

피루브산 탈수소 효소(송아지 심장)의 항체(토끼)생산

권 무 식

성균관대학교 농과대학 유전공학과

Production of Rabbit Anti-Bovine Heart Pyruvate Dehydrogenase Antibody

Moo Sik Kwon

Department of Genetic Engineering College of Agriculture
Sung Kyun Kwan University

ABSTRACT

Rabbit anti-bovine heart PDH antiserum was raised against E1(a, b) isolated from PDC, and then applied to detect E1a and E1b. Appropriate amounts of E1 were fractionated by SDS-PAGE and electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane. The E1a and E1b on the membrane were incubated with anti-E1 antiserum and identified by GAR-HRP system. It has been found that the immunodetection sensitivity of E1a and E1b were directly proportional to the amount of antigen and transfer time. The lengthy transfer times increased the immunodetection sensitivity of E1a and E1b. The maximal detection sensitivity of Western blotting of E1a and E1b was achieved at 3.5 V/cm for 16 hour transfer under these experimental conditions.

서 론

포유동물의 Pyruvate dehydrogenase complex (PDC)는 미토콘드리아에 위치한 multienzyme complex로서 일련의 연쇄반응을 거쳐 pyruvate를 산화적으로 탈탄산하여 Acetyl CoA로 전환하는 반응을 촉매하므로, 에너지 대사에 중추적 역할을 담당하고 있다. 이 PDC는 3개의 catalytic proteins인 pyruvate dehydrogenase (PDH 혹은 E1) (EC:2.4.1), dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) (EC: 2.3.1.12), dihydrolipoamide dehydrogenase (E3) (EC: 1.8.1.4)로 구성되어 있다. 이외에도 2개의 regulatory proteins인 E1-kinase(EC: 2.7.1.99), phospho-E1 phosphatase(EC: 3.1.3.43), 그리고 기능을 알 수 없는 protein X가 있다(1,2,3). E1은 nonidentical subunit a (Mr 41,000)와 b (Mr 36,000)가 두 copy씩 결합된 tetramer (a₂b₂)이며, E2는 monomer, E3는 identical

subunit 2개로 형성된 dimer이다. 한분자의 PDC에는 multiple copy의 E1, E2, E3를 포함하고 있다(1). E1 kinase에 의한 E1a subunit의 인산화는 PDC 촉매 작용을 inactivate 하지만, phospho-E1 phosphatase에 의한 탈인산화는 PDC 촉매작용을 다시 회복시킨다(1).

PDC activity는 이 복합체 전체 또는 catalytic components인 E1, E2, E3의 partial reaction activity를 spectrometry, 혹은 isotope를 사용하여 생화학적으로 진단할 수 있다(4, 5, 6, 7). 그러나 E1의 nonidentical subunits a 혹은 b의 분석법은 잘 알려져 있지 않다. 한편 세포 내에서는 PDC activity와 유사한 효소들이 함께 존재하며, 조직 파쇄시 나타나는 촉매작용의 저해 현상등으로 PDC 구성원중 어느 부분(효소)의 활성도를 정확히 분석하기에는 많은 어려움이 따른다(2, 8, 9, 10). 최근 개발된 immuno-blotting (11, 12)을 응용하면 복합단백질로 구성된 생체 촉매의 subunits를 비교적 정확하게 정성

혹은 정량할 수 있게 되었다. 그러나, immuno-blotting 제반 실험과정은 고찰하고자 하는 단백질에 적합하도록 적의 조절하여야 이의 진단 감도를 극대화할 수 있다.

본 연구에서는 PDC 구성원인 E1 subunits a와 b를 면역학적으로 동정할 수 있는 Western blotting을 아래와 같이 3단계 과정을 거쳐 확립하였다.

첫째, 송아지 심장 피루브산 탈수소 효소 복합체(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)에서 E1(a, b) 단백질을 분리하였다. 둘째, E1(a, b) 단백질을 토끼에 주사하여, 항 E1(a, b) 항혈청을 얻었다. 셋째, E1(a, b)를 소듐도데실 황산 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 하여, 전기적으로 니트로 셀룰로스(NC)막에 전위하였다. NC막에 전위된 피루브산탈수소 효소의 기본단위인 E1a와 E1b를 면역학적으로 동정할 수 있는 최적조건(일정한 전압하에서 단백질 양에 따른 전위시간)을 설정하였다.

