

생명과학실험 (1)

효소 반응

생화학 연구실
이학수

예비 보고서

- 체내에서 일어나는 화학 반응에서 효소의 역할
- 효소의 활성에 영향을 미치는 요소

오늘 실험

- Catalase와 무기촉매가 과산화수소를 분해하는 과정이 온도에 따라 어떻게 달라지는지 관찰

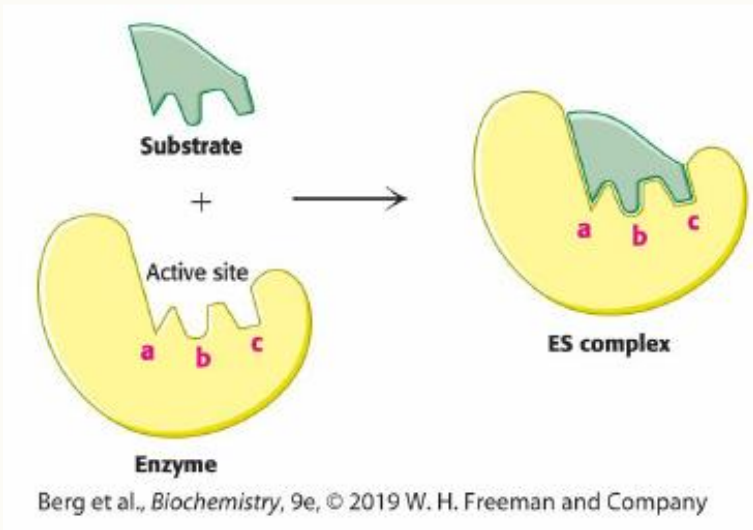
Introduction

효소의 일반적인 특징

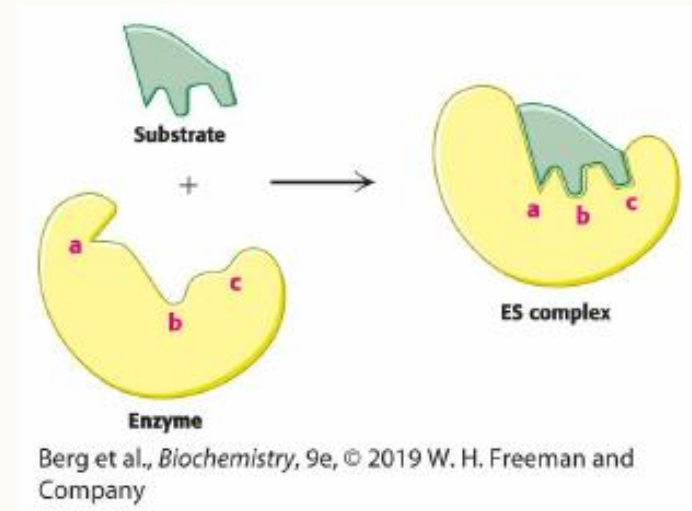
Introduction

효소의 일반적인 특징

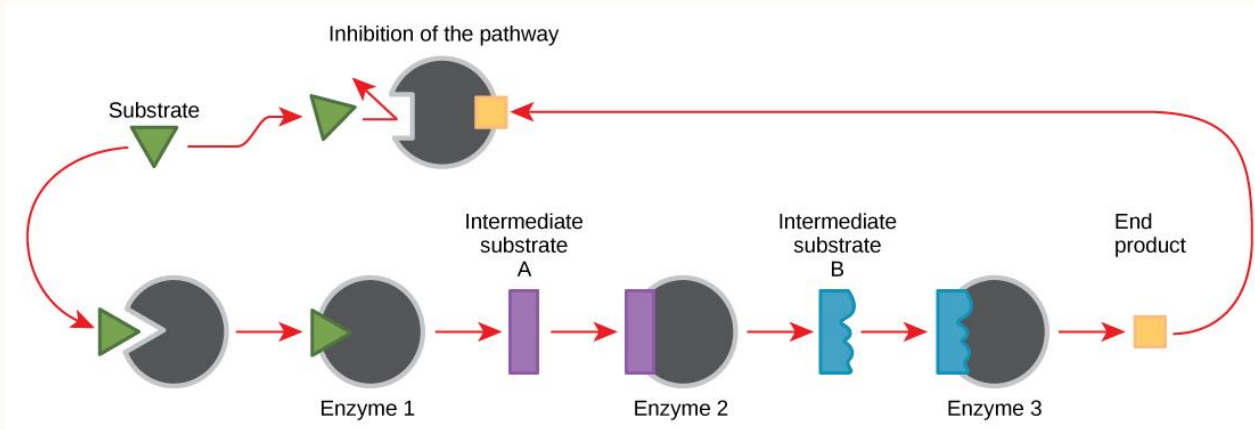
- 반응 과정 중 소비되지 않고, 반응 속도를 높여준다.



<Lock and Key model>



<Induced Fit model>



<Feedback Inhibition>

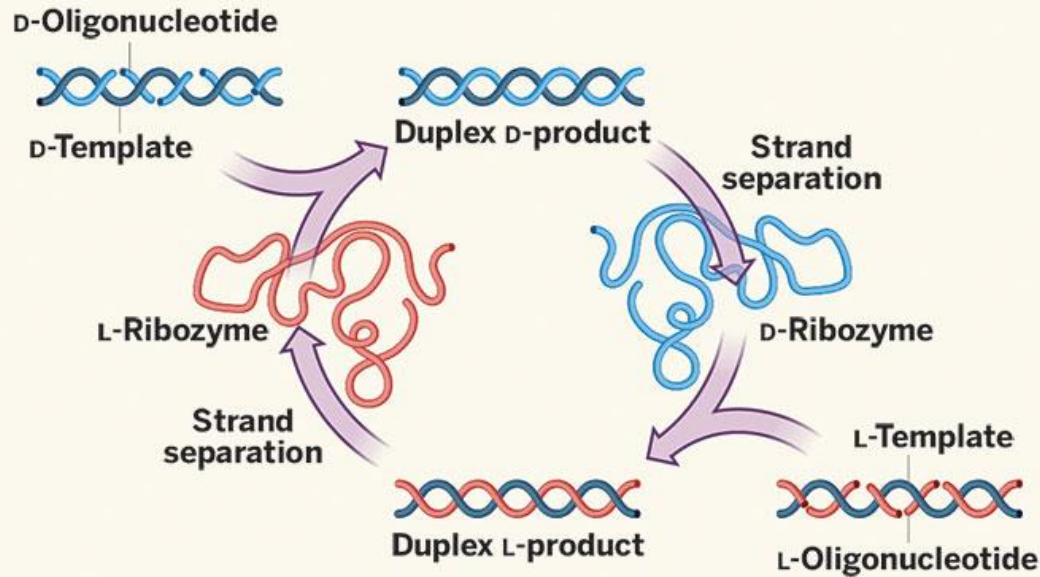
- 반응 과정 중 소비되지 않고, 반응 속도를 높여준다.

