

인삼 단백질分劃에 대한 폴리아크릴아미드 電氣泳動

金 春 美·黃 貞 周

이화여자대학교 약학대학

(Received September 20, 1986)

Polyacrylamide Gel Electrophoresis on Ginseng Proteins

Choonmi Kim and Jung-Joo Hwang

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

Abstract—Korean ginseng was purified to obtain radioprotective protein fractions by buffer extraction, ammonium sulfate fractionation, CM-cellulose column chromatography, heat inactivation and Sephadex G-75 column chromatography. The final three fractions, GI, GII and GIII were subjected to Disc-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and SDS-PAGE. The molecular weights(M.W.) of native and denatured proteins were estimated by using regression line equations obtained from the mobilities of standard proteins. As the results, in Disc-PAGE, the GI fraction showed two protein bands with M.W. of above 213,000 and 55,000, GII showed one band with M.W. of 44,000 and GIII, also one band with M.W. of 19,000. In SDS-PAGE, GI fraction gave four subunit bands with M.W. of above 114,000, 27,000, 24,000 and 19,000, GII gave two bands with M.W. of 46,000 and 22,000, and GIII, one band of 19,000.

보혈 강장제로서의 인삼에 대한 매우 높은 기호성과 오랜 사용에도 불구하고 이의 유효성분을 규명하기 위한 연구는 그 역사가 길지 않으며 특히 단백질성에 대해서는 현재까지도 연구 보고된 바가 많지 않다.

1963년 Gstirner과 Braun¹⁾이 한국 백삼에서 glutamic acid, cysteine, tyrosine 등의 성분을 확인하였고 1966년 Gstirner와 Vogt²⁾는 한국 인삼을 methanol-H₂O(v/v)로 추출하여 paper-electrophoresis를 실시한 결과 5개의 ninhydrin양성분획을 얻은 바 있다. 그 후 Yonezawa^{3,4)} 등은 X-ray를 조사한 마우스에서 열에 안정한 인삼단백분획이 방사선 방어효과를 나타낼을 보고하였으며 Takeda 등^{5,6)}도 X-ray를 조사시킨 마우스, 흰 쥐 및 guinea pig에서 인삼단백분획에 의한 항방사선효과를 확인, 보고하였다. 1983년 Kim과 Lee⁷⁾는 인삼의 방사선 방어작용의 기전을 단백질의 금속 착화합물 형성능력으로 설명하였으며 Kim⁸⁾은 부분 정제한 인삼단백성분에 대해 SDS-polyacrylamide 전기영동을 시도한 바 있다. Kim

과 Han⁹⁾은 γ -ray를 조사한 마우스에서 인삼단백분획이 현저한 방어효과를 나타낼을 보고하였고 또 최근 Kim과 Kim¹⁰⁾은 HPLC에 의해 인삼단백성분을 분석하여 보고하였다.

본 연구에서는 방사선 방어작용을 나타내는 인삼단백성분의 순수 분리와 구조규명을 위한 연구의 일환으로 부분 정제한 단백질성에 대해 DISC-polyacrylamide 전기영동과 SDS-polyacrylamide 전기영동을 실시하여 각 단백질자의 구성상태와 분자량을 검토하고, 이미 발표된 결과와 비교, 분석하고자 한다.

실 험 방 법

시료 및 시약—인삼단백질의 분리, 정제를 위해서는 강화산 6년근 백삼을 사용하였다. High molecular weight(HMW) calibration kit는 Pharmacia Fine Chemicals 제품이었고, bovine serum albumin(BSA), CM-cellulose, Sephadex G-75, blue dextran, acrylamide (for electrophoresis),

N,N'-methylene bisacrylamide, N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine(TEMED)과 Coomassie brilliant blue R은 Sigma Co. 제품이였다. Folin-C-phenol reagent, bromphenol blue, methyl green과 TLC plates(silica gel 60)은 Merck Co. 제품, β -alanine과 riboflavin은 BDH Chemicals Ltd. 제품, dialysis membrane은 Fisher Scientific Co. 제품, 그리고 ammonium persulfate, sodium dodecyl sulfate(SDS), β -mercaptoethanol, glycerin 및 그의 사용된 모든 시약은 일제 특급시약이였다.

