

# Chapter VI Enzymes

## 学习目标

- 酶的生理学意义
- 酶催化能力的来源
- 催化的化学机制
- 胰凝乳蛋白酶和溶菌酶的催化机制
- 酶动力学和抑制作用的描述

## 什么是酶？

- 一种生物催化剂
- 大多数是**球蛋白**
- 一些RNA分子（如**核酶**和核糖体RNA）也具有催化活性

## 酶的组成

一些酶除了蛋白质部分外，还需要额外的化学组分才能发挥活性。

- **辅因子 (Cofactor)**: 可以是无机离子（如 $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ）或复杂的有机/金属有机分子。
- **辅酶 (Coenzyme)**: 作为特定官能团的瞬时载体，多数来源于维生素。
- **全酶 (Holoenzyme)**: 具有催化活性的完整酶，包括其蛋白质部分和结合的辅酶/金属离子。
- **脱辅基酶 (Apoenzyme)**: 全酶中的蛋白质部分。

## 酶的分类

酶根据其催化的反应类型分为六类，并拥有正式的E.C.编号。

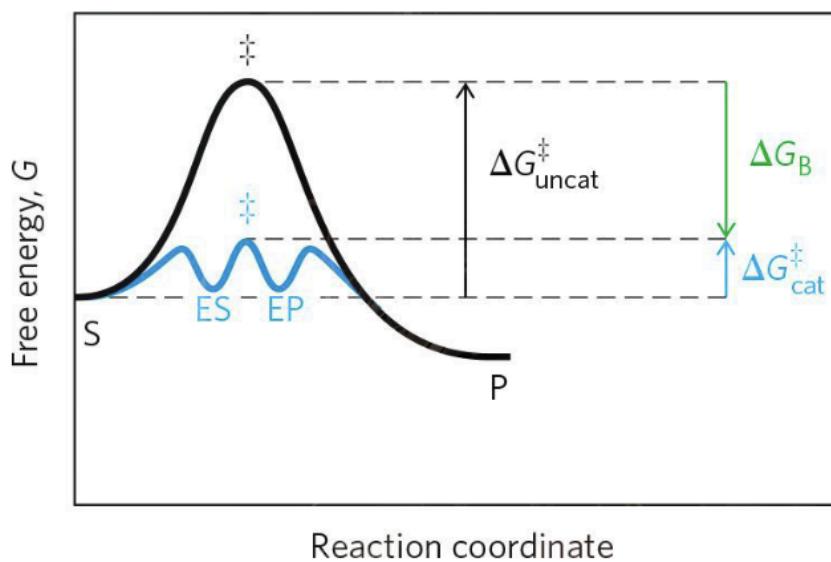
E.C.	类别名称	催化反应类型
1	<b>氧化还原酶</b>	电子转移（氢负离子或氢原子）
2	<b>转移酶</b>	基团转移反应
3	<b>水解酶</b>	水解反应（将官能团转移给水）
4	<b>裂合酶</b>	通过消除反应裂解C-C, C-O, C-N等键，产生双键或环； 或将基团加成到双键上

E.C.	类别名称	催化反应类型
5	异构酶	分子内基团转移，产生异构体
6	连接酶	通过偶联ATP或类似辅因子的裂解来催化C-C, C-S, C-O, C-N键的形成

## 酶促反应



- 真正使酶与大多数其他催化剂不同的是特定ES复合物的形成
- 底物与酶之间的相互作用由氢键、离子相互作用和疏水效应介导。
- 这些弱相互作用的形成会释放少量自由能
  - 可以使反应稳定
  - 酶催化的主要驱动力
  - 这部分能量被称为结合能 ( $\Delta G_B$ )



- 酶促反应的特点：
  - 高特异性
  - 反应条件温和
  - 速率高
  - 可被抑制剂调控
- 底物和酶在活性中心 (active site) 结合 (像肉夹馍)
- 酶通过降低反应的活化能 ( $\Delta G^{\ddagger}$ ) 来提高反应速率 ( $k$ )，但不改变反应的平衡常数 ( $K_{eq}$ ) 和总自由能变化 ( $\Delta G$ )  $\Delta G^{++}$