Introduction

효소의 일반적인 특징

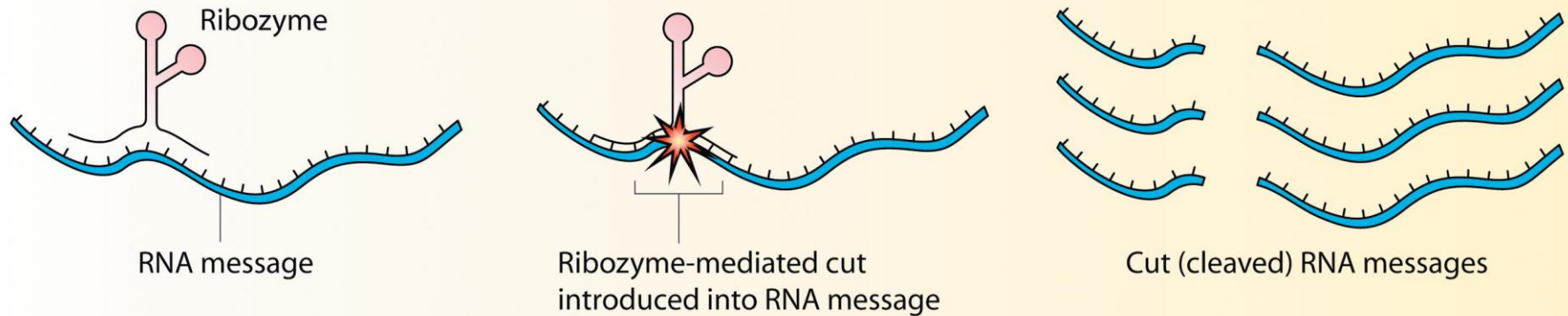
- 반응 과정 중 소비되지 않고, 반응 속도를 높여준다.
- 대부분 단백질로 이루어져 있다.
(RNA로 된 효소도 있음; Ribozyme / 리보솜을 구성하고 단백질 합성에 역할.)

Ribozyme



- Ribozyme은 효소처럼 작용하는 RNA 분자로서, Ribo + zyme의 합성어.

- ① Oligonucleotide의 분해와 연결
- ② DNA phosphodiester bond의 분해
- ③ RNA 서열 특이적 분해
- ④ 아미노산 사이의 peptide bond 형성

