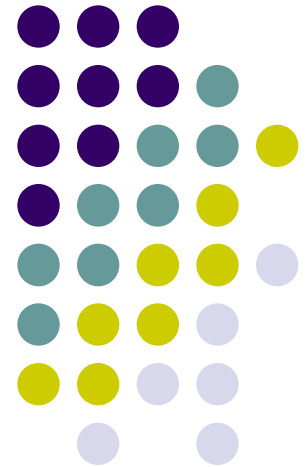
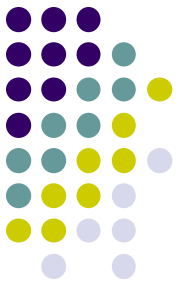


# 第三章 酶

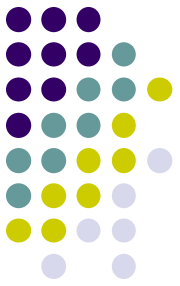
(Chapter 3 Enzyme)





## 本章掌握内容

1. 掌握酶的活性中心特点。
2. 掌握米氏方程的含义及动力学常数的意义。
3. 掌握竞争性、反竞争性以及非竞争性抑制作用的动力学特点。
4. 掌握别构酶的动力学特征。
5. 掌握下列概念：  
酶；酶的活性中心；高度特异性；可逆性抑制作用；别构酶；酶原；同工酶；酶活性；酶比活性；核酶。



# 什么是酶？

酶是一类由活细胞产生，对其特异性底物具有高效催化作用的蛋白质。

# 酶的研究历史



酶的研究历史是生物化学的发展史，酶作为最主要的生物催化剂，其研究历史已有150多年。

- In 1930s , people found:

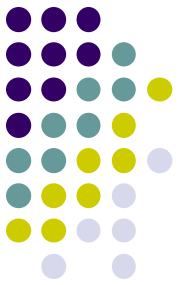
麦芽提取液可以将淀粉转化为糖。

- In 1857, Louis Pasteur found:

只有活的酵母细胞才能进行发酵，细胞如果死亡，发酵也就终止。

- In 1897, Eduard Buchner proved:

无细胞的酵母提取液可催化糖发酵生成醇的反应。



- **In 1926 , James Sumner proved:**

酶的化学本质是蛋白质 。

- **In 1982, Cech found:**

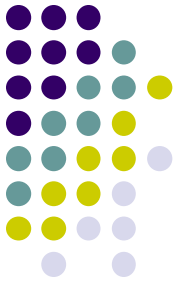
RNA也具有酶一样的催化活性，赋予了它一个专门的名字,即核酶(ribozyme)。

- **In 1986, Schultz and Lerner:**

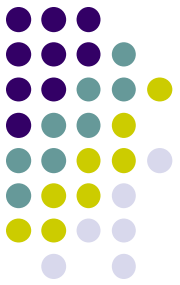
研制成功抗体酶。

- **In 1995 , Jack W. Szostak found:**

具有DNA连接酶活性的DNA片段，称其为脱氧核酶  
(deoxyribozyme) 。

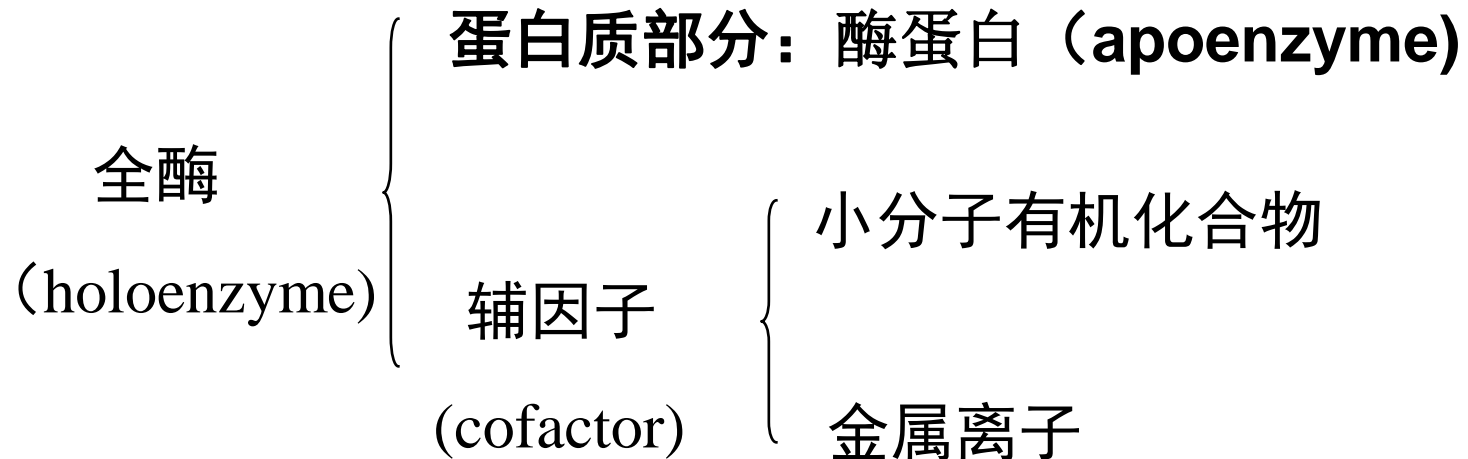


# 第一节 酶的分子结构

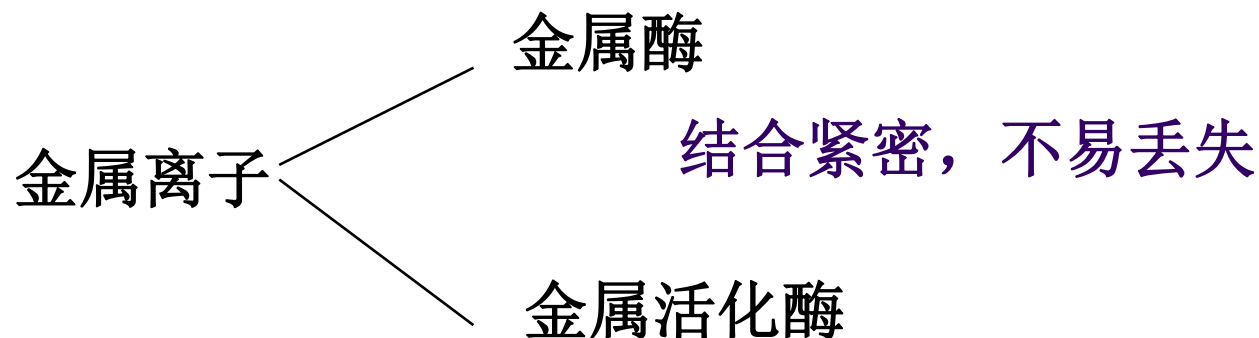


# 一、酶的分子组成

- 单纯酶 (simple enzyme)
- 结合酶 (conjugated enzyme)



# (一) 金属离子作为辅因子



## 金属离子的作用

- 稳定酶蛋白的构象。
- 参与催化反应，传递电子。
- 酶和底物之间发挥桥梁作用。
- 中和负电荷，降低静电斥力。



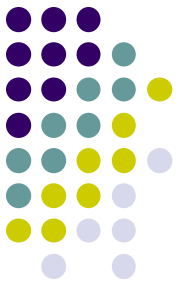
## (二) 小分子有机化合物作为辅因子



**B族维生素、血红素等。**

### 小分子有机化合物的作用

载体的作用，传递电子、质子及其他基团。



### (三) 辅因子的分类

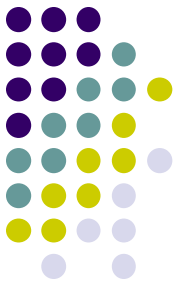
(按其 与酶蛋白结合的紧密程度不同)

#### 辅酶 (coenzyme)

与酶蛋白结合疏松，可以用透析或超滤的方法除去。

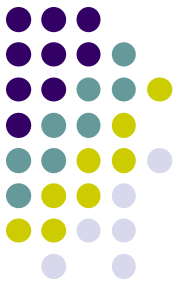
#### 辅基 (prosthetic group)

与酶蛋白结合紧密，不能用透析或超滤的方法除去。



## (四) 结合酶中各部分的作用

- 结合酶中只有全酶才能发挥酶的催化活性。
- 结合酶中酶蛋白决定了反应的专一性，辅因子决定了反应的种类和性质。
- 结合酶种类繁多，但它们的辅因子却为数不多。



## 二、酶的活性中心

### (一) 必需基团

酶分子中与酶活性密切相关的化学基团。

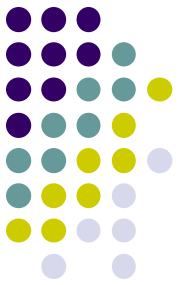
#### ■ 常见的必需基团：

Ser —— OH

His —— 咪唑基

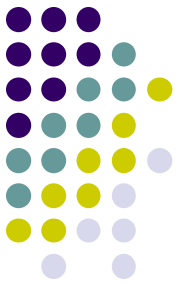
Cys —— SH

Asp ——  $\beta$  - COOH



## （二）酶的活性中心（active center）的概念

必需基团在一级结构上可能相隔甚远，但在空间结构上十分接近，构成特定的与酶催化活性密切相关的区域，即能与底物结合并催化底物转化为产物的空间结构，称为酶的活性中心(active center)或活性部位(active site)。



- 活性中心内的必需基团

结合基团

(binding group)

与底物结合

催化基团

(catalytic group)

催化底物转变为产物

- 活性中心外的必需基团

位于活性中心以外，维持酶活性应有的空间构象所必需。

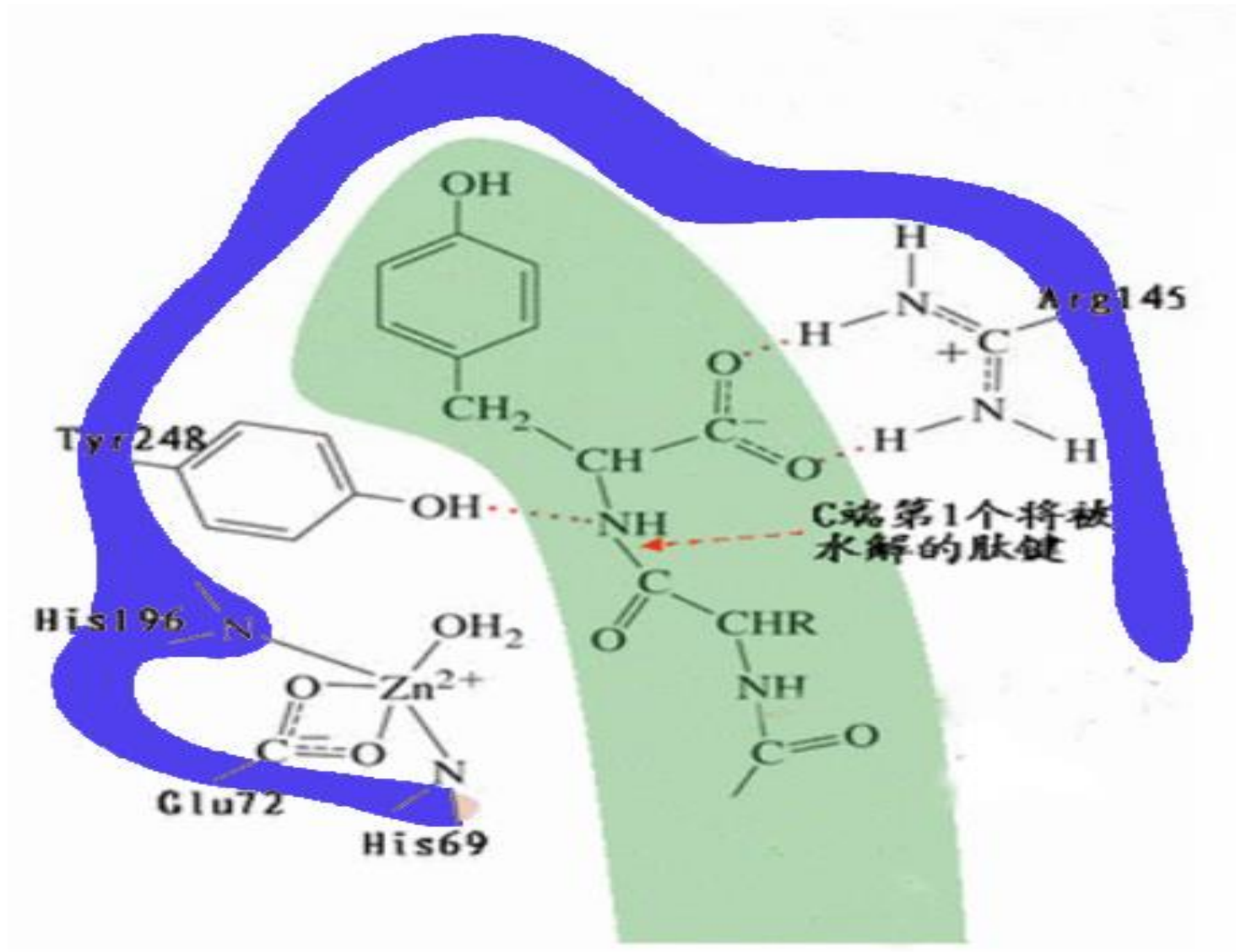
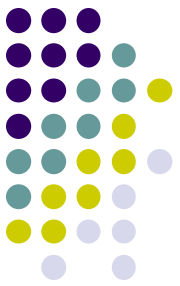
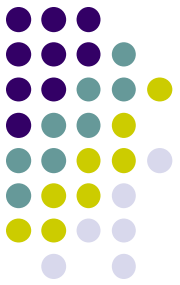


图3 - 1 羧肽酶A活性中心的形成



### (三) 活性中心的特点

1. 酶的活性部位在酶分子总体中占很小的一部分。
2. 活性中心是三维实体。
3. 活性中心结构具有柔性和可运动性。
4. 活性中心多为疏水基团组成的疏水区域。
5. 底物通过非共价键与活性中心结合。





