

人蔘蛋白質分割에 대한 SDS-폴리 아크릴아미드 電氣泳動

金 春 美

梨花女子大學校 藥學大學

(Received November 8, 1983)

Choonmi Kim

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120, Korea

SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis on Partially Purified Ginseng Proteins

Abstract—Ginseng proteins have been extracted and partially purified by the methods of ammonium sulfate fractionation, heat inactivation and Sephadex G-75 column chromatography. The final three fractions obtained (GI, GII and GIII) were subjected to paper chromatography and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular weights of polypeptide chains from each fraction were estimated by the standard line obtained from the plot of electrophoretic mobilities against the logarithm of molecular weights of standard proteins. Results are as follows: 1) GI showed three protein spots and four polypeptides of which M.W. were 63,000, 60,000, 56,000, 51,000 and 34,200. 2) GII showed four protein spots and five polypeptides with their M.W. of 64,600, 56,000, 45,400, 35,800, and 25,200. 3) GIII showed three protein spots and four polypeptides with their M.W. of 66,000, 63,000, 56,000 and 22,000.

인삼은 수천년전부터 동양 여러나라에서 널리 사용되어온 생약으로서, 많은 약물학적효과를 나타내고 있음은 잘 알려진 사실이다.¹⁾ 특히 1960년대부터 급진적 발전을 이룬 인삼에 대한 연구는 그 각각의 약리작용을 나타내는 원인물질을 규명하고 그 화학구조를 결정하기에 이르렀다. 그러나 현재까지 알려진 바로는 인삼이 나타내는 약효의 대부분이 인삼에 상당량 존재하는 saponin에 기인하는 것으로 보고되었으며, saponin이 나타내는 약리학적, 생화학적 작용과 그 구조와의 관계, 그 반응기전의 연구등에 대해 수많은 연구논문이 발표된 바 있다.²⁻⁸⁾

그러나 인삼이 함유하고 있는 단백질에 대한 연구보고는 별로 없으며 현재 진행되고 있는 분야도 많지 않은것 같다. 1976년 Yonezawa등⁹⁾이 인삼이 나타내는 방사선 방어작용은 인삼Saponin에 의한 것이 아니고 인삼단백질에 기인한다는 연구결과를 발표한 이래 1979년 Ando¹¹⁾와 1981년 Kimura등¹²⁾도 항방사선작용을 나타내는 인삼성분은 saponin이 아닌 다른 물질임을 보고한 바 있다. 최근 Kim과 Lee¹³⁾는 항방사선작용을 나타내는 인삼단백질은 catalase와 같은 metalloenzyme의 metal과 complex를 이루어 방사선으로부터 효소를 보호하고 또한 metalloenzyme의 금속이온에 의해 촉매되는 세포에 해로운 산화반응을 막아줌으로서 그 작용을 나타낸다는 기전을 보고하였다. 또한 인삼의 peptide 성분이 지방분해를 억제하는 작용이 있음이 보고되었고¹⁴⁾, Kim등¹⁵⁾은 인삼단백성분이 배양된 chick embryo의 뇌, 척추 및 근육세포의 성장을 촉진시킨다고 보고한 바 있다.

인삼이 나타내는 많은 약물학적 효과를 감안할 때, 인삼단백질의 역할이 위에서 언급된 정도에 그치지 않을 것임은 분명한 사실이다. 따라서 이미 알려진 약물학적 효과를 나타내는 단백질의 분리, 정제 그리고 그 구조의 규명과 더불어 그 작용기전을 설립해야 함은 물론, 아직 알려

지지 않은 인삼단백질의 효과에 대해서도 많은 연구가 필요하다고 생각된다. 따라서 본 연구는 우선 항방사선작용이 있는 인삼단백질을 분리, 정제하여 그 구조를 규명하는 과제를 수행함과 병행하여 인삼에 존재하는 다른 단백질에 대해서도 그 성분을 순수하게 분리, 정제하려는 목적을 가지고, 부분정제된 분획에 존재하는 polypeptide chain의 분자량 측정을 시도하였다.

