

사람 글로빈의 Chain Anomaly 決定에 관한 研究

魯 一 協 · 崔 正 淑

淑明女子大學校 藥學大學

(Received April 14, 1978)

Ihl-Hyeob Ro and Jung-Sook Choi

College of Pharmacy, Sook Myung Women's University, Seoul 140

Studies on the Chain Anomaly Determination of Human Globins

Abstract—We studied on the separation of α - and β -chain globins, the conditions of paper electrophoresis and mobility of globins in paper electrophoresis to determine their chain anomaly.

Acidic-acetone method of Wilson and Smith was found to be more efficient for separating α - and β -chain globins than trichloroacetic acid method of Hayashi. The conditions of paper electrophoresis were current of 20v/cm and 0.6mA/cm for three hours at room temperature.

In paper electrophoresis, the mobility of α -chain globin towards the cathode was greater than that of β -chain globin. The results showed the chain anomaly of α - and β -chain globins can be determined by the method of paper electrophoresis.

사람을 비롯한 脊椎動物의 赤血球에 들어있는 헤모글로빈(Hb 라고 略稱)은 heme 와 globin 으로 되어 있으며 단백질부분인 글로빈은 두 종류의 polypeptide 즉 α -chain 두개와 β -chain 두개가 $\alpha_2\beta_2$ ¹⁾ 상태로 결합한 단백질체이다. α -chain 및 β -chain 의 생성은 각각 고유의 유전자의 지배를 받으며 正常人은 부모로부터 正常的 α -chain 및 β -chain 을 만드는 유전자를 받는다. 그러나 양친의 어느 한쪽이나 또는 쌍방으로부터 非正常的 polypeptide 를 만드는 유전자를 받은 사람은 正常 및 非正常的의 두 종류의 chain 을 생성하므로 正常 Hb 이외에 異常 Hb 을 가지게 되거나 또는 전적으로 非正常的 Hb 을 갖게된다. 非正常的 peptide 組成을 가진 글로빈을 보유하고 있는 Hb 을 異常 Hb 이라고하고 이것의 생성으로 인하여 正常 Hb 의 생성이 부분적으로 또는 전적으로 억제된 狀態를 異常血色素症이라고 한다. 비정상 Hb 의 化學的 研究의 最終的인 판단은 chain 을 형성하고 있는 peptide 의 아미노산 순서²⁾의 異常을 지적하는데 있다고 할 수 있다^{3~6)}. 그러나 이것의 決定에 앞서 chain 자체의 異常 즉 chain anomaly 決定이 먼저 요구되는 것이다. chain anomaly 決定法으로는 ① Chernoff 法⁷⁾ ② 尿素解裂澱粉電氣泳動法⁸⁾ ③ hybridization 法⁹⁾ 등이 報告되어 있으나 모두 복잡하고 또 많은 숙련을 요하는 방법들이다. 著者들은 이와같은 불편을 해소할 목적으로 人血에서 Anson-Mirsky 方法¹⁰⁾에 따라 글로빈을 조제하고 글로빈으로

부터 Wilson 및 Smith의 acidic-acetone 法¹¹⁾과 Hayashi의 trichloroacetic acid 法¹²⁾에 의하여 α - 및 β -chain 글로빈을 얻어 paper electrophoresis 로 처리한 후 bromphenol blue 로 염색시켜본 결과 α -chain 글로빈의 mobility 가 β -chain 의 것보다 陰極側으로 더 많이 이동하는 것을 알았으며 이 성질을 이용하여 異常 Hb 의 chain anomaly 를 결정할 수 있는 방법을 연구하였으므로 報告하는 바이다.

實 驗

글로빈의 조제—人血의 Hb 농도 0.7% 전후의 溶血液 10ml 에 CO_2 를 통하여 安定한 CO-Hb 로 한 다음 $0\sim 5^\circ\text{C}$ 로 냉각하면서 濃염산—아세톤(3 : 197)液 300ml 를 교반하면서 1시간 여에 걸쳐 加하여, 淡褐色의 글로빈을 遠沈시켜 heme 을 함유하는 黑褐色의 上層과 分離시킨다. 이 글로빈을 acetone 液 (acetone 100ml 에 0.1 N-HCl 1ml 가 한 것)으로 씻어 不純物을 제거하여 脫 heme 시킨다.

