

7D.3 酶促反应动力学

迄今为止,我们还没有系统地讨论有催化剂参与时反应的动力学特征.尽管在前面,我们已经讨论了一类自催化反应,但大多数时候催化剂都是额外加入的,在总反应中不会被消耗的物质.

我们在本节要讨论的催化剂,酶,就是一种高效专一的生物均相催化剂.关于酶的基本概念与特性,你可以查阅生物化学书.我们在这里主要关注酶催化的反应,即酶促反应的动力学特性.

简单酶促反应与米氏方程

最简单的酶催化反应的机理可由以下基元反应描述.



其中E即参与催化的酶,S为底物(即反应物),ES为酶-底物复合中间体,P为产物.我们现在来推导该反应的速率方程.

Derivation.

对中间体ES做稳态近似可得

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

于是有

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

根据催化剂的物料守恒可得

$$[E] + [ES] = [E]_0$$

于是

$$[E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{k_1[S]}{k_{-1} + k_2}} \quad [ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]}$$

于是反应的速率即为

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S]}$$

为了简化上式,我们不妨定义 $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, 这样就有

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$

同理,最后可以得出

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2 [E]_0}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

如果底物S大大过量,那么就有 $\frac{K_M}{[S]} \sim 0$,于是

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]_0}{1 + \frac{K_M}{[S]}} \approx k_2[E]_0$$

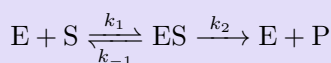
这就是酶的总浓度一定时反应的最大速率,记作 v_{\max} .如此,速率方程亦可以写作

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

这就是Leonor Michaelis和Maud Menten提出的米氏方程.

Theorem 7D.3.1 米氏方程

对于符合

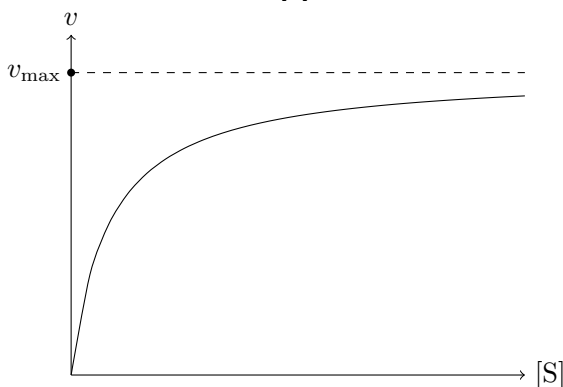


机理的酶促反应,其速率方程为

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

其中米氏常数 $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$. $v_{\max} = k_2[E]_0$,是该反应在酶的总浓度 $[E]_0$ 一定时能达到的最大速率.

以下是 v 对 $[S]$ 作图的结果.可以看出,当 $[S] \ll K_M$ 时近似地有 $v = \frac{v_{\max}}{K_M} [S]$,反应对S为准一级.当 $[S] \gg K_M$ 时,反应速率趋近于 v_{\max} ,反应对 $[S]$ 为准零级.



反应速率常数 k_1, k_{-1}, k_2 是较难直接获取的,但米氏方程为我们提供了线性回归测定它们的方式.将米氏方程变形可得

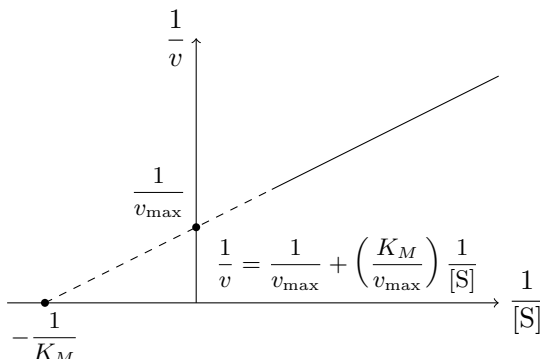
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \left(\frac{K_M}{v_{\max}} \right) \frac{1}{[S]}$$

可以看到, $\frac{1}{v}$ 与 $\frac{1}{[S]}$ 成一次函数关系. 测定S在不同起始浓度 $[S]_0$ 及其对应的速率 v_0 , 就可以通过线性回归的方式求出斜率 $\frac{K_M}{v_{\max}}$ 和截距 $\frac{1}{v_{\max}}$. 这种方式就是**Lineweaver-Burk作图法**².

Theorem 7D.3.2 Lineweaver-Burk作图法

在符合米氏方程的酶促反应中, 反应速率的倒数 $\frac{1}{v}$ 和底物浓度 $\frac{1}{[S]}$ 成一次函数关系, 根据实验数据作图就可以求得米氏常数 K_M . 因此, 这一方法也被称作**双倒数法**.