## 为什么能加快速率？

- 活化能 ( $\Delta G^{\ddagger}$ )降低后，活化分子增多

- 底物与酶结合后可以控制方向，有效碰撞成功率增加

## 如何降低活化能？

- **熵效应**: 酶通过结合能将反应物组织在**邻近且正确的方位**上，这抵消了形成过渡态时的熵减，从而降低了活化能。
  - 即：**结合能抵消熵减**
- **焓效应**: 酶和**过渡态**结合得最好，一般在结构上与其互补，利用张力效应使得底物形变（若与原始底物结合得最好，ES过于稳定，能量壁垒会更高）

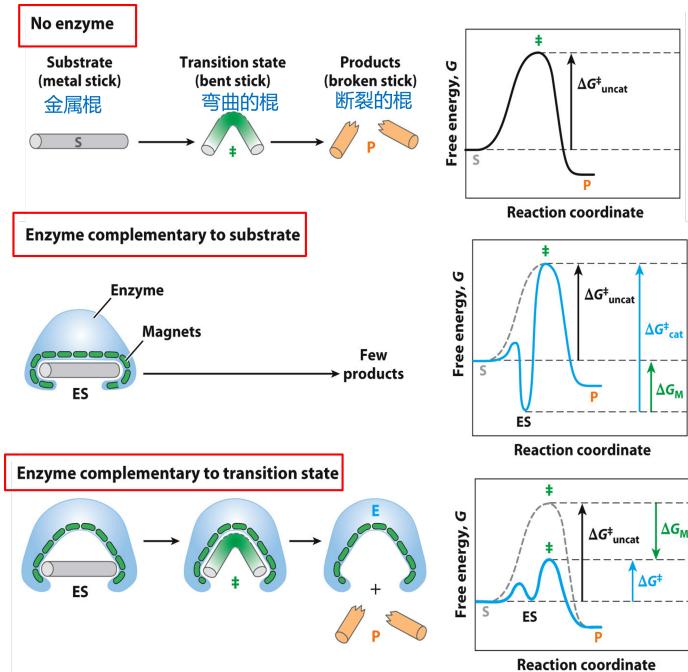
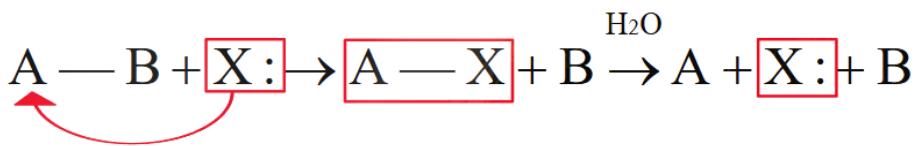


Figure 6-5c  
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W. H. Freeman and Company

## 催化机理

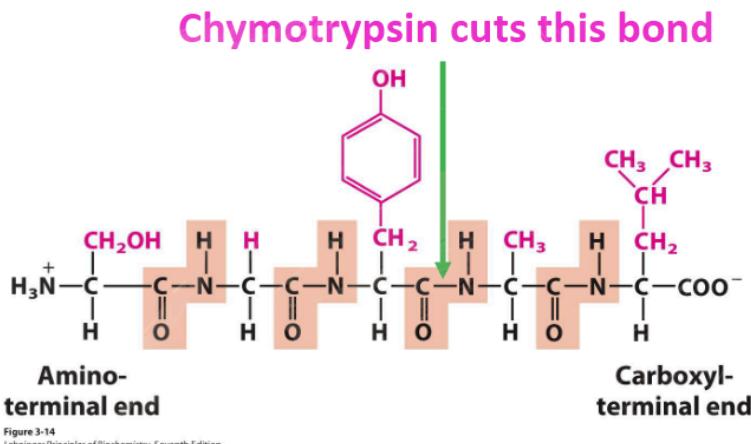
- 一般包含 **酸碱催化、共价催化、金属催化** 中的一种或多种
- 广义的酸碱催化：
  - 质子转移
  - 氨基酸残基（如Glu）可充当广义酸或广义碱
- 共价催化：
  - 酶和底物形成**短暂的共价键**，从而改变反应路径，需要酶上有一些**亲核基团**