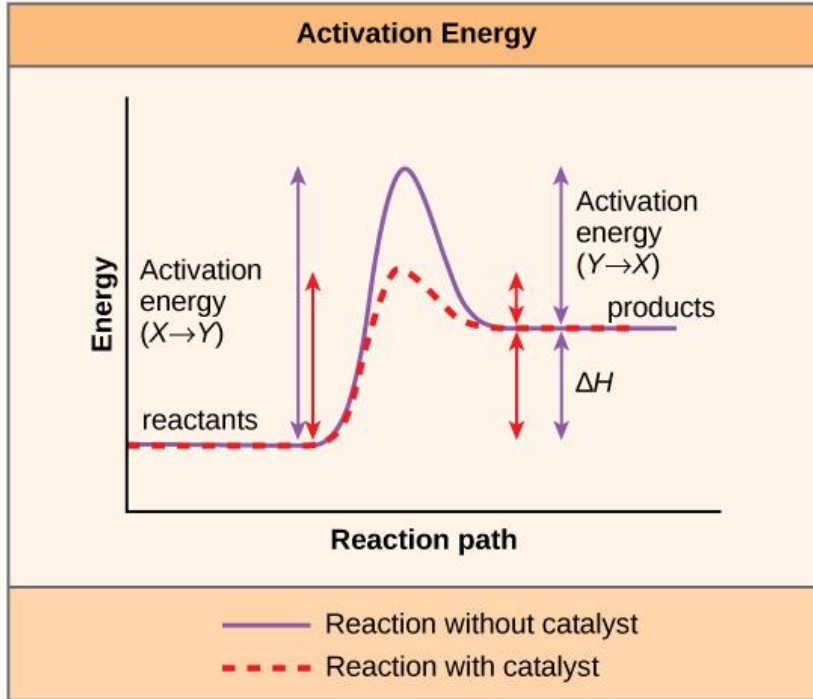


Introduction

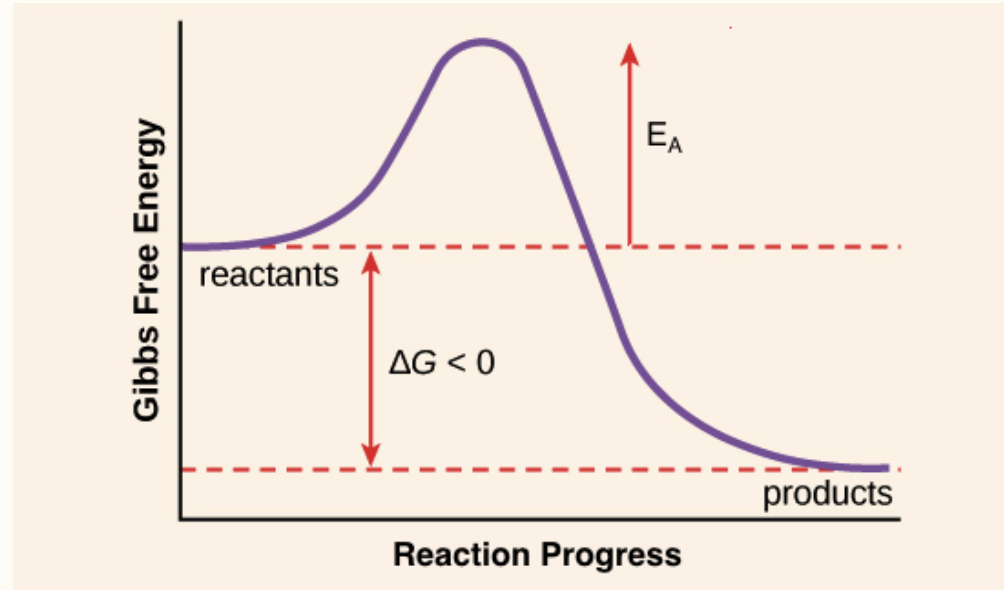
효소의 일반적인 특징

- 반응 과정 중 소비되지 않고, 반응 속도를 높여준다.
- 대부분 단백질로 이루어져 있다.
(RNA로 된 효소도 있음; Ribozyme / 리보솜을 구성하고 단백질 합성에 역할.)
- 화학 반응의 Activation Energy (활성화 에너지)를 낮춰준다.

Activation Energy



<Anabolism>



<Catabolism>

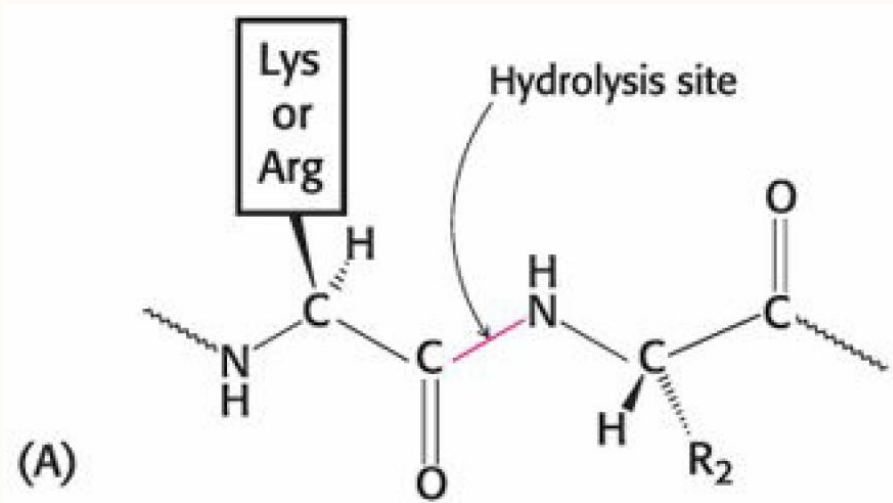
- An uncatalyzed reaction requires a higher activation energy than does a catalyzed reaction.
- There is **no difference in free energy** between catalyzed and uncatalyzed reactions.

Introduction

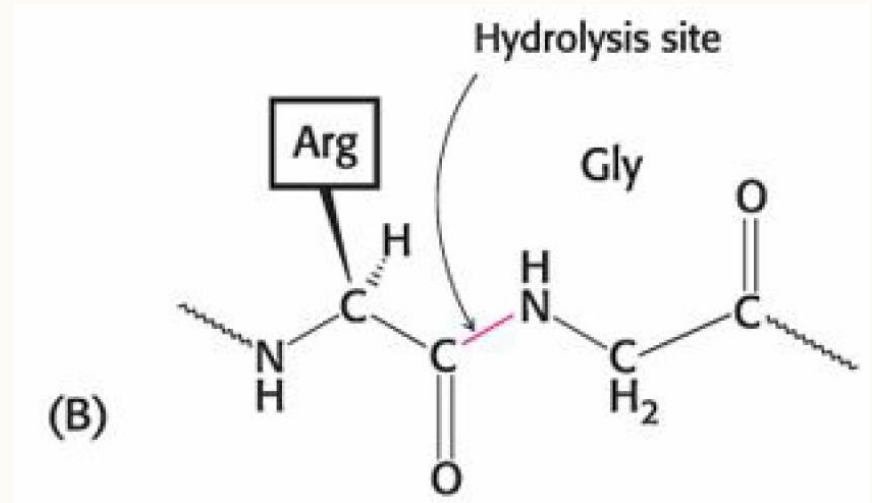
효소의 일반적인 특징

- 반응 과정 중 소비되지 않고, 반응 속도를 높여준다.
- 대부분 단백질로 이루어져 있다.
(RNA로 된 효소도 있음; Ribozyme / 리보솜을 구성하고 단백질 합성에 역할.)
- 화학 반응의 Activation Energy (활성화 에너지)를 낮춰준다.
- Specificity가 있다.

Enzyme Specificity



<Trypsin>



<Thrombin>

- Trypsin cleaves on the carboxyl side of arginine and lysine residues, whereas thrombin cleaves Arg-Gly bonds in particular sequences only.
- The specificity of an enzyme is due to the precise interaction of the substrate with the enzyme.

Introduction

효소는 어떻게 활성화 에너지를 낮출까?

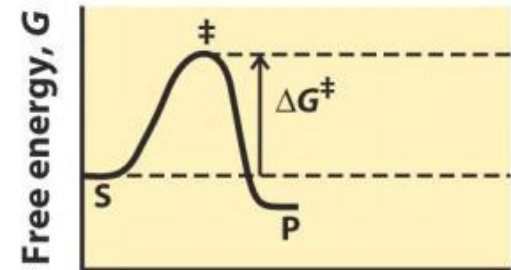
Introduction

효소는 어떻게 활성화 에너지를 낮출까?

