

热动力学的滴定量热法研究 II. 单底物酶促反应的热动力学

梁毅^{a,b*} 汪存信^b 刘欲文^b 屈松生^b 邹国林^c

(^a中国科学院生物物理研究所 生物大分子国家重点实验室 北京 100101)

(武汉大学 ^b化学与环境科学学院 ^c生命科学学院 武汉 430072)

摘要 用滴定量热法分别建立了滴定期和停滴反应期单底物酶促反应热动力学的数学模型. 根据这两种模型, 可由一次实验的滴定量热曲线同时解析出单底物酶促反应的热力学参数($\Delta_r H_m$)和动力学参数(K_m 和 k_2). 用滴定量热法研究了一个经典的单底物酶促反应——过氧化氢酶催化分解过氧化氢反应的热动力学, 由滴定期和停滴反应期热动力学模型解析出在 298.15K 和 pH=7.0 时该反应的米氏常数 K_m 分别为 $(5.41 \pm 0.24) \times 10^{-3}$ 和 $(5.43 \pm 0.21) \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 酶转换数 k_2 分别为 $(3.58 \pm 0.33) \times 10^3$ 和 $(3.60 \pm 0.41) \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, 摩尔反应焓为 $(-86.75 \pm 0.88) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 实验结果验证了上述热动力学模型的正确性.

关键词 滴定量热法, 酶促反应, 热动力学, 过氧化氢酶, 米氏常数

Titration Calorimetry Applied to the Study of Thermokinetics II. Thermokinetics of Single-substrate Enzyme-catalyzed Reactions

LIANG Yi^{a,b*} WANG Cun-Xin^b LIU Yu-Wen^b QU Song-Sheng^b ZOU Guo-Lin^c

(^aNational Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100101)

(^bCollege of Chemistry and Environment Science, ^cCollege of Life Science, Wuhan University, Wuhan, 430072)

Abstract Titration calorimetry is emerging as an important tool for characterizing interactions of biological macromolecules by virtue of its general applicability, high accuracy and precision. In this paper, two mathematical models for thermokinetics of a single-substrate enzyme-catalyzed reaction in titration period and in the stopped-titration reaction period, respectively, have been developed, by using titration calorimetry. On the basis of the titration calorimetric curve, one can use these two models to calculate not only the thermodynamic data ($\Delta_r H_m$) but also the kinetic data (K_m and k_2) for the reaction. Thermokinetics of a well-studied single-substrate enzymatic reaction, the catalase-catalyzed decomposition of hydrogen peroxide, was thus investigated by titration calorimetry, and the molar enthalpy ($\Delta_r H_m$) was found to be $(-86.75 \pm 0.88) \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. The Michaelis constant (K_m) for H_2O_2 and the turn-over number of the enzyme (k_2) were determined by the titration-period thermokinetic model to be $(5.41 \pm 0.24) \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(3.58 \pm 0.33) \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, respectively, whereas the corresponding kinetic parameters calculated by the stopped-titration-reaction-period thermokinetic model were $(5.43 \pm 0.21) \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $(3.60 \pm 0.41) \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, respectively, at 298.15 K and pH 7.0. Reliability of the above thermokinetic models was verified by the experimental data.

* E-mail: liangyi@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 1999-06-21, 修回日期: 1999-08-20, 定稿日期: 1999-10-03, 国家自然科学基金(39970164, 29873036, 29773033), 中国博士后科学基金和中国科学院王宽诚博士后工作奖励基金资助项目, 第 I 报见物理化学, 1997, 13(5), 425.

