임상 화학(Clinical Chemistry)

Lecture 4. Enzyme

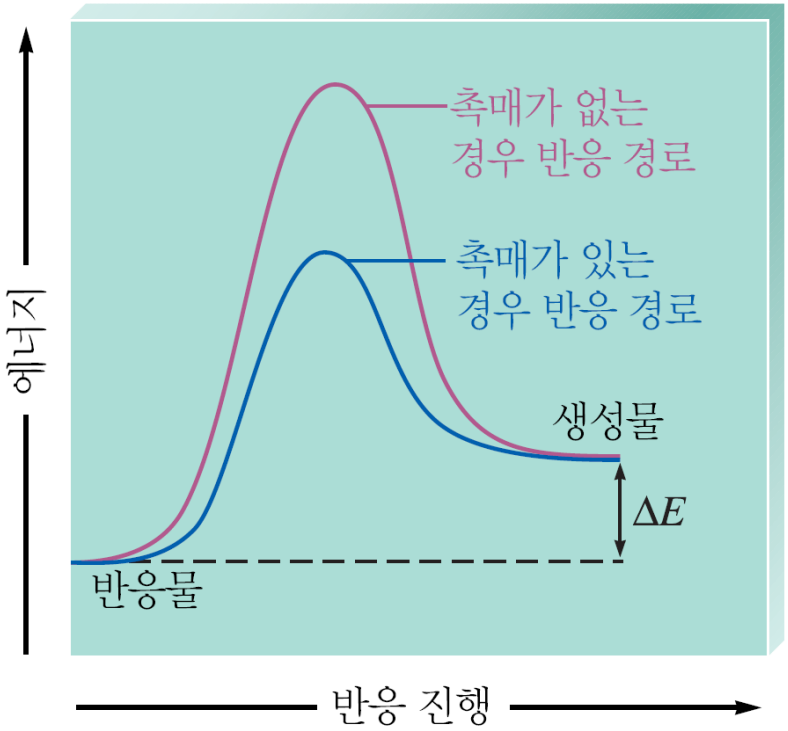
Prof. Choi Jeong Su
E-mail : guesschjs@korea.ac.kr
H.P : 010-6314-3910

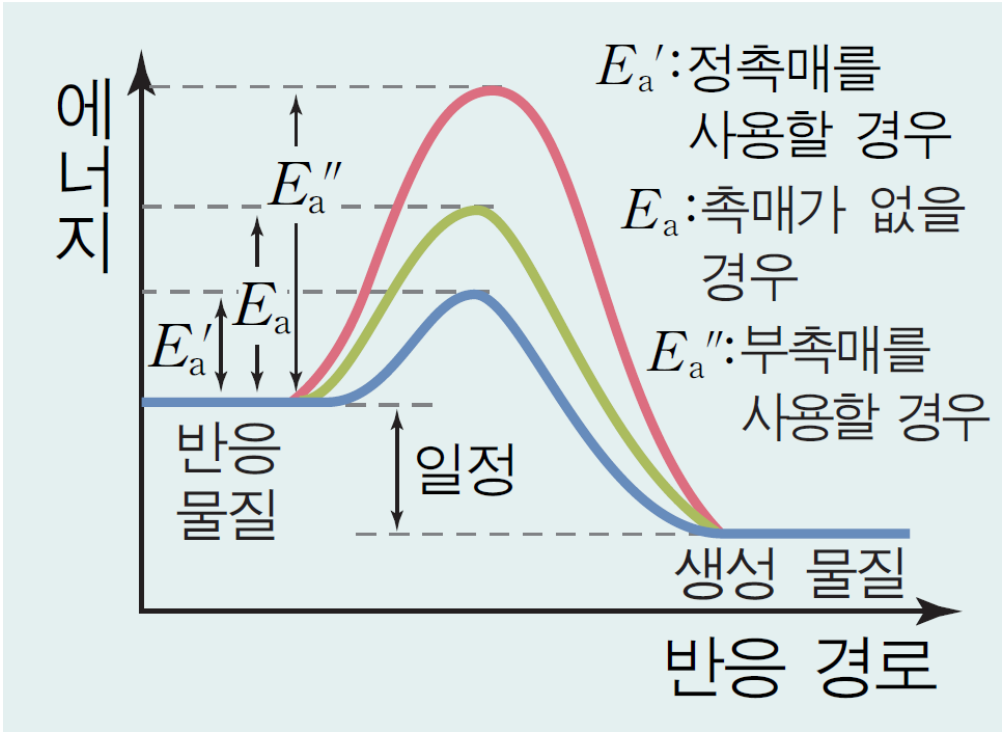
Lecture 4. Enzyme

■ 효소 (Enzyme)

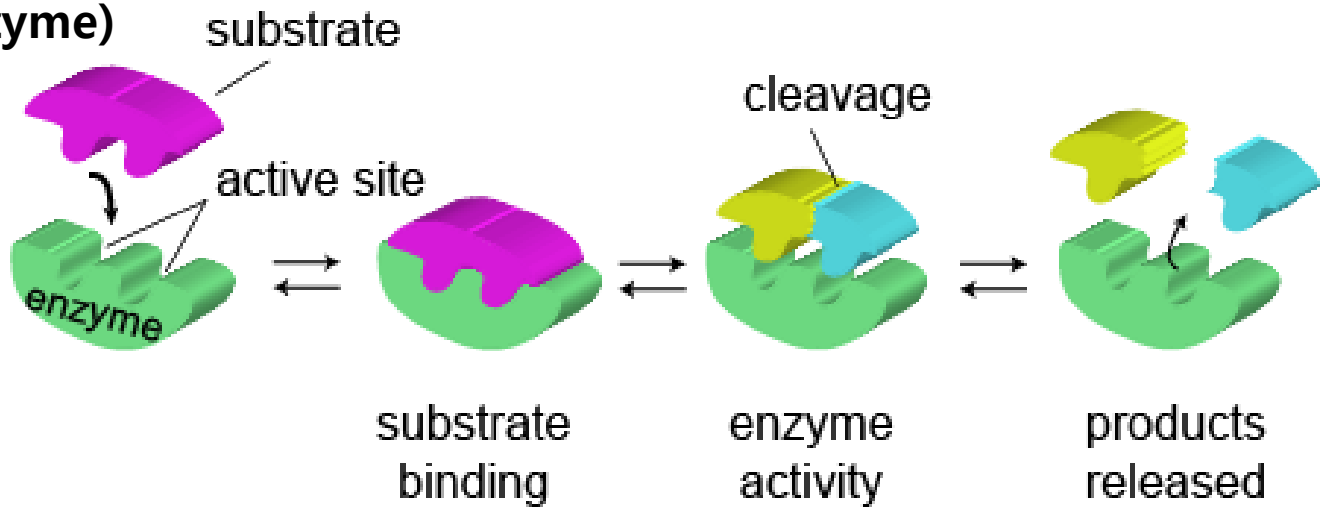
- 효소는 체내 세포에 존재하는 생물학적 촉매(biological catalysts)
- 활성화 에너지를 낮추어 효소가 없는 반응에 비해 반응 속도를 10^6-10^{12} 배 증가
- 단백의 일종으로 작용에는 Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} 등의 주로 2가 금속 이온과 Cofactor가 필요
- 효소의 특성
  ① 반응 도중에 변화되거나 소모되지 않는다.
  ② 계속 재사용 되므로 적은 양만 요구된다
  ③ 반응속도를 가속화할 뿐 평형상수를 바꾸지는 않는다
- 기질 (S: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