인삼단백질의 분리, 정제—인삼단백질의 분리 정제는 Kim^{9,11} 등의 방법을 적용하여 시행하였으며 Kim⁸의 방법과 비교할 때 CM-cellulose 칼람 크로마토그래피만이 추가, 시행되었으며, 그 방법은 다음과 같다. 즉 70% ammonium sulfate 분별침전에서 얻은 농축액을 0.02M KH_2PO_4 로 평형시킨 CM-cellulose 칼람(2.5×25cm)에 주입하고 0.02M KH_2PO_4 로 void volume(CM-A)을 유출시킨 다음, 0.05M-phosphate buffer(pH 7.4)를 사용하여 gel에 결합되었던 양이온성 물질을 유출시켰다(CM-B). 두 분획중 동물실험에서 방사선 방어작용을 나타낸 CM-B분획⁴을 취하여 heat inactivation과 Sephadex G-75 칼람 크로마토그래피를 시행하여 세 분획 GI, GII 및 GIII를 얻었다.

Disc-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)—염기성 단백질에 대한 Reisfeld¹²와 Pharmacia Fine Chemicals의 instruction booklet¹³의 방법에 준하여, 7.5% acrylamide gel을 사용하여 실시하였다. 표준단백질(HMW calibration kit)과 세 인삼분획은 전기영동용 완충액(pH 4.5)에 녹여 사용하였다.

전기영동용 유리관(10×0.6cm I.D.)에 separating gel 용액(7.5% acrylamide, pH 4.3)을 가하고 중합시킨 후 그 상단에 stacking gel 용액(2.5% acrylamide, pH 6.8) 소량을 첨가하고 다시 중합시켰다. 여기에 표준단백질용액(50 μg protein) 또는 세 인삼분획용액(각 100 μg protein)과 표지염색제(1% methyl green, 2 μl) 및 glycerin 1적을 함유하는 stacking gel용액을 가하고

중합시킨 후 gel당 2mA로 전기영동을 시작하였다. 약 30분 후 검체가 separating gel로 들어간 다음 gel당 6mA로 current를 바꾸어 표지염색제가 유리관 하단에 이를때까지 전개시켰다. 표지염색제의 이동거리와 gel의 길이를 측정 한 후, 12.5% TCA용액에서 단백질을 고정시키고 Coomassie brilliant blue R 용액으로 염색하였다. 다음 methanolacetic acid에 넣어 탈색시키고 다시 gel의 길이와 표준단백질 및 세 인삼분획의 이동거리를 측정하여 이동도(R_m)를 계산하였다.⁸ 표준단백질의 이동도로부터 least squares method에 의해 얻은 regression line equation에 준하여 각 인삼단백질의 분자량을 계산하였다.

SDS-PAGE—Weber와 Osborn¹⁴과 Pharmacia Fine Chemicals의 instruction booklet¹³의 방법을 병용하여 10% acrylamide gel을 사용하여 실시하였다. 표준단백질(HMW calibration kit)과 인삼분획은 2.5% SDS와 5% β -mercaptoethanol을 함유하는 0.01M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시키고 100°C에서 5~10분간 가열하여 사용하였다. 전기영동용 유리관의 gel상단에 표준단백질용액(100 μg protein) 또는 세 인삼분획(각 200 μg protein)과 표지염색제(0.05% bromphenol blue, 3 μl) 및 glycerin 1적을 혼합한 용액을 주입하고 gel당 8mA로 전기영동을 실시하였다. 표지염색제가 gel길이의 $\frac{3}{4}$ 정도 이동할 때까지 전개시킨 후 Disc-PAGE와 같은 방법으로 이동도를 계산하고 분자량을 추정하였다

실 험 결 과

인삼단백질의 분리·정제—이 과정에서 실시한 CM-cellulose 칼람 크로마토그래피는 Fig. 1과 같은 두개의 피크를 나타내었다. 이 중 CM-B는 Lieberman-Burchard 반응에 음성으로 saponin을 함유하지 않으며, Biuret test에 양성이고 UV 276nm에서 최대 흡광도를 나타내는 단백질물질이었다. 이 분획을 농축하여 Sephadex G-75 칼람 크로마토그래피를 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. 여기서 얻은 세 분획을 GI, GII 및 GIII라 하였다.