(Received June 21, 1999. Revised August 20, 1999. Accepted October 3, 1999)

Keywords titration calorimetry, enzyme-catalyzed reaction, thermokinetics, catalase, Michaelis constant

滴定量热法又称温度滴定法或热函滴定法^[1],它是一种能直接测量溶液化学反应和生化过程热力学参数的方法,尤其是在一次滴定实验中就能同时得到有关反应和过程的热力学参数 ΔH , ΔG 和 ΔS , 并通过测定 ΔH 的温度依赖性获取另一重要热力学参数 ΔC_p , 因而已在生物化学、物理化学和分析化学等众多领域得到广泛的应用^[2,3]. 最近几年,国内外在这方面的报道主要集中于该法测定氨基酸质子化反应^[4]、抗体-抗原相互作用^[5-9]、分子伴侣-底物相互作用^[10-12]、蛋白质-蛋白质相互作用^[13,14]、蛋白质-核酸相互作用^[15]、脂类-核酸相互作用^[16]、小分子配体-蛋白质相互作用^[17]、多糖-肽相互作用^[18]以及小分子配体与环糊精的相互作用^[19]等的热力学性质.

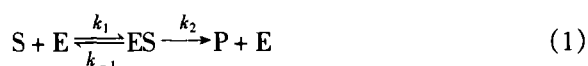
滴定量热法用于动力学领域的实验研究报道甚少. Freire 等^[20]应用滴定量热法研究了酵母细胞色素 c 氧化酶催化氧化亚铁细胞色素 c 的热动力学,并分析了原盐效应对该酶活性的影响,但他们把该酶促反应视为一级反应,而且只建立了停滴反应期一级反应热动力学的最原始数学模型[即前文^[21]中式(16)].

在前文^[21]滴定量热法应用于研究一级反应热动力学的基础上,本文系统地用滴定量热法分别建立了滴定期和停滴反应期单底物酶促反应热动力学的数学模型. 用滴定量热法研究了磷酸盐缓冲溶液中过氧化氢酶催化过氧化氢分解反应的热动力学,实验结果验证了本文滴定量热法及其数学模型的正确性.

1 数学模型

1.1 滴定期单底物酶促反应热动力学的数学模型

对于一个发生在恒压绝热式滴定热量计中的单底物酶促反应:



根据 Michaelis - Menten 学说原理,若产物对酶无抑制作用,则存在下列关系式^[22]:

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{k_2[E]_t[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

式中 $[S]$ 为 t 时底物浓度, K_m 称为米氏常数, k_2 称为酶转换数.

若以 E 为滴定剂,设其初始摩尔浓度为 $[E]_0$, 体积滴加速率为 V_0 , 则 t 时刻总酶浓度 $[E]_t$ 为:

$$[E]_t = \frac{[E]_0 V_0 t}{V_s + V_0 t} \quad (3)$$

式中 V_s 为被滴定液 S 的初始体积(本文中 $V_s = 100.0 \text{ mL}$), 由于本实验中 $V_0 t$ 项不超过 3.0438 mL , 与 V_s 相比可忽略不计, 因此式(3)可简化为:

$$[E]_t = \frac{[E]_0 V_0 t}{V_s} \quad (4)$$

将式(4)代入式(2)并加以整理可得:

$$\frac{K_m + [S]}{[S]} d[S] = -\frac{k_2 [E]_0 V_0}{V_s} t dt \quad (5)$$

式(5)两边在 $0 \sim t$ 范围内积分, 可以证明:

$$[S]_0 - [S] + K_m \ln \frac{[S]_0}{[S]} = \frac{k_2 [E]_0 V_0}{2 V_s} t^2 \quad (6)$$

在绝热式量热体系中, 反应完全的酶促反应的对比进度 ϕ ^[23] 可由下式计算得到:

$$\phi = \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0} = \frac{\Delta}{\Delta_\infty} \quad (7)$$

式中 $[S]_0$ 为底物的初始浓度, Δ , Δ_∞ 分别为绝热式量热曲线上的 t 时真实峰高(绝热温升)和最终真实峰高, 可分别由下列两式计算得出:

$$\Delta = \Delta_a - \Delta_d \quad (8)$$

$$\Delta_\infty = \Delta_{a,\infty} - \Delta_{d,\infty} \quad (9)$$

式中 Δ_a , $\Delta_{a,\infty}$ 分别为酶促反应的 t 时刻表观峰高(绝热峰升)和最终表观峰高; Δ_d , $\Delta_{d,\infty}$ 分别为被滴定液(底物)的 t 时刻稀释温升和最终稀释温升, 本实验中滴定剂(酶)的浓度极低 ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 因此其稀释温升可忽略不计. Δ_a , $\Delta_{a,\infty}$ 可按前文^[21]方法由实测滴定量热数据计算得出, Δ_d , $\Delta_{d,\infty}$ 则可由空白缓冲溶液滴入被滴定液(底物)中测出.

