

적하수은전극을 이용한 미토콘드리아 및 Submitochondrial particles의 호흡활성측정

정 진 · 박상규 · 이상기 · 김세호

서울대학교 농과대학 농화학과
(1985년 12월 10일 수리)

Determination of Respiratory Activity of Mitochondria and Submitochondrial Particles by Using Dropping Mercury Electrode

Jin Jung, Sang-Gyu Park, Sang-Kee Lee and Se-Ho Kim

Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

A polarograph with specially designed cell compartment usable in kinetic study of the mitochondrial respiration of a small sized sample was made, and its performance and experimental conditions were examined. An applied potential (ca-1.2V vs. SCE) which gives rise to the second step reduction of oxygen caused a considerable level of a residual current independent of oxygen, which is temporarily interpreted as the reduction current of the membrane-bound redox material(s) of mitochondria. A potential corresponding to the first step reduction of oxygen (ca-0.4V vs SCE) did not produce the residual current. Thus, it is suggested that a measurement of oxygen concentration in a sample of mitochondria and submitochondrial particles by using dropping mercury electrode should be done with an applied potential of about -0.4V vs SCE. Consumption of oxygen by mitochondria was observed to follow practically zero order kinetics. Its rate constant exhibited the proportional relationship with the respiratory activity of mitochondria. Usefulness of the instrument was properly demonstrated in the work on the temperature effect on the respiration of mitochondria isolated from several plant tissues which were selected on the basis of chilling susceptibility.

서 론

조직, 세포, 미토콘드리아, 또는 submitochondrial particles(SMP)의 호흡활성을 측정하는 기

기에는 백금과 산소투과막으로 이루어진 산소전극을 사용한다. 취급하기가 편하며 산소에 대한 선택성이 뛰어나므로 그 사용은 일반적이다.

그러나 산소전극은 분석화학적 관점에서 몇가지 단점을 갖고 있다. 즉 2가이온을 함유하는

phosphate buffer중에서 막이 손상을 입기 쉽다는 점, 막을 통해 산소의 확산이 이루어져야 하므로 response가 느리다는 점, 전류에 미치는 stirring의 재연성의 문제 등이 그것이다.¹⁾ 이러한 단점들은 반응속도론적인 연구에서는 특히 심각한 문제로 대두될 수 있다. 더우기 산소전극의 사용에는 상대적으로 다량의 시료를 필요로 하므로, 미토콘드리아나 특히 SMP의 준비에서 경험하듯이 한정된 양의 시료로서 다수의 반복실험을 수행하는데에 부담스러운 제한을 받게 된다.

본연구에서는 적하수은전극(DME)과 포화카로멜전극(SCE)을 이용하는 cell compartment와 간단한 polarograph를 제작하여 상기한 바와 같은 산소전극을 사용할 때의 단점들을 극복하며 미토콘드리아 및 SMP의 호흡활성을 측정할 수 있었다. 수은을 다룬다는 불편함때문에 이동하여 사용하는 것이 불가하다는 단점에도 불구하고, 실험실에서만 사용하는 경우에는 저렴한 가격으로 손쉽게 제작할 수 있을 뿐아니라 재현성이 뛰어난 실험데이터를 얻을 수 있어서 그 활용이 기대된다.

재료 및 방법

장치의 제작

직경 1cm, 길이 4cm정도의 시험관의 하단에서

약 1cm되는 지점에 sintered glass막으로 안쪽이 막혀있는 짧은 side arm(직경 0.4cm, 길이 0.5cm)을 부착시킨다음, side arm을 agar-agar(0.1M KCl)로 채웠다. 이와같이 변형시킨 두개의 시험관중에서 하나에는 하단에서 약 0.7cm까지 수은과 Hg₂Cl₂로 짓이겨 만든 Hg-Hg₂Cl₂ paste를 채우고 백금선을 꽂은다음 포화 KCl용액을 side arm위에까지 채워 포화카로멜전극(SCE)을 준비하였다. 또다른 하나에는 플라로그래프용 유리모세관을 꽂아 적하수은전극(DME)을 만들었다.