α - 및 β -chain 글로빈의 분리—acidic-acetone 法(Wilson 및 Smith 法)에 따라 글로빈을 약 1% 가 되도록 0.02N-HCl 에 용해시킨다. 常法에 따라 이 液을 $0\sim 5^\circ\text{C}$ 로 냉각하면서 濃염산—아세톤液 200ml 를 서서히 가하여 원심 분리한다. 침전된부분은 다시 0.02N-HCl 30ml 에 용해시키고 앞에서와 같이 濃염산—아세톤 70ml 를 加하여 원심분리 하고 침전된부분을 취하여 다시 0.02 N-HCl 20ml 에 용해하고 濃염산—아세톤 70ml 를 가하여 원심분리하여 침전을 취하고 침전은 濃염산—아세톤으로 세척하여 β -chain 글로빈을 얻는다.

그리고 上層부분에 濃염산—아세톤 20ml 를 $0\sim 5^\circ\text{C}$ 에서 서서히 가하여 원심분리하여 침전부분을 취하고 이것을 0.02N-HCl 300ml 에 용해하고 다시 濃염산—아세톤 300ml 를 서서히 가하여 원심분리 하여 침전부분인 α -chain 글로빈을 얻는다(Fig. 1).

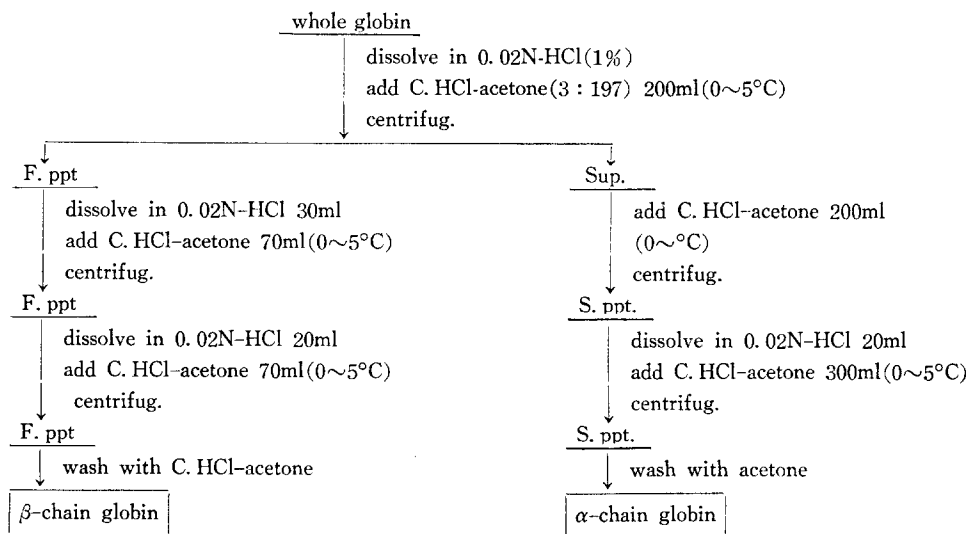


Fig. 1—Separation of α - and β -chain globin with acidic-acetone method by Wilson and Smith.

Hayashi 法에 따라 글로빈을 1% 농도 되도록 8M-요소액에 용해하고 이것에 2M-trichloroacetic acid 의 8M-요소용액 同量 가한후 室溫에서 5~10 시간 방치후 원심분리한다. 침전부분은 1M-trichloroacetic acid 의 8-M요소溶液 20ml 로 2회 세척하고 ether 로 세척하여 β -chain 글로빈을 얻는다. 그리고 上層 부분은 23/32 인치의 visking tube 를 사용하여 ultra-filtration 하여 市販 雪糖에 묻어 농축시켜 α -chain 글로빈을 얻는다(Fig. 2).

