

소의 혈청 Ornithine Carbamyltransferase 활성도 측정에 필요한 적합한 조건에 관한 연구

李 昌 雨

서울大學校 獸醫科大學

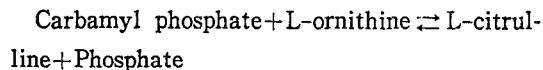
緒 論

동물의 간기능검사에 이용되는 효소로는 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), arginase, ornithine carbamyltransferase(OCT), sorbitol dehydrogenase(SDH), glutamate dehydrogenase(GMD), lactate dehydrogenase(LDH), alkaline phosphatase(ALP) gamma glutamyltransferase(GGT) 등^{5, 15, 38)}이 있다. 이 효소들 중 AST, LDH, GGT 및 ALP는 간특이성이 없기 때문에 단일 검사로서 간세포의 손상을 진단할 수 없는 단점이 있으며, ALT는 반추수의 간세포에 별로 존재하지 않기 때문에 반추수에서는 진단수단으로서의 가치가 없다.^{5, 15, 38)} 그래서 현재 반추수의 간세포손상을 진단하기 위하여 널리 이용되는 효소는 SDH^{2, 5, 9, 15, 18, 22, 38, 40, 48)}와 GMD^{1, 2, 5, 6, 15, 21, 22, 38, 40)}이다.

Treacher와 Collis⁵³⁾는 소에 있어서 SDH와 GMD가 비교적 간특이성을 갖고 있으나 腎皮質組織에도 각각 간조직의 38.5%와 22.3%의 농도에 해당되는 SDH와 GMD활성이 존재하기 때문에 이 두 효소도 절대적인 간특이효소가 아니라고 하였다.

한편 OCT^{12, 15, 43, 53)}와 arginase¹⁵⁾는 반추수뿐만 아니라 노소가 오줌중의 주요 질소화합물을 이루고 있는(ureotelic) 모든 포유동물에 있어서 간조직에 국한되어 있기 때문에 다른 어떤 효소보다도 간특이성이 있다. OCT는 Grisolia와 Cohen(1952), Krebs(1955) 등³²⁾이 발견한 후 Reichenbach⁴²⁾에 의해 현재의 이름이 명명된 효소이며,

Krebs와 Henseleit의 urea cycle에서 아래와 같은 반응을 촉매한다.^{12, 54)}



혈청OCT활성의 측정은 이 효소의 특징적인 간특이성이 때문에 많은 연구자들이 rat^{16, 20, 24-26, 28, 31, 34, 35, 36, 41, 46, 50)}, guinea pig⁵²⁾, mice⁷⁾, 돼지^{15, 17, 38, 55)}, 소^{1, 5, 9, 15, 18, 19, 23, 38, 48)}, 양^{27, 38)}, 개 등^{8, 15)}의 각종 동물과 사람^{8, 13, 39, 56, 57)}에 있어서 각종 방법에 의한 실험적인 간세포손상이나 자연 발생적인 간질환을 진단하는데 효과적임을 보고하였다. 그러나 검사시간이 너무 많이 소요되고 그 방법이 어렵다^{5, 19)}는 과거의 관념때문에 실제 임상에서는 널리 이용되지 못하고 있으며, 진단에 응용하기 위해 필요한 정보가 불충분한 상태이다.

혈청 OCT의 측정방법은 크게 나누어 두가지로 분류할 수 있다. 한가지 방법은 arsenolysis에 근거를 둔 방법^{30, 37, 38, 42, 44)}이고 다른 한가지는 citrulline 합성에 근거를 둔 방법^{8, 12, 13, 14, 23, 33, 45, 49, 51, 54)}이다. arsenolysis에 근거를 둔 방법은 반응혼합물을 24시간 반응시켜야 하기 때문에 귀찮고, 검사결과를 빨리 알 수 없는 큰 단점을 갖고 있다. 그러나 citrulline합성에 근거를 둔 방법은 반응시간이 15~60분^{12, 13, 54)}이면 충분하기 때문에 arsenolysis에 근거를 둔 방법의 가장 큰 단점을 해결할 수 있다. citrulline합성에 근거를 둔 방법은 반응혼합물중 OCT의 촉매작용에 의해 carbamyl phosphate(CAP)와 ornithine으로 부터 합성된 citrulline의 양을 diace-

tylmonoxime-antipyrine 반응을 이용하여 정량 함으로써 OCT활성을 측정하는 것이다.^{12, 14, 51, 54)} 이 방법은 Brown과 Grisolia⁸⁾가 고안한 이후 반응시간을 단축시키기 위한 연구¹³⁾, 혈청의 양을 감소시키기 위한 연구^{11, 13)}, 두 기질의 적합한 농도에 관한 연구^{11, 13, 49)}, 除蛋白을 하지 않고 직접 citrulline을 정량하는 연구 등^{11, 54)}이 진행되어 종래의 여러 단점이 보완되었다. 그러나 이 방법은 아직까지 국제적으로 표준화가 되어 있지 않으며,¹²⁾ 다음과 같은 문제점이 있다. 즉 많은 연구자들^{10, 12, 29, 33, 45, 49, 51)}에 의해 반응에 사용하는 완충액의 종류와 pH에 따라 ornithine이 zwitterion현상을 일으켜 OCT활성을 억제하거나, CAP가 자연분해를 일으켜 비효소적으로 citrulline을 합성하여 OCT측정을 방해할 수 있다는 사실이 밝혀졌다. Ceriotti¹¹⁾는 barbitalacetate 완충액(70 m moles, 37°C에서 pH 7.0)을 사용하고 두 기질의 농도를 조절함으로써 이러한 현상을 피할 수 있다고 하였으나 그의 보고문에서 밝힌 두 기질의 농도는 인산염완충액을 사용한 실험결과에 근거를 두고 있다. 또한 그는 citrulline 정량을 위한 발색시약 중 H₂SO₄의 최종농도를 50ml/L로 하였는데, Vassef⁵⁴⁾는 H₂SO₄의 최종농도가 35ml/L이상이면 반응혼합물중 혈청단백질이 침전하여 혼탁하게 되기 때문에 30ml/L로 하여 측정할 것을 주장하였다.