투명한 무색아크릴 원통을 사용하여 water jacket이 부착된 전해용기를 준비하고 DME와 SCE를 각각 최단거리에 정지하여 polarographic cell compartment를 만들었다(Fig. 1-B) 두 전극간의 거리를 최대한 단축시킨 것은 저항을 최소화시키기 위해서였다. 투명아크릴을 사용한 것은 cell내부를 볼 수 있어서 실험수행상 편리한 점도 크지만 분장치를 이용하여 호흡측정이외에 일어나 염록체의 광합성활성을 측정하고자 할때 광조사를 시키기 위해서였다. manual polarograph는 본연구의 목적에 부합되는 것으로 판단된 간단한 기본회로²⁾에 따라 제작하였다(Fig. 1-A).

장치의 성능조사

산소환원의 polarogram이 두단계의 환원파를 보여주는가를 조사하였다. 100ohm 가변 저항과

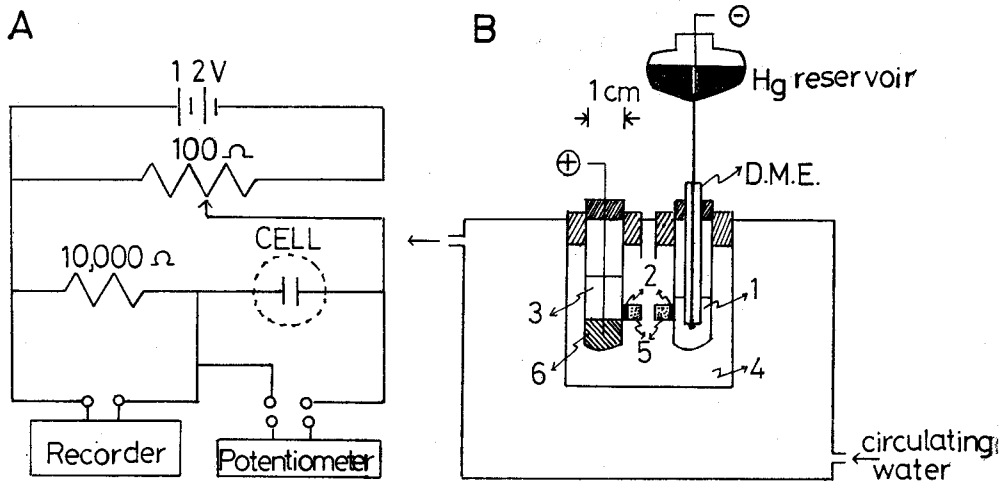


Fig. 1. Block diagram with circuit (A) and cell compartment (B) of the polarograph made for the work.

- 1. sample solution
- 2. sintered glass membrane
- 3. saturated KCl solution
- 4. supporting electrolyte (0.1N KCl)
- 5. agar-agar plug
- 6. Hg-Hg₂Cl₂ paste

potentiometer를 사용하여 DME에 0.0V~1.8V (vs. SCE)의 전위를 걸어주고 10KΩ저항에 걸린 iR drop으로 전류를 측정하였다. 0.1M KCl에 25°C에서 공기를 포화시켜 산소시료로 사용하였다.

실험조건하에서 산소환원전류가 확산지배적인가를 확인하기 위하여 한계전류(I_d)와 Hg reservoir 높이(h)와의 상관관계를 조사하고, 한계전류의 온도계수($\frac{1}{I_d} \frac{dI_d}{dT}$)를 7~23°C범위에서 측정하였다.

산소농도와 한계전류간의 비례관계를 조사하였다. 산소농도는 공기로 포화된 0.1M KCl을 de-aerated (N₂ purged) 0.1M KCl용액으로 희석하여 조절하였다.

