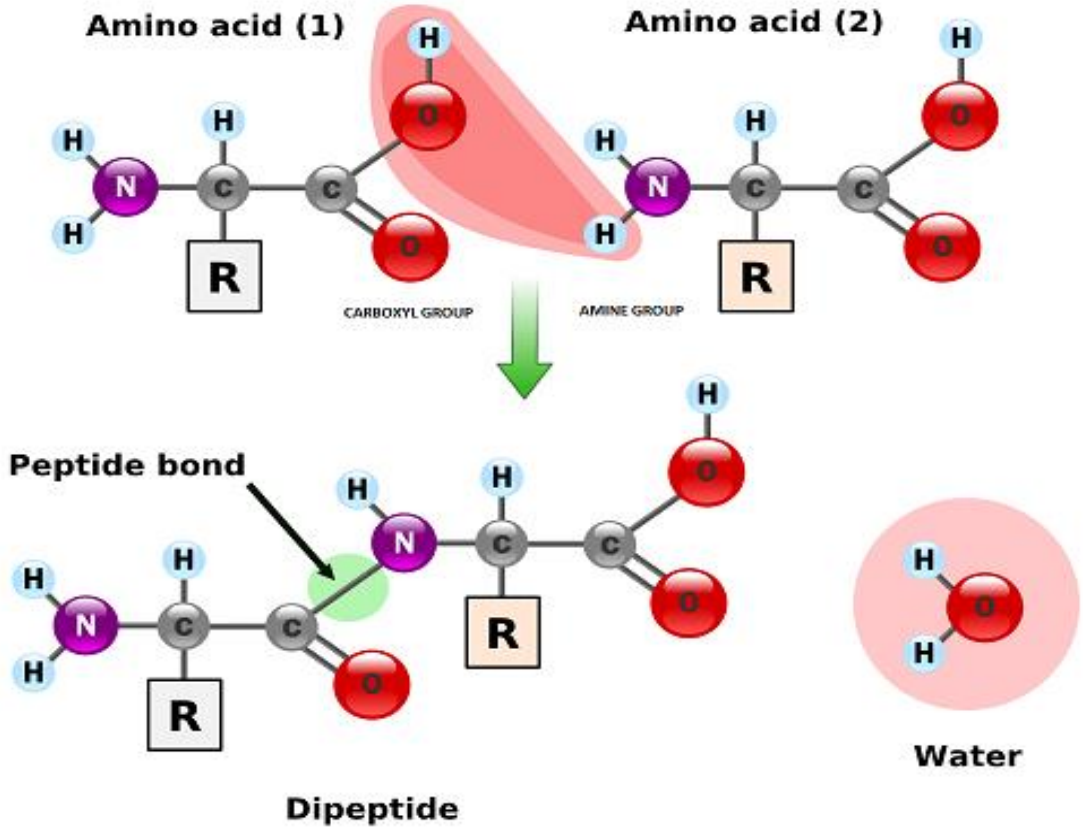
임상 화학(Clinical Chemistry)

Lecture 6. Amino Acid and Protein

Prof. Choi Jeong Su
E-mail : guesschjs@korea.ac.kr
H.P : 010-6314-3910

■ 단백질(Proteins)

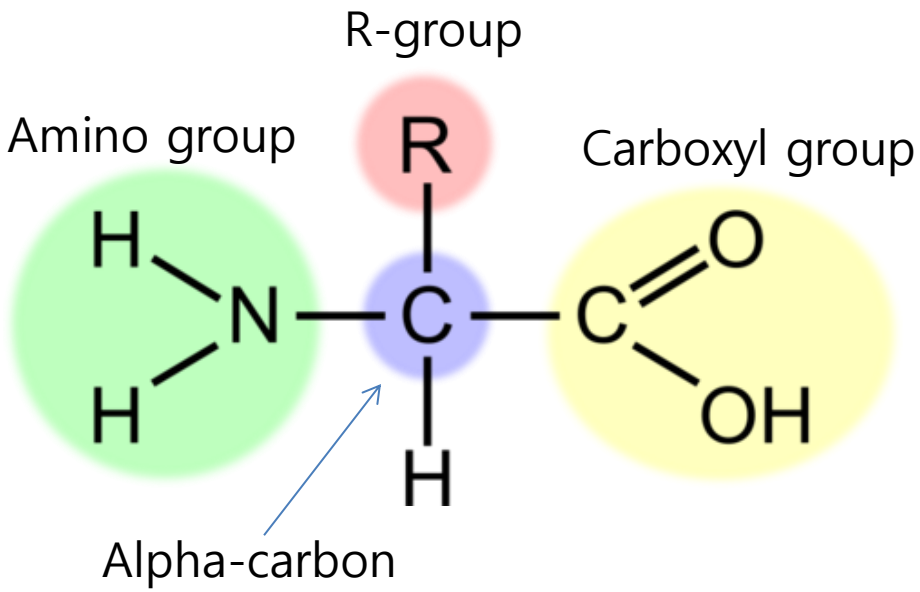
1) 많은 Amino acid(아미노산)의 중합체(Polypeptide)이다
   ① NH_2 Group (Amino기)과 COOH Group (Carboxyl기)을 동시에 포함하고 있다.
   ② Peptide 결합을 하고 있다
   - Amino acid의 Carboxyl기와 다른 Amino acid의 Amino기 사이에서 물 한 분자 빠져서 이루어진 결합 (2개의 Amino acid의 결합 = Dipeptide)



Lecture 6. Amino Acid and Protein

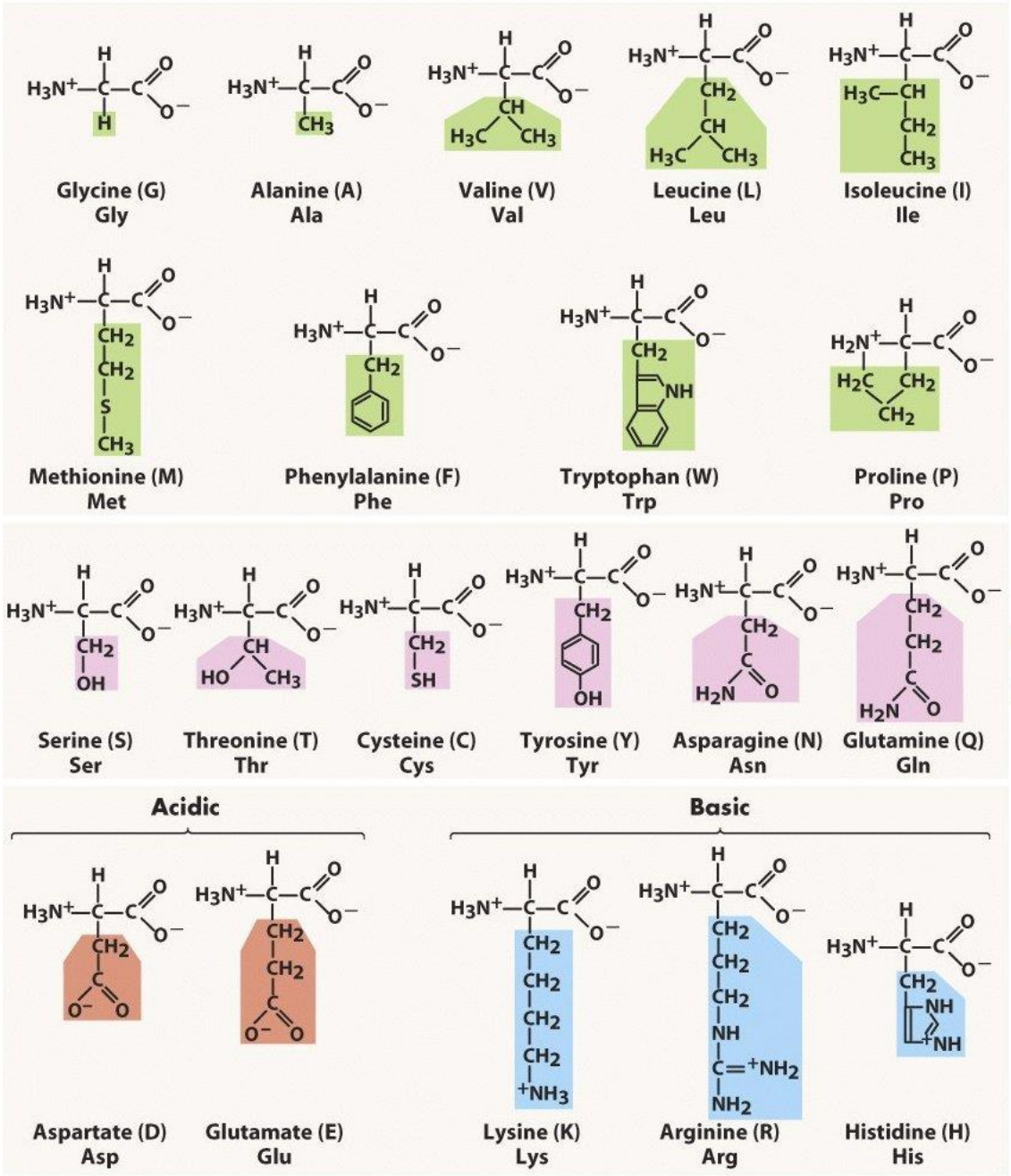
■ 단백질(Proteins)