저자는 기본적인 측정방법을 Vassef⁵⁴⁾에 준하고, 완충액은 Ceriotti¹¹⁾가 제시한 barbital-acetate 완충액을 사용하여 혈청 OCT측정과 관련된 여러가지 변수들의 영향을 조사하였으며 아울러 이 방법으로 조사한 건강한 소의 혈청 OCT활성도도 참고자료로서 함께 보고하는 바이다.

材料 및 方法

혈청OCT측정을 위한 기본적인 방법은 Vassef⁵⁴⁾에 준했고, 완충액은 Ceriotti¹¹⁾가 권장한 barbital-acetate 완충액을 사용하였으며 아래와 같다.

1. 시 약

Barbital-acetate 완충액

용액 A: Sodium acetate·3H₂O 9.715g

Sodium barbital 14.715g

증류수로 용해하여 1L가 되도록 희석하였다.

용액 B: HCl 50m moles/L

용액 A 20ml와 용액 B 24ml에 증류수를 첨가하여 100ml가 되게한 후 37°C에서 pH가 7.0이 되도록 조절하였다.

Ornithine 용액

18m moles/L

Urease 용액

Sigma Chemical Co.의 urease, typeⅢ를 완충액으로 용해하여 10mg/ml의 농도가 되게하여 냉동보존하면서 사용직전에 완충액으로 10배 희석하여 사용하였다.

CAP용액

CAP의 dilithium salt를 사용직전에 urease용액에 용해하여 30m moles/L가 되게하였다.

발색시약

발색시약 A: antipyrine 2g을 희석된 H₂SO₄ 용액(98% H₂SO₄ 60ml/L) 1L에 용해하였다.

발색시약B: 2,3-diacylmonoxime을 희석된 acetic acid(99% acetic acid 50ml/L)로 용해하여 9g/L가 되도록 하였다.

위의 발색시약 A와 발색시약 B를 실험 직전에 동량씩 혼합하여 사용하였다.

표준 Citrulline용액

citrulline을 증류수로 용해하여 1m mol/L가 되도록 희석하였다.

2. 혈청 : OCT활성도 측정방법을 확립시키기 위한 다음의 실험에서 6두의 한우로 부터 채취한 혈청을 pooling하여 사용하였고, 소의 정상 OCT활성도를 조사하기 위하여는 흄스타인 등총 179두로부터 채취한 혈청을 사용하였다.

3. OCT활성도 측정법 : 시험관 6개에 표 1에 서와 같이 시약과 혈청을 넣은 후 37°C의 항온수조에서 60분간 반응시킨 다음 생성된 citrulline을 그림 1에서와 같은 순서로 발색시킨 후 분광광도계의 파장 464nm에서 흡광도를 측정하였다.

OCT활성도의 산출은 시험관 1~6의 흡광도를 각각 A₁~A₆이라고 할 때 다음 공식에 의해 산출하였다.

$$\text{Net absorbance} = A_1 - A_2 - (A_3 - A_4) = A_1 - A_2 - A_3 + A_4$$

$$\text{OCT U/L of serum} = \frac{A_1 - A_2 - A_3 + A_4}{A_5 - A_6} \times \frac{1,000}{60}$$

4. H₂SO₄의 농도가 OCT 활성도 측정에 미치는 영향 : 혈청, urease 용액, 완충액을 각각 20μl씩

Table 1. Outline of the Procedure for Determination of Ornithine .Carbyltransferase Activity.

Tube No.	1	2	3	4	5	6
	Citrulline synthesis	Blank citrulline synthesis	Basal citrulline	Blank basal citrulline	Citrulline standard	Blank citrulline standard
Reagents(μ l)						
H ₂ O	—	20	—	20	—	20
Buffer	—	—	20	20	40	40
Citrulline std.	—	—	—	—	20	—
Ornithine	20	20	—	—	—	—
Serum	20	—	20	—	—	—
Urease	—	—	20	20	—	—
CAP	20	20	—	—	—	—

Tubes 4~6 : need not be incubated. CAP: carbamyl phosphate.

Two ml of color reagent to each tube
 ↓
 Mix thoroughly, keeping in an ice bath
 ↓
 Heat in a boiling water bath for 25 min.
 ↓
 Cool
 ↓
 Mix again
 ↓
 Read absorbance at 464 nm with 1cm-light path

Fig. 1. Procedure for the color reaction of citrulline.

넣은 시험관에 각종 농도의 H₂SO₄(2~6.5ml/100ml)를 2.0ml씩 첨가한 후 25분간 끓인 다음 냉각시켜서 흡광도를 측정하였다.

5. Antipyrine의 최종농도가 OCT활성도 측정에 미치는 영향 : 발색시약A의 antipyrine농도를 달리하여(0~2.0g/L) 상기의 OCT활성도 측정법에서와 동일한 방법으로 발색시켜 그 흡광도의 차이를 조사하였다.