下面是由Lineweaver-Burk作图法给出**7D.3.1**的图像.



通过 x 轴截距和 y 轴截距就能计算出 v_{\max} 和 K_M . 不过, 这一方法仍不能给出 k_1 和 k_{-1} 的具体值. 我们需要更复杂的手段进行测量, 这里就不再赘述.

Lineweaver-Burk作图法仍然存在一些缺陷. 只有当 $[S]$ 相当小时, 我们才能获取远离 y 轴的数据点. 对于一般浓度的S, 对应的数据大多靠近 y 轴, 较为密集, 在线性回归时容易引起误差. 因此, 可以对作图的直线表达式两端同乘 $[S]$, 即有

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

通过 $\frac{[S]}{v}$ 对 $[S]$ 作图, 得到斜率为 $\frac{1}{v_{\max}}$, 截距为 $\frac{K_M}{v_{\max}}$ 的直线. 这就是**Hanes-Woolf作图法**².

当然, 你还可以对**7D.3.1**变形得到

$$\frac{v}{[S]} = \frac{v_{\max}}{K_M} - \frac{v}{K_M}$$

通过 $\frac{v}{[S]}$ 对 v 作图, 得到斜率为 $-\frac{1}{K_M}$, 截距为 $\frac{v_{\max}}{K_M}$ 的直线. 这就是**Eadie-Hofstee作图法**².

竞争性抑制剂和非竞争性抑制剂

酶对反应体系是敏感的. 一些物质可以与酶发生反应, 进而降低其活性或使其完全失效. 这就是**抑制剂**.

¹如无特别说明, 截距一般指 y 轴截距.

²分别译作“莱恩威弗-伯克作图法”, “哈尼斯-伍尔夫作图法”和“伊迪-霍夫斯蒂作图法”.

Definition 7D.3.3 抑制剂

酶抑制剂是一类特异性作用于或影响酶的活性中心或必需基团,导致酶活性下降或丧失,进而降低酶促反应速率的物质.

按照抑制剂作用的机理不同,酶抑制剂可以简单地被分为如下两类.

Definition 7D.3.4 抑制剂的分类

竞争性抑制剂在结构上通常与底物相似.它和底物不能同时与酶结合,通常是由于它和底物对酶的同活性位点都具有亲和力,故底物和抑制剂竞争结合该位点,从而使得反应减缓.

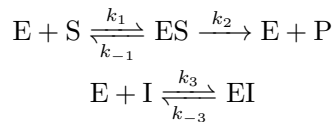
非竞争性抑制剂通常与酶的非活性部位结合,改变酶的结构,从而降低酶的活性,但不影响酶与底物结合.

反竞争性抑制剂仅与酶-底物复合物结合,导致其不能正常发生分解而生成产物.

复合抑制剂可以与酶或酶-底物复合物结合,使得反应的速率减缓.

以上四种抑制剂的结合都是可逆的.不可逆抑制剂通过与酶形成共价键,彻底改变其性质,从而使得反应减缓,并且这一作用是不可逆的.

我们现在来推导竞争性抑制剂存在下反应的速率方程.这一反应的机理可以表述如下.



Derivation.

对ES稳态近似,可知仍然满足米氏方程给出的关系

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M}$$

另一方面,对EI稳态近似可得

$$\frac{d[EI]}{dt} = k_3[E][I] - k_{-3}[EI] = 0$$

令 $K_I = \frac{k_{-3}}{k_3}$ 为抑制反应的平衡常数的倒数,则有

$$[EI] = \frac{[E][I]}{K_I}$$

由E的物料守恒有

$$\left(1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_I}\right) [E] = [E]_0$$

于是反应的速率即为

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E][S]}{K_M} = \frac{k_2[S]}{K_M} \cdot \frac{[E]_0}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[I]}{K_I}} = \frac{k_2[E]_0[S]}{[S] + \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) K_M}$$

我们按照Lineweaver-Burk作图法的形式对上式整理可得

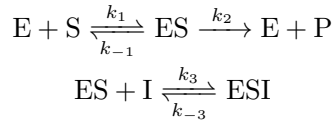
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) \frac{1}{[S]}$$

令 $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$,则上式可以写作

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{\alpha K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]}$$

可见竞争性抑制剂不改变直线的截距,只改变直线的斜率.如果令 $\alpha K_M = K_{M,\text{obs}}$ 为表观米氏常数,就可以知道竞争性抑制剂只改变 $K_{M,\text{obs}}$,不改变 v_{\max} .