联立式(6)和(7), 可以证明:

$$-\frac{1}{t^2} \ln(1 - \phi) = \frac{k_2 [E]_0 V_0}{2 V_s K_m} - \left(\frac{[S]_0}{K_m} \right) \left(\frac{\phi}{t^2} \right) \quad (10)$$

方程(10)称为用滴定量热法建立的滴定期单底物酶促反应热动力学的数学模型. 依据此模型, 将 $-\ln(1 - \phi)/t^2$ 对 ϕ/t^2 作图可得直线, 由一次实验所得直线的斜率和纵截距即可同时确定式(10)中的 2 个动力学参数 K_m 和 k_2 .

1.2 停滴反应期单底物酶促反应热动力学的数学模型

根据式(3)和(7), 在停止滴加 E 的 α 点(简称停滴点)所对应的总酶浓度和底物浓度分别为:

$$[E]_a = \frac{[E]_0 V_0 t_a}{V_S + V_0 t_a} \quad (11)$$

$$[S]_a = [S]_0 \left(1 - \frac{\Delta_a}{\Delta_\infty}\right) \quad (12)$$

式中 Δ_a 为 t_a 时刻所对应的酶促反应真实峰高. 将式(11)代入式(2), 可以推出:

$$\frac{K_m + [S]}{[S]} d[S] = -\frac{k_2 [E]_0 V_0 t_a}{V_S + V_0 t_a} dt \quad (13)$$

式(13)两边在 $0 \sim \Delta t^*$ 范围内积分, 式中 $\Delta t^* = t - t_a$, 可以证明:

$$[S]_a - [S] + K_m \ln \frac{[S]_a}{[S]} = \frac{k_2 [E]_0 V_0 t_a}{V_S + V_0 t_a} \Delta t^* \quad (14)$$

定义停滴反应期对比进度 ϕ^* 为:

$$\phi^* = \frac{[S]_a - [S]}{[S]_a} = \frac{\Delta - \Delta_a}{\Delta_\infty - \Delta_a} \quad (15)$$

结合式(14)和(15), 可以导出:

$$-\frac{1}{\Delta t^*} \ln(1 - \phi^*) = \frac{k_2 [E]_0 V_0 t_a}{(V_S + V_0 t_a) K_m} - \left(\frac{[S]_a}{K_m}\right) \left(\frac{\phi^*}{\Delta t^*}\right) \quad (16)$$

方程(16)称为用滴定量热法建立的停滴反应期单底物酶促反应热动力学的数学模型. 根据此模型, 将 $-\ln(1 - \phi^*)/\Delta t^*$ 对 $\phi^*/\Delta t^*$ 作图可得直线, 亦可由一次实验所得直线的斜率和纵截距同时确定式(16)中的 2 个动力学参数 K_m 和 k_2 .

如果酶促反应在绝热式热量计中进行, 则可由量热曲线的最终绝热温升 Δ_∞ 来确定其摩尔反应焓:

$$\Delta_r H_m = \pm \frac{\epsilon \Delta_\infty}{V_S \cdot [S]_0} \quad (17)$$

式中 ϵ 为反应体系的能当量, “+”号适应于吸热反应, “-”号适应于放热反应.

对于发生在热导式滴定热量计中的单底物酶促反应, 其滴定期和停滴反应期的热动力学模型分别与式(10)和(16)完全相同, 只不过此时的 ϕ 为相应的热导式量热体系中的对比进度^[23].