6. Diacetylmonoxime의 최종농도가 OCT활성도 측정에 미치는 영향 : 발색시약B의 diacetylmonoxime 농도를 달리하여(0~12.5g/L) 상기의 OCT측정법에서와 동일한 방법으로 발색시켜 그 흡광도의 차이를 비교하였다.

7. 발색에 소요되는 시간 : 상기의 OCT활성도 측정법에 준하여 반응혼합물에 발색시약을 넣은 다음 100°C로 끓이면서 경시적으로 반응액을 냉각시켜 흡광도를 측정하였다.

8. Urease의 농도가 OCT활성도 측정에 미치는 영향 : 100ml당 214mg의 뇨소를 첨가한 혈청과 각종 농도(0.2~1.0mg/ml)의 urease 용액(Sigma Chemical Co., Type III)을 사용하여 상기의 OCT활성도 측정법과 동일한 방법으로 실

험하여 urease농도별 흡광도를 비교하였다.

9. Ornithine의 농도가 OCT활성도 측정에 미치는 영향 : 각종 농도(2~22m moles/L)의 ornithine용액을 사용하고 상기의 OCT활성도 측정법과 동일한 방법으로 실험하여 ornithine농도에 따른 흡광도의 차이를 비교하였다.

10. CAP의 농도가 OCT활성도 측정에 미치는 영향 : 각종 농도(5~30m moles/L)을 CAP용액을 사용하고 상기의 OCT활성도 측정법과 동일한 방법으로 실험하여 CAP용액의 농도에 따른 흡광도의 차이를 비교하였다.

11. 발색도의 안정성 : 1m moles/L의 citrulline용액 0.5ml와 혈청 0.5ml 및 발색시약 60ml를 혼합한 후 25분간 끓이고 냉각시켜 13개의 시험관에 동량씩 나누어 넣고 시험관을 얼음물에 넣어서 실내조명과 직사광선하에 나누어 정치시켜 놓고 60분간 경시적으로 흡광도를 측정하여 조명별 및 경과시간별 흡광도의 변화를 비교하였다.

12. Citrulline의 표준곡선 : 각종 농도(0.1~4.0m moles/L)의 citrulline용액 20μl씩에 발색시약 2ml씩을 첨가하여 OCT활성도 측정법에 준하여 발색시킨 후 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

13. 정상적인 소의 혈청 OCT 활성도 : 이 실험 실 조건하에서 소의 혈청OCT활성의 정상치를 조사하기 위하여 홀스타인 암소 94두, 종모우(홀스타인 67두, 기타 18두)로부터 혈청을 채취하여 OCT활성도를 측정하였다. 측정방법은 상기의 OCT활성도 측정법과 동일하였으나 urease

용액의 농도는 0.6mg/ml로 하였다. 표본으로 선택된 소는 신체검사, 혈액학적 검사 및 혈청화학적 검사를 실시하여 건강하다고 인정되며, 간질을 정기적으로 구충한 소들 중 혈액채취 후에도 최소한 3개월 이상 건강에 이상이 발견되지 않은 소의 결과만 통계처리하였다. 성별 유의성 검정은 T-검정을 실시하였다.

결 果

혈청, urease용액, 완충액을 각각 20 μ l씩 넣은 시험관에 각종 농도의 H₂SO₄를 2ml씩 첨가하여 25분간 끓이고 냉각시켜 흡광도를 측정한 결과 H₂SO₄의 농도가 3ml/100ml일 때 까지는 흡광도가 0.007로서 변화가 없었으나 3.5ml/100ml 일 때 부터는 증가하기 시작하여 5.0ml/100ml 일 때는 0.050, 6.5ml/100ml일 때는 0.250이었다.

citrulline을 정량할 때 발색을 최대로 하는데 필요한 발색시약 중 antipyrine의 최종농도를 알기 위해 각종 농도의 antipyrine을 사용하여 발색시켜본 결과 antipyrine의 최종농도가 1.0g/L가 되기까지는 antipyrine의 농도가 증가함에 따라 흡광도도 증가하였으나 1.0g/L를 초과하면 오히려 감소하였다.

또한 citrulline을 정량할 때 발색을 최대로 하는데 필요한 발색시약 중 diacetylmonoxime의 최종농도를 알기 위해 각종 농도의 diacetylmonoxime을 사용하여 발색시켜본 결과 diacetylmonoxime의 최종농도가 5g/L가 되기 까지는 농도가 증가함에 따라 흡광도가 급격히 증가하였으나 5g/L를 초과하면 점차 감소하였다.

citrulline을 정량하기 위해 반응혼합물에 발색시약을 넣고 끓일 때 최대의 발색을 위해 소요되는 시간을 조사한 결과 25분까지는 시간이 경과함에 따라 흡광도가 증가하였으나 25분이 지나면 오히려 감소하기 시작하였다.

OCT활성도 측정시 발색반응의 간섭현상을 일으키는 혈청중 노소를 제거하는데 필요한 urease 용액의 최저농도를 알기 위한 실험에서 urease의 농도가 0.6mg/ml미만이면 간섭현상을 일으키고, 0.6mg/ml이상이면 간섭현상을 일으키지 않았다.

각종 농도의 L-ornithine 용액을 사용하여 L-

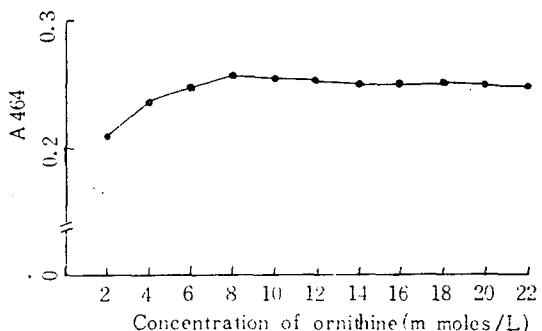


Fig. 2. Influence of ornithine concentration on serum ornithine carbamyltransferase activity.

