

基于米氏机理的酶催化反应中反应速率常数的计算

张恒*

武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072

摘要: 对基于米氏机理的酶催化反应模型, 本文介绍了求解全部反应速率常数的两种方法: 瞬态法和数学计算法, 其中瞬态法的核心是分析反应达到稳态前的过程, 数学计算法的核心是寻找反应过程中酶与底物浓度之间的关系。通过求解全部反应速率常数, 不仅可以加深对酶催化反应动力学的理解, 而且有助于提高对反应动力学的认识。

关键词: 酶催化反应; 动力学; 米氏机理; 速率常数

中图分类号: G64; O6

Determination of All Rate Constants in the Enzyme Catalyzed Reactions Based on Michaelis-Menten Mechanism

Heng Zhang *

College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China.

Abstract: Two protocols, the transient method and the mathematical method, are introduced to deduce all the rate constants in the enzyme-catalyzed reaction model based on the Michaelis-Menten mechanism. The transient method focuses on analyzing the period before reaching a steady state, while the mathematical method aims to establish a relationship between the concentration of the enzyme and the substrate. By calculating all the rate constants, one can enhance their understanding and grasp of the kinetics of the enzyme-catalyzed reaction.

Key Words: Enzyme catalyzed reaction; Kinetics; Michaelis-Menten mechanism; Rate constant

酶是生命过程中不可或缺的一类物质, 其特点是可高效催化生命过程中的各种生化反应。不仅生物化学课程中会对酶的催化作用做重点介绍, 物理化学课程中动力学章节的催化反应动力学部分一般也会介绍基于Michaelis-Menten机理的酶催化反应动力学模型。这一部分内容会通过动力学分析, 提出米氏常数 K_M 和最大反应速率 r_{max} 的概念并给出计算方法, 有时候还会讨论抑制剂对酶催化反应动力学的影响^[1]。酶催化的米氏机理模型尽管相对简单, 但是相当多的酶催化反应均可适用这一模型, 而且这一模型也可推广到其他类似的催化反应动力学过程。鉴于这一模型的重要性, 不少教学研究论文也从各个不同的方面进行了探讨^[2-5]。在教学中, 我们注意到现有的动力学分析不能求出米氏机理中酶E与底物S形成中间化合物ES这一步反应的正、逆反应速率常数, 导致对这一模型的认识还不够完善。为了可以更深入地理解酶催化反应的动力学过程, 我们在文献调研的基础上介绍解决这一问题的方法。

1 方法介绍

对于酶催化反应的Michaelis-Menten机理, 可用式(1)表示。



$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (2)$$

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (3)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (4)$$

对中间化合物ES应用稳态近似处理, 得到式(2), 整理可得式(3), 其中 $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$, 为米氏常数。结合如式(4)所示的酶的物料守恒, 得到式(5), 反应速率 r 可用式(6)表示。

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

当 $[S] \gg K_M$ 时, 反应速率趋近于极大值, $r_{\max} = k_2[E]_0$ 。

$$\frac{1}{r} = \frac{K_M}{r_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{r_{\max}} \quad (7)$$

整理式(6)可得如式(7)的双倒数形式, 以 $1/r$ 对 $1/[S]$ 作图, 即著名的Lineweaver-Burk双倒数作图, 从斜率和截距并结合酶的初始浓度 $[E]_0$ 可以求出 k_2 和 K_M , 由 K_M 的定义并结合 k_2 只能得到包含 k_1 和 k_{-1} 的关系式, 并不能得到各自的具体结果。显然为了求出 k_1 和 k_{-1} 需要寻找另外的方法。

1.1 通过分析稳态前过程的瞬态法

对于米氏机理的讨论, 一般都是在酶催化反应达到稳态后进行的, 也就是 $d[ES]/dt = 0$, 认为中间化合物ES的浓度基本不变。分析可知, 从开始反应到反应达到稳态的这个过程中, 中间化合物ES的浓度一定是逐渐增加的, 针对这个瞬态过程进行分析, 可以获取更多的动力学信息^[6]。