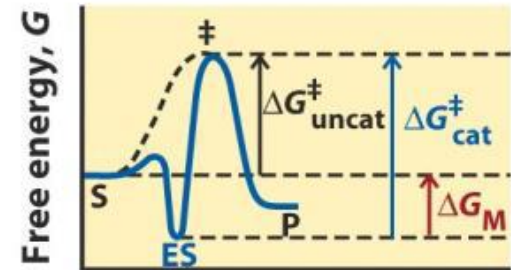
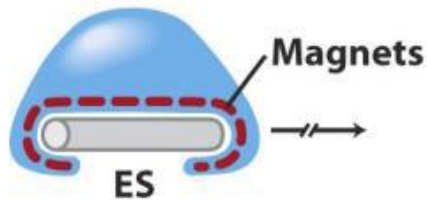
- 기질들이 적절한 배열(방향)을 갖게 하여 반응이 일어나기 쉽게 한다.
- 효소가 기질을 꼭 붙잡음으로써 반응에 필요한 짝 퍼지거나 휘게 하는 등의 화학 결합에 변화를 줄 수 있다.
- 반응에 필요한 microenvironment가 되어줄 수 있다.
(active site에 산성을 띠는 side chain을 가질 경우)
- Active site가 반응에 직접 참여하는 경우

Stickase (Imaginary enzyme)

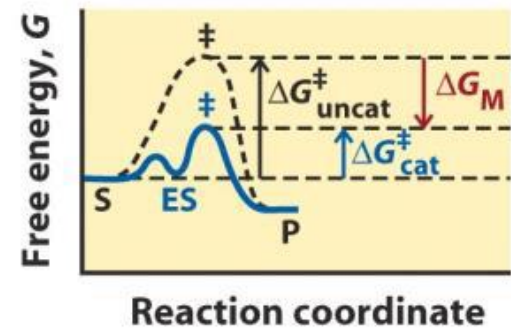
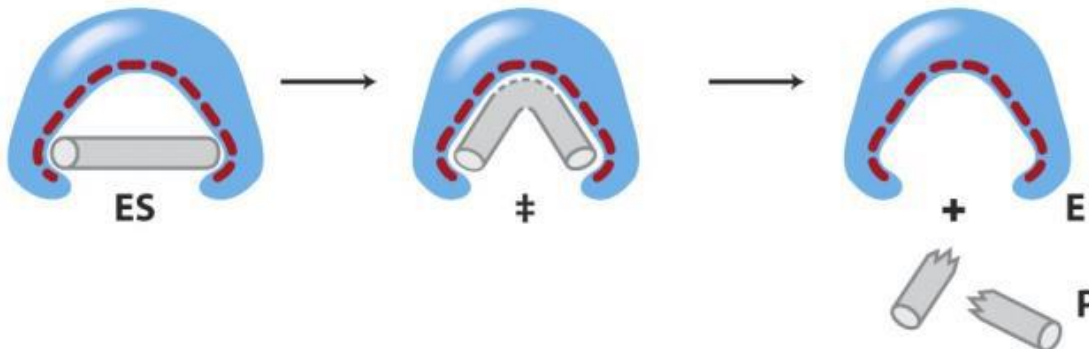
(a) No enzyme

