

血清蛋白質分割에 대한 研究*

I. 血清蛋白質分割에 對한 鹽析法과 濾紙, 寒天電氣泳動法과의 比較

全南大學校 農科大學 獸醫學科

林 鳳 鎬

I. 緒 言

動物體의 主要한 構成成分은 여러가지 蛋白質으로 되어 있으며 그 蛋白質의 種類, 性質에 따라 그機能에도 顯著한 差異가 있다. 그리고로 複雜한 混合體로 되어 있는 生體에 있어서 特定の 機能을 가진 여러가지 種類의 蛋白質의 分離에 對한 研究가 活潑히 實施되어 왔다.

血清의 蛋白質도 亦是 單一한 蛋白質로 되어있는 것이 아니며 相當한 數의 蛋白質混合體로 되어 있는 것이다. 이 蛋白質의 混合體가 어떠한 樣相의 集合體로 되어 있는가를 究明하기 爲하여 利用되고 있는 重要한 分割法에는 鹽析法, 電氣泳動法, 超遠心分離法, 免疫學의 分離法等이 있다.

鹽析法에 있어서는 現在 鹽析力이 강한 sodium sulfate, ammonium sulfate 등을 널리 使用하고 있는데 Howe⁽¹⁵⁾는 sodium sulfate를 使用하여 鹽析現象을 血清蛋白質分割에 對하여 系統的으로 研究하였다. Howe는 이 方法으로 血清蛋白質의 溶解도가 낮은 것부터 順次的으로 euglobulin, pseudoglobulin I, pseudoglobulin II, albumin으로 區分하고(以下 各各 euglob., p-glob. I, p-glob. II, alb.이라 略記) Howe의 方法이라 하여 臨床的 研究 및 應用等に 널리 利用되어 왔다.

그후 Tiselius⁽²²⁾(1937)는 電氣泳動法을 血清蛋白質分割에 適用하여 蛋白質分割에 劃期的인 發展을 가져왔고 이 方法에 依하여 血清蛋白質의 易動도에 따라 albumin, alphaglobulin, beta-globulin, gamma-globulin(以下 alb., α -glob., β -glob., γ -glob.,이라 略記)의 四成分으로 分離하고 血漿에서는 fibrinogen(fib.)을 加하여 五成分으로 區分하였다.

Durrum(1950)은 電氣泳動法과 濾紙 chromatography 등의 各其 長點을 結合 利用한 濾紙電氣泳動法을 使用

하여 血清蛋白質을 分割하였고 그 分割名稱도 電氣泳動法의 것과 같이 各各 alb., α -, β -, γ -glob.이라 稱하였다. 이 方法은 裝置가 簡單하고 微量의 試料로서도 足하므로 널리 利用되고 있으며, 이 裝置에는 支持體인 濾紙代身에 寒天⁽²¹⁾⁽⁹⁾ 澱粉 gel,⁽²⁰⁾ acetate cellulose⁽²⁰⁾ 등을 使用하여 血清蛋白質分割에 많이 利用하고 있다. Smithies⁽²⁹⁾(1955)는 濾紙電氣泳動法과 澱粉 gel 電氣泳動法의 二次元的 方法으로 血清蛋白質을 20餘種으로 區分하고 있고, Cohn⁽⁶⁾은 有機物인 ethanol을 利用하여 低濕度, 低 ion 強度下에서 血清蛋白質을 多量으로 分離하는데 成功하였다.

그러나 어떠한 方法을 利用하여 血清蛋白質을 分割하여도 生物學的, 生化學的 그리고 物理化學的으로 均一性이며 純粹한 單一 蛋白質을 分離하기는 어렵다. 卽蛋白質各分割의 均一성은 單 한가지의 方法만으로는 決定하기가 어려운 것으로 推測되는 바이다.

現在 一般的으로 알려져 있는 alb., P-glob., euglob. 등은 鹽析法에 依한 分割名稱이고 alb., α -, β -, γ -glob. 등은 電氣泳動法에 依한 分割의 名稱이다. 鹽析法과 電氣泳動法과의 各分割에 對한 比較는 平井,⁽¹³⁾ Kibrick,⁽²⁰⁾ Milne⁽²⁰⁾ 등에 依하여 研究된 바 있으나 濾紙, 寒天電氣泳動法과 鹽析法과 血清蛋白質分割에 對한 比較研究는 거의 없는 것으로 알고 있다.

著者는 血清蛋白質分割에 對하여 鹽析法과 濾紙 및 寒天電氣泳動法과의 關係를 比較 檢討하고, 다음 兩方法의 各分割에 對해서 抗原的으로 어떠한 關係가 있는가를 免疫電氣泳動法 및 Gel 二相擴散法의 方法으로 比較 檢討한 結果를 여기에 記錄하는 바이다.

便宜上 一編에서 鹽析法과 濾紙 및 寒天電氣泳動法과의 關係를 比較하고, 二編에서 兩者를 免疫學的으로 다루기로 하였다.

* 本論文要旨는 第8回 大韓獸醫學會에서 發表하였음(1964).

II. 材料 및 方法

血清 및 血漿 : 光州屠殺場에서 求한 牛血液에서 分離하였으며 血漿에는 二重蓆酸鹽을 使用하였다. 防腐劑로 1/10,000의 merthiolate를 添加하였으며 血清 및 處理한 血清等은 恒時 0°C~4°C의 冷藏庫에 保管하여 使用하였다. 血清蛋白質 測定은 Atago 蛋白計와 Biuret 方法⁽²⁷⁾을 使用하였다.

鹽析法 : sodium sulfate(Na_2SO_4)를 一定한 血清(血漿)에 階段的으로 2%씩(%는 血清 100cc에 對한 Na_2SO_4 의 g數) 增量하며 直接 加하여 그 Na_2SO_4 濃도가 4%, 10%, 12%, 14%……28%로 되게 하였고 Na_2SO_4 를 直接 加하지 않을 때는 各種 濃度の Na_2SO_4 溶液에 一定量의 血清을 加하여 各各 所期의 濃도에 達하게 하였다. Na_2SO_4 를 加한 血清은 34°C의 恒溫器에 3~5時間 放置하였다가 濾過하거나 遠心分離(3,000rpm 30分)한 後에 濾液은 그대로, 沈澱한 部分은 同一 濃度の Na_2SO_4 溶液으로 3回 洗滌한 後 cellophane 紙를 利用하여 5~12時間 流水 透析하여 鹽類를 除去한 後에 使用하였다. Na_2SO_4 處理는 恒時 34°C以上에서 操作하였다.

濾紙電氣泳動法(以下 濾紙法이라 略記) : 小林等⁽²¹⁾⁽¹⁷⁾의 方法에 準하여 裝置는 日本 東洋理化學工業株式會社 K-I型, 濾紙는 Whatman No.1(23×5cm), 血清은 0.05 ml를 2個 線狀으로 濾紙에 塗付, 緩衝液은 veronal buffer(pH 8.6, ion 強度 0.05), 濾紙 길이(長) 1cm當 6~7 volt 15~17時間 泳動, 105°C에서 乾燥, Brown phenol blue(B.P.B.)로 染色, densitometer로 各分割 測定, planimeter로 各分割 面積을 測定하여 各分割 比率를 算出하였다.

寒天電氣泳動法(以下 寒天法이라 略記) : 裝置는 濾紙法의 裝置를 使用하였으며 Bussard等⁽³⁾⁽⁹⁾⁽¹⁴⁾의 方法을 若干 變更하였다.

緩衝液槽 : 4個 또는 6個(載物硝子十枚橫入 染色壺를 使用하였음)를 使用하였으며 電極槽의 緩衝液의 pH變化를 避하기 爲하여 2~3回 使用後 陰, 陽極의 電極槽의 位置를 交換하였다.

緩衝液 : sodium barbiturate 15.85g을 770ml의 蒸溜水에 溶解, 0.1N HCl 230ml를 加하여 1,000ml로 하고(pH 8.2, ion 強度 0.05) 1/10,000의 merthiolate를 加하였다. 寒天溶液 : 1/10,000의 merthiolate를 加한 5%의 寒天溶液(bento agar DIFCO)이 凝固한後 約 1cm³의 크기로 切斷하여 2~3日間 蒸溜水를 每日 交替하면서 沈漬하여 두었다가 使用할 5% 寒天塊에 乾量으로 算出된 所定量의 蒸溜水를 加하여 再次 蒸인 後 56°C 恒溫槽에서 所定量의 緩衝液을 加하여 1% 寒天溶液이 되도록 하고 3枚 gauze를 겹쳐서 濾過하여 使用하였다. (大略 10g의 5

% 寒天塊에 蒸溜水 15ml와 緩衝液 25ml를 加하였다.)

寒天板 : 小型載物硝子는 清潔한 것을 methanol, ethanol로 處理, 乾燥에서 使用하였다. 載物硝子 4枚의 넓이(幅)와 2枚의 깊이(深)를 가진 paraffin 塊를 만들어 載物硝子 4枚를 paraffin 塊위에 平面으로 配列하고 이것을 水平面에(位置 不動의 平準한 容器에 3% 寒天으로 두께(厚) 1cm 程度의 寒天板을 만든것) 놓고 1% 寒天液 約 10ml를 부어 載物硝子上面에 約 1mm 두께의 寒天板을 만들었다. 泳動時의 寒天板과 緩衝液의 連結은 Whatman No.1 濾紙(5×8cm)를 寒天板 兩端에서 約 0.5cm 程度 部位에 附着시켰다. (Fig. 5)

血清量 : 26gauge 注射針을 使用하여 約 0.03ml를 寒天板의 well(구멍)에 注入하였다. well은 寒天板의 中央 中心部에 1個 또는 中央兩端에서 約 0.3~0.4cm 部位에 2個를 micro pipette로 直徑 約 1mm가 되도록 만들었다. 寒天板은 載物硝子가 4枚는 paraffin 塊를 1個 또는 2個 同時에 使用하였다.