反竞争性抑制剂的机理与竞争性抑制剂有些相似,可以表述如下.



我们现在来推导该反应的速率方程.

Derivation.

综合前面的推导,我们可以容易地得出

$$[\text{E}] = \frac{K_M}{[\text{S}]} [\text{ES}] \quad [\text{ESI}] = \frac{[\text{I}]}{K_I} [\text{ES}]$$

其中同样地有 $K_I = \frac{k_{-3}}{k_3}$.于是反应的速率为

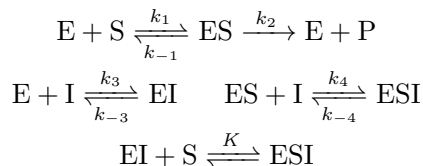
$$v = \frac{k_2 [\text{E}]_0}{1 + \frac{[\text{I}]}{K_I} + \frac{K_M}{[\text{S}]}}$$

令 $\alpha = 1 + \frac{[\text{I}]}{K_I}$.我们按照Lineweaver-Burk作图法的形式对上式整理可得

$$\frac{1}{v} = \frac{\alpha}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[S]}$$

可见反竞争性抑制剂只改变直线的截距,不改变直线的斜率.它同步地影响 $K_{M,\text{obs}}$ 与 v_{\max} .

非竞争性抑制剂的作用原理则稍复杂一些,它的机理可以表述如下.



由于体系中的E,ES,EI和ESI处于快速平衡中,因此最后一个反应的平衡常数 K 可以由前面的速

率常数求出,不是一个独立的量.我们现在来推导该反应的速率方程.

Derivation.

仍然有

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_M}$$

同样地,令 $K_1 = \frac{k_{-3}}{k_3}$, $K_2 = \frac{k_{-4}}{k_4}$ 分别为两个抑制反应的平衡常数的倒数,根据平衡态假设有

$$[\text{EI}] = \frac{[\text{E}][\text{I}]}{K_1} \quad [\text{ESI}] = \frac{[\text{ES}][\text{I}]}{K_2}$$

根据催化剂的物料守恒可得

$$\left[\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_1} \right) \frac{K_M}{[\text{S}]} + 1 + \frac{[\text{I}]}{K_2} \right] [\text{ES}] = [\text{E}]_0$$

于是反应的速率为

$$v = \frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2[\text{ES}] = \frac{k_2[\text{E}]_0}{1 + \frac{[\text{I}]}{K_2} + \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_1} \right) \frac{K_M}{[\text{S}]}}$$

一般情况下,抑制剂I由于结合的位点与活性位点无关,因此I与E和ES的结合能力应当相同,即 $K_1 = K_2$.令 $K_I = K_1 = K_2$,再令 $\alpha = 1 + \frac{[\text{I}]}{K_I}$,就有

$$v = \frac{k_2[\text{E}]_0}{\alpha \left(1 + \frac{K_M}{[\text{S}]} \right)}$$

我们按照Lineweaver-Burk作图法的形式对上式整理可得

$$\frac{1}{v} = \frac{\alpha}{v_{\max}} + \frac{\alpha K_M}{v_{\max}} \frac{1}{[\text{S}]}$$

如果令 $v'_{\max} = \frac{v_{\max}}{\alpha}$,就有

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v'_{\max}} + \frac{K_M}{v'_{\max}} \frac{1}{[\text{S}]}$$

可见非竞争性抑制剂不改变直线的 x 轴截距,即不改变 K_M ,而只改变 v_{\max} .

我们将这些抑制剂的作用总结如下.