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [P] \quad (8)$$

对于底物S, 存在如式(8)所示的物料守恒。在通常的实验条件下, $[S]_0 \gg [E]_0$, 并且一般达到稳态所需时间很短, 此段时间内生成产物P的量很少, 所以在达到稳态前的瞬态过程中可近似认为 $[S] \approx [S]_0$, 对中间化合物ES的微分方程可按式(9)处理。

$$\begin{aligned} \frac{d[ES]}{dt} &= k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ &= k_1([E]_0 - [ES])([S]_0 - [ES] - [P]) - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ &\approx k_1([E]_0 - [ES])[S]_0 - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \end{aligned} \quad (9)$$

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} [1 - \exp(-k_1(K_M + [S]_0)t)] \quad (10)$$

$$r = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} [1 - \exp(-k_1(K_M + [S]_0)t)] \quad (11)$$

求解式(9)对应的微分方程, 得到式(10), 进一步可得到瞬态过程中反应速率的表达式(11)。比较式(6)和式(11)可以看出, 当 t 足够大时, $\exp(-k_1(K_M + [S]_0)t) \rightarrow 0$, 式(11)就转化为式(6), 即瞬态结束后就进入稳态。如果从产物P的角度考虑, 可得式(12), 求解此微分方程可得如式(13)表示的产物P的浓度与时间的关系。

$$r = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} [1 - \exp(-k_1(K_M + [S]_0)t)] \quad (12)$$

$$[P] = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_M + [S]_0} t - \frac{k_2[E]_0[S]_0}{k_1(K_M + [S]_0)^2} + \frac{k_2[E]_0[S]_0}{k_1(K_M + [S]_0)^2} \exp(-k_1(K_M + [S]_0)t) \quad (13)$$

分析式(13), 可知当 t 足够大时, 第三项会趋近于零, $[P]$ 与 t 呈线性关系, 外推到 $[P]$ 为0, 将此时与时间轴的交点定义为“诱导”时间 τ (具有时间的量纲), 其表达式如式(14)

$$\tau = \frac{1}{k_1(K_M + [S]_0)} = \frac{1}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2} \quad (14)$$

数学变换后得到

$$\frac{1}{\tau} = k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2 \quad (15)$$

固定相同的酶初始浓度 $[E]_0$, 在不同 $[S]_0$ 的条件下分别测定对应的 τ , 以 $1/\tau$ 对 $[S]_0$ 作图, 从斜率可求出 k_1 , 从截距再结合通过稳态方法求出的 k_2 , 可以求出 k_{-1} 。由于 τ 一般很小, 为毫秒数量级的量, 且此时反应处于稳态前过程, 为了准确测定 τ , 需要用到流动法, 如使用停流仪(Stopped flow)。

1.2 通过数学分析的计算法

从数学的角度考虑, 由于 k_2 和 K_M 可通过稳态方法求出, 因此要求出 k_1 和 k_{-1} 实际上就是需要找到与 k_1 和 k_{-1} 相关的另一个关系式。李邦河院士及合作者提出了两种方法^[7,8], 这两种方法都是从酶E浓度与底物S浓度的关系出发, 提出了一个新视角, 即 $[E] = f([S])$ 的关系平面。在此平面上, 反应开始时, 坐标为 $([S]_0, [E]_0)$; 反应结束时, 坐标为 $(0, [E]_0)$ 。通过分析反应过程中 $[E]$ 与 $[S]$ 的函数关系, 可提供求解 k_1 和 k_{-1} 的方法。与瞬态法不同的是, 这两种方法理论上无需特殊的仪器设备, 只需测定反应过程中底物S和产物P的浓度, 结合反应初始条件 $[E]_0$ 和 $[S]_0$ 以及物料守恒关系式(4)和(8)从而得到 $[E]$ 与 $[S]$ 的关系, 进一步求出 k_1 和 k_{-1} 。由于其数学处理过程较为复杂, 以下只简要介绍计算方法, 具体数学处理参见原文。

