

酶学与酶工程

Enzymology and Enzyme Engineering

卢丹琪

ludanqi@mail.sysu.edu.cn

相关信息

- **对分易系统**
- **计分方式：考勤、课堂表现、作业小测等（40%）**
期末考试，闭卷（60%）

教材及参考书目

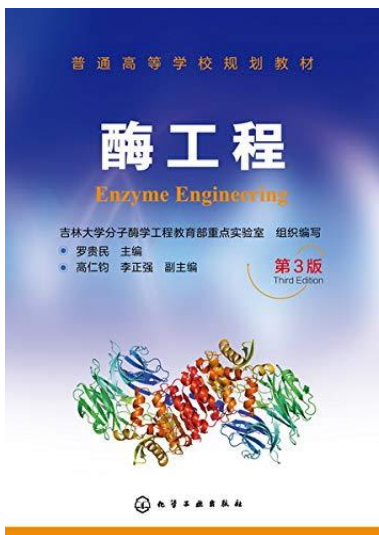
主讲教材：

《酶工程》，主编：罗贵民，出版社：化学工业出版社

参考书目：

《酶工程》，主编：郭勇，出版社：科学出版社（第四版）

《生物催化剂---酶催化手册》，秦永宁编著，化学工业出版社



第一章 酶学与酶工程绪论

第一节：酶的基本概念和发展历史（了解）

第二节：酶的分类、组成和结构特点（掌握）

第三节：酶催化作用的特点（掌握）

第一节: 酶的基本概念和发展历史

几千年来，人们不自觉地生活中利用酶来制造食品和治疗疾病！

文献记载：

- **4000多年前（夏禹时代），酿酒技术；**
- **3000多年前（周朝），制造饴糖、食酱；**
- **2500多年前（春秋战国），麴来治疗消化不良。**

不自觉地应用

酶工程发展史的关键事件

- ✓ 1783年，意大利科学家斯帕兰扎尼（L. Spallanzani, 1729—1799）设计了一个巧妙的实验：鹰吞肉的实验。
- ✓ 1836年，德国马普生物研究所科学家施旺（T.Schwann, 1810—1882）从胃液中发现胃蛋白酶，解开消化之谜。
- ✓ 1896年，巴克纳（Buchner）兄弟用细砂研磨酵母细胞，压取汁液，汁液不含活细胞，但仍能使糖发酵生成酒精和二氧化碳。**证明：发酵与细胞的活动无关**

主动性研究

酶工程发展史的关键事件

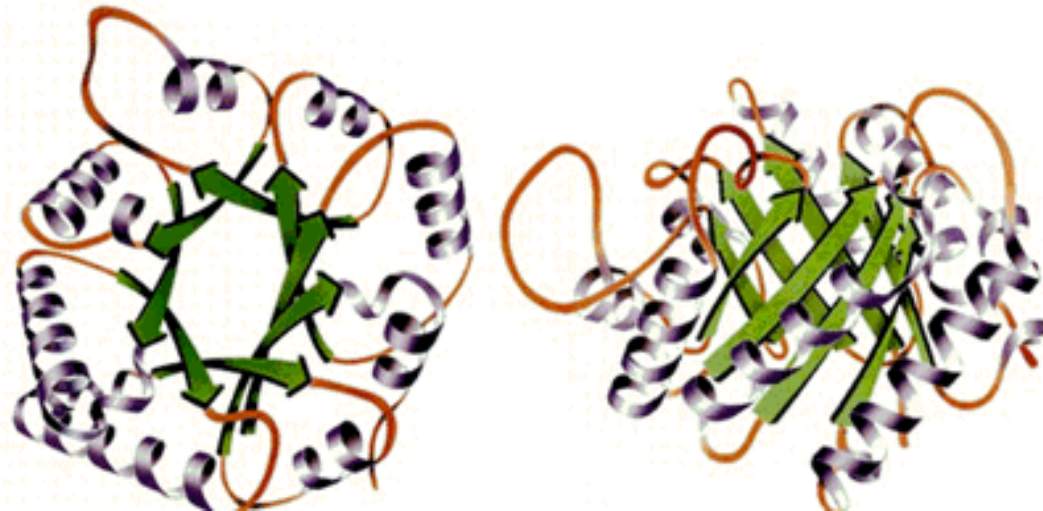
- ✓ 1926年，美国科学家萨姆纳（J.B.Sumner, 1887—1955）从刀豆种子中提取出脲酶的结晶，并通过化学实验验证实脲酶是一种蛋白质。
- ✓ 20世纪30年代，Northrop等科学家们相继得到了胃蛋白酶（pepsin）、胰蛋白酶（trypsin）等的结晶，并指出酶是一类具有生物催化作用的蛋白质。
- ✓ 20世纪80年代，美国科学家切赫（T.R.Cech, 1947—）和奥特曼（S.Altman, 1939—）发现少数RNA也具有生物催化作用。

什么是酶？

酶 (enzyme) 是一类由活细胞产生的，具有催化活性和高度专一性的生物催化剂（包括蛋白类酶和核酸类酶）。

- ✓ 酶是生物催化剂。
- ✓ 酶学的知识源于发酵，enzyme 词根zyme就是具有“发酵”或“酵母”意义的希腊文。
- ✓ 人体和哺乳动物体内含有超过5000种酶.....

- ✓ 溶解于细胞质中，或是与各种膜结构结合在一起，或是位于细胞内其他结构的特定位置上(是细胞的一种产物)，只有在被需要时才被激活，这些酶统称胞内酶。
- ✓ 在细胞内合成后再分泌至细胞外的酶——胞外酶。



酶催化作用实质：降低化学反应活化能

酶与无机催化剂比较：

相同点：

- 1) 改变化学反应速率，本身几乎不被消耗；**
- 2) 只催化已存在的化学反应；**
- 3) 加快化学反应速率，缩短达到平衡时间，但不改变平衡点；**
- 4) 降低活化能，使化学反应速率加快。**

酶作为催化剂的显著特点

- **高效性：**加快反应速度可高达 10^{17} 倍
- **专一性：**各种酶都有专一性，但专一程度的严格性上有所差别
- **可调节性：**包括抑制剂和激活剂调节、反馈抑制调节、共价修饰调节和变构调节等
- **条件温和：**酶所催化的化学反应一般是在较温和的条件下进行的
- **易变性：**大多数酶是蛋白质，因而会被高温、强酸、强碱等破坏

天然酶在工业应用上受到限制的原因

- ✓ 脱离其生理环境后不稳定
- ✓ 酶的分离纯化工艺复杂
- ✓ 酶制剂成本较高

什么是酶工程？

酶工程 (enzyme engineering) 是将酶学理论与化工技术相结合，研究酶的生产和应用的一门新的技术性学科。包括酶制剂的制备、酶的固定化、酶的修饰与改造及酶反应器等方面内容。

- ✓ **生物工程/生物技术 (biotechnology) 的重要组成部分。**
- ✓ **利用酶——用好酶，用好酶**

酶工程主要指天然酶制剂在工业上的大规模应用

由4个部分组成：

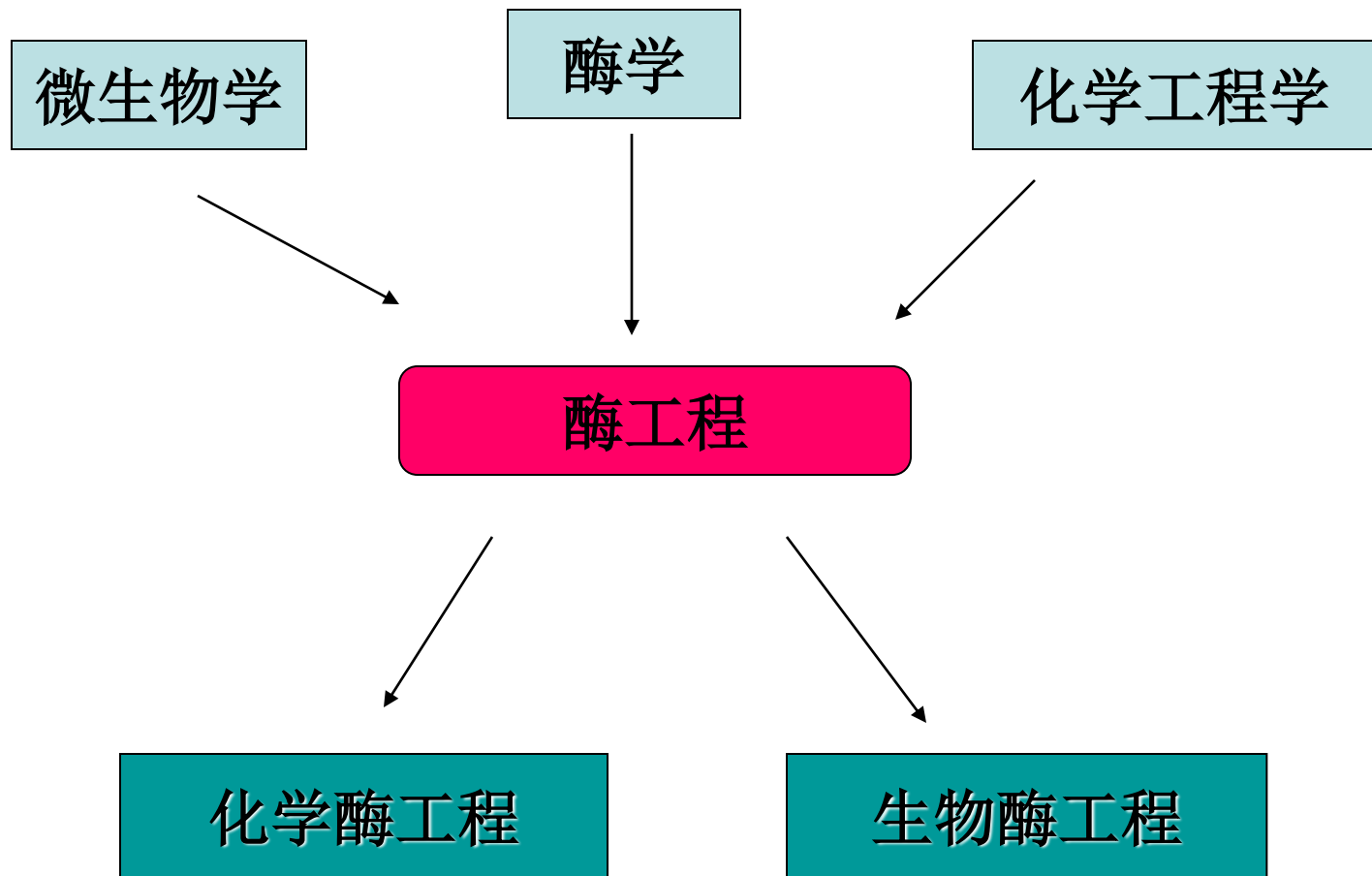
- 1. 酶的产生**
- 2. 酶的分离纯化**
- 3. 酶的固定化**
- 4. (酶) 生物反应器**

化学酶工程

- 用**化学**手段修饰、改造、模拟天然酶，使其更适合人们的需要，主要包括天然酶，化学修饰酶，固定化酶及化学人工合成酶的研究与应用。

生物酶工程

- 用**生物学**方法，特别是基因工程、蛋白质工程和组合库筛选法改造天然酶，创造性能优异的新酶，主要包括抗体酶、杂合酶、进化酶和核酸酶的研究和应用。



教学内容

- 1、酶学与酶工程概论
- 2、酶促反应动力学
- 3、酶的发酵生产
- 4、酶的分离纯化
- 5、酶的修饰
- 6、固定化酶与固定化细胞
- 7、酶蛋白质的稳定性及稳定化
- 8、酶的非水相反应
- 9、人工模拟酶、酶反应器
- 10、进化酶
- 11、杂合酶
- 12、抗体酶
- 13、酶的应用
- 14、纳米酶、基因组学与酶工程等

第二节：酶的分类、组成、结构特点

什么是酶？

酶（enzyme）是一类由活细胞产生的，具有催化活性和高度专一性的生物催化剂，包括蛋白类酶及核酸类酶。

酶的分类

国际生化联合会酶学委员会(I.E.C)提出，按酶促反应的性质，可把酶分成六大类：

- EC 1:氧化还原酶类(oxidoreductases)指催化底物进行氧化还原反应的酶类。例如，乳酸脱氢酶、过氧化氢酶等。
- EC 2:转移酶类(transferases)指催化底物之间进行某些基团的转移或交换的酶类。如转甲基酶、磷酸化酶等。
- EC 3:水解酶类(hydrolases)指催化底物发生水解反应的酶类。例如、淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶等。
- EC 4:裂解酶类(lyases)指催化一个底物分解为两个化合物或两个化合物合成为一个化合物的酶类。例如柠檬酸合成酶等。
- EC 5:异构酶类(isomerases)指催化各种同分异构体之间相互转化的酶类。例如，磷酸丙糖异构酶、消旋酶等。
- EC 6:合成酶类(连接酶类，ligases)指催化两分子底物合成为一分子化合物，同时还必须偶联有ATP的磷酸键断裂的酶类。例如，谷氨酰胺合成酶等。
- EC 7:转位酶类 (Translocases) ， 指催化离子或分子穿越膜结构的酶或其膜内组分。

酶的命名

习惯命名法:

1. 一般采用底物加反应类型而命名，如蛋白水解酶、乳酸脱氢酶、磷酸己糖异构酶等。
2. 对水解酶类，只要底物名称即可，如蔗糖酶、胆碱酯酶、蛋白酶等。
3. 有时在底物名称前冠以酶的来源，如血清谷氨酸 - 丙酮酸转氨酶、唾液淀粉酶等习惯命名法简单，应用历史长，但缺乏系统性，有时出现一酶数名或一名数酶的现象。

