임상 화학(Clinical Chemistry)

Lecture 9. Enzyme

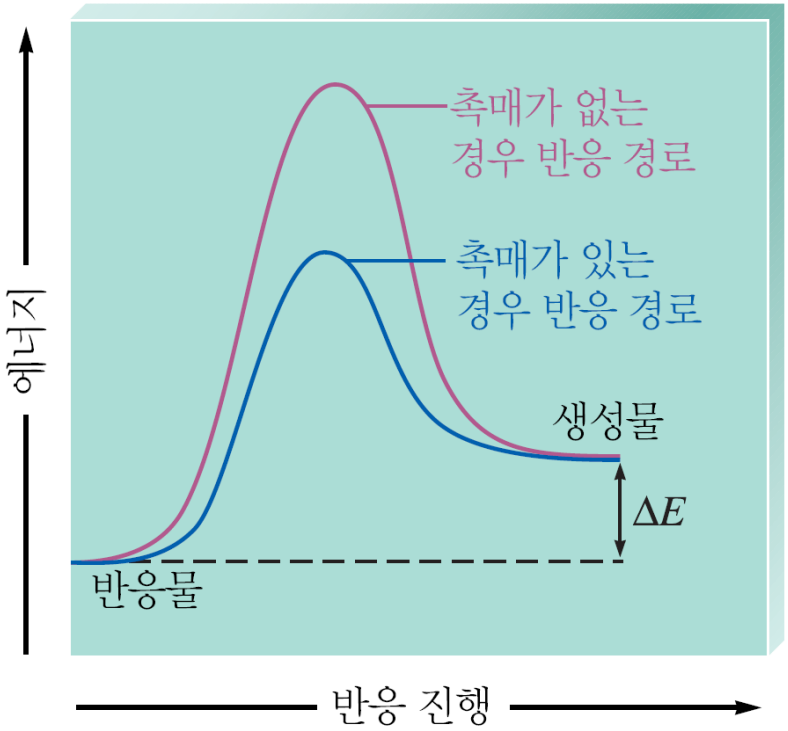
Prof. Choi Jeong Su
E-mail : guesschjs@korea.ac.kr
H.P : 010-6314-3910

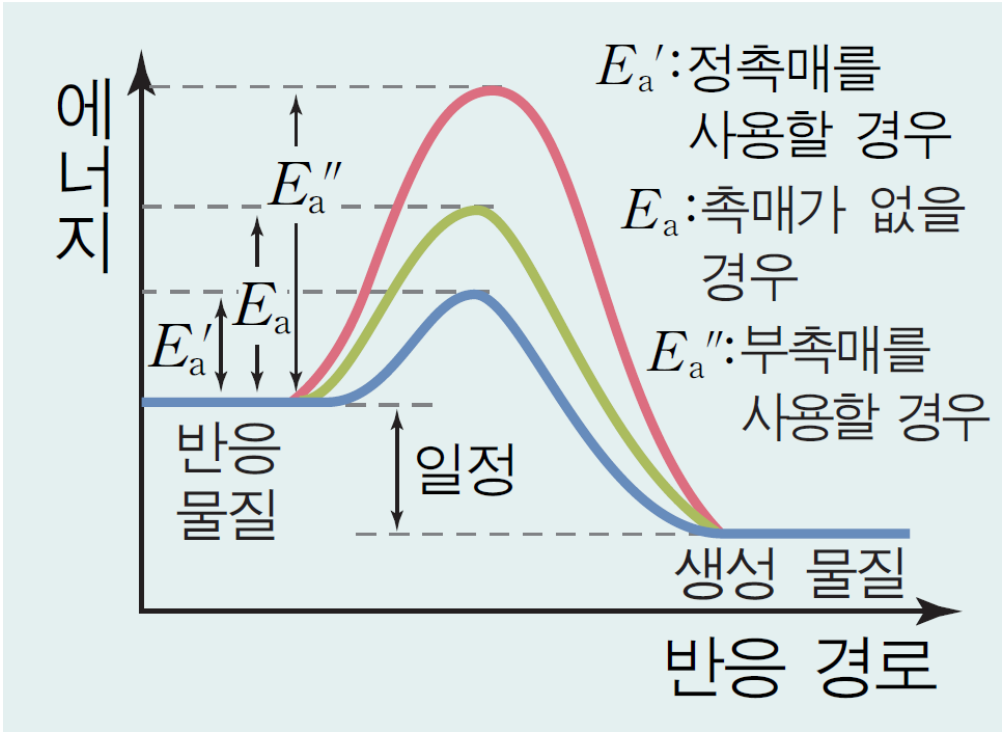
Lecture 9. Enzyme

■ 효소 (Enzyme)

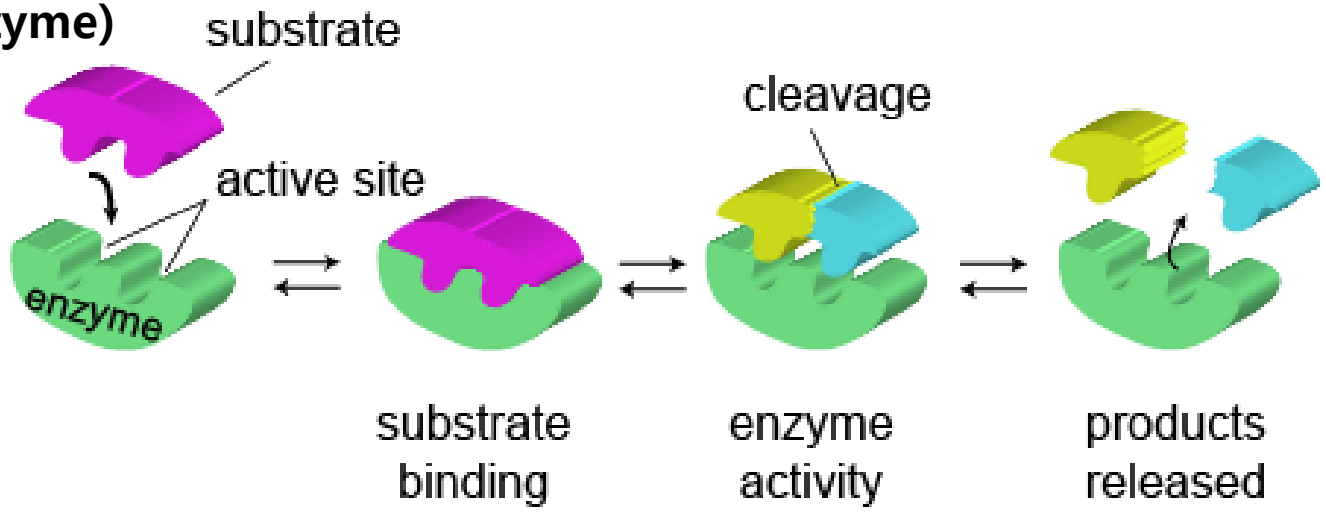
- 효소는 체내 세포에 존재하는 생물학적 촉매(biological catalysts)
- 활성화 에너지를 낮추어 효소가 없는 반응에 비해 반응 속도를 10^6-10^{12} 배 증가
- 단백의 일종으로 작용에는 Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} 등의 주로 2가 금속 이온과 Cofactor가 필요
- 효소의 특성
  ① 반응 도중에 변화되거나 소모되지 않는다.
  ② 계속 재사용 되므로 적은 양만 요구된다
  ③ 반응속도를 가속화할 뿐 평형상수를 바꾸지는 않는다
- 기질 (S: Substrate)
  -> 효소의 작용을 받는 물질을 총칭 (반응물)