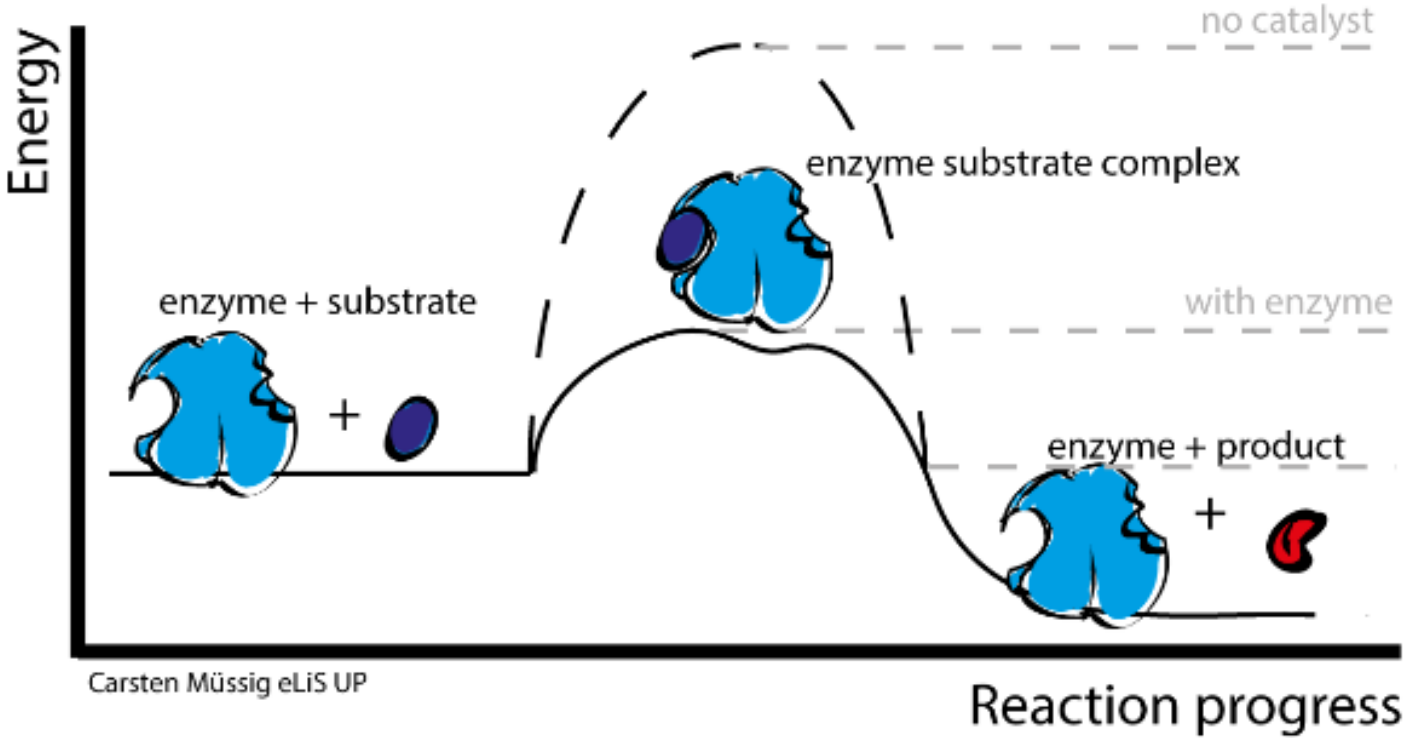
■ 효소 (Enzyme)


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 4. Enzyme

■ 효소 (Enzyme)

- 효소의 단위

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

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

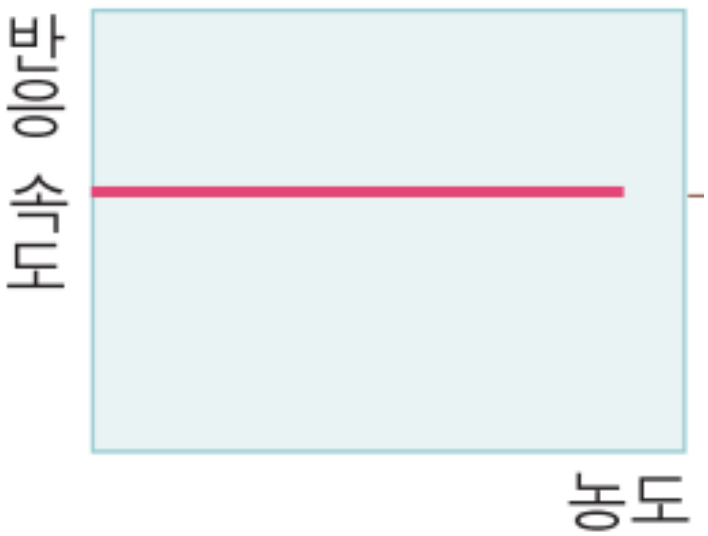
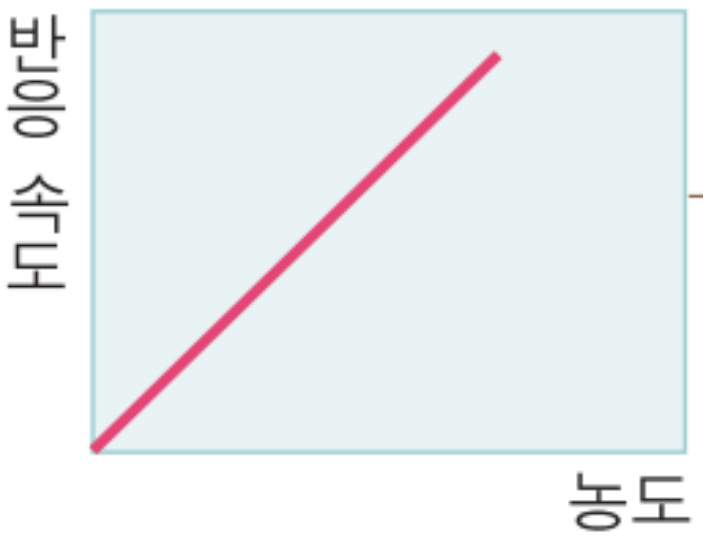
-> SI 단위 (Katal)

