

## Cellulose Acetate 전기영동에 의한 수소이탈효소 Isozyme의 분리\*

박상윤·조동현  
(성균관대·생물학과)

Separation of Dehydrogenase Isozymes by Cellulose Acetate Electrophoresis

Sang Yoon Park and Dong Hyun Cho  
(Dept. of Biology, Sung Kyun Kwan University)  
(1972. 9. 10 수리)

### SUMMARY

A simple and economical method for separation of lactate and malate dehydrogenase isozymes is described in detail. The method is based on cellulose acetate strip electroforetic separation of the isozymes, tetrazolium reduction to purple formazan. Resolution is as good as in the experiment using expensive equipments.

### 서 론

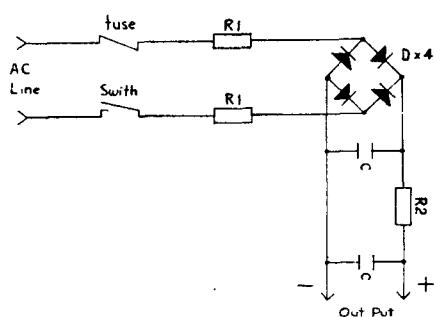
Kohn(1958)에 의하여 개발된 cellulose acetate 전기영동법은 혈청단백질의 분리에 있어서 전분·겔 전기영동법보다 해상력이 뛰어나 널리 애플리케이션되어 왔다. 더우기 이 방법은 조작이 간편하고 영동시간이 짧다는 장점이 있다. 본법은 혈청단백질 뿐만 아니라 isozyme 분리에 있어서도 훌륭한 결과를 보여 주었다. Wieland *et al.*(1959)에 의하여 lactate dehydrogenase isozyme 이 처음으로 분리된 것을 시작으로 leucine aminopeptidase(Maeda and Rosalki; 1964), amylase(Aw; 1966), alkaline phosphatase(Romel *et al.*; 1968) 등 많은 효소가 본법으로 분리되었다. cellulose acetate 전기영동법의 단 한가지 결점은 전분·겔이나 acrylamide gel 전기영동법에 비하여 해상력이 낮다는 데에 있다. 그러나 본격적인 전기영동실험을 위한 예비실험용으로서는 뛰어난 방법이라고 할 수 있다(Brewer 1970). 그동안 본 실험실에서 제작 사용하여 본 여러 가지 장치 중에서 가장 간단하고 경제적이면서도 충분히 실용적인 것을 소개한다.

### 실험장치의 제작

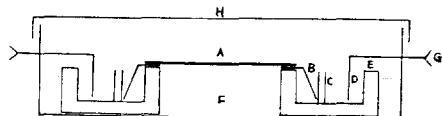
다른 전기영동장치와 마찬가지로 cellulose acetate 전기영동장치도 전원과 전기영동 cell의 두 부분으로 구성된다. 전원장치는 그림 1과 같이 아주 간단한 것이다. 실리콘 정류기 4개를 써서 브릿지정류하여 대략 140V 정도의 직류전압을 얻은 뒤, 10k $\Omega$ 의 필터저항을 통하여 대략 100V의 전압을 공급하도록 설계된 것이다. 이제 흐르는 전류는 부하에 따라 다르나 8×4.8cm cellulose acetate strip의 경우 대략 6mA 전후가 된다.

전기영동용 cell은 흔히 볼 수 있는 염색병 2개를 간격 약 3.6cm 정도 떨어서 나란히 놓은 것으로서 양쪽 염색병의 턱에 paper wick를 올려놓고 paper wick의 한쪽을 염색병의 완충용액에 담근다(그림 2). 전극은 백금선을 사용하였는데, 음극(−)의 경우에는 전건지에서 메이넨 탄소전극을 써도 좋다. 양극(+)으로 탄소막대를 쓰면 탄소가 석출하여 전기영동에 지장을 초래한다. 그러나 다음과 같이 처리하면 양극에도 탄소막대를 쓸 수 있다. barbituric acid 완충용액(pH 8.6,

\*본 실험을 위한 연구비 일부는 1972년도 문교부 학술연구조성비에 의한 것이다.



**Fig. 1.** Power supply for cellulose acetate electrophoresis. R 1, 2.5 ohms resistor; D, silicon diode; R 2, 10 kilo-ohms resistor 5 watts; C, 40 microfarads electrolyte condenser.



**Fig. 2.** Electrophoresis cell. A, cellulose acetate strip; B, paper wick; C, two slide glasses; D, electrode; E, staining bottle as a buffer tank; F, tap water; G, terminal, connecting position of out put leads from power supply; H, plastic housing.