染色液 : 6g의 amido black 10B를 mgthanol, acetic acid, 蒸溜水(45 : 10 : 45)의 溶液에 溶解시켜 만든 染色液에 3~5分間 染色, 蒸溜水에 2回 10分間씩, 다시 amido black 10B를 溶解시킨 液에 2回 5分間씩 洗滌하여 餘分의 染色液을 除去하여 室溫에서 乾燥시켰다.

泳動時의 電壓은 200~300volt(電流는 15~20mA), 泳動時間은 室溫에서 2~3時間이었다. 泳動後 寒天板은 載物硝子와 같이 paraffin 塊에서 分離하여 80°C 乾熱器에서 約 40分間 乾燥시킨 後에 染色하였다.

III. 實驗成績

1. 濾紙電氣泳動法

濾液 : Fib.은 出發點에서 移動하지 않고 8% Na_2SO_4 濃度液까지 남아있었으나 10%에서 消滅되었다. γ -glob은 12%에서 急作히 減少되어 16%에서는 微細한 痕跡만 남고 18%에서는 完全히 消滅되었다. α -, β -glob의 各分割은 各 % Na_2SO_4 濃도가 높을수록 漸次的으로 減少되어 大略 26% 附近에서 消滅되었으나 28%의 濾紙上에서도 微細한 痕跡을 남길 때도 있었다(Fig. 1).

沈澱部分 : 血清에 Na_2SO_4 를 加하여 結晶狀態로 되어있는 沈澱部分은 各各 同一%의 Na_2SO_4 濃度溶液으로 3回 洗滌하여 上清液을 버리고 流水 透析하면 原狀의 液體狀態로 되었다. 原液 또는 生理的食鹽水로 2倍 稀釋하여 濾液과 同量을 泳動시켰다.

γ -glob은 10% 濃度에서 나타나기 始作했으며, β -glob은 12%에서 γ -glob과 分離가 確實히 않은채 나타나서 漸漸 Na_2SO_4 濃도가 높아짐에 따라 增量하였고, α -glob은 14% 附近에서 부터 나타나기 始作하였다. alb.은 14% 附近에서 微細한 痕跡을 볼 수 있었고 16%, 18%에

서는 完全한 分割으로 나타나 Na_2SO_4 濃度가 높아 갈수록 그 量을 增加하고 있었다(Fig. 3).

2. 寒天電氣泳動法

濾液: 寒天板上의 β -, γ -glob.의 分割分離가 分明치 못하였고 中央出發點에서 alb., α -glob.은 陽極으로, γ -glob.은 陰極으로 移動하고, β -glob.은 出發點에서 若干 陽極으로 移動하였으나 帶로는 移動하지 않았다.

γ -glob.은 12% 附近에서 減少되면서 16에서는 完全히 消滅되어 버렸다. α -, β -glob.은 16%~18%에서 減少가 激甚하였으며 20~22%에서는 거의 完全히 消滅되고 있었다(Fig. 2).

沈澱部分: 濾紙法과 거의 같은 樣相을 보여주었으며 γ -glob.은 12%에서 大量으로 나타나기 始作하여 漸次 그 量을 增加하고, α -, β -glob.은 13% 附近에서 少量 나타나기 始作하여 漸次的으로 增量하고, alb.은 14%에서 稀薄하게 나타나기 始作하여 16%에서는 確然한 分割으로 되어 漸次 增量하고 있었다(Fig. 4).

以上은 濾紙, 寒天 兩法에 依한 各% Na_2SO_4 濃度の 濾液과 沈澱部分의 各分割에 對한 肉限의 觀察을 한 것이다.

Table 1은 濾紙法에 依한 各%의 濾液의 pH 및 各分割

Table 1. Comparison between the results of fractionating serum* with sodium sulfate and paper electrophoresis

Na_2SO_4 g/%	Protein g/dl	pH	Albumin		Globulins					
					α		β		γ	
			%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	%	g/dl
0	7.5	6.8	51	3.8	13	1.0	12	0.9	24	1.8
4	6.9	6.6	53	3.7	11	0.8	16	1.1	20	1.4
8	6.2	6.4	58	3.6	10	0.6	10	0.6	21	1.4
10	6.1	6.4	63	3.3	13	0.8	12	0.7	12	0.7
12	5.6	6.2	65	3.6	13	0.7	12	0.7	10	0.6
14	5.1	6.2	65	3.2	15	0.7	15	0.7	5	0.4
16	4.8	6.0	68	3.2	16	0.8	16	0.8	—	—
18	3.8	5.8	67	2.6	17	0.6	16	0.6	—	—
20	3.5	5.6	71	2.5	13	0.5	16	0.6	—	—
22	2.8	5.6	71	2.0	15	0.4	14	0.4	—	—
24	2.4	5.4	72	1.8	15	0.3	13	0.3	—	—
26	2.2	5.4	75	1.7	13	0.3	12	0.3	—	—

* Samples used are the filtrate after precipitation with sodium sulfate.

IV. 考 察

鹽析法의 溶解度와 濾紙, 寒天法의 易動度와의 關係는 Na_2SO_4 에 對한 溶解度가 낮은 蛋白質은 濾紙, 寒天板上의 易動度가 낮아지고 있었다. 即 鹽析法에 있어서 溶解度가 낮은 分割에서 높은 分割의 順序가 易動度가

의 蛋白質量, 比率等을 測定한 것이다.

pH는 Na_2SO_4 濃度가 높을수록 漸次的으로 低下되는데 正常血清의 pH 6.8의 26%에서는 5.4로 되었다.

各% 濾液의 蛋白質量도 Na_2SO_4 濃度가 높을수록 沈澱量이 增加하기 때문에 減少되어 正常血清의 平均總蛋白質 7.5g/dl에 비해 16%에서는 2.2g/dl로 減少되고 있었다.

alb.의 蛋白質은 總蛋白質의 51%에 該當한 3.8g/dl이며 14~16%에서 微量의 減少를 보이고 있었으나 18%부터 減少度가 增大하고 있었으며 Na_2SO_4 濃度가 增加함에 따라 그 濾液의 蛋白質量에 對한 alb.蛋白質의 比率는 漸次的으로 高率을 보여주고 있었다. 이것은 alb.以外的 蛋白質이 alb.보다 더 빨리 沈澱하기 때문이다.

α -, β -glob.은 正常血清에서 總蛋白質의 13%, 12%에 各各該當하여 蛋白質量은 各各 1.0g/dl, 0.9g/dl이며, 16%에서 少量, 減少되었고, 18%에서 減少量이 增加하여 26%에서는 少量이 殘留할 따름이었다.

γ -glob.의 蛋白質은 總蛋白質의 24%에 該當한 1.8g/dl이며 4%부터 減少되기 始作해서 12%에서 激甚하고 14%에서는 極히 少量으로 되었고, 18%에서는 完全히 없어져 있다.

느린 分割에서 빠른 分割의 順序에 一致되고 있었다. Na_2SO_4 濃度가 漸次的으로 增加함에 따라 濾紙, 寒天板上의 濾液의 分割은 易動度가 느린 것부터 即 fib., γ -, β -, α -glob., alb. 順序로 漸漸 減少 되어 가고 있었다. (Fig. 1, 2).

鹽析法의 分割과 濾紙, 寒天法의 分割의 比較

鹽析法의 血清蛋白分劃은 Howe⁽¹⁷⁾가 Na₂SO₄를 使用하여 溶解度가 낮은 것부터 euglob. (13.5~14.5%), p-glob. I (15~18%), p-glob. II (20~22%), alb. (22% 以上)으로 區分하였다.

1. 濾紙電氣泳動法

濾紙法과 鹽析法의 分劃의 關係는 Fig. 1, Fig. 3, Table 1에 表示한 바와 같다.

euglob.은 大部分의 r-glob.으로 되어 있고 少量의 α-, β-glob.이 混合되어 있을 뿐 아니라 微量의 alb.도 含有되고 있다. Table 1에 依하면 r-glob.은 거의 全量, α-, β-glob.은 各各 그 蛋白質量의 約 20%가 包含되어 있고, alb.은 約 0.05%가 含有되어 있으며, Fig. 3에서도 14%에서 alb.이 나타나고 있어 微量의 沈澱이 있다는 것을 意味하고 있다.

p-glob. I은 大部分의 α-, β-glob., 微量의 r-glob., 少量의 alb.으로 構成되고 있다. α-, β-glob.은 各其 蛋白質의 60~70%가 含有되고 있다.

p-glob. II는 α-, β-glob.의 蛋白質의 20~40%, 相當量의 alb.을 含有하고 있으며 r-glob.은 含有되어 있지 않다.

alb.은 鹽析法, 電氣泳動法에서 同一한 名稱으로 되어 있으며 鹽析法에서는 22%以上에서 沈澱한 蛋白質을 말하고 있다. 그러나 濾紙法에서는 Table 1, Fig. 1에서 表示한 바와 같이 22%에서 濾紙法에 依한 alb.뿐만 아니라 α-, β-glob.도 含有되어 있고 α-, β-glob.의 微量이 5%에서도 殘留하고 있어 鹽析法의 alb.은 濾紙法의 b.의 大部分과 微量의 α-, β-glob.을 含有하고 있는 것이다. alb.이라는 名稱이 同一하게 使用되고 있으나 實로 構成하고 있는 蛋白質은 同一한 것이 아니라 異質의 것을 보여주고 있다.

2. 寒天電氣泳動法

蛋白質 各分劃의 易動度가 濾紙法의 것과 그 樣相을 리 한다는 것은 前述한 바 있거니와 各% 濾液의 各劃의 樣相도 亦是 多少 差異가 認定되었다. Fig. 2, 3에 表示된 各% 濾液 沈澱部分의 各分劃의 樣相은 多少 差異가 있는 것도 있었으나 濾紙法의 것과 大概一되고 있었다.

euglob.은 濾紙法과 같이 大部分의 r-glob., α-, β-glob. 少量, 微量의 alb.으로 되어 있었다.

p-glob. I은 大部分의 α-, β-glob., 少量의 alb., 微量 r-glob.을 含有하고 있었고 p-glob. II는 少量의 α-, β-glob., 相當量의 alb.을 含有하고 있었으나 r-glob.은 含有되어 있지 않았다. α-, β-glob.의 樣相이 濾紙에 있어는, 26% 濾液까지 殘留하고 있는 反面, 寒天板에서 16% 濾液에서 急작이 減少되어 18, 20%에서는 거의 消滅되고 있어 兩者間에 Na₂SO₄ 濃度에 對한 樣相을

달리 하고 있다.

alb.은 濾紙上에서는 22%에서 α-, β-glob.이 混合되고 있었으나 寒天板에서는 α-, β-glob.의 混合이 없이 이 點도 亦是 兩者間에 差異를 보여주고 있다. 그러나 22% 以上에서 沈澱한 鹽析法의 alb.과는 一致되고 있었다.