国际酶学委员会规定了一套系统的命名法，它包括酶的系统命名和4个数字分类的酶编号。

例如对催化下列反应酶的命名： $\text{ATP} + \text{D—葡萄糖} \rightarrow \text{ADP} + \text{D—葡萄糖-6-磷酸}$

该酶的正式系统命名是：ATP：葡萄糖磷酸转移酶，表示该酶催化从ATP中转移一个磷酸到葡萄糖分子上的反应。

它的分类数字是：E.C.2.7.1.1

E.C代表按国际酶学委员会规定的命名

第1个数字(2)代表酶的分类名称(转移酶类)

第2个数字(7)代表亚类(磷酸转移酶类)

第3个数字(1)代表亚亚类(以羟基作为受体的磷酸转移酶类)

第4个数字(1)代表该酶在亚-亚类中的排号(D葡萄糖作为磷酸基的受体)

几个有关名词

- **酶 (Enzyme, E)**
- **底物(substrate, S): 酶作用的物质。**
- **产物(product, P): 反应生成的物质。**
- **酶促反应: 酶催化的反应。**
- **酶活性: 酶催化化学反应的能力。**



酶的结构

酶的活性中心

必需基团(essential group)

酶分子中氨基酸残基侧链的化学基团中，一些与酶活性密切相关的基团。

酶的活性中心(active center)

或称活性部位(active site)，指必需基团在空间结构上彼此靠近，组成具有特定空间结构的区域，能与底物特异结合并将底物转化为产物。

➤ 活性中心内的必需基团

结合基团
(binding group)
与底物相结合

催化基团
(catalytic group)
催化底物转变成产物

➤ 活性中心外的必需基团

维持酶活性中心应有的空间构象所必需。

➤ 构成酶活性中心的常见基团

His的咪唑基、Ser的 $-OH$ 、Cys的 $-SH$ 、Glu的 $\gamma-COOH$ 。

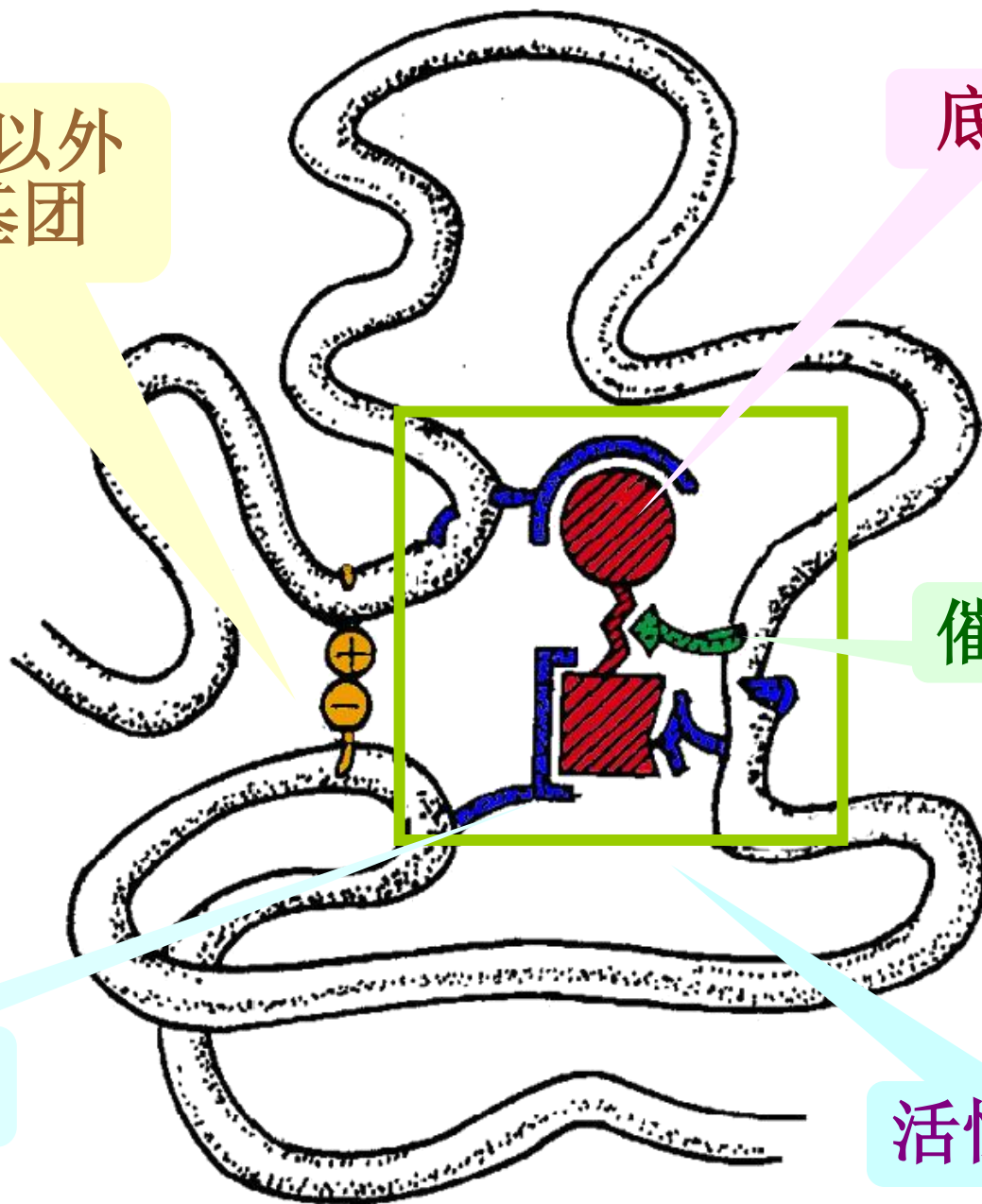
活性中心以外的必需基团

底物

催化基团

结合基团

活性中心



一些酶活性中心上的残基

酶	活性中心上的残基	酶	活性中心上的残基
胰凝乳蛋白酶	His57, Asp102, Ser195	木瓜蛋白酶	Cys25, His159
胰蛋白酶	His46, Ser183	乳酸脱氢酶	Cys, His, Tyr
枯草杆菌蛋白酶	Ser221, His64	延胡索酸酶	Met, His
核糖核酸酶	His12, Lys41, His119	6-磷酸葡萄糖脱氢酶	Lys, His, Tyr
碱性磷酸酶	Ser, His, Zn ²⁺		

除水解酶和连接酶外，其他酶在反应时都需要特定的辅（助）因子

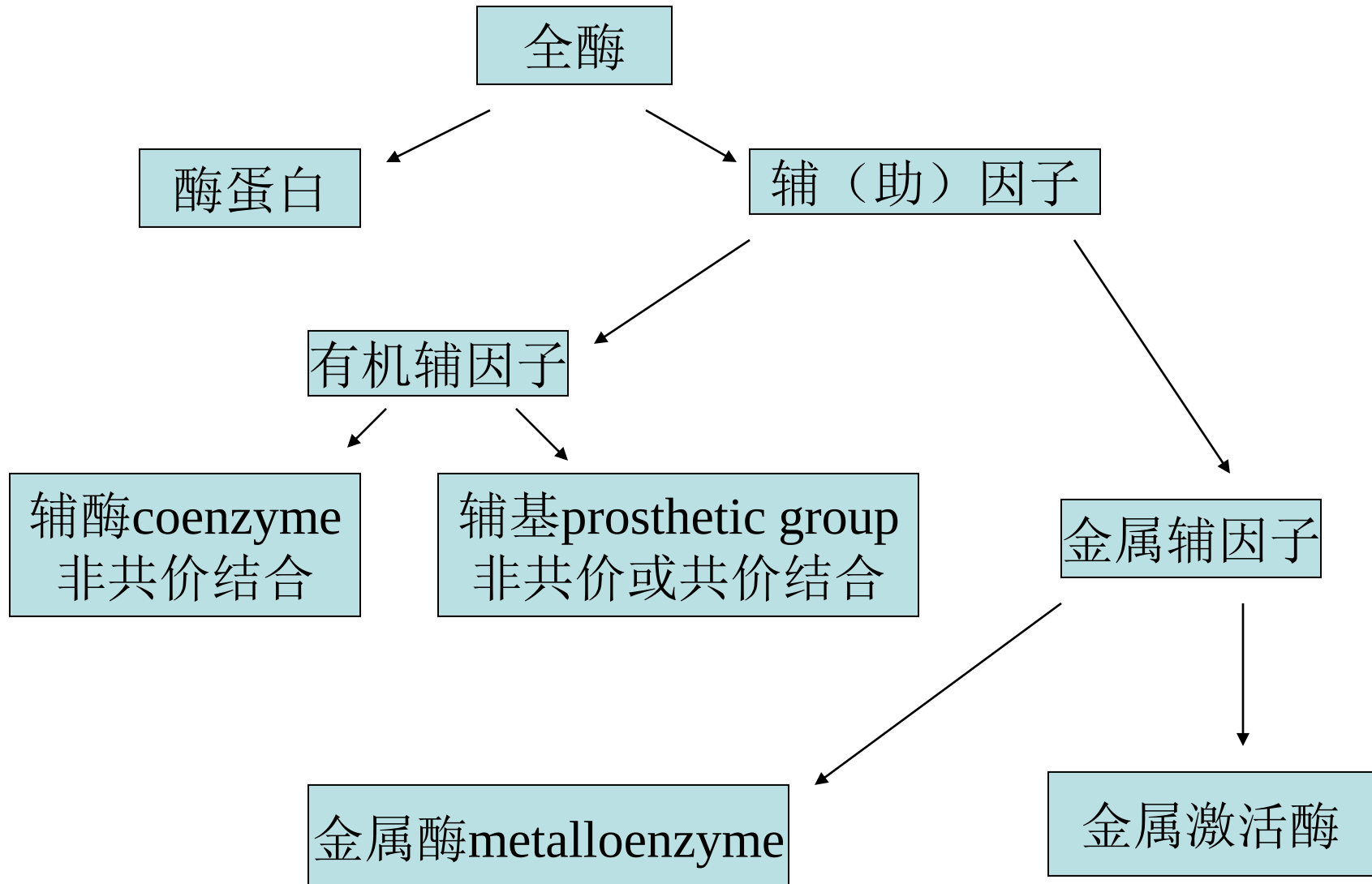


table 8–1

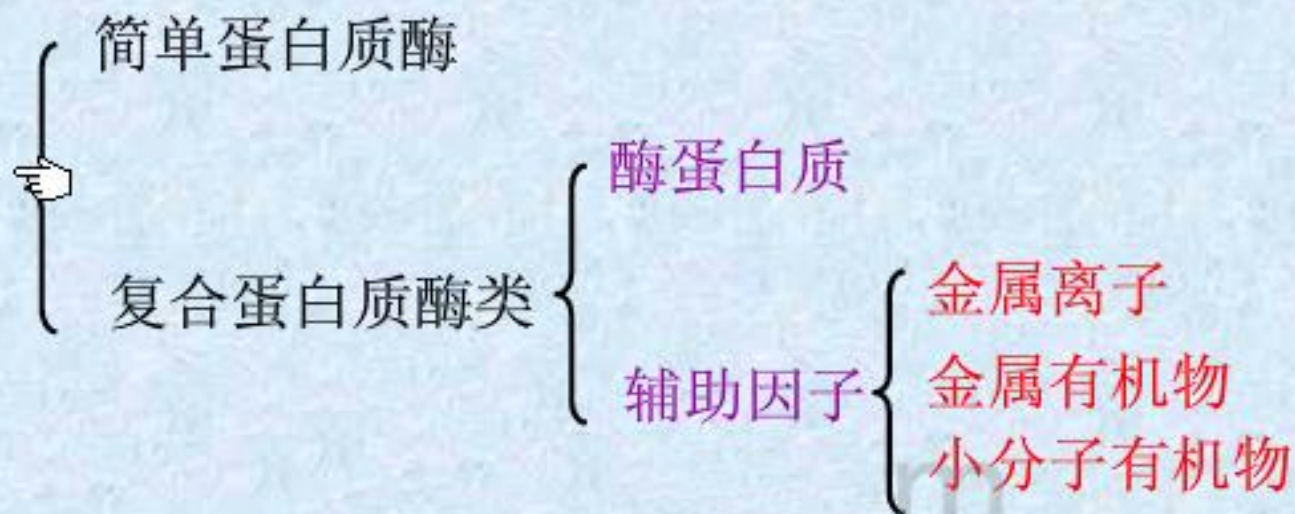
Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu^{2+}	Cytochrome oxidase
Fe^{2+} or Fe^{3+}	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Pyruvate kinase
Mg^{2+}	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

金属在酶催化中的作用

- ✓ **稳定酶构象**
- ✓ **参与酶的催化作用： 如激活底物**
- ✓ **电子传递体**

据酶分子
组成分类



全酶=酶蛋白+辅助因子

辅助因子:

辅酶

辅基

金属离子

酶的组成和结构特点

酶蛋白的组成

- 单体酶/寡聚酶
- 多酶复合体
- 多功能酶

单体酶、寡聚酶

1. 仅有一个活性中心的多肽链构成的酶
2. 由一条多肽链组成，如牛胰胰岛素、胰核糖核酸酶溶菌酶等，称为单体酶。
3. 由多条多肽链组成，如胰凝乳蛋白酶，由三条肽链组成，链间由二硫键相连构成一个共价整体，这类含几条肽链的单体酶往往是由一条前体肽链经活化断裂而生成，称为寡聚酶。
4. 单体酶或寡聚酶的种类很少，一般多是催化水解反应的酶，相对分子质量在35,000以下。

