PC-13

패 (*Ishige okamurai*) 추출물로부터 Phospholipase A_2 활성 저해 물질의 분리 정제

조지영 · 박선미 · 윤승제 · 홍용기
부경대학교 생물공학과

서론

대부분의 세포는 세포 밖으로 분비되는 분비형 효소 secretory PLA_2 와 세포내 존재하는 세포질형 효소 cytosolic PLA_2를 지니고 있다. 그 중 분비형 효소는 염증성 세포로부터 방출되어지며 관절염이나 허혈성 질환의 환부에 다량 존재한다. 또한 동물에 분비형 효소를 국소 투여하게 되면 부종을 형성하며, 항체 또는 특이적 저해제를 같이 투여하면 염증을 경감시킨다. 이와 같은 사실로 미루어 분비형 효소가 염증 발생에 1차적으로 관여하는 것으로 보고되고있다. 본 실험에서는 사람의 분비형 효소 대신에 *Vibrio mimicus*에서 분비되는 분비형 효소를 사용하여 이 효소의 작용을 저해하는 물질을 패 (*Ishige okamurai*) 추출물로부터 분리 정제하였다.

재료 및 방법

패 (*Ishige okamurai*) 추출물 조제

Jin et al. (1997) 법에 의해서 추출물의 조제하였다

PLA_2 활성 저해 반응

효소작용을 위해 10mM Tris 완충용액을 사용하였다. 기질로는 3.1 mM 4-Nitro 3-(Octanoxyl) benzoic acid를 acetonitrile에 녹여 사용하였다. 96 well plate에 200 μL의 완충용액과 5 μL (40 mg mL^{-1})의 추출물 그리고 5 μL의 효소를 혼합한 후 기질 10 μL를 첨가하였다. 효소의 반응은 37℃에서 4시간 반응시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 반응 정도는 $(EI_4-EI_0)/(E_4-E_0)$ 값으로 상대적인 효소작용의 저해 정도를 비교하였다.

EI_4: 추출물을 첨가한 반응액의 4시간 후의 흡광도 값,
EI_0: 추출물을 첨가한 반응액의 최초 흡광도 값
E_4: 추출물을 첨가하지 않은 반응액의 4시간 후 흡광도 값
E_0: 추출물을 첨가하지 않은 반응액의 최초 흡광도 값

극성에 의한 분리

패 (*Ishige okamurai*)의 분말에 메탄올과 물을 4:1의 비율로 넣어 추출하였고 이것을 Harborne J.B. (1998) 방법에 의해 5 fraction으로 나누었다.

Sephadex LH-20 gel filtration

극성에 따른 분리 결과 활성이 가장 좋은 fraction 3을 다음 단계에서 sephadex LH-20 (Parmarcia, 25×800 mm) gel filtration에 의해 분리하였다. 용매로는 100% methanol을 이용하였고, flow rate는 0.5 mL min^{-1}로 행하였으며 각 fraction당 2 mL 씩 분리하였다.

HPLC(고속액체 크로마토그래피)

Sephadex LH-20 gel filtration을 행한 후 활성 부분 (fraction 60-68)을 HPLC C8 reversed phase column (Nova-Pak, 3.9×150 mm)에 적용하여 linear gradient로 0-100% acetonitrile을 50분 동안 유속 1 mL min^{-1}로 용출 시키면서 220 nm에서 그 흡광도를 우선 측정하였다. 그 중 활성 부분만을 두 번째 단계로서 HPLC C18 reversed-phase column (Waters, 3.9×300 ㎜)에 30% acetonitrile로 15분 동안 wash 하고 난 후에 적용하여 linear gradient로 30-60% acetonitrile을 60분 동안 실시하였다. Flow rate는 1mL min^{-1}로 하였으며 220 ㎚에서 흡광도를 측정하여 최종적으로 분리하였다.

결과

극성에 의한 분리 결과 chloroform 층에서 분리된 fraction 3에서 효소 활성 저해효과가 나타났으며, sephadex gel filtration 결과 fraction 60-68에서 가장 높은 효과를 확인하였다. 이것을 HPLC reverse phase column에서 acetonitrile 농도 40%에서 효소 활성을 저해시키는 물질을 분리하였고 현재 GC-Mass를 통해서 1차적인 구조분석을 수행중이다

참고문헌

Ferrer I et al. (1997) Pilot survey for determination of the antifouling agent Irgarol 1051 in enclosed seawater samples by a direct enzyme-linked immunosorbent assay and solid phase extraction follwed by liquid chromatography- diode array detection. Environ. Sci. Technol. 31: 3530-3535..

Harborne J B (1998) Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant anlysis. Chanpman & Hall p 1-39.

Jin HJ, Kim JH, Sohn CH, DeWreede RE, Choi TJ, Tower GHN, Hudson JB, Hong YK (1997a) Inhibition of Taq DNA polymerase by seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. J. Appl. Phycol. 9: 383-388.