實驗方法

試料 및 試藥—인삼단백질의 분리, 정제를 위해서는 시중에서 구입한 6년생 백삼을 사용하였다. Sephadex G-75, acrylamide (for electrophoresis), methylenebisacrylamide, N, N, N', N'-tetramethylene diamine, Coomassie brilliant blue (R-250), bovine serum albumin, catalase, ovalbumin, pepsin 및 trypsin은 Sigma제품이고, Folin-C-phenol reagent와 bromphenol blue는 Merck 제품이였다. Cellulose dialysis membrane은 VWR Scientific Co. 제품이였으며, β -mercaptoethanol, ammonium persulfate, sodium dodecyl sulfate (SDS)와 그의 사용된 모든 시약은 일제 특급시약이였다.

實驗方法—1) 인삼단백질의 분리, 정제 : 인삼단백질의 분리, 정제는 Oura등¹⁶⁾의 방법을 적용하여 다음과 같이 시행하였다.

인삼가루를 0.05M-Tris-HCl buffer (pH7.6)로 추출하여 그 상등액을 동결건조시킨후 황산암모늄을 가하여 70%로 포화시켜 그 침전을 취하였다. 이 침전을 물에 녹여 투석시킨후 끓는 물에서 15분간 처리하여 열에 불활성인 단백질을 제거하고 그 상등액을 동결건조시켜 소량으로 만들었다. 이 용액을 Sephadex G-75 column에 주입한 후 0.05M-phosphate buffer (pH7.2)를 통하여 3개의 분획을 얻었으며 각 분획에 함유되어 있는 단백질의 양은 Lowry법에 의해 측정하였다. Fig. 1은 인삼단백질의 분리 정제 과정을 자세히 나타내주고 있다.

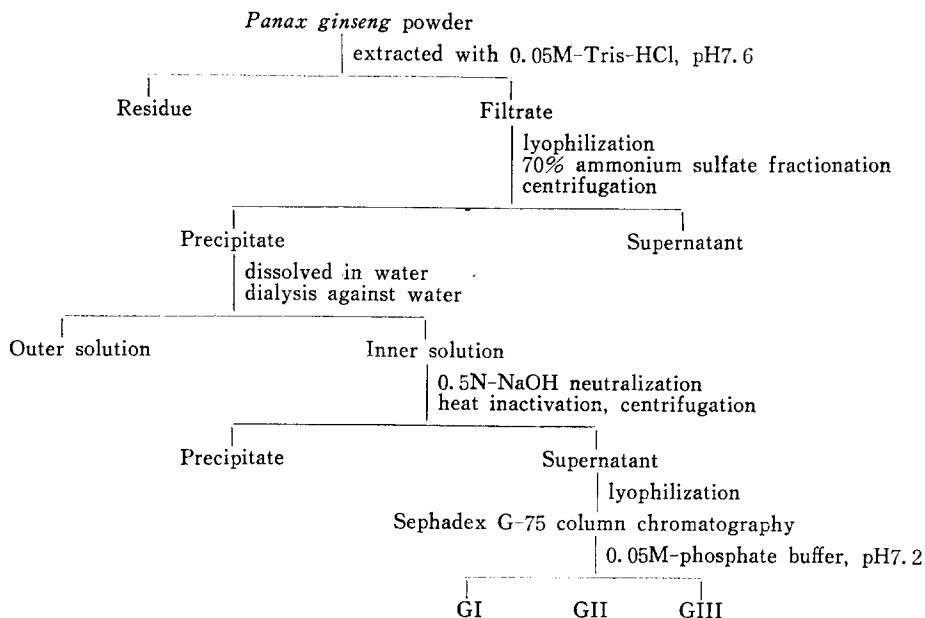


Fig. 1- Isolation and purification of ginseng proteins.

2) Paper chromatography: 위에서 얻은 3개의 분획(GI, GII 및 GIII)에 대해 Whatman No. 1 chromatography paper를 사용하여 paper chromatography를 시행하였다. 전개용매는 n-butanol: pyridine: acetic acid: H₂O=30:20:6:24이었고, 전개된 단백질은 U.V., ninhydrin spray 그리고 chlorine/tolidine test에 의해 검출하였다. 결과는 Fig. 2와 같다.

3) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE): 이 실험은 Weber와 Osborn¹⁷⁾의 방법에 의해 실행하였다.