多酶复合体

体内有些酶彼此聚合在一起，组成一个物理的结合体，此结合体称为多酶复合体(multienzyme complex)。

- **若把多酶复合体解体，则各酶的催化活性消失。**
- **参与组成多酶复合体的酶有多有少，如催化丙酮酸氧化脱羧反应的丙酮酸脱氢酶多酶复合体由三种酶组成，而在线粒体中催化脂肪酸 β -氧化的多酶复合体由四种酶组成。**
- **多酶复合体第一个酶催化反应的产物成为第二个酶作用的底物，如此连续进行，直至终产物生成。**

多功能酶

酶分子中存在多种催化活性部位的酶称为多功能酶(multifunctional enzyme)或串联酶(tandem enzyme)。

- 1. 例如大肠杆菌DNA聚合酶I是一条分子质量为109kDa的多肽链，具有催化DNA链的合成、3' -5' 核酸外切酶和5' -3' 核酸外切酶的活性。用蛋白水解酶轻度水解得两个肽段，一个含5' -3' 核酸外切酶活性，另一个含另两种酶的活性(克列诺片段)，表明大肠杆菌DNA聚合酶分子中含多个活性中心。**
- 2. 多功能酶在分子结构上比多酶复合体更具有优越性，因为相关的化学反应在一个酶分子上进行，比多酶复合体更有效，这也是生物进化的结果。**

酶概念的延伸

- **核酶 (ribozyme) 的发现：1986年Cech发现具有自身催化作用的RNA。是一种具有切割作用的反义RNA分子，可以特异的切割靶RNA分子，具有解离后重复切割相同靶分子的能力。**
- **脱氧核酶 (deoxyribozyme) 的发现：1995年Cuenoud等相继报道了DNA也有磷酸酯酶和连接酶的活性。**

核酶

核酶的发现： Thomas Cech的工作

- T.Cech的重要发现开始于1981年。
- 研究目的：细胞中DNA转录成rRNA后，rRNA中一些无意义的序列（IVT），或“内含子”（intron），如何从RNA分子中剪切下来的。**根据过去传统的概念，这一过程必须要有蛋白质酶来完成。**

- **研究对象：**原生动物四膜虫，其26s rRNA除了核糖体RNA外还有一个由413个核苷酸组成的插入序列（IVS）。
- **发现：**四膜虫的26S rRNA前体很不稳定，在鸟苷和 Mg^{2+} 存在下可切除自身的413个核苷酸的IVS，使两个外显子拼接起来，变成成熟的rRNA分子。
- **验证：**Cech克隆得到编码26S rRNA前体DNA并在无细胞系统中转录成26S rRNA前体分子。结果发现人工制备的26S rRNA前体分子在没有任何蛋白质催化剂存在的情况下，切除了前体分子中的IVS序列。
- **这种现象称为自我剪接(self-splicing)，这是人类第一次发现RNA具有催化化学反应的活性，具有这种催化活性的RNA称为核酶。**

S. Altman的研究工作：

- **研究目的：t-RNA分子的剪接过程。**
- **研究发现：在较高浓度的镁离子和适量精氨酸参与下，核
酸酶P（ribonuclease P, RNase P）中的RNA能够
切割tRNA前体的5' 端。**

核酸酶P (RNaseP)

- **RNaseP 功能：能剪切所有tRNA前体的5' 端，除去多余的序列，形成3' -OH 和 5' -磷酸末端。**
- **RnaseP由M1RNA和蛋白质亚基组成。**

M1RNA：375个碱基

蛋白质：119个氨基酸残基

体内： M1RNA和蛋白质对酶活性都是必需的。

核酶的发现对于所有酶都是蛋白质的传统观念提出了挑战。

1989年，核酶的发现者T.Cech和S.Altman被授予诺贝尔化学奖。



切赫

(Thomas Robert Cech)



阿尔特曼

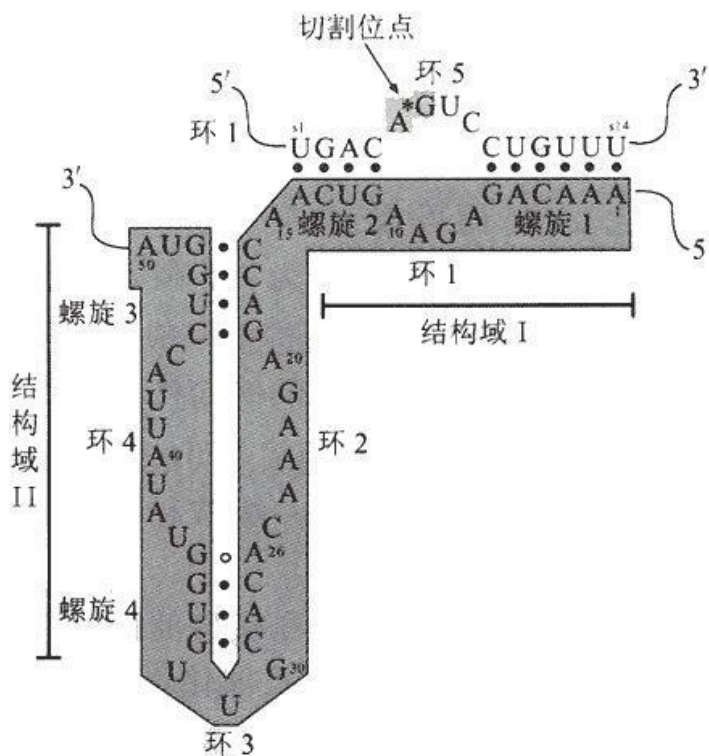
(Sidney Altman)

核酶发现的意义

- ✓ 突破了“酶是蛋白质”的传统概念。
- ✓ 对科学家们普遍感兴趣的生命的起源这一问题有了新的认识。
- ✓ 核酸性酶的发现提示RNA分子不但含有复制的信息，而且还有催化的功能。因此既是信息分子，又是功能分子。
- ✓ 推翻了核酸是信息分子，而蛋白质是功能分子的观点。

核酶的概念

- **核酶 (ribozyme) 泛指一类具有催化功能的RNA分子。一般是指无需蛋白质参与或不与蛋白质结合，就具有催化功能的RNA分子。**



核酶的分类

- 根据酶催化的底物是其本身RNA分子还是其他分子，可以将核酶分为分子内催化（in cis，也称为自我催化）和分子间催化（in trans）两大类；
 - ✓ 分子内催化：自我剪切酶（self-cleavage ribozyme），自我剪接酶（self-splicing ribozyme）
 - ✓ 分子间催化：RNA剪切酶，DNA剪切酶，多糖剪切酶，多肽剪切酶，氨基酸酯剪切酶，多功能酶等

也可以根据酶催化反应的类型，分为剪切酶，剪接酶和多功能酶等。

- ✓ **剪接型（splicing）核酶**：这类核酶具有核酸内切酶和连接酶两种活性。通过既剪又接的方式除去内含子，需要鸟苷酸或鸟苷及镁离子参与；
- ✓ **剪切型（cleavage）核酶**：这类核酶催化自身或者异体RNA的切割，相当于核酸内切酶。在 Mg^{2+} 或其他二价金属离子存在下，产生5' -OH 和2' , 3' -环磷酸二酯末端。

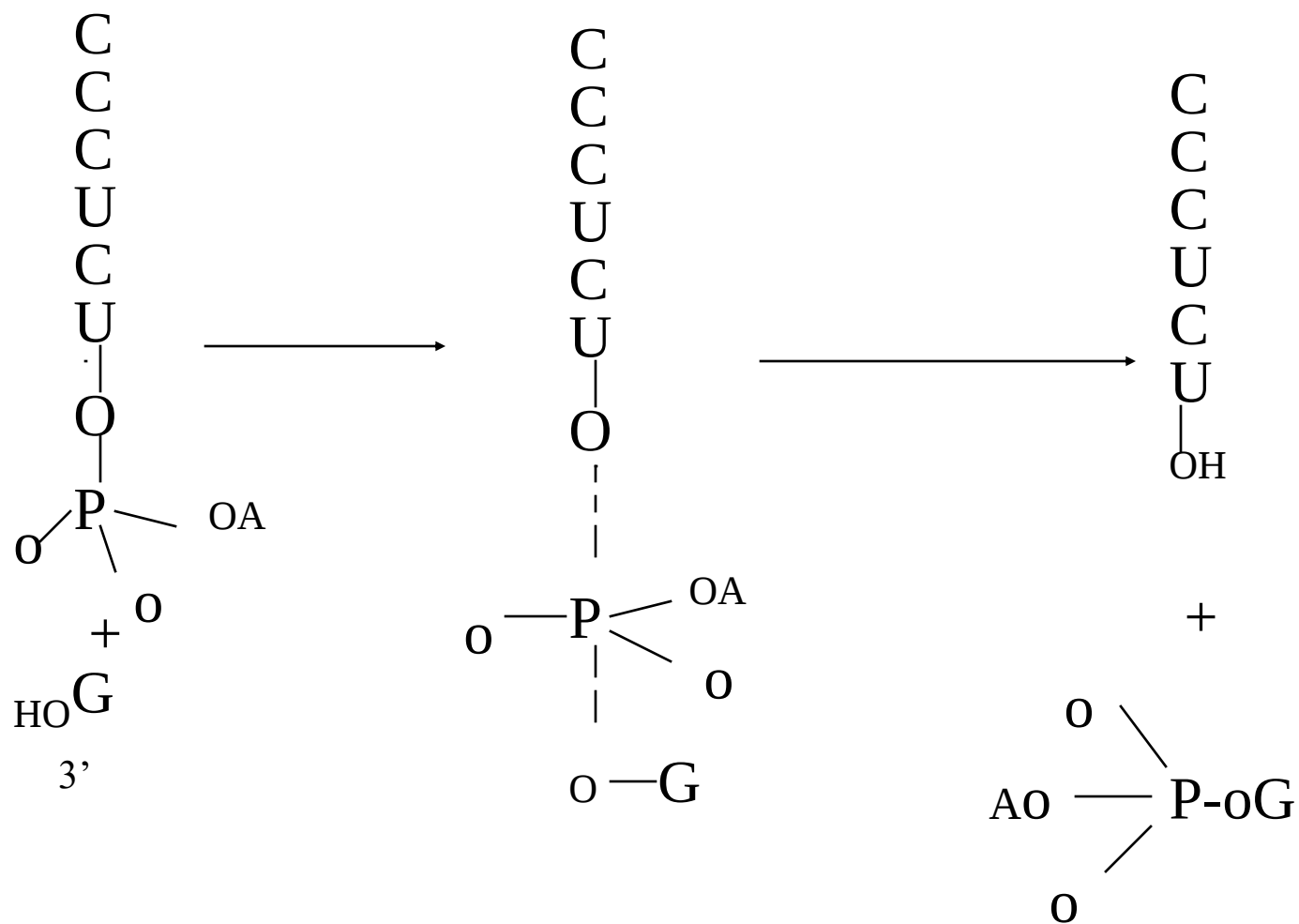
核酶作用的特点

- **化学本质：RNA**
- **底物：RNA、DNA, 肽键等, 有些还具有RNA 连接酶、磷酸酶等活性。**
- **反应特异性(专一性)：碱基**
- **催化效率：与蛋白质酶相比，核酶的催化效率较低，是一种较为原始的催化酶**
- **与一般的RNA相比，核酶具有较稳定的空间结构，不易受到RNA酶的攻击。更重要的是，核酶在切断mRNA后，又可从杂交链上解脱下来，重新结合和切割其它的mRNA分子。**

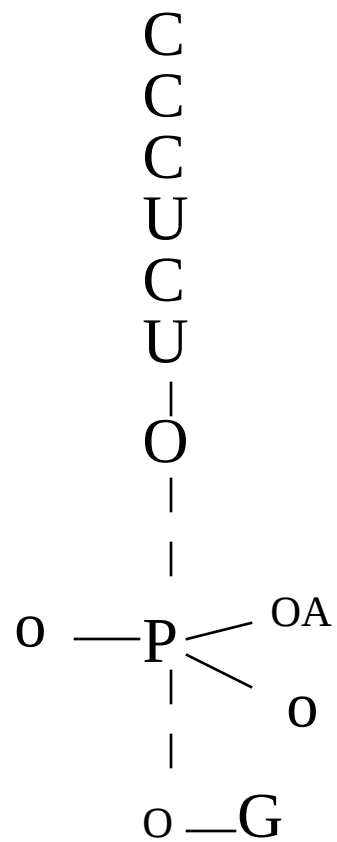
核酶是一种金属依赖酶

金属离子的作用：

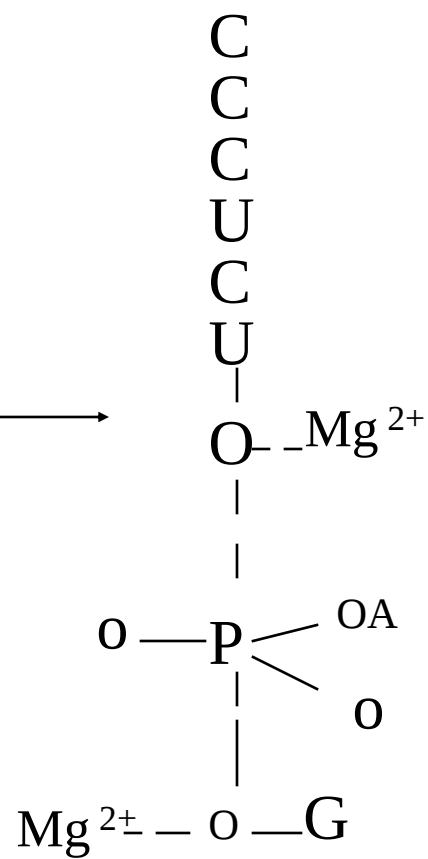
- ✓ 特异的结构作用，或参与活性部位的化学过程；
- ✓ 促进RNA的总体折叠；
- ✓ 二价金属离子（如 Mg^{2+} ）与底物活性部位直接相互作用，参与过渡中间复合物的形成；



过渡态



过渡态



金属离子催化

脱氧核酶(deoxyribozyme)