以上 鹽析法과 濾紙, 寒天法의 蛋白分劃을 比較 檢討한 結果, 濾紙 寒天法間에 어느 分劃에 있어서 多少 差異가 있었으나 大略 鹽析法의 各分劃은 濾紙法 및 寒天法의 各分劃의 混合體로 構成되었고, 一面 濾紙法 및 寒天法의 各分劃은 Na₂SO₄ 溶解度에 있어서 서로 重合되고 있는 것이 밝혀졌다. 兩者의 關係를 比較하면 Table 2에 表示한 것과 같다.

Table 2. Comparison of serum protein fractions obtained by salting out and Zone electrophoresis

Fractions of Salting out (Na ₂ SO ₄)	Fractions of Zone electrophoresis			
	Alb.	α-glob.	β-glob.	r-glob.
Euglob. (15%)	±	+	+	++++
P-glob. II (18%)	+	+++	+++	±
P-glob. I (22%)	++	++	++	-
Ab. (Above 22%)	++++	±	±	-

다음 鹽析法(Na₂SO₄)⁽¹⁵⁾과 電氣泳動法(boundary electrophoresis)⁽¹³⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²⁶⁾의 各分劃에 對한 研究結果와 本實驗의 結果를 比較 檢討코자 한다. 血清蛋白分劃에 있어서 電氣泳動法과 濾紙法과의 關係에 對하여 小林⁽²¹⁾은 여러 사람의 研究結果를 例로 들어 兩法의 各分劃이 거의 一致되고 있는 것을 報告하고 있다. 試料로 使用한 血清에 依하여 差異가 있다 손 치더라도 比較하는데 別로 支障이 없을 것 같다.

Fig. : 10% 濃度에서 完全히 沈澱하고 있는 것은 平井⁽¹³⁾의 結果와 一致되고 있다.

r-glob.: 平井⁽¹³⁾는 10~18%, Kibric⁽²⁰⁾는 15%에서 沈澱된 것으로 되어 있어 本實驗의 12~16%에서 沈澱한 것과 거의 一致되고 있다.

β-glob.: 平井⁽¹³⁾는 14~25%, Kibric⁽²⁰⁾는 16~19%에서 沈澱된다고 했고, Milne⁽²⁰⁾는 19.6%에서 沈澱된 것을 euglob.이라 看做하고 β-, r-glob.이 이것에 該當된다고 하였는데 亦是 β-glob.이 19.6%에서 沈澱된 것으로 되어 있다. 本實驗의 結果는 13~26%(濾液), 14~20%(寒天)에서 沈澱되고 있어 平井의 結果와 濾紙法과 大略 一致하고 있으나 寒天法과는 多少 差異가 있고 Milne, Kibric의 結果는 寒天法과 大略 一致되고 있으나 濾紙法과는 差異를 보여 주고 있다. 濾紙法과의 差異는 沈澱

開始와 完了사이의 濃度에 있어서 相當한 差異가 認定되고 있으나 Table 1에서 보면 本實驗도 亦是 16~19%의 濃度에서 大部分의 β -glob.이 沈澱되고 있는 것을 보여 주고 있다.

α -glob.: 24~28%⁽¹⁸⁾, 19.6~26.8%⁽²⁰⁾, 26%⁽²⁰⁾에서 沈澱된 것으로 되어 있으나 本實驗에서는 13~26%(濾紙), 13~22%(寒天)에서 沈澱되고 있어 β -glob.과 같이 前三者와 沈澱開始點에 있어서 相當한 差異를 보여 주고 있다. 前三者는 大概 β -glob.이 沈澱完了後에 α -glob.이 沈澱된 것으로 되어 있으나 本實驗에서는 沈澱의 遲速은 多少 差異가 設定되나 α -, β -glob.은 거의 同一하게 沈澱되고 있었다(Fig. 3, 4).

alb.: 鹽析法에서나 電氣泳動法에서나 同一한 名稱으로 使用되고 있다는 것은 前述한 바 있거니와 Howe⁽¹⁵⁾는 鹽析法에서 Na_2SO_4 濃度 22%以上에서 沈澱된 蛋白質을 指摘하고 電氣泳動法에서는 平井⁽¹³⁾은 25%以上, Kibric⁽²⁰⁾는 26%以上, Milne⁽²⁰⁾는 27% 以上에서 沈澱한 것을 말하고 있다. 本實驗에서는 14% 附近에서 沈澱을 始作하여 漸次的으로 増量하여 28~30%(濾紙), 20~22%(寒天)以上에서 다른 蛋白質을 混合하지 않고 있다. 前三者의 結果와 沈澱開始點에서 顯著한 差異를 보이고 있으나 alb.이 多量으로 沈澱한 것은 亦是 25%에서 부터 볼 수 있다.

alb.의 沈澱開始點에서 顯著한 差異를 보여준 理由는 잘 알 수 없으나 그 理由中에는 前三者의 實驗試料은 10倍以上으로 稀釋한 點과 沈澱部分을 除去한 濾液만을 使用하였기 때문에 alb.이 沈澱을 開始하는 Na_2SO_4 濃度에 對하여 疎忽하게 되었다는 點으로 생각된다. 그리고 α -, β -glob.의 沈澱이 完了된 後의 殘餘部分을 alb.이라 看做하였다는 點도 있다.

그 한 例로서 濾液만을 使用하였던 平井⁽¹³⁾의 結果를 보면, 2% 差異로 8~26%까지의 Na_2SO_4 를 가지고 血漿을 處理하여 各% 濃度 血漿의 各分劃의 比率와 蛋白質量을 算出하였다. 血漿의 總蛋白質量은 9.5mg/cc이고, alb.은 0%에서 5.2mg/cc, 16%에서 4.8mg/cc, 24%에서 3.9mg/cc로 되어 있다. 萬若 alb.이 25%以上에서 沈澱된다면 0% 濃度の alb.의 蛋白質量인 5.2mg/cc를 24% Na_2SO_4 濃度에서도 維持하여야 함에도 不拘하고 3.9mg/cc로 減少되어 約 25%나 減少된 셈이다. 16% 濃度에서도 0.7%의 減少를 보이고 있어 25%以下에서 alb.沈澱이 이미 始作되고 있는 것이 立證되어 本實驗結果의 一致되고 있다. 卽 alb.은 相當한 低濃度에서 沈澱되고 있는 것이 確實하다.

V. 結 論

血清蛋白質分劃法⁽⁸⁾ ⁽¹⁰⁾ ⁽¹⁶⁾ ⁽¹⁸⁾ ⁽²¹⁾ ⁽²⁰⁾ ⁽³²⁾은 여러가지 方

法이 있으나 주로 Na_2SO_4 등을 使用한 鹽析法⁽¹⁵⁾과 電氣泳動法⁽³²⁾, 濾紙 및 寒天電氣泳動法等이 많이 利用되고 있다. 本實驗에서는 鹽析法과 濾紙, 寒天電氣泳動法の 血清蛋白質分劃의 關係를 比較 檢討하였던바 그 結果는 다음과 같다.

I. 各% Na_2SO_4 濃度에 對한 濾紙, 寒天法의 各分劃의 沈澱樣相

1. Fib.: 4% Na_2SO_4 濃度에서 沈澱開始하여 約 10% 附近에서 完結.

2. γ -glob.: 12% 附近에서 沈澱하기 始作하여 約 16%에서 完結.

3. β -glob.: 12% 附近에서 沈澱하기 始作하여 約 26%(濾紙法), 20%(寒天法)에서 完結.

4. α -glob.: 13% 附近에서 沈澱開始하여 約 26%(濾紙法), 22%(寒天法)에서 完結.

5. alb.: 14% 附近에서 微量 沈澱하기 始作하여 漸次 増量, 約 28%(濾紙法), 22%(寒天法)에서 다른 蛋白質을 混合하지 않음.

II. 鹽析法과 濾紙, 寒天法 各分劃의 比較

1. euglob.: 주로, 大部分의 γ -glob.과 少量의 α -, β -glob., 微量의 alb.의 混合體

2. p-glob. I: 微量의 γ -glob.과 大部分의 α -, β -glob., 少量의 alb.의 混合體.

3. p-glob. II: 相當量의 α -, β -glob.과 少量의 alb.의 混合體.

4. alb: 大部分의 alb.과 微量의 α -, β -glob.의 混合體(濾紙法), 주로 alb.(寒天法).

以上の 比較에서 鹽析法의 各蛋白質分劃은 濾紙, 寒天法의 各分劃의 混合體이며 濾紙, 寒天法의 各分劃도 Na_2SO_4 溶解度에 있어서 서로 重合되고 있다. 大略의 結果로 보면 euglob.은 주로 γ -glob., p-glob.은 주로 α -, β -glob., 그리고 alb.은 주로 濾紙法 등의 alb.으로 構成되고 있으며 또한 鹽析法의 溶解度和 濾紙 및 寒天電氣泳動法の 易動度의 關係는 溶解도가 낮을수록 易動도가 늦어지고 있다.

II. 鹽析法(Na_2SO_4)에 依한 血清蛋白質分劃의 免疫學的 考察

I, 緒 言

前編에서 血清蛋白質分劃에 對한 鹽析法과 濾紙, 寒天電氣泳動法과의 比較에 있어서 鹽析法의 各分劃은 濾紙寒天法 등의 各分劃의 混合體로 되어 있었다. 이 編에서는 鹽析法의 血清蛋白質分劃이 抗原의 으로 單一 純粹한 것인가를 究明하기 爲하여 免疫電氣泳動法(以下 免疫法이라 略記)과 Gel 二相擴散法에 依하여 免疫學的의

로 檢討되지 한다.