- 如活化的丝氨酸（结构中有亲核性的氧）
- 金属催化：
  - 与底物相互作用来促进结合
  - 稳定带负电的物质，常参与氧化反应

## 例子

- Example 1: 凝乳蛋白酶使用酸碱和共价催化，切断芳香氨基酸后面的肽键



- Example 2: 溶菌酶使用酸碱和共价催化切断细菌细胞壁肽聚糖的 $\beta 1 \rightarrow 4$ 糖苷键，水解细胞壁，使细菌死于渗透压
    - 青霉素通过阻止肽聚糖交叉的合成为杀死细菌，使细胞壁太弱而无法抵抗渗透溶解。

# 酶动力学

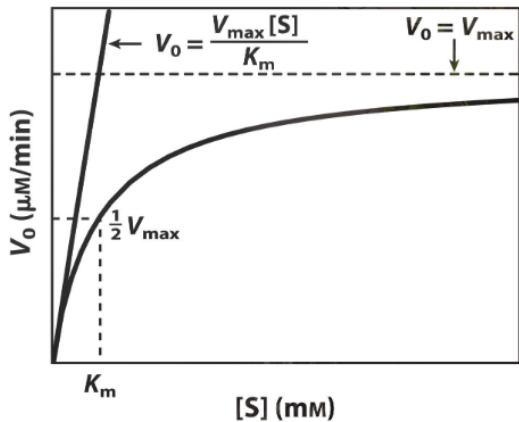
### 底物浓度对反应速率(一般指初始速率 $v_0$ )的影响

## 米氏方程的介绍

对于单底物反应，初始速率 ( $V_0$ ) 与底物浓度 ([S]) 的关系可用米氏方程描述：

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

- **$V_{max}$  (最大速度)**: 当酶被底物完全饱和时的反应速率。
  - **$K_m$  (米氏常数)**: 反应速率为  $V_{max}$  一半时的底物浓度。它近似反映了底物与酶的亲和力 ( $K_m$  越小，亲和力越高)。
  - **饱和动力学**:
    - 当  $[S] \ll K_m$  时， $V_0$  与  $[S]$  近似成线性关系。
    - 当  $[S] \gg K_m$  时， $V_0$  接近  $V_{max}$ ，与  $[S]$  无关。



米氏方程的推导(研究条件:  $[S] \gg [E]$ , 测定速度指初始速度  $v_0$ , 单分子反应)

一共分为三步:

- 从模型机制开始。
- 确定限制和假设。
- 进行代数...或复杂反应的图形理论。

### a) 模型机制



- 其中, 第二步为慢反应

### b) 确定限制和假设

#### • 总酶的浓度恒定

- 酶的质量平衡方程:
- $[E_{Tot}] = [E] + [ES]$
- 还隐含假设: (当  $[S] \gg [E]$ )
- $[S_{Tot}] = [S] + [ES] \approx [S]$

•  $ES$  形成的速率 =  $k_1([E_{Tot}] - [ES])[S]$

•  $ES$  分解的速率 =  $k_{-1}[ES] + k_2[ES]$

在稳态条件下,  $ES$  复合物的浓度是恒定的:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

因此,  $ES$  形成的速率等于  $ES$  分解的速率:

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

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

定义  $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ , 称为米氏常数。

$$[ES] = \frac{[E_{\text{Tot}}][S]}{[S] + K_M}$$

### c) 进行代数

- 产物形成的速率（反应速率  $v_0$ ）为：

$$v_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = k_2 \frac{[E_{\text{Tot}}][S]}{[S] + K_M}$$

- 当酶饱和时： $[ES] = [E_{\text{Tot}}]$
- 且对于最大速度： $V_{\max} = k_2[E_{\text{Tot}}]$

### 米氏方程：

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_M}$$

### $K_m$ 与 $V_{\max}$

- $K_m$  值等于反应速率为最大速率一半时候的底物浓度
- $K_m$  近似反映了底物与酶的亲和力
  - $K_m$  越小，亲和力越高
- $K_m$  是酶的特征常数，与酶的结构、底物结构、pH、温度和离子强度有关，与酶浓度无关
- 当  $K_{-1}$  为反应的限速步骤时，此时  $K_m \approx \frac{k_2}{k_1}$ , 即为 ES 解离为 E+S 的解离常数
- $V_{\max} = k_2[E_{\text{Tot}}]$ ,  $K_2$  又被称为酶的转换数，单位为  $s^{-1}$

