

华东理工大学研究生教育基金资助项目

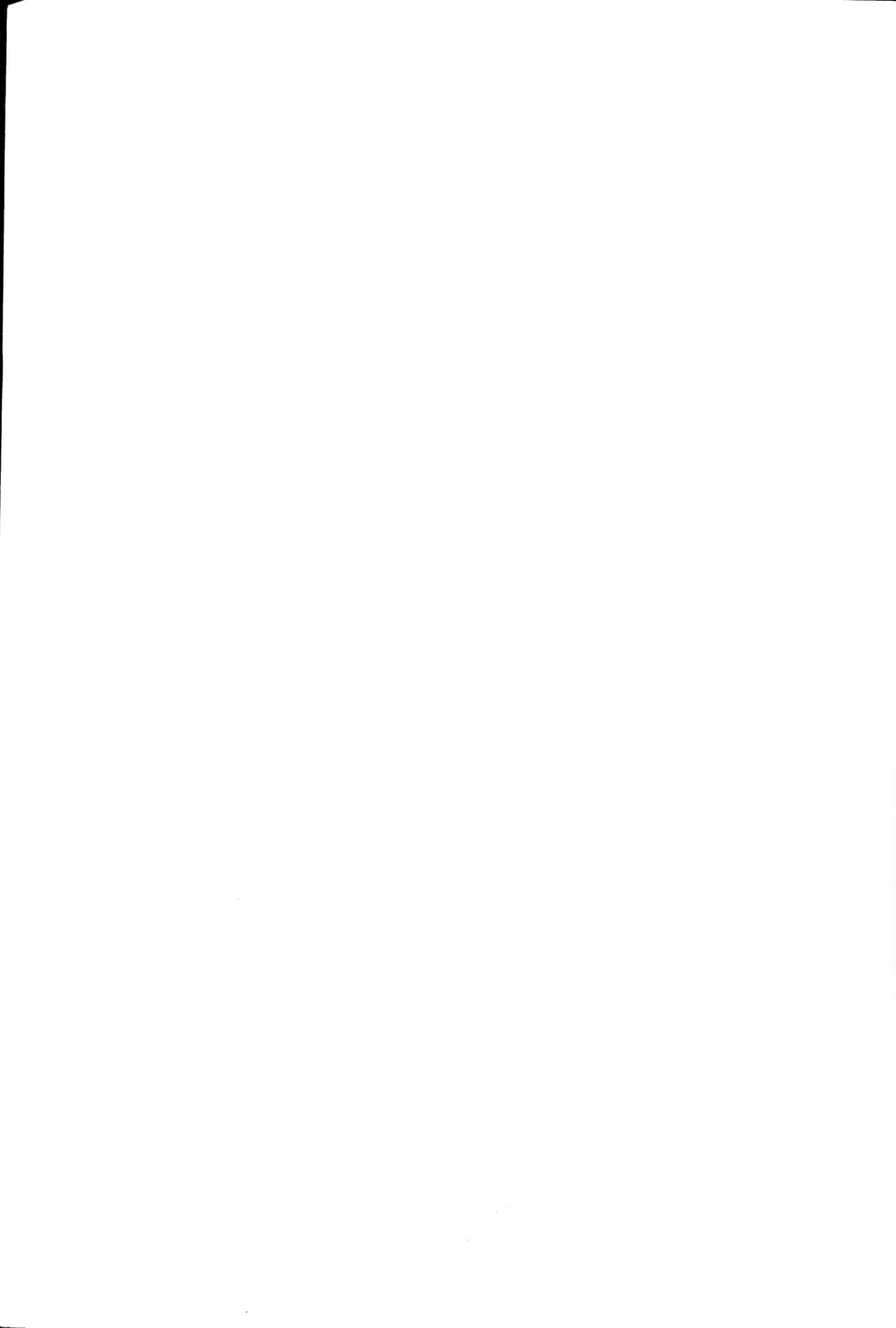
Modern Enzymology

现代酶学

袁勤生 主编

35
1-1

华东理工大学出版社



中科院植物所图书馆



S0003965





作者简介

袁勤生，1940年6月生，江苏武进人。1964年毕业于上海科技大学生物物理化学系，毕业后留校任教；1972年调入华东化工学院（现华东理工大学）工作，1985年晋升副教授，1990年晋升教授。曾任华东理工大学生物工程学院院长，教授，博士生导师。主要兼职有：国家新药研究与开发专家委员；国家新药评审委员（生物制品）；卫生部药典委员（90版）；中国药学会理事；中国生化药物学会主任委员；中国生化与分子生物学学会常务理事；中国工业生化专业委员会主任委员；上海药学会常务理事；上海生化药物学会主任委员；中国生化制药工业协会专家委员；《中国生化药物杂志》副主编等。

袁勤生教授长期以来从事生物化学及应用生化的教学与研究，尤其在酶的结构与功能、药用酶及生物医药等领域颇有建树；在国内外重要刊物上发表论文150余篇，有多项专利及省部级科技成果。袁勤生教授自20世纪80年代起就致力于SOD及生物技术产品的研究和开发，多次主持和组织全国性学术会议，为我国SOD及其生物技术产品的研究和应用作出了贡献。由于袁勤生教授在教学和科研上的杰出贡献，1994年被美国ABI权威机构收载入国际名人录。

Digitized by the Internet Archive
in 2011 with funding from
Institute of Botany, CAS and Internet Archive

<http://www.archive.org/details/xiandaimeixue00yuan>

华东理工大学研究生教育基金资助项目

现代酶学

袁勤生 主编

华东理工大学出版社

内 容 提 要

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

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

本书编委会

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

前 言

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

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

由于本人水平有限,书中难免存在不妥和错误,恳切希望广大读者、专家批评指正。

袁勤生
2001 年 7 月

目 录

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

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

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

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

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

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

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

1 酶的分离工程

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

酶的纯化过程一般包括下列步骤。

1.1 酶分离纯化的一般原则

1.1.1 建立一个可靠和快速的测活方法

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

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

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

1.1.2 酶原料的选择

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

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

1.1.3 酶的提取

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

1.1.4 酶的提纯

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

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

表 1-1 酶的提纯过程记录格式
(设想的提纯步骤)

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

1.1.5 酶的纯度检验

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

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

1.2 酶提取方法的选择

1.2.1 生物材料的破碎

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

表 1-2 细胞破碎方法

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

1.2.1.1 机械(匀浆)法

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

1.2.1.2 超声波法

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

1.2.1.3 冻融法

生物组织经冰冻后,细胞胞液结成冰晶,使细胞壁胀破。冻融法所需设备简单,普通家用冰箱的冷冻室即可进行冻融。该法简单易行,但效率不高,需反复几次才能达到预期的破壁效果。如果冻融操作时间过长,更应注意胞内蛋白酶作用引起的后果。一般需在冻融液中加入蛋白酶抑制剂,如 PMSF(苯甲基磺酰氟)、络合剂 EDTA、还原剂 DTT(二巯苏糖醇)等以防破坏目的酶。

1.2.1.4 渗透压法

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

菌和霉菌不太适用,除非用其他方法先除去这些细胞外层坚韧的细胞壁。

1.2.1.5 酶消化法

利用溶菌酶、蛋白水解酶、糖苷酶对细胞膜或细胞壁的酶解作用,使细胞崩解破碎。将革兰氏阳性菌(如枯草杆菌)一起温育,也可制得相应的原生质体。用 EDTA 与革兰氏阴性菌(如大肠杆菌)一起温育,也可制得相应的原生质体。几丁质酶和 3-葡聚糖酶则常用于水解曲霉、面包霉等的细胞壁。酶消化法常与其他破碎方法联合使用,如在大肠杆菌冻融液中加入溶菌酶就可大大提高破碎效果。

1.2.2 抽提方法

破碎生物组织一般在适当的缓冲液中进行。典型的抽提液由以下几部分组成:

抽提液 = 离子强度调节剂 + pH 缓冲剂 + 温度效应剂 + 蛋白酶抑制剂
 (KCl、NaCl、蔗糖) (各种缓冲液) (甘油、二甲基亚砷) (PMSF、DIFP)
 + 抗氧化剂 + 重金属络合剂 + 增溶剂
 (DTT、巯基乙醇) (EDTA、柠檬酸) (TritonX-100)

细胞胞液的离子强度在 0.3mol/L 左右,所以通常都用 0.3mol/L 的蔗糖溶液或 0.15mol/L 的 KCl 溶液抽提。如蛋白酶影响较大,则应改用离子强度低于 0.01mol/L 的 KCl 抽提。一般,抽提生物膜中的酶需加去垢剂(如 Triton X-100,去氧胆酸盐)等增溶剂,促使酶抽提,而抽提生物膜中的酶需加去垢剂(如 Triton X-100,去氧胆酸盐)等增溶剂,促使酶抽提,最后再透析去除增溶剂,恢复酶活性。抽提时为防止过冷、过热引起的酶分子变性失活,可加入适量的二甲基亚砷、甘油加以保护。此外,重金属离子影响和氧化失活作用(如酶的活性中心有巯基等)明显时,也应考虑去除。

1.3 酶纯化方法的选择

酶的提纯手段一般都是依据酶的分子大小、形状、电荷性质、溶解度、专一结合位点等性质而建立的。要得到纯酶,往往需要将各种方法联合使用。表 1-3 列出了最常用的纯化方法。

表 1-3 常用的提纯方法

性 质	方 法
溶解度	改变离子强度 改变 pH 温度 改变介电常数
电荷极性	离子交换层析 色谱聚焦 电泳 等电聚焦
大小或重量	离心分离 透析超滤 凝胶过滤
亲和部位	亲和层析 染料配体亲和层析 免疫吸附层析 共价层析

1.3.1 调节酶溶解度的方法

1.3.1.1 改变离子强度

蛋白质在溶液中由于表面带电的氨基酸残基与溶剂分子相互作用,所以能保持溶解状态。当加入盐离子时,蛋白质分子周围所带电荷增加,促进了与溶剂分子的相互作用,溶解度增加,这种现象称为盐溶。但当盐浓度继续加大时,大量盐离子使水浓度相对降低,蛋白质的水化作用减弱,相互凝聚而沉淀出来,这就是盐析。大部分酶在细胞中呈溶解蛋白的形式存在(达细胞总量 40%),在中性 pH 和离子强度为 0.5 ~ 0.2mol/L 的生理条件下极易溶解,因此得到粗酶抽提液后,改变这些条件就可使酶沉淀析出。

盐析时常用的盐有钠、钾、铵的硫酸、磷酸及柠檬酸盐。硫酸铵因具有高溶解度,对酶作用温和

且价廉等特点而最为常用。由于各种酶在不同浓度的硫酸铵溶液中溶解度不同,故可采用分级沉淀法分离酶。如兔肝超氧化物歧化酶(SOD)分离时,在粗抽提液中加入固体硫酸铵至 40% 饱和度,将部分杂蛋白沉淀,离心去除。在上清液中继续加固体硫酸铵至 75% 饱和度,将 SOD 沉淀下来,离心得到沉淀,即为第一步纯化的兔肝 SOD。

一种最有用的硫酸铵分级改进法即所谓反抽提法(Back - Extraction)。以 *E. coli* RNA 聚合酶的硫酸铵分级沉淀为例:此酶通常在 42% ~ 50% 硫酸铵饱和度时沉淀。用通常的分级沉淀方法是加硫酸铵至 33% 饱和度,弃去沉淀。在上清液中再加入硫酸铵至 50% 饱和度,析出 RNA 聚合酶。分离出沉淀,溶解于含有适当离子强度的缓冲液中。而反抽提法则是将该沉淀再悬浮于 42% 饱和度的硫酸铵溶液,这时沉淀中原来带有的某些杂蛋白又溶解了,而 RNA 聚合酶仍留在沉淀中,因而得到分离。换言之,反抽提法的原理就是将包括要分离的酶在内的多种蛋白质一起先沉淀出来,然后选择适当的递减浓度的硫酸铵溶液来抽提沉淀物。这种方法的优点在于许多蛋白质从溶液中沉淀析出十分容易,是非特异性的,但反过来,沉淀在溶液中溶解却有相当高的特异性。

硫酸铵反抽提法在提取易失活的酶时更有其优越性。例如,与 Cu、Zn - SOD 相比,肝脏 Mn - SOD 很不稳定,容易失活。采用一般硫酸铵分级沉淀法纯化时,得率较低。若用反抽提法,将肝脏组织在 85% 饱和度的硫酸铵溶液中匀浆破碎,离心得到沉淀,再用 65% 饱和度硫酸铵溶液洗涤,弃去上清液,再以 35% 饱和度的硫酸铵溶液抽提,Mn - SOD 得率较高。此外,反抽提法还用于多酶体系的纯化过程。使用这一方法酶活得率一般较高,可能是因为酶蛋白在非溶解状态较能抵御蛋白酶攻击的缘故。

具体进行硫酸铵盐析操作时还应注意两点。一是溶液的 pH 值。硫酸铵略呈酸性,大量加入会改变溶液 pH 值,一般可用稀浓度氨水来校正;二是硫酸铵应在搅拌中缓慢加入,避免溶液中硫酸铵局部浓度过高,当然搅拌也需温和,避免产生大量气泡。

硫酸铵分级沉淀法通常可去除抽提液中 75% 的杂蛋白,并可大大浓缩酶液,浓缩程度取决于用多少溶液溶解沉淀的酶蛋白。酶液体积越小,后续上柱分离就越容易。

1.3.1.2 改变 pH 值或温度

酶在等电点时,溶解度最小。将溶液 pH 值调到酶的等电点,可使酶沉淀析出。但在未纯化前等电点一般是未知的,需慢慢摸索,对某一特定的酶而言,pH 值变化范围不宜过大,以免酶失活。

利用温度的变化来改变酶溶解度的方法同 pH 值变化一样,比较难以控制,但如果纯化一些对热不敏感的酶,这一方法有着不可比拟的优点。如在纯化 Cu、Zn - SOD 时,将溶血液在 70℃ 加热 10min,很多杂蛋白变性被除去,Cu、Zn - SOD 仍稳定存在于溶液中。使用这一方法应注意酶溶液从一个温度加热到另一温度时时间要短,并应采用壁薄,具有大表面积的不锈钢容器进行加热。

1.3.1.3 改变介电常数

在溶液中加入与水互溶的有机溶剂,可显著降低溶液的介电常数,从而使酶分子相互之间的静电作用加强而发生沉淀。常用的有机溶剂有乙醇、丙酮、甲醇等。当溶液中存在有机溶剂时,酶蛋白的溶解度随温度的下降而显著降低,因此尽可能在低温下进行操作。这样不但可以减少加入的有机溶剂量,更重要的是减少了有机溶剂对酶的失活作用。

有机溶剂沉淀法较一般盐析法(如硫酸铵沉淀法)分辨率高。有时仅用这一方法就可将某些酶纯化,如乙醇沉淀法可纯化蓖麻过氧化氢酶。

但是,有些酶即使操作温度再低,一遇到有机溶剂即大量失活。如 Mn - SOD 在低温下用丙酮-氯仿处理会完全失活。这类酶的纯化就应严格避免接触有机溶剂。

聚乙二醇(PEG)也可视为有机溶剂,但它对酶的作用比较温和,不会使其变性。在溶液中加入 PEG 可降低蛋白质的水化作用,使其发生沉淀。常用的 PEG 分子量为 4 000 或 6 000。PEG 浓度达 20% 时,大部分蛋白质已发生沉淀。一般,低分子量酶由于体积较小,需采用较高浓度的 PEG 分级;高分子量酶,分子体积较大,采用低浓度 PEG 级分。PEG 的另一用途就是最近发展起来的所谓“双水相萃取”。PEG 与其他一些配对使用的物质,如右旋糖苷、无机盐(磷酸钾、硫酸铵)在水中达

一定浓度时,就能形成两相系统。蛋白质在这两相中具有不同的分配系数,改变组成两相的溶质浓度就可调节各种蛋白质在两相间的分配系数,从而得到萃取分离。

1.3.2 根据酶分子大小、形状不同的分离方法

1.3.2.1 离心分离

离心方法在酶分离纯化中最为常用。使用时首先应该考虑如何确定离心转速和离心时间。许多酶往往富集于细胞中某一特定的细胞器内,因此匀浆处理后应先通过离心得到某一特定的亚细胞器组分,如细胞核、线粒体、溶酶体等使酶先富集 10~20 倍,然后再对某一特定的酶进行纯化。

在酶的分离纯化过程中,离心分离的一般目的是为了压实沉淀,澄清上清液,因此对于一般的沉淀分离,如硫酸铵分级沉淀、有机溶剂沉淀,选用 39.2~58.8N(4 000~6 000g) 足以够用,对于线粒体之类的细胞器,则需 176.4N(18 000g) 以上的离心力才能进行较好的分离。离心力较大,达到分离所需的离心时间越短,反之亦然。在条件许可和不影响分辨率的情况下,可选用稍大一些的离心力,以节省离心时间。

1.3.2.2 凝胶过滤

凝胶过滤法分离酶蛋白质时,由于大的蛋白质分子被凝胶颗粒排斥,因而在颗粒外移动,速度较快;小分子蛋白质则进入凝胶颗粒的小孔内,路径加长,移动缓慢,从而根据分子大小将各种组分拉开(见图 1-1)。常用于凝胶过滤的介质有 Sephadex G 系列, Bio-GelAP 系列, Sepharose 等。

凝胶过滤法在实际操作时,首先应选择具有合适孔径的分离介质,使待分离的酶蛋白的分子量落在可分离的有效范围内。颗粒干粉经充分溶胀、脱气后,即可装柱平衡。溶胀时通常可将干粉放在水中过夜,或在沸水浴中加热 2h。柱子要垂直放置,装柱完毕后,通常还需用 0.2% 蓝色葡聚糖 ($M_r = 2\,000\,000$, $\frac{1}{50} \sim \frac{1}{100}$ 床体积) 来检查装性的均匀性和空柱体积 V_0 (即柱中颗粒外的溶剂体积)。上样体积不宜超过凝胶的体积 V_t 的 3%, 一般以 V_t 的 1% 为宜。洗脱液的体积以 $(V_t - V_0)$ 的 80% 左右。凝胶过滤用的缓冲液要具备一定的离子强度,以减少蛋白质分子间非专一性的静电相互作用的影响。在使用 Sephadex G 系列凝胶柱时,还需特别注意操作压,以免压力过高,压实凝胶,影响流速。凝胶柱不用时,加入 0.02% 叠氮钠溶液或 0.02% 柳硫汞溶液加以保存,以防微生物污染。

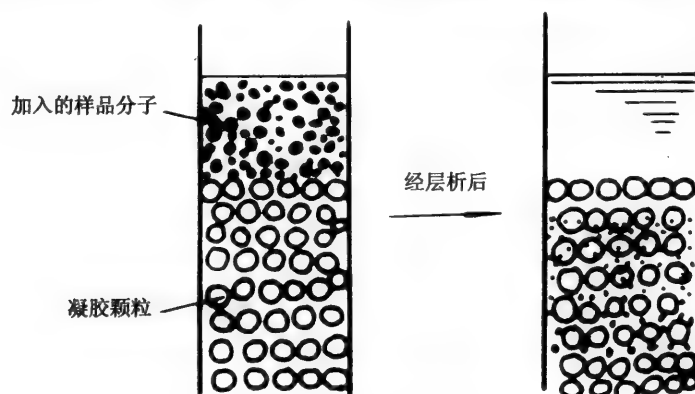


图 1-1 凝胶过滤分离示意图

1.3.2.3 透析、超滤

透析通常不作为纯化酶的一种单元操作,但它在纯化过程中极为常用,通过透析可除去酶液中的盐类、有机溶剂、低分子量抑制剂等。此外,采用聚乙二醇、蔗糖反透析还可对少量酶进行浓缩。

透析膜(袋)其截留极限一般在 M_r 为 5 000 左右。因此,如果将相对分子质量在 1 万以下的酶液进行透析时,就有泄漏的危险。透析袋在使用前最好在 EDTA - NaHCO_3 溶液中煮过,以除去生产过程中混入的有害物质,特别还应检查一下有无破损、泄漏处,这样才能装入待透析液,两头扎紧,进行透析。一般透析液需更换 3~5 次。透析袋使用后,一般可用清水冲洗干净,再次检查是否

完好,然后浸入 75%乙醇溶液中保存备用。

超滤(或超过滤)是在一定压力(正压或负压下)下将料液强制通过一固定孔径的膜,以达到分离纯化的目的,这一方法在提纯酶时,既可直接用于纯化过程,又可用于纯化过程之间(如酶液的浓缩等)。在纯化枯草杆菌 SOD 时,菌体经裂解后用孔径为 $0.8\mu\text{m}$ 和 $0.22\mu\text{m}$ 的微滤膜进行微滤,最后分别用截留为 1 万和 10 万的超滤膜进行截留,就可以得到 SOD 的粗抽提液。

超滤膜通常用纤维素、聚砜等材料制成,具各向异性,因此使用时要注意膜的正反面,不要搞错。超滤膜在使用后要及时清洗,一般可用超声波、中性洗涤剂、蛋白酶液、次氯酸盐及磷酸盐等处理,使膜基本恢复原有通水量。如果超滤膜暂时不再使用,可浸泡在加有少量甲醛的清水中保存。常用的超滤器种类和性能见表 1-4。

表 1-4 超滤器的种类和性能

类 型	优 点	缺 点
平板式	保留体积小,能耗介于管式和螺旋卷绕式之间,清洗方便	死体积大,单位有效膜面积较小
管式	易清洗,无死角;适宜处理含固体较多的料液,单根管子可以调换	保留体积大,单位体积中所含过滤面积较小,压力降大
中空纤维式	保留体积小,单位体积中所含过滤面积大,可以逆洗,操作压力较低($<0.25\text{MPa}$)	料液需经预处理,单根纤维损坏时,需调整整个柱子,价格较贵清洗较慢
螺旋卷绕式	单位体积中所含过滤面积大,换膜容易	料液需经预处理,压力降大,易污染,清洗困难

1.3.3 根据酶分子电荷性质的方法

1.3.3.1 离子交换柱层析

离子交换层析是依据被分离物质与分离介质间异种电荷的静电引力的不同来进行物质分离的。各种蛋白质分子由于暴露在分子外表面的侧链基团的种类和数量不同,在一定的离子强度和 pH 值的缓冲液中,所带电荷的情况也是不相同的。如果在某一 pH 值时,蛋白质分子所带正负电荷量相等,整个分子呈电中性。这时 pH 值即为该蛋白质的等电点。参与蛋白质电荷特性形成的氨基酸主要有组氨酸、精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、半胱氨酸,以及肽链末端氨基酸等等。如当 $\text{pH} < 6.0$ 时,天冬氨酸和谷氨酸的侧链带有负电性,当 $\text{pH} > 8.0$ 时,半胱氨酸的侧链由于巯基的解离,也带负电荷,如果 $\text{pH} < 7$,组氨酸残基带正电荷,大多数蛋白质等电点多在中性附近,因而层析过程可以在弱酸或弱碱条件下进行,避免了交换时 pH 急剧变化而导致蛋白质变性。

用于酶蛋白离子交换分离的载体,往往是高亲水性的、不会引起生物分子变性失活的纤维素、交联葡聚糖、交联琼脂糖等。常用的离子交换介质见表 1-5。

离子交换柱的柱长通常为柱径的 4~5 倍。离子交换剂如 CM-纤维素或 DEAE-纤维素,在装柱前应充分溶胀(在 10 倍量的蒸馏水中溶胀一夜或在 100°C 沸水浴中溶胀 1h 以上),倾析除去过细粒子,然后用 2~3 倍量 0.5mol/L HCl 和 0.5mol/L NaOH 溶液进行循环转型,每次转型至少维持 10~15min。对于阳离子交换剂,转型次序为酸—碱—酸,而阴离子交换剂则为碱—酸—碱,经平衡缓冲液平衡,即可进行层析操作。加入柱中的蛋白量一般约为柱中交换剂干重的 1/10 到 1/2 之间,样品体积也尽可能小,以得到理想的分辨率。洗脱时,可以通过提高洗脱液的离子强度、减弱蛋白质分子与载体亲和力的方法,逐一洗脱各蛋白质组分,也可改变洗脱液的 pH 值,使蛋白质分子的有效电荷减少而被解吸洗脱。

使用过的离子交换剂可用 2mol/L NaCl 彻底洗涤,阳离子交换剂转成 H^+ 型或盐型贮存,弱碱性阴离子交换剂以 OH^- 型贮存,中等和强碱性阴离子交换剂以盐型贮存,并且加入适当的保存剂,见表 1-6。

表 1-5 酶纯化过程中常用的离子交换介质

类 型	商 品 名	功 能 基 团	小分子 交换容量	
阴 离 子 交 换 剂	弱碱性	AE-Cellulose	氨基基 $-(CH_2)_2-NH_2$	0.3~0.4
	中等碱性	DEAE-Cellulose	二乙基氨基乙基	0.2~10
		DEAE-SephadexA-25, 50	$-(CH_2)_2-N^+(C_2H_5)_2$	3~4
		DEAE-SepharoseCL-6B		10~14
	强碱性	CelluxGE	胍乙基 $-(CH_2)_2-NH-C(=NH)-NH_2$	0.3~0.5
		TEAE-Cellulose QAE-SephadexA-25, 50	三乙氨基乙基 $-(CH_2)_2-N^+(C_2H_5)_3$ 二乙基-(2-羟丙基)-氨基基 $H_2)_2-N^+(C_2H_5)_2$ $ $ $CH_2CH(OH) \cdot CH_3$	0.4~0.75 -
阳 离 子 交 换 剂	弱酸性	CM-cellulose	羧甲基 $-CH_2-COO^-$	0.6~1.0
		CM-SephadexC-25, 50		4~5
		CM-SepharoseCL-6B		11~15
中等酸性	CelluxP	磷酸 $-P(O)(O^-)_2$	0.8~7.4	
强酸性	SP-Sephadex C-25, 50	磺丙基 $-(CH_2)_3-SO_3^-$	2~2.6	

表 1-6 离子交换剂保存剂

保存剂	浓度(%)	在下列介质中具有保存活性
洗必太	0.002	中性、弱酸和弱碱
苯基汞盐	0.001	弱碱
三氯丁醇	0.05	弱酸
甲 苯	0.03	所有介质
硫柳汞	0.02	弱酸
叠氮化钠	0.02	中性、弱酸和弱碱

1.3.3.2 层析聚焦法

层析聚焦法分离蛋白质分子的过程与等电聚焦电泳极其相似,区别仅在于其连续稳定的 pH 梯度是在固相的离子交换载体上形成的。一般以孔径 $10 \sim 10\mu m$, 表面含有较强缓冲能力的离子基团(如聚乙烯酰亚胺)的二氧化硅作层析介质。当两性电解质组成的多元缓冲液流过时,能形成一 pH 梯度。进行蛋白质分离时,先使柱内的载体(称多元缓冲交换剂)处于较高的 pH 环境中,加入样品后,用 pH 低于被分离物等电点的多元缓冲液展层洗脱,刚开始时,因环境 pH 值高于蛋白质的等电点,蛋白质带负电而被载体吸附,随着环境 pH 值逐渐降低至等电点以下,开始产生解吸现象,并被洗脱液洗脱下移。不断推进的结果,在柱内形成连续的 pH 梯度。此时,蛋白质区带的最前沿恰好被吸附阻滞在稍高于等电点的 pH 阶梯上,其尾部仍带正电荷,处于解吸状态。随着洗脱液的前移,大部分分子在其等电点附近凝聚,这些聚焦带随着多元缓冲液的流入被反复解吸洗脱,最后在 pH 值等于其等电点时被洗脱出层析柱,洗脱液中的多元缓冲液成分可用 Sephadex G25 等方法除

去。

1.3.3.3 电泳

电泳分离是根据在电场作用下,带电分子由于电荷性质和电荷多少的不同,向两极泳动的方向和速度也不相同的原理进行的。泳动的速率同时也受带电分子本身形状和大小的影响,为了尽可能减少对流作用,电泳在浸透电泳缓冲液的介质上进行(纸、纤维素粉末、淀粉或聚丙烯酰胺凝胶),通过考马斯亮蓝等染色剂染色显示出电泳后蛋白质区带的位置。电泳分离的蛋白质量通常较小(约数毫克),常用作分析使用,但现在也有进行制备性的电泳,用这一方法制备的酶可从介质上洗脱,或从电泳柱底部依次流出。

1.3.3.4 等电聚焦电泳

每一种蛋白质都有其特有的等电点(pI),如果电场中某一处的 pH 值等于某一蛋白质的等电点,由于此时该蛋白质所带净电荷为零,不再移动,等电聚焦用的缓冲液用一系列带有不同电荷性质(因而有不同的 pI 值)被称为 Ampholyte 的聚氨基酸组成。当酶试样加在凝胶的一端进行电泳时,由于 Ampholyte 分子量小,泳动快,因此先在电场中形成一梯度。蛋白质分子则受电场作用在这一 pH 梯度中各自迁移,直到与其等电点相同的位置(见图 1-2),经分别洗脱,就可得到纯化的样品。

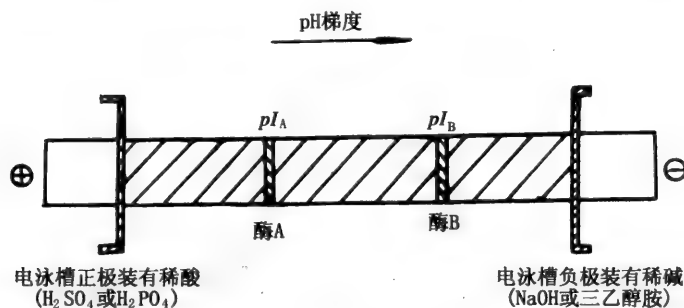


图 1-2 等电聚焦法分离酶蛋白

1.3.4 根据酶分子专一性结合的方法

1.3.4.1 亲和层析

与其他常规的纯化方法不同,亲和层析法是利用酶分子独有的专一性结合位点或结构性质的分离方法,具有分离效率高、速度快的特点(图 1-3)。酶的底物、抑制剂、辅因子、别构因子,以及酶的特异性抗体等都可作为酶蛋白的亲和配体,将这些亲和配体偶联于载体上,就制成了亲和介质。

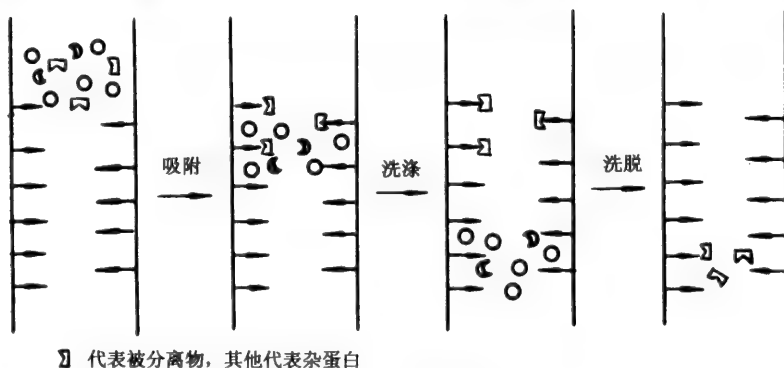


图 1-3 亲和层析原理图

亲和层析的介质,一般要具备以下特点。

- (1) 非特异性吸附要尽可能小。
- (2) 高度亲水性,不引起酶蛋白的变性失活。

- (3) 化学和机械性能稳定。
- (4) 具有高效的多孔结构,比表面积大。
- (5) 具备大量可被活化偶联的基团。
- (6) 配接的“手臂”(spacer)长度要合适,“手臂”和酶蛋白分子尽可能避免非特异性相互作用。

常用的载体有琼脂糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、多孔玻璃珠,其中以4%的交联琼脂糖(Sepharose 4B)最为常见。

琼脂糖的活化可采用溴化氰法。能使脂肪族伯胺或芳香胺类与活化的载体共价结合。

除溴化氰法外,还可采用三嗪法(图1-4(a))、高碘酸盐氧化法(图1-4(b))、苯醌法(图1-4(c))、环氧化物法(图1-4(d))等(见图1-4)进行活化。

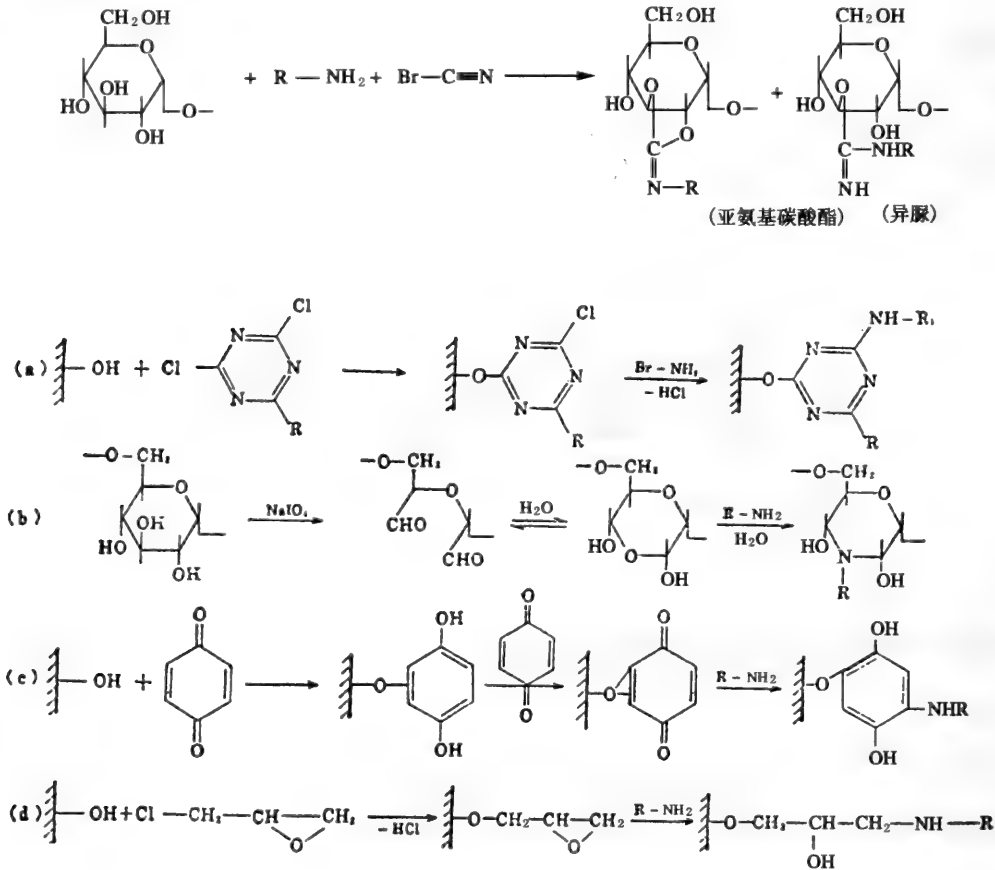


图1-4 其他活化载体的方法

对于聚丙烯酰胺,可以用制备酰胺衍生物的方法来活化。而多孔玻璃的活化,常用硅化法来进行。有时配基与载体偶联后,由于载体的空间位阻影响,配基与酶蛋白不能很好结合(见图1-5),需另加一手臂。

一些双胺类化合物,如己二胺、3,3'-二氨基二丙胺等,常被用作“手臂”,这些双胺的烃链 $H_2N(CH_2)_nNH_2$ 可长可短,视需要而定(表1-7)。

不过,手臂过长,则回旋角度大,接触空间广,使载体与手臂、各手臂与各配体间不免会有相互作用,反而不利于与酶分子结合。另外,长脂肪链本身也会与蛋白质发生非专一性的疏水相互作用,影响分离效果,已有人建议选用亲水性的手臂,以降低这种非专一性的吸附效应。

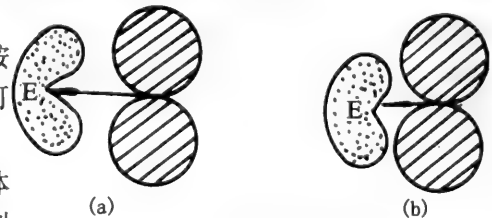


图1-5 手臂对亲和过程的影响

- (a) 未接手臂,亲和吸附作用较弱;
- (b) 接上手臂后,配基与酶能紧密结合

表 1-7 葡萄球菌核酸酶的亲和层析介质

层析介质	相对吸附能力
$\text{---PdTP}^{\text{①}} \text{ 氨基酚}$	2
$\text{---NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NHCCH}_2-\text{PdTP 氨基酚}$	8
$\text{---NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NHC}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}-\text{PdTP 氨基酚}$	10

① PdTp即3',5'-脱氧胸腺嘧啶核苷酸。

酶蛋白经亲和和吸附后,可以通过改变缓冲液离子强度和 pH 值的方法,将酶洗脱下来。也可以使用浓度更高的一同配体溶液或亲和力更强的配体溶液洗脱,这就是亲和洗脱。还有一种亲和洗脱概念,就是先用离子交换层析柱将所要分离的酶吸附到载体上,再用适量的酶的底物将酶洗脱下来。这种方法一方面无需费力准备亲和层析柱,另一方面通常用调整缓冲液的浓度或 pH 值的方法来洗脱,分辨离不高,其他电荷性质相近的蛋白也会随所要的酶一起流出,改用亲和洗脱,就能大大改善洗脱效果。

1.3.4.2 免疫吸附层析

抗原-抗体反应的高专一性经常被用于分离纯化过程。如果用传统方法从一个生物种属中得到少量的纯酶(如 0.1mg),利用它在另一种属(通常为兔子、羊或鼠)中产生多克隆抗体,这些抗体由于各自识别酶的不同抗原决定簇,因此与酶的亲和力也大小不一。抗体经纯化后,偶联到溴化氰活化的 Sepharose 上,即可用于从混合物中分离出酶抗原。利用改变洗脱液的 pH 值,增加离子强度或其他降低抗原抗体结合力的方法将吸附的酶解吸洗脱。解吸过程可能是整个纯化过程中最为困难的一步。因为酶在剧烈的解吸过程中,可能会大量失活,回收率大大降低。

单克隆抗体(McAb)制备技术的应用解决了许多在多克隆抗体使用中遇到的问题。首先,作为抗原的酶不用很纯,在筛选分泌特异抗体的细胞株时,可以筛去也分泌无关抗体的细胞株;其次,由于通常用小鼠免疫制备 McAb,抗原酶的用量很小,有时 50 μg 足以够用。而且,作为抗原的酶可含有不同的抗原决定簇,因而,同一抗原可产生许多不同的 McAb,从中挑选出亲和力适中的 McAb⁻来制备亲和介质。这样,既能高效吸附目的酶,又可避免后面洗脱困难的缺陷。所以,用 McAb 制得的亲和柱,其柱效往往很高,而且 McAb 还可通过体外大规模培养大量制备。

众所周知,所有动物产生抗体的淋巴细胞在体外培养条件下,其生存时间极短。而骨髓瘤细胞能在体外长期培养生长,但不能产生专一性的抗体。将这两类细胞融合得到的杂交细胞就兼有两者的长处:既能长期培养生长,又能分泌所需要的特异抗体。因此,我们可以将需要纯化的某一酶的酶液(不需要很纯)作为抗原去免疫动物,然后分离出这一动物的脾细胞,与遗传缺陷型骨髓瘤细胞相融合。经多次克隆后,挑选出能单一分泌这种酶抗体的杂交瘤细胞,再经扩大培养,即可大量得到这种酶的 McAb(见图 1-6)。

最常用的骨髓瘤的细胞突变系,其缺乏次黄嘌呤、鸟嘌呤、核糖基转移酶或缺乏胸腺嘧啶核苷激酶,这些突变系由于缺乏 DNA 补救旁路的酶,在含偶氮鸟嘌呤或溴脱氧尿苷的培养液中均可生长。同理,它们也不能利用外源性次黄嘌呤或胸腺嘧啶核苷。若用氨基喋呤阻断 DNA 前体内源性合成,即使在培养液中含有次黄嘌呤及胸腺嘧啶核苷,细胞仍将死亡。这种含氨基喋呤、次黄嘌呤及胸腺嘧啶核苷的培养液简称 HAT 培养液。骨髓瘤突变系细胞,如果同野生型含补救旁路酶的脾细胞形成杂交细胞,便能在 HAT 培养液中生长,因而就可挑选出不同于两种母本细胞,可大量繁殖且能分泌特异抗体的杂交细胞。

骨髓瘤细胞突变系的应用,简化挑选过程,大大节约了时间,促进了 McAb 技术的发展。McAb 技术已被用于从牛脑中提取芳香族 L-氨基酸脱羧酶,以及从基因工程菌发酵液中提取重组人 α -干扰素等。

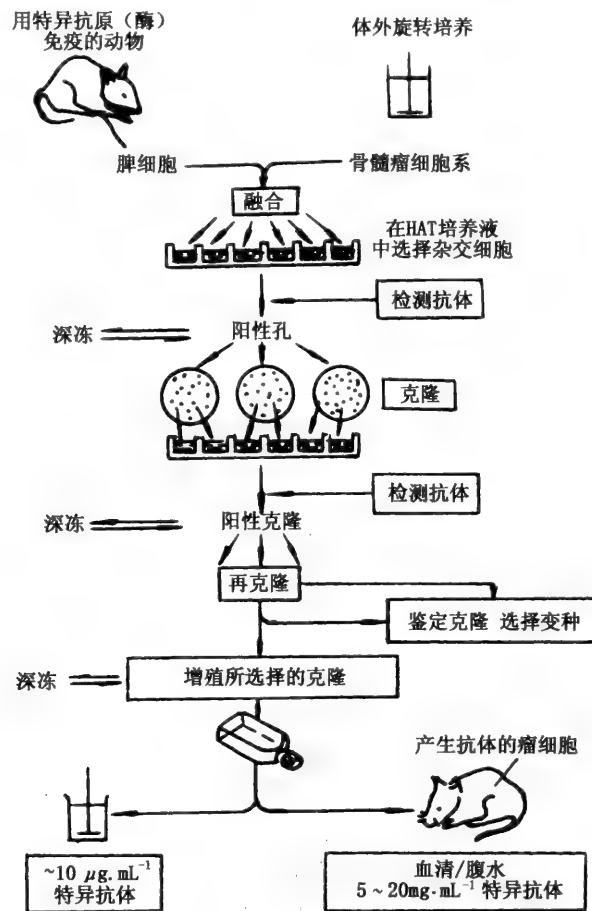


图 1-6 产生及克隆分泌抗体杂交瘤的常规步骤

1.3.4.3 染料配体亲和层析

70年代中期,人们发现一种称为 Cibacron 蓝 F₃G-A 染料(以前就用偶联这种染料的葡聚糖检查凝胶过滤柱的装柱质量和空柱体积 V_0)能与一些脱氢酶、激酶之类的酶蛋白结合。这些酶都具有一个被称为“二核苷酸折叠”的核苷酸结合部位来结合其辅因子,如 NAD^+ 、 $NADP^+$ 及 ATP 。Cibacron 蓝 F₃G-A 与 NAD^+ 的分子构象非常相像(图 1-7),因而就在酶的 NAD^+ 结合部位与其结合。

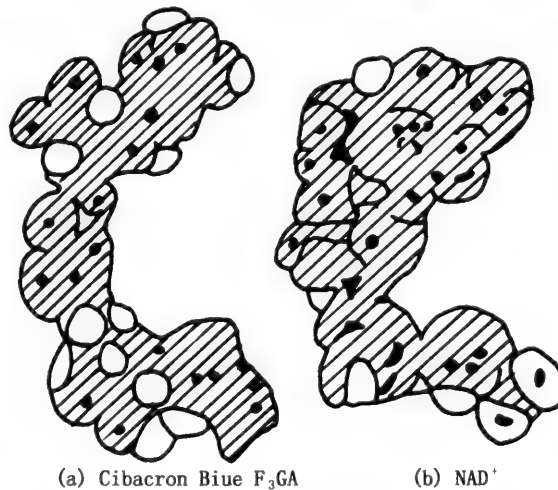


图 1-7 两种分子三维结构的比较

尽管染料分子与酶蛋白两者结合的分子机制尚未完全搞清,但染料配体亲和层析已被证明是酶分离纯化中一种很有用的方法。染料非常容易通过三嗪基氯基团与琼脂糖介质偶联。蛋白质也可以通过加入适量的底物或配基(0.1 ~ 1.0 mmol/L),或仅仅是增强离子强度(大于 100 mmol/L 的 NaCl)得到洗脱。

由于染料分子与被纯化的酶没有任何生物学的关系,所以严格地说只能称之为“准亲和层析”。

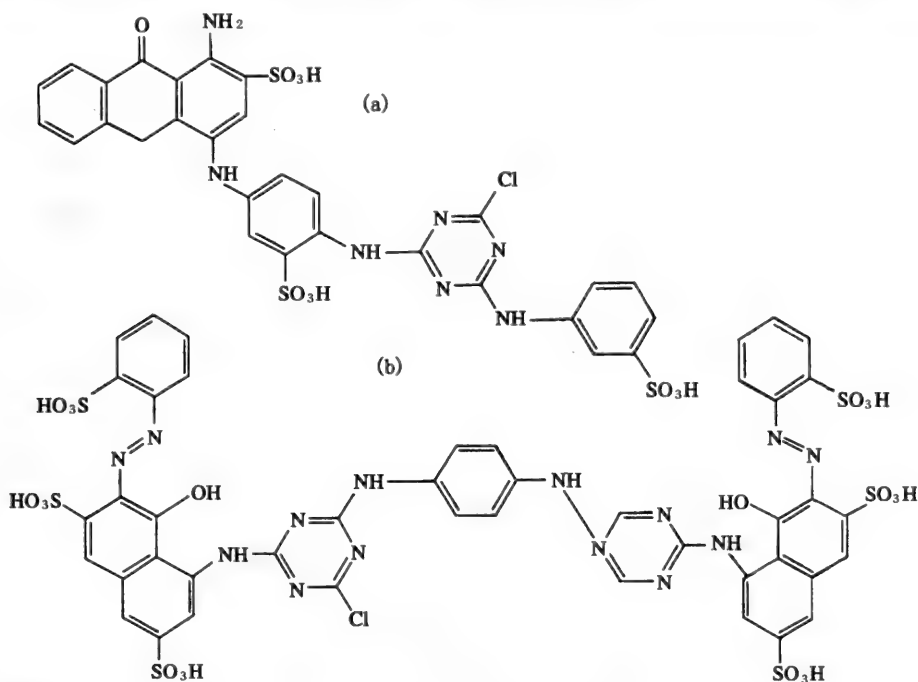


图 1-8 两种用于染料亲和色谱的染料

(a) Cibacron 蓝 F₃G-A; (b) Procion 红 HE-3B

自 Cibacron 蓝以后,许多其他三嗪类染料已被人们视为蛋白质纯化的有力工具。新近研究的 Procion 染料系列在某些蛋白质纯化中呈很高的专一性。连接在 Sepharose 上的 Procion 红 HE-3B(图 1-8)对一些 NADP⁺ 依赖型脱氢酶的结合优先于对 NAD⁺ 依赖型脱氢酶的结合。这一特性已被用以提取酵母粗抽提液中的 NADP⁺ 依赖型脱氢酶;相反, Cibacron 蓝 F₃G-A 则优先于 NAD⁺ 依赖型脱氢酶结合。

染料配体层析一般在低离子强度下(0.02 ~ 0.05mol/L)将酶吸附到层析柱中的染料凝胶载体上,再逐渐增加离子强度将酶洗脱。也可采用亲和洗脱法,即除了增加离子强度外,另加入一些酶的底物,使所需要的酶被单独洗脱。当然,染料配体层析中使用的染料结构不同,吸附和洗脱的条件也要相应变化。需要注意的是,在一定条件下,固定化染料能起阳离子交换剂的作用。为避免这种现象,层析操作最好在离子强度 ≥ 0.1 和 pH ≥ 7 时进行。

1.3.4.4 共价层析

共价层析与前述的纯化方法不同,它是利用层析介质与被分离物质(酶)间形成共价键的方式进行分离的,目前在巯基酶的分离纯化中应用较多。

共价层析的基本原理见图 1-9 所列。

在吸附过程中,被分离物共价结合到层析介质上,如巯基通过自由巯基与二硫键互换反应选择性地吸附在活化的巯基化的介质上,形成一混合二元化合物。由于偶联反应是可逆的,因此在洗涤除去那些没有吸附的物质后,就可用能够还原二硫键的低分子量巯基化合物进行洗脱,如 L-半胱氨酸、巯基乙醇、谷胱甘肽和二硫苏糖醇。

当酶蛋白巯基由于空间掩蔽效应(steric shielding)不能参与反应时,层析操作可在含有变性剂(8mol/L 尿素或 6mol/L 氯化胍)的缓冲液中进行。如果蛋白质所含巯基是以二硫键形式存在(如牛

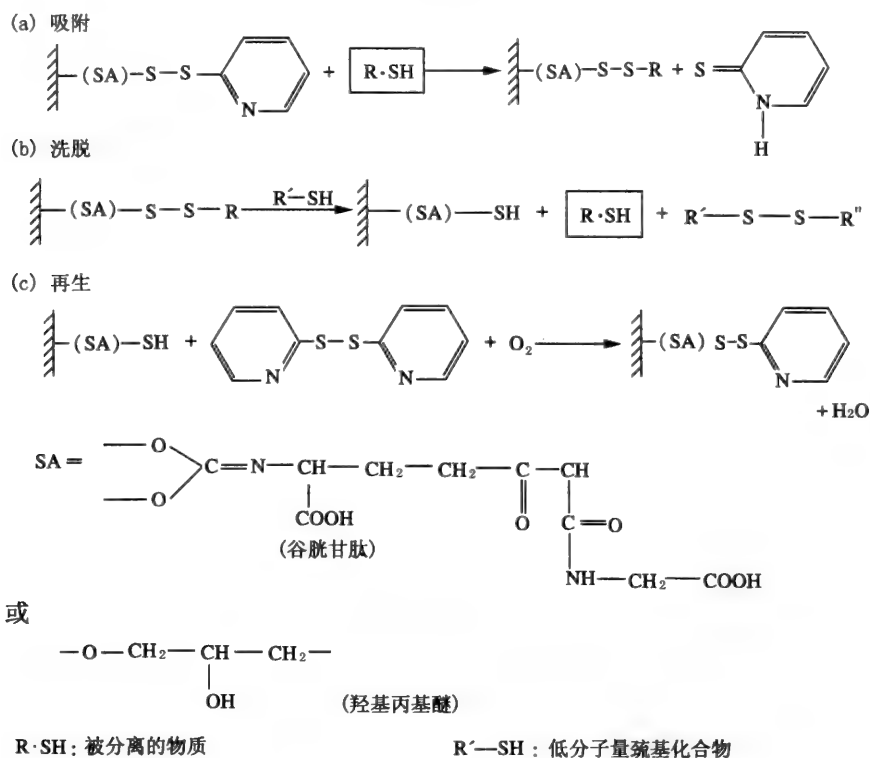


图 1-9 共价层析的原理

胰核糖核酸酶),那么就必须先用还原剂打开二硫键,再进行分离。

现在主要使用两种共价层析介质,即琼脂糖谷胱甘肽-2-吡啶二硫化物和2-吡啶二硫化物-羟基丙基醚琼脂糖。前者以谷胱甘肽作手臂,Sepharos 4B 为载体;后者以羟基丙基作亲和手臂,Sepharose 6B 为载体。两者在洗脱后,都可用 1.5mmol/L、pH8 的 2,2'-二吡啶二硫化物溶液再生。

共价层析方法除用来分离巯基酶以外,还可用来分离含巯基的多肽片段,以及汞化的(mercurated)mRNA。

1.3.5 其他分离方法

除了前面介绍的主要方法外,还有许多其他的分离方法可用于酶的提纯,如无机吸附层析,疏水吸附层析、薄板层析、高效液相色谱(HPLC)、冷冻干燥、亲和超滤、亲和分配、亲和电泳等等。这些方法有的处理量大,有的简便易行,有的快速高效、特异性高等。这里简要介绍两种方法。

1.3.5.1 无机吸附层析

蛋白质分子可以通过次级键与一些吸附剂发生作用。这些吸附剂通常是一些无机物(表 1-8),具有价廉、使用方便等优点,可作为柱层析用,也可直接加到粗提液中,搅拌吸附后过滤分离,适宜于工业规模生产。常用的无机吸附介质为羟基磷灰石,含有能与蛋白质分子正电荷基团起吸附作用的磷酸基团,又有吸附负电荷基团的 Ca^{2+} 。一般各种蛋白质所带的正负电荷的数量和强弱不同,因而与羟基磷灰石的吸附作用各有强弱,故可将各种成分一一洗脱。常用的洗脱剂有柠檬酸盐、NaCl、KCl 等。柠檬酸根离子与 Ca^{2+} 有强作用力,能削弱蛋白质负电荷的吸附作用,而高浓度的 NaCl、KCl(达 3mol/L 浓度)则降低蛋白质正电荷的吸附作用,常分别用于碱性蛋白和酸性蛋白的洗脱过程。

表 1-8 用于分离纯化酶的无机吸附剂

种 类	主 要 成 分
氧化铝凝胶 Cr(Alumina gel Cr)	二氧化二铝
硅 胶 (Silica gel)	二氧化硅
皂 土 (Bentonite)	硅铝酸镁
磷 酸 钙 (Calcium phosphate)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
羟磷灰石 (Hydroxyapatite)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
氧 化 钛 (Titanium Oxide)	TiO_2
多孔玻璃 (Controlled-pore glass)	SiO_2 和 B_2O_3

1.3.5.2 亲和超滤

亲和超滤是把亲和层析的高度专一性与超滤技术的高处理能力相结合的一种新颖分离方法。需要提纯的粗酶自由存在于抽提液时,可以顺利通过截留分子量较大的超滤膜。但当酶与大分子亲和配体混和,形成酶-配体复合物后,由于其分子量远大于超滤膜的截留分子量,因而被截留。提取液中其他未被结合的组分仍可顺利通过超滤膜,分离出上述复合物后洗去杂质,再用合适的洗脱液洗脱,使酶解吸下来;再通过一次超滤膜,把大分子配体分离出来,供再生使用。透过的酶液再经截留分子量小的超滤膜进行浓缩(图 1-10)。

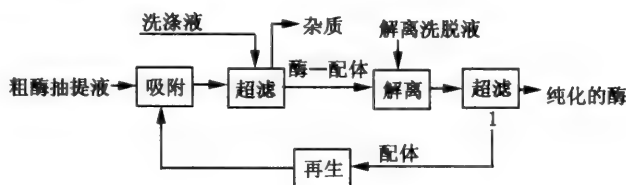


图 1-10 亲和超滤的原理

亲和超滤技术的关键在于选择合适的配体、载体及合适截留分子量的超滤膜。配体对所分离对象的亲和力要好,专一性要高,在亲和、洗脱条件下很稳定,抗剪切力,易回收等。常用的载体一般有聚丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、淀粉等。一个好的载体应该具有高度亲和性,不引起酶的失活,能自由悬浮于提取液中,不易产生膜的浓差极化和堵塞现象。超滤膜的截留分子量决定了超滤的透过速率。截留分子量越大,水通量也越大,超滤越容易进行。

亲和超滤技术既克服了超滤技术选择性不高(被分离物质的分子量需相差一个数量级以上,才能得到较好的分离效果)的缺点,又解决了亲和层析技术只能间隙操作,单批处理量小的不足,具有广阔的应用前景。

1.3.6 酶纯化方法的选择

各种纯化酶的方法都有其固有的优缺点。在设计某一酶的纯化路线时,应考虑各种因素对选用的纯化方法及先后次序的影响。对目标酶而言,可以有多种纯化方法,实际采用何种方法要看:1)制备的规模和要求酶的产量;2)允许用以制备的时间;3)实验室可利用的人员和设备。

一般来说,根据溶解度变化建立的纯化方法较适宜于早期的纯化阶段,规模较大;而柱层析法(如离子交换层析)或电泳分离更适宜于后期的纯化过程,规模较小。

有些情况,尤其在纯化过程中存在蛋白水解酶时,为了尽快将酶纯化,宁愿先用一些快速提纯法(如硫酸铵盐析等),而不采用较费时的柱层析等方法。采用高效液相色谱(HPLC)也能使层析操作快速进行。凝胶过滤时可采用较坚硬的,称为 Superose 交联珠状琼脂糖介质提高操作压力,使流速加快,缩短层析时间。离子交换层析和层析聚焦的珠状亲水介质与常规介质相比,分辨率较高,但价格比较昂贵,且需要特殊仪器,因而一般只用于纯化过程的最后几步。

当今亲和层析技术发展日新月异,但许多酶仍可方便地用“老式”的酒精沉淀或硫酸铵沉淀法制备。这些酶来源丰富,除用传统法制备得不到均质产品或产生部分失活外,一般不再费力采用亲和层析技术。

1.4 酶纯度的评价

酶纯化的目标是使酶制剂具有最大的催化活性和最高纯度,以下几种方法可用于检验这些指标。

1.4.1 酶纯度的检验

经分离纯化的酶,应设法检验其纯度,以解决是否有进一步纯化的必要。许多分离方法都可用于检验酶的纯度(表 1-9)。应该注意,由于酶分子结构高度复杂,由一种方法检验为均一的酶制剂用另一种方法检验可能结果不一致,因此,酶的纯度应注明达到哪种纯度,如电泳纯、层析纯、HPLC 纯等等。

表 1-9 一些常用的检验酶纯度的方法

方 法	备 注
超速离心	对检测少量杂质(<5%)时不太满意,当存在络合一解离体系时也会出现问题
电 泳	必须在多种 pH 值下进行,在单一 pH 值下,两种酶可能一起移动
SDS-电泳	检测与亚基分子量不同的杂质的一个主要方法,对检测制备物中蛋白水解酶的水解作用非常有用,酶由不同亚基组成时,会出现多条区带
等电聚焦	检测杂质的极灵敏方法,有时当存在表观异质时,会出现假象
N-末端分析	应该指明只存在单一多肽链,有些酶具有封闭和 N-末端,另一些酶则由二硫键连接的几条肽链组成
免疫技术	高度的专一性,但抗血清制备较为麻烦

一般实验室常用电泳法检验酶的纯度,电泳法所用样品少(10 μ g 左右),速度快(2~4h),仪器简单,操作也较方便。使用最多的为聚丙烯酰胺凝胶电泳。

聚丙烯酰胺凝胶电泳不同于一般的自由界面电泳或其他介质电泳,其电泳分离时,电泳系统兼有“电荷效应”、“浓缩效应”和“分子筛效应”,因而分辨率较高。根据制胶形状的不同,常分成圆盘电泳和垂直板电泳两种。

当聚丙烯酰胺凝胶的孔径约为被分离的蛋白质分子平均大小一半时,分离效果最佳。因此,用聚丙烯酰胺凝胶电泳来鉴定酶的纯度时,应根据被检测酶分子量的大小,选用合适孔径的凝胶(表 1-10)。凝胶的孔径可以通过改变聚丙烯酰胺(Acr)和甲叉双丙烯酰胺(Bis)的含量和比例,方便地加以调节。

表 1-10 电泳分离最适凝胶浓度

被分离蛋白分子量	凝胶浓度(%)
小于 10 ⁴	20~30
1~4×10 ⁴	15~20
4×10 ⁴ ~1×10 ⁵	10~15
1~5×10 ⁵	5~10
大于 6×10 ⁵	2~5

通常把浓度为 7.5% 的凝胶称为标准凝胶,其平均孔径为 5mm 左右,适合于生物体内大多数蛋

白质的分离。

溶液 pH 值可显著影响蛋白质分子侧链基团的解离状态,使蛋白质分子电荷性质发生改变,故应选择合适的 pH 凝胶系统,使蛋白质得到最好的分离。一般,高、中 pH 凝胶系统适合于分离酸性和中性蛋白质,低 pH 系统则适宜于碱性或中性蛋白质的分离。电极的接法前者为上负下正,后者改为上正下负。

电泳用的样品中通常加一些甘油或蔗糖溶液,用以增加样品密度,预防加样时样品扩散、漂移。样品中有时还要加入一些巯基乙醇,以防电泳时蛋白质侧链中游离的巯基氧化成二硫键,发生聚集现象。另外,样品液中常加入少量溴酚蓝(0.1%左右),用以指示电泳进行的程度。电泳结束后,需将分离的酶蛋白进行染色显示。染色的方法可分为两大类,一类是采用参与蛋白质起染色反应的染料染色,常用的有氨基黑 10B,考马斯亮蓝 R250 及一些荧光染料,如:1-苯胺基-8-萘磺酸镁等等;另一类是利用酶特异性的活性染色。

采用氨基黑 10B 染色时,常将氨基黑 10B 直接配在稀醋酸溶液中,这种染色液兼有固定和染色作用。凝胶在染色液中浸泡 1~2h,然后用稀醋酸溶液进行脱色显示。

考马斯亮蓝 R250 染色的灵敏度比氨基黑 10B 高 5 倍左右,且染色速度快,脱色方便,因而更受欢迎。

活性染色法是利用酶本身的催化活性,将酶促反应直接或间接地与可以生成有色物质的化学反应相偶联,从而染色显示酶蛋白所在位置。其中四氮唑盐法使用最为广泛,凡酶促反应的底物或产物能使黄色可溶性硝基四氮唑蓝(NBT)还原生成不溶性的蓝色甲臜物的都可用该法检测。如乳酸脱氢酶经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,将凝胶浸入含乳酸、 NAD^+ 、吩嗪甲基磺酸(PMS)和 NBT 溶液中,可在有活性的酶蛋白位置显出清晰的蓝色条带。又如:超氧化物歧化酶(SOD)经凝胶电泳分离后也可用此法检测,核黄素光化学还原时生成的 O_2^- 可使 NBT 还原,而 SOD 能够竞争性地清除 O_2^- ,因此,当电泳分离的凝胶经含核黄素、NBT、TEMED 的溶液浸泡后,再经光照,就能在蓝色背景上显示出含有 SOD 的空白条带,这种活性染色法可检测出纳克(ng)级的 SOD。如果染色显示出多个条带,说明酶样品中还含有其他蛋白质。假如只有一个条带,有时还需要进一步验证,因为某一条件下,可能有两种蛋白质的电泳迁移率完全相同,可以通过改变电泳条件,走双向电泳或其他方法来进一步确定酶的纯度。

SDS(十二烷基硫酸钠)聚丙烯酰胺凝胶电泳也常用于检验酶的纯度。这种方法分离蛋白质时,可使蛋白质分子按分子量大小排列,非常直观。SDS 可使蛋白质变性,使蛋白质肽链舒展,并按每两个氨基酸残基一个 SDS 分子的比例与蛋白质结合,其结果使得每个蛋白质分子所带电荷基本相同。因此,电泳迁移率只与蛋白质分子量的大小有关。如果被检测的酶含有不同分子量的亚基,那么即使是纯酶,SDS 凝胶电泳仍会按亚基分子量的大小显示出多个条带。需要注意的是如果变性过程不彻底,就会出现不正确的结果。

等电聚焦法分辨率较高,可将蛋白质按等电点的大小一一分开,可以检测出其他方法无法区别的电荷差异很小的同工酶。如纯化人胎盘雌二醇 17β -脱氢酶用普通电泳法在 pH6.2、pH7.8 条件下电泳结果一条带,但等电聚焦电泳还可分辨出其他五条微弱的区带。该法的缺点是仪器试剂较贵,操作较为复杂。

超速离心法需在专用的超速离心机上进行,通过观察离心过程中样品的沉降峰等检测酶的纯度,具体采用的方法有沉降速度法和沉降平衡法。

肽链 N-末端分析也可用于酶纯度的检测。通常如果酶分子只有一条肽链组成,理论上只能检测出一种 N-末端的氨基酸,如酶分子含有多个亚基,则检测的 N-末端氨基酸数目与亚基数一致。有些酶分子由于 N-末端的氨基和肽链中的羧基形成环状结构,就不能用该法检测纯度了。

利用抗原-抗体间的免疫反应也可检测酶的纯度,常用的有免疫扩散和免疫电泳法。这两种方法都应预先准备好被测酶蛋白的抗血清。在免疫扩散法中,通常将纯化制得的酶样品和抗血清分别加到琼脂糖凝胶板上小孔中,让其自由扩散,通过观察抗原-抗体间形成的沉淀弧的数量和形状,

来分析酶的纯度(图 1-11)。免疫电泳是将酶样品经电泳分离后,再将抗血清加到抗体槽中进行双向扩散,使其形成沉淀弧,免疫电泳由于利用扩散和电泳两种方法将不同抗原组分一一分开,故其灵敏度比单纯的免疫扩散法要高得多。

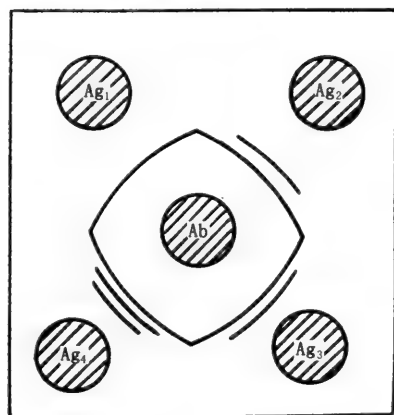


图 1-11 琼脂免疫双扩散法检验酶的性质
Ab: 抗血清
Ag1-4: 不同纯度的酶样品

经多步纯化后的酶蛋白中杂质比例一般都很低,有时用几种方法可能无法分析,这时若改用测定样品中有关污染酶活力可能比分析杂质蛋白质本身的存在与否更容易一些。

1.4.2 酶催化活性的检验

检测纯化酶的催化活性时,要使测定条件下在最适状态。如测定体系中有足够的激活剂和辅因子,无抑制剂等,还需搞清酶在什么条件下保存较为稳定。在有些情况下需加入一些还原剂(如二硫苏糖醇、巯基乙醇),以保证半胱氨酸侧链巯基处于还原态。在低温贮存酶时,可将酶在 50% (V/V) 的甘油溶液中保存(-18℃),以减少酶的失活。长期保存酶制剂时,应考虑到痕迹量蛋白水解酶降解作用的可能性。

1.4.3 酶活性部位滴定

如果酶制剂用前面介绍的方法分析达到均一,仍有可能其中有部分酶已经失活,一般可用“活性部位滴定”技术测定活性酶的含量。在这一方法中,如果再生酶的中间络合物分解反应较慢,就可观察到酶和底物反应过程中产物的快速释放现象。失活的酶不会产生任何产物,因此形成的产物浓度就可代表酶的浓度。

参考文献

- 1 Colowick sp, et al. Methods in enzymology. New York: Academic press. 1958
- 2 袁勤生,赵健,王维育等. 应用酶学. 上海: 华东理工大学出版社,1994
- 3 严希康. 生化分离技术. 上海: 华东理工大学出版社,1998
- 4 熊振平等. 酶的分离与纯化. 北京: 化学工业出版社,1994
- 5 冯万祥,赵伯龙. 生化技术. 长沙: 湖南科技出版社,1989

2 酶作用动力学

19世纪末 20世纪初,许多人致力于研究酶的催化作用并希望用数学原理和质量作用定律解释酶反应的进程。1902年, Henri 和 Brown 分别提出了酶促反应中有酶-底物络合物的生成,并推导了数学关系式。1909年, Sorenson 指出了 pH 值对酶活力的影响。1913年, Michaelis 和 Menten 用简单的平衡或准平衡概念推导了单底物的酶促反应方程。1925年, Briggs 和 Haldane 对酶动力学引入了稳态的概念。平衡态和稳态现在都已用于解释酶的动力学性质。

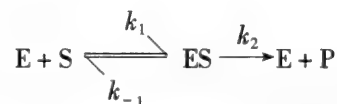
50年代中期以前,大多数单底物酶促动力学研究都基于 Henri 和 Michaelis - Menten 或 Briggs - Haldane 方程。60年代初,已尝试用平衡态概念解释双底物甚至三个底物的酶促反应。也有基于稳态的观点,如 Dalziel, Alberty, Hearon 等。后来, King 和 Altman 建立了一种推导复杂的稳态反应的图解法,经 Cleland 系数转换规则,可将复杂的酶促反应表示成简单的动力学方程。1965年, Monod, Wyman 和 Changeus 建立了变构酶动力学模型。一年以后, Koshland、Nemethy 和 Filmer 基于 Koshland 诱导模型建立了另一个解释变构酶动力学的模型。前稳态动力学主要由 Chane, Eigen, Roughton 和其他人建立。

酶作用动力学研究的是酶催化反应速度问题,分析各种因素对反应速度的影响,推断反应物到产物之间可能进行的历程,具有重要的理论意义和广泛的实践意义。

2.1 酶的基本动力学

2.1.1 Michaelis - Menten 方程

1913年 Michaelis 和 Menten 发展了前人的理论,对于只有一个底物结合位点的单底物酶催化反应,最简单的反应方程式为:



米氏方程假设 $k_2 < k_{-1}$, 酶、底物、酶-底物络合物之间达到平衡态 (equilibrium), 即 $E + S \rightleftharpoons ES$ 之间的平衡迅速建立, 络合物解离形成的产物 P 浓度很低, 不足以破坏这一平衡, 则:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES]$$

ES 的解离常数 K_s 为

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

则

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

因为 $[E_0] = [E] + [ES]$

$$v_0 = k_2[ES]$$

$$\frac{v_0}{[E_0]} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES]}$$

$$v_0 = \frac{k_2[E_0][S]}{K_s + [S]}$$

若底物浓度很高,所有的酶都以酶-底物络合物形式存在,初速度 v_0 达到最大 V_{\max} :

$$V_{\max} = k_2[E_0]$$

以 V_{\max} 代替 $k_2[E_0]$,则

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_s}$$

米氏方程通常假设底物浓度远高于酶浓度,作为催化剂的酶在反应中只需低浓度存在。应该认识到我们所说的对少量饱和的酶为一级反应时的低底物浓度,实际上比酶浓度高出几千倍,原因是酶和底物形成酶-底物络合物这一过程是可逆的反应。

由于初底物浓度 $[S_0]$ 远高于初酶浓度 $[E_0]$,则酶-底物络合物的形成对底物浓度变化而言可以忽略,所以 v_0 表达式中 $[S]$ 就是指 $[S_0]$ 。

米氏方程可解释一些实验事实,但无普遍适用性,因为有些酶促反应速度很快,足以破坏米氏假定的平衡条件。

2.1.2 Briggs - Haldane 修饰的 Michaelis - Menten 方程

1925年 Briggs - Haldane 对米氏方程引入了更为普遍的假设:在初速度范围内,酶浓度远低于底物浓度,则酶-底物络合物浓度也很低。除了反应和初期的瞬间,ES 的变化速率相对于 $[P]$ 而言可以忽略,即反应进行一段时间后,ES 的生成速度和分解速度相同(图 2-1)。

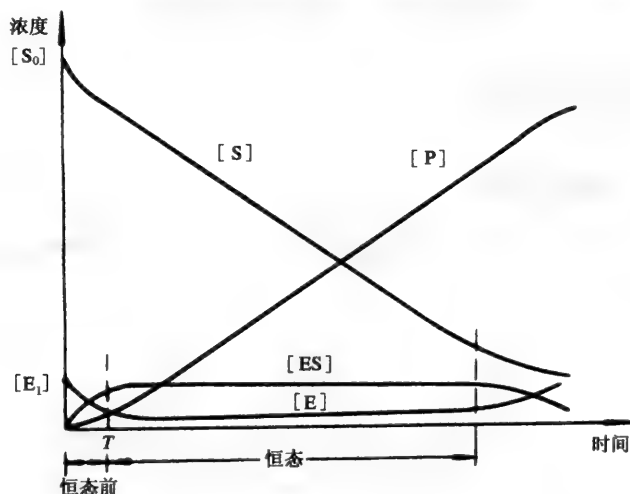
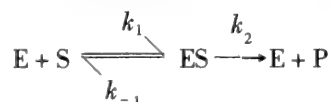


图 2-1 酶反应过程中各种浓度的时间曲线

快速反应研究证明在上述条件下,这一假设对大多数酶促反应是合理的。恒态通常在反应初期数毫秒内迅速建立,并维持数分钟,当产物累积时,可逆反应才有意义。

对于反应:



根据稳态(steady-state)假设:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

则

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

因为 $[E_0] = [E] + [ES]$

$$v_0 = k_2[ES]$$

$$\frac{v_0}{[E_0]} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES]}$$

$$\text{所以 } v_0 = \frac{k_2[E_0][S]}{(k_{-1} + k_2)/k_1 + [S]} = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{式中 } K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

底物浓度通常远高于酶浓度,故 $[S] \approx [S_0]$

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m}$$

这一关系式与米氏方程形式相同,只是常数定义不同,因此仍称为米氏方程。 K_m 定义为米氏常数,当 $k_{-1} \gg k_2$ 时, $K_m = K_s$ 。

v_0 对 $[S]$ 作图得双曲线与许多酶促反应结果一致(图 2-2)。

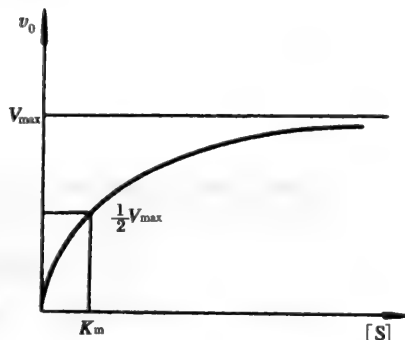
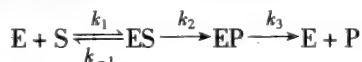


图 2-2 米氏方程曲线

2.1.3 米氏方程的意义

米氏方程是指每个酶分子只有一个结合位点,反应中只形成一种络合物的单底物酶促反应。这种反应很少见,但在多底物反应中,如果只有一种底物浓度发生变化,其他底物浓度都保持不变,那么可纳入准单底物反应。同样,单一结合位点的酶也可纳入于具有多个结合位点,且相互之间没有发生作用的酶(见变构酶一章)。具有一种络合物形成的反应历程一般为:



假设 $ES \rightarrow EP$ 为总反应限速步骤。

实际上,米氏方程能应用于很多酶促反应。常数 V_{\max} 和 K_m 可以测定, V_{\max} 随酶浓度发生变化,但 K_m 为所观察系统的特征常数,不随酶浓度改变,因而可用于鉴别特定的酶。一般, K_m 值在 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ mol/L 之间,由于催化这一步 ($ES \rightarrow E + P$ 或 $ES \rightarrow EP$) 通常为限速步骤, k_1 和 k_{-1} 远大于 k_2 , 因而米氏假定的平衡成立, $K_m \approx K_s$ 。一般 K_s 可代表底物与酶的亲和力: K_s 值越小,亲和力越高,反之亦然。

生物体细胞内,如果一种物质可进入几条供选择的代谢途径,那么决定因素之一就是各个途径第一个酶的 K_m 值。如,观察一下己糖磷酸:葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖-1-磷酸和果糖-6-磷酸在代谢中的取向,这些己糖磷酸在细胞内极易相互转变,可认为是同一种物质。糖酵解过程中的第二步由磷酸果糖激酶催化,该酶对底物果糖-6-磷酸的 K_m 值远小于糖原合成过程中的第一个酶对葡萄糖-1-磷酸的 K_m 。因此,在大多数己糖磷酸浓度下,果糖磷酸激酶被底物的饱和程度远高于糖原合成酶被底物的饱和程度,大多数己糖磷酸走糖酵解途径。只有在高己糖磷酸浓度下,果糖磷酸激酶被底物过饱和,这时糖原合成途径才有意义。当然,代谢物的取向除了取决于 K_m 值外,还受到各种酶的浓度及各酶浓度下的 V_{\max} 、激活剂和抑制剂的影响。

在酶促反应中,有 $V_{\max} = k_{cat}[E_0]$ 这一表达式。常数 k_{cat} 称为转换数,代表单位时间内每个酶分

子将底物分子转换成产物的最大值。对于以上所讨论的简单类型反应, $k_{cat} = k_2$ 。而对于较复杂的反应, k_{cat} 是几个速度常数的函数。对于大多数酶而言, 转换数在每秒 $1 \sim 10^4$ 范围内。

由于 $V_{max} = k_{cat}[E_0]$ 代入米氏方程:

$$v_0 = \frac{k_{cat}}{K_m}[E_0][S_0] \quad ([E_0] \ll [S_0] \ll [K_m])$$

所以 $\frac{k_{cat}}{K_m}$ 为二级速度常数, 如果一个酶有两个竞争性底物 S_1, S_2 , 则:

$$v_{s_1} = \left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right)_{s_1} [E_0][S_1] \quad v_{s_2} = \left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right)_{s_2} [E_0][S_2]$$

所以

$$\frac{v_{s_1}}{v_{s_2}} = \frac{(k_{cat}/K_m)_{s_1} [S_1]}{(k_{cat}/K_m)_{s_2} [S_2]}$$

当 $[S_1] = [S_2]$ 时, $v_{s_1}/v_{s_2} = (k_{cat}/K_m)_{s_1}/(k_{cat}/K_m)_{s_2}$ 所以 k_{cat}/K_m 比值可用于衡量酶对底物的专一性, 如延胡索酸水解酶水解底物延胡索酸(反丁烯二酸)、氟代反丁烯二酸, 氯代反丁烯二酸和溴代反丁烯二酸时, 其 k_{cat}/K_m 分别为 1.6×10^8 , 9.8×10^7 , 2.0×10^5 和 $2.5 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。底物中取代的卤素原子越大, 对酶的反应活性越低。表 2-1 列出了一些酶的 k_{cat}/K_m 值。

k_{cat}/K_m 值还可用于检验是否达到恒态或平衡态。恒态时:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

如果 $k_2 > k_{-1}$ (恒态假设的极端形式), 则 $K_m = k_2/k_1$, 以 k_{cat} 替代 k_2 , 则 $k_{cat}/K_m = k_1$, k_1 为底物和酶结合的速度常数。快速反应研究证明酶与底物结合的速度常数为 $10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 数量级, 所以如果 k_{cat}/K_m 为同样的数量级时就可假定为恒态。例如延胡索酸水解酶、过氧化氢酶和丙糖磷酸异构酶的 k_{cat}/K_m 分别为 1.6×10^8 , 4×10^7 及 $2.4 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$, 都达到了恒态。

表 2-1 一些酶和底物 K_m , k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 值

酶	底物	K_m (mol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{L}$)
乙酰胆碱酯酶	乙酰胆碱	9.5×10^{-5}	1.4×10^4	1.5×10^6
碳酸酐酶	CO_2	1.2×10^{-2}	1.0×10^6	8.3×10^7
	HCO_3^-	2.6×10^{-2}	4.0×10^5	1.5×10^7
过氧化氢酶	H_2O_2	2.5×10^{-2}	1.0×10^7	4.0×10^8
胰凝乳蛋白酶	N-乙酰甘氨酸乙酯	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}	1.2×10^{-1}
	N-乙酰缬氨酸乙酯	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}	1.9
	N-乙酰酪氨酸乙酯	6.6×10^{-4}	1.9×10^2	2.9×10^5
延胡索酸酶	延胡索酸	5.0×10^{-6}	8.0×10^2	1.6×10^8
脲酶	苹果酸	2.5×10^{-5}	9.0×10^2	3.6×10^7
	尿素	2.5×10^{-2}	1.0×10^4	4.0×10^5

恒态动力学常数都是由体外实验高纯度溶液中测出的, 一般都处于酶的最适 pH 值条件, 与体内细胞中酶起作用的 pH 值条件不一定相同。因为许多酶同处于一个环境并不一定是最适的 pH 值, 温度也是如此。体外恒态实验中酶浓度通常低于体内的酶浓度(快速反应测定中不必如此), 更为重要的是体外实验缺少很多因素, 如体内对酶很有贡献的生物膜。因此, 体外动力学研究尽管有用, 但并不完全代表生物有机体中酶的行为。

2.1.4 米氏方程中 K_m , V_{max} 的测定

2.1.4.1 Lineweaver - Burk 作图(双倒数图)

由米氏方程 $v_0 - [S_0]$ 曲线(图 2-2)外推 V_{max}, K_m 是很不准确的。1924 年 Lineweaver 和 Burk 将米氏方程化为倒数形式:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_{max}}$$

以 $\frac{1}{v_0}$ 对 $\frac{1}{[S_0]}$ 作图可得一直线(图 2-3)。纵轴截距为 $\frac{1}{V_{max}}$, 斜率为 $\frac{K_m}{V_{max}}$, 横轴截距为 $-\frac{1}{K_m}$ 即可得到 V_{max} 和 K_m 。

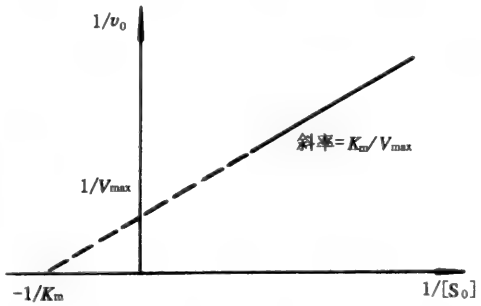


图 2-3 Lineweaver - Burk 作图

如果对某一酶双倒数作图有线性偏离,就说明米氏方程的假设对该酶不适用。

2.1.4.2 Eadie - Hofstee 和 Hanes 作图

双倒数作图有以下几个缺点:第一,直线外推至 $-\frac{1}{K_m}$ 时,通常已到纸的边缘,甚至重作图。第二,低底物浓度下测定往往不准确,底物浓度应由低到高全面选择。第三,这种作图法与其他作图法比较,很少有线性偏离,不利于观察酶的作用机制。

Eadie - Hofstee 将双倒数形式的方程两边同乘 $v_0 \cdot V_{max}$, 整理可得

$$v_0 = K_m \frac{v_0}{[S_0]} + V_{max}$$

v_0 对 $\frac{v_0}{[S_0]}$ 作图为一一直线[图 2-4(a)]斜率为 $-K_m$, 纵轴截距为 V_{max} , 横轴截距为 $\frac{V_{max}}{K_m}$, Hanes 作图是将双倒数方程两边同乘以 $[S_0]$, 可得

$$\frac{[S_0]}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} \cdot [S_0] + \frac{K_m}{V_{max}}$$

以 $\frac{[S_0]}{v_0}$ 对 $[S_0]$ 作图可得一直线[图 2-4(b)], 斜率为 $\frac{1}{V_{max}}$, 纵轴截距为 K_m/V_{max} 。

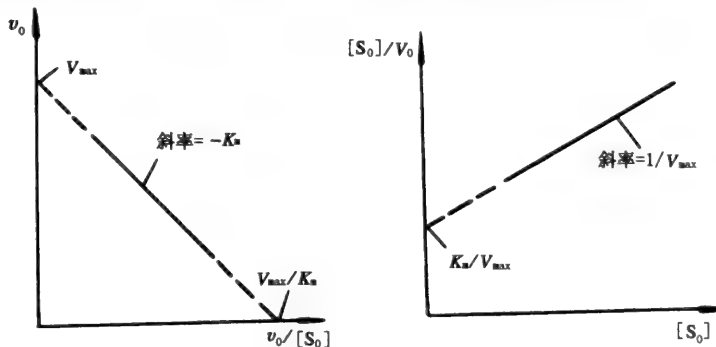


图 2-4 v_0 对 $v_0/[S_0]$ 和 $[S_0]/v_0$ 对 $[S_0]$ 作图

(a) Eadie - Hofstee 作图; (b) Hanes 作图

Eadie - Hofstee 和 Hanes 作图为动力学研究者偏爱,但双倒数作图法仍为广大酶学工作者使用。计算机通常以最小二乘法处理实验数据得到 K_m, V_{max} , 但结果并不完全可靠,重要的是应该观察是否有偏离线性的迹象。

2.1.4.3 Eisenthal and Cornish - Bowden 作图

由以上讨论可知,即使有计算机进行数据处理,也难以完全正确估计 K_m, V_{max} 值,1974 年, Eisenthal 和 Cornish - Bowden 提出了基于米氏方程的另一种作图法。在固定酶浓度时,双倒数关系

$$\text{式为} \quad \frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S_0]}{V_{\max} [S_0]}$$

$$\text{所以} \quad \frac{V_{\max}}{v_0} = \frac{K_m + [S_0]}{[S_0]} = \frac{K_m}{[S_0]} + 1$$

以 V_{\max} 对 K_m 作图可得一直线。乍看起来,似乎不可理解。但从数学上来说,此关系式是正确的。当

$$K_m = 0, V_{\max} = v_0,$$

$$V_{\max} = 0, K_m = -[S_0]$$

每一对 $v_0, [S_0]$ 都可标在 V_{\max} 轴和 K_m 轴上,相应的 $[S_0]$ 和 v_0 联成直线,这一簇直线交于一点,这点的坐标为真实的 K_m, V_{\max} 。然而,由于实验误差,这些直线通常交于一个范围内(图 2-5)。许多酶学工作者认为,只要没有偏离线性的迹象,估计 K_m, V_{\max} 的最好方法是从这些交点中取一个中间值。

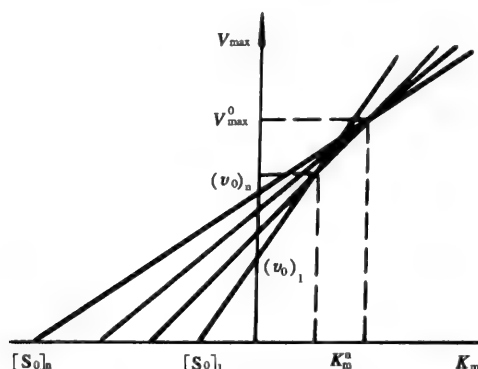


图 2-5 固定 $[E_0]$ 时酶促反应典型的 Eisenthal - Cornish - Bowden 图形

V_{\max}^0 和 K_m^0 分别为 V_{\max}, K_m 的最好估计值

2.1.4.4 米氏方程的积分式

在产物不产生抑制,且逆反应不进行,在任何给定时间内的反应全过程的速度仅仅由于 $[S]$ 降低影响时,Michaelis - Menten 方程的积分式可描述反应的全过程

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{重新整理并组合为} \quad v dt = - \frac{K_m + [S]}{[S]} d[S]$$

在任两个时间(例如零位时间 t_0 和任一别的时间 t)和对应的两个底物浓度 ($[S]_0$ 和 $[S]$) 之间积分:

$$v \int_{t_0}^t dt = - \int_{[S]_0}^{[S]} \cdot \frac{K_m + [S]}{[S]} d[S] = - K_m \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{d[S]}{[S]} - \int_{[S]_0}^{[S]} d[S]$$

$$vt = 2.3 K_m \log \frac{[S]_0}{[S]} + ([S]_0 - [S])$$

式中 $[S]$ 为底物在任一时间 t 的浓度 $= [S]_0 - [P]$ 。上式右边的部分是由一级反应项和零级反应项组成的。将方程两边除以 $K_m t$,重新整理为:

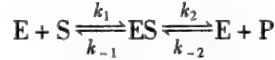
$$\frac{2.3}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]} = - \frac{1}{K_m} \frac{([S]_0 - [S])}{t} + \frac{V}{K_m}$$

这是一条直线方程。因此,在反应期间,通过测量不同时间利用的底物浓度(或形成的产物),以 $\frac{2.3}{t} \log \frac{[S]_0}{[S]}$ 对 $\frac{[S]_0 - [S]}{t}$ 作图,其斜率为 $-\frac{1}{K_m}$,纵轴截距为 $\frac{V_{\max}}{K_m}$,横轴截距为 V_{\max} ,在某些条件下

测量初速度可能有困难, K_m , V_{max} 可用该法测定。

2.1.5 可逆反应的 Haldane 关系式

一简单的酶催化二步可逆反应为



该可反应在任一方向上测定, S 和 P 的 K_m 值分别为 K_{ms} 和 K_{mp} 。正向和逆向的最大反应初速度分别为 V_f 和 V_r 。如前所述:

$$v_f = k_2[E_0] \quad K_{ms} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

通过相同的恒态处理, 可以证明:

$$v_r = k_{-1}[E_0] \quad K_{mp} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-2}}$$

从左向右看, 反应的平衡常数是各步平衡常数的乘积, 并用各速度常数表示:

$$K_{eq} = K_1 K_2 = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} \quad (K_{eq} \text{ 为平衡常数})$$

我们用 K_m , V_{max} 来表示这一组速度常数

$$\frac{v_f}{K_{ms}} = \frac{k_1 k_2 [E_0]}{k_2 + k_{-1}}, \quad \frac{v_r}{K_{mp}} = \frac{k_{-2} k_{-1} [E_0]}{k_2 + k_{-1}}$$

两式相除

$$\frac{v_f/K_{ms}}{v_r/K_{mp}} = \frac{k_1 k_2 [E_0]}{(k_2 + k_{-1})} \cdot \frac{(k_2 + k_{-1})}{k_{-2} k_{-1} [E_0]}$$

即

$$\frac{v_f K_{mp}}{v_r K_{ms}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = K_{eq}$$

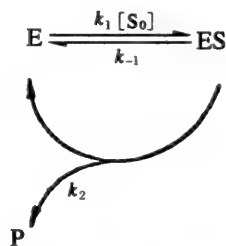
这一表达式为反应的动力学常数 K_m , V_{max} 与平衡常数 K_{eq} 的关系式, 由 Haldane 导出。假如已知平衡常数, 该关系式可用于验证动力学常数的准确性。

2.2 King - Altman 法推导酶动力学方程

酶促反应的中间络合物超过两个以上时, 速度方程用代数法推导相当复杂。1956 年, King 和 Altman 在矩阵的理论基础上提出了一个图解方法, 后又经 Wong 和 Hanes 加以规则化。对一般的生化工作者而言, 这是一个简便而又可靠的方法, 近年来已被广泛应用。

我们先从简单的酶反应开始, 在恒态条件下: $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$

King - Altman 法要求将反应写成循环形式, 使所有的含酶种类(包括 E 在内)相互转变展示出来, 每步都用 κ (Kappa)表示, κ 是这步速度常数和有关游离底物浓度的乘积, 如不涉及底物, 那么只有速度常数, 所以上式可写成



对每一个酶品种, 必须列出其所有的生成途径, 每条途径应该含有 $n - 1$ 步, n 为存在的酶品种数(上例为 2), 每条途径的各步 κ 积就可确定, 每个 κ 积包含 $n - 1$ 项。两个箭头同时到达一个酶品

种的途径是容许的,但两个箭头同时离开一个酶品种的途径是禁止的。因此,不会出现闭环。

酶品种	形成此酶品种的途径	κ 积总和
E	$E \xleftarrow{k_{-1}}$ 和 $E \xleftarrow{k_2}$	$k_{-1} + k_2$
ES	酶 $\xrightarrow{k_1[S_0]}$ ES	$k_1[S_0]$

对每个酶品种,成立关系式: $\frac{\text{酶品种}}{[E_0]} = \frac{\text{此酶品种 } \kappa \text{ 积总和}}{\text{所有 } \kappa \text{ 积总和}}$

所以

$$\frac{[E]}{[E_0]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-1} + k_2 + k_1[S_0]}$$

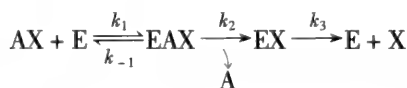
$$\frac{[ES]}{[E_0]} = \frac{k_1[S_0]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S_0]}$$

总的速度方程为

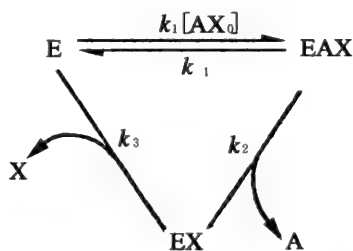
$$v = k_2[ES]$$

将上式[ES]代入,得 $v = \frac{k_2 k_1 [S_0] [E_0]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S_0]} = \frac{V[S_0]}{K_m + [S_0]}$

再举一个含有三个酶品种的反应实例,胰凝乳蛋白酶催化的反应可作此简化假定。在稳态条件下



循环形式为



酶品种	形成此酶品种的途径	κ 积总和
E	$E \xleftarrow{k_3}$ 和 $E \xleftarrow{k_{-1}}$	$k_2 k_3 + k_{-1} k_3$
EAX	$EAX \xleftarrow{k_1[AX_0]}$	$k_1 k_3 [AX_0]$
EX	$EX \xleftarrow{k_1[AX_0]}$	$k_1 k_2 [AX_0]$

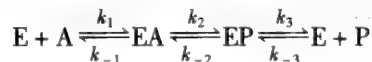
$$\frac{[EX]}{[E_0]} = \frac{k_1 k_2 [AX_0]}{k_2 k_3 + k_{-1} k_3 + k_1 k_3 [AX_0] + k_1 k_2 [AX_0]}$$

$$v = \frac{d[A]}{dt} = k_2 [EAX] = \frac{d[X]}{dt} = k_3 [EX]$$

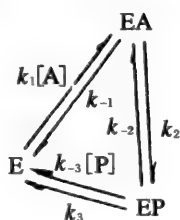
$$v = \frac{k_1 k_2 k_3 [AX_0][E_0]}{k_3(k_2 + k_{-1}) + k_1[AX_0](k_2 + k_3)}$$

上面两个实例可使我们对 King - Altman 方法有初步的了解。一般来讲,这个方法大体包含下列几步。

第一,写出其反应历程的方程式,将各种不同的酶存在形式(Enzyme Specles)安排成封闭的几何图形,每一种酶存在形式作为几何图形的一角,如简单的 Uni Uni 反应



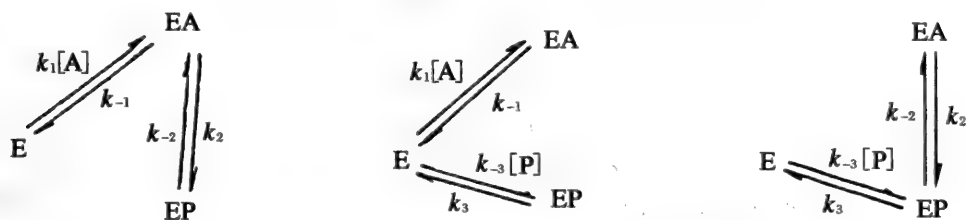
就存在三种不同的酶存在形式: E, EA 和 EP, 所以其几何图形为一个三角形:



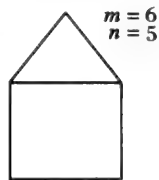
第二,写出 $n - 1$ 线的所有可能的图形, n 为几何图形的角数(即酶存在形式的数目), 它的 $n - 1$ 线图形的总数应为:

$$\frac{m!}{(n - 1)!(m - n + 1)!}$$

式中 m 为完整的几何图形的线段数目。在上例中, $n - 1$ 线图形的总数应为 $3 \times 2 \times 1 / (2 \times 1 \times 1) = 3$ 。这 3 个 $(n - 1)$ 图形如下:



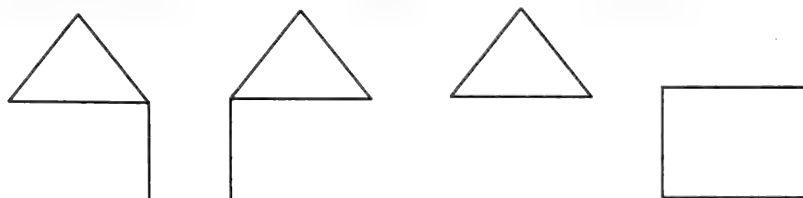
应该指出,当反应历程构成的基本图形包含不止一个封闭圈(closed loops)时,在写出 $(n - 1)$ 线图形时,心须把这些含有各种各样的封闭圈的图形除去。例如,按照反应的历程,得到如下的基本图形:



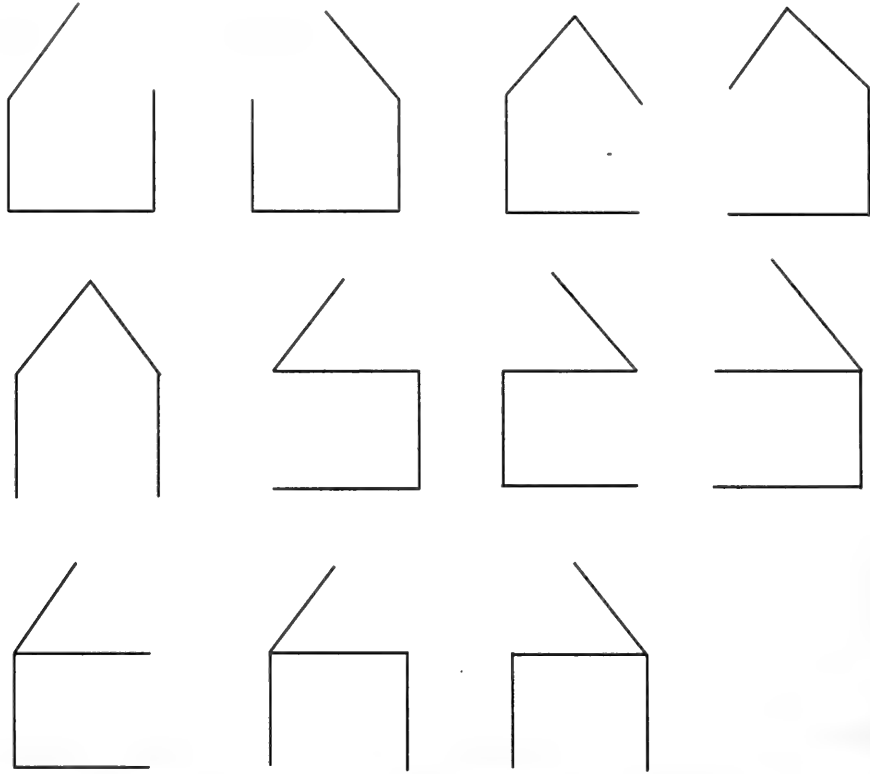
按上式计算

$$\frac{6!}{(5 - 1)!(6 - 5 + 1)!} = 15$$

即 $n - 1$ 线图形的总数应用 15 个,但其中包含着 4 个 $(n - 1)$ 线封闭:



应该除去,留下 11 个 $(n - 1)$ 线图形:



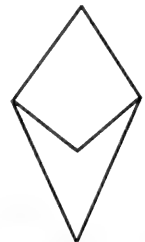
每一个给定线数的封闭圈可以产生 $(n - 1)$ 线的图形数,可用下列计算:

$$\frac{(m - r)!}{(n - 1 - r)!(m - n + 1)!}$$

式中 r 为封闭圈所具有的线数。显然, r 必须等于或小于 $n - 1$ 。

本例中 $m = 6, n = 5$ 。每种含三线封闭圈 $(n - 1)$ 线图形数 = $(6 - 3)! / (5 - 1 - 3)!(6 - 5 + 1)! = 3$, 每种含四线封闭圈 $(n - 1)$ 线图形数 = $(6 - 4)! / (5 - 1 - 4)!(6 - 5 + 1)! = 1$ (必须注意: $0! = 1$)。

又例如下例 5 角 6 线基本图形:

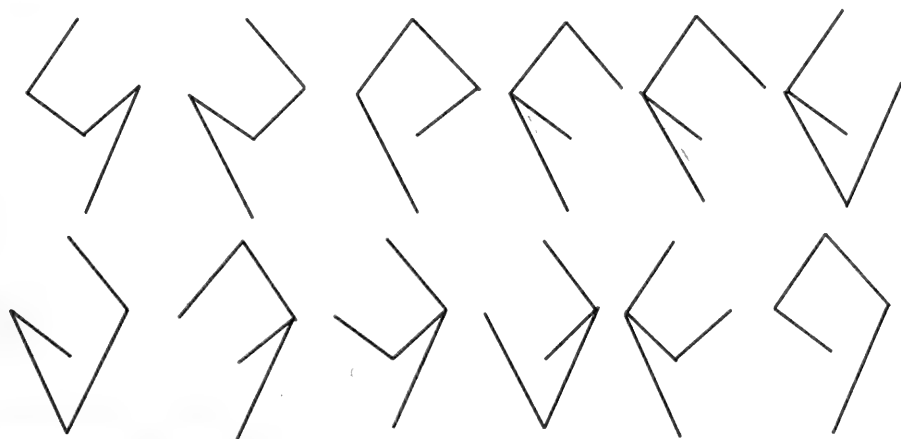


其 $(n - 1)$ 线图形的总数为 15 个,但在所有的 $(n - 1)$ 线图形中存在着三个不同的 4 线封闭圈图形:

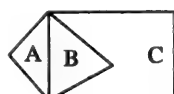


$$(6-4)! / (5-1-4)! (6-5+1)! = 1$$

这表示本例中每一种四线封闭圈仅能产生一种 $(n-1)$ 线图形, 余下的 12 个 $(n-1)$ 线图形都没有封闭圈:



对于较复杂的反应机制, 如



$m = 8, n = 6$ 。总 $(n-1)$ 线图形为 56, 但包含 $(n-1)$ 线封闭圈的图形数计算较复杂。下列介绍一种计算 $n-1$ 线有效图形数 (π) 的方法:

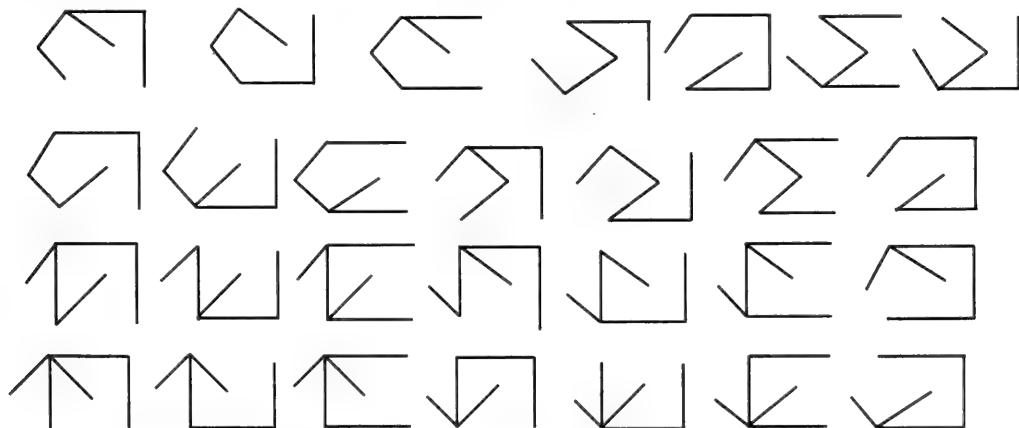
$$\pi = a \cdot b \cdot c - (l_{AB}^2 \cdot c + l_{BC}^2 \cdot a)$$

式中 a, b, c ——图 A, B, C 的线段, $a = 3, b = 3, c = 5$;

l_{AB}, l_{BC} ——图 A 和 B, 图 B 和 C 的共用边数, $l_{AB} = 1, l_{BC} = 2$ 。

则 $\pi = 3 \times 3 \times 5 - (1^2 \times 5 + 2^2 \times 3) = 28$ 。

与前面的结果相同, 有效的 $(n-1)$ 线图形为



对于 2 个基本图形组成的 King - Altman 图, 则

$$n = a \cdot b - l_{AB}^2$$

第三, 按照 King - Altman 图形可以写出每种酶存在形式的浓度和总酶浓度的比例, 它们具有基本上相似的表达式

$$\frac{E_x}{E_t} = \frac{\text{若干项的加和}}{\text{相同的分母}}$$

分子的每一项都由一个 King - Altman 图形构成, 对于某一种特定的酶的存在形式, 它的分子的每一

项可以由 King - Altman 图形中每一根线所表示的由其他酶形式转变为这种形式的速度常数,或速度常数与配基浓度彼此相乘而得到。例如,从前面 Uni Uni 反应的三个 King - Altman 图,我们可以得到

$$\frac{[E]}{[E]_t} = \frac{k_{-2}k_{-1} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}{\text{分母}}$$

$$\frac{[EA]}{[E]_t} = \frac{k_{-2}k_1[A] + k_3k_1[A] + k_{-3}[P]k_{-2}}{\text{分母}}$$

$$\frac{[EP]}{[E]_t} = \frac{k_1[A]k_2 + k_{-1}k_{-3}[P] + k_2k_{-3}[P]}{\text{分母}}$$

分母为所有各分子项的总和,即

$$\text{分母}[E_0] = (k_{-2}k_{-1} + k_{-1}k_3 + k_2k_3) + k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)[A] + k_{-3}(k_{-1} + k_{-2} + k_2)[P]$$

因此

$$\frac{[E]}{[E_0]} + \frac{[EA]}{[E_0]} + \frac{[EP]}{[E_0]} = 1$$

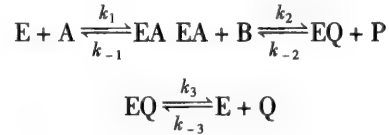
这样,速度方程可以方便地写出

$$v = \frac{k_2(k_{-2}k_1[A] + k_3k_1[A] + k_{-3}k_{-2}[P])[E_0]}{\text{分母}}$$

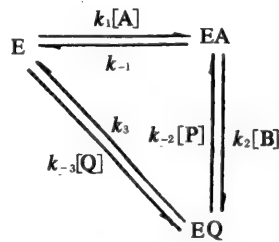
$$- \frac{k_{-2}(k_1k_2[A] + k_{-1}k_{-3}[P] + k_2k_{-3}[P])[E_0]}{\text{分母}}$$

$$= \frac{(k_1k_2k_3[A] - k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P])[E_0]}{(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3) + k_1(k_{-2} + k_2 + k_3)[A] + k_{-3}(k_{-1} + k_{-2} + k_2)[P]}$$

又如 Theorell - Chance 机制:



King - Altman 基本图形为



(n - 1) 线的所有图形:



$$\frac{[E]}{[E_0]} = \frac{k_{-1}k_{-2}[P] + k_2k_3[B] + k_{-1}k_3}{\text{分母}}$$

$$\frac{[EA]}{[E_0]} = \frac{k_1k_{-2}[A][P] + k_{-2}k_{-3}[P][Q] + k_{-1}k_{-3}[Q]}{\text{分母}}$$

$$\frac{[EQ]}{[E_0]} = \frac{k_1k_2[A][B] + k_2k_{-3}[B][Q] + k_{-1}k_{-3}[Q]}{\text{分母}}$$

$$v = k_1[E][A] - k_{-1}[EA]$$

$$\text{则 } \frac{v}{[E_0]} = \frac{k_1 k_2 k_3 [A][B] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} [P][Q]}{k_{-1} k_3 [B][Q] + k_{-2} k_{-3} [P][Q] + k_{-1} k_{-3} [Q] + k_{-1} k_{-2} [P]}$$

用 Cleland 系数变换法可将该式转化为恒态动力学常数表达的速度方程。

2.3 酶的抑制动力学

一些物质与酶结合以后,影响了酶与底物的结合及酶的转换数,从而改变了酶的活力,这些降低酶催化反应速度的物质称抑制剂。

可逆抑制剂与酶之间以非共价键发生作用,不涉及化学反应,因此,可逆抑制剂与酶迅速建立平衡,表现出一定程度的抑制(抑制程度取决于酶,抑制剂和底物浓度),并在初速度范围内保持不变。不可逆抑制剂在这段时间内抑制程度增加。

2.3.1 酶的可逆抑制

2.3.1.1 简单的可逆抑制

简单的可逆抑制类型有:竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制、混合型抑制。这些抑制类型的作用方式、动力学方程和双倒数作图方程见五月 2-2。

四种抑制类型的表观米氏常数见表 2-3。

表 2-2 酶的可逆抑制基本类型

类型	作用方式	动力学方程	双倒数作图方程
竞争性	$\begin{array}{c} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ \parallel \\ EI \end{array}$	$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m (1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]}$	$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} (1 + \frac{[I]}{K_i}) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$
非竞争性	$\begin{array}{c} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ \parallel k_i \quad \parallel k_i \\ EI + S \rightleftharpoons ESI \end{array}$	$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{(1 + \frac{[I]}{K_i})([S] + K_m)}$	$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} (1 + \frac{[I]}{K_i}) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} (1 + \frac{[I]}{K_i})$
反竞争性	$\begin{array}{c} E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P \\ \parallel k_i \\ ESI \end{array}$	$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{\frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{K_m} + [S]}$	$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} (1 + \frac{[I]}{K_i})$
混合型	$\begin{array}{c} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ \parallel k_i \quad \parallel k_i \\ EI + S \rightleftharpoons ESI \end{array}$	$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{(1 + \frac{[I]}{K_i}) K_m + (1 + \frac{[I]}{K_i}) [S]}$	$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot (1 + \frac{[I]}{K_i}) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} (1 + \frac{[I]}{K_i})$

表 2-3 可逆抑制剂存在时的表观米氏常数

类型	K_m'	V_{\max}'	斜率'
竞争性	$K_m (1 + \frac{[I]}{K_i})$	V_{\max}	$\frac{K_m}{V_{\max}} (1 + \frac{[I]}{K_i})$
非竞争性	K_m	$\frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$	$\frac{K_m}{V_{\max}} (1 + \frac{[I]}{K_i})$
反竞争性	$\frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$	$\frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$	$\frac{K_m}{V_{\max}}$
混合型	$\frac{(1 + \frac{[I]}{K_i}) K_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$	$\frac{V_{\max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$	$\frac{K_m}{V_{\max}} (1 + \frac{[I]}{K_i})$

四种抑制类型的双倒数图特征见图 2-6。

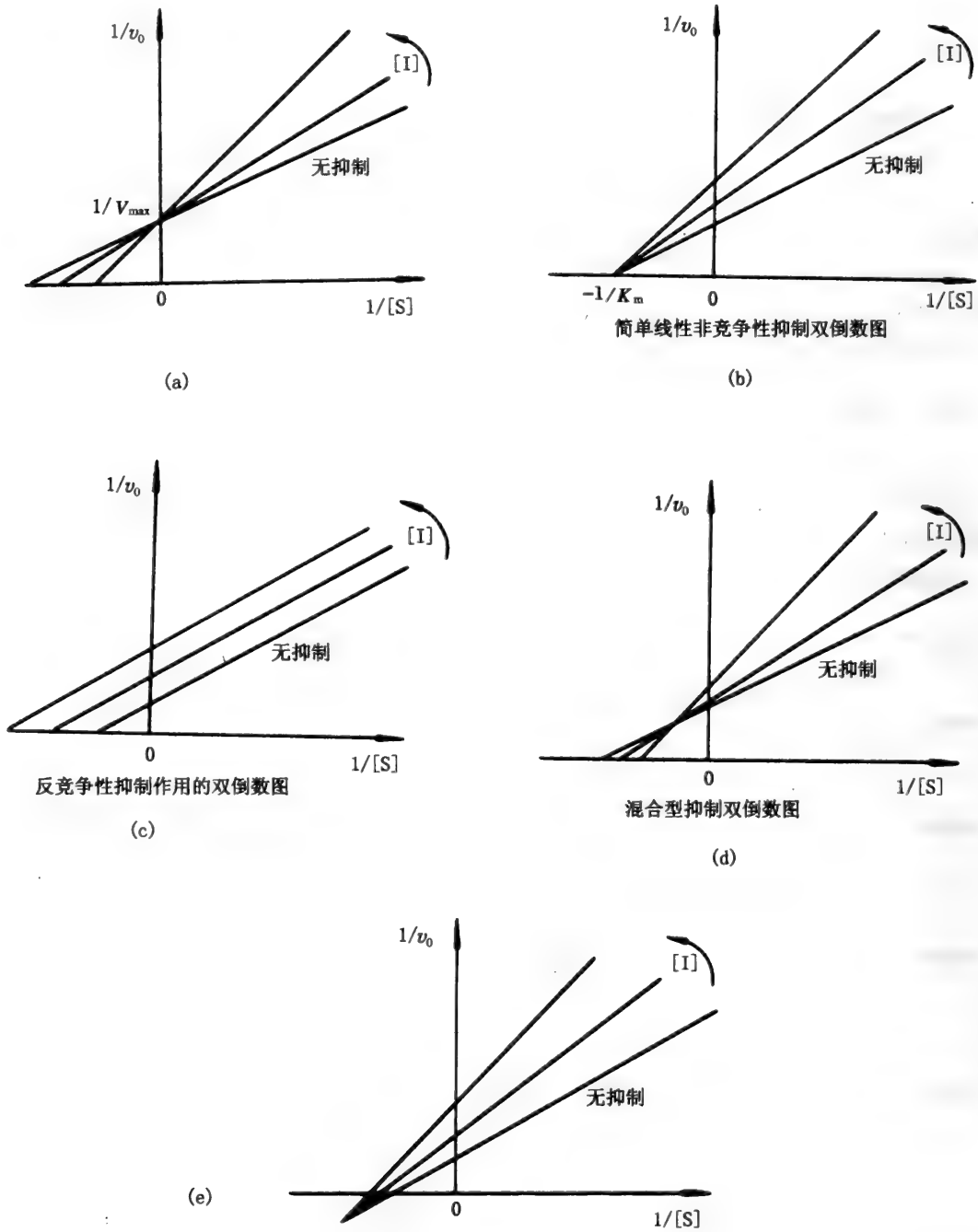
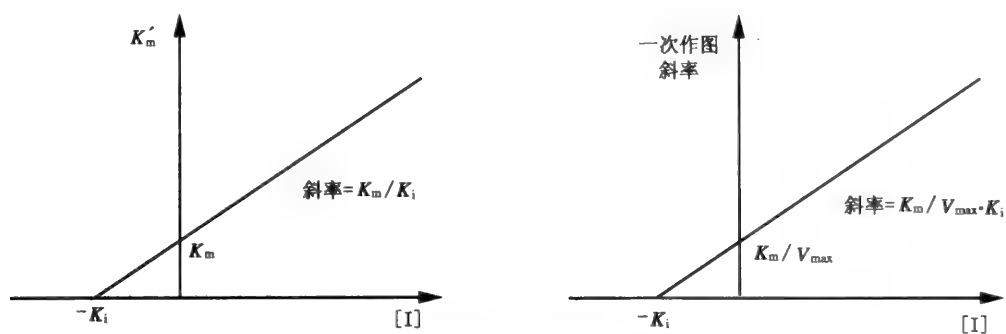


图 2-6 双倒数作图图谱

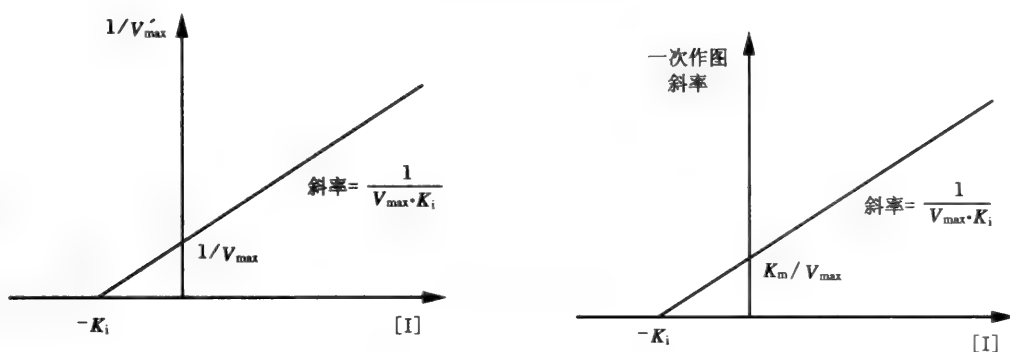
- (a) 竞争性抑制; (b) 非竞争性抑制; (c) 反竞争性抑制;
 (d) 混合型抑制($K_i' > K_i$); (e) 混合型抑制($K_i' < K_i$)

抑制常数 K_i 可用两次作图法求解, 两次作图法是指用抑制剂存在下的表观米氏常数或双倒数图斜率——简称一次作图斜率——对抑制剂浓度作图(图 2-7)。



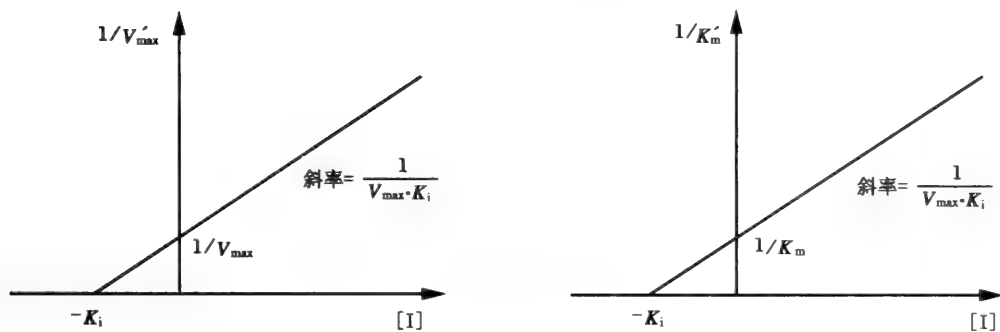
竞争性抑制两次作图

(a)



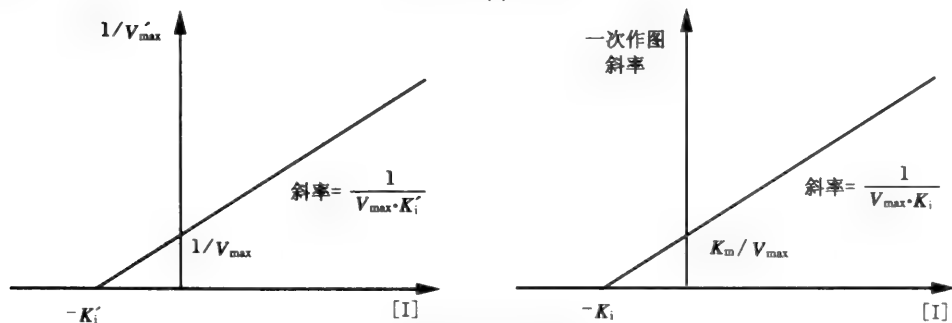
非竞争性抑制两次作图

(b)



反竞争性抑制两次作图

(c)



混合型抑制两次作图

(d)

图 2-7 两次作图图谱

(a) 竞争性抑制; (b) 非竞争性抑制; (c) 反竞争性抑制; (d) 混合型抑制

抑制常数 K_i 也可用 Dixon 作图法和 Cornish-Bowden 作图法求解(图 2-8、图 2-9)。竞争性抑制的 Dixon 方程。

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}[S]} \cdot \frac{[I]}{K_i}$$

非竞争性抑制的 Dixon 方程:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} + \frac{[I]}{V_{\max}K_i} \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 \right)$$

反竞争性抑制的 Cornish-Bowden 方程:

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}} + \frac{[I]}{K_i} \cdot \frac{[S]}{V_{\max}}$$

混合型抑制的 Cornish-Bowden 方程:

$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}} + \frac{[I]}{V_{\max}} \left(\frac{K_m}{K_i} + \frac{[S]}{K_i'} \right)$$

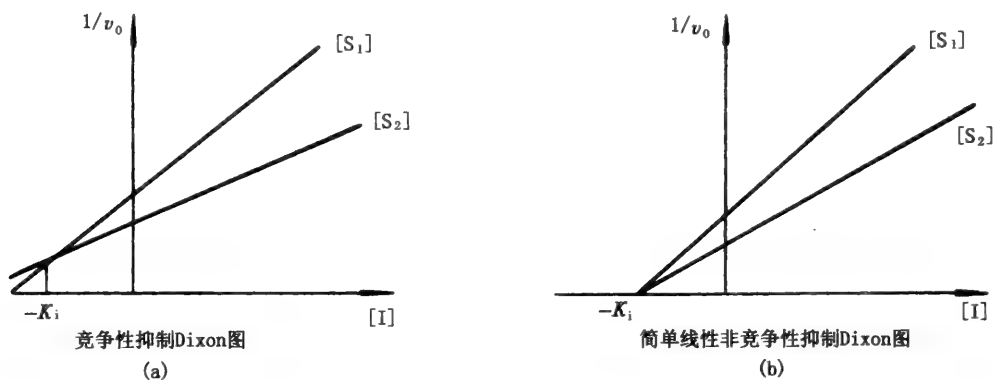


图 2-8 Dixon 作图图谱
(a) 竞争性抑制; (b) 非竞争性抑制

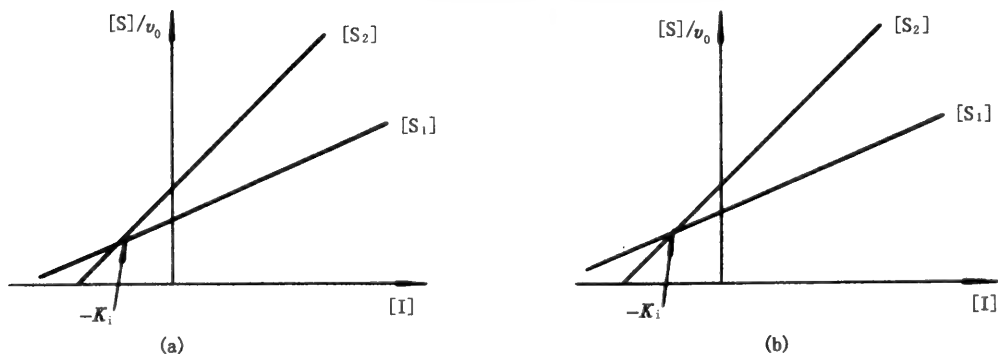
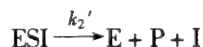


图 2-9 Cornish-Bowden 作图
(a) 反竞争性抑制; (b) 混合型抑制

2.3.1.2 部分抑制

以上讨论的都是形成死端络合物的抑制,而这些复合物不会释放产物。假如混合型抑制中 ESI 复合物也能释放产物:



这时,总的初速度为

$$v_0 = k_2[ES] + k_2'[ESI]$$

$$= k_2[ES] + k_2' \frac{[ES][I]}{K_i}$$

$$= k_2[ES] \left(1 + \frac{k_2'[I]}{k_2 K_i'} \right)$$

推导过程如前, 可得到如米氏方程的初速度表达式

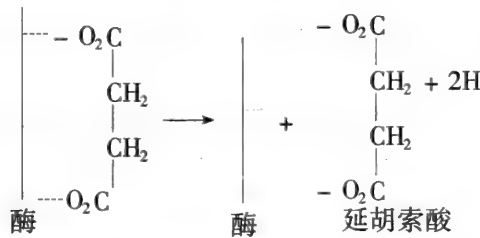
$$v_0 = \frac{V_{\max}[S] \frac{\left(1 + \frac{k_2'[I]}{k_2 K_i'} \right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i'} \right)}}{[S] + \frac{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i'} \right)}}$$

显然, 双倒数作图呈线性, 但斜率或截距对 $[I]$ 的两次作图为非线性, 这样就可区别部分抑制或形成死端复合物的抑制。

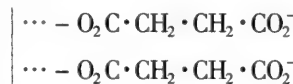
2.3.1.3 底物抑制

我们知道, 在给定的酶浓度下, 酶催化反应的速度随底物浓度的增加而加快, 至极限 V_{\max} 。有时, 在极高的底物浓度下, 初速度仍低于最大值, 有时认为测定系统与过量底物之间有相互作用, 但在有些情况下的确发现高浓度的底物会抑制自身转化为产物。

下面讨论在高底物浓度下的底物抑制机理, 如琥珀酸脱氢酶, 该反应的发生需要底物的两个羧基同时与酶分子结合:

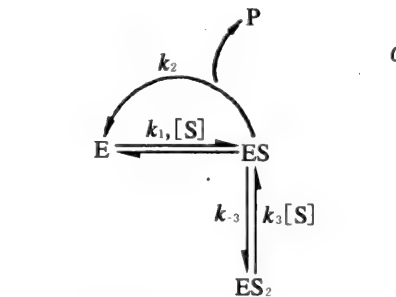


当底物浓度很高时, 可能会产生以下情形:



所以反应不能发生, 除非有一个分子解离, 反应才能进行, 底物抑制特征见图 2-10 所示。

一般, 当一分子底物与酶的一个位点结合, 另一个底物与酶上分开的位点结合, 往往会形成死端复合物。过量的底物分子可视为反竞争性抑制剂。



$$v = k_2[ES], \quad K_s' = k_{-3}/k_3$$

$$v = \frac{V}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[S]^2}{K_s'}}$$

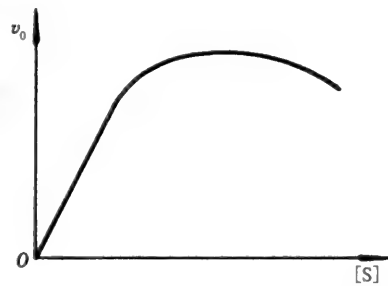


图 2-10 底物抑制的米氏作图

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_s'} \right)$$

由上式可以看出,当 $[S] \ll K_s'$, 可化为 Michaelis 方程式, 双倒数作图, 可求出 K_m 和 V 。当 $[S] \gg K_m$ 可简化为:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{[S]}{K_s'} \right)$$

此时以 $\frac{1}{v}$ 对 $[S]$ 作图, 取其直线延长部分, 即可求得 K_s' 和 V , 如图 2-11 所示。

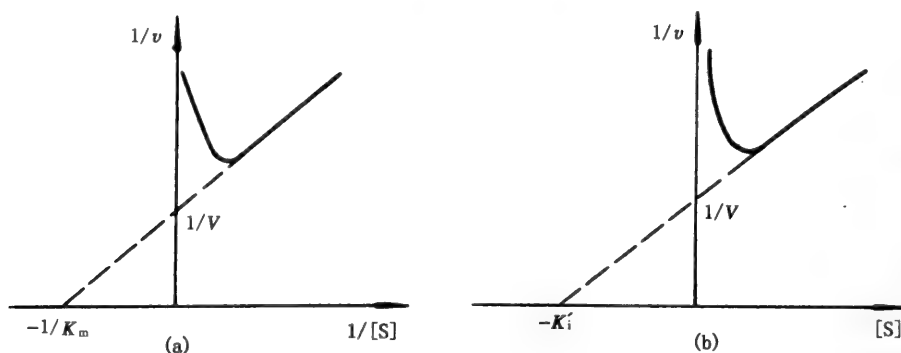


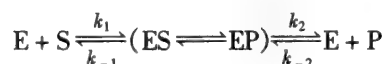
图 2-11 $\frac{1}{v}$ 对 $[S]$ 作图

(a) 底物抑制作用的双倒数图 ($[S] \ll K_s'$); (b) 底物抑制作用 $\frac{1}{v}$ 对 $[S]$ 图 ($[S] \gg K_m$)

2.3.1.4 产物抑制

产物对酶反应的抑制作用在生物体中较为常见。在细胞内, 酶反应的产物虽然不断地为另外的酶所作用, 但 E 和 P 总是同时存在的。因此, 考虑产物对反应速度的影响, 可能具有一定的意义。

在单底物酶反应中, 例



其速度方程为

$$v = \frac{V_1 K_{mp} [S] - V_2 K_m [P]}{K_m K_{mp} + K_{mp} [S] + K_m [P]}$$

$$v_1 = k_2 [E_0], v_2 = k_{-1} [E_0], K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, V_{mP} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}}$$

以 K_{mp} 除以分子, 分母得

$$v = \frac{V_1 ([S] - \frac{V_2 K_m}{V_1 K_{mp}} [P])}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_{mp}} \right) + [S]}$$

因为

$$K_{eq} = V_1 K_{mp} / V_2 K_m$$

所以

$$v = \frac{V_1 ([S] - [P]/K_{eq})}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_{mp}} \right) + [S]}$$

该表达式在形式上与 Michaelis - Menten 方程一致, 只是分子中 $([S] - [P]/K_{eq})$ 代替了 $[S]$, 分母中以 $K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_{mp}} \right)$ 代替了 K_m , 这就是说产物 P 对反应速度的影响相当于底物 S 的竞争性抑制反应速度的影响。

双底物酶反应的产物抑制作用将在 2.5.5 节中予以说明。

2.3.2 酶的不可逆抑制

酶的不可逆抑制指抑制剂与酶的活性中心发生了化学反应,抑制剂共价地连接在酶分子的必需基团上,阻碍了底物的结合或破坏了酶的催化基团,不能用透析或稀释方法使酶活性恢复。溶液中不可逆抑制剂的作用相当于失活的酶浓度,在酶和不可逆抑制剂作用完全后加入底物,则其动力学行为符合米氏动力学性质, K_m 不变,但 V_{max} 下降:

$$V'_{max} = k([E_0] - [I_0])$$

$$\frac{V'_{max}}{V_{max}} = \frac{[E_0] - [I_0]}{[E_0]}$$

$$V'_{max} = V_{max}[E_0] \left(1 - \frac{[I_0]}{[E_0]}\right)$$

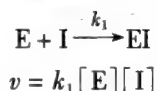
得到的双倒数图谱与可逆抑制中的非竞争性抑制图谱非常相似。因此,如果发现双倒数图谱中 K_m 不变,但 V_{max} 变小,首要问题是先鉴别到底属于可逆还是不可逆抑制。

可逆抑制剂与酶迅速建立平衡,并在初速度范围内保持不变,而不可逆抑制剂在这段时间内抑制程度增加。

2.3.2.1 非专一性的不可逆抑制

抑制剂与酶分子上不同类型的基团都能发生化学修饰反应,这类抑制称为非专一性的不可逆抑制。虽然缺乏基团专一性,但在一定条件下,也有助于鉴别酶分子上的必需基团。

最简单的非专一性不可逆抑制的动力学方程为



若 $[I] \gg [E]$, 则 $v = k'[E]$

式中 $k' = k_1[I]$

$$-\frac{d[E]}{dt} = k'[E]$$

积分,得 $\ln \frac{[E]_t}{[E]_0} = -k't$

或写成

$$\ln \frac{v}{v_0} = -k't$$

式中 $[E]_t$ —— t 时酶浓度;

$[E]_0$ —— 总酶浓度。

因此,以酶活力剩余分数的对数对时间作图可得到直线,求出 k' 值(图 2-12(a)),在根据不同抑制剂浓度下得到的 k' 对抑制剂浓度作图,即可求出 k 值(图 2-12(b))。

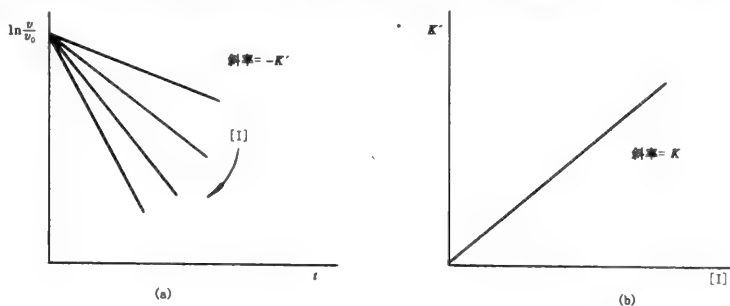
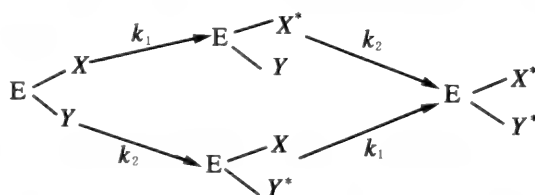


图 2-12 作图法求 k' 值和 k 值

如果某一非专一性的不可逆抑制剂与酶分子上的两种残基 X, Y 都发生作用, 反应速度不同并都导致酶活力降低, 反应过程可表示为



k_1 表示 X 被修饰为 X^* 的反应速度常数, k_2 表示 Y 被修饰为 Y^* 的反应速度常数。

若 $[I] \gg [E]$, $k_1' = k_1[I]$

$$k_2' = k_2[I]$$

X 和 Y 被修饰后的剩余百分数分别为:

$$\frac{X}{X_0} = e^{-k_1't} \quad \frac{Y}{Y_0} = e^{-k_2't}$$

X_0, Y_0 表示没有修饰时的浓度, X, Y 表示修饰后的浓度。则酶活力剩余分数可表示为:

$$\frac{v}{v_0} = e^{-k_1't} \cdot e^{-k_2't} = e^{-(k_1'+k_2')t}$$

以酶活力剩余分数的对数对时间作图可得到直线(图 2-13)。

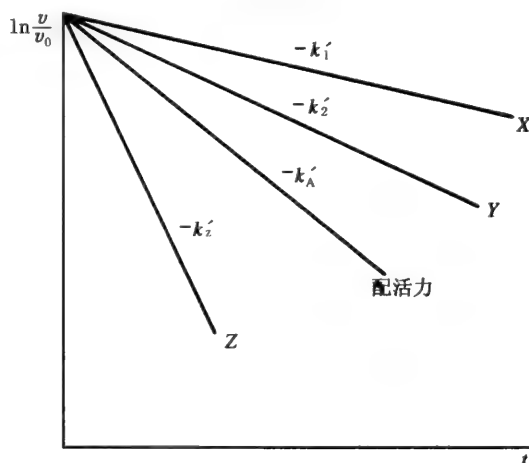


图 2-13 $\ln \frac{v}{v_0} - t$ 图

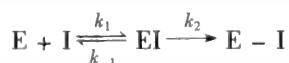
如果 $k_A' = k_1'$, 则 X 为酶活性中心所必需; 如果 $k_A' = k_1' + k_2'$, 则 X, Y 都为酶活性中心的必需基团; 如果残基 Z 的修饰速度远高于酶活力下降的速度, 则 Z 不是酶活动所必需的基团。

我国科学家邹承鲁建立的以统计学为基础的邹氏作图法也是阐明不可逆抑制剂对酶的修饰程度与酶剩余活力之间的关系, 详见有关文献。

2.3.2.2 专一性的不可逆抑制

专一性的不可逆抑制作用有 K_s 型和 K_{cat} 型两类。

K_s 型不可逆抑制剂又称亲和标记试剂, 结构与底物类似, 但同时携带一个活泼的化学基团, 对酶分子必需基团的某一个侧链进行共价修饰, 从而抑制酶的活性。 K_s 型不可逆抑制剂与酶的结合是可逆的, 但结合后与酶必需基团的作用是不可逆的, 抑制剂与酶作用的动力学过程为:



$$\frac{d[E-I]}{dt} = k_2[EI]$$

若 $k_2 \ll k_{-1}$, 则可推得

$$\ln \frac{v}{v_0} = k't$$

$$k' = \frac{k_1 k_2 [I]}{k_1 [I] + k_{-1}}$$

写成双倒数形式:

$$\frac{1}{k'} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_1}{k_2} \cdot \frac{1}{[I]}$$

式中 $K_1 = \frac{k_{-1}}{k_1}$

以 $\ln \frac{v}{v_0}$ 对 t 作图, 得到一系列 k' 值, 再以 $1/k'$ 对 $1/[I]$ 作图, 可求得 k_2 和 K_1 (图 2-14)。

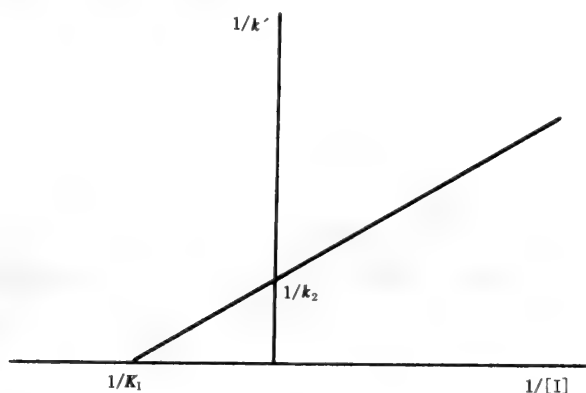
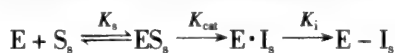


图 2-14 $1/k' - 1/[I]$ 图

K_{cat} 型不可逆抑制剂又称酶的自杀性底物。这类抑制剂也是底物的类似物, 但其结构中潜藏着一种化学活性基团, 在酶的作用下, 潜在的化学活性基团被激活, 与酶的活性中心发生共价结合, 不能再分解, 酶因此失活。每一种自杀底物都有其作用对象, 这是一种专一性很高的不可逆抑制剂。

如以 E 及 S_s 分别代表酶及自杀底物, I_s 为 S_s 被酶催化生成的抑制物, 则:



式中 K_s —— E_s 解离常数;

K_{cat} —— ES_s 转变成 EI_s 的催化常数;

K_i —— E 及 I_s 形成共价结合的速度常数。

抑制作用的效率及专一性不但与 K_s 有关, 更重要的是取决于 K_{cat} , 因为 S_s 单纯与 E 结合还不能成为抑制剂, 只有生成产物 I_s 后才有抑制作用。 K_{cat} 愈大, 生成产物的速度愈快, 抑制作用也愈强, 故自杀底物实际上是取决于 K_{cat} 的抑制剂, 故也称 K_{cat} 型抑制剂。

自杀底物所具有的 K_{cat} 型抑制作用有下列特点:

- (1) 自杀底物 S_s 的浓度愈大, 抑制作用也愈大, 其抑制动力学呈一级反应;
- (2) 抑制作用的最适 pH 值与催化底物的最适 pH 值一致;
- (3) 在自杀底物 S_s 过量时, 加入酶愈多, 产生的抑制愈大;
- (4) S_s 本身无抑制活性, 而生成的 I_s 是一种亲和标记性抑制物;
- (5) 酶活性中心的必需基团与 I_s 的化学计量关系是 1:1;

(6) 真正的底物 S 能竞争地阻断 S_i 的抑制作用。

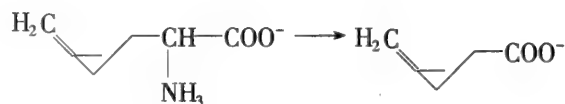
酶的自杀底物在治疗酶学上是一类崭新的课题,对于医疗实践有着极为重要的意义。过去的治疗酶学,着眼点在利用各种不同的酶作为治疗手段来医治一些疾病。如果以酶作为靶子,使某些致病菌或异常生长的细胞中的酶能被一些相应的化合物所抑制或失活,从而也能使疾病得以治愈。自杀底物就是在这方面能大显身手的一类化合物。因为一般的酶失活剂,多数是作用很剧烈的化学物质,对人体也是有毒的,实用价值极少;而自杀底物与酶的天然底物的共同之处就是对人体无毒或毒性较少,因此很有医疗价值。

酶的自杀底物多半是人工设计合成的,也有一些是天然产物。近年来,已合成了不少对人体的副作用较小的某些靶酶的自杀底物,以对付一些病原体的感染或对某些异常代谢加以矫正。

A 天然酶的自杀底物

天然酶的自杀底物并不一定能治病。有些酶的天然自杀底物,如不慎吃下,反而对正常人体的正常酶发生抑制而造成功能不正常或致病。

例如,在西印度群岛中有一种称为 Ackee 果 (*Blighia sapida*) 的植物,成熟的果实是牙买加岛居民的主要食品,但未成熟果实的假种皮中却含有一种有毒的降糖氨酸(即甲叉环丙基丙氨酸, Hypoglycin A),其结构式如下:



降糖氨酸

有毒的代谢物

此种降糖氨酸的降解产物却是人体中不少重要黄素酶的自杀底物。例如,此物可专一地抑制异戊酰 - CoA 脱氢酶,因而导致血中异戊酸的积聚。此种生理异常通过中枢神经系统可导致剧烈呕吐,称为牙买加呕吐病,主要是食用了未成熟的 Ackee 果所致。通常认为这种致命性疾病的死亡是由于低血糖所引起。患者血中葡萄糖水平只有 0.5mmol/L,约为正常人的十分之一浓度。

B. 治疗用人工合成的酶自杀底物

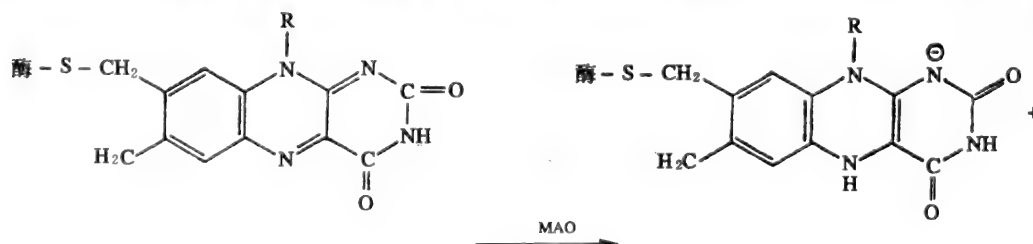
人工合成的各种酶的自杀底物是人类征服各类疾病的一种新的有效药物。

a 能治疗高血压的自杀底物

高血压病除了与各种精神因素有关外,一般与细胞质内线粒体中的单胺氧化酶有关。有较好疗效的降压药物优降宁(Pargyline)是一种 β -, γ -丙炔基叔胺类衍生物,实质上它是线粒体上的单胺氧化酶(MAO)的自杀底物。单胺氧化酶是一种黄素酶类,含有辅酶黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。当服用优降宁后,这个自杀底物可将酶上的辅基 FAD 中的核黄素部分还原并发生共价加合作用,使酶催化反应不能再继续进行。

血浆中的单胺氧化酶因不含有 FAD,不受优降宁的抑制。

由肠道所吸收的代谢产物酪胺等芳香胺类化合物可被肝及肠粘膜中线粒体单胺氧化酶所破坏而不能进入血液循环。当服用优降宁后,MAO 被其“杀”死后,酪胺等就可进入血液循环,并由肾上腺能神经原摄取而转变为 β -羟酪胺。后者一种假神经递质,可取代去甲肾上腺素而被积聚及释放,以致使交感神经末梢释放的去甲肾上腺素减少,从而导致血压的下降(见图 2-15)。



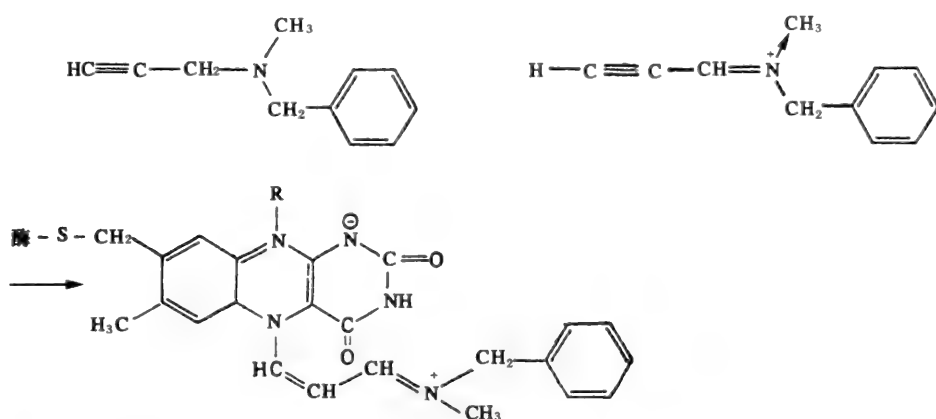
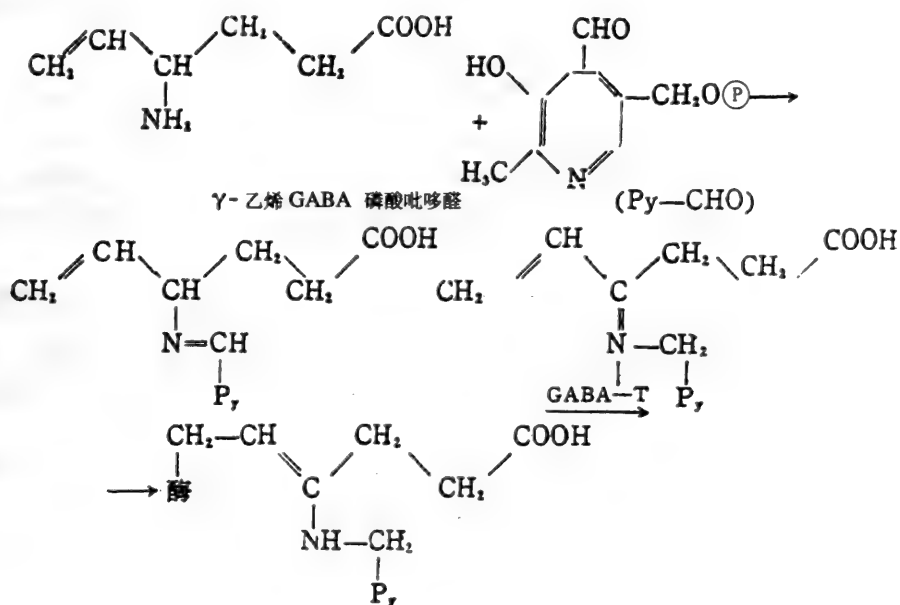


图 2-15 优降宁抑制 MAO 的机制

b. 癫痫治疗中自杀底物的应用

人脑中有一种叫 γ -氨基丁酸(GABA)的氨基酸,它是一种抑制性的神经递质。脑中的 γ -氨基丁酸转氨酶可破坏此氨基酸,一般这被认为是癫痫病发病的原因。如果对 γ -氨基丁酸转氨酶设法加以阻断或抑制,就可以起到抗癫痫的作用。 γ -氨基丁酸转氨酶是一种以磷酸吡哆醛为辅基的转氨酶。有几种自杀底物,如二氢芳族邻位氨基苯甲酸, γ -乙烯代氨基丁酸等可“杀死”此酶,尤以后者更为专一。

当 γ -氨基丁酸转氨酶被自杀底物阻断抑制后,脑中的 γ -氨基丁酸量相应地增高,以而脑中中枢可受抑制。故自杀底物 γ -乙烯代氨基丁酸将是一种很有效的抗癫痫药物。病人在注射自杀底物 γ -乙烯代氨基丁酸后,自发性运动减少,体温降低,此药具有强烈的抗抽搐及抗癫痫发作功能(见图 2-16)。

图 2-16 γ -乙烯 GABA-抑制 GABA-转氨酶(GABA-T)的机制

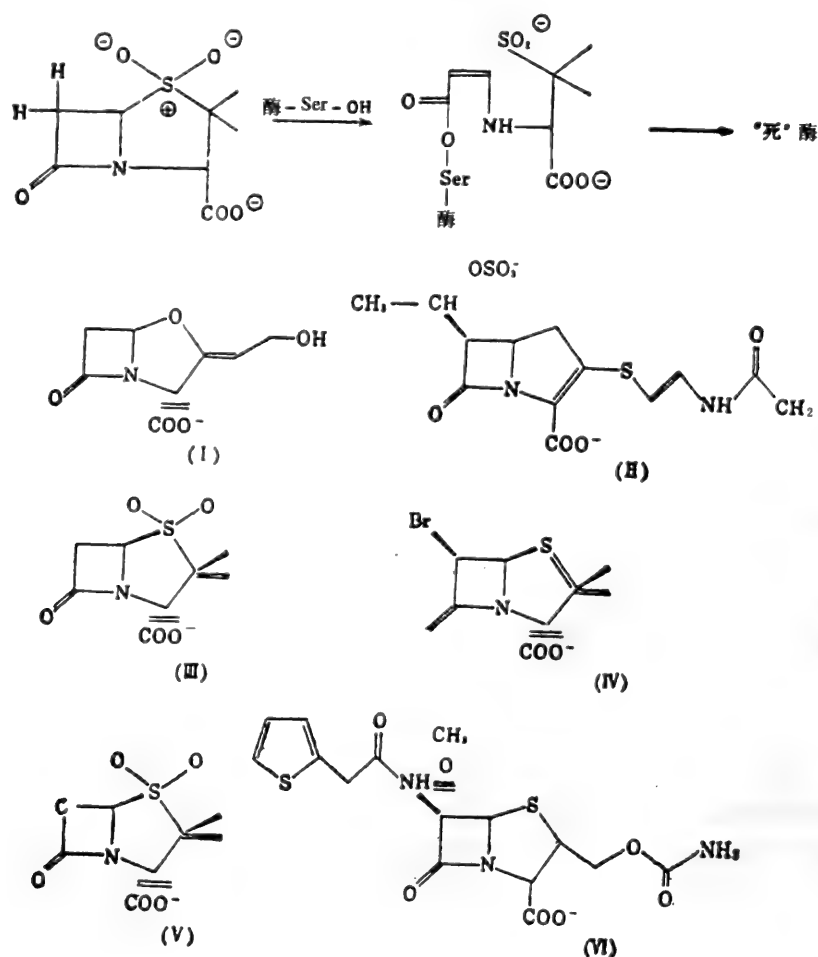


图 2-17 几种自杀性底物的结构式

c 用自杀底物来对付抗青霉素的菌株

青霉素之所以有杀菌力,就在于它的结构中具有 β -内酰胺(β -lactam)环的杀菌部分。由于广泛长期使用青霉素,某些菌株往往对青霉素产生耐药性,其原因多半是细菌体内被诱导出一种叫 β -内酰胺酶(β -lactamase)的适应酶的缘故。

此酶能水解青霉素中的内酰胺环,使之成为不具有杀菌力的青霉酸,这样,就破坏了青霉素的杀菌能力。治疗学上的课题就是要设法破坏这种 β -内酰胺酶,使细菌不能破坏青霉素。因此,设计出 β -内酰胺酶的自杀底物就很有用途。近年来,已经设计并合成了几种这样的自杀底物,它们的结构式如图 2-17 所示。

图 2-17 中(I)称为 Clavulanic acid;(II)称为 Olivanic acid;(III)称为 Pfizer 899,是一种青霉素亚砷衍生物,它能和抗性细菌中的 β -内酰胺酶结合而使酶“自杀”。

如把 Pfizer 899 与青霉素混合使用,就能增强它们对付抗性细菌株的能力。

d 自杀底物作为抗菌药

细菌中的丙氨酸消旋酶是一种以磷酸吡哆醛作为辅酶的酶。丙氨酸消旋酶对于细菌是必不可缺的。因为此酶能使 L-型氨基酸消旋成为 D-型,而 D-型氨基酸是细菌合成细胞肽多肽的重要原料。 β -氟代-D-丙氨酸是丙氨酸消旋酶的自杀底物,如该酶被“杀”,则细菌的肽多糖合成便被阻断,细菌因不能合成细胞壁而死亡,故自杀底物 β -氟代-D-丙氨酸可作为一种抗菌药物。

e 自杀底物在肿瘤治疗上的可能性

一种已在临床上应用于抗肿瘤的药物——5-氟脱氧尿苷酸(FdUMP),实际上是靶酶胸苷酸合

成酶的自杀底物。该酶在肿瘤细胞 DNA 的生物合成上是一个关键酶。如该酶被“杀”，则 DNA 就不能合成，并导致肿瘤细胞的死亡。

5-氟脱氧尿苷酸作为自杀底物的机制是，该化合物能通过正常的催化循环，使胸苷酸合成酶的巯基和酶的四氢叶酸(THFA)辅因子之间形成一种三元复合体(见图 2-18)。

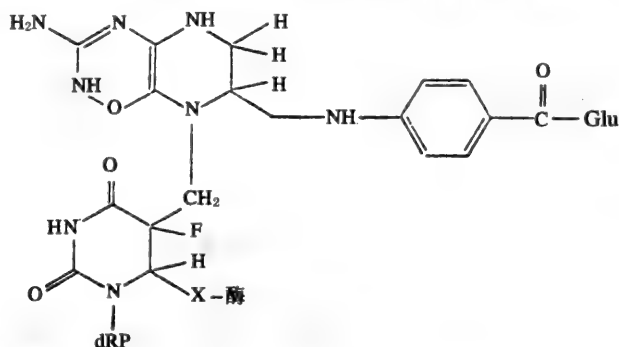


图 2-18 三元复合体

由于 5-氟脱氧尿苷酸由脱氧尿苷酸中的一个氢被氟所替代而成，且氟取代基并不能像氢那样可作为质子释放出去。因此，这种三元复合物一建立，就不能再拆开，结果三元复合体积聚起来了。这样，酶就不能再起作用，DNA 也不能合成，肿瘤细胞就被杀死。

f 用自杀底物来治疗震颤麻痹症

对于震颤麻痹症患者来说，脑中有足够量的多巴胺对其症状缓解是必需的，在理论上可用 α -多巴来治疗。其作用原理是 α -多巴会进入脑中并转变成多巴胺。但在药方式是一种一个很重要的问题，一般肌注或静注后， α -多巴这一类芳香族氨基酸易被组织中的芳香氨基酸脱羧酶所破坏，因而不易进入脑中。有一种 α -多巴的衍生物 α -二氟甲基多巴是芳香氨基酸脱羧酶的自杀底物，可作为治疗用药(见图 2-19)。

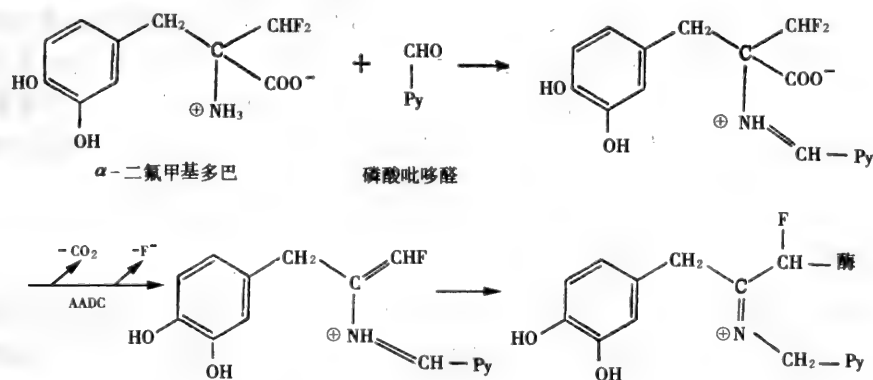


图 2-19 α -二氟甲基多巴抑制芳香氨基酸脱羧酶(AADC)的机制

当给予此药后，机体各组织中的芳香氨基酸脱羧酶活力显著降低，但脑中该酶的活力却下降甚少，故 α -多巴就不易在周围组织被破坏而较多地进入脑中，并受脑中仍有较高活力的芳香氨基酸脱羧酶的作用而形成较多的多巴胺，这对震颤麻痹症的治疗能起到良好的作用。

治疗时，可将 α -多巴与 α -二氟甲基多巴同时给药。此外 α -氟甲基多巴也有类似疗效。

g 痛风症的自杀底物疗法

各种类型的痛风症是一种嘌呤代谢异常所引起的疾病。特征是该患者的血和尿中尿酸盐浓度升高，从而在肾脏及各关节处有尿酸钠结晶沉着，久之形成小结石，致使骨关节变形、发炎或肾脏病变，导致肾功能衰竭。

用来医治各种类型痛风症的药物，别嘌呤醇实际上是黄嘌呤氧化酶的自杀底物。黄嘌呤氧化

酶受抑制后尿酸的产生减少,痛风症状就缓解。从机制上说,别嘌呤醇也是钼黄素酶在其 C_2 处进行羟化作用而生成别黄嘌呤的一种底物,不过是自杀底物。这是一种两个电子的氧化作用,活性部位 M_0^{VI} 被还原成 M_0^{IV} 。配位的吡唑嘧啶别黄嘌呤只能以从这一氧化态极端缓慢地释放出来,其解离作用的半衰期较长,为 300min。这期间对于别嘌呤醇在体内发挥作用已经足够了(见图 2-20)。

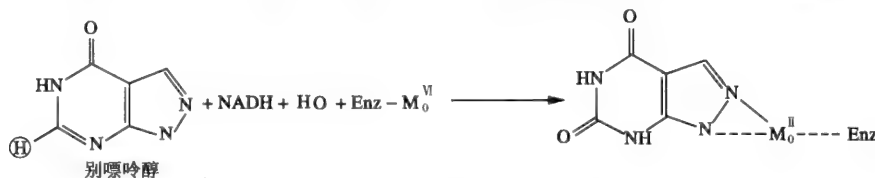


图 2-20 别黄嘌呤- M_0^{IV} 酶复合物

C 专一性靶酶的自杀底物的应用前景

以上述列举的各种医疗范围来看,酶自杀底物对靶酶的作用并不是像一般酶抑制剂那样降低了酶的催化速度,而是使酶本身在催化过程中“毁灭”。同时,自杀底物对靶酶的专一性甚高,这也是它的一个优点。因此,这就可以使人们设计出对付专一性靶酶的各种自杀底物,以达到各种不同的医疗目的。自杀底物确实是近年来酶学在医学中应用的一个突出成就。

酶的自杀作用以及自杀底物决不仅仅在医学实践中具有重要应用,在植物抗虫抗病中同样具有同样重要的地位,一些传统的农药如有机磷、氨基甲酸酯类和除虫菊酯类杀虫剂对农业害虫确有剧毒,但对环境产生污染,并使昆虫产生抗药性,甚至对人体也有不同程度的毒性。因此,人们开始关注植物蛋白酶抑制剂的抗虫抗病作用。一些存在于植物体内的专一性蛋白酶抑制剂与植物的抗虫抗病能力密切相关,这些蛋白酶参与了昆虫的食物消化,在昆虫在生理化活动中起重要作用,抑制昆虫肠道蛋白酶的活性,可使昆虫营养不良,生长发育受阻,甚至死亡。Hilder 等将豇豆胰蛋白酶抑制剂基因转入烟草,并得到高表达,产生的蛋白酶抑制剂达烟草叶片总蛋白含量的 1%,转基因烟草植物对烟芽夜蛾幼虫具有明显抗性。Johnson 将马铃薯蛋白酶抑制剂和番茄蛋白酶抑制剂基因转入烟草,可阻止烟草天蛾幼虫的生长。到目前为止,植物蛋白酶抑制剂转基因成功的例子还很少,蛋白酶抑制剂转基因在转基因植株上的表达还不够理想,相对于抗虫而言,植物蛋白酶抑制剂与病原菌蛋白酶的相互作用研究更少,因此设计和制造各类昆虫和病原菌的专一性靶酶的自杀底物和应用其他生物学手段进行植物抗虫抗病的研究既是一个艰巨的研究领域,又具有诱人的应用前景。是防治农业害虫的一种少污染、安全有效的途径。

2.3.3 酶抑制剂的设计及研究进展

随着人们对酶分子认识浓度不断深入,基于酶作用机理的抑制剂的研究已经成为医学领域中新药开发的热点。本文以肽酶抑制剂为例,简要地介绍一下酶抑制剂的设计方法及目前的研究进展。

多肽作为肽酶抑制剂地研究引起人们极大地关注,这是由多肽本身在生物体内地地位所决定的,首先,人体激素由甾体、氨基酸代谢物和多肽三类物质组成,其中多肽(大约 5~20 个氨基酸残基)所占比例最大;其次,很多多肽是水解酶的抑制剂,它们在各种组织中与酶结合,调节酶的活性,以保护这些器官;多肽和蛋白质一样也是生物体许多重要的结构物质,所以多肽抑制剂地抑制机理越来越得到人们地重视。但是,生物体内的肽酶一旦被抑制,将会引起广泛的生物学效应,而且多肽往往是极性的,口服后在小肠中难以被吸收,在酸性环境和肽酶丰富的区域又很易被水解,所以,既要解决对靶酶的选择性抑制问题,又要解决口服问题,必需对多肽抑制剂结构进行重新设计。

2.3.3.1 血管紧张肽原酶和血管紧张肽转化酶抑制剂的设计

人体正常的血压是由多种复杂的机制调控的,其中一种是由两种蛋白酶即血管紧张肽原酶(renin)和血管紧张肽转化酶(angiotensin converting enzyme 简称 ACE)进行调节的(见图 2-21)。

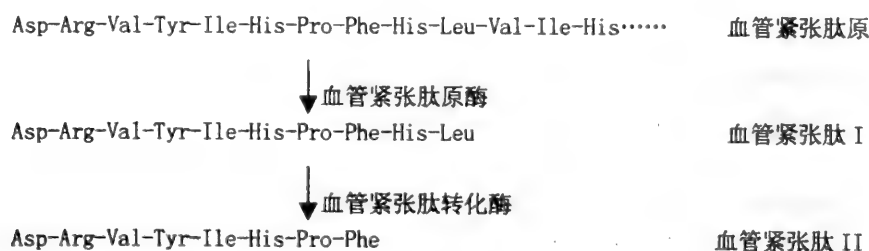


图 2-21 血管紧张肽原酶和血管紧张肽体系

血管紧张肽原酶把循环中血清球蛋白的血管紧张肽原水解成没有生物活性的十肽的血管紧张肽 I,在血管紧张肽转化酶作用下进一步水解为八肽的血管紧张肽 II,这是目前已知的最强的内源性升压物质,对血管有直接的升压效应,这可能是一部分高血压的基础。研究发现,一种九肽的蛇毒 Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Glu-Ile-Pro-Pro 可降低人的血压,但口服无效,人们希望能找到一种小分子来替代这种吸收差或容易被代谢的肽。这一想法从羧肽酶 A 作用机理的研究得到启发,已知 ACE 和羧肽酶 A 一样也是一种含 Zn 的蛋白酶,都可从底物的 C 末端水解氨基酸,不同的是羧肽酶 A 从 C 末端水解掉一个氨基酸,而 ACE 则从血管紧张肽 I 降解掉两个氨基酸。Squibb 研究小组推测 ACE 与血管紧张肽 I 的结合可能与羧肽酶 A 和底物的结合有共同之处,由于 L-苄基丁二酸是羧肽酶 A 的强竞争性抑制剂,因此认为丁二酰基氨基酸尤其是丁二酰基脯氨酸(因为蛇毒抑制剂的 C 末端为 Pro)可能是 ACE 抑制剂的研究起始物,但它是 ACE 的弱竞争性抑制剂,从这个抑制剂出发进行改造,人们设计出了目前已成功地应用于临床的治疗高血压的药物 captopril(图 2-22),这一药物与 ACE 抑制剂原型的区别在于与 Zn 配位的羧基改为巯基,与蛇毒具有同样强的抑制效应,而且口服有效。Captopril 是第一个通过对酶作用机理的研究设计的应用于临床的药物。

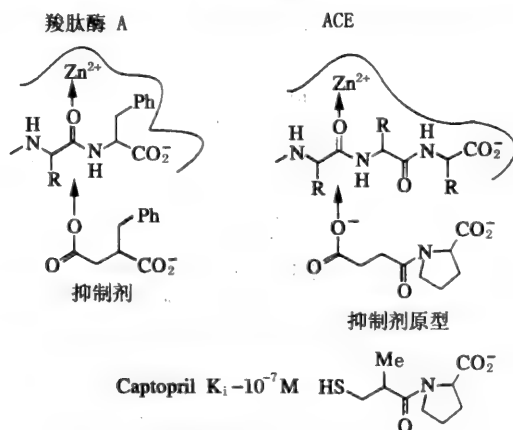


图 2-22 治病高血压药物 captopril 的设计过程

2.3.3.2 HIV 蛋白酶抑制剂的设计

众所周知的爱滋病是由 HIV 病毒(一种反转录病毒)感染引起的,这种病毒通过破坏人的免疫系统最终导致人死亡。治疗反转录病毒引起的疾病比治疗细菌等感染引起的疾病要困难得多,因为反转录病毒感染宿主细胞后,在逆转录酶作用下,将其 RNA 反转录成 DNA,在整合酶作用下,病毒 DNA 整合到宿主 DNA 分子上。病毒颗粒进一步繁殖时,不仅需要 DNA、RNA,还需要合成蛋白质来提供关键酶和结构蛋白,这些能组装成病毒外壳的蛋白质首先以蛋白前体的形式合成,通过剪切才能进行装配,这一过程需要的剪切酶就是 HIV 蛋白酶。因此,HIV 生活史中需要的逆转录酶、整合酶和 HIV 蛋白酶都可作为治疗爱滋病的靶酶。现在已有一些实验室得到了重组 HIV 蛋白酶的晶体结构,并确认该蛋白为酸性蛋白质,具有对称的活性中心结构。胃蛋白酶和血管紧张肽原酶(renin)抑制剂成功的设计对于寻找临床上治疗 HIV 病毒感染的药物有非常重要的意义。

胃蛋白酶、血管紧张肽原酶和 HIV 蛋白酶都是酸性蛋白酶,在催化过程中有一共同特征,即由酶活性部位的两个 Asp 残基先产生一亲核试剂攻击底物分子的羰基碳,然后,再由这两个 Asp 残基形成的电荷网络中的 H⁺ 中和带有负电荷的底物过渡态,抑胃肽(见图 2-23)是一种微生物代谢物,可抑制所有已知的酸性蛋白酶,在这个多肽分子中,羧基酸:抑肽酸出现了两次,推测可能抑肽酸的结构非常接近酶反应的过渡态(见图 2-23),因此抑胃肽是酸性蛋白酶的强抑制剂。仿制抑胃肽中的抑肽酸结构,将抑肽酸的 N 端和 C 端加以改良,可将血管紧张肽原酶的强抑制剂九肽:Pro-His-Pro-Phe-His-Phe-Val-Tyr-Lys 缩短为五肽,可达到相同的抑制效果(见图 2-24),但临床上稳定性还欠佳。血管紧张肽原酶抑制剂的设计方法为 HIV 蛋白酶的设计提供了很好的思路。

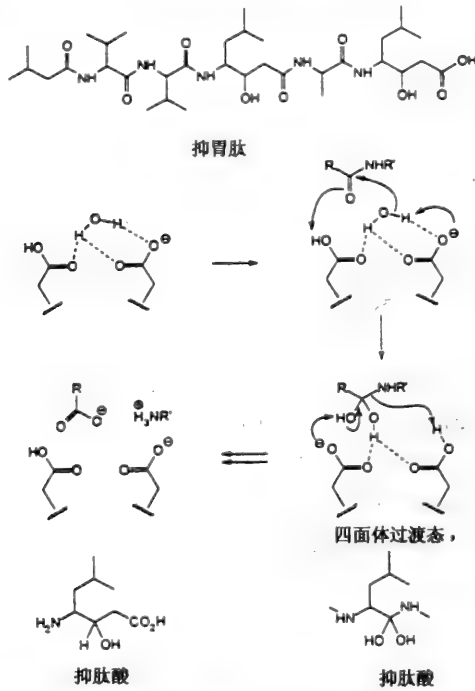


图 2-23 天冬氨酸蛋白酶作用机理和四面体过渡态的类似物:抑肽酸

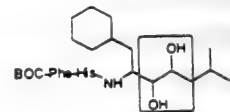


图 2-24 renin 抑制剂的结构

HIV 蛋白酶和血管紧张肽原酶不仅都是酸性蛋白酶,而且 X-射线发现它们都具有对称的活性中心结构,因此很多研究小组致力于设计具有对称结构的抑制剂,由于血管紧张肽原酶抑制剂是在二羟乙烯结构类似的分子上优化而成的,Merck 等研究小组用 X-射线分析了这种酶和抑制剂复合物的空间结构,在数据分析的基础上设计了将二羟乙烯结构类似物嵌合在环状的尿素分子上,进一步寻找酶和抑制剂之间存在的最重要的相互作用力(氢键或疏水相互作用),以优化这一抑制剂的结构,最后得到了 DMP323 分子(见图 2-25),其 K_i 值达 nM 数量级,并且还发现,如果去掉一个羟基,抑制活性基本不变。

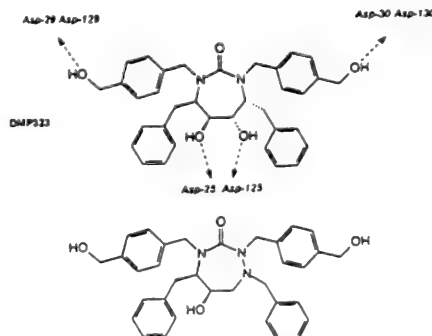


图 2-25 HIV 蛋白酶抑制剂的结构

由于化学随机筛选方法的不断改进,现在已经可以提供更多的非多肽结构类似物作为药物设计的起点,Saquinavir 作为 HIV 蛋白酶抑制剂,是这一领域最杰出的研究成果,也是第一个在美国批准为治疗艾滋病的药物。X-射线晶体研究阐明了酶对底物分子的切割位点(图 2-26),根据底物多肽顺序的框架,人们设计出最小的多肽结构类似物, P_1 和 P_1' 分别为 Phe 和 Pro,继续引入一羟乙基团(类似于抑肽酸结构),得到一个 HIV 蛋白酶的抑制,抑制常数 K_i 为 6.4nM,以这个抑制剂作为药物设计的起点,进一步进行优化,在 N 末端加上 Asp,对酶的亲和力可增加 50 倍,如将 N-末端占有酶疏水口袋的侧链换成喹啉基团,尤其是顺式结构的萘烷取代了 C-末端的 Pro 残基,可得到 HIV 蛋白酶非常强的抑制剂 Saquinavir(图 2-26),抑制常数 K_i 小于 0.4nM,药效学和毒理学研究证实可用与临床。这种人工设计的抑制剂是 HIV 蛋白酶有效的克星。

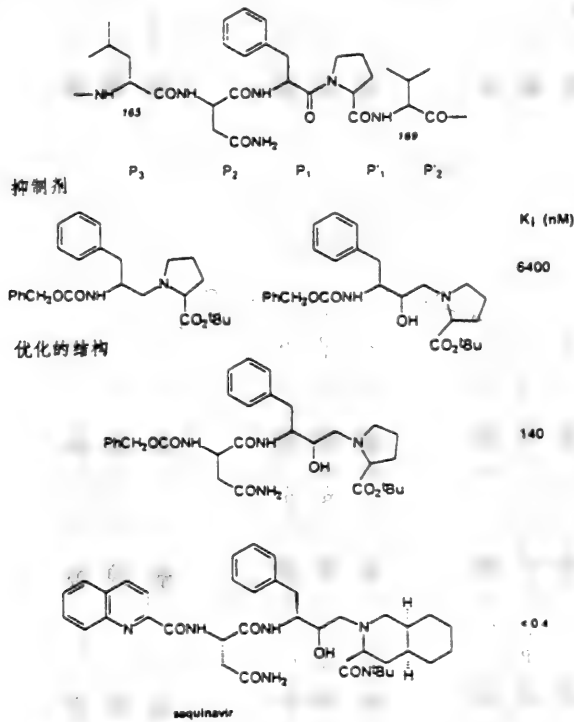


图 2-26 Saquinavir 药物的发现

2.3.3.3 抑制剂的设计和筛选

化学和生物科学的迅速发展使传统的寻找药物的方法发生了根本性的变革,对于天然产物的筛选曾经是药物化学家关注的焦点,传统的样品筛选首先需分离纯化,测试所需的量也较大,而现在筛选时多用生物学检测方法,不需要对混合物进行分离,只有测得有生物活性时才需进行药物提取,且微量样品足以进行活性测定,传统的药物化学家一年可合成数百个样品供药物筛选,这些样品如今通过自动分析仪一天就可完成活性检测,这种快速筛选方法反过来对于样品的提供带来了极大的压力。这里我们介绍一种结合合成法可提供为数众多的样品供药物筛选。这一方法基于 60 年代提出的多肽固相合成法原理,基本过程如图 2-27 所示。

图中用仅仅三个底物和三步反应就可产生 27 种化合物,每一种库不需分离就可进行检测,一旦检测到有药物活性的“起始化合物”,人们就可用化学方法优化这种物质的结构,使其性质适合于药物。

另一种有效的寻找药物的起始化合物的方法是近年来正在发展的计算机模拟技术。药物化学家应对酶与底物的空间结构信息、酶的作用机理进行综合考虑来设计有活性的抑制剂,以前他们很少能得到所希望酶的 X 射线晶体结构,现在已经解决的酶及酶抑制剂的 X 射线晶体结构数目不断增加,提供了很多底物和抑制剂与酶相互作用的结构信息,并将这些信息用计算机形象化而且定量

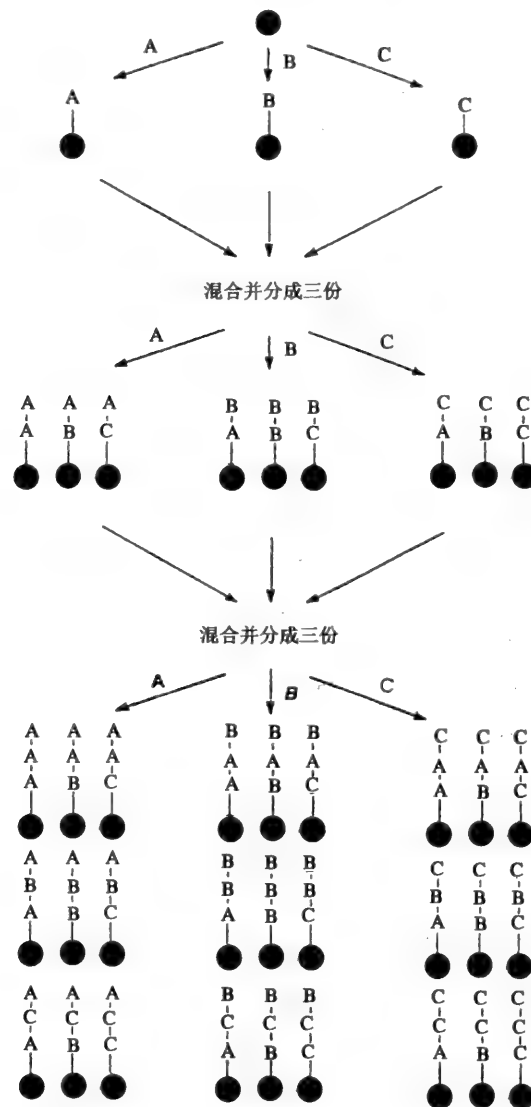


图 2-27 组合合成库示意图

地展现出来,使药物化学家可以非常详细地观察分子之间的相互作用。从 80 年代起,计算机技术迅速发展,一些药业公司已致力于人工设计的计算机分子设计软件设计靶酶的抑制剂,使其与酶的活性中心的结构互补。计算机模拟技术为药物设计开辟了又一个新的领域。

2.4 pH 值和温度对酶作用的影响

2.4.1 pH 值对酶作用的影响

近年来,pH 值对酶反应速度的影响已作为常用的鉴别酶活性部位解离基团的常用手段。pH 值研究可提供大量的有关酶促反应机理的信息。

pH 值对酶活性的影响主要是:(1) 使酶的空间结构破坏,引起酶活性丧失。这种失活分可逆和不可逆两种方式,可逆失活指在不同 pH 值下保温的酶液在最适 pH 值测活时,活力完全恢复。(2) 影响酶活性部位催化基团的解离状态,使底物不能分解为产物。(3) 影响酶活性部位结合基团的解离状态,使其不能与底物结合。(4) 影响底物的解离状态,使底物不能和酶结合,或结合后不能生成产物。综合上述种种原因,用酶活力对 pH 值作图往往有钟罩形曲线,酶的作用存在一最适

的 pH 值,它和酶的最稳定 pH 值不一定相同。由于最适 pH 值随底物浓度、温度和其他条件变化而变化,所以谈到所谓最适 pH 值应指明实验测定的条件,由于 pH 值影响比较复杂,本章只讨论活性部位基团的解离情况,非活性部位,如果不是影响酶的活性部位构象的基团,可以不予考虑。但这并不是说,除了活性部位以外,就没有 pH 值的影响了。

pH 值研究的基本方法十分简便,即测定酶促反应的最大反应速度 V_{\max} 和 V_1/K_s :(表现二级速度常数)的比值,或者抑制剂或激活剂与酶结合的 K_i 值。这些动力学参数都随反应 pH 值的变化而发生变化。用测得的动力学参数对数值对 pH 值作图,即得反应的 pH 曲线。解离基团的数目由曲线斜率求出。曲线渐近线的交点得出解离基团的表现 pK_a 值。

pH 值研究得到的参与酶催化反应的基团有: Asp, Glu, His, Gys, Lys, Arg 和 Tyr。

然而,准确地识别催化基团不是一件简单的事。主要原因是处于活性部位环境中的氨基酸侧链 pK_a 值有时会大大偏离水溶液中氨基酸的 pK_a 值。由于各种解离基团其热力学值具有一定特征,测定解离焓也有助于判断催化基团,遗憾的是这一热力学值也在一定的范围内波动。

1962 年, Findlay 等提出了另一方法,目前称之为“溶剂微扰技术”(Solvent perturbation technique)。众所周知,活性部位羧基的 pK_a 值与组氨酸的 pK_a 值部分重叠,因此,根据测定的 pK_a 值很难区别这两种残基。而溶剂微扰技术根据中性酸残基(羧基、巯基和酚羟基)和阳离子酸残基(氨基)的解离在混合一水溶剂系统中不同的表现行为,原则上可将两者区别开来。

例如,中性酸失去一个质子后产生一共轭的阴离子碱,解离导致溶液中离子数目净的增加:



有机溶剂使平衡向左移动,降低了溶液中的质子数,使 pK_a 值升高。而阳离子酸解离时,去一个质子仅仅改变了溶液中阳离子本身的大小,没有改变溶液中离子的数目。



对于这些阳离子酸,如果有有机溶剂对其 pK_a 有影响的话,也是使其降低而不是升高。

Findlay 等最初运用溶剂微扰方法识别牛胰核糖核酸酶中有催化活性的组氨酸残基。这是基于溶剂对酶侧链解离的影响和对反应缓冲液相同类型的解离影响是相等的假设。

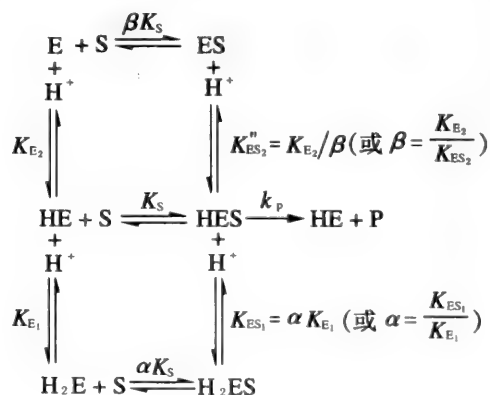
最近, Grace 和 Dunaway - Mariano 在一出色的研究中再现了溶剂微扰技术以识别酶的阳离子基团,并将结果用于酵母己糖激酶中有催化活性的天冬氨酸侧链检验。同时也提出了应用这一技术需注意的要点。

溶剂微技术已应用于 Escherichia coli 的碱性磷酸酶、谷氨酸脱氢酶、酵母无机焦磷酸酶、兔肌肌酸激酶、鸽子肝苹果酸酶、 β -羟甲基谷氨酰-CoA 还原酶、线粒体 F-1ATP 酶、大豆 β -糖化酶、牛脑己糖激酶、L-苯丙氨酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等研究。

单底物、单产物只形成一种中间物的快平衡系统中 pH 值的影响,有以下几种情形。

A 所有形式的 E 都与 S 结合,只有 HES 才能形成产物

各种离子,即质子化的酶品种以 H_2E , HE 和 E 表示,而不考虑其净电荷(实际上需要以 H_2E^{2+} , HE^+ 和 HE 和 E^- 等表示),假设底物不变,为 S,产物为 P



假设只有 HES 具有催化活性,根据对称性原则

$$\begin{cases} \beta K_s \cdot K_{ES_2} = K_{E_2} \cdot K_s \\ \alpha K_s \cdot K_{E_1} = K_{ES_1} \cdot K_s \end{cases}$$

假设去质子或加入质子的步骤与催化过程相比速度极快,因而所有的 H^+ 步骤达到平衡,再假设其余步骤达到准平衡,而催化步骤为限速步骤,所以

$$v_i = k_p [HES]$$

两边同除以总酶浓度 $[E_t]$:

$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{k_p [HES]}{[H_2E] + [HE] + [E] + [H_2ES] + [HES] + [ES]}$$

由各种平衡定义将各种酶品种转换成 HE 形式,分子分母同除以 $[HE]$,由于

$$V_{\max} = k_p [E_t]$$

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[H^+][S]}{K_{E_1} \cdot \alpha K_s} + \frac{K_{E_2}[S]}{[H^+]\beta K_s}}$$