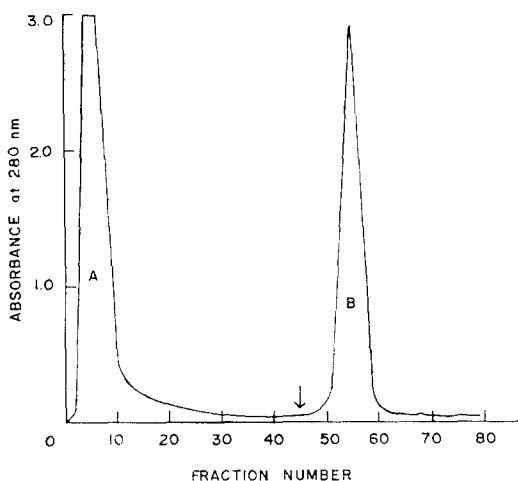


Fig. 1—CM-cellulose column chromatography of ginseng extract. The column (2.5×23cm) was eluted with 0.02M KH₂PO₄ and from the point of arrow, with 0.05M phosphate buffer (pH 7.4). The fractions of 20ml were collected at a flow rate of 170ml/hr.

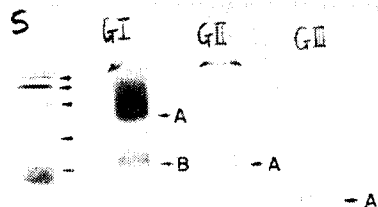


Fig. 2—Sephadex G-75 column chromatography of CM-B fraction. The column (2.5×35cm) was eluted with 0.05M phosphate buffer (pH 7.2) and the fractions of 5ml were collected at a flow rate of 15ml/hr.

Disc-PAGE—표준단백질과 세 인삼분획에 대해 Disc-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 3과 같다. GI분획은 2개의 band(GI-A 및 B)를 나타내었으며 그 중 하나(A)는 매우 강하고 넓은 band로 나타났고, GII 및 GIII분획은 각각 1개의 band(GII-A 및 GIII-A)를 나타내었다. 표준단백질의 이동도로부터 $Y = -3.090X + 5.856$ (Y: 분자

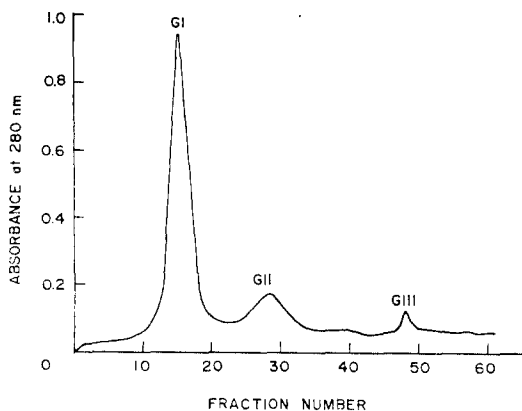


Fig. 3—Disc-polyacrylamide gel electrophoresis on Sephadex G-75 fractions. Standard proteins were Thyroglobulin, Ferritin, Catalase, Lactate dehydrogenase and Albumin, from top to bottom. Electrophoresis was carried out with 7.5% acrylamide gel at the current of 2mA per gel until dye front had migrated into the separating gel, and then at the current of 6 mA per gel until tracking dye reached the bottom of the gel.

량의 log값, X: 이동도)의 regression line equation을 얻었으며 이에 준하여 각 인삼분획이 나타낸 단백질 band의 이동도로부터 분자량을 계산하였다. 그 결과는 Table I과 같다. 즉 전기영동결과 각 분획에 존재하는 단백질의 분자량은 GI: 213,000이상 (A)과 55,000(B), GII: 44,000(A), GIII: 19,000(A)이었다.

SDS-PAGE—표준단백질과 세 인삼분획에

Table I—Molecular weights of ginseng proteins from Sephadex G-75 fraction by Disc-PAGE.

	Proteins	Rm value	M.W. of proteins
Standard proteins	Thyroglobulin	0.023	669,000
	Ferritin	0.061	440,000
	Catalase	0.146	232,000
	Lactate dehydrogenase	0.231	140,000
	Albumin	0.340	67,000
Sephadex fractions	GI-A	0.171	213,000
	GI-B	0.361	55,000
	GII-A	0.391	44,000
	GIII-A	0.511	19,000

SDS를 처리한 후 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. GI분획은 4개 (GI-a, b, c 및 d), GII는 2개 (GII-a 및 b) 그리고 GIII는 1개 (GIII-a)의 band를 나타내었다. 표준단백질의 이동도로부터 $Y = -1.324X + 5.085$ 의 equation을 얻었으며 이에 의해 각 인삼분획에 존재하는 subunit polypeptide의 분자량을 계산하였다. 그 결과는 Table II와 같다. 즉 SDS-PAGE의 결과 각 분획에 존재하는 단백질 subunit의 분자량은 GI:

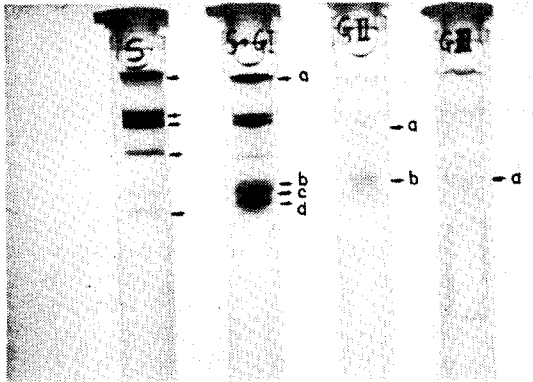


Fig. 4—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis on Sephadex G-75 fractions. Standard proteins were Thyroglobulin, Albumin, Catalase, Lactate dehydrogenase and Ferritin, from top to bottom. Electrophoresis was carried out with 10% acrylamide gel at the current of 8mA per gel.

Table II—Molecular weights of protein subunits from Sephadex G-75 fractions by SDS-PAGE.

	Proteins	Rm value	M.W. of subunits
Standard proteins	Thyroglobulin	0.028	330,000
	Albumin	0.202	67,000
	Catalase	0.242	60,000
	Lactate dehydrogenase	0.370	36,000
	Ferritin	0.631	18,500
Sephadex fractions	GI-a	0.021	114,000
	GI-b	0.499	27,000
	GI-c	0.536	24,000
	GI-d	0.606	19,000
	GII-a	0.322	46,000
	GII-b	0.556	22,000
	GIII-a	0.612	19,000

114,000이상 (a), 27,000 (b), 24,000 (c), 및 19,000 (d), GII: 46,000 (a)과 22,000 (b), GIII: 19,000(a)이었다.

고 찰

일반적으로 발암물질은 단백질과 포함될 때 암을 발생시키지 않는다¹⁵⁾고 믿어져 왔다. 이러한 시점에서 인삼추출물 공존시 X-ray조사로 발생하는 배양세포의 변형이 감소되며 세포밀도가 증가한다는 보고¹⁶⁾ 및 Yonezawa^{3,4)} 등과 Takeda^{5,6)} 등에 의한 인삼단백질의 항방사선작용에 대한 보고는 중요한 의미를 가진다. 따라서 방사선에 의한 손상을 감소 또는 회복시켜주는 성분의 발견은 암환자의 방사선치료시, 그 부작용을 감소시킬 수 있는 약물의 개발이라는 의미에서 뿐 아니라 오늘날의 다양한 방사선源으로부터 암의 발생을 예방할 수 있는 가능성을 제시하기도 한다.

본 연구에서 다섯단계의 분리, 정제과정을 거쳐 얻은 세 분획중 두 분획(GI과 GII)이 방사선 방어작용을 나타내며⁹⁾, Disc-PAGE의 결과 GI은 2개 그리고 GIII는 1개의 단백질을 함유하는 것으로 나타나고 있다. 그러나 GI-A band는 매우 넓고 강하기 때문에 한개의 단백질로만 구성되어 있는지 확실치 않으며, TLC¹⁰⁾에서는 GI이 3개의 점으로, HPLC¹⁰⁾에서는 2개의 피크로 나타났으므로 이 넓은 band가 2개의 매우 비슷한 성질을 가진 단백질로 구성되어 있을 가능성도 있다. SDS-PAGE의 결과 GI분획은 4개의 subunit band를 나타내고 있으며 GIII 성분은 monomer임을 알 수 있었다. GI에서 나타난 4개의 subunit은 2개의 단백질이 SDS에 의해 변성되어 나타난 것이나 각 band가 GI-A와 B의 어느 것으로부터 유래되었는지를 확인하기는 어렵다. 그러나 주시할 점은 GIII의 monomer와 같은 분자량(19,000)을 가진 subunit(GI-d)이 존재한다는 점이다. 즉 GI과 GIII가 나타내는 방사선 방어작용의 원인물질이 분자량 19,000의 같은 분자로, GIII에서 나타난 분자는 GI의 큰분자(GI-A)가 정제과정에서 일부 분해되어 나타난 것일

수도 있다는 점이다. 이 점은 SDS-HPLC¹⁰⁾에서 큰 A 피이크가 분해되어 작은 a 피이크를 남기고 분자량 19,000의 새로운 c 피이크를 만드는 것으로 설명된다. 방사선 방어작용을 나타내지 않는 GII분획에 존재하는 단백질은 dimer로 추측되며, SDS처리 후 나타난 GII-a band는 일부 분해되지 않은 native분자가 나타난 것으로 보이고 GII-b는 반으로 분해된 subunit이나 타난 것으로 생각되나, 분자량 19,000의 단백질은 존재하지 않는다.

