

人蔘, 沙蔘 및 도라지의 電氣泳動에 의한 蛋白質 패턴과 分子量

安相得* · 鄭燦文* · 權宇生* · 孫膺龍** · 李鎔世** · 尹慶恩***

Molecular Weight Estimation and Protein Patterns of *Panax ginseng*, *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* by Polyacrylamide gel Electrophoresis

Sang Deuk Ahn*, Chan Moon Chung*, Woo Saeng Kwon*,
Eung Ryong Son**, Yong Sae Lee*** and Kyeong Eun Yoon***

ABSTRACT

This study was carried out to identify the protein patterns and to estimate molecular weights of the ginseng and other plants.

Polyacrylamide gradient 2-30% gels for identification of protein patterns and 11% SDS polyacrylamide gels for molecular weight estimation of various plants were used.

Proteins extracted with distilled water and phosphate buffer were most clearly separated.

Although minor bands were a little different according to kinds of buffer, major bands showed similar pattern.

Major protein bands were two bands of 45,000, 66,000 in *Panax ginseng*, 3 bands of 32,000-39,000 in *Codonopsis lanceolata* and one double band around 39,000 kd in *Platycodon grandiflorum*.

緒 言

最近 科學의 發達로 生活水準이 向上됨에 따라 健康에 대한 관심이 높아지고 合成된 藥品보다는 生藥에 더 많은 관심을 갖게 되었다.

世界的인 生藥劑로 널리 알려진 人蔘은 健康食品 및 各種疾患의 治療제로도 그 수요가 漸次 증대되고 있는 實情이다.

人蔘의 수요량이 增大됨에 따라 各國이 자기나라에서 自生하는 藥草뿌리를 나름대로 人蔘이라고 輸

出하는 예가 있다. 브라질에서는 人蔘과 전혀 다른 비름과 식물인 宿根草를 “브라질人蔘”이라하여 人蔘 宗主國인 韓國에까지 수출할 계획으로 수출절차를 문의해온바 있으며 유럽에서는 Tai-ginseng이라하여 人蔘과 비슷한 生藥을 판매하고 있다.

이러한 狀況에서 眞正한 人蔘製品的의 如否가 問題視될 것이며 人蔘제품이라 할지라도 他物質이 混合되지 않은 純粹人蔘製品的의 眞僞如否에 대한 문제가 있을 수 있을 것이다.

본 연구는 이러한 문제에 대비하여 人蔘(白蔘 및 紅蔘粉末)과 他類似植物粉末의 蛋白質을 電氣泳動法

* 韓國人蔘理學 研究所(Korea Ginseng & Tobacco Research Institute)

** 高麗大學校 農科大學(Coll. of Agr. Korea University)

*** 水原大學 遺傳工學科(Dept. of Genetic engineering, Suwon Coll.) < 1985. 8. 23 接受 >

에 의해 各 植物의 pattern 과 分子량을 비교 구분하였다.

材料 및 方法

1. 植物 材料

紫莖種 6年生 白蔘 및 紅蔘의 粉末과 沙蔘(더덕, *Codonopsis lanceolata*) 및 도라지 (*Platycodon grandiflorum*)의 乾燥粉末을 使用하였다.

2. 電氣泳動 試料의 採取

蛋白質抽出 완충용액으로는 증류수와 0.025 M Phosphate buffer pH 7.2, 0.1M Tris-HCl buffer pH 7.5, 0.125 M Tris-borate buffer pH 8.9 를 使用하였다. 使用된 증류수와 buffer의 量은 各 試料의 건조분말 2g에 8ml씩 使用하였다. 건조분말에 buffer를 혼합後 尤발을 使用 미세하게 마쇄後 고속냉동원심분리기에서 12,000 × g로 30分間 원심분리하여 상등액을 전기영동시료로 취하였다.

3. 電氣泳動

2 ~ 30% polyacrylamide gradient tube gel을 使用하였으며 molecular weight의 推定은 0.1%

sodium dodecyl sulfate를 첨가한 11.0% polyacrylamide tube gel을 使用하였다. Molecular weight marker protein은 MWS-877(14,000 ~ 70,000, Sigma Co.)을 使用하였다. 電氣泳動後 protein의 發色은 Park³⁾의 方法을 使用하였다.