式中 $K_{E_1} = \frac{[HE][H^+]}{[H_2E]}, K_{E_2} = \frac{[E][H^+]}{[HE]}, K_{ES_1} = \frac{[HES][H^+]}{[H_2ES]}$

$$K_{ES_2} = \frac{[ES][H^+]}{[HES]}, K_s = \frac{[HE][S]}{[HES]}, \alpha K_s = \frac{[H_2E][S]}{[H_2ES]}$$

$$\beta K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

由于 $\alpha = \frac{K_{ES}}{K_{E_1}} \quad \beta = \frac{K_{E_2}}{K_{ES_2}}$

故
$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S][H^+]}{K_s \cdot K_{ES_1}} + \frac{[S]K_{ES_1}}{K_s[H^+]}}$$

分子分母同乘以 K_{ES_2}

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_s \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right) + [S] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES}} + \frac{K_{ES_2}}{[H^+]} \right)}$$

或
$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{1}{\frac{K_E}{[S]} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right) + \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES}} + \frac{K_{ES_2}}{[H^+]} \right)}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES_1}} + \frac{K_{ES_2}}{[H^+]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \cdot \frac{K_s}{[S]} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_E} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right)$$

溶液 pH 值固定,测定的动力学参数为:

$$V_{\max,app} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES_1}} + \frac{K_{ES_2}}{[H^+]} \right)}$$

$$K_{p,app} = \frac{K_s \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES_1}} + \frac{K_{ES_2}}{[H^+]} \right)}$$

$$\left(\frac{K_{s,app}}{V_{max,app}}\right) = \frac{K_s}{V_{max}} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_E} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]}\right)$$

所以

$$\frac{v}{V_{max,app}} = \frac{1}{\frac{K_{s,app}}{[S]} + 1}$$

为求出酸解离常数,在一定 pH 值范围内 $V_{max,app}$ 和 $K_{s,app}$ 作图可得到 K_{ES_1} , K_{ES_2} , K_E 和 K_{E_2} , 以及不依赖 pH 值的参数 V_{max} 和 K_s 。

式 $V_{max,app}$ 在酸性范围内,上述关系式中 $\frac{K_{ES_2}}{[H^+]}$ 一项可以忽略,因此

$$V_{max,app} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES_1}}\right) = V_{max}$$

$$V_{max,app} + V_{max,app} \frac{[H^+]}{K_{ES_1}} = V_{max}$$

$$\therefore V_{max,app} = V_{max} - V_{max,app} \frac{[H^+]}{K_{ES_1}}$$

以 $V_{max,app}$ 对 $V_{max,app} \cdot [H^+]$ 作图,纵截为 V_{max} ,斜率为 $-\frac{1}{K_{ES_1}}$ (见图 2-28)。

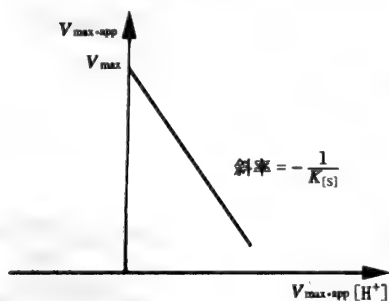


图 2-28 酸性范围内 $V_{max,app} - V_{max,app} \cdot [H^+]$

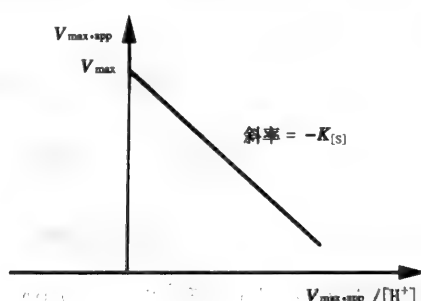


图 2-29 碱性范围内 $V_{max,app} - V_{max,app} / [H^+]$

同样,在碱性范围内,上述关系式中 $\frac{[H^+]}{K_{ES}}$ 可忽略:

$$V_{max,app} + V_{max,app} \frac{K_{ES_3}}{[H^+]} = V_{max}$$

$$V_{max,app} = V_{max} - V_{max,app} \frac{K_{ES_3}}{[H^+]}$$

作图(见图 2-29)可得 K_{ES_2} 和 V_{max} 。

类似地推导,可得

$$\frac{K_{s,app}}{V_{max,app}} = \frac{K_s}{V_{max}} + \frac{K_s [H^+]}{V_{max} K_E} + \frac{K_s}{V_{max}} \cdot \frac{K_{E_2}}{[H^+]}$$

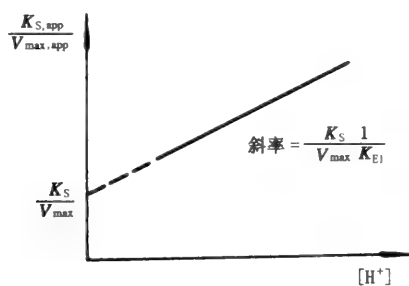
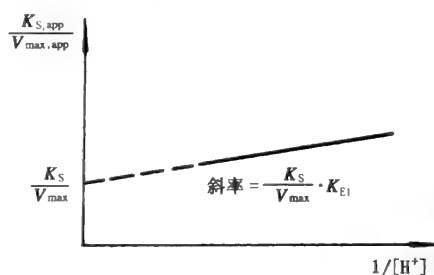
在酸性条件下, $\frac{K_{E_2}}{[H^+]}$ 很小

所以

$$\frac{K_{s,app}}{V_{max,app}} = \frac{K_s}{V_{max}} + \frac{K_s [H^+]}{V_{max} K_E}$$

以 $\frac{K_{s,app}}{V_{max,app}} \left(\frac{1}{v} - \frac{1}{[S]}\right)$ 对 $[H^+]$ 作图,斜率为 $\frac{K_s}{V_{max}} \cdot \frac{1}{K_E}$, y 轴截距为 $\frac{K_s}{V_{max}}$, 这样就得出 K_{E_1}

(见图 2-30)。

图 2-30 酸性条件下 $\frac{K_{S,app}}{V_{max,app}} - [H^+]$ 图 2-31 碱性条件下 $\frac{K_{S,app}}{V_{max,app}} - \frac{1}{[H^+]}$

在碱性条件下 $\frac{[H^+]}{K_{E1}}$ 很小,

$$\frac{K_{S,app}}{V_{max,app}} = \frac{K_S}{V_{max}} + \frac{K_S}{V_{max}} \cdot K_{E2} \cdot \frac{1}{[H^+]}$$

以 $\frac{K_{S,app}}{V_{max,app}}$ 对 $\frac{1}{[H^+]}$ 作图, 得到 K_{E2} (见图 2-31)。

Dixon-Webb 作图本质上是双对数作图, 在低 pH 值下, $\frac{K_{ES2}}{[H^+]}$ 可以忽略, 并可满足 $\frac{[H^+]}{K_{ES1}} \gg 1$, 故 1 也可忽略:

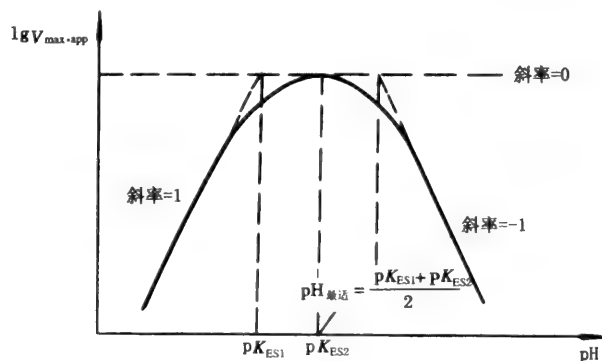
$$\lg V_{max,app} = \lg V_{max} - \lg\left(\frac{[H^+]}{K_{ES1}}\right) = \lg V_{max} + \text{pH} - \text{p}K_{ES}$$

即

$$\lg\left(\frac{V_{max,app}}{V_{max}}\right) = \text{pH} - \text{p}K_{ES}$$

因此, 以 $\lg V_{max,app}$ 对 pH 作图(图 2-32) pH 为酸性时, 斜率为 1, 当 $V_{max,app} = V_{max}$ 时, $\lg \frac{V_{max,app}}{V_{max}} = 0$, $\text{pH} = \text{p}K_{ES}$, 斜率为零的线与斜率为 1 的线交点即为 $\text{p}K_{ES1}$, 在高 pH 值下, $[H^+]/K_{ES}$ 可忽略, $V_{max,app} = \frac{V_{max}}{K_{ES}/[H^+]}$

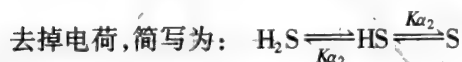
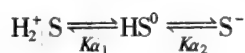
$$\begin{aligned} \text{所以 } \lg V_{max,app} &= \lg V_{max} - \lg \frac{K_{ES2}}{[H^+]} \\ &= \lg V_{max} - (\lg K_{ES2} - \lg [H^+]) \\ &= \lg V_{max} + \text{p}K_{ES2} - \text{pH} \end{aligned}$$

图 2-32 $\lg V_{max,app} - \text{pH}$ 图

斜率为零的线与斜率为 -1 的线相交得到 pK_{ES_2} 。同样,以 $\lg\left(\frac{K_{s,app}}{V_{max,app}}\right)$ 对 pH 作图,以及 $\lg V_{max,app}$ 对 pH 作图,分别得到 K_{E_1} 、 K_E 和 K_{ES_1} 、 K_{ES_2} (图 2-32)。

B 底物 S 解离, HS 为有活性的底物

如果底物也发生解离,对于几个解离形式的底物而言,真正的底物可能是其中的一种或更多,可以推导出类似的动力学关系式。当讨论金属效果时,这一点将更加清楚。所以,底物 S 与酶以相同的方式解离,即



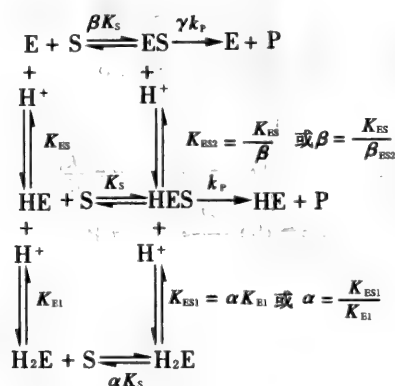
$$[S_t] = [H_2S] + [HS] + [S]$$

假设只有 HS 品种的底物有活性,则式(6-11)变为:

$$\frac{v_f}{V_{max}^f} = \frac{[S_t] \left/ \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{\alpha_1}} + \frac{K_{\alpha_2}}{[H^+]} \right) \right.}{K_s \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right) + S_t \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES_1}} + \frac{K_{ES_2}}{[H^+]} \right) \left/ \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{\alpha_1}} + \frac{K_{\alpha_2}}{[H^+]} \right) \right.}$$

C 所有形式的 E 都与 S 结合,但只有 HES 和 ES 可形成产物

对于单底物系统



由对称性规则得 $\begin{cases} \beta K_s \cdot K_{ES_2} = K_{E_2} \cdot K_s \\ \alpha K_s \cdot K_{E_1} = K_{ES_1} \cdot K_s \end{cases}$

初速度方程式为
$$\frac{v_f}{[E_t]} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_s} + \gamma \cdot k_p \cdot \frac{[S] K_{ES_2}}{K_s \cdot [H^+]}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} + \frac{[S][H^+]}{K_s \cdot K_{E_1}} + \frac{[S] K_{ES_2}}{K_s [H^+]}}$$

由于 $V_{max} = k_p [E_t]$

所以
$$\frac{v_f}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right) \left/ \left(1 + \frac{\gamma K_{ES_2}}{[H^+]} \right) \right. + [S] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{ES_2}}{[H^+]} \right) \left/ \left(1 + \frac{\gamma K_{ES_2}}{[H^+]} \right) \right.}$$

定义
$$V_{max,app} = \frac{V_{max} \left(1 + \frac{\gamma K_{ES_2}}{[H^+]} \right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{ES_2}}{[H^+]} \right)}$$

以 $V_{max,app}$ 对 pH 作图,当 $\gamma > 1$ 时,如果相继的两个 pK 值相差 3.5 个 pH 值以上,曲线将有两个

平衡段(见图 2-33(a)),这一类型中的 ES 比 HES 更有催化活性,如果 $\gamma < 1$ 则为图(2-33(b))所示的情形。

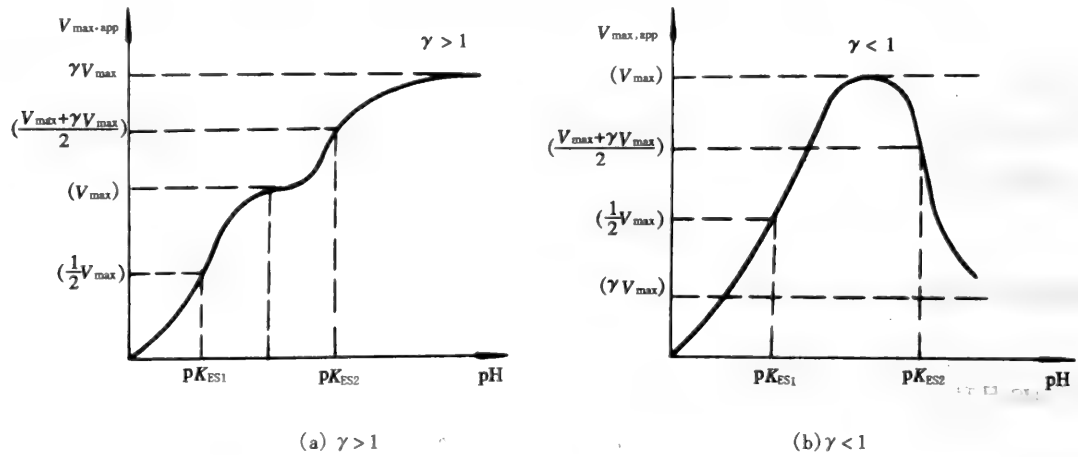
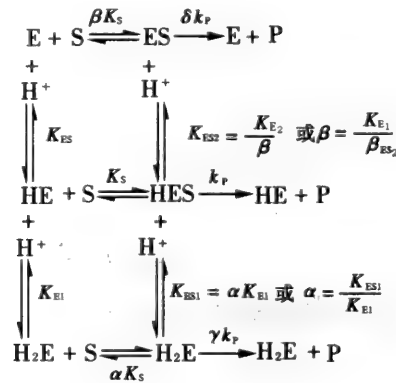


图 2-33 $V_{max,app} - pH$ 图

D 所有的形式的 E 都与 S 结合,所有形式的 ES 都可形成产物



正反应初速度方程为

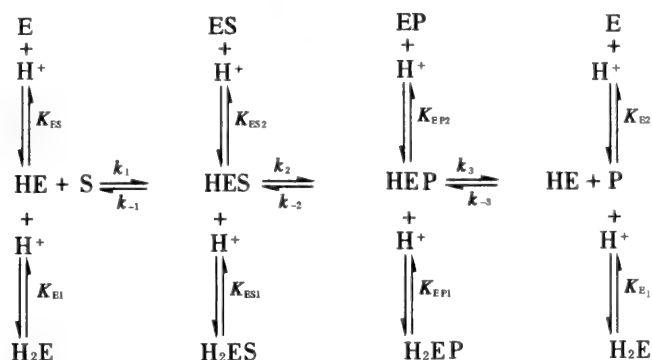
$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_s} + \frac{\gamma k_p [S][H^+]}{K_s \cdot K_{E_1}} + \frac{\delta k_p [S] K_{E_2}}{K_s [H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]}} + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S][H^+]}{K_s \cdot K_{E_1}} + \frac{[S] K_{E_2}}{K_s [H^+]}}$$

由于 $V_{max} = k_p [E_t]$, 所以

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s \left(1 + \frac{[H^+]}{K_E} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right) \left(1 + \frac{\gamma [H^+]}{K_{E_1}} + \frac{\delta K_{E_2}}{[H^+]} \right) + [S] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right) \left(1 + \frac{\gamma [H^+]}{K_{E_1}} + \frac{\delta K_{E_2}}{[H^+]} \right)}$$

E 系统 3 中增加 $ES \rightleftharpoons EP$ 一步

为简明起见,假设只有 HE 可以与 S 结合,但形成 HES 后,可以解离为 ES 和 H_2ES 。再假设 HES 可以产生 HEP,并可进一步解离为 EP 和 H_2EP ,但只有 HEP 可以释放产物 P。



在稳态条件下,如果酶促反应不受 $[H^+]$ 影响,速度方程为

$$\frac{v}{[E_0]} = \frac{k_1 k_2 k_3 [S] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} [P]}{(k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3) + k_1 [S] (k_2 + k_{-2} + k_3) + k_{-3} [P] (k_{-1} + k_2 + k_{-2})}$$

对于受 $[H^+]$ 影响的初速度方程(如上图),在稳态条件下可得到($P=0$)

$$\frac{v}{[E_t]} = \frac{k_1 k_2 k_3 [S]}{(k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right) + k_1 [S] \left[(k_{-2} + k_3) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{ES_1}} + \frac{K_{ES_2}}{[H^+]} \right) + k_2 \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{EP_1}} + \frac{K_{EP_2}}{[H^+]} \right) \right]}$$

$$\text{所以 } V_{\max, \text{app}} = \frac{k_2 k_3 [E_t]}{(k_{-2} + k_3) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right) + k_2 \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{EP_1}} + \frac{K_{EP_2}}{[H^+]} \right)}$$

$$\frac{V_{\max, \text{app}}}{K_{m, \text{app}}} = \frac{k_1 k_2 k_3 [E_t]}{(k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right)}$$

$$K_{m, \text{app}} = \frac{(k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right)}{k_1 (k_{-2} + k_3) \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{E_1}} + \frac{K_{E_2}}{[H^+]} \right) + k_2 \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{EP_1}} + \frac{K_{EP_2}}{[H^+]} \right)}$$

Ottolenghi 推导出了当稳态系统中所有的 E 都能与 S 结合,所有形式的 ES 都能形成相应形式的 EP,并且都可释放产物。反应系统中涉及两个质子的平衡,而这一动力学速度方程极其复杂,分母有 117 项之多。所以,为了理解所测得的 pK_2 ,即识别特定的解离基团,由温度效应或点专一性 (site-specific) 试剂估计的解离热焓 ΔH 是有意义的。

2.4.2 温度对酶作用的影响

温度对酶催化反应的影响,由于其复杂性,实际上至今还未完全搞清。一般来说,温度主要影响酶的稳定性,酶蛋白的热变性;影响最大反应速度,即影响 k_2 ;影响酶和底物的结合,即影响 K_s 或 k_1 和 k_{-1} ;影响酶和抑制剂、激活剂或辅酶的结合;影响酶和底物分子中某些解离基团的 pK 值;其他还影响缓冲液的 pH 值或某些气体的溶解度等。我们现在所理解的温度效应大部分基于经典动力学中容易接受的那些理论。

所谓酶的最适温度其实不是酶的特征性物理常数,当

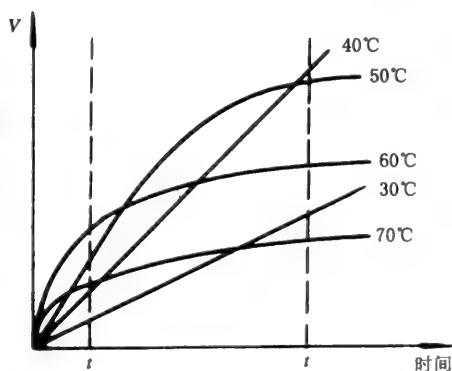


图 2-34 酶促反应最适温度示意图

温度提高时,除反应速度也随之增加外,酶蛋白变性而失去活力的速度也迅速增加。所谓最适温度实际上是这两种因素综合影响的结果。取得反应速度读数的时间间隔愈短,所求得的最适温度似乎也愈高,如图 2-34 所示。在 t_2 求得的最适温度为 40°C ,而在 t_1 求得的最适温度为 60°C 。

除在工业上使用酶作为催化剂进行某一化学反应时,测定所谓最适温度有其实际意义外,其余的所谓最适温度不是常数,也没有任何物理意义。

2.4.2.1 温度对反应速度的影响

根据绝对反应速度理论

$$k = \frac{K_B T}{h} K^\ddagger$$

式中 k ——反应速度常数;

K_B ——Boltzman 常数;

h ——Planck 常数;

T ——绝对温度;

K^\ddagger ——反应物与活化络合物之间的平衡常数。

其热力学关系有

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger = -RT \ln K^\ddagger$$

式中 ΔG^\ddagger ——活化自由能;

ΔS^\ddagger ——活化熵;

ΔH^\ddagger ——活化焓。

将式(6-65)代入式(6-64):

$$k = \frac{K_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} = \frac{K_B T}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}}$$

在温度变化范围不太大时, ΔS^\ddagger 为常数,先将上式两边取对数,再对 T 微分:

$$\begin{aligned} \ln k &= \ln\left(\frac{K_B T}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \\ \frac{d \ln k}{dT} &= \frac{\Delta H^\ddagger}{RT^2} + \frac{1}{T} = \frac{\Delta H^\ddagger + RT}{RT^2} \end{aligned}$$

与 Arrhenius 经验方程比较:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2}$$

式中 E_a ——反应的活化能。

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT$$

方程式可改写为:

$$d \lg k = -\frac{\Delta H^\ddagger + RT}{2.303R} d\left(\frac{1}{T}\right)$$

如将 $\lg k$ 对 $\frac{1}{T}$ 作图,应该得到直线,见图为 2-35。其斜率为 $-(\Delta H^\ddagger + RT)/2.303R$, E_a 和 ΔH^\ddagger 的值即可以计算求得。

应该指出,用以上方法作图求 E_a 时,反应速度可以任意单位表示,因为反应速度单位不同,只影响图 2-35 中直线的位置,而不影响其斜率。用以上方法测定酶反应活化能数值时,应该特别注意的是式中 k 为反应速度常数,而根据 $v = k_2[E_0]$,仅在反应速度为最大时, k_2 才与 v 成正

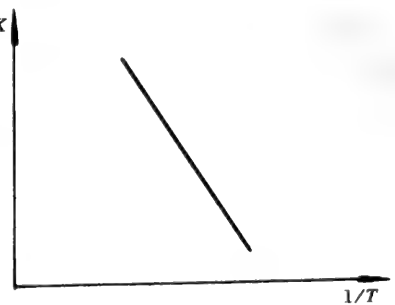


图 2-35 $\lg k$ 对 $1/T$ 作图以测量 E_a 和 $\Delta H^\ddagger + v^\ddagger$

比,所以可用 $\lg v$ 作图。各种酶反应的活化能数值,可查阅有关书刊。

2.4.2.2 求解离基团的 ΔH^0

由 Van't Hoff 方程:

$$\frac{d\ln(K)}{dT} = \left(\frac{\Delta H_{\text{解离}}^0}{RT^2} \right)$$

积分可得

$$2.303(\text{p}K_{a_1} - \text{p}K_{a_2}) = \left(\frac{\Delta H_{\text{解离}}^0}{R} \right) \left(\frac{T_2 - T_1}{T_1 \cdot T_2} \right)$$

由式(2-73)可以估计标准解离热焓。式中 K_a 为基团解离常数, R 为气体常数, T 为绝对温度, $\Delta G_{\text{解离}}^0$ 和 $\Delta S_{\text{解离}}^0$ (标准自由能和解离熵) 可由下式求得:

$$\Delta G_{\text{解离}}^0 = -RT \ln KT, \Delta S_{\text{解离}}^0 = \frac{1}{T} (\Delta H_{\text{解离}}^0 - \Delta G_{\text{解离}}^0)$$

表 2-4 列出了参与酶催化过程的解离基团的一些性质。

表 2-4 活化部位解离基团的性质

解离基团	$\text{p}K_a^- (25^\circ\text{C})$	$\Delta H_{\text{解离}} (kJ/mol)$
$\alpha - \text{COO}^-$	3.0~6.2	± 6.28
β 或 $\gamma - \text{COO}^-$	3.0~5.0	± 6.28
咪唑基	5.5~7.0	28.89~31.4
$\alpha - \text{NH}_3^+$	7.5~8.5	41.87~54.43
$\epsilon - \text{NH}_3^+$	9.4~10.6	27.2~29.3
-SH	8.0~8.5	25.12
酚羟基	9.8~10.5	50.24~54.43
胍基	11.6~12.6	

表 2-4 中的解离常数由于受微环境的影响,实际上测出的是表现解离常数(不是微观解离常数)。

前已提及,用 pH 对 V_{max} 和 K_m 的影响求得的 $\text{p}K_a$ 值,由于各种因素的影响,需用解离热焓 $\Delta H_{\text{解离}}^0$ 进行校对,但系统的 pH 要求精确到 0.02 个 pH 值,否则得不到较准确的动力学数据。

此外,溶液中酶的结构性质有时还可以从一定的 pH 和温度下的失活动力学进行研究,可以得到很有价值的资料。可参见有关人体肌酸激酶失活动力学的报道。

2.5 酶作用于多底物时的动力学

多底物反应是指两个或两个以上的底物所参与的反应,其动力学研究是一相当复杂的课题。这一节仅限于双底物反应作简要的讨论,包括双底物反应分类,推导动力学方程,分析实验数据及判断作用机制。

2.5.1 酶促反应按底物数分类

表 2-5 将 IUB-EC 所分成的六大类酶反应,按底物的多少予以对应分类。从表中可见,真正的单底物反应只有异构反应(包括变位酶、消旋酶在内的异构酶所催化的反应),只占总酶促反应的 5%,即使将单向的单底物反应(裂合酶反应)计算在内,也不超过 20%,而双底物反应占大多数,其中水解反应是双底物反应,但由于水的浓度在动力学中往往被看作是恒定的常数,而且是饱和的,故水就不作为一个在动力学上有意义的底物。实验证明:水解反应的动力学往往符合单底物反应

的动力学。同理,一些有水参加的裂合酶,如碳酸酐酶、延胡索酸酶等催化的反应也可看作是单底物单产物的反应。剩下的双底物反应中就以转移反应占绝大多数,因为氧化还原反应是转移电子或氢原子的反应,所以可看作是转移反应的一种。因此,双底物反应主要是转移反应,占总酶促反应的 50% 左右。

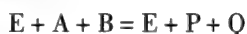
由此可知,单底物动力学只适用于表 2-5 中 1,3 类反应,以及第二类中的正向反应(如 B + C 中有一个产物是水,则也适用于逆向反应)。

表 2-5 酶促反应按底物数的分类

底物数	酶分类	催化反应	酶种类占总酶(%)
1. 单底物	异构酶	$A \rightleftharpoons B$	5
2. 单向单底物	裂合酶	$A \rightleftharpoons B + C$	12
3. 假单底物	水解酶	$A - B + H_2O \rightleftharpoons A - OH + BH$	26
4. 双底物	氧化还原酶	$AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$ $A^{2+} + B^{3+} \rightleftharpoons A^{3+} + B^{2+}$	27
	基团转移酶	$A + B_x \rightleftharpoons A_x + B$	
5. 三底物	连接酶	$A + B + ATP \rightleftharpoons AB + ADP + P_i$	24
		$A + B + ATP \rightleftharpoons AE + AMP + PP_i$	5

2.5.2 多底物反应动力学分类

双底物(BiBi)、双产物(BiBi)反应通式为



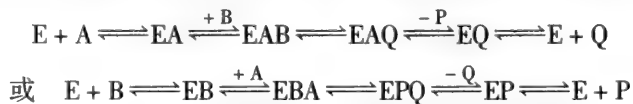
考虑酶与底物是否形式三元络合物,将酶分为两大类。

A 反应过程中形成三元络合物

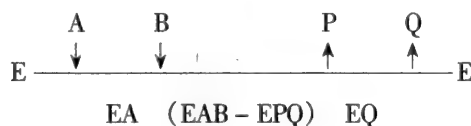


按酶与底物结合的顺序问题,进一步分为两种机制。

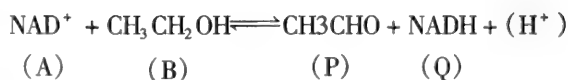
(1) 序列有序机制(Compulsory - Order Mechanism) 两种底物按一定顺序与酶结合,只有当第一个底物与酶结合后,第二个底物才结合上去,产物 P 和 Q 释放也按一定顺序进行:



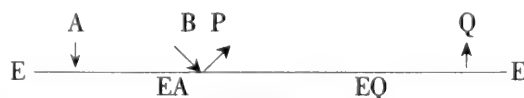
用图表示:



马肝中的醇脱氢酶反应:

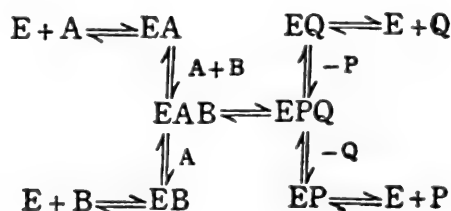


称为 Theorell-Chance 机制。

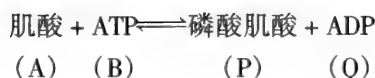


三元络合物 EAB 转变成 EPQ 的速度极快,这是一种特殊的序列有序机制。

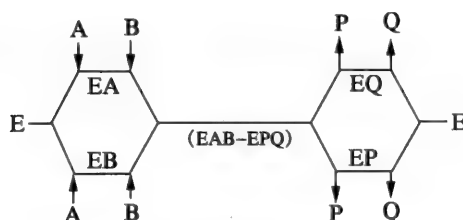
(2) 序列随机机制(Random-Order Mechanism) 两种底物不按一定的顺序与酶结合,产物也为随机释放:



如肌酸激酶催化的反应:

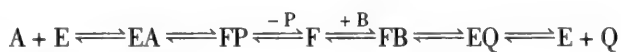


用图①表示

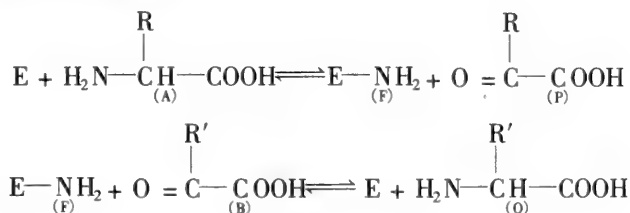


B 反应过程中不形成三元络合物

乒乓机制(Ping-Pong Mechanism)酶首先与一个底物结合,释放一个产物,再与另一底物结合,再释放出产物,即底物和产物交替地与酶结合或从酶释放。好像打乒乓一样一来一去。反应过程中无三元络合物形成:



如需要 PLP 为辅因子的转氨酶反应:



用图②表示:



2.5.3 Cleland 命名和表示法

1963年 Cleland 建立多底物、多产物系统的酶动力学用一套统一的命名方法和表示历程的原则,以双底物、双产物为例介绍下。

A 底物按与酶结合的次序,分别以 A, B, C, D 等表示

产物按它们脱离酶的次序,分别用 P, Q, R, S 等表示,抑制剂用 I 表示。

B 稳定状态中间物(包括自由酶)用 E, F, G 等表示

非中心复合物(又称过渡态复合物)指酶的活性中心没有被配基完全占据,如雌二醇 17β -脱

① 称 Cleland 表示法。

② 称 cleland 表示法。

氢酶中 E^{NAD^+} 或 $E^{NAD^{+1}}$ 分别以 EA, EB, EP, EQ 等表示。

中心复合物是指活性中心、完全被配基结合, 如 $E_{酶-醇}^{NAD}$ 或 $E_{酶-酮}^{NADH}$, 用外加括号的 (EAB)、(EPQ) 等代表。恒态动力学只假定存在一个中心复合物, 故以 (EAB - EPQ) 或 (EA - EP) 表示其异构化作用。

C 动力学上有意义的以应物或产物数目以单 (Uni)、双 (Bi)、三 (Ter)、四 (Quad) 等表示

如双底物、双产物的序列有序机制为 Ordered Bi Bi, 序列随机为 Random Bi Bi、乒乓反应为 Ping-Pong Bi Bi (实际为 Ping Pong Uni Uni Uni Uni)。

D 除随机机制外, 酶促反应历程用一直线表示

线上向下的箭头代表与酶结合的底物, 向上的箭头为从酶释放的产物。酶结合底物或释放产物的各种形式在线下表示。随机机制以菱形图线表示。三种双底物、双产物反应的历程 cleland 表示法见 4.3。

2.5.4 双底物反应恒态动力学

2.5.4.1 Alberty 表达式

A Alberty 一般速度方程

许多双底物酶促反应在固定一个底物浓度而改变另一底物浓度时都服从米氏方程。米氏方程适用于对于底物分子只有一个结合位点的酶催化反应。如果结合位点间无相互作用, 也适用于对底物有多个结合位点的酶。对这些反应, 在总酶浓度固定并远低于两个底物浓度时 Alberty 推导的一般式:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [A_0] [B_0]}{K_m^B [A_0] + K_m^A [B_0] + [A_0] [B_0] + K_2^A \cdot K_m^B}$$

式中 V_{\max} ——A、B 都饱和时的最大初速度;

K_m^A ——B 饱和时 $v_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$ 的 A 的浓度;

K_m^B ——A 饱和时 $v_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$ 的 B 的浓度;

K_2^A —— $E + A \rightleftharpoons EA$ 的解离常数。

在 $[B_0]$ 很高时简化为:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [A_0]}{[A_0] + K_m^A} \text{ (即米氏方程)}$$

类似的, 高 $[A_0]$ 时:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [B_0]}{[B_0] + K_m^B}$$

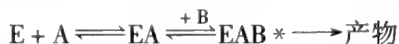
当 $[B_0]$ 固定而未饱和

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot K_1 [A_0]}{[A_0] + K_2} \text{ (也为米氏方程的一种形式)}$$

$$K_1 = \frac{[B_0]}{K_m^B + [B_0]} \quad K_2 = \frac{K_S^A K_m^B + K_m^A [B_0]}{K_m^B + [B_0]}$$

当 $[A_0]$ 固定而未饱和, 也可得到类似的表达式。

以序列有序反应讨论混合常数的 $K_S^A \cdot K_m^B$, 而不是 $K_m^A \cdot K_m^B$



当 $[B_0] \rightarrow 0$ 时, EA 与 B 形成的 EAB 极少。因此, $E + A \rightleftharpoons EA$ 接近于平衡态, $K_m^A \rightarrow K_S^A$, 与 Alberty 方程一致, 因为在 $[B_0]$ 很低且固定时,

$$K_1 \approx \frac{[B_0]}{K_m^B} \quad K_2 \approx \frac{K_S^A \cdot (K_m^B)}{(K_m^B)} = K_S^A$$

所以
$$v_0 = \frac{V_{\max} [B_0] [A_0]}{K_m^B ([A_0] + K_S^A)}$$
 式中为 K_S^A 而不是 K_m^A

B 先结合的序列有序机制,一般式中以 $K_S^B \cdot K_m^A$ 代替 $K_S^A \cdot K_m^B$,而序列随机机制可证明 $K_S^B \cdot K_m^A$ 或 $K_S^A \cdot K_m^B$ 都适用。

形成三元络合物的序列有序或序列随机反应,尤其是当限速步骤为 $EAB \rightleftharpoons EPQ$ 时,服从 Al-berty 一般速度方程。与单底物反应类似,米氏方程中 $ES \rightarrow EP$ 为限速步骤。序列随机中除三元络合物的互相转变外,所有的步骤都非常快速的反应,有时称为随机快平衡双双机制。

乒乓双双机制在初速度范围内释放的产物 P 浓度极低,逆过程可忽略,故 $K_S^A = 0$,因此 $K_S^A \cdot K_m^B = 0$ 。

$$v_0 = \frac{V_{\max} [A_0] [B_0]}{K_m^B [A_0] + K_m^A [B_0] + [A_0] [B_0]}$$

速度方程更为简化。

B 一次作图法

服从 Al-berty 一般速度方程的双底物反应,当固定一个底物浓度而改变另一底物浓度时也遵守米氏方程。因此,相应的双倒数作图也为线性。这种一次作图法有两种类型:酶完全饱和或几乎半饱和(half-saturating),结果如图 2-36 所示。

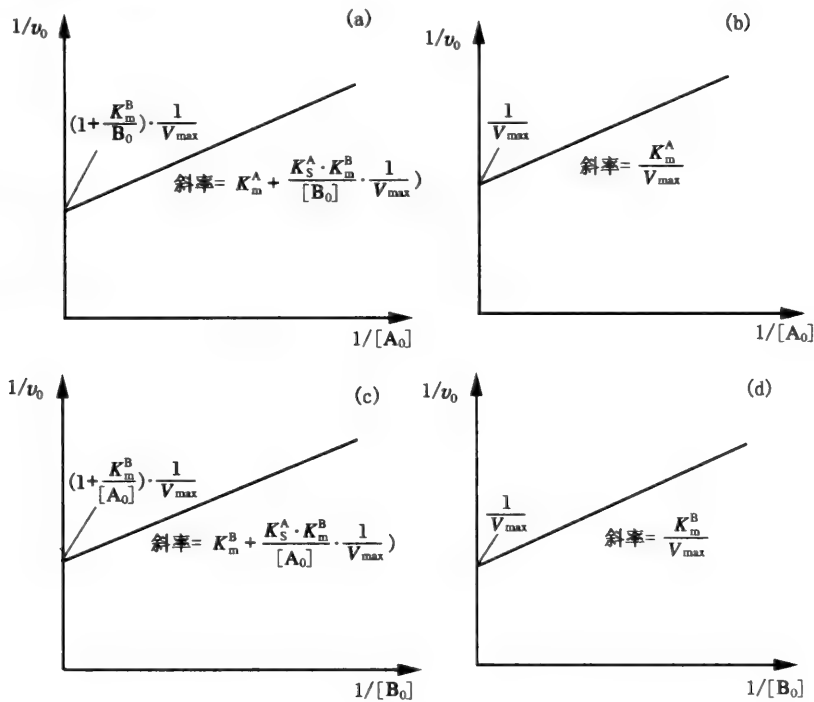


图 2-36 Al-berty 速度方程一次作图法

- (a) $[B_0]$ 固定并 $\approx K_m^B$ 时 $\frac{1}{v_0} - \frac{1}{[A_0]}$ 作图;
- (b) $[B_0]$ 饱和(即 A 为准单底物), $\frac{1}{v_0} - \frac{1}{[A_0]}$ 作图;
- (c) $[A_0]$ 固定并 $\approx K_m^A$ 时 $\frac{1}{v_0} - \frac{1}{[B_0]}$ 作图;
- (d) $[A_0]$ 饱和(即 B 为准单底物), $\frac{1}{v_0} - \frac{1}{[B_0]}$ 作图;

2.5.4.2 Dalziel 表达式

A Dalziel 一般速度方程

1957 年 Dalziel 推导了双底物的一般方程式为:

$$\frac{[E_0]}{v_0} = \phi_0 + \frac{\phi_A}{[A_0]} + \frac{\phi_B}{[B_0]} + \frac{\phi_{AB}}{[A_0][B_0]}$$

ϕ 为动力学系数,可用一次或二次作图法求得。方法如下:在一系列固定的,但不同的 $[B_0]$ 浓度下,以 $\frac{[E_0]}{v_0} - \frac{1}{[A_0]}$ 作图,得到斜率和截距,再二次作图,即可得到所需要的 $\phi_0, \phi_A, \phi_B, \phi_{AB}$ 值(图 2-37)。也可用在一系列固定但不同 $[A_0]$ 浓度下,以 $\frac{[E_0]}{v_0} - \frac{1}{[B_0]}$ 作图,得到同样结果。

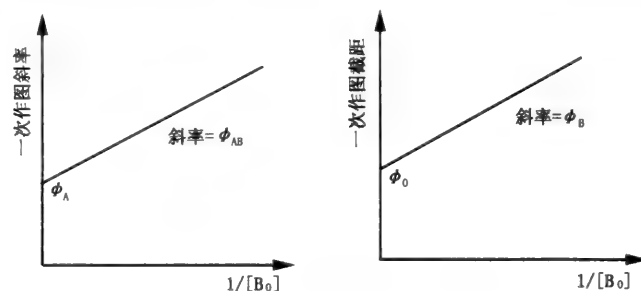
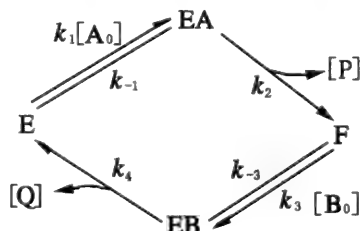


图 2-37 两次作图法求 Dalziel 动力学常数

Dalziel 方程可以转化为 Alberty 方程,并可求得相应的常数关系。因此,Alberty 方程中 V_{max} 等于 Dalziel 方程 $\frac{[E_0]}{\phi_0}$ 而 $K_m^A = \frac{\phi_A}{\phi_0}, K_m^B = \frac{\phi_B}{\phi_0}, K_s = \frac{\phi_{AB}}{\phi_B}$

B 速度常数及 Alberty 和 Dalziel 常数

Alberty 一般速度方程与米氏方程形式非常相似,故对双底物动力学入门非常有利,但 Dalziel 方程对酶动力学家来说更有价值。当然,一般速度方程中的动力学常数是反应过程中每一步速度常数的函数。对一个具体的双底物机制而言,都可计算出其动力学常数。一般 Dalziel 方程比 Alberty 方程中常数形式更为形象、直接,一目了然。以稳态乒乓双双机制为例,用 King-Altman 法推导的速度方程为:



$$\text{Dalziel 形式: } \frac{[E_0]}{v_0} = \frac{k_2 + k_4}{k_2 k_4} + \frac{k_{-1} k_2}{k_1 k_2} \cdot \frac{1}{[A_0]} + \frac{k_{-3} + k_4}{k_3 k_4} \cdot \frac{1}{[B_0]}$$

转化为 Alberty 形式:

$$v_0 = \frac{\left(\frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4} \right) [E_0] [A_0] [B_0]}{\frac{k_2}{k_3} \left(\frac{k_{-3} + k_4}{k_2 + k_4} \right) [A_0] + \frac{k_4}{k_1} \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_2 + k_4} \right) [B_0] + [A_0] [B_0]}$$

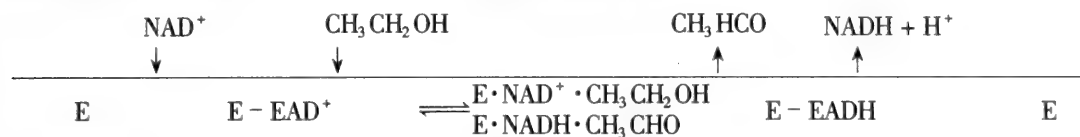
其他作用机制的稳态动力学方程也可用 King-Altman 法推导出。

2.5.4.3 Cleland 表达式

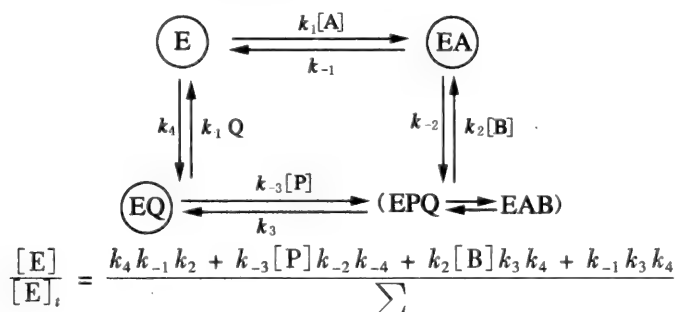
以有序双双机制为例:



需要 NAD^+ 或 NADP^+ 的脱氢酶的反应就属于这种类型。在这种情况下,辅因子像底物一样地起作用(作为底物 A),产生出 EA,EA 再与代谢物(底物 B)起作用,产生三元复合物 EAB, EAB 再进一步发生脱氢作用,生成脱氢的代谢物(产物 P)及接受了氢的辅因子(NADH 或 NADPH , 产物 Q)这两个产物和依次释放出来,先 P 后 Q。例如:醇脱氢酶



用 King-Altman 方法(见 4.4 节)可写成为:



$$\begin{aligned}
 \frac{[\text{EA}]}{[\text{E}]_t} &= \frac{k_4 k_1[\text{A}] k_{-2} + k_1[\text{A}] k_{-3}[\text{P}] k_{-2} + k_{-4}[\text{Q}] k_{-3}[\text{P}] k_{-2} + k_3 k_4 k_1[\text{A}]}{\sum} \frac{(\text{EAB} + \text{EPQ})}{[\text{E}]_t} \\
 &= \frac{k_4 k_1[\text{A}] k_2[\text{B}] + k_1[\text{A}] k_2[\text{B}] k_3[\text{P}] + k_{-4}[\text{Q}] k_3[\text{P}] k_2[\text{B}] + k_{-1} k_{-4}[\text{Q}] k_{-3}[\text{P}]}{\sum} \\
 \frac{[\text{EQ}]}{[\text{E}]_t} &= \frac{k_{-2} k_{-1} k_{-4}[\text{Q}] + k_1[\text{A}] k_2[\text{B}] k_3 + k_{-4}[\text{Q}] k_2[\text{B}] k_3 + k_{-1} k_{-4}[\text{Q}] k_3}{\sum}
 \end{aligned}$$

$$v = k_1[\text{E}][\text{A}] - k_{-1}[\text{EA}], \text{代入} [\text{E}], [\text{EA}],$$

整理得:

$$\begin{aligned}
 \frac{v}{[\text{E}]_t} &= \frac{k_1 k_2 k_3 k_4 [\text{A}][\text{B}] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-4} [\text{P}][\text{Q}]}{k_{-1} k_4 (k_{-2} + k_3) + k_1 k_4 (k_{-2} + k_3) [\text{A}] + k_2 k_3 k_4 [\text{B}] \\
 &\quad + k_{-1} k_{-2} k_{-3} [\text{P}] + k_{-4} k_{-1} (k_{-2} + k_3) [\text{Q}] + k_1 k_2 (k_3 + k_4) [\text{A}][\text{B}] \\
 &\quad + k_1 k_{-2} k_{-3} [\text{A}][\text{P}] + k_{-3} k_{-4} (k_{-1} + k_{-2}) [\text{P}][\text{Q}] + k_2 k_3 k_{-4} [\text{B}][\text{Q}] \\
 &\quad + k_1 k_2 k_{-3} [\text{A}][\text{B}][\text{P}] + k_2 k_{-3} k_{-4} [\text{B}][\text{P}][\text{Q}]}
 \end{aligned}$$

可以写成:

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{\text{num}_1[\text{A}][\text{B}] - \text{num}_2[\text{P}][\text{Q}]}{\text{const} + \text{coef}_A[\text{A}] + \text{coef}_B[\text{B}] + \text{coef}_P[\text{P}] + \text{coef}_Q[\text{Q}] \\
 &\quad + \text{coef}_{AB}[\text{A}][\text{B}] + \text{coef}_{AP}[\text{A}][\text{P}] + \text{coef}_{PQ}[\text{P}][\text{Q}] \\
 &\quad + \text{coef}_{BQ}[\text{B}][\text{Q}] + \text{coef}_{ABP}[\text{A}][\text{B}][\text{P}] + \text{coef}_{BPQ}[\text{B}][\text{P}][\text{Q}]}
 \end{aligned}$$

将上式分子和分母乘以 $(\text{num}_2)/(\text{coef}_{AB})(\text{coef}_{PQ})$, AB 分子项与 A, B, AB, ABP 分母项可直接定义动力学常数。PQ 分子项与 P, Q, PQ, BPQ 分母项乘以 $\text{num}_1/\text{num}_1$ 后可化为动力学常数(和 K_{eq})。AP 项乘以 $\text{num}_1/\text{num}_1$ 并以 $\text{coef}_P/K_{\text{IA}}$ 取代 coef_{AP} , 即可化简。BQ 项以 $\text{coef}_B/K_{\text{mA}}$ 取代 coef_{AB} 即为化简。分母常数项以 $\text{coef}_A/K_{\text{mB}}$ 可取代 coef_{AB} , 即可化简。用 K_{eq} 和动力学常数表示上面的动力学关系式, 为了简化起见, V_1 、 V 分别表示正逆最大速度。

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{V_1 V_2 ([\text{A}][\text{B}] - [\text{P}][\text{Q}]/K_{\text{eq}})}{V_2 K_{\text{IA}} K_{\text{mB}} + V_2 K_{\text{mB}} [\text{A}] + V_2 K_{\text{mA}} [\text{B}] + V_1 K_{\text{mQ}} [\text{P}]/K_{\text{eq}} \\
 &\quad + V_1 K_{\text{mP}} [\text{Q}]/K_{\text{eq}} + V_2 [\text{A}][\text{B}] + V_1 K_{\text{mQ}} [\text{A}][\text{P}]/K_{\text{eq}} K_{\text{IA}}}
 \end{aligned}$$

$$+ V_1 [P][Q]/K_{eq} + V_2 K_{mA} [B][Q]/K_{iQ} + V_2 [A][B][P]/K_{iP} \\ + V_1 [B][P][Q]/K_{iB} K_{eq}$$

式中动力学常数定义如下, 均用系数比值表示:

$$K_{mA} = \frac{coef_B}{coef_{AB}}, K_{mB} = \frac{coef_A}{coef_{AB}}, \\ K_{iA} = \frac{coef_P}{coef_{AP}} = \frac{coest}{coef_A} = \frac{k_{-1}}{k_1}, K_{iB} = \frac{coef_{PQ}}{coef_{BPQ}} \\ = \frac{k_{-1} + k_{-2}}{k_2}, K_{mP} = \frac{coef_Q}{coef_{PQ}}, K_{mQ} = \frac{coef_P}{coef_{PQ}}, \\ K_{iP} = \frac{coef_{AB}}{coef_{ABP}} = \frac{k_3 + k_4}{k_{-3}}, K_{iQ} = \frac{coef_B}{coef_{BQ}} \\ = \frac{const}{coef_Q} = \frac{k_4}{k_{-4}}, V_1 = \frac{num_1}{coef_{AB}}, V_2 = \frac{num_2}{coef_{PQ}}, \\ K_{eq} = \frac{num_1}{num_2}$$

这些定义根据的原则是 v 按其反应进行的方向, 分子是所有速度常数的乘积, 分母是包含所有反应物浓义乘积项的系数。 K_m 的分母和 v 的分母相同, 分子为分子分母消去注脚字母后, 留下分母的注脚字母, 即表示该底物的 K_m 值。用两个系数比值使得注脚字母消去后, 在分母系统注脚上剩下的一个字母, 即表示该字母代表的配基的抑制常数。在定义常数时, 要注意不使一个式子有两种以上的含义, 同时也可以发现抑制常数可以不止一种定义, 在可以有不止一种定义情况下, 有一些可以化为相同的表示, 有一些不易使速度方程化简, 因此要适当选择。

对于 Ordred *BiBi* 反应有 Haldane 方程

$$K_{eq} = \frac{V_1}{V_2} \frac{K_{iQ} K_{mP}}{K_{iA} K_{mB}}$$

为了获得逆反应速度方程, 我们可将分子分母均乘以 K_{eq}/V_1 , 可得

$$v = \frac{V_2 ([P][Q] - [A][B]K_{eq})}{\frac{V_2 K_{iA} K_{mB} K_{eq}}{V_1} + \dots}$$

从上式分母常数项我们即可得到 Haldane 方程

$$\frac{V_2 K_{iA} K_{mB} K_{eq}}{V_1} = \frac{(num_2)}{(coef_{PQ})} \frac{(const)}{(coef_A)} \frac{(coef_A)}{(coef_{AB})} \frac{(num_1)}{(num_2)} \frac{(coef_{AB})}{(num_1)} \\ = \frac{(const)}{(coef_{PQ})} = \frac{(const) K_{mP}}{(coef_Q)} = K_{iQ} K_{mP}$$

所以

$$K_{eq} = \frac{V_1}{V_2} \frac{K_{iQ} K_{mP}}{K_{iA} K_{mB}}$$

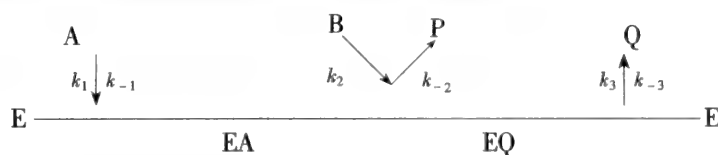
用 Haldane 方程可以消去 V_2 , 速度方程可表达为

$$v = \frac{V_1 ([A][B] - [P][Q]/K_{eq})}{K_{iA} K_{mB} + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + \frac{K_{mB} K_{mQ}}{K_{mP} K_{iQ}} [A][P]} + \frac{K_{mB} K_{iA}}{K_{mP} K_{iQ}} [P][Q] \\ + \frac{K_{mB} K_{iA}}{K_{mP} K_{iQ} K_{iB}} [B][P][Q] + \frac{1}{K_{iP}} [A][B][P] + \frac{K_{mA}}{K_{iQ}} [B][Q] \\ + \frac{K_{mQ} K_{mB} K_{iA}}{K_{mP} K_{iQ}} [P] + \frac{K_{mB} K_{iA}}{K_{iQ}} [Q] + [A][B]$$

如果是测定初速度, 上式可化简为

$$v = \frac{V_1 [A][B]}{K_{iA} K_{mB} + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]}$$

又如:有序双双机制中的马肝醇脱氢酶(Theorell-chance 机制)



King-Altman 法(见 2.2 节)推导速度方程

$$v = \frac{(k_1 k_2 k_3 [A][B] - k_{-1} k_{-2} k_{-3} [P][Q])[E_0]}{k_{-1} k_3 + k_1 k_3 [A] + k_2 k_3 [B] + k_{-1} k_{-2} [P] + k_{-1} k_{-3} [Q] + k_1 k_2 [A][B] + k_1 k_{-2} [A][P] + k_2 k_{-3} [B][Q] + k_{-2} k_{-3} [P][Q]}$$

用 Cleland 系数变换规则可将速度数的动力学关系式转化成可以测定的恒态动力学常数表达的方程

$$v = \frac{V_{\max f} \cdot V_{\max r} \left([A][B] - \frac{[P][Q]}{K_{\text{eq}}} \right)}{V_{\max r} \cdot K_{iA} \cdot K_{iB} + V_{\max r} K_{mB} [A] + V_{\max r} \cdot K_{mA} [B] + \frac{V_{\max f} \cdot K_{mQ} [P]}{K_{\text{eq}}} + \frac{V_{\max f} \cdot K_{mP}}{K_{\text{eq}}} [Q] + V_{\max r} [A][B] + \frac{V_{\max f} \cdot K_{mQ}}{K_{\text{eq}} \cdot K_{iA}} [A][P] + \frac{V_{\max f} \cdot K_{mA}}{K_{iQ}} [B][Q] + \frac{V_{\max f}}{K_{\text{eq}}} [P][Q]}$$

反应初期, $P \rightarrow 0$, 初速度为

$$\frac{V_f}{V_{\max f}} = \frac{[A][B]}{K_{iA} \cdot K_{mB} + K_{mB} [A] + K_{mA} [B] + [A][B]}$$

Cleland 表达式对复杂系统有很大的优越性, 它可使表达式简单明了。

2.5.5 多底物反应机制的鉴别

2.5.5.1 恒态动力学法

A 一次作图法

服从 Albery(或 Dalziel)一般速度方程的动力学机制在固定 $[B_0]$ 时, 以 $\frac{1}{v_0} - \frac{1}{[A_0]}$ 一次作图为线性, 或固定 $[A_0]$, 以 $\frac{1}{v_0} - \frac{1}{[B_0]}$ 作图也为线性。图 2-38 中 $\frac{1}{v_0}$ 上的截距或斜率都包含了固定的不饱和底物的浓度, 使固定的底物浓度取一系列不同的数值, 在每一浓度下重复做实验, 则一次作图得到

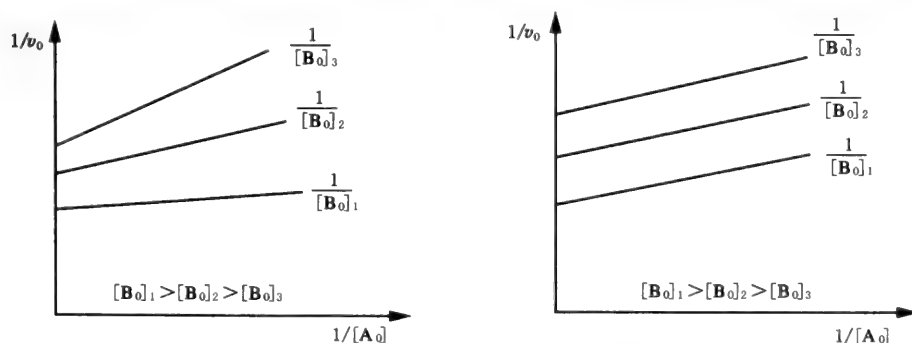


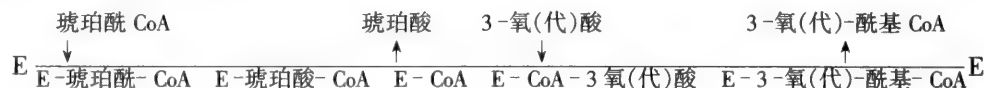
图 2-38 一次作图法 (作图可得到类似结果)

(a) 序列机制

(b) 乒乓机制(固定 $[A_0]$, 以 $\frac{1}{v_0} - \frac{1}{[B_0]}$)

的斜率、截距都会变化。序列有序和序列随机双双的这一形式一次作图法见图 2-38(a)。相反,乒乓双双机制由于 $K_s^A \cdot K_m^B = 0$, 故一次作图得到的斜率是一常数, 所以不同固定底物浓度下的重复实验得到了一系列平行直线(图 2-38(b))。因而一次作图法可以区别序列机制和乒乓机制, 但不能区别序列有序与序列随机机制。

如: 1967 年, Hersh 和 Jencks 研究 3-酮酸 CoA-转移酶时得到与图 2-38(b) 类似图形, 推测为乒乓机制。可能为下列反应:



后来得到的 E-CoA 络合物证实了这一机理。

但应注意, 由实验数据得到的图形有时很难判断是否平行。1962 年 Fromm 及其同事对酵母己糖激酶一次作图得到具有三元络合物机制, 脑己糖激酶为含有 E-P 二元络合物的乒乓机制。尽管同工作用是有可能不同, 但进一步研究(1969)发现在远离水平轴下面有一次作图的交点, 因而这一酶在反应过程中也是形成三元络合物。

B 抑制剂法

采用与底物竞争酶分子上结合位点的抑制剂, 可提供有关酶作用机制的重要信息。反应初期若有产物存在, 可能与底物竞争酶分子上的结合位点, 降低正反应速度。

双底物反应性质复杂。竞争性的抑制剂在整个反应中不一定表现竞争性方式。在一系列不同的抑制剂浓度下双倒数作图, 如果 $\frac{1}{v_0}$ 轴上的截距不随抑制剂浓度变化, 为竞争性抑制; 如果斜率不变, 则为反竞争性抑制; 若两者都发生变化, 为非竞争性或混合型抑制(见 5 章)。性质上为竞争性的抑制剂, 在双底物反应中可表现出各种抑制形式。

Cleland 通过数学方法分析了大量动力学数据, 提出了两条可推测多底物反应抑制图谱的规则。

(1) 抑制剂与一种形式的酶可逆结合, 变化底物与其他形式的酶结合, 双倒数图中 $\frac{1}{v_0}$ 轴截距发生变化。

(2) 抑制剂和变化的底物与相同形式的酶结合, 产物结合在另一种形式的酶上, 但这两种形式的酶之间可逆相连, 那么双倒数图中的斜率发生变化。

应用 Cleland 规则可以判断双底物、双产物反应中产物抑制类型, 如表 2-6、表 2-7。随机双双机制中, 任何一种产物产生抑制时, 变化底物与抑制剂都结合在同一形式的酶 E 上, 只有斜率发生变化, 都呈竞争性抑制。当底物过饱和时, 与产物结合的酶 E 浓度为零, 因此产物不产生抑制。表 2-8 总结了三种双双机制的产物抑制作用。

表 2-6 乒乓双双产物抑制作用

产物抑制剂	浓度变化底物	固定底物是否饱和	说明	纵截或斜率变化	抑制方式
P	A	B, 不饱和	P 结合 F, A 结合 E; 在 A, P 存在下, F 和 E 可逆相联	纵截	非竞争性
P	A	B, 饱和	恒态时 $[F] = 0$, P 不能和 F 结合	-	不抑制
P	B	A, 不饱和	P 和 B 均与 F 结合	斜率	竞争性
P	B	A, 饱和	[A] 饱和时不影响 P 和 B 结合 F	斜率	竞争性
Q	A	B, 不饱和	Q 和 A 均与 E 结合	斜率	竞争性
Q	A	B, 饱和	[B] 饱和时不影响 Q 和 A 结合 E	斜率	竞争性
Q	B	A, 不饱和	Q 结合 E, B 结合 F	纵截	非竞争性
Q	B	A, 饱和	在 B, Q 存在下, F 和 E 可逆相联	斜率	非竞争性
Q	B	A, 饱和	稳态时 $[E] = 0$, Q 不能与 E 结合	-	不抑制

表 2-7 A 先结合的有序双双产物抑制作用

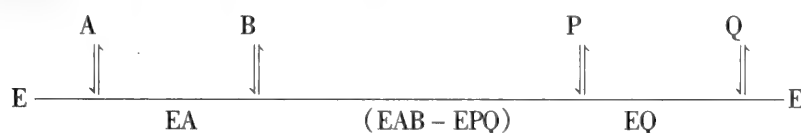
产物抑制	浓度变化底物	固定底物是否饱和	说明	纵截或斜率变化	抑制方式
P	A	B, 不饱和	P 结合 EQ, A 结合 E 在 A, B 存在下, E 和 EQ 可逆相联	纵截 斜率	非竞争性
P	A	B, 饱和	P 结合 EQ, A 结合 E 当 [B] 饱和, 恒态时 EA = 0, E 和 EQ 不能可逆相联	纵截 -	反竞争性
P	B	A, 不饱和	P 结合 EQ, B 结合 EA 在 B, P 存在下, EA 和 EQ 可逆相联	纵截 斜率	非竞争性
P	B	A, 饱和	[A] 饱和不影响 P 结合 EQ 和 B 结合 EA	纵截	
Q	A	B, 不饱和	Q 和 A 均与 E 结合	斜率	竞争性
Q	A	B, 饱和	[B] 饱和不影响 Q 和 A 结合 E	斜率	竞争性
Q	B	A, 不饱和	Q 结合 E, B 结合 EA 在 A 存在下, E 和 EA 可逆相联	纵截 斜率	非竞争性
Q	B	A, 饱和	当 [A] 饱和, 恒态时 [E] = 0, Q 不能结合 E	-	不抑制

表 2-8 三种双双机制产物和抑制作用

反应机制	抑制性产物	[A]变化		[B]变化	
		[B]不饱和	[B]饱和	[A]不饱和	[A]饱和
乒乓双双	P	非竞争	不抑制	竞争	竞争
	Q	竞争	竞争	非竞争	不抑制
有序双双 (A先结合)	P	非竞争	反竞争	非竞争	非竞争
	Q	竞争	竞争	非竞争	不抑制
有序双双 (B先结合)	P	非竞争	不抑制	竞争	竞争
	Q	非竞争	非竞争	非竞争	反竞争
随机双双	P	竞争	不抑制	竞争	不抑制
	Q	竞争	不抑制	竞争	不抑制

Cleland 规则的另一用处是:若某一双底物双产物反应得到抑制性产物 P、Q 分别对变化底物 A 或 B 的八个抑制图谱,即:P 对 A(固定 B,并分别为饱和及不饱和)P 对 B(固定 A,并分别为饱和及不饱和)Q 对 A(固定 B,并分别为饱和及不饱和),Q 对 B(固定 A,并分别为饱和及不饱和),根据这些图谱,可推测双底物、双产物的反应机制(图 2-39)。

序列有序(A先结合):



序列随机:



乒乓:

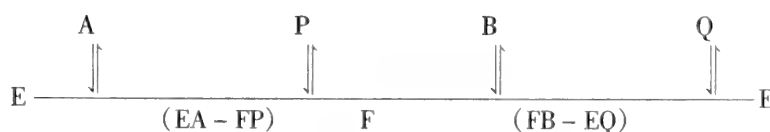
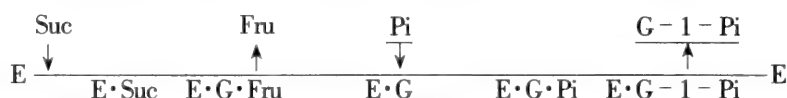


图 2-39 三种双双反应机制

2.5.5.2 非稳态法

A 平衡中的同位素交换法

1959年, Boyer 及其同事认为, 当化学反应达到平衡时观察同位素的交换可以判断反应机制。在没有其他的反应物和产物存在条件下, 一底物和一产物间若发生同位素交换为乒乓机制。如蔗糖磷酸化酶催化的反应: 无蔗糖和果糖存在时, 底物磷酸和产物葡萄糖-1-磷酸之间发生同位素交换, 同样, 无磷酸和葡萄糖-1-磷酸存在时, 蔗糖和果糖之间也发生同位素交换, 故推测正反应机理为:



更一般的应用是当反应物和产物浓度的变化在不改变平衡位置时, 观察同位素交换速率的变化。为便于理解, 双双反应的一般形式写为:

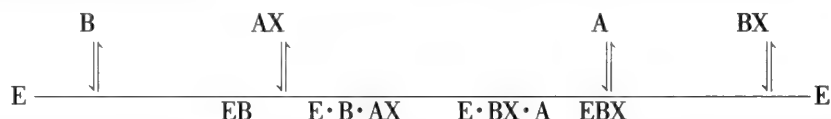


反应达平衡时:

$$\frac{[\text{BX}][\text{A}]}{[\text{AX}][\text{B}]} = K_{\text{eq}}$$

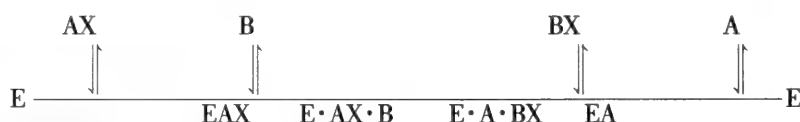
加入少量同位素标记的底物 B (量很少, 可认为不改变平衡点), 测定标记的 BX 形成的速率。然后增加 A 和 AX 的浓度, 并保持 [A]:[AX] 比例不变以防改变平衡点, 则 B 和 BX 的平衡浓度保持不变, 但却会影响 B 和 BX 间同位素交换的速率。

以序列有序双双反应为例:



A 和 AX 浓度轻微增加, B 与 BX 间同位素交换速率增加。但 A 和 AX 浓度显著增加时, 迫使酶形成三元络合物 E·B·AX 和 E·BX·A, 使 B 从 EB 中解离, 及 BX 从 EBX 中解离更加困难, 从而降低了 B→BX 的交换速率 [图 2-40(a)]。

若 AX 先结合的序列有序反应为:



当 AX 和 A 浓度增加时, 迫使自由酶形成 EAX 和 EA。由于 EAX 与 B 反应, 而 EA 不影响 BX 从 E·A·BX 中释放的初速度, 因而随着 [AX] 的增加, B 和 BX 间同位素交换速率以双曲线形式增加 [图 2-40(b)], 随机双双的反应结果类似。

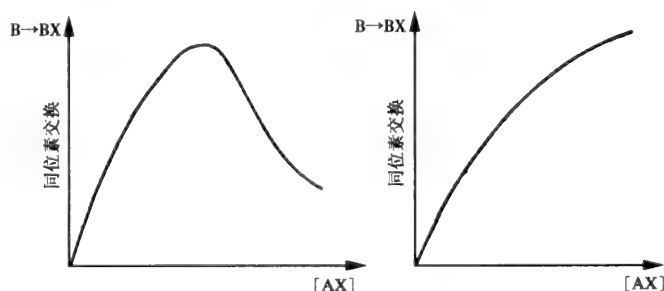
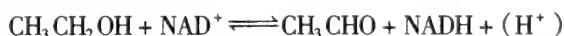


图 2-40 固定 [AX]/[A], B→BX 同位素交换速率对 [AX] 作图

(a) B 先结合的序列有序机制;

(b) AX 先结合的序列有序机制或序列随机机制

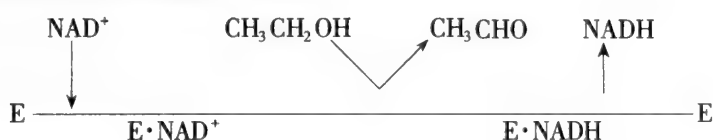
以马肝醇脱氢酶为例:



增加 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 、 CH_3CHO 的浓度,并保持两者比值不变, NAD^+ 和 NADH 的同位素交换速率下降,故可认为是 NAD^+ 最先结合, NADH 最后释放的序列有序机制。

B 快速反应研究

快速反应技术也可用于研究双底物反应的机制。1951年,Theorell 和 Chance 用有双光束检测器的停流技术研究马肝醇脱氢酶催化的反应。 NADH 和 $\text{E}\cdot\text{NADH}$ 在 350nm(不是 323nm)处吸光值不同,因而测定 350nm 和 328nm 吸光值的差别可知 $\text{E}\cdot\text{NADH} \rightarrow \text{E} + \text{NADH}$ 转换的速度。同样,328nm 吸光值的变化为 NAD^+ 还原速率(即 $\text{E}\cdot\text{NAD}^+ \rightarrow \text{E}\cdot\text{NADH}$)。Theorell 和 Chance 发现三元络合物的转换极其快, $\text{E}\cdot\text{NADH}$ 中 NADH 的释放为总反应的限速步骤。这个三元络合物的转换极其快速的序列有序反应称为 Theorell-Chance 机制。表示如下:

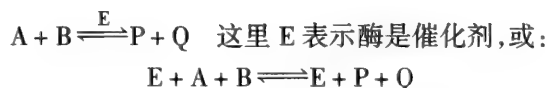


2.6 稳态前动力学

2.6.1 酶反应的分析

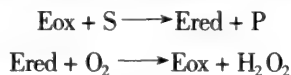
A 总反应

一个由特定的酶所催化的化学反应,当写作计量化学方程式时,就称为总反应(Overall reaction)。因为酶实质上没有变化,所以它可包含或不包含在方程式中。例如,从底物 A 与 B 生成产物 P 与 Q 的总反应,可写作:



B 部分反应

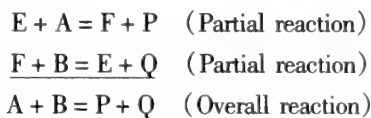
在适当条件下(如缺少一种底物),那么总反应的一部分就能被观察到,这就称为部分反应。例如,在葡萄糖氧化酶催化的反应中,两部分反应可被观察到:氧化型的酶(E_{ox})被葡萄糖还原生成还原型酶(E_{red})和 δ -葡萄糖酸内酯, E_{red} 被 O_2 重新氧化生成 E_{ox} 与 H_2O_2 :



编号:E.C.1.1.3.4 葡萄糖氧化酶催化的总反应为:



具有 PLP、黄素或血红素辅基的酶,总的反应常可分为两个部分反应,对应于辅基状态的变化。这些部分反应称为半反应(half-reactions):



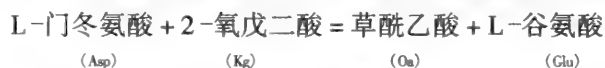
式中 E 与 F 是同一酶的不同状态(例如: E_{ox} 与 E_{red})。所谓乒乓机制(或替换的酶机制),就对应于上述反应。

C 基元反应

反应的最小单位(元)称为基元反应或基元步骤。因此,总反应包含几个部分反应,而每一个部分反应又可分成几个基元反应(步骤)。

应该注意,在描述部分反应或基元反应的化学方程式中,酶必须明确地写作为反应物。这与总反应不同,在总反应中酶被作为催化剂,不需出现在化学方程式中。

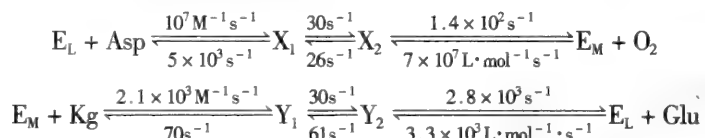
谷草转氨酶(E.C.2.6.1.1)的例子能很好说明上述各点,此酶催化下列总反应:



这是一个可逆反应, $K_{eq} = 0.16$ (pH7.4, 37°C), 此酶具 PLP 辅基。PLP 以共价键结合于酶分子 LYS 残基, 形成 schiff 碱。底物之一(氨基供体)与酶反应。在这个部分反应中转移氨基于 PLP 部分形成 PMP(Pyridoxamine phosphate), PMP 酶转移氨基给另一个底物(受体), 如重新形成 PLP 酶, 所以酶通过在 PLP 形式(E_L)与 PMP 形式(E_M)之间往返催化总反应。其半反应可写作如下:



由于 E_L 与 E_M 具有不同的吸收光谱, 因此这些半反应很容易用分光光度法进行研究。使用温度跃迁法研究此反应的作用机制, 发现上述每个(半)部分反应至少有三个基元反应组成, 至少包含两个中间物(X_1, X_2, Y_1, Y_2)。测定的速度常数如下:



一般说来,要知道一个基元反应是否进一步再分为几个步骤这是困难的。在许多情况下,被认为是一个基元反应的过程,已发现有两个或更多个步骤组成。很明显,部分反应或基元反应的研究能导致对反应机制更深入地了解。

2.6.2 流管法

快速反应技术对测定酶反应的基元反应的速度常数和阐明反应中间物,以及测定快速作用的反应初速度等方面都很重要。各种实验技术能够测定的反应速度范围大体如下:

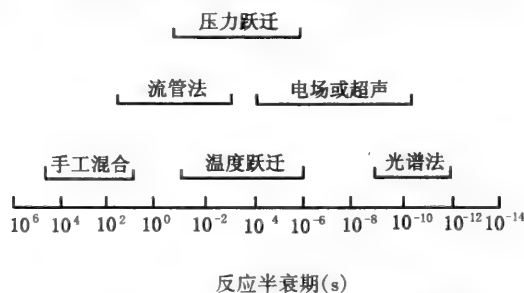


图 2-41 实验方法和反应速度的关系

在酶反应研究中,最常用的有流管法中的停流法(Flow methods, Stopped-flow)和驰豫时谱法中的温度跃迁法(Relaxation Spectrum, Temperature-Jump)。表 2-9 为停流法和温度跃迁法特点比较。

表 2-9 停流法与温度跃迁法特点比较

	停流法	温度跃迁法
适用的反应	可逆和不可逆反应	可逆反应
时间范围	200 μ s ~ min (ms ~ min) ^①	10ns ~ s (μ s ~ s) ^①
反应或微扰开始	混合	温度跃迁
反应曲线(对时间)	连续	连续
检测方法	光学和其他能广泛应用,受时间分辨力限制,能考察的变化较大	光学、电导率对可逆反应是强有力的方法,能观察的变化较小
特征		

① 在常用条件下。

Hartridge 和 Roughton 在 1923 年最先采用流管法测定血红蛋白和氧结合,可测得半衰期为 1 ~

2ms 的反应速度。其原理很简单:起反应的两种反应物分别由两根管子流入混合器,混合后经一根管子流出,在距离混合器一定距离的地方利用物理或物理化学方法进行测定,如图 2-41 所示。如果液体流速是 $u(\text{cm}\cdot\text{s}^{-1})$,混合器和测定地方距离为 d ,则反应时间 $t = d/u$,在管子不同地方测定,就可以得到产物随时间增加的曲线,这种管子叫恒流。

1963 年 Chance 为了克服恒流法要消耗大量样品的缺点,发展了停流法,参见图 2-42。在停流法中,反应物装在两个注射器内,将栅栏向前推进后,反应液迅速注入混合室迅速混合,发生反应。停流注射器这时受压后退,抵达停止栅栏时,触及触发器,驱动示波仪将光谱检测器的波谱记录下来,混合室和观察点间距离很短且是恒定的,实际上观察的是反应物在混合后的变化,由于混合非常迅速,用停流法可测得毫秒级的反应。假定混合室至观测点的距离为 1cm,而反应混合溶液的流速为 10ms^{-1} ,则反应开始的 1ms 时间无法检测,为死时间(dead time)(图 2-42)。

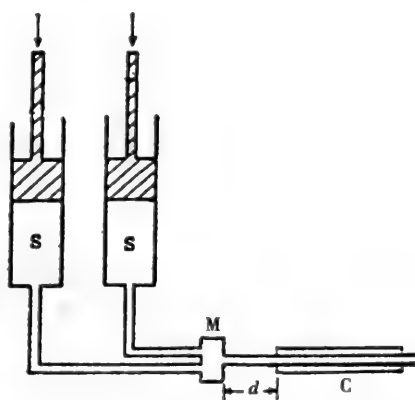


图 2-41 恒流法示意图
S—贮存反应物的针筒;M—混合器;C—检测器;
 d —混合器到检测器的距离

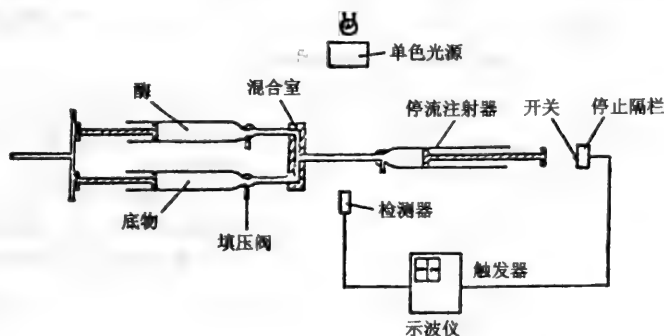


图 2-42 停流法示意图

2.6.3 弛豫时谱法

此法是 Eigen 等在 1954 年创立的。它是根据反应达到平衡后,用一些物理量去扰动平衡,测量是从一个平衡被破坏到新的平衡建立过程的时间曲线。平衡的扰动可采用一个或几个热力学变量,如温度、压力、电场等。温度跃迁是最常用的弛豫时谱法,可测得微秒数量级的速度,示意图见

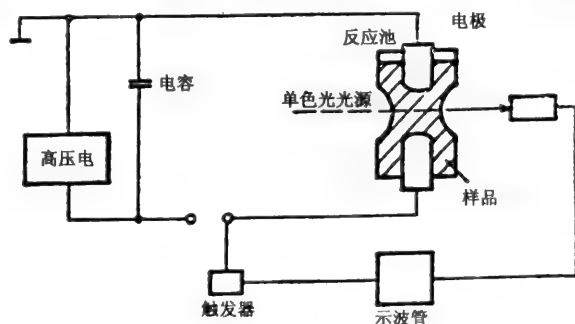


图 2-43 温度跃迁示意图

图 2-43。这一装置能在 $10\mu\text{s}$ 内,升温 5°C (离子强度 $> 10^{-2}\text{mol/L}$)。加热是由于荷电粒子(部分)在电场中作有向排列所引起,如溶液电导低,可改用激光脉冲加热,因实验时间持续不到一秒,所以

冷却效应可予忽略。

一般弛豫时谱是通过弛豫时间来求各个速度常数的(详见 2.6.4)。反应经过多少个基元反应,往往有多少个弛豫时间,在弛豫时间多于两个时,情况就比较复杂,有时也不易分辨开来,要借助计算机的帮助,才能对数据进行较满意的处理。

2.6.4 恒态前动力学

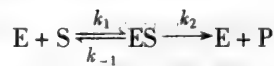
恒态动力学(参见第 4 章)对酶的研究虽具有十分重要的作用,但也存在着严重的局限性。在恒态动力学中通常所使用的酶浓度是 10^{-6} mol/L 或更低些,底物浓度和酶浓度比较起来是大大过量的,反应时间以分为单位。测得的速度是恒态速度,是整个反应的速度(取决于最慢一步的速度)。在反应中观察不到酶本身的变化,以及反应中各中间阶段的情况。因而依据恒态动力学所推定的反应机制是间接的,而快速反应动力学(恒态前动力学, Pre-Steady-State Kinetics; 瞬(变状)态动力学, Transient Kinetics)对阐明基元反应的速度常数、反应中间物等方面都很重要。表 2-10 说明两种动力学的主要特点。

2.6.4.1 恒态前的酶反应

在 Michaelis-Menten 采用的快速平衡假设中,当 E 和 S 混合后,ES 络合物形成的时间进程是被忽略的。在 Briggs 和 Haldane 稳态处理中,是假设 ES 处于恒态: $d[ES]/dt = 0$ 而获得速度方程。现在我们要讨论的是反应开始到建立恒态之间的过程,先说明一下 ES 络合物形成的时间过程:

表 2-10 恒态动力学与瞬态动力学

	恒态动力学	瞬态动力学
观察到的变化	底物,产物(总反应)	酶的状态或反映它的某些方面(部分反应,基元反应)
使用方法	无限制	停流法温度跃迁法或二者结合
目标反应的性质	无限制	具体伴随吸收率或荧光变化的反应(或通过某种方法转化为这些变化的反应)
时间范围	min ~ 1h	$\mu\text{s} \sim \text{min}$
酶浓度	$10^{-10} \sim 10^{-5}$ mol/L (常用 $10^{-9} \sim 10^{-6}$ mol/L)	$10^{-7} \sim 10^{-8}$ mol/L (常用 $10^{-6} \sim 10^{-4}$ mol/L)
优点	有广泛的适用性,酶样品较节约	能获得反应机制的更直接信息(数据,资料)
缺点	得到反应机制的间接信息,提供信息较少	需快速反应技术(和仪器)至少需用 10mg 酶



假定 $[S] \gg [E_0]$, 反应过程中有 $[S] = [S_0]$, 在反应开始阶段 $[S] \approx [S_0]$ 应是可以成立的,这样微分方程可获得明确的解

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E_0] - [ES])[S_0] - (k_2 + k_{-1})[ES] \quad (2-1)$$

$$\frac{d[ES]}{k_1[E_0][S_0] - (k_1[S_0] + k_2 + k_{-1})[ES]} = dt \quad (2-2)$$

对上式积分,(当 $t=0, [ES]=0, C = -\frac{1}{k_1[S_0] + K_m} \ln(k_1[E_0][S_0])$)

$$\text{则得: } [ES] = \frac{\alpha}{\beta}(1 - e^{-\beta t}) \quad (2-3)$$

式中 $\alpha = k_1[E_0][S_0], \beta = k_1[S_0] + (k_{-1} + k_2) = k_1([S_0] + K_m)$

当 t 足够大时,即 $t \gg \frac{1}{\beta}$ 时, $[ES] = \frac{\alpha}{\beta}$, 恒态建立,此时 $[ES] = \frac{\alpha}{\beta} = \frac{[E_0][S_0]}{K_m + [S_0]}, v = k_2[ES]$,

$V = k_2[E_0]$, 则可得 Michaelis-Menten 方程: $v = \frac{V[S]}{K_m + [S]}$

恒态之前的阶段称为恒态前, 那么达到恒态所需时间 t 有多长呢? 根据已测定的实验数据大体上为几个毫秒, 也就是说把酶加入反应体系后, 在几毫秒的瞬间就达到恒态, 因此我们通常测定的初速度是恒态速度。

由式(2-3)可计算一下, 如 $[ES]$ 要达到恒态值的 90%, $t_{0.9}$ 为多大? $t_{0.9} = 2.303/\beta = 2.303/k_1[S_0] + (k_{-1} + k_2) < 2.303/k_2 < 1s$, k_{cat} 从 $10^0 \sim 10^{-1} s^{-1}$, $t_{0.9}$ 为 $10^0 \sim 10^{-6} s$ 。

图 2-44 是按式(2-3)画出的 ES -时间曲线。

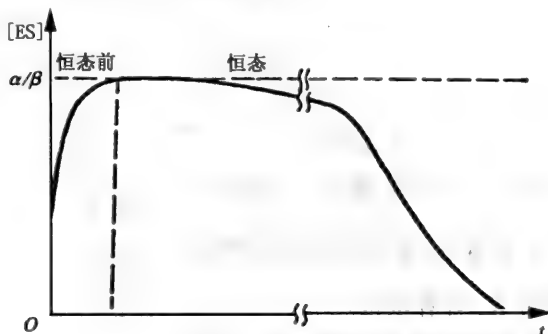


图 2-44 ES 时间曲线

将式(2-2)改写为:

$$[ES] = \frac{k_1[E_0][S_0] - d[ES]/dt}{k_1[S_0] + k_{-1} + k_2} \quad (2-4)$$

Wong, J T 指出: 恒态近似, 仅需 $d[ES]/dt \ll k_1[E_0][S_0]$, 在反应早期阶段, 如 $[S] \gg [E_0]$, 那么由于减少 $[S]$ 而使 $[ES]$ 变化速度相对缓慢, 显然, 恒态的正确性实质上依赖于 $\frac{[S]}{[E_0]}$ 高的比值, 而不决定于 $d[ES]/dt = 0$ 的假定。

2.6.4.2 停流法测 k

以胰蛋白酶和 α -胰凝乳蛋白酶作用于对-硝基苯酚酯一类的底物为例, 用停流法研究其恒态前的产物 P 形成的时间过程。实验条件仍为 $[S] \gg [E_0]$, 反应过程中有 $[S] = [S_0]$ 。式 $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ 是上述两种酶的一种简化机制。实际上它们的反应包含两个或两个以上的中间物, 多一个中间物, 处理就复杂得多。用简化机制在 t 时, E, S, ES 和 P 的浓度分别为 $[E_0 - E_s], [S_0], [ES], [P]$, 上式的微分方程如下:

$$\begin{aligned} \frac{d[ES]}{dt} &= k_1([E_0] - [ES])[S_0] - (k_2 + k_{-1})[ES] \\ v &= \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \end{aligned} \quad (2-5)$$

上式二阶微分:

$$\frac{d^2[P]}{dt^2} = k_2 \frac{d[ES]}{dt} \quad (2-6)$$

上两式代入式(2-2)得: $\frac{d^2[P]}{dt^2} = k_1 k_2 [E_0][S_0] - (k_1[S_0] + k_{-1} + k_2) \frac{dP}{dt}$

$$\text{其解为: } [P] = \frac{k_2[E_0][S_0]t}{[S_0] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} + \frac{k_1 k_2 [E_0][S_0]}{(k_1[S_0] + k_{-1} + k_2)^2} (e^{-(-k_1[S_0] + k_{-1} + k_2)t} - 1) \quad (2-7)$$

积分常数为 P_0 , 当 $t=0, P_0=0$

当 $t \rightarrow 0$ 时, 用幂级数展开前三项, 误差不大, 可化简为: $[P] = \frac{k_1 k_2 [E_0][S_0] t^2}{2}$ (2-8)

当 t 足够大时, 则变成:

$$[P] = \frac{k_2 [S_0][E_0] t}{[S_0] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} - \frac{k_1 k_2 [S_0][E_0]}{(k_1 [S_0] + k_{-1} + k_2)^2}$$
 (2-9)

$[P]$ 对 t 作图为一曲线, 外延到纵轴的截距为:

$$[P]_{t=0} = - \frac{k_1 k_2 [S_0][E_0]}{(k_1 [S_0] + k_{-1} + k_2)^2}$$
 (2-10)

横轴截距为:

$$t_{p=0} = \frac{1}{k_1 [S_0]} \text{ (当 } [S_0] \gg K_m \text{)}$$
 (2-11)

此式(2-8) $[P]$ 对 t^2 作图, 可得一直线, 其斜率为 $\frac{k_1 k_2 [E_0][S_0]}{2}$, k_2 可由恒态 V 求得, k_1 就可从斜率计算。已知 k_1 和 k_2, k_{-1} 就可以从恒态 K_m 计算求得。

以式(2-9) $[P]$ 对 t 作图, 从其中外推横轴截距可求得 k_1 。 k_2 和 k_{-1} 的求法与上相同。 $[P] - t$ 曲线如图 2-45 所示。

式(2-7)也可利用式(2-3)代入 $\frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]$ 求得, 其结果相同。

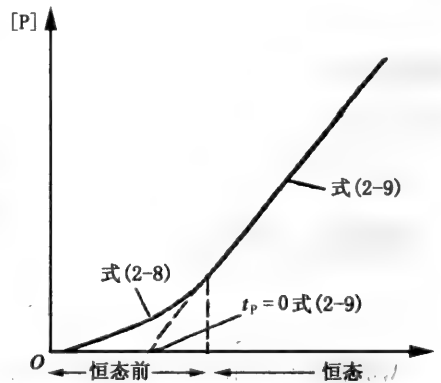


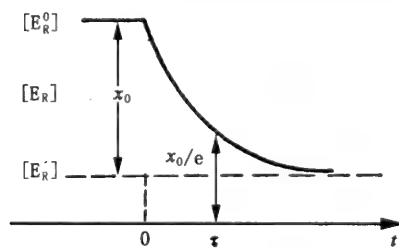
图 2-45 $[P]-t$ 曲线

2.6.4.3 温度跃迁法测定 k

如前所述, 速度跃迁是最常用的弛豫时谱法。 如果一个已处于平衡的酶反应极快升温(如 $5 \mu s$, 升 $5^\circ C$), 平衡位置就会发生轻微移动, 系统按下列关系式弛向新的平衡位置: $[X] = [X]_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$

式中 $[X]$ —— t 时和新的平衡位置之间的浓度差

$[X]_0$ ——在温迁开始时和到达新的平衡位置之间的浓度差;



τ ——弛豫时间, 是 $[X]_0$ 降低(变化)到 $\frac{1}{e}$ 所需的时间

(图 2-46)。

酶的两构象 E_R 和 E_T 间的可逆互变是能作简化处理的一个化学弛豫的例子。



开始时, 系统在温度 T 处于平衡, 在温度跃迁到 T' 后, 两个酶品种(species) 的浓度在不同时间可表示如下:

酶构象 T 时(开始) 浓度 T' 时(最终) 浓度

$$\begin{matrix} R & E_B^0 & E_B' \\ T & E_T^0 & \end{matrix}$$

弛豫期间浓度

$$E_B' + x$$

$$E_T' - x$$

图 2-46 温度跃迁示意图

在弛豫应答期间,酶在两种构象间重新分布,因此,表示离开新的平衡位置(浓度差) X 最终降低到零。在弛豫期间任一瞬间,按质量作用定律要求:

$$d[E_T' - x]/dt = k_1[E_B' + x] - k_{-1}[E_T' - x] \quad (2-13)$$

上式重排:
$$\frac{dE_T'}{dt} - \frac{dx}{dt} = k_1E_B' - k_{-1}E_T' + (k_1 + k_{-1})x \quad (2-14)$$

最后,在新的温度下,平衡重新建立,反应系统再次变为平稳。此时:

$$\frac{dE_T'}{dt} = k_1E_B' - k_{-1}E_T' = 0 \quad (2-15)$$

将上式中各项从重排式中消去,则可得:

$$-\frac{dx}{dt} = (k_1 + k_{-1})x \quad (2-16)$$

积分上式(当 $t=0, c = \ln x_0$)

$$x = x_0 e^{-(k_1+k_{-1})t} \quad (2-17)$$

式中 x_0 表示 E_B^0 和 E_B' 之间的浓度差,所以

$$x = (E_B^0 - E_B')e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2-18)$$

$$\tau = \frac{1}{k_1 + k_{-1}}$$

从测定 τ , 得到 $k_1 + k_{-1}$ 的和值, $\frac{k_1}{k_{-1}}$ 的比值就是 T' 时的平衡常数 $K_{eq} = \frac{E_T'}{E_B'} = \frac{k_1}{k_{-1}}$, 已知 k_1, k_{-1} 的和与比, 两个速度常数即可求得。

将上积分式写成对数形式
$$\ln x = \ln x_0 - \frac{t}{\tau} \quad (2-19)$$

用 $\ln x$ 对 t 作图为一一直线, 斜率为 $-\frac{1}{\tau}$ 。

下面我们以酶和底物的可逆结合为例, 作一些讨论



在弛豫期间任一瞬时:

$$\frac{d([ES]' - x)}{dt} = k_1(E' + x)(S' + x) - k_{-1}([ES]' - x) \quad (2-21)$$

上式重排:

$$\frac{d[ES]'}{dt} - \frac{dx}{dt} = k_1E'S' - k_{-1}[ES]' + k_1(E' + S')x + k_{-1}x + k_1x^2 \quad (2-22)$$

在新的温度下, 平衡再次建立, 则有:

$$\frac{d[ES]'}{dt} = k_1E'S' - k_{-1}[ES]' \quad (2-23)$$

从式(2-22)消去上式中各项后得:

$$-\frac{dx}{dt} = [k_1(E' + S') + k_{-1}]x + k_1x^2 \quad (2-24)$$

一般讲, 化学弛豫的正确应用取决于浓度扰动相对于总浓度很小时方可行, 所以可假定 x 非常小, x^2 项可略去, 积分得:

$$x = x_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2-25)$$

$$\frac{1}{\tau} = k_1(E' + S') + k_{-1} \quad (2-26)$$

用上式以 $\frac{1}{\tau}$ 对 $(E' + S')$ 作图, 可得一直线, 其斜率为 k_1 , 纵轴截距为 k_{-1} 。

多步可逆反应的机制可产生多个弛豫时间,但要注意任两个弛豫时间可被分辨的程度依赖于它们在数量级有多少差别。不良的结果总是可能存在的,所以表观的单个弛豫时间的测定并不是仅含有一对可逆步骤机制的最后证据。一个以上弛豫时间的测定将是存在多步反应的最后证据。

参 考 文 献

- 1 Boyer P D. The Enzymes. 3rd eds. New York: Academic Press, Inc., 1970
- 2 Kuby S A. A Study of Enzyme, Vol I - II. CRC Press, 1991
- 3 Dixon M. and Webb E. C. Enzymes, 3rd ed. Longmans, Group Ltd. 1979
- 4 Segal I H. Enzyme Kinetics. London: Cambridge Univ. Press, 1977
- 5 Engel P C. Enzymology. LABFAX, BTOS Scientific Publishers Limited, 1996
- 6 Arthor R S. Enzyme Kinetics. London: Cambridge Univ. Press, 1994
- 7 许根俊. 酶的作用原理. 北京: 科学出版社, 1984
- 8 邹国林, 朱汝璠. 酶学. 武汉: 武汉大学出版社, 1997
- 9 袁勤生, 赵健, 王维育. 应用酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 1994

3 酶的作用机制

酶催化反应机制的研究是当代生物化学的一个重要课题。酶为什么比一般催化剂的效率高?要回答这个问题需要从理论方面、酶的特性方面和化学性质方面来研究。近年来,由于 X-射线晶体研究提供了许多酶结构的信息,对一系列酶提出了可能的化学机制,但能否定量解释每个酶的催化能力还值得怀疑。许多问题尚待解决,很多规律性的东西还没有掌握,所以,只能说我们知道了有一些因素可以使酶反应加速,还很难确切地说它们的贡献有多大。显然,彻底阐明酶的催化机制是酶学和分子生物学研究的艰巨任务。

本章主要讨论酶的催化能力和专一性,介绍一些基本的催化原理,以及论述酶的一些已知的作用机制是如何用实验方法测定的。

提出一个酶的作用机制,应予确证以下几方面: 1) 底物转变为产物每一步过程的中间络合物及其基元反应次序; 2) 这些络合物之间相互转变的速度常数; 3) 络合物的结构,即酶的作用机制需要动力学和结构两方面的信息。因此动力学研究、X-射线结晶学、质谱技术等对酶作用机制研究有重要的意义。中间物的检测、氨基酸侧链的化学修饰,以及定点突变技术等也很有价值的研究手段。

3.1 酶催化的化学机制

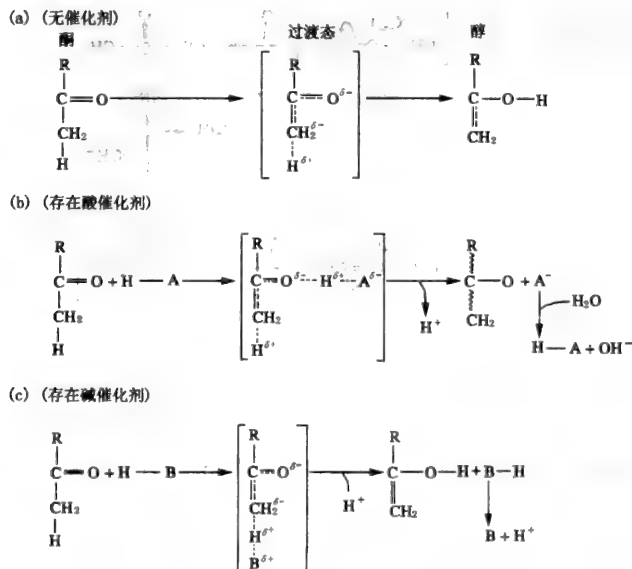


图 3-1 酮醇异构化机制

3.1.1 酸碱催化

酸(或碱)可以通过暂时提供(或接受)一个质子以稳定过渡态达到催化反应的目的,如酮与醇的异构化反应十分缓慢,若加入酸或碱催化剂,可使反应大大加快(图 3-1)。

酶分子中氨基酸侧链具有质子的供体和受体的功能,所以推测酸碱催化在酶分子中起了重要作用是合理的,如溶菌酶催化水解寡聚糖:

酶分子中 Glu-35 处于非极性环境,其侧链的羧基 pK_a 值为增加,甚至在 pH6 时仍未解离自由 Glu 侧链 pK_a 为 4.3)。反应时,羧基对底物糖苷中的氧提供一质子,以利于 C—O 键裂解,由 Asp-52 解离的侧链稳定所形成的碳正离子(图 3-2)。

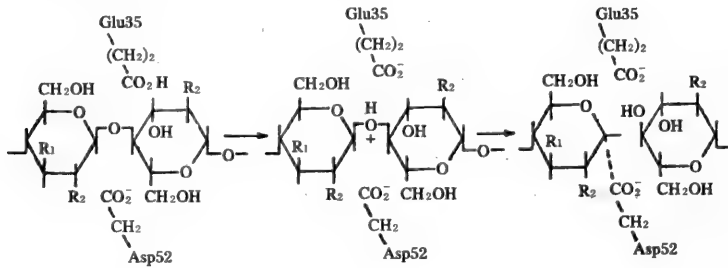


图 3-2 溶菌酶酸、碱催化反应示意图

组氨酸侧链 pK_a 值接近于 7,因而近中性 pH 条件下可作为质子传递体,既可提供质子,又可接受质子。一些酯酶、肽酶、蛋白水解酶活性中心的组氨酸在酶的酸、碱催化中起了极其重要的作用。

3.1.2 共价催化

所谓共价催化是通过催化剂与底物的共价键结合,形成过渡态来加速反应,如伯胺催化的乙酰乙酸脱羧过程如图 3-3 所示:

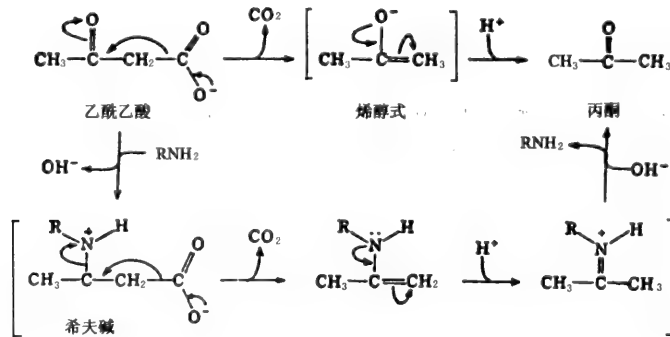


图 3-3 非酶催化的乙酰乙酸反应机制(上)及伯胺催化的反应机制(下)

反应第一步:胺对羰基碳原子进行亲核攻击形成希夫碱(Schiff base,见图 3-4)。

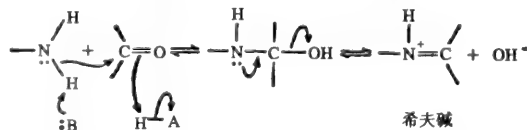


图 3-4 希夫碱的形成

共价中间物中质子化氮原子吸收电子,削弱了 $-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{COO}^-$ 的键合。希夫碱的形成和分解速度很快,因而不是整个反应的限速步骤。

共价催化具有亲核、亲电过程。

(1) 催化剂和底物进行亲核反应形成共价键。

(2) 再通过同一催化剂进行亲电催化,从反应中心吸收电子。

反应机制归入亲核或亲电催化,主要取决于哪种效果对催化限速反应步骤起了决定的作用,伯胺催化的乙酰乙酸脱羧很明显是亲电催化反应,因为亲核攻击形成希夫碱不是限速步骤,当然,某些共价催化反应中,亲核催化是反应的限速步骤。

底物的亲核性与其碱性程度密切相关。的确,亲核催化类似于一般碱的催化,只不过不是从底物吸取一个质子而是亲核攻击形成共价键。进一步,如果共价键的形成是共价催化的限速步骤,反应速度随着共价催化剂的碱性程度(pK 值)而增加。

如果形成共价键越稳定,其分解就越困难,一种好的共价催化剂必需具备表面上似乎矛盾的两重特性,高亲核性并使形成的键容易断裂,具有极高化性的咪唑和硫醇基团是良好的共价催化剂。

已分离出大量的共价键连接的酶-底物络合物,证明酶具有共价催化机理。如前所述的酶促乙酰乙酸脱羧过程就是通过与酶分子上 Lys 侧链的 ϵ -氨基形成了希夫碱。用 NaBH_4 将胺还原成亚胺以可逆抑制酶,可分离到共价络合物。酶分子上参与共价催化的其他功能基团有: His 的咪唑基, Asp 的羧基和 Ser 的羟基。此外,一些辅酶如硫胺素焦磷酸, PLP 等也可作为共价催化剂。

3.1.3 多元催化

酶的多元催化通常是几个基元反应协同作用的结果,如胰凝乳蛋白酶中的 Ser-195 作为亲核基团进行亲核催化反应,而 His-57 侧链基团则起碱催化作用。又如羧肽酶水解底物时,亲核基团为 Glu-270,或是由 Glu-270 所激活的水分子,而 Tyr-248 则起广义酸的作用。其它如 RNaseA 水解核酸分子时, His-119 及 His-12 分别起广义酸和广义碱的作用等。

3.1.4 金属离子催化

在所有已知的酶中,几乎有三分之一的酶表现活性时需要存在金属离子。根据金属离子与蛋白质结合作用的大小,将需要金属的酶分成两大类:金属酶,具有紧密结合的金属离子,常见的过渡金属离子为 Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+} 。金属激活酶,金属离子结合较松,通常是碱金属和碱土金属离子如 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 。

金属离子以多种方式参与催化作用:与底物结合,使其在反应中正确定向;通过金属离子氧化态的变化进行氧化还原反应;通过静电作用稳定或掩蔽负电荷(详见 3.4)。

3.1.5 微观可逆原理

在研究酶的动力学和作用机制时,常要用到这一原理以检查提出的历程是否合理。

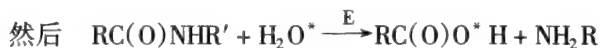
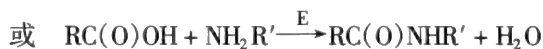
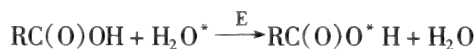
根据这个原理,可以引伸出许多不同的表达方式,其中一种提法为正反应方向最可能产生的过渡态也是逆反应最可能生成的过渡态。或者说正反应沿着某一最可能的途径进行反应,那么逆反应最可能的途径是它的逆转。

Breslow 和 Wernick 关于羧肽酶 A 催化多肽水解机制的研究可作为这个原理应用的一个实例。其他工作者曾报道羧肽酶 A 催化同位素标记的水中的氧掺入 N-苯甲酰甘氨酸的末端羧基中,在任何多肽水解中,水必须掺入到产物羧酸中。如果反应是经过酰基酶中间物而进行,那么酶将能在无任何自由胺的存在下催化末端羧基与溶剂水之间的氧原子交换。其反应如下:



如果需要胺,那么交换就不能证实酰基酶的存在,因为肽键的合成也可从羧酸中移去氧原子,

随后的水解可把溶剂中的同位素引入,反应如下:



Breshow 和 Wernick 证明,只有当掺杂的(contaminating)氨基酸存在时, ^{18}O 才从水掺入 N-苯甲酰甘氨酸的羧基,当无氨基酸存在时,不出现动力学上应有的速度进入羧基的交换。因此,只有通过完全水解和它的完全逆转,交换才能发生。

3.2 酶催化的专一性与高效性

3.2.1 过渡态和活化能

化学反应能量曲线显示从反应物到产物必须克服的能障(ΔG) [图 3-5(a)]。能荷的最高点为反应的过渡态,这是一个原子排列极不稳定的状态—化学键不断地合成和断裂,这一状态目前还无法用实验检测。活化能指的是分子间进行反应时必须取得的最低限度的能量。由过渡态反应理论可推导出速度常数(k')和活化自由能(ΔG)之间的关系方程:

$$k' = \frac{kT}{h} e^{-\Delta G^\ddagger/RT} = \frac{kT}{h} e^{-\Delta H^\ddagger/RT} \cdot e^{\Delta S^\ddagger/RT}$$

式中 k ——Boltzman 常数;

h ——Plank 常数;

T ——绝对温度;

R ——气体常数;

ΔH 和 ΔS ——活化焓和活化熵。

先要阐明过渡态和中间物是两个不同的概念,现在我们经常混用。中间物较过渡态稳定,甚至可以分离纯化和测定,半衰期大于 10^{-14} s。有中间物存在的反应图谱如图 3-5(b)所示,该反应具有两个过渡态,第一个用于形成中间物,第二个用于转化成产物。由于中间物形成产物或返回底物需要的能量较小,因此它处于亚稳态结构。一些非常不稳定的中间物与过渡态图谱非常相似。要加快反应速度,必须降低(ΔG)值。酶作为催化剂的作用就是与底物形成一种或多种中间物来降低(ΔG)。一般催化剂不改变自由能变化的大小(图 3-5a 中 ΔG),所以反应物和产物之间平衡点不变,只是加快了达到平衡的速度。化学反应的限速步骤是 $\text{S} \rightarrow \text{P}$ 过程中活化能最高的一步即图 3-5(b)中 $\text{E} + \text{S} \rightarrow \text{ES}$ 过程。

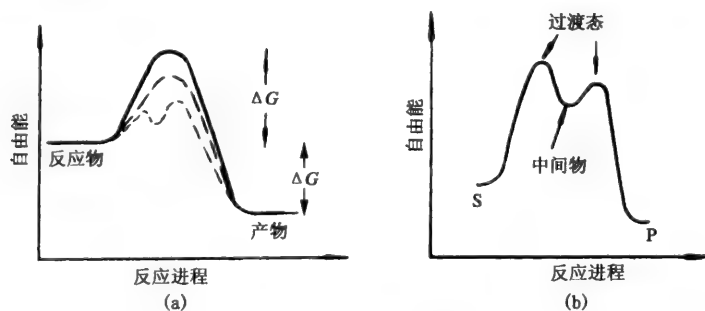


图 3-5 反应能量曲线

(a) 非催化反应(实线),催化反应(虚线),有中间物形成的催化反应(点线)

(b) 酶促反应 $\text{E} + \text{S} \rightleftharpoons \text{ES} \rightarrow \text{E} + \text{P}$ 的能量曲线

3.2.2 酶和底物的结合作用

ES复合物中底物在酶的活性中心的定位极大地增加了酶促反应速度,ES转化为ES*所需要的能量低于非酶反应中S转变为S*所需要的能量(图3-6)。所以底物和酶必须弱结合,否则ES→ES*所需要的能量几乎相当于S→S*所需的能量(图3-6虚线)。

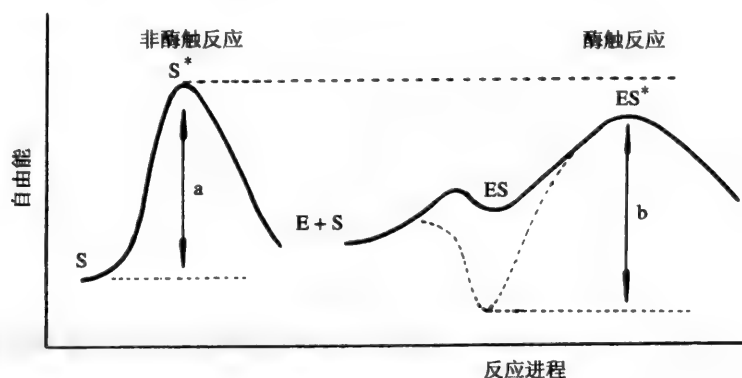


图3-6 底物与酶结合的能量曲线

换言之,酶和底物过强的结合力使酶催化活性大大降低。酶与底物有两种结合方式:酶与基态底物的结合;酶与过渡态底物的结合。一个所谓进化完全的酶必须具备与基态底物弱结合而与过渡态底物强结合的性质。只有当底物处于过渡态时,酶的活性部位与其形状完全匹配,相互作用力达到最强,ES*才能稳定,反应活化能大大降低(参见图3-6)。甚至某些酶学家认为过渡态的稳定化作用是酶加速反应的基本因素,过渡态类似物是酶蛋白的强抑制剂和抗体酶的出现也证明了这一观点。进化压力使 K_m 值(酶和底物的解离常数)达到优化:低的 K_m 值使ES能够形成但又不稳定,使其容易转变为ES*。

3.2.3 邻近和定向效应

当一个反应发生时,其反应物分子之间并不是相互靠近以后在任何方向上都可以发生反应,必须有一定的空间定向关系。相互反应的原子沿一轨道接近时,偏离最佳方向哪怕小于 10° 也会明显降低反应活性。如咪唑和对硝基苯乙酸酯反应:

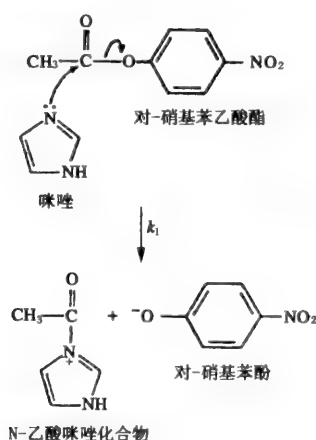


图3-7 N-乙酰咪唑化合物

产物为黄色的对-硝基苯酚盐离子,因而反应过程很容易检测:

$$\frac{d[\text{P}-\text{NO}_2\phi\text{O}^-]}{dt} = k'[\text{im}][\text{P}-\text{NO}_2\phi\text{AC}] = k'[\text{P}-\text{NO}_2\phi\text{AC}]$$

式中 ϕ ——酚；

im——咪唑；

k' ——准一级速度常数。

当 $[\text{im}] = 1\text{mol/L}$ 时, $k' = 0.0018\text{s}^{-1}$ 。

对于分子内反应(图 3-8)

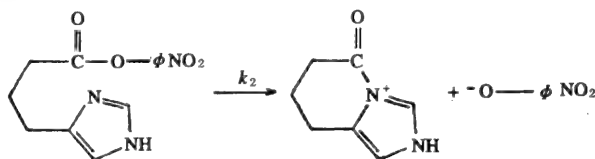


图 3-8 分子内反应

一级速度常数 $k_2 = 0.043\text{s}^{-1}$, 即 $k_2 = 24k_1'$, 也就是说 1mol/L 咪唑催化剂共价结合在反应物上, 其效应相当于自由溶液中的 24 倍。

让我们通过一个粗略的计算来证实一下反应基团的定向效应。根据 Daniel Koshland's 处理原则, 作以下几个假定:

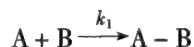
(1) 反应物的功能基团大小类同水分子。

(2) 溶液中每一个反应物周围具有 12 个最靠近的分子, 大小相同, 好似一个球体。

(3) 只有当反应物相互接触才可能发生化学反应。

(4) 溶液中反应物浓度非常低, 以致任何反应物分子与一个以上其他反应物分子同时接触的机会可以忽略不计。

对于反应:



遵守二级速度方程:

$$v = \frac{d[\text{A} - \text{B}]}{dt} = k_2[\text{A}][\text{B}] = k_2[\text{A}, \text{B}]_{\text{对}}$$

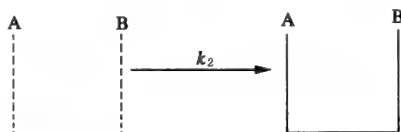
$[\text{A}, \text{B}]_{\text{对}}$ 为分子 A 和 B 接触的浓度, 其量可以计算:

$$[\text{A}, \text{B}]_{\text{对}} = \frac{12[\text{A}][\text{B}]}{55.5\text{mol/L}}$$

由于 A 和 B 接触有 12 种方式, 一个 B 分子与一个 A 分子靠近的机会是 $[\text{A}]/55.5\text{mol/L}$ (自由水中 $[\text{H}_2\text{O}] = 55.5\text{mol/L}$), 将上两式结合起来:

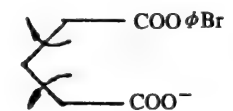
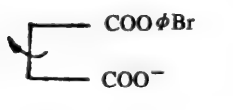
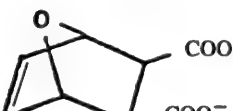
$$v = k_1 \left(\frac{55.5}{12} \right) [\text{A}, \text{B}]_{\text{对}} = 4.6k_1[\text{A}, \text{B}]_{\text{对}}$$

因此如果不考虑其他效果, 这一模型推测对于分子内的反应:



$k_2 = 4.6k_1$, 反应速度提高的倍数很小。很明显除了邻近效应外, 其他增加反应速度的因素都应该考虑。反应物之间相对移动和适当定向也可使反应速度大为增加。Thoms Bruice 观察发现分子内部移动极大地影响分子内反应速度。对于一个双分子反应, 当酶使两个底物分子安置在一起时, 不仅增加了邻近效应, 且降低了相对平移和旋转运动(降低熵值)。表 3-1 显示速度增加十分显著。

表 3-1 不同移动的自由度的酯形成酐的相对速度比较

反应物	相对速度常数
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C}-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Br} \\ + \\ \text{R}_2-\text{C}-\text{O}^- \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ -\text{R}_2\text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} + \text{O}^--\text{C}_6\text{H}_4-\text{Br} $	
$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \text{ COO } \phi \text{ Br} \\ + \\ \text{CH}_3 \text{ COO}^- \end{array} $	1.0
	$\sim 1 \times 10^3$
	$\sim 2.2 \times 10^5$
	$\sim 5 \times 10^7$

注:箭头表示旋转的自由度

3.2.4 底物的形变和酶的诱导契合模型

当底物与酶专一性的结合以后很可能发生形变、扭曲,使其几何和静电结构更接近于过渡态,降低了反应的活化自由能,使反应速度大为增加。如由于应力的作用,环状磷酸酯水解速度比开环的磷酸酯高 10^8 倍(图 3-9)。有很多证据表明有应力的环状化合物比应力较小的环状化合物或直链的化合物水解速度快得多。

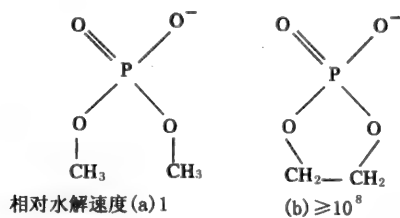


图 3-9 磷酸酯结构

(b)比(a)水解速度快,其应力可通过水解释放

要想得到解释酶催化反应的证据相当困难,曾经推测寡聚糖底物与溶菌酶结合时,进入酶分子活性部位的葡萄糖环会变形,几何形状接近于假定的过渡态(含有碳正离子),以增加反应速度(图 3-10)。另一例子是利用溶菌酶的抑制剂: N-乙酰葡萄糖胺三糖进行研究。X-射线证实被作用键邻近的糖环变成有应力的、平板式构型,而其他糖环都处于无应力的椅式构象。此外,二羟丙酮磷酸与丙糖磷酸异构酶结合时,红外光谱发现底物分子发生了形变。

也有人认为应力是为了稳定反应的过渡态而产生的,并不是使底物分子本身不稳定。换言之,与正常的底物构型比较,酶与过渡态底物结合更合适。因此,在几何和静电结构上类似于过渡态的

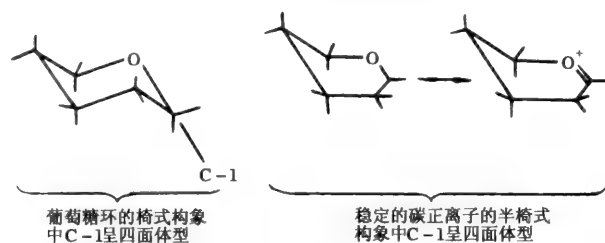


图 3-10 形成碳正离子时葡萄糖环的形变

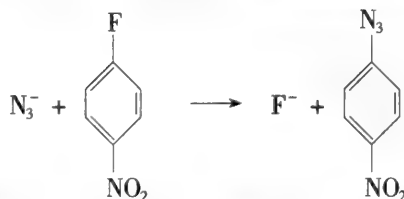
化合物较一般底物与酶分子结合更紧密。

Koshland 提出的诱导契合(induced-fit)理论预测“自由酶”分子活性部位的催化基团并不是精确位于自己位置上尽力发挥其催化功能,酶与底物分子的结合力将迫使酶分子处于更有催化活性的构象。专一性较差的底物的抑制剂(底物类似物)与酶活性部位结合,但它们不具备诱导酶发生适合的构象变化的结构特征。这一理论还可说明底物的专一性在高浓度下比低浓度更为重要。己糖激酶就是一个可用诱导契合理论解释的一个酶。该酶催化 ATP 上的磷酸基团转移到 G-6-OH 分子上,还可以转移到水分子上,即 H_2O 为底物时,仍具有 ATP 酶活力,但水中反应速度与 G 为磷酸受体相比只有 $5/10^6$ 。速度计算的差值相当于 ΔG^\ddagger 相差 29.3 kJ。因此,认为水分子缺乏诱导酶变形的化学侧链基团,而葡萄糖具有诱导形变的结构,与酶形成更有反应活性的复合物。

显而易见,诱导契合和应力理论可合二为一,即酶和底物形成复合物时都会发生形变,并且在相当高的底物浓度下反应速度大大增加。还有些人提出了另一种理论,认为自由酶是具有应力的分子,与底物结合时,应力即释放。

3.2.5 微环境的影响

溶剂的性质对有机反应速度影响很大。如:二甲基硫氧和二甲基甲酰胺等溶剂,不能溶合负离子,特别适合于亲核取代反应。例如,下列反应在二甲基硫氧中比在水中快 12 000 倍:



X-射线结晶学研究显示酶可对反应提供不寻常的环境。如溶菌酶分子上有一裂缝为底物结合部位,其中镶嵌了许多非极性的氨基酸侧链,显而易见提供了一个与溶剂水大不相同的特殊环境,而且在活性中心有一解离的带负电荷的 Asp-52 侧链。有助于稳定反应过渡态的碳正离子(参见图 3-10)。计算表明低介电常数介质中静电稳定作用很强,这就是反应速度较非酶催化高 3×10^6 倍的原因。许多其他酶促反应也表明,由于特殊的微环境,在一个溶液中可以同时存在高浓度的酸和高浓度的碱,使氨基酸侧链基团的 pK 偏离正常值,以在反应中起酸或碱的作用。

综上所述,我们定性的讨论了增加酶促反应速度的各种因素,但离开定量的理解、认识还有一段差距。我们还不知道各种因素对提高酶活性贡献到底有多大。人们现在正朝这一方向努力。近年来研究表明:典型的酶催化反应中酶碱催化和共价催化分别可加速反应 10~100 倍;邻近、定向效应和过渡态的稳定化作用分别可加速反应 10 1000 倍左右。

3.3 酶的活性部位柔性的假说

酶是生物体内起催化作用的蛋白质。酶的三维空间结构与其催化活性和调节作用紧密相关。在酶蛋白分子中与底物结合并起催化作用的区域,称为酶的活性部位。活性部位通常由酶分子中

的残基侧链活性基团及辅基构成,一般位于酶分子的凹槽或两结构域(或两瓣)的结合处。

酶蛋白的独特三维空间结构赋予酶催化反应的高效性和专一性,同时又具有可调节性。据 Koshland 提出的诱导契合(induced-fit)学说,酶蛋白与底物结合并不是底物与活性部位的密切互补匹配,而是在底物诱导下酶分子发生一定程度的构象变化,酶与底物发生互补楔合。至今,人们已逐渐接受了蛋白质(酶)分子并非完全刚性的观点,认为局部区域具有一定的可运动性或称为柔性(flexibility)。

事实上,构成蛋白质的二级结构单位,如 α -螺旋、 β -折叠和转角等是相对刚性的,它们是稳定蛋白质空间结构的基础。而且,蛋白质中还含有一定量的环(loop)结构和无规卷曲(random coil)。由环和无规卷曲构成的局部区域相结合比较柔性。某些较长的氨基酸侧链,如 Lys 也有一定的柔性,能不断进行分子内运动。因此,从结构学和动态学(dynamics)角度分析,可以认为蛋白质(酶)分子具有刚柔相间的空间结构。

3.3.1 酶的活性丧失和整体构象变化的关系

变性剂(盐酸胍、尿素、温度和 pH 等)的作用,会破坏酶蛋白的次级作用力,导致酶结构的松散,此过程称为去折叠(unfolding);同时酶的活性也随之丧失,称为变性(denaturation)。以前曾认为酶在去折叠过程中,活性的丧失与酶整体结构的去折叠过程存在平行关系,即构象变化与酶的失活同时发生。但是,越来越多的实验证据表明,在平衡态去折叠过程中,使酶活性丧失的变性剂浓度往往比酶蛋白整体构象变化所需的变性剂浓度低(图 3-11)。

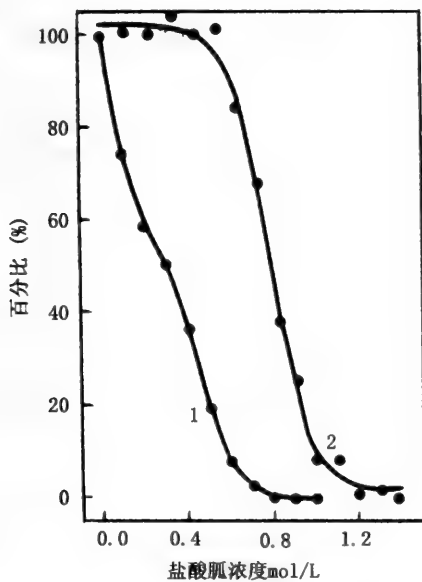


图 3-11 金黄色葡萄球菌核酸酶在盐酸胍作用下的活性丧失和构象变化

1. 酶的活性丧失(方点, DNA 水解活性), $c_m = 0.3 \text{ mol GdmCl/L}$;

2. 酶的二级结构变化(圆点, 远紫外 CD, $[\theta]_{222}$), $c_m = 0.8 \text{ mol gdmCl/L}$

如图 3-11 所示,金黄色葡萄球菌核酸酶在 0.6 mol/L 的盐酸胍时活性几乎丧失,可在此浓度时酶蛋白的二级结构(圆二色性检测)没有明显变化。它们的 c_m 值(变化曲线中点的盐酸胍浓度)分别为 0.3 mol/L 和 0.8 mol/L ,两条曲线存在较大的位移。用紫外差、荧光、巯基修饰和差热扫描等构象测试手段也得到类似的结果。即在变性剂作用下,酶蛋白去折叠过程中,酶活性的丧失先于整体构象变化。其它酶,如肌酸激酶、核糖核酸酶 A、胰凝乳蛋白酶、血管紧张素转换酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和乳酸脱氢酶的实验结果也同样支持上述观点。

根据不可逆抑制动力学的理论和方法,用停流仪研究变性剂作用下的酶活性丧失和构象变化,其拟一级反应速率见表 3-2。从表中可以看出,酶失活速度往往比构象变化(去折叠)速率大 1 000

倍,即酶的失活速度远大于可观测到的构象变化速率。

表 3-2 一些酶在盐酸胍作用下失活与构象变化速率常数的比较

	盐酸胍浓度 (mol/L)	剩余酶 活性(%)	拟一级失活 (快相)	速率常数 失活(慢相)	(s ⁻¹) 构象变化
肌酸激酶	0.5	15	3.6	-	0.004
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	0.7	0	> 50	0.0021	0.0013
胰凝乳蛋白酶	4	-	1.35	0.52	0.19
核糖核酸酶 A	3	3	> 50	-	0.01
血管紧张素转换酶	2	5	0.47	0.0012	0.0011

3.3.2 酶活性部位的柔性

基于上述实验观察结果和对活性部位的荧光探针选择性标记荧光研究,我国科学家邹承鲁首次提出酶活性部位柔性的假说。该学说观点不断地被国际学术界同行所接受。

天然状态的酶具有完整的三维空间结构,其中活性部位跟其它结构部位相比,具有较大的柔性,也就是说酶活性部位基团的运动性较大。因此,当低浓度变性剂作用时,酶分子整体刚性部分构象保持完整,而较柔性的活性部位的局部结构已发生明显变化,如活性基团的相互靠近和立体取向受到破坏,导致酶活性的丧失。

酶活性部位的柔性是酶充分表现其活性所必需的。首先是满足底物结合诱导的构象调整(诱导契合),再是酶的活性基团在活性部位必须具有一定的空间取向,以保持一个适应催化反应的空间微环境。还有,残基侧链活性基团的运动更有利于催化的高效性。另外,一个比较重要的因素是某些酶的活性是可调节的,它的催化效率和底物专一性受到其它因素的调节,如寡聚酶的组装和解聚,底物、产物、激活剂和抑制剂等的作用对酶活性的影响。这就要求酶的活性部位保持一定的柔性,其局部环境受到这些调节物或别构剂的影响而发生细微的构象变化,从而调节酶的活性和底物专一性。

如果用化学交联方法固定酶的柔性部位,则需要更高浓度的变性剂才能引起酶的构象变化和活性丧失,但同时也使天然酶的活性降低。某些酶如果进行特定氨基酸位点的突变,虽然酶的稳定性增大,但还是使天然酶的活性降低。再是,一些酶在低浓度的胍或尿素作用下由于增大了其局部区域的柔性,反而使酶的活性有所提高。这些事实都证明酶活性部位柔性对于酶的催化活性和调节的重要性。

当然,酶的柔性和刚性是局部的,也是相对的。对于局部柔性部位的维持必须有刚性部分来支撑。酶分子既要保持相对稳定的整体结构,又必须要有相对柔性的微环境状态。正是这种刚柔相济的独特酶分子结构,是酶的催化作用保持高效性和可调性的结构基础。

3.3.3 酶活性部位柔性和整体结构刚性的实例

金黄色葡萄球菌核酸酶为 149 个残基组成的核酸水解酶。其空间结构为 $\alpha + \beta$ 型两结构域的折叠类型,分别由三束 α -螺旋和五条 β -折叠链及两个反角(83 - 86 位, 94 - 97) 组成(图 3-12)。

该酶为 $\alpha + \beta$ 型蛋白,三束 α -螺旋构成 α 结构域,五条 β -折叠链构成 β 结构域。两结构域之间的凹槽构成活性部位,其中含有环、转角及无规卷曲结构单元。中间的圆点表示该酶活性部位所结合的 Ca^{2+} 。

此外,该酶还在 β_3 与 α_1 (35 - 54), α_2 与 α_3 (106 - 121) 间含有两段环结构。 α -螺旋和 β -折叠结构域之间的凹槽构成该酶的活性区域。相应地,构成活性部位的残基处于相对柔性的转角和环的局部区域内,如 Arg35, Lys49, Lys84, Arg87, Tyr115。用异核 NMR 研究该酶主链骨架和侧链的动态过程(dynamics),检测到该酶的 N-端、C-端及位于活性部位的环区域(如 35 - 54 位的 Lys48, Glu52,

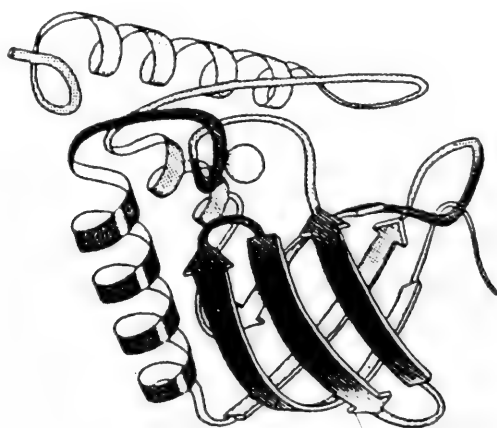


图 3-12 金黄色葡萄球菌核酸酶的三维空间结构

Lys53)肽链的运动性较大;另外,某些内埋的侧链也具有相当程度的分子内部运动。从酶蛋白的晶体结构分析, α 、 β 两刚性结构域和活性部位的动态学验证了图一中关于该酶活性丧失先于结构整体变化和活性部位相对柔性的观点。

生物体中的酶多种多样,分别催化不同的生化反应。酶的形态和作用方式也变化多端,有单体酶和寡聚酶之分,有水溶性酶和膜酶等。尽管这样,从目前所详细研究的几十种酶的情形来看,酶的活性部位都存在一定程度的柔性。这是酶蛋白结构和催化模式中一个较基本的概念。或许是酶蛋白为了适应高效性和可调性的特点而不断进化和选择的结果。当然,与其它假说一样,酶活性部位的假说也需要进一步的拓展和完善。

3.4 辅因子在酶促反应中的作用

3.4.1 金属激活酶和金属酶

已知所有酶中大约有一三分之一以上的酶,需要有金属原子存在,才能充分表现其催化活性。金属离子能以多种方式参与酶的催化作用:

- (1) 可接受或供出电子,激活亲电剂或亲核剂,即使在中性溶液中也能进行;
- (2) 金属离子本身就可作为亲电剂或亲核剂;
- (3) 可掩蔽亲核剂,以防止不需要的副反应产生;
- (4) 通过配位键,将酶和底物组合在一起,在此过程中,可能引起底物分子变形;
- (5) 可保持反应基团处于所需的三维取向;
- (6) 可使酶稳定于催化活性构象。

金属酶和金属激活酶两者之间并不能作出明确的区分,金属酶是指与金属原子结合较为紧密,在酶纯化过程中,金属原子仍被保留;金属激活酶是指金属原子结合不很紧密,纯化的酶需加入金属离子,才能被激活。

1970年Mildvan指出:在酶(E),金属离子(M),和底物(S)之间形成三元络合物,可有以下几种形式:

- (1) 酶桥络合物 $M-E-S$;
- (2) 底物桥络合物 $E-S-M$;

- (3) 金属桥络合物 $E-M-S$ 或 $\begin{array}{c} M \\ \diagdown \quad \diagup \\ E \quad S \end{array}$

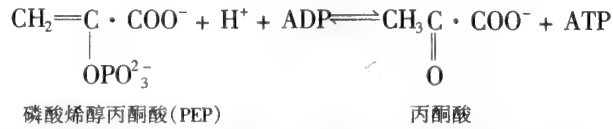
金属酶不能形成底物桥络合物,因纯化的酶是以 E—M 形式存在。

研究酶分子中金属离子的作用,常用核磁共振(NMR),电子自旋共振(ESR)和质子张弛率(PRR)放大技术。

A 碱金属阳离子激活(Na^+ , K^+)

碱金属阳离子和酶以弱的结合形成络合物,细胞内含量最多的 K^+ 能激活很多酶,特别是催化磷酸基转移或消去反应的酶。看来, K^+ 的作用基本上是和酶失活形式的负电荷基团结合,从而引起酶分子构象的变化,使之变为更有活性的形式。在某些情况下, K^+ 也能促进底物的结合。

肌肉丙酮酸激酶是四聚体蛋白,催化下列反应:



它需要碱金属阳离子和 Mn^{2+} (或 Mg^{2+}),这些离子都结合在酶的活性部位,各种研究表明 PEP 的羧基和酶上的 K^+ 结合,因此发生了构象改变,从而经 E— Mn^{2+} —PEP 络合物促进反应的进行。

B 碱土金属阳离子激活(Ca^{2+} , Mg^{2+})

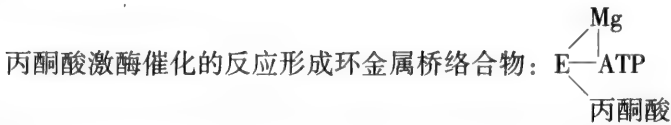
碱土金属阳离子和酶的结合相对的要强些。 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 能形成六个配位键的络合物。需 Ca^{2+} 激活的酶主要是细胞外酶,例:唾液和胰 α -淀粉酶, Ca^{2+} 起着保持酶催化活性所需结构的作用。各种需 Mg^{2+} 激活的细胞内酶,在体外大多数可被 Mn^{2+} 代替, Mn^{2+} 是顺磁性的,使系统就更容易被研究。

二价阳离子能形成各种类型的三元桥络合物。大部分激酶形成 E—S—M 络合物, S 为反应的核苷酸。例:肌酸激酶催化:

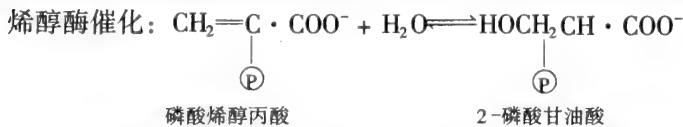


真正的底物是 MgATP,反应是通过形成 $\begin{array}{l} \text{ATP—Mg}^{2+} \\ | \\ \text{E} \\ | \\ \text{肌酸} \end{array}$ 络合物而进行的。1971 年 Cohn 及其同工

作者指出:二价阳离子结合于核苷酸的 α -和 β -磷酸,有助于络合物的取向,以及从 β -磷酸吸取电子,促进焦磷酸键断裂。



以丙酮酸或磷酸烯醇丙酮酸作为底物的许多酶,都可发现金属桥络合物的形成。



烯醇酶是二聚体酶,两个 Mg^{2+} 为稳定活性二聚体所需,另两个 Mg^{2+} 则为两个活性部位结合底物所需。Nowak, Midvan 等在 1973 年证明,酶结合的阳离子可能与水结合,形成配位羟基,能攻击磷酸烯醇丙酮酸(图 3-13):

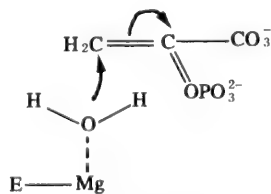


图 3-13 烯醇酶的作用机制

有一些酶,如大肠杆菌谷氨酰胺合成酶,具有形成酶桥络合物的机制,推测二价阳离子起着单纯的结构作用。

C 过渡金属阳离子激活(Cu, Zn, Mo, Fe, Co 阳离子)

过渡金属离子和酶的结合比上述金属离子强很多,常形成金属酶;这就使得它们在酶催化中的作用较易研究。在生物体中这些金属离子含量极微。

极微量的 Mo 和 Fe 存在于氧化氮还原酶(EC1.7.99.2),固氮菌的活化氮络合物中,Fe 是血红蛋白的组分;Co 存在于维生素 B₁₂ 中。下面稍为详细地讨论 Zn 金属酶的例子。

羧肽酶 A 是一个含 Zn²⁺ 的蛋白水解酶,可以水解蛋白质或多肽的 C 末端肽键。C 末端为疏水性氨基酸残基时,水解速度较快。牛胰羧肽酶 A 是一个单亚基酶,含有一个 Zn 原子,对酶的催化活性起了重要作用。X-射线晶体研究和氨基酸顺序分析显示 Zn²⁺ 位于活性中心,与 His-69、Glu-72、His-196 和 H₂O 以配位键结合,还有一个结合 C-末端氨基酸侧链的疏水口袋(图 3-14),底物的末端羰基与 Arg-145 的侧链之间发生静电相互作用。

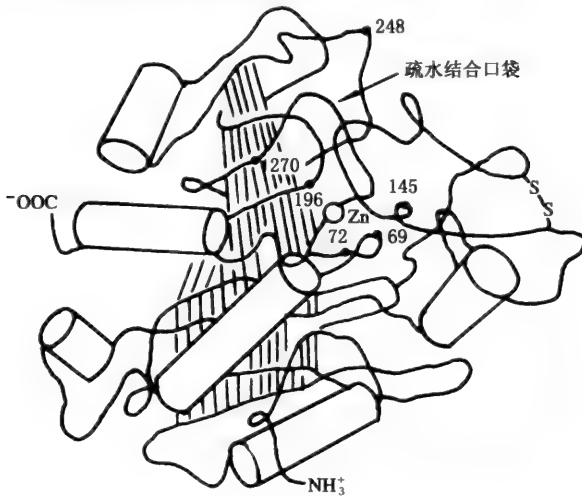


图 3-14 X-射线衍射显示的羧肽酶 A 三维结构示意图

反应时,肽键的羰基被水解,水分子代替羰基氧与 Zn²⁺ 发生作用。Zn²⁺ 起着吸电子的功能,和羰基氧作用,使电子由碳原子向氧原子流动,以利于肽键的水解。这一酶促反应涉及到广义的酸碱催化机制。X-衍射显示在酶-底物复合物中, Tyr-248 对肽键氮原子提供质子, Glu-270 的羧基则起了广义碱的作用,亲核攻击水分子。反应机制可用下图表示(图 3-15): R'' 为 C-末端氨基酸侧链, R' 代表肽键分子的其他部分。

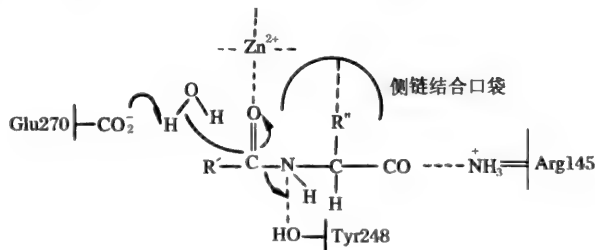


图 3-15 羧肽酶 A 的作用机制

X-射线衍射还显示底物的结合导致 Arg-145, Glu-270, 尤其是 Tyr-248 发生移动,以逼近底物,迫使水分子退出活性部位,形成一疏水环境,如果没有这一构象改变,底物由于被紧紧包围而无法进入这一位置。

3.4.2 辅酶

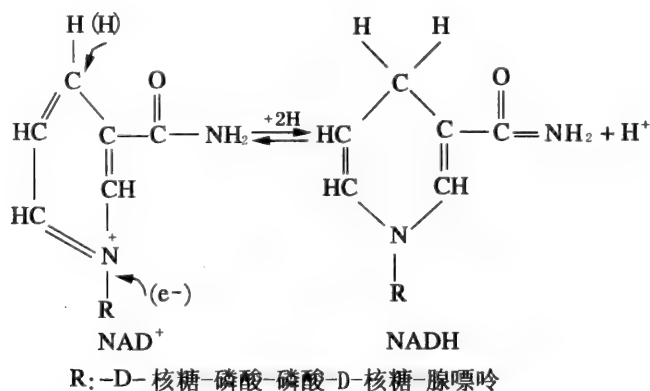
辅酶是有机化合物,许多酶表现催化活性时需要辅酶的参与,它们往往是维生素或维生素衍生物。有时,在没有酶存在的情况下,它们也能作为催化剂。但没有像和酶结合时那样有效。

如同金属离子-酶键合情况一样,辅酶-酶的结合也有紧密的、疏松的。与酶紧密结合的辅酶称为辅基,它们实际上形成酶活性部位的组成部分,像催化剂一样,作用结果,不发生净的变化。与酶疏松结合的辅酶可能被认为是辅底物(co-substrates),因为在反应开始,它们常与其他底物一起和酶蛋白结合,在反应结束以改变的形式被释放。它们被认为辅酶是由于:(1)它们通常在其他底物结合之前,就已结合到酶分子上;(2)在许多反应中,它们参与了反应;(3)通过细胞内存在的许多酶,它们可重新变换为原来的形式。

本节简要讨论一些主要的辅酶。

A NAD^+ 和 NADP^+

NAD^+ 和 NADP^+ 由维生素烟酰胺或烟酸衍生而成。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的氧化型和还原型,如下式所示:



NAD^+ 还原为 NADH 每分子需要两个还原当量;一个电子(e^-)和一个氢原子($\text{H} = \text{H}^+ + e^-$)加于烟酰胺的吡啶环,如上式所示。吡啶环是共轭的,正电荷可以离域,使环的几个部位易受亲核攻击。但精确的反应机制仍未搞清。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP^+)除了结合于腺嘌呤的 D-核糖-2' 位置磷酸化外,和 NAD^+ 是相同的,这并不影响氧化/还原性质,但 NAD^+ 和 NADP^+ 对不同的酶起着辅酶作用。利用 NAD^+ 的酶通常具有分解的功能,产生的 NADH 是细胞的一个能量来源;合成酶则常以 NADPH 作为辅酶。

上述名称和缩写系由 IUB 所推荐, NAD^+ 也可称为二磷酸吡啶核苷酸(DPN^+)或辅酶 I(CoI); NADP^+ 也可称为三磷酸吡啶核苷酸(TPN^+)或辅酶 II(CoII)。

NAD^+ 和 NADP^+ 是氧化/还原反应的辅酶,它们和酶结合疏松,在反应结束以后改变了的形式离开酶。

马肝醇脱氢酶的动力学机制是 Theorell-chance 机制,此酶以 NAD^+ 作为辅酶,催化伯醇或仲醇氧化。值得注意的是 NAD^+ 是第一个结合的底物, NADH 是最后离开的产物。 NADH 从酶解离是整个反应的限速步骤,这是 NAD^+ 是为什么被认为是一个辅酶而不是简单地作为一个底物的理由。马肝醇脱氢酶是二聚体蛋白,每一个亚基有一个 NAD^+ 的结合部位,两个 Zn^{2+} 结合部位;仅一个 Zn^{2+} 与催化作用直接有关,从 X-射线衍射研究结果,1975 年 Branden 等推测三元络合物可能如图 3-16 所示。

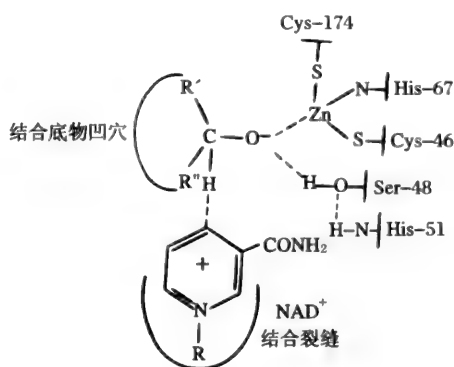
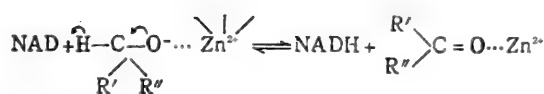


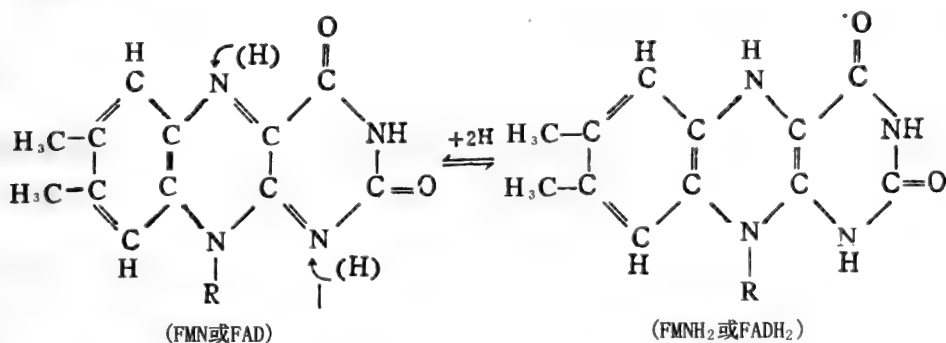
图 3-16 三元络合物

反应机制可能为:



B FMN 和 FAD

黄素核苷酸由核黄素(V_{B2})衍生而成,它们在氧化/还原反应中起辅酶作用。还原当量由黄素稠合三环系统运载:



R₁ FMN-核糖-磷酸

FAD-核糖-磷酸-磷酸-D-核糖-腺嘌呤;

FMN——黄素单核苷酸;

FAD——黄素腺嘌呤二核苷酸。

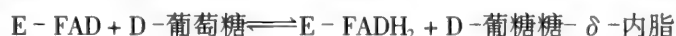
FMN 和 FAD 是结合紧密的辅基,蛋白质-黄素核苷酸络合物称为黄素蛋白。

由于黄素核苷酸不是独立存在,因此黄素蛋白催化的反应通常是将还原当量从一个供体经黄素转移到特定的外部受体。

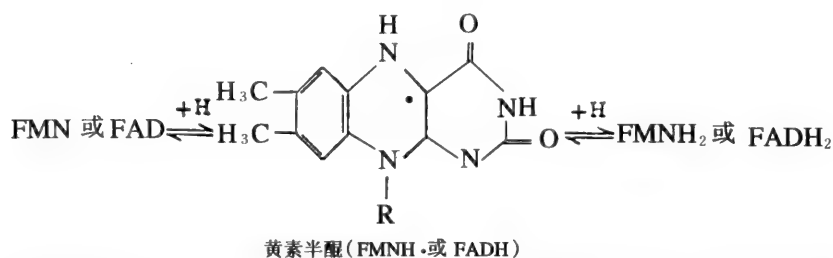
例: 葡萄糖氧化酶催化下列反应:



此酶以 FAD 作为辅基, O_2 作为氢受体, 1967 年 Bright 和 Gibson 指出这是一个二步反应:



某些黄素蛋白其黄素的还原显示为二步过程, 以一个不稳定的自由基半醌作为中间物:



对环系统能离域的未配对电子已由 ESR 研究揭示。许多黄素蛋白也是金属蛋白,金属离子的一个功能可能是稳定这个半醌。

以黄素核苷酸作为辅酶的所有反应并不是通过一个相同的机制而进行的。NADH 脱氢酶催化的反应显示有半醌形成,但葡萄糖氧化酶催化的反应就不是这样。1973 年 Massey 等指出, E-FADH₂ 重新氧化是通过多种机制进行的。在以分子氧作为受体的情况下,产物可能是 H₂O₂ (氧化酶)、H₂O₂ 与羟基化产物(羟化酶)或超氧化物阴离子(O₂⁻)与黄素半醌。

C ADP

ADP 作为辅酶参与磷酸转移反应。应注意:在这类转磷酸反应中伴随有高能焦磷酸键的生成与分解。本小节讨论中,把 ATP 仅看作为 ADP 的磷酸化形式。目前已知有 114 种以上转(未取代)磷酸基的酶,对 ADP 是专一的,称为激酶。

激酶(磷酸转移酶)催化:



另一激酶催化:



总的结果是两个激酶以 ADP 为辅酶,将磷酸基从 X 转移到 Y,这与 NAD⁺ 在两个脱氢酶系统作为氧还载体是完全类似的。另外,腺苷磷酸同烟酰胺核苷酸相似,和酶结合疏松,可被认为是反应的辅酶或辅底物。

在第一个反应中,如 X-P 键也是高能的,反应将处于可逆平衡,如不是高能键,ATP 将使 X 磷酸化。

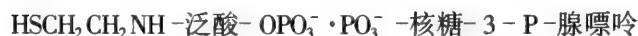
如第二个反应不是激酶而是由合成酶催化的反应,则:



Y 和 Z 合成新分子 Y-Z 的能量来自 X-P 的分解,ADP 在此反应中起着能量载体的作用。

D CoA·SH

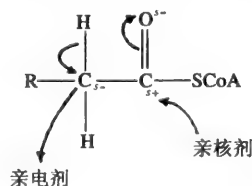
CoA 具有下列结构:



CoA·SH 和羧酸形成硫酯:

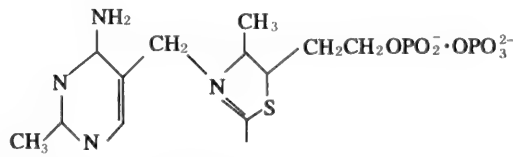


这些硫酯在生化代谢中具有重要意义,因为它们可被亲电剂进攻(包括其他酰基-CoA 分子和 CO₂)形成加成化合物,也可被亲核剂进攻(包括水)取代 -SCoA 基:

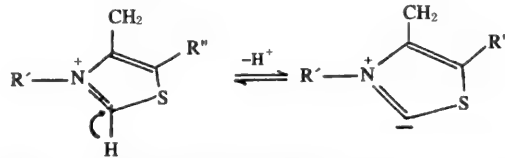


E TPP

硫胺素焦磷酸(TPP)由 V_{B1}, 硫胺素衍生而成:



噻唑环能失去一个质子产生一个负电荷的碳原子：



这是一个有效的亲核剂，能参与共价催化作用，特别是 α -酮酸脱羧酶、 α -酮酸氧化酶、转羟乙醛酶和磷酸酮醇酶 (phosphoketolase) 催化的反应。

例：丙酮酸脱羧酶(酵母和某些其他微生物)利用 TPP 催化丙酮酸产生乙醛。1957 年 Breslow 提出下列反应机制(图 3-17)：

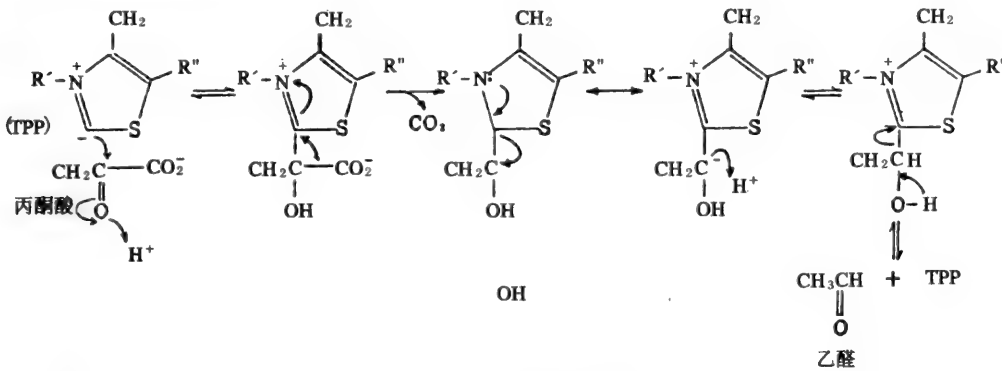


图 3-17 丙酮酸脱羧酶的作用机制

实际的脱羧步骤是由于噻唑环吸取电子通过亲电催化而被促进的。在没有酶存在的情况下，此反应也能进行，但形成的乙醛趋向于与 $\text{TPP}-\overset{\ominus}{\text{C}}-\text{OH}$ 络合物反应产生 3-羟基丁酮-2 作为最终产物。

1961 年 Juni 提出酶稳定 TPP-乙醛络合物防止缩合反应发生的方法。

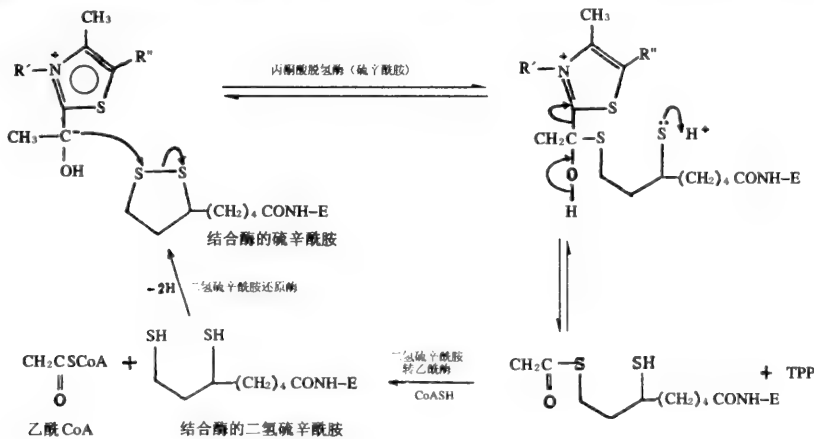


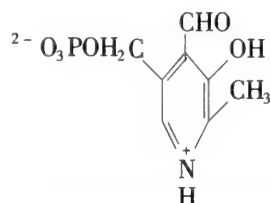
图 3-18 TPP- $\overset{\ominus}{\text{C}}-\text{OH}$ 络合物的形成过程

丙酮酸脱氢酶是多酶复合体,也可催化丙酮酸脱羧,但它利用第二个辅酶-硫辛酸,引入一个氧化步骤,还以 CoA·SH 作为第三个辅酶和乙酰-硫辛酰胺络合物反应,生成乙酰- CoA 作为最终产物。TPP—C⁻—OH 络合物形成的反应过程如图 3-18 所示。



F 磷酸吡哆醛(PLP)

PLP 由 V_{B6}(吡哆醛,吡哆醇或吡哆胺)衍生而成:



PLP 在氨基酸代谢中起重要作用,包括氨基转移酶(转氨酶),脱羧酶和消旋酶催化的反应。大量实验证明,在这些反应中都有希夫碱键合(-N=CH-)形成,这与 PLP 醛基有关,其可能有助于希夫碱的稳定。

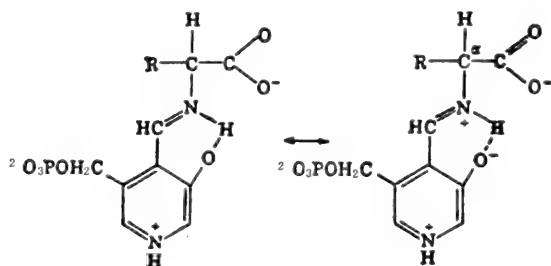


图 3-19 希夫碱键合(-N=CH-)过程

共轭双键系统将吡啶环和底物连接,带正电荷的氮原子趋向于从氨基酸的 C^α 吸取电子,削弱 C^α 和 R,H 和 COO⁻ 的结合,这个亲电催化的结果,可使三个键的任一个裂开形成负离子,又被共轭系统所稳定。

a 氨基酸消旋酶

氨基酸消旋酶催化单一的立体异构体形式转变为 D-和 L-立体异构体消旋混合物。PLP 以希夫碱键合于酶的 Lys 侧链氨基,并以磷酸负电荷和酶的正电荷基团静电键合。当氨基酸底物和酶结合时,希夫碱的碳原子受到底物 α-氨基的亲核攻击,PLP 的底物形成新的希夫碱键合,在这个络合物中已削弱的 C^α-H 键被裂开(如上所述,这是亲电催化结果)释放一个质子,整个过程是可逆的。因此,质子可加于络合物,重新形成游离的氨基酸。质子起始的丢失导致 C^α 不对称性的丧失,所以,重新产生的氨基酸未必是开始时存在的同样立体异构体(图 3-20)。

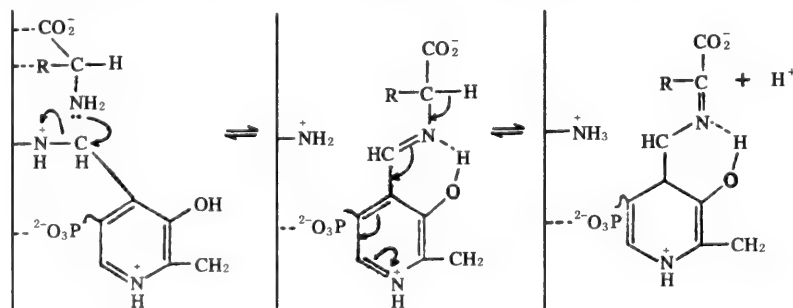


图 3-20 消旋反应

b 氨基酸转移酶

从希夫碱形成到质子丢失的各个反应同上,产生的络合物在一不同部位受到 H^+ 攻击,再经水解,形成磷酸吡哆胺同时释放酮酸(图 3-21)。

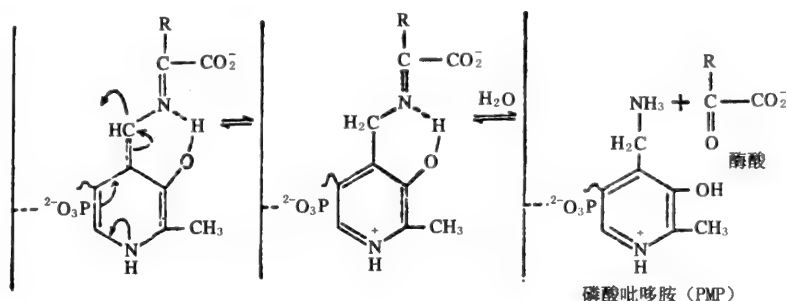
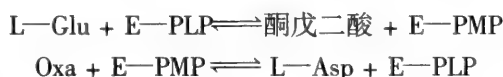


图 3-21 转移反应

从一个不同的酮酸对磷酸吡哆胺攻击开始,可发生逆向反应,形成不同于起始存在的氨基酸。这一类型反应的机制是 1960 年 Jenkins 等从天冬氨酸氨基转移酶的研究而建立的。二步反应可表示为:



Oxa: 草酰乙酸(丁酮二酸)。

动力学研究表明反应为 Ping-Pong bi bi 机制,这与上述化学机制是一致的。

c 脱羧酶

前面几步反应与上述相同,但希夫碱络合物选择的是 α -羧基而不是氢原子,形成的络合经水解,重新形成 PLP 和释放产物胺(RCH_2NH_2)。

G 生物素

生物素和硫辛酸相类似,牢固地结合于蛋白质的一个赖氨酸残基的侧链氨基(图 3-22)。

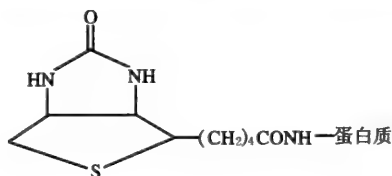


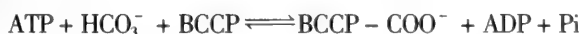
图 3-22 生物素

蛋白质结合的生物素能与 CO_2 键合,称为生物素羧基载体蛋白(BCCP),BCCP 在羧化反应中起重要作用。

大肠杆菌的乙酰-CoA 羧化酶可解离为三个性质不同的亚基。

a BCCP。

b 生物素羧化酶,催化:



c 羧基转移酶,催化:



BCCP 好似一个可动的臂,从生物素羧化酶活性部位将 $-CO_2^-$ 转移至羧基转移酶的活性部位。化学机制尚未确定,可能涉及下列步骤(图 3-23):

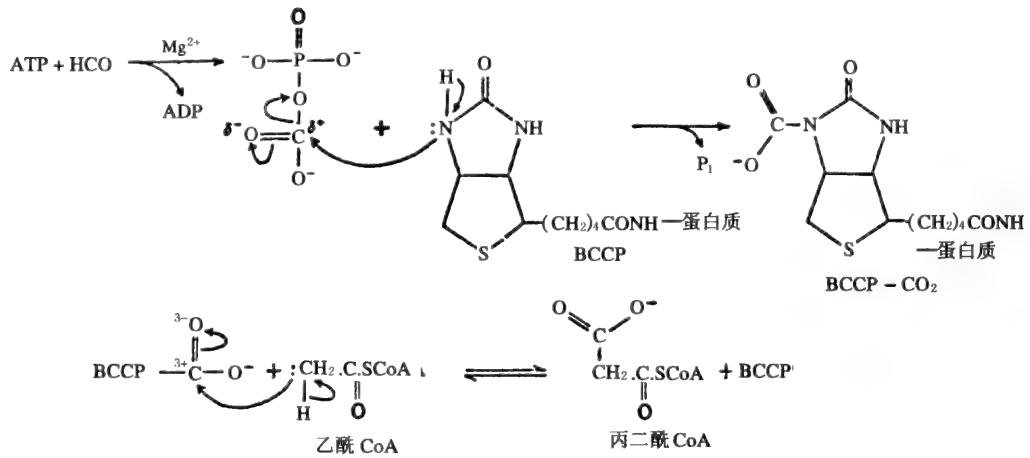


图 3-23 羧基转移作用

H 四氢叶酸

四氢叶酸(FH₄)由维生素叶酸衍生而成(图 3-24)。

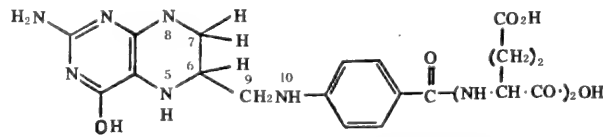
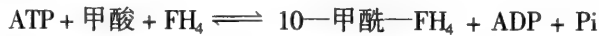


图 3-24 四氢叶酸

N₅ 和 N₁₀能运载一碳单位转移给适当的受体。

甲酰四氢叶酸合成酶催化:



这与生物素羧化机制很可能是类似的。10-甲酰-FH₄能进一步反应形成载于 FH₄ 的各种一碳基团(图 3-25)。

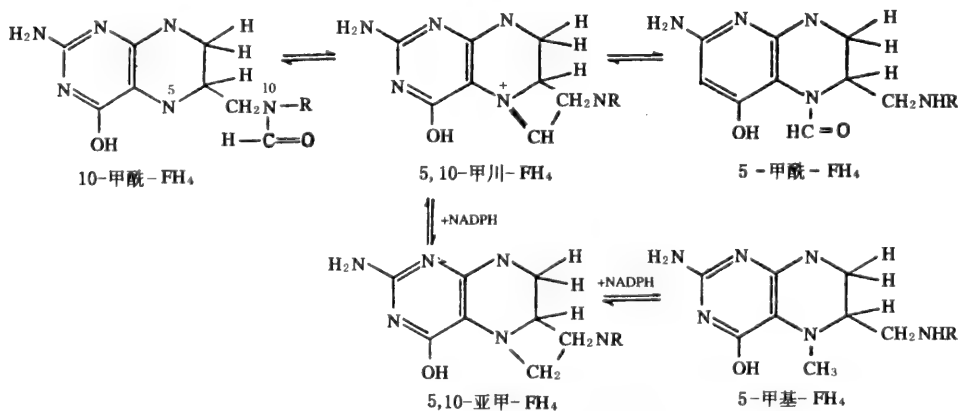
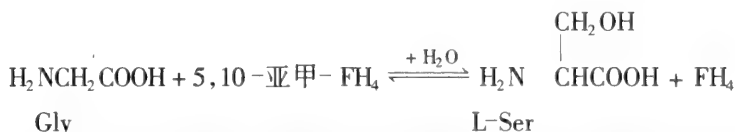


图 3-25 转一碳基反应

这些一碳单位可转移给一个受体。例如,经氨酸转羟甲基酶催化:



PLP 也参与这一反应, Gly 以希夫碱和 PLP 键合, 从 C^α 丢失一个质子, 亚甲-FH₄ 以适当的取向供给一碳单位, 使反应完成。

I 辅酶 B

1956 年 Hodgkin 阐明钴胺(素)(维生素 B₁₂)有一个钴离子的中心核, 为咕啉环所围绕。钴离子以一个共价键, 三个配位键和咕啉环的四个氮原子键合, 但由于共振, 四个键几乎是相等的。Co 又与环下二甲苯并咪唑连接, 后者又与咕啉环的一个吡咯组分相连, Co 的第六个配位部位在体内为 OH⁻ 所占有。在这个天然存在的化合物——羟钴胺中 Co 氧化状态为 +3, 但由于和各种基团相互作用, 因此仅具有单个正电荷, 可表示为 Co(III)⁺ (图 3-26)。

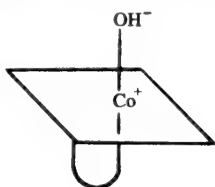
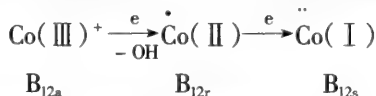


图 3-26 V_{B12} 结构简图

维生素 B₁₂ 通过与 NADPH 有关的还原系统活化, 可得到其辅酶形式:



Co(I) (B_{12s}) 是强力亲核的, 可被烷化。在腺苷转移酶作用下, 和 ATP 反应形成 5'-脱氧腺苷辅酶 B₁₂, 也称为 5'-脱氧腺苷钴胺。也可能甲基化形成甲基钴胺 (图 3-27)。

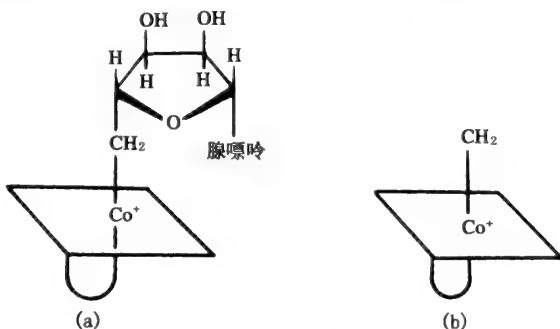
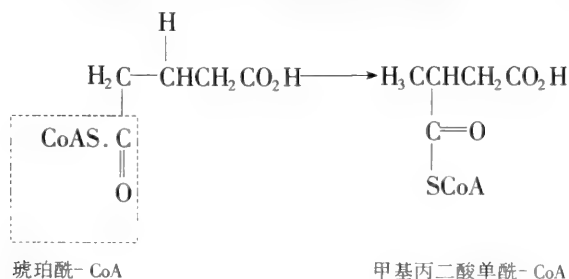


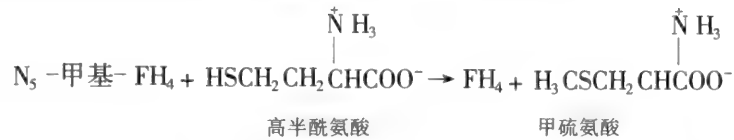
图 3-27 B₁₂ 辅酶简化表示
(a) 5'-脱氧腺苷钴胺 (b) 甲基钴胺

5'-脱氧腺苷钴胺是各种转移反应(通常是分子内)的辅酶。例如, 甲基丙二酸单酰-CoA 变位酶(E.C.5.4.99.2)催化: 已有证据表明, 氢原子是通过辅酶传递的。



甲基钴胺是几种甲基转移反应的辅酶。

例：在某些细菌和哺乳动物中,高半胱氨酸转变为甲硫氨酸的反应:



甲基是通过 B₁₂ 的钴离子转移的,对另一些细菌、真菌和较高等植物,这反应与 B₁₂ 无关。

5'-脱氧腺苷钴胺和甲基钴胺的详细机制仍不知道,可能与钴的氧化状态进一步变化有关。

3.5 酶作用机制的研究方法

前面讨论了增加反应速度的理论基础,下面介绍一些揭示酶作用机制的主要实验方法,分为六大类:动力学研究;中间物探测;X-射线晶体衍射;氨基酸侧链化学修饰;定点突变;蛋白水解酶作用。这些方法互为补充,并应得到一致的结果。

3.5.1 动力学研究

表 3-3 介绍了几种动力学研究方法,可用以推测酶的反应机制,分别介绍如下。

表 3-3 酶作用机制的动力学研究

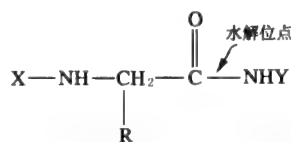
实验方法	所得信息
改变底物浓度	反应络合物顺序,区别的机制
改变底物结构	结合部位和催化部位的结构特点,即活性部位图解
可逆抑制	利用竞争性抑制剂了解活性部位
改变 pH	催化部位氨基酸的 pK _a 。由此推测催化部位可能拥有的氨基酸
恒态前动力学研究	检测酶中间络合物和基元反应速度常数

A 改变底物浓度

稳态动力学研究证明了单底物反应是通过一个或更多个酶-底物络合物的形成和分解进行的,但它不能指出络合物出现的顺序。以双底物反应为例,稳态动力学研究可以区别三元络合物和酶取代机制(有序双双,随机双双和乒乓双双等),再由产物抑制,底物结合或同位素交换实验,就可判断三元络合物是以有序还是随机方式形成的。

B 改变底物结构

酶促反应速度与底物结构相关,由此可以了解很多酶活性中心的结构,如胰凝乳蛋白酶偏爱的底物具有芳香基或大的疏水基团(R)的氨基酸,弹性蛋白酶所喜欢的底物含有小的疏水基团(R)氨基酸。比较大量的氨基酸衍生物水解速度,发现这些酶的底物结合部位都具备一定的特征,才会表现出如上各自的专一性行为。



沿着这一思路继续研究下去,可以得到活性中心更多详细的图谱。如以人工合成的多肽底物研究木瓜蛋白酶的专一性,发现酶分子上有七个亚部位,其中 S₂ 专一于 L-苯丙氨酸侧链。后来又发现 S₁' 对 L-氨基酸呈立体专一性并偏爱亮氨酸、色氨酸等疏水性侧链,酶和底物精确的相互作用结构解说有待于 X-射线衍射法的证实,现已推测出酶分子上可能的亚部位 S₁'、S₁ 和 S₂ (图 3-28)。

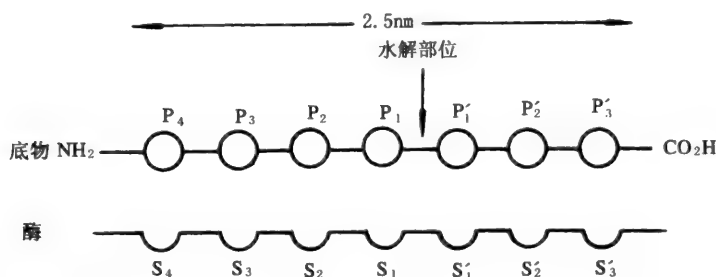


图 3-28 木瓜蛋白酶活性部位图谱中的亚部位

C 使用底物类似物

不可逆抑制剂与酶结合紧密,形成稳定的复合物。研究这类酶的抑制现象有助于了解酶活性中心的结构,如 DFP(二异丙基氟磷酸)与胰凝乳蛋白酶及其他丝氨酸蛋白酶的活性中心 Ser 结合,形成稳定的复合物。部分水解可得一系列片段。含有 DFP 的片段可能就是活性部位肽链的一级结构。实验显示胰凝乳蛋白酶 Ser 周围的氨基酸侧链为一 Gly — Asp — Ser — Gly — Gly — Pro —。分析表明该 Ser 为 195 号侧链,胰蛋白酶中也发现了同样的顺序。

如果抑制剂与底物结构类似,效果更佳,如竞争性抑制剂与底物竞争酶分子上同一个结合部位,比较底物与抑制剂结构,可以了解酶活性部位最基本的特征。

一般,由于直接研究酶-底物复合物相当困难,因而抑制剂在酶活性部位研究中很有价值。

D 改变 pH

前已论述(6章),溶液 pH 对酶活力有显著影响。pH 对表现米氏常数(K_m')的影响可以反映酶-底物复合物的解离情况,pH 对 V_{max}' (表现最大反应速度)/ K_m' 的影响反映了自由酶的解离情况,由此可以了解与酶活性有关的氨基酸的解离,核糖核酸酶活性中心两个组氨酸侧链就是用这种方法判断出的,并经过了 X-射线研究和其他方法证实。

有时,由于酶环境的影响,会使酶分子上的氨基酸侧链偏离自由氨基酸的 pK_a 值好几个单位,需用其他手段(如溶剂的微扰,侧链基团的自由焓)校正,故下结论需谨慎。

E 恒态前动力学

前面我们曾讨论过恒态前动力学可用于检测酶-底物络合物的形成及分解速度,与恒态动力学研究比较,快速反应技术要求酶浓度更接近于底物浓度,并需配备特殊仪器装置迅速混合反应液,以快速检测发生的反应,马肝醇脱氢酶的快速反应技术研究就是一个很好的例子。当酶与饱和底物乙醇及 NAD^+ 迅速混合,每摩尔酶快速释放 2 摩尔 $NADH$,随后反应进入速度较低的恒态阶段(图 3-29),测定反应早期的快速释放,可得到酶反应机制较为详细的信息。以荧光检测产物 $NADH$,自由的 $NADH$ 与酶结合的 $NADH$ 很容易鉴别。结果发现快速反应产生的 $NADH$ 是与酶结合的 $NADH$,结论是 $NADH$ 从酶分子上释放为总反应的限速步骤(图 3-30)。

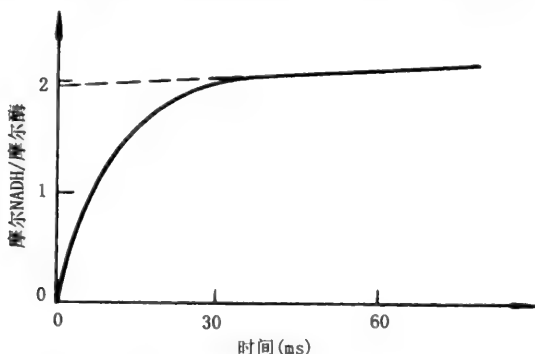


图 3-29 停流法研究马肝醇脱氢酶(二亚基)催化的反应

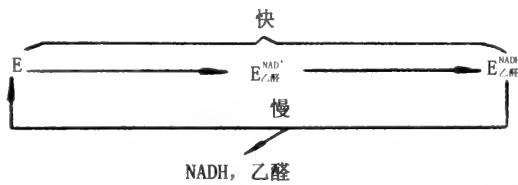
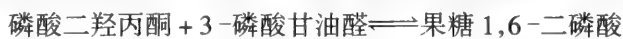


图 3-30 荧光检测马肝醇脱氢酶反应速度

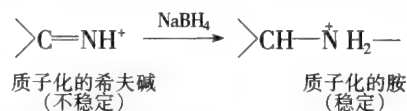
恒态前动力学研究其他成功的例子还有胰凝乳蛋白酶、乳酸脱氢酶反应机制等(参见 3.6 节)。

3.5.2 “捕捉”酶-底物复合物

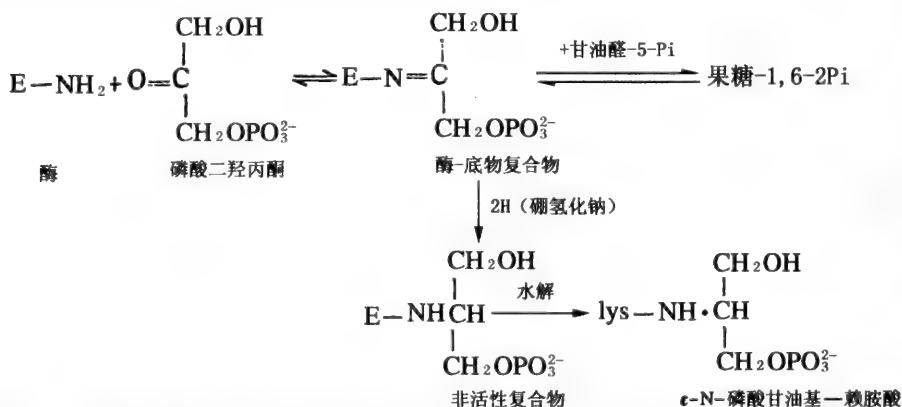
酶促反应的可逆性质使得直接测定底物的结合部位比较困难。恒态动力学研究发现很多酶促反应过程中存在酶-底物复合物,但要捕捉复合物并鉴定结合部位并不一定成功,这是由于分离过程中底物会从酶分子上解离。如果能通过化学修饰方法将复合物加以修饰;使底物无法解离,就可以鉴别结合部位了。例如:果糖二磷酸醛缩酶催化下列反应:



Horecker 及其同工发现用硼氢化钠处理反应复合物,可得到无活性的复合物,将这一复合物水解,得到 ϵ -N-磷酸甘油基-赖氨酸,证明了磷酸二羟丙酮通常与酶分子上的 lys 的 ϵ -氨基以希夫碱相连:



酶促反应的顺序和底物结合部位鉴别的过程如下:



有时,由于复合物的分解速度高于形成速度,捕捉复合物将非常困难,需采用间接的实验手段证明它的存在。还可采用分光光度法测定中间物的存在,如马肝醇脱氢酶的反应。

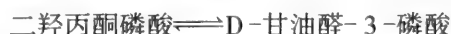
3.5.3 X-射线晶体衍射法

X-射线晶体衍射法可对酶的结构提供丰富且细致的信息。显然,为了准确定位酶催化过程中有功能的氨基酸侧链,首先应判明酶分子活性部位才能了解底物的结合模型。由于收集衍射数据往往需要几小时甚至更长时间,此时底物已转化为产物。因此,直接研究具有催化活性的酶-底物络合物结构一直到不久以前才成为可能。以酶催化的反应中涉及到两个或更多个底物为例,检测酶与其中一个底物形成的络合物已成为可能。如乳酸脱氢酶(参见 7.3.2),采用以下几个方法可以得到具有催化活性络合物结构的信息。

A 单底物反应平衡趋向一端

若在单底物中平衡非常趋向于一端,就有可能检测到活性络合物。如在磷酸丙糖异构酶催化

的反应中,可观察到酶-二羟丙酮磷酸络合物晶体:



B 酶与活性较弱的底物结合

如果酶与活性较弱的底物或竞争性抑制剂结合,其结合方式与酶-底物一致,但只能形成络合物而不会发生反应,观察酶的三级结构,如胰凝乳蛋白酶(参见 7.3.1)和乳酸脱氢酶,就可判断出正常底物如何与酶结合。

C 不稳定络合物在低温下观察

某些不稳定络合物可在低温下观察,因低温下络合物的分解速度会大大降低,但需采用防冻溶剂,有可能会改变反应机制,某些情况下采用高浓度的硫酸铵溶液可能较为合适,低温酶研究已有一些成功的例子。如核糖核酸酶和弹性蛋白酶,低温技术开拓了 X-射线衍射的前景。

X-射线晶体衍射得到的详细资料对于解释其他实验方法得到的结果很有价值。除了定位活性中心和提供可能涉及到催化过程的侧链基因性质,还可测定伴随着底物结合过程中酶结构(或构象)的变化的程度。

3.5.4 质谱法

质谱(MS)是现代科学技术中最有效的物质定性手段之一,在蛋白质的分析中,肽图分析是一个常用的工具,先用专一性的酶将蛋白质降解为一系列的肽,再经典型的反相液相色谱将这些肽进行分离,分离得到的每一个峰可用 Edman 降解法分析,质谱(MS)由于能分析特定的肽的离子碎片,因而也能够提供此类结构信息。质谱分析肽的基本原理:肽分子在质谱的离子化室中受到轰击后被电离,所生成的各种正离子碎片在高压电场中加速,经过磁场时被偏转,其偏转的轨道半径 R 为:

$$R = \sqrt{\frac{2V \cdot m}{H^2 \cdot e}}$$

式中 V ——加速电压;

H ——磁场强度;

m ——正离子质量;

e ——正离子电荷。

通过改变加速电压或磁场强度,可以只允许某一种质荷比(m/e)的离子通过出口狭缝,被离子捕获器收集,经过信息的放大处理,记录成条状的质谱图,与标准样品的质谱图对照,就可得到未知样品的结构信息。现在有了质谱与质谱的联用(Tandem MS)方法,是指由液相色谱收集到的肽在进入第一个质谱仪后,被电离成肽的离子碎片,并被选择性地进入第二个质谱仪,在第二个质谱仪中,这些被选择的肽的离子碎片受到进一步轰击,离解成更小的碎片离子(子离子),并由第二个质谱仪分析得到其组成。肽在受到轰击时会在组成其骨架的键合处断裂,产生的碎片离子包含了由第一个质谱仪选择得到的一系列肽的组成信息,由此可分析得知所研究的蛋白质的结构。质谱分析目前已经成为酶蛋白结构分析的重要手段之一。

3.5.5 氨基酸侧链的化学修饰

化学修饰法研究酶的机制的原理相当简单,如果与酶催化中心有关的氨基酸侧链被修饰,酶即失活。假如能建立标准结构技术使修饰的侧链具有等同性,分离并序列分析经修饰的肽,就可判断哪一个侧链与酶的作用机制有关。

但是,大部分化学修饰实验操作虽然简单,由于修饰试剂缺乏专一性,因而解释实验的结果还需十分谨慎。如远离活性中心具有反应活性的侧链经修饰后也可能由于引起酶空间构象的改变而导致酶的失活。如图 3-31 中,酶分子活性部位以外的基团 X-,经化学修饰导致酶分子构象的改变,引起酶的失活。