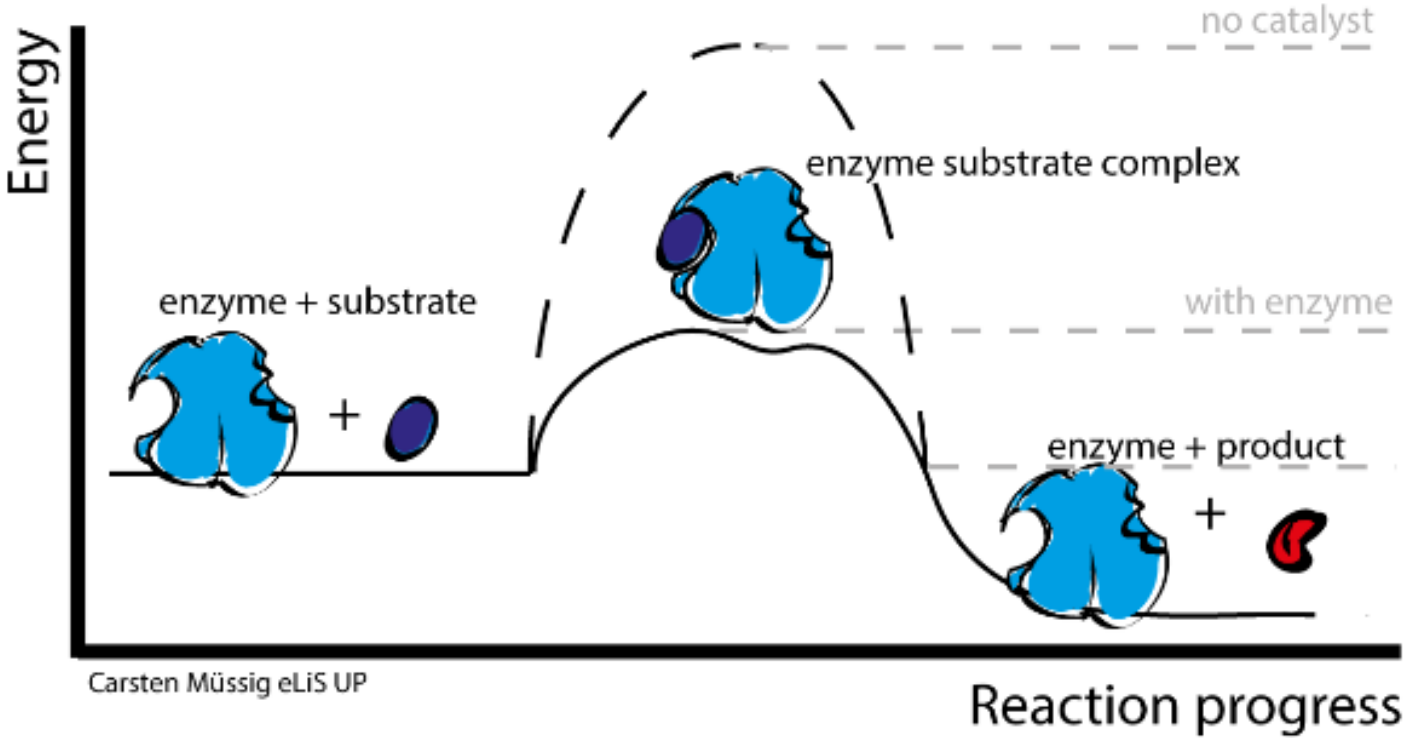
■ 효소 (Enzyme)


촉매가 없는
경우 반응 경로
촉매가 있는
경우 반응 경로
생성물
ΔE
반응물
에너지
반응 진행


에너지
E_a''
E_a
E_a'
반응
물질
일정
E_a':정촉매를
사용할 경우
E_a:촉매가 없을
경우
E_a'':부촉매를
사용할 경우
생성 물질
반응 경로

■ **효소 (Enzyme)**


substrate
active site
enzyme
cleavage
substrate binding
enzyme activity
products released


Energy
no catalyst
enzyme substrate complex
enzyme + substrate
with enzyme
enzyme + product
Carsten Müssig eLiS UP
Reaction progress

Lecture 9. Enzyme

■ 효소 (Enzyme)

- 효소의 단위

  -> 국제단위(International Unit : IU = 1U/L)

  * 최적 pH조건일 때 25℃에서 1분간 1㎛㏖의 기질을 생성물로 변화시킨 효소량

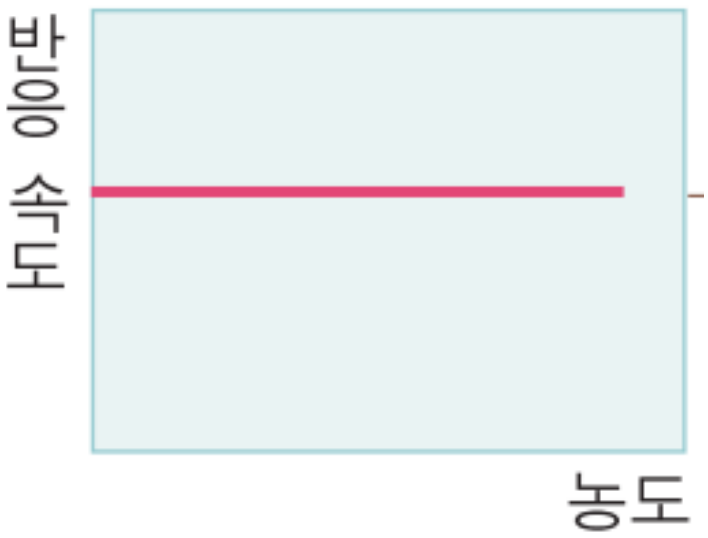
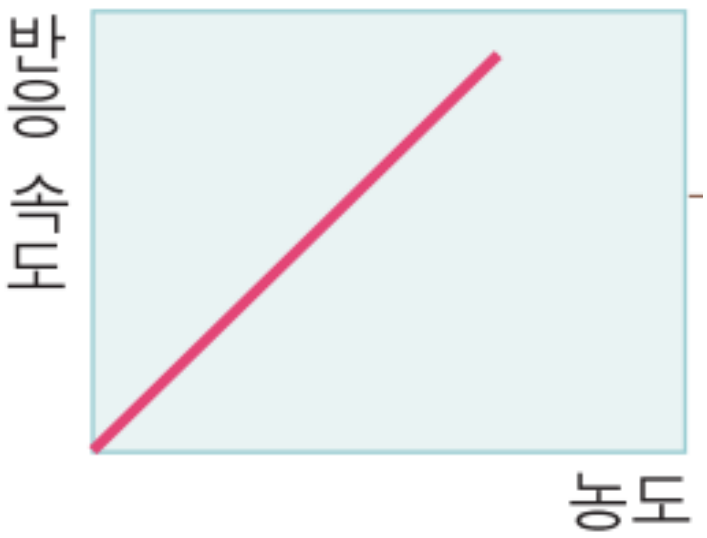
  -> SI 단위 (Katal)

  * 1Kat = 1초에 1mol의 기질을 생성물로 전환 시킬 수 있는 효소량

  -> UV unit (Karmen Unit)