1) 많은 Amino acid(아미노산)의 중합체(Polypeptide)이다
   ① NH_2 Group (Amino기)과 COOH Group (Carboxyl기)을 동시에 포함하고 있다.
   ② Peptide 결합을 하고 있다
   - Amino acid의 Carboxyl기와 다른 Amino acid의 Amino기 사이에서 물 한 분자 빠져서 이루어진 결합 (2개의 Amino acid의 결합 = Dipeptide)

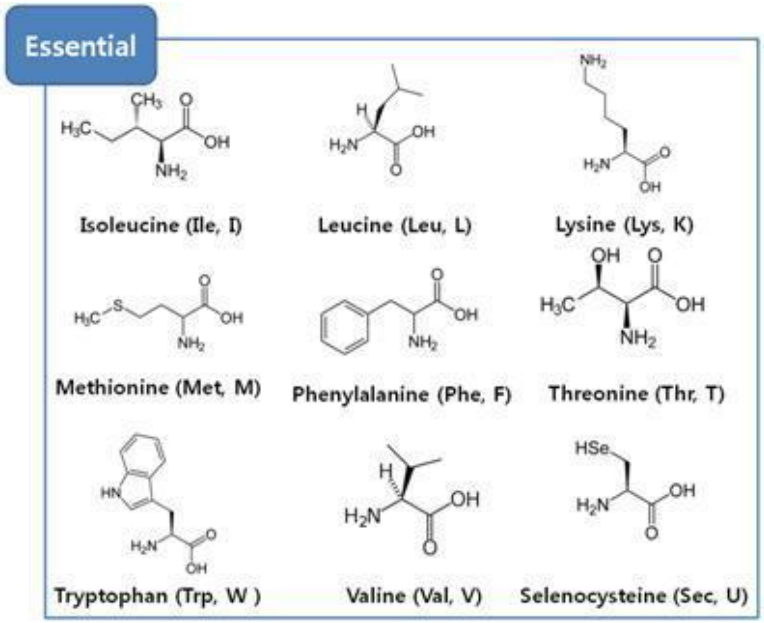


R=무극성
->무극성 아미노산
R=극성 (R-OH, R-NH)
->극성 아미노산
R=음이온($-COO^-$)
->산성 아미노산
R=양이온($-NH_2^+$)
-> 염기성 아미노산

Lecture 6. Amino Acid and Protein

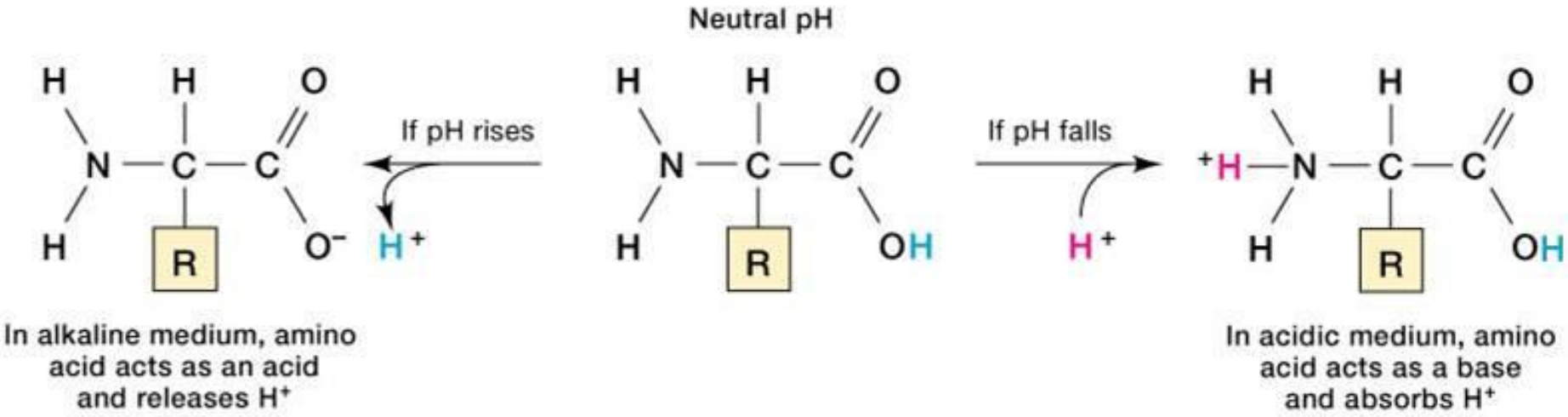


R=무극성
->무극성 아미노산
R=극성 (R-OH, R-NH)
->극성 아미노산
R=음이온(-COO^-)
->산성 아미노산
R=양이온(-NH_2^+)
-> 염기성 아미노산



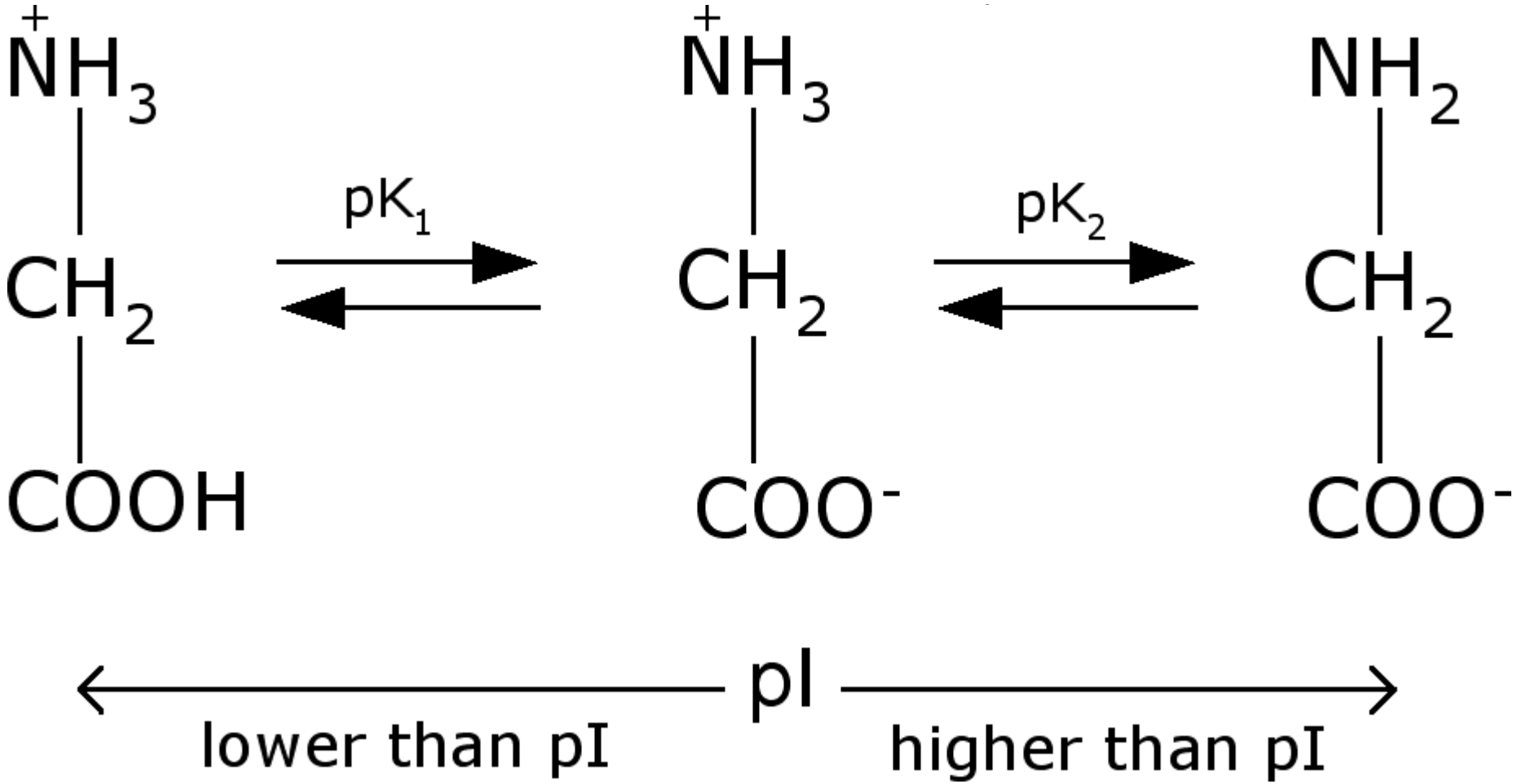
■ 단백질(Proteins)