미토콘드리아 및 SMP의 준비

Ikuma³³가 제안한 고등식물의 미토콘드리아 분리에 필요한 조건들을 감안하여, 통상적인 differential centrifugation방법⁴³⁵을 일부 보완하여 식물조직들(오이잎, 오이열매, 호박잎, 토마토잎, 콩배축, 벼유수 및 고추잎)로부터 미토콘드리아를 분리하였으며 그 과정은 전보⁶⁷⁷에서와 같다.

미토콘드리아 pellet을 분산매질(0.3M mannitol, 0.1mM EDTA, pH 7.4)에 분산시켜 20°C내외의 온도에서 ultrasonic disintegrator (MSE model soniprep 150)로 20초간씩 5회 내지 8회 초음파처리(23KHz, 110micron)한 후 원심분리(12,000g, 10분)하였다. 상등액을 취하여 반응매질(0.3M mannitol, 10mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM K-PO₄, pH 7.2)로 평형을 이룬 Sepharose 4B column에 통과시켜 void volumm에서 SMP를 수거하였다.

미토콘드리아 및 SMP의 호흡활성측정

DME에 시료 1.5~2ml를 넣고 항온에 도달할 때까지 세워둔후 시료를 잠시 심하게 저어준다. (이일은 미토콘드리아 또는 SMP의 호흡에 의해 거의 완전히 소모된 산소를 보충하기 위함이다.) 곧 수은모세관을 꽂고 수은주높이를 고정(40cm)하여 시료가 안정될때까지 1~2분간 기다린다음 recorder의 감도를 20mV full scale로 하여 시간에 따른 전류변화를 기록한다.

전류-시간관계가 실질적으로 일차함수관계를 보여주는 구간의 기울기로부터 산소농도감소속도를 계산하여 단위량의 미토콘드리아 또는 SMP의

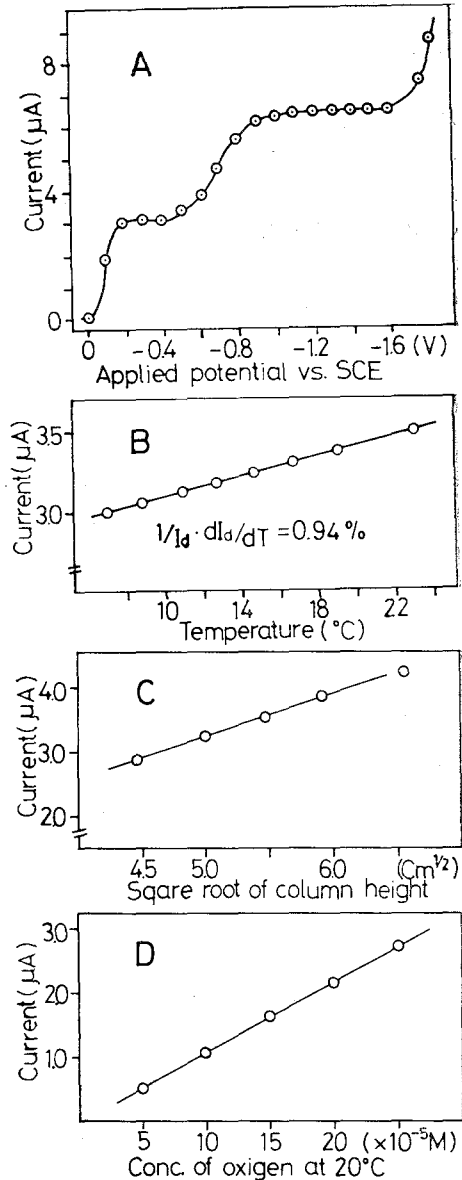


Fig. 2. Polarographic characteristics of the instrument with respect to oxygen reduction.