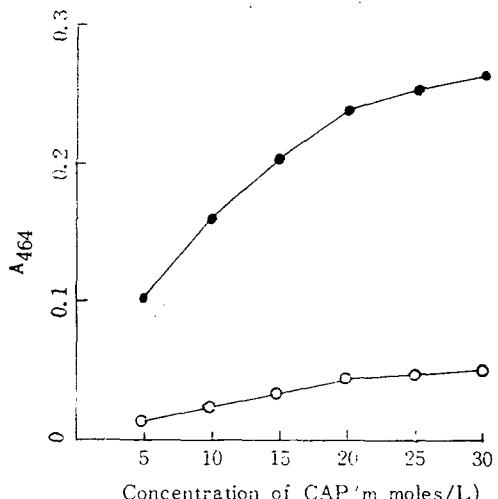


Fig. 3. Influence of carbamyl phosphate(CAP) concentration on serum ornithine carbamyltransferase activity.

(●—● : sample ○—○ : blank).

ornithine의 농도에 따른 흡광도의 차이를 관찰한 결과 그림 2에서와 같이 L-ornithine의 농도가 8m moles/L에 이르기 까지는 농도가 증가함에 따라 흡광도도 증가하였으나 농도가 그 이상일 때는 변동이 없었다.

각종 농도의 CAP용액을 사용하여 CAP의 농도에 따른 흡광도의 차이를 관찰한 결과 그림 3에서와 같이 CAP의 농도가 증가함에 따라 흡광도도 현저히 증가하였으며 공시험용액(blank solution)에서도 CAP의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 조금씩 증가하였다.

발색반응에 의해 생성된 색의 안정성을 알기 위해 citrulline을 혈청에 첨가하여 발색시킨 후 직사광선과 실내조명하에서 60분간 경시적으로 흡광도의 변동을 관찰한 결과 실내조명하에서는

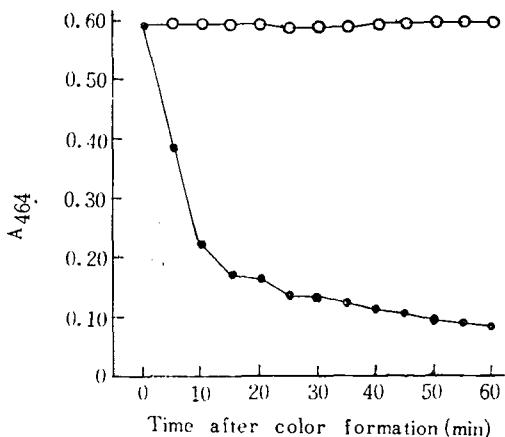


Fig. 4. Bench stability under direct sunlight (●—●) and room light condition (○—○), of the color formed by citrulline and color reagent.

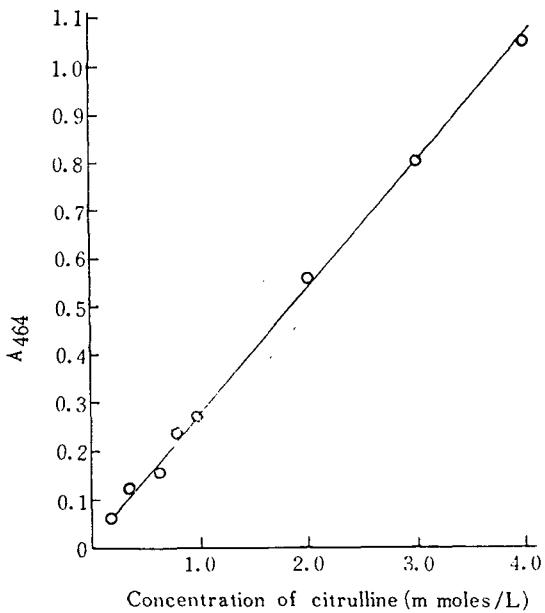


Fig. 5. Citrulline standard curve.

60분간 흡광도의 변동이 없었지만 직사광선 하에서는 흡광도의 급속한 감소를 일으켰다(Fig. 4).

citrulline의 표준곡선의 양상을 알기 위해 각종 농도(0.1~4.0m moles/L)의 citrulline 20μl씩에 발색시약 2ml씩을 혼합하여 발색반응을 일으킨 결과 그림 5에서와 같이 이 실험법위내에서 표준곡선은 직선상을 나타내었고, 상관계수 $r=0.9995$, 회귀함수 $Y=0.26+0.02$ 이었다.

정상적인 흔스타인 암소 94두와 종모우 85두(홀스타인 67두, 기타 18두)의 혈청 OCT활성도

를 조사한 결과 암소에 있어서 6.85 ± 4.38 U/L(평균±표준편차), 솟소에 있어서 2.89 ± 2.50 이었다. 정상범위는 암소에 있어서 $0.39\sim29.12$ U/L이었으며, 솟소에 있어서 $0.06\sim17.34$ U/L 이었다. T-검정결과 암소가 솟소보다 혈청OCT활성도가 높았다.

