

한국인의 성분비액에서 Phosphoglucomutase-1(PGM₁) 아형에 관한 연구

최상규 · 김문규

한양대학교 생물학과

본 연구는 polyacrylamide gel 등전점 전기영동을 응용, 보존시간에 따른 정액반, 질액반 등에서 PGM₁ 아형의 검출 및 효소활성의 안정성을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. (1). 정액반의 경우, 실온에서 보존 후 7일에는 85%, 14일에는 15%의 PGM₁ 아형의 판정이 가능하였고, 21일에는 전혀 판정이 불가능 하였다. (2). 질액반의 경우, 실온에서 보존 후 7일에는 67%의 PGM₁ 아형의 판정이 가능하였으나, 14일에는 전혀 불가능 하였다.

한편, 질액에 정액이 혼합된 경우, 질액의 PGM₁ 아형을 판정함으로써, 정액의 PGM₁ 아형의 추정치가 가능하였다. 이 결과를 통하여 실제 법생물학 분야에 활용이 가능하다고 인정되었다.

KEY WORDS: PGM₁, subtypes, Sex secretions

최근 혈청단백질 및 적혈구효소의 유전적 다형에 의한 개인차가 명백해지면서 인류유전학의 발전은 물론 법생물학 분야의 개체식별 및 친생자 확인 등에 응용을 위한 기초자료와 적절한 실험방법의 연구가 시급히 필요하게 되었다.

그리고 유전적 다형이 밝혀진 수십종의 효소 중 효소활성의 안정성이 가장 강한 효소가 바로 PGM₁이라는 사실도 명백해졌다 (Wraxall and Culliford, 1968; Rothwell, 1970). 더구나 최근 정액반, 질액반, 그리고 모근세포(毛根細胞)에서 PGM₁ 아형의 검출과 그 효소활성의 안정성을 조사한 연구가 다수 보고 되었다 (Yoshida *et al.*, 1979; Burgess *et al.*, 1979; Berg *et al.*, 1981; Oya *et al.*, 1983; Budowle *et al.*, 1986).

그러나 국내에서의 PGM₁ 효소에 관한 연구로는 이 등 (1982)이 마우스(mouth)에서 PGM 활성에 미치는 방사능의 영향에 관한 보고와 김 등 (1984)이 한국인 집단에서 PGM₁ 표현형의 분포 및 유전자 빈도, 정 등 (1985)이 모유(母乳)에서 PGM₁의 표현형 및 유전자 빈도를 보고하였을 뿐, 등전점 전기영동에 의한 PGM₁ 아형의 검출 및 효소활성의 안정성을 연구한 보고는 없다.

따라서 본 연구는 정액반과 질액반에서

PGM₁ 아형을 검출하고, 그 효소활성의 안정성을 조사하여 이를 실제 법생물학 분야에 활용할 수 있도록 실시하였다.

재료 및 방법

시료의 준비

정액반: 정액은 건강한 성인 남자 50명으로부터 약 3~5 ml씩을 제공받아 -20°C에 보존하였다. 이들 정액 중 일부는 5×5 cm 크기로 절단한 멸균 거즈에 묻혀서 건조시킨 것을 정액반으로 준비하였고, 21일동안 실온에 보존하면서 실험에 사용하였다.

질액반: 질액은 건강한 성인 여자 20명으로부터 면봉을 사용, 임의로 채취한 것과 동시에 정맥혈 소량을 제공받았다. 그리고 사체 부검시 채취한 질액 및 심장혈 각각 10예 등을 수집하였고, 질액반은 질액이 침윤된 면봉을 그대로 건조시켜 준비한 다음, 4°C 및 실온에 보존하면서 실험에 사용하였다. 모든 질액반 시료는 정액 및 정자의 혼합 여부를 실험전에 검사하였다.

등전점 전기영동

Polyacrylamide gel의 준비: 등전점 전기영동은

Table 1. Preparation of two kinds of polyacrylamide gel solutions.

Component	Composition for final pH range	
	4.5-7.0	3.5-9.5
29.1% Acrylamide solution	10 ml	10 ml
0.9% N,N ¹ -Methylenebis-acrylamide (Bis) solution	10 ml	10 ml
87% Glycerol solution	7 ml	7 ml
LKB 1809 Ampholine solution		
pH 3.5-10		2.8 ml
pH 4-6		0.2 ml
pH 5-7	2.25 ml	0.2 ml
pH 7-9	0.75 ml	
pH 9-11		0.4 ml
1% Ammonium persulphate solution	1.5 ml	1.5 ml
*Distilled water	Making final volume of 60 ml	

*Degasing should be done at this step.