재료 및 방법

피루브산 탈수소효소(E1a, b)의 분리

송아지 심장 피루브산 탈수소효소 복합체 (PDC) (Sigma Co., St. Louis, Mo., U. S. A)를 SDS-PAGE (stacking gel 6%, separating gel 9%, 두께 1.5mm) 하였다 (SE 500 vertical slab gel, PS 250 power supply, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, U. S. A.) (13). 전류는 dye front가 stacking gel을 통과할때 까지 30mA, separating gel을 통과할 때까지 50mA를 공급하였다. 겔 상에 PDC를 구성하고 있는 dihydrolipoamide acetyltransferase (E2), dihydrolipoamide dehydrogenase(E3), pyruvate dehydrogenase subunits a(E1a)와 b(E1b)로 전개되었다(14). 이들 가운데서 E1a와 E1b 부분(bands)을 함께 취하여 동일 부석막에 넣어 전기적 (100mA, 2시간)으로 피루브산 탈수소효소 E1a와 b 단백질을 추출하였다(15). 전기 추출시 사용한 완충액은 SDS-PAGE 전기영동 완충액과 동일하다. 분자량 측정은 low molecular weight marker (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 표준으로 사용하였다. 순수분리된 E1(a, b)는 Lowry법 (16)으로 정량한 후 항PDH 항혈청 생산을 위한 immunogen으로 사용하였다.

항 피루브산 탈수소 효소 (E1a,b)의 항혈청 생산

피루브산 탈수소 효소 항혈청 생산 과정은 문헌에 (17, 18) 제시된 방법을 따랐으며 요약하면 다음과 같다.

E1(a,b) 효소 단백질 (100 μ g/0.1 M 인산염 완충액

0.2ml)을 Freund's complete adjuvant (0.2ml)에 emulsify 하여 이를 생후 120일된 토끼의 배부 20군데에 현탁된 항원 15 μ l씩 피내 주사하고, 후측 장단지 좌우에도 50 μ l씩 주입하여 1차 접종을 마쳤다. 제1차 접종후 2주일 간격으로 제 2,3,4차 접종을 실시하였다. 단 제2차 접종부터는 Freund's complete adjuvant 대신 Freund's incomplete adjuvant를 사용하였다. 제4차 접종을 마친지 14일 경과후 2주 간격으로 토끼 귀 정맥에서 채혈 하였다.

채혈한 혈액을 상온에서 2시간 응고시킨 다음 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 저장하였다가, 응고된 혈액을 상온에서 원심분리 (1000rpm, 20분)하여 항혈청을 준비하였다. 제1차 접종 직전에 토끼 귀 정맥혈을 얻어 preimmunum serum으로 사용하였다.

항PDH 항혈청의 immunoreactivity는 dot-immunoblotting하여 관찰하였다. Antigen (E1a,b) 일정량을 NC막에 dot-blot 장치 (SRC-96, Schleicher & Schuell, D-3354 Dassel, W. Germany)를 이용하여 점적한 다음, 80 $^{\circ}$ C에 60분간 보관하여 건조시켰다. NC막에 흡착된 antigen은 간접 면역 분석법으로 동정하며(19), 그 자세한 실험 방법은 아래에 요약한 바와 같다.

E1a와 E1b의 Western Blotting

Pyruvate dehydrogenase E1(a,b) 일정량을 SDS-PAGE (stacking gel 6%, separating gel 9%, 두께 1.5mm)하여 이의 구성단백질로 전개한 다음 이를 폴리아크릴 아미드 겔에서 NC막으로 전기적으로 전위하였다. E1(a,b)의 SDS-PAGE시 duplicate를 만들어, 하나의 gel은 대조구로, 다른 gel은 electroblotting에 사용하였다. 전기 전위 장치 TE42(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA)의 음극과 양극의 거리는 9cm이며, 사용전압의 세기는 별도의 지시가 없는 한 3.5 Volt per cm였다. 전기 전위 방법은 대부분 Towbin 및 Burnette(11, 12)와 동일하였으며 모든 전위는 냉장실 (4 $^{\circ}$ C)에서 실시하였다. 이들 전위된 단백질을 항 PDH 항혈청과 반응시키어, 간접 면역 분석법으로 E1(a,b) 단백질을 동정하였다. 즉, E1(a,b) 항원-항E1(a,b) 항체복합체를 형성케하고 이를 horse radish peroxidase와 conjugate 시킨 염소에서 생산된 항토끼 IgG 항체(GAR-HRP, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 제2항체로 사용하여, 제1-제 2 항체 복합체를 형성시켰다. 이 제1-제 2항체 복합체 형성 여부는 horse radish peroxidase의 산화 작용에 의한 4-chloro-1-naphthol의 염색 침전으로 동정하였다. 제반 실험 과정은 Bio-Rad회사 (Richmond, CA, USA)의 처방 (19)에 근거하였으며, Blocking용액은 gelatin 대신 bovine

