

Saccharomyces 종의 등전점 전기영동에 의한 단백질 분획상 차이에 관한 연구

김종진 · 한면수 · 최상규
국립과학수사연구소 생물학과

Studies on the Differentiation of Protein Patterns from *Saccharomyces* species by Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gels

Kim, Jong-Jin, Myun-Soo Han and Sang-Kyu Choi

Department of Biology, National Institute of Scientific Investigation, Seoul, 158-094, Korea

ABSTRACT: The whole proteins from 10 different *Saccharomyces* species were separated by isoelectric focusing, which was carried out in pH gradient polyacrylamide gels with the carrier ampholytes of various pH ranges. About 25 protein bands were found in the gel using pH 3.0-10.0 carrier ampholytes. In gel using pH 4.0-7.0 carrier ampholytes, the protein band of pI 6.3 was found in *Sacch. cerevisiae* NCYC 478, ATCC 26787, *Sacch. rosei* and *Sacch. uvarum*, but it was absent in *Sacch. cerevisiae* ATCC 24903, ATCC 42949, ATCC 36029, *Sacch. steineri* var *hara*, *Sacch. bayanus*, and *Sacch. diastaticus*.

KEY WORDS □ *Saccharomyces cerevisiae*, whole protein patterns, IEF

최근 전기영동을 이용한 미생물 동정에 관한 연구가 다수 발표되었다(Cho, 1989; Drawert and Bednar, 1983; Jackman, 1985; Kim *et al.*, 1988; Shen, 1988). 이 방법은 종래의 동정법인 형태학적, 생리학적 그리고 생화학적 방법 등에 비하여 더욱 간편하고, 편리한 이점 및 정확도가 높다 (Jackman, 1987)는 이유로 그 관심이 높아지고 있다.

이와같은 연구는 주로 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)로 세균세포의 전단백질을 분획하거나(Jackman, 1982; 1985; Morris, 1973; Swing *et al.*, 1976) 특정 효소를 분획하여(Ha and Komagata, 1984; Matthew *et al.*, 1977) 그 분획상의 차이에 따라 미생물 종간의 분류학적 위치를 규명하고자 하였다. 이렇게 얻어진 단백질 분획상은 컴퓨터에 의한 분석으로 미생물 종간의 분류학적 유연관계가 조사하게 되었다 (Jackman, 1982; 1985; Kersters and Deley, 1975; Owen and Jackman, 1982; Swings *et al.*, 1976).

효모의 동정에 관한 연구가 최근 활발히 이루어져 Shen(1988)등은 SDS-PAGE법에 의해 *Candida*속과

다른 속간의 수용성 단백질 분획상이 상이함을 보고하였고, Kim 등 (1988)도 4종의 효모 세포막 단백질과 수용성 단백질의 분획상은 효모 속간에 차이가 있음을 보고하였다. 한편, Cho (1989)는 *Sacch. cerevisiae* 7 균주 및 *Saccharomyces*속 4종의 전단백질 분획상은 종간에서 약간의 차이를 보였으나 같은 종의 균주간에서는 유사하였다고 보고 하였다.

Drawert와 Bednar(1979; 1983)는 pH 3.0-10.0 구배의 등전점전기영동 (isoelectric focusing, IEF)을 이용하여 *Saccharomyces sp.*를 분석한 결과, *Saccharomyces*속의 종간에 차이가 있었으나, *Sacch. cerevisiae*의 균주간의 차이는 구별하기 어려웠다고 보고하였다.