LKB Application Note 250과 Kühnl과 Spielmann (1978)의 방법 등을 약간 변경하여 LKB 2117 Multiphor 전기영동장치 (LKB Instrument, Bromma, Sweden)를 이용하였다.

Polyacrylamide gel (PAG) 용액은 Table 1에서와 같이 ampholine 최종 농도 pH 4.5~7.0과 pH 3.5~9.5의 구배가 되도록 2 종류를 준비하였다. 모든 시약은 Sigma, Merck, Wako회사 제품 등을 사용하였다.

Table 1에서와 같이 준비한 polyacrylamide gel 용액을 크기 260×125×2 mm되는 2개의 유리판 중간에 부어 실온에서 하루밤을 둔 다음, 일단 4°C 냉장고에 30분간 넣었다가, polyacrylamide gel을 준비하였다. 전극용액은 ampholine pH 4.5~7.0과 pH 3.5~9.5 구배의 겔판 모두에서 양극에는 1M H₃PO₄ 용액을, 음극측에는 1M NaOH용액을 준비하여 electrofocusing strips (LKB 2117~106)에 충분히 적셔서 사용하였다.

시료의 적용과 영동조건: 준비된 정액반은 각각 5×3 mm 크기로 절단하여 습윤상자내에서 슬라이드 글라스에 올려 놓고 증류수 한방울씩을

떨구어 20분간 시료를 침윤시킨 다음, 양극측에서 2 cm 떨어진 gel 표면에 올려 놓았다. 질액반은 증류수로 추출한 다음, paper strips (5×3 mm)에 10 μl씩을 묻혀서 gel표면에 올려 놓고, 전기영동을 실시하였다.

정류기는 LKB 2197 power supply를 사용하여 전력은 25W로 고정시키고, 전류와 전압은 최고로 조정해 놓았다. pH 4.5~7.0 구배의 전기영동시 초기 전압 및 전류는 약 480V, 50 mA로 통전되다가, 약 90분이 지나면서 전압은 최고 1,400 V까지 올라가고, 전류는 약 16 mA로 감소되면서 계속하여 약 150분간 전기영동을 실시하였다.

pH 3.5~9.4 구배의 전기영동시 초기 전압 및 전류는 300 V, 70 mA에서 영동하다가, 90분이 지나면서 2~3시간까지 최고 전압 1,200 V로 올라가고, 전류는 20 mA 정도로 떨어지면서 등전점 전기영동을 완료하였다. 위 두조건인 전기영동시 prefocusing은 모두 30분간 실시했으며, 시료적용 후 90분 후에 시료를 묻혔던 paper strips 및 거-즈 절단조각을 제거하였다. 그리고 높은 전압으로 인한 열의 발생은 10°C의 냉각수를 계속 순환시켜 방지하였다.

염색 및 판정 : 염색용액은 Spencer 등 (1964)의 방법을 따라 제조하였다. 즉 glucose 1-phosphate 17 mg/ml, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP) 1 mg/ml, glucose 6-phosphate dehydrogenase 0.4 μ unit/ml, phenanzine methosulfate 1 mg/ml, MTT tetrazolium 1 mg/ml 등 염색시약을 0.03 M Tris HCl 완충액 (pH 8.0) 10 ml에 용해시킨 다음, 55°C로 온도를 유지한 2% agar gel-용액 10 ml를 혼합하였다. 전기영동이 완료된 polyacrylamide gel 표면에 위 염색 용액을 피복하여, 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 전기영동상을 관찰하여 PGM₁ 표현형을 관찰하였다.

등전점 전기영동에 의해 판정된 PGM₁ 아형의 명명은 연구자들에 따라 통일되지 않고 있는 실정이나, 본 연구에서는 전기영동 이동속도에 따라 fast(F) 및 slow(S)에서 유래된 F, S형, 즉 "1F, 1S, 2F, 2S" (Bissbort *et al.*, 1978; Dobosz and Koziol, 1981) 등으로 표기하기로 하였다.

그리고 PGM₁ 아형의 표현형은 Sutton (1979b)이 제시한 방법에 따라 판정하였다 (Fig. 1).

