

노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)의 알코올 水素離脫酵素
의 活性과 分離에 關한 研究

吳錫欣 · 鄭瑋載* · 朴相允**

(서울保健專門大學 · 衛生科, * 梨花女大 · 科學教育科, ** 成均館大 · 生物學科)

A study on Activity and Separation of Alcohol
Dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*.

Suk Heun Oh, Yong Jae Chung*, Sang Yoon Park**

(Dept. of Sanitary Engineer, Seoul Health Junior College,

*Dept. of Science Education, Ewha Womans Univ. and

**Dept. of Biology, Sung Kyun Kwan Univ.)

(1979. 4. 9. 접수)

SUMMARY

Drosophila melanogaster Oregon-R had been bred in a large quantity and the crude alcohol dehydrogenase (ADH) obtained was purified and the activity of the enzyme was measured, analyzed and its patterns were examined.

The results obtained are presented below:

1. Through this experiment, it was found that the specific activity of ADH of the *D. melanogaster* is about more than five times as strong as that of the *D. melanogaster* Samarkands which was found by Jacobson *et al.* in 1970.
2. It was learned that the ADH isozyme patterns of this strain was found to be ADH₁ and ADH₂ in the fast form and ADH₃ in the slow form.
3. It was learned that, ADH₁, ADH₂, and ADH₅A are found as the ADH patterns of crude enzyme, and that ADH₁, ADH₃A, and ADH₃B as the ADH patterns of the purified enzyme.
4. After the isolation and purification of ADH₃A and ADH₁ isozymes, specific activity of ADH₃A was found to be 4,330 (units/mg) and that of ADH₁ to be 3,670 (units/mg), and the exact position of their zymogram on the 7% acrylamide disc gel was distinguished.

緒 論

Markert와 Moller (1959)가 isozyme의 概念을 報告한 이래 酵素學, 遺傳學 그리고 發生學 등의 여러 分野에 있어서 이 方面의 研究가 여러 種類의 生物體에서 시도되었다. 그후 Johnson과 Denniston (1964)은 *Drosophila melanogaster*의 alcohol dehydrogenase (ADH) isozyme의 電氣泳動像은 相異한 strain 마다 각각 다르다고 보고 하였다.

Grell *et al.* (1968)은 *D. melanogaster*에서 fast form과 slow form으로 구분되는 2種類의 ADH isozyme을 확인하고 이들 2 isozyme을 control하는 유전인자는 제 2 염색체 위에 있음을 보고 하였다.

Jacobson (1968)과 Jacobson *et al.* (1970)은 *D. melanogaster*의 ADH isozyme을 分離 精製하여 이들의 活性과 isozyme 相互間의 interconversion에 關해서 研究 報告하였으며 Lakovaara와 Saura(1970)는 *D. subobscura*, *D. pseudoobscura* 및 *D. simulans* 등 8種에서 各各 ADH의 multiple form을 分離報告하였다.

우리나라에서는 Chung과 Lee (1972)가 韓國產 *D. melanogaster*를 國內 18個 地域에서 採集하여 cellulose acetate strip을 이용하여 各各의 isozyme에 대한 分離泳動像과 活性도를 測定比較하였다. 그후 Chung (1973)은 韓國產 *D. melanogaster* 4 strain을 starch gel 電氣泳動法으로 ADH isozyme의 밴드의 分布, 염색강도, 이동도를 比較 檢討한 바 있으며, Chung과 Oh (1974)는 6個 地域에서 採集한 韓國產의 *D. melanogaster*의 ADH isozyme의 電氣泳動像을 acrylamide disc gel을 이용하여 研究報告한 바 있다.

또한 Chung (1977 a)은 韓國產 *D. melanogaster*의 ADH인자형의 分布를 調查하기 위하여 13系統 (한국산 12계통과 표준 야생형인 Oregon-R)의 ADH에 대하여 agarose gel 電氣泳動法으로 實驗한바 있다.

ADH isozyme 以外에도 초파리의 isozyme에 관한 研究는 여러호소에 대하여 研究한 바 있다 (isoamylase: Chung, 1975 b, 1976, Chung and Park 1974, 1977, esterase: Chung 1975, α -glycerophosphate dehydrogenase: Chung 1977b). 最近에는 ADH isozyme의 動力學的 研究가 활발히 進진되어 여러 實驗材料로써 이들 isozyme의 分離 및 peptide의 構造를 밝히고 있다.