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

-> UV unit (Karmen Unit)

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

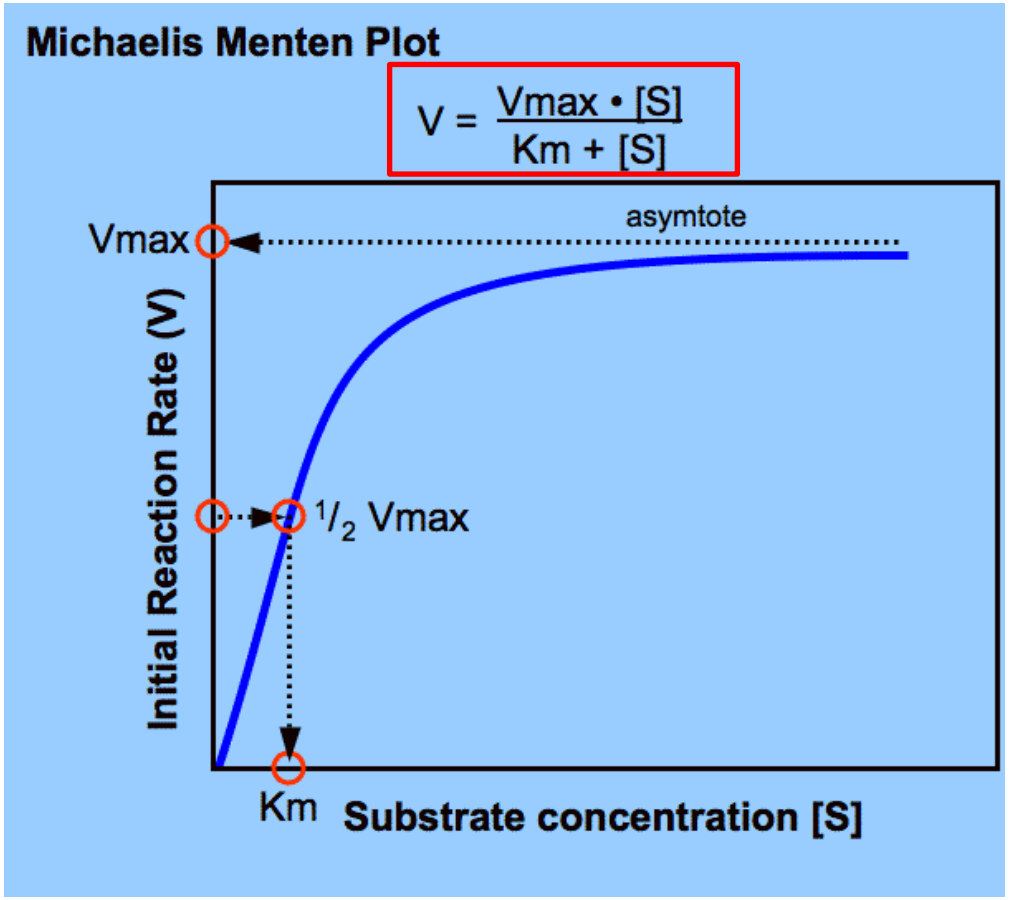
■ 효소 (Enzyme)

반응	0차	1차
농도에 따른 반응속도		

■ 효소 (Enzyme)

- 1차 반응 구간
  -> 반응 초기 기질의 양이 미량으로 존재할 때는 기질의 양이 증가할수록 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 작을수록 효소는 기질과 친화성이 높다

Lecture 4. 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)

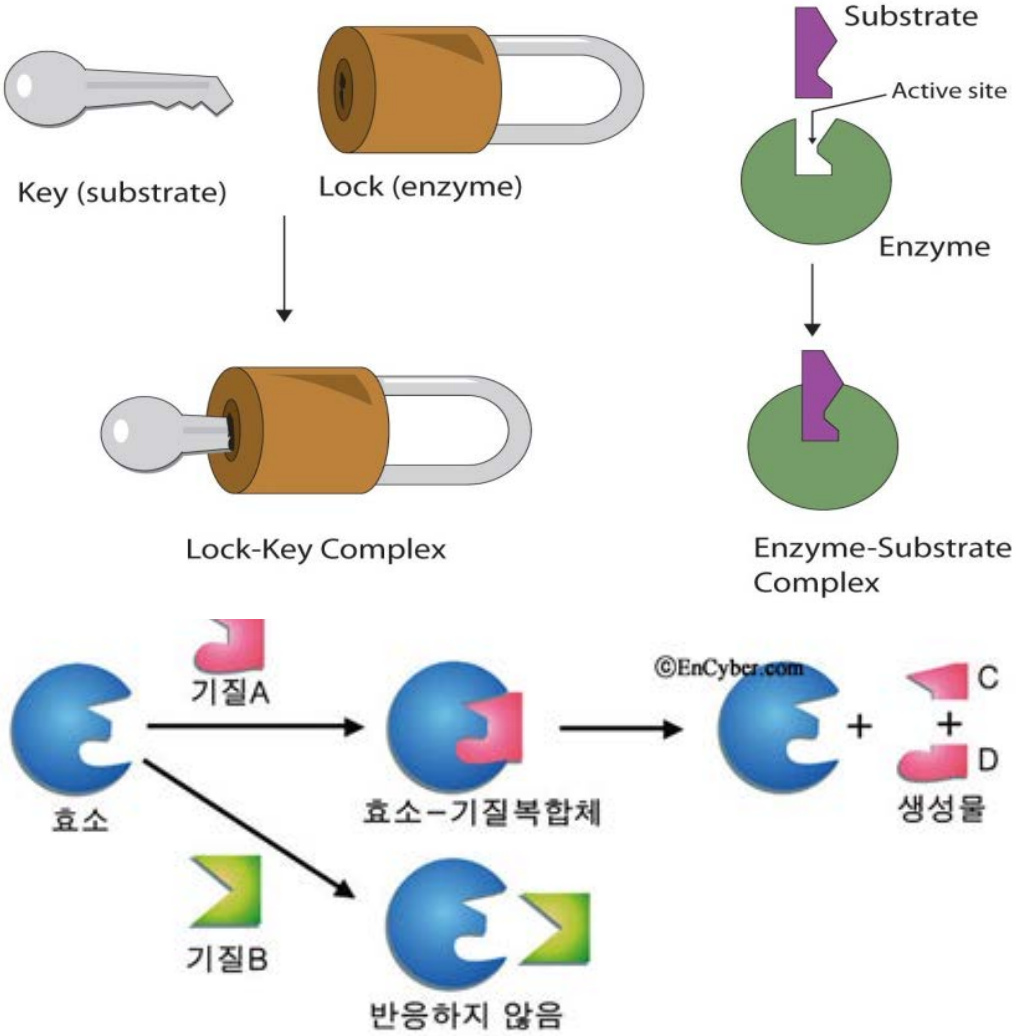
④ 분해효소 (Lyase)
- 가수분해와 산화 이외의 다양한 화학결합을 끊는 것을 촉매 (ALD=ALS)