표준 단백질과 인삼분획은 0.1%-SDS와 0.1%-β-mercaptoethanol을 함유하는 0.01M-sodium phosphate buffer, pH7.0(dialysis buffer)에 녹인 후 37°C에서 2시간 배양하여 사용하였다. 전기영동을 위한 gel은 10% acrylamide 용액을 만들어 여기에 gel buffer를 가하고 공기를 제거한 후 새로 만든 ammonium persulfate 용액과 N,N,N',N'-tetramethylene diamine을 가하였으며, 이 혼합용액을 잘 섞은 후 10×0.6cm tube에 각 2ml씩 가하여 만들었다. 여기에 위에서 준비한 단백질용액 또는 인삼분획(15~20μl)과 tracking dye(0.05% brom phenol blue, 3μl), glycerol(1적), mercaptoethanol(5μl) 및 dialysis buffer(50μl)를 혼합한 sample용액을 gel 상단에 주입하고 constant current(8mA/gel)에서 전기영동을 실시하였다. 이때 electrophoresis buffer는 gel buffer를 물과 1:1로 희석한 것을 사용하였다. 약 5시간 전개한 후 tracking dye와 gel의 길이를 측정한다음, 2시간동안 Coomassie brilliant blue로 staining을 하였다. 증류수로 gel을 잘 씻은 후 acetic acid와 methanol 혼합용액을 계속 갈아주면서 여러시간 destaining을 하였고, 나타난 blue band의 이동거리와 gel의 길이를 측정하여 다음 식에 의해 각 polypeptide chain의 mobility를 계산하였다.

$$\text{mobility} = \frac{\text{distance of protein migration}}{\text{gel length after destaining}} \times \frac{\text{gel length before staining}}{\text{distance of dye migration}}$$

표준 단백질의 mobility와 분자량에 의해 표준직선을 그리고 이 직선에 의해서 인삼분획이 나타내는 polypeptides의 분자량을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 3과 4, 그리고 Table I과 같다.

實驗結果 및 考察

인삼단백질의 분리 정제는 Fig. 1과 같은 방법으로 시행되었으며, 여기서 얻은 3개의 분획, GI, GII 및 GIII에 대해 paper chromatography를 실시하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다.

GI은 3개, GII는 4개, 그리고 GIII는 3개의 spot을 각각 나타내었는데 이때 각 분획의 a spot들은 그 Rf치가 매우 비슷하며(0.20, 0.22, 0.23) 또한 b spot들도 서로 비슷한 Rf치를 나타내고 있다(0.42, 0.40, 0.42). 그러나 c spot(0.66, 0.63, 0.87)과 d spot(0.76)은 서로 현저히 다른 Rf치를 나타내며, 여기서 GI과 GIII 분획은 항방사선작용이 있는 분획이므로¹⁰⁾, GI-c와 GIII-c가 그 원인이 되는 단백질이 아닌가 사료된다. 그러나 이들 각 단백질은 따로 분리되어 구조규명, 약리작용 및 반응기전등이 연구되어야 하며 현재 계속적인 연구가 진행중에 있다. 각 분획에 대한 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 3과 같다.

GI분획은 5개, GII분획도 5개, 그리고 GIII분획은 4개의 band를 나타내었으며 각 band가 의미하는 polypeptide chain의 분자량은 Fig. 4에 제시된 표준직선에 의해 측정되었다. 그 결과는 Table I과 같다.

즉 GI분획은 분자량이 63,000(a)과 60,000(b)의 두개의 얇은 band와 분자량 56,000(c)의 강한 band, 그리고 분자량 51,000(d)과 34,200(e)의 비교적 약한 band를 나타내었다. 또한 GII분획은

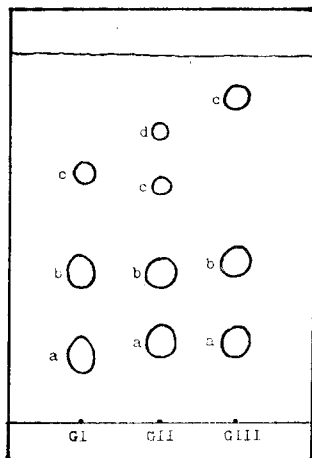


Fig. 2- Paper chromatography on Sephadex G-75 fractions.