考 察

혈청 20μl씩에 농도를 달리한 H_2SO_4 용액 2ml씩을 혼합하여 끓인 결과 H_2SO_4 의 농도가 3.5ml/100ml 이상되면 혼탁되어 흡광도가 증가하였다. Ceriotti¹¹⁾와 Vassee⁵⁴⁾는 이런 현상이 H_2SO_4 에 의해 혈청단백질이 침전되기 때문이며, H_2SO_4 의 농도와 혈청의 양에 따라 좌우된다고 하였다. Ceriotti¹¹⁾의 실험에서는 발색시약중의 H_2SO_4 농도가 5.0ml/100ml이었는데도 혈청단백질이 침전되지 않았는데 이 실험에서 3.5ml/100ml 농도로서도 단백질침전이 생긴 이유는 이 실험에서 사용한 발색시약의 조성이 다르기 때문인 것으로 생각된다.

OCT활성도 측정시 사용한 발색시약 중의 antipyrine과 diacetylmonoxime 농도는 연구자^{11-13), 23, 49, 51, 54)}에 따라 많은 차이를 나타내어 antipyrine은 1~5g/L, diacetylmonoxime은 1.7~4.5 g/L의 농도로 사용되어 왔다.

이 실험에서 antipyrine과 diacetylmonoxime의 적정농도를 알기 위해 antipyrine의 농도 또는 diacetylmonoxime의 농도만을 달리하여 정색성을 조사하였던 바 antipyrine의 농도는 1.0g/L일 때 그리고 diacetylmonoxime의 농도는 5g/L일 때 제일 높은 흡광도를 나타내어 Vassee⁵⁴⁾의 실험결과와 일치하였다.

반응혼합물에 발색시약을 첨가하여 발색반응을 일으킬 때 최대의 흡광도를 나타내기 위해 필요한 시간을 조사한 결과 25분만에 최대의 흡광도를 나타내었다. Ceriotti¹¹⁾는 발색시약에 $Fe_2SO_4 \cdot 9H_2O$ 를 첨가한 실험에서 15분만에 흡광도가 가장 커다고 하였으나 Vassee⁵⁴⁾는 $Fe_2SO_4 \cdot 9H_2O$ 를 첨가하면 초기에 발색반응은 촉진되지만 최대의 발색반응을 나타내는데 필요한 시간은 25분이라고 하였다.

citrulline 정량을 위한 antipyrine-diacetylmo-

noxime 발색시약은 citrulline뿐만 아니라 뇨소에 대해서도 발색반응을 일으키기 때문에 혈청 가검물 중 뇨소를 urease로 분해하지 않으면 안된다.^{11~13, 49, 51, 54)} 신기능이 약화된 동물은 BUN이 증가하지만 100mg/100ml를 초과하는 경우는 별로 없다. 뇨소를 혈청 100ml당 214mg(BUN으로 100mg/100ml) 첨가한 혈청을 사용하여 실험한 결과 뇨소를 분해하는데 필요한 urease (Sigma Chemical Co., Type III) 용액의 최저 농도는 0.6mg/ml임을 알 수 있었다. 실험에 사용되는 urease는 식물유래의 urease이며, urease 시약 중에 식물유래의 OCT활성이 있음이 증명된 바 있기 때문에⁴⁾ 시약 중 urease의 농도는 혈청내 뇨소를 완전히 분해할 수 있는 최소량을 사용하는 것이 좋다. 그러나 많은 연구자들이 최소 필요량의 7~10배에 해당되는 urease를 사용하고 있다.⁵⁴⁾

혈청OCT활성을 위하여 Brown과 Grisolia⁹, Ceriotti와 Gazzaniga¹³)는 인산염 완충액을 사용하였으나 Snodgrass와 Parry⁴⁹⁾는 인산염이 CAP와 경합하여 OCT활성을 방해한다고 하였다. Joseph 등²⁹⁾은 glycylglycine 완충액을 사용하였으나 Strandjord와 Clayson⁵¹, Snodgrass와 Parry⁴⁹⁾는 반응혼합물 중에 glycylglycine이 존재하면 37°C에서 CAP가 자연분해하여 비특이적으로 citrulline을 형성하기 때문에 부적합하다고 하였다. Strandjord와 Clayson⁵¹, Healy²³⁾는 Tris완충액을 사용하였으나 Snodgrass와 Parry⁴⁹⁾는 Tris완충액을 사용할 때 ornithine이 zwitterion을 형성하여 OCT활성을 억제함을 밝혔다. Ceriotti¹¹⁾는 인산염완충액을 사용할 때 ornithine 용액의 농도가 5m moles/L를 초과하면 ornithine의 zwitterion 현상때문에 OCT활성이 감소하며, zwitterion현상은 완충액의 종류와 pH에 좌우된다고 하였다. 이 실험에서는 barbital-acetate 완충액을 사용하여 실험하였을 때 ornithine용액의 농도가 8m moles/L 까지는 농도가 증가함에 따라 OCT활성이 증가하였으며, 8~22m moles/L 범위에서는 OCT활성이 뚜렷한 변화가 나타나지 않았다. 또한 CAP농도를 30m moles/L까지 증가시킴에 따라 OCT활성이 증가하였다. 비특이적인 citrulline생성도 CAP농도를 증가시킴에 따라 증가하였으나 그 증가폭은 미미한 것이다.

이 실험결과로 미루어 보아 barbital-acetate 완충액(70m moles/L, pH7.0 at 37°C)을 사용하면 ornithine용액과 CAP용액의 농도가 각각 22m moles/L, 30m moles/L 이내일 때에는 혈청OCT 활성도 측정에 지장을 줄만한 간섭현상이 일어나지 않는 것으로 사료된다.

citrulline과 발색시약에 의해 형성된 정색물질은 실내조명하에서는 60분간 안정성을 나타내었으나 직사광선하에서는 급속히 퇴색되었다. 따라서 이 실험은 직사광선이 차광된 상태에서 실시하고, 발색반응이 끝난 다음에는 되도록 빨리 그 흡광도를 측정하여야 될 것으로 사료된다.

citrulline의 농도를 달리하여 표준곡선을 작성하였던 바 citrulline의 농도가 0.1~4.0m moles/L의 실험범위내에서는 직선을 나타내었으므로 이 범위내에서는 표준곡선을 작성하지 않고 계산식에 의해 OCT활성도를 산출할 수 있으며, 혈청을 회석할 필요도 없었다.