2 实验

2.1 试剂

牛肝过氧化氢酶由中国科学院上海生物化学研究所提供, 其余试剂均为国产分析纯试剂, 实验过程中所用水均为去离子蒸馏水, 所有试样溶液均用缓冲溶液配制. 过氧化氢酶比活力约为 $3 \times 10^3 \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 置于冰箱中保存. 底物过氧化氢的浓度用碘量法标定, 磷酸盐 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$) 缓冲溶液浓

度为 $0.05 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$.

2.2 仪器

武汉大学热化学组自行研制的精密绝热式滴定热量计^[24], 该仪器应用于热力学和动力学测量的准确可靠性已在前文^[21]中由实验得以证明.

2.3 实验方法

量热池内加入过氧化氢溶液(被滴定液, S) 100.0 mL, 在注射器内装入过氧化氢酶溶液(滴定剂, E) 7.0 mL, 反应温度为 298.15 K (25.00 °C), 量热滴定前, 恒温数小时, 使反应体系与环境达到热平衡, 滴定总量 V_E 为 3.0438 mL, 反应过程中放出的热量以测温电桥的输出电压 (mV) 讯号输出, 在记录仪上记录成滴定量热曲线(图 1).

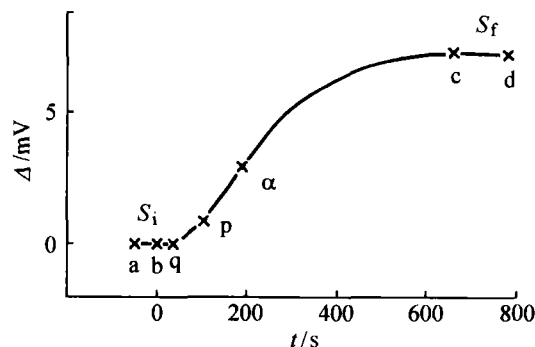


图 1 过氧化氢酶反应的滴定量热曲线
实验条件见表 1 中 No. 1

3 结果

图 1 是记录得到的过氧化氢酶催化过氧化氢分解反应的一条实测滴定量热曲线. 滴定剂(酶)在 b 点开始滴入, 于 α 点滴定结束, 至 c 点反应完全. 直线 ab 为反应前期, 其峰高变化率为 S_i ; 曲线 ba 为滴定期; 曲线 ac 为停滴反应期; 直线 cd 为反应后期, 其峰高变化率为 S_f . 该酶促反应的滴定量热曲线与前文^[21]中一级反应的滴定量热曲线相比有两点不同: 其一是在过氧化氢酶反应初期出现了一个“诱导期”(图 1 中 bq 段, 持续 10 至 40s); 其二是停滴点 α 不是明显的拐点.

由于过氧化氢酶反应服从 Michaelis - Menten 动力学规律和 Ogura 机理, 且分解产物氧气对过氧化氢酶无抑制作用^[25], 因此可按本文用滴定量热法建立的滴定期和停滴反应期单底物酶促反应热动力学的数学模型对滴定量热曲线进行解析.

利用图 1 和表 1 中的滴定量热数据 (Δ , Δ_α 和 Δ_∞), 可分别由式(7)和(15)求出滴定期和停滴反应期该反应的 t 时刻对比进度 ϕ 和 ϕ^* . 将 $-\ln(1-\phi)/t^2$ 对 ϕ/t^2 作图得一直线(相关系数 -0.9998), 斜率 $y = -0.7326$, 纵截距 $z = 2.256 \times 10^{-5} \text{s}^{-2}$, 代入相应的 $[S]_0$, $[E]_0$, V_0 和 V_S 值, 可求得 $K_m = 5.50 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $k_2 = 3.90 \times 10^3 \text{s}^{-1}$. 将 $-\ln(1-\phi^*)/\Delta t^*$ 对 $\phi^*/\Delta t^*$ 作图亦得一直线(相关系数 -0.9906), 斜率 $y = -0.4450$, 纵截距 $z = 8.328 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$, 代入相应的 $[S]_0$, $[E]_0$, V_0 , V_S , t_α , Δ_α 和 Δ_∞ 值, 亦可求得 $K_m = 5.45 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $k_2 = 3.92 \times 10^3 \text{s}^{-1}$. 计算结果均列于表 1.