즉, Wolfe *et al.* (1977)과 Dworschack와 Plapp (1977)은 말의 肝 ADH의 pH에 따른 適應과 活性時와 非活性時의 動力學的 研究를, Lastorf와 Megnet (1968)는 *Saccharomyces cerevisiae*의 ADH isozyme의 分離 및 活性을, Schimpfessel (1968)은 같은 호모로부터 2個의 ADH 合成과 조절자에 關해서, Tassin과 Vandecasteele (1972)는 *Pseudomonas aeruginosa*의 긴 측쇄를 가진 ADH isozyme의 分離와 特性을 각각 밝힌 바 있다.

그리고 Vallee와 Hoch (1955)는 호모의 ADH에 대하여 연구한바 있다. 本 研究는 *D. melanogaster*의 Oregon-R 계통을 大量 飼育하여 얻은 粗酵素를 精製한 다음 이에 對하여 ADH isozyme의 活性도를 測定하는 한편 isozyme pattern을 分析 檢討하였다.

實驗材料 및 方法

초파리 : *D. melanogaster*의 Oregon-R strain은 梨花女子大學校 遺傳學 研究室에서 繼代사육된 것을 大量 사육하여 실험 재료로 사용하였다. 사육온도는 25°C±1°C를 유지하였으며 사육된 成虫은 酵素活性을 유지하기 위하여 -30~-35°C로 急冷凍시킨 密閉 容器에 넣어 眞空狀態에서 保管하였다.

ADH isozyme의 分離精製 : 方法 1— 초파리成虫 60 g (body weight)에 5 mM K₂HPO₄ 180 ml를 加하여 tube and pestle homogenizer로 마쇄한 다음 27,000×g에서 遠心 分離하여 얻은 황갈색의 上澄液 180 ml에 0~60% ammonium sulfate 용액 (NH₄OH 르 pH 8.0) 180 ml를 넣고 30분간 교반 하면서 혼합시킨후 13,600×g에서 30分 동안 원 심분리하여 分離된 침전물에 5 mM K₂HPO₄ 51 ml를 加하여 녹이고, 5 mM K₂HPO₄에 투석시켰다. 이 투석된 효소액을 30,000×g에서 원심분리하여 잔사를 제거 하였다.

이 酵素液을 5 mM K₂HPO₄로 평형화한 Sepadex G-25 column (2.2×30 cm)에 흡착 시킨후 1.8 ml씩 fraction collector에서 분획하여 활성부분 55 ml를 모았다. 여기에 DEAE-cellulose (0.84 meq/gm)를 첨가하여 천천히 교반하면서 slurry 상태로 혼화하고, 이것을 다시 반복 세척하였다. 이 세척여액을 分割하여 濾取한 後 活性分劃部位 200 ml를 얻었다. 이것을 hydroxylapatite column (2×10 cm)에 흡착시킨 다음 전개용액 0.12 M K₂HPO₄와 0.5 M K₂HPO₄를 사용하여 linear gradient로 전개하였다. Effluent volume은 最初의 分획효소액 (F¹-fraction)은 120 ml에서, 두번째 分획효소액(F²-fraction)은 400~420 ml에서 각각 얻었다. 方法 2—초파리의 成虫 320 g에 0.03 M Tris buffer (pH 9.0) 1,500 ml를 加하여 5°C에서 균질화 시킨후 16시간 교반한 다음 15,000×g에서 45분 동안 원심분리하여 上澄液 1,320 ml를 얻고 여기에 n-butyl alcohol 70 ml를 20분간 到 절쳐서 교반하면서 서서히 첨가하였다. 이것을 2,600×g에서 1시간 원심분리하여 n-butyl alcohol과 침전물을 제거한 다음 分離된 수용액을 0.03 M Tris butter (pH 9.0)로 16시간 3회 반복해서 투석하여 남아있는 n-butyl alcohol을 완전히 제거 하였다. 투석후에 얻은 약 1,500 ml의 수용액은 40% 포화 황산암모늄용액으로 만든 후 용액의 pH를 암모니아수르 pH 7.5가 되도록 조절한 다음 1,500×g에서 원심분리하여 分離된 上澄液을 다시 70% 포화 황산암모늄용액으로 만든 다음 같은 方法으로 pH 7.5로 조절하여 다시 15,000×g에서 원심분리하여 상등액은 제거하고 효소침전물은 75 ml의 0.03 M Tris buffer (pH 9.0)에 용해시켰다. 이 酵素液을 0.03 M Tris buffer (pH 9.0)로 평형화 시킨 DEAE-cellulose column (2.5×30 cm)에 흡착시킨 후 전개용액 0.03 M Tris buffer 와 0.12 M Tris buffer를 사용하여 linear gradient로 전개시켜 effluent volume 50~200 ml를 얻었다. 이 효소액을 0.013 M potassium phosphate (pH 7.5)로 평형화시킨 hydroxylapatite column (2×10 cm)에 다시 통과시켜 effluent volume 64~100 ml에서 J¹-fraction, effluent volume 120~144 ml에서 J²-fraction을 얻었다.