이와같이 SDS-PAGE 및 등전점전기영동법에 의한 효모의 동정은 국내외에서 활발히 연구되어 유용한 가치가 있음을 제시하고 있다. 그러나 아직 국내에서는 등전점전기영동에 의한 효모의 단백질 분획상에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 몇가지 pH 농도구배를 달리한 등전점전기영동법을 이용, *Sacch. cerevisiae* 5균주와

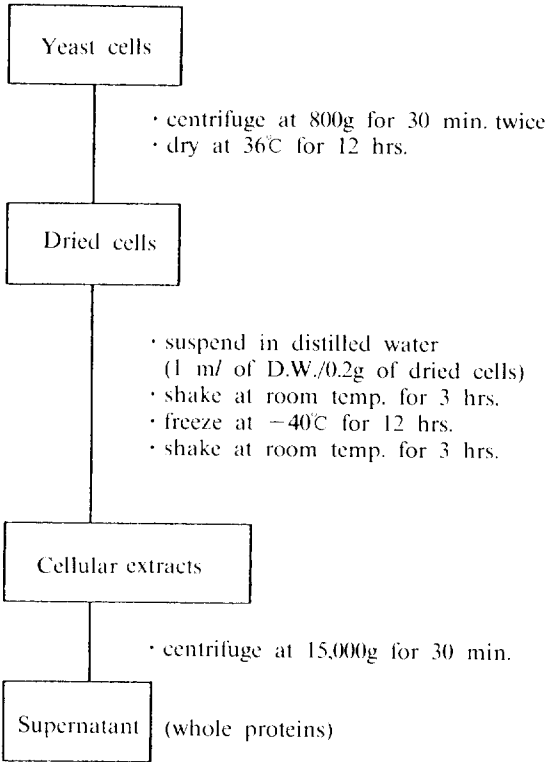


Fig. 1. Flow chart of preparations of whole proteins.

*Saccharomyces*속 5종을 대상으로 단백질 분획상을 비교하여, 효모의 동정을 위한 적정 pH 농도구배의 선정 및 실험조건을 검토하고자 본 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에서 사용한 균주 *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 478, ATCC 24903, ATCC 42949, ATCC 26787, ATCC 36029 등 5종은 건국대학교 미생물공학부에서 *Sacch. rosei* ATCC 36029, *Sacch. steineri* var *hara* ATCC 13668, *Sacch. bayanus* ATCC 15123, *Sacch. uvarum* ATCC 26602, *Sacch. diastaticus* IFO 1439 등 5종은 한국과학기술연구원 유전공학연구실에서 분양받아 사용 하였다.

배지 및 배양방법

배지는 YEPD(yeast extract 10 g, peptone 20 g, dextrose 20 g, distilled water 1l)를 사용하였다. 한천사면배지에서 3일간 배양한 후, 한 백금이를 치하여 YEPD 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간동안 진탕배양(reciprocal water bath, 120 stroke/min) 하였다.

효모세포의 파괴 및 단백질의 분리

Table 1. Volumes of carrier ampholytes.

	Final pH range		
	3.0-10.0	4.0-7.0	5.0-8.0
Ampholytes			
3.0/10.0	1.122 ml	-	-
4.0/6.0	-	0.561 ml	-
5.0/7.0	-	0.561 ml	0.561 ml
6.0/8.0	-	-	0.561 ml

Gunsalus(1955) 및 Shen(1988)등의 효모세포 파쇄법을 일부 변형한 자가분해법에 의해 전단백질을 분리하여 시료로 사용하였다(Fig. 1).

단백질의 등전점전기영동에 의한 분획

1) 겔의 준비

Giulian (1984)의 vertical slab polyacrylamide gel systems을 일부 변형하여 다음과 같은 조건으로 겔을 준비하였다. 겔 크기는 14×0.1 cm, 겔 농도는 7% w/v로 하였으며, carrier ampholytes 조성은 Table 1과 같으며 농도는 5.5% v/v로 하였다.

2) 전기영동

겔의 pH 기울기를 만들기위해 15 watts (500 V)에서 30분동안 예비전기 영동을 실시하였다. 다음에 새로운 완충액으로 교환하고 각 시료 (약 130-150 µg proteins)를 well에 넣은 후에 25 watts (1200 V)에서 1.0-1.5시간동안 전기영동을 실시하였다.