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

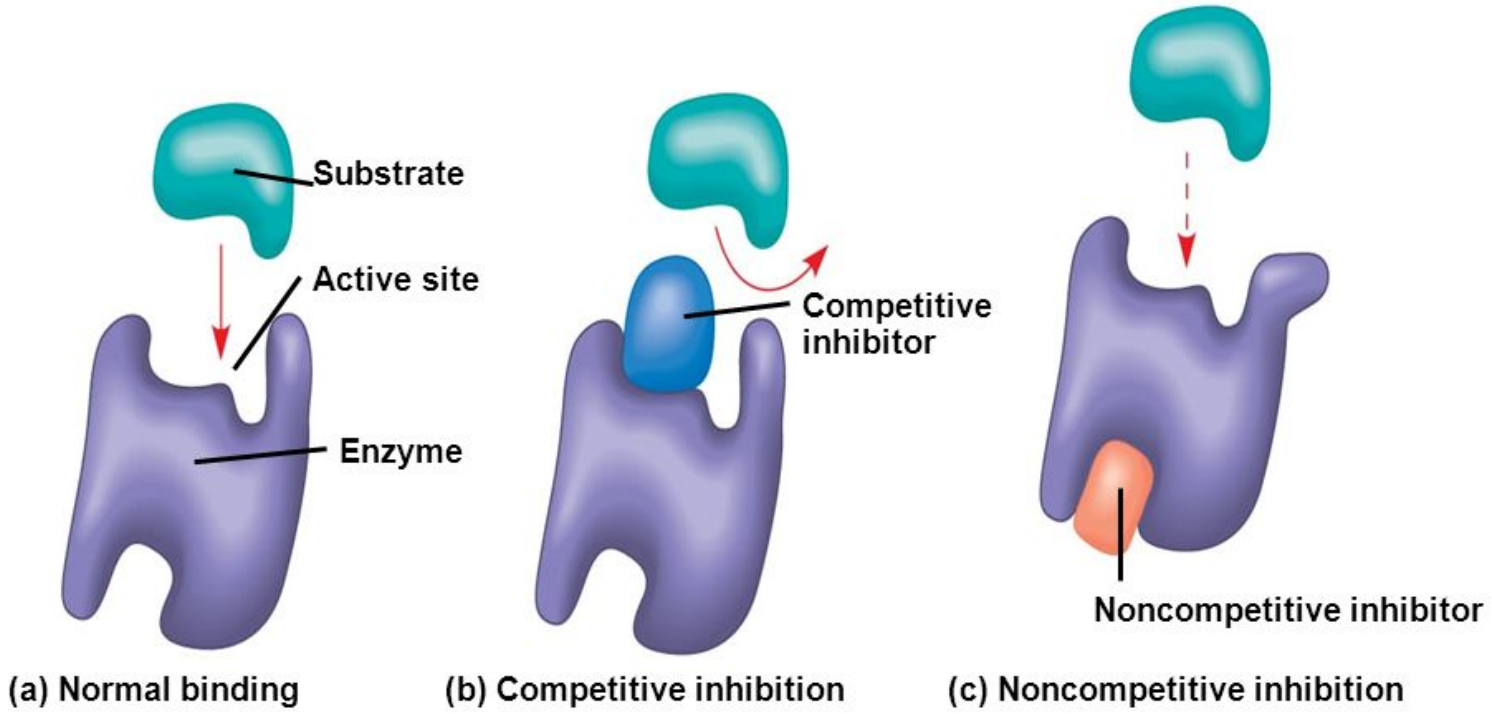
⑧ Cofactor의 유무

- 효소의 활성을 보이기 위해 필요한 무기 또는 유기 저분자 화합물

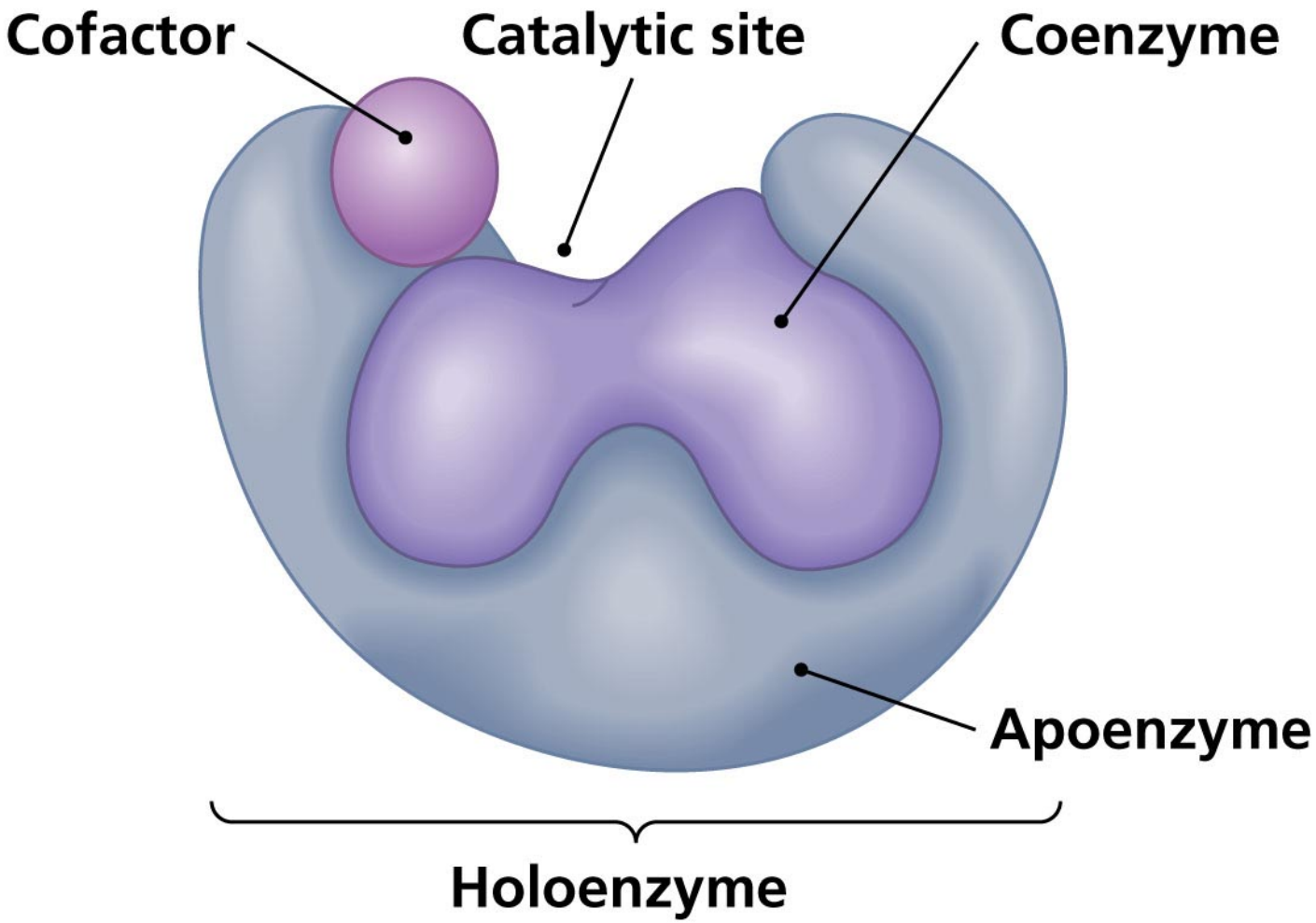
■ 효소작용에 영향을 주는 요인-Inhibitor

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

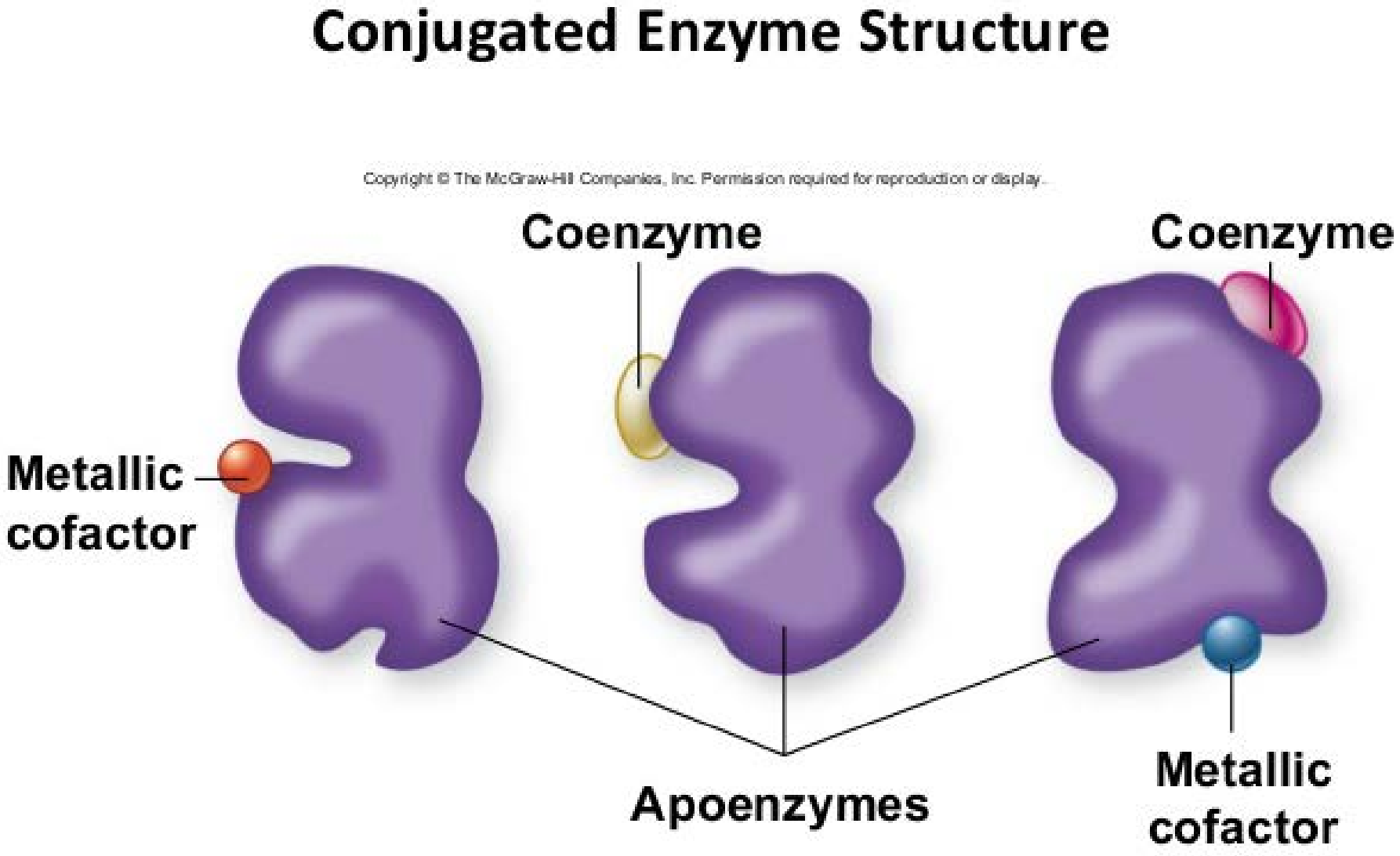


■ 효소작용에 영향을 주는 요인 - Cofactor



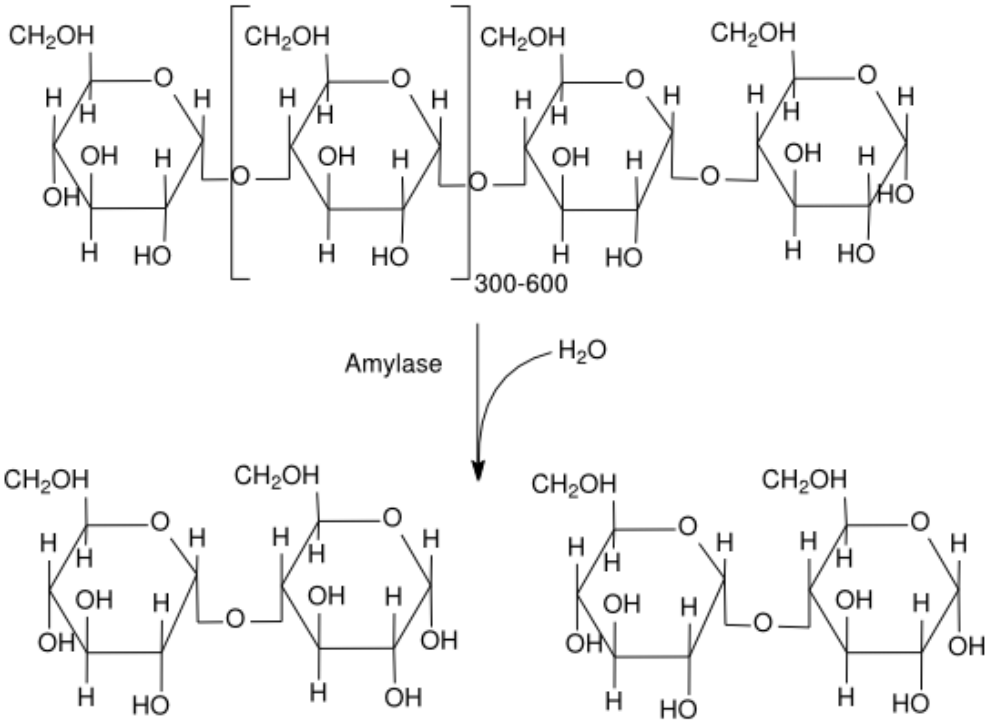
Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

■ 효소작용에 영향을 주는 요인 - Cofactor