결 과

정액반에서 PGM₁ 아형의 검출

정액반을 시료로 등전점 전기영동을 실시한 PGM₁ 아형의 영동상은 Fig. 2와 같다. 정액반 PGM₁ 아형의 영동상은 적혈구에서의 영동상과 동일한 양상이었다.

Fig. 2는 pH 4.5~7.0 구배의 전기영동상으로 1일 (Sp. Nos. 1,2,3)과 1주 보존된 정액반 (Sp. Nos. 5,7,9)에서는 PGM₁ 아형의 판정이 모두 용이하였으나, 3주 보존된 정액반 (Sp. Nos. 4,6,8)에서는 PGM₁ 영동상이 관찰되지 않았다.

실온에 보존된 정액반에서 PGM₁ 효소활성의 안정성을 조사한 결과는 Table 2 및 3에서와 같다.

Table 2의 pH 4.5~7.0 구배의 전기영동에서 46예의 정액반 중 모두 5종류의 PGM₁ 아형이

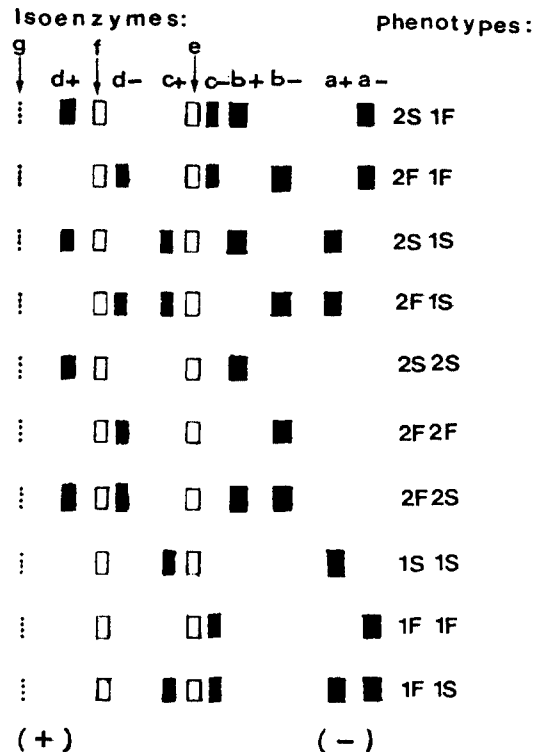


Fig. 1. Diagram showing the 10 PGM₁ subtypes (shaded) from red cell lysates after isoelectric focusing. The proposed relationship between the PGM₁ and PGM₂ loci described by Sutton (1979b).

*a-, a+, b-, b+: PGM₁ loci, c-, c+, d-, d+: PGM₂ loci, e and f: isoenzyme originated from the PGM₂ loci, g: unknown and rarely detected band.

검출되었으며, 3일까지는 PGM₁ 아형의 판정이 모두 가능하였으나, 7일에는 40예, 10일에는 급속히 떨어져 20예의 정액반에서, 그리고 14일에는 7예에서 PGM₁ 아형이 판정되었으나, 21일에는 전혀 판정이 불가능 하였다.

Table 3의 pH 3.5~9.5 구배에서는 1일에서 46예 모두에서 PGM₁ 아형의 판정이 가능하였고, 7일에는 18예, 그리고 14일에는 전혀 판정이 되지 않았다.

위의 결과로 보아 pH 4.5~7.0의 구배는 pH 3.5~9.5 구배의 전기영동보다 다소 높은 비율로 PGM₁ 아형의 판정이 가능하였다. 그러나 PGM₁ 아형의 종류에 따른 효소활성의 안정성에 차이는 인정되지 않았다.