Densitogram

Densitometer (Gelman ACD-18)에서 wavelength는 filter no. 550, slit size는 0.1×5 mm, O.D. range는 1.0의 조건으로 실시하였다.

pH 기울기 측정

pH 3.0-10.0 범위의 IEF calibration kit (Pharmacia Co.)를 이용하여 단백질분획의 pI를 측정하였으며 각 pI marker 단백질은 trypsinogen (pI 9.3), lentil lectin-basic (pI 8.65), lentil lectin-middle (pI 8.45), lentil lectin-acidic (pI 8.15), myoglobin-basic (pI 7.35), myoglobin-acidic (pI 6.85), human carbonic anhydrase B(pI 6.55), bovine carbonic anhydrase B (pI 5.85), β-lactoglobulin A (pI 5.20), soybean trypsin inhibitor (pI 4.55), amyloglucosidase (pI 3.50)등 이었다.

결과 및 고찰

각 균주에서 분리한 전단백을 시료로 한 등전점 전기영동의 단백질 분획상은 Fig. 2, 3, 및 4에서와 같다. Fig. 2에서와 같이 pH 3.0-10.0의 농도구배를 사용한 등전점전기영동의 경우, *Sacch. cerevisiae* 5균주와 *Saccharomyces*속 (*Sacch. rosei*, *Sacch. uvarum*, *Sacch. steinera* var *hara*, *Sacch. bayanus*, *Sacch. diastaticus*) 5종에서 약 25개의 단백질 분획 band가

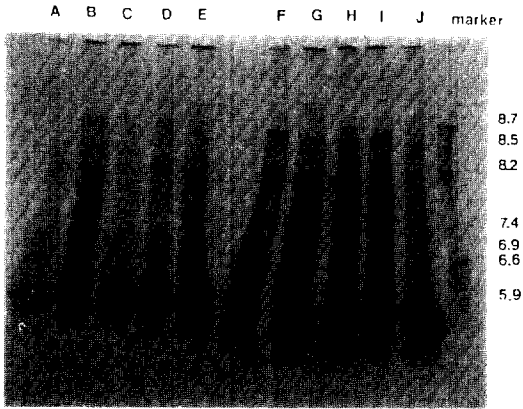


Fig. 2. IEF of whole proteins from *Saccharomyces* in pH 3.0-10.0 carrier ampholytes.
 A=*Sacch. rosei*, B=*Sacch. steineri* var *hara*, C=*Sacch. bayanus*, D=*Sacch. uvarum*, E=*Sacch. diastaticus*, F=*Sacch. cerevisiae* NCYC 478, G=*Sacch. cerevisiae* ATCC 24903, H=*Sacch. cerevisiae* ATCC 42949, I=*Sacch. cerevisiae* ATCC 26787, J=*Sacch. cerevisiae* ATCC 36029.

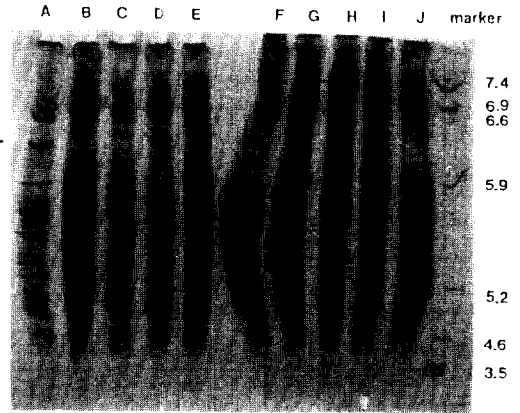


Fig. 3. IEF of whole proteins from *Saccharomyces* in pH 4.0-7.0 carrier ampholytes.
 A=*Sacch. rosei*, B=*Sacch. steineri* var *hara*, C=*Sacch. bayanus*, D=*Sacch. uvarum*, E=*Sacch. diastaticus*, F=*Sacch. cerevisiae* NCYC 478, G=*Sacch. cerevisiae* ATCC 24903, H=*Sacch. cerevisiae* ATCC 42949, I=*Sacch. cerevisiae* ATCC 26787, J=*Sacch. cerevisiae* ATCC 36029.
 →: pI 6.3 protein band.