■ Amylase (AMS)

- Amylase는 합성분비 되는 장소에 따라 췌장 Amylase와 타액 Amylase로 구분
- 소화효소의 하나로 Starch , Glycogen 등의 다당류를 Maltose등의 이당류로 가수분해하는 효소
- 사람에게는 α-Amylase만이 존재, Ca ion, Cl ion 존재



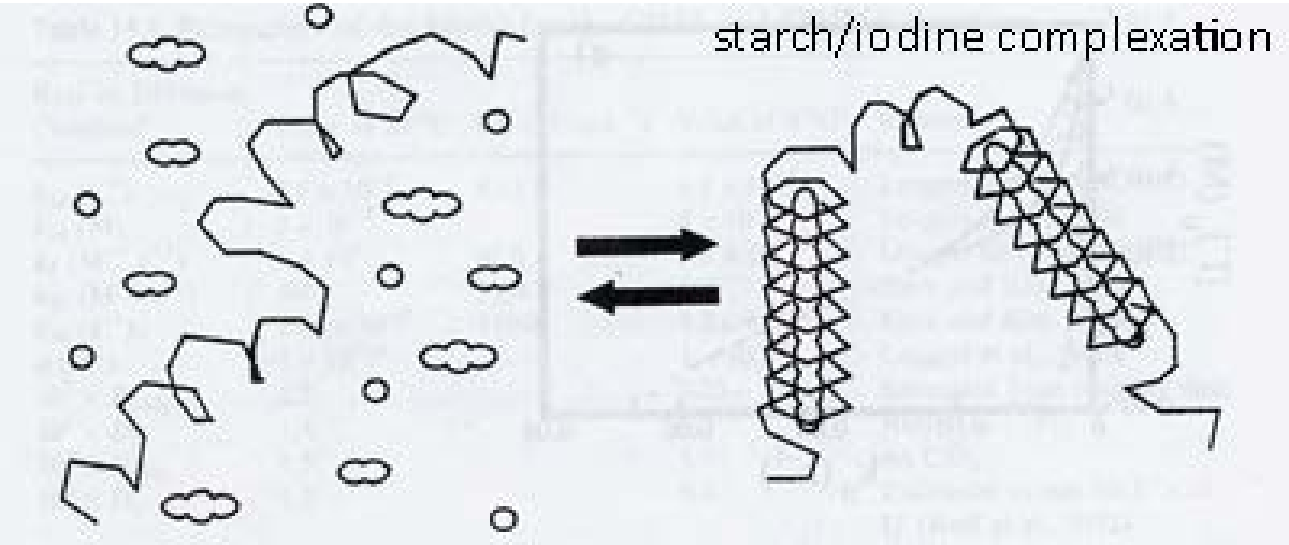
■ Amylase (AMS) 측정

- Iodometry 법 (Caraway 법)

  -> 전분(기질)이 Amylase에 의해 가수분해된 후의 전분이 소비된 양을 I_2 전분반응을 이용하여 측정하는 방법

$$\text{Starch} \xrightarrow{\text{Amylase(serum)}} \text{Maltose} \xrightarrow{\text{Maltase}} \text{Glucose}$$

-> 반응하고 남은 Starch + I_2 ---→ Violet color (660nm)



■ Amylase (AMS) 측정

- Saccharogenic 법

  -> 전분이 Amylase에 의해 가수분해된 후의 생성된 환원당의 양을 Folin-Wu 법으로 측정하는 방법

$$\text{Starch} \xrightarrow{\text{Amylase(serum)}} \text{Maltose} \xrightarrow{\text{Maltase}} \text{Glucose}$$

-> Glucose + Cu^{+2} → Gluconic acid + Cu_2^{+}

-> Cu_2^{+} + Mo^{+6} → Cu^{+2} + Mo^{+4} (Blue color, 600nm)

-> 발색시약 : Phosphomolybdate

 # 기질

-> 타액 Amylase : 감자 전분에 친화성이 높다
-> 췌장 Amylase : 옥수수 전분에 친화성이 높다
-> 올리고당을 기질로 사용하면 친화성의 차이는 거의 없다