- 1995年6月, Cuenoud等设计了具有连接酶活性的DNA分子, 它能够催化两个DNA片段的连接。
- 同年10月, Usman等人化学合成了一个由14个脱氧核糖核苷酸组成的单链DNA片段, 能够较弱地水解RNA磷酸二酯键。

脱氧核酶(deoxyribozyme)

定义：利用体外分子进化技术获得的一种具有高效催化活性和结构识别能力的单链DNA片段，称为酶性DNA，又称脱氧核酶(deoxyribozyme)。

根据催化功能的不同，可以将脱氧核酶分为5大类：

- **切割RNA的脱氧核酶**
- **切割DNA的脱氧核酶**
- **具有激酶活力的脱氧核酶**
- **具有连接酶功能的脱氧核酶**
- **催化卟啉环金属螯合反应的脱氧核酶。**

其中以对RNA切割活性的脱氧核酶更引人注意，不仅能催化RNA特定部位的切割反应，而且能从mRNA水平对基因进行灭活，从而调控蛋白的表达。

应用于生命起源的研究

- 生命的起源? 蛋白质?
- 新的观点：生命从RNA开始
- 体内选择技术的应用已经找到了一些催化基本生化反应（如RNA剪切、连接、合成以及肽键合成等）的核酶，这些结果支持了在蛋白质产生以前核酶可能参与催化最初的新陈代谢的设想。

核酶在遗传病，肿瘤和病毒性疾病上的应用

- 核酶可以特异性地识别并结合目标基因，使其断裂失活，从而阻断或降低目标基因的表达，起到基因沉默的作用。
- 核酶不会对细胞基因组产生副作用，因此是一种既安全又有效的分子生物学工具。
- 针对某些病原或肿瘤的基因设计特异性核酶，并将其导入细胞以阻断或降低这些基因在细胞内的表达，可达到抑制病原增殖、肿瘤扩散的目的。

■抗艾滋病毒HIV：设计专一识别HIV的RNA的核酶并将其导入被病毒感染的细胞内，有望建立抵抗HIV入侵的第一防线。甚至在HIV生活史的不同阶段也可切断HIV的RNA而不影响自身的RNA。

■治疗白血病：日本东京大学一研究小组指出，藉由核酶(ribozyme)可抑制具慢性骨髓性白血病 (chronic myelogenous leukaemia, CML)特性的基因活动。

■核酶抑制肝癌突变基因p53的表达，在肝癌中的应用。

酶的应用章节，进行讨论

核酶技术面临的问题

- 1、核酶催化切割反应的可逆性问题
- 2、提高催化效率
- 3、寻找合适载体将核酶高效、特异地导入靶细胞
- 4、使核酶在细胞内有调控地高效表达
- 5、增强核酶在细胞内的稳定性
- 6、对宿主的损伤问题有待进一步考察

酶的应用章节，进行讨论

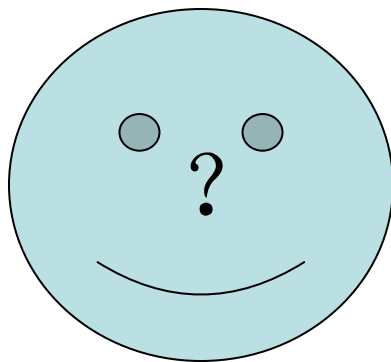
核酶的研究方法

- 利用天然的RNA或者DNA分子在体外筛选出具有酶活性的RNA或者DNA分子。
- 通过人工合成并在体外筛选出具有酶活性的小片段RNA或者DNA分子。
- 体外核酶筛选方法**SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)** 法，从随机单链序列库中筛选出特异性与靶物质高度亲和的核酸Aptamer。
- 这一方法制造出无数自然界尚未发现的核酶，以及脱氧核酶和RNA/DNA嵌合核酶。

生物催化剂

蛋白质类

核酸类



酶及生物催化剂概念的发展

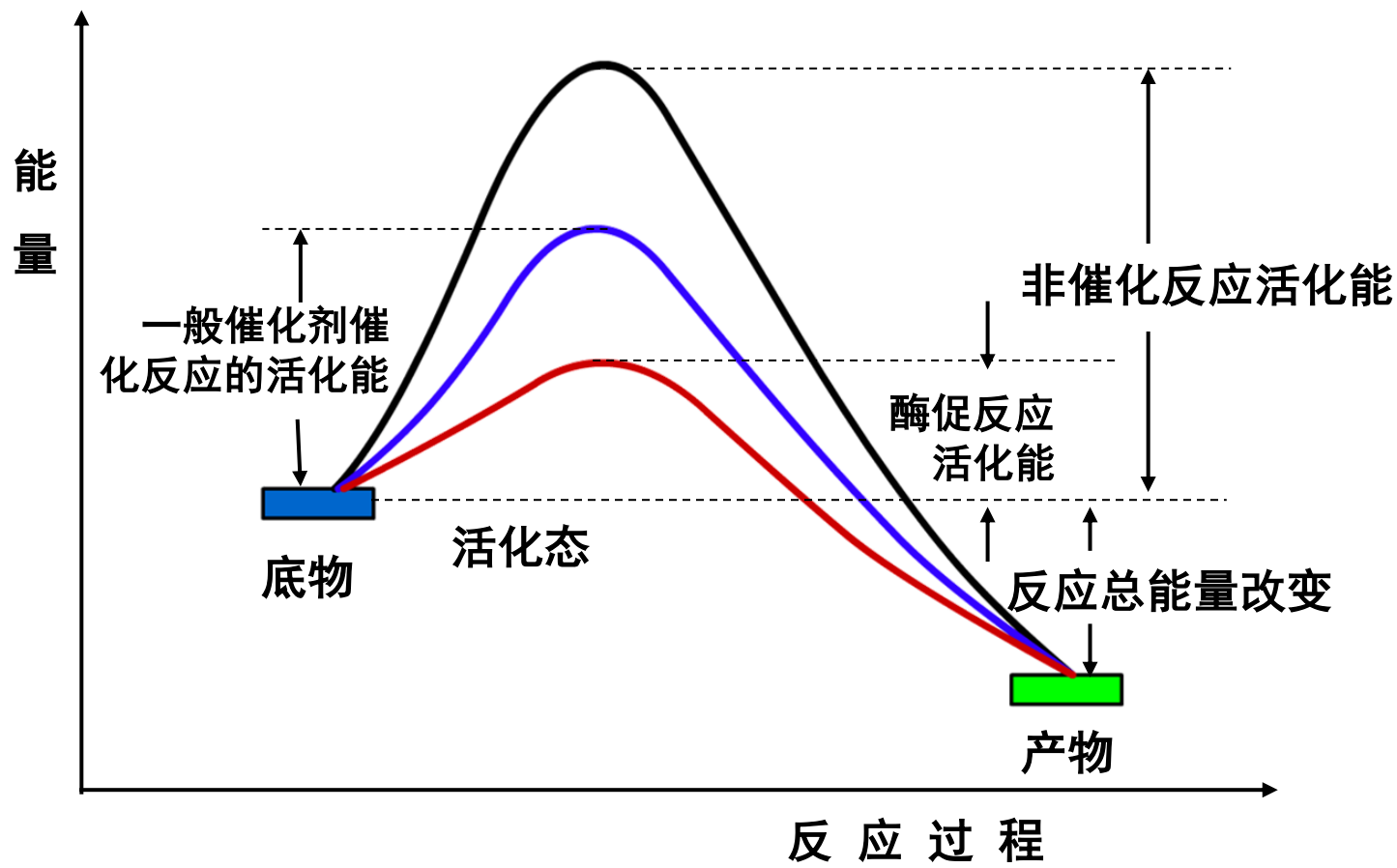


第三节：酶催化作用的特点

- 高效性
- 条件温和
- 专一性：各种酶都有专一性，但专一程度的严格性上有所差别
- 可调节性：包括抑制剂和激活剂调节、反馈抑制调节、共价修饰调节和变构调节等。
- 易变性：大多数酶是蛋白质，因而会被高温、强酸、强碱等破坏

(一) 酶促反应具有极高的效率

降低反应的活化能(activation energy): 底物从常态转变为容易发生化学反应的活跃状态所需要的能量称为活化能。



过氧化氢分解反应所需活化能

催化剂

每摩尔需活化能

无

75.24 KJ

胶态钨

48.94 KJ

过氧化氢酶

8.36 KJ

(二) 酶促反应具有高度的特异性

* 酶的特异性(specificity)

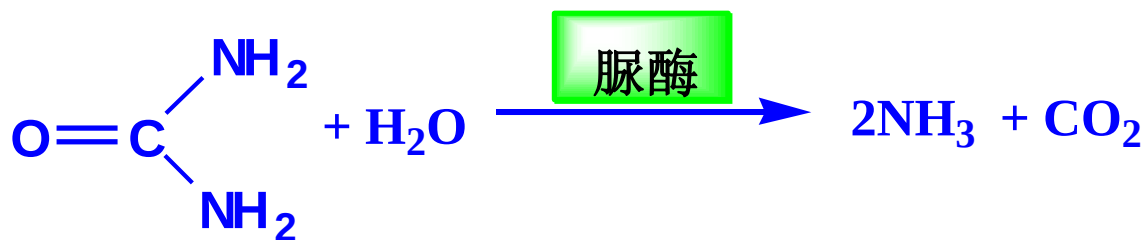
一种酶仅作用于一种或一类化合物，或一定的化学键，催化一定的化学反应并生成一定的产物。酶的这种选择性称为酶的特异性或专一性。

- 绝对专一性(absolute specificity)
- 相对专一性(relative specificity)
- 立体结构专一性(stereo specificity)