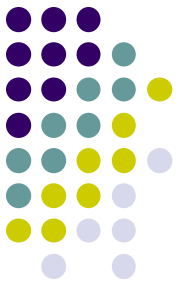
6. 活性中心对酶活性维持起到**决定作用**。

活性中心破坏，酶失活；

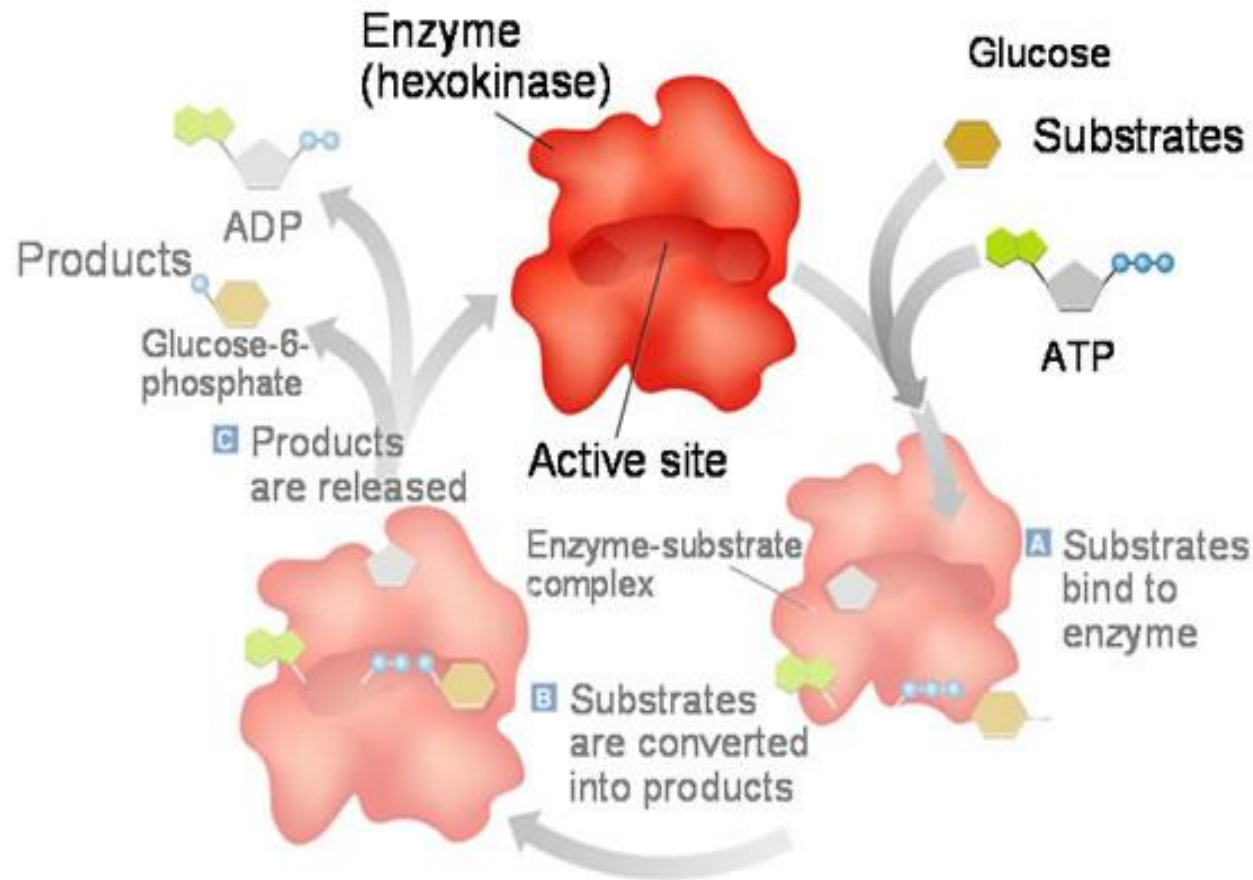
活性中心形成，无活性酶原转变为有活性的酶。

7. 酶蛋白分子其他结构为酶活性中心的形成提供结构基础；

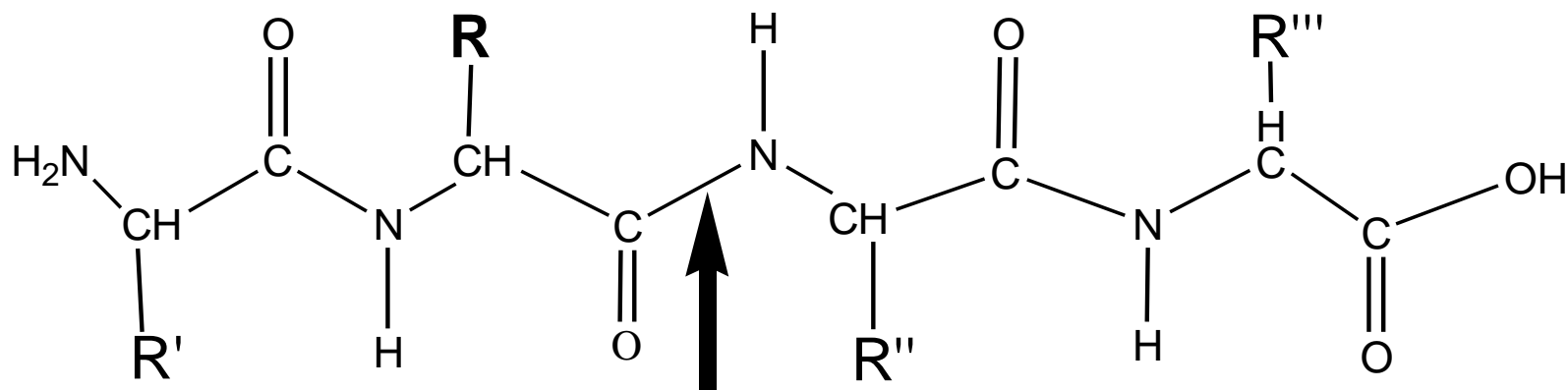
8. 不同酶分子活性中心的结构绝对不同。



## 举例：己糖激酶催化G生成G-6-P的过程



## (四) 活性中心结构与酶功能之间的关系



水解肽键的位置

---

水解肽键的酶或试剂

对被水解肽键羧基侧R的要求

胰蛋白酶

胰凝乳蛋白酶

金黄色葡萄球菌内肽酶V8

溴化氰

亚碘酰基苯甲酸

精、赖

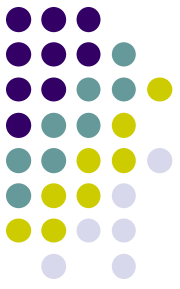
芳香族氨基酸：苯丙、酪、色

谷

蛋

色

---

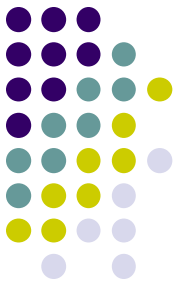


胰蛋白酶：结合口袋含Asp-COO<sup>-</sup>，所以水解肽键的羧基侧氨基酸为带正电荷的碱性氨基酸（**Arg、Lys**）。

胰凝乳蛋白酶：活性中心为长条形疏水口袋, 所以能容纳**芳香族氨基酸**的特大残基。

弹性蛋白酶：结合口袋中含有大量Thr和Val，易与Gly、Val、Ala等分子量较小氨基酸结合。

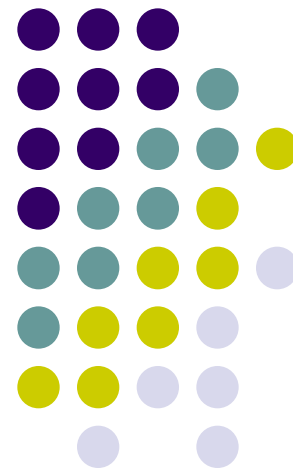
### 三、多酶复合物及多功能酶

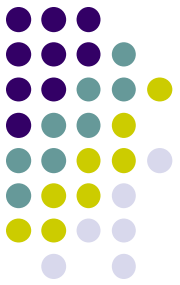


- 单体酶 (monomeric enzyme) : 只由一条多肽链组成, 这类只具备三级结构的酶称为单体酶。
- 寡聚酶 (oligomeric enzyme) : 有些酶是由多条相同或不同肽链 (亚基) 组成, 叫做寡聚酶。
- 多酶体系 (multienzyme system) : 催化不同化学反应, 但功能相关的酶组合在一起, 叫做多酶体系。
- 多功能酶 (multifunctional enzyme) : 有些酶在进化过程中由于基因融合, 将多种催化功能相关的酶融合成一条多肽链, 这类酶称为多功能酶。

## 第二节 酶促反应特点

---

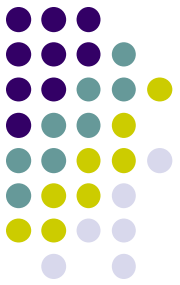




# 一、酶催化作用的特点

## （一）酶和一般催化剂比较的共同点

- 酶只能催化热力学上允许进行的反应，而不能违背之。
- 酶的作用不能改变反应平衡点，只能使反应加速达到平衡点。
- 在反应前后酶的质量不变。

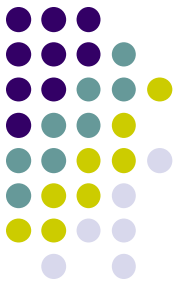


## (二) 酶作为生物催化剂的特点

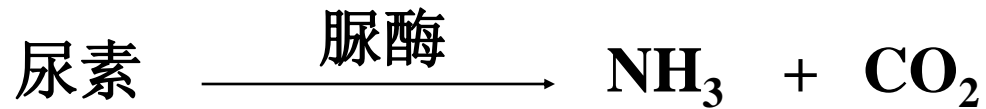
### 1. 酶易失活

- 使蛋白质变性的因素，均使酶失活。
- 常温、常压、中性条件下反应。

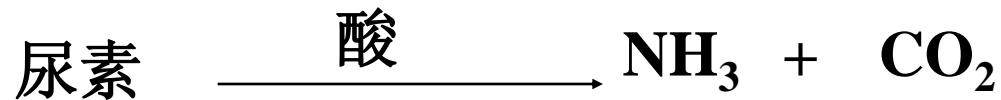




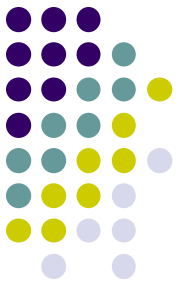
2. 高效性  $> 10^6 \sim 10^{13}$  倍



$$k = 3.0 \times 10^4$$



$$k = 7.4 \times 10^{-7}$$



## 活化能 (activation energy)



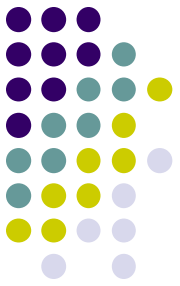
初态：反应物分子所具有的平均能量状态；

终态：产物所具有的能量状态；

过渡态（活化态）：中间产物所具有的能量状态。

- 酶高效催化特性主要通过降低反应的活化能实现的。

## 活化能（activation energy）



底物分子从初态转变到过渡态（活化态）所需要的能量变化，称为活化能。

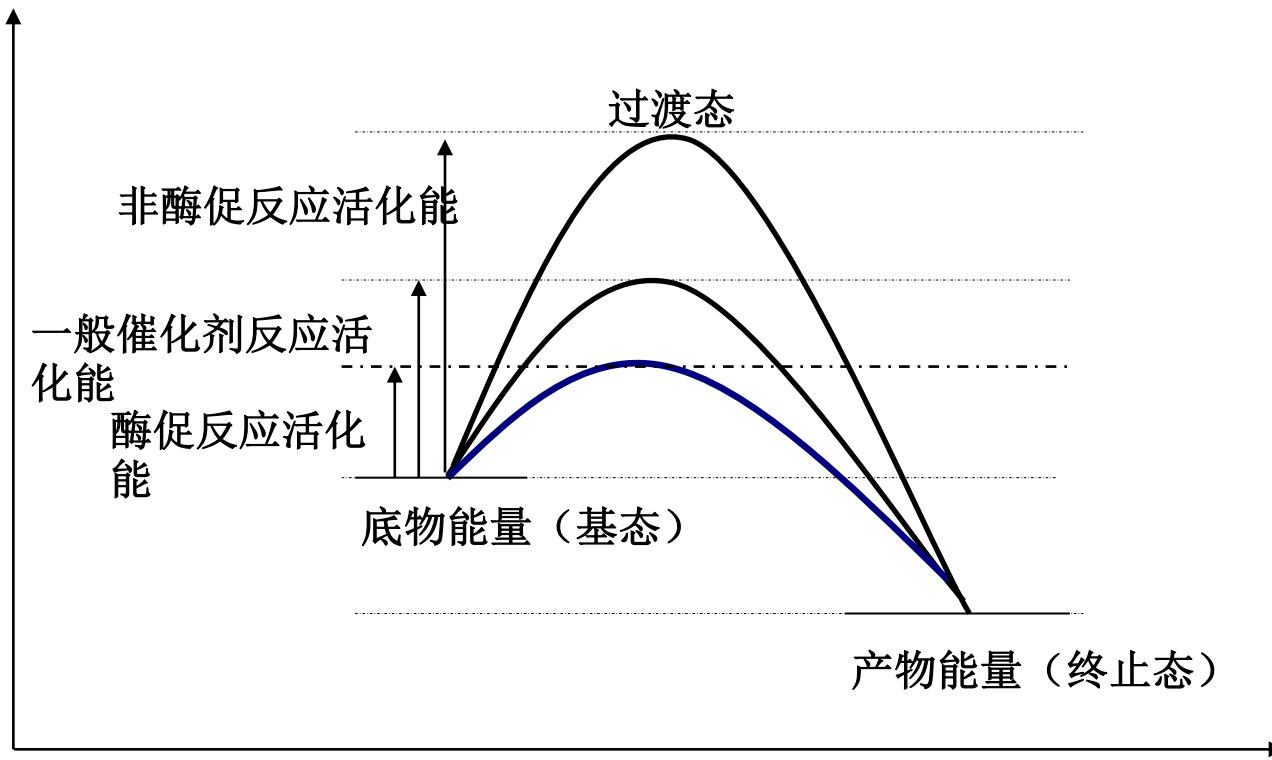
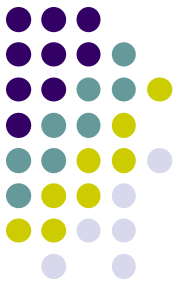


图3- 2 酶促反应与非催化反应的能量图解



### 3. 高度特异性

#### 1) 定义

一种酶只作用于**一种或一类化合物**，进行一种类型的化学反应，以得到一定结构的产物，这种现象称为酶的**特异性 (specificity)**。

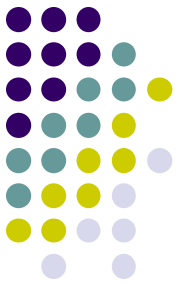
## 2) 分类

根据酶对底物选择的严格程度不同，分为三种类型：

- 立体异构特异性 (stereo specificity)
- 结构特异性 (structure specificity)

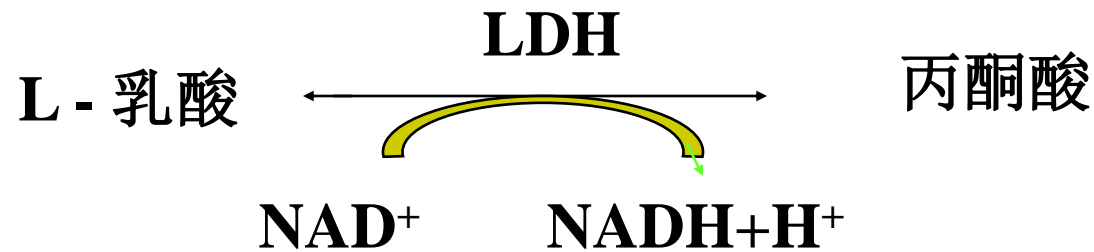
{ 绝对特异性(absolute specificity)  
相对特异性(relative specificity)

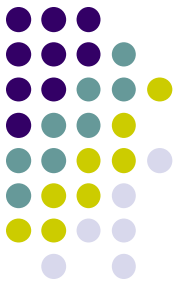




## ■ 立体异构特异性 (stereo specificity)

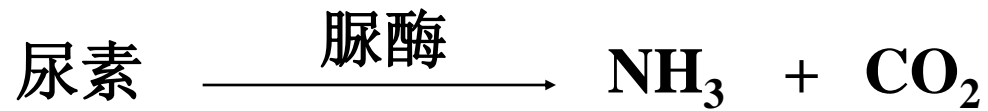
一种酶只能作用于立体异构体中的一种。

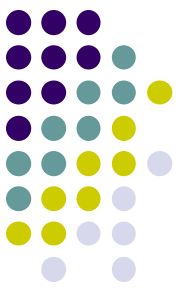




- 绝对专一性(absolute specificity)

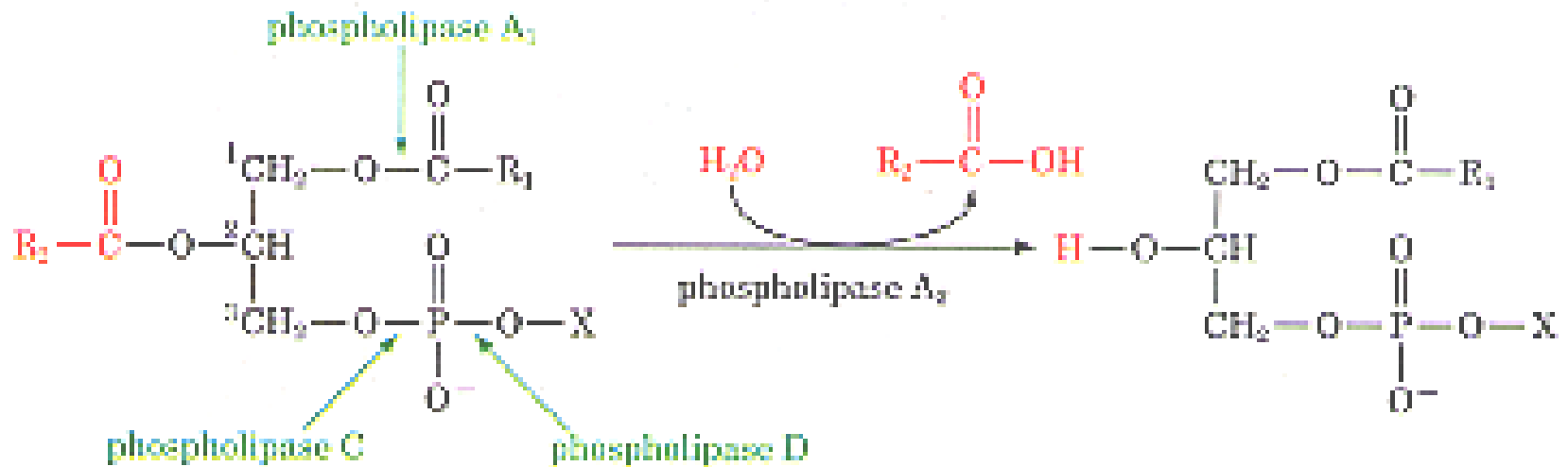
一种酶只对一种化合物有催化活性。





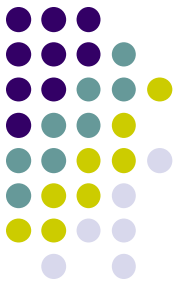
## ■ 相对特异性(relative specificity)

一种酶可以催化一类底物(结构相似的物质或一种化学键)。



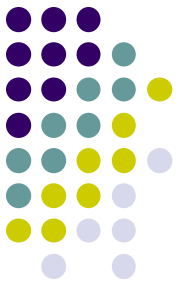
磷脂酶A<sub>2</sub>催化取代基X不同的磷脂水解相同的2-位酯酰键



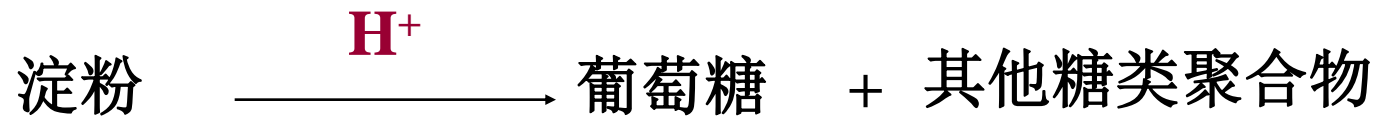
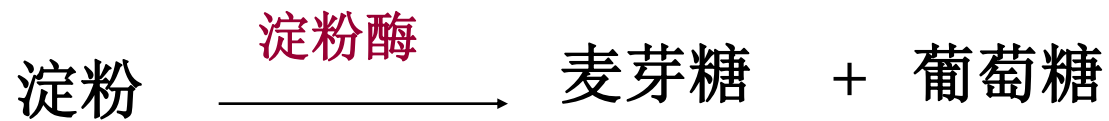