나타났으며, 그 분획상은 모든 종에서 유사하여 특이점이 발견되지 않았다.

pH 4.0-7.0 구배를 사용했을 경우, Fig. 3에서와 같이 pI 6.3에서 단백질 분획 band는 *Sacch. cerevisiae* NCYC 478, ACTT 26787, *Sacch. rosei*, *Sacch. uvarum*에서 나타났으며, *Sacch. cerevisiae* ATCC 24904, ATCC 42949, ATCC 36029, *Sacch. steineri* var *hara*, *Sacch. bayanus*, *Sacch. diastaticus*에서 나타나지 않았다. 그리고 pI 6.3의 단백질 band의 염색농도가 다른 범위의 band에 비해 진하고 분명하여 그 부분이 명확하였다. 또한 pH 5.6이하 범위의 단백질 분획상은 모든 종에서 유사하였다.

Fig. 4에서와 같이, pH 5.0-8.0 구배를 사용했을 경우에는 모든 종간의 단백질 분획상의 차이가 특정 범위(pH 5.6-6.9)에서 나타났으나, pI 6.3 단백질 분획 band는 명확히 구별되지 않았다.

pI 6.3 단백질 분획 band가 관찰되는 pH 4.0-7.0 구배의 단백질 분획상을 보다 더 정확하게 확인하기 위하여 densitogram을 행하였다 그 결과 종간의 차이를 구분할 수 있는 pI 6.3의 단백질 분획 peak를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

Drawert와 Bednar (1979; 1983)는 pH 3.0-10.0 구배의 등전점전기영동으로 7종의 *Sacch. cerevisiae*와 *Saccharomyces*속 4종에서 전단백질 분획상은 7종의 *Sacch. cerevisiae*와 *Sacch. uvarum*, *Sacch. bayanus*에서 유사하였으나, 이들 종에는 존재하지 않는 단백질 분획 band가 *Sacch. rouxii*에서는 pH 7.9에, *Sacch. aceti*에서는 pH 8.8에 각각 존재했다고

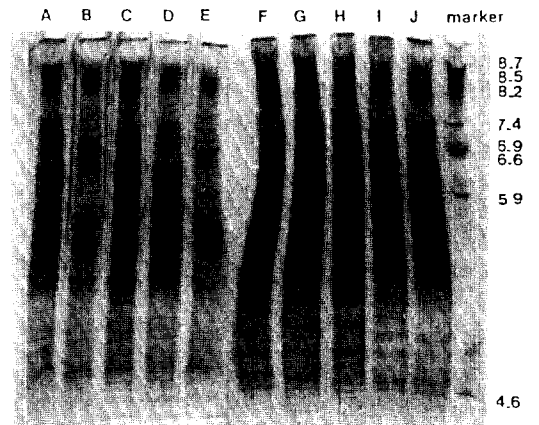


Fig. 4. IEF of whole proteins from *Saccharomyces* in pH 5.0-8.0 carrier ampholytes.
 A=*Sacch. rosei*, B=*Sacch. steineri* var *hara*, C=*Sacch. bayanus*, D=*Sacch. uvarum*, E=*Sacch. diastaticus*, F=*Sacch. cerevisiae* NCYC 478, G=*Sacch. cerevisiae* ATCC 24903, H=*Sacch. cerevisiae* ATCC 42949, I=*Sacch. cerevisiae* ATCC 26787, J=*Sacch. cerevisiae* ATCC 36029.