ADH isozyme 電氣泳動 : Ornstein and Davis (1959) 方法에 의한 acrylamide disc gel 電氣泳動을 실시 하였으며, tube는 內徑이 5 mm, 길이 85 mm의 유리관을 사용하였고, 이 tube에 7% acrylamide gel을 1.4 ml 넣은 後 氣泡을 없애고 少量의 증류수를 重層시켜 형광등 하에서 30分間 光重合시켰다. 重合이 끝난 gel은 上層의 증류수를 여과

지로 吸水 除去시킨 다음 酵素液 2, 0.05 M glycine buffer (pH 9.5) 1, 및 5% sucrose 1의 比率로 混合한 시료액을 만들어 그중 0.2 ml을 취하여 시료층으로 하였다. 시료층 위에 Tris glycine buffer를 充填시킨 후 上下泳動槽에 各各 Tris glycine buffer (pH 9.5) 250 ml를 부어 5°C에서 tube當 3 mA로 3時間 電氣泳動을 실시하였다. 泳動이 끝난 gel 은 ADH staining solution으로 25°C의 항온기에서 10분간 染色시킨 후 보관하였다.

ADH의 活性測定: 효소활성 측정조건은 酵素濃도에 따른 反應液의 速度가 直線이 되는 범위내에서 NAD (1.9 mM), Secbutylalcohol (0.13 M), glycine buffer (0.1 M, pH 9.5)와 酵素를 加한 혼합액 3 ml를 사용하였다. 따라서 효소 1單位는 반응속도 25°C, 波長 280 nm에서 1分當 0.001의 吸光度의 變化를 주는 효소의 양으로 환산 하였다. 이때 사용한 recording spectrometer는 Beckman model 25B를 사용하여 약 2분간 반응한 直線을 사용하였다. 효소의 分割은 fraction collector MRK Type 4를 이용 하였다.

蛋白質의 定量과 分離: 各 分離된 分割 酵素液中の 可溶性 蛋白質 定量은 Layne (1950)의 方法에 따라서 spectrometric 方法과 turbidimetric 方法으로 하였으며 이 蛋白質을 polyacrylamide gel electrophoresis 方法에 따라 成分別로 分離하였다.

結 果

1. 酵素의 活性

方法 1에 依한 各酵素分離液의 ADH活性: 粗酵素의 比活性은 Table 1과 같이 1,480 (unit/mg protein)이었고, Sepadex G-25 column을 통과 精製한 효소는 5,310으로 粗酵素의 약 3.6배, DEAE-cellulose를 통과 정제한 효소는 20,000으로 약 13.5배 였으며

Table 1. Purification of *D. melanogaster* Oregon-R alcohol dehydrogenase.

Solution.	Total activity (10 ⁶ units)	Total protein (g)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery (%)
Homogenate (27,000×g supernatant)	3.15	2.13	1,480	100
0~60% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	3.06	0.92	3,330	97
Dialysis (5mM K ₂ HPO ₄)	1.83	0.64	2,860	58
Eluted on Sepadex G-25	1.54	0.29	5,310	49
DEAE-cellulose.	1.50	0.075	20,000	48
Eluted with 0.12 M H ₂ HPO ₄ on hydroxylapatite column	0.4	0.018	22,200	12.7
Eluted with 0.5 M phosphate buffer on hydroxylapatite	0.32	0.012	26,700	10