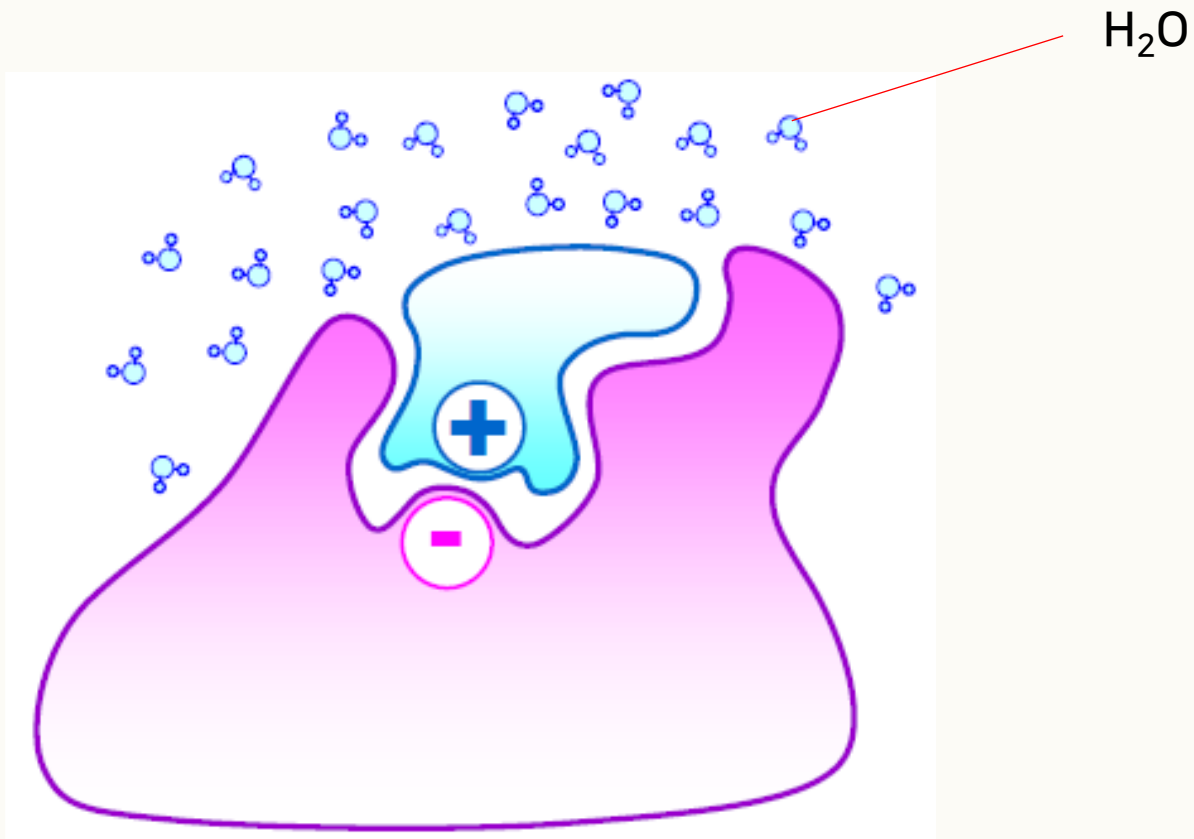


(b) Enzyme complementary to substrate



(c) Enzyme complementary to transition state



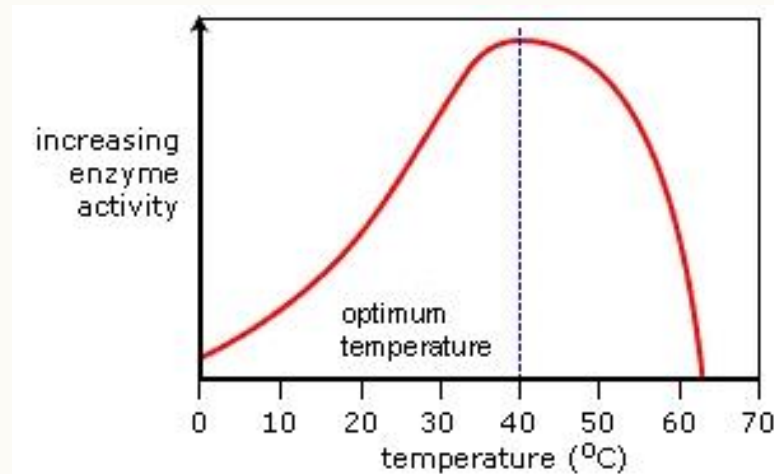


- Preventing the influence of water sustains the formation of stable ionic bonds.

Introduction

온도와 효소의 활성도

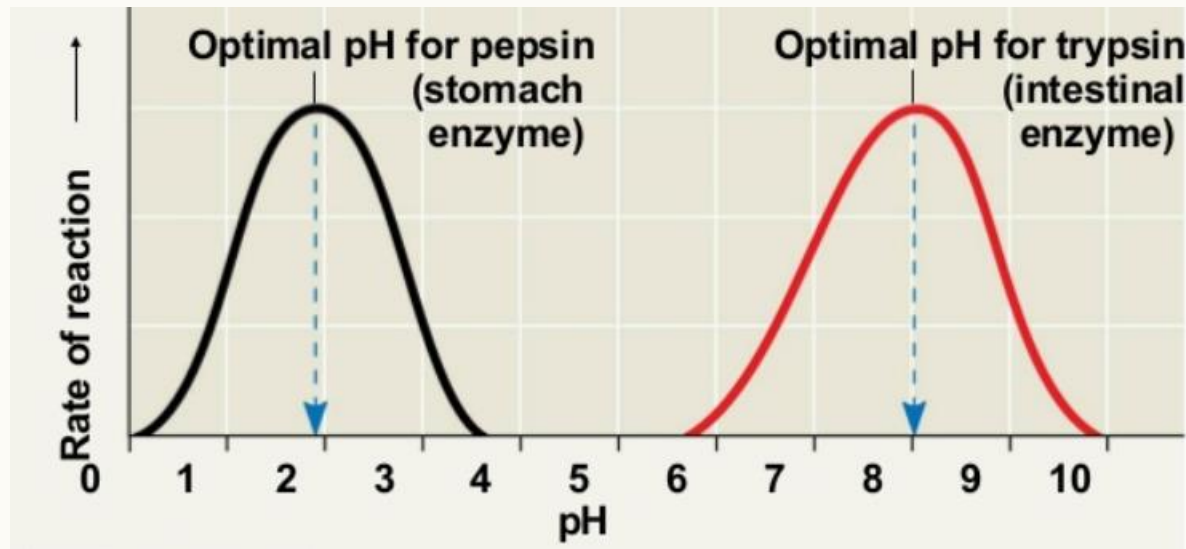
- 대부분의 체내에 있는 효소는 35~40°C의 최적 온도를 가지지만, 뜨거운 곳에서 사는 박테리아에 있는 효소는 70°C의 최적 온도를 가지기도 한다.