2) Buffer의 pH에 따라 +전하 또는 -전하으로 된다
- Zwittzer Ion 이다 (= Amphoteric 성질 = 양쪽성 성질)
- 아미노산 수용액에 산을 가하면 아미노기는 H^+과 결합하여 전체적으로 (+)를 띠고 알카리를 가하면 카르복실기는 수소원자를 잃고 아미노산은 전체적으로 (-)를 띤다



■ 단백질(Proteins)

2) Buffer의 pH에 따라 +극 또는 -극으로 된다
- Zwittzer Ion 이다 (= Amphoteric 성질 = 양쪽성 성질)



■ 단백질(Proteins)

3) 단백질의 생물학적 기능
- 생명유지와 생체 항상성 유지에 중요한 역할을 담당한다.

① 영양원
② 콜로이드 삼투압의 유지 및 수분 유지
③ 산-염기 평형의 유지
④ 물질의 운반, 이동
⑤ 혈액응고
⑥ 생체방어반응(면역글로불린, 보체계)
⑦ 효소 활성

■ 단백질(Proteins)

4) 단백질의 구조

① 1차구조 (Primary structure)

- 기본적인 아미노산 서열, 펩타이드 결합에 의해서 이루어진 아미노산 사슬

② 2차구조 (secondary structure)

- Polypeptide의 국부적 접힘 구조
- α-나선 (α-helix), β-병풍(β-pleated sheet) 구조가 2차구조에 해당

③ 3차구조(tertiary structure)

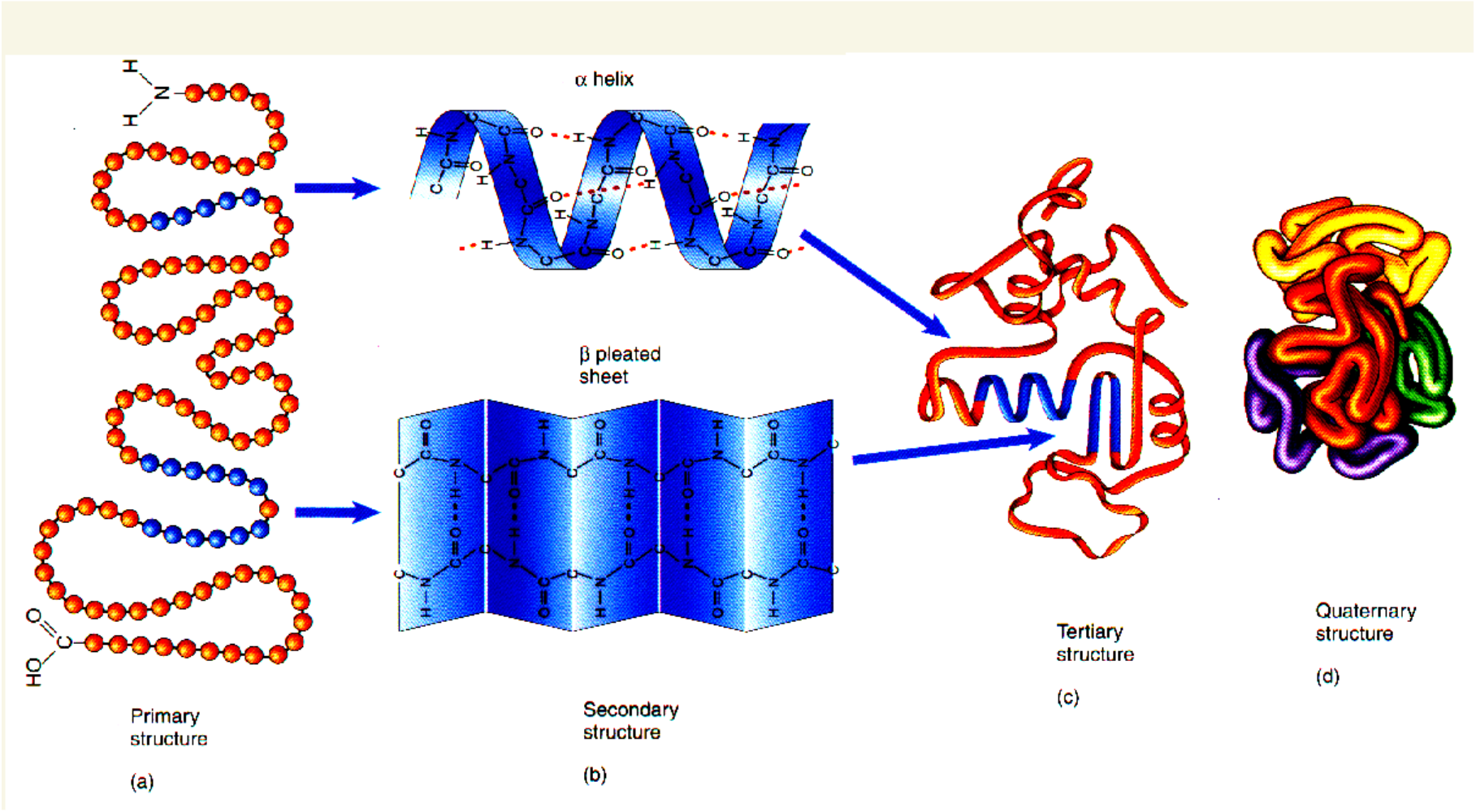
- 다양한 2차구조가 축적되어 전체적인 3차원 구조를 형성
- Protein folding 현상, domain 존재

④ 4차구조(quaternary structure)

- 2개 이상의 단백질들이 subunit이 되어 결합하여 단백질을 만드는 구조

■ 단백질(Proteins)

4) 단백질의 구조



■ 단백질(Proteins)

5) 단백질의 분류

- **단순 단백질 (Simple Protein)**
  (1) Albumin
  (2) Globulin (α_1-Globulin, α_2-Globulin, β-Globulin, γ-Globulin)
  (3) Histones
- **결합 단백질 (Conjugated Protein)**
  -> 아미노산 이외의 분자가 결합해 있는 단백질 (단백질+보결분자단)
  (1)Glycoprotein
  (2)Lipoprotein
  (3)Nucleoprotein
- **유도체 단백질 (Derivative Protein)**

: -> 화학 , 효소 , 물리적인 힘에 의한 작용에서 생기는 단백질
  (1) Dipeptide
  (2) Tripeptide
  (3) Polypeptide
- **특수 단백질 (Special Protein)**
  (1) Fibrinogen : 혈액응고에 관여
  (2) Transferrin : Glycoprotein의 일종 , Fe^{+2} 운반의 기능이 있다
  (3) Ceruloplasmin : α_2-Globulin의 일종 , Cu^{+2} 운반의 기능이 있다

Lecture 6. Amino Acid and Protein

■ 단백질(Proteins)

6) 단백질의 정상치

- Total protein : 6.5 ~ 8.5g/dℓ
- Albumin : 4.2 ~ 5.4g/dℓ
- Globulin : 2.4 ~ 3.5g/dℓ
  - ① α_1-Globulin : 0.2 ~ 0.4g/dℓ
  - ② α_2-Globulin : 0.4 ~ 0.9g/dℓ
  - ③ β-Globulin : 0.4 ~ 0.8g/dℓ
  - ④ γ-Globulin : 0.7 ~ 1.3g/dℓ
- Albumin/Globulin (A/G비) : 1.1 ~ 1.7

고단백질 혈증 (10 ~ 16g/dℓ) (Hyperproteinemia)	**저단백질 혈증 (4.0g/dℓ 이하) (Hypoproteinemia)**
주로 Immunoglobulin 증가 다발성 골수종 (Multiple Myeloma) Macroglobulin 혈증 고 Globulin 혈증 종양 림프성 망내증 특수한 원충 감염증 (Malaria)	주로 Albumin 부족 단백질 공급부족 : 소화기계 질환 , 기아 , 영양부족 단백질 합성장애 : 간기능 이상 , 간염 , Hyperglobulin 단백질 분해항진 : 갑상선 기능항진 , 당뇨병 , 발열 단백질 배설이상 : 신우염 (Nepritis) , 장관의 누출 , 화상

■ 단백질(Proteins) 측정 방법

1) 질소정량법(Micro-Kjeldahl법)

- 단백의 질소 함유량율이 거의 일정한(약16%) 것을 이용해서 질소를 측정한 후 계수 6.25(100/16)를 곱해서 단백의 양을 구하는 방법

2) Biuret법

- 널리 이용되는 비색법으로 단백의 기본구조인 펩티드 결합과 2가 구리(Cu^{2+})이온이 chelate 결합하여 청자색 착염을 형성 하는 것 이용

3) 굴절률 측정법

- 혈청 단백질의 질량농도는 혈청의 다른 성분보다 훨씬 높으므로 혈청의 굴절률은 거의 단백에 의해 좌우 되며 단백농도에 비례하여 굴절률이 증가하는 것 이용. 굴절률은 온도에 영향을 받아 5℃ 상승에 따라 0.2g/dL 저하 한다.