serum albumin (BSA)을 사용하여 조제하였다. E1a와 E1b의 electroblotting 전 후의 정량 분석은 이들 gels을 coomassie brilliant blue로 염색하여 단백질 띠의 강도를 scanning densitometer(GS 300, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA)로 scan하여 포물선하의 면적을 구하였다. 이들 면적을 대조구의 것과 비교하여 전기전위 양을 산출하였다. 이때 gel 상에서 소멸된 양만큼 전위되었다고 추산 하였다.

결과 및 고찰

피루브산 탈수소 효소 단백질(E1a,b)의 분리

Sigma사로 부터 구입한 송아지 PDC를 SDS-PAGE 한 다음 coomassie brilliant blue로 염색하면, Fig. 1 (Lane 1)과 같이 E2, E3, E1a, E1b 및 여러 불순 단백질 띠 (bands)를 볼 수 있었다. 이중 E1a와 E1b bands를 절단하여, dialysis bag에 넣고 electroelution 하여 이를 정제

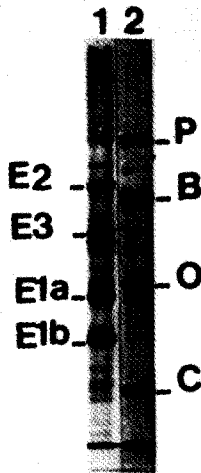


Fig. 1. SDS-PAGE of bovine heart pyruvate dehydrogenase complex. Lane 1: E2 (dihydrolipoamide acetyltransferase), E3(dihydrolipoamide dehydrogenase), E1a(pyruvate dehydrogenase subunit a), E1b(pyruvate dehydrogenase subunit b). Lane 2: SDS low molecular weight markers (Bio-Rad). P(rabbit muscle phosphorylase b: 97,400), B(bovine serum albumin: 66,200), O(hen egg white ovalbumin: 42,699), C(bovine carbonic anhydrase: 31,000).

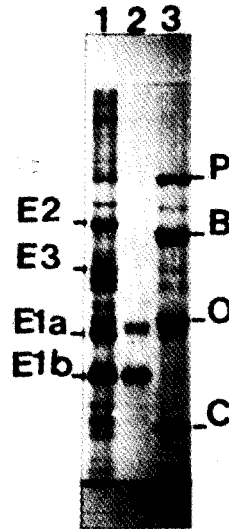


Fig. 2. SDS-PAGE of the purified PDH. Lane 1: PDC. Lane 2: E1a (pyruvate dehydrogenase subunit a), E1b(pyruvate dehydrogenase subunit b). Lane3: SDS-PAGE low molecular weight markers (Bio-Rad):P(97,400), B(66,200), O(42,699), C(31,000).

하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 이렇게 하여 일부 정제된 E1a,b (Lane 2)는 PDC(Lane 1)에서 발견되는 E2, E3 및 기타 불순 단백질이 대부분 제거된 비교적 순수한 것임을 보여주고 있다.