이 실험에서의 OCT활성도 측정법중 urease농도만 0.6mg/ml로 조절한 후 OCT활성도 측정법에 준하여 경상적인 소의 혈청 OCT 활성도를 조사한 결과 암소에 있어서 6.85 ± 4.38 U/L(평균±표준편차)이었고, 솟소에 있어서는 2.89 ± 2.50 U/L로서 암소의 혈청OCT활성이 솟소에 비하여 높았는데 이러한 결과는 젖소암소는 조단백질의 섭취량이 솟소보다 많으며 임신, 분만, 비유 등으로 인해 간에 대한 負荷가 높기 때문인 것으로 생각된다.

OCT의 1 U/L는 혈청 1L로부터 37°C에서 1분간 생성된 citrulline의 micromol수를 의미한다.

結論

citrulline합성에 근거를 둔 혈청OCT활성도의 측정법에 있어서 효소반응과 발색반응에 적합한 조건들을 조사하고 소의 혈청OCT활성을 측정한 결과는 아래와 같았다. 사용한 완충액은 barbital-acetate 완충액(70m moles/L, pH 7.0 at 37°C)이었다.

1. 발색시약중 H₂SO₄의 농도가 3.5ml/100ml 이상되면 혈청단백질의 침전으로 인하여 흡광도가 증가하였다.

2. 발색시약중 antipyrine, diacetylmonxime-

의 농도가 각각 1g/L와 5g/L일 때 흡광도가 제일 높았다.

3. 발색반응을 위해 끓이는 시간은 25분일 때 제일 높은 흡광도를 나타내었다.

4. 발색물질은 실내조명하에서는 최소한 60분간 안정하였으나 직사광선하에서는 급속히 탈색되었다.

5. 발색반응에 있어서 간섭물질로 작용하는 혈청중의 뇨소를 제거하기 위해 필요한 최소한의 urease농도는 0.6mg/ml(Sigma Chemical Co., Type III)이었다.

6. Ornithine용액의 농도를 22m moles/L까지 증가시켜도 zwitterion에 의한 방해현상은 나타나지 않았다.

7. CAP용액의 농도가 증가할 수록 OCT활성도 증가하였다. 비효소적 citrulline의 합성도 증가하였으나 완만한 경향이었다.

8. citrulline의 표준곡선은 최소한 4.0m moles/L 이내일 때 직선상을 나타내었다.

9. 이 실험실에서 조사한 정상적인 소의 혈청 OCT활성도는 암소에 있어서 6.85 ± 4.38 U/L(평균±표준편차)이었고, 솟소에 있어서 2.89 ± 2.50 U/L이었다. 그 정상범위는 암소에 있어서 0.39~29.12U/L이었고, 솟소에 있어서 0.06~17.34U/L이었다.

参考文献

1. Anderson, P.H., Berrett, S., Brush, P.J., Herbert, C.N., Parfitt, J.W. and Patterson, D.S. P.: Biochemical indicators of liver injury in calves with experimental fascioliasis. *Vet. Rec.* (1977) 100 : 43.
2. Anderson, P.H., Matthews, J.G., Berrett, S., Brush, P.J. and Patterson, D.S. P.: Changes in plasma enzyme activities and other blood components in response to acute and chronic liver damage in cattle. *Res. Vet. Sci.* (1981) 31 : 1.
3. Anwer, M.S., Engelking, L.R., Gronwall, R. and Klientz, R.D.: Plasma bile acid elevation following CCl_4 induced liver damage in dogs, sheep, calves and ponies. *Res. Vet. Sci.* (1976) 20 : 127.
4. Bagrel, A., Museur, G. and Siest, G.: Colorimetric determination of ornithine carbamoyl transferase activity in plasma, and results for a supposedly healthy population. *Clin. Chem.* (1975) 21 : 1716.
5. Benjamin, M. M.: Liver function tests. in *Outline of Veterinary Clinical Pathology*. 3rd ed. The Iowa State University Press, Ames (1978) p. 233.
6. Boyd, J. W.: The comparative activity of some enzymes in sheep, cattle and rats-normal serum and tissue levels and changes during experimental liver necrosis. *Res. Vet. Sci.* (1962) 3 : 256.
7. Bradfield, J. W., Whitmarsh-Everiss, T., Palmer, D. B., Payne, R. and Symes, M. O.: Hyperphagocytosis and the effect of lipopolysaccharide injection in tumor-bearing mice. *Br. J. Cancer.* (1980) 42 : 900.
8. Brown, R. W. and Grisolia, S.: Ornithine transcarbamylase activity in serum. *J. Lab. & Clin. Med.* (1959) 54 : 617.
9. Brown, R. W., Pier, A. C., Richard, J. L. and Krongstad, R. E.: Effects of dietary aflatoxin on existing bacterial intramammary infections of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* (1981) 42 : 927.
10. Burnett, G. H. and Cohen, P. P.: Study of carbamylphosphate-ornithine transcarbamylase. *J. Biol. Chem.* (1957) 229 : 337.
11. Ceriotti, G.: Optimal conditions for ornithine carbamyl transferase determination. A simple micromethod without deproteinization. *Clin. Chim. Acta.* (1973) 47 : 97.
12. Ceriotti, G.: Ornithine carbamoyltransferase. In *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd. ed. Vol. III. Verlag Chemie, Weinheim. (1983) p. 319.
13. Ceriotti, G. and Gazzaniga, A.: Accelerated micro and ultramicro procedure for ornithine carbamyltransferase(OCT) determination. *Clin. Chim. Acta.* (1967) 16 : 436.
14. Clayson, K. J., Fine, J. S. and Strandjord, P. E.: A more sensitive automated method for determination of ornithine carbamoyltransferase activity in human serum. *Clin. Chem.* (1975) 21 : 754.
15. Cornelius, C. E.: *Liver Function in Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 3rd ed. by Kaneko, J. J. Academic Press, New York. (1980) p. 237.