### 曲线图像解读

- 随着  $[S]$  的增大， $v_0$  先近似线性增加，后增加逐渐缓慢，最后几乎恒定
- $v_0$  趋近但永远无法达到  $v_{\max}$

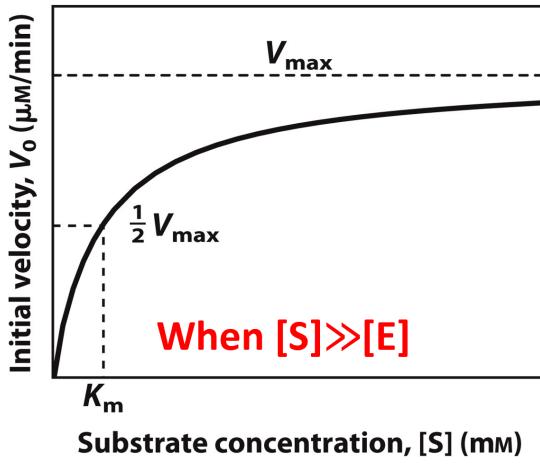


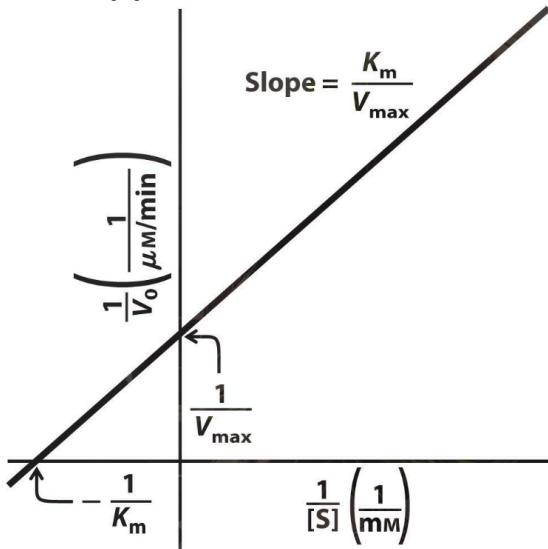
Figure 6-11  
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W.H. Freeman and Company

双倒数法求解  $K_m$  与  $V_{max}$

- 米氏方程两边同时取倒数：

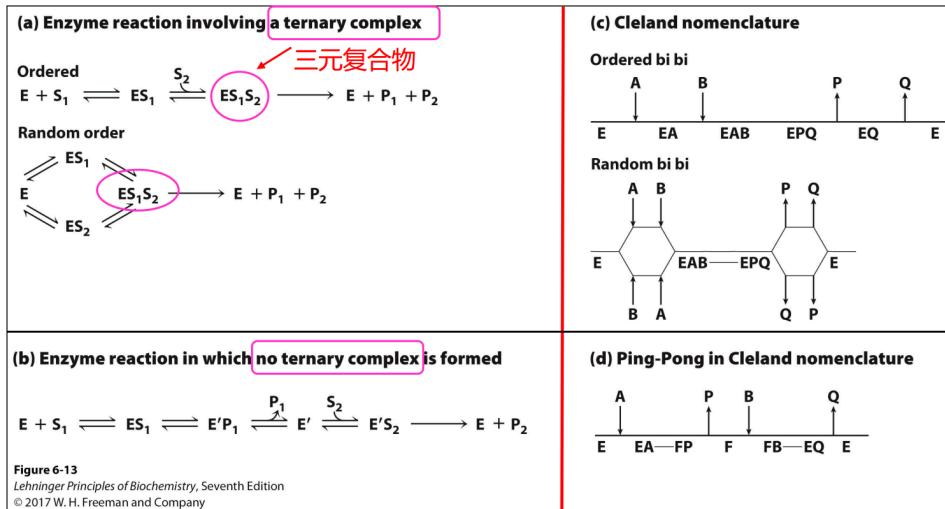
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

- 用  $\frac{1}{v}$  对  $\frac{1}{[S]}$  作图，纵截距为  $\frac{1}{V_{max}}$ ，横截距为  $-\frac{1}{K_m}$