結果 및 考察

植物의 조직내에는 各種 蛋白質이 存在하고 있으며 種이나 變種에 따라 電氣泳動時 나타나는 protein pattern은 相異하다.

本 實驗은 人蔘과 類似植物間의 區別方法과 분말 제품의 混合如否를 判別할 수 있는 方法을 究明하고자 白蔘 및 紅蔘粉末과 人蔘과 유사한 沙蔘 및 도라지 뿌리의 乾燥粉末에서 蛋白質을 추출 電氣泳動後 protein pattern을 비교하였으며 分子량은 SDS gel을 使用하여 推定하였다.

1. 蛋白質 Pattern

電氣泳動法에 의한 植物體의 단백질 pattern은 단백질 추출시 使用하는 buffer의 種類 및 pH등에 따라 서로 다른 형태를 보이기도하여 本 實驗에서는 증류수와 3種類의 buffer를 使用하여 단백질을 抽

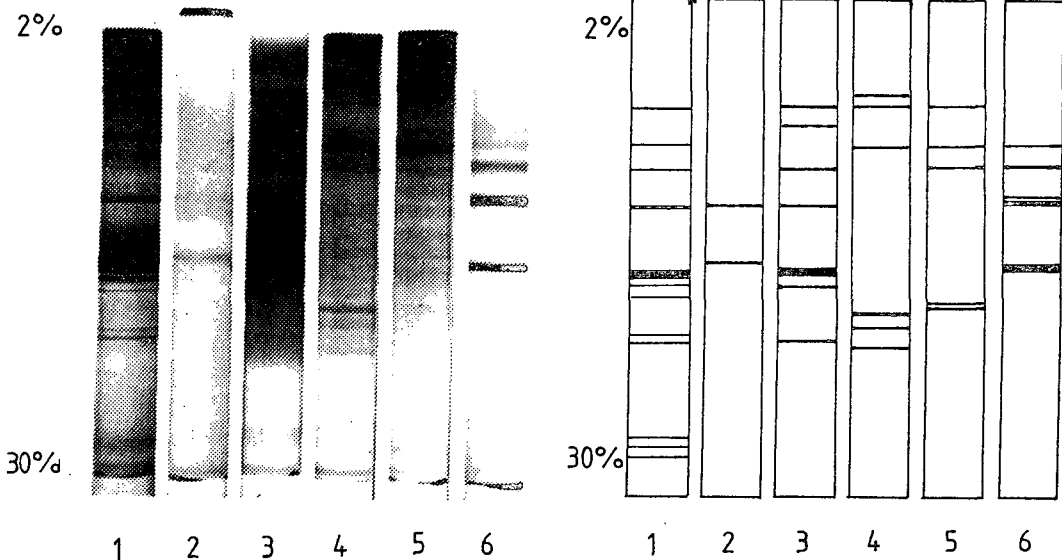


Fig. 1. Photograph and diagrammatic representation of protein patterns extracted with phosphate buffer(0.025M, pH 7.2) of *Panax ginseng*(1. fresh ginseng, 2. red ginseng, 3. white ginseng), *Codonopsis lanceolata*(4) and *Platycodon grandiflorum*(5) by 2-30% polyacrylamide gradient tube gel electrophoresis. 6. Bovine serum albumin(BSA)

