上制成酶 - 辅酶络合物，这种酶系统的活力往往较高，有人认为这可能是一种有前途的方法。

固定化的偶联酶系的催化效率,一般规律是:包埋酶优于游离酶;包埋后酶处于游离状态者优于固定于同一载体者,更优于固定于不同载体者。例如,聚丙烯酰胺胶包埋的苹果酸脱氢酶、乳酸脱氢酶和柠檬酸缩合酶系统,它在生产柠檬酸的速度上比未包埋者快4倍;又例如,以甲基-聚乙烯亚胺琥珀酰 NAD 为辅酶的乳酸脱氢酶与醇脱氢酶组成的偶联酶系统,它们在形成乳酸的速度上,处于半透膜内游离状态者高于固定于同一载体——DEAE 纤维素者,更高于分别固定于不同载体者。

### 三、固定化细胞

在固定化酶发展的同时,固定化细胞的技术也在开发,后者的实际应用甚至超过了固定化酶。例如,在日本和欧美各国最大规模的高果糖浆生产大多就是采用固定化细胞进行的。固定化细胞受到重视的主要原因是:① 它可以大大降低成本,省去酶的分离纯化工作,减少酶的活性损失,这一点对于细胞内酶与不稳定的酶来说特别有意义,而且固定化细胞的制备与使用都比固定化酶更简便;② 固定化细胞可以作为单一的酶发挥作用,也可利用它所包含的复合酶系完成一部分代谢乃至整个发酵过程,特别是那些需要辅助因子参与的合成代谢过程。

固定化细胞的方法和固定化酶的方法基本相似,常用的如下:

#### 1. 直接固定化法

这是在没有载体的情况下,借助物理或化学方法将细胞直接固定的方法。这种固定化既可发生在细胞结构上,也可通过细胞聚集(aggregate)来完成。对于微生物,可以借助加热、冰冻或 $\beta$ -射线等物理手段进行固定化,也可应用柠檬酸、各种絮凝剂、交联剂和变性剂等处理达到固定化。这些处理的作用不外乎:① 使菌体内起破坏作用的蛋白酶等变性,以防止目的酶被水解;② 使细胞结构固定,避免目的酶逸漏;③ 使菌体聚集,堵塞酶流散,促进较大的菌体颗粒形成。这些方法制备的固定化细胞一般只能用于完成单酶或少数几种酶催化的反应。例如,白色链霉菌的葡萄糖异构酶是胞内酶,当细胞在50℃以下保温时,该酶就会因细胞自溶而渗出;但是如果在60℃~80℃加热10min,那么起自溶作用的酶系就会失活,而葡萄糖异构酶却可以长时间使用没有明显的活力降低。又如,臭味假单孢菌的固定化,当这种细胞在含有硫酸铵的介质中培养时,生成的耐热性脂肪酶95%存在于细胞内;但此时如果将细胞在pH 6~7保温,则其中92%的酶就会渗出;反之,如果在pH 4.5~5.4、70℃中保温,则酶仍能 and 细胞保持结合,而且这种固定化的菌体可连续用于水解三乙酯。这可能是由于酸性条件下高温处理使酶的释放系统、即自溶酶系失效,并使与脂肪酶相结合的蛋白变性凝固而造成的。再如,用柠檬酸等处理链霉菌,然后干燥,结果也可得到含有高活性葡萄糖异构酶的固定化菌体。除了用上述物理方法与化学方法固定菌体外,也可直接应用霉菌孢子作为固定化菌体,这种情况下,孢子中的酶活力一般要比菌丝体高3~10倍,而且可长时间保存。

#### 2. 包埋

这是固定细胞最常用的方法。常用的包埋材料为聚丙烯酰胺、琼脂、海藻酸、角叉(菜)胶、胶原和纤维素等,其中聚丙烯酰胺应用较早、较多。影响聚丙烯酰胺包埋效果的因素很

多,包括菌体与胶量比、丙烯酰胺单体比、聚合条件、聚合时间以及使用条件等。例如,当菌体与胶量比为 10% 时,凝胶能滞留简单节杆菌的甾醇脱氢酶活性达 40%;而上述比值小于 5% 时,则凝胶中几乎不显示该酶活性。又如,当双丙烯酰胺与丙烯酰胺比为 13.3:333 时,固定化弗氏埃氏菌显示 70% 的葡萄糖转磷酸酶的活性;而比值为 13.3:420 时则仅有 34% 的活性。

除了聚丙烯酰胺外,用其他包埋材料形成的凝胶也有很好的机械性能,这方面的报道近年来日见增多。其中,角叉菜胶等多糖是很有前途的,因为它的包埋条件温和,形成的凝胶有一定的机械强度,扩散限制小,而且操作简便,只需将菌体的生理盐水悬液和溶于相同溶液的角叉菜胶混合,冷却后即成,或在加入某些阳离子溶液后冷却即成。这样得到的固定化细胞有较高的活力,而且稳定。如果胶的机械强度尚感不足,还可用丹宁、戊二醛等硬化剂进行处理,故颇受人们注意。角叉菜胶可用于多种微生物,一般认为它的工业应用潜力比聚丙烯酰胺大;琼脂和海藻酸也类似;此外,常用的包埋剂还有胶原,它们可用于形成膜状或纤维状的固定细胞。胶原在包埋后也可用各种硬化剂处理以提高其机械性能、防止酶的渗漏。

以上是过去常用的亲水包埋材料,近年来又发展了其他几类十分有用的包埋剂,如对  $\gamma$ -射线等敏感的聚合胶,乙烯吡咯烷、聚乙烯醇、聚  $\alpha$ -羟乙基丙烯酸等;对光敏感的交联聚合树脂, PEGM 和 ENT、ENTP 前体等;以及聚氨甲酸乙酯衍生物, PU 等(图 5.6)。其中,

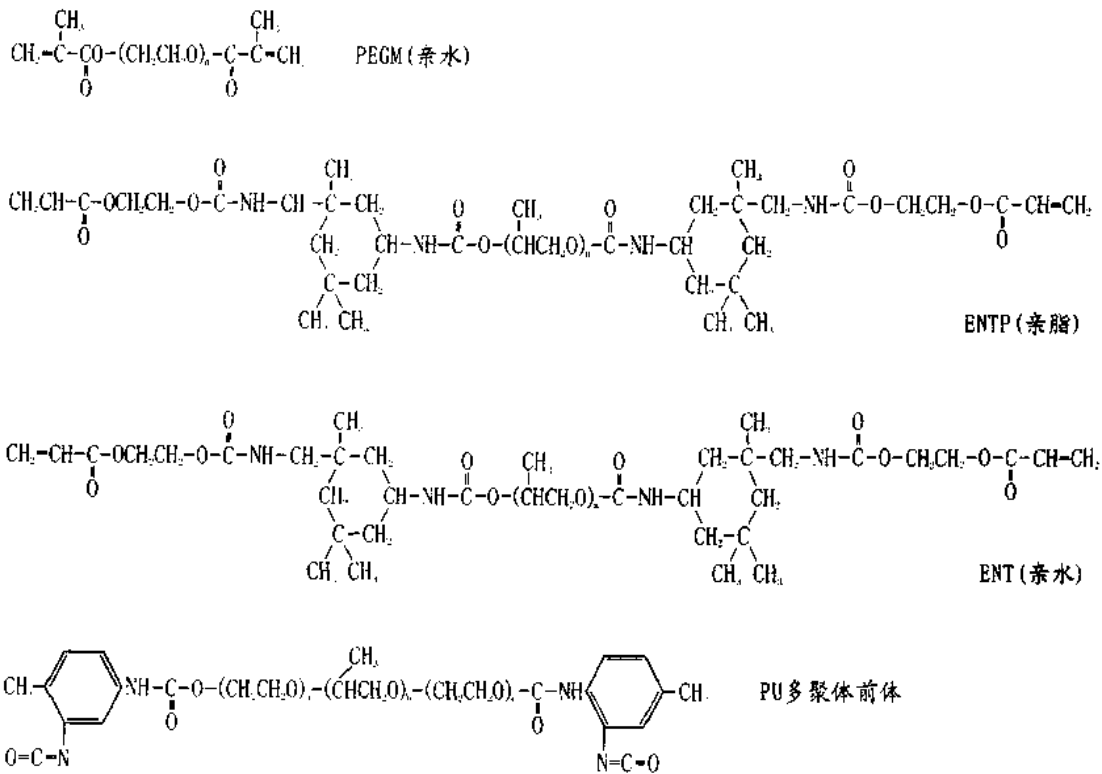


图 5.6 PEGM、ENT、ENTP 和 PU 结构示意图

PEGM(poly(ethylene)dimethacrylate)由适当链长的聚乙二醇和过量的甲基丙烯酸在对甲苯磺酞酸存在下聚合而成,ENT 前体由羟乙基丙烯酸、三甲基环己烯酮、二异氰酸和聚乙二醇合成,ENTP 由羟乙基丙烯酸、三甲基环己烯酮、二异氰酸和聚丙二醇合成。它们两端的丙烯酰

基对光具有敏感性,只要与酶液混合,在光增敏剂存在下,光照数分钟就可聚合得到固定化酶;ENT的长链部分为聚乙二醇,而ENTP为聚丙二醇;ENT聚合的树脂具有亲水性,ENTP聚合的树脂则具有疏水性;如果将ENT和ENTP以不同比例进行聚合时,还可调节固定化酶载体的链长和亲水性与疏水性。PU由两部分组成:一为聚氧乙烷 $\left(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}\right)_n$ ,具有较大亲水性;一为聚氧异丙烷 $\left(\text{CH}(\text{-CH}_3)\text{CH}_2\text{O}\right)_n$ ,显示较强的疏水性;因此,控制其中两者的比例,得到的胶亲水性和疏水性也不同。应用光敏树脂ENT、ENTP、PEGM及聚氨基甲酸乙酯包埋菌体都显著优于聚丙烯酰胺。例如,用这些聚合物包埋干酵母或融解细胞,结果发现,它们不仅能以葡萄糖为能源催化ATP生成,而且能催化CMP、胆碱合成CDP-胆碱,聚丙烯酰胺包埋的菌体则否。同样对于水溶性化合物生物学转化,上述胶包埋也显示出其优越性。例如,用它们包埋的简单节杆菌干细胞,可在10%甲醇存在情况下,转化氯化可的松为强的松,聚丙烯酰胺包埋者则不能,因为丙烯酰胺单体能引起酶失效。

此外,有机硅,聚硅氧烷,也是近年来常用的一种具有疏水性的新材料。有利于疏水性底物、产物、有机溶剂、 $\text{O}_2$ 及 $\text{CO}_2$ 等的吸入与排出。包埋过程通常作成珠粒,并有好的机械强度和耐温性。

包埋固定化细胞一般主要利用菌体的单种酶或极少数几种酶,但是也有利用包埋菌体的多酶系统生产某些代谢产物的报道。例如聚丙烯酰胺包埋的谷氨酸棒状杆菌用以生产L-谷氨酸;包埋产氨短杆菌用以生产CoA,而且如果用表面活性剂如SDS等处理包埋菌体还可显著升高CoA的积累。

### 3. 吸附

吸附是细胞固定化常用的另一类方法。

可用于固定化菌体的吸附剂很多,而且同一种微生物可用多种不同的吸附剂吸附,吸附量可能很不相同;反之,同一种吸附剂可用于吸附不同的微生物。但是,在任何情况下,都必须注意控制吸附条件,例如用硅藻土或氢型皂土吸附时,要求pH 3;用氨型皂土吸附时,则要求pH 5。过去常用的吸附剂已为各种纤维素等取代;近年来大孔陶瓷吸附剂特别受到人们的注意,如适于固定细胞的英国国际陶瓷公司的 $\text{C}_1$ 、 $\text{C}_2$ ,比表面积为 $4\sim 25\text{m}^2/\text{g}$ ,其空穴为 $10\ \mu\text{m}$ 、 $20\ \mu\text{m}$ ,每一陶瓷颗粒还有众多小孔,平均孔径为 $90\text{nm}$ ,以便于与菌体营养物、底物与产物的接触、流动。另外,刀豆蛋白(Con A)对糖蛋白具有专一的吸附作用,也可用于细胞固定化。例如,用Con A吸附啤酒酵母、假丝酵母及枯草杆菌NCIB,在前两者的细胞壁中包含 $\alpha$ -甘露糖,而后者则包含取代的 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷。但是,Con A不能吸附枯草杆菌NACC,因为它细胞壁中的取代基为 $\beta$ -吡喃型葡萄糖苷。

吸附法遇到的问题是,在酶反应过程中,酶和细胞容易脱落,同时也可能由于自溶而从吸附剂丢失。吸附法固定化细胞成功的例子不太多。

### 4. 交联和共价偶联

交联试剂和共价偶联试剂对细胞的毒性往往大于游离酶,因此应用交联法和共价偶联法固定细胞的报道较少。但也有些成功的例子,如有人用戊二醛交联大肠杆菌,得到的固定化细胞中门冬氨酸酶活性相当于完整细胞的34.2%;又如将藤黄微球菌共价偶联于羟甲基纤维素上仍然保存高的组氨酸氨解酶活性。但这些方法的发展有赖于新的温和的功能试剂

及偶联试剂的开发。

交联法的一个发展是和包埋法结合,例如,应用戊二醛和海藻酸等试剂进行双固定化;另一发展是物理絮凝交联,可以获得单位体积内高细胞浓度的固定化细胞;第三个发展是通过双功能试剂将同源或异源的酶固定于菌体的细胞壁上,这一方法的优点是可能将偶联或交联上去的酶和菌体原有的酶组合起来共同加工底物。例如,将淀粉葡萄糖苷酶偶联到含葡萄糖异构酶的链霉菌菌体上,使之直接“联合”加工淀粉为果糖。

固定化细胞的工作进展很快,而且取得了一定的成功,但也有一些问题无法或者难以解决:① 这种技术仅能用于产生胞内酶的菌体。② 如果底物为高分子物质或不溶性物质,使用时就十分麻烦。③ 固定化细胞不仅有固定化带来的扩散限制,相对酶而言,还增添了细胞壁的透性屏障,为部分消除这一因素,通常的办法是让菌体和甲苯、氯仿等接触处理一定时间(例如,37℃,1小时)。④ 固定化细胞可能同时存在催化底物和产物产生分解或转化等副反应的酶,因此有时需要采取加热、加酸、加碱或表面活性剂等预处理措施,例如,用固定化产氨短杆菌来转化延胡索酸为苹果酸,为了阻止琥珀酸的同时生成,可先用胆酸盐进行抽提处理;解决副反应的另一办法则是采用不同菌株。⑤ 由于微生物本身的复杂性,形成的固定化细胞一般在稳定性和酶活性水平上都较低。⑥ 应用初期往往有些细胞组成成分渗出,影响产品质量。

近年来固定化生长菌体的应用正在开发、扩大,它们或用于各种发酵产品如乙醇、啤酒、氨基酸、有机酸以及酶等的生产,或用于废水处理以及抗生素、激素等的转化。生长菌体的固定化方法主要是包埋,但偶尔也采用吸附与共价偶联等方法。包埋材料用得最多的仍推聚丙烯酰胺,其次是角叉菜胶和海藻酸;吸附剂主要是各种纤维素,也可用大孔陶瓷和皂土。生长菌体的固定化目前要解决的主要问题是氧及营养物质难于进入包埋胶内部,所以,这种技术对于厌氧菌一般较为适合。应用固定化生长菌体生产L-亮氨酸似乎已取得一定的成功。

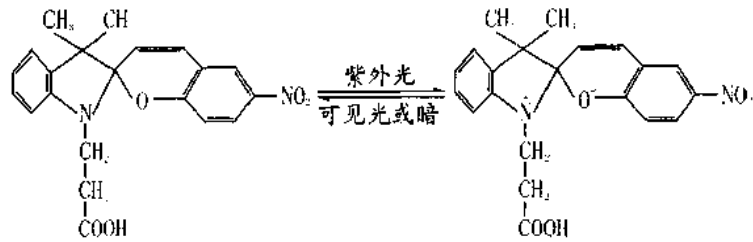
无论是理论研究,还是实际应用,开发细胞器的固定化是一个十分重要的课题。近年来人们在固定化线粒体、过氧酶体以及叶绿体方面也已经进行了一些探索,但由于这些细胞器的稳定性较低而没有突破性进展。细胞器的固定化方法同样主要是包埋法,其中,采用光敏聚合材料似有其独特的优越性。

#### 四、酶活性调节物质的同时固定化

通过选择固定化方法、固定化条件以及固定化载体可以获得高活性的固定化酶。但在实践中为了进一步提高酶的催化能力,是否也可通过同时固定某些调控物质来完成这一任务,这是一个新的值得探讨的领域。目前有关工作甚少,并远未能达到实用阶段。在已报道的实例中,一是借助光调控,这种调控需要一种光致异构化的物质(photochromism)参与,例如,有人发现有一种螺旋氧杂芞化合物(sptropyran),它能在紫外光与可见光或暗处发生:式5.13所示的异构化,在暗处具有疏水结构,在紫外光处则为开环状的亲水结构。将它和 $\alpha$ -淀粉酶或脲酶偶联后用胶原包埋,或者用它修饰胶原膜后包埋脲酶,结果都观察到:在光照下酶活性下降,放回暗处则恢复;而且,这种活性改变是由于 $V$ 的降低, $K_m$ 未变。另一种调控是借助电场,例如,用胶原膜将脂肪酶和液晶物质4'-甲氧基芞叉-4,-4'丁胺包埋在一起,结果发现,这种含液晶物质的固定化酶的活性随电压增加而升高,在4V时可增大3~4



倍;不含液晶物质者仅约 2 倍;并且这种随电压变化而改变酶活性的现象可反复重现。



5.13

## 第二节 固定化酶和固定化细胞的性质<sup>(4-6)</sup>

固定化对酶本身以及酶所处的环境都可能产生一定的影响,因此,固定化酶和水溶液酶表现出来的性态就不同,掌握这些影响规律对有效地应用固定酶和研究酶的生物学作用都有很重要的意义。

### 一、固定化对酶活性及酶反应系统的影响

固定化对酶活性及酶反应系统所产生的影响十分复杂,常因酶的种类、反应系统的组成、固定化方法以及固定化载体而显著不同。在大多数情况下,固定化酶活力常低于相应的溶液酶,但也有些情况固定化不引起酶活力下降,有时甚至还可能升高酶反应的速度。固定化对酶和酶反应系统的影响概括起来如下。

#### 1. 构象改变、立体屏蔽以及微扰

这些因素能直接影响酶的催化活性,它们或者和固定化过程有关,或者和载体的性质有关,或者两者兼有之(图 5.7)。

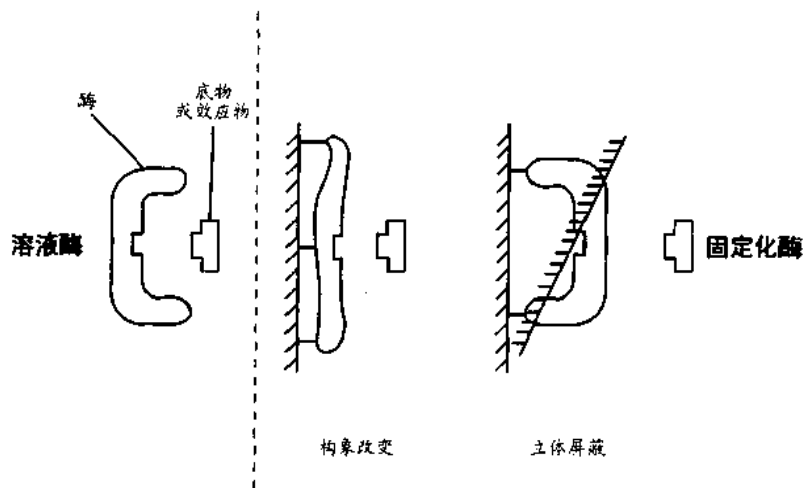


图 5.7 固定化酶相对溶液酶可能产生的构象改变与立体屏障

构象改变(conformational change)是指固定化过程中酶和载体的相互作用,引起了酶的活

性中心或/和调节中心构象改变,从而导致酶活性改变的一种效应。这种效应难以定量描写,也难以预测,多出现于吸附法和共价偶联法制备的固定化酶。

立体屏蔽(steric restriction)是指由于载体的孔径太小,或是由于固定化的方式与位置不当,给酶的活性中心或/和调节中心造成了空间障碍,底物与效应物等无法直接和酶接触,从而影响了酶活性的一种效应。这种效应也难于定量描写,不过,当以包埋法、采用大孔胶进行酶的固定化或以吸附法与共价偶联法将酶固定于纤维素之类的载体上,并在酶与载体间加“臂”时,情况往往就可能发生显著改善。

微扰(perturbation)是指由于固定化载体的亲水、疏水性质和介质的介电常数等直接或间接地影响酶的催化能力,或/和影响酶对效应物作出反应能力的一种效应。这种效应更难于定量描写和预见,但可通过改变载体与介质的性质作出判断或进行调节。

## 2. 分配效应和扩散限制效应

这两种效应和微环境密切相关。所谓微环境(microenvironment)是指和固定化酶紧邻的微观局部环境;它和宏观体系(bulk phase or macroenvironment)不同,是引入了固定化载体以后产生的新概念(图 5.8)。

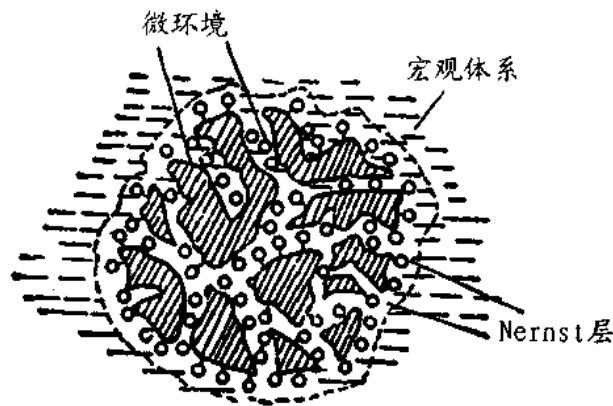


图 5.8 固定化酶的微环境与宏观系统

分配效应(partitioning effect)是由于固定化载体的亲水和疏水性质使酶的底物、产物以及其他效应物在微观环境与宏观体系间发生了不等分配,改变了酶反应系统的组成平衡,从而影响酶反应速度的一种效应。分配效应可以通过分配系数定量描述。一般规律为:① 如果载体与底物带有相同电荷,反应系统的  $K_m$  将因固定化而增大;反之,带有相反电荷时,  $K_m$  将减小。产物及其他效应物的动力学常数如  $K_p$ 、 $K_i$  和  $K_a$  等也类似。② 当载体带有正电荷时,固定化以后,酶活力 - pH 曲线将向酸性方向偏移;反之,阴离子载体将导致该曲线向碱性方向偏移。③ 上述效应可通过提高介质的离子强度而减弱或者消除。④ 采用疏水性载体时,如底物为极性物质或荷电物质,则其  $K_m$  将因酶的固定化而升高;如底物同样为疏水物质,则  $K_m$  将降低。其他效应物亦然。

扩散限制效应(diffusion limitation)是指底物、产物以及其他效应物的迁移和运转速度受到限制的一种效应。它包括两种类型,外扩散限制是指上述物质从宏观体系穿过包围在固定化酶颗粒周围的近乎停滞的液膜层(又称 Nernst 层)到颗粒表面所受到的限制,或/和向相

反方向运转所受到的限制;内扩散限制则是指上述物质从颗粒表面到颗粒内部酶所在位点所受到的限制,或/和向相反方向所受到的限制。扩散限制效应也可通过引入相应的参数和模量进行定量分析,一般规律为:① 这种效应对反应速度的影响程度既取决于该效应本身的大小,也取决于它和酶反应固有速度的相对大小。这就是说,如果酶反应本身的速度很小,扩散限制产生的影响也就大一些;反之,扩散限制就将在整个过程中起律速作用。② 扩散限制效应往往可通过充分搅拌和混合减轻或消除,而内扩散限制效应则取决于载体的性质,须通过实验进行测定和调整。

### 3. 其他

(1) 酶作用专一性。通常固定化酶的作用专一性和溶液酶基本相同,但是对于某些作用大分子底物的酶而言,如蛋白酶、葡萄糖淀粉酶等,由于其固定化载体与固定化方法的缘故,可能会给它的某些底物造成立体障碍,从而导致酶的专一性发生改变。

(2) 酶作用的“最适温度”。酶作用一般都有一个“最适温度”,它和酶的稳定性有关。大多数酶在固定化以后热稳定性常有所升高,因此,其最适温度也往往上升;但酶反应的活化能则较少改变。

## 二、固定化对酶稳定性的影响

大多数酶固定化后,一般都有较高的稳定性、较长的操作寿命和保存寿命,产生这种效应可能的原因有:① 固定化增加了酶活性构象的牢固程度;② 阻挡了不利因素对酶的侵袭;③ 限制了酶分子间的相互作用。但是如果固定化触及到酶的活性敏感区,也可能导致酶的稳定性下降。

固定化酶稳定性升高表现在以下方面。

### 1. 固定化增加了酶的耐热性

大多数固定化酶都具有较高的热稳定性。以氨基酰化酶为例,天然的溶液游离酶在70℃加热15min,其活力几乎全部丧失;但是当它固定于DEAE-纤维素以后,在相同条件下却可保存60%的活力;而固定于DEAE-葡聚糖以后,则可保存80%的活力。再如,偶联于CM-纤维素的胰凝乳蛋白酶,包埋于聚丙烯酰胺的乙酰胆碱酯酶等也类似。但是,也有的酶用某种方法固定化以后,酶的热稳定性反而下降,如DEAE-纤维素吸附的蔗糖酶、CM-纤维素偶联的过氧化物酶等。

### 2. 固定化增大了酶对变性剂、抑制剂的抵抗能力

表5.3列举了几种固定化酶对各种试剂的稳定性。有趣的是某些酶在固定化以后,不仅增强了它们对蛋白质变性剂如尿素和盐酸胍等的抵抗力,而且在这些变性剂存在的情况下,酶的活力反而有所升高。产生这种现象的原因可能是这些变性试剂增大了酶的柔顺性。不过,有的酶,如葡萄糖淀粉酶,在固定化以后对某些抑制剂甚至比溶液酶更为敏感。

### 3. 固定化减轻了蛋白酶的破坏作用

以氨基酰化酶为例,在胰蛋白酶作用下,溶液酶保存的活力仅为23%,固定于DEAE-

纤维素者为 33%，固定于 DEAE-葡聚糖者为 87%；在蛋白酶 Pronase P 的作用下，溶液酶保存 48% 的活力，固定于 DEAE-纤维素者保存 53%，而固定于 DEAE-葡聚糖者 88%。蛋白酶本身在固定化后一般都可避免自消化破坏作用。

表 5.3 某些酶对各种化学试剂的稳定性

酶	方法	试剂	保存活性(%)	
			溶液酶	固定化酶
氨基酰化酶	离子交换吸附法 (DEAE-纤维素)	6 mol/L 尿素	9	146
		2 mol/L 盐酸胍	49	117
		1% SDS	1	35
胰蛋白酶	缩合偶联法 (CM-纤维素)	4 mol/L n-丙醇	55	138
		3 mol/L 尿素	60	120
		大豆胰蛋白酶抑制剂	0	80
乙酰胆碱酯酶	包埋法	(Bidrin) $\begin{array}{ccccccc} & \text{O} & & \text{CH}_3 & \text{H} & \text{O} & \\ &    & &   &   &    & \\ (\text{CH}_3\text{-O})_2 & \text{-P-} & \text{O-} & \text{C} & = & \text{C} & \text{-C-N-}(\text{CH}_3)_2 \\ & & & & & & \end{array}$	0	49
葡萄糖淀粉酶	物理吸附法(活性炭)	0.002 mol/L 醋酸汞	80	0

#### 4. 固定化可以延长酶的操作和保存有效期

大部分的酶在固定化以后，其使用和保存的时间显著延长，这一特点最有实用价值。这种稳定性通常以半寿期表示，它是固定化酶的一个重要特性参数。

### 三、固定化对细胞性质的影响

和固定化酶相比，固定化细胞的情况比较复杂。一方面固定化对酶产生的某些影响同样对细胞表现作用。例如，固定化也可增加细胞的稳定性，而且这种稳定性的增加(包括热稳定性及使用稳定性)可因二价离子的存在而得到进一步改善；此外，某些细胞内酶的稳定性还常因抗生素如新霉素、氨基青霉素、氯霉素的存在而显著增大。

另一方面，由于细胞内环境的相对恒定和细胞的“缓冲作用”，固定化对细胞内酶产生的影响在某些方面不像固定化酶那样明显。例如，对 15 种固定化细胞的分析表明，就最适 pH 来说，和游离酶比较只有 5 种有小的偏移，10 种不变；就最适温度而言，仅包埋于聚丙烯酰胺胶内的恶臭假单胞菌的 L-精氨酸脱氢酶升高，其余的保持不变。

第三，固定化细胞(内)酶除受固定化因素影响外，还受细胞结构及细胞膜透性的影响。某些固定化细胞(内)酶在一定条件下经保温处理，或经表面活性剂等试剂处理后，常会出现活性升高的现象。例如，将聚丙烯酰胺胶包埋的大肠杆菌在 1 mmol/L 镁离子和 1 mol/L 的甲酸铵存在条件下，37℃保温 24~48h 后，门冬氨酸酶活性可升高 9~10 倍，估计这和细胞的自溶活化有关。即使在没有表面活性剂存在的情况下，聚丙烯酰胺聚合过程本身有时也有升高菌体酶活性的作用。

固定化生长菌体还要考虑其他很多因素，包括：菌体的生长、酶的活性变化、细胞的生理生化以及它们在颗粒内的分布等因素。这些方面目前还没有完整的资料，但从对转化菌株激素的有关固定化生长菌体的研究，可大体看出：① 固定化不仅能直接影响菌体的活性、酶活性及酶稳定性，还可能对固定化以后菌体的生长能力和酶的合成产生影响；② 固定化的

颗粒在培养基中保温一定时间后,通常菌体和酶的活力都会上升,并能维持相当长的时间,然后才开始逐渐下降;③ 菌体生长主要发生在颗粒内近表层处,菌的裂解与解吸则主要出现于颗粒深部,而且随着逐渐深入内部,解吸与裂解也逐渐增加。

### 第三节 固定化酶的应用<sup>(7-11)</sup>

固定化酶具有溶液游离酶所没有的一些特点,它的出现为酶学理论研究,也为酶在生产实践上的应用展现了更为广阔的前景。

#### 一、固定化酶在工农业生产上的应用

这是固定化酶应用的一个主要方面。和溶液游离酶相比,它的优越性是:

第一,能反复使用,可大大降低生产成本;同时也为实现生产的管道化、连续化与自动化提供了可能,为建立新型的酶法与化学法相结合的工艺以及酶法处理三废开辟了道路。

第二,酶或细胞经过固定化以后往往会获得对有机溶剂等的抵抗能力,因此,它可用于进行某些非水系统的反应,例如,甾体激素的生化转化,DL-酯类物质的消旋等;在某些情况下也可用于使酶促水解反应逆向进行,例如,固定化的 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶可在高浓度有机溶剂中催化酯合成。

第三,固定化细胞的发展,特别是固定化生长细胞的发展,为需要辅酶的系统和多酶系统才能进行的反应,为某些需要通过发酵才能进行的生产提供了可能。

固定化酶在工农业生产方面的应用近年来发展很快,某些已经正式投产,某些尚在试验阶段,表 5.4 列举了部分例子。

表 5.4 固定化酶(细胞)在工业生产上的某些应用

产 物	酶(或)细胞	固定化方法	原料
1. L-氨基酸	氨基酰化酶	载体结合法	乙酰-DL-氨基酸
2. 果糖浆	葡萄糖异构酶或含该酶之菌体	载体结合法或交联法	葡萄糖
3. 6APA	青霉素酰胺酶	载体结合法	青霉素 G
4. L-门冬氨酸	含有门冬氨酸酶的菌体	胶格包埋法	反丁烯二酸
5. L-苹果酸	含有反丁烯二酸酶的菌体	胶格包埋法	反丁烯二酸
6. 低乳糖牛奶	乳糖酶( $\beta$ -半乳糖苷酶)	载体结合法	牛奶
7. 乳酪	碱性蛋白酶	载体结合法	牛奶
8. 干蛋白	葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶	胶格包埋法	蛋白
9. 果汁脱苦	柚苷酶	载体结合法	桔类果汁
10. 啤酒	木瓜蛋白酶	载体结合或包埋法	生啤酒
11. 植物白脱	脂肪酶	胶格包埋法	植物油
12. 脂肪酸	脂肪酶	载体结合法	植物油
13. 类固醇	含脱氢酶及羟化酶的菌体	胶格包埋法	类固醇前体
14. L-丙氨酸	含有 L-门冬氨酸、 $\beta$ -脱羧酶的菌体	包埋法	L-门冬氨酸
15. D-苯甘氨酸	氨基酰化酶	载体结合法	乙酰-DL-苯基甘氨酸
16. ATP	乙酰激酶	载体结合法	ADP
17. 核苷酸类味精	5'-磷酸二酯酶,5'-腺苷酸脱氨酶	载体结合法	RNA
* 18. 乙醇	<i>Sacharomyces carlsbergensis</i> 或 <i>S. Cerevisiae</i>	角叉胶或聚丙烯酰胺 胶包埋	葡萄糖培养基
19. 啤酒	同上	聚乙烯氧或多孔砖吸附 或海藻酸包埋	

续表

产物	酶(或)细胞	固定化方法	原料
20. L-亮氨酸 21. 乙酸 22. 乳酸	<i>Serratia marcescens</i> <i>Aerobacter. sp.</i> 乳酸杆菌与酵母	角叉胶包埋 水合氧化钛吸附 明胶包埋	苏氨酸培养基 乙醇培养基
23. 淀粉酶 24. 杆菌肽 25. 氢气	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacill. sp.</i> <i>Clostridium butyricum</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>	聚丙烯酰胺胶包埋 聚丙烯酰胺胶包埋 聚丙烯酰胺或琼脂包埋	
** 应用内容	菌体	固定化方法	毒物
26. 废水处理 27. 脱氮作用	<i>Candida tropicalis</i> <i>Pseudomonas Putida</i> 各种微生物混合培养 <i>Pseudomonas sp</i> <i>Micrococcus denitrificans</i>	聚丙烯酰胺胶包埋 聚丙烯酰胺胶包埋 皂土和 Mg <sup>+</sup> 或聚氨基 甲酸乙酯海绵 活性炭吸附液膜	酚 苯 废水 亚硝酸, 硝酸

\* 18 以后为固定化生长菌体

\*\* 26 与 27 为固定化生长菌体在三废处理上应用

固定化酶(细胞)在工农业生产上具有很大的应用潜力,要解决的主要问题是它的操作和保存稳定性。固定化酶(细胞),特别是固定生长菌体在应用中的另一个重要问题是防止杂菌污染;为克服这一缺点,目前的方向是开发耐热和亲卤细胞的应用。

## 二、固定化酶在医药治疗上的应用

溶液酶作为治疗药物时有一些“致命”弱点,注射入人体以后一般可能产生三个问题:① 酶作为异物物质,反复应用会导致免疫反应;② 酶是蛋白质,在体内易被网状内皮系统移除和被蛋白酶水解破坏;③ 由于稀释效应,药物酶无法集中于靶器官组织以达到治疗所需的最适高浓度。溶液酶的这些缺点,通过选择适宜的载体与方法将它们固定化以后就能逐一地加以解决。表 5.5 列举了某些具有代表性的固定化药物酶及其优缺点。

表 5.5 某些具有代表性固定化药物酶

酶	应用方式	载体	应用对象	半寿期	优缺点
尿酸酶	组成体外循环	血液透析装置			优点:加速尿酸移去 缺点:需移去尿酸产物——尿素
门冬酰胺酶	移接	Dacron 脉管修复用 和移接管	急淋白血病	约 2d	优点:无免疫原性质
脲酶	体内循环	尼龙微囊	尿	1d	优点:易 缺点:消亡快;载体有毒性,难清除
脂肪酶	口服	肠衣包被	胰机能不全	1d	优点:抗酸
酪氨酸酶	体内循环	可溶性的聚顺丁烯二 酸与聚丙烯酸聚合物	癌瘤	24h	优点:最适 pH 向中性偏移
谷氨酰胺酶	体内循环	可溶性的聚乙二醇	癌瘤	24h	优点:无抗原性半寿期延长
$\beta$ -葡萄糖苷酸酶	体内循环	血影细胞	取代和补偿先天 缺失(肝)	18h	优点:抗原性
$\beta$ -葡萄糖苷酸酶	体内循环	脂质体	补偿先天缺失		优点:载体能被代谢 缺点:对载体和内含物敏感
胆红素葡萄糖醛酸 基转移酶	体内循环	和聚乙烯吡咯烷酮结 合的微粒体	黄疸		优点:不需分离酶 缺点:需使辅助因子扩散到微粒体内
过氧化氢酶	体内循环	尼龙微囊		短暂	优点:能做成糊状 缺点:在唾液很快移除

固定化药物酶就其应用方式而言,大体可分为两种类型:转入体内发挥作用和通过“体外循环”做成人工脏器。前一种情况又包括口服、移接和注入。口服最初主要限于消化酶类,近年来也有人尝试将酶以口服方式用于尿中毒等疾患的治疗。口服的优点是药物通过粘膜吸收后能迅速进行扩散,进入体内,通常不会引起免疫反应。为适应口服要求,可将酶包埋于酸稳定、但碱不稳定的微囊内。

其次是移接,这是从对脉管瘤进行脉管移接修复的启发中衍生出来的,即先将药物酶偶联固定于移接体的内表面,然后再移接到体内使之发挥作用。例如可将 L- 门冬酰胺酶固定化于 Dacron 移接体内用以降低血浆中的 L- 门冬酰胺水平。一般来说,这种应用方式能解决免疫原反应问题,效果也比较显著;但持续的时间通常十分短暂,其主要原因是血纤维蛋白以及其他不能透入的物质会在移植体表面积累。克服这一缺点的办法是,采用浸渍了肝素和血纤维蛋白溶酶的载体固定相应的药物酶。这一应用方式的另一问题是,如何才能简便地通过外科手术有效地将移接体引入体内。

第三是注入,这是最有实用价值的一种方式,溶液酶作为药物使用的弱点也集中表现于“注入”方式上。固定化酶可很好地解决这一问题,办法是将药物酶包埋于半透膜中,半透膜可容许小分子底物自由出入包埋膜,而药物酶和破坏它的蛋白水解酶以及其他免疫因子等不会直接接触,因而可延长酶在体内的半寿期和避免免疫过敏反应。不仅如此,如果选择的载体适宜,或者在载体上偶联适当成分,还可使药物酶比较集中地输送到靶组织。

用于包埋药物酶的载体有两种类型。一是可溶性载体,它有以下几种:① 聚乙烯吡咯烷酮,这种载体能显著地延长药物酶在体内的半寿期,但可惜的是它可能有一定的抗原性或免疫原性。② 多糖或糖肽,它们不仅能大大延长药物酶在体内寿命,而且许多研究表明,如果载体包含较高含量的半乳糖苷时,可以促进靶组织(如肝组织)迅速地将药物酶从血液中吸收出来,但它仍然不能完全克服抗原性和免疫原性的问题。③ 聚乙二醇,在药物酶上偶联足量的聚乙二醇后,既能使酶获得长的半寿期,又可使酶避免免疫反应,同时本身也不会表现免疫原性。以聚乙二醇包埋的腺苷酸脱氨酶已经 FDA 批准用于儿童免疫缺失症。不过,也有少数例外,如苯丙氨酸氨解酶在聚乙二醇偶联后,虽可大大减弱免疫原性,但不能完全消除。另外,还有一些来源的酶如门冬酰胺酶、谷氨酰胺酶等在结合了聚乙二醇后,酶活性往往迅速下降。④ 聚氨基酸以及血清白蛋白,有人发现偶联一定量的聚氨基酸到蛋白质上以后可以明显降低免疫原性,这一点已在核糖核酸酶、胰蛋白酶和门冬酰胺酶上得到证实,而且在修饰后显示出大为增长的半寿期;近年来人们也开始注意到应用血清蛋白作为载体,它的特点是半寿期长,可保护酶免于和天然酶的抗体反应,也不引起新的抗体产生,而且还有一定导向作用。⑤ 其他,值得提到的有核酸和脂类物质等,目前实验报道虽然还不多,但是它们可能作为药物的“导弹”,特别是脂类物质和药物酶结合后,对于脂肪组织、乳糜微粒有强的亲和力;也可联接某些荷电载体,如聚丙烯酸、聚顺丁烯二酸等,它们有时可能有助于某些药物酶克服其酶活性最适 pH 和生理 pH 不同的矛盾。不溶性载体包括:① 半透性聚合膜,其优点是包埋体表面积大,可充分地发挥酶的治疗效果,避免免疫反应,而且如果同时包埋某些蛋白酶(如胰蛋白酶)抑制剂还可延长酶在体内的半寿期;其缺点是,包埋的酶往往不稳定,比活力较低,由于膜具有较大生物学稳定性,因此长期使用会积累起来导致毛细血管系统堵塞或发炎。② 脂质体,它具有双重亲和性,根据药物或酶的溶解性质,可将这些药物酶包埋于其核心,也可包埋于类脂层,脂质体膜上可附加上各种物质以改变脂质体的荷电性

质、渗透性以及它被组织吸收与降解的特性,还可在脂质体的特定位点上偶联抗体、外源凝集素、糖蛋白、脂类以及其他物质以增加药物酶的导向性。脂质体能被生物体,特别是被内质网组织吸收和降解;脂质体最近的发展是应用能随温度改变而发生相变的脂类作为它的膜,在高于生理温度条件下,膜就变得不稳定,从而使其中包埋的药物酶释放出来,这样也有助于解决药物的定向释放问题。脂质体的缺点是:它们在组织和血浆中不太稳定。③ 红血球血影细胞(ghost cell),这是利用红血球膜透性的可逆变化将大分子药物(酶)包埋起来的一种载体。它的优点是:同种生物、同种血型来源的红血球在免疫学上具有相容性;红血球膜是一种超薄的膜,但对底物的扩散有一定选择性;半寿期长,比脂质体稳定。它的缺点是:某些底物和产物扩散较慢;包埋率,特别药物酶的包埋率低,且活性不高。

最后,固定化酶也可做成“人工脏器”参与体外循环,它的要求大体和注入方式相同。应用有两方面:一是用于除去有害的毒性物质及有潜在毒害作用的代谢尾产物,如清除尿毒症病人体内积累的尿素;进行这类应用时除了要考虑半寿期、免疫过敏等问题外,往往还要在“人工脏器”中偶联多种组成成分以彻底除去毒性产物。如处理尿素时,除了脲酶外,还要解决尿素分解生成氨的问题,这样就需要另外加入谷氨酰胺合成酶或加入去氨的树脂等。二是除去(一种或多种)氨基酸,使需要这些物质的病变组织“饿死”;治疗时只需将患者的血液引出体外,通过由固定化酶等构成的“人工脏器”加以处理,然后再流回体内。

### 三、固定化酶在分析化学中的应用

固定化酶在生化分析和临床检验中的应用也是一个十分重要的领域,它的发展非常迅速,这不仅因为它们比较稳定,可反复使用,能实行自动化、连续化等,而且因为它们对抑制剂和活化剂比较不敏感,因此可用于较复杂体系的检测。

分析化验中应用的固定化酶大体分为两类:酶感应器和固定化酶柱检测器。

酶感应器(enzyme sensor)是将酶固定并结合于感应器上组成的检测器,包括两种:① 酶电极,它是可以测定电流变化或电压变化的电化学感应器。当测定电流变化时,电流变化( $\Delta\mu A$ )一般是被测物质浓度的线性函数;当测定电压变化时,电压变化( $\Delta mV$ )与被测物质浓度为对数关系(Nernst 方程)。通常测定电压变化者较多。② 酶反应热感应器,它是通过感应酶反应过程的热变化进行检测的感应器,这种感应器的优点是可以普遍应用,缺点是干扰因素较多,而且需要较长时间的温度平衡。

固定化酶柱检测器包括两部分:固定化酶柱和检测器。它的特点是酶柱和检测器可分离组合,即同一酶柱可和不同的检测器自由组合。酶柱有两种类型:开放型管式非均相酶反应器(OTHERs)和填充床酶反应器。前者的主要优点是柱无压降,流量高,缺点是要使被测底物的完全转化需要一定长度的酶管。后者的特点是有较大的酶反应表面积,有利于使底物完全转化,但一般都有较明显的柱压降,甚至可能使柱流堵塞。在分析应用中 OTHERs 似乎受到人们更多的注意,过去多用尼龙管,近年来认为聚乙烯可能更为理想,因为它有较大的稳定性、化学惰性及较大的机械强度与柔顺性。至于检测器,过去主要用光学系统,现在逐渐转向电学系统。因为它可免除显色试剂,减少分离及其他化学操作,也可用于悬浮体系的测定,且成本较低。

固定化酶在分析应用中的问题与解决办法。

(1) 固定化酶的比活力决定分析系统的最终灵敏度。为了使样品中的溶质能在预期的



浓度范围进行检测,就必须增加酶层的厚度或酶柱的长度,或者提高固定化酶的比活力。但是增加酶层厚度和酶柱长度总归有限,因此提高固定化酶的比活力是更为有力措施。

(2) 固定化酶的稳定性是应用固定化酶的优势所在。包括两类稳定性:贮藏稳定性和操作稳定性,特别是后者更重要。一般认为,一个固定化酶分析系统至少应能使用 5 000 次以上的检测。近年来报道了一些改进固定化酶稳定性的方法,例如,将 Cleland 试剂共价偶联于尼龙管内壁,以增加固定在尼龙上的巯基酶的稳定性升高;又如,将酶的非必需基团进行分子内交联。

(3) 防止连续分析过程中前后样品间的相互重叠。这在酶柱反应器分析系统中尤为突出。由于它直接影响到检测的准确度,故须设法解决。可能采取的措施是:① 降低分析样品的液流速度,但这有一定限度,因为它关系到单位时间内应完成的样品检测数;② 缩短酶柱长度,但柱长和分析灵敏度有关,故也受到限制;③ 改变载体的性质或调整分析样品液流的介质组成。样品间相互重叠的主要原因是酶反应底物与产物的滞留,而滞留的主要原因又是由于这些物质和载体间存在的相互作用。因此,选择适宜的载体、升高或降低介质的离子强度都将有助于改善样品间的重叠问题。

表 5.6 某些酶电极

被测化合物	固定化酶	电极感应器	测定范围(mol/L)
腺苷单磷酸	AMP 脱氢酶	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 电极	
醇	醇氧化酶	Pt/O <sub>2</sub> 电极	
D-氨基酸	D-氨基酸氧化酶	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 电极	10 <sup>-5</sup> ~ 10 <sup>-2</sup>
L-氨基酸	L-氨基酸氧化酶	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 电极	10 <sup>-4</sup> ~ 10 <sup>-2</sup>
扁桃苷	β-葡萄糖苷酶	CN- 电极	10 <sup>-5</sup> ~ 10 <sup>-2</sup>
L-门冬酰胺	L-门冬酰胺酶	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 电极	5 × 10 <sup>-6</sup> ~ 10 <sup>-2</sup>
D-葡萄糖	葡萄糖氧化酶	Pt/醌电极	10 <sup>-5</sup> ~ 10 <sup>-4</sup>
	葡萄糖氧化酶	Pt/O <sub>2</sub> 电极	10 <sup>-5</sup> ~ 10 <sup>-4</sup>
	葡萄糖氧化酶/过氧化氢酶	Pt/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 电极	
葡萄糖-6-磷酸	碱性磷酸酯酶/葡萄糖氧化酶	Pt/O <sub>2</sub> 电极	
L-谷氨酰胺	谷氨酰胺酶	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 电极	10 <sup>-4</sup> ~ 10 <sup>-1</sup>
乳酸	乳酸脱氢酶	Pt/铁氧化物电极	10 <sup>-4</sup> ~ 10 <sup>-2</sup>
青霉素	青霉素酶	pH 电极	10 <sup>-4</sup> ~ 10 <sup>-2</sup>
L-苯丙氨酸	L-氨基酸氧化酶	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 电极	10 <sup>-5</sup> ~ 10 <sup>-2</sup>
	L-氨基酸氧化酶/过氧化物酶	Pt/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 电极	10 <sup>-5</sup> ~ 10 <sup>-3</sup>
磷酸酯	碱性磷酸酯酶/葡萄糖氧化酶	Pt/O <sub>2</sub> 电极	
酪氨酸	酪氨酸脱羧酶	CO <sub>2</sub> 电极	10 <sup>-4</sup> ~ 10 <sup>-1</sup>
尿素	脲酶	CO <sub>2</sub> 电极	10 <sup>-4</sup> ~ 10 <sup>-1</sup>
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 电极	10 <sup>-5</sup> ~ 10 <sup>-1</sup>
		pH 电极	
尿酸	尿酸酶	Pt/O <sub>2</sub> 电极	

#### 四、固定化酶与基础理论

和酶的基础理论相关的一个重要侧面就是对酶本身的研究,这也是分子生物学和化学催化理论研究的一个基本组成部分,而固定化酶是这种研究的一个理想的实验模型,只是目前工作还比较零星,大体有如下几个方面。

### 1. 酶的细胞生物学研究

和通常研究的均相状态的溶液酶不同,酶在生活的细胞体系中,一般都具有“区划性”,而且很多情况下,都是和亚细胞结构结合在一起的,这样它的性态与生理功能显然会和溶液游离酶不一样。应用固定化的双酶和多酶系统进行的模拟试验能获得一些很有趣的结果。例如,将己糖激酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶固定化在一起,和均相溶液酶体系相比较,结果观察到偶联反应的初速度显著升高,而中间产物积累达到恒态水平所需的潜伏期大大缩短甚至消失。又例如,将上述两种酶和 ATP 再生系统同固定于白蛋白上,然后用能透过葡萄糖、但不能透过葡萄糖-6-磷酸的膜进行包被,结果,在体外实现了“反抗”浓度梯度的葡萄糖的“活性运转”。

### 2. 酶的结构功能研究

大多数酶都是寡聚体,其中有的是恒态酶,服从米氏方程,也有的属于调节酶,表现别构调节性态。对于这些酶,阐明其亚基特性、亚基间的相互作用以及与酶的结构功能关系是一个十分重要的课题。但是在通常的溶液状态下,要获得解离的“天然”亚基是比较困难的,而应用固定化酶技术时则可以简便地解决。图 5.9 是这种方法的示意图,具体过程包括:① 在适宜的条件下将寡聚体酶的一个亚基和载体偶联固定;② 变性并除去其他亚基;③ 复性及活性检测(类型 I 中单个亚基表现活性,类型 II 中单个亚基无活性);④ 亚基重组和酶性质的测定。表 5.7 是通过这种方法得到的某些结果。

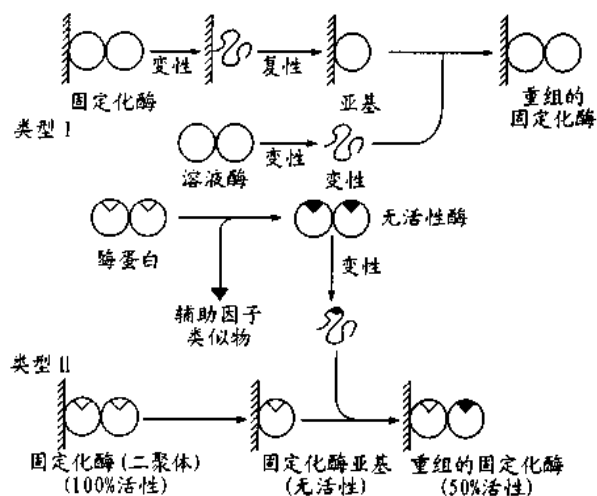


图 5.9 应用固定化酶研究亚基间的相互关系

### 3. 酶分子的改造与模拟

近年来有机化学家已开始把自己的注意力从天然的化合物转向人工合成大分子的研究;而遗传学家正在从基因角度进行生物特性的改造工作;酶学家则在考虑酶分子的修饰与模拟,其中一个重要的方面就是通过固定化技术来改变酶的特性。但目前这方面的工作尚处于探索阶段:① 借助辅助因子的固定化改变酶的性质,例如,用偶联了 AMP 的载体固定磷酸化酶 b,这样就可使它催化的转化不再需要游离的 AMP;将 NAD 直接偶联于醇脱氢酶,

可使之转变为含辅基类型的脱氢酶;将合成的黄素共价结合于木瓜蛋白酶,使这种水解酶也可获得催化氧化还原反应的活性。②在效应物存在条件下进行酶的构象“冻结”与固定化,藉以改造酶的性质。例如,可在效应物存在情况下,通过交联反应使 dCMP 氨解酶“冻结于”活化的构象状态;也可在底物存在时使门冬氨酸转氨甲酰酶“冻结于”高底物亲和力状态。

表 5.7 某些酶固定化亚基研究

酶	亚基数目	固定化亚基的活性状况
醇脱氢酶	2	亚基单体无活性
醛缩酶	4	亚基单体有活性
精氨酸酶	4	亚基单体有活性
门冬氨酸转氨甲酰酶	(AB <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	三聚体(AB <sub>2</sub> )有活性
肌酸激酶	2	亚基单体无活性
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	4	二聚体有活性
糖原磷酸化酶	4	亚基单体无活性
乳酸脱氢酶	4	亚基单体无活性
磷酸葡萄糖异构酶	2	亚基单体无活性
转醛酶	2	亚基单体有活性
磷酸丙糖异构酶	2	亚基单体有活性

固定化酶的研究尚处于发展阶段,新的载体、新的固定化技术尚在开发,新的应用还在探索,但是它的前景十分明朗。有人估计在这个世纪末,固定化酶将会普遍应用于工农业生产、临床治疗以及基础理论研究。

## 参 考 文 献

### 一、酶和细胞的固定化

- (1) Weetall HH. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1993, **41**(3):157
- (2) Schreuder MP, Mooren AT & Toschka HY. *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**(4):115
- (3) Huckel M, Wirth HJ & Hearn MT. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1996, **31**(3—4):165

### 二、固定化酶和固定化细胞的性质

- (4) Clark DS. *Trends Biotechnol.*, 1994, **12**(10):439
- (5) Svec F, Gemeiner P. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1996, **13**:217
- (6) Pinheiro HM. *Bioprocess Technol.*, 1996, **23**:311

### 三、固定化酶的应用

- (7) Terasawa M, Yukawa H. *Bioprocess Technol.*, 1993, **16**:37
- (8) Tanaka A, Nakajima H. *Arch. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1990, **42**:97
- (9) Bales V. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1994, **48**(1):5
- (10) Rongen HA, Bult A & Bennekoum WP. *J. Immunol. Methods*, 1997, **204**(2):105
- (11) Turkova J. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 1999, **722**(1—2):11

# 第三部分 酶反应动力学及其应用

## 第六章 酶反应动力学<sup>(1-3)</sup>

酶反应动力学和化学反应动力学一样,是研究酶反应速度规律以及各种因素对酶反应速度影响的科学。研究酶反应动力学规律对于生产实践、基础理论都有着十分重要的意义。

酶反应比一般的化学反应远为复杂,因为在酶反应系统中除了反应物(即底物)外,还有酶这样一种决定性的因素,以及影响酶的其他各种因素。正是这些因素的多种组合,才构成了不同水平、不同复杂程度的酶反应体系(表 6.1)。

表 6.1 影响酶反应动力学的因素

因素	种类	
酶系统	单酶系统	多酶系统
酶性质	恒态酶	别构酶
酶状态	溶液酶	固定化酶
底物	单底物	双或多底物
动力学性质	稳态动力学	稳态前动力学
动力学内容	稳态初过程	稳态全过程
其他影响因素	抑制剂,活化剂, pH, 温度等	

### 第一节 酶反应动力学体系

酶反应动力学以均相系统的化学动力学为基础,为此,下面首先回顾一下均相系统的一些化学动力学规律。

1. 最简单的均相反应系统:  $A \xrightarrow{k_1} C$

如为零级反应(Zero-order Reaction),有:  $-d[A]/dt = k_1$  6.1

$k_1$  为反应速度常数,  $t$  为反应时间。

$$[A] = [A]_0 - k_1 \cdot t \quad (t \ll [A]_0/k_1) \quad 6.2$$

$$[A] = 0 \quad (t \geq [A]_0/k_1) \quad 6.2'$$

零级反应的特点是:

- (1) 反应速度与反应物浓度  $[A]$  无关;
- (2)  $[A]$  与  $t$  为线性函数关系;
- (3)  $k_1$  的单位为: 浓度( $\mu\text{mol/L}$  或  $\text{mmol/L}$ )/时间( $\text{s}$  或  $\text{min}$ )

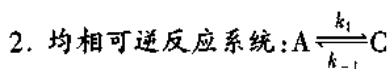
如为一级反应,有:  $-d[A]/dt = k_1 \cdot [A]_0$  6.3

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-k_1 t}$$
 6.4

$$t = 1/k_1 \cdot \ln[A]_0/[A] (= 2.3/k_1 \cdot \log[A]_0/[A])$$
 6.5

一级反应的特点是:

- (1) 反应速度与[A]呈比例;
- (2) [A]与 t 为半对数函数关系;
- (3)  $k_1$  的单位为  $s^{-1}$  或  $min^{-1}$ 。



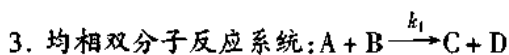
$$-d[A]/dt = k_1 \cdot [A] - k_{-1} \cdot [B]$$
 6.6

反应处于平衡时,有:

$$K_{eq} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[B]_{eq}}{[A]_{eq}}$$
 6.7

$[B]_{eq}$  和  $[A]_{eq}$  分别为平衡时的产物与底物浓度。

平衡常数  $K_{eq}$  为无因次常数。



按二级反应考虑:  $-d[A]/dt = k_1 \cdot [A] \cdot [B]$  6.8

如  $[B] \gg [A]$ ,  $[B] \approx [B]_0$ , 式 6.8 可简化为拟一级反应方程:

$$-d[A]/dt = (k_1 \cdot [B]) \cdot [A] = k'_1 \cdot [A]$$
 6.9

二级反应的特点是:

- (1) 反应速度与[A]和[B]相关;
- (2)  $k_1$  的单位为:  $1/(s \cdot \mu mol/L)$  或  $1/(min \cdot mmol/L)$ 。

图 6.1 示零级、一级或二级反应的反应速度与反应物浓度的关系。

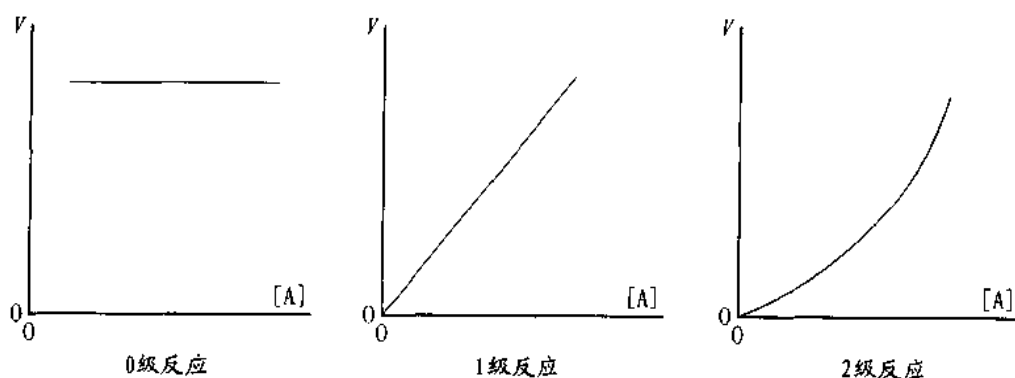


图 6.1 反应速度与反应物浓度的关系

4. 均相双分子可逆反应系统:  $A + B \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C + D$

$$K_{\text{eq}} = \frac{[C]_{\text{eq}} \cdot [D]_{\text{eq}}}{[A]_{\text{eq}} \cdot [B]_{\text{eq}}} \quad 6.10$$

$K_{\text{eq}}$ 亦为无因次常数。

5. 对于反应系统:  $A + B \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C$

按合成方向:  $-[A]/dt = k_1 \cdot [A] \cdot [B] - k_{-1} \cdot [C]$  6.11

$$K_{\text{eq}} = \frac{[C]_{\text{eq}}}{[A]_{\text{eq}} \cdot [B]_{\text{eq}}} \quad 6.12$$

此处,  $K_{\text{eq}}$ 为结合常数,其因次为浓度 $^{-1}$ ;解离常数有浓度因次。

6. 均相连续反应系统:  $A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$

(1) 如果第一个反应为零级反应,第二个为一级反应,则有:

$$-d[A]/dt = k_1 \quad 6.13$$

$$+d[B]/dt = k_1 - k_2 \cdot [B] \quad 6.14$$

$$+d[C]/dt = k_2 \cdot [B] \quad 6.15$$

反应开始后:  $[A] = [A]_0 - k_1 \cdot t$  6.2

$$[B] = k_1/k_2 \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 6.16$$

$$[C] = k_1 \cdot t - k_1/k_2 \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 6.17$$

如果  $k_2$  极大,或者系统中有大量催化第二个反应的催化剂能使  $k_2$  无限增大,那么中间产物  $[B]$  将趋于 0,终产物  $[C]$  将趋于  $[C]_{\infty}$ ;

$$[C]_{\infty} = k_1 \cdot t \quad 6.18$$

$[C]_{\infty}$  与  $t$  为线性函数,根据式 6.17 和式 6.18,应有:

$$\begin{aligned} \sigma &= [C]/[C]_{\infty} \\ &= 1 - \{(1 - e^{-k_2 t})/k_2 \cdot t\} \end{aligned} \quad 6.19$$

$\sigma$  为形成的终产物 C 与原始反应物 A 变化量之比,称为接近度, $\sigma$  愈接近 1,形成的终产物量愈能反映原始反应物的变化量。

(2) 如果第一个反应和第二个反应都是一级反应,那么应有:

$$-d[A]/dt = k_1 \cdot [A] \quad 6.3$$

$$+d[B]/dt = k_1 \cdot [A] - k_2 \cdot [B] \quad 6.20$$

$$+d[C]/dt = k_2 \cdot [B] \quad 6.21$$

反应开始后:  $[A] = [A]_0 \cdot e^{-k_1 t}$  6.4

$$[B] = \{[A]_0 \cdot k_1 / (k_1 - k_2)\} \cdot (e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}) \quad 6.22$$

$$[C] = [A]_0 + [A]_0 \cdot \left( \frac{k_2 \cdot e^{-k_1 t}}{k_1 - k_2} - \frac{k_1 \cdot e^{-k_2 t}}{k_1 - k_2} \right) \quad 6.23$$

图 6.2 示连续反应中两反应都为一级反应时,反应系统中各种成分浓度随反应时间发生的变化。反应开始后,首先是中间产物 B 的形成,[B]迅速升高,达到最大值,而后又复下降;[B]达到最大值的时间  $t_B$  为:

$$t_B = [\ln(k_1/k_2)]/(k_1 - k_2) \quad 6.24$$

终产物 C 的形成在反应初期有一延迟期,  $t_B$  时后加速;  $k_2$  愈大,则延迟期愈短,  $k_2$  无限增大,延迟期消失,[C]趋近  $[C]_\infty$ ; [A]的减少与  $[C]_\infty$  的增加呈对称图形。此时:

$$[C]_\infty = [A]_0 \cdot (1 - e^{-k_1 t}) \quad 6.25$$

如果取  $a = k_2/k_1$ ,根据式 6.23 与式 6.25,接近度应为:

$$\begin{aligned} \sigma &= [C]/[C]_\infty \\ &= \{1 + e^{-ak_1 t}/(a-1) - a \cdot e^{-k_1 t}/(a-1)\}/(1 - e^{-k_1 t}) \end{aligned} \quad 6.26$$

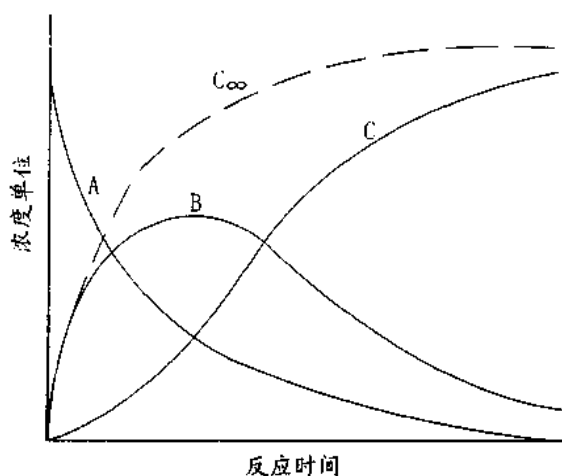


图 6.2 连续反应系统各有关成分浓度变化图形

## 第二节 酶(促)反应基本动力学关系<sup>(4-5)</sup>

酶反应的基本动力学关系,是指酶反应速度与酶和底物间的动力学关系。因为酶和底物是构成酶反应系统最基本的因素,它们决定酶反应的基本性质、酶反应的速度规律,而其他各种因素也正是通过它们产生影响的;而且,这种动力学关系是整个酶反应动力学的基础。

描写这种基本动力学关系的是米氏方程(Michaelis - Menten equation)。

### 一、米氏方程的推导

为了建立反应动力学关系式,一般先要确定反应的机制,即反应方式与反应历程。对于酶反应来说,有多种描述其作用机制的学说,其中得到较多实验支持的是活性中间络合物学说(intermediate complex hypothesis),它认为酶反应都要通过酶与底物结合形成酶-底物络合物,然后,酶再催化底物转化为产物,同时释放出酶来参加下一轮反应。最简单的情况可以表达成如下形式:



其中, E、S 和 ES 分别表示酶、底物和酶-底物络合物。根据这种机制, 如不考虑最后一环节的逆反应时, 酶反应初速度( $v$ )应由下式决定:

$$v = k_0 \cdot [ES] \quad 6.28$$

式 6.28 是酶反应动力学方程推导中具有关键性意义的关系式。

现在的问题是要解出[ES]。[ES]有几种方法可以求得, 简单的反应可用代数法, 而复杂的反应则多用矩阵法和图像法, 尤以图像法常用。

### 1. 代数法(algebraical procedure)推导酶反应动力学方程

根据式 6.27, 酶和底物的浓度如果处于相同水平, 则 ES 一般不能保持动态平衡; 但是, 当底物浓度相对酶浓度非常大的时候, 酶和底物一混合, 系统中的 ES 就会在极短的时间内(最多不超过 4s)迅速达到动态平衡, 即络合物生成速度与分解速度达到平衡, 反应系统进入稳态(steady state)\*。由于底物和酶在分子量上可能相差几个数量级, 因此, 这一情况在体外酶反应系统中很容易发现, 实际上也普遍存在。在稳态系统中:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E]_0 - [ES])([S] - [ES]) - k_{-1}[ES] - k_0[ES] \quad 6.29$$

$$k_1([E]_0 - [ES])([S] - [ES]) - k_{-1}[ES] - k_0[ES] = 0 \quad 6.30$$

$$[S] \gg [E], [E]_0 \gg [ES], [S] - [ES] = [S]$$

$$k_1([E]_0 - [ES]) \cdot [S] - k_{-1} \cdot [ES] - k_0 \cdot [ES] = 0 \quad 6.31$$

$$[ES] = \frac{[E]_0 \cdot [S]}{\frac{k_{-1} + k_0}{k_1} + [S]} \quad 6.32$$

$$v = \frac{k_0 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{\frac{k_{-1} + k_0}{k_1} + [S]} \quad 6.33$$

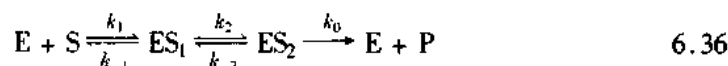
$$V = k_0 \cdot [E]_0 \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_0}{k_1} \quad 6.34$$

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{或} \quad v = \frac{V}{1 + K_m/[S]} \quad 6.35$$

式 6.35 就是酶反应的基本动力学方程, 亦即著名的米氏方程。

### 2. 矩阵法(matrix procedure)推导酶反应动力学方程

为便于讨论, 将式 6.27 表达成:



\* Michaelis & Menten 在推导米氏方程时, 曾假定  $k_{-1} \gg k_0$ ,  $E + S \rightleftharpoons ES$ , 这一平衡迅速建立, 并根据这一平衡(法)求得了[ES], 导出了米氏方程; Briggs & Haldane 认为  $k_{-1} \gg k_0$  不一定成立, 提出了稳态概念, 并用稳态法进行了推导。两者结果虽然相同, 但稳态概念更具普遍意义。



对于这样的系统,在稳态时用矩阵式计算,有:

$$\begin{pmatrix} \frac{d[E]}{dt} \\ \frac{d[ES_1]}{dt} \\ \frac{d[ES_2]}{dt} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_1 \cdot [S] & -k_{-1} & k_0 \\ k_1[S] & -(k_1 + k_2) & k_{-2} \\ 0 & k_2 & -(k_{-2} + k_0) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} [E] \\ [ES_1] \\ [ES_2] \end{pmatrix} = 0$$

或表成如下:

$$\begin{matrix} \frac{d[E]}{dt} \\ \frac{d[ES_1]}{dt} \\ \frac{d[ES_2]}{dt} \end{matrix} = \begin{matrix} [E] & [ES_1] & [ES_2] \\ \left. \begin{matrix} -k_1 \cdot [S] & -k_{-1} & k_0 \\ k_1 \cdot [S] & -(k_1 + k_2) & k_{-2} \\ 0 & k_2 & -(k_{-2} + k_0) \end{matrix} \right\} \begin{matrix} = 0 \\ = 0 \\ = 0 \end{matrix} \end{matrix} \quad 6.37$$

矩阵式中的各项因子,即酶的各种存在形式的分配比例可以这样计算:

以[E]为例,除去[E]列,再略去  $\frac{d[E]}{dt}$  或  $\frac{d[ES_1]}{dt}$  或  $\frac{d[ES_2]}{dt}$  中任何一行,例如略去  $\frac{d[ES_2]}{dt}$  行,则有:

$$[E] = \begin{vmatrix} k_{-1} & k_0 \\ -(k_{-1} + k_2) & k_{-2} \end{vmatrix} = k_{-1}k_{-2} + k_0(k_{-1} + k_2) \quad 6.38$$

同理,可以计算出[ES<sub>1</sub>]和[ES<sub>2</sub>]:

$$[ES_1] = k_1(k_{-2} + k_0) \cdot [S] \quad 6.39$$

$$[ES_2] = k_1 \cdot k_2 \cdot [S] \quad (\text{注意:}[ES_2] \text{ 相当于式 6.27 中的 } [ES]) \quad 6.40$$

$$[ES_2] = \frac{[ES_2]}{[E] + [ES_1] + [ES_2]} [E]_0$$

$$[ES_2] = \frac{[k_2/(k_2 + k_{-2} + k_0)] \cdot [S]}{\frac{k_{-1}k_{-2} + k_0(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_{-2} + k_0)} + [S]} \cdot [E] \quad 6.41$$

$$v = \frac{k_0 \cdot [k_2/(k_2 + k_{-2} + k_0)] \cdot [S]}{\frac{k_{-1}k_{-2} + k_0(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_{-2} + k_0)} + [S]} + [E] \quad 6.42$$

式 6.42 同样可化成米氏方程,但此处:

$$K_m = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_0(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_{-2} + k_0)} \quad 6.34'$$

$$V = \frac{k_0 \cdot k_2 \cdot [E]_0}{k_2 + k_{-2} + k_0} \quad 6.35'$$

实际上酶-底物络合物还可能包括更多种中间形式:  $ES_1, ES_2, \dots, ES_n$ , 如果以  $k_{ij}$  表示  $ES_i \rightarrow ES_j$  的反应速度常数, 那么在稳态时:

$$-\sum_{\substack{i=1 \\ j \neq i}}^n k_{ij} [ES_i] + \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^n k_{ji} [ES_j] = 0$$

$$\sum_{j=1}^n [ES_j] = [E]_0 \quad 6.43$$

对于这种情况, Cramer 建立了下式用以描述酶的各种形式的分配比:

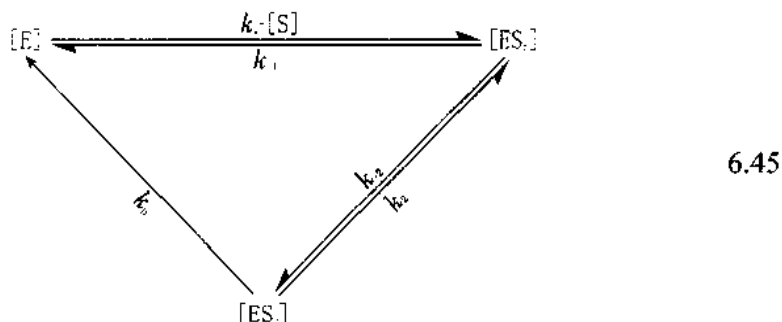
$$\frac{[ES_n]}{[E]_0} = \frac{\begin{vmatrix} -\sum k_{ij} & k_{21} & \cdots & 0 & \cdots & k_{n1} \\ k_{12} & -\sum k_{2j} & \cdots & 0 & \cdots & k_{n2} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ 1 & 1 & \cdots & 1 & \cdots & 1 \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ k_{1n} & k_{2n} & \cdots & 0 & \cdots & \sum k_{nj} \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} -\sum k_{ij} & k_{21} & \cdots & k_{m1} & \cdots & k_{n1} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ 1 & 1 & \cdots & 1 & \cdots & 1 \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ k_{1n} & k_{2n} & \cdots & k_{mn} & \cdots & -\sum k_{nj} \end{vmatrix}} \quad 6.44$$

### 3. 图像法(diagrammatic procedure)推导酶反应动力学方程

在矩阵法的基础上, King - Altman 设计了图像法, 它可以较简便地求得稳态条件下的反应速度方程。图像法包括以下基本步骤:

(1) 绘制基本图形, 即以酶存在的各种形式为顶点, 用线段按反应历程顺序依次连结成多角形, 每一线段应带有表示反应方向的箭头, 以及相应的反应速度常数与参加该反应阶段的底物、抑制剂等(统称配基)的乘积。

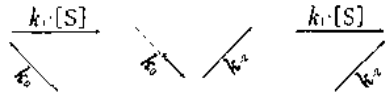
以反应式 6.36 为例, 它的基本图形如下:



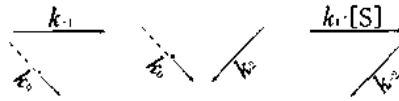
(2) 绘制计算图形, 即以基本图形为基础, 以比顶点数少 1 根线段将顶点依次连结起来组成相应的不封闭多角形。式 6.45 的计算图形如下:



$$[E] = k_1 k_2 + k_3(k_1 + k_2)$$



$$[ES_1] = k_1(k_2 + k_3) \cdot [S]$$



$$[ES_2] = k_1 k_2 \cdot [S]$$

在绘制计算图形时需要注意:第一,应将可能有的图形全部绘出。每一种形式可能有的图形总数为:

$$\frac{m!}{(n-1)!(m-n+1)!} \quad 6.46$$

其中  $n$  为顶点数,  $m$  为完整图形的线段数。

第二,不能有封闭的多角形,当基本图形不止一个封闭圈的时候,应将所有封闭圈的图形扣除。应扣除的每种封闭圈可以下式计算:

$$\frac{(m-r)!}{(n-r-1)!(m-n+1)!} \quad 6.47$$

其中  $r$  为封闭圈线段数。以下图为例:

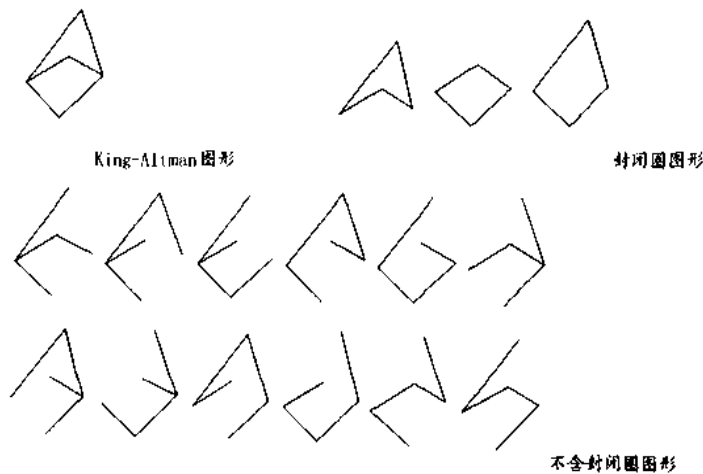


图 6.3 King-Altman 图形、封闭圈图形与不含封闭圈图形

它的  $n$  为 5,  $m$  为 6, 按式 6.47, 计算图形的总数为 15。但是, 这个总数中有下列三种 4 线段 ( $r=4$ ) 的封闭圈应除去, 因此, 不含封闭计算图形的实际数应为 12。

(3) 求分配比, 即以某一形式的全部速度常数与配基浓度乘积之和为分子, 以酶的各种形式的全部速度常数与配基乘积之和为分母。

显然式 6.37 中  $[ES_2]/[E]$  应为:

$$\frac{[ES_2]}{[E]} = \frac{[k_2/(k_2 + k_{-2} + k_0)] \cdot [S]}{\frac{k_{-1}k_{-2} + k_0(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_{-2} + k_0)} + [S]} \quad 6.48$$

(4) 建立反应速度方程。根据(3)之分配比, 求出  $[ES_n]$ , ( $ES_n$  是指直接形成产物前的中间络合物, 如式 6.37 中之  $ES_2$ ), 然后将它代入式 6.28 即可求得酶反应速度方程。如将式 6.48 中之  $[ES_2]$  代入式 6.28 后可得和式 6.42, (亦即和式 6.35) 完全相同的方程。这就是说, 和代数法一样都可得到米氏方程。

## 二、米氏方程的物理意义

1. 提供了两个极为重要的酶反应动力学常数  $K_m$  和  $k_{cat}$  并通过它们表达了酶反应性质、反应条件和酶反应速度之间的关系

$K_m$  称为米氏常数 (Michaelis constant), 它的物理意义是:

(1)  $K_m = (k_{-1} + k_0)/k_1$ , 说明  $K_m$  是反应速度常数  $k_1$ ,  $k_0$  和  $k_{-1}$  等的函数, 由于这些反应速度常数是由酶反应性质、反应条件决定的, 因此, 对于特定的反应、特定的反应条件来说,  $K_m$  是一个特征常数; 米氏方程正是通过  $K_m$  部分地描述了酶反应性质、反应条件对酶反应速度的影响。正因为  $K_m$  是一个特征常数, 所以, 有时也可通过它来鉴别不同来源或相同来源、但发育阶段不同或生理状况不同, 而催化相同反应的酶是否属于同一酶。

(2) 大多数情况下,  $K_m = (k_{-1} + k_0)/k_1 = K_s + k_0/k_1$ ; 但是也有很多情况, 例如, 在胰蛋白酶催化的水解反应中,  $k_{-1} \gg k_0$ , 因此, 其  $K_m \approx k_{-1}/k_1 \approx K_s$ ; 还有一些情况, 例如, 在葡萄糖氧化酶催化的反应中,  $k_0 \gg k_{-1}$ , 因此, 该酶反应的  $K_m \approx k_0/k_1$ 。  $K_s$  是反应式 6.28 前半部分的平衡常数, 更确切地说是酶-底物络合物 ES 的解离常数。由于  $K_m$  或者等于  $K_s$ , 或者类似于  $K_s(k_0/k_1)$ , 或者包含  $K_s$ , 为便于讨论, 人们常把它看作是络合物 ES 的解离常数。  $K_m$  愈大, 说明络合物愈易解离, 说明酶与底物的亲和力愈小; 反之,  $K_m$  愈小, 可认为酶与底物的亲和力愈大。

(3) 当  $v = V/2$  时,  $K_s = [S]$ 。说明  $K_m$  有浓度的因次。表示相当于反应达到最大速度一半时的底物浓度, 或者说, 相当于要使反应系统有一半的酶分子参加反应所必须具有的底物浓度, 因此  $K_m$  是衡量反应速度与底物浓度间关系的尺度。在实际工作中, 人们常通过  $K_m$  来确定酶反应要达到某种速度应该使用的底物浓度。

(4) 在酶的多种底物中,  $K_m$  能帮助人们判断酶的最适底物, 或者说, 可能的天然底物, 因为最好的底物应该具有最大的  $V/K_m$  值。同样地,  $K_m$  也可能帮助人们了解酶的底物在体内可能具有的浓度水平, 一般说, 作为酶的天然底物, 它在体内的浓度水平应接近它的  $K_m$  值, 因为如果  $[S] \ll K_m$ , 那么  $v \ll V$ , 大部分的酶处于“浪费”状况; 反之, 如果  $[S] \gg K_m$ , 那么  $v \approx V$ ,  $[S]$  将失去其生理意义, 这些都不符合自然法则。

(5) 通过体外测定某些物质对酶反应  $K_m$  的影响, 往往有助于推测该物质可能有的生理

效应,如作为抑制剂或活化剂等。同时也可帮助人们了解酶在机体内可能有的调节功能。

另一个重要的动力学常数是  $k_{cat}$ , 又称转换率(Turnover number), 它表示每个酶分子在单位时间内能使底物转化为产物的最大分子数。对简单的反应机制(如式 6.28 所示)来说,  $k_{cat}$  相当于  $k_0$ ; 而对于较复杂的反应机制(例如式 6.36 所示)来说;  $k_{cat}$  相当于各个环节的反应常数  $k_1 \cdot k_{-1} \cdot k_2 \cdots k_0$  的复合函数。因此, 和  $K_m$  一样, 对于特定的酶反应、特定的反应条件来说,  $k_{cat}$  也是一个表示酶催化能力的特征常数。  $k_{cat}$  和酶浓度的乘积为  $V(V = k_{cat} \cdot [E])$ ,  $V$  表示在某种酶浓度条件下酶反应可能达到的最大速度。和  $k_m$  一样, 米氏方程也通过  $k_{cat}$  或  $V$  描述酶反应性质和反应条件对酶反应速度的影响。

$K_m$  的大小对不同的酶、不同的酶反应来说, 可以很不相同, 甚至可能相差几个数量级, 一般多为  $10^{-5} \sim 10^{-3} \text{mol/L}$ , 表 6.2 列举了若干实例。  $k_{cat}$  的差别也很大, 通常的变动范围为  $10^1 \sim 10^8/\text{s}$ , 表 6.3 为某些实例。

表 6.2 某些酶反应的  $K_m$

酶	底物	$K_m(\text{mol/L})$
过氧化氢酶	$\text{H}_2\text{O}_2$	1.1
谷氨酸脱氢酶	谷氨酸	$1.2 \times 10^{-4}$
	$\alpha$ -酮戊二酸	$2.0 \times 10^{-3}$
	$\text{NH}_4^+$	$5.7 \times 10^{-2}$
	NADH	$1.8 \times 10^{-5}$
	NAD <sup>+</sup>	$2.5 \times 10^{-5}$
门冬氨酸转氨酶	门冬氨酸	$9.0 \times 10^{-4}$
	$\alpha$ -酮戊二酸	$1.0 \times 10^{-4}$
	草酰乙酸	$4.0 \times 10^{-5}$
	谷氨酸	$4.0 \times 10^{-3}$
胰凝乳蛋白酶	N-苯甲酰酪氨酰胺	$2.5 \times 10^{-3}$
	N-甲酰酪氨酰胺	$1.2 \times 10^{-2}$
	N-乙酰酪氨酰胺	$3.2 \times 10^{-2}$
	甘氨酸酪氨酰胺	$1.2 \times 10^{-1}$
碳酸酐酶	$\text{CO}_2$	$8.0 \times 10^{-3}$
丙酮酸脱羧酶	丙酮酸	$4.0 \times 10^{-4}$
	$\text{HCO}_3^-$	$1.0 \times 10^{-3}$
	ATP	$6.0 \times 10^{-5}$

表 6.3 某些酶反应的  $k_0$  值

酶	$k_0(\text{s}^{-1})$	酶	$k_0(\text{s}^{-1})$
过氧化氢酶	$3.8 \times 10^7$	$\beta$ -半乳糖苷酶	200
琥珀酸脱氢酶	20	碳酸酐酶	$6 \times 10^5$
乳酸脱氢酶	$1.0 \times 10^3$	磷酸葡萄糖变位酶	20

## 2. 米氏方程描述了酶反应速度与底物浓度的关系

从式 6.35 可以看到:  $[S] \gg K_m$  时,  $v \approx V$ , 反应速度接近最大速度, 同时反应速度与底物浓度无关, 相对底物来说, 反应系统表现零级反应性态; 反之, 当  $[S] \ll K_m$  时,  $v = V \cdot [S]/K_m$ , 反应速度与底物浓度呈线性比例关系, 显示一级反应特征;  $[S]$  接近  $K_m$  时, 反应系统则随底

物浓度而变动于零级反应和一级反应之间。由此可见：

- (1) 酶反应的反应速度和底物浓度直接相关；
- (2) 底物浓度决定着酶系统的反应级别；
- (3) 衡量这种关系的尺度是  $K_m$ 。

米氏方程概括的这些规律和绝大多数实验结果一致。但少数情况下出现产生异常，例如， $1/v$  对  $1/[S]$  作图（见后）时，一般应该得到线性图形，但有时也会产生如图 6.4 所示的偏离。出现这种现象的原因多种多样：

- (A) 可能是由于高底物浓度引起了抑制；
- (B) 可能是由于高底物浓度引起了活化；
- (C) 和 (D)，则可能是由于分析操作上的误差。

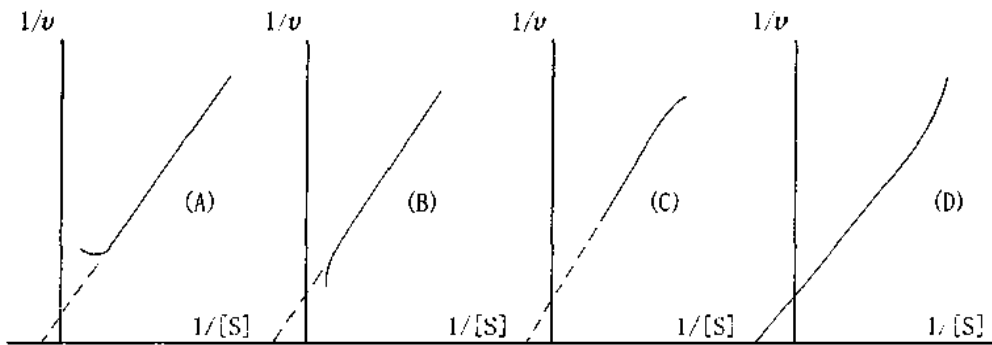


图 6.4  $1/v$  对  $1/[S]$  作图时可能出现的偏离

酶反应速度与底物浓度的关系还和酶的性质有关。在推导米氏方程时讨论的是恒态酶，表现为上述性态，得到的  $v$  对  $[S]$  的图形是矩形双曲线；但是如果涉及的是别构酶时，得到的  $v$  对  $[S]$  图形却是 S (sigma) 形曲线（见后）。

在实际工作中，反应系统使用适当的底物浓度是一个很重要的问题。以酶分析为例，用动力学方法进行酶活性测定，或进行底物以外其他因素的测定时，为了避免同时夹杂底物因素的影响，最好使用足够高的底物浓度，使反应呈零级反应性态；反之，进行底物本身的测定时，则应使反应速度直接比例于底物浓度，即使系统处于一级反应状态。表 6.4 列举了不同的相对底物浓度条件下，米氏方程按零级反应和一级反应处理时的相对误差。

表 6.4 米氏方程用零级关系式和一级关系式表示时的误差

$[S]/K_m$	用零级关系式表示时的误差(%)	用一级关系式表示时的误差(%)
0.01		1
0.05		5
0.1		9
0.2		17
1	50	50
5	17	
10	9	
20	5	
100	-1	

### 3. 米氏方程描写了酶反应速度与酶浓度间的关系

从米氏方程可以看到,酶反应速度比例于酶的浓度,

$$[S] \gg K_m, v = k_{cat} \cdot [E]_0 = V \quad 6.49$$

$$[S] \approx K_m, v = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{K_m + [S]} \cdot [E]_0 \quad 6.50$$

$$\begin{aligned} [S] \ll K_m, v &= \frac{k_{cat} \cdot [S]}{K_m} \cdot [E]_0 \text{ 或} \\ &= \frac{V \cdot [S]}{K_m} \end{aligned} \quad 6.51$$

这种分析和绝大多数实验情况一致。但是值得指出的是,当 $[S] \ll K_m$ 时,反应速度与酶的浓度间不是简单的线性函数关系,它受底物浓度变化的影响而变得十分复杂。如上所述,为排除底物这一因素的影响,以动力学方法进行酶活性测定时,应使用足够高的底物浓度,使每个酶分子都能正常地参加反应,也就是说,要使反应速度达到最大,这种情况下,酶反应速度仅取决于酶的催化性质和酶浓度。

某些酶反应的反应速度与酶浓度之间不是简单的比例关系,例如,某些蛋白酶催化的水解反应似乎更符合下式:

$$v = k_{cat} \cdot [E]^{2/3} \quad \text{或} \quad k_{cat} \cdot [E]^{1/2} \quad 6.52$$

对于这些现象有不同的解释,但这仅是一些例外。

### 三、米氏方程的某些重要表达形式及图形

为深入讨论各种因素对酶反应的动力学影响,同时也为了测得一些重要的动力学常数,往往需要将米氏方程化成各种形式,并作出相应的图形。其中最常用的以下几种。

$$1. v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad 6.53$$

此表达式对应的图形为 $v \sim [S]$ 作图(图 6.5A),这种作图法最方便,但也最不准确,因为:

- (1) 很难准确地画出矩形双曲线;
- (2) 很难画出渐近线;
- (3) 误差不易察觉。

$$2. \frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} \quad 6.54$$

该式对应的图形为 $1/v \sim 1/[S]$ 作图(图 6.5B),称为 Lineweaver-Burk 作图。在六七十年代,这是最常用的一种作图法,也称为双倒数作图;但是,现在有很多人对它提出了异议,理由是:

- (1) 点分布不均匀,集中于 $1/v$ 轴,不过,此缺点可通过适当选择 $[S]$ 克服;
- (2) 误差放大。在低的 $[S]$ 时, $v$ 很小,本身就容易产生误差;而化成 $1/v$ 与 $1/[S]$ 后,误差显著放大。

$$3. \frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V} + \frac{K_m}{V} \quad 6.55$$

相应的作图为  $[S]/v \sim [S]$ , 称为 Hanes 作图(图 6.5C)。这种作图法的优点是点分布均匀, 缺点是由于取  $1/v$  的原故, 使误差放大, 但是比较一致, 一般认为适用于常数测定。

$$4. v = V - K_m \cdot \frac{v}{[S]} \quad 6.56$$

对应图形为  $v \sim v/[S]$ , 称为 Eadie-Hofstee 作图(图 6.5D)。这种作图法缺点是点分布不均匀, 但没有误差放大, 可信度高, 更大的优点是各种因素的影响可在图形上表现出来, 因此, 越来越受到人们的重视。

$$5. \log \frac{V-v}{v} = \log K_m - \log[S] \quad 6.57$$

$$p[S] = pK_m + \log \frac{V-v}{v} \quad 6.58$$

此式可以  $v \sim \log[S]$  作图(图 6.5E), 但通常少用, 只有当  $[S]$  变动很大, 而  $v$  变化较小时, 这种作图法才有其优点。

$$6. \frac{2.3}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]} = \frac{1}{K_m} \cdot \frac{[S]_0 - [S]}{t} + \frac{V}{K_m} \quad 6.59$$

可用  $\frac{2.3}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]} \sim \frac{[S]_0 - [S]}{t}$  作图(图 6.5F)。但这种作图法仅用于不能测定初速度的情况。

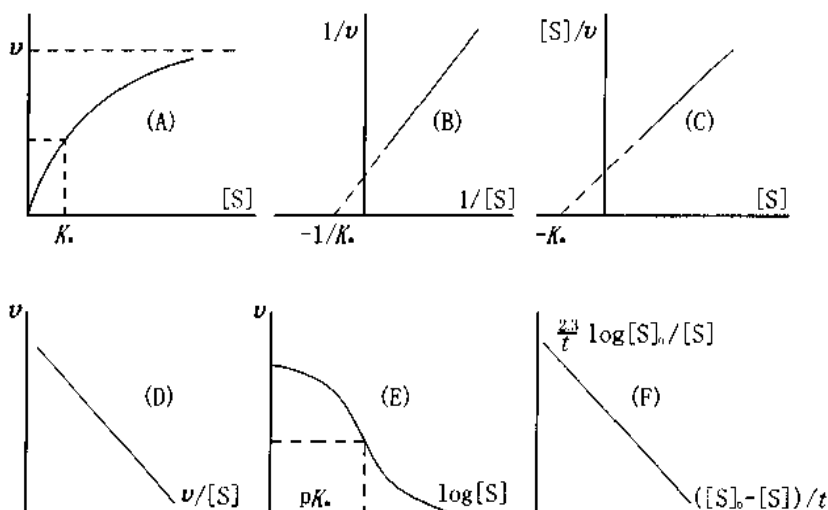


图 6.5 米氏方程的几种作图法

前述两个十分重要的动力学常数  $K_m$ 、 $V$  可通过以上各种作图法测得。但是在应用作图法测定动力学常数时, 应注意以下两个问题:



第一,最好使用接近  $K_m$  的  $[S]$ , 否则不能得到准确结果, 因为:

(1) 用 Lineweaver - Burk 作图时, 如果  $[S] \gg K_m$ , 曲线基本水平, 斜率近于 0; 如果  $[S] \ll K_m$ , 则曲线在 X 和 Y 轴的截矩都靠近原点;

(2) 用 Hanes 作图时, 不管  $[S] \gg K_m$ , 还是  $[S] \ll K_m$ , 曲线都接近水平;

(3) 用 Eadie - Hofstee 作图时,  $[S] \gg K_m$ , 曲线接近水平;  $[S] \ll K_m$ , 线极陡。

第二, 某些文献在作图时常采用  $\text{mmol/L}$  (或  $\text{mol/L}$ )  $\times 10^n$  表示底物或产物的浓度, 由于这种表示法可作两种理解:

(1) 表示坐标轴的坐标要升高  $10^n$  倍;

(2)  $\text{mM}$  (或  $\text{M}$ )  $\times 10^n$  表示坐标单位。

这样两种理解使浓度相差了  $10^{2n}$  倍。因此, 为了避免混乱, 建议在作图时还是直接使用  $\mu\text{mol/L}$ 、 $\text{mmol/L}$  或  $\text{mol/L}$  表示浓度。

#### 四、米氏方程的适用范围

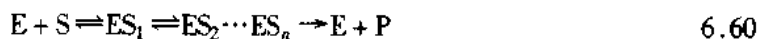
米氏方程是酶反应最基本的动力学方程, 它描写的是最简单的酶反应系统的动力学关系, 但是, 在它的推导过程中作过某些假定, 因此有必要进一步讨论一下它的适用范围和局限性。

##### 1. 多中间步骤

在推导米氏方程时是以式 6.27 为出发点的:



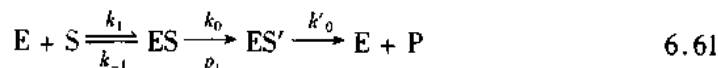
但是, 实际反应很可能是多中间步骤的, 例如:



对于这样一些复杂的机制, 无论是按代数法推导, 还是按矩阵法或者图像法推导, 得到的动力学方程都和原始的米氏方程一样, 这一点可从式 6.35 和式 6.42 的比较看出。唯一的差别仅仅在于, 中间步骤愈多,  $K_m$  和  $k_{cat}$  是由更多环节的反应速度常数组成的更复杂的复合函数。而事实上, 一般测得的  $K_m$  和  $V$  本身也可能就是由多个中间步骤提供的复合函数。

##### 2. 某些较复杂的反应历程

(1)

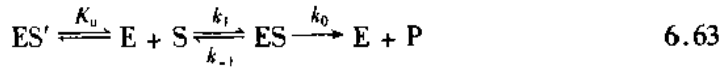


某些蛋白酶催化的反应取这样一种方式。它的动力学关系式仍是:

$$v = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}, \quad \text{只是}$$

$$V = \frac{k_0 k'_0 [E]_0}{k'_0 + k_0}; \quad K_m = \frac{k'_0}{k_0 + k'_0} + \frac{k_{-1} + k_0}{k_1} \quad 6.62$$

(2)



溶菌酶催化的反应可能取这种机制。其动力学关系仍可用米氏方程描写,但:

$$V = \frac{k_0[E]}{1 + K/K_u} \quad K_m = \left( \frac{1}{K} + \frac{1}{K_u} \right)^{-1} \quad 6.64$$

$$K = \frac{k_0 + k_{-1}}{k_1} \quad K_u = \frac{[E][S]}{[ES']} \quad 6.65$$

### 3. 稳态前

在任何一个酶反应系统中,酶和底物一经混合,就会立即生成酶-底物络合物(ES)及产物(P),并随时间而逐渐升高。但经过一定时间后,ES的形成与分解达到动态平衡,而P也将以恒定速度生成,系统进入稳态。图6.6描述了ES和P的这种变化情形。

在系统进入稳态后,  $d[ES]/dt = 0$ ;而在稳态前,  $d[ES]/dt \neq 0$ ,因此,稳态前的动力学关系有:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E] - [ES])([S] - [ES] - [P]) - k_{-1}[ES] - k_0[ES] \quad 6.66$$

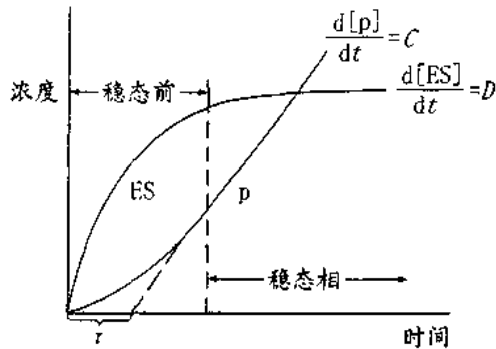


图 6.6 反应开始后到稳态过程 ES 与 P 随时间的变化

由于,  $[S] \gg [E]$ ,故  $[S] \approx ([S] - [ES] - [P])$ 。式 6.66 积分有:

$$[ES] = \frac{[E] \cdot [S]}{K_m + [S]} [1 - \exp k_1 \cdot t \cdot (K_m + [S])] \quad 6.67$$

$$v = \frac{k_0 \cdot [E] \cdot [S]}{K_m + [S]} \cdot [1 - \exp k_1 \cdot t \cdot (K_m + [S])] \quad 6.68$$

式 6.68 为稳定前的动力学方程,它和米氏方程相比:

- (1) 多了  $[1 - \exp k_1 \cdot t \cdot (K_m + [S])]$  一项;
- (2) 随着  $t$  增大,  $[1 - \exp k_1 \cdot t \cdot (K_m + [S])]$  可以消去,式 6.68 可还原为米氏方程,反应转入稳态。

式 6.68 也可改写成:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_0 \cdot [E] \cdot [S]}{K_m + [S]} \cdot [1 - \exp k_1 \cdot t \cdot (K_m + [S])] \quad 6.69$$

$$[P] = \frac{k_0 \cdot [E] \cdot [S]}{K_m + [S]} \cdot t - \frac{k_0 \cdot [E] \cdot [S]}{k_1([S] + K_m)^2} + \frac{k_0 \cdot [E] \cdot [S]}{k_1([S] + K_m)^2} \cdot \exp[-k_1 t([S] + K_m)] \quad 6.70$$

如将图 6.6 中  $d[P]/dt = C$  的直线部分外推到 X(时间)轴可测得  $\tau$ ,  $\tau$  称为“诱导”时间(induction period):

$$\tau = \frac{1}{k_1([S] + K_m)} = \frac{1}{k_1[S] + k_{-1} + k_0} \quad 6.71$$

式 6.71 表明  $\tau$  和  $[S]$  有反比关系, 如将  $1/\tau \sim [S]$  作图时, 可求得  $k_1$  (图形的斜率) 和  $(k_{-1} + k_0)$  (曲线的截矩), 由于  $K_m$  和  $k_0$  可通过稳态分析求得, 这样就可从  $(k_{-1} + k_0)$  计算出  $k_{-1}$ , 也可算出  $K_s$ 。  $\tau$  一般为  $10^{-3}$ s 左右。通常用于稳态测定法的时间极限为 10s 左右; 对于稳态前速度和常数的测定需要快速流管法 (fast flow technique), 它的时间极限  $t_{1/2} \sim 10^{-7}$ s; 或者弛豫时谱法 (Relaxation Procedure), 它的时间极限  $t_{1/2} < 10^{-3}$ s。

#### 4. 反应全过程和逆反应

当产物不产生抑制, 逆反应不进行, 反应全过程的速度仅由底物浓度的降低决定时, 米氏方程的积分式可用来描写反应全过程:

$$k_0 \cdot [E] \cdot t = ([S]_0 - [S]) + K_m \cdot \ln \frac{[S]_0}{[S]} \quad 6.72$$

在这一关系式中, 包括两种反应级 (参见式 6.2 或式 6.5), 其中究竟哪一种反应级起主要作用由当时的  $[S]$  决定。

如将反应过程的底物浓度以“对数平均浓度  $[S]_m$ ”表示时, 则反应平均速度:

$$v = \frac{[S]_0 - [S]_t}{t} = \frac{V \cdot [S]_m}{K_m + [S]_m} \quad 6.73$$

$$[S]_m = \frac{[S]_0 - [S]_t}{\ln([S]_0/[S]_t)} \quad 6.74$$

$1/v \sim 1/[S]_m$  作图有线性关系。

但是, 实际上, 当反应进行一定时间后, 随着产物的积累, 逆反应也往往变得不可忽视, 此时, 仍以反应式 6.27' 为例, 其总的动力学方程有:



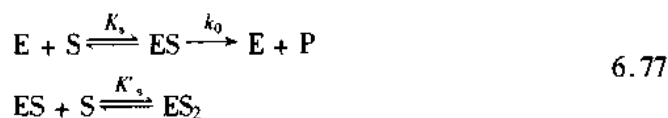
$$v_{\text{正}} = \frac{V_{\text{正}} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad v_{\text{逆}} = \frac{V_{\text{逆}} \cdot [P]}{K_p + [P]} \quad 6.75$$

$$v_{\text{净}} = \frac{V_{\text{正}} \cdot [S]/K_s - V_{\text{逆}} \cdot [P]/K_p}{1 + [S]/K_s + [P]/K_p} = \frac{V_{\text{正}}([S] - [P]/K_{\text{eq}})}{K_s(1 + [P]/K_p) + [S]} \quad 6.76$$

### 5. 高底物浓度抑制与活化

在某些酶反应系统中,它的底物在高浓度情况下可能会表现抑制作用或活化作用(如图 6.4(A),(B));根据机制不同,其动力学关系也各异,如:

#### (1) 高底物浓度引起抑制



$$v = \frac{VK'_s[S]}{K_sK'_s + K'_s[S] + [S]^2} \quad 6.78$$

$v \sim [S]$ 作图,如图 6.7,其中:

由图 6.7 可见:

①  $V$  只有理论意义,仅能通过  $1/v \sim 1/[S]$  图形的线性线段的延伸线与纵轴的交点才能获得;

②  $K'_s > K_s$ , 如  $r = K'_s/K_s$ , 则实际的最大速度  $V' = \sqrt{r}V/(2 + \sqrt{r})$ , 此时的底物浓度为  $\sqrt{K'_sK_s}$ ;

③ 底物浓度很高时,式 6.78 变为  $v = K'_s \cdot V/(K'_s + [S])$ 。

在酯酶、脲酶和二胺氧化酶等酶反应中都可观察这种动力学。

#### (2) 高底物浓度引起活化

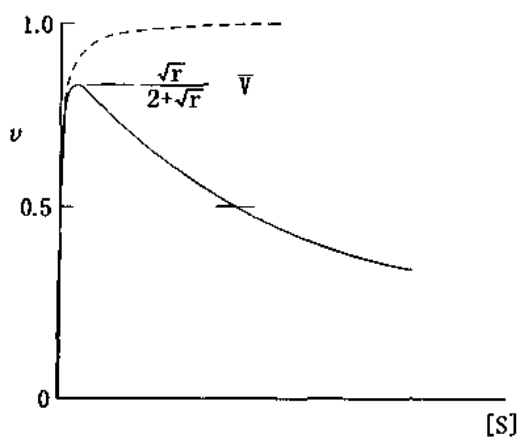
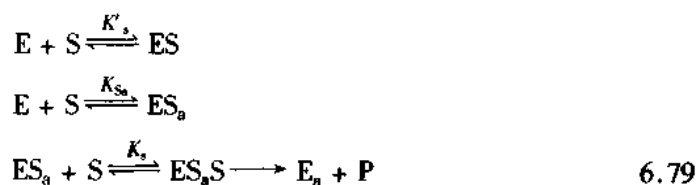


图 6.7 高底物浓度引起抑制



$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{[S]} \left( 1 + \frac{K_{S_2}}{K'_s} + \frac{K_{S_2}}{[S]} \right)} \quad 6.80$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_s}{V} \left( 1 + \frac{K_{S_2}}{K'_s} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{K_{S_2} K_s}{V} \frac{1}{[S]^2} \quad 6.81$$

$K_{S_2} \ll K'_s$  时,  $1/v \sim 1/[S]$  图形有线性关系, 测得的  $K'_m = K_m(1 + K_{S_2}/K'_s)$ ,  $K'_m$  是表现  $K_m$ ,  $K_m$  的增大是因为形成了无效的 ES 部分。

## 6. 双底物反应

在代谢研究和生产实践过程中我们经常可以遇到双底物反应



双底物反应, 根据反应过程中是否形成三元络合物分为两类: 连续机制 (sequential mechanism) 的乒乓机制 (non-sequential or Ping-pong mechanism)。在连续机制中又包括有序 (ordered) 和随机 (random) 两种类型 (图 6.8)。

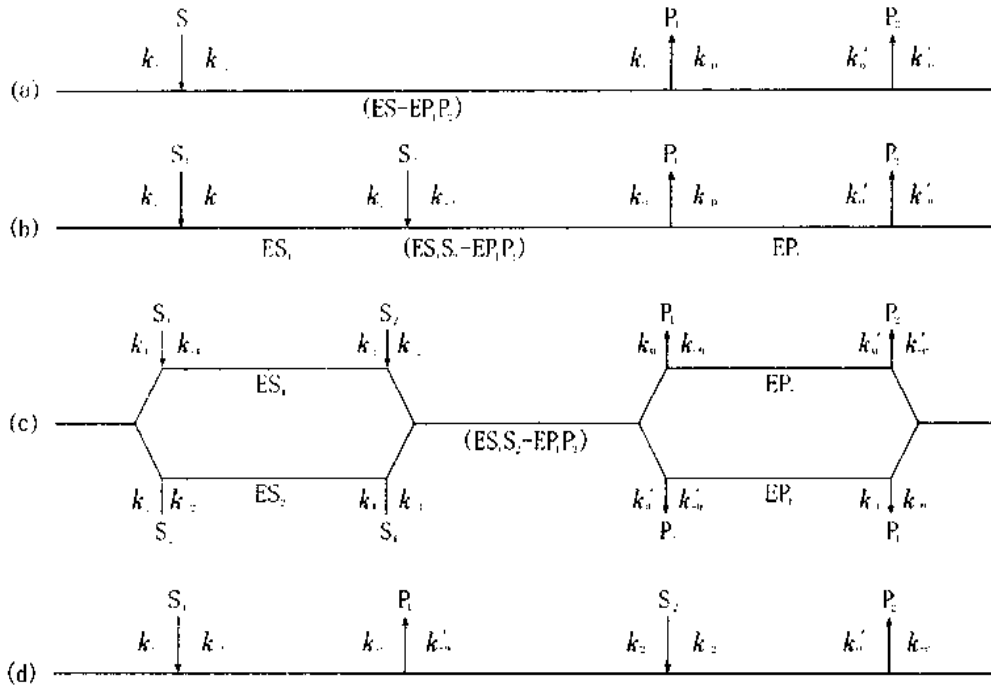


图 6.8 双底物酶反应的几种类型

- (a) 称为有序 U<sub>n</sub>B<sub>i</sub>, 如磷酸酯酶、酯酶反应等;
- (b) 称为有序 B<sub>i</sub>B<sub>i</sub>, 如 NAD(P)<sup>+</sup> 参加的脱氢酶反应等;
- (c) 称为随机 B<sub>i</sub>B<sub>i</sub>, 如己糖激酶、丙酮酸激酶反应等;
- (d) 称为乒乓 B<sub>i</sub>B<sub>i</sub>, 如抗坏血酸氧化酶反应等。

对于连续机制的反应来说, 它的反应速度方程如下:

$$v = \frac{V \cdot [S_1][S_2]}{[S_1][S_2] + K_{m_2} \cdot [S_1] + K_{m_1} \cdot [S_2] + K_{m_2} \cdot K_{m_1}} \quad 6.82$$

式中  $K_{m_1}$  和  $K_{m_2}$  分别为另一种底物大大过量条件下,  $v = V/2$  时, 底物  $S_1$  和  $S_2$  的浓度, 即  $S_1$  和  $S_2$  的米氏常数,  $K'_{m_1}$  为  $ES_1S_2$  的解离常数。

对于乒乓机制的反应来说, 因为  $K'_{m_1} = 0$ , 所以, 其反应速度方程为:

$$v = \frac{V \cdot [S_1][S_2]}{[S_1][S_2] + K_{m_2}[S_1] + K_{m_1}[S_2]} \quad 6.83$$

当  $S_2$  一定时, 式 6.82 和式 6.83 可表达成米氏方程的形式:

$$v = \frac{V'[S_1]}{K'_m + [S_1]} \quad 6.84$$

其中

$$V' = \frac{V[S_2]}{K_{m_2} + [S_2]} \quad 6.85$$

$$K'_m = \frac{K_{m_2} \cdot K'_{m_1} + K_{m_1} \cdot [S_2]}{K_{m_2} + [S_2]} \quad 6.86$$

$$\text{或} = \frac{K_{m_1} \cdot [S_2]}{K_{m_2} + [S_2]} \quad 6.87$$

$V'$  和  $K'_m$  与  $V$  和  $K_m$  不同, 它们随  $S_2$  的浓度而变化; 但当  $[S_2] \gg K_{m_2}$  时,  $V'$  和  $K'_m$  与  $V$  和  $K_m$  接近。也就是说, 双底物反应中一种底物大大超过其  $K_m$  时, 其反应可转变为拟单底物反应, 它的反应速度可以用米氏方程描述。

这种情况下,  $K_m$  同样可通过  $1/v \sim 1/[S]$  作图求得。式 6.82 和式 6.83 的双倒数关系式分别为式 6.88 与 6.89:

$$\frac{1}{v} = \left( 1 + \frac{K_{m_1}}{[S_1]} + \frac{K_{m_2}}{[S_2]} + \frac{K'_{m_1} \cdot K_{m_1}}{[S_1][S_2]} \right) \cdot \frac{1}{V} \quad 6.88$$

$$\frac{1}{v} = \left( 1 + \frac{K_{m_1}}{[S_1]} + \frac{K_{m_2}}{[S_2]} \right) \cdot \frac{1}{V} \quad 6.89$$

图 6.9A 与图 6.9B 分别为连续机制与乒乓机制的双倒数作图, 可见对于连续机制来说, 随着  $[S_2]$  的增大, 各直线的截矩与斜率都降低; 而乒乓机制的各直线却是一组平行线, 其斜率与  $[S_2]$  无关。值得指出的是, 连续机制图形中各直线的交点或高于或低于 X 轴, 取决于  $K'_{m_1}$ 、 $K_{m_1}$  和  $K_{m_2}$ 。在任意的  $[S_2]$  条件下, 相对于  $S_1$  的“表观  $K_m$ ”, 可从 X 轴的截矩求得, 这种表观的  $K_m$  将随  $[S_1]$  而改变。一般将上述双倒数作图称为初级图形, 而将初级图形得到的 Y 轴截矩或斜率相对  $[S_2]$  进行双倒数作图称为次级图形。图 6.10 表示双底物反应的初级图形和次级图形, 从次级图形可求得相应的  $K_m$ 。

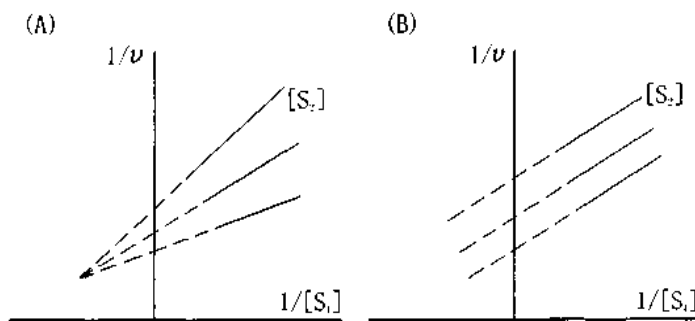


图 6.9 双底物酶反应的机制判别  
连续机制(A) 乒乓机制(B)

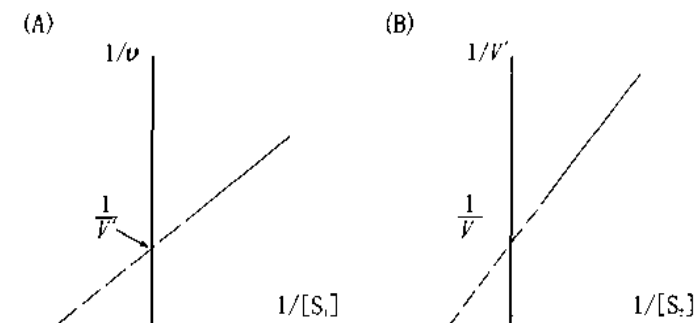


图 6.10 双底物酶反应的初级图形与次级图形  
初级图形(A) 次级图形(B)

