4 효소

물질대사

- 동화vs이화
  - 산화 = 이화(발열) → 방출된 E= ATP로 저장
  - 환원 = 동화(흡열) → 흡수한 E로 중합체 합성
- ATP
  - 고에너지 : ATP →ADP 발열반응, 인산기 사이 반발력 감소
  - 에너지 화폐로 쓰이는 이유
    - 원시대기조건 : 아데닌, 리보오스만 생성
  - 공역반응 : ATP 매개 연계반응

효소

- **촉매**
  - Ea변화 → 물질대사 속도 up
  - 근접성, 방향성, 활성화에너지, 온도에 영향
- **구조**
  - 단순 단백질 효소 : only 단백질
  - 복합 단백질 효소 : **전효소**
    - **전효소 = 주효소(단백질) + 보조인자(비단백질)**
    - 보조인자
      - 종류 기준 분류
        - **무기 보조인자** : Mg2+, Fe2+, Mn2+, Cu2+, Ca2+
        - **유기 보조인자**
          - **NAD+(VitB3)**
            - ADP + 리보오스 + 니코틴아마이드
            - H+ 2개 e-2개 전달 → NADH (+ H+)
            - NADH는 340nm흡광 존재
          - **FAD (VitB2)** : 2개/2개 전달
          - **CoA-SH(판토텐산, Vit B5)** : 아실기, 고E 전달
      - 주효소와의 결합기준 분류
        - **비공유 결합 : 조효소**
        - **공유 결합 : 보결분자단**
- **작용방식**
  - 근접성, 방향성
    - 충돌횟수 증가, 기질분자들의 방향성 조절
  - 비용매화 : 기질 주위의 H2O제거
  - 기질특이성 : 기질결합부위와 들어맞는 기질
  - 활성화E
    - **유도적합설** : 기질결합부위의 가벼운 변화 → 결합
    - **전이 상태 인식** : 기질결합부위 = S,P 중간단계인 전이상태물질 구조
    - ∴ 기질결합부위 = 대충 만든 전이상태 모양
- **성질**
  - 온도, pH에 민감
  - 반응 후 자기자신은 화학적변화 X
- **리보자임**
  - **rRNA**
  - 인트론의 스플라이싱 담당 (SnRNP)
  - **RNA World 가설** : RNA가 유전물질, 생체촉매 역할 모두 담당 했을 것이다.
    - 원시대기 포름알데히드 → 리보오스**만** 생성
    - 일반적으로 불안정한 구조(RNA) →안정 구조(DNA) 진화
    - RNA바이러스 존재, 자가복제능력 존재
    - 리보자임 촉매기능 수행
    - RNA 구조 변화 → 스스로 단백질 번역 조절
  - SELEX : 리보자임 획득 실험
    - 친화성 크로마토그래피 → 전이상태 유사체와 결합한 RNA(=리보자임) 용출 by 염 처리
  - 특정 단백질과 결합하는 RNA절편 구하기
    - **NC필터 이용**
      - **단백질 : 비특이적 결합**
      - **핵산 : UV처리해야만 필터와 공유결합**
      - RNA결합된 단백질 필터링 → 요소처리하여 RNA 분리

효소2

반응속도론

공식 및 그래프는 직접 써보고 그려보기

- 미하엘리스-멘텐 식 (Vmax 공식)
- 라인위버-버크 이중역수 그래프 공식
- **M-M식 해석**
  - **미하엘리스 멘텐 상수 Km = (k-1+k2)/k1**
  - **해리상수 Kd = Km → Km 작을수록 친화성 大**
  - 촉매 전환율, 회수율 = **kcat =k2**
  - 촉매효율 = kcat/Km
  - 효소 농도 높이면 → Vmax 증가, Km일정

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + E$$

- 동종효소
  - 다른 아미노산 서열, 같은 대사과정 효소(기질 결합부위 구조 유사) — 환경조건에 맞추어 여러가지 서열의 효소들이 발현
  - 고등생물 → 동종효소 비율up
    - **엑손 셔플링** : 진화 과정 中 서로다른 유전자의 엑손을 복제, 조합하여 new 유전자 제작 → 새로운 유전자에 동일한 도메인
    - **다유전자군** : 한 생물체 내에 유사한 정보의 유전자 그룹
      - 진화 과정 中중복 돌연변이 →살짝 다른 단백질 합성
      - **태아의 α2γ2 Hb**
      - 직렬상동 유전자 : 한종의 생물 내 염색체 중복현상 → 여러 유전자
      - 병렬상동 유전자 : 서로 다른종에서 같은 기능 유전자 →진화 관계 파악가능
    - **선택적 스플라이싱 (= 대체스플라이싱)** — 전사되면서 다양한 조합 엑손 연결 , 다양한 mRNA