II. 材料 및 方法

血清 및 鹽析法: 前編과 同一한

抗血清: 白色 改良種 家兔(約 1.5kg) 9 頭를 3 頭씩 三群으로 區分하고, 牛血清을 抗原으로 2ml.씩 4~5 日 間隔을 두고 5~6 回 耳靜脈에 注射하여 最後注射日로부터 1 週日後에 心臟에서 採血하거나 頸動脈에서 全血漿을 採血하였다. 抗血清은 56°C 的 恒溫槽에서 30 分間 非鹼化시키고 1/10,000 merthiolate 를 添加하여 0°C~4°C 的 冷蔵庫에 保管, 使用하였다.

免疫電氣泳動法: William,⁽³⁴⁾ Osserman⁽⁶⁾의 方法에 準하였다. 寒天泳動이 完了한 後에 血清을 泳動시킨 well 이 兩側에 있으면 中央에, well 이 中央에 있으면 well 的 兩側에, 移動軸의 方向에, 4mm 幅, 길이 5~6cm 的 trench(溝)를 만들어 抗血清 約 0.04ml 를 넣거나, Kohn⁽²²⁾⁽²³⁾의 方法에 依하여 幅 2mm, 길이 6cm 的 Whatman No. 1 濾紙를 抗血清에 沈澱하여 trench 位置에 놓았다(Fig. 5). (이것을 여기서 方法 I 이라 함). 中央 well 에는 正常血清을 泳動시킨 後 一側 trench 에 抗血清, 反對側 trench 에 各% Na₂SO₄ 的 血清濾液 또는 沈澱部分을 넣었다.(이것을 方法 II 라 함). 以上의 操作이 完了하면 即時 密閉된 容器에 넣어 (濕度를 維持하기 爲하여 底面에 充分하게 물을 적신 脫脂綿을 깔.) 室溫에서 48 時間 放置하여 擴散이 完了한 後에 1% NaCl 에 48 時間 2 回 液을 交替하면서 두었다가 蒸溜水에 4 時間 洗滌하여 餘分의 蛋白質을 除去하였다. 그리고 80°C 에서 約 30 分間 乾燥시킨 後에 前編에서 記述한 方法

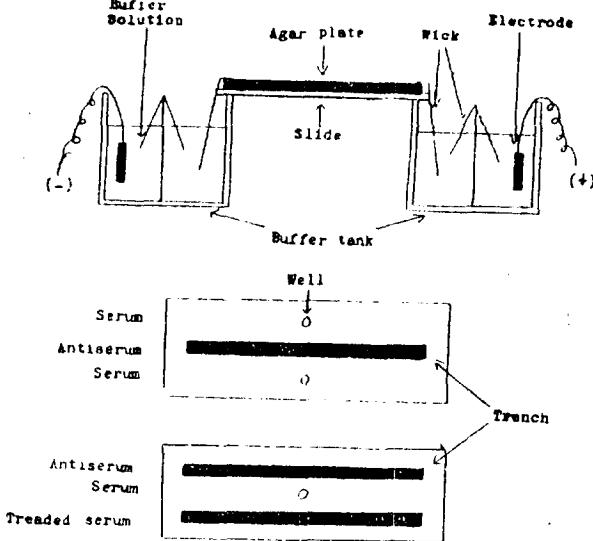


Fig. 5. Diagram of the immunoelectrophoretic Setup

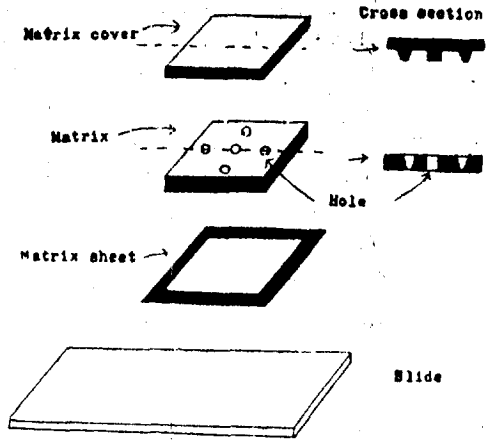


Fig. 6 Sketch representing the setup of microclot agar double diffusion test.

으로 染色하였다.

Gel 二相擴散法: 이것은 Ouchterlony 的 原理를 利用한 것이며 Crowle⁽⁶⁾⁽⁷⁾의 方法을 若干 變更하여 使用하였다.

載物硝子 및 寒天溶液: 前編과 同一한. 寒天板을 만들기 前에 載物硝子에 2% 寒天의 얇은 膜을 만들거나 또는 載物硝子 그대로 使用하였다.

Matrix(母型): 厚기 2~3mm, 一邊의 길이 2.5cm 的 四角形 plastic 板이며 中央에 1 個(直徑 0.15cm), 週邊에 4 個, 또는 6 個(上部直徑 0.15cm, 下部直徑 0.04cm 的 V 字型)의 hole 을 만들고 中央 hole 과 各週邊 hole 的 距離는 約 0.45~0.7cm 로 均一하게 하였다(Fig. 6).

Matrix sheet: 두께(厚) 約 0.3mm, 가(線)의 幅 2~3mm 的 四角型(2.5×2.3cm)의 틀(型)인 celluloid 板이다. 이것은 載物硝子와 matrix 사이에 얇은 寒天板을 만들기 爲하여 使用하였다(Fig. 6).

Matrix cover: Matrix 的 hole 에 對하여 鑄인 paraffin 으로 鑄型을 만든 것이다. 이것은 載物硝子위에 부어진 液狀態로 있는 寒天溶液이 matrix 를 놓을때 matrix hole 에서 위로 올라오는 것을 防止하기 爲한 것이다(Fig. 6).

寒天板: 載物硝子위에 matrix sheet 를 놓고 1% 寒天 溶液을 約 0.25~0.3ml 를 pipette 로 부은 後에 matrix cover 를 씌운 matrix 를 놓았다.(matrix 下面에 vaseline 이나 機械油를 塗付했다) 室溫에서 約 30 分間 放置하여 寒天이 凝固된 後 matrix 가 움직이지 않게 matrix cover 를 除去했다.

擴散과 染色: 中央 hole 에 抗血清, 週邊 hole 에 正常血清 또는 各% Na₂SO₄ 的 濾液 및 沈澱部分을 約 0.08 ml 씩 넣고 免疫法과 같이 密閉容器에 24 時間 擴散시킨 後, matrix 를 寒天이 附着되지 않게 分離除去하고 24 時間 1% NaCl 로 殘餘血清을 洗滌한 다음 免疫泳動

時的 寒天板과 同一한 方法으로 染色하였다. amido black 10B 代身에 1% 醋酸溶液에 1% azocarmine G의 染色液을 만들어 10分間 染色, 1% 醋酸溶液에 2~3回 10分間씩 洗滌하여 殘餘蛋白質을 除去한 後에 室溫에서 乾燥시켰다. 이에 沈澱帶는 赤色으로 染色되었다.

II. 實驗成績

1. 免疫電氣泳動法

A. 方法 I 에 의한 成績

正常血清: 正常牛血清의 各分劃의 抗原抗體反應을 보기 爲하여 寒天板 中央 well에 正常血清을 泳動시킨 後에 兩側 trench에 抗血清을 넣어 24時間 擴散시키고 染色하였다(Fig. 9). 12時間후에 各分劃의 位置에 乳白色의 沈澱弧가 나타나기 始作하였다.

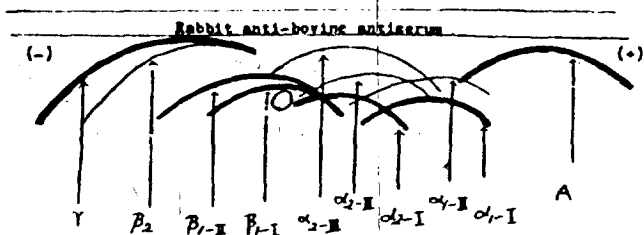


Fig. 7. Diagram of immunoelectrophoretic normal bovine serum precipitin arcs developed with rabbit anti-bovine serum.

alb.位置에 나타난 沈澱弧는 alb.을 抗原으로 한 抗原抗體反應의 結果로 나타난 것이며 一般의으로 沈澱弧가 鮮明치 못하였고 再現性도 좋지 못하였다.

α -glob.位置에서는 α_1 -glob., α_2 -glob.의 두個의 位置로 分離되었고 α_1 -glob.位置에 2個, α_2 -glob.位置에 3個의 沈澱弧로 分離되어 나타났다. α_1 -glob.位置의 α_1 -I, 沈澱弧(Fig. 7에서 表示한 α_1 -I, β_1 -I 등은 本實驗에 定하여 使用한 名稱이다)는 언제나 가장 鮮明하게 나타났고, α_1 -II는 稀微하게 나타났고. α_2 -I은 α_1 -I과 같이 鮮明하고 α_2 -II, α_2 -III는 稀微하게 나타났고, α_2 -III는 α -, β -glob.位置에 걸쳐서 抗血清側에 接近하여 길게 나타났고. 이것들의 沈澱弧外에 α_2 -glob.位置에 稀微한 沈澱弧가 나타날 때가 있었으나 恒時 나타난 것이 아니기에 α_2 -glob.位置의 沈澱弧數를 上記의 3個로 하였다.

β -glob.位置에서는 β_1 -I, β_1 -II가 鮮明하게 나타났으며 β_1 -II는 언제나 α_1 -I과 같이 다른 沈澱弧보다 強하고 鮮明하게 나타났고. β_2 -弧로 되어 있는 것은 血清 泳動出發點에서 陰極側으로 γ -弧와 거의 같이 延長되어 오히려 γ -glob.位置에 있었으나 여기서 β_2 -弧로 取扱하였다.

γ -glob.位置에는 길게 延長된 單一の γ -glob.의 沈澱弧로 되어 있었으며 鮮明度는 中間 程度였다.