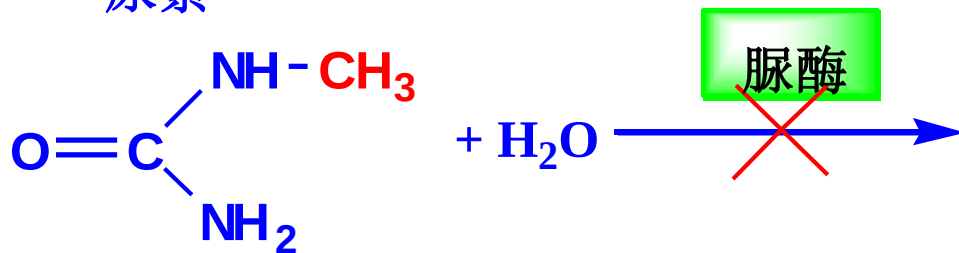
绝对专一性

酶只作用于特定结构的底物，进行一种专一的反应，生成一种特定结构的产物。

如：



尿素

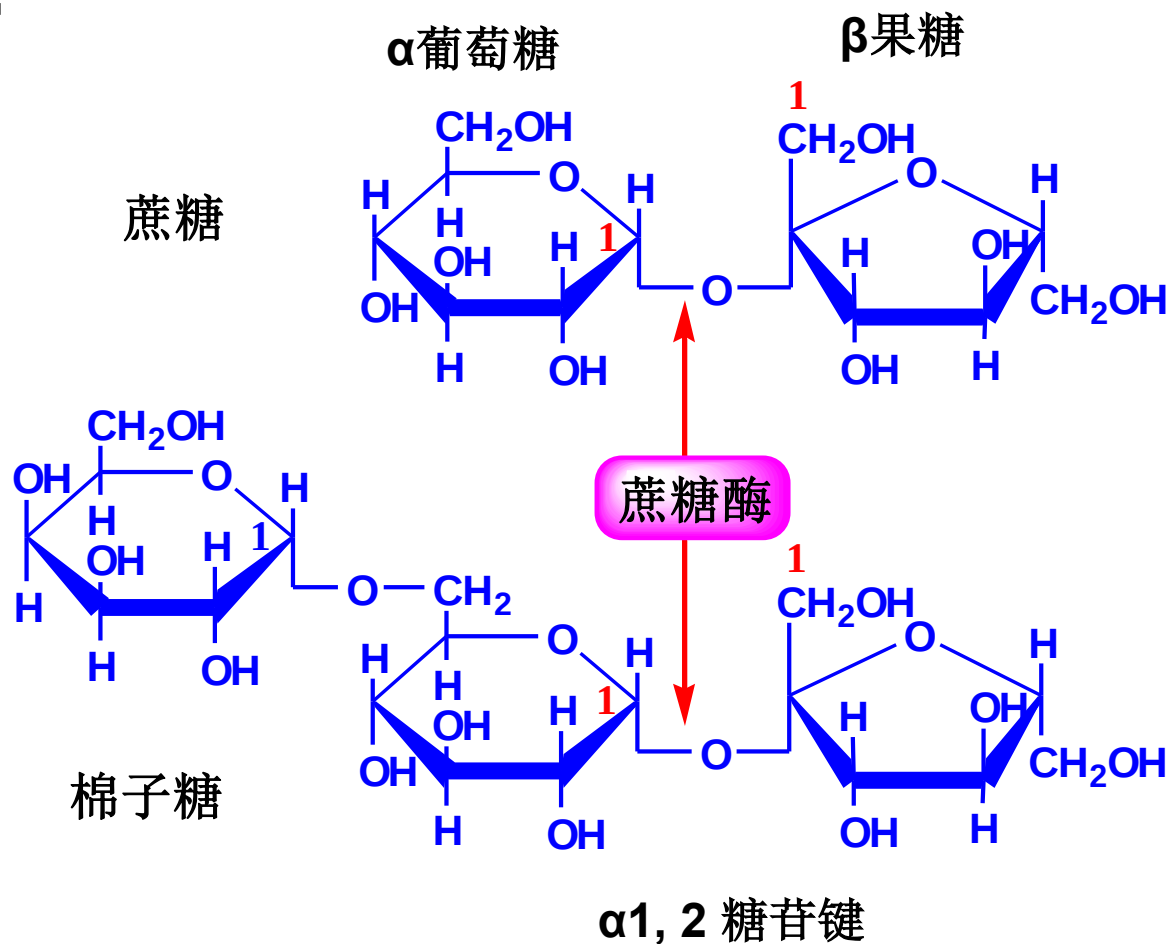


甲基尿素

相对专一性（键专一性和基团专一性）

酶作用于一类化合物或一种化学键。

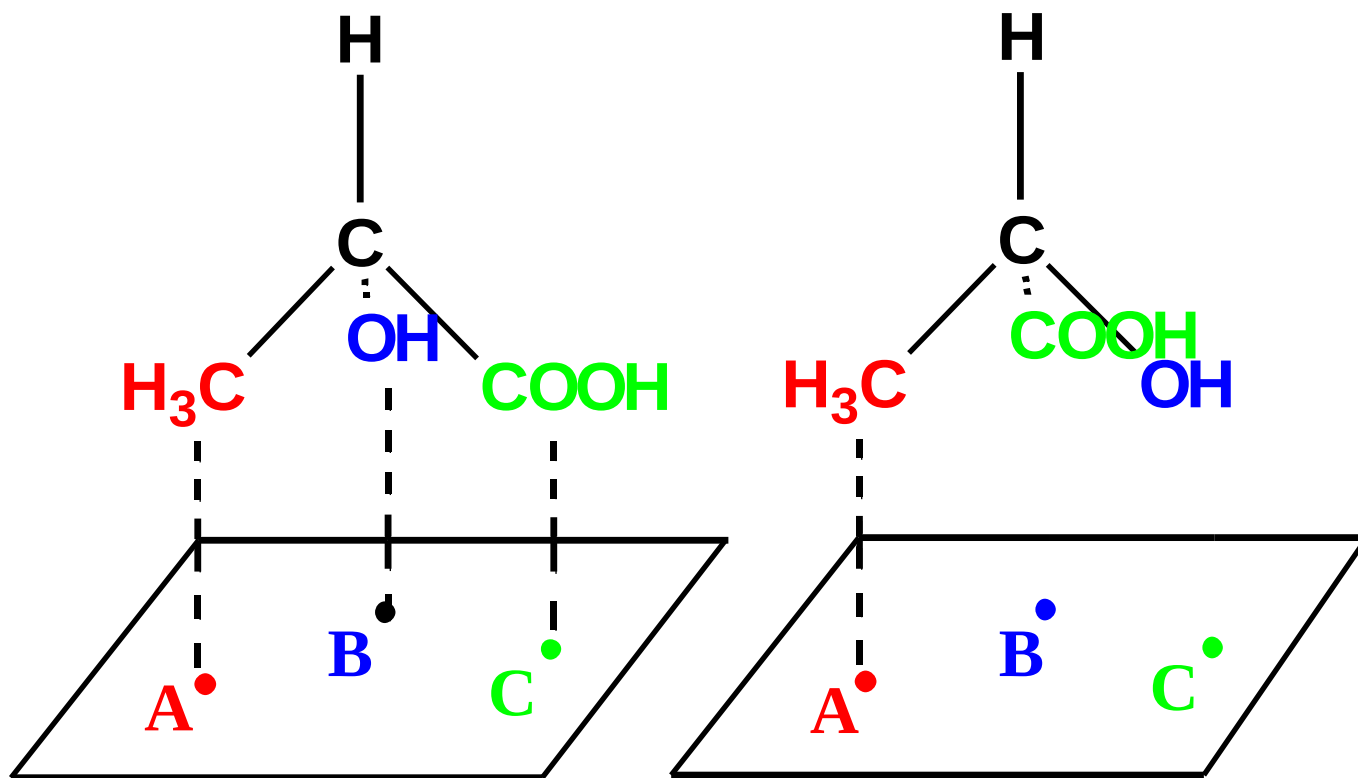
如：



- **基团专一性：中等专一性，例如激酶，己糖激酶催化很多己醛糖的磷酸化；**
- **生物降解中常见到低专一性的酶，而在合成中则很少见到，前者起降解作用，低专一性更经济。**

立体结构专一性

酶仅作用于立体异构体中的一种。



酶的专一性在蛋白质合成及DNA复制的过程中具有重要意义。

1、**氨酰tRNA合成酶**（结合氨基酸及tRNA）：

氨基酸+ATP+酶 $\longrightarrow$ 酶-氨酰-AMP+焦磷酸（容易出错）

酶-氨酰-AMP+tRNA $\longrightarrow$ 氨酰-tRNA+AMP+酶（专一性高）错误的氨酰-腺苷酸的中间产物会被降解。

2、**DNA聚合酶III** 具有核酸外切酶的活性，以保证DNA复制的准确性。

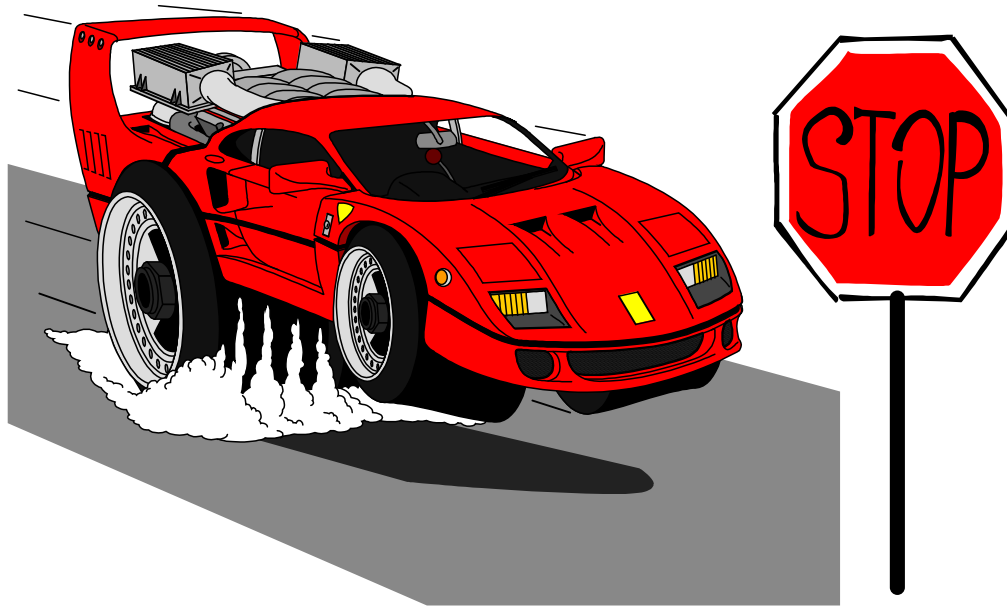
(三) 酶催化作用的条件温和

酶的催化作用一般都在常温、常压、pH值近乎中性的条件下进行。非酶催化作用则与之相反。

- 所需活化能低
- 极端条件下，酶易变性

（四）酶促反应具有可调节性

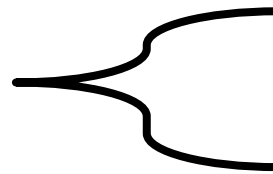
不合适的表达或激活导致细胞的癌变或死亡！



酶需要在正确的时间
和正确的地点有活性

➤ **调节对象 关键酶**

➤ **调节方式**

 **酶活性的调节（快速调节）**
酶含量的调节（缓慢调节）

什么是关键酶：

- 1. 一般位于代谢途径的起始或分支处；**
- 2. 活性较低，活性最低者又称为限速酶；**
- 3. 是可调节酶。**

酶的“量变”和“质变”的比较

	量变	质变
调节速度	慢，几小时-几天	快速，几秒钟-几分钟
能耗	高（通常涉及酶基因表达，因此需要消耗大量ATP）	低（除非使用抑制蛋白，因为在解除抑制的时候，通常需要将抑制蛋白水解）
决定酶最高活性的主要因素	酶合成与水解的相对速度	已有的酶浓度
活性变化持续时间	长	短

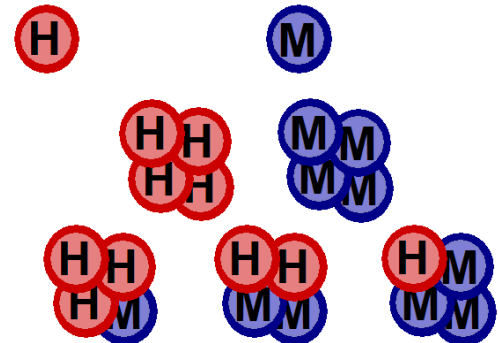
酶的“量变”

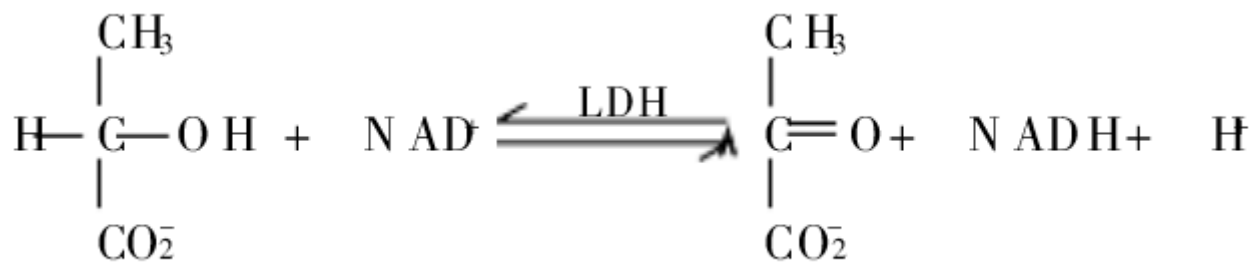
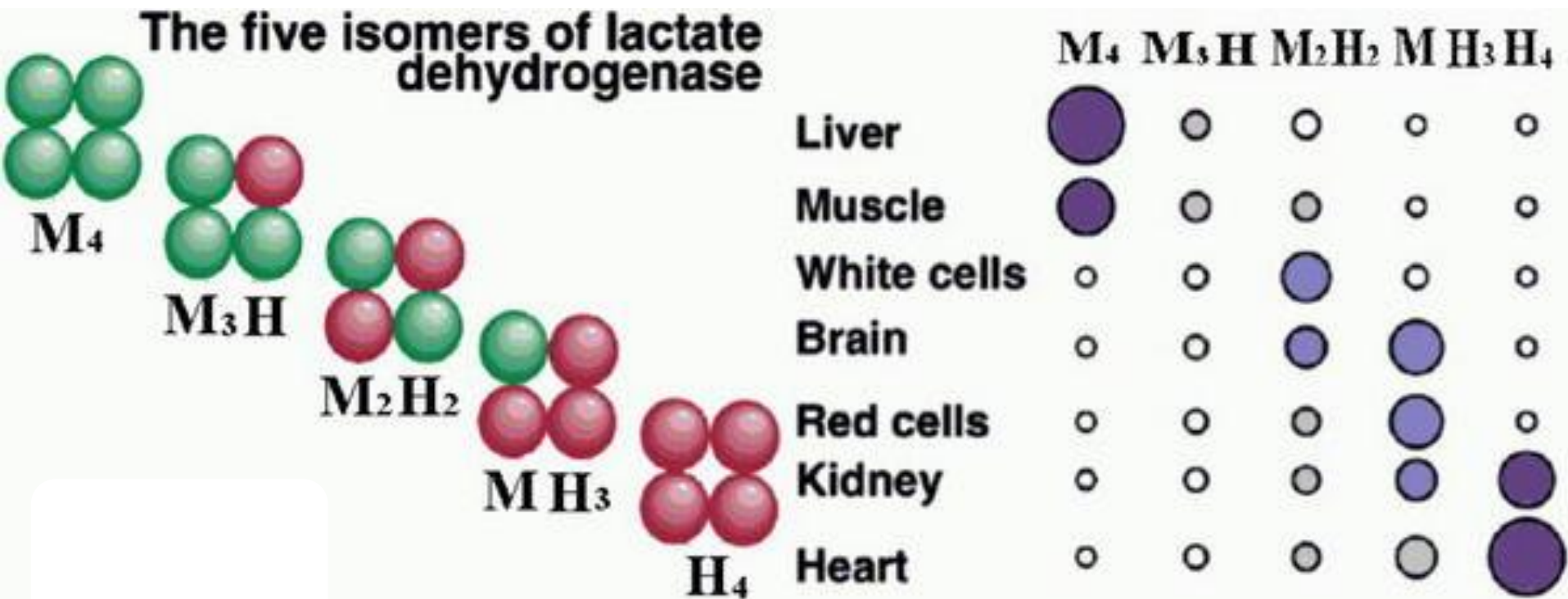
改变酶量的方式有两种：

