

모세관 전기이동을 이용한
 δ -Aminolevulinic acid와 Porphobilinogen의 분리

김진남¹, 윤종선², 류화원¹

전남대학교 생물화학공학과¹, 공업화학공학과²

전화 (062) 530-1842, FAX (062) 530-1849

E-mail : hwryu@chonnam.ac.kr

Abstract

In this study, δ -aminolevulinic acid, porphobilinogen, glycine and levulinic acid were successfully separated by capillary electrophoresis(CE). We established the separative conditions of the mixture containing four components by CE. The borate buffered solution was used for CE electrolyte, and its pH was adjusted to 9.25~9.42. Under constant current or constant voltage, higher concentration of borate produced better resolution of four components, but adversely affected migration rates, resulting in longer analysis time. While migration time was faster with increase in applied voltage, but adversely affected resolution. Each component was separated well in borate buffer of 30mM at the applied voltage of 20kV.

서론

최근 모세관 전기이동(capillary electrophoresis ; CE)을 이용한 분석기술이 획기적으로 발전되고 있다. CE의 가장 큰 잇점 중 하나는 그 적용 범위가 넓다는 점이다. 초기에는 주로 생물거대분자의 분석에 이용되었지만 이제는 아미노산, 키랄 약품, 비타민, 살충제, 무기이온, 유기산, 염료, 계면활성제, 펩타이드와 단백질, 탄수화물, 올리고 뉴클레오타이드와 DNA, 심지어는 세포와 바이러스 입자 등과 같은 화합물의 분리에도 유용하게 이용될 수 있음이 입증되었다. CE에서의 분리 메커니즘은 크로마토그래피에서의 분리 메커니즘과는 다르므로 상호 보완적인 분석이 가능하다. 또한 CE는 크로마토그래피보다 간단하고, 다른 분석 방법에 비해 시료의 양이 극히 적은 nl 단위로 분석 시간이 매우 짧으며 분리가 잘 되고 재현성이 뛰어나다는 장점을 갖고 있다. 또한 여러 가지 모드를 적용할 수 있어 다양한 분야의 분석에 응용할 수 있다[1].

δ -Aminolevulinic acid(ALA)는 탄소 5개의 아미노산으로 tetrapyrrole 생합성을 중개

하는 물질이며 농작물이나 사람 혹은 다른 동물들에게는 피해를 주지 않고 잡초들만 선택적으로 죽이는 생분해성 제초제/살충제로 연구되고 있다[2]. 그러나 ALA는 그 특성상 빛에 매우 민감할 뿐만 아니라 ALA dehydratase에 의해 porphobilinogen(PBG)으로 신속히 전환되기 때문에 빠른 분석 방법이 요구되고 있다. 현재 많이 사용되고 있는 ALA와 PBG 분석 방법은 1954년에 발표된 Mauzerall & Granick의 방법이 사용되고 있다[3]. 이는 절차상 매우 번거로우며 ALA, PBG를 각각 따로 분석해야 하므로 시간이 많이 소요되고 있다. 또한 ALA의 전구체인 glycine은 아미노산 분석기, HPLC, FPLC 등을 이용하여 분석하고 있으며, ALA dehydratase의 저해물질인 levulinic acid(LA)는 gas chromatography를 이용하여 분석하고 있다. 따라서 본 연구에서는 이러한 번거로움을 해결하기 위해 CE를 이용하여 ALA, PBG, glycine, LA를 동시에 분석할 수 있는 조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용한 표준시료액은 glycine(Yakuri Chemicals Co.) 10mM, PBG(Sigma Co.) 0.25mM, ALA(Sigma Co.) 2mM, LA(Fluka Co.) 2mM로 제조한 후 냉장 보관하여 사용하였다. 완충액은 sodium tetraborate(Yakuri Chemicals Co.)를 각 농도별로 제조한 후 여과하여 사용하였으며 완충액의 pH는 농도에 상관없이 9.25~9.42 범위였다. 분석은 UV detector가 장착된 Model 3850 Capillary Electropherograph(ISCO, Inc.)를 사용하였으며, 모세관 칼럼은 ISCO, Inc.의 용융 실리카 모세관(75 μ m ID \times 75cm)을 사용하여 UV 205nm에서 실험하였다.