4) 비탁법

- 단백질은 자신의 등전점보다 낮은 산성용액에서 양이온을 띠는데 여기에 sulfosalicylic acid를 가해 혼탁을 측정

■ 단백질(Proteins) 측정 방법

5) 색소결합법

- 혈청내 대부분의 단백이 색소와 결합하는 성질 이용. 전기영동 후 Ponceau S, Amido black 10B, Coomassie blue 염색법
- 알부민 염색 : HABA, BCG, BCP, BPB

6) 자외선법

- 단백질을 구성하는 방향족 아미노산인 tryptophan, phenylalanine, tyrosine 이 280nm에서 빛 흡수하는 성질 이용, 정제된 단백질 용액의 단백 측정에 이용

7)Lowry법

- 단백 농도가 낮은 시료의 5-100 μg의 미량 단백 측정 방법

■ 혈청 교질반응

- Albumin과 Globulin의 양적변화를 침전반응 및 혼탁반응 시켜 관찰
- 침전하기 쉬운 γ-Globulin이 증가하면 침전량이 증가하고, 반대로 Albumin이 증가하면 교질보호작용으로 침전이 억제된다.
- 교질반응 시약 : Thymol barbital buffer, Zinc sulfate buffer (표준액 : $BaSO_4$)
- TTT법 (Thymol Turbidity Test)
  -> Serum + TB ------> 침전 or 혼탁 (660nm)에서 혼탁도 측정
- ZTT법 (Zinc sulfate Turbidity Test)
  -> Setum + ZB ------> 침전 or 혼탁 (660nm)에서 혼탁도 측정
- CCF (Cephalin Cholesterol Flocculation Test)
  -> Serum + CCF액(Cephalin:Cholesterol = 1:3) --------> 침전 or 혼탁 (면상반응)
- 간기능 이상 환자의 혈청에 γ-Globulin이 증가하여 혼탁 정도가 강해짐
- LFT 종목 중 하나 (현재는 거의 실시하지 않는다)

■ Total Protein - Micro Kjeldahl 법 (질소 정량법, 적정법)

- 단백질의 질소 함유율이 거의 일정한 것을 이용해서 질소를 측정한 후 계수 6.25를 곱해서 단백질의 양을 구한다

① 1단계 : 산화

$$\text{Protein} + H_2SO_4 \xrightarrow[\text{Alkali, 증류}]{\text{Boiling, 산화}} (NH_4)HSO_4$$

② 2단계 : 증류

$$(NH_4)HSO_4 + NaOH \longrightarrow NH_3$$

③ 3단계 : 포집

$$NH_3 + H_3BO_3(\text{포집}) \longrightarrow NH_4H_2BO_3 \longrightarrow NH_4^+ + H_2BO_3^-$$

④ 4단계 : 적정

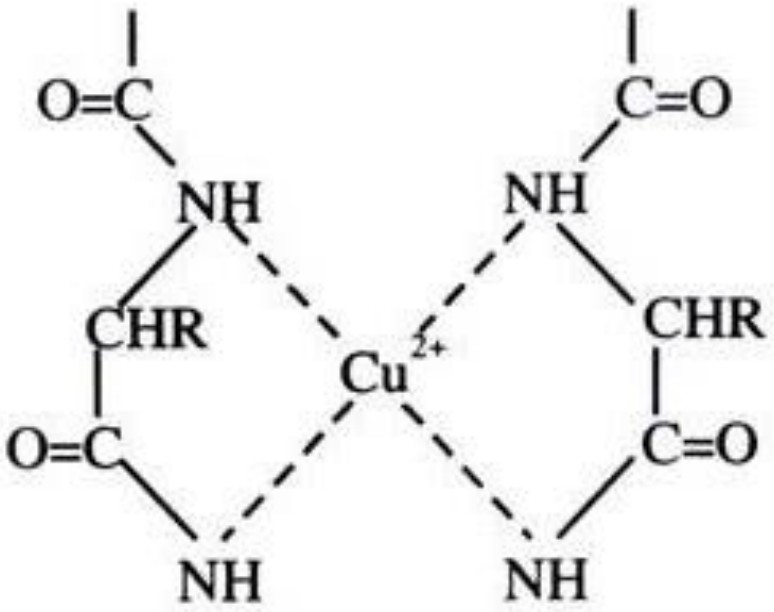
NH_4^+에 Methyl red (지시약) 를 가하면 Red Color로 변한다

여기에 HCl을 가하여 Red Color가 소실될 때 까지 적정한다 (적정량을 측정한다)

■ Total Protein - Biuret 법 (비색법)

- 단백용액을 알카리용액에서 Cu^{+2}로 처리하면 Chelate Complex가 생기는데 이와 유사한 반응이 유기화합물질인 Biuret과 Cu^{+2} 사이에 일어나기 때문에 Biuret 반응이라 하며 이 반응은 Amino acid나 Dipepide하고는 반응치 않으며 Tripolypeptide 이상에서 반응을 해서 Violet Color (540nm) 를 낸다