  * 25℃, 340nm에서 혈청 1ml의 흡광도를 0.001이 변화시키는 효소량

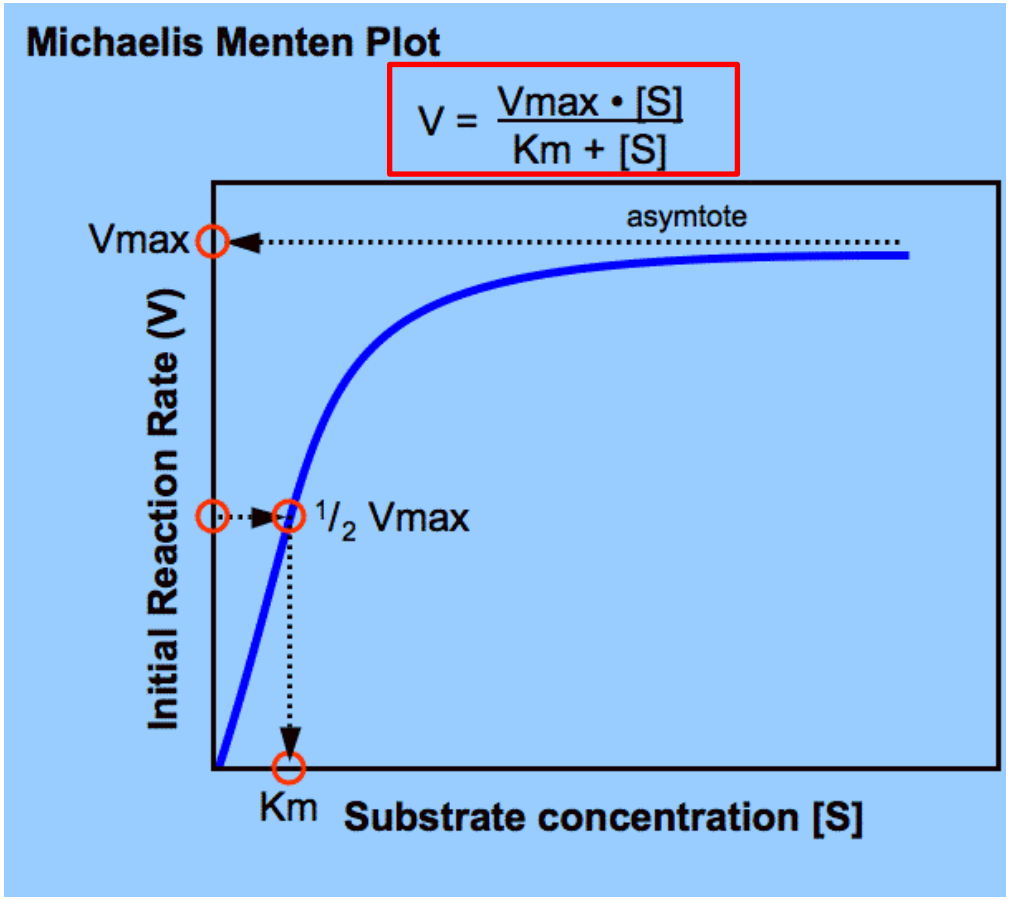
■ 효소 (Enzyme)

반응	0차	1차
농도에 따른 반응속도		

■ 효소 (Enzyme)

- 1차 반응 구간
  -> 반응 초기 기질의 양이 미량으로 존재할 때는 기질의 양이 증가할 수록 반응속도가 비례하여 증가

- 0차 반응 구간
  -> 기질의 농도가 일정 수준 이상 도달하면 반응속도가 증가하지 않는다. (Vmax)
  -> 임상검사에서 효소 농도만 반응에 영향을 주는 0차 반응 동역학 구간에서 효소를 측정한다.



- Michaelis 상수 (Km)
  -> 최대속도의 1/2속도를 얻을 수 있는 기질농도, 흔히 몰농도로 나타냄
  -> Km이 작을 수록 효소는 기질과 친화성이 높다

Lecture 9. Enzyme

■ 효소 (Enzyme)의 계통적 분류 (Enzyme Code)

① 산화환원효소 (Oxidoreductase)

- 두 기질 사이에 산화 환원반응 촉매 (LDH=LD, G6PD, GOD, POD)

② 전이효소 (Transferase)

- 기능기의 전이를 촉매 (GOT=AST, GPT=ALT, CPK=CK, r-GT=r-GTP)

③ 가수분해효소 (Hydrolase)

- 화합물의 가수분해를 촉매 (AMS, LPS, ACP, ALP)

④ 분해효소 (Lyase)

- 가수분해와 산화 이외의 다양한 화학결합을 끊는 것을 촉매 (ALD=ALS)

⑤ 이성화효소 (Isomerase)

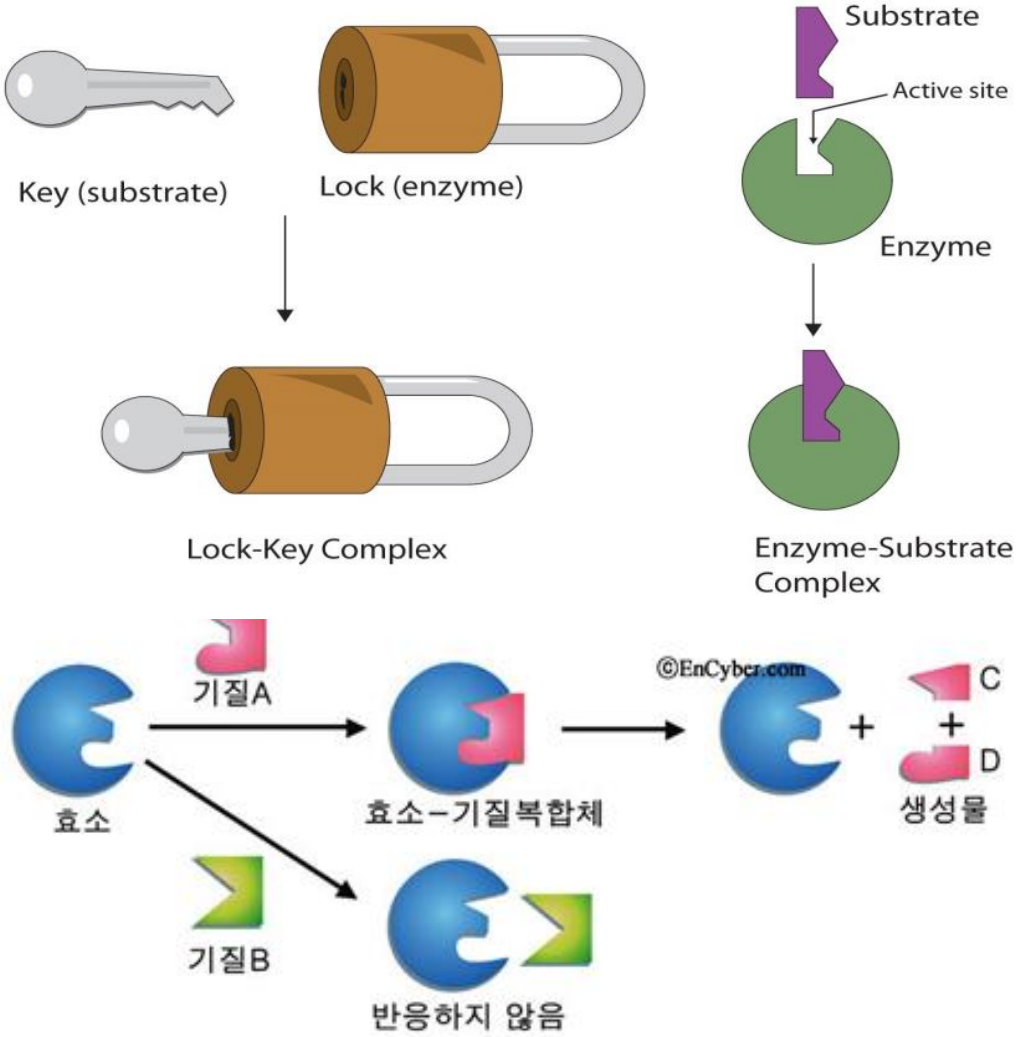
- 생화학적 구조의 재배열을 촉매 (PHI=PhosphoHexose Isomerase)