16. Corsi, G.C., Valentini, F. and Bertazzon, A.: Effect of subtoxic amounts of furan, acetylfuran and methylene chloride on some serum enzymes of rat. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* (1983) 59 : 1049.
17. Cysewski, S.J., Pier, A.C., Engstrom, G.W., Richard, J.L., Dougherty, R.W. and Thurston, J.R.: Clinical pathologic features of acute aflatoxidosis of swine. *Am. J. Vet. Res.* (1968) 29 : 1577.
18. Dickinson, J.O., Cooke, M.P., King, R.R. and Mohamed, P.A.: Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. *J. A. V. M. A.* (1976) 169 : 1192.
19. Dirksen, G.: Liver. in *Clinical Examination of Cattle*. 2nd ed. edited by Rosenberger, G., W. B. Saunders Co., Philadelphia. (1979) p. 242.
20. Faeder, E.J., Chaney, S.Q., King, L.C., Hinnchers, T.A., Bruce, R. and Faeder, B.A.: Biochemical and ultrastructural changes in livers of cadmium-treated rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1977) 39 : 473.
21. Ford, E.J.H. and Boyd, J.W.: Cellular damage and changes in biliary excretion in a liver lesion of cattle. *J. Pathol. Bacteriol.* (1962) 83 : 39.
22. Harvey, D.G. and Hoe, C.M.: The application of some liver function tests to sheep dosed with carbon tetrachloride and hexachlorophene. *Vet. Rec.* (1971) 88 : 562.
23. Healy, P.J.: Serum ornithine carbamyltransferase activity in sheep and cattle. *Clin. Chim. Acta*, (1968) 22 : 603.
24. Hewitt, W.R., Brown, E.M. and Plaa, G.L.: Acetone-induced potentiation of trihalomethane toxicity in male rats. *Toxicol. Lett.* (1983) 16 : 285.
25. Hewitt, W.R., Brown, E.M. and Plaa, G.L.: Relationship between the carbon skeleton length of ketonic solvents and potentiation of chloroform-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol. Lett.* (1983) 16 : 297.
26. Hewitt, W.R. and Plaa, G.L.: Dose-dependent modification of 1, 1-dichloroethylene toxicity by acetone. *Toxicol. Lett.* (1983) 16 : 145.
27. Hill, J.L. and Arnold, G.W.: The effect of lupinosis on the nutritional value of lupins to sheep. *Aust. J. Agric. Res.* (1975) 26 : 923.
28. Iijima, M. and Plaa, G.L.: A semiquantitative morphologic assessment of chlordcone potentiated chloroform hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* (1983) 17 : 307.
29. Joseph, R.L., Baldwin, E. and Watt, D.C.: Studies on carbamoyl phosphate-L-ornithine carbamoyltransferase from ox liver. *Biochem. J.* (1963) 87 : 409.
30. Kontinen, A.: Simple method for determination of ornithine transcarbamoylase activity in serum. *Clin. Chim. Acta*. (1967) 18 : 147.
31. Korsrud, G.O., Grice, H.G., Goodman, T.K., Knipfel, J.E. and McLaughlan, J.M.: Sensitivity of several serum enzymes for the detection of thioacetamide-, dimethylnitrosamine- and diethanolamine-induced liver damage in rats. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* (1973) 26 : 299.
32. Krebs, H.A., Eggleston, L.V. and Knivett, V.A.: Arsenolysis and phosphorolysis of citrulline in mammalian liver. *Biochem. J.* (1955) 59 : 185.
33. Lorentz, K. and Wrabetz: Bestimmung von ornithine carbamyl-transferase mittels Fearon-Reaktion. II Mitteilung: Enzymbestimmung. *Z. Klin. Chim. Biochem.* (1971) 9 : 220.
34. Marciniak, M. and Ba trukiewicz, Z.: Serum ornithine carbamoyltransferase(OCT) in rats poisoned with lanthanum, cerium and praseodymium. *Acta Physiol. Pol.* (1977) 28 : 589.
35. Marciniak, M. and Ba trukiewicz, Z.: Effect of various doses of cerium on the serum level of ornithine-carbamyltransferase in rats. *Acta Physiol. Pol.* (1981) 32 : 205.
36. Matsumori, H., Matsumoto, T. and Ishikawa, H.: Acute toxic effects of paraquat on ultrastructure of rat liver. *Acta Pathol. Jpn.* (1984) 34 : 507.
37. Moore, F.M.L.: A micromethod for the routine estimation of serum ornithine carbamoyltransferase activity. *Clin. Chim. Acta*, (1967) 15 : 103.
38. Moore, W.E.: Laboratory examination, in *Veterinary Gastroenterology*. 1st ed. edited by Anderson, N.V. Lea & Febiger. (1980) p. 44.
39. Ohtani, N.: Experimental and clinical studies on enzymes of mitochondria in various liver diseases