### 7. 高酶浓度

在推导米氏方程中有一条很重要的假定,即底物浓度大大高于酶浓度,因此,在酶与底物混合后,酶-底物络合物能迅速达到稳态平衡。这种假定在体外一般酶反应中很容易得到满足,但是体内的情况却不是这样,许多酶和它们的底物在细胞中的浓度往往接近于 $K_m$ 的水平。对于这种高酶浓度的反应系统,米氏方程已经不完全适用。为此,有人先后提出了各种方程以代替米氏方程用于描述各种酶浓度下的动力学关系。最初进行这项尝试的是 Straub,他提出了一个综合的动力学方程:

$$v = \frac{V}{2[E]_0} (K_m + [S]_0 + [E]_0) - \sqrt{K_m + [S]_0 + [E]_0 - 4[E]_0[S]_0} \quad 6.90$$

这个方程可用来描述各种底物与酶浓度条件下的动力学关系,但就应用言,该方程则太复杂,故人们又提出了各种简化近似式,其中,为较多人们接受的是 Cha-Cha 方程:

$$v = \frac{V \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0 + [E]_0} \quad 6.91$$

衡量各近似式的标准是它们与式 6.88 的相对误差:

$$\epsilon = \left( \frac{v_{\text{近似式}}}{v_{\text{式6.85}}} - 1 \right) \times 100\% \quad 6.92$$

据此,对于米氏方程来说,其相对误差为:

$$\epsilon_m = \frac{-K_m + [S]_0 + [E]_0 + \sqrt{K_m + [S]_0 + [E]_0 - 4[S]_0[E]_0}}{2(K_m + [S]_0)} \times 100\% \quad 6.93$$

对于 Cha - Cha 方程来说,其相对误差为:

$$-\epsilon_{cha} = \frac{1}{2} \left( 1 - \sqrt{1 - \frac{4[S]_0[E]_0}{(K_m + [S]_0 + [E]_0)^2}} \right) \times 100\% \quad 6.94$$

$\epsilon$  的(-)号表示近似值低于标准值。米氏方程和 Cha - Cha 方程的比较如表 6.5。

表 6.5 不同相对底物浓度与相对酶浓度条件下  
米氏方程与 Cha - Cha 方程的相对误差

底物浓度与酶浓度			相对误差	
	$[S]/K_m$	$[E]/K_m$	米氏方程	Cha - Cha 方程
$[S] \ll [E]$	0.1	10	900	0.8
$[S] \gg [E]$	10	0.1	0.08	0.8
$[S] \approx [E]$	10	10	24.8	34.8
	0.1	0.1	0.8	0.7

### 第三节 抑制剂对酶反应的影响

抑制剂(inhibitor)是对酶反应速度有十分重要影响的一种因素。抑制是指抑制剂与酶的活性有关部位结合后,改变了酶活性中心的结构(构象)与性质,从而引起酶活力下降的一种效应。但酶蛋白水解与变性不属于抑制(inhibition)范畴。

#### 一、抑制类型

抑制的过程是:抑制剂先与酶的活性中心有关部位形成可逆的、非共价结合,然后根据抑制剂的特点,有的继续保持这种可逆结合状态;有的则进一步转变为不可逆的共价键。

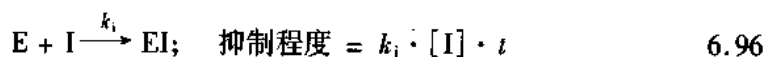


因此,抑制可分为两种类型:

##### 1. 不可逆抑制

这种情况下,抑制剂与酶形成共价键结合;这样,抑制剂一旦和酶结合就很难自发分解,不能用透析、超过滤等物理办法解除抑制。要使酶从抑制剂中释放出来,必须通过其他化学反应,这种抑制解除称为“复活”(reactivation)或“逆转”(reversal)。

不可逆抑制(irreversible inhibition)的动力学特征是:抑制程度比例于共价键形成的速度,并随抑制剂与酶的接触时间而逐渐增大。



$[I]$ 、 $k_i$  和  $t$  分别表示抑制剂浓度、抑制剂与酶形成共价键的反应速度常数和时间。但是最终抑制水平仅由抑制剂与酶的相对量决定,与抑制剂浓度无关。



## 2. 可逆抑制

这种情况下,抑制剂与酶的结合建立在解离平衡基础上,因此,可通过透析等方法除去抑制剂,减轻或消除抑制。可逆抑制(reversible inhibition)的动力学要复杂得多,它由酶与抑制剂间的解离常数( $K_i$ )以及抑制剂的浓度所决定,但与时间无关。

图 6.11 为两种类型抑制的特征图形。值得指出的是,在进行测定,制备这种特征图形时,应让抑制剂和酶先有一定的接触时间。

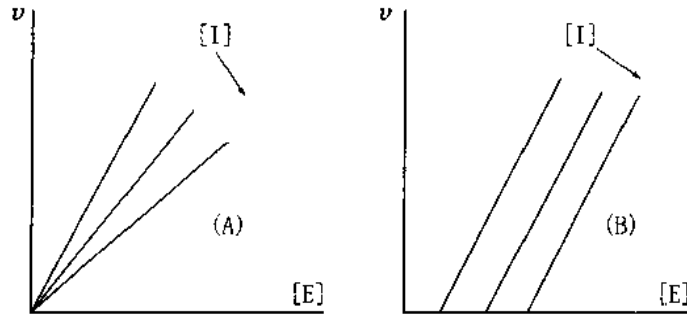
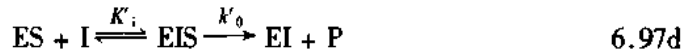
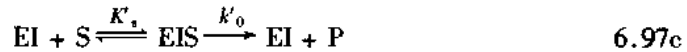
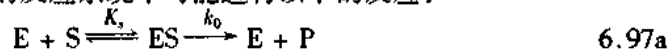


图 6.11 可逆抑制(A)和不可逆抑制(B)的特征图形

## 二、可逆抑制的动力学

在可逆抑制剂存在条件下,酶反应系统中可能进行以下的反应:



在比较简单的情况下, $k'_0=0$ ,此时总的反应速度仍取决于 $k_0$ 和 $[ES]$ ,即 $v_i = k_0 \cdot [ES]$ 。其中, $v_i$ 为抑制剂存在时的反应速度。由于抑制剂的存在, $[ES]$ 受多种因素的控制,用代数法或图像法可解出这个 $[ES]$ ,所以,在抑制剂存在下的总的动力学方程如下:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_s}{[S]} + \frac{K_s[I]}{[S]K_i} + \frac{[I]}{K'_i}} \quad 6.98$$

根据可逆抑制剂、底物和酶三者的相互关系,可逆抑制又可分为三种类型:

### 1. “完全型”竞争性抑制(fully competitive inhibition)

在这种抑制中,酶不能同时和底物、抑制剂结合,即不能形成 EIS,或者说  $K'_i$  或  $K'_s = \infty$ ,因此,它的动力学方程是:

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{[S] + K_m(1 + [I]/K_i)} \quad 6.99$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V} + \frac{K_m(1 + [I]/K_i)}{V} \cdot \frac{1}{[S]} \quad 6.100$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V} + \frac{K_s}{V \cdot [S]} + \frac{K_s}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i} \cdot \frac{1}{V} \quad 6.100'$$

和米氏方程相比,“完全型”竞争性抑制有以下特点:

(1)  $K_m(K_s)$ 增大了 $(1 + [I]/K_i)$ 倍,即抑制剂与酶结合后,酶和底物的亲和力降低了 $(1 + [I]/K_i)$ 倍; $[I]$ 愈高, $K_i$ 愈小,抑制剂浓度愈高,酶和抑制剂间的结合力愈强, $K_m$ 增大,酶和底物亲和力进一步降低,酶反应速度因之相应减慢。

(2) 抑制程度取决于 $[I]$ 和 $[S]$ 、 $K_s$ 和 $K_i$ 的相对大小,以 $(1/v_i - 1/v)$ 表示抑制程度时,有:

$$\frac{1}{v_i} - \frac{1}{v} = \frac{1}{V} \cdot \frac{K_s}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i} \quad 6.101$$

表明底物、抑制剂在浓度以及它们与酶的亲和力上存在着竞争关系:增大底物浓度,有利于酶和底物的结合,可减轻抑制作用;反之,增加抑制剂浓度,将加深抑制程度。同样,底物和抑制剂在 $K_s$ 和 $K_i$ 方面也表现类似的竞争性关系,故这种类型的抑制称为竞争性抑制。

### 2. “完全型”非竞争性抑制(fully non-competitive inhibition)

这种抑制的特点是,底物和抑制剂能够同时和酶结合并形成 EIS,而且  $K_s = K'_s$ ,  $K_i = K'_i$ ,但是 EIS 不能进一步转变为产物, $k'_0 = 0$ ,因此,它的动力学方程是:

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{(K_m + [S])(1 + [I]/K_i)} \quad 6.102$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{(1 + [I]/K_i)}{V} + \frac{(1 + [I]/K_i)}{V} \cdot \frac{K_s}{[S]} \quad 6.103$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_s}{[S]}\right) + \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_s}{[S]}\right) \cdot \frac{[I]}{K_i} \quad 6.103'$$

和米氏方程相比,“完全型”非竞争性抑制的特点是:

(1)  $V$ 降低了 $(1 + [I]/K_i)$ 倍; $[I]$ 愈大, $K_i$ 愈小,形成不能转变为产物的 EI 和 EIS 愈多, $V$ 降低的程度也愈显著;由于  $V$ 降低,酶的反应速度也相应减小。

(2) 如以  $v/v_i$  表示抑制程度,则有:

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad 6.104$$

$[I]$ 愈大, $K_i$ 愈小,抑制愈强;但与底物无关,底物浓度的增大不能减轻抑制,底物与抑制剂间没有竞争关系。

### 3. 反竞争抑制(uncompetitive inhibition)

这类抑制很少见,特点是抑制剂必须在酶和底物结合以后才能和酶结合形成 EIS,即  $K_i = \infty$ ,其动力学方程是:

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{K_s + (1 + [I]/K'_i) \cdot [S]} \quad 6.105$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_s}{[S]} \cdot \frac{1}{V} + \frac{1}{V} + \frac{[I]}{K'_i} \cdot \frac{1}{V} \quad 6.106$$

以上讨论了一些“比较极端”的情况,其中  $K'_i$  或  $K'_s = \infty$ , 或者  $k'_0 = 0$ , 可分别称之为“完全型”的竞争性抑制或“完全型”的非竞争性抑制。下面我们再讨论一些非“典型”的情况。

#### 4. “部分型”竞争性抑制 (partially competitive inhibition)

这种情况和完全型不同,酶和底物及抑制剂能同时结合形成三元络合物 EIS, 即  $K'_i$  和  $K'_s \neq 0$ ,  $K'_i/K_i = K'_s/K_s = \alpha$ ; 而且 EIS 和 ES 一样, 都能转变为产物, 在比较简单的情况下,  $k'_0 = k_0$ 。因此, 它的动力学方程是:

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{K_s \cdot \left( \frac{1 + [I]/K_i}{1 + [I]/K_i \cdot K'_s/K'_s} \right) + [S]} \quad \text{或}$$

$$= \frac{V \cdot [S]}{K_s \cdot \left( \frac{1 + [I]/K_i}{1 + [I]/\alpha \cdot K_i} \right) + [S]} \quad 6.107$$

当  $[I]$  足够大时, 式 6.104 变成:

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{K'_m + [S]} \quad 6.108$$

和米氏方程相比, 它的特点是:  $K_m(K_s)$  “增大”了  $(1 + [I]/K_i)/(1 + [I]/\alpha K_i)$  倍。但是, 实际上  $K_m(K_s)$  可能增大, 也可能减小, 取决于  $\alpha$  值; 当  $[I]$  足够大时, 所有的酶都取 EI 形式,  $K_m(K_s)$  变为  $K'_s$ 。

显然,  $K_m$  增大是一种抑制效应的表现, 而  $K_m$  减小时, 无疑可看成是一种活化效应。因此, “部分型”竞争型的动力学方程同时概括了抑制和活化两种效应。

#### 5. 部分型非竞争性抑制 (partially non-competitive inhibition)

这种抑制剂的特点是  $k'_0 \neq 0$ , 但  $k'_0 \neq k_0$ ,  $k'_0/k_0 = \beta$ , 因此, 其动力学方程是:

$$v_i = \frac{V}{\left(1 + \frac{K_s}{[S]}\right) \left(\frac{1 + [I]/K_i}{1 + [I]/K_i \cdot k'_0/k_0}\right)}$$

$$\text{或} = \frac{V}{\left(1 + K_s/[S]\right) \left(\frac{1 + [I]/K_i}{1 + \beta \cdot [I]/K_i}\right)} \quad 6.109$$

当  $[I]$  足够大时, 式 6.109 变为:

$$v_i = \frac{V'}{1 + K_s/[S]}; \quad V' = k'_0 \cdot [E] \quad 6.110$$

和米氏方程相比, 这种抑制的特点是:  $V$  改变了  $(1 + [I]/K_i)/(1 + \beta[I]/K_i)$  倍; 这种改变可能是增大, 也可能是减小, 取决于  $\beta$ ; 当  $[I]$  足够大时, 所有的酶取 EI 形式,  $k_0$  变为  $k'_0$ 。

同样, 这一动力学方程也同时概括了抑制和活化两种效应。

### 6. 混合型抑制(mixed inhibition)

某些情况下,抑制剂可能同时表现“部分型”竞争性抑制和“完全型”非竞争性抑制作用;某些情况下则可能同时都表现“部分型”的抑制,这些称为混合型抑制。

以前一种情况为例,其中,  $K'_i$  和  $K'_s \neq \infty$ ,  $k'_0 = 0$ , 所以,它的动力学方程是:

$$v_i = \frac{V/(1 + [I]/K_i)}{1 + \frac{K_s}{[S]} \left( \frac{1 + [I]/K_i}{1 + [I]/\alpha K_i} \right)} \quad 6.111$$

和米氏方程相比,这种情况下,  $V$  和  $K_m$  ( $K_s$ ) 都发生了变化:

$$V' = V/(1 + [I]/K_i); K'_m = K_m \left( \frac{1 + [I]/K_i}{1 + [I]/\alpha K_i} \right) \circ \quad 6.112$$

图 6.12A, B 是上述几种可逆抑制的典型特征动力学图形。其中,图 6.12A 为 Lineweaver - Burk 作图;图 6.12B 为 Dixon 作图,通过它可测得  $K_i$ 。

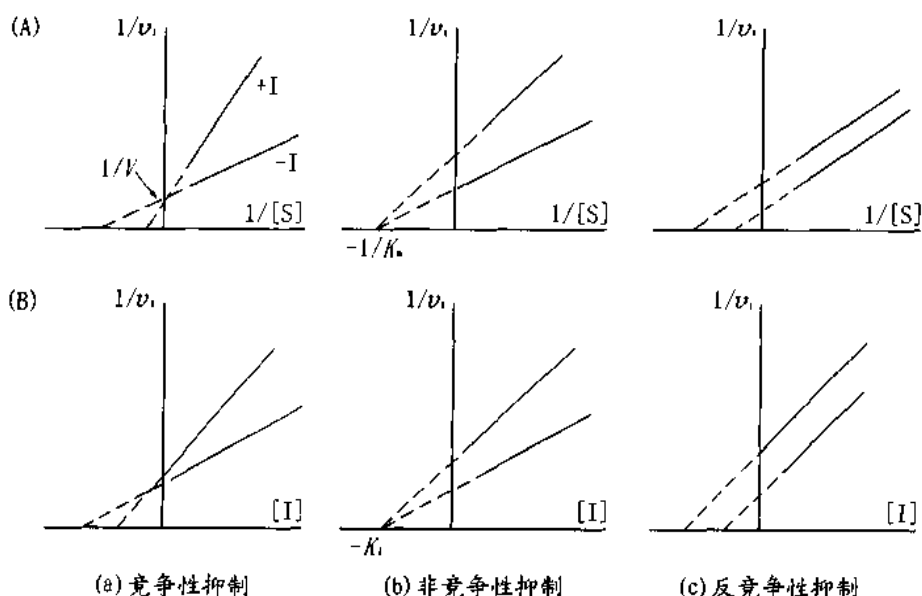


图 6.12 几种可逆抑制的特征动力学图  
Lineweaver-Burk 作图 (A) Dixon 作图 (B)

### 三、可逆抑制和不可逆抑制的相似性

上述各种可逆抑制类型中,竞争性抑制最为常见,典型的例子如丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制。这类抑制剂的作用点可能是酶活性中心中与底物相结合的基团,因此抑制剂和底物间表现竞争;也可能是酶活性中心中结合基团以外的相关其他基团,抑制剂和它结合以后能引起酶分子发生了不利于再和底物结合的构象改变。竞争性抑制的突出特点是,抑制剂和底物间存在着竞争,底物具有保护作用。非竞争性抑制,如核苷对霉菌酸性磷酸酯酶的抑制。产生这类抑制的原因可能是抑制剂作用了酶活性部位中的催化基团,也可能是由于影响了维持酶分子催化活性构型的必需基团,所以抑制剂与底物的结合无关。反竞争性抑制例子很少,如胍对芳香硫酸酯酶的抑制,它极可能是因为酶与底物结合后,酶分子的构型发

生了有利于和抑制剂结合的变化。

在反应机制上,不可逆抑制可认为是可逆抑制的进一步发展,是酶与抑制剂的次级键结合向共价键结合转化,因此有其共同的基础,而且不可逆抑制似乎同样具有上述三种类型:有些情况下,底物对酶具有保护作用,例如,底物可减轻氰化物对琥珀酸脱氢酶的抑制;也可以缓解二异丙基磷酸对胆碱酯酶的毒害;但是,也有很多情况,底物没有保护作用;此外还有极少数情况,像甘油醛-3-磷酸脱氢酶在底物(如  $\text{NAD}^+$ )存在时能加速碘代乙酸对它的抑制,表现出类似反竞争性的性态。

不过,可逆抑制与不可逆抑制间毕竟有着极大的不同。仅以底物的保护作用为例,对于可逆的竞争性抑制而言,它不因酶与抑制剂的接触时间长短而改变;然而,在不可逆抑制剂存在的体系里,底物的保护作用将随抑制时间的延长而逐渐削弱,直到抑制剂全部与酶结合才停止。

不可逆抑制的实际效应是降低系统中酶的有效浓度。例如,一个反应系统中原始的酶浓度为  $[\text{E}]_0$ 。加入不可逆抑制剂 I,如果  $[\text{I}] \geq [\text{E}]_0$ ,则经过一定时间以后,所有酶将全部被结合而不再表现活性;如果  $[\text{I}] < [\text{E}]_0$ ,则一定时间后,系统中将只有剩下的那部分酶,即  $[\text{E}]_0 - [\text{I}]$  的酶才能有效地发挥作用。这样从动力学角度来说,产生的效应将类似于完全非竞争性抑制,即不改变  $K_m$ ,而降低  $V$ 。但即使如此,两者仍有根本的不同,因为在不可逆抑制剂存在的体系里,导致的  $V$  下降与  $K_i$  无关。正由于这个原故,所以,如果一个反应体系表现非竞争抑制性态,在进行分析解释前,必须先确定这种抑制是由可逆抑制还是不可逆抑制所引起。

我国著名的科学家邹承鲁教授曾从可逆抑制的假设出发,推导了一个将可逆抑制与不可逆抑制统一起来的动力学关系式,根据这个方程,可通过实验求得相应的抑制剂与酶结合的动力学常数。

#### 四、抑制与活化

抑制剂的作用是降低酶反应速度,而活化剂的作用则是提高酶活性,两者(统称效应物)似乎截然不同,但是从作用原理和作用方式上看,都存在着共通之处,它们都要通过和酶结合,使酶的结构与构象发生改变,从而或者影响酶与底物的结合,或者影响酶对络合物的催化。从这点出发,就有可能对这两类物质的作用进行统一的动力学分析。例如,在部分型竞争性抑制的讨论中,我们已经指出,  $K_m$  可能增大,也可能减小,取决于  $\alpha$ 。当  $\alpha > 1$  时,  $K_m$  ( $K_s$ ) 增大,则效应物为抑制剂;反之,如果  $\alpha < 1$  时,  $K_m$  减小,则效应物为活化剂。同样,在部分型非竞争性抑制中,  $V$  的升高与降低取决于  $\beta$  值,  $k'_0 > k_0$  时,效应物表现活化作用;  $k'_0 < k_0$  时,表现抑制作用。至于完全型,也可作类似的分析,完全型的竞争性抑制表示酶与底物和抑制剂不能同时结合,而完全型的“竞争性”活化,则表示酶只有与活化剂结合以后才能与底物结合。它们的动力学方程与部分型略有不同:

$$v_i = \frac{V \cdot [\text{S}]}{K_m(1 + [\text{I}]/K_i) + [\text{S}]} \quad 6.99$$

$$v_a = \frac{V \cdot [\text{S}]}{K_m(1 + K_a/[\text{I}]) + [\text{S}]} \quad (v_a \text{ 表示活化时的 } v) \quad 6.113$$

完全型非竞争性抑制表示 EIS 不能转变为产物, 而完全型“非竞争性”活化则表示 ES 需和 I 结合形成 EIS 后才能转变为产物:

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{(K_m + [S])(1 + [I]/K_i)} \quad 6.102$$

$$v_a = \frac{V \cdot [S]}{(K_m + [S])(1 + K_a/[I])} \quad 6.114$$

值得提到的是, 对于许多酶反应来说, 高浓度的底物也常能产生抑制和活化影响, 这些已于前节讨论。另一方面, 产物也常具有抑制作用, 或者表现竞争性抑制, 或者表现非竞争性抑制。产物抑制和外源抑制剂不同, 产物在反应过程中不断形成和变化, 因而, 其动力学关系比外源抑制效应要复杂些。

产物表现竞争性抑制时的动力学方程为:

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{K_m(1 + [P]/K_p) + [S]} \quad 6.115$$

产物表现非竞争性抑制时的动力学方程为:

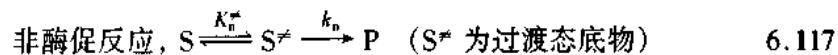
$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{(K_m + [S])(1 + [P]/K_p)} \quad 6.116$$

注意: 其中[P]为变量。

## 五、过渡态底物类似物

抑制剂的研究对理论与实践都有十分密切的关系, 特别是竞争性抑制剂可能有更重要的意义。因为它的结构在许多情况下与底物相似, 因此人们常使用各种底物类似物, 或者将底物加以某些修饰后作成各种抑制剂, 用以研究酶的活性中心对底物结构与构象的要求, 以及能力学方面的要求; 人们也可以设计某些关键性“靶酶”的底物或辅酶物质的类似物, 作为代谢拮抗物用以治疗疾病。

底物类似物可分为两种类型: 基态底物类似物和过渡态底物类似物。其中, 过渡态底物类似物(transition state substrate analogue)更受人们的重视, 因为它比基态类似物对酶有更强的亲和能力。1935年 Eyring 发展了过渡态理论, 认为对于任何一个化学反应而言, 从反应物转变为产物都要经过一个不稳定的过渡态阶段, 而反应的速度比例于这种过渡态中间物的浓度。酶反应也是这样。以  $S \rightarrow P$  的反应为例:



$$\begin{aligned} K_n^* &= [S^*]/[S] \\ v_n &= \frac{RT}{Nh} \cdot [S^*] \\ &= \frac{RT}{Nh} \cdot K_n^* \cdot [S] \\ &= k_n \cdot [S] \end{aligned} \quad 6.118$$

$$k_n = \frac{RT}{Nh} \cdot K_n^* \quad 6.119$$

$R$  为气体常数,  $T$  为绝对温度,  $N$  为 Avogadro 常数,  $h$  为 Planck 常数。

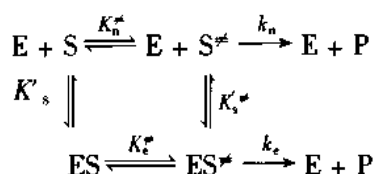


$$K'_s = [ES]/[E] \cdot [S]; K'_e = [ES^\ddagger]/[ES],$$

$$\begin{aligned} v_e &= \frac{RT}{Nh} \cdot [ES^\ddagger] \\ &= \frac{RT}{Nh} \cdot K'_e \cdot [ES] \\ &= k_e \cdot [S] \end{aligned} \quad 6.121$$

$$k_e = \frac{RT}{Nh} \cdot K'_e \quad 6.122$$

如果将式 6.117 和式 6.120 组成如下框式结构,



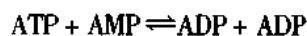
其中,  $K'_s = \frac{[ES^\ddagger]}{[E] \cdot [S^\ddagger]}$ , 按热力学有:

$$K'_n \cdot K'_s = K'_e \cdot K'_e \quad 6.123$$

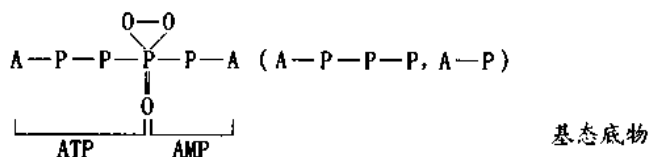
$$K'_s / K'_e = K'_n / K'_e = k_e / k_n \quad 6.124$$

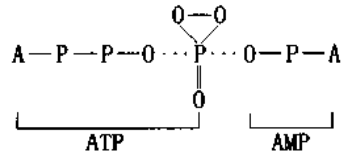
从式 6.121 可见:酶促反应与非酶促反应速度比等于酶和过渡态底物与酶和基态底物结合常数(注意! 此处  $K'_s$  为结合常数)之比。酶促反应速度通常比非酶促反应者高约  $10^6 \sim 10^{12}$  倍,因此,式 6.121 就表示,酶和过渡态底物的亲和力比酶和基态底物的亲和力要大约  $10^6 \sim 10^{12}$  倍。Pauling 认为这是由于酶和过渡态底物在结构和构象上能更好地互补的缘故。

作为抑制剂的过渡态底物类似物是指那些结构与过渡态底物相似,因而能和酶紧紧结合的稳定的分子。例如,腺苷酸激酶(adenylate kinase),也称肌激酶(myokinase),催化:

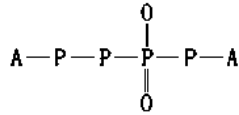


按理说,  $AP_4A$  ( $ATP + AMP$ ) 应可作为该酶的底物类似物,但是,它的  $K'_s$  为  $10^{-3}$  mol/L; 而实际上  $AP_5A$  却是与该酶有更强亲和力的底物类似物,  $K'_s$  达  $10^{-8}$  mol/L。这可能是因为后者在结构上与过渡态底物更为相近的缘故。

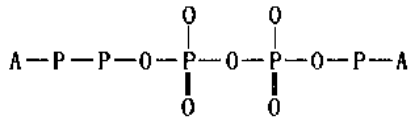




过渡态底物



基态底物类似物 (AP<sub>3</sub>A)



过渡态底物类似物 (AP<sub>5</sub>A)

## 六、几种类型的抑制剂

不可逆抑制剂在酶的作用机制研究和进行化学治疗等方面都起着十分重要的作用。常用的不可逆抑制可大体分为两类：一是专一地和特定(侧链氨基酸)基因反应的试剂；二是根据酶的作用机制，修饰酶的特定位点的专一性试剂。

在前一类抑制剂中有：

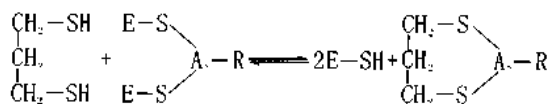
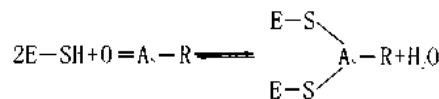
(1) 能和金属形成络合物，从而“毒害”以金属离子为活性中心的“金属酶”抑制剂，如氰化物、硫化物、叠氮化物和 CO 等；

(2) 作用以巯基为活性中心的“巯基酶”抑制剂，巯基试剂可大体分为三类：

a. 巯基烷化剂。如卤乙酸衍生物，其中碘乙酰胺是鉴定 SH 基是否是酶中的必需基团的常用试剂。卤乙酰衍生物和它的烯基取代物多具有催泪性。

b. 成硫醇盐试剂。属于这一类的有有机汞化物和砷化物，它们能可逆地和 SH 基反应形成硫醇盐；加入过量的巯基化物或二巯基化物又可使抑制逆转。最为人熟知的成硫醇盐试剂如对氯汞苯甲酸(p-chloromercuribenzoate, PCMB)和对羟汞苯甲酸(p-hydroxymercuribenzoate, PHMB)，常用于检定巯基是否属于酶的必需基团。

砷化物中的 Lewisite(路易斯气)，是强力毒气；它对应的解毒有效药物就是二巯丙醇，也称英国抗路易斯(British AntiLewisite, BAL)。





c. 巯基氧化剂。巯基很易被氧化剂氧化,但一般不很专一;最常见的如谷胱甘肽等二硫化物及  $I_2$ 。

(3) 重金属毒物。重金属盐如汞、铅、银、铜等,它们在高浓度时是蛋白质沉淀剂,但是某些酶对低浓度的这些盐也十分敏感,机理尚不清楚,例如,低浓度的银盐就能抑制  $\beta$ -果糖苷酶。重金属抑制可借助金属鳌合剂逆转。

在后一类抑制剂中包括(见第九章):

a. 拟底物(pseudosubstrate)。类似于底物,它们能被酶作用,但形成的中间产物是共价络合物,不能被酶进一步作用,催化分解,例如,抑制酯酶、蛋白酶的有机磷化合物。

b. 底物类似物。它们和底物仅有微小的区别,不能被酶作用,但能作为亲和标记试剂(affinity labeling reagent),标记酶的活性中心,如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶的专一性抑制剂 TPCK 和 TLCK 等。

c. “自杀性”底物(suicide),也称 k-cat 抑制剂。它是酶的底物,也能被酶作用,但是,在其被酶作用的部位包含潜在的化学活性基团,一旦被酶作用后,这种潜在的基团就会被激发而和酶蛋白的活性中心起反应形成共价结合,并阻止酶继续发挥作用。这类抑制剂的特点是,它本身没有或很少有非专一性的毒性,只有在被特定的酶作用以后才会表现毒性,因此在酶学和治疗学上可能有重要的意义。

#### 第四节 pH 对酶反应的影响

酶反应都是在一定的 pH 条件下进行的,酸、碱既能影响酶的稳定性,也能直接影响酶的催化活性。

##### 一、酸、碱对酶稳定性的影响

酶都有一定的酸、碱稳定性范围,超出这个范围后,酶就会变性失效。

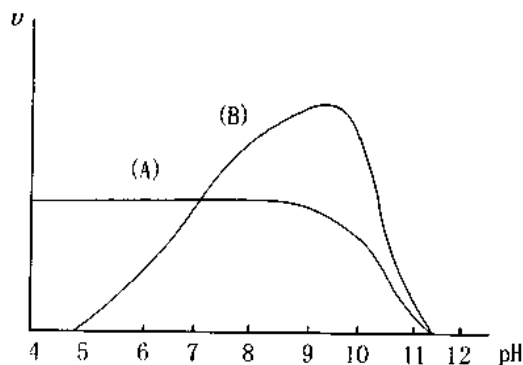


图 6.13 酸、碱对酶与酶反应的影响

(A) 酶稳定性 - pH 曲线

(B) 酶活性 - pH 曲线

为了了解酶在酸、碱中的稳定性情况,通常都要制备一条酶稳定性 - pH 曲线。方法是先将酶溶液分成若干份,分别置于不同的 pH 溶液中保温一定时间,然后再调整至某一共同

的 pH 进行酶活性测定。再将测得的结果绘成如图 6.13(A) 的酶稳定性 - pH 曲线; 图 6.13 (B) 为酶活力 - pH 曲线。比较图 6.13(A), (B), 可以了解酶的稳定性状况, 例如, 该酶在 pH > 9 时稳定性明显下降。

在制备酶的稳定性 - pH 曲线时, 应该注意介质的组成成分和温度条件, 因为它们也可能和 pH 同时对酶的稳定性产生影响。另外, 酸、碱对酶的破坏作用是随时间累加的, 因此, 还应注意在相应条件下的保温时间。

## 二、pH 对酶活力的影响

典型的酶活力 - pH 曲线有如钟罩形, 它和两性电解质在不同 pH 的解离曲线很相似(图 6.14)。因此, 最初认为 pH 对酶活力影响的根本原因可能是由于酸、碱影响了酶的解离状态。

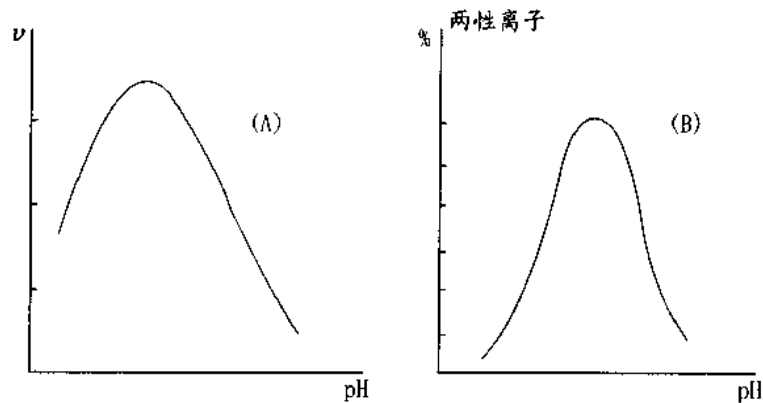


图 6.14 酸、碱对酶活力的影响(A)  
酸、碱对两性电解质解离状态的影响(B)

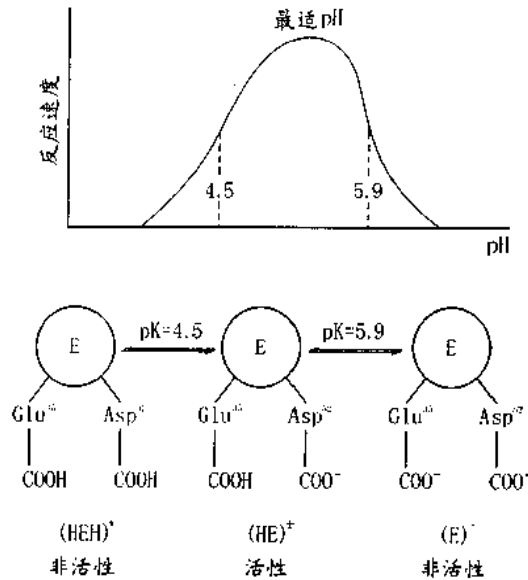


图 6.15 溶菌酶的最适 pH 与活性部位的解离

但是深入研究发现:① 酶反应都有其各自的最适 pH,而且这种最适 pH 往往和它的等电点不一致(表 6.6);② 某些酶经过部分修饰后,其最适 pH 通常不变;③ 对于某些活性中心结构已经知道的酶,它们的最适 pH 主要和活性中心的侧链基团的解离相关。以溶菌酶为例,它是一种碱性蛋白,X-衍射分析表明,该酶的活性中心包括两个关键性氨基酸侧链基团:35 位的 Glu 和 52 位的 Asp;而且,其中的 Glu 必须取 -COOH 形式,Asp 必须取 COO<sup>-</sup> 状态才有活性。已知  $pK_{\text{Glu-COOH}}$  为 5.9,  $pK_{\text{Asp-COO}}$  为 4.5,而溶菌酶的最适 pH 正好是 5.2[(4.5 + 5.9)/2](图 6.15)。

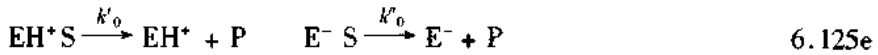
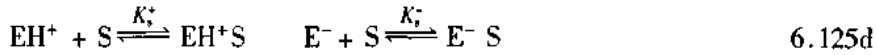
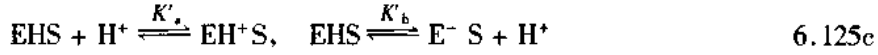
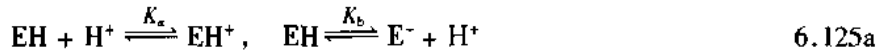
表 6.6 某些酶的等电点和最适 pH

酶	底物	等电点	最适 pH
乙酰胆碱酯酶	乙酰胆碱	5.0	8.4
核糖核酸酶(牛胰)	核糖核酸	7.8	7.8
$\alpha$ -淀粉酶(猪胰)	淀粉	5.2~5.6	6.9
$\alpha$ -淀粉酶(麦芽)	淀粉	5.7	4.7~5.4
$\beta$ -淀粉酶(麦芽)	淀粉	6.0	5.2
蔗糖酶	蔗糖	5.0	4.5
腺-磷酸氨酶(肌)	腺苷-磷酸	5.6	6.4
胃脘酶	各种蛋白质	3.8	1.5~2.5
胰脘酶	各种蛋白质	7.8	7.5
胰凝乳蛋白酶	各种蛋白质	8.1~8.6	8~9
木瓜蛋白酶	各种蛋白质	9.0	5.0~5.5
羧肽酶	Cbz-Cly-Phe	6.0	7.3
脲酶	脲	5.0~5.1	6.4~7.6
脱羧酶(酵母)	丙酮酸	5.1	6.0
磷酸化酶 b(兔肌)	淀粉	5.8	7~8
己糖激酶(酵母)	葡萄糖 ATP	4.5~4.8	8~9
肌激酶	ATP, AMP	6.1	8
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	乳酸	4.5~4.8	7.4
乳酸脱氢酶(酵母)	葡萄糖-6-磷酸	4.8	7.5~8.6
黄嘌呤氧化酶(牛乳)	黄嘌呤	6.7	8.5~9.0
过氧化氢酶(牛肝)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5.6	5.7
反丁烯二酸酶	反丁烯二酸	5.0~5.4	7.0
醛缩酶(兔肌)	果糖二磷酸	6.0	7.5~8.5
磷酸甘油酸变位酶	3-磷酸甘油酸	5.3	5.7
磷酸乙糖异构酶	葡萄糖-6-磷酸	约 6.0	7.8~8.0

这些事实说明, pH 对酶活性的影响不是由于酸、碱作用了整个酶分子,影响了整个酶分子的解离状态,而是由于它们改变了酶的活性中心或与之有关的基团的解离状态。也就是说,酶要表现活性,它活性部位的有关基团都必须选取一定的解离状态,其中任何一种基团的解离状态发生了变化就将使酶从活性状态转入无活性状态;反之亦然;至于活性部位以外的其他基团则无关紧要。

如果将处于活性解离状态的酶概括为 EH, 而由活性状态转入无活性状态时,其酸性解

离形式概括为  $\text{EH}^+$ , 碱性解离形式概括为  $\text{E}^-$ 。那么, 根据上述分析, 酸碱对酶活性的影响实际上和抑制剂的作用非常类似, 这就是说, pH 对酶反应动力学的影响可以简化为酸、碱的抑制影响。



和抑制剂的影响相似, pH 对酶反应的影响也可归纳为几种类型:

### 1. 酸、碱表现竞争性抑制影响

这种情况下,  $K_s^+$ 、 $K_s^-$ 、 $K'_a$  和  $K'_b = \infty$ 。

$$\text{H}^+ \text{ 的影响: } v^+ = \frac{V \cdot [\text{S}]}{[\text{S}] + K_m \left( 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a} \right)} \quad 6.126a$$

$$\text{OH}^- \text{ 的影响: } v^- = \frac{V \cdot [\text{S}]}{[\text{S}] + K_m \left( 1 + \frac{K_b}{[\text{H}^+]} \right)} \quad 6.126b$$

$$\text{pH 总的影响: } v_{\text{H}} = \frac{V \cdot [\text{S}]}{[\text{S}] + K_m \left( 1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[\text{H}^+]} \right)} \quad 6.126$$

(1) 和竞争性抑制剂一样, pH 改变了  $K_m$ , 因而, 也就使酶活力发生了变化。如果以  $K_{ap}$  代替改变了的  $K_m$ , 并取  $-\log(pK_m \text{ 或 } pK_{ap})$  的形式, 则:

$$\text{根据 6.127a, 当 } [\text{H}^+] \ll K_a \text{ 时, } pK_{ap} = pK_m \quad 6.127a$$

$$[\text{H}^+] \gg K_a \text{ 时, } pK_{ap} = pK_m + \text{pH} - \text{p}K_a \quad 6.127b$$

$$\text{根据 6.127b, 当 } [\text{H}^+] \gg K_b \text{ 时, } pK_{ap} = pK_m \quad 6.128a$$

\* 两性电解质在特定的 pH 条件中各种解离形式在总的电解质中所占的分配比可用 pH 函数( $f$ )来描述。

例如, 对于 EH 的解离:



$$\begin{aligned} f[\text{EH}] &= \frac{[\text{EH}]}{[\text{EH}^+] + [\text{EH}] + [\text{E}^-]} = \frac{[\text{EH}]}{[\text{H}^+][\text{EH}]/K_a + [\text{EH}] + K_b[\text{EH}]/[\text{H}^+]} \\ &= \frac{1}{1 + [\text{H}^+]/K_a + K_b/[\text{H}^+]} \end{aligned}$$

$$[H^+] \ll K_b \text{ 时, } pK_{ap} = pK_m - pH + pK_b \quad 6.128b$$

显然,就式 6.127 来说,只有当  $K_a \gg [H^+] \gg K_b$  时,  $pK_{ap} = pK_m$ 。

(2)  $K_a \gg [H^+] \gg K_b$  时,  $K_{ap}$  最小,酶活力最大,这就是酶的最适 pH( $pH_0$ )。

$$\begin{aligned} d \log(1 + K_b/[H^+] + [H^+]/K_a) / pH &= 0 \\ pH_0 &= (pK_a + pK_b) / 2 \end{aligned} \quad 6.129$$

可见:最适 pH( $pH_0$ )与底物浓度无关。

(3) 将  $pK_{ap}$  对 pH 作图,可得到图 6.16 所示之曲线,这条曲线实际上由斜率为 1.0 及 -1 的三个线段组成;将式 6.127a、b、6.128a、d 联立解,即上述三线段的交点,它们的 pH 指示相应的  $pK_a$  和  $pK_b$ 。

### 2. 酸、碱表现非竞争性抑制

这种情况下,  $K_s^+ = K_s^- = K_s$ ;  $K'_a = K_a$ ,  $K'_b = K_b$ ;  $k'_0, k''_0 = 0$ 。因此, pH 影响下的总的动力学方程为:

$$v_H = \frac{V \cdot [S]}{(K_m + [S]) \left( 1 + \frac{K_b}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_a} \right)} \quad 6.130$$

(1) 和非竞争性抑制影响一样,此时 pH 影响的是  $V$ , 如果以  $V_{ap}$  表示改变了的  $V$ , 则显然只有当  $K_a \gg [H^+] \gg K_b$  时,  $V_{ap} = V$ , 即才能得到真正的最大酶反应速度,这种 pH 也就是酶作用的最适 pH( $pH_0$ )。

(2) 和酸、碱表现竞争性抑制一样,  $pH_0 = (pH_a + pK_b) / 2$ 。

(3) 将  $\log V_{ap}$  对 pH 作图,可得到 6.17 所示之曲线,从这条曲线同样可测得相应的  $pK_a$  和  $pK_b$ 。

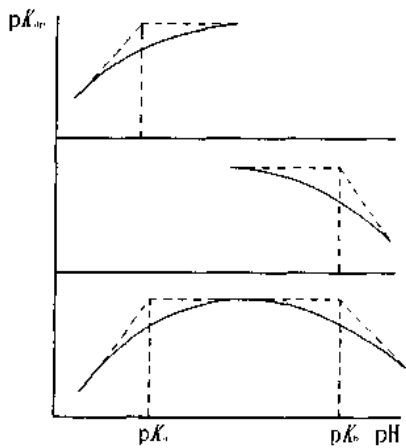


图 6.16  $pK_{ap} - pH$  作图

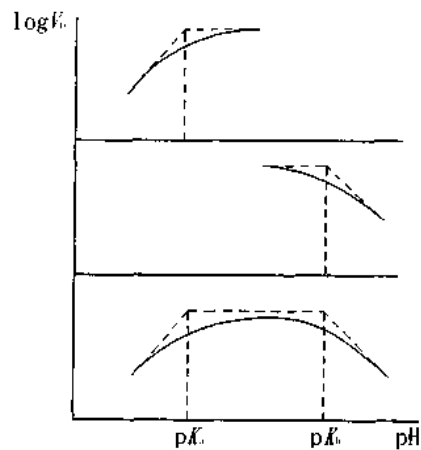


图 6.17  $\log V_{ap} - pH$  作图

### 3. 酸、碱表现混合型抑制影响

在这种影响下,  $K'_a$  和  $K'_b \neq \infty$ , 但也  $\neq K_a$  和  $K_b$ ;  $K_s^+$  和  $K_s^- \neq \infty$ , 也  $\neq K_s$ ;  $k'_0$  和  $k''_0 = 0$ , 因此,它的动力学方程是:

$$v_H = \frac{V \cdot [S]}{(1 + [H^+]/K'_a + K'_b/[H^+]) \left( [S] + K_m \left( \frac{1 + [H^+]/K_a + K_b/[H^+]}{1 + [H^+]/K'_a + K'_b/[H^+]} \right) \right)} \quad 6.131$$

其中, 
$$V_{ap} = \frac{V}{1 + [H^+]/K'_a + K'_b/[H^+]} \quad 6.132$$

$$K_{ap} = K_m \left( \frac{1 + [H^+]/K_a + K_b/[H^+]}{1 + [H^+]/K'_a + K'_b/[H^+]} \right) \quad 6.133$$

$$V_{ap}/K_{ap} = V/K_m \cdot \frac{1}{1 + [H^+]/K_a + K_b/[H^+]} \quad 6.134$$

在这种情况下,  $V$  和  $K_m$  都发生了改变, 通过  $pK_{ap}$  对  $pH$  作图,  $\log V_{ap}$  对  $pH$  作图可求得相应的  $pK_a$ 、 $pK'_a$ 、 $pK_b$  和  $pK'_b$  (图 6.18)。

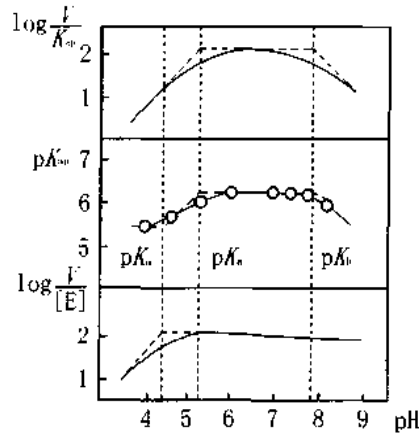


图 6.18  $pK_{ap}$ ,  $\log V_{ap}$ ,  $\log V/[E]$  对  $pH$  作图

### 三、研究 $pH$ 对酶反应影响的意义

研究  $pH$  对酶反应影响有两方面的意义: ① 所有酶反应都是在一定  $pH$  条件下进行的, 因此了解  $pH$  的影响是酶学的基本工作; ② 是认识酶的结构与功能关系, 探讨酶的作用机理的一种重要手段。在后一方面, 它可以发挥两种作用, 一是测定酶分子中参与结合和催化功能的基团; 二是测定酶反应可能经历的历程。

根据活性中间络合物理论,  $K_m$  ( $K_s$ ) 描写了酶与底物的结合特征,  $V$  描写了酶对底物的催化特征。因此, 如果底物不发生酸、碱解离, 那么, 从  $pK_{ap}$  或  $\log V_{ap}$  对  $pH$  的作图可测得的  $pK_a$ 、 $pK_b$  或  $pK'_a$ 、 $pK'_b$ , 将相应地代表结合基团或催化基团的解离常数, 对照氨基酸的解离常数 (表 6.7), 就能大致地判断出结合基团或催化基团的性质。但是, 在作出结论时必须十分小心, 因为: 第一, 某些氨基酸的  $pK$  值是相互重叠的, 如酪氨酸与赖氨酸, 门冬氨酸与谷氨酸; 第二, 微环境的影响, 一是多肽链中氨基酸间的相互影响, 二是介质的影响, 一般地说, 低的介电常数, 使羧基偏向于不解离, 因而升高其  $pK$  值, 同时压抑  $NH_3$  的离子化, 降低其  $pK$  值, 而在极性条件下则恰恰相反。例如, 在溶菌酶中 35 位的 Glu, 其  $pK$  值可从 4.4 升

至 5.9; 而在乙酰乙酸脱羧酶中, 其赖氨酸  $\epsilon$ -氨基的  $pK$  值可从 10.0 左右降至 5.9。因此, 在作出判断或作出结论时, 最好同时参考电离热\*, 即同时测定温度对  $pK$  值的影响 (表 6.7); 而且, 这种  $pK$  值最好根据  $V/K_m$  测得, 因为它表示真正“自由酶”的  $pK$  值。

表 6.7 某些氨基酸侧链基团的  $pK$  值及电离热

基 团	$pK$ 值(25℃)	$\Delta H$ (J/mol)
$\alpha$ -羧基	3.0~3.2	6 276
门冬氨酸 $\beta$ -羧基	3.0~4.5	6 276
谷氨酸 $\gamma$ -羧基	4.4	6 276
酪氨酸酚羟基	9.8~10.2	25 104
巯基	8.3~8.5	—
组氨酸咪唑基	5.6~7.0	28 870 ~ 31 380
$\alpha$ -氨基	7.6~8.4	41 840 ~ 543 920
胱氨酸 $\alpha$ -氨基	6.5~8.5	—
赖氨酸 $\epsilon$ -氨基	9.5~10.5	41 840 ~ 502 080
精氨酸胍基	11.5~12.5	502 080 ~ 543 920

大多数酶催化的反应是可逆的, 通过上述作图方法求得  $pK_a$ 、 $pK_b$ 、 $pK'_a$  和  $pK'_b$  后, 根据正逆反应相应的各  $pK$  值, 往往还可获得酶的反应机构的某些重要信息。以延胡索酸酶为例, 它催化:

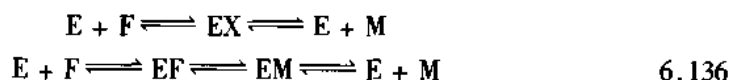


它的正逆反应的  $pK$  值如表 6.8。

表 6.8 延胡索酸酶反应测得的有关  $pK$  值

底物	$pK_a$	$pK_b$	$pK'_a$	$pK'_b$
苹果酸	6.2	6.8	5.3	7.3
延胡索酸	6.2	6.8	6.6	8.4

它的反应历程可能包含一个中间物, 也可能包含两个或多个中间过程, 如:



其中  $F$  和  $M$  分别代表延胡索酸和苹果酸。

由于  $pK_a$  和  $pK_b$  在正逆反应相同, 因此表明结合部位相同, 但  $pK'_a$  和  $pK'_b$  不同, 说明该酶反应至少包含两个以上的中间物过程。

以上我们仅讨论了  $pH$  对酶反应影响的一些简单情况, 因为  $pH$  除了对酶的解离状态直接产生影响外, 也可能影响到底物的解离和系统中其他组成成分的解离, 所以, 实际上  $pH$  的影响远为复杂。

\* 电离热  $\Delta H = 2.303RT^2 dpK/d(1/T)$

## 第五节 温度对酶反应的影响

### 一、酶反应的“最适温度”

和酸碱对酶反应体系的影响一样,温度既能改变酶反应本身的速度,也能导致酶蛋白变性失效;由于任何一种反应都是一定温度条件下进行的,温度的这两种效应都会发挥作用。通常所谓的“最适温度”,就是这两种效应的综合结果。

如果让酶反应在不同温度条件下进行,然后将测得的反应速度相对温度作图,那么一般可得到如图 6.19 所示钟罩形的曲线。它表明,在较低的温度范围内,酶反应速度随温度升高而增大,但超过一定温度后,反应速度反而下降;反应速度发生转折时的温度就称为酶反应的“最适温度”。产生钟罩形的原因就是由于一方面温度加速了酶反应的进行,另一方面温度加速了酶蛋白变性(图 6.19 的虚线部分)。

温度的这种综合影响,也就是说,“最适温度”,与时间有密切关系,不同的反应时间测得的最适温度往往不同。这是由于温度促使酶蛋白变性是随时间而累加的。在反应的最初阶段,酶蛋白变性常来不及表现,因此,反应的(初)速度随温度升高而增大;但是,随反应时间延长,酶蛋白变性因素逐渐突出,反应速度随温度升高的效应逐渐为酶蛋白变性效应所“抵消”,故而在不同反应时间内测得的“最适温度”也就不同,且随反应时间延长而降低(图 6.20,其中  $t$  为时间)。

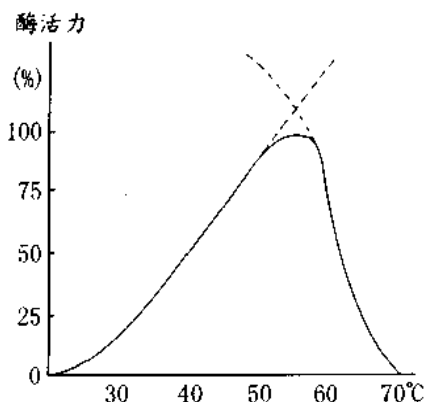


图 6.19 酶反应的“最适温度”

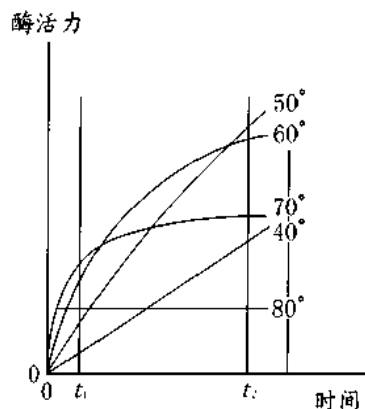


图 6.20 酶反应最适温度与时间的关系

### 二、温度对酶反应速度的影响

温度对酶反应速度的影响同样可根据 Eyring 等的绝对反应速度理论,也称为过渡态理论来进行讨论,这种理论认为,在反应系统中,并不是所有的分子都能进行反应,它们需要获得一定的能量转入瞬时的活化状态,即成为活化分子以后才能反应生成产物,这种从“基态”到“活化态”所需要的能量称为“活化能”(  $E_a$  )。

要加速化学反应有两种办法:① 增加活化分子的数目;② 降低反应的活化能。分子一般通过相互碰撞而传递能量,升高温度一方面能增加分子的动能,另一方面也能增加分子间



的碰撞频率,因此,温度升高可加速反应。催化剂所以能加速反应是因为它们能通过形成活化能较低的中间络合物,降低反应总的活化能。酶促反应也是这样。图 6.21 是以反应  $A + B \rightleftharpoons C + D$  为例,图示基态、活化态反应物的能量状况以及催化剂存在条件下的能量变化。如果酶对热稳定,那么,反应在温度升高时,将同时受到温度增加反应物分子的动能和降低反应活化能的双重影响。但是值得提到的是,对于催化剂促进的反应来说,它们的温度系数一般小于非催化反应,说明催化剂降低活化能可能是加速反应更重要的因素。

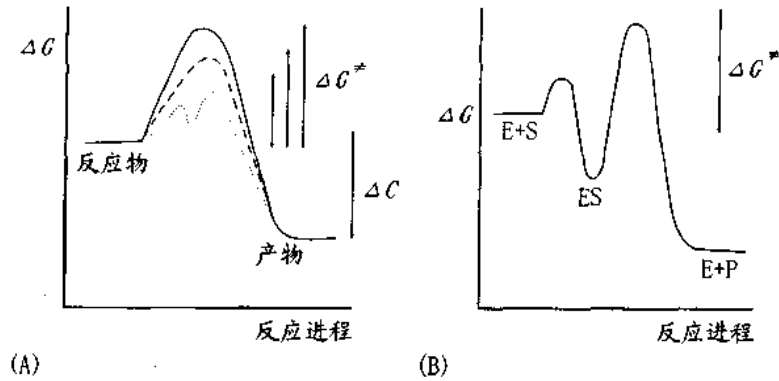


图 6.21 酶促与非酶促反应的自由能变化  
催化剂通过形成中间络合物(点线)降低活化能(A)  
酶促反应(B)

按照米氏方程,酶反应速度:

$$v = \frac{k_0[E][S]}{\frac{k_0 + k_{-1}}{k_1} + [S]} \quad 6.33$$

温度对酶反应速度的影响主要是影响动力学方程中的反应速度常数,根据绝对反应速度理论,反应速度常数  $k$  与温度  $T$  有如下的关系:

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad 6.137$$

其中  $k_B$  为 Boltzmann 常数,  $h$  为 Plank 常数,  $\Delta G^\ddagger$  为自由能变化。

为了定量地描写温度对反应速度的关系, Arrhenius 曾提出一个经验式

$$k = A \cdot e^{-E_a / RT} \quad 6.138$$

其中  $A$  称为频率系数 (frequency factor), 是比例于分子碰撞次数的常数,  $E_a$  为特定反应系统的活化能。

式 6.137 和 6.138 十分相似,实际上,式 6.137 可看作是式 6.138 的量子化学表达式。其中:

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad 6.139$$

$$\Delta S^\ddagger = (\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger) / T \quad 6.140$$

Arrhenius 经验式可改写成:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad 6.141$$

Arrhenius 经验式原是用来描写温度对化学反应速度影响的,但是在一定温度范围(一般

是在 45℃)以内,也适用于酶促反应;只是超过 45℃后,通常还伴随着酶的变性问题。

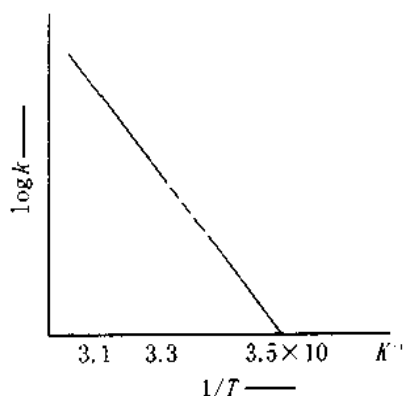


图 6.22  $\log k \sim 1/T$  作图

表 6.9 某些反应的活化能

反 应	催 化 剂	活化能(J/mol)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 分解	对照	75 312
	胶体铂	46 024
	Fe <sup>3+</sup>	41 003
	过氧化氢酶	< 8 368
乙酸丁酯水解	H <sup>+</sup>	66 944
	OH <sup>-</sup>	41 840
	胰脂肪酶	18 828
酪蛋白水解	H <sup>+</sup>	83 680
	胰蛋白酶	50 208
蔗糖水解	H <sup>+</sup>	104 600
	酵母蔗糖酶	33 472

根据式 6.141 进行  $\log k \sim 1/T$  作图(图 6.22),可得一直线,直线的斜率为  $-E_a/2.303R$ ,因而可求得  $E_a$ 。表 6.9 列举了某些反应的活化能,可见催化剂都能降低反应的活化能,特别是酶反应,这种降低尤为显著。正是因为这个缘故,酶比其他催化剂有更高的催化剂效率,即使是在生理条件(37℃、近中性的 pH)下,酶反应仍然能以很高的速度进行。以蔗糖水解为例,如以  $k_e$  和  $k_H$  表示酶和 H<sup>+</sup> 催化的反应速度常数,那么根据式 6.141 有:

$$\log k_e = \log A - \frac{8\,000}{2.3RT} \quad 6.142$$

$$\log k_H = \log A - \frac{25\,000}{2.3RT} \quad 6.143$$

其中,  $R = 8.28 \text{ J}/(\text{mol} \cdot ^\circ\text{C})$ ; 在 37℃时,  $T = 310 \text{ K}$ 。

$$\frac{\log k_e}{\log k_H} = \frac{25\,000 - 8\,000}{2.3 \times 1.98 \times 310} = 12.4 \quad 6.144$$

$$\frac{k_c}{k_H} = 2.5 \times 10^{12} \quad 6.145$$

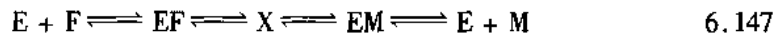
测得反应的活化能  $E_a$  以后,可以估计出反应的温度系数( $Q_{10}$ ),  $Q_{10}$ 表示温度升高  $10^\circ\text{C}$ ,反应速度提高的倍数。

$$\begin{aligned} \log Q_{10} &= \log k_{T_2}/k_{T_1} \quad (T_2 = T_1 + 10) \\ &= 0.219 E_a(1/T_1 - 1/T_2) \\ &= 2.19 E_a/(T_1 \cdot T_2) \end{aligned} \quad 6.146$$

例:  $E_a = 33\,472 \text{ J/mol}$ ,  
 $T_1 = 295 \text{ K}(22^\circ\text{C})$ ,  $T_2 = 305 \text{ K}(32^\circ\text{C})$   
 $\log Q_{10} = 2.19 \times 33\,472 / (295 \times 305) = 0.195$   
 $Q_{10} = 1.56$

### 三、温度与酶反应历程

和 pH 影响一样,研究温度影响也有两方面的意义:① 是酶学工作的基本内容;② 是深入认识酶作用原理的重要手段。例如,我们可根据绝对反应速度理论,通过动力学参数求得反应各个环节的热力学参数。仍以延胡索酸酶催化的反应为例。如前所述,该酶促反应历程如下:



对于  $E + S \rightleftharpoons ES$  这一平衡,有:

$$\Delta G = 2.3RT \log K_m(\text{或 } K_s) \quad 6.148$$

$$d \log K_m(\text{或 } K_s) / d(1/T) = -\Delta H / 2.3R \quad 6.149$$

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \quad 6.150$$

由于  $ES \rightleftharpoons X$  是反应的限度环节,因此,可根据式 6.137 ~ 6.140,求得相应的  $\Delta G^\ddagger$ ,  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta S^\ddagger$ 。

这样,就可将延胡索酸酶反应各环节的有关热力学参数计算出来(表 6.10)。此反应即:  $F + H_2O \rightarrow M$ , 总  $\Delta H$  按直接热力学测定为  $-15.1 \text{ kJ/mol}$ , 而按表 6.10 计算为  $-14.7 \text{ kJ/mol}$ , 因此,可见十分接近。

表 6.10 延胡索酸酶反应的  $\Delta H(\Delta H^\ddagger)$

反 应	计 算	$\Delta H(\text{或 } \Delta H^\ddagger) \text{ kJ/mol}$
$E + F \rightleftharpoons EF$	$d \log K_m / d(1/T) = \Delta H / 2.3R$	$\Delta H^\ddagger = 17.6$
$EF \rightleftharpoons X^\ddagger$	$d \log k_0 / d(1/T) = (\Delta H^\ddagger + RT) / 2.3RT^2$	$\Delta H^{\ddagger\ddagger} = 25.5$
$E + M \rightleftharpoons EM$	$d \log K_m / d(1/T) = \Delta H / 2.3R$	$\Delta H^- = -5.0$
$EM \rightleftharpoons X^\ddagger$	$d \log k_0 / d(1/T) = (\Delta H^\ddagger + RT) / 2.3RT^2$	$\Delta H^{\ddagger\ddagger} = 62.8$
$E + F \rightleftharpoons E + M$	$\Delta H^\ddagger + \Delta H^{\ddagger\ddagger} - \Delta H^- - \Delta H^{\ddagger\ddagger}$	$\Delta H = -14.7$

第二,可根据  $\log k$  对  $1/T$  的作图推测酶反应的机制。这种作图一般可得到直线,但是,

实际上有时得到的却是折线,产生这种现象的原因多种多样:或由于相变,例如,某些酯酶、蛋白酶催化的反应,这种作图在 $0^{\circ}\text{C}$ 处出现向上弯的情形;或由于酶反应本身由两个或两个以上具有不同温度系数的活性中心平行催化,这样得到的也是向上弯的折线;或者由于酶反应历程中包括两个或两个以上连续的、且具有不同温度系数的环节,这种机制就可能使折线向下弯。也可能由于酶具有两种或多种活性形式,还可能由于酶在不同温度能发生可逆变性,所有这些都可通过配合相应的辅助实验,或测定相应的热力学参数加以判断。值得提到的是, $pK_m$ 对 $1/T$ 作图和 $pK_i$ 对 $1/T$ 作图,同样可能得到直线或折线,因此,也可能对酶的作用机理提供某些有用的信息。

温度影响的第三种应用是它可补充 pH 对酶活性中心结构的研究,这点已在 pH 影响一节中讨论到。

#### 四、酶的热稳定性

化学反应(包括催化反应在内)的活化能为 $8\ 368 \sim 167\ 360\ \text{J/mol}$ 左右,大多为 $50\ 208 \sim 104\ 600\ \text{J/mol}$ ;而蛋白质变性的活化能则高得多,通常达 $167\ 360 \sim 418\ 400\ \text{J/mol}$ ,这主要是由于变性伴随熵值显著升高的缘故,正因为如此,酶在溶液中很容易随温度升高而急剧失效,失效的温度系数从 10 到几百(图 6.23)。

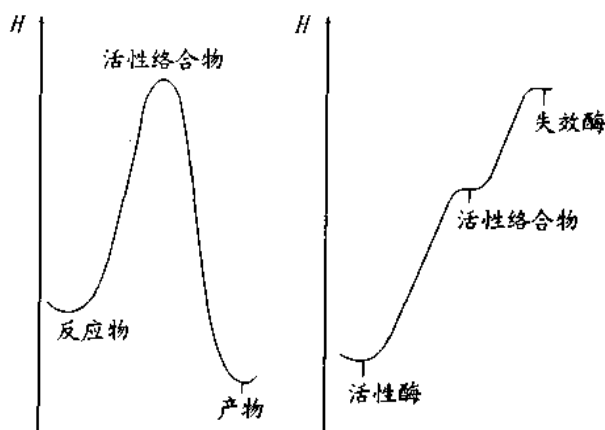


图 6.23 反应活化能与变性活性能

为测定酶的热稳定范围,可先将酶迅速升高至所要检测的温度,保持一定时间后,迅速降温,然后再在某一定温度条件下测定酶的活性。大多数酶在 $55^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 范围内开始失效,而个别酶可耐受 $100^{\circ}\text{C}$ 左右的高温,如腺苷激酶可在酸性 pH 中忍受 $100^{\circ}\text{C}$ 的持续热处理。图 6.24 例示酶活性-温度曲线与酶稳定-温度曲线。

为测定热失效的活化能,可将酶液在特定的温度下保温,然后在不同的时间间隔取样,并在酶稳定的温度条件下测定残存的活力,求出活力下降的速度,如此将不同温度下酶失效速度 $k'$ 的对数相对 $1/T$ 作图,便可测得热失效的活化能。对特定的酶来说,热失效速度与失效活化能一定,故可用于检定同工酶。

酶的热失效速度和溶液的性质密切相关。首先是 pH,对于不同的酶,pH 产生的影响很不相同,一般都有一个稳定的区域(不一定是等电点),在这个区域的两侧,酶失效速度迅速增大;其次是溶液的离子强度、蛋白质浓度以及底物、抑制剂等,它们的存在与否有着显著的

影响。最后,水的含量也是很重要的因素,干的酶制剂通常十分稳定。

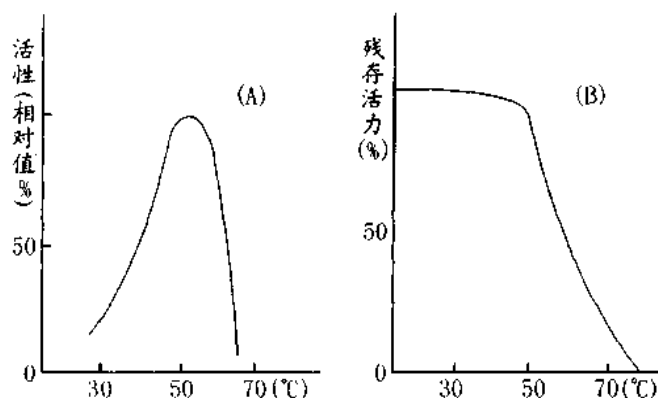


图 6.24 酶活性 - 温度曲线(A); 酶稳定性 - 温度曲线(B)

## 第六节 固定化酶催化反应动力学<sup>(6-7)</sup>

### 一、研究固定化酶反应动力学的意义

研究固定化酶动力学有两方面的意义:

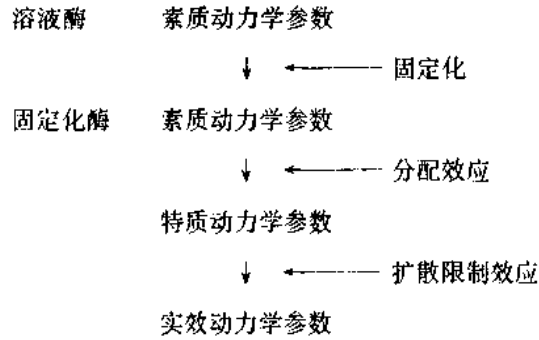
(1) 为了更好地应用固定化酶。固定化酶的应用日益广泛,而酶在固定化以后它的动力学性态和溶液酶显著不同,包括酶的活力、酶反应动力学参数(如  $K_m$  等),以及对 pH、温度、抑制剂等因素影响的反应等,此外还有底物专一性、稳定性等都可能发生很大的变化,所以,为了使固定化酶的潜在优势得以充分发挥,在设计更好的固定化反应系统前,必须对它催化的反应动力学有一个较全面的了解。

(2) 固定化酶是研究酶在体内性态的理想模型。酶在细胞中不是均一地以溶液状态分布的,大多是定位地和相应的细胞器或质膜相结合,处于这种状态下的酶的催化性质和在溶液中的显然不同,为了阐明代谢规律和进行调控,对于细胞中酶的这种“同素异态”特点,需要有一种不同于溶液酶的动力学体系与方法去进行描写、研究,而固定化酶可看作是符合这种要求的理想模型。

### 二、固定化酶的动力学参数和性态

#### 1. 动力学参数

酶促反应的性态通常总要通过各种动力学参数去描写,酶的固定化引起酶反应动力学性态的改变也必然反映在这些参数上,当酶处于溶液状态时,有一组参数来描写它的动力学性态,称为溶液酶的素质动力学参数(intrinsic parameter of soluble enzyme);当酶被固定化后,这些参数就会发生变化,首先跃迁为固定化酶的素质动力学参数(intrinsic parameter of immobilized enzyme)。再由于固定化载体的性质、方法与条件等因素的影响,产生了分配效应、扩散限制效应,素质动力学参数又会改变为特质动力学参数(inherent parameter)与实效动力学参数(effective parameter)。这些参数间的关系如下表。



### 2. 构象改变、屏蔽障碍以及微扰效应

这三种效应是相对独立的,但主要都取决于固定化的条件和方法,也部分地取决于载体的性质。在它们的影响下,溶液酶的素质动力学参数,发生了变化,跃迁为固定化酶的素质动力学参数。但是这种动力学影响很难加以定量分析和概括,通常必须通过实验加以具体测定。

### 3. 分配效应

这是指底物和其他效应物等由于和载体间的静电作用力、亲水和疏水作用力,使得它们在宏观体系与微观反应环境间产生的不等分配。由于固定化酶催化的反应速度取决于这些物质在酶周围微环境内的局部浓度,因此,在分配效应影响下的酶动力学性态,和根据宏观系统的总体浓度所预期的不同,从而,就构成了一组新的特质动力学参数。

(1) 由于荷电载体和荷电溶质间的静电作用力产生的分配效应

分配效应通常用分配系数  $\rho$  (partition coefficient) 来描述:

$$\rho = [C]_i / [C] \quad 6.151$$

$[C]_i$  和  $[C]$  分别表示底物或其他效应物的局部浓度和总体浓度。

根据 Boltzmann 分配定则:

$$\rho = \exp(-Z_e \cdot \phi / k_B \cdot T) \quad 6.152$$

$$[C]_i = [C] \cdot \exp(-Z_e \cdot \phi / k_B \cdot T) \quad 6.153$$

其中:  $\phi$  为静电位,  $Z_e$  为溶质电荷,  $k_B$  为 Boltzmann 常数。可见当载体和溶质具有相同电荷时,  $[C]_i \leq [C]$ ; 反之,当两者间具有相反电荷时,  $[C]_i \geq [C]$ 。

对于底物来说,如果一个固定化酶系统可以排除扩散限制,仅考虑分配效应的影响时,应有:

$$v = \frac{V \cdot [S] \cdot \exp(-Z_e \phi / k_B T)}{K_m + [S] \cdot \exp(-Z_e \phi / k_B T)} \quad 6.154$$

可见,在分配效应影响下,  $K_m$  发生了变化:

$$\begin{aligned} K'_m &= \frac{K_m}{\exp(-Z_e \phi / k_B T)} \\ &= K_m / \rho \end{aligned} \quad 6.155$$

当载体与底物具有相同电荷时,  $K_m$  增大 ( $K'_m > K_m$ ); 反之,带相反电荷时,  $K_m$  减小

( $K'_m < K_m$ )。表 6.11 列举了某些固定化酶的“素质”和“特质” $K_m$ 。

对于抑制剂来说,分配效应对  $K_i$  有类似于对  $K_m$  的影响:

$$K'_i = K_i/\rho \quad 6.156$$

同样,荷电抑制剂对酶反应速度的抑制影响将因载体的荷电性质而加强或减轻。

pH,也和上述情况类似,在静电分配效应下:

$$a_i^{H^+} = a^{H^+} \exp(-e\phi/k_B T) \quad 6.157a$$

$$\begin{aligned} \Delta\text{pH} &= \text{pH}_i - \text{pH} \\ &= 0.43 e\phi/k_B T \end{aligned} \quad 6.157b$$

表 6.11 某些酶反应的“素质” $K_m$  和“特质” $K_m$

酶	载体		底物*		$K'_m(K_m)$ mol/L
	名称	电荷	名称	电荷	
肌酸激酶	-	0	ATP	-	$6.5 \times 10^{-4}$
	$\rho$ -氨基纤维素	0	ATP	-	$8.0 \times 10^{-4}$
	CM-纤维素	-	ATP	-	$7.0 \times 10^{-8}$
胰蛋白酶	-	0	BAA	+	$6.8 \times 10^{-3}$
	顺丁烯二酸-乙烯	-	BAA	+	$2.0 \times 10^{-4}$
胰凝乳蛋白酶	-	0	ATEE	0	$2.7 \times 10^{-4}$
	CM-纤维素	-	ATEE	0	$5.6 \times 10^{-4}$
木瓜蛋白酶	-	0	BAEE	+	$1.9 \times 10^{-2}$
	$\rho$ -氨基-Phe-Leu 共聚物	+	BAEE	+	$1.9 \times 10^{-2}$
无花果蛋白酶	-	0	BAEE	+	$2.0 \times 10^{-2}$
	CM-纤维素	-	BAEE	+	$2.0 \times 10^{-3}$

\* ATP: 腺苷三磷酸; BAA: N-a-苯甲酰-L-精胺酰胺;

BAEE: N-a-苯甲酰-L-精氨酸乙酯; ATEE: 乙酰-L-酪氨酸乙酯

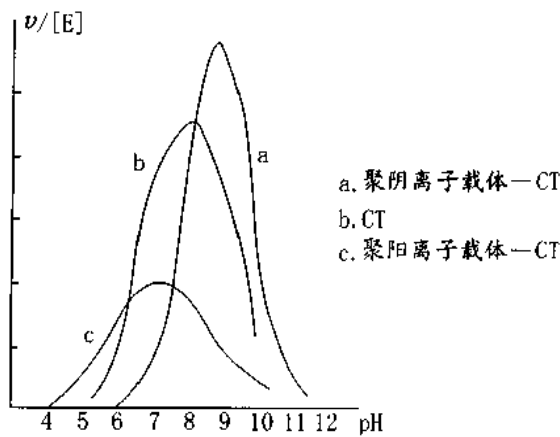


图 6.25 固定化胰凝乳蛋白酶的活性-pH 曲线  
a. 聚阴离子载体 b. 溶液酶 c. 聚阳离子载体

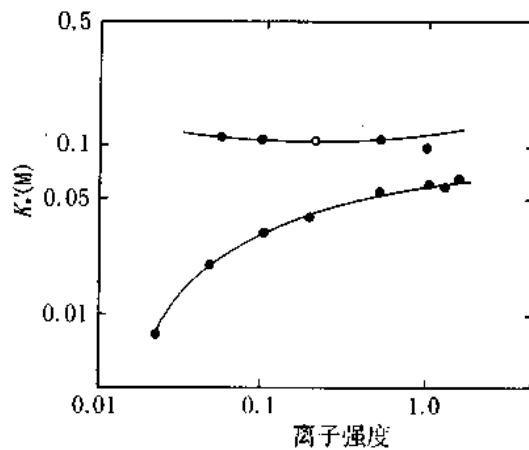


图 6.26 固定化菠萝蛋白酶的  $K'_m$  与离子强度的关系

由式 6.157a 可知,当酶固定于阴离子载体上时,分配效应将使微环境内的  $H^+$  局部浓度高于宏观总体浓度;反之,载体为阳离子时,则低于总体浓度。这种效应的表现结果是,酶的活力 - pH 曲线将分别因载体带有阴电荷或阳电荷而向碱性或酸性方向偏移(图 6.25),偏移范围由式 6.157b 决定。由于同样原因,测得的活性基团的  $pK$  值也将发生偏移。

$$\begin{aligned} \Delta pK &= pK - PK' \\ &= 0.43e\phi/k_B T \end{aligned} \quad 6.158$$

值得指出的是,静电分配效应和介质的离子强度,亦即和总的离子强度有着非常密切的关系,离子强度足够高时,分配效应的影响以及由此产生的偏移可以消除。以菠萝蛋白酶水解 BAEE(N-a-苯甲酰精氨酸乙酯)为例(图 6.26),溶液酶的素质  $K_m$  在相当广泛的离子强度范围内基本保持恒定,当该酶固定化于 CM-纤维素以后,它就具有了自己的特质  $K'_m$ ;不过,这种  $K'_m$  将随着反应体系的离子强度升高而增大,并逐渐趋于素质  $K_m$ 。

#### (2) 由于疏水作用产生的分配效应

至于疏水作用产生的分配效应,其影响规律目前还不能像静电分配效应那样可定量描述,但这种影响是十分肯定的。例如,将马肝醇脱氢酶偶联于丙烯酰胺与甲基丙烯酸共聚体上,其单体丙烯酰胺和甲基丙烯酸可分别看成是亲水与疏水成分。结果表明,改变两者的比例以升高疏水性时,可导致固定化酶作用正丁醇的表观  $K_m$  降低 4 倍。又例如,将  $\beta$ -果糖呋喃糖苷酶偶联于对氨基苯乙烯这一疏水性载体上时,结果表明,非极性的苯胺作用固定化酶时,能使其  $K_i$  降低;相反,具高极性的 Tris,却可使其  $K_i$  升高 3 倍。

#### 4. 扩散限制效应

和溶液酶不同,固定化酶构成的反应体系都有一个底物(或其他效应物)从宏观环境向酶的活性部位运转、产物从催化部位移向宏观体系的问题,即都有一个扩散限制的问题。当扩散速度很低、而酶的催化活性又相当强的时候这种效应特别显著。在扩散限制效应影响下,固定化酶的特质动力学参数也会发生变化,转变为实效动力学参数。在扩散限制效应影响下,酶分子得不到和宏观体系相同水平的底物,故观察到的反应实效速度比理论预期的要低,如果以实效系数  $\eta$  进行定量表示时,则有:

$$\eta = v'/v \quad 6.159$$

$\eta$  是反应实效速度  $v'$  与理论速度  $v$  之比;它是底物浓度的函数,由外扩散与内扩散两种扩散限制因素决定。

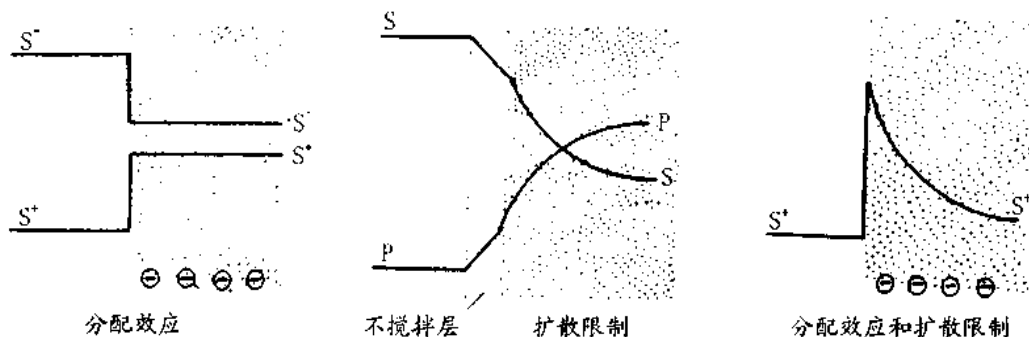


图 6.27 分配效应和扩散限制效应对溶质在固定化酶体系分布的影响



外扩散限制和内扩散限制不同：外扩散限制发生于固定化酶颗粒周围的处于停滞状态的 Nernst 层,是指底物从宏观体系移向酶颗粒表面运转过程中的一种扩散限制效应；而内扩散限制则发生在多孔性的载体内部,是指底物从固定化酶颗粒表面运转到酶活性部位的一种扩散限制效应。对于外扩散来说,由于催化反应是在底物到达酶活性部位以后才进行的,因此,底物在 Nernst 层中呈线性梯度形式的变化；而对内扩散限制来说,由于催化反应与扩散过程几乎是同时发生的,故而底物在多孔解质内形成的是非线性梯度。图 6.27 表示溶质在分配效应与扩散限制效应影响下的浓度变化模式。正因为如此,对这两种扩散限制效应必须用不同的处理方法进行理论分析。

### (1) 外扩散限制效应

在外扩散系统中,整个反应过程实际上包括三个环节：底物从宏观环境移向膜表面；底物转化为产物；产物从膜表面移向宏观环境。

其中底物和产物的转移速度  $J$  (mol/s) 有如下关系：

$$J_s = h_s \cdot ([S]_0 - [S]_i) \quad 6.160$$

$$J_p = h_p \cdot ([P]_i - [P]_0) \quad 6.161$$

$h$  为转移系数,  $([S]_0 - [S]_i)$  或  $([P]_i - [P]_0)$  为相应物质在宏观环境与固定化酶膜表面微观环境中的浓度差,它们分别构成底物或产物转移的推动力。

至于底物在膜表面的酶促转化虽然仍然服从米氏方程,但是在外扩散限制的影响下,其实效反应速度  $v'$  由  $S_i$  决定：

$$v' = \frac{V \cdot [S]_i}{K_m + [S]_i} \quad 6.162$$

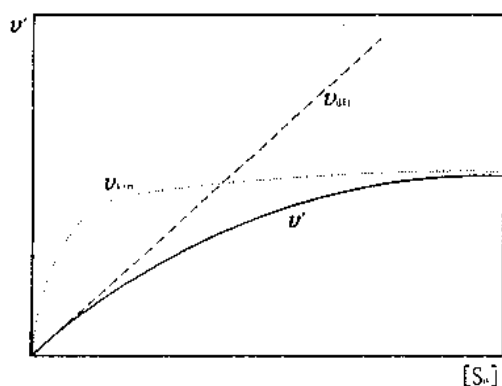


图 6.28  $v'$  与  $v_{kin}$  和  $v_{diff}$

这就是说,实效反应速度由底物的转移速度与酶促转化速度两者共同决定,而且通常由较慢的过程起主要作用。在“极端”情况下,外扩散转移速度非常快,酶促转化速度相对十分小时,微环境与宏观环境的底物浓度相等或接近,则实效反应速度受酶促反应动力学速度 ( $v_{kin}$ ) 控制：

$$v' \approx \frac{V \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} (\approx v_{kin}) \quad 6.163$$

反之,酶反应速度极大,而底物的扩散转移相对很慢时,实效反应速度将受扩散转移速

度( $v_{diff}$ )的限制:

$$v' = h_s \cdot [S]_0 (= v_{diff}) \quad 6.164$$

在上述极端情况之间,实效反应速度同时受这两种因素的限制,图 6.28 概括了它们的关系。

为了对上述关系作较深入的分析,通常要引入两个无因次参数:相对底物浓度  $\beta$  和底物模量  $\mu$ 。

$$\beta = [S]/K_m; \mu = V/(K_m \cdot h_s) \quad 6.165$$

$V/K_m$  是一级反应速度常数,因此,  $\mu$  实际上就是酶促转化速度与底物扩散转移速度之比,它可用来表示扩散限制效应的大小。

在恒态时:

$$h_s([S]_0 - [S]_i) = \frac{V \cdot [S]_i}{K_m + [S]_i} \quad 6.166$$

$$\beta_0 - \beta_i = \mu \cdot \frac{\beta_i}{1 + \beta_i} \quad 6.167$$

$$v' = \frac{V \cdot [S]_i}{K_m + [S]_i} \quad 6.162$$

$$\frac{v'}{V} = \frac{\beta_i}{1 + \beta_i} \quad 6.168$$

$\beta_i$ 、 $\beta_0$  和  $\mu$  之间具有复杂的函数关系式(6.167),故  $v'/V$  对  $\beta_i$  难以表达成直接简便的函数关系;但是如果将  $v'/V$  对  $\beta_i$  作图,一般可得图 6.29 所示的图形。可看出:①  $\mu$  可明显地改变  $v'/V$  对  $\beta_i$  的关系;②  $\mu < 0.1$  时,上述关系和无扩散限制系统者相似,反应仅由酶促转化速度控制,图形为矩形双曲线; $\mu$  增大,图形逐渐偏离正常; $\mu$  很大时,例如,  $\mu \geq 100$ , 反应速度由扩散速度决定,并线性地比例于  $\beta_0$ 。

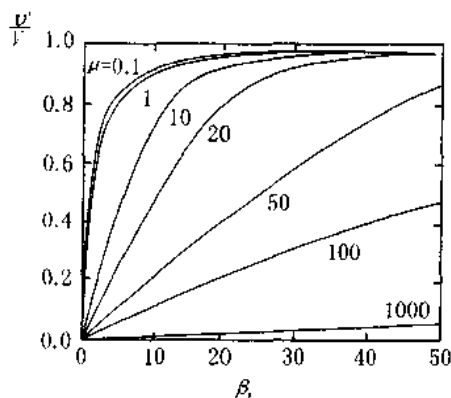


图 6.29  $v'/V$  相对  $\beta_0$  作图

扩散限制效应可看作是一种抑制效应,即扩散抑制。抑制程度和实效系数  $\eta$  成反比。实效系数是  $\mu$  和  $\beta_0$  等的复杂函数。但当  $\mu$  十分大或  $\beta_0$  很小时,由于膜表面环境中的  $\beta_i$  很低,反应接近一级反应,此时  $\eta$  趋于极限值  $\epsilon$ :

$$n \Rightarrow \epsilon = \frac{1}{1 + \mu} \quad 6.169$$

将  $\eta$  对  $\mu$  作图(图 6.30), 图形表明在较高的  $\mu$  区段, 可以获得线性线段, 而在这个范围内, 反应实际上受扩散控制, 扩散抑制随  $\mu$  而比例地增大。

某些情况下, 扩散抑制与化学抑制同时存在, 以非竞争性抑制剂为例:

$$v'_i = \frac{V \cdot [S]_i}{(1 + [I]/K_i)(K_m + [S]_i)} \quad 6.170$$

$$= \eta_i \left( \frac{V \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} \right)$$

$S_i$  由下式决定:

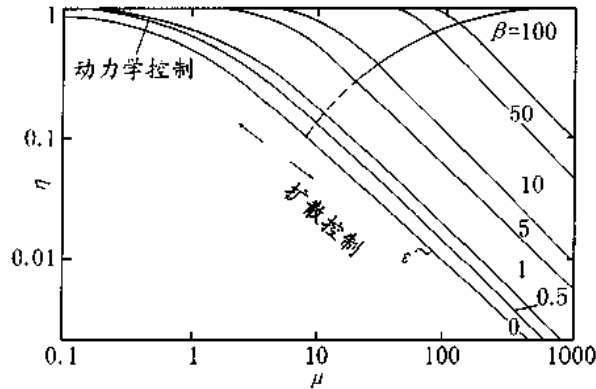


图 6.30  $\eta$  和  $\mu$  的关系

$$\beta_0 - \beta_i = \frac{\mu\beta_i}{(1 + [I]/K_i)(1 + \beta_i)} \quad 6.171$$

$$= \frac{\mu_i\beta_i}{1 + \beta_i}$$

在无扩散抑制时,  $\eta_i$  等于  $1/(1 + [I]/K_i)$ ; 反之, 无化学抑制时,  $\eta_i$  等于  $\eta$ ; 两者同时存在时,  $\eta_i$  是  $\mu$  与  $[I]/K_i$  的复杂函数。如果在恒定的  $\beta_0$  条件下, 将  $\eta_i$  对  $[I]/K_i$  作图(图 6.31), 则可以看到:

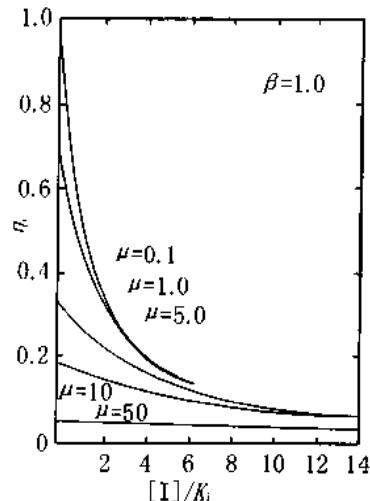


图 6.31  $\eta_i$  与  $[I]/K_i$  和  $\mu$  的关系

(1)  $\mu \leq 0.1$  时,  $\eta_i$  仅依赖于  $[I]/K_i$ , 即酶反应速度;

(2)  $\mu > 0.1$  时, 扩散抑制增强; 相对任何  $[I]/K_i$  值来说, 随着  $\mu$  增大,  $\eta_i$  (酶反应速度) 降低也愈显著;

(3)  $\mu \geq 50$  时,  $\eta_i$  (酶反应速度) 与  $[I]/K_i$  变化无关, 即  $\mu$  很大时, 扩散抑制超过并掩盖化学抑制。

上述规律同样适用于竞争性和反竞争性抑制。

## (2) 内扩散限制效应

和外扩散不同, 内扩散过程和酶反应过程是同时进行的, 即底物在转移过程逐渐消耗, 因此, 固定化酶颗粒中, 单位载体体积内底物浓度的改变速度将直接依赖于底物在载体内的扩散速度与酶反应速度:

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = \left( \frac{\partial[S]}{\partial t_{\text{diff}}} \right) + \left( \frac{\partial[S]}{\partial t_{\text{kin}}} \right) \quad 6.172$$

根据 Fick 扩散定律和米氏方程应有:

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = D'_s \left( \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} \right) - \frac{V''[S]}{K_m + [S]} \quad 6.173$$

$D'_s$  为实效的底物局部扩散系数,  $V''$  为局部体积内的  $V$ , 它和局部酶浓度有关。恒态时,  $\partial[S]/\partial t = 0$ , 因此式 6.174 可写成:

$$D'_s \left( \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} \right) = \frac{V''[S]}{K_m + [S]} \quad 6.174$$

写成无因次参数形式时:

$$\frac{d^2\beta}{dl^2} = \Phi^2 \left( \frac{\beta_i}{1 + \beta_i} \right) \quad 6.175$$

$$l = \frac{X}{L} \text{ 或 } \frac{X}{R} \quad 6.176$$

$$\phi = \left( \frac{V''}{K_m \cdot D'_s} \right)^{1/2} \text{ 或 } = \frac{R}{3} \left( \frac{V''}{K_m \cdot D'_s} \right)^{1/2} \quad 6.177$$

其中,  $L(R)$ ,  $x$ ,  $l$ , 与  $\phi$  分别为膜厚度或颗粒半径, 内伸距离, 无因次内伸距和内扩散底物模量。

在不考虑外扩散时,  $l$  与  $\beta_i$  的关系受  $\phi$  影响:

① 对任意确定的  $l$  来说,  $\beta_i$  随  $\phi$  升高而降低;

② 在膜内或颗粒内底物浓度下降的陡度随  $\phi$  升高而增大; 当  $\phi$  非常大时, 膜内或颗粒内将完全没有底物; 这相当于, 在  $\phi$  极大时, 参与催化的酶层厚度减小。

图 6.32 为不同  $\phi$  条件下, 实效反应速度相对不同底物浓度的作图。

可以看出:

①  $\phi \leq 1$  时, 反应基本上由动力学控制;

②  $\phi$  升高, 由于  $\beta_i$  降低, 反应速度下降;

③ 和外扩散比较,  $\phi$  升高对反应速度产生的影响比  $\mu$  升高带来的影响显著; 但各曲线仍然保持双曲线形状。

和外扩散限制类似,  $\eta$  和  $\beta$  与  $\phi$  具有复杂的函数关系, 而且  $\phi$  很高,  $\beta_0$  很低时,  $\eta$  同样将趋于一极限值:

$$\eta \Rightarrow \epsilon = \tanh \phi / \phi$$

6.178

关于内扩散抑制与化学抑制同时存在时对酶反应动力学的影响,和外扩散抑制很相似。从  $\eta_i$  对  $[I]/K_i$  作图可知:

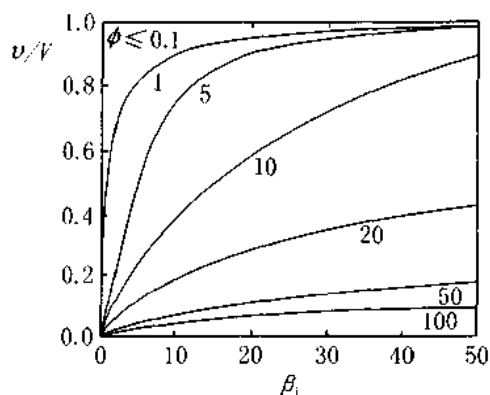


图 6.32  $v/V$  相对的作图

- ① 在  $\phi \leq 0.1$  时,酶反应主要取决于  $[I]/K_i$ ;
- ② 在  $\phi > 1$  时,酶反应速度不仅随  $[I]/K_i$  增大而降低,同时,也显著地受  $\phi$  的影响;
- ③ 和外扩散抑制不同,即使  $\phi$  很高,反应速度也仍因抑制剂浓度升高而降低,这是因为:

$$\phi_i = \frac{\phi}{(1 + [I]/K_i)^{1/2}} \quad 6.179$$

### (3) 扩散限制效应的判断

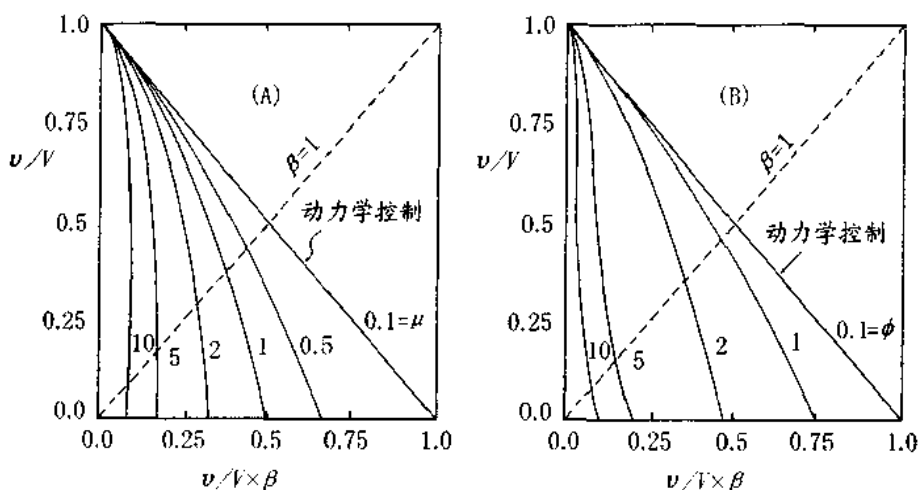


图 6.33 外扩散限制效应(A)与内扩散限制效应(B)影响下的 Eadie-Hofstee 作图

判别扩散限制效应有以下几种方法:

- ① 直接法,如果固定化酶的实效反应速度随溶液的混合程度或者溶液通过反应器的流速而改变,那么说明外扩散限制效应在起作用;如果实效反应速度因酶膜厚度或颗粒的直径

而改变,则应估计为内扩散限制的影响。

② Eadie - Hofstee 作图法,在扩散限制效应影响下,这种作图法得到的动力学图形明显地偏离线性,其中,外扩散限制使曲线上弯成为拱形,而内扩散限制使之成为 S 形(图 6.33)。

③ Arrhenius 作图法,如果反应受动力学控制,那么在低的温度条件下,测得的是“素质”活化能;如果存在着内扩散限制,那么在中等温度条件测得的活化能只有素质活化能的1/2;如果有外扩散限制,那么在高的温度条件下测得的表现活化能将等于 0(图 6.34)。

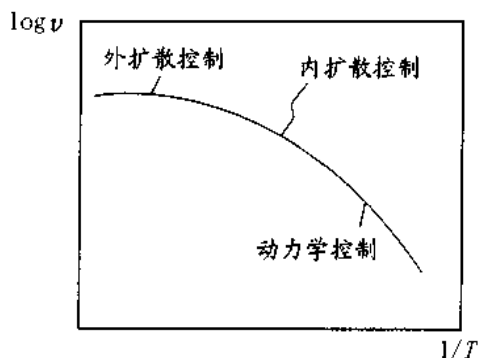


图 6.34 外扩散限制与内扩散限制效应影响下的 Arrhenius 作图

#### (4) 扩散限制效应的特性值

为了较全面地描述扩散效应,通常应测定下列特性数值:  $K_m$  (mol/L)、 $V''$  (mol/(cm<sup>2</sup>·s))、 $D_s$  (cm<sup>2</sup>/s)、 $D'_s$  (cm<sup>2</sup>/s)、界面厚度  $\delta$  ( $\mu$ m)、酶层厚度  $L$  ( $\mu$ m)、底物模量  $\phi$  和  $\mu$ 、一级反应实效系数  $\epsilon$ , 扩散效应影响下的表观极限米氏常数  $K$  和  $Biot$  数 ( $Bi$ ) 等。

在扩散限制效应下,固定化酶的动力学关系往往显著偏离米氏方程,故难以求得真正的  $K_m$ ,但可测定“最大”速度一半时的  $[S]$ ; 同时也可测定一级反应速度常数  $k'$  和相应的  $K$ 。

$$k' = V/K \quad 6.180$$

通过这两个参数和特质  $K_m$  的比较,可对扩散效应的大小作出定量的估计。

通过  $K$  还可求得相应的底物模量  $\phi$  和  $\mu$ , 它们分别表示内扩散与外扩散限制效应的大小,它们的关系是:

$$K \left( = \frac{K_m}{\epsilon} \right) = \frac{K_m \cdot \phi}{\tanh \phi} \quad 6.181$$

$$K \left( = \frac{K_m}{\epsilon} \right) = K_m (1 + \mu) \quad 6.182$$

当它们  $\leq 0.1$  时,相应的扩散限制可以忽略不计。

$Bi$  称为  $Biot$  数,表示内扩散限制与外扩散效应的相对大小。

$$Bi(\beta_0 - \beta_s) = - \left( \frac{d\beta_l}{dl} \right) \quad (l = 0) \quad 6.183$$

$$\beta_s = \left( [S] - \frac{v'}{h_s} \right) / K_m \quad 6.184$$

## 第七节 含水有机溶剂介质系统中的酶促反应性态<sup>(8-11)</sup>

通常情况下,大多数酶的工业应用反应都是在水溶液中进行的,而且,一般认为,也只有在水溶液中酶才能维持其正常的活性构象,有机溶剂只能使其变性失效。这一观点大体说来是正确的,在酶分子中的确包含了各种维持其活性构象的非共价作用力,其中,水对酶的催化起着不可或缺的作用。但是,近年来的实验结果表明,只要保证固定在酶分子表面、起维护其活性构象作用所必需的基本水分子外,其他大部分的水都可被有机溶剂取代而不会影响酶的活性,也就是说,酶在含水有机溶剂中同样能显示活性,而且,酶在含水有机溶剂系统中,活性或者在水溶液者相近,或者甚至高出在水溶液中的活性,表现出“超活性(super activity)”。

研究和开发含水有机溶剂介质系统中的酶促反应可能为酶在工业生化中的应用拓展更为广阔的前景,因为在有机溶剂系统存在下进行的酶反应具有一些在水溶液中所没有的优点:① 有利于疏水物质参加的反应,便于底物专一性的控制;② 能推动反应平衡向所需要的方向移动,同时又可减少由水引起的水解等副反应;③ 能减少微生物污染,某些情况下还有助于酶稳定性的提高。

含水有机溶剂系统进行的酶促反应也可看作为酶在细胞中的作用模型,因为:① 在活细胞中酶多集中于水和有机溶剂的界面,而且常以多酶复合物形式存在;② 近年来关于生物膜的流动相嵌模型又有了新的认识,即生物膜是一种动态结构,可能以各种结构形式存在,酶位于其中,动力学性态必然有所差别。因此,研究含水有机介质条件下的反应动力学性态就有它的重要意义了。

为了了解酶在有机介质中的性态,下面就某些问题作一初步讨论:

### 1. 水的作用

酶在无水的溶剂中不表现活性,但也不引起变性;加水后可能使反应加速,说明水对酶的催化起着十分重要的作用。那么,酶表现催化活性究竟需要多少水分?这个问题常因酶而异,可从几个水分子到几百个,甚至上千个水分子,一般认为,酶分子的水合大致包括如下几个过程:

- (1) 水分子首先和酶分子表面的带电基团结合;
- (2) 水分子和酶分子表面的极性基团结合;
- (3) 水分子凝聚于蛋白质分子的表面,以较弱的作用力和酶分子结合;
- (4) 酶分子表面完全水合。

其中酶分子表面带电基团和部分极性基团的水合是酶催化活性的必要条件,而在非水系统中,由于酶分子的带电基团和极性基团的相互作用可能形成非活性的封闭结构,因此不表现催化活性。水的作用是作为润滑剂,增大酶分子的柔顺性,并以非共价作用力维系形成的活性结构,这部分水称为“必需水”(essential water)。

衡量含水有机溶剂系统中水的参数通常采用水活度(water activity),这是指在一定的温度、压力下,系统中的水蒸气压与纯水蒸气压之比;它可通过平衡系统中气体的相对湿度求得。

## 2. 有机溶剂的影响

在含水有机溶剂介质系统中,有机溶剂可能从三方面影响酶的催化活性:

(1) 有机溶剂能通过直接和酶作用抑制酶或导致酶失效,也就是通过破坏氢键和疏水键,改变蛋白质的天然构象,降低酶的活性和稳定性。

(2) 有机溶剂也可能通过和底物或产物相互作用而影响酶的活性,例如,氯仿就能降低过氧化物酶催化的酚氧化。

(3) 有机溶剂还可能直接作用酶分子邻近的必需水分子,间接影响酶的催化作用,特别是高极性的溶剂能溶解大量的水,从酶分子上剥夺(strip)必需的水层。在这一方面,疏水溶剂的作用小些,不大可能移去酶结合的水,因而也不大会导致酶的失效。辣根过氧化物酶在各种溶剂中催化对氨基苯甲醚氧化可说明这一点(表 6.12)。

表 6.12 辣根过氧化物酶在各种有机溶剂中催化对氨基苯甲醚的氧化

溶 剂	反应速度 $\mu\text{ mol}/(\text{mg 酶}\cdot\text{min})$	溶 剂	反应速度 $\mu\text{ mol}/(\text{mg 酶}\cdot\text{min})$
甲苯	60	乙酸乙酯	45
苯	54	丁酸乙酯	62
己烷	75	二乙醚	105
环己烷	75	丁酮	23
十六烷	75	二氧杂环己烷	0
氯仿	9.6	二氧杂环己烷 + 5%缓冲液	7.5
甲醇	0	二氧杂环己烷 + 15%缓冲液	33
二甲亚砜	0	二氧杂环己烷 + 30%缓冲液	129

有机溶剂的这些影响对大多数酶来说都普遍存在,但是也有某些例外,譬如,猪胰的脂肪酶等在无水的吡啶中,甚至在能与水相混溶的溶剂中也保持其结合水,显示相当的活性。

现在的问题是,对于一给定的反应而言,究竟应怎样选择适宜的溶剂?

