

혈청단백질의 우무겔전기영동에 리용하는 린산완충액의 농도와 pH

심명수, 박성일, 림진

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《경제발전에서 전략적의의를 가지는 원료와 연료를 국내자원으로 보장하는 생산기술 공정을 확립하며 첨단설비를 비롯하여 절실히 요구되는 기술수단들을 우리의 실정에 맞게 자체로 생산보장하여야 합니다.》

혈청단백질조성을 분석하는 전기영동에서는 pH 8.6이 합리적인 pH로 알려져있으며 pK_a 8.0인 베로날(바르비탈)과 메디날(바르탈나트륨)로 만든 pH 8.6 베로날완충액을 리용하고 있다.[3]

우리는 이미 pH 8.6, 70mmol/L 베로날완충액대신 50mmol/L Na_2HPO_4 용액(pH 9.1)을 리용하여도 혈청의 알부민과 α_1 -글로불린, α_2 -글로불린, β -글로불린, γ -글로불린분획들이 원만히 분리되며 분석결과의 정밀성과 정확성이 보장된다는것을 확인[1-3]한데 기초하여 혈청단백질조성을 분석하는 우무겔전기영동에서 리용하는 린산완충액의 최적농도와 pH를 조사하였다.

재료와 방법

린산완충액은 전문기관에서 생산된 분석순(국규 1258-59)의 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 와 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 를 증류수에 풀어 만들었다. 이때 200mmol/L 용액들을 각각 풀고 pH별로 표 1과 같이 혼합한 다음 필요에 따라 증류수로 희석하여 그날로 사용하였다.

전기영동은 린산완충액과 비늘형정제우무로 만든 1% 우무겔[3] (90mm×60mm×1mm)을 담체로, 린산완충액을 영동완충액으로, 면천을 겔-영동완충액연결재료로 각각 사용

표 1. pH에 따르는 200mmol/L 린산완충액만들기

| pH | 8.2 | 8.6 | 9.0 |
|---|-------|-------|-------|
| 200mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 용액/mL | 2.45 | 0.46 | 0.05 |
| 200mmol/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 용액/mL | 97.55 | 99.54 | 99.95 |

하고 24mA의 전류세기에서 40~100min동안 진행하였다.(그림 1)

전기영동이 끝난 즉시 우무겔을 고정 및 염색[3]한 다음 수도물로 40~45min동안 탈색[3]하였다. 컴퓨터에 겔화상을 입력하고 그 화상에 대한 처리와 분석으로 덴시토그램을 작성하였으며 분획별상대이동도(R_f)를 결정하였다.[1-3]

실험에서는 전문병원의 생화학검사실에서 수집한 입원환자들의 림상혈청을 채혈한 때로부터 3~4h만에 전기영동시료로 사용하였다.

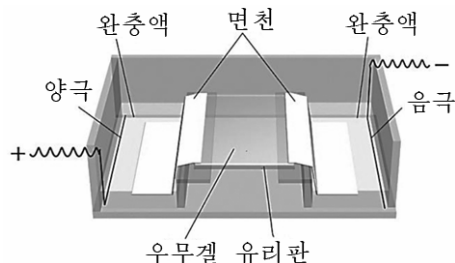


그림 1. 우무겔전기영동계의 구조

결과 및 논의

1) 린산완충액의 농도가 전기영동결과에 미치는 영향

pH 8.6인 린산완충액의 농도를 10, 25, 50, 100mmol/L로 높이면서 진행한 혈청단백질의 우무겔전기영동결과는 그림 2, 표 2와 같다.