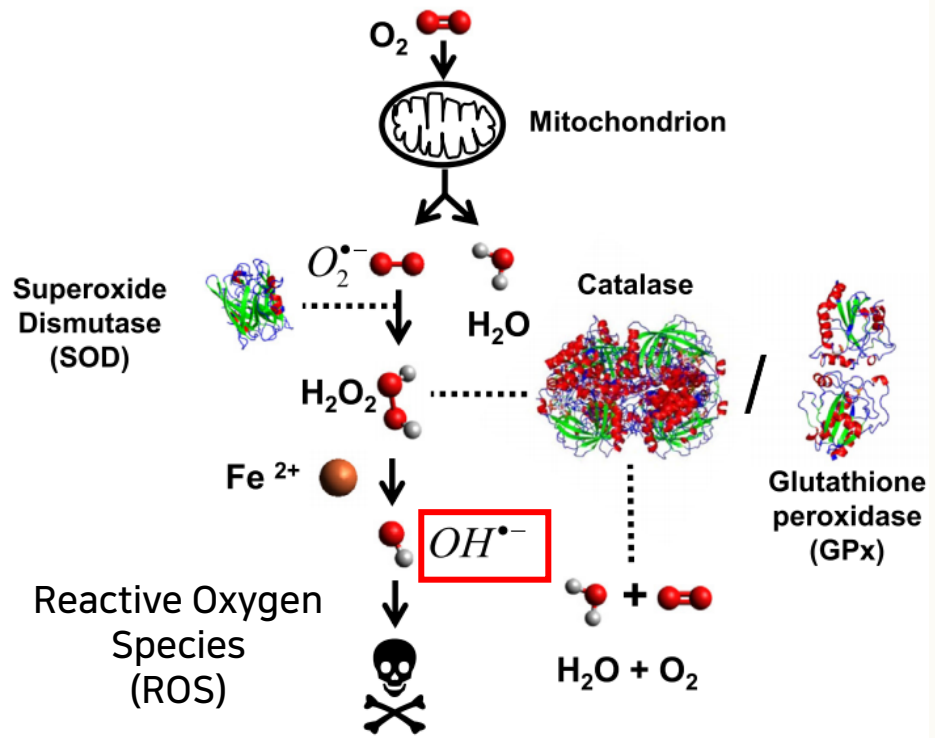
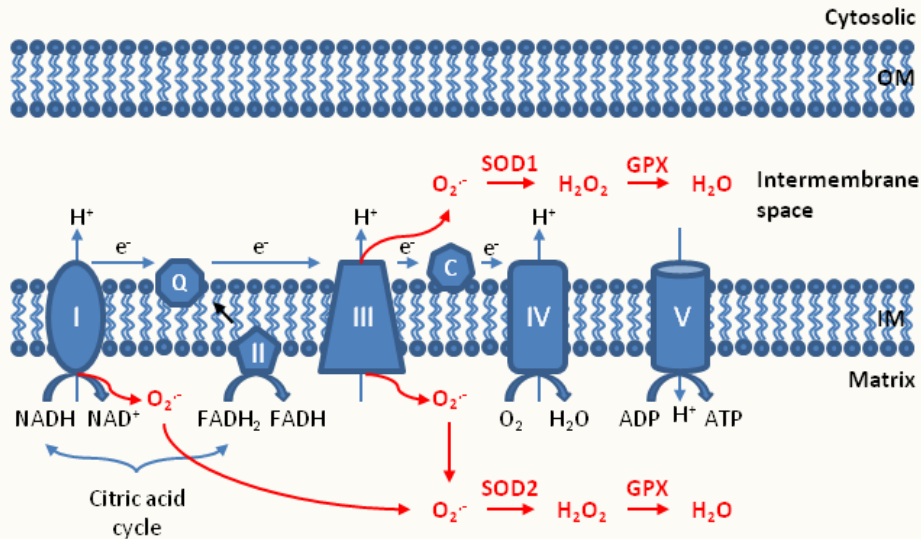
Introduction

pH와 효소의 활성도

- Pepsin과 trypsin은 둘 다 소화효소임에도, 활성도를 나타내는 pH가 다르다.



Catalase

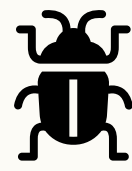


- 생물체 내에서 생성되는 산소 화합물인 ROS는 조직을 공격하고 세포를 손상시키는 산화력이 강한 산소임.
- Hydrogen Peroxide (과산화수소)에서 유래하는 hydroxyl radical은 큰 damage를 유발하는 ROS임.
- Catalase는 hydrogen peroxide를 분해할 수 있는 효소 중 하나임. (GPx, PRx, Catalase)