1.2.1 切线法

$$T_1 = \lim_{t \rightarrow +\infty} \frac{[E] - [E]_0}{[S]} \quad (16)$$

$$T_1 = -\frac{k_1[E]_0 - (k_{-1} + k_2) + \sqrt{(k_1[E]_0 + k_{-1} + k_2)^2 - 4k_1k_2[E]_0}}{2k_{-1}} \quad (17)$$

$$k_1 = \frac{k_2 T_1^2}{(T_1 K_M + [E]_0)(T_1 - 1)} \quad (18)$$

在切线法中, 反应趋近终点时 $[E] = f([S])$ 曲线的斜率可定义为式(16)中的 T_1 , T_1 的理论值可根据式(17)计算得到。为了求解 k_1 , 可以用接近反应终点时的 $[E]$ 和 $[S]$ 代入式(16)计算作为 T_1 的近似, 然后根据式(18)可求出 k_1 , 再结合通过稳态法求出的 k_2 和 K_M 即可求出 k_{-1} 。显然计算 T_1 选择的点越接近反应终点, 得到的 T_1 也就越趋近于理论值, 相应的计算得到的 k_1 和 k_{-1} 也就越准确。

1.2.2 关系式法

$$[E]([E]_0 - [E])(k_1[S][E] - k_{-1}([E]_0 - [E])) + [S][E]_0(k_1[S][E] - (k_{-1} + k_2)([E]_0 - [E])) = 0 \quad (19)$$

$$k_1 = \frac{k_2[E][E]_0([E]_0 - [E])^2}{[E]_0(-[S][E]^2[E]_0 + [S][E]^3 - [S]^2[E][E]_0 + [E]([E]_0 - [E])^2 K_M + [S][E]_0 K_M ([E]_0 - [E]))} \quad (20)$$

在关系式法中, 发现在更宽的范围内, $[E]$ 和 $[S]$ 之间的关系可用如式(19)所示的隐函数描述。整理式(19)可得式(20), 利用一组对应的 $([S], [E])$ 数据并结合初始条件 $[E]_0$ 和通过稳态法求出的 K_M , 利用式(20)就可以算出 k_1 。类似地, 在求出 k_1 后, 可以方便地求出 k_{-1} 。在关系式法中, 由于计算所用数据无需接近反应终点, 因此结果的准确性更容易得到保证。

2 应用举例

采用文献中提供的速率常数和初始条件^[9]: $k_1 = 100 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{-1} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 1 \text{ s}^{-1}$, $[E]_0 = 0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[S]_0 = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 采用Dynafit软件可生成酶催化反应中[E]、[ES]、[S]和[P]随时间变化的模拟实验数据^[10]。以下借助模拟动力学数据具体说明以上方法求解 k_1 和 k_{-1} 的过程。在计算过程中, 假设 k_2 (1 s^{-1})和 K_M ($0.11 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)已通过稳态方法求出。

图1给出了反应前25 ms内, 中间化合物ES与产物P的浓度与时间的关系。从图中可看出, 在15 ms以后, 中间化合物ES的浓度已基本不变, 说明反应进入稳态; 产物P的浓度在15 ms以后对时间呈线性关系, 以15–25 ms的数据进行线性拟合, 可得 $[P]/10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} = 9.78 \times 10^{-5} \times (t/\text{ms}) - 1.93 \times 10^{-4}$ 。外推到[P]为0时, 求出 τ 为1.97 ms。由于在进入稳态前, 反应消耗的底物非常少, 底物S浓度可认为不变, 将 $\tau = 1.97 \times 10^{-3} \text{ s}$, $K_M = 0.11 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[S]_0 = 5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 带入式(14), 可求出 $k_1 = 99.3 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 然后结合 K_M 的表达式, 可求出 $k_{-1} = 9.92 \text{ s}^{-1}$ 。计算结果与理论值吻合得很好, 说明这种方法是有效的。实际实验中, 可以在固定酶初始浓度 $[E]_0$ 不变的条件下, 采用多个不同的底物浓度 $[S]_0$ 进行实验, 可以在无需知道米氏常数的条件下, 根据式(15)求出 k_1 。