(1) 溶剂的相容性(compatibility)。这对于底物和产物特别重要,例如,糖仅能溶于极性溶剂,如吡啶或二甲基甲酰胺,并在其中进行反应,对以糖为底物的酶反应不宜选用疏水溶剂。对于产物同样有着相容性问题,有时甚至更为重要,例如,在己烷中进行多酚氧化酶反应,产生的是极性的醌类物质,它们不溶于己烷,而在酶周围的水层中聚合,抑制酶的活性或使酶失效;反之,在极性的有机溶剂中则没有类似的问题。

(2) 溶剂必须是惰性的,否则会干扰平衡,例如在酯类或醇类溶剂中进行转酯反应,就可能产生一些不必要的副反应。

(3) 其他应考虑的因素还有:粘度、密度、表面张力、毒性、成本等。

为了便于选择适宜的溶剂,许多人根据溶剂的物理化学特征和对酶活性的影响提出了各种模式。例如,Brink 和 Tramper 根据 Hildebrand 溶解性参数提出了丙烯的环氧化模式,认为低极性和高相对分子质量(>200D)的溶剂有利于催化活性的保持。

类似地,Laane 等还建立了溶剂疏水性对酶活性影响的定量关系式,该模式定义了一个参数  $\log P$ ,其中,  $P$  为溶剂在水和 1-辛醇构成的两相系统间的分配比,即:

$$P = \frac{[\text{溶剂}]_{\text{辛醇}}}{[\text{溶剂}]_{\text{水}}} \quad 6.185$$



如果溶剂的  $\log P$  高, 则它将有利于酶活性的发挥, 像葵醇、十六烷和苯二甲酸酯, 其  $\log P$  值大于 4, 对丙烯的环氧化有利; 反之, 短链醇、与水相混溶的溶剂、短链酯和醚等, 其  $\log P$  低于 2, 对酶发挥作用不利。这种相关性与溶剂的相对分子质量无关。

$\log P$  值很容易通过疏水片段常数计算出来。

Laane 等关系式与亲水溶剂能剥夺酶分子上的水的理论一致, 但是, 不能解释为什么猪胰脂肪酶在亲水的吡啶溶剂中具有极高的催化活性。类似的还有枯草杆菌蛋白酶、辣根过氧化物酶等, 它们在亲水溶剂中都显示高活性。为此, 人们又提出了各种修正式, 如:

$$\log P_{\text{修正}} = (1 - X)\log P_{\text{溶剂}} + X \log P_{\text{水}} \quad 6.186$$

$X$  是水溶解度的摩尔百分比。例如, 在 2% ( $v/v$ ) 的水 ( $X = 0.1$ ) 存在情况下, 相应的  $\log P$  的校正值为 0.36, 它虽然能很好地解释许多有机溶剂, 如乙酸乙酯和二乙醚等存在下的酶活性, 但仍然无法解释能与水相混溶的溶剂的情况。

值得注意的是, 应对酶活性的影响和对酶稳定性的影响区别开来, 例如, 将酶放置于有机溶剂中数小时以后再进行测定, 这样得到的结果应该是对酶稳定性的影响, 而不是对酶活性的影响, 所以, 最好是测定对素质动力学常数的影响。

### 3. 几种含水有机溶剂体系

含水有机溶剂介质体系归纳起来大致可分为以下几类:

- (1) 含有少量能与水相混溶的有机溶剂的(单相)水溶液体系;
- (2) 水与有机溶剂构成的两相系统(biphasic aqueous - organic system, or two - liquid - system), 其中包括水 - 非极性有机溶剂 - 表面活性剂三者共同构成的反相微胶束(reverse micellar solution)系统, 在这一节中我们也将主要讨论它;
- (3) 接近无水的单相有机溶剂系统(monophasic organic solvent)。

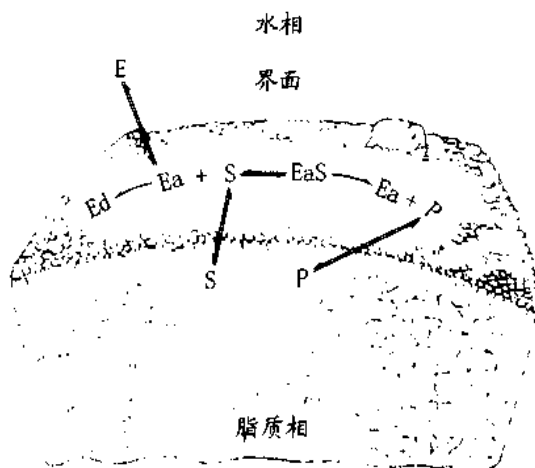


图 6.35 脂肪在水 - 疏水溶剂系统界面上的酶促水解示意图

最初应用含水有机溶剂系统进行的酶反应报道是在 70 年代中期, 当时使用的是能和水相混溶的极性有机溶剂, 如甲醇、二氧杂环己烷、二甲亚砜、二甲基甲酰胺和丙酮等, 由于它们能和水很好地混合, 故和蛋白质的相互作用能力很强, 易导致酶的失效, 因此, 实验的多是一些稳定的水解酶, 它们用在大量亲水有机溶剂存在的情况下也能保持足够高的活性, 如胰

凝乳蛋白酶、胰蛋白酶等。使用亲水溶剂的另一问题是反应产物的分离,所以 70 年代后期就开始应用含水的、与水不相混溶的疏水溶剂系统进行实验。

水和疏水溶剂构成的两相系统存在着两个问题:第一,疏水溶剂易和酶的疏水基发生作用,导致酶的失效,故这方面最初的报道是直接使用菌体进行水不溶性物质的氧化,例如,用 *Nocardia sp.* 菌体在甲苯或  $\text{CCl}_4$  中将胆固醇氧化为 4-烯-3-胆甾烯酮。又如,用 *Pseudomonas oleovorans* 在环己烷(20%)和水形成的两相系统中培养,结果 90% 的 1,7-辛二烯转化为环氧化物;在培养过程中,菌体存在水中,而生成的环氧化物进入有机溶剂,所以,产物的收得率可达水中的 5 倍。第二,反应物和产物的运转扩散限制问题。以脂肪酶为例,在这种系统中,酶溶于水,而底物不溶于水,所以,反应是在水相与有机相的界面上进行的。如图 6.35 所示,作为该酶底物的三甘油酯或胆固醇酯的脂肪滴,其表面覆盖着两亲性的磷脂和蛋白质层,构成和水相分隔的界面;这一层相对整个系统言虽然可以忽略,但在脂肪水解的调节上起着重要的作用。反应进行时,存在于水相的酶必须先和底物结合,因而,酶从水相移向界面的速度成了控制整个反应速度的律速环节。

在解决酶的稳定性问题方面人们首先考虑的是酶的固定化,由于酶在固定化以后,酶的稳定性一般有所升高,因此,在 70 年代后期人们开展了固定化酶在含水有机溶剂双相系统的应用。

以聚乙二醇(PEG-)修饰的酶为例,聚乙二醇是一种既亲水又疏水的合成高分子,它能和蛋白质分子表面的氨基结合修饰酶,这种修饰酶既可溶于水,也可溶于有机溶剂。PEG-修饰酶的特点是:这种高分子修饰通常不影响酶的活性,某些情况下,还可能表现超活性;能消除免疫原性和抗原性;还可避开蛋白酶的作用,因此,可作为有前途的新型药物制剂。

PEG-脂肪酶可以溶解于苯、甲苯等芳香族碳氢化合物和  $\text{CCl}_4$  等有机溶剂中,例如,用溶解于苯中的 PEG-脂肪酶可催化甘油单、二或三酯的合成。

在解决含水-有机溶剂双相系统中的酶失效和反应物与产物的运转问题方面,除了使用固定化酶外,另一种办法就是应用对水和有机溶剂都具有相溶性的两亲性表面活性剂。在这种情况下,水、有机溶剂与表面活性剂能很好地有机融合在一起,形成各种胶束、微团或者片层结构。图 6.36 是 AOT/水/异辛烷(25℃)构成的相图。

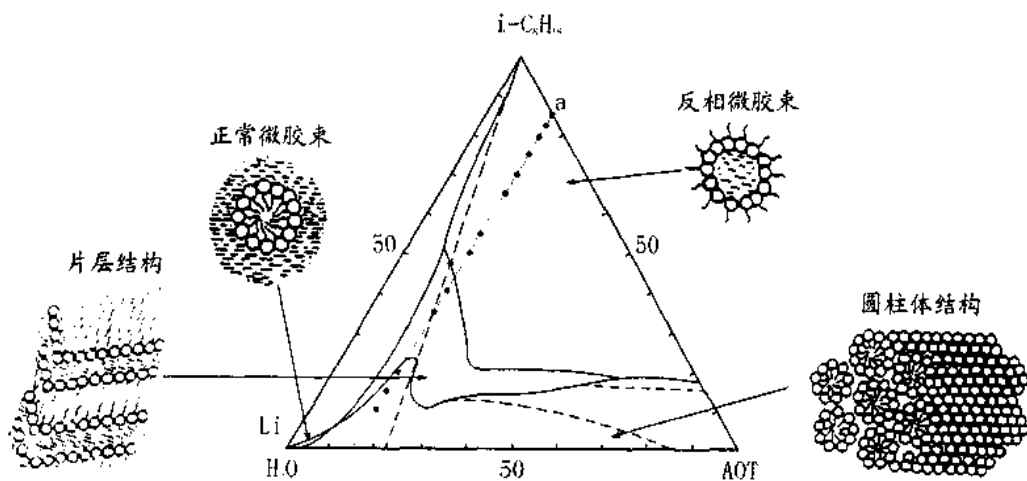


图 6.36 气溶胶 OT/水/异辛烷组成的相图

在表面活性剂中,现在常用的是阴离子型的气溶胶 AOT(Aerosol OT),即二(2-乙基己基)琥珀酰磺酸钠(bis(2-ethylhexyl)sodium sulfosuccinat)。而在三种物质混合后形成的各种系统中,反相胶束结构,也称反相微团结构(reverse micellar solution)最受人们注意。图 6.37 是 AOT 及水、有机溶剂形成的反相微胶束。

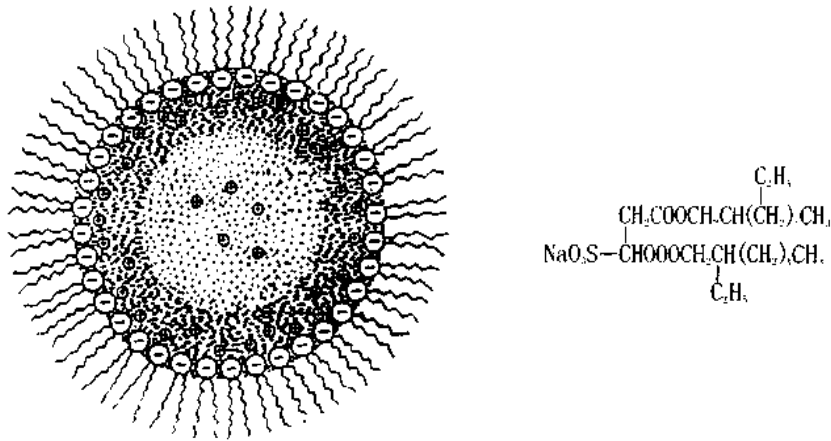


图 6.37 AOT(右)及其与水、有机溶剂形成的反相胶束(左)

反相微胶束或反相微团有着球形的结构,其中心部分包含一定量的水,形成一个“水库(water pool)”,酶溶解其中,并在那里进行催化反应。水库中的水以两种状态存在,其一是 AOT 通过其离子与偶极子的相互作用将水分子束缚在其周围的结合水;另一是在水库中心的“自由水”,它们和“宏观”系统中的水相同;这两种状态的水能不断地迅速进行交换。水库中水的含量以  $w_0 = [H_2O]/[AOT]$  表示,水含量增加,自由水的比例升高,AOT 分子的运动可能性也增大,但保持着反相微胶束的球形结构。

水库中水的物理化学性质取决于  $w_0$ ,例如,水库中水的黏度随  $w_0$  的减少而显著地上升,而水库内的 pH 则不一定均一。

在反相微胶束中,酶的活性与在水溶液中者有着某些不同,例如,  $\alpha$ -胰凝乳蛋白在 AOT-辛烷形成的反相微胶束中能催化 N-乙酰基-L-色氨酸甲酯水解,其反应的最适 pH 和水溶液者相比大约向碱侧偏移了 1.5 个单位,其原因可能是由于酶的活性中心的 pK 值发生了变化。再如,细胞色素 c 和  $c_3$ ,在反相微胶束中虽然仍能保持电子传递功能,但其活性随温度降低而下降。同时,在水库中的水即使达到  $-40^\circ\text{C}$  也不会冻结,并保持其中的酶活性,如  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶在 AOT-辛醇-水构成的反相微胶束中甚至可保存 2 年以上。

在反相胶束中酶反应可能有两种情况,其一是酶和底物仅存在于水相,而产物为脂溶性,这种情况下,反应速度由产物通过反相微胶束界面从水相进入有机相的速度决定,移动速度大时,产物不会在反相微胶束内积累,不易达到平衡状态,因此,反应效率高;反之,由于产物积累,系统易进入平衡,反应效率不可能很高。另一种情况是,底物和产物都是脂溶性的,这种情况下,反应主要由底物从有机相移向水相的速度决定。以辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)为例,该酶对氧化剂的专一性很高,如过氧化氢;对还原剂的专一性较低,如水溶性的氢醌或脂溶性的甲酚。

动力学处理表明 HRP 服从米氏方程,

$$v = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [\text{E}] \cdot [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

在 AOT-辛醇-水形成的反相微胶束体系中,HRP 作用氢醌的动力学参数取决于含水量  $w_0$ ,  $k_{\text{cat}}$  随  $w_0$  值的减小而增加,而  $K_m$  却相反,随  $w_0$  值的增大而降低;在水溶液中,这两个参数各为  $1.43 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  和  $7.81 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ,而在反相微胶束的系统中,该速度常数随  $w_0$  值的增加都逐渐接近水溶液者。

反之,HRP 作用对甲酚的动力学参数,  $k_{\text{cat}}$  和  $K_m$  都随  $w_0$  的增加而减小,在水溶液中  $k_{\text{cat}} = 648 \text{ s}^{-1}$  和  $K_m = 3.68 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ;但在反相胶束中,  $k_{\text{cat}}$  比水溶液者小很多,而  $K_m$  则非常小。

在以上的讨论中,仅考虑有机相只起底物或产物的贮存场所作用,但实际上它们是参于反应过程的,仍以氢醌为底物,这种情况下有:

$$v' = \frac{k'_{\text{cat}}[\text{E}][\text{S}']}{K'_m + [\text{S}']} \quad 6.187$$

上标表示水库中的各值。如果将有机相的体积和水相的体积分别以  $V_b$  和  $V_w$  表示,同时,如果  $R = V_w/(V_b + V_w)$ ,则有:

$$v' = v/R, [\text{E}]' = [\text{E}]/R, [\text{S}]' = [\text{S}]/R$$

代入式 6.188 后,应有:

$$\frac{1}{v} = \frac{R K'_m}{k'_{\text{cat}}[\text{E}][\text{S}]} + \frac{1}{k'_{\text{cat}}[\text{E}]}$$

如果  $1/v$  对  $1/[\text{S}]$  作图,可得相当于 Lineweaver - Burk 图形,并有:

$$k'_{\text{cat}} = k_{\text{cat}}; \quad K'_m = K_m/R$$

如再将  $k'_{\text{cat}}$  和  $K'_m$  对  $w_0$  作图,则  $k'_{\text{cat}}$  和  $k_{\text{cat}}$  虽然同样,但是  $K'_m$  却随  $w_0$  的减小而增大,甚至可达水溶液中的 20 倍左右,和仅将水库看作底物和产物贮存场所的结果比较,有相反的倾向。

有人也通过圆二色性(CD)谱等检测了各种酶在反相微胶束中的构象状况,在 190 ~ 230 nm 范围内观察到椭圆率的变化,说明蛋白的高级结构有了改变。

酶的性态在含水有机溶剂系统中的确有着明显不同,但目前尚很难用某种关系式加以概括和表达。

以上概要地讨论了溶液酶、固定化酶和酶在含水有机溶剂相中的反应动力学,它们是酶分析、酶反应器设计、酶作用原理以及酶生物学研究的重要基础和手段,在以后几章将讨论它们的某些应用。

## 参 考 文 献

### 一、酶反应动力学体系

- (1) Engle PC. Enzyme Kinetics, 2nd ed.. London: Chapman and Hall, 1981
- (2) Daniel LP. Enzyme Kinetics and Mechanism. San Diego: Acad Press, 1995
- (3) Cunningham MA, Bash PA. *Biochimie*, 1997, **79(11)**:687

## 二、酶(促)反应基本动力学关系

(4) Heinrich R, Schuster S & Holzhutter HG. *Eur. J. Biochem.*, 1991, **20**(1):1

(5) Dinos GP, Coutsogeorgopoulos C. *J. Enzyme Inhib.*, 1997, **12**(2):79

## 六、固定化酶催化反应动力学

(6) Otero C, Pastor E, Fernangez VM et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1990, **23**(3):237

(7) Cordemil E. *Biol. Res.*, 1996, **29**(1):13

## 七、含水有机溶剂介质系统中的酶促反应性态

(8) Andersson E, Hahn - Hagerdal B. *Biol. Res.*, 1990, **12**(4):242

(9) Kawakami K, Abe T & Yashida K. *Enzymol. Microb. Technol.*, 1992, **14**(5):371

(10) Koskinen MP, Kolibanov Am. *Enzymatic Reaction in Organic Media*. London: Blackie Academic & Professional, 1996

(11) Cabral JM, Aires - Barros MR, Pinheiro H et al. *J. Biotechnol.*, 1997, **59**(1—2):133

## 第七章 酶 分 析<sup>(1-3)</sup>

在生产实践和基础理论研究中往往要进行生化分析,其中一个重要方面就是酶分析(enzyme analysis, or enzymatic analysis)。酶分析包括两种类型:一是以酶为分析对象的分析,即一般所说的“酶活力测定(enzyme assay 或 measurement of velocity)”；二是以酶为分析工具或分析试剂的分析,称为“酶法分析”。前者的目的在于检知体液等生物样品中某种酶的含量或活性;后者则主要用于测定与生物学有关样品中酶以外其他物质的含量。两者检测的目的、对象虽然不同,但原理和方法都是以酶能专一而高效地催化化学反应为基础,通过测定酶反应速度而检知相应物质的含量。不过,值得提到的是如果被测物质为底物时,则除了动力学方法外,也可用总变量测定法来求得。此外,为了获得准确可靠的结果,这两种测定都有一个选择适宜的反应条件和测定方法的问题。

### 第一节 酶活力测定<sup>(4-6)</sup>

酶的含量和活性水平可通过测定特定系统的酶(促)反应速度而检知。在进行这种测定时可采用两种方式:一是测定完成一定量反应需要的时间;二是测定单位时间内的酶促反应量。前者通常称为终点法,后者称为动力学法。

#### 一、终点法

终点法,也称消色点法(achromic procedure),它是指在确定条件下,让酶作用一定量的底物,然后检测反应系统达到某一指标所需要的时间,并根据时间的长短来估计酶活力的一种方法。例如,工业生产 $\alpha$ -淀粉酶就常采用这种方法进行测定。酶活力常以时间的倒数( $1/t$ )直接表示,也可以其他方式表示。

终点法通常以取样方式进行,也就是在酶和底物混合后,在酶作用的不同时间里,从反应系统中取出部分样品进行检定,然后根据达到某种指标,例如根据某种颜色的消失所需要的时间来确定酶的活性或含量。这种方法的主要缺点是不精确,近于半定量,而且不能观察全过程,因此很少应用。

终点法的一个发展就是采用检测器对反应进行连续跟踪,并在反应达到某一程度时,精确地自动记录所需要的时间,这就是酶分析自动化中的所谓固定浓度法。

终点法的另一发展是做成简便的“酶检测纸片”。以“血清胆碱酯酶检定纸片”为例,在这种纸片上浸有氯化乙酰胆碱和溴麝香草酚,测定时只要将待检血清和纸片在 $37^{\circ}\text{C}$ 一起保温,如有活性的胆碱酯酶,氯化乙酰胆碱就会被水解,生成醋酸,使pH指示剂由深蓝转变为黄绿。根据这种转变所需要的时间可对血清中胆碱酯酶的水平作出估计。

## 二、动力学法

动力学法(kinetics procedure),是酶活力测定最常用的方法。

### 1. 原理

动力学法测定的原理是,在一定的条件下,酶反应速度和酶浓度成正比,因此测定酶反应速度就可求得酶浓度。

### 2. 反应条件

选择反应条件的基本要求是,所有待测定酶分子都能够正常地发挥它的作用。也就是说,反应系统中除了待测定的酶浓度是影响反应速度的唯一因素外,其他因素都应处于最适合酶发挥催化作用的水平。应考虑的因素是:

#### (1) 底物

① 底物的选择。为便于测定,选用的底物(包括人工合成底物)最好在物理化学性质上和产物有所不同。某些酶作用的底物和产物本身就有这种特点,如脱氢酶用的  $\text{NAD(P)H}$  和  $\text{NAD(P)}^+$ 。有的则需要加工成色原或荧光原底物,这种人工合成的底物本身没有颜色或荧光,但在酶作用后就会产生颜色或荧光,如磷酸酯酶测定用的对硝基苯磷酸。

#### ② 选择适宜的测定用底物浓度。

a. 一般地说,为了不使酶反应速度受到底物浓度的限制,反应系统应使用足够高的底物浓度,判别标准是  $K_m$ 。例如,选用的  $[\text{S}] = 100K_m$ ,在这种情况下,酶反应速度可达到最大速度的 99%。大多数酶具有相对的专一性,在可用的各种底物中可选择  $K_m$  小的作测定用。

b. 如果所选用的底物具有下述情况,例如,表现高底物浓度抑制,底物溶解度太小,或者具有毒性,或者较为昂贵而不能使用高浓度,同时又没有其他适宜的底物可以替代时,就只能根据具体的反应选择适当的底物浓度了,但应确定在该浓度条件下酶反应的动力学级别。例如,测定酵母来源的蔗糖酶,由于该酶受高蔗糖浓度的抑制,故一般测定选用 5% 左右的蔗糖浓度,这种情况下,反应为零级;另一方面,测定细胞色素氧化酶时,即使使用  $\geq 130 \mu\text{mol/L}$  的还原型细胞色素 C 为底物,反应仍为一级。如果在的确不能使用高底物浓度的情况下,那么应用小于  $0.1K_m$  的底物浓度,因为,此时反应接近于一级反应,根据动力学,表观的一级反应速度常数  $k' = V/K_m$ ,测出  $k'$  后可换算成最大速度,消去底物浓度的影响。

#### ③ 其他几种值得提到的情况。

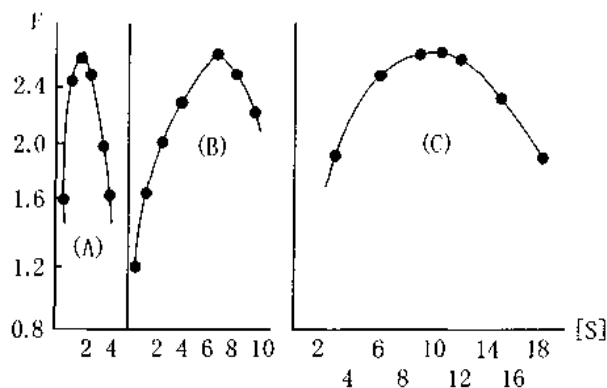
a. 和高底物浓度抑制相关,有些酶反应的  $v$  对  $[\text{S}]$  的图形不是典型的矩形双曲线。例如,血清谷氨酸脱氢酶催化:



参与反应的几种底物的最适浓度范围都很狭窄(图 7.1)。在这种情况下,就应特别注意控制各底物浓度于确定的范围。

b. 某些酶的底物是电解质,其最适浓度常因反应系统的 pH 而不同。例如,碱性磷酸酯酶以对硝基苯磷酸为底物,在 pH 9.8 时,最适浓度为 10 mmol/L;而在 pH 10.0 时,则变为 25 mmol/L。显然,这种情况下就需要根据酶反应的最适 pH 对最适的底物浓度作出相应的处理。

c. 某些酶的底物能自发地分解成干扰性的产物,或者形成其他酶的底物而干扰测定。例如,用草酰乙酸和 NADH 进行苹果酸脱氢酶测定,草酰乙酸在水溶液中不稳定,容易部分脱羧变为丙酮酸,当待测样品中同时包含有乳酸脱氢酶时就会产生干扰。针对这种情况可采取的解决办法有:① 添加专一性的抑制剂;② 采用转氨酶、L-天门冬氨酸和  $\alpha$ -酮戊二酸组成的体系,借以连续恒定地供应适量的草酰乙酸;③ 制备适当的空白。



(A) [NADH]的影响:  $[\alpha\text{-酮戊二酸}] 6.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}; [\text{NH}_4^+] 10.5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}; \text{pH } 8.0$   
 (B)  $[\alpha\text{-酮戊二酸}]$ 的影响:  $[\text{NADH}] 1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}; [\text{NH}_4^+] 10.5 \times 10^{-2} \text{ mol/L}; \text{pH } 8.0$   
 (C)  $[\text{NH}_4^+]$ 的影响:  $[\alpha\text{-酮戊二酸}] 6.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}; [\text{NADH}] 1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}; \text{pH } 8.0$

图 7.1 底物浓度对谷氨酸脱氢酶反应的影响

## (2) pH

①  $\text{H}^+$ 、 $\text{OH}^-$  能对反应体系产生多种影响:或改变酶活性中心的解离状况,升高或者降低酶的活性;或破坏酶的结构与构象导致酶失效;或作用反应系统的其他组成成分;或改变可逆反应进行的方向。例如,乳酸脱氢酶催化的反应在  $\text{pH } 7.0$  时指向乳酸生成,而在  $\text{pH } 10.0$  时倾向于形成丙酮酸。因此,在进行酶活力测定时要注意选择适宜的反应  $\text{pH}$ ,并将反应维持在这个范围内。值得提到的是,酶反应的最适  $\text{pH}$  可能因反应的温度与底物浓度而不同。例如,碱性磷酸酯酶的最适  $\text{pH}$  在  $25^\circ\text{C}$ 、 $30^\circ\text{C}$  和  $37^\circ\text{C}$  时分别为  $10.3$ 、 $10.1$  和  $9.9$ 。

② 酶反应通常总是借助于缓冲系统来控制  $\text{pH}$  的,因而,有一个选择适宜的缓冲离子和离子强度问题。选择缓冲离子应考虑以下几个问题:

a. 选择的离子的  $\text{pK}$  值须接近要调整的  $\text{pH}$ ,因为在这种情况下,缓冲能力最强。例如,磷酸缓冲液和 Tris(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液分别适用于低于和高于  $\text{pH } 7.5$  的反应系统; Gly-Gly(甘氨酸二肽)在  $\text{pH}$  大于  $8.0$  时是出色的缓冲系统,但在低于  $\text{pH } 7.5$  时则几乎无用。

b. 缓冲离子不同,同一酶反应所表现出来的活性水平可能各不相同,甚至最适  $\text{pH}$  也可能发生变化。如图 7.2,该图为 1,6-二磷酸果糖醛缩酶在各种缓冲系统中的活力 -  $\text{pH}$  曲线。虽然这可能是一个较突出的例子,但许多酶反应都或多或少地因缓冲离子组成不同而有所差异。

c. 某些缓冲离子可能与酶活性的某些必要成分形成络合物,从而导致酶活性的抑制。例如,磷酸能与多价阳离子如  $\text{Ca}^{2+}$  等结合;硼酸能与多种有机化合物如呼吸链中间递体结合,从而抑制相应的酶活性。



d. 某些缓冲体系可能因稀释和温度等变化而改变其 pH 值。例如,磷酸缓冲液稀释 10 倍(0.5→0.05 mol/L)时,pH 变化 0.3 单位;Tris 缓冲液在 4℃配制时为 pH 7.0,而在 37℃时变为 pH 5.9( $\Delta pK/\text{℃} = 0.03 \text{ pH}$ )。

e. 缓冲组成体系有时能被反应体系降解破坏。

f. 缓冲组成体系在可见光区与紫外光区(>240 nm)应没有吸收。

g. 价廉易于制备。

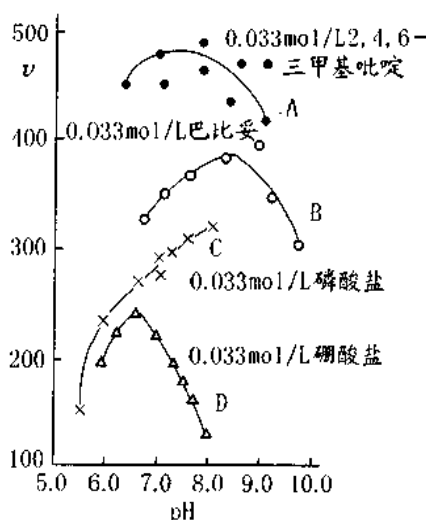


图 7.2 醛缩酶活力 - pH 曲线

③ 缓冲离子强度  $\mu = 0.5 \sum CZ^2$  ( $C$  为缓冲离子的浓度,  $Z$  为其带有的电荷),可能影响反应物的活度系数,是为初级盐效应,也可能影响弱酸、弱碱的解离,是为次级盐效应。因此,在选择离子强度时除了要保证反应体系的 pH 恒定外,也必须考虑到它可能对反应体系及酶本身带来的各种影响。

### (3) 温度

① 酶反应对温度十分敏感,温度既能影响化学反应速度本身,也能影响酶的稳定性,还可能影响酶的构象和酶的催化机制。从酶反应的温度系数来看,温度变化 1℃,反应速度可能相差 10%。为此要得到可以高度重复的结果,保持恒定的温度十分重要,最好控制在  $\pm 0.1\text{℃}$  的变动范围以内。

② 为了能够得到较大的、便于测定的反应速度,同时又要使酶的热失效减少到尽量小,国际生化联合会在 1961 年建议采用 25℃ 为酶反应的测定温度,到 1964 年则建议改为 30℃;国际临床化学联合会也建议采用 30℃。但实际上许多临床化学工作者常采用 37℃ 作为酶反应温度。

### (4) 辅助因子

① 有些酶需要金属离子,有些酶则需要辅酶物质,所以,在进行酶活性测定时,反应系统应该满足酶对这些辅助因子的需要,并注意它们的专一性、以及某些活化剂在高浓度时可能产生的抑制作用。

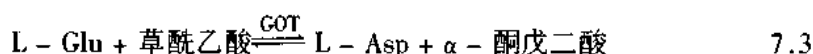
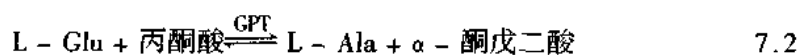
② 为了提高酶在反应系统中的稳定性,有时还需要加入某些相应的物质。例如,对巯基酶可加入二巯基乙醇、二巯基苏糖醇(DTT)等。

③ 在制备样品和反应过程中为了避免待测酶遭受蛋白酶的降解,往往需要加入蛋白酶的抑制剂,如 PMSF 等。有时也应考虑到某些酶的应用特点,在酶反应系统中最好同时包含应用时可能产生影响的因素。例如,在检定加酶洗涤剂中的酶活力时,反应系统中可加入适量的多聚磷酸钠等,它们是洗涤剂的成分之一。

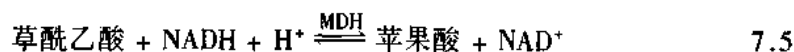
#### (5) 样品

① 许多待测样品是粗的细胞抽提液,其中可能包含各种干扰因素,例如可能存在着作用同一底物或产生同一产物的其他酶。因此在着手进行测定时,首先应了解系统中是否混有这些干扰因素。办法是:④ 同时采用不同的测定方法;⑤ 同时检测底物和产物的变化量,然后比较测得的结果是否一致。通过这些比较分析,如能肯定干扰的确存在,那么就应根据具体情况,采取相应措施,排除干扰。在消除样品可能带来的干扰方面,可供选择的办法有:④ 改用其他适宜的测定方法;⑤ 加入干扰酶的抑制剂、或限制其所需要的辅助因子的供应;⑥ 将样品或试剂进行纯化;⑦ 制备相应的空白。

以谷丙转氨酶(GPT)或谷草转氨酶(GOT)的测定为例:



这两个反应进行的方向都是从右到左。简便灵敏的测定方法是再偶联一个脱氢酶反应,前者可偶联乳酸脱氢酶(LDH),后者可偶联苹果酸脱氢酶(MDH),然后测定反应过程中 NADH 340 nm 光吸收的降低。



待测样品中,如果包含有谷氨酸脱氢酶(GluDH),就可能产生干扰,因为:



反应平衡倾向于形成 L-Glu,也导致 340 nm 光吸收下降。

GluDH 在脑、肝等组织中极为丰富,在正常血清中极少,但在某些病理条件下血清中这种酶活性可能显著提高,因而测定时也必须考虑它的影响。该酶反应需要  $\text{NH}_4^+$ ,而且  $K_m$  很大( $75 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ );如果反应系统能够避免  $\text{NH}_4^+$ ,这种干扰可以消除。不过即使如此,最好还是要进行空白实验。也就是说,可先测定以  $\alpha$ -酮戊二酸为底物的酶反应速度作为 GluDH 的空白值,然后再加入 L-Ala(或 L-Asp)测定 GluDH 和 GPT 或(GOT)的总速度,最后在计算时取两者的差作为 GPT(GOT)的活力(参见图 7.3(A))。

再以血清苹果酸脱氢酶的测定为例,该酶可用草酰乙酸和 NADH 为底物,然后通过测定 340 nm 光吸收的降低来计算酶活力。但是在样品中往往同时存在乳酸脱氢酶,如果反应系统中也有丙酮酸存在,就可能产生干扰,因为式 7.4 和式 7.5 所示的反应平衡都倾向右方,即都倾向降低 340 nm 光吸收。为了消除这种干扰,可先加样品和 NADH 作空白测定,待平衡后再加底物开始进行真正的酶反应测定(参见图 7.3(B))。

② 样品的稀释效应。样品的稀释可能带来两种效应,一是影响酶的稳定性,二是降低样品中原有抑制因素和辅助因素的浓度。例如,肌酸激酶在血清中的活力本来就比较,但

是,用生理盐水稀释后,活性还会进一步升高。产生这种现象的原因可能和样品中原有的抑制剂被稀释有关。因此有人建议,测定血清中的酶活力时,最好将样品体积与反应混合物的体积比记录下来以便分析比较。

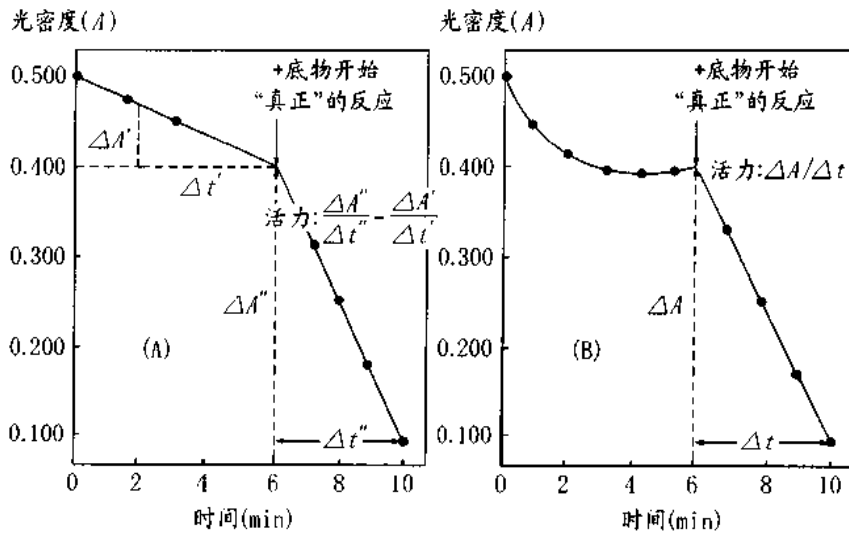


图 7.3 通过空白试验测定酶反应速度

#### (6) 空白和对照

每个酶反应通常都应该有适当的空白和对照。空白是指杂反应和自发反应引起的变化量,它提供的是未知因素的影响。空白值是指从不加酶、不加底物或两者都加,但酶预先经过失效处理的反应系统测得的结果。而对照是指用纯酶或标准酶制剂测得的结果,主要作为比较或标定的标准。

### 3. 测定方法

确定了适宜的反应条件后,为获得正确的结果还需要有适当的测定方法。测定方法可大别为两类:取样法(sampling method)和连续法(continuous method)。取样法是指在酶反应开始后不同的时间内,从反应系统中取出一定量的反应液,并用适当的方法停止其反应,然后再根据产物和底物在化学性质或物理性质上的差别进行分析,求得单位时间内酶促反应变化量的一种方法。连续法则是基于底物和产物在物理化学性质上的不同,在反应过程中对反应系统进行直接、连续观测的方法。从准确性和测定效率看连续法比较好。以下分别简述一些常用的具体测定方法。

#### (1) 化学法(chemical procedure)

化学法是一种取样法,停止酶反应通常是通过添加酶的变性剂,例如加 5% 的三氯醋酸、3% 的过氯酸或其他酸、碱、醇等。三氯醋酸是一种高效的蛋白变性剂和沉淀剂,但是它有一个缺点就是在紫外区有吸收;过氯酸没有此缺点,并且可用氢氧化钾中和,形成的  $KClO_4$  在冷却后可沉淀移去,但它不适于对酸和氧化剂敏感的对象。用于停止反应的试剂应根据具体反应灵活掌握,例如,以对硝基酚衍生物为底物的酶反应可用氢氧化钠或氢氧化钾停止反应,因为大多数酶对碱不稳定,而且碱有利于对硝基酚发色。另一种停止反应的办

法则是通过加热使酶变性失效。

在化学法中应用何种具体的检测方法要根据具体的酶反应而定。例如,钼蓝定磷法常用于许多有磷酸参加的酶反应,包括磷酸酯酶、核苷酸酶和磷酸化酶等的测定,此法简便灵敏。由于焦磷酸的酸酐键和一般的磷酸酯键不同,在 1N HCl, 100℃ 中 10 min 就能完全水解,因此,定磷法也可扩大到有 ATP 或 ADP 参加的酶反应,如某些激酶、合成酶的反应。又如,酯类、硫酯和混合酸酐等能和羟胺反应生成羟肟酸,后者再和三价铁盐产生紫色,因此这类反应也可应用于有上述物质参加的酶反应。

化学法比较古老,但目前仍广泛采用,因为:① 它不需要特殊仪器;② 几乎所有的酶反应都可根据产物和底物在化学性质上的差别设计相应的检定方法;③ 由于色原底物(chromogenic substrate)和荧光原底物(fluorechromgenic substrate)的开发,还可使原来复杂的测定方法得到大大简化,而且,变得更直观灵敏,同时准确度也得以提高。

所谓色原底物和荧光原底物,就是在原来的底物分子上分别接上适宜的有色基团、发色基团或荧光基团。这种底物或者原来没有颜色或荧光,而在酶作用后产生颜色与荧光,或者原来虽有颜色或荧光,但是在酶作用后,颜色深度和荧光强度发生了改变;另外也可能是大分子有色物质或荧光物质,在酶作用后释放出有色或荧光小分子可加以检测。例如,在淀粉等多糖分子上接上染料用于淀粉酶、溶菌酶等的测定;在磷酸或核苷酸分子上接上硝基酚用于磷酸酯酶等的测定;将酪蛋白做成活性染料 KNR 的衍生物后用于蛋白酶的检测。

化学法的缺点是工作量大,本身包含一定的误差,对速度大的反应常不易得到十分准确的结果,所以不是理想的测定方法。

#### (2) 放射化学测定法(radiochemical procedure)

放射化学测定法是酶分析中应用愈来愈多的一种重要方法,特别是当没有适当的光学或电学方法可用,或者应用光学或电学方法测定干扰较大时,尤能发挥作用。

放射化学法和化学法相似,不过,在这种方法中采用的是同位素标记的底物;它根据的原理是在进行酶促反应时,如能设法使放射性标记的产物定量形成,或设法使放射性底物和放射性产物分离,那么在反应一定时间后,停止反应并分离产物和底物,然后测定产物的放射性或未反应的底物的放射性,就可以知道反应进行的速度和酶的活性。如果比放射性(specific activity)已知,那么转化的底物量也就能计算出来。检测的灵敏度可通过反应时间的控制、比放射性的选择而加以调整。

已知的六大类酶几乎都可用此法测定。用于底物标记的同位素有: $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{131}\text{I}$ ,它们在衰变过程中放射的都是 $\beta$ 粒子。在酶分析中采用的底物,其比放射性一般不宜太高,因为这样既可降低分析成本,也能避免干扰,减少误差。在配制放射性底物时通常要用到一些基本概念:

① Ci(Curie,居里): 1 Ci 等于衰变率(disintegration)为  $3.700 \times 10^{10}$  原子/s(或等于  $2.22 \times 10^{12}$  DPM)的放射性物质质量。

② DPM(disintegrats per minute): 放射性物质每分钟的蜕变数。

③ CPM(counts per minute): 测得的放射性物质每分钟蜕变计数。由于放射性探测装置的效率低于 1,故 CPM 常小于 DPM。

④ S.A.: 比放射性,单位重量样品的放射性量(如 1 mci/mmol)。

根据这些概念就可从放射性同位素标记的和非标记的底物贮备液配制相应浓度的和比

放射性的底物溶液。

例如,欲从 0.1 mol/L GTP 贮备液和 15 mci/mmol、1 mci/ml  $^3\text{H}$ -GTP 贮备液配制 10ml GTP 浓度  $10^{-2}$  mol/L、比放射性为  $1 \times 10^5$  DPM/ $\mu\text{mol}$  的  $^3\text{H}$ -GTP 溶液,可按下述步骤计算:

① 10 ml  $10^{-2}$  mol/L GTP 溶液中具有的 GTP  $\mu\text{mol}$  数:

$$10 \text{ ml} \times 10^{-2} \text{ mol/L} (= 10 \text{ ml} \times 10 \mu\text{mol/ml}) = 100 \mu\text{mol}$$

② 10 ml  $10^{-1}$  mol/L、比放射性为  $1 \times 10^5$  DPM/ $\mu\text{mol}$  溶液具有的放射性:

$$100 \mu\text{mol} \times 1 \times 10^5 \text{ DPM}/\mu\text{mol} = 1 \times 10^7 \text{ DPM}$$

③ 配制 10 ml 上述溶液时需取的  $^3\text{H}$ -GTP 贮备液量:

$$1 \times 10^7 \text{ DPM} / (1 \text{ mci/ml} \times 2.22 \times 10^4 \text{ DPM/mic}) = 45 \mu\text{l}$$

④ 45  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -GTP 中具有的 GTP  $\mu\text{mol}$  数:

$$45 \mu\text{l} \times 1 \text{ mci/ml} \times 1 \text{ mmol}/15 \text{ mci} = 3.0 \mu\text{mol}$$

由于 3.0  $\mu\text{mol}$  相对于 100  $\mu\text{mol}$  来说可以忽略不计,故在配制该溶液时可先取 45  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -GTP 贮备液,然后加 1 ml GTP 贮备液,最后定容至 10 ml。

放射化学方法中一个十分重要的问题是产物和底物的分离,常用的方法有:

① 蒸发,当产物和底物之一是挥发性物质时适用。

② 抽提,无机磷酸形成钼酸盐络合物后可用异丁酸将其从水溶液中抽出。

③ 沉淀,多糖、多肽和核酸等的合成酶的测定通常用此法,形成的多聚物沉淀,收集于滤纸或玻璃纤维膜上(后者有助于提高计数效率)。小分子产物也可做成不溶性盐或其他类型的衍生物。

④ 离子交换,当底物是非离子型化合物时常用 DEAE 纤维素膜。

⑤ 其他,还可用活性炭吸附和纸层析电泳分离。

$^{32}\text{P}$ 、 $^{131}\text{I}$  等产生的高能  $\beta$ -射线,可直接用 Geiger miller 计数器探测计数,但是低能的  $\beta$ -射线,如来自  $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$  等的,则需用液体闪烁器检测。

放射化学检测法的特点是灵敏度极高,甚至高于光学和电学等方法,可直接用于体外酶活性检测,也可用于体内酶活性的测定。放射化学测定法是一种比较重要的方法,它的应用愈来愈广、越来越多,有些酶反应目前还只能采用此法测定。但是操作必须特别小心,因为它直接关系到使用者的健康、安全;另外,此法不能进行连续跟踪,反应时间也不能太长,同时必须使底物的转变落在初速度范围内;另一问题是辐射的淬灭(quenching),例如, $^3\text{H}$  发射的  $\beta$ -射线可被纸吸收。

(3) 光学法(spectrophotometric method)

① 光吸收测定法。这是根据反应产物与底物在某一波长或某一段上,有明显的特征吸收差别而建立起来的连续观测方法。

光吸收法应用的范围很广,几乎所有的氧化还原酶都可用此法测定。例如,脱氢酶的辅酶 NAD(P)H 在 340 nm 有吸收高峰,而氧化型则无;细胞色素氧化酶的底物为细胞色素 C,该物质在 550 nm 的消光系数  $\epsilon_{550(R)} = 2.81 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ,  $\epsilon_{550(O)} = 0.80 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ,这些光吸收差别都可用来进行测定。某些氧化还原酶难以获得天然的供受体,还可采用简单的人工供受体(表 7.1)。

可以利用光吸收法测定的还有那些催化双键饱和化或双键形成的酶反应,和那些催化环状结构变化的酶反应。例如,延胡索酸酶催化的反应,延胡索酸在 300 nm 有强的光吸收,

而苹果酸没有；尿酸氧化酶催化尿酸氧化为尿囊素，尿酸在 290 nm 有吸收，而尿囊素则否。

在应用光吸收法测定酶反应速度时，如果只需要了解酶活性的相对大小，那么可直接以单位时间内相应波长的光吸收值的改变 ( $\Delta A/\Delta t$ ) 表示；但如果要表达成更确切的单位(如国际单位)，则应先通过消光系数算出底物浓度或者产物浓度的变化量  $\Delta C(\Delta A/\epsilon)$ ，然后再以  $\Delta C/\Delta t$  表示。例如，脱氢酶，由于 NAD(P)H 在 340 nm 的克分子消光系数  $\epsilon = 6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ，因此，当反应过程中光吸收值改变  $\Delta A$  时，底物浓度的变化量  $\Delta C$  为：

$$\Delta C = \Delta A / 6.22 \times 10^6 l \text{ } \mu\text{mol/ml} \quad (l \text{ 为光径}) \quad 7.7$$

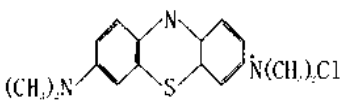
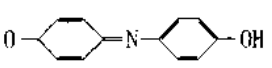
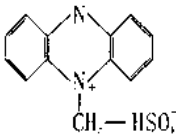

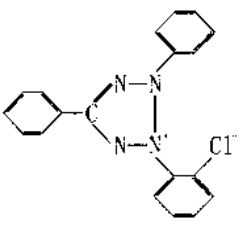
又如，细胞色素氧化酶，它的底物(细胞色素 C)的变化量和  $\Delta A$  有如下关系：

$$\Delta C = \Delta A / \Delta \epsilon_{550} l \quad (\Delta \epsilon_{550} = \epsilon_{550(R)} - \epsilon_{550(O)}) \quad 7.8$$

光吸收测定法灵敏度高(可检测到 nmol/L 水平的变化)，简便易行，而且一般可在较短时间内完成检测。

光吸收测定需要分光光度计。Chance 设计了两种特殊的分光光度计用于进行酶反应机制和酶生物学的研究。

表 7.1 某些简单的人工供受体

受体	结构式	当量	氧化还原电位 (V)	吸收峰 (nm)	$\epsilon$
甲烯蓝		2	0.011	610	$4.10 \times 10^4$
[2,6]-二氯酚靛酚		2	0.217	600	$2.10 \times 10^4$
二氯葱甲硫酸盐		2	0.080	388	$2.20 \times 10^4$
苜蓿紫色原		2	-0.359		
亚铁氰化钾	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	1	0.36 (pH=0)	420	$1.03 \times 10^3$
氯化三苯基四氮唑 (TTC)		1	-0.08	485	

② 荧光测定法 (fluorometric procedure)。荧光测定法也是一种连续观测方法。它的原理是,如果酶反应的底物与产物之一具有荧光,那么荧光变化的速度可代表酶反应速度。可用此法测定的酶反应有两类:一是脱氢酶催化的反应,它们的底物在酶反应过程中本身就有荧光变化,例如 NAD(P)H 的中性溶液能发射强的蓝白色荧光(460 nm),而 NAD(P) + 则否。另一类是利用荧光原底物的酶反应,例如,用二丁酰荧光素测定脂肪酶,二丁酰荧光素不发荧光,但水解后释放荧光素,能产生强的荧光。

荧光法测得的酶活性大小通常只能以单位时间内荧光强度的变化( $\Delta F/\Delta t$ )表示;荧光测定法的主要缺点就是,荧光读数与浓度间没有直接的比例关系,而且常因测定条件如温度、散射、仪器等而不同,所以如果要测定酶活性以确定的单位表示时,首先要制备校正曲线,然后再根据这曲线确切定量。

荧光测定法的另一缺点是易受其他物质干扰,有些物质如重铬酸钾常会抢夺能量,降低荧光强度,有些物质如蛋白质能吸收和发射荧光,这种干扰在紫外光区尤为显著,故测定的荧光最好是可见光。特别是以红荧光为好。

荧光测定法的优点是灵敏度极高,它比光吸收测定法还要高 2~3 个数量级,因此,特别适于酶量或底物量极低时的快速酶反应分析。

与此有关的是荧光光谱与荧光偏振分析,它们广泛用于酶作用机制的研究。

③ 旋光测定法 (optical rotatory procedure)。某些酶反应过程常伴随着旋光变化,在没有其他更好的方法可用时,考虑旋光测定法。以蔗糖酶反应为例,蔗糖的比旋( $Q$ )<sub>D</sub><sup>25</sup> = +67°,其产物 D-葡萄糖的比旋( $Q$ )<sub>D</sub><sup>25</sup> = +53°,D-糖( $Q$ )<sub>D</sub><sup>25</sup> = -92°,这种旋光变化可用于该酶反应的跟踪。其他能用此法测定的还有各种引起消旋、变旋的异构酶反应。

如果底物和产物的旋光太低,不能进行直接测定时可加入某些物质使之形成相应的络合物以提高其旋光度。例如,乳酸、苹果酸等羟基酸和钼酸盐络合后的比旋就会因此而显著升高。

旋光法的缺点是准确度和灵敏度不高,旋光度( $\theta$ )与浓度( $C$ )间的关系如下:

$$C = (Q) \cdot 100 / (Q)_{D}^{25} \times l \quad (l \text{ 单位为 dm}) \quad 7.9$$

根据这个关系,对于蔗糖酶来说,平面偏振光 589 nm 偏转 0.5°,蔗糖浓度的变化应为 0.013 mol/L,这种浓度至少比光吸收法要求的要大 2 个数量级。

旋光测定法的另一缺点是,酶反应过程中高比旋的蛋白质分子可能发生旋光变化,导致测定的精确度下降。此外,旋光测定法操作也不甚方便,故一般少用。

#### (4) 电化学测定法 (electrochemical procedure)

电化学分析法也是一类连续分析法,灵敏度和准确度都很高,可和光学方法媲美,而且即使测定系统中有某些物质污染,也不会影响结果。但此法要求一定的仪器设备。

① 选择性离子电极 (ion - selective electrode) 测定法。最普通的选择性离子电极是玻璃电极,用它测定酸度(pH)的变化,可用于有酸碱变化的反应的测定。此法操作简单,但有两个缺点:一是随着反应的进行,pH 不断改变,酶活力也将发生变化;二是测定系统的 pH 依赖于介质的缓冲能力,蛋白质是高缓冲性物质,粗的待测样品中往往包含大量惰性蛋白,因而难以保证恒定的缓冲强度,测定结果不易精确。连续滴定或恒酸滴定可以克服这些困难。所谓恒酸滴定就是在反应过程中,不断向反应系统加酸或碱使 pH 维持恒定,同时以加酸或加碱的速度代表反应速度。恒酸滴定仪 (pH stat) 就是适应这种需要而设计的一种精密测

定义,它可自动加酸、加碱控制 pH,并同时记录加入的酸碱量与时间的关系。

② 氧电极(oxygen electrode)测定法。这是一种极谱法(polametric method),或者说一种电解分析法的应用。原理是,如果给待测物水溶液插上电极,再加一定电压,那么其中的溶解物质就会在电极上进行氧化还原反应,产生电解电流,测定这种电流就可知道溶质的浓度变化。各种物质产生电极反应需要外加的电极电压是不同的,因此可以进行选择性测定。例如,溶解氧能在 0.65 V 左右的负电压条件下还原,而在这样低电极电压水平下是很少物质会发生反应的,故具有高的选择性。这种方法常用于测定氧化还原反应,如葡萄糖氧化酶、氨基酸氧化酶等,不过更多的还是用于线粒体和光合成酶系的研究。

和极谱分析用的滴汞电极不同,酶分析中用的氧电极是直径 0.02 cm、每秒振动频率为 60 周的微铂电极(vibrating Pt electrode)。这是因为:第一,滴汞电极得到的是波形电解电流,不宜用于测定浓度处于变动的物质;第二,汞对酶有毒性;第三,采用振动电极可防止电极发生极化和污染。

③ 细电流电位测定法。此法的原理是,如果反应的底物和产物在电学性质上不同,那么在一个细小稳定的电流下,两个极化的铂电极间电位就会不同,测定这种电位变化的速度可代表酶反应速度。例如,胆碱酯酶的测定,此酶催化:



由于硫代胆碱比碘乙酰硫代胆碱氧化电位低,因而,酶反应过程将产生电位降( $\Delta E$ ),而且, $\Delta E/\Delta t$  相对胆碱酯酶有线性关系;如用酶法分析测定抑制剂,则通常可检测出  $10^{-9}$  g/ml 的有机磷农药,误差约 1% 左右(图 7.4)。

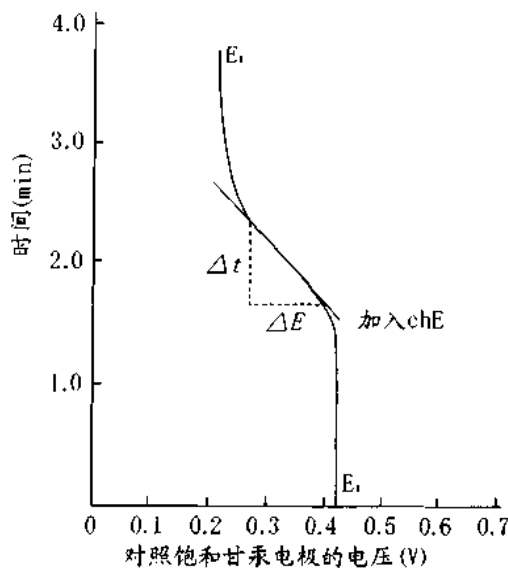
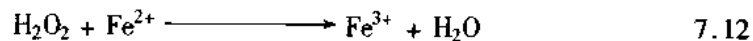
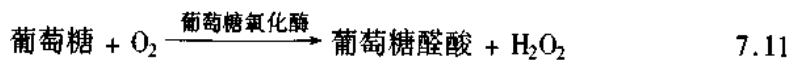


图 7.4 细电流电位测定法检测酶反应速度

④ 电流测定法。这种测定法是把两个电极浸入分析样品中,并在其间维持恒定电压,这样,反应过程中电流的变化速度将反映酶反应的速度。例如,用此法测定葡萄糖氧化酶:





反应过程中管状铂电极上发生的  $\text{Fe}^{2+}$  氧化将导致电流的变化,这种变化速度和酶反应速度间有线性关系。

#### (5) 量气法(manometry)

量气法主要用于有气体吸收或气体放出的反应,因此,测定须在密闭的仪器中进行。从方法和仪器上可区分为两种类型:差示(差示压力计)法,能同时测定反应过程中气体体积和压力的变化,不受外界温度、气压的影响,结果较准确,但仪器的常数测定很复杂。所以较常用的是另一种所谓(瓦氏呼吸计)测压法,它测定的是恒定体积内的压力变化,这种测压计的常数较易测得。

量气法应用的范围包括:① 耗气反应,如氧化酶反应等;② 产气反应,如脱羧酶、脲酶等催化的反应;③ 产酸反应,反应在含有一定百分比  $\text{CO}_2$  的重碳酸盐溶液中进行,酶反应过程产生的酸再和重碳酸盐反应释放出相应量的  $\text{CO}_2$ :



这类方法的主要缺点是准确度和灵敏度都不太高,而且操作麻烦,已渐趋于淘汰。它的一种发展是“船形测定仪”,该仪器是可用于快速反应的测定。

#### (6) 其他

其他还有:粘度法(viscosimetry),可用于水解大分子的酶,如  $\beta$ -葡聚糖酶的活性测定;比浊法(turbidimetry),可用于水解不溶性底物的酶,如溶菌酶的活力测定。由于准确度和灵敏度不高,而且粘度、浊度的变化与底物变化量之间没有严格的定量关系,故很少应用。

#### (7) 酶偶联分析法(enzyme coupled analysis)

酶偶联分析法是指在被测酶的反应体系中加入过量的、高度专一的“偶联工具酶”,使反应延续进行到某一可以直接、连续、简便、准确地测定的阶段,同时用光学法或电学方法进行检测或跟踪。

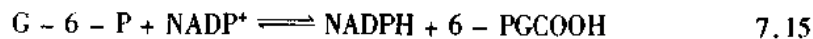
以光学偶联测定法为例:

① 如果被测酶反应的产物是某种脱氢酶的底物,那么,这种情况下,可向反应测定系统中加入足够量的相应脱氢酶和辅酶,使反应延续进行,同时跟踪检测 340 nm  $\text{NAD(P)H}$  特征光吸收的变化。例如,己糖激酶(HK)的测定就可在过量的葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)脱氢酶(G-6-PDH)和  $\text{NADP}^+$  存在条件下进行。

被测酶反应(assayed reaction),HK 催化:



偶联酶指示反应(indicating reaction),G-6-PDH 催化:



其中 G 和 6-PGCOOH 分别代表葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖酸。

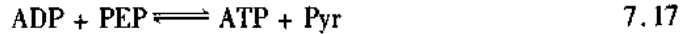
已知的脱氢酶中,大约有 50 种左右的酶可以利用  $\text{NAD}^+$  和  $\text{NADH}$ ,20 多种能利用  $\text{NADP}^+$  和  $\text{NADPH}$ ,它们都可用作偶联指示酶。

有些情况下,被测反应不能直接和上述脱氢酶反应连起来,则可再插入一个起联结作用的辅助酶反应。例如,测定肌激酶(myokinase, MK)就可用这样的系统:

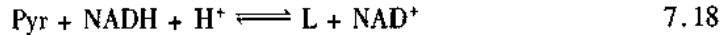
被测酶反应, MK 催化:



辅助酶反应(auxiliary reaction),丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)催化:



偶联指示酶反应, LDH 催化:



PEP、Pyr 和 L 分别代表磷酸烯醇丙酮酸、丙酮酸和乳酸; AMP、ADP 和 ATP 分别为腺苷一磷酸、二磷酸和三磷酸。

② 被测反应和其他有光学性质改变的酶反应偶联。例如, 腺苷酸脱氨酶催化 AMP 脱氨过程中伴随 265 nm 光吸收的降低; 此酶专一于 AMP, 而不作用 ADP 和 ATP, 因此, 在测定某些合成酶或激酶反应可用作偶联指示酶。例如, 测定肌激酶:

被测酶反应, MK 催化:



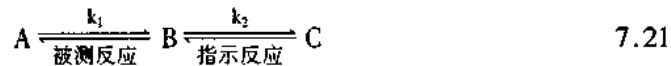
指示酶反应, 腺苷酸脱氨酶(adenylate deaminase)催化:



用这两种酶组成偶联测定系统时, 由于它们的最适 pH 相距较远, 因而不能在同一系统中进行作用, 必须分开建立两个反应系统, 并在不同的时间内从肌激酶反应系统取样, 然后转入脱氨酶反应系统测定。

应用酶偶联分析法最重要的条件是加入的偶联工具酶应该高度纯净、专一而且过量, 加入的酶反应不引起干扰, 而且要保证待测酶反应的反应速度是整个反应系统中唯一的速度限制因子, 测得的反应速度和待测酶浓度间应有线性关系。

至于偶联指示酶的量, 由于被测反应一般是零级反应, 而指示反应通常是一级反应, 即:



所以可以根据式 6.19 来进行计算, 为了使  $C_\infty \rightarrow C_0$ , 应使式 6.19 的指数项趋于 0, 同时使延缓期缩小到实验误差范围以内, 例如, 设  $e^{-k_2 t} = 0.01$ ,  $t$  为 5s ( $\approx 0.083$  min), 那么有:

$$k_2 = 4.6/0.083 = 55 \text{ min}^{-1} \quad 7.22$$

因而, 加入的偶联指示酶的活性应为:

$$V = 55 K_m(\text{B}) \text{ u/ml} \quad 7.23$$

如果, 被测反应也是一级反应时, 则  $k_2$  应根据式 6.26 计算。有人作了分析: 当  $k_2 = 10k_1$  时, 误差约为 23%;  $k_2 = 100k_1$  时, 误差为 4%;  $k_2 = 1000k_1$  时, 误差约为 0.7%。这就是说, 指示酶量应为被测酶的 100 倍左右。

三个以上的酶反应偶联分析采用得不多, 因为按照上述计算, 最后一步应用的指示酶量必须非常大。

#### 4. 测定

##### (1) 测定对象

和一般化学反应一样, 酶反应速度可用单位时间内反应物(底物)的减少或产物的增加来表示:

$$v = \pm d[\text{C}]/dt (-d[\text{S}]/dt \text{ 或 } d[\text{P}]/dt) \quad 7.24$$

[S]和[P]分别代表底物或产物浓度,  $t$  为时间。一般情况下, 产物和底物的改变量是一致的, 因此在理论上两者皆可。但是在实际上由于在酶反应系统中使用的底物浓度往往很大,

而反应时间通常很短,底物的减少量仅占总量的很小百分数,故不易准确测定;反之,产物从无到有,只要测定方法灵敏,就可以准确进行检测,所以还是以分析产物为好。

(2) 测定初速度

反应速度可以用单位时间内产物或底物的变化量表示。在进行测定时通常总要先将测得的产物或底物变化量相对时间作图,绘制一条的“酶反应进(过)程曲线”(progress curve or process curve)(图 7.5),这条曲线的斜率可代表酶的反应速度。

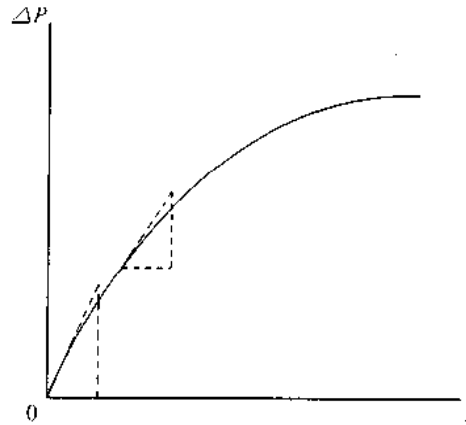


图 7.5 酶反应进程曲线

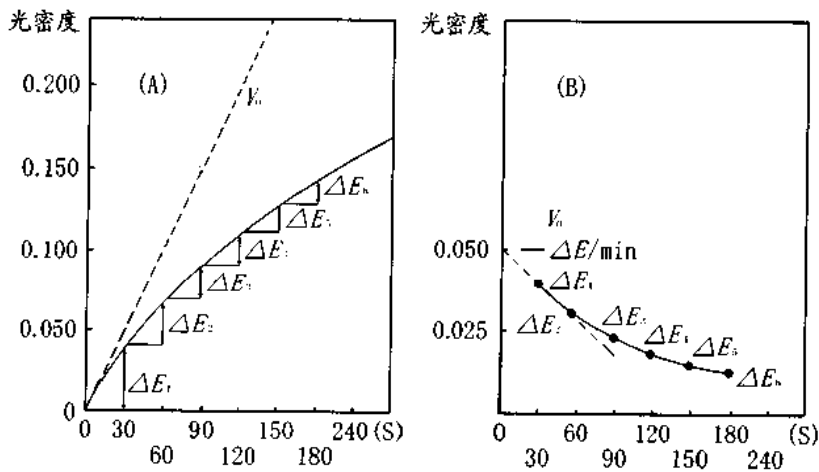


图 7.6 从非线性的进程曲线求得初速度

(A) 示通过  $t=0$ (零时点)的进程曲线切线

(B) 示外推到  $t=0$  的进程曲线切线

大多数酶的反应进程曲线表明,在酶反应的最初阶段里,底物或产物的变化量随反应时间而线性地增加,反应速度恒定;但是随着反应时间延长,这条曲线就会逐渐地弯曲下来,斜率减小,反应速度下降。产生这种现象的原因很多,例如,随着反应延续,底物浓度在不断降低,产物在不断增加,逆向反应从无到有逐渐变得显著起来;同时酸、碱、热等因素也在慢慢地起作用,使酶破坏失效。因此,这种情况下测得的反应速度只能是一种表现的、多种因素影响下的综合结果,而不能代表酶的真正活性。真正能代表酶催化活性的显然只能是反应

初始阶段的速度,即反应初速度。

初速度( $v_0$ )可从酶反应进程曲线中反应初始阶段的直线线段部分得到,以直线线段的斜率代表;如果这条直线线性不明显,那么应沿曲线的最初部分画出通过零时点或外推到零时点的切线(图 7.6),并以这条切线构成的斜率代表酶反应初速度。

进程曲线可以通过连续测定得到,也可在不同时间间隔取样进行测定后绘制,但是用取样法绘制的曲线,至少应由三个时间点组成:零时点、适当选择的时间间隔点,这一点取决于具体的反应和测定方法,以及两倍于这个间隔的点。并且要求在这种时间范围内反应量不超过底物总量的 20%。

### (3) 测定要达到的要求

酶活力测定的目的就是要通过酶反应速度的测定求得酶的浓度或含量,因此,测得的反应速度必须和酶浓度间有简单的线性比例关系,为此,在进行酶活性测定时首先必须用标准酶制备一条酶浓度曲线(enzyme concentration curve),即以反应速度相对酶浓度作图制备的曲线,它有双重意义:一方面通过这条曲线可以检验酶反应和测定系统是否适宜、正确;另一方面通过它可以求知待测样品中酶的浓度或含量。

要使测得的反应速度与酶浓度有良好的线性关系,最基本的一点就是必须测得酶反应的初速度。图 7.7 可以很好地说明这种相关性,(A) 是在不同酶浓度条件下得到的反应进程曲线,从这条曲线可以看到,酶浓度不同,酶反应速度下降的先后、快慢也不相同;如果将这些曲线在不同时间测得的反应速度相对酶浓度作图,就可得到 (B) 所示的酶浓度曲线。可见只有在反应时间( $t_0$ )测得的反应速度与酶浓度间具有合乎要求的线性比例关系,而在  $t_1$  和  $t_2$  ( $t_2 > t_1 > t_0$ ) 得到的测得的结果则不一定具有这种相关性,反应时间越长,偏离也越大。所以,在进行酶活力测定时,通常总要先制备两条曲线:酶反应进程曲线和酶浓度曲线。从前者可求得反应初速度,然后根据初速度绘制酶浓度曲线,并通过后者来检验酶反应测定系统是否适宜。

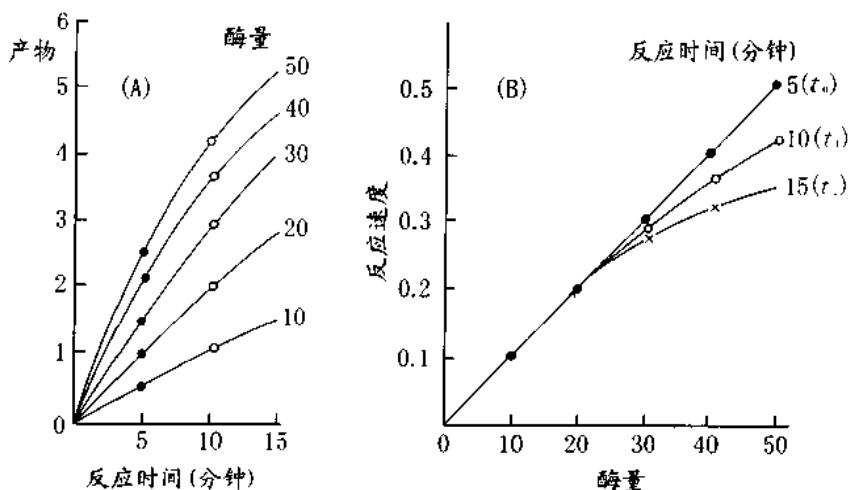


图 7.7 酶反应进程曲线(A)和酶浓度曲线(B)

绝大多数情况下,酶反应速度与酶浓度间很容易建立所预期的线性比例关系,但有时由于反应系统和测定系统存在某些问题也可能出现一些偏离线性的现象(图 7.8)。

产生图 7.8(A)所示的偏离现象,可能有以下几种原因:

① 测定的不是反应初速度。缩短测定的时间间隔,例如,测定“ $t_0$ ”的反应速度,情况就会改善。

② 反应系统受酶以外的其他组成因子的限制,例如,酶偶联分析时,偶联工具酶不够过量。增加工具酶,情况就可能好转。

③ 在被测样品中包含可逆抑制剂,通过透析或其他方法加以处理后,偏离一般就会消除。

图 7.8(B)所示的偏离可能是因为:

① 反应系统中杂有不可逆抑制剂(inh),例如,缓冲液中含有少量能抑制酶活性的重金属离子。通过透析或加入一定量与反应无关的蛋白,往往可使酶得到保护,偏移即会减轻或消除。

② 酶需要辅酶或活化剂(act),而这些辅助因子又易于解离,如果辅助因子不足时就可能出现这种情况;若作适量补充供应后常可恢复正常。

图 7.8(C)所示的情况则可能是由于底物不稳定。

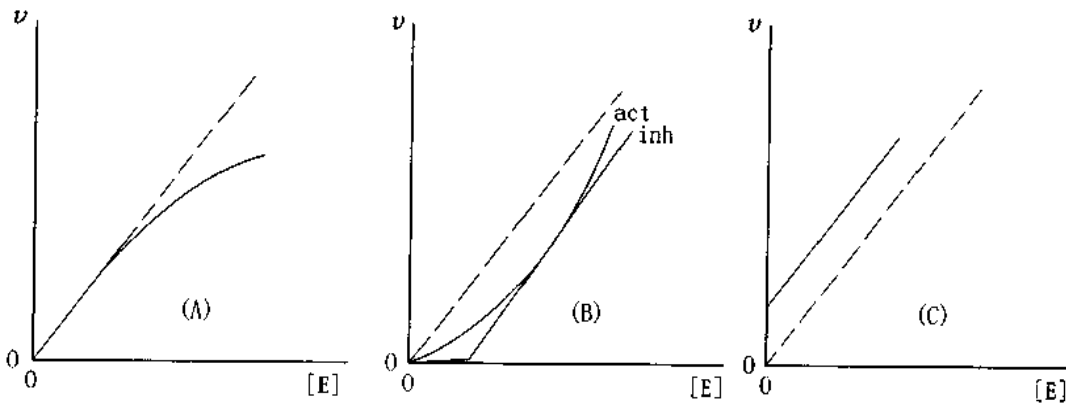


图 7.8 酶浓度曲线可能出现的异常情况  
(---为正常情况)

### 5. 酶的单位

在进行测定后,一般都要将结果换算成酶单位数。所谓酶单位,就是指在特定条件下,要使酶反应达到某种速度所需要的酶量。酶单位有各种表示方法,1961年国际生化联合会酶委员会建议:一个酶单位(IU)定义为在酶反应最适条件下(温度 25℃),每分钟催化一个微摩尔底物转化所需要的酶量。当底物为蛋白质、多糖等包括多个能被酶作用的键或基团时,可用催化一个微摩尔被作用的基团或键变化所需要的酶量表示酶单位;对于反应  $A + A \rightarrow C + D$ ,则须用催化两个微摩尔 A 的转变所需酶量计算酶单位;如果是通过物理方法测定的,那么应在物理量与化学量间建立对应关系后进行换算;如果是用放射化学法测定的,则可按下列式进行计算:

$$U = \frac{R_n}{2.22 \times 10^6 \times f \times SA \times t} \quad 7.25$$

$R_n$  为放射性产物生成速率,以 CPM 表示; $f$  为计数效率(小于 1); $SA$  为比放射性; $t$  为反应

时间(min)。

如果待测酶反应中底物浓度不能满足零级反应的要求,则应在测定  $k'$  和  $K_m$  后,求出  $V$  ( $= k' \cdot K_m$ ) 进行计算。

1972年酶委员会又提出一种新的酶单位 Katal (Kat), 一个 Kat 定义为最适反应条件下 (30℃), 每秒钟催化一个摩尔底物发生转化所需要的酶量。

$$1 \text{ Kat} = 60 \times 10^6 \text{ IU} \quad 7.26$$

但是,在实际工作中,为了简便,人们往往采用各自习惯沿用的单位,有时甚至直接应用测得的物理量表示,如以光吸收的变化值 ( $\Delta A/\Delta t$ ) 表示酶单位。

其他衍生单位:酶溶液的浓度通常以  $u/ml$  表示;而在估计酶制剂纯度时常用比活力,即单位重量的酶蛋白中具有酶单位数: $u/mg$  蛋白(或蛋白氮)表示。当酶制剂高度纯净,而且酶的分子量已知,甚至每个酶分子上的活性中心数目也已知时,还可采用分子活力或转换率 (turnover number, T.N.) 表示,它们分别表示在最适条件下,每个酶分子或每个活性中心每分钟催化底物分子或相关基团转化的数目。分子活力或转换率可用以进行酶催化效率的估计和比较。

## 第二节 酶法分析<sup>(7-8)</sup>

酶法分析是一种以酶为分析工具(或者说分析试剂)的分析,分析的对象可以是酶的底物、辅酶、活化剂甚至酶的抑制剂。在进行这类分析时,先要根据分析对象选择适宜的“工具酶”,然后通过酶反应进行催化、测定,最后再借助相应的校正曲线来检知它们的浓度或含量。在酶法分析检测的对象中,除了底物可以采用总变量分析法外,其他的一般都只能用动力学分析法。

### 一、动力学分析法

#### 1. 原理

这种分析法的原理是,在酶法分析的反应系统中,如果其他反应条件都处于最适,只有被测对象如底物、辅酶、活化剂或抑制剂的浓度是酶反应中决定反应速度的唯一因素时,酶反应速度和这些因素的浓度间就将有一个确定的比例关系,测定酶反应的速度就可求知它们的浓度。

#### 2. 酶法分析的反应条件

酶法分析采用的反应条件和酶活力测定的基本相同,但所用的酶量必须一定,除了相应的被测因素的浓度应控制在限速水平以外,其他反应成分均须保持恒定和最适。各种待测物质的酶法分析反应条件基本相同,但也各有特点。

##### (1) 被测物是酶的底物

酶反应的底物浓度曲线是一条双曲线。当  $[S] \ll K_m$  时,酶反应相对底物而言具有一级反应形态,酶反应速度比例于底物浓度,  $v = k' \cdot [S]$ , 因此测定酶反应速度可以得知它的浓度。

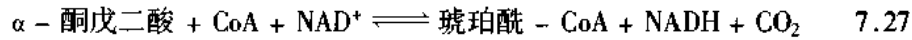
在测定这类物质时,关键是待检的样品中该物质的浓度应该十分小,例如,小于  $0.1K_m$

(参见表 6.4)。

不过,在测定底物浓度时,一般很少采用动力学方法。

#### (2) 被测物是辅酶

需要 NAD(P)、CoA 等辅酶的反应可看作是双底物反应,这些辅酶可看作是底物之一;当另一类底物(“真正”的底物)浓度足够高时,反应变为拟单底物反应。控制被测的辅酶浓度小于  $0.1K_m$ (相对辅酶的  $K_m$ ),那么反应速度将比例于相应辅酶的浓度。以 CoA 的测定为例,它是  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶的辅酶:



此反应可测定 340 nm 光吸收的变化,当式中另外两种底物浓度足够高时,反应速度比例于 CoA 的浓度。

#### (3) 待测物是活化剂

当其他条件最适而且一定时,活化剂在低浓度范围内,酶反应速度随活化剂浓度增大而升高,并在一定范围内具有线性比例关系。例如,用异柠檬酸脱氢酶测定锰离子时就十分灵敏,在非常低的  $\text{Mn}^{2+}$  浓度情况下,也能准确测定。但用动力学方法测定时有两个问题应注意:① 活化剂超过一定浓度水平后常会导致抑制;② 相似的离子往往能产生同样的活化作用,因此测定易受干扰,不专一。

#### (4) 被测物为抑制剂

不可逆抑制剂对酶反应产生的抑制程度随抑制剂浓度而线性地升高,但最终抑制程度由抑制剂的绝对量决定。可逆抑制剂在底物浓度一定时,在低的抑制剂浓度范围内,酶反应速度随抑制剂浓度而线性降低。因此它们都可以用动力学方法测定,而且,这种测定一般极为灵敏。例如,用胆碱酯酶作为工具酶,能检测  $10^{-10}$ 克水平的有机磷化合物。值得注意的是,某些抑制剂能抑制多种酶,这一点没有什么关系,相反,它可提供多种选择的可能;然而,有些酶却能被多种相似的抑制剂所抑制,如果“工具酶”选择不当,就会使测定结果不准确,受到干扰。

对酶法分析来说,在建立了适宜的反应系统和测定系统后,还必须制备一条酶反应速度相对于相应的被测物浓度的标准曲线,以便对未知样品量进行查对。值得强调的是,在测定未知样品时,所采用的反应系统、测定系统应和制备标准曲线时所用的系统必须完全相同,而且待测样品的浓度还应控制在这一曲线的范围以内。

## 二、总变量分析法

总变量分析法也称为平衡法(equilibrium procedure)或终点法。它是根据被测物质的性质,选择适宜的“分析工具酶”对该物质进行作用,然后在反应完成后,再借助物理、化学方法测出其总变化量,并参考反应的平衡点,最后计算出被测物的实际含量或浓度的一种分析方法。此法仅能用于底物的测定,应用时应考虑工具酶用量与反应平衡点两个问题。

### 1. 工具酶的用量

要使终点法获得好的结果,重要条件是:① 被测的底物浓度必须十分小,并控制反应于一级反应水平,因为这样既可使反应迅速达到平衡,防止过多的产物生成,避免逆反应,同时又可减少工具酶的用量。② 其他因素应尽量处于最适水平,如果是双底物反应,则另一底

物应有足够高的浓度。③ 酶的用量要高,以保证反应能较快地达到平衡终点。

工具酶都比较昂贵,因此有一个用量问题。

当被测底物浓度控制于一级反应水平时,

$$-d[S]/dt = k' \cdot [S] \quad k' = 2.303/t \cdot \log([S]_0/[S]) \quad 7.28$$

如果假定 99% 的底物转变为产物时,即可认为反应已经完成,那么有:

$$\log([S]_0/[S]) = 2 \quad 7.29$$

如果取反应时间  $t$  为 5 min(终点法测定多控制于 2~10 min),那么:

$$k' = 2.303/5 \cdot \log([S]_0/[S]) = 0.92(\text{min}^{-1}) \quad 7.30$$

因此,用酶催化时,工具酶的用量应为:

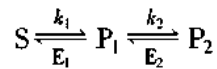
$$V = k' \cdot K_m = 0.92K_m(\text{U/ml}) \quad 7.31$$

当被测的底物浓度接近于  $K_m$  时,此时反应应以混合级方程描写。这样,工具酶的用量应为(参见式 6.69)。

$$\begin{aligned} V &= \frac{[S]_0 - [S]}{t} + K_m \cdot \frac{2.303}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]} \\ &= (0.92K_m + 0.2[S]_0) (\text{U/ml}) \end{aligned} \quad 7.32$$

概言之,对于单酶反应,工具酶用量一般可控制于  $1 \sim 2K_m(\text{U/ml})$  左右。

为测定方便,用终点法也可采用酶偶联分析法,这种情况下,



$E_1$  的用量仍可按式 7.30 或 7.31 计算,  $E_2$  则应根据式 6.26 求出  $\alpha$  后才能确定。表 7.2 为按式 6.26 计算得到的数据。

可见,  $\alpha = 2$  时,误差在 1% 左右时,  $E_2$  的用量可选择:

$$V = 1.84K_m[S_2] (\text{U/ml}) \approx 2K_m[S_2] (\text{U/ml}) \quad 7.33$$

表 7.2 指示酶的活性度与接近度  $\eta$  的关系

计算条件: $k_1 = 0.92 \text{ min}^{-1}$ , 反应时间 = 5 min							
$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$	0.1	0.2	0.5	1	2	5	10
$k_2(\text{min}^{-1})$	0.092	0.184	0.46	0.92	1.84	4.6	9.2
$\eta = \left( \frac{[P_2]}{[P_\infty]} \right)$	0.303	0.510	0.819	0.953	0.990	0.997	0.999
$\frac{[P_2]}{[S_0]}$	0.300	0.505	0.811	0.943	0.980	0.987	0.989

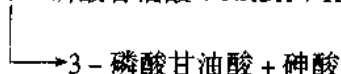
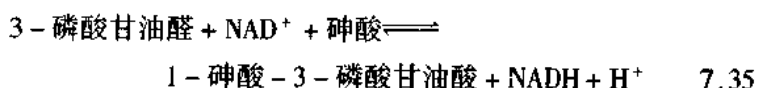
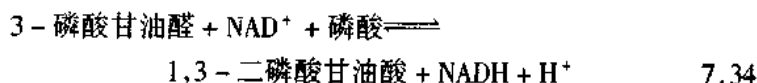
## 2. 反应的平衡点

终点法测定的第二个问题是反应的平衡点。酶反应一般都是平衡反应。当待测反应的平衡点极端偏向一方时,那么只要工具酶量足够大,反应时间较长,底物实际上可认为接近完全转化,计算起来也比较简单。但是许多反应的平衡点并不极端偏向一方,这种情况下,为使问题简化,可采取以下措施:



(1) 升高双底物反应中另一底物的浓度,改变 pH 移去反应生成的 H<sup>+</sup>,或偶联一个“捕捉”反应。例如,对于生成羰基化合物的反应可用苯肼或氨基脲除去生成物,使反应移向一向。但是,使用捕捉试剂时,应注意有些反应的测定可能受到它们的干扰,例如肼和氨基脲就可能缓慢地和 NAD<sup>+</sup> 反应生成在 UV 的长波区具有强吸收的产物,甚至掩盖 NADH 在 340 nm 的吸收。

(2) 应用辅酶或双底物反应中另一底物的类似物。例如,可以用吡啶-腺嘌呤二核甘酸代替 NAD<sup>+</sup>,它的氧化还原电位较高,能推动平衡以利于另一底物的测定;又例如,在 3-磷酸甘油醛脱氢酶测定时,可用砷酸代替磷酸:



如果用上述措施能使被测底物接近完全转化,那么就可以直接定量地测定底物浓度,否则就只能在确定条件下,通过制备标准曲线加以校正计算,或根据平衡常数进行计算了。

### 第三节 酶标免疫分析<sup>(9-12)</sup>

#### 一、原理与方法

酶标免疫分析(enzyme immunoassay, EIA)是以待测抗原(或抗体)和酶标抗体(或抗原)的专一结合反应为基础,然后通过酶活力测定来确定抗原(或抗体)含量的一类分析法。酶标免疫分析可分为:酶联免疫吸附分析(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和酶多型免疫分析(enzyme multiplied immunoassay technique, EMIT)。前者在和抗原(或抗体)结合后酶活性不发生变化,但在测定时必须进行相的分离,因此又称非均相分析法;后者由于和抗体结合后酶的活力会发生变化,故可直接在同一相中进行测定,没有相分离的必要,称为均相法。非均相法(heterogeneous EIA)又包括以下的具体的分析方法:

##### (1) 竞争法(competitive EIA)

竞争法的原理是,在测定体系中如果抗原(或抗体)的量一定,那么当加入待测抗体(或抗原)和酶标抗体(或抗原)进行免疫反应时,待测物质和酶标物质间就会产生竞争,相对仅有酶标物质进行免疫反应者,两者的差值显然代表待测物质的量。

具体的作法如图 7.9 所示,包括以下步骤:① 将定量的抗体(或抗原)分别吸附固定于载体;② 分别加入待测抗原(或抗体)和酶标抗原(或抗体)(enzyme label antigen or antibody)组成的混合物和“纯”的酶标抗原(或抗体)进行免疫反应;③ 洗去游离的抗原(或抗体);④ 分别保温进行酶反应和活力测定;⑤ 最后再根据两组测定差值确定待测抗原(或抗体)的含量。如果要获得确切的含量,可先在步骤②中用标定过的酶标抗原(或抗体)代替混合物制备一条标准曲线,然后再对照这条曲线求知抗原或抗体的量。

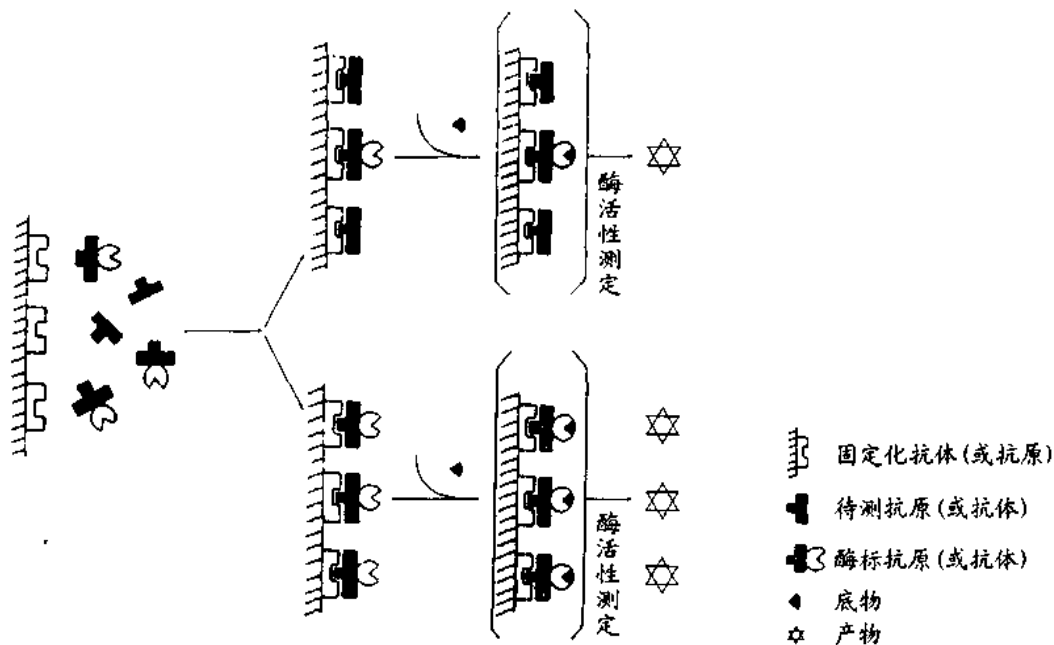


图 7.9 竞争法原理示意图

(2) 双抗法(sandwich EIA for multivalent antigen)

双抗法适于多价抗原的测定,这类抗原既能和固定用的抗体结合,也能和测定用的酶标抗体结合,由于这种结合具有双重选择性,因此,双抗测定法有极高的专一性。

具体操作如图 7.10 所示,包括四个基本步骤:① 将抗体(第一抗体)固定于载体表面;② 加入待测抗原溶液,进行免疫反应,然后洗去过剩的溶液;③ 再加入酶标抗体(第二抗体),洗去过剩的酶标抗体;④ 进行酶反应和活力测定。在这种测定中,酶活性比例于待测抗原量。

这种方法的特点是抗原和酶标抗体不一定要经过纯化,而且灵敏度很高,能测定极微量的抗原。

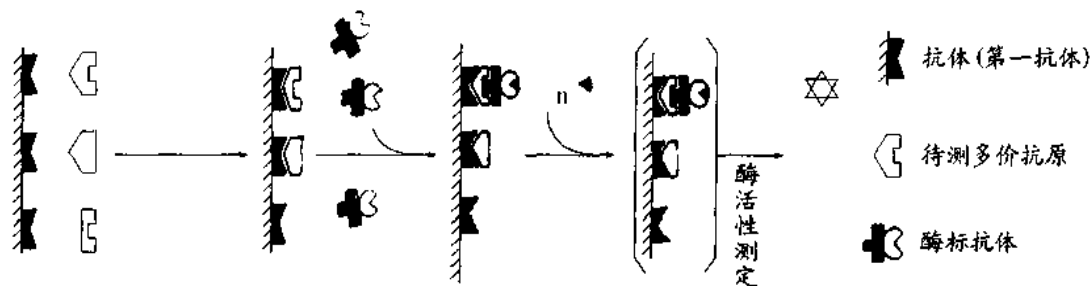


图 7.10 双抗法原理示意图

(3) 抗抗法(sandwich EIA for antibody)

抗抗法是利用抗原能专一地结合和固定待测抗体,然后再利用酶标抗球蛋白直接测定固定了的待测抗体。因此只要抗原足够纯净和专一,测定可以高度准确。

抗抗法(图 7.11)包括以下步骤:① 固定抗原;② 选择性地结合和固定待测抗体;③ 加入酶标抗球蛋白;④ 进行酶反应和酶活力测定,酶活力代表抗体量。抗球蛋白可用抗 IgG、IgM 或 IgA。

(4) 差相法(differential phase EIA)

差相法的原理是:一方面利用酶标抗体(或抗原)能选择性地和待测抗原或抗体结合;另一方面利用固定化了的抗原(或抗体)能除去多余的酶标抗体或抗原,从而使溶液相的酶活力能准确而直接地反映待测抗原(或抗体)的量。

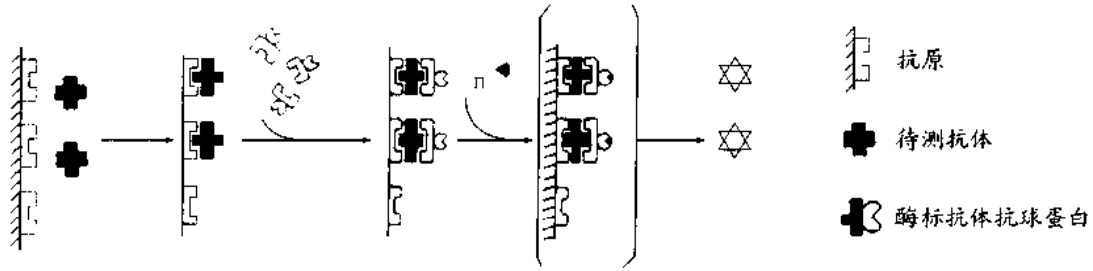


图 7.11 抗抗法原理示意图

差相法(图 7.12)包括如下操作步骤:① 待测抗原(或抗体)与过量的酶标抗体(或抗原)进行反应;② 加入过量的固定化的抗原(或抗体)移除多余的游离未结合的酶标抗体(或抗原);③ 测定上清液中结合的酶标抗体(或抗原)的活力,酶活性代表待测抗原(或抗体)的含量。

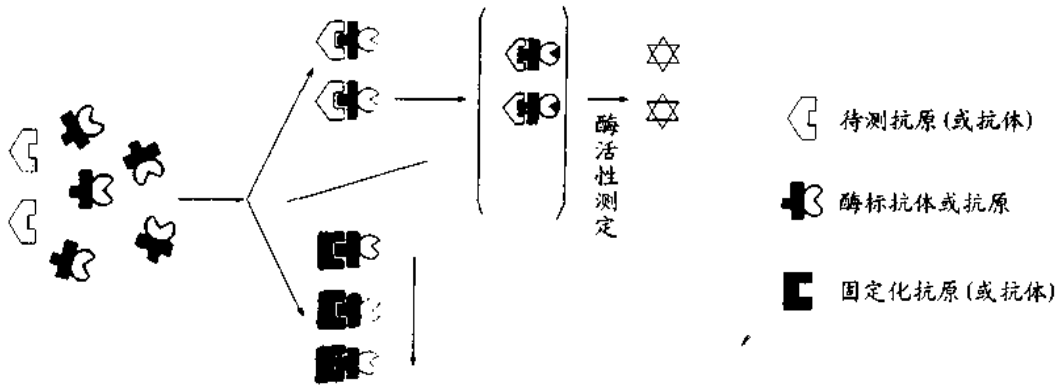


图 7.12 差相法原理示意图

(5) 均相法(homogeneous EIA)

均相法主要用于抗原测定,它的原理可用以下反应方程概括:

- ① 酶标抗原(活性)
- ② 待测抗原 + 抗体  $\rightleftharpoons$  待测抗原 - 抗体
- ③ 酶标抗原 + 抗体  $\rightleftharpoons$  酶标抗原 - 抗体(无活性)

### ①—③ 酶活性 - 待测抗原

这就是说,在通常的体系中,酶标抗原( $E_a-H$ ,  $H$  为半抗原)虽能正常地表现活性,但它和抗体结合后,由于可能产生立体障碍或构象改变,从而导致酶活力改变或丧失( $E_i-H$ -抗体)。因此,当体系中同时存在待测抗原时,由于抗体量一定,那么,待测抗原将和酶标抗原竞争抗体(图 7.13)。又因为酶标抗原-抗体无活性,所以在体系中测得酶活性来自未结合的酶标抗原。这样系统中待测抗原愈多时,未被结合的酶标抗原也愈多,可测得的酶活力也愈高,且酶活力比例于待测抗原的量。

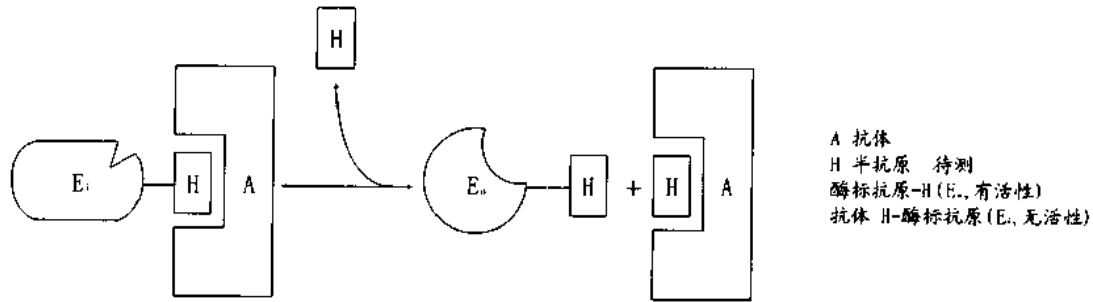


图 7.13 均相法测定原理示意图

均相法和非均相法相比,由于前者不需要进行相分离,故而较为简便,但是要得到适于这种方法的酶标抗原有较多的技术困难,特别是酶标抗原与抗体结合后的活力变化更难以预见、难于控制,因而这种方法应用不多。

## 二、酶标免疫分析中的几个问题

### 1. 酶

标记用酶的主要要求是:① 高稳定性,标记后的抗原(或抗体)仍具活性,在 4℃ 中至少应有 6 个月以上的半寿期;② 高的转换率:很少量的酶就可检出;③ 检测方法简便,可以采用光吸收法或荧光法;④ 价廉易得;⑤ 待测液中没有干扰酶活性测定的因素。根据上述要求,通常可用于酶标免疫分析的酶有辣根过氧化物酶、小肠碱性磷酸酯酶、大肠杆菌  $\beta$ -半乳糖苷酶和葡萄糖氧化酶等。

### 2. 酶标记

酶标记方法的选择标准是:不影响酶活性和免疫活性,操作简便,产量高,形成的产品稳定。现在最常用的是交联法,特别是戊二醛交联法。标记的方式有两种:① 一步式标记,即直接向酶与抗原(或抗体)蛋白的混合液中滴加戊二醛,此法已广泛用于碱性磷酸酯酶等的标记;② 两步式标记,过氧化物酶主要采用这种方式标记,即先向酶溶液加戊二醛,而后再加抗原(或抗体)蛋白,这是因为该酶游离氨基较少,而  $Ig$  则很多,故可减少  $Ig$  的自身交联。

为了消除自身交联也可采用杂型双功能试剂如  $N$ -羟琥珀酰亚胺- $m$ -马来酰亚胺苯甲酸(HSMB)等。

近年来,过碘酸交联法在制备酶标抗体上很成功,如制备的过氧化物酶- $Ig$  都得到了很

高的活性,反应机理是先用过碘酸氧化糖蛋白上的糖基,生成的醛基然后再和抗原(或抗体)的氨基反应。

酶标记反应后,必须除去未被标记的抗原(或抗体)以及未被结合的酶,在纯化酶标记物方面最常用的办法是通过 Sepharose 4B 或 Sephadex G-200 等进行胶过滤层析分离。

酶标记后应进行免疫活性和酶活性的检定,为此必须制备一条酶标抗原(或抗体)的浓度-免疫效应曲线,同时也要进行酶偶联量与相对活性的测定,必要时还须测定酶标后的  $V$  与  $K_m$ 。

### 3. 载体

用于抗原(或抗体)固定化的载体有两类,一是纤维素、琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶等,它们固定抗原或抗体多通过化学偶联法,形成的结合物十分稳定。另一类是聚苯乙烯、聚碳酸酯等,它们在酶标免疫分析的发展和推广过程中起了很大作用。其特点是应用简便、可反复使用,但其固定作用主要借助物理吸附力,因此,形成的结合物一般不稳定,易受反应条件(pH、温度)的影响而解吸。为提高测定的准确度和重复性,应对每批塑料的吸附性能进行测试,同时,避免使用长期保存的固定化抗原(或抗体);这类载体的另一缺点是有一定的非专一性吸附,为了消除非专一性吸附对测定的干扰,可用非离子型洗涤剂进行洗涤。

### 4. 固定

抗原或抗体的固定量一般有一个最适范围,固定的浓度过高或过低都难以获得满意的结果。故在建立酶标免疫分析系统时,应选择适宜的固定化抗原或抗体浓度,而且固定化的抗原或抗体的量应和待测抗体或抗原的量相当,或者超过后者。

### 5. 测定

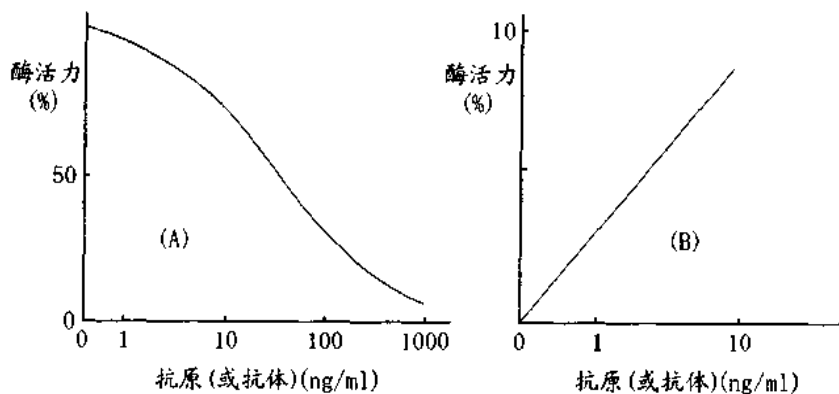


图 7.14 酶标免疫分析的标准曲线  
竞争法(A) 其他方法(B)

首先采用标准抗原或抗体,在确定的反应条件下制备一条标准曲线以备查对。标准抗体可采用高效价混合血清,抗原则需要经过充分纯化。图 7.14 分别为采用竞争法和其他方法获得的标准曲线。其次,还应通过各种实验比较各种方法的准确度、精确度和灵敏度。酶标免疫分析的准确度和多种因素,如免疫反应的专一性、标准抗原、抗体以及样品的特性等有密切关

系；一般情况下，它的准确度和放射免疫分析法相当。精确度因测定方法和测定范围而不同。灵敏度则取决于实验条件与测定方法，通常酶标免疫分析法可检测到 ng/ml 水平。

#### 第四节 酶循环分析法

酶循环分析法是在上述酶分析基础上，通过将两种相关的酶反应加以组合、放大而发展起来的一种超微量分析法。其特点是具有极高的灵敏度，甚至可测定少至  $10^{-15}$  摩尔水平的酶或其他生物物质。例如，在神经生化中可测定单个神经细胞中的酶或其他相关物质。研究酶循环分析法有两方面的意义：第一，它是一种非常有效的超微量分析手段，从理论上说，可能对 1 个分子的酶或其他物质进行定量测定；第二，酶循环反应机构本身可能就是生物机体的一种代谢系统模式。

##### 一、酶循环分析法原理

酶循环分析法是利用在专一性上相互关联的两种酶反应加以组合、循环地进行催化，使微量的酶活性或相关物质通过循环反应得以增幅放大，以达到可简便地定量测定目的的一种分析方法。以 CoA 的酶循环分析测定(图 7.15)为例：

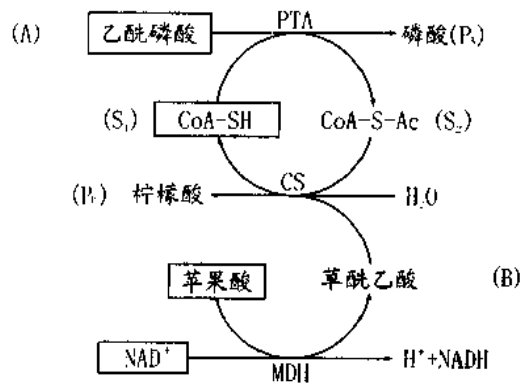


图 7.15 CoA 的循环分析法示意图

为了使待测物质 CoA 得以“循环放大”，先要选择两种相关的酶反应：磷酸转乙酰酶反应(PTA)和柠檬酸缩合酶(CS)反应。在过量的乙酰磷酸和草酰乙酸存在的条件下，由于 PTA 的作用 CoA 被乙酰化，同时生成和乙酰 CoA 等量的磷酸；另一方面在 CS 作用下，乙酰化了的 CoA 又重新脱去酰基，并生成与 CoA 等量的柠檬酸。如此反复循环  $n$  次以后，就会积累相当于  $n$  倍 CoA 的柠檬酸与磷酸，即相当于使 CoA 得到  $n$  倍的放大。这种情况下，如果再向循环系统中加入顺乌头酸酶(AC)和异柠檬酸脱氢酶(ICDH)以及过量的  $NADP^+$ ，那么积累起来的柠檬酸就会定量地使  $NADP^+$  转变为  $NADPH$ ，通过测定 340 nm 光吸收或 460 nm 的荧光就能准确而灵敏地检知 CoA。同样，这一循环系统也可和 MDH 偶联，根据 NADH 的生成用光学法检测。

##### 二、酶循环分析法动力学

为了用酶循环分析法检测微量的底物 S(如图 7.15 中的  $S_1, S_2$ )，反应系统的 A 和 B 必

须大大过量于它们相应的  $K_m$ ; 而被测的底物浓度  $[S]$  则十分小, 例如  $[S] \ll K_m$ , 使之反应速度比例于  $[S]$ :  $v = k' \cdot [S]$  ( $k' = V/K_m$ )。

同样, 用酶循环法检测微量的酶时, 酶浓度十分低, 而 A、B 及 S 的浓度要足够高, 这种情况下, 反应速度才能比例于  $[E]$ :  $v = k \cdot [E]$ 。

以下仍以  $[S]$  的测定为例进行动力学分析。根据图 7.15:

$$d[S_1]/dt = -k_a \cdot [S_1] + k_b \cdot [S_2] \quad 7.36$$

$$d[S_2]/dt = k_a \cdot [S_1] - k_b \cdot [S_2] \quad 7.37$$

注意: 此处  $k_a$ 、 $k_b$  为一级反应常数! 当  $t=0$  时,

$$[S_1] = [S_1]_0, [S_2] = [S_2]_0, [P_a] = [P_b] = 0,$$

$$[S_1]_0 + [S_2]_0 = [S]_0, \text{为一常数。因此:}$$

$$[S_1] = \frac{k_b}{k_a + k_b} [S] + \frac{k_a \cdot [S_1]_0 - k_b \cdot [S_2]_0}{k_a + k_b} \cdot e^{-(k_a + k_b) \cdot t} \quad 7.38$$

$$[S_2] = \frac{k_a}{k_a + k_b} [S] + \frac{k_a \cdot [S_1]_0 - k_b \cdot [S_2]_0}{k_a + k_b} \cdot e^{-(k_a + k_b) \cdot t} \quad 7.39$$

由于在酶循环分析法中,  $k_a$  和  $k_b$  通常大于  $10 \text{ min}^{-1}$ , 故式 7.36、7.37 中的指数项在反应开始后趋于 0,  $[S_1]$  和  $[S_2]$  仅由第一项决定, 而且,

$$[S_1]:[S_2] = k_b:k_a,$$

因此, 反应开始后  $[S_1]$  和  $[S_2]$  就成为定值, 并按下述比例分配:

$$[S_1] = \frac{k_b}{k_a + k_b} [S]; [S_2] = \frac{k_a}{k_a + k_b} [S]; \quad 7.40$$

至于 P, 由于:

$$d[P_a]/dt = k_a \cdot [S_1]; d[P_b]/dt = k_b \cdot [S_2] \quad 7.41$$

在反应开始后,  $P_a$  和  $P_b$  以恒定速度形成, 在  $t \text{ min}$  (通常为 30 ~ 60 min) 后,  $P_a$  和  $P_b$  通过积分应为:

$$[P_a] = [P_b] = \frac{k_a \cdot k_b}{k_a + k_b} \cdot [S] \cdot t = k_c \cdot [S] \cdot t \quad 7.42$$

$$k_c = \frac{k_a \cdot k_b}{k_a + k_b} \text{ 或 } \frac{1}{k_c} = \frac{1}{k_a} + \frac{1}{k_b} \quad 7.43$$

两种产物 ( $P_a$  和  $P_b$ ) 具有相同值, 它们和底物浓度  $[S]$  及反应时间  $t$  成正比。

由于  $k$  为一级反应速度常数, 有  $1/t$  的因次, 而且与酶的浓度有比例关系, 因此  $k_c$  也有  $1/t$  的因次, 并比例于两种酶的浓度。  $k_c$  称为循环率, 它可以根据式 7.43 分别求出  $k_a$ 、 $k_b$  后算出。  $k_a$ 、 $k_b$  可通过 Lineweaver - Burk 作图法, 在求出  $E_a$ 、 $E_b$  的  $V$  与  $K_m$  后得到, 也可按  $k' = \ln 2/t_{1/2}$  算出,  $t_{1/2}$  为半衰期。

为了提高  $k_c$ , 可以增大  $[E]$ 。由于在酶循环分析 A、B 通常大大过量, 因此相对  $[S]$  来说是一个拟单底物反应。又由于对应底物的  $K_m$  往往为 5 ~ 200  $\mu\text{mol/L}$ , 而被测定的  $[S]$  通常仅有  $\text{nmol/L}$  的水平, 因此当  $[E]$  增加到 0.1  $\mu\text{mol/L}$  左右的水平时, 反应就不再服从 Michealis - Menten 方程了, 而须以 Cha - Cha 方程描述:

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S] + [E]} \quad 7.44$$

在酶循环反应处于恒态时:

$$\frac{V_a \cdot [S_1]}{K_a + [S_1] + [E_a]} = \frac{V_b \cdot [S_2]}{K_b + [S_2] + [E_b]} \quad 7.45$$

( $K_a$  为  $K_m$ ,  $K_b$  为  $K_m$ )

由于  $[S_1] + [S_2] = [S]$ , 故

$$v_c = \frac{1}{\frac{K_a + [E_a]}{k_{c_1} \cdot [E_a] \cdot [S]} + \frac{K_b + [E_b]}{k_{c_2} \cdot [E_b] \cdot [S]}} \quad 7.46$$

因为,  $V_c = k_c \cdot [S]$ ,  $[E_a] \ll K_a$ ,  $[E_b] \ll K_b$ , 故

$$k_c = \frac{1}{\frac{K_a}{k_{c_1} \cdot [E_a]} + \frac{K_b}{k_{c_2} \cdot [E_b]}} \quad 7.47$$

设  $[E_a] + [E_b] = [E]$ ,  $[E_a] = \alpha \cdot [E]$ ,  $[E_b] = (1 - \alpha) \cdot [E]$ , 则

$$k_c = \frac{[E]}{\frac{K_a}{k_{c_1} \cdot \alpha} + \frac{K_b}{k_{c_2} \cdot (1 - \alpha)}} \quad 7.48$$

可见循环率随酶浓度增大而升高; 在  $[E_a]$  与  $[E_b]$  具有下述比例时, 循环率最大:

$$\left( \frac{[E_a]}{[E_b]} \right)_{\text{最适}} = \frac{\alpha}{(1 - \alpha)} = \frac{K_a/k_{c_1}}{K_b/k_{c_2}} \quad 7.49$$

酶循环分析法既可用于总的  $[S]$  的测定, 也可用于分别检测  $[S_1]$  和  $[S_2]$ , 还可用于检测微量的酶活性。由于酶循环分析法是通过相关酶的选择性增幅、放大的方法, 因此, 待测样品中即使混杂有某些其他物质, 在直接进行测定时也不会引起干扰。

酶循环分析法通过酶促反应循环放大, 因而具有很高的灵敏度, 如果再进一步用酶的循环系统偶联起来, 例如, 在 CoA 循环反应后, 生成的 NADPH 再继以循环反应, 那么增幅放大可进一步提高, 某些情况下可检测  $10^{-19}$  摩尔物质含量。

由于酶循环分析具有上述特点, 同时它又可作为机体内代谢单元的模型, 因此它的应用和研究还将进一步发展。

## 第五节 固定化酶在酶分析中的应用<sup>(13-19)</sup>

固定化酶也已经渗入并扩展到酶分析的各个领域, 为酶分析的简便化、连续化和自动化提供了可能。

最简单的应用是做成各种检测用纸片, 其中用于酶检测的纸片一般没有什么特殊问题, 但用于检测其他物质的酶纸片则有一个维持酶稳定性的问题。由于实用面不广, 这方面受到的注意不多。

固定化酶在酶分析上常用的有两种类型: 酶电极 (enzyme electrode); 酶管或酶柱与感应器 (enzyme tube (or column) plus bass sensor) 组成的测定分析仪。



## 一、酶(膜)电极

酶电极由选择性电极感应器和覆盖在它上面的选择透性酶膜 (selective permeable membrane) 组成。通过酶膜层的作用使底物转化为产物, 然后再通过感应器进行检测。图 7.16 为葡萄糖氧化酶电极示意图。

用酶电极检测的底物浓度一般是很低的, 因此这种转化可用一级反应动力学关系描述。固定化酶系统做成酶电极包含着内扩散和外扩散, 在反应与扩散处于平衡时有:

$$\overline{D_s} \frac{d^2[S]}{d^2X} = \frac{V}{K_m} \cdot [S] \quad 7.50$$

$$\overline{D_p} \frac{d^2[P]}{d^2X} = \frac{V}{K_m} \cdot [P] \quad 7.51$$

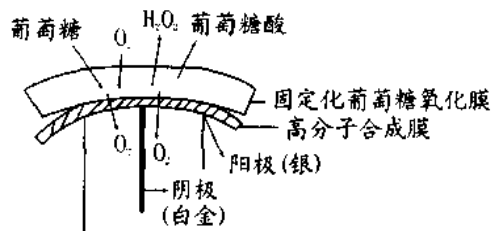


图 7.16 葡萄糖氧化酶电极示意图

仅考虑分配系数  $\rho$  的影响:

$$X = 0, [S] = [S_0] = \rho_s [S_i];$$

$$[P] = [P_0] = \rho_p [P_i] \quad 7.52$$

$$X = L, \frac{d[S]}{dX} = \frac{d[P]}{dX} = 0 \quad 7.53$$

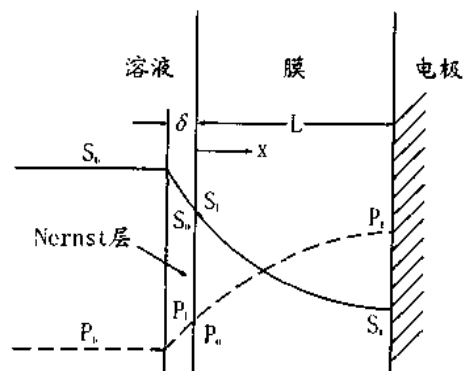


图 7.17 酶电极系统内底物与产物的浓度分布

在外扩散和内扩散处于平衡时:

$$D_s/\delta(S_0 - S_i) = -\overline{D}_s dS/dx \quad lx = 0 \quad 7.54$$

$$D_p/\delta(P_0 - P_i) = -\overline{D}_p dP/dx \quad lx = 0 \quad 7.55$$

$D$  为扩散系数。宏观溶液与电极感应器表面的浓度分配有如下关系：

$$[S_L] = \frac{[S_0]}{G_1 \cdot \cos K_m} \quad 7.56$$

$$[P_L] = P_p[P_0] + \frac{G_2 \cdot [P_0]}{G_1} \quad 7.57$$

$$G_1 = \frac{1}{P_s} + \frac{\overline{D}_s}{D_s} \cdot \frac{\delta}{L} \cdot m \cdot \tan K_m \quad 7.58$$

$$G_2 = P_p \cdot \frac{D_s}{D_p} \cdot \frac{\delta}{L} \cdot m \cdot \tan K_m + \frac{\overline{D}_s}{D_p} \left(1 - \frac{1}{\cos K_m}\right) \quad 7.59$$

$$m = L \cdot \frac{V}{K_m \cdot D_s} \quad 7.60$$

由于  $P_p$  与  $P_s = 1$ , 各种扩散系数大致相等, 宏观溶液中产物浓度近于 0, 如果样品液不搅拌, 那么  $\delta/L$  很小, 这种情况下,  $G_1 \rightarrow 1$ ,  $G_2 \rightarrow 1$ , 因此可简化为:

$$[S_L] = \frac{[S_0]}{\cos K_m} \quad 7.61$$

$$[P_L] = \left(1 - \frac{1}{\cos K_m}\right) \cdot [S_0] \quad 7.62$$

由于电极的电极电位( $E$ )由下式决定:

$$(E) = (E_0) + A \log(C_L + B) \quad 7.63$$

( $E_0$ ) 为参比电极电位,  $A$  为 Nernst 系数,  $B$  为介质系数, 由测定系统的其他离子决定,  $C_L$  为待测物质的浓度。将式 7.61 与式 7.62 代入式 7.63 得:

$$(E) = (E_0) + A \log G + A \log\left([S_0] + \frac{B}{G}\right) \quad 7.64$$

$G$  为式 7.61 与式 7.62 中  $[S_0]$  以外的常数项, 当  $B/G$  很小时, 在一定的范围内, ( $E$ ) 和  $\log[S_0]$  间有线性关系, 但是,  $[S_0]$  如果大于  $K_m$ , ( $E$ ) 达到饱和后, 线性关系就会破坏。

酶电极检测十分简便, 而且灵敏度高, 因此很可能得到普及和进一步发展; 近年来不仅有了各种酶电极, 还出现了各种微生物电极、多功能电极等。

## 二、酶管感应分析器

将酶固定于细管内壁, 样品通过细管时与管壁接触进行酶反应, 在细管出口处偶联感应分析装置, 检测流出的产物浓度, 再通过动力学关系就可求知待测物浓度。由于出口处产物的动力学推导较复杂, 在考虑反应速度(相对底物流向管壁的扩散速度)起律速作用的情况下, 有下述简单的关系式:

$$[P_e] = \frac{2l}{R V_f} \cdot \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad 7.65$$

其中  $[P_e]$  为细管出口处产物浓度,  $l$  为细管长度,  $R$  为细管半径,  $V_f$  为平均流速。此式限于  $[P_e]/[S_0] < 0.1$  的情况。

$[S_0] \ll K_m$ , 反应以一级反应动力学描述时,  $[P_e]$  比例于  $[S]$ , 因而适于用此法测定:

$$[P_e] = \frac{2L \cdot V \cdot [S]}{R V_f \cdot K_m + [S]} \quad 7.66$$

在非反应动力学律速的情况下,  $[P_e]$  和  $[S]$  的关系十分复杂, 不能以式 7.63 描述, 故难以此法测定。

流速对测定起着很大的作用, 因此在分析时应保持恒定的流速。

## 第六节 酶分析的自动化问题

所谓酶分析自动化(automation of enzyme analysis)就是指从清洗、加样、启动反应、测定、数据记录、计算处理直至提供结果等步骤, 全部由仪器自动操作。有些仪器只能作到半自动(semiautomation), 其结果计算需由人工完成。

要使酶分析自动化就必须使酶反应拟一级化, 即除了被测因素外, 其他因素都应保证过量、最适, 这样酶反应速度才能比例于被测因素。

以反应  $S_1 + S_2 \xrightarrow{E} P_1 + P_2$  为例:

$$[S_2] \text{ 和 } [E] \text{ 过量时, } \frac{d[P]}{dt} = k' [S_1]; \quad 7.67$$

$$[S_1] \text{ 和 } [S_2] \text{ 过量时, } \frac{d[P]}{dt} = k_0 [E] \quad 7.68$$

式 7.67 和式 7.68 是酶分析自动化设计的基础依据。实现  $[E]$  或  $[S]$  测定的自动化有以下几种方法:

### 一、初速度法

初速度法(initial velocity procedure)是一种通过分析仪器自动添加反应试剂和样品, 自动控制反应进行和检测, 并自动绘制酶反应进程曲线的半自动方法。但是从反应进程曲线求出反应初速度, 并换算成被测物的浓度还要靠人工进行。

为了和其他两种方法比较, 以荧光法测定脂肪酶为例, 用初速度法只能测得如图 7.18 的图形。

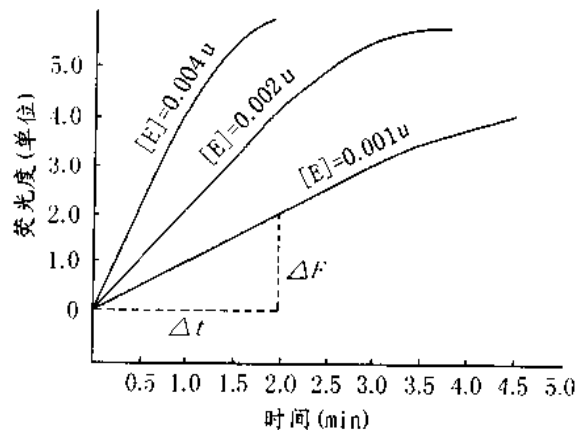


图 7.18 脂肪酶的反应进程曲线

自动分光光度计可简便地改造成这种类型的酶自动分析仪。

## 二、固定浓度法

固定浓度法(fixed concentration procedure)又称变时法,其原理是:

$$[P] = k' \cdot [S_1] \cdot t \quad [S_1] = \frac{[P]}{k'} \cdot \frac{1}{t} \quad 7.69$$

$$[P] = k_0 \cdot [E] \cdot t \quad [E] = \frac{[P]}{k_0} \cdot \frac{1}{t} \quad 7.70$$

当[P]固定时,1/t 相对[S<sub>1</sub>]或相对[E]作图都有一线性关系,当底物或反应产物变化(物理化学性质变化)达到某一固定值时,分析仪器就能自动地记录所用的时间,并换算成被测物的浓度。

同样,以荧光法测定脂肪酶为例,用这种方法时,可得图 7.19 所示的图形。荧光值可以人为固定,例如,取荧光值等于 2.0,所需要时间的倒数和酶浓度成正比。

这种方法可以做到全自动化,分析机器将酶加入反应系统、混匀,并经过一个短暂的潜伏期(一般为 15~30s),反应系统达到平衡并进入恒态以后,就会自动计时,当反应物或反应产物的物理化学性质——光吸收、荧光、pH 等改变达到一定值时,计时表自动停止。由于样品中被测物的浓度比例于时间的倒数,因此分析仪器将通过数字转换器和印刷机械把上述时间作为信号输出来,并表示成被测物的浓度。

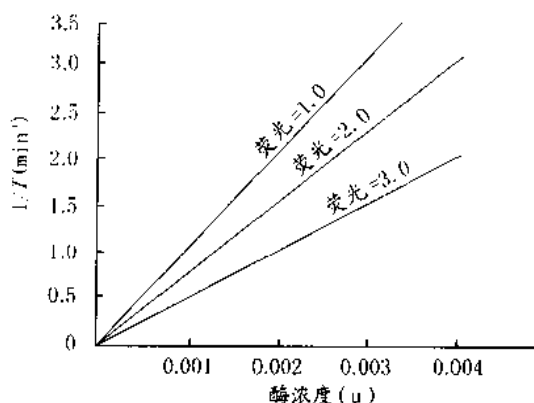


图 7.19 固定浓度(变时)法原理示意图

这种方法要求的自动化装置比第一种要复杂得多。

## 三、固定时间法

固定时间法(fixed time procedure)原理同样很简单,对于任何一个酶反应来说,在线性范围内选取一个时间进行反应的检定,此时测得的反应(产物)变化量无疑应与酶浓度(或其他被测物)有线性比例关系,测定了这种变化就可算出被测物的浓度。如图 7.20,只要选取的检读时间恰当,荧光值在一定范围内比例于酶浓度(或相应的被测物的浓度)。

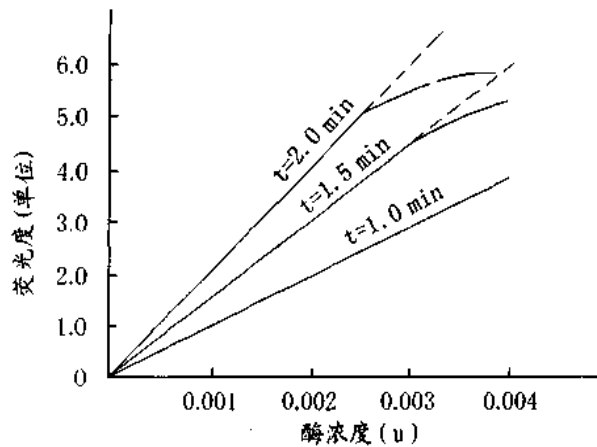


图 7.20 固定时间法测定原理

## 参 考 文 献

### 一、两种类型的酶分析

- (1) Robert EE, Michael JD. *Enzyme Assay: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press, 1992
- (2) Brodin SE, Wettermark G. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1991, **22**(1):1
- (3) Scheper TH, Lammers F. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1994, **5**(2):187

### 二、酶活力测定

- (4) Blomquist CH. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1995, **55**(5—6):515
- (5) McQueen MJ. *Clin. Chim. Acta*, 1995, **237**(12):91
- (6) Gallimore MJ, Friberger P. *Blood Rev.*, 1991, **5**(2):17

### 三、酶法分析

- (7) Billard P, BuBow MS. *Clin. Biochem.*, 1998, **31**(1):1
- (8) Ugarova NN. *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 1993, **29**(2):180