## 多分子反应

- 序列机制与乒乓机制



## 序列机制

- 底物和酶一个一个结合上去，最后一起分离
- 控制一个底物的浓度不变，改变另一个底物的浓度，双倒数法作图
- 多根图线会交叉，表明反应中出现了三元复合物，是序列机制

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [A] \cdot [B]}{K_m^A \cdot K_m^B + K_m^B \cdot [A] + K_m^A \cdot [B] + [A] \cdot [B]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m^A}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right) \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right)$$

## 乒乓机制

- 底物1结合释放，酶被修饰，再底物2结合释放
- 控制一个底物的浓度不变，改变另一个底物的浓度，双倒数法作图
- 多根图线会平行，表明反应是乒乓机制

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [A] \cdot [B]}{K_m^A \cdot [B] + K_m^B \cdot [A] + [A] \cdot [B]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m^A}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{K_m^B}{[B]} \right)$$

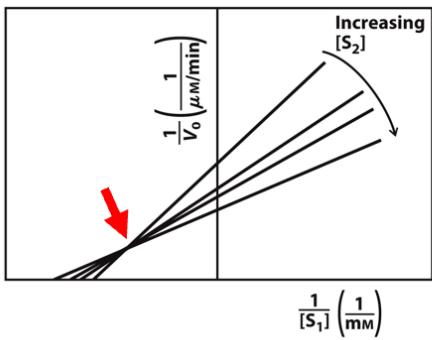


Figure 6-14a  
Lohringer Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W. H. Freeman and Company

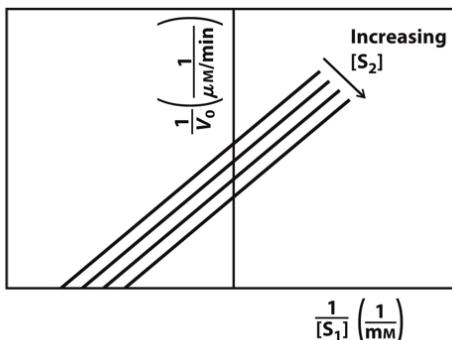


Figure 6-14b  
Lohringer Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W. H. Freeman and Company

## 酶抑制剂 inhibitor

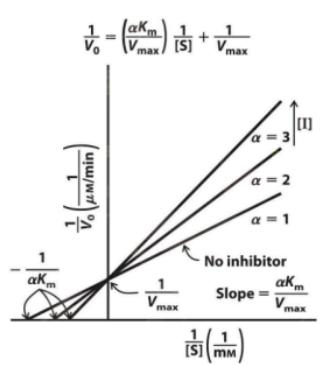
### 不可逆抑制剂

- 与酶的活性中心共价结合，使其永久失活
- 例如：阿司匹林、米酵菌酸

### 可逆抑制剂

#### 竞争性抑制剂

- 与底物结构相似，可与活性中心结合，阻止底物的结合
- 动力学效应：
  - $V_{max}$  不变
  - 表观  $K_M$  增大，酶和底物亲和力下降
- 双倒数图：线簇相交于y轴。
- 通过提高底物浓度可以抵消这种抑制作用



#### Competitive inhibition

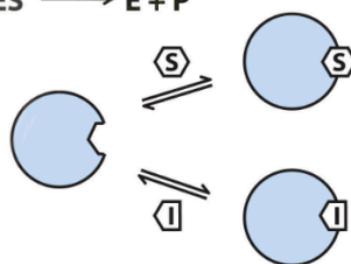
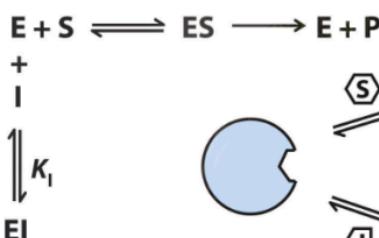
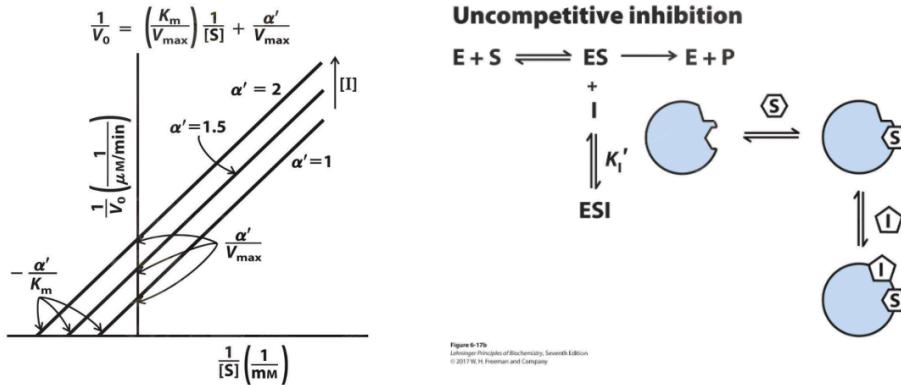


