

여지전기영동조에서 유기용매를 이용한 단백질이동

홍헌철 · 류우권 · 박중곤 · 송방호*

경북대학교 공과대학 화학공학과
*경북대학교 사범대학 생물교육과
(1991년 2월 19일 접수, 1991년 6월 19일 채택)

Protein Transport by the Paper Electrophoresis in Organic Solvent Medium

Heon Chul Hong, Woo Kweon Ryu, Joong Kon Park and Bang Ho Song*

Dept. of Chem. Eng., Kyungpook Nat'l Univ., Taegu 702-701, Korea

**Dept. of Biology, Teacher's College, Kyungpook Nat'l Univ.*

(Received 19 February 1991; accepted 19 June 1991)

요 약

생물고분자의 분석에 이용되어온 전기영동법은 비교적 장치가 간단하고 값이 싸서 주로 임상 분야에 널리 사용되어 왔다. 그러나 완충용액을 이용한 전기영동에서는 증발, 열효과, 완충용액의 농도구배 및 영동조 양단의 pH 변화 등과 같은 제한이 따르게 된다. 본 연구에서는 기존의 전기영동조에서 완충용액대신 유기용매를 매질로 사용하였으며, 유기용매내에서의 전기분자 추진에 의하여 lysozyme, α -amylase, pepsin을 이동시켰다. 단백질의 이동도는 완충용액을 이용한 전기영동의 경우 보다 약 2배 가량 빠르게 나타났으며 높은 전위 구배에 의한 열발생도 무시할 수 있을 정도로 감소하였다. 미수용매계내에서의 단백질의 실험은 α -amylase의 역가 측정 실험으로 검토하였다. 미수용매계내에서 전분을 분해할 때의 α -amylase의 역가 측정 실험결과 1시간 이내에서는 유기용매로 인한 효소의 실험은 없는 것으로 나타났다.

Abstract—Electrophoresis method has been widely used to analyze protein molecules in the clinical and biological field because of low cost and simple equipment. However, there are some problems in the application of the conventional electrophoresis such as evaporation of the buffer solution, formation of concentration gradient, pH changes and heat generation during the operation. To reduce the heat generation we used an organic solvent as a medium instead of buffer solution for the electromolecular propulsion, which has been previously used for the separation of dyes. We could increase the rate of movements of lysozyme, α -amylase and pepsin and reduce the heat generation in the electromolecular propulsion. The effect of the organic solvent on the activity of the protein was verified to be negligible by the experimental analysis of the activity of α -amylase.

1. 서 론

단백질은 세포내에서 가장 많은 존재하는 유기 물질

로 생체의 기본이 되는 복잡한 생물고분자이며 특이한 촉매 활성을 가지고 있어 효소로서 작용하므로 생물학적 기능이 다양하다. 단백질은 크기, 용해도, 전기적인 전하

[1-3], 흡착[4], 특정한 리간드에 대한 단백질의 생물학적 친화도[5] 등에 의해 분리할 수 있다. 단백질 분리의 구체적인 방법으로는 침전법, ultracentrifugation, 크로마토그래피, 전기영동으로 크게 대별된다.

대부분의 생물고분자는 수용액내에서 전하를 띠게 되므로 전기장내에서 움직이게 된다. 이러한 하전 입자가 전기장내에서 용매를 통하여 이동하는 것을 전기영동이라 한다. 이러한 특성을 이용하여 단백질의 분자량 측정[6], 유전자 조작을 거친 핵산의 분리 확인[7], 단백질의 분리[8-11] 등에 사용되고 있다. 특히 단백질의 분리에는 여러 가지 방법이 사용될 수 있으나, 전기영동에 의하면 가장 높은 분리도를 얻을 수 있다. 여지전기영동이나 이온영동은 아미노산이나 단백질 혼합물을 분리하는데 널리 이용되어 왔다[12-16]. 그러나, 이러한 전기영동에 의한 방법은 모두 완충용액을 사용하므로 전류에 의한 열발생과 이로 인한 완충용액 chamber 주변의 증발을 줄이기 위하여 낮은 이온 강도의 완충용액을 사용해야 하는 등의 문제점이 따르게 된다. 최근에는 완충용액에 5-15%의 프로필렌 글리콜이나 글리세롤을 첨가하면 증발을 줄일 수 있다는 보고도 있다[16]. 따라서 전기영동법에 의한 단백질 분리에는 다음과 같은 개선하여야 할 점들이 있다. 전기영동 중에 발생하는 열의 제거와 회분식이 아닌 연속계의 반응기를 scale up하는 것이다. 용액의 양단에 존재하는 전극에서 높은 전압이 걸리게 되므로 열이 발생하게 되고 이 열 효과로 인하여 단백질 변성을 일으킬 염려가 있다. 특히, 단백질의 활성은 열에 의해 변성되면 비가역 변화를 겪게 되므로 치명적이 될 수가 있다.