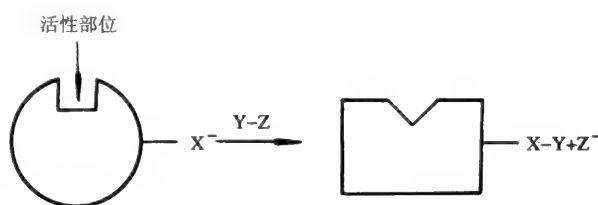
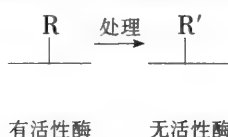
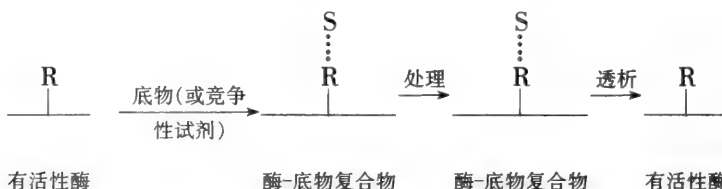


图 3-31 酶构象的变化

这两种情况可尝试在过量底物或竞争性抑制剂存在下进行修饰实验而加以区别,如果酶分子上的侧链(R)在没有底物或竞争性抑制剂存在下由于修饰剂处理而失活:



但是,在饱和底物或抑制剂存在下经同样处理,由于侧链不再接受修饰试剂,因而可避免酶因修饰导致失活:



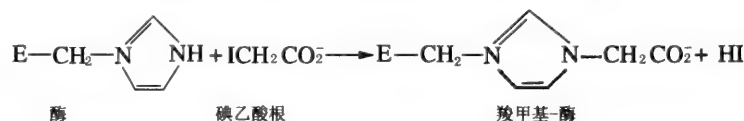
可以推测这一氨基酸侧链 R 位于酶的活性中心,有时,它们不仅可以保护底物结合部位(如上图),还可能保护邻近的催化基团。

要判断被修饰的氨基酸是否位于催化中心,除了上面谈到的底物(或竞争性抑制剂)保护实验外,还应注意化学修饰的程度和酶失活的程度必须存在化学计量关系,即一摩尔酶与一摩尔修饰剂作用引起 100% 失活。

酶的化学修饰实验显示了 His、Cys、Ser、Met、Tyr、Asp、Glu、lys 和 Trp 等残基位于一些酶的活性中心。

His 的咪唑基对酶的催化活性有重要贡献,这是由于其 pK_a 值处于大多数酶作用的 pH 范围内,既为质子受体又可是质子供体。胰凝乳蛋白酶中 TPCK 就是因为烷化了 His-57 使酶不可逆失活,而在过量竞争性抑制剂(苯甲酰胺)存在下可解除这一抑制效果,显示 TPCK 可能作用于酶的活性中心。同样,胰蛋白酶抑制剂 TLCK,也是因为烷化了必需基团 His 才使酶失活的。

用碘乙酸盐(iodoacetate)烷化溶菌酶中 His,引起酶完全失活:



His-119 和 His-12 被烷化,但两者不会在同一酶分子上被烷化,有可能这两种氨基酸在活性中心靠得很近。一种相似的烷化试剂碘乙酰胺却不能使酶失活,说明碘乙酸根负电荷与 His 的质子供体形式形成了静电相互作用。事实上,在 pH5.5 条件下,这一酸根离子不与 His 作用,推测 His-12 及 His-119 位于特殊的微环境。这一烷化过程可在过量磷酸存在下被解除,因磷酸根结合了酶的活性中心。

有时,某一酶由于其特殊的微环境,使某一氨基酸侧链表现不寻常的反应活性,从而达到专一性的修饰目的。如胰凝乳蛋白酶用二异丙基氟磷酸修饰,28 个 Ser 侧链中只有 Ser-195 被作用,X-射线晶体研究也发现了这个超反应活性的 Ser-195。又如牛肝中的谷氨酸脱氢酶共有 30 个 Lys 侧链,2,4,6-三硝基苯磺酸盐只作用 Lys-126 侧链。不过应注意不是所有活性特异的氨基酸都是

酶活性所必需的基团,如木瓜蛋白酶中 19 个 Tyr,只有一个与 DFP 反应,但修饰后并不改变酶的活力。

非专一性的化学修饰研究酶的活性中心可参见酶的不可逆机制动力学(2.3.2)。

近年来,定点突变方法以其更强的专一性、选择性和可控制特性很大程度上取代了化学修饰方法,但化学修饰方法体现了酶活性受抑制的程度与酶修饰速率之间的相关性,可以快速反映酶活性中心的结构信息,因而在研究酶作用机制方面仍保留其不可取代的特殊地位。

3.5.6 定点突变

定点突变指改变酶分子上特定位置的残基,观察酶结构和功能的变化,从而了解该位点的侧链基团在酶的结构和功能上的作用。DNA 寡核苷酸片段的合成,DNA 分子的重组,外源 DNA 在异源系统中的表达使得研究酶分子结构和功能之间的关系成为现实,现在可以对已克隆的核苷酸序列经设计后进行各种人为突变。定点突变主要包括:缺失、插入、移位和置换等。一个成功的定点突变工作需要进行三方面的工作。首先,对分离纯化酶分子,进行氨基酸序列分析,X-射线晶体衍射、核磁共振等一系列分析,获得足够多的结构信息。然后是对获取的基团片断进行定点突变,并进行表达。最后,对表达的产物进行分离纯化和生物学功能鉴定。典型的定点突变操作过程如图 3-32。

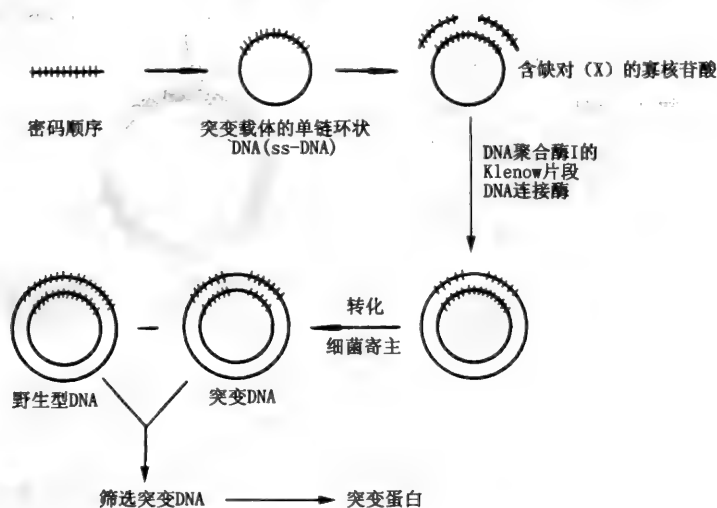


图 3-32 定点突变的典型操作过程

首先将一基因克隆到一载体上,如 M_{13} 噬菌体,其感染性的单链 DNA,即正链,在细菌胞内酶作用下,转变为双链复制型 DNA(RFDNA),然后将负链作为模板,以滚动环方式复制大量正链,并分泌到宿主菌外而不产生溶菌,这些子代 M_{13} 中只含有目的基因的一条链,因此很容易制备单链的重组分子(M_{13} 正链),合成一段诱变引物,该引物两测序列与目的基因诱变部位的两测序列互补,而中间是预先设计好的突变序列,将诱变引物与 M_{13} 正链重组分子杂交,在 Klenow 片段和 T_4 DNA 连接酶作用下合成异源双链 M_{13} 分子,转化 $E. coli F^+$ 菌株进行扩增,然后用杂交技术等筛选出带有突变位点的 M_{13} 噬菌体,制备突变的 DNA 分子进行碱基序列分析,进一步证实突变的可靠性。

由于体内存在修复系统会切除突变的碱基以及在以滚动环方式复制大量正链时,不以诱变的单链为模板,因此实际的突变率很低,约 1%~5%左右噬菌斑含有突变基因。要提高突变率,就要设法提高 M_{13} 负链的存活率。这里我们介绍几种可以增加转化细胞中的突变率的方法。

由 Zoller 和 Smith 提出的双引物法是在突变引物的上游,再增加一个保护性引物,可以避免突变引物被 5' 端外切核酸酶的水解,该法突变率接近 50%。

dUMP 正链缺失法:在 dut^- (dut 编码的 dUTPase 缺失), ung^- (ung 编码的尿嘧啶-N-糖苷酶缺

失)的 E. Coli 中培养 M_{13} 重组噬菌体,该 DNA 分子中一定量的 T 被 U 取代,以此正链为模板,加入突变引物,在体外合成正常的互补链后,转染 ung^+ 的 E. Coli, M_{13} RF 中带有 U 的正链被降解,带有突变位点的负链被大量繁殖。该法突变率超过 70%。

异源 M_{13} 双链缺口法:用带有目的基因并含有琥珀性突变(能通读琥珀终止子)的 M_{13} DNA 作为正链,与不含目的基因的野生型 M_{13} 退火,形成带缺口的异源 M_{13} 双链分子,再与突变引物退火,延长,转染野生型 E. Coli,正链的后代因含有琥珀性突变,不能在野生型 E. Coli 中正常繁殖,而负链的后代能大量扩增。该法突变率达到 70%。

硫代核苷酸负链法:在突变引物和正链退火后,用一种硫代核苷酸代替正常底物进行 DNA 合成,得到的 cccDNA 用 Nci I 或 PvuII 酶解,这些核酸酶不能水解含硫的核酸分子,所以只有正链被切割,用 ExoIII 扩大切口,切除正链上的目的基因,以负链突变基因为模板修复新的正链,转染 E. Coli,突变率 90% 以上。

抗性筛选法:将目的基因插入 Amp^s , Tet^r 载体中,变性后与突变引物, Amp^r 回复突变引物, Tet^s 回复突变引物退火,用 T4DNA 聚合酶和连接酶延伸并连接,转化合适的宿主菌并分别用抗 Amp 和对 Tet 敏感的培养基筛选突变体,可得到较高的突变率(图 3-33)。

近年来用 PCR 介导的突变技术进行定点突变研究非常有效。PCR 技术采用热变性使 DNA 双链分开,因此可以用双链 DNA 分子作为模板,避免了用单链 DNA 分子作为模板需进行分离纯化的过程。目前已建立了许多以 PCR 为基础的定点突变技术,这里择要介绍两种方法。

PCR 法产生点突变:把目的基因克隆在载体上,用限制性内切酶在突变位点两侧将质粒切开,使之线性化,设计两对引物,突变引物 1 和突变引物 2 之间部分互补,非突变引物 3 和非突变引物 4 之间部分互补,这样得到的 PCR 产物未断是同源的,可以进行碱基配对,在宿主菌中线性分子经过同源末端配对,即可得到突变质粒(图 3-34)。一般来说,同源末端较长,重组率较高。

重叠延伸突变法:设计两对引物,突变引物 c 和突变引物 b 之间部分互补, a, d 为非突变引物,分别在引物 a, b 和引物 c, d 作用下进行 PCR 反应,得到产物 AB 和 CD,将其混和,可得到上游链 AB 和下游链 CD 经重叠区碱基配对组成的杂合分子,延伸后即可得到突变体,在引物 a, d 作用下继续 PCR 反应,扩增所需要的突变体(图 3-35)。

如果定点突变难以确定原来的氨基酸突变为哪一种氨基酸更合适,这时需选择将原来的氨基酸突变为各种序列的氨基酸的套式突变法,如盒式突变(Cassette mutagenesis):用限制性内切酶移去插入在 M_{13} 或质粒的目的基因中欲突变的一小段 DNA 片断

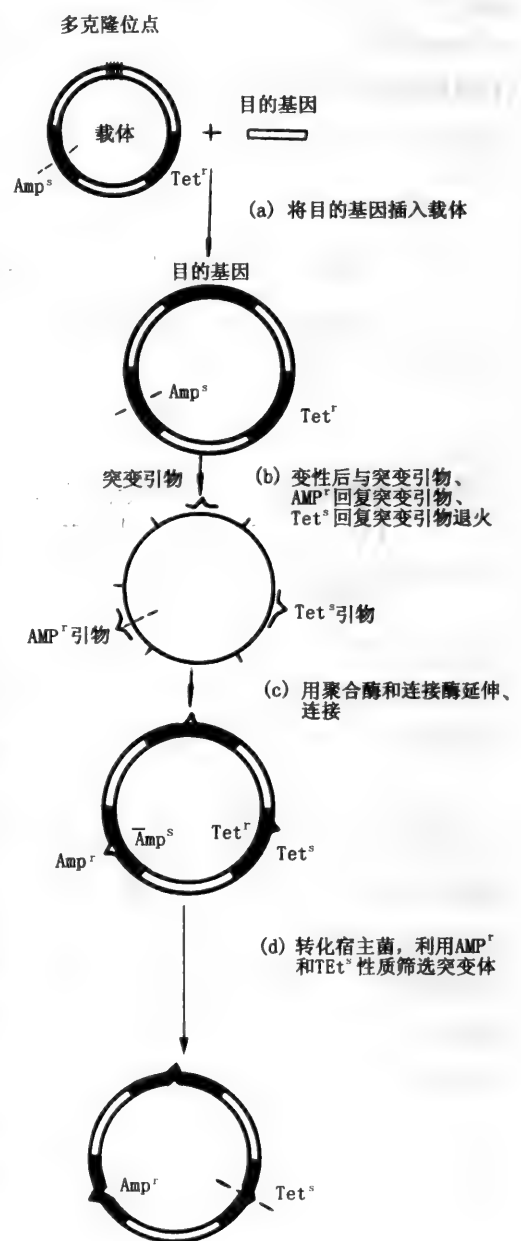


图 3-33 抗性筛选法示意图

(如决定一段重要的结构域),插入一段人工合成的与移去的 DNA 片断具有相同粘性末端的寡核苷酸片断(一般长度约 40 个核苷酸左右),这样可以获得一系列具有各种突变性质的 M_{13} 或质粒(图 3-36)。

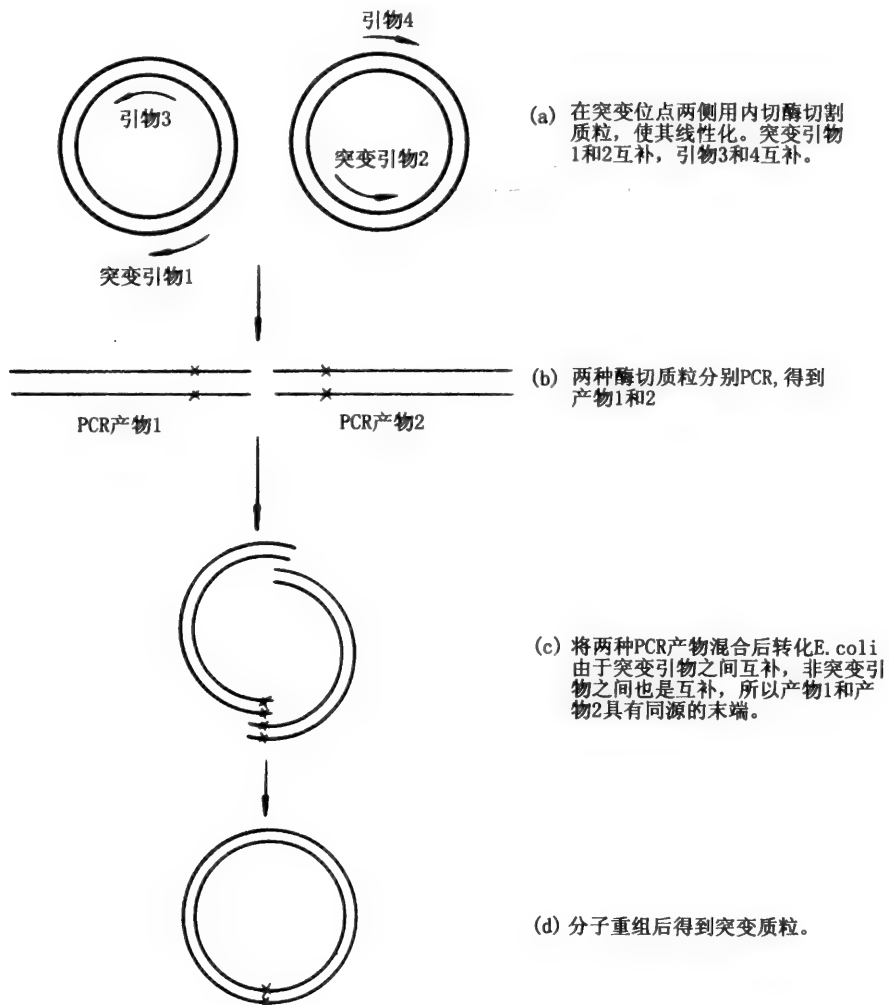


图 3-34 PCR 定点突变示意图

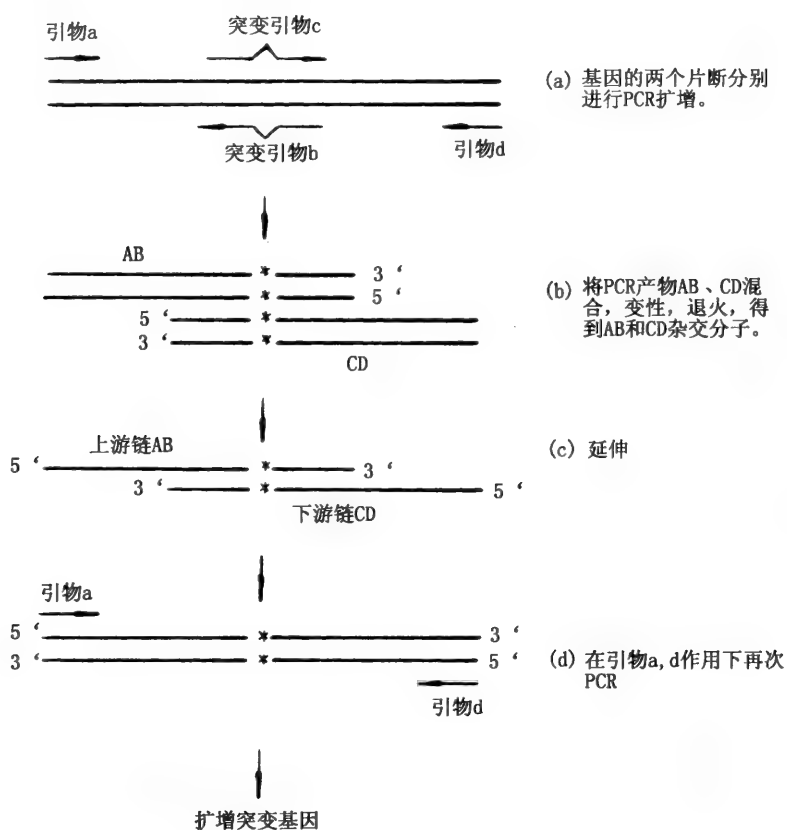


图 3-35 重叠延伸定点突变法示意图

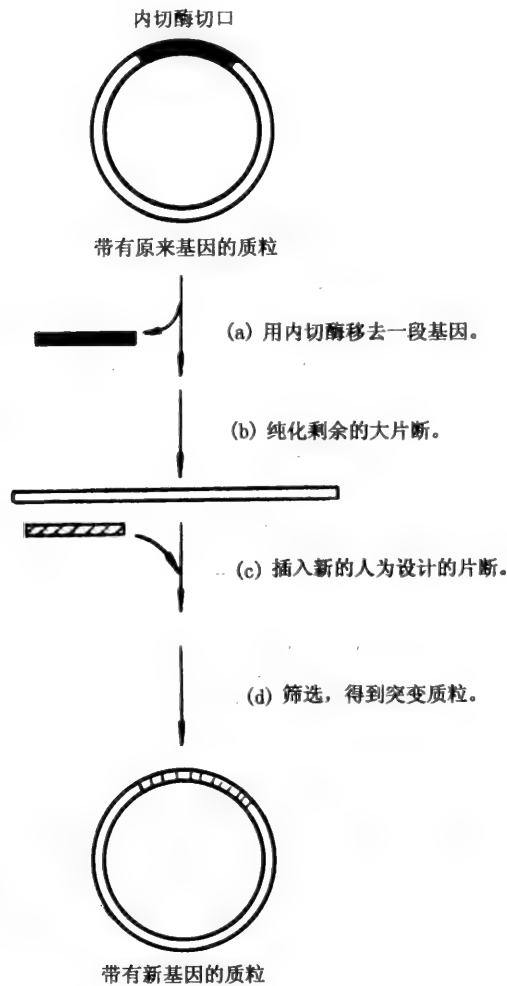


图 3-36 盒式突变示意图

另一种办法可以利用 *E. coli* 琥珀校正子 tRNA 库: 每个宿主菌含有一种琥珀校正子 tRNA 基因, 这样只要使目的基因欲突变的位点突变成琥珀终止子(UAG), 那么, 一系列校正子 tRNA (携带各种氨基酸) 就可以在琥珀密码子位点插入相应的氨基酸, 得到定向突变为各种氨基酸的突变产物。

3.6 酶反应机制实例

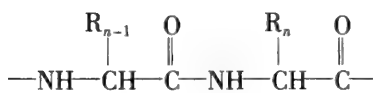
这一节以丝氨酸蛋白酶(serine proteases)乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase)酪氨酰-tRNA 合成酶(tyrosyl-tRNA synthetase)超氧化物歧化酶(superoxide, dismutase, SOD)为例, 说明各种酶的反应机制, 所用的各种实验方法互为补充, 并应得到相同的结果, 才可能描绘出合理的、可信的酶反应机制图谱。

3.6.1 丝氨酸蛋白酶

丝氨酸蛋白酶是一类重要的蛋白水解酶, 胰脏分泌的消化酶, 如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶及血液凝固中的凝血酶都属于丝氨酸蛋白酶的家族(表 3-4)。这种归类是因为这些酶的催化中心都有一个活性特异的 Ser 侧链, 四十多年通过动力学, 化学和物理技术的广泛研究, 丝氨酸蛋白酶与其他酶相比, 对其作用机制了解得最为透彻。下面主要介绍三种酶: 胰凝乳蛋白酶, 胰蛋白酶和弹性蛋白酶。这三种酶都以酶原形式在胰脏的腺泡中产生, 然后在小肠中由蛋白水解酶激活, 都可水解肽链中的酰胺键, 但专一性不同:

表 3-4 丝氨酸蛋白酶举例

酶	来源	功能
胰蛋白酶	胰脏	消化蛋白
胰凝乳蛋白酶	胰脏	消化蛋白
弹性蛋白酶	胰脏	消化蛋白
凝血酶	脊椎动物血清	血液凝固
血纤维蛋白溶酶	脊椎动物血清	血块溶解
补体 C ₁	血清	免疫应答中的细胞溶胞作用
激肽释放酶	血和组织	控制血流
顶体蛋白酶	精子顶点	穿透卵细胞
溶酶体蛋白酶	动物细胞	细胞蛋白周转
α -Lytic 蛋白酶	<i>Bacillus sorangium</i>	}可能与消化有关
蛋白酶 A 和 B	<i>Streptomyces griseus</i>	
枯草杆菌蛋白酶	<i>Bacillus subtilis</i>	



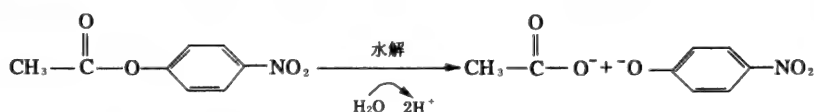
T

作用位点

对胰蛋白酶而言, R_{n-1} 为 Arg、Lys 时, 专一性较强; 胰凝乳蛋白酶, R_{n-1} 为 Phe, Trp, Tyr 时, 具有大的疏水基团水解速度较快, 若 R_{n-1} 为 His, Met, Leu, Asn 时, 作用十分缓慢; 弹性蛋白酶则要求 R_{n-1} 为小的中性侧链, 如 Ala, Gly, Ser, Val。这三种酶形成了强有力的消化酶系统。

3.6.1.1 动力学研究

胰凝乳蛋白酶在体外可以水解具有酯键和酰胺键的小分子化合物, 但专一性较低。这一特点在生理条件下是不重要的, 但在体外动力学机制研究时很有意义。Brian 以对硝基苯乙酯作为胰凝乳蛋白酶的底物:



反应呈两相进行(见图 3-37)。

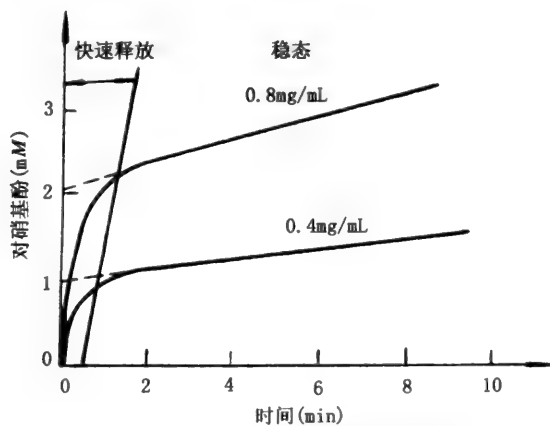


图 3-37 胰凝乳蛋白的快速释放

(1) “快速释放”相(burst phase)是在很短的时间内,每摩尔酶释放出等摩尔的对硝基酚。

(2) 稳定相(steady state phase)是反应速度降低,进入线性阶段。

这种现象解释为整个反应分两个过程: 1) 迅速释放对硝基酚,酶本身被乙酰化; 2) 乙酰化酶缓慢水解,释放乙酸(见图 3-38)。

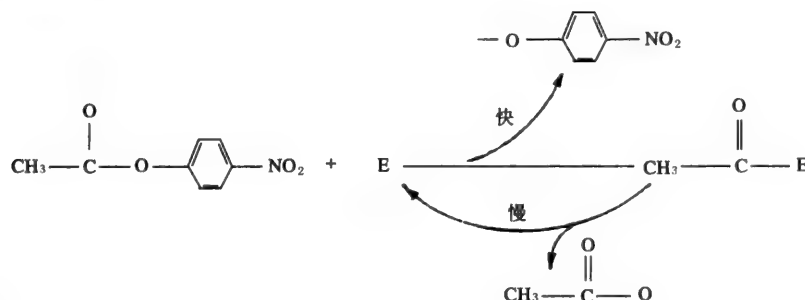
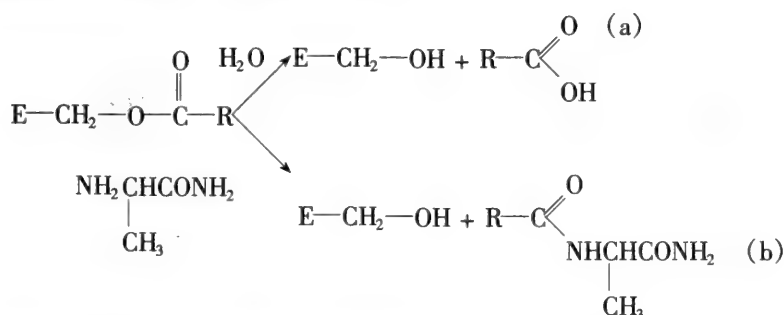


图 3-38 乙酰化酶水解

3.6.1.2 中间物检测

胰凝乳蛋白酶催化酯的水解分酰化和脱酰两个过程。脱酰反应与溶液的 pH 值密切相关。当 pH 值足够低时,脱酰反应十分缓慢,甚至可分离到酰化酶中间物。实验结果显示酰化反应发生在 Ser-195 侧链上。

当酶水解酰胺类底物时,脱酰反应速度远高于乙酰化过程,故酰化酶中间物不会“堆积”,即不可能直接收集,只能由实验间接地“捕捉”(trapping)。如,酶促水解过程中加入高浓度的丙氨酸酰胺或羟胺类亲核剂与水分子竞争酰化酶:



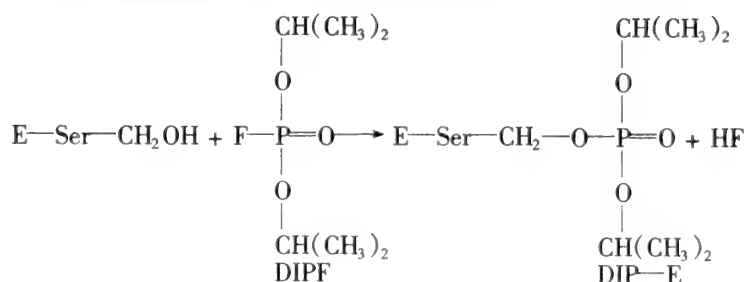
以酯为底物时,可直接得到乙酰酶中间物,并可测出产物(a)/(b)的比值。当以酰胺为底物时,加入相同浓度的亲核试剂,可观察到同样的(a)/(b)的比值,因此推测酰胺水解过程中也存在酰化酶中间物。

3.6.1.3 鉴定必需基团

为了鉴别胰凝乳蛋白酶分子上的必需基团,曾做过大量的研究工作。这儿只介绍一些经 X-射线研究证实有功能的侧链修饰实验。

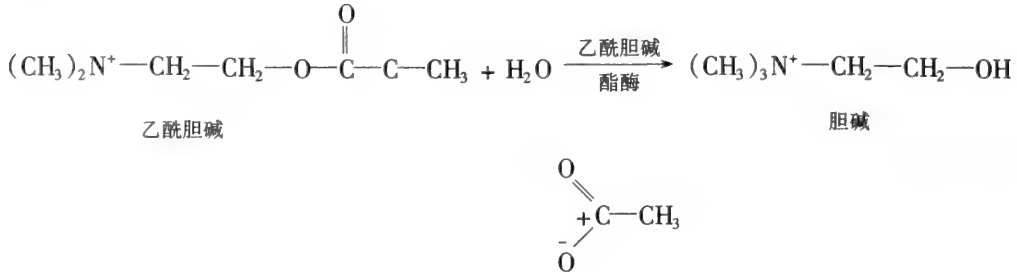
A Ser-195

用二异丙基氟磷酸(DFP 或 DIPE)进行修饰:



酶被不可逆失活,除了 Ser-195 外,酶分子上其余的 Ser 侧链都未参与修饰反应。

DIPF 修饰酶起源于人们发现有机磷化合物为强的神经毒剂。DIPF 可使乙酰胆碱酯酶失活,乙酰胆碱酯酶为催化胆碱水解的丝氨酸酯酶,该酶失活将阻碍神经冲动。Ser 还可用苯甲烷碘酰氟进行修饰。



B His-57

一些成功的亲和标记实验,证明了 His-57 与酶催化活性有关。对-甲苯磺酰-L-苯丙氨酰氯甲酮(TPCK)和底物对-甲苯磺酰-L-苯丙氨酰甲酯(TPME)结构相似(见图 3-39)。TPCK 可使酶失活,并存在着化学计量关系,修饰部位为 His-57(见图 3-40)。但 TPCK 不能使胰蛋白酶失活,这说明两种酶底物结合口袋不同。相反,对-甲苯磺酰-L-赖氨酰甲酮(TLCK)可使胰蛋白酶失活,但不作用于胰凝乳蛋白酶。TLCK 与胰蛋白酶的底物对-甲苯磺酰-L-赖氨酰甲酯(TLME)结构非常相似(图 3-39),这两种试剂在蛋白质顺序研究中应用较多,如制备胰凝乳蛋白酶时用 TLCK 处理酶以防有胰蛋白酶污染,反之亦然。

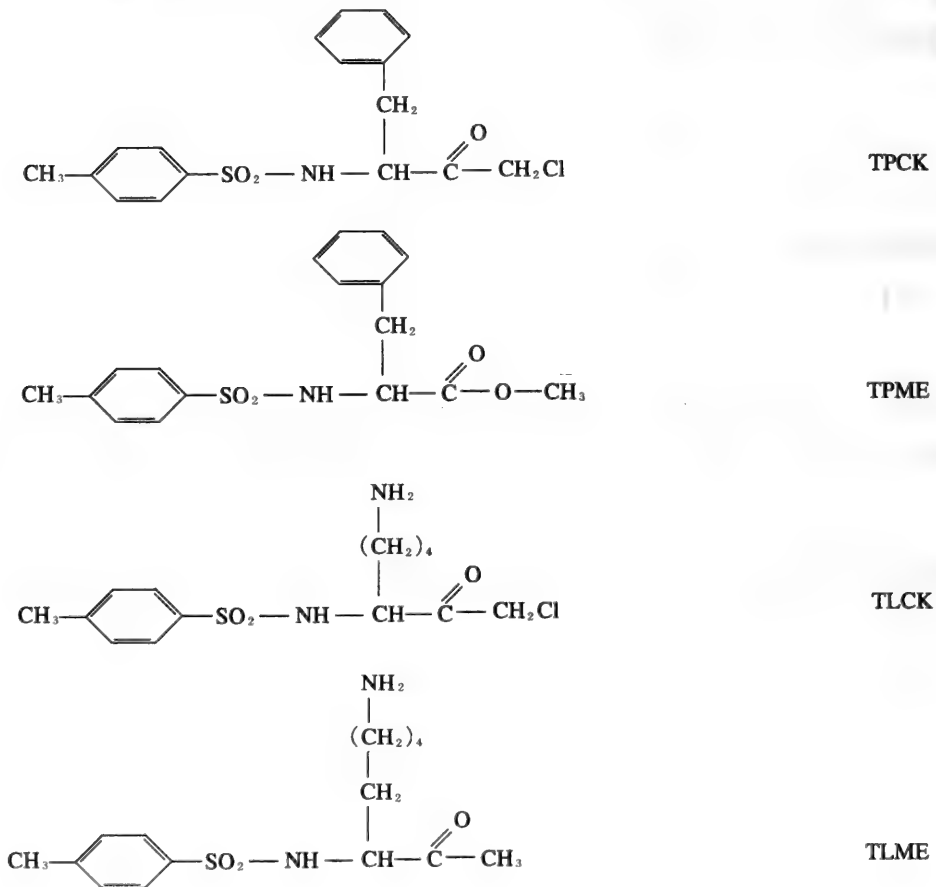


图 3-39 胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的底物与亲和标记试剂结构比较

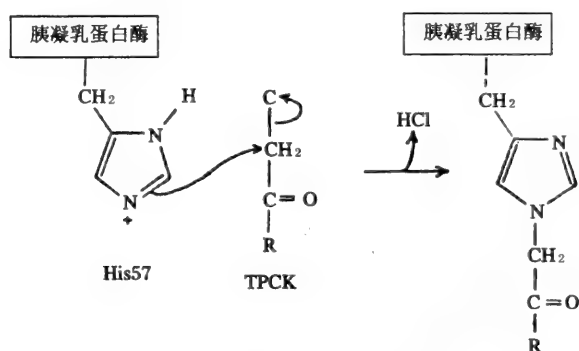
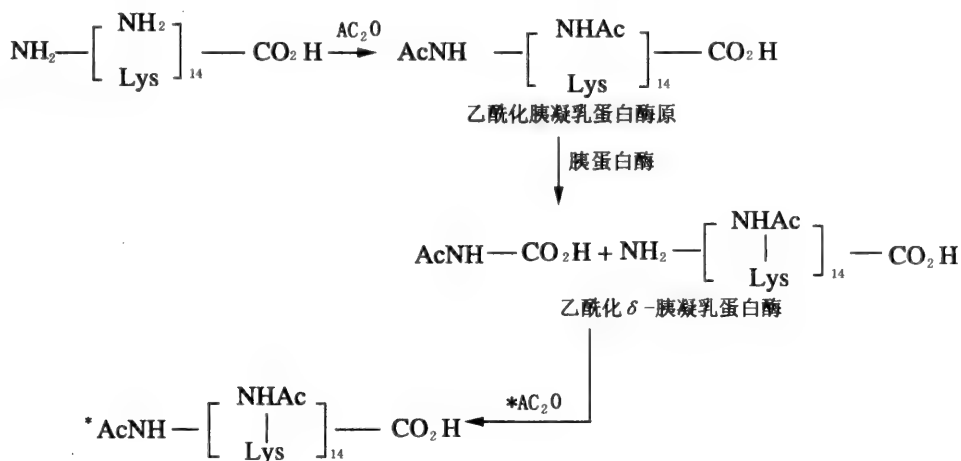


图 3-40 TPCK 与胰凝乳蛋白酶 His-57 的反应

C Ile-16

化学修饰实验还证明了胰凝乳蛋白酶上 Ile-16 的 α -氨基具有重要的功能。在通常情况下,要选择性地修饰这一氨基十分困难,双标记(double-labelling)实验(见图 3-41)可以解决这一问题。胰凝乳蛋白酶原首先与酸酐(Ac_2O)反应使分子上所有的 α -和 ϵ -氨基乙酰化,然后用胰蛋白酶作用产生完全有活性的 δ -胰凝乳蛋白酶,其中 Ile-16 具有自由的氨基,再与 ^{14}C 标记的酸酐作用,发现酶的失活与渗入 Ile-16 的 α -氨基的同位素量成正比,证明了酶活性中这一基团的重要性。

图 3-41 双标记实验中胰凝乳蛋白酶 Ile-16 基团 α -氨基的乙酰化

D Asp-102

专一性化学修饰 Asp 较为困难,因而采用了定点突变技术直接验证该侧链的功能,将 Asp-102 换成 Asn,胰蛋白酶突变体 D_{102}N 动力学分析表明 K_m 不变,但 K_{cat} 为天然酶的 0.05%,中子扩散技术和 X-射线衍射法研究都认为 Asp-102 以离子化形式存在,而不是从咪唑环上吸取一个质子成为质子化的形式。

3.6.1.4 X-射线结构研究

牛胰凝乳蛋白酶,牛胰蛋白酶,猪弹性蛋白酶之间氨基酸序列表现出严格的同源性,大约 40% 的一级结构为保守结构,与催化功能有关的基团非常相似,X-射线研究表明三者之间的三维结构也高度相似,胰凝乳蛋白酶的立体结构(见图 3-42)。分子形状呈椭圆形,最长处距离 5.1nm。三条肽链由 5 个二硫键维系, α -螺旋结构很少,只有两部分,分别位于 163-173 及 235-245 残基之间,大部分为反平行的 β -折叠片,主要集中在 27-112 及 133-230 残基之间。X-射线研究发现在猪胰凝乳蛋白酶的空间结构中,主要也是由反平行的 β -折叠片和少量的螺旋结构组成。尤其需注意的是牛胰凝乳蛋白酶中一些荷电氨基酸,如 Asp-102、Ile-16、Asp-194 深埋在分子内部,一般非极性氨基酸侧链往往位于分子内部,远离水分子,而极性氨基酸多处于分子表面。如果有例

外,这一氨基酸必有其特殊作用,说明这些氨基酸侧链对酶的活性有重要贡献。

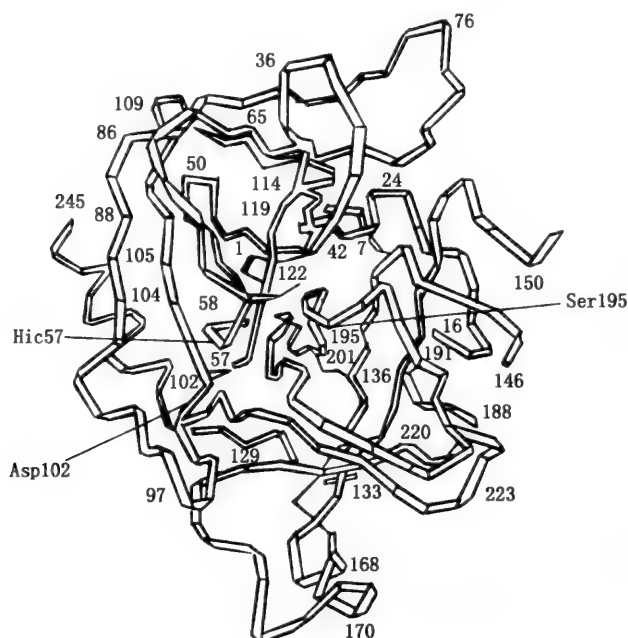


图 3-42 牛 α -胰凝乳蛋白酶的空间结构

虽然这三种酶严格同源,但它们作用底物的专一性不同,这与它们底物结合部位的差异有关(图 3-43)。

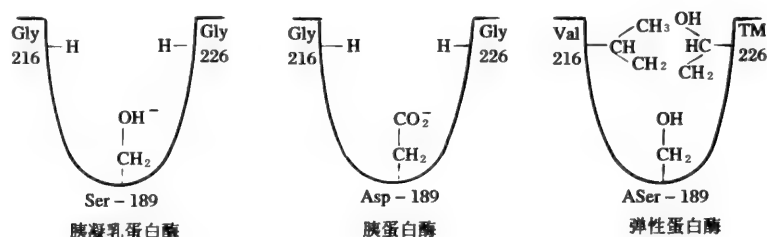


图 3-43 三种酶底物结合部位示意图

胰凝乳蛋白酶的结合部位为一非极性的口袋,因而喜欢作用具有芳香性或体积较大的疏水性侧链;胰蛋白酶结合部位中 Asp-189 替代了 Ser-189,所以它偏爱带正电荷侧链的底物;弹性蛋白酶结合口袋中 Val 和 Thr 分别代替了 2 个 Gly,其他部分与胰凝乳蛋白酶相同,故大体积的底物分子难以进入口袋,偏爱作用于体积较小的疏水侧链,其专一性较宽,可作用 Ala、Gly、Val 等。并由此而得名。相反,胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶因结合部位不能很好地固定这些小的氨基酸侧链,因而水解具有这些氨基酸残基的肽键速度很慢。

胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶氨基酸顺序和空间结构的相关性,说明它们在进化上有密切关系,推测可能来自共同的祖先。通过基因突变,出现性能上某些差异而发生趋异进化,另两个来自细菌的丝氨酸酶可以进一步说明丝氨酸蛋白酶家族进化上的关系。*Streptomyces griseus* 蛋白酶 A(SGPA)是具有胰凝乳蛋白酶专一性的(chymotryptic specificity)丝氨酸蛋白酶。X-射线研究表明,该酶与胰脏的丝氨酸蛋白酶比较,保守顺序 < 20%,但空间结构极其相似。枯草杆菌蛋白酶(最初从 *Bacillus subtilis* 分离得到)与胰凝乳蛋白酶相比,它们的一级结构和空间结构似乎看不出有何联系,但它们活性部位的基团基本相同,相应的三级结构的位置也几乎没有区别,但活性部位的氨基酸残基的顺序则大不相同(图 3-44),这是一个趋同进化的典型实例。

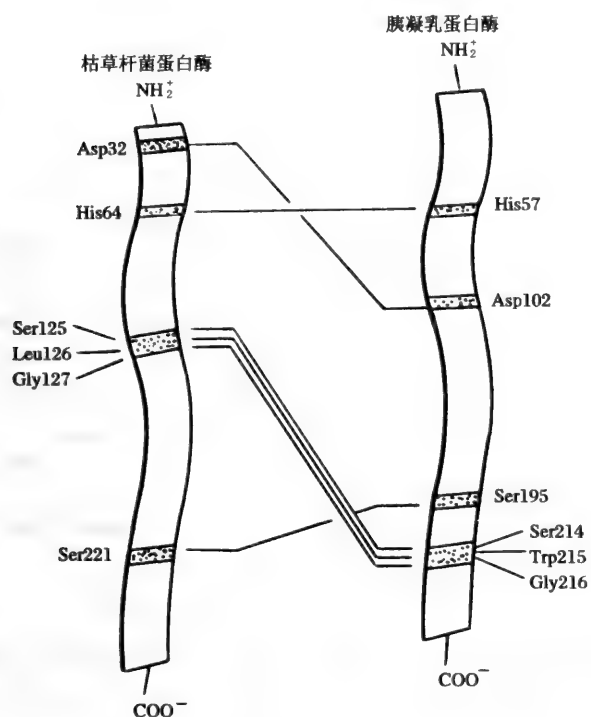


图 3-44 枯草杆菌蛋白酶(左)和胰凝乳蛋白酶(右)一级结构中活性部位残基的相对位置示意图
 Ser-221, His-64 和 Asp-32 为枯草杆菌蛋白酶的催化三元组,胰凝乳蛋白酶上的 Ser-214
 Trp-215 和 Gly-216 及枯草杆菌蛋白酶上相应的氨基酸残基参与了底物结合作用

此外,血液凝固中的凝血酶也是丝氨酸蛋白酶,其一级结构与三级结构与哺乳动物胰脏来源的酶区别较大,但其活性部位的结构及作用机制却非常相似。上述的实例表明,丝氨酸蛋白酶家族在进化上密切相关。

3.6.1.5 作用机制

丝氨酸蛋白酶的同源性表明它们具有相同的催化机制。基于大量的化学和结构资料的分析,人们描绘了丝氨酸蛋白酶的催化机制,现以胰凝乳蛋白酶为例介绍如下。

A 四面体中间物形成

胰凝乳蛋白酶活性中心的氨基酸侧链如图 3-45 所示。

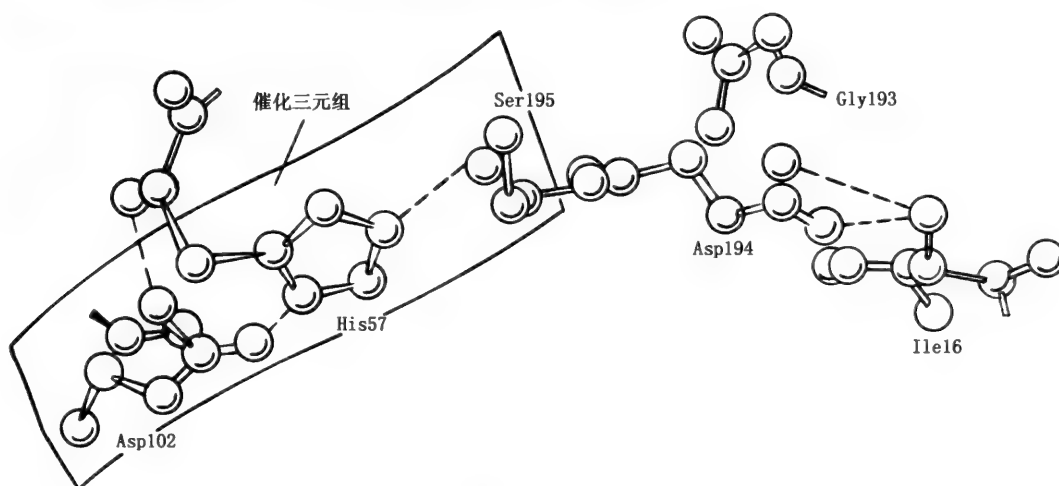


图 3-45 胰凝乳蛋白酶活性中心图谱(阴影部分)

当酶与底物结合时,形成米氏复合物(图 3-46)。

Ser-195 亲核攻击羰基形成四面体中间物(共价催化)图 3-47)。

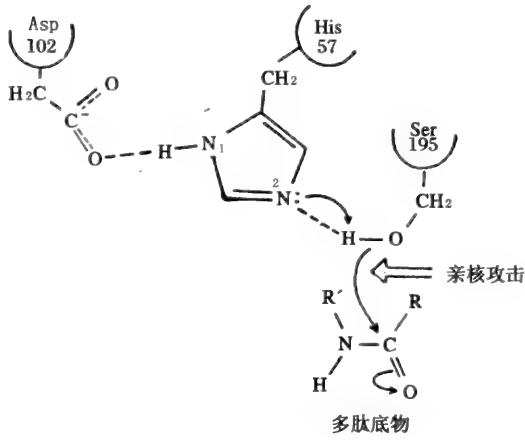


图 3-46 米氏复合物的形成

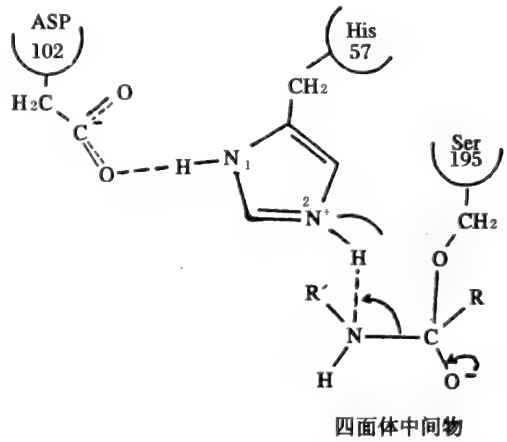


图 3-47 四面体中间物

X-射线分析认为 Ser-195 处于有利的位置(邻近和定向效应),是一个有效的亲核攻击基团。His-57 吸收释放的质子,起一广义碱的作用,这一过程为 Asp-102 加强。极化的 Asp-102 与 His-57 的氢发生静电相互作用(静电催化),酶的催化即从形成短暂的四面体结构开始。

B 形成乙酰化酶中间物

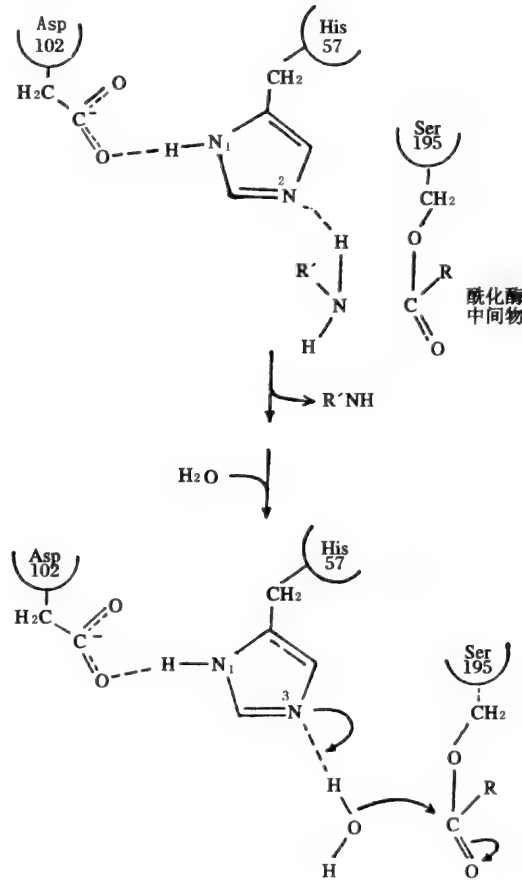


图 3-48 H₂O 的替代反应

四面体结构在 His-57N(3) 质子供体作用下(酸碱催化)分解,形成酰化酶中间物, R'NH₂ 从酶分子上释放并由溶剂 H₂O 替代(图 3-48)。这一过程极不稳定,但人们还是分离得到了弹性蛋白酶的酰化酶中间物(-55℃条件下),并进行了 X-射线结构的研究。

C 脱酰过程

脱酰反应是酰化反应的逆过程,释放生产物羧酸,酶得以再生。在这一过程中, H₂O 为亲核试剂(图 3-49)。

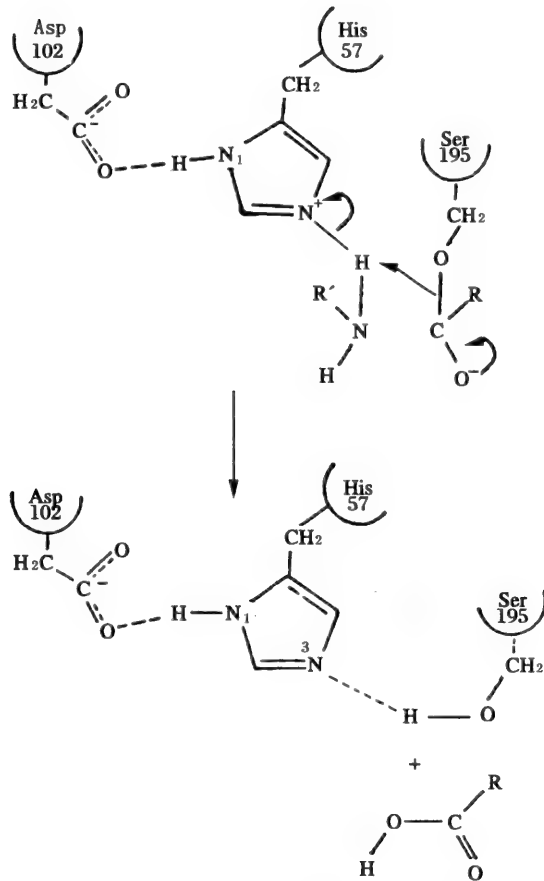


图 3-49 四面体中间物存在的实验依据

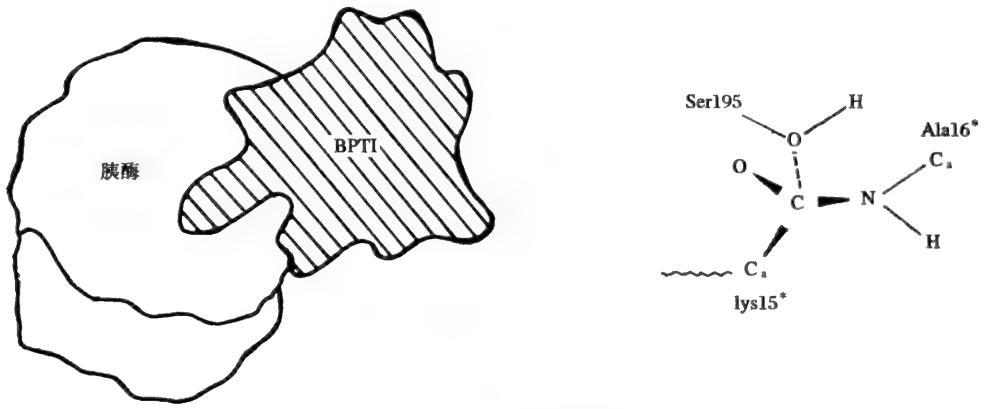
3.6.1.6 作用机制验证

上述胰凝乳蛋白酶作用模型经很多实验证明是合理的。下面列举一些成功的实验。

A 四面体中间物存在的实验依据

Robert Huber 对胰酶和牛胰蛋白酶抑制剂(BPTI)复合物的 X-射线研究结果是四面体中间物存在的有力证明。BPTI 是具有 58 个氨基酸残基的蛋白质,与胰蛋白酶结合时,因形成复杂的氢键网络而使酶失活,这个复合物的结合常数高达 $10^{13} (\text{mol/L})^{-1}$,是已知的蛋白质之间最强的相互作用。

BPTI 与胰酶活性中心结合的部位同酶与底物结合的部位非常相似。BPTI 的 Lys15* (* 表示 BPTI 的氨基酸残基,以区别于胰酶上的氨基酸残基)占据了胰酶的特异性口袋, Lys15* 和 Ala16* 之间的肽键恰好处在底物肽键被水解的位置(见图 3-50)。BPTI 胰酶活性中心结合的构象再次证明了四面体中间物的存在。胰酶活性中心 Ser-195 的侧链氧与被“水解”肽键的羰基碳之间距离(0.26nm)小于范德瓦力接触距离,此时肽键呈角锥状形变。由于活性中心复合物本身的刚性及结合的紧密性使得本该水解下来的基团无法释放,同时小分子也不能进入反应部位,所以,尽管两个原子之间(图 3-50(b))有协同的紧密接触,蛋白水解反应仍不能完成。



(a) 胰酶与 BPTI 复合物 (b) 胰酶活性中心 Ser195 与 BPTI 被“水解”肽键结构示意图

B 丝氨酸蛋白酶优先与过渡态底物结合

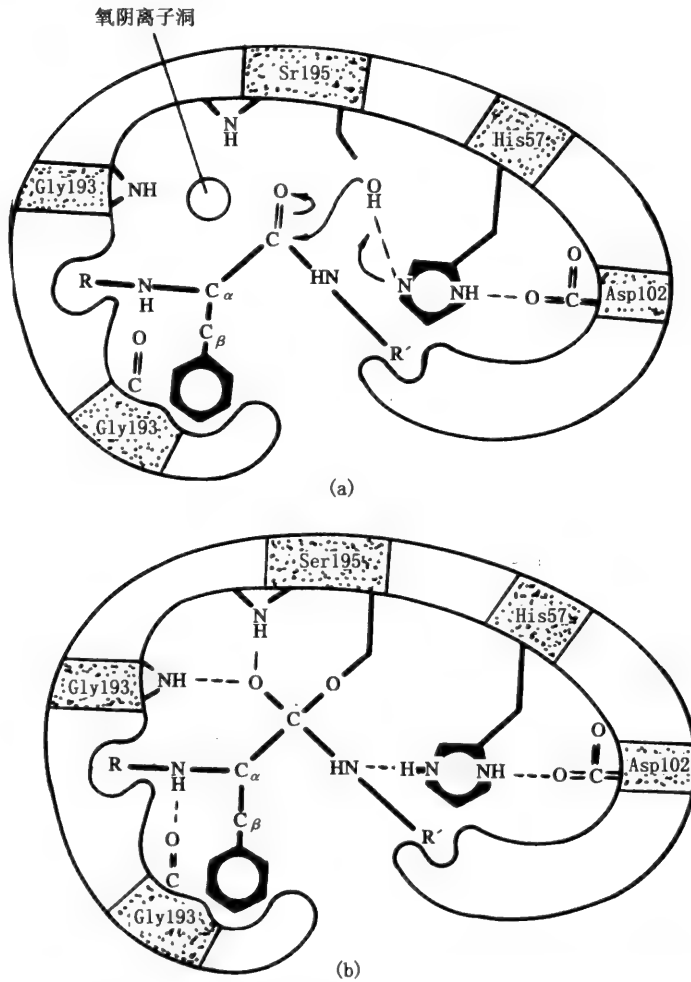


图 3-51 丝氨酸蛋白酶中的过渡稳定作用

(a) 米氏复合物中,被水解肽键的羰基碳在氧阴离子洞中与酶结合,构象发生形变。
 (b) 四面体中间物中,被水解肽键的羰基氧(氧阴离子)已进入氧阴离子洞,通过氢键与 Gly-193 和 Ser-195 的 NH 基团结合,随后构象扭曲,使被水解肽键的前面一个肽键的 NH 基团 Gly-193 形成另一近似氢键,因而丝氨酸蛋白酶优先与四面体中间物结合

一些丝氨酸蛋白酶与抑制剂结合的复合物,它们的结构经 X-射线仔细研究,比较,使人们搞

清了这些酶作用的结构基础(图 3-51)。

(1) 随着四面体中间物形成而生的构象变化导致了被水解肽键的羰基氧更加靠近活性中心部位,以利于占据称为氧阴离子洞的(Oxanion hole)空穴。

(2) 在此空穴中,酶与羰基氧形成两个氢键,而在正常的结构中不存在这种氢键。Kraut 首先注意到在胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶中,这两个氢键供体位置相关。根据趋同进化假说,他提出了氧阴离子洞的存在,使本来不相关的酶表现出相似的功能。

(3) 四面体形变结果,使在水解肽键前,酶与肽骨架上 NH 形成一近似氢键,因而酶容易同四面体中间物结合。

这些现象解释了丝氨酸蛋白酶的高催化效率。事实上,正由于 DIPF 四面体结构是过渡态类似物,因而是丝氨酸蛋白酶有效的抑制剂。

C 催化三元组(Catalytic Triad)的功能

早期的文献认为 Asp-102 极化了 His-57,使其直接从 Ser-195 吸取质子,而使 Ser-195 成为有效的亲核攻击试剂(羟基)(图 3-52)。

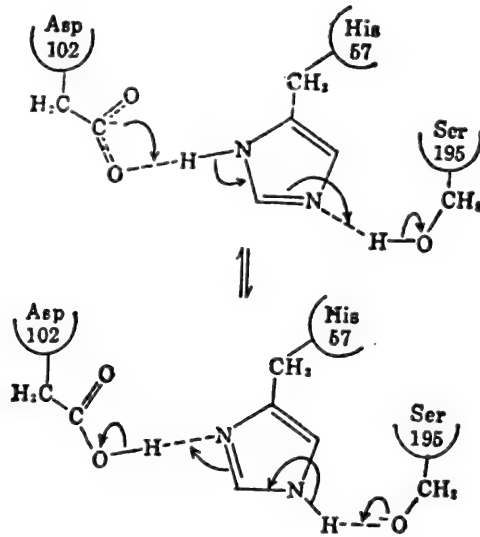


图 3-52 “电荷转接系统”

在这一过程中,Asp-102 的负电性通过 His-57 变化传到 Ser-195,因而催化键最初命名为“电荷转接系统”。现在认为,这一机理难以置信,因为羟基 $pK \geq 15$ 。His $pK \approx 7$ (NMR 测定),前者对质子的亲和力远高于后者,Ser-195 不可能通过催化三元组的相互作用有效地活化为亲核剂。事实上,用对-硝基苯磺酸甲酯处理胰凝乳蛋白酶,使 His-57 专一性地甲基化,以阻断催化三元组的作用(图 3-53)。

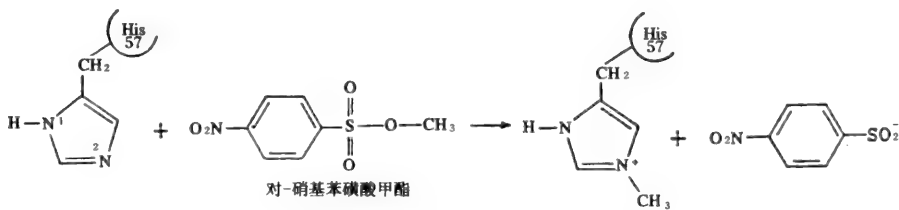


图 3-53 His-57 专一甲基化反应

然而,产生的酶仍有较好的催化活性,比非酶催化的反应加速 2×10^6 倍(天然酶约 10^{10} 倍)。很明显,催化三元组的功能很大程度上是作为质子供体和质子吸收器(酸碱催化),胰凝乳蛋白酶速度增

加的主要因素恐怕主要来源于与反应的过渡态优先结合。

此外,定点突变技术证实了活性部位三个氨基酸侧链之间的高度协同性。前面提到的 Asp-102 突变为 Asn 后, k_{cat} 下降为原来的 1/5 000, 酶与 DFP 的反应能力也降低为原来的万分之一, 与 TLCK 的反应活性降低为原来的 1/5, 显示了催化三元组中三者之间相互影响、互相牵制。

枯草杆菌蛋白酶中电荷转接系统由 Ser-221、His-64、Asp-32 组成。若将三种氨基酸分别定点突变为 Ala, 得到的三种突变体 k_{cat} 分别降低为原来的 $1/(2 \times 10^6)$ 、 $1/(20 \times 10^6)$ 和 $1/(3 \times 10^4)$ 。若将三种残基同时突变为 Ala, k_{cat} 仍降低为原来的 $1/(2 \times 10^6)$ 。这说明催化键中任何一个氨基酸突变, 酶活性都将受到严重损害。

3.6.1.7 酶原

蛋白水解酶通常先以酶原形式在体内合成。原因很明了, 以消化酶为例, 以酶原形式合成可以预防合成该酶的组织免受损伤, 急性腺炎就是因为合成的酶原在胰腺中提前活化的缘故。经氨基酸蛋白酶按以下途径活化(参见第 4 章有关内容)。

A 胰凝乳蛋白酶原

胰凝乳蛋白酶原的 Arg-15 和 Ile-16 之间由胰蛋白酶专一性地作用, 切断肽键, 形成 π -型胰凝乳蛋白酶, 再经 δ -型变为 α -型(图 3-54)。

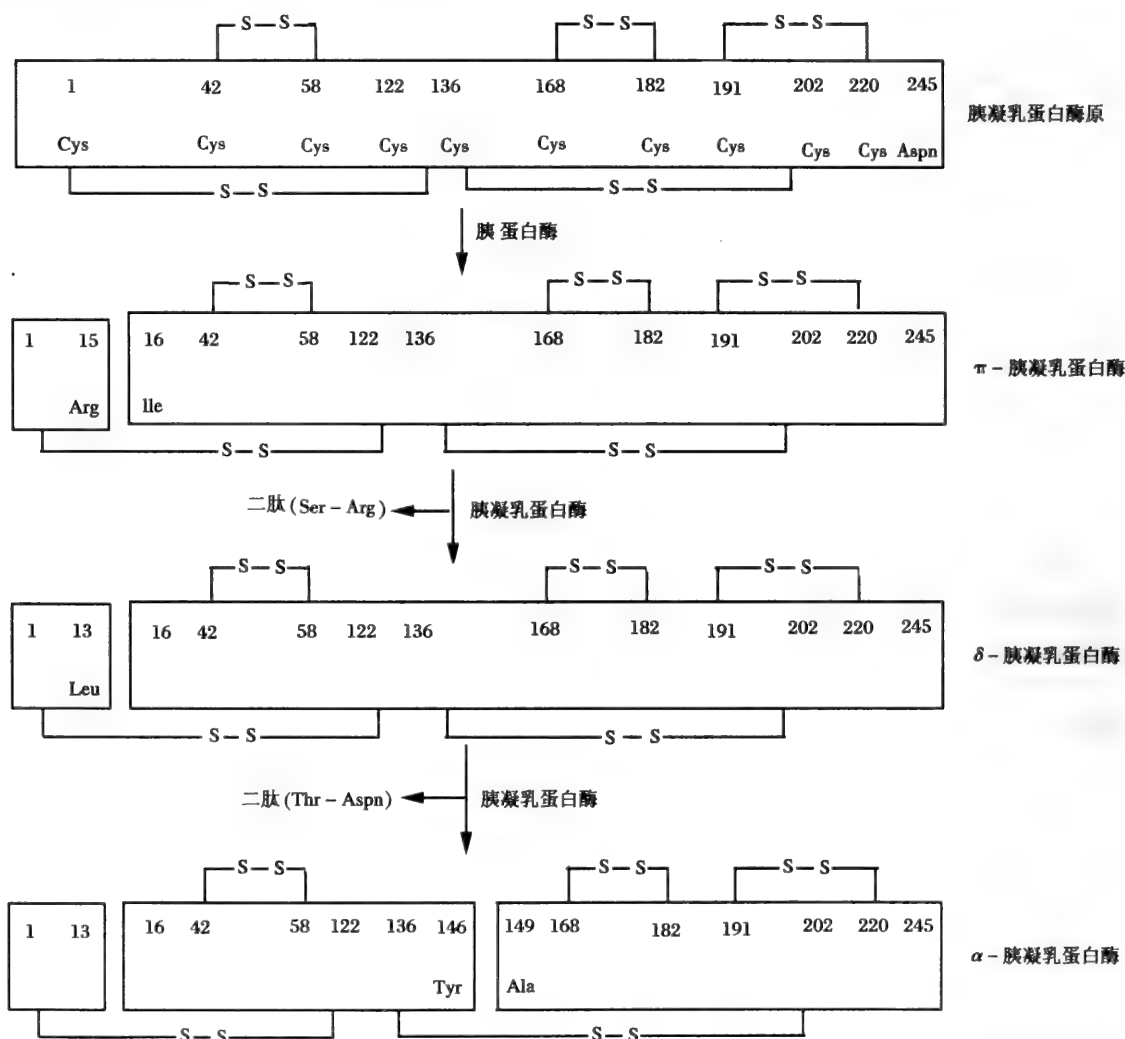


图 3-54 牛胰凝乳蛋白酶原活化示意图

B 胰蛋白酶原

胰蛋白酶原与胰凝乳蛋白酶原相比, N-末端少了 9 个氨基酸残基, 在小肠中由肠激酶(或胰蛋白酶本身)作用下将 Lys-15 及 Ile-16 之间肽链切断, 切除了 N-末端的一个六肽分子(图 3-55 酶原即活化为酶)。

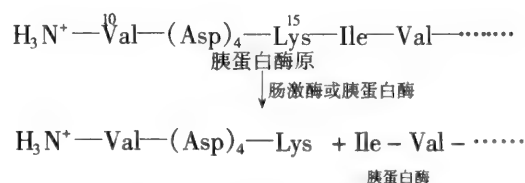


图 3-55 胰蛋白酶原活化示意图

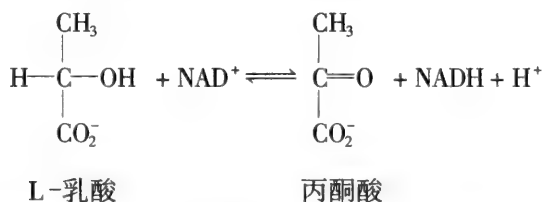
(注: 图中所用氨基酸顺序为胰凝乳蛋白酶编号, Val-10 实际为胰蛋白酶原末端, Ile-16 为胰蛋白酶末端)

弹性蛋白酶原的活化类似于胰蛋白酶原, 即通过切除 N-末端的一段肽链而活化。

胰蛋白酶原, 胰凝乳蛋白酶原和弹性蛋白酶原本身都具有催化底物分子所需的活性氨基酸侧链, 那么为什么还需要活化呢? 胰蛋白酶原和胰凝乳蛋白酶原的 X-射线研究表明, 新释放的 N-末端 Ile-16 残基从分子表面向内部移动, 与 Asp-194(图 3-45)形成离子键。除此变化之外, 酶原分子与酶分子结构上非常相似甚至催化链都相同。实际上, 人们发现, 其实酶原分子也具有酶的催化活性, 只是活性很低而已。仔细比较酶和酶原的结构, 就可发现酶原的低活性主要是因为没有形成合适的结合底物的口袋, 底物无法精确定位, 难以稳定四面体中间物。酶原经胰蛋白酶作用, Ile-16 的 α -氨基与 Asp-194 的羧基由于处于介电常数很低的酶分子内部, 静电相互作用很强, 由此触发一系列构象的变化(如 Asp-145, Met-192 等), 形成了酶原中不存在的底物结合中心。

3.6.2 乳酸脱氢酶

乳酸脱氢酶是一寡聚酶, 每一个亚基具有相同的功能, 可以催化下列反应:

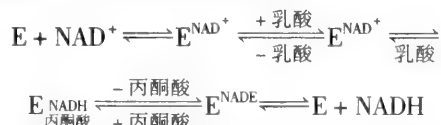


其逆过程是厌氧糖酵解的最后一步, 并提供了甘油醛-3-磷酸活力所需要的氧化型 NAD^+ 辅因子。该酶在细胞液中含有非常丰富, 因而所催化的反应可立即达到平衡。乳酸脱氢酶来源很多, 但大多数有关作用机制的详细工作主要基于角鲨和猪的乳酸脱氢酶的研究。下面讨论该酶的动力学机制, X-射线结晶衍射, 氨基酸侧链的化学修饰和定点突变的结果, 并讨论与乳酸脱氢酶有关的其他脱氢酶的作用机制。

乳酸脱氢酶(简称 LDH)由四亚基组分子量 140 000, 是研究同工酶的典型实例。大多数生物组织中有五种同工酶, 可用电泳分离。五种同工酶形式基于两种不同亚基的不同组合方式(α_4 , $\alpha_3\beta$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha\beta_3$ 和 β_4 , 分别为 $\text{LDH}_1 - \text{LDH}_5$ 型), 心肌中主要为 LDH_1 型(H_4 型), 而骨肌中主要为 LDH_5 型(M_4 型)。其他各种同工酶(如 C, E 和 F 型)也已被人们认识, 但分布较少, 这里不再进一步论述。

3.6.2.1 动力学研究

详细的稳态动力学研究表明, 乳酸脱氢酶以序列有序机制进行反应, 即酶先与 NAD^+ (或 NADH) 结合, 再与乳酸(或丙酮酸)结合形成三元络合物:



形成三元络合物的顺序是通过底物结合和产物抑制推测出来的, 如缺乏二核苷酸底物时, 酶不

会与乳酸和丙酮酸结合。

稳态动力学研究还显示了草氨酸(图 3-56(a))为丙酮酸(图 3-56(b))的竞争性抑制剂(注意两种分子为等电荷)。草酸(图 3-56(c))为乳酸(图 3-56(d))竞争性抑制剂。X-射线晶体研究表明,这些抑制剂很可能结合在酶的活性部位,作为底物类似物具有较大的价值,可以得到具有催化活性络合物的结构信息。

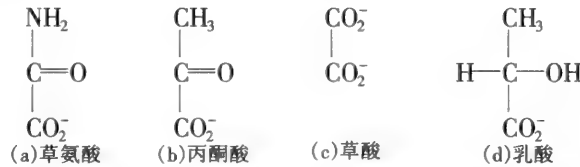


图 3-56 乳酸脱氢酶的一些底物和抑制剂的结构

用停流法分析了单个反应步骤的速度,将猪的 LDH₁ 型酶迅速与饱和浓度的底物 NAD⁺ 和乳酸结合产物 NADH 用分光光度法检测(图 3-57),在食品的死时间(deadtime)内,产物 NADH 有一最初“快速释放”(burst)阶段,然后产物 NADH 的释放才进入较快的稳态阶段,快速释放的量相当于每摩尔活性中心的酶产生一摩尔 NADH。猪的 LDH₅ 型酶研究得到类似的结果,但每摩尔活性中心的酶只有当 pH 值 ≥ 8.8 时快速释放的 NADH 量才等于 1 摩尔。在低 pH 值条件下,快速释放的 NADH 最较少。当 pH 值 = 6.8 时,每摩尔活性中心只释放 0.5 摩尔 NADH,由于 NADH 与酶的结合非常紧密,因而 E^{NADH} 复合物的解离可能是整个反应过程中最慢的一步(限速步骤)。用前稳态动力学方法仔细研究,可以测得猪中 LDH₁ 型酶催化反应中其他反应的速度常数。

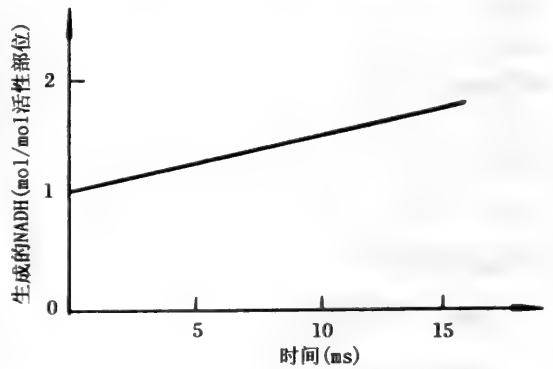


图 3-57

3.6.2.2 X-射线晶体研究

星鲨(dogfish)肌来源 LDH₅ 经 X-射线研究和氨基酸顺序测定表明,整个酶分子中有很多二级结构,约 40% α-螺旋和 23% β-折叠。更引人注意的是超二级结构(supersecondary)在 N-末端一半处有六条平行折叠片,C-末端有两个三股反平行折叠结构。六个折叠片与 NAD⁺ 的结合有关,这是至今为止所有已经分析过的脱氢酶的一般结构特征。这些酶与其他以单核苷酸,如 ATP 为底物的激酶可能与进化过程有关。如乳酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶三级结构非常相似,更换活性部位的氨基酸可使乳酸脱氢酶的专一性改变为苹果酸脱氢酶的专一性,六条折叠片的图解见图 3-58。酶与 NAD⁺ 的结合过程已经过详细研究,结合部位涉及到很多氨基酸侧链,可使人们进一步理解酶的专一性。乳酸脱氢酶结合部位的某些重要特征如图 3-59 所示。

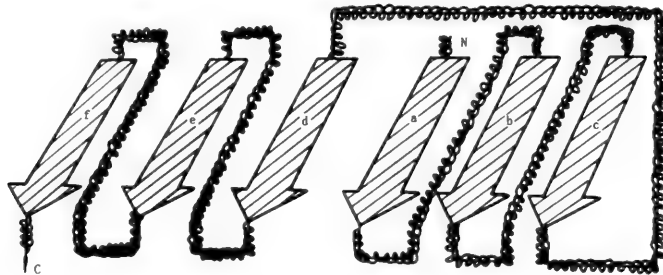


图 3-58 乳酸脱氢酶六条折叠片示意图

(a~f 为 6 条折叠片,腺嘌呤和 NAD⁺ 分别插在 a,b 和 d,e 中间)

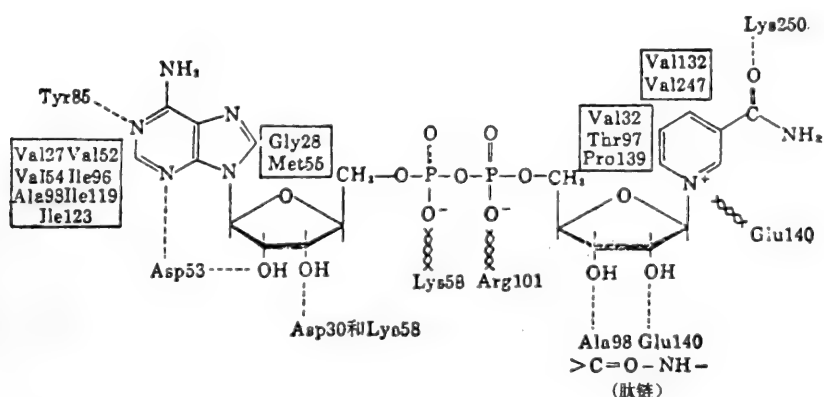


图 3-59 乳酸脱氢酶与 NAD⁺ 结合的一些相互作用关系图

(点线代表氢键, × × × 表示静电相互作用, 方框表示疏水相互作用)

腺嘌呤环结合在由 Val, Ile 和 Ala 侧链组成的疏水口袋中, Tyr - 85 和 Asp - 53 与腺嘌呤环形成氢键, 使之定向结合, 两个核糖环都有氢键与酶结合 (见图 3 - 60), 腺嘌呤核糖环上 2'-OH 与酶的专一性作用, 说明了为什么 NADP⁺ 只多了一个磷酸基就不能作为该酶的底物。在一般情况下, 脱氢酶只作用于 NAD⁺ 和 NADP⁺ 的一种, 但谷氨酸脱氢酶非常特殊, 可作用于两者。

尼克酰胺环上的羰基氧与酶分子上的 Lys - 250 形成重要的氢键, 使其 A 面与底物乳酸定向, 这就是酶具有 A 型专一性的原因 (图 3 - 60)。而 NAD⁺ 与甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶形成复合物时, 尼克酰胺环上的羰基氧与 Asn - 313 形成氢键, 使环的 B 面与底物分子定向, 解释了酶具有 B 型的专一性。

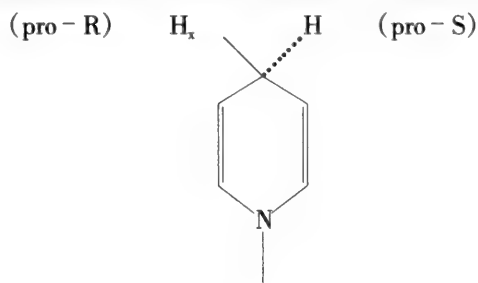


图 3-60 NADH 有关的脱氢酶的专一性

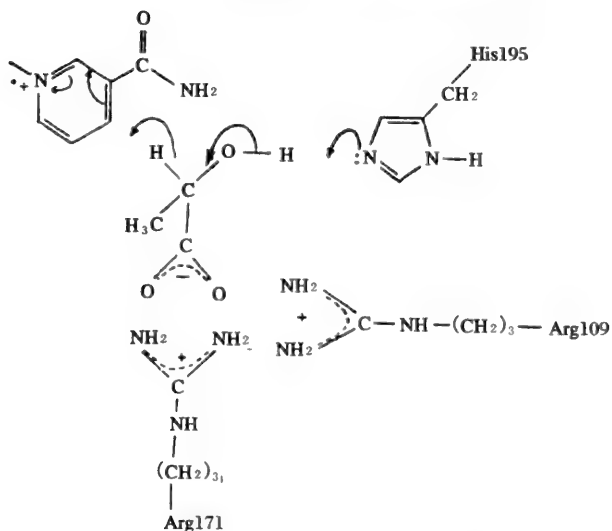


图 3-61 乳酸脱氢酶催化 NAD⁺ 和乳酸反应中电子的移动

用含有抑制剂的复合物结构,如 $E_{\text{草酸}}^{\text{NAD}^+}$ 和 $E_{\text{草酸乙酸}}^{\text{NAD}^+}$,以及 NAD-丙酮酸复合物的结构推测乳酸脱氢酶的活性复合物结构,底物乳酸很可能位于尼克酰胺环和 His-195 之间(图 3-61)。

由图 3-61 可见 Arg-109 和 Arg-171 与乳酸分子的羧基有静电作用,His-195 与乳酸的 -OH 基团结合,促使反应进行。

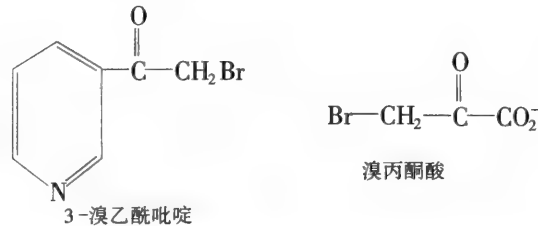
形成酶活性复合物时,酶构象的改变是关键,尤其在 E^{NAD^+} 复合物上加入第二个底物分子时更为重要。酶分子中有一柔性环(位于 98~120 氨基酸之间),没有底物时,伸在溶剂中,一旦有三元络合物形成这一环就向下移动,将底物围住并将水分子挤出活性部位。如,Arg-109 逼近底物分子 1.4nm,His-195 也发生微小移动(0.1~0.2nm),以使与底物分子接触,由此触发了电子的转移(图 3-62)。

3.6.2.3 氨基酸侧链的化学修饰

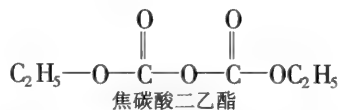
乳酸脱氢酶上经化学修饰的侧链基团有 His、Arg 和 Cys,其研究结果都经 X-射线晶体衍射证实。

A 组氨酸

用亲和标记试剂 3-溴乙酰吡啶及溴丙酮酸(后者需在 NAD^+ 存在下才能进行亲和标记)进行酶的化学修饰实验,结果表明,His-195 位于酶的活性中心。



由于 His-195 与酶分子其他 His 侧链相比,具有相当高的反应活性,故也可用焦碳酸二乙酯进行选择修饰:



在上述三种情况下的化学修饰导致酶失活,进一步推证了 His-195 的作用。

B 精氨酸

苯乙二醛是 Arg 的专一性修饰试剂,可使乳酸脱氢酶失活,实验发现酶分子的每个亚基上有一个 Arg 被修饰。当形成三元复合物后,酶能抵抗失活作用,推测 Arg 位于酶活性中心,但 X-射线数据分析表明底物结合中心有两个 Arg 残基,苯乙二醛究竟修饰了哪一个 Arg,目前还不清楚。

C 半胱氨酸

为了搞清 Cys 侧链是否位于乳酸脱氢酶的活性中心,用顺丁烯亚胺处理酶,可观察到每个亚基上有一 Cys 侧链被修饰,后来证明为 Cys-165。底物的结合对酶有保护作用,很多种脱氢酶都有一段类似于乳酸脱氢酶 Cys-165 附近的氨基酸顺序,证实了这一侧链与催化机制有关。事实上,X-射线研究认为 Cys-165 与底物结合中心有 1nm 的距离,所以,现在认为由于化学修饰导致酶失活主要原因是空间阻碍作用。由于 Cys-165 与一个体积较大的试剂结合,阻碍了 His-195 逼近底物,使具有催化活性的复合物难以形成,X-射线晶体研究还显示了修饰试剂很难靠近三元复合物(如 $E_{\text{丙酮酸}}^{\text{NAD}^+}$)的 Cys-165 侧链,解释了如上所说的对这一失活的保护作用。综上所述,可以推测,如果用一个小分子的化学试剂修饰 Cys-165,酶至少保留部分活性,后来证实用甲基硫磺酸与猪 LDH₁ 酶作用,Cys-165 被修饰,酶并没有失活,只是对底物的亲和力与未修饰的酶比较有些区别



3.6.2.4 定点突变

有关乳酸脱氢酶的两组实验有助于我们理解酶分子上柔性环区域的氨基酸所起的作用。已经

分离得到了由耐热细菌:枯草杆菌来源的乳酸脱氢酶的基因,该酶的氨基酸顺序和催化性质与真核的乳酸脱氢酶非常相似,暗示可能所有的乳酸脱氢酶结构都很相似,故以枯草杆菌来源的酶作为实验材料。

第一个实验,酶分子柔性环中的 Arg - 109 变为 Gln,因而将一正电荷侧链改变成了中性侧链,突变后酶对 NADH 的结合效应没有变化,但 k_{cat} 下降为原来的 1/400,提示 Arg - 109 侧链增加了丙酮酸羧基的极性,稳定了反应的过渡态。

第二个实验,测到了柔性环区域移动速率与活性复合物的形成有关,用 Trp 代替环中 Gly - 106, Tyr 替代了 Trp 侧链(Trp - 80, Trp - 150 和 Trp - 203)。应该注意到由于 Tyr 侧链的激发态会发生淬灭现象,因而 Trp 侧链的荧光强度往往高于 Tyr 侧链。突变后的酶有一个荧光侧链,位于柔性环区域(Trp - 106)与天然酶比较,突变酶对丙酮酸的 k_{cat} 为天然酶的 60%, K_m 保持不变,将突变体 E^{NADH} 与草氨酸混合,形成三元复合物,结果 Trp - 106 荧光强度降低,可反映出环的移动现象,停流法测得这一移动速度为 125 秒^{-1} ,非常相似于由 k_{cat} 测得的整个酶的总的转换率。

这就清楚地表明了整个反应的限速步骤与柔性环朝活性中心的移动有关。不同的实验中乳酸脱氢酶的专一性可变为苹果酸脱氢酶的专一性,考虑到新的底物分子体积较大并有负电性,故在耐热的枯草杆菌来源的乳酸脱氢酶上引入以下的变化:1) 活性部位体积增加(Asp - 197 → Asn); 2) 酸性侧链,上中性侧链代替(Asp - 197 → Asn); 3) 引入碱性侧链(Gln102 → Arg),这样就形成了一个“苹果酸”脱氢酶。催化由 NADH 还原草酰乙酸要比丙酮酸快 500 倍(乳酸脱氢酶最初催化苹果酸的速率只有 0.001),这一实验证实了两种酶的整体空间结构非常相似,因而活性中心相当小的变化可以显著地改变酶的专一性。

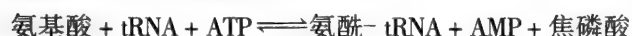
3.6.2.5 乳酸脱氢酶与其他一些脱氢酶的作用机制

以上讨论可以了解活性复合物的结构信息,以及复合物上电子的移动情况(图 7 - 63),并详细描述了结合部位的结构及各个基元的反应速率。

其他一些脱氢酶(如乙醇脱氢酶、苹果酸脱氢酶及 3-磷酸甘醛脱氢酶)的作用机制也有所知,至少已知道了大致轮廓,可以作一些概述,所有的脱氢酶每个亚基上都有一识别核苷酸的结合区域,催化区域结构是可变的。NAD⁺ 的尼克酰胺环对各种酶的结合可以解释氢传递的专一性(图 3 - 60)。以上所提到的所有脱氢酶,除了乙醇脱氢酶外,都有一 His 侧链从底物的一 OH 基团中吸收一个质子作为广义碱催化反应进行,使得氢化物离子(hydrion)容易向 NAD⁺ 转移(图 3 - 61)。乙醇脱氢酶的催化中心有一锌离子,推测可能 Zn^{2+} 或与 Zn^{2+} 结合的极化了的水分子(OH⁻)起碱催化剂的作用,涉及氧化还原反应的其他脱氢酶的作用机制是一个很有趣的化学问题。

3.6.3 酪氨酰-tRNA 合成酶

氨酰-tRNA 合成酶催化下列反应:



氨基酸连接在 tRNA 的腺苷 3'-末端的合适位置,有时连在 2'-OH 位置,也有连在 3'-OH 位置或与两者都相连。氨酰衍生物从合成蛋白质的核糖体上释放,按 mRNA 的碱基顺序合成蛋白质。mRNA(密码)上三个碱基与 tRNA(反密码)上三个碱基的专一性的氢键序列连接,蛋白质合成的准确性依赖于正确的 tRNA 与正确的氨基酸结合。这一因素又决定于氨酰-tRNA 合成酶与合适的 tRNA 及氨基酸之间专一性的相互作用。氨酰-tRNA 合成酶(蛋白质中 20 个氨基酸各有一个相应的酶)的 E.C 编号为 6.1.1.1 - 7, 9 - 12, 14 - 22, 酪氨酰-tRNA 合成酶的编号为 E.C.6.1.1.1。

以下我们将讨论氨酰-tRNA 合成酶的一般结构及动力学研究所揭示的详细的机制,还要讨论酶如何识别正确的底物。X-射线研究描述了枯草杆菌来源的酪氨酰-tRNA 合成酶的结构。最后还将介绍一些成功的定点突变实验,对于阐明酶的催化机制及了解各种氨基酸所起的作用有很大的帮助。

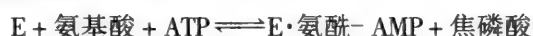
3.6.3.1 氨酰-tRNA 合成酶的结构

人们已经从原核和真核生物中纯化得到了各种氨基酸的氨酰-tRNA 合成酶。这类酶具有各

种结构类型如 $\alpha, \alpha_2, \alpha_4$ 及 $\alpha_2\beta_2$ 。分子量 (M_r) 在 50 000 到 300 000 范围内。酶催化相关反应的亚基结构的多样性似令人惊奇,但这种多样性在酶的顺序中也是存在的,对某一特定的酶,一般真核生物(酵母)的 M_r 亚基比原核(*E. Coli*)大,这与模板中 N-端的伸张部分(extension, 50~300 个氨基酸)有关。两种不同来源的相应的酶这部分顺序中只有一段顺序是同系的(30%~50%)。也有一些证据表明原核氨酰-tRNA 合成酶较大的亚基有重复顺序,有几种酶可形成分子量高达 10^6 左右的复合物,其意义尚不清楚。到目前为止,只有酪氨酰-tRNA 合成酶(来源于枯草杆菌)得到了 X-射线研究的详细结构信息。

3.6.3.2 动力学研究得到的反应机制

一系列实验显示由氨酰-tRNA 合成酶催化的整个反应分为两步,并伴有与酶结合的氨酰腺苷酸中间物的形成:



酶结合的中间物很容易得到,如将 Ile-tRNA 合成酶与 $[^3\text{H}]\text{Ile}$ 和 ATP 在必需的辅因子(Mg^{2+})存在下混合,随后在 Sephadex G-50 柱上进行凝胶过滤,Ile 迅速从中间物转移形成酶结合的产物(Ile-tRNA),随后从酶上慢慢解离。

由于 ATP、氨基酸和焦磷酸都可与酶结合,因而认为第一个反应为序列随机的三元复合物形成过程,也可通过观察需要氨基酸(而不是 tRNA)的 $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{焦磷酸}$ 变换反应了解发生的第一个反应。在这一实验中,需加入 $[^{32}\text{P}]\text{焦磷酸}$,定时分离出 ATP,测定渗入的 ^{32}P 强度,就可测得交换反应的速度。与整个反应的速度(即氨酰-tRNA 的合成)比较,在大多数情况下第一个反应的速度为总反应速度的 10~100 倍,这就提示第二个反应(氨酰转移或产物释放)是限速步骤。不过在有些情况下,如 *E. Coli* 来源的酪氨酰-tRNA 合成酶两个反应的速度常数非常相近,同时控制了整个反应速度。有时,情况更为复杂,如枯草杆菌来源的酪氨酰-tRNA 合成酶为两亚基酶,该酶呈现半位点(half-of-the-site)反应活性,只形成一个酪氨酰-AMP 分子 1 个 tRNA 分子与 1 个酶分子结合。这时,与酶结合的酪氨酰-AMP 中间物可与额外的 Tyr 和 ATP 结合,导致构象的变化。

3.6.3.3 底物识别

前已提及,氨酰-tRNA 合成酶正确认识底物是非常关键的问题,很多实验致力于分析这一识别机制。由于底物氨基酸分子体积小,故准确识别存在问题,如 Ile-tRNA 合成酶的识别因子识别 Ile 的能力为 Val 的 20~40 倍(这是从 Ile 有额外的甲叉基所得到的结合能,以及细胞内两个氨基酸相关的浓度这两个因素考虑得到的)。然而,实际上由 Val 代替 Ile 掺入错误的比例非常低(1,3000)。实验发现,Ile-tRNA 合成酶可以激活 Val,即在没有 tRNA 存在下,可以催化形成缬氨酰-AMP 复合物。然而,Val 随后却不能转移到 tRNA。实际上,在复合物中加入 tRNA^{le} 会导致缬氨酰-AMP 水解为 Val 和 AMP。在一系列氨酰-tRNA 合成酶中都发现了这种剪辑和校阅机制(editing and proof-reading)。涉及到启动酶分子上第二个活性位点(剪辑功能),有时也确实表明“错误”的氨酰-tRNA 会短暂形成,如在缬氨酰-tRNA 合成酶催化的反应中,有苏氨酰-tRNA 形成。但它从酶分子上解离之前会迅速分解。有些氨酰-tRNA 合成酶没有剪辑功能,因而半胱氨酰-tRNA 和酪氨酰-tRNA 合成酶对正确的氨基酸结合力远高于对竞争物的结合力。枯草杆菌来源的酪氨酰-tRNA 合成酶与正确的氨基酸底物结合时,酶分子上侧链基团的响应已由 X-射线晶体研究和定点突变证实。

tRNA 分子由于体积较大,故要正确识别这一底物似乎比较容易。目前,还未得到合成酶-tRNA 复合物的 X-射线结构,因而大多数关于它们之间的相互作用情况都是由间接的方法得到的,其中包括结合部位 tRNA 碱基的修饰效应及采用光化学交联来建立 tRNA 的哪一部分与酶接触都是间接的研究手段。研究的结果认为主要接触点位于 L 形 tRNA 分子,包括受体基的内部(图 3-62)。有时反密码也参与这些相互作用,专一性很可能与这些区域及合成酶的互补部分有关。有证据表明,当酶分子与正确的 tRNA 结合后,至少有部分识别过程涉及到酶分子构象的改变。氨基酸在酪氨酰-tRNA 合成酶上的定位与 tRNA 的结合是一致的,这一点已由定点突变验证。

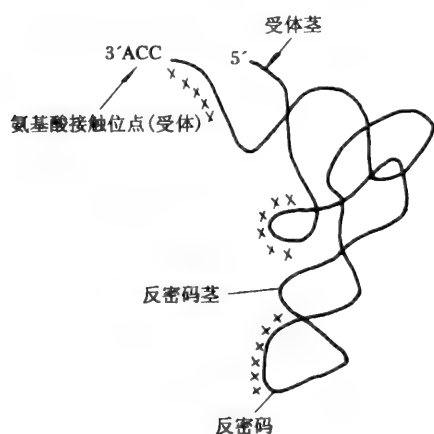


图 3-62 tRNA 分子的一般结构, 区域 x x x x 指已鉴别的与氨酰-tRNA 合成酶接触的一部分

3.6.3.4 枯草杆菌来源和酪氨酰-tRNA 合成酶的 X-射线结构

枯草杆菌来源的酪氨酰-tRNA 合成酶的一个亚基其 X-射线结构图, 如图 3-63 所示。

酶分子的两个亚基中各含有 419 个氨基酸, 在电子密度图 (electron-density map) 中只能鉴别 N-末端的 319 个氨基酸, C-末端的 100 个氨基酸没有规则, 难以辨认。每个亚基中心有 6 股 β -折叠结构和 5 个长 (大于 1.2nm) 的 α -螺旋片段及一些较短的伸展 (shorter stretches), 底物结合部位的定位已在图中显示出来。X-射线晶体研究了一系列复合物: AMP, ATP, 酪氨酸和酪氨酰-AMP 分别与酶的结合情况 (其中酪氨酰-AMP 复合物很稳定, 容易研究)。酶分子的氨基酸侧链与酪氨酰-AMP 的相互作用见下节。

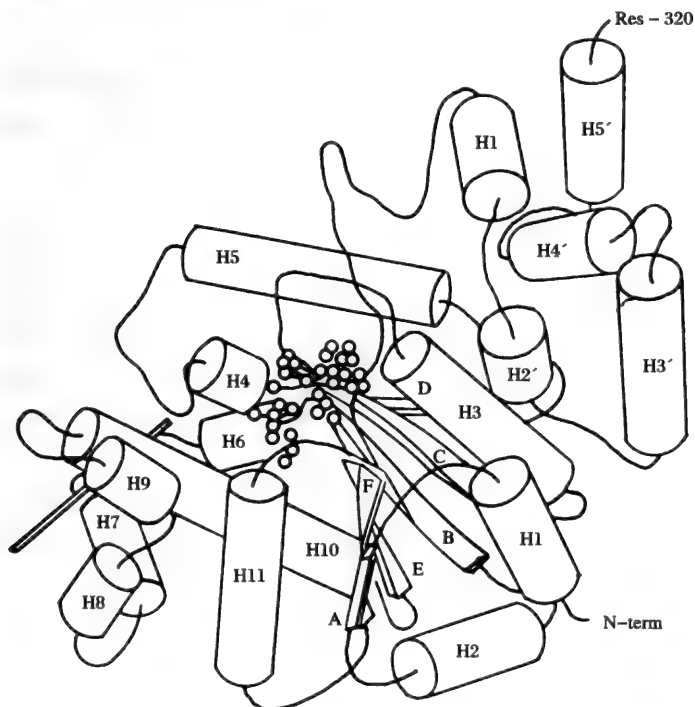


图 3-63 酪氨酰-tRNA 合成酶单体中 1~320 残基的多肽链构象

图中显示了酪氨酰-AMP 的结合位点, A→F 为 β -折叠, 下列氨基酸之间为 α -螺旋:

- H₁, 2-10; H₂, 19-27; H₃, 49-60; H₄, 71-74; H₅, 91-105; H₆, 124-128; H₇, 132-139; H₈, 145-149; H₉, 152-153;
- H₁₀, 164-183; H₁₁, 195-208; H₁', 248-256; H₂', 263-269; H₃', 275-287; H₄', 293-306; H₅', 309-318

Fersht 及其同工利用定点突变进行了一系列非常成功的实验。揭示了枯草杆菌来源的酪氨酰

-tRNA 合成酶不同部分的功能。这些实验的设计和解释主要基于 X-射线结晶学研究得到的结构信息。很多定点突变工作可参见 Fersht 等近期的综述。

A 氢键及专一性

X-射线结晶学研究指出,酶与酪氨酰-AMP 之间形成了很多氢键(图 3-64):

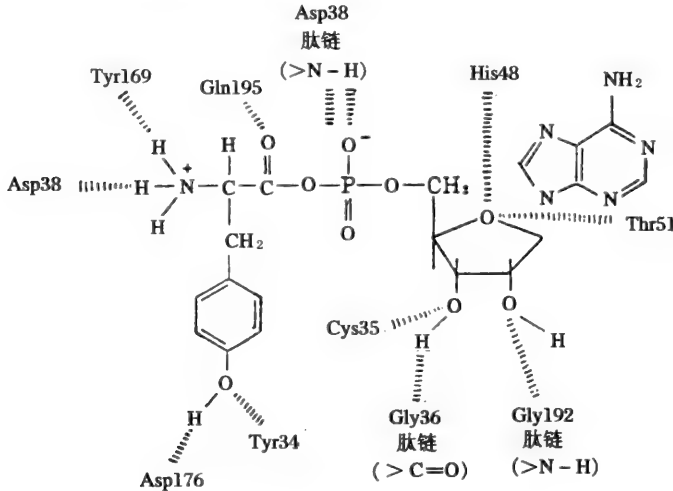


图 3-64 酪氨酰-AMP 和酪氨酰-tRNA 合成酶之间氢键(短划叠线表示)的相互作用

图 3-64 中所示的侧链如用不能形成氢键的侧链系统地取代(如 $\text{Cys}535 \rightarrow \text{Gly}$, $\text{Tyr}34 \rightarrow \text{Phe}$),并研究了由 ATP 活化 Tyr 的动力学效应,结果证明,由 X-射线鉴别的每个接触点非常重要,其他的侧链也有作用(如 Asp-78 与酪氨酰-AMP 的 α -氨基有相互作用)。Tyr-34 和 Asp-176(图 3-64)是酶分子上专一地识别 Tyr 的侧链, phe 因无酚羟基,不能识别。在核糖结合位点, Cys-35、Thr-51 和 His-48 都以专一性的氢键与核糖产生相互作用。化学修饰实验认为 Cys-35 可能与酶的催化活性有关,在其他原核的酪氨酰-tRNA 合成酶中,也都有这一侧链。但是,由 Gly 或 Ser 取代这一侧链却没有导致酶全部失活(k_{cat} 为野生型酶的 30%),故 Cys-35 不是酶的必需基团。

定点突变实验结果显示,不同类型的氢键对结合能贡献不同,不带电荷的 Tyr-169 侧链与底物的 α -氨基形成氢键,将此氨基酸突变,会减弱结合能 15.5kJ/mol。Tyr-34 侧链与酪氨酰-AMP 的酚羟基形成氢键,该氨基酸的突变反而降低 2.2kJ/mol 的结合能。图 3-64 中, Thr-51 侧链与酪氨酰-AMP 的核糖形成氢键,但由于几何位置上的关系,该氢键强度较弱,而与水分子形成更强的氢键,促进了酶-酪氨酰-AMP 复合物的解离。Thr-51 是其他原核生物来源的酪氨酰-tRNA 合成酶(如 *E. Coli* (Pro) 和 *Bacillus caldoterax* (Ala))活性部位中唯一不保守的氨基酸,人们对这一发现颇感兴趣。

Bacillus stearothermophilus 中的酪氨酰-tRNA 合成酶中的 Thr-51 侧链可突变成其他氨基酸的侧链,如 Pro、Ala。这些氨基酸不能与核糖形成氢键,将 Thr-51 分别突变为 Pro 及 Ala,酶活力提高,比值 k_{cat}/K_m 分别高 50 和 2 倍,这一实验表明酶活性有可能以合理的方式进一步得到改善。

B 酶分子 N 及 C-末端区域的功能

酪氨酰-tRNA 的缺失突变酶已被制备出来,由 N-末端 319 个氨基酸组成。这一突变酶与天然酶没有多大区别,但研究酪氨酸活化(形成酪氨酰-AMP)时,发现它不能与氨酰-tRNA 结合,实验的结论:多肽链的 C-末端区域与 tRNA 结合有关,并认为对所有的酪氨酰合成酶都适用。与 tRNA 结合有关的酪氨酰-tRNA 合成酶的某些氨基酸侧链已由定点突变实验鉴别。在实验中,人们构造了一些杂二亚基(heterodimers),由一条全长的多肽链(419 个氨基酸)和一条缩短的多肽链(319 个氨基酸)组成,其中带正电性的侧链由中性侧链替代($\text{Arg}, \text{His} \rightarrow \text{Gln}$, $\text{Lys} \rightarrow \text{Asn}$)。一组正电荷侧链与 tRNA 的受体和反密码基之间的相互作用穿过两个亚基(见图 3-62),使 tRNA 能正确定位。随后,

Bannister 等通过旋光色散(ORD)、圆二色性(CD)和红外(IR)光谱的分析研究,表明 Cu, Zn - SOD 的两个相同亚基之间是通过非共价的疏水相互作用而缔合,共有 12 - 14 个疏水的氨基酸残基的侧链提供了范德瓦力。肽链内部由半胱氨酸(C)55 和 144 的 SH 基之间构成的二硫键,对于亚基的缔合起重要作用。整个结构特征是由八股反平行的 β -折叠围成的圆桶状结构,称之为 β -桶(β -barrel)、其一侧尚有两个无代表性结构的环(loop)。在牛红细胞 Cu, Zn - SOD 亚基中, Cu 分别与四个组氨酸残基(H 44, 46, 61, 118)配位,而 Zn 则与三个 H(H 61, 69, 78)和一个天冬氨酸(D_{81})配位, Cu, Zn 之间相距约 0.6nm。

Cu, Zn - SOD 在一级结构上的明显不同,在构象上必然表现出差异。Cu, Zn - SOD 含 α -螺旋成分很少,主要是 β -折叠,与此相反, Mn 和 Fe - SOD 含有较多的 α -螺旋 (>32%), β -折叠较少。构象研究还表明, Fe 和 Mn - SOD 中不可能存在像 Cu, Zn - SOD 中的那种八股反平行的 β -折叠,也不存在长的松散环,整个结构比较紧凑。

3.6.4.2 SOD 的活性中心

在 0.3nm 分辨率的基础上,1980 年获得的牛红细胞 SOD 的 0.2nm 分辨率电子密度图,可以比较详细地看清活性中心附近位置的排列。结合底物 O_2 的是一个椭圆形的“口袋”,长 1.5nm,宽 0.9nm,深 0.6nm,口袋外缘一边是由苏氨酸(T315)、甘氨酸(G136)丙氨酸(A138)和甘氨酸(G139)组成。另一条边由甘氨酸(G59),脯氨酸(P60)、组氨酸(H61),以及苯丙氨酸(F62)和门冬酰胺(N63)组成。赖氨酸(K134)和精氨酸(R141)的侧链构成口袋的两侧。口袋底部排列着 Cu、Zn、门冬氨酸(D81),以及 H118、H44、H78 和 H69。Rotilio 等应用顺磁共振、核磁共振以及化学修饰等手段,获得了不少有关 SOD 活性中心分子、原子,以及电子信息的信息。通过光敏氧化和次级自由基对 SOD 的失活试验,表明与 Cu 配位的 N 原子来自组氨酸的咪唑环,用组氨酸特异性的化学修饰剂乙氧基甲酸酐进行修饰实验说明,至少有三个组氨酸与 Cu 配位,同样证实 Zn 也与三个组氨酸配位, Cu 和 Zn 之间通过共同连接一个组氨酸(H61)而形成所谓“咪唑桥”结构,见图 7-68。

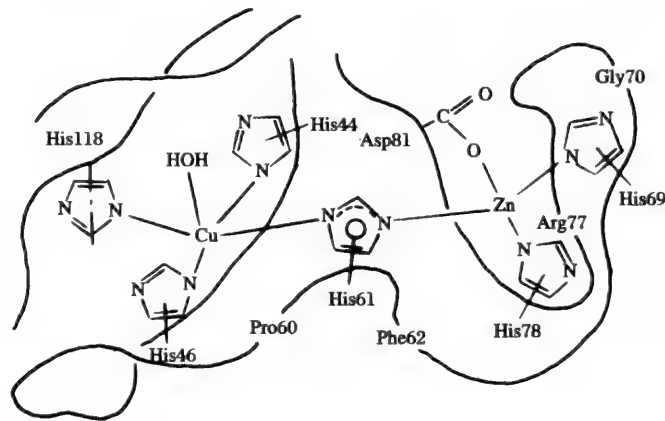


图 3-66 牛红细胞 Cu, Zn - SOD 活性中心的“咪唑桥”结构示意图

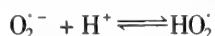
在“咪唑桥”结构中,咪唑环几乎与 Cu, Zn 金属离子在一个平面上,仅向 Cu 侧倾斜了约 0.03nm,所有的五个非配位的咪唑氮和非配位的 D 81 羧基中的氧都是氢键相连,而 H 61 的咪唑基的吡咯氢已被除去,允许同时和 Cu, Zn 相配位。活性中心“袋”的分子表面积约 66nm²,它是由主链和不变的侧链原子组成,参与“袋”组成的氨基酸具有相应的不变性,这说明活性袋的形状对酶的功能起着关键性作用。在“袋”的底部最狭窄部位有两个深洼,即形成了特殊键合位置:“Cu 位”和“水位”,这是活性中心中最关键部位。归纳出 Cu, Zn - SOD 活性中心结构有这样两个特点:1) Zn 周围环境拥挤, Zn^{2+} 并不裸露在溶剂中,不直接与 O_2 作用。 Zn^{2+} 的作用还在于固定“活性袋”的主链和侧链,对于维持 SOD 的构象是必不可少的。2) Cu^{2+} 是五配位,三肽 H44·V45·H46 的两个咪唑基占据了 Cu 配位平面的反位,正是由于 Cu 处于这样的歧变配位空间环境下,使得 Cu^{2+} 的氧化电势

达0.42V,远高于含水溶液中 Cu^{2+} 的氧化电势,所以说 Cu^{2+} 对催化 O_2^- 的作用机理有其特殊性。

对 Fe-SOD 的化学修饰除了发现组氨酸残基与金属辅基的配位并与活性有关外,还表明了色氨酸残基是与 Fe 形成配位关系的。Mn-SOD 有二聚体,也有四聚体,有报道二聚体的两个亚基共享一个 Mn^{3+} 。配位的氨基酸是 H28, H83, D165 和 H169, 邻近空间还存在其他亲水的氨基酸残基 F86, W87, W131 和 W167。再加上水分子,这些配位原子形成了近似三角双锥的几何构型,其中水分子占据了 H28 相反的轴向位置。

3.6.4.3 SOD 的作用底物

在数以千计的酶中仅 SOD 的作用底物为 O_2^- , 超氧阴离子自由基除 O_2^- 外还有 HO_2^\cdot , HO_2^\cdot 为 O_2^- 的质子化产物。 O_2^- 与 HO_2^\cdot 的化学反应并不一致,但两者之间有密切联系,根据

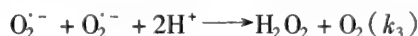
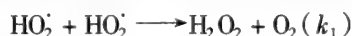


可知 O_2^- 为 HO_2^\cdot 的共轭碱。依照 Henderson-Hasselbalch 方程式

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log_{10} \frac{[\text{碱}]}{[\text{酸}]}$$

则在超氧阴离子自由基水溶中, $\text{pH} = 4.8 + \log_{10} \frac{[\text{O}_2^-]}{[\text{HO}_2^\cdot]}$ ($\text{pK}_a = 4.8$)。此式表明 pH 值愈小, O_2^- 愈小,

反之则愈大。在 pH 为 6.5 时, $[\text{O}_2^-]/[\text{HO}_2^\cdot]$ 为 100/1, 因此在生理情况下, O_2^- 的浓度远高于 HO_2^\cdot , 这表明在生物体内超氧化物自由基存在的主要形式为 O_2^- 。 O_2^- 既可作为还原剂供给电子, 又可作为氧化剂接受电子, HO_2^\cdot 也有同样性质。当两个 O_2^- 或 HO_2^\cdot 在一起相遇时, 一个 O_2^- 或 HO_2^\cdot 可被氧化, 而另一个 O_2^- 或 HO_2^\cdot 则可能被还原。换言之, 即可自发地发生歧化反应, 其产物为 O_2 与 H_2O_2



这三种歧化反应的反应速度常数(k)如下:

$$k_1 = 7.6 \times 10^5 \cdot \text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$$

$$k_2 = 8.5 \times 10^7 \text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$$

$$k_3 < 100 \text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$$

在需氧生物中某些酶反应可将 O_2 还原为 O_2^- , 如与线粒体的电子传递链有关的 NADH-泛醌还原酶、琥珀酸脱氢酶-细胞色素 C 还原酶可通过泛醌氧化还原反应中间物泛半醌自由基与 O_2 的反应产生 O_2^- 。需氧生物既要利用 O_2 , 又要清除 O_2^- , 还要合成能迅速歧化 O_2^- 的 SOD。大量事实证明, Cu, Zn-SOD 存在于真核生物的细胞浆中, Mn-SOD 存在于真核生物的线粒体和原核生物中, Fe-SOD 仅存在于原核生物中。

3.6.4.4 催化机理

三类 SOD 催化机理应相同, 但其中 Cu, Zn-SOD 有较大的稳定性, 并较 Mn-SOD 和 Fe-SOD 易于制备, 各种来源的 Cu, Zn-SOD 构造容易搞清楚, 而且有 Cu(II)与 Zn(II)以及“咪唑桥”特殊结构有利于采用理化方法探究其作用, 因此在 SOD 的催化反应机理研究中常以 Cu, Zn-SOD 作为对象。

用化学方法, 如用 EDTA 螯合剂可除去 Cu, Zn-SOD 中的金属而成为无活性酶, 改用二乙基二硫代氨基甲酸盐(DDC)可除去 Cu 而不除去 Zn, 亦可使酶活性完全丧失。仅除去 Zn, 尚可保持大部分活性, 但所不同的是酶的稳定性较差, 可使酶活性完全保持或保持 70%—90%, 由此可见 Cu^{2+} 为 Cu, Zn-SOD 活性所必需, 而 Zn^{2+} 与酶的稳定性有关, Fe-SOD 与 Mn-SOD 的活性也决定于所含的 Fe 或 Mn 的金属离子。

A 酶促反应

对于 O_2^- 歧化为 H_2O_2 与 O_2 的反应, SOD 与一般酶催化反应相比, 在于其底物是一种寿命很短

的自由基,这给 SOD 的反应动力学研究带来了很大困难,能够直接获得催化速率常数以及有关 pH、抑制剂对反应速率的影响等的信息应归功于脉冲辐射分解技术,脉冲辐射分解的优越性在于它既可产生足够高浓度的 O_2^- ($> 10^{-5} \text{ mol/L}$),又使时间分辨率达到 $1 \mu\text{s}$,用此技术测出牛红细胞 SOD 的催化反应速率常数为 $(2.37 \pm 0.18) \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (表 3-5)。

表 3-5 不同来源的三类 SOD 的催化反应速度常数

SOD 类型	来源	$k(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
Cu, Zn-SOD	牛红细胞	$(2.37 \pm 0.18) \times 10^9$
	人红细胞	$(1.2-1.6) \times 10^9$
Mn-SOD	大肠杆菌	$(1.5 \pm 0.15) \times 10^9$
	嗜热脂肪芽孢杆菌	$(5.5 \pm 0.2) \times 10^9$
Fe-SOD	发光杆菌	$(4.2-6.1) \times 10^8$
	细致虫藻	$(8.13 \pm 0.36) \times 10^7$

B O_2^- 如何进入活性部位

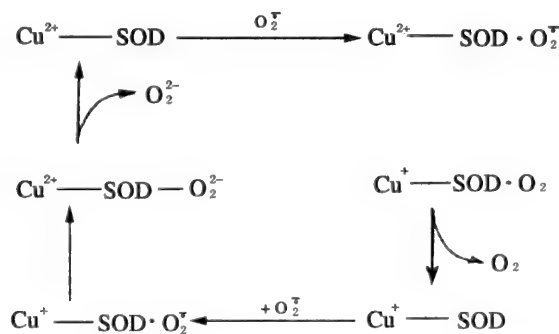
O_2^- 带有负电荷,在非酶反应中由于同性相斥,两者相遇机率极低,故自动反应速率也较小 ($k < 0.3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)。

在催化反应中 O_2^- 如何进入活性部位呢? 原来 Cu, Zn-SOD 多为酸性蛋白质,如哺乳类来源的酶等电点为 4~6,故在生理条件下,酶分子表面带负电荷部位比较多,而在活性部位部分多带正电荷,因此 O_2^- 难于在非活性部位碰撞,而趋向于活性部位。活性部位通道口的两侧赖氨酸残基与精氨酸残基都属于碱性氨基酸,其等电点分别为 9.74 与 10.76,它们带有的正电荷起到引导 O_2^- 进入活性部位的关键作用。在 Cu, Zn-SOD 催化反应中需要质子的参与,质子很可能来自此精氨酸残基,如果用精氨酸修饰剂丁二酮或苯乙二醛与 Cu, Zn-SOD 反应,则由于精氨酸被修饰,酶活性可丧失 99% 以上。

据 Schinima 报道,将羊 Cu, Zn-SOD 的氨基酸残基排列顺序与牛 Cu, Zn-SOD 相比较,两者的序列同一性虽达到 95%,但由于前者的分子表面,尤其是活性部位外侧,多几个带正电荷氨基酸残基,遂影响 O_2^- 进入活性部位,造成酶活性较牛 Cu, Zn-SOD 低 15%。

C 金属离子的还原与氧化

Cu, Zn-SOD 催化作用过程中 Cu^{2+} 的还原与氧化不少事实确证, Cu, Zn-SOD 的催化作用与活性部位中 Cu 离子的还原与氧化密切相关,但其机理,尚无一致结论,现简述以下两种不同观点的假说: (1) 有的学者认为 2 个 O_2^- 的电荷相同,故难于接近,但通过 Cu^{2+} 的配位,可加速 O_2^- 的歧化。(2) 有些学者认为 SOD 催化 O_2^- 机理不能仅用简单配位理论来解释,他们认为 Cu^{2+} 与 Zn^{2+} 相连的咪唑桥起着重要作用。



虽然关于 Cu, Zn-SOD 活性中心的“咪唑桥”结构,尚有不同看法,如 Bauer 研究了酵母 Cu, Zn-

SOD 中金属与酶蛋白关系,发现 Zn 与 Cu 共联的组氨酸残基仅和 Zn 配位,不过较多学者认为,根据牛 Cu,Zn-SOD 的 X 射线晶体结构分析,确证 Cu 与 Zn 之间通过组氨酸残基形成“咪唑桥”的结构。我们对牛红细胞 Cu,Zn-SOD 的重组研究,表明 Cu 和 Zn 与酶蛋白分子中的组氨酸残基咪唑环上的 N 原子之间的配位关系,以及 Cu 和 Zn 之间的“咪唑桥”连接部分对酶活性的表现至为重要。我们另一研究结果指出,电离辐射对 Cu,Zn-SOD 的损伤很可能是通过一部位的损伤而引起。

Cu,Zn-SOD 催化作用过程中咪唑桥与 Cu^{2+} 的还原和氧化的关系见以下示意图:

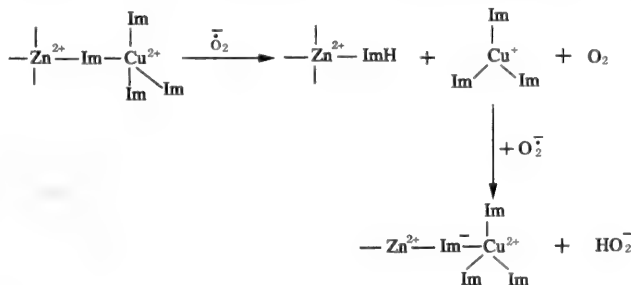


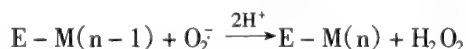
图 3-67 Cu,Zn-SOD 催化过程中“咪唑桥”的断开和重接

这示意图表明“咪唑桥”并非刚性的固定结构,而是一种柔韧灵活的连结方式,在 O_2^- 与 H^+ 的作用下可以暂时断开,但又在另一 O_2^- 作用下,可以恢复“咪唑桥”原来结构。正由于“咪唑桥”这一性质,Cu,Zn-SOD 才发挥对 O_2^- 的歧化作用。值得重视的是质子的来源,Fee 和 Ward 认为是从与 Cu^{2+} 配位的水分子的解离而来,有的学者认为处在活性中心部位口袋外侧的精氨酸残基可能提供了质子。

D 亚基与亚基的相互作用

在 Cu,Zn-SOD 的催化反应中,2 个亚基虽独立歧化,但它们相互作用也不可忽视,如在辐射所致 Cu,Zn-SOD 失活过程中,1 个亚基的失活可诱导另一亚基失活,从而导致 2 个亚基都失科学。Fielden 采用电子计算机模拟方法推测出每个酶分子中只有一半的 Cu^{2+} 参与了催化反应,据此提出的所谓的“一半部位”的催化机理,更可以反映出亚基与亚基的相互作用。

上述的 Cu,Zn-SOD 催化机理是复杂的。Mn-SOD 与 Fe-SOD 的金属离子与蛋白质构造均与 Cu,Zn-SOD 不同,但这三类酶的共同特点都是涉及活性部位内金属离子的交替还原或再氧化,有些学者为了说明其共同催化作用,常以下列通式表示,



其中 $\text{M}(n)$ 可以是 Cu^{2+} , 也可以为 Fe^{3+} 或 Mn^{3+} , 因此 $\text{M}(n-1)$ 就代表 Cu^+ , Fe^{2+} 和 Mn^{2+} , 不过事实上催化机理并不能用通式来表达,如 Cu,Zn-SOD 催化机理就与通式不一致。Mn-SOD 与 Fe-SOD 催化机理研究进展虽不及 Cu,Zn-SOD 迅速,然从已有资料可以看出其机理可能也与通式不同,而且不同来源的酶催化机理有所差异。Pick 等根据从大肠杆菌中提取的 Mn-SOD 动力学研究结果,指出酶浓度远高于 O_2^- 的浓度时出现的反应过程异于酶浓度低于 O_2^- 出现的反应过程。McAdam 在嗜热脂肪芽孢杆菌中得到 Mn-SOD 的研究中提出该酶反应循环先为快速的单电子氧化还原循环,接着是通过一步慢反应形成一种基本止无活性酶,然后再恢复到完全有活性酶的慢循环。

3.6.4.5 SOD 与其他抗氧酶的关系

生物体内的自由基主要是 O_2^- (或 HO_2^-) 及其活性衍生物,如 H_2O_2 、 $\text{RO}\cdot$ 、 $\text{RO}_2\cdot$ 及 ROOH 。需氧生物,其体内一定会有氧化谢,在氧化代谢反应中常有酶促氧化与还原。这表明在生物体内有酶参与氧自由基的产生和消除,最常见的酶有超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、色氨酸双氧酶、半乳糖酶、醛氧化酶、黄嘌呤氧化酶等。其中较为重要的是 SOD、CAT、GSH-PX,它们在体内

协同作用,共同构成一道保护屏障,使体内自由基的产生和消除处于动态平衡。有关抗氧酶的相互关系见图 3-68。

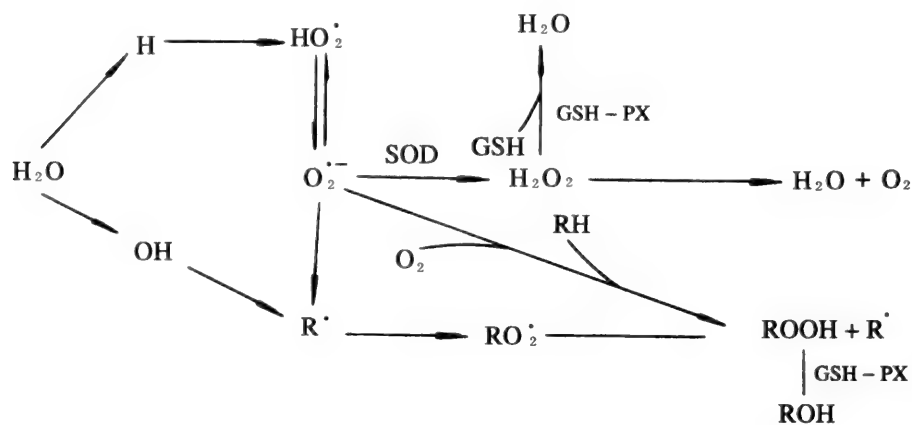


图 3-68 SOD, CAT, GSH-PX 的相互关系

从图中可见 O₂ 的还原过程第一个中间物为 O₂·⁻, SOD 的作用底物为 O₂·⁻, 在 SOD 作用下立即生成 H₂O₂ 和 O₂, H₂O₂ 在 CAT 的作用下再变成 H₂O 和 O₂。H₂O₂ 也可在有 GSH 存在情况下, 通过 GSH-PX 等酶的作用变成 H₂O 和 O₂。此外, 体内的 O₂·⁻ 在有氧情况下, 通过 GSH-PX 等的作用, 使 RH → ROOH → ROH, 这就是脂质过氧化的原理。总之, 由于生物体内存在这些抗氧酶, 使体内自由基的产生和消除处于平衡状态。

参 考 文 献

- 1 Kuby, S.A. A Study of Enzyme, Vol I - II. CRC Press, 1991
- 2 Boyer, P.D. The Enzymes, 3rd eds. New York: Academic Press Inc., 1970
- 3 Price, N.C. and Stevens, L. Fundamentals of Enzymology, 2nd eds. Oxford Univ. Press, 1989
- 4 Palmer, T. Understanding Enzyme, 3re eds. Ellis Horwood Ltd. 1990
- 5 Mathews and Van Holde. Biochemistry, 2nd eds. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1996
- 6 Michael, I.P. and Andrew, W. Enzyme Mechanisms. Northern Ireland: The Universities Press(Belfast) Ltd., 1987
- 7 Rees, A.R. etc. Protein Engineering. Oxford University Press, 1992
- 8 Tsou, C.L. Trends Biochem. Sci. 11, 427 - 430 (1986)
- 9 Hynes, T.R. and Fox, R.O. Proteins: Struct. Funct. Genet. 10, 92 - 105 (1991)
- 10 Kay, L.E., Torchia, D.A. and Bax, A. Biochemistry. 28, 8972 - 8979 (1989)
- 11 邹承鲁. 生物化学与生物物理报. 24(5), 393 - 398 (1992)
- 12 袁勤生, 赵健, 王维育. 应用酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 1994

4 酶活性的调节和酶的转换

4.1 酶活性调节的多样性

生命现象表现了它内部反应历程的有序性。这种有序性是受多方面因素调节和控制的,而酶活性的控制又是代谢调节作用的主要方式。酶活性的调节控制大概有下列九种方式:

4.1.1 酶浓度的调节

酶浓度的调节主要有两种方式:一种是诱导或抑制酶的合成;一种是调节酶的降解。例如,在分解代谢中, β -半乳糖苷酶的合成,平时是处于被阻遏状态。当乳糖存在时,抵消了阻遏作用,于是酶受乳糖的诱导而合成。

4.1.2 激素调节

这种调节也和生物合成有关。但调节方式有所不同。如乳糖合成酶有两个亚基,催化亚基和修饰亚基。催化亚基本身不能合成乳糖,但可以催化半乳糖以共价键的方式连接到蛋白上形成糖蛋白。修饰亚基和催化亚基结合后,改变了催化亚基的专一性,可以催化半乳糖和葡萄糖反应生成乳糖。修饰亚基的水平是由激素控制。妊娠时,修饰亚基在乳腺生成。分娩时,由于激素水平急剧的变化,修饰亚基大量合成,它和催化亚基结合,大量合成乳糖。

4.1.3 共价修饰调节

这种调节方式本身又是通过酶催化进行的。在一种酶分子上,共价地引入一个基团,从而改变它的活性。引入的基团又可以被第三种酶催化除去。例如,磷酸化酶的磷酸化和去磷酸化;大肠杆菌谷氨酰胺合成酶的腺苷酸化和去腺苷酸化就是以这种方式调节它们的活性。

4.1.4 限制性蛋白水解作用

限制性蛋白酶水解是一种高特异性的共价修饰调节系统。细胞内合成的新生肽大都以无活性的前体形式存在,一旦生理需要,才通过限制性水解作用使前体转变为具有生物活性的蛋白质或酶,从而启动和激活以下各种生物功能:酶原激活、血液凝固、补体激活等。除了参与酶活性调控外,还起着切除,修饰,加工等作用,因而具有重要的生物学意义。酶原激活是指体内合成的非活化的酶的前体,在适当条件下,受到 H^+ 离子或特异的蛋白酶限制性水解,切去某段肽或断开酶原分子上某个肽键而转变为活性的酶。如胰蛋白酶原,在小肠里被其他蛋白水解酶限制性地切去一个六肽,活化成为胰蛋白酶。血液凝固是由体内十几种蛋白因子参加的级联式酶促激活反应,其中大部分为限制性蛋白水解酶。在凝血过程中首先由蛋白因子(称为因子 Xa 的蛋白酶)激活凝血酶原,生成活性凝血酶;并由它再催化可溶性的纤维蛋白质原,转变成不稳定的可溶性纤维蛋白,聚集成网状细丝,以网住血液的各种成分。在凝血酶作用下,收缩成血块,导致破损的血管被封闭而修复。

补体是一类血浆蛋白,和免疫球蛋白一样发挥防御功能。免疫球蛋白对外来异物有“识别”结合作用和激活补体作用。补体是一组蛋白酶(由十一种蛋白组分组成),通常以非活性前体形式存在于血清中,一旦接受到抗原的入侵信号,被限制性蛋白酶水解而激活补体组分,最终会形成“活性复合物”执行其功能。

4.1.5 抑制剂和激活剂的调节

抑制剂的调节指酶活性受到大分子或小分子抑制剂抑制,从而影响酶的活性。大分子如胰脏的胰蛋白酶抑制剂(抑肽酶),小分子如 2,3-二磷酸甘油酸,是磷酸变位酶的抑制剂。

激活剂的调节指酶活性受到离子、小分子化合物或生物大分子的激活,从而提高酶的活性。金属离子对酶的激活最常见(参见 3.4),小分子化合物如 2,6-二磷酸果糖是磷酸果糖激酶有效的激活剂,生物大分子如酶原的激活、cAMP 对蛋白激酶的激活等。

4.1.6 反馈调节

许多小分子物质的合成是由一连串的反应组成的。催化此物质生成的第一步反应的酶,往往可以被它的终端产物所抑制,这种对自我合成的抑制叫反馈抑制。这在生物合成中是常见的现象。例如,异亮氨酸可抑制其合成代谢通路中的第一个酶——苏氨酸脱氨酶。当异亮氨酸的浓度降低到一定水平时,抑制作用解除。合成反应又重新开始。再如合成嘧啶核苷酸时,终端产物 UTP 和 CTP 可以控制合成过程一连串反应中的第一个酶。反馈抑制就是通过这种调节控制方式,调节代谢物流向,从而调节生物合成。

4.1.7 变构调节

变构调节源于酶反馈抑制的调节,如某一生物合成途径表示如下:



产物 F 作为这一合成途径中几个早期的酶(如 A→B)的酶的变构抑制剂,对这一合成途径加以反馈抑制,避免产物过量堆积。变构抑制剂与酶的结合引起酶构象的改变,使底物结合部位的性质发生变化并改变了酶的催化活性。变构酶大多为寡聚蛋白,因此变构调节的机理涉及到亚基之间的相互作用,如将变构酶拆分成单亚基,即失去途径活性,但仍保持了酶的催化活性。

4.1.8 金属离子和其他小分子化合物的调节

有一些酶需要 K^+ 活化, NH_4^+ 往往可以代替 K^+ ,但 Na^+ 不能活化这些酶,有时还有抑制作用。这一类酶有 L-高丝氨酸脱氢酶、丙酮酸激酶、天冬氨酸激酶和酵母丙酮酸羧化酶。另有一些酶需要 Na^+ 活化, K^+ 起抑制作用。如肠中的蔗糖酶可受 Na^+ 激活,二价金属离子如 Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} 往往也为一些酶表现活力所必需,它们的调节作用还不很清楚,可能和维持酶分子一定的三级、四级结构有关,有的则和底物的结合和催化反应有关。这些离子的浓度变化都会影响有关的酶活性。

丙酮酸羧化酶催化的反应为: $ATP + \text{丙酮酸} + HCO_3^- \rightarrow \text{草酰乙酸} + ADP + P_i$,这是从丙酮酸合成葡萄糖途径中限速的一步。丙酮酸的浓度影响酶的活力,而丙酮酸的浓度是由 NAD^+ 和 $NADH$ 的比值决定的, NAD^+ 和 $NADH$ 的总量在体内差不多是恒定的。 $NADH$ 的浓度相对地提高了,丙酮酸的浓度就要降低。

与此相类似的 ATP、ADP、AMP 的总量在体内也是差不多恒定的,其中 ATP、ADP、AMP 的相对量的变化也可影响一些酶的活性。Atkinson 提出能荷(Energy charge)作为一个物理量,这个物理量数值的变化和某些酶的活力变化有一定关系。

$$\text{能荷} = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

能荷的数值是 0~1,当腺苷酸全部以 AMP 的形式存在,能荷数值等于零,全部以 ATP 形式存在,能荷数值等于 1。细胞内的能荷数值一般在 0.8~0.9 之间,在这个范围内,能荷数值的增加可使和 ATP 再生有关的一类酶,如糖磷酸激酶、丙酮酸激酶、丙酮酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶和柠檬酸合成酶等反应速度降低;而使另一类和利用 ATP 有关的酶,如天冬氨酸激酶、磷酸核糖焦磷酸合成酶等的反应速度增加。

4.1.9 蛋白质剪接

20 世纪 90 年代初期,人们又发现了一种蛋白质活性的调节方式——蛋白质剪接(protein splicing)。

1990 年首次发现啤酒酵母细胞的基因 TFP₁ 表达两种蛋白质,其一是液泡 H⁺-ATPase 的催化亚基(69KD),由 TFP₁ 基因的 5' 端和 3' 端的编码区编码,另一个蛋白(50KD)则由 TFP₁ 基因的中间区域编码。实验证明 50KD 的蛋白是被剪切下来的蛋白内含子(intein),蛋白内含子往往具有核酸内切酶的活性,而 69KD 的蛋白是由两端的蛋白外显子(extein)连接起来的。此后,陆续在古细菌、真细菌和真核细胞中发现了蛋白质自我剪接的现象。

蛋白质的自我剪接说明成熟的蛋白序列与 mRNA 序列不一定顺序对应,一个单一的前体蛋白通过剪接机制可以产生多种蛋白质分子,这种新的蛋白质活性调节机理还有待进一步研究。此外,酶的区域化(Compartmentation)和多酶复合体等都和酶活力的调节控制有密切关系。

虽然酶活性的调节方式有很多,但大致可分成两大类:一是酶活性的调节;二是酶浓度的调节。本章着重讨论酶活性的调节中两类很重要的调节方式:

- (1) 通过配体的可逆结合,引起酶分子构象改变来调节酶的活性。
- (2) 通过酶分子共价结构可逆或不可逆的改变酶活性的调节。

4.2 通过配体诱导酶构象改变的活性调节

酶分子因与配体可逆非共价结合导致构象的变化,进而改变酶活性状态,称为酶的变构调节,具有这种调节作用的酶称为变构酶。

本节先从配体结合、协同性、协同配体结合及有关 Hill 方程、Adair 方程讨论着手,再进一步阐明变构酶的基本性质及两种理论模型。

4.2.1 配体和蛋白质的结合

4.2.1.1 配体和具有单个结合部位蛋白质的结合

假定配体 S 按下列反应和蛋白质 E 结合:



则结合常数 $K_b = \frac{[ES]}{[E][S]}$ ($K_b = K_s^{-1}$)

蛋白质的饱和分数 Y 可由下式给出:

$$Y = \frac{[ES]}{[E_0]} = \frac{[ES]}{[ES] + [E]} = \frac{K_b[E][S]}{K_b[E][S] + [E]} = \frac{K_b[S]}{K_b[S] + 1} \quad (4-1)$$

在 $[E_0]$ 恒定下, Y 对 $[S]$ 作图,为一双曲线

如果反应在稳态条件下进行, $[S_0] \gg [E_0]$, $[S] \approx [S_0]$, $[ES]$ 不随时间而变化,在最简单系统中, v_0 和 $[ES]$ 成正比。则: $\frac{v_0}{v} = \frac{[ES]}{[E_0]} = Y$, v_0 对 $[S_0]$ 作图,与 Y 对 $[S_0]$ 作图一样,也为一双曲线。在稳态条件下, v_0 与 $[S_0]$ 的双曲线关系是: Michaelis-Menten 方程所预示的。另一方面,如果反应进行和导出米氏方程所作的假定不相符合,那么,反应的动力学特性和结合特性通常是不一样的。

4.2.1.2 协同性

协同性：具有一个以上配体结合部位的蛋白质。在配体结合过程中，结合部位之间，存在着相互作用的可能性。

正协同性：一分子底物或配体的结合增加了蛋白质对另一分子相同的或不同的底物或配体的亲和力。

负协同性：一分子底物或配体的结合降低了蛋白质对另一分子相同的或不同的底物或配体的亲和力。

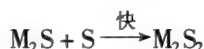
同种协同性：一分子底物或配体的结合影响了下一个相同底物或配体和蛋白质的结合。

异种协同性：一分子配体的结合影响另一个不同的配体和蛋白质的结合。

协同效应：正同种，正异种，负同种或负异种。变构抑制作用是负异种协同性的例子，变构激活作用则是正异种协同性的实例。

4.2.1.3 正同种协同性与 Hill 方程

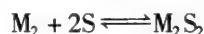
我们先讨论一下在二聚体蛋白质中最简单的正同种协同性的情况，此蛋白质具有两个相同的配体结合部位。当第一个配体结合时，增加了蛋白质另一个结合部位对配体的亲和力，反应如下：



式中 M 表示两个相同亚基中的一个，称为原体， M_2 表示二聚体蛋白质。如果亲和力增加很大， M_2S 和 S 反应很快，在此条件下， $[M_2S_2] \gg [M_2S]$ ，则 $Y = \frac{[M_2S_2]}{[(M_2)_0]}$ ，Y 对

[S] 作图，得 S 形曲线，而不是双曲线，如图 4-1 所示。

对于完全的 (Complete) 协同性来说，每个蛋白质分子不是完全饱和，就是无配体结合，即全或无，反应可写为：



其结合常数 $K_b = \frac{[M_2S_2]}{[M_2][S]^2}$ ， $Y = \frac{K_b[S]^2}{1 + K_b[S]^2}$

取对数：
$$\lg K_b + 2\lg[S] = \lg\left(\frac{[M_2S_2]}{[M_2]}\right)$$

$$= \lg\left(\frac{[M_2S_2]}{[(M_2)_0] + [M_2S_2]}\right) \quad (4-2)$$

对具有 n 个相同结合部位的蛋白质，其完全的正同种协同性的通式为：

$$\lg K_b + n\lg[S] = \lg\left(\frac{[M_nS_n]}{[(M_n)_0] - [M_nS_n]}\right) = \lg\left(\frac{Y}{1-Y}\right) \quad (4-3)$$

式(4-3)为 Hill 方程。如结合遵守此式， $\lg\left(\frac{Y}{1-Y}\right)$ 对 $\lg[S]$ 作图将是线性的，其斜率为 n，纵截为 $\lg K_b$ ，这样的图称为 Hill 曲线，实验测定的斜率，称 Hill 系数，以 h 表示。

Y 值低于 0.1 和高于 0.9，Hill 曲线斜率趋向于 1，表示没有协同性。这是由于在非常低的配体浓度下，系统中存在的配体对绝大多数蛋白质分子是不足以充满一个以上结合部位的，不论蛋白质的亲和力有多大；类似地在很高配体浓度下，只有极少数蛋白质分子尚留有未被结合的部位。

Hill 系统因此取线性斜率部分，即曲线中间部分，此处表现最大程度的协同效应。对协同性完全的系统，Hill 系统 h 等于结合部位数 n。对表现部分正协同性的蛋白质，仍能得到具有线性中间部分的 Hill 曲线，但 $h < n$ ，线性部分也较短。

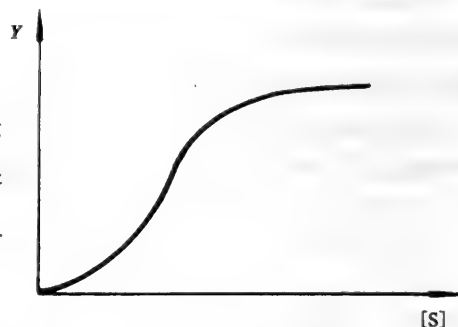


图 4-1 在固定蛋白质浓度下，表现正同种协同性结合的 Y-[S]

在配体 S 是底物,反应进行到产生产物, Michaelis-Menten 平衡假定成立情况下,反应初速度 $v_0 \propto [\text{MS}]$, $\frac{v_0}{v} = \frac{[\text{MS}]}{[\text{M}_0]} = Y$, $[\text{M}_0] = [\text{M}] + [\text{MS}]$, $\frac{Y}{1-Y} = \frac{v_0}{v-v_0}$, 所以 $\lg\left(\frac{v_0}{v-v_0}\right)$ 对 $\lg[\text{S}]$ 的 Hill 曲线可替代图 4-2 曲线,两个图的斜率具有相同的数值和意义,应该指出,虽然 $Y = \frac{v_0}{v}$ 关系对单体酶在稳态情况下假定是成立的,但对较复杂的寡聚酶系统, $Y = \frac{v_0}{v}$ 的关系不一定成立,只有当结合过程处于平衡或非常接近平衡条件下才成立。

Hill 作图的一个主要问题是需获得 \bar{v} 的正确估值,因协同系统的一次作图是非线性的,但应用 Eadie-Holctee 或其他作图法获得 \bar{v} 值,仍可作出 Hill 曲线,并测定 h 。若以 $[\text{S}]^h$ 代替 $[\text{S}]$,重新一次作图,这将获得更线性的结果, \bar{v} 值也更正确,如与初始测定的 \bar{v} 值有明显的差异,那么,用新的 \bar{v} 值,重作 Hill 曲线。

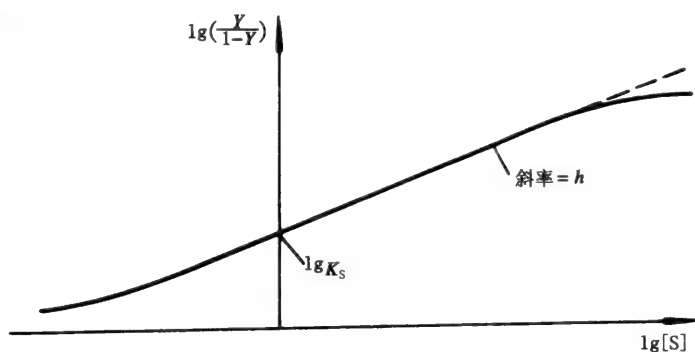


图 4-2 蛋白质浓度固定,结合表现为正同种协同性的 Hill 曲线

4.2.1.4 Adair 方程

现在我们讨论一个具有若干相同结合部位的蛋白质与其配体的结合,对协同性不作任何假定。每个结合部位的内在(微观)结合常数 K_b ,定义为蛋白质所有其他结合部位不存在时的结合常数,由于上述结合部位都相同,其 K_b 也就相同。但是,每步反应的实际(表观)结合常数都是不同的,以具有两个相同结合部位的二聚体蛋白质与配体 S 的结合为例:



K_{b_1} , K_{b_2} 仅取决于反应先后位置,与实际结合部位无关。饱和分数

$$Y = \frac{\text{单位体积内已结合配体的原体数}}{\text{单位体积内原体总数}} = \frac{[\text{MS}]}{[\text{MS}] + [\text{M}]}$$

由于原体是以二聚体的组分存在, Y 应该以实际存在的各种蛋白质-配体络合物浓度表示:

M_2 由 2 个原体组成,2 个原体都未结合配体

M_2S 由 1 个结合配体和 1 个未结合的原体组成

M_2S_2 由 2 个结合配体的原体组成

所以,已结合配体的原体总浓度为: $[\text{M}_2\text{S}] + 2[\text{M}_2\text{S}_2] = [\text{MS}]$

未结合配体的原体总浓度为: $2[\text{M}_2] + [\text{M}_2\text{S}] = [\text{M}]$

$$[\text{MS}] + [\text{M}] = [\text{M}_2\text{S}] + 2[\text{M}_2\text{S}_2] + 2[\text{M}_2] + [\text{M}_2\text{S}]$$

$$= ([\text{M}_2] + [\text{M}_2\text{S}] + [\text{M}_2\text{S}_2]) \times 2$$

$$\therefore Y = \frac{[\text{M}_2\text{S}] + 2[\text{M}_2\text{S}_2]}{[\text{MS}] + [\text{M}]} = \frac{[\text{M}_2\text{S}] + 2[\text{M}_2\text{S}_2]}{2([\text{M}_2] + [\text{M}_2\text{S}] + [\text{M}_2\text{S}_2])} \quad (4-4)$$

$$K_{b_1} = \frac{[M_2S]}{[M_2][S]} \quad [M_2S] = K_{b_1} [M_2][S]$$

$$K_{b_2} = \frac{[M_2S_2]}{[M_2S][S]} \quad [M_2S_2] = K_{b_2} [M_2S][S] = K_{b_1} K_{b_2} [M_2][S]^2$$

代入(4-4)式

$$Y = \frac{K_{b_1} [M_2][S] + 2K_{b_1} K_{b_2} [M_2][S]^2}{2([M_2] + K_{b_1} [M_2][S] + K_{b_1} K_{b_2} [M_2][S]^2)} = \frac{K_{b_1} [S] + 2K_{b_1} K_{b_2} [S]^2}{2(1 + K_{b_1} [S] + K_{b_1} K_{b_2} [S]^2)} \quad (4-5)$$

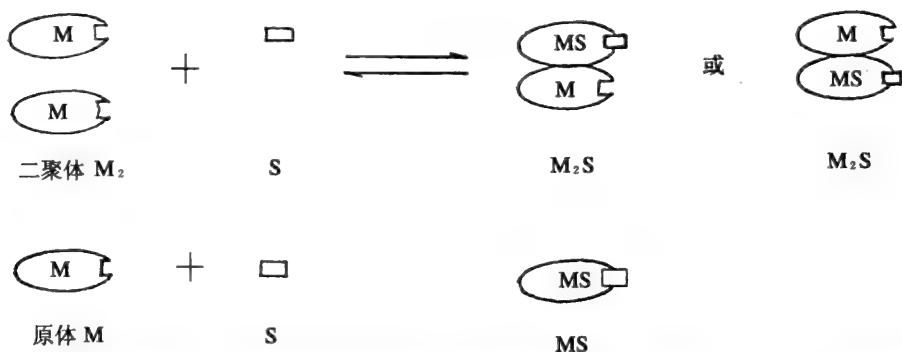
式(4-5)为二聚体蛋白质结合配体的 Adair 方程。

下面我们再对结合部位间无相互作用情况作些讨论,仍以二聚体为例,先比较一下在相同摩尔浓度下,二聚体和假设分离的原体的结合反应,然后考察微观和表观结合常数的关系。

二聚体蛋白质反应第一步:

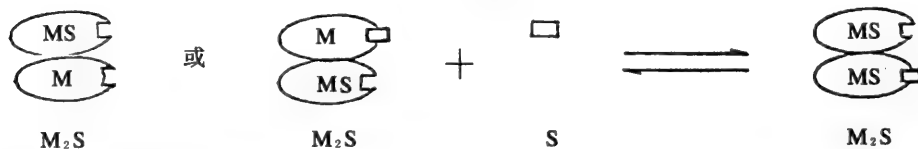


原体反应:



在正向反应中,二聚体有两个游离的结合部位,原体只有一个,所以,配体结合到二聚体的可能性是原体的二倍。在逆向反应中 S 的离解速度,两者是相同的,因此, $K_{b_1} = 2K_b$ 。

二聚体反应第二步



原体反应仍为: $M + S \rightleftharpoons MS$

在正向反应中,二聚体和原体都有一个游离的结合部位,配体与两者的结合可能性是相同的,在逆向反应中,二聚体有两个 S 离解的部位,原体仅一个,所以配体从 M_2S_2 离解的可能性是 MS 的两倍,因此 $K_{b_2} = 1/2K_b$ 。

将上述关系式代入式(4-5):

$$Y = \frac{2K_b[S] + 2 \cdot 2K_b \cdot 1/2K_b[S]^2}{2(1 + 2K_b[S] + K_b^2[S]^2)} = \frac{K_b[S] + K_b^2[S]^2}{(1 + 2K_b[S] + K_b^2[S]^2)}$$

$$= \frac{K_b[S](1 + K_b[S])}{(1 + K_b[S])^2} = \frac{K_b[S]}{1 + K_b[S]} \quad (4-6)$$

上式与具有单个配体结合部位, Y 对 $[S]$ 作图为双曲线的蛋白质的表达式是相同的。一般讲, S 具有几个相同结合部位的蛋白质结合, 如结合部位间无相互作用, Y 对 $[S]$ 作图, 将得双曲线。若结合反应是 S 转变为产物的第一步, 平衡假设成立, $v_0 \propto [MS]$, 那么, v_0 对 $[S_0]$ 作图也将得到双曲线。

从上述讨论: $K_{b_1} = 2K_b$

$$K_{b_1} = \frac{1}{2} K_b$$

$$K_{b_1} = 4K_{b_2}$$

对正同种协同性:

由于第一个配体分子的结合增加了蛋白质对配体的亲和力, 其第二个配体分子的结合比结合部位间无相互作用的要快, K_{b_2} 小于 $4K_{b_1}$, 按 Adair 方程, Y 对 $[S]$ 作图, 将得到 S 形曲线[图 4-3(a)], 协同程度愈大, 曲线 S 形特征愈显著。

在协同性是完全的情况下,

$$Y = \frac{K_b [S]^2}{1 + K_b [S]^2} \quad (\text{见 } 4.2.1.3)$$

对负同种协同性:

负同种协同性使第二个配体分子的结合比结合部位间无相互作用的要慢, K_{b_1} 大于 $4K_{b_2}$, Y 对 $[S]$ 作图, 即非 S 形曲线, 也非矩形双曲线[图 4-3(a)]。

配体与具有三个结合部位蛋白质结合的 Adair 方程: 配体与具有三个相同结合部位三聚体蛋白质(M_3)结合的三个结合反应如下:



使用与二聚体蛋白质结合反应类似推导, 可得:

$$Y = \frac{K_{b_1} [S] + 2K_{b_1} K_{b_2} [S]^2 + 3K_{b_1} K_{b_2} K_{b_3} [S]^3}{3(1 + K_{b_1} [S] + K_{b_1} K_{b_2} [S]^2) + K_{b_1} K_{b_2} K_{b_3} [S]^3} \quad (4-7)$$

结合部位间无相互作用:

$$K_{b_1} = 3K_b, K_{b_2} = K_b, K_{b_3} = \frac{1}{3} K_b$$

$$K_{b_1} = 3K_{b_2}, K_{b_2} = 3K_{b_3}$$

Adair 方程简化为: $Y = \frac{K_b [S]}{1 + K_b [S]}$

正同种协同性:

$$K_{b_1} < 3K_{b_2}, K_{b_2} < 3K_{b_3}$$

如果是完全的协同性, Hill 系数(h) = 3

负同种协同性:

$$K_{b_1} > 3K_{b_2}, K_{b_2} > 3K_{b_3}$$

配体与具有四个结合部位蛋白质结合的 Adair 方程: 四聚体蛋白质(M_4)结合配体的四个表现结合常数分别为 $K_{b_1}, K_{b_2}, K_{b_3}, K_{b_4}$, Adair 方程为:

$$Y = \frac{K_{b_1} [S] + 2K_{b_1} K_{b_2} [S]^2 + 3K_{b_1} K_{b_2} K_{b_3} [S]^3 + 4K_{b_1} K_{b_2} K_{b_3} K_{b_4} [S]^4}{4(1 + K_{b_1} [S] + K_{b_1} K_{b_2} [S]^2 + K_{b_1} K_{b_2} K_{b_3} [S]^3) + K_{b_1} K_{b_2} K_{b_3} K_{b_4} [S]^4} \quad (4-8)$$

结合部位间无相互作用:

$$K_{b_1} = 4K_b, K_{b_2} = \frac{3}{2}K_b, K_{b_3} = \frac{2}{3}K_b, K_{b_4} = \frac{1}{4}K_b$$

$$K_{b_1} = \frac{8}{3}K_{b_2}, K_{b_2} = \frac{9}{4}K_{b_3}, K_{b_3} = \frac{8}{3}K_{b_4}$$

Adair 方程可简化为: $Y = \frac{K_b[S]}{1 + K_b[S]}$

正同种协同性:

$$K_{b_1} < \frac{8}{3}K_{b_2}, K_{b_2} < \frac{9}{4}K_{b_3}, K_{b_3} < \frac{8}{3}K_{b_4}$$

如果完全的协同性, Hill 系数(h) = 4

负同种协同性:

$$K_{b_1} > \frac{8}{3}K_{b_2}, K_{b_2} > \frac{9}{4}K_{b_3}, K_{b_3} > \frac{8}{3}K_{b_4}$$

4.2.1.5 协同性的鉴别方法

A 动力学作图法

鉴别正协同、负协同或无协同效应,一般可用动力学作图法(图 4-3)。

a 类 Michaelis-Menten 作图

Y 对 [S] 作图(图 4-3(a)), 如得一双曲线为无协同效应, 如得一 S 形曲线, 表示正协同效应。负协同效应的曲线呈“颠簸”形(bumps), 与无协同曲线相似, 不易区别, 但不是矩形双曲线, 也有人称为表观双曲线, 它表示随着配体浓度的增高, 曲线的斜率愈来愈低, 即速度的增加愈来愈小, 恰与正协同效应相反。

b 类 Lineweaver-Burk 作图

$\frac{1}{Y}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图[图 4-3(b)], 正协同效应表现为向上凹的曲线, 负协同效应表现为向下凹的曲线, 无协同效应则为直线。

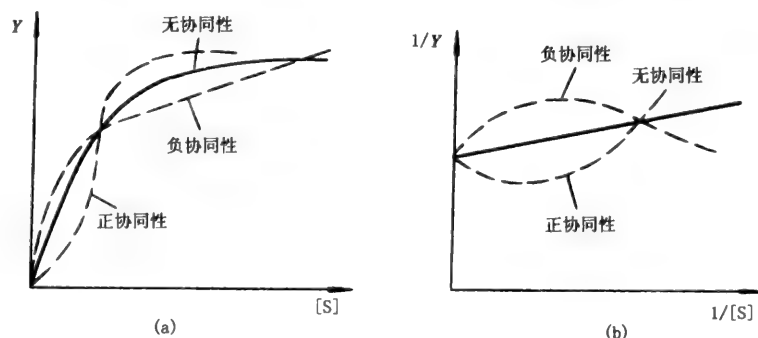
c 类 Eadie-Hofstee 作图

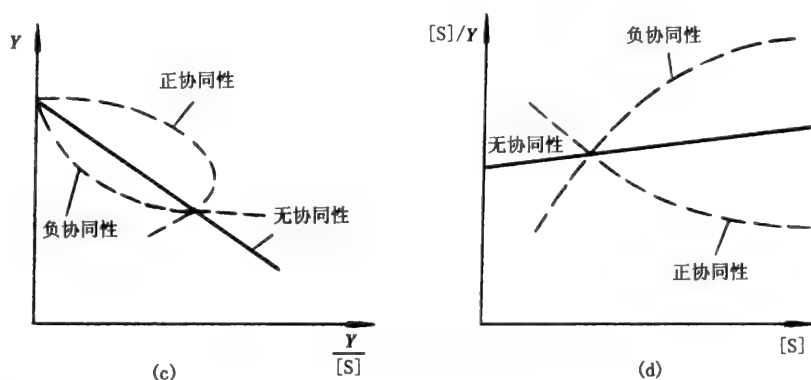
Y 对 $\frac{Y}{[S]}$ 作图[图 4-3(c)], 正协同效应为向左下凹的曲线, 负协同效应为向右上凹的曲线, 无协同效应为一负斜率的直线。

d 类 Hanes 作图

$\frac{[S]}{Y}$ 对 [S] 作图[图 4-3(d)], 正协同和负协同效应也分别是向上凹及向下凹的曲线, 无协同效应仍为直线。

如 S 是底物, 反应形成产物, 结合过程维持平衡或接近平衡, $[MS]$ 不变, $v_0 \propto [MS]$, $Y = \frac{v_0}{v}$, $[S_0] \gg [E_0]$, 在这些条件下, 用 v_0 代表 Y, $[S_0]$ 代替 [S] 作图, 将得到相同的结论。



图 4-3 正和负同种协同性四种作图($[E_0]$ 固定)B 比值 R_S

Koshland 等人建议用比值 R_S 来鉴别不同的协同效应。

$$R_S = \frac{\text{位点被 90\% 饱和时的底物浓度}}{\text{位点被 10\% 饱和时的底物浓度}}$$

Michaelis-Menten 型的酶 $R_S = 81$

具有正协同效应的酶 $R_S < 81$

具有负协同效应的酶 $R_S > 81$

对具有 n 个结合部位的酶, Hill 方程为:

$$\frac{v}{\bar{v}} = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n}, R_S = \left(\frac{9K'}{\frac{1}{2}K'} \right)^{1/n} = 81^{1/n}$$

式中 n 就是 Hill 作图中的 n , 所以,

当 $n = 1$	$R_S = 81$	无协同效应
$n > 1$	$R_S < 81$	产生正协同效应
$n < 1$	$R_S > 81$	产生负协同效应

C Scatchard 作图与平衡透析法

配体 S 与具有 n 个相同而无互相作用结合部位的寡聚蛋白(E 或 M_n) 结合

$$Y = \frac{[MS]}{[MS] + [S]} = \frac{K_b[S]}{1 + K_b[S]}$$

$$[MS] + [MS]K_b[S] = [MS]K_b[S] + [M]K_b[S]$$

$$K_b = \frac{[MS]}{[M][S]} = \frac{[MS]}{([M_0] - [MS])[S]}$$

$$\frac{[MS]}{[S]} = K_b[M_0] - K_b[MS] \quad (4-9)$$

1949 年 Scatchard 指出: 在上述条件下, $\frac{[MS]}{[S]}$ 对 $[MS]$ 作图将是线性的, 并具有图 4-4 的特征。

将平衡透析实验数据用 Scatchard 作图, 可测定协同效应的类型和结合部位数目。将已知浓度 ($[E_0] = [(M_n)_0]$) 的蛋白质溶液对已知浓度 ($[S_0]$) 配体溶液进行透析, 使其达到平衡 (注意: 蛋白质和配体在数小时内须是稳定的, 结合后不形成产物, 这二点限制了此方法的应用)。在此系统中, 配体能自由通过透析膜, 蛋白质则固定于透析膜间隔内 (例: 透析袋)。透析袋外自由配体浓度可随时进行测定, 当平衡时它与透析袋内自由配体浓度 ($[S]$) 相等 (图 4-5), 那么, $[S] = [S_0] - [MS]$, $[MS] = [S_0] - [S]$, $[S_0]$ 已知, $[S]$ 测定, $[MS]$ 计算出, 即可作图求得结合部位数 n 及协同效应的类

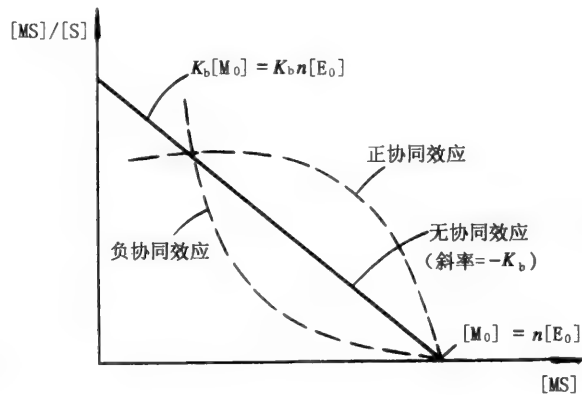


图 4-4 $\frac{[MS]}{[S]}$ 对 $[MS]$ 的 Scatchard 作图 ($[E_0]$ 固定)

型。或测定袋内总配体浓度 ($= [MS] + [S]$) 和袋外配体浓度 ($= [S]$), $[MS]$ 也可计算。

曾用此技术研究乳酸脱氢酶与 NADH 的结合, 结果发现四个亚基上的结合部位间不存在相互作用。

超离心或凝胶过滤也可得到透析平衡法的相似结果, 这都是基于蛋白质大分子比配体小分子移动快这一事实而进行的。超离心法是把无配体的蛋白质样品装在含有配体的缓冲液管柱上面, 离心作用使蛋白质通过配体溶液移动带走与之结合的配体而使留在后面的配体浓度降低。凝胶过滤法也是把无配体的蛋白质样品加到一个分子筛 (例: Sephadex) 色层柱上, 此柱先要用含配体的缓冲液平衡。用含配体的同样缓冲液洗脱, 由于蛋白质分子通过柱比配体分子快, 所以在蛋白质-配体络合物区带之后, 有一个较低浓度的配体区带。这样, 都可将 $[S]$ 测出。

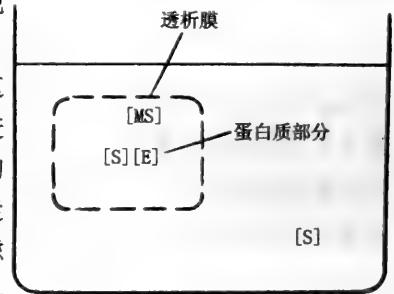


图 4-5 平衡透析实验示意图

4.2.1.6 氧和血红蛋白的结合

本节阐述的许多工作, 都是从研究氧和血红蛋白的结合过程开始的。1904 年 Bohr 及其同工作者揭示血红蛋白和氧结合的饱和分数 Y 对氧分压作图。得到了 S 形曲线。

1909 年 Hill 在结合部位间相互作用引起正协同效应的基础上说明这一现象, 正确提出每个血红蛋白亚基含有一个血红素, 还假定协同效应是完全的, 这样, 如血红蛋白分子有 n 个亚基, 总反应为:



在此基础上, 导出 Hill 方程, 发现 Hill 系数 (h) 约为 2.8。

以后, 证明每个血红蛋白分子具有 4 个结合部位, 因此, 协同效应并非是完全的。1925 年 Adair 发展了配体和蛋白质结合的理论, 他认为氧分子是以分离的四步结合于一个血红蛋白分子, 每步都具有一个不同的表现结合常数的关系, 应能解释正协同效应。

1960 年 perutz 及其同事用 X-线衍射分析研究阐明, 4 个结合部位处于非常相似的微环境中, 血红蛋白分子的 4 个血红素在空间是完全分离的, 因此结合部位间直接的相互作用是不可能的, 看来, 协同效应的机制很可能与亚基间相互作用有关。

迄今, 氧的协同效应的结构基础已得到初步解释, 去氧血红蛋白由于羧端形成亚基间的盐键, 因此整个分子绷得比较紧, 不易与氧结合, 只有某些盐键被打开后, 才能开始结合。很可能是第一个氧结合时, 要打开的盐键不只是四个亚基间的盐键的四分之一, 而是更多一些。打开盐键需要能量, 因此第一个氧的结合需要的能量多于第二个及第三个, 结合第四个氧时, 所需能量更少。因此, 从氧结合曲线看, 开始, 外界 $p\text{O}_2$ 增加, Y 从零上升比较困难, 从结合了第一个 O_2 开始, $p\text{O}_2$ 再增加, Y 值的增加就快了。所以 Y 对 $p\text{O}_2$ 作图, 呈 S 形曲线, 表现出正协同效应。血红蛋白的变构效

应(血红素邻近的变化,亚基构象变化及四级结构的变化)是它的协同效应的结构基础。

4.2.2 变构酶

4.2.2.1 基本性质

变构酶源于反馈调节的研究,20世纪50年代中期 Umbarger 证明由 L-Thr 历经 5 步反应合成 L-Ile 途径中,当 L-Ile 合成过量,随即对催化第一步反应的 Thr 脱水酶产生反馈抑制作用。Gerhart 和 pardec 在嘧啶核苷酸合成途径中发现终产物 CTP 能反馈抑制催化第一步反应的天冬氨酸转氨甲酰酶(ATCase)。

对这类反馈抑制的酶活性调控作用 Monod 等概括出下列几个要点。

1) 能调控酶活性的配体,称效应物,其分子结构常和酶反应中的底物或产物的结构不同,因此,这种效应物似乎不应该在酶的活性部位和酶结合。

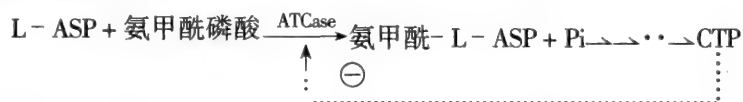
2) 变构酶的动力学性态和恒态酶不同,酶反应速度与底物浓度间不是矩形双曲线关系,而是 S 形曲线,S 形是表示在某一段的底物浓度时,酶反应速度对底物浓度的变化特别敏感。

3) 底物,效应物与变构酶的结合显然不同,有时因物理或化学的变化(如加热、冰冻、尿素、有机汞等处理),酶会失去对效应物的敏感性,但催化活性并未失去,这种脱敏的酶表现出正常的双曲线动力学现象。

4) 变构酶一般都是寡聚蛋白质,由若干亚基以非共价的结合方式连结在一起。

在上述各种现象基础上,Monod 等遂提出效应物是在酶的活性部位以外的地方和酶结合的,这个地方称为变构部位,当效应物和变构部位结合后,即引发酶活性部位构象改变,从而导致酶活性改变。

前面提到的 ATCase 是具有正协同效应的一个代表。它催化 ASP 氨甲酰化,这是嘧啶核苷酸生物合成一系列反应中的第一个反应。



动力学实验表明,在氨甲酰磷酸饱和浓度下,ATCase 初速度对 [ASP] 作图,呈现典型的变构酶 S 形曲线。ATP 是它的变构激活剂,终产物 CTP 是它的变构抑制剂,加入 ATP 使它的 S 形曲线趋向于双曲线,ATP 能降低 K_m 值约 33%,但 \bar{v} 相同,CTP 的加入,使它的 S 形曲线趋进一步下移,曲线的 S 形更加显著,CTP 增加 K_m 值为 50%, \bar{v} 却无明显改变。上述结果说明,ASP 产生正同种协同效应,ATP 产生正异种协同效应,CTP 产生负异种协同效应。

ATCase 结构可记为 $C_3(r_2)_3C_3$ (C 为催化亚基, r 为调节亚基),全酶中有两个催化三聚体(每个相对分子质量为 100 000 道尔顿)两个催化三聚体被三个调节二聚体(每个相对分子质量为 33 000 道尔顿)分隔开,全酶结构的结合需 Zn^{2+} 稳定。

每个调节二聚体能结合两分子 CTP,两个亚基表观上虽是相同的,但对第一个 CTP 分子的亲和力和比第二个 CTP 分子要大。现已知 ATP 和 CTP 竞争同一结合部位。近年来用停流法,弛豫时谱法测定,实验结果提示催化部位间相互作用可能是同构(Concerted)机制,而催化部位与调节部位间相互作用可能是渐变(Sequential)机制。用汞的化合物处理,可使 ATCase 脱敏。协同效应丧失,同时也不受 ATP 和 CTP 的影响。Gerhart 认为酶分子存在两种构象,当 L-天冬氨酸结合上去后,酶的催化亚基发生转动,使得上、下的催化亚基不是正好相对,

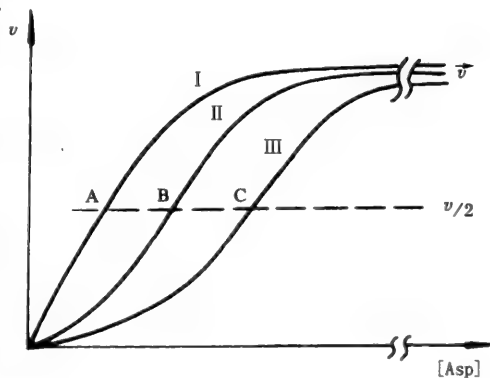
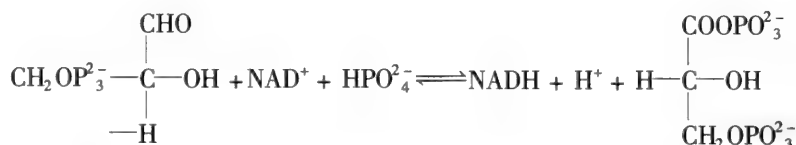


图 4-6 ATC 的动力学分析曲线
I:对照 II:加入 ATP III:加入 CTP

酶处于松弛状态,弛豫时谱法也证明 CTP 的衍生物 BrCTP 和酶结合的速度由构象变化的那一步所决定,同样 L-天冬氨酸的类似物琥珀酸及氨甲酰磷酸和酶结合也有构象变化。显然构象的变化对 ATC 的调节控制起着重要的作用。

下面再将甘油醛-3-磷酸脱酶作为具有负协同效应的一个实例,简述其主要特征,此酶催化下列反应:



它具有四个亚基,可和 4 个 NAD^+ 结合,但结合常数不同,其结合 NAD^+ 的解离常数见表 4-1。

表 4-1 NAD^+ 的解离常数

解离常数	虾肌平衡透析测定(mol/L)	兔肌超离心测定(mol/L)	兔肌平衡透析测定(mol/L)
K_1	小于 5×10^{-9}	小于 5×10^{-8}	小于 10^{-10}
K_2	小于 5×10^{-9}	小于 5×10^{-8}	小于 10^{-9}
K_3	6×10^{-7}	4×10^{-6}	3×10^{-7}
K_4	13×10^{-6}	35×10^{-6}	26×10^{-6}

荧光测定的结果也可看出,第一个 NAD^+ 结合时荧光变化最大,随后逐渐减少。说明 NAD^+ 的结合引起酶的构象变化。由于 K_1 和 K_2 接近, K_3 和 K_4 相接近,两者相差将近二个数量级。在一般情况下,只能结合两个 NAD^+ ,表现为半活性部位的性质。

不同的巯基修饰剂实验也证明半(活性部)位反应性是亚基构象变化的结果,而不是由于存在两类不同的亚基。

4.2.2.2 MWC 类型

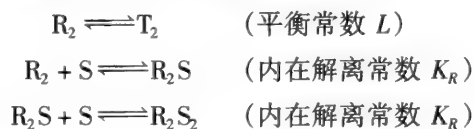
为了解释变构酶协同效应的机制并导出动力学方程,已提出很多理论模型,这里只介绍 MWC 和 KNF 两种模型。

1965 年由 Monod, Wyman 和 Changeux 提出,故简称 MWC 模型,又称同构模型(Concerted Model)。有时也称对称模型,(Symmetrical Model),这是基于下列的假定,在特定的蛋白质分子内,所有原体都必须处于相同的构象,全部是 R 构象状态(松弛态,高活性)或者全部是 T 构象状态(紧密态、低活性或无活性),不存在 RT 杂合物,这是假设不同构象状态的亚基面是不利于相互作用的。蛋白质的两种构象状态在无配体时处于平衡,通过配体的结合,平衡被扰动,这就能对协同效应给予解释。

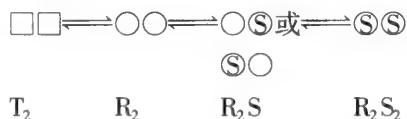
现以具有两个相同底物或配体结合部位的二聚体蛋白质为例,作一简明讨论。

在无配体时,二聚体的两种构象状态间存在着平衡($\text{R}_2 \rightleftharpoons \text{T}_2$),平衡常数称为变构常数,用 L 表示,杂合体 RT 被认为是不稳定的,可予忽略。

配体能结合于 R_2 分子两个结合部位中的任何一个,每个都有内在解离常数 K_R 。为了简化,假设底物不和 T 状态的酶结合,因此,只需考虑下列过程:



也可用示意图表示:



假定一分子 S 结合到 R_2 不改变另一个结合部位对 S 的亲合力。已结合 S 的亚基浓度 = $[R_2S] + 2[R_2S_2]$

$$\text{亚基总浓度} = 2[R_2] + 2[R_2S] + 2[R_2S_2] + 2[T_2]$$

$$\begin{aligned} \text{饱和分数 } \bar{Y} &= \frac{[R_2S] + 2[R_2S_2]}{2([R_2] + [R_2S] + [R_2S_2] + [T_2])} \\ &= \frac{[R_2S] + 2[R_2S_2]}{2([R_2] + [R_2S] + [R_2S_2] + L[R_2])} \end{aligned}$$

结合过程第一步, $R_2 + S \rightleftharpoons R_2S$, 表观结合常数 $K_b = \frac{[R_2S]}{[R_2][S]}$

$[R_2S] = K_b [R_2][S]$ 。在正向反应中, 存在着两个未结合部位, 但在逆向反应中仅一个结合配体可解离,

$$K_b = 2 \times \text{内在结合常数} = \frac{2}{\text{内在解离常数}} = \frac{2}{K_R}$$

$$\text{取代上式中 } K_b, [R_2S] = \frac{2}{K_R} [R_2][S]$$

结合过程第二步, $R_2S + S \rightleftharpoons R_2S_2$, 表观结合常数 $K_{b_2} = \frac{[R_2S_2]}{[R_2S][S]}$

$[R_2S_2] = K_{b_2} [R_2S][S] = K_b K_{b_2} [R_2][S]^2$ 在正向反应中, 仅存在一个未结合部位, 但在逆向反应中有两个结合配体可解离。

$$K_{b_2} = \frac{1}{2} \times \text{内在结合常数} = \frac{1}{2 \times \text{内在解离常数}} = \frac{1}{2K_R}$$

$$\text{取代上式中 } K_{b_2}, [R_2S_2] = \frac{2}{K_R} \cdot \frac{1}{2K_R} [R_2][S]^2 = \frac{[R_2][S]^2}{(K_R)^2}$$

取代 \bar{Y} 表达式中 R_2S, R_2S_2

$$\bar{Y} = \frac{\frac{2[R_2][S]}{K_R} + \frac{2[R_2][S]^2}{(K_R)^2}}{2\left([R_2] + \frac{2[R_2][S]}{K_R} + \frac{[R_2][S]^2}{(K_R)^2} + L[R_2]\right)} = \frac{\frac{[S]}{K_R} \left(1 + \frac{[S]}{K_R}\right)}{L + \left(1 + \frac{[S]}{K_R}\right)^2} \quad (4-10)$$

上式就是二聚体蛋白质的 MWC 方程, 对具有几个原体的蛋白质, MWC 方程为

$$\bar{Y} = \frac{\frac{[S]}{K_R} \left(1 + \frac{[S]}{K_R}\right)^{n-1}}{L + \left(1 + \frac{[S]}{K_R}\right)^n} \quad (4-11)$$

按 MWC 方程, L 愈大, \bar{Y} 对 $[S]$ 曲线就更 S 形, 在下述情况下, 将获得双曲线: $L = 0; n = 1$; 底物能和 T 状态、R 状态完全相同地结合。

如考虑到 T 状态也能和底物结合, 其内在解离常数为 K_T , 令 $\alpha = \frac{[S]}{K_R}, c = \frac{K_R}{K_T}$, 则 MWC 方程为:

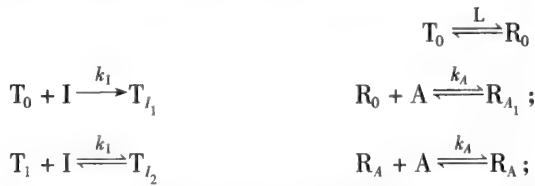
$$\bar{Y} = \frac{Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1} + \alpha(1 + \alpha)^{n-1}}{L(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n} \quad (4-12)$$

MWC 方程的推导虽假定一分子配体的结合不影响另一个结合部位对下一个配体分子的亲合力, 但方程与 S 形结合曲线是一致的, 它对协同效应的解释是基于 R_n/T_n 的平衡。在无配体, L 值很大, 平衡趋向于 T_n 状态, 如加入很低浓度的配体, 这些配体还不能和少量存在的 R_n 状态酶有效地反应, 因此只有很少量的 R_nS, R_nS_2 等络合物形成。当配体浓度较高时, 将会形成相当量的 R_nS, R_nS_2 等络合物。一些游离的 R_n 将从系统中消失, R_n/T_n 平衡被扰动, 更多的 R_n 从 T_n 形成, 新形成

的 R_n 与配体反应,结果再一次产生更多的 R_nS, R_nS_2 等络合物。所以, T_n 品种可看作是 R_n 的容器,当配体浓度高到足以产生相当量的蛋白质-配体络合物, T_n 才变为可利用的 R_n 。在络合曲线的配体临界浓度区域内,出现骤增(Surge)。当配体浓度更高时,更多的 T_n 被使用直到配体浓度高到足以使全部 T_n 转变为 R_n ,此时蛋白质完全被配体所饱和。因此,整个结合曲线是 S 形的,这是正同种协同效应的一个特征,但 MWC 模型假定底物结合的各步中 K_R 不变,正同种协同效应的产生是基于 R_n/T_n 平衡移向 R_n 。显然, MWC 模型不能解释负同种协同效应。

按 MWC 模型,变构抑制剂(产生负异种协同效应)结合于酶的 T 状态,并使 T 状态稳定,增加了 L 值,变构激活剂(产生正异种协同效应)结合并稳定酶的 R 状态,减小了 L 值两者都改变了 R/T 平衡。

我们仍以二亚基酶为例,在抑制剂和激活剂存在下,有下列平稳:



由于 I 和 A 的存在,使得 T 和 R 之间的比例产生了变化, L 变成了 $L'L' = \sum T_{1_i} / \sum R_{A_i}$,

同样的方法可以得到

$$\begin{array}{l} 2[I][T_0]/[T_{1_1}] = K_I \quad 2[A][R_0]/[R_{A_1}] = K_A \\ [T_{1_1}][I]/2[T_{1_2}] = K_I \quad [A][R_{A_1}]/2[R_{A_2}] = K_A \end{array}$$

因此 $L' = \frac{(1+\beta)^2}{(1+r)^2} L'$ 其中: $\beta = [I]/K_I$ $r = [A]/K_A$ 当有底物 S 存在的情况下

$$\bar{Y} = \alpha(1+\alpha)/L' + (1+\alpha)^2$$

$$\text{即} \quad \bar{Y} = \frac{\alpha(1+\alpha)}{L(1+\beta)^2/(1+r)^2 + (1+\alpha)^2} \quad (4-13)$$

分下列两种情况进行讨论:

(1) 存在抑制剂,不存在激活性, $r=0$,

$$\bar{Y} = \frac{\alpha(1+\alpha)}{L(1+\beta)^2 + (1+\alpha)^2} \quad (4-14)$$

$L(1+\beta)^2 > L$, 因为 β 不可能是负值。所以抑制剂的作用是使 L 的数值变大,由于 $L = T_0/R_0$, 因此 L 的增大意味着 T_0 的浓度增加,所以 S 形曲线更为显著。

(2) 存在激活剂,不存在抑制剂, $\beta = 0$

$$\bar{Y} = \frac{\alpha(1+\alpha)}{L/(1+r)^2 + (1+\alpha)^2} \quad (4-15)$$

因为 $L/(1+r)^2 < L$, 所以激活剂的作用,是被 R_0 增加,于是 S 形曲线变得比较地不明了。

变构酶在受到效应物调节时,按动力学性质的不同改变可分为两大类:

(1) K 系列酶

效应物只改变表观 $K_m(S_{0.5})$ 不改变反应 \bar{v} 。

(2) \bar{v} 系列酶

效应物只改变反应 \bar{v} , 不改变表观 $K_m(S_{0.5})$ 。

4.2.2.3 KNF 模型

又称渐变模型(Sequential model),这是解释变构作用的另一种较为重要的模型,1966年由 Koshland Nemethy 和 Filmer 提出。在 KNF 模型中假设:

(1) 对于聚合体的酶来说,每个亚基都可能存在两个状态,分别叫 R 态与 T 态(或称 B 态与 A 态);

(2) 结合底物(或其他配体)后,改变了结合底物的亚基的构象,成为 R 态,而未被底物结合的亚基的构象并没有发生显著的变化,仍处于 T 态;

(3) 结合了一个底物(或其他配体)以后,可以引起同一个酶分子的其他亚基对底物(或其他配体)的亲力的增加或减少。

KNF 模型和 MWC 模型的不同点在于:在无底物存在时,不必假设存在两种状态,也不必假设 $R_0 \rightleftharpoons T_0$ 的平衡存在。从 T 态转变为 R 态,是由底物(或配体)的结合而诱导产生的。如果酶分子是由 n 个亚基组成,这 n 个亚基的构象由 T 态变到 R 态,不是同时进行的,MWC 模型中不存在的 RT 形成,在 KNF 模型中是存在的。

底物在 KNF 模型中,可以为“正协同效应”,也可以是“负协同效应”,取决于底物结合后此亚基对其他亚基的影响,这种影响若是增大其他亚基对底物的解离常数,则产生“负协同效应”;反之,若是减少其他亚基对底物的解离常数,则产生“正协同效应”。