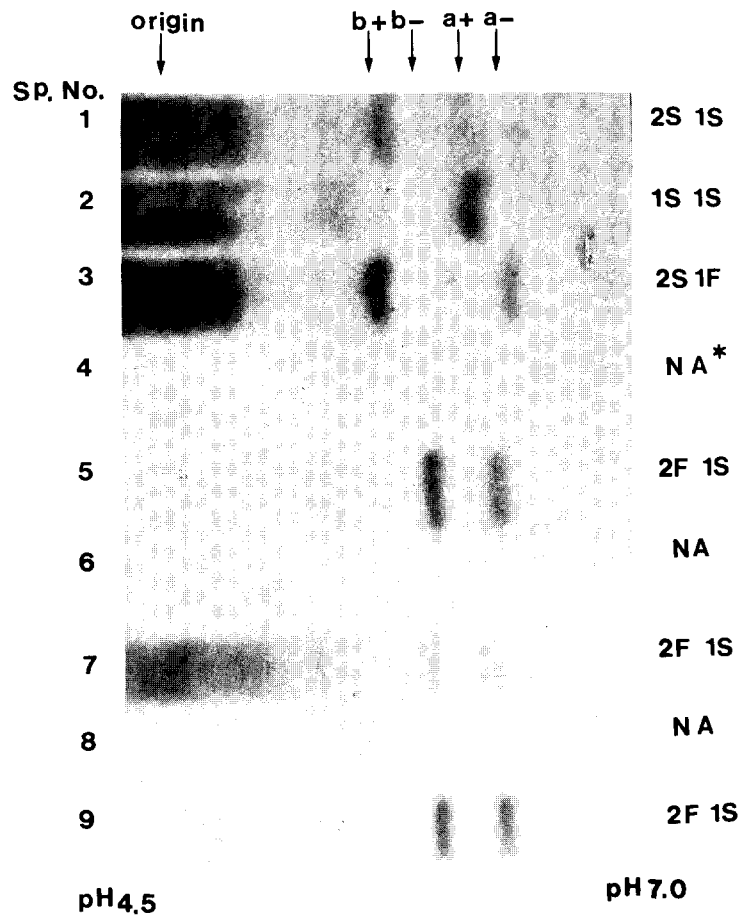


Fig. 2. PAG isoelectric focusing patterns of PGM₁ subtypes from seminal stains stored for 1 day (Sp. Nos. 1,2 and 3), 1 week (Sp. Nos. 5,7 and 9) and 3 weeks (Sp. Nos. 4,6 and 8) at room temperature. *NA: No enzyme activity

Table 2. The stability of PGM₁ subtypes of seminal stains according to the period of storage at room temperature using ampholine PAG plate (pH 4.5-7.0).

PGM ₁ subtype	No. of sample tested	Period of storage (day)					
		1	3	7	10	14	21
1F1S	7*	5	5	4	0	0	
2F1S	4	4	4	4	2	0	0
1S1S	25	25	25	25	10	5	0
2S1S	9	9	9	5	3	2	0
2S1F	1	1	1	1	1	0	0
Total	46	46	46	40	20	7	0

*No. of sample subtype determined

Table 3. The stability of PGM₁ subtypes of seminal stains according to the period of storage at room temperature using ampholine PAG plate (pH 3.5-9.5).

PGM ₁ subtype	No. of sample tested	Period of storage (day)				
		1	3	7	10	14
1F1S	7	7*	4	2	1	0
2F1S	4	4	3	1	0	0
1S1S	25	25	25	14	3	0
2S1S	9	9	7	0	0	0
2S1F	1	1	1	1	0	0
Total	46	46	40	18	4	0

*No. of sample subtype determined

Table 7. The detectable and typable rate of PGM₁ subtypes from seminal stains and vaginal stains according to the period of storage at room temperature.

Period of storage (day)	Seminal stains		Vaginal stains	
	detectable % (No.)	typable % (No.)	detectable % (No.)	typable % (No.)
1	100(46)	100(46)	100(12)	100(12)
7	89(41)	86(40)	775 (9)	67 (8)
10	50(23)	43(20)	33 (4)	17 (2)
14	22(10)	15 (7)	17 (2)	0 (0)
21	7 (3)	0 (0)	0 (0)	

고찰

최근 혈청 단백질과 적혈구 효소의 유전적 다형이 밝혀짐에 따라 인류 유전학 분야에서 유전적 분포의 조사와 법생물학 분야에서는 개체 식별 및 친생자 확인 등에 상당한 흥미와 관심을 모으게 되었다.

또한 최근에는 신선한 혈액이 아닌 건조된 혈흔에서의 PGM₁ 아형의 검출에 관한 연구와 정액, 질액, 그리고 모근세포에서도 PGM₁ 아형의 증명이 가능함을 보고하였다 (Yoshida *et al.*, 1979; Burgess *et al.*, 1979; Berg *et al.*, 1981; Oya *et al.*, 1983; Budowle *et al.*, 1986).