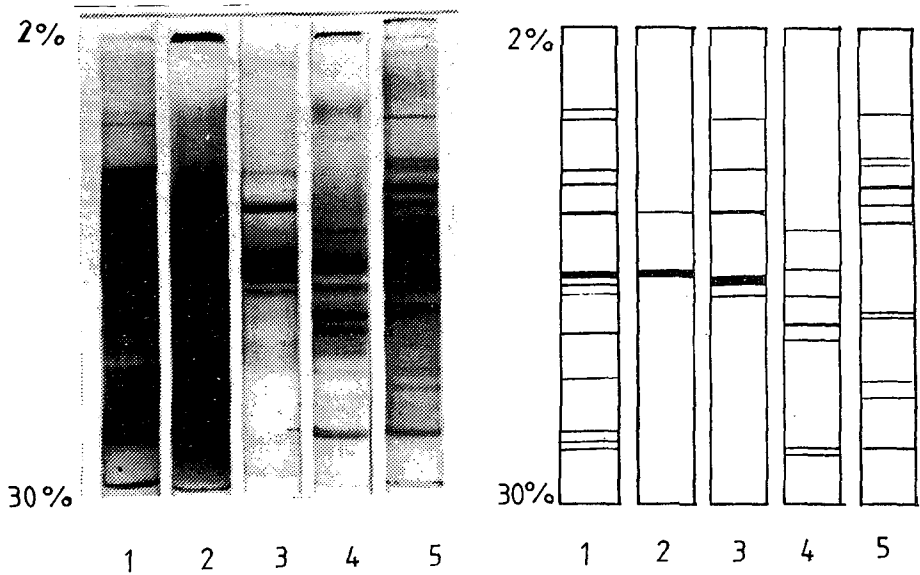


Fig. 2. Photograph and diagrammatic representation of protein patterns extracted with water(D.W.) of *Panax ginseng* (1. fresh ginseng, 2. red ginseng, 3. white ginseng), *Codonopsis lanceolata*(4) and *Platycodon grandiflorum*(5) by 2-30% polyacrylamide gradient tube gel electrophoresis.

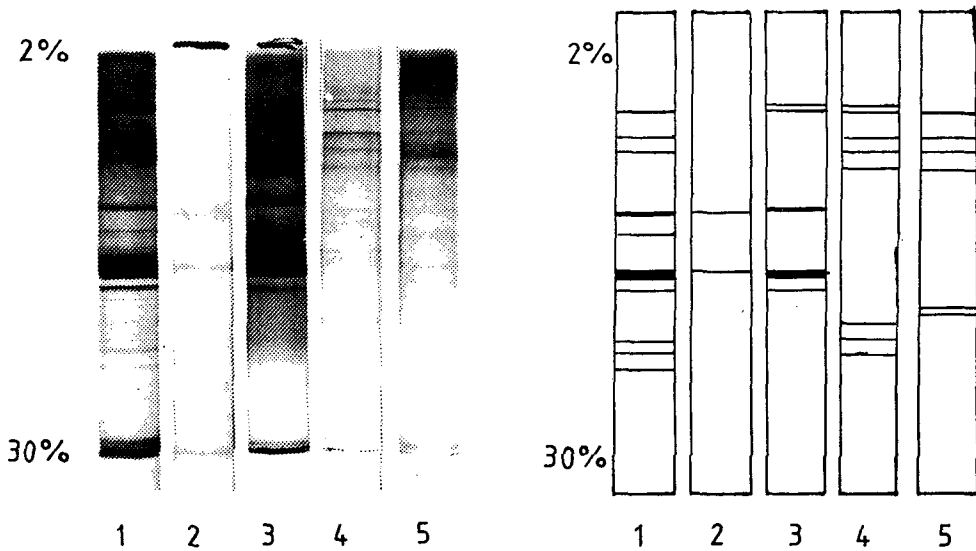


Fig. 3. Photograph and diagrammatic representation of protein patterns extracted with Tris-HCl buffer(0.1M, pH 7.5) of *Panax ginseng* (1. fresh ginseng, 2. red ginseng, 3. white ginseng), *Codonopsis lanceolata*(4) and *Platycodon grandiflorum*(5) by 2-30% polyacrylamide gradient tube gel electrophoresis.

出, 전기영동하였다(Fig.1-6).

植物的蛋白質 pattern은 band 수가 많아 類似植物間 差異를 區別하기 어려우나 各植物이 나타내는 特徵的인 band 에 의해 區別이 可能하였다.