$\mu=0.075$ )에 대략 1% 정도 되도록 agar를 넣고 끓인다음, 전극으로 사용할 탄소막대의 밑부분을 agar 용액에 넣은뒤 식혀준다. agar가 완전히 굳으면 전극주위의 agar를 5mm 정도 남겨두고 남아지를 면도칼로 잘라낸다. 이것을 양극으로 쓰면 완충용액중에 탄소가 석출하는 것을 방지할 수 있다.

### 실험 조작

일반적인 실험방법은 Kohn(1958, 1968)이 따랐다.

#### 1. Barbituric acid buffer (pH 8.6, $\mu=0.075$ )

Sodium diethylbarbiturate 41.2g

Barbituric acid 7.32g

sodium diethylbarbiturate를 500~600ml의 증류수에 용해한다. barbituric acid를 100~200ml의 뜨거운 증류수에 용해하고, 여기에 sodium diethylbarbiturate 용액을 섞는다. 이것을 stock solution으로 냉장고에 보관한다. 이 stock solution 1용을 증류수

\* 1. 염색액조제에 필요한 모든 용액은 냉동시켜 보관한다. 특히 phenazine methosulfate는 잘 변질되므로 사용직전 조제하여 쓰는것이 좋다. 보관할 경우 3ml 정도씩 다른 시험관에 넣어 보관하며, 0.3ml만 사용하고 남은 용액은 버린다.

로 2.67용이 되게 회석하면 pH 8.6, 이온강도 0.075 용액이 된다.

#### 2. Lactate dehydrogenase(LDH) 염색액

##### Buffer(0.5M Tris-HCl, pH 7.0)

Tris 60.6g

HCl(38%) 42ml

H<sub>2</sub>O to 1000ml

0.1N HCl로 pH를 조절한다.

##### 기질(1M Na-DL-lactate, pH 7.0)

85% DL-lactic acid 10.6ml

1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 49.0ml

H<sub>2</sub>O to 100ml

여름에 채운 100ml volumetric flask에 lactic acid를 넣고 증류수 25ml를 가한다. 여기에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액을 천천히 가하고 혼든다. 증류수를 표선까지 채우고 0.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 pH를 조절한다.

##### 염색액\*

Sodium lactate (1M) 1ml

NAD(1%) 1ml

Nitroblue tetrazolium(0.1%) 3ml

Phenazine methosulfate(0.1%) 0.3ml

Tris-HCl 1ml

염색액은 빛에 약하고 변질되기 쉬우므로 사용직전에 만드는 것이 좋다. 부득이한 경우 빛이 안드는 냉장고에서 냉동시켜 보관하는데 3일이상 경과하면 좋지 않다. 염색액이 알칼리성인 경우 특히 잘 변질된다. 염색액은 짙은 황색인데 갈색이나 청색을 띠면 버리고 다시 만들어야 된다.

#### 3. Malate dehydrogenase(MDH) 염색액

Buffer: LDH 와 같다.

##### 기질(1M sodium-DL-malate, pH 7.0)

DL-malic acid 13.4g

2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 49ml

H<sub>2</sub>O to 100ml

조제방법은 Na-lactate 와 같다.

##### 염색액

LDH 염색액과 같고 기질만 Na-lactate를 Na-malate로 대체한다.

#### 4. Cellulose acetate strip

cellulose acetate strip의 선택이 본실험에 있어서 가장 중요하다. 현재 여러 제조회사에서 출고되고 있는데, 모두가 질이 다르기 때문에 한번씩 시험하여 본 뒤, 가장 우수한 것을 선택하는 수밖에 없다. 본 실험

실에서는 Separaphore-III, Selecta EPI-4 및 EPI-5 (Beckman type), Separax를 사용하였는데, Selecta EPI-5가 제일 좋았다. Separax는 단단한 반면 분리가 나쁘고, Separaphore-III는 너무 약하여 전기영동 도중 자신의 중량을 이기지 못하고 밑으로 쳐지는 경향이 있었다.

### 5. 고정액

가장 널리 쓰이는 것은 5% acetic acid 용액이다. 본 실험실에서는 다음 고정액을 사용하였다.

Glacial acetic acid	5ml
Ethanol	5ml
H <sub>2</sub> O	200ml

### 실험 방법

1. 전기영동 cell의 양쪽염색병에 barbituric acid buffer를 70ml씩 넣는다.

2. 알맞는 크기의 paper wick(Whatman No. 1 여과지나 동등한 것)을 2개 준비하여 한쪽끝을 염색병의 buffer에 담그고 다른 한편은 염색병의 턱에 걸쳐 놓는다.

3. cellulose acetate strip을 8×49cm 크기로 자른 다음 한쪽끝에서 2cm 떨어진 곳에 grease pencil로 0.5cm 간격을 두고 1cm 길이로 출발점을 표시한다(Fig. 4).