단일성분을 함유하는 것으로 나타난 GIII분획이 정제과정에서 극소량이 회수되며 인삼에 따라서는 이 분획이 전혀 나타나지 않는 경우도 있어 이 성분에 대한 다음 단계의 연구에 많은 어려움이 있다. 따라서 단백질 함량이 많은 GI 분획의 분리가 현재 시도되고 있으며, 산지¹⁷⁾, 채취시기¹⁸⁾ 또는 종의 차이¹⁹⁾ 의해 인삼의 함유성분 및 함량이 달라진다는 문헌적 고찰을 근거로 GIII성분의 함량이 많은 인삼을 발견해야 하는 과제를 안고 있다.

결 론

방사선 방어작용이 있는 인삼단백분획을 Disc-PAGE와 SDS-PAGE로 분석한 결과 GI분획은 2개의 단백질분자가 4개의 subunit으로 구성되어 있고 GII는 1개의 단백질분자가 2개의 subunit으로 구성된 dimer임이 밝혀졌으며, GIII는 1개의 단백질분자가 monomer로 존재함을 알 수 있었다. 이 중 방어작용을 나타내는 두 분획 GI과 GIII가 분자량 19,000의 분자를 공통으로 갖고 있음이 밝혀져 이들 분자가 방어작용의 원인분자일 수도 있다고 생각되었다.

문 헌

- 1) Estirner, F. and Braun, W.: *Arch. Pharm.*, **296**(6), 384-389 (1963).
- 2) Gstirner, F. and Vogt, H.J.: *Arch. Pharm.*, **299**(11), 936-944 (1966).
- 3) Yonezawa, M., Takeda, A. and Katoh, N.: *Proc. 3rd Inter. Ginseng Symp.*, pp.17-20 (1980)
- 4) Yonezawa, M., Takeda, A. and Katoh, N.: *J. Radiat. Res.*, **22**, 336-343 (1981).
- 5) Takeda, A., Yonezawa, M. and Katoh, N.: *J. Radiat. Res.*, **22**, 323-335 (1981).
- 6) Takeda, A., Katoh, N. and Yonezawa, M.: *J. Radat. Res.*, **23**, 150-167 (1982).
- 7) Kim, C. and Lee, S.J.: *J. Kor. Res. Inst. Better Liv.*, **31**, 167-172 (1983)
- 8) Kim, C.: *Yakhak Hoeji* **27**(4), 315-320 (1980)
- 9) Kim, C. and Han, G.S.: *Yakhak Hoeji* **29**(5), 246-252 (1985).
- 10) Kim, C. and Kim, H.L.: *Arch. Pharm. Res.*, **9**(1), 5-9 (1986).
- 11) Kim, C. Hwang, J.J. and Kim, H.L.: *J. Kor. Res. Inst. Better Liv.*, **34**, 117-123 (1984).
- 12) Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Williams, D.E.: *Nature*, **195**, 281-283 (1962).
- 13) Polyacrylamide Gel Electrophoresis: *laboratory techniques*, Pharmacia Fine Chemicals (1983).
- 14) Weber, K. and Osborn, M.: *J. Biol. Chem.*, **244**(16), 4406-4412 (1969).
- 15) Greenstein, J.P.: *Biochemistry of Cancer*, 2nd Ed., pp.117-120 (1954).
- 16) Bae, H.W.: *Korean Ginseng*, 2nd Ed., pp.114-115 (1978).
- 17) Gstirner, F. and Vogt, H.J.: *Arch. Pharm.*, **300**(4), 371-384 (1967).
- 18) Hwang, J.K. and Yang, H.C.: *Insam Munhun Teukjip*, **5**, 91-122 (1974).
- 19) Hwang, J.K. and Yang, H.C.: *Insam Munhun Teukjip*, **5**, 123-133 (1974).