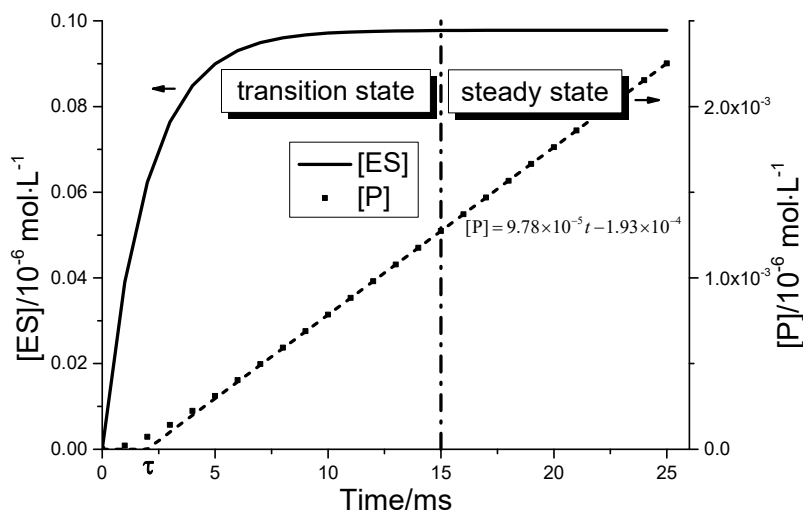


图1 酶催化反应早期中间化合物ES和产物P的浓度与时间的关系

图2给出了整个反应过程中[E]与[S]的关系, 反应刚开始时, 酶E和底物S的浓度分别为初始值 $0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 反应到终点时, 酶E的浓度恢复到初始值 $0.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 底物完全消耗。反应过程中底物S的浓度单调递减最后为零, 而酶E的浓度由于反应初期形成中间化合物ES, 反应后期中间化合物ES完全分解为产物, 因此表现出先减少后增加的趋势。图2中 $[E]_{\text{sim}}$ 为根据式(19)的隐函数计算出的酶的浓度, 可看出在相当大的底物S浓度变化范围内 $[E]_{\text{sim}}$ 与[E]均吻合的很好。

表1选取了5组底物S和酶E的浓度数据, 并用切线法和关系式法分别计算了 k_1 和 k_{-1} 。对于切线法, 结果表明只有当选择的数据点非常接近反应终点, 求出的 T_1 才接近根据式(17)算出的理论值(-0.9512), 此时求出的 k_1 和 k_{-1} 才接近理论值。而对于关系式法, 在较宽的浓度范围内, 根据式(20)求出的 k_1 和 k_{-1} 均与理论值非常接近。

3 结语

通过以上分析, 我们给出了两种求解米氏机理中 k_1 和 k_{-1} 的方法。瞬态法在分析进入稳态前动力学过程的基础上, 引入了“诱导”时间 τ 的概念, 通过测量 τ 并结合稳态法求出的 k_2 和 K_M , 可以求出 k_1