hydroxylapatite를 통과 정제한 정제효소 (Fig. 1) 중 F₁-fraction 효소액이 22,000으로

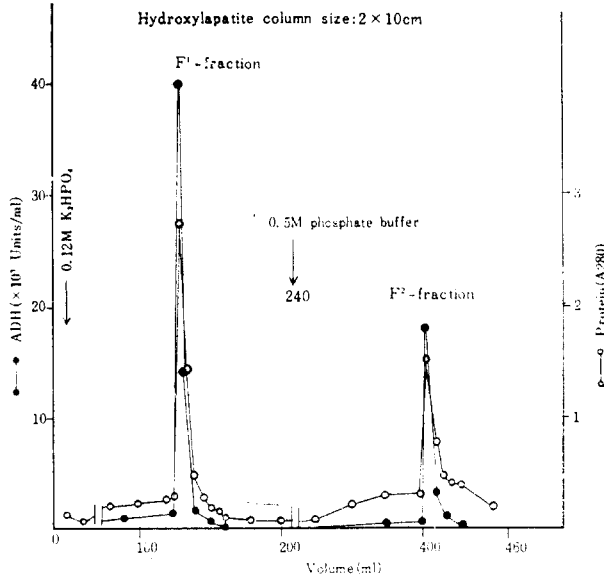


Fig. 1. Chromatography of alcohol dehydrogenase on hydroxylapatite

The enzyme was dissolved in 5 mM K₂HPO₄ and applied to a column (2×10 cm) of hydroxylapatite at 4°C. Eluted with 0.12 M potassium phosphate (pH.7.0), and collected F¹-fraction then continuously collected F²-fraction by linear gradient from 0.12 to 0.5 M phosphate buffer.

서 약 15배, F₂-fraction 효소액이 26,700으로서 약 18배로 정제 단계가 진행됨에 따라 높은 활성을 보였다. 정제효소의 recovery는 F¹-fraction이 12.7%, F₂-fraction이 10%이었다.

方法2에 의한 各酵素 分離液의 ADH 活性 : DEAE-cellulose를 통과 정제한 ADH의 比活性은 Table 2와 Fig 2, 3과 같이 1,830 (units/mg)로서 粗酵素의 1.8배를 나타내었고, hydroxylapatite를 통과 정제된 J¹-fraction의 효소액의 比活性은 약 4.3배, J²-fraction의 比活性은 약 3.7배로 각각 粗酵素의 比活性보다 높게 나타났다. 정제효소의 recovery는 J¹-fraction이 11%, J²-fraction이 4.8%이었다.

Table 2. Purification of *D. melanogaster* Oregon-R alcohol dehydrogenase.

Solution	Total activity (10 ⁶ units)	Total protein (g)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)
Homogenate (10,000×g supernatant)	2.28	2.28	1,000	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 40~70% precipitate	1.38	1.20	1,150	60.5
Eluted on DEAE-cellulose	0.42	0.23	1,830	18.4
hydroxylapatite. J ¹ -fraction	0.26	0.06	4,330	11.4
hydroxylapatite J ² -fraction	0.11	0.03	3,670	4.8

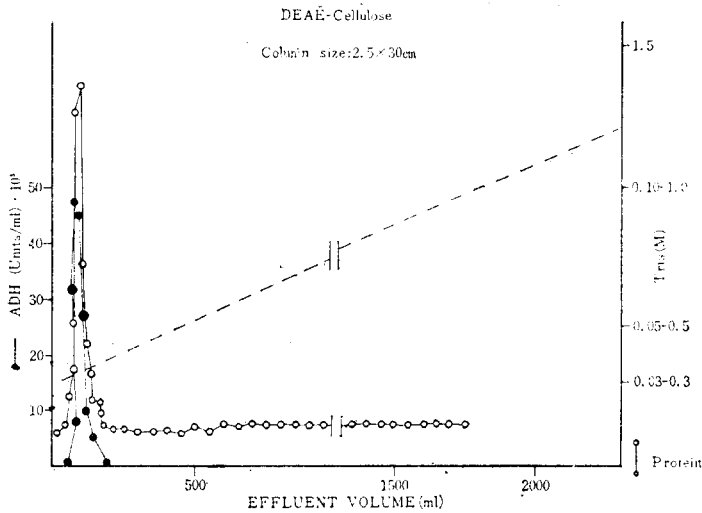


Fig. 2. Chromatography of alcohol dehydrogenase on DEAE-cellulose.