- A. Polarogram for the reduction of oxygen in air-saturated 0.1N KCl solution.
- B. Temperature dependence of limit current of the first step-oxygen reduction at -0.4V vs. SCE.
- C. Relationship between limit current (I_d) of oxygen reduction and height of mercury head (h) at 20°C. (Applied potential; -0.4V vs. SCE).
- D. Dependence of oxygen reduction current on oxygen concentration at -0.4V vs. SCE.

호흡에 의해 1분동안에 소모된 산소의 mole수로
서 호흡활성을 나타내었다.

시료는 다음과 같이 준비하였다. 미토콘드리아
시료는 미토콘드리아 pellet를 반응매질(전함참조)
에 분산시킨후 호흡측정 직전에 분산액 1.5ml당
호흡기질인 Na-Succinate(100mM) 100 μ l과 ADP
(10mM) 150 μ l를 각각 첨가하여 만들었다. 한편
SMP시료는 Sepharose 4B column으로부터 수거
한 SMP가 이미 반응매질에 분산되어 있는 상태
이므로 호흡측정 직전에 1.5ml당 호흡기질인
NADH(20mM) 100 μ l을 가하여 시료로 사용하였
다.

결과 및 고찰

제작한 장치가 산소환원에 대하여 polarograph
로서의 특성을 갖는 것은 Fig. 2의 데이터가 적절
히 보여주었다.

applied voltage 0.0~-1.8V(vs. SCE)에서 O₂
의 두단계 환원에 대응하는 전형적인 두개의 환
원파가 -0.4V전후와 -1.2V전후에서 각각 나타
났다(Fig. 2-A). 그리고 환원전류의 온도계수
($\frac{1}{I_a} \frac{dI_a}{dT}$)는 제 1파의 경우에 약 0.1%였으며
(Fig. 2-B), 한계전류와 수은통 높이의 제곱근간
에는 비례관계가 성립되었다(Fig. 2-C). 이러한
사실은 산소환원전류가 확산 지배적임을 시사하는