⑥ 합성효소 (Ligase)

- ATP 분해에 의해 두 물질의 축합반응을 촉매

■ 효소 (Enzyme)의 기질 특이성

- 효소는 일반적으로 특정의 기질에 대해서만 작용하는 성질(Lock and Key 이론)



■ 효소작용에 영향을 주는 요인

① 시간 (Time)

- 효소량에 비해 기질량이 충분하면 반응속도는 단위시간에 비례

② 온도 (Temperature)

- 효소는 열에 불안정하여 저온, 고온에서 불활성 된다.
- 10 ℃ 이상에서 효소의 반응속도는 현저히 증가한다. (10 ℃ 상승 당 반응속도 2배)
- 최적온도(=지적온도) : 가장 빠른 반응속도가 얻어지는 온도, 보통 37 ℃

③ pH

- 최적pH(=지적pH) : 최고 효소활성을 보이는 pH, 보통 pH 7.0

④ 기질의 농도 (Substrate Concentration)

- 일차반응에서는 기질의 양에 따라 반응속도가 변화한다
- 영차반응에서는 기질의 양과 관계없이 반응속도는 일정하다.

■ 효소작용에 영향을 주는 요인

⑤ 효소의 농도 (Enzyme Concentration)

- 효소의 농도에 따라 반응속도는 증가한다

⑥ Activator의 유무

- 효소의 활성을 촉진하는 촉진제 유무

⑦ Inhibitor의 유무

- 효소의 활성을 저해하는 저해제 유무
- 경쟁적 저해제 (Competitive inhibitor)

  * 효소의 활성부위에 기질과 경쟁적으로 결합함으로서 반응을 저해

- 비경쟁적 저해제 (Noncompetitive inhibitor)