以上 各分劃의 位置에 나타난 沈澱弧數는 alb.弧 1, α_1 -弧 2, α_2 -弧 3, β_1 -弧 2, β_2 -弧 1, γ -弧 1로 大略 都合 10個가 나타났고(Fig. 7, 9).

濾液: 正常血清 代身 各%의 濾液을 使用하였을 때 16%以下에서는 正常血清의 各分劃 沈澱弧가 나타났으나, 16%에서 γ -弧는 나타나지 않고 alb., α -, β -弧만이 나타나 γ -glob.의 沈澱弧를 意味하고 있었다(Fig. 10), 18% 濃度까지도 α -, β -弧가 나타나고 있었으나, 20%에서 β -弧는 消失되고 22%에서는 α -弧도 消失되고 있었다(Fig. 11). 이것은 前編에서의 寒天法에서 20%에서 完全히 α -, β -glob.이 消失되고 alb.만 남아있는 것과 一致되고 있다.

沈澱部: 12%에서 γ -弧만이 나타나고 其他沈澱弧는 나타나지 않았다(Fig. 12). 그러나 14%以上에서는 α -, β -弧가 鮮明하게 나타나 있다. 이것은 12%에서 γ -glob.만이 沈澱하나 14%부터는 α -, β -glob.이 沈澱한 것을 意味하는 것이다(Fig. 13).

B. 方法 II 에 의한 成績

寒天板 中央 well에 正常血清을 泳動시킨 後 兩側trench의 一側에 抗血清, 反對側에 正常血清, 濾液 또는 沈澱部分을 넣었다. 抗血清側에는 方法 I과 같이 沈澱弧가 나타나고, 他側의 血清內에 正常血清을 各分劃의 沈澱弧에 該當하는 抗原이 存在하면 擴散을 하여 正常血清의 該當 沈澱弧의 兩端에 連結된 一直線의 沈澱線이 나타났고(Fig. 8).

正常血清: 方法 I에서도 alb.-弧의 出現이 고르지 못한 關係인지 兩端에 連結되어야 할 沈澱線의 出現도 稀微하였다. α_1 -I, β_1 -I, β_1 -II의 沈澱線은 언제나 強하고 鮮明하게 나타났고, γ -line은 抗血清側에 接近하여 稀微하게 나타나거나 나타나지 않을 때가 많았다.

沈澱線은 抗血清側으로부터 γ -, alb., β_1 -II, α_1 -I, β_1 -I, 順으로 나타났으며 α_1 -II는 α_1 -I과 β_1 -II 사이에, 때에 따라서는 β -I과 α -I 사이에 나타났고. 其他 沈澱線은 稀微하게 나타나거나 나타나지 않을 때가 많았다.

方法 II에 있어서는 α_1 -I, β_1 -II, β_1 -I의 沈澱線만 恒時 鮮明하게 나타나고 alb., γ -line 등은 나타난 것이 稀微한 限만 아니라 나타난다 하더라도 鮮明치 못한 關係로 兩蛋白質의 反應關係는 實證하기 困難하였으므로 主로 α -, β -glob.의 沈澱與否에 適用하였다.

濾液: 18%以下의 濃度에서는 α -, β -弧의 沈澱線이 鮮明하게 나타났으나 20%부터는 나타나지 않았다. α -, β -line中에서도 α_1 -I, α_2 -I, β_1 -I, β_1 -II가 鮮明하였고 其他는 나타난 것이 稀微하였다. alb.-line은 때때로 稀微하게 나타났다.

沈澱部分: 12%에서 α -, β -弧의 沈澱線이 나타나기 始作하여 그 以上 28%까지 同一하게 나타났고(Fig. 15).

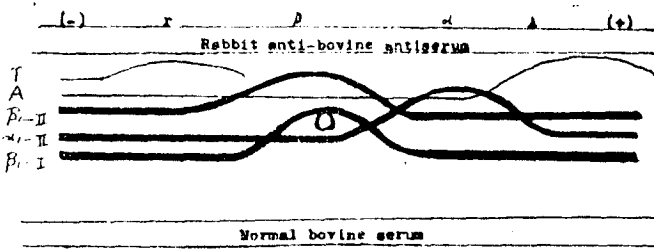


Fig. 5. Diagram of immunoelectrophoretic precipitin arcs and lines of normal bovine serum, developed with rabbit anti-bovine serum.

16). 이것은 α , β -glob.이 12%에서 沈澱하여 28%까지 繼續한 것을 意味하는 것이다.

2. Gel 二相擴散法

中央hole에 抗血清, 周邊hole에 正常血清 또는 濾液, 沈澱部分을 넣어서 擴散시키면 中央hole과 周邊hole 사이에 抗原抗體反應의 沈澱帶가 나타났다.

正常血清: Fig. 17에 表示된 바와 같이 沈澱帶가 約 5~6個 나타났으며 中央hole側 即 抗血清側에서 부터 alb., α , β , γ -glob.順으로 나타났다. α , β -帶는 언제나 鮮明하고 顯著하게 나타났으나 alb., γ -帶는 나타났어도 α , β -帶만 못하였고 그 鮮明度도 亦是 α , β -帶만 못하였다. α , β -帶는 때때로 2~3個로 分離하여 나타나고 있어 免疫泳動法에서 α , β -glob.位置의 弧數가 數個로 되어 抗原性으로 單一한 것이 아니었던 것과, 一致되고 있다.

濾液: Fig. 18, 19, 20, 21에서 表示된 바와 같이 4~14%까지는 正常血清의 各沈澱帶가 나타나고 있었으나 16%에서 γ -帶가 消滅되었고 때로는 18%에서도 若干 稀微한 痕跡이 남아 있었다. β -帶는 22%에서 消滅되었고, α -帶 alb.帶는 26%에서도 消滅되지 않고 있었다.

沈澱部分: Fig. 22에 表示된 것과 같이 10%에서는 沈澱帶의 出現이 없고 12%에서 나타나기 始作하였다. 12~16%까지 γ , β , α -帶가 나타나고, 18%에서 alb.-帶가 稀微하게 나타나기 始作하며 22%와 그 以上の 濃度에서는 各分劃沈澱帶가 全部 나타나 正常血清의 것과 같은 樣相을 보여주었다(Fig. 23).

Fig. 24는 γ -glob.이 몇%의 Na_2SO_4 濃度에서 沈澱하기 始作하는가를 보기 爲하여 Na_2SO_4 差異를 0.5% 間隔으로 하여 實驗한 結果로서, Na_2SO_4 10.5, 11, 11.5%의 沈澱部分에서는 反應이 없었고 12%에서 비로소 沈澱帶가 나타나기 始作하였다. 이것은 12%以上에서는 γ -glob.이 沈澱되지 않은 것을 意味한다.

VI, 考 察

前編에서 鹽析法의 血清蛋白質分劃이 濾紙, 寒天泳動法의 各分劃의 混合體인 것을 보여 주었고, 本實驗에서

는 鹽析法뿐만 아니라 濾紙, 寒天法의 各蛋白質分劃도 抗原의 으로 여러가지 相異한 蛋白質로 되어있는 것을 보여주고 있다.

牛血清에 對한 家兔抗血清의 沈澱弧는 約 10個가 確實히 나타나고 其外에 때로는 不確實한 沈澱弧도 3~4個 나타나는 것도 있었다. 그중 alb., γ -glob.은 單一 沈澱弧로 되었고 γ , β -弧는 數個로 分離되어 나타나고 있었다. Gel 二相擴散法에서도 α , β -帶는 때때로 2~3個로 分離되어 亦是 α , β -glob.이 抗原의 으로 單一한 것이 아니고 여러가지 蛋白質로 되어있는 그 多樣性을 보여주고 있다.

William⁽³⁰⁾은 免疫泳動法에 依하여 人血清에 對한 家兔抗血清의 沈澱弧를 14個, 人의 馬抗血清에서 23個, Clausen⁽⁴⁾은 mouse의 家兔抗血清에서 17個, Hochwald⁽¹⁴⁾은 23個를 報告하고 있으며 各沈澱弧中 alb., γ -弧는 抗原의 으로 單一하게 나타나고, α , β -弧等은 數個로 分離되어 나타나고 있는 것이 一致된 結果이며 本實驗의 結果와 거의 一致되고 있다. Smithies⁽²⁰⁾의 二次元的方法의 血清蛋白質分劃도 alb., γ -glob.은 單一한 分劃으로 되어있고 α , β -glob.은 亦是 여러개의 分劃으로 나누어지고 있다.

α , β -glob.位置에 여러개의 沈澱弧가 나타난 것은 이들 分劃이 여러가지 蛋白質로 構成되어 있는 것을 意味한 것이며 또 그 여러개의 蛋白質이 生物學的 生化學的 物理化學的 性質等도 同一한 것이 아닌 것을 意味한 것이다. α , β -glob.中에 生物學的 重要한 機能을 가진 것으로 lipoprotein, glycoprotein, siderophilin, haptoglobulin, ceruloplasmin 등이 含有되어 있으며 其他 血液凝固作用에 重要한 役割을 하는 prothrombin 같은 酵素等도 含有되고 있다.

免疫泳動法에서나 Gel 二相擴散法에서나 抗原抗體反應의 沈澱反應의 形態 및 鮮明度等은 여러가지 要素에 依하여 相當히 影響을 받아 恒時 一律의 으로 나타나지는 않았다. 即 血清分劃의 移動距離, 抗原의 性質 및 抗原性의 強弱, 抗體形成의 家兔體質, 使用한 抗原 抗體의 相互間의 量의 關係, 寒天板上의 well과 trench의 크기 및 距離, matrix 中央 hole과 週邊 hole의 크기 및 距離等에 影響을 받았으며 이러한 條件等을 一定하게 調節함으로써 一定한 結果를 얻을 수가 있었다.

Alb.: 方法 I, 方法 II, Gel 二相擴散法에 있어서 反應은 弱하게 나타났으며 方法 I에서 沈澱弧가 微弱한 關係인지 方法 II에 있어서도 沈澱線의 出現이 正常血清에서나 濾液 및 沈澱部分에서나 大端히 稀微하게 나타났었다. Gel 二相擴散法의 沈澱部分에 있었어서는 18~20%에서 沈澱帶가 나타나기 始作하여 22%에서 鮮明하게

나타나 있었다(Fig. 23).