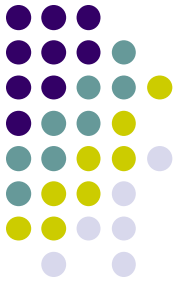
## 4. 酶活性受到调节和控制

- 1) 调节酶的浓度。
- 2) 通过激素调节酶活性。
- 3) 反馈抑制调节酶活性。
- 4) 抑制剂和激活剂对酶活性的调节。
- 5) 其他调节方式。



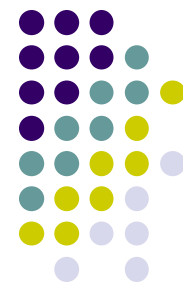
## 5. 酶催化没有副反应





## 第三节 酶促反应的机制

# 一、酶-底物复合物形成和诱导契合学说



酶与底物分子结合时，酶与底物的结构相互诱导、相互形变、相互适应，使酶活性中心与底物密切结合，这就是诱导契合 (induced-fit) 学说。

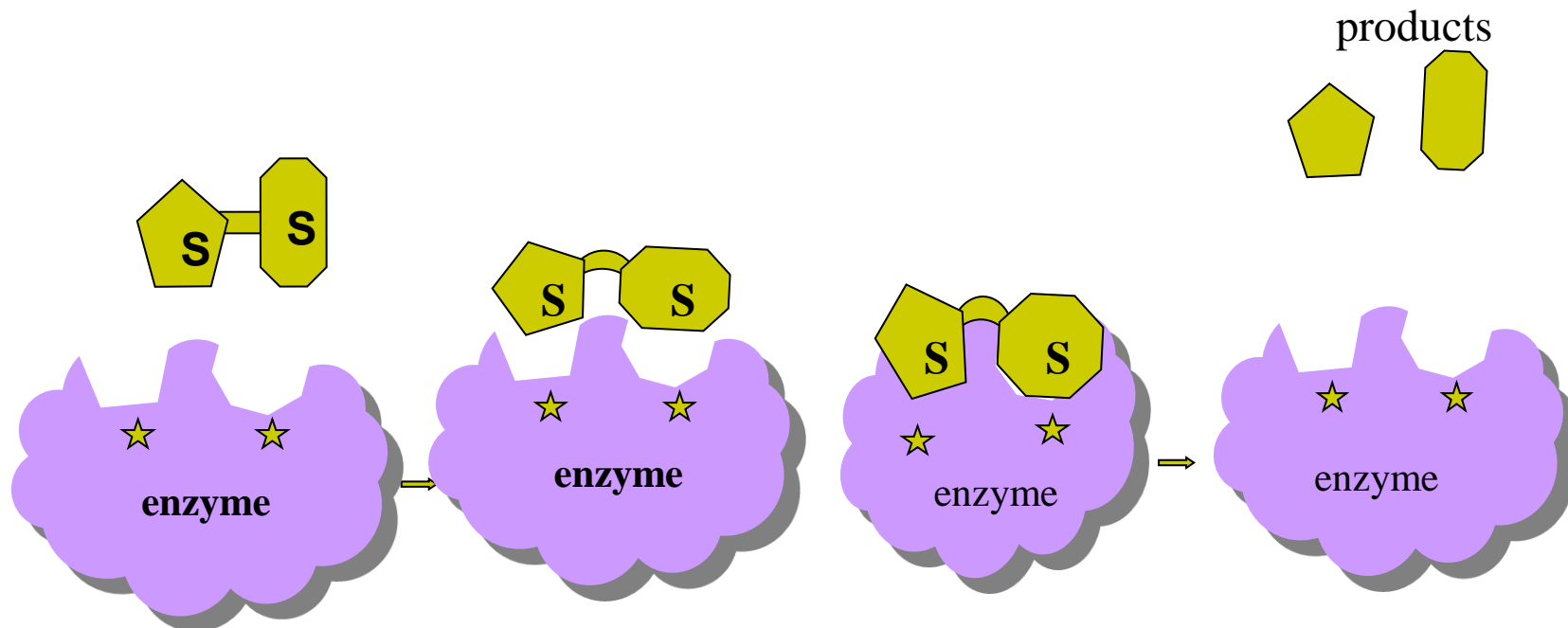
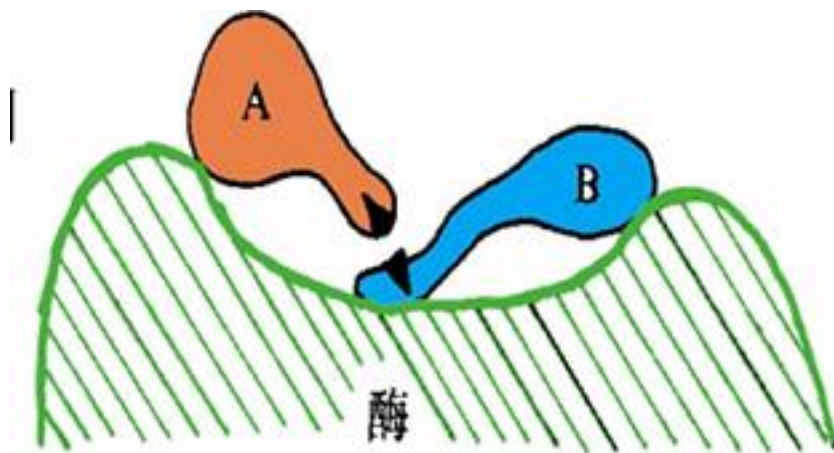


图3-3 酶与底物的诱导契合模型

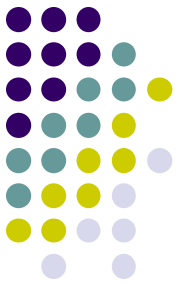
## 二、邻近效应和定向排列



在有两个以上底物参加的反应中，酶将相互作用的诸底物结合到酶的活性中心上，使它们相互接近，并按一定次序排列。



▲ 为反应部位



### 三、酸碱催化

酶可同时具有酸催化和碱催化两种特性，这是因为酶分子中含有各种不同的功能基团，它们的 $pK$ 值不等，解离程度不一。通过这类多功能基团的协同作用，其催化效率必将大大增进。



## ● 酸催化：

酸作为质子的供体，降低反应活化能，称为酸催化。

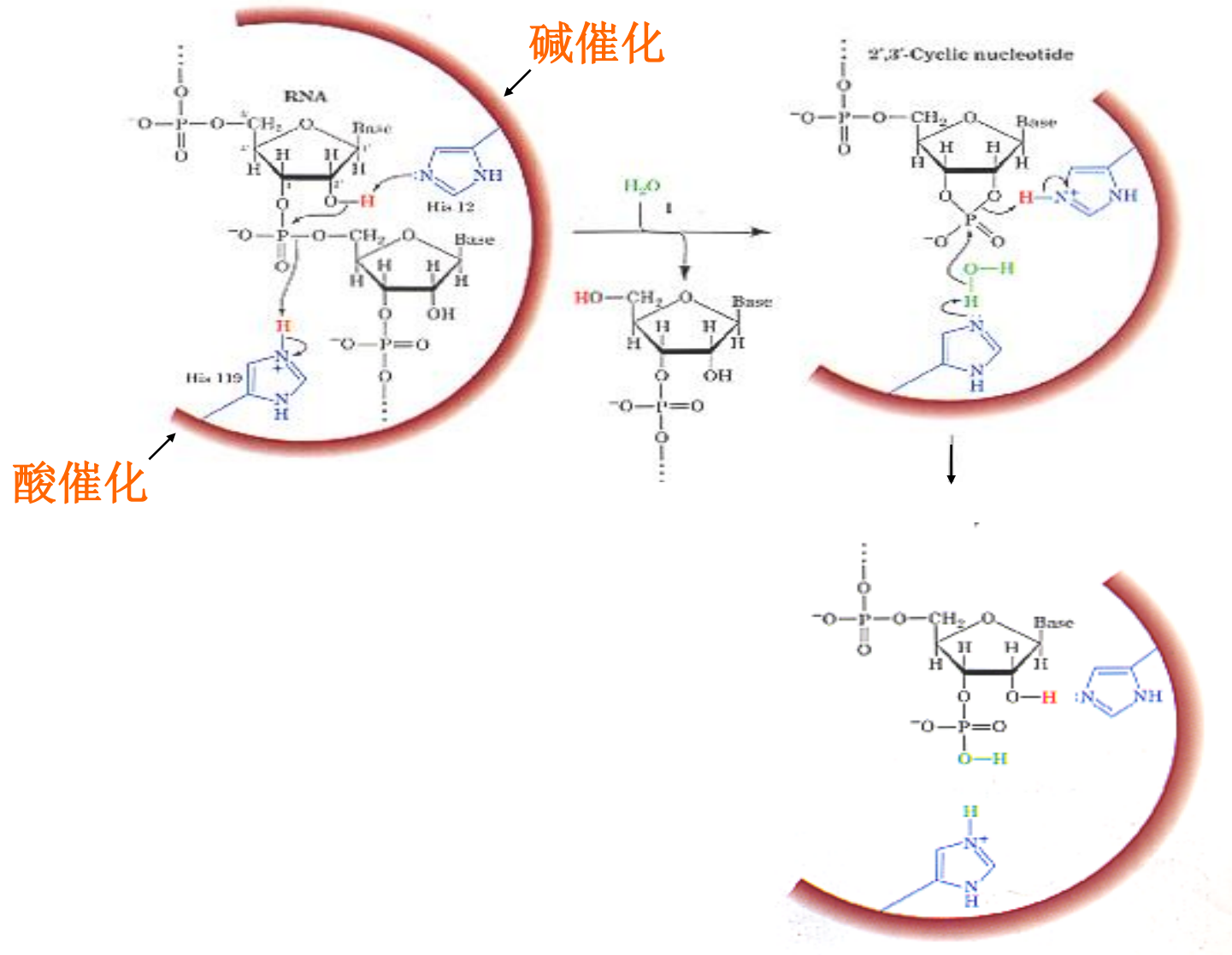
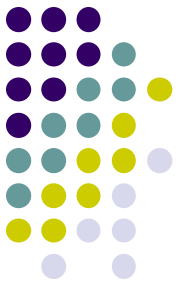
常见的质子供体： $\text{NH}_3$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OH}$

## ● 碱催化

碱作为质子的受体，降低反应活化能，称为碱催化。

常见的质子受体： $\text{COO}^-$ 、咪唑

# ● 举例：RNase A的酸碱催化机制







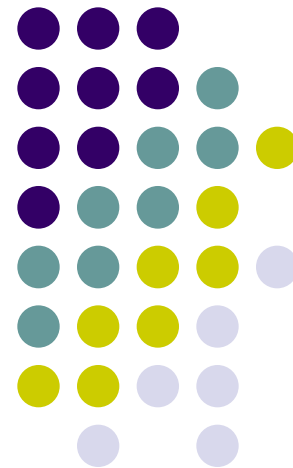
## 四、表面效应

酶的活性中心多是疏水的口袋，这样就造成一种有利于酶与其他特定底物结合并催化其反应的环境，排除周围水分子对酶和底物分子中功能基团的干扰性吸引和排斥，防止水化膜形成。

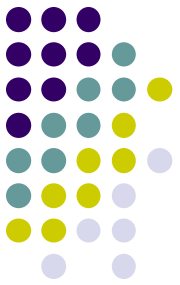
这种疏水环境有利于底物与酶分子的密切结合，这种现象称为表面效应（surface effect）。

# 第四节 酶促反应的动力学

(Kinetics of Enzyme-catalyzed Reaction)



# 概述



- 酶动力学

研究酶促反应速率及影响因素的科学。

- 研究意义

为研究酶结构和功能的关系提供实验依据；探索酶催化的有利条件, 有利于了解酶在物质代谢中的作用和了解部分药物的作用机制。



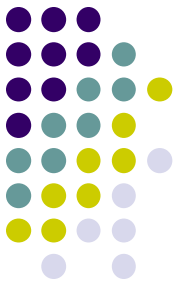
## ● 反应速率 (Velocity, $V$ )

单位时间内产物的增加量或反应物的减少量。

## ● 反应初速率 (Initial velocity)

反应刚开始时，时间进程曲线直线部分的反应速率。

下述所提及的反应速率均为反应初速率。



## ●影响酶促反应速率的因素

底物浓度

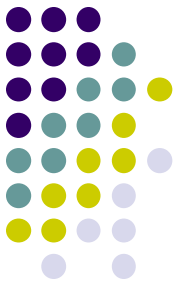
酶浓度

pH

温度

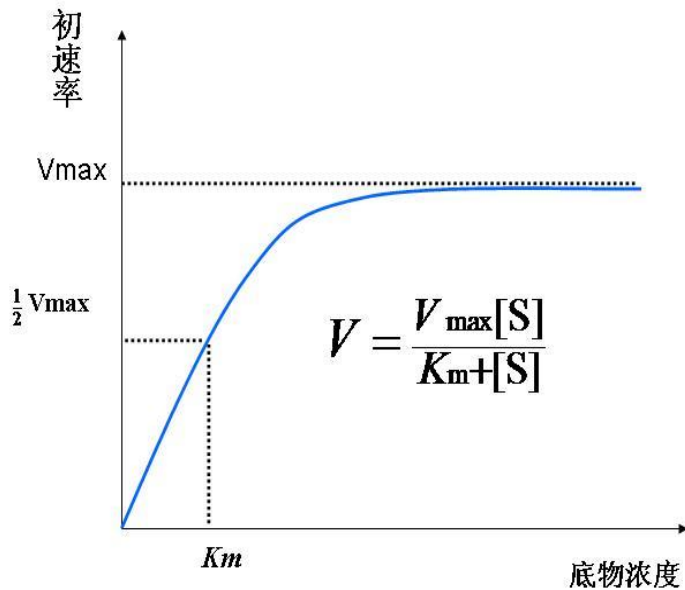
抑制剂

研究某一因素时，其他因素均固定不变。



# 一、底物浓度对酶促反应速率的影响

## (一) 酶促反应速率对底物浓度作图呈矩形双曲线



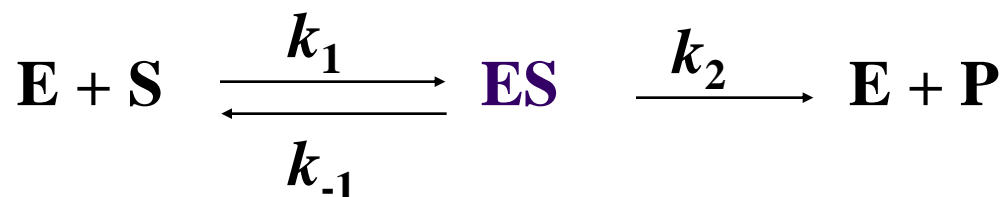
- [S]较低时， $V$ 与[S]成正比；
- [S] 逐渐增加，反应速率不再成正比例加速；
- 当[S]增加到一定程度时，反应速率不再增加，达到最大反应速率。

## （二）酶促反应速率对底物浓度的关系可用米氏方程表示



### ● 米氏方程推导的前提条件：

#### ■ 中间产物学说



### ● 推导假设：

- 1) 反应是单底物反应。
- 2) 反应速率是初速率，产物量极少，逆反应不予考虑。
- 3)  $[\text{S}] \gg [\text{E}]$ ,  $[\text{S}]$ 变化可以忽略不计。
- 4) 反应中 $[\text{游离酶}] = [\text{E}] - [\text{ES}]$ 。

## （二）酶促反应速率对底物浓度的关系可用米氏方程表示



### 1. Michaelis-Menten 方程（米氏方程）



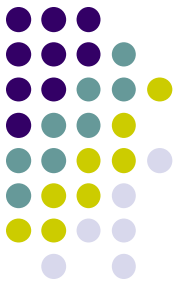
Leonor Michaelis  
1875–1949



Maud Menten  
1879–1960

1913年，Michaelis and Menten 提出 $V$ 与 $[S]$ 关系的数学方程式。即著名的**Michaelis-Menten 方程**（米氏方程）。





# Michaelis-Menten 方程

只适合于简单系统

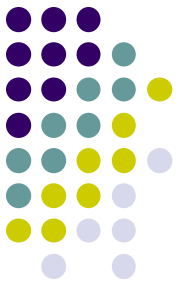
$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

[S] : 底物浓度。

V : 不同底物浓度下的反应速率。

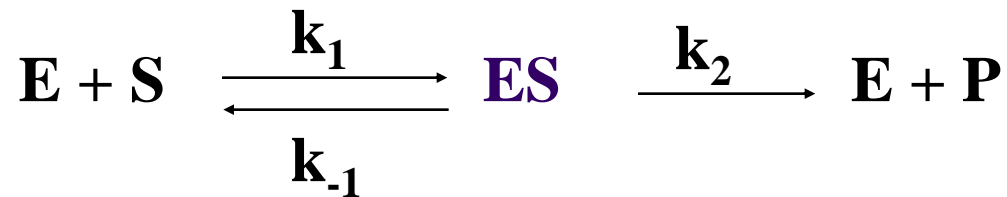
$V_{\max}$  : 最大反应速率 (Maximum velocity)。

$K_m$  : 米氏常数 (Michaelis constant)。



## 2. 米氏方程推导的前提条件

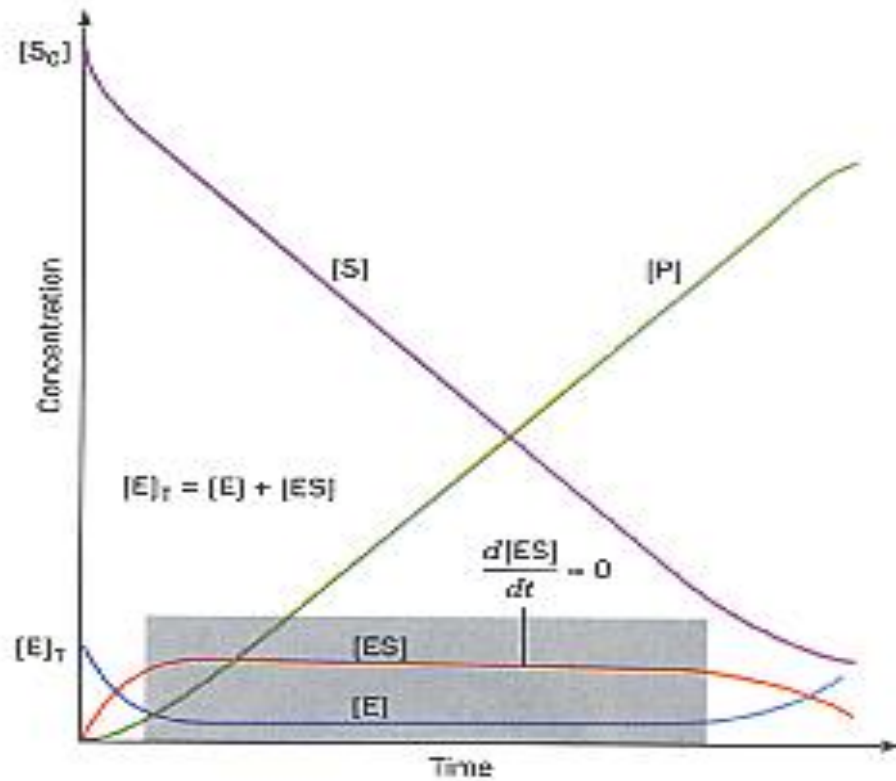
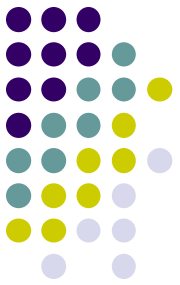
### ■ 中间产物学说