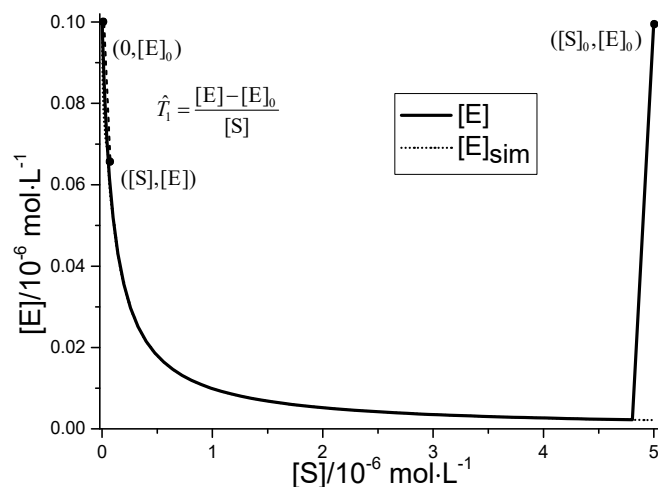


图2 酶催化反应中酶浓度[E]与底物浓度[S]的关系

 表1 根据两种方法计算出的 k_1 和 k_{-1}

[S]/10 ⁻⁶ (mol·L ⁻¹)	[E]/10 ⁻⁶ (mol·L ⁻¹)	切线法			关系式法	
		T_1	$k_1/10^6$ (mol ⁻¹ ·L·s ⁻¹)	k_{-1}/s^{-1}	$k_1/10^6$ (mol ⁻¹ ·L·s ⁻¹)	k_{-1}/s^{-1}
1.291 × 10 ⁻⁴	0.09988	-0.9498	103.3	10.36	100.4	10.05
5.571 × 10 ⁻⁴	0.09947	-0.9459	113.5	11.49	100.2	10.02
1.077	0.00926	-0.08428	-0.0722	-1.008	99.84	9.982
2.004	0.00498	-0.04731	-0.02254	-1.002	100.3	10.04
3.056	0.00347	-0.03159	-0.01002	-1.001	99.81	9.979

和 k_{-1} 。瞬态法具有明确的物理意义，易于理解，但是由于瞬态过程极短，需要用到快速反应动力学的仪器设备才能测量 τ ，对实验条件提出了较高的要求。数学计算法是通过寻找反应过程中酶E与底物S浓度之间的关系，寻找关于 k_1 和 k_{-1} 的另一个关系式，其中的切线法为了准确的求出 T_1 ，需要选择尽可能接近反应终点的的数据，而此时底物S的浓度非常小，从实验角度考虑难以准确测定，因此切线法只具有理论意义。与切线法相比，关系式法只需使用达到稳态后某个时刻的酶E与底物S的浓度即可准确计算出 k_1 和 k_{-1} ，从实验角度考虑更有可行性。

除了以上介绍的方法，在已知酶催化反应中底物浓度与时间关系的前提下，可以采用动力学模拟的方法，直接拟合求出米氏机理中的各个反应速率常数^[10]。此外，在达到稳态时，酶E与底物S形成中间化合物ES的反应可认为处于平衡态，因此采用快速反应测试手段中的温度跳跃弛豫法等弛豫方法也可提供求解 k_1 和 k_{-1} 的另一方法。

对米氏机理中全部速率常数的求解，体现了从提出问题、分析问题到解决问题的全过程，可以作为一个案例用于训练较为复杂动力学问题的处理，另一方面也可以通过提供更丰富的动力学信息完善对米氏机理模型的认识，在教学上拓展酶催化反应动力学的内容。

参 考 文 献

- [1] 傅献彩, 沈文霞, 姚天扬, 侯文华. 物理化学(下册). 第5版. 北京: 高等教育出版社, 2015: 292-296.
- [2] 王志鹏, 车子良, 马新雨, Zhuang, F., 蒋振雄, 尹晟, 王鹏. 化学教育(中英文), 2021, 42 (8), 105.

- [3] 和媛, 张焯, 王梦琛, 崔斌, 李延, 樊海明. 大学化学, **2022**, *37* (12), 2112046.
- [4] 刘梦婷, 杨树芬, 薛雨, 臧嘉妍, 苏权燕, 郑兴焯, 曹秋娥, 周川华. 大学化学, **2023**, *38* (9), 163.
- [5] Park, C. *J. Chem. Edu.* **2022**, *99* (7), 2556.
- [6] 陈石根, 周润琦. 酶学. 上海: 复旦大学出版社, 2001: 177–178.
- [7] Li, B.; Li, B.; Shen, Y. *J. Math. Chem.* **2009**, *46* (1), 290.
- [8] Li, B.; Li, B.; Shen, Y. *J. Math. Chem.* **2012**, *50* (4), 752.
- [9] Potratz, J. P. *J. Chem. Edu.* **2018**, *95* (3), 482.
- [10] 张恒, 汪存信. 大学化学, **2010**, *25* (4), 47.