결과 및 고찰

전압 20kV, 전류 45 μ A로 설정하여 CE의 전압과 전류에 미치는 완충액 농도의 영향을 조사하였다. 완충액 농도가 15mM 이하일 경우 전압은 분석종료시간까지 20kV를 유지하였으나, 완충액 농도가 증가함에 따라 전압이 점차 감소하였으며 45mM 이상에서는 거의 전압이 걸리지 않았다. 이는 완충액 농도가 증가할수록 저항이 감소하여 설정한 20kV를 유지하기 위해서는 더 많은 전류를 필요로 하기 때문인 것으로 사료된다(Fig.1). 전압 20kV, 전류 45 μ A로 설정한 조건에서 완충액 농도에 따른 각 성분들의 해상력과 이동시간을 조사하였다. 완충액 농도가 5mM에서는 PBG와 ALA의 분리가 되지 않았으나 완충액 농도가 점차 증가할수록 잘 분리된 반면에 이동시간이 증가 하였다. 이는 분석 중에 전압이 점차 감소한 결과라 사료된다. 30mM 이상의 완충액에서는 각 시료들의 피크가 넓어지는 현상이 나타나는 것으로 보아서 일정전류조건하에서는 완충액 농도가 25mM이 최적임을 확인했다(Fig.2).

Fig.3은 일정전압조건에서 각 완충액 농도에 따른 시료들의 이동시간을 나타낸 것이다. 이때 설정한 전압은 20kV, 전류는 분석종료시까지 20kV를 계속 유지할 수 있도록 충분히 높게 설정하였다. 15mM 이하의 완충액에서는 ALA와 PBG가 분리되지 않았고, 35mM 이상의 완충액에서는 잘 분리가 되었으나 glycine의 피크가 점점 높아진 반면에 PBG, ALA, LA의 피크가 다소 낮아지는 경향을 보였으며 이동시간의 증가와 함께 기준선도 일정하지 않는 것으로 보아 일정전압의 경우 완충액 농도가 30mM일 때 최적임을 확인했다. Fig.4는 전압에 따른 시료들의 이동시간을 나타낸 것이다. 10kV 전압에서 각 시료들의 이동시간이 10분에서 22분 사이였으나 전압을 증가 시킬수록 검출시간이 단축되었다. 그 이유는 전압이 클수록 전기삼투압흐름이 빨라졌기 때문으로 사료된다.

요약

일정전류와 일정전압조건 모두에서 완충액 농도가 증가할수록 시료들의 이동시간이 증가하였으며 전압이 높을수록 시료들의 이동시간이 단축됨을 알 수 있었다. ALA, PBG, glycine, LA의 최적 분석조건은 borate 완충액 30mM, 20kV, 76 μ A에서 가장 잘 분리 되었다. 본 연구를 통하여 ALA, PBG, glycine, LA를 동시에 분리할 수 있을 뿐만 아니라 ALA 2mM, PBG 0.25mM 범위내에서 선형적인 보정곡선을 보이므로 정량분석이 가능하였다. CE를 이용한 ALA와 PBG의 동시 정량분석으로 인체, 동식물 및 광합성 미생물의 대사과정에 수반되는 효소인 ALA synthetase, ALA dehydratase의 활성 연구, 광합성 홍색세균에 의한 ALA생합성, 의학, 생화학, 효소공학 등에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Matthew, E. R., P. O. Robert, , and P. L. James, "Capillary electrophoresis in biotechnology", *Biotechnol. Prog.*, **13**, 659-668 (1997).
2. Sasaki, K., S. Ikda, Y. Nishizawa, and M. Hayashi, "Production of δ -aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria", *J. Ferment. Technol.*, **65**(5), 511-515 (1987).
3. Mauzerall, D. and S. Granick, "The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine", *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-446 (1956).