### 四、酶标免疫分析

- (9) Guesdon JL. *J. Immunol. Methods*, 1992, **150**(1—2):33
- (10) Kawai T. *J. Immunol. Methods*, 1995, **153**(4):2 101
- (11) Komuro T. *日本临床*, 1995, **53**(9):2 322
- (12) Phadke RS. *Biosystems*, 1992, **27**(4):203

### 五、固定化酶在酶分析中的应用

- (13) Turner AP. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1994, **5**(1):49

- (14) Higson SP. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 1997, **37(11)**:721
- (15) Pfeiffer D, Ralis EV, Makower A et al. *J. Chem. Technol. Biochnol.*, 1990, **49(3)**:255
- (16) Tang LX, Vadgama P. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 1990, **28(3)**:B18
- (17) Gazzaz SS, Rasco BA & Dong FM. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, 1992, **32(3)**:197
- (18) Guesdon JL. *J. Immunol. Methods*, 1992, **150(1-2)**:33
- (19) van der Pol JJ, de Gooijer CD, Biselli M et al. *Trends Biotechnol.*, 1996, **14(12)**:471

## 第八章 酶反应器

酶在生产实践上蕴藏着巨大的潜力。为了使这种潜力得以充分发挥,除了要选育出合乎要求的产酶菌,建立有效的生产酶、提制酶的工艺外,还要经济有效地应用它,这是酶工程要考虑的一个重要方面。

酶反应器(Enzyme reactor)研究的中心问题是要合理应用酶,降低产品成本,提高产品的质量。具体地说,它包括三个内容:选择酶适宜的应用形式;选择适宜的反应器;选择适宜的反应操作条件。

### 第一节 酶的应用形式<sup>(1-4)</sup>

随着酶分离纯化方法的进步、固定化技术的发展,酶的应用形式也在不断地改进。就酶反应器来说,由于具体目标和内容不同,所采用的酶反应类型、反应性质、规模和要求也不同,还有酶的成本、稳定性,反复使用的可能性不同等问题,因此首先就有一个应用形式的选择问题。

#### 一、完整细胞

这种应用形式一般用于物质转化、三废处理等过程,主要利用细胞内酶发挥作用。例如,利用微生物的代谢活动,以生产不同复杂程度的产物,如抗生素、维生素等,这些产物的转化大多是在微生物生长的同时或生长的后期,通过其代谢活动完成的,因此,往往涉及多种酶的联合作用。当然也可利用单种酶的作用,因而与微生物本身的生长和代谢活动无关,在这种情况下有可能使用特殊的反应条件,例如,加入铁氰化钾等以加速根瘤土壤杆菌转化蔗糖为3-酮蔗糖;又例如,在水不相混溶的溶剂如四氯化碳组成的反应系统中,让诺卡氏稠菌糊中的胆固醇氧化酶能充分发挥作用,使高浓度的胆固醇迅速转化为胆甾烯酮。

就完整的细胞形式而言,细菌一般只用一次,某些霉菌的菌丝体可反复使用几次。为了克服回收上的困难,现在的趋势是发展固定化的微生物,特别是发展固定化的生长菌体。菌体可固定于聚丙烯酰胺胶内、胶原膜内或纤维素滤膜内,例如,应用包埋于聚丙烯酰胺胶内的产氨短杆菌,通过五步酶反应就能使泛酸转化为CoA。

完整细胞应用形式的主要缺点是副反应可能影响产品的产量与质量。解决的办法是选择适宜的底物或改造底物,或者设法选择地使干扰的酶失效。

#### 二、溶液酶

溶液酶的适用面很广,可用于物质转化、产品加工、工艺革新和三废处理等各种过程。

这种形式利用的主要是细胞外酶,但不限于胞外酶,也不限于微生物来源的酶。副反应少,并可通过对酶进行不同程度的纯化而加以避免副反应,因而能保证产品的质量。溶液酶

主要的缺点是很难反复使用。

### 三、固定化酶

固定化酶主要用于物质转化,某些情况下也可用于产品加工、革新工艺和处理三废等过程。

这种形式利用的也主要是细胞外酶。由于在反应前可将固定化酶充分洗净,反应后又很容易和反应液分离,故产品质量有较好的保证。

固定化酶的主要优点是能反复多次使用,特别是共价偶联的固定化酶有较长的使用寿命。已有的资料表明,以批量方式应用时,固定化酶至少可反复使用 10~15 次,某些情况下可高达 100 次以上;以连续方式应用时,一般也可使用大致相等的时间。固定化菌体反复使用的次数和时间则少得多。近年来人们正致力于开发固定化多酶反应器,或将酶固定于同一载体或不同载体,或将酶直接固定于菌体上,使之用于复杂的转化与生产。理论上,它可能兼备完整细胞与固定化酶所具有的优点,但实际应用尚存在许多问题。

溶液酶和固定化酶的选择,应考虑以下几种因素:应用的性质与范围;保存稳定性和操作稳定性;成本等。其中,第一种因素所遇到的情况比较多样、比较复杂,例如,某些过程就根本无法应用固定化酶。后两种因素,彼此间有一定的联系,一般地说,由于大多数酶处于固定化状态时有较高的稳定性,可以反复使用,成本相对较低。因此,人们对固定化酶具有更大的兴趣,它可能成为酶应用的一种主要形式。

在应用固定化酶时,有固定化方法与载体的选择问题。

#### 1. 固定化方法的选择

(1) 安全。在制备固定化酶的过程和应用中都必须考虑安全因素。因为除了吸附法和包埋法以外,其他固定化方法与固定化过程中都包含化学反应与化学试剂的应用,如共价偶联试剂或交联用的双功能试剂本身就是很强的蛋白质结合试剂,而且它们还可能在反应过程中形成有毒的副产物,因此这些试剂或副产物的残留将构成安全问题,对食品和医药工业尤应特别注意。

(2) 成本。许多在实验室可采用的固定化方法,在大规模生产时却往往不行,原因之一可能是放大上的困难,另一原因则可能是成本太高。不过在考虑成本时,还须将它和总的成本,即将它在总的成本中所占的比例,以及将它和工业产值联系起来加以权衡。因为有时固定化的成本虽然较高,但是和总的成本以及产值、效益相比却可能很小。

(3) 产量与活力。好的固定化方法与条件应不引起酶的失效,而且,固定的酶量大,相对活力高,同时酶的滞留时间长。

(4) 稳定性。好的固定化酶应有较高的操作稳定性(operational stability)与保存稳定性(storage stability)和较长的操作半寿期与保存半寿期。

在酶的固定化过程中,往往不只一种因素,而是两种以上的因素在起作用,例如,以共价偶联方式固定时,其中某些酶分子可能不是通过共价连接的,而是借助吸附力加以固定的。在这种情况下,这些酶分子在高的离子强度条件下就很可能解离脱落。



## 2. 固定化载体的选择

固定化载体的选择标准,基本上和固定化方法的选择标准相同,而且两者之间有着密切的联系。

(1) 载体的形式。固定化的载体可以做成多种形式:膜片状、管状、纤维状和颗粒状等。就非颗粒状载体来说,它们往往作为反应器整体的一个组成部分,因而要求有足够的机械强度能抵抗反应器中存在的压力降;对于颗粒状载体而言,它们在形状、大小和密度上可能各不相同,这些参数将直接影响固定化酶的性能。颗粒载体可以是球状,也可以是不规则无定形,前者很少出现压密、磨损等问题,但后者则可能因这些问题而阻碍它的应用。颗粒的大小和单位重量载体上酶的装载容量有关,以非孔型的球状载体为例,酶的装载容量反比于颗粒的直径。但是在选择载体时也应考虑到,当颗粒太小时,反应器有滞留的极限问题,而且比较敏感于机械应力,同时,破断负荷也将随颗粒的直径而减少;另外大多数载体材料的密度略大于水,它们适用于通常的反应系统,但是,如果反应系统有不溶性颗粒物质存在或产生时,为了使固定化酶在反应后易和这些物质分离,使用密度较大的载体就较为有利。

(2) 载体的结构。载体从结构上考虑可大体分为三种类型:有孔型、半透膜型和非孔型。载体做成有孔结构往往有助于大大提高酶的装载容量,但是采用有孔型载体时有三点值得注意:第一,如果酶是包埋在半透膜内,那么它们有着均一的分布和均一的动力学性态;但是如果是包埋或偶联于有孔载体内,则由于内扩散效应的影响,接近于载体表面的微环境和载体颗粒内部的微环境将有所不同。第二,如果酶的底物是大分子,则载体的孔径将是一个重要的限制因素。第三,对于某些载体材料来说,随着孔的增多、孔径的增大,往往还可能带来机械性能上的问题。

(3) 载体的性质。载体可分为水不溶性载体和水溶性载体。在固定化酶中通常多采用前者,但是对于作用高分子底物的酶来说,为了克服载体可能造成的立体障碍,采用水溶性载体往往比较有利,现在常用的水溶性载体材料有海藻酸、角叉菜胶等。有趣的是海藻酸在 pH 大于 4 时可溶,在 pH 3 以下则基本不溶,因而,有利于固定化酶的回收。水溶性载体中也包括某些小分子物质,如小分子脂肪酸衍生物,据报道它们对某些酸有稳定作用。

载体也可分为亲水载体和疏水载体以及无机载体。亲水载体适于通常的水溶液反应体系,但一般机械性能较差。疏水载体和无机载体,从经济观点看有利于工业上的应用,有较好的机械性能,而且较为稳定,回收也较容易,特别是以金属材料,如氧化铁等制成的载体。

载体的亲水与疏水性质等对反应的动力学性态有很大影响,它们既可能直接影响酶的催化性质,也可能通过分配系数影响反应的最适 pH 和  $K_m$ 。但是在酶反应器中这种影响似乎没有多大意义,因为:第一,在酶反应器中使用的底物浓度一般远远大于  $K_m$ ;第二,对于荷电的产物和底物系统来说,如果由它们产生的离子强度足够高,这种影响也往往可以淹没。

(4) 酶偶联量或装载量和实效系数。有孔型载体,特别是小颗粒载体可大大提高酶的装载容量。但是在高装载量情况下,并非所有的固定化酶分子一定都能有效地发挥作用,这样就产生了实效系数这一概念。实效系数是指可以有效地发挥作用的酶分子在总的固定化酶分子中占有的比例。图 8.1 表示在底物浓度为  $10 K_m$  的条件下,各种固定化酶量的实效

系数和颗粒大小的关系。

可见,第一,颗粒较小,实效系数较高;第二,单位载体上固定化的酶量较小,实效系数也较高。但是值得指出的是,酶装载量如果太小,实效系数虽高,但总的活力小,也不经济,因此在酶装载量和实效系数之间必须加以适当平衡。

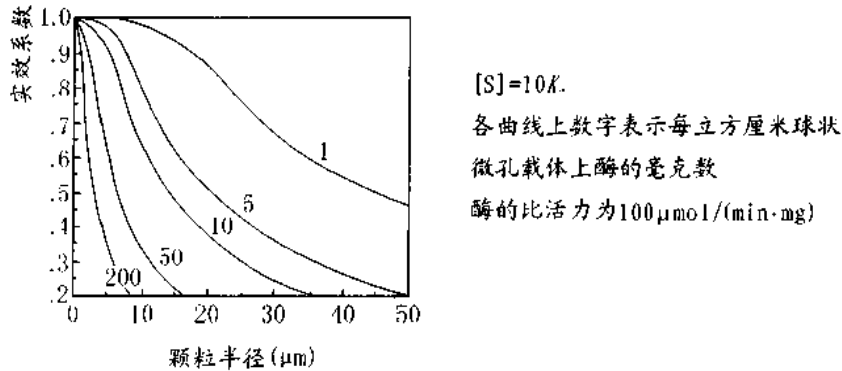


图 8.1 实效系数和颗粒大小的关系

表 8.1 归纳了酶的各种应用形式、固定化方法和固定化载体及其选择要点。

表 8.1 选择酶的应用形式、固定化方法和固定化载体应考虑的因素

	催 化 剂	固 定 化 方 法	固 定 化 载 体	酶 反 应 器
类 型	细胞 代谢型 非代谢型 修饰型 固定化细胞 酶 可溶性 稳定性 可溶性固定化酶 不溶性固定化酶	包埋 胶格 微囊 结合 吸附 共价	可溶性 低分子量 高分子量 不溶性 有孔型/非孔型 颗粒状 片状 管状 纤维状	批次式 单次应用 多次应用 连续式 开放型 封闭型 管状 管状 搅拌式 搅拌式
选择时应考虑的因素	转化性 产量纯度 稳定性、反复应用可能性	安全 成本 稳定性	固定化方法 底物性质 反应器 机械性能	操作需要 成本与价值 催化剂再生、更换 反应器动力学

## 第二节 酶反应器<sup>(5-6)</sup>

### 一、酶反应器类型

酶反应器按操作方式可大体分为两种类型:批量式反应器和连续流反应器。

批量式反应器,或称批量搅拌桶式反应器(Batch Stirred tank reactor, BSTIR),它的特点是,结构简单,不需要特殊设备,适于小规模实验。当前食品和饮料工业多采用这种形式的反应器。一般应用溶液酶或粗酶制剂催化,酶不回收,待反应转化至一定程度后,通过加热或其他方法直接使之失效除去。在工业生产中,这种反应器很少采用固定化酶,因为,在反

复过滤或离心回收过程中,容易造成酶的失效损失。

连续流反应器,根据其流动模式通常又可分成两种基本形式:连续(流)搅拌桶式反应器(continuous stirred tank reactor, CSTR 或称 continuous flow stirred tank reactor, CFSTR) 和填充式反应器(packed bed reactor, PBR)。在这两种基本形式基础上又发展了各种衍生形式:连续流搅拌桶-超滤组合式反应器(CSTR/Ultrafiltration reactor, CSTR/UFR);流化床反应器(fluidized bed reactor, FBR)以及循环床反应器(recycle reactor, RCR)等。图 8.2 是现有的各种反应器的示意图。

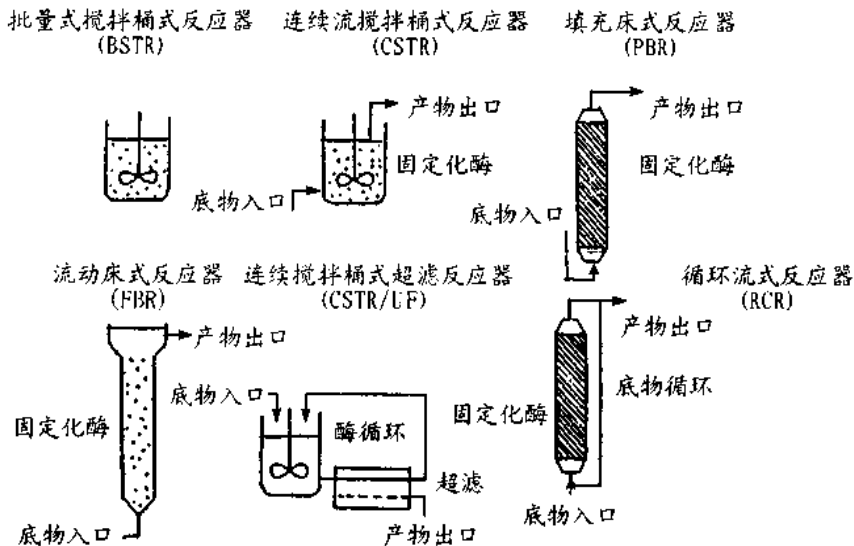


图 8.2 常见各类反应器示意图

连续流搅拌桶式反应器是批量式反应器的衍生形式,这种反应器都装有搅拌系统,反应器中的组成成分能充分混合,均一分布。在 CSTR 中催化剂通常采用颗粒状的固定化酶,少数报道应用片状固定化酶,酶量可根据需要适当确定。和批量式反应器不同,它在运转过程中要不断分出部分反应液,同时补充等量的新鲜底物溶液,为不致使反应器中的酶随反应液流流失,所以在它的出口处通常装有滤膜,也有的采用磁性的固定化酶酶粒,同时借助澄清方法滞留。

填充床式反应器是当前采用最多的一种反应器形式,床内用颗粒状或片状固定化酶填充;这种反应器也可平行地填充各向异性的半透性中空纤维,或者作成管状,内部填充酶膜、酶片等。填充床反应器运转时,底物按一定方向以恒定速度通过反应床。对于典型的填充床来说,如果柱的横截面上液体流动速度完全相同,同时不考虑流动方向上的速度梯度与温度梯度、以及轴向上的底物扩散因素,那么整个反应器可以看作是处于活塞式流动状态,因此这种反应器又称为活塞式流反应器(plug flow reactor, PFR)。CSTR/UFR 是由连续流搅拌桶式反应器和超滤装置组合而成的,它为小分子量产物与高分子底物的分离、底物较彻底的转化以及溶液酶或固定化酶的反复使用提供了可能。但是酶易因循环超滤而失效损失。现在有一些改进的报道,例如,直接将酶偶联于板状或中空纤维滤膜上。

流化床反应器和连续流搅拌桶式反应器都是让适量的颗粒状酶悬于反应床中,但前者不用搅拌器,而是让底物向上流过固定化酶床,因此流速要加以适当控制。流化床反应器中

酶的阻截常如 CSTR。

循环反应器是让部分反应流出液再循环,并和新加入的底物流入液混合再进入反应床,因此可达到较高的转化,这种反应器可使用高速液流,也可用于转化不溶性底物。

## 二、酶反应器的选择

选择酶反应器应考虑以下几个方面的问题:酶的应用形式;底物的物理性质;酶反应动力学;酶的稳定性;操作要求;应用的可塑性以及成本等。

### 1. 酶的应用形式与反应器选择

溶液酶的回收有一定困难,所以除了 BSTR 外,其他反应器一般都不适用;CSTR/UFR 虽然可以解决反复使用的问题,但是酶常因超滤膜吸附与浓差极化而损失,同时高流速超滤也可能造成酶的切变失效。

颗粒状或片状固定化酶对 CSTR 和 PBR 类型的反应器都同样适用,但膜状和纤维状固定化酶却只适用于填充床操作。另一方面,如果颗粒状酶易变形或易凝集,或者为了提高催化剂表面与反应器的体积比而需要使用小颗粒状酶或碎片状固定化酶时,那么这些小颗粒在 PFR 中往往会产生很高的压降,造成压密堵塞现象,大规模操作常不易获得足够的流速,此时用 FBR 则可克服这一困难。

### 2. 底物的物理性质

底物不外乎有三种形式:可溶性物质、颗粒物质和胶体物质。可溶性底物显然对任何类型的反应器都适用;但是颗粒体或胶体状底物却往往可能堵塞填充床,而这时应用 CSTR、FBR 和 RCR 较为适合,采用高的搅拌速度、高的流速可减少底物颗粒的集结、沉积和堵塞,能使底物保持悬浮状态。但须注意,高速搅拌等常导致酶从载体上脱落。

### 3. 酶反应动力学

根据各种反应器的动力学分析(见下),概括地说,对于大多数反应而言,由于在填充床反应器中,底物在每点上相对最终转化来说都处于最大状态,而在连续流搅拌桶式反应器中则恰恰相反,因此前者的平均反应速度高于后者,即 PBR 比 CSTR 优越。当产物对反应有抑制作用时,这一优越性更为突出;但是当底物对反应有抑制作用时,CSTR 受到的影响却比 PBR 小。另外,反应器中酶催化的反应速度的一般规律是,在 CSTR 中随搅拌速度改变、在 PBR 中则随流速而改变。

### 4. 酶的稳定性

在反应器运转过程中,由于高速搅拌、高速液流的冲击,酶常受到切变力作用,导致酶扭曲而失效,或导致酶从载体脱落,或导致固定化酶磨损最后从反应器中流失。就各种类型的反应器比较而言,CSTR 一般远比别的反应器更易引起这类切变损失。

### 5. 操作要求、应用的可塑性及成本

有的酶反应需要不断调整 pH,有的则需要经常供氧,也有的需要间歇地补充反应物,此

外还有一些情况需要不断进行酶的更新。对于这些, CSTR 类型的反应器可以不中断运转过程而顺利地实行, PBR 则不行。不过, 近年来的报道表明这个问题在特别设计的 PBR 中也可容易地得到解决。

CSTR 类型的反应器一般应用的可塑性较大, 结构较简单, 成本也低; 而与之相对的, PBR 反应器则稍稍逊色。但是, 在考虑成本时, 还须注意到酶本身的价值与其在相应的反应中的稳定性。

综上所述, 在选择反应器类型时必须根据具体情况进行权衡。为简明起见, 下面再将各类反应器的主要特征加以归纳比较。

BSTR 和 CSTR 的共同特征是: 结构简单, 操作方便, 适用面广(包括可用于粘性或不溶性底物的转化加工), 在底物表现抑制作用的情况下可以获得较高产量。BSTR 还可用溶液酶催化, 且比 CSTR 更简便。

PBR 最突出的优越性是它有较高的转化率; 特别是当产物对反应表现抑制作用的时候, 它受到的影响较小。缺点是用小颗粒固定化酶时可能产生高的压降和压密现象, 此外它不适于粘性或不溶性底物。

FBR 有下列特点: 物质交换和热交换特性较好; 不引起堵塞; 可用于不溶性底物的转化; 低压降; 但需要消耗较大的动力; 而且不易直接放大。

CSTR/UFR 能够使用溶液酶, 也适于处理粘性或不溶性底物; 然而长时间运转时, 酶的稳定性较差, 也易为超滤膜吸附, 并可能产生浓差极化现象。

RCR 的特点是, 转化率高, 可采用高速液流以克服外扩散限制, 但设备成本较高。

一个理想有效的反应器最好能包括上述各种类型的反应器的优点, 所以, 除了图 8.2 所示的各种类型以外, 人们还在开发其他更好的形式。例如, 近年来, 含水有机溶剂酶反应系统的开发, 人们就设计了相应的反应器(图 8.3)。

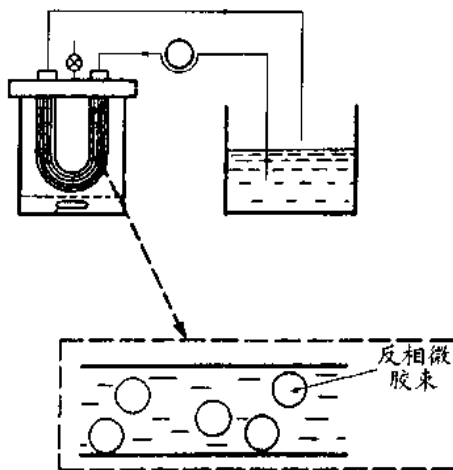


图 8.3 应用于含水有机溶剂系统酶反应的反应器之一

### 三、酶反应器的有关动力学问题

#### 1. 理想条件下各类型的反应器的动力学

为了了解和描述各种类型酶反应器的性能, 以便进行深入的比较与选择, 先讨论理想条

件下 Michaelis - Menten 方程在这些反应器中的表现特征。这里所谓的理想条件是指：

- (1) 等温；
- (2) 酶均一分布，在 PBR 中没有轴向扩散或梯度，在 CSTR 中完全均匀混合；
- (3) 不考虑底物的扩散限制；
- (4) 不考虑底物在固液相间分配系数的影响。

为便于讨论，引入几个参数：

$$\tau = \frac{V_R}{q} \quad 8.1$$

$\tau$  为反应液在反应器内停留的时间， $V_R$  为反应器体积， $q$  为流速，因此  $\tau$  可看作是特定条件下底物经过反应器空体积所需要的时间。

$$X = \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0} \quad 8.2$$

$X$  为转化率， $[S]_0$  和  $[S]$  分别为输入和输出时底物浓度。

$$r = \frac{X[S]_0}{\tau} \quad 8.3$$

$r$  为反应速度(代替第六章中的  $v$ )。

$$C_R = k_0 \cdot e \cdot \epsilon \cdot V_R \quad 8.4$$

$C_R$  为反应器的反应能力； $\epsilon$  为孔隙度，即液体体积与反应器体积之比，在 CSTR 中它接近于 1；在 PBR 中为 0.5 ~ 0.75。

酶反应器有多种形式，但最基本的是三种类型：BSTR，CSTR 和 PBR，它们的动力学方程如下：

$$\text{由于：} \quad r = k_0 \cdot e \cdot \frac{[S]}{K'_m + [S]} \quad 8.5$$

( $r$  代替  $v$ ；考虑到固定化酶的影响，以  $K'_m$  代替  $K_m$ )

在  $X = 80\% \sim 90\%$  时，式 8.5 须以积分式表示，故有：

$$\text{BSTR：} \quad k_0 \cdot e \cdot t = K'_m \ln \frac{[S]_0}{[S]} + ([S]_0 - [S]) \quad 8.6$$

$$X[S]_0 - K'_m \ln(1 - X) = k_0 \cdot e \cdot t \quad 8.7$$

$$X[S]_0 - K'_m \ln(1 - X) = k_0 \cdot \frac{E}{V_R} \cdot t \quad 8.8$$

式 8.8 中  $e$  为酶浓度， $E$  为总酶量。

PBR 在理想条件下可以看成是以活塞式流动方式运转的，即相当于很多个 BSTR 在工作，但是没有回混问题，故动力学方程可从式 8.8 加以引申，即得：

$$\text{PBR：} \quad \frac{q}{V_R} [X[S]_0 - K'_m \ln(1 - X)] = k_0 \frac{E}{V_R} \cdot \epsilon \quad 8.9$$

$$X[S]_0 - K'_m \ln(1 - X) = k_0 \cdot \frac{E}{q} \cdot \epsilon (= k_0 \cdot e \cdot \epsilon \cdot \tau) \quad 8.10$$

由于：

$$r = \frac{[S]_0 X}{\tau} \left( = \frac{k_0 \cdot E / V_R \cdot [S]}{K'_m + [S]} \right), \text{故：} \quad 8.11$$

$$\text{CSTR:} \quad X[S]_0 + K_m \left( \frac{X}{1-X} \right) = k_0 \cdot \frac{E}{q} (= k_0 \cdot e \cdot \tau) \quad 8.12$$

由上述方程可见:

(1) 当以实际的反应时间代替  $\tau$ , 而且  $\epsilon = 1$  时, 式 8.8 和式 8.10 基本相同, 即有近似的动力学性态。

(2)  $[S]_0 \gg K_m$  时, 反应趋向 0 级, 三种反应器表现相同的反应性态。

$$k_0 \cdot e \cdot \tau = X[S]_0 \left( X = \frac{k_0 \cdot e \cdot \tau}{[S]_0}; \tau = \frac{X[S]_0}{k_0 \cdot e} \right) \quad 8.13$$

但是当  $[S]_0 \ll K_m$  时, 需用一级反应动力学关系描写, 此时:

$$\text{PBR:} \quad K_m \ln(1-X) = k_0 \cdot e \cdot \epsilon \cdot \tau \quad 8.14$$

$$\text{CSTR:} \quad K_m \ln \left( \frac{X}{1-X} \right) = k_0 \cdot e \cdot \tau \quad 8.15$$

比较式 8.14 和 8.15, 可得:

$$E_{\text{CSTR}}/E_{\text{PBR}} = \frac{X \cdot \epsilon}{(1-X) \ln(1-X)} \quad 8.16$$

根据式 8.16, 当  $[S]_0 \ll K_m$ , 反应以一级反应动力学关系式描写时, 要达到一定的转化率, CSTR 所需要的酶量比 PBR 者大(图 8.4)。例如, 当  $[S]_0 = 0.1 K_m$ ,  $\epsilon = 0.5$ ,  $X = 0.99$  时, CSTR 所需的酶量是 PBR 所需的 25 倍。反之, 酶量相同时, 相同的反应时间内, 在 PBR 中底物的转化率远高于 CSTR。这就是说 PBR 优于 CSTR。

根据式 8.16 也可看出, CSTR 和 PBR 所需酶量都将随  $X$  变大而增加, 而且  $X$  愈大, 两者的比值也随之升高。如,  $[S]$  和  $\epsilon$  相同时,  $X$  从 0.95 升至 0.99, PBR 需要添加 30% 的酶, CSTR 则需添加 250% 的酶; 同样条件下,  $X$  从 0.90 升至 0.99 时,  $E_{\text{CSTR}}/E_{\text{PBR}}$  将从 4.5 升至 25(图 8.4)。这说明, 对于这两种反应器来说, 产值小的升高都必须以生产率的下降为代价, 这种下降在 CSTR 中尤为显著。也说明, 在选择反应器时, 必须考虑多种因素的相互关系, 如固定化酶的成本、底物是否昂贵、反应产物与反应物是否易于分离及转化率等, 并在其间作出权衡。例如, 可的松的转化、青霉素的脱酰基等反应, 由于底物较为昂贵, 而且不易和产物分离, 因此, 在保证相应的固定化酶具有高度的稳定性基础上, 值得强调的是产值, 而不是生产率。这也进一步说明, PBR 优于 CSTR。

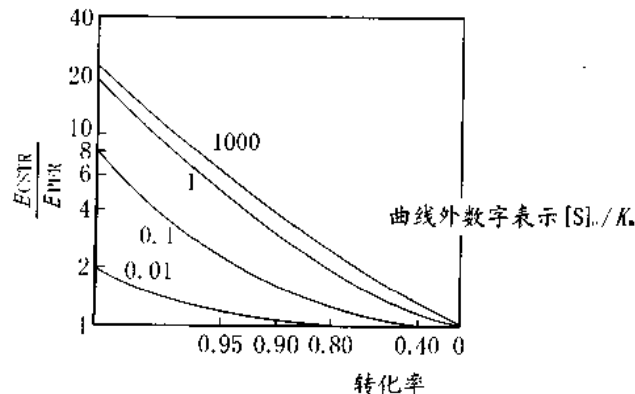


图 8.4 转化率与酶量的关系

6.2.1.1  
 2.2.1

图 8.4 描述了两反应器转化率和酶量的关系。

(3) 将式 8.8、式 8.10 和式 8.12 中之  $X$  对  $q \cdot K_m / k_0 \cdot e$  作图, 可得图 8.5 所示之曲线。横轴实际上表示流量与反应器体积比, 数值大, 则表示反应器体积小、酶浓度低、处理量大。从经济观点看, 横轴数值愈大愈好。图 8.5 表明, 转化率  $X$  相同时, PBR 的横轴值比 CSTR 者大, 这一点在转化率高时尤为显著; 但在  $X$  较低时, 则两者比值接近于 1。另一方面, 输入的底物浓度也影响横轴值的差,  $[S]/K_m$  升高时, 差值变小, 则 PBR 的优越性也逐渐消弱。

(4) 如前所述, CSTR 的效果比 PBR 差, 特别是在转化率高时更为突出。但是, 将多个 CSTR 直线联结在一起使用时, 这种不利的状况就可以得到克服。图 8.6 表示直线联结的多槽 CSTR 的转化率与 PBR 的转化率和  $q \cdot K_m / V$  的关系。其中  $n_1$  为反应槽数, 每个反应槽的体积为总体积的  $1/n_1$ , 由图可以看出, 对于相同的  $q \cdot K_m / V$  来说, 随  $n_1$  增加, 其反应的转化率也增高,  $n_1$  无限增大时, 最终将与 PBR 的转化率一致。此外也可看出, 转化率在反应槽数从 1 到 2 时增大得最明显, 这就是说, 反应槽数仅增加 1 个时就可大幅度补偿 CSTR 的不足。

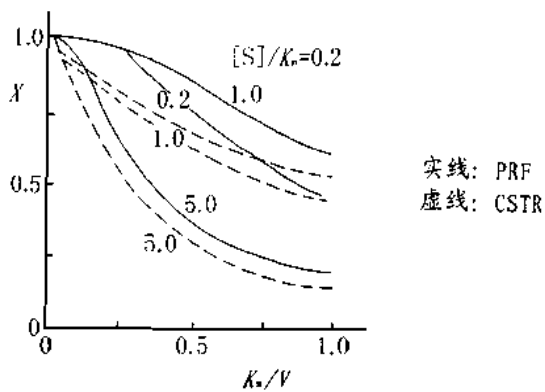


图 8.5 转化率与流速的关系

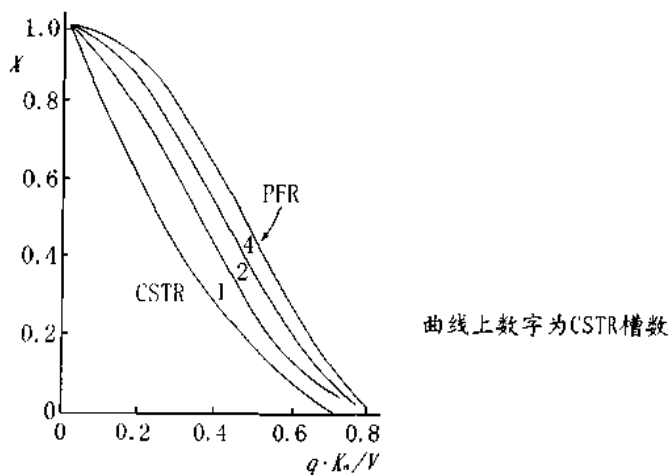


图 8.6 转化率与 CSTR 反应槽数的关系



## 2. 底物或产物抑制影响下的反应器动力学性态

表 8.2 是在底物或产物表现抑制影响的条件下, 两类基本反应器的动力学方程。

表 8.2 底物抑制与产物抑制条件下的动力学方程

底物抑制:

$$\text{BSTR: } r = k_0 / (1 + K'_s/[S] + [S]/K_s) \quad 8.17$$

$$\text{CSTR: } k_0[E]_0\epsilon\tau = [S]_0X + K'_s[X/(1-X)] + [S]_0(X - X^2)/K_s \quad 8.18$$

$$\text{PER: } k_0[E]_0\epsilon\tau = [S]_0X - K'_s\ln(1-X) + [S]_0^2(2X - X^2)/2K_s \quad 8.19$$

产物表现竞争性抑制:

$$\text{BSTR: } r = k_0[E]_0 / [1 + (K'_s/[S])(1 + [P]/K'_p)] \quad 8.20$$

$$\text{CSTR: } k_0[E]_0t = [S]_0X + K'_s[X/(1-X)] + (K'_s/K_p)[[S]_0X^2/(1-X)] \quad 8.21$$

$$\text{PFR: } k_0[E]_0\epsilon\tau = [S]_0X(1 - K'_s/K_p) - K'_s\ln(1-X)(1 + [S]_0/K_p) \quad 8.22$$

产物表现非竞争性抑制:

$$\text{BSTR: } r = k_0[E]_0 / [1 + (K'_s/[S])[1 + ([P]/K'_p)]] \quad 8.23$$

$$\text{CSTR: } k_0[E]_0\tau = [S]_0 + K'_sX/(1-X) + K'_s/K_p[(1-X)/[S]_0X^2] \quad 8.24$$

$$\text{PFR: } k_0[E]_0\epsilon\tau = [S]_0X(1 - K'_s/K_p - K'_s\ln(1-X)(1 - [S]_0/K_p) + [S]_0^2X^2/2K_p) \quad 8.25$$

可见:

(1) 当底物或产物对反应具有抑制作用时, 它们在各类反应器中都可能产生很大的影响, 并表现不同的动力学性态。其中, 底物抑制在 PBR 和 BSTR 中产生的影响比在 CSTR 中的强烈, 转化率的降低大于 CSTR; 与此相反, 产物抑制在 CSTR 中造成的影响则比在 PBR 中显著得多。

(2) 为了补偿底物或产物抑制作用导致的转化率下降, 在给定的时间内要达到非抑制情况下相同的转化率就必须提供更大量的酶。以 PBR 为例, 当产物表现非竞争性抑制时, 所需要的酶是没有抑制时的 2~500 倍; 而对于 CSTR 来说, 产物抑制引起的酶的添补量无疑更大。同样, 对于 PBR 来说, 底物抑制造成的酶需要量也将比产物抑制者更高。

(3) 为了减轻底物抑制造成的影响, 当采用 BSTR 时, 底物可以连续或断续的方式加入; 当采用 PBR 时, 底物可在床的不同位置分点添加; 对于 CSTR 来说, 为了减轻产物抑制, 可采用多级的(即直线联结的多槽)搅拌反应器。

## 3. 反应器和酶稳定性

酶的稳定性是酶反应器选择的另一重要参数。固定化酶在反应器中催化活性的损失可能有如下三种原因: ① 酶本身失效; ② 酶从载体上脱落; ③ 载体肢解。其中酶的失效可能由于热、pH、毒物或微生物等引起, 此过程一般比较缓慢, 而且底物往往有保护作用。酶从载体上解吸的情况在酶加工高分子底物时经常遇到, 特别是当底物或载体是荷电多聚电解质时更是如此。载体肢解主要受载体的性质、操作剪切等因素的影响。酶在各类反应器中稳定性的性态可用下述方程描写。

在等温操作条件下,如果底物没有保护作用,那么反应器中酶的热失效一般服从一级反应的动力学关系:

$$-\left(\frac{de_0}{dt}\right) = k_d \cdot e_0 \quad 8.26$$

其中,  $e_0$  为反应器中酶的实效浓度,  $k_d$  为酶的失效速度常数,  $t$  为酶在反应器中的操作时间。结合酶在反应器的动力学方程则有:

$$\text{CSTR:} \quad \ln \frac{[S]_0 X_0 + K'_m \cdot \frac{X_0}{1 - X_0}}{[S]_0 X_1 + K'_m \cdot \frac{X_1}{1 - X_1}} = k_d \cdot t \quad 8.27$$

$$\text{PBR:} \quad \ln \frac{[S]_0 X_0 - K'_m \ln(1 - X_0)}{[S]_0 X_1 - K'_m \ln(1 - X_1)} = k_d \cdot t \quad 8.28$$

其中  $X_0$  和  $X_1$  为 0 时和  $t$  时底物的转化率。由上述两方程可见:当反应处于零级反应状态,酶在 CSTR 中与在 PBR 中的失效情况没有显著差别;但是当反应变为一级反应时,酶的失效速度在 PBR 中大于 CSTR。不过值得指出的是,这里还应该同时权衡地考虑到 CSTR 比 PBR 需要更多的酶。

另一方面,在等温条件下,如果底物对酶具有保护作用,那么酶的活性损失则应用下述方程描写:

$$-\left(\frac{de_0}{dt}\right) = \left(\frac{K'_d}{[S]}\right) \cdot e \quad 8.29$$

在这种情况下,对于 CSTR 可导出式 8.30:

$$[S]_0(X_1 - X_0) + [S]_0 \ln \frac{X_0}{X_1} + K'_m \ln \frac{K'_m + [S]_0(1 - X_0)}{K'_m + [S]_0(1 - X_1)} = K'_d t \quad 8.30$$

由于在 CSTR 中任何时间内底物浓度都是均一的,因此酶失效的动力学关系较为简单;但是在 PBR 中,底物浓度沿液流方向逐渐在降低,故在反应器内的不同区段里,酶的失效速度也不一样,因而动力学关系比较复杂。但是如果将 PBR 看成是一系列的 BSTR,那么在相似的条件,从零级到一级反应的范围, PBR 应该优于 CSTR,即酶的失效速度较低。值得注意的是,上述所有动力学关系都是简化了的分析。

#### 4. 扩散限制与酶反应器

和溶液酶不同,固定化酶进行的是一种非均相体系的催化,整个过程中包括五个环节:底物从宏观系统移向载体表面;再从载体表面移向载体深部的酶作用点;底物被催化成产物;产物从酶作用部位移向载体表面;再从表面移向宏观系统。因此,包括外扩散限制和内扩散限制两种影响因素。在稳态条件下,各个环节的速度相同,并由最慢环节决定。至于扩散限制与酶反应器的关系可概括如下:

(1) 如果酶的反应速度受底物扩散速度的限制,那么这种限制将反映为反应速度高度依赖于宏观系统的底物浓度,并表现出一级反应性态。此时反应虽然仍可用 Michaelis-Menten 方程描述,但表现的  $K_m$  显著升高。这种情况下, CSTR 相对于 BSTR 和 PBR 来说,扩散限制的影响要显著些;当然,底物如果同时又表现抑制作用的话,情况就变得复杂起来。

(2) 对于 CSTR,宏观系统中的底物不随时间而改变,因此扩散限制的影响也相对恒定。

反之,在 BSTR 和 PBR 中,底物浓度受扩散限制的影响,而且,反应速度随反应时间或底物推进距离而不同,因此,在估算实效系数时,往往以底物的初浓度和终浓度的对数平均值求得平均实效系数来表示。

(3) 不论是在搅拌桶式反应器中,还是在填充床式反应器中,外扩散限制都和搅拌速度及流速有关,当线性流速小于 1~2cm/min 时,这种影响十分显著,而升高搅拌速度或流速,则情况可以大大改善。但是应注意,随着流速的升高,PBR 中的压力梯度亦会增大,从而可能带来压密等问题。

(4) 内扩散限制主要出现于多孔载体类型的固定化酶,它一般难于消除,但可通过下列措施减轻:① 降低单位载体上的酶活性量;② 升高底物浓度;③ 减小固定化载体的厚度或直径。

### 5. 各种反应器系统相对效率比较

影响酶反应器效率的因素很多,由于实验资料的缺乏,特别是中试水平资料更少,因此往往使反应器的设计和放大十分困难。为了对各种反应器进行比较,下面介绍一种反应器相对效率的比较标准。这种标准认为决定反应器效率的主要原因是:酶的装载量、载体装载量、酶的操作稳定性、内外扩散限制以及停留时间等。

表 8.3 是以这些因素为标准对几种反应器进行的系统比较。

表 8.3 几种反应器系统比较

A, 酶 反应器	B, 酶载量 (IU)	C, $\frac{K_0 \cdot e \cdot \tau}{K_{km}}$	D, 载体载量	E, C·D	F, 微观扩散效率
I 溶液酶 CSTR/UF	500	1.0	1.0	1.0	8
II 微囊包埋囊(PBR)	500	1.0	1.0	1.0	-111
III 珠状酶(PBR)	10~259	0.02~0.5	1.0	0.5	30~300m <sup>2</sup> /g
IV 胶原包埋柱(PBR)	50~500	0.10~1.0	0.5	0.5	100~1000m <sup>2</sup> /g
A, 酶 反应器	G, F 的相对值	H, 宏观扩 散效率	I, 相对 PBR 40% 转 化所需停止时间	J, 稳定性 因子	K, E·G· H·I·J
I 溶液酶 CSTR/UF	1.0	1.0	0.25	0.01	0.0025
II 微囊包埋囊(PBR)	0.5	0.5	1.0	0.05	0.0125
III 珠状酶(PBR)	0.25	1.0	1.0	0.05~1.0	0.1250
IV 胶原包埋柱(PBR)	0.5	1.0	1	1.0	0.2500

这种比较以拟一级反应动力学关系为基础,根据不同的固定化酶形式,分别建立了相对的动力学关系式,如:

$$\ln(1-X) = - \left( \frac{k_0 \cdot e \cdot \tau}{K_{km}} \right) \eta \cdot \bar{p} \cdot \left( \frac{k_1}{k_1 + \left( \frac{k_0 \cdot e}{K_{km}} \right) \eta \cdot L} \right) \quad 8.31$$

$$\ln(1-X) = - \left( \frac{k_0 \cdot e \cdot \tau}{K_{km}} \right) \eta \cdot \bar{p} \cdot \left( \frac{k_1}{k_1 + \left( \frac{k_0 \cdot e}{K_{km}} \right) \cdot \eta \cdot R/3} \right) \quad 8.32$$

式 8.31 适用于平板状固定化酶,式 8.32 适用于珠状或包埋于胶囊的固定化酶。式中

$\bar{p}$  为酶的装载密度,以单位毫升反应器液体中酶的毫升数表示; $k_1$  为物质转移系数; $L$  与  $R$  分别为板或珠的厚度、半径; $k_0 \cdot e$  表示反应器的催化能力,以每毫升载体包含的酶活力(国际)单位(IU)表示,酶的装载量达 500 IU/ml 时,可认为是一种高载量;在表 8.3 的  $k_0 \cdot e \cdot \tau / K_{i,m}$  一项中,当  $k_0 \cdot e$  达到这一水平时认定为 1; $k_0 \cdot e \cdot \bar{p}$  表示单位毫升反应器液体中总的酶载重量; $\eta$  是实效系数,表示微观扩散效率系数,因此上述两式可表达成:

$$\ln \frac{1}{(1-X)} = (1.0) \cdot \bar{p} \cdot \eta \cdot \nu \quad 8.33$$

其中, (1.0) 为  $k_0 \cdot e \cdot \tau / K_{i,m}$  的单位值。表中最后一项表示各种反应器的总效率,它包括酶的操作稳定性因素在内。

对于 CSTR/UFR 来说,如果应用溶液酶,还有一个问题要考虑,和 PBR 相比,要达到相同的转化率  $X$ (如 90%),它需要后者的 4 倍停留时间  $\tau$ ,因此,表中 I 项 CSTR 应为 0.25。

综观表 8.3 可见: PBR 优于 CSTR;固定化酶反应器系统优于溶液酶;微型胶囊稳定性较低,在工业反应器上效果较差,胶原包埋酶最佳。

### 第三节 酶反应条件<sup>(7-9)</sup>

为了充分发挥酶在生产实践中的潜力,除了要选择合适的酶的应用形式和有效的反应器外,还应确定适宜的反应条件以提高酶促反应的效率。

#### 一、转化率和产率

所谓酶促反应效率,包括两方面的内容:转化率和产率。

转化率和产率是两个不同的概念,但其相互间又有一定的联系。转化率是指某一时间内有多大比例的底物转化成了产物,转化率提高意味着产值大;产率则是指单位时间内,单位量的酶能催化多少产物生成。从降低生产成本的角度而言,反应的转化率和生产率最好都比较高,但是实际情况往往不是这样。它们受多种因素影响,而且这些因素之间又往往相互牵制。以固定化的青霉素酰胺酶在 CSTR 中转化青霉素生成 6 APA 为例,该酶受水解产

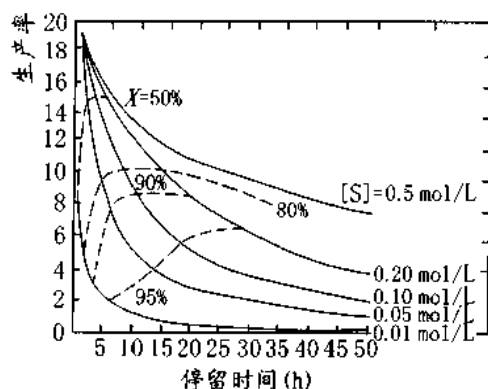


图 8.7 产率与底物在反应器停留反应时间的关系

实线: 底物浓度曲线,数字表示相应的浓度

虚线: 转化率等高线,数字表示相应的转化率

物的双重抑制;反应系统中的底物浓度以及底物在反应器中停留的时间对生产率和转化率都能产生影响(图 8.7)。图 8.7 中的虚线为转化率等高线,这条曲线和各底物浓度曲线的交点向横轴与纵轴作的垂线分别表示:在该底物浓度条件下要达到相应的转化率,底物在反应器中需要停留反应的时间和可能达到的生产率。由图 8.7 可见:

- (1) 在相同的底物停留反应时间内,产率随底物浓度增大而升高,但转化率相应降低;
- (2) 在相同的底物浓度条件下,产率随底物停留反应时间延长而减小,但转化率升高;
- (3) 转化率和产率有一定的矛盾,有时必须根据具体的情况权衡解决,但是为了获得相对好的转化率与产率,也可从图 8.7 找出适宜的底物浓度和底物在反应器中停留反应的时间来。

## 二、酶反应条件的选择与目标函数

在大多数情况下,反应开始阶段的性态一般可以预见和预测,但是在进行反应条件的选择时,重要的问题还在于:不仅要了解反应初始阶段的性态,而且必须估测系统在长时间操作后的情况和性态。如上所述,作为一般规律,反应系统的生产率都随底物在反应器中停留反应时间的延长而下降。引起这种下降可能有多种原因,如:底物浓度变小,产物生成以及酶的失效和酶的丢失等。特别是酶的失效和丢失可能是影响酶反应效率的十分重要的因素。

酶受到毒害、氧化和不适宜的 pH、温度的影响都可使酶变性失效,尤其是温度。高温对于酶反应系统来说有两方面的作用,一是提高酶反应速度,减少微生物污染的可能性;二是加速酶的变性失效。由于酶的热变性活化能远高于酶反应的活化能,因此反应器中很小的温度升高或温度梯度的形成,都可能大大加速酶的变性,显著地影响到酶的操作寿命。另外,酶也可能被反应系统中存在的或反应过程中产生的某些物质所毒害而失效,此时控制反应条件或向反应系统中添加底物等可以得到某些改善。

酶的丢失对固定化酶反应器系统、特别是对长时期运转的系统来说可能是一个普遍性的问题。丢失的原因很多,通过吸附制成的固定化酶如果长期运转于大体积的反应液中,由于解吸而产生的丢失往往是主要原因,而共价偶联的情况则好得多;第二种原因是随时间推延发生的载体溶解;第三是载体的磨损与肢解等。尽管造成丢失的原因很多,但反应条件也有很重要的影响。

为了获得高的酶反应效率,在进行条件选择时,通常总是抓住酶、底物、产物这三个主要因素,并在研究它们在反应器操作运转过程中的性态变化、以及各种因素可能对它们造成的影响等的基础上,加以综合分析,确定最适的目标函数,然后进行控制。仍以青霉素酰胺酶转化青霉素生成 6APA 的反应为例,在这个反应体系中,除了青霉素酰胺酶催化青霉素生成 6APA 的反应外,青霉素和 6APA 本身也会发生自发分解与聚合等反应(图 8.8),其中只有 6APA 是所需要的产物。

为了获得高产的 6APA,控制反应条件极为重要。已知:

(1) 青霉素酰胺酶催化青霉素转化生成 6APA 时,底物浓度在  $2.7 \times 10^{-2}$  mol/L 以下,服从 Michealis - Menten 方程;  $K_m$  为  $4.5 \times 10^{-3}$  mol/L; 最适 pH 为 8.5; 在 pH 6.5 ~ 10 的范围内,速度常数  $k_p$  的变化服从下述关系:

$$k_p = k_{10} [1 - (Q_1 - 8.5)^2 / 17.4] \quad 8.34$$

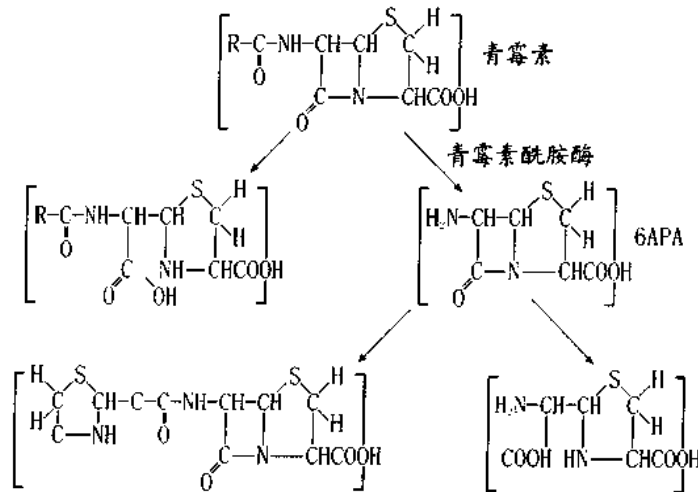


图 8.8 青霉素及 6APA 可能发生的几种反应

该酶反应在 44℃ 以下, 温度对酶反应的影响可表达成:

$$k_p = k_{p_0} [\exp\{([E'_a]/R)(13.35 \times 10^{-3} - Q_2)\}] \quad 8.35$$

式 8.34 和式 8.35 中的  $Q_1$  表示 pH,  $Q_2$  表示绝对温度的倒数;  $[E'_a]/R$  值为  $2.78 \times 10^3$ 。综合上述两种因素的影响有:

$$k_p = k_{p_0} [1 - (Q_1 - 8.5)^2/17.4] [\exp\{[E'_a]/R)(13.35 \times 10^{-3} - Q_2)\}] \quad 8.36$$

(2) 青霉素的自发降解和 pH 与温度有密切关系:

$$k_3 = \exp[\ln k_3^0 + n(Q_1 - Q_1^0) + n'(Q_2 - Q_2^0)] \quad 8.37$$

其中  $k_3^0$  为  $Q_1 = Q_1^0, Q_2 = Q_2^0$  时的降解速度常数。  $Q_2 = 3 \times 10^{-3} K^{-1}$ ;  $Q_1 = 8.0$  时,  $k_3^0 = -7.4, n = -1.07 \times 10^4, n'$  在  $Q_1 < 8.0$  时为 1.315,  $Q_1 > 8.0$  时为 1.85,

(3) 6APA 的自发降解有下述动力学关系:

$$k_2 = \exp[\ln k_2^0 + m(Q_2 - Q_2^0) + m'(Q_1 - Q_1^0)] \quad 8.38$$

$Q_2 = 3 \times 10^{-3} K^{-1}$ ;  $Q_1 = 9.5$  时,  $k_2^0 = -1.54, m = -1.243 \times 10^4, m' = 2.05$ ;

(4) 青霉素酰胺酶失效动力学符合一级反应规律:

$$d[E] / dt = f(T, \text{pH}, [E], [S] \text{ 等}) \quad 8.39$$

$$d[E] / dt = -k[E] \quad 8.40$$

$k$  为酶失效的速度常数。由于该酶对 pH 在 6.5~10 的范围不敏感, 底物也不表现抑制作用, 因此, 酶的失效仅由温度决定:

$$k = k_0 \exp[-([E']/R)Q_2] \quad 8.41$$

其中  $k_0 = 2.06 \times 10^{47}, [E']/R = 3.655 \times 10^4$ 。

(5) 基于上述分析, 该反应系统中底物、产物和酶的变化可用下列各式描述:

$$d[S] / dt = -[k_p[E] \cdot [S] / (K_m + [P])] - k_3 \cdot [S] \quad [S](0) = [S]_0 \quad 8.42$$

$$d[P]/dt = + [k_p[E] \cdot [S] / (K_m + [P])] - k_2 \cdot [P] \quad [P](0) = [P]_0 \quad 8.43$$

$$d[E]/dt = - k \cdot [E] \quad 8.44$$

式中 [S]、[P] 和 [E] 分别表示青霉素、6APA 和酶的浓度。将 pH 和温度的影响引入上述各式 (8.42—8.44) 后就可对底物、产物与酶在反应过程中的变化作出系统描述, 并可根据它们对确定的过程目标选择最适的操作条件。

对于这一反应系统来说, 过程目标无疑是选择适于 6APA、减少酶失效的反应条件。现在引入几个参量:

$$X_1 = [S]/[S]_0; X_2 = [P]/[S]_0; X_3 = [E]/[E]_0, \tau = t/\bar{t}, \bar{k}_2 = k_2 \cdot \bar{t}, \bar{k}_3 = k_3 \cdot \bar{t},$$

$$\bar{k}_p = (k_p \cdot [E]_0/[S]_0)[E], k_3 = (K_m/[S]_0) \cdot \bar{t},$$

$\bar{t}$  为反应终止时间, 则有:

$$X_1 = - [\bar{k}_p \cdot X_1 \cdot X_3 / (k_3 + X_1)] - \bar{k}_3 \cdot X_1 \quad X_1(0) = 1 \quad 8.45$$

$$X_2 = [\bar{k}_p \cdot X_1 \cdot X_3 / (k_3 + X_1)] - \bar{k}_2 \cdot X_2 \quad X_2(0) = 0 \quad 8.46$$

$$X_3 = - kX_3 \quad X_3(0) = 1 \quad 8.47$$

这样, 该过程的目标函数就可表成:

$$\text{最大 } J = X_2(1) - \zeta[1 - X_3(1)] \quad 8.48$$

其中  $\zeta$  为权衡常数, 表示产量与酶成本的关系。

基于上述讨论, 通过计算机, 就可根据不同的要求, 从式 8.45—8.48 求出最适的解。表 8.4 总结了 BSTR 的最适结果。

表 8.4 青霉素转化为 6APA 的操作条件选择

酶失效速度 ( $\xi=0, \tau=3h$ )	I		II		III	
	$k_0 = 2.06 \times 10^{27}$ [E']/R = 3.635 × 10 <sup>4</sup>		$k_0 = 2.3 \times 10^{27}$ [E']/R = 1.5 × 10 <sup>4</sup>		$k_0 = 0$ [E']/R = 0	
J	0.939 8		0.942 4		0.949 6	
反应终止时间						
t(酶失效速度 I)	1	2	3	4	5	6
J	0.476 6	0.801 8	0.939 8	0.927 7	0.983 6	0.989 4
酶成本的权衡	6	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
系统 J(E <sub>3</sub> , R, 酶失效速度 I)						
改变温度和 pH	0.939 8	0.928	0.921	0.917	0.914	0.910
恒定 pH	0.931 2	0.923	0.918	0.913	0.914	0.906
恒定温度	0.937 6	0.928	0.910	0.893	0.882	0.864
恒定 pH 和温度	0.930 5	0.917	0.903	0.889	0.875	0.861

为了获得最大的 6APA 产值和最小的酶活性损失, 就应选择适宜的 pH 与温度, 而其中温度更重要。目标函数表明, 酶的成本与稳定性是最敏感的因素, 从改进加工过程的观点看, 似乎更有价值的是研究如何解决生产过程中酶的稳定性问题。如果酶的成本高, 那么低温、较长的批量加工时间可能较为合宜。

还可参考利用葡萄糖异构酶加工葡萄糖为果糖的研究, 在这一反应系统中控制温度似乎同样是关键的环节。这种研究在 BSTR 和 PFR 中都已进行过。

### 三、多酶反应器的条件控制

有许多反应包括两种以上酶的作用,在这种情况下,应该考虑以下问题:

(1) 相关酶的最适 pH、最适温度可能不同。为了获得最大的效率,反应系统应该设法解决这个问题,或者在它们之间选择适当协调的 pH 与温度,或者沿着反应器轴向根据酶的特点变更相应的参数。

(2) 相关酶的比例。有人在假定没有转移限制的情况下,提出了一个获得最大产率所需要酶的比例关系:

$$\omega = \frac{1 + (b - 1)(b/2)^{1/2}}{1 + b^2} \quad 8.49$$

$\omega$  为酶 1 与酶 2 的摩尔浓度比; $b$  为反应 1 和反应 2 的一级反应速度常数的比值。

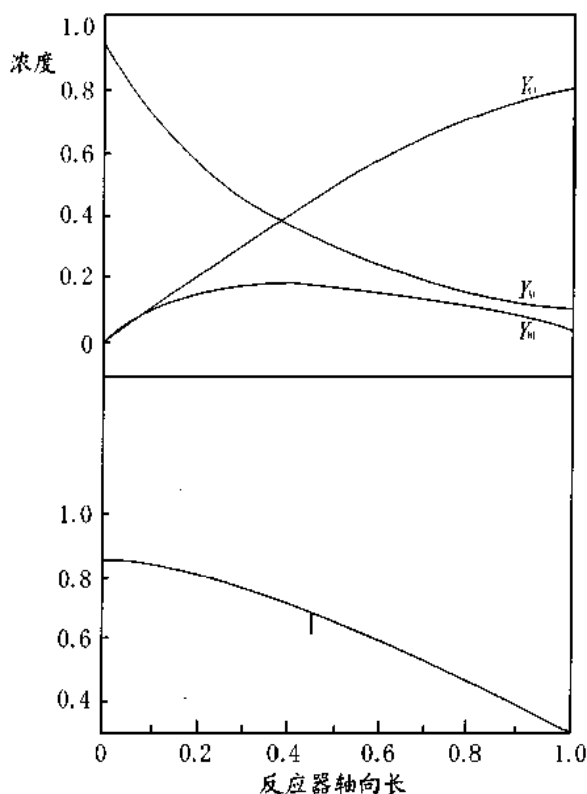


图 8.9 各成分沿轴向方向的浓度变化模式

(3) 更普遍的情况是存在着转移限制。为此有人根据两酶反应系统:  $A \rightarrow B \rightarrow C$ , 建立了一个复杂的目标函数关系:

$$\text{最大}[Y_c(\tau)'] = \text{最大}\left(\int_0^{\tau'} (f_1 - f_2) Y_A + f_3 Y_B\right) \quad 8.50$$

其中,  $Y$  为无因次浓度, 它表示相当的产物浓度与底物浓度比;  $\tau' = V_R \epsilon / q$ ;  $f_1$ 、 $f_2$  和  $f_3$  为包含转移与动力学参数在内的非线性函数。这是一个复杂关系式, 而且实际上也很难沿反应器轴向方向根据  $\omega$  来构建反应器, 所以通常总是设法在均一的装载与局部的最佳化分布间取得适当的解决, 例如两种酶以串列方式装载。



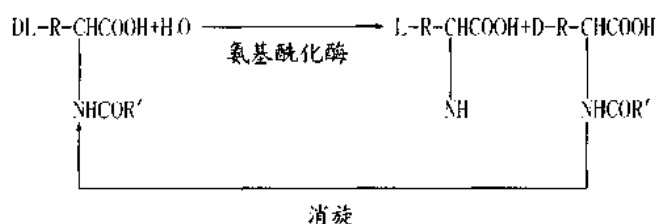
图 8.9 是两种酶按局部最佳化分布时,反应器内 A、B 和 C 各成分沿轴向方向的浓度变化模式。

#### 第四节 酶反应器的应用<sup>(10-12)</sup>

酶很早就已应用于生产实践,其中,青霉素酰化酶就是一例,类似的还有氨基酰化酶,本节以其为中心题材较系统地加以介绍。

##### 一、氨基酰化酶在生产 L-氨基酸上的应用

氨基酰化酶催化下述反应:



从 1954 年起它就用于从化学合成的乙酰 DL-氨基酸混合物的分离,进行选择性的拆分制备 L-氨基酸;到了 1969 年,又将它做成了世界上第一个用于工业生产的固定化酶。

##### 1. 氨基酰化酶的固定化方法和载体的比较

为了适于工业应用,人们摸索了各种氨基酰化酶的固定化方法与条件。结果表明:物理吸附法效果都很差。但是如果用弱碱性的纤维素或葡聚糖作为载体,通过离子交换吸附,则可获得高活性和高产率的固定化酶;与此相反,弱碱性合成树脂或 Sephadex 阳离子交换剂则不行。在共价偶联法中,用重氮化的芳香氨基玻璃为载体虽可以得到活性很高的固定化酶,但因为很不稳定,故无法考虑应用;另一方面以卤素取代的乙酰基纤维素为载体做成固定化酶,在活性和稳定性方面则相对较好些。而交联法在此酶的固定化中效果一般不佳。在包埋法中,聚丙烯酰胺胶格包埋可以获得较好的效果,尼龙包埋次之。

表 8.5 列举某些固定化方法与载体的效果。

##### 2. 固定化氨基酰化酶的性质

为了选择适于应用的固定化酶,人们对 DEAE-Sephadex A-25 离子交换吸附的氨基酰化酶、碘代乙酰纤维素共价偶联的氨基酰化酶及聚丙烯酰胺胶格包埋的氨基酰化酶进行了一些比较系统的研究,相对于溶液酶来说,结果表明:

- (1) 上述各固定化酶的最适 pH 没有大的偏移( $\Delta\text{pH} = 0.5 \sim 1.0 \text{ pH}$ );
- (2) 固定化酶在金属离子、抑制剂等影响下的反应性态、底物专一性及动力学常数也都没有发生值得注意的变化;

表 8.5 氨基酰化酶的各种固定方法与载体的比较

固定化方法和载体	氨基酰化酶用量 (u)	固定化氨基酰化酶	
		活力 (u)	得率 %
物理吸附			
活性炭	1 210	0	0
酸性氧化铝	1 210	13	1.0
离子交换吸附			
TEAE 纤维素	1 210	623	51.5
DEAE 纤维素	1 210	668	55.2
DEAE - Sephadex A - 25	1 210	713	58.9
DEAE - Sephadex A - 50	1 210	680	56.2
CM - Sephadex C - 50	1 210	0	0
Amberlite IR-4B	1 210	0	0
共价偶联			
重氮化芳香氨基玻璃	1 210	525	43.4
溴代乙酰纤维素	1 210	339	28.0
碘代乙酰纤维素	1 210	472	39.0
交联			
戊二醛	1 440	211	14.7
环己羰亚胺	1 440	17	1.2
包埋			
聚丙烯酰胺胶格包埋	1 000	526	56.6
尼龙微囊包埋	1 000	360	26.0

表 8.6 固定化氨基酰化酶的某些性质

性 质	溶液酶	固定化氨基酰化酶		
		DEAE - Sephadex 离子交换吸附	碘代乙酰纤维素共价偶联	聚丙烯酰胺胶格包埋
最适 pH	7.5 ~ 8.0	7.0	7.5 ~ 8.0	7.5
最适温度(°C)	60	72	55	65
活化能(kJ/mol)	28.9	29.3	16.3	22.2
K(mmol/L)	5.7	8.7	6.7	5.0
i(克分子/小时)	1.52	3.33	4.65	2.33
热稳定性(残存活性%)				
60°C, 10 min	62.5	100	77.5	78.5
70°C, 10 min	12.5	87.5	62.5	34.5
操作稳定性(半寿期, d)	-	50°C, 65d	-	37°C, 48d

(3) 固定化酶的热稳定性都比溶液酶显著升高,其中,DEAE - Sephadex 固定化者尤为突出;

(4) 最适温度和反应活化能也有所不同,DEAE - Sephadex 固定的氨基酰化酶最适温度更有较大的升高;

(5) 操作稳定性的实验表明,DEAE - Sephadex 氨基酰化酶在 50°C 中使用的半寿期可达 65 d,包埋酶在 37°C 中为 48 d(表 8.6)。

### 3. 适于工业应用的固定化氨基酰化酶的选择

由于酶和载体的成本都比较高,为适应工业应用的要求,根据固定化酶的稳定性及其再

生可行性,人们进一步对上述三种固定化酶进行了分析比较。结果首先否定了碘化乙酰纤维素固定的酰化酶,因为它要通过偶联制备,较为繁复,又很难再生;其次也否定了包埋酶,主要是它的稳定性,特别是操作稳定性较低,而且也不易再生。DEAE-Sephadex-氨基酰化酶从成本、制备、酶活性、稳定性上都明显优于前两种,虽然其与酶和载体的结合力相对较弱,但其再生简便足以补偿,故它是理想的应用形式。

表 8.7 为三种固定化氨基酰化酶的评价。

表 8.7 各种固定化氨基酰化酶的评价

评估内容	固定化氨基酰化酶		
	DEAE - Sephadex 离子交换吸附	碘代乙酰纤维素 共价偶联	聚丙烯酰胺胶格包埋
制备 酶活性 成本 结合力 操作稳定性 再生	容易 高 低 中 高 可能	难 高 高 强 — 不可能	中等 高 中等 强 中等 不可能

#### 4. DEAE - Sephadex 氨基酰化酶的制备

DEAE - Sephadex 氨基酰化酶制备的最适条件已经确定:1 000 L DEAE - Sephadex A - 25 预先用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0 平衡, 然后加入 1 100 ~ 1 200 L 酶液(总单位数约 330 000 000u), 35°C 中搅拌交换吸附约 10 h, 即可获得 160 000 ~ 200 000 u/L 的固定化酶, 产值 50% ~ 60%。

#### 5. 氨基酰化酶反应器

氨基酰化酶通常以 PBR 方式应用。

为了进行有效的催化应考虑以下因素:① 底物流注方式;② 柱面积对反应速度的影响;③ 柱压降。

底物溶液以上升或下行方式流注对反应速度都无明显影响;但暖的底物液流可能带来气泡, 而易于分离, 故以选择下行者为佳。

通过对相同体积、不同柱长的酶柱进行比较实验, 结果说明除了少数情况外, 柱面积对反应速度没有大的影响。

实验表明, 在特定温度条件下, 柱的压降和流速与柱长有关。

#### 6. 底物溶液的流速

为了使乙酰 DL - 氨基酸得到完全的不对称水解, 控制底物溶液流速十分重要, 图 8.10 为水解程度与流速的关系图。一般地说, 在 50°C 的反应条件下, 1 个床体每小时的流速可以获得高的转化。

#### 7. 固定化氨基酰化酶的再生

DEAE - Sephadex 离子交换吸附的氨基酰化酶, 具有很高的操作稳定性, 并能在使用一

定时间后,加入相当于损失的酶量,简便地使之再生。

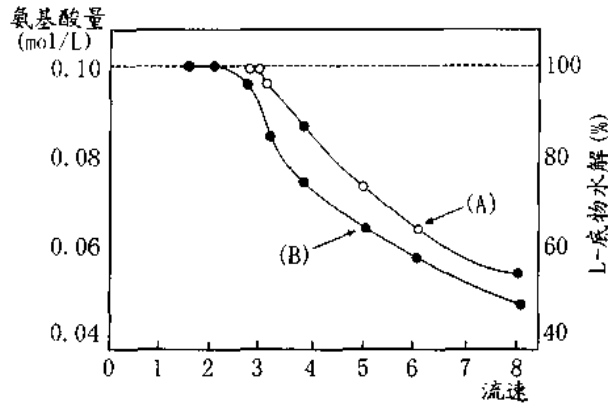


图 8.10 乙酰化 DL-氨基酸水解程度与流速关系  
(A) 乙酰 DL-甲硫氨酸 (0.2 mol/L)  
(B) 乙酰 DL-苯丙氨酸 (0.2 mol/L), 反应温度 50°C

图 8.11 表示该酶的操作稳定性及再生。

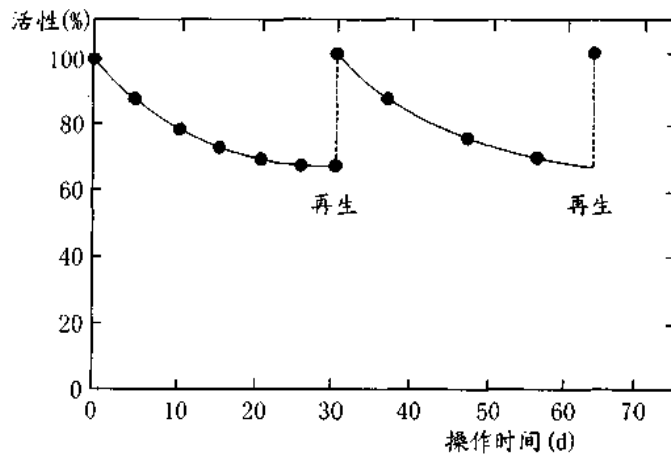


图 8.11 DEAE-Sephadex 氨基酰化酶操作稳定性及再生

### 8. L-氨基酸的连续生产

以 L-甲硫氨酸生产为例。0.2 mol/L 乙酰-DL-甲硫氨酸的 pH 7.0 溶液含  $5 \times 10^{-4} \text{ mol/L Co}^{2+}$ , 在 50°C 条件下, 以 2 000 L/h 的速度通过 1 000 L 的酶柱。2 000 L 流出液蒸发浓缩, 结晶分出 L-甲硫氨酸; 余下之乙酰-D-甲硫氨酸母液, 再在 60°C 中加热, 以醋酸酐消旋, 然后调整 pH 至 1.8, 分出乙酰-DL-甲硫氨酸, 做成底物再输入反应器中进行水解。此工艺产率可达理论值的 94%。

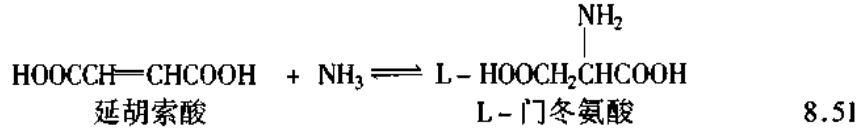
### 9. 成本核算

由于固定化酶相当稳定, 而且可反复使用, 因此酶的消耗可由原来占总成本的 25% 以上降至约 1%; 由于固定化酶的生产过程可以自动控制, 加上产品的纯化步骤可以简化, 劳

动力成本也可由原来的 20% 降到 7% ~ 8% ; 由于产率的升高、产品的分离简化, 底物能获得充分利用, 从而成本也能节省 10% 以上。这样在减去固定化酶制备等的费用后, 固定化酶用于氨基酸生产成本可比原来的溶液酶工艺降低 40% 左右。

## 二、固定化菌体在生产 L- 门冬氨酸上的应用

门冬氨酸酶催化:



通过此反应可生产出医药和食品工业所需要的 L- 门冬氨酸。门冬氨酸酶系细胞内酶, 可从大肠杆菌等获得, 但纯酶不很稳定, 为了适应工业生产的要求, 故人们常采用固定化菌体反应器。

### 1. 固定化菌体制备

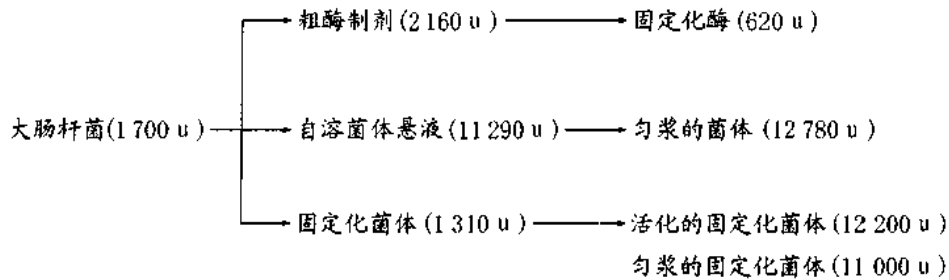


图 8.12 各种门冬氨酸酶制剂活性比较

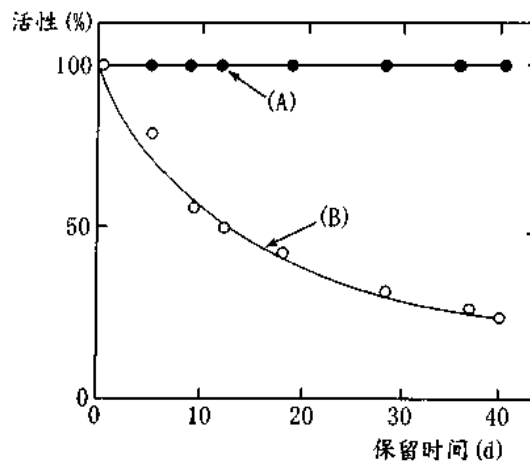


图 8.13 固定化菌体 (A) 与自溶菌体 (B) 稳定性比较

应用聚丙烯酰胺胶格包埋和戊二醛交联都能获得高酶活性催化剂, 前者更佳。实验发现, 将固定化大肠杆菌在含有  $1 \text{ mmol/L Mg}^{2+}$  之  $1 \text{ mol/L}$  延胡索酸铵溶液、 $\text{pH } 8.5$ 、 $37^\circ\text{C}$  中悬

浮 24~28 h 后, 门冬氨酸酶的活性可升高 9~10 倍。这是由于大肠杆菌在胶格中发生了自溶, 增大了底物和(或)产物的透性所致。

图 8.12 为 1 g/h(湿重)菌体分别制成的各种酶制剂的活性比较, 可见: 自溶菌体悬液中门冬氨酸酶的活性和经过相应活化处理后的固定化细胞者相近, 但后者稳定(图 8.13), 更适于工业生产应用。

## 2. 固定化菌体的性质

研究表明:

- (1) 固定化菌体和游离菌体的最适 pH 不同, 前者为 8.5, 后者为 10.5;
- (2)  $Mn^{2+}$  对溶液酶和固定化酶都有活化作用, 对游离菌体和固定化菌体无此作用;
- (3)  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  能提高游离菌体与固定化菌体的热稳定性;
- (4) 更值得注意的是, 上述离子对固定化菌体的长期操作有稳定作用。

## 3. 反应器的应用

研究也表明:

- (1) 底物溶液流速控制于每小时 0.8 床体积时, 延胡索酸可完全转化为门冬氨酸;
- (2) 低温条件下, 固定化菌体柱的操作半寿期十分长, 37℃ 时可大于 120 天(图 8.14);
- (3) 固定化菌体柱连续转化产率可达理论值的 95%, 成本比直接应用菌体降低 30% 以上。

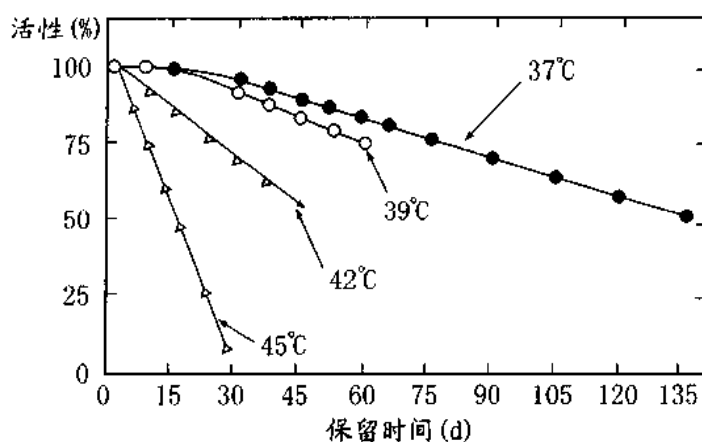


图 8.14 固定化菌体在不同温度中的操作稳定性

## 三、应用连续流双酶反应器生产 L-丙氨酸

L-丙氨酸可以通过氨基酰化酶制备, 但如前所述, 必须同时将未反应之 D 型底物消旋后, 生产才能连续进行。另一方面, 某些氨基酸, 如 L-丙氨酸也可通过一个双酶(包括一个辅酶)系统催化连续进行生产。这个催化系统是:



通过  $\text{NAD}^+$  的再生就可不断生成 L-丙氨酸。为此人们设计了如图 8.15 所示的连续流双酶-膜反应器。

酶-膜反应器的优缺点可概括如表 8.8:

表 8.8 酶-膜反应器的优缺点

优点	缺点
1. 均相催化剂 (没有固定化过程遇到的活性失效;没有转移扩散限制;没有化学物质污染) 2. 投资少 3. 单位体积可达到高活性 4. 生产率恒定 5. 产物超滤 6. 反应器容易清洁,灭菌,控制	1. 膜成本较高 2. 酶在溶液中稳定性较差 3. 有回混问题

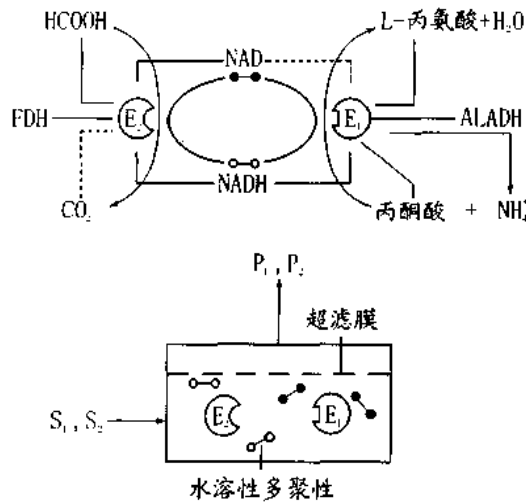


图 8.15 双酶-膜反应器转化生产 L-Ala 示意图

图 8.15 所示的双酶-膜反应器能否大规模应用,取决于它在经济上的可行性,其中催化剂的成本与底物的成本是极为重要的因素。为此,人们首先设法以经济的方法合成了水溶性的  $\text{NAD}$ -高聚物以解决辅酶的滞留问题。然后研究了催化剂的成本、底物的成本,并在此基础上建立了降低生产成本的目标函数。例如,由于不完全滞留而导致催化剂酶和辅酶的损失有如下关系:

$$(V_{RL})_i = C_i(1-R) \frac{q}{V} (= C_i \frac{(1-R)}{\tau}) \quad 8.54$$

其中,  $(V_{RL})_i$  是指相应的催化剂成分由于不完全滞留而被丢失的速度;  $C_i$  为相应的催化剂成分的浓度;  $R$  为滞留系数;  $q$ 、 $V$  及  $\tau$  如前述。

由于热失效有如下关系:

$$(V_D)_i = k_{Di} \cdot C_i \quad 8.55$$

$(V_D)_i$  和  $k_{Di}$  分别为催化剂相应成分的失效速度与失效速度常数。

上述两种因素综合在一起有:

$$\frac{(C_i)_F}{\tau} = k_{D_i} \cdot C_i + \frac{(1-R)C_i}{\tau} \quad 8.56$$

其中,  $(C_i)_F$  是为维持恒定的活力水平需要不断补充的相应的催化剂成分的浓度, 由催化剂相应成分的成本 ( $F_{C_i}$ ) 有:

$$F_{C_i} = \frac{f_{C_i} \cdot (C_i)_F / \tau}{(C_S)_F \cdot u \cdot M_P / \tau} = \frac{k_{D_i} \cdot C_i + (1-R)C_i}{(C_S)_F \cdot u \cdot M_P} f_{C_i} \quad 8.57$$

$f_{C_i}$  为催化剂相应成分成本因子;  $(C_S)_F$  为关键的底物浓度;  $u$  为转化率,  $M_P$  为产物分子数。

关于底物的成本, 就完全的转化系统来说, 单位质量产物的生成所需的底物成本有下述关系:

$$a_0 = \sum_{i=1}^M v_i \cdot f_{S_i} \cdot M_{S_i} / M_P \quad 8.58$$

$a_0$  为底物成本因子;  $v_i$  为化学计量系数,  $f_{S_i}$  为各底物组成成分成本,  $M_{S_i}$  为底物的分子量。因此, 总的底物的成本 ( $F_S$ ) 有:

$$F_S = a_0 / u \quad 8.59$$

因此, 目标函数:

$$F = F_S + \sum_{i=1}^N F_{C_i} = a_0 / u + \frac{1}{(C_S)_F \cdot u \cdot M_P} \sum_{i=1}^N C f_{C_i} [(1-R) + k_{D_i} \cdot \tau] \quad 8.60$$

实验表明:

- (1) 上述酶-膜系统的最佳化取决于膜的滞留特性, 也取决于酶和辅酶的稳定性;
- (2) 当底物成本较高时, 为了达到较大的转化率, 必须升高催化剂的浓度;
- (3) 从工程的观点看还应确定适宜的反应器大小。

## 第五节 酶工程的现状与前景

酶在工农业生产上具有很大潜力, 然而目前它的应用还主要限于水解酶和氧化还原酶, 即主要限于降解类型反应。虽然医药、食品工业要求有更多样化的反应解决产品的生产问题, 在这方面现在仅有少数引人注意的报道。例如, 利用水解酶的逆向反应合成或改造所需要产品, 其中包括利用肽酶合成新型甜味剂 L-Asp-L-phe。应用此法的优点: ① 可直接利用 DL-phe; ② 得率高; ③ 耗能少。此外, 也包括利用酰化酶向 6APA、7ACA 等抗生素内酰胺母核引入新的侧链基团制备新型的抗生素, 还包括利用 *Achromobacter* 的蛋白酶 I 对 Lys 羧基端肽键的专一识别作用, 在不同条件下分别进行水解和合成催化反应, 将猪型的胰岛素改造为人型胰岛素, 这一方法收率很高, 它可能是仅次于半合成法的最好方法,

图 8.16 是这一方法反应原理示意图。

利用固定化酶对有机溶剂具有较高的抵抗能力, 可在有机溶剂中催化某些水难溶性物质进行非水相生化转化, 代表性的例子如前述利用 *Nocardio*、*Achrobacher* 或 *Curvularia* 等菌体在有机溶剂中催化类固醇进行的脱氢、羟化等反应。又例如利用相应的酶和 5-磷酸吡哆醛结合使之具有催化转移、合成等活性(表 8.9)以制备多巴等产物。

酶的应用形式已在逐渐演变发展, 从溶液酶、菌体到固定化酶、固定化菌体, 近来人们正



致力于开发固定化生长菌体、固定化多酶系统，包括辅酶的固定化与再生以及酶-菌体共固定化系统的应用。

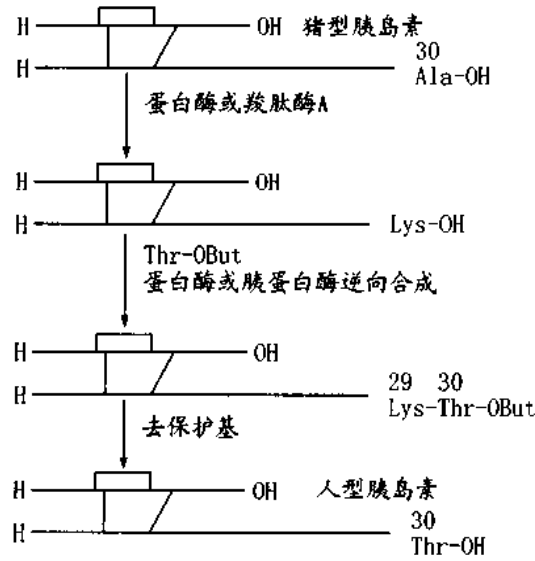


图 8.16 酶法改造猪型胰岛素为人型胰岛素示意图

表 8.9 通过与 5-磷酸吡哆醛结合改变酶催化性质例

产 物	收 率		底 物	①反 应 ②酶 ③微生物
	g/L	收率 (%)		
L-酪氨酸	58	88	丙酮酸钠 醋酸钠 酚	① $\alpha, \beta$ -消除逆反应 ② 酪氨酸酶 ③ <i>Erwinia herbicola</i>
L-酪氨酸	53.5	78	DL-丝氨酸 醋酸钠 酚	① $\beta$ -取代反应 ② $\beta$ -酪氨酸酶 ③ <i>Erwinia herbicola</i>
L-多巴	58.5	—	丙酮酸钠 醋酸钠 邻苯二酚	① $\alpha, \beta$ -消去逆反应 ② $\beta$ -酪氨酸酶 ③ <i>Erwinia herbicola</i>
L-多巴	53	71	DL-丝氨酸 醋酸钠 邻苯二酚	① $\beta$ -取代反应 ② $\beta$ -酪氨酸酶 ③ <i>Erwinia herbicola</i>
L-色氨酸	100	100	丙酮酸钠 醋酸钠 吲哚	① $\alpha, \beta$ -消去逆反应 ② 色氨酸酶 ③ <i>Proteusretgeri</i>
L-半胱氨酸	50	88	$\beta$ -氯-L-丙氨酸 硫化钠	① $\beta$ -取代反应 ② 半胱氨酸脱 HS 酶 ③ <i>Enterobacter cloacae</i>

酶反应器也在发展,除了前述的几种基本形式以外,新的形式正在开发、酶-膜反应器也在逐渐推向应用。

最后还有两点值得指出:一是上述的讨论中建立酶反应器是指建立由酶(或它相应的其他形式)和一定的反应器设备装置构成的应用体系,当然这里也包括反应的条件控制。但是酶反应器似乎可以有更广泛的涵义,在某些情况下,人们还往往将它和生物反应器、酶工程或生物工程等概念等同起来考虑。所谓酶工程,似乎可以这样定义,即它是以现代酶学、现代生物学(包括生物化学、微生物学、遗传学及分子生物学等)理论知识为基础,结合化学工程、电子计算机等的现代成就,将酶有效地应用于生产实践的一种技术体系。如果说酶工程包括三个主要的组成部分,即酶的生产、制备与应用的话,酶反应器虽然主要在酶的应用过程中发挥作用,但是它在酶工程中占有中心的地位。它不仅联系着底物和产物,也联系着催化剂和产物,还反映着酶工程的水平,并随酶工程的发展而发展。例如,酶反应器的中心问题是降低生产成本,获得高产、高稳定的酶。酶的生产已有一整套产酶菌种选育与提高产量的办法,包括基因重组技术。随着生产的发展,酶反应器可能对酶的特性提出更高的要求,为适应这种需要,蛋白质工程正在兴起,它能对酶进行定向的改造。此外“人工酶”也将发展和介入。

值得提到的另一点是,酶反应器不仅限于工农业生产上的应用,也包括分析应用和医药应用的范畴。酶反应器在分析上可能发挥两方面的作用:一是固定化酶反应器用于酶法分析,这主要是酶电极、酶柱以及酶标免疫分析的应用;二是酶自动分析体系的建立。酶反应器在医药上的应用也包括两个方面:一是药物酶的固定化与改造,以利于克服免疫反应、延长半寿期和增大疗效;二是“人工脏器”的建立。

总的说来,酶反应器是酶在生产实践中发挥作用的一个关键环节,它对酶的应用具有十分重要的意义,目前尚处于开发的早期阶段,其最终目标是实现全自动最佳控制。

## 参 考 文 献

### 一、酶的应用形式

- (1) Soel F, Gewerer P. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1996, **13**:217
- (2) Nikolova P, Ward OP. *J. Ind. Microbiol.*, 1993, **12**(2):76
- (3) Wiseman A. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1993, **56**(1):3
- (4) Tanaka A, Nakajima H. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1990, **42**:97

### 二、酶反应器

- (5) Kise S, Hyashiida M. *J. Biotechnol.*, 1990, **14**(2):221
- (6) Chang HN, Furusaki S. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1991, **44**:27

### 三、酶反应条件

- (7) Krastanov A. *Appl. Microbiol.*, 1997, **47**(5):476
- (8) Heinrick R, Schuster S & Holzhtutter MG. *Eur. J. Biochem.*, 1991, **201**(1):1
- (9) Aserjo JA, Andrews BA. *Bioprocess Technol.*, 1990, **9**:143

#### 四、酶反应器的应用

- (10) Kumar KK, Sudhakaran V, Deshpande BS et al. *Hindustan Antibiot. Bull.*, 1993, **35**(1—2):111
- (11) Sarney DB, Vulfson EN. *Trends Biotechnol.*, 1995, **13**(5):164
- (12) James J. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1996, **36**(5):437

# 第四部分 酶的作用原理

## 第九章 酶的催化原理

探讨酶的作用原理是为了更好地认识酶、掌握酶、应用酶。

酶作为生物催化剂,它除了有高效、高度专一的催化特性外,还能适应生理功能的需要调节其催化活性,因此,酶的作用原理,要探讨两个十分重要的内容:酶的催化机制和酶作用的调节机制。

研究酶的催化机制的目的就是要阐明:酶催化作用的结构基础;酶的作用方式;酶为什么会有高度的作用专一性?为什么会有如此高的催化效率?

### 第一节 酶催化功能的结构基础<sup>(1-3)</sup>

酶活性结构的测定是研究酶作用原理的基础工作,也是一件浩繁的工作,除了酶的纯化工作外,还必须进行和酶蛋白有关的各项测定。

#### 一、酶的相对分子质量测定

可用的方法有:超离心法、胶过滤法和 SDS - 聚丙烯酰胺胶电泳法。

超离心法(ultracentrifugation)的原理是,大分子在强的离心力场(如  $300\,000 \times g$ )下会产生离心沉降,然后按离心沉降平衡法或沉降速度法,在测得溶质浓度( $C$ )沿离心轴距( $r$ )的分布等后,就能算出溶质的相对分子质量( $M$ ):

$$M = \frac{2RT}{(1 - \bar{v} \cdot \rho)\omega^2} \cdot \frac{d \ln C}{dr^2} \text{ 或 } M = \frac{RTS}{D(1 - \bar{v} \cdot \rho)} \quad 9.1$$

其中  $R$  为气体常数,  $T$  为温度,  $\bar{v}$  为分比体积(1 g 溶质加入溶液中后引起的体积改变),  $\rho$  为溶液密度,  $\omega$  为角速度,  $S$  为沉降系数。超离心法的准确度可达 90%。

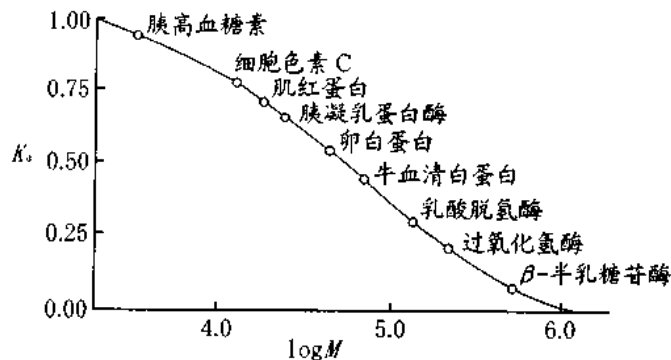


图 9.1 某些蛋白质在 Sephadex G - 200 上的胶过滤性态

胶过滤法的原理是,在一定条件下,溶质相对分子质量( $M$ )的对数与分配系数  $K_d$  间具

有近似的线性关系。在测定系统建立后,从标准曲线(图 9.1)根据  $K_d$ ,就可求得待测分子的相对分子质量。

大多数酶为球状蛋白,此法准确度也可达 90% 左右,但非球状蛋白或糖蛋白用此法测定时常会产生偏离。

SDS-聚丙烯酰胺胶电泳法的原理是,在 SDS 存在的条件下,蛋白质的电泳迁移率由它的相对分子质量决定;在大多数情况下,蛋白质相对分子质量的对数与迁移率间有线性关系(图 9.2)。因此只要选择适宜的胶浓度(例如,相对分子质量 10 000 ~ 70 000 用 10% 的胶,25 000 ~ 200 000 用 5% 的胶),并选用适当的标准蛋白作参考,就能测出待测蛋白的相对分子质量,准确度也在 90% 以上。但碱性蛋白和糖蛋白用此法测定有偏差。

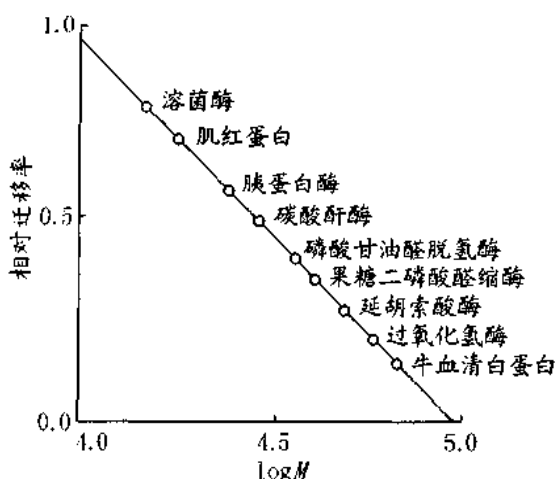


图 9.2 某些蛋白质在 SDS-PAGE 的电泳性态

除了上述三种常用的方法外,还可采用渗透压法和光散射法,当然最可靠的是肽的序列分析。

和其他蛋白质一样,酶的相对分子质量彼此间的差别也很大 ( $10^4 \sim 10^6$ ),有的以单体形式存在,但更多的则是寡聚体。许多水解酶的相对分子质量较小 ( $10^4$  左右),以单体形式存在。某些脱氢酶的相对分子质量很大,如酵母醇脱氢酶由四个 35 000 的单体组成,相对分子质量为 140 000;牛肝谷氨酸脱氢酶由六个 336 000 的单体组成,活性形式的相对分子质量达  $2 \times 10^6$ 。

## 二、酶的氨基酸组成测定

氨基酸组成分析包括三个基本程序:

- (1) 水解。常用酸或碱水解,但近年来多致力于开发酶水解。
- (2) 组成分离与分析。分离通常主要采用离子交换层析法,组成成分检测则一般通过茚三酮反应或荧光胺反应。
- (3) 氨基酸组成分析。近年来多采用气-液色谱法和高效液相层析法,效果良好。

氨基酸组成分析结果表明:① 和其他蛋白质一样,酶分子中所有氨基酸都是 L-型,它们之间以肽键相互连接;② 酶分子的氨基酸组成或多或少地和酶的催化性质与来源相关。例如,猪胃蛋白酶的酸性氨基酸组分远大于碱性氨基酸(43:4),这可能和该酶在酸性条

件(胃)中表现活性一致;通常在蛋白质中极性与非极性氨基酸的比值一般为 1~3,但是,金黄色葡萄球菌的 C<sub>55</sub>-异间二烯醇磷酸激酶却有着很高的非极性氨基酸含量(比值为 0.6),这可能和该酶作用的是疏水性对象有关。如果用差别指数(DI)来衡量分子间的相似性,当组成完全相同时,DI = 0,反之,为 100,那么可以发现:功能相同或相近的酶,氨基酸组成的相似性也愈大,DI 愈小;另一方面,功能相同而来源不同的酶,则将随其在系统发育上的疏远,DI 逐渐增大。以磷酸甘油醛脱氢酶为例,按人为比较标准,兔、鸡、鲟和大肠杆菌来源者的 DI 值分别为 2.9、3.3、5.4、和 7.5。同样,果糖二磷酸醛缩酶也类似。

在进行酶的氨基酸组成分析中还发现,某些酶,特别是胞外水解酶如溶菌酶、核糖核酸酶除了分子较小外,在氨基酸组成上一般没有游离的半胱氨酸侧链,只有含二硫键的胱氨酸。另一方面,大多数胞内酶如乳酸脱氢酶,分子内没有二硫键,只有游离的半胱氨酸。

### 三、酶的一级结构测定

一级结构是指构成酶蛋白肽链的氨基酸组成排列顺序,其经典测定包括以下程序:

#### 1. 肽链片段化

由于酶分子很大,因此,必须先将它切成适当大小的片段。肽链片段化可用酶法,也可采用化学法。

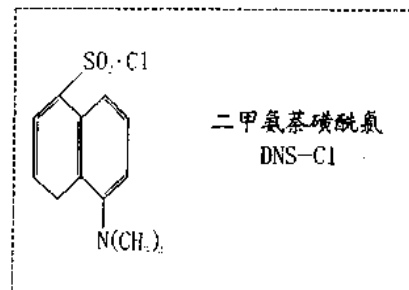
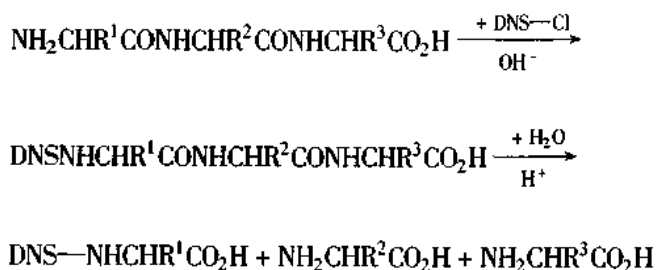
酶法最常用的有胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶等。应用蛋白酶进行专一性水解时,以下几点值得注意:① 蛋白酶必须高度纯净;② 待测样品最好先进行变性处理以保证能有效而且完全的水解;③ 为减少或增加水解片段数可分别用丁烯二酸酐或 2-溴乙胺(2-bromoethylamine)等进行化学修饰。

化学法通常采用 CNBr 法,CNBr 在酸性条件下,能从 Met 的 C-端使肽链断开;由于 Met-肽链中出现不多,因此可减少断裂的片段数,有利于片段的纯化,如猪肌肉中的腺苷激酶用胰蛋白酶断裂为 32 个片段,用 CNBr 法仅 6 个片段。

#### 2. 肽链片段的分离纯化

常用的方法主要是胶过滤,水解混合物通过 Sephadex G-50 柱后,根据 280 nm 或 215 nm 的光吸收分部收集洗脱峰。近年来多倾向采用高效液相层析法。

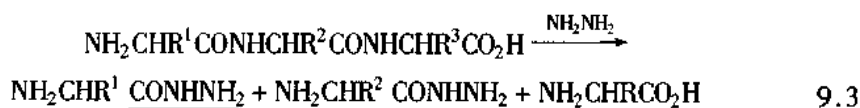
#### 3. 肽链片段的序列分析



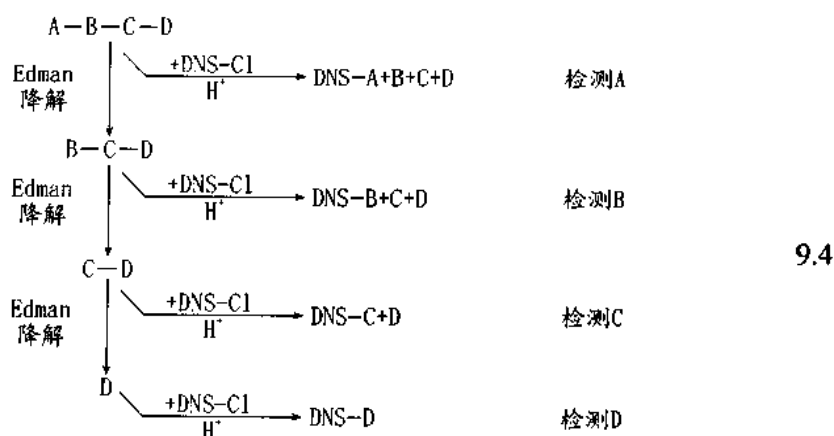
9.2

(1) N-末端测定。N-末端氨基酸残基过去多用 2,4-二硝基氟苯 (1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, FDNB) 标记, 现在则广泛采用二甲氨基萘磺酰氯 (dimethylaminonaphthyl (Sulphonyl) or dansyl chloride, DNS-Cl) 标记, 标记的 N-末端氨基酸再借助电泳或层析法确定。

(2) C-末端测定。C-末端氨基酸测定通常用肼解 (hydrazinolysis) 法, 也可采用羧肽酶, 但该酶作用羧基端时易受侧链基团的影响。



(3) 序列分析。整个肽片段的序列分析, 一般采用 Edman 顺序降解 (Edman degradation) 法, 此法的一个改进是二甲氨基萘磺酰氯 - Edman 降解法 (dansyl-Edman procedure), 它的特点是以 Edman 顺序降解为主干, 而在每步降解的同时取出一小部分用二甲氨基萘磺酰氯进行相应的“N-末端”氨基酸的测定。



另一种氨基酸序列分析法是质谱 (mass spectrometry) 法。它的优点是不一定需要纯的样品。

#### 4. 酶总序列确定

为了确定酶的总序列一般要选取两种以上的酶切系统或化学断裂系统, 分别制备两组或两组以上的肽链片段, 并分别对它进行序列分析, 然后再将这些肽链片段的进行重叠、比较和分析, 这样就能完成整个酶蛋白的序列分析。另一种确定总序列的办法是和 X-衍射技术结合, 即根据 X-衍射电子密度图进行定位。

#### 5. 二硫键定位

为了确定二硫键在哪一肽链片段中, 可采用对角线电泳 (diagonal electrophoresis) 法, 即将肽段混合物在过甲酸中氧化, 然后将氧化前后的产物在 pH 6.5 中进行双相电泳, 其中不含二硫键的片段分别分布于对角线上, 而含二硫键的片段, 由于胱氨酸被氧化后形成半胱氨酸磺酸, 迁移率增大将离开对角线 (图 9.3)。

自 Sanger 完成了第一个蛋白质 (胰岛素) 的序列分析以来, 现在已有上千种蛋白质的一级结构得到了测定, 但是用这种经典方法测定, 通常需要几年的辛勤工作才能完成一个蛋白

质分子的一级结构分析。近年来,由于 DNA 序列分析进展非常迅速,所以目前的趋向是通过 DNA 的序列分析来确定特定蛋白质或酶的结构。如大肠杆菌青霉素酶的一级结构测定,用经典法需费时约 4 年,而通过 DNA 序列分析却只需 6 个月,还澄清了经典法尚感不确定的问题。

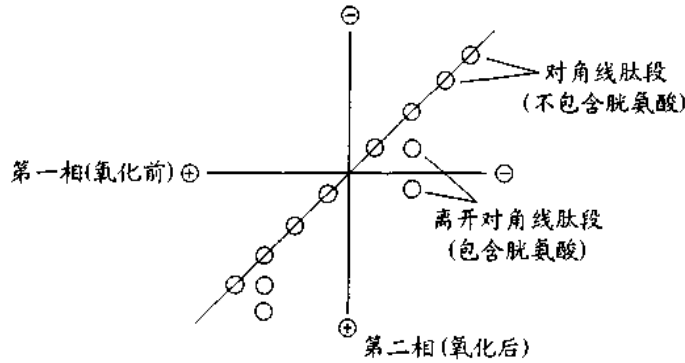


图 9.3 对角线电泳示意图

酶的一级结构测定结果表明,酶的一级结构和酶的催化功能有着密切关系。例如,几乎所有哺乳动物的磷酸甘油醛脱氢酶的一级结构都相同;猪肉来源和大龙虾肌肉来源的仅有 28% 的差别,而且这种差别仅发现于活性中心以外部位。又如,胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶,木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶和菠萝蛋白酶,它们都可能分别来源于共同的祖先,在“分化进化”(divergent evolution)过程中,为适应各种底物,一级结构产生了某些突变,因而表现不同的专一性,但它们的结构中和催化有关的片段序列仍表现出高度的相似性。反之,在“趋同进化”(convergent evolution)的过程中,亲缘关系上相距甚远的生物,其功能相似的酶,也常具有和催化活性有关的某些共同的一级结构序列。如枯草杆菌来源的蛋白酶和牛胰凝乳蛋白酶的一级结构虽有 83 个不同的氨基酸,但活性所必需的肽段 64—74, 218—229 完全相同,构成由 Ser...His...Asp 组成的电力接续系统(charge-relay system)(表 9.1)。

表 9.1 蛋白酶中与催化活性有关片段序列

酶	氨基酸序列		
	必需的 Ser	必需的 His	必需的 Asp
牛胰蛋白酶	Gly, Asp, Ser, Gly, Gly	Ala, Ala, His, Cys, Tyr	Asn, Asn, Asp, Ile, Met
牛胰凝乳蛋白酶	Gly, Asp, Ser, Gly, Gly	Ala, Ala, His, Cys, Gly	Asp, Asn, Asp, Ile, Thr
猪弹性蛋白酶	Gly, Asp, Ser, Gly, Gly	Ala, Ala, His, Cys, Val	Gly, Tyr, Asp, Ile, Ala
牛凝血酶	Gly, Asp, Ser, Gly, Gly	Ala, Ala, His, Cys, Leu	Asp, Arg, Asp, Ile, Ala
枯草杆菌蛋白酶 (BPN')	Gly, Thr, Ser, Met, Ala	Asn, Ser, His, Gly, Thr	Val, Ile, Asp, Ser, Gly

#### 四、酶的二级、三级结构测定

所谓二级、三级结构是指蛋白质和酶分子在不同水平上构建的三维结构。其中二级结构是指肽链相邻区段借助氢键等沿轴向方向建立起来的折叠与螺旋;三级结构则是指在二级结构基础上,肽链进一步的折叠与盘绕,这样在多肽链中原来相距较远的序列也有可能集中到一个区域内。



二级结构测定主要借助旋光色散(optical rotatory dispersion, ORD)和圆二色性(circular dichroism, CD)技术;三级结构则可借助分光光度法(spectrophotometry),但更有效的是X-衍射技术(X-ray crystallography)。

X-衍射分析法是根据X-射线照射结晶分子时产生的X-衍射图确定分子内原子的空间排列的分析方法。X射线的波长( $\lambda = 0.154 \text{ nm}$ )和原子间的距离如果接近,当它照射晶体时,由于晶体内原子的规则排列,故而散射波间会产生相长和相消干涉。当 $\lambda = 2 d_{hkl} \cdot \sin\theta_{hkl}$ (其中 $hkl$ 表示原子表面层, $d_{hkl}$ 为原子层间距离, $\theta$ 为X-射线照射原子层的人射角)时,则产生相长干涉,出现可检测的衍射图谱。各衍射点的位置和强度可通过感光片和衍射计测定。由于衍射点的X-射线强度为结构因子 $F_{hkl}$ 绝对值的2倍,因此可通过测定衍射点的强度确定 $F_{hkl}$ ,并可根据下式获得结晶内的电子密度分布:

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+\alpha_{hkl}}$$

其中 $V$ 为单位晶格体积, $\alpha_{hkl}$ 为 $F_{hkl}$ 的相位角。

通过X-衍射分析技术测定酶的高级结构时,一般要进行以下工作:①制备适当大小的结晶,一般为 $0.5 \text{ mm}$ 左右;②进行同型重原子(heavy atom)取代以助相位的确定,但这种重原子必须不破坏晶体的结构;③制备高分辨率(例如 $0.3 \text{ nm}$ 以下)的X-衍射图;④根据X-衍射图谱的相位、位置和强度,通过电子计算机进行分子的电子密度分析;⑤结合酶的一级结构从原子排列水平确定酶的高级结构。

自从1960年用X-衍射技术测定了血红蛋白以来,现在已有100种左右的蛋白质和酶的高级结构得到了确定。通过这些方法获得的结果可大体概括如下:

(1) 在多肽链中,某些氨基酸如Ala、Val、Leu等适于形成螺旋;某些氨基酸如Pro、Asn、Asp等则通常不形成螺旋;Phe有破坏螺旋的作用;Asp、Glu、Thr等常出现于螺旋的N-端;非极性氨基酸如Ala、Val、Ile以及Phe等一般埋于酶分子内部,形成疏水区;极性氨基酸如Lys、Asp等则倾向于暴露在酶的表面。但是某些担负特殊功能的氨基酸侧链可能例外,如胰凝乳蛋白酶的Asp-194、Ile-16和Asp-102都埋于分子内部,相互作用促进活性结构的形成;又如某些非极性氨基酸也可能分布于酶表面,以便和非极性底物或和膜结合。

(2) 蛋白质和酶的基本结构因素是肽键、 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠等,根据它们的分布,酶和蛋白质可分为四种类型:①全 $\alpha$ -蛋白,即蛋白质仅由 $\alpha$ -螺旋组成;②全 $\beta$ -蛋白,即主要为 $\beta$ -折叠结构,如胰凝乳蛋白酶;③ $\alpha + \beta$ 蛋白,由 $\alpha$ -螺旋与 $\beta$ -折叠组成,如嗜热菌蛋白酶、溶菌酶、核糖核酶等;④ $\alpha/\beta$ 蛋白, $\alpha$ -螺旋与 $\beta$ -折叠交替出现,激酶类、脱氢酶类等均属此种类型。

(3) 蛋白质和酶在溶液中具有较柔顺的结构,能以多种构象状态存在,处于结晶形式时则有较大的刚性。但它们在溶液中的时均结构(time average structure)和晶体者十分相似,而且某些酶如胰核糖核酸酶、磷酸丙糖异构酶等处于晶体状态时也表现活性,虽然催化速度较慢,但解离性质和溶液酶相近。

(4) 蛋白质和酶分子内部的极性基团通常配对形成氢键,它们对于形成和稳定特定构象有一定作用。

酶大都有球状结构,在其表面一般都有一个凹穴形成网兜(pocket or bracket),这往往就是酶的活性结构区域。在这个区域通常还可进一步划分出结合部位与催化部位,例如,激酶

类和脱氢酶类中就可分出与核苷酸结合的相同部位和彼此不同的催化部位,其中与核苷酸相结合的部位由  $\alpha$ -螺旋与  $\beta$ -折叠共同组成,结合部位和催化部位还可相对移动,为酶发挥催化功能创造适宜的构象。

研究表明,酶需要有一定的高级结构(构象)才表现活力,高级结构被破坏,酶的活力也随之丧失。但是,值得指出的是,酶的一级结构是高级结构的基础,一级结构本身就包含高级结构的因素;从热力学而言,肽链通常总是选取最稳定的折叠方式形成活性酶。以牛胰核糖核酸酶的重氧化重组为例,在其结构中包含有 4 对链内二硫键,将这些二硫键还原为 8 个 -SH 基后,在变性剂存在时,酶就变成一条不规则的线状多肽链,同时丧失活性;去掉变性剂后,如果再进行温和的重氧化,则酶又可恢复活性(参见图 3.13)。这就是说,在 105 种 ( $8! / 24 \times 4$ ) 可能出现的二硫键重建方式中,该酶仅选取了原来的一种。用快速技术测定重组过程表明,肽链自行折叠成高级结构包括两步:第一步是核化,即先形成折叠核心,这步很快,约 55 ms;第二步则是围绕核心诱导肽进一步折叠形成活性酶,需时约 356 ms。

另一方面,一级结构的改变能导致活性构象形成与破坏。以胰凝乳蛋白酶原的激活为例,这种酶和它的酶原之间仅在两处有两个氨基酸的差别,即在酶原激活过程中仅切去了两个二肽 14—15 和 147—148,前者有活力,后者则无。激活的机制是:根据 X-衍射分析(图 9.4),该酶的催化中心由 Ser-195, His-57 和 Asp-102 组成,这三个氨基酸残基联在一起形成一个电力接续系统(charge-relay system)。Ser-195 的羟基具有非常高的亲核性,但在酶原状态下, Ser-195 的羟基只能与其邻近的 Asp-194 羧基形成氢键,因而不能形成电力接续系统。X-衍射分析表明,在胰凝乳蛋白酶原激活中, Ile-16 是酶原转变为酶的关键,它的作用是通过其荷正电的氨基与 Asp-194 的羧基形成静电键,“释放” Ser-195 的羟基,促成电力接续系统的建立。酶活力与 pH 的关系也说明这一点,由于 Ile 氨基的 pK 值为 8.5,当反应系统 pH > 8.5 时, Ile 的氨基失去  $H^+$ ,因而 Asp-194 与 Ile-16 间的静电键瓦解, Asp-194 羧基只能转而与 Ser-195 的 -OH 形成氢键,催化中心因之破坏,不再具有活力。