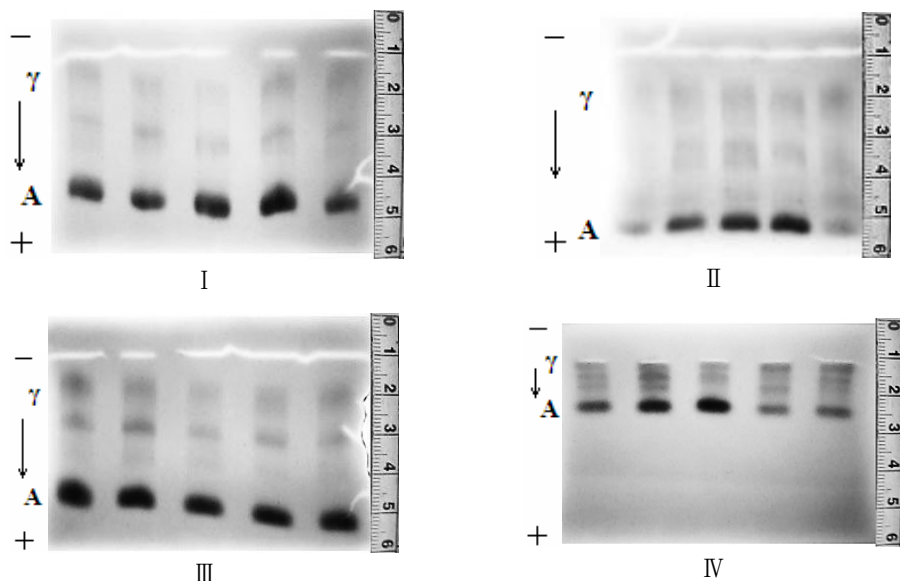


그림 2. 혈청단백질의 우무겔전기영동에서 pH 8.6인 린산완충액의 농도변화에 따라 주어진 혈청단백질의 우무겔전기영동상들
린산완충액의 농도 (mmol/L) 를 I에서는 10, II에서는 25, III에서는 50, IV에서는 100으로 하였음, + 양극, - 음극, ↓ 영동방향, A는 알부민, γ 는 γ -글로불린, 눈금자척도 cm

표 2. 린산완충액(pH 8.6)의 농도에 따르는 우무겔전기영동결과

| 조사지표 | 완충액 농도/(mmol·L ⁻¹) | | | |
|------------------------------|--------------------------------|------|------|-------|
| | 10 | 25 | 50 | 100 |
| 전극사이전압($U_{\text{총}}$)/V | 161 | 120 | 67 | 43 |
| 영동시간/min | 40 | 50 | 85 | 100 |
| 평균영동거리/mm | A | 36.4 | 42.0 | 37.8 |
| | γ | 6.0 | 10.0 | 7.4 |
| 영동속도/(mm·min ⁻¹) | A | 0.91 | 0.84 | 10.45 |
| | γ | 0.15 | 0.20 | 0.09 |

A는 알부민, γ 는 γ -글로불린

표 2에서 pH 8.6인 린산완충액의 농도(C)가 높아질 때 전극사이전압($U_{\text{총}}$)은 로그함수 $U_{\text{총}} = -53.44 \ln C + 285.31$ ($R^2 = 0.9826$)에 따라 낮아졌으나 영동완충액과 먼천에 걸리는 전압의 변화는 인정되지 않았다.(그림 3)

전기영동계(그림 1)의 매 요소들은 직렬회로를 이루고있으므로 pH 8.6인 린산완충액의 농도가 높아질 때 $U_{\text{총}}$ 의 변화로부터 우무겔에 걸리는 전압도 로그함수형태로 감소된다는 것을 알 수 있다.

표 2에서 pH 8.6인 린산완충액의 농도(C)가 높아질 때 알부민과 γ -글로불린의 전기영동 속도(v_A 와 v_γ)는 각각 지수함수 $v_A = 1.304e^{-0.023C}$ ($R^2 = 0.984$)과 $v_\gamma = 0.328e^{-0.033C}$ ($R^2 = 0.917$)의 형태로 감소하였다.(그림 4)