- 一种是通过同工酶**
- 一种是通过控制酶基因的表达和酶分子的降解（基因的表达调控，及蛋白降解调控）**

同工酶

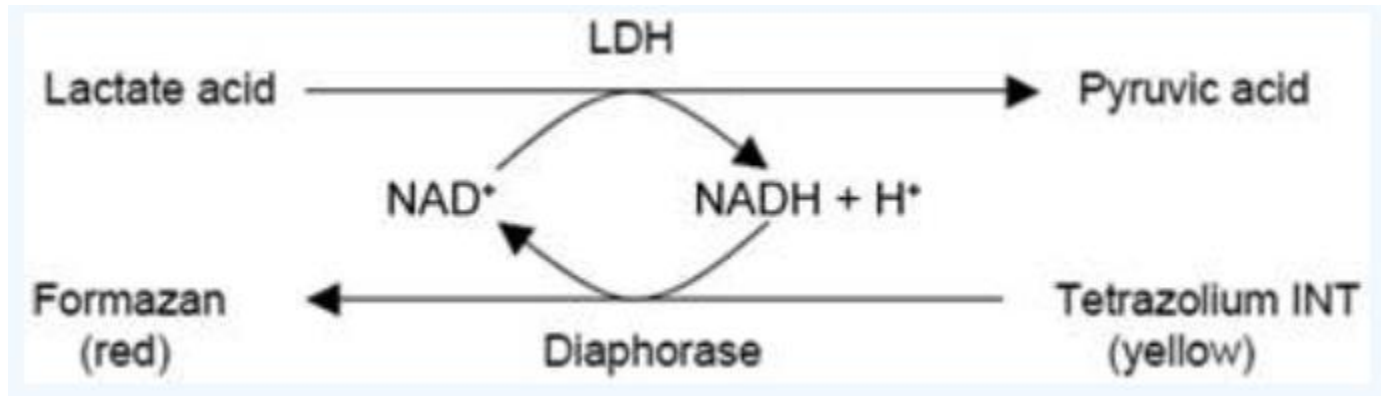
- **同工酶是指催化相同的反应但性质不同（ V_{max} 和/或 K_m 不同）的酶。**
- 它们可能以不同的量出现在一种动物不同的组织或器官，也可能出现在任何真核生物细胞不同的细胞器。例如，高等动物的乳酸脱氢酶（LDH）有五种形式— M_4 、 M_3H 、 M_2H_2 、 MH_3 和 H_4 。 M_4 由四个M亚基组成，主要存在于骨骼肌， H_4 由四个H亚基组成，主要存在于心脏。





心肌中富含的H₄及MH₃在体内倾向于催化乳酸的脱氢，而骨骼肌中丰富的M₄则有利于丙酮酸还原而生成乳酸。

LDH release 实验原理

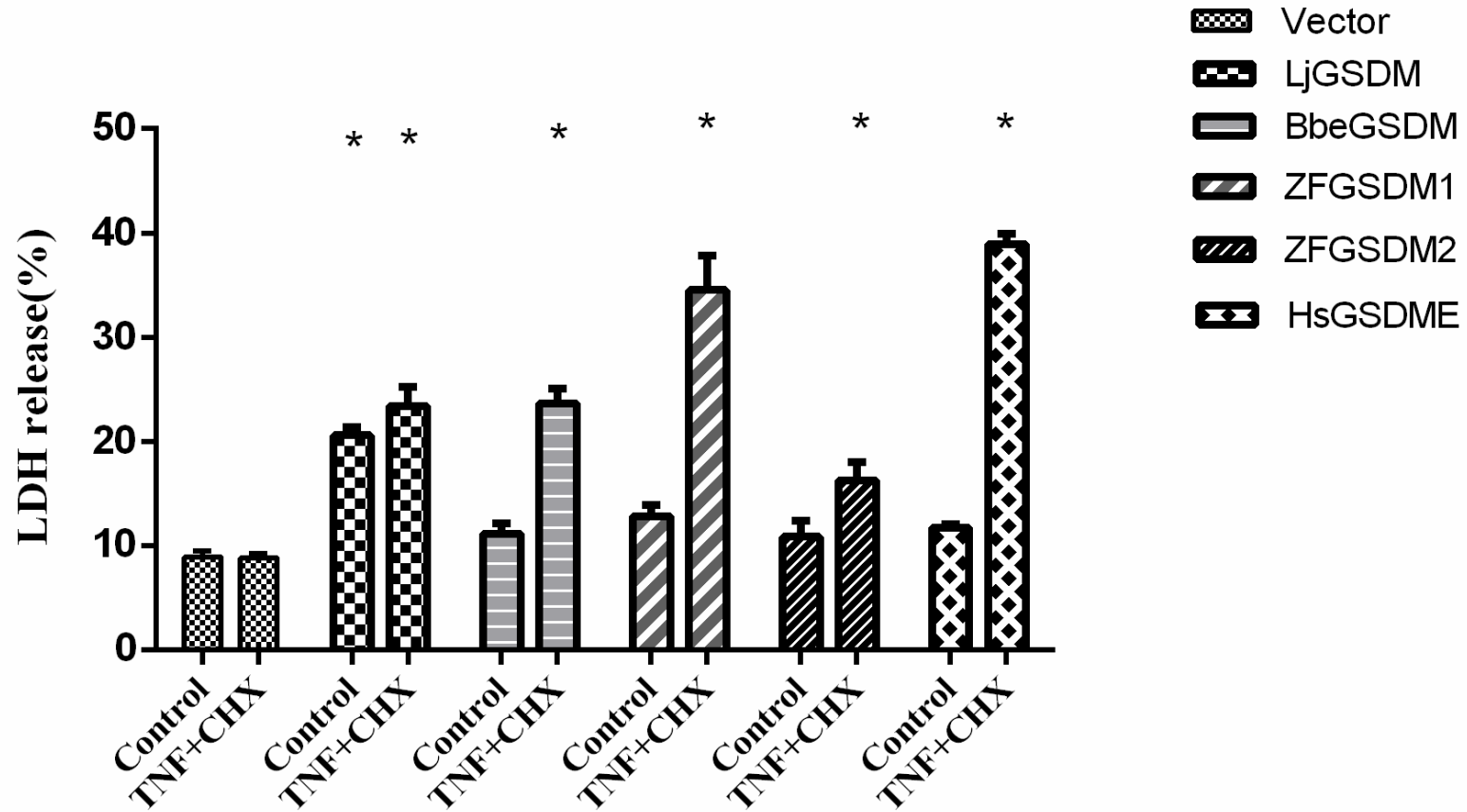


硫辛酰胺脱氢酶(diaphorase)

强生色物甲臞(formazan)

Formazan在490nm波长下产生吸收峰，从而可以通过比色来定量乳酸脱氢酶的活性，吸光度与乳酸脱氢酶活性成线性正相关。

LDH释放分析



同工酶的定义

- 1971年国际生化学会生化命名委员会建议：**同一种属中由不同基因或（复）等位基因编码的多肽链所组成的单体、纯聚体或杂交体，其理化及生物学性质不同而能催化相同反应的酶称同工酶**
(primary isozyme原级同工酶，基因级同工酶)。

基因级或原级

- 由**不同基因**产生的肽链而衍生的同工酶。
- 这里所指的不同基因可以在不同染色体或在同一染色体的不同位点上，例如LDH中A、B两条肽链的基因分别在第11及第12对染色体上，唾液淀粉酶和胰淀粉酶的基因在第1对染色体的不同位点上。
- 这类同工酶因分子结构差异较大，彼此间无交叉免疫。
- 最典型的同工酶是乳酸脱氢酶（LDH）同工酶。

同工酶概念的延伸：次生或转译后

- 由**同一基因**转录出的，经过不同的mRNA加工剪接，再转译出的多种肽链，严格来说不属于同工酶。
- 由**同一基因、同一mRNA**转译生成原始的酶蛋白，再经过不同类型的共价修饰（如糖基化等），严格来说也不属于同工酶而称为synzyme。
- 不同种属中催化相同反应的酶称为xenozyme，也不属于同工酶。

- 在动、植物中，组织特异的同工酶谱，叫做组织的多态性，体现各组织的特异功能。
- 大多数基因性同工酶由于对底物亲和力不同和受不同因素的调节，常表现不同的生理功能，例如动物肝脏的碱性磷酸酯酶和肝脏的排泄功能有关，而肠粘膜的碱性磷酸酯酶却参与脂肪和钙、磷的吸收。
- 所以同工酶只是做相同的“工作”（即催化同一个反应），却不一定有相同的功能。

同工酶的应用

- **物种进化** (Lamprey LDH)
- **遗传变异** (亲子鉴定)
- **杂交育种**
- **个体发育、组织分化等**
- **疾病检测** (血清的LDH1是诊断心肌梗塞的特异性指标)

酶的应用，讨论

酶的“质变”

- 1. 水解激活**
- 2. 别构调节**
- 3. 共价修饰**
- 4. 调节蛋白的结合和解离以及单体的聚合和解离。**

1、水解激活：酶原与酶原的激活

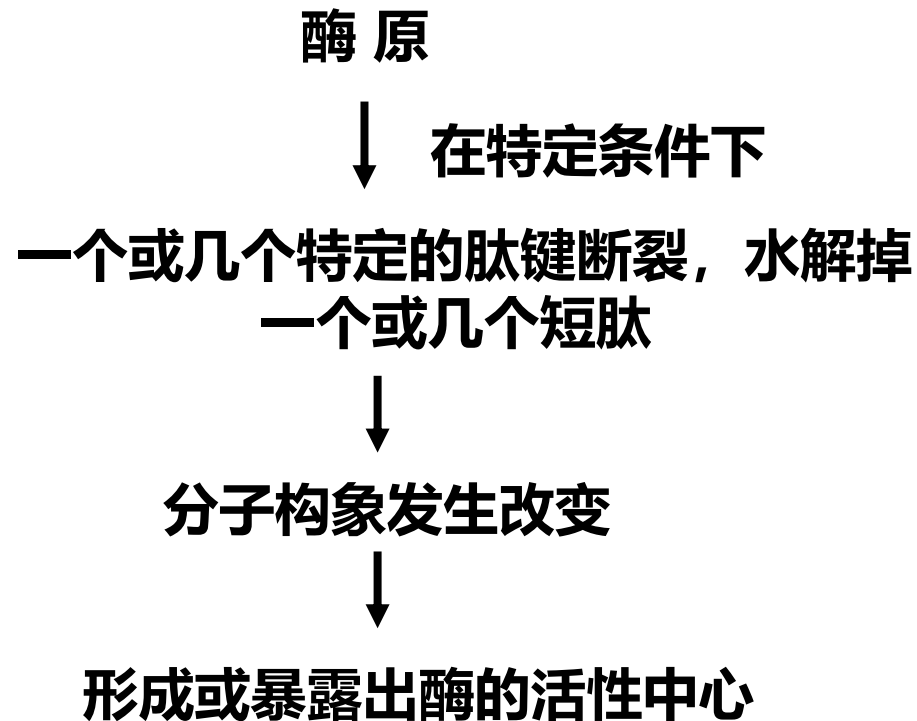
➤ 酶原 (zymogen)