피루브산 탈수소 효소 항체 생산

일정량의 항원 (E1)을 토끼에 주사하여 면역반응을 유도하였으며, 제4차 접종후 면역시킨 토끼에서 채혈하여 항혈청을 분리하였다. 한편, immunization 직전에 동일 개체의 귀 정맥에서 10ml 채혈하여 preimmune (control) serum을 준비하였다. 이와 같이 준비한 항혈청의 antigen-antibody immunoreactivity를 dot-blotting 하여 점검하였다. 즉 항원에서 사용한 E1-antigen 일정량 (50-400ng)을 NC 막에 점적한 후, 위에서 준비한 항혈청과 반응시키고 antigen-antibody immunocomplex의 형성 여부를 GAR-HRP system을 사용하여 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 준비된 항혈청 (Lane A)은 E1 과 항원-항체 반응을 일으켰으나, preimmune serum (Lane B)과는 반응하지 않았다. 이 항혈청은 E1 ab 50 ng (본 실험에서 사용한 최소량)과 immune complex

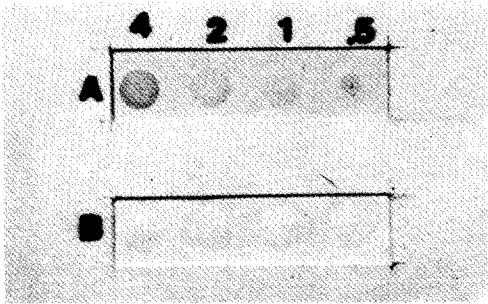


Fig. 3. Dot-Immunoblot of PDH.

A: Known amounts of PDH(4=400ng, 1=100ng, 0.5=50ng)were reacted with rabbit antibovine heart PDH antiserum, B: Known amount of PDH(2=200ng, 1=100ng, 0.5=50ng) were reacted with rabbit preimmune serum.

를 형성함이 관찰되었다. 이는 E1a와 E1b의 양이 동일하다고 가정할때 E1a 약 25ng, E1b 약 25ng을 동정하여 낼 수 있음을 의미한다. 한편, PDH (E1a 1,200ng; E1b 2,000ng)를 SDS-PAGE 하여 (Fig 4, Lane 1) NC 막에 Electroblotting (20V/cm, 60 mins)한 후 위에서 준비한 항 혈청과 반응 시켰다. NC막에 형성되었을 PDH-anti PDH antiserum 복합체를 GAR-HRP system으로 분석한 결과(Fig. 4, Lane 3), PDH subunits E1a와 E1b bands를 모두 관찰할 수 있었다.

이상의 PDH dot immunoblotting과 western blotting 결과로 보아 토끼에서 생산된 피루브산 탈수소효소(송아지 심장) 항혈청은 anti-E1ab antibody로 사용하여도 무방함을 알 수 있었다.

PDH의 Western Transfer

전기 전위 효율: Pyruvate dehydrogenase (E1a,b)의 electroblotting maximum efficiency를 관찰하기 위하여, 적정량의 E1a와 E1b (1000ng-31ng; 1000ng에서 반희석하여 5번째 까지)를 SDS-PAGE 후환, 이들 효소 단백질을 NC 막에 electroblotting하였다. 이때 일정한 전압(3.5 V/cm)하에서 시간을 조절하여 전위 하였다. 전위하고 난 뒤 SDS-PAGE gel을 coomassie brilliant blue로 염색하여, 전위되지 않고 남아 있는 E1a와 E1b를 densitometer 로 scan하여 정량하였다. Table 1에 의하면, E1a와 E1b 양에 따른 전기전위는 전위 시간에 따라 점진적으로 증가함을 알 수 있다. 즉, E1a 또는 E1b 125ng 이하를 4시간 전위하면 gel 상에서 전량 transfer 되었으며, 250ng의 E1a 또는 E1b는 8시간 전위하면



Fig. 4. Western blot of E1a and E1b. Pyruvate dehydrogenase subunits E1a(1,200ng) and E1b (2,000ng) were fractionated by SDS-PAGE, and electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane at accelerating voltage of 20V/cm for 60 mins. The immobilized E1a and E1b were detected by indirect immunological procedures presented in the Materials and Methods. Lane 1: Control (Gel before electroblotting). Lane 2: Gel after electroblotting. Lane 3: Corresponding blot on nitrocellulose membrane.

거의 전량 transfer 되었다. 500ng의 E1a 및 E1b의 경우 12시간 전위하였을 때 E1a는 98%, E1b 100% 전위되었으며, 1000 ng의 E1a 및 E1b의 경우 12시간 전위하면 E1a는 99%, E1b는 100% 전위되었다. 이상의 data는 E1(a,b)를 일정한 가속전압(3.5V/cm) 하에서 electroblotting 하였을 때, E1b가 E1a 보다 신속하게 transfer 됨을 의미한다.