- Protein + Biuret 시약 $\xrightarrow{\text{Alkali(NaOH)}}$ Violet Complex



Biuret 시약

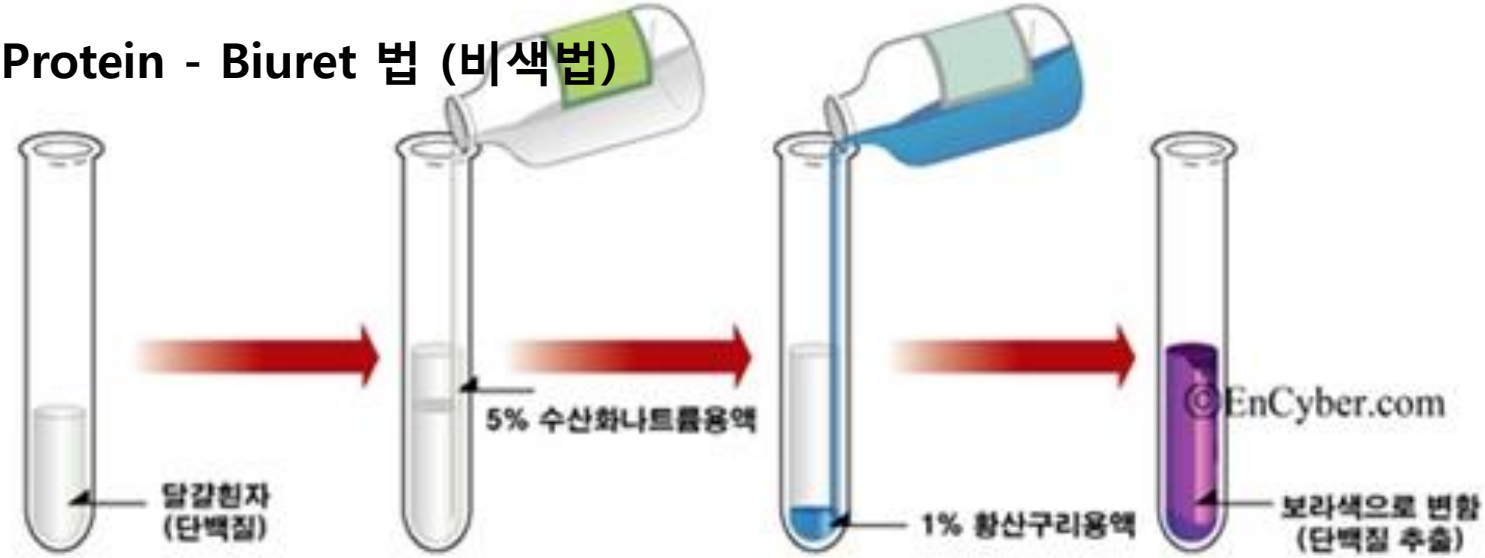
① NaOH : pH 조절

② KI : 환원제

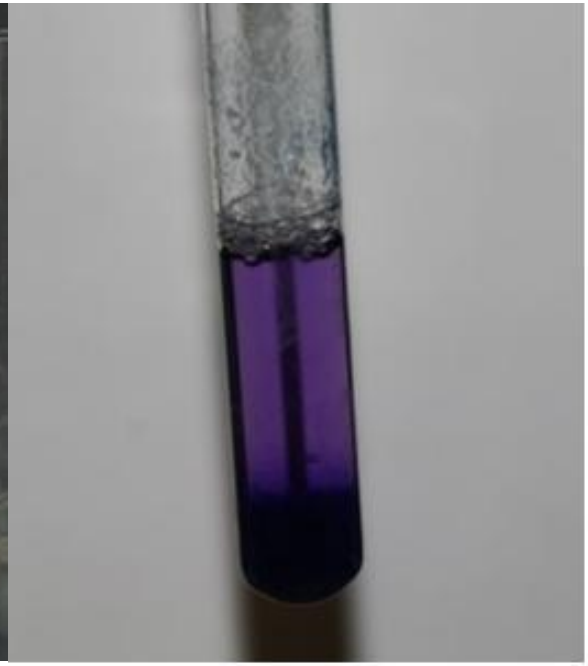
③ CuSO4 : 정색시약

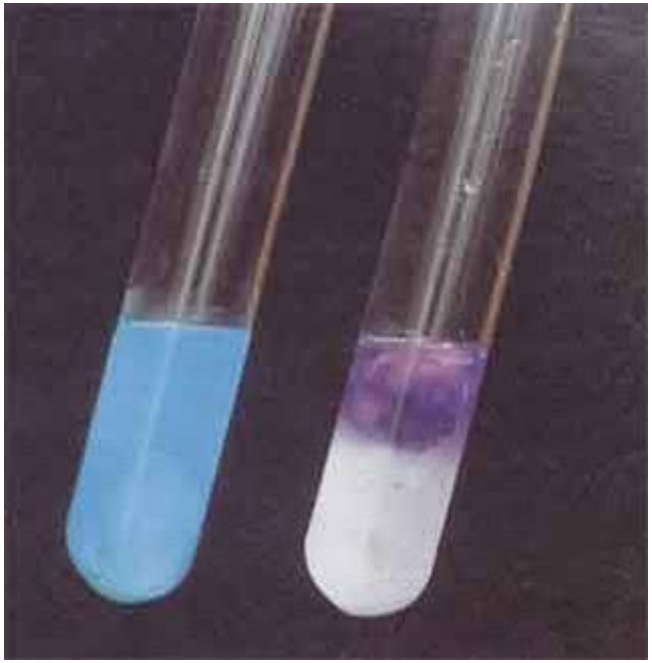
④ Rochelle salt(Na. K. tartrate) : 발색안정

■ Total Protein - Biuret 법 (비색법)









Lecture 6. Amino Acid and Protein

■ Albumin

- 간에서 합성되는 수용성 단백질
- 혈청 단백질의 60~70%를 차지한다.
- 기능
  ① 교질삼투압 유지
  ② 생체 내 물질 (Bilirubin, 유리지방산, Ca ion, metal ions, hormones 등) 결합, 운반
  ③ 노폐물, 유독물질 운반 배설
- 정상치
  ① Albumin : 4.2 ~ 5.4g/dℓ
  ② Globulin : 2.4 ~ 3.5g/dℓ
  α_1-Globulin : 0.2 ~ 0.4g/dℓ
  α_2-Globulin : 0.4 ~ 0.9g/dℓ
  β-Globulin : 0.4 ~ 0.8g/dℓ
  γ-Globulin : 0.7 ~ 1.3g/dℓ
  ③ Albumin/Globulin (A/G비) : 1.1 ~ 1.7

■ Albumin 측정법

- 색소결합법 (비색법)

  -> Albumin이 각종 색소와 결합하는 성질을 이용하여 측정하는 방법

  -> pH 지시약 이용, 용액의 pH가 변하지 않아도 단백질에 의해 색조가 변하는 성질, 즉 단백오차(protein error)를 이용한다

  ① 2-[4′-hydroxyazobenzene] benzoic acid (HABA) method
  ② BCG method (bromocresol green)
  ③ BCP method (bromocresol purple)
  ④ BPB method (bromophenol blue)
  ⑤ Methyl Orange

- 염석법 (Salting-out method)

  -> 침전하기 쉬운 Globulin을 Total 혈청 단백으로부터 침전분리하여 측정하는 방법

- 혈청단백질 전기영동법 (Serum protein electrophoresis method)

  -> 등전점 차를 이용하여 혈청단백을 분획별로 분리하는 방법

■ Albumin 측정법 (색소결합법, 비색법)

- 2-[4′-hydroxyazobenzene] benzoic acid (HABA) method

  -> Albumin이 등전점보다 높은 pH에서 양이온 색소와 결합

  -> Phosphate buffer (pH 6.2)

Albumin + HABA색소 $\xrightarrow{\text{pH 6.2}}$ **Red color (480nm 에서 비색정량)**

Albumin의 isoeletronic point (IP) – pH 4.9

- BCG method

  -> Albumin이 등전점보다 낮은 pH에서 음이온 색소와 결합

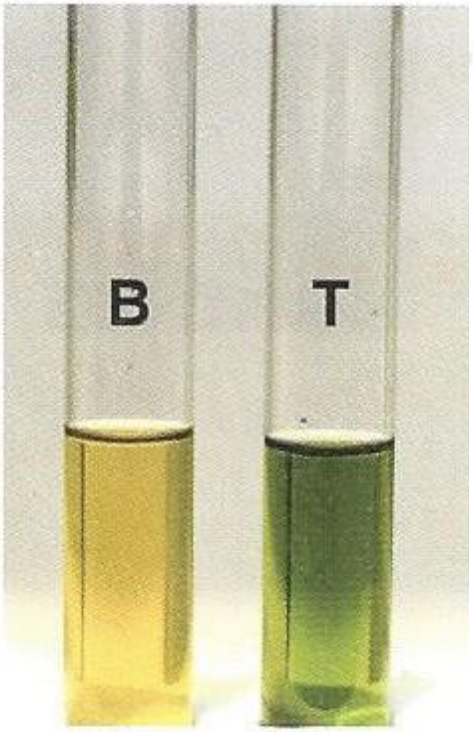
  -> Succinate Buffer (pH 4.2)

  -> Brij-35 : 시약 맹검의 흡광도를 저하, 반응액의 혼탁을 억제, 검량선이 직선성이 되도록 하기 위함

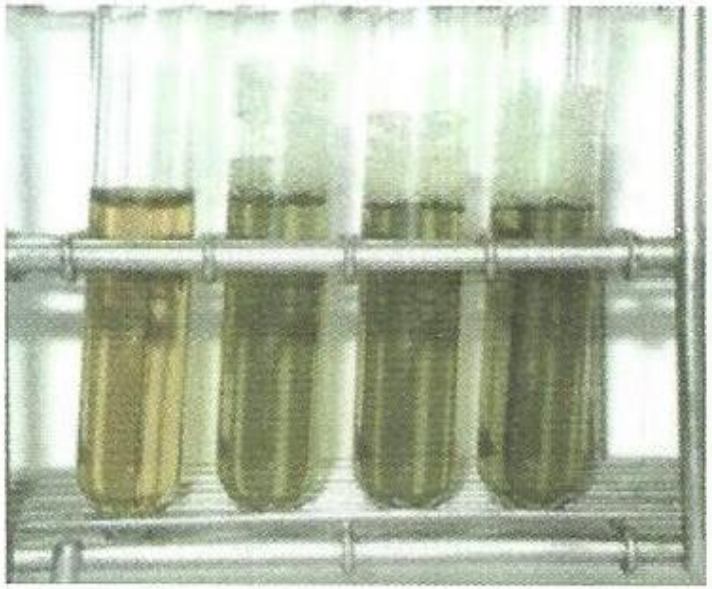
Albumin + BCG색소 $\xrightarrow{\text{pH 4.2}}$ **green color (630nm 에서 비색정량)**

Albumin의 isoeletronic point (IP) – pH 4.9

■ Albumin 측정법 (색소결합법, 비색법)



아래 그림은 알부민을 측정한 것이다. 반응의 pH는 ?