仍以两亚基酶为例来说明此模型。

一个二聚体酶蛋白在 KNF 模型中,其每个原体都可以 R 态或 T 态构象存在,因此, $R_2, T_2, RT, R_2S, R_2S_2, RTS, RSTS, T_2S, T_2S_2$ 都可能存在,但为了更好说明协同效应,在平衡或接近平衡时,KNF 线性逐变模型只考虑 T_2, TRS, R_2S_2 三种形式。



\bar{Y} 表达式的导出与 Adair 方程(二聚体蛋白仅存在一种构象形式)相类似。

$$Y_s = \frac{K_{b_1} [S] + 2K_{b_1} K_{b_2} [S]^2}{2(1 + K_{b_1} [S] + K_{b_1} K_{b_2} [S]^2)}$$

如 $K_{b_1} = 4K_{b_2}$, 无协同效应;

$K_{b_1} < 4K_{b_2}$, 正同种协同效应;

$K_{b_1} > 4K_{b_2}$, 负同种协同效应。

按 Koshland 诱导契合理论,当配体结合于 T 态构象蛋白质时诱导构象发生变化(T \rightarrow R):

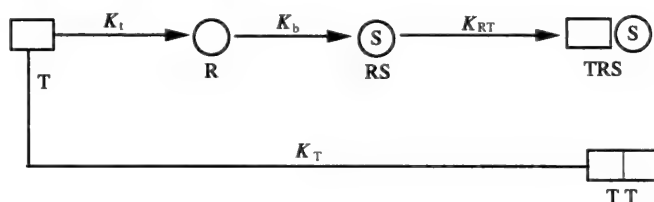


相同结果也能从另一途径获得,若存在 R/T 平衡,平衡强力趋向于 T 态,S 仅能与 R 态结合,因此扰动了平衡:



在两种情况下, TTS, TR 存在量可予忽略,平衡时,存在的构象品种是相似的。

我们选择后一途径,讨论 KNF 模型。



分析此过程需引入下列常数:

K_t ——构象变化 $T \rightleftharpoons R$ 的平衡常数:

$$K_t = \frac{[R]}{[T]}$$

K_b —— $R + S \rightleftharpoons RS$ 反应的结合常数:

$$K_b = \frac{[RS]}{[R][S]}$$

K_{RR}, K_{RT}, K_{TT} ——相互作用常数,表示寡聚蛋白各种构象形式的相对稳定性;

$$K_{RR} = \frac{[RR]}{[R][R]}, K_{RT} = \frac{[RT]}{[R][T]}, K_{TT} = \frac{[TT]}{[T][T]}$$

为了简化计算过程中的数学表示,使所有亚基的相互作用都以标准态为准,令 $K_{TT} = 1$

例:如 $K_{RT} > 1$, RT 比 TT 更稳定,这将促进 S 的结合。

如 $K_{RT} < 1$, RT 比 TT 不稳定, S 的结合将是困难的。

以上述常数分析反应 $T_2 + S \rightleftharpoons TRS$, 则:

$$K_{b_3} = 2 \cdot K_i K_b \frac{K_{RT}}{K_{TT}}$$

对 $T \cdot RS + S \rightleftharpoons RS \cdot RS$

$$K_{b_2} = \frac{1}{2} K_i K_b \frac{K_{RR}}{K_{RT}}$$

代入 \bar{Y} 表达式,得:

$$\bar{Y} = \frac{K_i K_b K_{RT} [S] + K_i^2 K_b^2 K_{RR} [S]^2}{1 + 2K_i K_b K_{RT} [S] + K_i^2 K_b^2 K_{RR} [S]^2} \quad (4-16)$$

如 $K_{TT} \approx K_{RT} \approx K_{RR}, K_{b_1} = 4K_{b_2}$ 为无协同效应,原体间所有相互作用都是相同的。

如 $K_{TT} \approx K_{RT} \ll K_{RR}, K_{b_1} < 4K_{b_2}$ 为正同种协同效应;

如 $K_{TT} \approx K_{RT} \gg K_{RR}, K_{b_1} > 4K_{b_2}$ 为负同种协同效应。

此外,如 $K_{TT} > K_{RR} \gg K_{RT}$, RT 杂合体得难存在,这是 MWC 模型假设的条件。

假设该系统含有抑制剂或激活剂,其速度方程的导出较为复杂,不如 MWC 模型得到的结果简明。

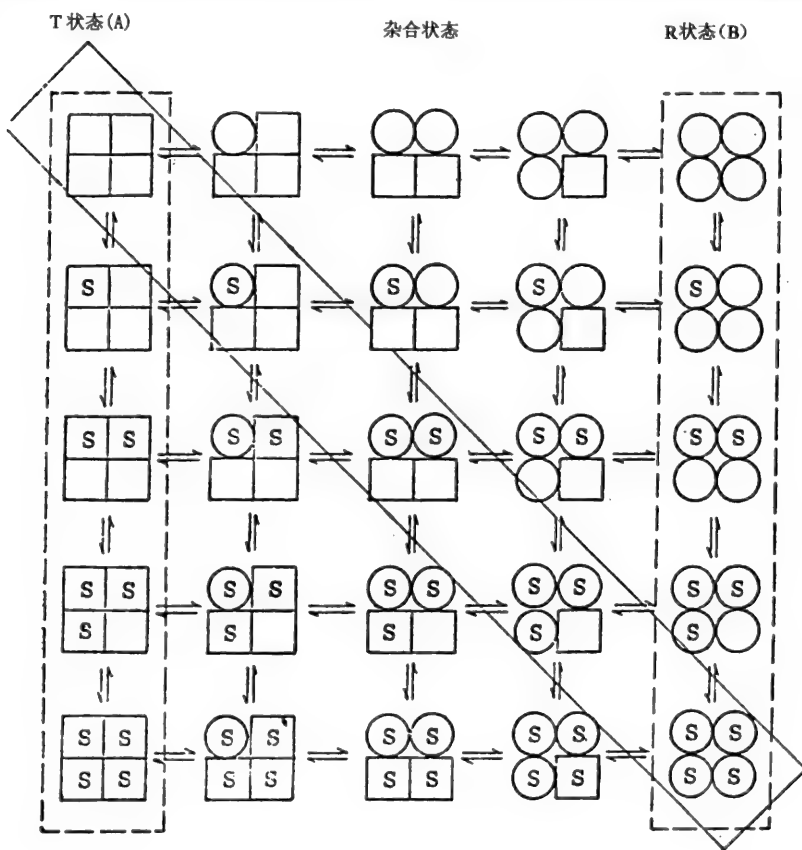


图 4-7 $n=4$ 变构酶可能存在的状态(虚线包括部分为 MWC 模型中存在的状态; 实线包括部分为 KNF 模型中存在的状态)

应该指出,无论是 MWC 模型还是 KNF 模型都只是考虑了最简单的情况,亦即图 4-7 中虚线和实线框出的情况,忽略了框外其他情况,因此对于实验结果的解释,可能都还有一定局限性。

4.2.2.4 变构酶的调节功能

正协同效应和负协同效应对于生物体内不同功能的调节都具有重要的生理意义。

正协同效应提供了一个配体浓度变化对酶反应速度影响极为敏感的区域,即 S 形曲线的中间“陡段”。在此区域以外,配体浓度的变化对于反应速度影响都比较小。对于一个底物同时受几种酶的作用,底物在各个途径的分配可以通过正协同效应的酶来实现,变构抑制剂使灵敏的陡段右移,也就是说只有在更高的底物浓度下,才能使这个酶有效地作用。例如,氨甲酰磷酸是合成 CTP 的原料,也是合成 Arg 的原料,L-天冬氨酸甲酰基转移酶的正协同效应使氨甲酰磷酸在两条合成途径中能够获得合理的分配。

负协同效应提供了一个配体浓度变化对酶反应速度影响相对不敏感的区域。对于许多酶都需要的底物,但其中有一条途径特别重要,负协同效应就可使其稳定地进行。如 NAD^+ 是许多脱氢酶的共同底物,甘油醛-3-磷酸脱氢酶为保证糖酵解过程能正常地运行, NAD^+ 的结合产生负协同效应, NAD^+ 和此酶的结合的解离常数很小,因此尽管底物 NAD^+ 的浓度很低,也能够和酶顺利地结合,但是当 NAD^+ 浓度升高时,酶结合了两个 NAD^+ 以后,第三个或第四个 NAD^+ 结合就非常困难,除非 NAD^+ 的浓度高出两个数量级才会进一步的结合,这样就保证了甘油醛-3-磷酸脱氢酶的反应速度一定程度上不受其他反应的影响。

4.3 通过酶共价结构改变的活性调节

这类调控方式又可再分为不可逆的和可逆的两种。

4.3.1 共价结构不可逆改变的活性调节

很久以前就已知道许多蛋白酶是以无活性的前体(酶原)形式被合成出来;再经其他蛋白酶作用变为活化的酶,酶原由蛋白水解作用活化的一些实例列于表 4-2。

表 4-2 经蛋白水解作用活化的某些酶

酶	酶前体	功 能
胰蛋白酶	胰蛋白酶原	胰分泌物
胰凝乳蛋白酶	胰凝乳蛋白酶原	胰分泌物
弹性蛋白酶	弹性蛋白酶原	胰分泌物
羧肽酶	羧肽酶原	胰分泌物
磷脂酶 A_2	磷脂酶原 A_2	胰分泌物
胃蛋白酶	胃蛋白酶原	分泌到胃液内,在 pH1~5 具有最大活性
凝血酶	凝血酶原	血凝系统的一部分
Clr	Clr	补体系统第 I 组分的一部分
几丁质合成酶	酶原	与酵母细胞分裂时隔膜形成有关

上表前四种酶都是先在胰脏腺泡细胞中以酶原形式合成,再贮存于酶原颗粒里,酶原从酶原颗粒释放到十二指肠内是受激素,主要是胰促胰酶肽-胰酶分泌素和胰泌素调控的,蛋白质的消化需要这些专一性不同的酶协同作用才能完成,协调是由一个共同因素来达到的即这些酶原全由胰蛋白酶作用而被活化,见图 4-8。

这些酶原活化时,都是从 Lys 和 Arg 残基的羧端肽键断开,这和胰蛋白酶专一性是一致的。例:胰蛋白酶原活化时从肽链 N 端切去一个 6 肽 Val·Asp·Asp·Asp·Asp·Lys。为了说明胰蛋白酶启动酶原活化的过程,必须考虑另一个蛋白酶,肠肽酶(前称肠激酶)的作用,肠肽酶是在小肠上皮细

胞的刷状缘处合成,当它进入十二指肠时,以很高的专一性催化胰蛋白酶原活化,产生的胰蛋白酶就催化其他酶原的活化。图 4-8 显示出几个重要的调控特征,其中主要一点是酶原不能过活化,否则胰脏将受到损害(急性胰腺炎就是胰脏合成的蛋白酶前体过早被活化),因此,肠肽酶所启动的酶原活化部位,离开产生酶原的部位必须有一段距离,以策安全。活化蛋白酶的产量是由分泌到十二指肠的内酶原的量控制的,而酶原的量又是激素调控的。偶而蛋白酶也会把自身降解为氨基酸和小肽,经肠道重新吸收,用于蛋白质合成。这种短寿命的水解酶人类胰脏平均日产量竟有 10g 之多。

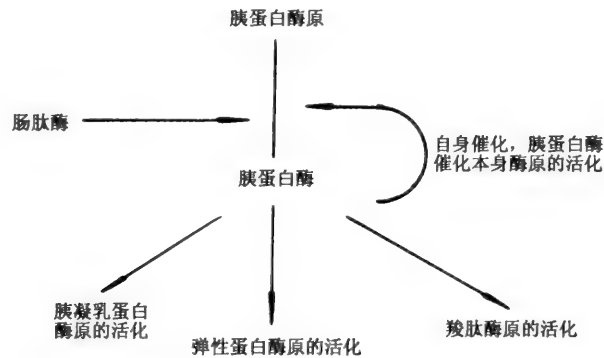


图 4-8 胰脏蛋白酶的协调活化

为防止胰蛋白酶原过早活化,另有一种附加的机制,这就是在胰分泌物里存在着胰蛋白酶抑制蛋白,约为分泌物蛋白质含量的 2%,与酶原颗粒中可能存在的活化胰蛋白酶紧紧结合,以确保胰蛋白酶原仅在生理上合适的时间和合适的地点才被活化,这就是当胰蛋白酶原在小肠里遇到肠肽酶时才被活化。肠肽酶生产的调控,迄今尚未搞清。

图 4-8 也显示了信号的放大作用,这是一个很重要的概念。少量的肠肽酶能迅速产生大量的胰蛋白酶,由于一分子酶在短时间内能作用于许多底物分子,所以胰蛋白酶随即将更大量的其他活性蛋白酶产生出来。

放大作用的特征也可从血凝系统和补体激活系统阐明,在血凝系统,一系列酶和蛋白质因子依次相互作用,以级联反应方式,终于导致凝血酶原活化产生凝血酶,凝血的内部途径如图 4-9 所示。

图 4-9 中罗马字母表示凝血因子,右下脚加 a 表示已活化;P·L 表示磷脂。

因子	名称
I	纤维蛋白质原
II	凝血酶原
III	组织促凝血酶原激酶
IV	Ca^{2+}
V	促凝血球蛋白原
VI	促凝血球蛋白
VII	自凝血酶原 I
VIII	抗血友病球蛋白
IX	自凝血酶原 II
X	凝血酶原激酶原
XI	血浆促凝血酶原激酶前体
XII	接触因子
XIII	血纤维交链酶

凝血酶催化纤维蛋白原限定数量 Arg - Gly 肽链水解,产生血纤维蛋白,再自发形成不溶的凝

块,经纤维蛋白分子间相互交联而巩固。血液凝固存在着两种激活途径;外部途径由伤害组织释放的脂蛋白启动,内部途径由围绕在受损血管表面的纤维蛋白胶原与某种激发因子接触而引发,在两种途径中,酶促反应一个连着一个,使开始的微弱信号逐级放大,以确保很快产生足够量的纤维蛋白,阻止血液流失。生物体的凝血系统是一个复杂的过程,我们仅从酶原活化的一个方面来了解这个过程,看到了通过级联式酶的作用,把信号不断放大,对外来意外的条件作出有效的反应的过程。

补体是一类血浆蛋白,是可被许多抗原抗体反应激活的一组蛋白酶,包括十一种蛋白组分,它们通过级联反应而被激活最后形成“攻膜复合物”。对入侵生物,例如细菌能引起破坏最终导致溶解。补体系统的启动常由结合于入侵生物表面的抗体分子聚集所引起,这种聚集,经依次活化多种酶原而激活补体系统各组分,最终使入侵生物的膜破裂。

从上述讨论,可以了解到共价结构不可逆改变的酶活性调节,实际上是酶原活化过程,受这种机制调节的酶具有下列特点:都以无活性的酶原形式合成,分泌;当生物体需要时,就会受到相应蛋白酶的限制性水解作用而被活化,能将微弱的初始信号,经级联酶反应迅速放大,对外来条件作出有效的反应;活性蛋白酶完成特定的功能后,即被降解,而不是再变回酶原,活化过程是不可逆的;受这种方式调控的酶主要是一些消化酶,与生物体防御功能有关的酶。

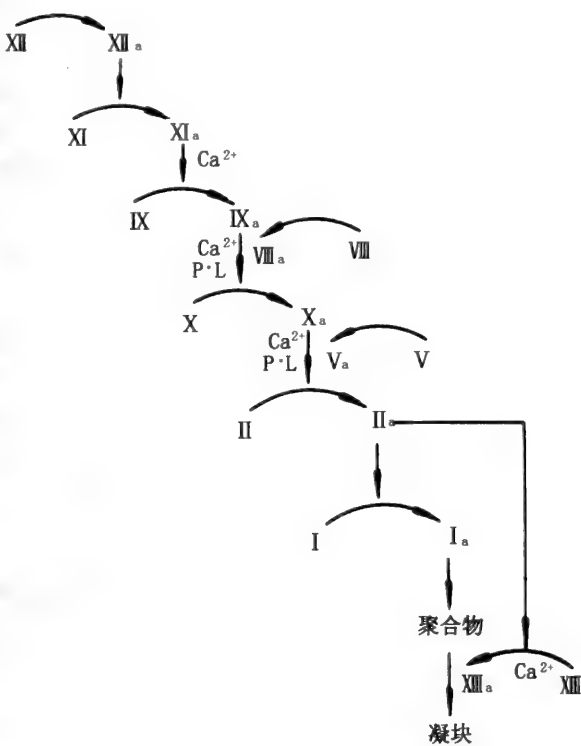
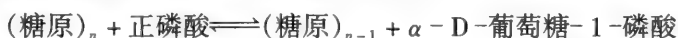


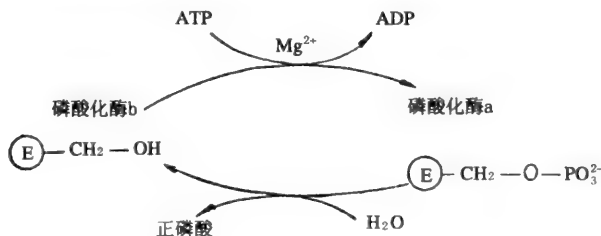
图 4-9 凝血的内部途径示意图

4.3.2 共价结构可逆改变的活性调节

现在已知有相当多的酶是以两种不同催化性能的形式存在,在其他酶的作用下能互相转变,也就是这些酶是通过可逆的共价修饰以调节其活性。磷酸化酶可作为这类酶的典型实例,它催化下列反应:



磷酸化酶以两种形式存在:磷酸化酶 b,需依赖 AMP 才有活性;磷酸化酶 a 不需要依赖 AMP 即有活性,磷酸化酶 a 和 b 的共价结构差别仅在 Ser₁₄, a 是磷酸化的, b 没有磷酸化。再比较两种形式酶的三维结构,可发现 N 端 1-19 氨基酸肽段的构象是明显不同的, b 形式酶肽段是柔性的,而 a 形式酶是有序化的,这是由于磷酸化的 Ser₁₄ 和具有阳电荷的 Arg69 相互作用所致。



b→a 反应由磷酸化酶激酶催化,需 ATP 和 Mg²⁺;
a→b 反应由磷酸化酶磷酸酶催化,有正磷酸释出。如果反应以循环方式进行,总的结果是 ATP 水解为 ADP 和正磷酸。

由激素启动磷酸化的级联机制如图 4-10 所示。

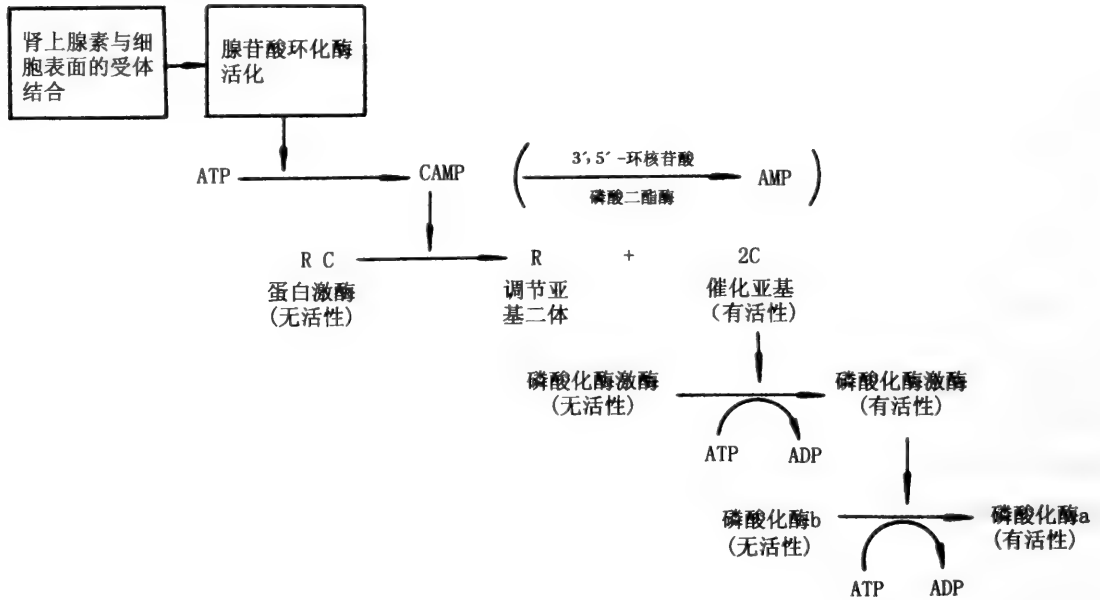


图 4-10 磷酸化酶由激素启动活化的级联机制

已报道有 140 多种酶和蛋白质的生物活性是受可逆共价修饰调控的,表 4-3 列出了其中 13 种。

表 4-3 受可逆共价修饰调控活性的酶和蛋白质

酶或蛋白质	修饰类型	生物功能
磷酸化酶	磷酸化	糖原代谢
糖原合成酶	磷酸化	糖原代谢
磷酸化酶激酶	磷酸化	糖原代谢
磷酸酶抑制蛋白质	磷酸化	糖原代谢
果糖-2,6-二磷酸酶	磷酸化	调节糖原酵解
6-磷酸果糖-2-激酶	磷酸化	
丙酮酸脱氢酶复合物(哺乳动物)	磷酸化	丙酮酸进入三羧酸循环
支链 2-酮酸脱氢酶复合物	磷酸化	Leu: Ile: Val 的降解
乙酰 CoA 羧化酶	磷酸化	脂肪酸合成
肌宁蛋白 I	} 磷酸化	} 肌内收缩
肌球蛋白轻链		
Gln 合成酶(哺乳动物)	ADP-核糖基化	} Gln 在许多生物合成反应中作为 N 的供体
Gln 合成酶(大肠杆菌)	腺苷酰化	
RNA 核苷酸转移酶(大肠杆菌)	ADP-核糖基化	在 T4 噬菌体感染后,酶的 α -氨基 Arg 残基被修饰,关闭了突主基因的转录

大多数可逆共价修饰是磷酸化 - 去磷酸化循环,修饰部位通常是 Ser 侧链,但磷酸酶抑制蛋白则在 Thr 侧链。另一具有代表性的例子为 E. coli 谷氨酰胺合成酶活化的共价调控模式。谷氨酰胺

合成酶参与了氨基酸的脱氨作用,动物体内的氨基氮可用于谷氨酸、色氨酸和组氨酸嘌呤和嘧啶核苷酸及氨基糖的合成。脑细胞中在大量的谷氨酰胺和谷氨酸,这些氨基酸的会降低 α -酮戊二酸的量,干扰 TCA 循环和能量代谢,因此谷氨酰胺合成酶的活性需严格调控。谷氨酰胺和谷氨酸合成反应如下:



E. coli 谷氨酰胺合成酶的活性由两种不同但联锁的机制调节:反馈抑制导制的变构调节和共

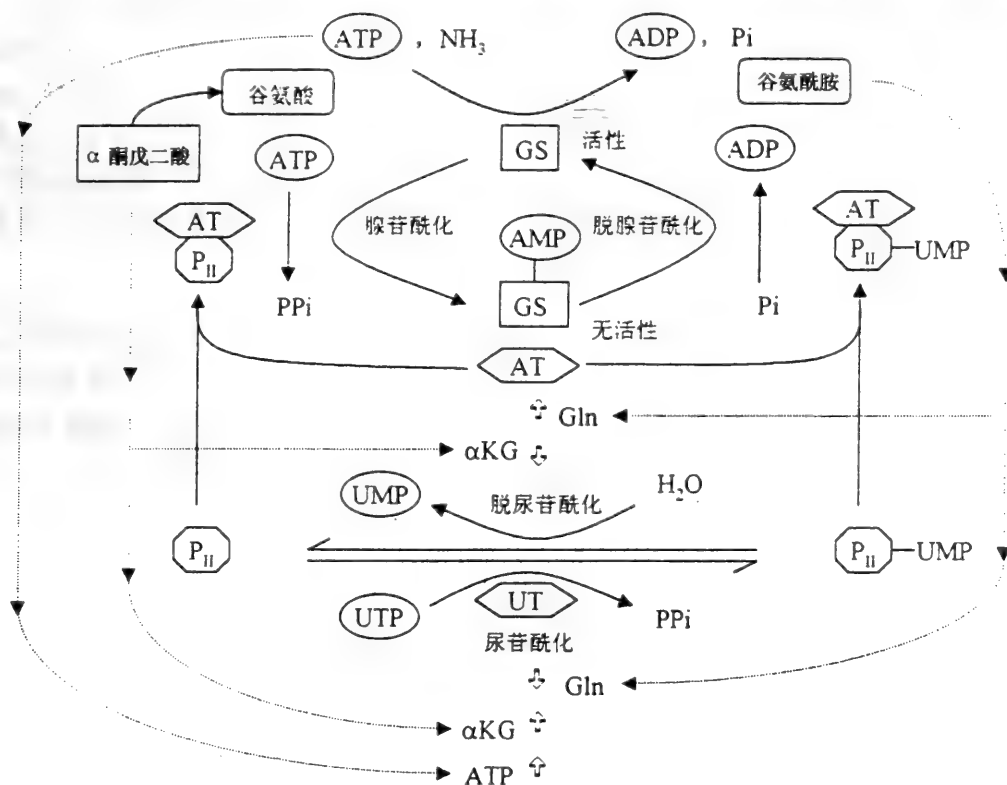


图 4-11 *E. coli* 中谷氨酰胺合成酶的活性调节

价修饰调节。共价修饰调节包括一系列复杂的级联调控步骤(图 4-11)。谷氨酰胺合成酶的腺苷酰化和脱腺苷酰由同一种酶复合物催化,该复合物由腺苷酸转移酶和调节蛋白 P_{II} 组成。P_{II} 分子是否被腺苷酰化决定了该复合物催化腺苷酰化或脱腺苷酰反应。尿苷酰转移酶可以使 P_{II} 分子特殊位点被尿苷酰化变为 P_{II}-UMP,再与腺苷酰转移酶结合,使谷氨酰胺合成酶脱腺苷酰化成为活化的形式,没有被尿苷酰化的 P_{II} 分子与腺苷酰转移酶结合,使谷氨酰胺合成酶腺苷酰化而失活。尿苷酰转移酶活性被 ATP 和 α -酮戊二酸激活,谷氨酰胺抑制,这种活性调控方式保证了谷氨酰胺含量丰富,使其合成速度下降,非尿苷酰化的 P_{II} 分子堆积激活了腺苷酰转移酶催化谷氨酰胺合成酶被腺苷酰化的反应,谷氨酰胺合成酶活性降低。反之,如果细胞缺少谷氨酰胺, α -酮戊二酸和 ATP 含量丰富,这一调控方式激活了谷氨酰胺合成酶的活性。

很少有关于未经共价修饰和经过共价修饰的酶的 X-射线衍射结构图谱的比较来解释为何共价修饰可以改变酶的催化活性,也许共价修饰稳定了酶的某种构型(R 或 T 型),或者共价修饰直接改变了底物或调节物的结合部位。

除表 4-2 所列各种修饰类型外,还存在其他类型的修饰,其中包括甲基化、乙酰化、Tyr 化、硫酸化。

对酶的可逆共价修饰调节的生理意义,已有许多综述,下面特别提出其中的两点。

(1) 由于酶从一种形式转变为另一种形式是酶催化的。所以活性酶数量能迅速发生变化,反应开始的信号也迅速被逐级放大。

(2) 酶的活性形式和非活性形式连续互变状态下,对生物体代谢环境的变化,随时准备应答的可逆共价修饰系统较不可逆共价修饰能作出更多更及时的调控反应。

4.4 代谢途径中酶活性的调节

代谢途径中酶的调节是指在相关的代谢途径中一串酶及位于调节点的关键酶活性的调节。某一代谢途径的末端产物浓度往往可以影响该代谢途径起始阶段的某一步反应,这种影响称为反馈。若该代谢的速度由于反馈而加速,称为正反馈,反之则称为负反馈。反馈调节可通过诱导、阻遏和变构等方式进行。有时代谢途径的限速反应被两个或两个以上的酶所催化,这些酶称为同工酶,这些同工酶的活性被各自分支代谢途径的产物浓度所调节。我们以糖代谢中糖酵解的标志酶-磷酸果糖激酶和糖原分解代谢中的关键酶-糖原磷酸化酶为例来说明代谢过程中酶活性的调节机制。

4.4.1 磷酸果糖激酶

磷酸果糖激酶(PFK)即6-磷酸甲糖激酶(F-6-P激酶),催化ATP上的磷酰基转移到F-6-P的C₁位上形成F-1,6-2P,这一步是酵解反应的关键步骤,酵解的速度决定于该限速酶活性的高低。PFK是由四亚基组成的变构酶,ATP和PFK的底物,也是该酶的变构抑制剂,柠檬酸、脂肪酸可加强这种抑制效应,ATP的抑制效应可被AMP,ADP,磷酸等代谢物逆转。

体外磷酸果糖激酶的动力学性质如图4-12所示:

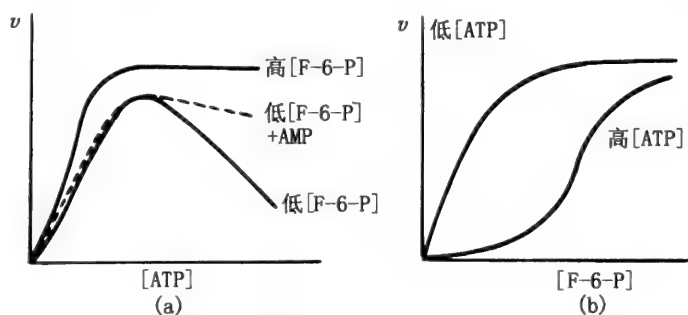


图4-12 磷酸果糖激酶的动力学性质

该图显示了F-6-P和ATP之间存在着相互作用:F-6-P浓度低时,高的ATP浓度会抑制PFK的活性(a),而高的TAP浓度下,酶活性对F-6-P浓度作图时反应曲线呈S型。酶最初的活性调节机制基于图(a)所表现的动力学性质提出的:ATP的浓度的变化决定了PFK的活性,由此调节了酵解途径的流量。如静止的肌肉中ATP浓度高,抑制了酶的活性,酵解的流量降低,ATP的生成量减少。但有人发现这个由体外的动力学实验得出的理论与体内的调节过程并不一致:某一种苍蝇飞行时运动的肌肉中ATP的浓度与静止的肌肉中ATP的浓度相比,仅仅下降了10%,而酵解的流量却增加了100倍!

随后人们提出了多种理论来解释这一现象。有一种解释模型认为PFK对酶的激活作用被ADP,AMP等代谢物放大,该模型认为在腺苷酸激酶作用下体内存在着下列平衡:



肌肉中由于[ATP]高于[ADP]、[AMP],所以ATP浓度的微小变化会引起ADP、AMP浓度较大的变化,比如测定上述的苍蝇飞行肌中AMP浓度,与静止时比较,增加了2.5倍,因此认为PFK活性是由ATP、ADP、AMP共同调控的。但人们发现这一调控方式还不足以解释代谢流量发生的大的变化。到底是什么因素能灵敏地调节PFK的酶活性呢?底物循环理论认为F-6-P和F-1,6-2P

之间存在着下列平衡(图 4-13):

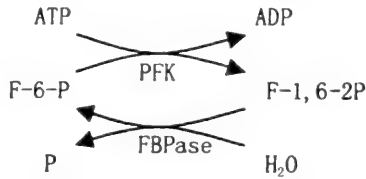


图 4-13 底物循环示意图

PFK: 磷酸果糖激酶 FBPase: 果糖-1,6-二磷酸酶

底物循环使两个酶的活性可以分开调节,这种调节方式比单独调节一个酶的活性要容易得多,这一步反应速度取决于正逆反应速度的差值。运动的肌肉中 ATP 浓度下降,AMP 浓度升高,AMP 激活 PFK 酶活性,但抑制 FBPase 酶活性,因此 AMP 浓度的微小变化导致 F-6-P→F-1,6-2P 流量有大的变化,估计信号可放大 100 倍。底物循环假设解释了代谢净流量对 AMP 浓度的敏感性。但有人发现在鼠肝组织中正常生理条件下如果考虑酶的区域化等因素,底物循环速率几乎可忽略不计。这样又出现了另一种循环机制(见图 4-14):

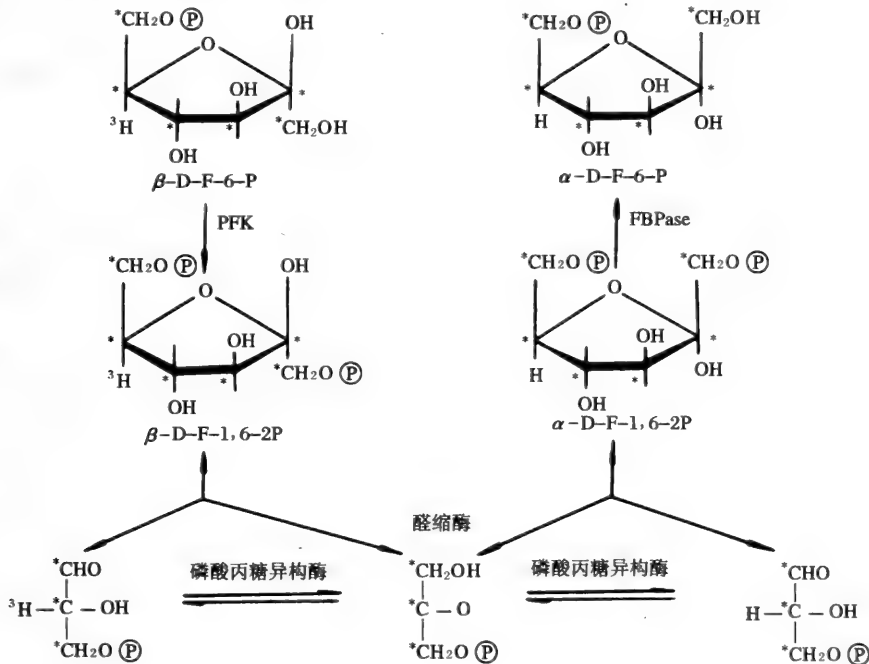
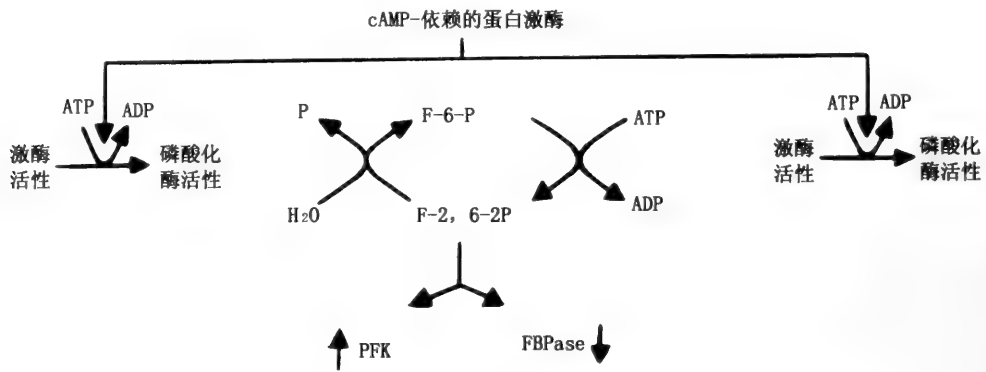


图 4-14 循环系统示意图

星号表示 ^{14}C ,在系统中加入 $5\text{-}^3\text{H}$, $\text{U-}^{14}\text{C}$ 标记的 F-6-P,在 PFK 和醛缩酶作用下转化为同位素标记的 D-甘油醛-3-磷酸和磷酸二羟丙酮,在磷酸丙糖异构酶作用下 D-甘油醛-3-磷酸 C-2 位上 ^3H 与水溶液中的 H 发生交换,然后在醛缩酶和 FBPase 作用下转化成丢失了 ^3H 标记的 F-6-P,系统中加入 $5\text{-}^3\text{H}$, $\text{U-}^{14}\text{C}$ 标记的 F-6-P 后定时取样分析,发现 F-6-P 的 $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比值下降,并可测定循环速率,证实了循环的存在。循环机制认为:PFK 作用于 $\beta\text{-F-6-P}$,酶活性被 $\alpha\text{-F-1,6-2P}$ 激活;FBPase 作用于 $\alpha\text{-F-1,6-2P}$,酶活性被 $\beta\text{-F-6-P}$ 激活。酶专一性的差异以及 F-6-P 和 F-1,6-2P 之间这种缓慢(速度常数约 1/秒)而自发的异头物异构化反应造成细胞内 F-6-P 和 F-1,6-2P 之间 α 和 β 异头物分布不平衡,由此放大了 AMP 和其它代谢物对代谢的调控。

20 世纪 80 年代初,人们注意到 F-2,6-2-P 是 PFK 有效的变构激活剂,它是迄今为止已知的肝脏组织中的 PFK 最强的激活剂,与 AMP 协同酶活性;也是肝脏组织中 PFK 的强抑制剂,与 ATP

协同抑制酶活性。PFK-2 和 FB Pase-2 分别催化了 F-2,6-2-P 的合成与降解反应,这两个酶是由相同的两个亚基(分子量分别为 53 000)组成的同一种酶,只是由于可逆的磷酸化作用而造成不同的酶活性,酶分子的 Ser 残基磷酸化变成水解酶的活性,去磷酸化则变为激酶的活性(图 4-15)。



激酶活性: PFK-2; 磷酸化酶活性: FB Pase-2

图 4-15 F-2,6-2P 合成与降解示意图

很多证据表明肝脏中 F-2,6-2P 在调控 PFK 和 FB Pase 中起了决定性作用,并协调了细胞内糖酵解和糖异生的平衡。所以肝脏中糖酵解的流量是由于 F-2,6-2P 水平控制,而不是 ATP,AMP 和柠檬酸水平控制的。但在其他组织中还没有足够的证据表明 F-2,6-2P 对酵解强有力的调节作用。

4.4.2 磷酸化酶

磷酸化酶是控制糖原分解代谢的调控酶,控制着糖原降解途径。所谓调控酶是指代谢反应中酶活性低,催化的反应远离平衡,反应速率较慢因而决定整个代谢反应速度的酶。糖原降解代谢途径所包含的反应过程虽少,但涉及的调控机制却很复杂。

磷酸化酶活性的调节途径有多种。酶的共价修饰调节:在酶的共价修饰对酶活性的调节(4.3)中介绍了无活性的磷酸化酶 b 分子上 Ser₁₄ 被磷酸化酶激酶磷酸化成为活性的磷酸化酶 a,磷酸化酶磷酸酶则可以逆转此过程,这一可逆过程伴随着酶分子四级结构的改变:b 为二亚基酶,a 为四亚基酶。除了改变共价结构调节酶的活性外,生物体内还存在着另一条活化磷酸化酶的途径即配体诱导的活化途径;一些配体可以与酶结合,使酶的构象发生变化从而改变酶的活性;如 AMP,IMP 可以活化 b 型酶,但这一效应被 ATP,ADP,UDPG 和 G-6-P 对抗。因而当 AMP 浓度高,而 ATP 和 G-6-P 浓度低时,b 型酶被激活。如有一种鼠的肌肉中缺乏磷酸化酶激酶的活性,不能通过将酶从 b→a 的转换激活酶,这种鼠肌中磷酸化酶的活化就是通过 IMP,AMP 诱导激活的。

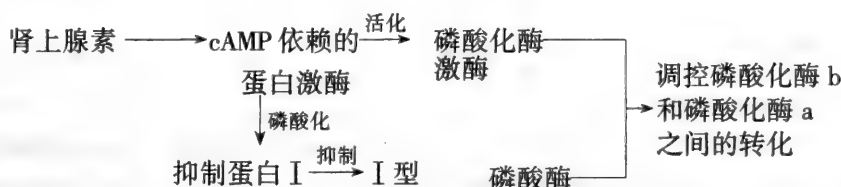
共价修饰调节酶的活性又可分为两类:激素启动磷酸化酶活化的级联调控机制(图 4-10)和神经冲动(通过 Ca²⁺ 作用)活化磷酸化酶途径。低浓度 Ca²⁺ 在 Mg²⁺ 和 ATP 存在时可激活磷酸化酶激酶活性,激活位点不同于 cAMP 依赖的蛋白激酶激活部位。由肌浆内质网释放的 Ca²⁺ 可应答神经冲动并促发肌肉收缩,由此说明消耗 ATP 的肌肉兴奋和产生 ATP 的糖原磷酸化途径之间关系密切。

磷酸化酶激酶有四亚基组成:α(M,145 000),β(M,128 000),γ(M,45 000)和 δ(M,16 000)。α,β 亚基与酶的磷酸化功能有关,γ 亚基上含有酶的活性中心,δ 亚基的性质类似于调钙蛋白。由 Ca²⁺ 活化的磷酸化酶激酶将 Ca²⁺ 结合于 δ 亚基上,触发了一系列构象变化使 γ 亚基转变为活性形式。肌肉中存在一种肌钙蛋白,其浓度远高于调钙蛋白,生理作用是调节肌肉收缩。在 Ca²⁺ 存在下与磷酸化酶激酶的 β 亚基发生作用而使激酶活化,这一调节方式对于糖原降解与肌肉收缩的同步和协调非常重要。

现在认为由激素活化途径和神经冲动激活的途径是互相关联的,如 Ca²⁺-调钙蛋白系统可以

影响腺苷酸环化酶活性和 3', 5'-cAMP 磷酸二酯酶活性(cAMP 水解为 AMP), 这一系统还可激活多种蛋白激酶使一系列的酶磷酸化如糖原合成酶、酪氨酸羟化酶等。而 cAMP-依赖的蛋白激酶又可催化肌钙蛋白的磷酸化以调节肌肉的运动。

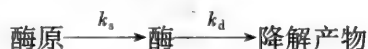
人们用一系列的实验方法在生物体内和体外证明了磷酸化酶活化的级联途径。显然, 一旦级联途径被启动, 生物体内还必需具有一种能切断磷酸化酶活性的机制以阻止糖原不必要的损耗, 如激酶(cAMP 依赖的蛋白激酶、Ca²⁺-调钙蛋白系统激活的多种蛋白激酶、磷酸化酶激酶)的活性可被一种或多种磷酸酶作用而逆转。磷酸酶有两种类型: I 型磷酸酶使磷酸化酶激酶的 β 亚基优先脱磷酸, 这种酶有两种相同的催化亚基, 相对分子质量各都为 3 700。II 型磷酸酶则使 α 亚基优先脱磷酸, 共有 2A, 2B 和 2C 三种类型, 催化亚基各不相同。现在知道很多抑制蛋白只能抑制 I 型磷酸酶, 却不能抑制 II 型磷酸酶, 如抑制蛋白 I, 分子量为 20 000, 在肌肉中的浓度 I 型磷酸酶浓度其作用方式很有意思, 只有当它在 cAMP 依赖的蛋白激酶作用下本身的 Ser 侧链被磷酸化才能对 I 型磷酸酶起作用:



这一在体内可以应答肾上腺素的磷酸化机制是激酶和磷酸酶作用能协调进行, 精细地调节磷酸化酶的活性。

4.5 酶的转换

酶在细胞的代谢中不断的合成和降解的过程称为酶的转换(enzyme turnover), 酶的转移是酶活性调节的重要方式之一, 细胞内所有的生物分子包括酶都会受到环境因素的影响, 比如超氧阴离子会影响酶的结构、构象和活性, 从这个角度来看受损伤的酶分子被转换掉可看作是酶分子的质量控制过程。酶浓度在合成和降解的过程中保持动态平衡。不同的酶分子在细胞中的半衰期相差很大, 短则几分钟长则数月。一般代谢途径的第一个酶和催化限速步骤的酶在体内转换速度很快, 因为这些酶活性需严格调控。酶的半衰期可从理论上推导:



$$\frac{d[E]}{dt} = k_s - k_d[E]$$

式中, E 为 t 时的酶浓度, k_s 为酶的合成速度, k_d 为酶的降解速度常数。假设平衡时酶浓度为 E_{eq} , 此时由于 $k_s = k_d[E_{eq}]$, 则

$$\frac{d[E]}{dt} = k_s - k_d[E_{eq}] - [E]$$

积分, 得:

$$\ln([E_{eq}] - [E]) = -k_d t + \text{常数}$$

用酶活性代替酶浓度,

$$\lg(v_{eq} - v) = -k_d t + \text{常数}$$

以 $(v_{eq} - v)$ 对时间作图, 可得 k_d 值, 酶的半衰期为:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} = \frac{0.693}{k_d}$$

由于细胞内的酶是由合成和降解两个相反的过程控制的, 我们就从这两方面来进行讨论究竟哪些因素决定了酶的转换速率。

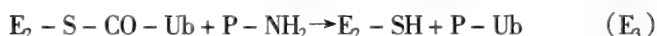
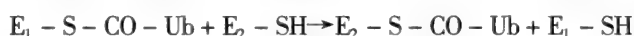
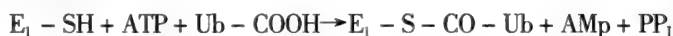
4.5.1 酶合成的调节

酶分子合成的调节就是酶基因表达的调节,既基因转录和翻译水平上的调节,转录水平上的调节研究得较清楚的有原核生物 *E. coli* 中的乳糖操纵子模型,清楚地阐明了酶合成的诱导和阻遏是在调节基因的产物-阻遏蛋白的作用下通过操纵基因控制结构基因的转录,原核生物中转录和翻译是偶联的。真核生物基因表达的调节比原核生物复杂得多,细胞内 DNA 含量远远超过原核细胞,且大部分用于储存调控信息,真核生物基因一般不组成操纵子,mRNA 的半衰期较长,转录后 mRNA 前体通过不同的剪接会产生不同的 mRNA,真核生物和原核生物在翻译完成后都需要进行一系列加工和修饰才能折叠成正确的酶蛋白分子,现在认为可能多肽链的氨基酸顺序中存在着第二遗传密码-折叠密码决定着肽链的空间结构,翻译的过程是一个非常复杂的生物反应过程,需要两百多种因子的参与。目前,用分子生物学的方法调控酶的合成来生产次级代谢物已成为酶工程的一个热点,弥补了以往被动地筛选菌种生产基因工程产品的不足。

4.5.2 酶降解的调节

4.5.2.1 酶降解的作用机制

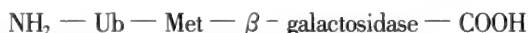
酶的降解大多在细胞内进行。据估计肝细胞中 40% 蛋白质由溶酶体蛋白酶降解,60% 由非溶酶体蛋白酶降解,估计胞汁中至少存在四大类蛋白酶系:两类是由 Ca^{2+} 活化的蛋白酶(calpains),一类是多亚基的中性蛋白酶(分子量约 700KD),还有一类是分子量更大的 ATP 依赖的蛋白酶体(proteasome)。目前研究得比较清楚的降解途径主要有两条:溶酶体降解途径(又称非 ATP 依赖型降解途径)和泛素蛋白标记的降解途径(又称 ATP 依赖型降解途径)。溶酶体中含有大量的蛋白酶,由内吞而进入溶酶体的蛋白质在酸性条件下无选择性地被降解,最后变为小肽和氨基酸。溶酶体蛋白酶主要降解半衰期较长的蛋白质。胞汁内四大类蛋白酶分子两差异很大,分子量越大,其专一性越高,调节机制也越复杂,如真核细胞中广泛存在的泛素(Ub)可选择性地标记蛋白质然后进行降解。作用方式如下:



E_1 : 泛素活化酶 E_2 : 泛素载体蛋白 E_3 : 泛素-蛋白连接酶 P: 蛋白质

Ub 是由 76 个氨基酸组成的蛋白质,在 ATP 存在时,泛素的羧基 Ub - COOH 与泛素活化酶的巯基 $E_1 - \text{SH}$ 共价结合,再与泛素载体蛋白作用,得到活化的泛素: $E_2 - \text{S} - \text{CO} - \text{Ub}$,在泛素-蛋白连接酶催化下活化的泛素分子转移到被降解的蛋白质的 $\text{Lys} - \text{NH}_2$ 上,蛋白质被泛素标记后去折叠,然后被体内的蛋白酶复合体分解。

定点突变实验证实了特殊序列的泛素标记的蛋白质在体内被优先降解,将泛素基因连接在 β -半乳糖苷酶基因 N-末端的 Met 上,得到产物为:



将 β -半乳糖苷酶的 N-末端 Met 进行一系列的置换,发现末端为 Ser, Ala, Gly 等氨基酸时, β -半乳糖苷酶在体内较稳定,末端为 Ile, Gin, Glu, Tyr 时酶的降解速度增加,若末端为 Leu, Asp, Phe, Arg, Lys 时,酶分子非常不稳定,说明 N-末端残基的性质对蛋白质的稳定性有很大的贡献。

磷酸化也是一种标记蛋白质使其优先降解的方法。如细菌生长在以醋酸为碳源的培养基上时,糖异生途径非常活跃以产生大量的己糖,一旦在培养基中加入葡萄糖,糖异生途径马上被抑制,原因是因为催化糖异生途径限速步骤的果糖二磷酸酶稳定性发生了变化,其降解速度常数 k_d 从每小时 0.008 增加到 0.42(酶的降解速度一般服从一级动力学, $v = k_d[E]$),果糖二磷酸酶的 Ser 残基被磷酸化,数分钟内酶活性急剧下降,半小时内酶即降解,说明磷酸化导致酶失活并成为酶降解的

标记。谷氨酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、HMG - CoA 还原酶等都是磷酸化作为酶降解标记的酶。说明酶的转换速度与酶的结构有关。

4.5.2.2 酶降解的化学信号

大量实验证明了酶的结构与转换速度的相关性,如上所述 N-末端残基的性质、酶的磷酸化标记。进化似乎赋予细胞内酶分子构象极大的稳定性,任何修饰或改变酶结构的因素都会降低酶的稳定性,成为被降解的信号,损伤的酶分子上分子结构发生的某些化学变化成为蛋白水解酶水解的标志而优先降解,如突变的分子比天然存在的分子更容易降解,基因工程中要得到一个高表达的突变分子很困难就是因为突变酶比天然存在的酶容易降解。又如酶分子上 Lys, Arg, Pro 等残基对体内的氧化系统特别敏感,大肠杆菌和鼠肝来源的蛋白酶只作用于被氧化的谷氨酰胺合成酶却不降解天然酶,氧化也成为酶优先水解的标志。

一些实验发现某些分子量大的亚基较分子量小的亚基更容易降解,推测可能是分子量大的亚基上存在着对蛋白酶敏感的位点。等电点较低,疏水性较高的酶转换速度较快,但这些规则却都存在例外。

与辅因子结合力弱,容易变性的酶似乎也被优先降解。如酶的底物、以 PLP 为辅基的酶结合 PLP 时,全酶对蛋白酶的反应不敏感,但脱掉辅基,酶很容易被蛋白酶水解。

实际上要找出半衰期比较短的酶分子的结构特征目前还有一定难度,因为目前大量结构已搞清楚的酶大多是体内较稳定的酶,而转换速度较快的酶细胞内含量较少,了解的结构信息相应也少,有人用显微注射法将纯化的几十种已知结构和序列的酶注入细胞,测定各种蛋白质的半衰期,结果发现半衰期小于 2 小时的酶分子在一个或多个区域内富含 Pro, Glu, Ser 和 Thr,简称 PEST 序列,虽然这一序列的功能还不明确,但富含这一序列的酶确实容易被泛素分子标记。

参 考 文 献

- 1 Kuby, S.A. A study of Enzyme, Vol I - II. CRC Press, 1991
- 2 Price, N.C. and Stevens, L. Fundamentals of Enzymology, 2nd eds. Oxford Univ. Press, 1989
- 3 Palmer, T. Understanding Enzyme, 3rd eds. Ellis Horwood Ltd. 1990
- 4 Daniel, L.P. Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism. Academic Press Inc., 1983
- 5 Alan, F. Enzyme Structure and Mechanism, 2nd eds. W.H. Freeman and Company, 1985
- 6 Reginald, H.G. and Charles, M.G. Biochemistry, 2nd eds. Saunders College Publishing, 1999
- 7 吴乃虎. 基因工程原理, 第二版. 北京: 科学出版社, 1998
- 8 袁勤生, 赵健, 王维育. 应用酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 1994

5 同工酶

早在 1895 年, Fischer 等就提出了同工酶的概念, 即不同种类、不同器官和组织起源的酶可作用于同一底物, 催化相同的化学反应, 但其性质可以不尽相同。但是, 直到 20 世纪 50 年代后, 由于人们对酶的本质——蛋白质有了明确的认识, 特别是随着胰岛素结构的弄清以及对蛋白质构象有了较清楚的了解, 这为研究同工酶确立了牢固的理论基础。同工酶的存在十分普遍, 无论是微生物, 还是动物和植物, 在其同一物种的不同个体, 或是同一个体的不同器官、细胞, 或是同一细胞的不同部位, 以及生物在生长发育的不同时期和不同的代谢条件, 都有不同的同工酶分布。目前, 50% 以上的酶分子都已发现有同工酶存在。

同工酶最初在英文方文献中同时出现两个词: isozyme 和 isoenzyme, 后来统一为 isozyme。同工酶的测定不但有助于临床诊断, 也是研究代谢调节、分子遗传、生物进化、个体发育、细胞分化和癌变的有力工具, 在生物学、分子酶学、临床医学中均占有重要地位。

5.1 同工酶的结构基础

同工酶之所以能催化相同的反应, 是因为其在活性中心的结构上有类同之处, 而它们之所以存在着物理特性、催化性质及免疫特异性的区别, 也由于在分子组成和结构上有一定的差别。

5.1.1 同工酶的一级结构的差异

同工酶在一级结构上的差异大致有三种情况。

(1) 分子量不同, 氨基酸组成相差悬殊。例如细胞膜上有两种半乳糖苷转移酶同工酶 I 和 II, 它们的分子量分别为 5 4000 和 76 000, 其氨基酸组成、含糖量及糖链组成相差甚大, 电泳、层析、底物特异性和某些动力学参数也十分不同, 可以想像, 它们有不同的免疫特异性和不同的水解肽谱。

(2) 分子量接近, 但氨基酸组成及水解后肽谱不同, 免疫性质也不同。如兔醛缩酶(ALD)的 A 亚基和 C 亚基, 分子量分别为 40 000 和 37 000, 以及大鼠丙酮酸激酶(PK)的 L 亚基和 M 亚基(相对分子质量约 60 000)都属于这种情况, 见表 5-1。

表 5-1 兔醛缩酶和大鼠丙酮酸激酶同工酶的氨基酸组成(残基数/亚基)

氨基酸残基	兔醛缩酶(ALD)			大鼠丙酮酸激酶(PK)			
	A 型	B 型	C 型	L 型	R 型	M(M ₁)型	K(M ₂)型
Lys	27	28	19	22	24	39	39
His	11	9	7	11	11	12	12
Arg	14	15	14	40	37	33	32
Cys	8	8	6	6	6	9	10
Asp(Asn)	30	35	34	37	37	49	49
Thr	20	21	17	25	26	23	27

续表

氨基酸残基	兔醛缩酶(ALD)			大鼠丙酮酸激酶(PK)			
	A型	B型	C型	L型	R型	M(M ₁)型	K(M ₂)型
Ser	19	17	20	35	34	27	27
Glu(Gln)	41	41	37	59	61	51	52
Pro	19	17	18	27	31	29	22
Gly	31	29	29	44	44	41	42
Ala	44	38	39	58	57	61	60
Val	21	25	25	51	49	46	48
Met	3	6	3	14	15	18	16
Ile	19	20	17	40	36	36	39
Leu	35	36	31	50	48	45	43
Tyr	11	10	9	9	9	10	10
Phe	7	11	9	17	18	16	16
Trp	3	14	3	4	5	2	3
总计	366	357	337	549	548	547	547

(3) 分子量接近,氨基酸组成类似,水解后肽谱也较近似,但免疫性质不同。如醇脱氢酶(LDH)的A(M)亚基和B(H)亚基(分子量约为35 000)以及ALD的A和B亚基(分子量约为39 000)都属于这一类。LDH是研究得最深入的一组同工酶,猪和鸡A亚基和B亚基及狗鱼的A亚基的一级结构均已阐明。其中猪的LDH-B有331个氨基酸残基,LDH-A有329个氨基酸。对照A、B两亚基其同一性在75%左右,活性中心附近接近辅酶或底物各氨基酸残基,十分类似(表5-2)。

表5-2 猪乳酸脱氢酶活性中心附近氨基酸残基的比较

酶蛋白上残基接近辅酶的部位	残基顺序	A亚基	B亚基	酶蛋白上残基接近辅酶的部位	残基顺序	A亚基	B亚基
NAD(H)的腺嘌呤	26	Val	Val	NAD(H)的焦磷酸	39	Ala	Gln
	51	Val	Val		57	Lys	Lys
	52	Asp	Asp		98	Gly	Gly
	53	Val	Ala		100	Arg	Arg
	54	Met	Leu		244	Tyr	Tyr
	84	Tyr	Tyr	连于烟酰胺的核糖	31	Val	Val
	95	Ile	Val		96	Thr	Thr
	97	Ala	Ala		99	Ala	Ala
	118	Ile	Val		138	Ser	Ser
	122	Ile	Ile	烟酰胺	31	Val	Val
连于腺嘌呤的核糖	27	Gly	Gly		137	Val	Val
	29	Gly	Gly		139	Asn	Asn
	52	Asp	Asp		166	Leu	Leu
	57	Lys	Lys		245	Thr	Thr
			249		Ile	Ile	
			酶蛋白上残基接近底物的部位	108	Arg	Arg	
				170	Arg	Arg	
				194	Arg	Arg	

5.1.2 构象变化造成同工酶的差异

一级结构相同的同工酶,可以存在不同的构象,形成所谓构象同分异构体(conformational isomer或comformer),虽然从牛胰核糖核酸酶可逆变性后重新复性(renaturation)的工作证明了蛋白质的空间构象取决于它的一级结构,但不能排除在一级结构不变的条件下,可以有一种以上稳定的构象,而一般天然蛋白质只是存在于最稳定的构象而已。实验证明:小鸡线粒体中的MDH_m加入微量的

碘后,并不会引起分子的碘化,却可发现电泳速度和旋光色散的改变,提示有构象的变化,并证明天然状态的 MDH_m 具有最少的表面负电荷和最多的 α -螺旋区域。同样,用胍使 MHD_m 变性后,再去胍使酶复性,电泳速度可与天然酶一样,而热稳定性有所不同,也可能因构象不同所致,这类构象同分异构体可能还包括 GOT_m、MM 型 CK,以及红细胞中的 ACP。这类同工酶的不同构象可以互相转化,又称为互变性同工酶(interconvertible isozyme),属于次级同工酶的一种类型,为了有别于不能互变的原级同工酶,故后者又称为不互变性同工酶(non-interconvertible isozyme)。

但是,别构酶(allosteric enzyme)在加入效应剂后引起的别构效应也有酶分子空间构象的变化,有人认为这是暂时性的变化,当效应剂去除后可复原,故不能属于次级同工酶的范畴。

Harris 曾统计了 100 多种亚基数目,发现单亚基的占 30%,多亚基的占 70%。在多亚基中,最多是双亚基的占 43%;而三亚基及四亚基的各占 4%和 24%,表 5-3 列举了一些酶的亚基数,其中大多数是同工酶。

表 5-3 一些酶的亚基数目

单亚基:	
(1) 己糖激酶 I (HK-I)	(4) 红细胞酸性磷酸物 ₁ (ACP ₁)
己糖激酶 II (HK-II)	(5) 腺苷酸激酶
己糖激酶 III (HK-III)	(6) 腺苷脱氢酶
己糖激酶 IV (HK-IV)	(7) NADH 黄递酶
(2) 磷酸葡萄糖变化酶 ₁ (PGM ₁)	(8) 磷酸甘露糖异构酶
磷酸葡萄糖变化酶 ₂ (PGM ₂)	(9) 肽酶 B
磷酸葡萄糖变化酶 ₃ (PGM ₃)	(10) 肽酶 C
(3) 碳酸酐酶 B (CA-B)	(11) 磷酸甘油酸激酶
碳酸酐酶 C (CA-C)	
双亚基:	
(1) 醇脱氢酶 ₁ (ADH ₁)	(9) 肽酶 A
醇脱氢酶 ₂ (ADH ₂)	(10) 肽酶 D
醇脱氢酶 ₃ (ADH ₃)	(11) 焦磷酸酶
(2) 3-磷酸甘油脱氢酶 ₁ (GPD ₁)	(12) 6-磷酸葡萄糖脱氢酶
3-磷酸甘油脱氢酶 ₂ (GPD ₂)	(13) 超氧化物歧化酶 (Cu ²⁺ , Zn ²⁺)
(3) 酸性磷酸酶 ₂ (ACP ₂)	(14) 烯醇化酶
酸性磷酸酶 ₃ (ACP ₃)	(15) 酯酶 D
(4) 谷草转氨酶 _z (GOT _z)	(16) 异柠檬酸脱氢酶 (ICD)
谷草转氨酶 _m (GOT _m)	(17) 谷丙转氨酶 (GPT)
(5) 苹果酸脱氢酶 _z (MDH _z)	(18) 2,3-二磷酸甘油酸变位酶
苹果酸脱氢酶 _m (MDH _m)	(19) 次黄嘌呤三磷酸酶
(6) 腺嘌呤转磷酸核糖酶	(20) 胎盘碱性磷酸酶 I (AKP-I)
(7) 磷酸己糖异构酶	胎盘碱性磷酸酶 II _A (AKP-II _A)
(8) 磷酸葡萄糖酸脱氢酶	(21) 肌酸激酶 M (CK-M)
	肌酸激酶 B (CK-B)
三亚基:	
嘌呤核苷磷酸化酶	
四亚基:	
(1) 乳酸脱氢酶 A (LDH-A)	(4) 超氧化物歧化酶 (Mn ²⁺)
乳酸脱氢酶 B (LDH-B)	(5) 丙酮酸激酶 L (PK-L)
乳酸脱氢酶 C (LDH-C)	丙酮酸激酶 R (PK-R)
(2) 醛缩酶 A (ALD-A)	丙酮酸激酶 M [PK-M(M ₁)]
醛缩酶 B (ALD-B)	丙酮酸激酶 K [PK-K(M ₂)]
醛缩酶 C (ALD-C)	(6) 3-磷酸甘油醛脱氢酶
(3) 磷酸果糖激酶 (PFK)	(7) 血清胆碱酯酶
	(8) 苹果酸酶-S

5.1.3 同工酶亚基的杂交

同工酶的亚基在一定条件下能解聚为单体,又能在一定条件下重新聚合或重组成新的杂交体。

5.1.3.1 体外杂交

在高离子强度的介质中反复冻融或调节介质的 pH 值可使同工酶的纯聚体解聚成单体,并再重组而生成杂交体。亚基杂交只限于同一种酶的亚基,如 LDH - A₄ 和 LDH - B₄ 解聚后可生成 A、B 亚基的杂交体,但 LDH 的亚基不能和 ALD 或 PK 的亚基杂交,而不同种属中同一种酶的不同亚基则可在体外杂交。如鸡的 M 型 PK 可与牛的 L 型 PK 杂交。因亚基的重组是随机的,故重组后生成同工酶数目(包括原来的纯聚体在内)应符合随机分配的数学公式,即

$$\text{同工酶的数目 } I = \frac{(n + s - 1)!}{n!(s - 1)!}$$

式中 n 为每一酶分子的亚基数, s 为可杂交的亚基种类数。例如某一种酶为四聚体,有三种不同的亚基均能杂交,则杂交后应形成 $(4 + 3 - 1)!/4!(3 - 1)! = 15$ 种同工酶,其中 12 种为杂交体。

5.1.3.2 体内杂交

同种或异种动物中同一种酶的亚基在体外虽都杂交,但体内并非如此。如 ALD - A₄ 和 ALD - B₄ 可在大鼠肾脏中形成 A₃B、A₂B₂、AB₃ 三种杂交体;ALD - A₄ 和 ALD - C₄ 也可在大鼠脑中形成 A₃C、A₂C₂、AC₃ 三种杂交体,但鸡肾中有 A、B、C 三种亚基,其中 A - B、A - C 可以杂交,却无 B - C 的杂交。与此相似,成年鼠肾、小肠或胎肝中的 PK,可发现 K 亚基和 L 亚基的纯聚体及杂交体,胎鼠骨骼肌的新生鼠脑也有 K 亚基和 M 亚基的杂交体,甚至 L' 亚基也可在胎肝中和 K 亚基杂交,但从未发现 L 与 M 两型亚基的杂交。

同工酶亚基在有些组织中不能杂交的原因,可能由于(1)为不同亚基编码的基因,在有些组织中不全部表达,例如在鼠肾中不能合成 ALD 的 C 亚基,鼠脑中不能合成 B 亚基,因此鼠肾中没有 A - C 杂交,鼠脑中也没有 A - B 杂交。同样,能合成 L 及 K 型 PK 的鼠肾、肝脏和小肠不能合成 M 型 PK,而合成 M 型的骨骼肌及脑却不能合成 L 型 PK,这就是没有 L - M 杂交体的原因。(2)能表达的不同亚基在不同的细胞中合成,如有人证明 L 型 PK 和 K 型 PK 几乎分别在肝实质细胞和柯否氏细胞中合成,故肝脏中没有 PK 的 L - K 杂交体,但在肾脏及小肠粘膜上皮细胞中,L 亚基和 K 亚基可在相同的细胞中合成,因而可有 L - K 杂交体。(3)不同亚基虽在同一细胞,但却在不同的亚细胞组分中合成,如线粒体内外的 MDH 及 GOT 也不能形成杂交体。有人认为,只存在于成熟睾丸及精子中的 LDH - C 亚基在线粒体中合成,而 A、B 两亚基在胞液中合成,这可能就是除豚鼠外的大多数动物中 C 亚基没有杂交体的原因。故睾丸只较其他组织多一个 C₄ 酶带,即 LDH₄,其电泳速度一般在 LDH₃ 或 LDH₄ 之后,因动物而异。(4)不同亚基即使在同一亚细胞组分中合成,但其基因不在同一时间内开放,因此不同亚基也没有聚合的机会,睾丸和精子中没有 C 亚基杂交也可能由于 A、B 亚基和 C 亚基的合成不同步,而先合成的亚基又没有多余可以和后合成的亚基杂交。

5.1.3.3 同工酶亚基在体内的聚合机理

蛋白质亚基的解离和聚合是生物化学中十分重要而有趣的课题。在研究血红蛋白(Hb)四级结构形成机理时发现,Hb 合成时,多核糖体上先合成含 141 个氨基酸残基的 α 亚基,接着与未完成的 β -亚基合成 $\alpha\beta$ 杂交二聚体,待含 146 个氨基酸残基的 β -亚基合成完全后,再与另一个 $\alpha\beta$ 亚基形成 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体。免疫球蛋白(Ig)的合成是先合成轻链(L)和重链(H)的杂交体 HL,待 H 链合成完成后,HL 脱下,再形成 H₂L₂ 的 Ig 分子。上述过程保证了在正常情况下只 2:2 杂交,而不会形成纯聚体及 1:3 的杂交体,否则就是不正常的病理情况,但同工酶不同,它既有纯聚体,又有 1:3 的杂交体。说明同工酶的亚基聚合机理有其独特的地方。不少学者还提出同工酶在刚合成时以单体存在,然后随机聚合,如大鼠心肌中烯醇化酶的两亚基 α 和 β 含量相等,三种同工酶 $\alpha\alpha:\alpha\beta:\beta\beta$ 的比值为 1:2:1,和体外杂交一样。也有人提出,在同工酶合成时可先合成纯聚体再通过亚基交换而形成杂交体,但亚基交换仅在体外证实,而在体内尚无足够的证据。在研究 LDH 同工酶在心肌、骨骼

肌和肝脏等组织中的代谢转换率时发现,LDH 亚基聚合并不是随机的。事实上,在 A 和 B 亚基各占 50%的组织中,LDH 同工酶的比值也不一定是 1:4:6:4:1 的对称性分布,因此很有可能同工酶亚基的聚合还是另有特殊机制。

5.2 同工酶与基因

关于酶和基因的关系,早就有人提出一个基因决定一个酶的假设。事实上,酶不是基因的直接产物。从基因到酶,即 DNA \rightarrow 蛋白质,中间还要经过转录和翻译过程。业已证明,基因通过转录、翻译合成特异的酶,所以从本质上说,同工酶结构的差异主要来自基因的差异,只有一部分同工酶是在多肽链合成后它的结构再经过改变而来的。

根据同工酶的来源和结构不同,从基因角度可将它分为四类。

5.2.1 单基因决定的同工酶

产生这类同工酶的基因是不同的,它们大都是结构差异较大的单链酶或同聚体酶。例如过氧化氢酶,它属于单体酶,它在植物的不同部位和不同生长发育期合成现多种同工酶。

5.2.2 多基因决定的同工酶

这类同工酶的基因是由两个或两个以上的基因决定的几条不同的多肽链组成,它们都是异聚体酶。如 LDH 是四聚体酶,由两个基因 LDH^A 和 LDH^B 决定的肽链 A 和肽链 B 组成。这两种多肽链可以通过异聚和同聚方式构成五种同工酶。

要知道多基因决定的同工酶总数 (i),可以由决定同工酶的基因数 (L) 以及酶的多肽链数 (n),从下式算出:

$$i = \frac{(L + n - 1)!}{n!(L - 1)!}$$

人肝的醇脱氢酶有三个基因位点, ADH^A 、 ADH^B 、 ADH^C , 产生三种肽链,而酶为二聚体,故可以构成 6 种同工酶。

5.2.3 复等位基因决定的同工酶

由于同一基因位点的多向突变,造成群体的不同个体之间等位基因的差别,产生多肽链一级结构的差别,而使个体与个体之间出现结构不同的同工酶。如玉米中酯酶受同一位点的 E^S 、 E^N 、 E^F 三种等位基因所控制,是二聚体。

如果酶中的多肽链是复等位基因决定的,则计算式为:

$$i = \frac{(L + h + n - 1)!}{n!(L + h - 1)!}$$

h 为等位基因数。

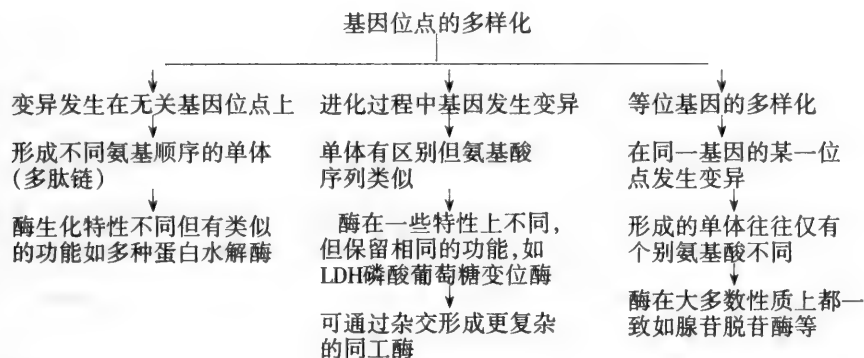
上述玉米中酯酶,如有一个杂合子 E^F/E^N , $h = 1$,则它的同工酶总数为 3,同工酶多肽链的组合为 FF, FN, NN。

以上计算只说明在群体中或整体生物的全生长发育过程中,一特定同工酶可能出现的理论总数,而在实际材料和分析中不一定能把所有的同工酶组合找到,特别是那些甚微的等位基因决定的同工酶,因目前的电泳分离技术有一定局限性。

5.2.4 修饰同工酶

这是指多肽链合成后,再发生结构上的改变而形成新的同工酶。日本学者证明,一种水稻酯酶同工酶的谱带 A_1 是受一个显性基因控制的。在对有 A_1 谱带的品种与无 A_1 谱带的品种向杂交后

代所作的遗传分析后表明,出现典型的孟德尔分离现象。在总数为 836 个 F_2 植株中,629 个出现 A_1 谱带,207 个无 A_1 谱带。由此可见,同工酶谱带是受等位基因或不同位点基因控制的。也有实验证实,玉米过氧化氢酶是四聚体蛋白,在一定条件下可以解聚,再重新组合成五种同工酶,并且证明单体是最初的基因产物,这些单体聚合成四聚体后才具有酶活性。现将同工酶与基因的关系总结如下:



5.3 同工酶的分离、纯化及鉴定

基于同工酶的化学本质为蛋白质,因此同工酶的提纯与其他任何蛋白质或酶的提纯,原则上没有什么不同。常用的方法是先从组织或细胞中抽提,然后根据同工酶表面电荷、分子量、等电点、耐热性、动力学和免疫性质的差别逐步予以分离。同工酶的提取只有计算比活(即酶活性(u)/毫克蛋白)时才有真正的差别,而不是简单测定酶的总活性。

5.3.1 几种常用分离和测定同工酶的方法

5.3.1.1 电泳

区带电泳是最常用的分离同工酶的方法,采用高分辨率的支持物如淀粉凝胶或聚丙烯酰胺凝胶可获得满意的分离效果。近年来采用等电聚焦电泳还可以分出一级结构相同而空间构象不同的酶分子。酶分离后,再加入底物保温,并用类似于组织化学的特殊方法来鉴定底物的减少或产物的生成。但是能被电泳法分离的不一定是同工酶,酶带的数目也不一定代表同工酶的数目。因为某些酶蛋白可与电泳介质中的带电物质结合,改变其分子大小及电荷,从而改变电泳速度。例如:LDH可与血清中的免疫球蛋白A或G结合而形成相对分子质量从 $300 \times 10^3 \sim 1\,000 \times 10^3$,等电点从 pH6.3~7.2的各条酶带。过去在人血清电泳时发现的“巨淀粉酶”(macroamylase)实际上是淀粉酶和免疫球蛋白A的复合物。这些复合物都不是同工酶。相反,两种电泳速度不同的同工酶,如其中一个和带电的小分子物质结合后,其电泳速度恰巧和另一个相等,则两种同工酶在电泳时可分离不开而只出现一条酶带,故不能单凭电泳来鉴定是否同工酶。

5.3.1.2 层析

大多数同工酶的分子量比较接近,而表面电荷差别较大,故一般较少用分子筛层析而用离子交换层析来分离同工酶。采用阳离子或阴离子树脂则取决于同工酶的等电点及其在不同 pH 中的稳定性。离子交换层析可用于纯化或制备不同的同工酶,但其分辨率低于电泳。

亲和层析是利用同工酶和相应的配基(如底物、辅酶、抑制剂、抗体等)亲和力不同的原理,将同工酶混合物通过固相的配基,再用缓冲液分别将吸附程度不同的同工酶洗脱下来,即可达到分离的目的。此法特异性高,特别适用于分离和提纯同工酶。

5.3.1.3 热稳定性

利用同工酶热稳定性的不同,将含有两种同工酶的混合样品加热处理后,可以较特异地破坏其中一个不耐热的同工酶。因此测定加热前后的活力,可在不需分离的情况下,分别计算出两种同工

酶的活力。此方法简易,但准确性较差。

5.3.1.4 动力学

原级同工酶对底物的特异性、亲和力或对各种抑制剂和激活剂的敏感性常不相同,这些动力学的差别常被用于测定或区别同工酶,例如 ALD 同工酶有三种纯聚体即肌型(A_4)、肝型(B_4)和脑型(C_4),它们对底物 1,6-二磷酸果糖(FDP)及 1-磷酸果糖(F1P)的亲和力差异很大。 A_4 催化 FDP 和 F1P 分解的速度比值为 50,即几乎不能作用于 F1P;而 B_4 的比值为 1,催化两种底物分解的速度相等, C_4 介于 A_4 和 B_4 之间。在 A_4 和 B_4 混合的样品中,分别测定 FDP 或 F1P 为底物时的活力,即可大致推测样品中 A_4 和 B_4 的相对比值。LDH 同工酶也有不同的底物专一性,如心肌中的 LDH- B_4 (或 LDH- H_4)对 α -羟丁酸的亲和力远大于肝脏或骨骼肌中的 LDH- A_4 (或 LDH- M_4)。

又如己糖激酶(HK)和葡萄糖激酶(GK,又称Ⅳ型己糖激酶)是催化葡萄糖受 ATP 磷酸化的同工酶, HK 对葡萄糖的 K_m 约为 0.1mmol/L;而 GK 则高至 10mmol/L 左右。当 HK 和 GK 共存时,在 2.5mmol/L 葡萄糖浓度时测得的酶活力减去对照值后主要为 HK 的活力;而在 100mmol/L 葡萄糖时测得的活力则为 HK 和 GK 活性的总和,由此可算出 GK 的活力。

动力学法虽然简单,不必分离同工酶即可分别测定,但不易找到只作用于同型同工酶的抑制剂或激活剂。

5.3.1.5 免疫法

多基因位点的原级同工酶与复等位基因同工酶或次级同工酶比较,其氨基酸组成常有较大的差别,故有不同的抗原性。利用纯化的同工酶在异种动物中制备抗血清,再加至同工酶的混合样品中,该抗体即可与相应的同工酶抗原形成免疫复合物而沉淀,而将另一型免疫性不同的同工酶留在溶液中,从而达到分离的目的。有时沉淀时可回收全部酶活力,如各型 AKP 同工酶,则测定沉淀的活力即可定量。如果抗体将酶活力全部抑制,沉淀中免疫复合物没有活力,如各型 CK 同工酶,则测定上清液中的残余活力即为另一型未被沉淀的同工酶的活力。从不加抗体的样品中测出的总活力减去加抗体后的活力,即得被沉淀的同工酶的活力。利用放射免疫法还可以精密而特异地测定微量的同工酶。此外,免疫法还可以区别组织中某一同工酶活力的增高是由于激活还是酶蛋白增多的结果,因后者有抗原量的增加,可用免疫定量法(如火箭电泳法)测定出来,而前者的酶蛋白抗原并不增加。

5.3.2 同工酶类型的鉴别

从同一组织或不同组织中分别提取的能催化相同反应的酶,究竟是结构完全相同的同一种酶还是结构不同的同工酶?是原级还是次级同工酶?当在技术上还不能测出全部一级结构时,可以用较简易的方法,如末端分析,水解后肽链的指纹图谱等加以鉴定,或者将上述各项方法的鉴定结果,加以综合分析,也可获得较为可靠的结论。

表 5-4 三类同工酶在性质上的区别

方 法	原级同工酶		次级同工酶	同一种酶
	多基因位点 ^①	复等位基因		
电泳速度,等电点离子交换层析行为	不同	常不同	常不同	相同
热稳定性	不同	不同或接近	不同或接近	相同
动力学性质	不同	常不同	常相同或接近	相同
免疫性	不同 ^② ,可交叉	常交叉	常相同	相同
相对分子质量	不同,常接近	几乎相同	不同或接近	相同

① 指纯聚体 ② 少数情况下可交叉

从表 5-4 可见,不论原级或次级同工酶,因酶蛋白的等电点或相对分子质量不同,电泳速度通

常也不同。不同糖链,特别是糖链末端唾液酸数量不同的次级同工酶,或者聚合程度不同的次级同工酶,也可分别因糖链的电荷不同及酶蛋白的分子量不同而有不同的电泳速度。但如果复等位基因同工酶中只有非极性氨基酸的交换变异,或其碱性氨基酸置换成酸性氨基酸的同时,伴有等量的酸性氨基酸置换成碱性氨基酸,可以没有电泳速度的改变。同样,在形成次级同工酶时,如修饰过程不引起酶分子电荷或分子量的改变,也不会改变等电点和泳速。此外,同一型复等位基因同工酶的电泳速度有个体差异,而不同型复等位基因同工酶的泳速也不成等差级数,后一性质类似于次级同工酶。离子交换层析的原理和电泳相同,故其应用于鉴定同工酶的价值也和电泳一样。

热稳定性在鉴别同工酶类型上也有一定意义,其灵敏度有时可超过电泳。原级同工酶的热稳定性大多不同,其中复等位基因同工酶的热稳定性有时可区别很大,有时则比较接近,取决于置换氨基酸的多少及种类,次级同工酶也视不同的修饰情况,可以接近或不同。实验证明:糖链不同的次级同工酶,其热稳定性常有区别。

动力学性质的测定是区别原级或次级同工酶较好的手段,因原级同工酶的各项动力学参数包括底物的 K_m ,抑制剂的 K_i 、激活剂的 K_a 常不相同,有时尚有别构效应和无别构效应的区别,如丙酮酸激酶中的 L 型和 K 型对底物磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)均是正协同别构效应,而 M 型则无别构效应而呈米氏动力学。次级同工酶的蛋白结构因差别很少,故其动力学参数往往相同或比较接近,如 L 型和 R 型 PK。但在少数情况下也可不同,如 AKP,在不同浓度的底物(β -萘酚磷酸)时,其最适 pH 均不相同,如在不同底物浓度各自相应的最适 pH 条件下测定反应速度,可发现肝、肾、骨中三型 AKP 的 K_m 略有不同。

免疫性质是区别两类原级同工酶最好的方法,多基因位点的同工酶常有不同的免疫特异性。如三类 LDH 和三类 ALD 的亚基以及两类 CK 的亚基。不同亚基只能和本身相应的抗体起反应,彼此无交叉免疫,只有个别例外。如 M 型 PK 的抗体虽不能和 L 型 PK 结合,却能 and K 型 PK 反应,故有人将 K 型 PK 称为 M_2 型 PK,但其免疫沉淀线并不融合而是互相交叉。复等位基因同工酶往往有相同的免疫决定簇,可交叉免疫。如果两个同工酶的动力学不同而免疫性相同,往往提示是复等位基因同工酶。当因遗传变异而产生某一同工酶的变种,没有催化活性或活力极低,用其他方法无法检测,此时用这种同工酶正常型的抗体,可与此变异酶发生免疫反应,就可证明此同工酶的存在,故免疫法在检出复等位基因同工酶中有独特的优点。

次级同工酶的一级结构基本相同,故其免疫性质也往往相同。肝、胎盘、肾、肺、小肠等组织中的芳香酰胺酶(AAD),虽然其电泳迁移率和热稳定性有所差别,但其动力学和免疫性质是相同的。各组织的 AKP 各有不同的电泳图谱,但利用免疫法鉴定只有三种类型(表 5-5)即肝型、胎盘(晚期)型和小肠型三型原级同工酶,而骨型、肾型乃至早期胎盘型和肝型之间都有交叉免疫,其动力学性质也十分相似,故一般认为它们可能是次级同工酶。

表 5-5 人肝、胎盘、小肠中纯化的 AKP 的酶学及免疫学性质

	肝	胎盘	小肠
相对分子质量($\times 10^4$)	18	13	17
等电点	4.7	4.5	4.6
最适 pH	10.6	10.5	10.5
pH 安定性	4~11	6~11	5~11
K_m (PNPP)(mmol/L)	0.31	0.30	0.30
抑制后残余活性%			
Na_2HPO_4 (1mmol/L)	71	34	105
L-胱氨酸(1mmol/L)	68	87	50
L-苯丙氨酸(1mmol/L)	96	56	50
L-同型精氨酸(1mmol/L)	57	95	101
抗肝 AKP 抗体	++	-	-
抗胎盘 AKP 抗体	-	++	+ ^①
抗小肠 AKP 抗体	-	+ ^①	++

① 如抗体浓度适当,可消除交叉反应。PNPP:对-硝基酚磷酸酯

5.4 同工酶的应用

同工酶的应用范围很广,它涉及到的领域有临床诊断、代谢调控、分子遗传、生物进化、个体发育、细胞分化和肿瘤发生等,故在酶学、分子生物学和医药学中占有重要地位。

5.4.1 同工酶与临床诊断

血清中的同工酶是临床上感兴趣的,因为它们可作为组织损伤的分子标记物。在正常情况下,细胞膜对酶是不能渗透的,但在病变和组织损伤时,细胞膜就变得可渗透,致使可溶性细胞内含物如酶等,就会泄漏到血清中,在发生疾病时,血清中酶浓度升高,超过健康状况下的血清酶浓度。因此,血清的酶浓度常被用来确定病人是否发生组织损伤,损伤到何程度。下面简要介绍几种常用的血清检测同工酶。

5.4.1.1 酸性磷酸酶(acid phosphatase)

酸性磷酸酶具有由不同分子形式组成的复杂酶谱,这些分子形式部分由多基因座(multiple genetic loci)所产生。此酶存在于许多组织中,在成人前列腺腺中特别高,此酶已应用于转移性前列腺癌的检测。当它与非转移性癌比较时,发现其血清酸性磷酸酶活性明显升高。由于前列腺癌的转移所产生的酸性磷酸酶和前列腺及其肿瘤所释放的不同,我们可以加入对同工酶有不同影响的抑制剂,通过测定加入抑制剂和未加抑制剂的血清,来判断是前列腺还是非前列腺的同工酶,以改进试验的诊断特异性。最近,利用同工酶在免疫化学上的差异,已能借助于RIA或免疫电泳检出前列腺特异的酸性磷酸酶。

5.4.1.2 碱性磷酸酶(basic phosphatase)

与酸性磷酸酶一样,碱性磷酸酶的同工酶谱也是十分复杂的。其异质性也部分由多基因座产生。血清碱性磷酸酶主要有四种来源:骨、肝、肠和胎盘。这些组织的每一种都各含一种同工酶。临床上感兴趣在于能把骨疾引起的血清碱性磷酸酶的升高和肝病所引起的升高区别开来。在骨中,释放的碱性磷酸酶增加,看来是和骨基质(不管是正常还是病理的)沉积作用有关。例如,直接或间接引起成骨细胞高度活动的任何疾病,都将引起骨的碱性磷酸酶同工酶血清浓度的升高,包括软骨病,佩奇特氏病(Paget's disease)以及由某些肿瘤引起的骨急性浸润。与此类似,在许多肝功能失调中也会发生肝脏异常地大量释放碱性磷酸酶。故对血清碱性磷酸酶升高的患者,诊断调查第一步是先确定升高源是骨还是肝,其鉴别可由凝胶电泳或热稳定试验来判别。有一种酶叫雷根同工酶(Regan isoenzyme),它出现恶性肿瘤病人的血清中,但由于患者比例很小,所以作为癌症标志物的有效性是有限的。

5.4.1.3 肌酸磷酸激酶(CPK)

CPK同工酶存在于兴奋组织中,如神经和肌肉。尤其在心肌可大量找到肌脑型(MB)杂合体同工酶。此MB同工酶是心肌损伤高度特异的标志物,但对心脏病人来说,MB同工酶升高的诊断特异性也非绝对,还存在其它潜在的MB同工酶释出源。例如各种器官的平滑肌组分常含有少量MB同工酶。

5.4.1.4 乳酸脱氢酶(LDH)

乳酸脱氢酶(LDH)是一种普遍存在的糖酵解酶,因此其血清活性在多数不相关的疾病中都会升高。象这样缺乏诊断特异性,使得测定总的血清LDH没有多大诊断意义。在发现了LDH以同工酶形式存在以后不久,人们就想利用这种异质性来获得较好的诊断特异性。已经设计出几种不需分离就能测定血清LDH的方法。最广泛采用的作为心肌梗塞的一种生化诊断试验,被称为2-羟丁酸脱氢酶(HBD)鉴定法。但是HBD的临床特异性还是不够满意的。例如一项全面调查发现,有15%病人最后诊断不是心肌梗塞,其血清HBD活性也升高。这种特异性不好的主要原因有两种:一是五种同工酶LDH₁到LDH₅,都有广泛的组织分布。实质上,几乎所有组织都会有这五种同工

酶。虽然每种同工酶在各组织中所占比例不一,但几种组织类似于心脏,即都含 LDH_1 和 LDH_2 ,都显出高 HBD 活性。尤其是红细胞,它与心肌十分相似,故只要红细胞在体内或体外发生溶血,就会使血清 HBD 升高,从而造成指示心脏损伤的假象。二是,LDH 同工酶的 HBD 活性是由其亚基组成所产生的。B 型亚基比 A 型亚基更容易氧化 2-羟丁酸。因此 $\text{LDH}_1(\text{B}_4)$ 是最活跃的 HBD 同工酶, $\text{LDH}_5(\text{A}_4)$ 活性最差, $\text{LDH}_4(\text{A}_3\text{B})$ 、 $\text{LDH}_3(\text{A}_2\text{B}_2)$ 和 $\text{LDH}_2(\text{AB}_3)$ 则显出居间的活性梯度。这三种杂合体同工酶分布广泛,而每一种都可能成为血清 HBD 总活性的一部分。这后一种属同工酶性质上的问题,可能通过一种分离方法如电泳或柱层析来克服。

血清同工酶研究还可用于特殊遗传病诊断,如先天性代谢缺陷,是由于某特异酶类的合成有缺陷。引起这些疾病的遗传损伤,看来每种都局限于单基因座。在那里,一种酶仅由一种基因座编码。要是该基因座就是这种遗传缺陷的所在,那末纯合子个体的酶缺陷就是完全的。也就是说,作为该基因座产物的酶或有缺陷,或者不能合成,这取决于受损伤的性质。但是,在多基因座同工酶的情况下,一种先天性代谢缺陷只能影响一种同工酶的亚基型的合成。仅有那些正常情况下含有会影响该亚基的才是有缺陷的同工酶。由于酶的多样性,许多遗传缺陷就只限制在它们的代谢结果中。在这种同工酶缺陷病中对同工酶进行分析,无论在理解疾病本质的理论研究,还是为了临床诊断的实用方面,都将是重要的。

5.4.2 遗传与进化中的同工酶

同工酶作为遗传标志,已被遗传学家广泛用于遗传分析的研究,这是因为(1)同工酶是分子水平的指标,按照一个基因编码一个同工酶亚基的理论,可从同工酶的表现型变异直接推测其基因型的变异,显然优于某些形态学的指标,后者往往是多个基因型的综合表现型;(2)同工酶可用测定活力的方法鉴定,较非酶蛋白质分析方便;(3)同工酶比其他指标灵敏,可以反映 DNA 上一个碱基的微小变异。

同工酶作为遗传标志物的优点如下。

1) 同工酶分析能方便地处理大批样品,所需样品少。

2) 等位基因的同工酶能同时显性表达。即一种等位基因不会因另一种的存在被掩蔽掉。因此,在杂合子中被编码的两种不同的同工酶亚基将同时呈现,而纯合子中将只能找到一种亚基。也就是说,一个个体的基因型可以从同工酶的表现型上显示出来。同工酶的这种优点胜过使用如像颜色变异和形态特化等经典的遗传标志物。因为当使用经典的遗传标志物时,如果两种等位基因皆以杂合子状态存在,而其中之一对另一种是显性的,那末显性的将优先表达。这样一来,一个有着显性表现型的个体,或可能是纯合子的显性等位基因,或可能是具有隐性的或被掩蔽了的等位基因的杂合子。像这样可能存在的两种基因,只能通过好几代的谱系研究来判别,这是极不方便的方法,研究长寿的有机体尤其麻烦。

3) 用同工酶分析法来检出变种比用肉眼观其外表的办法灵敏得多。经典遗传学中所看到的颜色变化和异常形态,常常是因一个基因产物(不论是酶还是其它蛋白质)的整个缺失而引起的。象这样的一种完全缺失(complete deletion),似会引起代谢的极度混乱。此时,个体除了有异常的外观外,大概也会引起生物化学上的异常。现在,应用同工酶变种作为遗传标志物,由于它们在电泳电荷等物理化学性质上的彼此不同,加之酶的多种形态都至少会有部分酶活性(否则它们不会称为同工酶),因此携带着各种同工酶等位基因的品系,将比携带不同形态表现的基因品系更接近于野生型。对某些基因座而言,其编码的酶活性若全部缺失就会成为致死条件(lethal condition)。现在可使用等位基因变体来完成这种基因座的遗传分析。这些变体仅在其产物的电泳迁移率上有差异,生物活性并无不同。同工酶变种的这些特性在野生型群体的遗传中也是重要的,因为存留许多世代的那些突变大概不会发生剧烈生化后果的突变。

同工酶的进化理论涉及单基因位点操作作用的多等位基因所引起的同工酶类,现在普遍认为这类等位基因是由原始基因突变产生,而多基因位点同工酶的进化比较复杂,整个过程分三步:(1)

祖先基因(ancestral gene)的突变产生了多等位基因;(2) 基因座复制;(3) 等位基因的分离,致使第一个基因座仅携带一种等位基因,而第二个基因座只携带另一种等位基因。但还不清楚这些步骤是按上述次序发生的,还是第(2)步先于第一步。选择论者的观点是,应先发生第(1)步,再由此步所产生的等位基因传播给整个群体,建立起杂合子优势。接着再发生第(2)和第(3)步,使不仅是杂合子而是物种的所有成员都得到能合成由以上等位基因编码的这两种基因产物的好处。这种思路的必然结果是,许多单基因座的多等位基因可能只是最后进化到多基因座同工酶的中间阶段。

目前对多基因座同工酶是由基因复制和趋异性进化引起的假设仍有争议,主要是缺乏直接证据。一般认为,已经有一着一种特定酶的有机体,不象要重新演化此酶的一种同工酶。但是,同工酶也可能是由趋同性进化(convergent evolution),而不是趋异性进化所引起的。在试图设法判别进化的这两种可能策略时,可以采用比较多基因座同工酶氨基酸顺序的方法,以确定某一级顺序是否符合于来自祖先基因的趋异性进化。现就人的碳酸酐酶 B 和 C 以及猪乳酸脱氢酶亚基 A 和 B 简要说明之,因为已获得了它们完整的氨基酸序列资料。

碳酸酐酶同工酶 B 和 C 仅有一个氨基酸的长度之差,即 B 是 260 个残基;C 是 259 个残基。如果设想在相当于 B 链第 126 位残基处,C 链顺序中丢失了这个残基,那末将得到这两种多肽最大的同源性顺序。情况正是这样,此时两个顺序中有 60% 的氨基酸相同。相同的氨基酸占有相同的位置。但是,当考虑剩下的这 40% 的残基位置时,似又不能从蛋白质顺序这种分子水平来推导出基因进化的正确路线,理由有二:首先,遗传密码是很丰富的,一种氨基酸可由几套三联密码子中的任一套来体现;其次,我们现在测定的多肽顺序仅是我们看到的进化到今天的产物,现在还没有研究进化中间阶段的好办法。但是从碳酸酐酶 B 和 C 链的顺序看,多数氨基酸的置换作用是按最小突变路线进行的,可用编码的三联体中只发生一个碱基变换来解释。要求相应密码子中三个碱基全变的置换只有一处,那就是第 245 位。在 B 多肽链中那里是由 AUU 或 AAC 编码的天冬氨酸,而在 C 同工酶中则被 UGG 编码的色氨酸所代替。除了一级顺序资料外,X 射线结晶学的研究揭示了两种同工酶在 0.2nm 分辨率下肽链二、三级结构的折叠情况,指出两种同工酶之间存在着高度的三维结构同源性,补充了它们的一级结构顺序的高度同源性。

对猪乳酸脱氢酶 A 和 B 亚基的研究也得到了类似结果。A 和 B 多肽链间仅有两个氨基酸长度的差异。A 较短,共 331 个残基。设想第 17 残基不是因 A 链中丢失,就是在 B 链中重复,而残基 331 位则因 A 链中的丢失。这样一来,就可得到两个多肽链的最大同源性。两种多肽氨基酸全顺序的 75% 是相同的。氨基酸大多数的置换作用,也只要密码子中一个碱基的变化就能达到,并不要求三个碱基全变。乳酸脱氢酶亚基的高分辨率 X 射线结晶学的结构,也指出了 A 和 B 亚基在三维结构上有较高的同源性。在折叠的多肽链中鉴定各氨基酸所处的位置,就能按照它们在亚基结构中的位置把氨基酸分类。已发现催化上重要的残基比非直接参与活性部位的残基显示了出更强的保守性。在亚基表面上的氨基酸通常比内部的残基更易被置换。

```

A: ATLKQLIHNLLKEEH-VPHNKITVVGAVGMACAISIL
   1      10      20      30      35      40
B: ATLKEKLIAPVAQQETTIPBNKITVVGAVGQVGMACAISIL

```

图 5-1 猪乳酸脱氢酶 A 和 B 亚基一级结构顺序比较

图 5-1 是猪乳酸脱氢酶 A 和 B 亚基 N-端前 40 个氨基酸残基,下面横线表示不相同的残基。总之,碳酸酐酶和乳酸脱氢酶同工酶的结构资料和下述概念完全一致:从单一祖先基因进化而来的两套多基因座同工酶都由该祖先基因经过复制,后来再经过众多的点突变分化而来的。其中大多数是碱基的置换作用,偶尔也发生碱基的丢失或插入。

Eventoff 等人得到了角鲨的 A 亚基完整的氨基酸顺序资料,以及鸡的 A 和 B 亚基近于完整的顺序资料。所有五种乳酸脱氢酶同工酶都显出高度的顺序同源性,并可在 A 和 B 亚基之间作出有

意义的比较。总的说来,不同物种相同的亚基之间比同种物种不同亚基型之间有更高的顺序类似性。例如,猪 LDH 的 A 和 B 亚基间在进化上的差异,比猪 A 和鸡 A 之间,或比猪 B 和鸡 B 之间的差异都要大。因此,自 A 和 B 亚基相互分化以来,它们各自都有相当高的进化保守性(evolutionary conservation)。

要想鉴别过去的进化活动就必须研究大量的不同物种,以便能从进化至今的分支端追溯并勾勒出进化树的轮廓。虽说 X 射线晶体学和氨基酸顺序资料能详细描绘出酶结构的图象,但需要通过昂贵又费力的步骤才能得到,这对于甄别数量庞大的同工酶类是不适用的。为此应采用其它技术,尽管目前有关信息还很少。Markert 等人曾研究过鱼的乳酸脱氢酶同工酶类的电泳迁移率,评论了其它脊椎动物中这类同工酶的类型资料。这种广泛的调查使我们能对进化进程中 LDH 基因的倍加用图表来说明。例如,脊椎动物最原始类型之一的八鳗目只具有 LDH 单基因座,这就类似于无脊椎动物。然而,所有其它的脊椎动物都至少有两个基因座。这就暗示,LDH 基因座最初的倍加是在演化到脊椎动物后不久发生的。

特异的抗血清是研究同工酶结构类似性的另一种方法。一些酶显示,多基因座同工酶的不同亚基型没有免疫学上的交叉反应。例如,人碳酸酐酶 B 的抗体不和人碳酸酐酶 C 反应。反之,C 同工酶的抗体也不和 B 反应。已经证明,LDH₁ 和 LDH₅ 之间同样没有交叉反应法。同工酶在免疫化学性质上截然不同的事实表明,处于表面处的氨基酸曾发生过广泛的置换反应,以致于不存在由两种同工酶共同使用的公共抗原决定簇(antigenic determinant)。大家所熟悉的碳酸酐酶和 LDH 的结构支持了这一结论。同工酶之间不存在这种免疫交叉反应,就象同酶特异抗血清有助于证明生物相当缺乏物种特异性那样,是值得注意的。在烯醇化酶的情况下,鼠肌烯醇化酶亚基 $\beta\beta$ 的抗血清,能和包括鱼类在内的大量脊椎动物肌肉的烯醇化酶相结合,但它却对鼠的 $\alpha\alpha$ 同工酶无效。更引人注目的是,对丙酮酸激酶的研究也得到了类似的结果。人肝和肌肉中的这种同工酶之间并不显示化学交叉反应性,但这两种酶的抗血清却能和大肠杆菌中的丙酮酸激酶起反应。人同工酶的抗血清不能和同种机体的另一丙酮酸激酶基因座的产物起交叉反应,但他们却能和原核生物的酶实现交叉反应,虽说进化上人和大肠杆菌约在 15 亿年前就分叉了。乳酸脱氢酶同工酶的进化,也曾免疫化学进行过研究。在脊椎动物进化进程中,所有六种不同 LDH 基因座都会显现,但仅有三种被保留在哺乳动物中,同工酶的这些免疫化学研究,证明多基因座产物之间有很大的结构差异。各同工酶亚基型又说明了脊椎动物进化的高度保守性。以至看来酶结构变化象是有很强的进化压力,因为同工酶的亚基从原基因复制产生它们起就分叉得很厉害。使人联想到多基因座同工酶对有机体必定是有利的,因为它们的趋异性竟能超越通常范围较窄的酶的可变异性。

5.4.3 代谢调节中的同工酶

近年来,有关同工酶与代谢调节的研究已愈来愈受到人们的重视,但已阐明的同工酶还不多。实验表明:同工酶在各组织或亚细胞组织分中分布的不同以及它们之间底物特异性和动力学的差别决定了同工酶在体内的功能是不同的。下面简单介绍在细菌和哺乳动物体内同工酶对代谢的调节。

5.4.3.1 细菌中同工酶对氨基酸合成的调节

有关同工酶参与代谢调节最早也是最成功的例子之一,是关于细菌中的合成控制。如在大肠杆菌中某些氨基酸的合成,当单一的酶反应同时产生几种终产物时,必将引出一个调节的问题。由这些产物中的一种所引起的反馈抑制,不仅会干扰自身,也会干扰其他产物的形成。例如,天冬氨酸激酶催化苏氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸和异亮氨酸的合成,就如图 5-2 所示。现在这一问题已通过天冬氨酸激酶的三种同工酶的演化得到澄清,原来,AK I 和 AK III 活性可分别被苏氨酸和赖氨酸抑制,而 AK II 的合成被甲硫氨酸抑制。此外,还存在着由赖氨酸、甲硫氨酸和苏氨酸的分支点抑制(branch point inhibition)。在这种抑制作用中,这些底物各抑制形成自身的最后一步反应。由图 5-2 可清楚地看出,任一产物的积累都只能引起天冬氨酸激酶活性的部分抑制。而且,余下的代谢物

的流向又将通过分支点抑制被引向适当途径。

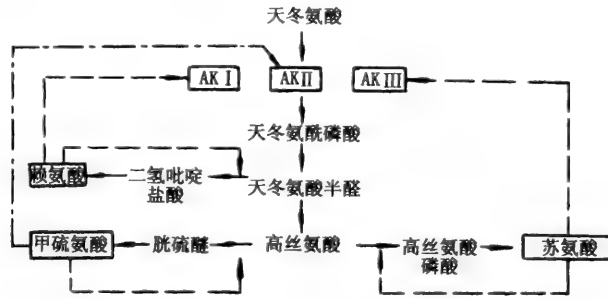


图 5-2 天冬氨酸激酶同工酶(AK I, AK II, AK III)在大肠杆菌合成赖氨酸、甲硫氨酸和苏氨酸的调节中的作用
—·—·—酶活性的抑制作用, - - - 酶合成的抑制作用

5.4.3.2 哺乳动物体内同工酶对代谢的调节

哺乳动物体内的同工酶系统远比细菌复杂,不少代谢通路中均有同工酶存在。有人统计了糖代谢四条通路中的酶,发现大多是多基因位点调控的(表 5-6),如参与葡萄糖酵解的 11 个酶中,竟有 9 种具有多基因位点的同工酶。

表 5-6 哺乳动物四条糖代谢通路中的同工酶

酶	基因位点数	酶	基因位点数
糖酵解通路		糖异生通路	
己糖激酶	2	丙酮酸羧化酶	-
磷酸己糖异构酶	1	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶	2
磷酸果糖激酶	3	果糖二磷酸酶	2
醛缩酶	3	糖原糖化通路	
磷酸丙糖异构酶	2	糖原磷酸化酶	3
3-磷酸甘油醛脱氢酶	1	磷酸葡萄糖变位酶	3
磷酸甘油酸激酶	2	6-磷酸葡萄糖酶	-
磷酸甘油酸变位酶	2~3	糖原合成通路	
烯醇化酶	3	UDPG 焦磷酸化酶	-
丙酮酸激酶	3	糖原合成酶	2
乳酸脱氢酶	3		

(1) 不同亚细胞组分中的同工酶常有不同的生理功能, Urela 曾统计哺乳动物体内具有“区域化”(Compartmentaion)现象的同工酶约有 40 种左右。不同型的同工酶和不同的亚细胞组分结合,它们往往有不同的动力学性质,它们在催化 $A \rightleftharpoons B$ 的可逆反应中,正逆两个方向的反应速度是不同的。表 5-7 列举了分布于线粒体内外的 MDH_m 和 MDH_c 的动力学区别。指出 MDH_m 对苹果酸的亲和力大于 MDH_c (K_m 小),而对 NADH 的亲和力又小于 MDH_c (K_m 大),并且 MDH_m 受低浓度草酰乙酸的抑制, MDH_c 则否。这说明 MDH_m 催化苹果酸 + $NAD^+ \rightarrow$ 草酰乙酸 + $NADH + H^+$ 的速度较逆向反应快,而 MDH_c 则催化逆向反应较快。这和它们的生理功能是一致的。因 MDH_m 属三羧酸循环酶系,它主要使苹果酸脱氢,而 MDH_c 则主要使胞液中的草酰乙酸还原而穿入线粒体。后一反应对胞液中的 NADH 的 H 进入线粒体氧化(苹果酸-草酰乙酸循环,图 5-3)以及胞液中来自线粒体的柠檬酸裂解后生成的草酰乙酸(另一产物乙酰 CoA 可用于脂肪酸合成)重新回入线粒体(苹果酸-丙酮酸循环,图 5-4)有关。

表 5-7 牛心中两型苹果酸脱氢酶同工酶的比较

	MDH _m	MDH _s
分子量	62 000	52 000
等电点	5.5~5.6	4.6~4.7
K _m L-苹果酸	2.5 × 10 ⁻⁴ mol/L	4.7 × 10 ⁻⁴ mol/L
NAD ⁺	9.9 × 10 ⁻⁵ mol/L	9.9 × 10 ⁻⁵ mol/L
草酰乙酸	3.4 × 10 ⁻⁵ mol/L	4.2 × 10 ⁻⁵ mol/L
NADH	5.2 × 10 ⁻⁵ mol/L	2.7 × 10 ⁻⁵ mol/L
草酰乙酸开始抑制浓度	1.3 × 10 ⁻⁴ mol/L	> 1.9 × 10 ⁻⁵ mol/L 仍不抑制

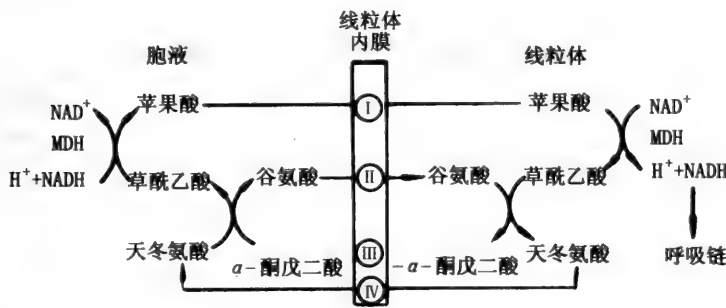


图 5-3 苹果酸-草酰乙酸循环

I ~ IV 为各种二羧酸转位酶,其中 I, IV 可相同, II, III 也可能相同

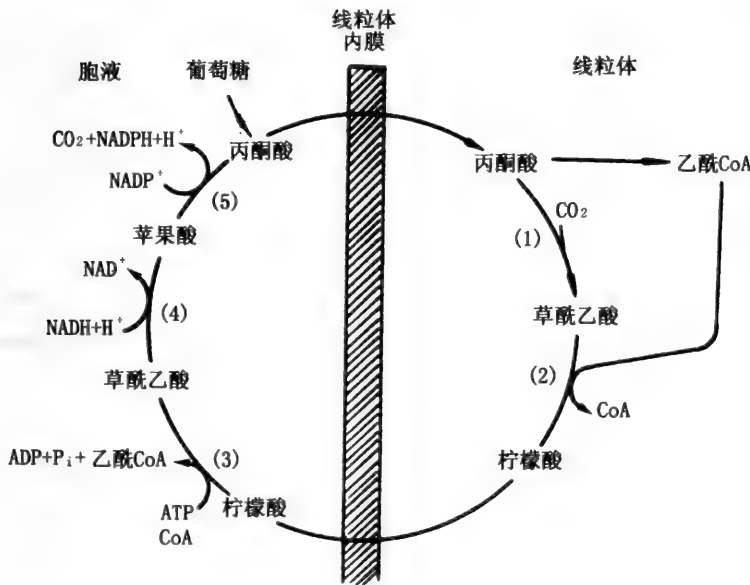


图 5-4 丙酮酸-苹果酸循环

(1) 丙酮酸羧化酶; (2) 柠檬酸合成酶; (3) ATP-柠檬酸裂合酶; (4) 苹果酸脱氢酶; (5) 苹果酸酶

与此相似,最近发现位于肌肉线粒体内膜的肌酸激酶(CK_m)主要使来自氧化磷酸化的 ATP 和肌酸作用生成 ADP 和磷酸肌酸。

(2) 在催化底物循环的酶系中,常有同工酶存在,如在糖酵解和糖异生通路上有三处底物循环:如图 5-5 所示:

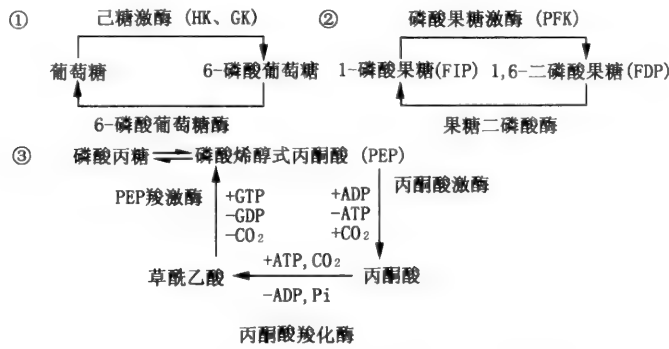


图 5-5 糖酵解和糖异生中的底物循环

其中第③个循环又称为丙酮酸羧化支路。三个循环涉及的七种酶中,已报道五种有同工酶(表 5-8),表 5-8 总结了三种糖酵解关键酶的分布。

表 5-8 三种糖酵解关键酶的同工酶在成年大鼠组织中的分布

组 织	己糖激酶 (HK)				磷酸果糖激酶 (PFK)				丙酮酸激酶 (PK)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	K	M	R	L
骨骼肌	+	+++	+		++					+++		
心肌	++	+++	+		++				+	++		
脑	+++	+	±		++	+			+	++		
脾	+++	+++	+++			+	++		++			
胃	0	0	0	0			++		++			
小肠	+++	+++	++	±			++		++			+
胸腺	+++	+++	++			+	++		++			
肺	+++	+++	+++			+	++		++			
肾脏	+++	+	++	±		++	+	±	++			+
肝脏	+++	+	++	+++			±	++	+			+++
睾丸	+++	+++	±			++	+		++			
红细胞	+++	+	±				±	++			++	
白细胞	0	0	0	0		+	++		++			
脂肪组织	+++	++	+		0	0	0	0	++			

+ 多少代表酶含量的高低

0 未见文献报导

由上可知,同工酶广泛参与代谢各过程,不同代谢途径的酶系都互相独立地催化一个单向的反应,而同一途径的酶分子又互相疏松地结合在一起形成所谓“多同工酶复合体”(polyisozyme complex),成为代谢途径中的催化单元。

5.4.3.3 代谢途径区域化的同工酶

代谢途径区域化是代谢机构的基本特征,有许多同工酶参与。从许多例子中可以看到,不论是动物还是植物,一种酶反应是由分隔于细胞质和各细胞器中的同工酶所催化的,有时这些同工酶有明显不同的性质,但对玉米来说,特异分布于细胞质、线粒体和乙醛酸循环体之中的几种苹果酸脱氢酶同工酶,却有着十分类似的动力学性质,从而认为这些同工酶的代谢意义在于它们的区域化。大概这些同工酶对特定的细胞成分各有其特异的结合位点,由这种结合位点把各同工酶分隔在特定的区域。把酶安放在特定位置这一事实本身就提供了选择优势。但是,未能实现对同工酶结合于细胞成分的这种选择性进行检验。即使对已知道全部结构的同工酶,也未能从其结构上识别出结合位点。总之,能够证明结合位点存在的直接证据还是很少的。

Ureta 曾列举了一大群同工酶,它们彼此除了电荷差异外,其它性质没有什么不同。当然,要是这些同工酶的存在并未授予有机体某些选择优势的话,那末就很难对它们的进化和特异的组织分布作出解释。在推测这些“沉默同工酶(silent isoenzymes)”的功能时,Ureta 提议,细胞质的代谢过程

要比近年来所设想的有更高的组织化。他认为每一个代谢途径都是由多酶复合体(multi-enzyme complex)来进行的。这些复合体的稳定性不同于已被我们完整分离出来、确证其存在的脂肪酸合成酶复合体。现在设想,糖酵解酶类所组成的复合物是一种松散的联合体,致使在匀浆和离心时这种复合物就解体了。据此又认为,代谢途径可以看作是由多同工酶复合物(polyisoenzymic complex)进行的一系列分开的单向顺序的组合。还具体地提出下列途径是由各个独立的复合体进行的:葡萄糖→糖原;糖原→葡萄糖;糖原→丙酰乙酸→葡萄糖;草酰乙酸→糖原等等。因此一种酶能同时有好几种反应顺序块中出现,并假定每一种复合体各有其特异的同工酶。言外之意,这些联合体是通过同工酶彼此间相配基团的亲和力集合而成,也就是说,集合取决于同工酶结合部位的特异性。有关同工酶缔合的特异性尚未经详细研究,如果 Ureta 的观点是正确的话,这种特异性必然存在,由此所得研究结果也将不会是人造的。

5.4.4 癌瘤状态下同工酶谱改变的生物学意义

癌瘤状态下酶谱的改变与其生长迅速的特点相适应。一些与核酸和蛋白质生物合成有关的“增殖性酶”的增高可以提供癌瘤增殖所需的细胞成分;一些糖代谢酶类活性的改变也为细胞增殖提供核糖等原料或能量(表 5-9)。同样,同工酶谱的改变也适应细胞增殖的需要。例如糖酵解酶系中,一引进胎型同工酶增高后,它们对底物的亲和力比成年型大得多,故可使糖酵解速度增加,有利于细胞增殖。同时,因分化型同工酶丧失,使脏器的一些特殊功能(如糖异生、鸟氨酸循环)降低。这样,在一定程度上也可将 ATP 节约下来,更多地用于增殖必需的蛋白质和核酸的生物合成。

表 5-9 与癌瘤恶性程度有关的酶谱变化

1. 核酸代谢	2. 糖代谢	3. 蛋白质和氨基酸代谢	4. 其它代谢方面
嘧啶、RNA、DNA 的合成增加:	葡萄糖分解代谢增加:	蛋白质合成增加:	膜 cAMP 代谢:
氨基甲酰磷酸合成酶-2	己糖激酶	氨基酸掺入蛋白质(丙氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、异亮氨酸、赖氨酸)	cAMP 磷酸二酯酶增加:
氨基甲酰转移酶	磷酸果糖激酶	微粒体以外的蛋白合成	腺苷酸环化酶:减少
二氢乳清酸酶	丙酮酸激酶	系统活性	多胺化合物的合成增加:
三磷酸胞苷合成酶	葡萄糖合成降低:	分解氨基酸的酶减少:	鸟氨酸脱羧酶
尿嘧啶核苷激酶	6-磷酸葡萄糖酶	谷氨酸脱氢酶	多胺化合物的合成降低:
核糖核苷酸脱氢酶	果糖二磷酸酶	谷氨酸草酰乙酸转氨酶	S-腺苷蛋氨酸合成酶
胸苷酸合成酶	烯醇式丙酮酸羧激酶	色氨酸吡咯酶	酮体利用增加:
脱氧胞苷酸脱氢酶	丙酮酸羧化酶	5-羟色胺脱氨酶	琥珀酰辅酶 A 乙酰乙酰辅酶 A 转移酶
胸腺嘧啶脱氧核苷酸酶	特异性磷酸化酶减少:	5-羟色胺脱羧酶	脂类代谢降低:
DNA 多聚酶	果糖激酶	尿素循环降低:	α -磷酸甘油脱氢酶
DNA 核苷酸转移酶	葡萄糖激酶	鸟氨酸转氨基甲酰基酶	β -羟 β -甲戊二酰辅酶 A 合成酶
tRNA 甲基化酶	果糖代谢降低:		
嘧啶分解代谢降低:	蔗糖激酶		
二氢尿嘧啶脱氢酶	醛缩酶		
嘌呤合成增加:	同工酶改变减少:		
次黄嘌呤核苷酸脱氢酶	米氏常数大的同工酶		
腺嘌呤核苷酸脱氢酶	同工酶改变增加:		
嘌呤分解代谢降低:	米氏常数小的同工酶		
腺嘌呤核苷酸激酶	5-磷酸核糖的利用增加:		
	磷酸核糖焦磷酸合成酶		

出现 Crabtree 效应(Crabtree effect)是癌瘤组织糖代谢最普遍最典型的特点之一,这在数十年前就由 Warburg 发现,但其确切机制尚未完全清楚。最近证明:癌瘤组织中丙酮酸激酶(PK)活力的增高及其同工酶谱由 L 型转变为 K 型,与 Crabtree 效应有密切关系。因为 PK 以 ADP 为底物,故糖酵解必需 ADP,而 ADP 也是线粒体中刺激细胞呼吸和氧化磷酸化的重要化合物,故胞液中的 PK 与线

粒体之间有竞争 ADP 的作用。实验证明:低分化肝癌组织液中的 PK 活性可较正常肝脏高很多倍,且同工酶谱由 L 型转变成 K 型,而 K 型对底物 ADP 及 PEP 的 K_m 较 L 型小得多,这就使肝癌液中的 PK 向线粒体争夺 ADP 的能力显著提高,使液中的糖酵解加速;同时使线粒体中的 ADP 明显减少,导致呼吸降低。这是造成癌瘤中出现 Crabtree 效应的重要机理。糖酵解中另一个可与线粒体争夺 ADP 的 3-磷酸甘油酸激酶,由于在肝癌时增高不多,且不是糖酵解的关键酶,故与 Crabtree 效应的关系较少。

5.4.5 发育与分化中的同工酶

发育是指在一稳定的遗传信息库中基因经选择性的表达,由单细胞受精卵产生一个复杂的成体的过程。这种过程的主要特征是组织分化,由此产生了许多细胞类型。每一类细胞都有其自己特异的体征和代谢特性,从而使成年机体具有既分工又统一的整体功能。很清楚,特异的基因表达产生了成体组织特异的同工酶谱,鉴于这类同工酶谱都是由单细胞阶段的一个前体酶谱产生的,因此一系列复杂的同工酶变化显然都是在发育中发生的。从同工酶学诞生的那天起,这些变化就一直引起发育生物学家们的浓厚兴趣。

5.4.5.1 同工酶与发育

作为特异基因产物的同工酶类是判别细胞类型的有效标志物,我们可按同工酶的分子组成来划分细胞。这种方法显然比只用形态学标准要准确得多。此外,在这方面用同工酶也比用其它基因产物具有更多优点,因为同工酶是以系列形式存在,能很方便地把一种同工酶作为评价它在另一场合下发生变化的对照。这一点特别重要,因为以发育过程中细胞蛋白质浓度升高是常有的事。但是常常发现,同工酶的比例变化比单种酶或蛋白质的绝对浓度的变化更能精确地反映发育变化。这是因为估价后一种变化的差别很大,其值甚至取决于用作比较依据的是干重、湿重、蛋白质含量,还是细胞数目。

发育上对同工酶发生兴趣,不仅是因为它们最后的组织分布是代谢分化的一项主要特征,也因为能在胚胎和婴儿生命各个时间辨别出容易消逝的同工酶谱,这对解释发育过程的这些阶段中特有的代谢问题是必不可少的。虽说发育同工酶学(developmental isozymology)比标志物描述性的研究是更难、更属推理性的研究领域,但它对阐明发育过程将会起重要作用。

5.4.5.2 个体发育时同工酶谱变化的类型

在个体发育时,不同的同工酶在同一种组织中可有不同的变化,而不同组织中同一种同工酶的变化也各不相同,现分别说明之。

(1) 不同组织的胎儿型同工酶相同,只有二种。如哺乳动物中不同胎儿组织的主要 PK 都是 K 型。在不少成年组织中,也仍以 K 型为唯一形式。在肾脏中,虽然 L 型在出生前后开始表达,但 K 型 PK 始终占绝对优势(90%或以上)。在肝脏中,出生前 2 天, K 型还略多于 L 型,但出生后 L 型逐渐增多,至成年期可至 85~90%左右。在骨骼肌、心肌及脑中,则胎儿期的 K 型随着分化发育而逐渐被 M 型取代(表 5-10),最后导致 PK 同工酶在成年组织中不同的分布。

表 5-10 大鼠发育过程中丙酮酸激酶同工酶谱的变化

	胎 鼠	新生鼠	成 年
肾	K	K(L)	K>L
肝	K>L, R ^②	L>K	L>K
骨骼肌	K	MK	M
心 脑	K	MK	M>K

①“()”表示可有可无,各家报道不同;

②在胎鼠肝中发现 R 型,可能与胎肝的造血功能有关

与此相似,大鼠胎儿期的肌酸激酶(CK)几乎全部是 BB 型,出生前才开始出现 M 亚基,成年后的大多组织,包括肝、肾、脑、小肠等仍保留 BB 型为唯一的 CK 同工酶,只有骨骼肌转变为全部是 MM 型,心肌和乳腺也以 MM 型为主。

(2) 不同组织有相同的胎儿型同工酶,但可有两种,在不同种属的动物中其主要胎儿型有所不同。如豚鼠和家兔的胚胎中 ALD 的 C 亚基可占总活性的 50% 以上;而田鼠或大鼠的胚胎组织中, A 亚基可逐渐取代早期的 C 亚基而成为主要的胎儿型同工酶。出生后,大多数种属 C 亚基的表达很快被阻遏,但 C 亚基仍是脑中同工酶的主要亚基,也是心肌、脾脏、性腺和红细胞中的次要成分。在成年动物中, A 亚基是多数组织的主要成分,但肝脏中 A 亚基的绝大部分被 B 亚基取代,以致 B 亚基占优势,肾脏中的 A 亚基也有部分被 B 亚基取代。因此,大鼠从胚胎到成年的发育过程,对肝、肾(可能还有小肠粘膜)说来,有一个 $C \rightarrow A \rightarrow B(A+B)$ 的演变过程。而其他组织则发生 $C \rightarrow A$ 的取代,有人报道,胎脑中以 A 亚基为主,故脑的发育可能有 $A \rightarrow CA$ 的演变。

(3) 不同组织中胎儿型与成年型同工酶互相变换。如大鼠谷氨酰胺酶有 L 型及 K 型之分,分别存在于成年肝脏和肾脏中,但胎肝中可有大量的 K 型,而胎肾中却有 50% 左右的 L 型。

(4) 同工酶没有胎儿型与成年型之分。在上述 1、2 两例情况中,有一个共同的特点,就是同工酶有特定的胎儿型及成年型,后者不会在较早的胎儿期出现,如 L 及 M 型 PK 和 B 型 ALD。但对 LDH 说来, A、B 两型亚基在受精卵着床后就始终同时存在,唯其比例在不同种属中有很大差异,人类以 B 型为主,鼠类以 A 型为主。一般在妊娠后期,酶谱发生剧烈变化并在不同组织中有不同的发展趋向,从而造成出生后各组织 LDH 同工酶谱的分化。肝脏和骨骼肌以 A 型占优势;而心肌、肾、脑则以 B 型为主。

有人用电泳测定了人类早期胎儿(胎长 10.5 厘米)中各组织的 LDH,发现都是 $LDH_3(A_2B_2)$ 最高,以后随着胎儿的长大和各脏器的分化成熟, A_2B_2 向不同的方向发展。在心、肾、大脑中逐渐变成 $LDH_1 > LDH_2 > LDH_3 > LDH_4 > LDH_5$, 肝脏和骨骼肌则相反,其他组织如卵巢、前列腺、胰腺等仍以 LDH_3 最多。

在成年动物的肝脏中,不少同工酶可由成年型置换胎儿期的胎儿型,除上述 PK、ALD 外,还有 GK 取代 HK,肝型糖原磷酸化酶取代胎儿型糖原磷酸化酶等。但也有一些同工酶仍保留其胎儿型为主,如 IV 型磷酸果糖激酶和 BB 型 CK,其他组织和肝脏相比,保留胎儿型同工酶较多。

参 考 文 献

- 1 Rider CC, Tayler CB. Isoenzymes. Outline studies in Biology. Chapman and Hall, 1980
- 2 陈惠黎,李文杰. 分子酶学. 北京:人民卫生出版社,1983
- 3 赖德、泰勒著,范培昌译. 同工酶. 北京:科学出版社,1987
- 4 Notstran B et al. in Isoenzymes, vol-1, Molecular structure (Markert CL et al.) New York: Academic press, 1975
- 5 Payue DM, Porter DW et al. Arch Biochem Biophys, 1972, 151:122 - 127
- 6 Vessel ES, in Isoenzymes, vol-2 (Markert CL et al), Academic press, New york, 1975
- 7 陈惠黎. 同工酶的分子生物学,国外医学分子生物学分册. 1981,4: 158

6 核 酶

50多年来,人们一直认为酶是蛋白质,然而近年来的实验表明,核酸分子也可以有酶活性,即RNA分子有酶活性,DNA分子也有酶活性。本章重点介绍核酶的发现、分类、功能及应用前景。

6.1 核酶的发现和类别

核酶(Ribozyme)主要指一类具有生物催化功能的RNA,亦称RNA催化剂。核酶的发现始于1981年,美国Colorado大学的Cech等人,在研究四膜虫rRNA时,首次发现rRNA中I型内含子具有自我剪接的功能。1983年Altman等人在研究细菌RNase P时发现,当约400nt的RNA分子单独存在时,也能完成切割rRNA前体的功能,证明此RNA分子具有全酶活性。后来到了1986年T·Cech又发现L-19 RNA在一定条件下能以高度专一性的方式去催化寡聚核苷酸底物的切割与连接。基于Cech和Altman的创造性工作,后来将这类具有酶的催化特性,本质上不是蛋白质而是核酸的分子定名为核酶。核酶的发现,从根本上改变了以往只有蛋白质才具有催化功能的概念,为此Cech和Altman也因此获得了1989年度的诺贝尔化学奖。

在自然界中现已发现多种核酶,尤其是植物病毒、拟病毒、卫星RNA,它们以滚动环方式进行复制,以RNA为模板首先合成一个长RNA转录物,所产生的单拷贝长度的RNA要经过一个自身切割的过程来完成,自我切割是这些RNA生命周期中一个不可缺少的环节。目前主要有四种核酶能用于反式切割靶RNA(图6-1):四膜虫自身剪接内含子、大肠杆菌RNase P、锤头状核酶和发夹状核酶。

但也有人提出异议,认为rRNA前体不是真正的生物催化剂。因为:(1)它只是自身催化,而不是催化其他分子间的反应;(2)催化剂在反应前后应无变化,而它变化了,在反应中释放出一段长413nt的IVS,其本身变成成熟后不具催化能力。但是,在没有任何蛋白质和ATP的情况下,rRNA前体的自我剪接成rRNA这个事实是不能否认的。经过十余年的努力,发现的核酶已有几十种,按其反应类别可分为催化分子内反应和催化分子间反应两大类。而催化分子内反应的核酶又可分为自我剪接(self-splicing)和自我剪切(self-cleavage)型核酶。

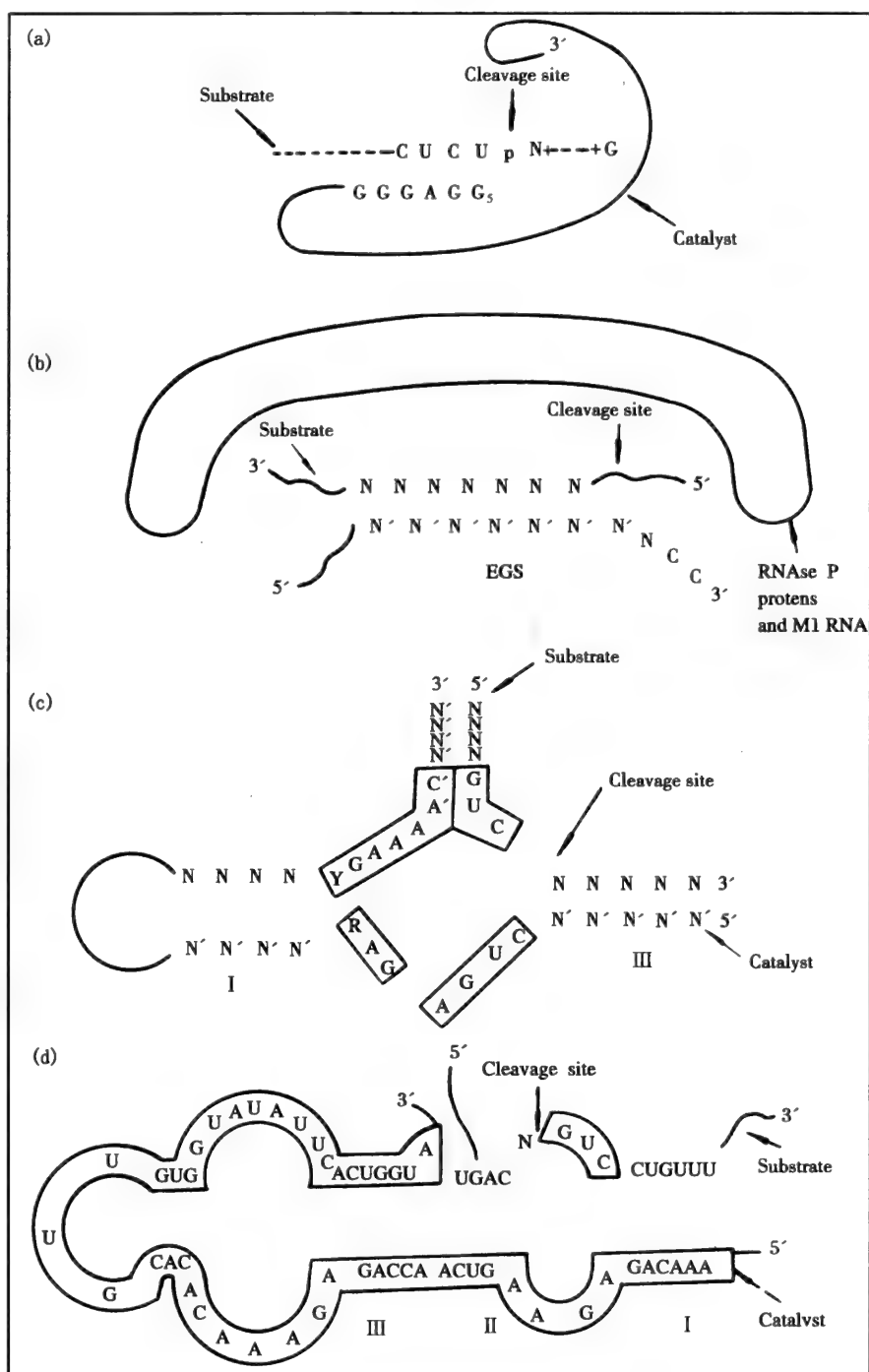


图 6-1 四种具催化切割功能的核酶

- (a) 四膜虫自身剪接内含子
- (b) 大肠杆菌的 RNase P
- (c) 锤头状核酶
- (d) 发夹状核酶

6.2 核酶的催化类型

6.2.1 I型内含子的自我剪接

Cech 小组在研究嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 26s rRNA 基因转录问题时,发现转录产物 (rRNA 前体) 很不稳定,几秒钟内即自动切除 413nt 的内含子 (intron) 片段 (即间插序列片段, in-

tervening Sequence IVS), 并产生成熟的 rRNA 分子, 这一过程是在没有任何蛋白质或酶的情况下进行的。rRNA 前体的自我剪接实验过程如下: rRNA 前体经纯化, 去蛋白质后与二价正离子 ($MgCl_2$) 和一个鸟苷因子一起保温, rRNA 前体就发生剪接, 反应特点是: $G-3'-OH$ 和 $U-3'-OH$ 向 IVS 剪接点进行亲核攻击, IVS 被准确地切开, 两段编码序列(外显子, exon)接在一起, 而 IVS 则共价环合。1986 年 Cech 等通过对 rRNA 前体自我剪接机制的深入研究, 发现图 6-2 和图 6-3 等一系列反应都是由 IVS 的特殊结构引起的。

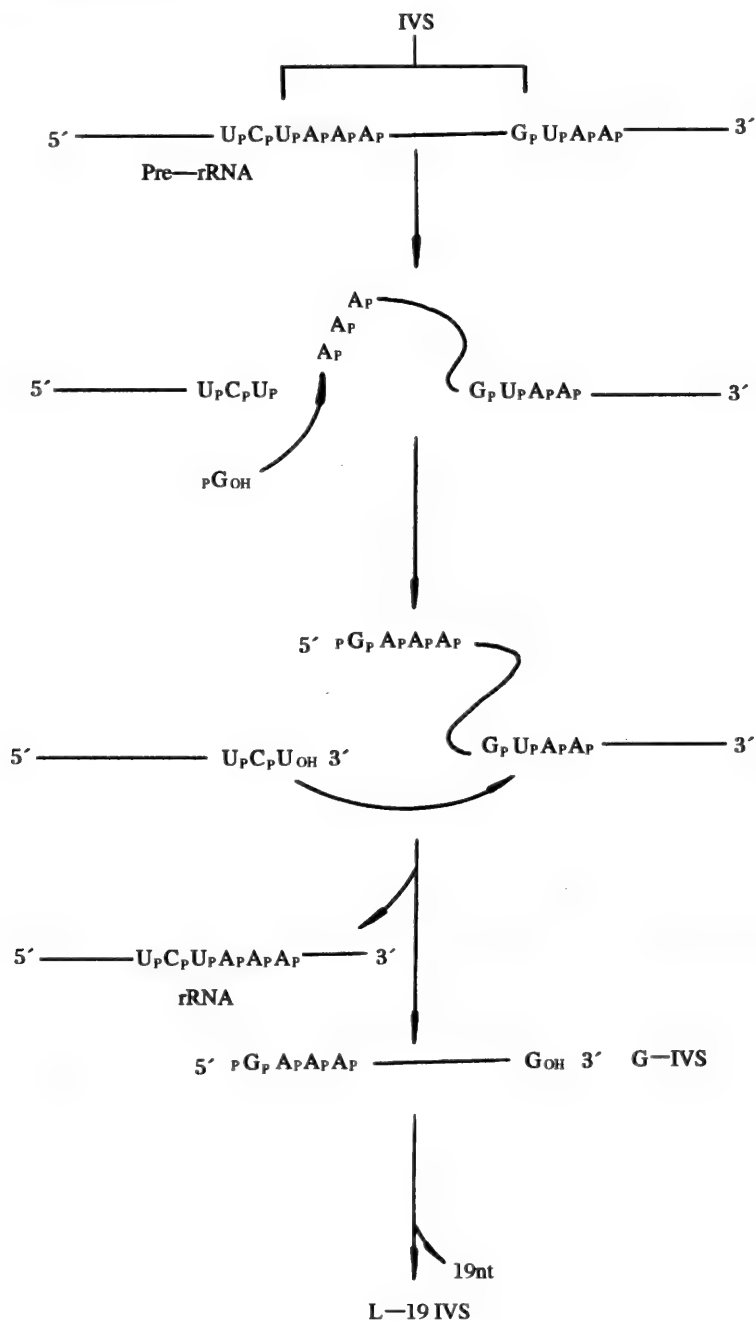
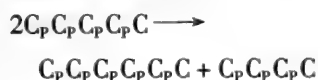


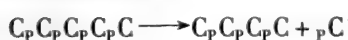
图 6-2 四膜虫 r-RNA 前体自我剪接反应

自我剪接反应释放出来的线性 IVS 可通过转磷酸酶反应而自身环化。虽然 IVS 本身缺少环化点不能再催化分子内反应,但它却能催化其他 RNA 分子发生的多种分子间反应:

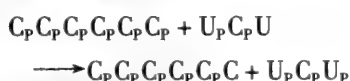
(1) 转核苷酸作用,



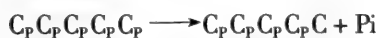
(2) 水解作用,如



(3) 转磷酸作用,如



(4) 去磷酸作用,如



(5) RNA 限制性内切酶作用,如



前四个作用相当于蛋白质催化剂的核苷酸转移酶、磷酸二酯酶、磷酸转移酶和磷酸酯酶,就是说 L-19 IVS 具有多种蛋白酶催化剂的功能。第五种作用是一个新发现,用天然或人工合成的 RNA 底物都能得到同样的结果。此 RNA 限制性内切酶性质与 DNA 限制性内切酶相似,只不过其底物是单链 RNA。

用点突变方法改变 L-19 IVS 催化中心 -GGAGGG- 序列制备出含 -GCAGGG-、-GGCGGG- 一序列的人工 RNA 催化剂。结果像预期的那样,它们分别限制性降解相应的底物(表 6-1)。这不仅证实 RNA 催化剂的活性部位及其底物专一性,而且可人工制造新的 RNA 催化剂,使之具有更广泛的应用前景。

L-19 IVS 不仅具有高度的底物专一性;而且也服从米氏动力学规律,对于 C₅ 底物,其 K_m 值为 42 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹, K_{cat} 值为 33 × 10⁻³ s⁻¹, K_{cat}/K_m 比为 10³ s⁻¹·mol⁻¹·L, 与 RNaseA 极相似;再者对竞争性抑制剂敏感,例如脱氧 C₅ 是其竞争性抑制剂, K_i 值为 260 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹。这些都是经典酶催化作用的特征。Cech 还比较了 RNA 和蛋白质的高级结构,从理论上说明 RNA 也可满足生物催化剂所必需的结构要求。

表 6-1 天然与人工 RNA 催化剂的底物专一性

RNA 催化剂 (线状 394nt RNA 的 22~27) 5'→3'	底物 I (5'→3')	II	产物 ^①
—GGAGGG—	GGCCUCUA ₅ (1)	G°	GGCCUCU + GA ₅
	GGCCUGUA ₅ (2)		-
	GGCCGCUA ₅ (3)		-
—G CAGGG—	(1)	G°	-
	(2)		GGCCUCU + GA ₅
	(3)		-
—GG CGGG—	(1)	G°	-
	(2)		-
	(3)		GGCCGCU + GA ₅

① 表示无降解产物。

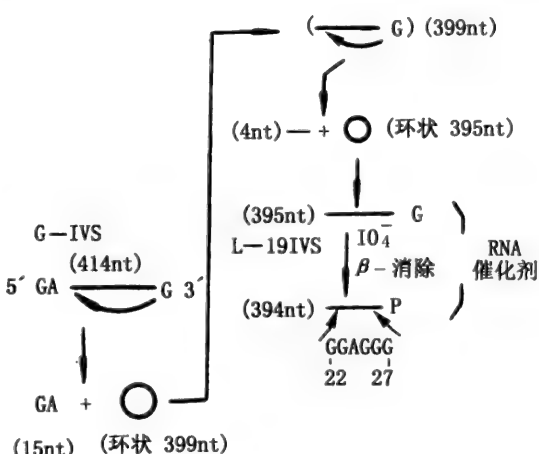


图 6-3 L-19 IVS(395nt)和 394nt RNA 的形成

6.2.2 异体催化剪切型

1983年 Altman 和 Pace 报道 RNase P 可催化 t-RNA 加工,单独 RNA 部分就可起催化作用。

tRNA 前体 $\xrightarrow{\text{RNase P}}$ 5'端成熟的 t-RNA
 证实了 RNA 具有分子间催化活性,这个 RNA 分子可以分离得到,也可在体外转录产生。

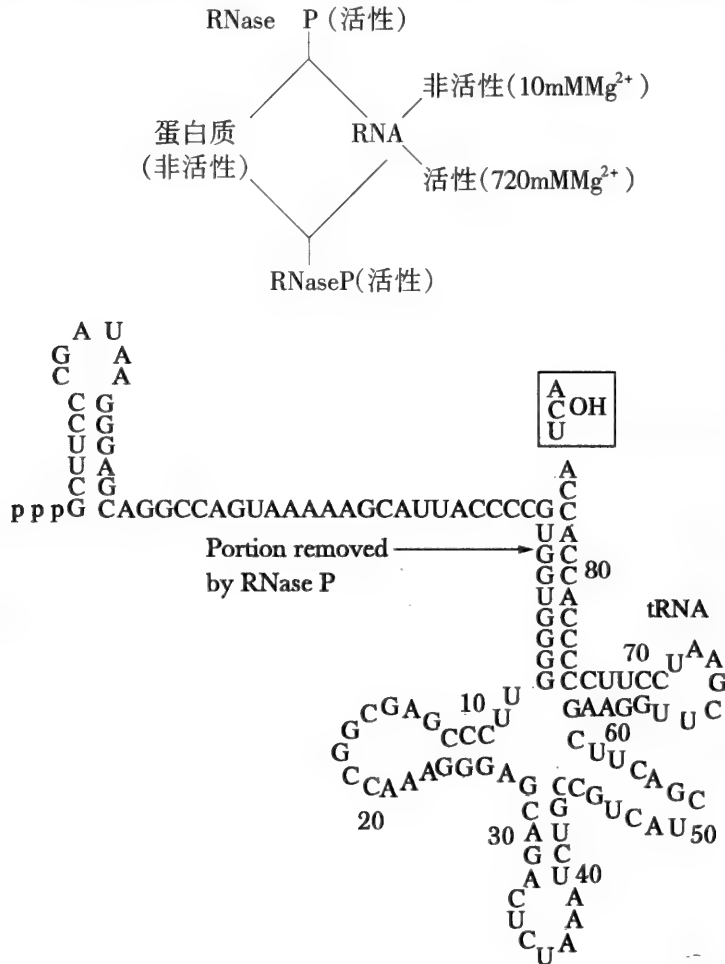


图 6-4 RNase P 对 tRNA 前体的剪切

RNase P 是个常见的酶,具有来自前 tRNA 的 5'端引导序列。RNase P 能有效地切割小 RNA 底物。原则上,只要具有 CCA 的反义 RNA 并能结合到靶 RNA,任何 RNA 都可以作为 RNase P 的底物。RNase P 是一种 5'端内切酶,负责 tRNA 前体 5'端的成熟。它对切点左侧寡核苷酸顺序和长度无严格要求,产物带 3'-OH 及 5'-磷酸末端。见图 6-4。

RNase P 于 1972 年在大肠杆菌首次发现。1978 年 S·Altman 发现纯 RNase P 的密度介于蛋白质和 RNA 间,进而证明该酶由 RNA(称为 RNase P-RNA)和蛋白质(称为 RNase P-蛋白质)两部分组成。

至今尚未测出真核生物 RNase P-RNA 具有催化活性。已进行过研究的真核生物材料有酵母、KB 细胞、家蚕丝腺体、鸡胚、小牛心、Hela 细胞等。真核生物 RNase P 反应所需的金属离子, pH 值以及抑制剂与大肠杆菌 RNase P 相似。同时,它们都能以大肠杆菌 tRNA 前体为底物,且切点也与大肠杆菌 RNase P 一致。这些真核生物 RNase P 一般也是由 RNA 和蛋白质两部分组成,但其 RNA 分子比原核生物 RNase P 中的要小。例如,原核生物,鼠伤寒沙门氏菌的 RNase P-RNA 长 375nt,大肠杆菌的长 377nt,枯草杆菌的长约 400nt;而真核生物,酵母 RNase P-RNA 长 250nt,哺乳

动物的可能更短。

根据对原核生物 RNase P-RNA 结构与功能的研究,成功地构建了一个比天然分子(345 ~ 417nt)小的具催化 tRNA 5'成熟功能的 Ribozyme (263nt)。

6.2.3 自体催化剪切型

自我剪切与自我剪接不同,后者包含剪切与连接两个步骤。1984 年美国 Apirion 研究组报道,一种 T₄ 噬菌体 RNA 前体在没有别的酶参与下能进行自我剪切,加入非离子型去垢剂可促进反应进行,将 215nt 的转录产物剪切成 139nt 的成熟 RNA 和另一 76nt 的片段。已知能进行自我剪切的 RNA 分子有丁型肝炎病毒(HDV)RNA、链孢霉线粒体 RNA、鳄梨日斑病类病毒(ASBV)RNA、烟草环斑病毒(STRSV)RNA 等。图 6-5 列出几种自我剪切的 RNA 结构,其中箭头指出处为自我剪切部位。

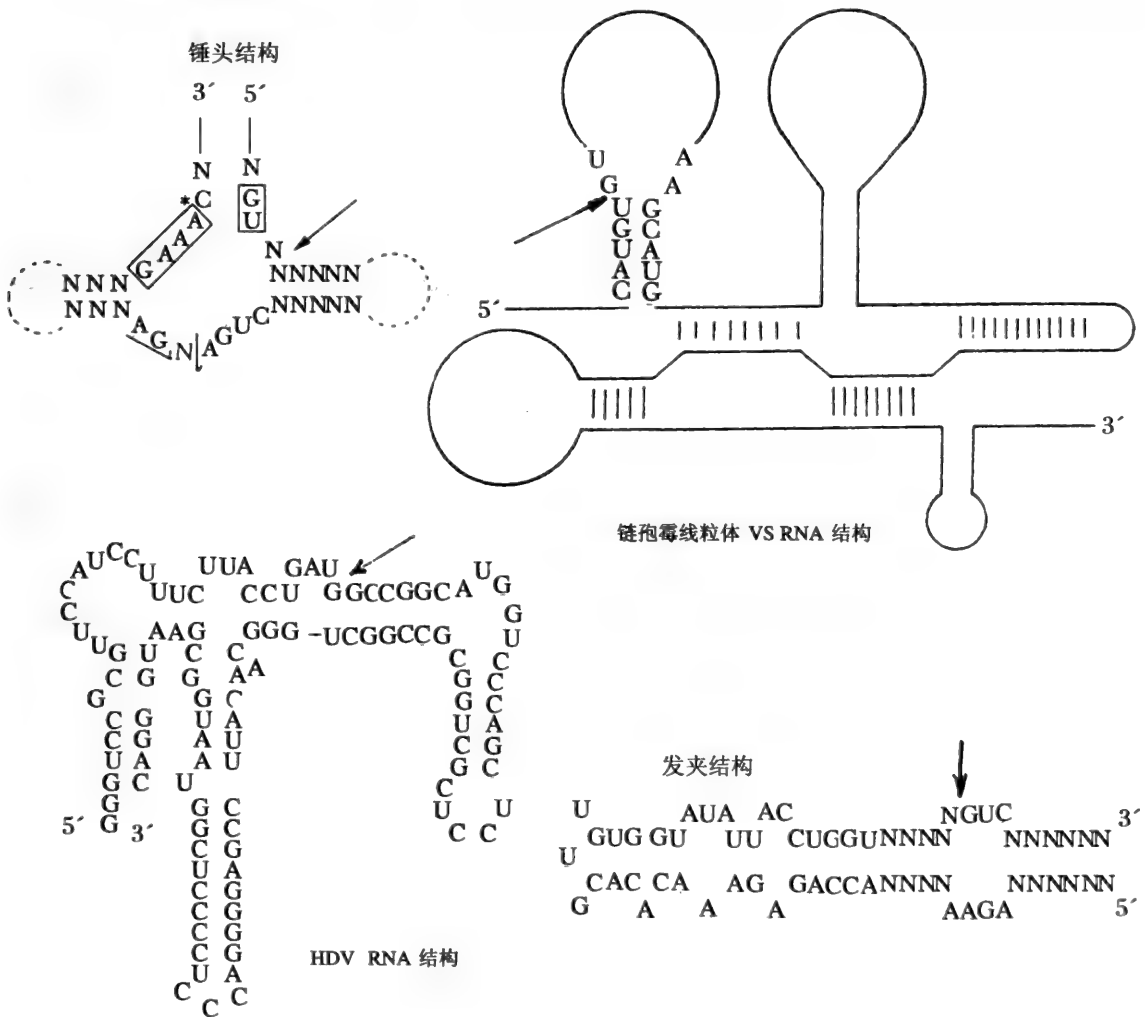


图 6-5 几种能进行自我剪切的 RNA 结构

6.2.3.1 类病毒的自我剪切

类病毒是目前已知的最小植物致病源。它由环状小分子 RNA(约 220 ~ 400nt)组成,由于基因组甚小,一般认为不编码任何蛋白质,它们的复制完全依赖于宿主。研究证明类病毒的复制是通过 RNA 到 RNA 的途径,其复制模式是一个滚环状模式,环状类病毒进入宿主细胞后,首先由正链类病毒为模板转录出多个单位长链锁体的负链复制中间物,这个负链中间物有两种可能的命运:一是负

链中间物先被剪切成单位长并连接成环状负链分子,然后以环状的负链为模板转录出多个单位长的正链复制中间物,后者再经过剪切和环化成为具感染性的类病毒分子;二是多个单位长的负链复制中间物不经剪切直接作为正链复制中间物的转录模板。

6.2.3.2 锤头二级结构模型

澳大利亚 Adelaide 大学的 Symons 实验室对许多类病毒、拟病毒、卫星 RNA 的自我剪切方式进行了多年的研究。他们于 1986 年提出锤头状二级结构模型来解释 RNA 的自我剪切机制。锤头结构由两部分组成,一个是催化部分,另一个为底物部分。根据两者在锤头结构中的相对位置,可以把各种天然和人工合成的锤头结构归纳为四种类型。最初提出的锤头结构中,有 13 个核苷酸是保守的。1989 年 Koizumi 等进一步证明,只要保证锤头结构中 11 个核苷酸的保守序列不变,剪切反应即可发生。

6.3 核酶的应用前景

核酶是近几年来继反义 RNA 后发现的又一个抑制基因表达的有力工具,具有很大的潜在应用价值。目前主要有以下几个方面的应用前景。

6.3.1 作为 RNA 限制性内切酶

核酶的切割反应具有特异性,它可以识别底物 RNA 的特定序列并在专一位点上进行切割,其特异性接近 DNA 限制性内切酶,高于 RNase。因此,可利用核酶的这种特性发展一套序列特异的 RNA 内切酶,应用于 RNA 分子生物学的研究。

6.3.2 作为抗病因子

分子生物学家已开始根据不同生物来源的靶 RNA 序列(只要含有 GUX,这里 X 可以是 G、U、A 中的任一个)作为底物设计不同的 Ribozyme,人工合成它们的序列,利用基因工程技术进行克隆,或用作目的基因转代到植物、动物和微生物中使其在体内表达,有效地抑制相应靶 RNA,从而达到抗病毒病和基因治疗的目的。

Haseloff 和 Gerlach 等人首次于 1988 年针对 CATmRNA 为靶分子,设计了三个不同的锤头型核酶分子,体外实验证明能高效地阻断 CAT 基因的表达。据此他们又提出了通用设计原则,这为利用核酶技术阻断靶基因表达打下了坚实的理论基础。随后分子生物学家根据不同生物来源的靶 RNA 序列,只要含有 NUX($N = A, U, C, G, X = A, U, C$)作底物就可以设计不同的锤头型核酶,人工合成全序列(约 30~50bp),利用基因工程技术进行克隆,或用作目的基因转化到植物、动物和微生物中使其在体内表达,有效地抑制相应靶 RNA 分子,达到抗病毒和基因治疗的目的。

Sarver 于 1990 年以人免疫缺陷病毒(HIV-1)的 gag RNA 为靶分子设计了定点切割的特异性核酶。在无细胞系统中发现转录的核酶能有效而精确地切割 HIV RNA,随后将该核酶基因构建在 5' 为人肌动蛋白启动子和 3' 为 SV40PolyA 的哺乳动物表达载体中,导入 HeLa CD₄ 细胞中,当用 HIV 病毒进行浸染时,转化的 HeLa CD₄ 细胞表现出抗 HIV-1 浸染的能力,PCR 法证明该核酶切割 gag RNA 的切点正确,经过 9 个月的观察,未发现有细胞毒性。Sarver 等的实验结果为艾滋病的治疗提供了新途径。另外,抗肝炎病毒的核酶和一些特异切割癌基因的核酶也正用于肝炎、肿瘤和器官移植后排斥反应等疾病的治疗。

6.3.3 生命起源的探索

多少年来人们一直在争论,自然界中先有核酸还是先有蛋白质?因此,发现与确认 RNA 具有酶活性对于人们关切的生物进化、生命起源等的研究有着重要启示;并且打开了一个新的研究领域。

综上所述核酶的发现,为用其他方法无法解决的问题如艾滋病的治疗提供了一个途径,此后的许多研究者都从这一途径得到了新的进展,这也为今后的研究开创了一个方向;又由于核酶分子很小,易于人工合成,操作方便,使得核酶应用前景很广。另外随着对酶在细胞内作用机理的深入研究还可进一步了解核酶在细胞内如何运输、降解、结合及寿命维持等有关情况,这都为更好地利用核酶提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 Kruger K, Grabowski PJ, Cech TR, et al. *Cell*. 1982, 31: 147 - 157
- 2 Guerrier TC, Pace N, Altman S, et al. *Cell*. 1983, 35: 849 - 857
- 3 Forster AC, Symon RH. *Cell*. 1987, 49: 211 - 220
- 4 Symon RH. *Annu Rev Biochem*. 1992, 61: 641 - 671
- 5 Rossi J. ed. *Current Opinion in Biotech*. 1992, 3: 3 - 7
- 6 邹国林,朱汝璠. 酶学. 武汉: 武汉大学出版社,1997
- 7 沈喜同等. DNA 也有酶活性. *生命化学*, 1996, 16(5): 1 - 3
- 8 康良仪. 一种有广泛应用前景的“分子剪”——核酶催化剂. *高技术新技术农业应用研究*. 北京: 中国科学技术出版社,1991, 255 - 229
- 9 Sullenger BA, Cech TR. *Science* 1993, 262: 1566 - 1569
- 10 Nakamaye KL, Eckstein F. *Biochem* 1994, 33: 1271 - 1277
- 11 Noller HF et al. *Science*. 1992, 256: 1416 - 1419
- 12 Pan T, Unlenbeck OC. *Nature*, 1992, 358: 560 - 563
- 13 Piceirilli JA et al. *Science*, 1992, 356: 1420 - 1424
- 14 Dai XC et al. *Science*, 1995, 267: 237 - 240
- 15 Zhang B et al. *Nature*, 1997, 390: 96 - 100

7 抗体酶

在 Ribozyme 发现五年后,1986年,美国《Science》周刊同时发表了两篇来自 Lerner 和 Schultz 分别领导的两个研究组有关如何发现具有酶催化性质的抗体研究报告。他们用 Abzyme 来命名新发现的具有酶催化活性的抗体,中文译名为抗体酶。Abzyme 的本质为免疫球蛋白(Ig),但是在易变区被赋予了酶的属性,所以又被称为催化抗体(Catalytic antibody)。抗体是目前已知的最大多样性体系,原始大家族有 1×10^8 结合部位,体细胞变异还可以增加 1×10^4 的结合部位。抗体有极高的亲和力,解离常数在 $10^{-4} \sim 10^{-14}$ mol/L,这与酶相似,但无催化活力。酶的催化在于能结合底物产生过渡态,降低能障。人们设想以过渡态类似物作为半抗原,诱导与其互补构象的抗体,使其具有催化活性,这种构思是成功的,近年来在哺乳动物的免疫系统中已制备了 50 多种催化抗体。抗体酶的应用前景十分诱人,在理论上它不仅是研究酶作用机理的有力手段,同时也为过渡态理论提供依据。

7.1 酶作用的过渡态及过渡态类似物

Pauling 认为,酶通过某种方式与高能、短寿命的过渡态结合而起催化作用。在这个处于反应底物和产物之间的过渡态构型中,某些键在形成,另一些键在断裂。1969年, Jencks 进一步发展了 Pauling 的理论,他认为,在结构和电荷排列两方面,酶分子与它催化反应的过渡态呈互补,即酶分子充当化学反应的模板,使底物分子转变成新的构型——过渡态。随着反应的进行,能量平衡转向有利于能量较低的产物分子一边。而过渡态不会回到底物分子。到达过渡态的过程实际是反应的困难阶段。

Pauling 在提出酶催化的过渡态结构理论的同时,就已指出酶和抗体的根本不同在于前者选择性地结合一个化学反应的过渡态,而抗体则是结合一个基态分子。Jencks 预言,如果抗体能够结合过渡态的话,理论上它们就能获得催化性质。由于 ES^* (过渡态中间物)的半衰期很短,约在 $10^{-10} \sim 10^{-12}$ 秒的范围内,实践中很难将过渡态俘获,因此,目前的做法是寻找过渡态类似物,能够模拟一个酶催化反应过渡态的结构稳定物质被称为过渡态类似物。它能与相应的酶紧密结合而成为该酶的竞争性抑制剂。现在已有数十种酶发现了过渡态类似物,例如腺苷酸激酶的过渡态类似物为 A_pA ,醛缩酶的过渡态类似物为磷酸乙醇酸等。它们与酶的结合比底物还要牢固 3~5 个数量级,这说明它们在结构上比底物更接近在反应过程中生成的过渡态中间物。

7.2 抗体酶的催化反应

迄今为止,获得的抗体酶已能成功地催化六种类型的酶促反应和几十种类型的化学反应。这些抗体酶的催化专一性相当于或超过一般酶的反应专一性,催化速度有的也可以达到酶的催化水平,但总的来说,由于抗体与底物结合后缺乏结构的动态变化,阻碍了产物的释放。所以,目前抗体酶的催化效率还普遍低于天然酶。下面简单介绍一些抗体酶催化的反应。

7.2.1 酰基转移反应

生物体内蛋白质合成是一个复杂过程。氨基酸在掺入肽链之前必须进行活化以获得额外能量,这活化过程即酰基转移反应(Acyltransferation),又称氨酰基化反应(Aminoacylation)。1986年,Tramonatano等研制成功首例酰基转移抗体酶。目前,该抗体酶的研制已接近实用阶段。Jacolson等设计了一个中性磷酸二酯作为反应过渡态的稳定类似物,得到的单克隆抗体可以催化带丙氨酰的胸腺嘧啶的氨酰化反应,反应速度为 $5.4 \times 10^4 (\text{mol/L}) \cdot \text{min}^{-1}$,比无催化反应的速度提高了 10^8 倍,见图7-1。

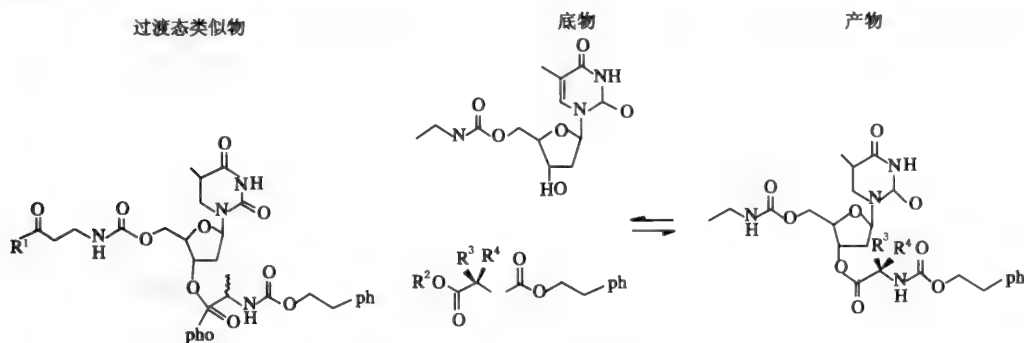


图7-1 氨酰化反应

7.2.2 重排反应

Claisen重排是有机化合物异构化的一种重要形式,生物体由一些化合物在光照下会发生Claisen重排。Hilvert等选用的是一个有椅式构象的氧氮杂双环化合物来模拟由分枝酸生成预苯酸这样一个Claisen重排反应的过渡态结构,见图7-2。实验获得成功,反应速度加快了 $10^3 \sim 10^4$ 倍。这是首次用抗体酶催化了C—C键的生成。

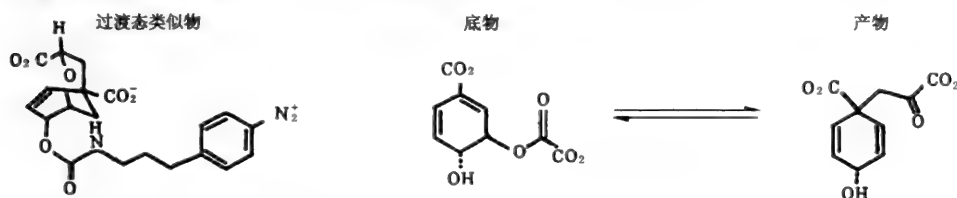


图7-2 Claisen重排反应

7.2.3 氧化还原反应

氧化反应在生物体内十分广泛,主要是呼吸链的一系列反应。Shokat制得了对氧化态 $K_m = 8 \text{mmol/L}$,对还原态 $K_m = 300 \text{nmol/L}$ 的抗体,使标准电位变为 -340mv 。由于黄素还原态的还原范围扩大,使一些原来无法按其还原的物质(标准还原电位差大于无抗体酶催化的黄素标准还原电位差)得以还原。这意味着抗体酶可以使热力学上原来无法进行的氧化还原反应得以进行,如图7-3所示。

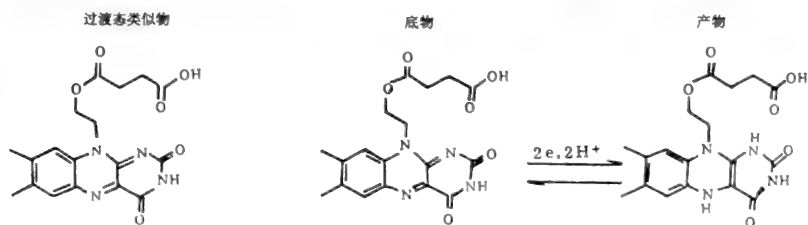


图7-3 氧化-还原反应(Redox)

7.2.4 金属螯合反应

金属螯合反应对于辅酶、辅因子和酶的结合来说意义重大。Schultz PG 等用 G-甲基卟啉诱导产生的抗体可催化平面状卟啉的金属螯合反应,见图 7-4。这抗体不仅可催化 Cu^{2+} , Zn^{2+} 和卟啉的螯合,还可催化 CO^{2+} , Mn^{2+} 和卟啉的螯合。实验表明,该抗体酶对其中某些金属卟啉具有很高的亲和力。意味着可研制抗体-血红素复合物为催化剂催化氧还反应,电子传递反应,见图 7-4。

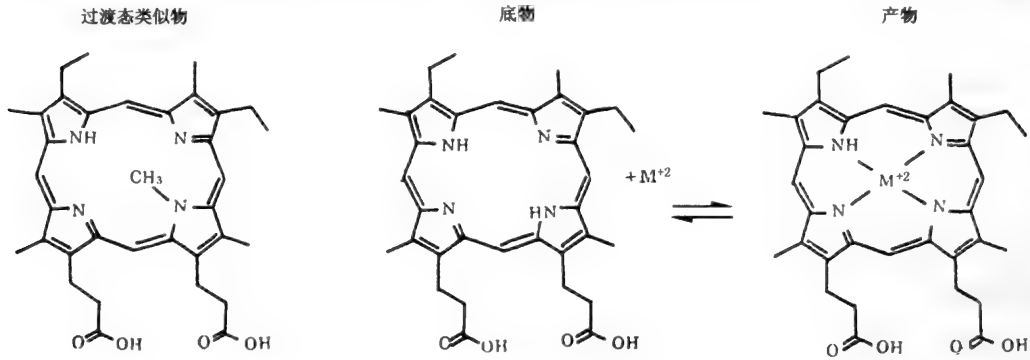


图 7-4 金属螯合反应

7.2.5 磷酸酯水解反应

磷酸二酯键是自然界最稳定的键之一,因此,它的水解对抗体酶来说是个挑战。Janda 等利用稳定的五配位氧代铼络合物 A 模拟 RNA 水解时形成的环形氧代正磷中间物,产生了一种单抗 G12,可以催化水解磷二酯,见图 7-5。催化速度常数 (K_{cat}) = $1.53 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 米氏常数 (K_m) = $240 \mu\text{mol/L}$ 。

过渡态类似物

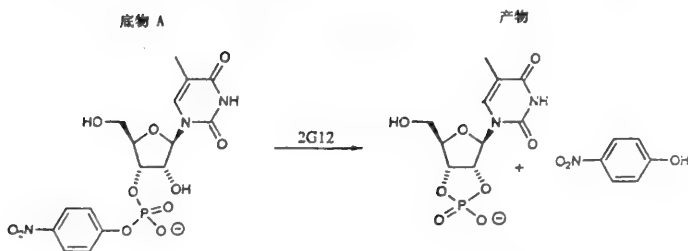
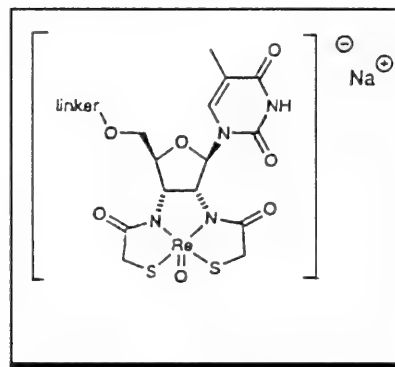


图 7-5 磷酸酯水解反应

7.2.6 磺酸酯闭环反应

Lemer 等人用脒基离子化合物作半抗原,产生的抗体酶(17G8)可催化 B 转化为 C 和 D 混合物,见图 7-6。

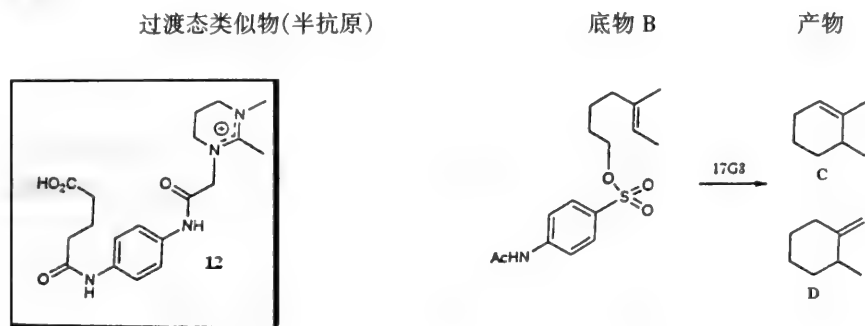
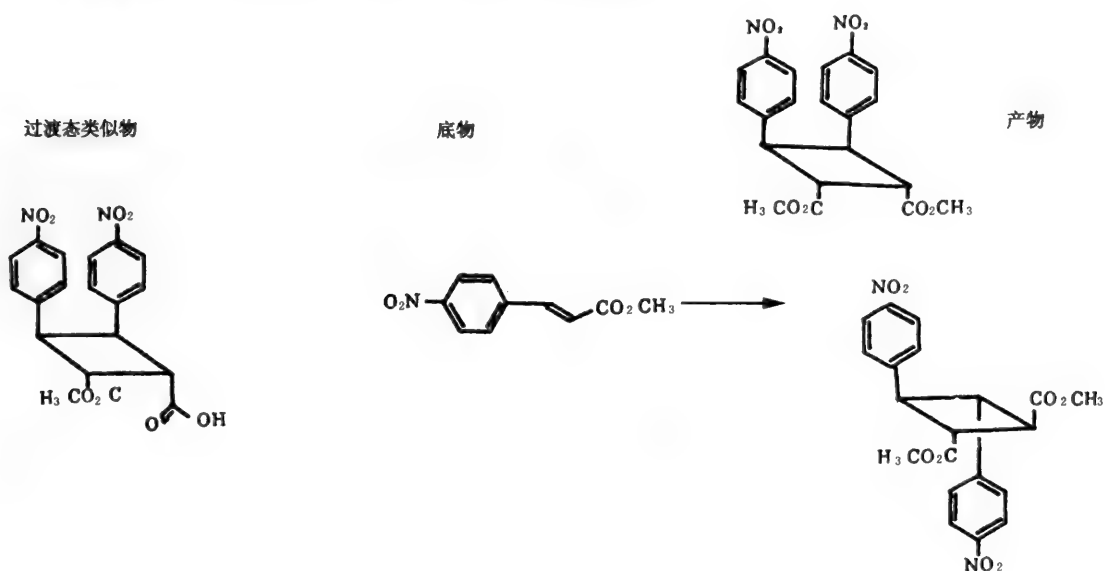


图 7-6 磺酸酯闭环反应

7.2.7 光诱导反应

光诱导反应包括光聚合反应和光裂解反应,这两类反应在植物体内尤为重要,见图 7-7。图 7-7A 为光聚合反应,图 7-7B 为光裂解反应。

A 光聚合反应(二聚作用)(Photo-induced dimerization)



B 光裂解反应(Photo-induced cleavage)



图 7-7 光诱导反应

7.3 抗体酶的制备方法

制备抗体酶的方法很多,如拷贝法、引入法、诱导法、化学修饰法和基因工程法等,这里重点介绍前三种。

7.3.1 拷贝法

拷贝法操作步骤比较简单,见图 7-8。先用已知酶作为抗原免疫动物,获得了抗酶的抗体,再将这种抗体免疫动物进行单克隆化即获得了单克隆的抗抗体,将后者进行筛选,应获得具有原酶活性的抗体(抗体酶)。

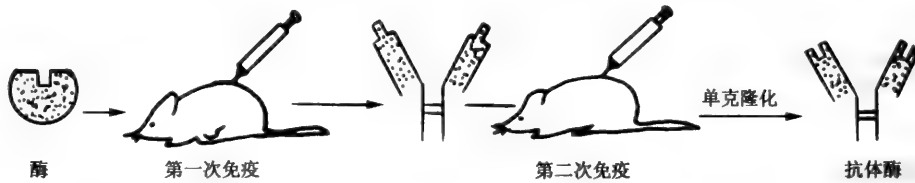


图 7-8 拷贝法示意图

拷贝法的优点是对于某些来源紧张的酶来说可以用生产单克隆抗体的方法来大量生产,不足之处是这类抗体酶需要筛选获得,具有一定的盲目性。

7.3.2 引入法

借助于基因工程和蛋白质工程方法将催化基因引入到已有底物结合能力的抗体的抗原结合位点上。具体的方法可以采用寡核苷酸定点诱变技术将特定的氨基酸残基引入抗原结合部位,使其获得催化功能。也可以采用选择性化学修饰的方法将人工合成的或天然存在的催化基因引入到抗原结合部位。如果引入的催化基因与底物结合部位取向正确、空间排布恰到好处,则就会产生高活性的抗体酶。引入催化基因的方法有:(1) 利用部位选择性试剂,用类似亲和标记的方法定向地将催化基因引入抗体;(2) 用 DNA 重组技术和蛋白质工程技术改变抗体的亲和性和专一性,引入酸、碱催化基团或亲核体。使用这类方法的关键在于要事先对抗体的结构有所了解,确定工程化抗体的目标部位。

Schultz PG 等人使用可裂解亲和标记物 (cleavable affinity label) 将含巯基的柄状亲核基团引入到抗 2,4-二硝基苯酚 (DNP) 的单抗 MOPC 315 的抗原结合位点。得到的抗体

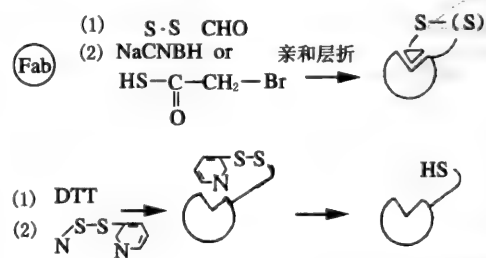


图 7-9 Schultz 小组用引入法制备抗体酶示意图

酶对含有 DNP 与香豆素的羧酸酯的水解反应的催化效率比二硫苏糖醇 (DTT) 高 6×10^4 倍,见图 7-9。

7.3.3 诱导法

即用设计好的半抗原,通过间隔链 (space) 与载体蛋白 (如牛血清白蛋白等) 偶联制成抗原,然后采用标准的单克隆技术制备、分离、筛选抗体酶。实际上,利用过渡态类似物制备抗体酶(图 7-10),其过渡态是很不稳定的。一般反应的过渡态还只是一种理论推测,并未在结构上予以阐明。因此,实际上采用的过渡态类似物(半抗原)也只能是根据推测而设计的。



图 7-10 利用过渡态类似物制备抗体酶示意图

Hilvert D 等人选用一个椅式构象的氧杂双环化合物作为由分枝酸(chorismic acid)生成预苯酸(prephenic acid)的过渡态类似物,诱导的抗体酶比原反应速度加快 $10^2 \sim 10^4$ 倍。而且还观察到新抗体酶表现出高度的立体异构专一性,它只催化(-)-分枝酸为底物的反应,对(+)-分枝酸无作用,见图 7-11。

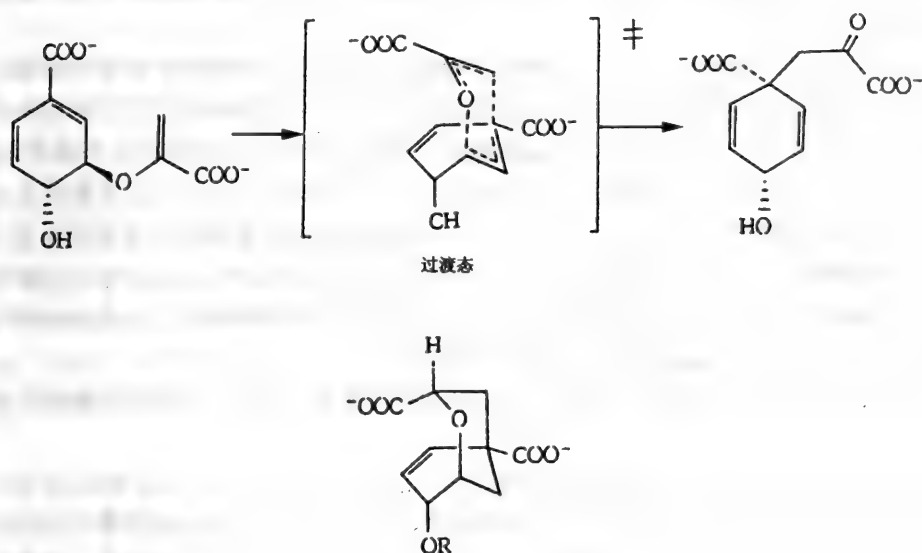


图 7-11 由分枝酸生成预苯酸的反应机理

前已提及,诱导法的关键在于过渡态类似物的正确设计。一般认为酯水解反应的过渡态是带电的四面体结构,因而可选用具有四面体结构的带电磷酸酯作为过渡态类似物。图 7-12 给出了他们使用过渡态类似物与过渡态间的关系。

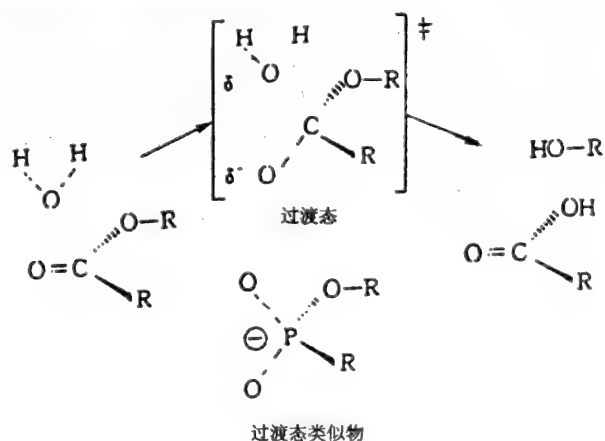


图 7-12 羧酸酯水解反应机理

7.4 发展前景

抗体酶的实践已清楚表明,它是研究酶作用机理的有力工具。在抗体酶获得成功之前,支持 Pauling 的过渡理论的证据主要来自酶抑制剂的研究。抑制剂只能提供作用过程中结合专一性的信息,不能给出结合后发生催化反应以及结合与催化之间的关系。在抗体酶的研究过程中,可以直接观察到过渡态理论设计抗体酶起到的作用,这也就为酶的过渡态理论的正确性提供了一个有力的实验证据。

除了基础理论研究的价值外,抗体酶的应用前景也令人鼓舞。Lerner 指出,如将催化水解反应的抗体酶研究深入下去,极有可能得到一种新型的蛋白酶。这种新酶就能按照人们的意愿对特定的肽键进行水解。在医学上可利用抗体酶专一破坏病毒蛋白质及专一地清除体内“垃圾”。Lerner 还提到将具有立体专一性的抗体酶应用于制药工业是很有前途的,它有助于避免化学合成中遇到的令人头痛的对映体拆分的难题。

随着制备抗体酶新方法的不断发展,将进一步拓宽其催化反应范围。特别是对那些天然酶不能催化的反应,则可研制抗体酶来进行催化。这些抗体酶在医学上可用于诊断和治疗,如利用抗体酶基因来治疗遗传性疾病。在有机合成中,可用抗体酶解决外消旋混合物的对映体拆分等难题,这在药物、精细化工产品等生产中将发挥重要作用。抗体酶的固定化已取得初步成功,具有酯解活力的抗体酶已用于生物传感器的制造上。我们还可以设计专一性很强的多肽水解酶去破坏病毒蛋白或清除血管凝血块。抗体酶亦可用于可卡因吸毒患者的治疗,癌症药物的治疗以减少化疗的副作用。立体专一性的抗体酶用于制药工业的对映体拆分,改进合成步骤,抗体酶催化已从酰基转移反应,协同反应发展到光化学反应,氧化还原反应及交换合成反应。

尽管抗体酶研究取得很大进展,但离开实际应用还有一定的距离,目前以下几个问题亟待解决。

(1) 催化效率。抗体酶是不对称合成的理想催化剂,其催化反应的范围十分广泛,而且还在不断扩大,然而,催化抗体现在还未达到实用阶段。对实用来说,来源,费用和可靠性都是要考虑的因素,但能否实用的关键因素是催化效率;反应的时间是否合理,反应的收率是否可以接受。与酶的催化速度相比,目前所得到的大部分催化抗体的反应速度加强只能是中等水平的,其 $K_{cat}/K_{m,cat}$ 为 10^3-4 ,个别可达到 10^6-7 ,比酶催化低 2—3 个数量级。因此,如何提高抗体酶的催化效率,抗体酶将来能否与酶竞争是个公开挑战。

(2) 抗体酶筛选。虽然用 PCR 和噬菌体技术构建的庞大的 Fab 蛋白组合库,可绕过动物免疫,直接从库中筛选有用抗体,从而大大促进抗体酶生产,但面对巨大的免疫系统资源,目前的筛选方法只能筛选其中的一小部分抗体。一般是通过对半抗原结合力的大小来筛选的,而不是通过催化活性来筛选。问题是对半抗原的亲合力最大,不一定是最好的催化抗体。有人在制备含硒抗体酶时就遇到这个问题。如筛选半抗原亲合力小的抗体,其谷胱甘肽过氧化物酶活力反而高很多。因此,这是对开发通过催化活性直接筛选抗体酶的又一个挑战,但可以满怀信心地说,这个问题是能够解决的,正在开发的 catELISA 法就强调了这个问题。

(3) 抗体酶专一性。从经济观点出发,和酶催化一样,抗体酶的高度专一性是个缺点,因为对每一个底物和每一个反应都需要不同的催化剂。因此,开发能催化多种底物的抗体显然是应用研究的追求目标。这种多用途催化抗体已出现。Lerner 小组原来设计的水解四氢吡喃乙缩醛的抗体 14D9,后来发现还能催化烯醇醚水解,环氧化物的形成和开环。