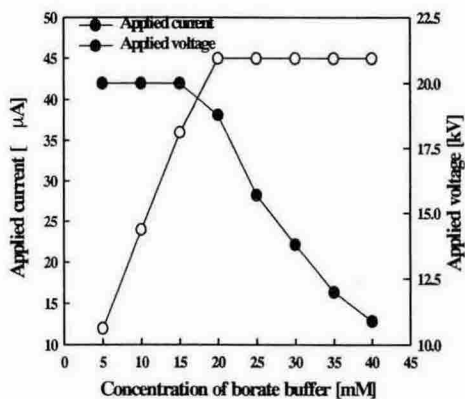


Fig.1. Effect of concentration of borate buffer on applied currents and applied voltages.

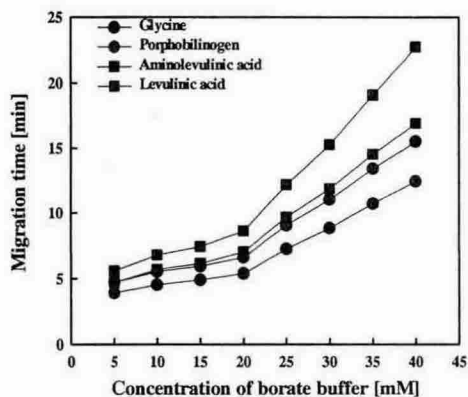


Fig.2. Effect of concentration of borate buffer on migration time. (setting voltage, 20kV)

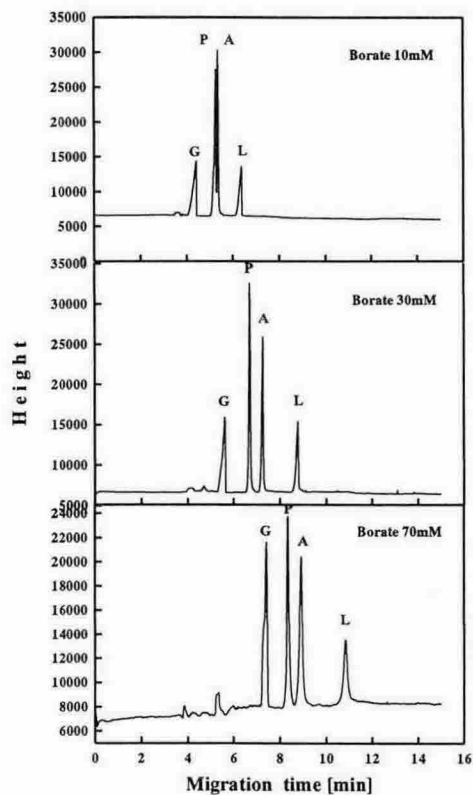


Fig.3. Chromatogram of mixture on concentration of borate buffer. (constant voltage, 20kV ; P, PBG ; A, ALA ; G, glycine ; L, LA)

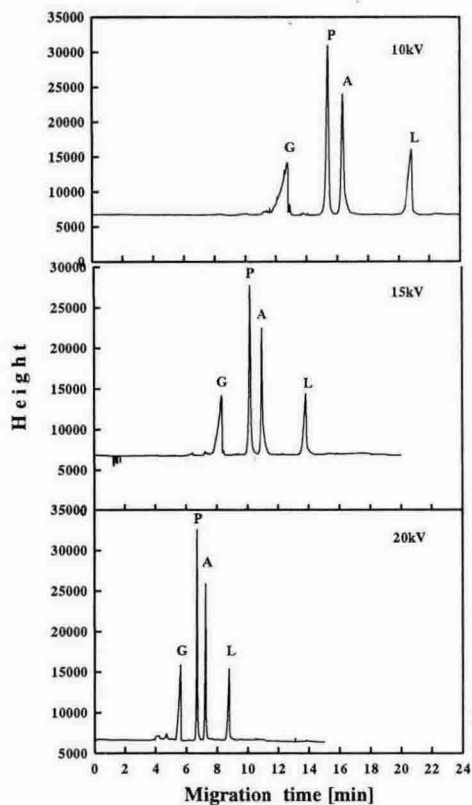


Fig.4. Chromatogram of mixture on applied voltages. (P, PBG ; A, ALA ; G, glycine ; L, LA)