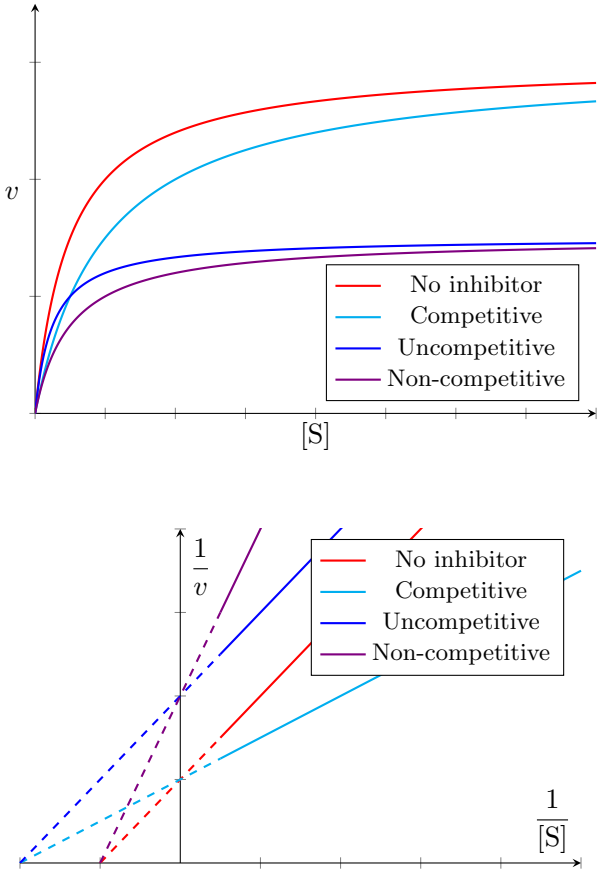
Theorem 7D.3.5 抑制剂的作用

竞争性抑制剂使得 $K_{M,\text{obs}}$ 减小,但不改变 v_{\max} .

反竞争性抑制剂使得 $K_{M,\text{obs}}$ 和 v_{\max} 都减小,但不改变 $\frac{K_{M,\text{obs}}}{v_{\max}}$.

非竞争性抑制剂使得 v_{\max} 减小,但不改变 $K_{M,\text{obs}}$.

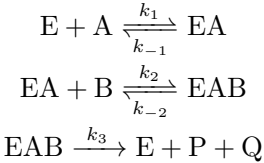
我们在下面给出加入这几种抑制剂后的图像和对应的Lineweaver-Burk图以供你参考.



多底物酶促反应——单置换反应与双置换反应

实际情况中超过60%的酶促反应都涉及两个及以上的底物.对双底物酶促反应的研究表明有以下几种机理.

如果两种底物A和B需要按照顺序与E结合,然后生成产物,那么这样的机理被称为**单置换反应**.我们可以将机理表述如下.



现在我们来推导单置换反应的速率方程.

Derivation.

仿照米氏方程的推导方式,对EA和EAB稳态近似可得

$$\frac{d[\text{EA}]}{dt} = k_1[\text{E}][\text{A}] - k_{-1}[\text{EA}] - k_2[\text{EA}][\text{B}] + k_{-2}[\text{EAB}] = 0 \tag{1}$$

$$\frac{d[\text{EAB}]}{dt} = k_2[\text{EA}][\text{B}] - k_{-2}[\text{EAB}] - k_3[\text{EAB}] = 0 \quad (2)$$

不妨令 $K_{M,B} = \frac{k_{-2} + k_3}{k_2}$ 为该反应对B的米氏常数.由(2)可得

$$[\text{EAB}] = \frac{k_2[\text{B}]}{k_{-2} + k_3} [\text{EA}] = \frac{[\text{B}]}{K_{M,B}} [\text{EA}] \quad (3)$$

由(1)和(3)可得

$$\begin{aligned} [\text{E}] &= \frac{(k_{-1} + k_2[\text{B}]) [\text{EA}] - k_{-2}[\text{EAB}]}{k_1[\text{A}]} \\ &= \frac{k_{-1} + k_2[\text{B}] - \frac{k_{-2}[\text{B}]}{K_{M,B}}}{k_1[\text{A}]} [\text{EA}] \\ &= \frac{k_{-1} + \frac{k_3}{K_{M,B}} [\text{B}]}{k_1[\text{A}]} [\text{EA}] \end{aligned} \quad (4)$$

这里由中间量[EA]统一变量可以降低计算的难度.

这样,由(3)和(4),以及E的物料守恒 $[\text{E}] + [\text{EA}] + [\text{EAB}] = [\text{E}]_0$ 可得

$$[\text{EA}] = \frac{[\text{E}]}{[\text{E}] + [\text{EA}] + [\text{EAB}]} [\text{E}]_0 = \frac{1}{\frac{k_{-1} + \frac{k_3}{K_{M,B}} [\text{B}]}{k_1[\text{A}]} + 1 + \frac{[\text{B}]}{K_{M,B}}} [\text{E}]_0 \quad (5)$$