Photo by Charles Hedgcock, (c) 2015 Wendy Moore

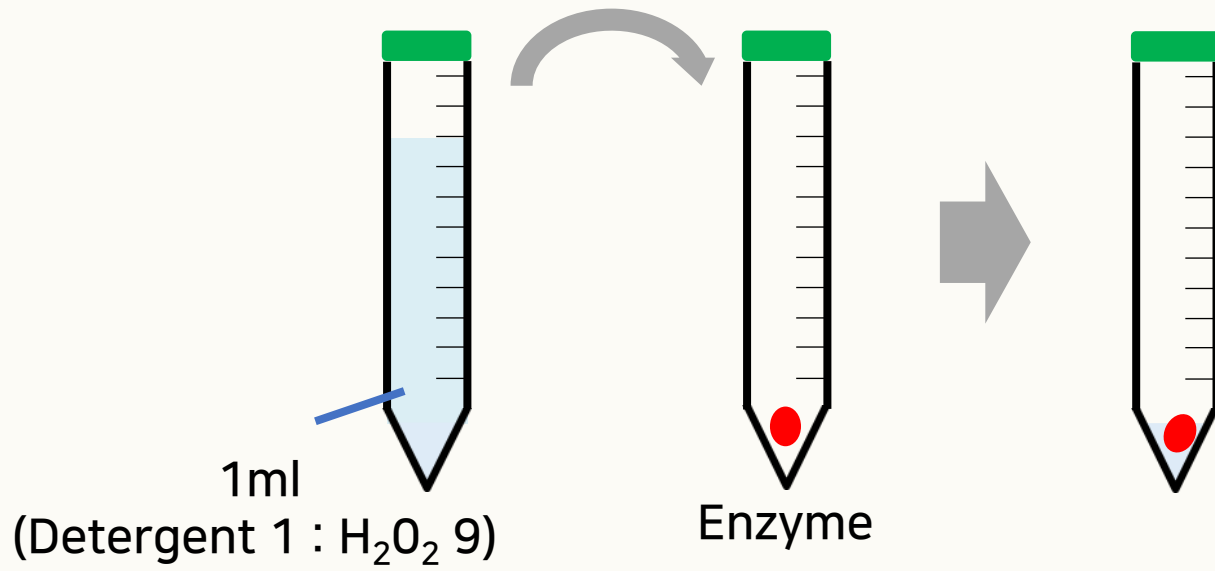
Bombardier beetle ; 폭탄먼지벌레

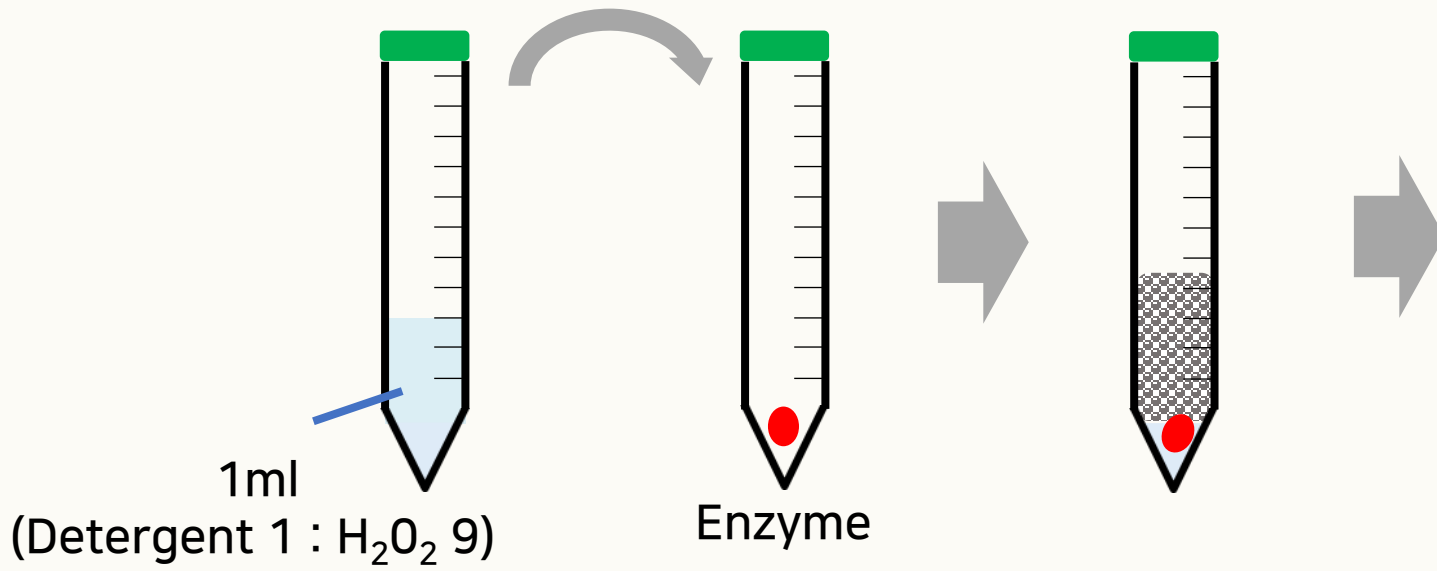


Experiment

Preview

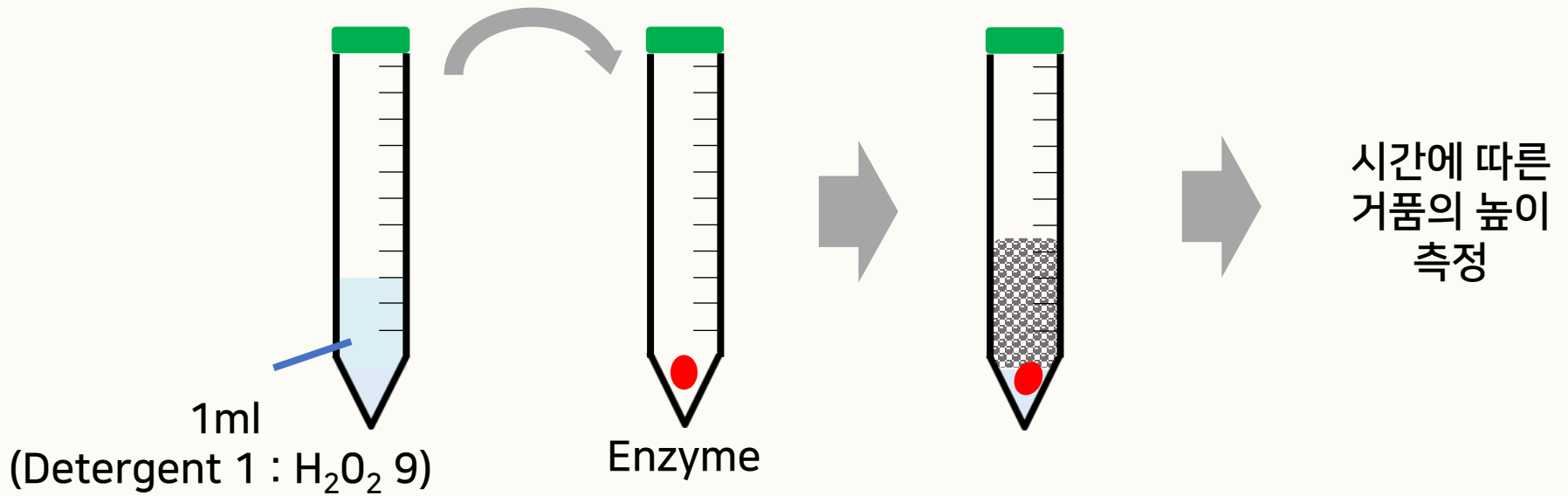
- $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- 간(Liver), 감자 - Catalase를 함유한 동물 & 식물 조직
- 1M Potassium iodide(KI) - 위 반응을 매개하는 촉매
-Potassium iodide : 166.0028g/mol





시간에 따른
거품의 높이
측정

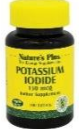
Hypothesis ;




Hypothesis ; 온도에 따라 Catalase 활성도가 달라질 것이다.