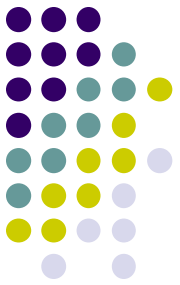


### ● 推导假设：

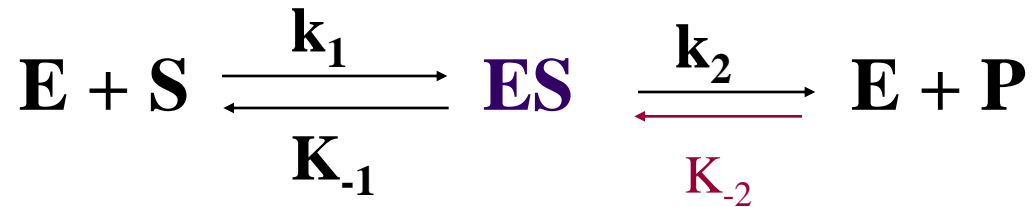
- 1) 反应是单底物反应。
- 2) 反应速率是初速率，产物量极少，逆反应不予考虑。
- 3)  $[\text{S}] \gg [\text{E}]$ ,  $[\text{S}]$ 变化可以忽略不计。
- 4) 反应中 $[\text{游离酶}] = [\text{E}] - [\text{ES}]$ 。

## ● 酶催化简单反应的历程曲线

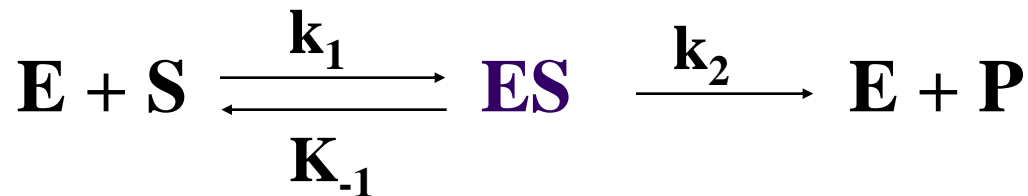




当[S]>>[E]时，[ES]的生成速度与分解速度相等，即[ES]保持稳态( **steady state**) 。



● 推导过程



$$V = k_2[\text{ES}]$$

(1)

稳态:  $k_1 [\text{E}][\text{S}] = k_{-1} [\text{ES}] + k_2 [\text{ES}]$

$$[\text{E}] = [\text{E}_t] - [\text{ES}]$$

整理后得:

$$\frac{([\text{E}_t] - [\text{ES}]) [\text{S}]}{[\text{ES}]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (2)$$

(米氏常数)



由 (2) 式得:  $([E_t] - [ES]) [S] = [ES] K_m$

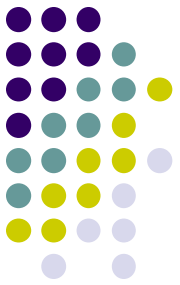
$$[ES] = \frac{[E_t] [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

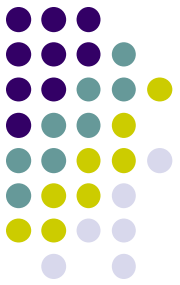
将 (3) 带入 (1) 得  $V = \frac{K_3 [E_t] [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$

当底物浓度很高, 将酶的活性中心全部饱和时, 即  $[E_t] = [ES]$  反应达到最大速率。

$$V_{\max} = K_3 [ES] = K_3 [E_t] \quad (5)$$

将 (5) 代人 (4) 得米氏方程:  $V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$





## (二) 米氏方程动力学常数的意义

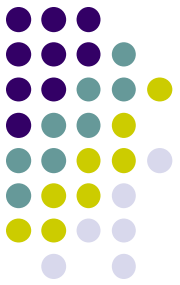
### 1. 米氏常数 ( $K_m$ ) 的意义

#### 1) $K_m$ 值是酶的特征性常数

与酶结构、底物种类、外界环境有关；与酶浓度无关。



$K_m$  值取值范围:  $10^{-6} \sim 10^{-2}$



2)  $K_m$  值表示反应速率为最大反应速率一半时的[S]。

2) 当  $V = V_{max}/2$  时，米氏方程成为

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

$\therefore K_m = [S]$ ，即  $K_m$  表示反应速率为最大反应速率一半时的[S]。  
其单位为 mmol/L。

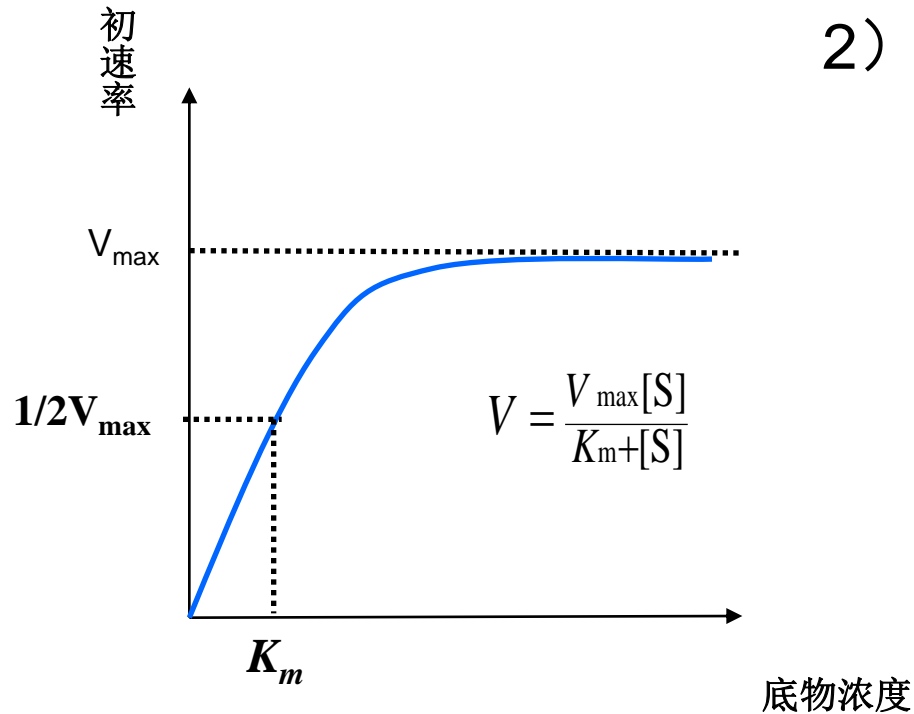
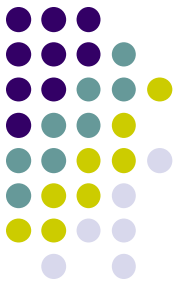


图3 - 4 底物浓度对酶促反应速度的影响



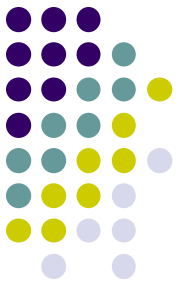


3)  $K_m$ 值反映了酶对底物亲和力的大小。

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{当 } k_{-1} \gg k_2 \text{ 时}$$

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_s$$

$K_m \downarrow \longrightarrow$  亲和力愈大;       $K_m \uparrow \longrightarrow$  亲和力愈小



## 2. $V_{\max}$ 的意义

$V_{\max} = k_2[E_T]$   $V_{\max}$ 与加入的酶量成正比。

$V_{\max}$ 的单位:  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$

### ● $V_{\max}$ 的定义

当酶被底物饱和时，单位时间内，每毫克酶催化底物转变为产物的数值。

### 3. 利用双倒数作图法测定 $K_m$ 和 $V_{\max}$



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



两边取倒数

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Lineweaver-Burk双倒数方程

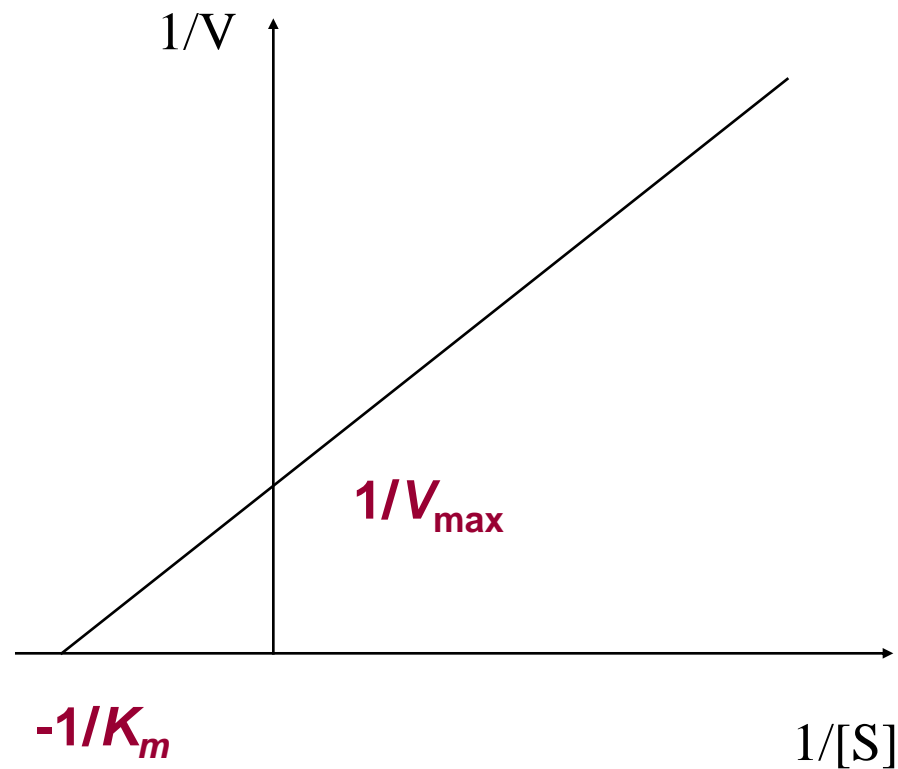
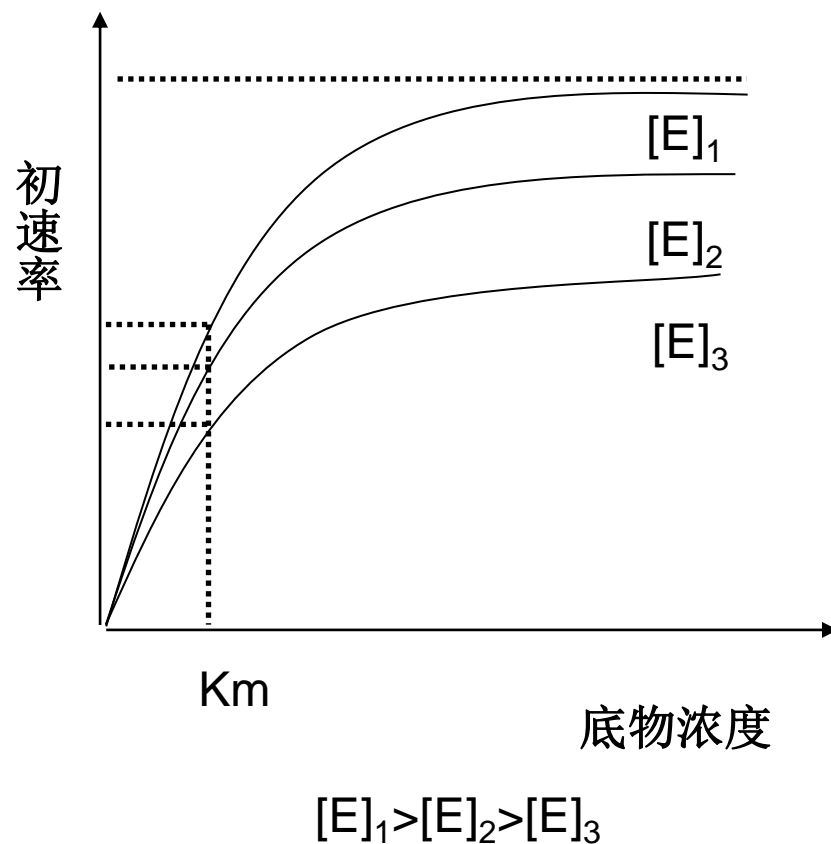
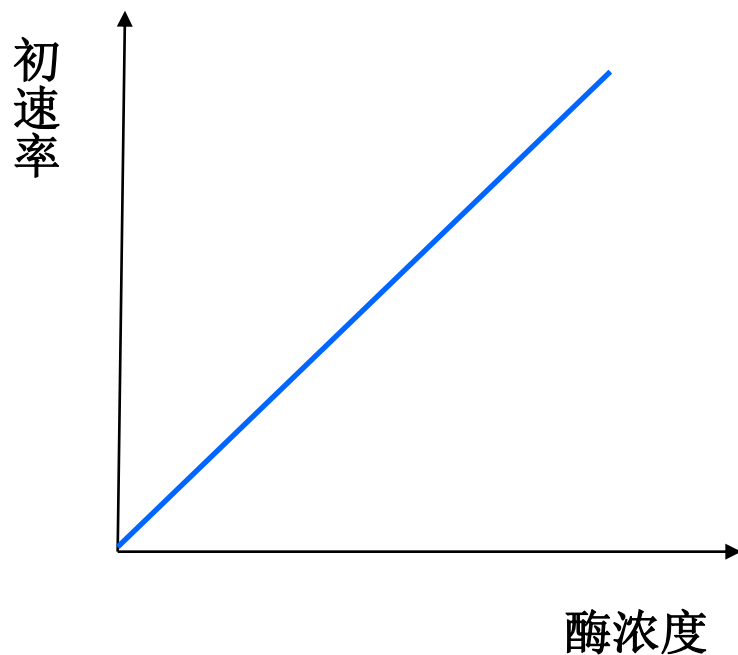


图3-5 Lineweaver-Burk双倒数作图法

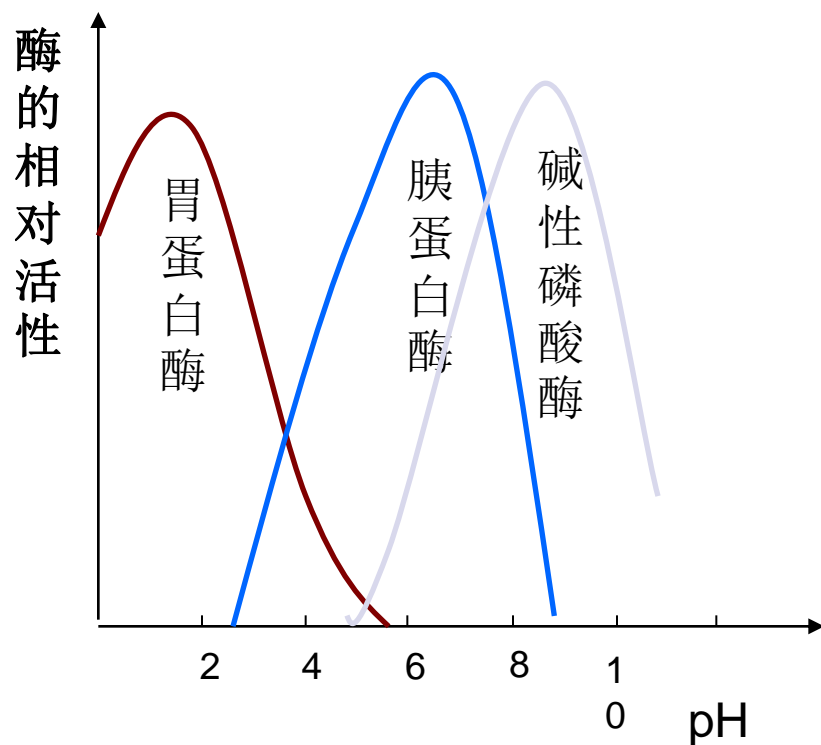


## 二、酶浓度对酶促反应速率的影响

在酶促反应体系中，底物的浓度又足够大，酶全部被底物饱和时，则反应速率与酶浓度成正比。



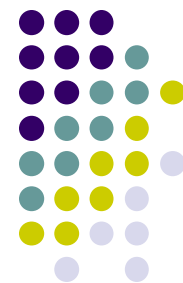
### 三、pH对酶促反应速率的影响



#### 酶的最适pH (optimum pH)

在某一pH环境下，使各必需基团的解离情况得到统筹兼顾，相互协调，使酶可以发挥最大活性。这种酶催化活性最高时反应系统的pH称为酶的最适pH。

图3-7 pH对三种不同酶活性的影响



## 四、温度对酶促反应速率的影响

### ● 双重影响

升高温度，酶促反应速率升高；酶的化学本质是蛋白质，温度升高引起酶蛋白变性而酶促反应速率逐渐下降。

### ● 最适温度（optimum temperature）

酶促反应速率最大时的反应系统温度，称为酶促反应的最适温度。

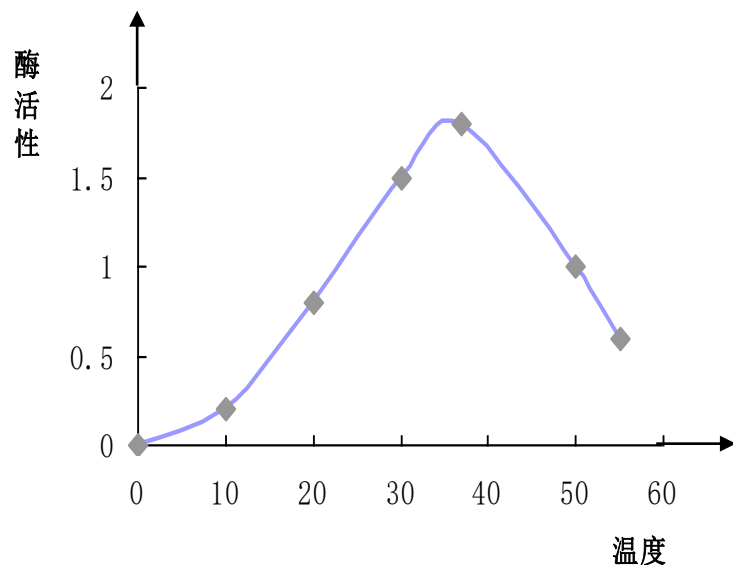
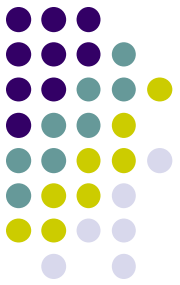


图3-8 温度对唾液淀粉酶活性的影响

恒温动物组织中，酶的最适温度一般在37~40℃



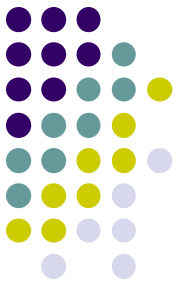
## 五、抑制剂对酶促反应速率的影响

- 酶的抑制剂 (inhibitor, I)