(4) 底物抑制。与过渡态最相近的两个稳定的结构是反应物和产物。结合基态过紧,由于提高了反应活化能而使催化效率降低,以产物结合过紧张则抑制转化数。后一问题对键形成反应特别严重:因为两个强束缚结构间键的形成会加强二者的结合(螯合效应)。最好的解决办法是建立的半抗原在结构上要与产物有显著差异。

(5) 催化基团的最适装配。很多化学转化需要酸、碱或亲核基团参与,这类催化残基对需能反应特别重要。现在还不能通过免疫精确地使这些基团在抗体中精确定位。Schultz 小组利用抗体和半抗原间的电荷互补性,在抗体结合部位上诱导出一个具有催化活性的羧基。然而,这种方法是否具有普遍性,通过这种方法能否把 2~3 个这类基团引入抗体还有待证实,因此,表征对更有意义、更困难的化学转化具有中等以上活力的抗体是严峻挑战。

最后,抗体酶是抗体与酶结合的产物,它的发展有赖于抗体与酶的结构的深入研究,特别是对酶作用机制的深入研究。而目前,人们对抗体、尤其对酶的认识还很肤浅,因此必要的基础理论研究还须跟上。

参 考 文 献

- 1 Hilvert D. Catalytic antibodies: Perspectives and Prospects, In: Chemical Aspects of Enzyme Biotechnology, ed., New York: Plenum press, 1990, P 111 ~ 118
- 2 Wirsehing P et al. Reactive Immunization. Science, 1995, 270: 1775
- 3 Lerner RA. ACTa Chen Scand. 1996, 50: 672 ~ 678
- 4 Janda KD. Science 1997, 275: 945 ~ 948
- 5 Hasserodt J, Levner RA et al. L Am Chem Soc, 1996, 118: 1154 ~ 1155
- 6 Charbonnier JP et al. Science, 1997, 275: 1140 ~ 1142
- 7 Shokat KN et al. Nature, 1989, 338: 269 ~ 171
- 8 Baldwin E, Schultz PG. Science, 1989, 245: 1104 ~ 1107
- 9 高翔. 抗体酶的研究进展. 生命的化学, 1994 14(1): 6 ~ 9
- 10 罗贵民. 催化抗体研究进展及展望. 全国酶工程会议论文集. 杭州. 1999, 34 ~ 41
- 11 邹国林, 朱汝璠. 酶. 武汉: 武汉大学出版社, 1997 302 ~ 308

8 模拟酶

模拟酶(enzyme mimics)又称人工合成酶(synzymes)是一类利用有机化学方法合成的比天然酶简单的非蛋白质分子。模拟酶在结构上必须具有两个特殊部位,即一个是底物结合位点,一个是催化位点。业已发现,构成底物结合位点比较容易,而构建催化位点比较困难,但两个位点可以分开设计。

在模拟酶方面,固氮酶的模拟最令人瞩目。人们从天然固氮酶由铁蛋白和铁钼蛋白两种组分得到启发,提出了多种固氮酶模型,如过渡金属(铁、钴、镍等)的氮络合物、过渡金属(钒、钛等)的氮氧化物以及过渡金属的氨基酸络合物等。此外,利用铜、锌、铁、钴等金属络合物模拟过氧化氢酶和超氧化物歧化酶等。胰凝乳蛋白酶的模拟是一个比较成功的例子,鉴于该酶的活性中心有羧基、咪唑基和羟基组成的电荷中继网络作为催化位点,模拟酶用 β -环糊精组成基本骨架,用以“固定”底物,并在环糊精上引入邻-硫代咪唑代苯甲酸的侧链,大大提高了催化效率。谷胱甘肽过氧化物酶(GP_x)是一种含硒的金属酶,国内有人合成了谷氨酰 γ -丝氨酰-甘氨酸三肽,再经苯甲基磺酰氟和硒化氢(H₂Se)相继作用,制备了Glu-Selcys-Gly三肽,发现此三肽有GP_x的活力。近年来,国际上又开发出一种分子压印(molecular imprinting)技术或生物压印(bioimprinting)技术。该技术可以借助于模板在聚合物物质上形成特异的识别位点和催化位点,其原理与抗体酶的制备大致相同,只是用人工高聚物代替抗体,如以对硝基酚乙酸酯水解反应的过渡态类似物对硝基酚甲基磷酸酯为模板,可以获得咪唑基的聚合物,催化对硝基酚乙酸酯的水解反应。分子压印技术,可用于合成稳定性好的人工酶,也可用于手性药物及化合物的分离纯化及生物分子的识别检测,并可作为生物传感器检测的分子识别元件。

酶的模拟工作可分为三个层次:一是合成有类似活性的简单络合物,这类模拟酶的作用机理与酶不完全相同,且在反应效率和专性性方面远不及天然酶;二是酶的活性中心模拟,这是人工合成具有一定专一性和反应效率的络合物;三是酶的整体模拟,这是高级模拟,包括微环境在内的整个活性部位的化学模拟。下面以环糊精、冠醚化合物为例介绍几种酶的模拟研究。

8.1 环糊精模拟酶

环糊精(Cyclodextrin, CD)早在1891年就发现,但长期来由于化学反应被认为仅发生于分子间的碰撞而没有引起人们的重视。近年来,随着对环糊精性质研究的深入,发现其有独特的包络作用即包络多种有机和无机分子,故环糊精可作为酶的模型,模拟多种天然酶。目前已模拟的有 α -胰凝乳蛋白酶、核糖核酸酶、转氨酶及氧化还原酶等。

环糊精的分子形状如轮胎,它是由几个D(+)葡萄糖残基,通过 α -1,4糖苷键连接而成,聚合度分别为6,7或8个葡萄糖,依次称为 α -、 β -及 γ -环糊精。每个葡萄糖残基均处于无扭变形的椅式构象,如图8-1所示。

三种环状糊精的结构相似,但性质存在差别,其水溶解度、穴洞大小,列于表8-1。

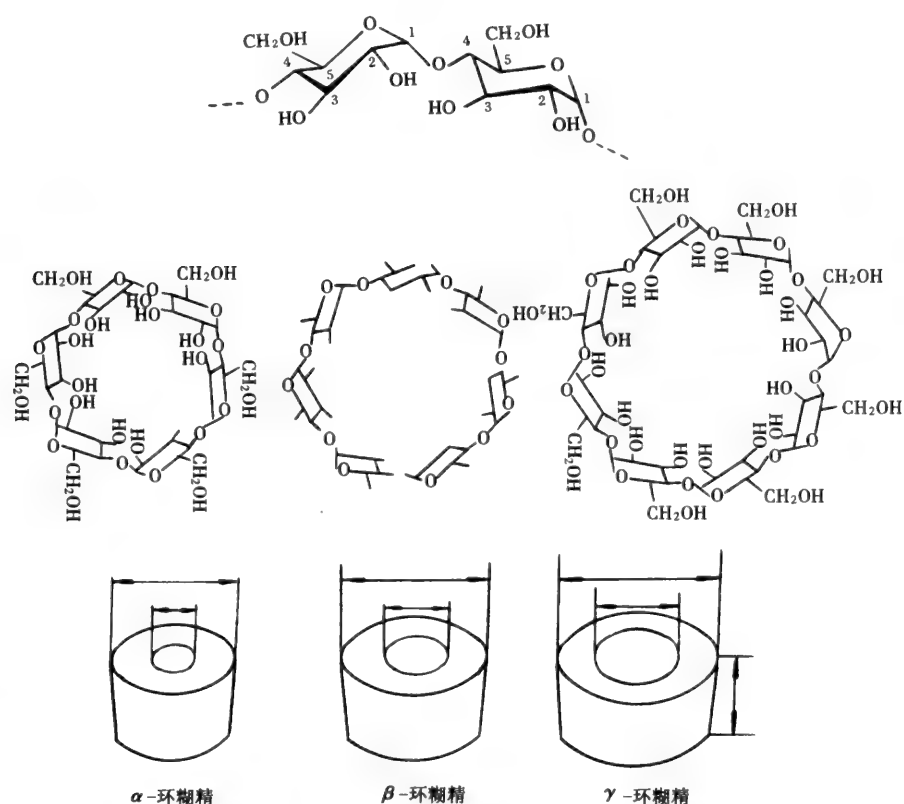


图 8-1 环糊精的分子结构

三种环状糊精均为白色结晶粉末， β -糊精的水溶解度最低，易于在溶液中液结晶，提纯。水溶解度随温度上升而增高。在有机溶液中，如甲醇、乙醇、丙醇、乙醚等环状糊精不溶解。结晶无一定熔点，加热到约 200℃ 开始分解。

表 8-1 环状糊精性质

环 状 糊 精	α -环糊精	β -环糊精	γ -环糊精
葡萄糖单位数	6	7	8
分子量	972	1135	1297
结晶形状(由水结晶)	六角片	单斜晶	方片或长方柱
结晶水份(%)	10.2	13.2~14.5	8.13~17.7
比旋度($[\alpha]_D^{25}$ 水)	+150.5±0.5	+162.0±0.5	+177.4±0.5
水溶解度(g/100ml, 25℃)	14.5	1.85	23.2
穴洞			
内径(m)	$5 \sim 6 \times 10^{-10}$	$7 \sim 8 \times 10^{-10}$	$9 \sim 10 \times 10^{-10}$
高度(m)	$7.9 \pm 0.1 \times 10^{-10}$	$7.9 \pm 0.1 \times 10^{-10}$	$7.9 \pm 0.1 \times 10^{-10}$
体积(大致 m^3)	174×10^{-10}	262×10^{-10}	472×10^{-10}
体积(ml/mol)	104	157	256
体积(ml/g)	0.1	0.14	0.20
外边直径(m)	$14.6 \pm 0.4 \times 10^{-10}$	$15.4 \pm 0.4 \times 10^{-10}$	$17.8 \pm 0.4 \times 10^{-10}$

加有机溶剂能助长 β -环状糊精从水溶液中结晶出来，曾试验过 30 多种有机溶剂，其中二甲苯的效果最好，结晶母液中剩余糊精浓度最低，0.04mg/ml。但如果生成稳定乳化液，过滤困难。甲苯

的效果也很好,不生成乳化液,工业生产常用甲苯为络合剂,从发酵液中结晶 β -环状糊精。

环状糊精没有尾端基,化学和酶反应性质与开链糊精有根本性的差别。没有还原端,不具还原性质。也没有非还原端,有的淀粉酶不能水解。例如 β -淀粉酶属于外酶,水解方式是由开链糊精分子非还原端开始,但却不能水解环状糊精。 α -淀粉酶的各种醇羟基都位于穴洞外面上边缘,如图8-2所表示,所以外边缘具有亲水性或极性。洞穴内壁为氢原子和糖甙键氧原子,具有疏水性或非极性。

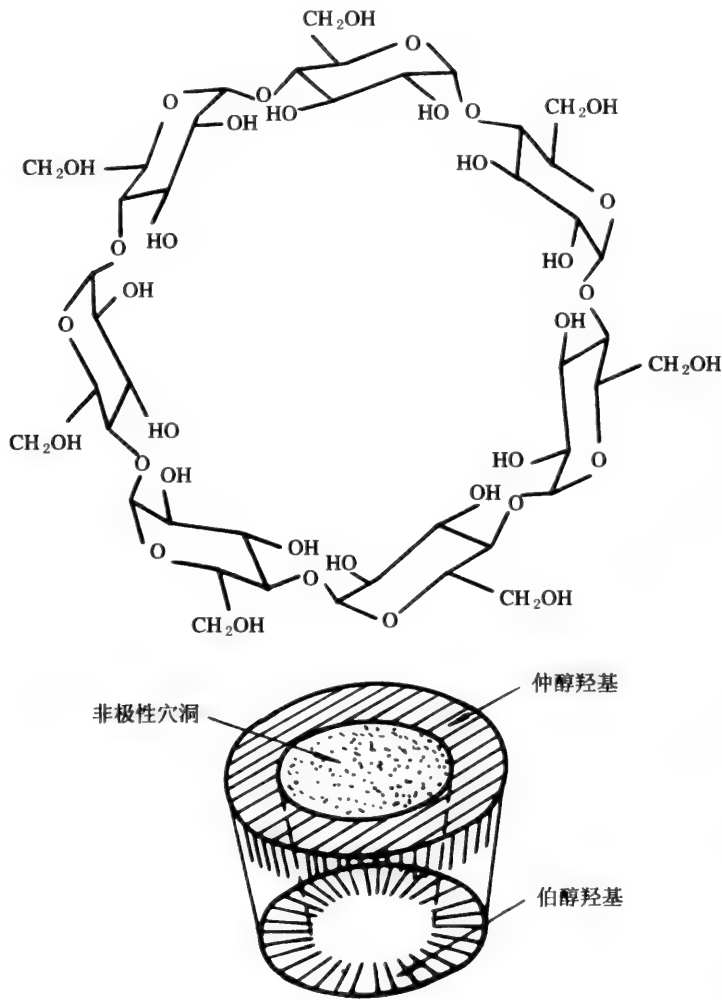


图8-2 环状糊精分子穴洞

环状糊精穴洞外边具有亲水性,内壁具有疏水性,与表面活性剂性质相似,对于水和油类物有乳化作用,实际为好乳化剂,应用于食品工业是稳定性高的乳化物。

化合物分子大小适当,能被环状糊精穴洞包埋在内,得络合物。较大分子不能被全部包埋在洞内,分子的一部分在洞内,其余部分在洞外。这种反应称为包接反应,所得产物称为包接络合物,这是环状糊精的最重要功能。水溶液中结晶出来的环状糊精晶体,其穴洞并不是空的,而是被水分子占据着。但因为水分子为极性物,洞内壁为非极性,因此极性和非极性物之间有一定的排斥作用。水分子在穴洞的占据是欠稳定的,易被极性较水低的分子所取代。

8.1.1 α -胰凝乳蛋白酶的模拟

Bender 等人合成了一个具有 α -胰凝乳蛋白酶所有特征的模拟酶,见图8-3。该模型利用 β -环糊精作为酶的结合部位,而连在其侧链上的羧基、咪唑基及环糊精本身的一个羟基共同构成催化

中心(电荷中继网系),由此实现胰凝乳蛋白酶的全模拟。模拟酶与天然酶的比较见表 8-2。

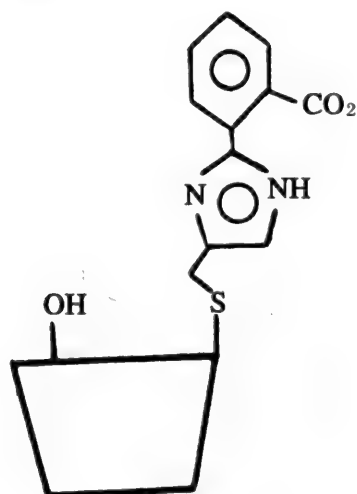


图 8-3 α -胰凝乳蛋白酶的模拟物

从表 8-2 可以看出,天然与模拟的胰凝乳蛋白酶的催化能力虽相近,但从反应速度模拟的要比天然的快。Bendel 等人后来又合成了 α -和 γ -环糊精为结合部位的胰凝乳蛋白酶模拟酶,这三种酶具有不同的底物选择性。

表 8-2 天然和模拟胰凝乳蛋白酶催化酯水解时的活性比较

酶	底物	pH	K_{cat} ($\times 10^{-2} s^{-1}$)	K_m ($\times 10^{-5} mol/L$)
天然胰凝乳蛋白酶	乙酸p-硝基苯酯	8.0	1.1	4.0
胰凝乳蛋白酶模拟酶	乙酸m-叔丁基苯酯	10.7	2.8	13.3

8.1.2 核糖核酸酶的模拟

核糖核酸酶催化 RNA 中磷酸二酯键的水解断裂。Breslow 等人设计合成了两种修饰环糊精 A 和 B,见图 8-4。用它催化环状磷酸二酯的水解。

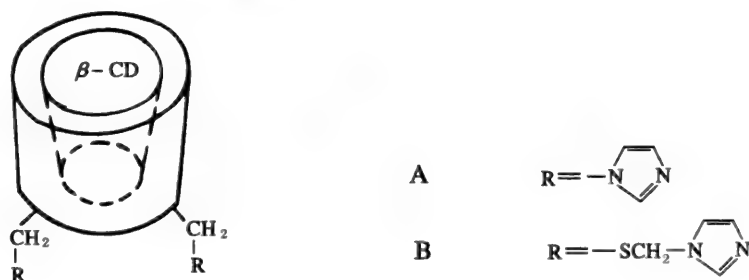


图 8-4 修饰环糊精

当环状磷酸二酯在碱性条件下水解时,同时产生两种产物 C 和 D,而在 A 的催化下水解反应只生成 C,B 催化时水解反应只生成 D,见图 8-5。

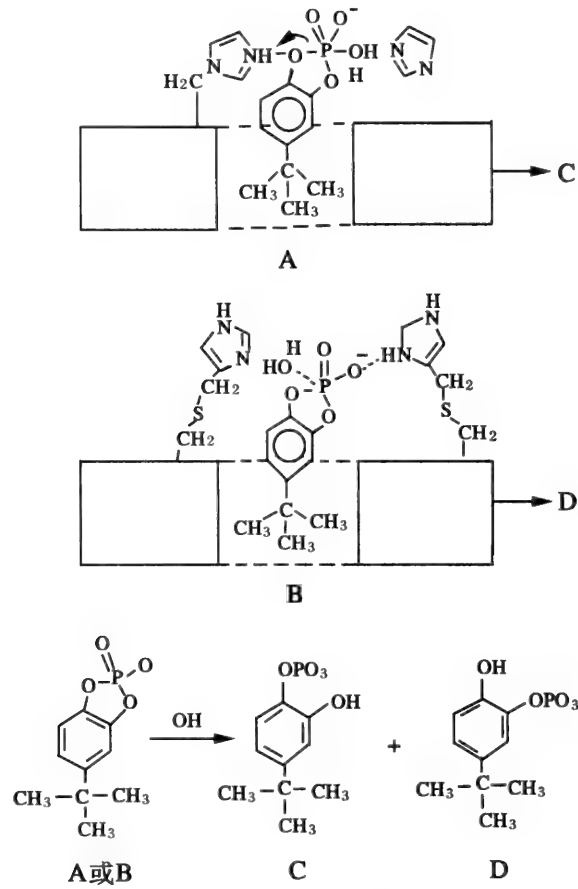


图 8-5 水解反应

8.1.3 转氨酶的模拟

磷酸吡哆醛及磷酸吡哆胺是转氨酶的辅酶。其中最重要的反应是酮酸与氨基酸间的转换,转氨反应的机理见图 8-6。

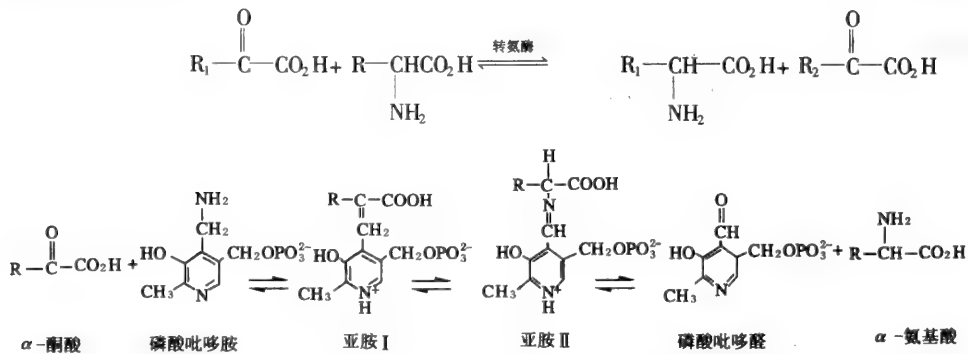


图 8-6 转氨反应机理

模拟研究表明,在没有酶存在的情况下,磷酸吡哆醛(胺)亦能实现这种转氨作用,但反应速度极慢,且反应无任何选择性。原因在于辅酶本身无结合部位,即不能形成酶-底物络合物,而后者往往是酶反应必不可少的环节。第一个模拟转氨酶模型是1980年报道的,磷酸吡哆胺连在β-环糊精的b-c原子上,见图

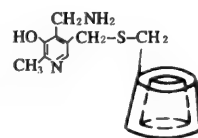


图 8-7 模拟转氨酶模型

8-7。在此模拟酶存在的情况下,其转氨反应比磷酸吡哆胺单独存在时约快 200 倍。

由于 β -环糊精本身具有手征性,可以预料产物氨基酸亦应该具有光学活性,事实上产物中 L-和 D-氨基酸的含量确实不同。模拟酶的不足之处在于它不像真正的转氨酶那样除了辅酶部分外还具有其他催化基团,见图 8-8。这种模型化合物的最大优点是具有良好的立体选择性。

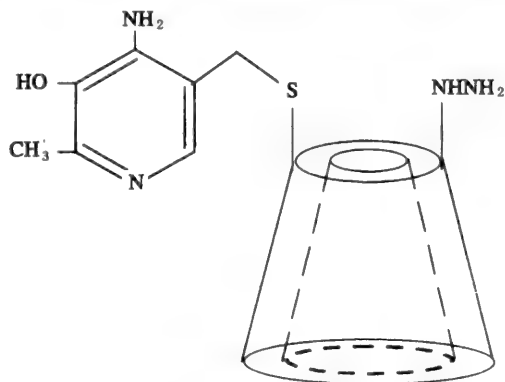


图 8-8 环糊精模拟化合物

8.2 冠醚化合物的模拟酶

1967 年 C.J. Pederson 首次合成冠醚(二苯并-18-冠-6),并报道了这类化合物具有和金属离子、铵离子及有机伯铵离子形成稳定的络合物的独特性质。随后人们合成了各种各样具有不同络合性能的所谓“主体分子”,并提出“主客体络合物化学”的新概念。主体-客体之间的这种非共价络合作用是生物过程中酶-底物、抗原-抗体、激素-受体等许多手性识别的基础,因而近年来这一领域的研究愈来愈引起化学家们的兴趣和关注。若通过巧妙的设计,将一些具有催化活性的基团连接在主体分子上,就能很好地模拟酶的作用。研究还表明,手性冠醚主体分子在络合氨基酸酯时,对客体分子的对映体具有很高的选择性,这种手性识别为模拟酶的活性部位提供了一个良好的基础。

8.2.1 水解酶的模拟

Matsui 设计合成了含冠醚环和 SH 基的主体分子 A, B, C, 分子中的冠醚环为结合部位,含醚侧臂或亚甲基为立体识别部位,侧臂末端为催化部位,见图 8-9。

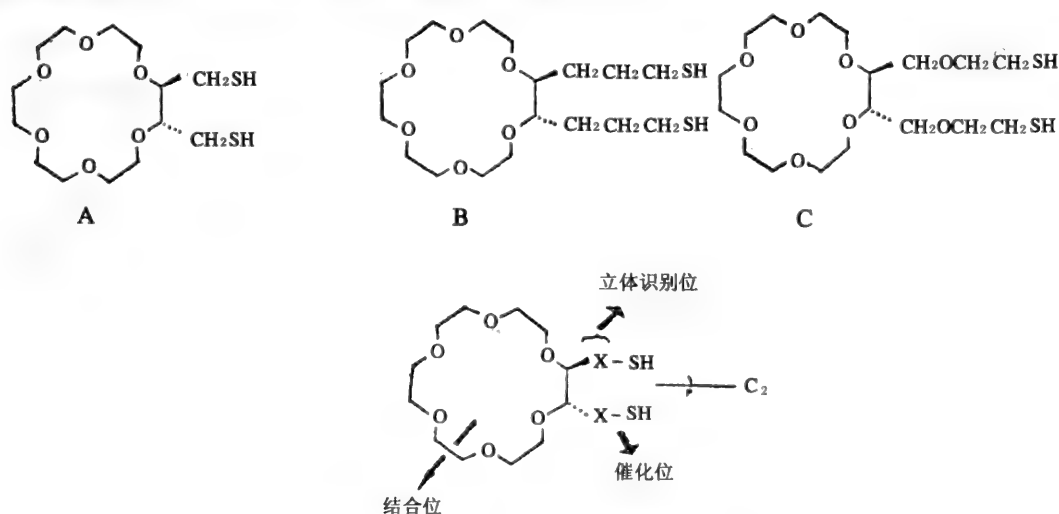


图 8-9 冠醚水解酶模拟物

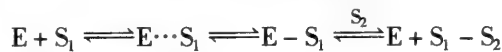
表 8-3 氨基酸对-硝基苯酯释放对-硝基苯酚的速率常数 $k(10^{-3}\text{秒}^{-1})$

酯	冠 醚					
	无	18-冠-6	18-冠-6 + BuSH	A	B	C
$\text{Br}^- \text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOC}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ (1)	3	0.9	1	1700	50	2500
$\text{Br}^- \text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOC}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ (2) CH ₃	5	5	4	6	4	37
$\text{Br}^- \text{H}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_2-\text{COOC}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ (3)	<0.1	<0.05	<0.05	<0.4	7	2
$\text{Br}^- \text{H}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3-\text{COOC}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ (4)	310	1	0.9	6	42	41
$\text{Br}^- \text{H}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_3-\text{COOC}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ (5)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 8-3 所列数据表明,在 A, B, C 存在时,各种氨基酸的盐与冠醚环结合,使在 -SH 附近底物有较高的浓度。 α -氨基酸酯盐的催化速度格外高,由于底物分子中的羰基与催化基 -SH 紧靠在一起,使反应加速。侧臂长的 C 比 B 的催化能力大,可能在铵盐阳离子和醚氧原子间附加的极-偶极(pole-dipole)作用和氢键作用,使侧臂被固定在适宜反应的构象上。

8.2.2 肽合成酶的模拟

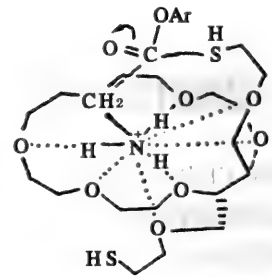
生物体内,肽合成第一步由氨基酸 t-RNA 连接酶(或称氨基酸活化酶)催化,再由转肽酶催化肽链延长。Sasaki 等合成了含 SH 基团冠醚化合物 D,见图 8-10。D 模拟酶催化双分子反应,由非共价络合物($\text{E}\cdots\text{S}_1$)形成共价中间体($\text{E}-\text{S}_1$),然后与第二底物反应,得到产物(S_1-S_2)。反应过程可用下式表示:



Sasaki 等人还合成了冠醚化合物 E。模拟酶 E 的冠醚环内结合进质子化的 α -氨基酸对硝基苯酯分子,形成非共价络合物,由于 -SH 基的进攻,催化水解释放出对硝基酚,生成双硫酯。此时可以假定两个底物分子被放到很接近的位置,发生分子内催化反应,酰基转移形成肽键,再生出 -SH 基,重复以上反应可以延长肽链。这种含有一个结合部位和两个反应部位的冠醚化合物,可以看作是一个肽合成酶模型(图 8-11)。

8.3 超氧化物歧化酶(SOD)的模拟

既然 SOD 活性与金属离子有关,配位化学家主张,用合成方法,将小分子化合物与 Cu^{2+} , Mn^{3+} 或 Fe^{3+} 配位,制成模拟 SOD。采用模拟 SOD 可以研究金属离子催化 O_2^- 歧化为 O_2 与 H_2O_2 的作用机理,并有可能作为药物应用于临床,因此近 20 年来对模拟 SOD 进行了较多研究,其中尤其是模拟 Cu, Zn-SOD 与模拟 Mn-SOD。



D
图 8-10 肽合成酶模拟物

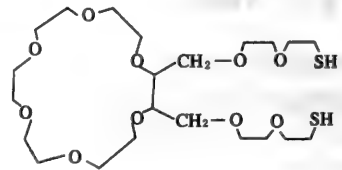


图 8-11 肽合成酶模拟

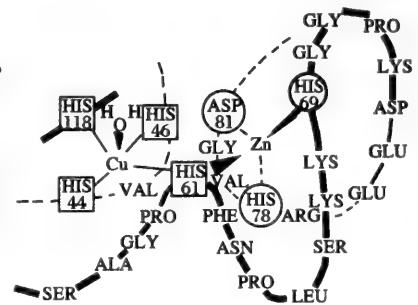


图 8-12 CuZn-SOD 活性中心结构

X-射线单晶结构分析表明 Cu, ZnSOD 的活性部位包含一个咪唑桥联的 Cu(II), Zn(II) 结构, Cu(II) 与 1 个水分子和 4 个来自组氨酸残基(His - 44, - 46, - 61, 和 - 118)的咪唑氮配位, 呈现三角双锥畸变的四方锥构型, 其中一个咪唑基(His - 61)的氮原子与 Zn(II) 桥联, 另外两个咪唑的氮原子(His - 69, - 78)和一个天冬氨酸残基的羧氧(Asp - 81)配位, 呈畸变四面体构型(图 8 - 12)。Cu(II) 是氧化还原的活性中心, Zn(II) 只起着稳定蛋白质构象的作用。

8.3.1 CuZn - SOD 活性中心的模拟

由于 Cu(II), Zn(II) 离子的动力学活性和与咪唑基三者之间酸碱度不匹配等问题, 在合成过程中, 必需选择适当的配体以抑制 Cu(II) 和 Zn(II) 的水解, 增大配位咪唑质子的离解和减少 Cu(II) 和 Zn(II) 的动力学活性, 故合成咪唑桥联的 Cu(II), Zn(II) 异双核配合物十分困难, 直到 20 世纪 90 年代才获得了第一个咪唑桥联的 Cu(II), Zn(II) 配合物的晶体结构, 即 $[(\text{tren})\text{Cu}(\text{im})\text{Zn}(\text{tren})](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (tren: 三(2-氨基乙基胺), im: 咪唑基), 见图 8 - 13。这为 CuZnSOD 活性中心结构的模拟创造了条件。

模拟物的结构特征是咪唑桥联 Cu(II) 和 Zn(II), 此点与天然酶活性中心类似, 其 Cu(II) - Zn(II) 间距离为 0.584nm, 与 SOD 中 0.63nm 相近。Cu(II) 的配位数和配位环境也与之基本相同, Cu(II) 为畸变的三角双锥构型。

Weser 等指出, 有效的 SOD 模拟物的 Cu(II) 中心的构型应该是略有畸变的平面正方形。模拟物在歧化 O_2 的过程中 Cu(II) 的构型发生可逆的转变, 生成 Cu(I) 的不规则四面体构型, 他们合成出一系列的 Schiff 碱铜(II) 配合物, 证实了他们论点的正确性。

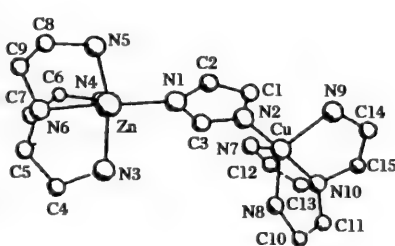


图 8 - 13 SOD 模拟物 $[(\text{tren})\text{Cu}(\text{im})\text{Zn}(\text{tren})](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ 的晶体结构

8.3.2 超氧化物歧化酶的功能模拟

过去对 SOD 模拟物的活性研究一般在简单体系中进行, 不能确切地反映其在真实的生物体内的复杂环境中的效能。模拟物在生物体系中的效能, 才能决定其可能的应用价值。有人用人多形核白细胞 (PMNL) 体系为研究对象。PMNL 是体内重要的免疫活性细胞, 受异物 (PMA) 刺激后发生呼吸爆发, 耗氧量大增, 同时产生大量活性氧 (O_2^- , OH^\cdot , $^1\text{O}_2$, H_2O_2) 以鲁米诺 (luminol) 为光扩增剂, 建立细胞活性氧的产生和测定系统, 研究了 21 种新合成的 SOD 模拟物在活细胞体系中清除活性氧的效能, 探讨了活性与结构的关系, 发现 20 员大环和二氧四胺这两类配体的铜配合物有较高的活性。活性氧氧化鲁米诺而发光, 光强度在一定程度上反应出活性氧的量, 因此加入 SOD 或 SOD 模拟物引起的发光抑制率可表示其歧化活性氧的活性, 见图 8 - 14。

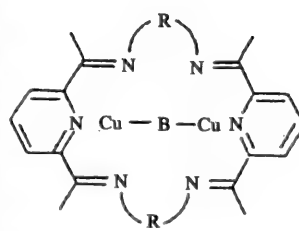


图 8 - 14 具有清除活性氧的模拟物

8.3.3 模拟 Mn - SOD

Darr 等报道, 将脱铁敏与 MnO_2 混合, 搅拌 16 小时, 可制备成水溶性模拟 Mn - SOD, 两者的比例以 1:1 为适宜, 该模拟酶不与血清白蛋白结合, 因此在血清白蛋白存在下酶活性没有明显变化, 用细胞色素 c 还原法测定模拟酶活性时, $1 \mu\text{mol/L}$ 的模拟 Mn - SOD 活性相当 1 个单位的 SOD, 即按锰含量计算, 约相当天然 Mn - SOD 活性的 1%。Beyer 等为了提高模拟 Mn - SOD 的活性, 另用脱铁敏、抗坏血酸与 MnO_2 混合搅拌, 制成的模拟 Mn - SOD 水溶液可保护灭草灵与亚硫酸盐对绿藻的危

害。

模拟 Cu, Zn - SOD 中所含的 Cu(II) 释放后, 可显示毒性, 而模拟 Mn - SOD 中 Mn(III) 显示的毒性却很小, 甚至不明显。在实用性方面, 模拟 Mn - SOD 的前景要优于模拟 Cu, Zn - SOD。Fridovich 与 Darr 联合专利报告指出 Mn - SOD 模拟物可应用于减轻活性氧对机体的损伤作用, 近年来模拟 Fe - SOD 受到重视, 在理论上 Fe - SOD 模拟物所释放的 Fe(III) 的毒性比 Mn^{3+} 更小, 甚至不存在。

目前已合成了众多的 SOD 模拟物, 有的结构与 SOD 活性中心类似, 有的只具有 SOD 活性, 有的则兼而有之。对这些模拟的研究, 为天然 SOD 的作用机理提供了很多有价值的材料。但迄今在结构上能模拟 Cu(II) - im - Zn(II) 的异双核仍很少, 且不能模拟天然酶中 Cu(II) 和 Zn(II) 不同的配位环境, 天然酶中铜和锌位于卷曲的蛋白链中, 有利于 Cu(II) 和 Cu(I) 的构象转变以保证其高活性而模拟物尚未能满足这一条件。模拟物中多数在体内稳定性和活性下降, 因而设计和合成具有精确活性中心结构的、热力学稳定且动力学惰性的模拟物, 并具有实用价值, 仍然任重道远。

参 考 文 献

- 1 Mosback K. Enzyme Engineering, XI. 1991, 59 ~ 62
- 2 Chaplin MF, Bucke C. Enzyme Technology. Cambridge University Press, 1990
- 3 Mosback K. Program of Enzyme Engineering XIV. Beijing: 1993, 1 ~ 36
- 4 Faulker M, Steven RD, Fridovich I. Arch Biochem Biophys. 1994, 301 ~ 341
- 5 Luo Qin-hai, Zheng Li-ming, Lu Qin et al. Science in China. 1995, 36 36(B): 170
- 6 Getzoff ED et al. Nature. 1983, 306: 287 ~ 290
- 7 Radzicaka A, Wolfeuden R. Science, 1995, 267: 90 ~ 95
- 8 沈孟长, 罗勤慧, 朱宁荣. 高等学校化学学报, 1990, 11: 1322 ~ 1315
- 9 袁勤生, 陈吉祥. β -环糊精修饰 SOD 研究. 药物生物技术, 1996, 3(2): 87 ~ 90
- 10 孙存普, 张建中, 段绍瑾主编. 模拟 SOD. 自由基生物学导论. 合肥: 中国科学技术出版社, 1999, 76 ~ 77
- 11 Ikeda HK et al. J Inclusion phenom, 1989, 7: 117
- 12 Rama RK et al. J Chem Soc Chem Commun, 1990, 10

9 气体酶学

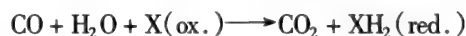
9.1 引言

气体分子作为小的、无形的、甚至多半是惰性的来说都似乎不会作为酶的底物目标。但是生物进化却提供了一系列的酶可专一性地与一些气体分子起作用。例如氧, CO, CO₂, 氮, 氢等, 这些酶中有不少在生物地质化学循环中起了不可磨灭的作用。从细胞水平来说, 它们与能量储备机构紧密地联系在一起。气体酶学就是对这些以各种气体为底物的酶进行研究。

近年来, 对气体酶学的研究进展很快, 不但在新的实验技术的开拓上, 而且与化学及物理学的观点相互渗透, 与环境保护等领域相结合, 以便使气体酶学更好地为全人类的利益服务。

9.2 氧化一氧化碳的酶

一氧化碳是大气中最严重的一种污染物, 它是由不同途径产生的, 例如汽车尾气、煤的不完全燃烧以及火山爆发的气体中均含有 CO。据估计, 全世界 CO 的年产量约为 $3.1 \times 10^9 \sim 14.1 \times 10^9$ 吨之多。对这些大气中的 CO 的清除, 土壤表面的细菌活动有很大的功劳。这些细菌能清除 CO, 其原因主要是由于菌体中含有 CO 脱氢酶(carbon monoxide dehydrogenase), 此酶可在无氧气存在时将 CO 氧化成 CO₂:



现已研究清楚, 凡是厌氧菌(如 *Clostridium thermoaceticum*)的 CO 脱氢酶是含镍的酶; 而各类需氧菌中的 CO 脱氢酶则是含铜的酶。能够氧化 CO 的细菌有多种, 详见表 9-1。

表 9-1 氧化一氧化碳的细菌群

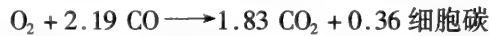
需氧菌类	
(Aerobic bacteria)	
羧基氧细菌	<i>Pseudomonas carboxydovorans</i>
(Carboxydotrophs)	<i>Pseudomonas carboxydohydrogena</i>
	<i>Pseudomonas carboxydoflava</i>
	<i>Bacillus schlegelii</i>
固氮菌	<i>Rhizobium japonicum</i>
(N ₂ fixers)	
甲烷养细菌	<i>Pseudomonas mechanica</i>
(Methanotrophic bacteria)	<i>Methylosinus Inichosporium</i>
	<i>Methylococcus capsulatus</i>

厌氧菌类
(Anaerobic bacteria)

产丙酮菌 (Acetogens)	<i>Clostridium thermoaceticum</i> <i>Clostridium pasleurianum</i> <i>Clostridium bormicoaceticum</i> <i>Acetobacterium woodii</i>
产甲烷菌 (Methanogens)	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> <i>Methanosarcina barkeri</i>
光养菌 (Phototrophs)	<i>Rhodospseudomonas gelatinosa</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>
硫酸盐还原菌 (Sulfate-reducers)	<i>Desulfovibrio desulburicans</i> <i>Desulfovibrio vulgaris</i> <i>Desulfovibrio cholonicus</i>

9.2.1 羧基养细菌的 CO 脱氢酶

羧基养细菌是代表在有氧情况下能够利用 CO 作为唯一的碳源和能源的菌群,所生成的 CO₂ 可通过核酮糖二磷酸羧化酶(ribulose - bisphosphate carboxylase)来进行同化作用。例如被 *Pseudomonas carboxydovorans* 细菌的生长细胞所吸收和形成的气体的化学计量为:



上述 *P. carboxydovorans* 细菌的 CO 脱氢酶可被 CO 所诱导。CO 脱氢酶催化 CO 被氧化成 CO₂, 它是羧基养细菌类 CO 代谢的关键酶(图 9-1),此酶具有三种功能:(1) 供应并引导电子进入一条特殊的 CO 不敏感的电子传递磷酸化的呼吸链;(2) 提供 CO₂ 作为碳源;(3) 通过卡尔文循环(Calvin cycle),用逆向电子传递提供二氧化碳同化作用所需的 NADH。

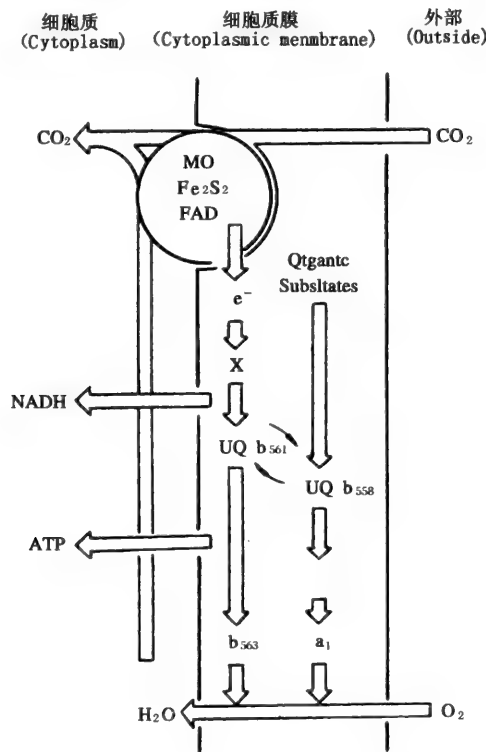


图 9-1 *Pseudomonas carboxydovorans* 细菌中的 CO 脱氢酶的功能和定位

国外曾有人观察到 CO 被 CO 脱氢酶氧化时可以与非生理的电子受体[如亚甲蓝(Methylene

blue), 绿脓菌素(Pyocyanine)]的厌氧还原相偶联, 不排除 CO 可以被加氧酶反应所氧化的可能性。在 CO 脱氢酶反应中并未发现有自由的甲酸或氢气产生, 因而在 CO 氧化反应中无论自由甲酸或分子氢都不是中间体。后来进一步证实在高度纯化的 CO 脱氢酶制剂中并不存在甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase)或氢化酶(Hydrogenase)的活力。P. carboxydovorans 细菌的 CO 脱氢酶的分子量为 300,000。

9.2.2 硫酸盐还原细菌中的 CO 脱氢酶

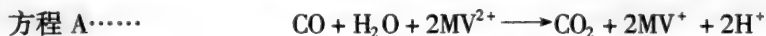
此菌系培养在乳酸盐培养基中, 在菌体抽提物中可检测到 CO 脱氢酶的活力。检测系用测压计法进行, 系统中含有菌体抽提物、甲酸盐、亚硫酸盐和一定催化量的甲基紫精(methyl viologen), 在 pH6.8 进行。结果显示可从 CO 形成等当量的氢和 CO₂:



如果在测定时不含有甲酸盐及甲基紫精的话, 则 CO 被消耗, 亚硫酸盐则被还原成硫化氢:



又如 Desulfovibrio desulfuricans 等一类生长在丙酮酸盐或乳酸盐上的硫酸盐还原菌, 其无细胞的抽提液可使每 mol 的 CO 被氧化时, 有 2 moles 的甲基紫精被还原:



对此等细菌的 CO 脱氢酶进行研究, 证实此酶即使暴露于空气中时也十分稳定。用 Sephadex G-150 凝胶过滤柱检测得到此酶的分子量为 180,000。

9.2.3 光养厌氧菌的 CO 脱氢酶

从湖沼的沉淀物中可以分离出一种厌氧生长在黑暗中靠 CO 生长的菌株 Rhodo-Pseudomonas gelationsa。这种靠 CO 生长的细菌每小时每克蛋白可代谢 6.7 μmol 的 CO 并产生等当量的 CO₂ 和氢气:



在这种情况下, 氢从水中的生成可以用氚标记的水来证实, 因为可观察到氚气的形成。R. gelationsa 菌的 CO 氧化体系是由 CO 来诱导的, 这一点在光生长下的细胞是没有的。当细胞依靠 CO 并生长在黑暗中, 一旦转移到依靠 CO 和光两者来生长时, 则 CO 还是比光重要。CO 氧化活力可用甲基紫精作为电子受体, 在 24℃, pH 大于 8.5 的情况下来测定。结果是每 mol CO 氧化时至少有 2 moles 的甲基紫精被还原。这一点支持所有的厌氧 CO 脱氢酶具有同样的反应方程式(见前方程 A)这个观点。

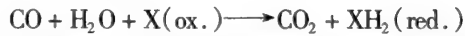
9.2.4 甲烷养细菌的甲烷单加氧酶

利用甲烷的细菌, 在把甲烷氧化到 CO₂ 的过程中, 其中间物除了甲烷、甲醇、甲醛和甲酸外, 许多其他化合物包括 CO 也能被氧化, 但 CO 不是这种细菌的生长基本物质。CO 之所以能被甲烷养细菌(例如 Pseudomonas methanica)所氧化, 是由于这些细菌的甲烷单加氧酶体系的低专一性所致。此反应并不支撑这类细菌的生长, 因为它们的生长还是要依赖氧气和还原的吡啶核苷酸类, 而此反应并未提供可供细胞起同化作用的碳化合物。



9.2.5 关于氧化 CO 的酶的总结

各种在代谢上十分不同的细菌都会含有一种氧化一氧化碳的活力。除了在甲烷养细菌中含有的非专一性的甲烷单加氧酶复合体以外, 至今已经纯化和研究了的其他氧化 CO 的酶都是 CO 脱氢酶, 具有专一性地催化 CO 的氧化至 CO₂, 如下式:



分子氧并不包含在 CO 氧化过程中,即使是在严格的需氧的羧基养细菌中亦是这样。需氧酶绝对利用 2-电子的载体,而厌氧酶则利用 1-电子载体。需氧的 CO 脱氢酶的生理上的电子载体尚不清楚,设想可能是醌或 b 型细胞色素。红氧还蛋白(Rubredoxin)被认为是一种细菌 *Clostridium thermoaceticum* 中的 CO 脱氢酶的生理电子载体。在需氧 CO 脱氢酶的情况下,电子是在约为 0 mV 的氧化还原电位下被传递的;而在厌氧酶的情况下,则在一个更负的氧化还原电位下被传递的。总的说来,厌氧 CO 脱氢酶的专一性 CO 氧化活力比需氧酶的要高,但需氧酶对 CO 的亲合力却要高出几个数量级。需氧酶和厌氧酶两者的金属成分的主要差别已研究清楚,即前者是钼而后者是镍。但相同的是都存在锌并都具有铁-硫中心。据推测厌氧 CO 脱氢酶通常含有(4Fe-4S)类型的铁-硫中心,而(2Fe-2S)类型的中心则通常发生在需氧 CO 脱氢酶中。需氧 CO 脱氢酶的辅因子组成显然更为复杂,因为它们更含有 FAD、钼蝶呤(molybdopterin)与可能有硒。厌氧 CO 脱氢酶是否是一种含有一个 Ni-四吡咯结构的类咕啉(corrinoid)酶尚需进一步证实。与需氧酶当暴露在氧气下仍很稳定这一点相反,厌氧酶会很快被空气失活。但也有例外,例如从严格的厌氧菌 *D. desulfuricans* 所提取的酶并不受氧气的影响,因而能在有氧情况下分离提取。

9.3 甲烷单加氧酶的作用

气体甲烷可以通过一种酶即甲烷单加氧酶(Methane monooxygenase, MMO)来进行生物氧化而生成甲醇。甲醇可由机体进一步氧化生成甲醛。一部分甲醛在生物体内进行同化作用,另一部分则氧化成 CO_2 以供给甲烷氧化起始步骤中作为辅因子之用(见图 9-2)。

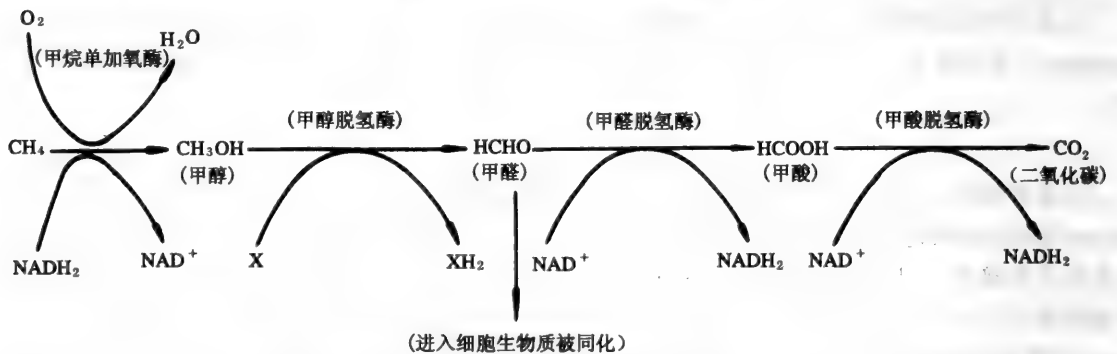


图 9-2 甲烷通过甲醛的生物氧化至 CO_2 的途径在甲醇脱氢酶反应中的酶辅因子 X 为吡咯喹啉醌(PQQ, 即 Pyrrolo quinoline quinone)

9.3.1 甲烷单加氧酶的性质

可以从六种不同的能氧化甲烷的细菌中提取到无细胞的具有甲烷单加氧酶活性的制剂。例如细菌 *Methylococcus capsulatus* 中的 MMO 是与细胞中的颗粒部分(particulate fractions)连结在一起的。

MMO 第一次是从细菌 *Methylosinus trichosporium* 的细胞膜上分离得到的。使用的方法是用磷脂酶 C(phospholipase C)和超声波来处理就可将 MMO 复合体解离成三个蛋白质:一个具有分子量 47,000 的蛋白质,含有一个铜原子;一个具有分子量 9,000 的蛋白质和一个具有分子量 13,000 的细胞色素 C,内含 0.3 到 0.8 个原子的铜。粗的颗粒部分酶,需利用 NADH、维生素 C 或甲醇脱氢酶作为电子供体,但纯化的酶并不需要 NADH 作为电子供体,仅仅需要维生素 C 或甲醇/甲醇脱氢酶偶联。

近年来, *Methylococcus capsulatus* 细菌的 MMO 已纯化,并可从中解离得到三个组分,每一组分都已纯化,这三个组分是:蛋白质 A,这是一个分子量为 220,000 的蛋白质,具有 3 个亚基,分子量各为

54,000, 42,000 和 17,000。这些亚基含有非血红素 (non-heme) 铁 (每克分子 2~3 克原子) 和锌 (每克分子 0.2~0.5 克原子), 不含酸不稳定硫化物。另一为蛋白质 B, 这是分子量为 20,000 的酸性蛋白质, 不含辅基或金属。又一蛋白质 C, 这是分子量约 40,000 的单一多肽蛋白质, 每克分子蛋白质中含有 1 克分子 FAD 和一个 $2\text{Fe}-2\text{S}$ 的中心。

9.3.2 可溶性 MMO 复合体中的电子转移

在三种可溶性 MMO 组分中只有组分 C 具有独立的催化活性。它是一种 NAD(P)H 受体还原酶, 可催化细胞色素 C、铁氰化钾、二氯酚-靛酚 (dichlorophenol-indophenol) 或氧气由 NAD(P)H 中介的还原作用。利用纯化的蛋白质可以观察到受 NADH 还原的蛋白质 C 也可在厌氧条件且不存在蛋白质 B 的情况下转移电子至氧化的蛋白质 A 上。由电子吸收光谱和电子自旋共振 (ESR) 光谱可观察到 NADH 还原的蛋白质 C 显示出每一个 FAD 和 Fe_2S_2 中心要完全还原需要 3 个电子, 并且蛋白质 C 存在四种形式, 即氧化形式 (0e, 即没有电子)、半醌形式 (1e)、半醌/还原铁硫形式 (2e) 和二氢醌/还原铁硫形式 (3e)。从把蛋白质 C 的每一辅基用一种方法专一性地除去并重组的研究以及从动力学的研究中可以得出蛋白质 C 中的电子转移次序是: $\text{NADH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FeS} \rightarrow$ 受体。从上述的四种电子形式的存在可以支持下述观点: 即蛋白质 C 可从 NADH 分裂电子对, 因而可形成一个电子传递步骤直至蛋白质 A, 进一步用停流研究方法证实在蛋白质 C 中的分子内电子转移反应 (约 170s^{-1}) 要比电子转移至组分 A 时的速度 (约 3.7s^{-1}) 快得多。此外, 最近也已证实可氧化的底物可与蛋白质 A 中的铁中心相互作用, 这就是 MMO 复合体的“加氧酶”组分。

虽然在蛋白质 C 和蛋白质 A 之间有电子转移, 但是已发现除非蛋白质 B 被加入, 否则就没有底物氧化作用发生。因为蛋白质 B 不含任何金属或辅基, 因此就很难设想这一蛋白质是如何直接包括在底物氧化作用过程中的。尤其是因为从一些机制方面的数据来看, 氧化作用是通过某一金属才发生的。基于直到最近为止的资料证据, 已有可能设计出一个在 MMO 复合体内部的电子转移途径图 (图 9-3)。

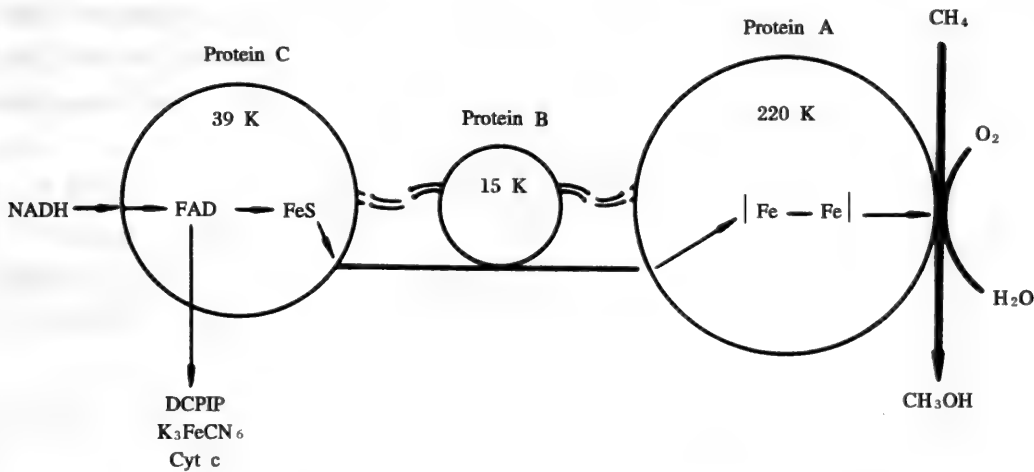


图 9-3 *Methylococcus capsulatus* (Bath) 细菌中的可溶性甲烷单加氧酶复合体中蛋白质 A、B 和 C 之间的电子转移途径

在这一途径图中, 蛋白质 C 中的被 NADH 还原的 FAD 把电子传递至 FeS 中心, 这一中心然后即把电子传递给蛋白质 A 中的 Fe-Fe 中心。在没有蛋白质 A 的情况下, 从蛋白质 C 来的电子能够在 FAD 的水平上传递至相应的替代受体上。被还原的蛋白质 A 然后即能与要被氧化的底物结合, 在蛋白质 B 的存在下, 即能实现氧化作用。蛋白质 B 确切地在复合体中的那一部位起作用目前尚不清楚, 但蛋白质 B 在甲烷氧化作用中是绝对需要的。

9.3.3 甲烷单加氧酶的底物专一性

M. Capsulatus (Bath) 细菌中的可溶性 MMO 是一种底物专一性不是很强的酶:(1) 它除了可与甲烷起作用外,与乙烷、丙烷、丁烷、戊烷、己烷、庚烷均可起作用,生成相应的醇类,反应速率都在同一数量级之中;(2) 它也可与环己烷作用生成环己醇,与苯作用生成酚,与甲苯起作用生成甲苯酚。且反应速率也都相差不多。

9.4 固氮酶的作用

9.4.1 概述

固氮酶(Nitrogenase)能在温和的条件下激活氮分子 N_2 的能力几十年来都极大地诱惑了生物化学家对其进行研究。由于氮分子的三价键 $N \equiv N$ 的极其稳定性就使得要它直接与其他化合物起作用是其困难的,也就是说,除非利用极端手段(如高压、高温及非生物催化剂等)是办不到的。到目前为止,工业上能够“固定”氮的方法也只有用 Haber 方法来从氮气生产氨(NH_3)。其生产手段严酷,如不能有氧和水存在,有反应物 H_2 存在,需高温($200^\circ C \sim 400^\circ C$)、高压及有催化剂的存在。并且 N_2 本身也需要以高压形式存在以推动反应向产物(NH_3)生成方向进行。

从另一角度来看,生物固氮过程就显得完全不同:反应是在生活环境温度下发生的,并且可以有水和氧的存在,且反应是不可逆的。近 20 多年来对固氮酶在激活 $N \equiv N$ 作用的酶学、生理学等方面的研究有了较大的收获,发表的文章已数以千计。下面主要对固氮酶作用的酶学方面作一简介。

9.4.2 固氮酶的酶学简介

固氮酶含有两个蛋白质分子。第一个是一种含有 2Mo 原子、 33 ± 3 个 Fe 原子和较少的 S 原子的 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体。此蛋白质可被氧分子不可逆地失活($t_{1/2} \approx 10$ 分钟,在空气中,约在 $20^\circ C$ 时)。约有一半的铁原子是以 $[4Fe - 4S]$ 簇(cluster)的形式存在的,其余大部分是作为单电子顺磁共振的一部分而存在的。这一顺磁共振部分称为 FeMoco,它含有 Mo, Fe 和 S,其比例为 $1:(6 \sim 8):(4 \sim 9)$ 。

第二种蛋白质是一个 γ_2 二聚体,含有一个 $[4Fe - 4S]$ 簇,它可能位于亚基之间,但不含钼。曾报道在固氮菌 *Qzotobacter vinelandii* 的 Fe 蛋白中含有较高的 Fe S 含量,某些螺旋菌(spirilla)的 Fe 蛋白可被酶修饰而致可逆地失活。这种 Fe 蛋白具有与 ATP 和 ADP 的单镁盐结合的位点,曾经被称为“dinitrogenase reductase”,因为它是一种供给 MoFe 蛋白质电子的专一的由 MgATP 激活的电子供体。它的活力对分子氧比对 MoFe 蛋白质更灵敏($t_{1/2} = 30 \sim 45$ 秒)。

固氮酶在还原 N_2 至 $2NH_3$ 的同时使 16 个 MgATP 水解成 MgADP + P,并形成一分子的氢作为副产品。固氮酶还可还原多种 N_2 的类似物(analogues),例如 HCN, HN_3 , CH_3NC , CH_3CCH 等等,其中最著名的是 C_2H_2 (可被还原至 C_2H_4),此作用已被采用为测定固氮酶的乙炔试验(aceylene test)。

固氮酶的特点就是在其功能中包含 H_2 。 H_2 在固氮酶的作用中所扮演的角色尚未完全被了解,主要的有下列几方面。

- 1) H_2 是 N_2 被固氮酶还原的一种竞争性抑制剂。
- 2) H_2 是 N_2 还原的一种副产品,其反应为:



但在其他底物被还原时, H_2 不一定必须是一种副产品。

- 3) 如果既无 N_2 也无其他类似底物存在时,则 H_2 是一种唯一的产物(exclusive product)。

4) 固氮酶催化从 D_2 形成 HD 的生成量极小,但如果 N_2 被还原成 $N_2 + D_2$ 时,则可形成相当多量的 HD。此时每产生 1 分子的 HD 要消耗一个电子和 2 分子的 ATP。

5) 固氮酶最为令人惊奇的特点是它的缓慢。 N_2 还原的转移时间(turnover time)是 $1.25s \text{ mole}^{-1}$ 或 $\sim 150ms/1$ 电子转移至底物。

6) 当一旦弄清楚钼和铁是固氮酶中的必要成分时, N_2 复合体必然包括在固氮酶的功能中这一点就越来越明显了。从化学上来说关于分子氮 N_2 的复合体中第一个被报告的是 $[Ru(NH_3)_5(N_2)]^{2+}$ 。目前,已知这一类 N_2 复合体的种类已超过 100 种。关于这种 N_2 复合体在固氮酶中的确切性及其种类,目前国际上正在进行大量的工作,至今尚未最后得出结论。

[附记]植物的光合作用机制,严格说来,也应属于气体酶学的研究范畴。读者欲了解这方面的内容,请参阅有关植物生理学方面的专著。

参 考 文 献

- 1 Diekert, G. & Ritter, M. Purification of the nickel protein carbon monoxide dehydrogenase of clostridium thermoaceticum. FEBS Lett. 151, 41, 1983
- 2 Meyer, O & Rajagopalan, K. V. Molybdopterin in carbon monoxide oxidase from carboxy do trophic bacteria. J. Bacteria 157, 643, 1984
- 3 Dalton, H & Leak, D. J. Methane oxidation by microorganisms. In: Microbiae Gas Metabolism: Mechanistic, Metabolic and Bictchnological Aspects. Ed. by R. K Poole & C. S. Dow New York: Academic Press, 1984
- 4 Woodland, M. P & Dalton, H. Purification and properties of component A of the methane monooxygenase from Methylococcus capsulatus (Bath). J. Biol, Chem. 259, 53, 1984
- 5 Cox, R. P. Private communication. 1996
- 6 Postgate J. R. The fundamentals of nifrogen fixation. Camb. Univ. Press, 1982
- 7 Thorneley, R. N. F. & Lowe, D. J. Kinetics and mechanism of the nitrogenase enzyme system. In "Metal ions in biology" vol. 7(ed. T. Spiro), 1990
- 8 Degn, H Cox, R. P. and Toftlund, H. Gas Enzymology. D. Reidel Publishing Company, 1985

10 非水介质中的酶催化反应

10.1 非水介质酶催化反应及其特征

从传统概念上讲,生物催化剂,包括酶、微生物细胞、动物细胞、植物细胞及一些细胞器均是在水溶液环境中催化水溶性底物的转化。然而,随着生物技术的发展,生物催化剂需要向更为广泛的应用方面发展。1984年,美国麻省理工学院的科学家 Klibanov 成功地实现了猪胰脂肪酶在 99% 的有机溶剂中催化三丁酸甘油酯与醇之间的转酯反应,并证实了酶在 100℃ 高温下,不仅能够在有机溶剂中保持稳定,而且酶还显示出很高的催化转酯活力。这一发现为酶学研究和应用带来了又一次革命性飞跃,并成为生物化学和有机合成研究中一个迅速发展的领域。

有机相酶催化反应在生物工程领域的极大意义引起了研究文献的爆炸性增长。20 多年来的研究表明,在有机介质中酶催化反应可以获得许多常规条件下所不具有的新特征和优势:(1) 可进行水不溶性化合物催化转化,使酶作用底物的范围大大拓宽;(2) 改变反应的平衡点,使水溶液中不能发生的反应向所期望的方向进行,催化水解反应的酶可催化合成反应的进行,如转酯、酯化、氨解、酰基交换和转硫酯等;(3) 由于酶在有机溶剂中结构上“刚性”的增加,对底物的专一性,包括区域专一性和对映体专一性均大大提高,从而使实现对酶催化选择性的有目的调控成为可能;(4) 酶的热稳定性大大提高;(5) 由于酶不溶于大多数有机溶剂,反应后易于回收和重复利用;(6) 可避免长期反应中微生物的污染;(7) 减少或防止由水引起的副反应;(8) 可方便地利用对水分敏感的底物进行反应,如酸酐;(9) 当使用挥发性溶剂作介质时,反应后的分离过程能耗降低。

在传统概念中,有机溶剂易于引起酶蛋白变性而失活。实验表明,在无水或含微量水 (< 1%) 的有机溶剂中,酶的稳定性显著提高,如脂肪酶和溶菌酶在 100℃ 可保存若干小时而不失活,这种热稳定性的提高是难以以化学交联、固定化、甚至是蛋白质工程的手段所能达到的。热稳定性的产生可归结为两方面的原因:(1) 酶结构刚性增强;(2) 水含量有限。通常,水溶液中的酶分子在结构上形成亲水区和疏水区,前者位于分子的表面,与水相接触,环境中的水分子与酶蛋白功能团之间形成氢键,使蛋白质形成具有柔韧性的空间结构,称为“开放”型空间结构。但当处于有机溶剂中时,蛋白质分子的疏水区暴露出来,分子折叠受到一定程度的破坏,带电基团之间相互作用形成非活性的“封闭”构象。酶分子结构刚性增强,对受热而引起折叠松散的抗性增强,表现为其热稳定性提高。此外,在酶分子的不可逆变性过程中,水是一个必要的参与者。如随温度升高,酶分子首先发生折叠及螺旋结构的“松散”,随后会发生一种或多种变性反应:形成错误的卷曲结构、S—S 键受到破坏、天冬酰胺和谷氨酰胺残基脱酰胺基及天冬氨酸的肽键发生水解,上述每一步反应都有水的参与。在无水或仅含微量水的有机介质中,这一系列变性作用受到有效抑制,从而大大提高了酶的热稳定性。从图 10-1 可以看出:在有机溶剂中水的含量对酶的稳定性有极大的影响,随着体系中水含量的增加,酶的稳定性明显降低,并存在临界水浓度,当超过临界值时,酶的稳定性急剧下降。此外,处于溶剂中的酶预先达到的状态对其在溶剂中的稳定性也有显著的影响。当酶预先处于“湿态”时,由于水的预先存在使酶分子构成其柔韧性的“开放”构象,刚性降低,与“干态”酶相比,

在有机溶剂中更易于受到破坏,产生热失活。柱状假丝酵母脂肪酶在有机溶剂中和水溶液中的稳定性比较也具有相似的结果。通常认为在极性溶剂中酶具有较差的稳定性,大部分非水相酶反应均被限制于相对非极性的溶剂中。一方面非极性溶剂利于提高酶的稳定性,另一方面,在非极性溶剂中酶易于保持其活性构象而表现出高的催化活力。

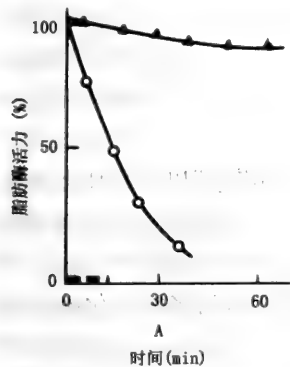


图 10-1 A 干猪胰脂肪酶在 100°C 失活曲线

- pH8.0 0.1mol/L 磷酸缓冲液;
- 含 0.8% 水和 2mol/L 庚醇的三丁酸甘油酯;
- ▲ 含 0.015% 水和 2mol/L 庚醇的三丁酸甘油酯

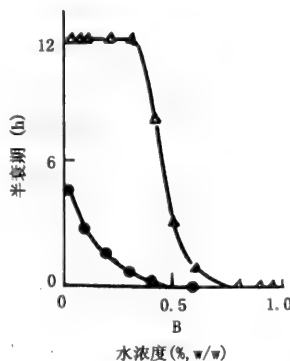


图 10-1 B 湿酶和干酶在含不同含水量的 2mol/L 庚醇/三丁酸甘油酯溶液中的半衰期(100°C)

- 湿酶; △ 干酶

在非水介质酶催化反应中,有机溶剂的加入使得大量非水溶性底物可以进行酶促转化。常见的反应体系包括微水有机溶剂体系、反向胶团体系和水/水不互溶溶剂两相体系。

10.2 微水有机溶剂体系

含微量水的有机溶剂体系是非水介质酶催化反应中研究最为广泛的反应体系。催化剂、有机溶剂和水含量的控制是构成体系的三大要素。其中水的含量对酶的活力和选择性具有极大的影响,成为有机溶剂酶催化反应的关键控制因素。

10.2.1 水的作用及其调控

10.2.1.1 水-酶构象的润滑剂

二十几年来,在有机介质酶催化反应研究中,已存在一个共识,即微量的水对酶有效发挥催化作用是必需的,因为水直接或间接地参与了酶天然构象中所有的非共价相互作用,包括氢键、静电作用、疏水相互作用和范德华力。Gupta M. N 认为,无水条件下酶分子的带电基团和极性基团之间相互作用,形成一种非活性的“封闭”结构,水的加入可削弱这种相互作用,使非活性的“封闭”结构“疏松”,酶分子的柔韧性增加,并通过非共价作用力来维持酶的催化活性构象,即水充当了酶结构的“润滑剂”。Jaap Broos 等利用荧光各相异性(Time-Resolved Fluorescence Anisotropy)的方法对几种酶的水化程度与其柔韧性的关系进行了测试,利用 TRFA 技术在微微秒-毫微秒时间窗内对蛋白质的构象变化进行监测,借助高水平的荧光技术与数据分析获取蛋白分子内部流体力学与酶构象的重要信息,证实了随酶分子水化程度的增加,其柔韧性增强,酶活力随之提高。其研究结果还表明,在不同的有机溶剂中,酶的柔韧性不同,对映体选择性也在差异。另外,Guinn R. M 及其合作者利用电子顺磁共振自旋探针(EPR Spin Probe)就水对酶结构和活性的影响进行测定,也得出水是酶分子的“润滑剂”的结论。

在有机溶剂中酶的水化作用是不完全的,水化程度低的酶常具有较高的结构刚性,酶分子内部流动性的降低被认为是其稳定性增加的原因。然而,也许正是由于结构上柔韧性的降低使得酶在非水介质中的催化活力比水溶液中要低。

对于水在酶分子上的结合过程和结合量,Rupley J. A 在对溶菌酶的水化过程进行研究后提出:

可以将干蛋白质分子的水化过程分为四步:(1)水与蛋白质分子表面的带电基团结合,结合水量为 $0 \sim 0.07\text{g 水/g 蛋白质}$,这一过程为离子化基团的水化过程;(2)水与蛋白质分子表面极性基团的结合,亦即极性部分水簇的生长过程,结合水量为 $0.07 \sim 0.25\text{g 水/g 蛋白质}$;(3)水吸附到蛋白质分子表面相互作用较弱的部位,结合水量为 $0.25 \sim 0.38\text{g 水/g 蛋白质}$;(4)蛋白质分子表面完全水化,被单层水分子所覆盖,一般需水量为 0.38g 水/g 蛋白质 ,约结合300个水分子/蛋白分子。第一阶段的水化相当于每个蛋白质分子吸附 $40 \sim 60$ 个水分子。溶菌酶水化至 0.2g 水/g 蛋白质 ,即每个酶分子吸附180个水分子时开始表现出催化活力。通常蛋白质吸附 0.25g 水/g 蛋白质 时开始呈现出分子流动性的变化,这一流动性正是为酶的呈现活性所必需的。

就酶本身而言,当周围含有足够的水分子来维持其天然构象时,这些“必需水”以外是什么介质无关紧要。也就是说,只要酶吸附了足够的“必需水”,在有机溶剂中也应显示出催化活力。对不同的酶,在有机溶剂中催化反应所必需的水量有很大差异。例如,一个脂肪酶分子只结合几个水分子就会显示活性,在辛烷中糜蛋白酶催化反应需吸附50个水分子,而乙醇脱氢酶和多酚氧化酶在溶剂中显示活性时都有成百上千个水结合在酶分子上,足够形成一个单分子层。Affeck. R对枯草杆菌蛋白酶在四氢呋喃中催化反应的研究表明,加入适量的水能使酶活性中心的极性和柔韧性提高,从而酶活急剧升高。然而过量的水会引起酶活性中心内部水簇的形成,改变酶活性中心结构,导致酶活力的降低。如图10-2所示:Klibanove利用猪胰脂肪酶催化三丁酸甘油酯进行转酯反应,随着体系中水含量增加,酶的催化活力有显著改变,水含量在 0.95% 左右,酶有最大活力。

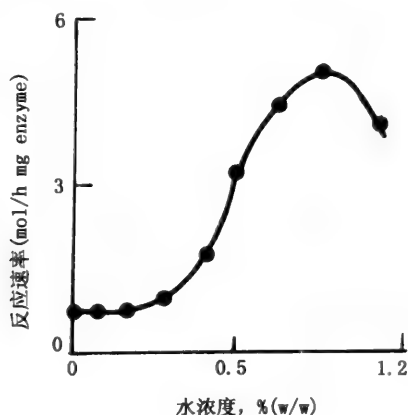


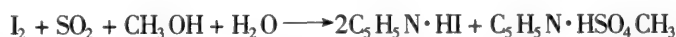
图 10-2 猪胰脂肪酶催化三丁酸甘油酯与正庚醇转酯反应速率与水浓度的关系

有时,向干酶中加入少量的水(0.015%)也会使酶恢复活力,对此 Zaks 认为,有部分水可以极牢固地吸附在酶分子上,即使经过干燥处理,这部分水也不被除去,故再加入少量的水就可以补足维持酶活性构象的“必需水”量,使酶恢复活力。“必需水”在酶反应中并非作为反应的直接参与者,只是起维持酶活力构象的作用。从结构的角度来看,水作为润滑剂是由于它具有与蛋白质分子功能团形成氢键的能力,使蛋白质分子功能团相互连接,释放其封闭结构。Zaks 和 Klibanov 用甘油、乙烯基甘油醇和甲酰胺作为“氢键形成体”代替水来研究酶结构的变化,结果表明,三种共溶剂可部分代替水作为酶的活化剂,只是与水相比,它们形成氢键的能力较差,因而溶剂化效率较低。这一结果也证明了水的润滑剂作用源于其形成氢键的能力。

10.2.1.2 水分的测定和水活度

在有机介质酶催化反应中,酶的催化活力高低与其结合水的多少直接相关。从理论上说,与体系中总的水含量及有机溶剂性质等因素无关。事实上,由于反应体系中的水会在溶剂、酶、底物、产物及载体之间进行分配,因而体系中溶剂、载体的性质对结合于酶分子上的水量有直接影响。对反应的最佳水含量进行优化是反应有效进行的条件。通常体系中的水分可以通过卡尔-费休法和气

相色谱法进行的测定。前者使用更为广泛,是通过滴定法进行水分测定的化学分析方法。水存在时碘与二氧化硫发生氧化还原反应,游离碘还原为碘化氢。其中水、碘、二氧化硫按化学计量发生反应。



以卡尔-费休试剂滴定水分的终点以颜色反应进行判断:当水存在时,为淡黄色,近终点时呈琥珀色。刚出现微弱的黄棕色,即有游离碘出现时即为滴定终点。

对于特定的反应体系,测定水在酶分子上的吸附等温线有助于了解在一定水含量条件下酶上吸附水量的多少。Zaks 等对酵母醇氧化酶在不同溶剂中的吸附等温线进行了测定,并就酶分子吸附水量与反应速率之间的关系进行了探讨。如图 10-3 所示:在不同性质的溶剂中,水在溶剂与酶之间的分配有显著不同,但吸附等温线的趋势是基本一致的。

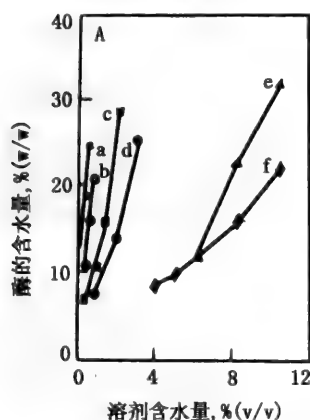


图 10-3 A 结合在酵母醇氧化酶上的水量与溶剂含水量的关系

a. 乙醚; b. 乙酸丁酯; c. 乙酸乙酯;
d. 正辛醇; e. 叔戊醇; f. 2-丁醇

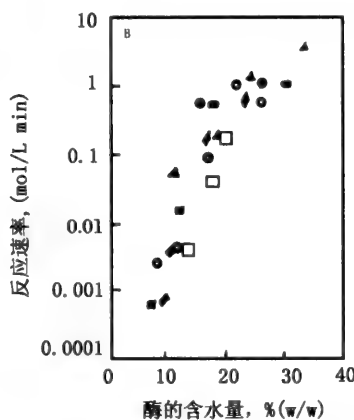


图 10-3 B 溶剂中酶活性与结合水的关系

□ 乙醚; ○ 乙酸丁酯; ■ 乙酸乙酯;
● 正辛醇; ▲ 叔戊醇; ◆ 2-丁醇

吸附等温线的测定是通过向体系中加入一系列不同浓度的水,使之在有机溶剂和定量的干酶之间进行分配达到平衡后,测定溶剂中剩余水的总量,计算出酶的吸附水量,再以溶剂和酶中吸附水的浓度作图而得到。

从上述研究结果可以知道,水分会在反应体系各组分之间进行分配,直至达到平衡,因而用加水量只能间接反应酶结合水量对其催化能力的影响。当然通过水吸附等温线的测定可以找出体系加水量与酶结合水之间的量的关系,但这种方法也存在很大的不便和误差:一方面,体系中的底物、产物及载体的性质会对水的分配产生影响,任何一个参数的改变,均会导致吸附等温线的改变,而且在条件优化过程中,每改变一个条件都需要重新测定吸附等温线,这给实验带来很大的工作量;其次,随着反应的进行,体系组成会发生改变,酶吸附水量也会因此而改变,水含量的影响很难被准确地反映出来。针对这一问题, Peter J. Halling 提出以水活度作为研究的参数。水活度的定义为:在一定温度和压力下,反应体系中水的蒸气分压与相同条件下纯水的蒸气压之比。采用水活度作为研究参数有几个优点:(1) 水活度的大小直接反映出酶分子结合水分的多少,与体系中的其他因素无关。(2) 低水溶剂体系是一个涉及到固相(酶和载体)、液相(含底物的溶剂)和气相(液面上部的空间)的多相体系,当体系处于平衡状态时,各相的水活度相等。(3) 水活度的大小易测,可在反应达到平衡时测定体系上部气体的湿度来获得。目前,已有大量的传感器用于测定体系中气相的水活度。达到平衡时气相-液相-固相中的水活度相等,因而通过气相水活度的测定便可直接反映出整个体系的水活度。水在体系各相之间发生分配达到平衡,最终体系中各相水活度相等,如图 10-4 所示。最好的水活度测定传感器应属 Philips 研制的“氯化铝湿度传感器”,另外也有将探头直接浸没于溶剂中测定液相水活度的传感器。

在研究水分对酶活力的影响时,特别是在水分的测定中,无论是水浓度还是水活度都应格外小心,因为水有一定的挥发性,且易于吸附到其他组分或物质上,少量的水更易于丢失。同样,水也易于在环境与样品间进行分配。水浓度或者样品的水容量越低,测定中产生偏差的可能性也就越大。

通常选用有机溶剂作为反应介质的一个重要目的是改变水解反应的平衡点,如使酶促水解反应逆向进行——催化合成反应。在非极性溶剂中,水的体积分数在较高范围内发生改变不会对反应的平衡点产生影响,如当水从 50% 减少至 1% 时,反应平衡点也许并不因此而改变;但当水减少至 1% 以下时,反应的平衡点会因此发生转移。可见,在低水含量酶催化体系中,水分的影响至关重要。由于水会在催化剂和主体相之间进行分配,因而体系中诸多变量通过改变活性酶分子周围的水浓度来间接对其活力产生影响。此时,水活度即成为预测水对酶活力影响的一个合理参数。

在低水溶剂体系中,要使酶表现出最大催化活力,确定适宜的体系水活度至关重要。最佳水活度与溶剂性质及酶本身特性相关。Hirofumi H. 对酶特筭与反应最佳水活度的关系进行了研究。在对脂肪酶催化转酯反应中,根据酶对水的敏感程度将所研究的脂肪酶分为三种类型,如图 10-5 所示。

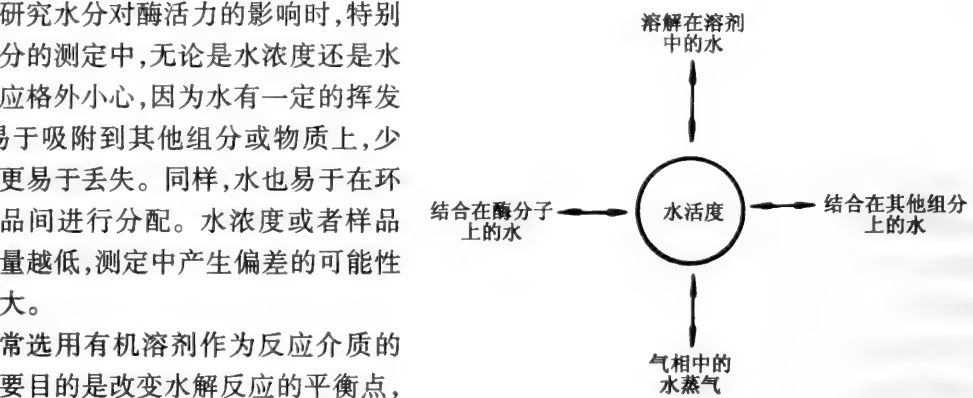


图 10-4 水在各相间的平衡示意图

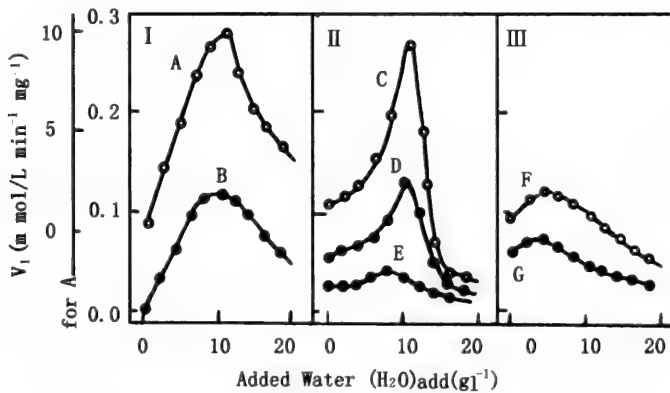


图 10-5 加水量对脂肪酶催化正辛醇与三丁酸甘油酯转酯反应速率的影响
(Lipase: A, *Candida cylindracea* (OF); B, *Candida cylindracea* (AY); C, *Pseudomonas* sp.;
D, *Pseudomonas fluorescens*; E, Porcine pancreas; F, *Penicillium cyclopium*; G, *Penicillium roqueforti*.)

I: 敏感型,当体系中不加水,及水活度极低时,酶活力接近零;随水活度的增加,酶活力急剧上升至最大值后下降;II: 范围敏感型,即在很低的水活度时,酶具有中等催化活力,在最佳水活度附近,酶活力发生急剧变化。III: 不敏感型,反应具有最佳水活度,但酶活力不随水活度的改变发生突跃式变化。

对于无水消耗或生成的反应,如转酯反应,I和II型的脂肪酶较为适宜。此时,只需控制体系处于最佳水活度附近就可以获得较满意的酶催化活力,且在反应过程中酶活力可以稳定地保持在较高水平,而对于酯合成和肽合成等缩合反应,在反应过程中水作为副产物生成,随着反应的进行,体系中的水含量不断升高。此时III型酶更为适合,因为此类酶对体系中水活度的变化不敏感,水活度在最佳值附近发生一定的波动不会引起酶活力的显著降低。当然,对特定的底物转化过程,除

考虑水活度对酶活力的影响外,酶对反应的特异性和选择性是首要考虑的因素。另外,在与水不互溶的溶剂中,最佳水活度随酶浓度的增大而增大;而在与水互溶的溶剂中,最佳水活度不随酶浓度而发生改变。

10.2.1.3 水活度的调控

当研究反应体系中各组分或条件对酶活力的影响时,应控制体系处于恒定的水活度,以消除由于水的分配而引起的酶活力改变。利用特定的水合盐对,通过两种不同操作方式可获得恒定的水活度。

(1) 将酶与盐的饱和溶液平衡,同时将含有底物的溶剂平衡至相同的水活度,然后混合进行反应,如图 10-6 所示。

(2) 向干燥的反应器中直接加入一种高水合盐,这种水合盐释放部分水到体系中,本身转化为低水合盐或无水盐。

由水合盐与其无水形式构成的盐对可以对体系中的水活度起缓冲作用,其作用原理如图 10-7

所示(以 Na_2HPO_4 为例)。 Na_2HPO_4 有三种水合形式: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,向体系中加入 Na_2HPO_4 ,假定反应过程中有水生成,当反应开始后,随着反应的进行体系中的水浓度增加(阶段 I),体系中的水活度也随之增大;当反应进行到一定程度,体系中积累足够多的水时,部分 Na_2HPO_4 结合水,形成 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 形式,从而体系中的盐以 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 盐对的形式存在。此后,随着体系中水的积累,无水盐不断转化为二水盐,在全部转化之前,体系水活度保持不变。当无水盐全部转化为二水盐后,水的进一步产生和积累会引起体系水活度的提高(阶段 II),直至水的量足以使二水盐转化为七水盐,形成 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 盐对,从而将体系水活度维持在另一个水平,这便是水合盐对对体系中水活度起到“缓冲”作用的机理。

在第一种操作方式中,当已达到预平衡的两部分混合时,且在以后的反应过程中水活度能否维持恒定,是值得注意的问题。通常有两种情况可能会引起水活度的改变:(1) 在反应中产生或消耗水;(2) 溶剂化作用和相行为。将反应控制在较低的转化率时,按化学计量产生的水一般很少,其对水活度的影响可以忽略。由相平衡导致水活度的改变则较为复杂:只有当水在两组分之间及两者混合物中的活度系数有严格的相关性时,水活度在混合前后才会保持不变。否则,将分别进行预平衡的底物和溶剂相混合时,水活度会发生变化。对此,有一种较为合理的解决方法,即分别将催化剂与整个主体相,包括溶剂和底物分别预平衡至恒定的水活度,然后将催化剂分散到主体相中。在无其他操作时,水活度则不会发生改变,因为水在两者之间的分配已达到平衡。如果除水以外的其他组分,如底物发生重新分配,那么也会导致水活度的改变,因为相组成的变化会引起水活度系数的改变。当反应中有大量的水产生或消耗时,可通过加除水剂或加入水的方式来维持恒定的水活度,如加入乙基纤维素、分子筛等均可有效去除反应体系中的水分,以硅藻土吸附胰凝乳蛋白酶催化 N-乙酰苯丙氨酸与乙醇的酯化反应过程中,加入 4% 的乙基纤维素可有效维持反应在较宽

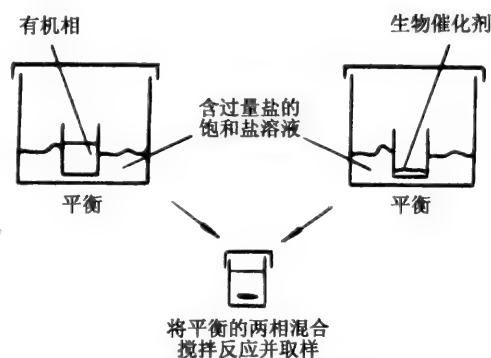


图 10-6 已知水活度下利用预平衡法测定反应初速率示意图

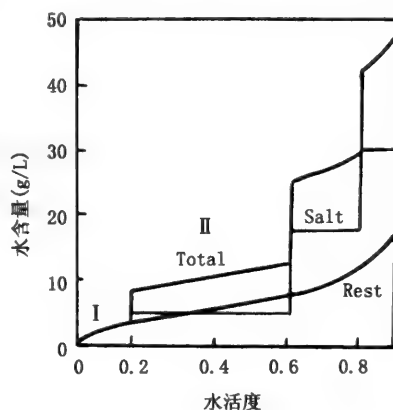


图 10-7 水合盐对体系水活度的缓冲作用原理

的水浓度范围内具有较高的转化率。当然,控制过程最好在传感器的监测下进行。

10.2.1.4 水化方式

在通常的研究中,总会涉及一个前提,即“假定水在各相间的分配已达到平衡”,那么在反应开始前或反应过程中水的分配是否已真正达到平衡了呢?水在各相间达到平衡的速度如何呢?由于蛋白质对水的结合存在滞后现象,通常体系中的水活度真正达到平衡往往需要几十分钟,乃至几小时。另外,蛋白质的催化活力也依赖于其水化的过程和方式,例如,即使反应体系的最终组成相同,但组分加入次序的不同也会导致酶活力的差异。

Marie G.P 等人以己烷作为反应介质,就枯草杆菌蛋白酶催化转酯反应探讨了酶的水化方式与催化活力的关系。以两种不同方式对酶进行水平衡:(1)空气平衡(Air);将酶置于一定湿度的空气中预平衡,再与相同水活度的溶剂相混合,进行催化反应。(2)原位平衡(In Situ),即将冻干的酶直接置于溶剂中达到平衡。研究发现,在相同水活度下,不同的平衡方式对酶的起始反应速率有较大影响,而且这种影响并非由平衡方式的不同导致酶结合水分子数的不同而引起。当酶吸附相同量的水时,两种平衡方式所产生的酶催化活力有显著差异,原位平衡时酶活力明显高于空气平衡。产生差异的原因可能是由于不同水化方式引起酶构象排布的不同而引起的。酶在水化过程中释放大量的吸附热,从而引起一些不利的酶构象变化。有机溶剂作为一种热的“疏散剂”将部分吸附热从酶分子上释放出来,使之避免对酶产生有害的影响。因而在有机溶剂中酶水化时由于吸附热的及时“疏散”,不利的构象变化很小,使酶能够保持较高的催化活力,所以原位平衡比空气平衡更有利于酶活力构象的形成与保持。另外,伴随水化过程,酶粉的物理形态也发生变化。空气平衡时,水在酶分子上不仅仅进行单分子层吸附,还存在次级水化层。Marie C.P 以及 NMR 法测定了溶剂中酶吸附水的量,结果表明:当经过空气平衡的酶放入溶剂中时,溶剂可使次级水化层脱稳,这部分水被从酶表面置换下来,形成围绕在酶分子周围的微水相,同时酶粉颗粒完全崩溃,呈胶样状态,导致传质阻力增大,反应速率降低。

表 10-1 水合盐对在不同温度下可维持的水活度

盐对	$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O} /$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} /$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} /$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} /$
	Na_2SO_4	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Na_2HPO_4
20℃	0.76	0.74	0.57	0.15
30℃	0.83	0.85	0.65	
40℃			0.73	

10.2.2 有机溶剂的影响与反应介质工程

10.2.2.1 有机溶剂的作用与 $\lg P$

在有机相酶学研究中,存在一种共识:在非水或低水环境中,只要酶分子的“必需水”层不被剥除,酶就可以有效地发挥其催化作用。因而 Zaks 提出了非水相酶学的一个具有普遍意义的定律:作为反应介质,非极性溶剂优于极性溶剂。由于极性溶剂,特别是与水互溶的有机溶剂会争夺、甚至剥除蛋白质分子的“必需水”层,扰乱酶分子天然构象的形成。这一说法确实可以作为 Zaks 定律的一个合理解释。Zaks 和 Klivanov 检测了在各种溶剂中水对醇脱氢酶、醇氧化酶及多酚氧化酶活性的影响,结果表明:有机溶剂是通过与酶分子周围的水层而不是酶分子本身发生作用的。他们还发现,随着增加溶剂中的水含量,酶的活力迅速增加。表达有机溶剂对酶催化活力影响的一个比较准确,或者说是较为有意义的术语是溶剂“扭曲(或扰动)”酶的水结合区的能力,即有机溶剂穿透并进入催化剂的“必需水”层,或将“必需水”推开或拉脱的能力。溶剂这种水扰动能力与其性质密切

相关。Laane 等深入研究了溶剂的理化性质与酶功能的相关性,其中包括:Hildebrand (希尔德布兰德)溶解度参数(δ)、介电常数(ϵ)、偶极矩(μ)以及分配系数的对数($\lg P$),发现 $\lg P$ 与酶活力之间具有最好的相关性。E. Catoni 等以固定化 *Pseudomonas sp.* 脂肪酶催化 1-苯乙醇与乙酸酐的酯化为模型反应,就溶剂特性与酶活力的关系进行了研究,并得出了类似的结论:酶活力与溶剂的介电常数无明显的相关性,与 Hildebrand 溶解度参数仅有很弱的相关性,对于非极性溶剂,这种相关性更不明显。通常两变量之间的相关系数可由公式进行计算:

$$\gamma = \frac{N \sum_1^N X_i Y_i \sum_1^N X_i Y_i}{\sqrt{N \sum_1^N X_i^2 - (\sum_1^N X_i)^2} \sqrt{N \sum_1^N Y_i^2 - (\sum_1^N Y_i)^2}}$$

当 γ 接近 1 时,表明两个变量之间具有很高的相关性。Catoni 对底物转化率与溶剂理化性质之间的相关性进行计算,结果如表 10-2 所示。

表 10-2 转化率与溶剂理化性质间的相关系数 γ

溶剂理化性质	相关系数 γ	$P^{\text{D}}(\%)^2$
$\lg P$	0.90	0.1
Hildebrand 溶解度参数	0.72	1
介电常数	-0.63	2~5

① 根据非相关变量计算获得的 γ 值高于实验 γ 值的概率。

$\lg P$ 为化合物在标准正辛醇-水两相体系中的分配系数的对数。从严格意义上讲, $\lg P$ 代表溶剂的疏水性(hydrophobicity),而非极性(polarity),两者之间有密切的相关性,但并不是完全等同,后者更为常用。Brink & Tramper 的研究结果也表明,当以 Hildebrand 溶解度参数作为恒量溶剂特性的参数时,仅当所用溶剂的极性较弱, δ 小于且接近于 8,溶剂的相对分子质量大于 150 时,酶才会表现出较高的活力。 δ 与溶剂的相对分子质量有关:

$$\delta = \left(\frac{\rho(\Delta H^{\circ} - RT)}{M_w} \right)^{\frac{1}{2}}$$

而 $\lg P$ 仅与溶剂的极性相关, $\lg P$ 与酶活力的相关性与反应类型无关。 $\lg P$ 是恒量溶剂极性的直接参数。且在相当宽的极性范围内, $\lg P$ 随溶剂极性的变化有明显差异。

单一化合物的 $\lg P$ 可以通过疏水片段常数(hydrophobic fragmental constants)计算来得到,表中列出了 107 种溶剂的 $\lg P$ 值。对两种化合物所组成的混合物 $\lg P$,可通过经验公式进行计算:

$$\lg P_{\text{mixture}} = X_1 \lg P_1 + X_2 \lg P_2$$

其中 X_1 和 X_2 分别为组分 1 和组分 2 的摩尔分率,对于反向胶团体系,界面相的 $\lg P_i$ 与连续相的 $\lg P_{\text{cph}}$ 的极性也可通过计算获得:

$$\lg P_i = \frac{a_0}{a_0 + a_1} \lg P_{\text{cosurfactant}} + \frac{1}{a_0 + 1} \lg P_{\text{CTAB}}$$

a_0 为界面相中辅表面活性剂(cosurfactant)对 CTAB 的摩尔分率

$$\lg P_{\text{cph}} = C_0 \lg P_{\text{cosurfactant}} + (1 - C_0) \lg P_{\text{organicosolvent}}$$

其中 C_0 为辅表面活性剂在连续相中的摩尔分率。

10.2.2.2 溶剂极性与酶活力的关系

在微水有机介质酶催化体系中,溶剂对水的扰动能力与其极性密切相关,Laane 提出可将常用的 30 多种有机溶剂根据其在水中的溶解度分为三类。

表 10-3 常用有机溶剂的 $\lg P$ 值

Solvents	$g P$	Solvents	$\lg P$	Solvents	$\lg P$
1. dimethylsulfoxide	-1.3	37. <i>m</i> -phthalic acid	1.5	73. cyclohexane	3.2
2. dioxane	-1.1	38. triethylamine	1.6	74. benzophenone	3.2
3. <i>N,N</i> -dimethylformamide	-1.0	39. benzylacetate	1.6	75. propoxybenzene	3.2
4. methanol	-0.76	40. butylacetate	1.7	76. diethylphthalate	3.3
5. acetonitrile	-0.33	41. chloropropane	1.8	77. nonanol	3.4
6. ethanol	-0.24	42. acetophenone	1.8	78. decanone	3.4
7. acetone	-0.23	43. hexanol	1.8	79. hexane	3.5
8. acetic acid	-0.23	44. nitrobenzene	1.8	80. propylbenzene	3.6
9. ethoxyethanol	-0.22	45. heptanone	1.8	81. butylbenzoate	3.7
10. methylacetate	0.16	46. benzoic acid	1.9	82. methylcyclohexane	3.7
11. propanol	0.28	47. dipropylether	1.9	83. ethyloctanoate	3.8
12. propionic acid	0.29	48. hexanoic acid	1.9	84. dipentylether	3.9
13. butanone	0.29	49. chloroform	2.0	85. benzylbenzoate	3.9
14. hydroxybenzylethanol	0.40	50. benzene	2.0	86. decanol	4.0
15. tetrahyarofuran	0.49	51. methylecyclohexanol	2.0	87. heptane	4.0
16. diethylamine	0.64	52. methoxybenzene	2.1	88. cymene	4.1
17. ethylacetate	0.68	53. methylbenzoate	2.2	89. pentylbenzoate	4.2
18. pyridine	0.71	54. propylbutylamine	2.2	90. diphenylether	4.3
19. butanol	0.80	55. pentylacetate	2.2	91. octane	4.5
20. pentanone	0.80	56. dimethylphthlate	2.3	92. undecane	4.5
21. butyric acid	0.81	57. octanone	2.4	93. ethyldecunoate	4.9
22. biethylether	0.85	58. heptanol	2.4	94. dodecanol	5.0
23. benzylethanol	0.90	59. toluene	2.5	95. nonane	5.1
24. cyclohexanone	0.96	60. ethylbenzoate	2.6	96. dibutylphthalate	5.4
25. methylpropionate	0.97	61. ethoxybenzene	2.6	97. decane	5.6
26. dihydroxybenzene	1.0	62. dibutylamine	2.7	98. undecane	6.1
27. methylbutylamine	1.2	63. pentylpropionate	2.7	99. dipentylphthalate	6.5
28. propylacetate	1.2	64. chlorobenzene	2.8	100. dodecane	6.6
29. ethylchloride	1.3	65. octanol	2.9	101. dihexylphthalate	7.5
30. pentanol	1.3	66. nonanone	2.9	102. tetradecane	7.6
31. hexanone	1.3	67. dibutylether	2.9	103. hexadecane	8.8
32. benzylformate	1.3	68. styrene	3.0	104. dioctylphthalate	9.6
33. phenylethanol	1.4	69. tetrachloromethane	3.0	105. butyloleate	9.8
34. cyclohexanol	1.5	70. pentane	3.0	106. didecylphthalate	11.7
35. methylcyclohexanone	1.5	71. ethylbenzene	3.1	107. dilaurylphthalate	13.7
36. phenol	1.5	72. xylene	3.1		

表 10-4 常用有机溶剂的分类

$\lg P$	在水中的溶解度(wt%) (20℃)
$\lg P \leq 2$	> 0.4
$2 < \lg P \leq 4$	0.04 ~ 0.4
$\lg P \geq 4$	< 0.04

酶在不同性质有机溶剂中的催化反应研究表明,酶活力与 $\lg P$ 之间存在以下相关性:在 $\lg P < 2$ 的极性溶剂中,酶具有较低的催化活力;在 $\lg P$ 为 2~4 的中等极性溶剂中,酶常常表现出中等催化活力,但不同体系酶活力有较大差异;在 $\lg P > 4$ 的非极性溶剂中酶有较高的催化活力。这一结论与溶剂的水扰动能力的强弱是一致的: $\lg P < 2$ 的极性溶剂会强烈地扰动或扭曲水与催化剂之间的相互作用,导致酶变性失活,而且酶的“脱稳”不仅仅局限于高级结构上,在次级结构,如 α -螺旋和 β -折叠上均可能出现脱稳,导致酶活丧失。 $\lg P$ 为 2~4 的溶剂具有较弱的水扰动能力,会对酶活力产生影响,但影响的程度与酶的特性和体系性质有关,无法直接进行预测。而 $\lg P > 4$ 的非极性溶剂通常不会扰动酶的必需水层,因而利于酶处于活性状态。

Zaks 和 Klivanov 用三种不同来源的脂肪酶-猪胰脂肪酶、酵母脂肪酶和霉菌脂肪酶在不同极性

的有机溶剂中催化反应,并以溶剂的极性常数 $\lg P$ 对酶促反应的初速率作图,获得了酵母脂肪酶、霉菌脂肪酶与 $\lg P$ 之间的 S 型相关性曲线(图 10-8)。P. Gremonesi 及 F. R. dactoli 分别对 20- β 羟基甾体脱氢酶和黄嘌呤氧化酶的研究也得出了类似的结果。

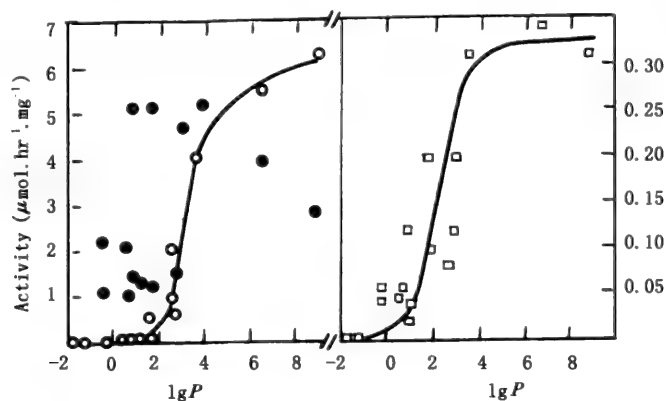


图 10-8 脂肪酶在近无水有机溶剂中催化三丁酸甘油酯与戊醇转酯反应初速率与 $\lg P$ 的关系
● 胰脂肪酶; ○ 酵母脂肪酶; □ 霉菌脂肪酶。

猪胰脂肪酶与 $\lg P$ 之间不遵循这一规律,这是由于猪胰脂肪酶对水的结合紧密而牢固,实验所测试的溶剂均不能破坏其水化层,因而溶剂极性与酶活力之间不呈现 S 性相关曲线。

10.2.2.3 溶剂与底物、产物之间的极性匹配

在有机溶剂中,酶能够保持其“必需水”层、形成柔韧性的天然构象是酶发挥活力的重要前提。但在选择溶剂的过程中,还应该考虑到溶剂与反应物和产物性质的匹配问题。例如, Baokang Yang 在研究脂肪酶催化三酰甘油酯与甘油之间进行转酰基反应的过程中发现,在 $\lg P$ 为 $-0.33 \sim 0.80$ 的极性溶剂中,反应具有较高的初始速率;在 $\lg P > 2.5$ 的非极性溶剂中,由于甘油在主体相中扩散受到限制,转酰基反应几乎不能发生。另外,在反应过程中,随着极性的甘油不断被转化为非极性的产物,反应的最佳 $\lg P$ 也会随之而逐渐提高。在生成非极性产物的反应中,如酯化反应,如果反应介质选择极性很强的溶剂,那么由于产物从酶活性中心向主体相的扩散受到限制,导致反应速率降低。因此,溶剂性质对酶催化反应的影响是一个综合而复杂的过程,其中包括溶剂对水-酶相互作用的扰动与扭曲,与固定化酶微环境之间的匹配以及对底物和产物的溶解与扩散的影响等因素。

催化剂与溶剂的接触区域,即界面相(interphase)的性质也应该被考虑在内。特别是在反向胶团体系及固定化酶体系中,界面相的影响尤为重要。所谓界面相,从广义上讲,可以指游离酶的结合水层、反向胶团体系中的表面活性剂层或者在固定化酶中的固定化介质区(如图 10-9 所示)。

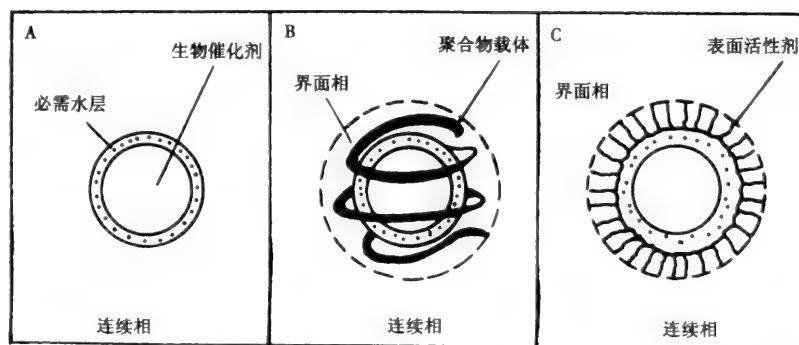


图 10-9 生物催化剂在介质中的存在模型

A 游离生物催化剂; B 聚合物固定化生物催化剂; C 固定于反向胶团中的生物催化剂

当反应物易于由主体相(连续相)进入界面相,同时/或产物易于由界面相进入主体相时,体系具有较高的传质速率,此时整个反应具有较高的速率。从各组分的极性考虑,应满足以下条件:

$$\begin{aligned} &|\lg P_i - \lg P_s| \text{ 较小, } |\lg P_{\text{cp}} - \lg P_s| \text{ 较大;} \\ &\text{或 } |\lg P_i - \lg P_p| \text{ 较大, } |\lg P_{\text{cp}} - \lg P_p| \text{ 较小。} \end{aligned}$$

其中 $\lg P_i$, $\lg P_{\text{cp}}$ 分别为界面相和连续相的极性常数, $\lg P_s$, $\lg P_p$ 分别为底物和产物的极性常数。有两种特别的情况需慎重考虑:(1) 当反应存在底物抑制时,应当适当控制 $|\lg P_i - \lg P_s|$, 避免过量底物聚集在酶周围,产生抑制;(2) 当产物极性大于底物时,应考虑利用反应-分离耦合的方法,如进行连续沉淀或其他方法,及时去除产物,以利于反应的进一步进行。

在进行溶剂选择和优化时,三个特殊的操作因素值得考虑:

(1) 当底物具有中等极性时,利用 $\lg P$ 为 2~4 的中等极性溶剂作为反应介质可达到较高的反应速率,但在中等极性的溶剂中,酶较易失活;

(2) 在近无水反应介质中,用 D_2O 代替 H_2O 利于稳定酶的构象;

(3) 利用可以紧密结合水的载体对酶进行固定化,可以避免溶剂对酶结合水层的扰动,此时利用 $\lg P < 4$ 的溶剂同样可以获得高酶活和高酶稳定性。例如,将嗜热菌蛋白酶吸附在亲水的多孔玻璃珠或吸附树脂 Amberlite 上催化肽合成反应时,在极性的乙酸乙酯($\lg P = 0.68$)中同样可达到很理想的转化率。

10.2.2.4 溶剂性质对酶选择性的影响

酶区别于化学催化剂的最显著特点之一就是其催化作用具有高度的选择性,或称专一性,包括底物专一性、反应专一性和立体专一性。将酶识别对映体、对映面以及与前手性中心相连的相同功能团的能力称为对映体选择性,区别同一分子上的相同功能团的能力称为区域选择性;对具有不同化学性质的分子的选择性称为反应专一性。酶在有机溶剂中刚性的增强,使之具有在水溶液中所不可比拟的优越性:良好的对映体选择性或区域选择性。针对溶剂性质影响酶的选择性这一现象, Klibanov 首先提出可以借助介质工程来实现对酶选择性的修饰。他们在研究中发现,当 N-乙酰-丙氨酸氯乙酯水解酶从水相转移至丁醚中时,选择性会大大降低,并进一步证实,枯草杆菌蛋白酶在有机介质中可以催化 D-氨基酸进行肽合成反应,且该酶在催化 N-乙酰-丙氨酸氯乙酯与丙醇的转酰基反应中,其选择性表现出很强的溶剂依赖性。

酶的前手性选择性同样受到溶剂性质的极大影响。针对这些研究结果,研究者们提出了各种模型对之进行解释,其中包括“活性中心水分子置换”模型,“立体选择性”模型和“非立体选择性”模型等。事实上,到目前为止,所有这些研究都是针对特定的酶、底物和特定体系进行的,尚不足以总结出普遍适用的规律。因而,利用酶在不同有机溶剂中的 X-射线结晶学研究,辅之以计算机模型化方法对与酶活力和对映体选择性的关系进行研究,实现具有普遍意义的酶反应选择性的预测与控制将成为可能。

10.2.2.5 介质工程展望

所谓介质工程,即通过对催化剂微环境的修饰或向体系中增加添加物,引入固体基质或改变液相介质本身的组成等手段,提高酶的催化反应性和稳定性,从而达到高产率的目的。

所谓辅助剂(Additive),是指能够起到稳定催化剂、协助其提高抵御变性作用的能力、同时又不会对酶活力产生太大影响的化合物。如前所述 D_2O 是一种辅助剂,在较高浓度下可以有效稳定蛋白质分子的构象。但 D_2O 价格较昂贵,广泛应用存在一定的困难。另外,多元醇也是一类很好的辅助剂,如甘油、乙二醇、糖类及多元醇聚合物,它们除了利于维持蛋白质分子的天然结构所必需的疏水相互作用外,还对蛋白质分子周围的水层具有保护和促进作用。然而,这些辅助剂的添加也会带来一些不利影响,如引起反应介质粘度的增大,传质速率降低,从而对酶反应速率产生影响。无论如何,将辅助剂与高温下的有机介质酶催化过程结合起来,仍是一个富有生命力的崭新研究方向。

总之,在有机介质酶催化反应中,溶剂的选择是一个重要的方面。最佳的反应介质,应该不过分扰动酶的水化层、利于酶的稳定性,同时对底物、产物具有良好的溶解性和匹配特性。此外溶剂的毒性、粘度、成本和回收方法以及产物分离的难易程度也是应用研究中不可忽视的问题。

10.2.3 酶的选择与催化剂工程

10.2.3.1 有机介质中的生物催化体系

非水介质中的生物催化越来越得到了广泛的应用,特别是在手性分子的光学拆分上展示出极富吸引力的应用前景。在有机溶剂中生物催化剂可以以酶、细胞或细胞器的方式进行催化。利用微生物或酶进行催化反应时,必须考虑其商业可获得性和成本。以完整细胞和酶制剂进行催化各有利弊,两者的优缺点比较如表 10-5 所示。

表 10-5 有机溶剂中细胞与酶催化体系的比较

生物转化体系	优点	缺点
完整细胞	成本低,体系中存在所需要的辅因子	反应器体积较大 存在较多的副反应 操作复杂,使用共溶剂时会 使膜酶受到破坏
酶制剂	装置简单,操作容易 对特定反应具有专一性 能较好地耐受有机溶剂	成本高 必要时需添加辅因子或需利 用辅因子循环体系

由于酶制剂在有机溶剂酶催化体系中具有明显的优势,因而得到更为广泛的应用。通常在低水溶剂体系中,酶可以以多种状态催化反应进行:

- (1) 酶溶解在浓的底物中进行催化,如以 50% 的蔗糖溶液作为底物制备果糖寡聚糖;
- (2) 以固体酶粉悬浮在有机溶剂中,是有机介质酶催化中常用的一种形式;
- (3) 固体酶吸附在载体颗粒上;
- (4) 聚乙二醇修饰酶,以溶解状态存在于芳香族碳氢化合物中;
- (5) 将酶包埋在凝胶中;
- (6) 固定化酶悬浮在有机溶剂中。

其中(1)和(4)是两种较为特殊的酶形式,(1)只能应用于有限的特殊情况下,而酶的 PEG 修饰已有较多的研究。(3)、(5)和(6)为三种固定化形式的酶催化体系。(2)即直接将酶粉悬浮在有机溶剂中是一种简便易行的操作方式。由于酶在有机溶剂中的溶解度很低,故反应后的回收变得非常简单。但游离酶粉的悬浮催化存在其致命的弱点,即扩散限制和水化粘结。

10.2.3.2 固相酶催化的传质问题

酶在有机溶剂和水溶液中催化反应的最大区别在于:在有机溶剂中酶催化为非均相反应。固体颗粒酶与水溶液中的分子酶相比存在更大的扩散限制。在悬浮在有机溶剂中的颗粒酶催化反应过程中,至少存在两种障碍是底物扩散所必需穿越的:(1)在反应进行之前,底物必须从主体溶剂相通过边界层扩散到酶颗粒的表面。在传统的非均相反应过程中,称为外扩散。(2)底物在含水和盐的酶颗粒中扩散至活性中心位点,称为内扩散。通过剧烈搅拌可以克服外部扩散的影响,但不能克服内部扩散。提高底物在溶剂中的扩散能力也是提高悬浮酶活力的一个方法。

利用超临界流体作为反应介质会明显改善固体酶反应的活力。所谓超临界流体是指超过其临界温度和临界压力的流体,其物理性能介于气液之间。由于在超临界流体中底物具有极好的扩散性能,克服外部传质阻力所需要的搅拌频率比在传统有机溶剂中约低两个数量级。由于超临界流体的扩散性能介于气液之间,故底物在其中的传质速率比在一般溶剂中高得多,从而大大提高酶催化反应的速率。

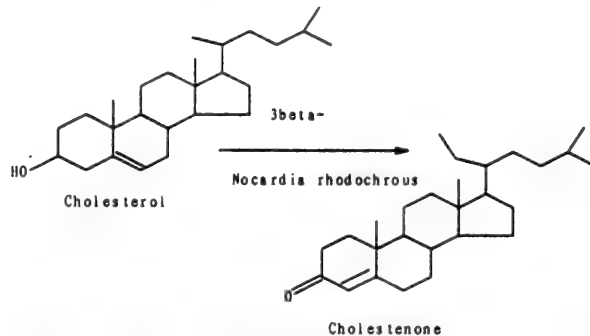
前已述及,酶在有机溶剂中的催化活力与其水化程度和水化方式密切相关。有微量的水利于

酶形成具有催化活力的天然构象。然而,当反应过程中有水不断生成,或环境中水浓度过高而又难以控制时,随着反应的进行,酶粉颗粒吸附过量的水,彼此粘结,形成较大的酶团,严重时甚至会形成硬性颗粒,传质阻力大大增加,以致反应无法顺利进行。固定化是克服酶粉粘结的一个有效措施。

10.2.3.3 酶的固定化与催化特性

有机介质酶催化体系中的固定化酶除了具有常见的优点,如改善酶的稳定性和易物回收外,还具有特别的优势:(1) 通过选择合适的载体可使体系中的水进行有利的分配;(2) 强制酶在巨大的载体表面上进行分散,以此提高底物分子对酶活性位点的可接近性。Laane 等对固定化以及游离嗜热菌蛋白酶、醇脱氢酶、蘑菇多酚氧化酶、羧化酶和脂肪酶在有机溶剂中的酶活力进行了对比实验,结果表明,固定化酶的催化行为明显优于游离酶。

固定化载体的特性对反应速率有很大影响。Laane 认为,利用亲水性载体有利于协助酶吸附“必需水”,对反应是有利的。而 Reslow 等的研究表明:对胰凝乳蛋白酶和马肝醇肿氢酶来说,疏水性载体优于亲水性载体。因为当固定于疏水性载体上时,酶可以较容易地竞争获得其“必需水”,从而表现出高活力。究竟何种性质的载体更为有利,从已有的研究结果尚不足以总结出一条普遍适用的规律。有一点值得提出的是:载体的选择应与反应体系中其他组成部分的性质,如溶剂、底物和产物的性质相协调和匹配。Atsuo 等将 *N. rhodochrous* 细胞包埋在不同性质的凝胶中催化胆固醇脱氢反应:



由于底物具有强的非极性,溶解于非极性溶剂中的底物很难在亲水性凝胶中进行扩散,因而当细胞包埋在亲水性凝胶中时,由于扩散限制而表现出很低的催化活力。当包埋在疏水性的氨基甲酸酯预聚体(PU-3)凝胶中时,酶表现出很好的催化活力。他们将极性不同的 PU-3 与 PU-6 以一定比例混合,制备具有不同极性的混合凝胶,对酶进行包埋,凝胶比例,或凝胶极性与酶活力的关系曲线表明,该酶促反应在疏水性凝胶作为固定化载体时更为有效,如图 10-10 所示。

通常,固定化载体的选择可遵循两条原则:(1) 协调水分在体系中的分配,形成最有利于酶活性构象的分配模式。(2) 减少底物和产物的扩散障碍,在无底物抑制情况下,底物应易于从主体相扩散到载体中酶分子周围,产物应易于进行反方向扩散。载体、溶剂和底物/产物极性之间的选择原则在本章 10.2.2.3 中已进行了论述。

除了载体本身的极性外,其孔径和表面修饰对酶的反应速率同样有很大影响。Bosley 等以不同孔径的多孔玻璃对 *Rhizomucor miehei* 脂肪酶(R. m. Lipase)进行吸附,在近无水溶剂中催化酯化反

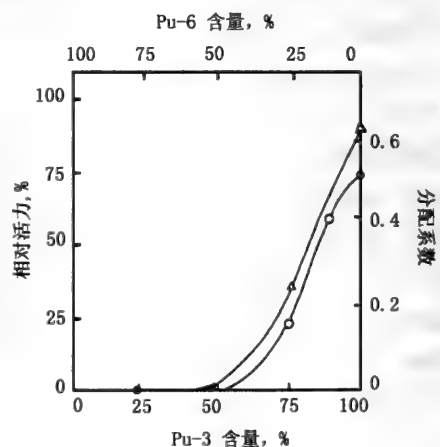


图 10-10 凝胶性质对包埋 *N. rhodochrous* 细胞催化胆固醇脱氢反应的影响

PU-3——疏水性聚胺酯预聚体;
PU-6——亲水性预聚体。
○——与游离细胞相比的相对活力;
△——胆固醇的分配系数。

应,结果表明:只有当载体孔径 $\geq 35\text{nm}$ 时酶分子才能进入到固定化载体的孔内。尽管反应底物的分子量很小,但酶要实现有效催化,载体孔径也要大于 100nm 。另外,Bosley的研究还表明,尽管脂肪酶可以很容易地吸附于多种疏水表面上,但当载体表面为长链烷基所修饰时,固定化酶具有最高催化活力,而苯基衍生载体吸附酶的活力较低。另外,载体颗粒直径越小,固定化酶的催化效率越高,但过于细小的颗粒会给操作带来不便,特别是在搅拌罐反应器中酶的回收难度加大。此外,应依据固定化载体的机械性能来选择反应的操作方式,如质硬的非压缩性颗粒适宜于构建填充床反应器,而较软的弹性颗粒则更适合于在搅拌罐中进行反应。

10.2.3.4 酶的化学修饰

蛋白质分子通过表面与天然或化学合成的大分子相结合而得到修饰,修饰后蛋白质分子的理化性能发生改变,生物性能得到改善。通常,化学修饰过程不引起蛋白质分子构象的剧烈变化。通过修饰可以改变抗原性蛋白质分子的免疫反应性或免疫原性,抑制变应原性蛋白引起的免疫球蛋白E(IgE)的产生,也可以使酶溶解于有机溶剂中,从而更有效地发挥催化作用。酶分子通过化学修饰后可提高其结构的稳定性,并使之催化反应的选择性发生改变。有关蛋白质修饰的研究列于表中。

表 10-6 修饰蛋白与修饰剂

被修饰蛋白类型	被修饰蛋白	修饰剂
蛋白质分子	凝血因子 VIII,牛血清蛋白,血红蛋白,IgG,胰岛素,乳铁传递蛋白, $\alpha 2$ -巨球蛋白,新抑癌蛋白,卵清蛋白	合成聚合物: 多聚 L-天冬氨酸及其衍生物,聚乙二醇,多聚 D-赖氨酸,多聚 L-赖氨酸,聚顺丁烯二酸-苯乙烯寡聚物,聚乙烯醇,吡喃共聚物
酶	精氨酸酶,L-天冬酰胺酶,过氧化氢酶,胰凝乳蛋白酶,弹性蛋白酶, α -(β -)半乳糖苷酶, β -葡萄糖苷酶, β -葡糖苷酸酶,L-谷氨酸酶,苯丙氨酸氨解酶,链激酶,超氧化物歧化酶,胰蛋白酶,尿酸酶,尿酸酶	多糖类: 琼脂糖,缩甲基纤维素葡聚糖,支链淀粉
抗原	α -淀粉酶,牛血清蛋白,过氧化氢酶,鞭毛蛋白,溶菌酶,巨球蛋白,regweed 花粉,筒状长穗牧草	脂肪酸: 乙酸,丙酸,癸酸,辛酸,月桂酸,棕榈酸,硬脂酸

在修饰过程中,不同的修饰剂会与酶分子上不同的基团进行偶联,导致酶具有不同的活力和选择性。例如,Quming 等对酵母脂肪酶进行不同基团的修饰,获得的修饰酶在溶剂中具有良好的溶解性,且催化酯水解反应的选择性明显改善。

表 10-7 不同基团修饰脂肪酶的活力与对映体选择性

修饰剂	修饰基团	相对活力(%) ^a	E [*]	产物光学特性
None	/	100	1.5	R-(+)
PLP	-NH ₂	50	2.4	R-(+)
DTT	-S-S	96	1.7	R-(+)
PGL	Arg	70	5	R-(+)
TNM	Tyr	75	33	R-(+)
DEP	His	55	4.4	R-(+)
TNM, Na ₂ S ₂ O ₄	Tyr	41	37	R-(+)
NEM	Cys	75	1.5	R-(+)
I ₂	Tyr	62		
Activated PEG	-NH ₂	94	5	R-(+)
GTA	Cross-Linking	81	1.3	R-(+)
DDNB	Cross-Linking	70	4.5	R-(+)

a: 修饰酶催化(+/-)-2-(2,4-二氯苯氧基)丙酸酯的水解

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_p)]}, \quad c = \frac{ee_s}{ee + ee_p}$$

在酶和蛋白质分子的化学修饰研究中,使用较多的修饰剂为聚乙二醇(PEG)。PEG分子中具有亲水性羟基和疏水长链,其两性性质使之特别适用于酶的修饰。PEG的亲水性使酶的修饰可以在水溶液中进行,而其疏水性使修饰酶可以在疏水环境中发挥催化作用。通常,以单甲氧基聚乙二醇(分子量为5000Da)与氰尿酸氯反应,后者三个氯原子中的两个为PEG所取代,合成2,4-(对甲氧基聚乙二醇)-6-氯-s-三丫嗪,即活化PEG,也称之为PEG₂。通过PEG₂分子中所含的一个氯原子与蛋白质分子中的末端氨基或赖氨酸分子中的ε-氨基结合,生成修饰蛋白分子。大多数蛋白分子的PEG修饰是通过活化的PEG₂来进行的。不同的修饰度(即蛋白分子结合PEG的氨基数占氨基总数的比例)对酶在溶剂中的溶解度、催化活力的热稳定性均产生影响。K. Tankahashi研究了PEG修饰过氧化氢酶在苯和水溶液中的催化水解活力,结果表明:随修饰程度的提高,酶在水溶液中的活力降低,而在苯中的活力提高;PEG修饰脂肪酶的热稳定性明显提高。

修饰酶的独特优势——高热稳定性、在有机溶剂中的优良溶解性、良好的催化能力与选择性——都表明酶的化学修饰是一项具有实际应用价值的技术。

表 10-8 修饰过氧化氢酶在苯中的溶解度

修饰度 (%)	在苯中的溶解度 (mg/mL)
0	0.00
21	0.14
34	0.25
46	0.64
55	> 2.00

10.2.3.5 酶的结晶纯化与蛋白质工程

迄今为止,在有机溶剂酶催化研究中,大多是使用商品化的粗酶制剂。不稳定性和纯化费用昂贵限制了高纯度酶的使用。粗酶制剂容易获得,价格相对低廉,同时还具有较好的操作稳定性。但综观大部分的研究结果可以看出,粗酶制剂催化反应的选择性通常不够理想。Jim Lalonde认为粗酶制剂中存在的水解酶是导致其选择性降低的主要原因。他将 *Candida Rugosa* 脂肪酶(CRL)经离子交换层析纯化的活性酶组分在2-甲基-2,4-戊二醇中进行结晶,得到有三条电泳区带的酶晶体,再以戊二醛交联,最终获得长度为30μm,厚度为2μm;不溶于水 and 有机溶剂的块状晶体。晶体中含有50%的孔道,这些孔道对溶剂、底物和产物的扩散极为有利。该晶体称之为交联酶晶体(Cross-linked Enzyme Crystal, CLEC)。对CRL-CLECs的催化特性和理化性能研究发现,其催化酯选择性水解拆分α-取代羧酸及仲醇的选择性比CRL粗酶制剂提高了3~50倍。在水溶液中其热稳定性由纯化CRL的不到5小时提高至13天。在水/水互溶的有机溶剂混合物中的稳定性提高300~3000倍。Lalonde认为,水解酶的去除,即酶纯度的提高显著提高了CRL-CLECs的对映体选择性;酶的结晶和交联使之具有高度的稳定性。

固定化、化学修饰及纯化结晶交联均是利用工程手段改进生物催化剂的催化特性和稳定性的有效方法。而Anold则利用传统的蛋白质工程方法来改变酶分子的表面性质,并以此改善酶在有机溶剂中的性能。在研究中,她强调增加酶构象的稳定性以及酶表面与有机溶剂相匹配的重要性。实验证明,以此为原则进行非水介质中的酶分子设计,所获得的工程酶活力和稳定性都显著提高。例如,利用遗传学手段,Anold将枯草杆菌蛋白酶分子中Asp248改变为Asn,以减少分子表面电荷;将Asn218改变为Ser以促进氢键的形成,这两种措施分别使酶在二甲基甲酰胺中的催化活力提高40%。再如,将α-水解蛋白酶分子表面的极性基团用非极性基团取代后,酶的稳定性显著提高。

10.3 “pH 记忆”与“分子印迹”技术

在微水有机溶剂酶催化体系中,控制反应介质的 pH 值似乎是不可能的。虽然体系的宏观 pH 及酶分子必需水层内的微观 pH 值均无法直测,但微水环境 pH 值确实存在,而且对酶活力和选择性均有显著影响。那么,酶分子微环境中的 pH 值究竟由什么来决定呢? Zake 和 Klivanov 将猪胰脂肪酶溶解于具有不同 pH 值的缓冲液中,然后在冷丙酮中进行沉淀,真空干燥,从而使酶带有不同的初始微环境 pH 值,然后用于催化三丁酸甘油酯的水解。结果发现酶的水解活力与溶解酶的缓冲液 pH 值有很大关系,两者之间呈钟罩形曲线。从而验证了酶具有“记忆”pH 值的能力,即酶的离子化基团在缓冲液中所获得的离子化状态可以在有机溶剂中得以保持。

与“pH 值记忆”特性相似,蛋白质分子还具有对配体的“记忆”功能。当蛋白质溶于高浓度配体溶液中时,即使两者之间仅有弱结合能力,但借助质量作用定律,仍会形成大量的弱结合复合物。冻干后用无水溶剂洗去配体,获得的蛋白质分子中会有许多由配体结合时留下的“印迹”,由于蛋白质分子在无水有机溶剂中具有结构刚性,这些“印迹”得以保持,由此方法制备的蛋白质称为“印迹蛋白分子”。“印迹蛋白分子”在无水介质中会展现出对原始配体的极大的结合容量。这种高度选择性结合能力,可用于专一性催化、分离纯化和生物传感器。

Lorenzo Braco 将牛血清蛋白在对羟基苯甲酸中溶解,冻干后获得的“印迹蛋白分子”对配体的结合能力提高了 9 倍,即结合达到平衡时,每分子蛋白质可结合 6.6 个配体分子,而天然蛋白质则只能结合 0.7 个配体分子。L-酒石酸印迹牛血清蛋白对 L-酒石酸的结合能力由天然蛋白质的 1.0 ± 0.6 提高至 30.0 ± 2.1 分子配体/分子蛋白。

Marriane Stahl 利用分子“印迹”技术将新的立体专一性引入酶分子中。他将胰凝乳蛋白酶与 N-乙酰-D-色氨酸共沉淀,在环己烷中该沉淀可催化 N-乙酰-D-色氨酸乙酯的合成,酯化速率达到 $7.5 \text{ nmol/mg 酶} \cdot \text{小时}$ 。该酶在水溶液中并不具有合成 D-型色氨酸酯的能力,当酶在 D-配体溶液中进行沉淀时为酶引入了新的特性,这种特性在多次重复使用过程中保持不变。“印迹”胰凝乳蛋白酶催化合成的 N-乙酰-D-色氨酸乙酯的光学纯度达到 98% 以上。可以说,这一技术为新型人工催化剂的设计提供了有力手段。

10.4 反向胶团的酶学研究

所谓反向胶团酶催化体系是指在非极性有机溶剂中,酶分子溶解在由表面活性剂形成的含水反向胶团内催化底物的转化。在适宜条件下,反向胶团溶液是均相的、热力学稳定的透明液体。早在 1952 年, Hanahan 观察到卵磷脂在甲醇和二乙醚的混合溶剂中可被磷脂酶催化水解。此后, Misiorowsk 和 Wells 进行了详细的研究,并提出在有机溶剂中可形成反向胶团。至 1977 年 Marinek 首先利用表面活性剂使酶溶解有机溶剂中,从此,有机溶剂中的酶学研究开始了突飞猛进的发展。

至 1986 年已对近 30 种酶在反向胶团中的催化特性进行了研究。大多数的研究结果证明:包覆在反向胶团中的酶具有水溶液中所没有的优良特性,如良好的稳定性、较高的催化活力,甚至表现出“超活力”(Super activity)。

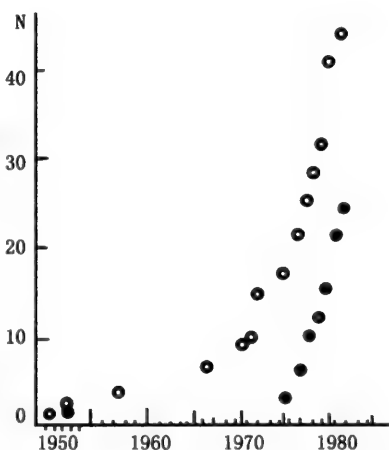


图 10-11 借助表面活性剂溶解于有机溶剂中的酶的数量(●)及催化活力研究(○)

10.4.1 反向胶团的形成与酶的包覆

当体系中水和有机溶剂同时存在时,两性表面活性剂分子会形成球状或椭球状的胶束,其大小与蛋白质分子相近(在同一数量级上)。当体系中水浓度高于有机溶剂时,形成常规胶团;反之,则形成反向胶团。图 10-12 为典型的相图。

CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 和 AOT(Aerosol ST, 即 Sodium bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate) 是反向胶团体系中最常用的表面活性剂。用于形成反向胶团的溶剂为非极性有机溶剂,如碳氢化合物——辛烷、苯,长链醇、氯仿、二乙醚或混合物。其他两性化合物有 SDS、烷基化 PEG(商品名 Brij)、吐温、Triton 和天然卵磷脂等。

胶团的大小一般不超过几个纳米。由阴离子表面活性剂所形成的反向胶团的大小均匀,且与表面活性剂浓度无关。而阳离子表面活性剂则不同,所形成的胶团大小分布范围宽,表面活性剂浓度越高,所形成的大胶团所占比例越高。在有机溶剂中,反向胶团以动态存在,表面活性剂分子可以在胶团与主体溶剂中快速地进行互换,其在胶团分子上的停留时间约为 10^{-7} 秒。此外,处于胶团上的表面活性剂分子并非静止存在,而是连续地颤动,就象是“飘浮在劲风中的羽毛”。然而,尽管表面活性剂分子有很高的流动性,但反向胶团的界面却能保持完好,并不为周围溶剂分子所穿透。由于其动态特性,在有机溶剂中反向胶团体系是很容易达到平衡。例如,AOT 在烷烃中只需简单摇动就可自发地形成反向胶团,所形成的胶团溶液保存数周乃至数月而不会发生任何变化。建立包覆于反向胶团中的酶反应体系只需将冻干的酶或酶的水溶液加到含有表面活性剂的有机溶剂中,搅拌或振荡,酶分子便自发包覆到反向胶团之中。

两性化合物在有机溶剂中所形成的反向胶团为蛋白质在有机溶剂中的溶解提供了良好的条件。蛋白质分子可根据其自身的性质选择最适宜的微环境。如图 10-13 中(a)所示:亲水性蛋白质分子可以完全包覆在反向胶团核心的水溶液环境中,从而避免与有机溶剂和胶团界面的直接接触;而对具有表面催化活力的酶,如脂肪酶,可以与反向胶团的表面层相互作用,甚至部分嵌入(b);典型的膜酶(疏水性蛋白质)则直接与有机溶剂接触(c)。

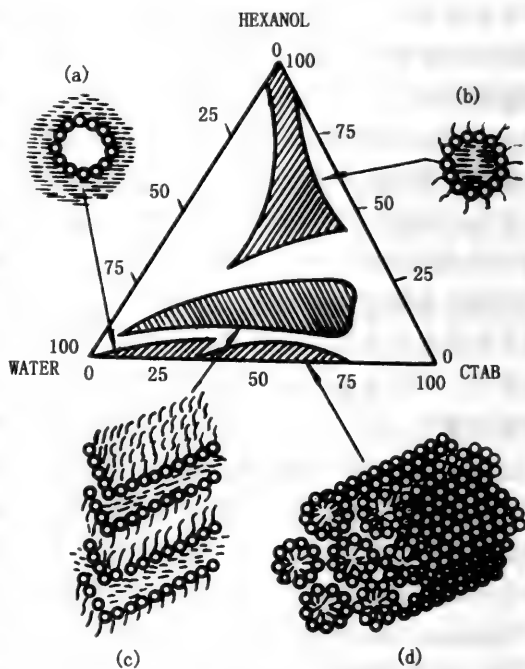


图 10-12 CTAB/水/己醇体系相图

(a) 常规胶团;(b) 反向胶团;(c),(d) 中介相

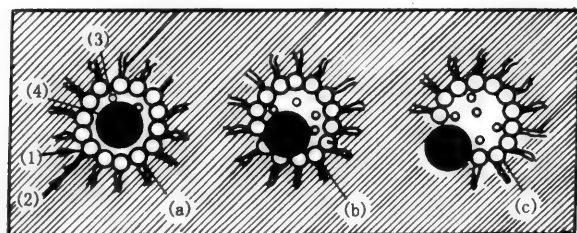


图 10-13 反向胶团示意图

分别含有(a)亲水性,(b)表面活性及(c)疏水性蛋白质。

(1) 表面活性剂分子的极性头;(2) 表面活性剂分子的碳氢尾;(3) 反离子和/或水分子;(4) 蛋白质(酶)分子。

10.4.2 反向胶团包覆酶的催化特性

包覆在反向胶团中的酶催化反应动力学符合典型的 Michaelis-Menten 方程,但在微观非均相体系中所进行的酶反应动力学还涉及到底物、抑制剂、激活剂及其他组分在有机溶剂和胶团相之间的扩散与分配。另外,当使用无机表面活性剂时,电荷层(双电层)的形成会引起胶团内局部 pH 的改变(通常为 1~2 个 pH 单位),改变程度由电荷的符号及表面活性剂结合水的量来决定。这是反向胶团酶催化中 pH 曲线与水溶液中有所偏离的根本原因,这种效应与固定化酶催化体系中 pH 的变化情况相似。

在反向胶团酶催化体系中,含水量是影响酶的催化活力和稳定性的重要因素。对反向胶团中的 α -胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、溶菌酶、磷脂酶、醇脱氢酶、焦磷酸酶、胰脂肪酶、过氧化物酶、碱性磷酸化酶及羟基醇脱氢酶等催化特性的研究表明:酶催化活力与胶团的结合水程度密切相关。一级反应速率常数与水的摩尔分率($[H_2O]/[Surfactant]$)和表面活性剂浓度均呈钟罩型曲线。例如,G. Hedstrom 利用脂肪酶在 AOT/异辛烷反向胶团体系中催化胆固醇酯的合成与水解反应进行了研究,结果证明当 $[H_2O]/[AOT]$ 的摩尔比为 9 时,酶促反应具有最高速率。

在有机溶剂中的反向胶团可以溶解并包覆大量的水和其他极性底物。通常 1 个分子表面活性剂可以增溶几十个化合物分子。水的存在导致了水结合反向胶团的产生,其形状和大小均与在低水含量体系中所形成的反向胶团不同。例如,在异辛烷/AOT 反向胶团中,随着 $[H_2O]/[AOT]$ 从 0 提高到 50,胶团半径从 1.7nm 增大至 12nm。随水化程度的提高,胶团的不对称性的降低(由椭球形变成近似球形)。

胶团中水的理化性质与主体相有很大差异,包括酸度、粘度、极性等等。当结合水程度较低时,由 AOT 形成的胶团中水的粘度约为主体相中水的 200 倍,其极性与氯仿相当。随水化程度的增加,这种差异越来越不明显。结合于反向胶团中的水的独特性质可能会对酶催化特性及活力产生较大影响。

Martinek 和 Klyachko 在研究中发现,包覆在 AOT/正辛烷反向胶团中的 α -胰凝乳蛋白酶的一级反应速率常数 K_{cat} 仅略高于水溶液中的 K_{cat} 值,但过氧化物酶则表现出极高的超活力(Super activity)。包覆的过氧化物酶活力与胶团中表现活性剂浓度有关,但含有不同浓度表面活性剂的所有体系均具有相同的最大速度常数 $K_{cat,max}$,其值比水溶液体系中高 100 倍。当处于最佳水结合度时,包覆于卵磷脂/混合溶剂(正辛烷/甲醇/戊醇为 27:1:2, v/v)反向胶团体系中的酸性磷酸化酶活力比水中高 200 倍。这种“超活力”现象在反向胶团酶学研究中引起了极大的兴趣。

处于反向胶团中酶的专一性也会发生改变,如马肝醇脱氢酶可催化脂肪酸氧化产生相应的脂肪醛:



在水溶液中,酶作用的最适底物为辛醇。当酶包覆在反向胶团中后,其作用专一性明显改变,最适底物为丁醇,这种变化可能是由于体系极性对底物分配产生影响而引起的。疏水性较强的底物(辛醇)更易于分配在非极性的有机溶剂中,从而在酶活性中心周围极性环境中的底物浓度降低,反应速率减慢。包覆在反向胶团中的猪胰脂肪酶作用底物专一性也与水溶液中有明显不同:在底物的水乳液中,酶对任何一个脂肪酸衍生物均没有特别的专一性,而在 AOT/辛烷反向胶团中,其催化油酸甘油酯水解的最大速率比三丁酸甘油酯快 15 倍。

10.4.3 反向胶团酶学的应用

利用反向胶团包覆可使酶“溶解”在非极性的有机溶剂中,从而使一些水不溶性化合物,如胆固醇、前列腺素、生物碱、脂类、脂肪等都可以作为酶催化的底物进行转化。同时也大大拓展了酶在有机合成方面的应用。例如,Veeger 及其合作者成功地利用反向胶团包覆三酶体系实现了孕酮的酶

促还原。Martinek 对 20 世纪 80 年代反向胶团体系在酶催化反应中的应用作了归纳,如表所示:

表 10-9 反向胶团体系的应用

应用领域及化合物	催化剂	研究者
精细有机合成:		
1) 原理		Martinek et al., 1977
2) 水不溶化合物的转化		Martinek and Semenov, 1981
a) 链烷醇	醇脱氢酶	Martinek et al., 1981
b) 孕酮	固醇脱氢酶	Hilhorst et al., 1983, Malakhova et al., 1983
c) 甘油酯	脂肪酶	Morita et al., 1984, Han and Rhee, 1985
d) 亚油酸	脂氧化酶	Luisi et al., 1984
e) 前列腺素类	前列腺素合成酶	Mevkh et al., 1985
3) 肽合成	糜蛋白酶	Luthi and Luisi, 1984
临床与化学分析:		
4) 生物发光分析	萤火虫荧光素酶	Belyaeva et al., 1983, Klyachko et al., 1987
5) 水不溶化合物的检测	D-氨基酸氧化酶 脂氧化酶	Kurganov et al., 1985
6) 酶联免疫分析	过氧化物酶	Erjomin et al., 1986
能量与物质的生物转化:		
7) 水的生物光解	氢化酶	Hilhorst et al., 1982
8) 纤维素水解为葡萄糖	纤维素酶	USSR patent, 1984
医药:		
9) 生物体中的药物载体	纳米微囊化的酶	Speiser, 1984
10) 外用药物	胶原酶及蛋白酶	USSR patent, 1984
蛋白质化学:		
11) 超离心测定蛋白质的分子量及有效体积		Levashov et al., 1981, 1982
12) 利用水不溶化合物对蛋白质的共价修饰		Levashov et al., 1984, Klivanov et al., 1985
13) 蛋白质的选择性抽提和分离		Goklen and Hatton, 1985
其他:		
14) 结晶酶学		Douzou, 1980
15) 分离技术		Armstrong, 1985

在传统的水溶液体系中,由于大部分底物处于离子化状态或高度水化状态,因而水解反应占据优势。对生成水的聚合反应,如糖和氨基酸聚合分别生成寡聚糖和肽、脱氢和酯化反应,通过降低介质中的水含量,可使反应的平衡点发生转移,提高聚合反应产物的得率。反向胶团酶催化体系可以有效地实现这一目的。Martinek 利用醇脱氢酶在反向胶团中催化异丁醇氧化成相应的醛,反应的平衡常数比水溶液中提高 10^6 倍。

反向胶团体系的出现,使酶分析方法在理论和应用上都得到了很大发展。首先,酶法检测非水溶性化合物得以实现;其次,由于包覆在反向胶团中的酶具有更高的催化活力和稳定性,从而使分析方法更为灵敏和可靠。如,利用荧光素酶可检测低浓度 ATP 的存在:



将酶包覆在 Brij96/辛烷/水体系中,可检测的 ATP 最低浓度达到 10^{-15} mol/L。

反向胶团在医药领域同样引起人们的极大兴趣。例如,在胶团体系中可将蛋白质药物分子用不溶于水的化合物进行化学修饰,制备与生物膜有较强相互作用的疏水性蛋白质,从而产生崭新的医疗特性;将药物包覆在胶团中,可以建立药物体内运输的新方式。此外,含酶的纤微米颗粒或纤微米胶团通常具有很好的热稳定性,如 Martinek 成功地制备出半径小于几十纤微米的反向胶团,包覆其中的胰凝乳蛋白酶可在 $80^\circ\text{C} \sim 90^\circ\text{C}$ 保持催化活力。

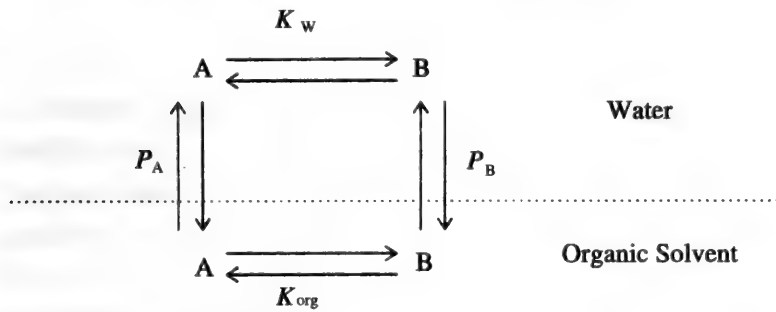
著名的膜研究专家 E. Maddy 曾指出:“蛋白质研究必须在水溶液介质中进行的观念并不是来源于蛋白质本身固有的特性,而是由于技术的限制,人为地将其局限在了水溶液之中。”反向胶团酶学在过去的若干年中无论在基础研究还是应用研究上都已取得了引人注目的进展。

10.5 水-有机溶剂两相体系

10.5.1 两相体系的特点与构成

Antonini 和 Lilly 工作小组分别于 1973 年和 1975 年将两相体系应用到生物催化反应中,从而对精细有机合成的发展起到了极大的促进作用。开始,使用两相体系的目的在于实现高浓度水不溶性底物,如胆固醇的生物转化,后来以 Klivanov 为首的莫斯科小组利用两相体系作为反应介质成功进行了有机合成反应,如酯和肽的合成。Martinek 对单底物和双底物反应中两相比对反应平衡常数的影响作了数学描述:

两相体系中,反应物的产物在两相间进行分配:



其中 K_w, K_{org} 分别为两相中反应平衡常数, $P_A = \frac{[A]_{org}}{[A]_w}$, $P_B = \frac{[B]_{org}}{[B]_w}$

当反应达到平衡时,整体平衡常数:
$$K_{biphasic} = \frac{[B]_{total}}{[A]_{total}} = K \frac{1 + P_B \frac{V_{org}}{V_w}}{1 + P_A \frac{V_{org}}{V_w}}$$

反应产率与相比的关系如图:对单底物反应,产率和相体积比之间为单增变化,存在极限值:

$$K_{biphasic} = K \frac{P_B}{P_A}$$

而双底物反应在最佳相比时,产率达到最大值。

在两相体系中,有机溶剂的选择至关重要。溶剂选择应满足以下要求:不引起酶变性失活;酶具有较高的催化活力;底物和产物在两相间具有最佳分配系数,减少抑制作用,达到最高反应速率。最佳溶剂的选择是一个非常复杂的问题,针对特定体系有特定的选择。

常规的两相体系是由水和水不互溶的有机溶剂所构成,而 Kulas 和 Mattiasson 则提出水溶液两相体系。当两种性质上不相容的水溶性聚合物,如 PEG 和 dextran,以合适的浓度共存于水中时,会形成不相容的两相。由于两水相间的表面张力与水/有机溶剂体系相比低得多,因而可获得很大的界面面积,使反应速率得到提高。这是一种特殊的两相酶催化体系。

10.5.2 固定化催化剂在两相体系中的应用

在水/有机溶剂/固定化酶体系中,固定化过程可通过保护酶不受有机溶剂的变性作用而提高其稳定性,载体的类型和特性对酶活力和稳定性极其重要,如当催化剂包埋在天然或合成的凝胶中时,胶的亲水-疏水平衡便是一个重要的影响因素。此外,载体性质和溶剂极性对底物和产物在固定化酶与溶液主体之间的分配起着决定性作用。

上述体系实际是一个有水、有机溶剂和固定化酶所构成的多相体系,Lilly 和 Woodley 对这一复杂的体系进行了详细描述。他们将两相和三相体系划分为五种不同的类型,如图 10-14 所示。

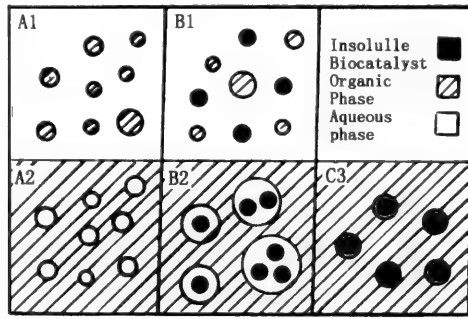


图 10-14 水、有机溶剂和固定化酶构成的多相体系

- A1: 有机溶剂分散在含可溶性酶的水溶液中;
- A2: 可溶性酶溶于水相,而后分散在有机溶剂中;
- B1: 固定化酶和有机溶剂分散在水中;
- B2: 固定化酶和水分散在有机溶剂中;
- C3: 仅有薄层水吸附在固定化酶周围,分散在有机溶剂中

A1 和 B1 体系中的水为连续相,A2、B2 和 C3 体系中有有机溶剂为连续相。A1 和 A2 体系适合于在搅拌罐反应器中进行反应。在搅拌罐中,反应速率与搅拌程度及两相体积比有关。在分散相中底物浓度与其粘度有关,从而对反应速率产生影响。B1、B2 和 C3 体系中使用固定化催化剂,反应器的形式可采用搅拌罐、流化床或固定床等不同方式。B1 和 B2 中由于存在分散的水相,不仅存在相间传质,而且催化剂颗粒的内外扩散也构成限速步骤。相对而言,C3 中无分散水相,更易于操作。随颗粒表面吸附的水层越薄,传质阻力越低。利用游离酶时,水与有机溶剂之间应能够得到充分乳化以提供足够的接触表面,减少传质阻力。

10.5.3 两相体系的应用

两相体系作为有机溶剂酶催化的一种形式,广泛应用于非水溶性底物的转化。例如 Furnhasin 等利用固定化或游离细胞在两相体系中实现了烷烃的环氧化反应。烷烃环氧化物的制备有两条主要途径,即氯乙酸法和过氧化氢法。这两种方法成本高、能耗大、存在副产物的处理、污染、腐蚀和安全等方面的问题。因而研究人员致力于开发新的方法来进行取代。利用生物工程方法实现烷烃环氧化被认为是一个可能的取代途径。烷烃在适宜有机溶剂中的溶解度比水中高得多,从而在溶剂相中可达到较高的底物浓度,降低水相中底物和产物的抑制作用。Neidleman 利用多酶体系实现了烷烃氧化物的合成; Schwartz 和 McCoy 在 *Pseudomonas Oleovorans* 发酵液中加入 20% (v/v) 环己烷,将 1,7-辛二烯转化为环氧辛烯和二环氧辛烷,反应转化率可达到 90% 以上。利用两相体系,95% 的单环氧辛烯可被抽提到有机相中,从而有效降低了产物的抑制作用,反应转化率得以提高。

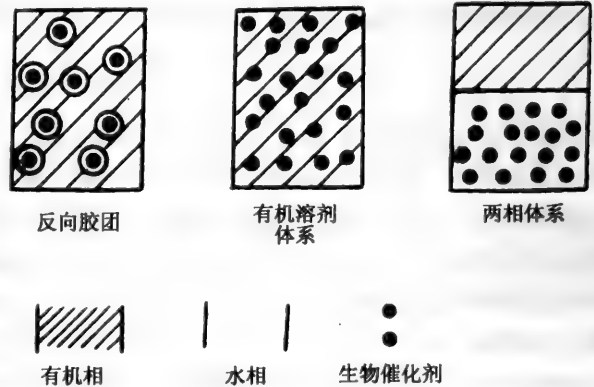


图 10-15 非水介质酶催化体系构成示意图

至此,已对非传统酶学中所涉及的三种常见酶催化反应体系-无水(微水)有机溶剂体系、反向胶团体系及两相体系分别进行了论述。三种体系在构成上有显著不同,因而酶催化行为也各不相同。

表 10-10 有机介质体系中酶催化行为的比较

参数	反向胶团体系	无水有机溶剂体系	双相体系
酶活力	高	低	低
酶负载量	低	高	高
产率	高	低	低
产物回收	难	容易	一般
酶重复利用	难	可能	难
连续操作	难	可能	可能

在反向胶团体系中酶具有良好的分散状态和微环境,故表现出很高的催化活力。但由于反向胶团中酶的负载量有限,从而无法达到理想的产物终浓度,而且利用反向胶团体系进行连续催化和酶的重复使用都存在困难,其应用受到一定的限制。在双相体系中,酶活力受有机溶剂性质的影响,这种影响主要来自于底物和产物在两相之间的分配作用。从理论上说,在水/有机溶剂两相体系中进行生物催化时,产物的得率会高于任何一单相体系。两相体系的最大缺点是体系中水的大量存在不利于产物的分离,使操作成本提高。相比而言,有机溶剂酶催化体系在操作上具有较为显著的优势。

10.6 非水介质酶催化反应在有机合成中的应用

在水溶液中,酶分子中的疏水氨基酸有避开水而隐藏于分子内部的趋势,从而引起分子折叠。当周围环境中的水为非极性溶剂所替代时,酶分子内的疏水基团分散,导致三级结构的重排。这意味着酶分子构象在极端条件下会发生剧烈改变。酶分子的非极性“口袋”由内向外翻转,其催化行为或空间结构似乎与水中有所不同,因而研究者推测在非水介质中其立体选择性会有所改变。近年来的研究结果越来越证明了人们所预期的结果:即在非水介质中酶常常会有高度的选择性,包括立体选择性、对映体选择性、区域选择性和化学选择性。这为非水介质酶催化在有机合成领域开辟了极有意义的新天地。迄今为止,已有以脂肪酶、蛋白酶为典型代表的多种酶用于非水介质中催化酯化、酯交换、肽合成和大环内酯合成等多种反应,特别在前手性化合物的不对称合成、对映体的选择性拆分等方面获得了诸多有意义的结果。

10.6.1 脂肪酶及其对映体选择性催化原理

在非水介质酶选择性催化研究中,脂肪酶(甘油三酯酰基水解酶,EC3.1.1.3)催化反应的对映体选择性引起了特别的重视。在非水介质中,脂肪酶具有以下特点:(1)在非极性溶剂中特别稳定,(2)对大小、构象及立体化学结构不同的多种底物具有催化活力,(3)在非极性溶剂中催化酯化反应的对映体选择性比常规水解反应要高。脂肪酶可催化的底物范围很广,这说明蛋白骨架富有极好的柔韧性,从而可容纳许多大小不同、构象各异的底物分子。目前,约有 20 种不同来源的脂肪酶以商业化产品出现,对五种酶进行了 X-射线结构分析,包括 *Rhizomucor miehei* 脂肪酶(RML)、人胰脂肪酶、*Pseudomonas glumae* 脂肪酶(PGL)、角质化酶和乙酰胆碱酯酶。结果表明,这些酶均为 Ser 酯酶,蛋白链中含有 α/β 水解酶的典型折叠结构,即大部分平行的 β -片段围绕在 α -螺旋核心的周围。活性中心 Ser 周围具有共同的五氨基酸序列:Gly-X-Ser-X-Gly。这种折叠结构使得所有的脂肪酶催化中心的三个氨基酸——Ser, His, Glu/Asp——具有相同的排列方式:Ser 处于 β -片段与 α -螺旋之间的发夹结构弯角处,其他两个氨基酸 His 和 Glu/Asp 位于 Ser 的一侧,形成的氧离子空洞位于 Ser 的另一侧,从而构成了所有脂肪酶的共同催化机制:在水溶液中,一个“盖子”覆盖

在活性中心位点上,当脂类或有机溶剂存在时,“盖子”打开,暴露出活性中心,催化底物进行转化。

表 10-11 有机介质中有代表性的酶催化反应

催化剂	溶剂	催化反应
脂肪酶(粗提物)	非极性溶剂	酯合成、酯交换、肽合成、大环内酯合成
蛋白酶(嗜热菌蛋白酶,枯草杆菌蛋白酶,胰凝乳蛋白酶)	乙酸乙酯 戊醇	肽合成
固定化酶(羧基酯酶)	甲基丙酸酯	对映体选择性酰化外消旋醇
固定化醇脱氢酶	异丙醇	酮类底物的不对称还原
固定化多酚氧化酶	氯仿	酚氧化为喹啉
固定化扁桃酸脲酶	乙酸乙酯	光学活性 R-醇的合成
胆固醇氧化酶	庚烷,四氯化碳 丁酸乙酯	3 β -羟基类固醇的氧化

脂肪酶具有很宽的作用底物范围,且在适宜条件下对大量的手性分子具有高度的对映体选择性,因而脂肪酶被有机化学家广泛应用于光学纯化化合物的制备中,包括选择性水解、酯化或转酯制备药物前体、农用化学品或其他合成材料。

表 10-12 商品化脂肪酶及其来源

酶源	厂商	酶源	厂商
Alcaligenes sp.	Amano	Porcine pancreas	Sigma, Amano
Achromobacter sp.	Meito Sangyo	Pseudomonas qeruginosa	Amano
Aspergillus. niger	Amano	Pseudomonas fluorescens	Amano
Bacillus subtilis	Towa Koso	pseudomonas sp.	Sigma, Boehringer-Mannheim
	Sigma, Amano, Meito Sangyo Boehringer-Mannheim	Rhizopus arrhizus	Boehringer-Mannheim
Candida cylindracea			
Candida lipolytica	Amano	Rhizopus delemar	Sigma, Amano
Chromobacterium viscosum	Sigma, Toyo Jozo	Rhizopus Titanabe	Seiyaku
Geotrichum candidum	Sigma, Amano	Rhizopus japonicus	amano, Nagase, Sangyo
		Rhizopus oryzae	Amano
Humicola lanuginosa	Amano	Rhizopus sp.	Amano, Serva
Mucor miehei	Amano, Novo	Wheat germ	Sigma
Penicillium camemberli	Phone-Poulenc		
Phycomyces nitens	Takeda Yakuhin		

迄今,对脂肪酶对映体识别机制的了解仅限于通过对其作用底物的共同特征来获得经验性规律。如,经过对催化酯水解或酯合成反应的对映体选择性进行总结归纳,发现脂肪酶的选择性遵循以下规律:与体积相似的其他醇相比,脂肪酶催化仲醇的反应速率较快,对具有两个不同大小取代基的仲醇可进行有效拆分。虽然各种酶对不同醇的对映体选择性程度有所不同,但所有脂肪酶和酯酶对仲醇都具有相同的偏爱空间结构。这一经验性结论为新的脂肪酶催化反应中预测酶偏爱的仲醇对映体提供了方向。

10.6.2 对映体选择性拆分

在有机溶剂中,借助脂肪酶催化酰基转移反应可实现消旋酸或消旋醇的光学拆分。所催化的转酰基反应可以是酯化,也可以是转酯。从机理上说,酶促酯合成或酯交换与相应的水解反应具有某些相同的特征,但决定立体化学专一性的基本原理有一定的差异。

脂肪酶在有机溶剂中催化转酰基反应动力学可表述为乒乓反应机制:

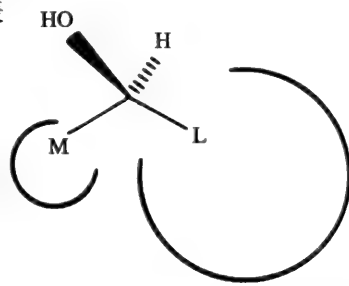
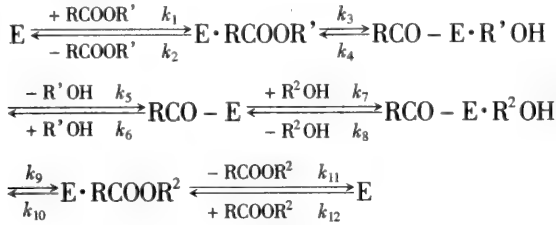


图 10-16 CRL 偏爱的仲醇对映体结构示意图
M—中等大小取代基; L—大取代基

当 R' = H 时, 上述反应为酯化反应方程。

对水解反应而言, 由于体系中高浓度水的存在 (55.5mol/L), 反应专一性降低。另外, 在酶促缩合反应中, 产物的积累会导致逆反应的进行, 因此反应平衡常数 K 不仅对转化率有极大影响, 而且对酶的对映体选择性也有显著影响。对酶促拆分反应:



其中 A 和 B 为一对对映体, 反应的平衡常数 $K = \frac{k_2}{k_1} = \frac{k_4}{k_3}$, 恒量反应的对映体选择性参数 $E = \frac{k_1}{k_3}$ E 也称为对映体比率, E 值越大, 酶对 A 的选择性越高, E 值可通过以下公式进行计算:

$$E = \frac{\ln[1 - (1 + K)(1 - \frac{[A]}{[A]_0})]}{\ln[1 - (1 + K)(1 - \frac{[B]}{[B]_0})]}$$

$$\text{或 } E = \frac{\ln[1 - (1 + K)(c + ee_s\{1 - c\})]}{\ln[1 - (1 + K)(c - ee_s\{1 - c\})]}, \quad E = \frac{\ln[1 - (1 + K)c(1 + ee_p)]}{\ln[1 - (1 + K)c(1 - ee_p)]}$$

其中 c 为转化率, 其最大值为 $[1/(1 + K)]$, ee_s 和 ee_p 分别为底物和产物的对映体过剩值。

上述方程表明, 酶促反应的对映体选择性由动力学参数 E 和热力学参数 K 共同决定。根据方程进行计算机作图, 可知: 产物和残余底物的光学产率与 K 值大小成反比, 而且即使 K 值很小的反应, 通过提高转化率 ($> 50\%$) 的方法也无法获得高纯度的残存底物。根据特定反应的 $c - E - K$ 图, 可以对反应程度进行预测与控制, 以期达到最佳反应结果。

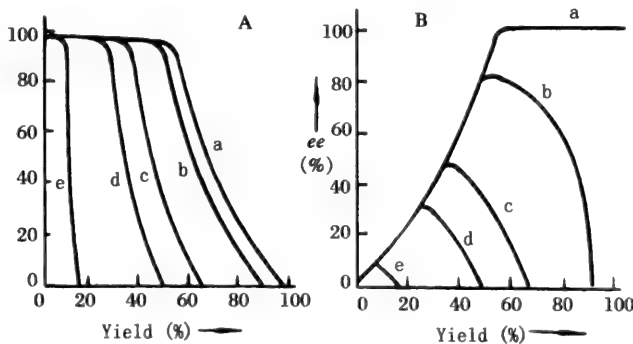


图 10-17 产物(A)和残存底物(B)的对映体过剩与转化率的函数关系
 $E = 100, K = 0(a); 0.1(b); 0.5(c); 1.0(d); 5.0(e)$ 。

仅当反应完全不可逆时, E 值才是不依赖于底物浓度和转化率的常数。在不可逆的前提下, 或在反应的初始阶段, 产物积累很少 (如转化率 $< 20\%$, 对一般反应, 当转化率接近 40% 时, 逆反应才

变得明显)时测定底物和产物的 $ee\%$ 值,可通过计算获得 c 和 E 值:

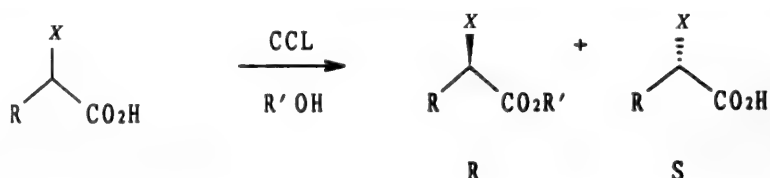
$$c = \frac{ee_s}{ee_p}, \quad E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} \quad \text{或} \quad E = \frac{\ln[(1-c)(1+ee_p)]}{\ln[(1-c)(1-ee_p)]}$$

在高转化率 (>40%) 时测定 ee_s 和 ee_p , 可计算 c 、 E 及平衡常数 K 值。

值得强调的是,只有当反应不可逆时, E 值才是与转化率无关的常数,否则, E 会随着 c 发生显著的变化。例如脂肪酶于正己烷中催化(±)-2-溴己酸与1-丁醇酯化反应,当体系中加入0.1%的水时,随转化率由30%提高至67%, E 值由300降低至3。

10.6.3 消旋酸的酶促拆分

利用有机溶剂中酶催化酯的不对称合成可以对消旋酸进行光学拆分,该研究领域较为成功的例子是2-卤素羧酸的光学拆分。通常大多数底物通过酶促酯化可获得高光学纯度的R-酯。



澳大利亚的 Chemie Linz CO. 在 100kg 规模上实现了两个衍生物的拆分: a: $R = CH_3$, $X = Br$, b: $R = C_4H_9$, $X = Br$ 。研究中还发现酯化反应的 E 值随醇链长的增长而提高。此外,利用不对称转酯反应也可以实现手性酸的制备。当酯分子中手性碳原子位于酸部分上时,使用非手性醇进行选择性转酯反应,然后通过层析或蒸馏的方法将两种酯进行分离。由于酯的分离常常具有较大难度,从而使这一方法的应用受到限制。在消旋酸的拆分反应中,由于底物的电性及空间障碍对酶催化具有强烈的影响,因而一般带有供电基团或庞大侧链的羧酸形成酶-底物复合物的速率较慢,此时将消旋酸转化为活性酯(如氯乙酯),更易受到亲核攻击而加快反应的进行。

10.6.4 消旋醇的拆分

消旋醇的拆分是非水介质酶促拆分研究中的一项重要内容。前面已提到脂肪酶对具有两个不同大小取代基的仲醇可进行有效的选择性催化。此外,水解酶类还可以催化许多具有环状结构或非环状结构的伯醇或仲醇进行选择性酰化反应。

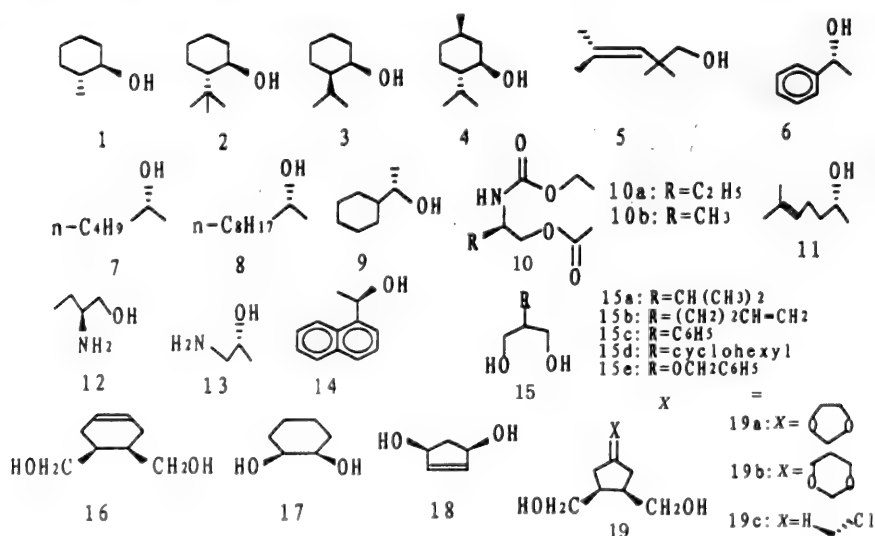
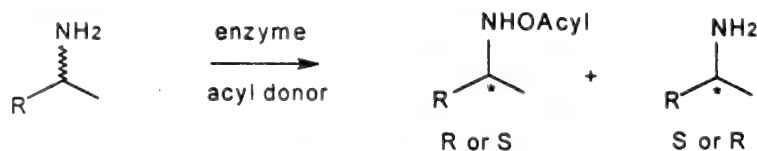


表 10-13 消旋醇的酶促拆分研究结果

底物	选择性	酰基供体	转化率(%)	ee _s %	ee _p %	E	底物	选择性	酰基供体	转化率(%)	ee _p %
Candida cylindracea						PPL 纯化的 P1 组分					
1	1R,2R	十二烷酸	44	80	98	>100	15a	Pro-R	乙酸甲酯	91	65
2	1R,2S	十二烷酸	34	/	-100	>100	15b	Pro-R	乙酸甲酯	70	90
3	1R,2R	十二烷酸	30	/	88	23	15c	Pro-R	乙酸甲酯	98	92
4	1R,2S,	十二烷酸	45	/	95	92	15d	Pro-R	乙酸甲酯	90	58
	5R										
5	R	十二烷酸	31	32	72	8	16	Pro-R	乙酸甲酯	/	96
6	R	十二烷酸	35	50	93	45					
Mucor miehei lipase						Pseudomonas sp. lipase					
6	R	辛酸	45	71	87	31	15e	Pro-S	乙酸异丙酯	53	96
7	R	辛酸	51	87	83	30					
8	R	辛酸	49	83	87	38					
9	R	辛酸	44	67	86	27					
PPL 粗酶制剂						PPL 粗酶制剂					
10a	R	乙酸乙酯	41	65	>95	78	17	Pro-S	乙酸甲酯	/	84
10b	R	乙酸乙酯	51	>97	91	>100	18	Pro-S	乙酸三氯乙基酯	48	95
11	R	三氯乙基丁酸酯	30	66	88	22	19a	Pro-S	乙酸甲酯	57	26
11	R		52	>97	91	>100	19b	Pro-S	乙酸甲酯	74	68
12	S	乙酸乙酯	/	>95	>95	>100	19c	Pro-S	乙酸甲酯	79	84
13	R	乙酸乙酯	/	/	>95	/					
14	R	三氯乙基丁酸酯	49	-93	-100	>100					

10.6.5 消旋胺的拆分

手性胺在医药工业和精细化工领域具有广泛的用途,可作为药物或药物合成的中间体。例如,毒扁豆碱作为治疗早老性痴呆症(亦称 Alzheimer's 疾病)的药物已进行临床试验。此外,手性胺作为手性羧酸的拆分剂同样倍受关注。在有机溶剂中酶催化酯和胺之间进行氨解反应可以获得光学活性胺或酰胺:



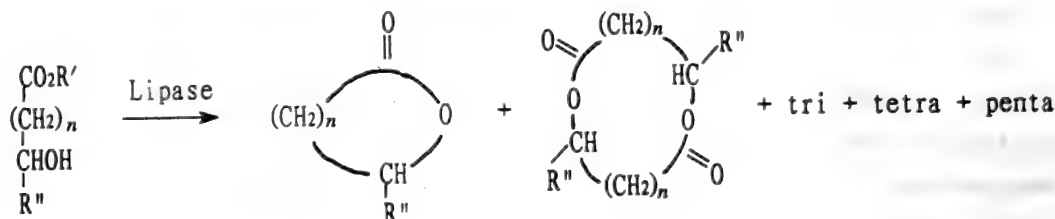
a: R=Ph; b: R=1-naphthyl; c: R=Et; d: R=C₅H₁₁

用于催化氨解反应的常用酶,一个是枯草杆菌蛋白酶,其催化产物为 S-胺,而 *Candida antarctica* lipase (CAL) 催化产物通常为 R-胺。Gutman 利用玻璃珠固定化酶构建连续柱状反应器,制备重要的药物中间体(R)-1- aminoindan。在 3-甲基-戊醇中,以丁酸三氟乙基酯进行转氨反应,连续操作 95 小时,R-胺的产量为 330g,产率为 40%,光学纯度大于 98%。

10.6.6 酶促大环内酯的合成

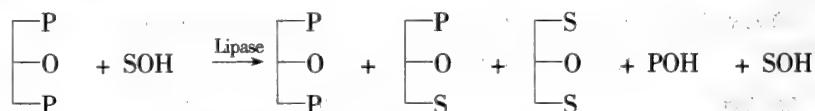
内酯衍生物是香料和食品工业中常见的调味成分。据报导,多种昆虫的异性吸引信息素及植

物生长调节剂也具有内酯结构。大部分内酯衍生物为手性分子,生理活性与构象有关。在有机溶剂中脂肪酶可催化羧酸与酯发生内酯化反应来合成大环内酯。研究表明:合成的产物随羧酸的链长及脂肪酶源的不同而异。例如,在无水异辛烷中,不同来源的脂肪酶催化 10-羟基十碳酸内酯化时,反应的产物不是十碳的单元内酯,而是二~五元内酯的混合物。不同来源的脂肪酶催化反应产物中各化合物的比例不同。当脂肪酶催化 16-羟基十六碳酸发生内酯化反应时,16 碳内酯为主要产物。因此,内酯化反应过程似乎并不像想像中的那么简单。



10.6.7 区域选择性催化

多功能团有机化合物的选择性修饰通常具有一定难度。利用常规化学反应往往需要多步且繁琐的操作。借助酶的区域选择性催化可使这一过程得到简化。所谓区域选择性是指酶对同一化合物分子中的几个相同基团具有选择的能力。例如,利用脂肪酶选择性催化甘油三酯的酯交换反应,从油脂制取类可可脂是最为典型的例子。



利用 1,3 位专一性脂肪酶催化转酰基反应,可从较为廉价的油脂制取由 SOS/SOP/POP(三者的比例为 30.1:49.3:19.8, w/w/w)的类可可脂,其组成及理化性能与天然可可脂极为相似(天然可可脂中三者的比例为 34.3:49.0:16.2),可作为优良的天然可可脂代用品用于食品和医药工业。

10.6.8 溶剂及催化剂纯度对选择性的影响

在非水介质酶选择性催化反应中,有机溶剂不仅对反应速率及酶的稳定性有很大影响,且对酶的专一性,也有明显的影响。迄今已有大量研究报导了溶剂性质及水含量对酶的对映体选择性的影响。结果表明,随溶剂疏水性的增加,酶的对映体选择性降低。也有研究者认为,酶在 $\lg P \sim 2$ 的溶剂中具有最佳的对映体专一性。假如将所研究的溶剂分为环状结构和非环状结构两组,可得到他们作为反应介质时酶催化选择性 E 与 $\lg P$ 之间的平滑的相关曲线。值得注意的是,由于每项研究都是针对特定的反应模型,对此进行系统的比较似乎有较大的难度。

此外,目前用于催化反应的酶大多为粗酶制剂,其中竞争性酶的存在也是影响选择性的因素之一。一般来源于微生物的脂肪酶为胞外酶,具有较好的均一性和纯度。而来源于哺乳动物或植物的脂肪酶制剂中常含有干扰性的其他酶,包括蛋白酶和酯酶。这些干扰性酶常常表现出与目标脂肪酶相反或较差的对映体选择性,从而导致反应具有较低的光学产率或出现难以重现的结果。为去除或减小这些酶的干扰,可采取以下措施:(1) 利用化学试剂处理粗酶制剂,如丝氨酸酶抑制剂,使干扰酶失活;(2) 利用物理方法处理酶制剂,如纯化、结晶等;(3) 选择适宜的酰基供体作为目标酶的有效作用底物,而对于干扰性酶来说却不是适宜底物。在利用粗 PPL 酶制剂进行催化反应的研究中证明,使用上述方法可以有效提高产物的光学纯度。如,经过真空脱水至恒重后,PPL 催化酯化反应的 E 值可提高 3 倍。这是由于完全脱水后干扰酶不能有效发挥其催化活力,而 PPL 自身由于具有极强的结合水能力,即使真空干燥也不会完全去除这些结合水,从而表现出良好的催化能力。

参 考 文 献

- 1 Ampon K., Basri M. et al. Immobilization by adsorption of hydrophobic lipase derivatives to porous polymer beads for use in ester synthesis. *Biocatalysis*, 1994, 10: 341 ~ 351
- 2 Arroyo Miguel, Sanchez-Montero J. M., et al. A new method to determine the aw range in which immobilized lipases display optimum activity in organic media. *Biotechnology Techniques*, 1996, 10(4): 263 ~ 266
- 3 Bosley J. A. and Clayton J. C. Blueprint for a lipase support: Use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, 43: 934 ~ 938
- 4 Braco Lorenzo, Dabulis Katherine and Klivanov A. M. Production of abiotic receptors by molecular imprinting of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87: 274 ~ 277
- 5 Cao S. G., Yang H. et al. Enhancing enzymatic properties by the immobilization method. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, 59: 7 ~ 14
- 6 CASA R. M. dela, Sanchez-Montero J. M. and Sinisterra J. V. Water adsorption isotherm as a tool to predict the preequilibrium water amount in preparative esterification. *Biotechnology Letters*, 1996, 18(1): 13 ~ 18
- 7 Cygler Miroslaw, Grochulski Pawel et al. A structural basis for the chiral preferences of lipases. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116: 3180 ~ 3186
- 8 Gupta M. N. Enzyme function in organic solvents. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 203: 25 ~ 32
- 9 Halling P. J. Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: Prediction of effects on equilibrium position. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 35: 691 ~ 701
- 10 Halling P. J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, 16: 178 ~ 206
- 11 Inada Yuji, Nishimura Hiroyuki, et al., Ester synthesis catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase in benzene. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 1984, 122(2): 845 ~ 850
- 12 Kirchner Gerald, Scollar M. P. and Klivanov A. M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107(24): 7072 ~ 7076
- 13 Laane Colja. Medium-engineering for bio-organic synthesis. *Biocatalysis*, 1987, 1: 17 ~ 22
- 14 Mestri S. D. and Pai J. S. Effect of moisture on lipase catalyzed esterification of geraniol of palmarosa oil in non-aqueous system. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(4): 459 ~ 461
- 15 Robb D. A., Yand Zhen and Halling P. J. The use of salt hydrates as water buffers to control enzyme activity in organic solvents. *Biocatalysis*, 1994, 9: 277 ~ 283
- 16 Soh Bin Kim and Cha Yong Choi. Effect of solid salt hydrates on the asymmetric esterification of 2-chloropropionic acid: control of water activity in organic solvent. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(10): 1075 ~ 1076
- 17 Zaks A. and Klivanov A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82: 3192 ~ 3196
- 18 Zaks Aleksey and Klivanov A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(17): 8017 ~ 8021

11 酶的分子工程

酶的分子工程(molecular engineering of the enzyme)主要指用化学或分子生物方法对酶分子进行改造。随着各个学科及相关技术的发展,特别对酶结构与功能的深入了解、基因工程及固定化技术的普及,使酶的分子改造工程进入实用阶段。总体来说酶的分子工程分两部分:一是分子生物学水平,即用基因工程方法对 DNA 或 RNA 进行分子改造,以获得化学结构更为合理的酶蛋白。二是对天然酶分子进行改造,这包括酶一级结构中氨基酸置换、肽链切割、氨基酸侧链修饰等。具体而言,酶的分子工程主要有以下几方面内容。

- 1) 对酶分子的侧链基团,尤其酶活性中心中的必需基团进行化学修饰,研究酶的结构与功能的关系;
- 2) 通过对酶功能基团的修饰和与水不溶性大分子的结合,改造酶性能,增加酶的稳定性;
- 3) 通过对酶分子内或分子间的交联,或与水不溶性载体的结合制成固定化酶,催化特定的反应;
- 4) 用化学方法合成新的有机催化剂,使其具有酶活性(模拟酶);
- 5) 用分子生物学方法克隆酶或修饰基因以便产生新的酶(突变酶),或设计新基因合成自然界不存在的新酶(抗体酶)。

模拟酶和抗体酶本书另有章节介绍,本章重点介绍酶的化学修饰(enzyme modification)。

近年来研究发现,由于酶分子表面外形的不规则、各原子间极性和电荷的不同、各氨基酸残基间相互作用等结果,使酶分子结构的局部形成了一种微环境(酶活性部位就是处于微环境中)。这种微环境可以是极性的,也可以是非极性的,但都直接影响着酶活性部位氨基酸残基的电离状态,为它们发挥作用提供了合适的条件。酶经过化学修饰后,除了能减少由于内部平衡力被破坏而引起的酶分子伸展打开外,还由于大分子修饰剂本身就是多聚电荷体,所以有可能在酶分子表面形成一层“缓冲外壳”,在一定程度上抵御外界环境的电荷、极性变化,维持酶活性部位微环境的相对稳定,使酶能在更广泛的条件下发挥作用。

11.1 设计酶化学修饰的注意点

酶化学修饰所用的各种方法手段虽多,但基本原则都是充分利用修饰剂所具有的各类化学基团的特性,或直接或经过一定的活化过程与酶分子上某种氨基酸残基(一般尽量选择非酶活必需基团)产生化学反应,对酶分子结构进行改造。以下几点是我们开始设计酶化学修饰反应时必须注意的。

11.1.1 对酶性质的了解

主要包括对酶的活性部位、酶的稳定条件、酶反应最佳条件及酶侧链基团性等的了解。

11.1.2 对修饰剂的要求

在选择修饰剂时要考虑:(1) 修饰剂的分子量、修饰剂链的长度对蛋白质的吸附性;(2) 修饰剂上反应基团的数目及位置;(3) 修饰剂上反应基团的活化方法与条件。一般情况下,要求修饰剂具有较大的分子量、良好的生物相容性和水溶性、修饰剂分子表面有较多的反应活性基团及修饰后酶活的半衰期较长。

11.1.3 对酶反应条件的选择

修饰反应一般总是尽可能在酶稳定的条件下进行,尽量少破坏酶活性功能的必需基团。反应的最终结果是要得到酶和修饰剂的高结合率及高酶活回收率。因此选择反应条件时要注意:(1) 反应体系中酶与修饰剂的分子比例;(2) 反应体系的溶剂性质,盐浓度和 pH 条件;(3) 反应温度及时间。以上的反应条件随修饰反应的类型不同而不同,需要经过大量实验才能确定。

11.2 酶分子侧链基团的化学修饰

用化学修饰的方法研究酶分子的结构与功能已经成为一种重要的基础手段,酶分子侧链基团的修饰是通过选择性的试剂或亲和标记试剂与酶分子侧链上特定的功能基团发生化学反应而实现的,这是酶分子化学基础研究的一个方向。侧链基团化学修饰的一个非常重要的作用是用来探测活性部位的结构。反应试剂与酶分子接触并发生化学反应,与酶分子的侧链氨基酸残基共价连接形成某些可探测的报告基团。理想情况下,修饰试剂只是有选择地与某一特定的残基反应,很少或几乎不引起酶分子的构象变化。在此基础上,从该基团的修饰对酶分子的生物活性所造成的影响,就可以推测出被修饰的残基在该酶分子中的功能。