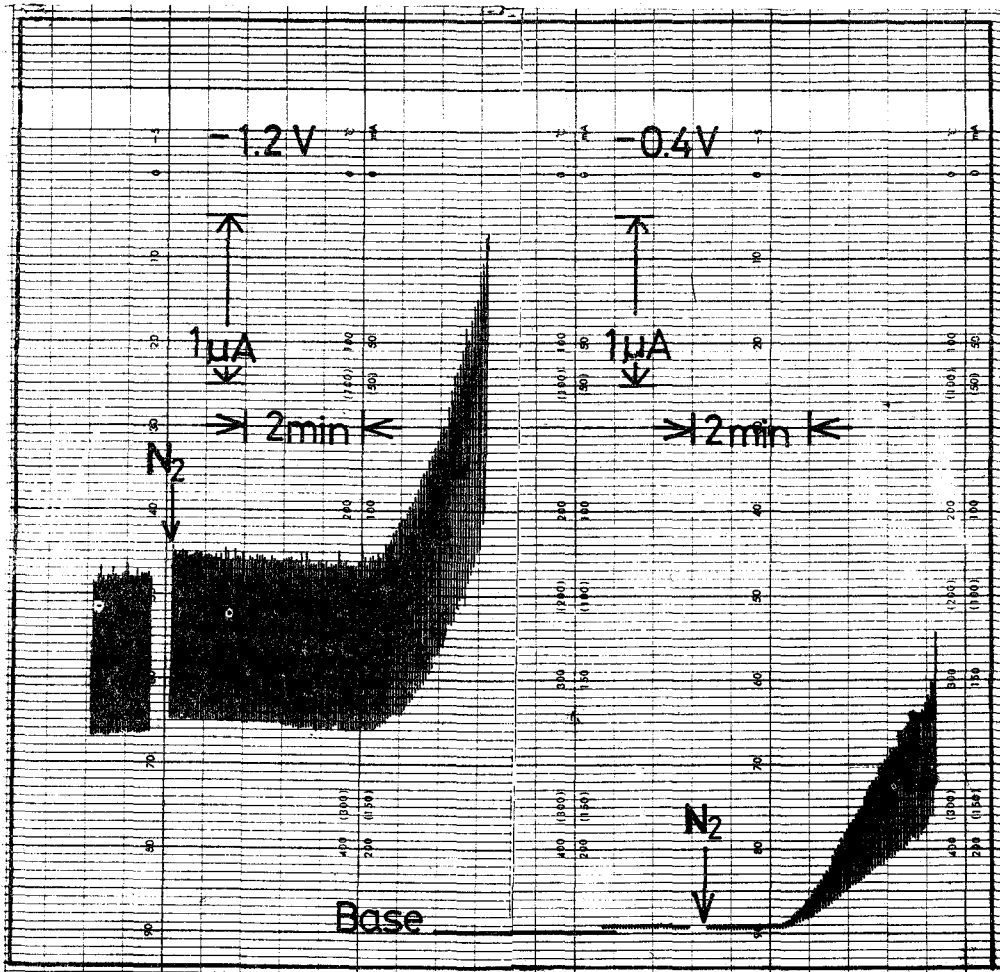


Fig. 3. Polarographic traces of oxygen uptake by mitochondria at -1.2V vs. SCE and at -0.4V vs. SCE respectively.

것이다.^{8,9)} 또한 환원전류는 예상되었던 바와같이 산소농도에 비례하였으며 (Fig. 2-D), 용존산소측정감도는 수은통의 높이와 더욱 중요하게는 recorder의 sensitivity에 의해 결정될 것이나 상온에서 수은통 높이를 40~50cm로 조절하고 5mV full scale의 감도를 갖는 recorder를 사용한 본장치에서는 그것이 applied voltage-1.2V에서 약 $1 \times 10^{-6}M$ 이었고 -0.4V에서 $2 \times 10^{-6}M$ 정도였다.

미토콘드리아 및 SMP의 분산액은 산소의 제 2 환원파에 대응하는 -1.2V(vs. SCE)에서 산소환원과는 무관한 상당한 크기의 잔존전류가 흐르는 것을 관찰하였다. 즉 시료에 -1.2V를 걸어주었을 때 초기 얼마 동안은 호흡에 의한 산소소모를 보이는 급격한 전류감소가 있었으나 그후 더이상

의 변화가 없이 일정한 크기의 전류를 유지하였다. 그러한 현상이 수은에 의한 미토콘드리아 호흡기능의 저해에 기인한 것인지 확인하기 위하여 질소를 제거 (N_2 purging)시켜 보았으나 잔존전류의 크기에는 실질적인 차이가 보이지 않았다 (Fig. 3) 즉 미토콘드리아호흡에 의해 시료중의 용존산소는 완전히 소모되었음을 알 수 있었다. 한편 미토콘드리아만을 제외하고 실시한 blank test를 통하여, 잔존전류는 반응매질의 조성물질 또는 배질중의 어떤 미지의 불순물에 의하여 생긴 것이 아니라는 것도 확인하였다. 따라서 상기한 잔존전류는 미토콘드리아막에 결합되어 있고 -1.2V(vs. SCE)에서 환원되는 물질(들)에 의한 전류일 것으로 해석되어지나 이 문제에 관해서는