与酶结合使酶催化活性降低或丧失，而不引起酶蛋白变性的一类化合物。

### \*抑制剂区别于酶的变性

- 抑制剂对酶有一定选择性
- 引起变性的因素对酶没有选择性

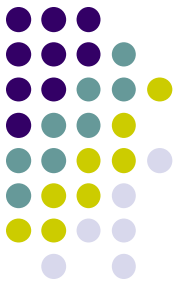


- 抑制作用的类型

可逆性抑制 (reversible inhibition)

不可逆性抑制 (irreversible inhibition)





## (一) 不可逆性抑制(irreversible inhibition)

### ● 定义

抑制剂与酶的必需基团以共价键结合而引起酶活力丧失，不能用物理方法除去抑制剂而使酶复活，称为不可逆性抑制。

### ● 分类

- 非专一性抑制
- 专一性抑制

## ● 非专一性抑制

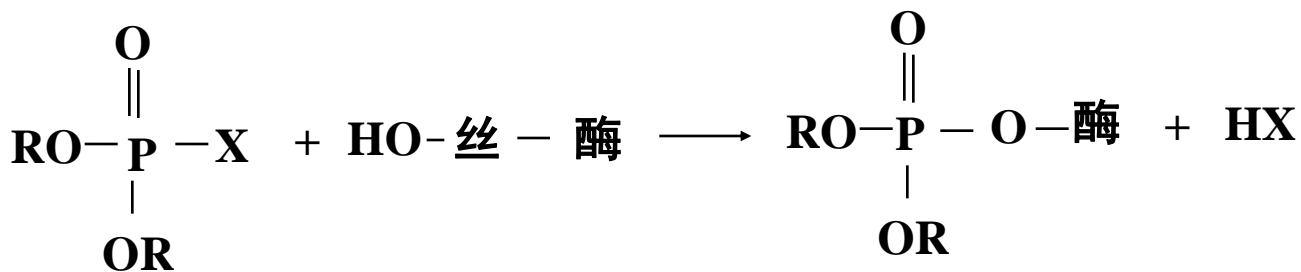


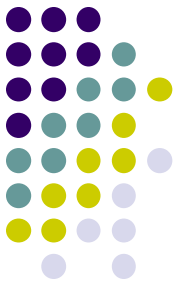
1) 有机磷化合物  $\longrightarrow$  羟基酶

$\left\{ \begin{array}{l} \text{I: 敌敌畏、美曲膦酯等农药} \\ \text{E: 蛋白酶} \end{array} \right.$

酯酶（胆碱酯酶）

解毒剂：解磷定





## 2) 有机汞、有机砷化合物

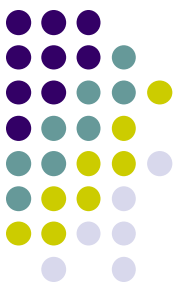
—————→ 巯基酶

解毒剂：GSH、过量的巯基化合物

## 3) 重金属盐

铅 —————→ 亚铁螯合酶

4) 氰化物 —————→ 细胞色素氧化酶



## (二) 可逆性抑制 (Reversible Inhibition)

- 概念：

抑制剂与酶非共价疏松结合而引起酶活性降低或丧失，称为可逆性抑制。

- 特点

- a. 结合可逆，除去抑制剂，酶活性可以恢复；
- b. 酶活性降低而非丧失。

## ● 类型

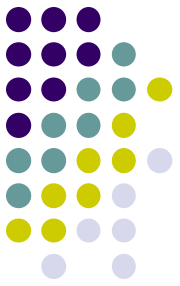
根据I与E结合的方式不同，可以分为四种：

**竞争性抑制 (competitive inhibition)**

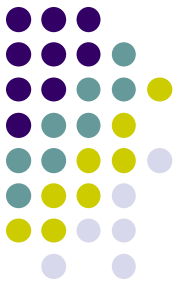
**反竞争性抑制 (uncompetitive inhibition)**

**非竞争性抑制 (non-competitive inhibition)**

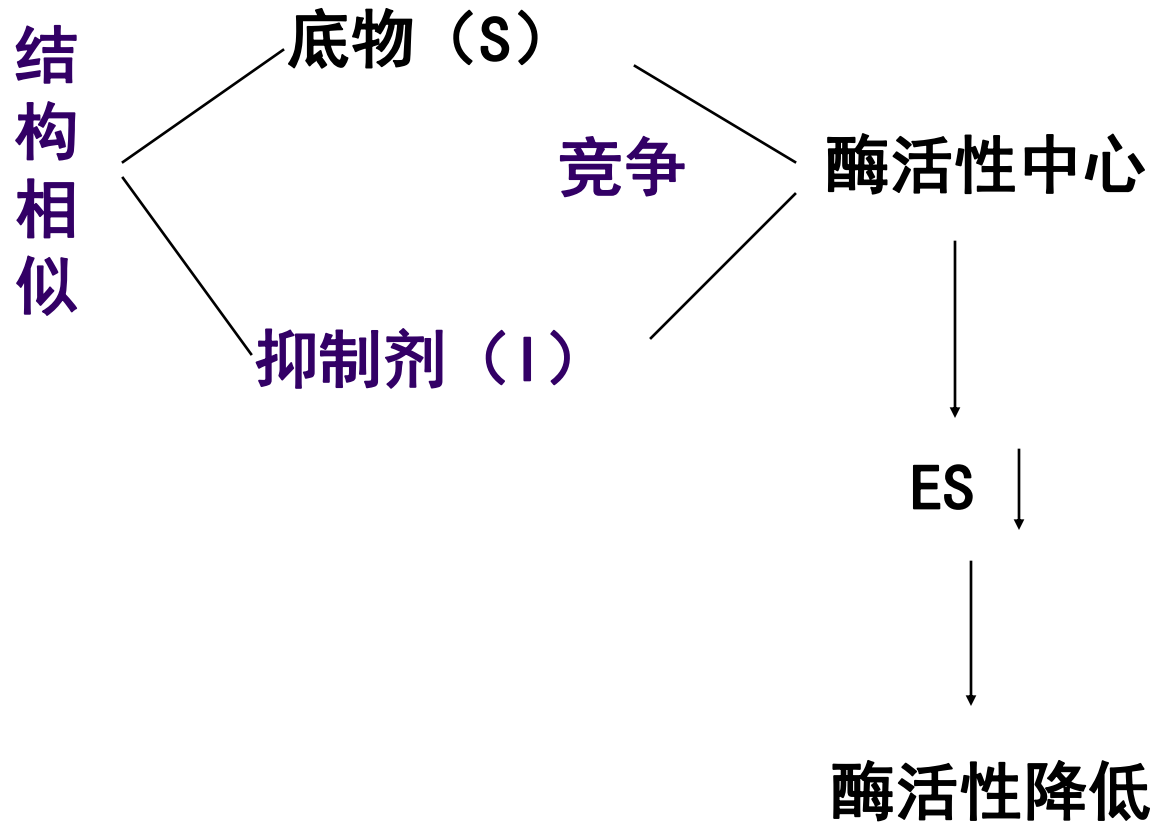
**混合性抑制 (mixed inhibition)**



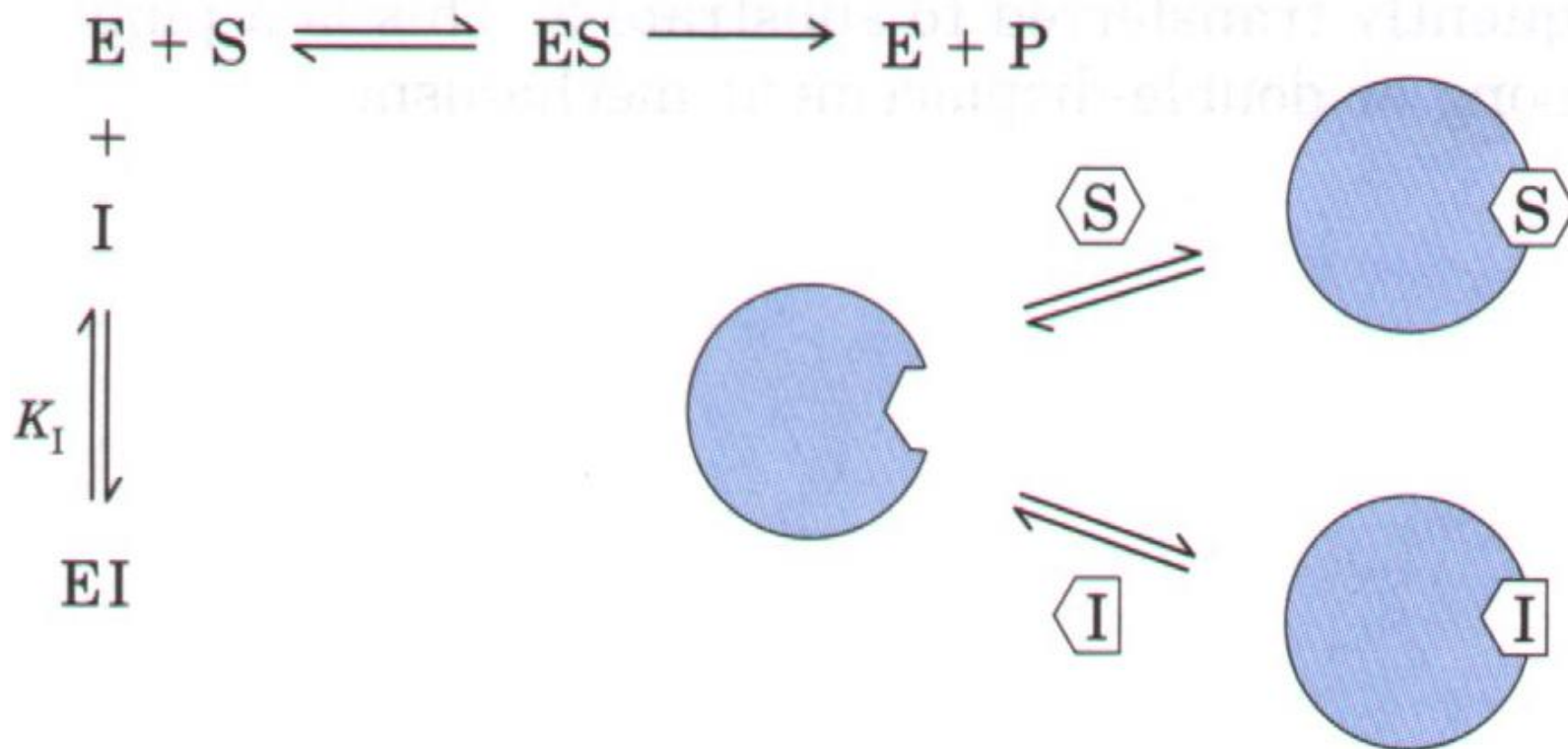
# 1. 竞争性抑制 (competitive inhibition)



## ● 特点



## ● 反应模式



**Competitive inhibition**

抑制剂对酶促反应速率的影响取决于  $[I]$  与  $[S]$ 。

# ● 动力学特点

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

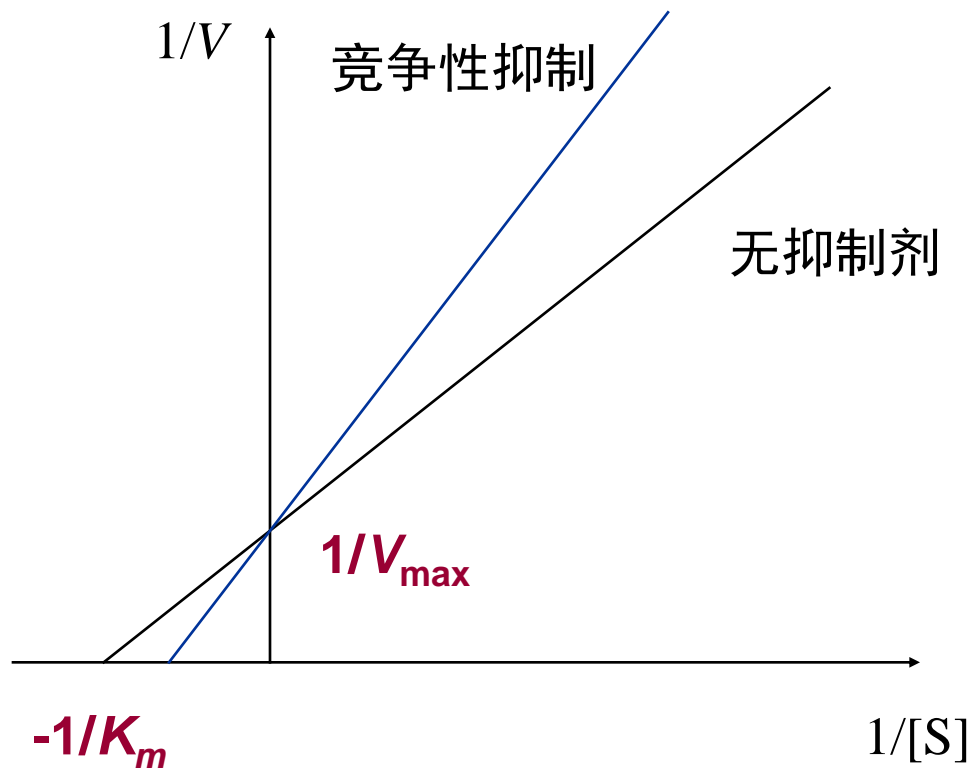


表观 $K_m$ 值  $\uparrow$

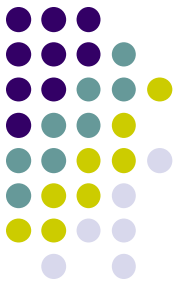
$V_{\max}$  不变

修饰因子 $\alpha$   
||  
 $\left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$   
 $K_i$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

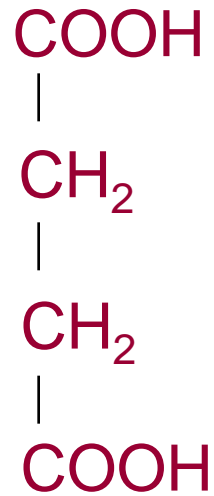
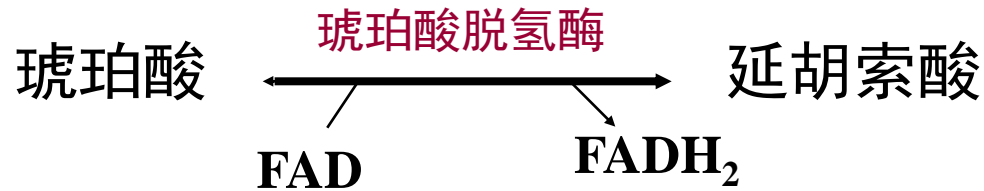




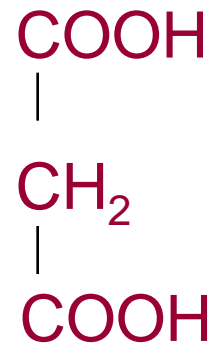


## \* 举例

- 丙二酸与琥珀酸竞争琥珀酸脱氢酶



琥珀酸

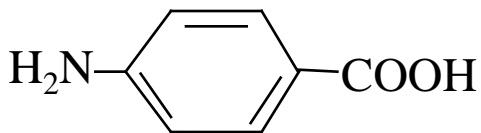


延胡索酸

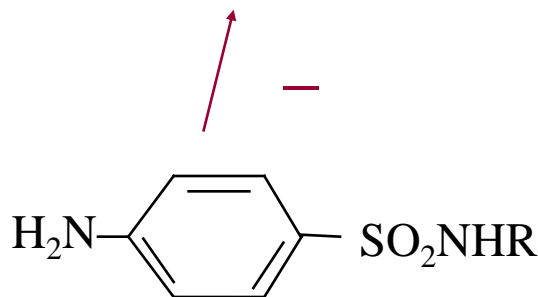
## ● 意义

### 磺胺类药物的抑菌机制

与对氨基苯甲酸竞争二氢叶酸合成酶



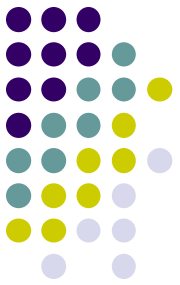
对氨基苯甲酸



对氨基苯磺酸  
(磺胺类抗菌素主要成分)