4. 이를 따로 준비한 barbituric acid buffer의 수면에 띄워서 기포가 완전히 빠지면 buffer 속에 담근다.

5. 최소한 20분정도 망치한 후에 cellulose acetate strip을 전자 여과지 사이에 끼워 이분의 buffer를 제거한 뒤 출발점이 양극(+)쪽에 오도록 전기영동 cell의 양쪽 염색병의 paper wick 사이에 걸쳐 놓는다.

6. 전원을 양쪽 염색병의 전극에 연결하고 전원스위치를 넣는다.

7. 대략 20분간 전류를 흘려서 빈 cellulose acetate strip의 buffer가 평형상태에 이르러 안정된 다음, 스위치를 끊고 sample을 출발점에 올려 놓는다.

8. sample은 다음 두가지 방법으로 얻을 수 있다.

9. 적당한 유리판 위에(slide glass) 1×10mm로 자른 여과지(Whatman No. 1이 좋음)를 놓은 위를 2×2cm로 자른 여과지로 덮는다.

10. 이 여과지(2×2cm)에 파쇄한 조직액 2방울을 떨어뜨린다. 조직파쇄액은 다음과 같이 준비한다. 조직:증류수(W/V)를 1:6 정도로 하여 수동식 glass homogenizer에서 20분간 파쇄한다. 이때 적당한

buffer를 증류수 대신 사용하여도 좋으나 결과는 같다.

11. 잠시후 1×10mm 여과지가 충분히 젖었으면 2×2cm 여과지를 살며시 들고 펜실으로 1×10mm 여과지를 접어서 cellulose acetate strip의 출발점에 올려 놓는다.

12. 2~3분이 지난 뒤 cellulose acetate strip에서 sample 여과지를 빼내고 전원스위치를 넣는다.

13. 조직이 연하거나 소량인 경우 10~12의 방법을 생략하고 다음 방식으로 한다. 9에서 준비한 여과지 위에 증류수를 2방울을 떨군다. 여기에 떼어낸 조직을 놓고 다른 유리판으로 덮어서 눌러 조직을 파파한다. 근조직과 같이 단단한 조직은 냉장고에서 얼린뒤에, 위의 방법을 쓴다.

14. 전기영동이 끝나면 시간과 일치되게 cellulose acetate strip 보다 조금 큰 여과지에 염색액을 직셔서 유리판 위에 놓는다.

15. 전기영동이 끝나면 스위치를 끊고 cellulose acetate strip을 영동 cell에서 꺼내어 윗면이 밑을 향하도록 염색액이 묻은 여과지 위에 포갠다. 이때 기포가 cellulose acetate strip과 여과지 사이에 생기지 않도록 조심한다.

16. 이것을 물에 적신 여과지가 달린 Petri dish에 옮기고 항온기(37°C)에서 염색시킨다. 염색시간은 20~60분 정도면 된다.

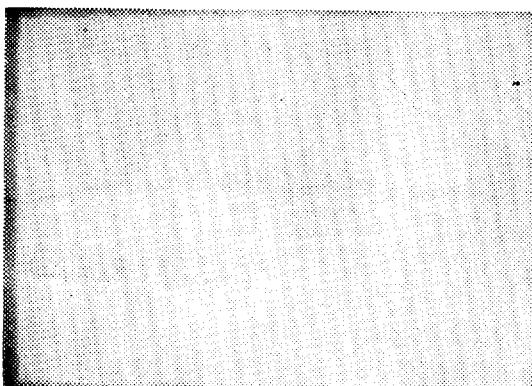
17. 염색된 cellulose acetate strip은 고정액에 5분 정도 넣어둔 뒤에 수도물로 잘 씻어서 여과지 사이에 끼워 건조시킨다.

18. 염색된 cellulose acetate strip을 투명하게 할 필요가 있으면 유동파라핀에 넣었다 꺼내면 좋다. xylol로 유동파라핀을 제거하면 cellulose acetate strip은 원상대로 되돌아 간다.

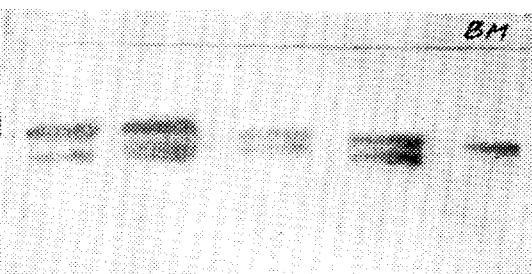
19. 고도의 재현성이 필요한 경우, 전기영동이 한번 끝날때마다 염색병의 buffer를 매번 서것으로 바꾸어 준다. 그러나 한번의 전기영동이 끝난 뒤 양쪽염색병의 buffer를 서로 잘 섞어준 뒤, 전극의 극성을 바꾸어서 다시 영동하여도 실용상 별 지장은 없다.