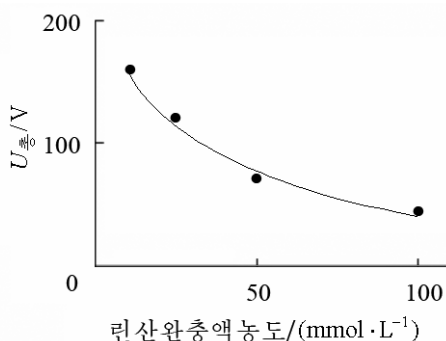


그림 3. 혈청단백질의 우무겔전기영동에서 pH 8.6인 린산완충액의 농도변화에 따른 전극사이전압($U_{\text{전}}$)변화

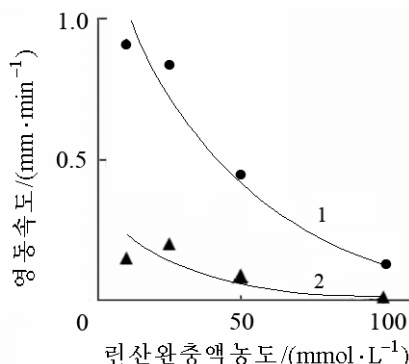


그림 4. 혈청단백질의 우무겔전기영동에서 pH 8.6인 린산완충액의 농도변화에 따른 알부민(1)과 γ -글로불린(2)의 전기영동속도변화

pH 8.6, 70mmol/L 베로날완충액을 리용하는 우무겔전기영동법으로 혈청단백질조성을 분석하는 린상검사에서 합리적인 전기영동시간과 분리구역(전기영동속도가 가장 빠른 알부민분획의 앞경계로부터 가장 느린 γ -글로불린분획의 뒤경계까지의 거리)은 각각 90min과 30~35mm이다.[3] 이 경험에 따라 전기영동 90min만에 주어지는 분리구역을 표 2의 v_A 와 v_γ 값들에 근거하여 추정 한 결과는 표 3과 같다.

표 3. 우무겔전기영동*을 90min동안 진행하였을 때 분리구역의 추정결과

| pH 8.6인 린산완충액농도 (mmol·L ⁻¹) | | 10 | 25 | 50 | 100 |
|--|----------|------|------|------|------|
| 이동거리**/mm | A | 81.9 | 75.6 | 40.0 | 11.7 |
| | γ | 13.5 | 18.0 | 7.8 | 0.9 |
| 분리구역/mm | | 68.4 | 57.6 | 32.2 | 10.8 |

* 1% 우무겔(90mm×60mm×1mm)과 두겹면천을 리용, 전류는 24mA로 유지, ** 표 2의 영동속도에 90min을 곱한 값, A는 알부민, γ 는 γ -글로불린

표 3에서도 pH 8.6인 린산완충액의 농도(C)가 높아질 때 알부민과 γ -글로불린분획의 이동거리들(L_A 와 L_γ)과 분리구역($D_{A\gamma}$)은 각각 지수함수 $L_A = 117.73e^{-0.023C}$ ($R^2 = 0.983$)와 $L_\gamma = 29.71e^{-0.033C}$ ($R^2 = 0.913$), $D_{A\gamma} = 90.79e^{-0.021C}$ ($R^2 = 0.994$)의 형태로 감소하였다.(그림 5) 우리가 리용한 우무겔에서 영동방향의 길이는 60mm이고 겔모서리로부터 3~5mm 되는 곳까지 면천이 설치되어있으며 약 15mm 되는 곳에 시료가 적재되므로 알부민분획의 이동거리는 약 40mm로 제한된다. 이에 따라 그림 5를 확대하면 분리구역이 30mm이상으로 주어지는 pH 8.6인 린산완충액의 농도는 52.5mmol/L이하였고 알부민분획의 이동거리가 40mm 이하로 주어지는 pH 8.6인 린산완충액의 농도는 47.8mmol/L이상이었다.(그림 6) 결국 pH 8.6

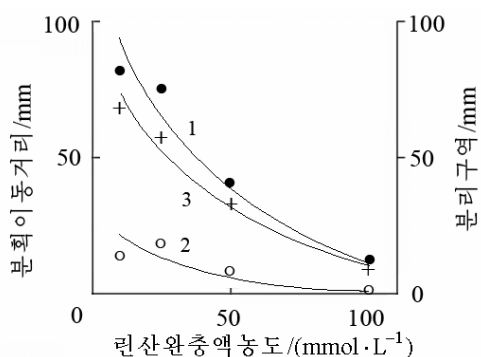


그림 5. 혈청단백질의 우무겔전기영동에서 pH 8.6인 린산완충액의 농도변화에 따르는 알부민(1)과 γ -글로불린(2)분획의 이동거리 및 분리구역(3)변화