본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위한 방법으로 전기영동에서 사용하는 완충용액 대신 전기 전도도가 매우 낮은 혼합 유기용매를 전기분자 추진에 의한 단백질 이동의 매질로 사용하였다. 유기용매는 전기 저항이 크므로 고전압을 가하더라도 발생열량이 작을 수 있는 잇점이 있다. Haber는 이러한 이유로 유기용매내에서 전기장에 의한 유기염료의 이동에 성공하였으며 유기용매내에서 전기장에 의한 물질이동[17]을 전기분자 추진(electromolecular propulsion)이라고 명명하였다. 유기용매를 이용한 단백질의 전기분자 추진은 가능성만 제시되었지 연구 발표된 바 없으므로 본 연구에서는 4가지 혼합 유기용매를 매질로 이용하여 단백질 이동을 시도하였다. 전극 양단에 혼합 유기용매를 채운 후 지지체를 고정시키고 유기용매를 통과시켜 고전압을 가하면 전위 구배에 의해 완충용액을 포함한 단백질 용액이 전기적인 특성에 따라 이동하게 된다. 이러한 전기분자 추진에 의한 단백질 분리에 있어서 우려되는 점은 유기용매로 인한 단백질의 실활이므로

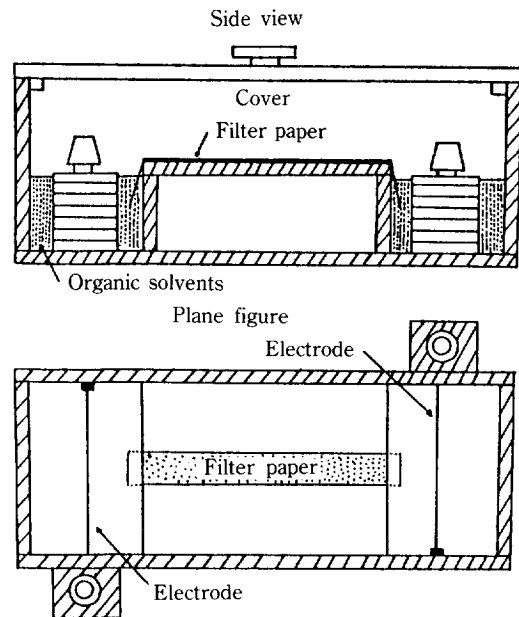


Fig. 1. Schematic representation of commercial horizontal paper electrophoresis cell.

이에 대한 조사와 더불어 새로운 분리 기법의 가능성을 제시하였다.

2. 실험

2-1. 실험 재료

실험에 사용한 단백질은 촉매성과 특이성이 현저하고 등전점이 pH 11인 lysozyme과 활성 측정이 간편하고 등전점이 pH 5-pH 6인 α -amylase와 등전점이 매우 낮은 pepsin(EC 3. 4. 23. 1)을 사용하였다. 전기분자 추진의 매질로 사용한 유기용매는 Haber[17]가 유기염료의 전기분자 추진에 사용한 바 있는 propylene glycol 40%, propylene carbonate 40%, N-methylacetamide 16%, tetrahydrofurfuryl alcohol 4% 조성(v/v)의 혼합 유기용매를 사용하였다. 전기분자 추진조는 Fig. 1에 나타난 것과 같이 gel이 존재하지 않는 평판형 전기분자 추진조를 사용하였다. 양단 전극은 직경 0.5 mm의 백금선으로 제조하였으며 반응조는 투명한 아크릴판으로 제작하였다. 여지는 Toyo사의 여지전기영동용 paper No. 51을 사용하였다. 본 실험에서 사용한 고전압 power supply는 최고 15 KV의 DC power supply를 특수 의뢰 제작하여 사용하였다.