다시 말하면, E1(a,b)를 전위할 때 E1b가 E1a보다 빠른 시간에 100% 전위됨을 말한다. 예를 들어 E1a와 E1b 각각 1000 ng 씩 electroblotting할 때, E1b는 8시간에 거의 100% 전위되었으나, E1a는 16시간 이상 20시간 동안 전위 하여도 SDS-PAGE gel 상에 미량 잔존함을 관찰 하였다(Table 1). 이는 E1a와 E1b의 분자량의 차이에서 연유된 것으로 추측된다. Towbin(11), Towbin and Gordon(20)과 Burnette(12)은 단백질의 전위효율은 이들 분자량과 반비례한다고 보고 하였다. 포유류 PDH E1

Table 1. Transfer efficiency of E1a and E1b as a function of transfer time. Amounts of E1a or E1b adsorbed on blots were estimated by subtracting residual amounts on SDS-PAGE gels after electroporetical transfer from the initial dosages of E1a or E1b

Amount	1,000 ng				500 ng				250 ng			
	a		b		a		b		a		b	
Subunits												
Units												
Transfer time	%	ng	%	ng	%	ng	%	ng	%	ng	%	ng
4 hr	51	510	69	690	54	270	81	405	52	130	97	243
8 hr	71	710	99	990	92	460	99	495	97	240	+	250
12hr	84	840	99.5	995	98	490	+	500	+	250	+	250
16hr	99	990	+	1000	+		+	500	+	250	+	250
20hr	99.5	995	+	1000	+		+	500	+	250	+	250

(Continued)

Amount	125 ng				62.5 ng				31.25 ng			
	a		b		a		b		a		b	
Subunits												
Units												
Transfer time	%	ng	%	ng	%	ng	%	ng	%	ng	%	ng
4 hr	93	116	+	125	+	62.5	+	62.5	+	31.25	+	31.25
8 hr	+	125	+	125	+	62.5	+	62.5	+	31.25	+	31.25
12hr	+	125	+	125	+	62.5	+	62.5	+	31.25	+	31.25
16hr	+	125	+	125	+	62.5	+	62.5	+	31.25	+	31.25
20hr	+	125	+	125	+	62.5	+	62.5	+	31.25	+	31.25

+: 100% transfer

Table 2. Sensitivity of immunodetection of E1a and E1b. Various amounts of E1a and E1b were fractionated by SDS-PAGE, and electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane at 3.5 V/cm for 4, 8, 12, 16 and 20 hrs. Then the membranes were incubated with anti-E1 antiserum, followed by GAR-HRP. The immunoadsorbed E1a and E1b were visualized by stain deposition from the oxidation of 4-chloro-1-naphthol catalyzed by horse radish peroxidase

Amount of E1a or E1b applied	1,000ng		500 ng		250 ng		125 ng		62.5 ng		31.25 ng	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Transfer time												
0 hr												
4 hr	+ ¹⁾	+	+	+	- ²⁾	+	-	-	-	-	-	-
8 hr	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
12hr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
16hr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20hr	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1) +: Antigen detected on nitrocellulose membrane

2) -: Antigen undetected on nitrocellulose membrane

a는 41,000 dalton, E1b는 36,000 dalton이므로 (1), E1b는 E1a 보다 빠르게 전위된 것으로 추측할 수 있다. 본 실험 결과도 이들 (11, 12, 20)의 보고와 일치 한다고 사료된다. 그러므로, E1a 또는 E1b의 maximum transfer 를 성취하기 위하여, 이들 subunits의 종류에 따라 전위 시간을 적의 조절하여야 됨을 알 수 있다.

면역학적 동정감도: Pyruvate dehydrogenase (E1a,b)의 Western blotting 동정감도를 살펴 보면, 일정한 가속 전압(3.5 V/cm)하에서 동정되는 E1a와 E1b의 감도는 항원의 양과 전위 시간에 비례함을 알 수 있다. Table 2에 의하면 1000ng 또는 500ng의 E1a와 E1b를 4, 8, 12, 16, 20시간 전위한 결과, 모든 경우 간접 면역법으로 분석되었으며 NC막에 나타난 E1a와 E1b의 농도는 전위 시간이 증가할 수록 점진적으로 짙어짐을 볼 수 있었다. E1a 혹은 E1b 각각 250ng을 electroblotting 하였을 때 전자는 8시간 이상 전위하여야 NC막에 검출되었으나, 후자는 4시간 전위하여도 동정이 가능하였다. 125ng의 경우 E1a는 12시간 이상 전위하여야 검출이 가능하였으나, E1b는 8시간 전위 하여도 검출되었다. 62.5ng을 전위 하였을 시, E1a와 E1b 모두 12시간 이상 전위하여야 동정할 수 있었다. 31.25ng인 경우 16시간 이상 전위하여야 NC막에 동정되었다.