表 1 给出了不同实验条件下利用热动力学模型(10), (16)和(17)求得的 K_m , k_2 和 $\Delta_r H_m$ 值. 由表 1 可见, 由滴定期和停滴反应期两种数学模型得到的

米氏常数 K_m 的重现性均较好, 计算平均值 ($5.41 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $5.43 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与文献值^[26] ($5.27 \times 10^{-3} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 基本符合; 酶转换数 k_2 和摩尔反应焓 $\Delta_r H_m$ 的重现性亦较好, 计算平均值 (k_2 : $3.58 \times 10^3 \text{s}^{-1}$, $3.60 \times 10^3 \text{s}^{-1}$; $\Delta_r H_m$: $-86.75 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) 亦与文献值^[26] (k_2 : $3.59 \times 10^3 \text{s}^{-1}$; $\Delta_r H_m$: $-88.88 \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) 相吻合. 实验结果同时表明, 对于同一滴定量热曲线的不同反应期(滴定期和停滴反应期), 本文测定的动力学参数 (K_m , k_2) 的自洽性均较好, 而且对于同一滴定量热曲线的相同反应期, 相关系数均在 $-0.9900 \sim -0.9999$ 间, 这表明有较好的线性关系, 可以用式(10)和(16)表示. 因此, 本文实验结果验证了用滴定量热法建立的滴定期和停滴反应期单底物酶促反应热动力学数学模型的正确性.

表 1 298.15K 时过氧化氢酶催化过氧化氢分解反应的实验条件和计算结果^{a)}
(介质: pH=7.0 的 $0.05 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液)

No.	$10^3[S]_0$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$10^7[E]_0$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ϵ ($\text{J} \cdot \text{mV}^{-1}$)	$10^2 V_0$ ($\text{mL} \cdot \text{s}^{-1}$)	t_α (s)	Δ_α (mV)	Δ_∞ (mV)	$10^3 K_m$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$10^{-3} k_2$ (s^{-1})	$-\Delta_r H_m$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
1	4.026	3.922	4.767	1.622	187.61	2.8997	7.3005	5.50 ^{b)} 5.45 ^{c)}	3.90 ^{b)} 3.92 ^{c)}	86.44
2	4.026	3.922	4.757	3.243	93.85	1.8118	7.2950	5.28 ^{b)} 5.81 ^{c)}	3.98 ^{b)} 3.97 ^{c)}	86.20
3	4.026	3.922	4.711	3.243	93.85	1.7700	7.4700	5.25 ^{b)} 5.23 ^{c)}	3.95 ^{b)} 3.87 ^{c)}	87.41
4	2.013	3.922	4.757	3.243	93.87	0.8850	3.7100	5.22 ^{b)} 5.26 ^{c)}	3.21 ^{b)} 3.73 ^{c)}	87.67
5	6.481	3.690	4.852	2.242	93.88	1.7654	11.480	5.30 ^{b)} 5.39 ^{c)}	3.53 ^{b)} 3.02 ^{c)}	85.95
6	3.241	3.690	4.760	3.242	93.88	0.9925	5.9675	5.75 ^{b)} 5.41 ^{c)}	3.14 ^{b)} 3.31 ^{c)}	87.66
7	3.241	2.460	4.803	3.248	93.71	0.8078	5.7592	5.20 ^{b)} 5.21 ^{c)}	3.52 ^{b)} 3.03 ^{c)}	85.35
8	1.620	1.230	4.764	3.238	93.99	0.2607	2.9688	5.77 ^{b)} 5.67 ^{c)}	3.42 ^{b)} 3.93 ^{c)}	87.29
平均值								5.41 ^{b)} 5.43 ^{c)}	3.58 ^{b)} 3.60 ^{c)}	86.75
标准偏差								0.24 ^{b)} 0.21 ^{c)}	0.33 ^{b)} 0.41 ^{c)}	0.88

a) $V_S = 100.0 \text{mL}$, $V_E = 3.0438 \text{mL}$, S: H_2O_2 , E: 过氧化氢酶; b) 滴定期法; c) 停滴反应期法.