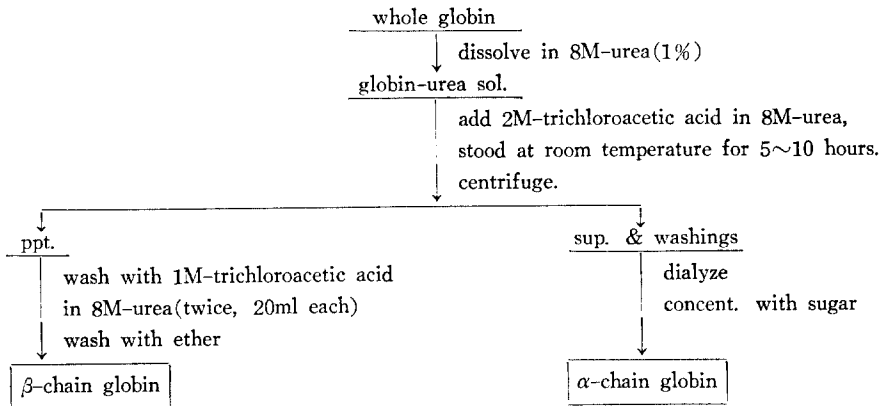


Fig. 2—Separation of α - and β -chain globin with trichloroacetic acid method by H. Hayashi.

여지 전기영동법—分離한 α - 및 β -chain 글로빈을 8M-요소액에 용해하여 Toyo filter-paper No. 2(세로 10cm, 가로 40cm)에 양극에서 음극으로 21 cm 되는 곳에 α - 및 β -chain globin 을 spotting 한 후 20v/cm, 0.6mA/cm, 室溫, 3 시간동안 전기영동한다. 이때의 buffer 의 組成은 pyridine 30ml, acetic acid 4ml, 요소 420g 을 증류수에 녹여 1l 로 하고 N-NaOH 로 pH 를 7.5 로 조절하여 사용한다.

전기영동이 끝난 후 건조하여 bromphenol blue 로 염색하여 α - 및 β -chain globin mobility 를 관찰하고 densitometry 하여 확인한다.

結果 및 考察

글로빈의 조제—人血 2ml 를 Hb 농도 0.7% 전후의 溶血液로 한다음, CO₂ 를 통과시켜 CO-Hb 로 한다음 濃鹽산-아세톤 300ml 를 가하여 globin 沈澱 325mg 을 분리하였다.

α - 및 β -chain 글로빈의 분리—알의 acidic-acetone 법에 따라 사람 글로빈 500ml 으로부터 α - 및 β -chain 글로빈을 분리한 결과 α -chain 174mg, β -chain globin 283mg 을 얻었다.

그리고 trichloroacetic acid 法에 따라 whole human globin 500mg 으로부터 α - 및 β -chain 글로빈을 분리한 결과 α -chain globin 23mg, β -chain globin 352mg 을 얻었다. 이 결과에 의하면 acidic-acetone 法의 globin 收得率은 약 91.41%이며 trichloroacetic acid 法의 수득율은 약 75.11%이다. 따라서 acidic-acetone 法이 분리 및 수득에 있어서 良好하므로 이하 그 方法에 따라 α - 및 β -chain globin 을 분리하였다. 또 acidic-acetone 法에 따라 분리한 α - 및 β -chain globin 에 대하여 total-N 를 Semi-Kjeldahl 法에 의하여 定量한 결과는 α -chain globin 16.23%, β -chain globin 16.92%였으며 窒素含量으로 보아 不純物이 비교적 적은 α - 및 β -chain globin 을 收得하였다고 볼 수 있다.