효소 억제

- **비가역 억제**
  - **공유결합**
  - 페니실린 : β-락탐고리(반응성 大) → 트랜스펩티다아제 저해 → 그람(+)균 세포벽 합성 X
  - 암피실린 : 그람(-)균까지 효과 갖도록 R기 변형
- **가역 억제**
  - **경쟁적 저해**
    - 저해제가 **기질결합부위**에 결합 — ES → E + P 반응은 영향 X — kcat 일정
    - [ES] 형성↓ → **Km↑ kcat 일정 Vmax 일정**
  - **비경쟁적 저해**
    - 저해제가 E or ES복합체의 **다른자리**에 결합
    - [ES] 형성 동일 → **Km 일정, kcat↓ Vmax ↓**
      1. 정상적인 E가 ES형성하는것은 이상X ∴ Km 일정
      2. ES에 저해제 결합시 ES → E+P 반응X ∴ kcat 감소
  - **불경쟁적 저해** — 저해제가 ES의 **다른자리** 결합 → **Km↓, kcat↓ Vmax↓**
- S → P 총 양은 효소/저해제 존재 유무에 관계없이 일정 (속도 차이만 유발하는것)

효소의 조절

- **비가역 조절**
  - 효소원(전구체) → 일부절단시 활성화 (첨부터 활성시 세포에 손상위험)
  - 보체, Caspase, 혈액응고인자, 펩신, 트립신, 키모트립신
- **가역조절** : 인산화 (kinase : Pi 붙여줌, phosphatase : Pi 떼냄)
- 조절단백질 : 어떤 단백질이 붙으면 활성/안붙으면 비활성
- **알로스테리 조절**
  - 4차구조 : 여러 폴리펩티드 → 기질 결합할때마다 효소구조 변함 **(협동성, S자곡선)**
  - **알로스테리물질(조절자)**
    - 기질 결합부위가 아닌 알로스테리 자리에 결합
    - 음성 알로스테리 물질 : 기질 결합 hard → 일단 하나 붙으면 속도 up (협동성, S자 그래프)
    - ⭐ **음성 알로스테리 물질 ≠ 비경쟁적 저해제** — 그래프 모양이 다름. ▶ **활성조절과 저해는 다른개념**
  - **헤모글로빈 (유사 효소)**
    - **산소의 조절(협동성)**
      - 4개의 폴리펩티드(α2β2), 4개의 기질결합부위(헴 = 철 + 포피린 링)
      - 조직에서 산소 결합력 : 헤모글로빈(적혈구)小 → 미오글로빈(근육)大 산소 전달
    - **2,3-BPG(음성 알로스테리)** — HB의 알로스테리 자리에 결합 → HB 산소 결합력 ↓→조직에 산소공급
    - **H+조절(음성 알로스테리)** — 호흡↑케톤체↑→ CO_2 발생 → 탄산무수화효소→H^+ 생성 → HB알로스테리 자리 결합 → 산소 결합력 감소
- **피드백 조절**
  - 음성피드백
    - 타겟은 일반적으로 **비가역반응**
    - 효소1 : 알로스테리 효소
    - 최종산물= 음성 알로스테리물질
  - 양성피드백 : 적조현상, 옥시토신등 거시적 현상, 계의 파괴

효소 연구방법론 : 생화학적 접근방법

PKU의 원인 효소가 PAH인지 확인해보자

페닐케톤뇨증

- 원인
  - 상ch 열성(aa)
  - 혈중 페닐알라닌, 페닐케톤 양이 多 → LNAAT(뇌의 아미노산 트랜스포터)가 다른 아미노산 수송 X → 뇌발달 이상
- 특징
  - aa태아 : 정상엄마에 의해 노폐물 제거 → 문제 X
  - aa태아 출생 후 : 페닐알라닌 최소로 식이요법 요구(~10살)
  - aa엄마가 임신
    - 정상 태아여도 엄마 혈액의 과량의 페닐알라닌이 태아에게 전달 → 뇌발달 이상
    - 임신시도시 또 다시 식이요법 해야함
- **진단법 : 구쓰리테스트** - 페닐알라닌 경쟁적저해제 극복하고도 세균이 증식하면 PKU