Figure 6-17a  
Lohringer Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W. H. Freeman and Company

#### 反竞争性抑制剂

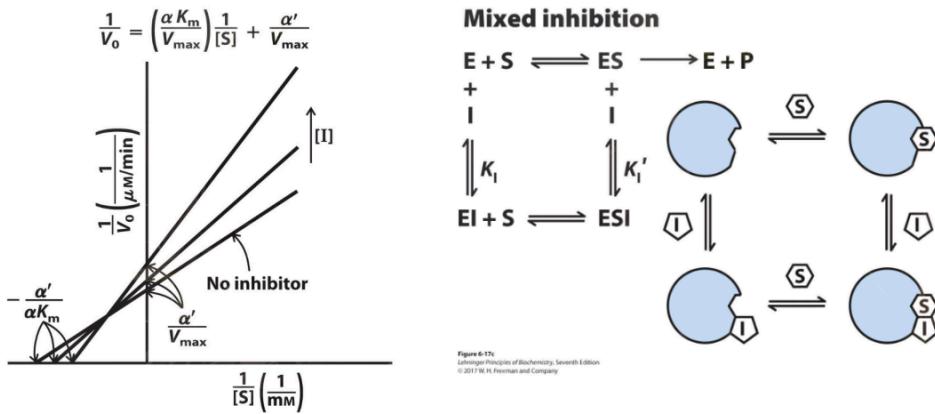
- 只和ES结合，产生了抑制剂的结合位点，产生ESI复合物
- ESI的形成减少ES转变为产物， $V_{max}$  下降，但同时降低了ES的浓度使得 $K_m$  降低
- 动力学效应：

- $V_{max}$  减小
- 表观  $K_M$  也减小
- $\frac{K_m}{V_{max}}$  不变
- 双倒数图: 线簇相互平行。
- 总体表现为最大速率降低, 酶与底物的亲和力增加



## 混合型抑制剂

- 与活性中心以外的调节位点结合
- 动力学效应
  - $V_{max}$  减小
  - 表观  $K_m$  改变。
- 双倒数图: 线簇相交于y轴左侧。
- 非竞争性抑制 (Noncompetitive inhibition) 是混合型抑制的一种特殊情况, 其中  $K_m$  不变。