## 2. 反竞争性抑制 (uncompetitive inhibition)

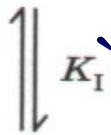


### ● 反应模式

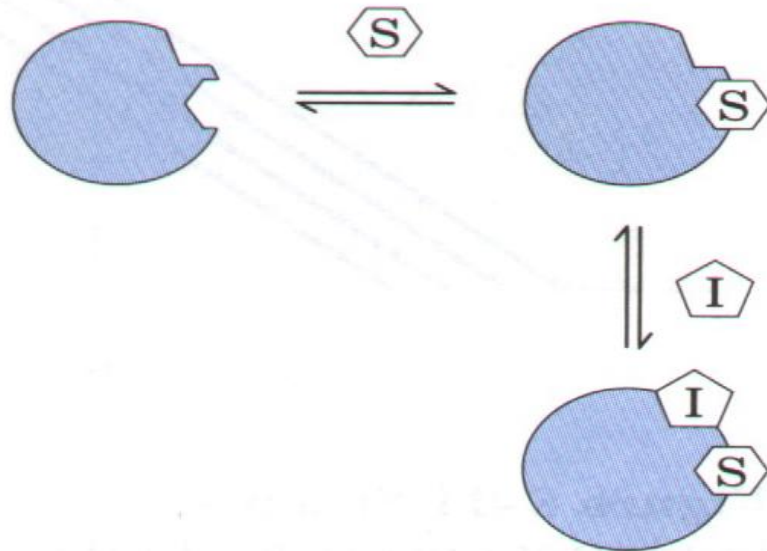


+

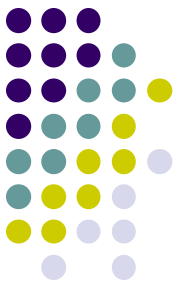
I



ESI



**Uncompetitive inhibition**



## ● 特点

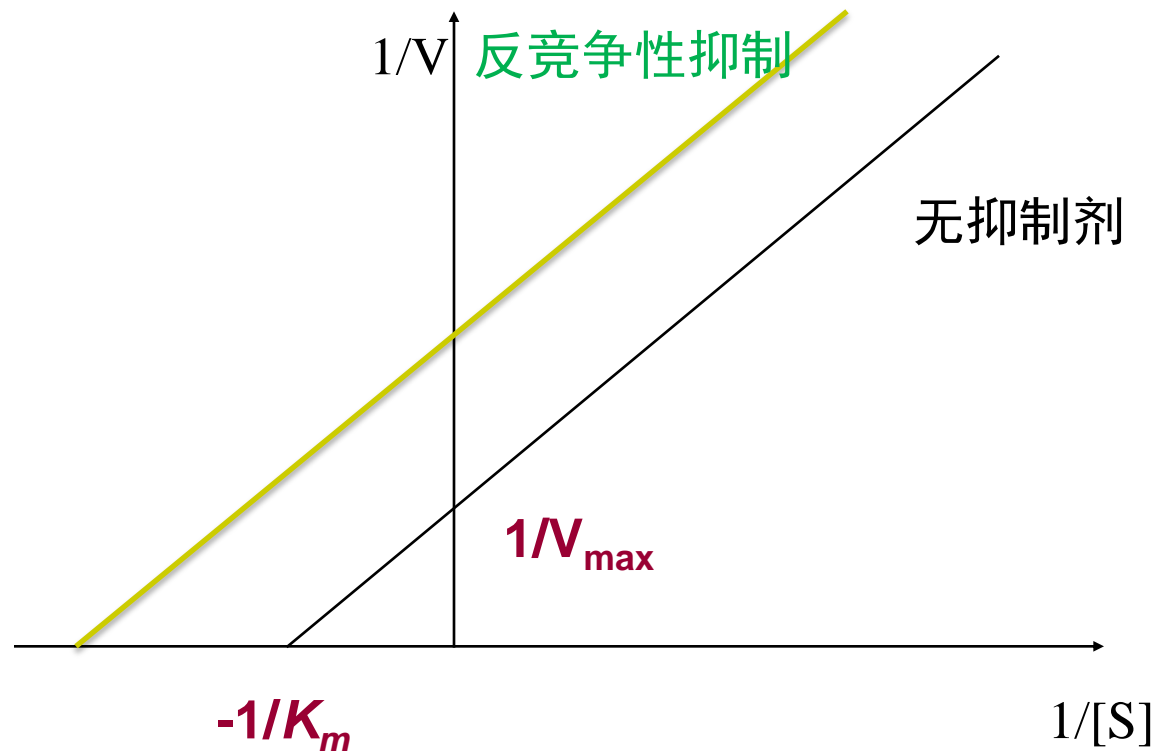
$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S](1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

1) 抑制剂只与酶-底物复合物结合。

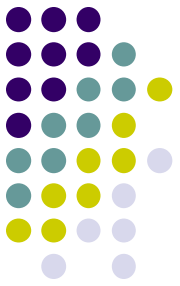
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

2) 抑制程度取决于抑制剂的浓度及底物浓度。

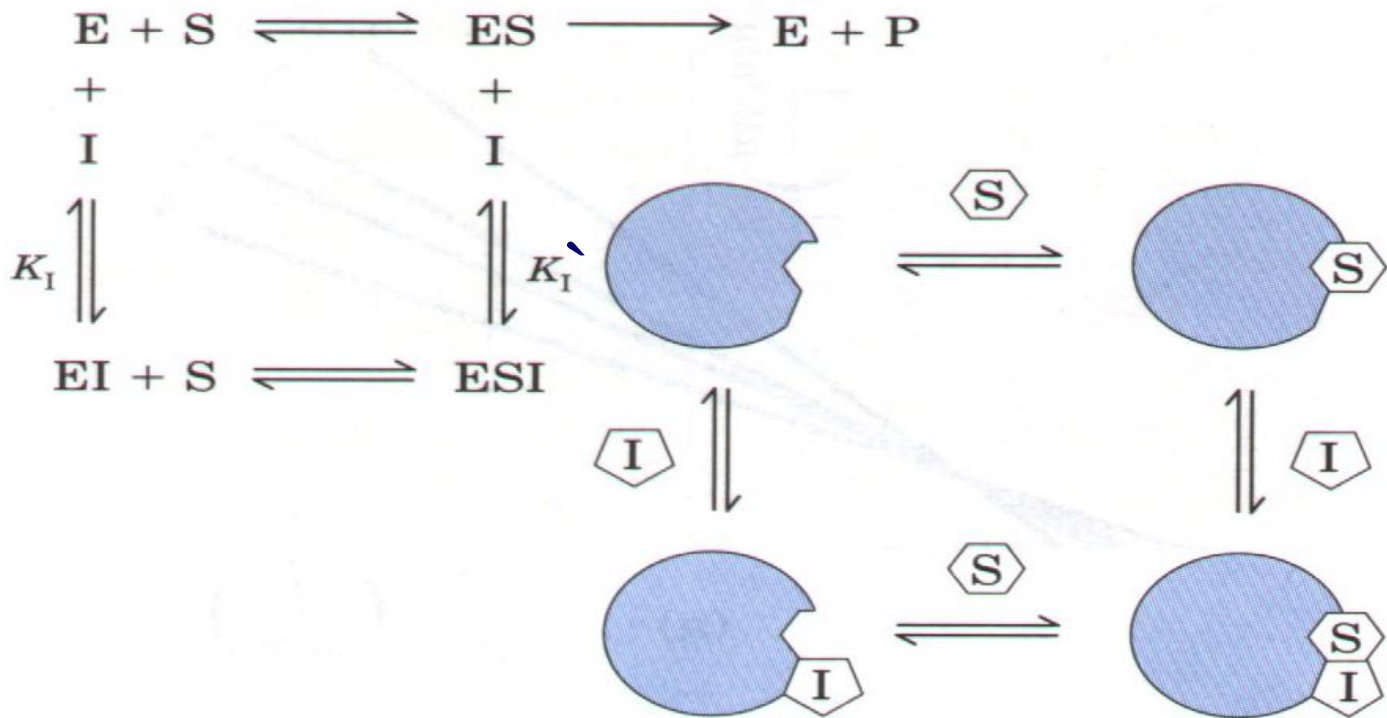
3) 动力学特点：  
表观  $K_m$  值降低；  
 $V_{\max}$  降低。



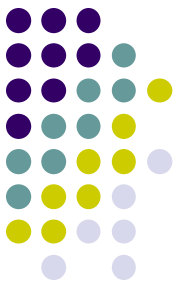
### 3. 非竞争性抑制 (non-competitive inhibition)



❖ 反应模式 ( $K_i = K_i'$ )



**Noncompetitive inhibition**



$$V = \frac{V_{\max} [S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

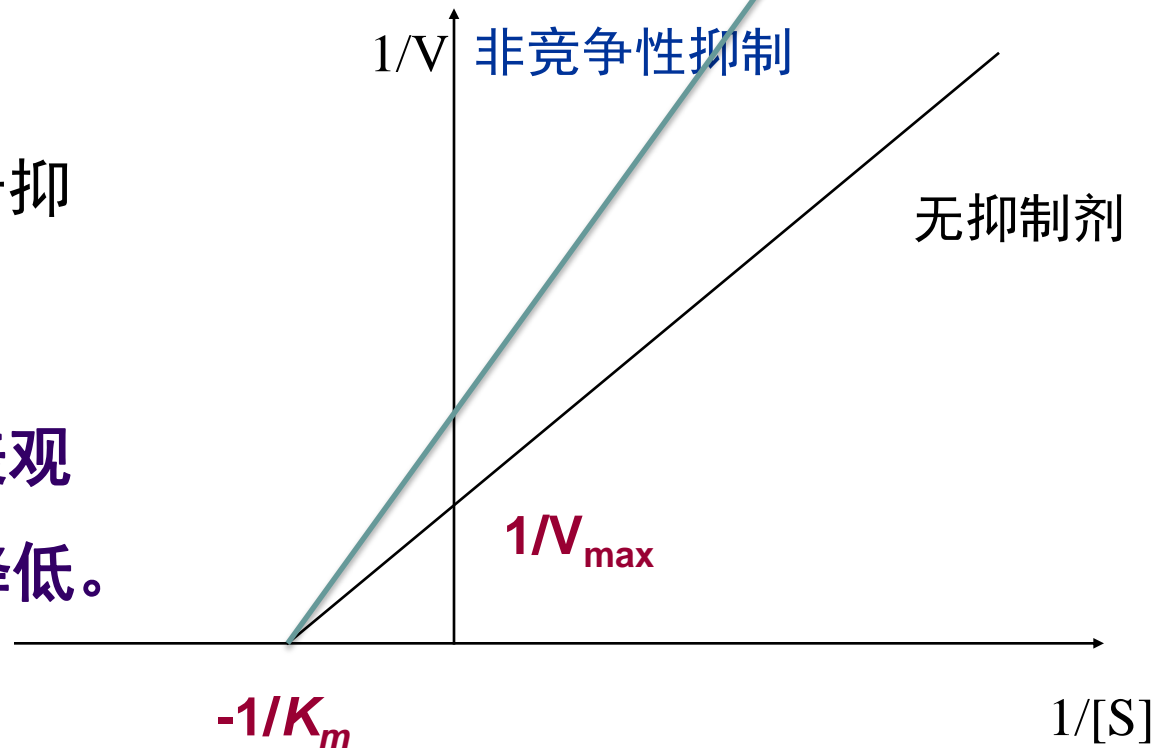
## ● 特点

1) 抑制剂与酶活性中心外的必需基团结合，底物与抑制剂之间无竞争关系。

2) 抑制程度取决于抑制剂的浓度。

3) 动力学特点：**表观  $K_m$  值不变；  $V_{\max}$  降低。**

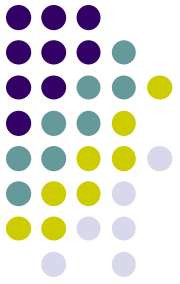
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$





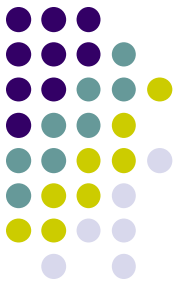
# 三种可逆性抑制作用的比较

| 作用特点        |           | 无抑制<br>剂      | 竞争性抑<br>制剂 | 非竞争性<br>抑制剂 | 反竞争性<br>抑制剂 |
|-------------|-----------|---------------|------------|-------------|-------------|
| I的结合部位      |           |               | E          | E、ES        | ES          |
| 酶促动力学<br>特点 | 表观 $K_m$  | $K_m$         | 增大         | 不变          | 减小          |
|             | $V_{max}$ | $V_{max}$     | 不变         | 降低          | 降低          |
| 双倒数作图       | 横轴截距      | $-1/K_m$      | 增大         | 不变          | 减小          |
|             | 纵轴截距      | $1/V_{max}$   | 不变         | 增大          | 增大          |
|             | 斜率        | $K_m/V_{max}$ | 增大         | 增大          | 不变          |



## 第五节 酶活性的调节

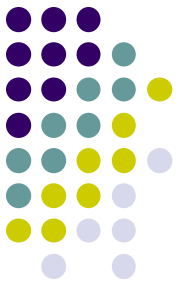




## ● 调节酶 (regulatory enzyme)

因环境因素的作用表现出催化活性变化，进而调整代谢途径反应速率的酶，统称为调节酶。

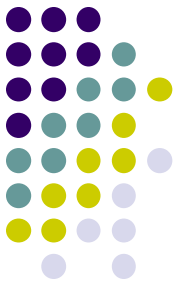
{ 别构酶  
酶原  
同工酶



# 一、别构酶 (allosteric enzyme)

- 定义

细胞内有些酶活性中心以外的某个部位可与一些代谢物分子可逆结合，引起酶的空间构象发生改变，进而影响酶的催化活性。这些通过构象改变而影响其活性的酶称为别构酶。



## （一）别构效应剂（allosteric effector）

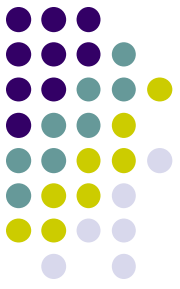
- 别构效应剂（allosteric effector）

引起别构效应的物质称为别构效应剂。使酶活性升高的物质称为别构激活剂，使酶活性下降的物质称为别构抑制剂。

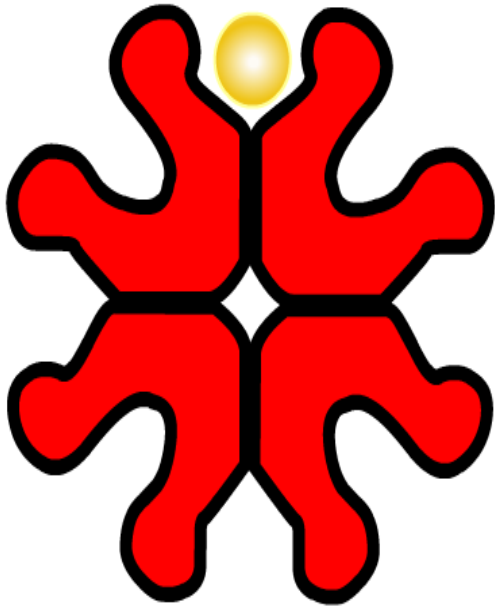
- 别构部位（allosteric site/regulatory site）

别构效应剂与酶结合的部位。

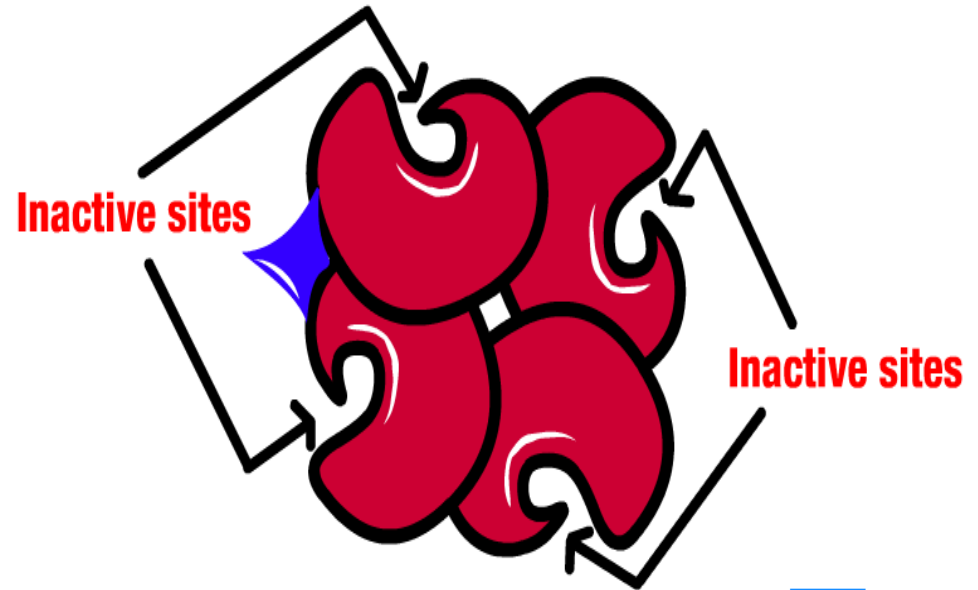
## (二) 别构酶 (allosteric enzyme) 的特点



1) 多亚基组成, 调节部位与催化部位可以是同一亚基, 也可以是不同亚基。



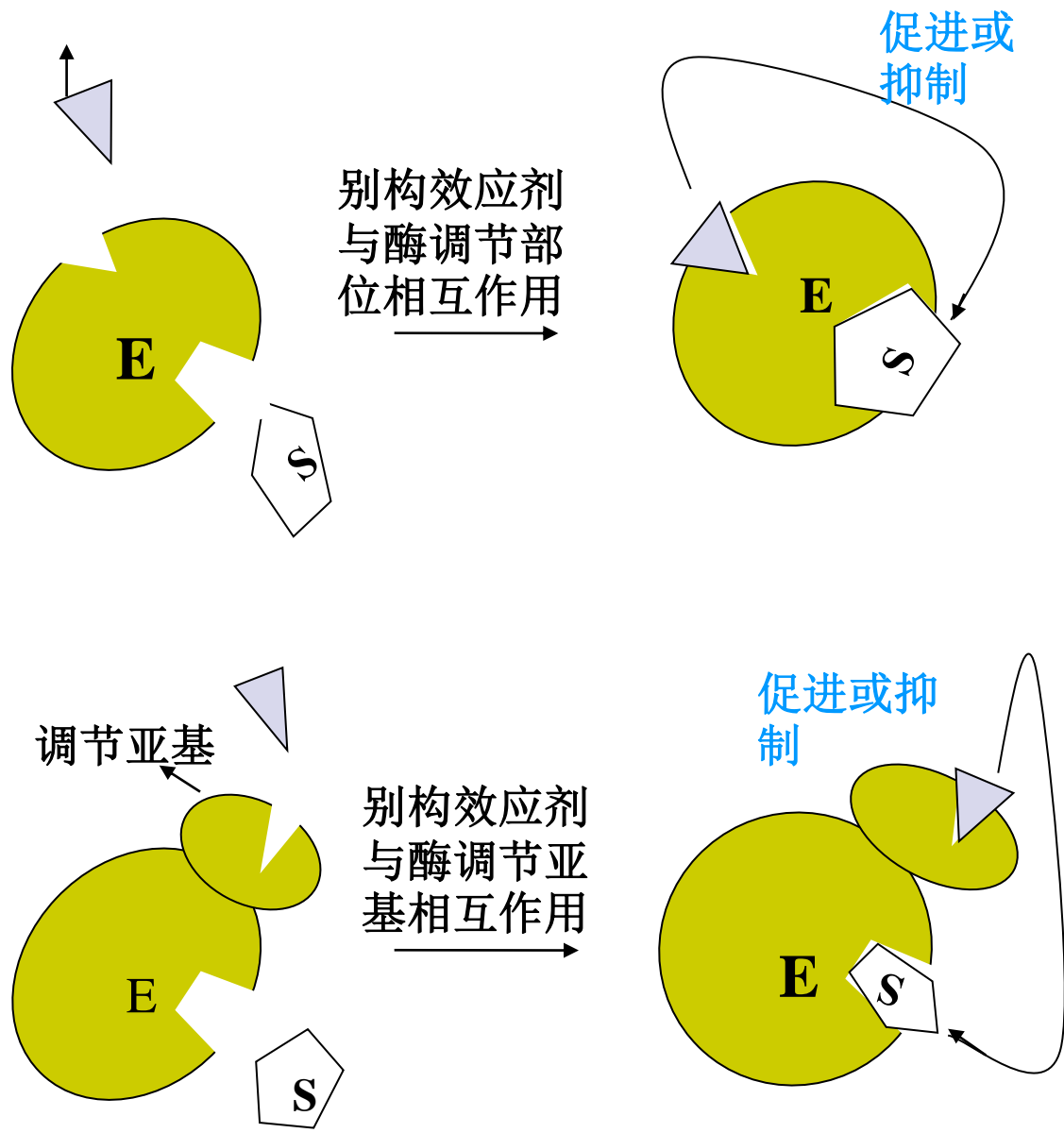
**An activator stabilizes the active form.**