Phosphate buffer 로 抽出한 단백질의 경우 人蔘(水蔘, 紅蔘, 白蔘)에서는 45,000 과 66,000 Kd 에 서 major band 가 관찰되었으나 紅蔘에서는 그의 band 가 관찰되지 않았다. 沙蔘에서는 32,000~39,

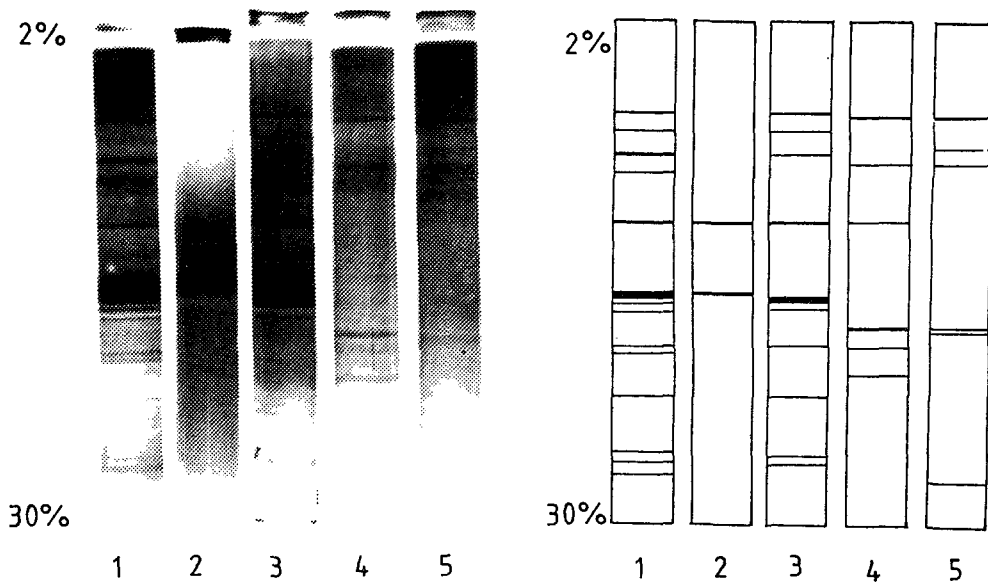


Fig. 4. Photograph and diagrammatic representation of protein patterns extracted with Tris-borate buffer(0.125M, pH 8.9) of *Panax ginseng* (1. fresh ginseng, 2. red ginseng, 3. white ginseng), *Codonopsis lanceolata*(4) and *Platycodon grandiflorum*(5) by 2-30% polyacrylamide gradient tube gel electrophoresis.

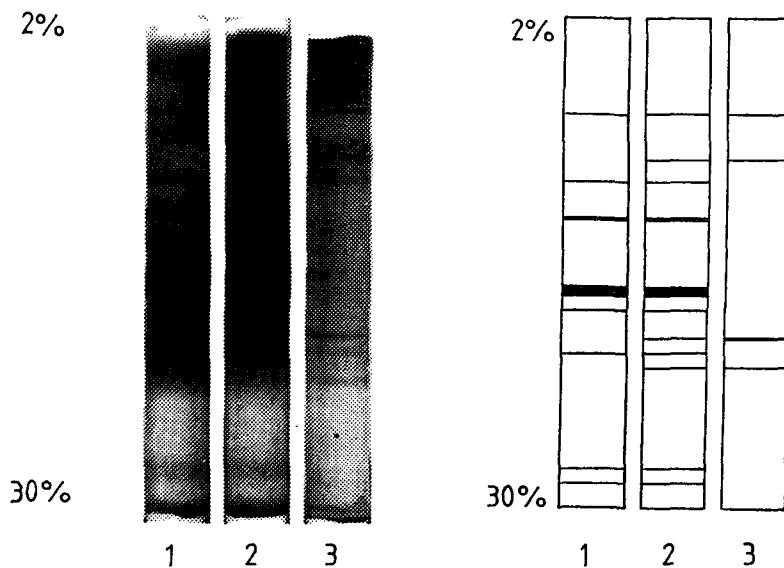


Fig. 5. Photograph and diagrammatic representation of protein patterns of white ginseng(1), mixed(2) and *Codonopsis lanceolata*(3) by 2-30% polyacrylamide gradient tube gel electrophoresis.