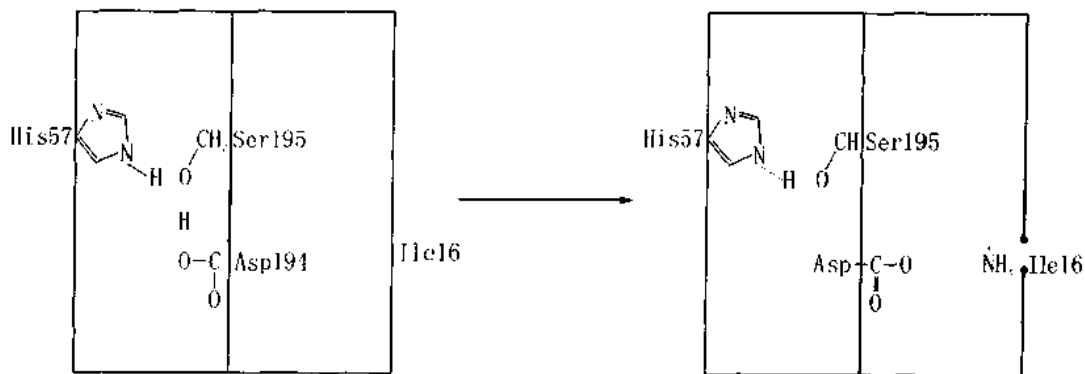


图 9.4 胰凝乳蛋白酶原激活示意图

## 五、酶的四级结构测定

除少数单体酶外,大多数酶都是由多个亚基组成的寡聚体,亚基间的联结排列就是人们通常说的(蛋白质或酶的)四级结构。

### 1. 亚基数目与种类

亚基的数目和种类可通过多种方法测得,如分析在 SDS 条件下的电泳图谱,测定 N-末端和 C-末端氨基酸,比较正常和变性条件下酶的相对分子质量。

寡聚酶大多具有相同的亚基,而且亚基数目多为偶数,个别的为奇数;不同亚基组成的酶,亚基的数目则可偶可奇,例如,大肠杆菌 RNA 聚合酶( $\alpha_2\beta\beta'\delta$ )、ATP 酶( $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon$ )、磷酸化酶激酶( $\alpha_4\beta_4\gamma_4\delta_4$ )都由四种以上亚基组成。

### 2. 亚基间的结合与排列

寡聚酶在变性条件下可解离为亚基,说明亚基间是通过弱的非共价键结合的。X-衍射分析表明,在这些非共价的结合中,非极性键的数目多于氢键数目,更多于静电键;而非极性键主要是范德瓦耳力与疏水键。某些对冷敏感的酶如线粒体腺苷三磷酸酶和磷酸化酶 b 等,其疏水键可能起着很重要的作用。

X-衍射分析表明,亚基排列的一般规律是能最大地增加亚基间的接触位点数。例如,乳酸脱氢酶是四聚体,其亚基排列为四面体(tetrahechral)(图 9.5(A))。但也有例外,例如,大肠杆菌 RNA 聚合酶在相继用交联剂与变性剂处理后,再进行电泳分析,结果只得  $\alpha\beta$ 、 $\beta\beta'$ 、 $\beta'\alpha$ 、 $\alpha\beta\alpha$  等四种络合物,未得到  $\alpha\alpha$  与  $\alpha\alpha'$ ,因此推测其亚基排列只能如图 9.5(B) 所示。

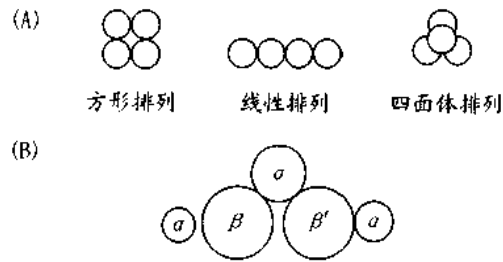


图 9.5 (A) 四聚体中亚基可能的排列方式与乳酸脱氢酶亚基的排列方式  
(B) RNA 核苷酸转移酶的可能排列方式

### 3. 多亚基意义

- (1) 为酶的催化活性提供调节基础(见酶的调节原理);
- (2) 为酶提供多种催化功能;
- (3) 增加酶的稳定性。

酶的结构测定表明,无论从分子大小、氨基酸组成、一级结构,还是从亚基组成来看,酶与其他蛋白质没有截然明显的差别,这就是说不存在酶的特有成分与结构。酶和其他蛋白质不同可能在于:酶分子是在一级结构基础上,通过二、三级的折叠盘绕,形成了具有催化功能的特定活性构象结构域;酶分子不是以整个分子,而是以这个活性构象结构域参与和底物结合,参与对底物进行催化,这个结构域即通常称为的“活性中心”(active centre)。

## 六、活性中心的测定

赘言之,所谓活性中心就是指酶分子中与催化功能直接相关的氨基酸残基按照特定的

立体构象组成的活性结构区域。整个催化过程包括两个环节:酶和底物结合;催化底物进行转化。因此,整个活性中心也可分为结合部位(binding site)与催化部位(catalytic site)。测定这两个部位的组成与结构是酶作用原理研究工作中的一个重要组成部分。

### 1. 催化部位、催化基团的测定

#### (1) 共价标记(covalent labelling)

这是一类较直接的方法,通过它可了解到催化中心的氨基酸组成及其附近肽段的组成。具体方法有以下几种:

① 用氨基酸试剂进行“有限”标记。在不引起蛋白变性的条件下,用某种专一性的氨基酸试剂进行酶的修饰,然后测定酶活力变化,这样常可判断被修饰的氨基酸是否属于催化部位。例如,木瓜蛋白酶由 212 个氨基酸残基组成,每个酶分子包含一个半胱氨酸,如果用碘乙酸将其 -SH 基羟化,则活性丧失,但高级结构不变,说明 -SH 与催化功能有关。

表 9.2 列举某些常用的氨基酸试剂。

表 9.2 某些常用的氨基酸试剂

氨基酸	氨基酸试剂
CysH	汞试剂,如对氯汞苯甲酸 二硫化物,如 5,5'-二硫二(2-硝基苯甲酸) 碘乙酰胺
Lys	2,4,6-三硝基苯磺酸 磷酸吡哆醛(±还原试剂如 NaBH <sub>4</sub> )
His	二乙基焦碳酸盐 光氧化
Arg	苯乙二醛 2,3-丁二酮
Tyr	四硝基甲烷 N-乙酰咪唑
Trp	碘 N-溴代丁二酰亚胺
Asp, Glu	水溶性羰二亚胺 + 亲核试剂如 Gly 甲酯

应用这种方法时两个问题值得注意:一是随氨基酸残基所处的微环境不同,它们和这些试剂的反应性能也可能发生改变;二是反应的专一性不高。后一问题可通过控制反应条件部分解决,例如在 pH 7 以上,碘乙酸易和半胱氨酸反应,但 pH 低于 6 时则主要和 Met 反应。



底物:醛缩酶  $\text{R}_1 = -\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$ ;  $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{OH}$

乙酰乙酸脱羧酶  $\text{R}_1 = -\text{CH}_2\text{COCH}_3$ ;  $\text{R}_2 = -\text{CO}_2\text{H}$

活性中心片段:

醛缩酶—Glu Leu Ser Ala Tyr Pro \* Lys Leu

乙酰乙酸脱羧酶—Glu Gly Thr Leu Leu \* Pro Asn Met Val

图 9.6 醛缩酶及乙酰乙酸脱羧酶的活性中心测定

E 表示酶的主体, \* 表示标记位置

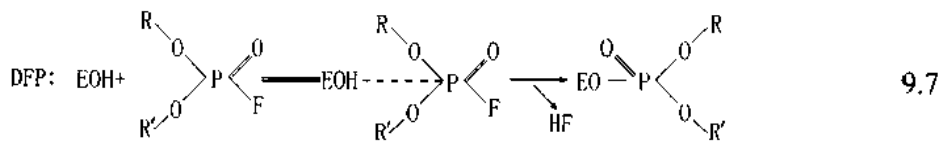
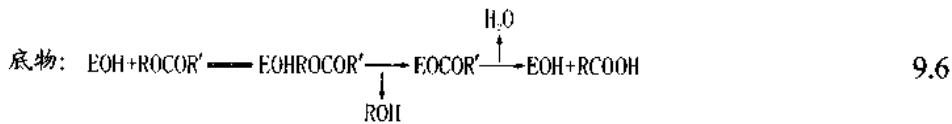
② 用底物、抑制剂或类底物进行亲和标记。底物可看作是极为专一的标记试剂。但是用它来标记酶的活性中心时,必须满足两个条件:反应不是一次取代(见下);形成的酶-底

物络合物十分稳定。然而除了磷酸葡萄糖变位酶和磷酸甘油变位酶外,后一要求一般很难满足。为克服上述困难,有两种办法,一是加入某种抑制剂抑制催化反应的进行,例如,测定醛缩酶和乙酰乙酸脱羧酶的活性中心时,可用氢硼钠抑制反应的进行,结果测得了两酶的活性中心片段(见图 9.6)。

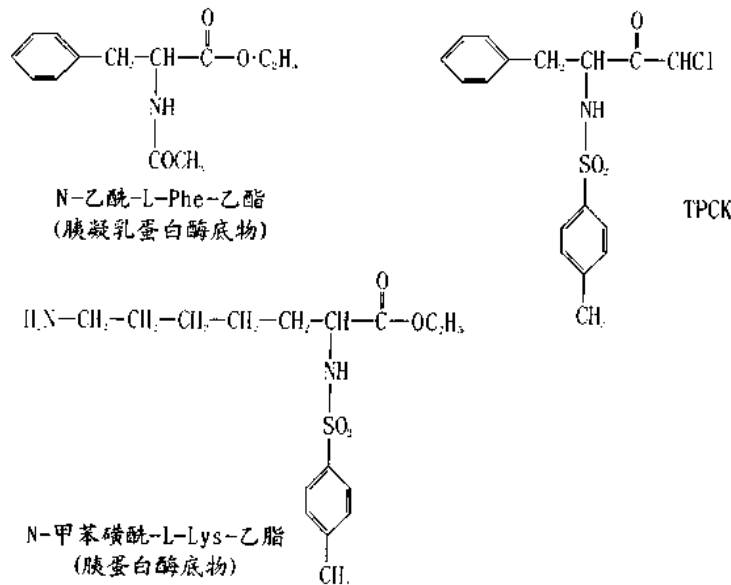
另一办法则是用抑制剂或类底物代替底物。例如:

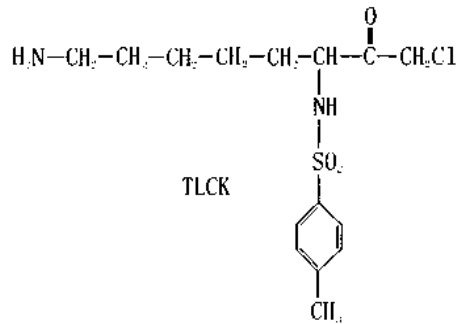
DFP(二异丙基氟磷酸, diisopropyl fluorophosphate)是某些酯酶和蛋白酶的抑制剂,结构上它和底物类似,但能和催化基团形成稳定的共价结合,从而抑制催化的进一步进行,故这类抑制剂又称为拟底物(pseudo-substrate)。

这种抑制剂修饰的结果,标记的是酶分子的 Ser。通常游离的 Ser 等伯醇基相当稳定,不能和 DFP 等反应;然而,当它一旦参与酶的活性中心后,由于特定构象的影响,就变得非常活泼,可表现出“超”反应性。例如,在胰凝乳蛋白酶中有 28 个 Ser,但仅 Ser-195 被修饰,该残基被修饰后,酶的活性完全丧失;与此相反,胰凝乳蛋白酶原中的相应基团却不能和 DFP 等反应,说明 Ser-195 确是该酶的催化基团。与 DFP 相似的抑制剂还有对硝基苯乙酸,它作用胰凝乳蛋白酶时也是标记 Ser-195。



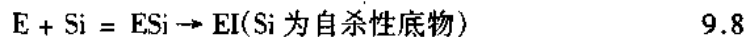
除了 DFP 之类的拟底物抑制剂外,还有 TPCK 和 TLCK 之类的底物类似物,也称为类底物(substrate analogue),它的特点是在结构上既具有酶作用专一性要求的基团,也能和酶按 1:1 摩尔比进行反应,“亲和标记”(affinity label)酶。



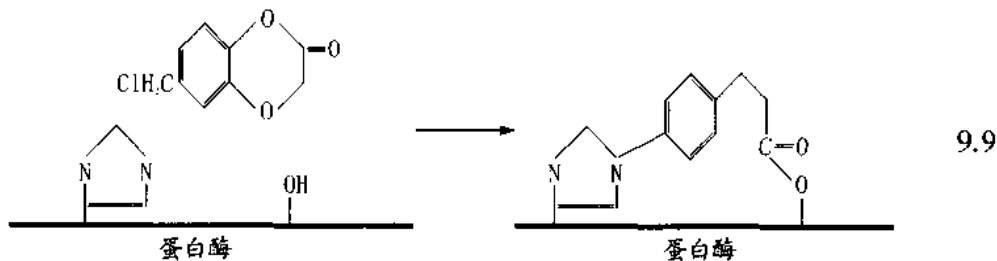


TPCK(N-*p*-toluenesulphonyl-L-phenylalanine chloromethylketone, 甲苯磺酰苯丙氨酸氯甲酮), 它能作为胰凝乳蛋白酶的“亲和标记”抑制剂, 具有该酶结合专一性要求的 Phe, 标记的位置为 His-57, 标记后酶完全失效, 而且不能再和 DFP 反应; 反之, 预先用 DFP 标记的酶或用脲变性的酶也不能再和 TPCK 反应; 同时当可逆抑制剂存在时, 还可使这种失效减轻, 说明在胰凝乳蛋白酶中 Ser-195 和 His-57 共同组成了该酶的催化部位。对于胰蛋白酶、凝血酶、血纤蛋白溶酶、激肽释放酶、木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶等不能用 TPCK, 但可用 TLCK(N-*p*-tuenesulphonyl-lysine chloromethylketone) 作为类底物进行催化部位的标记。

和 DFP、TPCK 相似, 还有一类抑制剂称为自杀性底物 (suicide substrate), 它具有天然底物类似的结构, 而且本身就是酶底物, 但是, 也包含潜伏的反应活性基团, 这种基团在被酶催化的同时活化, 并能和酶的催化基团进行反应, 标记催化基团, 这种标记又为 K-cat 标记。



仍以某些以 His 与 Ser 为催化部位的蛋白酶或酯酶为例, 它们能水解卤代内酯类(如 3,4-二氢-6-氯甲基香豆素), 使之开环, 而开环后的酰基能迅速和酶活性中心的 Ser-OH 反应, 同时卤代基和 His 的咪唑基反应, 导致酶标记与抑制。



应用抑制剂、类底物进行标记有较确定的意义。但是它们和普通氨基酸试剂仍无明显的界线。例如, 硝基苯乙酸和普通酸酐一样都是酶的酰化剂, TPCK 同时也是烷化剂。而且, 即使这些试剂标记酶以后, 引起了酶的活性下降或丧失, 也不能就简单地肯定它们标记的一定是酶的活性中心。因为这种修饰结果也可能是由于造成了立体障碍, 引起了构象改变, 或者带来了微扰。所以, 在进行共价标记时, 标记的部位是否属于活性中心, 还要考虑其他检定标准, 例如: 第一, 修饰程度和失效程度之间是否有化学计量关系; 第二, 竞争性抑制剂与底物是否有保护作用(图 9.7)。

## (2) 动力学参数测定

活性中心的解离状态和酶的活性直接有关, 因此通过动力学方法求得有关参数后, 就可

对酶活性中心的化学性质作出判断(参见第六章)。

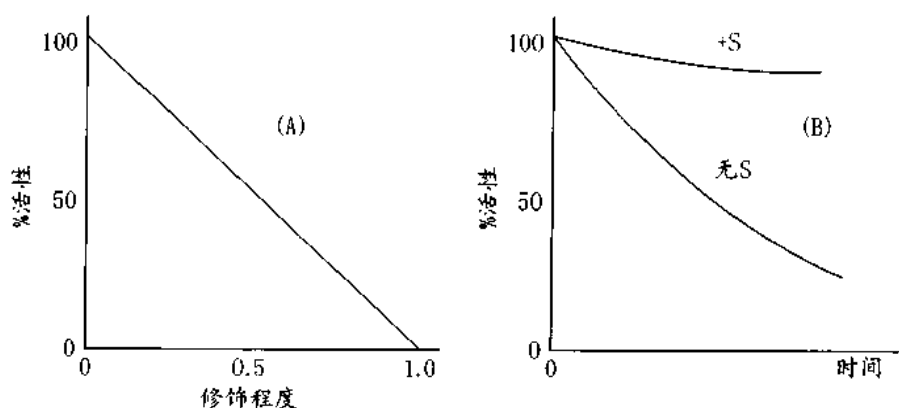


图 9.7 判别标记的是否催化基团的标准

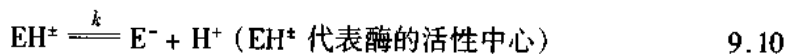
(A) 修饰程度与失效程度间有无化学计量关系

(B) 底物 (S) 或竞争性抑制剂是否有保护作用

①  $pK$  值。从  $\log V$  或  $pK_m$  相对  $pH$  的关系可得到与反应有关的基团的  $pK$  值。例如, 通过此法测得核糖核酸酶的催化基团为 His, 这与 X-衍射及其他技术测定得出的结论一致。

但是应注意: 各种氨基酸之间,  $pK$  值往往可能重叠(参见表 9.3), 而且微环境也可能影响和改变相应氨基酸残基的  $pK$  值。

② 解离热  $\Delta H$ 。通过在不同温度条件下测定  $V$  (或  $K_m$ ) 与  $pH$  的关系, 可求得有关基团的解离热  $\Delta H$ (表 9.3):



$$\Delta H = 2.303 \cdot R \cdot dpK/d(1/T) \quad (R \text{ 为气体常数}) \quad 9.11$$

$pK$  对  $1/T$  作图, 斜率为  $-\Delta H/2.303 R$ 。 $\Delta H$  测定有助于补充  $pK$  值对活性中心性质的判断, 但是, 它同样不能排除微环境的影响。

表 9.3 各种氨基酸残基的  $pK$  值与解离热  $\Delta H$

氨基酸残基	$pK$ 值	$\Delta H$ (J/mol)
$\alpha$ -羧基	3.0~3.2	$\pm 6276$
$\beta$ -羧基(门冬氨酸)	3.0~4.2	$\pm 6276$
$\gamma$ -羧基(谷氨酸)	~4.4	$\pm 6276$
酚羟基(酪氨酸)	9.8~10.4	$\pm 25104$
SH基(半胱氨酸)	8.3~8.6	—
咪唑基(组氨酸)	5.6~7.0	28870~31380
$\alpha$ -氨基	7.6~8.4	41840~54392
$\alpha$ -氨基(胱氨酸)	6.5~8.5	—
$\epsilon$ -氨基(组氨酸)	9.4~10.6	41840~50208
胍基(精氨酸)	11.6~12.6	50208~54392

③ 在适宜的有机溶剂存在条件下, 测定介电常数对  $pK$  值的影响, 根据  $pK$  值的偏离可进一步补证上述判断。

通过动力学常数测定酶的活性中心还有一个应注意的问题。即  $pH$  对酶活性的影响也

可能是由于影响了酶的构象。例如,通过  $\log V$  对  $\text{pH}$  作图,求得胰凝乳蛋白酶的  $\text{p}K = 8.3$ ,但实际上这是由于影响了酶的构象的缘故。

### (3) 比较生化分析

一级结构的分析表明,很多具有相同催化功能的酶,即使来源不同,在它们的活性中心中往往仍可找到相同或者相似的肽段。如表 9.1 所示, Ser 和 His 是凝乳蛋白酶的催化基团,显然在具有相似肽段的蛋白酶或酯酶中, Ser 和 His 同样可能是酶的活性中心。

### (4) X-衍射分析

用上述各种方法可推测构成催化部位的氨基酸残基,而 X-衍射分析还能帮助人们了解这些基团所处的相对位置与实际状态,以及与催化部位有关的其他基团。以溶菌酶为例,通过 X-衍射分析(图 9.8)表明:① 溶菌酶活性中心部位有一个适合于底物嵌合的凹穴;② 在形成酶-底物络合物时,底物周围排列着许多相关的氨基酸;③ 在被水解的糖苷键邻近的氨基酸残基中,催化基团为 Glu-35 和 Asp-52。其中 Glu-35 处于疏水氨基酸残基包

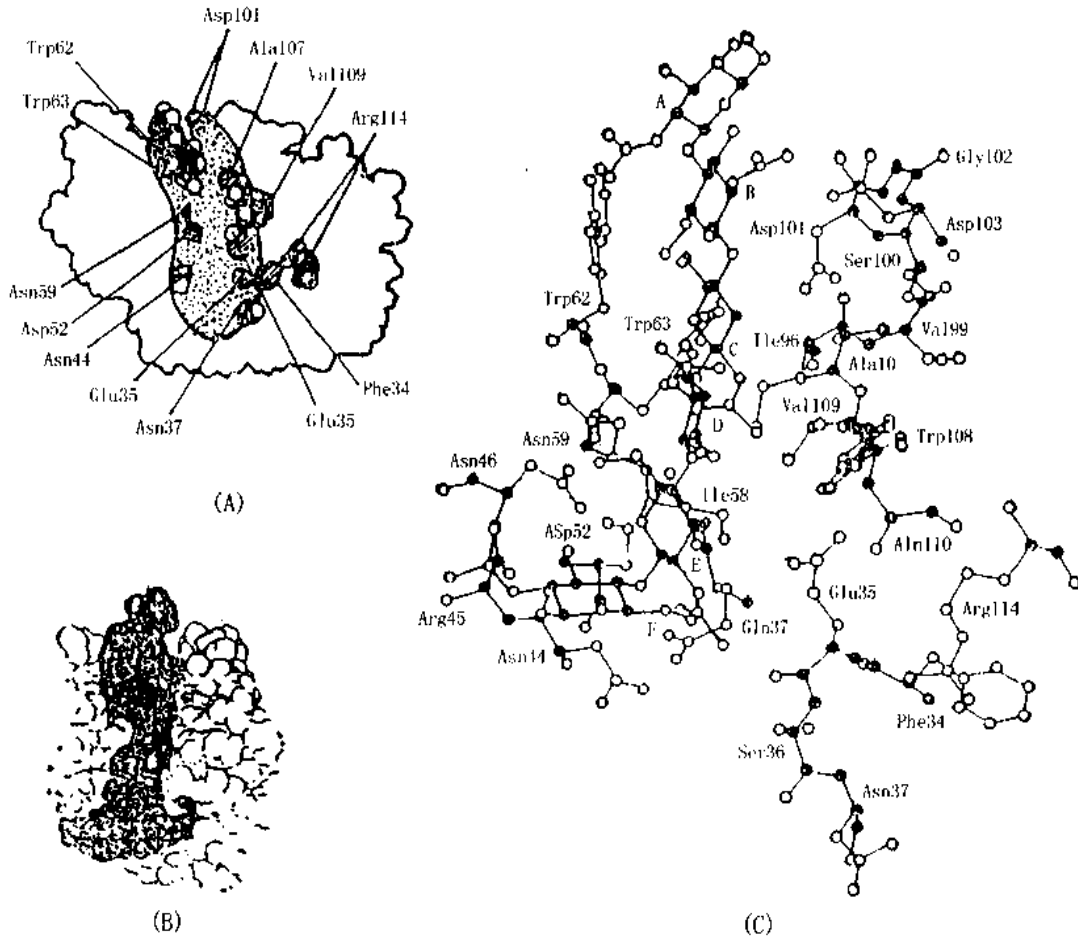


图 9.8 溶菌酶 X-衍射分析图

- (A) 示活性中心(凹穴)有关基团
- (B) 溶菌酶-乙酰氨基葡萄糖络合物
- (C) 底物周围有关氨基酸残基排列状态



围之中,  $pK$  因之升高, 故以不解离的形式存在, 而相对的 Asp-52 位居极性区,  $pK$  因之降低, 处于解离状况。这样, 两个羧基在催化过程中就有了明显的分工。

再以胰凝乳蛋白酶为例。X-衍射分析(图 9.9)表明: ① 这种酶的催化中心由 Ser-195、His-57 和 Asp-102 组成, 它们联结在一起形成了一个电力接续系统, 使 Ser-195 的羟基具有非常高的亲核性; ② Ile-16 是胰凝乳蛋白酶由酶原转变为酶的关键, 它的作用可能是通过其氨基与 Ser-195 邻近的 Asp-194 的羧基形成静电键, 促成电力接续系统的建立。

表 9.4(见 297 页) 列举了某些测定的结果。一般地说, 作为催化基团的都是一些极性氨基酸残基, 特别是 Ser、His、Asp、Glu 等, 但极性氨基酸残基中, 目前尚未发现或很少发现有哪一种酶的催化基团是 Thr 或 Arg 的。在水解酶中通常包含 2~3 个不同的催化基团。

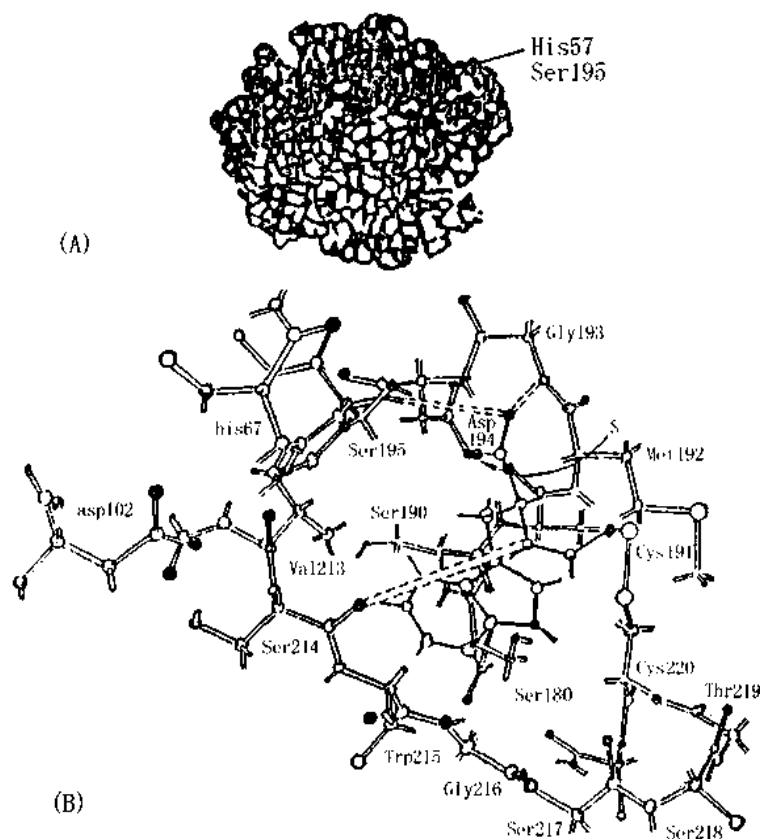


图 9.9 胰凝乳蛋白酶 X-衍射分析图

(A) 示活性中心

(B) 示电力接续系统

## 2. 结合部位、结合基团的测定

### (1) 共价标记

通过化学修饰法标记氨基酸残基, 同时观察酶活力下降是测定催化基团的一种有效方法。由于催化基团具有较强的反应性能, 因而标记较易; 但是对于结合部位来说, 酶与底物之间的结合主要通过氢键、疏水键等次级键, 结合基团一般没有高的反应性能, 应用弱的试

剂往往达不到标记效果,而过强的反应却又会使同种类型的氨基酸残基普遍标记,因而难以作出确切的判断。下面列举两种可用的方法与较成功的例子:

① 在进行酶的氨基酸标记的同时,观测酶与底物结合能力的变化。例如,用过碘酸氧化胰凝乳蛋白酶,结果表明:Met - 192 被标记,酶的活力虽然下降,但不完全丧失,说明 Met - 192 不是催化基团;进一步深入分析又发现,氧化后的酶在作用非专一性底物,如乙酰 - Val 乙酯、乙酰  $\beta$  - 硝基苯酯时,活力不变,而在作用专一性底物,如乙酰 - Trp - 酰胺乙酯时,活力才显著下降,而且,这种降低是由于  $K_m$  增大,因此推断 Met - 192 是该酶的结合基团之一。

② 在底物或竞争性抑制剂存在下,进行保留标记。例如,胰蛋白酶的保护性保留标记。胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶在一级结构上有 40% 左右的共同处,由于前者专一于碱性氨基酸如 Arg - 、Lys - 等构成的肽键,而后者专一于芳香族或疏水性氨基酸组成的肽键,因此,可以推测在胰蛋白酶的活性中心必然有一个和碱性氨基酸对应的酸性结合基团。苯咪唑是胰蛋白酶的竞争性抑制剂,具有碱性基团,显然,它的抑制点应是该酶的结合部位。所以,如果在苯咪唑存在下先用某种氨基酸试剂使酶分子上的酸性氨基酸侧链基团加以“普遍”修饰,然后除去苯咪唑,再用同位素标记( $^{14}\text{C}$  标记)的同种氨基酸试剂对酶进行修饰,那么,后来修饰的部位应是酶的结合基团。应用这种方法发现,标记的是该酶的 Asp - 189。和胰乳蛋白酶比较,后者的对应位置不是酸性氨基酸,而是疏水氨基酸。

表 9.4 某些酶的催化基团

类别	酶 (例)	催化基团 ( )内为研究方法	金属等因子
水解酶类 (酯酶)	胆碱酯酶	Ser(DFP 标记)	无
	磷酸酯酶	Ser(底物标记)	Mg, Mn
(糖苷酶)	溶菌酶(鸡蛋白)	Glu - 35, Asp - 52(X - 衍射分析)	无
	葡萄糖淀粉酶	- COOH, - COO <sup>-</sup> (动力学方法)	无
(蛋白酶)	$\alpha$ - 胰凝乳蛋白酶(牛)	His - 57(TPCK), Asp - 102(X - 衍射)	无
	胰蛋白酶(牛)	Ser - 195(DFP, 硝基苯乙酸)	无
	胰蛋白酶(牛)	His - 46(TLCK), Asp - 90(X - 衍射)	无
	胰蛋白酶(牛)	Ser - 183(DFP)	无
	枯草杆菌蛋白酶	Asp - 32(X - 衍射), His - 64(X - 衍射), Ser - 221(DFP)	无
	羧肽酶 A(牛)	Tyr - 248, Glu - 270(X - 衍射)	Zn
	木瓜蛋白酶	Cys - 25, His - 58(碘乙酸)	无
	胃蛋白酶(猪)	Asp	无
转移酶类	磷酸变位酶	Ser(底物)	Mg
	RNase A(牛)	His - 12(碘乙酸), His - 119(碘乙酸)	无
	RNase T	Glu - 58(碘乙酸)	无
解酶类	醛缩酶	Lys(底物)	无
	乙酰磷酸脱羧酶	Lys(底物)	无
氧化还原酶类	3 - 磷酸甘油醛脱氢酶	Cys(碘乙酸)	NAD

(2) 动力学方法(见前)

(3) X - 衍射分析

和测定催化基团一样,这种方法具有决定性意义。许多酶,如羧肽酶 A、碳酸酐酶、溶菌酶、 $\alpha$  - 胰凝乳蛋白酶、核糖核酸酶以及枯草杆菌蛋白酶等的 X - 衍射分析说明,每一个酶分子上都有一个凹穴,底物就在这个部位和酶结合。以溶菌酶为例,X - 衍射分析表明,

N-乙酰氨基葡萄糖的六聚糖恰能填满该酶活性中心凹穴部位(图 9.8);分布在其周围的氨基酸,如 Asp-101、Trp-62、Trp-63、Ala-107、Ile-58、Asn-44、Asn-44、Asn-37、Phe-34 及 Arg-114 等均能分别与六聚糖的糖环侧链形成氢键,促成酶与底物的结合。

根据对酶的活性结构研究,大体可作出如下的概括:① 酶的蛋白质本质为酶的催化活性提供了多种功能性残基。② 酶的一级结构一方面为酶准备了功能片段,另一方面又为酶形成特定的活性构象奠定了基础。③ 酶通过高级结构将相应的功能基团组织在酶分子的特定区域(如酶的凹穴),形成活性中心;活性中心是指直接参与和底物结合并参与催化底物转化的各有关氨基酸残基按特定构象分布组成的活性结构。④ 活性中心的这种活性结构也要求活性中心以外的其他氨基酸残基共同维系;这些残基被修饰、被改变,或者其相互间的连接被破坏,那么活性中心就会瓦解,酶就会失效。因此对于酶的活性而言,所有这些氨基酸残基,包括活性中心的氨基酸残基在内,都是必需的,称为必需基团。活性中心和必需基团的区别是:活性中心的有关基团都是必需基团,但是必需基团却不一定都属于活性中心组成。正因为如此,许多人认为,胰凝乳蛋白酶 Ile-16 和 Asp-194 属于必需基团,但不能算作活性中心。

表 9.5 结合部位的氨基酸残基及其作用

酶的侧链基	底物侧链	键性质	以溶菌酶为例	其他例
肽主链—CO—NH—	极性基	氢键	Ala-107 的 -CO-( $\alpha$ ) 和底物的乙酰氨基(-NH-)	
酸性、碱性氨基酸残基: Asp, Glu, Lys, Arg, His, $\alpha$ -氨基(N 末端), $\alpha$ -羧基(C 末端)	解离基 极性基	离子键 氢键	Asp-101 的 $\beta$ -羧基和底物的糖羟基	胆碱酯酶和底物的季胺基; 胰蛋白酶和底物的碱性氨基酸残基
极性(非解离)残基: Ser, Thr, Tyr, Trp, Cys, Met, Asn, Glu	极性基或解离基	氢键	Trp-63 的吲哚氨基和底物的糖羟基	
非极性残基: Gly, Ala, Pro, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Met(CH <sub>3</sub> )	非极性基		Trp-62 的吲哚和底物的六碳糖 B 环; Trp-108 的吲哚和底物的 D 环的乙酰氨基的 CH <sub>3</sub>	胰凝乳蛋白酶的 Trp 和芳香族氨基酸底物的侧链
金属 Mg, Mn, Zn 等	解离基	配位键		氨基肽酶(Mn)和底物的两个氨基

## 第二节 酶反应历程与方式<sup>(4-6)</sup>

酶反应的进行首先要求酶和底物结合形成酶-底物中间络合物,然后酶再催化底物进行转化,分出产物,同时酶回复原状并参加下轮催化。络合物的形成是专一性决定的过程,也是变分子间反应为分子内反应的过程,同时又是一个诱导契合过程,由于中间络合物的形成,酶和底物的结构都将发生有利于反应的变化,因而反应能高速地进行。

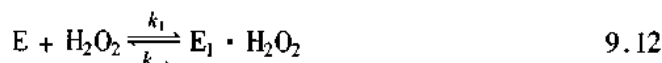
### 一、酶-底物络合物的检测

有多种方法可用于检测酶-底物络合物(ES-intermediate)。

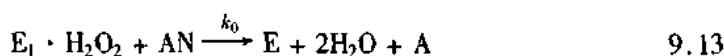
### 1. 光学方法

包括吸收光谱法和荧光光谱法,也包括旋光色散、圆二色性法。前两者的原理是,酶与底物结合成络合物后能引起微环境的变化,从而导致酶分子上的发色基团的光吸收与荧光特性发生相应的改变;后两者则可能是由于酶与底物结合后引起了酶蛋白二级结构的改变。

以过氧化物酶与过氧化氢酶为例。它们都含有血红素辅基,溶液呈红褐色。过氧化物酶在波长 645 nm、538 nm、548 nm 和 498 nm 处有特征吸收带,加入半底物(双底物之一)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>以后,形成酶-底物络合物:



原来的吸收带消失,同时出现新的吸收带。每毫克铁原子在 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 时,新吸收带为 561 nm、530 nm。此时若再加入适当的供氢体 AH<sub>2</sub>,反应便可进一步进行下去:



酶重新游离出来,同时光谱也恢复原状。有人以无色孔雀绿为供氢体(AH<sub>2</sub>)在 25℃ 用快速流管法测定了各个过程的动力学常数,结果是: $k_1 = 1.2 \times 10^7 \text{ mol}/(\text{L} \cdot \text{S})$ ,  $k_{-1} = 0.2 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_0 = 5.2 \text{ s}^{-1}$ 。由此根据  $k_1$ 、 $k_{-1}$ 、 $k_0$  可算出:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_0}{k_1} = 0.44 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \quad 9.14$$

这和通过  $1/v \sim 1/[S]$  作图测得的  $K_m = 0.41 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  非常一致。这说明过氧化物酶反应的确包含  $E \cdot H_2O_2$  这样的过程。过氧化氢酶的情况也类似,NaN<sub>3</sub>能抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的分解,加入 NaN<sub>3</sub>以后,过氧化氢酶在波长 624 nm、544 nm、506 nm 处有三条特征吸收带;加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后,则只在 588 nm、547 nm 处出现吸收带;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 完全分解后,又恢复原状。

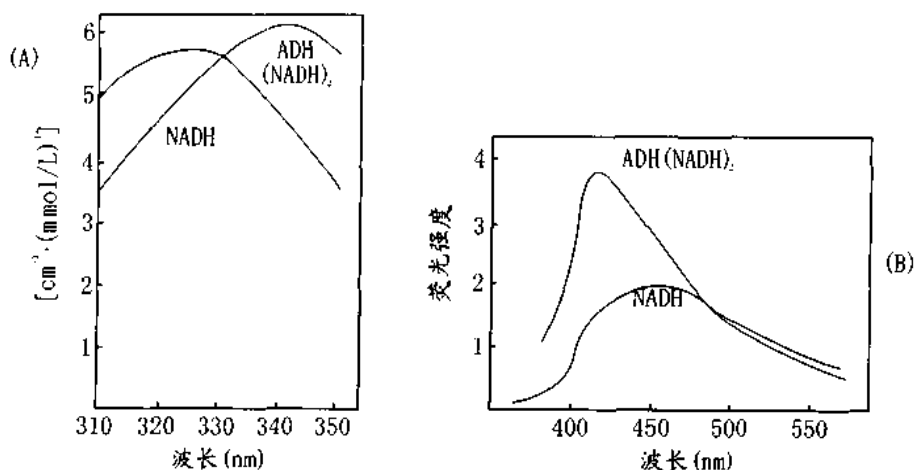


图 9.10 ADH 与 NADH 结合前后光学性质的变化

再以脱氢酶为例,在加入载体底物 NAD(P)H 后常能观察到吸收光谱与荧光光谱的变化,图 9.10 为马肝醇脱氢酶 (ADH) 与 NADH 结合前后 NADH 的吸收光谱与荧光光谱的变化。峰带的位移在 ADH:NADH = 1:2(摩尔比)时达到最大,因此,可以推测这种络合物的组成为 ADH(NADH)<sub>2</sub>;同时,在温和条件下,对氯汞苯甲酸(一种专一性的巯基试剂)可使

NADH 游离出来,光谱也可恢复原状。这说明这种络合物是以酶的—SH 基和 NADH 的尼克酰胺环连接形成的。

## 2. 迁移性态检测法

包括电泳法、胶过滤法、沉降与透析平衡法。原理是酶与底物形成络合物后,它们的电学性质、分子大小不同于原来的酶。

## 3. 磁学方法

包括核磁共振与顺磁共振法。因为需要金属离子的酶中的金属、底物的正电子在酶与底物结合后可能产生磁学性质上的变化。

## 4. 动力学方法

包括稳态动力学分析和稳态前动力学分析。稳态动力学测定有三类方法:快速流管法、快速扫描法和温度跃迁法或压力跃迁法(又称弛豫时谱法)。前两类方法可测得  $t_{1/2} \approx 10^{-3}s$  的变化,而后一方法可测得  $t_{1/2} < 10^{-3}s$  的变化,图 9.11 和图 9.12 分别为快速流法与弛豫法测定仪示意图。

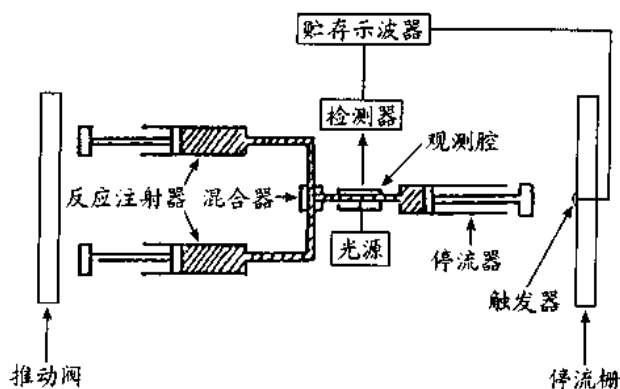


图 9.11 快速流法测定仪示意图

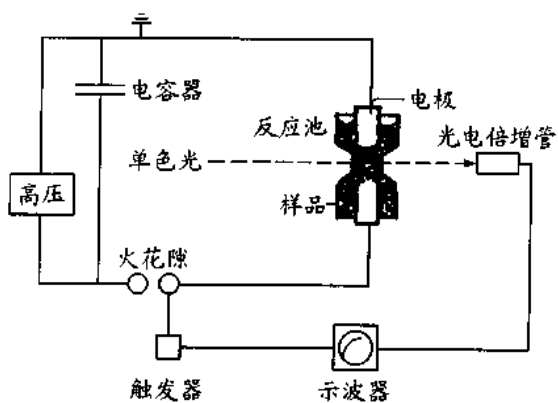


图 9.12 弛豫测定仪示意图

## 5. X-衍射分析法

这是最有价值的一种方法,它除了能够提供大量酶结构、活性中心组成与活性中心各基团的相对位置等有关信息外,还能指示酶与底物的结合方式以及伴随底物结合可能引起的酶和底物在构象上的变化。

络合物最直接的检定方法是将它们分离出来加以确认,但是,酶-底物络合物很不稳定,要对它们进行检定或把它分离出来都有一定的困难。为此,通常还要对反应采用某些特殊条件和措施使之稳定下来:① 在低温条件下反应;② 在有利于络合物形成而不利于底物转化的条件下反应;③ 对于双底物反应只加入其中一种底物,或者只加辅助因子;④ 加入抑制剂,抑制络合物的分解;⑤ 用类底物或竞争性抑制剂代替底物。以 D-氨基酸氧化酶为例,这种酶的氧化型为黄色,完全还原时无色;酶与类底物苯甲酸或底物 D-丙氨酸结合后形成紫色络合物,络合物的吸收光谱与酶不同。这种酶-(类)底物络合物可在无氧和不适于反应的条件下分离纯化出来,并已测定其组成和相应的特征。

## 二、酶反应方式与反应历程

通过上述方法检测,并结合酶反应的专一性等研究,可了解到酶的反应方式与酶反应历程的某些特点。

### 1. 酶与底物多点结合

当酶作用含有不对称碳原子或者含有“潜在”的不对称碳原子(如 NADH 尼克酰胺环第四位碳原子)的化合物时,一般都表现高度的立体专一性,这说明酶在发挥其催化作用时,酶和底物间必定有多点结合。X-衍射分析也证明这一点,这些结合都是通过次级键,即氢键、离子键、疏水键等构成的,通过它们的共同作用,从而达到稳定酶-底物络合物的要求。酶和底物结合的强度可以标准自由能变化  $\Delta G^\circ$  表示:

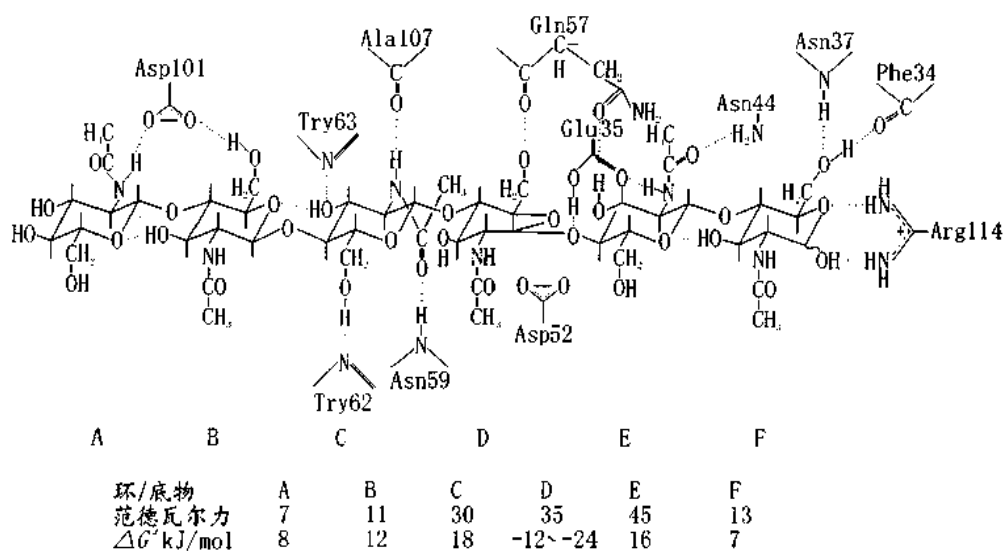


图 9.13 溶菌酶与底物结合时的自由能变化

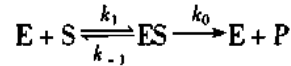
$$E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_{+1}} ES \quad K = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[ES]}{[E][S]} \quad 9.15$$

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln K \quad 9.16$$

以溶菌酶为例,酶与底物各位点结合的  $\Delta G^\ddagger$  如图 9.13 所示。其中个别位点,如 D 糖环,它与其他底物结合位点的  $\Delta G^\ddagger$  不同,可能为正值,但总的  $\Delta G^\ddagger$  仍为负值。

## 2. 酶 - 底物络合物的形成与分解

根据酶反应活性中间络合物学说,酶反应过程可概括如下式:



即包括络合物形成和络合物分解两个过程。

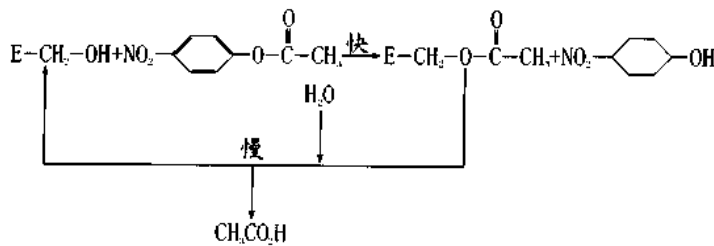
酶和底物的结合与解离通过快速测定技术得到的结果如表 9.6。

酶反应快速测定技术得到的结果也表明,就整个酶反应过程而言,一般都包括快的“突发”反应期和慢的酶再生期。以胰凝乳蛋白酶水解对 - 硝基苯乙酸为例,对 - 硝基酚的释放和“酰化”酶的形成发生在快的突发阶段,“酰化”酶的脱酰化则在慢的阶段。

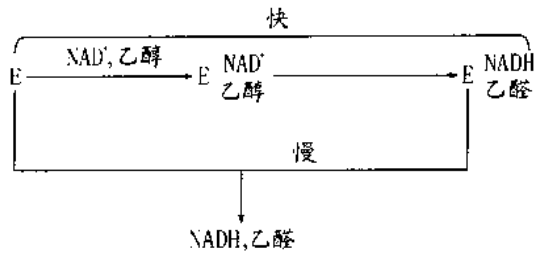
又如马肝醇脱氢酶催化的反应,酶与 NADH 能以摩尔比 1:2 迅速形成络合物,而从 NADH 上释放酶则是限速环节。

表 9.6 某些酶底物反应的结合与解离速度常数

酶	底物	$10^{-8} k_1$ (s·mol/L) <sup>-1</sup>	$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> )	$10^{-4} \text{kcal}/Ks$ (s·mol/L) <sup>-1</sup>
3-磷酸甘油醛脱氢酶	NAD	0.19, 0.0137	$1 \times 10^3, 210$	
兔肌乳酸脱氢酶	NADH	~ 10	~ $10^4$	
苹果酸脱氢酶	NADH	5	50	
过氧化物酶	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.09	< 1.4	
过氧化氢酶	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.05	—	
门冬氨酸转氨酶	Glu, Asp	> 0.1 - 1	$10^5 \sim 10^6$	
肌酸激酶	ADP	0.22	$1.8 \times 10^4$	
丙酮酸激酶 - Mn <sup>2+</sup>	丙酮酸	0.045	$21 \times 10^4$	
核糖核酸酶	胞苷-3'-磷酸	0.46	$4.2 \times 10^3$	
胰凝乳蛋白酶	咪唑基丙烯酰-L-色氨酸酰胺	$6.2 \times 10^{-2}$	$2.7 \times 10^3$	
溶菌酶	(N-乙酰-D-葡萄糖胺) <sub>2</sub>	0.024	24	
酪氨酰-tRNA合成酶	酪氨酸 tRNA <sup>Tyr</sup>	22	1.5	
乙酰胆碱酯酶	乙酰胆碱			1.6
碳酸酐酶	CO <sub>2</sub>			0.82
	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			0.15
延胡索酸酶	延胡索酸			1.6
	苹果酸			



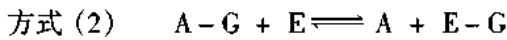
9.17



9.18

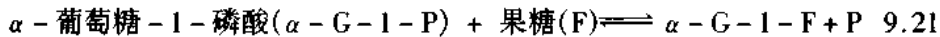
### 3. 酶的作用方式

酶和底物结合形成酶-底物络合物后,酶可能以两种不同的方式参加反应:① 仅为底物的进一步转化提供场所;② 本身直接介入转化。以转移反应为例:

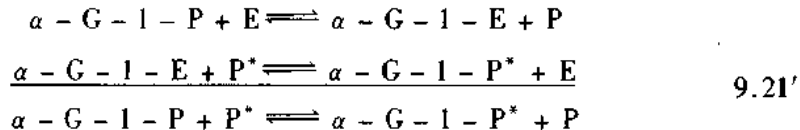


其中 A-G 为供体, G 为转移基团, B 为受体。要确定酶究竟以哪一种方式参与反应, 有两种检验方法。

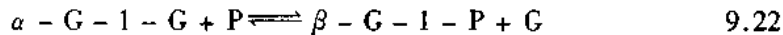
(1) 同位素交换法(isotope exchange)。这是根据在 A-G、E 和 A\* 的系统中或在 B-G、E 和 B\* 的系统中能否发生同位素交换, 即是否能形成标记的 A\*G 或 B\*G 来进行判断的一种方法。例如, 蔗糖磷酸化酶催化反应:



当果糖不存在时, 可观察到  $\alpha\text{-G-1-P}$  与  $\text{P}^*$  之间发生同位素交换, 即加入  $\text{P}^*$  后, 能观察到  $\alpha\text{-G-1-P}^*$  的形成, 说明此酶是按第二种方式催化转移反应的。因为:



与此相反, 麦芽糖磷酸化酶催化的反应虽然相似:



但它不能催化  $\beta\text{-G-1-P}$  与  $\text{P}^*$  或  $\alpha\text{-G-1-G}$  与  $\text{G}^*$  之间的同位素交换, 说明该酶是按第一种方式催化转糖苷反应的。

水解酶反应从广义来说也可看作是转移反应, 因此, 同样可用此法来判断酶的催化方式, 以 ATP 酶(ATPase) 为例, 正常情况下, 它不能催化 ATP 与  $\text{P}^*$  或 ATP 与  $\text{ADP}^*$  之间的同位素交换, 因而, 似乎可推断没有 E-P 或 E-ADP 之类的中间络合物形成。但是, 如果以酒石酸钾的复铈盐将反应抑制 90% 时, 则发现  $\text{ADP}^*$  能渗入到 ATP 中去, 从而, 说明该酶反应可能经过 E-P 阶段, 只是 EP 很不稳定。

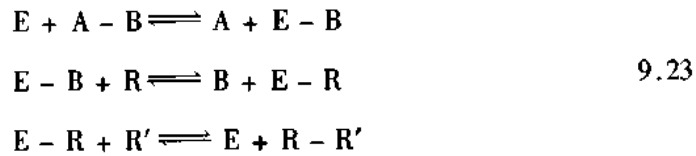
同位素交换法也可用于了解合成酶的作用过程, 合成酶催化:



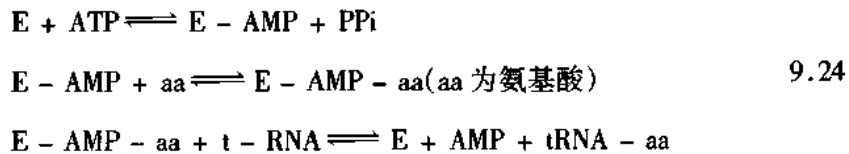
用同位素交换法一般可得如下结果:① R 和 R' 不存在时, A-B 和 A\* 可进行交换, 而 A-B



和 B\* 之间则否;R 存在时, A - B 和 B\* 之间进行的交换受到抑制。② A - B 不存在时, R - R' 与 R\* 发生交换,而 R - R' 与 R\* 间则否;加入 B 时,后一交换进行,而前一交换受到抑制。因此可推断合成酶催化的反应历程是:



氨基酰 - tRNA 合成酶催化方式尚未彻底弄清楚,但一般认为可能是:



(2) 旋光转向法(optical inversion)。当酶反应发生在底物的不对称碳原子上时,如果反应按方式 1 进行,那么反应后一般可观察到旋光的变化;如果是按方式 2 进行的,则通常没有旋光变化。按方式 1 进行,可能发生的是“一次取代”,反应结果 X、Y、Z 在 C 上排列发生了改变,旋光转向;按方式 2 进行,则可能发生的是“二次取代”,由于在第二次取代中,C 上的 X、Y、Z 在排列上又恢复原状,因此,不发生旋光转向。应用这种方法测得的结果,除个别较复杂的酶反应外,一般与同位素交换法一致。图 9.14 为旋光转向示意图。

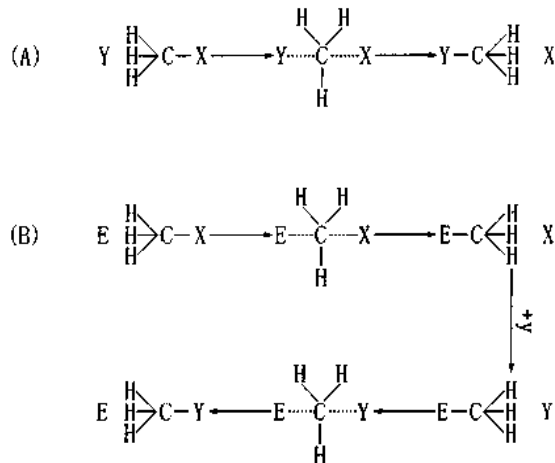


图 9.14 旋光转向示意图: (A) 一次取代; (B) 二次取代

酶不管以何种方式催化反应进行,在酶和底物结合形成络合物以后,两者都会发生一些改变,酶发生构象改变,底物发生扭曲,前者是酶表现高度专一性催化的基础,后者则是底物走向反应的过渡形式。

### 第三节 酶的作用专一性机制<sup>(7-8)</sup>

关于酶的作用专一性机制有各种学说。这些学说有一些共同点,即都认为:① 酶的活性中心是酶表现作用专一性的基础,不仅要求结合基团与催化基团的存在,而且要求它们有

特定的构象分布;② 酶要表现作用专一性必须通过它和底物结合。

### 一、酶的刚性与“锁和钥匙”学说

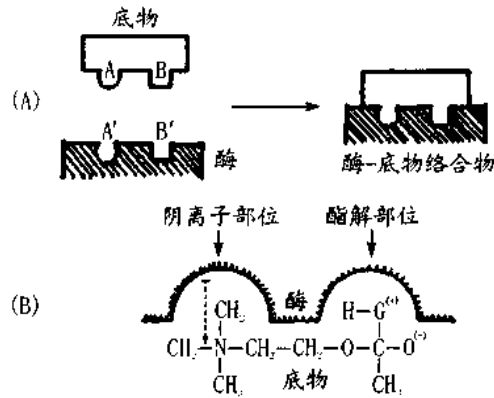


图 9.15 “锁和钥匙”学说示意图 (A)  
乙酰胆碱酯酶及其底物 (B)

早在 1890 年 E. Fisher 就提出了“锁和钥匙”学说(lock and key theory)来解释酶的作用专一性。他认为酶和底物间存在着互补的结构特征,只有那些符合这种特征要求的物质才是底物,才能和酶结合,并被酶催化转化,酶和底物的这种专一关系类似“一把钥匙开一把锁”。图 9.15(A)为锁和钥匙学说示意图。

锁和钥匙学说的前提是酶分子具有确定的结构与构象,并具有一定的刚性。

这一学说有相当多的事实支持,例如,乙酰胆碱酯酶催化乙酰胆碱化合物生成乙酸和胆碱。在这个酶反应中,乙酰胆碱酯酶要求底物中的胆碱氮带正电,根据这种特点,可推测该酶分子中至少有一个阴离子部位与酯解部位(图 9.15(B))。事实也的确如此,这两部位间有严格的距离,胆碱和酰基间多一个或少一个 $-\text{CH}_2-$ 的衍生物都不适于作底物或竞争抑制剂,而符合这种键长、键角要求的化合物却都能和酶发生作用,或者被酶催化水解,或者抑制酶。实际上,强有力的有机磷杀虫剂以及与此相应的解毒剂也就是根据这一思想设计出来的。

### 二、酶的柔顺性与“诱导契合”学说

酶究竟是刚体还是有一定的柔顺性? X-衍射分析、各种光谱分析以及核磁共振分析表明,游离酶和酶-底物络合物在结构上往往不同,即伴随底物与酶的结合,酶的构象可能发生某些变化,也就是说,酶分子是柔顺可变的。以 D-氨基酸氧化酶为例,它能在某种条件下和底物或类底物形成较稳定的络合物,有人在研究了这种酶从酶蛋白到全酶以至到酶-底物络合物的流体力学性状变化(表 9.7)后指出,酶的这三种形式虽然在相对分子质量上的差别相对很小(相对分子质量约 115 000),但沉降常数、扩散系数却按上述顺序明显增大,粘度则依次降低,体积逐渐变小。这说明从酶蛋白到全酶到酶-底物络合物,分子形状在逐步改变,分子结构在逐步变得更为致密。根据光散射计算了分子的轴比,表明分子形状可能发生了从棒状到椭圆到球状的变化; $[\alpha]_D^{20}$ 也随上述顺序减小,根据 $[\alpha]_D^{20}$ 计算了 $\alpha$ -螺旋度的相对值,表明 $\alpha$ -螺旋度在逐渐增大,如果以酶蛋白的螺旋度为 0,那么,酶-底物络

合物则为 0.9。这就是说,底物和酶的结合引起了活性中心构象改变,使  $\alpha$ -螺旋度升高,从而酶的分子形状也发生了变化。

表 9.7 D-氨基酸氧化酶某些物化常数

物化常数	酶蛋白	全 酶	酶-底物络合物
$S_{20\omega}$ (s) (沉降系数)	$4.5 \times 10^{-18}$	$8.0 \times 10^{-18}$	$11 \times 10^{-12}$
$D_{20\omega}$ ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ) (扩散系数)	$4.5 \times 10^{-7}$	$6.0 \times 10^{-7}$	$6.8 \times 10^{-7}$
$v$ (ml/g) (比体积)	0.789	0.718	0.655
$\eta$ (粘度)	$6.2 \times 10^2$	$2.6 \times 10^{-2}$	$1.75 \times 10^{-2}$
$[\alpha]_D^{20}$ ( $\infty$ 旋)	-102	-55	-12
$f$ (螺旋度)	0	0.47	0.90

根据酶分子具有一定柔顺性事实, Koshand 在解释酶的作用专一性机制时提出了诱导契合学说,他认为酶和底物在接触以前,两者并不是完全契合的,只有由于底物和酶的结合部位结合以后,产生了相互诱导,酶的构象发生了微妙的变化,结合基团和催化基团转入了有效的作用位置,酶与底物才完全契合,酶才能高速地催化反应进行。如图 9.16, (A) 是酶和底物结合前的状态,催化基团处于没有活性的构象状态;(B) 为酶和适宜的底物结合后,结合基团和催化基团都转入有效位置,同时催化基团开始发挥催化功能。底物与酶的这种契合关系可喻为手与手套。

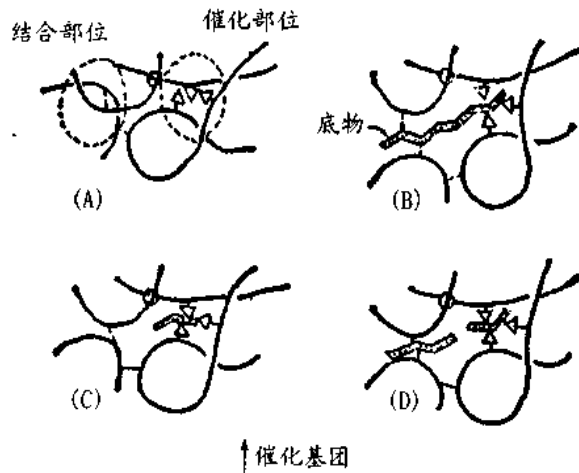


图 9.16 诱导契合学说示意图

有大量实验事实支持诱导契合学说,以胰蛋白酶为例,它可以苯甲酰-L-Arg-乙酯(BAEE)和苯甲酰-L-Lys-乙酯(BLEE)为底物,底物的酯键和酶的催化部位、碱性侧链和酶的结合部位各各对应。由于酶的催化部位和结合部位在酶的立体构造上有一定距离,因此,要求底物的酯键与碱性基团间也要有一定长度的链距,其间多一个或少一个 $-\text{CH}_2-$ 都不宜作为底物。同时也由于酶专一性结合部位要求底物的氨基带正电,因此短链烷基铵离子能竞争性地抑制 BAEE 水解(图 9.17(A))。另一方面,乙酰-Gly-乙酯(AGEE)由于没有碱性氨基酸侧链基团,因而,胰蛋白酶只能缓慢地催化它水解;有趣的是,这种情况下,短链烷基铵离子对它的水解不仅不产生竞争性抑制作用,相反地,还能起激活作用(图 9.17(B))。而且,短链烷基铵离子对 BAEE 产生的抑制作用与对 AGEE 产生的激活作用,其  $K_i =$

$K_a$ 。后一事实说明,烷基铵离子能与酶活性中心中的结合基团结合,并诱导酶的构象发生变化,使其催化基团获得了正确取位,催化才得以有效地进行。

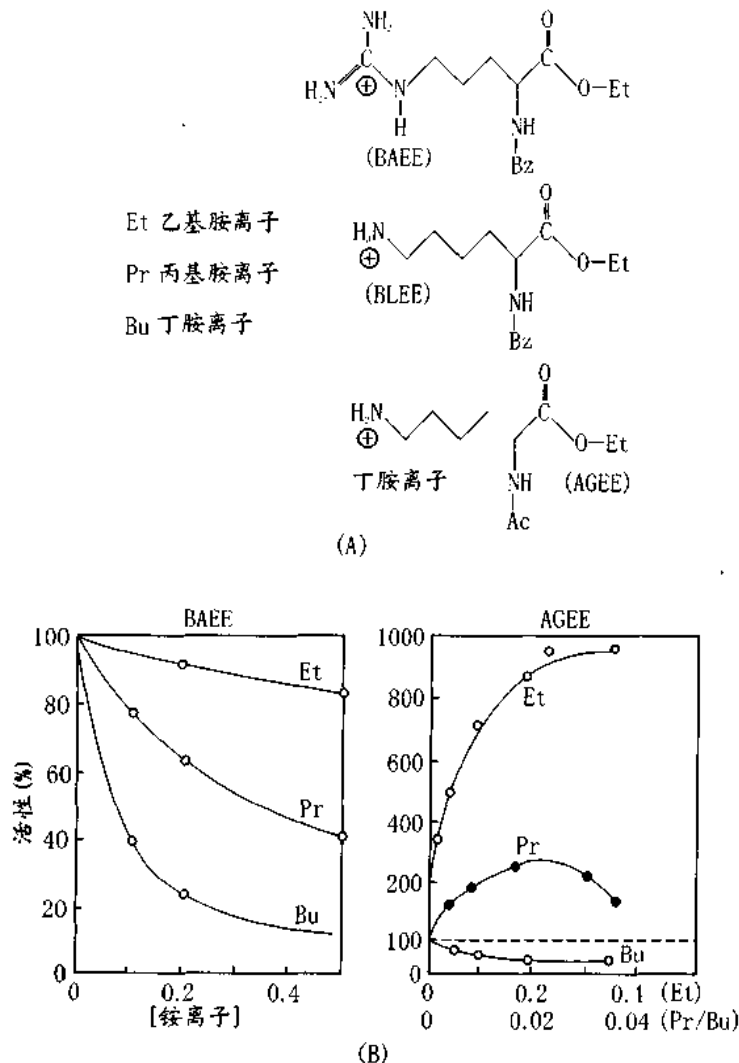


图 9.17 短链烷基铵离子对胰蛋白酶、BAEE 水解作用的抑制

诱导契合学说认为:① 酶分子具有一定的柔顺性;② 酶的作用专一性不仅取决于酶和底物的结合,也取决于酶对底物的催化,取决于催化基团的正确取位。诱导契合学说认为催化部位要诱导才能形成,而不是“现成的”,因此,可以排除那些不适合的物质偶然“落入”现成的催化部位而被催化的可能。诱导契合学说也能很好地解释所谓“无效”结合,因为,这种物质不能诱导催化部位形成。

### 三、扭曲与过渡态学说

这种学说认为,酶的作用专一性既寓于酶与底物的结合,也寓于酶对底物的催化,酶与底物的结合不仅促成了结合基团和催化基团的正确取位,同时也为下一步酶对底物的催化作了准备。

早在 1930 年 Haldane 就指出,酶与底物结合过程中有部分结合能使底物扭曲,降低反

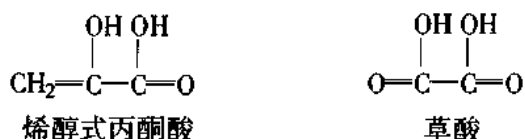
应活化能,推动底物反应。这种学说和锁和钥匙有相通之处,因为按照锁和钥匙学说,酶是刚性分子,底物和酶的活性中心具有高度互补性。当这种互补性不甚精确时,在底物与酶的结合过程中,必然会导致底物发生某种程度的扭曲、张拉,从而导致反应键的削弱,促进反应进行。这就是说,酶在底物专一结合时就包含有进一步催化的意义。例如,溶菌酶的适宜底物是 N-乙酰胞壁酸(NAM)与 N-乙酰氨基- $\alpha$ -脱氧-D-葡萄糖(NAG)通过  $\beta$ -1,4-连接交替组成的六聚糖。与此相对应,在该酶分子的活性中心中也有六个亚位点,可专一地和六聚糖各各结合,其中自非还原端算起第 1,2,3 与 5,6 糖环(分别称为 A、B、C 与 E、F 糖环)与活性中心相应的五个亚位点十分吻合,结合自由能为负值;但是 D-糖环(即第 4 糖环)则否,它只有在发生一定的扭曲,导致从稳定的椅型构象变为半椅型构象后才能和酶结合,正是由于这种构象的转变,就导致了糖苷键的削弱,反应的加速(参见图 9.13)。

以后,Pauling 发展了上述观念,引进了过渡态学说。即认为:① 任何一个化学反应的进行都必须经过活性中间络合物阶段或者说过渡态阶段,而且,反应速度与过渡态底物的浓度成比例;② 酶的活性中心对过渡态底物有更好的互补性,这就是说,酶和过渡态底物有更强的结合力。

过渡态学说的特点是,酶的高度作用专一性不仅寓于底物的静态结构之中,也寓于底物的动态变化之中。这和诱导契合学说有相通之处,按照一般学说,酶分子既具有一定的柔顺性,酶分子在和底物结合时,除了底物能诱导它的催化基团正确取位外,由于酶也有一定的刚性,在契合的同时能引起底物分子的扭曲,导致底物向过渡态转变,使反应得到加速。而且也只有能形成过渡态的底物才能被酶作用。

由于获得了大量的过渡态底物类似物,过渡态学说得到了有力的支持。这些类似物的特点是,它们和酶的结合能力远大于天然底物,因而常可作为酶的强力抑制剂,例如,D-糖环处于半椅型的构象是溶菌酶天然底物的过渡态,人工合成 (NAG)<sub>2</sub>-NAM 内酯因具有半椅型结构也就成了过渡态类似物抑制剂,事实上它的  $K_i/K_m = 10^{-4}$ 。

又如,烯醇式丙酮酸是乳酸脱氢酶、丙酮酸激酶、草酰乙酸脱羧酶和丙酮酸羧化酶等共同的过渡态底物,草酸类似于烯醇式丙酮酸,因此,它也可作为这四种酶共同的过渡态类似物,对这四种酶表现强的抑制作用,  $K_i/K_m = 10^{-3}$ 。



过渡态底物类似物是现代药物设计的一个重要方向。

#### 第四节 酶反应的催化机制<sup>(9-11)</sup>

从能量的角度看,任何一个化学反应的进行都必须克服一定的能障,都必须具有一定的活化能(更确切地说是活化自由能  $\Delta G^\ddagger$ )。

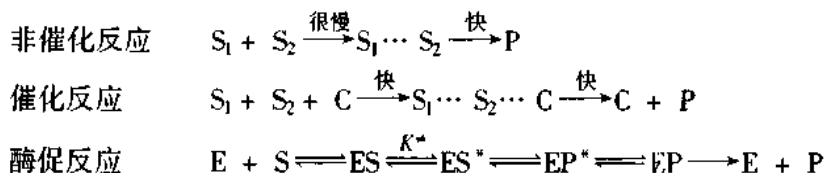
按照过渡态理论。这种活化自由能就是使基态反应物分子形成过渡分子所需的能量,它和反应速度常数  $k$  之间有如下关系:

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\Delta G^\ddagger/RT} = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{-\Delta H^\ddagger/RT} \cdot e^{-\Delta S^\ddagger/R} \quad 9.25$$

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger \quad 9.26$$

其中,  $K_B$  与  $h$  分别为 Boltzman 与 Plank 常数,  $R$  为气体常数,  $T$  为温度,  $\Delta G^\ddagger$ 、 $\Delta H^\ddagger$  与  $\Delta S^\ddagger$  各为自由能、焓与熵的变化。

因此, 为了(在恒定温度条件下)加速化学反应, 就必须设法降低活化自由能。酶所以能高效地加速反应的原因之一就在于它通过各种方式形成能障较低的过渡态络合物, 大大降低总的活化能。



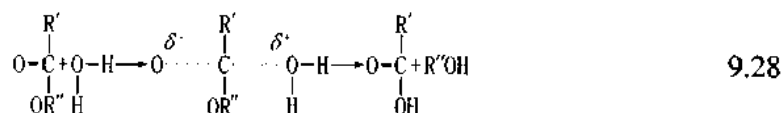
其中限速步骤通常是活化能最高的过渡态形成步骤, 它决定总的速度:

$$V = k \cdot [ES^\ddagger] = k \cdot K^\ddagger [ES] \quad 9.27$$

通过降低反应活化自由能而加速酶反应的因素有:

### 一、张变、扭曲效应 (strain distortion)

过渡态的形成是反应进行的关键。以酯水解为例:



当水分子加到酯上, 形成具有正电区与负电区的过渡态络合物后, 反应就能进行。

进行酶反应时, 底物先与酶形成酶-底物络合物, 由于互补性不甚精确, 从而导致底物产生某种张变、扭曲, 使基态底物转变为过渡态构象, 降低活化能, 因此反应得以加速, 这就是“张变扭曲”机制的中心思想。

张变、扭曲的能量来自于结合能。例如, 有人发现胃蛋白酶在作用某些肽时,  $K_m$  虽然很接近, 但催化速度却大不相同(表 9.8), 这是由于不同的底物和酶结合时能够提供用于升高反应速度的结合能不同。当底物浓度很低时, 表 9.9 中的  $k_{cat}/K_m$  可看作是表观的二级反应速度常数:  $v = (k_{cat}/K_m) \cdot [E] \cdot [S]$ 。由于过渡态的形成是反应的限制环节, 故  $k_{cat}/K_m$  相当于该环节的平衡常数。

表 9.8 胃蛋白酶对某些肽的水解动力学常数

底物*	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (s <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup> )
Chz, His, Phe, Trp, Oet	0.23	0.51	2 200
Chz, His, Phe, Phe, Oet	0.18	0.31	1 720
Chz, His, Phe, Tyr, Oet	0.23	0.16	690
Chz, His, Tyr, Tyr, Oet	0.24	0.009 4	39

\* Chz 苄氧羰基, Oet 乙酯

又如, 胞苷脱氨酶和四氢尿嘧啶结合, 由于后者具有类似于过渡态的 C-4 四面体结

构,因此它和酶的结合力比天然基态底物大  $10^3$ ,接近于  $16 \text{ kJ/mol}$ ,这部分能量就可用于使底物张变扭曲,加速反应。

张变、扭曲效应对反应速度的影响很大。例如,乙烯环磷酸酯的水解速度是磷酸二酯水解速度的  $10^8$ 倍,因为环磷酸的构象更接近于过渡态(图 9.18)。

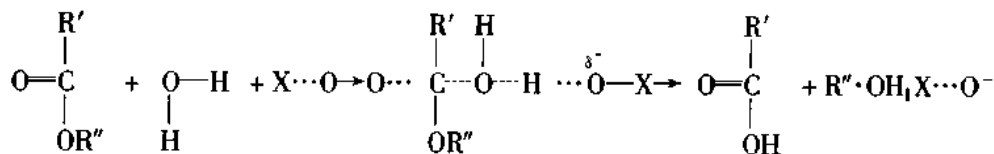


图 9.18 扭曲对反应速度的影响

酶和底物结合导致底物张变、扭曲的例子很多,例如,前述的溶菌酶与其底物结合时能引起 D-糖环构象改变;又如,磷酸二羟丙酮与磷酸丙糖异构酶结合时也能被扭曲。不过,值得提到的是,对溶菌酶-底物络合物的能量进行仔细计算后表明,扭曲对该酶反应速度的促进作用并不大。

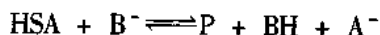
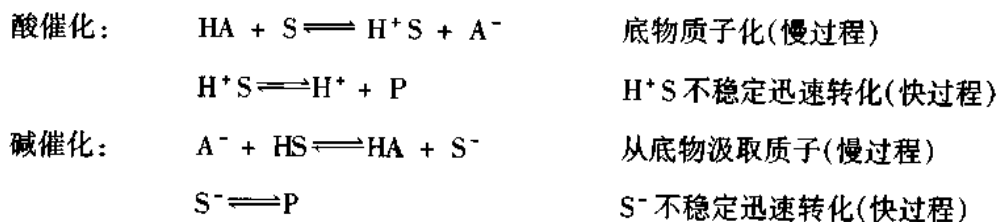
## 二、酸碱催化(acid - bases catalysis)

酸碱催化是通过瞬时地向反应物提供质子或从反应物中汲取质子,以稳定过渡态、加速反应的一类催化机制。仍以酯的水解为例:



9.29

在水溶液中通过高反应性的质子( $\text{H}^+$ )和氢氧离子( $\text{OH}^-$ )进行的催化称为狭义的酸碱催化;而通过  $\text{H}^+$ 、 $\text{OH}^-$  以及能提供  $\text{H}^+$ 、 $\text{OH}^-$  的供体(如醋酸和胺等)进行的催化则称为广义的酸碱催化。酸碱催化机制可概括如下:



酸碱催化的效率和广义酸碱的解离常数 ( $\text{p}K$ ) 有关:

$$\log k_a = C_A - \alpha \text{p}K_a \quad 9.30$$

$$\log k_b = C_B + \beta \text{p}K_b \quad 9.31$$

式 9.28 与式 9.29 所示的关系式称为 Brønsted 催化作用定律。其中  $C_A$ 、 $C_B$  为常数,由

反应类型、温度及溶剂系统等因素决定； $\alpha$  和  $\beta$  称为 Brønsted 系数，它们是衡量酸碱强度对反应速度影响的灵敏度指标，变动于 0~1 之间。当  $\alpha$  或  $\beta = 0$  时，说明没有质子转移，反应速度与酸碱强度无关；反之，当  $\alpha$  或  $\beta = 1$  时，质子完全转移，反应敏感于酸碱强度。根据上述关系进行 Brønsted 作图(图 9.18)，可以估算出广义酸碱对反应速度所能发挥的作用。例如，1 mol/L  $pK_a = 7$  的酸，在 pH 7，而  $\alpha$  各为 0.1、0.5 与 1 时，表明其对反应的催化效率分别为水的 1、200 和  $5 \times 10^6$  倍。

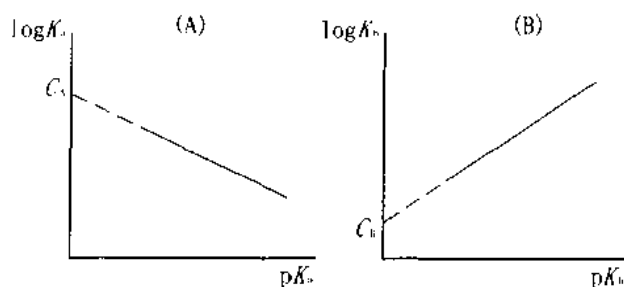


图 9.19 Brønsted 作图  
广义酸催化(A) 广义碱催化(B)

酸碱催化也与 pH 有关：

$$\text{酸催化: } v = k_b \frac{[HA][S][H^+]}{K_a + [H^+]}$$

$$\text{碱催化: } v = k_b \frac{[A^-][HS]K_b}{K_b + [H^+]}$$

对一个酸碱催化体系来说，通常得到的是表观速度常数  $k_{obs}$ ，它是各种酸碱催化的速度常数与相应的酸碱浓度乘积之和：

$$k_{obs} = k_s \cdot [H_2O] + k_H[H^+] + k_{OH}[OH^-] + k_a[A] + k_b[B] \quad 9.32$$

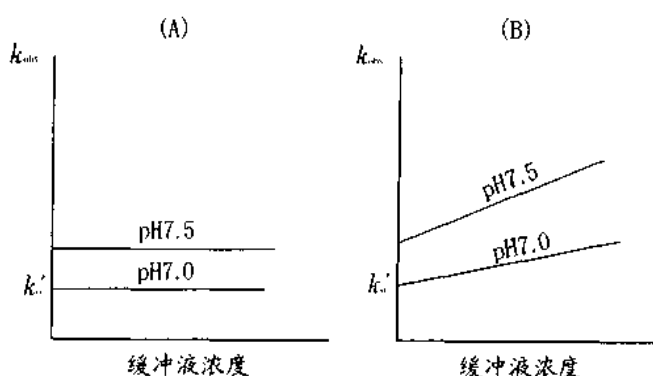


图 9.20 缓冲液浓度对  $k_{obs}$  的影响  
狭义酸碱催化(A) 广义酸碱催化(B)

如果将  $k_{obs}$  相对缓冲液浓度作图(图 9.20)，可以了解到狭义的酸碱催化与广义的酸碱催化所起的作用。在保持缓冲离子对的比例恒定条件下，如果反应速度不随缓冲液浓度而变化，则说明是狭义酸碱在起作用；相反，如果存在着相关性，则表明包含广义酸碱催化。图



中  $k'_0$  表示自发反应的速度常数。

酸碱催化在酶的催化过程中占有很重要的地位,酶分子中具有各种酸性或碱性氨基酸侧链,如 Glu、Asp、His、Lys、CysH 和 Tyr 等,它们可能在特定条件下发挥作用。一般酶反应涉及的都是广义酸碱催化,尚未发现酶具有浓缩  $H^+$  或  $OH^-$  的机构。

酸碱催化在酶反应中发挥作用的例子如溶菌酶对寡聚糖的水解,该酶的 Glu - 35 侧链处于高度非极性的环境中,因此其羧基在 pH 6 以内处于不解离状态,能为底物的糖苷氧桥提供质子有利于 C—O 键的断裂;由此形成的正碳离子可为邻近处于解离状态的 Asp - 52 侧链所稳定。

### 三、共价催化 (covalent catalysis)

共价催化又称亲核 (nucleophilic catalysis) 或亲电子催化。在催化时,亲核催化剂或亲电子催化剂能分别放出电子或汲取电子并作用底物的缺电子中心或负电中心,迅速形成不稳定的共价络合物,降低反应活化自由能,以达到加速反应的目的。仍以酯水解为例(见式 9.31)。

和酸碱催化相似,放出电子和汲取电子一般是一慢过程,催化速度取决于放出电子与汲取电子的速度,催化效率也取决于亲核催化剂与亲电子催化剂的 pK 值与反应系统的 pH。但和酸碱催化不同,它形成的过渡态络合物不是离子键,而是共价键。

共价催化在酶促反应机构中占有极重要的地位,许多酶反应都包含这种机制,表 9.9 列举了某些借助共价催化机制进行的酶反应。

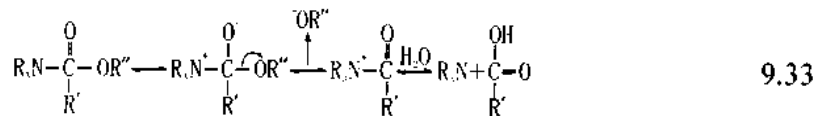


表 9.9 某些通过共价催化机制进行的酶反应

酶	共价中间络合物	参与共价中间络合物形成的氨基酸残基
3-磷酸甘油醛脱氢酶	酰基-酶	Cys
D-氨基酸氧化酶	Schiff 碱	Lys
乙酰 CoA 乙酰基转移酶	酰基-酶	Cys
Gly 咪基转移酶	咪基-酶	His
蔗糖磷酸化酶	葡糖基-酶	Cys
转醛醇酶	Schiff 碱	Lys
胰蛋白酶	酰基-酶	Ser
木瓜蛋白酶	酰基-酶	Ser
碱性磷酸酯酶	磷酸基-酶	Ser
ATP-柠檬酸解酶	磷酸基-酶	Glu
果糖二磷酸醛缩酶	Schiff 碱	Lys
磷酸葡萄糖变位酶	磷酸基-酶	Ser
琥珀酰 CoA 合成酶(ADP)	磷酸基-酶	His

值得指出的是,酶分子中某些氨基酸侧链既可作为酸碱催化剂,又可作为亲核亲电子催化剂发挥作用,究竟采取什么方式? 因酶和这些侧链基所处的微环境而不同。

羧基,它们在肽链中的  $pK_a$  为 3~4,通常以  $-\text{COO}^-$  形式存在,在酶的催化作用中  $-\text{COO}^-$  较  $-\text{COOH}$  更为重要。但在疏水与极性环境中,它们的  $pK$  值可能发生变化,例如,在溶菌酶中 Glu 的羧基以不解离形式存在,而 Asp 者却以解离形式存在,因而它们在催化中起的作用不同。

氨基,当底物带负电时,主要取  $-\text{NH}_3^+$  形式,起酸碱催化剂的作用。但是很多以 Lys 为活性中心的酶,催化时其  $\epsilon$ -氨基以  $-\text{NH}_2$  形式起亲核作用, $-\text{NH}_2$  的催化效率因所处的环境而异。例如,乙酰异丁酯水解时,加苯胺,反应加速 10 倍。磷酸吡哆醛、生物素等辅酶也是通过 Lys 的  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$  的亲核作用将它们结合于酶分子上发挥作用的。

巯基,主要以  $-\text{SH}$  形式存在,在许多酶反应中起亲核催化剂的作用,但也可以  $-\text{S}^-$  形式存在,作为酸碱催化剂。

咪唑基,在酶的催化过程中起着特别重要的作用,因为它的  $pK$  值为 6.1~7.1,在生理 pH 条件下,无论作为酸碱催化剂,还是共价催化剂,它都能迅速建立提供质子与汲取质子的平衡、亲核与亲电子的平衡。一般地说,在涉及到磷酸基转移的反应(如磷酸变位反应)或活泼酯的酰基转移反应中,它的作用主要作为亲核试剂推动磷酸基转移;而在“丝氨酸”酶和“巯基”酶催化的非活泼酯及酰胺水解反应中,它主要作为酸碱催化剂,增加 Ser、羟基与巯基的亲核性。

咪唑基从水中取出质子的速度为  $10^3 \text{ mol/L}\cdot\text{s}$ ,放出质子的速度为  $2 \times 10^{10} \text{ mol/L}\cdot\text{s}$ ,咪唑基的再生过程,即从水中汲取质子的过程是慢环节,所以如果反应速度接近  $10^3 \text{ mol/L}\cdot\text{s}$  时,则很可能是咪唑基在起作用;在极性环境中这种速度还可提高 2 级,达  $10^5 \text{ mol/L}\cdot\text{s}$ 。

#### 四、静电催化 (electrostatic catalysis)

过渡态也可通过底物的荷电基与催化剂的荷电基加以稳定,正碳离子可通过负电荷的羧基稳定,同样含氧阴离子的负电荷,也可通过金属离子加以稳定。值得顺便提到的是,在已知四分之一左右的需要金属的酶中,金属所起的作用可能很不同:有的参与酶和底物的结合,并起稳定催化构象的作用,如某些碱土金属  $\text{Ca}^+$  与  $\text{Mg}^+$  等;有的和酶的结合力很弱,起活化作用,如碱金属  $\text{K}^+$  等是某些与磷酸基转移有关酶的活化剂;至于过渡态金属,它们或者通过静电结合导致底物扭曲、张变,或者作为亲核电子试剂进行共价催化。

#### 五、多元催化与协同效应 (multicatalysis and coordinate action)

酶分子是一个拥有多种不同侧链基团组成活性中心的大分子,这些基团在催化过程中根据各自的特点发挥不同的作用。而酶的催化作用则是一个综合的结果,是通过这些侧链基团的协同作用共同完成的,例如胰凝乳蛋白酶就是通过 Asp-102、His-57、Ser-195 组成的电力接续系统完成催化的。

多元催化与协同作用的效果远胜单元催化的效果。以甲基葡萄糖在苯中的变旋反应为例,在没有催化剂存在时,反应进行得极为缓慢;酚和吡啶都具有催化作用;酚与吡啶同时存在时,催化效率又可进一步提高;如果将酚羟基与吡啶再结合于同一分子(即  $\alpha$ -羟吡啶),则催化效率的升高更为显著,当它的浓度为  $0.001 \text{ mol/L}$  时,其催化效率比酚与吡啶的混合液大 7 000 倍。

## 六、微环境效应 (microenvironment)

有机化学反应实验说明,溶剂的性质对反应速度的影响很大,例如  $\text{N}_3^-$  与对硝基氟苯中氟的取代反应,在 DMSO 中进行的速率就比在水中大 12 000 倍以上。

X-衍射分析表明,酶分子的活性中心区就是一个特殊的微环境。例如,溶菌酶的活性中心凹穴就是由多个非极性氨基酸侧链基团包围的、和外界水溶液显著不同的微环境。计算表明,这种低介电常数的微环境可能使 Asp-52 对正碳离子的静电稳定作用显著增强,从而使催化速度得以增大  $3 \times 10^6$  倍。

## 七、邻近效应与定向效应 (proximity and orientation)

酶除了能通过各种机制形成酶-底物络合物,降低反应活化自由能,使底物由基态转变为过渡态外,从热力学角度而言:  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$  ( $\Delta H^\ddagger$  与  $\Delta S^\ddagger$  分别为活化焓与熵),酶也能通过与底物形成酶-底物络合物,减少负熵,促使催化效率提高,使反应加速。

熵是衡量系统中有序度的量的概念。对于  $A + B \rightarrow C$  的反应系统来说, A、B 每一种分子都有三个平移度、三个旋转自由度,但当它们反应变为 C 以后,就减少了三个平移度与三个旋转自由度。也就是说,当反应物从自由基态变为结合的过渡态以后,就能引起熵的损失,负熵增大,  $-T\Delta S$  变为较大的正值。

在酶促反应系统中,负熵的减少主要寓于酶-底物络合物的形成。酶-底物络合物的形成既是一个专一性识别过程,更重要的还是一个变分子间反应为分子内反应的过程。概括地说,这是一个负熵减少的过程,在这一过程中酶的作用通过两种效应得以体现,这两种效应即邻近效应和定向效应。

邻近效应 (proximity) 是指酶、底物结合形成络合物时,底物分子和底物分子(如双分子反应)间、酶的催化基团与底物分子间,由于结合形成了“一个分子”,反应基团的有效浓度得到了极大升高,反应速度得以大大增大的一种效应。以有机化学模型实验——胺催化对硝基苯水解为例:

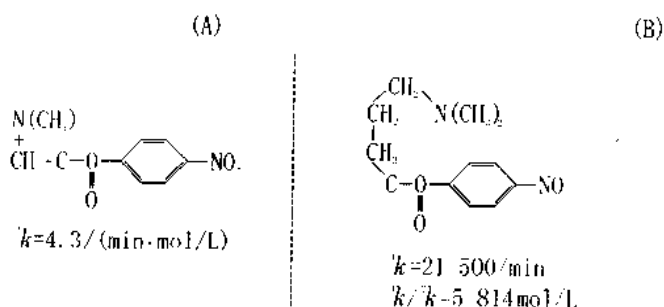
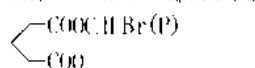
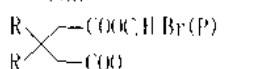
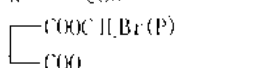
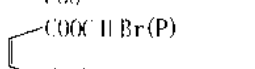
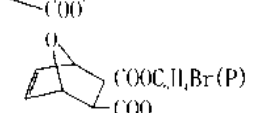


图 9.21 邻近效应对反应速度的影响

图中 (A) 为三甲基胺对硝基苯酯羰基直接进行亲核作用,催化酯进行水解, (B) 为三甲基胺与对硝基苯酯结合成一个分子后进行的催化。由于两者的反应级不同,无法直接作出反应速度的比较,但是从  $k/k$  可以看出,当分子间反应变为分子内反应后,底物的有效浓度增加了近 6 000 mol/L,这是一般的溶液系统不可能达到的水平。

表 9.10 定向效应对反应速度的影响

反应物	酯水解相对速度(mol L <sup>-1</sup> )
CH <sub>2</sub> (COO) - CH(COO)H Br(P)	1.0
	10
	$6 \times 10^5$
	$2 \times 10^5$
	10
	$8 \times 10^5$

定向效应(orientation)是指反应物的反应基之间,酶的催化基团与底物的反应基之间的正确取位后产生的反应速度增大的一种效应。正确定向取位问题在游离的反应物体系中很难解决,但是当反应体系由分子间反应变为分子内反应后,这个问题就有了解决的基础。正确定向取位对加速反应的意义可通过以分子内羧基催化酯水解的模型实验加以说明(表 9.10),其中戊二酸由于  $\alpha$  和  $\beta$  碳原子间的连接的旋转自由度很大,所以水解速度较小,反之,当两羧基完全固定,取向问题得到解决后,如 3,6-环氧- $\Delta^4$  的水解速度则非常大,反应速度常数可升高  $5 \times 10^4$  倍。

再例如邻羟苯丙酸的内酯形成,当用甲基取代了苯环邻近的碳原子上的 H,使羧基与羟基之间能更好地定向时,反应速度也可加速  $4 \times 10^5$  倍。

Page 和 Jencks 认为,邻近效应和定向效应在双分子反应中起的促进作用至少可分别达  $10^4$  倍,两者共同作用则可能使反应速度升高  $10^8$  倍。

以上讨论的是人们现阶段对酶催化作用的结构基础、酶的催化机制的一些基本认识。概括地说,酶的蛋白质本质不仅为酶提供了多种结合和催化的功能基团,更为酶建立特定的活性构象中心奠定了基础。酶和底物结合形成活性中间络合物的过程既是一个专一性识别的过程,也是一个变分子间反应为分子内反应、实现酶各种催化功能的过程,通过这种选择和协同作用,使酶反应得以高度专一、高效地进行。

## 参 考 文 献

### 一、酶催化功能的结构基础

- (1) Kim DN. *Compr. Supramol. Chem.*, 1996, **4**:503
- (2) Cid H, Bunster M. *Biol. Res.*, 1996, **29**(1):77
- (3) Narlikar GJ, Hersechleg D. *Ann. Rev. Biochem.*, 1997, **66**:19
- (4) Tsou CL. *Trends in Biochemical Science, Science*, 1986, **11**(10):427;1993, **262**:380

## 二、酶反应历程与方式

- (5) Suexling CJ. *Experientia*, 1991, **47(11—12)**:1 139
- (6) Keizer J. Smolen P. *Curr. Top. Cell Regul.*, 1992, **33**:39
- (7) Jen - Jacobson L. *Biopolymer*, 1997, **44(2)**:1 535

## 三、酶的作用专一性机制

- (8) Zhang ZY, Dixon JE. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 1994, **68**:1
- (9) Harrison DH, Bohren KM & Pestko GA. *Biochemistry*, 1997, **56(51)**:16 134

## 四、酶反应的催化机制

- (10) Demchenko AP. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, **1 209(2)**:149
- (11) Koch KA, Pena MM & Thiele DJ. *Chem. Biol.*, 1997, **4(8)**:549
- (12) Marsh EN. *Bioessay*, 1995, **17(5)**:431

## 第十章 酶作用的调节原理<sup>(1)</sup>

在长期的进化选择过程中,为适应外界环境的变化,满足生理功能的需要,生物体形成了一整套调节机构。对于酶来说,至少有两种调节机制:酶合成水平上的调节,即基因水平上的调节,包括基因突变、基因表达,这是一个较长的、效应持续的调节;另一为酶结构活性水平上的调节,包括酶结构修饰调节,也包括酶活性动力学调节和别构调节,这种调节是一个较快速的,甚至是即时性的调节。下面讨论后一种调节。

### 第一节 通过共价结构改变进行的调节<sup>(2-3)</sup>

#### 一、不可逆的共价调节

这种调节通常又称为酶原激活(zymogen activation),受这种机制调节的酶具有以下特点:它们都以无活性的酶原形式合成和分泌;当功能需要时,被相应的蛋白酶作用切去一小段肽链而活化;酶原变为酶是不可逆的;接受这种调节方式的酶主要是一些消化酶和一些执行防御功能的酶,它们的激活往往不是靠一种蛋白酶,而是借助酶的级联体系(cascade,或称酶瀑体系)完成的。

##### 1. 肠道蛋白水解酶

包括胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶以及羧基肽酶等。这些酶都是以酶原形式由胰腺体细胞合成,然后在激素(enterocrimn,如肠胰酶肽)等控制下分泌到十二指肠,分泌量由激素调节,酶原活化后再参与肠道食物蛋白的消化。

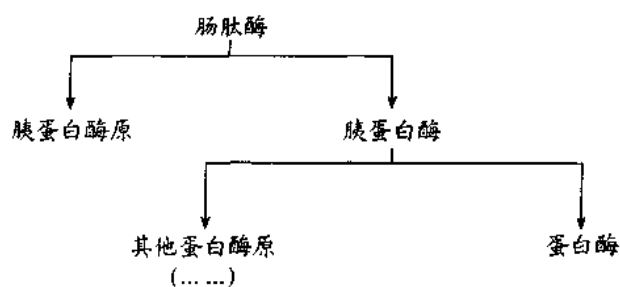


图 10.1 肠道蛋白质消化酶的酶原激活示意图

这些酶原的激活如图 10.1 所示;可见它们(包括胰蛋白酶原本身)都可通过胰蛋白酶的作用而激活,因此,胰蛋白酶的激活具有引发的意义。这种引发激活由肠肽酶(enterokinase,又称肠激酶)执行,在后者的作用下,移去胰蛋白酶原中 N-端的 Val、Asp、Asp、Asp、Asp、Lys 组成的六肽,酶原就变为活性酶。肠肽酶由小肠上皮细胞分泌,这样可避免上述消化酶

原在合成后就被立即活化。此外,胰细胞还能产生一种蛋白质性质的胰蛋白酶抑制剂,它能专一地和胰蛋白酶结合,使之不表现活性,从而可防止痕量的胰蛋白酶在胰中引起其他酶原过早地被激活。

酶原激活过程是一种快的信号放大过程,信号引起肠肽酶分泌后,痕量的肠肽酶就能迅速而相继地引起大量的胰蛋白酶原和更大量的其他酶原的激活。

酶原激活也是一种不可逆的过程,被激活的酶再通过自身消化、降解,然后回到氨基酸库。

## 2. 凝血酶(thrombin)

血液凝固机制与过程如图 10.2,它包括一系列蛋白与蛋白质因子的作用,其中每个环节都包含酶和蛋白因子的激活与信号放大。血液凝固的引发有两种方式,一是内源性的(intrinsic),从血浆因子 XII 开始,它通过和表面带负电的物质接触而激活;另一是外源性的(exogenous),从损伤组织释放的脂蛋白因子 III 进入血浆开始,它能和血浆因子 VII 及  $Ca^{2+}$  结合成复合物而激活血浆因子 X。

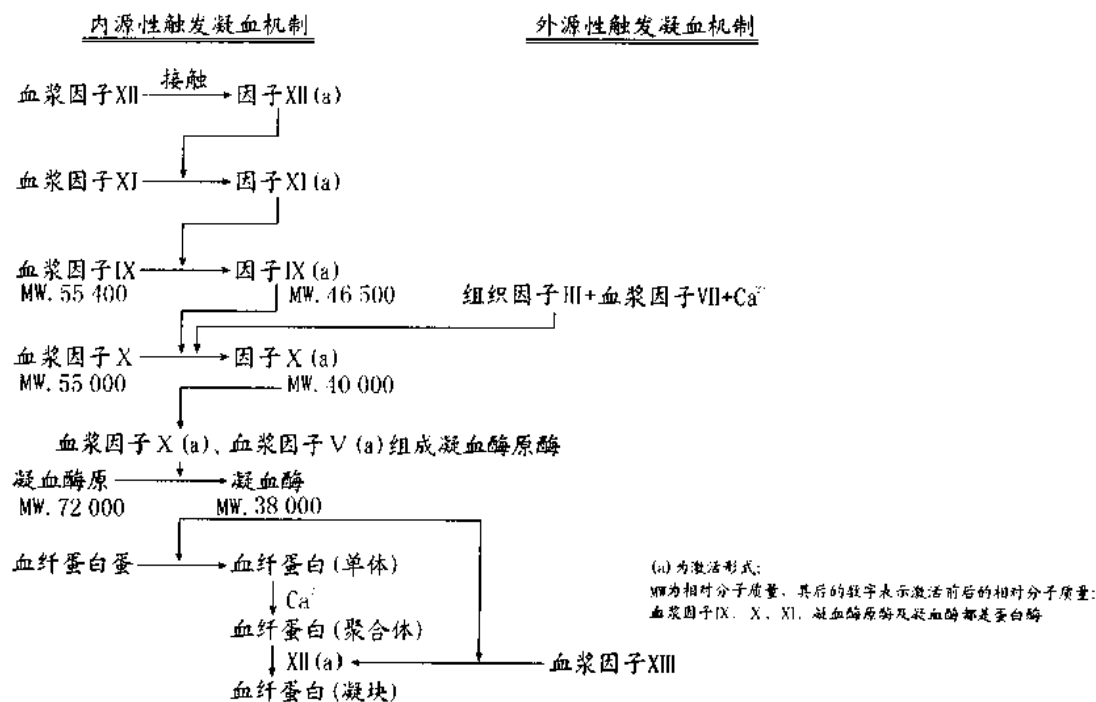
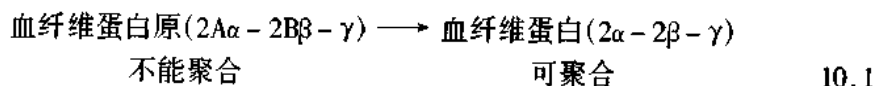
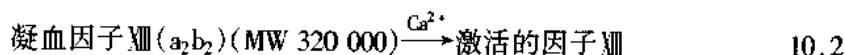


图 10.2 血液凝固的机制与过程

凝血酶在血液凝固体系中占有关键的地位,其作用是催化血纤维蛋白原转变为血纤维蛋白(fibrin),即从血纤维蛋白原的两条  $2A\alpha$  链与两条  $2B\beta$  链的两端分别移去酸性的 A 片段与酸性的 B 片段(图 10.3),减弱  $\alpha$  与  $\beta$  链的负电性,使之容易聚合:



凝血酶的另一作用是激活凝血因子 XIII:



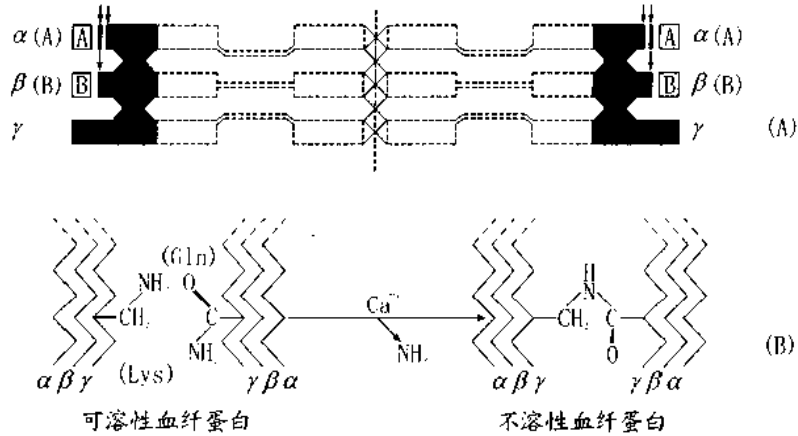


图 10.3 血纤维蛋白原激活示意图

激活的 XIII 能催化血纤维蛋白单体间的 Lys 与 Gln 发生转氨基反应,使血纤维蛋白  $\gamma$  链与  $\gamma$  链、 $\alpha$  链与  $\alpha$  链间分别形成两个与四个酰胺键,促使血纤维蛋白形成网状的稳定聚集体。

凝血酶原(thrombinogen)是糖蛋白(含糖基 10%),由约 560 个氨基酸残基组成的单肽链,相对分子质量 72 000(图 10.4),激活时被切去约 250 个氨基酸,形成 314 个氨基酸的凝血酶。该酶包括 49 个氨基酸组成的 A 链与 265 个氨基酸组成的 B 链,活性中心位于 B 链侧。

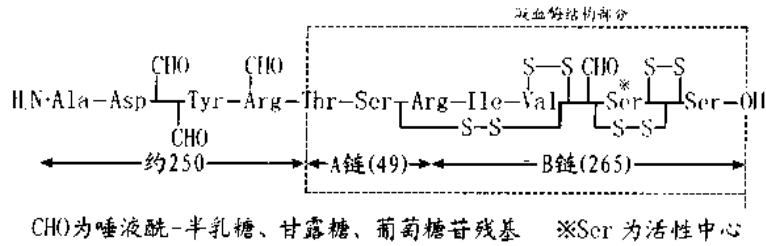


图 10.4 凝血酶原结构

### 3. 血纤维(蛋白)溶酶(plasmin)

血纤维蛋白溶酶是通过血纤维蛋白溶酶原(plasminogen)的激活转化而来的,这种激活也依赖于酶的级联系统(图 10.5)。

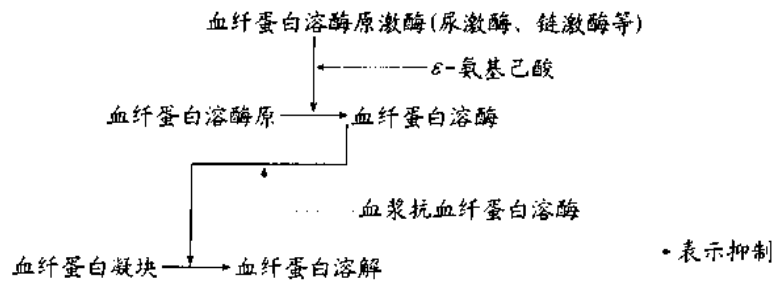


图 10.5 血纤维蛋白溶解系统

血纤维蛋白溶解的引发因子是血纤维蛋白溶酶原激酶,它们或来自于组织、血浆和尿



液,或来自微生物。其中,尿激酶(urokinase)、链激酶(streptokinase)和 tPA(tissue plasminogen activator)已用于临床治疗血栓静脉炎。血纤维蛋白溶酶对血纤维蛋白凝块的溶解是一个逐步降解的过程。

#### 4. 补体(complement)

补体是一类血浆蛋白,它和免疫球蛋白(immunoglobulin (Ig))一起发挥防御功能。其中,免疫球蛋白对外来异物有“识别”结合作用和激活补体的作用。补体是一组蛋白酶,包括 11 种蛋白质组分,它们通过级联体系而激活,最终形成“攻膜复合体”(membrane attack complex),杀伤入侵异物。所谓“攻膜复合物”是由 11 种蛋白组分中的 C<sub>5b</sub>、C<sub>6</sub>、C<sub>7</sub>、C<sub>8</sub> 各 1 分子与 C<sub>9</sub> 6 分子组成的十聚体,简化为 C<sub>5</sub> 6—9,它的形成与作用如图 10.6:

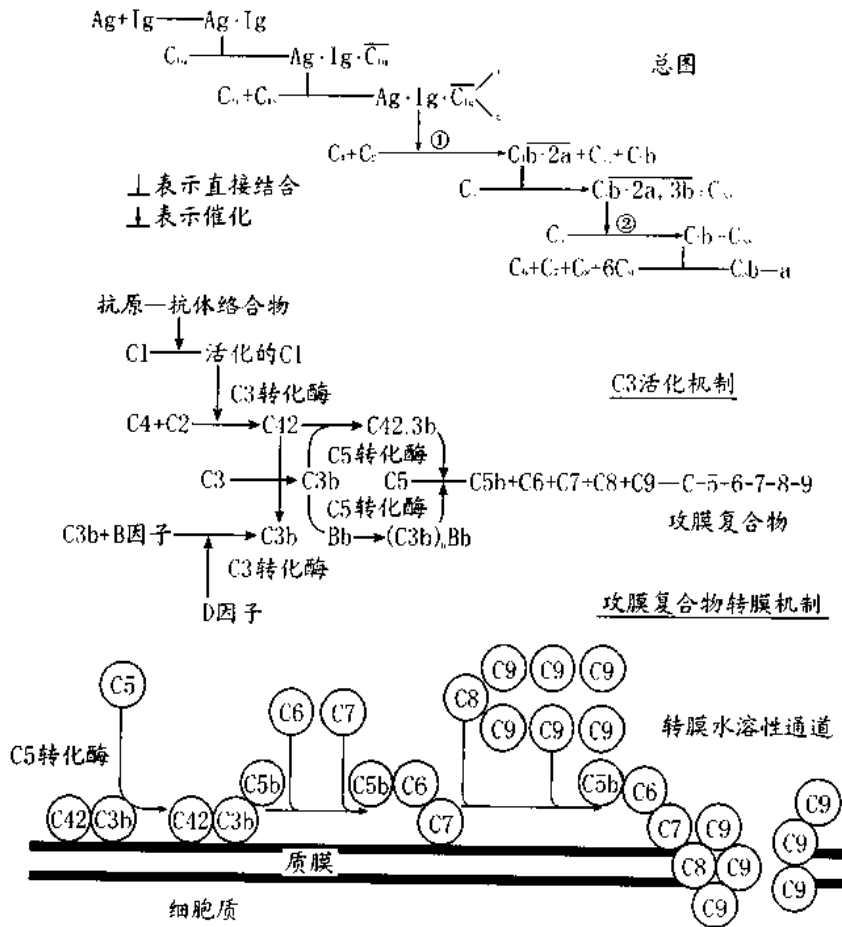


图 10.6 “攻膜复合体”的形成与作用机制

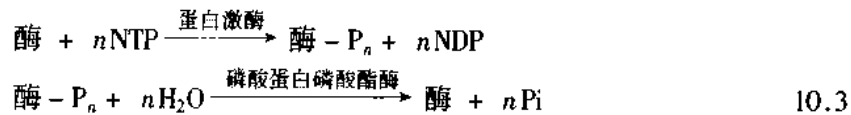
不可逆共价调节有两个特点:第一,这种调节是通过级联体系完成的,是一个快速的信号放大过程。即由一个小的信号引发体系中第一个酶的释放和激活,再依次迅速地导致第二、第三……个酶的大量、更大量的激活,最终完成特定的生理功能;第二,激活是一个蛋白质肽链水解的不可逆过程,酶原激活后不能再变回酶原状态,因而这种调节是“一次性”的调节,被激活的酶在完成其特定的生理功能后,能及时地从靶部位通过自身催化或组织蛋白酶作用而降解移去。

## 二、可逆的共价调节

现在已知有相当多的酶能以两种形式存在,它们具有不同水平的催化活性,并且这两种形式能在其他酶的作用下进行可逆互变,也就是说,它们能通过可逆的共价修饰调节其活性。可逆的共价修饰有多种类型,在代谢调节中占有很重要的地位,其中了解得最多的是磷酸化/脱磷酸化、腺苷酰化/脱腺苷酰化调节。

### 1. 磷酸化与脱磷酸化(phosphorylation and dephosphorylation)

这种共价调节可以下式概括:



NTP、NDP 表示核苷三、二磷酸,  $\text{P}_i$  表示无机磷酸(图 10.7)

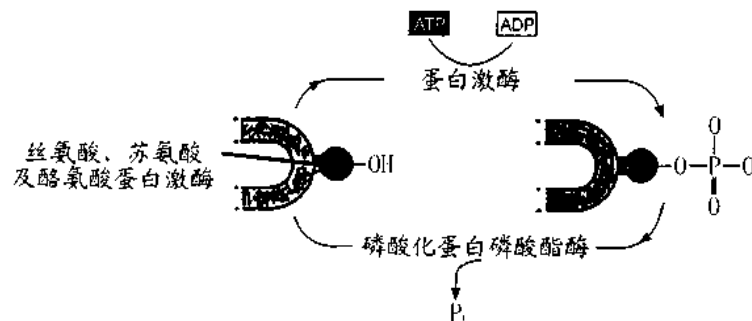
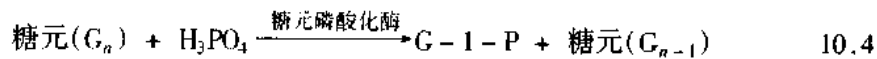


图 10.7 磷酸化与脱磷酸化可逆调节示意图

以糖元磷酸化酶(glycogen phosphorylase)为例,它催化:



该酶以两种形式存在:磷酸化酶 b,需要有 AMP 才有活性,AMP 能与酶的别构位点结合,但正常生理条件下此位点被 ATP 竞争性地占据,故此形式实际上无活性;磷酸化酶 a,不需要 AMP,正常生理条件下具有完全的活性。磷酸化酶 b 转变为磷酸化酶 a 要求磷酸化酶激酶等组成的级联体系催化;反之,磷酸化酶 a 可通过磷酸化酶的磷酸酯酶催化逆转为磷酸化酶 b(图 10.8)。

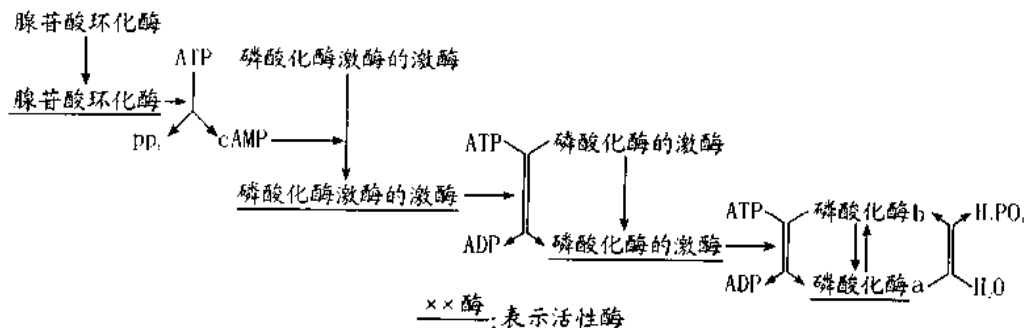


图 10.8 磷酸化酶 a、b 相互转化机制

磷酸化酶 a 与 b 在共价结构上的差别是,磷酸化酶 a 的 Ser-14 被磷酸化,而 b 则否。这样在三维结构上 N-端前 19 个氨基酸所处的构象显著不同,在 b 中,它是柔顺的;而在 a 中,由于 Ser-14 与 Arg-69 能形成静电结合,故有规整的构象。

肌肉中的磷酸化酶 a 为四聚体,相对分子质量 370 000,肝中的磷酸化酶 a 为二聚体。磷酸化酶 b 都为二聚体。

肌肉的磷酸化酶激酶(phosphorylase kinase),相对分子质量  $1.3 \times 10^6$ ,由三种不同的亚基组成,可能结构为:  $A_4B_4C_3$ 或  $(2\beta\gamma\delta)_4$ 。其中,  $\alpha$  和  $\beta$  亚基包含 Ser 残基,能被依赖于 cAMP 的蛋白激酶磷酸化;  $\delta$  亚基为钙调蛋白,能结合  $Ca^{2+}$ ;  $\gamma$  为催化亚基。磷酸化酶激酶也需要磷酸化后才有完全的活性,催化这种反应的为另一激酶(蛋白激酶)!其中,亚基  $\beta$  的磷酸化较快,而且与酶活力的升高相平行;亚基  $\alpha$  的磷酸化进行得较慢,亚基  $\alpha$  的磷酸化可能和脱磷酸的控制有关,因为它能极大地升高已磷酸化的磷酸化酶激酶对磷酸酯酶的敏感性。

蛋白激酶(protein kinase)(包括磷酸化酶激酶)的功能是催化蛋白质(酶)磷酸化,与之相应的是磷酸蛋白磷酸酯酶。蛋白质的可逆磷酸化和脱磷酸化,一般认为是生物活性的一种基本调节机制,通过这种机制,细胞就能对内、外各种信号因子作出相应的响应,调节相关的生化过程与生理机能,控制相关基因的表达、细胞的生长与分化、甚至细胞的癌变与逆转化。

蛋白激酶是一个大家族,在整个基因组中大约有 1% 的基因编码蛋白激酶,目前已发现的蛋白激酶达百余种,通过比较各种蛋白激酶的氨基酸组成和特征,人们绘成了相应的系统树(图 10.9)