보고하였다. 본 연구에서도 pH 3.0-10.0 구배에서 *Sacch. cerevisiae* 5균주와 *Sacch. uvarum*, *Sacch. bayanus*, *Sacch. rosei*, *Sacch. steinera* var *hara*, *Sacch. diastaticus* 등 5종에서 pH 7.9와 pH 8.8의

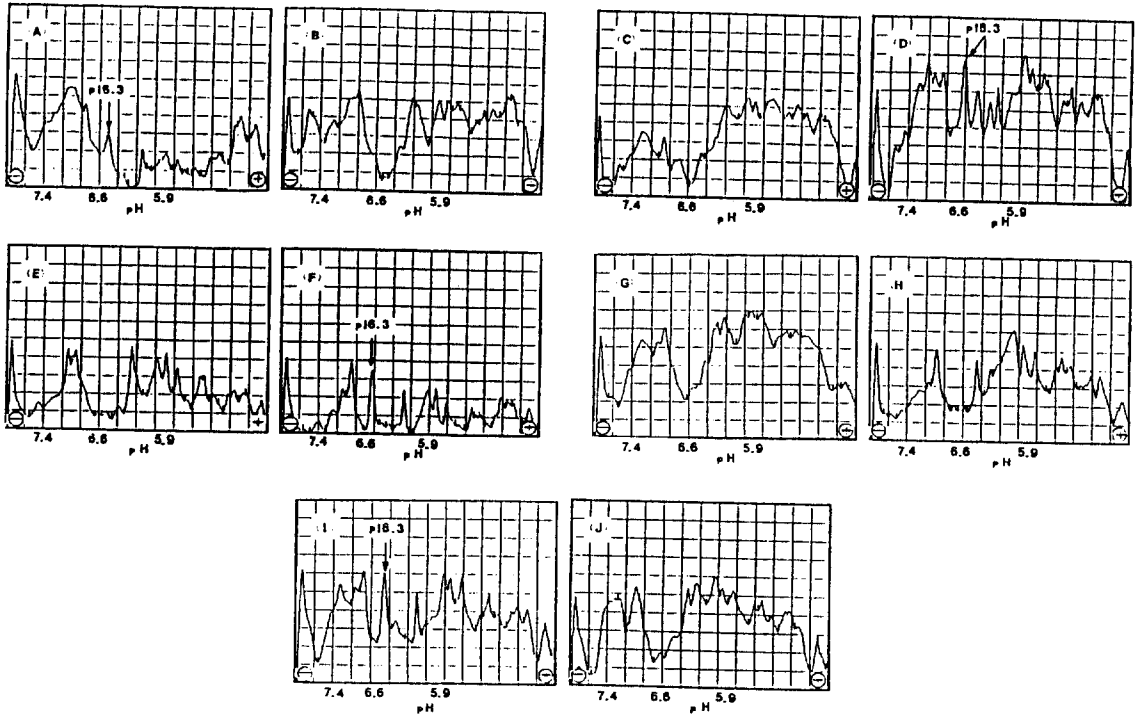


Fig. 5. Densitogram of protein patterns from *Saccharomyce* sp. in the gel of pH 4.0-7.0 carrier ampholyte. A = *Sacch. rosei*, B = *Sacch. steineri* var *hara*, C = *Sacch. bayanus*, D = *Sacch. uvarum*, E = *Sacch. diastaticus*, F = *Sacch. cerevisiae* NCYC 478, G = *Sacch. cerevisiae* ATCC 24903, H = *Sacch. cerevisiae* ATCC 42949, I = *Sacch. cerevisiae* ATCC 26787, J = *Sacch. cerevisiae* ATCC 36029.

→: Densitometric peak of pI 6.3 protein band
light wavelength: filter no. 550

단백질 분획 band가 관찰되지 않았다. 한편 본 연구에서는 pH 4.0-7.0의 농도구배를 사용한 등전점 전기영동의 경우, pI 6.3에서 특이한 단백질 분획 band가 *Sacch. cerevisiae* NCYC 478, ATCC 26787,

Sacch. rosei, *Sacch. uvarum*에서 나타났다. 이러한 결과를 종합하여 볼때, 효모균주간의 전단백질 분획상 구별에는 적절한 pH 농도구배의 등전점 전기영동법이 필요하다고 사료된다.