4 讨论

4.1 关于过氧化氢酶反应的“诱导期”

在用间歇型微量热法研究过氧化氢酶反应时, 并未出现“诱导期”现象^[27]. 可见此现象并非过氧化氢酶反应的特征, 而是滴定量热计中以酶为滴定期时过氧化氢酶反应的特征; 而且, 这一现象也不是热量计热滞后现象的表征, 因为该仪器热滞后时间常数仅为 4s 并已被扣除. 实验中发现, “诱导期”的长短近似与 $[S]_0$ 成正比. 我们认为, 由于滴定初期酶浓度极低, 此时底物过氧化氢破坏过氧化氢酶^[28] 的速率与过氧化氢酶的滴加速率近似相等, 而且过氧化氢的稀释为小的吸热过程, 因此导致过氧化氢酶反应的表现峰高近似为零, 即所谓“诱导期”现象的产生.

另外, 停滴点 α 不是明显的拐点, 这是由滴定量热计中酶促反应热动力学行为的复杂性引起的, 而停滴点即拐点则可能是一级反应的特征^[21].

4.2 滴定期和停滴反应期酶促反应热动力学的数学模型

在推导滴定期酶促反应热动力学数学模型[式(10)]的过程中, 我们引入了一个简化条件: $V_S + V_0 t \approx V_S$. 在本文实验条件下, 这一简化可带来约 3% 的误差, 但该项误差可通过减少滴定总量 V_E 的方法来降低.

当 $[S]_0$ 很大(即 $[S]_0 \gg K_m$) 时, 式(16)即转变为停滴反应期零级反应热动力学的数学模型:

$$\phi^* = \frac{k_2[E]_0 V_0 t_\alpha}{(V_S + V_0 t_\alpha)[S]_a} \Delta t^* = k_0 \Delta t^* \quad (18)$$

式中 k_0 为零级反应速率常数与 $[S]_a$ 的比值. 在相同条件下, 式(10)则不能转变为滴定期零级反应热动

力学的数学模型,而成为:

$$\phi = \frac{k_2[E]_0 V_0}{2V_S[S]_0} t^2 \quad (19)$$

当 $[S]_0$ 很小(即 $[S]_0 \ll K_m$)时,式(16)即转变为停滴反应期一级反应热动力学的数学模型:

$$-\ln(1 - \phi^*) = \frac{k_2[E]_0 V_0 t_a}{(V_S + V_0 t_a) K_m} \Delta t^* = k_1 \Delta t^* \quad (20)$$

式中 k_1 为一级反应速率常数.在相同条件下,式(10)亦不能转变为滴定期一级反应热动力学的数学模型,而成为:

$$-\ln(1 - \phi) = \frac{k_2[E]_0 V_0}{2V_S K_m} t^2 \quad (21)$$

用滴定量热法测定生物大分子间及小分子-生物大分子相互作用的特征热力学参数是近年来国际上比较热门的研究课题,但该法应用于测定上述相互作用的特征动力学参数少见文献报道.本文实验结果表明,滴定量热法用于研究单底物酶促反应动力学是完全可行的,从而为生化过程动力学规律的滴定量热研究带来了曙光.

致谢 中国科学院生物物理研究所的周筠梅教授仔细审阅了本文,在此表示衷心感谢.