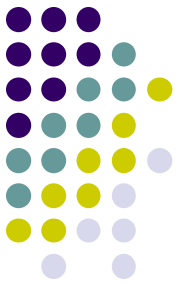


**An inhibitor stabilizes the inactive form.**  
**A single activator or inhibitor will affect the active sites of all the subunits.**



## 2) 别构效应剂与酶的调节部位/亚基结合，引起别构酶发生构象变化。





3) 别构效应剂引起别构酶各亚基之间发生协同效应。

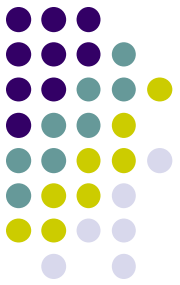
■ 亚基构象改变可以相互影响，发生协同效应（cooperative effect）。

正协同效应（positive cooperative）

后续亚基的构象变化增加酶对底物的亲和力，此协同效应为**正协同效应**。

负协同效应（negative cooperative）

后续亚基的构象变化降低酶对底物的亲和力，此协同效应为**负协同效应**。



- 同种协同效应

由于底物分子作为别构调节剂所产生的协同作用称为同种协同效应。

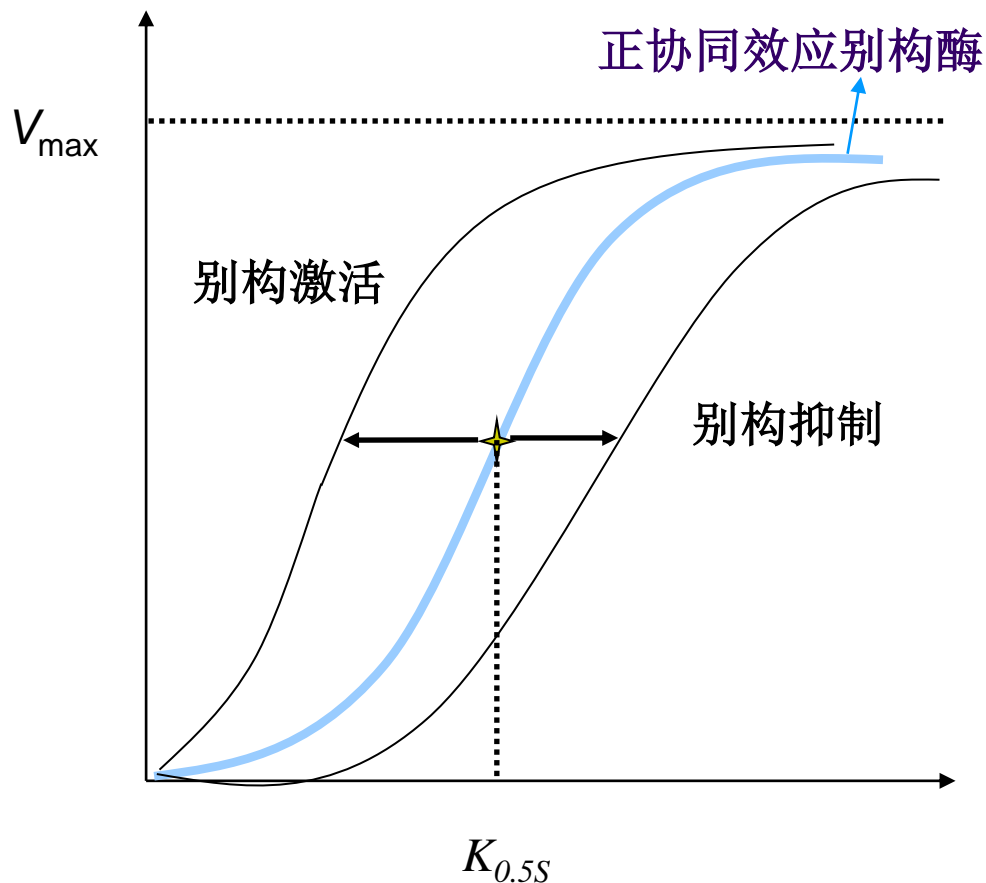
- 异种协同效应

别构效应剂为其他代谢物分子所产生的协同效应称为异种协同效应。其中，异种协同效应为别构调节中最常见的现象。



### (三) 别构酶的动力学特征

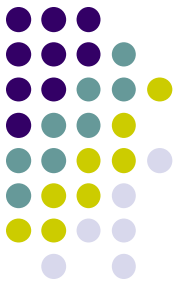
- 别构酶的反应初速率与底物浓度的关系不服从米氏方程
- 正协同效应的别构酶  $V$  对  $[S]$  的关系呈现 S 形曲线



■ S 形曲线表明，酶分子上一个功能位点的活性影响另一个功能位点的活性，显示协同效应的存在。

■ 别构激活剂可以使曲线左移，别构抑制剂使曲线右移。





## 二、酶原

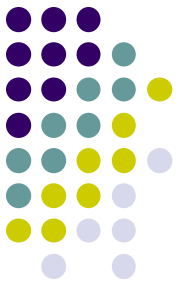
### (一) 酶原与酶原激活

- 酶原(zymogen /proenzyme)

有些酶在细胞内刚合成或初分泌时并无活性，这类无活性的酶的前体，称为酶原。

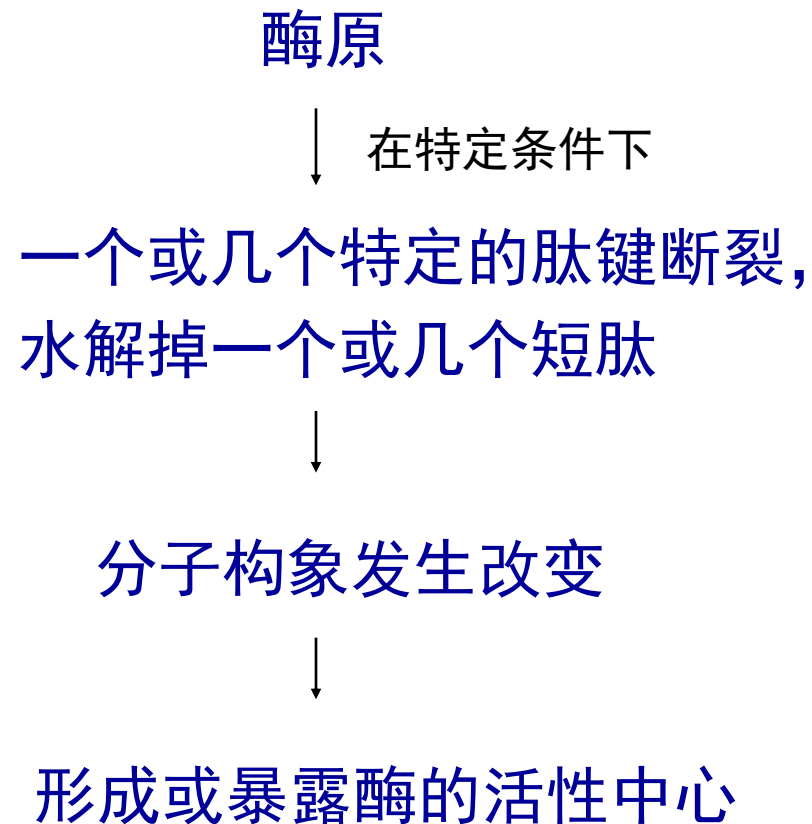
- 酶原激活

无活性的酶前体转变成有活性的酶的过程称为酶原激活。



## ● 酶原激活的机制

### 形成酶的活性中心的过程



# ● 举例：胰凝乳蛋白酶原的激活过程



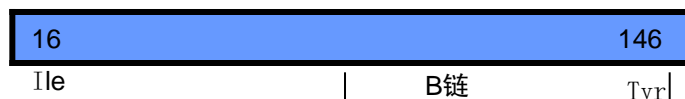
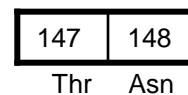
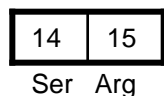
胰蛋白酶在 $\text{Arg}_{15}$ ,  $\text{Ile}_{16}$ 断裂

糜蛋白酶原



糜蛋白酶在 $\text{Leu}_{13}$ ,  $\text{Tyr}_{146}$ 和  
 $\text{Asn}_{148}$ 自我消化

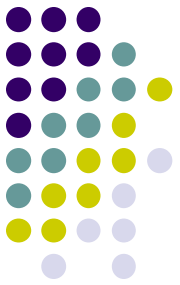
$\pi$ -糜蛋白酶



$\alpha$ -糜蛋白酶

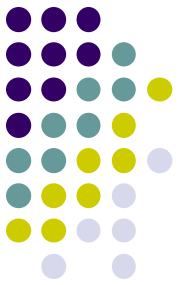
图3 - 16 胰凝乳蛋白酶原的激活过程

胰凝乳蛋白酶原一级结构激活时切除14 ~ 15及147 ~ 148两段肽段



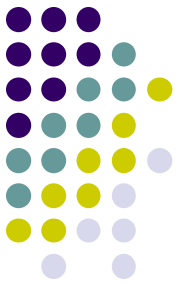
● 某些酶原激活需水解掉一个或几个肽段

| 酶原      | 激活因素                 | 激活途径       | 部位   |
|---------|----------------------|------------|------|
| 胃蛋白酶原   | H <sup>+</sup> 或胃蛋白酶 | 胃蛋白酶及六肽    | 胃腔   |
| 胰凝乳蛋白酶原 | 胰蛋白酶                 | 胰蛋白酶及两个二肽  | 小肠肠腔 |
| 弹性蛋白酶原  | 胰蛋白酶                 | 弹性蛋白酶及几个肽段 | 小肠肠腔 |
| 羧基肽酶原   | 胰蛋白酶                 | 羧基肽酶及几个肽段  | 小肠肠腔 |



## (二) 酶原激活的意义

- 1) 保证合成酶的细胞本身的蛋白质不受蛋白酶的水解破坏。
- 2) 保证合成的酶在特定部位和环境中发挥其生理作用。



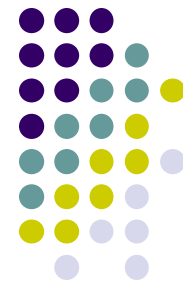
## 三、同工酶

### (一) 同工酶的概念

催化相同化学反应，但酶蛋白的分子结构、理化性质和免疫学特性各不相同的一组酶称之为同工酶(isozyme)。

同工酶存在于同一种属的不同个体，同一个体的不同组织，同一细胞的不同亚细胞结构或细胞的不同发育阶段。

## (二) 同工酶在生物体内的分布



### 1. 乳酸脱氢酶 (LDH) 是由四个亚基组成的蛋白质

亚基有两种基本类型，一种主要分布在心肌中，称H亚基；另一种则分布于骨骼肌及肝中，称M亚基。

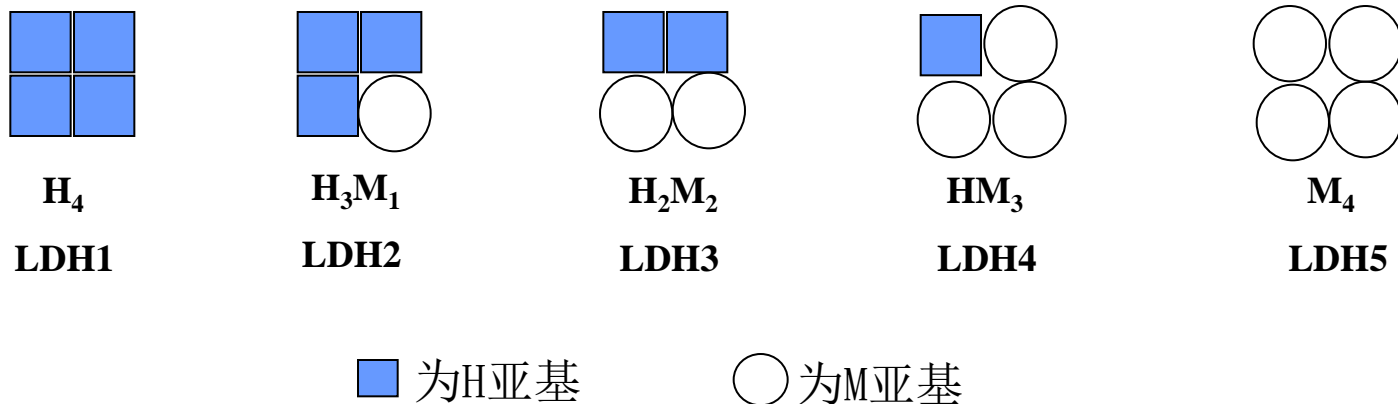
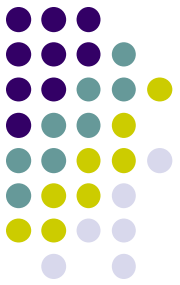


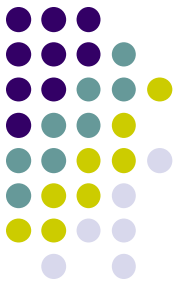
图3 - 17 乳酸脱氢酶的同工酶组成



## 2.人体各个组织器官的LDH同工酶谱(活性%)

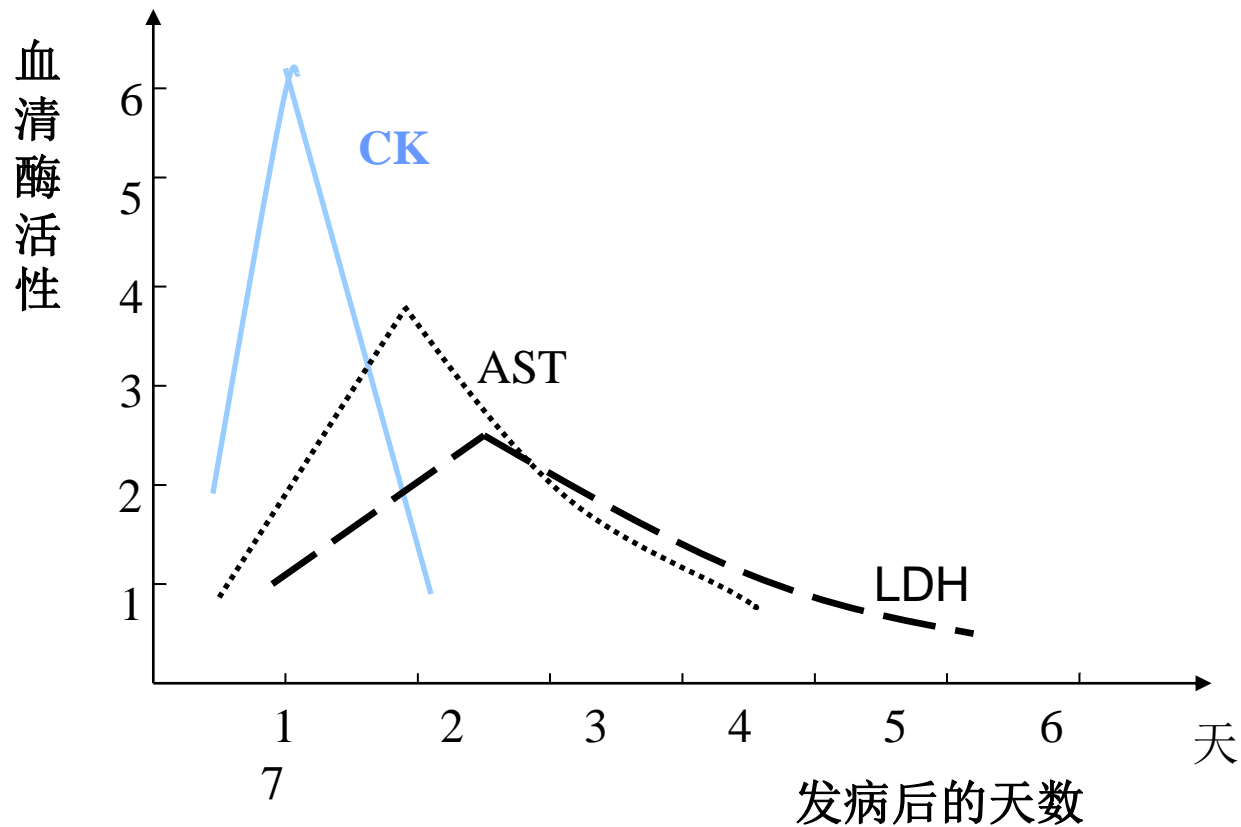
| LDH同工酶  | 血清   | 骨骼肌 | 心肌 | 肝  | 肺  |
|---|------|-----|----|----|----|
| LDH <sub>1</sub> (H <sub>4</sub> )                | 27.1 | 0   | 73 | 2  | 14 |
| LDH <sub>2</sub> (H <sub>3</sub> M)               | 34.7 | 0   | 24 | 4  | 34 |
| LDH <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> M <sub>2</sub> ) | 20.9 | 5   | 3  | 11 | 35 |
| LDH <sub>4</sub> (HM <sub>3</sub> )               | 11.7 | 16  | 0  | 27 | 5  |
| LDH <sub>5</sub> (M <sub>4</sub> )                | 5.7  | 79  | 0  | 56 | 12 |



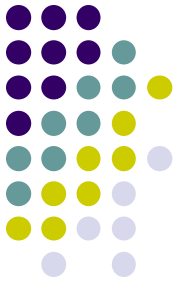


### (三) 血清同工酶测定的临床意义

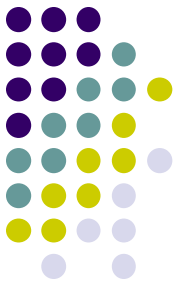
当组织细胞病变时，该组织细胞特异的同工酶可释放入血。血清同工酶活性和同工酶谱分析有助于对疾病的诊断。