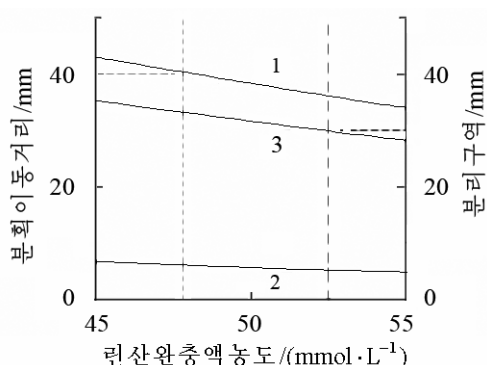


그림 6. 혈청단백질의 우무겔전기영동에 합리적인 pH 8.6인 린산완충액의 농도관정
1, 2는 알부민과 γ -글로불린의 이동거리변화, 3은 분리구역변화

인 린산완충액의 농도가 47.8~52.5mmol/L일 때 90min만에 30~33mm의 분리구역이 주어졌다. 우리는 혈청단백질조성을 분석하는 우무겔전기영동에서 pH 8.6인 린산완충액의 최적농도로 47.8~52.5mmol/L의 중간에 가깝고 시약조제에도 편리한 50mmol/L를 선택하였다.

2) 린산완충액의 pH가 전기영동결과에 미치는 영향

pH 8.6인 린산완충액의 최적농도가 결정된 조건에서 pH가 각각 8.2, 8.6, 9.0인 50mmol/L 린산완충액들을 리용한 혈청단백질의 우무겔전기영동상들과 덴시토그램들은 그림 7과 같다.