최초로 Spencer 등 (1964)은 적혈구에서 PGM₁ 표현형을 전분 겔 전기영동법에 의해 3종류 즉 PGM₁ 1-1, PGM₁ 2-1, PGM₁ 2-2 표현형을 증명하였으며, 이들 표현형은 2개의 대립유전자 PGM₁¹과 PGM₁²에 의하여 유전된다고 하였다. 그 후로는 등전점 전기영동에 의해 10종류의 PGM₁ 아형을 증명하였으며, 4개의 대립유전자 즉 PGM₁^{1F}, PGM₁^{1S}, PGM₁^{2F}, PGM₁^{2S}에 의하여 유전되고 있음을 보고하였다 (Ishimoto and Kuwata, 1972; Bark *et al.*, 1976; Kühnl *et al.*, 1977; Sutton and Burgess, 1978; Burdett, 1981).

본 연구에서 polyacrylamide gel 등전점 전기영동으로 적혈구 용혈액에서의 PGM₁ 아형은 pH 4.5~7.0 및 pH 3.5~9.5 구배에서 모두 Sutton (1979a)이 제시한 모식도와 일치하였다.

그리고 pH 4.5~7.0 구배의 PGM₁ 영동상은 pH 3.5~9.5 구배보다 a 및 b 동위효소의 band들이 명확히 구별되어 PGM₁ 아형의 판정이 매우 용이하였다.

사람 정액에서의 PGM₁ 아형의 검출을 등전점 전기영동에 의해 최초로 실시한 Sutton (1979b)은 동일한 사람의 정액과 혈액의 PGM₁ 표현형의 영동상은 서로 같다고 보고하였다.

또한 Oya 등 (1983)은 정액반 및 질액반에서 PGM₁ 아형의 검출 및 실제 법생물학 분야에 활용하기 위한 효소활성의 안정성을 연구보고 하였다.