在 20 种构成蛋白质的常见氨基酸中,只有具有极性的氨基酸残基的侧链基团才能够进行化学修饰,这些基团的反应性取决于它们的亲核性。很多因素都可以影响亲核性的大小,这些因素对酶分子的化学修饰反应会造成较大的影响。

选择性修饰试剂首先必须要能够与某一特定的氨基酸残基的侧链基团发生化学反应,并形成紧密的共价连接。人们已经找到许多不同氨基酸残基侧链基团的特定的修饰试剂并应用到酶分子的化学修饰的研究中。然而目前这类反应试剂的专一性不够,即使试剂对某一基团的反应是专一性的,也仍然有多个同类残基与之进行反应,使得对某个特定残基的选择性修饰非常困难。

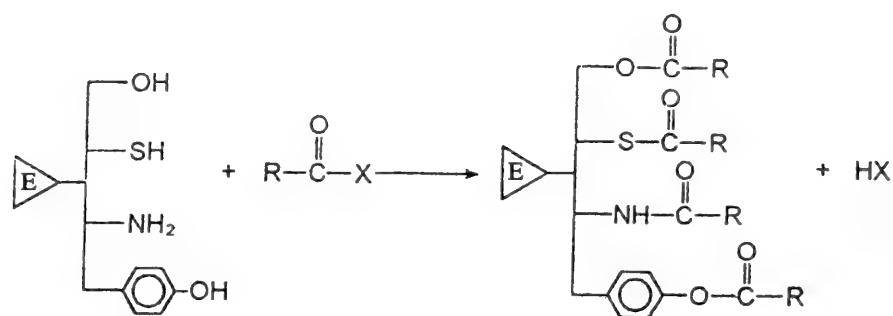
为了克服这一缺陷,人们开始使用亲和性标记试剂,这些化合物是具有化学反应性的蛋白质分子的底物或配体的类似物。由于结构的相似性,它们对底物或配体的结合部位具有一定的亲和性,因而能够选择性地结合在酶分子的表面上的特定部位。另外,由于亲和性标记试剂中最重要的是光亲和标记和标记和自杀性抑制剂两种类型。光亲和标记试剂的反应可以用光照来引发,因此它们的反应性可以被很好地控制,其参与反应的成分为自由基,可以与它们附近几乎所有的基团反应,这些标记试剂也可以与非极性的侧链基团相结合。自杀性抑制剂作为底物是没有反应活性的,一旦它们转变成产物,就会产生 1 个可反应基团,因此它们标记的是活性部位附近的侧链基团。由于它们的这种特性,自杀性抑制剂可以被用来作为治疗某些疾病的有效药物。

11.2.1 几种重要的修饰反应

尽管许多文献报道了大量的酶的修饰反应,但根据其反应性质主要可分为以下几种类型。

A 酰化及其相关反应

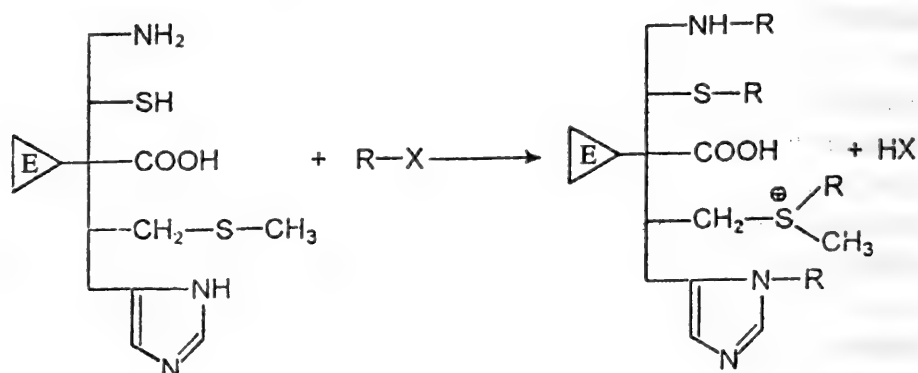
这类化学修饰试剂如乙酰咪唑、二异丙基磷酰氟、酸酐磺酰氯、硫代三氟乙酸乙酯和 O-甲基异脲等,它们在室温(20℃~25℃)、pH 值为 4.5~9.0 的条件下可与酶分子的某些侧链基团发生酰基化反应。被作用的酶分子侧链基团有氨基、羟基、巯基以及酚基等。



式中 E 表示酶分子。

B 烷基化反应

这类试剂的特点常常是带有活泼的卤素原子,由于卤素原子的电负性,使烷基带有部分正电荷,很容易导致酶分子的亲核基团(例如 $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ 等)发生烷基化。属于这类修饰试剂的有:2,4-二硝基氟苯、碘代乙酸、碘代乙酰胺、苯甲酰卤代物和碘甲烷等。被作用的分子的侧链基团有氨基、巯基、羧基、硫醚基和咪唑基等。

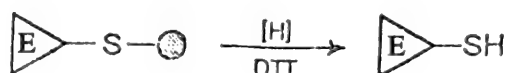
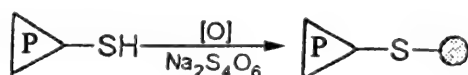


C 氧化和还原反应

这类试剂具有氧化性,能将侧链基团氧化,属于这类试剂的有 H_2O_2 ,N-溴代琥珀酰亚胺等,有些试剂具有很强的氧化性,往往容易使肽链断裂,因此在修饰反应中要控制好氧化条件。光敏剂存在下的光氧化是一种比较温和的氧化作用。易受氧化作用的侧链基团有巯基、硫醚基、咪唑基、咪唑基以及酚基等。

另外还有一类主要作用于二硫键的还原剂。这类修饰试剂有2-巯基乙醇、巯基乙酸和二巯苏糖醇(DTT)等。

值得提出的是连四硫酸钠或连四硫酸钾(Tetrathionate)是一种温和的氧化剂,因此在化学修饰反应中常用来作为 $-\text{SH}$ 的可逆保护剂。



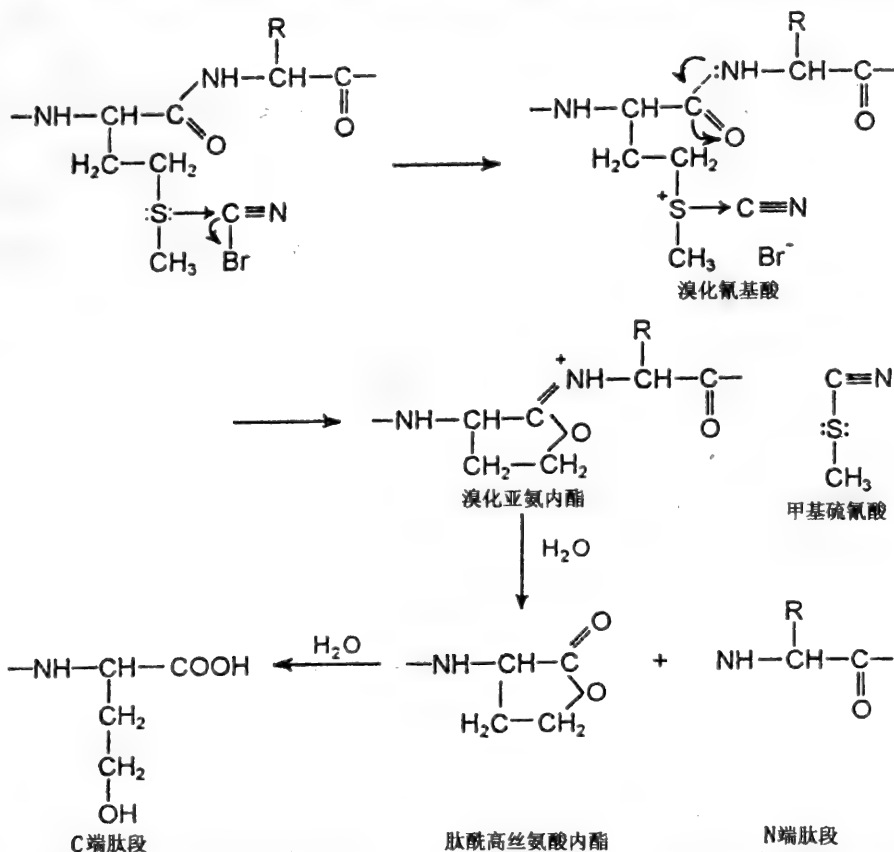
D 芳香环取代反应

酶分子氨基酸残基的酚羟基在3和5位上很容易发生亲电取代的碘化和硝化反应。这类修饰反应的一个典型的例子是四硝基甲烷(TNM, Tetranitro-methane),它可以作用于酪氨酸的酚羟基,形

成 3-硝基酪氨酸的衍生物。这种产物有特殊的光谱,可用于直接的定量测定。



另外还有一些酶分子与化学试剂的重要反应,如溴化氰裂解,在自发和诱导重排的条件下主要导致肽键的断裂。溴化氰(CNBr)裂解甲硫氨酸残基的羧基侧链肽键的反应机理如下图所示:



酶分子化学修饰的反应极其复杂,某一特定的侧链基团可以被很多种不同反应的试剂修饰,酶分子中同一种基团被某一试剂修饰时,其化学反应性也很不相同,这与基团所处的化学微环境有关。有时两类不同的侧链基团可以与同一试剂进行同一性质的反应。这种反应的复杂性给修饰结果的分析与处理带来了一定的困难。修饰试剂通常主要针对某一种侧链基团,但是很少是绝对专一性的。正因为这一点,我们在讨论修饰试剂对酶分子的影响时,也应该考虑它的一些其他的副反应。不管怎样,应该记住一个基团的修饰反应所需的特定反应条件暗示了酶分子内的特定的环境。

11.2.2 特定氨基酸残基侧链基团的化学修饰

A 巯基的化学修饰

由于巯基具有很强的亲核性,巯基基团一般是酶分子中最容易反应的侧链基团,因此人们最先研究它的特异性修饰试剂并研究了巯基在酶催化过程中的重要作用以及在一些酶分子中对维持亚基间相互作用所做的贡献。

烷基化试剂是一种重要的巯基修饰试剂,特别是碘乙酸和碘乙酰胺。在蛋白质的氨基酸组成分析和测序前,通常要用碘乙酸来使巯基基团羧甲基化,以防止半胱氨酸的降解,而且羧甲基化的半胱氨酸很容易被氨基酸分析仪所识别。其他一些卤代酸和卤代酰胺如溴代乙酸也被应用来修饰巯基,但反应比碘乙酸和碘乙酰胺要慢。然而,在卤代酸与巯基反应的同时,尽管反应能力比较弱,

咪唑基团也会与卤代酸结合,核糖核酸酶中的咪唑基团的反应就是一个明显的例子。

N-乙基马来酰亚胺是一种有效的巯基修饰试剂,该反应具有较强的专一性并伴随光吸收的变化,可以很容易通过光吸收的变化确定反应的程度。另外,N-取代马来酰亚胺自旋标记物可以作为自旋探针来研究酶分子构象变化的情况,如曾经用来有效地研究了丙酮酸脱氢酶复合体系臂的运动性的研究。图 11-1 表示几种常用的巯基试剂修饰时的反应方程式。

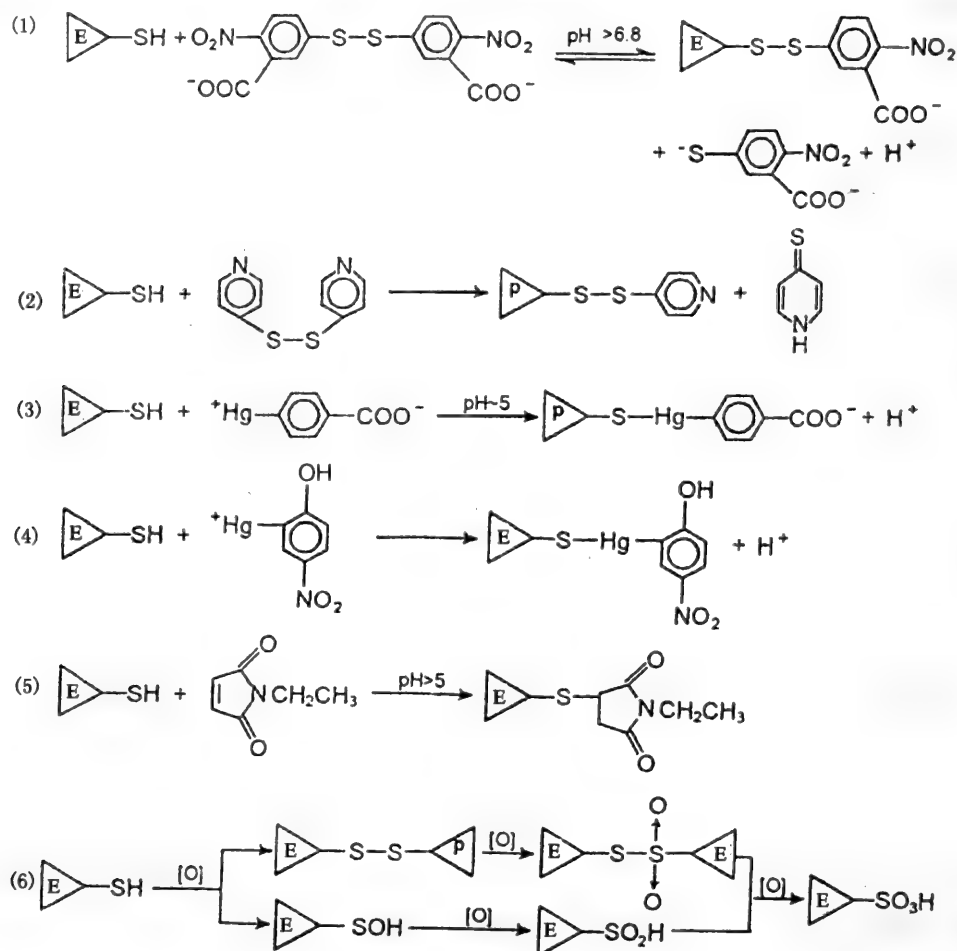


图 11-1 巯基的化学修饰

(1) DTNB; (2) 4,4'-二硫二吡啶(4-PDS); (3) 对氯汞苯甲酸(PMB);

(4) 2-氯汞-4-硝基苯酚(MNP); (5) N-乙基马来酰亚胺(NEM); (6) 过氧化氢氧化

5,5'-二硫-2-硝基苯甲酸(DTNB),又称为 Ellman 试剂,目前已成为最常用的巯基修饰试剂,DTNB 可以与巯基反应形成二硫键,使酶分子上标记 1 个 2-硝基-5-硫苯甲酸(TNB),同时释放 1 个有很强颜色的 TNB 阴离子。该阴离子在 412nm 具有很强的吸收($\epsilon = 1.36 \times 10^4 (\text{mol/L})^{-1} \text{cm}^{-1}$, $\text{pH} = 8.0$),可以很容易通过光吸收的变化来监测反应的程度。DTNB 也可以用来定量检测溶液中硫化氢的含量。只是 1mol 硫化氢与 1mol DTNB 反应将产生 2mol TNB 和 1 mol 硫。由于定点诱变的迅速发展,在目前的结构与功能的研究中,特别是半胱氨酸的侧链基团的化学修饰有被定点诱变的方法取代的趋势。Kanaya 等人用定点诱变的方法研究了半胱氨酸残基在核糖核酸酶 H 中的作用。

B 氨基的化学修饰

非质子化的赖氨酸的 ϵ -氨基是酶分子中亲核反应活性很高的基团,搞清楚它的亲核性对于研究赖氨酸的一系列修饰反应是很重要的。图 11-2 表示几种常用的氨基修饰试剂与酶分子中氨基反应的方程式。 ϵ -氨基的 pK_a 值一般为 10,由于微环境的影响,蛋白质分子中也可能存在低 pK_a 。

值的赖氨酸残基,这些残基具有更强的可反应性,因而可以被选择性地修饰。在草酰乙酸脱羧酶中就存在一个 pK_a 值为 5.6 的可反应赖氨酸残基。

有许多化合物都可用来修饰赖氨酸残基,三硝基苯磺酸(TNBS)就是其中非常有效的一种。TNBS 与赖氨酸残基反应,在 420nm 和 367nm 能够产生特定的光吸收,Xia 等人用 TNBS 标记了 GSH 转移酶的 1 个反应活性很高的赖氨酸残基,证实了在酶的活性部位 GSH 结合区域存在一个赖氨酸残基,即 Lys-44。

目前,氨基的烷基化已经成为一种重要的赖氨酸修饰方法,这些试剂包括有卤代乙酸、芳基卤和芳族磺酸,或者在氢的供体(如硼氢化钠,硼氢化氰或硼氢)存在的条件下使蛋白质分子与醛或酮反应,称为还原性烷基化。

赖氨酸残基的还原性烷基化所使用的羰基化合物取代基的大小对修饰的结果具有很大的影响。在硼氢化钠的存在下,用不同的羰基试剂使卵类粘蛋白、溶菌酶、卵转铁蛋白的赖氨酸残基烷基化,修饰程度为 40% ~ 100%。其中丙酮,环戊酮、环己酮和苯甲醛为单取代,而丁醛有 20% ~ 50% 的双取代,甲醛则几乎为 100% 的双取代。这 3 种蛋白的甲基化和异丙基化的衍生物仍是可溶性的,并且仍然具有几乎全部的生物活性。

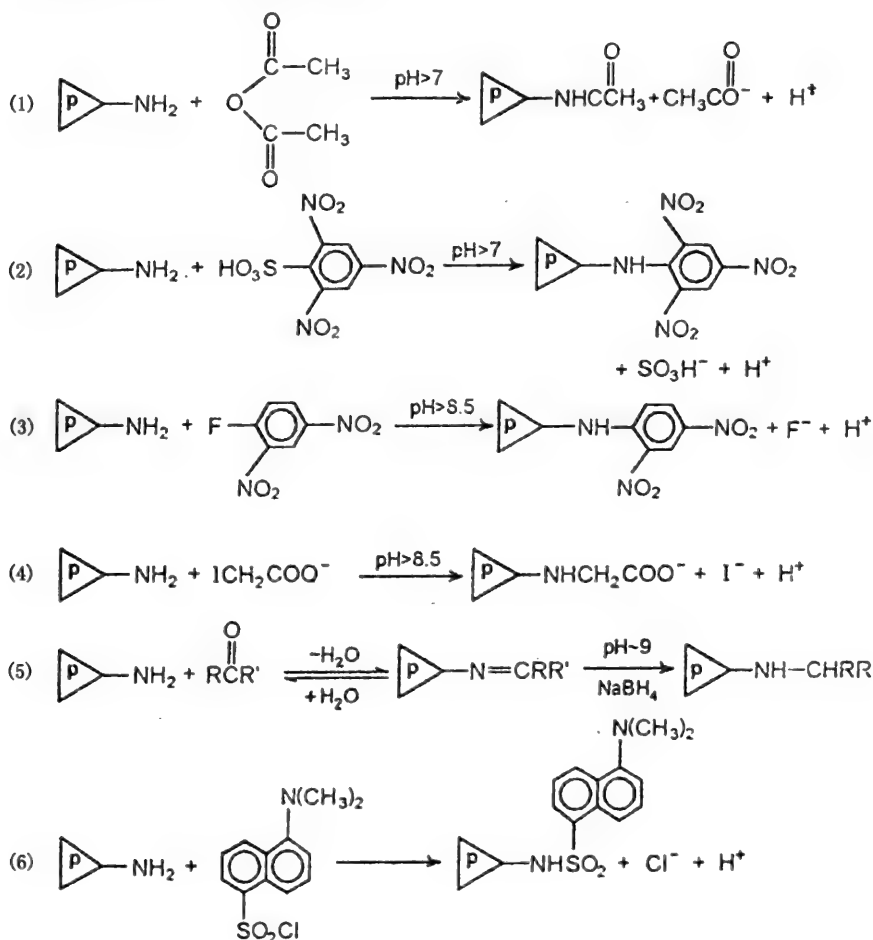


图 11-2 氨基的化学修饰

- (1) 乙酸酐; (2) 2,4,6-三硝基苯酚(TNBS); (3) 2,4-二硝基氟苯(DNFB)或称 Sanger 试剂;
(4) 碘代乙酸(IAA); (5) 还原烷基化; (6) 丹磺酰氯(DNS)

C 羧基的化学修饰

由于羧基在水溶液中的化学性质使得酶分子中谷氨酸和天门冬氨酸的修饰方法很有限,产物一般是酯类或酰胺类。几种修饰试剂与羧基的反应方程式表示于图 11-3。在一些情况下,它们也

可与赖氨酸残基的 ϵ -氨基通过酰胺键相连。

水溶性的碳化二亚胺类特定修饰酶分子的羧基基团,目前已成为一种应用最普遍的标准方法,它在比较温和的条件下就可以进行。 $[^{14}\text{C}]$ 甘氨酸乙酯酰胺化后在氨基酸分析仪上将会出现 1 个新的峰。在一定的条件下, $[^{14}\text{C}]$ 甘氨酸乙酯也可以与丝氨酸、半胱氨酸和酪氨酸反应。抗冻糖肽 8 的末端羧基与 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺反应结合上乙醇胺成为 N-(2-羟胺),仍然具有 90% 的剩余活力,说明该糖肽上羧基所带的电荷为非必需的。

羧基也可以与硼氟化三甲铵盐(Trimethylexonium fluoroborate)反应生成甲酯。胃蛋白酶与 $[^{14}\text{C}]$ 硼氟化三甲铵盐在 pH 值为 5.0 的条件下反应,酶的活力完全丧失,研究结果表明该酶有两个羧基为其必需基团。

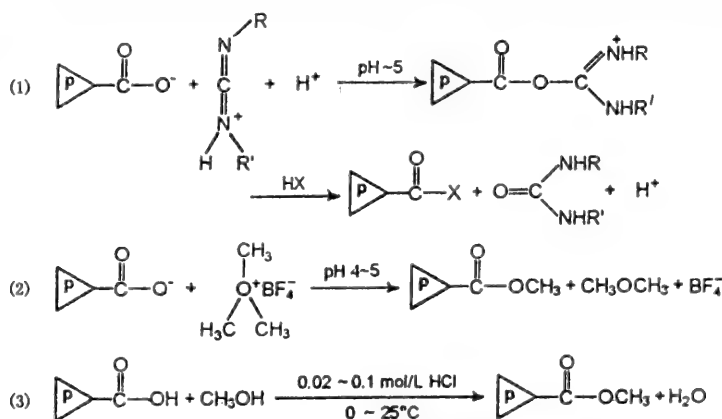


图 11-3 羧基的化学修饰

(1) 通过水溶液的碳化二亚胺进行酯化反应或脲化反应,式中 R, R' = 烷基;HX = 卤素、一级或二级胺;

(2) 硼氟化三甲铵盐;(3) 用甲醇-HCl 的酯化反应

D 咪唑基的化学修饰

组氨酸残基的咪唑基可以通过氮原子的烷基化或碳原子的亲核取代来进行修饰(图 3-10)。由于组氨酸残基位于许多酶的活性中心,因此有大量关于组氨酸残基修饰的报道。Schneider 曾对组氨酸残基在酶活性部位的作用进行了总结,见图 11-4。

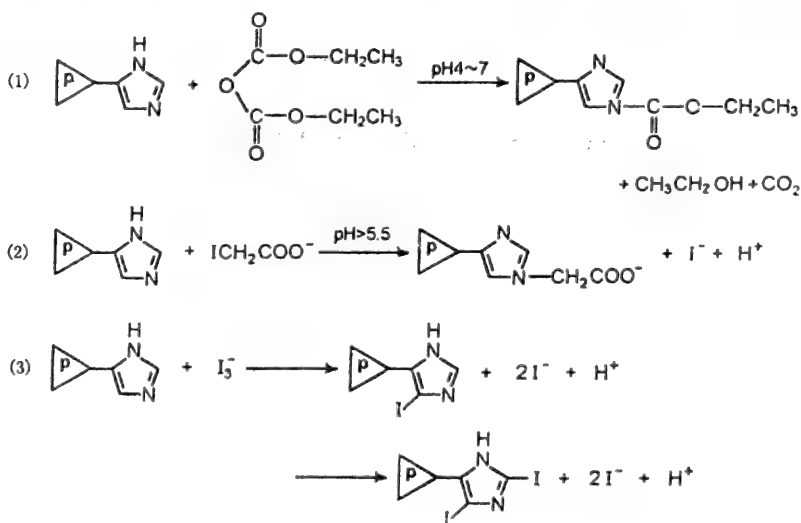


图 11-4 组氨酸咪唑基的化学修饰

(1) 焦碳酸二乙酯;(2) 碘代乙酸;(3) 碘化反应

组氨酸残基的咪唑基的修饰主要有两种方法,第一种是光氧化。然而,光氧化的特异性很低,不但与组氨酸残基反应,而且与甲硫氨酸、色氨酸以及少量的酪氨酸、丝氨酸和苏氨酸残基进行反应。碱性亚甲蓝和玫瑰红是该方法常用的两种试剂。

焦碳酸二乙酯(DPC, Diethylpyrocarbonate)是最常用的修饰组氨酸残基的试剂。该试剂在接近中性的情况下表现出比较好的专一性,与组氨酸残基反应使咪唑基上的1个氮羧乙基化,并且使得在240nm处的光吸收增加。该取代反应在碱性条件下是可逆的,可以重新生成组氨酸残基。在水溶液中,特别是在高pH的情况下,该试剂的稳定性不够好。

E 胍基的化学修饰

精氨酸残基含有1个强碱性的胍基,在结合带有阴离子底物的酶的活性部位中起着重要作用,因此对精氨酸残基的修饰研究是非常重要的。但是,由于精氨酸残基的强碱性,因而与大多数试剂很难发生修饰反应,反应所需的高pH值也会导致酶结构的破坏,而一些二羰基化合物则能够在中性或弱碱性的条件下与精氨酸反应(图11-5),所以关于精氨酸残基的化学修饰试剂的研究大多集中在二羰基化合物上。

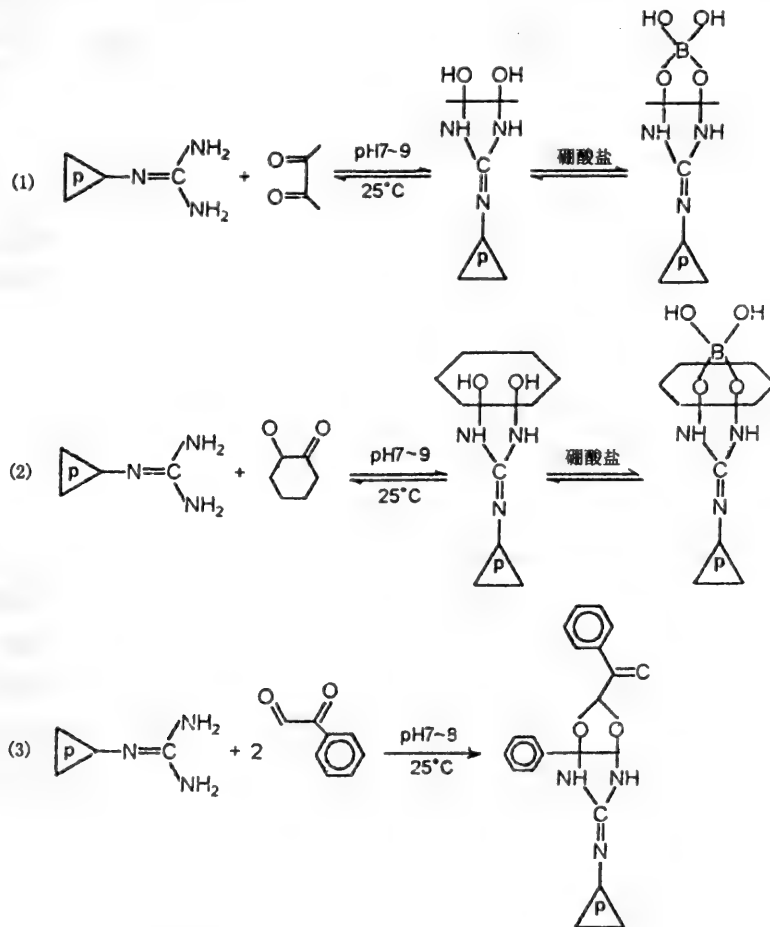


图 11-5 胍基的化学修饰

(1) 在硼酸盐存在下丁二酮; (2) 在硼酸盐存在下 1,2-环己二酮; (3) 苯乙二醛

丁二酮和 1,2-环己二酮与胍基反应可逆地生成精氨酸-丁二酮复合物,该产物可以与硼酸结合而稳定下来。上述反应要在黑暗中进行,因为丁二酮可以作为光敏性反应试剂破坏其他残基,特别是色氨酸、组氨酸和酪氨酸残基。丙酮酸激酶是众多酶中精氨酸残基修饰研究的一例,伴随精氨酸残基的修饰,酶分子可逆地失活,底物保护作用说明酶分子在底物磷酸烯醇式丙酮酸的磷酸结合位点具有 1 个必需的精氨酸残基。

F 二硫基的化学修饰

同巯基基团类似,二硫键具有其特有的特性可以用来进行特异的修饰,通常是通过还原的方法,这些方法通常与某些巯基修饰方法相结合以阻止再氧化成二硫键或计算断裂开的二硫键的数目。用巯基乙醇将二硫键还原成游离巯基是一种很常用的方法,具有高度的选择性和长的半衰期。为使二硫键充分还原,反应应该在有变性剂的存在下进行,并且由于反应的平衡常数接近于1,必须使用大大过量的巯基乙醇。

应用二硫苏糖醇(DTT)和它的差向异构体二硫赤藓糖醇(DTE),也称作 Cleland 试剂,一定程度上缓解了大过量的还原试剂使用的问题(图 11-6)。由于第二步反应是分子内反应以及还原试剂形成一个空间上有利的环状二硫键,因此反应平衡向还原蛋白质分子二硫键的方向移动。羟基使得 Cleland 试剂的水溶性增强,溶液因巯基的原因具有少许的臭味。

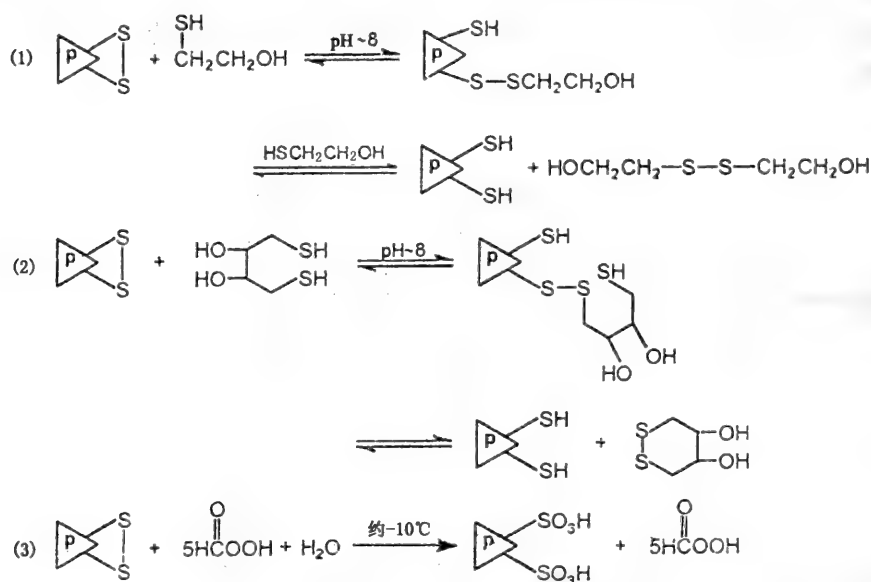


图 11-6 二硫键的化学修饰

(1) 2-巯基乙醇; (2) 二硫苏糖醇(DTT)或二硫赤藓糖醇(DTE); (3) 过甲酸

二硫键由于其在酶分子序列分析及在酶分子析叠研究中的重要地位,因此二硫键的化学修饰,二硫键数目的测定以及二硫键位置的确定成为非常重要的问题。酶分子中有无二硫键,是链内二硫键还是链间二硫键,这需要用实验的手段予以确定。最好的判断方法是通过 NR/R(非还原/还原)双向 SDS 电泳技术进行鉴定。其第一向样品未经还原处理,而第二向样品经过还原处理。因此,既无链内二硫键又无链间二硫键的酶分子出现在对角线上(两个方向电泳的迁移率相等);存在链间二硫键的酶分子,由于链间二硫键被还原而断裂,第二向电泳时由于分子变小而出现在对角线下方;只有含有链内二硫键的蛋白质分子,由于链内二硫键被还原,使分子伸展而体积增大,因此出现在对角线的上方。二硫键经还原处理后,被还原为巯基,一般情况下很易自动氧化回去,因而需要经过羧甲基处理,以防止重新氧化成二硫键。

11.2.3 化学修饰反应的条件控制

酶分子的特性反映了它的氨基酸组成的变化,功能基团的解离状态的改变使得整个复杂的维持其整体构象的吸引和排斥力的网络发生改变,进而影响到酶分子的生物学活性。由于许多化学修饰反应主要是由酶分子的整体结构所控制,但也为所要修饰的单个或一类基团的情况所影响,因此这些化学反应对于所处的反应条件特别敏感。在设计化学修饰反应时,仔细的选择反应条件是很关键的一步。

上述修饰氨基酸侧链基团的反应与大多数有机反应不同的一个重要的特征是反应试剂要温和得多。温和的反应条件是防止酶分子变性的一个必要条件。除非在实验中或应用时不必考虑酶的生物学活性,才会采取比较剧烈的反应条件。例如,酶作为某些商业粘合剂的粗原料时,其化学处理可以采用比较剧烈的条件。

在所有影响酶分子的化学修饰反应的条件中,pH 值是最最重要的一个条件,因为它决定了具有潜在反应能力的基团所处的可反应和不可反应的离子状态。

温度也是一个必须要注意的条件,因为温度可以影响到活性巯基的微环境。仔细选择温度可以减小或防止一些竞争的基团反应。在低温(约 -10°C)情况下用甲酸氧化酶可以使反应限制在半胱氨酸、胱氨酸和甲硫氨酸残基上。而在较高的温度下,甲酸可以与色氨酸、酪氨酸、丝氨酸以及苏氨酸残基发生反应。

一些试剂在水溶液中不溶或者溶解量有限,因此需要一些有机溶剂来帮助溶解。不幸的是对于大多数酶来说都不能用有机溶剂,因为有机溶剂可以使酶变性,通常会产生沉淀。尽管大多数酶是水溶性,一些存在于膜上的酶却只有在去垢剂的帮助下才能溶解。

在某些情况下,用化学修饰的方法来定量测定酶分子中某一残基的总数时,需将蛋白质分子充分伸展,以便使所有的残基暴露出来。使蛋白质分子充分伸展常用的手段是用变性剂变性。盐酸胍和脲和生物化学家所喜爱使用的变性剂。一般,绝大多数球状蛋白质分子在 8mol/L 脲溶液中或在 6mol/L 盐酸胍溶液中就处于充分伸展的状态。

图 11-7 为脲溶液对肌酸激酶和盐酸胍溶液对氨基酰化酶的空间结构的影响。从图中可见,用各种不同的物理和化学手段监测都表明在 8mol/L 脲溶液中或在 6mol/L 盐酸胍溶液中肽链已充分伸展。从图中还可以看到,半胱氨酸巯基随着肽链的伸展而暴露出来,在充分伸展的状态下才能测得总巯基数。

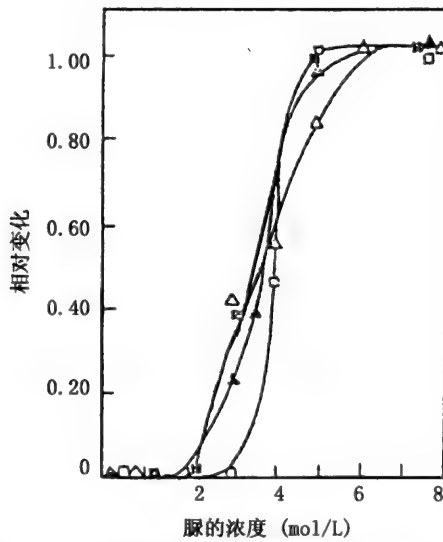


图 11-7 肌酸激酶在不同浓度脲溶液中的去折叠的情况

□—内源荧光发射光谱的红移;▲—标记基团的荧光发射光谱的红移;

■—内埋巯基的暴露;△—二聚体的解聚

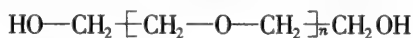
11.3 有机大分子对酶的化学修饰

酶化学修饰常用的修饰剂有糖及糖的衍生物(如有旋糖酐、糠肽、Sephadex G-25、Polylactose 等)、聚乙二醇、大分子多聚物(如乙烯吡咯烷酮、乙醇醇、乙烯乙酸、丙烯酸等的单聚或共聚物),具有生物活性的大分子物质(如肝素)、蛋白质类等,修饰方法亦很多,如:溴化氰法、高碘酸氮化法、戊二醛法、叠氮法、琥珀酸法和三氯均嗪法等。

现以聚乙二醇、右旋糖酐、糖肽、肝素、血清白蛋白为例,简要介绍一些化学修饰方法。

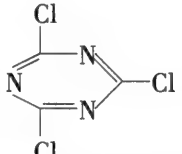
11.3.1 聚乙二醇

聚乙二醇(polyethylene Glycol, PEG) 是一个线性分子,它的分子式为:

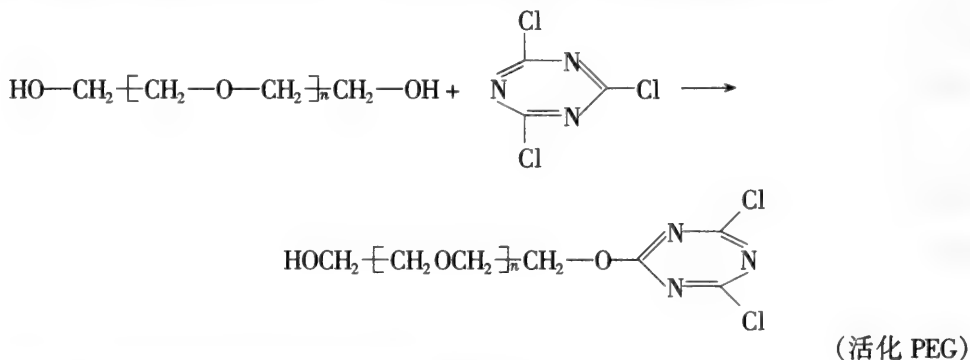


聚乙二醇具有良好的生物相容性,它在体内不残留、无毒无抗原性,故是一种优良的修饰剂。其修饰方法主要有:

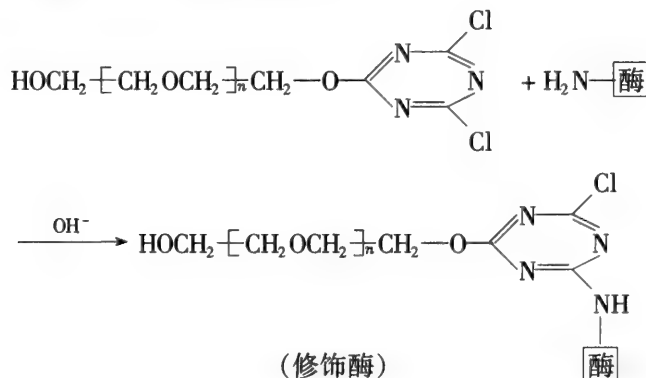
11.3.1.1 三氯均嗪法

三氯均嗪环  上的氯原子很活泼,容易产生亲核取代反应。当环上一个氯原子

被取代后,能够稳定其他的碳-氯键。(第一个氯原子在 4℃ 就能反应,第二个氯原子 25℃ 反应,第三个氯原子则要到 80℃ 才反应),三氯均嗪活化 PEG 形成修饰酶的反应如下:



通过石油醚抽提或减压蒸馏得到活化的 PEG。

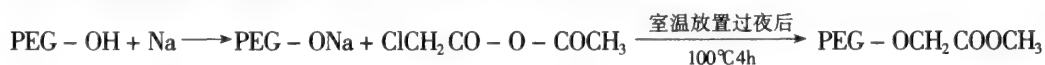


11.3.1.2 叠氮法

此修饰方法是 PEG 链端羟基转化成叠氮基,然后与酶反应,整个反应如下:

A PEG 甲氧甲酰甲酯制备

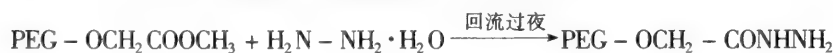
PEG 与氯醋酸酐及重氮甲烷反应生成 PEG 甲氧甲酰甲酯。



用减压蒸馏法除去过量的试剂。

B PEG 酰肼的制备

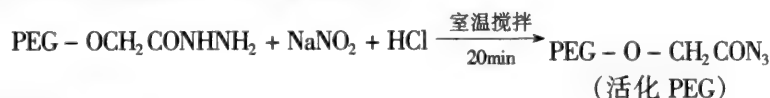
第一步反应产物与肼反应生成相应的酰肼化合物。



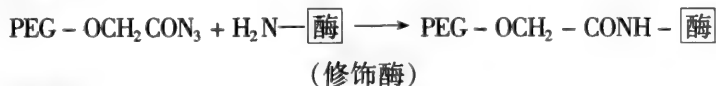
用减压蒸馏法得到产物。

C PEG 羧甲基叠氮化物制备

PEG 酰肼化合物经亚硝酸作用后生成活化 PEG。



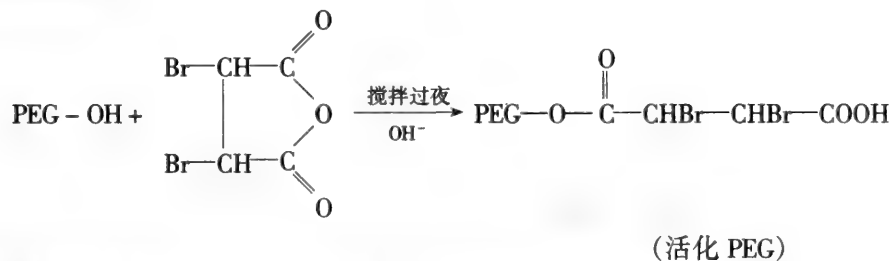
D 活化 PEG 与酶交联



11.3.1.3 琥珀酸酐法

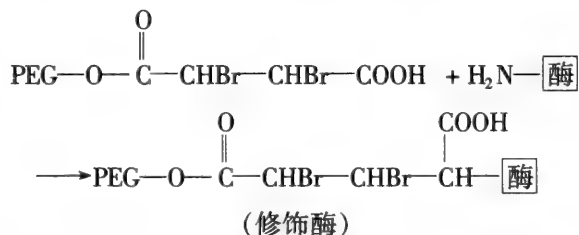
常用二溴代琥珀酸酐作为 PEG 的活化剂。活化反应在温和的碱性条件下进行,产物与酶分子上氨基产生交联反应。

1) PEG 活化反应



经过减压浓缩得到活化 PEG。也可用 α,β -碘代琥珀酸酐作为活化剂。

2) 修饰反应



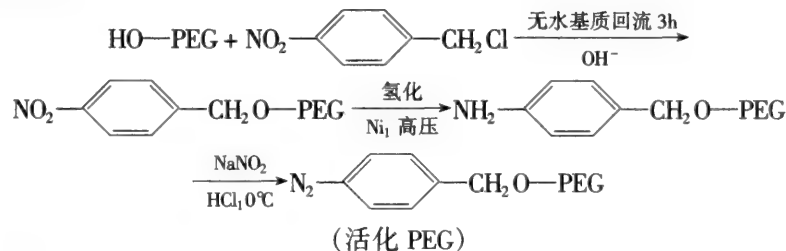
11.3.1.4 重氮法

重氮化反应主要是将修饰剂上有关基团转变为重氮基团,然后在弱碱性条件下与酶分子上酚基、咪唑基等反应,生成修饰酶。

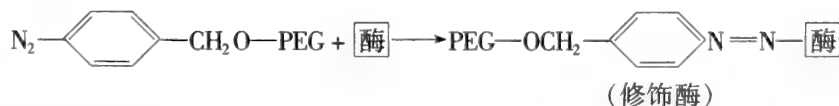
1) 对-硝基苄基化合物法

以对-硝基苄基氯作为 PEG 活化剂。

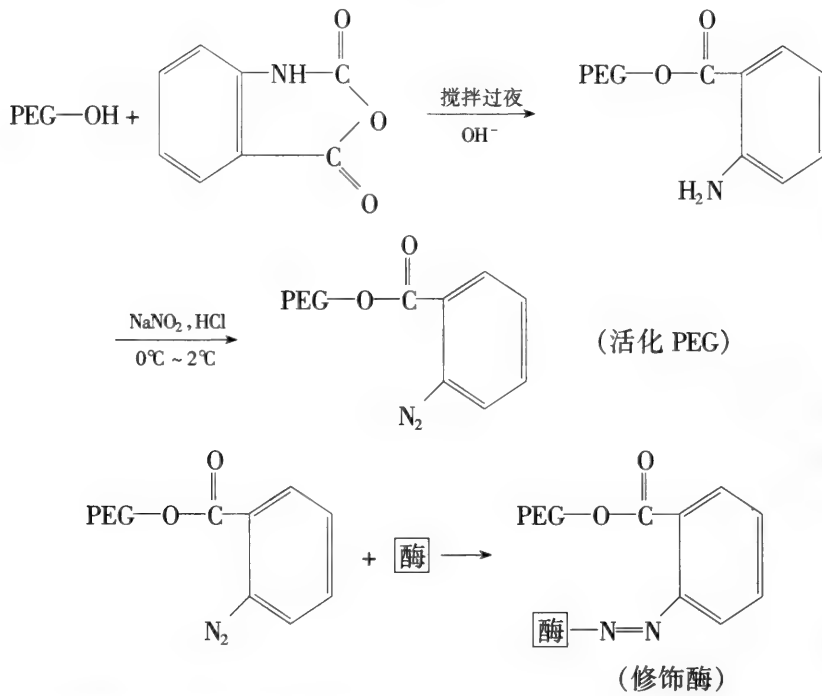
(1) PEG 活化反应



(2) 修饰反应



2) N-羧氨基苯甲酰法

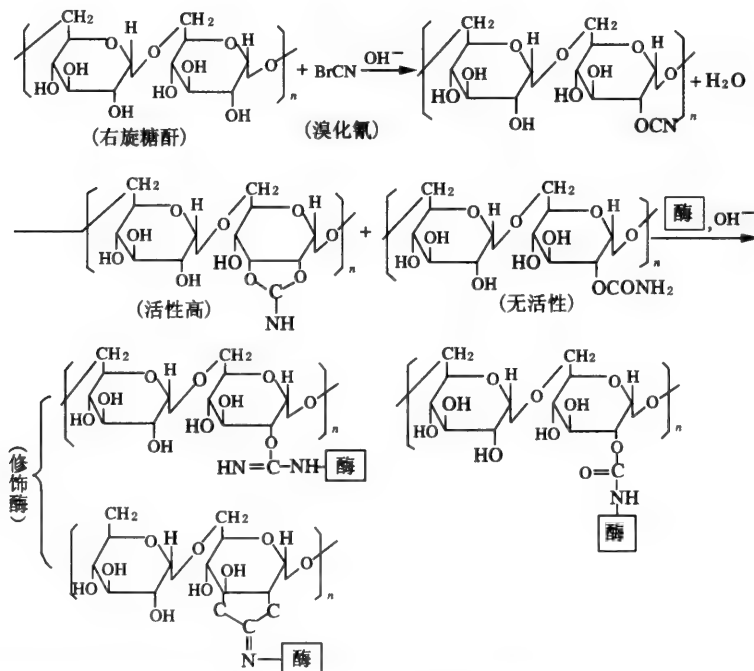


11.3.2 右旋糖酐及右旋糖酐硫酸酯

右旋糖酐是由 α -葡萄糖通过 α -1,6 糖苷键形成的高分子多糖, 具有较好的水溶性和生物相容性, 可用作代血浆, 右旋糖酐硫酸酯是多糖分子结构中的羟基与硫酸成酯而得。多糖链上的双羟基结构经活化后可与酶分子上自由氨基结合。

11.3.2.1 溴化氰法

糖分子上邻双羟基在溴化氰作用下活化, 然后在碱性条件下与酶分子上氨基反应, 产生共价结合。反应过程为:



右旋糖酐溴化氰法修饰酶时, 右旋糖酐的活化是关键的一步。为了能得到既含有较多的活性基团, 又保持水可溶性的活化右旋糖酐, 人们摸索总结出的活化反应要点如下。

1) 活化反应体系中溴化氰用量不能过多,一般以溴化氰:右旋糖酐为 0.5:1(质量比)或更少为宜。这主要是减少右旋糖酐在活化时产生过多的自身交联,导致产物水溶性降低。

2) 当所用的右旋糖酐分子量为 17 000 ~ 2 000 000 时,活化体系中右旋糖酐浓度应控制在 10mg/ml 左右,因为随着右旋糖酐分子量的增加,水溶性减小。

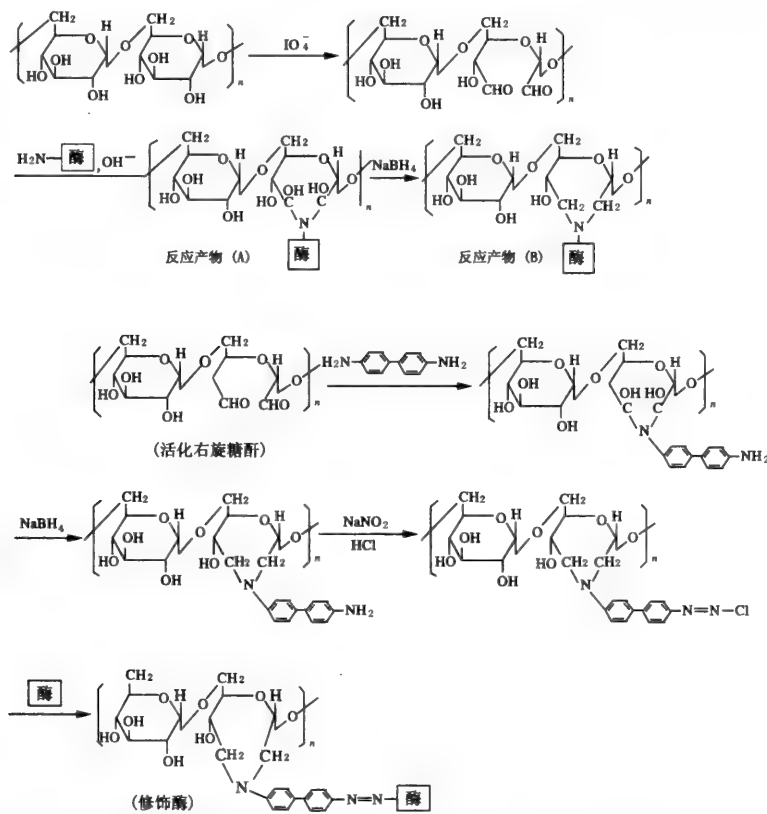
3) 溴化氰要分次加入反应体系中,并激烈搅拌,这是为了防止溴化氰自身水解和反应体系中局部溴化氰浓度过高引起产物水溶性降低。通常加入固体溴化氰效果比加入液体溴化氰好。

4) 活化反应要在 4℃ 下进行,待体系中 pH 值保持一段时间不变后即反应终点。

5) 活化的右旋糖酐冷冻干燥后水溶性常会降低。

11.3.2.2 高碘酸氧化法

高碘酸能通过氧化邻双羟基结构而将葡萄糖环打开,形成的高活性醛基与酶分子上氨基反应,使右旋糖酐和酶共价结合。反应过程为:



1) 由于反应产物(A)不稳定,所以用四氢硼酸钠将其还原成反应产物(B)。

2) 用高碘酸氧化时,通过调节加入的高碘酸量来控制右旋糖酐的氧化程度。当右旋糖酐的氧化程度达到 20% ~ 25% 时,与酶具有较高的结合率。

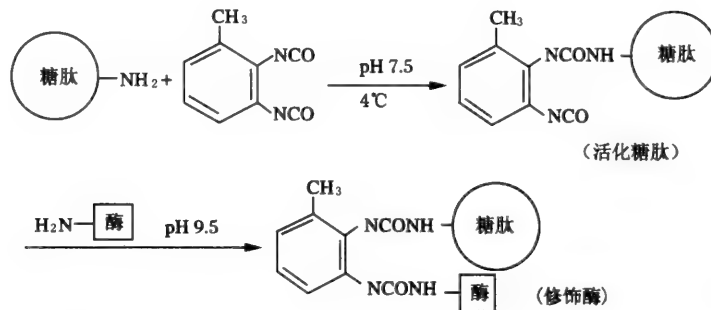
3) 修饰酶生成后,用四氢硼酸钠还原的反应比较激烈,对酶活影响较大,因此可考虑在酶与右旋糖酐间增加一个手臂(如联苯胺)来减小酶的失活。

11.3.3 糖肽

糖肽一般是通过纤维蛋白酶或蛋白水解酶降解人纤维蛋白或 γ -球蛋白而得。由于糖肽结构上含有氨基,所以经活化后能与酶分子上氨基反应而产生共价结合。常用的有以下两种方法。

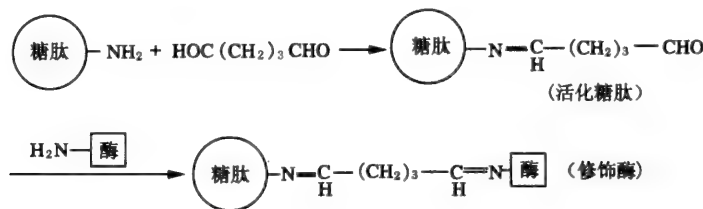
11.3.3.1 异氰酸法

糖肽在低温条件下用 2,3-异氰酸甲苯活化,再在碱性条件下与酶交联。



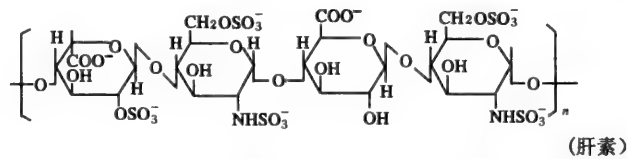
11.3.3.2 戊二醛法

用双功能试剂戊二醛将糖肽的氨基活化,然后与酶分子上氨基反应生成修饰酶。



11.3.4 具有生物活性的大分子物质

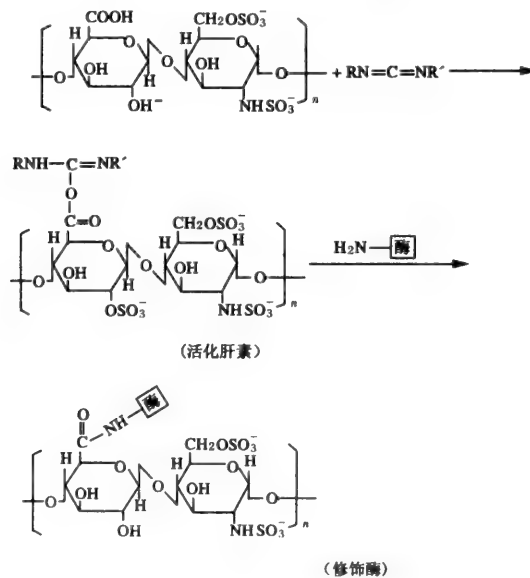
肝素是一种含硫酸酯的粘多糖,由氨基葡萄糖和两种糖醛酸组成,平均分子量 20 000 左右。



肝素不仅与其他大分子修饰剂一样,共价交联于酶后可增加酶的稳定性,同时由于肝素在生物体内还具有抗凝血、抗血栓、降血脂等活性,因此,更适于用来修饰溶解血栓酶类以增加疗效。根据肝素结构特性,常用下面的修饰方法。

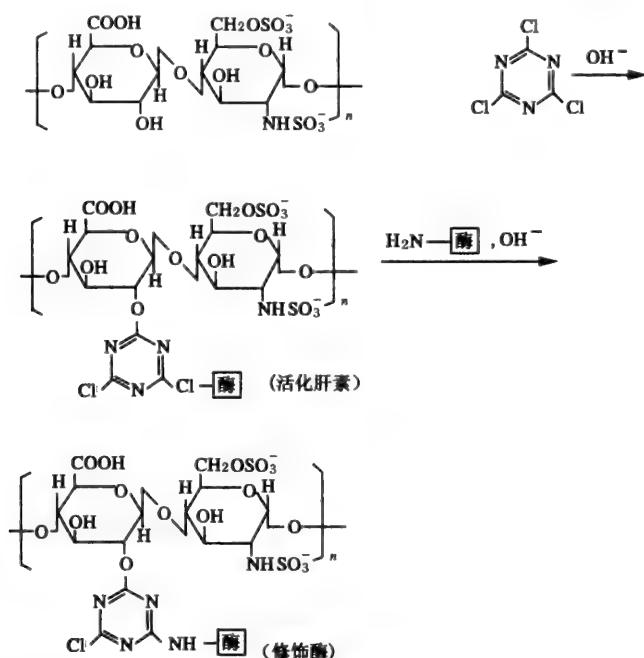
11.3.4.1 羰二亚胺法

用羰二亚胺活化肝素分子上的羧基,然后和酶分子上氨基交联反应,生成修饰酶。



11.3.4.2 三氯均嘧啶法

用三氯均嘧啶活化肝素分子上羟基,然后和酶分子上氨基反应生成修饰酶。



11.3.4.3 溴化氰法

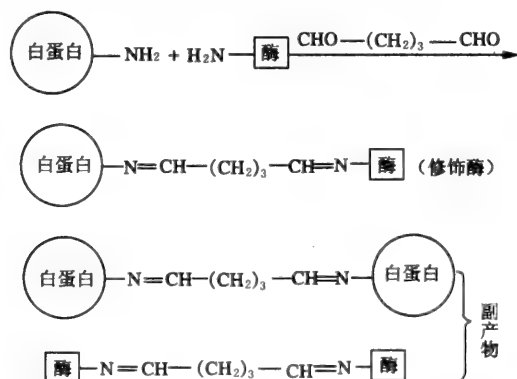
用溴化氰活化肝素分子上邻双羟基,然后和酶分子上氨基反应生成修饰酶。具体反应参见右旋糖酐溴化氰活化修饰法。

11.3.5 蛋白质类及其他

血浆蛋白质是血浆中的天然组分,它们和其他蛋白质(包括酶类)的复合物在血液中有可能被视为“自体蛋白”而被接受。同时由于血浆蛋白质具有较大的分子量,在改进酶性质上效果更明显,因此,已被认为是具有较大优越性和前途的一类修饰剂,其中人血清白蛋白(以下简称白蛋白)是目前研究较多的一种酶修饰剂,其修饰方法主要有以下几种。

11.3.5.1 戊二醛法

此方法是利用戊二醛双功能基团的活泼性,使白蛋白和酶分子上氨基产生交联反应,生成修饰酶。

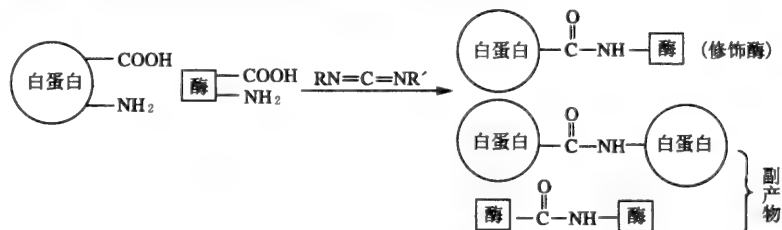


此修饰反应由下列因素控制:(1) 双功能基团与蛋白质和溶剂的相对反应速度;(2) 双功能基团与酶和白蛋白的相对反应速度(这与蛋白质上可反应基团的数目有关);(3) 分子间交联速度与

分子内交联速度的相对关系(高蛋白质浓度可能有利于分子内交联);(4) 白蛋白和酶的反应分子比例。

11.3.5.2 羰二亚胺法

白蛋白和酶以羰二亚胺作为交联剂的修饰反应过程如下:



从上述两方法中可看到,白蛋白用化学性质活泼的戊二醛、羰二亚胺作为交联剂来修饰酶,反应产物不仅有修饰酶,而且还有酶分子间和白蛋白之间的交联副产物,这直接影响了修饰酶的收率。

另外从许多报道来看,在运用上述两修饰方法时,反应结束后酶活损失较大。这主要原因可能是在修饰反应过程中,活泼的双功能交联剂不仅与蛋白质的氨基、羧基反应生成修饰酶,而且还可能与酶活必需基团,如组氨酸、酪氨酸的环结构,半胱氨酸的巯基等发生反应,导致酶失活。

鉴于以上原因,人们目前在进行白蛋白修饰酶反应时,常在反应体系中加入酶专一性底物来保护酶活性部位,虽然效果不尽理想(见表 11-1)。最近国内报道的活性酯法新工艺把白蛋白修饰酶的研究推进了一步。

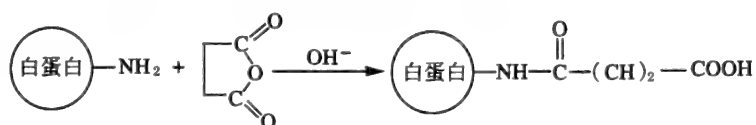
表 11-1 戊二醛法白蛋白修饰酶的酶活回收率

酶	反应条件	酶活回收率
尿酸酶	加尿酸保护。	66%
尿酸酶	—	4%
α -葡萄糖苷酶	加合成底物保护	35%~60%
<i>l</i> -天门冬酰胺酶	加天门冬氨酸保护	60%
尿激酶	—	45%~50%

11.3.5.3 活性酯法

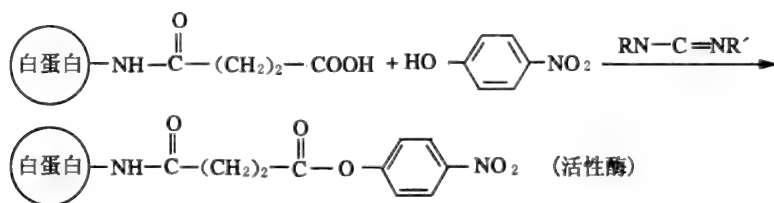
活性酯法白蛋白修饰酶工艺是根据多肽合成原理发展起来的,主要特点是反应条件温和,避免了活泼的双功能交联剂直接与酶接触所可能产生的酶失活,减少了副反应的产生。根据我们的经验,用活性酯法以白蛋白修饰尿激酶,在不用底物保护酶活性部位的条件下,酶活回收率仍高达 90% 以上,结合率高达 80% 以上。下面是活性酯法工艺过程。

1) 白蛋白琥珀酰化



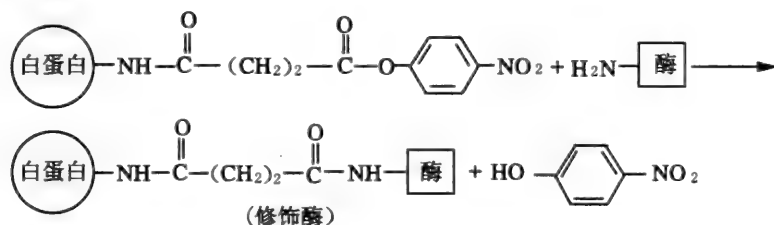
这步反应通过白蛋白和琥珀酸酐作用后,使白蛋白分子表面的氨基琥珀酰化。这既提供了大量的活性酯反应必需基团——羧基,又防止了在活性酯反应时白蛋白产生自身交联。

2) 活性酯形成反应



琥珀酰化白蛋白在羰二亚胺作用下与对硝基苯酶形成了活性酯,除去小分子活泼交联剂后,将得到的大分子白蛋白活性酯用于与酶进行共价交联。

3) 修饰反应



由于白蛋白活性酯的反应活泼性,使酶与白蛋白形成了良好的交联,同时小分子交联剂作为酶与白蛋白之间的“手臂”防止了白蛋白形成对酶活的空间障碍,得到了高酶活回收率。

11.4 修饰酶的性质及特点

酶修饰后其酶学性质会发生变化,其中以热稳定性、体内半衰期及抗原性减小等变化最为显著。

11.4.1 热稳定性

许多修饰剂分子存在多个活性反应基团,因此常常可与酶形成多点交联,相对固定酶的分子构象,增强酶的热稳定性。PEG 修饰酶在热稳定性上没有明显提高,主要可能是 PEG 和酶是单点交联,相对的难以产生固定酶分子构象的效应。

酶催化功能的发挥需要这种高度有序的天然构象来保证。如果从热力学角度看,酶天然构象高度有序,熵值小,应该说是不稳定的,但是酶分子结构中内部基团间的相互作用、基团与外相水溶液间的相互作用,能产生补偿性的焐值和熵值,使整个酶分子结构的熵值最后处于一种平衡状态,紧密有序的构象得以维持。当酶发生热失活时,虽说是一个复杂的过程,但现在人们普遍认为:主要是因为酶分子内基团间的相互作用在受热情况下发生了变化,原先的平衡力受到了破坏,于是酶分子天然构象就向热力学上熵值高方向变化,即从紧密有序趋于随机松散,拆叠结构打开,最终导致了酶催化功能的丧失。

酶化学修饰则是基于上述观点,从增强酶天然构象的稳定性着手来减少酶热失活。酶化学修饰通过将酶与修饰剂交联后,就可能使酶的天然构象产生“刚性”,不易伸展打开,并同时减小酶分子内部基团的热振动,从而增强酶的热稳定性,见表 11-2。

表 11-2 天然和修饰酶的热稳定性对比

酶	修饰剂	天然酶		修饰酶	
		温度/时间	残留酶活 (%)	温度/时间	残留酶活 (%)
腺苷脱氨酶	右旋糖酐	37℃/100min	80	37℃/100min	100
α-淀粉酶	右旋糖酐	65℃/2.5min	50	65℃/63min	50
β-淀粉酶	右旋糖酐	60℃/5min	50	60℃/175min	50
胰蛋白酶	右旋糖酐	100℃/30min	46	100℃/30min	64
过氧化氢酶	右旋糖酐	50℃/10min	40	50℃/10min	90
溶菌酶	右旋糖酐	100℃/30min	20	100℃/30min	99
α-糜蛋白酶	右旋糖酐	37℃/6h	0	37℃/6h	70
β-葡萄糖苷酶	右旋糖酐	60℃/40min	41	60℃/40min	82
尿酸酶	人血清白蛋白	37℃/48h	50	37℃/48h	95
α-葡萄糖苷酶	人血清白蛋白	55℃/3min	50	55℃/60min	50
L-天门冬酰胺酶	人血清白蛋白	37℃/4h	50	37℃/40h	50
尿酸酶	人血清白蛋白	60℃/5h	25	60℃/5h	85
尿酸酶	聚丙烯酰胺-丙烯酸	37℃/2d	50	37℃/2d	100
糜蛋白酶	肝素	37℃/6h	0	37℃/24h	80
L-天门冬酰胺酶	聚乳糖	60℃/10min	19	60℃/10min	63
葡萄糖氧化酶	聚乙烯酸	50℃/4h	52	50℃/4h	77
谷氨酰胺酶-天门冬酰胺酶	糖肽	45℃/10min		45℃/10min	增加
糜蛋白酶	聚(N-乙基吡咯烷酮)	75℃/117h	61	75℃/117h	100
L-天门冬酰胺酶	聚丙氨酸	50℃/7min	50	50℃/22min	50

11.4.2 抗原性

有些修饰剂在消除酶抗原性上并无作用。譬如 PVP 修饰酶在重复用于体内后,会诱导机体产生抗体使酶失活。糖类物质包括右旋糖酐也不容易消除酶抗原性,这类修饰酶在体内仍可诱发过敏反应。现在比较公认的是 PEG 和人血清白蛋白在消除酶抗原性上效果明显。

酶分子结构上除了蛋白水解酶的“切点”外,还有一些氨基酸残基组成了抗原决定簇,当酶作为异源蛋白进入机体后,就会诱发产生抗体,抗原-抗体反应不但能使酶失活,且会对人体造成伤害及危险,但是,通过酶化学修饰,有些组成抗原决定簇的基团与修饰剂形成了共价键,这样就可能破坏了酶分子上抗原决定簇的结构,使酶的抗原性降低乃至消除。同时,大分子修饰剂也同样能“遮盖”抗原决定簇和阻碍抗原、抗体产生结合反应。修饰酶的抗原性变化见表 11-3。

表 11-3 修饰酶的抗原性变化

酶	修饰剂	抗原性
胰蛋白酶	PEG	消除
过氧化氢酶	PEG	消除
精氨酸酶	PEG	消除
腺苷脱氨酶	PEG	消除
尿酸酶	PEG	消除
谷氨酰胺酶-天门冬酰胺酶	PEG	消除
超氧化物歧化酶	PEG	消除
L-天门冬酰胺酶	PEG	消除
超氧化物歧化酶	白蛋白	消除
L-天门冬酰胺酶	白蛋白	消除
α-葡萄糖苷酶	白蛋白	消除
尿酸酶	白蛋白	消除
尿酸氧化酶	PEG	消除
核糖核酸酶	聚 DL-丙氨酸	降低
链激酶	PEG	消除
胰蛋白酶	聚 DL-丙氨酸	降低
L-天门冬酰胺酶	聚 DL-丙氨酸	降低

11.4.3 体内半衰期

许多酶经过化学修饰后,由于增强了抗蛋白水解酶、抗抑制剂和抗失活因子的能力以及对热稳定性的提高,体内半衰期都比天然酶延长,这对提高药用酶的疗效具有很重要的意义,见表 11-4。

表 11-4 天然和修饰酶的体内半衰期对比

酶	修饰剂	半衰期或酶活残留率(%) / 时间	
		天然酶	修饰酶
羧肽酶 G	右旋糖酐	3.5h	17h
精氨酸酶	右旋糖酐	1.4h	12h
α -淀粉酶	右旋糖酐	16%/2h	75%/2h
谷氨酰胺酶-天门冬酰胺酶	糖肽	1h	8.2h
L-天门冬酰胺酶	聚丙烯酸	3h	21h
尿酸酶	白蛋白	4h	20h
α -葡萄糖苷酶	白蛋白	10min	3h
超氧化物歧化酶	白蛋白	6min	4h
尿激酶	白蛋白	20min	90min
氨基己糖苷酶 A	PVP	5min	35min
精氨酸酶	PEG	1h	12h
腺苷脱氨酶	PEG	30min	28h
L-天门冬酰胺酶	PEG	2h	24h
过氧化氢酶	PEG	0%/6h	10%/8h
尿酸酶	PEG	18%/3h	65%/3h

11.4.4 最适 pH

有些酶经过化学修饰后,最适 pH 发生变化,这在生理和临床应用上都有意义(见表 11-5)。例如猪肝尿酸酶的最适 pH 值为 10.5,在 pH 值为 7.4 生理环境时仅剩 5%~10% 酶活,但用白蛋白修饰后,最适 pH 范围扩大,当在 pH 值为 7.4 时仍保留有 60% 酶活,这就更有利于酶在体内发挥作用。解释这一现象的假设是修饰尿酸酶的微环境更稳定,当酶在 pH 值为 7.4 时,酶活性部位仍能处于相对偏碱的环境内行使催化功能,或者是修饰酶被“固定”于一个更活泼的状态,并且当基质 pH 值下降时,酶仍能保持这种活泼状态使催化功能不受影响。

表 11-5 天然和修饰酶的最适 pH 对比

酶	修饰剂	最适 pH	
		天然酶	修饰酶
尿酸酶(猪肝)	白蛋白	10.5	7.4~8.5
糜蛋白酶	肝素	8.0	9.0
吡啶-3-链烷羧化酶	聚丙烯酸	3.5	5.0~5.5
尿酸酶(猪肝)	PEG	8.2	9
产朊假丝酵母尿酸酶	PEG	8.2	8.8

再如吡啶-3-链烷羧化酶修饰后,最适 pH 值从 3.5 变到 5.5。这样在 pH 值为 7 左右时,修饰酶酶活比天然酶增加 3 倍,在生理环境下修饰酶抗肿瘤效果要比天然酶大得多。

11.4.5 酶学性质的变化

绝大多数酶经过修饰后,最大反应速度 V_m 没有变化。但有些酶在修饰后,米氏常数 K_m 会增大。据研究认为,这可能主要是交联于酶上的大分子修饰剂所产生的空间障碍影响了底物对酶的接近和结合。但人们同时认为,修饰酶抵抗各种失活因子的能力增强和体内半衰期的延长,能够弥补 K_m 增大的缺陷,不影响修饰酶的应用价值,见表 11-6。

表 11-6 天然酶和修饰酶的 K_m 对比

酶	修饰剂	K_m	
		天然酶	修饰酶
苯丙氨酸解氨酶	PEG	6×10^{-5}	1.2×10^{-4}
猪肝尿酸酶	PEG	2×10^{-5}	7×10^{-5}
产朊假丝酵母尿酸酶	PEG	5×10^{-5}	5.6×10^{-5}
L-天门冬酰胺酶	白蛋白	4×10^{-5}	6.5×10^{-5}
尿酸酶	白蛋白	3.5×10^{-5}	8×10^{-5}
腺苷脱氨酶	右旋糖酐	3×10^{-5}	7×10^{-5}
吡啶-3-链烷羟化酶	聚丙烯酸	2.4×10^{-6}	7.0×10^{-6}
吡啶-3-链烷羟化酶	聚顺丁烯二酸	2.4×10^{-6}	3.4×10^{-6}
猪肝尿酸氧化酶	PEG	2×10^{-5}	6.9×10^{-5}
产朊假丝酵母尿酸氧化酶	PEG	5.0×10^{-5}	5.6×10^{-5}
精氨酸酶	PEG	6.0×10^{-3}	1.2×10^{-2}
谷氨酰胺酶-天门冬酰胺酶	糖肽		不变
胰蛋白酶	右旋糖酐		不变
L-天门冬酰胺酶	聚丙烯酸		不变

11.4.6 对组织的分布能力变化

一些酶经化学修饰后,对组织的分布能力有所改变,能在血液中被靶器官选择性地吸收。

11.4.6.1 α -葡萄糖苷酶

Pmepes 病主要是由于糖原贮积于肝细胞的二级溶酶体所造成的。因此在用 α -葡萄糖苷酶进行治疗时,希望酶在体内尽量避免受到吞噬细胞的破坏,尽快到达肝细胞。现在人们已知,肝细胞上具有特异性的白蛋白受体,因此用白蛋白修饰酶后,能有利于肝细胞对酶的摄入,使更多的酶到达靶位发挥作用,见表 11-7。

表 11-7 天然和修饰 α -葡萄糖苷酶的分布能力对比

酶	肝溶酶体摄入量(%)	肝细胞摄入/吞噬细胞摄入
α -葡萄糖苷酶	注入量的 22	$0.1 \neq 0.01$
白蛋白修饰 α -葡萄糖苷酶	注入量的 35	$0.2 \neq 0.03$

11.4.6.2 辣根过氧化物酶

辣根过氧化物酶用聚赖氨酸修饰后,细胞的摄入量增加,这种穿透细胞的能力增强被认为可能是聚赖氨酸增加了酶分子上正电荷,因为当聚赖氨酸上氨基被酰化后,修饰酶就不表现出细胞穿透力增强的现象,见表 11-8。

表 11-8 天然和修饰辣根过氧化物酶的细胞穿透力对比

样品	细胞抽提液中酶含量($\frac{\Delta A_{460}}{\text{分}}$)
对照	0
辣根过氧化物酶	0.002
聚赖氨酸修饰辣根过氧化物酶	0.159

11.4.6.3 溶菌酶

天然溶菌酶几乎不被肝细胞吸收,用唾液酸苷酶处理后也没有变化。但溶菌酶与胎球蛋白来源糖肽交联后,再用唾液酸苷酶除去糖肽末端唾液酸,暴露出半乳糖残基,就很快能被肝细胞吸收。如果用半乳糖苷酶除去半乳糖,则肝细胞的吸收又马上下降。由此可见,肝细胞表面有特异性的半乳糖受体来识别和结合半乳糖分子,而此修饰方法也能使一些酶或药物被肝吸收加快,见表 11-9。

表 11-9 天然和修饰溶菌酶的肝摄入量对比

酶	每分钟肝摄入量(%)
天然溶菌酶	3.2
唾液酸糖肽修饰溶菌酶	3.5
脱唾液酸糖肽修饰溶菌酶	34

同理,用聚乳糖修饰 L-天门冬酰胺酶后,由于肝细胞的特异性受体能和乳糖的非还原端半乳糖结合,使得聚乳糖修饰 L-天门冬酰胺酶在进入体内 10min 后即被肝细胞吸收,而此时,90%的天然酶还存留于血液中。

综上所述,可以看到酶化学修饰这项新技术在一定程度上将会大大改善天然酶的一些不足之处,使其更适用于实际应用需要。在各种客观条件下,如何保持酶的稳定性是一个首要的问题,它不仅可以降低使用成本、延长使用寿命、改善反应条件,还可改变最适反应 pH,降低 K_m ,提高 K_i ,减少或消除抗原性,增加抗蛋白酶水解能力,甚至使酶分子具备对细胞的亲和力或穿透性,这些都是实际应用中急需改进和解决的关键技术。酶化学修饰可以在这方面发挥作用。

当然,酶的化学修饰不是酶分子工程的全部内容。随着酶构效关系的进一步研究发展,DNA 重组技术的建立,使人们在一定程度上摆脱了对天然酶的依赖。近十年来,基因工程的发展使人们较容易地克隆各种酶基因、并使其在生物中高效表达。目前已有百余种酶基因克隆成功,有的已经或即将投入生产。

参 考 文 献

- 1 Caecce MG, ed. FEBS Letters. 1976, 62:338 ~ 341
- 2 Takahashi K. J Biochem. 1976, 80:1173 ~ 1176
- 3 Yie C. Meyer DJ, ed BJ. 1993, 293:357 ~ 362
- 4 熊振平等. 酶的化学修饰. 酶工程. 北京: 化学工业出版社, 1994, 181 ~ 222
- 5 周海梦, 王洪睿. 蛋白质化学修饰. 北京: 清华大学出版社, 1998, 19 ~ 46
- 6 陈吉祥, 袁勤生. β -环糊精对 SOD 化学修饰. 中国医药工业杂志, 1998, 29(2):59
- 7 吴云, 顾琛, 袁勤生. 右旋糖酐对超氧化物歧化酶的化学修饰及其性质研究. 生物化学与生物物理学报, 1986, 18(3):308
- 8 Broun GB ed. Enzyme engineering. New York and Lendon: Plenum Prees, 1978
- 9 Hoa LX ed. Biochem Biophys Acta. 1994, 1205:83 ~ 88
- 10 韩静淑等. 生物细胞的固定化技术及其应用. 北京: 科学出版社, 1993

12 酶化学修饰的定量处理 及不可逆抑制动力学

用于蛋白质分子侧链基团化学修饰的试剂种类繁多,但是,除少数试剂如 DTNB 等对被修饰基团具有高度专一性外,绝大多数试剂专一性很差,它们不仅可以修饰某一类侧链基团,同时还可以与其他类型的侧链基团反应。当然我们可以通过筛选专一性强的试剂、控制修饰反应条件以及采取对其他基团进行可逆的保护措施来提高修饰的专一性。然而即便如此,还有一个问题,除了亲和标记外,基团专一性试剂可以不加区分地与处于蛋白质分子表面的可反应的所有同类基团作用,这些同类基团中有处于活性部位的必需基团,也有处于活性部位以外的非必需基团。这就使化学修饰的方法在应用上具有很大的局限性。早期这一研究一直停留在定性描述的阶段,大量的实验数据不能进行定量的处理。

直到 20 世纪 60 年代初, Ray-Koshland 和邹承鲁分别建立了蛋白质功能基团的化学修饰与其生物学活性之间的定量关系,为化学修饰这一技术的应用注入了新的活力。Ray-Koshland 方法建立于动力学的基础上。邹承鲁的方法则是建立于统计学的基础之上。下面我们将分别介绍 Ray-Koshland 方法和邹承鲁的方法,而重点介绍邹承鲁的方法。

在目前用来分析酶化学修饰动力学的一些方法中,我们主要介绍邹承鲁提出的酶活性不可逆改变的动力学方法。化学修饰试剂与酶的某些必需基团发生化学反应,形成共价键,从而造成酶活性的全部或部分丧失。与可逆抑制作用不同,酶活性的这种丧失,不能通过用透析、凝胶过滤等物理手段去除修饰试剂使酶的活性恢复,因此又称为不可逆抑制作用。过去的大多数研究者都集中于研究酶的可逆抑制动力学,而对于酶分子本身基团改变的动力学研究关注甚少。近年来,酶化学修饰的不可逆抑制动力学的研究有了很大的发展,用不可逆化学修饰的方法研究催化过程中酶的必需基团的性质时,能够给出可逆抑制作用所不可能给出的确切信息,例如亲和探针和自杀性底物就是很好的例证。尤其是邹承鲁提出的酶活性修饰过程中底物反应的动力学,不仅在酶化学修饰的不可逆抑制作用方面得到很大的发展,而且在酶分子的伸展、再卷曲和失活、复活动力学等方面的研究得到了广泛的应用。

12.1 Ray-Koshland 方法

Ray-Koshland 方法是建立于动力学基础上的方法。Ray 和 Koshland 认为在蛋白质的化学修饰反应中,一般情况下,修饰试剂浓度远大于蛋白质的浓度,因此在修饰反应中修饰试剂的浓度变化可以忽略不计。因此反应均可按伪一级反应处理。

这个方法的核心是分别测定蛋白质修饰反应中,基团被修饰的反应速度和蛋白质失活的反应速度。用半对数作图法比较两者反应速度常数,判断必需基团的性质和数目。

一个典型的例子是用 2,4,6-三硝基苯磺酸修饰胰蛋白酶抑制剂。2,4,6-三硝基苯磺酸修饰胰蛋白酶抑制剂时,氨基破坏的速度和抑制剂活性丧失的速度分别被测定。按伪一级反应动力学

处理方法进行半对数作图,结果表示于图12-1。从图12-1可以直观地看到 -NH_2 的修饰反应是由快慢两相组成的一级反应动力学过程。按照动力学方法处理,可以将快慢两相分离开来。从曲线(Δ)的直线部分斜率可求得慢反应的速度常数,将直线部分延伸(虚线)并交于纵轴。扣除慢相部分的贡献得到一条直线(\bullet),从其斜率即可求得快相反应速度常数。尔后又测定失活的速度常数,发现它为一个单相一级反应过程,其反应速度与修饰反应快相速度是比较一致的(图12-1中可见两者基本平行)。因此可以判断快反应的 -NH_2 是酶的必需基团,而且必需基团数目是一个。

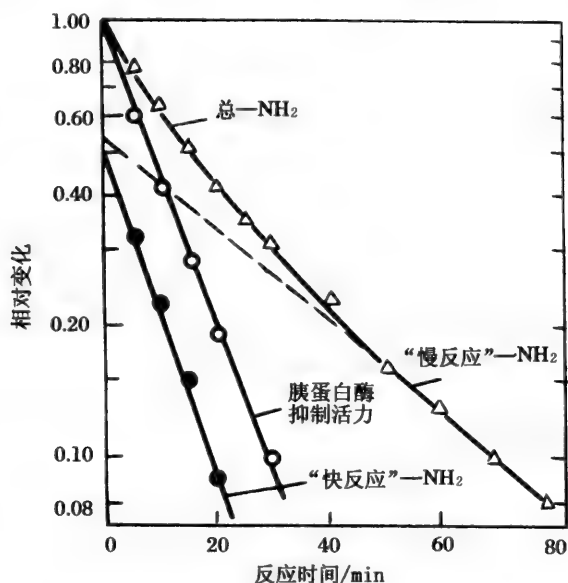


图12-1 胰蛋白酶抑制剂被2,4,6-三硝基苯甲酸修饰时氨基和活力丧失的半对数作图
(此图数据取自文献[25])

用 Ray-Koshland 方法处理的另一个典型的例子是 DTNB 对氨基酰化酶的化学修饰 60 倍过量(分子比)的 DTNB 与猪肾氨基酰化酶在 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.3), 于 25℃ 下反应。分别测定其 -SH 与 DTNB 反应的速度和酶的失活速度。图12-2为氨基酰化酶 -SH 丧失和酶失活过程的半对数作图。从图12-2中可以清楚地看到, -SH 的修饰反应是一个双相的一级反应过程而失活是单相的一级反应过程。失活的速度常数比较接近 -SH 修饰的慢相反应速度常数(表12-1)。此外还可以看到曲线2中直线部分延长并交于纵轴,其交点在50%左右。这表明反应的总 -SH 数目中有一半是慢反应 -SH ,一半是快反应 -SH 。现在已知反应掉的总 -SH 数是4个。因此可以判定,酶的慢反应 -SH 是酶的必需基团,而且每一个酶分子有两个必需 -SH 。

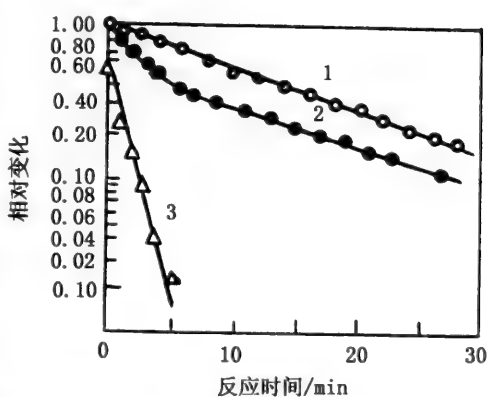


图12-2 用DTNB修饰氨基酰化酶时巯基和活力丧失过程的半对数作图
1—失活的实验数据点(\circ);
2— -SH 丧失的实验数据点(\bullet);
3—扣除慢相贡献后的数据点(Δ)
(此图数据取自文献[26])

表 12-1 氨基酰化酶被 DTNB 和 IAM 修饰时修饰反应和失活的速度常数

修饰试剂	速度常数		
	修饰反应		失活
	$k_1(\text{s}^{-1})$	$k_2(\text{s}^{-1})$	$k(\text{s}^{-1})$
DTNB IAM	1.1×10^{-2}	0.96×10^{-3}	1.1×10^{-3}
		1.2×10^{-3}	1.5×10^{-3}

① k_1 和 k_2 分别为快相和慢相反应的一级反应速度常数

Ray-Koshland 方法使蛋白质化学修饰推向定量阶段,这一方法发表后的十几年中,该方法得到了较广泛的应用,这是积极的一面。然而由于这一方法存在着局限性,致使许多情况下的化学修饰不能用此方法进行定量处理。Ray-Koshland 方法对于那些满足一级反应动力学的化学修饰可以得到满意的结果,但对于:(1) 非一级反应动力学;(2) 反应速度很快的化学修饰;(3) 修饰反应动力学很难监测的反应,特别是那些非均相的反应,就无法处理。在与 Ray-Koshland 几乎同时,邹承鲁提出的统计学方法没有了上述局限性,因而在应用上较 Ray-Koshland 方法更具有普遍性。因此在近二十多年中,该方法已成为化学修饰定量处理的主要方法。

12.2 邹承鲁作图法

1962 年邹承鲁提出以统计学为基础的作图法(简称邹氏作图法)。由于它具有简便、可靠、适用性广的优点,三十多年邹承鲁作图法在国际上成为主要的方法而得到广泛的应用。

在这个方法中,根据必需和非必需基团与试剂作用的反应速度和其他性质的不同,邹承鲁将化学修饰分为 6 种情况分别处理。由于化学修饰试剂专一性的提高,修饰技术的发展,从三十多年来应用邹氏方法进行定量的文献看,这 6 种情况中前三种用得比较普遍,下面对这几种情况作分别介绍。

1) 修饰试剂仅用于一类基团,其中必需基团与非必需基团作用速度相等。

今设 a 是作用过程剩余的具有全部活力的酶分子的分(在简单情况下 a 亦为其活力剩余分数),而 x_e 代表其必需基团剩余分数。若在酶蛋白质中,同类基团中仅有 1 个为表现活力所需,则 $a = x_e$ 。但如果必需基团数为 i ,即在同类基团 X 之中,有 i 个均为必需,此时如果所有的基团 X 作用速度相等,即破坏程度相同,那么,具有全部活力的分子应该是那些所有的必需基团未受到破坏者,所以

$$a = x_e^i, \quad a^{1/i} = x_e \quad (12-1)$$

如果同类基团 X 的平均剩余分数为 x ,由于此类基团的破坏程度都相同,即 $x_e = x$,则有

$$a^{1/i} = x \quad (12-2)$$

上式有两种作图法:

第一种,以 a 的对数相对于 x 的对数作图,所得的直线斜率为 i ,亦即必需基团的数目;

第二种,假设有一系列 i 值,以 $a^{1/i}$ 对 x 作图,能获得直线者,其 i 值即为所求的必需基团的数目。

图 12-3 表示卵粘蛋白的酯化对其作为胰蛋白酶活力的控制效应^[27]。从图 12-3 可以清楚看出,虽然此物质含有约 28 个羧基,但其中仅有 2 个(即 $i = 2$)为必需基团。自 1962 年以来应用邹承鲁作

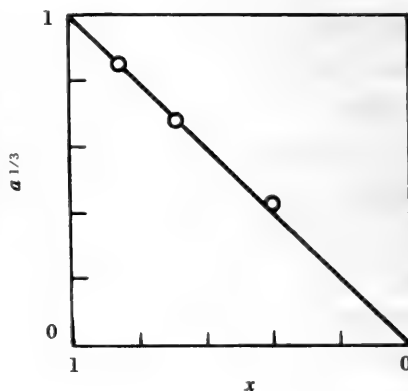


图 12-3 卵类粘蛋白的酯化对其作为胰蛋白酶抑制活力的影响

用 Fraenkel-Conrat 数据,以 $a^{1/i}$ 相对羧基剩余分数作图,依一般文献习惯,基团剩余分数的标尺自左至右为 1 至 0,下同。

图法的文献中,相当一大部分属于这一种情况,都得到了很满意的结果。下面再举几个例子:(1) 用对羟基苯甲酰甲醛(p-hydroxyphenyl-glyoxal) 修饰牛胰核糖核酸酶 A,用邹承鲁的方法处理,图 12-4 所示的结果表明 $i = 1$,则只有一个精氨酸残基是酶的必需基团^[28]。(2) 用(2-羟基-5-硝基苄基) 溴化铈[di-methy (2-hydroxy-5-nitrobenzyl)sulfonium bromide] 修饰兔肌酸激酶。图 12-5 所示 $i = 1$,即每一个亚基只有一个色氨酸残基是酶的必需基团^[29]。这是因为肌酸激酶表现活力的最小功能单位是亚基。值得注意的是当我们不能确切得到可反应基团的总数时,此时无法计算出基团剩余分数。此时我们可以用基团被破坏的数目 m 作为横坐标,同样可以求得必需基团的数目。(3) 胰蛋白酶二硫键的还原与活力的关系,图 12-6 的结果表明 $i = 3$ 时为一条直线,表明此酶中有 3 对必需二硫键。

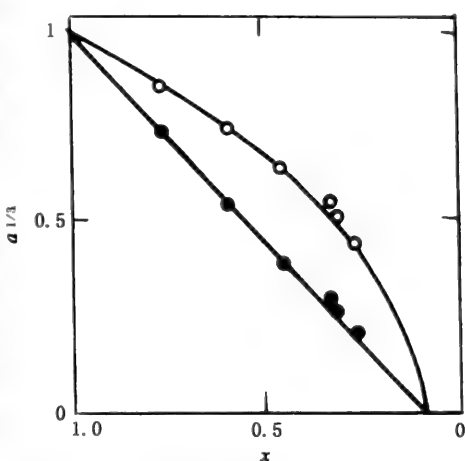


图 12-4 用对羟基苯甲酰甲醛(p-hydroxyphenyl-glyoxal) 修饰牛胰核糖核酸酶时,剩余活力分数 a 和精氨酸残基剩余分数的关系

●— $i = 1$; ○— $i = 2$
(此图数据取自文献[28])

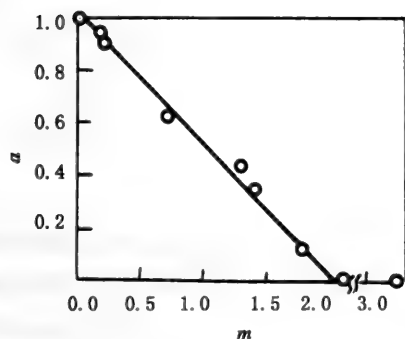


图 12-5 2-羟基-5-硝基苄基的引入对肌酸激酶的活性的影响
 a 为活力的剩余分数, m 为被修饰的色氨酸残基数
(此图数据取自文献[7])

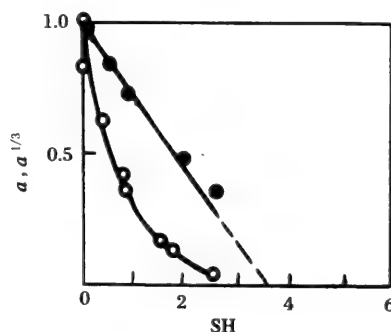


图 12-6 胰蛋白酶二硫键还原与活力的关系
○— $i = 1$; ●— $i = 3$
(此图数据取自文献[9])

2) 同类基团 X 中,必需基团与非必需基团作用速度相差很大。

这种情况较第一种情况更为普遍。如果我们假定同类基团 X 的总数为 n ,其中按照反应速度不同,可以分为 3 类:第一类是反应速度最快的非必需基团,其总数为 s ,当这些基团已基本上全部破坏时,其余基团的破坏还可以忽略不计;第二类是 p 个反应速度较快的基团,其中包括 i 个必需基团;第三类是反应最慢或根本不被破坏的基团,其数目是 $n - p - s$ 。当必需基团开始破坏,生物活力开始下降时,总的基团 X 的剩余分数的关系是:

$$x = \frac{px_e + (n - p - s)}{n}$$

将式(12-1)代入,移项整理得:

$$a^{1/i} = \frac{nx - (n - p - s)}{p} \quad (12-3)$$

从式(12-3)可以看出,以 $a^{1/i}$ 对 x 作图,可以得到斜率为 n/p 的直线(图 12-7),并且当 $a^{1/i}$ 和 x 均为 1 时, x 和 $a^{1/i}$ 分别等于 $(n - s)/n$ 及 $(p - s)/p$ 。由于已知 n ,从这些关系就可以求出 p 和 s 的

值。从式(12-3)还可以看出,当 $p = n, s = 0$ 时,式(12-3)就简化成式(12-2)。

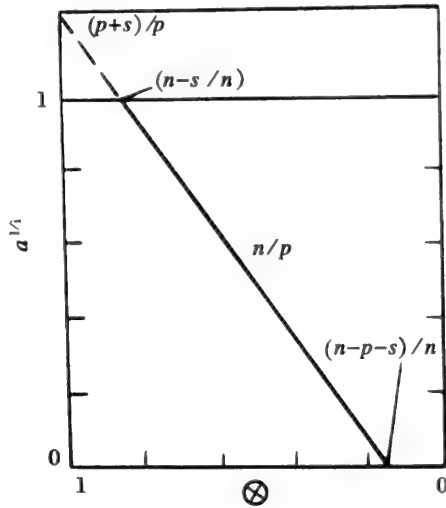


图 12-7 基因改变对蛋白质生物活力的影响

有时当同类基团 X 的总数为未知,无法计算此类基团的剩余分数,而此时可以测定已改变的基团数 m ,则由于

$$x = \frac{n - m}{n}$$

代入(12-3)式后整理得

$$a^{1/i} = \frac{p + s + m}{p} \tag{12-4}$$

同样以 $a^{1/i}$ 对 m 作图,可以求得 p 和 s 。

属于这种情况的一个典型例子是 DTNB 对猪肾氨基酰化酶的化学修饰。图 12-8 是用修饰时酶的剩余活力分数 a 与被修饰的-SH 数 m 之间的关系(实验值)。在这样的曲线上很难直观判定必需基团数目。用图 12-8 的数据我们用邹承鲁作图法进行处理,以 $a^{1/i}$ 对 x 作图, i 分别取 1, 2, 3, 得到了图 12-9 中的 3 条线。我们可以看出, $i = 2$ 时得到很好的线性关系。从线 2 的数据,可以计算得到 $s = 2, p = 2$,因此可以认为 4 个反应-SH 基中,2 个-SH 反应很快,是非必需基团,2 个-SH 反应较慢,均为必需基团。这一结果与用 Ray-Koshland 方法测定的结果是一致的。

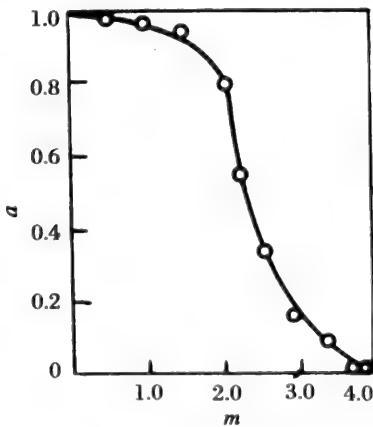


图 12-8 用 DTNB 修饰氨基酰化酶时酶的剩余活力分数(a)与被修饰的巯基数(m)之间的关系

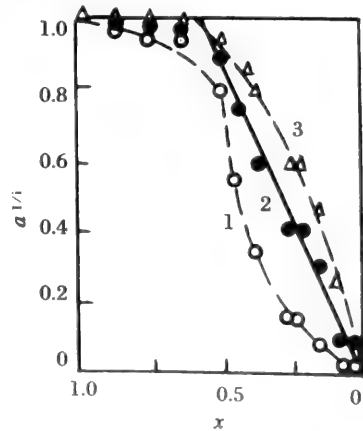


图 12-9 用 DTNB 修饰氨基酰化酶时活力剩余分数(a)与巯基剩余分数之间的关系
1— $i = 1$ (\circ); 2— $i = 2$ (\bullet); 3— $i = 3$ (\triangle)
(数据取自文献[26])

另一个例子是用 *N*-溴代琥珀酰亚胺修饰文昌鱼碱性磷酸酯酶。酶分子中含有 8 个色氨酸残基 ($n = 8$)。在 pH 值为 4.0 的条件下,用 NBS 作用结果,以残余活力分数 a 对残余色氨酸残基数 x 作图,得到较好的线性关系(图 12-10)。从图 12-10 中可以得到: $s = 3, p = 4$ (其中 $i = 1$), $n - p - s = 1$ 。由此可以判定:在文昌鱼碱性磷酸酯酶分子中,有 3 个反应很快的色氨酸残基,它们是非必需的;有 4 个反应较快的色氨酸残基,其中有 1 个必需基团;有 1 个反应极慢的残基,它对酶活性也是非必需的。

在很大程度上,式(12-4)较式(12-3)有更为广泛的应用价值,即使当能与某一试剂起反应的基团总数 n 未知时,也能根据已经被改变了的基团数,利用式(12-4)求 i 值。图 12-11 是根据 Whitaker 与 Jandorf 所报道的 α -胰凝乳蛋白酶与二硝基氟苯(FDNB)作用过程中活力丧失的数据^[33],按照式(12-4)作图的结果。从图 12-11 可以看出,虽然在 pH 值为 7.2 或 pH 值为 7.9 时, p 的数值可能略有不同,但在已与 FDNB 作用的基团中仅有 1 个是胰凝乳蛋白酶的必需基团。由于胰凝乳蛋白酶在与 FDNB 作用时,其酚基、氨基和组氨酸的咪唑基均能被二硝基苯化,因此判断这一必需基团性质就要分别测定这些基团的改变。Whitaker 和 Jandorf 曾报道在 pH 值为 10 时,FDNB 对胰凝乳蛋白酶的作用比较专一,酶分子中两个咪唑基仅有一个与 FDNB 作用,从活力降低与二硝基苯化程度的关系看来,此一咪唑基是必需基团。

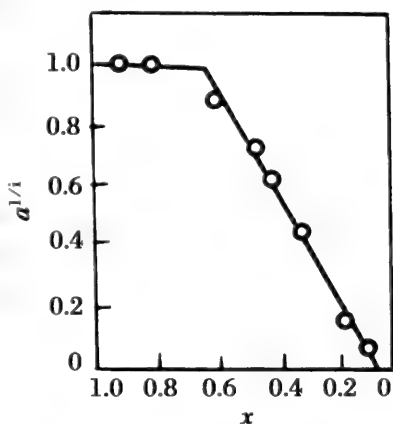


图 12-10 文昌鱼碱性磷酸酯酶被 *N*-溴代琥珀酰亚胺修饰时活力剩余分数 (a) 与色氨酸残基剩余分数 (x) 之间的关系

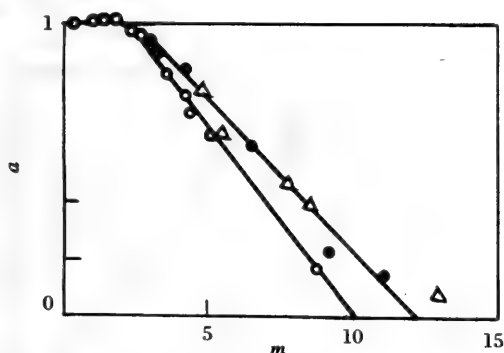


图 12-11 α -胰凝乳蛋白酶二硝基氟苯化对其活力的影响用 Whitaker 和 Jandorf 数据^[11]作图。横坐标为与每分子酶结合的二硝基氟苯数。
○—反应在 pH7.24 进行;△,●—是当 pH 值为 7.95 和 7.98 时,在三种不同的缓冲液中进行反应的结果。

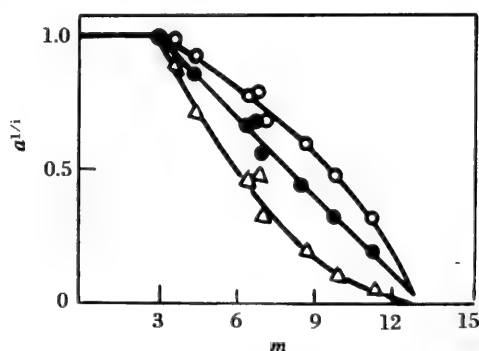


图 12-12 胃蛋白酶羧基的化学修饰
△— $i = 1$;●— $i = 2$;□— $i = 3$
(此图数据取自文献[12])

另一个典型的例子是胃蛋白酶羧基被修饰的情况(图 12-12),从图中可见 $i = 2$ 时为一一直线,显然胃蛋白酶的必需羧基是两个。

3) 同类基团 X 中,必需基团与非必需基团的反应速度不相等但又不是相差很大。

这类情形的活力降低与基团改变的定量关系略为复杂一些,并且随反应级数的不同,其数学关系也不同。由于在一般情况下,引起基团性质改变的试剂通常都是过量存在,所以这里仅考虑当反应级数为一级时的情形。

如果必需基团被破坏时的一级反应速度常数为 k_1 ,非必需基团的相应常数为 αk_1 ,其中 α 为两类基团与试剂作用速度常数的比值。必需基团和非必需基团的残余分数各为 x_c 和 x' ,则:

$$x_e = e^{-k_1 t}$$

$$x' = e^{-\alpha k_1 t} = x_e^\alpha$$

$$nx = px_e + (n - p)x_e^\alpha$$

由于

将式(12-1)代入上式得:

$$nx = pa^{1/i} + (n - p)a^{\alpha/i} \quad (12-5)$$

由于 i 常为不太大的正整数, a 一定小于 1, 所以当 $a \gg 1$ 及 $a \ll 1$ 时式(12-5)可以分别简化为式(12-6)和式(12-7):

$$a^{1/i} = \frac{n}{p}x \quad (12-6)$$

$$a^{1/i} = \frac{nx - (n - p)}{p} \quad (12-7)$$

式(12-6)和式(12-7)也可以同样在当 $n - p - s = 0$ 及 $s = 0$ 时从式(12-3)简化得到。

在核糖核酸酶光氧化的过程中, 根据 Weil 等的数据随着酶活力的丧失, 组氨酸残基被破坏, 以 a 直接对 x 作图(见图 12-13)或 $a^{1/2}$, $a^{1/3}$ 对 x 作图均不能得到直线关系。但从图(12-13)中线 1 和线 2 的直线部分估计, p 及 i 最可能为 1 或 2。

如果将式(12-5)两边均除以 $a^{1/i}$, 移项并取对数得:

$$\lg\left(n \frac{x}{a^{1/i}} - p\right) = \lg(n - p) + \left(\frac{\alpha - 1}{i}\right) \lg a \quad (12-8)$$

在假定 $p = i = 1$ 及 $p = i = 2$ 时, 分别以 $\lg(nx/a^{1/i} - p)$ 对 $\log a$ 作图, 结果如图 12-14, 从图 12-14 可见, 仅在 $p = i = 1$ 时可以得到直线关系, 并以直线(线 1)的斜率, 可以计算 a 值为 0.21, 亦即在光氧化过程中所破坏的组氨酸残基仅有 1 个为必需基团, 其破坏速度较其他组氨酸残基约快 5 倍。这一结果和核糖核酸酶羧甲基化的报告是符合的, 现已经知道, 在核糖核酸酶分子中的 4 个组氨酸残基中, 位于活性中心的一个最易与溴代乙酸进行反应。应该指出, 从图 12-14 计算所得的 $a = 0.21$; 可能仅为其余 3 个组氨酸残基相对破坏速度的平均值。因此, 以上结果不能排除在酶分子中另有一个破坏较慢的组氨酸残基的可能性, 亦即以上结果可能与 Findley 等人的设想, 即核糖核酸酶的必需基团中包含两个组氨酸咪唑基并不矛盾。

这种情况的另一个典型的例子是转酮醇酶(transketolase)的精氨酸残基被修饰与活力的关系^[37]。图 12-15 为 $a^{1/i}$ 对 x 作图的结果, a, b, c 3 条线分别为当 $i = 1, 2, 3$ 时 $a^{1/i}$ 与 x 的关系, 它们都不是直线。这表明非必需基团及必需基团与试剂反应速度相差并不太大, 即不满足 $a \gg 1$ 或 $a \ll 1$ 的条件。图 12-16 为根据式(12-8)作图。当 $p = 4, i = 1$ 时为一一直线, 由斜率求得 $a = 0.023$, 表明转酮醇酶有 4 个快反应基团, 其中 1 个是必需基团, 快反应基团的速度约为慢反应基团的 40 倍。

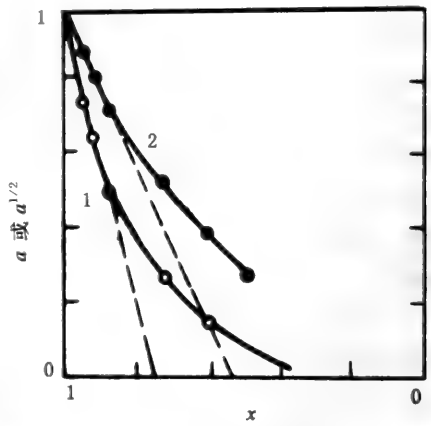


图 12-13 核糖核酸酶光氧化过程中组氨酸残基的破坏与其活力的关系
用 Weil 等^[13]的数据作图, 纵坐标线 1 和线 2 分别为 c 及 $a^{1/2}$

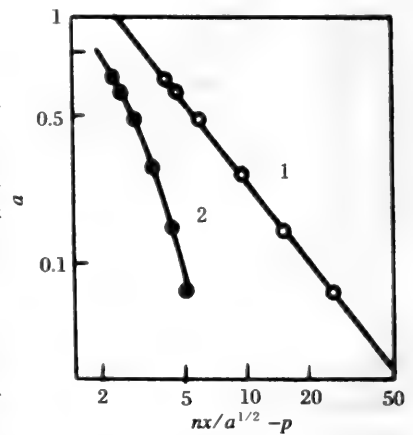


图 12-14 求核糖核酸酶组氨酸残基中的必需基团数

用图 12-13 数据以 $\lg(nx/a^{1/i} - p)$ 作图, 注意纵横坐标均为对数标尺, 线 1, $n = 4, p = i = 1$; 线 2, $n = 4, p = i = 2$ 。

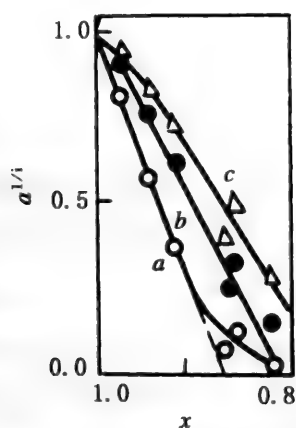


图 12-15 转酮醇酶的精氨酸残基的修饰与活力之间的关系
 $a: i = 1(\bullet); b: i = 2(\blacktriangle); c: i = 3(\blacksquare)$
 (数据取自文献[37])

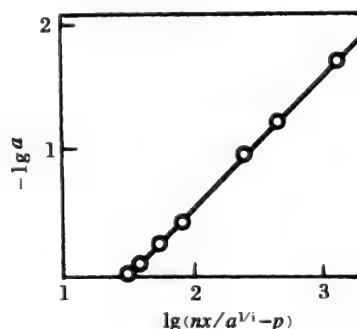


图 12-16 转酮醇酶的精氨酸残基的修饰时 $\log a$ 对 $\log(nx/a^{1/i} - p)$ 作图
 (图中数据取自文献[37])

上述3种情况下的定量处理方法使用比较广泛,从目前掌握的文献看,绝大部分的文献使用的都为上述3种情况下的定量方法。作为一种严谨的科学方法,邹承鲁还考虑到已经出现的某些比较特殊的情况和可能存在的情况。因此他的定量处理方法中还包括下面3种情况下数据的处理。由于目前使用的较少,因此对后三种情况只作简单的介绍。

4) 必需基团已全部被修饰的酶分子尚有部分残余活力 a_T 。

此时所测得的活力剩余分数 a_x , 与体系中完全未被修饰的酶分子的分分数 a 之间有如下关系

$$a = \frac{a_x - a_T}{1 - a_T} \quad (12-9)$$

根据(12-9)式计算出 a 值代入前面所介绍的有关公式,以 $a^{1/i}$ 对 x 作图可求得 i, p 和 s 值。图12-17为胰蛋白酶的色氨酸残基被修饰与活力的关系^[38]。由作图得 $s = 1, p = 3, i = 2$ 。表明胰蛋白酶的4个色氨酸中,有1个快反应基团,3个慢反应基团中有两个是必需的。如果将(12-9)式代入(12-2)式可以得到

$$a_x = x^i(1 - a_T) + a_T \quad (12-10)$$

显然,这时实际测得的剩余活力 a_x 与 x^i 成正比。由 a_x 对 x^i 作图,不仅可以求得必需基团数 i ,而且还可以由截距或者斜率求得残余活力 a_T 。这特别适用于 a_T 未知的情况。 α -淀粉酶由已烯酮酰化就属于此种情形(图12-18)。它表明 α -淀粉酶有两个氨基是必需的,其残余活力为 $a_T = 0.04$ 。

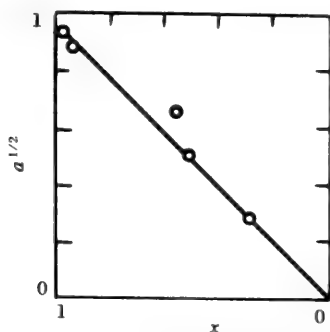


图 12-17 胰蛋白酶色氨酸残基修饰时 $a^{1/2}$ 与 x 的关系

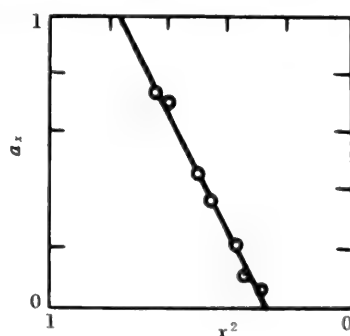


图 12-18 a_x 对 x^i 作图($i = 2$)

5) 同类基团 X 中,保留其中之一,酶即保有全部活力。

这种情况与前面介绍的情况正好相反。用第一种情况中的同样方法,可以得到活力丧失的分数 $(1 - a)$ 与必需基团被修饰的几率 $(1 - x_e)$ 的 i 次方成比。

$$(1 - a) = (1 - x_e)^i \quad (12-11)$$

Ray 和 Koshland 曾指出,这种情形对于一些功能主要在维持蛋白质三级结构的必需基团适用。例如,可以想像某一蛋白质的三级结构主要靠两个二硫键维系,只要二者任留其一,这个蛋白质的三级结构即可维持不变。但是,至今在实验上还没有遇到过这种情况。

6) 试剂作用于两种不同侧链基团 X 和 Y ,二者均含有必需基团。

当在与某一类试剂作用的两类基团中均包含必需基团时,数学关系比较复杂。如基团 X 和 Y 的总数为 n_x 和 n_y ,活力剩余分数分别为 x 和 y ,与试剂迅速作用的非必需基团数分别为 s_x 和 s_y ,与必需基团作用速度约略相等的基团数为 p_x 和 p_y ,则根据式(12-3) 同样推理得:

$$a = \left(\frac{n_x x - (n_x - p_x - s_x)}{p_x} \right)^i \left(\frac{n_y y - (n_y - p_y - s_y)}{p_y} \right)^j \quad (12-12)$$

式中 i 及 j 分别为 X 和 Y 中的必需基团数。式(12-12) 虽然比较复杂,但在实验中也常能对 s 和 p 的数值先作约略的判断。如果基团开始破坏,活力立即下降,则显然 s_x 及 s_y 或者皆等于零,或者至少两者之一等于零,如仅两者之一等于零,则至少在反应初期,活力下降仅与 X 和 Y 其中之一发生关系,亦即可用前面所述的几种方法来处理,如果 X 或 Y 中有一部分较其余基团反应缓慢,在实验过程中也较易发现。在 $s = 0, n = p$ 的情况下,式(12-12) 可简化为

$$a = x^i y^j \quad (12-13)$$

即使对于像式(12-13) 这样简化了的关系式,如果 i 及 j 均为未知,可能的组合方式很多,用于处理实验数据也还不是十分简单的。此时如果可以先根据试剂消耗总量,或基团 X 及 Y 改变的总量与活力下降的关系,先依照前面所述的几种方法,特别是式(12-4) 关系,求出必需基团总数 $(i + j)$ 的数值,就可以简化根据式(12-13) 求 i 及 j 的过程。三十几年前邹承鲁考虑到了当时试剂专一性条件,提出对这第 6 种情况的处理方法,曾经在当时为处理这种复杂的修饰情况起了重要的作用。现在试剂的专一性选择范围及对某一些基团可以实行可逆保护等方面进展,这第 6 种情况遇到的比较少了。在此不再举例说明。

十分有意思的是蛋白质化学修饰的定量处理的邹氏作图法还可以应用到判断蛋白质折叠所必需的残基数。用此方法判定兔肌肌酸激酶的半胱氨酸残基结果表明,每一个亚基有 3 个对折叠必需的(其中包括有一个是对催化必需的)半胱氨酸残基。其方法是将兔肌肌酸激酶在 3mol/L 盐酸胍溶液中充分去折叠,然后控制 MNP(2-氯汞-4-硝基苯酚)与充分去折叠酶的反应分子比,得到一系列不同修饰程度(m)的去折叠酶,然后分别稀释 30 倍复性 3 小时后,测定酶活性,得到酶活力剩余分数 a 。用 $a^{1/i}$ 对 m 作图(图 12-19),从图 12-19 中可见,当 $i = 3$ 时为一一直线,这表明肌酸激酶分子中,每一个亚基上有 3 个半胱氨酸巯基对酶的折叠和催化活性是必需的。

邹承鲁提出的这一方法,三十几年来在国际上已经被广泛地使用和引用。它已被收编入英、美、日等国的教科书和专著中。1979 年出版的著名的 Dixon 和 Webb 酶学教科书中,曾以同样的篇幅介绍 Ray-Koshland 方法和邹承鲁方法^[42]。但是在以后出版的教科书和专著中,则主要介绍邹承鲁方法。这说明它是当前研究蛋白质侧链基团化学修饰和生物活力之间定量关系的主要方法,在教科书和引用文献中被称之为邹氏方法、邹氏公式或邹氏作图法。1984 年 Brocklehurst 提出,邹氏作图法可以作为判断酶

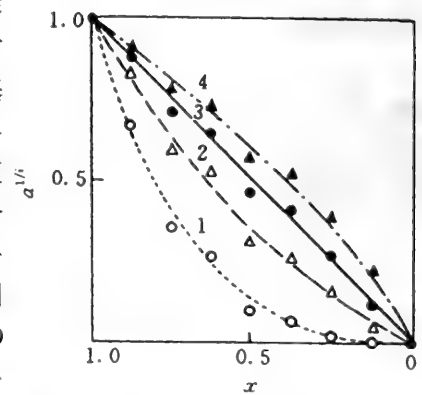


图 12-19 再折叠后肌酸激酶剩余活力分数和剩余巯基分数之间的关系

a 为剩余活力分数; x 为剩余巯基分数; 图中数字为 i 值,复性体系中的酶浓度为 $1.6\mu\text{mol/L}$ 。

特征的一种重要手段,并据此得出 Chymopapain A 即 Chymopapain S 的结构。邹承鲁领导的实验室曾经对胰岛素和胰蛋白酶必需二硫键^[31,46],木瓜蛋白酶的必需组氨酸和色氨酸残基,肌酸激酶的必需半胱氨酸巯基和必需色氨酸残基^[29,48]以及氨基酰化酶的必需半胱氨酸巯基^[49]的研究中成功地运用这一定量处理的方法,近年来又对邹氏作图法进一步推广到多亚基的别构蛋白和半位反应^[50],同时对邹氏作图法进行了严格的数学证明(见附录),进一步认识到这一方法的价值与可靠性。此外,应用这一方法时,需要先假设一个参数的值,然后手工计算,反复试多次,找出最好的线性拟合,才能确定必需基团的数目,为了克服上述缺点,邹氏作图法计算机模拟也应运而生,计算机模拟较之手工作图能更为简便而准确地确定必需基团和非必需基团的性质和数目及其修饰速度之比。

邹氏作图法确定的意义在于,它不仅为蛋白质化学修饰研究本身由定性描述转入定量研究提供了依据和计算方法,而且对目前日益发展的蛋白质工程来说,用这种简单而成熟的方法首先确定蛋白质的必需基团,也正是蛋白质工程设计的必要前提和手段之一。

12.3 酶化学修饰的动力学机制

酶的化学修饰反应的动力学分析取决于反应体系的条件。如果修饰试剂可认为是伪一级反应条件,即修饰试剂的浓度大大高于酶的浓度,则其数学处理是非常简单的。

12.3.1 不可逆反应

如果我们考虑一种最简单的反应,即酶(E)修饰试剂(I)生成无活性的酶-修饰试剂复合物(EI):



反应速度 v 为

$$v = k_1 [E][I] \quad (12-15)$$

如果 $[I] \gg [E]$,可化简为:

$$v = k_{\text{obs}} [E] \quad (12-16)$$

其中

$$k_{\text{obs}} = k_1 [I] \quad (12-17)$$

方程(12-16)可写成

$$-\frac{d[E]}{dt} = k_{\text{obs}} [E] \quad (12-18)$$

其中 $[E]$ 为 t 时刻酶的浓度。

对方程(12-17)积分, $[E]$ 从 0 到 t 时刻,得到酶活力分数的自然对数和时间之间的线性关系:

$$\ln \frac{[E]_t}{[E]_0} = -k_{\text{obs}} t \quad (12-19)$$

因此以酶活力剩余分数的常用对数对时间作图可以得到一条斜率为 $-0.43k_{\text{obs}}$ 的直线。

根据方程(12-17),可以由不同浓度 $[I]$ 下得到的一系列 k_{obs} 值确定 k_1 。如果修饰反应的级数不是 1,其线性的偏差是可以预计到的,例如



则

$$k_{\text{obs}} = k_1 [I]^2 \quad (12-21)$$

在这种特殊情况下,只有 k_{obs} 对 $[I]^2$ 作图才能得到一条直线。

修饰反应的动力学级数通常也可以由方程(12-21)的对数形式得到:

$$\lg k_{\text{obs}} = n \lg [I] + \lg k_1 \quad (12-22)$$

其中 n 为反应的动力学级数或使 1 mol 酶活性单位失活所需最小的 1 摩尔数。上式自从 Levy 等

人^[54]首次推导出来,这个关系式已被广泛应用,尽管如 Jabalquinto^[55]和 Carlson^[56]指出的那样,这个关系式并不是总是合适的。必须指出的是,这个关系式只对于方程式(12-14)那样的不可逆机制才适用,对于方程式(12-23)和式(12-27)那样的可逆机制或在失活前先形成一个可解离复合物的机制是不适用的。这些机制可以通过下面介绍的方法,对数据进行适当的处理而鉴别出来。二级反应速度常数 k_1 也可以通过实现在 $[E] \approx [I]$ 的条件下得到(例如田维熙等人^[57]进行的 DTNB 使鸡肝脂肪酸合成酶的失活作用的研究),但这种情况下 k_1 必须通过适当的二次作图才能从斜率求得。

12.3.2 可逆反应

对于如下机制:



可逆地生成无活性的 EI 复合物。若 $[I] \gg [E]$, 则



假设反应初始时 EI 的浓度为 0, 反应速度方程式在平衡条件下可简单地积分并化简^[58]成:

$$\ln \frac{([E] - [E_0])}{([E_0] - [E_e])} = (k_1[I] + k_{-1})t \quad (12-25)$$

$[E_0]$ 为 E 的初始浓度, $[E]$ 为任意 t 时刻酶的浓度, $[E_e]$ 为平衡时的浓度。由于达到平衡是一级反应过程, 由 $\ln([E] - [E_0])$ 对 t 作图可得到表观速度常数——正反应和逆反应速度常数的总体效果:

$$k_{\text{obs}} = k_1[I] + k_{-1} \quad (12-26)$$

因此, k_{obs} 对 $[I]$ 作图应该得到斜率为 k_1 , 外推纵坐标截距为 k_{-1} 的直线。

12.3.3 形成中间体复合物

这种机制是指在酶和抑制剂在形成无活性的 EI 复合物之前先形成可解离的复合物:



对于这个机制, 表观失活速度为:

$$v = k_2[E \cdot I] \quad (12-28)$$

假定平衡条件 $k_2 \ll k_{-1}$ 成立^[61], 可得^[62]:

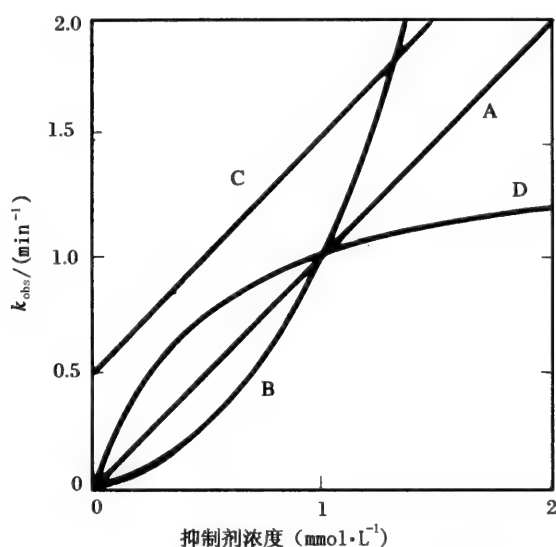
$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 k_2 [I]}{k_1 [I] + k_{-1}} \quad (12-29)$$

写成倒数形式:

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_{\text{diss}}}{k_2} \cdot \frac{1}{[I]} \quad (12-30)$$

上式中 $K_{\text{diss}} = k_{-1}/k_1$ 。因此, 对于方程式(12-14)、式(12-23)和式(12-27)所描述的机制可以分别给出 k_{obs} 对 $[I]$ 的函数关系: 对于式(12-14)是一斜率为 k_1 并且通过原点的直线; 对于式(12-23)是一斜率为 k_1 , 外推截距为 k_{-1} 的直线; 对于式(12-27)则是一双曲线。最后一种形式最好用倒数方程(12-30)表示, 斜率 = K_{diss}/k_2 , 截距 = $1/k_2$ 。

通过 k_{obs} 对 $[I]$ 作图(见图 12-20), 可见 3 种机制是可以区分的。应该强调的是要完全区分这些机制, I 的浓度范围应该足够大。例如, 反应为反应式(12-27)的机制, 尽管在失活反应过程中有中间体产生, 当 $[I] \ll k_{-1}/k_1$ 时, 方程式(12-29)就变成:

图 12-20 不同抑制剂类型 k_{obs} 对抑制剂浓度作图

A, 方程式(12-17); B, 方程式(12-21);

C, 方程式(12-26); D, 方程式(12-29)

动力学常数分别为: $k_1 = 1 \text{ min}^{-1} \text{ m mol/L}^{-1}$; $k_{-1} = \text{min}^{-1}$;

$$k_2 = 0.5 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{\text{obs}} = k_2 [\text{I}] / K_{\text{diss}} \quad (12-31)$$

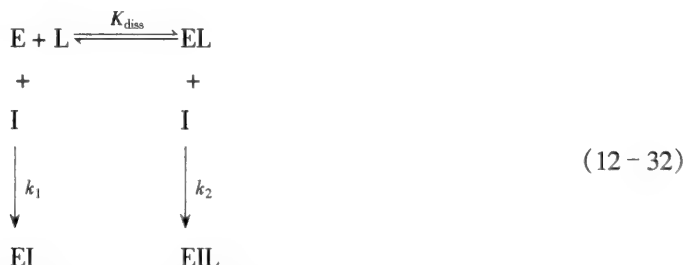
成为图 12-20 中 A 类型的图了。酶通过这些机制失活的例子已经有许多报导^[55,63,64]。

12.4 利用失活动力学确定酶-配位体解离常数

如果某种抑制剂对酶的化学修饰反应机制清楚了,通常酶和配体结合的解离常数就可以确定下来,就可以知道配合物修饰使酶失活的反应速度。下面介绍一种提供有意义的酶与底物或辅助因子结合的信息的参考方法。另外,还有如平衡分析、滴定法、分光光度法等其他方法,这里就不再介绍了。

12.4.1 由不可逆失活动力学机制确定酶-配体的解离常数

从失活-保护实验中,根据酶和配体结合后对抑制剂反应具有全部或部分的保护作用来确定酶-配体复合物的解离常数。这个过程一般为



天然酶(E)和酶-配体复合物(EL)均可和抑制剂反应生成无活性的酶-抑制剂复合物 EI 和 EIL,速度常数分别为 k_1 和 k_2 。L 和 E 的结合取决于解离常数 K_{diss} 的大小。假定 E、L 和 EL 之间的平衡远快于 E 和 I 的反应,酶在 L 存在下的失活速度可表示为:

$$-\frac{d[\text{Ea}]}{dt} = k_1 [\text{E}][\text{I}] + k_2 [\text{EL}][\text{I}] \quad (12-33)$$

$[\text{Ea}] = \text{活性酶浓度} = [\text{E}] + [\text{EL}]$ 。

式(12-33)除[Ea]得

$$-\frac{d[\text{Ea}]}{dt[\text{Ea}]} = \frac{k_1[\text{E}][\text{I}] + k_2[\text{EL}][\text{I}]}{[\text{E}] + [\text{EL}]} \quad (12-34)$$

由于

$$K_{\text{diss}} = [\text{E}][\text{L}]/[\text{EL}] \quad (12-35)$$

则

$$-\frac{d[\text{Ea}]}{[\text{Ea}]} = \frac{[\text{I}](k_1 K_{\text{diss}} + k_2[\text{L}])}{K_{\text{diss}} + [\text{L}]} dt \quad (12-36)$$

因此,酶在配体存在下的失活表现伪一级反应速度常数($k_{\text{obs}}^{\text{L}}$)为

$$k_{\text{obs}}^{\text{L}} = \frac{[\text{I}](k_1 K_{\text{diss}} + k_2[\text{L}])}{K_{\text{diss}} + [\text{L}]} \quad (12-37)$$

化成倒数形式

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}^{\text{L}}} = \frac{K_{\text{diss}}}{[\text{I}](k_1 K_{\text{diss}} + k_2[\text{L}])} + \frac{[\text{L}]}{[\text{I}](k_1 K_{\text{diss}} + k_2[\text{L}])} \quad (12-38)$$

若 I 不和 EL 反应, $k_2 = 0$, 则

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}^{\text{L}}} = \frac{1}{[\text{I}]k_1} + \frac{[\text{L}]}{[\text{I}]k_1 K_{\text{diss}}} \quad (12-39)$$

方程(12-38)和(12-39)中 $1/k_{\text{obs}}^{\text{L}}$ 对 $[\text{L}]$ 作图分别为双曲线和直线,这样就可以判断 I 是否和 EL 反应。当(12-39)成立, K_{diss} 可以由直线在横轴的截距求出。图 12-21 所示为根据式(12-39)确定酵母磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶- Mn^{2+} 复合物解离常数的实验数据。当 k_2 不等于 0, K_{diss} 最好由 Scrutton 和 Utter^[69] 推导的下式估算:

$$\frac{k_{\text{obs}}^{\text{L}}}{k_{\text{obs}}} = \frac{k_2}{k_1} + \frac{1 - k_{\text{obs}}^{\text{L}}/k_{\text{obs}}}{[\text{L}]} K_{\text{diss}} \quad (12-40)$$

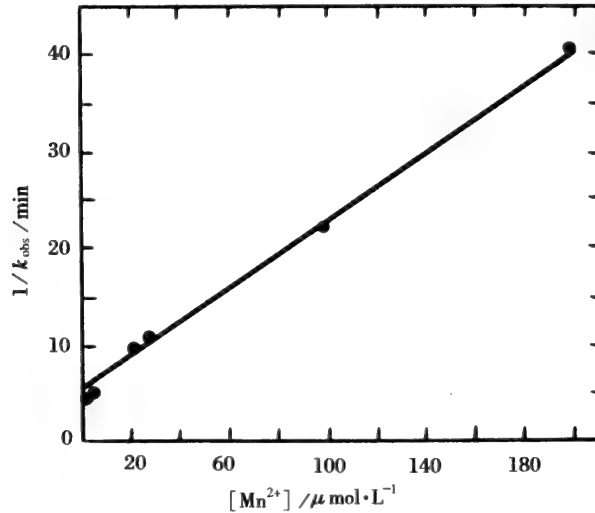


图 12-21 酵母磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶被苯乙二醛修饰时 $1/k_{\text{obs}}^{\text{L}}$ 对 Mn^{2+} 的关系反应在 60mmol/L 的硼酸盐缓冲液中进行, pH 值为 8.4, 25°C

当 $k_{\text{obs}}^{\text{L}}/k_{\text{obs}}$ 作为 $(1 - k_{\text{obs}}^{\text{L}}/k_{\text{obs}})/[\text{L}]$ 的函数作图, K_{diss} 可以由直线的斜率得到。由于 k_1 可以从方程(12-17)中得出, 所以 k_2 可以从截距求得。

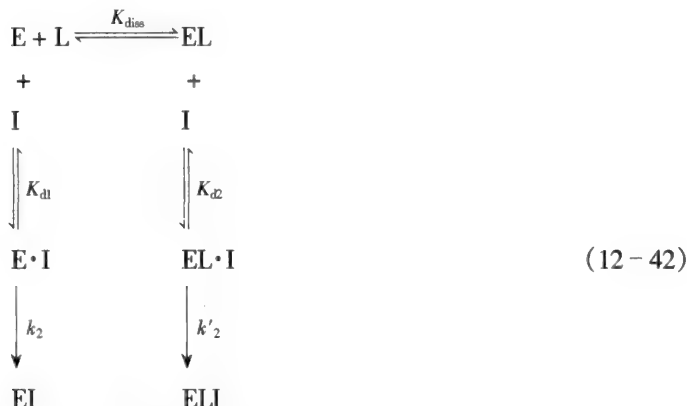
另一种数据处理的办法是应用下列关系式:

$$k_{\text{obs}}^{\text{L}} = k_2[\text{I}] + (k_{\text{obs}} - k_{\text{obs}}^{\text{L}})K_{\text{diss}}/[\text{L}] \quad (12-41)$$

例如, Fujioka 等人 and Jabalquinto 等人就是根据这个关系分别确定了酵母 ϵ -N-(L-戊二酸基-2)-L-赖氨酸脱氢酶和鸡肝甲羟戊酸-5-二磷酸脱羧酶的酶-底物复合物的解离常数。

12.4.2 存在中间体复合物的失活动力学反应的酶-配体的解离常数的确定

这种类型的反应首先是由 Horiike&McCormick 和 Carrillo 等人分析的。配体存在下这种失活机制的一般形式为：



假定 E 和 EL 都可以和 I 反应, 分别形成 E·I 和 EL·I 复合物并进一步生成无活性的 EI 和 ELI 复合物。K_{d1} 和 K_{d2} 为解离常数, k₂ 和 k'₂ 为速度常数。

这种情况下, 当 [I] 和 [L] 都远大于 [E] 时, Carrillo 等人推导出机制 (12-42) 的一般速度方程, 并由此可推出

$$k_{\text{obs}}^L = \frac{(k_2 K_{\text{diss}} K_{\text{d2}} + k'_2 [L] K_{\text{d1}}) [I]}{K_{\text{d2}} K_{\text{diss}} (K_{\text{d1}} + [I]) + K_{\text{d1}} [L] (K_{\text{d2}} + [I])} \quad (12-43)$$

或改写成

$$\frac{k_{\text{obs}}^L}{k_{\text{obs}}} = \frac{k'_2 (K_{\text{d1}} + [I])}{k_2 (K_{\text{d2}} + [I])} + K_{\text{diss}} \frac{K_{\text{d2}} (K_{\text{d1}} + [I])}{K_{\text{d1}} (K_{\text{d2}} + [I])} \cdot \frac{(1 - k_{\text{obs}}^L/k_{\text{obs}})}{[L]} \quad (12-44)$$

若 EL 复合物不与 I 反应 (即 k'₂ = 0 且 K_{d2} 趋于无穷), 则式 (12-31) 可化简为

$$\frac{k_{\text{obs}}^L}{k_{\text{obs}}} = K_{\text{diss}} \frac{(K_{\text{d1}} + [I])}{K_{\text{d1}}} \cdot \frac{(1 - k_{\text{obs}}^L/k_{\text{obs}})}{[L]} \quad (12-45)$$

比较方程式 (12-44) 和 (12-45) 可以很清楚地看出, 若 EL 复合物不与 I 反应, k_{obs}^L/k_{obs} 对 (1 - k_{obs}^L/k_{obs})/[L] 作图过原点, 此时 K_{diss} 可以由斜率计算得出

$$\text{斜率} = K_{\text{diss}} (1 + [I]/K_{\text{d1}}) \quad (12-46)$$

K_{d1} 可以从式 (12-29) 和式 (12-30) 独立求得。若按式 (12-44), K_{diss} 值不能由这些方式得到。

12.4.3 酶化学修饰反应的 pH 效应

pH 效应下抑制剂对酶的化学修饰反应的速度可以用来判断酶中的反应基团的 pK 值。

通过化学修饰确定的蛋白质中特定氨基酸残基的 pK 值是很有意义的, 因为它可以用来证实通过其他方法测定的这些残基的 pK 值。例如, 通常可以通过研究 pH 值对 k_{cat}、K_M 或 k_{cat}/K_M 的影响来得到酶中重要的催化基团的 pK 值。比较而言, 动力学和化学修饰研究所得到的 pK 值为进一步确定酶特定的化学机制提供了证据。用这种方法, Willenbrock 和 Brocklehurst 提出了组织蛋白酶 B (一种含半胱氨酸的蛋白酶) 质子解离的详细机制, 并解释了该酶的亲核性和催化活性。

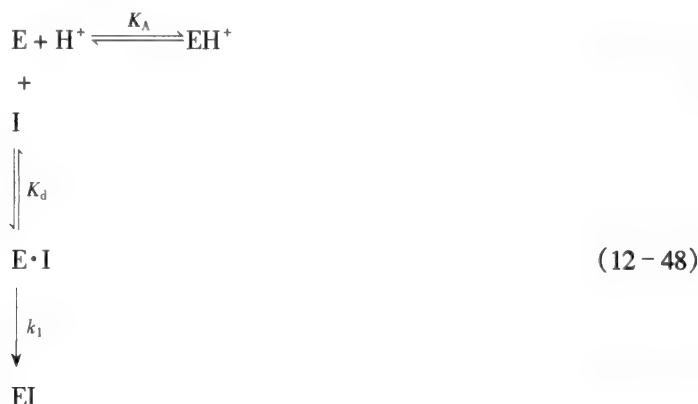
大多数情况下的数学处理是与前文所述结合配体的 K_{diss} 的确定是相同的。因此我们可以从 (12-39) 式得到下面的关系式:

$$1/k_1 = 1/k + [H^+] K_A/k_1 \quad (12-47)$$

其中 k₁ 是在给定 H⁺ 浓度下的伪一级失活反应速度常数, k 是 pH 依赖的伪一级失活反应速度常数, K_A 为 H⁺ 和酶结合的平衡常数。1/k 对 [H⁺] 作图, 从图中直线在横轴上的截距和斜率可以确

定 K_A 的值。

如果在酶的失活反应过程中,酶和抑制剂形成一个可逆的中间复合物,反应如下:



从式(12-45)可得

$$k = \frac{k_1 [I] / K_A}{K_d [H^+] + (K_d + [I]) / K_A} \quad (12-49)$$

或其倒数形式

$$\frac{1}{k} = \frac{1}{k_1} + \left(\frac{K_d}{k_1} + \frac{K_d K_A}{k_1} [H^+] \right) \frac{1}{[I]} \quad (12-50)$$

因此,在一系列不同 H^+ 浓度下,将 $1/k$ 作为 $1/[I]$ 的函数作图,得到一簇在 $1/k$ 轴上有共同截距 $1/k_1$ 的直线。以这些直线的斜率对 H^+ 的浓度进行二次作图,从 $[H^+]$ 轴上的截距可以求出 K_A 的值。

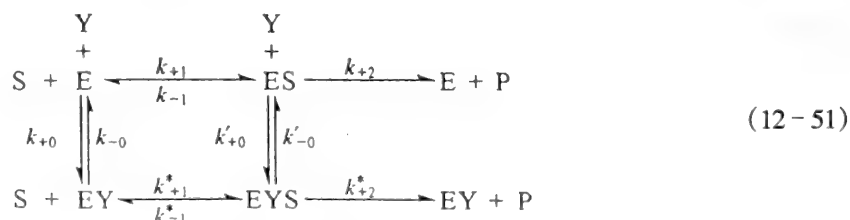
更复杂的情况,例如结合了质子的酶仍能再结合抑制剂的方程也可推导出来,详细情况读者可以参考 Tipton 和 Dixon 的文章。

12.5 酶活性修饰过程中底物反应动力学

早在 1965 年,邹承鲁就对单底物酶不可逆抑制动力学进行了系统的研究,提出了底物和抑制剂竞争的概念不仅适用于可逆抑制动力学,而且也可应用于不可逆抑制动力学的研究,并且建立了定量的判据来区别不可逆抑制剂的类型。根据他所推导出的在有抑制剂存在的条件下底物反应的动力学方程,由一次实验即可得到酶活性不可逆抑制的表观动力学常数。近年来,应用这一动力学方法,在酶抑制动力学和激活动力学等方面的研究都取得了令人满意的结果。后来,又将这一理论推广到多底物酶反应系统。这一理论不仅适用于单底物反应,而且也可用于双底物反应的抑制动力学研究,以及酶分子的伸展、再卷曲过程中底物反应动力学的研究。

12.5.1 单底物酶反应,非配合型抑制剂

配位型抑制剂在文献中也有称为络合型抑制剂(complexing inhibitors)。对于酶活性可逆和不可逆修饰两种情况,反应机制(12-51)都同样适用:



其中 E, S, Y, ES, EY, EYS 分别代表酶、底物、抑制剂(或激活剂)及其相应的复合物。在通常的实验

条件下,容易满足 $[S] \gg [E_0]$ 和 $[Y] \gg [E_0]$,且一般来说修饰反应的速度都要远远慢于催化反应中稳态建立的速度,因此下列关系总是成立的:

$$\left. \begin{aligned} [ES] &= \frac{[E_T][S]}{K_M + [S]}, & [E] &= \frac{[E_T]K_M}{K_M + [S]} \\ [EYS] &= \frac{[E_T^*][S]}{K_M^* + [S]}, & [EY] &= \frac{[E_T^*]K_M^*}{K_M^* + [S]} \end{aligned} \right\} \quad (12-52)$$

其中 K_M 和 K_M^* 为米氏常数, $K_M = (k_{+2} + k_{-1})/k_{+1}$, $K_M^* = (k_{+2}^* + k_{-1}^*)/k_{+1}^*$, $[E_T] = [E] + [ES]$ 和 $[E_T^*] = [EY] + [EYS]$ 分别代表未被修饰和已被修饰酶的总浓度,令 $[E_0] = [E_T] + [E_T^*]$ 为加入反应体系中酶的总浓度,则:

$$-\frac{d[E_T]}{dt} = \left\{ \frac{[Y](k_{+0}K_M + k'_{+0}[S])}{K_M + [S]} + \frac{k_{-0}K_M^* + k'_{-0}[S]}{K_M^* + [S]} \right\} [E_T] - \frac{[E_0](k_{-0}K_M^* + k'_{-0}[S])}{K_M^* + [S]}$$

该式可以写成

$$-\frac{d[E_T]}{dt} = (A[Y] + B)[E_T] - B[E_0]$$

其中 A 和 B 分别表示酶同修饰试剂结合的正向和逆向反应表观速度常数。在此条件下可以导出在修饰试剂存在下底物反应的动力学方程:

$$[P]_t = \frac{A[Y]v' + Bv}{A[Y] + B}t - \frac{(v - v')A[Y]}{(A[Y] + B)^2}e^{-(A[Y] + B)t} + \frac{(v - v')A[Y]}{(A[Y] + B)^2}, \quad (12-53)$$

$[P]_t$ 为 t 时刻的产物浓度, v 和 v' 分别代表酶与修饰试剂结合前后的反应速度。显然,当 $v > v'$ 为抑制过程, $v < v'$ 为激活过程。

$$\begin{aligned} v &= \frac{k_{+2}[E_0][S]}{K_M + [S]}, & v' &= \frac{k'_{+2}[E_0][S]}{K_M^* + [S]} \\ A &= \frac{k_{+0}K_M + k'_{+0}[S]}{K_M + [S]}, & B &= \frac{k_{-0}K_M^* + k'_{-0}[S]}{K_M^* + [S]} \end{aligned} \quad (12-54)$$

$$(12-55)$$

如果 EYS 无活性,即 $k_{+2}^* = 0$ ($B = 0$),则(12-40)式可化简为(见图 12-22):

$$[P]_t = \frac{v}{A[Y]}(1 - e^{-A[Y]t}) \quad (12-56)$$

当 $t \rightarrow \infty$ 时的产物浓度 $[P]$ 为:

$$[P]_\infty = \frac{v}{A[Y]} = \frac{V[S]}{(k_{+0}K_M + k'_{+0}[S])[Y]} \quad (12-57)$$

(12-56), (12-57) 两式相减并取对数得:

$$\lg([P]_\infty - [P]) = \lg[P]_\infty - 0.43A[Y]t$$

因为 $[Y]$ 、最大反应速度 V 和 K_M 均为已知,由 $\lg([P]_\infty - [P])$ 对 t 作图,由斜率和截距分别可以求得 A 和 v 的值(图 12-23)。由 $1/[P]_\infty$ 对 $1/[S]$ 作图的斜率和截距可求得微观速度常数 k_{+0} 和 k'_{+0} 。

有时酶分子与不可逆抑制剂结合后不完全失活,即 $k_{+2}^* \neq 0$, 此时式(12-53)可化为:

$$[P]_t = v't - \frac{v - v'}{A[Y]}e^{-A[Y]t} + \frac{v - v'}{A[Y]} \quad (12-58)$$

这种情况下, $[Y]$ 的增加并不改变反应系统终态活力水平,它只缩

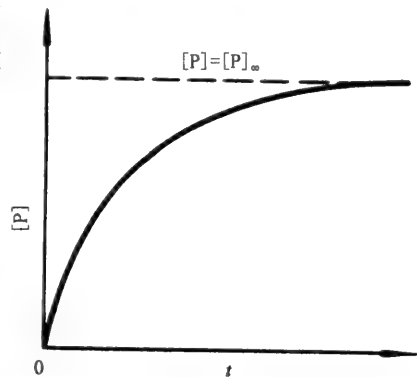


图 12-22 底物和不可逆抑制剂同时存在的条件下产物生成的时间过程 (渐近线表示形成产物的最终浓度)

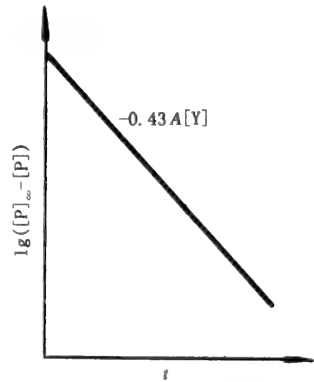


图 12-23 由半对数作图求表观速度常数 A (斜率 = $-0.43A[Y]$)

短抑制过程的弛豫时间(见图 12-24)。当时间 t 足够大时, $e^{-A[Y]t} = 0$, $[P]_t$ 的渐近线方程为 $[P]_t = v't + (v - v')/A[Y]$, 由 $\ln([P]_t - [P]_t)$ 对 t 作图的斜率求得表观速度常数 A , 再由 A/v 对 $1/[S]$ 作图的斜率和截距可求得微观速度常数 k_{+0} 和 k'_{+0} 。

对于慢可逆抑制作用 ($B \neq 0$), 虽然酶和抑制剂结合后无活力 ($k_{+2}^* = 0$), 但是由于抑制过程达到终态时仍有部分未与抑制剂结合的天然酶存在, 因而表现出有部分剩余活力。这时 (12-53) 式可化为:

$$[P]_t = \frac{Bv}{A[Y] + B}t - \frac{A[Y]v}{(A[Y] + B)^2}e^{-(A[Y] + B)t} + \frac{A[Y]v}{(A[Y] + B)^2} \quad (12-59)$$

从 (12-59) 式可以看出, $[Y]$ 的增加既缩短抑制过程的弛豫时间, 也降低了反应系统终态时的活力水平 $Bv/A[Y] + B$) (图 12-25)。应用前面的类似作图法可求得 A 和 B 以及 k_{+0} , k'_{+0} , k_{-0} 和 k'_{-0} 。

正如前面所指出的, 当 $v < v'$ 时, (12-53) 式代表激活过程。有些本来就具有活性的天然酶 ($v \neq 0$), 当与激活剂结合产生进一步的激活过程就属于这种情况。由 (12-53) 式可知, 反应系统达到稳态时的活力水平是 v 和 v' 的加权平均值。它的弛豫时间 τ 可由渐近线方程 $[P]_t = (A[Y]v' + Bv)t/(A[Y] + B) - (v' - v)A[Y]/(A[Y] + B)^2$ 和直线方程 $[P] = vt$ 的交点得, $\tau = 1/(A[Y] + B)$ (见图 12-26)。

由 $1/\tau$ 对 $[Y]$ 作图可以求得 A 和 B 。 v 可在激活之前直接由实验测定, 因而 v' 可由渐近线方程的斜率计算得到。分别由 A/v 和 B/v 对 $1/[S]$ 作图, 可以得到 k_{+0} , k'_{+0} , k_{-0} 和 k'_{-0} 。

如果酶分子在激活前完全无活性 ($v = 0$), 例如酶原的激活, 也就是说, 只有 EYS 才有活性, 方程式 (12-53) 可化简为

$$[P]_t = \frac{A[Y]v'}{A[Y] + B} \left(t + \frac{1}{A[Y] + B} e^{-(A[Y] + B)t} - \frac{1}{A[Y] + B} \right) \quad (12-60)$$

激活过程达到终态时的渐近线方程为

$$[P]_t = \frac{A[Y]v'}{A[Y] + B} \left(t - \frac{1}{A[Y] + B} \right) \quad (12-61)$$

该渐近线在横轴上的截距, 即弛豫时间 $\tau = 1/(A[Y] + B)$ 。改变 $[Y]$, 由 $1/v$ 对 $[Y]$ 作图, 可求得表观速度常数 A 和 B , 进而可求得它们所对应的微观速度常数。对于上述两种情况的不可逆激活过程, $[Y]$ 增加, 缩短过程的弛豫时间, 而增加终态时的活力水平 (图 12-26)。若激活过程不可逆 ($B = 0$), $[Y]$ 的增加只缩短过程的弛豫时间, 不改变终态时的活力水平。

12.5.2 单底物酶反应, 配合型抑制剂

作为不可逆抑制剂, 亲合标记试剂已被广泛地应用于研究酶的活性部位。它与酶分子不可逆

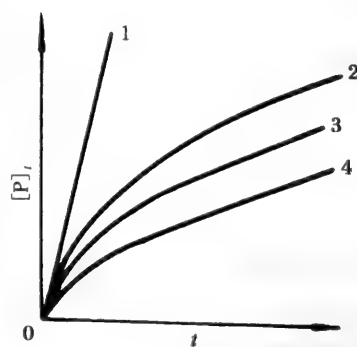


图 12-24 酶与抑制剂不可逆结合后仍有部分剩余活力

曲线 1 为无抑制剂存在下的底物反应, 曲线 2, 3, 4 代表抑制剂浓度下 (1→4 浓度增大) 的底物反应

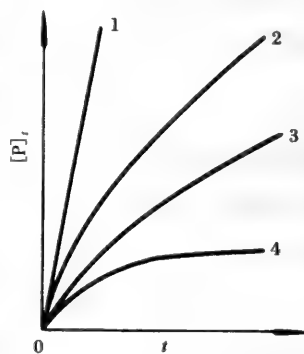


图 12-25 底物与慢可逆抑制剂同时存在下的底物反应 (说明同图 (12-5))

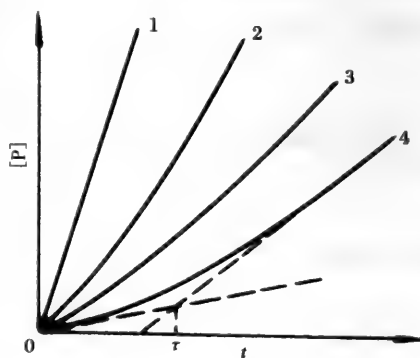
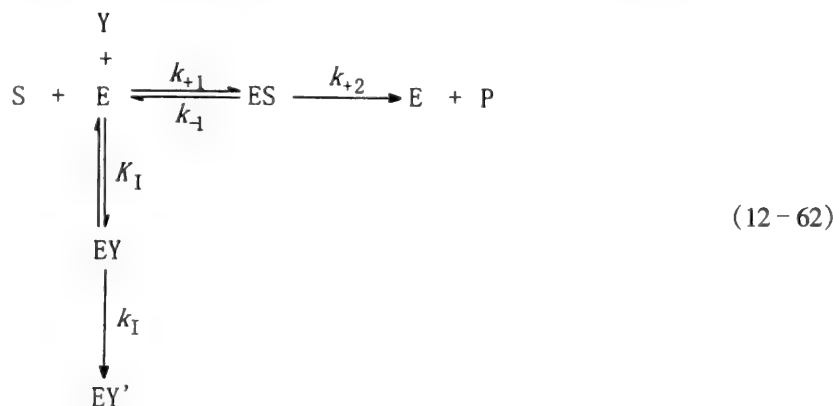


图 12-26 酶激活过程的产物生成过程 曲线 1 为完全激活的酶的底物反应; 曲线 2, 3, 4 代表不通激活剂浓度下 (2→4 浓度减小) 的底物反应

作用之前,先与酶分子形成可逆的配合物。这类修饰试剂作为化疗药物有重要的应用前景。事实上有很多激活剂在不可逆激活之前也先与酶分子形成可逆的配合物,如乙酰胆碱脂酶的激活。这类修饰试剂成为配合型修饰试剂,它们在与酶作用过程中的底物反应动力学较之非配合型复杂些。

对于配合型不可逆抑制剂,考虑它在结构上是底物或过渡态中间物的类似物,很可能结合在底物的结合部位上以致三元复合物 EYS 不能形成,并且它与酶分子可逆的结合步骤远快于不可逆的修饰过程,因而有



$$\begin{aligned}
 -\frac{d[\text{E}_T]}{dt} &= k_1[\text{EY}] = \frac{k_1 K_M [\text{E}_T][\text{Y}]/K_I}{K_M \left(1 + \frac{[\text{Y}]}{K_I}\right) + [\text{S}]} = A[\text{E}_T][\text{Y}] \\
 A &= \frac{k_1 K_M / K_I}{K_M \left(1 + \frac{[\text{Y}]}{K_I}\right) + [\text{S}]}
 \end{aligned}
 \quad (12-63)$$

配合型不可逆抑制剂存在下的底物反应动力学方程:

$$\begin{aligned}
 [\text{P}]_t &= \frac{v^*}{A[\text{Y}]}(1 - e^{-A[\text{Y}]t}) \\
 [\text{P}]_\infty &= \frac{v^*}{A[\text{Y}]} = \frac{V[\text{S}]}{(k_1/K_I)K_M[\text{Y}]} \\
 v^* &= \frac{V[\text{S}]}{K_M(1 + [\text{Y}]/K_I) + [\text{S}]}
 \end{aligned}
 \quad (12-64)$$

式(12-64)在形式上与式(12-56)完全相同,所不同的只是 A , v^* 和 $[\text{P}]_\infty$ 的表达式。 k_1/K_I 代替了非配合型不可逆竞争性抑制剂的 k_{+0} , 比较式(12-64)和式(12-57)可知,对配合型抑制剂来说, $1/A$ 和 $[\text{Y}]$ 成正比,而非配合型的抑制剂的表观 A 与 $[\text{Y}]$ 无关。这也正是用作图法区分这两类抑制剂的理论依据。其中的 k_1 和 K_I 值可由 $1/A$ 对 $[\text{Y}]$ 作图,从斜率和截距求得(图 12-27)。

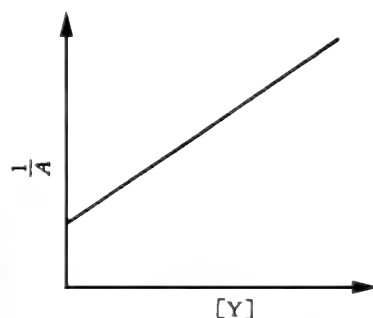


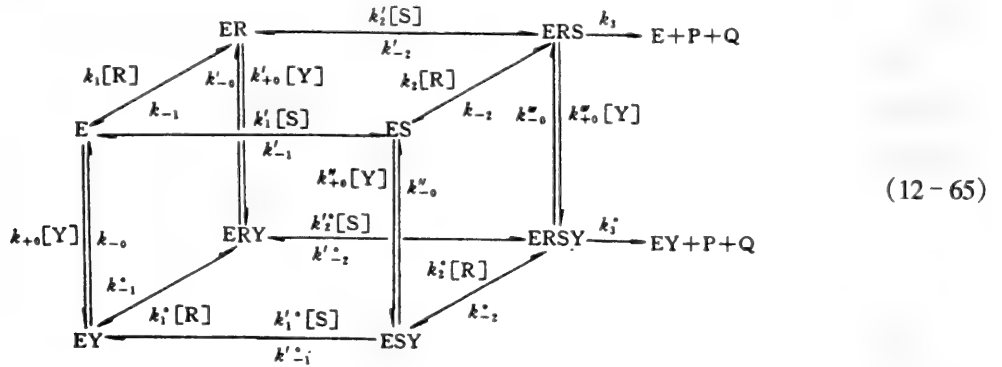
图 12-27 配合型抑制反应 $1/A$ 对 $[\text{Y}]$ 作图

12.5.3 双底物酶反应,非配合型抑制剂

很多酶反应包含一个以上的底物。理论研究的结果表明,前面所介绍的单底物酶反应的动力学方法也完全适用于双底物酶反应系统^[16]。对于双底物酶反应的随机机制,有序机制,强制有序机制和乒乓机制,用类似处理单底物酶反应的方法,都可以推导出在形式上和式(12-53)完全相同的动力学方程。不同机制之间的差别以及它们与单底物酶反应之间的差别仅仅表现在正向和逆向的表观速度常数 A 和 B 以及 v 、 v' 和 $[\text{P}]_\infty$ 的表达式上。

A 随机机制

对于双底物酶反应的随机机制,其修饰反应机制如下:



E 和 Y 所代表的依然为酶和修饰试剂, R 和 S 为两种底物, ER, ES, ERS, ERSY 等分别为其相应的复合物。令 $[E_T]$ 和 $[E_T^*]$ 分别代表未修饰和已修饰的酶的浓度, 则有

$$\left. \begin{aligned} [E_T] &= [E] + [ES] + [ER] + [ESR] \\ [E_T^*] &= [EY] + [ERY] + [ESY] + [ESRY] \\ [E]_0 &= [E_T] + [E_T^*] \end{aligned} \right\} \quad (12-66)$$

当 $[R], [S]$ 和 $[Y] \gg [E]_0$, 则

$$-\frac{d[E_T]}{dt} = \frac{d[E_T^*]}{dt} = (k_{+0}[E] + k'_{+0}[ER] + k''_{+0}[ES] + k'''_{+0}[ERS])[Y] - (k_{-0}[EY] + k'_{-0}[ERY] + k''_{-0}[ESY] + k'''_{-0}[ERSY]) \quad (12-67)$$

同样, 由于酶与底物反应的稳态建立的速度要远远快于修饰反应的速度, 随着时间的变化, $[E_T]$ 的减少和 $[E_T^*]$ 的增加不会对稳态造成影响, 所以下列关系是成立的:

$$\left. \begin{aligned} K'_R[ER] &= [E][R], K'_S[ES] = [E][S] \\ K'_R K_S [ERS] &= K'_S K_R [ERS] = [E][R][S] \\ K''_R [ERY] &= [EY][R], K''_S [ESY] = [EY][S] \\ K''_R K_S [ERSY] &= K''_S K_R [ERSY] = [EY][R][S] \end{aligned} \right\} \quad (12-68)$$

酶修饰的速度为:

$$-\frac{d[E_T]}{dt} = \frac{k_{+0} + k'_{+0} \frac{[R]}{K'_R} + k''_{+0} \frac{[S]}{K'_S} + k'''_{+0} \frac{[R][S]}{K'_S K'_R}}{1 + \frac{[R]}{K'_R} + \frac{[S]}{K'_S} + \frac{[R][S]}{K'_S K'_R}} [E_T][Y] - \frac{(k_{-0} + k'_{-0} \frac{[R]}{K''_R} + k''_{-0} \frac{[S]}{K''_S} + k'''_{-0} \frac{[R][S]}{K''_S K''_R}) [E_T^*]}{1 + \frac{[R]}{K''_R} + \frac{[S]}{K''_S} + \frac{[R][S]}{K''_S K''_R}} \quad (12-69)$$

$$= A[E_T][Y] - B[E_T^*] = (A[Y] + B)[E_T] - B[E]_0$$

底物反应的动力学方程的形式与单底物酶反应的动力学方程式(12-53)形式相同, 其中

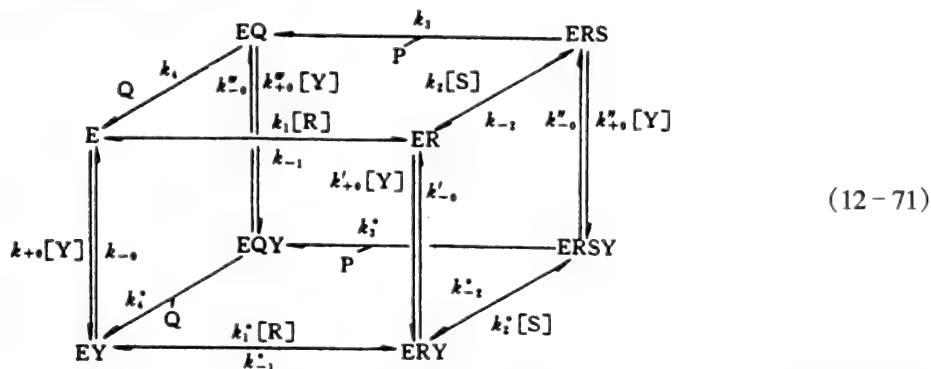
$$\left. \begin{aligned} A &= \frac{k_{+0} K_S K'_R + k'_{+0} K_S [R] + k''_{+0} K_R [S] + k'''_{+0} [R][S]}{K_S K'_R + K_S [R] + K_R [S] + [R][S]} \\ B &= \frac{k_{-0} K_S^* K''_R + k'_{-0} K_S^* [R] + k''_{-0} K_R^* [S] + k'''_{-0} [R][S]}{K_S^* K''_R + K_S^* [R] + K_R^* [S] + [R][S]} \\ v &= \frac{k_3 [E_0][R][S]}{K_S K'_R + K_S [R] + K_R [S] + [R][S]} \\ v' &= \frac{k_3 [E_0][R][S]}{K_S^* K''_R + K_S^* [R] + K_S^* [S] + [R][S]} \end{aligned} \right\} \quad (12-70)$$

当反应为不可逆 ($B=0$) 时, 则

$$[P]_{\infty} = \frac{v}{A[Y]} = \frac{k_3[E_0][R][S]}{k_{+0}K_S K'_R + k'_{+0}K_S[R] + k''_{+0}K_R[S] + k'''_{+0}[R][S]} \cdot \frac{1}{[Y]}$$

B 有序机制

有序机制的酶修饰反应的机制为:



P 和 Q 为生成的产物。同样,可以导出与前面形式相同的反应速度方程,其正向和反向表观反应速度常数 A 和 B 分别为:

$$A = \frac{k_{+0}K_{iR}K_{MS} + k_{+0}K_{MR}[S] + k'_{+0}K_{MS}[R] + \frac{k''_{+0}k_4 + k'''_{+0}k_3}{k_3 + k_4}[R][S]}{K_{iR}K_{MS} + K_{MR}[S] + K_{MS}[R] + [R][S]}$$

$$B = \frac{k_{-0}K_{iR}^*K_{MS}^* + k_{-0}K_{MR}^*[S] + k'_{-0}K_{MS}^*[R] + \frac{k''_{-0}k_4^* + k'''_{-0}k_3^*}{k_3^* + k_4^*}[R][S]}{K_{iR}^*K_{MS}^* + K_{MR}^*[S] + K_{MS}^*[R] + [R][S]}$$

(12-72)

其中

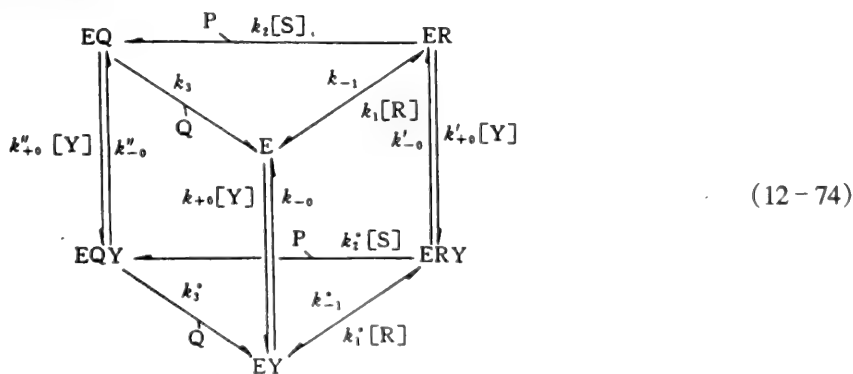
$$K_{MR} = \frac{k_3 k_4}{k_1(k_3 + k_4)}, \quad K_{MS} = \frac{k_4(k_{-2} + k_3)}{k_2(k_3 + k_4)}, \quad K_{iR} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$$K_{MR}^* = \frac{k_3^* k_4^*}{k_1^*(k_3^* + k_4^*)}, \quad K_{MS}^* = \frac{k_4^*(k_{-2}^* + k_3^*)}{k_2^*(k_3^* + k_4^*)}, \quad K_{iR}^* = \frac{k_{-1}^*}{k_1^*}$$

(12-73)

C 强制有序机制

强制有序反应机制的酶修饰反应为:

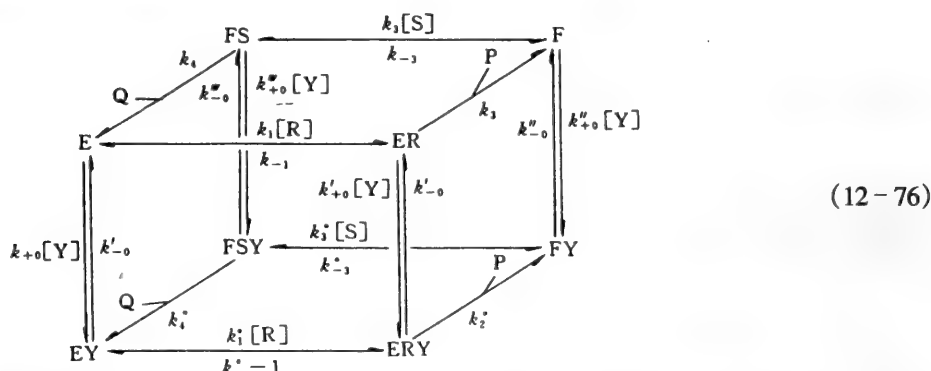


该机制下,其修饰反应的正向和反向表观反应速度常数为:

$$\left. \begin{aligned}
 A &= \frac{k_{+0} \left(\frac{k_{-1} k_3}{k_1 k_2} + \frac{k_3}{k_1} [S] \right) + k'_{+0} \frac{k_3}{k_2} [R] + k''_{+0} [R][S]}{\frac{k_{-1} k_3}{k_1 k_2} + \frac{k_3}{k_1} [S] + \frac{k_3}{k_2} [R] + [R][S]} \\
 B &= \frac{k_{-0} \left(\frac{k_{-1} k_3^*}{k_1^* k_2^*} + \frac{k_3^*}{k_1^*} [S] \right) + k'_{-0} \frac{k_3^*}{k_2^*} [R] + k''_{-0} [R][S]}{\frac{k_{-1} k_3^*}{k_1^* k_2^*} + \frac{k_3^*}{k_1^*} [S] + \frac{k_3^*}{k_2^*} [R] + [R][S]}
 \end{aligned} \right\} \quad (12-75)$$

D 乒乓机制

这种机制酶的修饰反应机制为:



其中 E 和 F 为天然酶的两形式, [E] 和 [F] 以及 [ER] 和 [FS] 都为未被修饰的酶的浓度, 则,

$$\left. \begin{aligned}
 [E_T] &= [E] + [ER] + [F] + [FS] \\
 [E_T^*] &= [EY] + [ERY] + [FY] + [FSY]
 \end{aligned} \right\} \quad (12-77)$$

同样可以得到与前面相同的反应速度方程。其中

$$\left. \begin{aligned}
 A &= \frac{k_{+0}(k_{-1} + k_2)k_3k_4[S] + (k'_{+0}k_4 + k''_{+0}k_2)k_1k_3[R][S] + k''_{+0}(k_{-3} + k_4)k_1k_2[R]}{(k_{-1} + k_2)k_3k_4[S] + (k_2 + k_4)k_1k_3[R][S] + (k_{-3} + k_4)k_1k_2[R]} \\
 B &= \frac{k_{-0}(k_{-1} + k_2^*)k_3^*k_4^*[S] + (k'_{-0}k_4^* + k''_{-0}k_2^*)k_1^*k_3^*[R][S] + k''_{-0}(k_{-3}^* + k_4^*)k_4^*k_2^*[R]}{(k_{-1}^* + k_2^*)k_3^*k_4^*[S] + (k_2^* + k_4^*)k_1^*k_3^*[R][S] + (k_{-3}^* + k_4^*)k_1^*k_2^*[R]}
 \end{aligned} \right\} \quad (12-78)$$

为了求得各反应机制中的各微观动力学常数, 以随机机制为例, 先保持一个底物浓度如 [R] 不变, 由 $1/[P]_0$ 对 $1/[S]$ 作图为一一直线 (图 12-28), 它的斜率和纵轴截距分别为:

$$\left. \begin{aligned}
 s &= \frac{k_{+0}K_S K'_R [Y]}{k_3 [E]_0} \frac{1}{[R]} + \frac{k'_{+0}K_S [Y]}{k_3 [E]_0} \\
 i &= \frac{k''_{+0}K_R [Y]}{k_3 [E]_0} \frac{1}{[R]} + \frac{k''_{+0}[Y]}{k_3 [E]_0}
 \end{aligned} \right\} \quad (12-79)$$

分别由 s 对 $1/[R]$ 和 i 对 $1/[R]$ 再次作图 (图 12-28(b), (c)), 它们的斜率和截距分别为

$$\left. \begin{aligned}
 i &= k'_{+0}K_S [Y]/k_3 [E]_0, & s &= k_{+0}K_S K'_R [Y]/k_3 [E]_0 \\
 i &= k''_{+0}[Y]/k_3 [E]_0, & s &= k''_{+0}K_R [Y]/k_3 [E]_0
 \end{aligned} \right\} \quad (12-80)$$

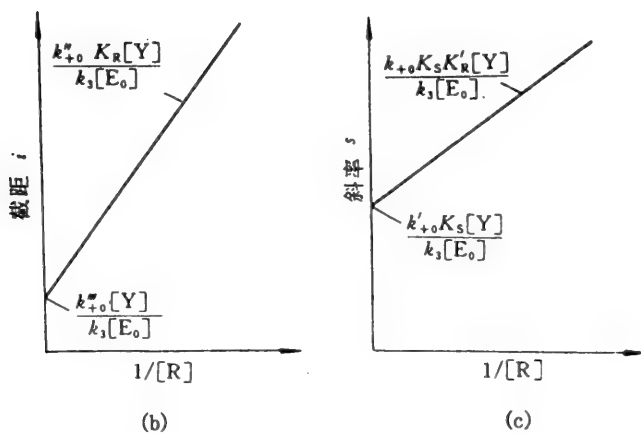
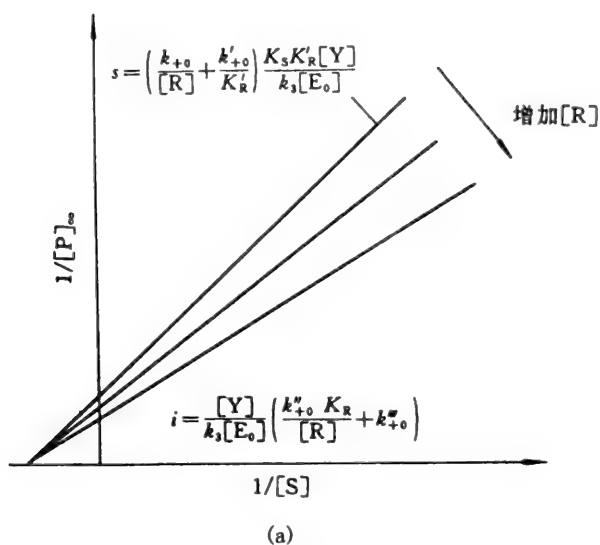


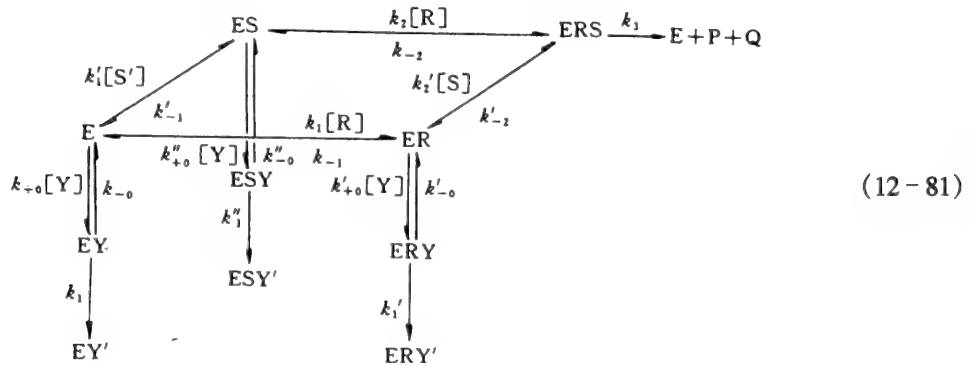
图 12-28 $1/[P]$ 对 $1/[S]$ 作图求非配合型抑制剂的微观抑制速度常数,直线的斜率和截距都随 $[R]$ 的增加而减小;(b)和(c)分别为(a)的截距和斜率对 $1/[R]$ 再作图

由于 $[E_0]$ 和 $[Y]$ 为已知,而 k_3 和解离常数 K_R , K'_R 和 K_S 可由实验在无抑制剂存在的条件下测得,所以微观抑制速度常数 k_{+0} , k'_{+0} , 和 k''_{+0} , 可由斜率和截距计算。用同样的方法可以求得各机制所对应的微观速度常数。对于慢可逆抑制剂可用 v/A 和 v'/B 代替上面的 $[P]$ 。仿照上述步骤就可以求得各机制相应的正向和反向微观抑制速度常数。

12.5.4 双底物酶反应,配合型抑制剂

A 随机机制

同单底物酶不可逆配合型抑制剂一样,类似于 Laidier 和 Bunting 的假设,双底物酶不可逆抑制剂在结构上也是底物的类似物并与底物竞争同一结合部位使之不能形成四元复合物 ERSY。随机机制酶的配合型修饰反应机制如下(式(12-81)):



按此反应机制可以得到

$$\left. \begin{aligned} [E_T] &= [E] + [ER] + [ES] + [ERS] + [EY] + [ERY] + [ESY] \\ [E_T^*] &= [EY'] + [ERY'] + [ESY'] \end{aligned} \right\} \quad (12-82)$$

由于配合型抑制剂通常是底物或过渡态的类似物,它们与酶的结合速度要远远快于不可逆的修饰速度因此下列关系是成立的:

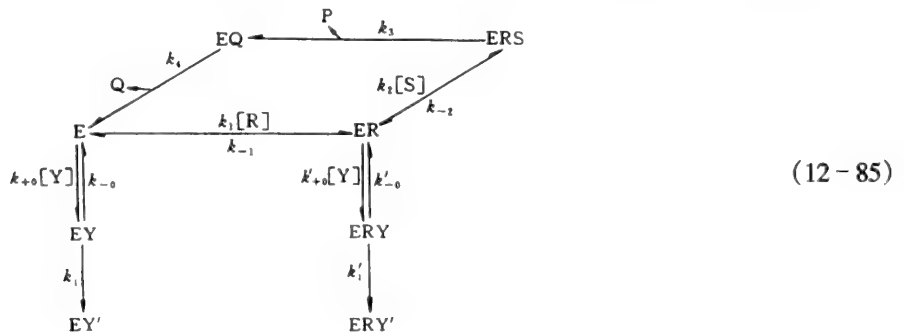
$$\left. \begin{aligned} [EY] &= [E][Y]/K_1, K_1 = k_{-0}/k_{+0} \\ [ERY] &= [ER][Y]/K'_1, K'_1 = k'_{-0}/k'_{+0} \\ [ESY] &= [ES][Y]/K''_1, K''_1 = k''_{-0}/k''_{+0} \\ K'_R [ER] &= [E][R], K'_R = k_{-1}/k_{+1}, K_R = k_{-2}/k_{+2} \\ K'_S [ES] &= [E][S], K'_S = k'_{-1}/k'_{+1}, K_S = k'_{-2}/k'_{+2} \\ K'_R K_S [ERS] &= K'_S K_R [ERS] = [E][R][S] \end{aligned} \right\} \quad (12-83)$$

相应的动力学方程形式与式(12-64)完全相同,不同之处仅在于 v^* 和 A 的表达式,

$$\left. \begin{aligned} v^* &= \frac{k_3 [E]_0 [R] [S]}{\left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) K'_R K_S + \left(1 + \frac{[Y]}{K'_1}\right) K_S [R] + \left(1 + \frac{[Y]}{K''_1}\right) K_R [S] + [R][S]} \\ \frac{1}{A} &= \frac{\left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) K'_R K_S + \left(1 + \frac{[Y]}{K'_1}\right) K_S [R] + \left(1 + \frac{[Y]}{K''_1}\right) K_R [S] + [R][S]}{\frac{k_1}{K_1} K_S K'_R + \frac{k'_1}{K'_1} K_S [R] + \frac{k''_1}{K''_1} K_R [S]} \end{aligned} \right\} \quad (12-84)$$

B 有序机制

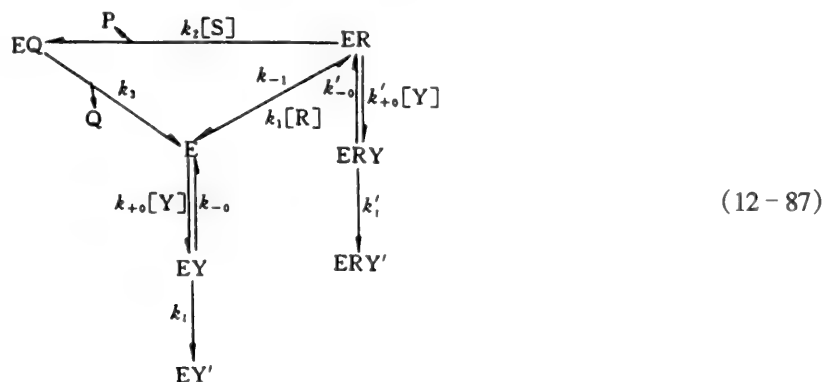
对于某些酶,其三元复合物只能按一定的顺序在其一定的二元复合物形成之后才能形成。机制(12-85)中的 ESR 复合物只能通过 ER 复合物形成。配合型抑制剂一般与酶的一个底物很相似,因此能够与酶发生配合反应。Y 与 S 相似而只能与 E 和 ER 结合,此时 $1/A$ 和 v^* 的表达式为:



$$\left. \begin{aligned} \frac{1}{A} &= \frac{\left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) (K_{iR} K_{MS} + K_{MR} [S]) + \left(1 + \frac{[Y]}{K'_1}\right) K_{MS} [R] + [R][S]}{\frac{k_1}{K_1} (K_{iR} K_{MS} + K_{MR} [S]) + \frac{k'_1}{K'_1} K_{MS} [R]} \\ v^* &= \frac{V[R][S]}{\left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) (K_{iR} K_{MS} + K_{MR} [S]) + \left(1 + \frac{[Y]}{K'_1}\right) K_{MS} [R] + [R][S]} \end{aligned} \right\} \quad (12-86)$$