① 3.5
② 4.2
③ 4.9
④ 6.2

■ Albumin 측정법 (염석법)

- 염석 : 단백용액에 높은 농도의 염을 가하면 단백질이 물과 친화력을 잃고 단백분자 상호간에 결합(Globulin)에 의해 침전되는 현상
- 황산나트륨 (Na_2SO_4), 아황산나트륨 (Na_2SO_3), 황산암모늄 [$(NH_4)_2SO_4$]
- 단백질에 따라 용해도 차이, 알부민보다 글로불린이 저농도에서 먼저 석출
- Ether를 첨가하여 Globulin과 Albumin의 분리를 촉진할 수 있다.

Serum + Na_2SO_3 ⟶ Globulin 침전 ⟶ 원심분리 여액(알부민만 포함)
여액을 뷰렛법(비색측정) ⟶ 알부민 값이 얻어짐

- 총단백질 값 - 알부민 값 = 글로불린 값, 이로부터 알부민/글로불린비(A/G비)
- 알부민/글로불린비(Albumin/Globulin Ratio, A/G Ratio)
- 각종 이상 상태에서 알부민은 변화하지 않거나 감소 경향, 글로불린은 증가 경향.
- 많은 질환에서 A/G비는 저하(<1.0), 이는 진단에 중요한 보조정보로서 널리 이용.

■ Albumin 측정법 (염석법)

- A/G ratio 의 변화와 병태.

① A/G ratio 증가

-> 알부민 증가 : 영양과잉

-> 글로불린 감소 : 항체결핍 (무감마글로불린혈증)

② A/G ratio 불변

-> 알부민, 글로불린 증가 : 탈수증 (dehydration)

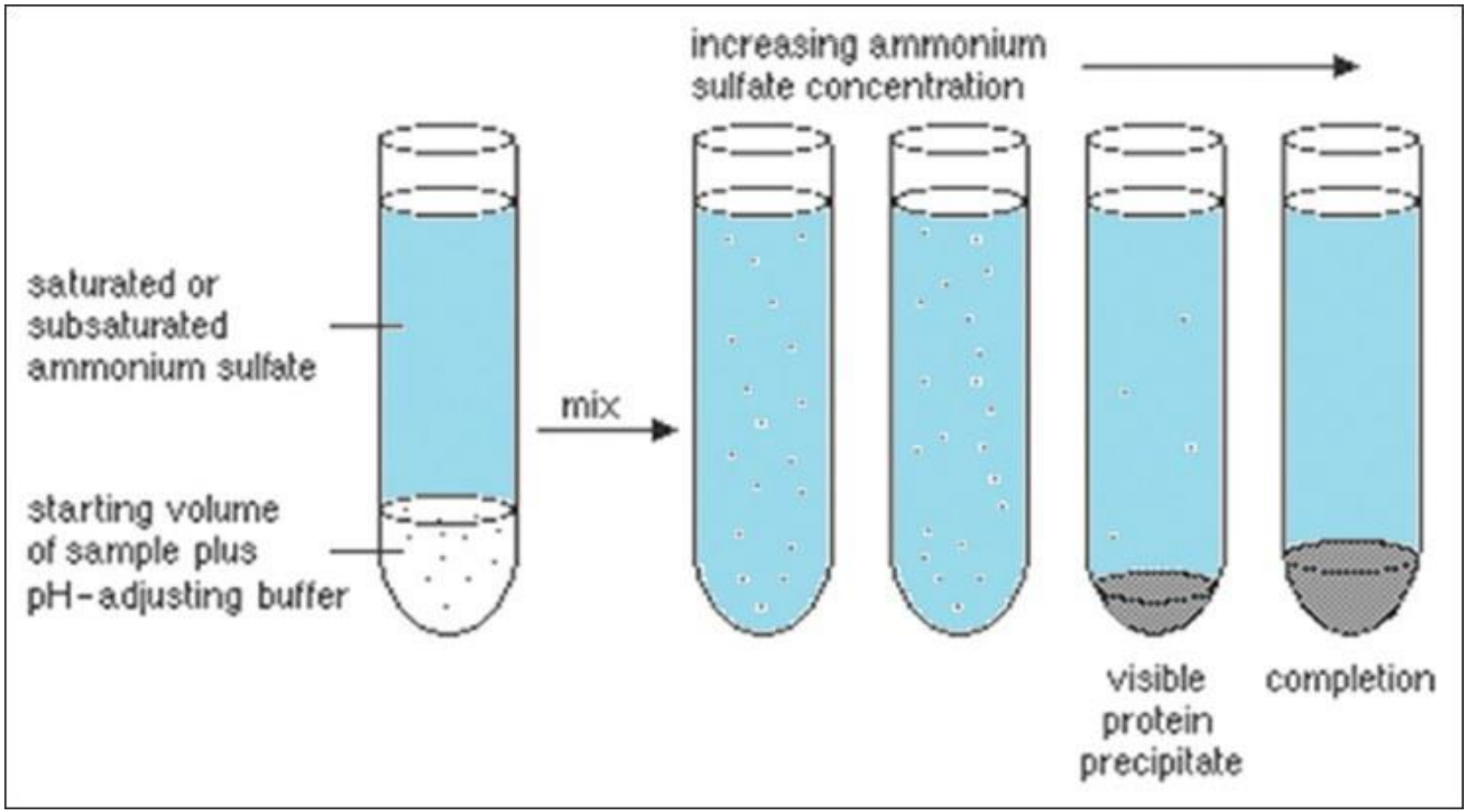
-> 알부민, 글로불린 감소 : 수혈증 (hydremia)

③ A/G ratio 감소

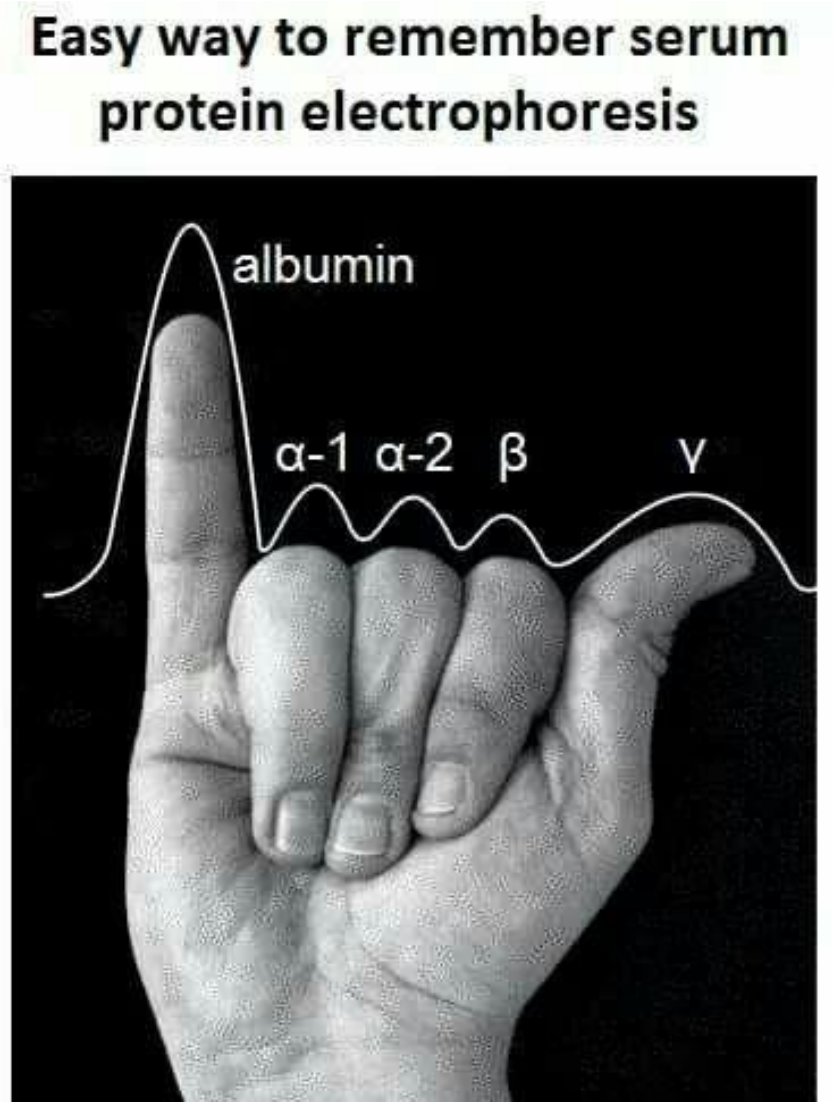
-> 알부민 감소 : 혈관외 누출 (네프로제 증후군, 단백질 누출성 위장염, 화상)