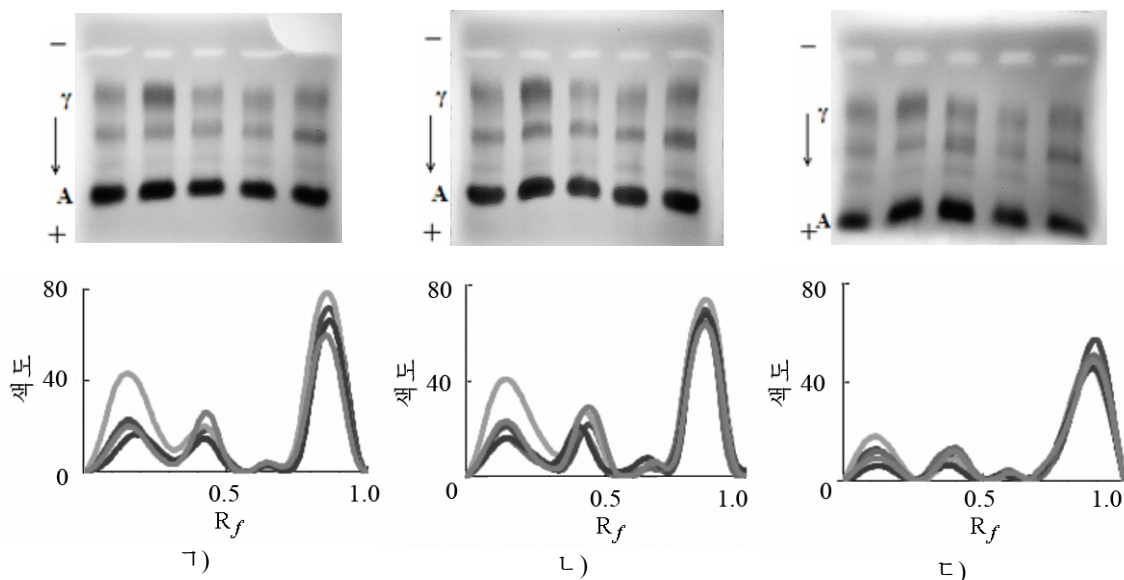


그림 7. 50mmol/L 린산완충액의 pH변화에 따라 주어진 혈청단백질의 우무겔전기영동상과 덴시토그램

㉠-㉡)는 pH가 각각 8.2, 8.6, 9.0인 경우

그림 7에서 린산완충액의 pH가 8.6으로부터 ± 0.4 만큼 변화될 때 알부민과 α_2 -글로불린, β -글로불린, γ -글로불린분획들의 R_f 값은 모두 0.2~0.6범위에서 변화되었으며 유의한 차이가 없었다.(그림 8) α_1 -글로불린분획은 전기영동상이나 덴시토그램에서 몹시 희

미하게 나타났으므로 그것의 R_f 값은 논의하지 않았다.

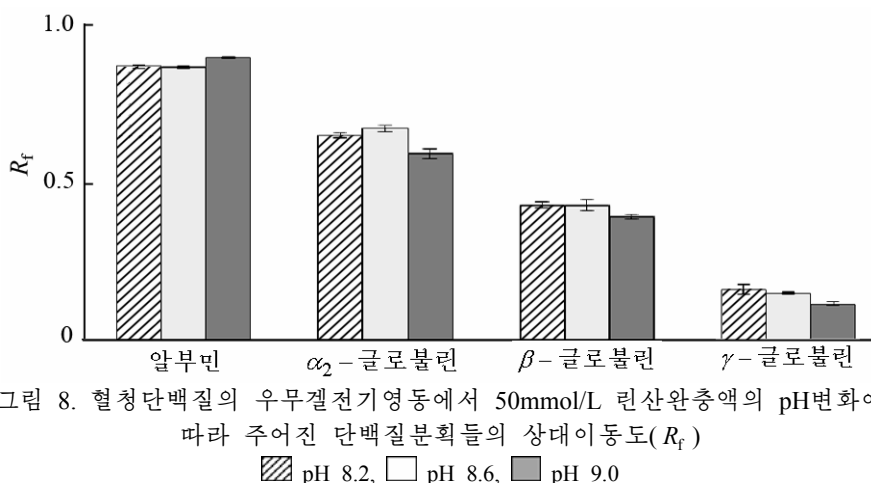


그림 8. 혈청단백질의 우무겔전기영동에서 50mmol/L 린산완충액의 pH변화에 따라 주어진 단백질분획들의 상대이동도(R_f)

▨ pH 8.2, □ pH 8.6, ■ pH 9.0

이로부터 우리는 혈청단백질조성분석을 위한 우무겔전기영동에서 린산완충액의 pH가 8.6 ± 0.4 범위내에서 변동되도록 하는것이 좋다고 보았다.

맺는 말

혈청단백질조성을 분석하는 우무겔전기영동에 리용하는 린산완충액의 최적농도는 50mmol/L이다. 린산완충액의 pH가 8.6으로부터 ± 0.4 정도 변화되어도 혈청단백질분획들의 R_f 값에서는 유의한 차이가 없다.

참고 문헌

- [1] 박성일 등; 내과, 2, 20, 주체108(2019).
- [2] 박성일 등; 기초의학, 2, 13, 주체108(2019).
- [3] 보건기규 667:2018 《전기영동기》, 주체107(2018).
- [4] 전은애 등; 림상실험검사 표준조작지도서, 과학백과사전출판사, 84~85, 주체106(2017).

주체109(2020)년 4월 5일 원고접수

The Concentration and pH of Phosphate Buffer Solution Using in Agar Gel Electrophoresis for Serum Protein Composition Analysis

Sim Myong Su, Pak Song Il and Rim Jin

The optimal concentration of phosphate buffer solution using in agar gel electrophoresis for serum protein composition analysis is 50mmol/L. Even though the pH of phosphate buffer solution varies as much as ± 0.4 from 8.6, there is not a significant change in the values of relative migration mobility(R_f) in serum protein fractions.

Keywords: serum protein composition, agar gel electrophoresis, phosphate buffer