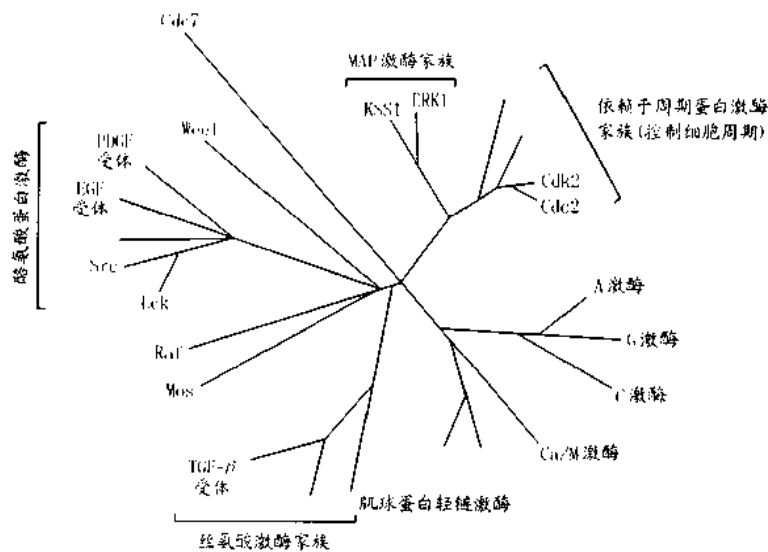


图 10.9 蛋白激酶的进化系统树

在这些激酶中,有的能和第二信使 cAMP、 $Ca^{2+}$ -CaM(钙调蛋白)与 cGMP 等偶联起激素信号的转化、传导和放大作用;有的能接受第二信使二酰基甘油(DAG)的信息,控制细胞的增殖、生长和分化。这些蛋白激酶催化的是 Ser 与 Thr 残基的磷酸化;被磷酸化的 Ser 或 Thr,它们的 N-端相邻的 2~5 个氨基酸残基中一般都有一个或一个以上的 Arg 或 Lys。这类激酶,也可称为 Ser 或 Thr 激酶,它们或通过 G 蛋白或通过离子通道蛋白传递和转化

外界信息。与此相对的,还有一类蛋白激酶催化的是蛋白质中的酪氨酸残基磷酸化,或者称为酪氨酸激酶。和 Ser 与 Thr 激酶不同,它们都是一些跨膜蛋白,其膜外侧部分可作为受体直接接受外界信号,内侧部分是具有催化活性的结构域(图 10.10)。

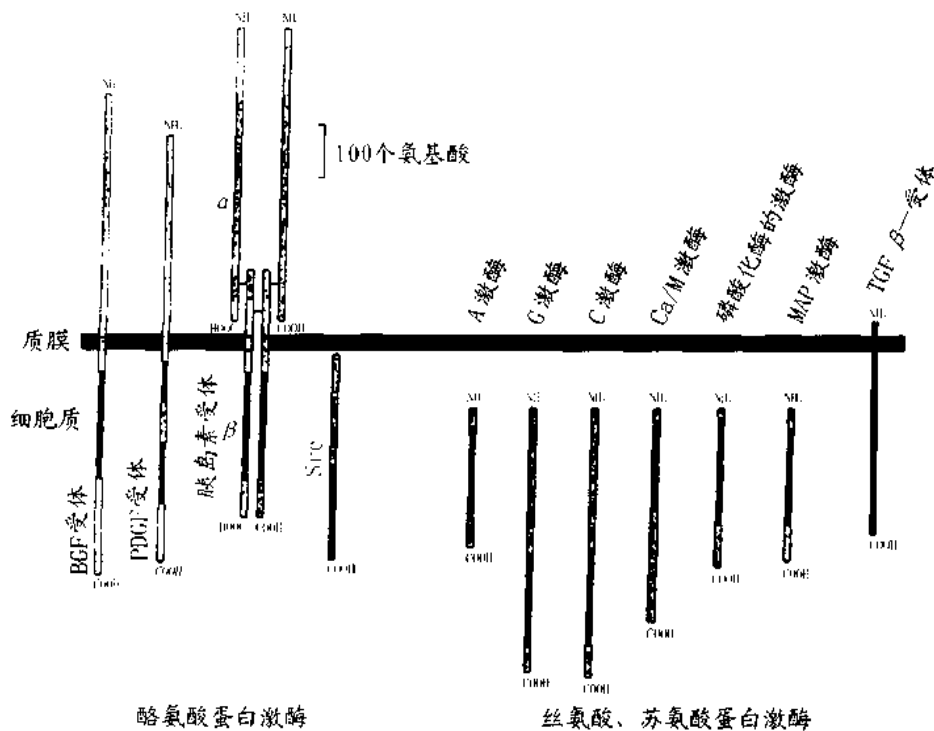


图 10.10 某些蛋白激酶在细胞中的位置与大小

在这类蛋白激酶中,有的是胰岛素和某些其他生长激素,如 EGF、PDGF 等受体;也有的是某些致癌因子的受体,这些因子由癌基因编码,能促使细胞发生癌变。

蛋白激酶是一类别构酶,在其分子中一般都包含催化亚基(C)和调节亚基(R)。根据其信号分子(包括第二信使)的要求可分为以下几类。

(1) 依赖于 cAMP 的蛋白激酶(cyclic AMP dependent protein kinase)

这种激酶也称为 A 激酶(A-kinase),要求 cAMP 激活。调节亚基 R 对催化亚基 C 的活性有抑制作用;cAMP 与 R 亚基的结合常数为  $10^{-7}$  mol/L,结合后导致酶的构象改变,释放亚基 C,后者再表现催化活性(图 10.11)。在哺乳动物组织中,这是最主要的蛋白激酶,又可进一步分为 I 型和 II 型。两者的差别在于 I 型能催化自身磷酸化,而且也只有磷酸化后它才能被 cAMP 激活:



在动物体内, A 激酶的靶蛋白首先是磷酸化酶激酶,它的磷酸化能导致糖原磷酸化酶的活化; A 激酶的另一靶蛋白是糖原合成酶,但是,它的磷酸化能引起合成酶活性的抑制。所以,在动物体内肾上腺素的分泌将导致腺苷酸环化酶的活化、cAMP 水平的升高、A 激酶的激活,最终促进糖原的分解、抑制糖元的合成。

在某些动物细胞中，例如，下丘脑的神经内分泌细胞中，A 激酶能使某些特殊基因的调节蛋白磷酸化，这些蛋白识别一些特殊基因，如生长激素抑制因子(somatostatin)基因启动子的短段 DNA 序列(约 30 个核苷酸)，促进转录的进行。这一短段的 DNA 序列又称为 cAMP 响应因子(cAMP response element, CRE)，因为 cAMP 能使之活化；相应的调节蛋白称为 CRE 结合蛋白(CRE binding protein)。

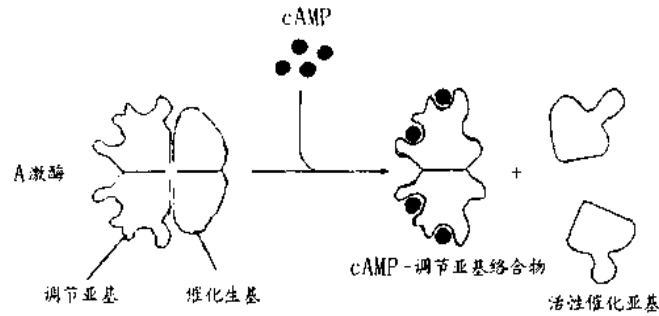


图 10.11 A 激酶活化示意图

A 激酶也能使 Ca-激酶磷酸化(见下)。

A 激酶存在于所有的动物细胞，但是，它们在不同类型的细胞中有不同的靶蛋白，这可能就是不同类型的细胞对 cAMP 产生的效应不同的缘故。

另一方面，cAMP 的效应是短暂的，被 A 激酶磷酸化的蛋白质常会立即除去磷酸，担负这一任务的是二种磷酸化蛋白的磷酸酯酶，其中一种受 cAMP 调节。cAMP 在活化 A 激酶的同时，也为专一的磷酸酯酶的抑制蛋白(specific phosphatase inhibitor protein)的磷酸化创造了条件，引起该蛋白质活化，使之能和磷酸酯酶结合，导致其失效；反之，当 cAMP 水平下降时，磷酸酯酶具有完全的活性，能使糖原代谢中三种关键酶去磷酸，抑制糖原分解(图 10.12)。

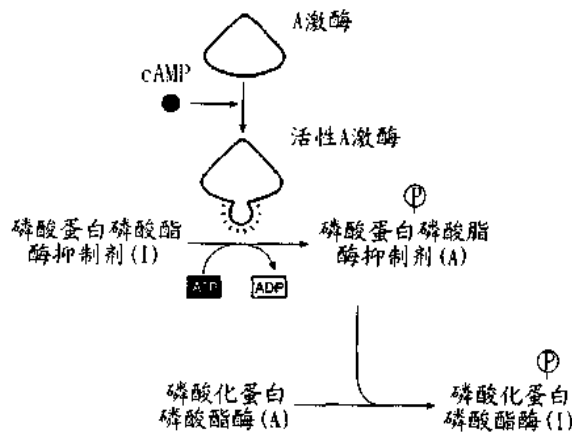


图 10.12 cAMP 导致磷酸化蛋白磷酸酯酶的抑制

(2) 依赖于  $Ca^{2+}$  - 钙调蛋白的蛋白激酶( $Ca^{2+}$ /calmodulin - dependent protein kinase)

这种激酶也称为 CaM - 激酶，受  $Ca^{2+}$  - 钙调蛋白络合物调节。

钙调蛋白(calmodulin)是由大约 150 个氨基酸残基组成的单链蛋白，包含四个对  $Ca^{2+}$

具有高亲和力的结合位点；存在于几乎所有的动物细胞，每个动物细胞约含有  $10^7$  个钙调蛋白，相当于 1% 的总细胞蛋白。钙调蛋白是一种别构蛋白，当它和  $\text{Ca}^{2+}$  结合后，发生构象变化，就能和细胞中的其他靶蛋白(X)结合并改变它们的活性(图 10.13)。

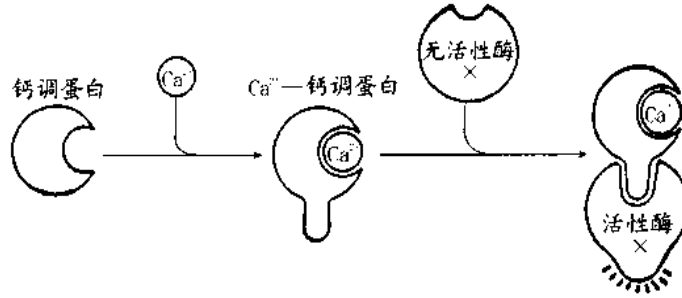


图 10.13  $\text{Ca}^{2+}$  和钙调蛋白结合引起的构象改变

$\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白调节的靶蛋白包括各种酶和膜运转蛋白，例如，它能和质膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 结合并活化它，使之泵出  $\text{Ca}^{2+}$ ，恢复细胞质中的  $\text{Ca}^{2+}$  水平。但是， $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白更主要的作用还是调节 CaM-激酶。

最早知道的 CaM-激酶是肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase)，它的作用关系到平滑肌收缩。另一 CaM-激酶是磷酸化酶激酶，已于前述，它的作用是促进糖原分解。这些酶的底物专一性都较低；近年来又发现了一些专一性更为广泛的 CaM-激酶，它们参与了动物细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的许多作用。其中了解最多的是 CaM-激酶 II，或称为多功能 CaM-激酶(multifunctional CaM-kinase)，它存在于所有的动物细胞中，特别是某些神经组织中十分丰富，甚至可达 2%。例如， $\text{Ca}^{2+}$  流入以儿茶酚胺为神经递质的神经元细胞，一方面能刺激儿茶酚胺的分泌，另一方面也能活化 CaM-激酶 II，进而导致酪氨酸羟化酶的磷酸化与活化，后者是儿茶酚胺合成的限速环节。

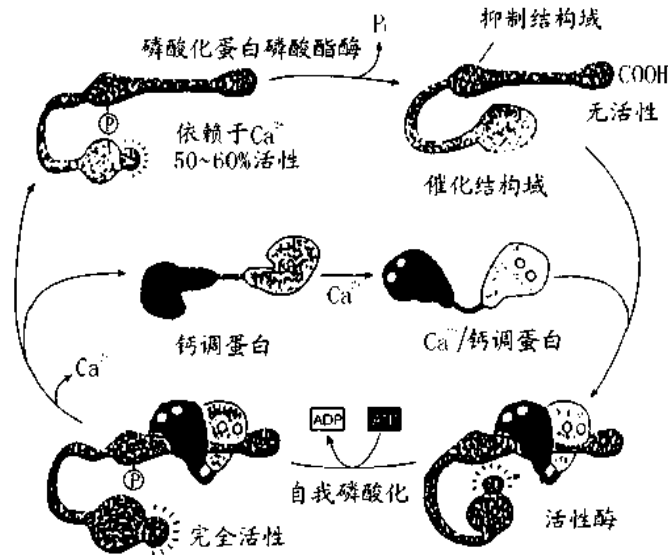


图 10.14 CaM-激酶的分子记忆机制

CaM-激酶 II 还有一个重要的特性,就是它有“分子记忆”功能,当它被活化后,即使移去  $\text{Ca}^{2+}$  也能保持一段时间的活化(图 10.14)。

A 激酶和 CaM-激酶都能调节糖原的分解与合成,它们和糖原代谢的关系可概括如图 10.15。

值得提到的是,A 激酶和 CaM-激酶不仅在糖原中起着协同的调节作用,它们本身也能相互影响。表现在:

第一, $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白能调节腺苷环化酶和 cAMP 磷酸二酯酶的活性;反之,A 激酶也能使  $\text{Ca}^{2+}$  通道蛋白磷酸化,改变其活性;同时,A 激酶还能使内质网(ER)上的  $\text{IP}_3$  磷酸化,调节  $\text{IP}_3$  诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  释放;

第二,A 激酶能直接磷酸化某些 CaM-激酶;

第三,A 激酶和 CaM-激酶常能作用相同的靶蛋白,调节其活性,但磷酸化的位点有所不同。

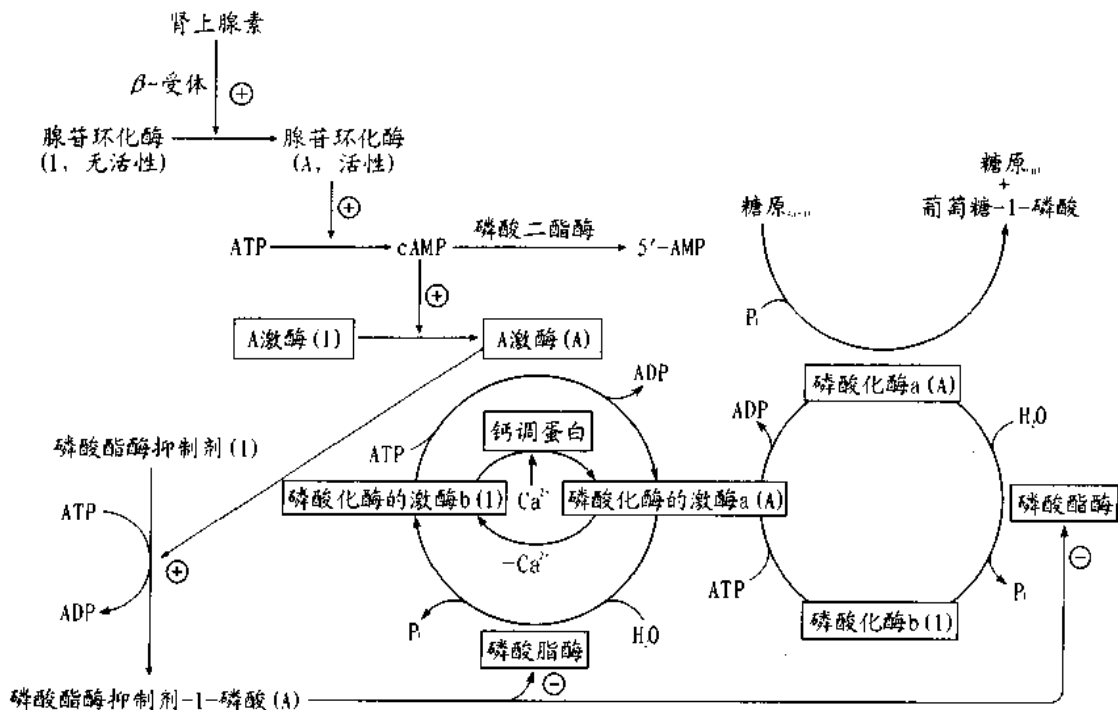
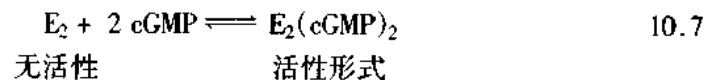


图 10.15 糖原代谢的磷酸化酶控制

### (3) 依赖于 cGMP 的蛋白激酶(cyclic GMP dependent protein kinase)

这种激酶又称 G 激酶,要求 cGMP 激活,与 cGMP 结合后转变为活性形式;



此类酶的天然底物(靶蛋白)尚不清楚,可能与血管壁平滑肌的松弛和血管的舒张有关。因为心钠肽(atrial natriuretic peptides, or atriopeptides)和血管壁的受体结合后,一方面能刺激肾分泌  $\text{Na}^+$  和水,诱导血管平滑肌松弛,降低血压,同时也能活化鸟苷酸环化酶,升高 cGMP 的水平百倍以上。

(4) 依赖于二酰基甘油的蛋白激酶(diacylglycerol activated protein kinase)

这类酶也称 C 激酶(C - kinase or PKC), 能被二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)活化。DAG 以及同时生成的肌醇 1,4,5 - 三磷酸(inositol triphosphate, IP<sub>3</sub>)都是磷脂酰肌醇, 特别是 PIP<sub>2</sub>(phosphatidyl inositol diphosphate)代谢过程中起信号作用的产物。IP<sub>3</sub>能升高胞质的 Ca<sup>2+</sup>; DAG 有两个作用, 一是分解产生花生四烯酸(arachidonic acid), 后者再进一步代谢生成前列腺素发挥作用; 另一更重要的是活化 Ser/Thr 蛋白激酶。IP<sub>3</sub>和 DAG 的作用又相互促进, 例如, IP<sub>3</sub>在诱导胞质中的 Ca<sup>2+</sup>升高的同时, 也能促使 C 激酶转位, 在质膜表面和 DAG、Ca<sup>2+</sup>及带负电荷的磷脂酰 Ser 残基结合并活化。

在哺乳动物中 C 激酶有 8~10 个亚类(isoforms), 是最大的 Ser/Thr 蛋白激酶家族; 其中, 至少有 4 个亚类能为 DAG 活化。

C 激酶的靶蛋白因细胞类型而不同。它在脑中含量最高, 在神经细胞中能磷酸化离子通道, 改变其性质, 增大神经细胞质膜的兴奋性。

C 激酶也和细胞的生长、分化以及肿瘤发生有密切的关系。在许多细胞中, C 激酶能通过级联系统磷酸化 MAP - 激酶, 然后再磷酸化和活化与 DNA 结合的基因调节蛋白, 如图 10.16 中的 Elk - 1 和 SRF(serum response factor), 前者是称为 SRE(serum response element)的短段 DNA 序列的结合蛋白, 它们能增强某些特殊基因的转录; C 激酶也可导致抑制蛋白的磷酸化, 如图 10.16 中的 NF - κB, 它是免疫球蛋白 κ 基因增强子的结合蛋白, 参与许多基因的表达调控; 在非活化的细胞中, 能与阻遏蛋白 I - κB 结合形成杂三聚体, 失去和 DNA 的结合能力; DAG 使 C 激酶活化后, 导致 NF - κB/I - κB 复合物的解离, 释放的 NF - κB 再被运转到核内, 调节基因的转录。

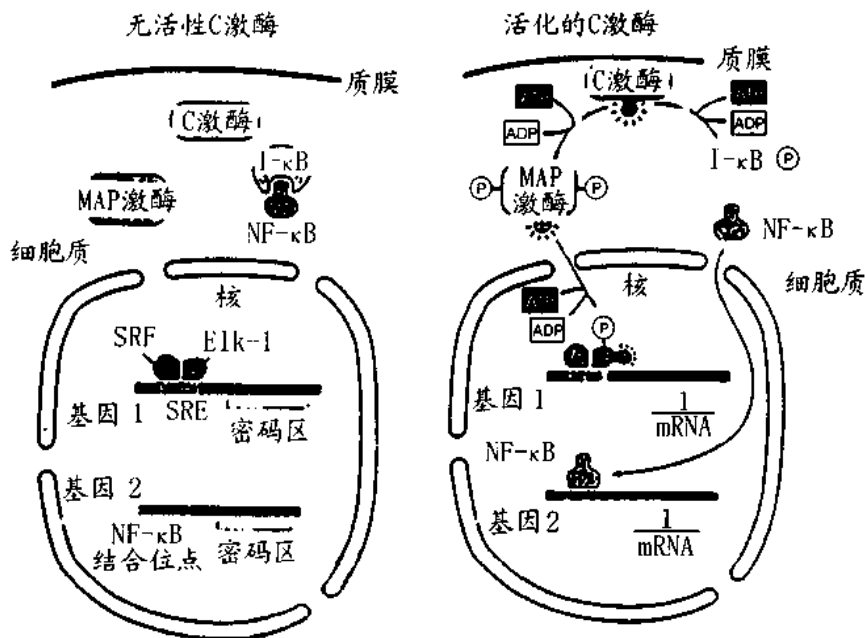


图 10.16 C 激酶活化特殊基因的转录



值得提到的是, DAG 能很快地被代谢, 因而不大可能维持 C 激酶在细胞增殖分化中的长效效应, 这样, 要继续 DAG 的活化作用就必须有新的产生波; DAG 的产生主要是通过磷脂酶分解膜磷脂酰肌醇, 但是, 现在还不清楚磷脂酶的活化机制。

(5) 酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine( - specific protein) kinase; protein tyrosine kinase, PTK; 也称 receptor tyrosine kinase)。和 Ser/Thr 蛋白激酶相对应, 这类酶催化 ATP 上的末端磷酸基转移至受体蛋白酪氨酸羟基, 使受体蛋白活化。许多激酶或生长因子的受体以及一些癌基因的表达产物都具有酪氨酸激酶的活性, 因此, 它们在信息传导、细胞生长、增殖和分化等过程中都有着十分重要的作用。

具有 tyrosine 激酶活性的激素与生长因子受体包括: 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、血小板衍生生长因子 (platelet - derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、胰岛素和胰岛素类生长因子 (insulin, insulinlike growth factor - 1, IGF - 1)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 以及巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M - CSF) 等的受体, 它们在自身磷酸化后能引发细胞内的信号级联系统, 活化相应的靶蛋白, 实现各自的效应。

某些癌基因的表达产物本身就具有 tyrosine 激酶的活性, 例如, 最初发现 PTK 是在 1979, 称为  $PP^{v-33c}$ ! 它不是一般的细胞膜受体蛋白, 而是一种病毒致癌基因的细胞内表达产物。这些癌基因编码的是一些非正常的、具有组成型特点的 PTK。又例如, 在 1982 年发现了 EGF 受体, 它和以后发现的 erbB 病毒致癌基因编码的蛋白很相似, 后者实际上是一种缺头的 (truncated) EGF 变种蛋白。这种变种蛋白缺少 EGF 在细胞外与 EGF 受体结合的结构域, 但有细胞内的催化结构域, 因此它就成了“组成”型的 PTK, 机体带有这种有缺陷的变种蛋白, 就等于能不断地接受增殖的信号, 刺激细胞不断地生长。再例如, 鼠神经系统的 *neu* 癌基因也能编码一种 Tyrosine 激酶, 这种基因能通过某些化学诱导剂诱发表达, 表达产物和正常蛋白间仅在跨膜的蛋白片段上有一个氨基酸残基的差别, 从而使得该 Tyrosine 激酶具有组成型的活性状态。这些都说明 Tyrosine 激酶在控制细胞增殖中的作用。

现在研究表明, 在细胞信号传导上有两条基本途径, 一是由七个跨膜段组成的细胞膜受体, 它与信号分子结合后作用 G 蛋白, 再作用靶蛋白, 引起第二信使的生成和改变, 导致蛋白激酶活化, 产生相应的生理效应; 另一是跨膜 Tyrosine 激酶, 当受体与胞外侧的信号分子结合时, 激活细胞内侧的催化结构域, 然后再导致细胞的生长与分化。但是, 这种信号又是如何传递下去的?

Ras 蛋白是近年来研究的热点问题之一。Ras 基因是一类原癌基因, 广泛存在于生物界, 在细胞的生长发育过程中起着重要的作用, 它的点突变和许多肿瘤的发生有密切关系。Ras 蛋白是一类低相对分子质量的 G 蛋白, 属于 GTPase 大家族, 它从 PTK 接受磷酸后, 将信号传递到核, 然后激发细胞的生长与分化。Ras 有两种可互变的构象: Ras·GTP 与 Ras·GDP, 只有 Ras·GTP 才能激发信号传递。调控 Ras 蛋白结构改变的是鸟苷酸释放蛋白 (guanine nucleotide releasing proteins, GNRP) 和 GTP 水解酶激活蛋白 (GTPase activated proteins, GAP)。前者起正调控作用, 能促使 Ras·GDP 释放 GDP, 有利于 Ras 蛋白的再活化; 后者起负调控作用, 能促使 Ras·GTP 转变为 Ras·GDP。Ras 的致癌作用可能就在于它编码一种能对抗 GAP 作用的蛋白质。近年来一个重要进展就是发现了“联接器” (adaptor), 它的作

用是将 PTK 和 GNRP 联接起来。

另一个重要突破就是搞清楚了 MAPKKK - MAPKK - MAPK 级联系统(图 10.17)。因为 Ras 接受 PTK 的磷酸活化后,寿命很短,能被磷酸酯酶迅速逆转或由于 GTP 水解为 GDP 而失效;为了刺激细胞增殖和分化,这种信号必须转变为较长的信号并传递下去,该传递系统涉及多个 Ser/Thr 激酶和 Tyr 激酶构成的级联系统,其中上述 MAP 激酶系统就可能起着特别重要的作用。MAP 激酶称为促细胞分裂素激活的蛋白激酶(mitogen - activated protein (MAP) kinase),也称为细胞外信号调节的蛋白激酶(extracellular signal regulated kinase (ERK)),该激酶的特点是,在结构组成上它包含紧相邻的 Thr 和 Tyr,这两个氨基酸存在于 TEY box 中,两者仅相差一个氨基酸;在活性上要求这两个氨基酸都磷酸化。MAPK 的磷酸化由专一的 MAPK 激酶(MAPKK)催化,MAPKK 又要求 MAPKKK 催化磷酸化;MAPKK 和 MAPKKK 都是 Ser/Thr 类型的激酶。当 MAPK 活化后,它就能通过磷酸化其他蛋白激酶或基因调节蛋白将信号传递下去,在转录的调控中发挥重要的作用;作为这种靶蛋白的如 SRF 和 Elk - 1,它们就和基因 *fos* 的转录控制直接相关(图 10.17)。

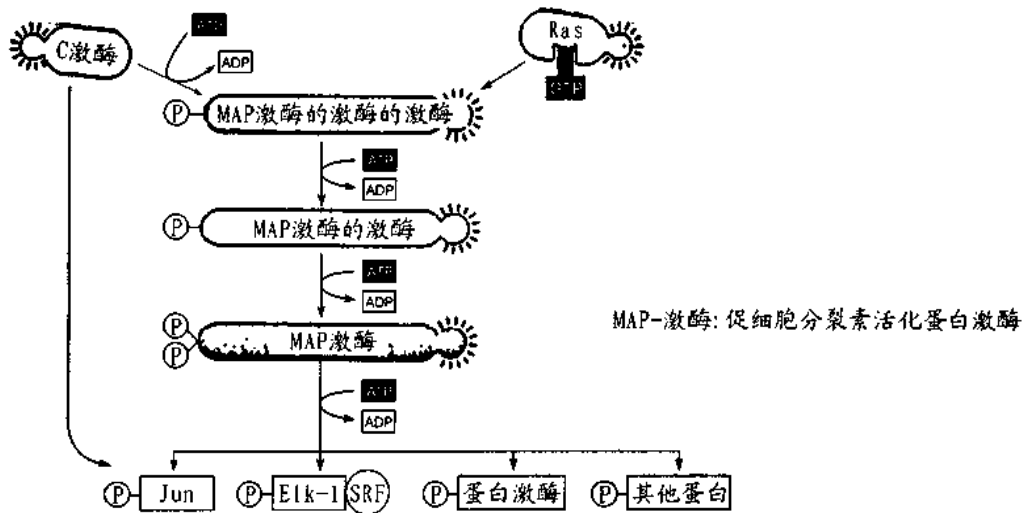
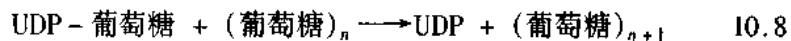


图 10.17 MAPKKK - MAPKK - MAPK 级联系统

磷酸蛋白磷酸酯酶是磷酸化/脱磷酸化可逆共调节另一侧面的关键酶,它们中有的专一性很高,如线粒体中作用磷酸化丙酮酸脱氢酶的磷酸酯酶;有的则专一性较低,对许多磷酸化蛋白都可作用。而它们对脱磷酸部位的氨基酸排列顺序的要求,通常和蛋白激酶十分相似。至于它们的分子组成,一般地说,都包括有抑制亚基,而且也只有当催化亚基从这种抑制亚基中解聚释放出来后,酶才显示活性。

磷酸化/脱磷酸化可逆共价调节的特点是:① 与不可逆的一次性共价调节不同,它是由不同酶催化的一种酶活性形式的可逆平衡调节;② 它也是通过级联体系进行,因此一个微小的信号就能瞬时地使酶大量转变为所需要的活性形式,例如,有人计算过,一个信号仅仅在 2 秒钟内就可使 50% 的磷酸化酶转变为活性形式;③ 一个信号可能同时通过两个或多个磷酸化/脱磷酸化调节系统协同地发挥作用。如果说上述糖原磷酸化酶是糖原分解代谢的关键酶之一,那么糖原合成代谢的关键酶则是糖原合成酶,它催化:



糖原合成酶也能以两种可以相互转变的 D 型和 I 型存在。D 型依赖于葡萄糖-6-磷酸(G-6-P), 而 I 型则与之无关。和磷酸化酶相似, 这两种形式也通过酶促磷酸化与去磷酸化而互变; 但是不同的是, 磷酸化使活性的 I 型变成只有部分活性的 D 型, 后者必须再与 G-6-P 进行别构结合后才表现完全的活性。催化糖原合成酶磷酸化的酶也是蛋白激酶, 而且性质上和催化糖原磷酸化酶磷酸化的完全相同。因此, 同一种激素信号引发 cAMP 产生(更确切地说是升高 cAMP 浓度), 再通过蛋白激酶活化磷酸化酶, 同时“抑制”糖原合成酶, 从而对糖原代谢作出极为灵敏的协同调节。

酶的可逆共价磷酸化调节是生物体内酶活性调节的基本机制, 外界信号因子, 特别是激素, 往往通过这一机制调节代谢活动。

通过磷酸化/脱磷酸化进行的可逆共价调节, 可引起酶活性“即时”的改变, 也可引起酶基因表达的改变。图 10.18 为胰岛素对磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)基因转录影响示意图。

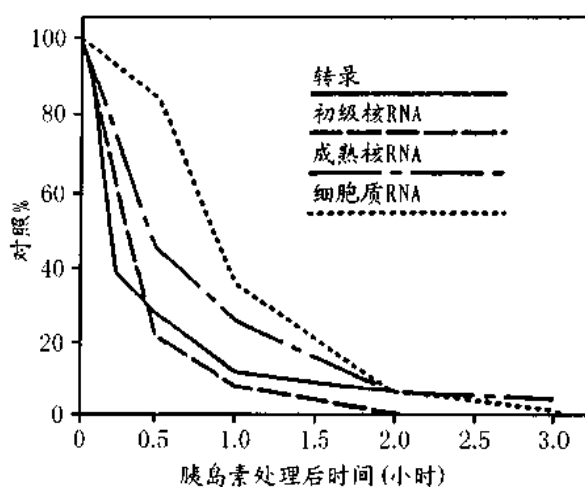
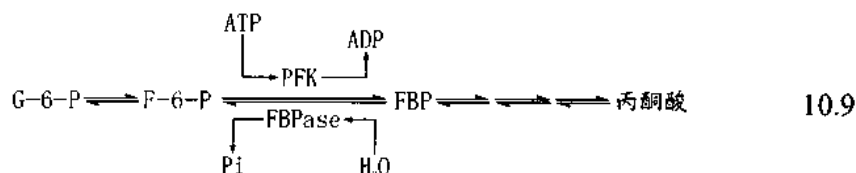


图 10.18 胰岛素对 PEPCK 基因转录影响示意图

关于磷酸化/脱磷酸化, 值得提到的还有, 这种可逆的调节不仅可通过酶活性形式的互变实现, 也可通过某中间代谢产物的“无用”循环(futile cycle)进行控制, 最好的例子是果糖-6-磷酸(F-6-P)与 1,6-二磷酸果糖(FBP)的互变循环。这种互变由磷酸果糖激酶(PFK)与果糖-1,6-二磷酸酯酶(FBPase)催化完成:

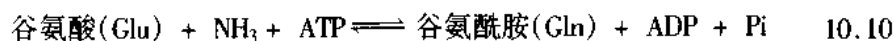


如果仅从  $\text{F-6-P} \rightleftharpoons \text{FBP}$  这一循环看, 它的最终结果是导致 ATP 分解, 因此称为“无用”循环。但是从整个代谢调节的角度来看, 这一环节包含了极为灵敏的调节控制机构, 因为在高的  $[\text{AMP}]/[\text{ATP}]$  情况下, FBPase 被抑制, 而 PFK 被激活, 这样整个系统倾向于糖原分解, ATP 产生; 反之, 在低的  $[\text{AMP}]/[\text{ATP}]$  时, PFK 受到抑制, 从而, 有利于糖原合成和

ATP 利用。至于 PFK 与 FBPase 本身的调节将在以后讨论。

## 2. 腺苷酰化与脱腺苷酰化(adenylation and deadenylation)

这种调节在细菌中有着十分重要的作用。以大肠杆菌中的谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)为例,它催化:



Gln 是细菌中氮代谢的中心产物,因此,此酶在氮平衡中是一个关键酶。

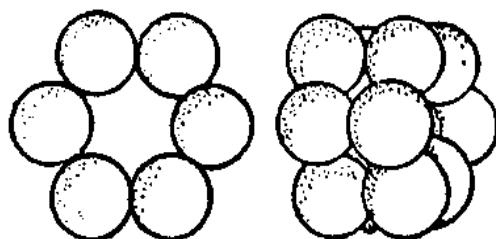
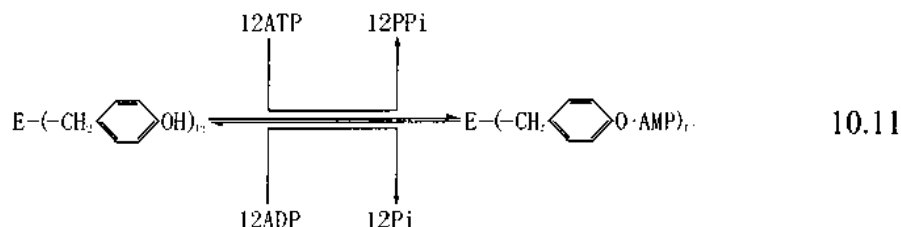


图 10.19 大肠杆菌谷氨酰胺合成酶结构示意图

谷氨酰胺合成酶的相对分子质量为  $6 \times 10^5$ ,由 12 个相同的亚基组成如图 10.19 所示的双层六面体。该酶受三种机构调节:① 别构调节,即受尾产物累加式反馈抑制调节;② 二价离子的可逆调节,二价阳离子存在时,分子致密折叠(无游离 SH 基),稳定且具有催化活性,移除二价金属离子,SH 基游离,倾向于解离为组成多肽,同时变为无活性形式;③ 腺苷酰化与脱腺苷酰化,这是一种通过酶分子各亚基上的酪氨酸侧链羟基的腺苷酰化与脱腺苷酰化进行的可逆共价调节:



腺苷酰化的谷氨酰胺合成酶,活力较低,要求  $\text{Mn}^{2+}$ ,而且对 His、AMP、CTP 及 Trp 等的反馈抑制敏感;脱腺苷酰化后,活力升高,同时,对金属离子的需求发生变化,要求  $\text{Mg}^{2+}$ 。

在细菌中,腺苷酰化的程度主要取决于氮平衡,即取决于  $[\text{NH}_4^+]/[\text{Gln}]$ 。 $[\text{NH}_4^+]$ 高时,倾向于脱腺苷酰化;反之, $[\text{Gln}]$ 高于 $[\text{NH}_4^+]$ 时,腺苷酰化占主要地位。

谷氨酰胺合成酶(GS)的腺苷酰化/脱腺苷酰化也是通过级联系统完成的,涉及多种酶的作用,其中谷氨酰胺合成酶腺苷酰基转移酶(AT)直接参与此活动,该酶由调节亚基(R)与催化亚基(C)组成,能催化 GS 的腺苷酰化与脱腺苷酰化,但究竟催化哪一种反应分别取决于 R 是否尿苷酰化。尿苷酰化由尿苷酰基转移酶(UT)及尿苷酰基移除酶(UR)调节控制;后两种酶的活性又分别取决于 Gln 与  $\alpha$ -酮戊二酸的调节作用。

## 第二节 通过聚合(结合)解离进行的调节

这是基于高级结构改变进行的调节,包括两种类型:聚合解离调节与结合解离调节。

### 一、聚合解离调节

这是寡聚酶的一种调节方式。

在已知酶中,单体酶很少,极大多数,特别是代谢途径中的一些关键酶都是寡聚酶。根据 Hais 对 100 种酶进行的分析,由单亚基组成的酶占 30%,而由多亚基组成的酶,即由不同亚基组成的酶占 70%,其中最多的是双亚基的酶(占 43%),其次是四亚基组成的酶(占 24%),三亚基的酶为数较少。

不管是由同种亚基、还是由不同种亚基组成的酶,随着酶的聚合解离,酶的活性也往往会发生改变。一般规律是,大多数寡聚酶,其聚合形式具有较高的活性;解离后,酶的活性部分降低,或者完全丧失。

例如,肾脏来源的丙酮酸激酶,它由相同的亚基组成,以二聚体和四聚体两种形式存在,通常两者保持动态平衡。但是,在底物或激活剂存在时,平衡倾向于形成四聚体,活力升高, $K_m$ 减小;抑制剂则倾向于稳定二聚体构象,降低活力,增大  $K_m$ 。

又如,谷氨酸脱氢酶,该酶由六个亚基组成,三个亚基构成一个三聚体,因此是一个双层分子。双层六聚体是酶的活性形式,又可分为两种类型:X型和Y型,其中,Y型能催化谷氨酸脱氢,X型能催化丙氨酸脱氢。ADP和Leu能促进Y型变构为X型;而GTP或GDP和NADH则能促进X型变构为Y型。X型可再聚合为纤维状多聚体(即三聚体层数增加),而Y型不能进一步聚合。和其他酶不同,其聚合形式无活性。谷氨酸脱氢酶的结构和相互转变如下(图 10.20):

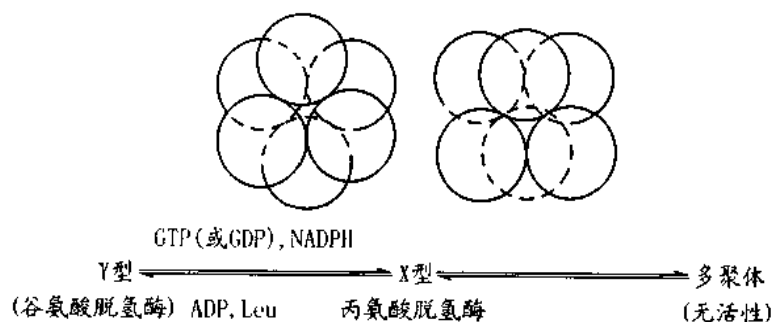
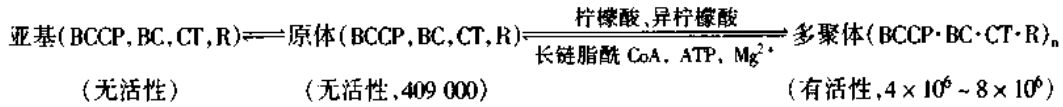


图 10.20 谷氨酸脱氢酶的亚基组成

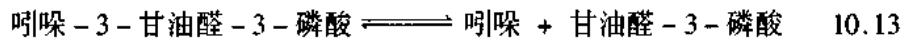
再例如,乙酰 CoA 羧化酶,它是脂肪合成途径中的第一个酶,也是限速酶。由四种亚基(更确切地说四种蛋白)组成:一个是生物素羧基载体蛋白(biotin carboxyl carrier protein, BCCP),一个是生物素羧化酶(biotin carboxylase, BC),一个是羧基转移酶(carboxyltransferase, CT),还有一个是调节蛋白(R)。这样组成的原体结构形式,相对分子质量约 409 000(相当于 18.5 S),活力很低,甚至无活力。但是,当柠檬酸或异柠檬酸等与调节蛋白结合后,原体可进一步聚合成细丝多聚体,长约 400 nm 的,相对分子质量  $4 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ (相当于 43 S),

也只有这种多聚体才表现高活性。长链脂酰 CoA 能拮抗柠檬酸对聚合的促进作用, ATP - Mg<sup>2+</sup> 能使多聚体解聚, 因此, 都能抑制酶的活性。



10.12

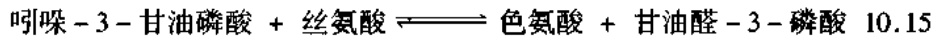
乙酰 CoA 羧化酶实际上是一种多酶复合物。这种多酶复合物包括可溶性、结构化及亚细胞上定位排列的三种类型(或者说三种水平)。通常讨论的属于第二种水平, 它的生理意义是能缩短中间代谢产物在酶间的运转距离, 减少扩散限制, 避免不必要的副反应。此外, 某些酶在多酶复合物形成的过程中, 还由于复合物中各组成酶(或广义说的亚基)的相互作用, 使得各种酶(亚基)都能固定于高活性的构象状态。仍以第二章中提到的色氨酸合成酶为例: 色氨酸合成酶由两种亚基  $\alpha$ 、 $\beta$  组成( $\alpha_2\beta_2$ ), 其中  $\alpha$  亚基能催化:



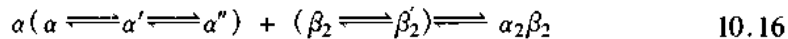
$\beta_2$  能催化:



而  $\alpha_2\beta_2$  能催化:



实验表明,  $\alpha_2\beta_2$  催化的效率远大于  $\alpha$  和  $\beta_2$  活力的和。而且, 实验也表明,  $\alpha$  和  $\beta_2$  结合后伴随着紫外差别光谱的产生; 温度突跃实验还表明, 游离的  $\beta_2$  至少能以两种构象状态存在,  $\alpha$  至少有三种构象, 但  $\alpha_2\beta_2$  只有一种构象。



辅酶、底物以及底物类似物结合实验表明,  $\alpha_2\beta_2$  的形成不仅使  $\alpha$  与  $\beta_2$  固定于具有最高催化效率的构象状态, 同时也限制了  $\beta_2$  可能催化的副反应。因此色氨酸合成酶的两亚基 ( $2\alpha$  和  $\beta_2$ ) 的结合也可以看作是通过聚合解离调节酶活性的一个特殊例子, 只是  $\alpha_2$  和  $\beta_2$  的结合特别紧密罢了 ( $K_s$  接近  $10^{10} \text{ mol/L}^2$ )。

将代谢相关的酶定位于亚细胞结构、特别是定位于膜上可认为是多酶系统的一种更高级形式, 它能保证代谢更有效地进行。值得指出的是, 酶和亚细胞结构(或膜)的结合也可看作是酶活性调节的一种方式。例如, 线粒体的 ATPase 和膜结合与否, 它的动力学参数就显著不同。这种调节更确切地说, 似可称为结合解离调节。

## 二、结合解离调节

很早就有人观察到, 植物的蔗糖酶可以处于溶解状态和与细胞颗粒体相结合的状态, 根据它们处的状态不同分别表现催化水解和合成的活性。以后又发现很多酶, 特别是某些在代谢中占有关键地位的酶, 如脑己糖激酶、醛缩酶、谷氨酸脱氢酶等, 它们能根据生理功能的需要、外界条件的变化而可逆地和细胞颗粒体结合或从其上解离下来, 并通过这种可逆的结合与解离, 调节其酶的活性。

以脑己糖激酶为例, 该酶是大脑酵解途径中主要的控制点之一(另一为磷酸果糖激酶)。有三种同工酶, 其中 I 型占 90% 以上。它的活性除了受产物 ADP 和葡萄糖 - 6 - 磷酸

(G-6-P)的反馈调节外,也受结合解离调节控制。

脑己糖激酶能和线粒体外膜结合,其间的结合主要通过酶分子的N-端与外膜的己糖激酶结合蛋白(Hexose Kinase Binding Protein, HBP)位点间的静电作用。但是它们的力量不是太大,而且有些可能是相互排斥的。脑己糖激酶的可逆结合、解离与G-6-P存在与否以及盐浓度大小有关。在G-6-P不存在时,低盐浓度由于能提供架桥阳离子,因而有利于加强己糖激酶与HBP的连系结合。但是盐浓度太高时,它又可能破坏静电作用力,导致酶从线粒体上解离下来。在G-6-P存在时,G-6-P能诱导酶的构象发生变化,这种构象改变不仅表现反馈抑制效应,也能导致结合的静电作用消失,因而即使在低盐浓度下,酶也易从线粒体上解离出来。

结合的和解离的己糖激酶由于构象上的不同,它们的动力学性态也有差异。例如,在以葡萄糖和ATP为底物时,对氯汞苯甲酸对解离后处于溶解状态的酶是竞争性抑制剂,而对结合于线粒体上的酶来说却是非竞争性的。又例如,己糖激酶在解离状态时,作用ATP的 $K_m$ 为0.035 mmol/L, G-6-P对它表现竞争性抑制作用,其 $K_i$ 为0.007 mmol/L;而在结合状态时,对ATP的 $K_m$ 为0.1 mmol/L, G-6-P对它虽然同样表现竞争性抑制作用,但 $K_i$ 为0.035 mmol/L。

脑己糖激酶的这些特点,决定了它在特定的条件下是处于结合状态还是解离状态,也决定了它在细胞内的分布及以何种动力学性态参与代谢过程。

除了脑己糖激酶外,磷酸果糖激酶、醛缩酶、乳酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶等也表现类似的特点。虽然它们结合的亚细胞部位可能不同,但这种结合与解离都受相应的小分子控制,结合与解离状态的酶反应动力学性质都不相同。而且这种结合与解离可在瞬间完成,因此这种调节也可能具有普遍的生物学意义。

### 第三节 别构调节<sup>(4-8)</sup>

酶的作用要通过它催化的反应,或者说要通过酶活性表现出来。对于恒态酶来说,酶的活性服从反应基本动力学规律,而在代谢途径中起关键作用的调节酶则主要受别构方式调节。

#### 一、别构调节的基本特征

别构调节(allosteric effect)源于反馈调节(feedback regulation)的研究,很早人们就发现:AMP能激活磷酸化酶b;Ile能抑制它生物合成途径中的第一个酶——Thr脱水酶;类似地,CTP能抑制嘧啶生物合成的第一个酶——门冬氨酸转氨甲酰酶,而嘌呤核苷酸(如ATP)却能活化它。这些抑制剂与活化剂都是相应的代谢途径的尾产物或与尾产物相关的物质,而作用的对象往往是这个代谢途径中的第一个酶或分支上代谢途径中的第一个酶。Monod等将这种反馈性的调节概括地称为别构调节。别构调节是生物机体适应外界条件变化,保持代谢系统处于平衡,保证生命活动正常进行的一种重要调节方式。

别构调节具有以下几个基本特征:

(1) 和上述调节有关的物质都是小分子,称为效应物(effector)。这些效应物在结构上和被调节的酶的底物或产物可能相同,也可能不同;对酶的作用不同于竞争性抑制、非竞争

性抑制和反竞争性抑制,因为它作用的部位不是酶的活性中心,而是活性中心以外的其他部位,即调节中心。但是,它们正是通过和调节中心结合,使酶活性中心的构象发生改变,从而导致酶活性的改变,因此这种调节称为别构调节。

(2) 受别构调节控制的酶一般都是寡聚酶,由多个亚基组成,各亚基之间通过次级键联结。在别构酶分子上有可和底物相结合的部位,即活性中心;也有可和效应物相结合的部位,即调节中心。这两种部位可能位于同一亚基上,也可能分别位于不同亚基上。每个别构酶分子上可以有一个以上的活性中心与调节中心,因此可能结合一个以上的底物分子与效应物分子。调节中心与活性中心虽然在空间上是分开的,但这两部位间能相互影响,产生协同效应。所谓协同效应是指一个分子与酶结合后对第二个分子结合产生的影响。这种影响可能有利于第二个分子的结合,称为正协同;也可能不利于进一步结合,称为负协同。上述协同如果发生于同一种分子,例如,底物之间,则称为同源效应;如果发生于异种分子,例如,效应物与底物之间,则称为异源效应。为了讨论方便起见,通常将这种参与与酶结合的小分子效应物与底物统称为配体(ligand,以L表示)。正负协同与同源、异源效应可以交互组合,例如,别构抑制就是负的异源协同;别构活化则是正的异源协同。

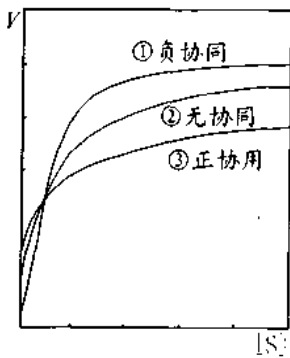


图 10.21 协同效应的动力学

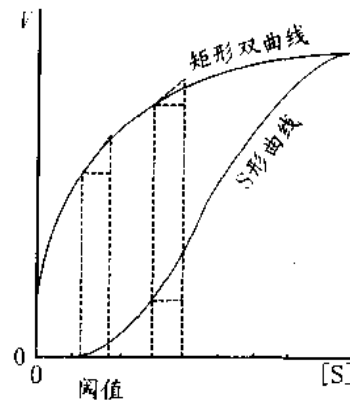


图 10.22 S形曲线的特征

(3) 别构酶的动力学性态和恒态酶不同,往往偏离米氏方程,酶反应速度与底物浓度间不是矩形双曲线(hyperbola),而是S形曲线(Sigmoid curve)或表观双曲线(图10.21)。和恒态酶相比,S形曲线的特点是存在两个阈值,当底物浓度低于下阈值时,酶反应速度随底物浓度较为缓慢地升高,但超过下阈值后,酶反应速度随底物浓度升高而迅速增大(图10.22)。表观双曲线则恰恰相反,在这种情况下,酶反应速度随底物浓度升高的增大愈来愈小。别构酶的这种动力学性态还会因其他效应物的存在而进一步改变,效应物如果仅引起 $K_m$ 改变,而不改变 $V$ ,则称为K型效应物;如果不改变 $K_m$ ,但使 $V$ 变化,则称为V型效应物;当然也有的既能影响 $V$ ,又能影响 $K_m$ 。在K型、V型或K-V混合型的效应物中有的起激活作用,称为激活型效应物(激活剂),有的起抑制作用,称为抑制型效应物(抑制剂),它们引起的动力学性态的变化如图10.23所示。

(4) 调节中心和活性中心的关系可通过物理或化学的方法如加热、冰冻、尿素或有机汞等处理而加以解除,这种处理称为脱敏(desensitization)。脱敏后的酶表现正常双曲动力学性态(图10.24)。



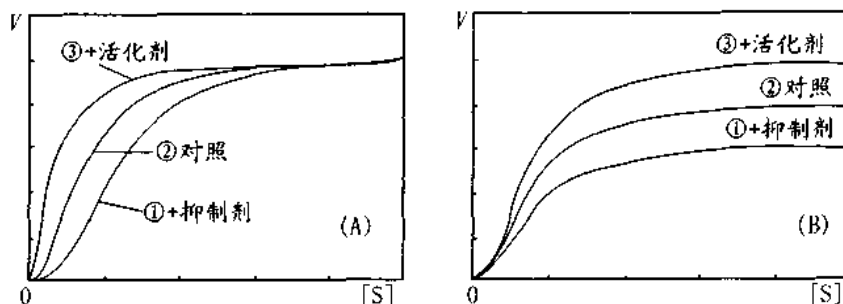


图 10.23 效应物对别构酶动力学性态的影响  
K 型效应物(A) V 型效应物(B)

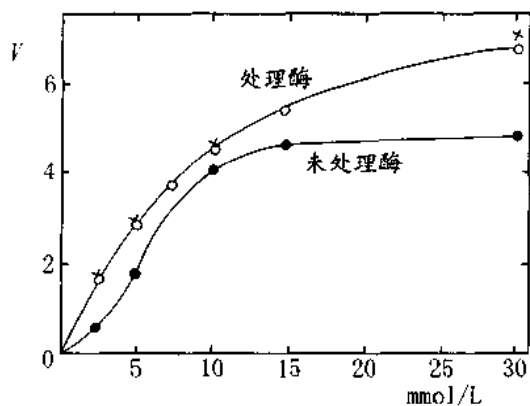
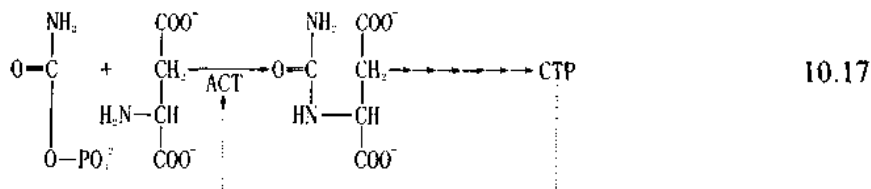


图 10.24 别构酶在脱敏前后的动力学性态变化

下面以 Asp 转氨甲酰基酶(aspartate carbonyl transferase, ACT)为例,讨论别构酶的有关特性。该酶催化 Asp 氨甲酰化:



这个反应是嘧啶核苷酸生物合成途径中的第一个反应。ACT 受该生物合成途径的尾产物 CTP 抑制,受 ATP 激活。它的动力学关系为 S 型双曲线,0.5 mmol/L CTP 可使 S 型曲线进一步下移,2 mmol/L ATP 则可使 S 型曲线上趋成矩形双曲线。CTP 和 ATP 都是 K 型效应物(图 10.25)。

嘧啶营养缺陷型大肠杆菌中 ACT 占总蛋白量的 8%,因此很易提纯。该酶的分子量约 300 000,用对羟汞苯甲酸处理后,再通过 DEAE - Sephadex 或通过蔗糖密度梯度离心可获得 5.8 S 与 2.8 S 两种蛋白质(图 10.26)。

这两种蛋白质之一具有催化活性,但不受 CTP 或 ATP 调节;另一却不具催化活性,但能和 CTP 紧密结合。将这两种蛋白质放在一起,并进行透析后,两者又能重组成可为 CTP 或 ATP 调节的具有催化活性的酶。说明此酶催化中心与调节中心分别位于不同亚基上。已知

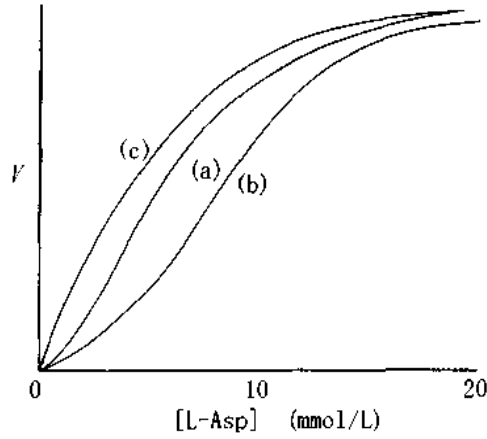


图 10.25 Asp 转氨酰酶的动力学性态曲线

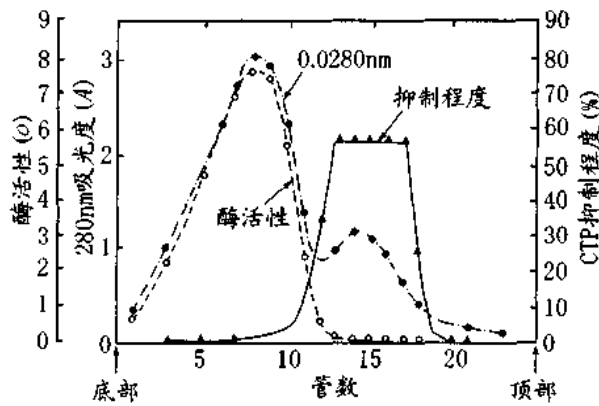


图 10.26 Asp 转氨酰酶的催化亚基与调节亚基

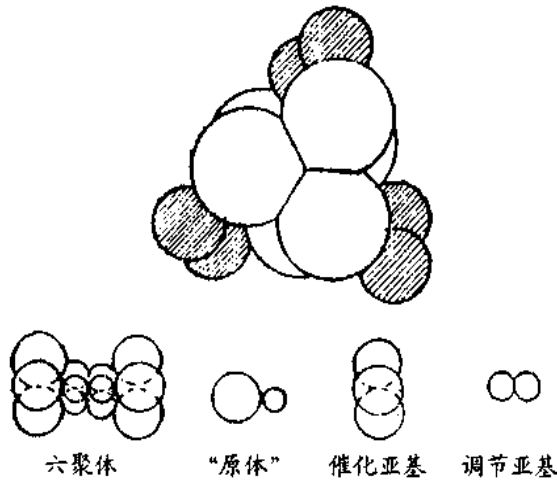


图 10.27 天冬氨酸转氨酰酶结构示意图

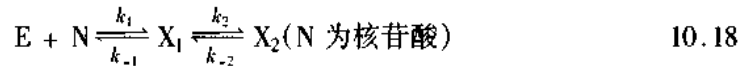
催化亚基由三个相对分子质量 33 000 的相同多肽链组成,每个酶分子包含两个催化亚基。催化亚基的转换率约为天然酶的两倍,这种催化亚基受调节亚基抑制的现象可能是别构酶的普遍特征。调节亚基相对分子质量约 34 000,由两条相同的多肽链组成,每个酶分子包括

三个调节亚基。电子显微镜观察及 X-衍射分析表明,每个 ACT 分子体积为  $11\text{nm} \times 11\text{nm} \times 9\text{nm}$ ,三个调节亚基被对称地夹在两个催化亚基之间,中心为  $2.5\text{nm} \times 5\text{nm} \times 5\text{nm}$  腔(图 10.27)。

催化亚基和调节亚基的序列已经测定。化学修饰表明:催化亚基中的巯基、Lys-80 的氨基、Tyr-160 以及其中一个 Arg 残基和酶活性有关;调节亚基中四个巯基和 Zn 结合有关,两个 Arg 残基和调节有关。取代实验还表明,Asp-125 和催化活性有关。

对催化亚基进行的研究表明,催化亚基间没有协同性;催化按有序方式进行,即先和氨甲酰磷酸结合。同位素交换实验表明,底物间是直接反应的,即按一次取代方式进行。N-磷乙酰-L-门冬氨酸(PALA)是过渡态类似物,相对门冬氨酸来说,它是一种非竞争性抑制剂,  $K_i = 10^{-8} \text{mol/L}$ 。

效应物和调节亚基的结合研究表明:每个调节亚基能结合 2 个 CTP 或 2 个 ATP,CTP 和 ATP 竞争相同的结合位点;这些结合位点至少包含一个 Phe 和一个 His。这两个结合位点虽然相同,但第一个效应物的结合能影响第二个位点的亲和力,即表现协同性。这种协同性的产生主要是由于效应物引起了酶构象改变(三级结构重排),如果将构象改变表达成下式:



CTP 的结合倾向导致构象  $X_2$  形成,而 ATP 的结合倾向导致构象  $X_1$  形成。

X-衍射分析表明,Zn 位于催化亚基和调节亚基界面,距最近的巯基  $2.4\text{nm}$ ,CTP 距最近的巯基  $4.3\text{nm}$ ,因此,可以估计催化亚基和调节亚基的结合位点相距甚远;但是,效应物的结合能通过构象的改变影响催化亚基,例如,ATP 或 CTP 的加入可引起紫外差别光谱的出现,旋光( $233 \text{nm}$ )降低,与对羟汞苯甲酸反应的速度降低,以及变性速度减缓;CTP 的结合可引起 Tyr-160 光吸收升高,而 ATP 将引起光吸收下降。脱敏后这些现象都会消失。

## 二、别构调节的几种模式学说

在解释别构调节的机制与规律方面有各种模式学说,其中为人们普遍接受的是:

### 1. Hill 模式方程(Hill model)

别构酶一般具有 S 型曲线的动力学性态,但人们很早就注意到血红蛋白和  $\text{O}_2$  的结合(血红蛋白结合氧的饱和度相对  $[\text{O}_2]$  作图)也表现 S 型曲线的性态,因此在建立别构调节的模式时往往选择它们作为模型。

Hill 模式方程就是在这种研究基础上建立的。

肌红蛋白也能和  $\text{O}_2$  结合,但较简单:



$$K = \frac{[P][A]}{[PA]} \quad [PA] = \frac{[P][A]}{K} \quad 10.20$$

$$Y (= \frac{[P][A]}{[P] + [PA]}) = \frac{[A]}{K + [A]} \quad 10.21$$

其中 P、A、K 及 Y 分别为蛋白质、配体、蛋白质与配体络合物的解离常数及结合了配体的蛋白质在总蛋白质中占有的百分数(饱和百分数)。在这种情况下,Y 对  $[A]$  作图可得双曲线(图 10.28)。

血红蛋白不同,它是由四个亚基组成的寡聚蛋白,其亚基间具有协同性。如果假定蛋白

质有  $n$  个与 A 的结合位点, 而且 A 的结合表现完全的协同性, 即当第一个 A 结合后, 就会使以后的  $(n - 1)$  个 A 几乎同时与蛋白质结合。也就是说, 该蛋白质或者以 P 的形式存在, 或以  $PA_{(n)}$  的形式存在, 没有  $PA_{(n-1)}$  等中间形式:



$$K = \frac{[P][A]^n}{[P(A)_n]}$$

$$Y = \frac{[P(A)_n]}{[P] + [P(A)_n]} = \frac{[A]^n}{K + [A]^n} \quad 10.23$$

式 10.23 为 Hill 方程, 其中  $n$  称为 Hill 系数,  $Y$  对  $[A]$  作图可得到 S 形曲线(图 10.29)。

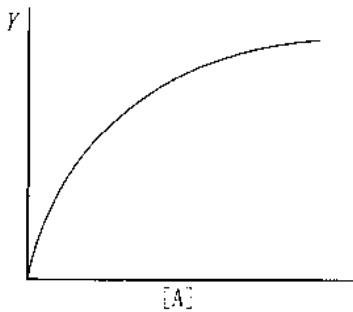


图 10.28 肌红蛋白与氧结合的  
 $Y$  对  $[A]$  作图

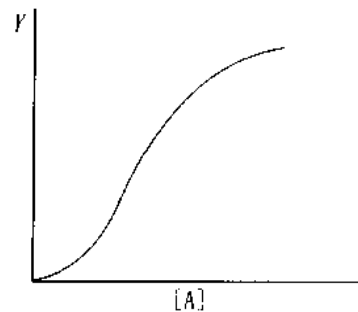


图 10.29 血红蛋白与氧结合的  
 $Y$  对  $[A]$  作图

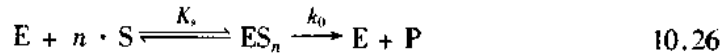
式 10.23 可重排为:

$$\frac{Y}{1 - Y} = \frac{[A]^n}{K} \quad 10.24$$

$$\log \frac{Y}{1 - Y} = n \cdot \log[A] - \log K \quad 10.25$$

$\log \frac{Y}{1 - Y}$  对  $\log[A]$  作图具有线性关系, 斜率为  $n$ 。

对于别构酶催化的反应来说, 由于:



$$Y = \frac{[ES_n]}{[E_0]} = \frac{v}{V} \quad ([E_0] \text{ 为总酶浓度}) \quad 10.27$$

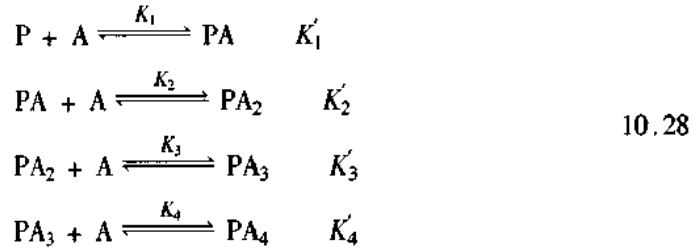
$\log \frac{v}{V - v}$  对  $\log[S]$  作图同样有线性关系, 斜率为  $n$ 。

$n$  是指蛋白质分子上和配体可能结合的位点数, 测出来的  $n$  往往小于实际的结合位点数, 而且不一定是整数。这是因为原来假定配体与蛋白质的结合是全协同的, 配体的结合仅导致  $PA_n$  或  $ES_n$  的形成, 不存在  $PA_{n-1}$  或  $ES_{n-1}$  等形式。但是实际情况是, 配体的结合不一定导致全协同, 而且可能导致  $P \rightarrow PA_{n-i} (i \neq 0)$  或  $E \rightarrow ES_{n-i} (i \neq 0)$  等一系列中间类型化合物的合成。正因为如此,  $n$  可用于判断配体结合后协同性的程度: 当  $n > 1$  时, 意味着正协同, 即  $v$  对  $[S]$  改变的灵敏度增加。第一个配体的结合有利于相继配体的进一步结合;

$n = 1$  时,意味着配体的结合不表现协同性;反之,  $n < 1$  时,意味着负协同,即第一个配体的结合不利于相继配体的进一步结合,  $v$  对  $[S]$  改变的灵敏度降低。

## 2. Adair(Adair model)模式方程

Adair 对血红蛋白和  $O_2$  的结合,按照配基逐步结合的机制,即按照存在着多种不同的中间解离形式的结合方式提出了另一个模式:



其中  $K_1, K_2 \dots$  为固有解离常数,  $K'_1, K'_2 \dots$  为表观解离常数。表观解离常数是可测得的常数,它除了包括固有解离常数这一因素外,也包括相应环节中可利用的结合位点(数)与可能的解离位点(数)的影响,因为在逐步结合机制中,这两种位点(数)在各环节中是不同的。例如,第一步中配体可利用的结合位点数是 4,配体从蛋白质(酶)上可能解离下来的位点数是 1;第二步则分别为 3 与 2;第三步为 2 与 3;第四步为 1 与 4,故有:

$$\begin{aligned} K'_1 &= \frac{1}{4} K_1, K'_2 = \frac{2}{3} K_2, K'_3 = \frac{3}{2} K_3, K'_4 = 4K_4 & 10.29 \\ y &= \frac{\frac{[A]}{K'_1} + \frac{2[A]^2}{K'_1 K'_2} + \frac{3[A]^3}{K'_1 K'_2 K'_3} + \frac{4[A]^4}{K'_1 K'_2 K'_3 K'_4}}{4\left(1 + \frac{[A]}{K'_1} + \frac{[A]^2}{K'_1 K'_2} + \frac{[A]^3}{K'_1 K'_2 K'_3} + \frac{[A]^4}{K'_1 K'_2 K'_3 K'_4}\right)} \\ Y &= \frac{K'_2 K'_3 K'_4 [A] + 2K'_3 K'_4 [A]^2 + 3K'_4 [A]^3 + 4[A]^4}{4(K'_1 K'_2 K'_3 K'_4 + K'_2 K'_3 K'_4 [A] + K'_3 K'_4 [A]^2 + K'_4 [A]^3 + [A]^4)} \end{aligned} \quad 10.30$$

式 10.30 即 Adair 方程。

当结合位点间没有相互作用时,即  $K_1 = K_2 = K_3 = K_4$ , 或

$K'_1 = 3/8 K'_2, K'_2 = 9/4 K'_3, K'_3 = 8/3 K'_4$  时,

Adair 方程可简化为:

$$y = \frac{K}{1 + K[A]} \quad (K = K_1 = K_2 = K_3 = K_4) \quad 10.31$$

当结合位点间表现正协同时,  $K_1 > K_2 > K_3 > K_4$ , 亦即

$$K'_2 < 8/3 K'_1, K'_3 < 9/4 K'_2, K'_4 < 8/3 K'_3。$$

这样,解离常数(严格地说是固有解离常数)可用来判断配体结合的协同性。

## 3. MWC 模式——齐变或对称模式(The Concerted Model of MWC)

1965 年 Monod, Wyman 和 Changeux 提出了一个简单的模式用以解释别构调节性态,要点如下:

(1) 别构酶是由确定数目的亚基组成的寡聚酶,各亚基都占有相等的地位,因此每种别

构酶都有一个对称轴(酵母二聚体己糖激酶例外)。

(2) 每种亚基都可能以松弛型(R)或绷紧型(T)两种构象状态存在。这两种构象状态可以互变,取决于外界条件,也取决于亚基间的相互作用。按此模式,构象的转变采取同步协同方式,或者说采取齐变方式,即各亚基在同一时间内均取相同的构象状态。如果一个亚基从 T 态转变为 R 态,那么其他亚基也几乎同时转变为 R 态,不存在 TR 的“杂合态”。

别构酶的构象状态转变时,分子的对称性不变(图 10.30)。

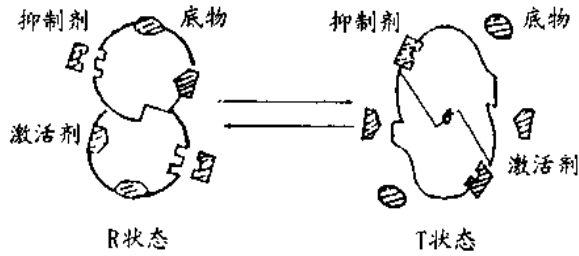
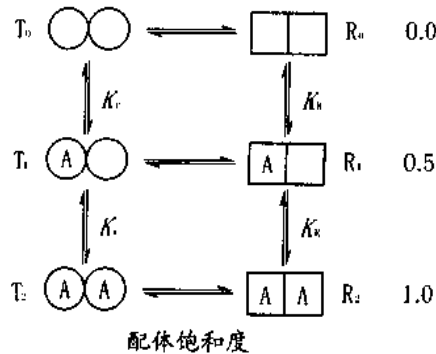


图 10.30 MWC 模式: T 态与 R 态的对称性齐变

(3) 每一个亚基配体只有一个结合位点。别构酶在不同构象状态对特定的配体有不同的亲和力,但相同构象的各亚基对特定配体的亲和力相同,即:  $K_R$  为一定值,  $K_T$  也是一定值。和前述模式不同,这种模式认为,别构酶的协同性不是由于  $K$  值改变,而是通过  $R \rightleftharpoons T$  互变。当配体不存在时,  $R \rightleftharpoons T$  处于平衡,但主要可能取 T 态;配体倾向于和 R 态结合,当大量配体存在时,则转变为 R 态。



(4) 对于同源协同效应来说,如果以  $y$  表示蛋白分子上配体结合位点配体结合的饱和百分数,  $\bar{R}$  表示 R 态构象在总的别构酶中占的比例数(两者都变动于  $0 \rightarrow 1$ ),  $n$  表示配体结合位点数,  $L$  表示 T 态与 R 态蛋白浓度比(  $L = [T_0]/[R_0]$ ),  $C$  表示配体与 R 态结合和与 T 态结合的解离常数比(  $C = K_R/K_T$ ),  $\alpha$  表示游离配基的相对浓度(  $\alpha = [A]/K_R$ ), 则有:

$$y = \frac{LC\alpha(1 + C\alpha)^{n-1} + \alpha(1 + \alpha)^{n-1}}{L(1 + C\alpha)^n + (1 + \alpha)^n} \quad 10.32$$

$$\bar{R} = \frac{(1 + \alpha)^n}{L(1 + C\alpha)^n + (1 + \alpha)^n} \quad 10.33$$

由式 10.32 与式 10.33 可见:

a. 极端情况下:  $L \rightarrow 0$ ,  $n \rightarrow 1$  时,  $y = \alpha/(1 + \alpha)$ , 酶都取 R 型, 不表现协同性; 而

$L \rightarrow \infty, n \rightarrow 0$  时,  $y \approx Ca/(1 + Ca)$ , 即:  $y = [A]/([A] + K_T)$ , 酶取 T 态, 同样不表现协同性; 当  $n = 1$  时,  $y = \alpha / \{\alpha + [(1 + L)/(1 + LC)]\}$ ; 也不表现协同性;  $C = 1$  时, 即  $K_R = K_T$ , 同样, 也无协同性可言;

b. 当  $L$  不趋 0, 也不趋于  $\infty$ ;  $C$  不等于 1 时;  $L$  和  $C$  对协同性的影响如图 10.31 所示,  $L$  愈大, 别构酶主要取 T 态, 第一个配体结合引起的正协同效应愈明显; 反之,  $C$  愈趋于 0 时, 正协同性也显著。

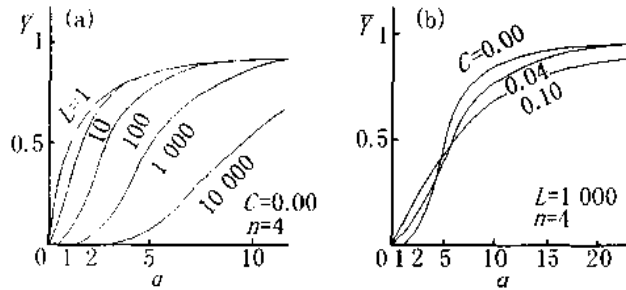


图 10.31  $L, C$  与协同效应的关系

对于异源协同效应来说, 如果底物易于与 R 态结合 ( $K_R < K_T$ ), 别构激活剂(A)也易于和 R 态结合, 那么, A 将使  $R \rightleftharpoons T$  的平衡倾向于 R 态增加, 即降低  $L$  值, 为底物提供更多高亲和力的 R 态, 使  $y$  增高, 表现激活效应, 同时对底物的协同效应减少, 使曲线趋 S 型倾向减弱; 当 A 使  $L$  值降低至 0 时, 则变成双曲线。反之, 别构抑制剂 I 倾向于与 T 态结合, 使  $R \rightleftharpoons T$  的平衡倾向于 T 态增加, 使与底物高亲和力的 R 型减少,  $y$  降低, 表现抑制效应, 同时对底物的协同效应加强, 使曲线 S 型倾向愈加明显。

(5) 别构酶可以分为两类, K 型和 V 型。对于 K 型来说, 底物对 R 态有更大的亲和力 ( $K_R < K_T$ ), 在这种情况下, 激活剂或抑制剂都可通过改变  $R \rightleftharpoons T$  的平衡, 使 R 态增加或减少。对于 V 型来说, R 态和 T 态对底物有相同的亲和力 ( $K_R = K_T$ ), 但  $k_o$  不同; 效应物的作用是通过改变  $R \rightleftharpoons T$  平衡, 影响反应的  $k_o$ 。K 型的例子如 ACT 与 ATP 及 CTP; V 型的例子如 AMP 与 磷酸化酶 b。

MWC 模式简单明了, 能解释许多协同机制。缺点是不能说明同源负协同效应, 因为这种模式有一个重要假定:  $K_R$  与  $K_T$  在酶与底物结合的各步中保持不变, 同源协同是由于底物与一种构象状态结合后引起了  $T \rightleftharpoons R$  的平衡移向一方, 因此这种同源协同只可能是正协同, 而不可能是负协同。

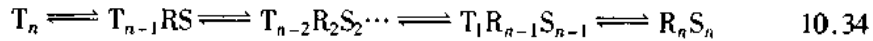
#### 4. KNF 模式——序变模式(The sequential model of KNF)

这是 1966 年 Koshland、Nemtethy 和 Filmer 提出来的模式, 它是 Adair 模式与诱导契合学说在别构酶研究上的一种发展, 其要点如下:

(1) 当配体不存在时, 别构酶只有一种构象状态 T 存在, 而不是处于  $R \rightleftharpoons T$  的平衡状态; 配体与酶结合后诱导 T 态向 R 态转变。

(2) 别构酶的构象以序变方式进行, 而不是齐变。即在配体和一个亚基结合后, 可引起该亚基的构象发生变化, 并使邻近亚基易于发生同样的构象改变, 影响对下一分子配体的亲和力; 当第二个配体结合后, 又可导致第三个亚基发生类似的变化, 如此顺序传递, 直至最后

所有亚基都处于同样的构象。这种序变机制的特点是可形成各种“TR”杂合态。



(3) 亚基间的相互作用可能表现为正协同效应,也可能是负协同效应,前者导致下一亚基对配体有更大的亲和力,  $K_1 > K_2 > K_3 \cdots$ ; 后者则降低亲和力,  $K_1 < K_2 < K_3 \cdots$ 。负协同的例子如  $NAD^+$  和兔肌磷酸甘油醛脱氢酶(四聚体)的结合,它相继的四个解离常数为:  $K_1 = 10^{-11} \text{ mol/L}$ ;  $K_2 = 10^{-9} \text{ mol/L}$ ;  $K_3 = 10^{-6} \text{ mol/L}$ ;  $K_4 = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。

KNF 模式根据各个平衡的特征常数也建立了一个类似于 Adair 模式的方程,但甚为复杂。例如,按照这种模式,各个解离常数间的相互关系都包含三个组成部分:

- a. 亚基与配体间的解离常数;
- b. 亚基构象转变的平衡常数,这种常数和两种构象间自由能差有关;
- c. 亚基相互作用常数,包括各亚基间的相互作用,也包括各亚基间的几何排列,例如,四聚体就可能有方形、线性以及四面体等多种排列,因此,它们的相互作用常数就各不相同。

(4) 激活或抑制效应物引起的构象变化和对酶反应性态的影响也是序变的。

### 5. Eigen 模式(Eigen model)

Eigen 模式综合了上述各种模式的特点(图 10.32),要点如下:

- (1) 不管配体是否结合,亚基都可能发生构象改变。
- (2) 可能有各种不同构象的亚基杂合体。
- (3) 各种构象状态都能和底物顺序地结合。
- (4) 和 Eigen 模式相比, MWC 模式(短线框所示)和 KNF 模式(点线斜框所示)可看作是普遍情况中的两种特殊情况。

以上是普遍接受的几种模式,它们从不同角度对别构酶的协同性和别构调节机制作了解释,并为进一步探讨别构酶的生理意义提供了讨论的基础和借鉴。不过,这些模式都有一定的局限性,别构酶的真正机制可能更为复杂。

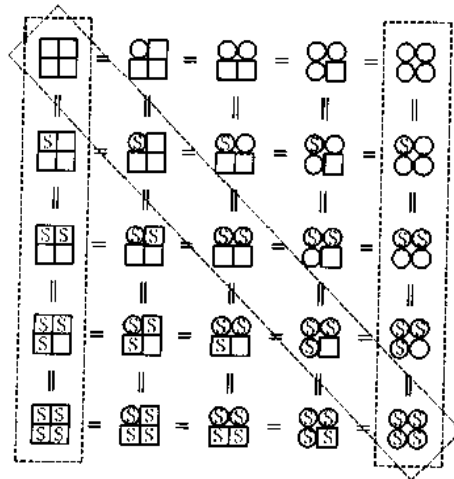


图 10.32 Eigen 模式和 MWC 模式及 KNF 模式比较



### 三、别构酶的实验研究

在着手别构酶研究时,一般要进行以下几方面工作:

#### 1. 酶反应动力学性态是否表现协同性

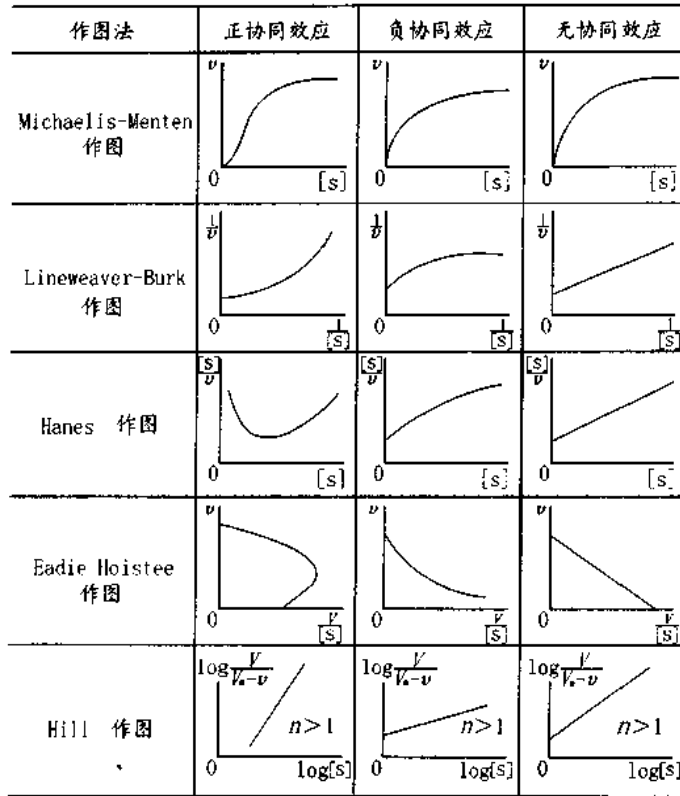


图 10.33 鉴别协同效应的各种动力学作图法

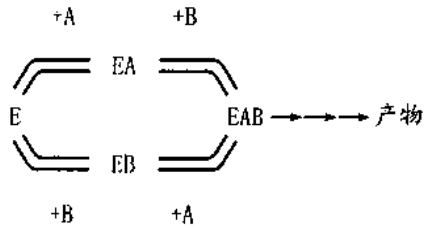
为了了解酶反应动力学性态是否表现协同性,通常要在广泛的底物浓度范围内测定酶的活性,然后再根据各种作图法(图 10.33)作出判断。

值得指出的是:

第一,当酶反应表现负协同效应时,用  $v \sim [S]$  作图,得到的曲线往往不易和恒态酶动力学曲线区别开来;

第二,可能出现负协同假象,假如,在系统中存在着催化相同反应、但  $K_m$  不同的同工酶时,用  $1/v \sim [S]$  作图,同样可得向下弯的曲线;

第三,许多酶似乎具有 S 型曲线的正协同效应,但是 S 形曲线并不意味着一定表示正协同性。例如,大肠杆菌苏氨酸脱氨酶在介质中很易失活,但高浓度底物对它有保护作用,这种情况下,  $v$  对  $[S]$  作图往往也可得到 S 形曲线;许多激酶要求活化剂,作用的真正底物是底物与活化剂的络合物如  $ATP - Mg^{2+}$ , 因此如果反应系统始终保持恒定的底物与活化剂比例时,用  $v$  对  $[S]$  作图得到的往往也是 S 形曲线。再例如,随机连续机制中的双底物反应:



10.35

如果 E 和 B 结合的亲和力小于 EA 和 B, 那么, 在 [E] 与 [B] 恒定的系统里, 当 [A] 较低时, E 将主要和 B 反应, 系统通过较慢的途径  $E \rightleftharpoons EB \rightleftharpoons EAB \rightarrow$  产物进行; 而在 [A] 较高时, 系统将转向较快的途径  $E \rightleftharpoons EA \rightleftharpoons EAB \rightarrow$  产物。这种情况下,  $v \sim [A]$  作图得到的也是 S 形曲线, 虽然, 它也是 [A] 对  $v$  的一种调节, 但毕竟不是别构意义上的协同调节, 从某些微生物来源的磷酸-2-酮-3-脱氧庚糖酸醛缩酶催化的反应中就可观察到这种现象。此外“记忆酶”催化的反应也往往有 S 形曲线的性态(见后)。

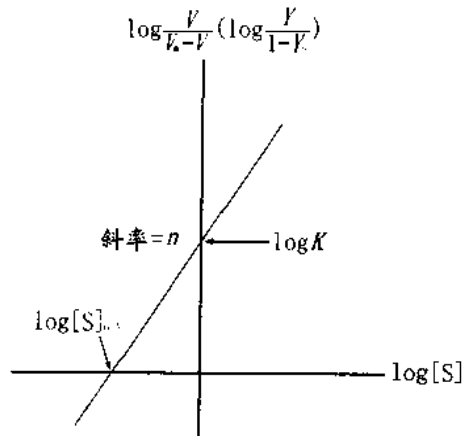


图 10.34 Hill 作图

在别构酶的研究中, Hill 作图是一种常用的方法, 通过它可求取别构酶反应的  $[S]_{0.5}$  时的  $K_m$ , 即别构反应的表观  $K_m$  (图 10.34)。通过它也可鉴定协同作用的类型与协同作用的大小。

协同作用的类型可以通过上述各种图形特征直接判断; 而协同作用的大小常借助 Hill 系数  $n$  (又称协同系数) 和饱和比值  $R_S$  (称为协同指数, 也称灵敏度指数) 进行判断。  $n$  可通过 Hill 作图法求得。一般地说,  $n > 1$  时,  $n$  愈大, 正协同效应也愈大;  $n < 1$  时,  $n$  愈小, 负协同效应愈小。至于  $R_S$ , 可定义为:

$$R_S = \frac{\text{酶分子中结合位点被 90\% 饱和时的底物浓度}}{\text{酶分子中结合位点被 10\% 饱和时的底物浓度}} \quad 10.36$$

- $n = 1$  时,  $R_S = 81$ , 不表现协同效应;
- $n > 1$  时,  $R_S < 81$ ,  $R_S$  愈小, 正协同效应愈显著;
- $n < 1$  时,  $R_S > 81$ ,  $R_S$  愈大, 负协同效应愈显著。

## 2. 配体结合是否表现协同性

为了了解配体结合是否表现协同性可通过平衡透析法或超离心法进行直接结合测定,

然后通过 Hill 作图法(图 10.34)或 Scatchard 作图法(图 10.35)作出判断。Scatchard 方程是由 Adair 方程衍生而来:

$$\frac{r}{[A]} = \frac{n}{K} - \frac{r}{K} \quad 10.37$$

$r$  为每个蛋白分子上结合的配体分子  $[A]$  的平均数,  $[A]$  是游离配体  $A$  的浓度; 当结合位点是等价的, 而且独立不相关时,  $r/[A]$  对  $r$  的作图为线性, 斜率为  $-1/K$ ,  $x$  轴截距为  $n$ ; 当结合位点间表现协同性时, 则为曲线(图 10.35)。其中: ① 表示结合位点间无协同效应; ② 表示结合位点间存在着正协同性; ③ 表示结合位点间存在着负协同性。

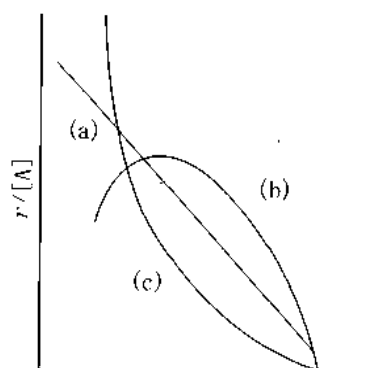


图 10.35 Scatchard 作图

### 3. 是否在活性中心外存在着调节分子的结合位点

为了了解酶分子是否存在着活性中心外的调节位点, 可采用脱敏处理的办法, 然后观察是否能够将调节亚基和催化亚基分离开来。最典型的例子如前述的门冬氨酸转氨甲酰基酶(ATC)。

对于别构酶来说, 效应物的结合部位和活性中心催化部位的分布可能有图 10.36 所示的三种方式。对具体的酶来说, 究竟取何种方式, 脱敏处理能提供某些信息。以苏氨酸脱氨酶为例, 此酶被 Ile 抑制, Ile 相对 Thr 来说, 表现的是竞争性抑制, 因此上述两个部位有可能按方式 (1) 排布。但是, 将此酶如用  $55^{\circ}\text{C}$  处理, 结果发现, 该酶对 Ile 的敏感性随时间推移逐渐下降, 10min 后甚至完全消失, 而酶活性不变(图 10.37), 这一实验显然排除了按方式 (1) 排布的可能。至于究竟按方式 (2) 或方式 (3) 排布, 从动力学上很难区别, 但是 X-衍射分析等可能回答这一问题, 因方式 (2) 不一定伴随构象改变, 而方式 (3) 必然要通过构象改变才能实现相互作用。

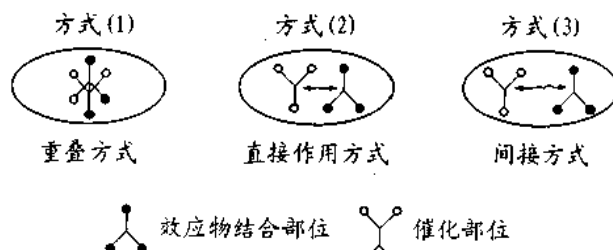


图 10.36 效应物结合部位与催化部位的分布

有些酶受两种以上的效应物的调控,那么它们在空间的排布上是相互分离的,还是相互重叠的?这一问题通过脱敏处理可部分解决。如前述的 ATC, 在脱敏后对 ATP 和 CTP 的敏感性同时消失,而且这两种效应物之间表现竞争性,这说明两者是相互重叠的。此外,也可通过突变后观察酶对不同效应物的反应,例如,大肠杆菌磷酸烯醇丙酮酸羧化酶,它受 4 种效应物影响,突变后可得到对其中一种效应物不敏感的“变异酶”,说明该酶的 4 种效应物结合位点是相互分离的,因而可独立地发生脱敏。

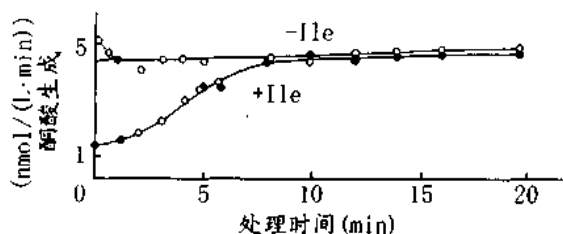


图 10.37 苏氨酸脱氨酶脱敏前后的活力变化

#### 4. 配体结合后是否引起酶的构象改变

可通过下列方法进行测定:

- (1) 比较分子形状的变化,包括应用电子显微镜观察及超离心分析等。
- (2) 测定二级结构的变化,如采用旋光色散等方法。
- (3) 跟踪三级结构的变化,如用差别光谱方法。

(4) 较直接的是 X-衍射分析法。通过这种方法测定的别构酶有:磷酸化酶 a、乳酸脱氢酶和甘油醛磷酸脱氢酶等。但研究得最清楚的是血红蛋白,当  $O_2$  和脱氧血红蛋白的一个亚基上的血红素结合后,就导致铁向血红素平面发生小的移动(约 0.07 nm),这种小的移动又可进一步引发一系列构象改变。

#### 5. 构象改变模式

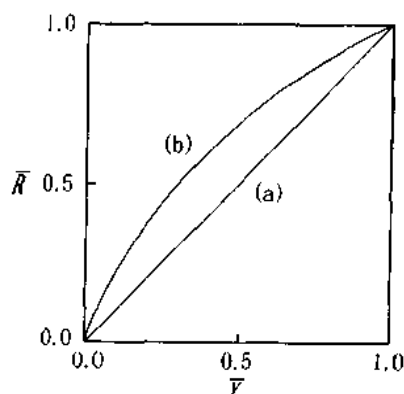


图 10.38  $\bar{R}$  对  $\bar{y}$  作图

为了判断别构酶构象改变究竟采取何种模式,可根据  $\bar{R}$  对  $\bar{y}$  作图而加以区别(图 10.38):如果按照 KNF 序变模式,一个亚基的构象仅在配基结合到该亚基时才发生改变,因此可以预期  $\bar{R} \sim \bar{y}$  的图形是线性的;如果按 MWC 齐变模式时,由于  $R \rightleftharpoons T$  的转换具

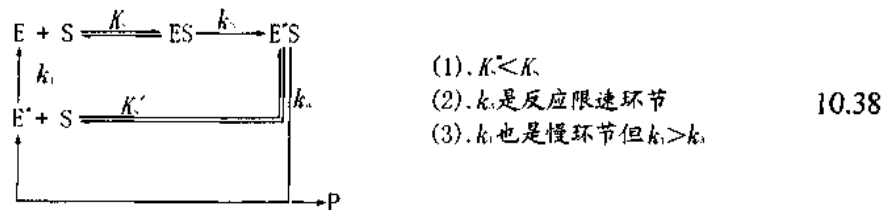
有齐变性,故而  $\bar{R} \sim y$  的图形为非线性。如 Asp 转氨甲酰酶、Asp 激酶、高丝氨酸脱氢酶等都观察到后一情况,说明它们可能是采取齐变模式。

#### 四、滞后效应与记忆酶

别构酶和配体结合后伴随着构象的改变,这种构象的改变通常进行得很快,据估计一般为  $10^{-4} \sim 10^{-2}$  s,即和催化的速度大致相当。但是现在也知道有一些酶的构象改变十分缓慢,表现出来是它们对底物或效应物的反应比较迟钝。例如,D-葡萄糖-6-磷酸对腹水瘤细胞来源的己糖激酶同工酶 II 的抑制作用的“半时间”(half time)可能超过 10 s;再如,大肠杆菌苏氨酸脱氨酶对 Ile 抑制的响应需要数分钟;酵母磷酸甘油醛脱氢酶在加入  $NAD^+$  后,需要数分钟后才会有明显的催化效应出现。酶对配体应答的这种延缓现象通称为滞后效应。滞后效应的生理意义还不清楚。就产生滞后效应的原因而言,可能是由于别构酶从非活性的构象状态 T 转变为活性的构象状态 R 需要一定的时间。

表现滞后效应的酶不限于别构酶,也出现于通过聚合与解离进行调节的酶;除此而外,还可见于一类所谓的“记忆酶”(memoric enzyme)。

如果说,别构酶有下述特点:① 都是寡聚酶;② 在活性中心以外,还存在着调节部位;③ 配体与酶结合后,导致酶的构象改变,从而表现出协同效应。那么,记忆酶和别构酶不同:① 它们大多是单体酶;② 不存在着另外的调节部位;③ 因而也没有协同效应。但是记忆酶也有某些地方和别构酶相似,例如:它们也因构象的变化而有不同的活性;它们也有 S 曲线的动力学性态;而且,也有类似的“别构效应物”调节其活性。记忆酶的特点可用式 10.38 描写:



(1) 记忆酶通常可以两种以上的构象存在,其中 E 是热力学上的稳定构象,可由构象  $E^*$  缓慢地转化而来;

(2) E、 $E^*$  都能和底物结合,但  $E^*$  有更大的亲和力,即  $K'_S < K_S$ ,且形成的是  $E^*_S$ ;

(3) 只有  $E^*_S$  才能转化为产物,而  $ES \rightarrow E^*_S$  进行得极为缓慢,是整个反应的限速环节,  $k_1 > k_3$ ;

(4)  $E^*_S$  转化并释放出产物后,在一定时间内,酶将停留或者说“记忆”于易和底物结合的  $E^*$  构象状态,因此称为“记忆酶”。

记忆酶一般有 S 形曲线,这是因为在低的底物浓度条件下,  $ES \rightarrow E^*_S$  远慢于  $E^* \rightarrow E$ ,因此,游离的  $E^*$  很少;也因此,  $E^* + S \rightarrow E^*_S \rightarrow E^* + P$  途径起的作用甚小,反应主要通过  $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E^*_S \rightarrow E^* + P$  进行。但在高的底物浓度条件下,总的反应速度升高,  $E^*$  形成将快于转变为 E 的速度,因而较多的  $E^*_S$  较快地形成,反应速度大幅度地增加,结果导致 S 形的动力学性态。

由于  $ES \rightarrow E^*S$  是限速环节,“别构”效应物可通过加速或延缓这一环节来调节酶活性; $E^*$  转变为  $E$  是缓慢的环节,“别构效应物”也可能通过控制这一步而影响酶活性。

由于  $E$  是热力学上的稳定构象状态,在反应开始时,酶大多取  $E$  的形式,只有经过一个延缓阶段,随着反应进行, $E^*$  增多后反应才会加速,因此记忆酶反应通常都表现滞后效应。

记忆酶催化的反应可以是单底物反应,也可以是双底物反应。已知的记忆酶如肝葡萄糖激酶,麦胚中的己糖激酶等。记忆酶的生理意义尚不清楚。

### 五、别构调节的生理意义

别构调节包括同源和异源两种类型、正协同和负协同两种性质的调节。

同源协同是对底物浓度改变作出的调节效应。在同源正协同的情况下,酶具有 S 型曲线的动力学性态。如前所述,这种曲线的特点是有两个阈值,在下阈值的范围内,对于较小的底物浓度变化,酶反应速度可作出灵敏的应答,这一点可根据 Hill 方程算出(表 10.1)。当酶不表现协同效应时,反应速度从 10% 的  $V$  升到 90% 的  $V$  需要使底物浓度增大 81 倍;而在表现正协同时,例如,在  $n = 4$  的别构酶反应系统中反应速度升高到同样的水平,则只需要增大 3 倍。这种应答灵敏度的改变显然具有重要的生理意义,特别是在代谢途径中占有关键地位的酶更是如此,因为在生理条件下,底物浓度的变化一般不可能很大。另一方面,在阈值以外,在过高或过低的底物浓度条件下,酶活性都不会发生很大的明显变化,这样就能保证机体始终处于一个相对恒定的状态。

表 10.1  $n$  值与  $R_s$  的关系

$n$ 值	$R_s$ (倍)	$N$ 值	$R_s$ (倍)
1	81	4	3
2	9	0.45	6 561
3	43		

与同源正协同相反,同源负协同具有表观的双曲线动力学性态,它的特点是酶反应速度对底物浓度变化相对地不敏感。这一特点对于机体内那些和多条代谢途径有联系的酶反应来说,保证其能恒定正常地工作是十分重要的,因为它不会受其他反应的升降而产生明显的变化。如磷酸甘油醛脱氢酶是糖代谢中一种重要酶,它需要载体底物  $NAD^+$ ,而  $NAD^+$  和许多脱氢酶反应相关, $[NAD^+]$  常可能发生大的波动,但磷酸甘油醛脱氢酶相对  $NAD^+$  来说有极低的  $k_1$  与  $k_2$ ,还有较高的  $k_3$  与  $k_4$ (见前),因此无论  $[NAD^+]$  如何变动,它始终可以不受太大的干扰而保持较为恒定的水平。

如果说,同源协同,特别是同源正协同是酶适应底物浓度变化进行代谢调节的一种重要方式,那么别构效应物的作用则是在这一基础上使上述调节变得更为灵敏,使代谢活动进行得更为经济有效,更为协调。这一点联系到别构酶往往在代谢途径中占有第一位置或分支的第一位置,而作为异源负协同效应物往往是该代谢途径的尾产物,作为异源正协同的效应物往往是与该代谢途径尾产物相关的物质,它的生理意义就十分清楚了,因尾产物表现的反馈抑制(如 CTP 对 ATC)可以使不必要的反应停止,避免无用中间物的积累;而别构激活(如 ATP 对 ATC)可使相关的代谢达到平衡和协调。

如上所述,讨论别构调节的生理意义时,必须和代谢体系、生理系统一起来考虑。由于代谢调节的多样性,在不同的代谢体系中,别构酶也可能有些不同。例如,有的代谢途径有

多个别构调节环节;有的别构酶则可受不同的效应物调控;也有的别构酶具有多种同工酶,分别受不同的效应物调控。而为了生理活动的需要,瞬时地将某种信号放大,进行代谢和生理调节。别构调节还可能和可逆的共价调节、聚合解离调节结合在一起组成各种级联系统。这些我们在前面已部分涉及到,并将在酶生学中进一步讨论。

## 参 考 文 献

### 一、酶的作用调节体系

(1) Mildvan AS. *Proteins*, 1997, **29**(4):401

### 二、通过共价结构改变进行的调节

(2) Sim RB. *Methods Enzymol.*, 1993, **223**:13

(3) Jakubke HD, Eichhom U, Hansler M et al. *J. Biol Chem.*, 1996, **377**(7—8):455

### 三、别构调节

(4) Taylor SS, Buechler JA & Yonemoto W. *Ann. Rev. Biochem.*, 1990, **59**:971

(5) Nelsestuen GL, Bazzi MD. *J. Bioeng. Biomembr.*, 1991, **23**(1):48

(6) Pilkis SJ, Granner DK. *Ann. Rev. Physiol.*, 1992, **54**:885

(7) Douglas KT. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1992, **3**(4):370

(8) Kang RG. *Biol. Res.*, 1996, **29**(1):47

# 第五部分 酶的生物学

## 第十一章 酶的生物学

“酶的生物学”是现代酶学、分子生物学研究领域中的一个十分重要的课题,其目的就是要从各个方面、各个角度,从分子水平阐明酶和生命活动的关系。

作为酶生物学的研究对象,就应保持酶的天然状态,并作为生物体、细胞中的一个组成部分,联系细胞结构,联系细胞中的其他组成成分、其他酶和酶系,联系生物所处的条件与状态,联系生命现象和过程,联系生物的遗传变异和生物的进化发展,观察酶的含量和活性变化,并考虑各种环境因素的影响和酶的调节机制,这样,才能对酶和生命活动的关系有一正确的认识。

### 第一节 酶和细胞结构<sup>(1-3)</sup>

细胞的结构(intracellular structure)是非均一的,酶的分布和它所处的环境与状态也是非均一的,它们或处于“溶解”状态,或者定位于细胞质中,或者结合于某特定的亚细胞结构上。

#### 一、细胞结构

细胞的大小、形状、亚细胞结构及组成分布一般说来很不同。原核细胞较小,为  $0.5 \sim 500 \mu\text{m}^3$ ,亚细胞结构分化程度低;真核细胞较大, $200 \sim 15\,000 \mu\text{m}^3$ ,亚细胞结构分化清晰。真核细胞的外层一般都有一层半透性的细胞膜,在植物和细菌的细胞中,除膜外,通常还有一层起机械保护作用的细胞壁。至于细胞内的组成习惯上分为两部分:核和细胞质。细胞质是非均一的,其中包含着多种亚细胞结构,或者说细胞器(subcellular organelle):线粒体、溶酶体、内质网、高尔基体、过氧酶体等(图 11.1)。

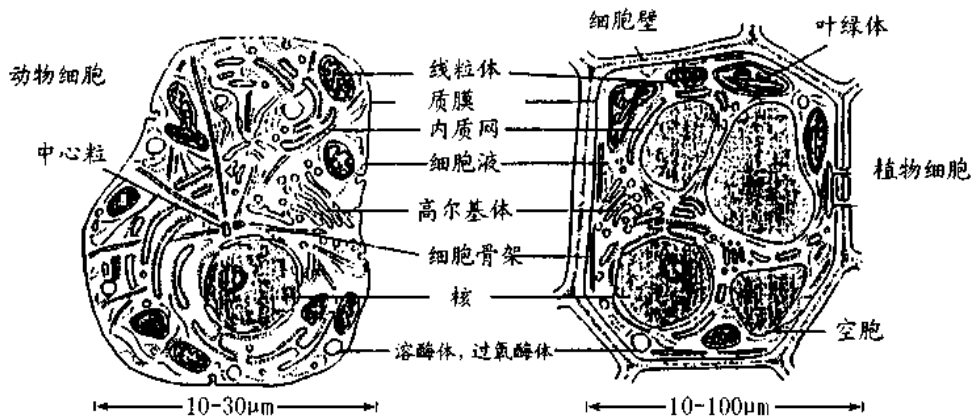


图 11.1 细胞结构示意图



## 1. 生物膜(Biomembrane)

生物膜实际上是细胞膜(质膜, plasma membrane)和亚细胞器膜的总称。生物膜的基本结构是镶嵌着蛋白质的双层磷脂(phospholipid bilayer), 其间蛋白质(膜蛋白)可在脂中自由侧向扩散, 因此有人用流动镶嵌模型(fluidmosaicmodel)描写生物膜的结构(图 11.2)。磷脂的极性头通常位于双层的表面, 而长的碳氢链构成疏水的层间质。当磷脂悬于水中或用超声波破碎后, 一般就会自动形成密封的磷脂双层泡囊, 这一特点已用于某些重组研究。膜蛋白大体分为两类: 外周蛋白(peripheral protein), 它们通过次级键和膜表面极性头结合附着于膜的表面, 不伸入脂双层, 用温和的处理(如改变溶液的离子强度和 pH、加入金属螯合剂等)就可将它们从膜上溶解下来; 固有蛋白(integralprotein, or transmembrane protein), 它们通过疏水键和膜结合, 或者插入脂双层, 或者横贯脂双层, 或者埋入脂双层。一般只有采用较强烈的手段, 例如, 用去垢剂、有机溶剂、增溶剂和磷脂酶等处理后才能将它们从膜上溶解下来。膜蛋白占膜总重的 50% ~ 80%。

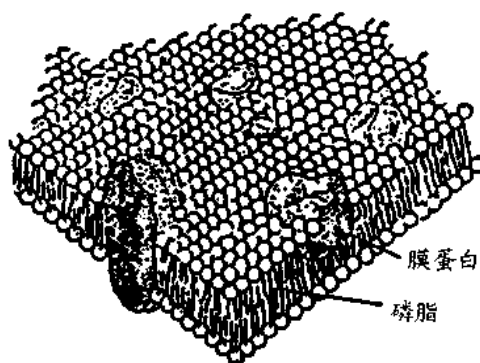


图 11.2 生物膜结构示意图

生物膜的作用是: ① 构筑物质透过、运转的屏障, 避免外界条件的直接影响, 保证细胞、细胞器的稳定与协调; ② 将有关蛋白质和酶定位于适当的位置, 为建立各种专一有效的酶反应系统和受体系统等提供结构基础。

## 2. 细胞核(nuclei)

这是细胞中最大的细胞器。在不分裂的细胞中, 核外包被着双膜, 膜上有孔, 孔的大小和数目因核的种类而不同, 这些孔在膜上规则排列, 容许小分子, 包括某些大分子通过它进行运转。在非分裂的核中, 除核仁外, 核质呈均一状, 核的密度最大, 因其中包含高浓度的大分子, 大约有近 34% 的蛋白质, 10% 的 DNA 和 2% RNA。在分裂的细胞中, 核膜消失, 并围绕子核再形成新的核膜, 核仁变得不明显, 同时, 染色质形成新的染色体(chromosome)。

细胞核的基本物质是染色质(chromatin)。如果说细胞核是 DNA 和 RNA 复制合成的主要场所的话, 那么染色质就是实际进行和调节这些过程的物质基础。

染色质是以核小体为重复单元, 通过主链 DNA 串连组成的念珠状结构。核小体由组蛋白 H<sub>4</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>A 和 H<sub>2</sub>B 各 2 分子组成八聚体核心, 外面以直径约 2.2 nm 的主链 DNA 双螺旋片段、长约 140 个碱基对相对组蛋白核心做近两圈的盘绕。核小体间为 60 个左右的碱基对

与 1 分子  $H_1$  组成的连接链,因此染色质在电镜下呈念珠状(图 11.3)。主链 DNA 包含着大量的基因,一般认为,染色质的凝聚与松弛状态决定着相应基因的表达。

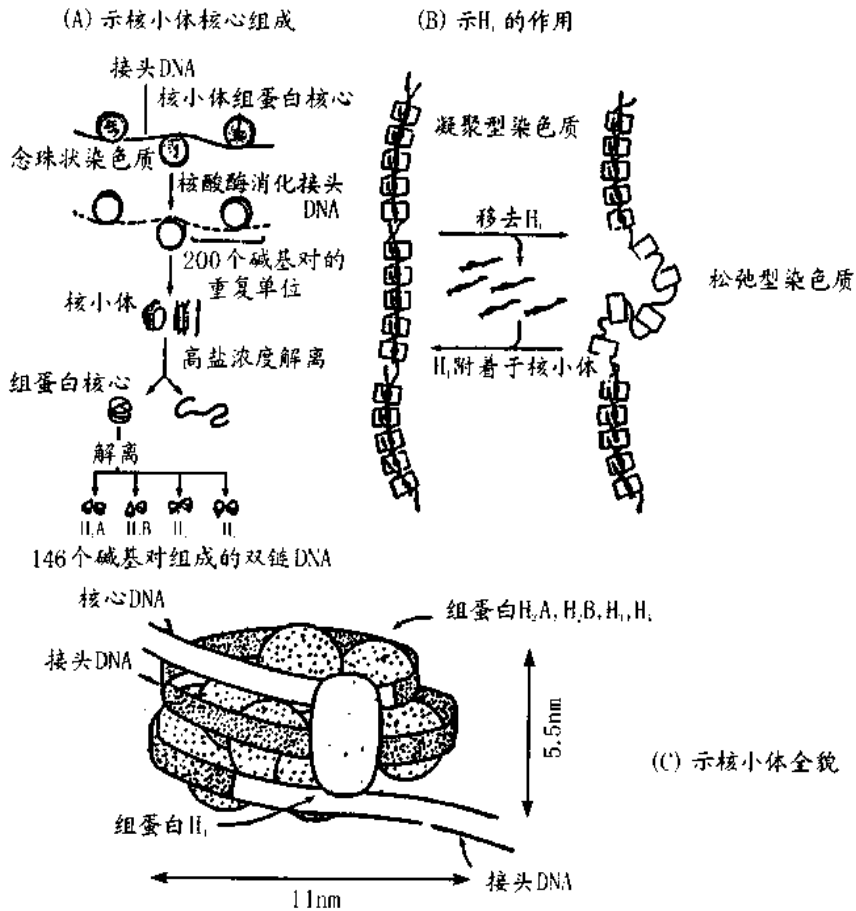


图 11.3 染色质及核小体的结构示意图

### 3. 线粒体

线粒体是直径约  $0.3 - 0.7 \mu\text{m}$ 、长约  $2 \sim 4 \mu\text{m}$ 、体积约  $1 \mu\text{m}^3$  的长椭圆形细胞器。它在细胞中的数目数以千计,高能消耗的组织则更多,在肝细胞中约占总体积的五分之一,在心肌细胞中甚至高达二分之一。

线粒体具有双膜结构(图 11.4):外膜(outer membrane)平滑;内膜(inner membrane)内伸成嵴(cristae),占线粒体膜的 75% 以上,是线粒体功能的主要担负者。产能、需能越多的组织(如翅肌),嵴的数目也越多。

线粒体的外膜和内膜无论在组成和透过性上都很不相同,外膜通常能透过相对分子质量达 10 000 的荷电分子如 ATP 等,而内膜只能容许相对分子质量 150 以下的不带电荷的分子通过,但是内膜中也有些移位蛋白,能专一地帮助某些代谢物进行跨膜运转。此外,在内膜上还分布着大量的蘑菇状小颗粒,用电子显微镜进行观察时,它们由球状头部、柄与由内膜构成的基部组成,是线粒体功能的基本单位。外膜和内膜间为膜间空间(intermembrane space),其间充满液体,起联系两膜的作用,并为酶反应提供辅助因子。

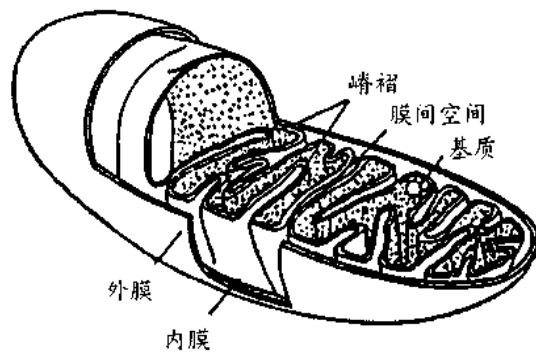


图 11.4 线粒体的结构示意图

线粒内膜内包被着基质(matrix),其中包含着高浓度的蛋白质,约占线粒体总蛋白的70%,而在内膜中只占20%,外膜中则仅4%左右。由于线粒体的核酸含量不高,因此,它的密度不是很高。

#### 4. 溶酶体(lysosome)

溶酶体是直径0.2~0.5 μm的近圆形细胞器,其密度和线粒体相近。溶酶体在几乎所有的真核细胞中都存在(但红细胞例外),每个细胞中20个左右。

溶酶体可看作是细胞的消化器官。它的结构特点是:①具有较“厚”而且较稳定的单层膜,已知有些物质如可的松等能加强膜的稳定性,但是有些因素如去垢剂、孕酮、射线等则能增加膜的脆性;②由于该细胞器中存在大量酸性的糖蛋白,并具有和膜结合的质子泵,所以,它的内部pH约比细胞质者低1.5个pH单位;③在该细胞器内包含约60种最适pH为酸性的水解酶。

#### 5. 内质网(endoplasmic reticulum, ER)

这是由脂蛋白膜组成的网状结构。它的大小和形态很不相同,有的呈列管状排列,有的为泡囊状;有的部位和核膜相连,有的则连接于高尔基体,有的还直接开口于质膜表面。

内质网在形态上可区分为光滑型(Smooth ER)与粗糙型(rough ER)两种类型。粗糙内质网膜上附着大量的高密度小颗粒,通过脱氧胆酸盐等处理,可使小颗粒从膜上分离下来。这些小颗粒大小均一(约15 nm),由核糖核酸与蛋白质组成,称为核糖体(ribosome)。

内质网担负多种生物功能:蛋白质的合成与运转、脂类物质合成以及异物转化等。蛋白质的合成主要在核糖体上进行,滑面内质网则参与细胞的其他活动。

内质网在细胞内的分布也很不均一,在分泌蛋白的细胞中有密集的内质网,例如1g肝细胞内可能包含10 m<sup>2</sup>的内质网;反之,在非分泌性细胞,如红细胞中,则缺乏内质网。

内质网在细胞破碎过程中可能断裂,其膜碎片再重新形成泡囊结构,即通常所谓的微粒体(microsome)。

#### 6. 其他

除了上述几种主要的细胞器外,还有:

(1) 高尔基体(Golgi apparatus)。它是和内质网相连的一种细胞器,其结构在某些方面类似于内质网,由光滑扁平的膜泡囊结构组成,但膜比内质网者稍厚。高尔基体的主要功能是将合成的产物进行加工包装。