적 요

10종의 *Saccharomyces* species로부터 얻은 전단백질을 몇가지 pH 농도구배 조건에서 등전점 전기영동법으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. pH 3.0-10.0 농도구배에서, 약 25개의 단백질 분획 band가 관찰되었고, 그 분획상이 사용한 모든 종에서 유사하였다.
2. pH 4.0-7.0 농도구배의 경우, *Sacch. cerevisiae* NCYC 478, ATCC 26787, *Sacch. rosei*, *Sacch. uvarum*에서는 pI 6.3의 단백질 분획 band가 발견되었으나, *Sacch. cerevisiae* ATCC 24904, ATCC 42949, ATCC 36029, *Sacch. steinera* var. *hara*, *Sacch. bayanus*, *Sacch. diastaticus* 등에서는 발견되지 않았다.

REFERENCES

1. Cho, W.-Y., 1989. Studies on the identification of different *Saccharomyces* species by the electrophoretic protein patterns. Master's thesis, Kon-Kuk University.
2. Drawert, F. and J. Bednar, 1979. Comparative investigation of yeast proteins of various genera by means of isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *J. Agric. Food Chem.* 27: 3-6.
3. Drawert, F. and J. Bednar, 1983. Comparative investigation of yeast proteins of different *Saccharomyces* species and various strains belonging to the species *Saccharomyces cerevisiae* Hansen by means of isoelectric focusing in

- polyacrylamide gels. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 848-851.
4. **Giulian, G.G., R.L. Moss and M. Greaser**, 1984. Analytical isoelectric focusing using a high-voltage vertical slab polyacrylamide gel system. *Anal. Biochem.*, **142**, 421-436.
 5. **Gunsalus, I.C.**, 1955. Extraction of enzymes from microorganisms. *Methods Enzymol.*, **1**, 51-56.
 6. **Ha, D.-M. and K. Komagata**, 1984. Electrophoretic comparison of enzymes in the strains in biovars of *Pseudomonas maltophilia*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **30**, 277-287.
 7. **Jackman, P.J.H.**, 1982. Classification of *Corynebacterium* species from axillary skin by numerical analysis of electrophoretic protein patterns. *J. Med. Microbiol.*, **15**, 485-492.
 8. **Jackman, P.J.H.**, 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole cell protein patterns. *Chemical Methods Bacterial Systematics*, 115-129.
 9. **Jackman, P.J.H.**, 1985. Microbial systematics based on electrophoretic whole cell protein patterns *Methods Microbiol.*, **19**, 209-225.
 10. **Kerstens, K. and J. Deley**, 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 333-342.
 11. **Kim, Y.-N., H.-Y. Cho, J.-H. Kim, S.-K. Yoon and S.-M. Byun**, 1988. Differentiation of yeast species by techniques of electrophoresis and immunodiffusion. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **20**, 90-94.
 12. **Matthew, M., G. Carnelis and G. Wauters**, 1977. Correlation of serological and biochemical grouping of *Yersinia enterocolitica* with the β -lactamases of the strains. *J. Gen. Microbiol.*, **102**, 55-59.
 13. **Morris, J.A.**, 1973. The use of polyacrylamide gel electrophoresis in taxonomy of *Brucella*. *J. Gen. Microbiol.*, **76**, 231-237.
 14. **Owen, R.J. and P.J.H. Jackman**, 1982. The similarities between *Pseudomonas paucimobilis* and allied bacteria derived from analysis of deoxyribonucleic acids and electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.*, **126**, 2954.
 15. **Shen, H.D.**, 1988. Differential identification of *Candida* species and other yeasts by analysis of [³⁵S]methionine-labeled polypeptide profiles.
 16. **Swings, J., K. Kersters and J. Deley**, 1976. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Zymonas* strains. *J. Gen. Microbiol.*, **93**, 266-271.

(Received May 14, 1991)

(Accepted July 12, 1991)