000 Kd 사이에 3 개의 band가 특징적이었고 도라지는 39,000 Kd정도에서 double band가 특징적으로 관찰되었다(Fig. 1).

증류수로 抽出한 단백질에서는 분리가 가장 잘 되어 명확한 band pattern을 보였으며 試料間 差異를 容易하게 識別할 수 있었다. Band의 pattern은

phosphate buffer 로 추출한 것과 유사한 형태를 보였다(Fig. 2).

Tris-HCl 및 Tris-borate buffer로 추출한蛋白質의 pattern도 phosphate buffer와 증류수로抽出한蛋白質 pattern과 비슷하여 人蔘은 45,000 및 66,000Kd에서 沙蔘은 32,000~39,000Kd에서 그리고 도라지는 39,000 Kd에서 각각 특징적인 band가 관찰되었다(Fig. 3, 4).

紅蔘의蛋白質 pattern은 buffer의 種類에 관계없이 45,000과 66,000Kd에서 2個의 band가 관찰되었을뿐 다른 band는 관찰되지 않았다. 이는 紅蔘製造時 一部蛋白質이 高温에 의해 파괴되었거나 다른物質로變化된 것으로推測된다.

그의 다른 試料에 있어서는 buffer 種類에 따라 minor band의 位置와 呈色程度에 약간의 差異가 있었을뿐 major band는 同一하게 관찰되었다. 蛋白

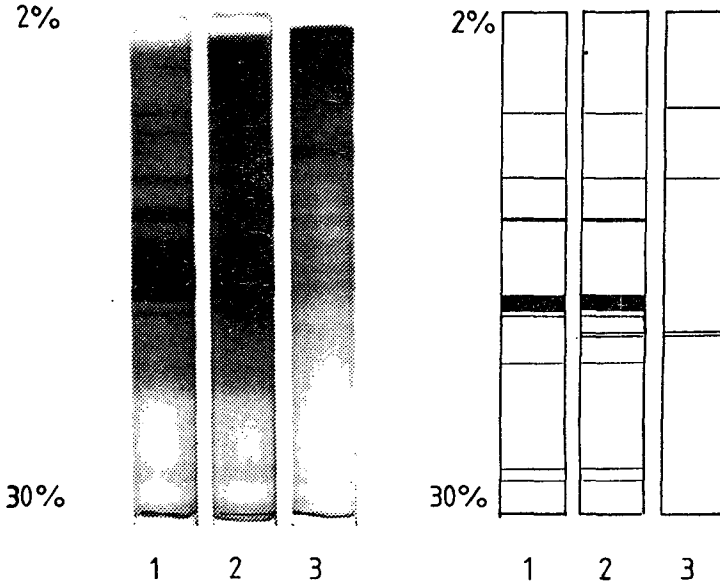


Fig. 6. Photograph and diagrammatic representation of protein patterns of white ginseng(1), mixed(2) and *Platycodon grandiflorum*(3) by 2-30% polyacrylamide gradient tube gel electrophoresis.

質의 分離程度는 증류수와 phosphate buffer로抽出한 것이 가장 좋았으며 試料間區別이 容易하였다.

人蔘과 沙蔘 및 도라지 粉末의蛋白質 pattern의 差異는 Figs. 1-4에서 考察되었으나 이들간 어떤 band가 相異한지 究明하기 위하여 人蔘과 沙蔘 및 도라지 試料를 混合하여 電氣泳動한 結果 白蔘과 沙蔘의 混合試料의 band中 32,000, 36,000, 39,000, 95,000 Kd의 band는 沙蔘에서, 19,000, 44,500, 66,000 및 69,000 Kd의 band는 白蔘에서 由來된 band임을 나타내어 두 植物間 단백질 pattern이 다르다는 것을 證明하였다(Fig. 5).