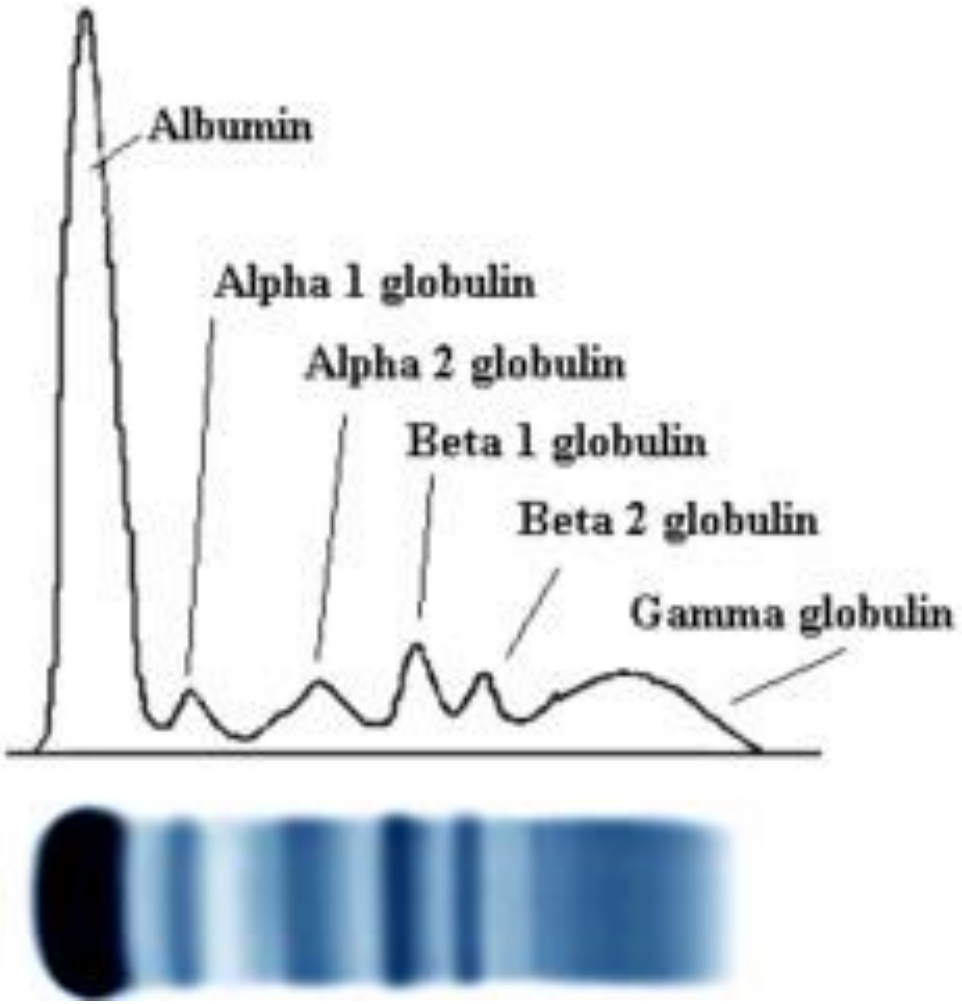
-> 글로불린 증가 : 항체 증가(감염증), 이상단백질 증가(다발성 골수종)

■ Albumin 측정법 (염석법)



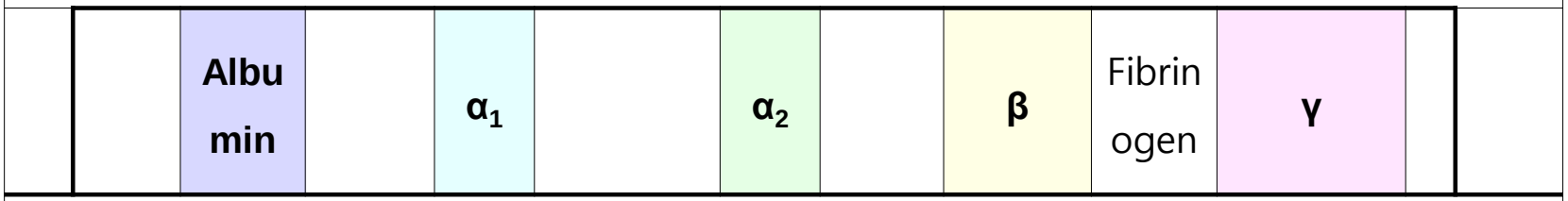
■ **혈청단백질 전기영동법 (Serum protein electrophoresis method)**





Lecture 6. Amino Acid and Protein

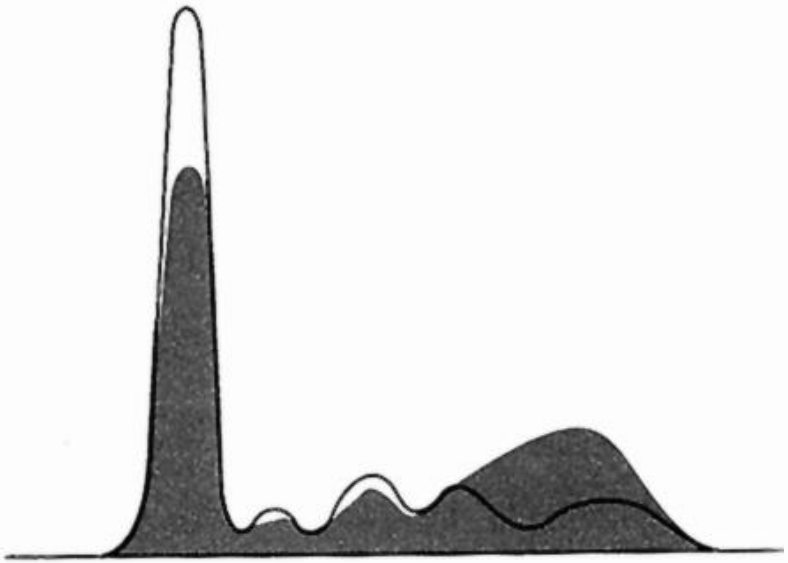
■ 혈청단백질 전기영동법 (Serum protein electrophoresis method)

전기영동시 Supporting Media (지지체)	(+)  (−)				
단백질 분획	Albumin	α_1-Globulin	α_2-Globulin	β-Globulin	γ-Globulin
정 상 치	50~65%	2~6%	4~8%	8~15%	12~20%
구 체 적 성 분	Pre-Albumin Albumin	α_1-Acid glycoprotein α_1-Antitrypsin α_1-Lipoprotein (HDL) α_1-Fetoprotein Mucoprotein	α_2-Macroglobulin Haptoglobin Ceruloplasmin Glycoprotein Prothrombin	β-Lipoprotein (LDL) Preβ-Lipoprotein (VLDL) Transferrin Hemoglobin (Hemopexin) C_3 Complement C_4 Complement CRP	IgG IgM IgA IgD IgE

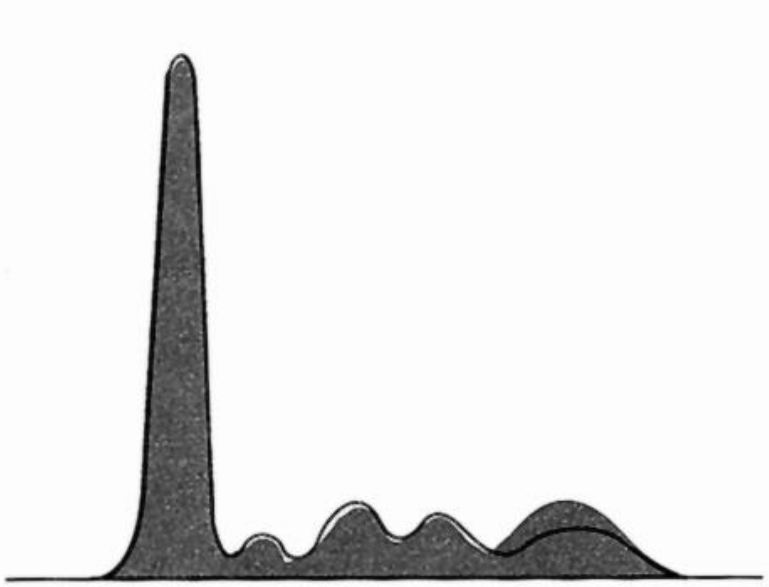
■ 혈청단백질 전기영동법 (Serum protein electrophoresis method)