C 强制有序机制

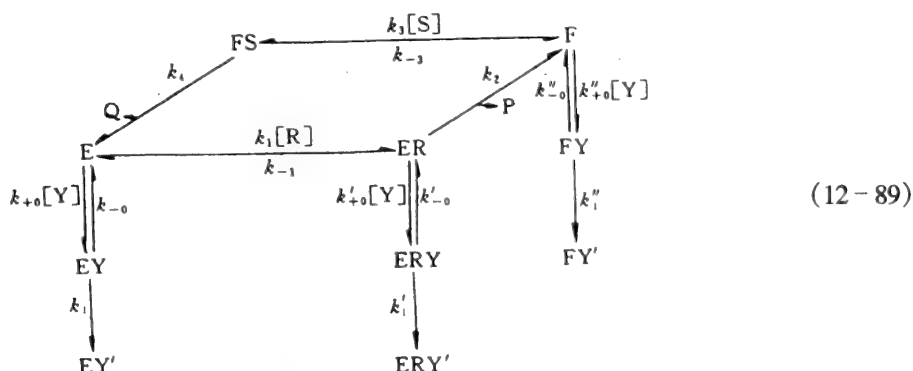
强制有序机制的酶的配合型不可逆抑制如(12-87)所示。



其 $1/A$ 和 v^* 的表达式为:

$$\left. \begin{aligned} \frac{1}{A} &= \frac{\left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) (k_{-1} k_3 + k_2 k_3 [S]) + \left(1 + \frac{[Y]}{K'_1}\right) k_1 k_3 [R] + k_1 k_2 [R][S]}{\frac{k_1}{K_1} (k_{-1} k_3 + k_2 k_3 [S]) + \frac{k'_1}{K'_1} k_1 k_3 [R]} \\ v^* &= \frac{k_1 k_2 k_3 [E]_0 [R][S]}{\left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) (k_{-1} k_3 + k_2 k_3 [S]) + \left(1 + \frac{[Y]}{K'_1}\right) k_1 k_3 [R] + k_1 k_2 [R][S]} \end{aligned} \right\} \quad (12-88)$$

D 乒乓机制



对于乒乓机制(12-89)式, $1/A$ 和 v^* 的表达式分别为

$$\left. \begin{aligned} \frac{1}{A} &= \frac{\left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) (k_{-1} + k_2) k_3 k_4 [S] + \left(1 + \frac{[Y]}{K'_1}\right) (k_{-3} + k_4) k_1 k_2 [R] + \left\{ \left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) k_4 + k_2 \right\} k_1 k_3 [R][S]}{\frac{k_1}{K_1} (k_{-1} + k_2) k_3 k_4 [S] + \frac{k''_0}{K''_1} (k_{-3} + k_4) k_1 k_2 [R] + \frac{k'_1}{K'_1} k_1 k_3 k_4 [R][S]} \\ v^* &= \frac{k_1 k_2 k_3 k_4 [E]_0 [R][S]}{\left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) (k_{-1} + k_2) k_3 k_4 [S] + \left(1 + \frac{[Y]}{K''_1}\right) (k_{-3} + k_4) k_1 k_2 [R] + \left\{ \left(1 + \frac{[Y]}{K_1}\right) k_4 + k_2 \right\} k_1 k_3 [R][S]} \end{aligned} \right\} \quad (12-90)$$

值得注意的是对于各种不同的底物反应机制,其配合型抑制反应的表观速度常数 A 均与抑制剂的浓度有关,以 $1/A$ 对 $[Y]$ 作图将得到一条在纵轴上具有正截距的直线,用此方法,可以很容易地区分配合型和非配合型抑制反应。

比较配合型和非配合型反应的 $[P]_0$ 的表达式可以看出,两者的形式是完全相同的,只是前者的微观抑制速度常数被相应的速度常数除以相应的解离常数所取代,如 k_{-1} 被 k_1/K_1 代替。根据前面图 12-28 所介绍的作图法,可以求得 k_1/K_1 , k'_1/K'_1 以及 k''_1/K''_1 的值。显然,要得到微观抑制速度常数 k_1 , k'_1 和 k''_1 的值,首先必需求得解离常数 K_1 , K'_1 和 K''_1 。以随机机制为例,根据式 (12-81),其中 $k_3[E_0]$ 和 $[Y]$ 已知,而 K_R , K_S 和 K'_R 均可由在无抑制剂存在下的实验测得,所以 K_1 , K'_1 和 K''_1 可由 $1/v^*$ 对 $1/[S]$ 作图的斜率和纵轴的截距分别对 $1/[R]$ 再作图求得(图 12-29)。同理可以求得其他各机制的每个微观抑制速度常数和解离常数。

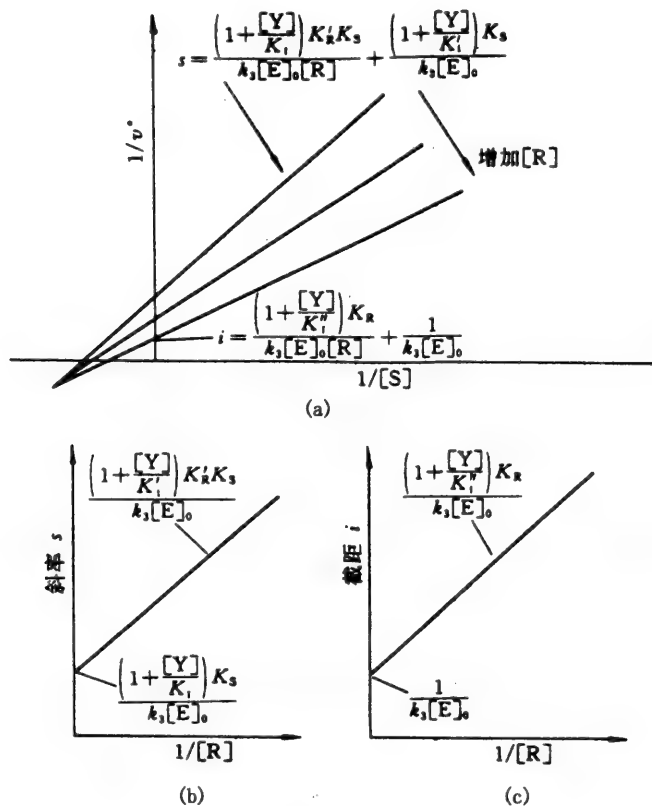


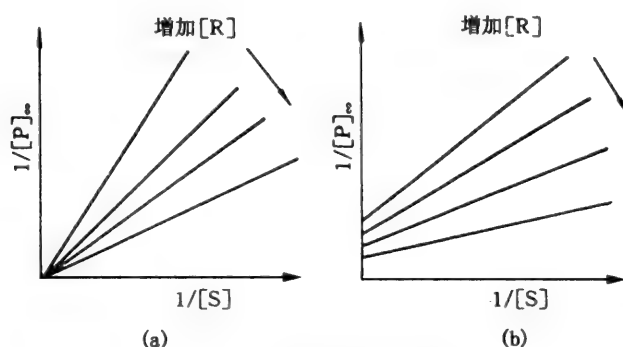
图 12-29 $1/v^*$ 对 $1/[S]$ 作图求配合型抑制剂的微观速度常数,其截距和斜率都随 $[R]$ 的增加而减小;(b)和(c)分别为(a)的斜率和截距对 $1/[R]$ 再作图

单底物酶的各种反应机制的表观失活速度常数 A 列于表 12-2 中,相应的单底物酶反应的速度列于表 12-3 中。

用配合性不可逆抑制过程底物反应动力可以阐明双底物酶底物结合顺序的不同机制。以随机机制为例,当配合型不可逆抑制剂与其中 1 个底物,如 S 竞争时, ESY 不能形成,即 $k''_1/K''_1 = 0$,这时在不同的 R 浓度下, $1/[P]_0$ 对 $1/[S]$ 作图可得到一簇交于原点的直线,其斜率随着 $[R]$ 的增加而减小(图 12-30(a));而对于有序机制,上述作图则得到交于 $1/[P]$ 轴上的一组直线,其斜率和截距都随 $[R]$ 的增加而减小(见图 12-30(b))。

表 12-2 不同抑制类型的动力学判据

抑制类型	定义	可逆抑制		不可逆抑制	
		条件	稳态活力分数	条件	A
竞争性	Y 不同 ES 结合	$1/K'_0 = 0$	$\frac{1 + [S]K_M}{1 + [S]/K_M + [Y]/K_0}$	$k'_{+0} = 0$	$\frac{k_{+0}}{1 + [S]/K_M}$
非竞争性	Y 同 ES 结合	$K_0 = K'_0$	$\frac{1}{1 + [Y]/K_0}$	$k_{+0} = k'_{+0}$	k_{+0}
反竞争性	Y 只与 ES 结合	$1/K_0 = 0$	$\frac{1 + [S]/K_M}{1 + [S]/K_M + [Y]/K'_0 K_M}$	$k_{+0} = 0$	$\frac{k'_{+0}[S]}{K_M + [S]}$

图 12-30 双底物反应,配合型不可逆抑制剂,用 $1/[P]_{\infty}$ 对 $1/[S]$ 作图区别底物结合的随机机制(a)和有序机制(b)

12.5.5 可逆抑制剂和不可逆抑制剂的底物竞争性概念的统一

过去对于可逆抑制剂的竞争性、非竞争性和反竞争性的抑制类型的区分是根据抑制剂的浓度对表观米氏常数的影响来判断的,并且仅仅只适用于可逆抑制剂。而邹提出的酶活性修饰过程中底物反应动力学的方法不仅适用于可逆反应,而且适用于不可逆反应(机制(12-51)),它统一了可逆和不可逆竞争的概念。不可逆抑制剂的竞争性、非竞争性和反竞争性的定义与可逆抑制剂一样,分别为底物的结合阻止抑制剂的结合、不影响抑制剂的结合和促进抑制剂的结合。区分二者不同抑制类型的条件也是类似的(表 12-2),只是区分可逆抑制剂不同抑制类型是根据抑制剂浓度对表观米氏常数的影响,而区分不可逆抑制剂是根据抑制剂浓度对表观失活速度常数 A 的影响。从表 12-2 的结果可以看出,适当的 A 对 $[S]$ 作图可以很容易地区分不可逆抑制剂的不同底物竞争性类型,对于竞争性抑制剂, $1/A$ 对 $[S]$ 作图为一 条直线;反竞争性, $1/A$ 对 $1/[S]$ 作图为直线,并且可以由它们的截距求得 k_{+0} 和 k'_{+0} ;而非竞争性的 A 与 $[S]$ 无关。

另外,根据式(12-57),适当的 $[P]_{\infty}$ 对 $[S]$ 或 $1/[S]$ 作图也可以用来判断抑制剂的作用类型并求得相应的微观速度常数。

对于双底物酶非配合型抑制剂,可用前面的作图法求得微观速度常数后再加以判断。

12.6 不可逆抑制动力学在其他方面的应用

邹提出的酶活性不可逆改变动力学不仅在酶的化学修饰的研究中取得了很大的进展,而且在酶脱辅基和加辅基以及酶分子去折叠和再折叠过程中的活力变化的研究也得到了成功的应用。这一节将主要介绍一些具体的应用实例。

12.6.1 酶脱配体的动力学

图 12-31 为邻二氮杂菲(1,10-phenanthroline, 简称 OP)存在下氨基酰化酶催化底物的反应过程^[19], 随着时间的增加, 产物的生成趋向一条斜线, OP 浓度的增加不仅缩短了弛豫时间, 也降低了直线部分的斜率, 说明 OP 对氨基酰化酶的脱锌作用为可逆抑制作用。由 $1/A$ 对 $[OP]$ 作图为一斜线(图 12-32), 根据前面我们介绍的方法, OP 对氨基酰化酶的作用为配合型抑制, 其抑制机制为:

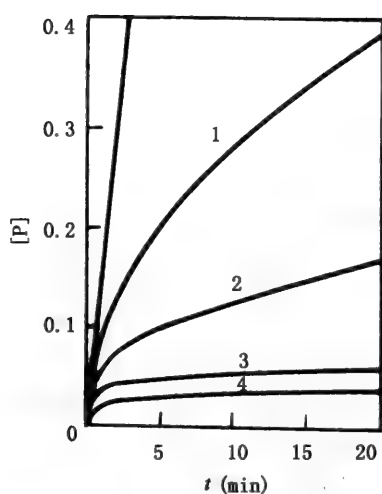
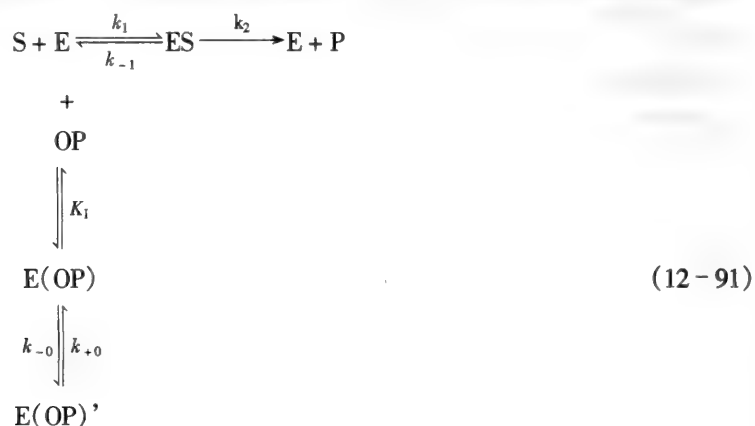


图 12-31 OP 存在下氨基酰化酶催化底物的反应过程

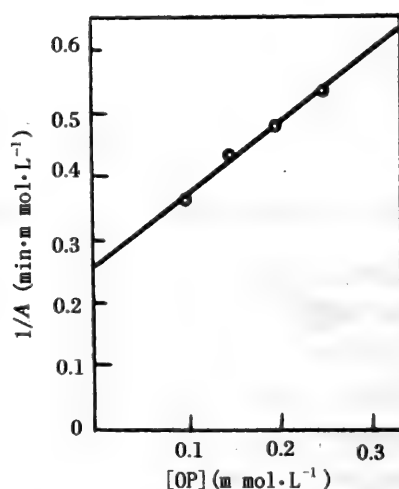


图 12-32 $1/A$ 对 OP 的浓度作图

按照前面的作图法, 通过适当的作图, 可求得 OP 对氨基酰化酶作用的各种微观速度常数, 见表 12-3。

表 12-3 OP 抑制氨基酰化酶的解离常数和微观速度常数

常数	$1/A$ 对 $[S]$ 作图	$1/A$ 对 $[OP]$ 作图
$K_i (\mu M)$	119	122
$k_{+0} (S^{-1})$	16×10^{-3}	15×10^{-3}
$k_{-0} (S^{-1})$	0.8×10^{-3}	1.0×10^{-3}

另外, 用不可逆抑制动力学的方法还研究了 OP 对氨基酰化酶 Zn^{2+} 和 CO^{2+} 酶作用的比较, 并且研究了脱辅基的氨基酰化酶重组的动力学过程。

12.6.2 酶在变性剂中失活的动力学

由于酶在变性剂中的失活通常是一个较快的过程,因此用一般的定时取样测活的方法难于得出快失活的速度常数。应用不可逆抑制动力学的方法,在变性剂的存在下,连续监测酶催化底物的反应过程,可以很容易地得到酶在该变性剂中的失活速度常数。用此方法,不仅能够排除常规方法中由于取样测活时由于变性剂稀释或底物诱导复活的影响,而且能够分别给出游离酶和底物结合后酶在变性剂中的失活速度常数。

图 12-33 为木瓜蛋白酶在盐酸胍溶液中变性时酶催化底物的反应过程。随着反应时间的延长,产物趋于一个定值,即木瓜蛋白酶在 5mol/L 盐酸胍溶液中变性后没有剩余活力,其变性机制为:

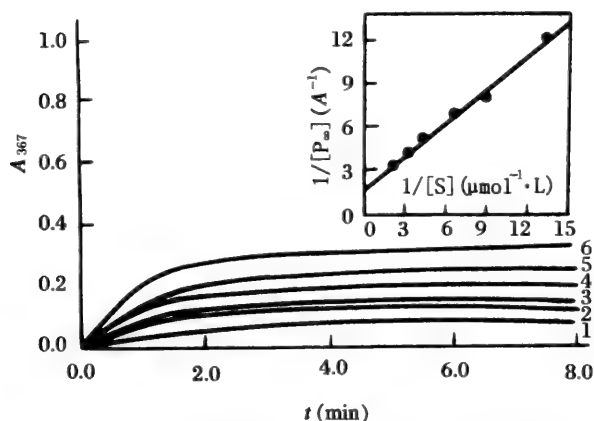
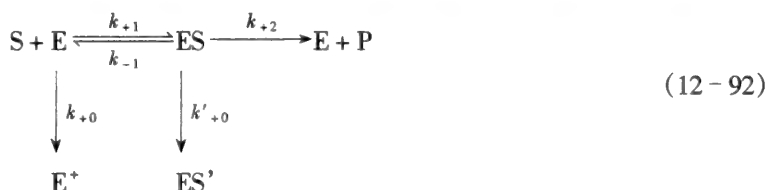


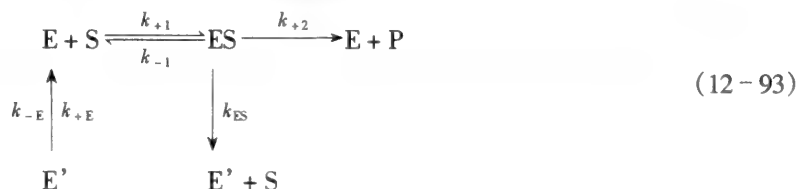
图 12-33 木瓜蛋白酶在 5mol/L 盐酸胍中,不同底物浓度下的失活过程,内插图为 $1/[P]_{\infty}$ 对 $1/[S]$ 作图

根据酶活性不可逆改变的动力学的方法,有

$$\begin{aligned}
 [P]_{\infty} &= V_{\max} [S] / A (k_{+0} K_M + k'_{+0} [S]) \\
 A &= (k_{+0} K_M + k'_{+0} [S]) / (K_M + [S])
 \end{aligned}$$

以 $1/[P]_{\infty}$ 对 $1/[S]$ 作图,从斜率和截距就可分别得到游离酶和底物结合酶的失活速度常数。

氨基酰化酶在 0.5mol/L 的盐酸胍溶液中变性时失活的动力学过程表示于图 12-34(a)^[80],可以看到有些酶在一定的变性剂浓度下仍然具有部分的剩余活力,此时它的失活机制为:



其底物反应的速度方程为:

$$\begin{aligned}
 [P]_t &= \frac{vk_{-E}}{A} t + \frac{v}{A^2} (A - k_{-E}) (1 - e^{-At}) \\
 A &= \frac{k_E K_M + K_{ES} [S]}{K_M + [S]} + k_{-E}
 \end{aligned}$$

按图 12-34(b), (c), (d) 的作图方法, 即可求得氨基酰化酶在盐酸胍溶液中变性时的各种微观速度常数, 见表 12-4。

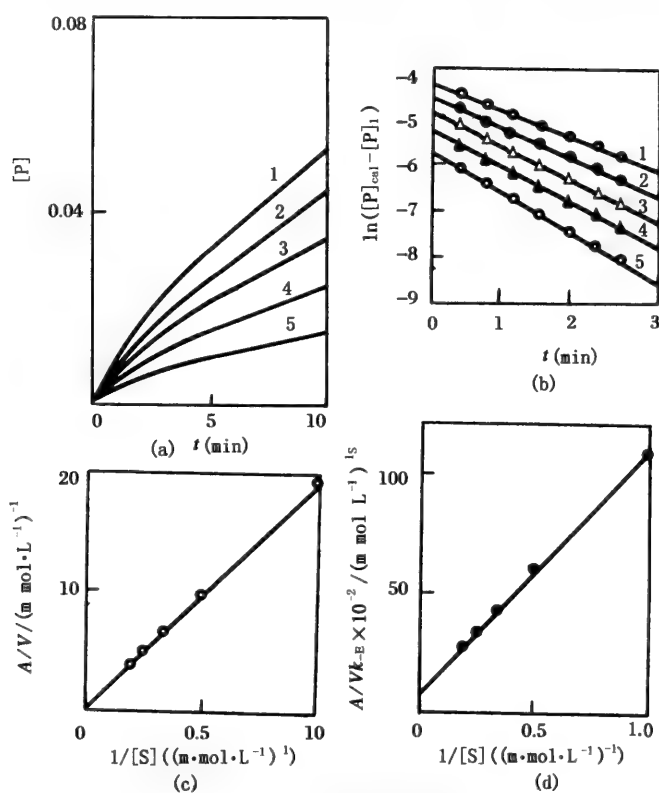


图 12-34 作图求氨基酰化酶在 0.5 mol/L 的盐酸胍溶液中的失活速度常数

(a) 0.5 mol/L GuHCl 溶液中, 不同底物浓度下, 酶催化底物的反应过程;

(b) $\ln([P]_{\text{calc}} - [P]_t)$ 对时间 t 作图;

(c) A/v 对 $1/[S]$ 作图; (d) A/vk_{-E} 对 $1/[S]$ 作图

表 12-4 氨基酰化酶在不同浓度的盐酸胍溶液中的失活速度常数^[80]

盐酸胍 (mol/L)	失活速度常数 ($\times 10^3 \text{ s}^{-1}$)		
	k_{+E}	k_{-E}	k_{ES}
0			
0.2	10.7	4.27	0.81
0.5	15.2	1.88	5.38
0.8	20.6	0.64	7.53
1.0	25.8	0.38	9.50
1.5	*	*	*
4.0	*	*	*

k_{+E} 和 k_{ES} 分别为游离酶和底物结合酶的失活速度常数,

k_{-E} 为变性酶的复活速度常数

* 反应速度太快, 无法用常规方法测得

另外, 不可逆抑制动力学在酶的脲、去垢剂以及热等条件下的变性失活研究也得到了成功的应用。

酶活性不可逆改变动力学不仅在适用于研究酶的变性过程, 而且也会适用于酶的折叠过程的研究。随着研究的不断深入, 它的应用必将越来越广泛。

参 考 文 献

- 1 Shaw E. *The Enzymes* (Ed. Boyer P D), 3rd. ed. Vol.1, New York: Academic press, 1970, 91 ~ 146
- 2 Wold F. *Methods Enzymol*, 1977, 46, 3 ~ 14
- 3 Singer S J. *Adv Protein Chem*, 1967, 22, 1 ~ 54
- 4 Baker B R. *Design of Active Site Directed Irreversible Enzyme Inhibitors*. New York: Wiley, 1967
- 5 Rando R R. *Theory and Practice in Affinity Techniques* (Eds. Sundaram P V. et al.), London: Academic press, 1978, 135 ~ 150
- 6 Walsh C T. *Trends Biochem Sci*, 1983, 8, 254 ~ 257
- 7 邹承鲁. *生物化学与生物物理学报*, 1965, 5, 398 ~ 408
- 8 邹承鲁. *生物化学与生物物理学报*, 1965, 5, 409 ~ 417
- 9 Wang Z X, Tsou C L. *J Theor Biol*, 1987, 127, 253 ~ 270
- 10 Wang Z X, Wu H B, Wang X C, Zhou H M, Tsou C L. *Biochem J*, 1992, 281, 285 ~ 290
- 11 Wang Z X, Wang H R, Zhou H M. *Biochemistry*, 1995, 34, 6863 ~ 6868
- 12 周海梦, 王希成. *生物化学杂志*, 1991, 7(6), 702 ~ 706
- 13 Wang X C, Zhou H M, Wang Z X, and Tsou C L. *Biochem. Biophys. Acta*, 1990, 1039, 313 ~ 317
- 14 许根俊, 邹承鲁. *生物化学与生物物理学报*, 1963, 3, 163 ~ 168
- 15 颜思旭, 蔡红玉. *酶催化动力学原理与方法*. 厦门大学出版社, 1987, 151
- 16 Litte J E and Caldwell M L A J. *Biol. Chem.*, 1942, 142, 585 ~ 595
- 17 Wang H R, Bai J H, Zheng S Y, Wang Z X, Zhou H M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, 221, 174 ~ 180
- 18 Dixon M and Webb E C. *Enzymes*, 3rd. ed., 1979, 376 ~ 379
- 19 Cornish-Bowden A. *Fundermentals of Enzyme Kinetics*, Butterworths, London, 1979, 94 ~ 96
- 20 Lundblad Roger L and Noyes Claudia M. *Chemical Reagents for Protein Modification*, 1984, Vol.1, 2 ~ 5
- 21 孙之荣, 赵康源, 王志新, 周海梦, 邹承鲁. *中国科学*, 1992, 22(6), 602 ~ 610
- 22 Frost A A, Pearson R G. *Kinetics and Mechanisms*, 2nd ed., New York: John Wiley & Sons, 1961, p. 186
- 23 Laidier K J, Bunting P S. *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, 2nd ed., Oxford: Clarendon Press, 1973, 175 ~ 180
- 24 Wang H R, Zhang T, Zhou H M. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1248, 97 ~ 106
- 25 Wang H R, Wang X C, Zhang T, Zhou H M. *Science in China (Series B)*, 1995, 38(3): 328 ~ 335
- 26 He B, Zhang Y, Zhang T, Wang H R, Zhou H M. *J Protein Chem*, 1995, 14(5): 349 ~ 357
- 27 He B, Yan M, Zhang T, Zhou H M. *Chinese Science Bulletin*, 1994, 39(13): 1122 ~ 1127

13 氧自由基与酶

自由基(free radical)作为一类化学实体在 20 世纪初就被人们所认识。生物体中自由基的存在 50 年代才得到确认,随着现代生物技术的发展,许多生命现象的自由基机制逐步被揭示,一个具有生命力和广阔前景的新兴学科——自由基生物学——正在形成。方允中教授是我国自由基生物学的开拓者,从 1986 年至今,我国自由基生物学的研究进入了蓬勃发展的新时期,在此期间频频举办 SOD、脂质过氧化、天然抗氧化剂及自由基与疾病等专题学术研讨会,创办了不定期刊物《Advances in Free Radical Biology and Medicine》,出版了一批学术专著和教材,涌现出一批专门从事自由基生物学理论和应用研究的科学家。

自由基是游离存在的、带有不成对电子的分子、原子或离子,其化学性质很活泼。在生物体内它们虽然不断产生,但也在不断地被清除。在生理条件下,处于平衡状态的自由基浓度是极低的。它们不仅不会损伤机体,而且还可显示出独特的生理功能。在病理情况下,自由基的产生和清除失去平衡,多余的自由基就会损伤机体,在自由基的产生和清除机理中某些酶起到关键作用。本章重点介绍生物体内自由基的产生和清除,与自由基密切相关的抗氧化酶。

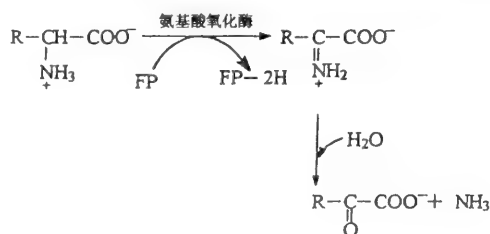
13.1 氧自由基在生物体内的作用

13.1.1 自由基的生物学意义

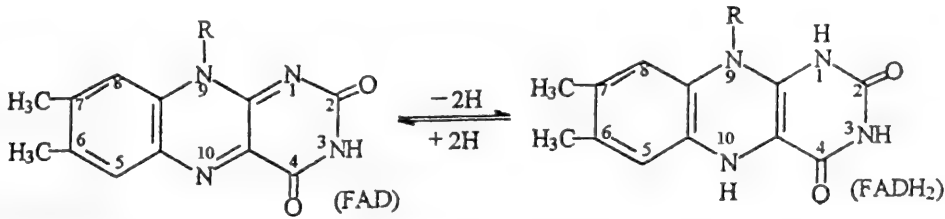
在正常的生命过程中自由基为维持生命所必需,但自由基也是生物大分子、细胞和生物组织的危险杀手。在正常的生理情况下,体内自由基不断产生,但也不断地被清除,使之维持在一个正常的生理水平上,过多或过少都会给机体造成损伤,在某些病理情况下,自由基产生和清除功能失去了平衡,不论其原因是自由基产生过量,还是不足,或者是机体清除自由基的能力减弱,都会导致疾病的发生或衰老。一般来说,自由基具有很高的反应活性,可造成对机体的损伤,但在正常的生理状态下,自由基的浓度很低,不仅不会损伤机体,而且还可显示出独特的生理作用。体内某些重要物质,例如前列腺素的合成就是通过自由基反应实现的。另一方面,人体还可利用自由基的杀伤作用清除异物,例如吞噬细胞的杀菌过程就涉及到自由基对微生物的杀伤作用。

13.1.2 生命过程中某些重要的自由基反应

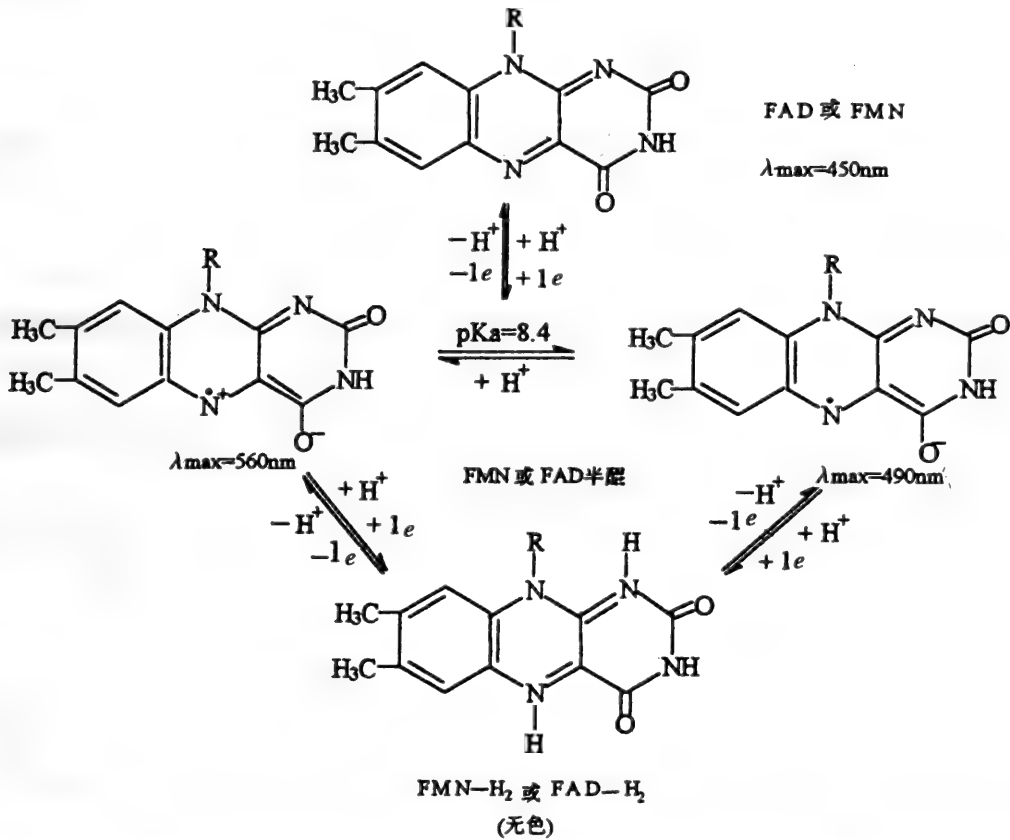
不少酶反应都有自由基参与,例如,氨基酸的氧化脱氨作用



黄素蛋白接受由氨基酸脱出的氢变为还原型黄素蛋白 FP-2H



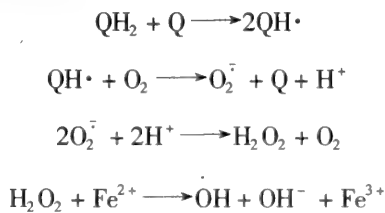
式中 R 代表黄素辅基的其余部分。实验证明上述两种氧化过程是分两步完成的,例如, FAD-2H (还原型黄素腺嘌呤二核苷酸)氧化为 FAD(黄素腺嘌呤二核苷酸)的过程产生了半醌类型的自由基。



辅酶 NAD⁺ (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)和 NADP⁺ (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)传递氢的作用亦被证明为自由基历程。

在某些药理过程中亦与自由基有密切关系。一些抗衰老,抗肿瘤以及抗脂质过氧化的药物,例如以后将要详细讨论的维生素 C 和维生素 E 以及许多中药的有效成分都是自由基清除剂。

对于涉及自由基的病理过程,虽然其反应机制大多尚不十分清楚,但确实证明有自由基参与。例如在对兔心肌缺血再灌注的研究中,根据实验,有人提出所产生的氧自由基是来自心肌线粒体或微粒体呼吸链上泛醌(Q)的氧化还原反应



13.2 生物体内自由基的产生和清除

除了物理或化学因素可使生物体产生外源性自由基外,生物体内自由基尚可从非酶反应和酶反应中产生。在某些氧化还原反应中产生的中间物自由基如 FMN 或 FAD 半醌自由基,其寿命极为短暂,而且对机体无明显毒性。内源性自由基一般指氧自由基及其活性衍生物。

在生理情况下这些自由基不断在产生,但也不断被清除,因而显不出自由基对机体的损伤。由于某些生理作用或生化反应中需要 O_2^- 、 $\cdot OH$ 等参与,机体还要通过自由基的产生与清除来维持有利无害的、生理性低水平的、稳定平衡的自由基浓度。必须指出的是,在某些病理情况下,自由基的产生与清除失去了平衡。不论其原因是自由基的产生增加,还是机体清除自由基的能力减弱,或者兼而有之,其后果是造成了对机体的损害。

13.2.1 生物体内自由基的产生

生物体内产生的自由基主要是 O_2^- (或 HO_2^-) 与 $\cdot OH$ 及其活性衍生物如 H_2O_2 、 1O_2 、 $RO\cdot$ 、 RO_2 及 $ROOH$ 。

13.2.1.1 O_2^- 的产生

A 非酶反应

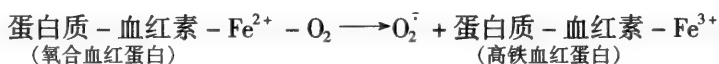
在需氧的生物体内到处存在着 O_2 。如果在 O_2 参与的非酶反应中 O_2 能从还原剂接受一个电子,就可以转变为 O_2^- 。这类的非酶反应在生物体内是存在的,现简述如下:

(1) 在 O_2 的存在下,有些生物分子氧化时可产生 O_2^- 。这些生物分子包括甘油醛、还原型核黄素、FMN 与 FAD、肾上腺素、四氢喋呤和半胱氨酸、GSH 等巯基化合物。

(2) 在人体内,铁与蛋白质结合成血红蛋白、肌红蛋白、铁蛋白等化合物。非蛋白质结合的铁是极少的,如在脑脊髓液中仅含有 $2.2 \pm 1.3 \mu\text{mol/L}$ 。在离体实验中已证明 Fe^{2+} 可逐渐被空气中 O_2 氧化为 Fe^{3+} ,同时 O_2 转变为 O_2^- 。

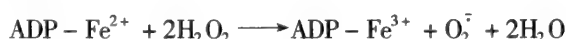


(3) 在非酶反应中以氧合血红蛋白转变为高铁血红蛋白时产生的 O_2^- 最值得重视。因为每日人体中红细胞的氧合血红蛋白约有 3% 转变为高铁血红蛋白,表明循此途径可有相当量的 O_2^- 产生。

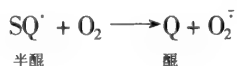


在铜离子与 NO_2^- 的存在下,上述反应可加速。居住在 NO_3^- 污染的水源地区的人,尤其是婴儿饮了 NO_3^- 污染的水时,肠中细菌可将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,从而促使高铁血红蛋白与 O_2^- 的产生。

(4) 在生物体内经常产生 H_2O_2 。如果 H_2O_2 不及时被清除,则有可能与过渡金属离子或其复合物如 $ADP-Fe^{2+}$ 反应,产生 O_2^- 。



(5) 在氧化还原反应中醌类化合物产生的半醌自由基可与 O_2 反应产生 O_2^- 。



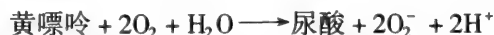
B 酶反应

需要氧维持生命的生物包括细菌等微生物以及人,其体内一定会有氧代谢。在氧的代谢反应

中常有酶促氧化与还原。这表明有些酶促反应中可能有 O_2^- 的产生。

a 黄嘌呤或次黄嘌呤氧化为尿酸

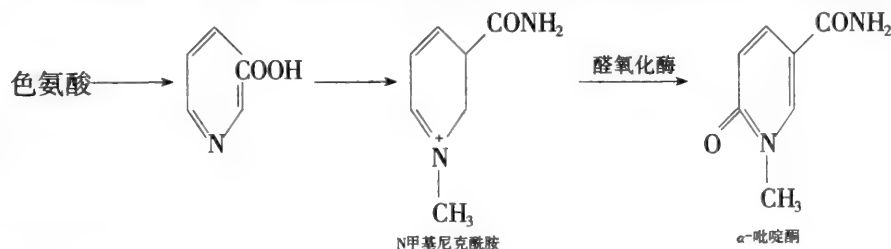
在黄嘌呤氧化酶的催化下,黄嘌呤(或次黄嘌呤)可通过将单电子或双电子给予 O_2 的方式氧化为尿酸。



b 醛氧化酶

醛氧化酶也具有 2 个 FAD、2 个 Mo 及 8 个 Fe。它还含有 1 个或 2 个分子的辅酶。

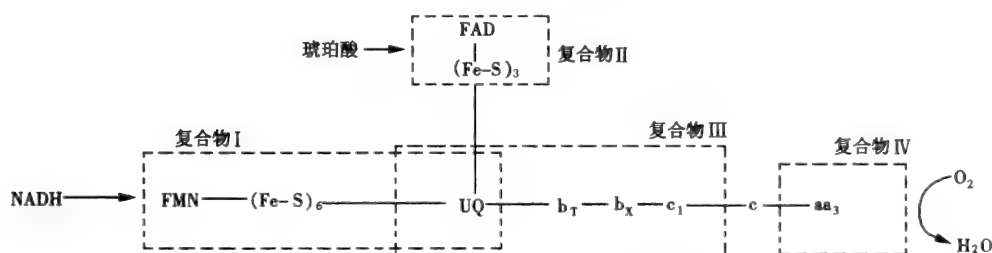
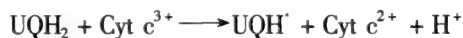
它的系统名称为醛-氧-氧化还原酶,其底物为醛与氧。该酶可催化醛与氧反应生成酸和 O_2^- 。它对底物的专一性较黄嘌呤氧化酶更差,它尚可催化 N-甲基烟酰胺转变为 2-吡啶酮。



c 线粒体呼吸链有关的某些酶

线粒体呼吸链为 NADH、黄素蛋白、铁硫蛋白、泛醌与细胞色素类组成的一系列氧化还原系统。

辅酶 Q(泛醌 UQH_2)可转变为泛半醌(UQH^+),如氧化型细胞色素 c($Cyt\ c^{3+}$)可使 UQH_2 氧化成 UQH^+ 自由基。它可自氧化为 UQ_2 同时产生 O_2^- 。



虽然复合物 I、II、III 都涉及泛醌,可能产生 O_2^- ,但其效能并不一致。一般认为,复合物 I 与复合物 III 都含有 UQ,是产生 O_2^- 的主要部位,而将电子传递至 UQ 的复合物 II 却是次要的。

必须指出的是, O_2^- 的产率快慢决定于线粒体代谢的状态。在生理条件下,生物体内 96% ~ 99% 的 O_2 可通过细胞色素氧化酶的催化而还原为水,仅 1% ~ 4% 的 O_2 产生 O_2^- 与 H_2O_2 。由于 O_2^- 与 H_2O_2 可分别被 SOD 及过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶清除,因此不会积累到足以损伤机体的浓度。但是在线粒体结构与功能受到影响时, O_2^- 与 H_2O_2 的生成可能增多,如果增加到超过生物体内的防御能力,就会发生活性氧对机体的损伤。

d 微粒体电子传递系统有关的某些酶

微粒体不是细胞内存在的实体组织名称,而是用差速离心分离细胞器所得到的核蛋白体与内质网膜。前者为蛋白质生物合成的场所。后者的功能虽随细胞不同而异,但都存在电子传递系统,其中某些酶反应产生 O_2^- 。

脂肪酸、甾体、药物及许多异生素(xenobiotics)的氧化转变反应中需要微粒体电子传递系统。后者包括了三种黄素蛋白(fp_1 、 fp_2 及 fp_3)和其他黄素蛋白以及两种血红素蛋白(细胞色素 b_5 与细胞色素 P450)。

1) 黄素蛋白(fp_1)。具有 NADPH-细胞色素 P450 还原酶的功能,含有 FMN 与 FAD 两种辅基。在氧化还原过程中产生的自由基型黄素蛋白可在特殊情况下与 O_2 反应生成 $O_2^{\cdot-}$, $HO_2^{\cdot-}$ 或其衍生物如 1O_2 可能参与脂类过氧化,或在血红素加氧酶作用下使血红素氧化裂解为胆色素。

2) 黄素蛋白(fp_2)。又名 NADH-细胞色素 b_5 还原酶。它可将电子从 NADH 传递到细胞色素 b_5 。

3) 黄素蛋白(fp_3)。即所谓的混合功能胺氧化酶,其功能是参与许多二级及三级胺的氧化转变。

4) 其他黄素蛋白。在肝微粒体中除含有 fp_1 , fp_2 与 fp_3 三种黄素蛋白外,还含有其他的黄素蛋白,如 DT 黄递酶、葡糖酸丙酮氧化酶。

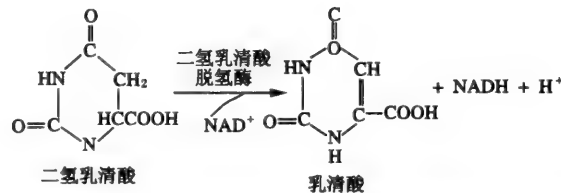
5) 细胞色素 b_5 。为 fp_1 与 fp_2 两种黄素蛋白之间的电子传递蛋白。它具有脱饱和酶的作用,如可使硬脂酰-CoA 转变为油酰-CoA。它在微粒体电子传递系统中的主要作用可能是作为氧化型细胞色素 P450 的电子供体。

6) 细胞色素 P450。它在许多有机化合物的氧化转变中起到氧活化与底物相互作用的关键酶。其辅基为 Fe^{3+} -血红素。

e 其他酶体系

产生 $O_2^{\cdot-}$ 的酶反应尚有多种酶。二氢乳清酸脱氢酶、NADPH 氧化酶、铁氧还蛋白-NADPH 还原酶、红氧还蛋白-NADPH 还原酶、非特异性过氧化物酶、硝基丙烷双氧酶、吲哚胺双氧酶、色氨酸双氧酶、半乳糖氧化酶等。

1) 二氢乳清酸脱氢酶



在二氢乳清酸脱氢酶作用下,二氢乳清酸可转变为乳清酸。由于该系统含有泛醌,可在催化反应中转变为泛半醌,泛半醌与 O_2 反应可产生氧化型泛醌及 $O_2^{\cdot-}$ 。

2) NADPH 氧化酶或 NADH 氧化酶

该酶存在于嗜中性粒细胞及巨噬细胞的浆膜内。在 NADPH 氧化酶或 NADH 氧化酶作用下,可产生 $O_2^{\cdot-}$,同时 NADPH 或 NADH 可氧化为 $NADP^+$ 或 NAD^+ 。

3) 铁氧还蛋白-NADPH 还原酶

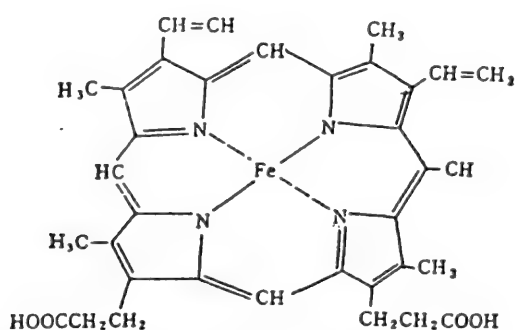
该酶的底物为铁氧还蛋白及 NADPH。在 O_2 的存在下其他催化产物除 $O_2^{\cdot-}$ 外,尚有 $NADP^+$ 及还原型铁氧还蛋白。

4) 红氧还蛋白-NADPH 还原酶

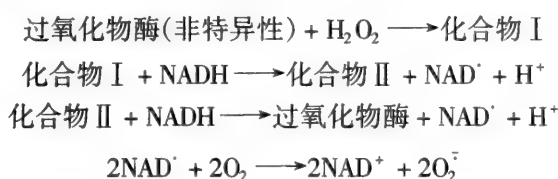
红氧还蛋白-NADPH 还原酶的催化作用虽与铁氧还蛋白-NADPH 还原酶类似,但底物之一红氧还蛋白与后者不同。在催化反应中都产生 $O_2^{\cdot-}$ 。

5) 过氧化物酶

在植物与细菌中含有非特异性过氧化物酶。该酶的辅基为 Fe^{2+} -原卟啉 IX,其分子结构式如下:



在 H_2O_2 存在下,它可作用于愈创木脂醇、联苯胺与邻联二茴香胺以及其他底物。设底物为 SH_2 ,则其反应式可表示如下:



NAD^+ 是一种自由基。它与 O_2 反应可产生 O_2^- 。其反应速度是很高的, k_2 为 $1.9 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

6) 硝基丙烷双氧酶

该酶可催化 2-硝基丙烷氧化为丙酮,同时产生 O_2^- 。SOD 可抑制其氧化反应。

7) 色氨酸双氧酶

该酶可作用色氨酸,但不能作用其他底物。在催化过程中既产生了 O_2^- ,又利用了 O_2 ,其产物为 N-甲酰-犬尿氨酸。

8) 半乳糖氧化酶

该酶可催化半乳糖氧化。其底物分子中 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 转变为产物分子中 $-\text{CHO}$ 。在催化反应中产生 O_2^- ,而且 O_2^- 也参与其催化作用。

13.2.1.2 $\cdot\text{OH}$ 的产生

$\cdot\text{OH}$ 的化学性质非常活泼,寿命极短,产生部位常为其起作用的部位。如果在生物体内重要生物分子如核酸不处在 $\cdot\text{OH}$ 产生部位,则不会受到损伤。虽然至今难于用现有的技术直接检查出生物体内的 $\cdot\text{OH}$,但是已有很多事实间接证明生物体内确有 $\cdot\text{OH}$ 产生。

A 通过 Fenton 型 Haber-Weiss 反应产生 $\cdot\text{OH}$

已有不少实验证据指出,生物体内 $\cdot\text{OH}$ 的产生也可能通过类似反应,其理由是该反应中 Fe^{3+} 、 O_2^- 与 H_2O_2 都在生物体内存在或经常产生,即使没有 Fe^{3+} 与 O_2^- ,只要有 Cu^+ 代替 Fe^{3+} 与 O_2^- 反应中产生的 Fe^{2+} ,也可与 H_2O_2 反应产生 $\cdot\text{OH}$,甚至某些还原剂如抗坏血酸也可起到类似作用。但是必须指出的是,如果体内清除 O_2^- 与 H_2O_2 能力较强,通过 Fenton 型 Haber-Weiss 反应产生 $\cdot\text{OH}$ 的可能性是很小的。

B 某些药物在体内代谢中可能产生 $\cdot\text{OH}$

1) 羟化的化学药物,如 6-羟基多巴胺、6-氨基多巴胺,6,7-二羟基色胺,5-羟基巴比妥酸、四氧嘧啶进入生物体内,可产生 $\cdot\text{OH}$ 。其证据是:(1) 与甲硫基丙醛反应可产生 C_2H_4 ;(2) 被 $\cdot\text{OH}$ 清除剂抑制。

2) 带有醌型的抗肿瘤药物,如博莱霉素、丝裂霉素 B、C 与链黑霉素进入生物体内,可产生 $\cdot\text{OH}$ 。其证据是它们都可与 $\cdot\text{OH}$ 捕获剂 DMPO 或 PBN(phenyl butyl nitron)结合。

C 某些酶或其复合体系可产生 $\cdot\text{OH}$

1) 黄嘌呤氧化酶。已知黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤氧化反应中产生 O_2^- 与 H_2O_2 , 则在生物体内铁离子存在条件下可进一步转变为 $\cdot\text{OH}$, 其证据是: (1) 与甲硫基丙醛反应产生 C_2H_4 ; (2) 可被 SOD 与过氧化氢酶抑制; (3) 可被 $\cdot\text{OH}$ 清除剂清除; (4) 加入 H_2O_2 , 可因 $\cdot\text{OH}$ 产量增多使 $\cdot\text{OH}$ 的反应加强。

2) 前列腺素合成酶。该酶的催化反应中产生的 $\cdot\text{OH}$ 可使酶发生自身失活, 但加入甲硫基丙醛不仅可除去 $\cdot\text{OH}$, 使酶自身失活受到抑制, 而且通过甲硫基丙醛与 $\cdot\text{OH}$ 反应产生的 C_2H_4 , 可间接证明酶促反应中确有 $\cdot\text{OH}$ 产生。

3) 鸟嘌呤环化酶。在酶促过程中所需要的 $\cdot\text{OH}$ 可在反应中产生, 其主要证据是其反应可被 $\cdot\text{OH}$ 清除剂抑制。

4) 微粒体乙醇氧化体系。在肝微粒体中存在醇脱氢酶, 它可使乙醇氧化为乙醛, 同时产生 H_2O_2 。后者通过 Fenton 反应可产生 $\cdot\text{OH}$, 其证据是: (1) 用脱铁敏 (desferrioxamine) 使 Fe 不能参与 $\cdot\text{OH}$ 产生的反应, 则反应受到抑制; (2) 加入 $\cdot\text{OH}$ 清除剂可使反应受到抑制; (3) 由于叠氮化物可抑制过氧化氢酶, 加入叠氮化物可使 H_2O_2 与 Fe^{2+} 之间反应更加强。

5) 微粒体电子传递体系。该体系可能产生 O_2^- , 并可间接产生 $\cdot\text{OH}$ 。后者的证据为: (1) 与甲硫基丙醛反应产生 C_2H_4 ; (2) 与 DMSO 反应产生 CH_4 ; (3) 可被 $\cdot\text{OH}$ 清除剂抑制。

D 某些生理或病理生理作用中产生 $\cdot\text{OH}$

1) 嗜中性白细胞及巨噬细胞吞噬细胞时可产生 $\cdot\text{OH}$ 。其证据是, 加入甲硫基丙醛可产生 C_2H_4 。

2) 发炎。在发炎过程中有 $\cdot\text{OH}$ 产生, 其证据是: ①可被 $\cdot\text{OH}$ 清除剂抑制; ②可被过氧化氢酶与 SOD 抑制; ③加入 H_2O_2 可增强发炎作用。这些证据表明 $\cdot\text{OH}$ 的产生可能通过 Fenton 型的 Haber-Weiss 反应。

3) O_3 中毒。从肺部吸入 O_3 后, O_3 可以诱发产生 $\cdot\text{OH}$ 。

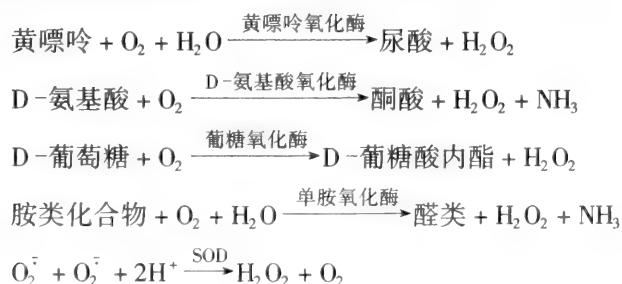
4) 电离辐射。X 射线或 γ 射线照射生物体可产生 $\cdot\text{OH}$ 。

5) 其他物理或化学因素对生物体的作用。由于自由基相互作用, 其他物理因素如光通过光敏剂的作用产生的 O_2^- 或 $^1\text{O}_2$ 就有可能产生 $\cdot\text{OH}$ 。有些化学因素如毒物进入生物体后也可能直接或间接产生 $\cdot\text{OH}$ 。

13.2.1.3 H_2O_2 的产生

O_2 获得两个电子就可成为 O_2^{2-} , 在 H^+ 存在的条件下可转变为 H_2O_2 , 但事实上 O_2 难于同时接受一对电子。虽然通过 O_2^- 或 HO_2^- 的自动歧化反应可产生 H_2O_2 , 但是在 pH 值为 7.4 的生理条件下, 主要还是 O_2^- 。 O_2^- 的歧化反应速度是较低的, 因此在生物体内, 通过非酶反应产生 H_2O_2 的可能性是很小的。在生物体内 H_2O_2 的产生是通过酶促反应。

在生物体内产生 H_2O_2 的酶促反应是比较多的, 如黄嘌呤氧化尿酸, D-氨基酸氧化为酮酸, D-葡萄糖氧化为 D-葡萄糖酸内酯, 胺类化合物氧化为醛类以及 O_2^- 的歧化反应。

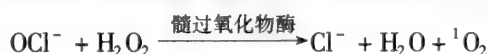


在这些酶促反应中,除了 SOD 催化 O_2^- 歧化为 H_2O_2 外,其他酶均直接使 O_2 转变为 H_2O_2 。线粒体与内质网产生的 O_2^- 是 H_2O_2 产生的主要来源。其 H_2O_2 产量约占氧耗量的 1.7%^[30]。

13.2.1.4 1O_2 的产生

虽然有些学者认为 O_2^- 的自动歧化反应中产生 1O_2 ,但证据是不足的。Fenton 反应中产生 1O_2 虽有一些间接证据,然而至今尚无确论。在生物体内 1O_2 产生的来源如下。

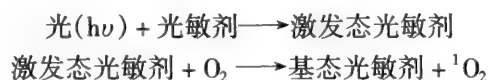
(1) 嗜中性白细胞与巨噬细胞吞噬细菌时髓过氧化物酶的催化反应



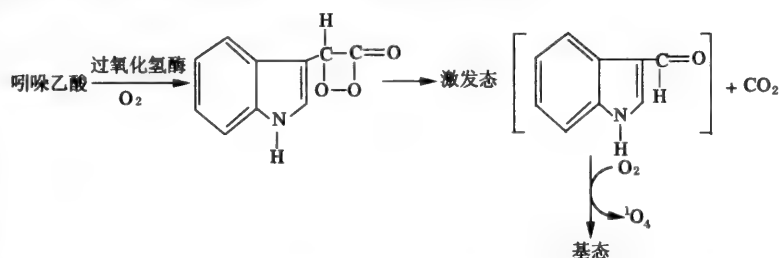
(2) 脂类过氧化过程中 RO_2^- 与 RO_2^- 的相互作用



(3) 光敏反应。例如眼角膜中柱细胞含有的视黄醛就是一种光敏剂,在光敏反应中可产生 1O_2 。



(4) 某些植物和细菌中过氧化物酶的催化反应,例如



13.2.1.5 脂类过氧化物的产生

$RO\cdot$, RO_2^- 与 $ROOH$ 为脂类过氧化产物,但在正常生理情况下,脂类过氧化产物的含量是极低的,即使有机会发生脂类过氧化,其产物也会被转变为无害物质。

在第三章活性氧中,我们已经简述了脂类过氧化物的产生,但均指离体实验中产生的条件。在生物体内就不一定相同,例如在生物体内, O_2^- 是可以产生的,但 O_2^- 本身并不能使脂类过氧化,只有其质子化产物 HO_2^- 具有引发脂类过氧化的作用。 O_2^- 与 H_2O_2 反应所产生的 $\cdot OH$ 可引发脂类过氧化,但体内 SOD 与过氧化氢酶或谷胱甘肽过氧化物酶可分别清除 O_2^- 与 H_2O_2 。 1O_2 虽可在脂类过氧化过程中 RO_2^- 与 RO_2^- 反应时产生,也能引发脂类过氧化,但首要前提是要有其他活性物质如 $\cdot OH$ 作为最初引发物。脂类过氧化为链式反应,但可在谷胱甘肽过氧化物酶与谷胱甘肽转硫酶作用下阻断。抗氧化剂如维生素 E 与 SH 化合物也可阻止脂类过氧化。

在病理情况下,外源性物质如 O_3 、药物与毒物都可间接引发脂类过氧化,内源性物质如活性氧产生增多与体内清除活性氧或抗脂类过氧化的能力下降,则可使脂类过氧化发生或加强。

13.2.2 自由基的清除

活性氧既包括 O_2^- , $\cdot OH$, $RO\cdot$, RO_2^- 等自由基,又直接或间接地关系到生物体内其他自由基的产生,因此清除活性氧的能力实际上反映生物体内清除自由基的效能。前者常指有关酶的活力与抗氧化剂的作用。

13.2.2.1 酶对自由基的清除

A SOD

O_2^- 还原为水的过程中第一个中间物就是 $O_2^{\cdot-}$ 。如果 $O_2^{\cdot-}$ 及时得到清除,则产生 $\cdot OH$ 的可能性就极小。清除 $O_2^{\cdot-}$ 的 SOD 是很重要的,但在组织细胞内 SOD 的含量是不同的,例如在细胞外液中 SOD 含量低于胞浆与线粒体。SOD 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力与其含量多寡有关。生物体合成 SOD 常受 $O_2^{\cdot-}$ 浓度的影响,例如经常处在 O_2 分压较高的环境中生物体内 $O_2^{\cdot-}$ 浓度高于正常水平,在 $O_2^{\cdot-}$ 的诱导下, SOD 的生物合成能力增高。必须指出的是, SOD 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力总是有限度的,如果 $O_2^{\cdot-}$ 的产生超过 SOD 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力,就会发生 $O_2^{\cdot-}$ 对机体的危害。

B 过氧化氢酶

过氧化氢酶可清除 H_2O_2 ,但在细胞内主要存在于过氧化体。在后者中,酶反应产生的 H_2O_2 可被过氧化氢酶清除,其他细胞器如线粒体产生的 H_2O_2 可透过细胞器膜,进入胞浆。其中尚未得到清除的可进入过氧化体,最近被过氧化氢酶清除。

C 谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽转硫酶与其他有关的酶如葡糖-6-磷酸脱氢酶

在线粒体及胞浆中所产生的 H_2O_2 常靠谷胱甘肽过氧化物酶清除。脂类氢过氧化物可被谷胱甘肽过氧化物酶或谷胱甘肽转硫酶清除。在这两种酶作用中所产生的 GSSG 在谷胱甘肽还原酶作用下又可还原为 GSH,继续参加清除活性氧的反应。同时由 NADPH 氧化的 $NADP^+$ 需要葡糖-6-磷酸脱氢酶的催化作用才能再还原为 NADPH,以维持体内清除活性氧的能力。

13.2.2.2 抗氧化剂

A 维生素 E

维生素 E 可以猝灭 1O_2 ,又可与 1O_2 起反应,故它是 1O_2 的有效清除剂。依靠维生素 E 的这一作用,生物膜可免受 1O_2 的损害。它还可与 $O_2^{\cdot-}$ 反应,但反应是缓慢的。在脂类氧化的过程中起到连锁反应关键作用的 RO_2^{\cdot} 遇到维生素 E 时,可转变为化学性质较不活泼的 $ROOH$,同时维生素 E 转变为维生素 E 自由基,再变成 α -妊娠醌及其他产物。这样一来,脂类氧化的链式反应可以中断,从而起到终止脂类氧化的作用。在抗坏血酸作用下,维生素 E 自由基可转变为维生素 E。此反应似乎发生于膜的表面,因为水溶性维生素 C 不能进入膜的疏水层。

B 谷胱甘肽

在生物体内含有的 SH 化合物有蛋白质与非蛋白质。在含有 SH 基的非蛋白质中以谷胱甘肽的含量为最高(表 13-1)。因此在防护自由基损伤作用方面比其他 SH 基化合物显得特别重要。

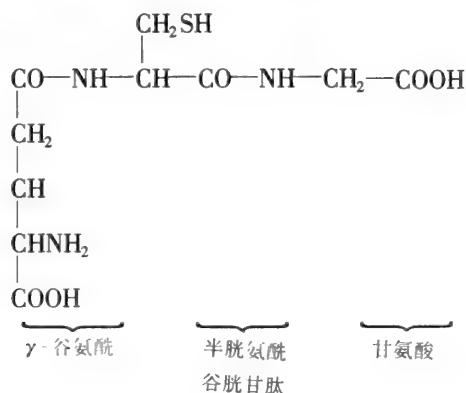


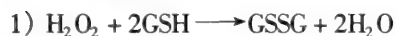
表 13-1 哺乳类组织中某些 SH 基化合物的含量

SH 基化合物	含 量 (10^{-9} mol/g 组织)		
	- SH	- S - S -	总 量
半胱氨酸	30—100	3—20	30—120
硫辛酸	-	-	5—25
巯基氨基酸三甲内盐	40—400	-	40—400
辅酶 A	0—250	0—90	100—500
谷胱甘肽	500—10 000	25—500	500—10 000

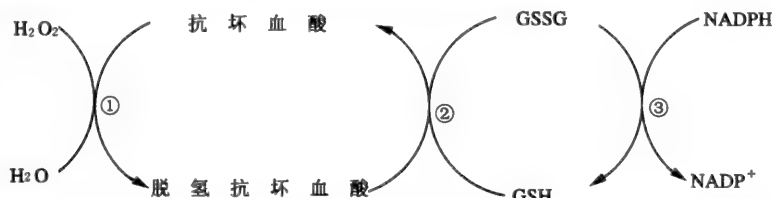
谷胱甘肽的生物学作用重要性还表现在很多方面,如它为某些酶如乙二醛酶、顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸异构酶,前列腺素内过氧化物酶的辅助因子;参与甲状腺素的生物合成、胰岛素的降解以及某些药物或毒物的代谢。

现着重介绍它防护自由基或活性氧损伤机体的作用。

(1) 清除 H_2O_2



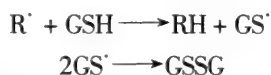
2) 参加叶绿体中抗坏血酸、谷胱甘肽循环以清除 H_2O_2 。



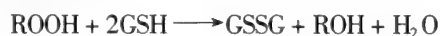
其中①抗坏血酸过氧化物酶,②脱氢抗坏血酸还原酶,③谷胱甘肽还原酶。

(2) 修复损伤

例如使有机自由基恢复为原有机化合物

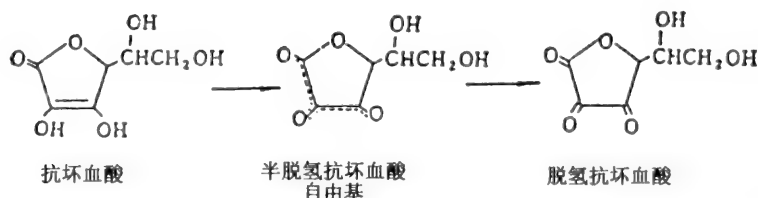


(3) 防护脂类过氧化物造成的损伤



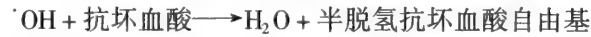
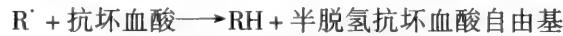
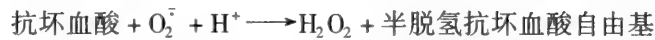
谷胱甘肽还原酶

C 抗坏血酸



抗坏血酸是电子供体,为还原剂,当它供给一个电子时就成为半脱氢抗坏血酸自由基,如再供给一个电子,则成为脱氢抗坏血酸。

由于抗坏血酸有这种特性,在低浓度抗坏血酸中它可使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , Fe^{3+} 与 H_2O_2 反应生成 $\cdot OH$,显示有害作用,但在生物体内抗坏血酸浓度比较高,它可作为自由基清除剂,如:

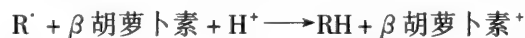
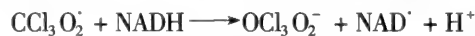
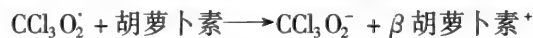


D 尿酸

Ames 报道,在人的血浆中含有 0.12 ~ 0.45mmol/L 的尿酸。它是单线态氧和 $\cdot\text{OH}$ 的有力清除剂。有些学者还指出,尿酸可抑制脂类过氧化,而在细胞外液中 SOD 与过氧化氢酶都很低。Ames 认为,尿酸可能和抗坏血酸一样起到抗氧化剂作用。在人血中尚存在 4.5mmol/L 葡萄糖。后者也可清除 $\cdot\text{OH}$ 。 $\cdot\text{OH}$ 与尿酸反应产生的自由基可迅速与 O_2 反应生成有机 O_2^- ,有机 O_2^- 虽为自由基也可损伤某些酶,但其反应性较 $\cdot\text{OH}$ 差得很多。

E β 胡萝卜素与 NADH

β 胡萝卜素与 NADH 可以使 CCl_3O_2^- 自由基转变为 CCl_3O_2^- ,从而使 CCl_3O_2^- 化学活性丧失。在反应中所产生的 β 胡萝卜素 $^+$ 与 NAD^\cdot 等自由基的化学活性低,对其他生物分子影响甚小。 β 胡萝卜素与 NADH 尚可使 R^\cdot 转变为 RH ,从而起到减轻有机自由基的损伤作用。



F 血浆铜蓝蛋白

在正常成人血浆中血浆铜蓝蛋白含量为 300mg/100ml,这是一种 α 糖蛋白。最初以为它的功能是转运 Cu,但后来发现它可催化 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,而且对于许多芳香族胺类与酚类也有类似作用。有些学者指出,它可动员贮藏的胺类,以调节循环血液中生物活性胺如肾上腺素与羟吲哚。近来发现血浆铜蓝蛋白可能是一种抗氧化剂,如能抑制抗坏血酸或无机铁引起的脂类自氧化。它还能清除 O_2^- 。当患炎症性疾病如风湿性关节炎、感染或怀孕时,血浆铜蓝蛋白都会增高,甚至在任何损伤情况下也有同样情况。它可能是抗御活性氧的抗炎性内生蛋白质。

血浆铜蓝蛋白清除 O_2^- 的能力仅为 SOD 的 1/30 000,但由于血浆中该蛋白含量较高,实际上相当于 100mL 血浆中含 30 μg SOD,故清除 O_2^- 的作用不可忽视。

G 茶多酚

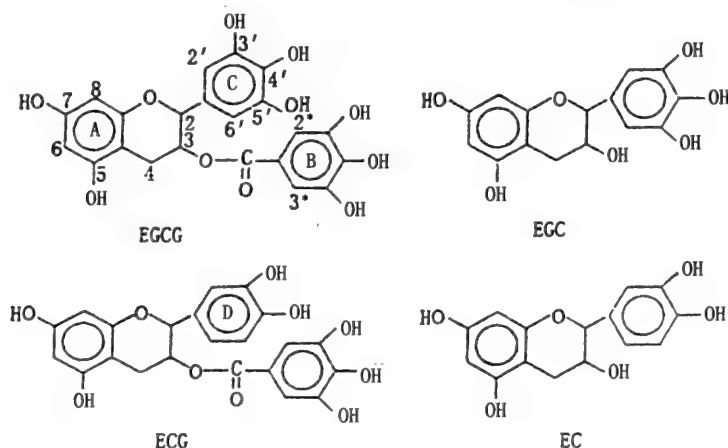


图 13-1 茶多酚的四个单体的结构式

茶叶在中国和世界已有几千年栽种和饮用历史。喝茶有助于健康已被广大人民所接受,喝茶可以预防一些疾病也被流行病学所证实。过去一般认为喝茶有助于健康是因为茶叶中含有维生素

和一些微量元素,但是这一看法并不全面。近来研究表明,茶叶中对身体健康最有益的物质是具有很强抗氧化能力的茶多酚。茶多酚占茶叶干重的 30% 左右。科学研究证明,茶多酚可以有效地清除氧自由基和脂类自由基,预防脂质过氧化。茶多酚是一种多酚类物质,它包含四种单体成分,其结构如图 13-1 所示。

由于这四种儿茶素的结构不同,它们对氧自由基的清除效率也不一样,表 13-2 给出了用化学发光法和 ESR 技术测量的结果。

表 13-2 茶多酚四种单体对超氧阴离子自由基的清除率(nmol/L)

茶多酚	EGCG	ECG	EC	EGC
清除率	316.3 ± 2.4	263.0 ± 6.0	231 ± 4.0	228.9 ± 4.1

由表中的数据可以看出具有较多酚羟基的儿茶素具有较强的抗氧化能力。这几种儿茶素对氧自由基的清除能力按以下关系递减:EGCG > ECG > EC > EGC。

H 银杏叶提取物(EGb)

银杏树(*Ginkgo biloba*)为银杏科银杏属植物,又名公孙树,为中国特有的古老植物,其叶作药用在我国已有 5 000 年的历史,“神农本草”就有记载,银杏具有治疗哮喘和气管炎的作用。自 20 世纪 60 年代以来国内外学者对银杏的化学成分、药理作用及其应用作了大量的研究工作。

银杏提取物(extract of *ginkgo biloba*)的种类很多,提取方法不同,其效果也不同。最早注册的银杏提取物是 1965 年德国的商品 Tebonin,后被法国研究发展注册为 Tanakan(1974 年),现定名为 EGb761,已在 30 多个国家得到应用。

EGb 有清除多种自由基的作用,是一种广谱的自由基清除剂,我们的实验表明它具有清除羟自由基、超氧阴离子自由基和一氧化氮,抑制脂质过氧化作用,其作用强度与自由的酚羟基数目有关,5OH(myricetin) > 4. H(querctetin) > 3OH(fisetin, kaempfeol, rutin),其结构中吡喃环上 C2-3 位间双键和 B 环两个邻位羟基基团是作用所必需的。

13.2.2.3 自由基修复机理

在正常生物体内,自由基的产生与清除可维持低水平的、有利无害的平衡,但很可能有少数自由基会损伤生物分子,使后者成为自由基。然而这些自由基又可在抗氧化剂作用下转变为原来的生物分子。这种现象称为自由基修复,通过酶反应的生物分子修复常称为生化修复。

A 防止自由基的产生

在生物体内存在的过氧化氢酶与谷胱甘肽过氧化物酶能催化 H_2O_2 分解。铁传递蛋白与铁蛋白能结合铁。这些作用可防止 O_2^- 与 H_2O_2 在铁离子作用下产生更有毒害的 $\cdot OH$ 。SOD 对 O_2^- 的清除也有助于防止 $\cdot OH$ 自由基的产生。

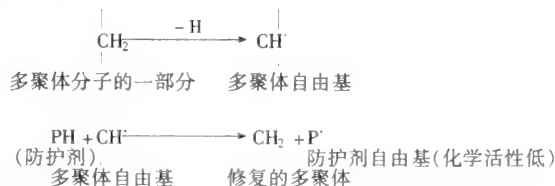
B 自由基的清除

生物体具有的清除自由基的能力,可使生物分子避免受到自由基的损伤。虽然防止自由基的产生或自由基的清除都不直接关系到自由基修复,但可减少生物分子受到更多自由基的损害,有助于自由基修复效能。

C 自由基的修复

Alexander 与 Charlesby 早就对多聚体的辐射防护提出了自由基修复的学术思想。他们认为巯基化合物抗辐射机理可能是自由基修复。其代表性反应如下所示:

a 生物分子自由基的生成



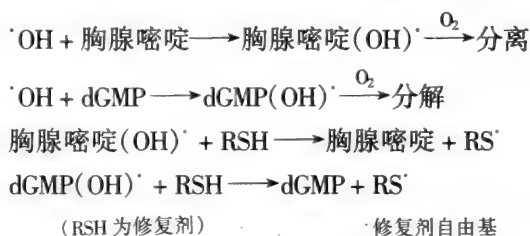
b 生物分子自由基的变化

必须指出的是,如果多聚体自由基不能及时得到 H 而恢复为多聚体,则在 O_2 存在下可转变为过氧自由基,然后发生分解。

他们认为巯基化合物($R'SH$)可能起到防护剂作用,如 $\begin{array}{c} | \\ CH^{\cdot} + R'SH \longrightarrow CH_2 + R'S^{\cdot} \\ | \end{array}$ 。其他学者相继指出,谷胱甘肽、抗坏血酸、维生素 E、 β 胡萝卜素与 NADH 可修复自由基引起的生物分子损伤。

重要生物分子如核酸与蛋白质可能受到辐射所致自由基的损害,但在防护剂作用下,可以得到恢复。

例如胸腺嘧啶与 dGMP 遇到 OH 都可转变为加成化合物。如不能及时修复,这些加成化合物将分解,从而使生物大分子受到不可逆的伤害;若有修复剂帮助,可以恢复成胸腺嘧啶与 dGMP。



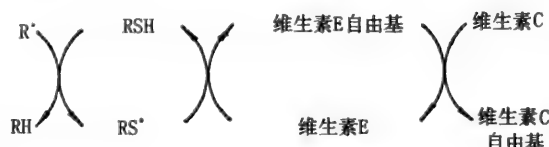
c 顺序自由基修复

要使生物分子自由基不断地得到修复,首要条件是修复剂自由基也要恢复为原来修复剂分子。顺序自由基修复可以起到这样的重要作用。

例如在电子传递反应中,谷胱甘肽可以不断地修复 R^{\cdot} 为 RH。



在维生素 E 与抗坏血酸的存在下,顺序自由基修复更可发挥作用。



13.3 生物体内一些重要的抗氧酶

为了防止活性氧对机体的危害,机体的首要防御手段是氧不能通过 4 次单电子还原反应,而是通过细胞色素,氧化酶的催化作用,使氧接受 4 个电子与 4 个离子直接还原为水。如果通过单电子反应产生 $O_2^{\cdot-}$ 与 H_2O_2 或进一步发生 LH 过氧化,机体可使用第二道防御手段,即 SOD 等抗氧酶来清除,下面简要介绍几种生物体内重要的抗氧酶。

13.3.1 超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1)是一种广泛存在于动物、植物和微生物中的金属酶。按照所属种类的不同,可分为 Fe-SOD, Mn-SOD 和 CuZn-SOD 三种。

SOD 最早是在 1938 年由 Mann 和 Keilin 从牛红细胞中分离提取的,原名血铜蛋白(Erythrocytein),1969 年 McCord 和 Fridovich 发现了其生物催化酶活性,并正式命名为超氧化物歧化酶。现在

已知此酶为 CuZn-SOD。随后又分别发现了 Mn-SOD 和 Fe-SOD。三类酶都能催化超氧阴离子(O_2^-) 发生歧化反应:



由于 SOD 是目前为止所发现的唯一的以自由基 O_2^- 为底物的酶,所以它在维持生物体内 O_2^- 产生与消除的动态平衡中起着极其重要的作用。

13.3.1.1 SOD 的种类、分布与分子进化

SOD 按其分子所含金属辅基不同可分为 CuZn-SOD, Mn-SOD 的 Fe-SOD 三种。但最近 Kim 等发现在链霉菌天蓝菌(*Streptomyces coelicolor* Muller)中还存在有两种新的 SOD; NiSOD 和 FeZnSOD。

SOD 是生物体防御氧毒性的关键性防线。人们最初认为 SOD 只存在于好氧生物和耐氧生物中,而专性厌氧生物中不存在。1973 年 Beel 发现在厌氧菌硫酸还原菌(*Sulfite-reducing bacteria*)中有 SOD 活力,以后 SOD 活力在多种专性厌氧菌中被发现,只是活力很低,不易检测。一般认为,专性厌氧菌中的 SOD 可以在细菌偶尔暴露于低浓度氧环境中时所抵抗氧毒性,比如专性厌氧菌从一个无氧环境到另一个低浓度氧环境的过程中,就需要这种保护。

厌氧细菌梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)、绿菌属(*Chloibium*)和脱硫弧菌属(*Desulfobivrio*)被认为是地球上原始的生物。它们只含有 Fe-SOD,而无 Mn-SOD,这表明 Fe-SOD 出现于生物进化的早期,而 Mn-SOD 是在此基础上进化而来的。这中间可能有过渡形式,如 Cambialistic(来源于拉丁语 Cambialia,意思是“变化”)酶,是能接受 Fe 或 Mn 作为辅因子的 SOD。从五种厌氧菌里都发现了 Cambialistic 酶,它们所产生的 SOD 种类依赖于氧的存在,比如脆壁芽孢杆菌(*B. fragilis*),多形拟杆菌(*B. thetotaomicron*)和龈拟杆菌(*B. gingivalis*)在无氧条件下培养时,Fe-SOD 是体内唯一的 SOD,而在有氧条件下培养时,SOD 总活力增加,但 Mn-SOD 占优势。至今仅在兼性厌氧菌中发现 Cambialistic SOD,它可能代表 Fe-SOD 和 Mn-SOD 分化以前的早期的 SOD 形式。固氮生物如固氮菌属和根瘤菌属也只有 Fe-SOD。

好氧和兼性厌氧细菌里含 Fe-SOD 或 Mn-SOD,或者两者都有。如大肠杆菌在无氧条件下只含有 Fe-SOD;而在有氧条件下还存在 Mn-SOD。蓝细菌的细胞浆里有 Fe-SOD,而且它们的类囊体膜上存在一种紧密结合的 Mn-SOD。

大多数真核藻类在其叶绿体基质里存在 Fe-SOD,类囊体膜上结合着 Mn-SOD,这与原核蓝细菌相似。这些研究结果都支持藻类叶绿体起源于蓝细菌内共生的假说。大多数藻类不含 CuZn-SOD,如绿藻中不含 CuZn-SOD,而轮藻中含有 CuZn-SOD,说明轮藻是绿藻向高等植物进化的过渡形式,真菌里一般含 Mn-SOD 和 CuZn-SOD。

植物细胞里 SOD 含量最多的是 CuZn-SOD,定位于细胞质以及叶绿体和线粒体内外膜之间;Mn-SOD 定位于线粒体基质中。豌豆叶子的过氧化物酶体中也含有 Mn-SOD。植物细胞里 Fe-SOD 主要存在于叶绿体中。一般认为编码 Fe-SOD 的基因从原核细胞移到共生的宿主植物细胞里,保存下来并且表达。已发现根瘤土壤杆菌(*A. tumefaciens*)在宿主植物冠瘿形成过程中,将其基因组的一部分转移到宿主植物。

大多数原始的无脊椎动物细胞里都存在 CuZn-SOD。这暗示着在动物进化的早期就有这类 SOD。脊椎动物一般含 CuZn-SOD 和 Mn-SOD。人、鼠、猪和牛等动物的红细胞及肝细胞中含 CuZn-SOD,而从人和动物的肝细胞中也纯化了 Mn-SOD。CuZn-SOD 主要存在于细胞质,但也见于过氧化物酶体中。Mn-SOD 一般存在于线粒体基质中。SOD 是细胞内酶,但在人血清中分离到一种特殊的细胞外 CuZn-SOD (EC-SOD, extracellular superoxide dismutase),不同于一般的 SOD,这种 SOD 已在多种动物细胞里发现。hEC-SOD 主要发现于血浆、淋巴、子宫液、组织和某些培养细胞的分泌物中,是子宫液中的主要 SOD,但在其他组织中的含量却明显下降。从进化上来说,CuZn-SOD 是真核生物酶,但在某些细菌里却发现 CuZn-SOD,如与鱼类共生的发光杆菌(*Pleiongnathi*)中含有 CuZn-SOD,这可能是基因转移的结果。对氨基酸组成进行比较发现,这种菌的 CuZn-SOD 与

宿主鱼类的同一性比其他真核细胞 CuZn-SOD 的同一性要高,但后来在几种细菌中也发现有 CuZn-SOD,这就不能用基因转移来解释了。SOD 同工酶在系统发育上的分布和亚细胞定位为真核生物的叶绿体及线粒体起源于原核生物内共生的假说提供了有力的证据。Bonov 和 Fridovich 报道在大肠杆菌中也存在有 Cu/Zn-SOD, Imlay 进一步发现,大肠杆菌的 Cu/Zn-SOD 同其他细菌中的 SOD 一样,分泌到外周质中,它主要参与防御外周质大分子抵御胞质外超氧化物。Cu/Zn-SOD 业已被发现广泛存在于紫色细菌的不同亚属中。细菌中的 Cu/Zn-SOD 与真核中的相比同一性更高,但活性中心和结构在原核中和真核中是相似的。对铜的使用和一个不变的二硫键说明 Cu/Zn-SOD 是在有氧的环境中进化的。hMn-SOD 存在于线粒体基质,结晶几乎是无色的,而从加有硫酸胺或聚乙二醇(PEG)的培养基所获得的含 Mn(III)的细菌 SOD 则呈紫红色。EC-SOD 与 Cu/Zn-SOD 有约 50% 的顺序同一性,但 hEC-SOD 和 hCu/Zn-SOD 也有许多不同的方面。前者较后者有更多的 α -螺旋结构,对氰化物的叠氮化物抑制的敏感性是后者的 3 倍多,对高温、极端 pH、尿素、盐酸胍较后者更具有耐受性。前者的吸收峰在 652nm,与后者相比向蓝光移动了 30nm。另外,两者之间也无相同的抗原性。这些分析表明 EC-SOD 是在细菌出现后,真菌和植物出现前从 CuZn-SOD 分化出来的,对胞外和细胞表面结合 SOD 的需要进化历史中出现得很早。

从以上这些讨论可以看出,Mn、Fe-SOD 有一个共同的祖先,而 CuZn-SOD 是在以后单独进化的。在同一生物内,尤其是高等动植物体内,SOD 分布的特点是以同工酶的形式存在,这三种 SOD 都可催化 O_2^- 歧化为 H_2O_2 和 O_2 。那么这三种 SOD 同时存在的意义是什么?实验结果表明,对灭草灵(Paraquat)、 O_2^- 、机体生长和代谢速度、环境中金属成分及含量,光和温度等外界环境条件的变化,这三种 SOD 的反应都不同。生物体为了防御氧毒性,采用三种类型的 SOD 以同工酶的形式分布于有机体内,以确保氧自由基在各种条件下均能被有效清除。据此可知 SOD 对生命的存在是至关重要的。

13.3.1.2 SOD 的分子结构与理化性质

SOD 属金属酶,其性质不仅取决于蛋白质部分,还取决于活性中心金属离子的存在。

A Cu,Zn-SOD 的结构与理化性质

到目前为止,已经完成全部氨基酸序列分析工作的 CuZn-SOD 不下 30 种,不同来源的 CuZn-SOD 在氨基酸序列上显示出明显的进化保守性和高度的序列同一性。在 150 多个氨基酸组成中,有 19 个氨基酸是完全不变的,另外还有 19 个也近乎不变。对牛红细胞、马肝和酵母 CuZn-SOD 氨基酸分析表明人和牛红细胞 CuZn-SOD 全序列同一性为 80%,CuZn-SOD 在进化上的高度保守性可以与细胞色素 C 相媲美。CuZn-SOD 结构的同一性还进一步表现在:(1)与金属辅基相连和参与肽链内部二硫键形成部位附近的氨基酸残基相同;(2)富含甘氨酸残基;(3)氨基酸序列中都有一个超可变区,共有 23~25 个残基,从 χ 射线晶体结构分析表明,这个超可变区位于分子的主要结构表面部分,可能与酶的免疫学性质有关,与此相对应,在 C 末端有一序列同一性更高的区域,在此区域有一精氨酸(Arg¹⁴¹)对酶活力起关键作用。

在氨基酸序列上呈现不变的或近乎不变的氨基酸残基中,甘氨酸占了很大的比例,富含保守的甘氨酸残基是 CuZn-SOD 组成的重要特点,它们的大量存在和均匀分布对于酶分子高级结构(折叠或发夹)的形成有着重要的联系。

在 19 个不变的氨基酸残基中,大部分氨基酸是用以构成酶的活性中心的,如 His44、His61、His118 与 Cu 相连(以牛红细胞 CuZn-SOD 氨基酸序列为例)His44、His69、His78 和 Asp81 与 Zn 相连,而 Arg141 更是 CuZn-SOD 酶活性所不可缺少的。此外,Cys55 和 Cys144 形成的二硫键,它对维持 CuZn-SOD 蛋白二聚体的稳定起重要作用。这些说明了 CuZn-SOD 由一级结构决定的比一级结构更为精密的高级结构的高度保守性。

CuZn-SOD 一般是由两个相同亚基组成的二聚体,每个亚基含有一个铜原子和一个锌原子,分子量约为 16kD。CuZn-SOD 一般没有或含有很少的酪氨酸和色氨酸。它们的紫外吸收光谱类似

于苯丙氨酸,在 250~270nm 有不同程度的吸收,而在 280nm 的吸收峰不存在或不明显。CuZn-SOD 的可见光吸收光谱反映了二价铜离子的光学性质,不同来源的 SOD 都在 680nm 附近有最大吸收,CuZn-SOD 最适 pH 较宽,在 5.2~9.5 之间,CuZn-SOD 对氰化物、 H_2O_2 敏感,但在热、蛋白水解酶作用下相对比较稳定。

根据牛和人的红细胞 CuZn-SOD 的组成分析,可以看出其氨基酸组成有以下几个特点:(1)年两种来源的 SOD 都含有 Met,其 Gly 含量不仅类似,而且在所有氨基酸中为最高;(2)牛红细胞 SOD 中无 Trp,但每个分子中含有 2 个分子的 Tyr,而人的红细胞 SOD 不仅无 Trp,也无 Tyr;(3)人 Cu/Zn-SOD 的 153 个氨基酸残基中有 126 个氨基酸残基与牛同源,也即它们的同一性在 82%;(4)它们之间 17~36 位上有 11 处明显不同,它们中的大部分位于蛋白表面,因此可以推测两者的二、三级结构是相似的;(5)尽管有 82% 的同一性,有两个区域显示明显的不同。两个酶 N-端最初的 16 个氨基酸残基是一样的,但随着就有一个 20 个氨基酸残基的片段,两者有 11 处不同,这种突然的不同其原因还无法解释,但并不影响蛋白的高级结构。另一个不同是 109~111 位点上的三个氨基酸残基,其中一个残基,人是 Cys 而牛是 Ser,这三个氨基酸残基影响亚基与亚基表面之间的主要静电变化,这也许是人 SOD 较之牛 SOD 具有明显不稳定的主要原因。因此 Jabusch 等人将第 111 位的 Cys 衍生为其他的氨基酸,结果可以使人 SOD 趋于稳定。

比较不同来源的 CuZn-SOD 的氨基酸序列可以看出,无论是来自细菌、真菌、高等植物细胞浆,它们的同一性很高。有些氨基酸很保守,在所有序列中都不变,这暗示着这些氨基酸与活性中心有关。不同来源的 CuZn-SOD 在高同一性的基础上彼此又有差异,虽然不同 SOD 间序列的差异不能代表准确的进化钟,但氨基酸同一性在一定程度上能反映种属间的亲缘关系,比如来自各种高等动物 CuZn-SOD 的同一性比它们和低等动物及植物的同一性要高。大鼠和小鼠 CuZn-SOD 的同一性高达 97%,人与高等动物、箭鱼、果蝇、植物、真菌及光合自养细菌的同一性分别为 82%,67%,62%,56%和 18%,来自被子植物细胞浆的 CuZn-SOD 彼此同一性在 80%~90%,来自叶绿体的 CuZn-SOD 同一性高达 90%以上,而细胞浆与叶绿体的 CuZn-SOD 的同一性只有 68%,可见叶绿体 CuZn-SOD 与细胞浆 CuZn-SOD 的进化存在着差异。

有关 CuZn-SOD 高级结构的信息主要来源于 X 射线衍射晶体结构分析,1972 年,Richardson 实验室首先获得了牛红细胞 CuZn-SOD 的单晶,1974 年获得了 0.55nm 粗分辨率的电子密度图,表明该酶的两个亚基在结构上是相同的,整个结构由 β 片层组成, α 螺旋几乎没有,1975 年获得了 0.3nm 分辨率的电子密度图,1980 年进一步得到了其 0.2nm 分辨率的电子密度图。分析结果表明,CuZn-SOD 球蛋白分子的两个相同的亚基是非晶体系二重联相关联的,它们之间通过非共价键的疏水作用结合,两个 Cu 原子之间相距了 3.38nm,同一亚基中 Cu,Zn 相距 0.63nm,亚基由 8 股反平行的 β 折叠和 3 个无代表性结构的环组成具有拓扑性的希腊钥匙 β -桶。

CuZn-SOD 的活性部分是一个椭圆形的“口袋”或称“槽”,其长 1.5nm,宽 0.9nm,深 0.6nm,其外缘一边是由 Thr135,Gly136,Ala138 和 Gly139 组成;另一边由 Gly59,Pro60,His61,Phe62 和 Gln63 组成,Thr135 和 Arg141 构成口袋的两侧,Cu,Zn 及 His,Asp81 形成狭长的槽底,Cu 与 His44,His46,His61,His118 相连,Zn 与 His61,His69,His78,Asp81 相连,Cu,Zn 之间通过 His61 形成咪唑桥结构,Cu 部分暴露于溶剂中,桶边缘的 Arg141 有辅助引导底物向 Cu^{2+} 靠近的作用,因此影响 Arg 电荷的溶剂能引起酶活性的损失, Zn^{2+} 则深埋于蛋白质结构内部,主要起稳定作用,SOD 与一般酶相比在承受变性因子攻击时表现出较强的稳定性,主要是由于金属辅基的存在, Cu^{2+} 与酶活性有关,把 Cu^{2+} 用其他二价金属如 Co 和 Hg 取代,酶活消失。牛红细胞 Cu-SOD,Zn-SOD 结构示意图见图 13-2。

B Mn-SOD、Fe-SOD 的结构与理化性质

Mn-SOD 在真核生物中多为四聚体,在原核生物中多为二聚体。大多数 Fe-SOD 为二聚体,这两种 SOD 的许多性质都很相似。每个亚基的分子质量一般为 23kD,大于 CuZn-SOD 亚基的分子质量,每个亚基含 0.5~1.0 个 Mn 或 Fe 原子。

Mn,Fe-SOD 的结构特征是不含 Cys,含有较多的 Trp 和 Tyr。因此紫外吸收光谱类似一般蛋白

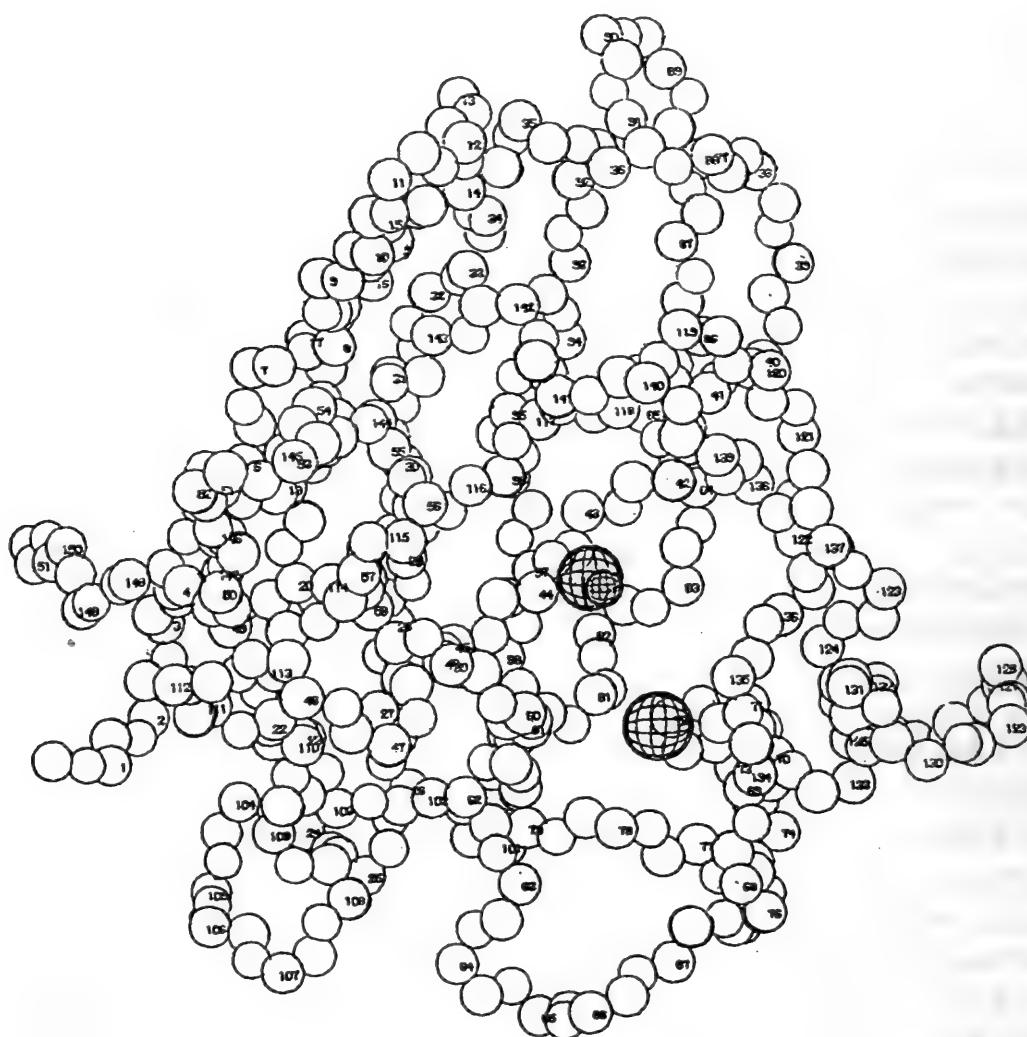


图 13-2 牛红细胞 Cu-Zn-SOD 结构示意图

质,在 280nm 附近有最大吸收峰,Mn-SOD 的可见光吸收光谱在 475nm 附近有最大吸收,Fe-SOD 在 350nm 处有最大吸收,这都反映了所含金属离子的光学性质。

任何生物来源的 Mn-SOD 和 Fe-SOD 的一级结构同一性都很高,均不同于 CuZn-SOD 的序列,可见它们来自于一个共同的祖先。高等植物线粒体、叶绿体的 SOD 序列类似于原始细菌的 SOD,这些都支持内共生假说。这种同一性在一定程度上代表着物种亲缘关系的远近。如人 Mn-SOD 和鼠、大肠杆菌的 Mn-SOD 的同一性分别为 94% 和 43%,植物 Fe-SOD 之间的同一性要比它们和细菌 Fe-SOD 的同一性高出 20% 以上。Phalgun 等比较了 7 种嗜盐古细菌家族里的 SOD,在 199 个氨基酸中有 125 个氨基酸完全不变(62%),而它们与真细菌和真核线粒体 SOD 相比只有 35%~40% 的同一性,尽管如此,参与形成活性中心、催化中心及与金属连接的氨基酸在所有 Fe-SOD 和 Mn-SOD 中都是保守的,而且与金属 Mn 或 Fe 相连的氨基酸也完全一致,它们是组氨酸 26、87、181 和天冬氨酸 185。

Mn-SOD 晶体和 Fe-SOD 晶体的电子密度图分辨率分别为 0.18nm 和 0.21nm,在活性中心以及金属-配体簇附近的结构上,二者很相近。每个亚基包含两个结构域,一个结构域由三个 α -螺旋组成,另一个结构域由三个 α 螺旋和一个 β 折叠组成。金属结合位点就在这两个结构域之间。围绕活性中心的是几个保守的芳香族氨基酸,其中有三个 Tyr、三个 Trp 和两个 Phe,都在距金属离子 1nm 的范围内。Fe-SOD 中的第 90 位氨基酸残基是 Tyr,Mn-SOD 中则是 Phe,两者都围绕活性中

心,作用相似。

Mn-SOD 和 Fe-SOD 尽管在一级结构和空间结构上显示了很大的相似性,但毕竟还有区别。Mn-SOD 对 H_2O_2 不敏感,而 Fe-SOD 对 H_2O_2 敏感。同一种生物来源的 Mn-SOD 和 Fe-SOD,它们的抗原性不同。早期的重组实验显示,有几种细菌来源的 Fe、Mn-SOD 的 Try 可以有效地与别的金属离子结合,而仅原有的金属离子显示最大的催化活力。在一级结构上,也有几个位置的氨基酸对 Mn-SOD、Fe-SOD 分别是专一的,由此可以区别 Mn-SOD 和 Fe-SOD。Fe-SOD 中 83 位的谷氨酰胺和 Mn-SOD 中 160 位的谷氨酰胺作用相同。在这两种 SOD 中,83 位和 160 位的氨基酸在空间结构上距离很低。为了适应这个结构,Mn-SOD 中与 160 位 Gln 相邻的 82、83 位氨基酸是体积较小的 Gly,相应的在 Fe-SOD 中,82、83 位分别为 Ala 和 Gln,160 位是体积较小的 Ala。85 位的 Trp 对于 Fe-SOD 是专一的,正是这个 Trp,Fe-SOD 才对 H_2O_2 敏感。161 位在 Mn-SOD 是 Asp,在 Fe-SOD 是 Gly。对四种 Cambialistic SOD 进行研究后发现,它们在一级结构上类似于 Mn-SOD,但在金属成分和对抑制剂敏感性等性质上又类似于 Fe-SOD。这些酶蛋白在体内可能既能用 Mn,又能用 Fe 作为辅因子,它们代表 Fe-SOD 和 Mn-SOD 之间的过渡形式。

C EC-SOD 的结构与理化性质

EC-SOD 是大分子分泌型糖蛋白,由 4 个相同的亚基组成,亚基分子量约为 30 000。在 222 个氨基酸残基的成熟蛋白 N-端有 18 个氨基酸残基的信号肽,说明它是一个分泌蛋白,成熟蛋白的前 95 个氨基酸残基与其他 SOD 无任何顺序一致性,在 Asn89 位上是 N-乙酰化的,第 96~193 的氨基酸残基顺序与 CuZn-SOD C-端 2/3 的氨基酸残基顺序有 50% 的同源性,C-末端的 194~222 的氨基酸残基是强亲水性的,包含有 9 个带正电荷的氨基酸残基,羧基末端的 Lys211 和 Lys212 是肝素结合区,对肝素和其他硫酸糖蛋白具有亲合性,利用这一性质可对其进行体外纯化和体内定向用药,但 EC-SOD 是一个复合物,它对肝素的亲和力可分为三类:没有亲和,较弱的亲和和高亲和;从 His96 到 Gly193,与 Cu/Zn-SOD 有约 50% 的顺序同一性,而且这些顺序非常的保守,这种异常的同源区域和 N-端前 95 个氨基酸的部分残基可能与四聚体相互结合的功能有关。EC-SOD 活性部位的组成与 CuZn-SOD 很相似,因此它们的酶活性及对抑制因子,如氰化物、叠氮化物、二乙基二硫代氨基甲酸盐和 H_2O_2 等的敏感性也都很相似。EC-SOD 也可被氰化物、叠氮化物、二乙基二硫代氨基甲酸盐和 H_2O_2 灭活,而 H_2O_2 是 Cu/Zn-SOD 催化反应的产物,EC-SOD 分子中也含有 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} ,但它与 Cu/Zn-SOD 的氨基酸组成却大有不同。大部分的 EC-SOD 在血管系统中结合于内皮细胞表面。

D 重组人 SOD 天然人 SOD 结构与理化性质的比较

Kajihara 等将重组人 Cu/Zn-SOD(r-hSOD)与人胎盘 Cu/Zn-SOD 的物化性质进行了比较,结果发现酶活性、金属含量、氨基酸组成、胰蛋白酶的肽谱图没有区别,分光光度性质包括 UV、ESR 和 CD 光谱也一致。等电凝胶电泳分析表明它们的等电点(pI)值不同,h-SOD 的 pI 值略低于 r-hSOD 的 pI 值,这是由于在 *E. coli* 中表达的重组人 SOD N-末端没有被乙酰化和糖基化,因而其 pI 值也不同。

重组人 Cu/Zn-SOD(*E. coli*)主要有三个异构体,它们的等电点(pI)分别为 5.14(A),5.06(B)和 4.99(C)。它们的化学和分光光度性质如酶活性、金属含量、氨基酸组成、UV、ESR 等没有明显的区别,不同在于在 260nm 处的 CD 光谱和反相 HPLC 的洗脱部分。当被还原和羧甲基化处理后,三个异构体的 pI 值就一致了,跟异构体 A 的值一样。这些结果表明三个异构体的一级结构是一样的,只是二级结构和三级结构略有不同,而且这些不同主要是第 111 位的 Cys 的结构变化引起的,当他们用 ^{135}S er 代替 ^{135}C ys,SOD 的 pI 值接近 A 的值,但仍有少量的 B 和 C 存在,这个结果表明异构体的存在不仅仅简单的用 ^{135}C ys 的修饰来解释,但 Kajihara 的实验表明用 ^{135}S er 代替 ^{135}C ys 可以使 SOD 的结构更加稳定。(例如,他们取 SOD 包含 ^{135}C ys 的一段多肽(His80-Arg115)来观察反相 ^{135}C ysHPLC 的洗脱结果,结果 ^{135}C ys 的洗脱峰宽且不同的异构体出峰不一样,而 ^{135}S er 的出峰非常窄且一样。SOD 有两个游离的 Cys,但 ^{60}C ys 与异构体的存在无关。Wenisch 等通过等电点聚焦纯化重组人 SOD 时也

发现了它们存在三个不同等电点的异构体:5.07、4.92和4.80。且它们的酶活性一致,进一步的研究发现,这种现象可能是酶在形成过程中的不同状态,pI 5.07可能是酶形成过程中的最终状态,pI值为4.80可能是酶形成过程中的最初状态,而pI值为4.92则是两种状态的混合物。

Gorecki等发现重组人Cu/Zn-SOD与天然的Cu/Zn-SOD结构上明显的区别是N-末端没有乙酰化,但其对酶活性没有影响;而对于rh-Mn-SOD来讲,其结构的一个不同是N-末端多一个Met,而天然的Lys,这是由于大肠杆菌缺乏甲硫氨酰氨肽酶对Met-Lys底物作用。

13.3.1.3 SOD的基因结构

A 人Cu/Zn-SOD的基因结构

hCu/Zn-SOD在人类染色体中的位置是21q22。Down's综合症就是该区染色体异常引起的。该酶整个编码区长495bp。3'端非翻译区(3'-UTR)长96bp,约90%~95%的Cu/Zn-SOD的RNA具有在TATAAA上游23bp处的5'起始位点。研究人员发现同一个基因可以转录出不只一种mRNA来。同一个人Cu/Zn-SOD基因在转录时会产生两个mRNA,一个大约0.7kb,另一个0.9kb,它们的不同在于它们的3'-UTR相差222bp,其中0.7kb的数量大约是0.9kb的4倍。两种Cu/Zn-SOD mRNAs,都是从同一基因转录来的功能mRNA。这可能是经过加工后的mRNA,因为对大鼠编码Cu/Zn-SOD的基因进行序列分析,它含5个外显子和4个内含子,基因全长6000bp,包含2个CCAAT盒,1个TATA盒和4个不同的DC样盒。大鼠在进化上和人类较接近,这表明hCu/Zn-SOD基因的表达调控主要在转录水平上进行。一般认为,hCu/Zn-SOD不像hMn-SOD那样可进行诱导表达。但也有报道IL-1能缓慢增加人W138肺成纤维细胞Cu/Zn-SOD活性水平。

Delabar等人研究了大鼠与人的cDNA基因发现,它们的cDNA顺序的同源性在86%,3'-UTR的同源性是71%。按照每100万年有1%发生随机突变的速度,而大鼠和人类的分支是7亿5千万年,由于选择压力的存在,它们的3'-UTR应该只有52%的同源性。3'-UTR的这种相对比较高程度的同源性在其他种类的基因中也已被发现,从以上这些数据,我们可以判断,3'-UTR在这些基因表达、翻译和翻译后水平的调控方面起了非常重要的作用。

人Cu/Zn-SOD基因5'端的DNA顺序很有意思:启动区域包括TATAA和CATT顺序,再加3个5'GGGCGG 3'boxes与转录因子Spl的结合位点相似,-330与0之间的区域G+C含量超过65%,而CpG含量与GpC含量几乎相同;因此,这个区域被称为'HTF岛',这些性质在其他的一些管家基因中也已被发现,但是否也像Cu/Zn-SOD一样,目的是用来很好地调节这些基因的表达还不太清楚。

B 人Mn-SOD的基因结构

近年来的研究表明,人Mn-SOD是一个由位于6q25的核基因编码的抗氧化酶,有活性的Mn-SOD蛋白最后定位于线粒体基质。Mn-SOD基因的表达既可因细胞受到辐射、氧化或还原试剂、细胞因子、病毒感染等因素的刺激而显著提高,也可随细胞的癌变而大幅降低。Mn-SOD基因表达的应激性波动现象及与肿瘤发生的相关性,引起了人们对其基因结构研究的重视。研究报道表明,不同来源的人Mn-SOD cDNA的翻译区都是一致的,且在5'端非翻译区具有高度同一性,但3'非翻译区的变异程度却很大。目前已从cDNA 3'-端非编码区多样性、基因组结构与调控序列特点等方面得到一些对人Mn-SOD基因表达规律的理解和线索。

Northern Blot实验显示,人Mn-SOD基因的转录有长约1kb的4kb的两种mRNA。为探明不同转录子是否来自同一基因及其结构差异,自Beck等首次从人T淋巴细胞克隆Mn-SODcDNA以来,不同作者又相继克隆了胎盘、肝脏、大肠癌细胞等不同组织或细胞来源的Mn-SOD cDNA。通过比较发现,不同组织或细胞来源的cDNA中编码序列和5'-端非翻译区基本一致,但3'-端非翻译区在长度和碱基序列上存在明显差异。

1990年,Church从人胎盘cDNA文库克隆到一全长4.2kb的Mn-SOD cDNA,其中3'-端非翻译区长达3426bp。经过分析,作者认为这一迄今所得最长的Mn-SOD cDNA大致可以涵盖其他组织或细胞来源的较短cDNA。除加poly(A)信号序列有所不同外,其3'-端非翻译区上段193bp的碱基

序列与 Wispe 等自大肠癌细胞克隆的 1021bp Mn-SOD cDNA 3'-端非翻译区完全一致,而上游 19bp 加下段 36bp 与 Beck 等自 T 淋巴细胞克隆的 830bp Mn-SOD cDNA 3'-端非翻译区序列相同,并在上游 19bp 与下段 36bp 之间的相应位置有可供完成 mRNA 剪接反应的剪接供体(GT)和剪接受体(AT)序列。据此可以推测,Mn-SOD 较短 mRNA 系由较长 mRNA 剪接而来。值得注意的是,在 Mn-SOD cDNA 3'-端非翻译区中段有一与某些细胞因子或癌基因类同的 AT 富集区,提示 Mn-SOD 基因的表达与细胞因子或癌基因有相似的应激性变化特征。

1994 年,Wan 等获得了长达 1285bp 的人 Mn-SOD 基因组 DNA 序列。全序列分析表明,人 Mn-SOD 基因组包含 5 个外显子和 4 个内含子。通过引物延伸实验,找到一个与众不同的转录起始部位位于翻译起始位点上游,也即第 1 外显子起始密码(ATG)上游 74bp 处。在转录起始部位的上游,有一长约 400bp 的区段,G+C 含量高达 78%,集中分布着 7 个 Sp-1(promotor-selective transcription factor-1,5'-GGGCGG-3')和 3 个 AP-2(activator protein-2,5'CCGCGGGCG-3')转录因子结合序列。但在 5'端上至 780bp 的范围内,未发现一般基因所常见的 TATA 和 CAAT 盒序列。除 5'端有与 AP2 和 SP1 一致的序列外,3'端还各含有一个与 SP1 和 NF- κ B 一致的序列。这些潜在的调节元件的生物学功能目前正在研究之中。但 SP1、AP2 和 NF- κ B 一致序列的存在提示,这些潜在调节因素在人 Mn-SOD 基因表达调控中可能起着重要的作用。

多个 SP-1 和 AP-2 结合序列集中于转录起始部位上游,强烈提示,SP-1 和 AP-2 转录因子在 Mn-SOD 基因的转录调控中有重要作用。已有实验证实,SP-1 与 AP-2 协同可显著提高 SV40 病毒和某些真核基因的 mRNA 合成水平。现在认为,AP-2 激活转录存在两条不同的信号转导途径,其中之一是由佛波酯(phorbol ester)介导的蛋白激酶 C 途径。Fujii 等的实验表明,佛波酯可以诱导 Mn-SOD 基因的表达。

此外,在第 5 外显子终止密码(TAA)的下游,也发现了两个转录因子结合序列,即距终止密码 901bp 处的 SP-1 结合序列和 1309bp 处的 NF- κ B 结合序列(5'-GGGACTTC-3')。NF- κ B 系一多聚体蛋白,正常情况下与抑制性蛋白 1 κ B 结合存在于细胞浆。当细胞受到氧化或还原试剂、细胞因子、病毒感染等因素刺激时,NF- κ B 解聚并与 1 κ B 脱离,游离出 50-和 65-kD 的二个亚基,进入胞核激活基因转录。Das 等最近证实,N-乙酰胱氨酸、二硫苏糖醇、2-巯基乙醇等巯基试剂诱导腺癌细胞中 Mn-SOD 基因的表达并与 NF- κ B 的活化同步存在。

Wan 等获得的 Mn-SOD 基因组 DNA 中,转录起始部位上游的 5'-端序列仅长 782bp。1996 年,Zhang 从人白细胞基因组文库中得到一个 Mn-SOD 基因组 DNA 序列,其 5'-端序列长 5538bp。Zhang 鉴定的转录起始部位与 Wan 等稍有不同,即位于第 1 外显子起始密码上游 67bp 处,并且在长达 5.5kb 的 5'-端上游序列中又发现了一些重要的调控元件,如一个 AP-1 转录因子结合序列(5'-GTGACTTAA-3')、一个急性期反应序列(5'-CTGGGA-3')、两个与 *Egr-1* 基因调控序列(5'-GCCGGGGCG-3')相近的序列(5'-GCCGGCG-3')等。特别值得一提的是 *Egr-1* 基因调控序列。*Egr-1* 基因最初自血清因子刺激增值的小鼠 3T3 细胞中克隆,后被证实是在细胞受到辐射作用早期被大量诱导表达的基因。Mn-SOD 基因结构中存在与 *Egr-1* 基因类同的调控序列,是其具有辐射诱导特性的有力证据。

Zhang 还进行了将 Mn-SOD 基因 5'-端上游序列分段连入报告质粒,并在不同细胞系检测功能的实验。结果发现:(1) 围绕转录起始部位的 -114 到 +38bp 区段(152bp)具有引导下游基因表达的最强活性,此区段中包含 4 个 SP-1 转录因子结合序列,应是 Mn-SOD 基因主要启动子的所在部位;(2) 转录起始部位上游 -2013 到 -223bp 区段在肝癌细胞中引导基因表达的活性明显高于神经瘤细胞,而 -717 到 -223bp 区段在两种细胞中的表达活性相似,提示在 -2013 到 -717bp 区段内可能存在负调控序列,对 Mn-SOD 基因的组织或细胞特异性表达起重要作用。

C 人 EC-SOD 的基因结构

Folz 等分离了大于 10 000bp 的 hEC-SOD 基因,DNA 印迹分析表明它在人类基因组中是单拷贝的,也没有证据表明它是假基因。hEC-SOD 全长约 5 900bp,它富含 G+C,其中包含 3 个外显子

和 2 个内含子,全长为 720bp 的编码区是连续的,位于外显子 3 内。没有明显的 TATA 盒,它的表达调控可能主要在转录后或转译水平上进行。hEC-SOD 在人体内各组织的表达水平是不同的, RNA 印迹分析结果是:成人心脏 > 胎盘 > 胰脏 > 肺 > 肾脏 > 骨骼肌 > 肝脏,而在脑中表达很少。在不同病人的血清中表达水平也不同,由高到低排列是:肾病 > 肝病 > 糖尿病 > 健康者,而在脑血管病、心脏病、急性消化道病患者体内没有观察到明显的不同。

13.3.1.4 SOD 生物合成的调控机制

到目前为止,尽管 SOD 酶活性的调控机制我们还没有完全搞清,但我们已从金属离子、SOD 的 mRNA 的非翻译区(UTR)以及氧压等方面得到一些对 SOD 调控机制方面的初步了解。

A 金属离子在翻译水平的早期参与了酶活性的调控

Percival 等人为了研究铜是否对 CuZn-SOD 酶活性有调控作用时,建立了这样一个模型:他们找到一种人的分化缺陷型的红白血病细胞株-k562 细胞。当有氯高铁血红素存在时,它会生成胚胎血红蛋白,而 Caeruloplasmin——一种血浆铜蛋白,在其上有特异性结合位点。当 Caeruloplasmin 与 K562 细胞结合时,需要有大量的 Cu 参与。现已知道, Caeruloplasmin 结合得越多,氯高铁血红素将刺激细胞从 Caeruloplasmin 转移更多的 Cu。参与反应的 Cu 主要定位在胞液中,而不是首先转向线粒体或核内。通过观察 Cu 从 Caeruloplasmin 的转移的速度,观察到氯高铁血红素诱导的 K562 细胞比未诱导的细胞来得快。在 K562 细胞中, CuZn-SOD 是主要的也许是唯一的 Cu 受体蛋白。胞液中半数的 Cu^{67} 与 CuZn-SOD 结合。让人感兴趣的是,受氯高铁血红素刺激的 K562 细胞开始合成更多的 CuZn-SOD。高铁血红素的诱导时间延长能使 K562 细胞慢慢失去 CuZn-SOD 酶活性。96 小时后,已诱导的 K562 细胞的 CuZn-SOD 酶活性仅仅是或低于未诱导细胞 CuZn-SOD 酶活性的 60%。这种酶活性的降低完全是 CuZn-SOD 酶专一性的,而作为对照的 Mn-SOD 的酶活性没有损失。当 Caeruloplasmin 加入时,可以部分恢复 CuZn-SOD 活性。在以后的研究中他们又发现,在 48 小时的诱导和非诱导的细胞中,不管有没有加入 Caeruloplasmin, CuZn-SOD mRNA 浓度没有明显区别,另外,当 CuZn-SOD 与 4,5- ^3H 赖氨酸结合成免疫受体型 CuZn-SOD 蛋白时,细胞仍有转录能力,并且酶活力不受影响。因此, SOD 的酶活力的降低不是在转录前发生的。为了解释 SOD 酶活力丢失的原因,他们观察到:在 Caeruloplasmin 存在下, K562 细胞对铜有亲和能力,并将 Cu^{2+} 转移给 CuZn-SOD; 在细胞膜上, Cu^{2+} 有变化但却没有 Caeruloplasmin 穿透细胞。

总的来说,在分化过程中,部分 CuZn-SOD 酶活力丢失与 Caeruloplasmin 有关。除了对酶活力有影响外,经氯高铁血红素处理的 K562 细胞仍保持合成 CuZn-SOD 的能力。实验发现, CuZn-SOD 酶功能与酶本身以外的 Cu 有关,也即与 Caeruloplasmin 有关。因此他们认为非蛋白本身所需的铜是一种维持或恢复 CuZn-SOD 酶活性的因子。他们的实验数据支持这样一种观点: Cu 在转录后调控水平上控制 CuZn-SOD 的表达。

B SOD 的 mRNA 的非翻译区(UTR)与 SOD 的酶活性有关

真核生物的 mRNA 的 3' 非翻译区(3'-UTR)在基因表达调控中是必不可少的。kilk 等人发现细胞中人 CuZn-SOD 酶活性是受 mRNA 的长度调控的。Delabar 等人也发现哺乳动物 CuZn-SOD 酶活性的调节极大程度上依赖于 mRNA 的长度。研究人员发现同一个基因可以转录出不只一种 mRNA 来,它们的不同在于它们的 3'-UTR 相差 222bp。Delabar 等人研究了大鼠与人的 cDNA 基因发现,它们的 cDNA 顺序的同一性在 86%, 3'-UTR 的同一性是 71%。按照每 100 万年有 1% 发生随机突变的速度,它们的 3'-UTR 应该只有 52% 的同一性。从以上这些数据,我们可以判断, 3'-UTR 在这些基因表达、翻译和翻译后水平的调控方面起了非常重要的作用。Kilk 等人同时研究了蛋白水平上的 3'-UTR 和 5'-UTR 对 cDNA 表达的影响。他们发现, 5'-UTR 对酶的表达没有任何影响,而当从 3'-UTR 的末端降解掉 185bp, 则酶活性下降 3 倍。为此,他们设计了这样两个质粒: pCGSOD 和 pCGSOD $\Delta 5'$ - Δi 。pCGSOD 包含 CuZn-SOD mRNA 的所有 Poly(A) 位点, pCGSOD $\Delta 5'$ - Δi 在其后又增加一个 15bp 的 Poly(A) 尾巴,它们可以转录成两种 mRNA, 0.7Kb 的 mRNA 在第一个 Poly(A) 位点 P(A)I 结束,而 0.9Kb 的 mRNA 在 P(A)II 结束。有趣的是,当这个质粒在猴细胞株

cos1 中表达时,所得到的 mRNA 大部分是 0.9Kb,而当在人体细胞株中表达时,0.7Kb mRNA 是 0.9Kb mRNA 的 4 倍之多。是谁在调控这两种 mRNA 的比例? Gu 等人研究表明这可能与 5'-UTR 有关。Kilk 还证实了含有长的 Cu-SOD, Zn-SOD cDNA 的质粒比含有短的 cDNA 质粒的 SOD 酶活性要高。他们发现,第一个 P(A)I 和第二个 P(A)II 位点之间,含有一个 AU 丰富的区域,其中有 1 个 AUUUA 区域和 5 个 AU 丰富区域,而在 P(A)I 上游,则没有类似的结构。因为长的 CuZn-SOD mRNA 包含有 UUUA 区域,可以推断 mRNA 可以调控 CuZn-SOD 的酶产量的能力是由 3'-UTR 的这一结构决定的。Delabar 也作了这方面的研究,他们考察了大鼠和小鼠组织和细胞系中 CuZn-SOD 活性与 mRNA 水平的关系。在所有的组织和两种小鼠细胞系中,通过总 RNA 的 Northern blot 分析, SOD 酶都与 0.7Kb 的 mRNA 杂交。为了比较 mRNA 水平与酶活性的关系,对不同组织的 mRNA 进行了定量分析发现:在大鼠中, CuZn-SOD mRNA 的顺序是肝 > 脑 > 小脑 > 肺,其中肝的 CuZn-SOD mRNA 的量是肺的 5 倍。在酶活性方面他们也提出了相似的结论,尽管酶活性的变化范围没有 mRNA 的大。在小鼠组织中, CuZn-SOD mRNA 的顺序是肝 > 肾 > 脑 > 肺, CuZn-SOD 酶活性的顺序也是如此。在两种小鼠的细胞系中, CuZn-SOD mRNA 的水平 and CuZn-SOD 的酶活性与脑中观察到的差不多。人的 CuZn-SOD mRNA 水平, FG2 肝细胞瘤细胞的 CuZn-SOD mRNA 的量是成纤维细胞的 4 倍。这些结果说明在组织和细胞中 CuZn-SOD 活性的调控极大程度上与 mRNA 水平的调节有关。这种调控机制,特别是翻译水平和翻译后水平的调控机制还有待进一步的研究。

1990 年, Church 从人胎盘 cDNA 文库克隆到一全长 4.2kb 的 Mn-SOD cDNA, 其中 3'-UTR 长达 3426bp。3' 端还各含有一个与 SP1 和 NF- κ B 一致的序列。这些潜在的调节元件的生物学功能目前正在研究之中。但 SP1、AP2 和 NF- κ B 一致序列的存在提示,这些潜在调节因素在人 Mn-SOD 基因表达调控中可能起着重要的作用。

Zhang 还进行了将 Mn-SOD 基因 5'-端上游序列分段连入报告质粒,并在不同细胞系检测功能的实验。结果发现:(1) 围绕转录起始部位的 -114 到 +38bp 区段(152bp)具有引导下游基因表达的最强活性,此区段中包含 4 个 SP-1 转录因子结合序列,应是 Mn-SOD 基因主要启动子的所在部位;(2) 转录起始部位上游 -2013 到 -223bp 区段在肝癌细胞中引导基因表达的活性明显高于神经瘤细胞,而 -717 到 -223bp 区段在两种细胞中的表达活性相似,提示在 -2013 到 -717bp 区段内可能存在负调控序列,对 Mn-SOD 基因的组织或细胞特异性表达起重要作用。

C SOD 的表达调控与一些细胞因子有关

Marklund 研究了一些细胞因子在人成纤维细胞中对 SOD 的调控作用,发现由于 EC-SOD 的分泌特性,它是释放到胞质空间的超氧阴离子自由基最主要的防御系统。在人成纤维细胞中, γ 干扰素(IFN- γ)能显著激活 EC-SOD 的表达,而白细胞介素-1 α (IL- α)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和转化生长因子 β (TGF- β)则降低其表达活性,然而在高剂量的 IFN- γ 存在下, TNF- α 则能增加 IFN- γ 对 EC-SOD 的表达刺激作用。以上研究发现在细胞因子的协同作用下, EC-SOD 参与了复杂的炎症应激反应,当需要的时候, EC-SOD 可以增加对细胞外或细胞间质的物质的保护作用。而 Cu/Zn-SOD 不受任何细胞因子的影响, Mn-SOD 受部分细胞因子的影响,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1(IL-1)、白介素-6(IL-6)、脂多糖(LPS)均可诱导 Mn-SOD mRNA 的表达而 TGF- β 直接降低 Mn-SOD 的活性。Asayama 报道,培养中的单核细胞受细菌 LPS 刺激后 3 天, Mn-SOD 增加了 4.7 倍。Naoyuki 等也报道, hMn-SOD 在人卵巢癌中大量表达,说明癌细胞中存在一种刺激 hMn-SOD 表达的物质。三种 SOD 对细胞因子的不同反应,说明它们合成的调控机制是不同的,因此它们的生理作用也不一样。

多个 SP-1 和 AP-2 结合序列集中于转录起始部位上游,已有实验证实, SP-1 与 AP-2 协同可显著提高 SV40 病毒和某些真核基因的 mRNA 合成水平。Fujii 等的实验表明,佛波酯可以诱导 Mn-SOD 基因的表达。

D SOD 的转录调控与一些转录调控因子有关

Seo 等发现在 SOD 的 5'-侧区的一段顺序, -116 到 -45 区域可以提高 Cu/Zn-SOD 的转录

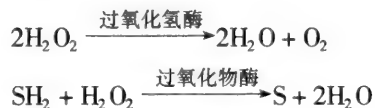
活性,因此称这一区域为正调控区(PRE, positive regulatory element), PRE 在 Cu/Zn - SOD 的转录活性方面起了很重要的作用。他们在研究过程中将这一区域分成两个部分, - 104 到 - 89 是 Sp1 结合位点, Sp1 能活化 SOD 的转录; - 64 到 - 55 是 C/EBP 相关因子结合位点,也能活化 SOD 的转录; Seo 等还发现 C/EBP 是一个家族,有 C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP ϵ , C/EBP γ ; 其中 C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ 和 C/EBP ϵ 是正调控因子,而 C/EBP γ 则是负调控因子。Carri 等发现在酵母中,铜依赖的转录因子 ACE1 等激活酵母 Cu/Zn - SOD 的表达; 又有人报道黄体生成素, Ca²⁺ 等能诱导小鼠的 SOD 高表达。

E SOD 酶活性的调节与氧压有关

在 SOD 中, SOD 酶活性的调节还与氧压有关。就拿大肠杆菌来说吧, 它有 Fe - SOD 和 Mn - SOD, 这两种酶对氧活性的反应不同, 不管有没有 O₂ 存在, Fe - SOD 都会被合成, 而 Mn - SOD 只有当有氧气存在时才存在。因此, Hassan 等人认为其作用机制可能是: (1) 分子氧直接充当诱导剂或去阻遏剂; (2) 分子氧还原成 O₂⁻, 然后作为诱导剂或去阻遏剂; (3) O₂⁻ 与一些前体反应, 产生更稳定的产物, 由其充当诱导剂或去阻遏剂。Hassan 等人还发现百草枯对 *E. Coli* 中 Mn - SOD 的表达有诱导作用。由于百草枯的毒理作用的重要因素是产生大量的 O₂⁻ 而 O₂⁻ 的存在正好诱导了 Mn - SOD 的大量生成, 从而使 *E. Coli* 对百草枯的毒性有抵御功能。为此他们又用链黑霉素做试验, 发现链黑霉素的毒性对 Mn - SOD 表达水平低的 *E. Coli* 较表达水平高的细胞要大得多。因此我们认为 O₂⁻ 是一类很重要的氧毒性试剂而 Mn - SOD 对其毒性有十分重要的防御功能。许多报道也称在哺乳动物的某些组织, 氧压对 CuZn - SOD 酶活性的调节起了很重要的作用。因此, 年轻的大鼠和小鼠当在有 85% 氧气的环境中生存 7 天以后, 其肺中 SOD 活性有明显增加。在大鼠中脑中的 SOD 酶活性也有增加而其他器官, 如心脏则没有变化, 肝和肾中甚至减少。另一方面, 在严重的低氧情况下, 小鼠中肺部和脑的 SOD 活性在降低, 而心脏和骨骼、肌肉中的 SOD 活性没有变化。在生理条件下观察 CuZn - SOD 的表达调控, 不同组织中的比较并不能说明 CuZn - SOD 的 mRNA 的水平(或酶活性)与组织中氧压(pO₂)的关系。他们发现直接暴露于空气中的肺的 CuZn - SOD mRNA 水平较低。而肝, 相对来说 pO₂ 较低, 其 CuZn - SOD mRNA 却很高。而氧消耗较高的脑, 其 CuZn - SOD mRNA 水平却较低。所有这些数据表明除了氧压和氧耗以外, 这有其他因素也在调节着 CuZn - SOD 基因的表达。

13.3.2 过氧化氢酶

过氧化氢酶和过氧化物酶都可清除生物体内产生的 H₂O₂。其不同之处是前者催化 H₂O₂ 分解为 H₂O 与 O₂; 而后者催化 H₂O₂ 氧化其他底物(以 SH₂ 表示)后才产生 H₂O。这两种酶的催化反应式如下:



1811 年 Thenard 首先发现动植物组织可分解 H₂O₂, 产生 O₂。Schonberin 也观察到这种现象, 他认为在反应中酶起到关键作用。后来 Wolff 与 Stoecklin 以及其他一些学者相继提纯了这种酶——过氧化氢酶。1937 年 Sumner 与 Dounce 得到牛肝过氧化氢酶的结晶。

需氧的微生物或其他低等生物如日本甲虫芽胞杆菌、肺炎枝原体、绿藻、蓝绿藻以及肝吸虫等寄生蠕虫中均有过氧化氢酶存在, 但少数好氧菌如过氧化醋杆菌缺乏该酶。少数厌氧菌如谢氏丙酸杆菌中虽有过氧化氢酶存在, 在大多数厌氧菌中却无过氧化氢酶。该酶尚存在于绿色植物, 而且亦存在于动物的主要组织。后者中酶含量以肝与红细胞为最多, 脑、心与骨骼肌为最少。提纯过氧化氢酶既可采用菌藻, 也可采用肝或红细胞作为原料。从红细胞中提纯酶是先从溶血液中加入乙醇-氯仿混合液, 随后按 Agner 法分离出纯酶。

A 分子结构与理化性质

大多数来源不一的过氧化氢酶系分子量为 65 000 ~ 80 000 的亚基所组成。关于亚基数,许多学者的意见不一致,但用 SDS 处理法测出亚基数为 4。每个亚基均有一个 Fe(III)-原卟啉作为辅基,后者连接到酶活性部位。

结晶的牛肝与红细胞过氧化氢酶中氨基酸组成颇为类似(表 13-3)。根据 Schroeder 等的报道,用胰蛋白酶水解过氧化氢酶所得出的肽段数,表明酶的三个或四个亚基的氨基酸排列顺序相同。

表 13-3 过氧化氢酶的氨基酸残基组成(%总氨基酸残基)

氨基酸残基	牛肝				牛红细胞
	Raddakrishnan	Schnuchel	Schroeder	Deisseroth	Deisseroth
丙氨酸	6.80	6.18	7.14	7.26	7.65
精氨酸	5.12	5.89	6.03	6.25	5.68
天冬氨酸	12.10	11.04	13.60	12.82	12.48
半-胱氨酸	0.82	0.56	1.34	0.41	-
谷氨酸	8.14	8.52	-9.14	9.16	9.99
甘氨酸	6.56	5.60	7.19	6.59	7.22
组氨酸	3.40	6.41	4.13	4.14	3.28
异亮氨酸	2.63	3.78	3.65	3.28	3.99
亮氨酸	6.29	8.47	7.14	7.88	7.60
赖氨酸	4.74	8.70	5.38	5.92	5.91
甲硫氨酸	1.72	2.46	1.90	1.54	2.06
苯丙氨酸	5.25	5.95	6.12	6.73	5.63
脯氨酸	7.49	5.09	7.70	8.22	7.83
丝氨酸	4.48	3.83	4.50	4.43	4.88
苏氨酸	4.39	3.60	4.45	4.27	5.02
色氨酸	-	2.29	-	-	-
酪氨酸	3.57	4.86	3.99	4.49	3.75
缬氨酸	4.83	6.75	6.54	6.62	7.32

注:表中英文为论文作者

过氧化氢酶的沉降速度常数($S_{20,W}$)为 $(11.1 \sim 11.8) \times 10^{-13}$,扩散常数($D_{20,W}$)为 $(4.1 \sim 4.5) \times 10^{-37}$ 。分子量为 225 000 ~ 269 000(表 13-4),部分比容为 0.73 ~ 0.74。经计算颗粒半径为 0.052nm。这些结果可说明过氧化氢酶为略微水化的结构紧密的球蛋白。

表 13-4 过氧化氢酶的 $S_{20,W}$, $D_{20,W}$ 及分子量

不同来源的过氧化氢酶	$S_{20,W}$	$D_{20,W}$	分子量
牛肝			
Sumner 与 Gralen	11.2×10^{-13}	4.1×10^{-7}	248 000
Sumner 等	-	4.5×10^{-7}	225 000
Agner	11.2×10^{13}	4.3×10^{-7}	225 000
Samejima	11.2×10^{-13}	4.1×10^{-7}	248 000
Tanford 与 Lovr en	11.6×10^{-13}	-	260 000
马红细胞, Deutsch	11.8×10^{-13}	4.15×10^{-7}	269 000
猪红细胞, Nagahisa	11.1×10^{-13}	4.1×10^{-7}	243 000

过氧化氢酶中-SH基在维持酶的分子结构与结合辅基方面均起重要作用。Samejima 与 Yang 报道,经酸变性处理测出过氧化氢酶有 16 个-SH基。Abe 等认为,-S-S-基亦为维持酶的分子

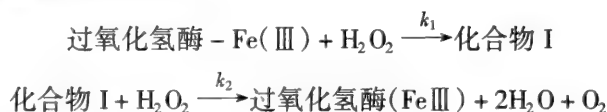
结构所必需。

Nakatani 指出,过氧化氢酶分子中 95 个组氨酸残基中有 10~19 个处于分子内部,可能参加酶蛋白的某些阴离子基团的盐键合;当外加实验条件如光氧化造成酶失活时,组氨酸残基亦相应破坏。

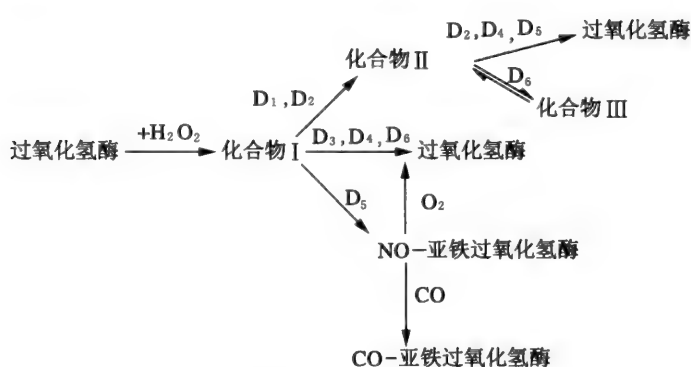
过氧化氢酶的浓溶液或 1:300 000 溶液在冰盒中能保持 1 个月,但更稀溶液即使在冷处放置并且避光保存,也会迅速丧失活性。在贮藏中,酶活性之所以丧失可能是由于酶分子离解为亚基,因为只有原酶才能保持酶活性。

过氧化氢酶可催化 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2 ,但其反应机理比较复杂。一般认为在催化过程中有化合物 I 的产生。所谓化合物 I 就是过氧化氢酶与 H_2O_2 结合的复合物。关于化合物 I 的构造至今还不清楚。原来的过氧化氢酶中辅基的 Fe 为三价,但与 H_2O_2 结合成化合物 I 后,则铁氧化成五价。由于血红素环中电荷非区域化,难于确定其确实的分子构造。

过氧化氢酶有特殊紫外与可见光吸收光谱,如在 404~406nm 处有明显的吸收峰,即所谓的 Soret 带。但他与 H_2O_2 形成化合物 I 后,吸收光谱有明显改变(图 7-1)。催化反应完毕后酶的吸收光谱可恢复原状。整个酶反应式简示如下:



过氧化氢酶也可催化 H_2O_2 氧化某些氢供体,如抗坏血酸、亚铁氰化物,苯酚、醇、甲酸、亚硝酸盐、叠氮化物、羟胺,其反应示意如下:



(D₁ = 抗坏血酸或亚铁氰化物, D₂ = 苯酚, D₃ = 醇或甲酸盐,
D₄ = 亚硝酸钠, D₅ = 叠氮化物或羟胺, D₆ = 过氧化氢)

化合物 I、II、III 的结构与理化性质都不相同,如其吸收光谱中最大吸收峰为:化合物 I, 670nm, 570nm, 535nm 与 405nm; 化合物 II, 568nm~575nm, 535nm 与 420nm; 化合物 III, 585nm~545nm 与 422nm。

B 测定方法

1) 测压法

在过氧化氢酶的催化下 H_2O_2 分解为 H_2O 与 O_2 , 根据产生 O_2 压的测定可以推算出过氧化氢酶活力。该法不常采用。但 Chance 与 Maehly 主张,测定细胞提取液或混浊样品中过氧化氢酶活力时宜采用测压法,特别是其他方法使结果受到干扰时更应采用。

2) 滴定法

其原理是用滴定法测定未被催化分解的过氧化氢,从而计算出催化分解的 H_2O_2 量,以此测出过氧化氢酶活性。测定 H_2O_2 可用常规碘滴定法,例如取 pH7.0 的 H_2O_2 -酶反应体系,在 0.5, 1.4,

7, 10min 吸取一定量反应液, 放入 3.5mol/LH₂SO₄ 溶液中使酶停止催化, 然后测定 H₂O₂ 按照

$$k = \frac{2.3}{\Delta t} \log \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{开始}}}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{终止}}}$$

$\Delta t =$ 时间 (min), 求出不同反应时间的 k 值。如果 k 值随时间递减, 可将 k 值为纵坐标, 时间为横坐标作图, 求出 $t = 0$ 时的 k 值。然后根据 k 值与酶单位 (u) 的关系 ($k = 6.93 \times 10^{-3} \text{ u}$), 计算酶活性。

3) 分光光度法

其原理与滴定法相同。在这方面的测定方法是比较多的, 其中最简便的是直接测定 240nm 的光吸收改变量, 但样品溶液中应无强烈吸收 240nm 的杂质。其计算方法与滴定法相类似, 所不同的是可用光吸收代替 H₂O₂ 浓度或测定数。

4) 酶活力计算公式的说明

$$(1) k = \frac{2.3}{\Delta t} \log \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{开始}}}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{终止}}}$$

此公式系来自酶的动力学。

$$v = k[\text{H}_2\text{O}_2]$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = k[\text{H}_2\text{O}_2], \int_{\text{开始}}^{\text{终止}} \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{[\text{H}_2\text{O}_2]} = \int_{t_0}^{t_1} k dt$$

$$\ln \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{开始}}}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{终止}}} = k \Delta t$$

$$2.3 \times \log \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{开始}}}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{终止}}} = k \Delta t$$

$$k = \frac{2.3}{\Delta t} \log \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{开始}}}{[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{终止}}}$$

(2) 如果 $[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{终止}} = \frac{1}{2} [\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{开始}}$, 则 Δt 为半反应期 (τ), 即

$$\tau = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k}$$

$$1 \text{ u} = \frac{100}{\tau_{\text{观察}}} = \frac{k_{\text{观察}}}{6.93 \times 10^{-3}}$$

C 主要生理作用

过氧化氢酶存在于红细胞及某些组织细胞内微体(即过氧化体)中。它的主要生理作用就是催化 H₂O₂ 分解为 H₂O 和 O₂, 使得 H₂O₂ 不致于与 O₂⁻ 在铁螯合物作用下反应生成非常有害的 ·OH。

(1) 在红细胞中过氧化氢可以氧化血红蛋白成为高铁血红蛋白, 但由于过氧化氢酶清除了 H₂O₂, 遂不发生这样的反应。

(2) 在微体中, 尿酸酶、D-氨基酸氧化酶、黄嘌呤氧化酶、 α -羟酸氧化酶的反应都可产生 H₂O₂。但可被过氧化氢酶及时清除。

(3) 除了红细胞与微体中产生的过氧化氢可被过氧化氢酶清除外, 细胞内其他细胞器如线粒体产生的 O₂⁻ 都可经过超氧化物歧化酶的催化转变为 H₂O₂ 与 O₂, 而 H₂O₂ 可以进入微体中, 被过氧化氢酶清除。必须指出的是, 线粒体中产生的少量 H₂O₂ 尚可被谷胱甘肽过氧化物酶清除。

13.3.3 谷胱甘肽过氧化物酶

谷胱甘肽过氧化物酶(简称 GSH-Px), 即谷胱甘肽:H₂O₂ 氧化还原酶(ECl.11.1.9), 于 1957 年被 Mills 从牛红细胞中发现。它是清除 H₂O₂ 与有机氢过氧化物的主要酶。

13.3.3.1 分子结构

从人与动物的组织或细胞中提纯的 GSH - Px, 分子量为 76 000 ~ 95 000, 平均约为 85 000。它是一种水溶性四聚体蛋白质, 四个亚基相同或极为类似。其硒含量为 3.5 ~ 4.24g 原子/mol, 表明每个亚基有一个原子硒(表 13-5)。

表 13-5 谷胱甘肽过氧化物酶的分子量、亚基分子量与硒含量

酶来源	分子量	亚基分子量	硒含量 (g 原子/mol)
牛红细胞	85 000		
	83 000	21 000	4.04
羊红细胞		22 000	3.8
大鼠肝	76 000	19 000	4.24
人红细胞	95 000	23 000	3.5
人胎盘	85 500	22 000	4.0

牛红细胞 GSH - Px 有 178 个氨基酸残基。虽然其排列顺序尚未最后确定, 但根据 X 射线对该酶晶体的分析结果, 可以推测氨基酸排列顺序(图 13-3), 如硒半胱氨酸处在第 35 位置。

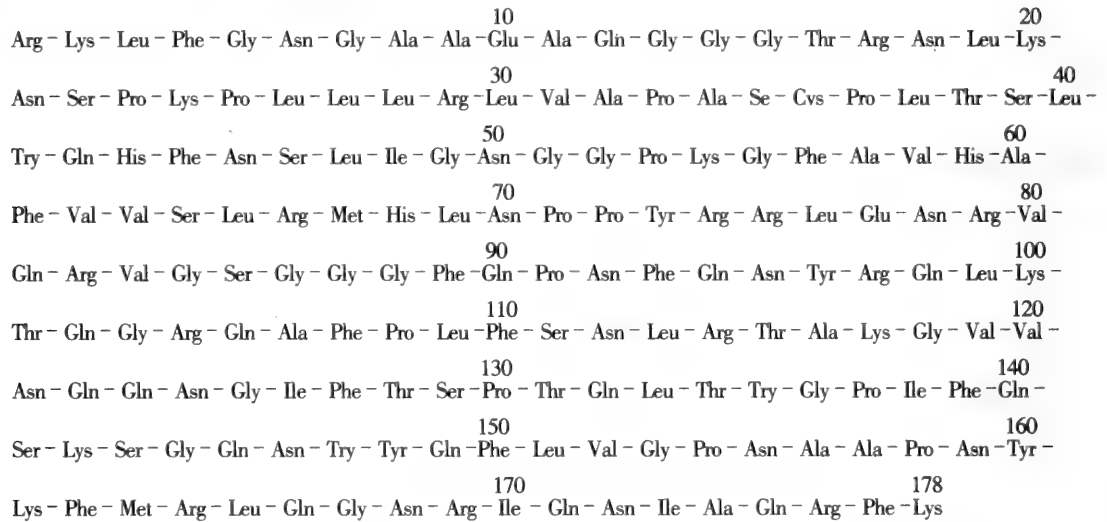


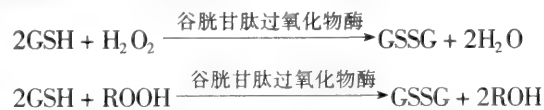
图 13-3 谷胱甘肽过氧化物酶的氨基酸排列顺序(据推测)

GSH - Px 的亚基结构见图 13-4。在其亚基结构中, 有 α_1 、 α_2 、 α_3 、 α_4 4 处 α 螺旋及 β_1 、 β_2 、 β_3 、 β_4 4 处 β 折叠, 后者有半数为顺向平行, 另半数为反向平行, 整个酶分子中, 4 个亚基处于 1 个平面。

4 个 Se 原子在 1 个分子中的彼此距离 ($\geq 20\text{\AA}$) 远超过二硒化物桥形成所需距离, 因此在酶的氧化反应中, 不会生成二硒化物桥。具有催化活性的硒半胱氨酸位于酶分子表面凹穴的活性部位, 易于接触有机氢过氧化物等底物。后者虽不溶于水, 但由于活性基团周围存在一些疏水性芳香环氨基酸残基, 形成脂溶性底物可进入的疏水性区域, 使底物与硒半胱氨酸反应, 从而使 GSH - Px 显示很高的反应性。

13.3.3.2 化学反应性

GSH - Px 可使 H_2O_2 转变为 H_2O 或使许多有机氢过氧化物 (ROOH) 还原为有机氢氧化物 (ROH), 但在催化反应中需要 GSH 作为氢供体, 其反应式如下:



除非有些有机氢过氧化物如胆固醇 - 25 - 氢过氧基受空间阻遏的影响不能被酶催化还原为 ROH 外, 几乎所有的有机氢过氧化物都可在 GSH - Px 的作用下还原为 ROH。

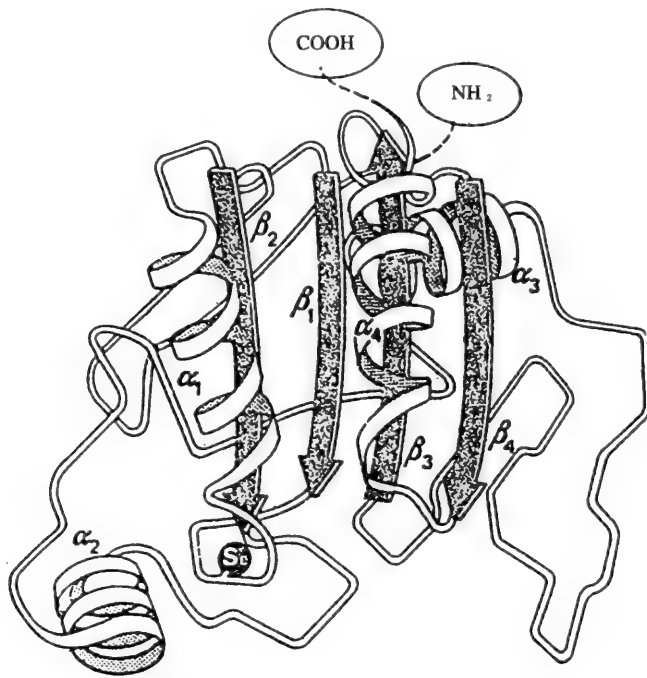


图 13-4 GSH-Px 的亚基结构示意图
($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4$... α 螺旋; $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$... β 折叠)

GSH-Px 虽然可催化许多 SH-基化合物氧化,但催化效率相对很低。在所有的 SH 基化合物中以 α -谷胱甘肽催化效率最高。如果以后者为 100%,则绝大多数 SH 基化合物仅被氧化 1% ~ 5%,甚至几乎无变化。

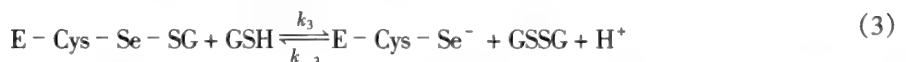
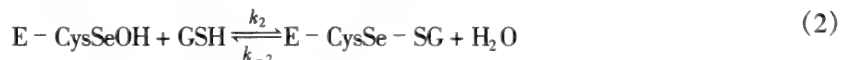
GSH-Px 愈纯,其性质愈不安定。纯酶置于冰箱中贮存,其酶活性会降低,如纯酶溶液的比活性为 274u/mg,经深度冰冻融化后,其比活性下降至 40u/mg。

GSH-Px 的最适 pH 为 8~9,如大鼠肺的 GSH-Px 的最适 pH 为 8.8~9.0,人红细胞的 GSH-Px 为 8.5。在 pH 值为 6 或 6 以下 GSH-Px 显不出活性。

氰化物与叠氮化物都不能抑制 GSH-Px 的活性。它的吸收光谱在 400~420nm 范围内不显示 Soret 带,因此该酶不是血红素过氧化物酶。

13.3.3.3 作用机理

在 GSH-Px 的催化反应中,其分子中硒半胱氨酸起到重要作用。



在反应(1)中 ROOH 可用 H_2O_2 代替,无论 ROOH 还是 H_2O_2 ,都可将 GSH-Px 中的硒醇离子氧化成为硒次磺酸衍生物($E - \text{CysSeOH}$),但后者是整个酶促反应的中间物,属于简单过渡态复合物,在反应(2)中 GSH 为供氢体底物,它与酶反应的中间物作用后产生酶 GSSG。这三种反应明显地表明,GSH-Px 的催化反应是一种循环过程,其中硒半胱氨酸发生的可逆性氧化还原反应确起到重要作用,详见图 13-5。

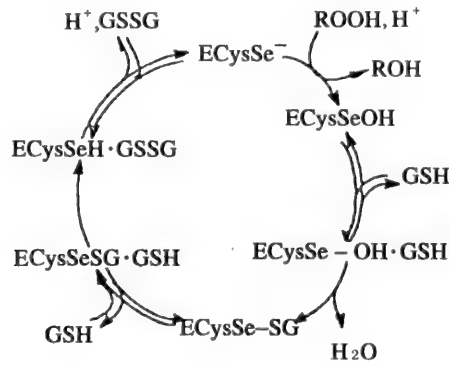


图 13-5 GSH-Px 的催化过程

必须指出的是,在循环过程中 GSH-Px 可恢复原来状态,但 GSH 却变成 GSSG。要使 GSSG 还原成 GSH,必须在 GSH 还原酶作用下由 NADPH 提供 H。在此反应中,NADPH 氧化成 NADP⁺。

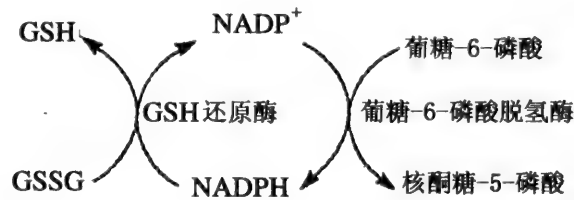
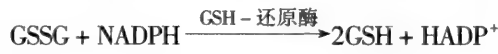
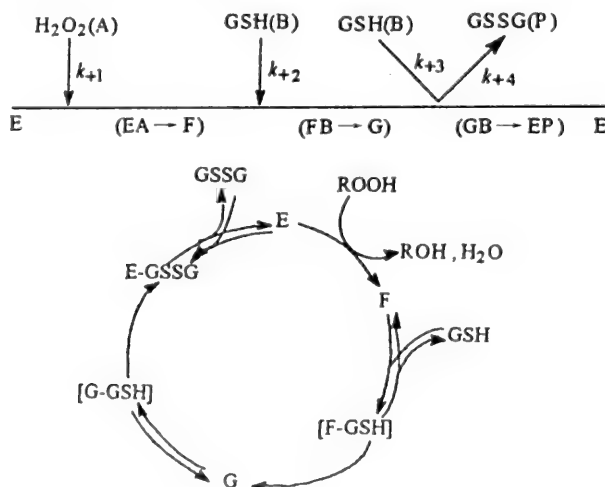


图 13-6 GSH-Px、GSH 还原酶与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的关系

NADP⁺ 在戊糖磷酸旁路中靠葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)的作用,将葡萄糖-6-磷酸转变为核酮糖与磷酸,同时 NADP⁺ 还原为 NADPH(图 13-6)。从这些机理中可以看出,酶促反应能否成为真正循环过程,不仅决定于 GSH-Px 酶促反应本身,而且还决定于其他酶促反应,甚至涉及一些有关的代谢途径。

13.3.3.4 动力学

根据 Flohe 等的研究,GSH-Px 的酶动力学符合 Cleland 的乒乓机理,如底物为 H₂O₂ 与 GSH(2 个分子),其酶促反应动力学的乒乓机理可示意如下:



如果忽略逆反应与酶-底物复合物的生成,酶的动力学可按以下公式计算:

$$\begin{aligned} -\frac{d[A]}{dt} &= k_{+1}[A][E] \\ \frac{d[E]}{dt} &= -k_{+1}[A][E] + k_{+3}[G][B] \\ \frac{d[F]}{dt} &= k_{+1}[A][E] - k_{+2}[F][B] \\ \frac{d[G]}{dt} &= k_{+2}[F][B] - k_{+3}[G][B] \end{aligned}$$

在稳定状态时, $\frac{d[A]}{dt} = v = [F_0] \left\{ \frac{1}{k_{+1}[A]} + \frac{1}{k_{+2}[B]} + \frac{1}{k_{+3}[B]} \right\}$

设 $\phi_1 = \frac{1}{k_{+1}}$, $\phi_2 = \frac{1}{k_{+2}} + \frac{1}{k_{+3}}$, 则

$$\frac{[B_0]}{v} = \frac{\phi_1}{[A]} + \frac{\phi_2}{[B]}$$

此式符合 Dalziel 乒乓机理的初速度方程式。以 $v/[E_0]$ 为横坐标,并以 $\frac{1}{A}$ 为纵坐标,当 $[B]$ 一定时两者应成直线关系。如果 $[B]$ 为另一值,则得出直线应与前次所得直线相平行。实验证明理论推导与实验结果是一致的。

由于 GSH-Px 的动力学符合乒乓机理,该酶与底物就显不出饱和特性。换句话说,其 V_{\max} 几乎是无限大,从而也无真实的 K_m 值。当氢过氧化物浓度相对极高时,表现 K_m 值与 GSH 浓度成直线相关。这些结果证明了在催化过程中酶和脂类过氧化物并未生成酶-底物复合物,间接支持了硒半胱氨酸被脂类过氧化物氧化而成为氧化型的酶。后者通过分子内反应转变为新中间物,从而与 GSH 高度专一地结合成酶-GSH 复合物,最后产生 GSH-Px 与 GSSG。

13.3.3.5 生物学作用

GSH-Px 的主要生物学作用是清除脂质氢过氧化物,并在过氧化氢酶含量很少或 H_2O_2 产量很低的组织中,可代替过氧化氢酶清除 H_2O_2 。此外,鉴于该酶尚可广泛地清除有机氢过氧化物,故有防止畸变,预防衰老及参与前列腺素合成等重要生理作用。现将其生物学作用简述如下:

A 清除脂质氢过氧化物

动力学研究证明, GSH-Px 清除脂质过氧化物的速率方程式符合 $v = \frac{d[LOOH]}{dt} = k_{+1}[LOOH][E]$ 。事实上,在体外实验中所采用的 LOOH 浓度常为 1mmol/L 以上,一般都达到反应速率饱和程度,故实际上清除 LOOH 的速率与 LOOH 的种类和浓度无关,而与 GSH 浓度却成正相关。体内实验和体外实验的结果是不同的,如体内实验所产生的 LOOH 浓度常在 $1\mu\text{mol/L}$ 以下,根据结果推知,清除 LOOH 速率必与 LOOH 种类和浓度有关,而且由于 GSH 可以通过催化循环过程中再生,在正常生理情况下, GSH-Px 清除脂质过氧化物的速率却与 GSH 浓度无关。很明显,无论体内实验或体外实验,清除脂质过氧化物的速率均决定于 GSH-Px 的浓度。

B 清除 H_2O_2

脑与精子几乎不含有过氧化氢酶,而含有较多的 GSH-Px,因此尽管在代谢反应中产生 H_2O_2 ,仍可被 GSH-Px 清除。即使含有过氧化氢酶较多的组织,亦需 GSH-Px 清除 H_2O_2 ,因为在细胞中过氧化氢酶多存在于过氧化体,而在胞浆与线粒体基质腔中却很少,它们含有较多的 GSH-Px,故不会受到 H_2O_2 的危害。有些病人缺乏产生过氧化氢酶的基因,但 GSH-Px 可清除 H_2O_2 ,故 H_2O_2 损伤组织不明显。

C 减轻有机氢过氧化物对机体的损伤

在病理生理情况下,活性氧可能诱发脂质过氧化,除了直接造成生物膜损伤外,还可能通过脂

质氢过氧化物与蛋白质(包括酶)或核酸的反应,使机体组织发生广泛性损伤,但是只要 GSH - Px 清除脂质氢过氧化物能力不受到影响,脂质氢过氧化物对机体的损伤就可得到减轻。

除了脂质氢过氧化物外,尚可能出现其他有机氢过氧化物,如核酸氢过氧化物,胸腺嘧啶氢过氧化物。后两者属于致突剂。GSH - Px 既有清除有机氢过氧化物的作用,当然会降低致突发生率。

细胞老化可能与脂质过氧化有关,尽管脂质过氧化仅是细胞老化原因之一,但预防脂质过氧化常可延缓细胞老化。GSH - Px 无疑地在预防衰老方面起到重要作用。

必须指出的是,GSH 还原酶与 G - 6 - PD 脱氢酶亦起到协同作用。如果这两种酶之一受到损害或生物合成受到抑制,则 GSH - Px 的生物学作用也相应受到影响。

D 参与或调节前列腺素的生物合成

虽然花生四烯酸合成前列腺素系通过生物级联过程,然而前者尚可转变为其他生物物质,如产物 12-羟基廿碳四烯酸(HETE)表现趋化活性,涉及发炎反应。在环氧酶与脂氧合酶作用下,花生四烯酸尚可氧化成某些氢过氧化物。这些氢过氧化物显著地干扰前列腺素的生物合成,但在 GSP - Px 作用下,可转变为无活性物质或进入级联过程,故 GSH - Px 对前列腺素生物合成尚可起到调节作用,见图 13-7。

虽然一般认为 GSH - Px 参与前列腺素的生物合成,但对其作用部位与机理尚未搞清楚,目前仅可表示在前列腺素生物合成的过程中直接与 GSH - PX 有关的反应为前列腺素 G 转变为前列腺素 H 以及前列腺素 E, 15-氢过氧化物转变为前列腺素 E₂。有的学者认为在前列腺素的生物合成中 GSH - Px 的作用就是将过氧化中间物调节到正确变化途径,以防止有害或无用副产物的产生。

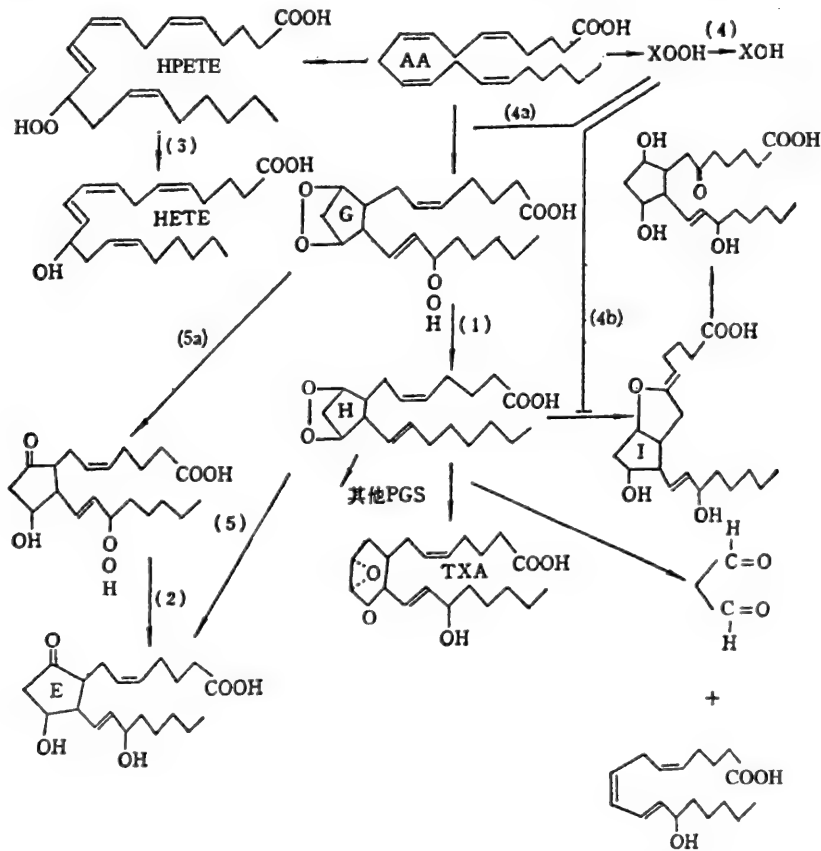


图 13-7 花生四烯酸级联过程中 GSH - Px 作用部位推测

AA: 花生四烯酸;HPETE: 12-hydroperoxyei-cosatetraenoic acid;HETE: 12-hydroxyei-cosatetraenoic acid;G: 前列腺素 G₂;E: 前列腺素 E₂;I: 环前列腺素;TXA: thromboxane A₂;H: 前列腺素 H₂;(1),(2),(3),(4),(4a),(4b),(5),(5a)表示 GSH - Px 作用地位

13.3.4 谷胱甘肽转硫酶

谷胱甘肽转硫酶(EC2.5.1.18)又名不含硒的谷胱甘肽过氧化物酶(Non-Se-GSH-Px)。它是一种多功能的酶,仅用转硫或清除有机氢过氧化物均不能概括它的功能。

A 分子结构

Non-Se-GSH-Px 是分子量为 40 000~50 000 的二聚体蛋白质。随着亚基的不同组合而有多种同工酶,如大鼠肝胞浆 Non-Se-GSH-Px 为 Y_a, Y_b 与 Y_c 三种不同亚基组合成的 $Y_a Y_a, Y_c Y_c, Y_a Y_c$ 与 $Y_b Y_b$ 等同工酶,其亚基分子量为 22 500~25 000;大鼠肝微粒体 Non-Se-GSH-Px 的分子量常不一致。Partridge 等发现大鼠肝 Non-Se-GSH-Px 有 I, II, III, IV, V, VI 等 6 种同工酶。它们是由分子量为 20 000, 23 500 与 25 000 的 3 种亚基(相当于 Y_a, Y_b 与 Y_c)组成的二聚体。

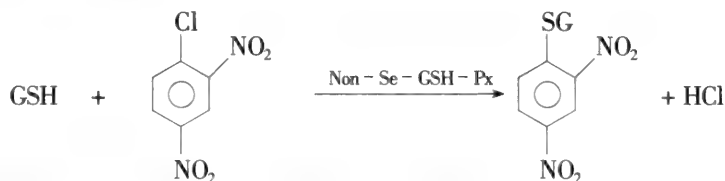
其氨基酸组成(表 13-6)表明酶分子中无色氨基酸残基。由于 Non-Se-GSH-Px 的同工酶等电点不同,不同来源的酶分子中氨基酸组成可能有差异。

表 13-6 Non-Se-GSH-Px 的氨基酸组成

氨基酸残基	残基数 亚基	氨基酸残基	残基数 亚基
天冬氨酸	11	甲硫氨酸	4
苏氨酸	7	异亮氨酸	6
丝氨酸	7	亮氨酸	18
谷氨酸	8	酪氨酸	6
脯氨酸	5	苯丙氨酸	9
甘氨酸	9	组氨酸	2
丙氨酸	12	赖氨酸	6
$\frac{1}{2}$ 胱氨酸	1	色氨酸	0
缬氨酸	7	精氨酸	9

B 化学反应性

在 Non-Se-GSH-Px 的作用下,GSH 可与许多亲电药物结合,如 GSH 与 1-氯-2,4-二硝基苯结合成为 1-巯基-2,4-二硝基苯与 HCl



该酶还可清除脂质氢过氧化物,但不能催化 H_2O_2 分解。



从微粒体提纯的 Non-Se-GSH-Px 为低活性酶,但经 N-乙基顺丁烯二酰亚胺处理后,活性可大为增加。除了 N-乙基-顺丁烯二酰亚胺可作为 Non-Se-GSH-Px 的活化剂外,还有一些 SH 基试剂如乙酰乙酰胺、2',2-二硫代吡啶基、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)也可使该酶活化。

C 生物学作用

Non-Se-GSH-Px 既然可以和许多亲电性药物结合,则可发挥其解毒作用,另外它还有减轻脂质过氧化作用,虽然与解毒作用相比可能不是主要的,但与 Se-GSH-Px 协同作用则值得重视。在肾上腺、肝脏、肾、脑中 Non-Se-GSH-Px 几乎占有所有 GSH-Px 的 25%~35%。在睾丸中约占 90%,因此在某些组织中 Non-Se-GSH-Px 对减轻脂类过氧化可能起相当大的作用,见表 13-7。

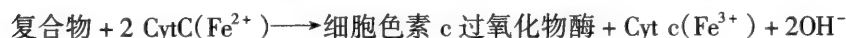
表 13-7 大鼠组织中 Non-Se-GSH-Px 含量

组 织	Non-Se-GSH-Px (nmol/L·NADPH 氧化/min·mg 蛋白质)	Non-Se-GSH-Px
		总 GSH-Px
肾上腺	168 ± 6	38
脾	0	0
肝	143 ± 11	35
心	0	0
肺	0	0
肾	66 ± 11	31
脑	12 ± 2	26
睾丸	62 ± 5	91

13.3.5 其他过氧化物酶

13.3.5.1 细胞色素 c 过氧化物酶

某些细菌以及酵母线粒体的内膜与外膜间,存在血红素为辅基的细胞色素 c 过氧化物酶。该酶与 H_2O_2 可生成复合物。后者可使还原型细胞素 c 转变为氧化型。



已知细胞色素 c 过氧化物酶的最大吸收峰为 407nm 及该酶与 H_2O_2 的复合物最大吸收峰为 419nm,故测定复合物的光吸收就可高度准确而又灵敏地确定 H_2O_2 产生的反应率。这种方法已应用于原生动物及实验室中分离线粒体与过氧化体的研究。

13.3.5.2 NADH 过氧化物酶与氧化酶

某些细菌如干酪乳杆菌、粪链球菌含有 NADH 过氧化物酶,后者能利用 H_2O_2 氧化 NADH 成为 NAD^+ 。产气荚膜梭菌是一种厌氧菌。其耐氧变种亦含有 NADH 过氧化物酶。

NADH 氧化酶的作用与 NADH 过氧化物酶虽都可使 NADH 氧化为 NAD^+ ,但 NAD 氧化酶尚能同时使 O_2 还原为水,而 NADH 过氧化物酶却只能利用 H_2O_2 作为氧化剂,使 NADH 氧化为 NAD^+ 。



在氧的存在下某些耐氧的厌氧菌有合成 NADH 氧化酶的能力,从而可在有限氧气中生存,但实际上尚显示生长受到抑制的效应。这是因为 NADH 来自糖酵解等代谢途径,本应参与生长有关的生化反应,而由于进入 NADH 氧化酶或过氧化物酶的反应,遂使生物受到抑制,但这种抑制效应的出现可使细菌不致于 O_2 中毒而死亡。

13.3.5.3 “非专一性”过氧化物酶

在植物与细菌中存在以血红素为辅基(图 13-8)的过氧化物酶,其底物多无专一性。人工合成的底物如愈创木脂醇、联苯胺与邻联二茴香胺,在 H_2O_2 的存在下,经“非专一性”过氧化物酶的作用可转变为有色物质。在生物体内,该酶的底物尚未查明。在少数动物系统中也有这种酶,例如牛乳与唾液中存在乳过氧化物酶。

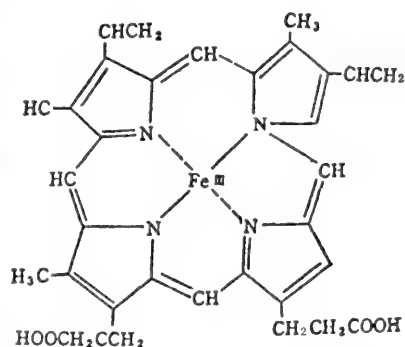
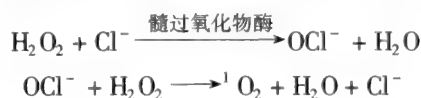


图 13-8 辅基血红素(高铁原血卟啉)

除了乳过氧化物酶外,还有以下的“非专一性”过氧化物酶。

a 髓过氧化物酶

该酶存在于吞噬细胞。它可催化 H_2O_2 与 Cl^- 反应为 OCl^- 与 H_2O



b 甲状腺过氧化物酶

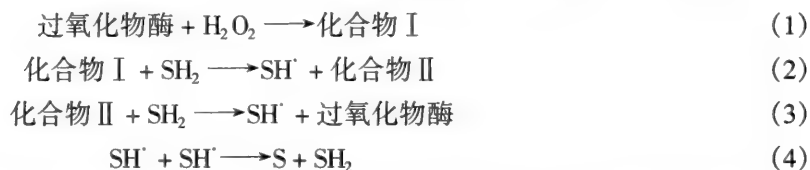
该酶存在于甲状腺。由于它可催化 I^- 为 I_2 ,使后者可连接到甲状腺素分子上,它与甲状腺素的生物合成有密切联系。

c 子宫过氧化物酶

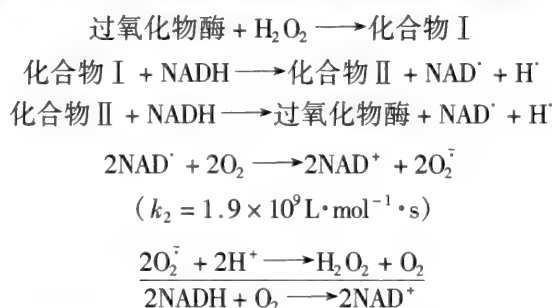
已知该酶含量可随雌激素的注射量增加而增加,但对该酶的功能至今尚不清楚。

虽然在动物的某些组织中存在“非专一性”过氧化物酶,但这类酶并未广泛存在于动物组织。

在生物学研究中常用的过氧化物酶为辣根过氧化物酶。该酶有数种不同形式,但都含有结合型糖类。该酶对底物专一性的要求不高,如愈创木脂醇、邻苯三酚、NADH、巯基化合物、苯酚、吲哚乙酸等底物都可在辣根过氧化物酶催化下被氧化。如以 SH_2 代表底物,则酶反应式如下所示:



在反应(1)中, H_2O_2 从辣根过氧化物酶分子取走两个电子,其中一个电子来自酶的辅基中 Fe(III),另一个电子的取走可能造成酶蛋白具有额外的氧化能力。所生成的化合物 I 与底物(SH_2)反应生成 SH^\cdot 自由基与化合物 II,然后化合物 II 与另一 SH_2 反应生成 SH^\cdot 自由基与过氧化物酶。这表明催化反应(1)中生成的化合物 I 需要通过反应(2)与(3)的单电子接受反应才能恢复原来的酶。其中间物为化合物 II,另一中间物为 SH^\cdot 。两个 SH^\cdot 可化合成为 S 及 SH_2 。反应(4)为歧化反应。因为 SH^\cdot 有时可使 O_2 还原为 O_2^- 而 O_2^- 歧化反应产物之一为 H_2O_2 。由此可见,仅需少量 H_2O_2 就可起动反应。现以 NADH 为例,以说明辣根过氧化物酶的催化反应机理。



这种反应反映出过氧化物酶尚具有氧化酶的效能,因为在正常反应中只需要供给 H_2O_2 与 SH^\cdot 就可以发生反应,但有些 SH^\cdot 自由基如 NAD^\cdot 可类似氧化酶,能将 O_2 直接还原为 O_2^- ,最后通过歧化反应将 O_2^- 转变为 H_2O_2 与 O_2 。

在植物细胞中苯丙氨酸衍生的酚类聚化而成木质,但聚化过程中靠连接在细胞壁上的过氧化物酶,先使这些酚类氧化成为酚氧自由基,然后自由基中间物才聚化。在氧化反应中所需的 H_2O_2 是结合在细胞壁上的苹果酸脱氢酶产生的 NADH 在过氧化物酶作用下的氧化产物。此外,植物过氧化物酶尚作用于植物激素吲哚乙酸的降解,从而参与植物生长的调节。

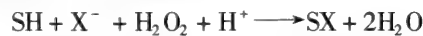
除了上述实例外,要在整体实验中鉴别植物与细菌的非专一性过氧化物酶的底物以及评价清除 H_2O_2 的意义都嫌不易。许多植物根茎部组织所出现的超弱化学发光可能来自过氧化物酶的催

化反应。例如吡啉乙酸降解产生的激发态吡啉乙酸可生成 dioxetane 中间物,然后分解成激发态羰基化合物。当后者转变为基态时就发出光,或者激发 O_2 成为 1O_2 。

在实验室中辣根过氧化物酶可用于检测 H_2O_2 的产生。其反应底物为 7-羟-6-甲氧香豆素。后者可在 360nm 光波激发下发出 450nm 的荧光;但经辣根过氧化物酶作用后,荧光强度随着 H_2O_2 产生量而相应减少,故根据荧光丧失量可推算出 H_2O_2 产生量,但其他底物亦可与 7-羟基-6-甲氧香豆素竞争,从而造成 H_2O_2 的测定结果偏低。此法不适合于叶绿体中的 H_2O_2 产量测定,因为叶绿体含有大量抗坏血酸,而后者恰好可被过氧化物酶氧化。

13.3.5.4 氯过氧化物酶与溴过氧化物酶

从烟黑霉属 (*Caldariomyces fumago*) 中分离出的氯过氧化物酶,在 H_2O_2 与卤族离子如 Cl^- , Br^- 或 I^- 存在下,它可催化卤族原子进入许多底物分子。



底物 卤族离子

但是存在于海产生物中的溴过氧化物酶,只能催化 Br^- 与底物在 H_2O_2 的作用下反应成为溴化合物。

13.3.5.5 抗坏血酸过氧化物酶

从眼虫属中可纯化出抗坏血酸过氧化物酶。它可催化抗坏血酸与 H_2O_2 反应生成脱氢抗坏血酸与 H_2O ,此反应可被 CN^- 与 N_3^- 抑制。植物中常含有较高量的抗坏血酸,可能与清除 H_2O_2 有关。

13.3.6 过氧化氢酶与谷胱甘肽过氧化物酶的协同作用

动物体内各种组织细胞清除活性氧的方式不一定完全相同,如清除 H_2O_2 虽主要靠过氧化氢酶,但少量 H_2O_2 也可被谷胱甘肽过氧化物酶催化分解。在脑与精虫中几乎不含有过氧化氢酶,但由于含有较多的谷胱甘肽过氧化物酶, H_2O_2 仍可及时被清除。在有些动物组织例如肝脏中,这两种酶在细胞内的分布是不一样的。过氧化氢酶存在于过氧化体,而谷胱甘肽存在于胞浆与线粒体的基质,但对于清除整个细胞的 H_2O_2 ,这两种酶显示很好的协同作用。

在过氧化体中羟基乙酸氧化酶与尿酸氧化酶等催化反应产生的 H_2O_2 可及时被过氧化氢酶清除。在线粒体中 H_2O_2 主要来自 SOD 催化 O_2^- 歧化反应,其大部分可被谷胱甘肽过氧化物酶催化分解,剩余 H_2O_2 可透过线粒体膜进入胞浆,继续被胞浆中酶催化清除,然后可渗入到过氧化体,在过氧化氢酶下分解为 H_2O 与 O_2 ,详见图 13-9。

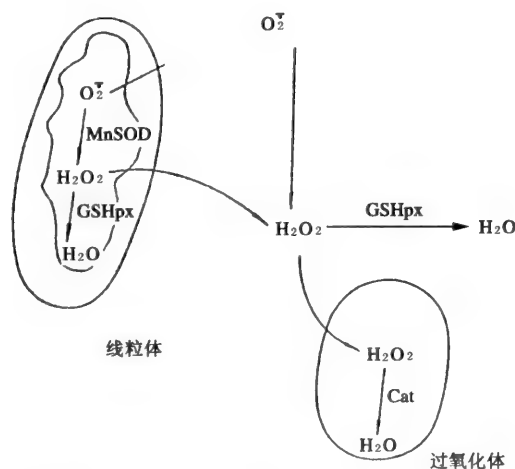


图 13-9 线粒体与过氧化体中 H_2O_2 的清除(GSH-Px, 谷胱甘肽过氧化物酶; Cat, 过氧化氢酶)

在红细胞中虽有过氧化氢酶,但清除低量 H_2O_2 的效能不及谷胱甘肽过氧化物酶。红细胞经常

产生的低量 H_2O_2 实际上被谷胱甘肽过氧化物酶催化分解。有些病人患先天性过氧化氢酶缺乏症,但并不影响生命,主要是由于 H_2O_2 可被谷胱甘肽过氧化物酶清除,另外还靠抗氧化体系的作用。如果在特殊情况下 H_2O_2 产量增高超过体内清除 H_2O_2 的能力,则先天性过氧化物酶缺乏症病人可能发生严重的临床症状。

参 考 文 献

- 1 方允中,李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989
- 2 Pryor W A. Free radical in Biology, Vol.1. New York: Academic Press Inc, 1976
- 3 孙存普,张建中,段绍瑾主编. 自由基生物学导论. 合肥:中国科技大学出版社, 1999, 46 ~ 90
- 4 赵保路等. 氧自由基和天然抗氧化剂. 北京: 科技出版社, 1999, 199 ~ 263
- 5 Beek Y, Oren B ed. Nucleic Acid Res, 1987, 15(21): 9076
- 6 Tainer J A ed. Nature, 1983, 306: 284 ~ 287
- 7 袁勤生. 我国 SOD 研究热点和问题. 中国医药工业杂志, 1994, 25(5): 227
- 8 施惠娟,袁勤生等. hSOD cDNA 的克隆、测定及表达. 生物化学与生物物理学报, 1999. 31(1): 16 ~ 18
- 9 刘卫华,罗贵民,丁兰等. 兼具 SOD 和 GPX 活性的双功能酶的制备及性质研究. 生物化学杂志, 1995. 11: 673 ~ 677

14 参与细胞跨膜信号转导的酶

细胞信号转导是细胞赖以生存的基本特性和能力。单细胞生物在受到各种外界物理或化学信号作用时,需要作出相应的反应以利于生存;多细胞生物的存活更有赖于细胞间的信号交流与协调。外界信号首先刺激细胞质膜,再通过跨膜的信号转导系统使细胞产生各种反应。细胞的信号转导包括信号分子的接受、信号的放大和效应的产生三个过程。大多数化学信号分子(第一信使)都通过与质膜上专一性受体的结合而得以识别。受体能区分不同的外界刺激,并激活位于胞膜或胞内的特定信号分子,产生第二信使,后者通过细胞内的一系列信号分子组成的级联反应,可使信号分子的作用逐级放大,使胞外信号分子微量的变化就可以引起明显的生物效应。最后作用于其靶分子,产生基因表达、酶活力、蛋白活性和膜通透性等方面的改变,从而产生各种生理或病理效应。有的化学物质如甾体激素、维生素 A, D, 和一些其他的脂溶性化合物可透过细胞膜而直接进入胞浆,与胞浆受体结合后进入细胞核;也有些化合物如甲状腺素和维甲酸受体主要在细胞核内,结合配体后即可直接调节基因的活化。与胞浆或胞核受体有关的内容因不属于信号的跨膜转导,这些受体一般都不是酶,故不在本章讨论。

绝大部分参与细胞跨膜信号转导系统的信号分子都是酶,如核苷酸环化酶、磷脂酶和蛋白激酶等。有些参与信号转导的蛋白质,即使没有以“酶”来命名,实际上也是有催化活力的酶,如胰岛素和生长因子受体是一类受体型酪氨酸蛋白激酶,如 G 蛋白具有 GTP 水解酶的活力,而参与生长因子信号转导的 Raf, MEK 和 ERK 等信号分子都是蛋白激酶。这些酶都有一个共同的特点,即含有一个和上游分子结合而受上游分子调节的结构域或模体,以及一个使下游分子发生水解、磷酸化或其他变化的催化域。细胞跨膜信号转导是酶的细胞生物学中的重要内容,也是当今细胞生物学和分子生物学的共同前沿。本章主要介绍组成细胞跨膜信号转导系统的几类酶,它们有些直接参与信号级联反应(信号流)的逐级放大,如一些蛋白激酶,也有些和产生外界信号的第二信使有关,如一些核苷酸环化酶和磷脂酶。

14.1 参与细胞跨膜信号转导的受体

受体是细胞的一种生物大分子,它能专一性地识别细胞外界的化学信号分子,根据其存在位置的不同,主要分两种,位于细胞膜上的称为膜受体,位于细胞质、核质等胞内亚细胞器的称为胞内受体。

膜受体一般有三个结构域,即胞外域(也即配体结合域)、跨膜域和胞内域。根据其不同的结构和功能,膜受体可分成四类,这里只作一简单介绍。

14.1.1 G 蛋白偶联受体

大多数这类受体有一个共同的结构特征,即都有由 α 螺旋形成的七次跨膜结构。这类受体嵌入膜内,在膜内侧有 G 蛋白识别序列,活化受体可以与 G 蛋白偶联。当配体与受体结合后,通过 G 蛋白与一些效应酶偶联,如:腺苷酸环化酶、磷脂酶 C 和磷脂酰肌醇-3-激酶等,产生第二信使,或

者激活的受体通过 G 蛋白直接调控离子通道,如蕈毒、碱受体、某些肾上腺素能受体等。

14.1.2 酪氨酸蛋白激酶相关受体

这类受体有三种形式。

(1) 受体的胞内结构域本身有酪氨酸蛋白激酶(TPK)活性。结合配体后,受体的胞内域可以发生自身磷酸化,从而召集胞浆中的多种酶到自身磷酸化的部位,使它们接受底物和产生第二信使,或直接启动蛋白激酶级联系统。大多数生长因子的受体属于这一类,它们的 TPK 结构域称为受体型 TPK。

(2) 受体本身没有 TPK 活性,但是直接和胞液中非受体型 TPK 偶联,胞外配体的结合导致受体的聚合,从而与胞液中的 TPK 作用,并激活其活性。很多细胞因子如红细胞生成素(EPO)和干扰素(INF)的受体属于这种类型。

(3) 受体肽链(或一个亚基)无 TPK 活性,也不直接和胞液中的非受体型 TPK 偶联,而是和另一肽链(或另一亚基)形成异二聚体受体,通过另一肽链再和胞液中的非受体型 TPK 互相作用而转导配体的信息。如白细胞介素 6(IL-6)受体肽链与 gp130 肽链形成杂二聚体,而 gp130 再和胞液中的一种非受体型 TPK 偶联,这种起信息转导作用的肽链往往是几种同类受体的共用链,且不止 gp130 一种。受体不同肽链(亚基)聚合时可使结合在肽链上的蛋白激酶互相靠扰,并相互发生酪氨酸磷酸化,再将信号传递至下一信号分子。不少白介素(如 IL-2)的信号通过的 JAK-STAT 通路就是这样转导的。

14.1.3 其他有酶活力的受体

根据酶性质的不同,主要可分成三种亚类。

(1) 受体的胞内域有鸟苷酸环化酶活力,如心房利钠肽(心钠素)受体。

(2) 受体的胞内域有丝/苏氨酸蛋白激酶活力,如转化生长因子- β (TGF- β)受体。

(3) 受体的胞内域有蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)活性,如白细胞的 CD45。

14.1.4 尚未确定有酶活力的受体——离子通道受体

这类受体由多个蛋白质亚基聚合组成一个膜孔,即离子通道。当受体与配体结合时,导致受体构象的变化,使离子通道开放,允许离子跨膜流动,形成膜电位的变化,称为配体门控通道(ligand-gated channel),如乙酰胆碱的蕈毒碱受体。当细胞膜电位发生改变时,有些离子通道也可以开放,这种离子通道,称电压门控通道(Voltage-gated channel)。

14.2 G 蛋白家族

G 蛋白,即鸟苷三磷酸结合蛋白(guanosine triphosphate binding protein),是一类蛋白质家族,包含大量结构和功能极为相似的成员,在细胞信号转导过程中起着偶联膜受体和效应器的中介作用。它与 GTP 结合状态为活化状态,与 GDP 结合状态为非活性状态。由于其大小和结构不同,通常分成两大类:一是异三聚体 G 蛋白,简称 G 蛋白,由 α 、 β 及 γ 三类亚基组成;另一类是单链小分子 G 蛋白,通常称为小 G 蛋白。

14.2.1 异三聚体 G 蛋白

14.2.1.1 异三聚体 G 蛋白的分类

异三聚体 G 蛋白的 α 、 β 、 γ 三类亚基,分别又有多种形式。目前发现的 α 亚基有 20 余种,分子量约 $(39 \sim 46) \times 10^3$, β 亚基有 6 种,分子量约 37×10^3 , γ 亚基则有 12 种,分子量约 8×10^3 。因此,由它们组成的 α 、 β 、 γ 三聚体 G 蛋白可有上千种,这些数量众多的 G 蛋白可归纳为四大类。

① G_s 。能活化腺苷酸环化酶(AC)。

② G_q 系列。包括 G_q, G_{11}, G_{14} 和 G_{16} , 能活化磷脂酰肌醇专一性磷脂酶 $C\beta(PI-PLC\beta)$ 。

③ G_i, G_o 和 G_t 系列。 G_i 能抑制 AC、电压门控 Ca^{2+} 通道和 $PI-PLC$, 活化 K^+ 离子通道和 Na^+ 通道等, G_o 能抑制神经元 Ca^{2+} 通道, G_t 能活化 cGMP 磷酸二酯酶。这些 G 蛋白常能产生 G_s 或 G_q 相反的生物学效应, 故将它们合并成一类。

④ G_{12} 和 G_{13} 系列。功能还不清楚, 可能与活化小 G 蛋白 Rho, JNK(c-Jun N-末端激酶)、 Na^+/K^+ 交换系统和活化立早基因转录等有关。

14.2.1.2 异三聚体 G 蛋白的结构

A α 亚基

G_α 在合成后加工过程中, 其 N 端的甘氨酸和豆蔻酸(十四烷酸)以共价链连接, 并以此插入质膜的脂双层中。 G_α 有二个结构域: GTP 结合域和催化域。GTP 结合域是独特的螺旋结构域, 它把 GTP 包埋在整个蛋白质的中心。催化域有 GTP 水解酶(GTPase)活性, 与其他 GTP 酶超家族成员, 如小 G 蛋白和蛋白质合成中的延长因子等有相似的结构。

B β, γ 亚基

β 亚基有 7 个 β 片层结构, 其中一个组氨酸可以被磷酸化, 并且磷酸基团通常来自 GTP 而不是 ATP, 其功能还不清楚。 γ 亚基有一个 N 端无规则卷曲, 其中半胱氨酸可以发生法呢基化(farnesylation), 锚定在膜内侧。 β 亚基与 γ 亚基紧密结合形成一个功能单位, 只有在变性时才能分开。

14.2.1.3 作用模式、活化机制和功能

A 作用模式

由于 G 蛋白三类亚基都有很多种亚型, 使得 G 蛋白有很大的多样性, 有利于与多种受体和多种效应分子起作用, 形成复杂的信号通路。受体、G 蛋白及效应分子相互作用时可有不同的模式(图 14-1)。

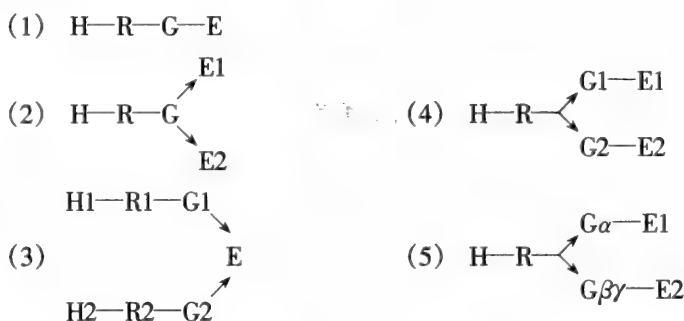


图 14-1 受体-G 蛋白-效应分子的作用模式

H—信号分子; R—G 蛋白偶联受体; G—G 蛋白;

α, β, γ —G 蛋白的亚基; E—效应分子

(1) 一个配体-受体复合物(H-R)和一个 G 蛋白作用, 再和下游的一个效应分子作用;

(2) 一个 H-R 和一个 G 作用, 再和两个 E 作用;

(3) 两个 H-R 和两个 G, 再和一个 E 作用;

(4) 一个 H-R 和两个 G, 再分别和两个 E 作用;

(5) 一个 H-R 分别和 G 蛋白中的 G_α 和 $G_{\beta\gamma}$ 作用, 后两者再分别和两个 E 作用

B G_α 的活化与功能

在基础状态时, G 蛋白的 α, β, γ 三个亚基以异三聚体形式存在, 并有 GDP 结合于 α 亚基, 呈非活化状态。当有七次跨膜结构的 G 蛋白偶联受体与配体结合后, 导致受体 α 螺旋的变构, 影响了胞内域的构象变化, 暴露出 G 蛋白的结合位点。G 蛋白与活化受体结合后, 也发生构象改变, 使 α 和 $\beta\gamma$ 亚基互相分离, α 亚基释放 GDP 而结合 GTP, 从而激活 G 蛋白。由于 G 蛋白构象的改变, 使其与配体-受体复合物分离。G 蛋白的 α 亚基再与效应分子(腺苷酸环化酶、PI-PLC 等)结合, 使

效应分子激活。 α 亚基发挥 GTP 酶的作用,使 GTP 水解成 GDP 和 P_i ,变成非活化状态,从而与 $\beta\gamma$ 亚基重新结合。

活化的 G_α 可以调节很多效应酶,如: $G_s\alpha$ 可激活腺苷酸环化酶; $G_i\alpha$ 则抑制腺苷酸环化酶; $G_q\alpha$ 活化光受体 cGMP 磷酸二酯酶; $G_q\alpha$ 活化 PI-PLC β 等。一些 G_α 亚基还能调节 Na^+/H^+ 交换等。

GTP/GDP 的转化是 G 蛋白活性调节的关键。因此,体外研究时常用一些抗水解的 GTP 类似物,如 GTP 中 γ 磷酸基团连接的氧键换成硫键的 GTP γ [S]等,可使 G 蛋白持续激活。一些细菌毒素能作用于 G 蛋白,如霍乱毒素 (CTX) 和百日咳毒素 (PTX),是一类引起 ADP-核糖基化 (ADP ribosylation) 作用的酶, G_α 亚基是这种酶的适宜底物。霍乱毒素可以使 $G_s\alpha$ 发生 ADP-核糖基化,从而抑制其 GTP 酶的活性,延长 GTP 的作用,使 G_s 蛋白持续活化。百日咳毒素则可以使 G_i, G_o, G_t 的 α 亚基发生 ADP-核糖基化,从而抑制 GTP 与 α 亚基的结合,使 G_i, G_o 和 G_t 处于无活性状态。但 G_q 系列的 α 亚基对百日咳毒素不敏感。

C $G\beta\gamma$ 的活化及功能

近年的研究表明, $\beta\gamma$ 亚基不只是起到辅助和调节 α 亚基使 G_α 亚基与膜的结合更为牢固的功能,也能与效应酶作用,如能直接调节 PI-PLC 的 β_1, β_2 和 β_3 亚型,和腺苷酸环化酶;直接或间接活化离子通道:活化磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI-3K)、丝裂源激发的蛋白激酶 (MAPK) 等,以及与 Rho, Rac, Arf 等小分子 G 蛋白发生作用。

14.2.2 小分子 G 蛋白

小分子 G 蛋白为单链结构,分子量一般为 $(20 \sim 30) \times 10^3$,与异三聚体 G 蛋白一样具有 GTP 结合活化,GDP 结合失活的特征和 GTP 酶的活力。小 G 蛋白超家族的成员,至少有 50 多种,由于它们与分子量为 21×10^3 的 Ras 蛋白有较大的同源性,也称它们为 p21Ras 超家族。根据同源性的程度,又分为 6 个亚家族,即 Ras, Rho, Arf, Sar, Ran, Rab,它们参与多种细胞的信号转导过程。这里只介绍主要的 Ras, Rho 和 Arf 三种家族。

14.2.2.1 Ras 家族

Ras 家族成员很多,包括三种 Ras 蛋白 (H-Ras, N-Ras 和 K-Ras),四种 Rap 蛋白 (Rap-1a, 1b, 2a, 2b),二种 Ral 蛋白 (Ral A 和 Ral B) 和二种 R-Ras 样蛋白 (R-Ras 和 TC21)。最近又发现了 Rhe b 这种新的 Ras 家族成员。这些家族成员的最重要的特征是它们有相似的效应结构域 (effector domain),也称开关 I 区 (switch one region),这个区域的 Tyr35 和 GTP 的 γ -磷酸基团结合时产生构象变化。此外,还存在着另一个 Ras-GDP 和 Ras-GTP 两种结合状态时构象差别很大的区域 (60~72 位),称为开关 II 区 (switch two region),该区一个保守的 Gly60 也能与 GTP 的 γ 磷酸基团作用。

H-Ras, K-Ras 和 N-Ras 在第 12 和 61 位的氨基酸有所区别 (如 12 位在 H-Ras 为 Arg, N-Ras 为 Gly, K-Ras 为 Gly, Ser, Cys 或 Val, 第 61 位除 N-Ras 为 Arg 或 Lys 外,其他均为 Gln),然而未发现功能上的差别。它们最早是在人的某些肿瘤 Ras 基因突变的情况下被发现的。这些突变导致 Ras 蛋白的持续激活,从而引发人们对 Ras 的信号机制的研究。随后发现,信号从细胞膜受体酪氨酸蛋白激酶 (TPK),经 Ras 蛋白介导到 Raf 1,然后进入丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 的信号转导系统 (图 14-2)。

对 Ras 的活化起直接调控作用的蛋白主要有两种:GTP 酶激活蛋白 (GAP) 和鸟苷酸释放蛋白 (GNRP)。前者可以用 Ras-GTP 结合并激活其 GTP 酶活性,促使活性的 Ras-GTP 转变成无活性的 Ras-GDP;GNRP 则使 Ras-GDP 释放 GDP,以利于和 GTP 结合而活化 Ras。从受体活化到 Ras-GTP 增多的过程中,需要一些衔接蛋白 (adaptor) 起中介作用,如:生长因子受体结合蛋白 2 (Grb2) 和 Sos 蛋白 (son of sevenless 蛋白,为动物中由类果蝇基因 Sos 编码的蛋白质)。Grb2 含有二个 Src 同源结构域-3 (Src homology-3, SH3) 和一个 Src 同源结构域-2 (Src homology-2, SH2),二个 SH3 结构域组成一个结合 Sos 蛋白结合区,可以结合 Sos 蛋白上的富含脯氨酸的区域,而 SH2 结构域则可以与受体的酪氨酸自身磷酸化部位结合 (见图 14-3)。当生长因子受体激活后,Grb2/Sos 复合物可以同这

些受体 TPK 所催化的自身磷酸化部位结合,形成受体- Grb2 - Sos 复合物,导致 Ras - GTP 的升高。此外,磷脂酰肌专一性磷脂酶 C - γ (PI - PLC γ)、磷脂酰肌醇-3 激酶(PI - 3K)和一种称为 Syp 的酪氨酸蛋白磷酸酯酶(PIP₂)也能通过各自的 SH2 结构域与受体与酪氨酸自身磷酸化位点结合。和 Grb2 同源的其它衔接蛋白还有: Ash, Nck, Shc 等,它们都属于线虫 Sem5 基因的同源产物。与 Sos 同源的则有 Cdc25 蛋白等,有 Sos 类似的功能。

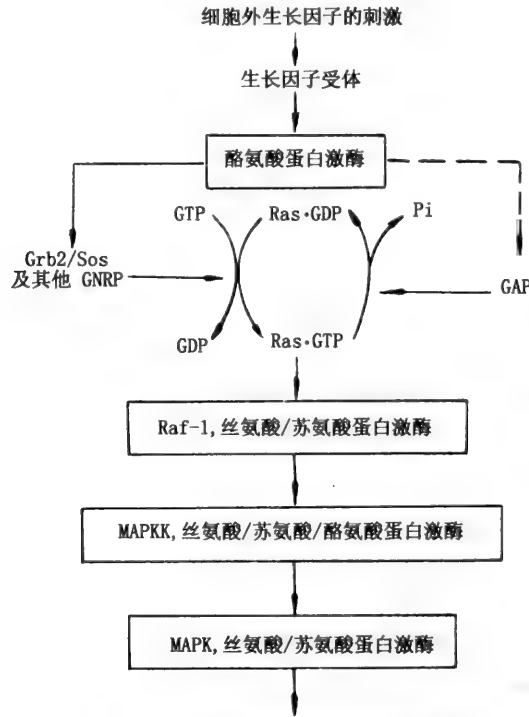


图 14-2 Ras 介导的信号转导途径模式图
Grb—生长因子受体结合蛋白; Sos—见正文介绍; GNRP—鸟苷酸释放蛋白; GAP—GTP 酶激活蛋白

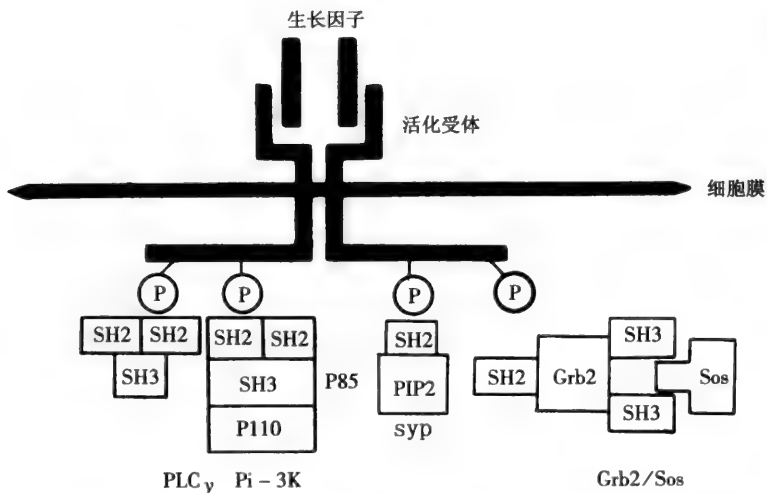


图 14-3 衔接蛋白和一些酶通过 SH 结构域和生长因子受体自身磷酸化部位的结合
PLC γ —磷脂酶 C - γ ; PI - 3K—磷脂酰肌醇-3 激酶; Syp—一种酪氨酸蛋白磷酸酯酶(PIP₂);
Grb/Sos—同图 14-2 说明; \textcircled{P} —自身磷酸化位点

14.2.2.2 Rho 家族

在小 G 蛋白超家族成员中, Rho 是最早被发现的一种 Ras 同源蛋白, 因而得名 Rho (Ras homologue)。哺乳动物细胞来源的 Rho 家族包含三种 Rho 亚型 (Rho A、B、C), 两种 Rac 亚型 (Rac1、2) 和 Cdc42 (一种鸟苷酸交换因子)、Rho G、TC10 各一种。各亚型之间有 80% ~ 90% 序列相同, 其中 Rho G 和 TC10 与其他成员差别较大。Rho B 和 Rho C 研究得还不够清楚, Rho B 可能是很多生长因子如表皮生长因子 (EGF) 和血小板源生长因子 (PDGF) 等诱导的立早基因产物。Rho A 研究得最清楚, 它分布广泛, 在维持细胞形态、细胞粘连、细胞迁移、有丝分裂、细胞生长和凋亡等方面都起作用。

Rho 的活化可能受多种上游信号的调节。G₁₂ 蛋白可以激活 Rho 专一的鸟苷酸交换因子 GEF 使 Rho-GDP 变成 Rho-GTP 转而活化 Rho。在酵母中, Ras 等一些小 G 蛋白可以直接激活 Cdc42, 调节 Rho 的另一种机制是 Rho 鸟苷酸解离抑制因子 (RhoGDI), 可以与 Rho、Rac、Cdc42 (Hs 亚型) 等以 1:1 结合。RhoGDI 是 Rho 的一种负控调节物, 使 Rho 稳定于 GDP 结合的非活性型, 以及阻止 Rho 与膜结合。因此, 有人推测, 在静息细胞中, Rho 以 RhoGDI 复合物形式而存在, 在活化过程中首先释放 GDI。

目前发现 Rho 的靶分子主要有二类: 一是新蛋白激酶 (protein kinase novel, PKN) 和 p160 ROCK, 另一类是无激酶活性的 rhophilin、rhotekin, 而另外一些分子则可能受到 Rho 的间接调控, 如磷脂酰肌醇-5-激酶和 3-激酶 (PT-5K 和 PI-3K) 和磷脂酶 D (PLD)。

14.2.2.3 Arf 家族

Arf 是 ADP-核糖基化因子的简称。最早在霍乱毒素使 G_s 发生 ADP 核糖基化的过程中作为必需的一个辅因子被发现, 因而命名为 ADP-核糖基化因子。随后发现, 它与其他单亚基的小分子 G 蛋白或异三聚体 G 蛋白在结构上有同源性, 而且都能与鸟苷酸结合, 因而被归纳为小分子 G 蛋白。

Arf 最早在质膜中得到纯化, 后来发现它更多存在于胞浆中。目前发现的 Arf 至少有 6 种, 分别称为 Arf1 ~ 6。Arf 在所有的真核生物中都存在, 它的基因也存在于原核生物中。

Arf 本身的 GTP 酶活性很低, 需要 GTP 酶激活蛋白 (GAP) 来增强其 GTP 酶活性。另外, Arf 的活化也需要 GDP 的解离和 GTP 的结合。一种鸟苷酸交换因子 (GEF) 可调节 GDP 的解离过程。很多磷脂, 如磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酸 (PA)、磷脂酰肌醇-4-磷酸 (PI-4-P)、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PI-4,5-P₂) 等都能加快 GDP 从 Arf 上解离出来, 稳定无鸟苷酸的游离 Arf。然而, 在 GTP 结合 Arf 时, 同样需要一些磷脂和一些去垢剂, 如: 双豆蔻酰磷脂酰胆碱、双豆蔻酰磷脂酰乙醇胺等。这些磷脂可以使得 Arf1 稳定于活化形式。

Arf 在泡膜运输过程中起作用, 尤其在在高尔基体膜上非网格蛋白 (non-clathrin) 被膜 (coat) 的装配过程中起重要作用。近年来发现, Arf 可以调节磷脂酶 D (PLD) 的活性, 通过 PLD 活性的变化影响磷脂酸 (PA) 和甘油二酯 (DAG) 的产生, 从而调节细胞信号过程。至于它在细胞信号转导过程中的其他作用, 目前还不清楚。

14.3 核苷酸环化酶

这是一类合成第二信使——环核苷酸的膜结合酶, 有腺苷酸环化酶 (AC) 和鸟苷酸环化酶 (GC) 两类。AC 和异三聚体 G 蛋白相偶联, 而 GC 本身就是一种膜受体。

14.3.1 腺苷酸环化酶

AC 催化 ATP 生成 3',5'-环腺苷一磷酸, 简称 cAMP, 另一产物是焦磷酸 P_i。已发现哺乳动物的 AC 有 10 型, 其中 I ~ VIII 型已被克隆并已知其染色体定位, 它们的分布有组织特异性, I 型和 VIII 型主要存在于神经细胞, 特别是海马区的锥体细胞和颗粒细胞。II 型除脑中表达较多外, 还分布于肺及嗅觉上皮, III 型主要存在于嗅觉上皮, 在脑、肺、肾也有少量, IV、V、VI、VII 型则广泛分布于脑、心、肾、肝和睾丸中 (睾丸中无 IV 型)。即使同时存在于脑中的各型, 其在脑内的分布也不相同。如

II型和VII型在结构上比较相似, II型主要存在于小脑海马, 在新皮质和黑质有中度表达; 而VII型几乎集中在小脑颗粒层。

14.3.1.1 腺苷酸环化酶的结构

AC是一个结构十分特殊的跨膜蛋白, 含有1064(大鼠IV型)至1248(大鼠VIII型)个氨基酸残基, 在构象上类似多次跨膜的离子通道蛋白。N端在胞内, 接着是6次跨膜结构(第一组跨膜域M1)然后是第1个胞内结构域C1, 又分成C1a和C1b。C1a在各型AC中有55%~93%的同源性, 再向C端又是6次跨膜结构(第二组跨膜域M2), 再进入胞内形成第2个胞内结构域C2, 其C2a在各型AC中也有53%~89%的同源性, C2b是整个肽链的C端。C1a和C2a是AC的催化部位, 这两个部位对催化作用均为必需。目前尚不知哪个部位对催化更重要, 也不知调节部位在C1a或C2a(见图14-4)

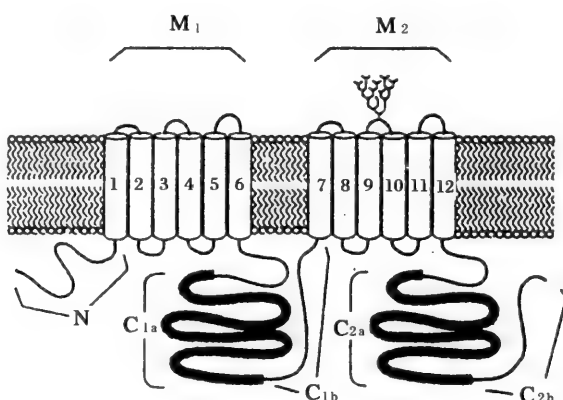


图14-4 腺苷酸环化酶(AC)的拓扑结构

N—N端; M1, 1~6—第一组跨膜域; C1a, C1b—第1胞内结构域; M2, 7~12—第二组跨膜域; C2a, C2b 第2胞内结构域; 粗线部分为各型AC间的高度同源区

14.3.1.2 腺苷酸环化酶的调节

AC和异三聚体的G蛋白偶联, 并受G蛋白调节, 但不同型别的AC受不同的G蛋白调节。一般说来, G_s 的 α 亚基激活AC; G_i 或 G_o 的 α 亚基抑制AC; 而G蛋白的 β, γ 亚基则可激活或抑制不同类型的AC。此外, Ca^{2+} 和 Ca^{2+} -钙调蛋白(CaM)复合物分别可抑制和激活AC, 蛋白激酶C和蛋白激酶A也分别能激活和抑制AC(表14-1)。后一作用是蛋白激酶A对GC的反馈性抑制。

表14-1 哺乳动物各型腺苷酸环化酶的专一性调节

型别	激活性调节物	抑制性调节物
I	$G_s \alpha$, Ca^{2+} - CaM	$G_i \alpha$, $G_o \alpha$, $G\beta\gamma$
II	$G_s \alpha$, $G\beta\gamma$, PKC	?
III	$G_s \alpha$, Ca^{2+} - CaM	$G_i \alpha$, $G\beta\gamma$ (?)
IV	$G_s \alpha$, $G\beta\gamma$?
V	$G_s \alpha$, PKC	$G_i \alpha$, Ca^{2+} , PKA
VI	$G_s \alpha$, PKC(?)	$G_i \alpha$, Ca^{2+} , PKA
VII	$G_s \alpha$, $G\beta\gamma$ (?), PKC(?)	?
VIII	$G_s \alpha$, Ca^{2+} - CaM	?