1. 에세이 기법 확립

- 에세이 : 특정 효소의 존재여부나 양을 확인하는 실험
- PAH효소 + 보조인자 가정 → 생성물이 450nm 흡광하는지 확인하자

2. 조추출액 획득

- 세포 파쇄
- 원심분리 → 수용성 단백질 : 상층액

3. 염석

- (NH4)2SO4를 조금씩 투여 → 염 농도에 따라 침전 — **# 용해도 큰 ptn이 마지막에 침전**
- 10만개 →33333개/ 33333개 /33333개 분리

4. 투석

- 염석으로 나뉜 각 단백질들의 염 제거
- 에세이 실시 : 확률 1/100000 → 1/33333로 증가 (흡광 있는것)

5. 크로마토그래피

- 박층 크로마토그래피 (Thin-layer chro.) — 이동상/고정상을 극성/무극성 조정하여 **전개율(Rf)** 측정 → 물질의 극성 비교
- 겔 여과 크로마토그래피
  - 다공성 충전제(구슬)
  - 큰분자 → 작은분자
- 이온교환 크로마토그래피
  - 음이온교환 : 양이온 구슬 → (+)전하 분자 먼저 분리 = pI 큰것 부터 분리
  - 양이온교환 : 음이온 구슬 → (-)전하 분자 먼저 분리 = pI 작은 것 부터 분리
  - 충전제와 같은 전하 분자 → 반대전하 분자
- 친화 크로마토그래피 — 친화력 없는 분자 → 친화력 있는 분자

6. 등전점 전기영동

- pI에 따라 분리
  - ① pI 작은게 상대적으로 (-)전하를 띰
  - ② pH 구배 설정시 pH 낮은 곳이 (+)극
  - **→ low pH 영역에 pI 낮은 단백질이 위치**

7. SDS-PAGE

- **단백질을 분자량에 따라 분리** → 단백질 종류 수, 각 단백질의 양, 각 단백질의 크기 알수 O
- SDS : 계면활성제 → 아미노산 R기 전하 상쇄 & 음전하 코팅
- 실험과정 : 샘플, SDS, β-ME, 글리신 all 가열 → 단백질 변성(선형) → 전기영동
  - 스태킹겔 : 단백질 일렬 정렬
  - 분리용겔 : 분자량에 따른 분리
  - 음전하 폴리펩티드 이동 : 길이가 짧은 단백질 →긴 단백질 순서로 전개
- 결과분석
  - 마커단백질(분자량 known)로 샘플 분자량 유추 by 표준곡선
  - 분자량大 →전개거리 차이가 小 — 아크릴아마이드 농도↓전개시간↑ → 전개거리 늘림
- 다단위 단백질
  - SDS에 의해 단위체 분리가능성 존재 — = 소단위체 분자량
  - 마커단백질 겔여과 크로마토그래피 수행 → 샘플 분자량 먼저 알아내면 됨 — = 총분자량
  - 몇 개의 소단위체로 구성되어있는지 알수 O
- **2차원 전기영동**
  - 분자량이 같은 경우 단백질 분리
  - **1차 : 등전점 전기영동 2차 : SDS-PAGE (순서중요)** — 순서 바뀌면 SDS에 의해 (-)전하 코팅되버림 → 단백질 고유 pI 사라짐
  - 서로 다른 두세포 : 공통 발현 단백질 / 특정세포 발현 단백질 등 확인가능

6 & 7 보충설명

- 단백질 정제 정도의 확인 **(정제과정을 거칠수록~)**
  - **총 단백질 질량 감소** — 관심없는 단백질 제외됨
  - **관심 효소의 활성 감소** — 실험 오차로 어쩔수 없음
  - **관심 효소의 비활성 증가** — 비활성 = 특이활성도 = 단백질 1mg당 효소 단위값
- 정제 여부의 확인 by SDS-PAGE — 마지막 정제 후 샘플속 ptn 밴드가 1개인지 확인

8. 아미노산 서열분석

- 단백질 변성(β-ME) → 트립신(3등분), CNBr(2등분) 처리
- **생어 방법**
  - FDNB : N말단에 공유결합
  - 강산처리 : 아미노산 하나씩 절단
  - FDNB 붙은 아미노산 find = 1st 아미노산!
- **에드만 분해법**
  - PITC : N말단에 공유결합 → N말단 아미노산 하나 절단
  - 다시 생어법으로 다음 아미노산 find
- 마지막 아미노산까지 확인 후 절편순서 정렬
- 이황화결합 위치 찾기
  - 1차 종이 크로마토그래피
  - 과포름산 증기 : 이황화 결합 cut
  - 2차 종이 크로마토그래피 → 대각선에서 벗어난 것끼리이황화결합