- α1-산성 당단백질(α1-Acid Glycoprotein, AAG)
  -> 프로게스테론의 불활성화, 불활성 인플루엔자 바이러스에 의한 면역반응을 제어
  -> 악성종양, 염증, 스트레스 그리고 혈액질환에서 증가
- α1-항트립신(α1-Antitrypsin, AAT)
  -> 트립신이나 키모트립신의 활성 억제 작용, 플라스민 기능 억제
  -> 결손증, 폐기종, 네프로제증후군 및 영양불량 등에서 저하
- α2-마크로글로불린(α2-Macroglobulin, AMG)
  -> 플라스민, 트립신에 대한 길항작용과 성장인자에 대한 활성화 작용
  -> 네프로제증후군이나 간장애에서 상승하는 급성상반응물질
- 합토글로빈(Haptoglobin)
  -> 합토글로빈과 저분자량의 헤모글로빈이 결합, 거대분자의 합토글로빈-헤모글로빈 복합체 형성, 신사구체를 통한 헤모글로빈의 배설이 저하
  -> 전염성단핵구증, 간실질 세포장애, 혈관내 용혈시에 저하
- 트랜스페린(Transferrin, Tf)
  -> 혈청 철의 99%는 Fe-트란스페린의 형태로 존재, 이것은 철 수송체
- 세룰로플라스민(Ceruloplasmin, Cp)
  -> 구리대사에 중요한 역할, 혈청 구리(약 100μg/dL)의 90% 이상이 Cp와 결합

■ **혈청단백질 전기영동법 (Serum protein electrophoresis method)**

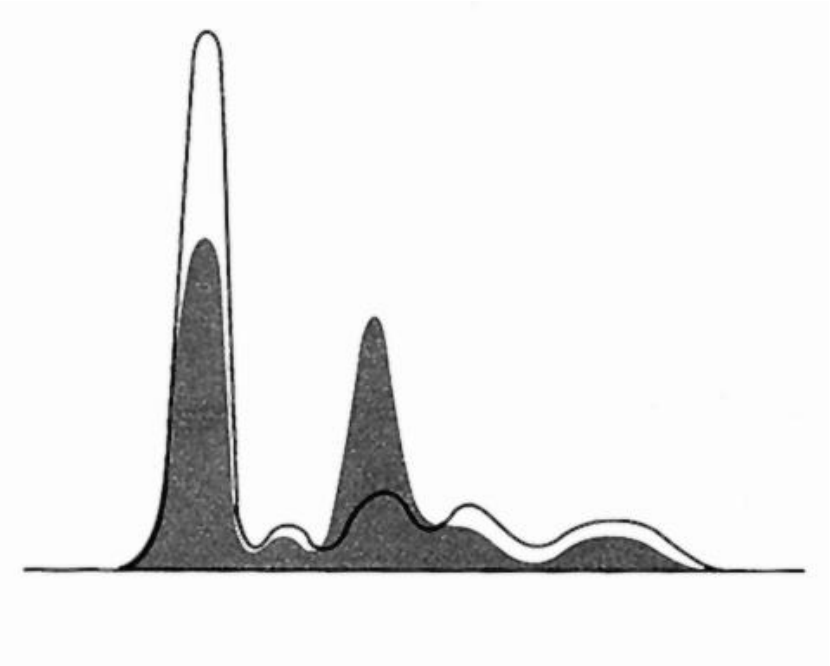


간경변증(Cirrhosis)

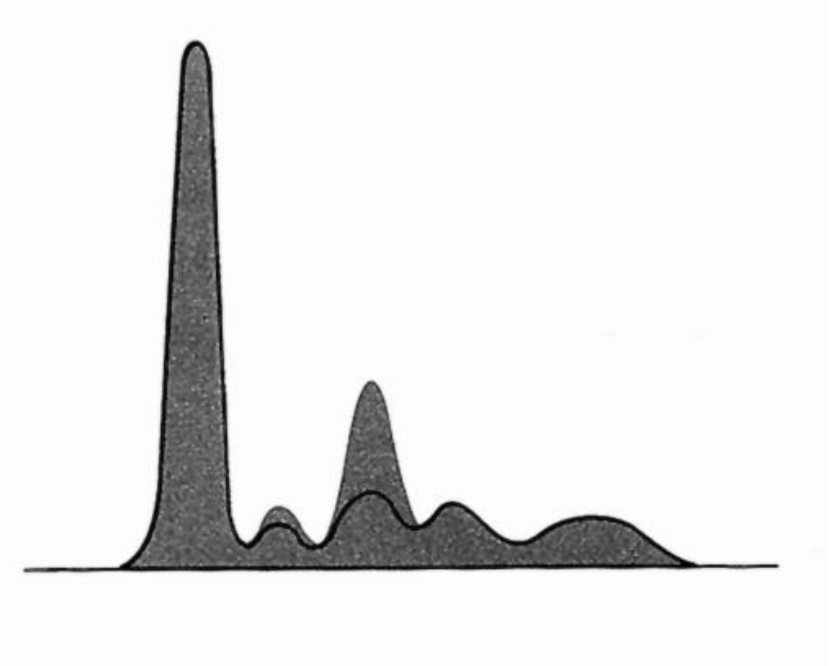


다클론성 감마글로불린장애 (Polyclonal Gammopathies)

■ **혈청단백질 전기영동법 (Serum protein electrophoresis method)**

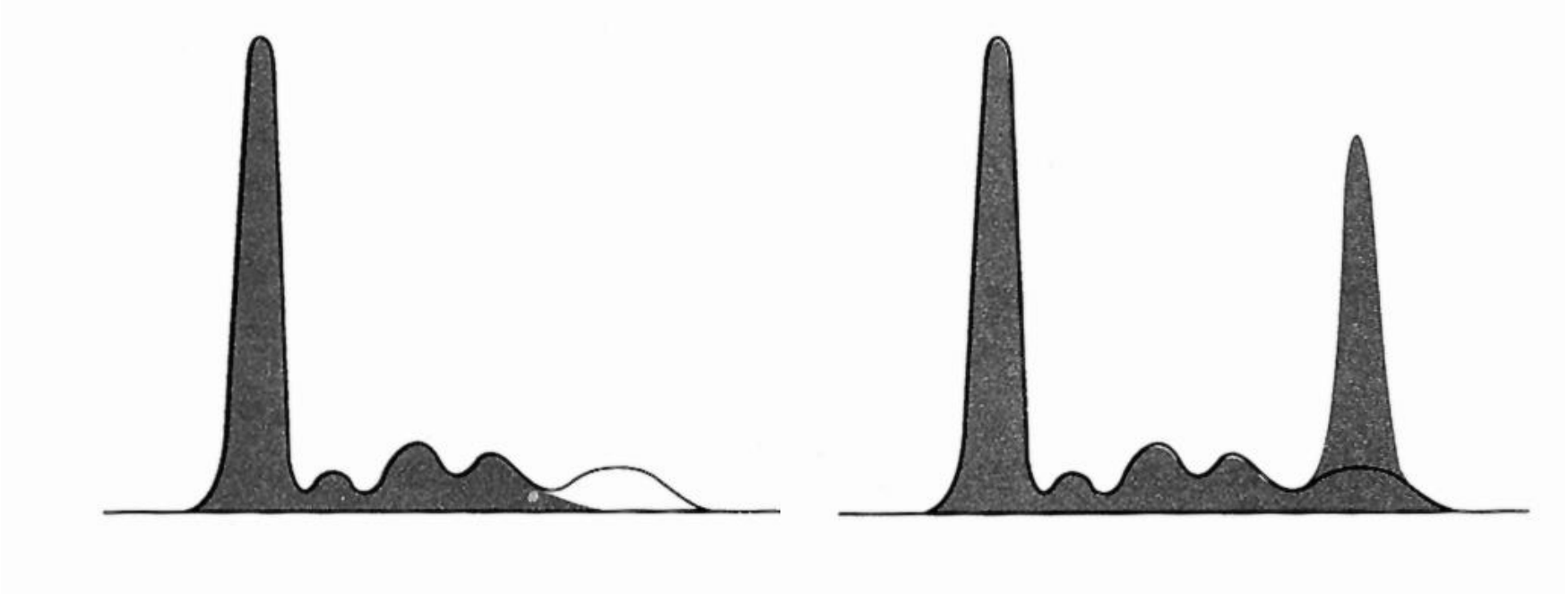


신증후군(Nephrotic Syndrome)



급성 염증(Acute Inflammation)

■ **혈청단백질 전기영동법 (Serum protein electrophoresis method)**



저감마글로불린혈증
(Hypogammaglobulinemia)

단클론성 감마글로불린장애
(Monoclonal Gammapathies)