(2) 过氧化物酶体( Peroxisome)。它只存在于肝、肾等细胞中,是单膜包被的直径约 0.2 ~ 0.5  $\mu\text{m}$  的球状体。富含氧化酶和过氧化氢酶等,与  $\text{H}_2\text{O}_2$  的代谢有关。

## 二、酶(或酶系统)在细胞中的定位研究

### 1. 酶的组织化学法

这种方法包括以下步骤:① 将待研究的组织取出,并立即在  $-100^\circ\text{C}$  进行冰冻;② 作冰冻切片;③ 用戊二醛或甲醛进行交联固定;④ 移置于载玻片上,与含有酶底物的缓冲液保温,同时采取措施防止扩散移位,例如,检定碱性磷酸酯酶时可采用 Gomori 捕捉法,用钙盐直接将产物磷酸沉淀下来;⑤ 显色,例如,上述磷酸钙盐可先用硝酸钴处理,再用硫化铵处理,这样具有碱性磷酸酯酶的活性处将以黑点显示出来。

酶组织化学法的优点是每次可检定一种细胞类型。问题是,很多酶不一定都能找到满意的防扩散防位移的方法与显色反应;此外,固定时还可能导致酶失效。

酶组织化学法的发展方向:一是和抗体反应结合,即采用带有荧光标记的、酶的专一性抗体进行酶的定位;二是和电子显微镜技术结合,这样可揭示许多光学显微镜无法了解的细微定位。

### 2. 差别离心分离法

酶组织化学观察可以进行酶在亚细胞结构中的定位,但是要进行定量生化分析时,还必须将各种细胞器分离开来,然后分别地进行测定。

(1) 匀浆(homogenization)。其目的是破坏细胞膜、释放细胞器,要求不破坏亚细胞的结构完整性和不改变其中相应组成的生化活性。常用的方法有:高频声波破碎法、渗透介质爆破法、高速捣碎法和匀浆法。其中,高频声波法主要用于细菌,对真核细胞常可能导致膜结构明显损坏;低渗介质爆破法比较温和,处理结果可形成原生质球状物,只要及时恢复等渗,对细胞器的损伤很小;高速捣碎法主要用于硬的纤维组织,对细胞器的破坏作用较大;匀浆法适用于软组织,条件温和,是常用的方法。

为了获得没有损伤的制剂,选择适宜的匀浆介质很重要,例如,过去常采用 0.25 mol/L 的蔗糖溶液。

(2) 差别离心分离(differential centrifugation)。由于各亚细胞成分的大小、形状和密度彼此不同,因此,可在特定的介质中通过不同的离心力场将它们加以差别离心分离开来。表 11.1 是某些细胞成分的沉降系数,常用的差别离心程序如下图(图 11.5)所示。为了获得较纯的亚细胞成分,收集的沉淀至少须反复悬浮、沉降两次以上。应用上述程序,核、线粒体和微粒体可以很好地分开,但线粒体、溶酶体和过氧酶体常难得到很好的分离。为了将线粒体和溶酶体完全分开,在杀死动物前先喂饲 Triton WR 1 339 或胶体金,溶酶体由于能被这些物质相应地降低或升高其密度,从而可达到和线粒体分离的目的。此外,也可通过蔗糖或其他多糖进行梯度离心将上述三者分开。

表 11.1 某些细胞成分的沉降系数

颗粒	沉降系数, S
蛋白质	2 ~ 20
核酸	2 ~ 100
核糖体	30 ~ 80
微粒体	100 ~ 15 000
溶酶体	$1 \sim 2 \times 10^4$
线粒体	$2 \sim 10 \times 10^4$
细胞核	$5 \sim 10 \times 10^6$

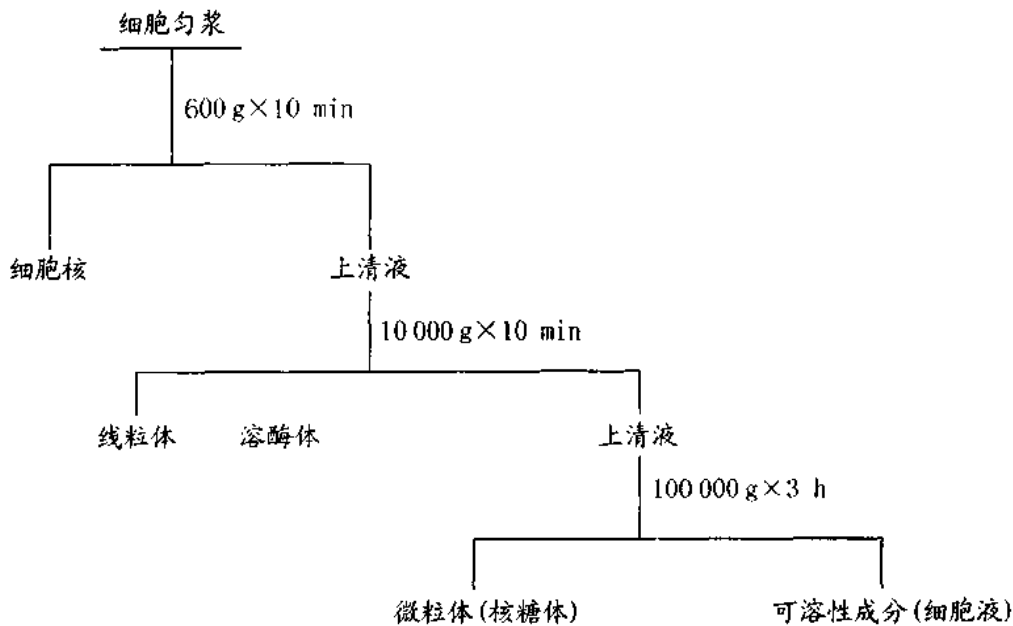


图 11.5 亚细胞的差别离心分离

(3) 纯度检定。亚细胞器的纯度可通过生化分析法与组织化学方法检定。已知某些酶对于特定细胞来说或者是独有的,或者是主要的,因此,它们可以作为检定的标准之一。表 11.2 列举了某些细胞器的“标记酶”。

纯度检定是一个很重要而且相当复杂的工作,因此,在作出结论时应该十分慎重。通常可能遇到的问题是:① 交叉污染问题,例如,在微粒体的分级分离部分就可能包含各种来源(如质膜)的膜片段;当测得的活力很小时,这点尤须注意。② 同工酶的存在,很多情况下,同工酶和细胞器有对应关系,例如,线粒体和细胞液中都有各自的苹果酸脱氢酶、谷草转氨酶和超氧化物歧化酶等,应加以区别。③ 膜屏障使酶在测定时无法利用底物,从而造成“假阴性”;为了解决这种屏障造成的假象,可能时改用小分子底物,或对细胞器进行某些“活化”处理。④ 细胞器本身的非均一性。⑤ 不同生物、不同组织,甚至同一组织的不同部位,酶的分布可能存在差异。

表 11.2 各亚细胞的“标记”酶和该亚细胞器的功能

亚细胞结构	标 记 酶	亚细胞功能
细胞核	NMN 腺苷酰转移酶 DNA 核苷酰转移酶	DNA、RNA、NAD 生物合成
线粒体	琥珀酸脱氢酶	电子传递;氧化磷酸化;尿素循环;三羧酸循环;脂肪酸氧化;血红素合成
溶酶体	酸性磷酸酯酶 核糖核酸酶	水解细胞废弃成分或异物
内质网	葡萄糖-6-磷酸酶 NADPH-细胞色素还原酶	蛋白质生物合成;粘多糖胆固醇、磷脂等的生物合成
过氧酶体	过氧化氢酶	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 分解
质 膜	5'-核苷酸酶	
细胞液	乳酸脱氢酶	氨基酸活化;糖酵解;糖元生成;戊糖支路

### 三、各细胞器中酶的分布

研究表明,细胞器间存在着一定的分工,各细胞器往往集中着它们各自的特征酶和酶系,但不排除其他细胞器中也可能包含一定数量的相同酶和酶系。

#### 1. 质膜

在质膜上的酶主要有两种:Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶和腺苷酸环化酶,它们的特点和功能将在下节讨论。

#### 2. 细胞核

核上的有关酶主要担负 DNA 合成和 RNA 合成,但也有些酶能为合成提供所需要的能量。核中的酶根据其分布可分为四类(表 11.3)。核液中和细胞液中的酶十分相似,主要是一些与糖酵解有关的酶;结合于染色质和核仁上的酶则与 DNA 与 RNA 合成有关,但核仁中没有 DNA 聚合酶,它主要和 rRNA 与 mRNA 的合成有关。结合在核上的酶往往需用高浓度的盐溶液如 1 mol/L NaCl 才能将它们抽提出来。第四类是结合于核膜的酶,它们的抽提更难,一般要用去垢剂才行。

表 11.3 分布于细胞核的酶

结合部位	酶
膜 染色质	葡萄糖-6-磷酸酶;酸性磷酸酯酶 RNA 核苷酰转移酶 II;RNA 核苷酰转移酶 III;核三磷酸酶;DNA 核苷酰转移酶;NMN 腺苷酰转移酶
浓缩于核仁中 核液中	RNA 核苷酰转移酶 II;RNA 甲基转移酶;核糖核酸酶。 糖酵解酶;磷酸戊糖支路酶;乳酸脱氢酶;苹果酸脱氢酶;异柠檬酸脱氢酶;精氨酸酶

#### 3. 线粒体

线粒体上主要集中了三羧酸循环、脂肪酸氧化、呼吸链、氧化磷酸化等一系列和能量代

谢有关的酶和酶系。表 11.4 列举了线粒体上有关酶的分布。有两点值得指出：

表 11.4 线粒体内酶的分布

结合部位	酶
外膜	NADH 脱氢酶; 细胞色素 $b_5$ 还原酶; 胺氧化酶; 犬尿酸氧化酶; 己糖激酶; 腺苷酸激酶; 胆碱转磷酸基酶; 甘油磷酸转酰基酶; 酰基 Co A 合成酶; 磷脂酶 $A_2$
内膜	琥珀酸脱氢酶; NADH 脱氢酶; 3-羟基丁酸脱氢酶; 电子传递链; 细胞色素 C 氧化酶; 腺苷三磷酸酶; 肉碱棕榈酰转移酶; 己糖激酶
膜间 基质中	腺苷酸激酶; 核苷二磷酸激酶; 核苷单磷酸激酶 三羧酸循环(除琥珀酸脱氢酶); 脂肪酸- $\beta$ -氧化酶系; 丙酮酸脱羧酶; 谷氨酸脱氢酶; 丙氨酸脱氢酶; 丙酮酸激酶; 氨甲酰磷酸合成酶; 鸟氨酸转氨甲酰酶

- (1) 线粒体内膜上酶的分布也有一定的规律(见后);
- (2) 在线粒体内也有 DNA、RNA 以及蛋白质合成有关的酶系。

#### 4. 溶酶体

溶酶体中包括约 60 种左右的水解酶, 最适 pH 大多接近酸性; 其中有很多是糖蛋白, 糖的部分对该酶可能有一定的保护作用。这些酶的主要任务是消灭外源物和分解自身的废弃物。除了水解酶外, 在溶酶体膜上也有  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATP 酶和一些阳离子蛋白如 NADH 脱氢酶等; 前者可能与维持溶酶体的酸性有关, 后者的作用尚不清楚。表 10.5 为溶酶体中包含的酶。

表 11.5 溶酶体中的有关水解酶

酶类型	酶
蛋白水解酶	组织蛋白酶 B、D、G、L; 弹性蛋白酶; 胶原酶
糖苷水解酶	$\beta$ -D-葡萄糖苷酸酶; $\beta$ -N-己酰-D-氨基己糖苷酶; 透明质酸氨基葡萄糖苷酶; 溶菌酶; 神经氨酸苷酶
核酸水解酶	DNase II; RNase II
脂肪水解酶	磷脂酶 $A_1$ 、 $A_2$ ; 胆固醇酯酶
其他	酸性磷酸酯酶; 芳香硫酯酶

#### 5. 内质网

内质网具多种功能: 蛋白质合成、脂类合成、药物转化等。担负这些功能的酶如表 11.6。值得指出的是, 蛋白质合成是在核糖体上进行的, 核糖体有的游离于细胞液中, 但大部分结合于内质网上。

表 11.6 内质网上酶的分布

部位	酶
粗糙内质网(胞浆侧)	蛋白质合成有关酶系: 腺苷三磷酸酶; 细胞色素 $b_5$ 还原酶; NADPH-细胞色素还原酶; GDP 甘露糖 $\alpha$ -甘露糖苷基转移酶; 5'-核苷酸酶; 胆固醇酰基转移酶
粗糙内质网(腔)	葡萄糖-6-磷酸酯酶; 核苷二磷酸酶; $\beta$ -D-葡萄糖苷酶
光滑内质网	药物代谢酶(芳香环羟化, 侧链氧化, 脱氨, 脱羟, 脱卤等有关酶); 甾体羟化酶; 甘油磷酸酰基转移酶; 肉碱酰基转移酶; 脂肪酸伸长酶; 胆固醇生物合成酶

71311-1  
71311-1  
71311-1

## 6. 细胞液

细胞液中主要集中着大量与糖酵解、糖元异生作用、脂肪酸合成、核苷酸合成等有关酶和酶系(表 11.7)。

表 11.7 细胞液中酶的种类

酶类型	酶
糖代谢酶系	糖酵解酶系(包括磷酸酶,磷酸化酶激酶,蛋白激酶);糖元合成酶;果糖二磷酸酶;磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶;戊糖磷酸支路酶系;苹果酸脱氢酶;乳酸脱氢酶;异柠檬酸脱氢酶;柠檬酸解酶;葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶
脂肪代谢酶系	乙酰 CoA 羧化酶;脂肪酸合成酶复合物;甘油-3-磷酸脱氢酶(NAD <sup>+</sup> )
氨基酸和蛋白质代谢酶系	门冬氨酸氨基转移酶;丙氨酸氨基转移酶;精氨酸酶;精氨酸琥珀酸合成酶;氨基酰-tRNA 合成酶
核酸代谢酶系	核苷激酶;核苷酸激酶。

## 第二节 酶在生物体内的功能<sup>(4-14)</sup>

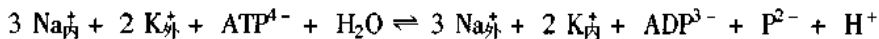
在生物体内经常不断地进行着成千上万种化学反应,它们几乎都是酶催化的,这些酶和酶反应在机体内发挥着大体四类作用。

### 一、执行某种具体的生理功能

这些酶在适应外界条件变化的条件下直接参与某种具体的生理功能。例如,神经末梢中的乙酰胆碱酯酶负责传导神经冲动,肌纤-ATP 酶和肌肉收缩有关,生物膜上的 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶担负离子的跨膜主动运转。

以 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶为例。很早就已发现,几乎所有的动物细胞质膜都包含 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>泵,它们能泵出 Na<sup>+</sup>、泵入 K<sup>+</sup>,从而使细胞内外形成一组很高的、但方向相反的 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>浓度梯度。这种离子活性运转不仅和细胞膜电位的形成、葡萄糖和氨基酸的运转有关,同时也关系到细胞体积的控制、蛋白质的合成等。因此有人估计在动物细胞中约有三分之一的能量用于维持这种泵的活动,对于电学活性的神经细胞来说,这种能量更高。

以后逐渐发现,所谓 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>泵实际上就是 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶,它是一种各向异性的酶,由 α、β 两种亚基组成四聚体(α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>),相对分子质量约 270 000。α 的相对分子质量 95 000,贯穿膜的两侧,在细胞质膜内侧具有 ATP 酶的活性位点,在细胞质膜外侧有 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>和抑制剂乌本苷(ouabain)的结合位点;β 的相对分子质量为 40 000,是一种糖蛋白,糖基链位于细胞外侧。Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶能以可逆的两种构象状态存在,这两种构象对 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>有不同的亲和性。用重新密封的红血球血影细胞(ghost)进行的实验研究表明:① Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>的运转和 ATP 的水解紧密相关;② 这种离子运转和 ATP 水解只有当 Na<sup>+</sup>与 ATP 在血影细胞的内侧,K<sup>+</sup>在细胞的外侧时才能进行;③ 乌本苷能专一地抑制 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>泵,也能专一性地抑制 ATP 酶,但也只有当它在血影细胞的外侧时才能表现这种抑制,而且它与 K<sup>+</sup>竞争结合位点;④ 每分子 ATP 水解(该酶的催化效率是 100 分子 ATP/(酶分子·秒))伴随 3 个 Na<sup>+</sup>的泵出和 2 个 K<sup>+</sup>的泵入,其化学计量关系是:





红血球血影细胞实验表明,Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>泵的功能可以逆转,也就是说,当Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>的浓度梯度在质膜相应侧增加到足够高的水平时,该泵就能催化从ADP与磷酸合成ATP,同时伴随着浓度梯度的下降。图11.6为Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP酶的结构、存在状态和作用机制示意图。

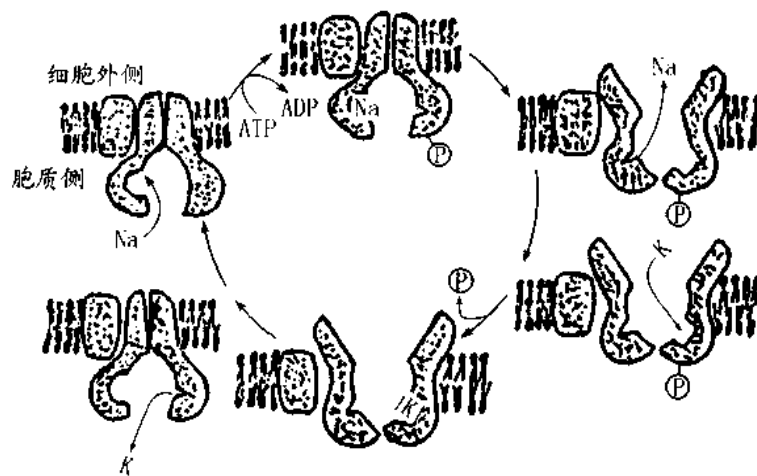


图 11.6 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>-ATP 酶结构和作用机制示意图

## 二、担负保卫清除任务

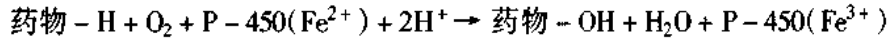
参与这一工作的酶可能是个单个酶,如超氧离子歧化酶,它能直接移除高反应性的O<sub>2</sub><sup>-</sup>,防止过氧化脂质的生成;如限制性内切核酸酶,它能选择性地水解入侵菌体的异源DNA。

参与这一工作的也可能是多种酶组成的混合物,如溶酶体的水解酶,它们被核糖体合成后,先经高尔基体聚集浓缩、包装,形成初级溶酶体;初级溶酶体再和吞噬体(phagocytic vesicle)或自噬泡(autophagosome)结合形成次级溶酶体。所谓吞噬体是指通过胞饮或吞噬外源物形成的颗粒,自噬泡是指包被了自身废弃物形成的颗粒。

参与这一工作的也可能是一个酶系,如前章所述的凝血酶系、溶血纤维蛋白酶系和免疫系统中的补体系,它们都是通过酶的级联系统发挥作用的;还有以内质网为主的药物转化酶系等。

在生物机体中经常有一些外来的、或自身产生的非营养性物质,它们既不能转变为细胞成分,也不能用作能源,例如它们有些是生理活性、病理活性的物质,也有些甚至是有毒的毒理活性物质。在这些物质中有许多是脂溶性物质,在体内它们往往先要通过某些生化转化,增强其极性,增大其水溶性,然后或者排出体外,或者转变为生理的、病理或毒理的物质在机体内发挥作用。转化反应包括氧化(合)、还原、水解等所谓第一相反应。有的物质经过这一相反应就可很大大地改变其极性达到上述要求,但有的却必须进行第二相反应,使之与极性很强的物质结合,更大大地增加其溶解性。参与这两相反应的酶系,特别是参加第一相反应的酶系,大部分存在于内质网中。

以氧化(合)酶系为例,大多数外源的脂溶性物质一般都可被肝细胞内质网中NADPH参与电子传递链氧化。这些电子传递酶几乎占到内质网膜组成的十五分之一左右,组成相当复杂。如单氧合酶(monooxygenase),又称混合功能氧化酶(mixed function oxidase),它们是由细胞色素P-450、细胞色素b<sub>5</sub>组成的羟化酶系(hydroxylase),在药物代谢中起着十分重要的作用(图11.7)。



这些蛋白的分离一般需用去垢剂(如 Renex 690 等)或蛋白酶等处理。

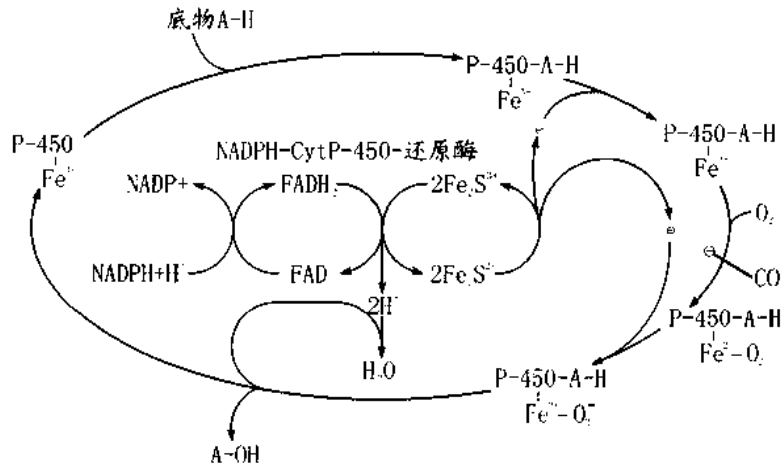
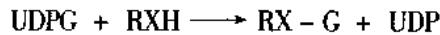


图 11.7 氧化(合)酶系作用示意图

再以葡萄糖醛酸转移酶为例,体内进行的第二相反应大致有六类:葡萄糖醛酸结合;硫酸氨基酸形成;硫酸酯形成;马尿酸形成;乙酰化;甲基化等。其中第一类反应最重要。催化葡萄糖醛酸结合(conjugation)的是内质网中的葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronyl-transferase),它催化葡萄糖醛酸基由 UDP-葡萄糖醛酸(UDPG)转移至各种受体(RXH),此反应不可逆。



葡萄糖醛酸转移酶存在于哺乳动物的多种组织如肾皮质、消化道等中,但就外源物质的解毒和转化来说,肝脏的内质网是最重要的场所。此酶对底物的 RX-部分有一定的专一要求,它们可以是羟基、羧基、巯基、氨基、亚氨基、芳香基、烃基和杂环化合物等,因此,内质网内的葡萄糖醛酸转移酶是一个具有不同底物专一性的家族。但是,此酶不很稳定,常因膜结构破坏而失效。在进行分离纯化时,通常先要用中性的表面活性剂进行处理。

在体内进行的外源物解毒和转化反应有两个特点:其一,是反应的独立性,例如,镇静药物氯丙嗪,它在相应酶的作用下可独立地进行 N-氧化、N-脱烃、羟化以及结合等反应;其二,是反应的连续性,即通过多种酶共同作用,连续完成。

### 三、协同激素等起信号传递与放大作用

信号分子根据其产生、输送及作用部位可分为三类:局部化学调节物、激素及神经递质。根据其溶解性质及受体部位可分为两类:疏水分子,例如,甾体激素穿过质膜,活化细胞质中的受体蛋白,形成甾体-受体蛋白络合物,然后,再和染色质结合,调节特定基因的转录;亲水分子,包括大部分腺体分泌的激素、神经递质和局部化学调节物质,它们作用质膜表面的受体蛋白,并以某种方式转换为细胞内信号,调节靶细胞、靶蛋白的性态。

细胞外信号转换为细胞内信号大体有两类方式(图 11.8):一是信号分子在体外与质膜载体蛋白结合,或通过蛋白激酶直接传递,或通过受体调节的胞饮作用,吸入靶细胞,然后再以信号分子本身或以其转化产物作为细胞内信号发挥作用;二是信号分子在体外与质膜上

的受体蛋白结合,导致后者发生构象改变,影响质膜上酶的活性或者离子通道,在细胞内形成新的信号分子——第二信使,再通过相应的酶,调节靶细胞的性态。

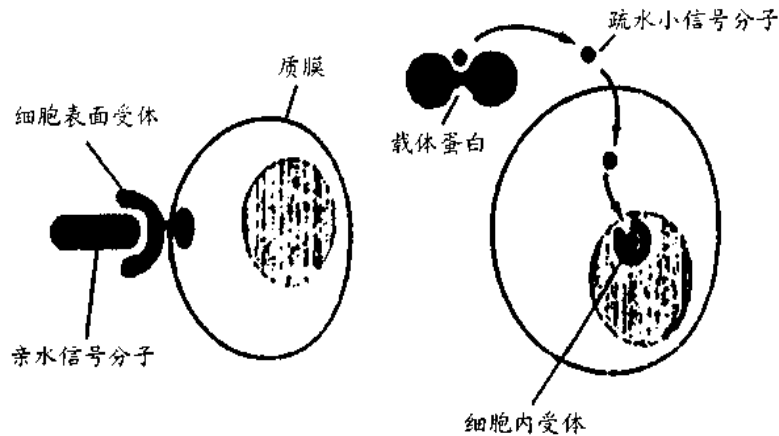


图 11.8 细胞外信号转换的两种方式

作为第二信使的有 cAMP 和  $\text{Ca}^{2+}$  等,它们和酶等在协同激素方面共同发挥信号转换、放大作用。下面以它们为例作一些说明。

#### 1. 受体、腺苷酸环化酶、cAMP 和蛋白激酶体系

在这一体系中 cAMP 是中心环节,起第二信使作用。

cAMP 是原核细胞和真核细胞内普遍存在的反应调节因子,它在动物细胞内含量水平一般为  $10^{-6}$  mol/L 左右,在激素作用下其浓度可能在数秒内发生 5 倍左右的变化。cAMP 的形成与分解由腺苷酸环化酶(adenyl cyclase)与磷酸二酯酶调节控制。

激素信号是如何转换为 cAMP 信使的?

(1) “移植”实验与细胞融合实验表明,受体与腺苷酸环化酶是两种不同的蛋白。各种细胞对信号分子(signaling molecular)都有它们各自专一的受体。受体多嵌合于质膜的外表面,某些受体蛋白已经纯化,相对分子质量约为 100 000;而腺苷酸环化酶则嵌合于质膜的内表面,该酶已通过疏水层析从各种细胞纯化,相对分子质量约 150 000 ~ 200 000,要求 Mg-ATP 或 Mn-ATP 为底物。

(2) 实验也发现在膜中还存在着一种 GTP 结合蛋白,称为 G 蛋白(G-protein),或称 GTP 结合调节蛋白(GTP binding regulatory protein),受体通过它间接活化腺苷酸环化酶。G 蛋白具有 GTP 酶的活性,当它和 GTP 结合时能协同激素受体活化腺苷酸环化酶,而当它结合的 GTP 水解为磷酸与 GDP 后,就可逆地失去了这种调节作用,这样就能保证及时地“转达”激素活化腺苷酸环化酶的信号。反之,某些异常情况下,G 蛋白失去了 GTP 酶的活性,就会停滞于与 GTP 结合的状态,在即使没有激素的作用情况下,腺苷酸环化酶也会持续地处于高活性状态,使 cAMP 大量生成。例如,霍乱毒素,它能催化 ADP-核糖基自  $\text{NAD}^+$  转移至 G 蛋白的精氨酸侧链上,使之失去 GTP 酶的活性,引起 cAMP 异常升高,使肠壁细胞离子的活性运转加速,最终导致大量失水和  $\text{Na}^+$  丢失,机体死亡(图 11.9)

(3) 重组和动力学实验表明,受体、腺苷酸环化酶及 G 蛋白能在质膜上独立地相对移动,而且在接受信号前后,即在激活与非激活状态情况下,它们所处的相对位置与构象也各

不相同。

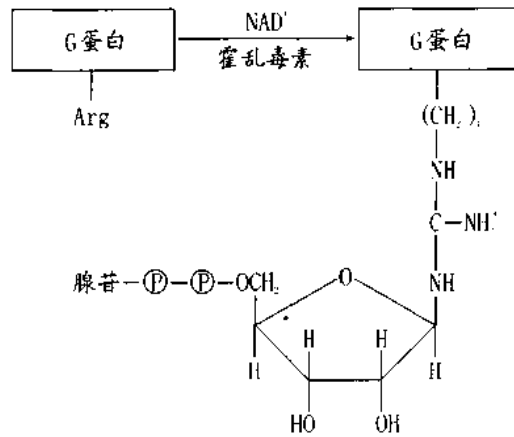


图 11.9 霍乱毒素的作用示意图

根据这些实验观察,关于信号分子制动腺苷酸环化酶,产生 cAMP 的机制可概括为三个步骤:首先,是信号分子和受体蛋白结合,改变其构象,使之能和 G 蛋白结合并活化 G 蛋白;接着,活化的 G 蛋白在细胞质侧以 GTP 取代 GDP,并与之结合,而 GTP 的结合又促使 G 蛋白的构象改变,并导致该蛋白去活化腺苷酸环化酶,激活后的环化酶再催化 ATP 生成 cAMP;最后, G 蛋白水解 GTP,同时 G 蛋白、腺苷酸环化酶再回复到原来的非活化构象状态(图 11.10)。

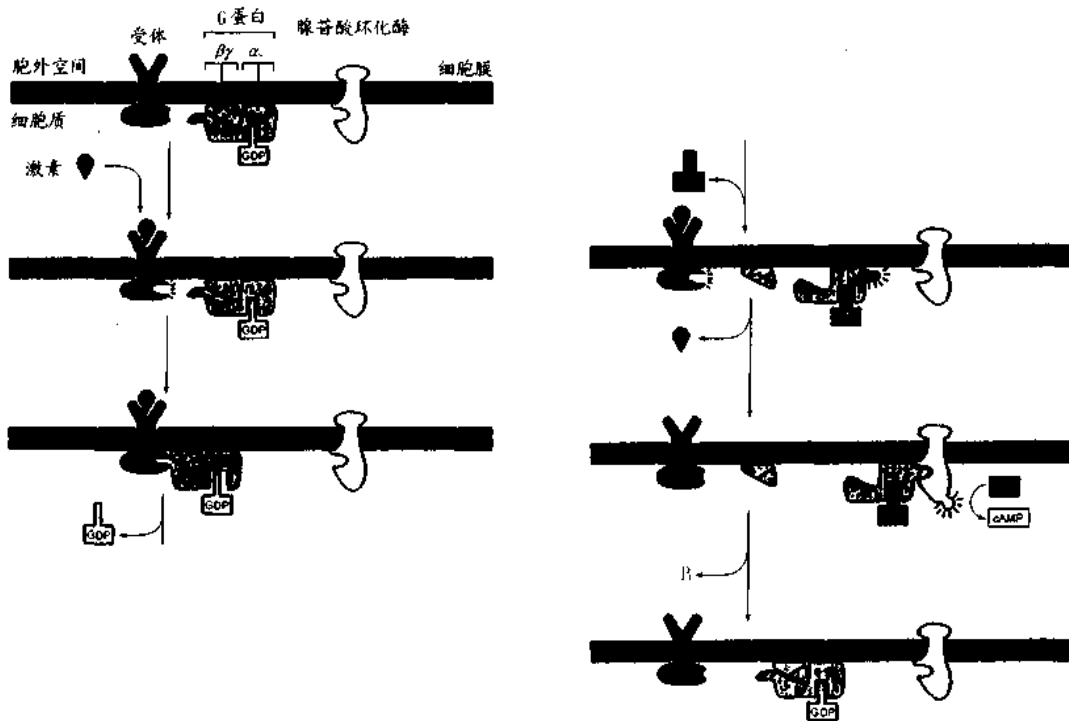


图 11.10 受体、G 蛋白、腺苷酸环化酶、cAMP 和蛋白激酶

cAMP 生成后,它在动物细胞内发挥作用时主要通过活化 cAMP 依赖的蛋白激酶,后者再进一步催化细胞内有关的靶蛋白使之磷酸化,改变和调节它们的活性和相应的生理功能。

## 2. 受体、膜 $\text{Ca}^{2+}$ 通道、 $\text{Ca}^{2+}$ 、钙调蛋白及相关酶体系

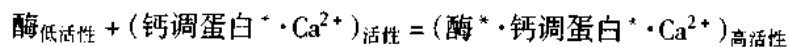
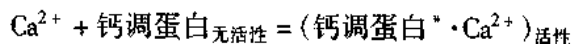
在细胞中,代谢过程的调节有许多是通过改变对  $\text{Ca}^{2+}$  敏感的相关酶活性实现的。在这一体系中, $\text{Ca}^{2+}$  是中心环节,起第二信使的作用。

正常情况下, $\text{Ca}^{2+}$  在细胞液中的浓度很低( $\leq 10^{-7}$  mol/L),比细胞外液或亚细胞器中的浓度水平低 1 000 倍( $\geq 10^{-3}$  mol/L)。维持细胞液与细胞外液、细胞液与亚细胞器间这种  $\text{Ca}^{2+}$  浓度梯度的因素很多,如质膜与细胞器膜上的  $\text{Ca}^{2+}$  - ATP 酶( $\text{Ca}^{2+}$  泵)、 $\text{Na}^+$  促进的  $\text{Ca}^{2+}$  反向运输和线粒体氧化磷酸推动的  $\text{Ca}^{2+}$  主动运输;此外,也和某些小分子物质与大分子物质对  $\text{Ca}^{2+}$  的结合有关。

另一方面,在信号分子刺激下, $\text{Ca}^{2+}$  可以瞬时地大量进入细胞液,并作为第二信使引发一系列的应答、调节。就大多数分泌细胞来说,通常信号分子在活化受体分子后,首先导致质膜去极化,然后促使膜上的  $\text{Ca}^{2+}$  通道构象改变,推动  $\text{Ca}^{2+}$  进入细胞液;另外,信号分子活化受体引起质膜去极化后,也可再通过某种方式促使  $\text{Ca}^{2+}$  从亚细胞器中释放到细胞液。值得提到的是, $\text{Ca}^{2+}$  通道的打开是瞬时的,当信号移去后又会立即关闭,同时,进入细胞液的  $\text{Ca}^{2+}$  又能很快地泵出,恢复原状。

$\text{Ca}^{2+}$  传递信号分子的信息主要通过钙调蛋白(参见第十章)。钙调蛋白在真核细胞中普遍存在,每个动物细胞中约包含  $10^7$  个分子。这种蛋白由 148 个氨基酸组成,单链,酸性蛋白,热稳定,相对分子质量 16 700;分子中的酸性氨基酸约占三分之一,因而有利于和  $\text{Ca}^{2+}$  结合;根据 X-衍射分析,每个分子折叠形成 4 个可和  $\text{Ca}^{2+}$  结合的位点;分子中没有半胱氨酸与脯氨酸,因而具有很好的柔顺性,有利于感应  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的微小变化;钙调蛋白非常专一于  $\text{Ca}^{2+}$  (不和  $\text{Mg}^{2+}$  作用,细胞液中的  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为  $10^{-3}$  mol/L),并对它具有很高的亲和力( $10^{-6}$  mol/L 左右,细胞在信号分子的影响下,进入细胞液中的  $\text{Ca}^{2+}$  不超过  $10^{-5}$  mol/L); $\text{Ca}^{2+}$  和钙调蛋白结合后,可引起后者的构象发生变化,而且,这种构象变化因每个钙调蛋白分子上结合的  $\text{Ca}^{2+}$  数目的不同而异。

$\text{Ca}^{2+}$  活化的钙调蛋白再进一步将信息传递给某一特定的细胞蛋白或酶,产生相应的应答,调节相应的酶活性和生理活动过程:



其中 \* 者表示处于活性构象状态。为钙调蛋白调节的已知有环核苷酸磷酸二酯酶、腺苷酸环化酶、膜  $\text{Ca}^{2+}$  - ATP 酶、磷酸化酶激酶等近十种酶。

不言而喻,这种信号传递系统也包含信号放大过程。

值得提到是,同一个细胞外的信号往往可以同时引起 cAMP 和  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度改变,而且,它们对细胞内活性的调节在很大程度上也往往是相互重叠、相互渗透的。例如,磷酸化酶激酶由四种亚基  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  组成  $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ , 其中,  $\delta$  是一种钙调蛋白,  $\gamma$  为催化亚基,在  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基中有 Ser 残基,能够为依赖于 cAMP 的蛋白激酶磷酸化。 $\text{Ca}^{2+}$  能与  $\delta$  亚基结合,使  $\delta$  构象改变,导致  $\gamma$  与  $\delta$  形成络合物,受 cAMP 与  $\text{Ca}^{2+}$  共同调节,而且,也只有在  $\gamma$  亚基与钙调蛋白 -  $\text{Ca}^{2+}$  结合后,  $\beta$  亚基才能被依赖 cAMP 的蛋白激酶磷酸化而转入活性状态。此外,钙调蛋白

本身就能调节与 cAMP 合成、分解有关酶的活性；反之，依赖于 cAMP 的蛋白激酶也能使  $\text{Ca}^{2+}$  通道(或  $\text{Ca}^{2+}$  泵)磷酸化。

另一点值得提到的是 cGMP, 它也普遍存在于动物细胞, 但浓度远低于 cAMP。它同样有细胞内第二信使的作用, 当完整细胞对各种细胞外信号分子产生应答时, 它的浓度也随着升高。但是鸟苷酸环化酶一般不在膜上, 而是在破碎的细胞中, 且它不被信号分子活化。因此, 现在的认识是, cGMP 可能参与  $\text{Ca}^{2+}$  引发的应答, 因为细胞液中  $\text{Ca}^{2+}$  水平的升高能活化 cGMP 环化酶, 并抑制 cGMP 磷酸二酯酶。升高的 cGMP 再通过活化依赖于 cGMP 的蛋白激酶发挥相应的作用。

#### 四、催化代谢反应

酶最主要的、也是最基本的生物学功能就是催化代谢反应, 建立起各种代谢途径、各种代谢体系, 为生物机体的生存、发展, 为形形色色的生命活动提供物质基础和能量来源。代谢途径、代谢系统尽管多种多样, 但是贯穿于整个生物界, 起根本作用的是两种: 氧化(或光合)磷酸化能量转换系统和核酸、蛋白质的生物合成系统。

##### 1. 氧化磷酸化(oxidation phosphorylation)

生物为适应外界环境的变化, 就要能感应、运动、吸收与分泌; 为了生存、生长和繁殖, 就要不断地进行分解、转化, 就要不断地进行生物合成。所有这些过程都需要能量。

##### (1) 生物机体的能量来源

除了绿色植物和某些藻类可以利用日光的能量外, 大部分生物所需要的能量都是通过碳水化合物, 特别是葡萄糖的氧化取得的。

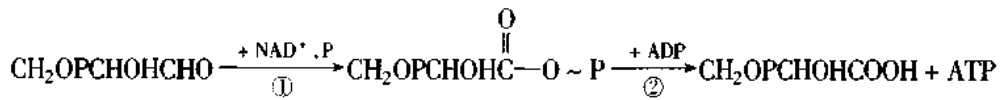
在生物机体内, 葡萄糖的氧化大体可分为两阶段: 酵解和氧化。能量通常以高能化学键的形式积累和转移。常见的高能化学键如表 11.8, 其中最主要的能源形式是 ATP。上述过

表 11.8 常见的几种高能化学键

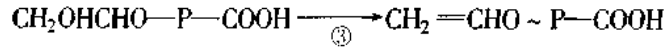
键 型	结 构	例	$\Delta G^\circ$ (水解释放) (kJ)
$\begin{array}{c} \text{  } \\ \text{---CO---} \\   \end{array}$	烯醇磷酸	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \text{  } \\ \text{R---C---O---P} \end{array}$	磷酸烯醇 -62.8
	混合酸酐	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \text{  } \\ \text{R---C---O---P} \end{array}$	乙酰磷酸 -58.2
$\begin{array}{c} \text{  } \\ \text{---C---N---} \\   \\ \text{H} \end{array}$	磷酰胺	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \text{  } \\ \text{R---C---N---P} \end{array}$	肌酸磷酸 -53.6
$\begin{array}{c} \text{  } \\ \text{---C---} \end{array}$	硫酯	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \text{  } \\ \text{R}_1\text{---C---S---R}_2 \end{array}$	乙酰 CoA -34.3
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \text{  } \\ \text{---P---O---} \\   \\ \text{O}^- \end{array}$	焦磷酸	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \text{  } \\ \text{R---O---P---O---P} \\   \\ \text{O}^- \end{array}$	ATP -37.2

程中释放出来的能量就是借助“磷酸化”机制,以 ATP 的形式固定下来的。

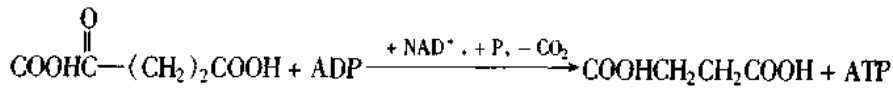
在酵解阶段有两个环节形成 ATP,一是通过 3-磷酸甘油醛脱氢酶①与磷酸甘油酸激酶②催化进行的:



另一是在烯醇化酶③、丙酮酸激酶④催化下进行的:



在三羧酸循环阶段里,α-酮戊二酸形成琥珀酸的同时也产生一个 ATP:



通过这类反应产生 ATP 的方式,通常称为底物水平的磷酸化(phosphorylation at the substrate level)。但是,更多的 ATP 来自于酵解过程中产生的 NADH,特别是来自于三羧酸循环过程中产生的 NADH 和琥珀酸的进一步彻底氧化过程,通过这一个过程进行的磷酸化就称为氧化磷酸化。氧化磷酸化是生物机体获取能量,即生成 ATP 的主要方式。

## (2) 线粒体制剂

线粒体是氧化磷酸化进行的主要场所。最早用于研究氧化磷酸化的材料是牛心线粒体、鼠肝线粒体。以后,又制备了各种线粒体碎片制剂,在这制剂中有的只有电子传递活性,如 Keilin-Hartee 心肌制剂、电子传递颗粒(ETP);有的则仍保有一定的氧化磷酸化活力,如洋地黄皂苷制剂、超声波处理得到鼠肝线粒体碎片制剂、牛心线粒体碎片制剂(ETP<sub>H</sub>)。此外,值得提到的还有:①呼吸酶复合物(respiratory enzyme complexes),它们是通过胆酸盐溶解、硫酸铵分级沉淀获得的,通过它们重组呼吸链,可深入研究呼吸链组成和顺序;②线粒

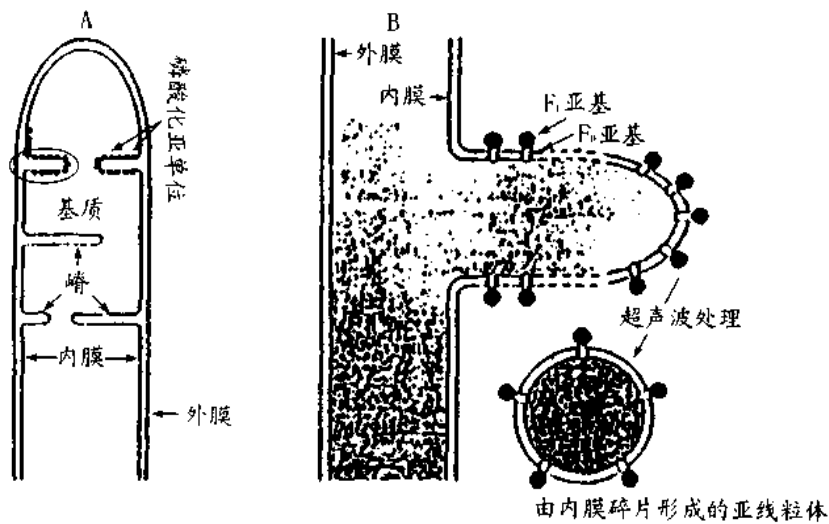


图 11.11 内翻外(亚线粒体颗粒)小泡示意图

体内膜制成的小泡,它们是在线粒体破碎(例如用超声法处理)后,将内膜碎片重新封闭形成的内翻外(亚线粒体颗粒)小泡(inside-out vesicle),通过它们可以研究各种偶联因子等在呼吸和氧化磷酸化中的作用(图 11.11)。

### (3) 呼吸链(respiratory chain)

氧化磷酸化实际上是通过呼吸链使 NADH 或琥珀酸等彻底氧化的同时进行的磷酸化过程。所谓呼吸链是指以黄素核苷酸为辅基的脱氢酶、电子中间传递体和氧化酶组成的电子传递链(electron transport chain)。现在比较普遍接受的呼吸链组成、顺序以及建筑在呼吸链上的氧化磷酸化过程如图 11.12 所示。其中, Suc 为琥珀酸, FMN(FAD)、FeS 代表以黄素核苷酸为辅基的脱氢酶与铁硫中心组成的络合物, CoQ 为辅酶 Q, Cyt 代表细胞色素。

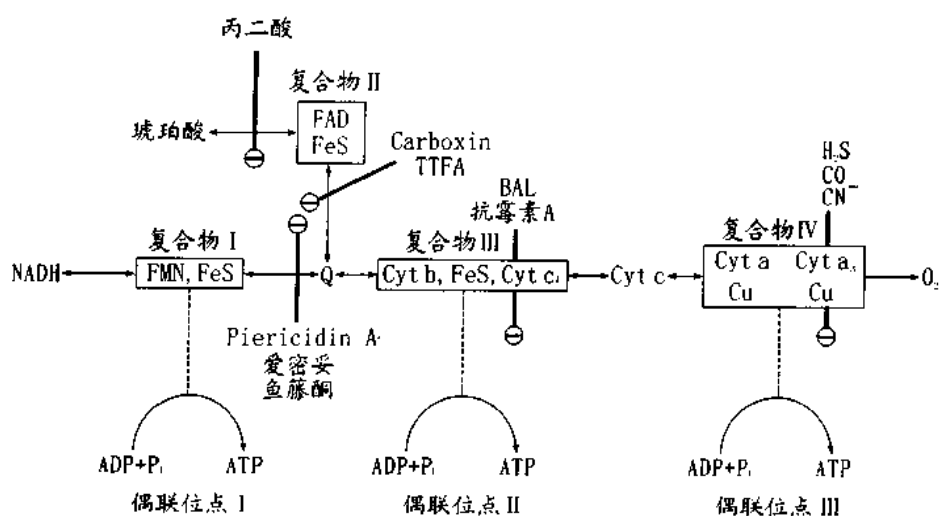


图 11.12 电子传递链及氧化磷酸化系统的结构组成

呼吸链研究的主要问题是要弄清它的组成和排列,常用的方法有:

① 光学方法。由于呼吸链各组成成分都有特征的氧化还原差别吸收光谱,因此,可以通过这一性质测定它们的含量、氧化还原状态和它们在电子传递过程中的动力学变化,从而判断该成分是否属于呼吸链以及它在链中位置,表 11.9 列举了各成分的特征吸收谱带波长和测定时用的参比波长。值得说明的是,因为线粒体是脂蛋白复合物,具有强的光散射,在不同的介质中、不同的代谢条件、不同的代谢状态下可能有膨胀收缩等变化;再加上各细胞色素本身的光吸收峰又比较接近,为了使测定能反映真实状况,故通常要采用一个不受氧化还原影响的参比波长作为空白,并借助双光束分光光度计进行测定。为获得更多的信息,一般还应配以电子传递链的专一抑制剂或人工供受体以便进行分段研究。

② 根据氧化还原电位(redox potential)进行判断。电子传递总是从低电位流向高电位,图 11.13 为呼吸链各组成成分的氧化还原电位  $E'$ ,根据它就可判断这些成分在链中的位置。

③ 分离重组。一种成分如果属于呼吸链,那么将它抽出后,呼吸链就会瘫痪;将它重组进去,则应又能恢复链的活性。CoQ 是呼吸链的组成成分,其证据之一就是,用辛烷或丙酮抽提除去 CoQ 后, NADH 与琥珀酸都不能被氧化,加入 CoQ 后则又可恢复该电子传递链的功能。



表 11.9 呼吸链各组成成分的光学特征与测定用波长

组成成分	氧化型		还原型		测定波长 - 参比波长		
	波长 (nm)	消光系数 $\frac{1}{\text{mmol/L}}$	波长 (nm)	消光系数 $\frac{1}{\text{mmol/L}}$	测定波长 (nm)	参比波长 (nm)	消光系数 $\frac{1}{\text{cm} \cdot \text{mol/L}}$
NADH			340		340	370	6
黄素蛋白					465	510	11
CoQ	275	165	275 290	23 46			
Cyt. b			562 ~ 575	20.7	564	575	20
Cyt. c <sub>1</sub>			554	24.1	554	540	
Cyt. c	528	11.2	550.25	27.7	550	541	19
Cyt. a	483	79	605	21	605	630	16
Cyt. a <sub>3</sub>	280	241	445	98	445	460	91

④ 呼吸组成成分的纯化与鉴定。通常纯的线粒体内膜制剂可用作这种研究的出发物质,例如,通过胆酸盐等处理后可由此得到 4 种复合物。其中:

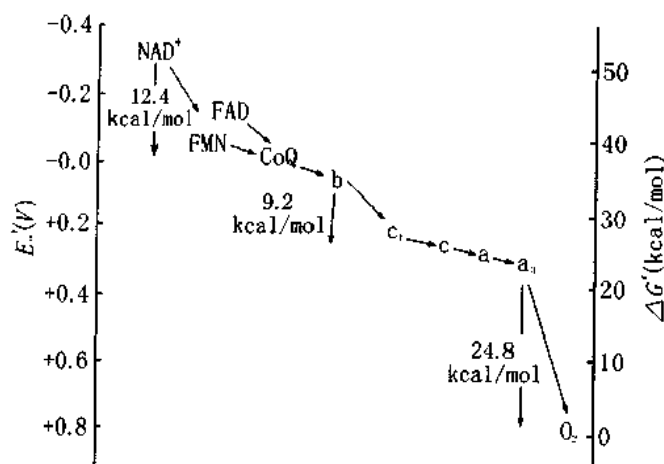


图 11.13 电子传递链各组成成分的氧化还原电位( $E'$ )及氧化还原过程中的自由能变化( $\Delta G'$ )

复合物 I:具有 NADH - CoQ 还原酶活性,由 16 条肽链组成,相对分子质量约 800 000,包含 2 个 FMN 和 5 个铁硫中心(iron-sulphur cluster)。此复合物横贯线粒体内膜。

复合物 II:具有琥珀酸 - CoQ 还原酶活性,由相对分子质量 70 000 与 27 000 的亚基组成二聚体,包含 1 个 FAD,4 个铁硫中心。此复合物嵌合于线粒体内膜的基质侧。

铁硫中心在上述两种复合物中都起着很重要的作用,但是,它们不稳定,这可能是复合物容易失效的主要原因,同时也是呼吸链抑制剂的重要作用位点。

复合物 III:CoQ - 细胞色素 c 还原酶,又称为细胞色素 b-c<sub>1</sub> 复合物,相对分子质量大约是 500 000 亚基的二聚体。每个单位包含三个细胞色素和一个铁硫蛋白,还包含一个对抗霉素敏感的蛋白。细胞色素 b 已分离,相对分子质量为 17 000 和 37 000,具有很强的疏水性,

埋在膜中心。细胞色素  $c_1$ , 相对分子质量 31 000, 也是一种嵌合蛋白, 而且其血红素基指向细胞色素  $c$ 。细胞色素  $c$  和它们不同, 分子较小, 是外周蛋白, 能在膜内迅速地进行侧向移动。CoQ, 是联系上述两种以黄素核苷酸为辅基的脱氢酶与细胞色素的纽带, 高度疏水, 能在疏水区中迅速移动, 但似乎不是琥珀酸脱氢酶直接作用的受体, 一般需要与  $b-c_1$  复合物中的一种相对分子质量约 15 000 的蛋白(称为 CoQ 结合蛋白)结合才有活性。

复合物 IV: 细胞色素氧化酶复合物, 这是研究得较为清楚的一种复合物。相对分子质量约为 300 000 亚基的二聚体, 由细胞色素  $a$ 、细胞色素  $a_3$  和两个铜原子组成, 包括 8 种不同的多肽链, 相对分子质量分别为 15 000、11 200、40 000、25 000、9 800、7 300, 它们的排列依次自基质侧指向细胞浆侧, 横贯线粒体内膜, 并两端突出, 细胞色素  $a$  在细胞浆侧, 而细胞色素  $a_3$  位于基质侧。细胞色素氧化酶复合物接受从细胞色素  $c$  来的 4 个电子(每次 1 个), 然后递给  $O_2$ , 最终形成两分子水。电子的传递过程是: 电子先进入细胞色素  $a$  血红素和铜蛋白 Cu 组成的低电位中心, 然后再转移至细胞色素  $a_3$  血红素和另一个铜, 最后完成氧化。

上述四种复合物都能各自形成膜结构, 也能相互组合, 例如, 复合物 I、III、IV 和复合物 II、III、IV 就可分别组合形成 NADH 氧化酶体系与琥珀酸氧化酶体系。

呼吸链的组成和顺序已经大致清楚。有三点值得指出: ① 磷脂和呼吸链有密切关系, 它不仅参与呼吸链组成成分与线粒体内膜的结合, 而且也和一些酶的活力有关; ② 呼吸链各组成成分在线粒体中的含量很不相同, 就摩尔比而言, 如果说 NADH 脱氢酶为 1, 那么  $b-c_1$  复合物为 3, 细胞色素氧化酶为 7, 细胞色素  $c$  为 9, 而 CoQ 为 50; ③ 呼吸链组成成分在线粒体内膜中有很高的扩散速度, 四种复合物的扩散速度平均约为 8 nm/ms, 而在复合物中起联系作用的 CoQ 和细胞色素  $c$ , 它们的分子较小, 速度更快。根据这些特点, 以及用过量的磷脂“稀释”线粒体内膜蛋白后进行的电子显微镜观察, 有人推测呼吸链组成成分(复合物)之间不一定有严格的结构上的排列顺序, 电子传递可能是通过载体和复合物之间的碰撞实现的。

#### (4) 氧化与磷酸化

氧化磷酸化是指氧化和磷酸化的偶联过程, 更确切地说是指伴随呼吸链电子传递过程中, 使 ADP 磷酸化形成 ATP 的过程。呼吸链是氧化磷酸化的结构基础; 进一步要阐明的问题是: 氧化与磷酸化的偶联点; 氧化磷酸化的性质; 氧化磷酸化的机制。

##### ① 氧化与磷酸化的偶联点

有两种方法可确定电子传递链中可进行磷酸化的位点。

a. 根据电子传递链各环节的氧化还原电位差进行判断。电子在两个氧化还原系统间传递转移时, 自由能的变化( $\Delta G_o'$ )和氧化还原电位差( $\Delta E_o'$ )之间有如下关系:

$$\Delta G_o' = -nF \cdot \Delta E_o'$$

$n$  为传递的电子数;  $F$  为法拉第常数;  $\Delta E_o'$  为两系统的标准氧化还原电位差。

已经知道, 在 pH 7,  $Mg^{2+}$  存在的条件下, 从 ADP 磷酸化形成 ATP 所需要的能量约 35.1 kJ/mol, 因此, 根据电子传递链各组成成分的氧化还原电位就可对偶联点作出理论上的判断(参见图 11.13)。

b. 测定 P/O 值, 这是最常用的实际方法。所谓 P/O 值是指每消耗一个氧原子, 或者说, 伴随每对电子通过电子传递链传递所产生的 ATP 数目。应用这种方法时, 可同时配以相应的人工供受体进行分段测定。例如, 以 NADH 为底物时, 测得的 P/O 值为 3; 而以维生

素 C 为底物时,测得的 P/O 值为 1。

根据现有的知识可大致确定:氧化与磷酸化的偶联点基本上位于电子传递链的复合物 I、III 和 IV 等环节上,例如,NADH 完全氧化时可产生 3 分子 ATP,而琥珀酸、FADH<sub>2</sub> 完全氧化时只能产生 2 分子 ATP。

### ② 氧化磷酸化的性质

a. 呼吸控制。氧化磷酸化是彼此依赖、相互制约的过程。没有氧化,自然不能进行 ADP 的磷酸化。但是在正常情况下,磷酸化也控制氧化过程,如果没有 ADP,没有它的磷酸化,氧化也不能进行。

进行氧化磷酸化反应,需要有四种基本因素参加:底物(如 NADH)、O<sub>2</sub>、ADP 和 P<sub>i</sub>。如以氧的消耗速度作为测定指标,那么,这些因素都将分别对它产生不同的影响,表现为如图 11.14 所示的五种不同的呼吸状态。

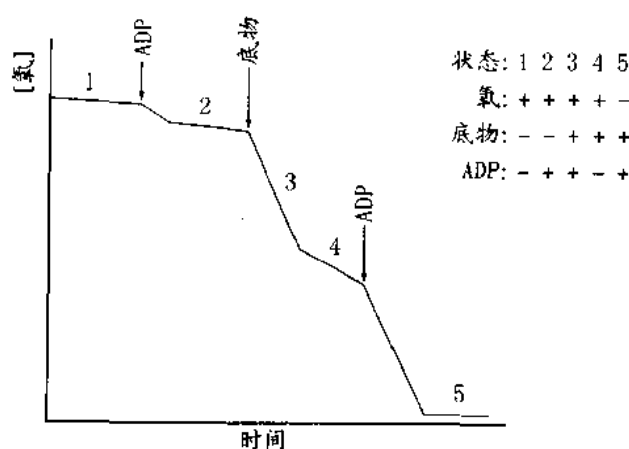


图 11.14 线粒体的五种呼吸状态

在这些因素中,ADP 的影响最为突出,因为其他三种因素的浓度通常不会限制反应的速度。与此相对应的,ADP 在细胞中的浓度却随 ATP 的合成与利用而发生明显的变化,当细胞内 ATP 大量用于做功时,ADP 的水平就会升高;反之,ATP 合成积累时,ADP 的浓度就会下降。因此,ADP 是控制氧化磷酸化的关键底物,它的浓度水平直接决定磷酸化的程度,也明显地控制着氧化。通过 ADP 浓度变化进行的调节通常称为呼吸控制(respiratory control)。

b. 氧化磷酸化与线粒体结构的完整程度相关。破碎的线粒体、线粒体碎片制剂,氧化磷酸化活力都会有不同程度的降低,有的甚至完全丧失;加入某种(些)偶联因子(coupling factor)后,常可部分或全部恢复。

线粒体的完整程度可以呼吸状态 3 和呼吸状态 4,即 ADP 存在时和不存在时的氧耗速度比来衡量,完整的线粒体这个比值可达 10 以上,而损伤的线粒体则可能低到 1 左右。

氧化磷酸化研究的一个重要发现是,将线粒体提取出来的某些成分,例如,磷脂、疏水性膜蛋白、偶联因子(F<sub>1</sub> 和 F<sub>0</sub>),以一定比例(如磷脂酰胆碱:磷脂酰乙醇胺 = 1:3 ~ 4)与某些呼吸复合体,在一定条件下重组时,可以得到具有氧化磷酸化活力的小囊泡结构。其中,偶联因子 F<sub>1</sub> 在电子显微镜下就是线粒体内膜突出的球状头部,是一种对冷不稳定的球状蛋白,由五种亚基组成,具有 ATP 酶的活力,在氧化磷酸化过程中能催化逆反应,即 ATP 合成;

$F_0$  相当于内膜突出的柄,是相对分子质量 18 000 的蛋白质,主要起结构因子的作用(图 11.15)。

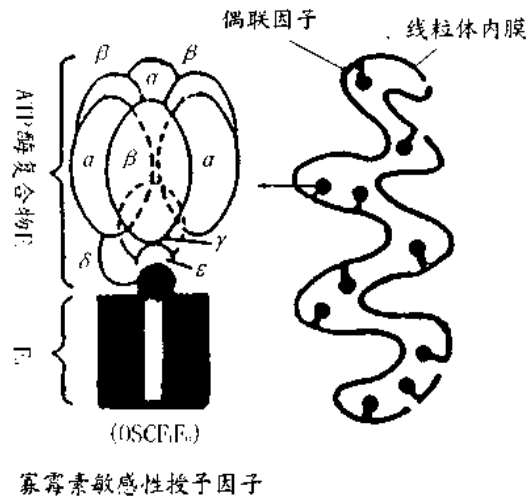


图 11.15 偶联因子  $F_1$  和  $F_0$

c. 解偶联(uncoupling)。正常情况下,氧化和磷酸化是紧密关联、相互制约的,但是,某些因素能切断其间的联系,这种现象称为解偶联。解偶联能使氧化不再受磷酸化控制(图 11.16A)。其结果是氧和底物大量消耗,氧化释放的能量以热的形式散发。在自然界里,解偶联对于冬眠动物、适应寒冷的动物或植物的产热来说,有一定的生理意义。在实验室中,人们已经发现很多化合物具有解偶联作用,称为解偶联剂(uncoupler),其中,最常用的如 2,4-二硝基酚(DNP)、双香豆素(Dicoumarin)等酸性芳香族化合物。

d. 抑制。有两类抑制剂能影响氧化磷酸化的进行。一类为呼吸抑制剂,它们能作用电子传递链的某特定环节,如抗霉素 A(antimycin A)、爱密妥(amobarbital)等属之(参见图 11.12);另一类为氧化磷酸化抑制剂,如寡霉素(oligomycin)、对氯汞苯甲酸(PCMB)等。要区别呼吸抑制剂和氧化磷酸化抑制剂,只需在氧化磷酸化反应系统中分别加入这两类抑制

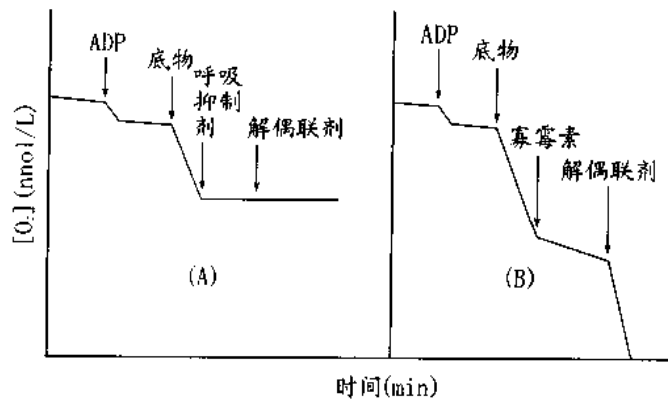


图 11.16 A. 解偶联剂的作用 B. 用解偶联剂判别两类抑制剂

剂,然后再加解偶联剂,如果是氧化磷酸化抑制剂,则引起的氧消耗抑制将被解除(图 11.16A);而呼吸抑制剂却不然,它导致的抑制不受解偶联剂的影响(图 11.16B)。

e. 其他。还有一些性质也有助于氧化磷酸化机制的研究,如:

ATP -  $P_i^*$  和 ATP - ADP $^*$  交换。在线粒体存在的系统中,不论呼吸进行与否,都能进行 ATP 和  $P_i^*$ 、ATP 和 ADP $^*$  中末端  $P_i$  的交换。这种交换反应可被氧化磷酸化抑制剂所抑制,解偶联剂也能降低其交换速度。

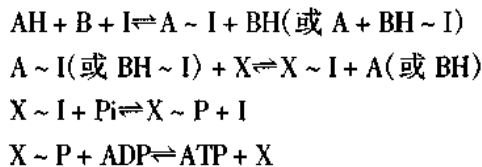
“ATP 跳”。将线粒体与底物及  $P_i^*$  预先保温,然后再加入 ADP,那么随着 ADP 的加入,在反应初期, $P_i^*$  参入 ATP 的速度就将出现一个跳跃,然后才以较慢的恒速进行,在有解偶联剂条件下不出现这种“ATP 跳”。

电子倒流(reverse electron flow)。琥珀酸的  $E_o' = -0.32 V$ ,而  $NAD^+$  的  $E_o' = -0.03 V$ 。但是,在某些情况下琥珀酸能还原  $NAD^+$ ,这种现象称为“电子倒流”;在没有呼吸时不进行电子倒流;但是,如果加入 ATP,这种电子倒流又会发生。

### ③ 氧化磷酸化机制

这是研究的焦点,在生物化学发展过程中曾提出过三种学说。

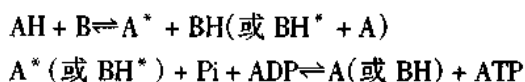
a. 化学(偶联)学说(chemical hypothesis)。该学说可用下述反应式概括:



A、B 为电子传递体;I 和 X 为偶联因子,通过它们,氧化和磷酸化就会偶联起来,I 有抑制性质,因为在形成 A ~ I 后,如果没有其他受体与之进一步反应,A 就不能释放出来,呼吸就要受到抑制,表现为磷酸化控制氧化。

这种学说认为存在着高能的中问络合物如 X ~ I、X ~ P 等,通过它们氧化过程产生的能量最终转移到 ATP。但是,至今未能分离到这类中间络合物,以至于连最初提出该学说的 E. C. Slater 也认为“它几乎可以肯定是不正确的了”。

b. 构型偶联学说。可以下式表示:



化学偶联学说认为电子传递过程中释放的能量是贮存在共价键中,而构型偶联学说则认为这种能量贮存于肽链折叠之中。这种学说认为膜内的大分子电子传递成分具有两种不同的构象,即低能型与高能型构象,电子传递过程中释放的能量能使低能型构象转变为高能型,而逆过程能推动 ADP 磷酸化形成 ATP。

支持这一学说的证据是线粒体的超微结构研究,在通常情况下,线粒体具有守能构象,电子传递能使其向凝聚型构象转变。

这一学说的弱点是不够具体,而且线粒体的构象变化不等于电子传递成分的构象变化,因而也未能得到进一步证实。

c. 化学渗透学说(chemiosmotic hypothesis)

这种学说由 P. Mitchell 在 1961 年提出,现已拥有越来越多的支持。

该学说认为电子传递和 ATP 合成之间的偶联不是通过共价高能中间络合物,也不是通

过高能构象蛋白,而是借助跨膜质子浓度梯度形成的跨膜电位。其基本点是:它认为,电子传递链成分在线粒体内膜中的不对称分布是质子定向跨膜转移的必要条件,通过专一性抗体结合、外源凝集素结合、蛋白酶断裂以及不能透过膜的试剂标记,分别对完整线粒体和超声波处理过的亚线粒体颗粒进行试验,结果都表明电子传递体在内膜上的分布排列确实符合这一规律(图 11.17)。

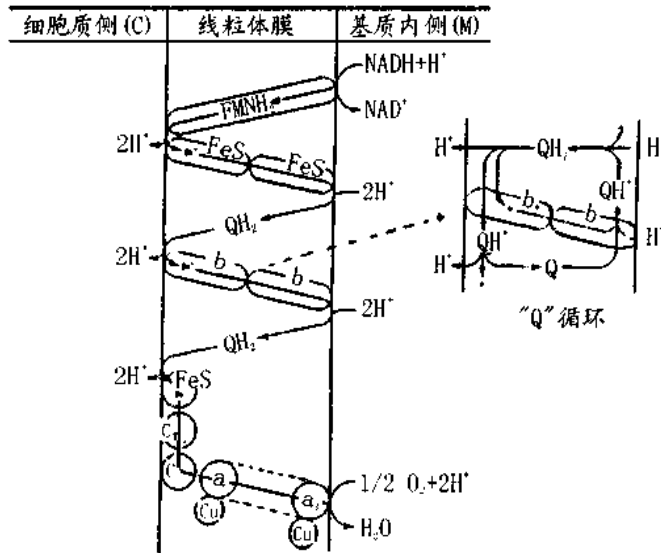


图 11.17 电子传递体在线粒体内膜中的分布

在电子进行传递过程中,电子传递链复合体起着质子泵的作用,它们能将 H<sup>+</sup> 从线粒体内膜的基质侧定向地泵至内外膜间空间。

化学渗透学说认为线粒体内膜应是质子不透性的,这样才能在电子传递过程中在内膜两侧建立起质子浓度梯度,形成膜电位,形成推动 ATP 形成的原动力(图 11.18)。

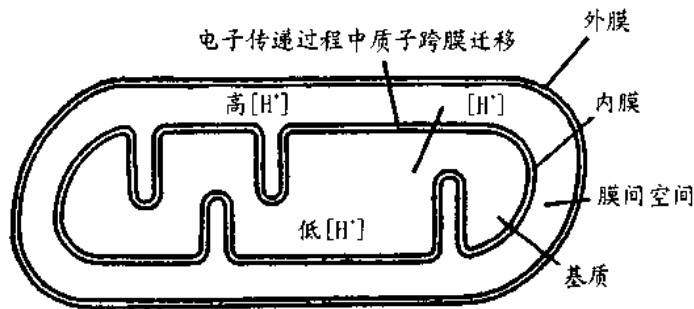


图 11.18 线粒体内膜两侧质子浓度梯度的形成

化学渗透学说一个极为重要的特点就是它包含膜的概念,要维持电子传递过程形成的电势,就要求膜具有质子不透性,能够阻止质子跨膜回渗。就是说,应形成相对封闭的系统。这些现在都已得到证实,并表明解偶联剂(例如 DNP)的作用就在于它能破坏膜的这种透性壁垒。其中最有力的证据可能是重组实验,例如,有人用提纯了的细胞色素 c、细

胞色素氧化酶、磷脂、内膜疏水蛋白质以及偶联因子  $F_0$ 、 $F_1$  等放在一起重组,结果获得了小囊泡结构。和亚线粒体颗粒相似,它是一种内翻外的小泡(inside-out vesicle),也有球状头部和短柄(参见图 11.11)。但是,最初得到的这种小囊泡结构只能催化细胞色素 c 氧化,而不能偶联生成 ATP。以后发现这是因为小囊泡上的酶没有各向异性的分布,小囊泡内外都有细胞色素 c,因此,不能形成跨膜的质子梯度。如果设法预先抽掉小囊泡外的细胞色素 c,并采用能穿过小囊泡膜的还原型吩嗪二甲硫酸酯(PNS)还原泡内的细胞色素 c,这样由于能产生跨膜的质子浓度梯度,因而也就能合成 ATP。说明封闭的不能透过质子的膜结构是氧化磷酸化得以进行的结构基础。

已经测定,伴随电子传递大约能产生 1.4 个单位的跨膜 PH 梯度,相当于 0.14 V 的膜电位( $\Delta\psi$ ),根据下式就可算出电势,或者说质子推动力(proton motive force, pmf) $\Delta P$ :

$$\Delta P = \Delta\psi - 2.3 RT \Delta \text{pH}/F$$

$F$  为法拉第常数。根据电势可算出,伴随每对电子转移,复合物 I、III、IV 都能分别产生 1 分子 ATP,这与实际测定的结果一致。

如果说,推动 ATP 形成的原动力是线粒体内膜的跨膜电位,那么,利用这种原动力直接形成 ATP 的则是线粒体 ATP 酶复合体。它就是内膜表面向基质空间突出的球状头部,这种酶一方面能够利用 ATP 水解的能量将质子泵出内膜;另一方面,如果存在着足够高的质子浓度梯度,强大的质子流也能从相反方向穿过 ATP 酶复合体,推动 ATP 的合成(图 11.19)

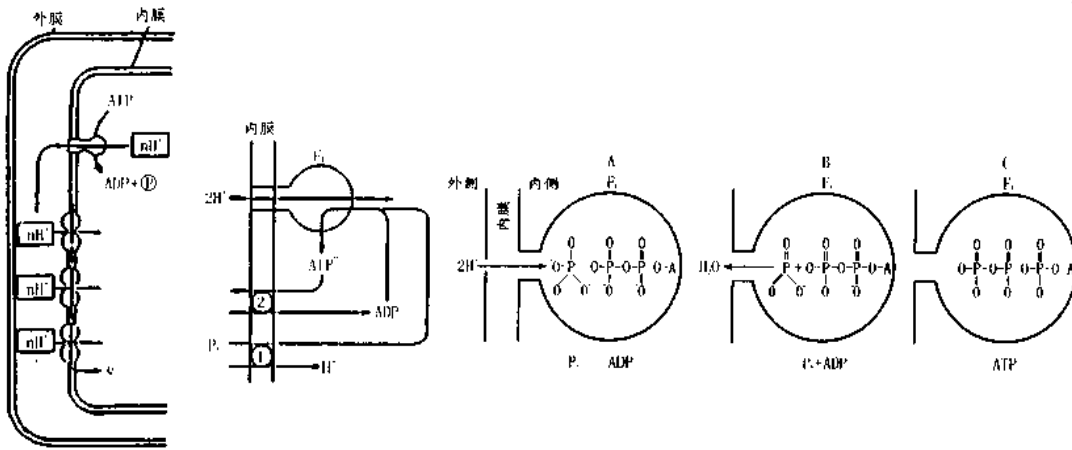


图 11.19 质子流穿过球状头部合成 ATP

关于 ATP 合成酶催化 ATP 合成的证据。实验表明,在一个即使没有电子传递的系统中,如果人为地给线粒体或叶绿体添加一定的 pH 梯度,那么,也能观察到 ATP 的合成。图 11.20 就是用类囊体膜(相当于线粒体内膜)进行的实验示意图。

氧化磷酸化是物质分解代谢的最后步骤,在物质的氧化过程中产生的能量除去一部分以热的形式散发外,其余大部分是通过氧化磷酸化以 ATP 形式贮存下来的。氧化磷酸化的机制现在普遍接受的是化学渗透学说,该学说认为在线粒体中进行的生物氧化导致了内膜两侧质子跨膜电势梯度的形成,这种质子梯度转而推动 ATP 合成酶催化 ADP 的磷酸化。形成的 ATP 再提供机体各种生命活动,也包括核酸和蛋白质复制合成的需要。

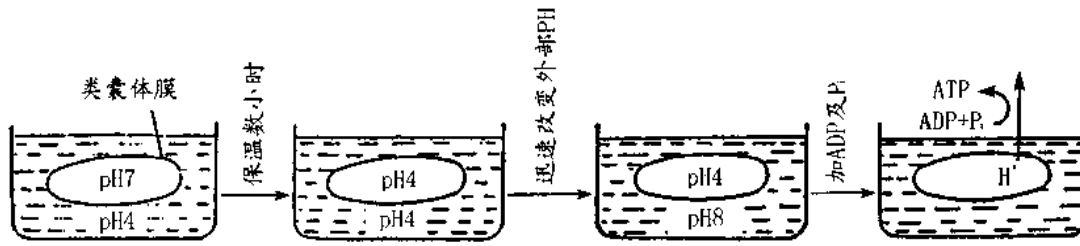


图 11.20 质子梯度促成 ATP 合成

## 2. 核酸、蛋白质的复制合成

核酸和蛋白质是生命体系最基本的物质。其中 DNA 是生物遗传变异的物质基础,生物的遗传特性以特定的核苷酸序列作为密码编码于 DNA 分子中。DNA 一方面通过复制将上述特性传给子代;另一方面通过转录转变为 RNA,再通过翻译表达为特定的蛋白质,然后通过它们表现各种生物特性,实现各种生命活动机能。因此,核酸和蛋白质的复制、转录和翻译对整个生物界而言,是一种非常重要而又普遍存在的代谢系统。它们有着基本的共同点,但对于不同生物来说也有各自的一些特点。

### (1) DNA 的复制合成(DNA replication)

在 50 年代后期,就已证明 DNA 的复制是以半保留方式进行的,在复制过程中,DNA 首先必须解链,然后再分别以解开的双链作为模板,按碱基配对原则合成两条互补的新链。这样,在新合成的 DNA 中就有一条来自原来的 DNA,另一条则是新合成的。图 11.21 示 DNA 以半保留方式进行复制。

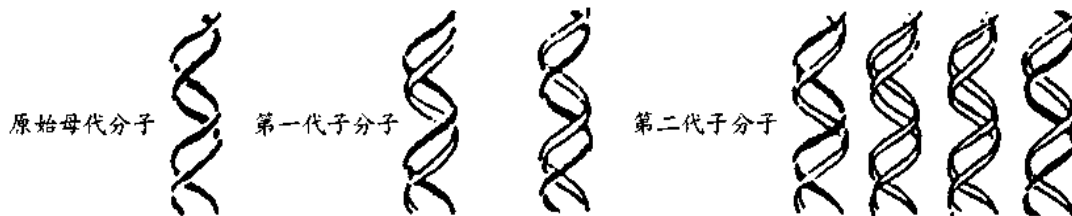


图 11.21 DNA 的半保留复制示意图

到了 60 年代,通过放射自显影方法进一步表明,在 DNA 复制过程中,DNA 的双链是逐步解开的,以“Y”的形式逐步推进,这种结构称为 DNA 复制叉(图 11.22)。以后又表明,在复制叉内,复制是以不对称的方式进行的。

DNA 复制合成是一个复杂过程,包含多种蛋白质和酶的协同作用。

① 拓扑异构酶(topoisomerase)。DNA 是由核苷酸配对组成的双螺旋结构,双螺旋再进一步盘绕组成超螺旋(通常为负超螺旋)或更高级结构,因此,在 DNA 进行复制时,首先要将螺旋解开,但是在解开螺旋的同时就必然会在复制叉前产生正超螺旋,这样就会产生一种应力,这种应力如不以某种方式使之释放,就将阻碍复制的前进。释放应力有两种可取的方式,一是让应力一直传至超螺旋末端,即让整个 DNA 分子绕它的主轴进行旋转(每解开 10 对核苷酸旋转一次),如果,复制叉每秒钟推进 500 个核苷酸对,那么,DNA 分子就必须每秒钟旋转 50 次;就大肠杆菌的复制速度而言,每分钟就要旋转 18 000 次左右,这就需要消耗大



量自由能;而且,环状分子根本不能采用这种方式。另一种方式则是在 DNA 分子中作一切口,使链可以自由转动,使超螺旋变为松弛状态(图 11.23)。担负这一工作的为拓扑异构酶,这类酶不仅能解决复制前进时遇到的困难,而且也可折开复制好的两组 DNA 间的拓扑键,使它们不至于紧紧地缠在一起,因此,它们是复制中、转录中一种极为重要的酶。

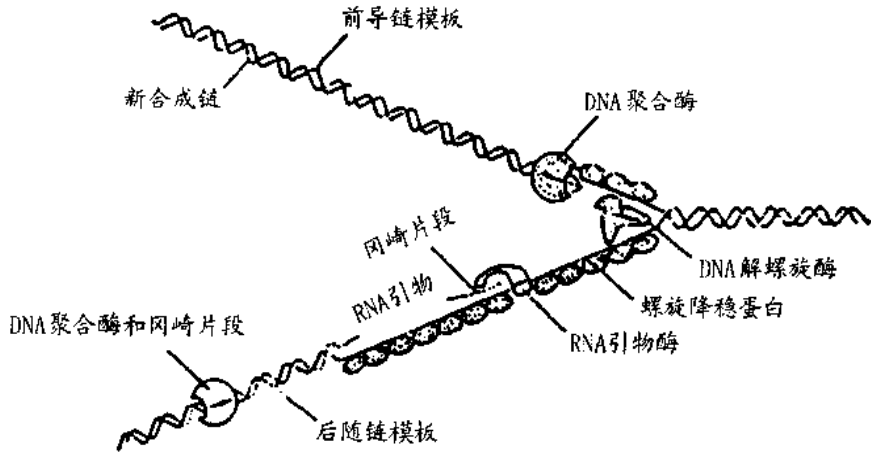


图 11.22 DNA 的不对称复制示意图

拓扑异构酶可以看作是一类催化 DNA 分子内磷酸二酯键可逆地断裂与重接的核酸酶,其作用是使线性的或环状的、单链的或双链的 DNA 分子进行拓扑变换,例如,超螺旋和松弛态间的变换,而不改变其化学组成与结构,因此,它们催化的反应很难用一般的化学方程表示。拓扑异构酶根据其作用方式分为 I 型和 II 型。

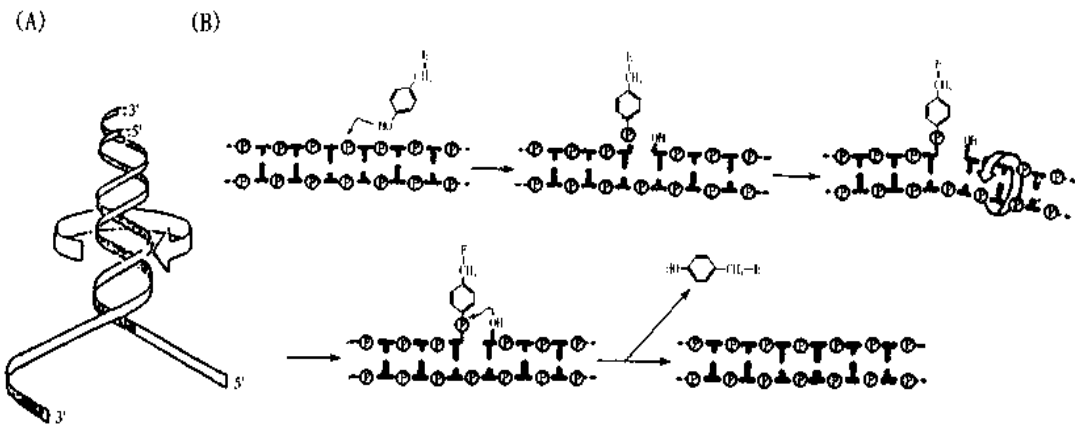


图 11.23 DNA 超螺旋应力释放方式

(A) 整个 DNA 分子绕主轴旋转

(B) 通过拓扑异构酶(I 型拓扑异构酶)的作用

I 型拓扑异构酶。该酶进行催化时,酶活性中心的酪氨酸残基先作用 DNA 双链中的一链,断裂其磷酸二酯键,并和其磷酸基形成共价结合;然后, DNA 双链在切口两端彼此相对

旋转,释放积累的超螺旋扭曲;接着再重新形成磷酸二酯键,完成其拓扑异构化过程。这种酶反应不需要 ATP,磷酸二酯键断裂过程的能量贮存于酪氨酸-磷酸酯键中,然后再回用于重新形成磷酸二酯键。I 型拓扑异构酶的意义尚不十分清楚,因为,已知缺失该酶基因的大肠杆菌也能正常生长。

II 型拓扑异构酶。和 I 型不同,它能瞬时地断裂 DNA 的双链,让另一双链 DNA 穿过断口,然后重封断口,因此,对双链 DNA 的联环和解环、打结和解结都十分有效。此外,它也能在复制后阻止 DNA 间的缠绕方面发挥突出的作用。这类酶对 DNA 序列有很高的专一性,和许多 II 型限制性内切核酸酶一样,它以“错切”方式断裂 DNA 链,其间相隔四个核苷酸。II 型拓扑异构酶也广泛存在于各种生物中,文献中常用的名称有 DNA 旋转酶(DNA gyrase)、紧旋拓扑异构酶(twisting topoisomerase)等。

② DNA 解螺旋酶和 DNA 单链结合蛋白。DNA 由于具有双螺旋结构,因此在进行复制时,必须预先将复制叉前的双股螺旋解开,提供暴露的 DNA 模板链,以便相应的脱氧核苷三磷酸能够进入链中进行配对反应,担负这一任务的有两种蛋白(图 11.24)。

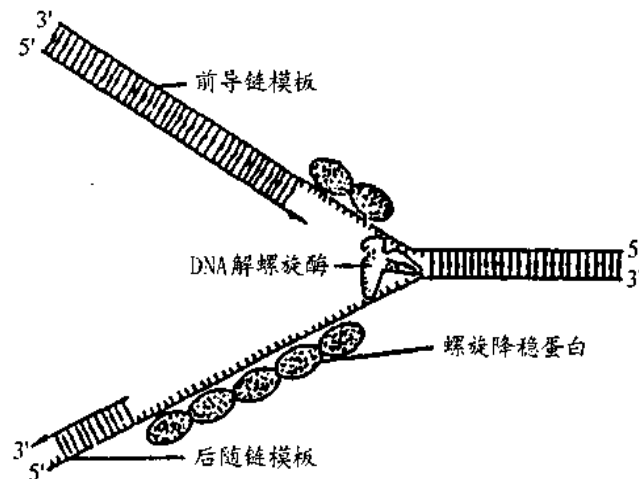


图 11.24 与 DNA 解链有关蛋白质

DNA 解螺旋酶(DNA helicase),又称为解链蛋白(unwinding protein),它实际上是一种依赖于 DNA 的 ATP 酶,能够利用 ATP 水解的能量解开 DNA 双链,一般每解开一对碱基消耗 1~2 摩尔 ATP。

近年来,在真核细胞中已分离到多种 DNA 解螺旋酶,可分为两种类型:其一主要来源于营养体细胞,例如,人体(培养)细胞,它除了解链活性外,还有升高  $\alpha$ -DNA 聚合酶活性的特点;另一种主要来源于减数分裂细胞,它不具激活聚合酶的能力,其 ATP 酶活性(解链活性)随减数分裂期的推进而表现增长的趋势。

DNA 单链结合蛋白(Single strand binding protein, SSBP),也称螺旋降稳蛋白(helix destabilizing protein)。它和单链 DNA 有强的结合力,特别是来源于原核细胞的蛋白,它们和单链 DNA 的结合还表现正协同性,倾向于扩大结合范围,协助解开螺旋,使单链伸展。这种结合表现出来的“侵蚀”作用,能最终使 DNA 融点降低。例如,最初发现的单链结合蛋白,  $T_4$  噬菌体基因 32 编码的蛋白,能使双链 DNA 在远低于  $T_m$  的温度下解开,因此,又称融化蛋白。

DNA 结合蛋白还有另外一个十分重要的特点,就是它们能专一地激活同源的 DNA 聚合酶。例如,大肠杆菌来源的 DNA 结合蛋白 I 能激活 DNA 聚合酶 III;小牛胸腺来源的 DNA 结合蛋白 UPI 能激活 DNA 聚合酶  $\alpha$ 。

DNA 结合蛋白的主要功能是协同解链酶解开 DNA 双链,以便进行复制;另一可能的功能是在复制过程中保护单链部分不致被核酸酶作用而降解。

③ DNA 聚合酶。在 DNA 复制过程中,DNA 聚合酶起着极其重要的作用。

DNA 聚合酶已在各种生物中发现,其中细菌的、特别是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I、II、III 研究得较为清楚。表 11.10 列举了这三种 DNA 聚合酶的有关特点。

表 11.10 大肠杆菌中三种 DNA 聚合酶的特点

特 点	DNA 聚合酶 I	DNA 聚合酶 II	DNA 聚合酶 III
功能:5'→3'聚合	+	+	+
3'→5'外切	+	+	+
5'→3'外切	+	-	+
模板-引物:			
完整双链	-	-	-
带有引物的单链	+	-	-
带有缺口的双链或 5'端突出的单链			
单链长 < 100 核苷酸	+	+	+
单链长 > 100 核苷酸	+	-	-
相对分子质量	109 000	120 000	140 000
分子数/菌体	400		10~12

在真核细胞中,已知有四种类型的 DNA 聚合酶:DNA 聚合酶  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和线粒体 DNA 聚合酶。它们的催化方式与活性要求和原核细胞者大致相同。其中 DNA 聚合酶  $\alpha$  可能是复制的关键酶,是真核细胞中最主要的 DNA 聚合酶,占其总量的 80%~90%,活性最高,且随细胞的生长周期平行变化,从 G 期开始升高,S 期达到高峰,以后逐渐下降。该酶的相对分子质量约 300 000,由 4~5 种亚基组成,最适的底物为带缺口的双链 DNA。聚合酶  $\beta$ ,分子较小,单链,相对分子质量约 45 000,可用 DNase I 处理过的 DNA 为模板,也可以人工合成的多聚脱氧核苷酸为模板,此酶在细胞中的活力水平较为稳定,不随细胞生长周期而变化,估计它的主要功能是修复。DNA 聚合酶  $\gamma$  是一种较奇特的酶,它虽然可用缺口 DNA 为模板,却也能利用多聚核苷酸为模板,并要求有脱氧核苷酸链作为引物。例如,poly A:oligo dT<sub>8-10</sub>,即多聚 A:寡聚 dT<sub>8-10</sub>,活力很高,颇像反向转录酶,但它不能以天然 RNA 为模板。它在细胞分裂期,活力水平明显改变,而且先于 DNA 聚合酶  $\alpha$  达到高峰,因此推测它可能在复制起动中起重要作用。在线粒体中,DNA 聚合酶属  $\gamma$  类型,在性质上和细胞核者略有差别。值得指出的是,真核细胞来源的 DNA 聚合酶和原核细胞者有一点显著不同,即都不具有外切核酸酶活性。因此,可以推测,在复制校正上真核细胞必然还有其他有关酶。表 11.11 是真核细胞 DNA 聚合酶的某些性质。

④ DNA 连接酶(DNA ligase)。DNA 连接酶对 DNA 复制和修复都非常重要,实验表明,在该酶缺失的大肠杆菌中出现冈崎片段累积,而且对紫外光特别敏感。它的作用是催化 DNA 链中相邻的 5'-磷酸与 3'-OH 末端或切刻(nick)连接形成磷酸二酯键。研究得较多的有两种:大肠杆菌 DNA 连接酶和 T<sub>4</sub> 诱导的大肠杆菌 DNA 连接酶。前者要求 DNA 提供能

量,而且只能催化 DNA 与 DNA、DNA 与 RNA 之间的交错切刻(或粘性末端)连接,不能催化平头双链 DNA 连接;后者则不同,它不仅能利用 ATP 的能量连接 DNA - DNA、DNA - RNA 与 RNA - RNA 之间的交错切刻,也能连接平头双链 DNA。动物细胞来源的 DNA 连接酶属后一类型。

表 11.11 几种真核细胞 DNA 聚合酶

DNA 聚合酶	来源	细胞中位置	相对分子质量 ( $\times 10^3$ )	亚基 ( $\times 10^3$ )	抑制剂
$\alpha$	KB 细胞	核, 细胞浆	156	76, 66	Aphidicolin, N-乙基丙亚胺, 阿糖 - ATP
$\beta$	肝癌	核	31		二脱氧核苷三磷酸, 碘乙酸
$\gamma$	鸡胚	核, 线粒体	180	47	二脱氧核苷三磷酸, N-乙基丙亚胺
疱疹病毒诱导	感染的 Hela 细胞	核	144	74, 29	乙酰磷酸, 阿糖 - ATP, N-乙基丙亚胺
牛痘诱导	同上	细胞浆	115		乙酰磷酸, N-乙基丙亚胺

在 DNA 复制合成有关的酶中,值得提到的还有引物酶(primase),它实际上是一种 RNA 聚合酶,能催化在 DNA 模板上直接合成 RNA 链。在原核细胞中,这种引物链长约 50 ~ 100 个核苷酸;在真核细胞中,约 10 个核苷酸,但都位于 DNA 链的 5' - 末端。引物酶通常总和其他一些蛋白,如 DNA 解链酶等组成复合体,称为引物体(primasome),参与 DNA 的复制。不同来源的引物酶在某些性质上一般有所不同,例如,对利福平(rifampicin)的抑制敏感性就有差别,噬菌体 M13 来源者能被利福平抑制,因而 DNA 复制启动受阻,而大肠杆菌来源者则否。

⑤ 反向转录酶。在 DNA 的复制合成中,最后值得提到的是以 RNA 为模板的反向转录酶,它能以 RNA 为模板进行 DNA 的合成。这是 RNA 病毒的一种复制方式。病毒有 DNA 病

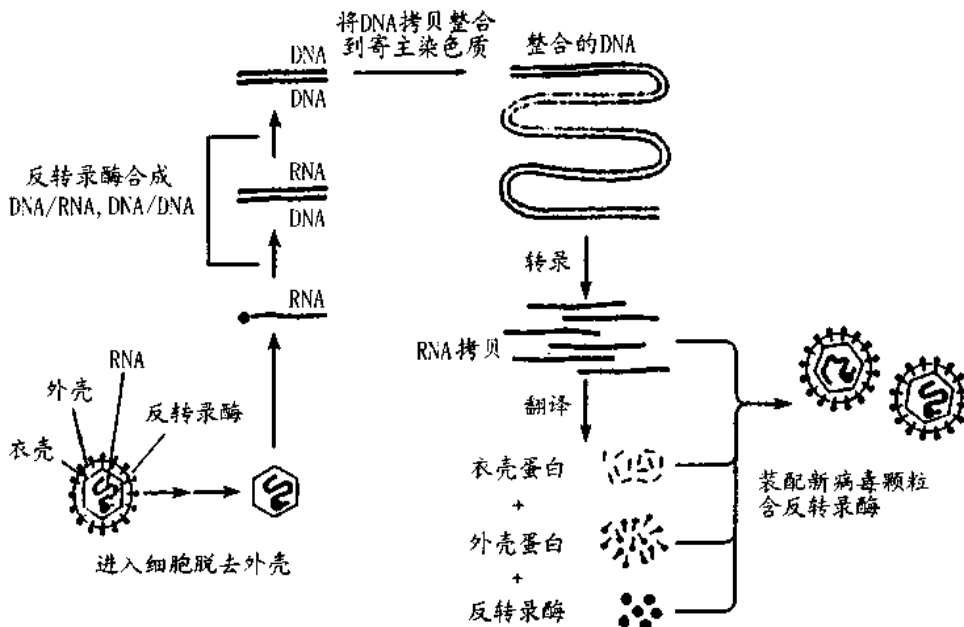


图 11.25 反向转录酶与病毒增殖

毒和 RNA 病毒,植物病毒大多属 RNA 型,如 TMV;动物病毒、噬菌体等则两者都有,例如,多瘤病毒、T 偶噬菌体属于 DNA 型;而小儿麻痹病毒及某些致癌病毒则属于 RNA 型。RNA 病毒复制有两种方式。一是 RNA $\rightarrow$ RNA;一是反向转录:RNA $\rightarrow$ DNA,其全过程实际上是 RNA $\rightarrow$ RNA·DNA $\rightarrow$ DNA。催化后一反应的就是依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶,又称反向转录酶(reverse transcriptase),此酶包含于反转病毒(retrovirus)的病毒粒子中。反向转录反应也受放线菌素 D 所抑制。反向转录酶的生物学作用是以病毒 RNA 为模板合成 DNA,而后 DNA 再环化、整合到寄主基因组中作为前病毒(provirus)存在下来,最后在寄主的表达系统催化下转录、翻译形成新的病毒,或者导致病毒增殖(图 11.25),或者导致癌变。值得指出的是,反向转录酶不仅可在几乎所有的致癌 RNA 病毒中找到,也已在某些正常细胞,特别是胚胎等正在分裂的细胞中发现。

## (2) RNA 的转录合成(transcription)

由于在真核生物中转录的原始产物往往是不表现功能的 RNA 分子,所以,必须经过转录后加工才能得到成熟的、有功能的 RNA 分子,因此,就“转录”这一过程而言,实际上应包括转录合成与转录后加工两个环节。

① 转录合成。这是指以 DNA 为模板,根据碱基配对原则,通过 DNA 指导的 RNA 聚合酶(DNA directed RNA polymerase,DDRP)催化的 RNA 合成过程。在这个过程中,编码于 DNA 核苷酸序列中的信息被转录为 RNA 的核苷酸序列。和 DNA 复制不同,转录以完整的 DNA 双链为模板、以全保留的方式进行;转录后的 DNA 仍保持双链结构,虽然在转录过程中 DNA 双链可能发生局部、短暂的解开,但是,似乎没有解链酶系统参加。而且,在体外,转录能在 DNA 两条链上同时进行;在体内,仅有 1%左右的 DNA 核苷酸序列被转录为 RNA;在某一时间内,DNA 两条链中只有包含某特定基因的链用于转录,这条链就称为意义链,另一链则称为反意义链。在多基因的 DNA 双链中,各基因并不总集中在同一链上,即在一条链中既包含某些基因的有意义链部分,也包含另一些基因的反意义链部分,因此可以想象,在转录过程中必然具有识别转录起始位点的机制。实际上催化转录的 RNA 聚合酶就包含这种识别机制。

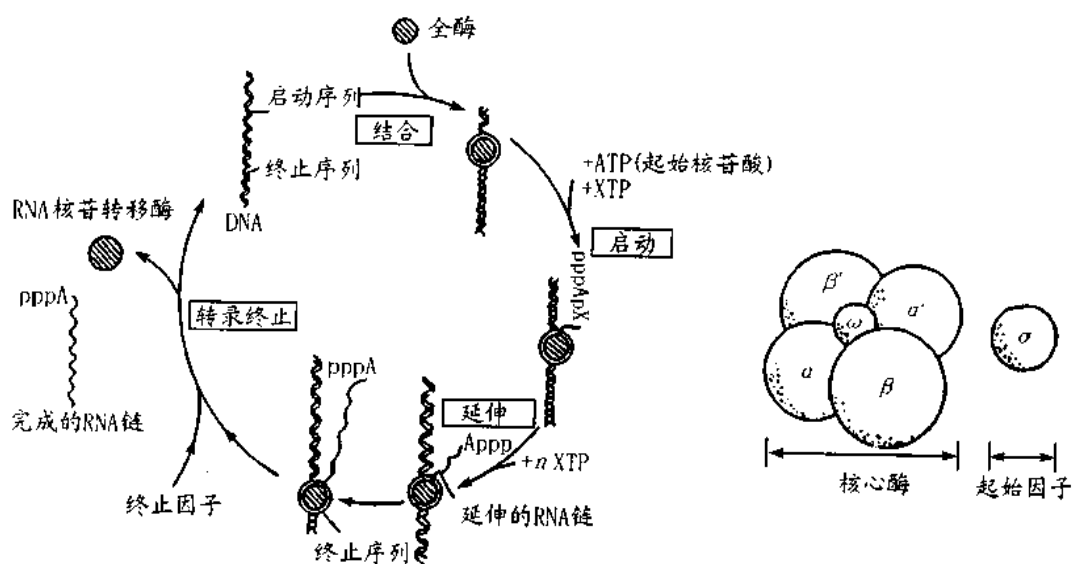
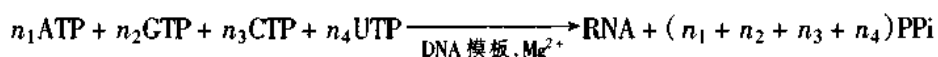


图 11.26 RNA 聚合酶结构及转录示意图

RNA 聚合酶是一种核苷酸转移酶,催化:



其中  $n_1 \cdots n_4$  由模板决定。在已知的 RNA 聚合酶中,大肠杆菌来源者研究得最早,并经高度纯化和充分检定。该酶的相对分子质量约 500 000,由五种亚基组成,全酶为(holoenzyme) $\alpha_2\beta\beta'\sigma\omega$ 。其中, $\sigma$ 称为起始因子,能识别 DNA 分子上转录合成 RNA 的起始信号。通过各种方法,例如,通过磷酸纤维素柱层析,除去  $\sigma$  因子后的酶称为核心酶(core enzyme),它虽仍然具有催化转录的活性,但是,如果说全酶只能从 DNA 特定的启动子位点引发 RNA 的合成,那么核心酶则可在 DNA 两条链的任何位点开始随机转录(图 11.26)。

表 11.12 列举了该酶各亚基的某些特点和功能

表 11.12 大肠杆菌 RNA 聚合酶各亚基主要特点

亚基	相对分子质量	比例	功 能
$\alpha$	40 000	2	和 $\beta$ 结合参与酶和 DNA 启动区的反应,参与特定基因表达
$\beta$	150 000	1	和底物结合,参与 RNA 链引发、延伸,催化磷酸二酯键形成
$\beta'$	160 000	1	参与酶和模板结合,也和核心酶与 $\sigma$ 结合及转录终止有关
$\sigma$	86 000	1	识别起始信号
$\omega$	9 000	1	未知

转录全过程实际可分为三步:起始、延伸和终止。图 11.27 为转录过程示意图。

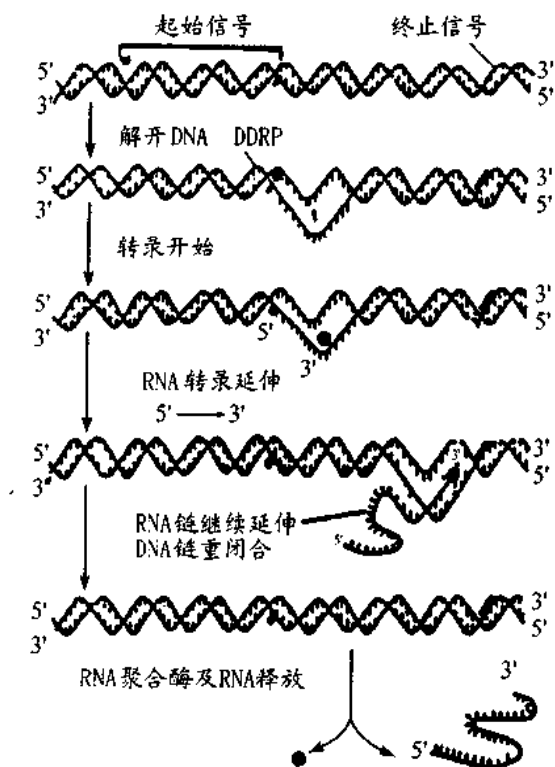
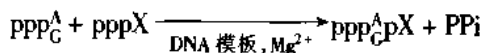


图 11.27 转录过程示意图

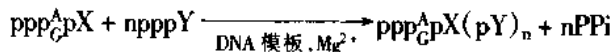
首先,是转录的起始(initiation)。已知 RNA 聚合酶的核心酶能与 DNA 结合,并对所有双螺旋区都具有大致相同的亲和力,在底物、 $Mg^{2+}$  存在的条件下能催化 RNA 的合成。但是,由于没有固定的引发起始点,同时也不固定以哪一条 DNA 链为模板,所以得到的产物通常不均一;另一方面,核心酶如果和  $\sigma$  结合后, $\sigma$  就能引起酶的构象改变,使酶与转录起始位点(启动子)结合力大大增强,同时显著地削弱核心酶和其他双螺旋区的亲和能力。如果以解离常数表示核心酶与一般 DNA 和全酶与一般 DNA 之间的相互作用力,那么,它们分别为  $0.5 \times 10^{-11}$  mol/L 和  $10^{-7}$  mol/L。这就是说,全酶与一般 DNA 的结合能力低于核心酶;但是,全酶与 DNA 特定的启动子区的结合却特别紧密,解离常数达  $10^{-14}$  mol/L,即  $\sigma$  能专一地升高核心酶和特定的启动子的结合能力约  $10^3$  倍。由于全酶能专一地和 DNA 的启动子区紧密结合,因此,可以通过硝酸纤维素滤膜将全酶和启动子区的络合物分离出来,然后再在 DNase 的水解处理下获得全酶保护下的 DNA 片段。现在已知该片段(即启动子区)包括 41 ~ 44 个碱基对。比较不同来源的这一段表明,它们都有一 6 ~ 7 个核苷酸组成的同源区 TATAAT,称为“Pribnow Box”,其中心大约位于 mRNA 转录起始序列 5' - 端上游 10 个核苷酸的位置。以后又发现,除了这一段外,还有一个为酶识别启动子所必需的序列片段 TTGACA,其中心位于 -35 的位置。以后,在真核基因中也发现了类似的序列,不过,它们的位置分别位于大约 -30 和 -70 处。

启动子实际上还可分为三个部分:一是起始信号区;二是酶的紧密结合区;三是 RNA 转录引发点。根据现有的认识,转录的起始可能是:全酶先与 DNA 结合形成不稳定的络合物,酶再沿着 DNA 滑动,识别起始信号,并滑向酶的紧密结合区,由于该区富含 AT 顺序,因而酶易于在该区使 DNA 双链作有限的、瞬时的解开;然后酶再进一步滑向引发点,引入第一个核苷三磷酸 pppG 或 pppA,并开始进行转录。有人做过估计,全酶在转录起始序列的定位精确度约  $\pm 1$  个核苷酸。现在知道,阻遏蛋白的作用就在于阻遏“解开的”启动子络合物形成;利福霉素(rifamycin)的阻遏作用在于它能和酶的  $\beta$  亚基结合,其结果也是导致转录起始的抑制。

接下来第二步是 RNA 的延伸(elongation),这是 RNA 聚合酶催化的没有引物参加的 RNA 全新合成。转录开始后,按配对原则进入转录系统的第二个核苷三磷酸在全酶催化下与第一个核苷三磷酸结合形成第一个 3'→5'的磷酸二酯键:



与此同时, $\sigma$  开始从核心酶上解离下来,并与另一核心酶结合,参与下一轮转录。另一方面,随着  $\sigma$  的解离,核心酶的  $\beta'$  构象发生改变,酶与 DNA 的结合因之松弛,并失去结合的专一性,酶易于滑动,从而,转录进入延伸阶段:



有人估计延伸的速度在大肠杆菌中为 20 ~ 50 个核苷酸/秒,误差根据条件的不同而变动于 1/42 000 ~ 1/2 400。利链霉素(streptolydigin)能和  $\beta$  结合,改变其构象,因之,抑制转录延伸;放线菌素 D 也能抑制延伸,但它是作为 DNA 的嵌合剂在 G-C 碱基对处阻止 RNA 的进一步合成。

第三步是转录的终止(termination),在 DNA 分子中有转录终止的核苷酸信号序列,它们中有的能被 RNA 聚合酶自身识别,有的则同时需要另一蛋白质因子  $\rho$  参与。根据转录得到

RNA的3'-端顺序测定表明,在不依赖于 $\rho$ 因子终止的RNA中,其3'-末端多带有一串UUU...A(A),而它的上端为富含GC的区域,如:

ACGGUUUCCGGGAUUUUUUA - 3' - OH

UGCCGCCGGGGUUUUUUA - 3' - OH

至于依赖于 $\rho$ 因子终止的RNA 3'-末端,则既无U,也无GC。根据DNA在转录终止区的结构测定表明,所有终止点附近都有一个回文结构(形成所谓Gierer结构),这种回文结构可转录形成茎环结构的RNA。对于不依赖于 $\rho$ 因子终止的RNA聚合酶来说,茎环结构一方面有阻碍酶移动的作用,另一方面也可引起酶从“延伸”构象转变为“终止”构象,使生成的RNA与酶从模板上脱落下来;而对于依赖于 $\rho$ 因子的聚合酶,茎环结构仅能使酶的移动暂停,只有在 $\rho$ 因子与之反应后,才能使新生的RNA链释放出来。 $\rho$ 因子是一种相对分子质量约30万、由6个相同亚基组成的蛋白质,具有两种活性,一是识别终止点( $\rho$ 位点),终止转录;二是ATP酶的活性,该活性依赖于它与RNA的结合。一般认为:转录开始后, $\rho$ 因子附着于新生的RNA链上,同时利用水解核苷三磷酸的能量沿5'→3'方向移向RNA聚合酶,当转录到达终止点时,就和暂停的RNA聚合酶接触、反应,并促使RNA释放。

由此可见,转录合成过程需要三种蛋白质(酶)参与:起始要求全酶、延伸要求核心酶,终止要求 $\rho$ 因子。值得提到的是,许多噬菌体来源的RNA聚合酶是分子较小的单链蛋白,而且对自己的启动子有高度的识别专一性。

在真核细胞中基因的转录在原理上和原核细胞者相同,但是,转录机器远为复杂。首先,RNA聚合酶在真核细胞中有三种,分别催化不同类型的RNA转录合成;其次,酶的组成也较复杂,如果说原核生物的聚合酶由5个亚基组成,那么,真核生物者就可能包含9~11个亚基;第三,在真核生物中,转录需较多的辅助因子参与。

RNA转录合成的调节有多种因素参与,就真核生物而言,还可能和DNA的甲基化与染色质的结构状态有关。

RNA转录合成的研究中通常要用到一些专一性的抑制剂,它们可大体分为两种类型:一类是通过与DNA模板结合而发挥作用的,如放线菌素D(actinomycin D)、纺锤菌素、吡啶、溴乙锭以及黄曲霉素等。其中,放线菌素D最常用,它的作用方式是插入DNA双链的dG与dG对之间,通过氢键或静电键结合于DNA,在低浓度时阻止延伸,在高浓度时也抑制转录起始。另一类是通过作用于RNA聚合酶而表现抑制的,如利福平、利链菌素、 $\alpha$ -鹅膏蕈碱(a manitine)。其中,利福平对付细菌RNA聚合酶是极有效的抑制剂, $K_i \approx 10^{-3}$  mol/L,但对真核生物的RNA聚合酶作用很小;反之, $\alpha$ -鹅膏蕈素是真核细胞RNA聚合酶,特别是RNA聚合酶II的强力抑制剂,而对细菌、线粒体与叶绿体RNA聚合酶的作用很小。此外,值得提到的是,线粒体RNA聚合酶(如粗糙链孢霉来源者)一般分子较小,是单肽链蛋白,对利福霉素十分敏感。

② 转录后加工。转录合成的最初产物是RNA前体,它们一般需要经过转录后加工才能成为成熟的、有功能的RNA。转录后加工可以概括五种类型: i. 长的多顺反子转录初产物通过内切核酸酶水解; ii. 转录产物的核苷修饰,主要是tRNA,也有部分rRNA采取这种方式; iii. 在转录产物的3'-末端添加核苷酸; iv. 在转录产物的5'-末端添加核苷酸; v. 剪接,即从转录产物的内部切除插入序列。在这五种加工方式中,在原核生物中仅发现前两种,而在真核细胞内上述五种加工方式都可观察到。



a. rRNA 前体加工包括两种类型:一是裁剪(trimming),即将前体裁剪成一定长度的成熟 rRNA。参与这项工作的主要是一些核酸酶,例如,大肠杆菌 30 S rRNA 的转录后加工,这种加工可分为两个阶段:首先是 RNase III 和 RNase E 的作用,形成 16 S rRNA 前体、23 S RNA 前体、7 S RNA 前体和 tRNA 前体;然后是 RNase M 的作用,使第一阶段产物形成成熟的 16 S、23 S 和 5 S RNA(图 11.28)。在真核细胞中 rRNA 前体的加工也类似;其中还包括插入序列的除去,例如,四膜虫 28 S rRNA 前体中存在着插入顺序(intervening sequence, IVS),除去这段 IVS 的加工,称为剪接(splicing),现在已知是通过 RNA,即 Ribozyme 催化完成的。二是修饰,主要是核糖 2' 位的甲基化及某些碱基修饰,但参与这种修饰的酶目前了解得很少。

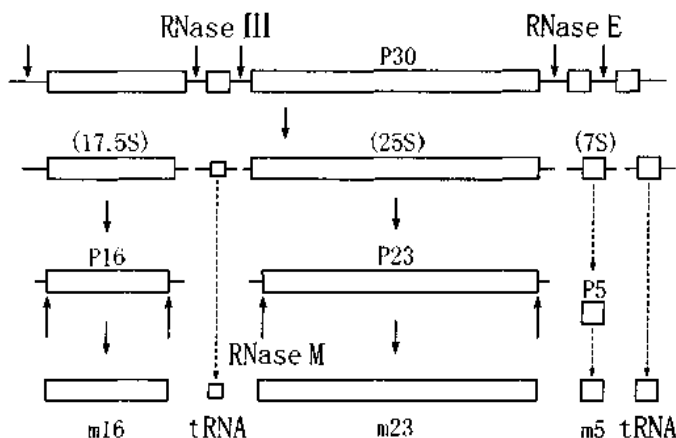
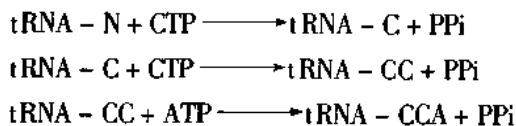


图 11.28 大肠杆菌 rRNA 前体的转录后加工

b. tRNA 前体的转录后加工成熟包括三种类型的反应:一是剪切、修剪(clipping)和剪接。这种后加工也包括多种核酸酶的参与,其中, RNase P 的作用是催化 tRNA 前体水解产生一个成熟的 tRNA 5' - 端,此酶包含有 70% 的 RNA,深入研究表明担负其催化作用的也是 RNA;催化 tRNA 前体 3' - 端成熟的是 RNase F,它是一种 3' - 内切核酸酶,此外, RNase III 和 RNase E 也有辅助作用。在 tRNA 前体后转录加工中还要进行修剪,即从 3' - 末端逐个切下多余的序列,担负这一任务的是 RNase D。至于从 tRNA 前体中除去插入序列则包括一系列酶的作用,如:内切核酸酶、激酶、2', 3' - 环磷酸 - 3' - 磷酸单酯酶、RNA 连接酶以及磷酸单酯酶等的作用(图 11.29)。

第二种类型的反应是在 3' - 末端添加 CCA-OH。在大肠杆菌的 tRNA 基因中本身就编码有成熟的 3' - 末端 CCA-OH 的序列,但 T4 噬菌体等的 tRNA 基因中无此编码序列,这种序列必须在转录后通过寄主细胞内专一的 tRNA 核苷酰转移酶, tRNA - CMP - AMP 焦磷酸化酶催化完成:



第三类反应是核苷修饰。成熟的 tRNA 分子中包含许多修饰成分,而且,不同的 tRNA 中所含的修饰成分在种类与数目上各不相同,担负这类核苷修饰的酶一般专一性很高, DNA、rRNA、多聚核苷酸、核苷酸以及核苷等都不能用作底物,同时,每一种核苷的修饰都需