The enzyme had been fractionated by $(NH_4)_2SO_4$ (method 2) and dialyzed against 0.03 M Tris-chloride, pH 9.0. The enzyme was adsorbed to a column (2.5×30 cm) of DEAE-cellulose, equilibrated with 0.03 M Tris-chloride, pH 9.0 and eluted gradient (1.2 liters of 0.03 M Tris-chloride, and 1.2 liters of 0.12 M Tris-chloride, both at pH 9.0) at a flow rate of 1.4 ml per. min.

2. ADH isozyme pattern

方法 1에 의해 精製된 ADH의 isozyme pattern: 酵素를 精製하는 過程에서 ADH isozyme의 轉換有無를 確認하기 위하여 초파리 20個體에 0.05 M glycine buffer (pH 9.5) 1 ml와 5% sucrose 1 ml를 加하여 均質化시킨 용액을 시료층으로 充填시켜 電氣泳動시킨 결과 Fig. 4와 같이 fast form ADH₁, 및 ADH₂와 slow form ADH₃A의 zymogram이 나타났다.

한편 粗酵素의 ADH

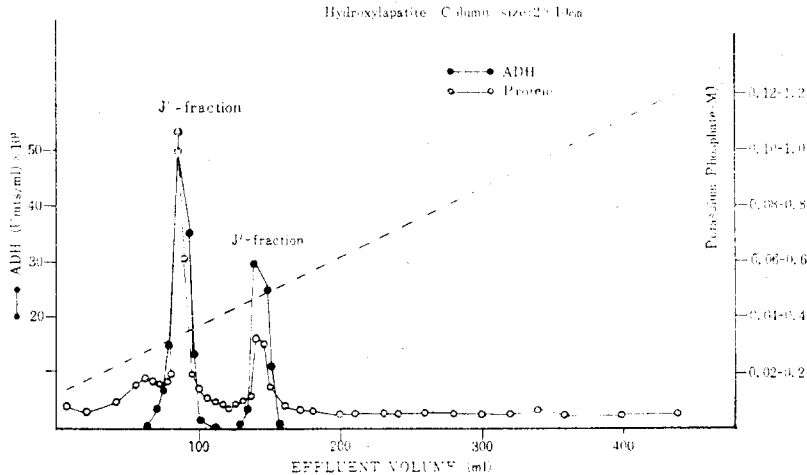


Fig. 3. Chromatography of ADH on hydroxylapatite. ADH from DEAE-cellulose chromatography in Fig. 2 was dialyzed against 0.01 M potassium phosphate, pH 7.5 and adsorbed to a column (2×10) of hydroxylapatite equilibrated at 0.013 M potassium phosphate, pH 7.5. Protein was eluted with 400 ml of 0.013 M potassium phosphate, pH 7.5 and the enzyme was eluted with a linear gradient (250 ml of 0.013 M potassium phosphate, pH 7.5 and 250 ml of 0.12 M potassium phosphate, pH 7.5) at a flow rate of 20 ml per hour.

isozyme zymogram과 蛋白質 pattern은 Fig. 5-a와 같이 ADH₁, ADH₂, ADH₅A 그리고 ADH₅B가 나타났다. Sepadex G-25 및 DEAE-cellulose를 통과 정제시킨 효소의 isozyme pattern은 ADH₁, ADH₅A 그리고 ADH₅B가 나타났으며 hydroxylapatite를 통과 정제한 J¹-fraction 및 J²-fraction에서 모두 ADH₅A와 ADH₅B만이 나타났다.

方法 2에 의해 精製된 ADH의 isozyme pattern: 粗酵素와 포화황산암모늄에 침전시킨 ADH는 butyl alcohol을 함유하고 있어 isozyme pattern의 染色이 不可能하였다. 그러나 butyl alcohol을 除去한 DEAE-cellulose column 및 hydroxylapatite를 통과정제한 J¹ 및 J²-fraction의 효소액의 ADH isozyme pattern은 각각 Fig. 6과 같다.

DEAE-cellulose를 통과정제한 효소에서는 ADH₁, ADH₅A 그리고 ADH₅B가 確認되었으며 hydroxylapatite를 통과정제한 J¹-fraction에서는 ADH₅A, J²-fraction에서는 ADH₁의 isozyme만이 確認되었다.