한편 E1a와 E1b의 NC막에 동정된 감도를 비교하여 보면 E1a의 감도가 E1b의 감도보다 낮음을 알 수 있다. 예를 들어, E1a와 E1b 각각 250ng씩 4시간 전위하였을 때 E1b는 동정할 수 있었으나, E1a는 검출되지 않았다(Table 2). 이는 이미 설명한 바와 같이 E1a와 E1b의 전위효율이 다르기 때문인 것으로 사료된다. Table 1과 Table 2에 의하면, E1a와 E1b의 전위율과 면역학적 동정감도는 일치하지 않음을 알 수 있다. 예를 들어, E1a 혹은 E1b 62.5ng을 100% 전위하는데 4시간이하 소요되나, 실제로 12시간 이상 전위시킨 경우에만 면역학적으로 동정이 가능하였다. 이는 곧 전기전위 시간의 증가는 단백질의 전위량을 증가할 뿐만 아니라 전위(NC)막에의 흡착도를 아울러 증가시키어, 전위된 단백질을 전위막에 안정하게 고착시키는 것으로 사료된다.

본 연구 결과 PDH nonidentical subunits E1a 또는 E1b를 Western blotting 기법으로 분석할 경우, 3.5 V/cm의 가속 전압으로 16시간 전위하면 면역학적 동정감도를 극대화 할 수 있다.

포유류 pyruvate dehydrogenase complex는 세포내사 및 선천적 pyruvate 대사 이상 연구에 차지하는 비중이 크므로, 오래 전부터 몇몇 실험실에서 집중적으로 연구되어 왔다. 특히 Reed (University of Texas, Austin, Texas, USA)와 coworker들은 PDC 구성 단백질의 분리 정제

(21), 생화학적 검정계(23), 촉매기작(1) 및 조절작용(1)등을 규명하였다. 최근에 recombinant DNA technology 를 응용하여 Patel(Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA)과 colleague들은 PDC 구성원인 E1a(24), E1b(25), E2(26), E3(27)의 cDNA clone 을 human liver에서 분리하는데 성공하여, 분자생물학적 차원에서 PDC catalytic mechanism 연구를 선도하였다. 선천적인 PDC deficiency로 인한 사람의 pyruvate metabolism disorder에 관한 보고는 여러 곳에서 발표되었다(8, 9). 이들은 주로 PDC 전체 activity를 생화학적으로 측정하여 판단하였으므로(4, 5, 9), 이 복합체 어느 특정한 구성원의 defect(s) 여부는 규명이 곤란하였다. 본 연구에서 E1을 순수분리 정제하여 anti-E1 antiserum을 얻었고 이 항혈청을 이용하여 E1의 immunoblot system을 확립하였으므로 향후 E1a와 E1b를 translational level에서 연구하는데 기여할 것으로 사료된다.

요 약

피루브산 탈수소 효소(PDH 혹은 E1)는 피루브산 탈수소효소 복합체(PDC)의 구성원으로, 이형의 기본단위 a(E1a)와 b(E1b) 각각 두 분자씩 함유된 사랑체이다. E1의 효소 활성도는 분광분석기, 방사선 동위원소 등을 사용하여 측정할 수 있으나, E1a 혹은 E1b의 생화학 분석에는 많은 어려움이 있다. 본 연구에서 이들 기본단위를 효율적으로 정성 정량 분석할 수 있는 Western blot 기법의 최적 조건을 결정하였다. E1(a,b)를 PDC (송아지 심장)에서 분리하여, 항 E1(a,b) 항혈청을 토끼에서 얻었다. E1(a,b)를 SDS-PAGE 한 후, 전기전위하여 항 E1(a,b) 항혈청과 반응시키고, GAR-HRP system으로 전위막에 흡착된 E1a 혹은 E1b를 동정하였다. E1a와 E1b의 전위율은 시료 단백질의 양과 분자량의 영향을 받아 변하였으며 면역학적 동정감도는 주로 전위시간에 비례하였다. 전위시간의 증가는 니트로 셀룰로스 위에 전위된 단백질의 흡착도를 증가시켜 동정감도를 증가시켰던 것으로 여겨졌다. 그러므로 E1a 또는 E1b의 면역학적 동정감도를 최대로 하기 위하여 낮은 가속전압에서 장시간 전기전위하는 것이 바람직하다. 본 연구에서 도입된 immunoblot system으로는 E1a와 E1b의 최대 동정감도는 가속전압 3.5 V/cm하에서 16시간 전위하여 성취되었다.