- with special reference to alcoholic liver disease, *Hokkaido Igaku Zasshi*, (1980) 55 : 67.
40. Pearson, E.G. and Craig, A.M.: The diagnosis of liver disease in equine and food animals. *Modern Vet. Parc.* (1980) : 315.
 41. Plaa, G.L., Hewitt, W.R., du Souich, P. and Lock, S.: Isopropanol and acetone potentiation of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: simple versus repetitive pretreatments in rats. *J. Toxicol.* (1982) 9 : 235.
 42. Reichard, H.: A new specific liver test. Determination of ornithine carbamyltransferase in human serum. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (1957) 9 : 103.
 43. Reichard, H.: Studies on ornithine carbamyl transferase activity in blood serum. Tryckeri Balder, A.B., Stockholm. (1962) p.3.
 44. Reichard, H. and Reichard, P.: Determination of ornithine carbamyltransferase in serum. *J. Lab. Clin. Med.* (1958) 52 : 709.
 45. Reifer, I. and Kleczkowski, K.: Enzymatische und nichtenzymatische citrulline synthese. *Z. Naturforsch.* (1960) 15 : 431.
 46. Sato, T., Tanaka, J., Kono, Y., Jones, R.T., Cowley, R.A. and Trump, B.F.: Hepatic cellular injury following lethal *Escherichia coli* bacteraemia in rats. *Lab. Invest.* (1982) 47 : 304.
 47. Schulman, A.: The influence of the halothane test on heart parameters, OCT-activity, acid-base balance and blood electrolytes in halothane-sensitive pigs and in pigs premedicated with a beta-blocker(propranolol). *Acta Vet. Scand.* (1982) 23 : 153.
 48. Shaw, F.D.: Sorbitol dehydrogenase in the diagnosis of liver disease of ruminants. *Aust. Vet. J.* (1974) 50 : 277.
 49. Snodgrass, P.J. and Parry, D.J.: The kinetics of serum ornithine carbamoyltransferase. *J. Lab. & Clin. Med.* (1969) 73 : 940.
 50. Sobocinski, P., Powanda, M.C., Canterbury, W. J., Machotka, S.V., Walker, R.I. and Snyder, S.: Role of zinc in the abatement of hepatocellular damage and mortality incidence in endotoxemic rats. *Infection and Immunity.* (1977) 15 : 950.
 51. Strandjord, P.E. and Clayson, K.J.: An automatic method for the determination of ornithine carbamoyl transferase activity. *J. Lab. & Clin. Med.* (1966) 67 : 154.
 52. Thurston, J.R., Baetz, A.L., Cheville, N.F. and Richard, J.L.: Acute aflatoxicosis in guinea pigs: sequential changes in serum proteins, complement, C4, and liver enzymes and histopathologic changes. *Am. J. Vet. Res.* (1980) 41 : 1272.
 53. Treacher, R.J. and Collis, K.A.: The effect of protein intake on the activities of liver specific enzymes in the plasma of dairy cows. *Res. in Vet. Sci.* (1977) 22 : 101.
 54. Vassef, A.A.: Direct micromethod for colorimetry of serum ornithine carbamoyl transferase activity, with use of a linear standard curve. *Clin. Chem.* (1978) 24 : 101.
 55. Werner, P.R. and Sleight, S.D.: Toxicosis in sows and their pigs caused by feeding rations containing polybrominated biphenyls to sows during pregnancy and lactation. *Am. J. Vet. Res.* (1981) 42 : 183.
 56. Wilkinson, J.H.: An Introduction to Diagnostic Enzymology. Edward Arnold, London. (1962) p.238.
 57. Wolf, P.L. and Williams, D.: Practical Clinical Enzymology: Techniques and Interpretation. John Wiley, New York, (1973) p.223.

A Study on Optimal Conditions for Serum Ornithine Carbamyltransferase Determination in Cattle

Chang-Woo Lee, DVM, MS, PhD.

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Abstract

The optimal conditions for the evaluation of serum ornithine carbamyltransferase activity, based on the determination of citrulline formed during the enzymatic reaction, were investigated and the serum ornithine carbamyltransferase activity of cattle were surveyed. Barbital-acetate buffer(70m moles/L, pH 7.0 at 37°C) were used for the entire experiment.

The results were as follows.

1. When the concentration of H_2SO_4 in color reagent exceeds 3.0 ml/100ml the serum protein precipitated and absorbance increased.
2. The concentrations of antipyrine and diacetylmonoxime required for maximal color formation were 1g/L and 5g/L, respectively.
3. The absorbance was maximal when the reaction mixture was boiled for 25 minutes.
4. The chromogen were stable for at least 60 minutes under room lighting condition, but decolorized rapidly under direct sunlight.
5. The minimal concentration of urease solution(Sigma Chemical Co., Type III) required for elimination of serum urea was 0.6mg/ml.
6. When the concentration of L-ornithine solution increased up to 22m moles/L, the ornithine carbamyltransferase activity was not inhibited by zwitterion of ornithine.
7. In accordance with the increase of carbamylphosphate concentration the ornithine carbamyltransferase activity increased and the nonenzymatic citrulline production also increased slightly.
8. The standard curve of citrulline revealed linear pattern within the range of this experiment (0.1~4.0m moles/L).
9. The ornithine carbamyltransferase activities of normal cattle investigated in this laboratory were $6.85 \pm 4.38U/L$ (mean \pm SD) in cows and $2.89 \pm 2.50U/L$ in bulls. The range of the activities were 0.39~29.12U/L in cows and 0.06~17.34U/L in bulls.