  * 효소의 활성부위를 변화시켜 기질이 결합할 수 없도록 방해하는 저해제

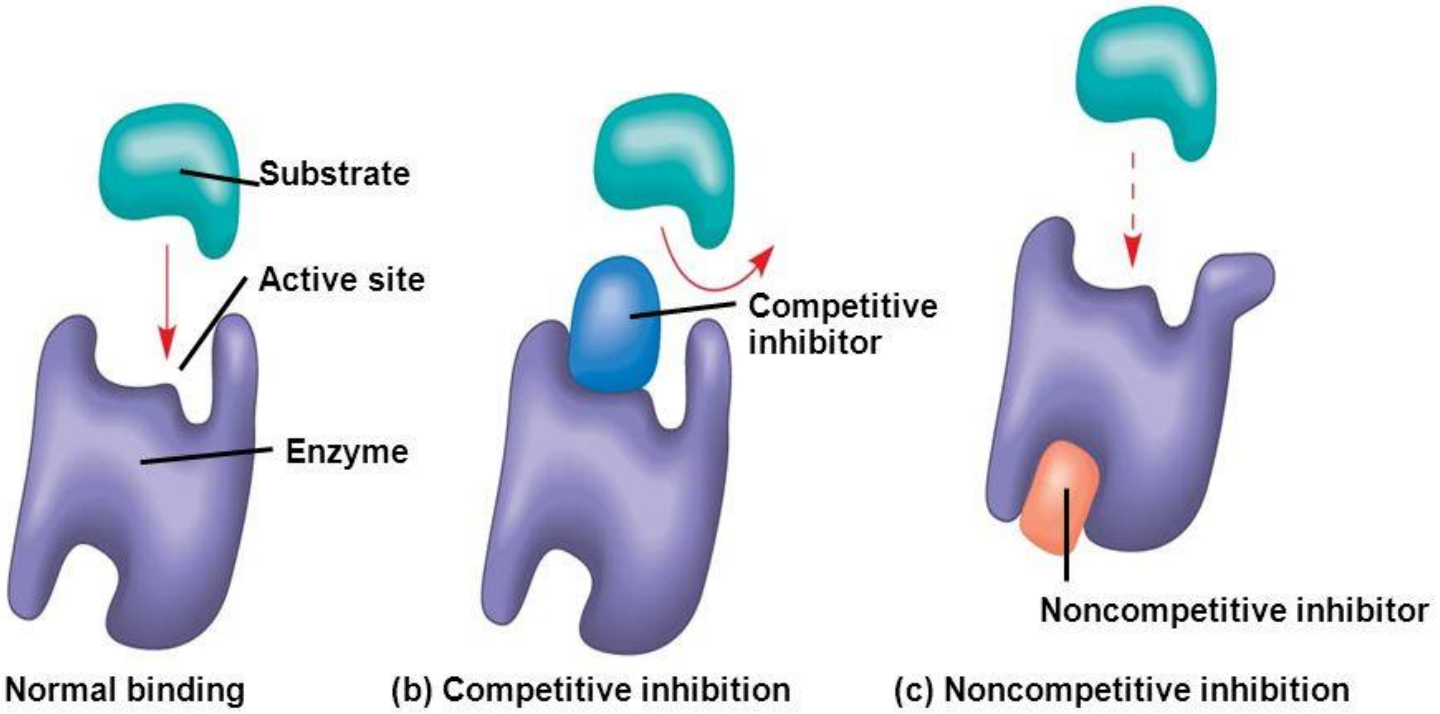
⑧ Cofactor의 유무

- 효소의 활성을 보이기 위해 필요한 무기 또는 유기 저분자 화합물

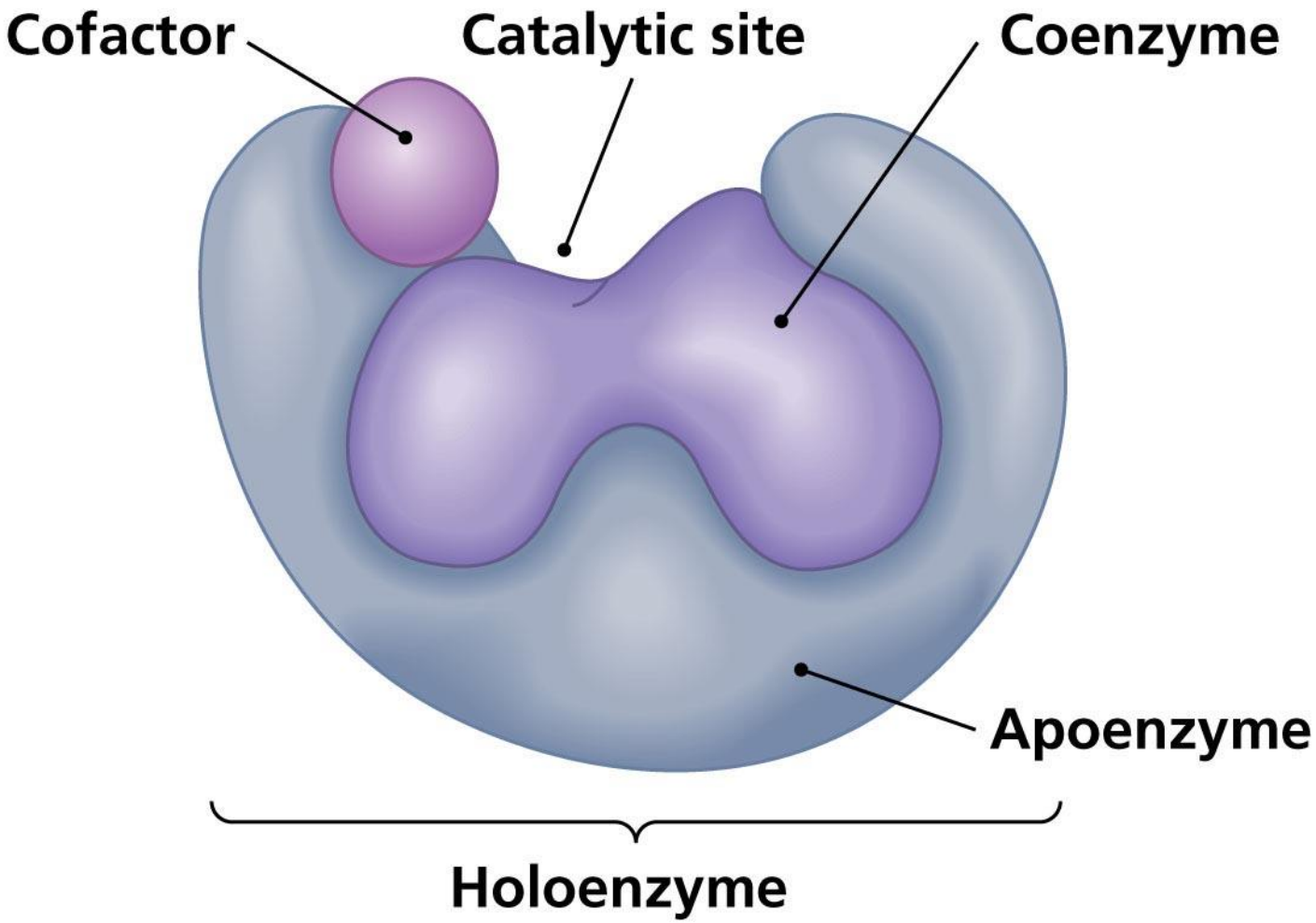
■ 효소작용에 영향을 주는 요인-Inhibitor

Enzyme Inhibitors

- **Competitive inhibitors** bind to the active site of an enzyme, competing with the substrate
- **Noncompetitive inhibitors** bind to another part of an enzyme, causing the enzyme to change shape and making the active site less effective
- Examples of inhibitors include toxins, poisons, pesticides, and antibiotics

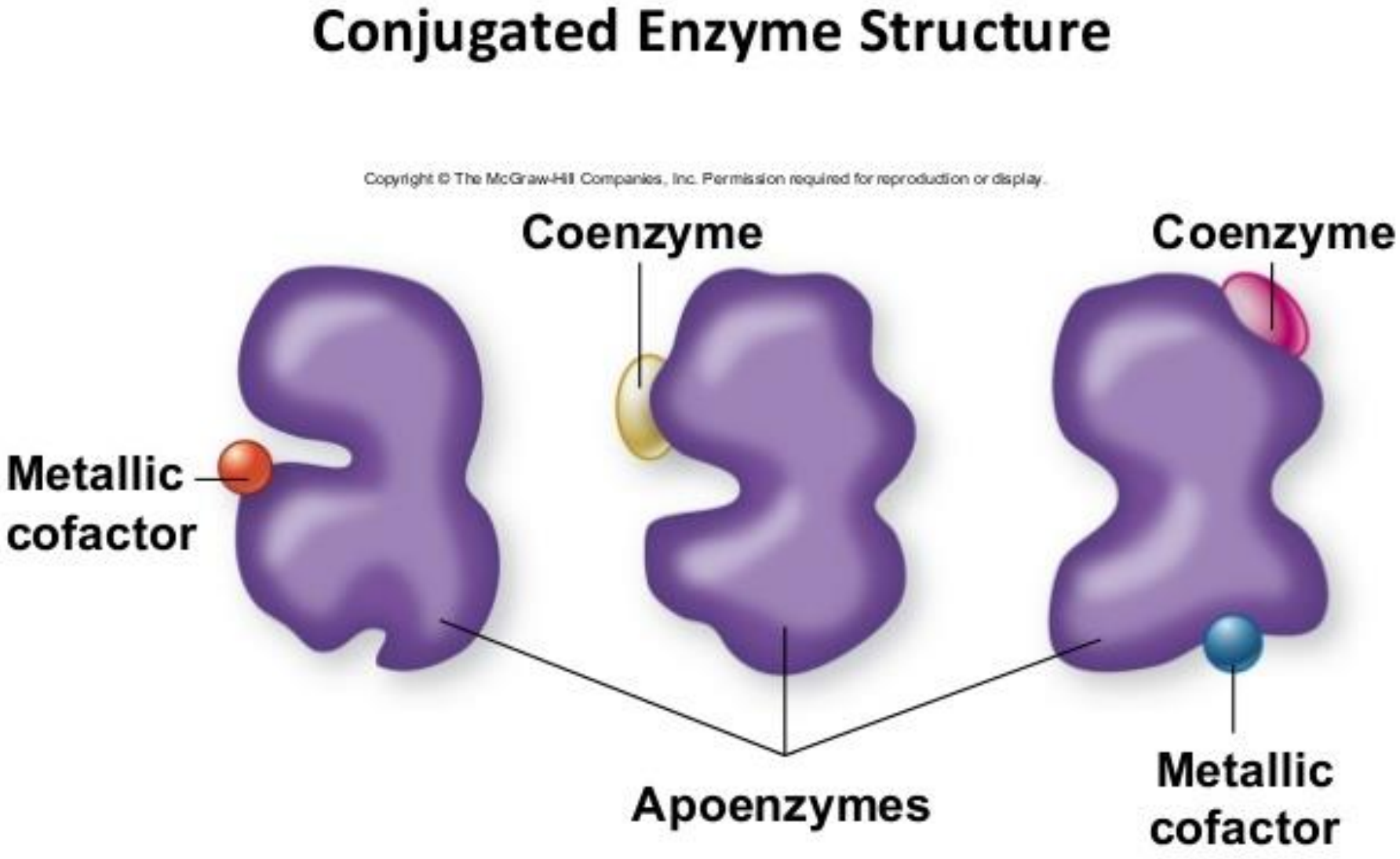


■ **효소작용에 영향을 주는 요인 - Cofactor**



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

■ 효소작용에 영향을 주는 요인 - Cofactor



■ Lactic Dehydrogenase (LDH, LD)

- 젖산탈수소효소는 수소 수용체인 NAD 존재 하에 Lactic acid와 Pyruvic acid의 가역적 이행반응을 촉매하는 산화환원 효소
- 심장, 심근, 간, 골격근 등에서 생성
- 혐기적 해당계의 최종단계에 관여하는 중요한 효소