### 실험 결과

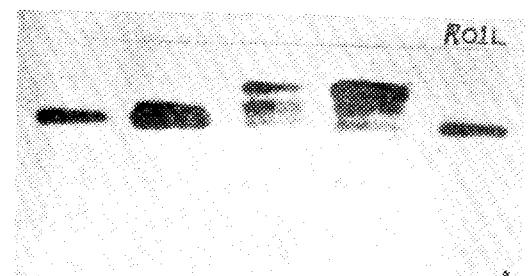
그림 3~5는 본 장치로 분리한 여러가지 동물조직의 lactate dehydrogenase와 malate dehydrogenase isozyme의 pattern이다. albino rat의 대뇌와 근조직을 40분간 전기영동하여서 얻은 영동상(zymogram)은 전형적 포유류의 lactate dehydrogenase isozyme



**Fig. 3.** Lactate dehydrogenase isozymes of albino rat tissues. The Selecta EPI-5 strip is run for 40 minutes.



**Fig. 4.** Malate dehydrogenase isozymes of animals. Electrophoresed for 40 minutes on the Separax strip. Left to right; Crayfish tail muscle, muscle of *Oryzias latipes*, gill of snake head, stomach of toad and muscle of the snake *Natrix tigrina lateralis*.



**Fig. 5.** Lactate dehydrogenase isozymes of the snake, *Natrix tigrina lateralis*. The Separax strip is run for 60 minutes. Left to right; Brain, heart, skeletal muscle, liver and stomach. 형을 보여 준다(Fig. 3). Fig. 4는 여러 동물조직의 malate dehydrogenase isozyme이다. 대부분의 생물에 있어서 malate dehydrogenase는 2개의 subunit으로서 구성되어 있다는 점을(kaplan, 1970) 감안하여도 cellulose acetate strip으로 malate dehydrogenase isozyme을 세밀하게 분리한다는 것은 무리인듯하다.

그러나 Fig. 4에서도 볼 수 있듯이 종에 따른 세 가지의 특징은 그대로 영동상에서 확인할 수 있다. 유혈 목조직의 lactate dehydrogenase isozyme도 본 장치로서 분리되었다(Fig. 5). 각 조직 사이에서 나타나는 독특한 isozyme 형을 알아 볼 수 있다. 이 외에도 본 실험실에서 행한 예비실험결과 alcohol dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, catalase 및 peroxidase 역시 본 장치로 분리됨을 확인하였다.

### 요 약

간편하고 경제적이며 재현성도 우수한 cellulose acetate 전기영동장치를 제작하였다. 본 장치를 사용하여 몇가지 동물 조직의 lactate 및 malate dehydrogenase isozyme을 분리 검출하여 본 결과, 기존 제품으로 실험한 결과와 별로 차이가 없음을 알았다. 특히 cellulose acetate 전기영동은 일정한 정전류에서 실시하는데, 본 장치에서는 약간의 전류변동이 있는 것이 사실이나 실험결과는 충분히 실용적인 것이었다.

### 문 헌

- Aw, S.E., 1966. Separation of urinary isoamylases on cellulose acetate. *Nature* **209** : 298.  
 Brewer, G.J., 1970. An Introduction to Isozyme Techniques. Academic Press, New York, N.Y.  
 Kaplan, N.O., 1970. Evolution of pyridine nucleotide linked dehydrogenases. Miami Winter Symposia 1, pp.66-88. North-Holland Pub. Co., Amsterdam.  
 Kohn, J., 1958. A microelectrophoretic method. *Nature* **181** : 838.  
 Kohn, J., 1968. Cellulose acetate electrophoresis and immuno-diffusion techniques. I. Smith (Ed.) Chromatographic and Electrophoretic Techniques Vol. II. Zone Electrophoresis(2nd ed.), pp. 84-146, John Wiley, New York, N.Y.  
 Maeda, B.W. and S.B. Rosalki, 1964. Localisation of leucine aminopeptidase isoenzymes. *J. Clin. Path.* **17** : 61-62.  
 Romel, W.C., LaMancusa, S.J. and J.F. DuFrene, 1968. Detection of serum alkaline phosphatase isoenzymes with phenolphthalein monophosphate following cellulose acetate electrophoresis. *Clin. Chem.* **14** : 47-57.  
 Wieland, Th., Pfleiderer, G. and F. Ortanderl, 1959. Ueber die Verschiedenheit der Milch-sauerrindenhydrogenasen. III. Vergleiche der Milchsaueredehydrogenasen aus verschiedenen Rattenorganen. *Biochem. Z.* **331** : 103-109.