2-2. 실험방법

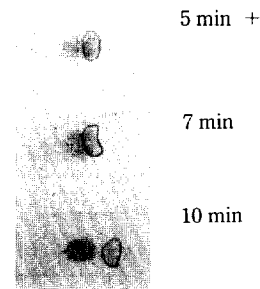
대부분의 단백질은 유기용매내에서 침전되며 단백질이 활성을 갖고자 하면 물을 필요로 한다. 따라서 본 연구에서는 먼저 단백질을 완충용액에 용해시켜 단백질 시료액을 만든 다음 이 용액에 유기용매를 1:1로 혼합하여 단백질 시료액으로 사용하였다. 일반적으로 유기용매와 물을 혼합하면 두개의 상으로 존재하게 된다. 그러나 본 연구에 사용한 혼합 유기용매는 물과 거시적으로 섞일 수 있는 alcohol과 glycol이 포함되어 있으므로 최종 혼합 단백질 용액은 유기용매와 섞여서 pseudo-homogeneous 상으로 존재하게 된다. 혼합 단백질 시료액은 일주일까지 침전이 생기지 않았으며 최종 혼합 단백질 용액은 미시적으로는 두개의 상으로 이루어져 있다고 생각할 수 있다. 단백질 시료액의 농도는 100 g/l로 하였으며 수용액과 유기용매의 혼합비는 1:1로 하였다.

평판형 전기분자 추진조의 chamber내의 혼합 유기용매를 일정한 level로 유지시킨 다음 Toyo No. 1 filter paper strip(15×11 cm) 양단을 solvent chamber에 넣어 용매를 서서히 적신다. 용매가 충분히 적셔지면 power supply를 이용하여 고정된 전압을 가한 후 tip이 부착된 마이크로 피펫으로 1 μ l의 혼합 단백질 시료액을 strip의 중심부에 가하였다. 전기분자 추진한 다음 paper strip을 오븐에 넣어 90-100°C에서 10분간 건조시킨 후 ninhydrin 용액을 spray시키고 열을 가하여 발색시킨 다음 단백질의 이동된 위치를 확인하였다. Ninhydrin 용액은 0.2%의 ninhydrin을 n-butanol에 용해시켜서 사용하였다.

α -Amylase의 활성 측정 방법으로서 본 연구에서는 Fuwa의 blue-value개량법을 이용하였다[18]. 농도가 0.067 M인 인산 완충액에 용해시킨 1%의 가용성 전분을 기질로써 사용하였다. 인산 완충액에는 최종 농도 2 mM로 calcium acetate를 첨가하였다. pH 4.0, 7.0, 10.0의 각 완충 용액에 α -amylase를 10 g/l되게 용해시켜 혼합 유기용매와 1:1(v/v)로 혼합하여 최종 단백질 시료액을 만들고, 그 중 2.5 ml를 취하여 37°C 항온 수조에서 임의의 시간동안 보관한 후 37°C에서 기질 10 ml와 약 6분간 반응시킨 다음 요오드 용액 5 ml를 첨가하여 발색시켜 700 nm파장 범위에서 흡광도를 측정하였다. 이 처리 과정에서 유기용매와 혼합하지 않고 동일한 pH의 완충용액을 동량 가하여 동일한 조건하에서 처리한 단백질 시료액의 경우와 비교함으로써 유기용매에 의한 효소의 실패 여부를 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 단백질의 이동



Movement of the lysozyme in the mixed organic solvent system.

Composition of the protein solution: 10 mg lysozyme; 100 μ l water; 100 μ l organic solvent.

Fig. 2. Movement of the lysozyme on the paper wetted with organic solvents for the electric pressure 7 KV.