References

- 1 J. Barthel, "Thermometric Titrations", John Wiley & Sons, New York, 1975, p. 1.
- 2 E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, *Anal. Chem.*, 1990, 62 (18), 950A.
- 3 M. L. Doule, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1997, 8, 31.
- 4 LIU Shi - Jun, WANG Cun - Xin, WU Xu - Heng, QU Song - Sheng, *Acta Physico - Chimica Sinica*, 1995, 11(7), 617(in Chinese).
- 5 C. S. Raman, M. J. Allen, B. T. Nall, *Biochemistry*, 1995, 34, 5831.
- 6 K. Tsumoto, K. Ogasahara, Y. Ueda, K. Watanabe, K. Yutani, I. Kumagai, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(31), 18551.
- 7 F. P. Schwarz, D. Tello, F. A. Goldbaum, R. A. Mariuzza, R. J. Poljak,

Eur. J. Biochem., 1995, 228, 388.

- 8 K. Tsumoto, K. Ogasahara, Y. Ueda, K. Watanabe, K. Yutani, I. Kumagai, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271(51), 32612.
- 9 M. B. Keown, A. J. Henry, R. Ghirlando, B. J. Sutton, H. J. Gould, *Biochemistry*, 1998, 37, 8863.
- 10 K. Aoki, H. Taguchi, Y. Shindo, M. Yoshida, K. Ogasahara, K. Yutani, N. Tanaka, *J. Biol. Chem.*, 1997, 272(51), 32158.
- 11 L. L. Randall, T. B. Topping, D. Suci, S. J. S. Hardy, *Protein Sci.*, 1998, 7, 1195.
- 12 Z. Lin, F. P. Schwarz, E. Eisenstein, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270(3), 1011.
- 13 M. L. Wu, W. T. Morgan, *Protein Sci.*, 1995, 4, 29.
- 14 A. Yokota, H. Takenaka, T. Oh, Y. Noda, S. I. Segawa, *Protein Sci.*, 1998, 7, 1717.
- 15 R. O'Brien, B. DeDecker, K. G. Fleming, P. B. Sigler, J. E. Ladbury, *J. Mol. Biol.*, 1998, 279, 117.
- 16 C. H. Spink, J. B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 10920.
- 17 Y. V. Griko, D. P. Remata, *Protein Sci.*, 1999, 8, 554.
- 18 R. E. Hileman, R. N. Jennings, R. J. Linhardt, *Biochemistry*, 1998, 37, 15231.
- 19 P. D. Ross, M. V. Rekharsky, *Biophys. J.*, 1996, 71, 2144.
- 20 P. E. Morin, E. Freire, *Biochemistry*, 1991, 30(34), 8494.
- 21 WANG Cun - Xin, LIANG Yi, WANG Wen - Qing, SONG Zhao - Hua, LIU Yu - Wen, QU Song - Sheng, *Acta Physico - Chimica Sinica*, 1997, 13(5), 425(in Chinese).
- 22 K. J. Laidler, P. S. Bunting, "The Chemical Kinetics of Enzyme Action", 2nd Edn., Clarendon, Oxford, 1973, p. 73, 164.
- 23 LIU Jing - Song, ZENG Xian - Cheng, DENG Yu, *Chem. J. Chin. Univ.*, 1992, 13(11), 1466(in Chinese).
- 24 HUANG Ying - Jun, WANG Cun - Xin, SONG Zhao - Hua, WU Xu - Heng, LIU Shi - Jun, QU Song - Sheng, *Journal of Wuhan University (Natural Science Edition)*, 1994, (6), 76(in Chinese).
- 25 Y. Ogura, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, 57, 288.
- 26 Y. Liang, Y. X. Wu, D. H. Li, C. X. Wang, Y. Liu, S. S. Qu, G. L. Zou, *Thermochim. Acta*, 1997, 307, 149.
- 27 Y. Liang, S. S. Qu, C. X. Wang, Y. W. Liu, Z. Y. Wang, Z. H. Song, G. L. Zou, *Sci. China, Ser. B (English Edition)*, 1998, 41(6), 575.
- 28 K. J. Laidler, "The Chemical Kinetics of Enzyme Action", Clarendon, Oxford, 1958, p. 321.

(Ed. PAN Bing - Feng)

(ZHENG Guo - Cheng)