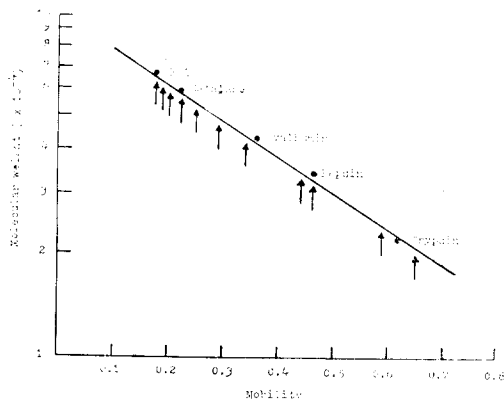


Fig. 4- Electrophoretic mobilities of standard proteins were plotted against the logarithm of their known molecular weights. Arrows (→) indicate the molecular weights of polypeptide chains from Sephadex G-75 fractions.

분자량 56,000(b) 및 35,800(d)의 2개의 강한 band와 분자량 64,600(a), 45,400(c) 및 25,200(e)의 3개의 약한 band를 나타내고 있다.

GIII분획은 분자량 56,000(c)의 비교적 강한 band와 분자량 66,000(a), 63,000(b) 및 22,000(d)의 3개의 약한 band를 나타내었다. 여기서 각 분획이 나타내는 분자량 56,000이상의 band들은 서로 각각 같은 물질을 의미하는 것 같으며 이들 물질은 분자량과 상관없이 Sephadex gel에 흡착되었다가 계속 유출되어 나온것으로 생각된다. 또한 GI-e는 GII분획과의 경계선에서 GII-d 물질이 넘어온 것일 가능성이 있으며 이점에서는 GII-e와 GIII-d의 경우도 같다. 따라서 각 분획에 고

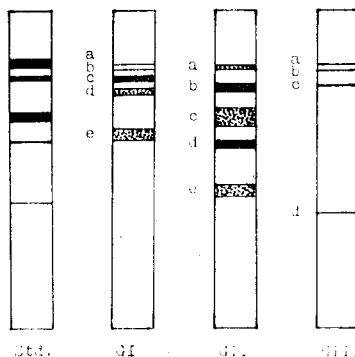


Fig. 3- SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on Sephadex G-75 fractions. Standard proteins are B.S.A., catalase, ovalbumin, pepsin, and trypsin, from top to bottom.

Table I-Molecular weights of polypeptide chains from Sephadex G-75 fractions.

Fractions	Band symbol	Rf value	M.W. of polypeptides
G I	a	0.20	63,000
	b	0.22	60,000
	c	0.25	56,000
	d	0.29	51,000
	e	0.46	34,200
G II	a	0.19	64,600
	b	0.25	56,000
	c	0.34	45,400
	d	0.44	35,800
	e	0.59	25,200
G III	a	0.18	66,000
	b	0.20	63,000
	c	0.25	56,000
	d	0.65	22,000

유한 polypeptide band는 GI-d, GII-c와 GII-d 그리고 GIII-d라 할 수 있으며 이 결과는 paper chromatography의 상단에 나타난 GI-c, GII-c와 GII-d, 그리고 GIII-c spot들과 상응하는 결과임을 알 수 있다. 또한 GI와 GIII는 항방사선작용을 나타내는 분획이므로 GI-d와 GIII-d band가 제시하는 polypeptide에 의해 구성된 단백질이 방사선 방어작용의 원인물질이 될 것으로 사료된다.

SDS는 polypeptide chain과 결합하여 그 구성아미노산에 의해 생기는 전하의 차이를 없애고 단지 그 크기의 차에 의해서 이동하게 하므로 SDS-PAGE의 mobility는 각 polypeptide chain의 분자량에 대한 함수로 나타나게 된다. 또한 SDS는 oligomeric protein과 반응하면 그 4차구조를 분해하여 구성 polypeptide chain을 분리하며 globular protein인 경우에는 그 3차구조를 denaturation에 의해 rod-shape으로 만드는 것으로 알려져 있다.