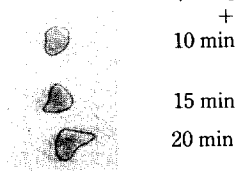
Table 1. Moving velocity of lysozyme in the horizontal electrophoresis with organic solvents

pH of protein solution	4.1	H ₂ O	8.0	10.0
Moving velocity of lysozyme toward anode(cm/min)	0.06	0.06	0.05	0.04

분자량이 단백질의 약 10% 정도가 되는 유기염료의 일종인 bromophenol blue(B.P.B.)를 전기분자 추진하였다. B.P.B.의 시료액도 단백질 시료액을 조제하는 방법과 동일하며 0.1% B.P.B.를 순수한 증류수에 용해시켜 사용하였다. 추진조의 양단에 7 KV의 전압을 가했을 때 유기용매가 양극에서 음극으로 이동하는 것이 확인되었으며 그 속도는 0.8 cm/min이었다. 그러나, B.P.B.는 전위구배에 의한 유기염료의 이동 효과로 인해 양극쪽으로 이동하였으며, 전위구배 0.5 KV/cm에서 0.98 cm/min으로 이동하였다.

Lysozyme의 최종 시료액을 1 μ l가하고 전극 양단에 7 KV의 전압(전위구배 0.5 KV/cm)을 가하여 전기분자 추진한 결과 이동속도는 0.06 cm/min이다(Fig. 2). 이때의 전류는 0.02 mA로서 여지의 단위 길이당 발생 열량은 계산치로서 0.0067 W/cm²에 불과하다. 단백질 원액의 pH에 따른 lysozyme의 이동속도는 Table 1과 같다. Lysozyme의 등전점은 pH 11.0이며 단백질 원액의 pH가 감소할수록 즉, 등전점으로부터 멀어질수록 이동속도는 증가하고 있다. 일반적으로 단백질은 카르복실기와 아민기를 가지고 있어서 단백질 자체구조에 -COOH기를 가지고 있을 때는 높은 pH에서 이온화하여 -COO⁻기로 존재하며 아민은 전하를 가지지 않는다. 마찬가지로 H⁺이 과잉으로 존재하는 낮은 pH에서 -NH₂기가 존재하면

Composition of the protein solution: 10 mg α -amylase;
100 μ l of pH 4.1 buffer sol.; 100 μ l organic solvent.



Composition of the protein solution: 10 mg α -amylase;
100 μ l of pH 10 buffer sol.; 100 μ l organic solvent.



Movement of the α -amylase in the mixed organic solvent system.

Fig. 3. Movement of the α -amylase on the paper wetted with mixed organic solvents for the electric pressure 7 KV.

Table 2. Moving velocity of α -amylase in the horizontal electrophoresis with organic solvents

pH of protein solution	4.1	H ₂ O	7.2	10.0
Moving velocity of α -amylase toward anode(cm/min)	0.02	-0.04	-0.05	-0.06

$-\text{NH}_2$ 기는 H^+ 이온과 반응하여 $-\text{NH}_3^+$ 로 존재하며 카복실기는 이온화되지 않는다. 그러므로, 전기영동에서 완충용액의 pH가 단백질의 등전점보다 높을 때는 음전하를 띠게 되어 양극쪽으로 이동하며 등전점 보다 낮을 때는 단백질이 양전하를 띠게 되어 음극으로 이동하는 것과는 상이한 결과를 나타내었다. 이에 따라 Haber는 유기용매내에서의 유기염료의 이동을 전기분자 추진(electromolecular propulsion)이라 명명한 바 있으며[17] 이를 규명하기 위한 화학적 해석과 유기용매내에서의 단백질 입자의 거동에 대한 연구는 계속되어야 할 것이다.

등전점이 pH 5.5인 α -amylase를 동일 방법으로 전기분자 추진한 결과 완충용액이 pH 4.1인 최종 단백질 시료액의 경우에는 이동속도 0.02 cm/min로 양극쪽으로 이동하고 있으나 pH 10.0인 경우 음극쪽으로 이동하였다(Fig. 3). 각 pH에 따른 이동속도 변화는 Table 2와 같다. 따라서 단백질 원액의 pH는 단백질의 이동속도에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 유기용매계에서의 이동속도는 분자량이 α -Amylase에 가까운 사람 혈청 단백질의 경우 완충용액(pH 8.6)을 사용한 Durrum [13]의 결과에서 보다 1.5배 이상 빠르게 나타났다. α -Amylase의 경우 단백질 원액의 pH가 등전점(pI)에 가

Table 3. Moving velocity of pepsin in the horizontal electrophoresis with organic solvents

pH of protein solution	2.7	4.0	5.6	7.2	8.5	10.0
Moving velocity of pepsin toward cathode (cm/min)	0.053	0.068	0.073	0.08	0.09	0.093