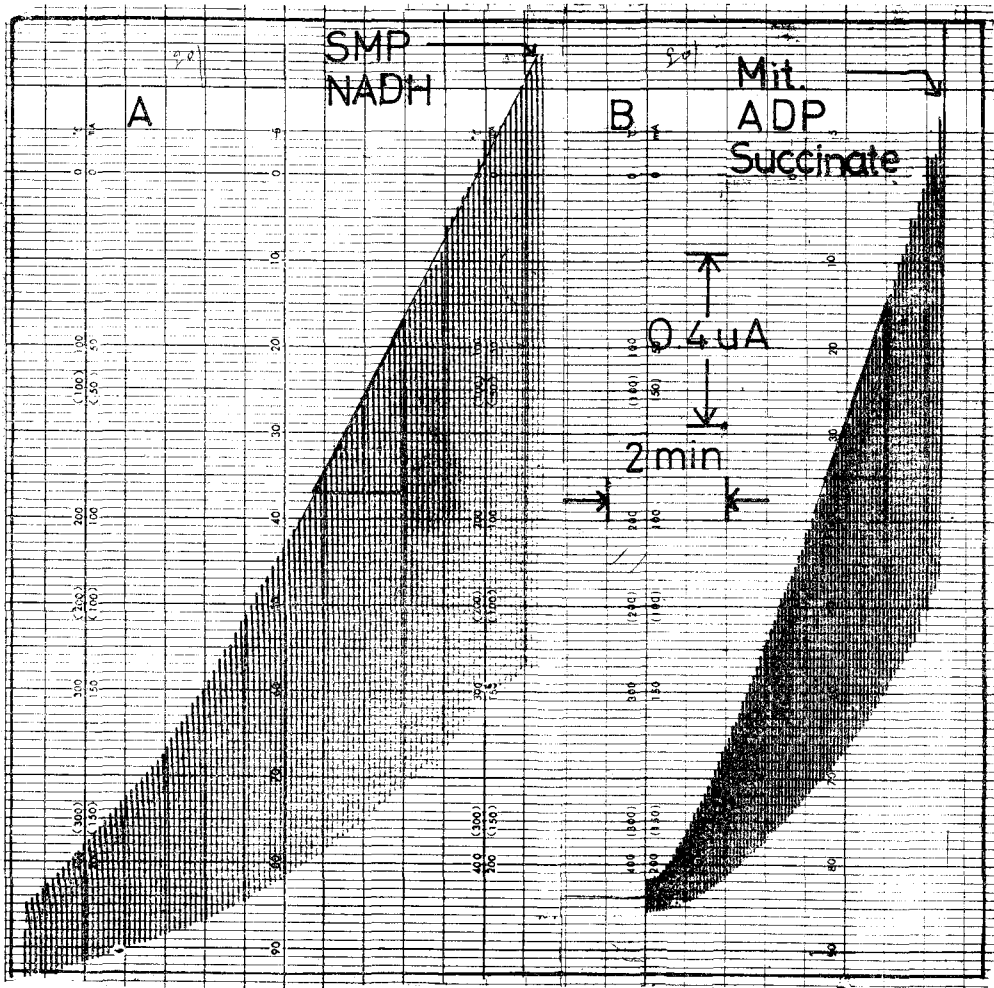


Fig. 4. Typical polarographic traces of oxygen uptake at 20°C by mitochondria (B) and submitochondrial particles (A) obtained from rice leaves (Applied potential; -0.4V vs. SCE).

보다 조직적인 연구가 요구된다. 현재로서는 미지의 이들 환원성 물질(들)은 $-0.4V(SCE)$ 에서는 환원되지 않는 것을 알 수 있었다. 즉 시료에 $-0.4V$ 를 걸어주면 호흡에 의해 용존산소가 소진된 후에는 잔존전류가 전혀 보이지 않았다(Fig. 3).

따라서 membrane이 노출된 organelle내지 suborganelle 수준에서 적하수는 polarography를 적용하여 용존산소농도의 변화를 측정하려는 실험에서는 $-0.4V(vs. SCE)$ 전후의 제 1 산소환원파에 대응하는 applied voltage의 선택이 중요한 실험조건의 하나가 될 것이다. 물론 $-0.4V$ 의 선택은 $-1.2V$ 에 비하여 산소 측정감도가 대략 반으로 줄어드는 단점이 있으나 그것이 호흡활성 측정시에 특별히 문제점이 된 일은 본연구에서는 없었다.