■ Lipase (LPS) 측정

- TG를 Glycerol과 Fatty acid로 가수분해 하는 췌장 분비 효소
- 적정법을 이용하여 측정

측정법	**Tietz 법**	**Cherry-Crandall 법**
원리	①1단계 : 가수분해 Lipase (Serum) ↓ Olive Oil + H_2O → Glycerol + Fatty acid ②2단계 : 지시약 첨가 Fatty acid에 Thymolphthalein 첨가 후 ③3단계 : 적정 NaOH로 Blue Color가 될 때 까지 적정한다 (지방의 90%까지 측정)	①1단계 : 가수분해 Lipase (Serum) ↓ Olive Oil + H_2O → Glycerol + Fatty acid ②2단계 : 지시약 첨가 Fatty acid에 Phenolphthalein 첨가 후 ③3단계 : 적정 NaOH로 Red Color가 될 때 까지 적정한다 (지방의 70%까지 측정)
기질액	Olive Oil	Olive Oil
지시약	Thymolphthalein	Phenolphthalein
Buffer	Tris Buffer (pH 8.0)	Phosphate Buffer (pH 7.0)
적정액	0.05N NaOH	0.05N NaOH
최적 pH	pH 8.0	pH 7.0
종말 Color	Blue	Red
비고	Tietz 법이 Cherry-Crandall 법 보다 더 정확하다	

■ 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

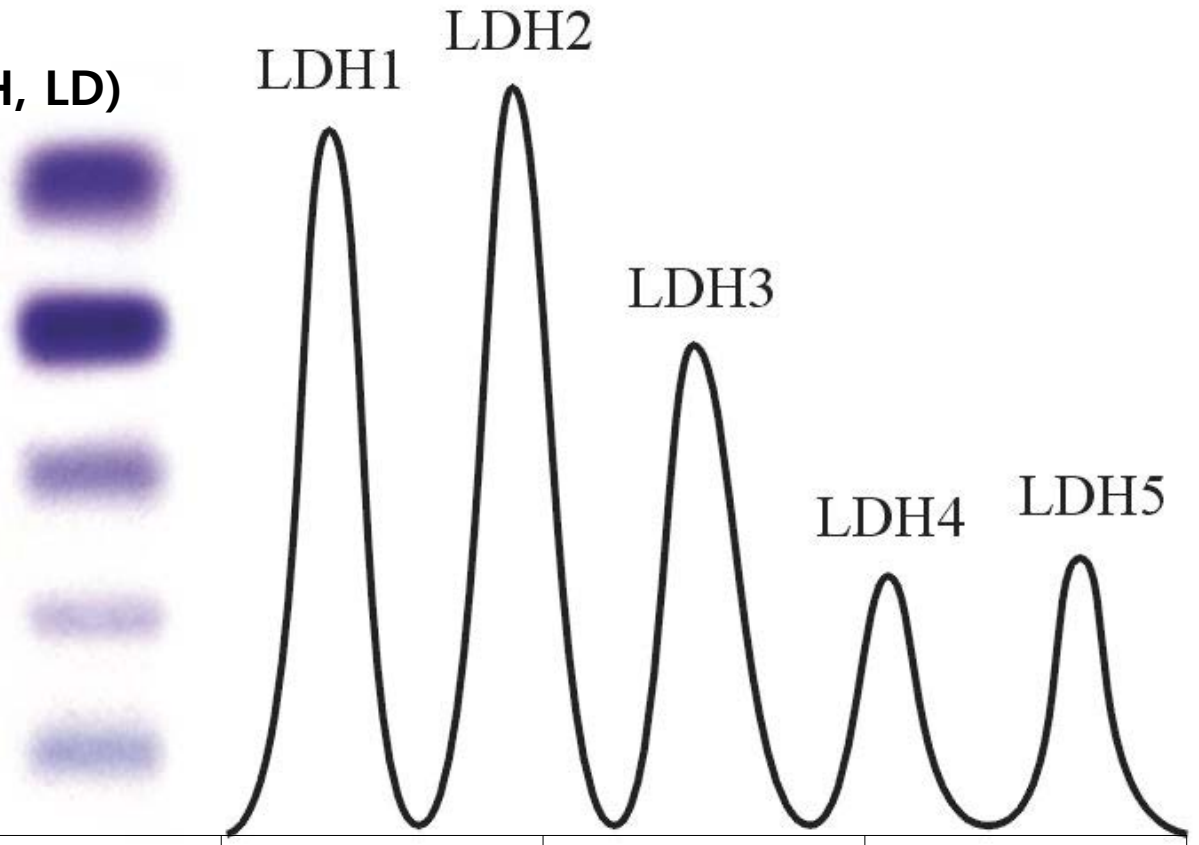
$$\text{L-Lactate} + \text{NAD}^+ \underset{\text{pH 7.4~7.8}}{\overset{\text{pH 8.8~9.8}}{\rightleftharpoons}} \text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

	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 4. 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	적혈구(세망내피계)	폐, 비장, 갑상선	신장, 췌장, 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)

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

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

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

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

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

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

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

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

■ Creatine Kinase (CK, Creatine phosphokinase=CPK)

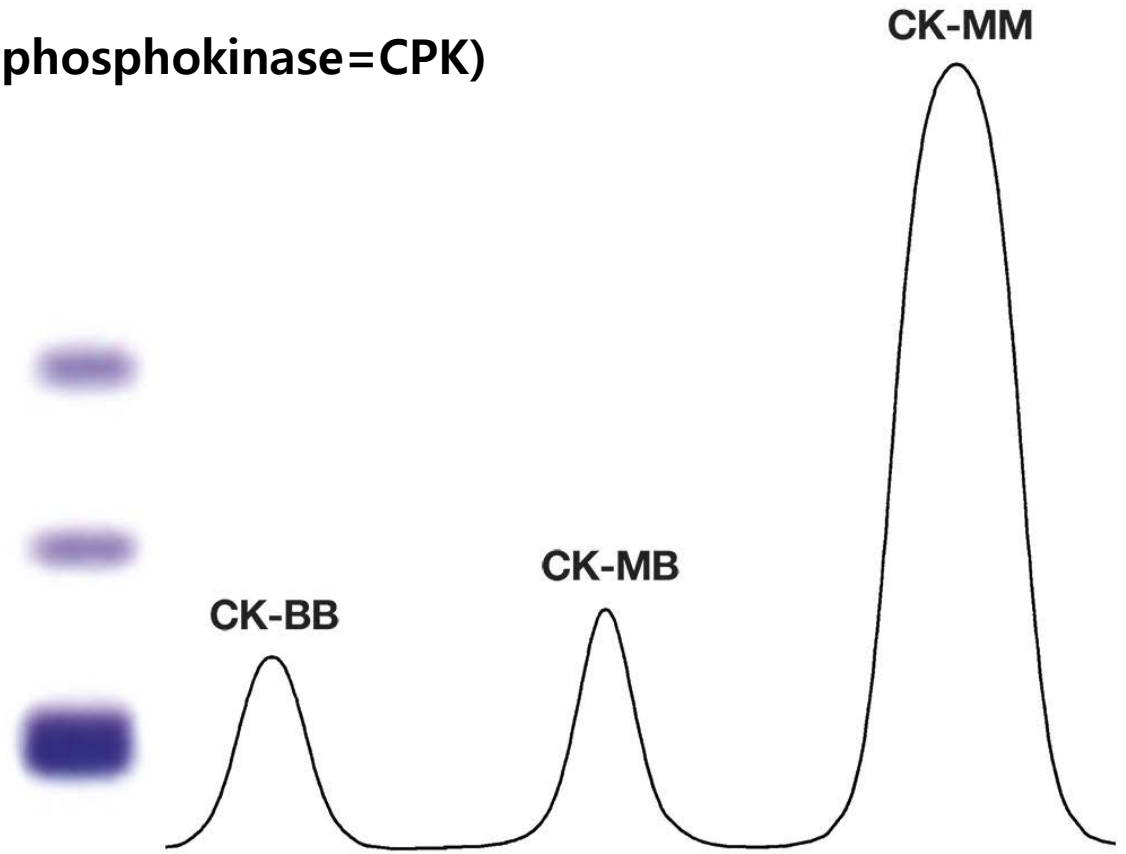
- ATP의 인산기를 Creatine으로 전이하는 정반응과 Creatine Phosphate의 인산기를 ADP로 전이하는 역반응을 촉매하는 전이효소
- 골격근, 심근, 뇌에 특이적으로 많이 포함
- 근육이나 뇌질환 진단 지표 (심근경색시 제일 먼저 증가하는 효소)