Table 4. Inactivation α -amylase under buffer solution and micro-aqueous solvent system

Time(min)	0	30	60	120
OD : Buffer(pH 7.0)	0.40	0.40	0.40	0.47
Solvent	0.37	0.36	0.39	0.42
Unit : Buffer(pH 7.0)	9.60	9.60	9.60	8.50
Solvent	10.08	10.24	9.80	9.20

까울수록 이동속도가 감소하였다. 이것은 등전점 근처에서 단백질 전하의 대수합이 감소하였기 때문인 것으로 생각된다.

pH 4.0의 완충용액에 용해시킨 pepsin원액을 혼합 유기용매와 1 : 1로 섞은 최종 단백질 시료액을 전위구배 0.64 KV/cm로서 전기분자 추진한 결과 pepsin을 0.068 cm/min의 속도로 이동시킬 수 있었다. 원액 pH에 따른 단백질의 이동속도변화는 Table 3에 나타내었다. Pepsin의 경우에 있어도 단백질 원액의 pH에 따른 이동속도는 단백질 원액의 pH가 등전점에서 멀어질수록 증가하였다.

3-2. 유기용매계에서의 효소단백의 활성변화 및 안정성

실험에서 사용한 혼합 유기용매와 전기분자 추진에서 사용한 조성과 같은 단백질원액을 1 : 1로 섞인 α -amylase혼합 단백질 시료액으로써 전분을 분해할 때에 시간에 따른 활성도를 37°C에서 측정한 결과는 Table 4와 같다. 임의의 시간동안 효소단백이 처리하는 전분의 양으로 α -amylase의 역가를 계산하여서 효소단백의 활성도를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 1 mg의 전분을 1분간에 가수분해시키는 효소 역가를 1단위(IDB Unit)로 표시하였다. α -Amylase의 역가는 (1)식과 같이 나타내었다. 이 식에서 $\text{OD}_{\text{control}}$ 은 기질과 반응시키지 않은 초기 흡광도를 나타내며, $\text{OD}_{\text{sample}}$ 은 효소를

$$\text{Unit} = \frac{\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}}{\text{OD}_{\text{control}}} \times \frac{1}{\text{Reaction Time(min)}} \times 100 \quad (1)$$

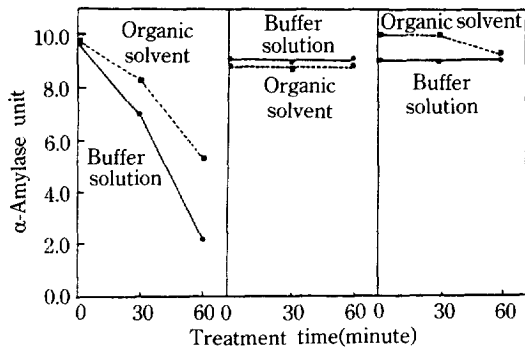


Fig. 4. α -Amylase stability in mixed organic solvent system.

임의의 시간동안 처리하여 기질과 반응시킨 시료액의 흡광도를 나타낸다. pH 7.0의 중성 완충용액에서와 유기용매와 혼합한 시료액을 동일 조건에서 임의의 시간동안 처리하고 전분 분해반응을 6분간 진행시킨 후 흡광도를 측정하였다. 단백질 원액의 pH가 4.0, 7.0, 10.0일 때 혼합 단백질 시료액내의 α -amylase가 37°C에서 반응을 하는 경우에 대하여 단백질의 실활을 조사하였다. 또한 동일한 조건의 단백질 원액만을 처리한 경우와 비교하여서 유기용매에 의한 실활 여부를 검정하였다. 결과로서 효소의 역가는 Fig. 4에 나타내었다. 중성영역의 pH에서 1시간동안 처리하였을 경우 α -amylase의 활성은 혼합 단백질 시료액에서 전혀 실활되지 않았다. 단백질 원액이 산성인 경우(pH 4.0) 단백질 원액내의 효소 활성의 80%가 상실되었으나 유기용매 혼합 단백질 시료액에서는 단지 50%만이 상실되었다. 이상의 실험 결과로 유기용매계에서 전기분자 추진하는 과정에는 유기용매로 인한 효소의 실활은 없는 것으로 보이며 산성 및 알칼리성 용액에서는 오히려 효소의 활성이 유기용매로 인하여 증가하는 것으로 보인다.