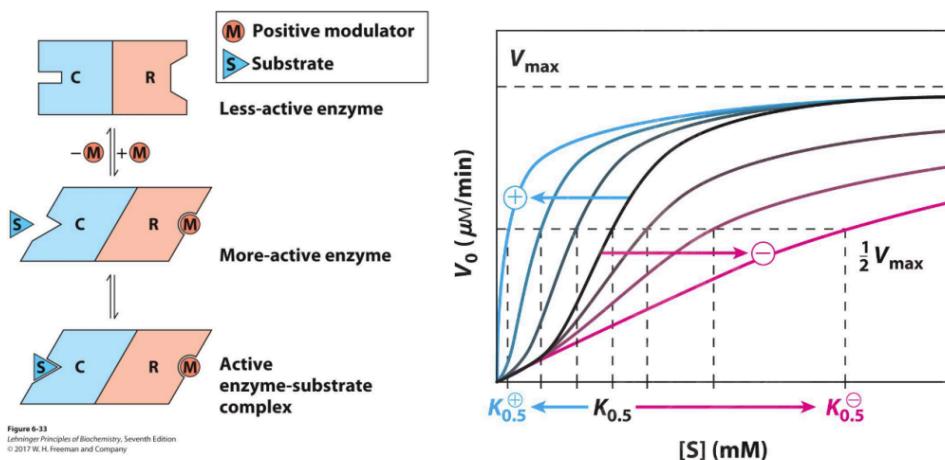


## 酶的调节

### 非共价修饰: 别构效应 allosteric

- 别构剂与酶的别构位点结合, 引起酶构象的改变, 类似于血红蛋白

- 可能促进也可能抑制（下图曲线，左移促进，右移抑制）



## 可逆共价修饰

酶的活性可以通过共价添加或去除化学基团来快速调节。

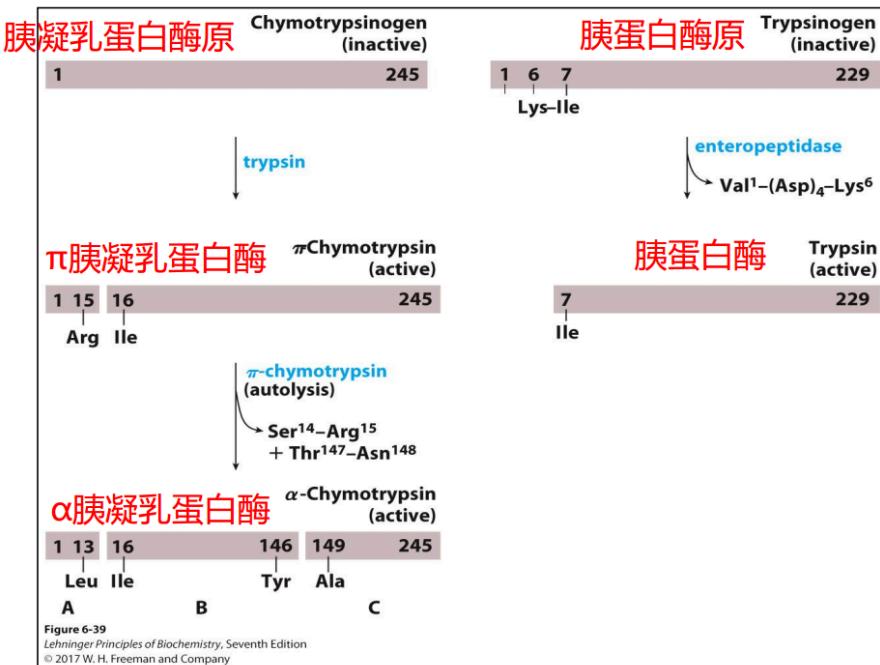
是否可逆取决于有没有可逆修饰的酶

常见的修饰包括：

- 磷酸化 (Phosphorylation)**: 在Tyr, Ser, Thr, His残基上。
- 腺苷酰化 (Adenylylation)**: 在Tyr残基上。
- 乙酰化 (Acetylation)**: 在Lys或N端 $\alpha$ -氨基上。
- 豆蔻酰化 (Myristoylation)**: 在N端 $\alpha$ -氨基上。
- 泛素化 (Ubiquitination)**: 在Lys残基上。
- ADP核糖基化 (ADP-ribosylation)**: 在Arg, Gln, Cys等残基上。
- 甲基化 (Methylation)**: 在Glu残基上。

## 酶原

- 酶原是具有催化活性的酶的前体物质，需要通过**蛋白水解切割**去除部分肽段，使活性中心形成或暴露，从而具有催化活性



- 血凝：

- 血液凝固是一个由一系列酶原的蛋白水解激活组成的级联放大反应。
- 该过程最终导致可溶性的**血纤蛋白原 (fibrinogen)** 被**凝血酶 (thrombin)** 切割，转变为不溶性的**血纤蛋白 (fibrin)**，形成血凝块。

- 多重调节：

- 一些酶受多种机制的精细调控。
- 例如，**糖原合成酶 (glycogen synthase)** 具有至少九个不同的磷酸化位点，可以被多种蛋白激酶磷酸化，从而实现对其活性的精细调节，而非简单的“开/关”切换。

## 第六章 总结

本章中，我们学习了：

- 为什么大自然需要酶催化
- 酶如何加速化学反应
- 凝乳蛋白酶如何分解肽键
- 如何进行和分析动力学研究
- 如何描述酶抑制剂
- 如何调节酶活性