考 察

酵素精製 方法 1에 의한 *D. melanogaster* Oregon-R의 ADH 粗酵素와 精製過程의 ADH酵素의 比活性을 比較한 結果 Sepadex G-25로 정제된 효소는 3.6배 DEAE-cellulose로 정제된 효소는 13.6배, hydroxylapatite로 分離한 F¹-fraction에서는 15배, 그리고 F²-fraction에서는 18배나 높은 결과를 얻었다.

이것은 Jacobson *et al.* (1970)이 *D. melanogaster* Samarkands로 실험한 ADH 比活性은 각각 Sepadex G-25로서 1.3배 DEAE-cellulose로서 4.6배 및 hydroxylapatite로서 정제된 효소에서 18배와 3.3배를 얻은 성적과 比較할때 Oregon-R의 ADH活性은 Samarkands의 活性에 比해 훨씬 높았다.

精製方法 2에 의한 比活性은 粗酵素보다 DEAE-cellulose로 정제된 효소가 1.8배, hydroxylapatite로 정제된 효소중 J¹-fraction이 4.3배, J²fraction이 3.7배의 活性을 보였다. 그러나 Jacobson *et al.* (1970)이 發表한 結果보다는 낮은 活性을 나타내었다.

한편 Jacobson *et al.*은 方法 2에 의하여 *D. melanogaster* Samarkands의 ADH를 DEAE-cellulose column에 흡착시켜 ADH₅A와 ADH₅B isozyme을 分離 精製하였으나, 本 實驗에서는 DEAE-cellulose에서의 ADH isozyme의 分離精製는 不可能하였으며, 여기서 얻은 효소액을 hydroxylapatite로 再分離하여 2個의 fraction (J¹, J²)으로 分割한 結果 ADH₁ 및 ADH₅A를 分離 確認할 수 있었다. 따라서 *D. melanogaster* Oregon-R의 ADH活性을 나타내는 主 isozyme은 ADH₁과 ADH₅라고 生覺된다.

Oregon-R의 ADH isozyme pattern은 粗酵素에서는 Fig. 4와 같이 ADH₁, ADH₂ 및 ADH₅A의 isozyme이 검출되었다. 이것은 Ursprung과 Leone (1965)이 *D. melanogaster* Oregon R-ch에서, Grell *et al.* (1968)이 *D. melanogaster*의 다른 여러계통을 시료로 하여 5% acrylamide plate gel 을 이용하여 分離한 ADH isozyme pattern과 比較할 때 다같이 ADH₁과 ADH₅가 검출되었고 염색강도 역시 ADH₅가 각각 높았으며, ADH₁이 가장 낮은 사실에 일치하였으나 本 實驗에서는 ADH₂를 확인하였으나 다른 2계통에서는 ADH₃가 나타났다 (Grell *et al.*, 1968, Ursprung and Leone, 1965). 本 실험에서 정제된 ADH isozyme pattern은 ADH₁, ADH₅A 및 ADH₅B로 나타났는데 Grell *et al.* (1968)

과 Jacobson *et al.* (1970)이 *D. meanogaster* Canton-S와 *D. melanogaster* Samarkands에서 精製한 ADH isozyme의 pattern은 ADH₁-5까지 모두 나타난 사실과 比較할 때 本 實驗에서 사용한 *D. melanogaster* Oregon-R은 ADH isozyme pattern이 이들 보다 단순하였다. 또한 粗酵素에서 分離한 ADH isozyme pattern은 ADH₁, ADH₂ 그리고 ADH₅A이었는데, 정제효소에서는 다같이 ADH₁, ADH₅A 그리고 ADH₅B가 나타난 점으로 보아 정제과정중에 ADH₂가 ADH₅B isozyme으로 conversion된 것이라고 生覺된다.

結 論

Drosophila melanogaster Oregon-R을 大量飼育하여 alcohol dehydrogenase를 精製하여 그 活性을 測定하는 한편 alcohol dehydrogenase의 isozyme pattern을 分析한 結果 아래와 같은 몇가지 사실을 얻었다.