白蔘과 도라지 粉末의 混合時에도 19,000, 44,500, 45,000 및 66,000Kd의 band는 白蔘에서 39,000 Kd의 double band는 도라지에서 由來된 band임을 나타냄으로서(Fig. 6) 沙蔘과 도라지의 단백질 pattern

이 人蔘과 전혀 달랐다.

따라서 人蔘의 粉末에 도라지나 沙蔘의 뿌리 분말이 첨가되었을 때 電氣泳動法에 의한 단백질 pattern을 調査함으로써 人蔘이외의 他物質이 混合되었음을 究明할 수 있을 것으로 思料된다.

2. 蛋白質 分子量 推定

蛋白質溶液에 SDS를 처리하면 蛋白質分子는 subunit로 解離되어 蛋白質本來의 電荷와 關係없이 subunit의 泳動速度는 그 分子量과 一定한 關係를 갖는다.⁷⁾ 各 植物의 蛋白質溶液을 SDS로 처리하여 molecular weight marker protein과 同時에 泳動하여 各 subunit의 相對移動度에 따른 分子量을 推定한 結果 Figs. 7-8과 같다.

7種의 marker protein의 相對移動度를 分子量

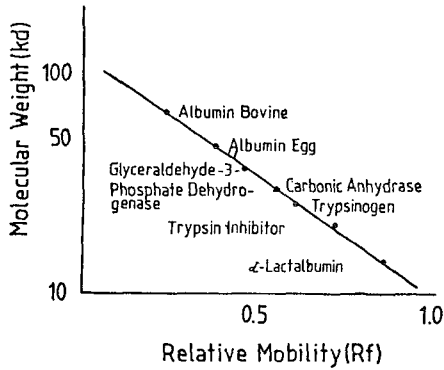


Fig. 7. Comparison of molecular weight of 7 different polypeptide chains in the molecular weight range from 14,200 to 70,000 with their electrophoretic mobilities on SDS gel.

對數値로 환산하여 Semi-log 紙에 圖示한 分子量의 檢量線은 直線으로 表示되었다(Fig. 7).

蛋白質分子量의 檢量線은 gel의 농도, bis의 量에 따라 直線 또는 曲線으로 나타나며 分子量의 범위도 달라진다. Shapiro^{4,5} 등은 5% polyacrylamide SDS gel 에서 分子量 15,500~165,000 Kd 범위는 直線으로 表示된다고 하였고, Weber⁶ 등은 10% 표준 gel에서 10,000~70,000Kd의 범위는 直線으로 表示되나 bis의 量을 2倍로 하면 直線으로 나타나지 않고, bis의 量을 1/2로 減少하면 17,000~50,000Kd까지는 直線, 50,000~200,000 Kd까지는 곡선으로 나타난다고 하였는데 本 實驗의 14,200~70,000Kd 범위의 marker protein이 직선으로 圖示되었음은 Weber⁶의 結果와 같은 경향이였다.