心肌梗死后血清中肌酸激酶、谷草转氨酶以及乳酸脱氢酶的活性变化



## 第六节 酶活性的测定



# 一、酶活性及酶比活性

## ● 酶活性 (enzyme activity)

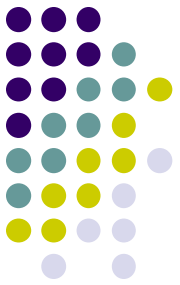
酶活性也称为酶活力，是指酶催化一定化学反应的能力。测定酶活性实际就是测定酶促反应的速率。酶促反应速率可用单位时间内、单位体积中底物的减少量或产物的增加量来表示。

酶活性用来衡量酶含量的多少。

## ● 酶的比活性 (specific activity)

酶的比活性是指每毫克酶蛋白所含的酶活力单位数，代表单位质量蛋白质的催化能力。

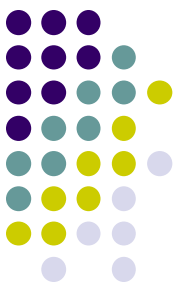
酶的比活性则通常用来衡量酶的纯度。



## 二、酶活性测定的最适条件

### (一) 酶活性测定需要在规定的实验条件下，测定该酶催化反应的速率

所谓酶活性测定规定的实验条件，就是指影响酶促反应速率的各种因素（除酶活性待测外）均需恒定。



## (二) 酶活性测定的通常条件

- 1) 底物要有足够量，一般相当于20~100倍 $K_m$ 。
- 2) 最适pH的确定。
- 3) 最适温度随反应的时间而定。
- 4) 缓冲液的种类和浓度均可对酶活性有所影响。
- 5) 辅因子或辅酶是某些酶表现活性的必要条件。
- 6) 有些酶反应体系需要加入激活剂。
- 7) 有些酶对反应体系需要小心除去或避免抑制剂的污染。
- 8) 当反应体系温育一定时间后，可加酶的抑制剂以终止反应，或加热使酶灭活，然后测定其产物的生成量，或底物的消耗量，以求得酶促反应速率。

### 三、酶活性测定方法

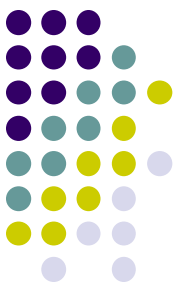


#### (一) 直接测定法 (direct assay)

是指对参与酶促反应的底物或产物的含量变化进行直接检测，不需任何辅助反应即可测定反应物或底物的浓度。

利用底物和产物的光吸收度不同进行测定。





## (二) 间接测定法 (indirect assay)

利用非酶辅助反应对底物或产物的变化进行间接检测。



(氧化型, 在610nm 处有吸收峰)

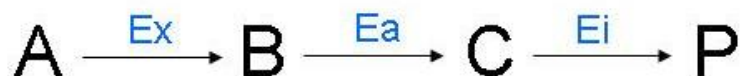
(还原型, 在610nm 处无吸收峰)

### （三）酶偶联测定法（enzyme coupled assay）



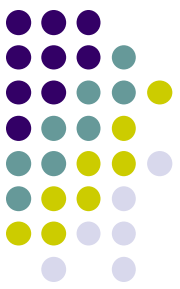
#### 1. 原理

许多酶促反应的底物或产物可以与另外的酶偶联，偶联的酶利用上一个酶催化的产物为底物，以此类推，最后一个反应后的产物可以直接测定，这种间接测定酶活力的方法称为酶偶联测定法。



A为底物，B、C为中间产物，P为产物， $E_x$ 为待测酶， $E_a$ 、 $E_i$ 都为工具酶。



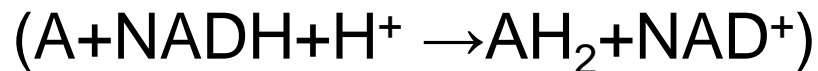


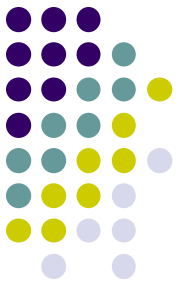
## 2. 酶偶联反应常用的指示酶

### 1) 脱氢酶

辅酶： $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ； $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 。

$\text{NADH}$ 及 $\text{NADPH}$ 在340nm处有吸收峰，而其氧化型 ( $\text{NAD}^+$ 及 $\text{NADP}^+$ )则无此吸收峰。因而可利用340nm 处吸光度的变化，以监测这类脱氢酶所催化的氧化还原反应。

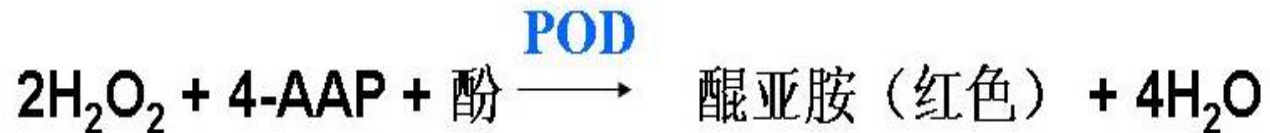


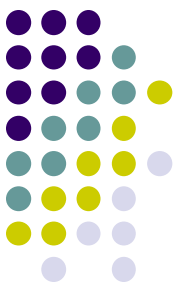


## 2) 过氧化物酶

过氧化物酶（peroxidase, POD）可催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  与某些物质反应，例如与4-氨基安替比林（4-AAP）和酚反应，将其氧化为有色物质，通过颜色变化指示酶活性。

该反应方程式如下表示：



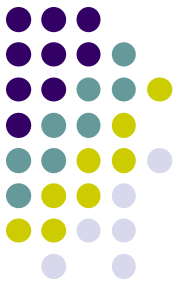


### 3) 荧光素酶

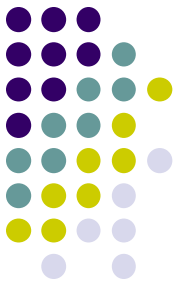
自然界中能够以荧光素为底物发出荧光的酶，统称为荧光素酶（luciferase）。



荧光素酶常常可以作为“报告蛋白”被用于分子生物学研究中，这一技术被称为报告基因检测法或荧光素酶检测法（luciferase assay）。



## 第七节 酶的命名与分类



# 一、酶的命名原则

习惯命名法 —— 推荐名称

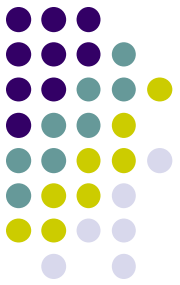
系统命名法 —— 系统名称

## 二、分类



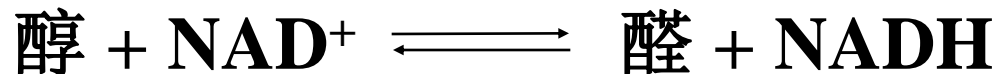
### IEC (International Enzyme Committee)分类法

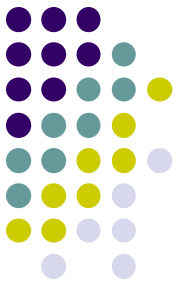
- 氧化还原酶类 (oxidoreductases)
- 转移酶类 (transferases)
- 水解酶类 (hydrolases)
- 裂解酶类 (lyases)
- 异构酶类 (isomerases)
- 连接酶类 (ligases)



- 根据酶所催化的化学键特点和参加反应的基团不同又分为亚类和亚亚类。
- 四个数字的分类编号：

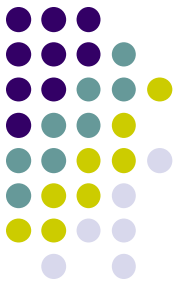
EC 1.1.1.1 醇：NAD<sup>+</sup>氧化还原酶





## 第八节 其他具有催化作用的生物分子





# 一、核 酶 (ribozyme)

## (一) 核酶的概念

是20世纪80年代初期发现的具有催化功能的RNA分子。它是具有高度专一的核酸内切酶的活性。

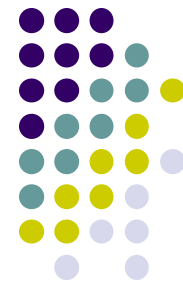
## (二) 核酶的发现



1982年切赫（Cech）等人在研究四膜虫前体rRNA剪接机制时发现，在没有任何蛋白酶参与下，含有413bp干扰序列（IVS）的前体rRNA（L19RNA）发生了自我剪接，但反应体系需镁离子和鸟苷参与。

研究认为，L19RNA（IVS）具有类似蛋白酶的功能，能够打断及重建磷酸二酯键。这是人类首次发现的具有催化作用的RNA分子。

### (三) 核酶的分类

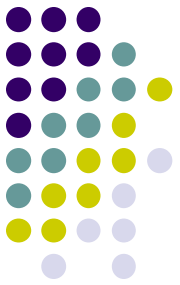


1. 按其作用方式分类 { 剪切型核酶  
剪接型核酶

2. 按结构和来源分类

小分子核酶 { 锤头型核酶  
发夹型核酶  
人丁型肝炎病毒核酶  
脉孢菌VS核酶

大分子核酶 { 组 I 内含子  
组 II 内含子  
RNA酶P核酶



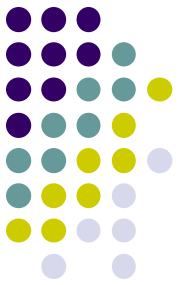
## （三）核酶的结构

### 1. 核酶的一级结构

核酶一级结构分子大小可以不同

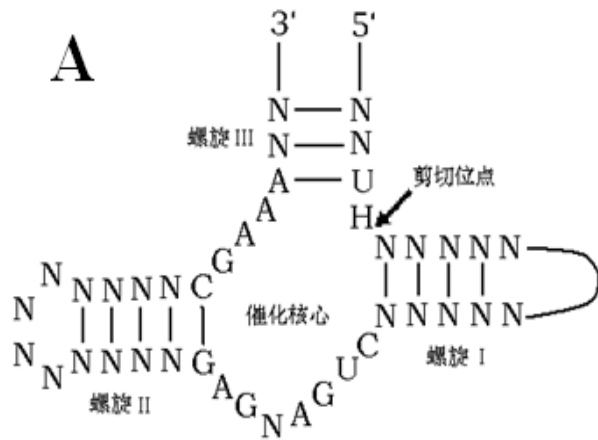
举例：

- 锤头型核酶L19 RNA是从6400个核苷酸的四膜虫大核rRNA逐步剪接而来，由395个核苷酸组成。



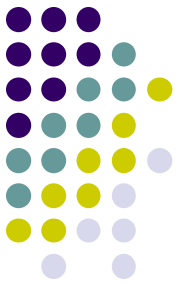
## 2. 核酶的二级结构

### 锤头型核酶的二级结构特点：

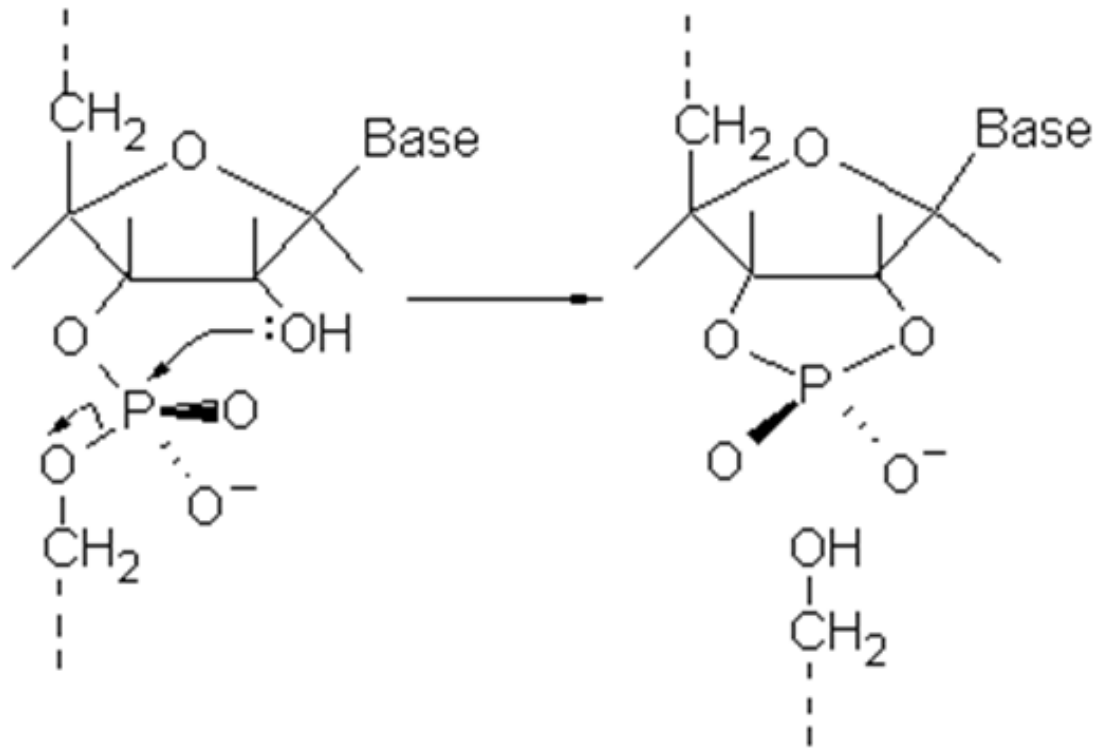


- 由高度保守的核苷酸组成的催化核心。
- 三个双螺旋茎（螺旋 I，螺旋 II，螺旋 III）。
- 对剪切点的识别序列UH(H为除G以外的核苷酸)。

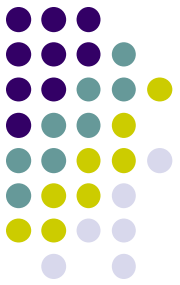
锤头型核酶的二级结构



## (四) 核酶的催化机制



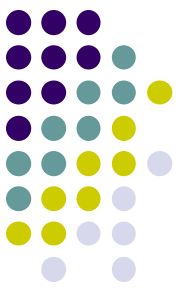
剪切点核苷酸糖基2'-OH对邻近的磷酸二酯键进行亲核攻击，产生两个产物，其一含有2',3'-环磷酸。



## (五) 核酶的催化反应特点

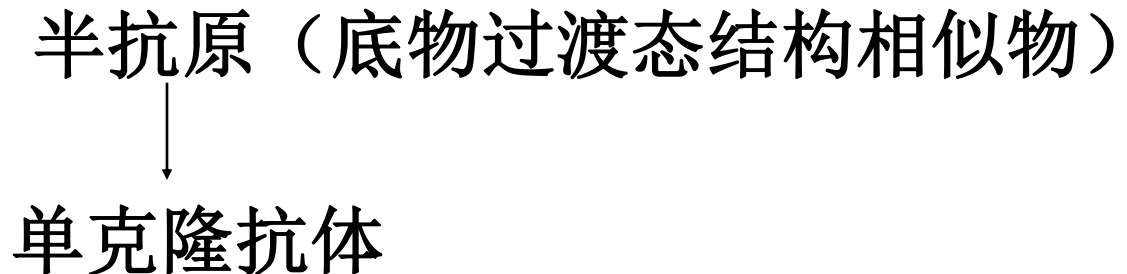
### 锤头型核酶为例说明核酶的催化活性

- (1) 核苷酸转移作用。
- (2) 水解反应，即磷酸二酯酶作用。
- (3) 磷酸转移反应，类似磷酸转移酶作用。
- (4) 脱磷酸作用，即酸性磷酸酶作用。
- (5) RNA内切反应，即RNA限制性内切酶作用。



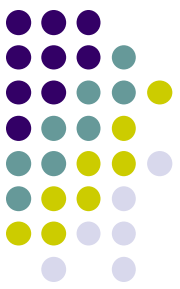
## 二、抗体酶 (abzyme)

- 抗体酶：又称催化抗体，为有酶样活性的抗体。



- 抗体能专一地识别某化学反应的过渡态，它利用其结合能降低该反应的活化能，从而像酶一样催化该化学反应加速进行。





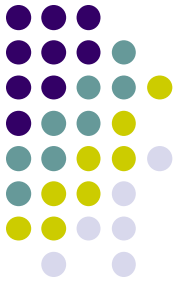
## ● 抗体酶特性

- 1) 专一性、 pH依赖性、 受抑制剂调节；
- 2) 催化活性小。

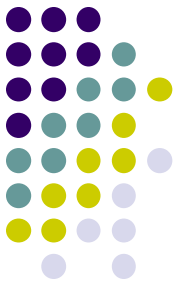
## ● 抗体酶应用

设计和生产抗体酶，在理论上和实践上均具有重要意义。

可以建立具有各种专一性的抗体酶库，用于切割蛋白质，就像限制性核酸内切酶库一样供研究者选用。



## 第九节 酶与医学的关系

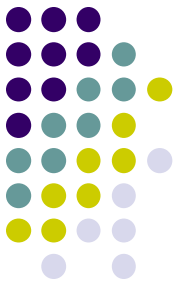


# 一、酶与疾病的发生

当某种酶在体内的生成或作用发生障碍时，机体的物质代谢过程常可失常；失常的结果则表现为疾病。

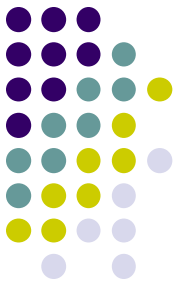
举例：

急性胰腺炎时，许多由胰腺制造的蛋白水解酶在胰腺细胞内就被异常激活，导致胰腺组织严重破坏



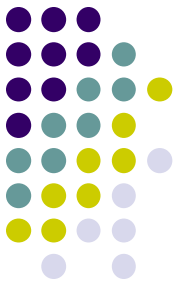
## 二、酶与疾病的诊断

当某些器官组织发生病变时，由于细胞的坏死或破损，或细胞膜通透性增高，可使原存在于细胞内的某些酶进入体液中，使体液中该酶的含量增高。通过对血、尿等体液和分泌液中某些酶活性的测定，可以反映某些组织器官的病损情况，而有助于疾病的诊断。



### 三、酶与疾病的治疗

- 替代治疗
- 抗菌治疗
- 抗癌治疗
- 对症治疗



# 思考题

- 论述酶活性中心的结构特点及与功能的相关性。
- 何谓酶的抑制剂？酶的抑制剂的主要类别及其特点是什么？
- 论述酶在医药学中的用途。