Experimental Design

1
 H_2O_2
+
세제



2
 H_2O_2
+
세제



3
 H_2O_2
+
세제




4°C


4
 H_2O_2
+
세제



5
 H_2O_2
+
세제

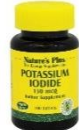


6
 H_2O_2
+
세제




37°C


7
 H_2O_2
+
세제



8
 H_2O_2
+
세제



9
 H_2O_2
+
세제



50°C

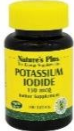
Experimental Design

N.C
 H_2O_2
+
세제


P.C
 H_2O_2
+
세제

Catalase


1
 H_2O_2
+
세제



2
 H_2O_2
+
세제



3
 H_2O_2
+
세제




4°C


4
 H_2O_2
+
세제



5
 H_2O_2
+
세제

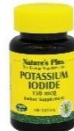


6
 H_2O_2
+
세제




37°C


7
 H_2O_2
+
세제



8
 H_2O_2
+
세제



9
 H_2O_2
+
세제



50°C

Experiment

Process

1. 9개의 15mL tube에 각각 1~9까지 번호를 쓴다.
2. tube 2, 3, 4를 water bath(37°C) tube 5, 6, 7을 얼음에, tube 8, 9, 10을 water bath(50°C)에 둔다.
3. KI 용액, 간, 감자를 각각 상온과 얼음, water bath(37, 50°C)에 둔다.
(before 2 hr)

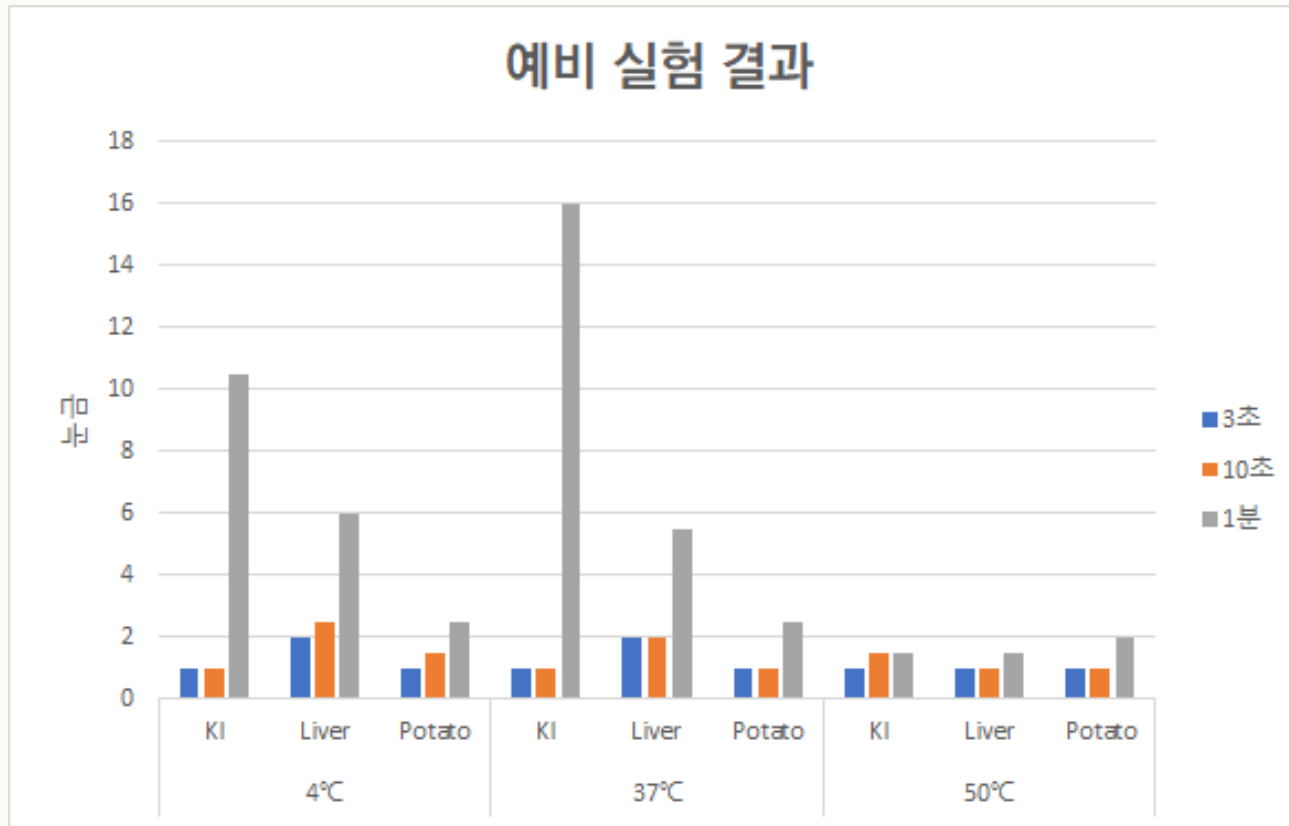
Experiment

Process

4. tube 2(KI 20ul)에 [H₂O₂+세제 용액]을 넣고 tube에서 발생하는 거품의 부피를 3초, 10초, 1분 단위로 잰다.
5. tube 3(간 0.2g) [H₂O₂+세제 용액] 을 넣고 tube에서 발생하는 거품의 부피를 3초, 10초, 1분 단위로 잰다.
6. tube 4(감자 0.2g) [H₂O₂+세제 용액] 을 넣고 tube에서 발생하는 거품의 부피를 3초, 10초, 1분 단위로 잰다.
7. 얼음에 두었던 KI 용액, 간, 감자에 대해 반복 실험한다.
8. Water bath(50°C)에 두었던 KI 용액, 간, 감자에 대해 반복 실험한다.

Experiment

Result



✓ 각 조 실험 결과에 대한 내용도 결과 보고서에 작성해주세요!

토의

실험 결과를 살펴보고 효소(및 촉매) 반응에 대한 여러 특징(경향)들을 정리해 보세요.

- ① 어떻게 실험을 계획해야 결과를 더 신뢰할 수 있을까?
- ② 무슨 기체가 발생해서 거품이 생겼을까?
- ③ KI를 넣은 튜브에서 거품의 색깔은 왜 노란색이었나?
- ④ 반응이 끝난 후 과산화수소수를 더 넣어주면 어떻게 될까?
- ⑤ KI, 간, 혹은 감자를 더 넣어주면 전체 거품의 양은 어떻게 될까?

문의 : hs950303@gmail.com

예비 보고서

1. Qiagen 사의 DNeasy Blood & Tissue kit 조사 (원리 및 과정 등)
2. DNA와 RNA의 차이점