注: G_s , G_i , G_o —各型G蛋白; α, β, γ —G蛋白亚基; CaM—钙调蛋白; PKC—蛋白激酶C; PKA—蛋白激酶A; (?)—不肯定; ?—未发现

14.3.2 鸟苷酸环化酶

鸟苷酸环化酶(GC)催化 ATP 生成 3',5'-环鸟苷一磷酸,简称 cGMP,另一产物也是 P_i。20 世纪 80 年代早期发现心房中有一种肽类能引起利尿、利钠和血管扩张,人们把这一肽类称为心房利钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP),继而用交联技术发现 ANP 可和细胞膜上的一种受体蛋白结合,最后证明这一 ANP 的受体蛋白是一种核苷酸环化酶,能专一地催化 GTP 合成 GMP 和 P_i。

GC 也是一个家族,有多种类型。哺乳动物细胞浆中的 GC 是两个大小不同亚基的二聚体,血红素为其辅基。平滑肌扩张剂一氧化氮(NO)就是通过血红素激活 GC 而引起血管扩张的。膜结合型 GC 为单体,分子量约 $(120 \sim 180) \times 10^3$ 。其 N 端 1/2 在膜外,为配体结合区,接着是一段跨膜区,胞内的 C 端 1/2 为环化酶催化区,有两个区域和腺苷酸环化酶 AC 的 C1a 和 C2a 区高度同源,并且这两个区域彼此也有高度同源,因此它能催化和 AC 相似的反应。

胞浆型 GC 在催化性质上和膜结合型不同,底物 GTP 对后者呈现正协同别构效应,而对前者则没有协同效应。cGMP 作为 GC 的产物,其生物效应几乎全部是通过蛋白激酶 G 来实现的。

14.4 产生脂类信号分子的酶

脂类信号(lipid signal)分子指一些属于脂类的小分子物质,具有第二信使的作用,或目前虽未肯定是第二信使,却有类似第二信使的调节细胞代谢的功能。参与产生脂类信号分子的酶类主要有各种磷脂酶和磷脂酰肌醇激酶。

14.4.1 磷脂酶类

磷脂酶(phospholipase, PL)是催化磷脂水解的一类酶,主要有磷脂酶 A₂(PLA₂)、磷脂酶 C(PLC)和磷脂酶 D(PLD)。它们催化磷脂水解后的产物,如甘油二酯(DAG)和肌醇-3,4,5-三磷酸(IP₃)等是细胞的第二信使。另一些产物,如磷脂酸(PA)、溶血磷脂酸(LPA)、花生四烯酸(AA)等是细胞信号转导途径中的重要分子,也可能有第二信使的作用。因而磷脂酶及其在细胞信号转导过程中的作用是细胞信号转导研究中的重要领域。图 14-5 指出了各种磷脂酶水解磷脂分子时的位点。

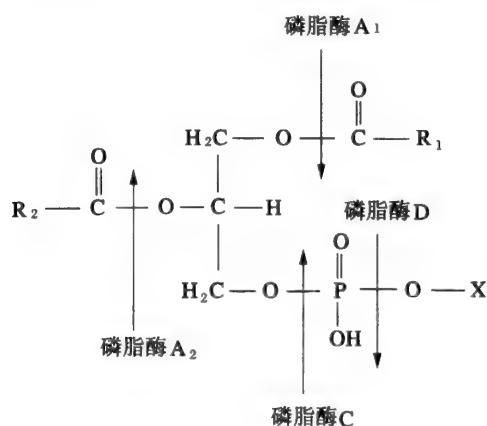


图 14-5 各种磷脂酶水解磷脂的位点

R₁—常为饱和脂酸的烃基;R₂—常为不饱和脂酸的烃基;X—胆碱,见于磷脂酰胆碱,又称卵磷脂(PC)乙醇胺,见于磷脂酰乙醇胺,又称脑磷脂(PE) 丝氨酸,见于磷脂酰丝氨酸,又称丝氨酸磷脂(PS) 肌醇—见于磷脂酰肌醇(PI),肌醇的 4 位或 4,5 位有磷酸基团是称为磷脂酰肌醇-4-磷酸(PI-4-P)或磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PI-4,5-P₂),PI 和肌醇上有磷酸取代的衍生物统称为肌醇磷脂

14.4.1.1 磷脂酶 A₂

PLA₂ 催化水解磷脂中的 2 位酯酰键,产生游离不饱和脂肪酸(USFA)和溶血磷脂(lysophospholipid)。USFA 不但为二十烷类化合物(eicosanoid)和血小板活化因子(PAF)等提供前体,同时也参与了细胞信号过程。

A PLA₂ 的分类和结构

根据 PLA₂ 的结构同源性、分子大小、细胞内定位以及是否依赖 Ca²⁺ 的其它酶学特性,人们将 PLA₂ 分成九类(I ~ IX)。九类 PLA₂ 中,只有 IV、VI 和 VIII 类为胞液型,其他都是分泌型 PLA₂。PLA₂ 分子量差异较大,从 13 × 10³ 到 85 × 10³,分泌型的 PLA₂ 大多为小分子,且分子内有 5 ~ 8 个二硫键,而胞液型 PLA₂ 分子量相对较大,不含二硫键。分泌型 PLA₂ 大多依赖 Ca²⁺ (VII 型例外),以 His - Asp 残基对为催化中心残基,N 端有一个 Ca²⁺ 依赖性磷脂结合域(CaLB)。胞液型 PLA₂ 则不依赖 Ca²⁺ (IV 型例外,需要低浓度 Ca²⁺),催化中心需要 Ser。VI 和 VII 型 PLA₂ 虽分属胞液型和分泌型,但都存在与其它脂酶相同的 GX SXG 模体(motif),而另一胞液型 IV 型则有 GLSGS 模体,且也有 CaLB。

B PLA₂ 的调节与功能

胞液型 PLA₂ 可以在胞液 Ca²⁺ 浓度升高时,发生膜转位。MAPK(p42 或 p44)可以使 PLA₂ 的 Ser505 磷酸化而使其激活。最近发现,p38MAPK 和 Jun N 端激酶(JNK)也能磷酸化胞液型 PLA₂,提示胞液型 PLA₂ 可能是促细胞有丝分裂的一个信号分子。但在很多细胞中,PLA₂ 的磷酸化不足以使其完全活化,还需要在磷酸化前先有胞液 Ca²⁺ 浓度的升高。在有些细胞中发现 PLA₂ 还受 TPK 的磷酸化而激活,G 蛋白的 βγ 亚基也是 PLA₂ 的正调节因子。

分泌型 PLA₂ 似乎与细胞信号转导无关,但由它作用磷脂后释放的廿碳花生四烯酸(AA),可以进一步代谢而合成前列腺素(prostaglandin)、血栓素(thromboxane)和白三烯(leukotriene),都是体内重要的活性物质,参与炎症、血小板聚集和过敏反应等病理过程。胞液型的 PLA₂ 则是细胞信号转导中重要的酶,产生的 AA 可以激活某些 PKC 亚型(α、β、γ、ε、ζ)。AA 可以释放到胞外介质中,也可以再进入胞内。PLA₂ 作用于磷脂酰胆碱(PC)生成的 LPC,也有信使功能,可以加速 HL-60 细胞向巨噬细胞分化和激活常规型 PKC(α、β、γ)等。PLA₂ 作用于磷脂酸(PA,磷脂酶 D 的产物)后生成的 LPA 已被认为是重要的细胞信使,它能活化某些非典型 PKC(PKCζ)、MAPK、促进 DNA 合成等。

14.4.1.2 磷脂酶 C

已发现的磷脂酶 C(PLC)有三种,即磷脂酰肌醇专一性磷脂酶 C(PI-PLC)、磷脂酰胆碱(PC)专一性磷脂酶 C(PC-PLC)和鞘磷脂酶(sphingomyelinase)。以 PI-PLC 的研究最多,其主要底物是磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PI-4,5-P₂),后者受 PI-PLC 水解后生成 DAG 及 IP₃,PI-PLC 也可催化磷脂酰肌醇-4-磷酸(PI-4-P)及磷脂酰肌醇(PI)的水解。PC-PLC 则使磷脂酰胆碱(PC)水解成 DAG 及磷酸胆碱。鞘磷脂酶的专一性底物是鞘磷脂(sphingomyelin),后者分子中以神经酰胺(ceramide)取代 PC 中的 DAG,故受鞘磷脂酶水解后不生成 DAG,而生成神经酰胺;另一产物仍为磷酸胆碱,故这个酶也是一种 PLC。PC-PLC 和鞘磷脂酶尚未提纯,目前对其结构所知甚少,故本处以讨论 PI-PLC 为主。

A PI-PLC 的分类

最初从牛脑中发现了 3 种 PI-PLC 亚型,被称为 PI-PLC β1、PI-PLC γ1、PI-PLC δ1。随后,在哺乳细胞、果蝇和真菌中相继发现 7 种、2 种、2 种亚型。所有 14 种 PLC 都是单链蛋白,分成 β、γ 和 δ 三种类型。以上三类 PI-PLC 都存在于哺乳动物中,而低等真核生物只有 δ 亚型。

B PI-PLC 的结构

尽管 PI-PLC 各亚型之间同源性低,但有明显的两个位于肽链中部同源性很高的区域:一个约含 170 氨基酸,称 X 区,另一个约含 260 个氨基酸,称为 Y 区,它们共同构成催化域(图 14-6)。在 X 区前面是约 300 个氨基酸的 N 端,包括一个 N 侧的 PH(pleckstrin homology)结构域和毗邻的一个

EF-手臂(EF-hand),后者作为 PH 结构域和酶的另一部分的柔性连接区,也与结合 Ca^{2+} 有关。在 C 端,所有 PI-PLC 都有一个 C2 结构域,与 Ca^{2+} 依赖性的磷脂结合有关,因而 PI-PLC 的所有亚型都依赖 Ca^{2+} 。 β 和 δ 型 PI-PLC 的 X、Y 区相隔 40~110 个氨基酸,而 γ 型 PLC 的 X、Y 间相隔约 400 个氨基酸,其间有两个 SH2 和一个 SH3 结构域把另一个 PH 结构域分割开来,因此,其它型的 PLC 都只有一个 PH 结构域,而 γ 型 PI-PLC 则有两个 PH 结构域。

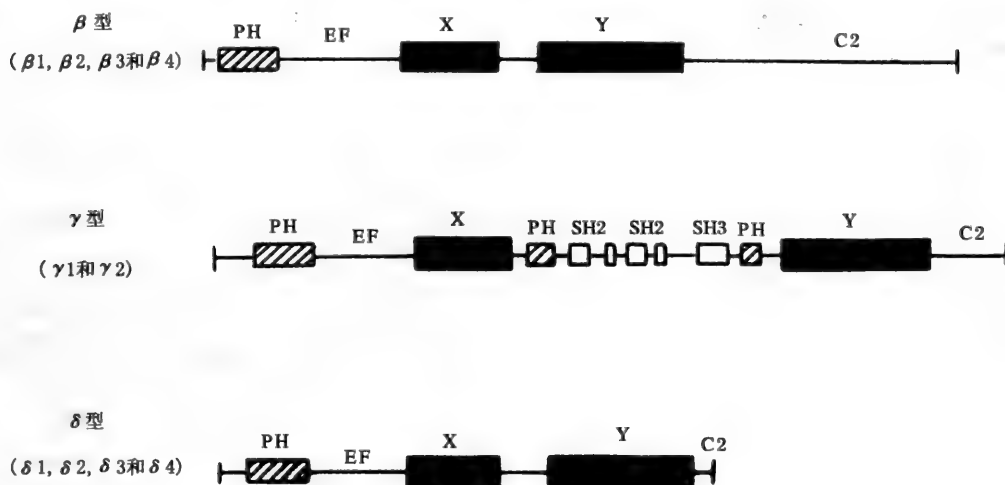


图 14-6 哺乳动物中三种 PI-PLC 的结构

X—X 区;Y—Y 区;PH—Pleckstrin 同源结构域;EF—EF 手臂;C2—C2 结构域;
SH2—Src 同源结构域 2;SH3—Src 同源结构域 3

C PI-PLC 的调节

G 蛋白的 G_q 家族的亚基可以调节 PI-PLC β 的各亚型的活性。PI-PLC β 的羧基端 1/3 顺序与 $G\alpha$ 结合有关。不同的 $G_q\alpha$ 可以在不同的组织中,不同程度地激活不同的 PI-PLC β 。缓激肽、凝血酶、组胺、胆碱能毒蕈碱 m1、促甲状腺激素等受体都通过 $G_q\alpha$ 或 $G_{11}\alpha$ 活化 PI-PLC β (图 14-7A)。G 蛋白中 $\beta\gamma$ 亚基也能激活 PI-PLC β ,在 PI-PLC β 氨基端的 2/3 的序列与 $G\beta\gamma$ 亚基结合有关。胆碱能毒蕈碱 m2 受体的信号就是通过 $G\beta\gamma$ 亚基激活 PI-PLC β 而转导的(图 14-7B)。

一些肽类生长因子的受体与生长因子结合后,受体 TPK 上活化的磷酸酪氨酸残基可结合 PI-PLC γ 的 SH2 结构域,使其 Tyr783, Tyr771, Tyr1254 等酪氨酸磷酸化,磷酸化后的 PI-PLC γ 发生膜转位,从而发生进一步激活(图 14-7C)。很多非受体型 TPK 如:Src, Syk, Lck, Fyn, ZAP-70, Jak/Tyk 等的酪氨酸残基受磷酸化活化后,也可以通过 PI-PLC γ 的 SH2 结构结合 PI-PLC γ ,并使 PI-PLC γ 发生酪氨酸磷酸化而激活(图 14-7D)。但是,PI-PLC γ 在不经酪氨酸磷酸化的情况下,也可以被一些磷脂来源的第二信使活化。如 PLD 的产物 PA,是 PI-PLC γ 1 的别构激活剂,在微管相关蛋白 tau 或 tau 样蛋白存在下,PLA₂ 的产物 AA 也能刺激 PI-PLC γ 的活性,磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI-3-K)作用的产物 PI-3,4,5- P_3 也能结合而活化 PI-PLC γ 。

总之,PI-PLC β 主要受异三聚体 G 蛋白的调节,而 PI-PLC γ 因有能与磷酸酪氨酸结合的 SH2 结构域,故可受活化的生长因子受体调节。

14.4.1.3 磷脂酶 D

磷脂酶 D(PLD)的底物主要是磷脂酰胆碱(PC),产物是磷脂酸(PA)和胆碱。膜结合性 PLD 只对 PC 起作用,但在牛肺的胞液中也曾发现能水解磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰肌醇(PI)的 PLD,产物除 PA 外,分别是乙醇胺和肌醇。磷脂酶 D 除有水解功能外,尚有磷脂酰转移功能。可将磷脂酰基团从 PC 转至另一碱基(如乙醇胺)或醇基(如乙醇)上,从而合成 PE 或磷脂酰乙醇,后一反应常用来测定 PLD 的活力。

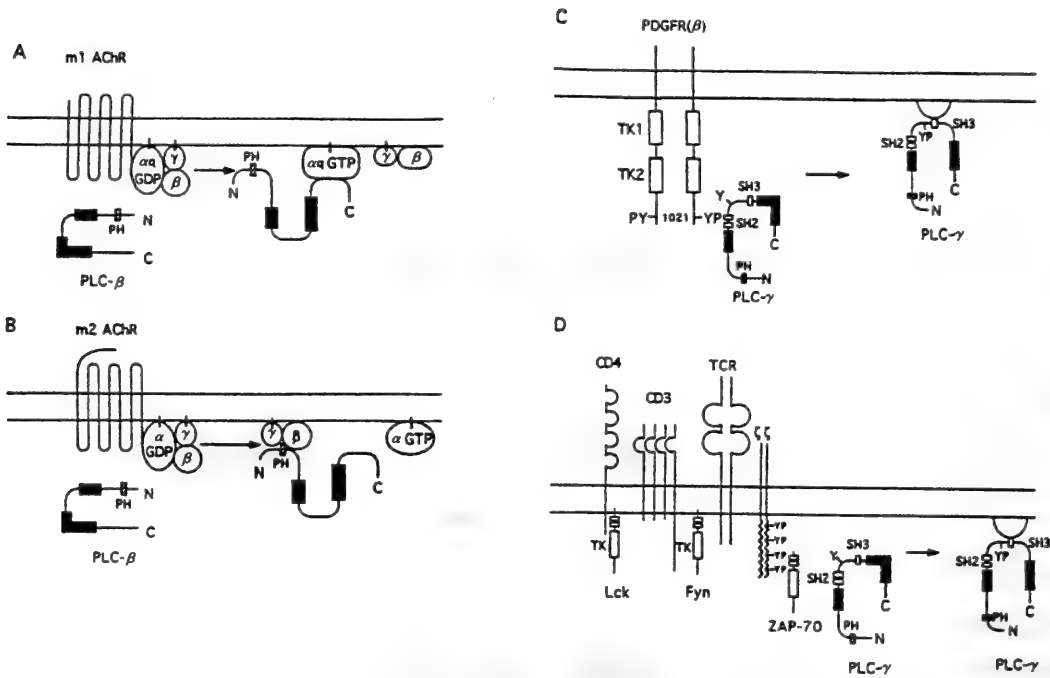


图 14-7 PI-PLC β 和 PI-PLC γ 的激活机理

A—乙酰胆碱毒蕈碱 m1 受体通过 $G\alpha_q$ 激活 PI-PLC β ; B—乙酰胆碱毒蕈碱 m2 受体通过 $G\beta\gamma$ 激活 PI-PLC $\beta_3, \beta_2, \beta_1$; C—PDGF- β 受体通过胞内酪氨酸蛋白激酶激活 PI-PLC γ ; D—白细胞表面受体通过非受体型酪氨酸蛋白激酶激活 PI-PLC γ ; AchR—乙酰胆碱受体; α_q —G 蛋白 α_q 亚基; β, γ —G 蛋白 β, γ 亚基; PDGFR(β)—血小板衍生生长因子; TK—酪氨酸蛋白激酶; PY, YP—磷酸化的酪氨酸; Y—酪氨酸; CD4, CD3—白细胞表面抗原; TCR—T 细胞受体; ζ —受体 ζ 链; Lck, Fyn, ZAP-70—非受体型酪氨酸蛋白激酶; N—N 端; C—C 端; PH—pleckstrin 结构域; SH2—SH2 结构域; SH3—SH3 结构域

A PLD 的生化特性

PLD 也有不同亚型,它们的组织分布、最适 pH,对 Ca^{2+} 的需求以及激活剂等都不相同,如脑和肺组织中的 PLD 受油酸激活,而肾脏和脾脏中的另一型 PLD 不受油酸激活,但受小分子 G 蛋白激活,例如从猪肺微粒体中获得较高纯化的 PLD,分子量为 190×10^3 ,最适 pH 为 6.6,只催化 PC 水解,受磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PI-4,5- P_2)和小分子 G 蛋白激活。

最近,已从酵母、植物和哺乳动物细胞中克隆出 PLD,它们之间有四个同源的保守序列(I~IV)。人的两个 PLD(hPLD1a 和 pHLD1b)也已从 HeLa 细胞中被克隆,分别为 1072 和 1034 个氨基酸的单链蛋白,分子量为 124×10^3 及 120×10^3 。在很多组织中,PLD 在质膜、高尔基体和细胞核中活性较高,在胞浆中也有明显的活性,但在线粒体中没有 PLD。PLD1 主要存在于核周边,如内质网、高尔基体、内体(endosome)等,PLD2 则主要存在于质膜。

B PLD 的调控

用蛋白激酶 C(PKC)的激活剂佛波酯(PMA)和抑制剂证明大多细胞中的 PLD 受 PKC 激活,特别是 PKC β I 和 PKC α ,cAMP 和蛋白激酶 A(PKA)也有激活作用,但机制尚不清楚。一些实验结果显示,PKC 激活 PLD 可能通过非磷酸化方式。TPK 也能激活 PLD,但机制也不清楚。G 蛋白如 Arf 和 Rho 等对 PLD 也有激活作用。GTP 可能作为小分子 G 蛋白的激活剂,从而激活 PLD。但 PLD 最主要的激活剂可能是 PI-4,5- P_2 ,对 PLD 呈别构激活作用。

C PLD 的生物学功能

PLD 首先可以将生物膜上的 PC 变成 PA,释放出极性的胆碱(choline),同时改变生物膜的组成和电荷,使膜的生理特性发生显著变化。产物 PA 类似第二信使,可引起多种生理效应,如促进 DNA 合成和肌动蛋白聚合,调节超氧离子生成和 GTP 酶激活蛋白(Ras-GAP)。PA 还可经磷脂酸磷酸酶作用,转变成 DAG,PKC 的晚期和持续激活可能主要受到来自 PLD 作用产生的 DAG 的影响。

PA 经 PLA_2 作用产生的 LPA 是活化的血小板和其他一些细胞的一种主要的胞外信号分子。LPA 尚可激活 Rho 蛋白和某些非典型 PKC, 如 ζ 型, 有报告认为 PLD 和 PKC 参与细胞囊泡的运输和出胞作用(exocytosis)。

虽然 PLC 的产物 DAG 也能经甘油二酯激酶生成磷脂酸(PA), 后者再经 PLA_2 转变成溶血磷脂酸(LPA), 但体内 PA 和 LPA 的直接来源应是 PLD, 也许 PLD 在体内的主要功能是通过 PA 和 LPA 来实现的。

14.4.2 磷脂酰肌醇激酶

磷脂酰肌醇(PI)中肌醇的 3,4,5 位均可被磷酸化, 分别由磷脂酰肌醇-3 激酶(PI-3K)、-4 激酶(PI-4K)和-5 激酶(PI-5K)催化, 其磷酸基团的供体都是 ATP。这些磷酸化数目及部位不同的 PI 衍生物的代谢转变如图 14-8 所示。肌醇基团被磷酸化的次序是 4 位 \rightarrow 5 位 \rightarrow 3 位, 或 4 位 \rightarrow 3 位, 但 PI-3,4- P_2 不能转变成 PI-3,4,5- P_3 , 后者只能来自 PI-4,5- P_2 的 3 位磷酸化。各磷酸基团又可被相应的磷酸酶水解转变而成为少一个磷酸基团的 PI 衍生物。这里主要介绍细胞信号转导通路中最主要的磷脂酰肌醇-3 激酶(PI-3K)。

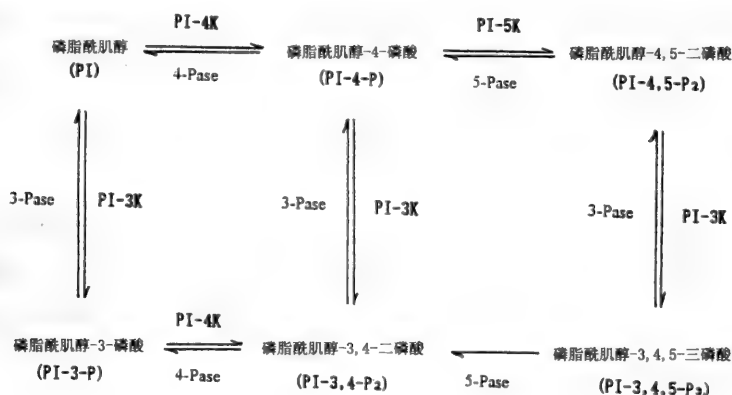


图 14-8 磷脂酰肌醇磷酸衍生物的代谢转变

PI-3K, -4K, -5K—磷脂酰肌醇-3 激酶, -4 激酶, -5 激酶; 3-Pase, 4-Pase, 5-Pase—
3-磷酸酶, 4-磷酸酶, 5-磷酸酶

14.4.2.1 PI-3K 的分类与结构

根据结构及底物专一性, PI-3K 主要分成三类(见图 14-9)。

A I 类 PI-3K

这类 PI-3K 可以磷酸化 PI、PI-4-P 和 PI-4,5- P_2 , 但在体内的优先底物是 PI-4,5- P_2 , 其催化亚基为 p110 蛋白(有 α 、 β 、 γ 、 δ 四种), 它们从近 N 端到 C 端分别为 Ras 结合域、PI-3K 域和一个 Ser/Thr 蛋白激酶域, 并都可和调节亚基结合成异二聚体。根据结合调节亚基的不同, 这类 PI-3K 的催化亚基可分成 A 和 B 两个亚型, I A 型和 p110 蛋白为 α 、 β 或 δ , 故又分为 α 、 β 或 δ 三型 PI-3K。最 N 端(在 Ras 结合域前)有一个调节亚基结合域, 通过此结合域中酪氨酸磷酸化的 YXXM 模体和调节亚基 p85 结合, 而 B 型的催化亚基 p110 蛋白为 γ 型, 故又称 PI-3K γ , 缺乏 N 端的调节亚基结合域, 不通过磷酸酪氨酸而是通过一未知部位和调节亚基 p101 结合。A、B 两型都有 Ras 结合域, 都可受 Ras 激活。A 型 p85 调节亚基的 N 端含有一个 SH3 结构域, C 端有两个 SH2 结合域, 分子中还有富含 Pro 的结构域和催化亚基 p110 结合区, 其 SH2 结合域也可和活化生长因子受体的磷酸酪氨酸结合, 故 I-A 型(PI-3K α 、 β 、 δ)还可受 TPK 的调节(参见图 14-3)。有报道 I-B 型(PI-3K γ)可受 G 蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基的调节。

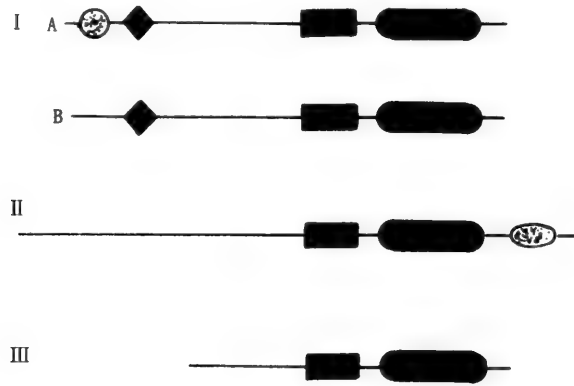


图 14-9 PI-3K 催化亚基 p110 蛋白的分类和结构

I - A 型自左至右的黑框分别为:调节亚基结合域;Ras 结合域;PI-3K 域;蛋白激酶域。

II 型的最右此侧(C 端)为 C2 结合域

B II 类 PI-3K

这类 PI-3K 可以磷酸化 PI 和 PI-4-P,但不能磷酸化 PI-4,5-P₂,只含 PI-3K 域和 Ser/Thr 蛋白激酶域而不含调节亚基结合域和 Ras 结合域。目前还未发现与这类 PI-3K 结合的调节亚基。有一个 C 端的 C2 结构域,但和一般结合 Ca²⁺ 和 C2 结构域不同,缺乏关键的 Asp 残基,故这类 PI-3K 并不依赖 Ca²⁺。然而,它是否受到胞外刺激剂的调节还不清楚。

C III 类 PI-3K

这类 PI-3K 只能磷酸化 PI,不能大磷酸化 PI-4-P 和 PI-4,5-P₂。在结构上,与第 II 类相似,但不含 C2 结构域。哺乳动物的这类 PI-3K 与酵母 Vps34p 蛋白同源。Vps34p 是酵母中唯一的 PI-3K,它是酵母的新生蛋白从高尔基体运输到液泡(相当于哺乳细胞的溶酶体)所必需的。

14.4.2.2 PI-3K 的功能

PI-3K 和它的产物在膜运输中也有重要作用,尤其是 III 类 PI-3K 和它的产物—3 位磷酸化的肌醇磷脂被认为是膜运输和囊泡形成过程中非常重要的分子。PI-3K 可能通过调节小 G 蛋白 Rac 的鸟苷酸交换因子和调节整合蛋白(integrin)对胞外基质的亲和性,使细胞骨架发生重组。PI-3K 的信号还可经 Rac 转至 Ras。此外,PI-3K 还参与抗细胞凋亡的信号转导。已经发现一些处于 PI-3K 下游的分子,如 I 类和 II 类 PI-3K 的产物,PI-3,4,5-P₃ 和 PI-3,4-P₂,可直接激活肌醇磷脂依赖性蛋白激酶(PDK)和蛋白激酶 B(PKB),p70 核糖体 S6 激酶(p70^{S6K})和一些新型和非典型 PKC 如 ε,η(L),ζ 型等。当 PI-3Kγ 受 Gβγ 激活后,其 PI-3K 活性可间接激活 MAPK 而引发 MAPK 信号流。所有的 PI-3K 还都有 Ser/Thr 蛋白激酶的活性,但目前还不知它们的天然底物。因此,PI-3K 的功能至少有三个方面:

(1) 产生 3 位磷酸化的肌醇磷脂,再使下游信号分子如 PDK 和 PKB 等活化;

(2) 发挥 Ser/Thr 蛋白激酶的活性,使某些蛋白磷酸化;

(3) 通过 SH2、SH3 结构域和富含 Pro 的结构域,作为“衔接蛋白”,这一作用已经被越来越多的实验结果证实,它可以和 TPK,Grb2,Ras,管蛋白等多种蛋白质结合,作为装配信号,而不需要其 PI-3K 和蛋白激酶活性。

14.5 蛋白激酶

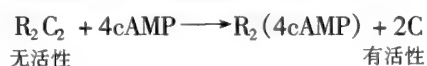
蛋白质磷酸化是最主要的细胞信号转导方式。通常蛋白质中丝氨酸(Ser),苏氨酸(Thr)和酪氨酸(Tyr)可以被磷酸化。近年也发现组氨酸(His)磷酸化的存在。催化 Ser/Thr 磷酸化的蛋白激酶是一个大家族,根据其不同的功能可以分成以下几大类,它们大多也是一个家族。(1) 环核苷酸依赖

性蛋白激酶(PKA, PKG); (2) 脂类依赖性蛋白激酶(PKC, PKB, PKN); (3) 钙-钙调蛋白依赖性蛋白激酶; (4) 丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK); (5) MAPK 激酶(MAPKK, 同时有酪氨酸蛋白激酶活力); (6) MAPKK 激酶(MAPKKK); (7) 周期蛋白依赖的蛋白激酶(cyclin dependent kinase, cdk)(如 cdc2-激酶); (8) 核糖体 S6 蛋白激酶(RSK); (9) 酪蛋白激酶和糖原合成酶激酶 3(GSK-3); (10) 跨膜受体丝/苏氨酸蛋白激酶等。蛋白激酶的另一个大家族是酪氨酸蛋白激酶(TPK), 专门催化蛋白质中酪氨酸的磷酸化。以下对几种常见的蛋白激酶作简单的介绍。

14.5.1 环核苷酸依赖性蛋白激酶

14.5.1.1 蛋白激酶 A

蛋白激酶 A(PKA)又叫 cAMP 依赖性蛋白激酶。在代谢的调节和细胞信号转导中具有重要作用, 是由两个催化亚基(C)和两个调节亚基(R)组成的四聚体。四聚体的 PKA 呈非活性状态, 当 4 个 cAMP 结合到 2 个 R 亚基时, C 亚基脱离 R 亚基成为活性形式。



A PKA 的分类

PKA 全酶的分子量约 180×10^3 , 分成 I 类和 II 类。它们的 C 亚基基本相同, 而 R 亚基不同(有 R I 和 R II 两类)。两类 R 亚基的分子量不同, R I 为 49×10^3 , R II 为 55×10^3 , 它们各自又有 α 、 β 两种亚型, 即 R I α 、R I β 、R II α 、R II β 。C 亚基分子量为 40×10^3 , 目前发现 C 亚基又有 C α 、C β 、C γ 三种亚型, 但同一个 PKA 中的 C 亚基都为同一种亚型。

B PKA 的结构

1) C 亚基。C 亚基具有催化活性, 它能识别底物的 RRXS/T 和 RXS/T 二种模体。其中 R 为碱性的精氨酸, X 为任意氨基酸, 在接受磷酸基团的 S/T 的羧基端多为疏水氨基酸。在测定 PKA 的活性时, 肝中丙酮酸激酶的七肽“Kemptide”(LRRASLG)被证明是很好的底物。七肽的 S 改为 A 后, 则成为抑制剂。C 亚基 70% 氨基酸序列的约 250 个氨基酸参与构成催化活性中心。C 亚基的 N 端部分有一个核苷酸(ATP)结合区, 这个区有一个富含甘氨酸(G)的序列: GXGXXGX₁₆K, 类似于其它一些蛋白中的核苷酸识别域(如 GXXXXGKX 和 GXGXXG), Lys72 和 Glu91 形成一个离子对, 对结合 ATP 的 α 和 β 磷酸基团都很重要; Ala70 可能与腺苷酸的识别有关。C 亚基的催化中心位于分子中部, 有结合多肽底物和催化磷酸基团转移的作用。由 RDLKPEN 七个氨基酸残基构成一个环, 其中 Asp(D)166 是磷酸基团转移的结构基础, Lys(K)168 起稳定和降低活化能的作用。这一 Lys 只存在于丝/苏氨酸蛋白激酶; 在酪氨酸蛋白激酶中, 常为 Arg(R)或 Ala(A)所代替, Asp184 和金属离子 Mg²⁺ 等结合有关。在 C 亚基氨基端, 有一个甘氨酸可以发生豆蔻酰化, 其生物学意义还不清楚。PKA 的 C 亚基上, 还存在一个 Thr197 的磷酸化位点, 目前认为它在酶的成熟过程中发生自身磷酸化, 而不是作为磷酸化和非磷酸化状态调节酶活性的作用。

2) R 亚基。R 亚基是 cAMP 结合的靶蛋白, 在 PKA 的四聚体中, 它作为一种“假底物”而抑制 C 亚基发挥催化作用。只有当 cAMP 结合 R 亚基后, 解离状态的 C 亚基才有催化活性。R I α , R I β , R II α , R II β 这些不同的调节亚基, 都由不同的基因编码。 α 或 β 型都有组织的专一性。R 亚基有三个结构域, 氨基端是二聚化结构域, 负责和另一个 R 亚基的聚合, R I 还有两个半胱氨酸残基对二聚化十分重要, 二聚化结构域中有假底物模体 RRNAIH(存在于 R I)和一个真底物模体 RRVSC(存在于 R II, 其中 S 为磷酸化位点), 此真底物模体以自身磷酸化状态存在。二聚化结构域的羧基侧有两个前后相连的 cAMP 结合域 A 和 B, 对不同 cAMP 衍生物的亲和力不同, 其中 B 结构域结合和解离 cAMP 的速度较 A 结构域快, 为优先结合 cAMP 的位点。

C PKA 的分布

PKA 广泛存在于各组织, 其中 I 类 PKA 主要存在于非神经细胞, 尤其在骨骼肌和心肌中的含量更为丰富, 一般主要存在于胞浆中。II 类 PKA 主要存在于神经细胞的各个亚细胞组分中。蛋白

激酶在细胞中的定位对其功能的发挥有重要作用。目前已发现了与 PKA 的定位有关的“锚蛋白”(AKAP),它能跟 R II 亚基结合,使得 PKA 定位于不同的部位。详细的机制还有待进一步的研究。

14.5.1.2 蛋白激酶 G

蛋白激酶 G(PKG)又称 cGMP 依赖性蛋白激酶,是另一类依赖环核苷酸激活的蛋白激酶。越来越多的细胞信号事件被认为和 cGMP 的升高和 PKG 有关。除节肢动物的组织和哺乳动物小脑皮质中层的普金野细胞(purkinje cell)、血小板、小肠上皮细胞等一些特殊的细胞外,PKG 在组织中的存在量一般比 PKA 低 10~100 倍。哺乳动物组织中的 PKG 也有两类:PKG I (分子量为 76×10^3)和 PKG II (分子量为 86×10^3)。PKG I 存在于胞浆中,有 α 和 β 二种亚型,PKG II 存在于膜性组分。

A PKG 的结构

PKG 和 PKA 不同,催化域和调节域在同一亚基内,PKG I 以二聚体存在,而 PKG II 原来被认为是以单亚基存在,现在则有证据认为这个单亚基也来源于二聚体。PKG 的单体至少有五个功能域,N 端的三个结构域和酶活力调节有关,催化结构域占 C 端的一半。

1) 二聚化结构域。处于氨基末端,和细胞定位有关。含有保守的由 Leu 和 Ile 组成的亮氨酸拉链结构。PKG I α 通常发生乙酰化修饰,PKG II 则发生豆蔻酰化修饰,都是 PKG 的膜定位所必需的。PKG I、II 的这一结构域都含有自身磷酸化位点。PKG I 的二聚体结构域还含有一个自身抑制模体,类似于 PKA 中 R 亚基的假底物模体,在结合 cGMP 前与底物蛋白竞争,起自身抑制活力的作用。另有一个协同作用的调节位点使 PKG I 成为一个别构酶。PKG II 能调节氯离子通道,而乙酰化的 PKG I 则没有这种功能。

2) cGMP 结合域。PKG 有两个 cGMP 结合域,与二聚化结构域相毗邻,N 侧的一个亲和性高,C 侧的一个亲和性较低。前者含有保守的 Thr,后者在 I 型为 Thr,II 型为 Ser。

3) 催化域。位于 C 端,与其他蛋白激酶类似,约 260 个氨基酸残基构成,有保守的 Lys 和必需的 Thr,Thr 也可被自身磷酸化,PKG I 在此结构域还有一个细胞核定位信号。

4) 羧基端结构域。约有 70 个氨基酸残基,功能还不明确。

B PKG 在信号转导中的作用

PKG 可参与心房利钠肽(ANP)的信号转导。ANP 的受体是鸟苷酸环化酶,受 ANP 激活后,催化 GTP 生成 cGMP,cGMP 只要在很低的浓度时即可激活 PKG。激活的 PKG 可以有很多种类的底物。在平滑肌细胞中,PKG I 可磷酸化肌醇三磷酸(IP₃)受体,抑制 Ca²⁺ 从内质网释放,降低胞浆 Ca²⁺ 的浓度。体外实验证明,PKG I 可以激活 Ca²⁺ 活化的 K⁺ 通道,使 Ca²⁺ 通道 α 亚基磷酸化,导致超极化和电压门控 Ca²⁺ 通道的失活,降低细胞内 Ca²⁺ 浓度,因而促进平滑肌松弛,抑制心肌收缩和血小板凝聚。其他一些已知的 PKG 引发的效应有促进肾小管的利尿和肠粘膜 Cl⁻ 离子的分泌。

14.5.2 脂类依赖性蛋白激酶

14.5.2.1 蛋白激酶 C

蛋白激酶 C(PKC)是一种 Ser/Thr 蛋白激酶,1977 年日本 Nishizuka 首先在鼠脑的胞浆成分中发现,受甘油二酯(DAG)和 Ca²⁺ 的激活。因其受 Ca²⁺ 激活而被命名为 PKC。DAG 是细胞对多种胞外刺激作用的第二信使,是肌醇磷脂或胆碱磷脂受磷脂酶水解而产生的。所有的 PKC 亚型的激活还需要磷脂酰丝氨酸(PS)——一种膜磷脂。也就是说,PKC 的激活需要膜环境,这并不意味着 PKC 为膜蛋白。事实上,目前发现的所有 PKC 亚型大多存在于胞浆中,接受刺激后,首先可逆地转位到膜上,在膜中受脂类 PS,DAG 等因子作用下才激活。到目前为止已发现至少有 12 种 PKC 亚型,分成三大型或三组(表 14-2)。

表 14-2 哺乳动物组织中的 PKC 同工酶

组(型)	同工酶(亚型)	残基数	激活剂	组织分布
cPKC (常规型)	α	672	Ca^{2+} , DAG, PS, FFA, LPC	广泛
	β I	671	Ca^{2+} , DAG, PS, FFA, LPC	某些组织
	β II	673	Ca^{2+} , DAG, PS, FFA, LPC	很多组织
	γ	697	Ca^{2+} , DAG, PS, FFA, LPC	仅在脑中
nPKC (新型)	δ	673	DAG, PS	广泛
	ϵ	737	DAG, PS, FFA, PIP_3	脑及其他组织
	η (L)	683	DAG, PS, PIP_3 , 胆固醇, SO_4^{2-}	皮肤, 肺, 心
	θ	707	?	肌肉, T细胞等
aPKC (非典型型)	μ	912	?	NRK 细胞
	ζ	592	PS, FFA, PIP_3 , LPA, ?	广泛
	λ	587	?	卵巢, 睾丸等
	τ	587	?	肾, 脑, 肺

注: DAG—甘油二酯; PS—磷脂酰丝氨酸; FFA—顺式不饱和脂肪酸; PIP_3 —磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸; LPC—溶血磷脂酰胆碱; LPA—溶血磷脂酸; η (L)和 λ 类的酶学性质尚不清楚。

A 常规型 PKC

常规型 PKC (conventional PKC, cPKC) 包括 α , β I, β II 和 γ 四个亚型。酶分子 N 侧的 1/2 肽段为调节结构域, 含有三个与酶活力调节有关的模体(图 14-10)。

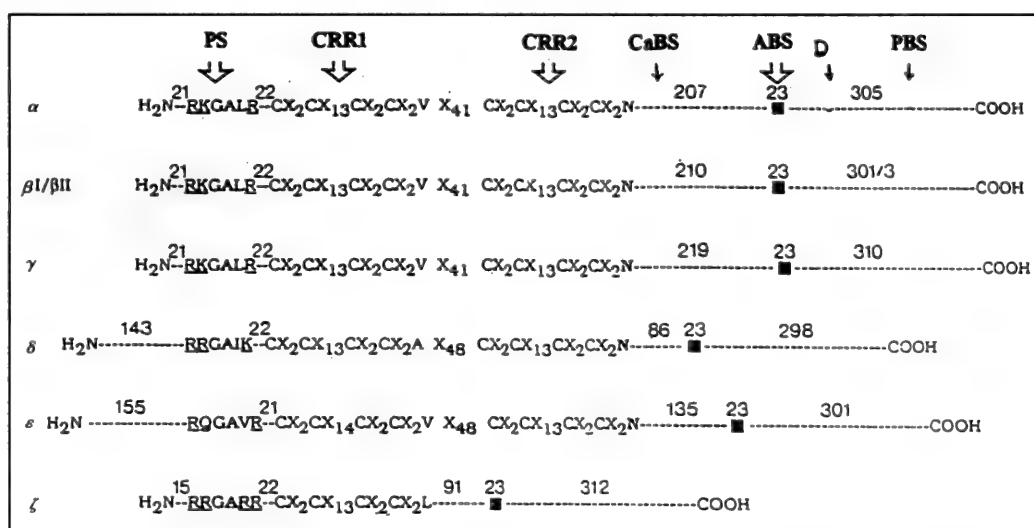


图 14-10 几型蛋白激酶 C 的模体

PS, CCR, CaBS, ABS, DFG, PBS 为不同功能的模体, 见正文说明; 英文字母为氨基酸残基单字符号; X 为任意氨基酸; 数字为间隔的氨基酸残基数

1) 假底物模体(PS)。其中心肽段为(或 RQ)GAL(或 IVR)R 六肽, 和被 PKC 磷酸化的底物肽段 RXXSXRO 基本相同, 只是第 4 位的 S(磷酸化位点)换以 A, 故不能被自身催化磷酸化而成为假底物。但这个假底物顺序可和酶催化中心的底物结合位点结合而阻断真底物的酶的结合。

2) 两个富含 Cys 的模体(CRR-1 和 CRR-2)。CRR-1 能和激活剂 DAG 或佛波酯(PMA)结合, CRR-2 模体中的 Asn 在结合中起重要作用, 可增加 DAG 或 PMA 的结合力。DAG 或 PMA 和 CRR

模体结合后,可引起酶的变构,改变肽链的折叠状态,解除假底物模体对催化中心的阻断作用而导致酶的激活。

3) 钙结合模体 CaBS。DAG 对酶的激活需要 Ca^{2+} 的存在,因 Ca^{2+} 和钙结合区结合后可加强酶的变构。故常规型 PKC 同时需要 Ca^{2+} , DAG 和磷脂酰丝氨酸(PS)激活,还受到顺式不饱和脂肪酸和溶血磷脂酰胆碱的进一步激活。

PKC 的 C 端 1/2 为催化区域,除有 ATP 结合模体(图 14-10 中的 ABS)外,尚有蛋白质结合模体(PBS)和催化位点 Asp Phe Gly(DFG)。

B 新型 PKC

新型 PKC(novel PKC, nPKC)包括 $\epsilon, \delta, \eta(L), \theta, \mu$ 五个亚型,因缺乏 Ca^{2+} 结合模体,故不需 Ca^{2+} 而只需 DAG 和 PS 的激活,其中 ϵ 和 $\eta(L)$ 可受 $PI-3,4,5-P_3$ 激活, ϵ 还受到不饱和脂肪酸的激活。

C 非典型 PKC

非典型 PKC(atypical PKC, aPKC)包括 ζ, λ, τ 三个亚型,因同时缺乏 Ca^{2+} 结合及 DAG 结合模体,故激活剂既不需要 Ca^{2+} 也不需要 DAG,只受磷脂和不饱和脂肪酸激活。其中 ζ 型也可受到 $PI-3,4,5-P_3$ 及溶血磷脂酸(LPA)的激活。

14.5.2.2 蛋白激酶 B

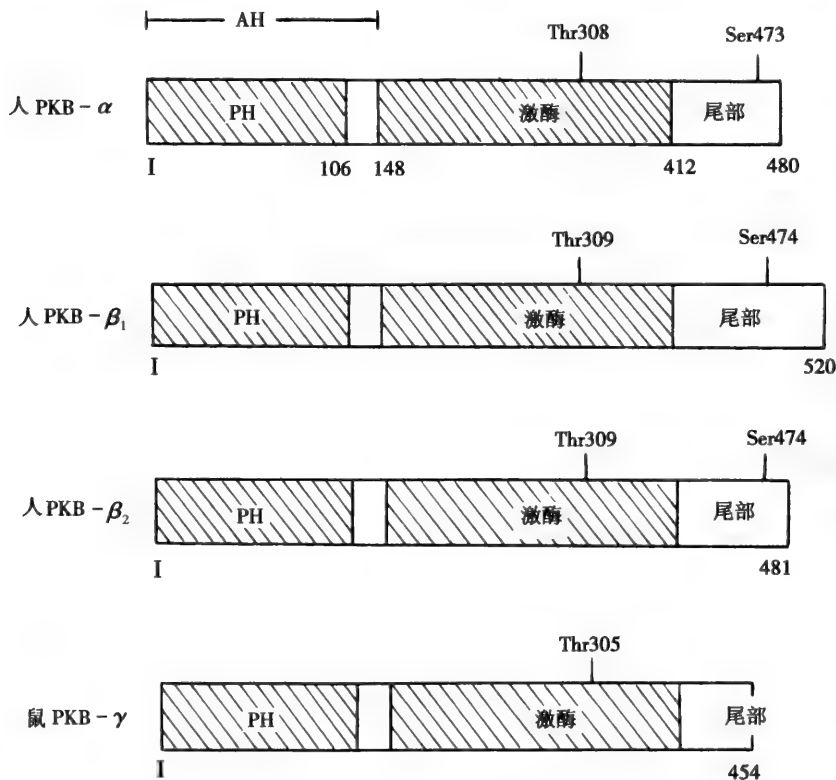


图 14-11 PKB 各亚型的结构模式图

AH—Akt 同源结构域; PH—pleckstrin 同源结构域

蛋白激酶 B(PKB)也属 Ser/Thr 蛋白激酶,最早于 1991 年由三个研究组分别同时发现。其中两个组发现它的催化域与 PKC ϵ 和 PKA 分别有 73% 和 68% 的相同,故将其命名为 PKB 和 RAC-PK (related to the A and C kinases),同时另一个研究组发现它是 T 细胞性淋巴瘤逆转录病毒癌基因 v-akt 的产物,故又称其为 Akt。

A PKB 的亚型和结构

(a) PKB 的亚型。目前发现的 PKB 亚型有很多种,包括最早发现的 PKB α (Akt1、RAC-PK α)及后来发现的 PKB β (Akt2、RAC-PK β)和 RAC-PK γ (PKB γ)等。

(b) PKB 的结构。PKB 为单链的结构(见图 14-11,在 N 端 1~147 位是调节区,称为 AH 结构域(Akt homology domain),其中 1~106 位是 PH 结构域,可能是与其他蛋白质或磷脂等脂类作用的部位。148~411 位是激酶域,和其他 Ser/Thr 蛋白激酶有较多的同源性,有一个保守的 Thr(Thr308/Thr309 或 Thr305),从 412 位起为 C 端尾区,除 PKB γ 外,都有一个 Ser473/474。

B PKB 的激活机制

目前认为 PKB 的活化和膜转位以及 Thr308 及 Ser473 的磷酸化有关(见图 14-12)。PI-3K 的产物 PI-3,4-P₂ 或 PI-3,4,5-P₃ 可以结合 PKB 的 PH 结构域,使 PKB 向膜转位,从而更容易被 PKB 激酶磷酸化。其中 PI-3,4,5-P₃ 还有第二信使的作用,能别构激活 PKB 激酶(又称 USK 或磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶-1, PDK1),使 PKB 发生 Thr308 磷酸化,从而发生部分活化。另外,还存在另一种和整联蛋白(integrin)相连的 PKB 激酶,能特异性磷酸化 PKB 的 Ser473,从而完全活化 PKB。由此可见,PKB 的活化主要依赖于 PI-3K 产生的 3 位磷酸化的磷脂酰肌醇。

最近报道,cAMP 也可激活 PKB,而非典型 PKC 中的 PKC ζ 则是 PKB 的负调控因子。

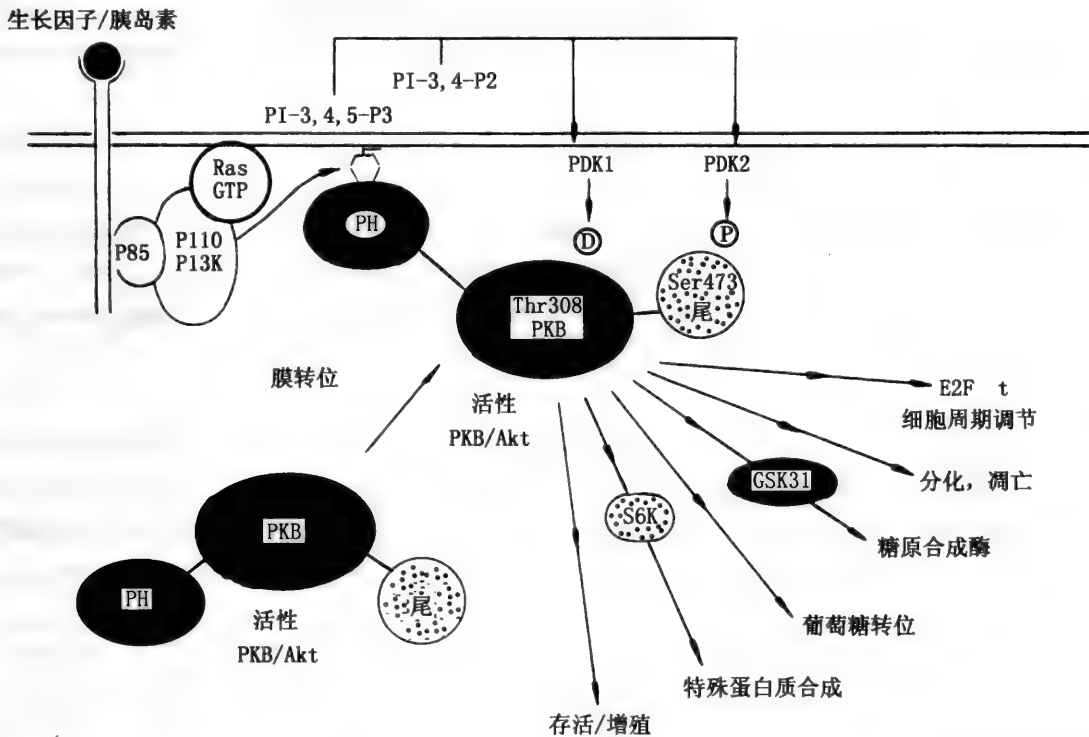


图 14-12 PKB 的激活机制和功能

PI-3K—磷脂酰肌醇-3-激酶;P100—磷脂酰肌醇-3-激酶的催化亚基;p85—磷脂酰肌醇-3-激酶的调节亚基;PDK—磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶;E2F—延长因子 2;GSK3—糖原合成酶激酶-3;S6K—核糖体蛋白 S6 激酶(p70^{S6K})

C PKB 的功能

在体外,PKB 可以磷酸化合成肽 RxRyz(S/T)(hy),其中 R 为精氨酸,x 为任何氨基酸,y 和 z 是甘氨酸外的其他小氨基酸,hy 是大的疏水氨基酸。在体内,PKB 的底物目前较确定的有:(1) 糖原合成酶激酶 3(GSK3),该酶受 PKB 磷酸化后活性降低,再使糖原合成酶因磷酸化减少而活性增加,从而导致糖原合成增加而血糖降低。(2) 磷酸果糖-2-激酶(PFK-2),PKB 能催化 PFK-2 分子上两个 Ser 发生磷酸化而激活 PFK-2,从而进一步激活磷酸果糖-1-激酶(PFK-1),使糖酵解作用增强而血糖降低。(3) 核糖体蛋白 S6 激酶(ribosomal protein S6 kinase, p70^{S6K}),p70^{S6K} 是一种和细胞在丝裂源刺激下使蛋白质合成增加的激酶,但目前还不能肯定 p70^{S6K} 的激活是否直接受 PKB 磷酸化所致。(4) 翻译因子抑制剂 4E-BP1,PKB 还能使 4E-BP1 磷酸化而失活,从而使翻译因子 eIF-4E

去抑制而起动翻译起始复合体的形成,促进蛋白质的合成。(5) 细胞凋亡相关蛋白 BAD, PKB 可使 BAD 的 Ser136 或/和 Ser112 发生磷酸化,磷酸化的 BAD 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 或 Bcl-X_L 解离而与磷酸丝氨酸结合蛋白 14-3-3 结合,已游离的抗凋亡蛋白 Bcl-2 或 Bcl-X_L 则可抑制细胞凋亡(apoptosis)。但 PKB 的抗凋亡尚可能有其他机制,如抑制参与细胞凋亡的胱冬蛋白酶-3(caspase-3)和 GSK-3。

PKB 还和很多其他信号过程有关,如葡萄糖的吸收(使葡萄糖载体-4, GLUT4, 向胞膜转移)、细胞的存活和增殖、肿瘤的转移和细胞的分化等。

14.5.2.3 新蛋白激酶 PKN

新蛋白激酶(protein kinase novel, PKN)是和 PKB 一样在 1996 年新报道的一种受脂肪酸(如花生四烯酸)及特殊脂类如心磷脂(Cardiolipid)激活的蛋白激酶,因与 PKC 高度同源,故也称为蛋白激酶 C 相关激酶(protein kinase C related kinase, PRK)。

A PKN 的亚型、结构和调节

最近发现 PKN 有 α 及 β 两型,有很大同源性,但它们的脯氨酸保守域的结构不同。 α -PKN 存在于各种组织,特别是脑,而 β -PKN 在正常成人组织中不存在,只存在于人类的肿瘤细胞,主要定位于胞核及核周高尔基体。

PKN 的分子量约 104×10^3 , C 端区为催化结构域,与 PKC 的催化域极为类似。N 端区为调节结构域,有亮氨酸拉链(Leucine zipper)结构。在 GTP 存在下,可与小分子 G 蛋白 Rho(主要是 RhoA)以 1:2 结合,位置在 PKN 的 74~113 位,并受 Rho 蛋白激活。两个结构域之间有富含脯氨酸的保守区域,可与带 SH3(Src homology 3)结构的蛋白质结合。当细胞 Fas 受体(一种凋亡相关受体)受刺激时,胞内胱冬蛋白酶-3(Caspase-3)被激活而水解 PKN 调节域和催化域之间的连接链,使 PKN 的 C 端区形成一个有激酶活性而不受调节的片段。

B PKN 的功能

因 PKN 含有转录因子的亮氨酸拉链结构,是可能具有转录因子的功能。在应激(如热休克、亚砷酸钠、血清饥饿等)刺激下, PKN 转入核中,调节热休克转导因子(HSF-1)的表达。Rho-PKN 信号转导通路除也应激有关外,也参与细胞凋亡的信号转导。PKN 与细胞骨架蛋白(如神经微纤维蛋白 α -actinin)连接,与维持细胞形态有关,当细胞受溶血磷脂酸(LPA)刺激时,能促进细胞骨架纤维和斑块聚焦连接(focal contact),使细胞骨架作出反应。PKN 还可使细胞的细纤维蛋白 Vimentin 和神经细胞的微管结合蛋白 tau 磷酸化,与老年性痴呆(Alzheimer 病)中神经纤维缠结的形成有关。

在胰岛素促进葡萄糖摄入细胞的信号转导中,也有 Rho 蛋白和 PKN 的参与,但其信号是由 Rho 直接传至 PKN 为主,还是通过 PI-3K 的间接途径为主则尚未解决。胰岛素如何激活 Rho 也不清楚。

14.5.3 钙调蛋白依赖性蛋白激酶

钙调蛋白(calmodulin, CaM)是一种单亚基的钙结合蛋白,有四个结构域,每个结构域分别可以结合一个 Ca^{2+} 。只有结合 Ca^{2+} 的钙调蛋白,即 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 复合物才有生物活性。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 活化的蛋白激酶主要包括三类:磷酸化酶激酶(phosphorylase kinase)、肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)和钙调蛋白依赖性蛋白激酶(CaM-PK)。CaM-PK 至少有 I~V 个亚型,其中 CaM-PK II 的已知底物较多,也意味着它有多方面的生理功能,由于它能催化突触蛋白 I 的位点 II 磷酸化,因而得名 CaM-PK II。因为 CaM-PK II 研究得较为清楚,因此,这里主要介绍 CaM-PK II。

14.5.3.1 生化特征及结构

哺乳动物前脑中纯化的 CaM-PK II 由 8~10 个亚基组成,每个亚基分子量约 $(50 \sim 60) \times 10^3$ 。这些亚基分别有 $\alpha, \beta, \beta', \gamma, \delta$ 等,它们以不同的比例组合成不同来源的 Ca-PK II。CaM-PK II 的

各亚基有相似的结构,都由4个结构域组成(见图14-13)。

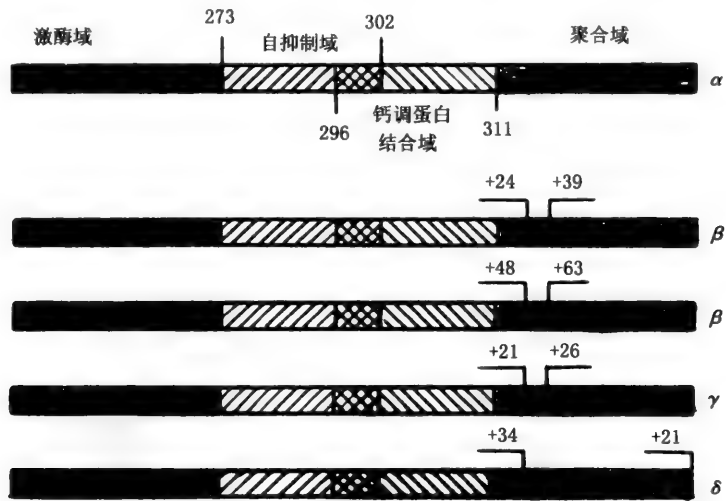


图14-13 CaM-PK II各亚基的结构域

$\beta\beta'\gamma\delta$ 亚基中聚合结构域上的数字表示该处插入的氨基酸残基数

A 激酶域

位于N端,与其他Ser/Thr蛋白激酶有相同的保守氨基酸残基,用胰凝乳蛋白酶处理CaM-PK后能得到氨基端1~271的片段,且具有不依赖 Ca^{2+} /CaM的激酶活性, α 亚基的氨基端1~291位片段在细菌中表达产物同样有不依赖 Ca^{2+} /CaM的激酶活性,表明氨基端有完全的酶活力,只是通常被羧端的自抑制域抑制其活动。

B 自抑制域

紧接着激酶域,并可和激酶域结合而抑制激酶活性,类似以假底物方式与激酶底物竞争而发挥其抑制作用。但也有人认为CaM-PK的自抑制域是通过阻止ATP的结合而抑制酶的活性。

C 钙调蛋白结合域

在 α 亚基位于第296~311残基段, β 亚基则在297~310残基段,具有很强的CaM亲和性。其氨基酸特点是:290~309氨基酸残基间有80%的 α 螺旋,有较多的碱性氨基酸,还有一个疏水区。

D 聚合域

位于C端,与亚基聚合成全酶有关。另外,与其在亚细胞中的分布等也有关。各亚基的长度不同主要是该结构域中插入的氨基酸残基数不同而引起的。

14.5.3.2 CaM-PK的激活

非活性型的CaM-PK II结合 Ca^{2+} /CaM后,立即成为活性型。紧接着在Thr286发生自身磷酸化,使CaM-PK II变成 Ca^{2+} 不依赖性激酶,降低其本身对CaM的亲合力,与CaM解离的CaM-PK因仍保持Thr286的磷酸化而仍有活力,最后磷酸基团被水解而使酶回复到非活性形式(见图14-14)。因CaM-PK II能保持对 Ca^{2+} 激活的“记忆”,因此人们认为神经组织中的CaM-PK II能作为神经记忆分子。

CaM-PK II的底物包括很多酶、骨架蛋白、离子通道和转录因子等,故在体内的功能十分广泛,表14-3列举了神经细胞中CaM-PK II的可能底物。

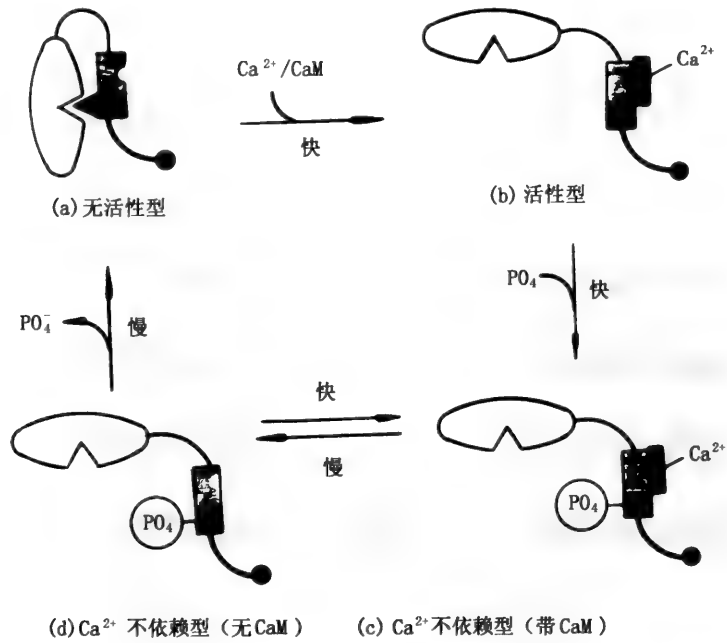


图 14-14 CaM-PK II 的激活过程

(a) 自抑制域和激酶域结合使酶无活力; (b) Ca^{2+}/CaM 与酶的 CaM 结合域结合使酶变构, 自抑制域脱离激酶域, 从而使酶活化; (c) 活化的酶发生 Thr286 自身磷酸化而成 Ca^{2+} 不依赖型; (d) Ca^{2+} 不依赖型的酶因 Thr286 仍有磷酸化而有活力

表 14-3 CaM-PK II 在神经细胞中的可能底物

底物蛋白	底物蛋白磷酸化与功能的关系
突触前	
突触蛋白 I	调节突触囊泡的可利用性
Tau 蛋白	调节轴突微管
色氨酸羟化酶	5-羟色胺合成
酪氨酸羟化酶	儿茶酚胺合成
突触后	
微管相关蛋白 I	调节树突细胞微管
谷氨酸受体 I	调节离子促进型谷氨酸受体
钙神经蛋白 (calnurin)	钙依赖性蛋白磷酸酶
基因表达	
S6	翻译因子
类固醇反应元件组合蛋白	转录因子

14.5.4 丝裂源激活蛋白激酶信号流中的蛋白激酶家族

丝裂源激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,简称 MAPK)是细胞信号转导过程中的一类重要的 Ser/Thr 蛋白激酶,普遍存在于各种生物中,因而存在 MAPK 家族。目前发现的哺乳细胞中 MAPK 家族至少有三个亚家族:(1) ERK(extracellularly-responsive kinase,简称 ERK);(2) JNK/SAPK(c-Jun N-terminal kinase,简称 JNK,或 stress-activated protein kinase,简称 SAPK);(3) p38-MAPK(见图 14-15A)。最近又发现一些 MAPK 的家族成员,如 ERK3、ERK5 和 p38 相关的蛋白激酶等,但它们的功能和调节还不清楚。所有这三个亚家族的 MAPK 的激活都有着共同的特点,即它们的活化都经过一个蛋白激酶的级联激活系统:MAPKKK(MAPK kinase Kinase)家族→MAPKK(MAPK kinase)家族→MAPK 家族。其中,MAPKKK 和 MAPK 都是 Ser/Thr 蛋白激酶,而 MAPKK 则是“双功能”激酶,既能磷酸化 Ser/Thr 又能磷酸化 Tyr(见图 14-15B)。但参与 ERK、JNK/SAPK 和 p38-MAPK 三个级联激活系统的 MAPKKK 和 MAPKK 都不相同。这一蛋白激酶超家族的种类十分繁多,虽然大部分都是 Ser/Thr 蛋白激酶,但有些 Ser/Thr 蛋白激酶具有 Tyr 蛋白激酶的活力。

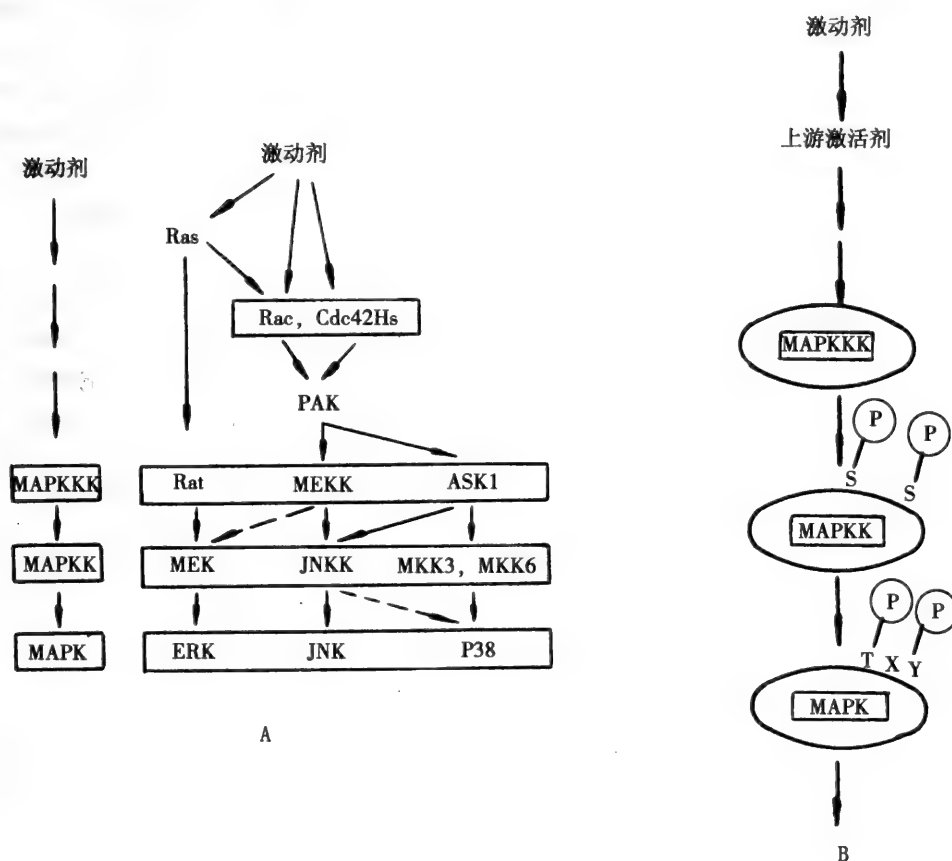


图 14-15 MAPK 信号流中的蛋白激酶

Ras、Rac、Cdc42Hs—小分子 G 蛋白;PAK—p21 相关蛋白激酶;B—MAPK 的级联激活;

S—丝氨酸;T—苏氨酸;Y—酪氨酸;X—任意氨基酸;P—磷酸基团

14.5.4.1 ERK 系统的级联成员

最早,在研究胰岛素和其他一些多肽生长因子刺激细胞时,由于受体 TPK 活化而发生微管相关蛋白-2 的磷酸化时发现了 ERK。随后发现,ERK 的活化过程是一系列蛋白激酶逐级连续激活的过程。这一系列蛋白激酶分别是:属于 MAPKKK 级的 Raf 亚家族;属于 MAPKK 级的 MEK1/MEK2 和属于 MAPK 级的 ERK 亚家族(见图 14-15A)。

A Raf

Raf 是一个病毒癌基因 *v-Raf* 同源的细胞基因 *c-Raf* 的产物,在脊椎动物中 Raf 主要有三种亚类, A-Raf、B-Raf 和 C-Raf-1, 分子量为 $(40 \sim 75) \times 10^3$ 。Raf 家族均含有三个高度的保守区 (CR), CR1 ~ CR3。CR1 为富含 cys 残基的结构域, 又称 CRD, 其中有锌指结构可以结合磷脂酰丝氨酸 (PS), 还有两个 Ras 结合域。CR2 富含 Ser/Thr 残基, 有磷酸化位点, 为 Raf 激酶活性的调节区。CR3 位于 C 端, 是 Raf 的 Ser/Thr 蛋白激酶的催化域, 含有 Tyr 和 Ser, 它们的磷酸化修饰也可改变 Raf 的激酶活性。最近还发现 C-Raf-1 的 C 末端还有和磷脂酸 (PA) 的高亲和结构域。

非活化状态的 Raf-1 通过 CR-1 结合的 PS 和一个称为 14-3-3 的 PS 结合蛋白相结合, 从而稳定 Raf-1 于非活化状态。Ras 经活化成 Ras-GTP 后, 与 Raf 的 Ras 结合域结合, 使 Raf 脱离 14-3-3 而从胞浆转位到膜上, 这一过程受到膜上的 PS 增强。但是 Raf 的完全活化, 尚需受非受体型 TPK 如 Src 的作用, 使 Tyr340 和 Tyr341 磷酸化, Raf-1 也可在 Ser259 上发生自身磷酸化而自身激活。此外, PKC 也可使 Raf-1 中 CR3 域的 Ser499 磷酸化而激活 Raf。反之, 在 Raf N 端的 Ser43 可受 PKA 磷酸化而抑制 Raf 的活性, 可见 PKC 和 PKA 分别使 C 端和 N 端磷酸化而双重调控 Raf 的活性。

B MEK

MEK 主要包括 MEK1 和 MEK2, 它们有一个富含 Pro 的结构域可以结合 Raf, 并作为 Raf 的底物受其磷酸化而激活。MEK 是可溶性酶, 然而, 是膜上活化后的 Raf 返回胞浆中激活 MEK, 还是 MEK 在近膜区域受 Raf 激活, 目前还不清楚。体外实验结果, C-Raf 和 A-Raf 能在缺乏膜的情况下磷酸化并 MEK 并激活 MEK。和其他 MAPKK 一样, MEK 是“双功能”激酶, 能先后有序地催化 MAPK 分子中 ThrXaaTyr(TXY) 模体的 Tyr 和 Thr 残基的磷酸化。在 MAPK 的 ERK 亚家族中的 TXY 模体是 TEY, 故 MEK 又称为 TEY 激酶, ERK 中的 Tyr 和 Thr 顺序磷酸化是 ERK 激活所必需的。

C ERK

目前已发现的 ERK 至少有三个: ERK1、ERK2 和 ERK3。ERK1 和 ERK2 的分子量为 44×10^3 和 42×10^3 (故通常又称为 p44-MAPK 和 p42-MAPK), ERK3 的分子量为 62×10^3 。其中 ERK1, 2 是研究得较清楚的 MEK 的底物。ERK 受 MEK 活化后可以转位到细胞核内, 使很多依赖磷酸化激活的转录因子或转录过程所需的酶发生磷酸化, 如转录因子 E1K-1 和 TAL-1 以及 RNS 聚合酶 II 等。其他核蛋白如 *c-fos*、*c-myc*、*c-myb*、Ets-2、p53 和 STAT 也可受到 ERKs 的磷酸化。一些结构蛋白, 如微管相关蛋白-2 等也能作为 ERK 的底物, 这些蛋白的磷酸化可以调节细胞的结构。有趣的是 ERK 的上游分子如 Sos 蛋白也可以受 ERK 的磷酸化, 这可能是一种反馈调节作用。和大多数 MAPK 一样 (ERK3 可能例外), ERK1 和 ERK2 是 Pro 依赖的 Ser/Thr 蛋白激酶, 优先磷酸化底物中有 ProXaaSer/Thr 或者至少是 Ser/ThrPro 结构。ERK3 的磷酸化模体则是 Ser Glu Gly (SEG)。

14.5.4.2 JNK/SAPK 系统的级联成员

最早发现某些细胞受一些生长因子、细胞因子作用或受癌基因转化后, 转录因子 *c-Jun* 的氨基末端被某个蛋白激酶磷酸化而激活, 人们将这一蛋白激酶称为 *c-Jun* 氨基末端激酶 (JNK)。另外, 也有人发现一些环境应激因素, 如紫外辐射、炎症细胞因子 (TNF- α , IL-1) 以及细菌脂多糖 LPS 等也能使 *c-Jun* 的氨基末端被磷酸化, 他们称这种激酶为紧张活化蛋白激酶 (SAPK)。经基因克隆后发现, JNK 就是 SAPK。JNK 也属于 MAPK 成员, 并和 JNKK、MEKK 构成一条 MAPK 信号途径 (图 14-15A)。

A MEKK

属于 MAPK 信号系统中的 MAPKKK 家族。包括 MEKK1、MEKK2 和 MEKK3。尽管 MEKK1 相当于 ERK 信号流中的 Raf, 但它不同于 Raf。纯化的 MEKK1 处于激活状态, 但它在静息细胞内可能和一种抑制剂结合, 而在外界刺激信号转入时脱离抑制剂而被激活。小 G 蛋白 Rac 和 Cdc42Hs 可通过 P21 蛋白活化激酶-1 (PAK-1) 调节 MEKK1。MEKK3 除了能磷酸化激活 JNKK 外, 可能还可激活 ERK 系统中的 MEK。

B JNKK

属于 MAPK 信号系统中 MAPKK 家族, 相当于 ERK 信号流中的 MEK。常见的是 JNKK1 (又称

MKK-4), 它们都是“双功能”激酶, 可以先后磷酸化底物 JNK 蛋白 ThrProTyr(TPY) 模体中的 Tyr 和 Thr, 从而活化 JNK, 故 JNKK 又称 TPY 激酶。JNKK 也能激活 p38 - MAPK。

C JNK/SAPK

属于 MAPK 信号系统中的 MAPK 家族, 相当于 ERK 信号流中的 ERK, 包括 JNK1、JNK2 和 JNK3 或称 SAPK α 、SAPK β 和 SAPK γ 。JNK1 和 JNK2 在多数细胞中表达, JNK3 则主要存在于神经细胞中。JNK 可使一些转录因子磷酸化, 如 JNK2 对 c-Jun 的亲合性最强, 使 N 端 Ser63、Ser73 磷酸化, 其次是 JNK1, 除 c-Jun 外, JNK 还能磷酸化其他转录因 TCF(ternary complex factor, 如 E1k-1) 和 ATF-2 (cAMP 反应元件结合蛋白家族成员) 等。

14.5.4.3 p38 - MAPK 系统的级联成员

脂多糖(lipopolysaccharide, 简称 LPS) 结合细胞表面 CD14 后, 引起细胞内 MAPK 信号流的激活, 尤其是诱导了一种分子量为 38×10^3 的蛋白质发生酪氨酸磷酸化, 这种蛋白质称为 p38 蛋白。经序列分析, 发现 p38 是 MAPK 家族成员。构成 p38 相关的 MAPK 系统的级联成员主要有: ASK1、MKK3/MKK6 和 p38(图 14-15A)。一些应激因素(除脂多糖外还有渗透压变化等)和细胞因子引导的细胞凋亡, 可能需要激活这一信号流。

A ASK1

最近才发现的 ASK1(apoptosis signal-regulating kinase 1, 简称 ASK1) 属于 MAPKKK 家族。它既能磷酸化 MKK3/MKK6, 也能磷酸化 JNKK1。有关 ASK1 的很多细节还很不清楚。

B MKK3/MKK6

属于 MAPKK 家族。在 6 种亚型的 MKK 中, 只有 3 和 6 型 MKK 是活化 p38 的蛋白激酶。它也是“双功能”激酶, 能先后磷酸化 p38 中的 Thr Gly Tyr(TGY) 模体中的 Tyr 和 Thr, 从而激活 p38, 故 MKK 又称 TGY 激酶。

C p38

属于 MAPK 家族。是酵母 HOG1 蛋白的结构同源物(HOG1 是酵母中的 MAPK 之一)。它可以受 MEK3、MEK4 和 MEK6 磷酸化而激活。作为蛋白激酶, 它本身可以磷酸化多种转录因子, 如 TCG、ATF-2 和 MEF-2C 等。

14.5.5 酪氨酸蛋白激酶

1980 年, 有人发现 Src 基因编码的蛋白质是一个专一性磷酸化酪氨酸的蛋白激酶, 称为酪氨酸蛋白激酶(tyrosin protein kinase, TPK), 简称酪氨酸激酶。自此, 越来越多的 TPK 及其底物相继被发现。所有的 TPK 可以简单的分成两大类: 受体型 TPK(R-TPK) 和非受体型 TPK(TPK)。

14.5.5.1 受体型 TPK

受体型 TPK 包括许多具有跨膜结构的多肽类生长因子受体, 如表皮生长因子(EGF)受体、血小板源因子(PDGF)受体、集落刺激因子(CSF)受体、肝生长因子(HGF)受体、胰岛素受体等。一些配体还不很清楚的细胞表面受体, 如 ret、eck 等基因编码的产物也属受体型 TPK。

A 受体型 TPK 的亚类

根据结构上的特点, 尤其是配体结合域中的一些序列的相似性及结构特点, 受体型 TPK 又可分成九个亚类, 同一亚类中的成员有共同的结构特点(见图 14-16)。

B 受体型 TPK 的结构特点

受体型 TPK 包含四个功能域。从氨基末端开始, 有一个由数百个氨基酸组成的细胞外配体结合域, 这个区域通常被糖基化修饰。跨膜区域包含一段疏水性氨基酸组成的多肽链, 跨膜一次, 在胞浆段有一个催化域和调节域。配体结合域是受体 TPK 结构中最具特色的部分, 由多种可识别序列组成(见图 14-16)。有的含多半胱氨酸残基结构、有的含多个免疫球蛋白样结构、有的含纤连蛋白(fibronectin)样结构等, 这些不同结构模体的折叠构成了配体专一性结合位点。跨膜域将受体固定在细胞质膜上, 当配体和受体结合后, 跨膜域在结构上可能发生一系列的变化, 此结构的变化可

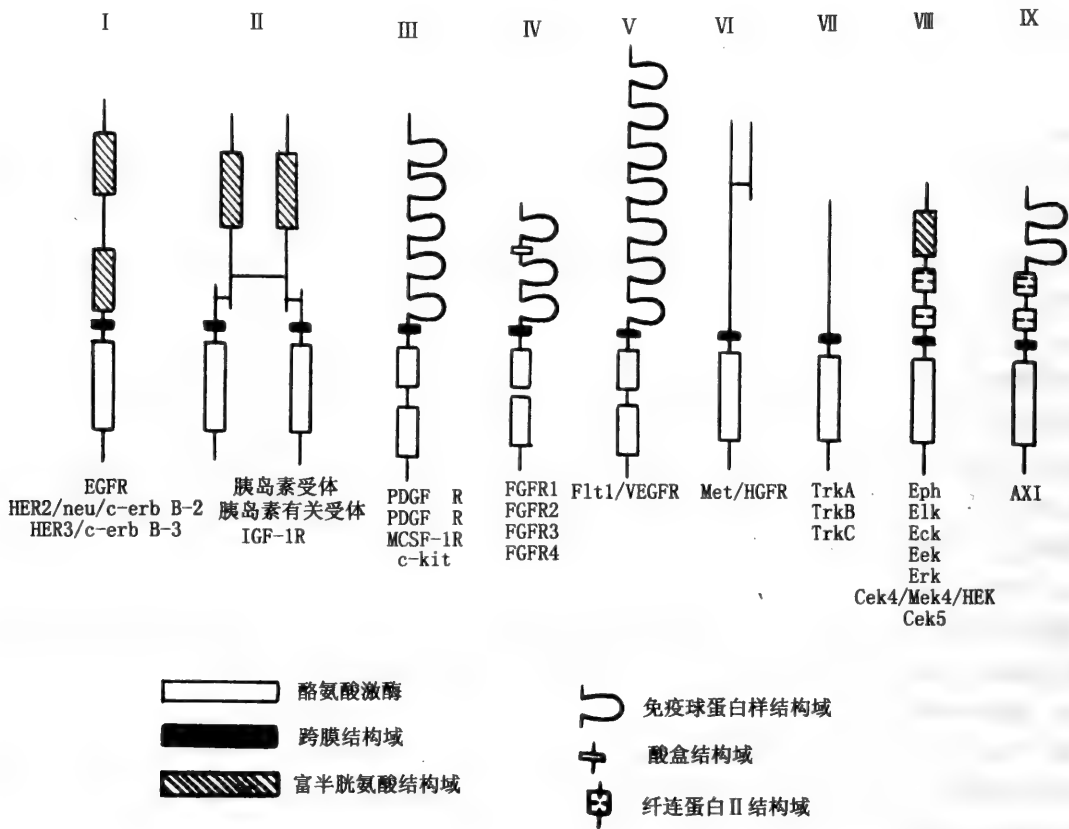


图 14-16 不同类型受体 TPK 的结构

EGFR—表皮生长因子受体;IGF-1R—类胰岛素生长因子-1受体;PDGF α R、PDGF β R—血小板源生长因子 α 、 β 受体;MCSF-1R—单核集落刺激因子-1受体;FGFR—纤维生长因子受体;VEGFR—血管内皮细胞生长因子受体;HGFR—肝生长因子受体;HER-2/neu/c-erb b、c-kit、Flt1、Met、Trk、Eph、Elk、Eck、Eek、Erk、Cek4/Mek/HEK、Cek5—均为相应的细胞基因产物;AXI—一种受体蛋白

以引起受体的聚合而激活受体。催化域大约由 260 个氨基酸残基组成。与 Ser/Thr 蛋白激酶不同, TPK 在催化域有二个保守的模体, 第一个为 DLAARN; 第二个是 VPIKW, 其中色氨酸(W)和脯氨酸(P)高度保守。两个保守模体都可能存在于活性中心附近, 第一个保守模体中的 AAR, 其精氨酸(R)带正电荷, 可以与 ATP 的 γ 磷酸基团形成离子键, 第二个保守模体可能与底物酪氨酸的识别有关。有趣的是, 有些 TPK 的催化域被一些激酶插入序列(kinase insert region)分开, 但在空间上, 催化域可能并没有被分开, 因这些插入序列可能是形成突出的环而存在。TPK 的调节域可能有多处, 如羧基端近膜侧的区域和插入序列。这些区域包含很多对 TPK 正常功能有重要意义的结构信息, 如包含自身磷酸化的位点, 被 Ser/Thr 蛋白激酶磷酸化的位点, 以及一些与其运输、活性下调等方面的调节有关的位点。

14.5.5.2 非受体型 TPK

非受体型 TPK 不具备和配体结合的能力, 它们一般存在于细胞浆和胞内颗粒性组分中, 分子量从 40×10^3 到 120×10^3 不等。在各种组织和细胞中广泛存在。

A 非受体型 TPK 的分类

根据在亚细胞定位和表达情况, 非受体型 TPK 可以分成八类, 分别为 Src, Fak, Abl, Syk, Fps, Jak, Csk 和 Btk 八个家族(见表 14-4)。

B 非受体型 TPK 的结构

与受体型 TPK 不同, 非受体型 TPK 没有配体结合域和跨膜域, 除了有激酶活性和催化域外(Src 家族有保守的模体 DLRAAN), 大多还有 SH2 结构, 或兼有 SH2 结构和 SH3 结构。SH2 结构约 100

个氨基酸组成,含有和磷酸酪氨酸肽段结合的位点。SH3 结构域约 60 个氨基酸组成,含有富含脯氨酸肽段结合的位点(见图 14-17)。

表 14-4 非受体型 TPK 的表达组织和亚细胞分布

家族	成员数	表达的组织	亚细胞分布
Src	9	广泛表达	各种细胞膜质结构
Fak	1	广泛表达	细胞粘着斑
Abl	2	广泛表达	胞核及胞质
Syk	2	Syk 在 B 细胞,ZAP-70 在 T 细胞	胞质
Fps	3	Fer, Flk 广泛表达	胞核及胞质
		Fps 主要在造血细胞	胞质
Jak	3	大多造血组织	胞质
Csk	1	广泛表达	胞质
Btk	3	某些造血细胞,Tec 在肝脏	胞质

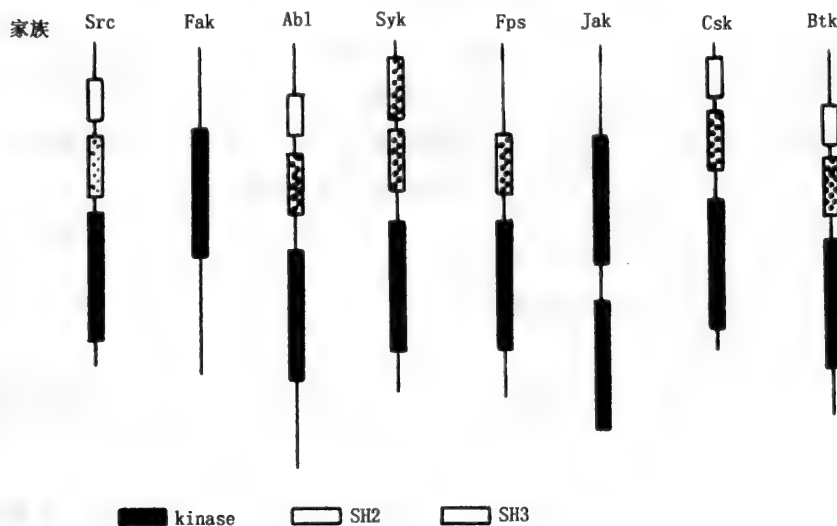


图 14-17 几种非受体型 TPK 的结构

有的家族如 Src 家族,N 端的 15 个氨基酸是膜定位必需的,这部分结构可以在蛋白翻译后加工过程中发生豆蔻酰化。除 Src 和 Btk 外,Src 家族的其他成员通常还在半胱氨酸上有棕榈酰化,这两种脂肪酰化都是它们锚定在膜上所必需的。

14.6 重要的细胞跨膜信号转导通路

各种能影响细胞活动的外界信号分子,诸如激素、细胞因子、神经递质,乃至药物、毒素以及环境物理因素均有各不相同的信号转导通路。严格说来,凡能引起不同生物效应的因素都有各自特异的信号转导通路。但是相似的化学物质或能引起相似生物效应的物质往往有类似的信号转导方式。本节拟将几类重要的细胞跨膜转导通路予以介绍。

14.6.1 环腺苷酸介导的跨膜信号转导

这是最早被发现的细胞信号转导系统。1957 年 Sutherland 用肾上腺素作用于破碎的肝细胞

后,发现磷酸化酶活性增高。进一步发现这一作用与一种热稳定因子 cAMP 的产生有关,后来以 cAMP 加入肝切片,同样激活磷酸化酶,并促进糖原分解,从而提出了肾上腺素的作用是通过 cAMP 而实现的观点,将 cAMP 称为第二信使。

14.6.1.1 以 cAMP 为第二信使的信号分子

大多数肽类激素,包括下丘脑的释放激素、垂体促激素、抗利尿激素、甲旁腺素、绒毛膜促性腺激素、胰高血糖素等都是通过细胞膜上相应的受体,将信号传至 G_s 蛋白,经 G_s 激活腺苷酸环化酶(AC),引起 cAMP 合成增多。儿茶酚胺的 β 受体(典型配体为异丙基肾上腺素)也通过类似的方式激活 AC 和升高 cAMP。因此,cAMP 是这类激素的第二信使。毛猴碱毒素(Forskolin)则可不依赖 G 蛋白的情况下激活 AC。然而 AC 也可受到一些信号分子的负调控,如生长抑素(somatostatin)受体和儿茶酚胺 α_2 受体(典型配体为去甲肾上腺素)可通过 G_i 蛋白抑制 AC 的活性,使 cAMP 的浓度下调。不同组织的前列腺素 E1 的受体因偶联不同的 G 蛋白 G_o 或 G_i ,故对 cAMP 的生成有不同的作用。

14.6.1.2 cAMP 的第二信使作用

cAMP 的生物效应几乎全部是通过 PKA 来实现的,cAMP 结合 PKA 的调节亚基,使调节亚基与催化亚基解聚而活化 PKA 的催化亚基。后者可通过一系列蛋白激酶引起磷酸化级联反应,最后激活或抑制一些代谢过程的关键酶。以下列数例说明之,其中(+)代表酶受磷酸化而激活,(-)代表酶受磷酸化而抑制。

- (1) PKA→糖原磷酸化酶 b 激酶(+)→糖原磷酸化酶 b 型转为 a 型(+)→糖原分解。
- (2) PKA→糖原合成酶 D 型转为 I 型(-)→糖原合成减少。
- (3) PKA→磷酸果糖-2-激酶(-)/果糖-1,6-二磷酸酯酶(+)(该两酶活力存在于同一蛋白质的不同结构域)→果糖-2,6-二磷酸浓度下降→糖酵解减弱,糖异生增强。
- (4) PKA→丙酮酸脱氢酶(-)→糖氧化分解减弱。
- (5) PKA→乙酰 CoA 羧化酶(-)→脂肪酸合成减少。
- (6) PKA→甘油三酯脂肪酶(+)→脂肪分解增强。

14.6.1.3 cAMP 介导的转录水平的调控

cAMP 激活 PKA 后,除了可以使一些代谢相关的酶发生磷酸化以调节代谢外,活化的 PKA 催化亚基也可以进入核内,磷酸化一些转录因子,直接调节转录因子的活性,从而激活 cAMP 诱导的基因表达。

细胞核内基因 DNA 受 cAMP - PKA 诱导的基因转录调控区,都存在着一个由 8 个碱基组成的共同 DNA 序列,TGACGTCA,称为 cAMP 反应元件(cAMP response element, CRE)。能与 CRE 结合的蛋白质,称为 CRE 结合蛋白(CRE binding protein, CREB)。目前发现的 CREB 至少有 10 种以上,它们的 C 端都有亮氨酸拉链结构,为 DNA 结合域。N 端为转录活化域,包含两个不同的区域,一个是磷酸化盒(phosphorylation box, P-Box)或称为激酶诱导域(KID),包含多个磷酸化位点,可以被多种激酶磷酸化,如 PKA、PKC、糖原合成酶激酶-3 和酪蛋白激酶(CK) I 和 II 等。另外一个存在于 P-Box 两边的富含 Gln 残基的区域(Q1 和 Q2 区),可能与 RNA 聚合酶的结合有关。当 PKA 的催化亚基进入核内,使 CREB 的 P-Box 上 133 位 Ser 磷酸化而活性增强,催化亚基还可使一些其他有关蛋白质如 CRE 调节蛋白(CREM)和转录因子 ATF 等因磷酸化而激活,结果引起基因的表达(见图 14-18)。

14.6.1.4 cAMP 的降解

细胞内 cAMP 的水平也受到 cAMP 磷酸二酯酶的调节,此酶能水解 cAMP 成 5'-AMP,使 cAMP 的刺激信号终止。很多 cAMP 磷酸二酯酶受到胞浆 Ca^{2+} 水平升高的活化, Ca^{2+} 结合到钙调蛋白, Ca^{2+} /钙调蛋白复合物可以结合到 cAMP 磷酸二酯酶,从而激活 cAMP 磷酸二酯酶活性,使 cAMP 水解。

14.6.1.5 环鸟苷酸通路和环腺苷酸通路的比较

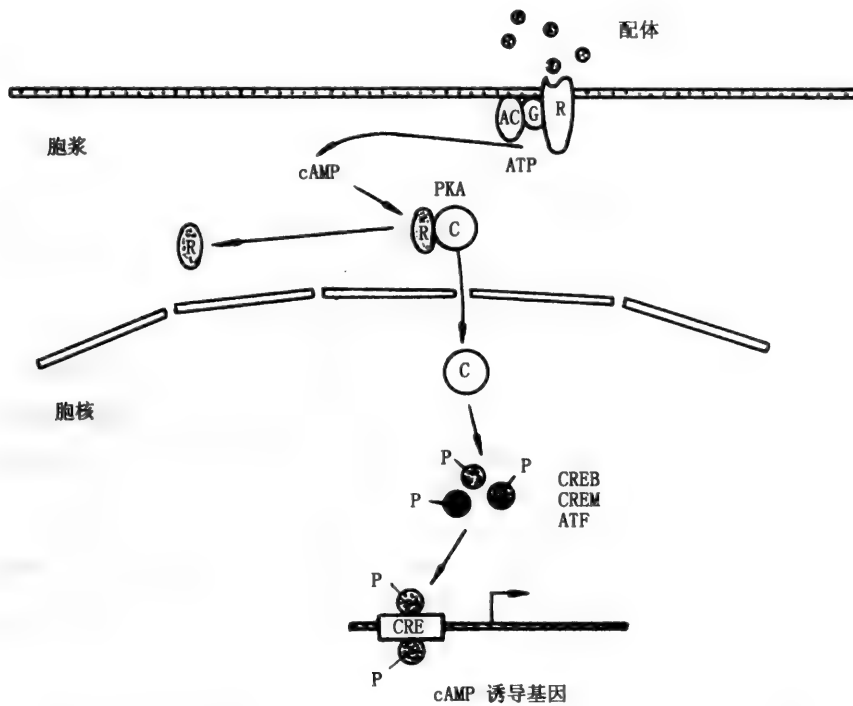


图 14-18 cAMP 信号转导引起的基因转录

R(膜上)—受体; G—G 蛋白; AC—腺苷酸环化酶; R(胞浆)—PKA 调节亚基; C—PKA 催化亚基; CRE—cAMP 反应元件; CREB—CRE 结合蛋白; CREM—CRE 调节蛋白; ATF—一种转录因子

环鸟苷酸(cGMP)是由鸟苷酸环化酶(GC)产生的,后者不需要和 G 蛋白偶联而本身就是一种跨膜受体,可与外界信号分子如心房利钠肽直接结合。cGMP 通过蛋白激酶 G(PKG)使一系列蛋白质磷酸化,引起激活或失活,从而表现生物效应。有趣的是 cGMP 引起的生物效应在很多方面恰巧和 cAMP 相反,如 cGMP 降低细胞内 Ca^{2+} 浓度,降低心肌收缩力,而 cAMP 则使细胞内 Ca^{2+} 浓度上升而促进心肌收缩。因此,过去曾把 cAMP 和 cGMP 看作对生理效应的正负调节剂,提出所谓“阴阳”学说。

14.6.2 磷脂酶 C 介导的跨膜信号转导

磷脂酶 C 中 PC-PLC 的产物是甘油二酯(DAG)和磷酸胆碱,其中 DAG 有第二信使的作用;而 PI-PLC 除产生 DAG 外,还生成 1-1,4,5- P_3 (IP_3),均有第二信使的作用。故此处分别介绍 PI-PLC/PC-PLC-DAG-PKC 和 PI-PLC- IP_3 两条信号转导通路。

14.6.2.1 磷脂酶 C-甘油二酯-蛋白激酶 C 通路

A 激活 PLC 的信号分子

表 14-5 总结了一些重要的激活 PI-PLC 的胞外信号分子和受体,PI-PLC 的激活有通过 G 蛋白和 TPK 两种方式。有些因子主要通过 G 蛋白,如胆碱能蕈毒碱 m 受体和肾上腺能 α_1 受体激动剂的信号以及蛙皮素、凝血酶等,另一些则主要通过受体 TPK,如生长因子 EGF 和 PDGF;或非受体型 TPK,如 IL-6。但也有些信号分子在目前还缺乏主要通过哪一方式激活 PI-PLC 的报道,其中有些分子如下丘脑和垂体激素也能通过 cAMP 转导信号,可能一个信号分子作用于不同细胞的受体时会引起不同的信号转导方式,如抗利尿激素(加压素 Vesopressin)作用于肾脏时,主要通过 cAMP 通路。而作用于肝脏时则主要通过 PI-PLC-DAG-PKC 通路。

对激活 PC-PLC 的专一性信号分子还所知甚少,可能表 14-5 中的一些因子也激活 PC-PLC,但激活较慢。

表 14-5 一些主要的激活 PI-PLC 的胞外信号分子和受体

分类	信号或受体
神经递质及其受体	胆碱能毒蕈碱样受体 (m1, m2, m3, m5), 肾上腺能受体 (α 1), 组胺受体 (H1), 5-羟色胺受体 (5-HT1, 5-HT2), 腺嘌呤能神经肽 Y 受体
炎症介质	缓激肽, P 物质, 乙酰 MetLeuPhe 趋化因子 血小板活性物质 (PAF)
下丘脑及垂体激素	甲状腺刺激素 (TSH) 释放激素, 促性腺激素释放激素 (GRH), 促肾上腺皮质激素 (ACTH), 生长激素, 加压素, 催产素
胃肠道及其他激素	胃泌素, 胰泌素, 胆囊收缩素, 蛙皮素, 血压高张素
生长因子及促分裂因子	EGF, PDGF, 纤维生长因子 (FGF), 神经生长因子 (NGF), 凝血酶, 磷脂酸
细胞因子	白细胞介素 IL-1, IL-4, IL-6, IL-7, 白细胞抑制因子 (LIF), 睫状促神经因子 (CNTF), 抑瘤素 M, T 细胞受体-CD3 复合物, 膜结合性 IgM, IgE 的高亲和受体, IgD 受体, IgG 受体家族
二十烷类化合物	前列腺素 D2, E2, 血栓素 A2, 白三烯 D4
其他	内皮素, 含甘露糖-6-磷酸的肽, 铜蛋白, 胶原, 精子, 血清因子, α -酮异己二酸, 1,25-二羟维生素 D ₃ , 葡萄糖, 乙醇, 苦味剂

B 甘油二酯的生成和作用机理

PI-PLC β 受 G 蛋白 G $_q$ α 或 G $\beta\gamma$ 激活, 或 PC-PLC γ 被受体或非受体 TPK 激活后, 催化 PI-4, 5-P₂ 水解生成的 DAG 是脂溶性的, 生成后仍停留在膜上, 是常规型和新型蛋白激酶 C (PKC) 的特异性激活剂, 主要与 PKC 调节结构域中的 CCR2 结合, 引起 PKC 变构, 使假底物模体在空间上脱离被其阻断的催化中心而引起酶的激活。佛波酯 (PMA) 具有 DAG 类似的立体结构, 也可激活 PKC, 并促进 PKC 从胞液转至膜结构, 再受膜上的磷脂激活。但 PMA 激活 PKC 的作用并不持久, 用 PMA 长期处理细胞, PKC 活力反而降低, 甚至消失。这就是 PKC 特有的下降调节, 可能和 PMA 诱导 PKC 转至膜上, 被一种依赖钙的蛋白酶 Calpain 水解有关。

DAG 激活 PKC 的过程通常还需要 Ca²⁺ 及磷脂酰丝氨酸等其他物质。Ca²⁺ 与 PKC 的 Ca²⁺ 结合域 (CaBS) 结合后, PKC 转位到细胞膜上, 使位于膜上的 DAG 在磷脂酰丝氨酸 (PS) 帮助下激活 PKC。当然, 一些新型 PKC (nPKC) 并不需要 Ca²⁺ 参与激活, 也有一些非典型 PKC (aPKC) 的激活, 还不需要 DAG 激活等, 这些 PKC 可能受到不饱和脂肪酸 (FFA) 和 PI-3,4,5-P₃ 等其他因素的激活。

目前普遍认为: 受 PI-PLC 作用来自 PI-4,5-P₂ (PIP₂) 的 DAG 和受 PC-PLC 作用来自磷脂酰胆碱 (PC) 的 DAG 都能激活 PKC。来自 PI-4,5-P₂ 的 DAG 量少, 产生速度快, 持续时间短, 可以使 PKC 迅速激活, 从而引发早期的细胞的反应, 如激素和神经递质的释放以及酶的分泌等。但 PKC 大量持续的激活则在时相上较 PIP₂ 产生的 DAG 出现较晚, 与 PC 水解产生的 DAG 时相一致 (见图 14-19)。它和一些细胞的晚期效应, 如增殖和分化等有关。至于 PC 产生 DAG 的途径, 大多认为是经磷脂酶 D (PLD) 首先生成磷脂酸 (PA), 再经 PA 磷酸酶生成 DAG。由于 PKC 也可激活 PLD, 所以很可能先由 PIP₂ 产生的 DAG 首先激活 PKC (快相), PKC 再激活 PLD, 从而产生晚期 DAG 及 PKC 激活的慢相。至于 PC-PLC 使 PC 直接水解生成 DAG 的途径是否在激活 PKC 上有生理意义, 尚有不同的意见。PLA₂ 的产物不饱和脂酸和溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 对 PKC 的激活则既快速又持久。

来自 PIP₂ 和来自 PC 的 DAG 在结构上有不同的特征。来自 PIP₂ 的 DAG, 除甘油上 1 位的脂肪酸通常是硬脂酰基外, 2 位多为不饱和的脂肪酸链, 通常为廿碳花生四烯酸; 而来自 PC 的 DAG 则其 1 位主要是饱和的豆蔻酸, 而 2 位是只有 1 个和 2 个双键的不饱和的油酸和亚麻酸。由于两种 DAG 的脂肪酸组成不同, 受 DAG 激酶催化而转变成 PA 的速度不同, 可能是 PIP₂ 来源的 DAG 作用短暂而 PC 来源 DAG 作用持久的机理。

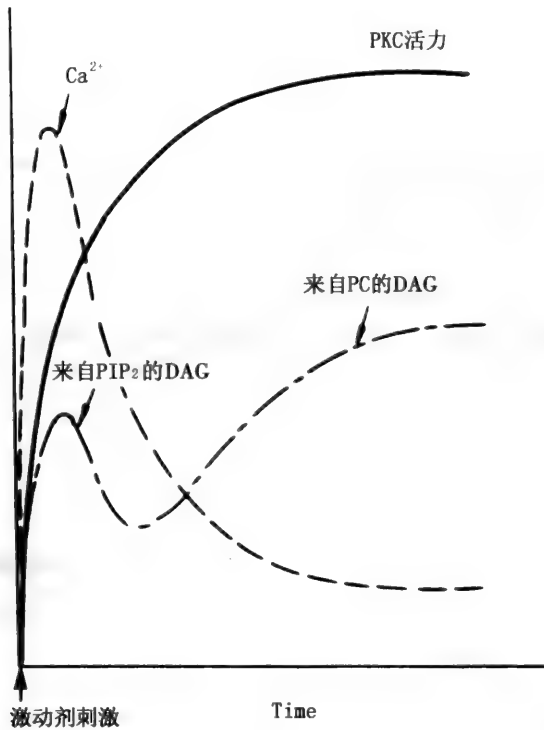


图 14-19 细胞受外界信号(激动剂)刺激后细胞内 Ca^{2+} 、DAG 和 PKC 活力的变化
 PIP_2 —磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸; DAG—甘油二酯; PC—磷脂酰肌醇

C 蛋白激酶 C 的底物蛋白

PKC 的生物效应是通过对众多底物蛋白的磷酸化来实现的, 目前已知 PKC 的底物蛋白约有下列几类, 但大多是在体外实验证明的, 体内是否如此还有待于证实, 故这些 PKC 底物被磷酸化的生理意义有些还不明了。

(a) 酶。如糖原磷酸化酶激酶, 糖原合成酶, 甲羟戊二酰 CoA 还原酶, 酪氨酸羟化酶, 腺苷酸环化酶, 肌球蛋白轻链激酶等。

(b) 收缩蛋白和细胞骨架蛋白。如肌球蛋白轻链, 肌钙蛋白, 钙桥蛋白, 微管相关蛋白等。

(c) 膜蛋白。 Ca^{2+} -ATP 酶, Na^+/K^+ -ATP 酶, Na^+/H^+ 交换泵和 GTP 酶激活蛋白(GAP)等, 后一作用 GAP 抑制而使 Ras 处于激活状态。

(d) 信号转导蛋白。如 Raf 的 Ser499 位可受 PKC 磷酸化而激活, 使 PKC 信号通路和生长因子通路(Raf - MEK - ERK)实行对话(cross talking)。PKC ζ 抑制 PKB, 使 PKC 信号通路调控胰岛素/生长因子通路。

(e) 膜受体。如 EGF 受体, 胰岛素受体, 生长激素介质 C 受体, IL-2 受体, 胆碱能烟碱样受体, β 肾上腺能受体等。通过这些受体调节区的磷酸化, 对受体实现反馈调节。如 EGF 和胰岛素受体 C 端的 Ser 或 Thr 被磷酸化后, 可抑制受体的 TPK 活性和对 EGF 的亲合力。

(f) 转录因子。PKC 可从胞液转至胞核, 使一些转录因子发生磷酸化, 如使 Fos 和一种丝氨酸蛋白磷酸酶磷酸化, 后一作用可使 Jun 蛋白脱磷酸。磷酸化的 Fos 和脱磷酸的 Jun 形成异二聚体 AP-1, Jun 也可形成同二聚体, 影响基因转录。PKC 还可使血清反应因子(SRF)磷酸化而使 SRF 结合于 c-fos 基因调节区的 DNA 序列(血清反应元件 SRE), 从而促进 fos 基因的转录和合成, 使细胞内的 fos 蛋白增加。此外, PKC 还可使穿梭蛋白(shutter protein)样的转录因子转至细胞核, 如 NF- κ B 是一种穿梭于胞质及胞核的异四聚体转录因子, 在胞质中和抑制蛋白 I κ B 结合, PKC 使 I κ B 磷酸化而脱离 NF κ B, 促使后者转位至胞核, 发挥转录因子的作用, 调节基因转录。

D 蛋白激酶 C 和基因转录

佛波酯 PMA, 又称 TPA, 能直接激活 PKC 而影响基因转录, 在很多 DAG - PKC 途径激活的基因调控区, 存在着一个共同的序列 TGAGTCA, 称为 TPA 反应元件 (TPA - responsive element, TRE), 上述 AP - 1 可结合到 TRE 上, 然后促进基因转录。

E 甘油二酯的转变

甘油二酯可以酰化成甘油三酯或水解成甘油一酯或甘油, 也可磷酸化成 PA。PA 可以重新合成磷脂酰肌醇, 组成磷脂酰肌醇循环 (见图 14 - 20); 或被 PLA_2 水解成 LPA。

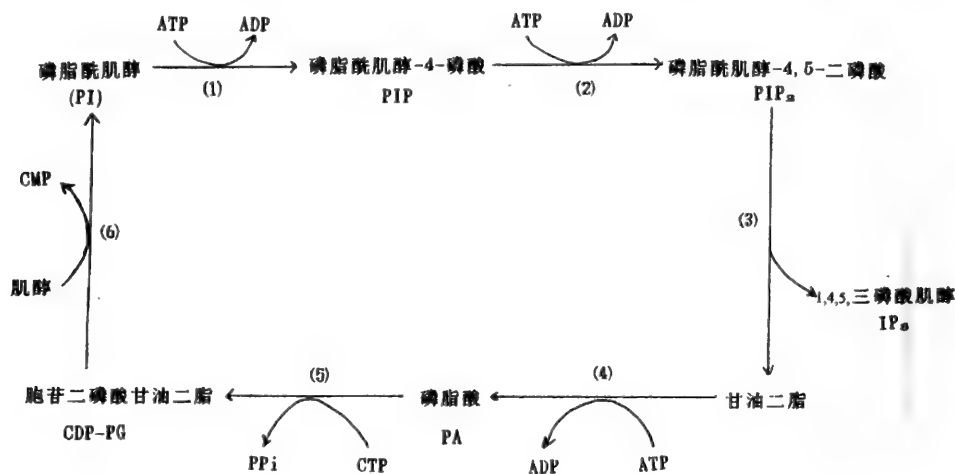


图 14 - 20 磷脂酰肌醇循环

- (1) 磷脂酰肌醇-4-激酶; (2) 磷脂酰肌醇-5-激酶; (3) 磷脂酰肌醇专一性磷脂酶 C;
(4) 甘油二酯激酶; (5) CTP 磷酸胞苷酸转移酶; (6) CDP 甘油二酯肌醇转移酶 (PI 合成酶)

14.6.2.2 磷脂酰肌醇专一性磷脂酶 C - 肌醇三磷酸 - Ca^{2+} 介导的跨膜信号转导

PI - PLC 水解 PI - 4,5 - P₂ 的另一产物是 IP₃, IP₃ 可动员细胞内钙库释放 Ca^{2+} , 再通过 Ca^{2+} 或 Ca^{2+} - 钙调节蛋白 (CaM) 复合物转导信号。

A 三磷酸肌醇的信使作用

肌醇三磷酸 (I - 1,4,5 - P₃, IP₃) 是水溶性的小分子, 可以从产生的胞膜内侧部位进入到胞液中。IP₃ 可以被内质网或肌浆网膜表面的 IP₃ 受体专一性的识别, IP₃ 本身有 Ca^{2+} 通道的功能, 因而开放 Ca^{2+} 通道, 使储存在内质网或肌浆网内的 Ca^{2+} 释放入胞浆中, 使胞浆中 Ca^{2+} 浓度升高。内质网内的 Ca^{2+} 贮备枯竭后, 还能激活细胞膜的钙通道, 引起胞外 Ca^{2+} 内流。胞液 Ca^{2+} 浓度升高后, 可诱导一系列的变化。

B Ca^{2+} 的信使作用

Ca^{2+} 升高可以激活 PKC 和钙调蛋白依赖性蛋白激酶 (CaM - PK), 再使得一系列酶磷酸化, 如活化酪氨酸羟化酶、色氨酸羟化酶后可加速儿茶酚胺、5'-羟色胺等神经递质的合成。CaM - PK 使平滑肌的肌球蛋白轻链磷酸化后, 还可引起平滑肌收缩或张力增加。磷酸化细胞的微丝蛋白、微管蛋白等后可调节细胞的形态和运动。 Ca^{2+} 的升高还可进一步激活 PI - PLC, 促进 IP₃ 产生, 构成正反馈调节。 Ca^{2+} 离子浓度过高又能抑制 IP₃ 介导的胞内钙释放, 以防 Ca^{2+} 过高造成细胞损伤。胞内 Ca^{2+} 的释放主要依靠 Ca^{2+} 泵将 Ca^{2+} 泵出细胞外, Ca^{2+} 信号的升高和降低, 在数分钟内完成, 而 CaM - PK 的活性可维持较长时间。

C IP₃ 的代谢

IP₃ 代谢主要有二方面途径: 一是在 5'-磷酸酶作用下水解生成 I - 1,4 - P₂ 而失活, 另一途径是在某种磷酸肌醇 3-激酶作用下, 进一步磷酸化, 生成 I - 1,3,4,5 - P₄。近年来发现, I - 1,3,4,5 - P₄ 也有第二信使功能, 它可以促进 Ca^{2+} 从胞外进入到胞内。最后, I - 1,3,4,5 - P₄ 可以进一步水解成

I-1,3,4-P₃, 这种肌醇三磷酸与 I-1,4,5-P₃ 不同, 是一种失活形式, 用以重新合成 PI-4,5-P₂。

14.6.3 受体酪氨酸蛋白激酶介导的跨膜信号网络

通过受体酪氨酸蛋白激酶(R-TPK)介导的信号分子主要是包括某些生长因子在内的细胞因子, 胰岛素因具有类似生长因子的作用, 并且受体十分类似生长因子受体, 故属于生长因子受体家族。

当生长因子等信号分子和受体结合后, 首先导致受体的二聚化, 通过这一过程, 使胞内的 TPK 结合域互相靠拢, 并互相磷酸化二聚体中对方单体的一些 Tyr 残基, 这些残基位于受体胞内 C 端的调节域, 处于一定的位点, 不同位点的磷酸化 Tyr 可以召集带有 SH2 结构的下游分子, 包括一些酶和衔接蛋白(参阅图 14-3), 使后者激活并将信号转导下去, 形成复杂的信号转导网络, 主要有下列四条通路(见图 14-21)。

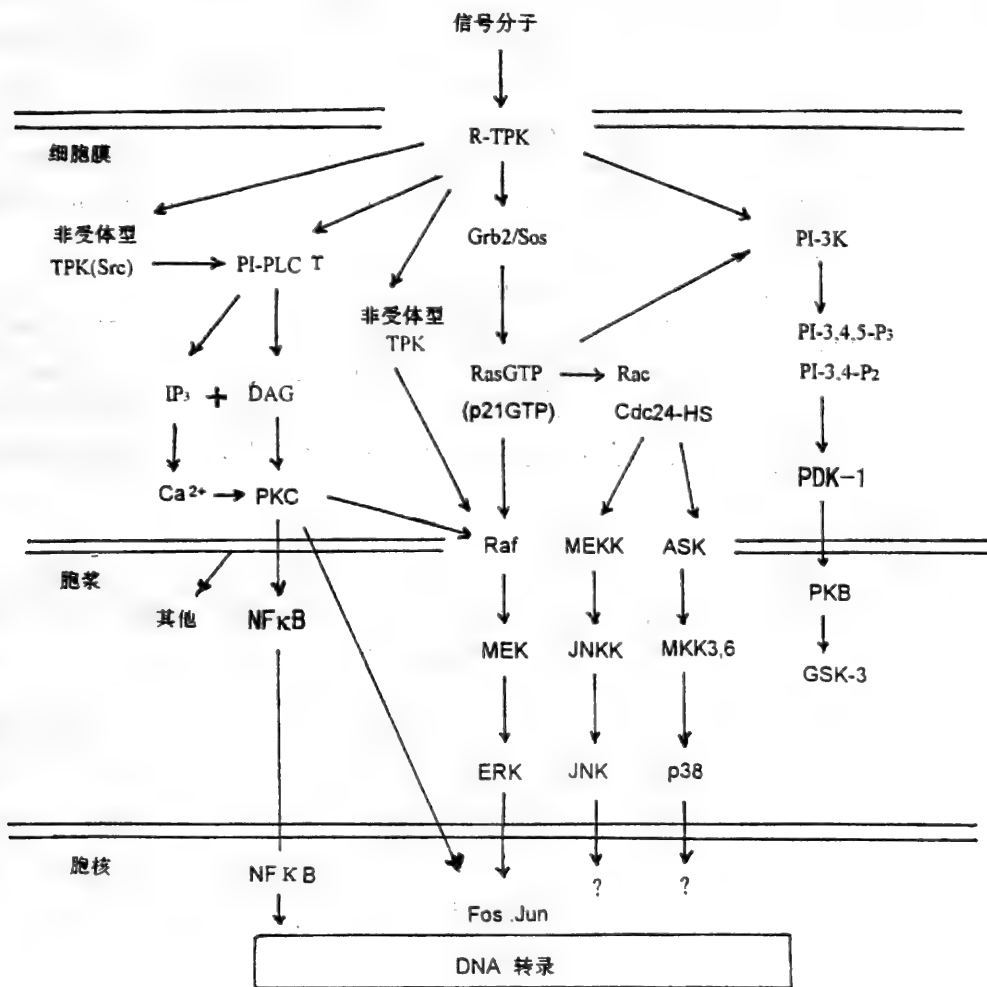


图 14-21 受体 TPK 跨膜信号转导通路网络
各种缩写字号见正文说明, 并见图 14-2、14-3、14-18、14-15

14.6.3.1 Grb2/Sos 衔接蛋白-Ras 通路

这已在本章小分子 G 蛋白 Ras 部分予以介绍, Grb2-Sos 复合物中的 SH2 和受体的磷酸化 Tyr 结合后, 可发挥鸟苷酸释放蛋白(GNRP)的作用, 使 Ras 从 GDP 结合形式转变成 GTP 结合形式而活化(参阅图 14-2), 活化的机理可能与 Ras 效应结构域中的 Tyr35 与 GTP 的 γ 磷酸结合后发生构象

变化有关。另一方面,实验表明:Ras 的 GTP 酶激活蛋白(GAP)也含有 SH2 结构,可以和活化受体直接结合,并成为受体 TPK 的底物。通过酪氨酸的磷酸化,改变 GAP 的活性,转而调节 Ras 的活力。Ras 被活化后,主要可由下列三种方式将信号下传(见图 14-21)。

A Raf - MEK - ERK 级联系统

活化 Ras 可和 Raf - 1 的 Ras 结合域结合,使 Raf - 1 脱离其抑制蛋白 14 - 3 - 3,转位到膜上,从而活化 Raf - 1。再将 Raf - 1 的信号经 MEK 转导至 ERK,ERK 受磷酸化激活后可转移至细胞核内使一系列的转录因子发生磷酸化而启动转录,其中包括 Fos 和 Jun。

B 小 G 蛋白系统

活化的 Ras 也可激活另一型小 G 蛋白 Rac 或 Cdc42 - Hs,然后再将信号逐级转至 JNK/SAPK 级联系统或 p38 - MAPK 级联系统(参阅图 14 - 15),但这一通路的细节以及生理意义尚不清楚。

C PI - 3K - PKB 系统

I 类 PI - 3K 的催化亚基都有一个 Ras 结合域,可和活化的 Ras 结合而被激活,其激活机理可能和 Ras 促进 PI - 3K 转膜有关。PI - 3K 信号再经 PI - 3,4,5 - P₃ 或 PI - 3,4 - P₂ 激活 PDK - 1 或使 PKB 转膜而向下转导至 PKB,这是生长因子信号转导入 PI - 3K - PKB 通路的一个中转站。

14.6.3.2 磷脂酰肌醇专一性磷脂酶 C γ 通路

PI - PLC γ 有两个 SH2 结构域,也可和 R - TPK 的某一磷酸 Tyr 位点结合,R - TPK 使 PI - PLC γ 的 Tyr783,771 和 1254 磷酸化,从而激活 PI - PLC γ ,后者使 PI - 4,5 - P₂ 水解生成 DAG,转而激活 PKC,使生长因子的信号转入 PKC 通路。

14.6.3.3 磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B 通路

PI - 3K 系统除可通过 Ras 激活,也存在不依赖 Ras 的激活通路。因 I 类 PI - 3K 的 p85 调节亚基的 C 端带有 SH2 结构域,可直接和自身磷酸化的 R - TPK 中磷酸 Tyr 位点结合,其 Tyr 可被 R - TPK 磷酸化而激活,也同样可启动 PI - 3K - PKB 通路。这是一条新发现的转导胰岛素/生长因子信号的另一条 R - TPK 通路,这些生长因子主要包括 PDGF、神经生长因子 NGF 和类胰岛素生长因子 IGF。

A PI - 3K 的激活

胰岛素受体结合胰岛素而活化后,其磷酸化的 Tyr 先和一类胰岛素受体底物蛋白(IRS - 1,可能还存在 IRS - 2)结合,IRS 有多个 Tyr 磷酸化位点,这些 Tyr 被胰岛素受体 TPK 磷酸化后,可以和 Grb2/Sos 复合物结合,活化 Ras,转而活化 PI - 3K;Tyr 磷酸化的 IRS 也可以和 I - A 类 PI - 3K 的 p85 调节亚基中 SH2 结构域结合而激活 PI - 3K。另外,也发现了其它类似 IRS - 1 作用的蛋白,如 Shc 蛋白(Src homologue and collagen like protein)。Shc 是一种胞浆蛋白,在 EGF 和胰岛素处理细胞后,Shc 蛋白可以转位到膜上,并发生酪氨酸磷酸化,然后,被含 SH2 结构的 Grb2 识别。Shc 蛋白是在研究 EGF 受体自身磷酸化位点突变后的信号过程中被发现的。研究发现,缺乏所有 5 个酪氨酸磷酸化位点的 EGF 受体,仍然可以对 EGF 产生反应而发生细胞增殖。Shc 蛋白的发现,提示了胰岛素/生长因子受体和配体结合后不同于受体自身磷酸化和 IRS - 1 介导机制以外的又一种机制的存在。由此可见,从胰岛素/生长因子信号到 PI - 3K 的转导至少可有 4 种方式:(1) R - TPK 自身磷酸化 \rightarrow Grb2/Sos \rightarrow Ras \rightarrow PI - 3K,(2) R - TPK 自身磷酸化 \rightarrow 与 I - A 类 PI - 3K 调节亚基 p85 的 SH2 域结合 \rightarrow PI - 3K,(3) R - TPK 自身磷酸化 \rightarrow IRS \rightarrow 1 \rightarrow PI - 3K,(4) R - TPK(不经磷酸化) \rightarrow Shc 转膜,Shc 被 R - TPK 磷酸化 \rightarrow Grb2/Sos \rightarrow Ras \rightarrow PI - 3K。

B 3 位磷酸化的肌醇磷脂的生成和对 PKB 的激活

这已在上面 14.5.2.2 介绍 PKB 时述及,这里不再重复。

14.6.3.4 非受体型 TPK 通路

某些非受体型 TPK 如 Src 也可通过其 SH2 域与活化的受体 TPK 结合,它的 Tyr 被磷酸化的活性形式同样可激活 PI - PLC γ ,使信号转入 PKC 通路,也可激活 Raf - 1,使信号越过 Ras 而进入 Raf - MEK - ERK 系统。

14.6.4 异三聚体 G 蛋白介导的跨膜信号网络

和 TPK 受体相似,异三聚体 G 蛋白偶联受体和配体(参见表 14-5)结合后,也可将信号通过 $G_q\alpha$ 或 $G_{\beta\gamma}$ 转导至 PI-PLC β ,激活 PI-PLC β -DAG-PKC 通路。近年来还发现 $G_{\beta\gamma}$ 激活 B 型 PI-3K(PI-3K γ)后,尚可激活 MAPK 信号流,并且由 Shc、Grb2、Sos 等衔接蛋白和小 G 蛋白 Ras 介导,其机制可能是 $G_{\beta\gamma}$ 诱导 PI-3K 转膜,并增强 Src 样激酶活性,再激活 Shc 或 Grb2/Sos。由此可见,PI-3K 在细胞信号转导中不但可处于激活的下游,受 Ras 激活;也可处于 Ras 的上游,通过 Grb2/Sos 而激活 Ras 信号流。

$G_{\beta\gamma}$ 还可激活磷脂酶 A_2 (PLA $_2$)而增加花生四烯酸(AA),进而激活某些 PKC,以及激活小 G 蛋白,如 Rho、Ras 和 Arf,而这些小 G 蛋白可激活 PLD。因此可能存在 $G_{\beta\gamma}$ →Rho 等小 G 蛋白→PLD→PA→DAG→PKC 的另一条由小 G 蛋白通过 PLD 活化 PKC 的途径。

异三聚体 G 蛋白除能调节腺苷酸环化酶而影响 cAMP 的生成($G_i\alpha$ 激活, $G_i\alpha$ 和 $G_{\beta\gamma}$ 抑制)外,尚能调节 cGMP 的分解而参与视觉信号的转导。当光子刺激视网膜,首先被圆柱状细胞中的光受体视紫红质(rhodopsin)接受。视紫红质由视黄醛和视蛋白(opsin)两部分组成,受光子活化的视蛋白能激活一种异三聚体 G 蛋白 G_t (又称转导蛋白 transducin),使不活化的 GDP 结合形式变成有活性的 GTP 结合形式。游离出来的 $G_t\alpha$ 亚基再激活 cGMP 磷酸二酯酶,此酶的非活化形式为 $\alpha\beta\gamma$,活

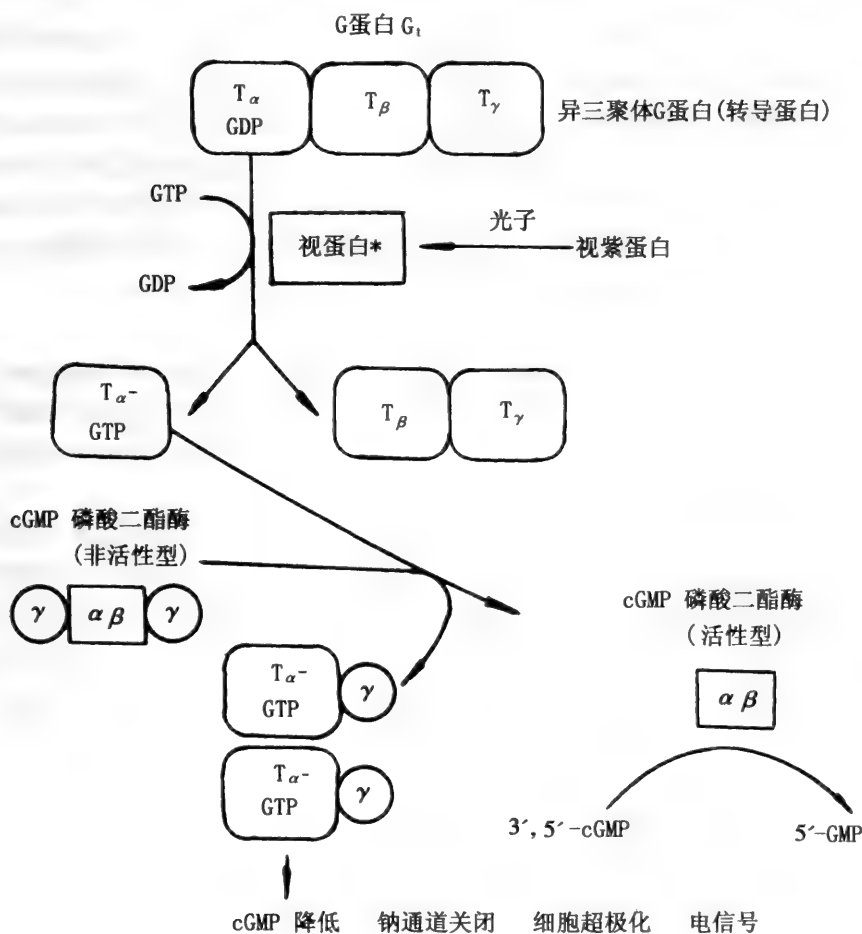


图 14-22 圆柱状细胞中视觉信号的转导

化形式为 $\alpha\beta$ (即 $G_t\alpha$ 结合磷酸二酯酶的两个 γ 亚基而去除之)。活化的 cGMP 磷酸二酯酶使 3',5'-cGMP 水解成 5'-GMP(图 14-22)。当 3',5'-cGMP 降低后,细胞的 Na^+ 通道关闭,细胞发生超极

化,光信号变为电信号,最后传至视神经而引起视觉。

故异三聚体 G 蛋白介导的跨膜信号网络主要可归结如下。

- (1) $G_q\alpha \rightarrow PI - PLC\beta \rightarrow DAG \rightarrow PKC$ 。
- (2) $G_{\beta\gamma} \rightarrow PI - PLC\beta \rightarrow DAG \rightarrow PKC$ 。
- (3) $G_{\beta\gamma} \rightarrow PI - 3K\gamma \rightarrow PKB$ 。
- (4) $G_{\beta\gamma} \rightarrow PI - 3K\gamma \rightarrow Grb2/Sos(或 Shc) \rightarrow Ras \rightarrow MAPK$ 信号通路(如 $Ras \rightarrow Rac \rightarrow MEKK \rightarrow JNKK \rightarrow JNK$)。
- (5) $G_{\beta\gamma} \rightarrow PLA_2 \rightarrow AA \rightarrow PKC\alpha, \beta, \gamma, \epsilon, \zeta$ 。
- (6) $G_{\beta\gamma} \rightarrow$ 小 G 蛋白 $\rightarrow PLD \rightarrow PA \rightarrow DAG \rightarrow PKC$ 。
- (7) $G_q\alpha, G_i\alpha, G_{\beta\gamma} \rightarrow$ 腺苷酸环化酶 $\rightarrow cAMP$
- (8) $G_i\alpha \rightarrow cGMP$ 磷酸二酯酶。

14.6.5 受体通过非受体型酪氨酸蛋白激酶的跨膜信号转导

不少细胞膜受体没有内在的 TPK 活力或 Ser/Thr 蛋白激酶活力,也不和 G 蛋白偶联,如 T、B 淋巴细胞表面的抗原受体和一些细胞因子受体,这些受体一般通过胞浆中的非受体型 TPK 介导其信号转导。

14.6.5.1 参与的非受体型 TPK

淋巴细胞抗原受体,包括 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞受体,都由多个亚基组成,在启动 T 和 B 淋巴细胞免疫反应过程中起重要作用。结合配体后,T 细胞受体(TCR)可以偶联 Src 家族的 Lck、Fyn 和 ZAP70(Syk 家族成员),B 细胞受体(BCR)则可以偶联 Lyn、Blk、Fyn 和 Syk 等非受体型 TPK,然后再经非受体型 TPK,将信号转导至 Raf 或 PC - PLC γ (参阅图 14 - 7D)。白细胞介素(IL)、干扰素(IFN)和粒单集落刺激因子(GM - CSF)等细胞因子受体大多是异二聚体或异三聚体,其一个亚基的胞外区和配体以不同亲和力结合,另一亚基(常是几种不同细胞因子所共用)则能和非受体型 TPK(如 JAK 家族)结合。JAK(Jak)是一类重要的非受体型 TPK,参与细胞因子的信号转导。

14.6.5.2 JNK - STAT 通路

这一途径是上述细胞因子信号转导的一个主要途径。涉及的转导分子为 JAK 和 STAT,JAK 的全称是 Just Another Kinase 或 Janus Kinase。也是一类非受体型 TPK 家族,包括 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2。STAT 的全称是 signal transducer and activator of transcription。它具有信号转导和转录因子双重功能,也是一个家族,包括 STAT1 ~ STAT6,都由几种蛋白质组成。

通常 JAK 和细胞因子受体的共有亚基(如 IL - 6 受体为 gp130 肽链,GM - CSF 为 gp140 肽链)相结合。当受体结合配体后,受体的异源二聚化使共有亚基结合的不同 JAK 互相靠拢,并互相使对方的 Tyr 磷酸化。活化后的 JAK 也可使受体上的 Tyr 磷酸化,召集有 SH2 结构域的 STAT 结合于受体上,然后 JAK 再使 STAT 的 Tyr 磷酸化,导致 STAT 与受体的亲和力降低并脱离受体。Tyr 磷酸化的 STAT 可进一步聚合成二聚体,转位到细胞核内,和 DNA 上的启动子序列(如 γ -干扰素活化序列 GAS 或相关序列)结合,从而调节基因的转录。此外,受体的二聚化还导致 Syk, Lck 等非受体型 TPK 和 PI - 3K 的激活,再作用于下游的信号分子将信号传递下去。

不同细胞表面有不同的细胞因子受体,又含有不同类型的 JAK 和 STAT,并且不同类型的受体和不同 JAK 及不同 STAT 的结合均有种类专一性,这样就保证了各种细胞因子能引发不同的生物效应。如 IL2 的受体的 β 和 γ 亚基分别结合 JAK1 和 JAK3,受体亚基异源二聚化后,JAK1 和 JAK3 的 Tyr 被交叉磷酸化,激活的 JAK3 再磷酸化受体 β 亚基的 Tyr,招募 STAT5 锚定到受体 β 亚基上,然后 JAK3 再使 STAT5 的 Tyr 磷酸化,STAT5 形成同源二聚体后,进入细胞核参与基因的转录调控。

14.6.6 鞘磷脂酶-神经酰胺介导的跨膜信号转导

鞘磷脂长期以来被认为是较稳定的膜的结构组分,代谢并不活跃,其代谢产物的作用也并没有

引起人们的重视。后来发现鞘磷脂的一种代谢产物鞘胺醇(Sphingosine)可以抑制 PKC 的活性,以及发现 1,25 二羟维生素 D₃ 能诱导 HL-60 细胞中神经鞘磷脂(sphingomyelin)的水解,因而,引发了人们研究鞘磷脂的兴趣,从而出现了“鞘磷脂-神经酰胺通路”的概念。现已知道,此通路和细胞凋亡密切相关。

14.6.6.1 神经酰胺的生成

信号转导中的神经酰胺是由神经鞘磷脂酶(sphingomyelinase, Smase, 又称为神经鞘磷脂专一性的磷脂酶 C)水解鞘磷脂而产生的,另一产物是磷酸胆碱。目前发现一些细胞因子,如肿瘤坏死因子(TNF)、神经生长因子(NGF)以及白细胞介素-1 β (IL-1 β)等与膜受体结合后,可以激活 Smase。SMase 有中性 pH 依赖型(NSMase, 又分成 Mg²⁺ 依赖性和非依赖性两型)和酸性 pH 依赖型(ASMase)三种亚型,均位于细胞膜上。NSMase 主要活化 ERK 信号流,导致细胞增殖和炎症反应等;而 ASMase 则激活 JNK/SAPK 信号流或/和胱冬蛋白酶,导致细胞凋亡等。

14.6.6.2 神经酰胺的信号转导过程

神经酰胺具有多种生物学效应,对不同细胞株呈现不同的作用,如增殖,分化和凋亡。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)或 Fas 配体(FasL)和相应受体 TNF-R1 或 Fas 结合后,都可引发神经酰胺信号通路而引起细胞凋亡。

以 TNF- α 为例, TNF 有两类受体, R1 和 R2, R2 的胞浆区有一个功能域 NSD, 为 NSMase 的活化域(NSMase activating domain); R1 的胞浆区有另一个功能域 DD, 为“死亡功能域(death domain)”。NSD 位于 TNF-R2 受体胞内域的近膜部分, 通过一个称为 FAN(factor of activating NSMase)的胞内蛋白质活化细胞膜上的 NSMase, 产生神经酰胺, 后者再活化膜上的神经酰胺激活性蛋白激酶(ceramide activating protein kinase, CAPK), 它也是一种脯氨酸依赖的丝/苏氨酸蛋白激酶, 催化含有 Thr Leu Pro 序列中的 Thr。由细胞因子诱导而转位到膜上的 Raf-1, 可被 CAPK 在 Thr269 位磷酸化而增强 Raf-1 对 MEK 的磷酸化活性, 从而使信息转向 Raf-MEK-ERK 级联系统, 并实现神经酰胺通路和 Raf-1 通路的对话, 最后引起细胞的增殖和炎症反应(图 14-23)。

当 TNF- α 诱导细胞凋亡时, 位于 TNF-R1 胞内远膜部分的 DD 域通过一系列胞内的结合蛋白(如 TNF-R 死亡域相关蛋白 TRADD 和 Fas 死亡域相关蛋白 FADD 相继结合形成 TNFR1-TRADD-FADD 复合物)激活与细胞凋亡有关的蛋白酶, 如 ICE 蛋白酶。此酶因可使无活性的 IL-1 β 水解而转换成有活性的 IL-1 β , 故开始称为 IL1 β 转换酶(interleukin1 β converting enzyme, ICE)。后发现 ICE 是一个蛋白酶家族, 1996 年后将 ICE 家族的成员通称为胱冬蛋白酶(caspase)(见图 14-23)。因其活性中心 QACIG 中有半胱氨酸 C, 水解底物蛋白中天冬氨酸(Asp)的羧基侧, 故而得名。并将第一个 ICE 编号为胱冬蛋白酶-1, Ced3 为胱冬蛋白酶-2, YAMA/ CPP32 为胱冬蛋白酶 3 等。这类半胱氨酸蛋白酶可水解聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)和核纤层蛋白(lamin B1), 而 PARP 是维持 DNA 完整的重要酶。PARP 的分解可引起染色体 DNA 断裂而导致 DNA 梯形电泳谱。

一些生物化学因素和环境紧张因素, 如: 紫外线、 γ 线辐射、热休克、过氧化物等, 也会激活 ASMase 而诱导神经酰胺的生成。神经酰胺还可以激活 MEKK/JNKK/JNK 信号流, 和 ASK-MKK3, 6-p38 信号流, 进而激活胱冬蛋白酶, 同样可以导致细胞凋亡(见图 14-23)。

除 CAPK、MEKK 外, 神经酰胺作用的靶蛋白还有属于丝/苏氨酸蛋白磷酸酶-2A(PP2A)家族的 CAPP(Ceramide activated protein phosphatase)、PKC ζ 、Vav(一种鸟苷酸交换因子)等。从而使下游蛋白 NF- κ B(通过解离和降解 I κ B)、Rb(视网膜母细胞瘤基因产物)活化, 调节 *c-myc* 表达、诱导环氧酶 Cox(cyclooxygenase)和抑制磷脂酶 D 等, 引发细胞分化、细胞周期的静息、细胞凋亡等生物学效应。

14.6.6.3 神经酰胺的降解

神经酰胺可以在神经酰胺酶的作用下, 脱去酰基链, 成为鞘氨醇。鞘氨醇可以有多种生理功能, 如作为 PKC 和磷脂酸磷酸酶等的抑制剂, 降低胞内 cAMP 等。鞘氨醇还可以在鞘氨醇激酶(sphingosine kinase)的作用下磷酸化成为鞘胺醇-1-磷酸。后者可以激活 TPK 以及有改变胞内 cAMP 浓度、引发 Ca²⁺ 的流动等多种功能。鞘氨醇和鞘胺醇-1-磷酸的功能还有待于进一步研究。

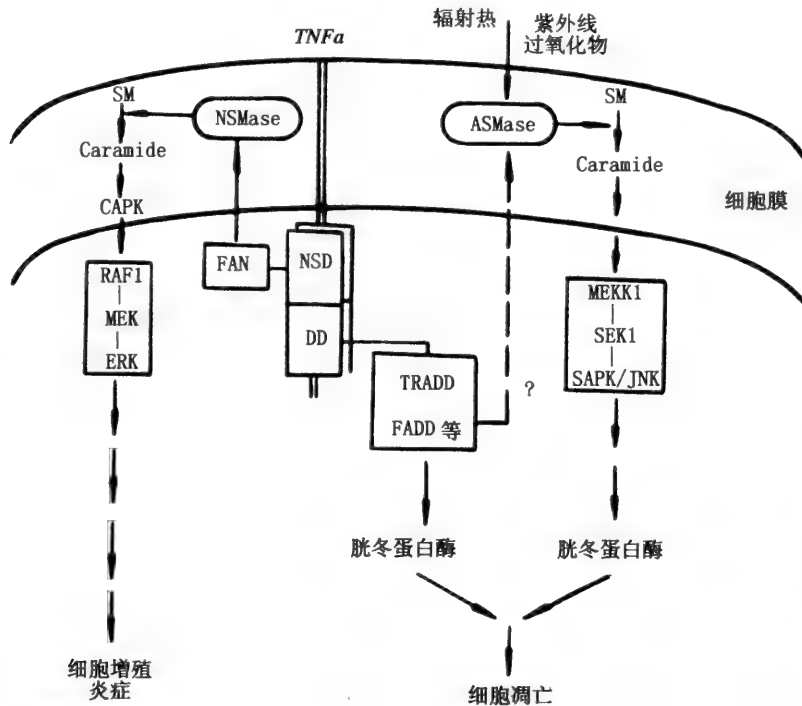


图 14-23 肿瘤坏死因子 α 和环境紧张因素诱导神经酰胺的信号转导过程

TNF α —肿瘤坏死因子 α ; SM—鞘磷脂; NSMase—中性 pH 依赖性鞘磷脂酶; ASMase—酸性 pH 依赖性鞘磷脂酶; Ceramide—神经酰胺; CAPK—神经酰胺激活性蛋白激酶; NSD—NSMase 活化域; DD—受体死亡域; TRADD—TNF 受体死亡域相关蛋白; FADD—Fas 死亡域相关蛋白; RAF1—MEK—ERK—ERK 信号系统的级联成员; MEK1—SEK1—SAPK/JNK—JNK 信号系统的级联成员, SEK1 即 JNKK

14.6.7 受体丝氨酸蛋白激酶介导的跨膜信号转导

这类受体最典型的代表是转化生长因子- β (TGF- β) 的受体, 分成 I、II 和 III 型。其中 I 和 II 型是跨膜糖蛋白, 它们的胞内结构域是丝/苏氨酸蛋白激酶; 而 III 型受体是一种含有硫酸肝素/硫酸软骨素糖氨基聚糖的蛋白聚糖, 实际上是一种辅受体 (coreceptor)。TGF- β 有 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 三种, 都是二聚体。由 III 型受体先与 TGF- β 结合, 再将 TGF- β 转递给 II 型受体, 后者能被 I 型受体识别和结合, 形成 II 型受体-TGF- β -I 型受体三联复合物。II 型受体胞内域的丝/苏氨酸蛋白激酶使 I 型受体的 GS 功能域 TTGSGGSL 序列中的 Ser 和 Thr 发生磷酸化, 从而活化 I 型受体。I 型受体激活后的丝/苏氨酸蛋白激酶再使胞质中的底物蛋白 Smad2/Smad3 羧端特异的 Ser 磷酸化, 活化的 Smad2/Smad3 再和 Smad4 形成复合物, 进入胞核, 与特异的 DNA 结合蛋白结合而活化某些基因转录。增强某些蛋白质的合成, 如 p15 和 p21 等细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 (CDK) 的抑制剂, 从而负调节细胞周期而抑制细胞增殖。

14.6.8 细胞信号转导通路间的对话

细胞信号转导实际上是一个十分复杂的网络, 各条转导通路并不是独立存在而互不相关, 而是相互联络, 尤似一个交通网。一条通路的激活可以启动或活化另一通路, 也可以抑制另一通路, 这就是所谓信号转导的“对话” (Cross talk)。这对各条信号通路间的平稳和细胞的正常活动具有十分重要的意义。今举例以说明之。

14.6.8.1 三条 MAPK 信号流之间的对话

本章图 14-21 所示的三条 MAPK 信号系统常有不同的生理功能。Raf-MEK-ERK 系统的激

活与细胞存活、增殖有关;其抑制和细胞分化有关,而 MEKK - JNKK - JNK 系统和 ASK - MKK3/MKK6 - p38 系统的激活则和环境应激刺激与细胞凋亡相关,尤其是前者;而后者则尚和胞外渗透压变化有关。有些外界信号分子尚可同时激活两条通路,如脂多糖可同时激活 JNK 和 p38 通路。三条通路之间可以互相“对话”,如 ASK 可以激活 JNKK, JNKK 也可能激活 p38,且 MEKK 可能激活 MEK(参阅图 14 - 15),故 Raf - MEK - ERK 通路是三条 MAPK 信号流中最重要而最经常被活化的通路。此外, Ras 不但可活化 ERK 通路,还可通过活化 Rac,再通过 p21 相关激酶(PAK)激活 JNK 系统。但这些对话的生理意义不明。

14.6.8.2 Grb2/Sos - Ras - MAPK 途径和 PI - 3K - PKB 途径的对话

不少生长因子如 PDGF、IGF 可同时通过受体 TPK 活化 Grb2/Sos - Ras 通路和 PI - 3K - PKB 通路,这是因为自身磷酸化而激活的受体 TPK 可同时活化 Grb2/Sos 和 PI - 3K。并且, Ras - GTP 可激活 PI - 3K;而 PI - 3K 又可间接激活 MAPK。有实验证明 PI - 3K 的产物 PI - 3,4,5 - P₃ 和 PI - 3,4 - P₂ 可激活 PKC ϵ , η (L)和 ζ ,后者也可引发 MAPK 通路的活化。

14.6.8.3 受体 TPK 通路和 PKC 之间的对话

如图 14 - 21 所示,受体 TPK 活化后可以直接激活 PI - PLC γ ,也可先激活 IA 型 PI - 3K,再通过此酶产物 PI - 3,4,5 - P₃ 激活 PI - PLC γ ,后者生成的 DAG 通过激活 PKC,转而激活 Raf,启动 Raf - MEK - ERK 通路,这就可解释为什么不少生长因子可以引起 PKC 活力的升高,以及 PKC 的激活剂可引起 ERK 通路中一些信号分子活力的升高,此外, PKC 还可对受体 TPK 的胞内调节区的 Ser 或 Thr 进行磷酸化修饰,从而抑制受体 TPK 的活力。

14.6.8.4 G 蛋白通路和受体 TPK 通路间的对话

这两条通路是细胞增殖信号转导中最主要的通路各自均有一些支路如 G 蛋白-腺苷酸环化酶 - cAMP 通路和 G 蛋白 - PI - PLC β - DAG 通路以及受体 TPK - PI - PLC γ - DAG 通路和前述的受体 TPK - Ras、TPK - PI - 3K 通路。这两条大通路之间也在各个层次上互相联系,实现对话。例如:

(1) G 蛋白 α 亚基或 $\beta\gamma$ 亚基激活 PI - PLC β ,后者催化 PI - 4,5 - P₂ 水解生成的 DAG 激活 PKC,同样可激活 Raf - 1,进入 Raf - MEK - ERK 通路。

(2) G 蛋白 $\beta\gamma$ 亚基激活 Grb2/Sos 或 Shc 进入 ERK 通路。

(3) G 蛋白 α 亚基激活腺苷酸环化酶,后者使 cAMP 升高后活化 PKA,而 PKA 则是 Raf - 1 的负调节因子。如 PKA 可使 Raf - 1 N 端的 Ser43 发生磷酸化引起酶结构改变,掩盖了 Raf - 1 的 Ras 结合域,阻止 Ras - GRP 对 Raf - 1 的激活。cAMP 尚可通过 Raf - 1 Ser621 的磷酸化而抑制 Raf - 1。

(4) PKA 也可使受体 TPK C 端调节区中的 Ser/Thr 残基磷酸化从而抑制受体 TPK 的活力。

14.6.8.5 cAMP - PKA 通路、PI - PLC - DAG - PKC 通路和 PKB 之间的对话

PKC 可抑制 V 型(可能还有 VI 和 VII 型)腺苷酸环化酶(AC);而 cAMP 通路似乎有负调节 PI - PLC - PKC 通路的作用,因有报导认为当细胞内 cAMP 浓度增高时, PI - 4,5 - P₂ 的水解降低,导致 DAG 下降和 PKC 活力降低。PKA 和 PKC 的互相拮抗还能表现在基因调节水平,因(1)cAMP 反应元件(CRE)结合蛋白(CREB)既可受 PKA 的催化亚基磷酸化而激活,又可受 PKC 的磷酸化,后一过程不能激活 CREB,反而减少了 PKA 使 CREB 磷酸化的机会,(2) 磷酸化 CREB 既可与 DNA 的 CRE 序列结合,也可和 AP - 1(Fos 和 Jun 的异二聚体)作用的 TPA 反应元件(TRE)结合,这样,活化的 CREB 就能和受 PKC 正调节的 AP - 1 竞争 TRE 位点,(3) CREB 可取代 Fos 和 Jun 形成异二聚体,阻断 AP - 1 的形成。

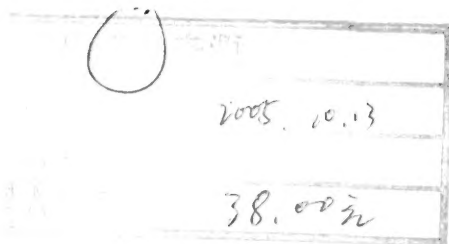
此外,最近发现 cAMP - PKA 可激活 PKB,而 PKC ζ 可抑制 PKB。PKB 的上游分子 PI - 3K 也可激活 PKC。

总之,细胞信号转导的研究方兴未艾,发展十分迅速,很多新的信号分子、新的信号通路以及它们之间的对话还有待于进一步发现。

参 考 文 献

- 1 林其谁. 跨膜信号传递. 见: 敖世洲主编. 蛋白质可逆磷酸化对细胞活动的调节. 上海: 上海科学技术出版社, 1994, 67 ~ 76
- 2 Hamm He. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem*, 1998, 273: 669 ~ 672
- 3 Sunahara R K, Dessauer C W, Gilman A G. Complexity and diversity of mamalian adenylyl cyclases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1996, 36: 461 ~ 480
- 4 Bos J L. Ras-Like GTPase. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1333: M19 ~ M31
- 5 Symons M. Rho family GTPase: the cytoskeleton and beyond. *Trends in Biochem Sci*, 1996, 21: 178 ~ 185
- 6 Exton J H. Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases. *Eur J Biochem*, 1997, 243, 10 ~ 20
- 7 Miles D H, Graeme M. Tailoring cAMP-signalling responses through isoform multiplicity. *Trends in Biochem Sci*, 1997, 22: 217 ~ 224
- 8 Dennis E A. Diversity of Group Types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem*, 1994, 269: 13057 ~ 13060
- 9 Noh D Y, Shin S H, Rhee S G. Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 99 ~ 114
- 10 Exton J H. New development in phospholipase D. *J Biol Chem*, 1997, 272: 15579 ~ 15582
- 11 Alex T, Lewis C C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, 1997, 387: 673 ~ 676
- 12 Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici P G, Gitking J S, Wetzker R. Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI3-K. *Science*, 1997, 275: 394 ~ 397.
- 13 Lopez-Illasaca M, Gitkind J S, Wetzker R. Phosphoinositide 3-kinase γ is a modulator of G $\beta\gamma$ -dependent Jun kinase activities. *J Biol Chem* 1998, 273: 2505 ~ 2508.
- 14 Marks F. Protein kinase A. In: F Marks, ed. Protein phosphorylation. Weinheim: VCH Publishers, Inc. 1996, 37 ~ 280
- 15 Nicholas S F, Paolo S C. Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1288: F101 ~ F121
- 16 Tasken B S, Skalhegg R, Solberg K B, et al. Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. *J Biol Chem*, 1993, 268: 21276 ~ 21283
- 17 Wen W, Meinkoth J L. Tsien R Y, et al. Identification of a signal for rapid export of proteins from the Nucleus. *Cell*, 1995, 82: 463 ~ 473
- 18 Wilkinson S E, Hallam T J. Protein kinase C. Measurement of translocation, activation, and role in cellular responses. *Methods Mol Biol*, 1995, 41: 261 ~ 270
- 19 Wilkinson S E, Hallam T J. Protein kinase C: is its pivotal role in cellular activation over-stated? *Trends in Pharmacol Sci*, 1994, 15: 53 ~ 57
- 20 Nakamura S I. Phosphatidylcholine hydrolysis and protein kinase C activation for intracellular signaling network. *J Lipid Mediators Cell Signal*. 1996, 14: 197 ~ 202
- 21 Barbara M M, Julian D. PKB/Akt: connecting phosphoinositids 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends in Biochem Sci*, 1997, 22: 355 ~ 358
- 22 Coffer P J, van-Puijenbroek A, Burgering BM, et al. Insulin activates Stat3 independently of p21ras-ERK and PI-3K signal transduction. *Oncogene*, 1997, 15: 2529 ~ 2539
- 23 Stephens L, Anderson K. Protein kinase B kinase that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate dependent activation of protein kinase B. *Science*, 1998, 279: 710 ~ 714
- 24 Marte B M, Downward J. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends in Biochem Sci*, 1997, 355 ~ 358
- 25 Doornbos R P, Theelen M, van der Hoeven PCJ et al. Protein kinase C ζ is a negative regulator of protein kinase B. *J Biol Chem*, 1999, 274: 8589 ~ 8596

- 26 Filippa N, Sable C L, Filoux C, et al. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol cell Biol*, 1999, 19: 4989 ~ 5000.
- 27 Sugden P H, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal*, 1997, 9: 337 ~ 351
- 28 Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinase. *Biophys Biophys Acta*, 1997, 1333: F85 ~ F104
- 29 Ichijo H, Nishida E. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, 1997 275: 90 ~ 94
- 30 Kolibaba K S, Druker B J. Protein tyrosine kinase and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1333: F217 ~ F248
- 31 Marrero M B, Paxton W G, Schieffer B, et al. Angiotensin II signalling events mediated by tyrosine phosphorylation. *Cell Signal*, 1996, 8: 21 ~ 26
- 32 van der G P, Hunter T, Lindberg R A. Receptor protein kinase and their signal transduction pathways. *Ann Rev Cell Biol*, 1994, 10: 251 ~ 337
- 33 Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell*, 1997, 88: 333 ~ 348
- 34 鲍国斌, 濮璐, 裴钢. G 蛋白对离子通道的调控. *生命的化学*, 1998, 18: 19 ~ 22
- 35 朱锦芳, 郑仲承, 刘新垣. 细胞因子受体及其介导的信号转导. *生命的化学*, 1996, 16(3): 14 ~ 17
- 36 Hunn T A. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*, 1996, 274: 1855 ~ 1859



图书在版编目(CIP)数据

现代酶学/袁勤生主编. —上海:华东理工大学出版社, 2001.9

(华东理工大学研究生教育基金资助项目)

ISBN 7-5628-1139-3

I. 现... II. 袁... III. 酶学 IV. Q55

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 23520 号

华东理工大学研究生教育基金资助项目

现代酶学

主编 袁勤生

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

ISBN 7-5628-1139-3/TQ·79

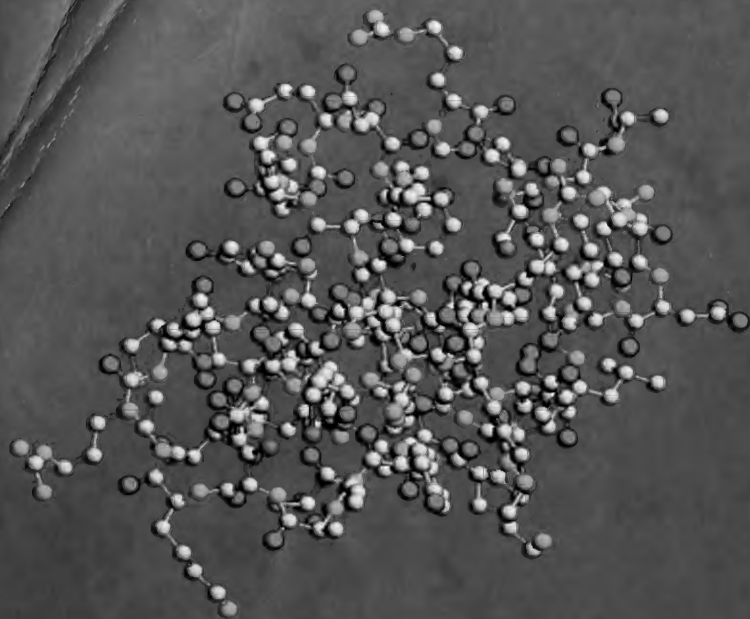
定价: 38.00 元

1000

1000

● 责任编辑: 钱四海

● 封面设计: 唐啸谷



现代酶学

● 袁勤生 主编

ISBN 7-5628-1139-3



9 787562 811398 >

ISBN 7-5628-1139-3/TQ · 79

定价: 38.00 元