4. 결 론

Lysozyme과 α -amylase 그리고 pepsin의 3가지 단백질에 대하여 단일 단백질분리 실험과 효소 역가 측정 실험을 행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 유기용매계에서의 고전압 전기분자 추진으로 완충용액에서 보다 1.5배에서 2배의 빠른 이동도를 얻었다. 기존의 전기영동법에서 발생 열량은 $0.10\text{--}0.80\text{ W/cm}^2$ 인데 비해 유기용매를 이용한 고전압 전기분자 추진의 열발생량은 0.0067 W/cm^2 에 불과하여 냉각장치 없이도 효소 역가를 유지하면서 분리가 가능하였으며 발생열량과 이동속도면에서 기존의 전기영동법 보다 우수함을 알 수 있었다.

(2) Bromophenol blue(B.P.B.)는 전압차에 의한 유기염료의 이동 효과로 0.5 KV/cm에서 양극쪽으로 0.98 cm/min의 속도로 이동하였으며, 각 단백질을 유기용매와 혼합한 시료액을 전기분자 추진한 결과 B.P.B.보다 느린 속도로 이동하였다. 이것은 단백질의 분자량이 B.P.B.의 분자량 보다 크기 때문이다. 각 단백질은 등전점에서 멀어질수록 이동속도가 증가하는 경향을 보였다. 따라서 단백질 분리에 있어서 분자량과 단백질 원액내의 완충용액의 pH가 이동방향과 이동속도에 관련함을 알 수 있다.

(3) 유기용매내에서의 효소의 역가를 측정한 결과 단백질 원액이 산성(pH 4.0)인 경우 1시간 후 단백질 원액내의 효소활성의 80%가 실활되었으나 유기용매 혼합 단백질 시료액에서는 50% 정도 실활되어 유기용매로 인한 단백질 활성의 증가가 나타났다. 알칼리성 영역에서는 단백질 원액내의 단백질이 실활되지 않았으며 유기용매로 인하여 완충용액내의 단백질의 활성보다도 크게 나타났다. 중성영역에서는 단백질 수용액을 이용한 유기용매계에서 120분이 지날 때까지 효소의 실활이 거의 없었다.

감 사

본 연구는 과학재단 연구비('87-'90)의 일부로서 완성되었음.

REFERENCES

- Moore, D. H.: "Electrophoresis in Physical Techniques in Biological Research", 2nd ed., Academic Press, New York, 121(1968).
- O'Farrell, P. H.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007(1975).
- Mullon, C., Mason, N. and Spark, R.: *Biotech. Bioeng.*, **30**, 123(1987).
- Yamamoto, S., Nomura, M. and Sano, Y.: *AICHe J.*, **39**(9), 1426(1987).
- Ruckenstein, E. and Lesins, V.: *Biotech. Bioeng.*, **28**, 432(1986).
- Weber, K. and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406(1969).
- De Wachter, R. and Fiers, W.: *Methods Enzymol.*, **21**, 167(1971).
- Longworth, L. G. and MacInnes, D. A.: *J. Am. Chem. Sci.*, **62**, 705(1940).
- Larson, D. L. and Feinberg, R.: *Science*, **120**, 426(1954).
- Nielsen, L. E. and Kirkwood, J. G.: *J. Am. Chem.*

- Sci.*, **68**, 181(1946).
11. Landstein, K., Longsworth, L. G. and Van der Scheer, J.: *Science*, **88**, 83(1938).
 12. Durrum, E. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2939(1950).
 13. Durrum, E. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 4875(1951).
 14. Durrum, E. L., Paul, M. H. and Smith, E. B.: *Science*, **116**, 428(1952).
 15. Common, R. H., Mckinley, W. P. and Maw, W. A.: *Science*, **118**, 86(1953).
 16. Block, R. J., Durrum, E. L. and Zweig, G.: "A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis", 2nd ed., Academic Press Inc.(1958).
 17. Haber, N.: *Biochem. J.*, **79**, 272(1982).
 18. Yoo, Y. J., Hong, J. and Hatch, R. T.: *Biotech. Bioeng.*, **30**, 147(1987).