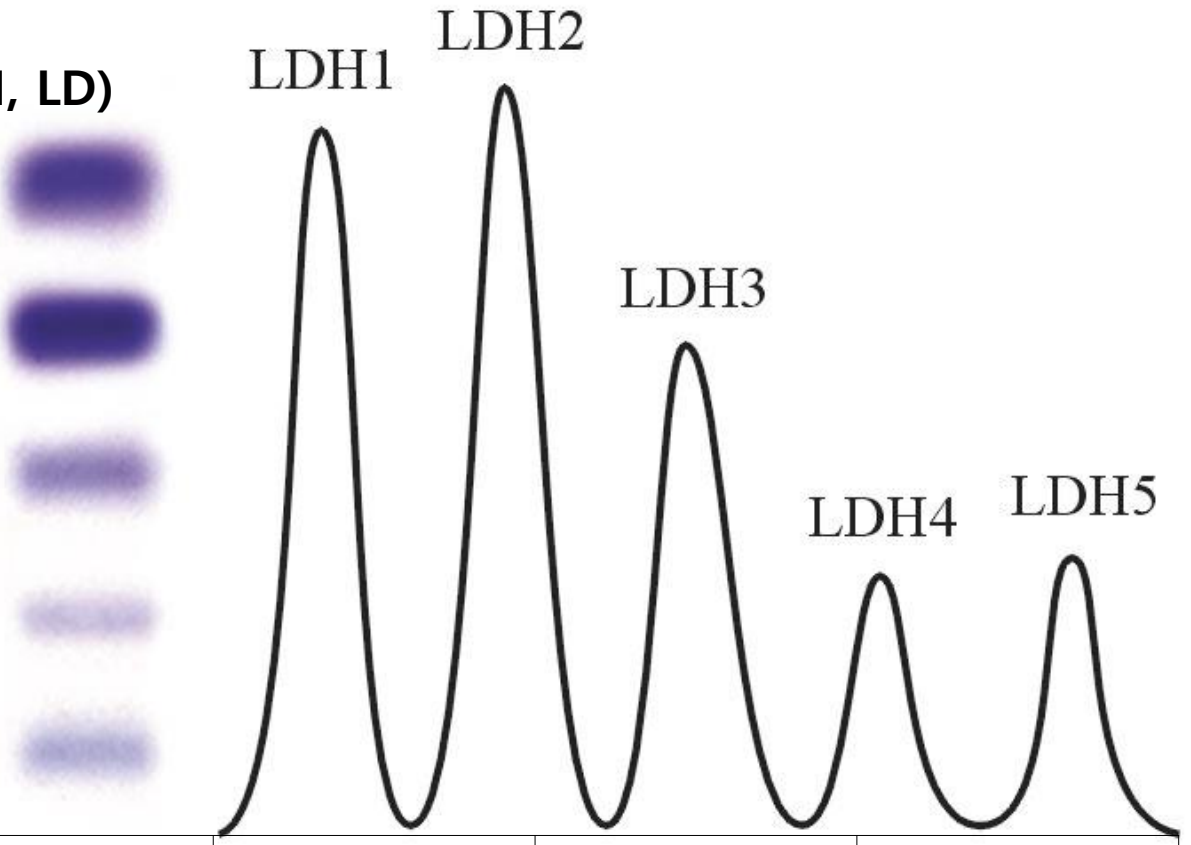
$$\text{L-Lactate} + \text{NAD}^+ \underset{\text{pH 7.4~7.8}}{\overset{\text{pH 8.8~9.8}}{\rightleftharpoons}} \text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

	정반응 (Lactic acid → Pyruvic acid)	역반응 (Pyruvic acid → Lactic acid)
최적 pH	pH 8.8 ~ 9.8 (pH 9.5)	pH 7.4 ~ 7.8 (pH 6.0 ~ 8.5)
기질	Lactic acid	Pyruvic acid
보조효소	NAD	NADH

Lecture 9. Enzyme

■ Lactic Dehydrogenase (LDH, LD)

- LDH는 2개의 Subunit인 심근형(H형), 골격근형(M형)으로 이루어진 4량체
- 정상치
  - -> 200~400 Unit/L
  - -> 신생아 > 성인
  - -> 출생 시 성인의 약 2배
    14세 이후 성인치



Isoenzyme	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5
Subunit	HHHH형	HHHM형	HHMM형	HMMM형	MMMM형
정상치	21 ~ 33%	36 ~ 46%	23 ~ 32%	1 ~ 6%	0 ~ 5%
유래장기	심장 , 적혈구	신장 , 적혈구	폐 , 비장 , 갑상선	위 , 종양 , 태반	간 , 골격근
주요질환	심근경색 용혈성 질환	용혈성 질환 * 혈관내 용혈 * 악성 빈혈 * 용혈성 빈혈 심근경색	폐경색	전이암	급성간염

■ Lactic Dehydrogenase (LDH, LD) 측정

- UV법

① Wacker법 (정반응 이용 : Lactic acid → Pyruvic acid)

$$\text{L-Lactate} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Serum(LDH)}} \text{Pyruvate} + NADH + H^+$$

* 340nm에서 NADH 증가량 측정

② Wroblewski-Ladue법 (역반응 이용 : Pyruvic acid → Lactic acid)

$$\text{Pyruvate} + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{Serum(LDH)}} \text{L-Lactate} + NAD^+$$

* 340nm에서 NADH 감소량 측정

■ Lactic Dehydrogenase (LDH, LD) 측정

- 비색법

① Babson법 (정반응 이용 : Lactic acid → Pyruvic acid)

$$\text{L-Lactate} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Serum(LDH)}} \text{Pyruvate} + NADH + H^+$$

$$NADH + \text{Tetrazolium, PMS} \xrightarrow{HCl} \text{Formazan (Red, 570nm)}$$

② King법 (정반응 이용 : Lactic acid → Pyruvic acid)

$$\text{L-Lactate} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Serum(LDH)}} \text{Pyruvate} + NADH + H^+$$

$$\text{Pyruvic acid} + \text{2,4 DNPH} \xrightarrow{NaOH} \text{Hydrazone (Brown, 500nm)}$$

③ Cabaud-Wroblewski법 (역반응 이용 : Pyruvic acid → Lactic acid)

$$\text{Pyruvate} + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{Serum(LDH)}} \text{L-Lactate} + NAD^+$$

$$\text{남은 Pyruvate} + \text{2,4 DNPH} \xrightarrow{NaOH} \text{Hydrazone (Brown, 500nm)}$$

■ Creatine Kinase (CK, Creatine phosphokinase=CPK)