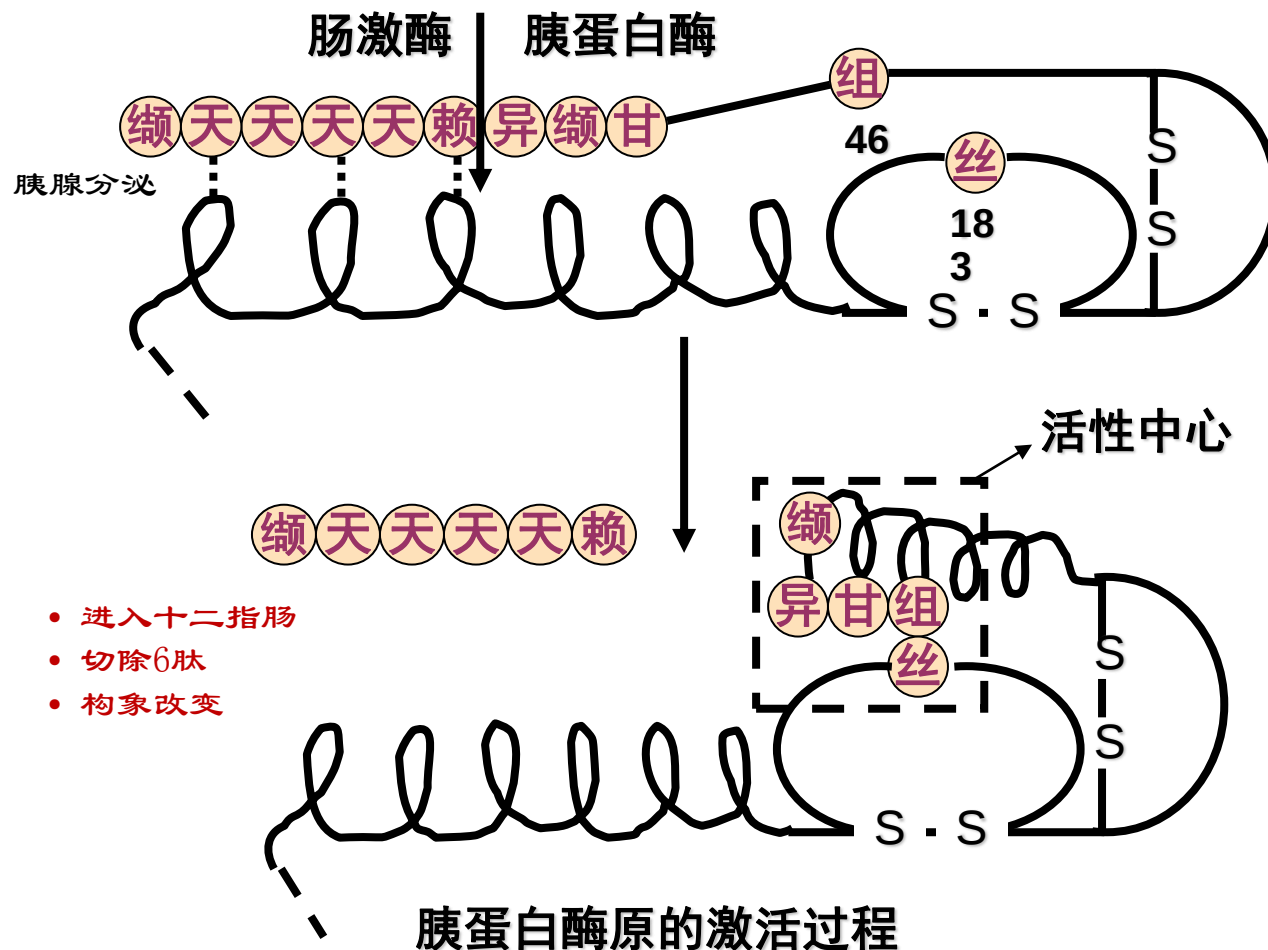
有些酶在细胞内合成或初分泌时只是酶的无活性前体，此前体物质称为酶原。

➤ 酶原的激活

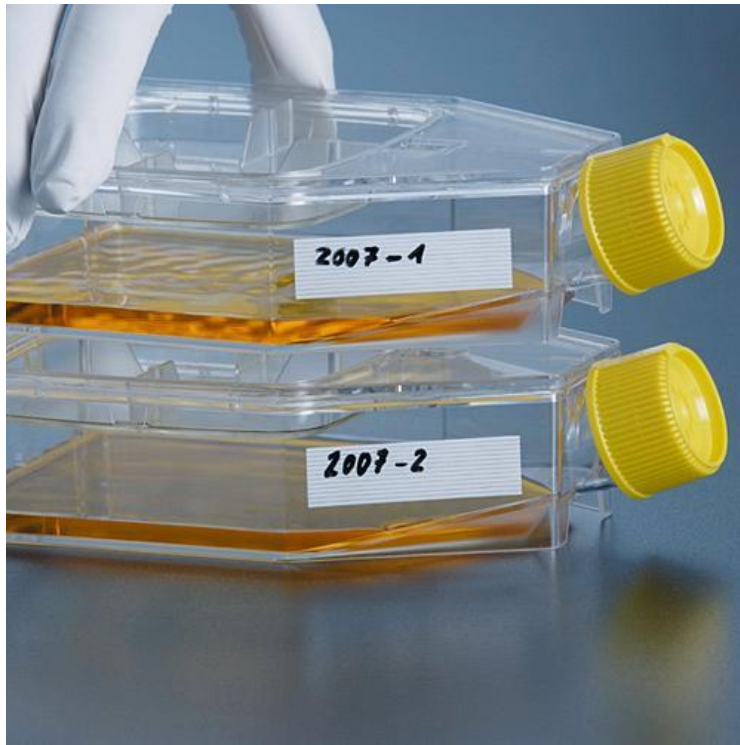
在一定条件下，酶原向有活性酶转化的过程。

➤ 酶原激活的机理

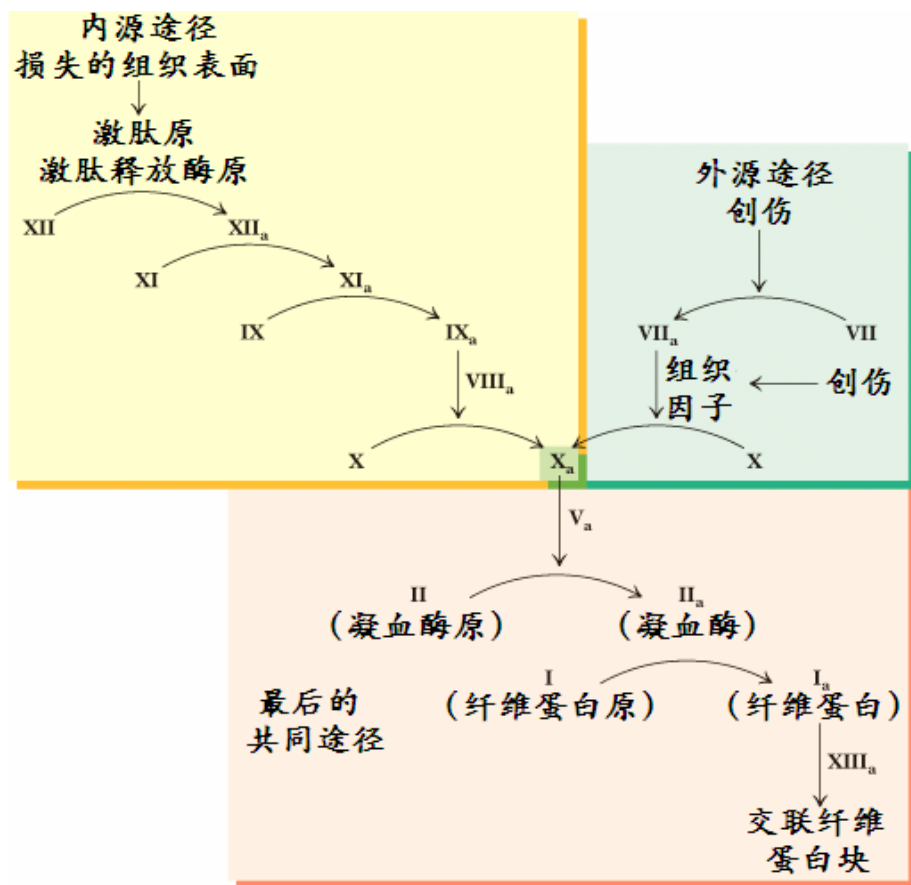




- 胰蛋白酶的作用位点：赖氨酸和精氨酸残基中的羧基侧切断。
- 消化作用，限制性水解其它酶原，是特异性最强的蛋白酶。
- 抑肽酶的抑制作用。
- 细胞培养过程??



- 细胞传代过程的消化作用
- 如何终止？原理？？



某些凝血因子的水解激活

■ 在正常情况下，多数凝血因子以无活性的酶原形式存在

■ 当组织或血管内膜受损后，酶原转变为有活性的酶，触发级联式酶促反应

■ 可溶性的纤维蛋白原转变为稳定的纤维蛋白多聚体，网罗血小板等形成血凝块。

■ 你知道全血，血清，血浆的区别吗？

■ 有什么用途？

■ 抗凝剂？肝素，EDTA，柠檬酸钠等

酶原激活的生理意义

1. **避免酶对细胞进行自身消化，并使酶在特定的部位和环境中发挥作用，保证体内代谢正常进行。**
2. **有的酶原可以视为酶的储存形式。在需要时，酶原适时地转变成有活性的酶，发挥其催化作用。**
3. **水解激活是一种不可逆的调节方式。**

2、别构调节激活

➤ 变构调节 (allosteric regulation)

一些代谢物可与某些酶分子活性中心以外的部位可逆地结合，使酶构象改变，从而改变酶的催化活性，此种调节方式称变构调节。

- 变构酶 (allosteric enzyme)
- 变构部位 (allosteric site)
- 变构效应剂 (allosteric effector)
 - 变构激活剂
 - 变构抑制剂

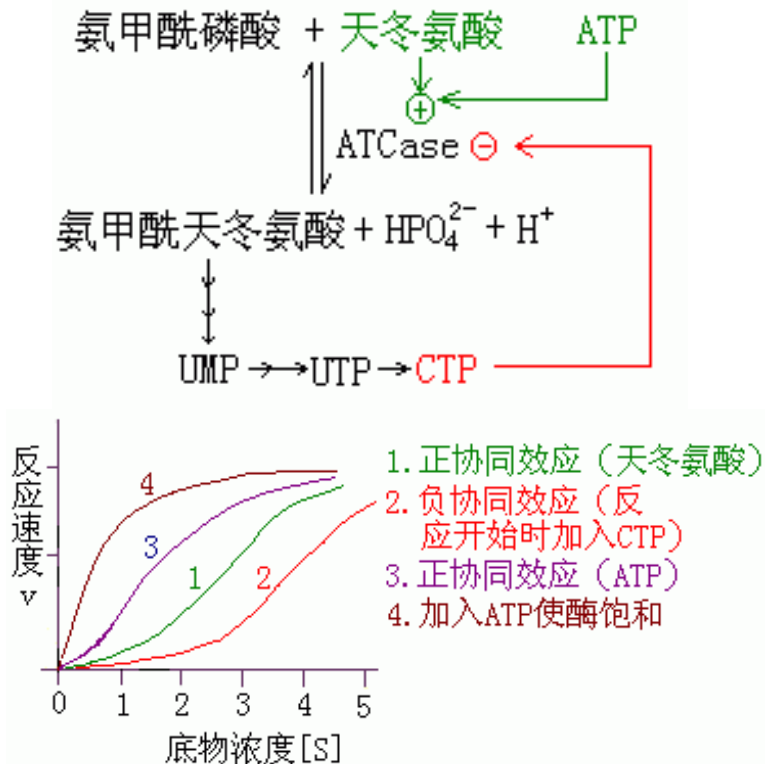
变构酶的协同效应

协同效应是指一个效应物分子与变构酶的结合，对第二个效应物分子的结合产生影响。

正协同效应：指效应物分子与变构酶的结合后，本身构象发生变化，**有利于**后续底物分子或调节物分子的结合。

负协同效应：指效应物分子与变构酶的结合后，本身构象发生变化，**不利于**后续底物分子或调节物分子的结合。

别构酶举例：天冬氨酸转氨甲酰酶，简称ATCase



ATCase是研究得最多的一个调节酶

- Arthur Pardee等人发现ATCase的一个最有效的抑制剂是代谢途径的终产物胞嘧啶三磷酸 (CTP)
- 当CTP水平高时，CTP与ATCase结合，降低CTP合成的速度
- 当细胞内CTP水平低时，CTP从ATCase上解离，加快CTP合成速度。
- ATP是酶的别构激活剂。

3、酶的共价修饰调节

➤ 共价修饰(covalent modification)

在其他酶的催化下，酶蛋白肽链上的一些基团可与某种化学基团发生可逆的共价结合，从而改变酶的活性，此过程称为共价修饰。

➤ 常见类型

磷酸化与脱磷酸化（最常见）

乙酰化和脱乙酰化

甲基化和脱甲基化

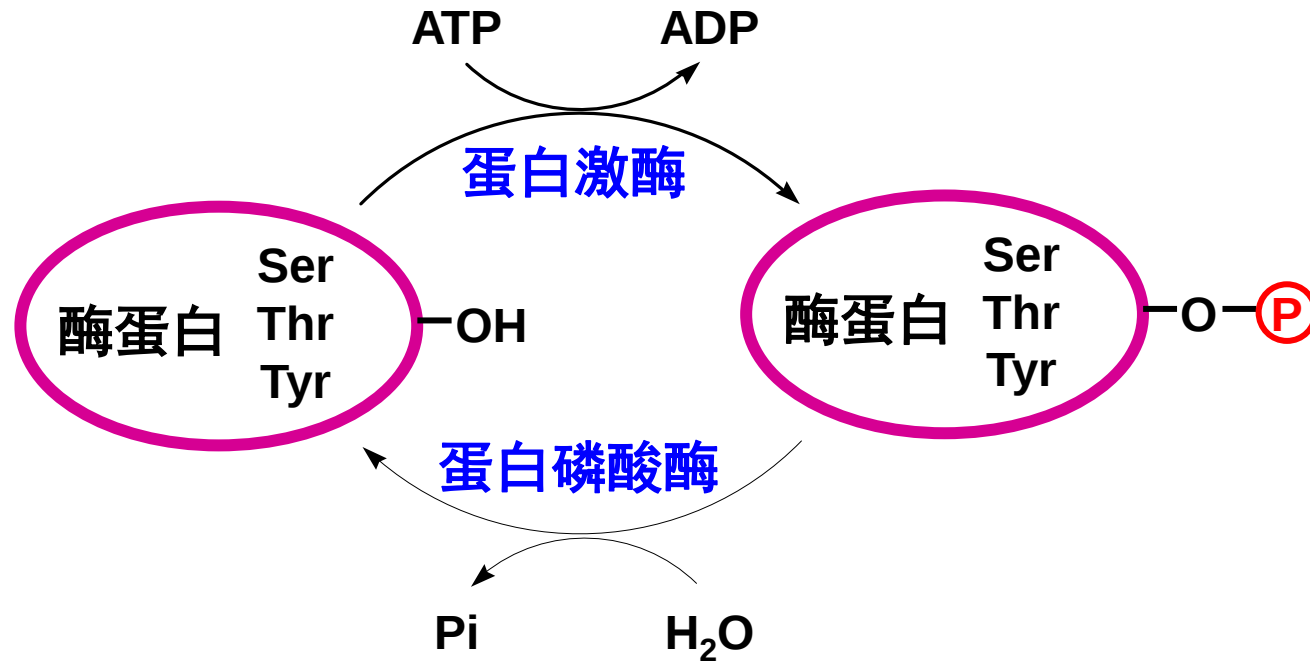
腺苷化和脱腺苷化

- SH与 - S - S互变

酶共价修饰的几种形式

共价修饰	被修饰的氨基酸
磷酸化 $\text{酶} \xrightarrow[\text{ATP}]{\text{ADP}} \text{酶}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)_2$	Tyr, Ser, Thr, His
腺苷酸化 $\text{酶} \xrightarrow[\text{ATP}]{\text{PP}_i} \text{酶}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{ribose}-\text{adenine}$ 腺嘌呤	Tyr
尿苷酸化 $\text{酶} \xrightarrow[\text{UTP}]{\text{PP}_i} \text{酶}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{ribose}-\text{uracil}$ 尿嘧啶	Tyr
ADP-核糖基化 $\text{酶} \xrightarrow[\text{NAD 尼克酰胺}]{\text{ADP-核糖基化}} \text{酶}-\text{ribose}_1-\text{pyrophosphate}-\text{ribose}_2-\text{adenine}$ 腺嘌呤	Arg, Gln, Cys, His
甲基化 $\text{酶} \xrightarrow[\text{S-腺苷甲硫氨酸}]{\text{S-腺苷高半胱氨酸}} \text{酶}-\text{CH}_3$	Glu

丝/苏氨酸蛋白激酶
酪氨酸激酶



酶的磷酸化与脱磷酸化

- 蛋白质的磷酸化主要集中在肽链中的酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸残基上，这些残基上具有游离的羟基，且本身不带电荷。
- 当磷酸化作用后，蛋白质便具有了电荷，从而使结构发生变化，进一步引起蛋白质活性的变化。