미토콘드리아호흡에 의한 succinate oxidation과 SMP호흡에 의한 NADH oxidation을 나타내는 polarographic trace의 대표적인 예를 Fig. 4에 각각 보여주었다. 기질의 농도를 충분히 크게 유지하는한 호흡에 의한 기질산화(즉 산소소모) kinetics는 O차반응의 처리가 가능하였다.

O차반응의 기술기인 속도상수와 호흡활성간에는 비례관계가 성립되는 것을 확인하였다. 호흡활성을 임의로 조절하기 위하여 intact mitochondria에 완전히 불활성화시킨($100^{\circ}C$ 에서 15분간 가열시킨) 미토콘드리아분산액을 첨가하므로써 상대적 호흡활성이 서로 다른 (100%에서 0%까지) 시료들을 준비하고 그 호흡반응의 속도상수를 구하였던바, Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. 따라서 O차반응으로 취급된 호흡의 속도상수는 미토콘드리아 및 SMP의 호흡활성을 나타내는 지표로 이용될 수 있음을 알았다.

미토콘드리아의 호흡활성전이온도를 측정하는 일—따라서 mitochondrial membrane의 상전이 온도를 구하는 일⁷⁾—과 같이 고도의 정량성이 요구되는 데이터의 수집이 필요한 일에 있어서 본 연구에서 제작된 polarograph는 적절히 이용된다는 것을 확인하였다. Fig. 6의 예에서 보여주는 바와 같이, 식물미토콘드리아 및 그 SMP의 호흡반응의 활성화에너지가 불연속적으로 급작스럽게 증가하는 온도를 호흡속도 상수들을 일정한 온도 구간에 걸쳐 행한 Arrhenius plot로부터 구할 수 있었다. Table 1에는 몇가지 식물들의 미토콘드리아호흡활성전이온도들을 측정하여 보여 주었다.

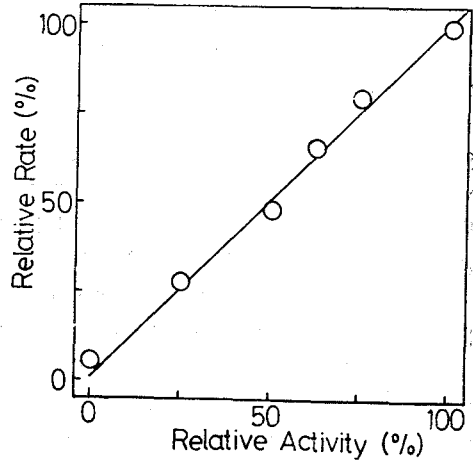


Fig. 5. Relationship between relative respiratory activity of mitochondria and relative oxygen consumption rate at $20^{\circ}C$.

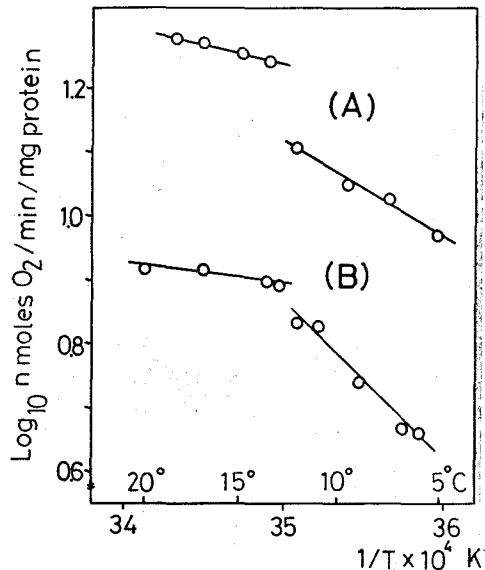


Fig. 6. Arrhenius plots of respiratory activity of mitochondria isolated from cucumber leaves (A) and of submitochondrial particles from cucumber fruit (B).