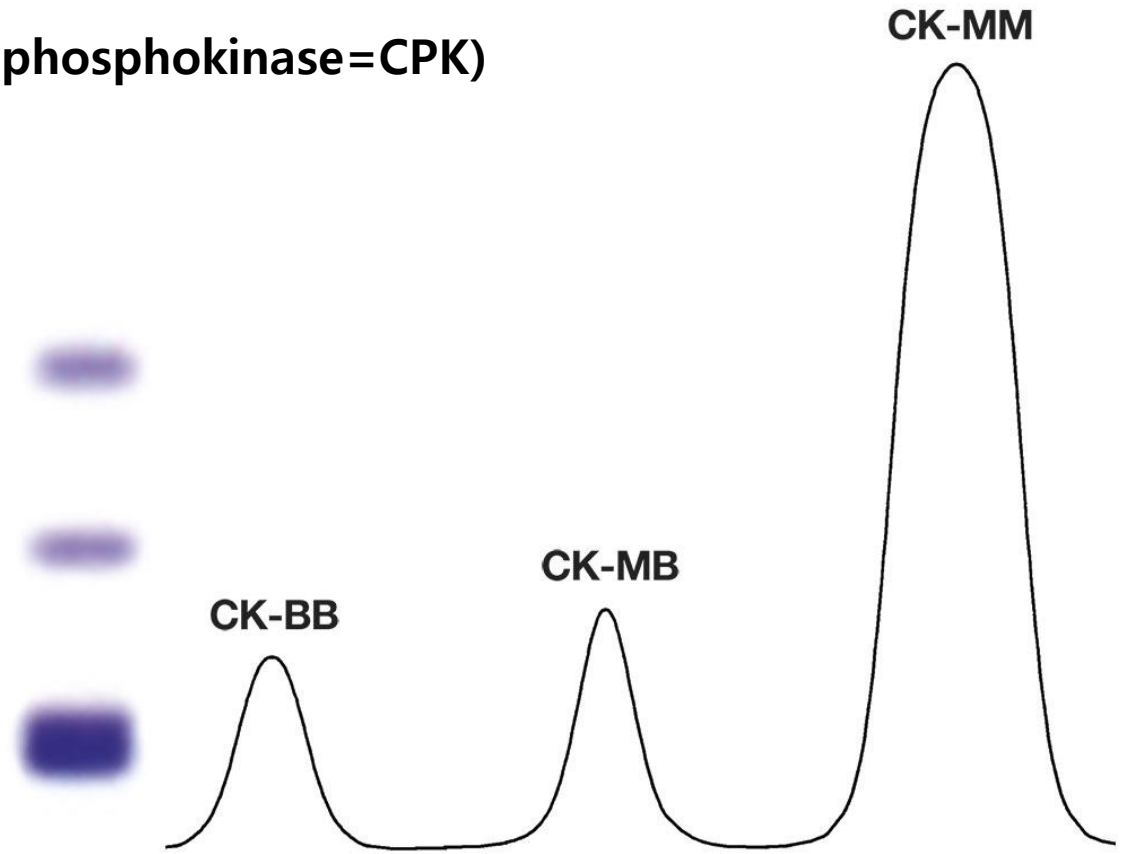
- ATP의 인산기를 Creatine으로 전이하는 정반응과 Creatine Phosphate의 인산기를 ADP로 전이하는 역반응을 촉매하는 전이효소
- 골격근, 심근, 뇌에 특이적으로 많이 포함
- 근육이나 뇌질환 진단 지표 (심근경색시 제일 먼저 증가하는 효소)

$$\text{Creatine} + \text{ATP} \underset{\text{pH 7.4, } Mg^{2+}}{\overset{\text{pH 9.0, } Mg^{2+}}{\rightleftharpoons}} \text{Creatine-P} + \text{ADP}$$

	정반응 (Creatine → Creatine-P)	역반응 (Creatine-P → Creatine)
최적 pH	pH 8 ~ 9 (pH 9.0)	pH 6 ~ 7 (pH 7.4)
기질	Creatine	Creatine Phosphate
보조효소	ATP	ADP

■ Creatine Kinase (CK, Creatine phosphokinase=CPK)

- CK는 2개의 Subunit인
  뇌형(B형), 골격근형(M형)
  으로 이루어진 2량체
- 정상치
  -> ♂ 25 ~ 130 Unit/L
  -> ♀ 20 ~ 120 Unit/L



Isoenzyme	CK-BB (= CPK Ⅰ)	CK-MB (= CPK Ⅱ)	CK-MM (= CPK Ⅲ)
정상치	CK-BB < 1%	CK-MB < 5%	CK-MM > 94%
유래장기	뇌 (신경)	심근	골격근
주요질환	악성종양 , 뇌손상	심근경색	총 CK가 상승하는 모든 질환

■ Creatine Kinase (CK, Creatine phosphokinase=CPK) 측정

- UV법 (역반응 이용 : Cr-P → Cr)

① Rosalki법

$$\text{Creatine-P} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{Serum(CK)}} \text{Creatine} + \text{ATP}$$

$$\text{ATP} + \text{Glucose} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{G-6-P} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G6PD}} \text{6-Phosphoglunate} + \text{NADPH}$$

* 340nm에서 NADPH 증가량 측정

- 비색법 (정반응 이용 : Cr → Cr-P)

① Nuttal-Wedin법

$$\text{Creatine} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Serum(CK)}} \text{Creatine-P} + \text{ADP}$$

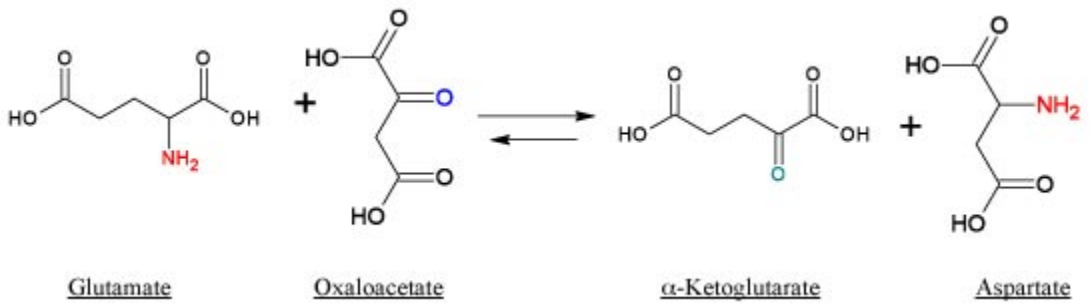
$$\text{ADP} + \text{PhosPhoenolpyruvate} \xrightarrow{\text{PyruvateKinase}} \text{Pyruvate} + \text{ATP}$$

$$\text{Pyruvic acid} + \text{2,4 DNPH} \xrightarrow{\text{NaOH}} \text{Hydrazone (Brown, 500nm)}$$

■ Aspartate Aminotransferase & Alanine Aminotransferase (AST & ALT)

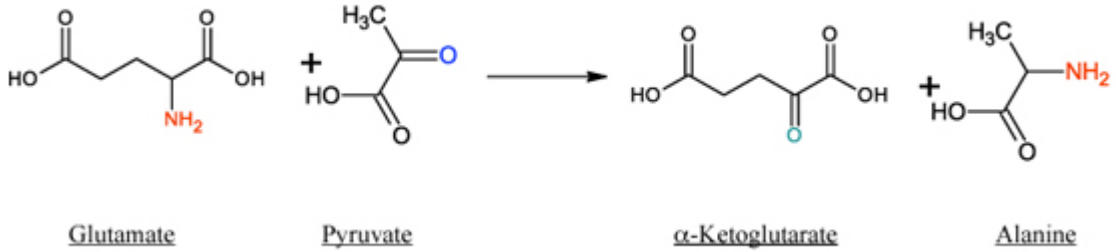
- Amino acid(Aspartate, Alanine)와 Keto acid(ketoglutarate) 사이 Amino기 전이효소
- AST = GOT (Glutamic Oxaloacetic Transaminase)

-> Aspartate + α-Ketoglutarate $\overset{\text{AST = GOT}}{\rightleftharpoons}$ Glutamate + Oxaloacetate



- ALT = GPT (Glutamic Pyruvic Transaminase)

-> Alanine + α-Ketoglutarate $\overset{\text{ALT = GPT}}{\rightleftharpoons}$ Glutamate + Oxaloacetate



■ Aspartate Aminotransferase & Alanine Aminotransferase (AST & ALT)

- AST, ALT는 심근, 간에 많이 분포

Enzyme	AST		ALT	
최적pH	정반응 pH 7.4	역반응 pH 8.0~8.5	정반응 pH 7.4	역반응 pH 8.0~8.5
기질	Aspartate, α-Ketoglutarate		Alanine, α-Ketoglutarate	
주요질환	간질환, 심근경색		간질환, 심근경색	
비교	심근경색 : AST > ALT		간질환 : AST < ALT	

- 정상치

  -> AST : 13~40 IU/L

  -> ALT : 7~40 IU/L

■ Aspartate Aminotransferase & Alanine Aminotransferase (AST & ALT) 측정

- UV법 (Karmen 법)