Alb.의反應이微弱한原因이牛血清alb.의抗原性이微弱한것인지,抗原量의使用量過多에基因한것인지,牛血清alb.에對한家兔의抗體形成의不完整性에서온것인지그原因은不明하다.前編의濾紙,寒天法에있어서alb.의沈澱이大略14%Na₂SO₄濃度에서始作되고있었으나方法I,II에서는alb.의反應性微弱으로그沈澱與否를가리지못하였고Gel二相擴散法에서는18%沈澱部分에서反應을나타내고있어前編의結果와差異를보여주고있었다.

α -glob.: 方法I, II에서는數個의沈澱弧가나타나고있었고그중 α_1 I은全沈澱弧中에서언제나가장強하고鮮明하게나타나고있어그抗原性의強함을意味하고있었다. α_2 I도相當히鮮明한便이었으나其他 α -弧는Na₂SO₄處理血清에는나타나지않은것이 많았다. Gel二相擴散法에서도 α -帶가언제나強하게나타나抗原性이 강한 것이 方法I, II에와一致되고있었다.

濾液에있어서 α -glob.이方法I, II에서는18%까지나타나고있으나20%에서消滅되고있는것은寒天法의結果와一致되고있다(Fig. 2, 10, 11). Gel二相擴散法에서는26%까지나타나고있어濾紙法과大略一致되고있고方法I, II에依한것과는差異를보여지고있다.

沈澱部分의 α -glob.의反應은方法I에서14%,方法II에서12%, Gel二相擴散法에서는12%에서各各鮮明하게나타나고있어濾紙,寒天法의結果와거의一致되고있다(Fig. 4, 12, 13, 15).

α -glob.은各方法에있어서沈澱弧나沈澱帶가鮮明하게나타나고있어抗原性이強함을表示하고있으며方法에따라多少差異는있었으나約12%濃度에서沈澱하기始作하여約26%에서完結되고있었다.

β -glob.: α_1 -glob.과같이數個의沈澱弧로나타났고其中方法I, II에서 β -I, β -II가鮮明하게나타났으며 β -II는 α_1 I과같이이러한方法에서나가장強하게反應을보이고있었고, β -帶도 α -帶와같이恒時鮮明하게나타났다.

濾液에있어서方法I, II의18%까지反應을보이나20%에서 α -弧와같이나타나지않은것은寒天法과거의一致되고있다(Fig. 2, 10, 11). Gel二相擴散法에서는22%까지沈澱帶가남아있었으나24%에서消滅되고있었다(Fig. 21).

沈澱部分에서는方法I에서14%,方法II에서12%에서 α -glob.과같이나타나고있었고(Fig. 12, 15). Gel二相擴散法에서는12%에서沈澱帶가나타나大略寒天法과거의一致되고있었다(Fig. 22). 精結 β -glob.은12%附近에서沈澱하기始作하여約24%에서完結된것이다.

γ -glob.: 方法I에서 α -, β -弧보다는鮮明도가弱하였으며方法II에서는沈澱線의出現이고르지못하였다. Gel二相擴散法에서도反應이弱한便이었다.

濾液에있어서方法I, Gel二相擴散法에서14%까지反應을보였으나16%부터反應을보이지않았으며濾紙,寒天法과大略一致되었다(Fig. 10). 方法II에서는沈澱線形成이不良하여實證하기困難하였다.

沈澱部分에있어서는方法I, Gel二相擴散法의12%에서反應을보이고있어 γ -glob.은12~16%에서沈澱된것으로濾紙,寒天法과一致되고있다.

以上Na₂SO₄의血清蛋白質溶解度에對한各分割의抗原性을檢討하였다.各方法에있어서抗原的으로各分割의反應은多少差異는있었으나大略一致된結果를보여주고있었다.

鹽析法의分割에對한免疫泳動및Gel二相擴散法의抗原性關係는Table 3에表示된바와같다.鹽析法에依한各分割은抗原性에있어서여러가지蛋白質의混合體이며濾紙寒天法의各分割도alb., γ -glob.以外的蛋白質은抗原性에있어서單一한것이아닌것을알수있었다.

Table 3. Comparison of serum protein fractions by salting out and Immuno-electrophoresis

Fractions of Salting out	Fractions to Immuno-electrophoresis	Fractions to Immuno-precipitation
Euglobulin	γ -, β -, α -globulin	γ -, β -, α -globulin
P-globulin I	β -, α -globulin	β -, α -globulin
P-globulin II	β -, α -globulin	β -, α -globulin
Albumin	Albumin	Albumin, α -globulin

V. 結 論

Sodium sulfate를使用한鹽析法의各蛋白質分割에對하여免疫學的으로抗原性의單一與否를實驗檢討한結果鹽析法뿐만아니라濾紙,寒天法에依한各分割도抗原的見地에서單一한蛋白質이아니라여러가지蛋白質로되어있었으며各分割에따라抗原性強弱의差異도있었다.

正常牛血清에對한家兔抗血清은免疫電氣泳動法에있어서alb. 1, α_1 -glob. 2, α_2 -glob. 3, β_2 -glob. 2, β_1 -glob. 1, γ -glob. 1인約10個의沈澱弧數로나타났다. Gel二相擴散法에서는約5~6個의沈澱帶가나타났으며그중 α -, β -glob.의抗原性이強하게나타났다.

I. 各% Na₂SO₄濃度에對한免疫電氣泳動法과Gel二相擴散法의免疫學的反應

1. γ -glob.은12~16%濃度에서反應
2. β -glob.은12~20%(免疫泳動), 12~22%(擴散法)

에서 反應

3. α -glob.은 12~22%(免疫泳動), 12~26%(擴散法)

에서 反應

4. alb.은 20~22%에서 反應하기 始作

II. 鹽析法과 免疫電氣泳動法, Gel 二相擴散法과의 各 分劃의 抗原의 比較

1. euglob.은 γ -, β -, α -glob.의 混合體
2. p-glob.I은 β -, α -glob.의 混合體
3. p-glob.II는 β -, α -glob.의 混合體
4. alb.은 alb.과 α -glob.의 混合體

各方法에 있어서 多少의 差異는 設定되었으나 鹽析法의 各分劃에 對한 濾紙, 寒天法과 免疫學的分析의 結果는 大略 一致되고 있었다.

本論文에 對한 文獻提供과 助言을 하여 주신 日本北海道大學 醫科大學 教授 平井透松 博士에게 深甚한 謝意를 表하는 바이다.

<參考文獻>

1. Anatoly Bezkorovainy and Max E. Rafelson, Jr.: Characterization of some proteins from normal human platelets, J. Lab. & Clin. Med. 64: 212-225, 1964.
2. Angelo, Scanu, and Page, Irvine H.: Separation and characterization of human serum chylomicrons, J. Exp. Med. 109-3: 239, 1959.
3. Bussard, A., and Perrin, D.: Electrophoresis in agar plates, J. Lab. & Clin. Med. 46: 689-701, 1955.
4. Clausen J, and Heremans, J.: An immunologic and chemical study of the similarities between mouse and serum proteins, J. Immunol. 84: 128, 1960.
5. Chon, E, I, et al: Am. Chem. Soc. 62: 3356, 1940. Cited from(II),
- 6) Crowle, A. J.: A simplified agar electrophoretic method for use in antigen separation and serologic analysis, J. Lab. & Clin. Med. 48: 642, 1956.
7. Crowle, A.J.: A simplified micro double-diffusion agar precipitin technique, J. Lab. & Clin. Med. 52: 784, 1958.
8. Elliott, F. Osserman.: A modified technique of immunoelectrophoresis facilitating the identification of specific precipitin arcs, J. Immunol. 84: 93-97, 1960.
9. Giri, K.V.: Agar electrophoresis of serum proteins on cellophane and polyester films, J. Lab. and Clin. Med. 48: 775, 1956.
10. 平井透松·島尾和男: 血清及び血漿蛋白質의 定法, 內科ニ統括, 第四卷, 第七號, 369, 1956.
11. 平井透松·島尾和男: 電氣泳動法, 共立出版, 東京.

1958.

12. 平井透松; 血漿蛋白質 A. 化學及物理, 日本血液學全書, 第2卷 289~318, 1963.
13. 平井透松: 血漿蛋白質分劃法, 最新醫學, 第10卷, 第10號, 105-121, 1955.
14. Hochwald, G. M. Thorbecke, G.J. and Asofsky, R.: Sites of formation of immune globulins and of a component C' 3, J. Exp. Med. 114-4: 459-470, 1961.
15. Howe, P. E.: The use of sodium sulfate as the globulin precipitant in the determination of proteins in blood, J. Biol. Chem. 49: 93-107, 1921.
16. Ivor Smith.: Chromatographic and electrophoretic techniques. Interscience publishers. INC. New York, 1960.
17. 林鳳鎰: 濾紙電氣泳動法에 依한 韓牛, 豚의 正血清蛋白分劃에 對한 研究, 大韓獸醫學會誌 4: 1-6, 1964.
18. John L. Fahey.: Immunochemical studies of twenty mouse myeloma proteins: Evidence for two groups of proteins similar to gamma and beta-2a globulins in man, J. Exp. Med. 114-3: 358-398, 1961.
19. John R. Thurston, Melvin S. Rheins, and Edwin V. Buehler.: A rapid method for recovering serologically active globulins by sodium sulfate precipitation, J. Lab. and Clin. Med. 49: 646, 1957.
20. Kibrick, A.C., and Blonstein, M.: Fractionation of serum into albumin and alpha, beta, and gamma globulins by sodium sulfate, J. Biol. Chem. 176: 983-987, 1948.
21. 小林茂三郎 濾紙電氣泳動法の實際, 南江堂, 東京, 1956.
22. Kohn, J.: An immunoelectrophoretic technique. Nature. 180: 986-987, 1957.
23. Kohn, J.: A micro-electrophoretic method. Nature. 181: 83, 1958.
24. Komarkova, A. and Korinek Prague, J.: Immunoelectrophoresis in patients with hyperparathyroidism, J. Lab. & Clin. Med. 54: 707-711, 1959.
25. Korner, A. & Debro, J. R.: Solubility of albumin in alcohol after precipitation by trichloroacetic acid; a simplified procedure for separation of albumin, Nature. 178: 1067, 1956.
26. Milne, J.: Serum protein fractionation; A comparison of sodium sulfate precipitation and electrophoresis, J. Biol. Chem. 169: 595, 1947.
27. 水原三一郎·赤上屈四郎: 蛋白質化學, No.2, 119 p.