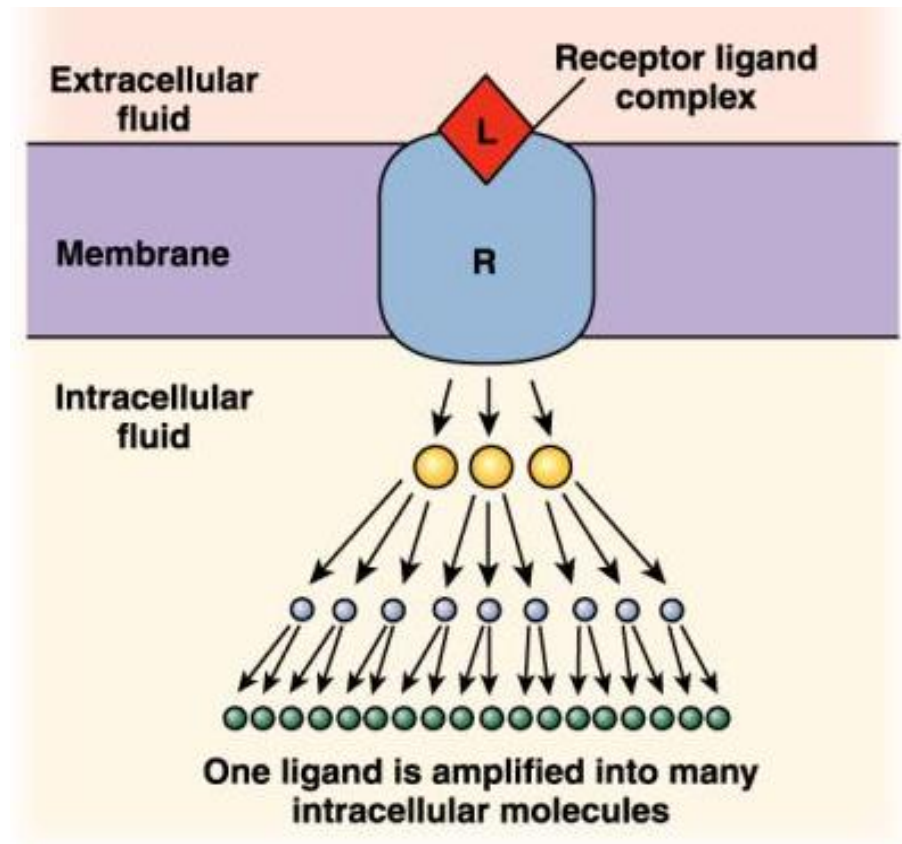
蛋白激酶活性分析分为两步：

- ①末端标记的三磷酸核苷核供体(通常是ATP，有时用GTP)中的磷酸基团转移到蛋白质或肽底物上。**
- ②将磷酸化的底物分离出并进行定量分析。**

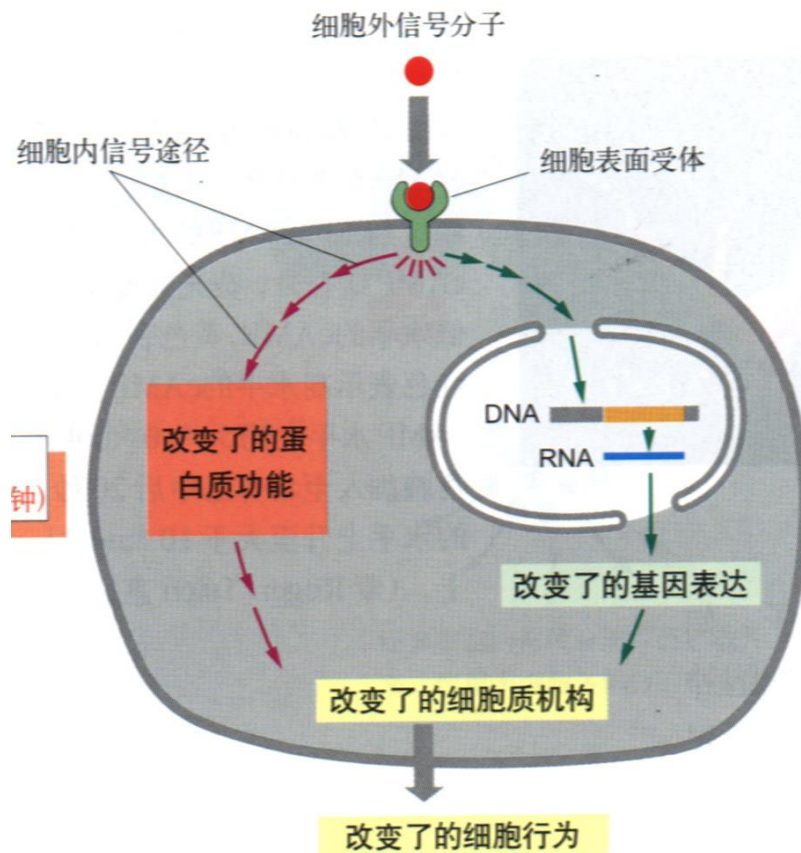
所有已知的丝/苏和酪氨酸蛋白激酶都有一个共同的催化结构域(约270个氨基酸)。蛋白丝/苏氨酸激酶家族较酪氨酸激酶家族大。

共价修饰调节的特点

1. 受共价修饰的酶存在有（高）活性和无（低）活性两种形式；
2. 具有瀑布效应（级联效应）；
3. 是体内经济、有效的快速调节方式。

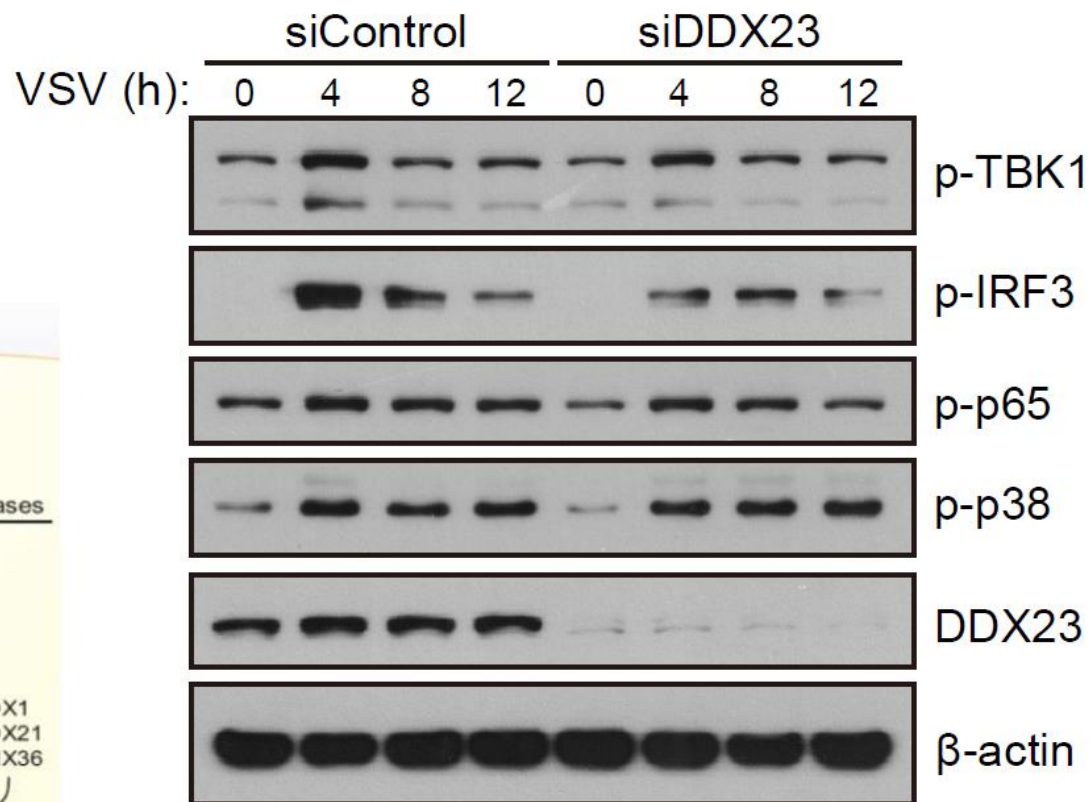
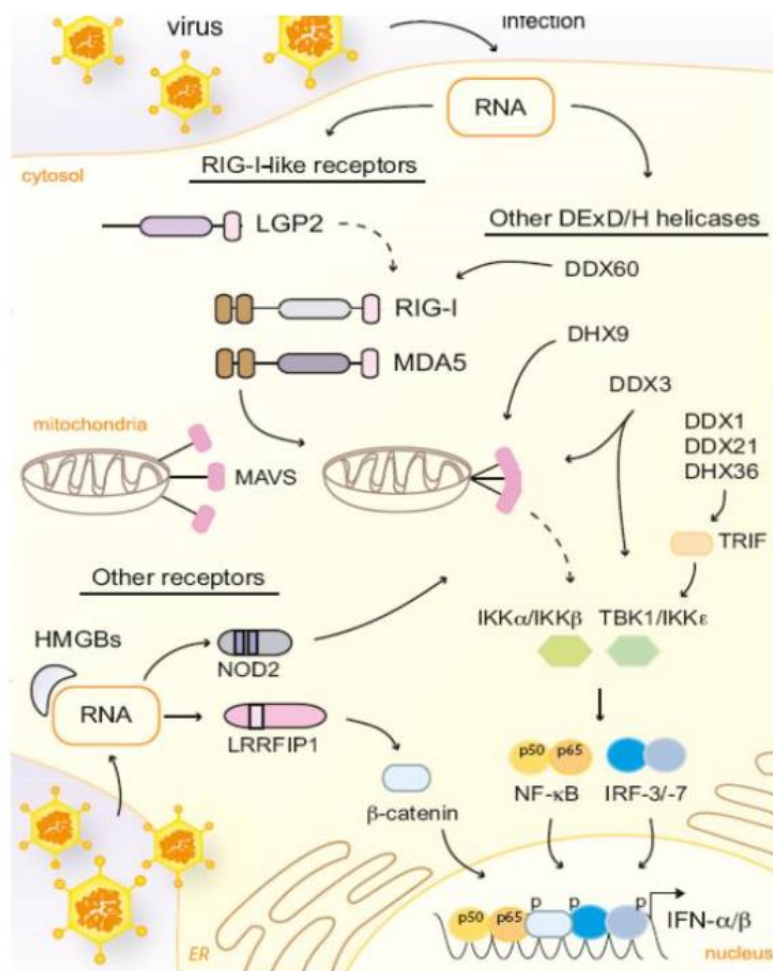


细胞对信号的反应



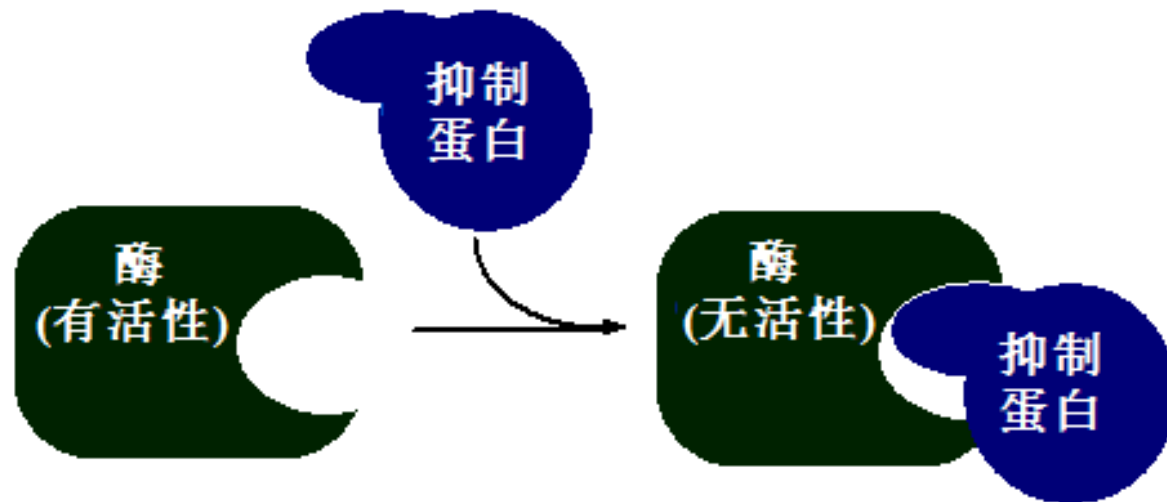
- 1.细胞质：蛋白质活性改变
- 2.细胞核：基因表达改变-转录出新的或更多的蛋白质

细胞质



4、调节蛋白的激活或抑制

- **调节蛋白：能够作为配体与特定的酶结合而调节被结合酶的活性**
- **激活酶活性的调节蛋白称为激活蛋白，抑制酶活性的蛋白称为抑制蛋白。**
- **抑制蛋白通常结合在酶的活性中心阻止底物与活性中心结合而达到抑制的效果。**



抑制蛋白对酶活性的抑制

酶的“质变”

1. 水解激活
2. 别构调节
3. 共价修饰
4. 调节蛋白的结合和解离以及单体的聚合和解离。

蛋白酶与蛋白酶抑制剂

蛋白酶	抑制剂
丝氨酸蛋白酶	Serpins
糜蛋白酶	α 1-抗糜蛋白酶
补体因子1	C1抑制剂
弹性蛋白酶（嗜中性细胞分泌）	α 1-抗胰蛋白酶
凝血因子X	抗凝血酶III
凝血酶	抗凝血酶III
纤溶酶	α 2-抗纤溶酶
胰蛋白酶	胰胰蛋白酶抑制剂

第一章 小结

第一节：酶的基本概念和发展历史（了解）

第二节：酶的分类、组成和结构特点（重点掌握）

第三节：酶催化作用的特点（重点掌握）

思考题

- 理解同工酶的概念
- 列举2个同工酶应用的例子
- 酶的“量变”和“质变”的区别
- 酶活性调节的主要方式