要相应不同酶催化。

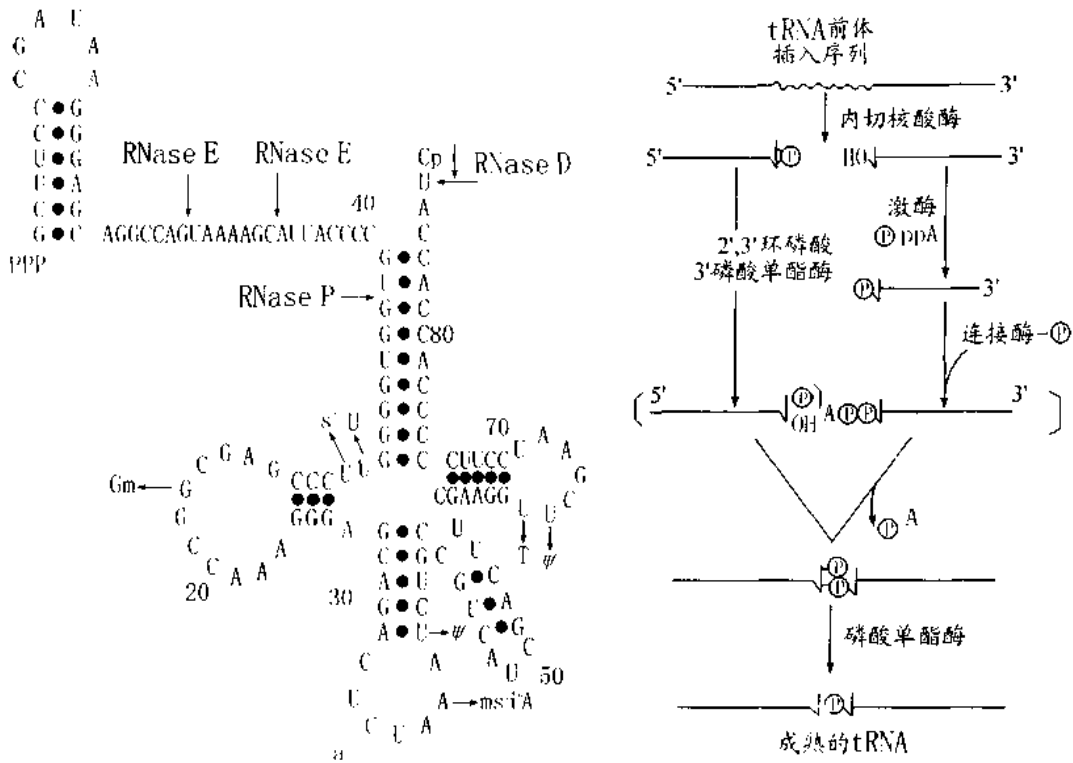
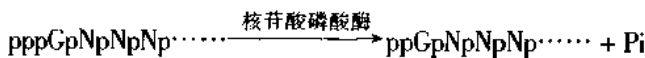


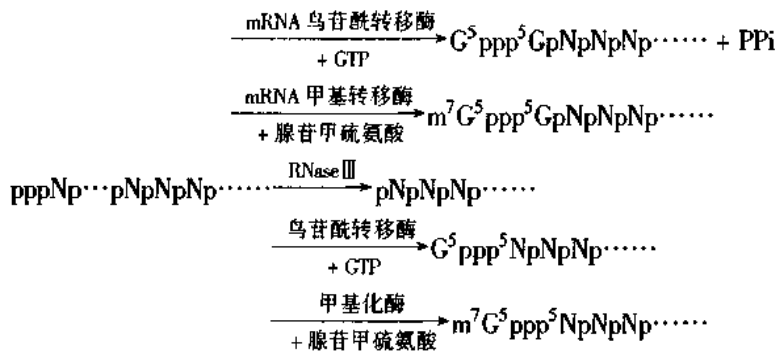
图 11.29 tRNA 前体的转录后加工

c. mRNA 的转录与 mRNA 前体的转录后加工和成熟。在原核细胞和真核生物中 mRNA 转录与转录后加工都不同。原核细胞中 mRNA 的转录特点是多顺反子转录,因为相关蛋白的结构基因通常在一起组成一个转录单位的(操纵子),并且转录与翻译相偶联,往往在尚未完成转录时,就已经开始了蛋白质的翻译合成。除个别的 mRNA 以外,一般不需要进行转录后加工,即使顺反子间存在一些非翻译区,它们在转录后也不需要加工除去。mRNA 的半寿期较短,通常只有几分钟或更短。

在真核细胞中,它的转录单位一般是单顺反子,转录和翻译在时间和空间上是分开的。转录的初产物一般存在着插入顺序,而且大多数情况下,插入序列比结构基因长,因此,在转录后需要进行复杂的加工,才能够获得成熟有功能的 mRNA。这种转录后加工包括:5'-端加帽;3'-端加尾;剪接;甲基化等。

5'-端加帽发生于转录早期,转录终止以前,其意义可能是为 mRNA 增加一个有利于和核糖体结合的特殊结构。加帽有两种方式,一是通过核苷酸磷酸水解酶从 5'-端三磷酸中脱去一个磷酸,然后通过 mRNA 鸟苷酰转移酶和 GTP 反应生成 5',5'-三磷酸连结,并释放出焦磷酸,最后,再通过 mRNA 甲基转移酶的作用,使帽子上的 G 甲基化和使 5'-端第一个核苷酸的核糖基 2'-羟基甲基化,这一步包括两种专一性不同的甲基化酶的作用。参与这种方式加帽的酶都已从牛痘等病毒中纯化。另一种方式是先通过 RNase III 切开 RNA 链,形成 5'-磷酸末端,然后再通过鸟苷酰转移酶和甲基化酶的作用形成甲基化的 5'-端帽:





3'-端加尾是 mRNA 前体加工成熟的另一重要步骤,其作用可能与 mRNA 的进一步加工,以及与成熟的 mRNA 从核转移至细胞质有关。催化加尾反应的酶为多聚腺苷酰聚合酶 (poly A 聚合酶),此酶要求 ATP 为底物,并以具有 3'-OH 的 RNA 为引物,  $\text{Mn}^{2+}$  为活化剂,一般不需要模板;但是,对某些病毒来说, Poly A 聚合酶似乎是编码于其基因组的。此酶被其他的 NTP,特别是 GTP 所抑制。尾长通常为 100 ~ 200 个腺苷酸残基,但线粒体的 mRNA 的较短。

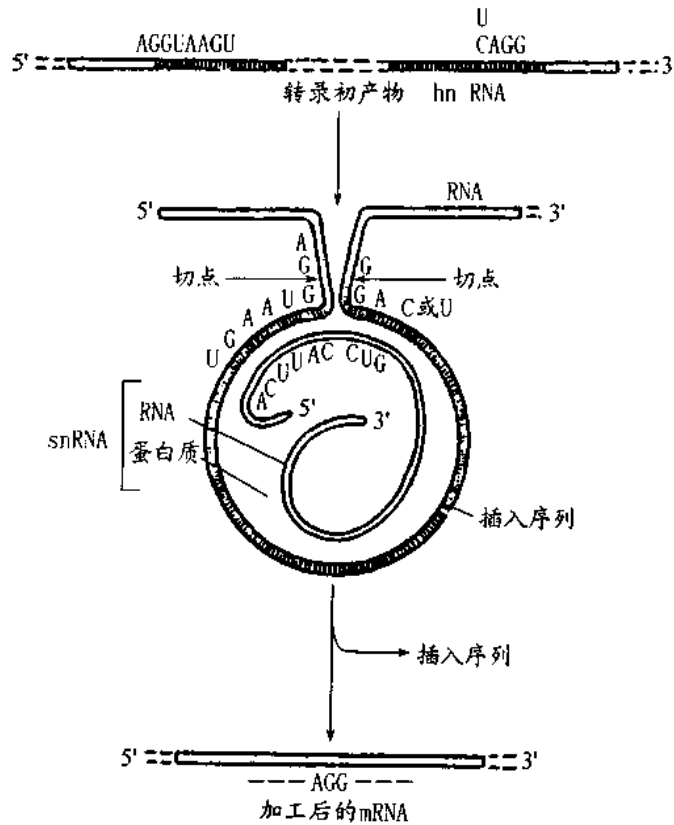


图 11.30 mRNA 前体的转录后加工

mRNA 前体加工成熟关键的一步是剪接(图 11.30)。mRNA 转录的初产物是不均一的核质 RNA,称为异质核 RNA(heterogeneous nuclea RNA, hnRNA),其相对分子质量分布幅度极广,约  $2 \sim 20 \times 10^6$ ,沉降系数多在 20 S 以上,主要在 30 ~ 40 S 区域,少部分甚至可达 70 ~

100 S。如果说 hnRNA 一般包含 6 000 ~ 50 000 个核苷酸, mRNA 则通常只有 500 ~ 3 000 个核苷酸, 因此有很大部分核苷酸要在成熟过程中被切除, 而且这些将被切除的部分都分散插在 mRNA 内部作为插入顺序。插入顺序在进化过程中可能产生累积性突变, 但是, 几乎所有插入顺序的两端点(边界区)都有相似的、比较保守的核苷酸序列, 即同源序列, 它们构成 mRNA 加工成熟过程中剪接部位的指示信号。现在知道, 在细胞中存在大量细胞核小分子的 RNA 核蛋白颗粒(SnRNP), 其 RNA 上具有可和上述同源序列配对的核苷酸序列, 这样, 插入序列就能与之形成特殊的高级结构便于 RNA 剪接酶识别并将其除去。由于插入序列分散在 mRNA 的不同部位, 因此, mRNA 的加工成熟实际上是在单一 RNA 链上多点位置上进行的; 而且, 由于边界区具有相同的同源序列, 所以, 同一条 RNA 可以通过不同方式加工产生编码不同蛋白的 mRNA。mRNA 的剪接同样也可能是 RNA 型催化剂催化的。

### (3) 蛋白质的翻译合成(translation)

DNA 中编码的信息必须最终解码翻译成相应的蛋白质, 这样信息才得以表达, 相应的生物学特征才得以表现, 生物的遗传变异才得以实现。蛋白质翻译合成也包括翻译和翻译后加工两个基本环节。

① 翻译合成这个环节涉及到多种因素的协同作用。其中 mRNA 通过其特定的核苷酸序列, 以三联密码(triplet code)的方式将 DNA 编码的信息翻译为蛋白质中的氨基酸序列;

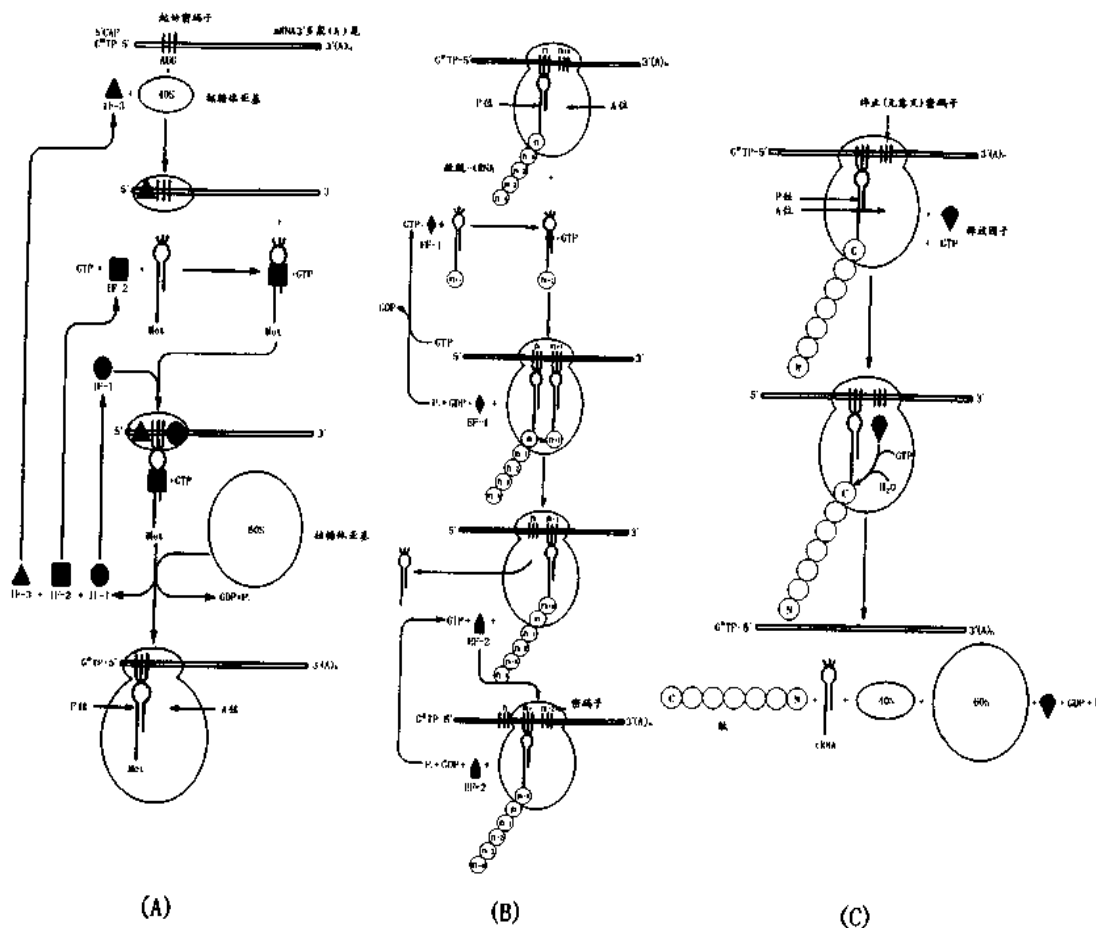
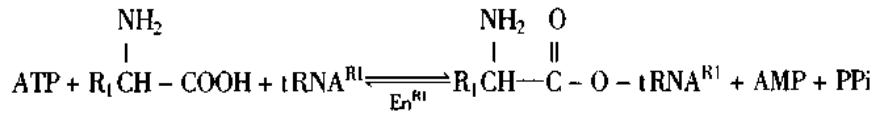


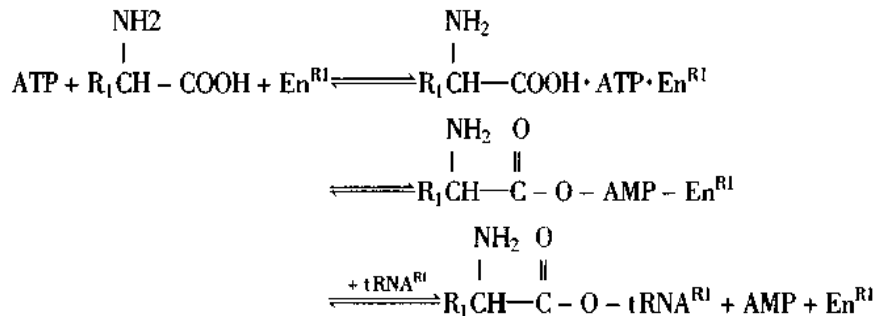
图 11.31 蛋白质翻译合成示意图

tRNA 则以互补于 mRNA 三联密码的反密码子(anticoder)将相应的氨基酸运载到特定的位置上;核糖体是蛋白质翻译合成的场所;在其他相应的酶和蛋白质因子的参与下完成这种翻译合成。图 11.31 示蛋白质翻译合成全过程及有关因素。

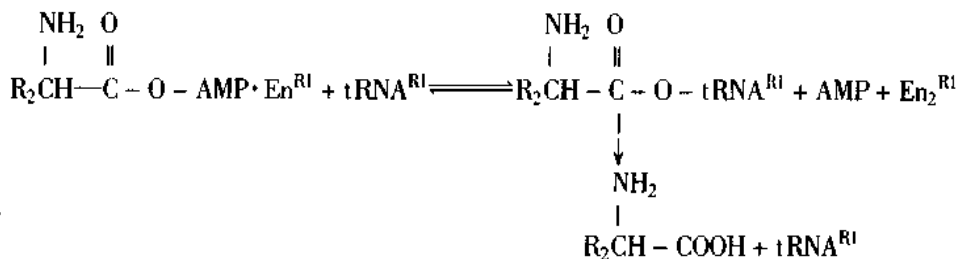
a. 氨基酸活化。在进行蛋白质的翻译合成时,首先须使氨基酸活化,并使它和相应的 tRNA 结合,然后再运载到蛋白质合成的场所。担负这一工作的是氨基酰 tRNA 合成酶(aminoacyl tRNA synthetase),它催化:



氨基酰 tRNA 合成酶的专一性很高,每一种氨基酸都有它相应的合成酶。现在已经有多种合成酶得到了纯化,它们的组成很不相同。有的由单肽链组成,有的是由相同亚基组成的寡聚酶,还有一些则是由不同亚基组成的寡聚体,但所有的氨基酸 tRNA 合成酶的催化方式基本相似。



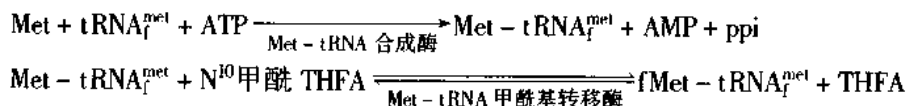
氨基酸活化的酶反应过程实际上包括三步:第一步是形成酶、氨基酸和 ATP 的络合物,这一步的专一性不高;第二步是催化酶-氨基酰-AMP 衍生物的形成,该步专一性也不太高,例如,异亮氨酰-tRNA 合成酶,它对异亮氨酸的  $K_m$  是为  $5 \mu\text{mol/L}$ ,对缬氨酸的  $K_m$  为  $0.4 \text{ mol/L}$ ;如果反应系统中没有异亮氨酸,只有缬氨酸时,它就可能用缬氨酸代替,形成“异亮氨酰-tRNA 合成酶”-缬氨酰-AMP 络合物,不过这种误配在反应的第三步可纠正,因为不正确的“合成酶-氨基酰-AMP”络合物在加入相应的 tRNA 后,形成的不正确的氨基酰-tRNA 很不稳定,易被合成酶催化加水分解:



用快速流管法测定表明: $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{O} \\ | \quad \parallel \\ \text{R}_2\text{CH} - \text{C} - \text{O} - \text{tRNA}^{\text{R}_1} \end{array}$  的寿命仅几十毫秒。只是目前对于合成酶在后一纠正过程的机制还了解很少。

b. 翻译启动(initiation)。通常引入的第一个氨基酸是甲硫氨酸(Met),专一于 Met 的 tRNA 有两种:一是  $\text{tRNA}^{\text{Met}}$ ,它主要作为肽链内部 Met 的载体;二是  $\text{tRNA}^{\text{Met}}$ ,它是参与合成启

动的甲硫氨酸的载体。在真核细胞中引入的形式是 Met - tRNA<sup>met</sup>,而在原核生物中则是 fMet - tRNA<sup>met</sup>,也就是说,在原核生物中 Met 在引入前必须先进行甲酰化。催化这一反应的是甲硫氨酰 tRNA 甲酰基转移酶,此酶专一性很高,不能作用游离的 Met 或 Met - tRNA<sup>met</sup>,以 N<sup>10</sup>甲酰四氢叶酸(N<sup>10</sup>甲酰 THFA)为供体:

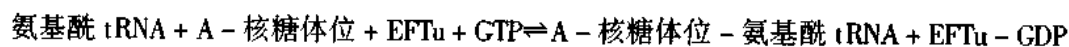


在合成启动中还需要其他一些蛋白因子(启动因子 initiation factor, IF),在原核生物中它们是 IF - 1、IF - 2 和 IF - 3,在真核细胞中是 eIF - 1、eIF - 2、eIF - 3、eIF - 4A、4B、4C、4D 和 eIF - 5 等。这些因子都由多条肽链组成。

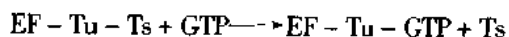
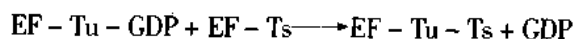
翻译启动如图 11.31A。i. “启动 tRNA”携带 Met 在几种蛋白质性质的启动因子的参与下装配到小亚基上,其中 IF - 3(或 eIF - 2)首先参与小亚基和 mRNA 的结合;IF - 2(或 eIF - 2)具有 GTP 酶的活性,其作用是催化(f)Met - tRNA<sup>met</sup> 和 GTP 结合,并促进小亚基结合,这一步在某些生物中是限速环节。ii. 载有(f)Met - tRNA<sup>met</sup> 的小亚基和 mRNA 结合,这一步可能有 IF - 1(或 eIF - 1)参加,其作用是阻止小亚基和大亚基“过早地”结合,并帮助 mRNA 的 5' - 端和 16 S rRNA 的 3' - 端结合,使 mRNA 正确定位,同时在翻译启动区形成适宜的高级结构,以便起始密码 AUG 能够容易地为(f)Met - tRNA<sup>met</sup> 所识别。iii. 识别起始密码,这一步也可能有 IF - 1(或 eIF - 1)参加,同时伴随 GTP 的水解,IF - 1(或 eIF - 1)的作用是促进启动络合物、即核糖体和它上面的 mRNA 以及与起始密码 AUG 配对的(f)Met - tRNA<sup>met</sup> 络合物的形成。iv. 启动过程完成,所有和小亚基结合的启动因子完全脱离,大亚基与小亚基结合形成一个功能完全的核糖体,同时启动因子 tRNA 连同它运载的(f)Met 也移位到 P 位,并空出 A 位准备肽链延伸。

c. 肽链延伸(elongation)。肽链延伸由三步组成,每一步都要相应的蛋白因子(或称为延伸因子,elongation factor, EF)催化完成(图 11.31B)。

第一步是氨基酰 tRNA 的引入,这一步在原核细胞中需要延伸因子 EFTs 和 EFTu 参与,前者较稳定,后者很不稳定。其中 Tu 类似于合成酶,它能专一地和 GTP 与氨基酰 tRNA 结合,并将氨基酰 tRNA 引入核糖体的 A 位(aminoacyl - tRNA binding site)。其作用高度专一,不作用游离的 tRNA、fMet - tRNA<sup>met</sup>、Met - tRNA<sup>met</sup> 以及取代了的氨基酰 tRNA;它和 GTP 结合能力很强,其解离常数  $K_d = 2 \times 10^{-7}$  mol/L,催化:



EFTu - GDP 的结合能力非常强( $K_d = 3 \times 10^{-9}$  mol/L),在 EFTu 的再生中需要 EFTs, Ts 取代 GDP 形成 Tu - Ts,然后再和 GTP 与氨基酰 tRNA 结合,同时释放 Ts。Tu 和 Ts 都已高度纯化。



真核细胞中类似的因子为 EF1 -  $\alpha$  和 EF1 -  $\beta$ 。

第二步是肽键形成,这一步需要肽酰转移酶(peptidyl transferase),它催化 f·Met 或肽酰基由 P 位(peptidyl - tRNA binding site)转移至 A 位氨基酰 tRNA 上形成肽酰 tRNA, tRNA<sup>met</sup> 或相应的 tRNA 则游离于 P 位。最近研究表明,肽酰转移酶可能不是蛋白质,而是核糖体大亚基

的组成成分 rRNA。反应要求有较高的  $K^+$  浓度。嘌呤霉素 (puromycin) 和氨基酰 tRNA 的 3' - AMP 残基结构很相似, 在酶的催化下能形成肽酰嘌呤霉素, 该络合物很易从核糖体上脱落, 因而能抑制肽链延伸合成。

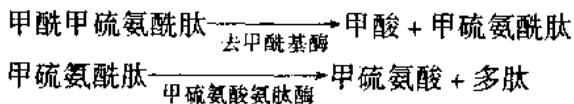
第三步是转位 (translocation), 在肽键形成后, 核糖体沿 mRNA 作 5' → 3' 方向的相对移动, 每次一个密码子的距离, 使生成的肽酰 tRNA 从 A 位转入 P 位, 原在 P 位游离的 tRNA 离开核糖体。参与转位的为 EFG 因子 (真核细胞中的 EF - 2), 又称为转位酶 (translocase)。此酶已经纯化结晶, 是一 SH 蛋白, 它和 GTP 有很强的亲和力,  $K_m = 2 \times 10^{-6}$  mol/L, 在催化转位的同时伴随着 GTP 的水解。

d. 合成终止 (termination)。mRNA 的终止密码有三种: UAA、UAG 和 UGA。参与肽链合成终止的蛋白因子或称释放因子 (releasing factor, RF), 在原核生物中已知有 RF - 1, 相对分子质量 44 000, 负责识别 UAA、UAG; RF - 2, 相对分子质量 47 000, 负责识别 UAA 和 UGA; RF - 3 的作用是激活 RF - 1 和 RF - 2, 本身具有 GTPase 的活性。在真核细胞中, 只有一种终止因子 RF, 相对分子质量 56 500。终止机制可能是, 当 mRNA 的终止密码进入核糖体的 A 位后, 由于没有相应的氨基酰 tRNA 可以专一地与之识别、结合, 而 RF - 1 或 RF - 2 能与之结合, RF 与 A 位结合后, 肽酰转移酶将肽链转移至 RF, 但这种络合物非常不稳定, 肽链很快地就被肽酰转移酶水解, 同时 tRNA、mRNA 也相继地从核糖体上脱落, 核糖体解体为相应的大小亚基, 翻译合成终止 (图 11.31C)。

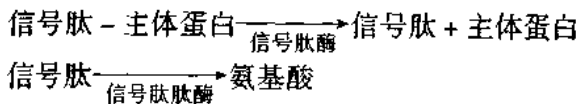
② 翻译后加工。翻译后加工包括肽链水解、氨基酸残基的化学修饰、非氨基酸辅基的添加等。就各类生物细胞来说, 这些加工有共同之处, 但也有明显的特征差别, 这种差别也可能是细胞选择性控制的一部分。

a. 肽链水解。这是最普遍、也是最主要的一类加工, 有三种方式。

N - 端 (甲酰) 甲硫氨酸的去除。(甲酰) 甲硫氨酸是肽链合成的起始氨基酸, 一般必须在肽链合成后除去, 肽链才能形成所需要的构象, 反应如下:



信号肽的除去。大部分分泌蛋白与膜糖蛋白, 前者如胰岛素、淀粉酶, 后者如水泡性口膜炎病毒 G 蛋白和组织相容性蛋白 HLA 等, 它们都由粗糙内质网合成, 然后移入高尔基体, 这些蛋白在 N - 端通常都有一段称为信号肽的“前” (pre - ) 序列, 这一肽段由 20 ~ 30 个氨基酸组成, 其中还包含 8 ~ 10 个强疏水性的氨基酸残基如亮氨酸、缬氨酸等。它们的作用是帮助主体蛋白穿过磷脂层, 分泌到质膜外。信号肽在分泌过程中被“信号肽酶”切除:



激素蛋白原和酶原激活。某些具有特定生理功能的蛋白质, 例如激素和酶等, 通常情况下以“前体”或“原” (“pro - , - ogen”) 的形式合成存在, 在功能需要时再通过蛋白酶水解切去部分肽段转变为功能态的激素或酶。如胰岛素, 它由  $\beta$  - 胰岛细胞膜结合的多核糖体合成, 合成的初产物为胰岛素原前体, 包括由 24 个氨基酸残基组成的信号肽和 81 个氨基酸残基组成胰岛素原。分泌时先被信号肽酶除去信号肽, 然后再被胰蛋白酶和羧肽酶 B 等作用切下 31—59 之间的肽段形成成熟的胰岛素, 成熟的胰岛素由两对二硫键连接的 A、B 两肽段组

成(图 11.32)。

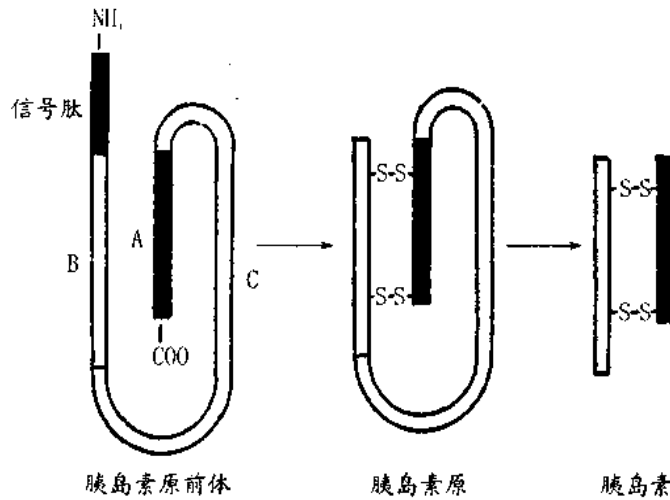


图 11.32 胰岛素原前体的翻译后加工

胰凝乳蛋白酶原由 245 个氨基酸残基组成,包含五对二硫键,它先在胰蛋白酶作用下,切开 15—16 肽键,则酶原由无活性形式转变为活性的  $\pi$ -胰凝乳蛋白酶,然后该激活的酶再在胰凝乳蛋白酶等的作用下,切去 14—15, 147—148 两个二肽,转变为  $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶,或再进一步转化为其他活性形式(图 11.33)。

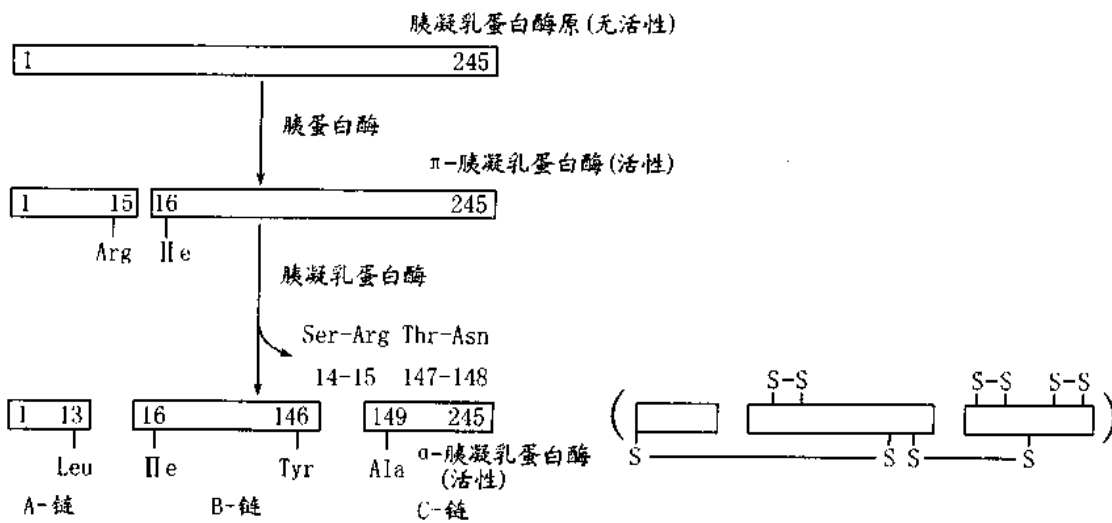


图 11.33 胰凝乳蛋白酶原的活化

b. “可逆”共价修饰。“可逆”共价修饰包括:乙酰化、甲基化和磷酸化等(图 11.34)。最简单的是肽末端的乙酰化、酰胺化,例如,大肠杆菌核糖体蛋白 L7/L12 的乙酰化,它们的生理意义尚不十分清楚,但在乙酰化后细菌的生长速率发生改变。其次是磷酸化、腺苷酰化,这类修饰往往和蛋白的功能化,尤其和酶等的活性调节有着密切关系。羟基化,特别是脯氨酸的羟化,可能和蛋白质的结构改变相关,如胶原蛋白的羟化有助其稳定性的增大。比较复



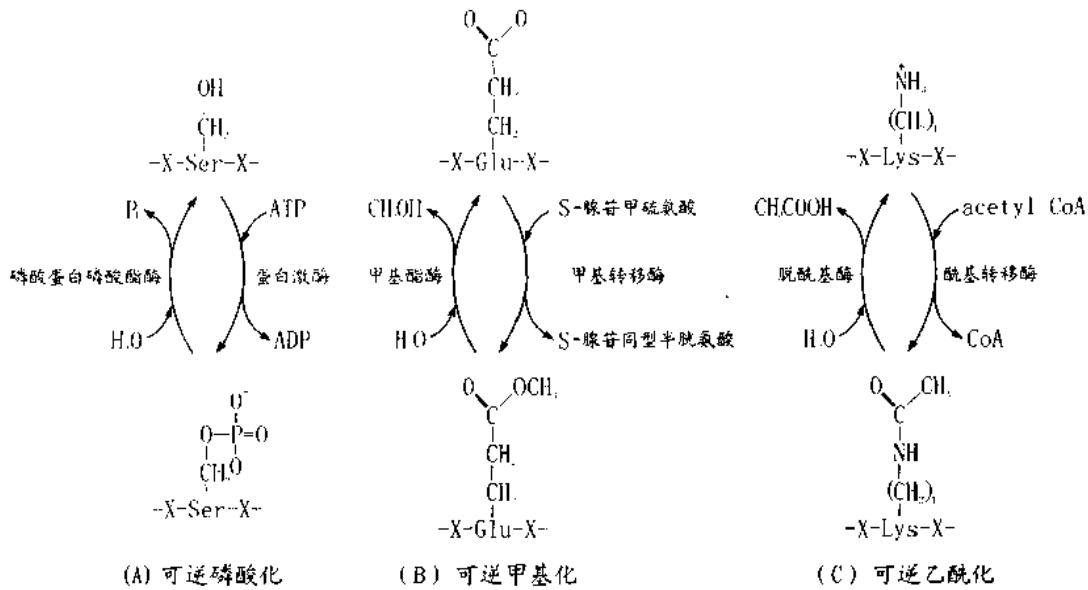


图 11.34 蛋白质的几种“可逆”共价修饰

杂的是糖苷化,许多分泌蛋白和膜蛋白都是糖蛋白,糖基可能有利于分泌蛋白的稳定化,对于病毒蛋白来说还可能有利于它的成熟。在细菌蛋白中很少糖苷化而真核细胞则比较普遍,分两种类型:O-型连接,糖基连于丝氨酸或苏氨酸羟基上,这种类型糖苷链较短,通常只有1~3个糖残基;另一类是N-型连接,糖基连于门冬酰胺的氨基上。近年来,特别引人注目的是包含半乳糖和唾液酸的“复合物”和“高聚甘露糖”,它们可能是构成糖蛋白糖部分的主要形式。糖蛋白的生物合成过程很复杂,是一个多步骤过程,包括糖残基的逐步加合,有关的酶存在于内质网膜上。糖基向蛋白质的转移在蛋白质合成延伸阶段就已开始,催化这一过程的寡糖-蛋白质转移酶也存在于内质网膜上,它要求底物具有门冬酰胺-X-丝氨酸(或苏氨酸)三肽结构。与糖苷化相对应的是某些糖残基的移除,主要借助糖苷酶的作用,它们存在于高尔基体内。糖苷化加工问题是生物工程学家们十分关心的,因为它直接关系到糖蛋白是否可以通过基因重组在异源生物中进行表达。

c. 辅基的添加。对某些蛋白和酶来说,辅基像生物素、硫辛酸、磷酸吡哆醛等的添加,在其功能表达中是十分重要的。

d. 二硫键的形成。二硫键是蛋白质二级结构的重要稳定因素,在高等细胞中二硫键一般限于分泌蛋白与某些膜蛋白。二硫键的形成也是和肽链延伸同时进行的。催化这一反应的酶称为蛋白质二硫键还原酶,以氧化型的谷胱甘肽等为氧化剂。

e. 脂肪酸的添加。细胞有一种特别的机制就是将脂肪酸链共价地添加到水溶性的蛋白上使之能从细胞液中移向并停驻于膜上,这样就可赋予细胞一种特殊的性质,这种情况多见于某些转化细胞。例如,劳氏肉瘤病毒(Rous Sarcoma virus)的癌基因 *src* 编码一种 Tyr-蛋白激酶,该蛋白激酶通常情况下和豆蔻酸(myristic acid, 不饱和的十四碳脂肪酸)共价偶联,因而能和膜结合,同时,细胞转化为癌细胞;但是,如果将该酶的N-末端 Gly 改换成 Ala,那么,脂肪酸的附着就可阻止, *src* 蛋白仍然保持激酶的活性,并停留于细胞液,但不促使细胞转化。类似地,另一癌基因 *ras* 蛋白,它也必须先和棕榈酸(palmitic acid, 十六碳的不饱和脂

肪酸)偶联,才能和膜结合,导致细胞转化。这可能是激酶必须先和膜结合才能找到它需要的底物,而这种膜结合前提是激酶本身应先和脂肪酸偶联。

可见,从 DNA 复制到 RNA 转导到蛋白质翻译合成,虽然包含多种因素的协同作用,但酶的催化在这个过程中起着不可或缺的作用。

### 第三节 酶和代谢调节<sup>(15—21)</sup>

酶的最主要功能是催化代谢反应,建立各种代谢途径、代谢体系,因此,所谓代谢调节实际上就是通过酶进行的调节。对于代谢系统来说,酶不再是一个独立的因素,它们之间不仅有着功能上的联系,而且往往还有结构与组织上的相互关联、彼此协调、彼此制约等问题。

#### 一、代谢系统中酶的结构与组织

催化水解等简单反应的酶,多是些单体酶,它们的结构一般也比较简单。但是生物体内更多的是寡聚酶,它们的结构与组成随功能的复杂程度而不同。例如, RNA 聚合酶,它催化转录反应,在整个反应过程中包含识别、启动、延伸和终止等多个环节,适应这种需要,该酶除了核心酶外,还包含起识别作用的  $\sigma$  亚基与起转录终止作用的  $\rho$  因子等,这些因子能在转录的不同阶段里与核心酶进行可逆的结合与解离。又如,别构酶,该酶兼具催化和调节两种功能,因此,从结构上也可区分为催化部位与调节部位。

对于代谢系统来说,情况更为复杂,相关的酶常以物理方式或共价方式集中在一起形成多酶复合物(multi-enzyme complexes)或多酶多肽(multi-enzyme polypeptides),又统称多酶蛋白(multi-enzyme protein),如丙酮酸脱氢酶、色氨酸合成酶、氨甲酰磷酸合成酶、芳香氨基酸合成酶以及脂肪酸合成酶等。这样的多酶蛋白往往有单酶所不具有的一些特点:① 运转时间(transit time),即一种酶的产物运转至下一个酶的活性中心所需要的时间减少;② 稳态迁移时间(transient time),即从一种稳态迁移到另一稳态所需要的时间缩短;③ 专一(通道)化和区划化(channeling or compartment)的建立,即系统中一种酶的产物主要为系统本身所利用,而不为系统以外的其他酶所利用;④ 具有协同性,通常是正的协同性(coordinate effect)。以下以氨甲酰磷酸合成酶和与芳香氨基酸合成有关酶为例加以说明。

#### 1. 氨甲酰磷酸合成酶

氨甲酰磷酸合成酶(carbamoyl phosphate synthetase, CPS)的作用是催化谷氨酰胺(Gln)、 $\text{CO}_2$  和 ATP 合成氨甲酰磷酸,后者是嘧啶核苷酸(PyNt)与精氨酸(Arg)代谢途径中的关键酶。该酶作用的直接产物——氨甲酰磷酸(CP)位于这两条合成途径的分支点上,生成的氨甲酰磷酸或者通过门冬氨酸转氨甲酰基酶(Aspartate carbamoyl transferase, ACT)转移至门冬氨酸(Asp),或者通过鸟氨酸转氨甲酰基酶(Ornithine carbamoyl transferase, OCT)转移至鸟氨酸(Om)(图 11.35)。

大肠杆菌中,CPS、ACT 和 OCT 是独立分离存在的,CPS 的突变缺失将导致 PyNt 与 Arg 营养缺陷型;Om 能活化 CPS,而 UMP 等则能抑制 CPS 与 ACT,通过它们可以调节这两条合成途径的平衡。

和大肠杆菌不同,在酿酒酵母中的 CPS 有两种:CPS<sub>Py</sub>与 CPS<sub>Arg</sub>。这两种 CPS 产生的 CP

都能被两条合成途径所利用,因此,任何一种 CPS 缺失,余下的一种 CPS 仍然能使该菌在基本培养基上生长,不过生长速度显著降低。这种生长速度的降低是由于  $CPS_{PY}$  与 ACT 形成了多酶复合物,该复合物限制了 CP 在两条途径间进行直接交换,这实际上意味着存在一种多酶系统的定向通道,使得 CP 倾向于向特定方向流动。

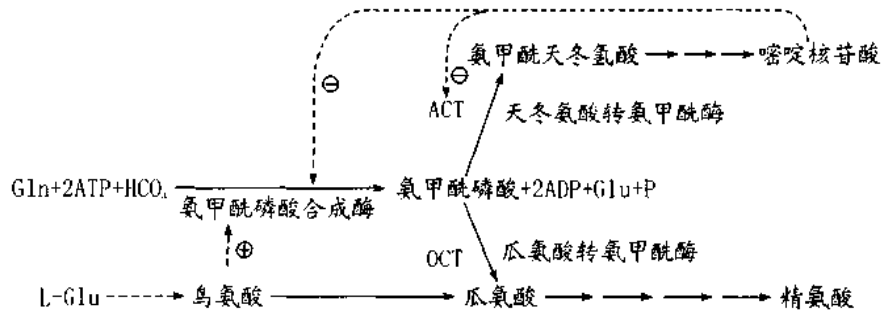


图 11.35 氨甲酰磷酸的合成与其进一步转化

在粗糙链孢霉中,这种定向通道现象更为明显,  $CPS_{PY}$  与 ACT,  $CPS_{Arg}$  与 OCT 间能分别以物理力形成多酶复合物,并分别位于不同的亚细胞结构中。前者位于细胞质中,后者位于线粒体中,因此,任何一种 CPS 缺失都将导致相应的营养缺陷。而且体外实验表明,  $CPS_{PY}$  形成的 CP 不能与外加的同位素标记的 CP 进行交换。

在较高等的真核细胞如鼠肝、鼠腹水肝癌细胞中,线粒体内形成的是  $CPS_{Arg}$  与 OCT 组成的复合物,而在细胞质里是  $CPS_{PY}$ 、ACT 与二氢乳清酸酶(dihydro-orotase, DHO)组成的多酶复合物。后一复合物的相对分子质量约 800 000,在 SDS 处理后变为相对分子质量 200 000 的单一肽链。

和上述讨论相对应,从 Gln(或  $NH_3$ )、 $CO_2$  和 ATP 到嘧啶核苷酸生物合成途径有关的酶结构基因组分析表明,大肠杆菌包含 6 种相关的酶基因,酿酒酵母、粗糙链孢霉只有 5 种,因为,编码 CPS 与 ACT 的基因已融合为单一基因;而在较高等的真核细胞中甚至只有 3 种,它们分别是:乳清酸还原酶(ototate reductase, OR)、乳清酸磷酸核苷酰转移酶(ototate phosphoribosyl transferase)、乳清酸核苷 5' - 磷酸脱羧酶(oritidine 5' - phosphate decarboxylase)。

## 2. 参与芳香氨基酸生物合成的有关酶

细菌、霉菌和植物等都能自己合成芳香氨基酸,一般地说,合成途径中有关酶都能或多或少地组成多酶复合物,只是不同生物有些差别而已。以粗糙链孢霉的色氨酸合成(biosynthesis of tryptophan)系统为例(图 11.36)。

在粗糙链孢霉的细胞内包括三种多酶复合物:arom 复合物(arom cluster),对氨基苯甲酸合成酶复合物与色氨酸合成酶复合物,它们分别以共价键结合;在这个基础上,这三个复合物彼此间,以及它和合成途径中其他酶之间又以次级键维系在一起形成一种“超级的多酶复合物”。在三个多酶复合物中,“armo”已经过较系统的研究,该复合物相对分子质量约 330 000,包括两条相对分子质量 165 000 的多肽链,具有五种酶活性。

在色氨酸生物合成中,去氧奎尼酸变为去氧莽草酸是合成与降解的关键一步,在多酶复合物中“定向通道”能有效地促使反应沿合成方向进行。

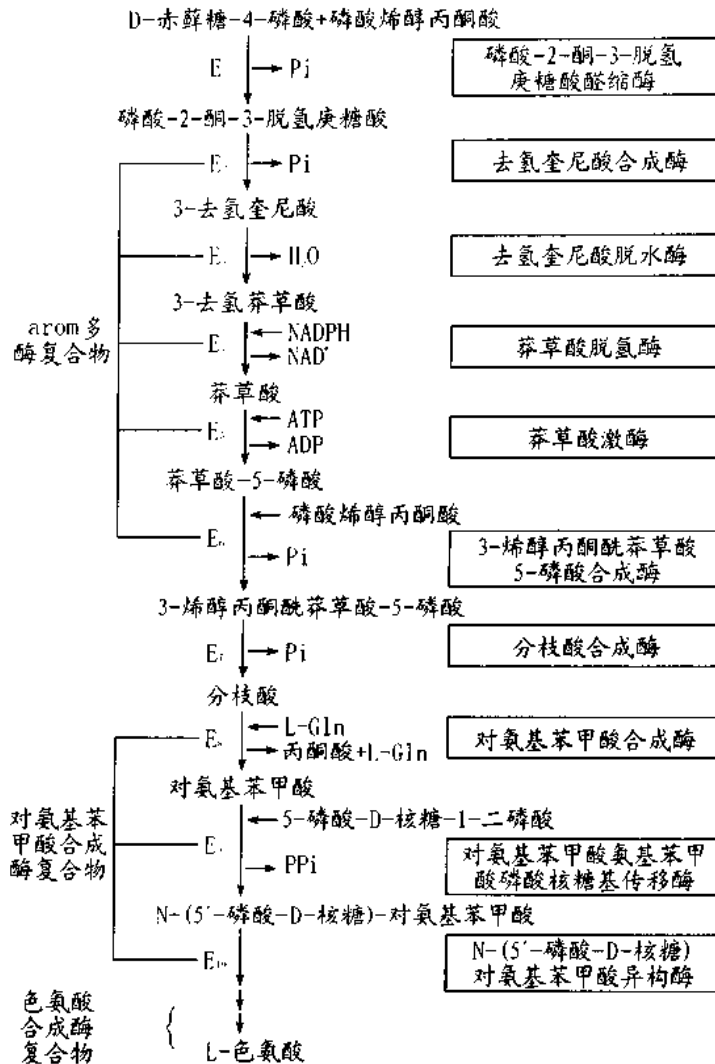


图 11.36 色氨酸合成酶系统示意图

对色氨酸合成各环节有人作过计算,从 7-磷酸-2-酮-3-脱氧-D-阿糖-庚糖酸 (7-phospho-2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptonate, PKDH) 到 3-烯醇丙酮酰莽草酸-5-磷酸 (3-enolpyruvylshikimate-5-phosphate, EPSP), 如果每一步都经过催化,那么总的过程的稳态迁移时间需 125 ~ 200 min;但是,通过对“arom”复合物进行的实验观测,得到的结果是 12 ~ 20 min,这就是说,效率高了约 10 倍(图 11.37)。不仅如此,实验还表明,复合物的形成可能导致正协同,例如,从 PKDH 到 EPSP 五步的反应速度比从莽草酸 (3-dehydroshikimate) 到 EPSP 两步的反应速度也要快上 10 倍;PKDH 还能使 arom 复合物中的 E<sub>3</sub>、E<sub>4</sub> 和 E<sub>5</sub> 对它们相应的作用底物的 K<sub>m</sub> 值减小! 并且 PKDH 和 arom 复合物结合后,arom 复合物对蛋白酶的抵抗力也有所提高。

这又一次说明,多酶复合物的形成带来游离酶所不具有的特点:它可以缩短代谢中间物在酶间的运转距离,减少扩散限制,使“复合物”的各组成酶或其亚基固定于高活性的构象状态;“复合物”的形成也可能使其各组成酶产生正协同,因而反应催化效率得以提高;对于分

枝的代谢途径,“复合物”组成酶间的定向通道,还可减少或避免副反应发生。

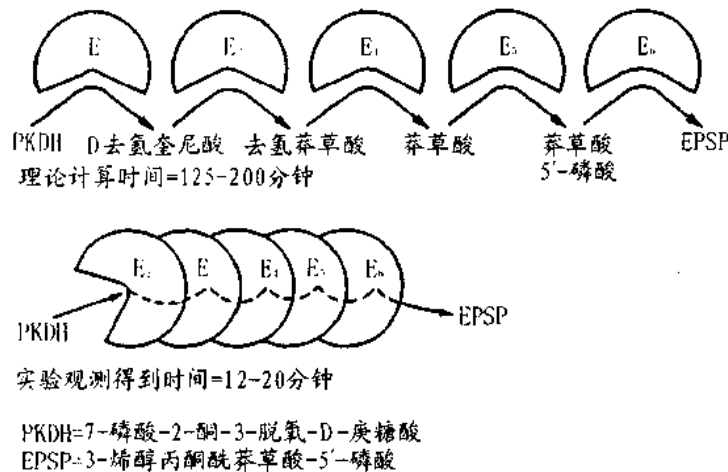


图 11.37 从 PKDAH 到 EPSP 理论与实测的反应速度

相关酶形成多酶复合物可能是代谢系统的一种普遍现象,因此,在生物体内酶催化代谢反应规律不能简单地用单个酶反应来进行描述。一般认为,从酶到多酶复合物是生物进化发展过程的一种形式,而且进化程度越高越倾向形成较大的多酶复合物。此外,从细菌与真核细胞某些多酶复合物的比较看,似乎随着进化发展,复合物中各组成成分的基因还有融合倾向,倾向于形成多酶多肽。

### 3. 糖原颗粒及 DNA“复制装置”

糖原颗粒似乎可看作是更接近于天然状态的“多酶复合物”,可从肝或骨骼肌匀浆在 pH 6.1 通过高速离心沉降得到,是肝或骨骼肌的亚细胞颗粒。除糖原外,还包含高浓度的糖原酵解酶,即使是经过反复洗涤后仍然如此;而且用不同方法获得的颗粒,其酶组成大致类似。糖原颗粒中包含的酶有:磷酸化酶、磷酸化酶激酶、磷酸化酶-磷酸酯酶、糖原合成酶、蛋白激酶、ATP 酶、AMP 脱氨酶、腺苷酸激酶、肌酸激酶、葡萄糖磷酸变位酶。其中,磷酸化酶、糖原合成酶、磷酸化酶激酶、淀粉-1,6-葡萄糖苷酶等占绝大部分,可能达总酶蛋白的 95%,而磷酸化酶-磷酸酯酶则仅占 0.2%。

洗涤过的游离糖原颗粒能催化糖原转化为乳酸,其速度为体内速度的 30% 左右。在糖原颗粒中也包含许多调节糖原合成和分解的酶类,例如,控制 AMP 水平的腺苷脱氨酶。研究也表明,影响糖原颗粒活性的各种效应物,例如,磷酸化酶激酶催化磷酸化过程中所需的  $\text{Ca}^{2+}$  和 ATP 的浓度,以及抑制磷酸化酶磷酸酯酶所需的 AMP 的浓度,都与体内观察到的结果一致。

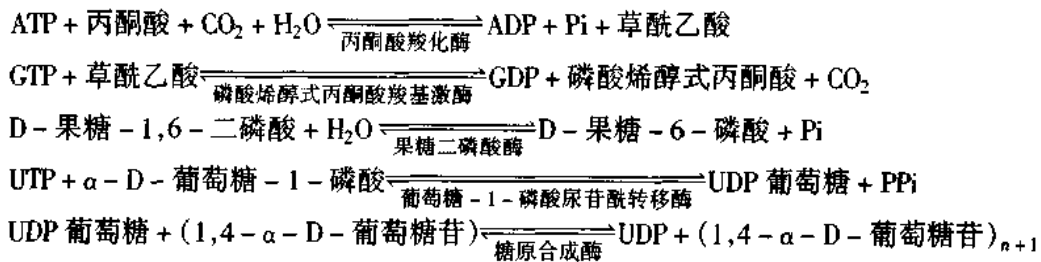
和糖原颗粒相似,与 DNA 合成有关的所谓复制装置(replicaton apparatus)也可看成是一种接近天然的“多酶复合物”。它是从 S 期成纤维细胞的细胞核中分离出来的,包括催化从核苷三磷酸转化为 DNA 所需要的六种酶:DNA 聚合酶、胸苷激酶、胞苷激酶、核苷二磷酸激酶、胸苷酸合成酶以及四氢叶酸脱氢酶。它们能在蔗糖梯度离心分离中共沉降。

## 二、代谢系统的区划化及其相互联系

在功能上相互关联的酶除了可在结构上组织化形成多酶复合物外,在细胞中还可能被进一步区划化(compartmentation),在亚细胞结构水平上建立起相应的代谢体系或代谢途径区划,这些代谢体系或代谢途径之间又可通过底物、辅助因子、效应物、甚至酶而相互联系。下面以糖和脂肪酸的分解与合成代谢体系为例加以说明。

### 1. 糖和脂肪酸代谢体系在(肝)细胞中的区划化

糖酵解、糖原合成、 $\beta$ -脂肪酸氧化、脂肪酸合成以及三羧酸循环直接关系到能量转换、生成,与这些代谢有关的酶占细胞蛋白质的很大部分。其中糖酵解、磷酸戊糖支路的酶在细胞质中发挥作用;糖原异生途径,除了丙酮酸羧化酶等催化的反应外,其余都可通过糖酵解系统的酶逆向催化进行,因此,相关的酶也主要分布于细胞质中;丙酮酸羧化酶存在于线粒体基质中;磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶则因生物而不同,有的在细胞质中,有的只在线粒体中,有的在两者之中都可观测到。至于三羧酸循环和 $\beta$ -脂肪酸氧化,它们都是在线粒体中进行的,所有有关的酶都集中在线粒体基质内,只有琥珀酸脱氢酶存在线粒体的内膜表面;电子传递链的酶如前所述分布于线粒体膜上。脂肪酸合成有关酶基本上存在于细胞质中,某些酶如去饱和化酶存在于内质网内。



### 2. 代谢体系间的相互联系

在生物体内,代谢途径、代谢体系间是相互联系、彼此制约的,一条途径的产物往往是另一途径的底物、辅助因子或调节因子。在糖和脂肪酸的分解合成体系中,联系它们的共同因子是: $\text{NAD}^+ - \text{NADH}$ 、 $\text{NADP}^+ - \text{NADPH}$ 、AMP、ADP和ATP,以及乙酰CoA等。例如,在降解途径(糖酵解、磷酸戊糖支路、三羧循环以及脂肪酸 $\beta$ -氧化)中产生NADH、NADPH和ATP,而在合成途径(脂肪酸合成、胆固醇合成、糖原异生)中则需要NADPH、NADH和ATP或GTP。但是,各代谢途径在细胞中往往被区划化,而且往往还有选择性透性膜加以分隔,此外,由于各种酶对上述共同因子,如NADH与NADPH均有一定的专一性要求,这样,就产生了如何将相应的各种因子进行有效运转的问题,或者说,进行相关物质的跨膜运转(transmembrane transport)问题。例如,NADH和ATP主要通过线粒体氧化产生,而需要它们的合成体系却在细胞质中。在生物体内,解决这一矛盾的办法是通过穿梭系统(shuttle mechanism)。所谓穿梭系统就是通过膜两侧酶系的平行作用,将不能透过膜的代谢体系共同联系因子和可以自由透过膜的物质偶联起来,组成一个循环反应系统,借助可自由穿过膜的物质的穿梭作用而达到代谢途径间的相互联系。

(1) 尼克酰胺核苷酸辅酶相关的穿梭系统。由于 $\text{NAD(P)}^+$ 和 $\text{NAD(P)H}$ 不能穿过线粒

体内膜,为此,和尼克酰胺核苷酸辅酶相关的代谢系统要进行运作,就必须通过和相应的穿梭系统相偶联才有可能,已知这种相关的穿梭系统有两个:一是门冬氨酸-苹果酸系统;一是甘油-3-磷酸系统。

门冬氨酸-苹果酸穿梭系统(malate-aspartate shuttle)(图 11.38)主要存在于肝细胞中,由两个苹果酸脱氢酶(MDH)、两个谷草转氨酶(GOT)和线粒体内膜中两个负责特殊离子穿膜运转的转位因子(translocator),也称透性酶组成。

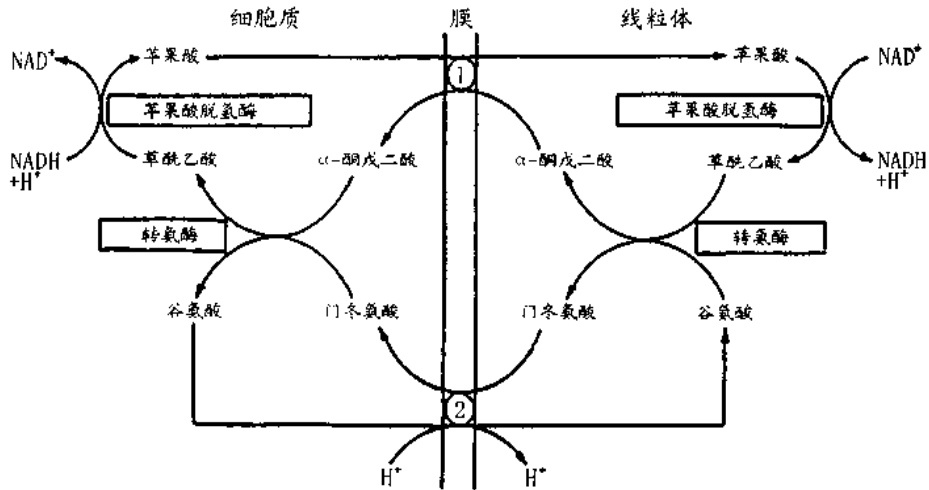


图 11.38 NADH 的穿梭运转方式之一

整个运作过程是:细胞质中的 NADH 在草酰乙酸存在下由 MDH 催化氧化;形成的苹果酸在转位因子①参与下,和谷氨酸交换地转入和运出线粒体;转入的苹果酸,在线粒体内的  $NAD^+$  参与下,由 MDH 催化氧化,生成 NADH 与草酰乙酸;NADH 进入电子传递链进行氧化磷酸化,而草酰乙酸由 GOT 催化,与  $\alpha$ -酮戊二酸反应生成门冬氨酸;门冬氨酸在另一转位因子②的参与下,与  $\alpha$ -酮戊二酸交换地转出和运入线粒体;进入细胞质的门冬氨酸再通过转氨反应变为草酰乙酸进行下一轮穿梭运转。

甘油-3-磷酸穿梭系统(glycerol 3-phosphate shuttle)(图 11.39)主要存在于神经、肌肉细胞中。由膜两侧对应的甘油-3-磷酸脱氢酶组成。运作过程是:细胞质中的甘油磷酸脱氢酶催化 NADH 中的氢转移至磷酸二羟丙酮形成甘油磷酸,后者扩散至线粒体内膜与外膜之间,并在内膜结合的甘油磷酸脱氢酶作用下,将氢转移至内膜上的黄素核苷酸,然后通过呼吸链进行氧化,同时生成磷酸二羟丙酮再返回到细胞质中参与下一轮穿梭。

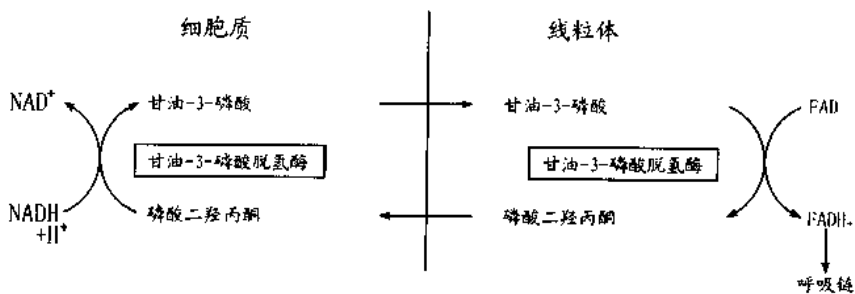


图 11.39 NADH 的穿梭运转方式之二

上述穿梭系统有两点值得提到:一是有的需要有转位因子参加,转位因子是蛋白质性质的物质,对被转位的代谢物有很高的专一性,在很多情况下,它催化的是交换性的转位;一是在膜的两侧有催化相同反应的酶,它们互为同工酶。

(2) 腺苷酸的转位。腺苷酸衍生物也不能自由地穿过线粒体膜,ATP 主要在线粒体中形成,而在细胞质中被利用,利用后分解生成的 ADP,再转入线粒体中通过氧化磷酸化形成 ATP。因此,同样有一个运转问题,而完成该任务的也是转位因子。这种转位因子能专一、交换地分别使 ATP 和 ADP 流向细胞质和线粒体基质。AMP 不能借助转位因子直接穿过线粒体内膜。在线粒体内膜上的转位因子虽然占总蛋白的 6%左右,但 ADP 流向氧化磷酸化部位仍然是氧化磷酸化的限速环节(图 11.40)。

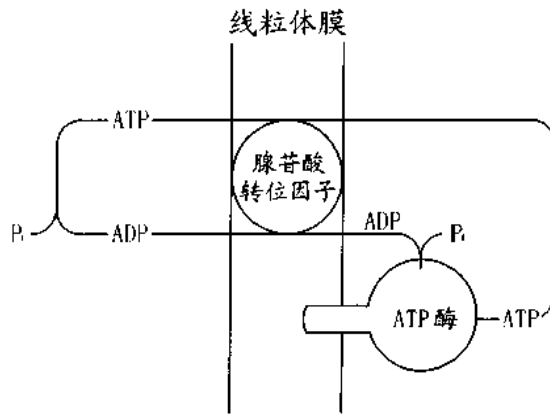


图 11.40 腺苷酸衍生物的运转机制

(3) 乙酰 CoA 和糖、脂肪酸代谢的相互联系。乙酰 CoA 是糖酵解与脂肪酸  $\beta$ -氧化的尾产物,是三羧酸循环与脂肪酸合成的关键底物。乙酰 CoA 产生于线粒体的基质,限速的两种酶分别为丙酮酸脱氢酶和乙酰 CoA 转移酶;而直接利用乙酰 CoA 的是柠檬酸合成酶和乙酰 CoA 羧化酶,前者使乙酰 CoA 进入三羧酸循环,后者是催化脂肪酸合成的第一步反应。脂肪酸合成是在细胞质中进行的。要使线粒体产生的乙酰 CoA 转至细胞质需要有三种因子:柠檬酸合成酶使乙酰 CoA 变为柠檬酸,再借助三羧酸转位因子将柠檬酸转移至细胞质,最后再通过 ATP 柠檬酸解酶使柠檬酸变为乙酰 CoA(图 11.41)。

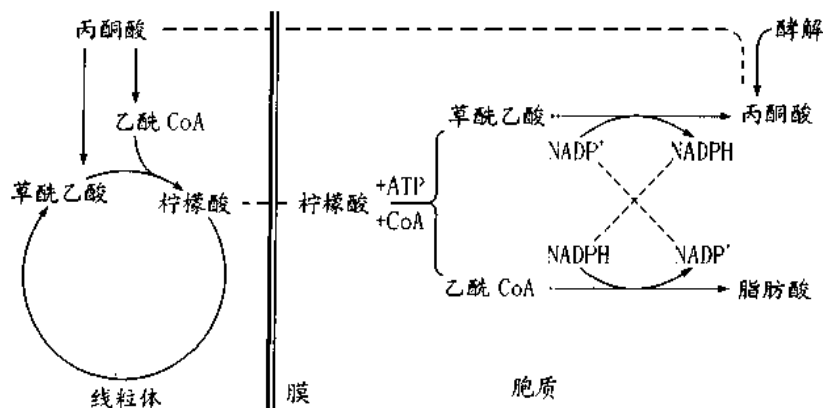


图 11.41 乙酰 CoA 运转机制

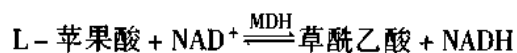


酶系统在细胞内的区划化对生物来说,在提高酶系统的催化效率与专一性方面可认为是一种进化,但是,在另一方面区划化也带来了代谢途径或代谢体系间的相互联系问题,及共同因子的联系与转移问题。在解决这个问题上,生物不是靠这些因子简单的被动扩散,而是借助转位因子与相应的酶系。转位因子目前了解的还不多,至于酶,相对各种代谢物而有所不同,但其中同工酶起着十分重要的作用。

### 三、同工酶

同工酶的生理功能可大体概括为两个方面:一是调节各区划间的代谢物的浓度梯度,例如,协调各种代谢途径的共同因子的转移;其次,是使复杂的代谢体系整体化,使之能协同地进行调节控制。

以苹果酸脱氢酶为例,此酶催化:



在生物体中有两种类型的苹果酸脱氢酶,分别位于线粒体和细胞质中。由于编码它们的基因不同,其氨基酸组成和电泳的行为也有差别,特别是它们的动力学性态更是不同(表 11.13)。

这两种同工酶作用草酰乙酸的转换率都比作用苹果酸者高,细胞质的 MDH 尤为显著,并为过量的苹果酸所抑制,而线粒体者恰相反,能为高浓度的草酰乙酸所抑制。因此,细胞质的 MDH 倾向于推动上述反应向左,即草酰乙酸的还原,而线粒体 MDH 倾向于推动上述反应向右,即苹果酸氧化。这可能就是通过 MDH 使 NADH-NAD<sup>+</sup> 进行穿膜转移的动力学基础。

表 11.13 线粒体与细胞质中的苹果酸脱氢酶(MDH)

	相对浓度	电泳方向	L-苹果酸		草酰乙酸	
			$K_m$ (mmol/L)	转换率	$K_m$ (mmol/L)	转换率
线粒体 MDH	70	阴极	1.0	35 000	0.04	60 000
细胞质 MDH	30	阳极	0.54	20 000	0.05	70 000

同样,在穿梭系统中,与 MDH 协同配合的另一酶——门冬氨酸转氨酶(GOT)也有两种同工酶,分别位于线粒体和细胞质中;它们在物理性质、免疫学性质以及动力学性态方面都显著不同。线粒体酶倾向于催化草酰乙酸变为门冬氨酸,而细胞质者则倾向于催化门冬氨酸转变为草酰乙酸,这样,通过这对同工酶就解决了草酰乙酸不能穿过线粒体内膜的矛盾。

同工酶的另一重要生理意义是能对复杂的代谢体系提供选择性调节。

### 四、酶与代谢活性调节

由于几乎所有的代谢反应都是酶催化进行的,因此,代谢调节实际上就是通过酶进行的调节。在生物体内,酶的调节包括酶量的调节和酶活性的调节,或者说,包括酶合成水平上的调节与酶分子活性水平上的调节。

和单个酶反应不同,酶组成各种代谢系统后,就必须从整体角度来考虑代谢活性的调节问题,也就是说,在单个酶活性调节的基础上,还必须考虑各个酶连接后产生的一些整体性的新问题,诸如可控点问题、调节方式问题等。

## 1. 调控点

所谓调控点,是指在反应系统中起调节作用的关键环节。对于简单的反应  $A \rightleftharpoons B$  来说,如果同时有几种酶能够起催化作用,那么在通常的生理条件下,  $K_m$  大的酶反应就可能是调节的关键环节。但是对于较复杂代谢反应,例如:  $A \rightleftharpoons B \rightleftharpoons C \cdots \rightleftharpoons H$ , 如果该反应是在一个封闭的平衡系统中进行,那么整个反应系统无疑取决于反应速度最小的环节。不过,这种系统在生物体中是无意义的。反之,如果反应是在不封闭系统中进行,底物能不断得到补充,产物能不断移去,整个系统就处于恒态;但是,就各具体反应环节而言,有的接近于平衡,有的却远离平衡,那么,这种情况下哪一环节是调控点? 为此,这里需要用到一个概念:不平衡比 (disequilibrium ration)  $\rho$ 。

对于任何一个反应  $A \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} B$  来说,都有一个平衡常数  $K_{eq}$ ,

$$K_{eq} (= k_1/k_2) = [B]/[A]$$

但在实际的反应系统中,  $K' = [B]/[A] \neq K_{eq}$ , 此时就引出了  $\rho$  来,

$$\begin{aligned}\rho &= K'/K_{eq} \\ &= [B]/[A] \cdot 1/K_{eq} \\ &= k_2 \cdot [B]/k_1 \cdot [A] \\ &= v_{正反应}/v_{逆反应}\end{aligned}$$

$$v_{逆反应} = \rho \cdot v_{正反应}$$

在代谢反应中任何一个环节显然都有:

$$v_{净} = v_{正反应} - v_{正反应} \cdot \rho$$

根据数学分析,可以做出结论,对于一个复杂的代谢反应来说,愈接近平衡,即  $\rho \rightarrow 1$  的环节不可能是调控点;反之,愈远离平衡,  $\rho$  愈小的环节,倒很可能在理论上是反应的调控点。

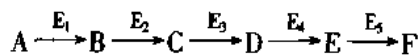
除了上述理论分析外,也可以通过实验测定调控点,有三个标准:① 该环节酶活性最低;② 反应远离平衡点;③ 交叉点,即调节因子引起的微扰将使调控点前后代谢物浓度出现相反的变化。

## 2. 代谢系统的调节方式

### (1) 代谢系统的几种模式

代谢系统根据其性质和作用可分成三类(见图 11.42):① 合成代谢途径 (Anabolic pathways), 催化组成机体结构物质的合成;② 分解代谢途径 (Catabolic pathways), 通过水解、氧化、氧化磷酸化等使有机分子分解;③ 双重代谢途径 (Amphibolic pathways), 有着一种以上的功能, 位于代谢的十字路口, 联结合成代谢和分解代谢, 如三羧酸循环。

代谢从形式和组成方式上, 或者通过线性相连, 组成如下式所示的模式:



大肠杆菌中的异亮氨酸合成体系属之(图 11.43):

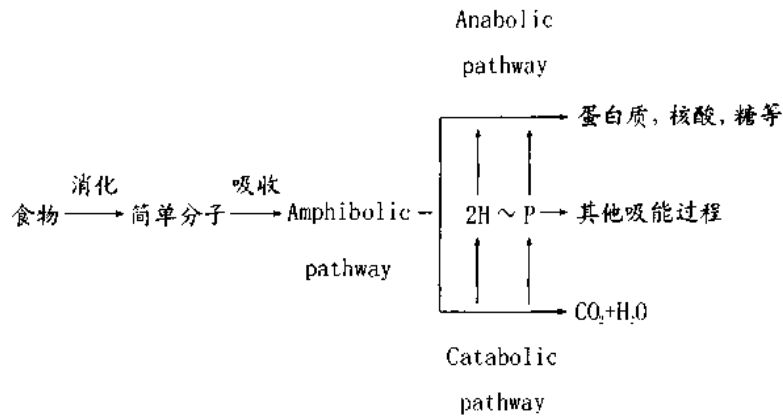


图 11.42 代谢系统三个途径之间的关系

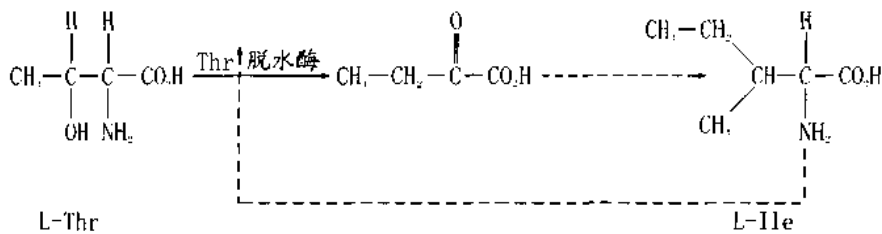
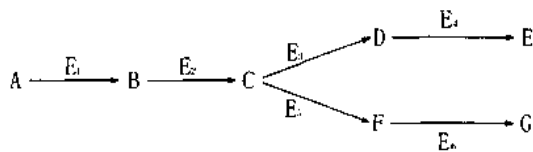


图 11.43 大肠杆菌中的异亮氨酸合成途径

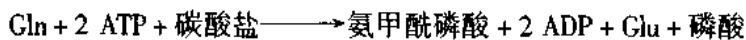
或者通过分枝相连的,组成如下模式:



大肠杆菌中合成嘧啶核苷酸与精氨酸的体系属之(见图 11.35)。

### (2) 代谢调节的基本方式——反馈调节

代谢调节的基本方式是反馈抑制(feedback inhibition)与反馈阻遏(feedback repression),统称反馈调节(feedback regulation)。这种调节的作用点通常就在代谢系统的第一个酶或分枝途径的第一酶上,也就是说,代谢的调控点在代谢途径前面的酶上,这样就可避免中间产物不必要的积累,因此是一种最经济的调节方式。例如,大肠杆菌中异亮氨酸的合成途径,由于它是线性的直链代谢途径,其代谢调控也较简单,伴随尾产物异亮氨酸的大量积累,或从外源添加大量的异亮氨酸,就可对它的第一个酶产生反馈性抑制与阻遏,阻断该途径的继续进行;反之,异亮氨酸缺乏或消耗时,该关闭的代谢又可重新启动。对于分枝代谢途径来说,调控点接近于分枝点,通常是分枝途径的第一个酶,这样,既能对某些产物积累时进行相应的调控,又不影响其他相关代谢途径的继续进行。以氨甲酰磷酸的合成控制为例,氨甲酰磷酸由氨甲酰磷酸合成酶催化合成:



如前所述,氨甲酰磷酸是嘧啶(核苷酸)和精氨酸合成的重要原料。在这个系统中,氨甲酰磷

酸合成酶具有十分重要的作用。嘧啶核苷酸能强烈地反馈抑制该酶,但精氨酸则否。当嘧啶核苷酸过量时,氨甲酰磷酸的合成就受到抑制,余下的氨甲酰磷酸合成能力仅可缓慢支持精氨酸的合成;在这种情况下,鸟氨酸将积累,而在达到足够的高的浓度时,它就能抵消嘧啶核苷酸的作用,恢复氨甲酰磷酸合成酶的作用。由于高浓度的嘧啶核苷酸能反馈抑制 Asp 转氨甲酰基酶,因此形成的氨甲酰磷酸将仅用于精氨酸的合成;当精氨酸过量时,它又能反馈抑制氨基酸转乙酰基酶,调整鸟氨酸的合成水平。

代谢的反馈调节多种多样,可大致分为:

① 协同式反馈调节(concerted or multivalent feedback regulation)。处于这种调节控制下,只有当两种或两种以上的尾产物同时过量存在时,才会出现相应的抑制或阻遏。

② 累加式反馈调节(cumulative feedback regulation)。处于这种调节控制下,对某种酶的反馈抑制或阻遏按尾产物的种类与浓度产生相加效应。

③ 合作式反馈调节(cooperative feedback regulation)。处于这种调节控制的代谢系统,一种尾产物浓度的变化就能对系统产生调节效应,但是如果有两种或两种以上的尾产物过量存在时,其效应就会产生超过累加式的反馈调节。

④ 酶的多型性反馈调节(enzyme multiplicity feedback regulation)。这实际上就是根据酶的多型性,即同工酶进行的一种调节。

以大肠杆菌门冬氨酸激酶(aspartokinase, AK)的活性调节为例(图 11.44)。

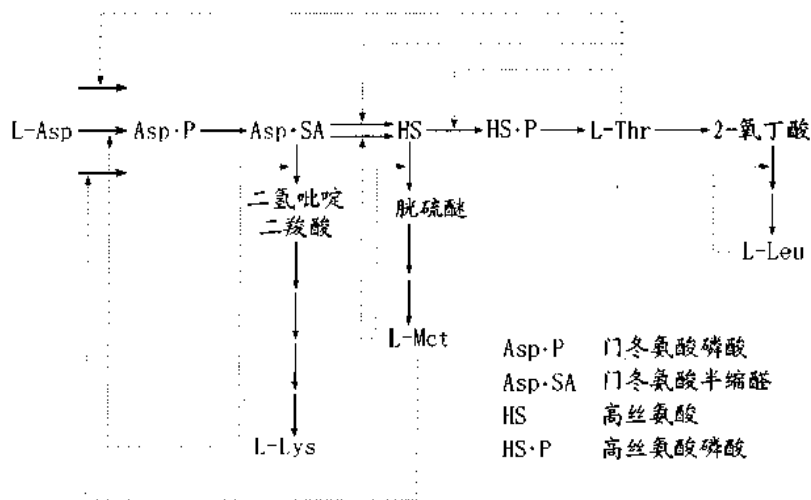


图 11.44 大肠杆菌门冬氨酸激酶的活性调节

在门冬氨酸转化为赖氨酸、苏氨酸等的生物合成途径中,有一共同的步骤即门冬氨酸变为门冬氨酸磷酸,这是关键的调控步骤,由门冬氨酸激酶(AK)催化。在大肠杆菌中有三种 AK 同工酶,其中,AK<sub>L</sub> 能专一而且完全地被 Lys 反馈阻遏和抑制;AK<sub>T</sub> 能为 Thr 反馈抑制,为 Thr 与 Ile 反馈阻遏;AK<sub>H</sub> 对 Met 敏感,能被 Met、Thr 和 Ile 的前体同型(高)丝氨酸抑制。显然,这是一种十分精确的调控机构。

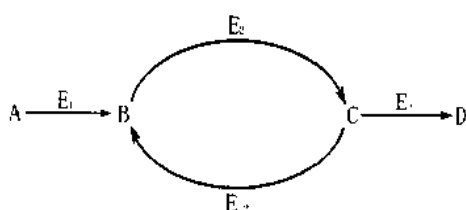
不仅如此,AK 还可进一步和另一种同工酶——同型(高)丝氨酸脱氢酶(HDH)偶联进行调节。HDH 催化门冬氨酸-β-半缩醛形成高丝氨酸。HDH 有两种:HDH I 能为 Thr 反馈阻遏和抑制,HDH II 能 Met 反馈阻遏和抑制;而且在大肠杆菌中 AK<sub>T</sub> 和 HDH I、AK<sub>H</sub> 和 HDH II

往往以多酶多肽的形式融合在一起,前者相对分子质量约 350 000,为六聚体,后者相对分子质量约 170 000,为四聚体。在 Lys 过量存在的情况下,AK<sub>L</sub> 受到反馈抑制,门冬氨酰磷酸的生成减少,同时从门冬氨酰磷酸到 Lys 途径的第一个酶也受到抑制,这样,在 Lys 过量时,就有利于导向同型(高)丝氨酸及其后续产物 Met 和 Thr 与 Ile 的形成。

### (3) 调节信号的放大

代谢调节实际上是机体对代谢内外条件变化信号产生的一种响应。反馈调节可认为是对反应产物变化作出的一种响应。和单个酶反应不同,代谢系统的一个重要特征就是它能将起始信号加以放大;除了产物外,起始信号也可以是底物或其他配基的浓度改变。在机体体内,有两种重要的代谢信号放大(signal amplification)机制适应这种需要:底物循环和酶的(共价修饰)互变循环。

① 底物循环(substrate cycle)。这种机制可以下式表示:



其中, E<sub>2</sub> 和 E<sub>1</sub> 分别催化 B→C 和 C→B, 如果 E<sub>2</sub> 和 E<sub>1</sub> 都有活性, 那么 B, C 将互变。以糖酵解循环中的 6-磷酸果糖激酶(6-phosphofructokinase)和果糖二磷酸酯酶(fructose-bisphosphatase)为例, 它们能催化 D-果糖-6-磷酸(F6P)和 D-果糖-1,6-二磷酸(FDP)互变, 互变的净结果是 ATP 水解为 ADP 和磷酸(图 11.45)。

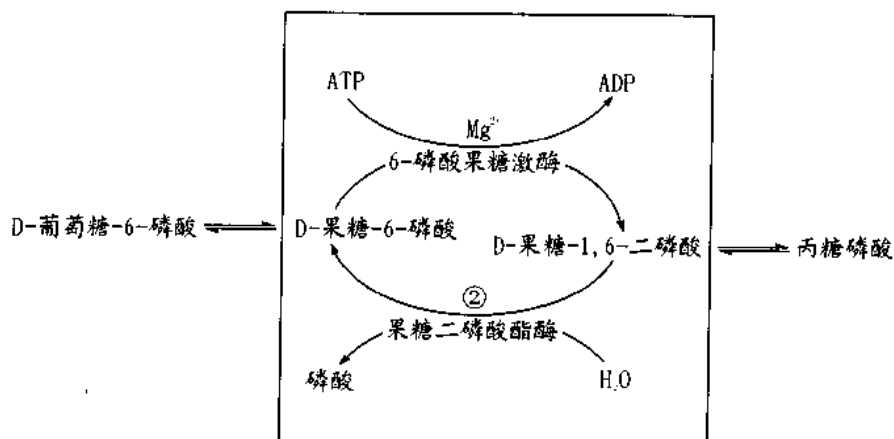


图 11.45 D-果糖-6-磷酸和 D-果糖-1,6-二磷酸构成的底物循环

底物循环的意义在于一种信号往往能同时以相反的方式调节参与循环的两种酶的活性,因此,这一调控比对单种酶来得更为精确有效,例如,AMP 能活化 6-磷酸果糖激酶,而同时抑制果糖二磷酸酯酶,这样,AMP 一个小的浓度改变就能引起底物循环发生大的净变化。同样,肝中的 D-葡萄糖(G)和 D-葡萄糖-6-磷酸(G6P)也能构成底物循环,它们分别由己糖激酶(HK)与葡萄糖-6-磷酸酯酶(G6Pase)催化。这种循环在调节葡萄糖代谢中十分重要(图 11.46)。

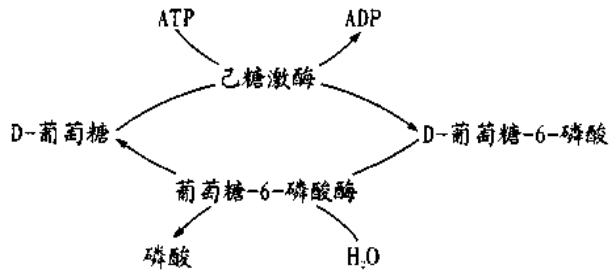


图 11.46 D-葡萄糖和 D-葡萄糖-6-磷酸构成的底物循环

糖酵解和三羧酸循环可认为是生物界中进行生物氧化、提供能量的主要途径。而且,对于糖酵解来说,通过各种方法测定表明,6-磷酸果糖激酶和己糖激酶催化的反应由于具有低的活性,同时又远离平衡点,因此,一般认为它们可能是该代谢途径的调控点,代表着糖酵解途径的活性。这一点也可通过底物循环加以说明(图 11.47)。体外实验表明,6-磷酸果糖激酶有着十分复杂的动力学性态(图 11.48),在生理范围内,低的 F6P 浓度条件下,高浓度的 ATP 能导致 6-磷酸果糖激酶的抑制(ATP 结合的位点在活性中心以外的部位),这种抑制能为其他各种代谢物如 ADP、AMP、磷酸和 FDP 等拮抗。

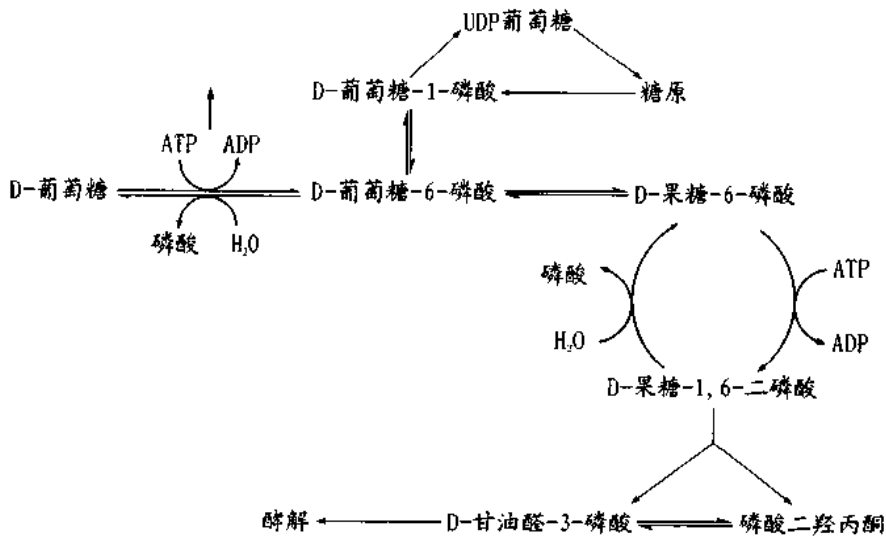


图 11.47 肌肉中部分糖酵解途径

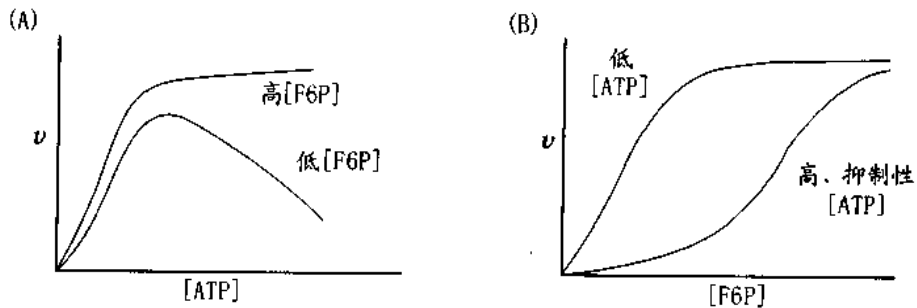


图 11.48 6-磷酸果糖激酶的动力学性态示意图

关于酵解途径的调控有三种说法:一种认为 ATP 是调节的效应物,即认为 ATP 浓度的改变能解释 6-磷酸果糖激酶的活性变化。然而,某些测定表明,ATP 浓度的改变不足以解释酵解途径的活性变化。例如,绿头苍蝇翅肌在飞行时,相对静止的肌肉而言,糖酵解途径的活性可增大 100 倍,但 ATP 的浓度仅有 10% 的下降。另一种解释是,6-磷酸果糖激酶的活性调控是 ATP、AMP、ADP 等代谢物浓度改变的综合结果,但是,对 6-磷酸果糖激酶动力学性态的仔细分析表明,这种综合影响也不能解释酵解途径的活性改变。第三种解释则是立足于 F6P 与 FDP 构成的底物循环。测定表明,在不进行糖原异生作用的各种类型的肌肉组织中,虽有相当大量的果糖二磷酸酯酶,但该酶受 AMP 的强烈抑制。在静止肌肉中,AMP 的浓度很低,6-磷酸果糖激酶催化的 F6P→FBP 速度虽较低,而果糖二磷酸酯酶催化的速度更低,因此糖酵解相对活性很低;当肌肉作功时,ATP 的浓度下降,AMP 的浓度升高,6-磷酸果糖激酶可能被活化,果糖二磷酸酯酶则受到抑制,因此,糖酵解活性升高。按估计,当 AMP 的浓度发生 2.5 倍的变化时,糖酵解活性可升高约 250 倍。底物循环不仅能解释糖酵解对 AMP 变化的灵敏性,同时也能解释果糖二磷酸酯酶在各种类型肌肉中的分布。例如,在心肌中就没有果糖二磷酸酯酶,这和心肌对能量的需求十分恒定,对酵解的调节要求远小于骨骼肌的事实相一致。

与此相类似,人们早就注意到,在糖酵解中,当 6-磷酸果糖激酶被抑制时,磷酸化的己糖,即 D-葡萄糖-6-磷酸就会积累。D-葡萄糖-6-磷酸是在己糖激酶催化下由 D-葡萄糖转化而来的,反应过程中消耗一个 ATP。己糖激酶存在于各种哺乳动物组织中,为 D-葡萄糖-6-磷酸抑制,相对 D-葡萄糖言,它表现非竞争抑制,因此这种抑制调节着 D-葡萄糖-6-磷酸和 D-果糖-6-磷酸的生成。另一方面,值得注意的是,己糖激酶位于单糖代谢分枝点上,D-葡萄糖-6-磷酸既能用于糖酵解,为之提供果糖-6-磷酸,同时,也能通过磷酸变位酶的作用形成 D-葡萄糖-1-磷酸用于糖原合成。在通常的生理条件下 D-葡萄糖-6-磷酸浓度不会造成对己糖激酶的抑制,当机体从食物摄取大量糖,或其他原因使血液循环中 D-葡萄糖浓度升高时,由于胰岛素的分泌,才会推动 D-葡萄糖进入细胞,同时促进糖原的合成。也就是说,D-葡萄糖浓度的升高,过量的葡萄糖才会经过 D-葡萄糖-6-磷酸、D-葡萄糖-1-磷酸和 UDP-葡萄糖等合成糖原。

以上介绍了通过底物循环在糖酵解分枝点前后对己糖激酶和 6-磷酸果糖激酶进行调控以响应各种代谢条件的变化,可见,这种双点调控比单点调控更为有效。

② 酶的(共价修饰)互变循环(interconvertible enzyme cycle)。已知某些酶的活性可以通过可逆的共价修饰加以调节,因此,将这些酶组成互变循环时,它们就能显著地放大起始信号。以丙酮酸脱氢酶多酶复合物为例。该酶复合物在联结糖酵解与三羧酸循环上占有关键的地位,其组成和活性调节因生物而有一些差别。在大肠杆菌中,复合物由丙酮酸脱氢酶( $E_1$ )、乙酰基转移酶( $E_2$ )和二氢硫辛酸还原酶( $E_3$ )组成,其组成与活性调节如图 11.49。

乙酰 CoA 和 NADH 相对 CoA 和  $NAD^+$  而言能竞争性地抑制该酶,两者在一起能抑制该酶和硫辛酰胺的结合,同时,核苷单磷酸能活化该复合物,而 GTP 却能抑制它。在哺乳动物中丙酮酸脱氢酶复合物比大肠杆菌者要复杂很多:第一,它比较大;第二,它由二十面体,而不是八面体组成;第三,除  $E_1$ 、 $E_2$ 、 $E_3$  外,复合物还包含另外两种酶——丙酮酸(硫辛酰胺)激酶和丙酮酸(硫辛酰胺)磷酸酯酶,前者和酶结合紧密,后者容易和复合物解离。在哺乳动物中,该酶的活性调节除了上述机制外,主要通过可逆磷酸化(图 11.50)。

当  $[NADH]$  和/或  $[乙酰 CoA]$ , 或者  $[ATP]/[ADP]$  较高时,激酶被活化,丙酮酸脱氢酶失

活,丙酮酸的脱羧受到抑制,不能进入三羧酸循环参加代谢,同时,在高的 $[NADH]/[NAD^+]$ 条件下,磷酸酯酶活性也将受到抑制;反之,丙酮酸的存在能抑制激酶的活性,使复合物保持活性状态。因此,通过这些代谢物浓度的变化可以十分灵敏地调节丙酮酸脱氢酶的活性形式与非活性形式间的平衡。

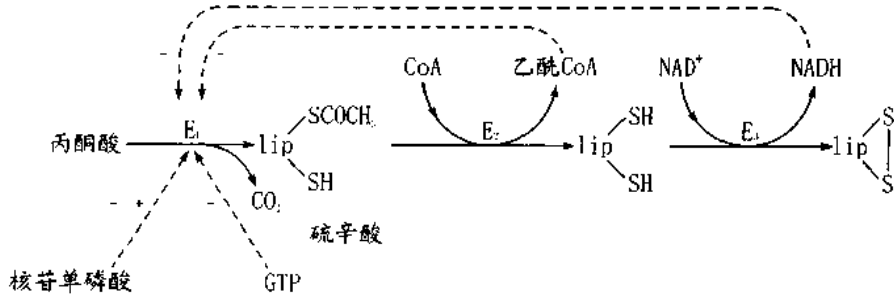


图 11.49 大肠杆菌丙酮酸脱氢酶复合物组成及活性调节

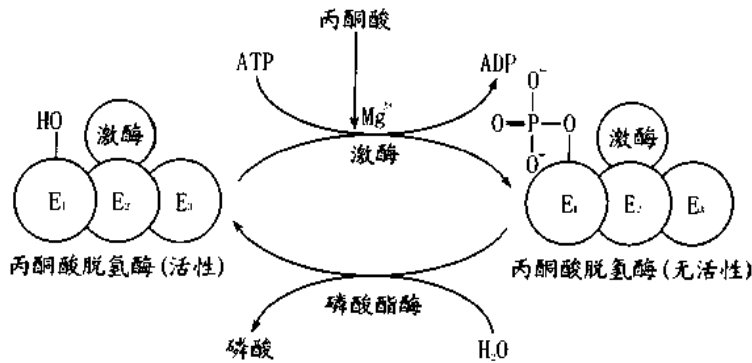


图 11.50 丙酮酸脱氢酶多酶复合物可逆磷酸化互变

酶的共价修饰互变循环另一最典型的例子是磷酸化酶、磷酸化酶激酶和蛋白激酶,它们在相应的激酶和磷酸酯酶作用下能迅速放大外界信号,调节糖酵解活性。有人作过估计,cAMP 仅 1% 的升高,就可能有 50% 的磷酸化酶 b 转化为磷酸化酶 a,而这一过程可发生在肾上腺素等激素注射后的两秒钟内。

## 五、酶合成水平上的调节与酶的周转

### 1. 原核生物与真核生物中酶合成水平的调节

#### (1) 原核生物

对于这类生物来说,由于其转录与翻译紧密相连,因此,酶的合成调节主要在于转录,调节的基础是操纵子,围绕操纵子可从不同环节、以不同方式进行调节,但是基本的调节方式是两种:诱导和阻遏。

#### (2) 真核细胞

真核生物情况要复杂得多,可能在染色质、复制、转录、转录后加工、翻译和翻译后加工等各种水平上进行调节。首先是染色质水平上的调节,这是指染色质的结构和构象状态水



平的调节,因为,它和基因表达密切相关,参与这种调节的包括各种酶促反应,例如,DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、磷酸化以及聚(ADP-核糖)修饰等。

真核细胞内酶合成的其他几类调节是:

① 阻遏与诱导。例如,精氨酸能分别阻遏和诱导 HeLa、KB 以及 L 细胞内精氨酸合成与分解途径中的有关酶。

② 激素调节。激素能通过它对细胞的特定受体的识别与结合,诱导 mRNA 和酶的合成。一般多肽激素与儿茶酚胺类激素的受体多在细胞表面,而甾体激素的受体多在细胞质内。表 11.14 列举了某些激素(包括 cAMP)对肝中的酶浓度的影响。

表 11.14 某些因素对肝酶浓度的影响

酶	$t_{1/2}$ (h)	糖皮质激素	cAMP	葡萄糖	胰岛素	周期律动
ODC	0.18	+	+	N.S.	+	+
TAT	1.5~2	+	+	-	+	+
TO	2.5	+	0	-	+	+
SDH	4.4	+	+	-	N.S.	-
PEPCK	5.5	+	+	-	-	+
GK	12~18	+(?)	-	+	+	+

激素诱导可能产生一种所谓超诱导。这是指某些酶,例如,HTC 细胞的酪氨酸转氨酶(TAT),用甾体激素诱导时,如果培养体系中同时加有低浓度的放线菌素 D(例如  $0.25 \mu\text{g/ml}$ ),则这种诱导完全被抑制;但如果放线菌素 D 浓度升高达  $1 \sim 5 \mu\text{g/ml}$  时,甾体激素就可以诱导酶大量合成。这种“超诱导”现象的机制可能是:在 TAT 的 mRNA 合成的同时也合成了一种不稳定的阻遏子,该阻遏子能和 TAT 的 mRNA 相互作用阻止其翻译,并加速其分解,因此平时仅有少量 TAT 合成;甾体激素能使阻遏子失效,同时稳定 TAT 的 mRNA,使之能大量翻译。阻遏子的 mRNA 对放线菌素 D 的敏感性比 TAT 的 mRNA 低,因此在低浓度放线菌素 D 条件下,TAT 的 mRNA 可能被抑制,而阻遏子则否,故 TAT 合成受阻。但是放线菌素 D 浓度升高时,阻遏子合成也受阻,而且它很不稳定,TAT mRNA 得以从阻遏子中解放出来进行大量翻译合成。

③ 日夜周期、生长发育对酶合成的影响。有许多酶在日夜周期中有明显的改变,但有的则否。另一方面,代谢活性及其相应的酶谱通常随生物的生长发育而不同,而且这种变化在胚胎与器官形成阶段特别显著。这些酶或酶谱变化的根本原因与激素的分泌有密切关系。

酶量调节也应包括降解的调节,酶的合成与降解实际上就构成了酶的周转(enzyme turnover)。

## 2. 酶的周转

### (1) 酶周转的动力学

在正常情况下,细胞内的酶量总保持恒态水平(steady state level)。根据测定表明,酶的合成速度服从零级反应动力学关系,与细胞内已有的酶浓度无关:

$$v_s = k_s$$

另一方面,酶的降解速度服从一级动力学方程,而且这种降解是随机进行的,新生成的酶分子与老的酶分子一样都可能受到降解:

$$v_d = k_d[E]$$

因此,某一时间内酶的水平由下式决定:

$$d[E]/dt = k_s - k_d[E]$$

恒态时,  $d[E]/dt = 0, k_s = k_d[E]$ 。

当激素、营养等生理状况发生改变时,酶的合成和降解速度也会发生相应的变化。如果新的合成与降解速度常数分别为  $k_s'$  与  $k_d'$ ,那么,新的恒态水平由下式决定:

$$[E_t]/[E_0] = k_s'/k_d'[E_0] - (k_s'/k_d'[E_0] - 1)e^{-k_d't}$$

其中,  $[E_0]$  为起始的酶浓度,  $[E_t]$  为  $t$  时的酶浓度

通常,酶的周转速度,更确切地说,酶的降解速度常用酶的半寿期(half-life) ( $t_{1/2}$ ) 表示,它和  $k_d$  的关系是:

$$t_{1/2} = \ln 2/k_d = 0.69/k_d$$

## (2) 酶周转的一般规律

当细胞的总体积改变可以忽略不计时,酶的周转一般规律是:

① 在同一组织中酶的周转速度,或者说,酶的半寿期可以很不相同,从几十分钟到几天。例如,在肝中鸟氨酸脱羧酶的半寿期为 20 min,而 6-磷酸果糖激酶则可达到 7 d。同一酶在不同组织中,甚至在同一细胞的不同区划中,其半寿期也可能有很大的差异。例如,  $\delta$ -氨基戊二酸合成酶在细胞液中的半寿期为 20 min,而在线粒体中则为 60 min,因此,酶的周转速度似乎不能以细胞或细胞器为划分单位。

② 半寿期较短的酶对各种刺激因素的响应也较快,因而,能较快地控制酶的水平。图 11.51 为三种酶在某些因素的刺激下的诱导合成与刺激移去后的变化情况。其中,鸟氨酸脱羧酶有最短的半寿期,它能非常快地改变其合成速度,并在 2~3 h 内达到新的平衡;而在刺激移去后,又能迅速地(一般 2~3 h 内)回复到原有水平。反之,丙酮酸激酶有着十分长的半寿期,在刺激后 5 h 中仅有缓慢的线性升高,并需要在 7 h 以后才能达到新的恒态水平的 90%。

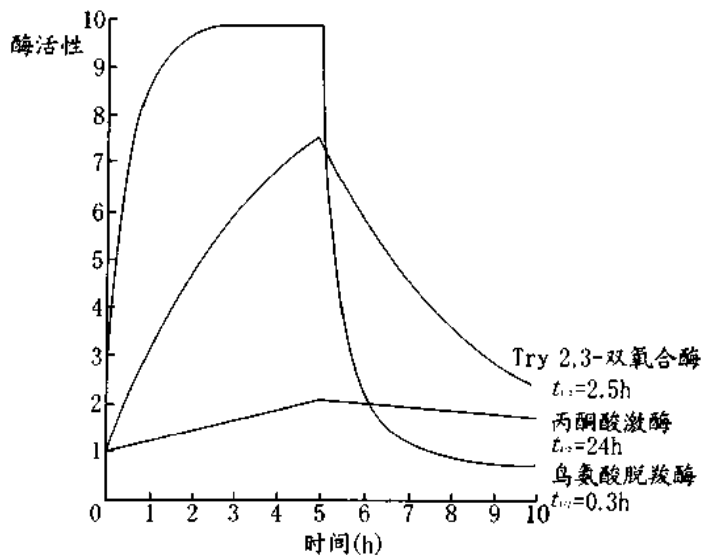


图 11.51 某些酶的半寿期与各种条件下的含量变化

③ 对于代谢而言,代谢途径中的第一个酶或限速环节的酶往往有较短的半寿期,例如,鸟氨酸脱羧酶、 $\delta$ -氨基戊酸合成酶、酪氨酸氨基转移酶以及丝氨酸脱水酶等,它们的半寿期都很短;

④ 就蛋白质的结构而言,第一,亚基较大的蛋白质通常有较短的半寿期,这可能和较大的多肽链相应地有着较多的对蛋白酶敏感点有关,因为易受蛋白酶降解。

其次,等电点较低的酶、包含大量疏水氨基酸的酶,以及在体外易被蛋白酶水解的酶,它们的半寿期一半也较短。

第三,某些蛋白质通常以蛋白质复合物的形式存在,当它处于未装配状态时,一般对蛋白酶的作用较为敏感(图 11.52)。

第四,异常蛋白,例如突变蛋白、化学修饰蛋白等相对正常蛋白而言,一般半寿期也较短。例如,大肠杆菌的 $\beta$ -D-半乳糖苷酶的变种就很易被降解;再如,血红红蛋白的脯氨酸如被铃兰氨酸(azetidine-2-carboxylate)取代后,它的半寿期就会由 120 min 减至 20 min。

⑤ 底物、辅助因子以及竞争性抑制剂的结合,往往可增大酶对降解的抵抗能力。例如,从鼠肝、鼠肌、鼠的骨髓以及酵母细胞纯化的蛋白酶等表明,它们作用全酶的活性很低,但却能使除去了磷酸吡哆醛的酶蛋白失效;再如,鸟氨酸氧化酸氨基转移酶,该酶相对分子质量 180 000,由四个相对分子质量 45 000 的亚基组成,当磷酸吡哆醛解离后,就解聚为相对分子质量 90 000 的二聚体,同时伴随构象的改变和某些氨基酸侧链基团(半胱氨酸、酪氨酸和色氨酸等)的暴露,如果和族专一性(*ser*-)蛋白酶保温,全酶有抵抗能力,而酶蛋白就可能发生部分降解。

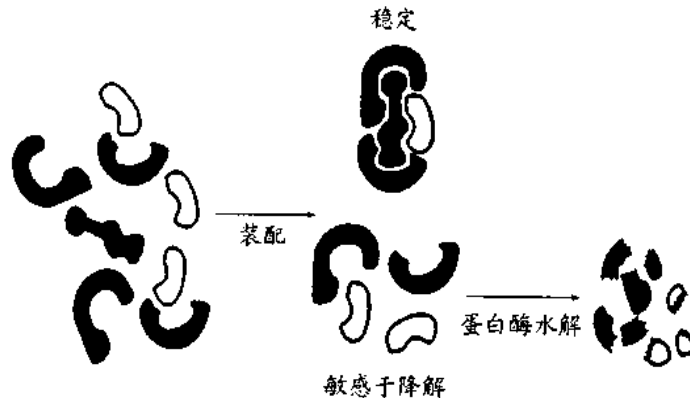


图 11.52 未装配的蛋白质对蛋白酶具有较大的敏感性

⑥ 癌基因(*oncogene*),例如 *fos*, *myc* 等的产物一般也是一些半寿期较短的蛋白,这可能是与它们在控制细胞的生长和分裂中起着十分重要的作用有关。这些类型的蛋白只有不断迅速降解,它们的浓度才能通过改变合成速度而得到相应的改变。

### (3) 酶的降解机制

和所有蛋白质一样,酶的周转和降解是通过蛋白酶的作用完成的。已知在溶酶体内存在着各种内肽酶和外肽酶,如组织蛋白酶(*cathepsin*)D 和 B,它们的浓度可能分别达 0.78 mmol/L 和 1.54 mmol/L;同样,在细胞质和线粒体内也发现类似的蛋白酶。这些蛋白酶专一性很低,可以作用各种蛋白质和酶,而且在细胞内很可能存在一个可供随时应用的降解

系统。但是在通常情况下,体内的蛋白质和酶常能抵抗它们的降解,只有在一定的条件下才会变得敏感起来。例如,由于化学修饰,或由于辅助因子的丢失,或由于某些其他物质的结合,导致了蛋白质或酶发生构象改变才使之变得不稳定起来;当然,也可能在正常情况下存在着某种专一的蛋白酶抑制剂使降解系统不能发挥作用。但是,不管是哪一种情况,酶和蛋白质的降解一般是多步骤的过程,包含着引发、专一和非专一的蛋白酶水解等过程(图 11.53)。

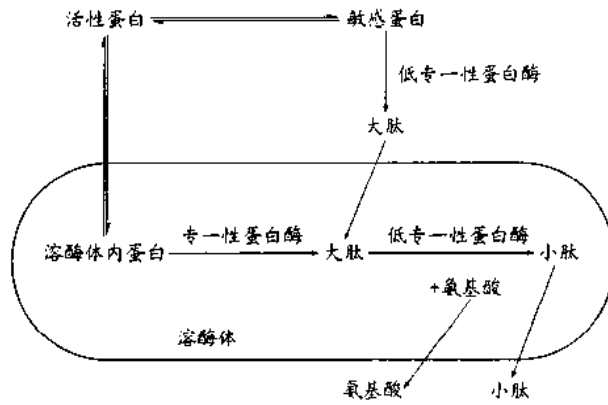


图 11.53 酶(蛋白质)降解是一个多步骤的过程

现在的问题是,蛋白酶水解机构如何识别要被降解的蛋白?

一般认为,被降解的信号之一是多肽链的 N-端第一个氨基酸,当 N-端的氨基酸是 Met, Ser, Thr, Ala, Val, Cys, Gly 和 Pro 时,相应的蛋白质是稳定的;而其余 12 种氨基酸引导的蛋白质就有可能吸引蛋白酶作用,容易被降解,成为半寿期短的蛋白质,在细胞液的稳定蛋



图 11.54 泛素的立体结构

白中还未发现过这些氨基酸位于其 N - 末端;即使某些蛋白质的氨基末端以这些氨基酸结尾,它们通常也都将被运转至其他细胞器,如内质网腔或高尔基体中,因而,半寿期也是长的。这就是“N - 末端法则(N - end rule)”。该法则在细菌中似乎也适用。

被选择性降解的另一信号就是泛素(ubiquitin)的结合,在真核生物中称为“泛素(依赖)途径(ubiquitin - dependent pathway)”。泛素是一种由 76 个氨基酸组成、耐热的小分子蛋白质(图 11.54)。当单个泛素分子和蛋白质结合后,就起着一种共价修饰的调节作用;而泛素的多拷贝在多酶复合物的催化下加到 N - 不稳定标记的靶蛋白的氨基末端时就会导致该蛋白立即而完全的降解。

酶复合物先将泛素结合到靶蛋白多肽链邻近的赖氨酸残基上,然后再催化一系列泛素加到第一个泛素上,形成一支的多泛素链(图 11.55)。接着,这个带有分支多泛素的蛋白质就会被一种依赖于 ATP 的蛋白酶迅速降解。

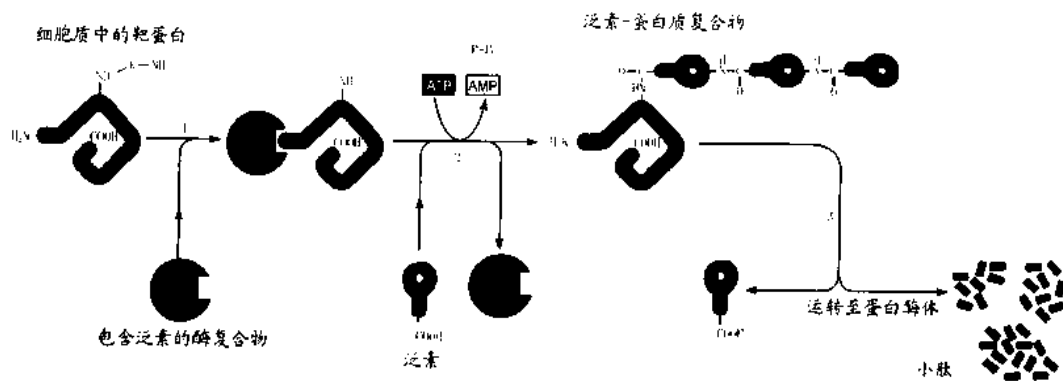


图 11.55 依赖于泛素的蛋白质降解

上述蛋白质的降解是在蛋白酶体(proteasome)中进行的,这种蛋白酶体分散在整个细胞中,每个蛋白酶体由包含多种不同蛋白酶的中心圆柱体组成,其蛋白酶的活性中心面向内



图 11.56 蛋白酶体的电镜示意图

腔;圆柱体的末端是一大的蛋白复合物,由至少 10 种以上的多肽链组成,其中某些具有水解 ATP 的能力,它们能选择性地和降解的蛋白结合,并将后者运转至内腔,在那里通过多种蛋白酶的作用,将其水解为小肽释放。图 11.56 示蛋白酶体的电镜图形。

酶的降解周转是生物体内普遍存在的现象,虽然乍一看,从酶合成到酶降解总的结果是能量的消耗,但这是生物适应外界条件变化的必要过程。因为在培养或营养条件改变的情况下,在激素进行生理机能调节的情况下,以及生长发育过程中都必然伴随新酶的形成和一些酶的废弃。将废弃不用的酶加以降解和重新利用是符合自然法则的必然结果。

生物在长期的进化过程中,为了适应生命活动的需要,为了适应外界条件的变化,已从酶的结构、酶系的组成建立了极为精巧,堪称天衣无缝的一整套机构以保证代谢活性的调节。

#### 第四节 酶生物学知识的应用<sup>(22—28)</sup>

酶和生命活动有密切关系,一方面它决定着生物的机能水平,另一方面它也反映机体的生理状况,因此阐明了酶的生物学功能,掌握了它在体内作用特点和规律,就有可能控制生物,使之能更好地为生产实践服务。下面以大纲形式加以概括。

##### 一、酶生物学知识和医学实践的关系

###### 1. 阐明病理机制

- (1) 探讨疾病与酶机能—代谢异常的关系;
- (2) 探讨先天遗传疾患与酶缺失的关系;
- (3) 探讨癌变与核酸合成代谢、癌基因产物的关系。

###### 2. 进行疾病诊断

- (1) 比较正常和病理状况下酶谱差异,为早期诊断、鉴别诊断以及预后建立特异的指标;
- (2) 建立简便、灵敏的酶法分析系统,以供临床上进行有诊断价值的代谢物或毒物等的分析。

###### 3. 治疗疾病

- (1) 基于正常和病理组织以及病害生物的酶谱差异,针对关键酶设计和开发高度专一、强力的抑制剂(包括过渡态类似物)作为治疗药物;
- (2) 根据疾患产生原因,设计相应的药物以调节酶的机能和代谢;
- (3) 进一步开发药物酶的品种与应用,并根据药物酶在体内代谢规律与存在问题,进行有针对性的改造与修饰,包括设计新的剂型、制成人工脏器,以适应各种需要,扩大应用范围。

##### 二、酶生物学知识在农业生产上的应用

包括两方面:一是防治病虫害、除莠,这一方面基本和酶生物学知识在医学实践上的应

用相似;二是增产方面的应用,具体地说有两种内容的工作可作:

- (1) 掌握作物生长发育过程中酶活性变化的规律,有效地控制作物的生长发育;
- (2) 探明优良品种的酶特征,建立快速简便的筛检方法,并定向进行新品种培育。

### 三、酶生物学知识与发酵工业

酶生物学知识在这个领域的应用主要是根据酶活性变化的特征进行定向选育,另一方面,微生物发酵是当前酶生产的主要方式,利用酶生物合成的规律可大幅度地提高酶的生产量。

总之,酶和酶学与生产实践、基础理论都有非常密切的关系,它可以、也已经在这些方面发挥很大作用,并还蕴藏着巨大的潜力。随着酶学的发展,它的应用也必将跃入更新的境界,展现更加宽广的前景。

## 参 考 文 献

### 一、酶和细胞结构

- (1) Marijuan PC. *Biosystems*, 1991, **25**(4):259
- (2) Bennett MJ. *Clin. Chim. Acta*, 1994, **226**(2):211
- (3) Danpure CJ. *Bioessay*, 1997, **19**(4):317

### 二、酶在生物体内的功能

- (4) Koch KA. *Chem. Biol.*, 1997, **4**(8):549
- (5) Nelson N. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1992, **4**(4):654
- (6) Booesen K. *Ther. Drug Monit.*, 1996, **18**(4):392
- (7) Sando JJ, Maurer MC, Bolen EJ et al. *Cell Signal*, 1992, **4**(6):595
- (8) Casabona G. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 1997, **21**(3):407
- (9) Moser CC, Page CC, Farid R et al. *Bioeng. Biomembr.*, 1995, **27**(3):263
- (10) Trijbels FJ, Ruitenbeek W, Huizing M et al. *Mol. Cell Biochem.*, 1997, **174**(1—2):243
- (11) Koch KA. *Chem. Biol.*, 1997, **4**(8):949
- (12) Lohman TM. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**(4):2 269
- (13) Zawal L, Reinberg D. *Ann. Rev. Biochem.*, 1995, **64**:533
- (14) Greider CW. *Trends Genet.*, 1996, **14**(8):294

### 三、酶和代谢调节

- (15) Dorter TD. *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**(21):13 469
- (16) Ovadi J. *J Theor. Biol.*, 1991, **152**(1):1
- (17) Kaijser J. *Curr. Opin. Cell Regul.*, 1992, **33**:391
- (18) Mayer F. *FEMS Microbial. Rev.*, 1993, **10**(3—4):327
- (19) Goldberg AL. *J. Biol. Chem.*, 1997, **378**(3—4):131
- (20) Vaux DL, Strasser A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, **93**(6):2 239

(21) Brown GO(ed.). *Bioenergetics*, p.111. Oxford: Oxford IRC press, 1995

#### 四、酶生物学知识的应用

(22) Jacobeen EN, Finney Ns. *Chem. Biol.*,1994,**29**(4):401

(23) Hooper NM. *Int. J. Biochem.*,1991,**23**(7—8):641

(24) Fisher LJ, Raymon HK & Gage FH. *Ann. N. Y. Acad Sci.*,1993,**295**:278

(25) Smitl DA, Jones BC & Walker DK. *Med. Res. Rev.*,1996,**16**(3):243

(26) Whittls FJ. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*,1994,**23**:349

(27) FRetthold DW. *J. Psychoactive Drug*,1990,**22**(4):419

(28) McLullough KC. *Rev. Sci. Tech.*,1993,**12**(2):325