藝立出版, 東京, 1958.

28. Paul Heller, Vincent J. Yakulis, and Aaron M. Josephson.: Immunologic studies of human hemoglobins, *J. Lab. & Clin. Med.* 59: 401-411, 1962.
29. Poullie, M.D., and Smithies, O.: Comparison and Combination of the starch-gel and filter paper electrophoretic methods applied to human sera: Two-dimensional electrophoresis, *Biochem. J.*, 68: 637, 1958.
30. Robbins, J. L., Hill, G.A., Marcus, S., and Carlquist, J.H.: Paralbuminemia: Paper and cellulose acetate electrophoresis and preliminary immunoelectrophoretic analysis, *J. Lab. and Clin. Med.* 62: 753-761, 1963.
31. Severson, H.: *J. Biol. Chem.*, 139: 805, 1941. Cited from (II).
32. Tiselius A.; *Trans. Farad. Soc.*, 33, 524, 1937. Cited from (II).
33. 友田 勇: 家畜血清蛋白に關する濾紙電氣泳動學的研究, 1. 健康家畜の血清蛋白像, *日本獸醫學雜誌*.
34. Williams, C.A., Jr. & Grabar, P.: Immunoelectrophoretic studies on serum proteins, I. The antigen of human serum, *J. Immunol.* 74: 158-168, 1955.
35. Williams, C.A., Jr. & Grabar, P.: Immunoelectrophoretic studies on serum proteins, II. Immune sera: antibody distribution, *J. Immunol.* 74: 397-403, 1955.

EXPLANATION OF PLATE

PLATE I

Paper and Agar electrophoretic patterns of filtrate and precipitate of serum with various per cent of sodium sulfate. The numbers correspond to the per cent of the salt respectively. Anode on the right.

- Fig. 1. Paper electrophoretic patterns of the filtrate. Fibrinogen remains at the starting point of the plasma strip (top).
- Fig. 2. Agar electrophoretic patterns of normal serum (S) and the filtrate.
- Fig. 3. Paper electrophoretic strips of serum (bottom) and the precipitate.
- Fig. 4. Agar electrophoretic patterns of the precipitate. 26 F: The filtrate with 26 per cent of the salt.

PLATE II

Immunoelectrophoretic precipitin arcs and precipitin lines of normal serum, filtrate and precipitate, developed with rabbit anti-bovine antiserum. Anode on the right.

- Fig. 9. Normal serum precipitin arcs. of. Fig. 7.
- Fig. 10. Precipitin arcs of the filtrate of 16 (upper) and 18 (lower) per cent of sodium sulfate. γ -arc is not seen.
- Fig. 11. Precipitin arcs of the filtrate of 20 (upper) and 22 (lower) per cent of sodium sulfate. Only Alb-arc is shown.
- Fig. 12. Precipitin arcs of normal serum (upper) and the precipitate of 12 per cent (lower) of sodium sulfate. Only γ -arc is seen.
- Fig. 13. Precipitin arcs of normal serum (upper) and the precipitate of 14 per cent (lower) sodium sulfate. α -, β -, and γ -arcs are seen.
- Fig. 14. Precipitin line of the filtrate of 13 per cent sodium sulfate. Heavy α - and β -precipitin lines and faint Alb-line are seen.
- Fig. 15-16. Precipitin lines of the precipitate of 12 and 28 per cent sodium sulfate. α - and β -precipitin lines appear from the precipitate of 12 percent of the salt.

PLATE III

Immunological precipitin bands by micro double diffusion test. Central hole: Rabbit anti-bovine antiserum. Peripheral numbers correspond to the per cent of sodium sulfate.

- Fig. 17. S: Normal bovine serum. R: Normal rabbit serum.
- Fig. 18-21. The precipitin bands of the filtrate. γ -band disappears at 18 per cent, β -band at 22 per cent, and α -band remains at 26 per cent.
- Fig. 22-23. The precipitin bands of the precipitate. No bands are seen at 10 per cent. γ -, β -, and α -bands appear at 12 per cent and all bands are seen at 22 per cent.
- Fig. 24. The precipitin bands of the precipitate. No bands are seen at under 11.5 per cent, but are seen at 12 per cent.