① AST (GOT)

$$\text{Aspartate} + \alpha\text{-Ketoglutarate} \xrightarrow{\text{Serum(AST)}} \text{Glutamate} + \text{Oxaloacetate}$$

$$\text{Oxaloacetate} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{MalateDehydrogenase(MDH)}} \text{Malate} + \text{NAD}^+$$

* 340nm에서 NADH의 감소량을 측정

② ALT (GPT)

$$\text{Alanine} + \alpha\text{-Ketoglutarate} \xrightarrow{\text{Serum(ALT)}} \text{Glutamate} + \text{Pyruvate}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{LactateDehydrogenase(LDH)}} \text{Malate} + \text{NAD}^+$$

* 340nm에서 NADH의 감소량을 측정

■ Aspartate Aminotransferase & Alanine Aminotransferase (AST & ALT) 측정

- 비색법 (Reitman-Frankel법)

① AST (GOT)

$$\text{Aspartate} + \alpha\text{-Ketoglutarate} \xrightarrow{\text{Serum(AST)}} \text{Glutamate} + \text{Oxaloacetate}$$

$$\text{Oxaloacetate} + \text{2,4 DNPH} \xrightarrow{\text{NaOH}} \text{Hydrazone (Brown, 500nm)}$$

② ALT (GPT)

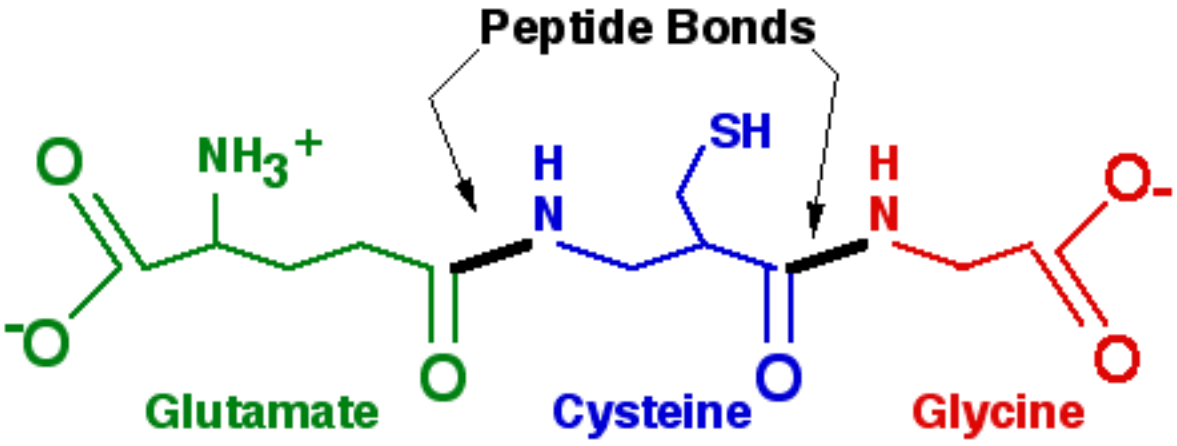
$$\text{Alanine} + \alpha\text{-Ketoglutarate} \xrightarrow{\text{Serum(ALT)}} \text{Glutamate} + \text{Pyruvate}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{2,4 DNPH} \xrightarrow{\text{NaOH}} \text{Hydrazone (Brown, 500nm)}$$

■ Gamma Glutamyl Transpeptidase (γ-GTP)

- γ-GTP는 γ-Glutamylpeptide를 γ-Glutamyl기와 Peptide Chain으로 가수분해하여 γ-Glutamyl기를 여러 Amino acid나 Peptide로 이전시키는 전이효소
- 간, 담도계 질환과 관련된 효소

Glutathione + Amino acid $\xrightarrow{\text{γ-GTP}}$ γ-glutamyl-peptide + L- cysteinylglycine



■ Gamma Glutamyl Transpeptidase (γ-GTP) 측정

- 뼈질환과 간질환 구별에 이용
- 신생아가 성인보다 6~7배 높고 출생 5~7개월에 성인치

측정법	Orlowski 법	송합법	Goldberg 법	L-γ-G-3-C-4-H 기질 이 용 법
원리	Serum (γ-GTP) ↓ 합성기질 + Glycylglycine ⟶ γ-Glutamyl-Glycylglycine + 생성물			
	생성물 + 정색시약 → Color			
합성기질	γ-Glutamyl-*p*-Nitroanilide	γ-Glutamyl-β-Naphthylamide	γ-Glutamyl-*p*-Nitroanilide	L-γ-G-3-C-4-H
생성물	*p*-Nitroaniline	β-Naphthylamine	*p*-Nitroaniline	5-Aminosalicylic acid *p*-Xylenol
정색시약		*p*-Dimethylaminocinenamaldehyde	$NaNO_2$ Sulfamate	Sodium metaperiodate
Color	Yellow	Red	Blue	Blue
파장	410㎚	540㎚	640㎚	640㎚
정상치	0~50 Unit/L			0~43 Unit/L

■ Alkaline Phosphatase & Acid Phosphatase (ALP & ACP)

- 여러가지 Monophosphate Ester를 가수분해하여 Phosphate기와 Alcohol을 생성

① ALP

-> 성인에서 정상 혈청 중 ALP는 주로 간에서 유래, 소아는 골에서 유래

-> 모든 조직에 존재하는 아연을 활성중심으로 하는 당단백금속효소

-> 간, 담도계 효소

-> 골연화증, 구루병, 뼈 재생 시기에는 ALP증가, 골다공증에선 정상 (ALP3)

② ACP

-> 정상 혈청 중 ACP는 75%가 간에서, 25%는 전립선에서 유래

-> 뼈, 간, 비장, 신장에 존재

-> 적혈구와 혈소판에도 많이 존재하여 용혈 검체 사용불가

-> 전립선암에서 현저한 증가

■ Alkaline Phosphatase & Acid Phosphatase (ALP & ACP) 측정

- ALP와 ACP는 측정에 사용되는 반응은 동일하나 반응 pH만 다르다

종류	ALP	ACP
최적 pH	pH 8 ~ 10 (pH 10.5)	pH 4 ~ 6
기질	Bodansky 법 : β-Glycerophosphate Bessey-Lowry 법 : *Para*-Nitrophenylphosphate Kind-King 법 : Phenylphosphate	
활성제	Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2}	

① Bodansky (Fisk-Subbarrow법)

β-Glycerophosphate $\xrightarrow{\text{Serum(ALP, ACP)}}$ Phosphate +Glycerol

Phosphate + Amm.Molybdate $\longrightarrow$ Phosphomolybdate + ANSA $\longrightarrow$ Molybdenum

② Bessey-Lowry법

p-Nitrophenylphosphate $\xrightarrow{\text{Serum(ALP, ACP)}}$ *p*-Nitrophenol + NaOH (Yellow, 410nm)

③ Kind-King 법

Phenylphosphate $\xrightarrow{\text{Serum(ALP, ACP)}}$ Phenol + 4-AAP (Red, 520nm)

Lecture 9. Enzyme

■ Cholinesterase (ChE)

- ChE는 Cholinester를 Choline과 Fatty acid로 가수분해하는 효소
- 간에서 합성되며 합성능은 Albumin 생합성과 평형, 간 실질 장애 진단
- Acetylcholinesterase(AChE), Pseudocholinesterase(SChE)

■ Leucineaminopeptidase (LAP)

- LAP는 N말단에 Leucine을 갖고 있는 Peptide를 말단에서 절단하는 효소
- 폐쇄성 황달과 관련

■ Aldolase (ALD)

- ALD는 포도당을 젖산으로 당분해하는 효소
- 골격근질환과 관련