1. 본 실험을 통해서 *Drosophila melanogaster* Oregon-R의 alcohol dehydrogenase의 比活性은 Jacobson *et al.* (1970)이 報告한 바 있는 *D. melanogaster* Samarkands의 그것에 比하여 약 5배 이상의 比活性을 나타냄을 確認하였다.
2. 이 strain의 ADH isozyme pattern은 fast form인 ADH₁, ADH₂ 그리고 slow form인 ADH₅임을 알게 되었다.
3. 粗酵素에서의 ADH isozyme pattern은 ADH₁, ADH₂ 그리고 ADH₅A가 나타났는데, 정제효소에서는 ADH₁, ADH₅A 및 ADH₅B가 나타났다.
4. ADH₅A와 ADH₁ isozyme을 分離 精製한 結果 ADH₅A의 比活性은 4,330 units/mg이었고, ADH₁의 比活性은 3,670 units/mg임을 알게 되었으며, 이것을 7% acrylamide disc gel에 電氣泳動하여 zymogram의 位置를 精確히 判別하였다.

참 고 문 헌

- Chung, Y.J., 1973. A study of Alcohol dehydrogenase of *Drosophila melanogaster* in Korea by starch gel electrophoresis. *Korean. J. of Zool.* 16 : 67-77.
- Chung, Y.J., 1975 a. An electrophoretic study of esterase in the Korean natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Kor. Res. Inst. Bet. Liv.* 15 : 171-178.
- Chung, Y.J., 1975 b. Biochemical population genetic study of the drosophilid flies in Korea: Isoamylase of *Drosophila virilis*. *Kor. Res. Inst. Bet. Liv.* 14 : 81-94.
- Chung, Y.J., 1976. Biochemical and population genetic study of the drosophilid flies in Korea: Isoamylase of *Drosophila melanogaster*. *Kor. Res. Inst. Bet. Liv.* 16 : 89-99.
- Chung, Y.J., 1977 a. A study of alcohol dehydrogenase alleles in the Korean strains of *Drosophila melanogaster*. *Kor. J. Breeding.* 9 : 38-42.
- Chung, Y.J., 1977 b. A study of α -glycerophosphate dehydrogenase alleles in the Korean strains of *Drosophila melanogaster*. *Kor. J. Breeding.* 9 : 44-48.
- Chung, Y.J. and K.S. Lee, 1972. A Biochemical and genetic study of alcohol dehydrogenase in the Korean natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Jour. Kor. Res.*

- Inst. Bet. Liv.* **9** : 123-132.
- Chung, Y.J. and S.H. Oh, 1974. A study of alcohol dehydrogenase of *Drosophila melanogaster* in Korea by means of acrylamide gel electrophoresis. *Jour. Kor. Res. Ins. Bet. Liv.* **13** : 115-124.
- Chung, Y.J. and K.S. Park, 1974. A study of amylase isozymes in five strains of *Drosophila melanogaster* in Korea. *Korean J of Zool.* **17** : 117-126.
- Chung, Y.J. and K.S. Park, 1977. An electrophoretic study of isoamylases in the Korean strains of *Drosophila melanogaster*. *Kor. Res. Ins. Bet. Liv.* **18** : 89-96.
- Dworschack, R.T. and E.V. Plapp, 1977. Kinetics of native and activated isozymes of horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry.* **16(1)** : 111-116.
- Grell, E.H., Jacobson, K.B. & J.B. Murphy, 1968. Alterations of genetic material for analysis of alcohol dehydrogenase isozymes of *Drosophila melanogaster*. *Ann. N.Y. Acad. of Sci.* **151** : 441-455.
- Jacobson, K.B., 1968. Alcohol dehydrogenase of *Drosophila*: Intercoversion of isozymes. *Science.* **159** : 324-325.
- Jacobson, K.B., Murphy, J.B. & F.C. Hartman, 1970. Isoenzymes of *Drosophila* alcohol dehydrogenases. *The J. of Bio.* **245** : 5, 1075-1083.
- Johnson, F.M. and C. Denniston, 1964. Genetic variation of alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. *Nature.* **204** : 906.
- Lakovaara, S. and A. 1970. Isozymes of alcohol dehydrogenase in the species of the *Drosophila obscura* group. *Ann. Acad. Sci. Fenn. A IV Biologia.* **163** : 1-10.
- Layne, E., 1950. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring protein, methods in enzymology Vol. III. Ed. by Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan, Academic press, Inc. New York. pp.447-454.
- Lutstorf, U. and R. Megnet, 1968. Multiple form of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arc. of Bioch. and Biophy.* **126** : 933.
- Markert, G.L. and Møller, 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **45** : 753.
- Ornstein, L. and B.S. Davis, 1959. "Disc electrophoresis" (Division of Postman Kodak Co.) Distillation Products Industries.
- Schimpfessel, L., 1968. Presence and regulation of the synthesis of two alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. et. Bioch. et. Biophys. Acta.* **151** : 317-328.
- Tassin, J.P. Vandecasteele, 1972. Separation and characterization of long-chain alcohol dehydrogenase isoenzymes from *Pseudomonas*. *Bioch. et. Biophys. Acta.* **276** : 31-34.
- Ursprung, H. and J. Leone, 1965. Alcohol dehydrogenase: A polymorphism in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* **160** : 147-154.
- Vallee, B.L. and S.L. Hoch 1955. A component of yeast alcohol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **41** : 327.
- Wolfe, J.K., Weidig, C.F., Halvorson, H.R., and J.D. Shore, 1977. pH dependent conformational states of horse liver alcohol dehydrogenase. *The J. of Bio. Chem.* **252(2)** : 433-436.