고온성식물인 오이, 호박, 토마토 및 벼 등은 비교적 높은 호흡활성전이온도를 보이는데 반하여, 상대적으로 내한성이 강한 고추와 콩(배축)은 $5^{\circ}C$ 이하—실험수행상의 제한때문에 측정온도를 $5^{\circ}C$ 이하로 하강시키지 못하였음—이었다는 사실은 고온성식물과 저온성식물간의 호흡활성전이온도를 비교한 기존의 연구결과들^{10),11)}과 일치되는 점이다.

Table 1. Activity transition temperature of mitochondrial respiration.

Plant	Tissue	Transition	Temperature (°C)
Cucumber	leaf	12~13.5	mitochondria
	fruit	12.5	SMP
Zucchini	leaf	12.5	mitochondria
Tomato	leaf	11.1	mitochondria
Rice (Sangpung)	panicle	12	mitochondria
Rice (Taebeak)	panicle	17~18	mitochondria
Soybean	hypocotyl	<5	mitochondria
Pepper	leaf	<5	mitochondria

다.

본장치는 광합성명반응의 연구에도 이용될 수 있음을 알았다. 다만 이에는 광원이 필요하며 이를 위해 500W tungstenhalogen lamp가 부착된 slide projector를 cell compartment의 전방에 위치시켜 광조사를 시켰다. 잘게 찢은 버일을 DME에 채우고 buffer를 첨가한 다음 광조사를 실시하면 수분(보통 4分정도) 후에 산소발생을 보이는 한계전류의 상승이 기록되었다. 광합성연구에의 응용에 관해서는 차후 보고하고자 한다.

초 록

소량의 시료로서 미토콘드리아 및 SMP호흡의 속도론적 연구에 이용할 수 있는 적하수은전극 polarograph를 제작하여 그 성능, 실험조건 및 응용성을 검토하였다. 산소의 제 2 단계 환원이 일어나는 전위(약 $-1.2V$ vs SCE)는 막에 결합된 환원성물질의 환원전위로 해석되는 상당한 크기의 잔존전류를 일으키기 때문에 부적절한 것으로

판단되었다. 그러나 산소의 제 1 단계 환원이 일어나는 $-0.4V$ (vs SCE)하에서는 잔존전류가 관찰되지 않았으며 산소농도의 변화는 정량적으로 추적되었다. 호흡기질의 농도를 충분히 크게 유지하는 한 호흡에 의한 용존산소 소모는 O차반응의 처리가 가능하였으며, 그속도 상수와 미토콘드리아 호흡활성간에는 비례관계가 성립되었다. 냉냉성이 서로 다른 몇가지 식물조직으로부터 분리한 미토콘드리아의 호흡활성에 미치는 온도효과를 조사하고 호흡활성전이온도를 측정하므로써 제작한 장치의 효용성을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Lessler, M.A. and Brierley, G.P.: Methods. Biochem. Anal., 17 : 1(1969).
2. Lingane, J.J.: Anal. Chem., 21 : 45(1949).
3. Ikuma, H.: Plant Physiol., 45 : 773(1970).
4. Bonner, W.D. Jr.: Methods Enzymol., 10 : 128(1967).
5. Singer, T.P., Oestreicher, G. and Hogue, P.: Plant Physiol., 52 : 616(1973).
6. 정진, 박상규 : 서울대학교 농학연구, 9(1), 별책, 75(1984).
7. 정진, 이상기, 인만진 : 서울대학교 농학연구, 10(1), 별책, 51(1985).
8. Lingane, J. J. and Kolthoff, I.M.: J. Amer. Chem. Soc., 61 : 825(1939).
9. Meites, L. and Meites, T.: Ibid., 72 : 3686(1950).
10. Lyons, J.M. and Raison, J.K.: Plant Physiol., 45 : 386(1970).
11. Maeshina, M. Uritani, I. and Asahi, T.: Agric. Biol. Chem., 44(10) : 2493(1980).