감 사

본 연구는 88-89년도 한국 과학재단의 신진연구비로

수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

참 고 문 헌

1. L. J. Reed(1974), *Accounts Chem. Res.*, **7**, 40
2. O. H. Wieland (1983), *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **96**, 123
3. D. J. Carothers, G. Pons, and M. S. Patel (1989) *Arch. Biochem. Biophysic.* **268**, 409.
4. B. Atkin, N. R. M. Buist, M. F. Utter, and A. B. Leiter (1979) *Pediatr. Res.* **13**, 109
5. D. Chung, W. L. Niu, and R. P. Cox (1981) *Biochem. J.*, **200**, 59
6. D. Chung, C. Hu, and M. S. Partel MS (1983) *Ibid.* **214**, 177
7. C. Hu, M. F. and Utter, M. S. Partel (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 2315
8. J. P. Blass (1978) Inherited disorders of carbohydrate metabolism, (D. Burman D, J.B. and Holton, C.A. Pennock eds), p. 239, University Park, Baltimore, MD
9. S. P. Blass (1983) The metabolic basis of inherited disease, 5th ed. (J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, eds) p. 239, University Park Press, Baltimore, MD
10. J. H Collins (1987) Clinical studies, p. 78, University Press, N. Y.
11. H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A **76**, 4350
12. W. N. Burnette (1981) *Anal. Biochem.*, **112**, 195
13. U. K. Laemmli (1970) *Nature* **227**, 680
14. A. B. Leiter (1978) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex and pyruvate carboxylase in mammalian liver. p.38, *Ph. D. Thesis*, Dept. of Biochemistry, School of medicine, Case Western
15. E. Jacobs and A. Clad (1986) *Anal. Biochem.*, **154**, 583.
16. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265
17. W. J. Herbert (1978) Laboratory animal techniques for immunology, Handbook of experimental immunology (Weir, ed.) 3rd ed. A4.2 Blackwell Sci. Pub., Oxford.
18. E. d. Harlow and D. Lane (1988) Antibodies a laboratory manual, p.53, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor NY
19. Brochure of "The Bio-Rad immuno-blot (GAR-HRP) assay kit" (1983) 83-0007, 0283, I, Chemical division, Richmond, Calif., U.S.A.
20. H. Towbin and J. Gordon (1984) *J. Immun. Meth.*, **72**, 313
21. T. C. Linn, J. W. Pelly, F. H. Pettit, F. Hucho, D. D. Randall, L. J. Reed (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**, 327-342
22. M. L. Pratt, J. F. Maher, and T. E. Roche (1982) *Eur. J. Biochem.*, **115**, 349
23. T. E. Roche and L. J. Reed (1972) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**, 840
24. L. Ho, I. D. Wexler, T. Liu, T. Thekkumkara, and M. S. Patel (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 5330
25. L. Ho, A. A. Javed, R. A. Pepin, T. J. Thekkumkara, C. Raefsky, J. E. Mole, A. M. Caliendo, M. S. Kwon, D. S. Kerr, M. S. Patel (1988) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **150**, 904
26. T. J. Thekkumkara, B. W. Jesse, L. Ho, C. Raefsky, R. A. Pepin, A. A. Javed, G. Pons, and M. S. Patel (1987) *Ibid.* **145**, 903
27. G. Pons, C. Raefsky Estrin, D. Carothers, R. A. Pepin, A. A. Javed, M. K. Ganapathi, D. Samols, M. S. Patel and (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 1422.

(Received; August 2, 1990, Revised; September 27,1990, Accepted; December 30, 1990)