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

	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

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

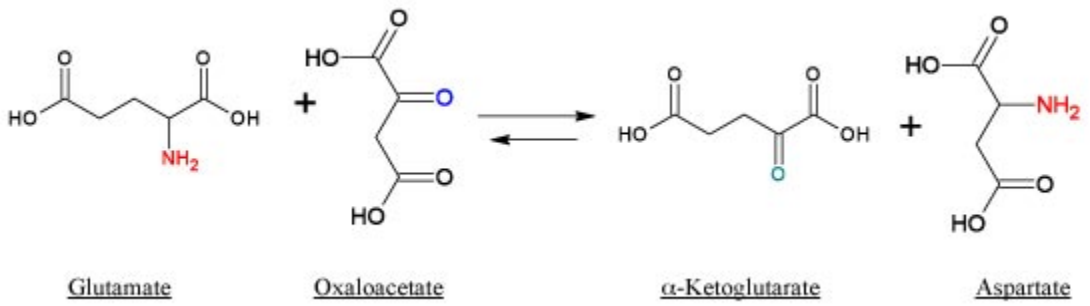
$$\text{ADP} + \text{PhosPhoenolpyruvate} \xrightarrow{\text{PyruvateKinase}} \text{Pyruvate} + \text{ATP}$$

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

■ Aspartate Aminotransferase & Alanine Aminotransferase (AST & ALT)

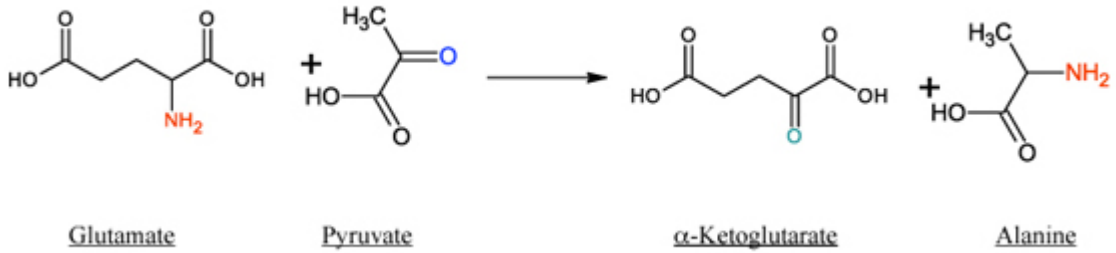
- Amino acid(Aspartate, Alanine)와 Keto acid(ketoglutarate) 사이 Amino기 전이효소
- AST = GOT (Glutamic Oxaloacetic Transaminase)

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



- ALT = GPT (Glutamic Pyruvic Transaminase)

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



■ 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)

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

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

* 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)

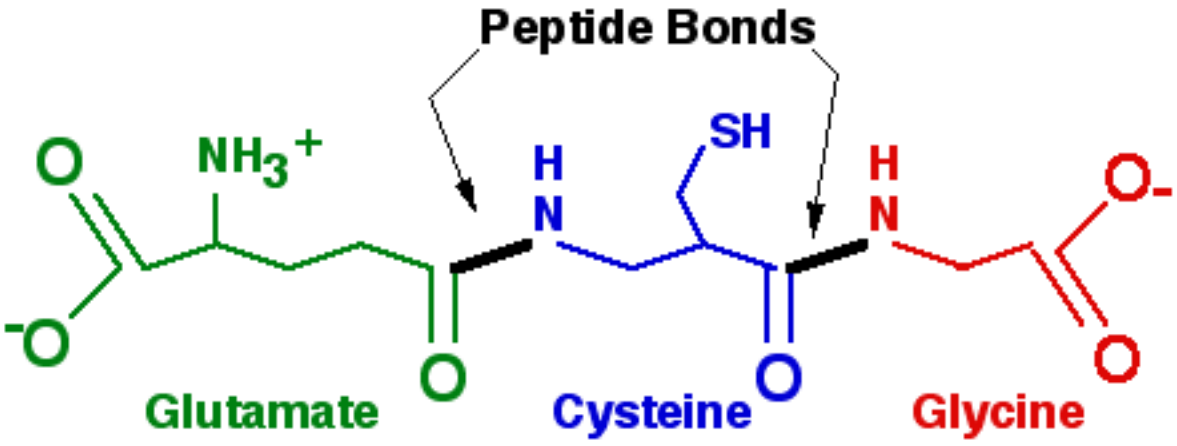
$$\text{Alanine} + \alpha\text{-Ketoglutarate} \xrightarrow{\text{Serum(ALT)}} \text{Glutamate} + \text{Pyruvate}$$

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

■ 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** (glutamyl-carboxy-hydroxyanilide)
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
정색시약		*p*-Dimethylaminocinenamaldehyde	$NaNO_2$ Sulfamate	*p*-Xylenol Sodium metaperiodate
Color	Yellow	Red	Blue	Blue
파장	410㎚	540㎚	640㎚	635㎚
정상치	0~50 Unit/L			0~43 Unit/L

Lecture 4. Enzyme

■ 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

-> 아연을 활성중심으로 하는 당단백금속효소

-> 간, 담도계 효소 (ALP1, ALP2)

-> 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 4. 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