于是反应的速率即为

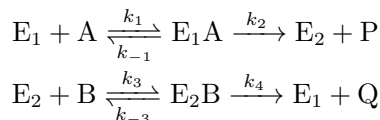
$$\begin{aligned} v &= \frac{d[\text{P}]}{dt} = k_3[\text{EAB}] = \frac{k_2 k_3 [\text{B}]}{k_{-2} + k_3} [\text{EA}] \\ &= \frac{1}{\frac{K_{M,B}}{k_3 [\text{B}]} \cdot \frac{[\text{E}]_0}{\frac{k_{-1} + \frac{k_3}{K_{M,B}} [\text{B}]}{k_1[\text{A}]} + 1 + \frac{[\text{B}]}{K_{M,B}}}} \\ &= \frac{[\text{E}]_0}{\left(\frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_1[\text{A}]} \right) + \frac{K_{M,B}}{k_3} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_1[\text{A}]} \right) \frac{1}{[\text{B}]}} \end{aligned} \quad (6)$$

我们按照Lineweaver-Burk作图法的形式对(6)整理可得

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[\text{E}]_0} \left[\left(\frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_1[\text{A}]} \right) + \frac{K_{M,B}}{k_3} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_1[\text{A}]} \right) \frac{1}{[\text{B}]} \right] \quad (7)$$

以 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[\text{B}]}$ 作图,将得到斜率为 $\frac{K_{M,B}}{k_3 [\text{E}]_0} \left(1 + \frac{k_{-1}}{k_1[\text{A}]} \right)$,截距为 $\frac{1}{[\text{E}]_0} \left(\frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_1[\text{A}]} \right)$ 的直线.因此,改变[A],直线的斜率和截距将发生变化.这是单置换反应的特征.

如果底物A与酶E₁反应后生成修饰形式的酶E₂,然后与另一种底物B反应生成原先的酶,如此循环往复,那么这样的机理被称为**双置换反应**.我们可以将机理表述如下.



现在我们来推导双置换反应的速率方程。

Derivation.

这一反应由两个相关的米氏反应构成.我们先对 E_1A 和 E_2B 稳态近似可得

$$\frac{d[\text{E}_1\text{A}]}{dt} = k_1[\text{E}_1][\text{A}] - (k_{-1} + k_2)[\text{E}_1\text{A}] = 0 \quad [\text{E}_1\text{A}] = \frac{[\text{E}_1][\text{A}]}{K_{M,\text{A}}} \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{E}_2\text{B}]}{dt} = k_3[\text{E}_2][\text{B}] - (k_{-3} + k_4)[\text{E}_2\text{B}] = 0 \quad [\text{E}_2\text{B}] = \frac{[\text{E}_2][\text{B}]}{K_{M,\text{B}}} \quad (2)$$

其中 $K_{M,\text{A}}$ 和 $K_{M,\text{B}}$ 分别为两步的米氏常数.

体系处于稳态时, E_1 和 E_2 的浓度也应当变化不大(否则就不满足 E_1A 和 E_2B 的稳态近似).于是有

$$\frac{d[\text{E}_1]}{dt} = k_4[\text{E}_2\text{B}] + k_{-1}[\text{E}_1\text{A}] - k_1[\text{E}_1][\text{A}] \quad (3)$$

(1) + (3)可得

$$k_4[\text{E}_2\text{B}] = k_2[\text{E}_1\text{A}] \quad (4)$$

结合(1)(2)和(4)和物料守恒 $[\text{E}_1] + [\text{E}_1\text{A}] + [\text{E}_2] + [\text{E}_2\text{B}] = [\text{E}]_0$ 可得

$$[\text{E}_1\text{A}] = \frac{[\text{E}]_0}{\frac{K_{M,\text{A}}}{[\text{A}]} + 1 + \frac{k_2}{k_4} \left(\frac{K_{M,\text{B}}}{[\text{B}]} + 1 \right)} \quad (5)$$

于是反应的速率即为

$$v = k_2[\text{E}_1\text{A}] = \frac{[\text{E}]_0}{\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_4} + \frac{K_{M,\text{A}}}{k_2[\text{A}]} + \frac{K_{M,\text{B}}}{k_4[\text{B}]}} \quad (6)$$

我们按照Lineweaver-Burk作图法的形式对(6)整理可得

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[\text{E}]_0} \left[\frac{K_{M,\text{B}}}{k_4} \frac{1}{[\text{B}]} + \left(\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_4} + \frac{K_{M,\text{A}}}{k_2[\text{A}]} \right) \right] \quad (7)$$

以 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[\text{B}]}$ 作图,将得到斜率为 $\frac{K_{M,\text{B}}}{k_4[\text{E}]_0}$,截距为 $\frac{1}{[\text{E}]_0} \left(\frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_4} + \frac{K_{M,\text{A}}}{k_2[\text{A}]} \right)$ 的一条直线.因此,改变 $[\text{A}]$,直线的斜率不变而截距变化.这是双置换反应的特征.