본 연구는 정액반 및 질액반에서 PGM₁ 아형의 안정성을 조사한 결과, 14일 실온에 보존된 정액반에서 PGM₁ 아형의 판정이 가능하였고 (15%), 21일에는 전혀 불가능하였다. 그리고 질액반의 경우는, 10일에서 17%의 PGM₁ 아형의 판정이 가능하였으며, 14일에는 전혀 불가능하였다. 그러나 Oya 등 (1983)은 pH 5.0~6.5 구배의 등전점 전기영동에 의해 정액반에서의 PGM₁ 아형의 판정이 3주까지 가능함을 보고하였고, Budowle 등 (1986)도 3주까지 정액반에서 PGM₁ 아형의 판정이 가능하다고 하였다. 이들은 모두 pH 구배가 본 연구 (pH 4.5~7.0)와는 다른 좁은 범위의 pH 5.0~6.5 구배를 사용하였다. 그리고 질액반을 시료로 PGM₁ 아형의 효소활성의 안정성을 조사한 보고는 현재까지 없다. 따라서 여러종류 pH 구배의 등전점 전기영동을 실시하여 정액반 및 질액반에서의 효소활성의 안정성을 계속 연구할 필요가 있음을 알 수 있었다. 또한 본 연구는 질액과 정액이 혼합된 혼합반에서 정액의 가능한 PGM₁ 아형을 추정할 수 있는 결과를 얻을 수 있었다. 한편 PGM₁ 효소활성은 시간이 경과함에 따라 그 식별이 어려워져 검출은 가능하나, 판정 가능한 비율은 감소하는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 정액반 및 질액반을 대상으로 polyacrylamide gel 등전점 전기영동에 의한 PGM₁ 아형의 분포 및 효소활성의 안정성의 결과는 법생물학의 기초자료가 되는 물론 실제 활용에도 가치가 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Bark, J. E., M. J. Harris, and M. Firth, 1976. Typing of the common phosphoglucomutase variants using isoelectric focusing. A new interpretation of the phosphoglucomutase system. *J. Forens. Sci. Soc.* **16**:115-120.
- Berg, S., M. Ladiges, und L. Ladiges, 1981. Der Einfluss von Blutproben und Spurenalterung auf das PGM₁-und Gc-Subtypenmuster. *Z. Rechtsmed.* **87**:85-94.
- Bissbort, S., H. Ritter, and J. Kompf, 1978. PGM₁ subtyping by means of acid starch gel electrophoresis. *Hum. Genet.* **45**:175-177.
- Budowle, B., R. S. Murch, L. C., Davidson, A. M. Gambel, and J. J. Kearney, 1986. Subtyping phosphoglucomutase-1 in semen stains and blood stains: A report on the method. *J. Forens. Sci.* **31**:1341-1348.
- Burdett, P. E., 1981. Isoelectric focussing in agarose: phosphoglucomutase (PGM locus 1) typing. *J. Forens. Sci.* **26**:405-409.
- Burgess, R. M., J. G. Sutton, and P. H. Whitehead, 1979. An improved means of enzyme typing of hair roots using isoelectric focusing. *J. Forens. Sci.* **4**:392-396.
- Chung, Y. J., S. J. Kang, and I. S. Cho, 1985. Polymorphism of milk phosphoglucomutase in Korean population. *Kor. J. Genet.* **7**:105-110.
- Dobosz, T. and P. Koziol, 1981. Rare phenotypes of the phosphoglucomutase locus-I detectable by isoelectric focusing on cellogel. *Hum. Genet.* **59**:81-83.
- Ishimoto, G. and M. Kuwata, 1972. The typing of red cell enzymes by isoelectric focusing in gels. *Rep. Nat. Res. Inst. Police Sci. (Japan)* **25**:13-16.
- Kim, S. H., K. S. Park, and Y. J. Kim, 1984. Red cell phosphoglucomutase-1 polymorphism in Korean. *Kor. J. Genet.* **6**:1-14.
- Kühnl, P., U. Schmidtmann and W. Spielmann, 1977. Evidence for two additional common alleles at the PGM₁ locus (phosphoglucomutase EC 2.7.5.1). A comparison by three different techniques. *Hum. Genet.* **35**:219-223.
- Lee, K. S., S. R. Kim, and Y. J. Kim, 1982. Radiation effects on the phosphoglucomutase activities in the mouse (*Mus musculus*). *Kor. J. Zool.* **25**:179-185.
- Oya, M., A. Kido, and N. Komatsu, 1983. Medicolegal investigation of sexual assault material by phosphoglucomutase subtypes. *Jpn. J. Legal Med.* **37**:783-787.
- Rothwell, T. J., 1970. The effect of storage upon the activity of phosphoglucomutase and adenylate kinase enzymes in blood samples and blood stains. *Med. Sci. Law.* **10**:230-234.
- Spencer, N., D. A. Hopkinson, and H. Jarris, 1964. Phosphoglucomutase polymorphism in man. *Nature* **204**:742-745.
- Sutton, J. G. and R. Burgess, 1978. Genetic evidence for four common alleles at the phosphoglucomutase-1 locus (PGM₁) detectable by isoelectric focusing. *Vox. Sang.* **34**:97-103.
- Sutton, J. G., 1979a. Further alleles of phosphoglucomutase in human semen detected by isoelectric focusing. *J. Forens. Sci.* **24**:189-192.
- Sutton, J. G., 1979b. Characterisation of the isoenzymes of phosphoglucomutase (PGM) determined by the first (PGM₁) and second (PGM₂) locus observed by isoelectric focusing. *Hum. Genet.* **47**:279-290.
- Wraxall, B. G. D. and B. J. Culliford, 1968. A thin layer starch gel method for enzyme typing of blood stains. *J. Forens. Sci.* **8**:81-82.
- Yoshida, H., T. Abe, and F. Nakamura, 1979. On the frequencies of PGM₁ subtypes detected from hair roots in Japanese by isoelectric focusing. *Rep. Natl. Res. Inst. Police Sci.* **32**:15-18.

(Accepted March 20, 1988)

Studies on the Phosphoglucomutase-1 (PGM₁) Subtypes in Sex Secretions in Korean

Sang Kyu Choi and Moon Kyoo Kim (Department of Biology, Hanyang University,
Seoul 133-791, Korea)

These studies have been carried out to examine the stability of enzyme activity of PGM₁ subtypes in seminal stains and vaginal stains according to the period of storage time by means of polyacrylamide gel(PAG) isoelectric focusing.

The results from the experiments were as follows. (1) The stability of enzyme activity of PGM₁ subtypes was determined from seminal stains and vaginal stains according to the period of storage time. The PGM₁ subtypes of seminal stains stored at room temperature could be determined 86% after 7 days and 15% after 14 days, but almost impossible after 21 days. (2) In the case of vaginal stains stored at room temperature, PGM₁ subtypes could be determined 67% after 7 days, but almost impossible after 14 days.

On the other hand, when the vaginal fluid was mixed with seminal fluid, PGM₁ subtypes of the seminal fluid could be postulated by the determination of PGM₁ subtypes from the vaginal fluid. These results lead to the possibility of application in forensic biology.