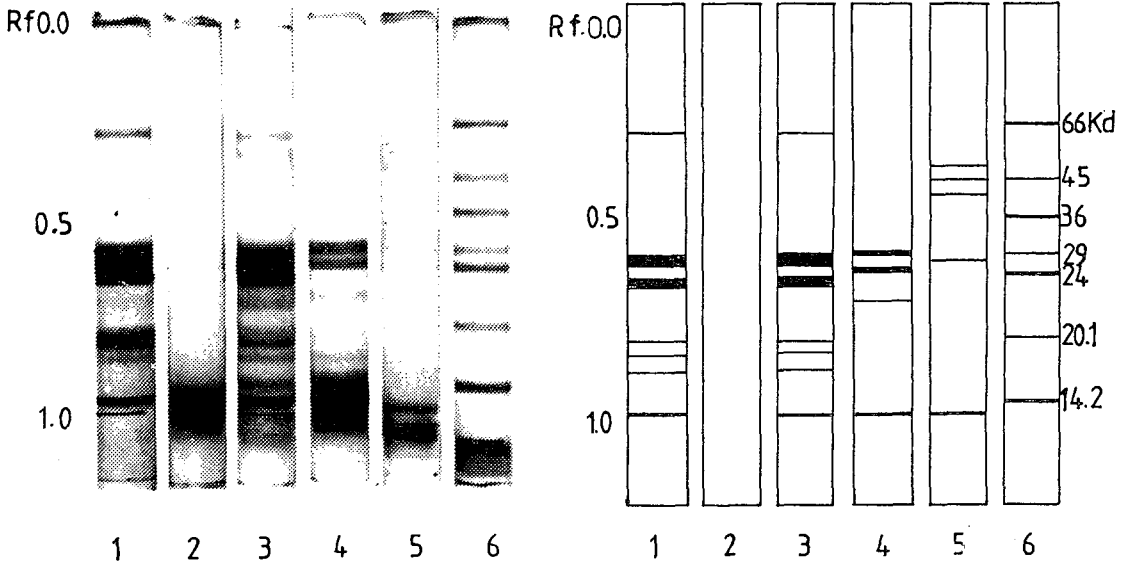


Fig. 8. Photograph and diagrammatic representation of molecular weight patterns of protein of *Panax ginseng* (1. fresh ginseng, 2. red ginseng, 3. white ginseng), *Codonopsis lanceolata*(4) and *Platycodon grandiflorum*(5) by 11% polyacrylamide SDS gel electrophoresis. 6. molecular marker protein.

各 植物의 分子量을 推定해 본 結果 水蓼과 白蓼에서는 다같이 27,000, 23,000 Kd의 major band와 66,000, 19,000, 18,500, 18,000 및 13,000 Kd의 minor band가 관찰되었으나 紅蓼에서는 전혀 관찰되지 않았다. 沙蓼에서는 29,500 및 24,000 Kd의 major band와 22,500, 13,000 Kd의 minor band가 관찰되었고 도라지에서는 45,500, 45,000, 44,500, 28,700 및 13,000Kd의 약한 band가 관찰되었다.

紅蓼에서 band가 전혀 관찰되지 않은 것은 grad-

ent gel의 단백질 pattern에서 45,000 및 66,000 Kd에서 약하게 검출되었던 蛋白質이 SDS gel에서는 작은 分子量의 subunit로 解離되어 泳動時 밀로 빠져버렸거나 해리된 subunit量이 少量으로 band로 檢出되지 않은 것으로 思料된다.

摘 要

乾燥粉末상태의 人蓼 및 類似 宿根性 植物間의 區

別方法을 確立하기 위하여 단백질 추출과 분리방법을 달리하여 전기영동법에 의해 各 植物의 蛋白質 pattern 및 分子量을 推定하였던바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 蛋白質分離는 증류수와 phosphate buffer 로 抽出하였을 때 가장 잘 되었으며 比較하기가 容易하였다.

2. 蛋白質抽出方法에 따라 各 植物의 minor band 는 약간의 差異가 있었으나 major band 는 差異가 없었다.

3. 各 植物을 區別할 수 있는 band는 人蔘이 45,000 및 66,000 Kd이며 沙蔘은 32,000 ~ 39,000Kd 이고 도라지는 39,000Kd에서 double band가 특징적인 band로서 各 植物을 區別할 수 있는 蛋白質이었다.

引 用 文 獻

1. Dunker, A. K. and R. R. Ruckert. 1969. Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gel. *J. Biochem.* 244: 5074-5080.
2. Herrick, J. L. and A. J. Smith. 1968. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weight of proteins by Disc-gel electrophoresis. *Biochem. & Biophys.* 126: 155-164.
3. Park, W. M. and H. Stegemann. 1979. Rice protein patterns. Comparison by various PAGE-techniques in slabs. *Z. Acker-und Pflanzenbau.* 148:446-454.
4. Shapiro, A. L., E. Vinuela, and J. V. Maizel, Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys.* 28: 815-820.
5. _____ and J. V. Maizel, Jr. 1969. Molecular weight estimation of polypeptide by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: Further data concerning resolving power and general considerations. *Anal. Biochem.* 29: 505-514.
6. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
7. 電氣泳動學會. 1978. 電氣泳動實驗法. 光文社.