Fig. 4. Electrophoresis of alcohol dehydrogenase on crude enzyme. Electrophoresis was carried out in disc polyacrylamide gel (7%) and tris-glycine buffer at 3mA per gel for 3hr.

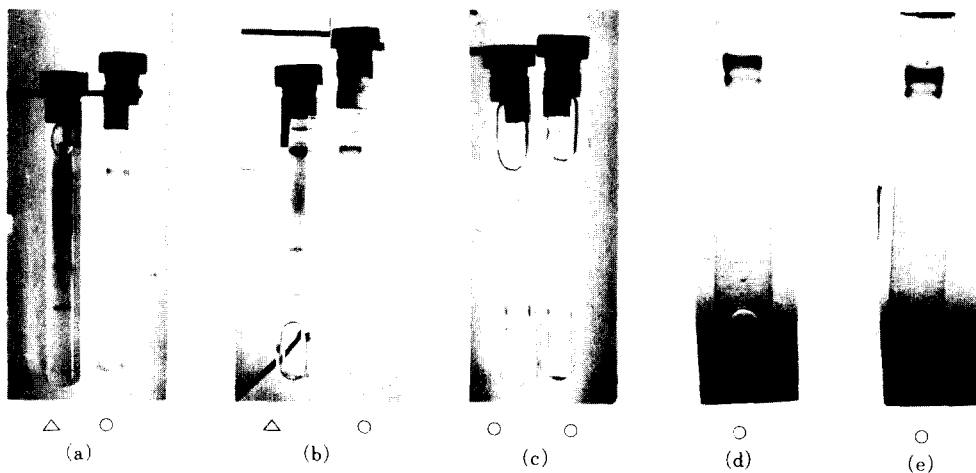


Fig. 5. Electrophoresis of alcohol dehydrogenase purified by method 1. a. supernatant of homogenate, b. ADH from sepadex G-25 (D-sol.), c. ADH from DEAE-cellulose (E-sol.), d. The F¹-solution and e. The F²-solution from hydroxylapatite were subjected to electrophoresis on polyacrylamide (7%) in tris-glycine buffer, pH 8.5

○ : ADH isozyme
 △ : Protein

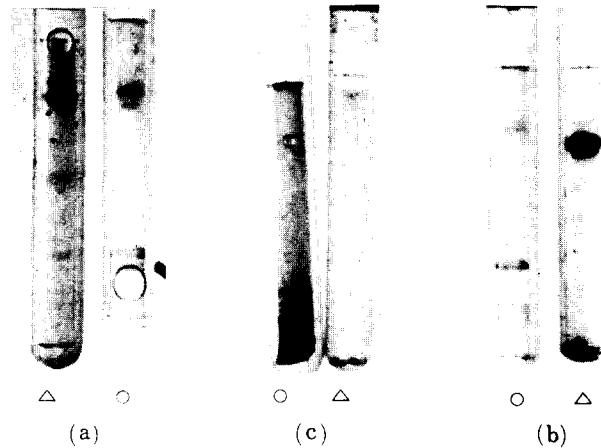


Fig. 6. Electrophoresis of alcohol dehydrogenase purified by method 2.
 a. The peak from DEAE-cellulose, b. The first peak from hydroxylapatite and c. The second peak from hydroxylapatite were subjected to electrophoresis on polyacrylamide (7%) in tris-glycine buffer (pH. 8.5).

The enzyme was located by tetrazolium reduction.

○ : ADH isozyme

△ : Protein