따라서 인삼분획이 나타낸 각 band는 그 자체로서 한개의 단백질을 의미할 수도 있고 경우에 따라서는 oligomeric protein의 protomer를 나타낼 수도 있다. 또한 분자량이 서로 다른 복수개의 subunit으로 이루어진 단백질의 경우에는 복수개의 band를 나타낼 것이다. 그러므로 나타난 band수와 각 분획이 함유하고 있는 단백질의 수와의 상관관계는 설립할 수 없으며, 측정된 각 분자량이 곧 각 단백질의 분자량이라고도 할 수 없는 것이 사실이다. 오히려 이들 분자량은 각 단백질을 이루고 있는 subunit의 분자량일 가능성이 많다. 따라서 앞으로 이들 단백질을 더욱 정제하여 각각의 순수한 단백질을 분리한 후 이에 대해 SDS를 첨가하지 않은 PAGE를 시행하여 먼저 각 단백질의 총 분자량을 측정하고, 계속해서 SDS-PAGE에 의해 그 subunit의 분자량을 측정하여 각 단백질의 구조적특징을 밝히고자 한다. 또한 각 단백질이 나타내는 약리작용을 규명하고 그 작용기전을 설립하고자 계속적인 연구가 진행중이다.

結 論

부분정제된 인삼분획에 대해 paper chromatography와 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 결과, GI 분획은 3개의 단백질 spots와 5개의 polypeptide band를 나타내었고, 이들의 분자량은 각 63,000, 60,000, 56,000, 51,000, 및 34,200이었다. 또한 GII분획은 4개의 단백질 spots와 5개의 polypeptide band를 나타내었는데 이들의 분자량은 각 64,000, 56,000, 45,400, 35,800 및 25,200이었다. 마지막으로 GIII분획은 3개의 단백질 spot와 4개의 polypeptide band를 나타내었으며 각 분자량은 66,000, 63,000, 56,000 및 22,000이었다.

文 獻

1. Korean Ginseng Research Institute, *Korean Ginseng*, 2nd ed., Seoul, Korea(1978).
2. H. Oura, S. Nakashima, K. Tsukada and Y. Ohta, *ibid.* 20, 980(1972).
3. H. Oura, S. Hiai, Y. Odaka, and T. Yokozawa, *g. Biochem.* 77, 1057(1975).
4. I.I. Brekhman and I.V. Dardymov, *Ann. Rev. Jharmacol.* 9, 419(1969).
5. B.H. Han, Y.N. Han and L.K. Woo, *J. Pharm. Soc.* 16, 129(1972).
6. K.S. Baik, C.Y. Lee, G.N. Lee, S.O. Song and K.H. Kang. *Korean J. Physiol.* 10, 7(1976).
7. B.H. Han and L.K. Woo, *ibid.* 1, 22(1977).
8. H. Saito, Y. Yoshida and K. Takai, *Japan J. Pharmacol.* 24, 119(1974).
9. M. Yonezawa, *J. Radiat. Res.* 17, 111(1976).
10. M. Yonezawa, A. Takeda and N. Katoh, *J. Radiat. Res.* 22, 336(1981).
11. T. Ando, T. Muraoka, H. Okuda and N. N. Yamasaki, *Symphosia for Wakan-Yaka* 12, 15(1979).
12. M. Kimura, I. Waki, O. Tanaka, Y. Nagai and S. Shibata *J. Pharmaco, Bio-Dinamics* 5(1981).
13. C. Kim and S.J. Lee, *J. Korean Res. Inst. Better Living* 31, 169(1983).

14. T. Ando, T. Muraoka, N. Yamasaki and H. Okuda, *Plan. Med.* **38**, 18(1980).
15. Y.C. Kim, D.S. Han, H. Huh, S.M. Ahn and H.J. Koo, *Yakhak Hoeji* **27**, 109(1983).
16. H. Oura, S. Hiai, Y. Odaka and T. Yokozawa, *J. Biochem.* **77**, 1057(1975).
17. K. Weber and M. Osborn, *J. Biol. Chem.* **244**, 4406(1969).
18. O. Gaal, G.A. Medgyesi and L. Vereczkey, *Electrophoresis in the separation of biological macromolecules*, p. 205(1980).