PLATE I

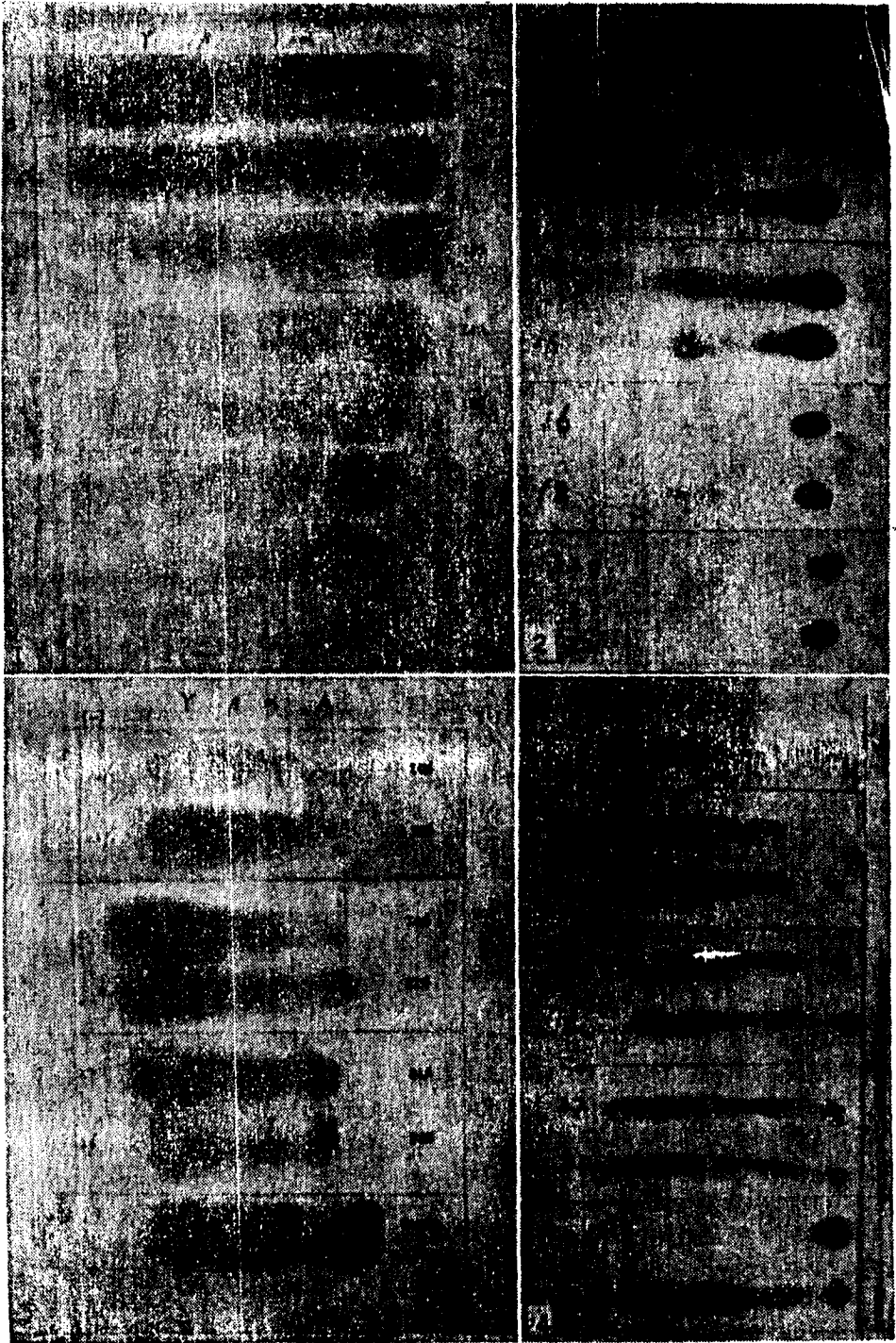


PLATE II

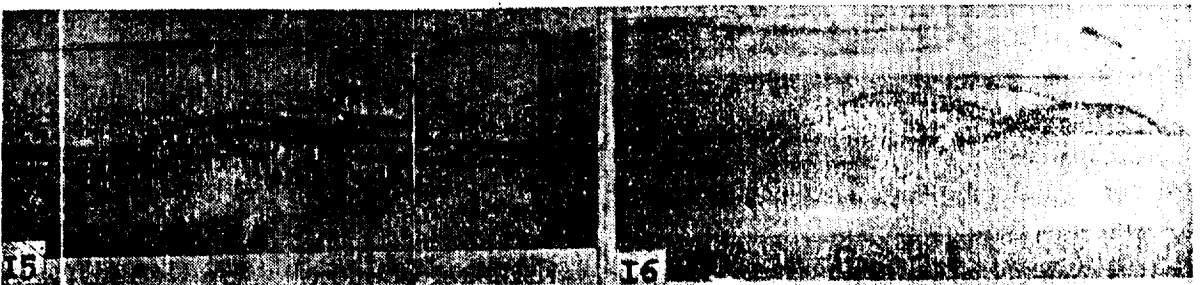
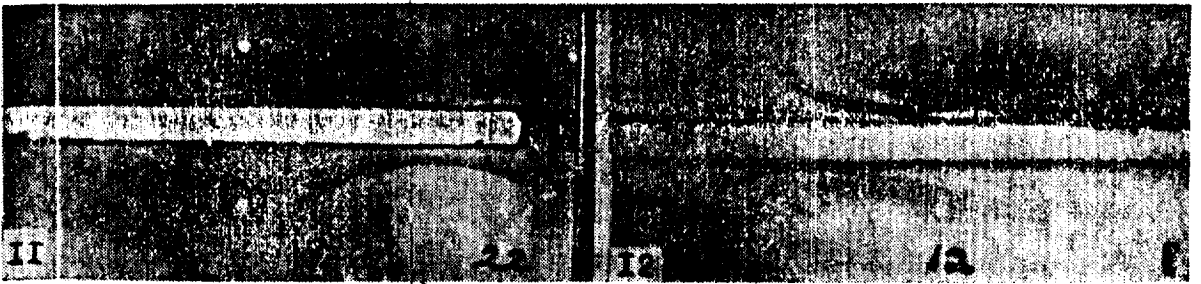
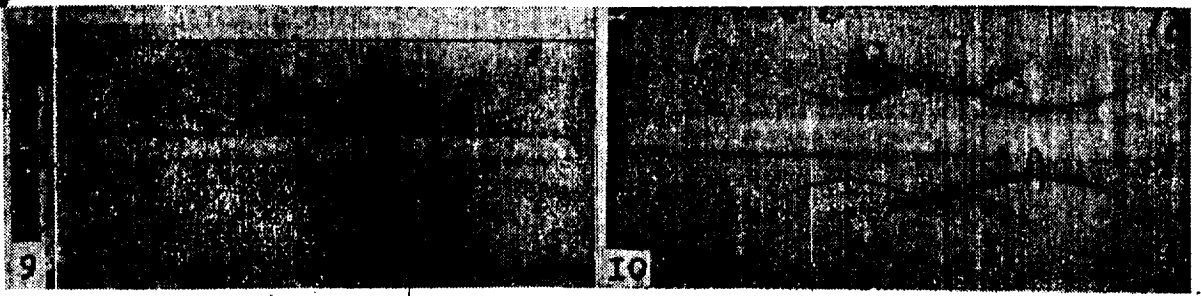
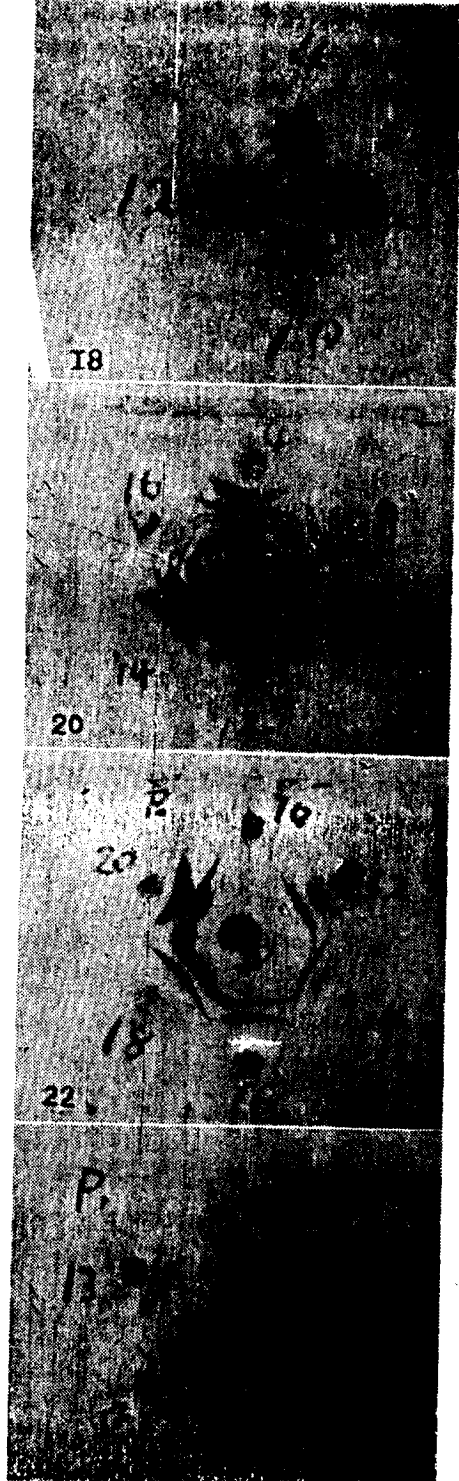
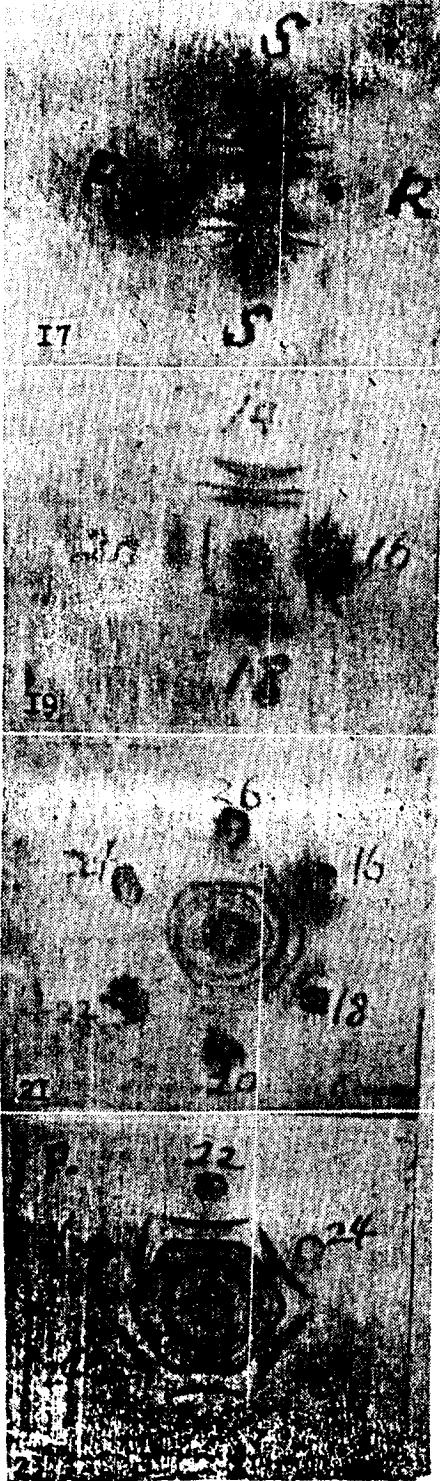


PLATE III



Studies on Bovine Serum Protein Fractions

1. A Comparison of Sodium Sulfate Precipitation and Zone (Paper, Agar) Electrophoresis

Bong Ho Rim

Dep. of Pathology, Division of Veterinary Science, College of Agriculture, University of Chunnam

ABSTRACT

Many kinds of techniques have been used for fractionating serum proteins. In the present study, using bovine serum, the fractions obtained with sodium sulfate were compared with those determined by zone electrophoresis.

1. Fibrinogen was precipitated with 4 to 10 per cent of sodium sulfate.
2. γ -globulin required 10 to 16 per cent of the salt for precipitation.
3. β -globulin began to precipitate at 12 per cent sodium sulfate, and completed precipitation at approximately 26 per cent in paper electrophoresis, while at 22 per cent in agar electrophoresis.
4. α -globulin completed precipitation at 13 to 28 per cent sodium sulfate in paper electrophoresis and at 22 per cent in agar electrophoresis.
5. Albumin began to precipitate at 14 per cent of the salt, and was free from the mixture of globulins approximately at 28 per cent in paper electrophoresis, while at 22 per cent in agar electrophoresis.

The results of comparing fractions by the two methods were as follows:

1. Euglobulin (15%) was equal to the sum of the most γ -globulin and a small quantity of the α - and β -globulins.
2. Pseudoglobulin I (15-17.5%) corresponded to the most α - β -globulins and a small quantity of albumin.
3. Pseudoglobulin II (18-22%) was a mixture of the α - β -globulins and albumin fraction.
4. Albumin (above 22%) contained the most albumin fraction separated by zone electrophoresis and a small quantity of the α - and β -globulins.

As mentioned above the fractions obtained with sodium sulfate were a mixture of the various proportion of the fractions determined by zone electrophoresis. The solubility of serum fractions to sodium sulfate coincided with the mobility of those by zone electrophoresis.

(By per cent of sodium sulfate we mean gram of sodium sulfate contained in 100 ml. of solution).

II. Immunological Studies on Serum Protein Fractions with Sodium Sulfate

In the previous report the fractions of bovine serum protein with sodium sulfate compared with those obtained by zone electrophoresis, and the findings were that the former contained various proportion components of the latter. In this study the author studied whether or not the fractions with sodium sulfate are simple component antigenically by immunoelectrophoresis and micro double diffusion test (Immuno-precipitation), using rabbit antiserum to bovine serum,

In immunoelectrophoresis, normal bovine serum developed with rabbit antiserum showed about ten distinct precipitin arcs. The distribution of these arcs was as follows: 1 albumin, 2 α_1 , 3 α_2 , 2 β_1 , 1 β_2 , and 1 γ -globulin (Fig. 7. 9).

In micro double diffusion test, five to six precipitation bands could be seen between antigens and antibody, the order of the precipitation bands location is albumin, α -, β -, and γ -globulin from the side of antiserum well (Fig.19). Frequently the α - and β -precipitation bands were separated into two or three precipitation bands, which indicated that these globulins are not a pure component antigenically as shown in immuno-electrophoresis.

In both immunological methods, the two α - β -precipitin arcs and bands appeared clear and strong, indicating that the two globulins reacted as strong antigens.

The precipitate reaction of γ -globulin was shown at 12 to 16 per cent sodium sulfate; β -globulin at 12 to 20 per cent; α -globulin at 12 to 22 per cent (immuno-electrophoresis), at 12 to 26 per cent (Diffusion); and albumin at

above 22 per cent.

Antigenically euglobulin contained γ , β , and α -globulins, Pseudoglobulin I and Pseudoglobulin II were composed of α , and β -globulins, and albumin was a mixture of α -globulin and albumin determined by zone electrophoresis.

The results indicated that the fractions of serum protein obtained by either method were constituents of various proteins antigenically except γ -globulin and albumin by zone electrophoresis.