여지 전기영동법—室溫에서 3시간 영동후 염색한 결과 α -chain globin이 β -chain globin의 것보다 mobility가 陰極側으로 Fig. 3과 같이 크게 移動하였다. 다시 확인하기 위하여 染色시킨 여지를 liquid paraffin으로 적신 다음 세로판지로 앞뒤로 싸서 photo volt corporation mode S-48A를 사용하여 densitometry한 결과는 Fig. 4와 같다.

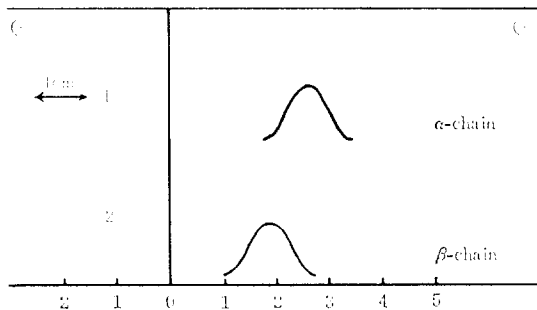


Fig. 3—Paper electrophoretic patterns of supernatant and precipitates derived from whole human globin with C. HCl-acetone.

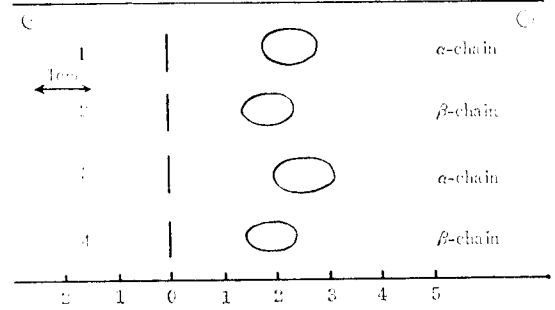


Fig. 4—Densitometric patterns of supernatant and precipitates derived from whole human globin with C. HCl-acetone.

paper electrophoresis한 결과 α_2 및 β_2 로 非對稱解離된 globin은 荷電差에 의하여 α -chain globin은 β -chain globin보다 陰極側에 보다 많이 移動한다. pH 7.5의 buffer液 使用時 α -chain globin은 β -chain globin보다 빨리 移動한다는 Muller의 報告¹³⁾와 一致하는 결과를 얻었다.

結 論

1. chain의 분리효과에 있어서 Wilson 및 Smith의 acidic acetone法이 Hayashi法보다 良好하다.
2. 泳動條件은 20v/cm, 0.6mA/cm, 3hrs. 泳動시키는 것이 效果的이다.
3. electrophoresis와 densitometry의 결과로 보아 α -chain globin의 mobility가 β -chain globin의 것보다 빠르다.
4. acidic-actone法으로 分離한 α - 및 β -chain globin을 paper electrophoresis하면 간편하게 비정상 Hb의 polypeptide의 chain anomaly를 決定할 수 있다.

文 獻

1. H. S. Rhinesmith, W. A. Schroeder, and L. Paulng, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4682(1957).
2. G. Braunizer, R. Gehring-Muller, N. Hilschmann, K. Hilse, G. Hobom, V. Rudloff, and E. Wittmann Liebold, *Z. Physiol. Chem.*, **325** 283 (1961).
3. 魯一協, 淑明女子大學校 論文集, **7**, 377(1968).
4. I. H. Ro, *et al.*, *Science*, **158**, 1059(1967).
5. I. H. Ro, *et al.*, *Am. J. Phys. Anthropol.*, 389(1970).
6. 魯一協: 韓國營養學會誌, **3**, 161(1970).
7. A. I. Chernoff, and N. M. Pettit, *Blood*, **24**, 6(1964).

8. T. Take, *J. Biochem.*, **49**, 206(1961).
9. T.H.J. Huisman, *Adv. Clin. Chem.*, **6**, 231(1965).
10. M.L. Anson and A.F. Mirsky, *J. Gen. Physiol.*, **13**, 469(1930).
11. S. Wilson and B.D. Smith, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 405(1957).
12. H. Hayashi, *J. Biochem.*, **50**, 70(1961).
13. C.J. Muller, *Nature*, **186**, 643(1960).