

전리수를 사용한 이차원 전기영동법

민병술*, 이윤배**, 이종권**, 류근걸**, 이미영*

*순천향대학교 생명과학부

**순천향대학교 신소재화학공학부

e-mail:sulbyong@sch.ac.kr

2-Dimensional gel electrophoresis by using electrolyzed water

Byoung-Sul Min*, Yoon-Bae Lee**, Jong-Kwon Lee**,
Kun-Kul Ryoo**, Mi-Young Lee*

*Division of Life Science, Soonchunhyang University

**Division of Material and Chemical Engineering,
Soonchunhyang University

요 약

일반 증류수로 제조된 완충용액으로 미세조류를 파쇄하였을 때 미세조류의 두꺼운 세포벽에 의해 단백질 추출이 효율적으로 이루어지지 않는다. 따라서 일차원 및 이차원 전기영동법을 사용하여 단백질 발현 양상을 분석할 때 효율이 떨어진다. 본 연구에서는 물의 클러스트가 작아 세포벽에 잘 흡수될 수 있다고 알려진 환원전리수를 사용하여 효율적으로 단백질을 추출하였고, 이차원 전기영동법으로 단백질 발현 양상을 확인하였다.

1. 서론

전기분해에 의해서 pH나 산화·환원전위 (oxidation-reduction potential, ORP)를 조절한 수용액을 전리수 (electrolyzed water) 라고 부른다. 물에 직류전압을 가하면 이온의 이동에 의해 pH를 변화시킬 수 있는 이온수를 만들 수 있다. 양극에서 생성되는 물은 H⁺ 이온의 증가로 pH가 감소되며, ORP가 증가하게 되어 강한 산화성의 상태가 되고, 음극에서는 OH⁻ 이온의 증가로 pH가 상승하여 환원성의 상태가 된다. pH나 산화·환원전위 (ORP)를 조절한 전리수는 고체 표면에 부착한 불순물질을 효과적으로 제거 할 수 있다 [1-2]. 뿐만 아니라 최근 산화수용액으로서의 전리수가 살균효과를 가지고 있다고 알려지고 있고 환원수용액은 물의 크기가 작기 때문에 흡수가 빠르며 전기적 에너지를 덜고 있기 때문에 조직 세포에 확산이 빠르다고 알려져 있다 [3-5]. 세포의 조직, 기관의 프로테오솜을 분석을 하기 위해 가장 자주 사용되는 것이 이차원 전기영동법에 의한 단백질 분리와 분리된 단백질 spot

의 질량분석기에 의한 동정이다. 이러한 이차원 전기영동법을 시행하기 위해서는 단백질의 추출이 무엇보다도 중요하다. 미세조류는 탄수화물로 이루어져 있는 두꺼운 세포벽을 가지고 있어 일반 증류수로 제조된 완충용액으로는 단백질 추출의 효율이 떨어진다. 본 연구에서는 *Nannochloropsis salina*와 *Nannochloropsis oculata*에 광스트레스를 가한 후 환원전리수를 이용하여 세포를 파쇄, 단백질을 추출하여 단백질 발현 양상 유무를 확인하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 광스트레스

Low light (40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)에서 배양한 *N.salina* 및 *N.oculata*를 무균대에서 200 ml 세포 배양용 병에 2개씩 옮긴 후 하나의 배양용 병은 대조군으로 low light에서 배양하고 하나의 배양용 병은

실험군으로서 high light를 가하여 준다. Low light 은 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (2,000 lux)의 빛의 세기로 일반 배양기에서 배양하고 high light 은 2,000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (100,000 lux)의 빛의 세기로 할로겐 램프를 이용하여 광스트레스를 12시간 동안 가해준다. High light 12시간 뒤 원심분리 (15,000 rpm, 10분, 4 °C)하여 쉘을 수거하였다.

2.2. 이차원 전기영동

2.2.1. 시료 처리

프로테옴 분석을 위해서 막자사발에 수거한 쉘을 넣은 뒤 액체질소로 파쇄한 뒤 환원전리수를 첨가하여 한번 더 파쇄하여 완전히 단백질을 추출하였다. 원심분리 (15,000 rpm, 10분, 4 °C) 한 후 상등액을 취해 이차원 전기영동의 시료로 사용하였다.

2.2.2. 등전점 전기영동

단백질 시료의 양이 500 μg 이상이 되도록 하였고, 250 μl 의 rehydration 용액 (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 0.5% ampholytes, 100 mM DTT, 0.01% bromophenol blue)을 사용하여 단백질을 녹였다. Rehydration 용액에 녹아있는 각 조건의 단백질 250 μl 을 IPG holder에 주입하였고, 등전점 전기영동을 위하여 단백질이 가진 pH에 따라 이동할 수 있도록 만들어진 13 cm immobilized dry strip (pH 4-7 NL, Amersham Biosciences)을 위에 놓고 cover fluid 용매를 주입한 후, IPG phore (Amersham Biosciences)를 이용하여 단백질이 가진 pH에 따라 이동을 시켰다.

2.2.3. SDS-polyacrylamide gel 전기영동

11.5%의 fixing acrylamide 겔을 만든 후 등전점 전기이동 시킨 strip을 겔 위에 넣고 그 위에 1% agarose gel로 고정시킨 후 이차원 전기이동을 실시하였다 (Amersham Biosciences, Hoefer SE600). 15분 동안 겔당 25 mA씩 전극을 주어 우선 전개시킨 후, 5시간 동안 겔당 50 mA씩 전극을 주어 단백질을 분자량에 따라 이동 시켰다.

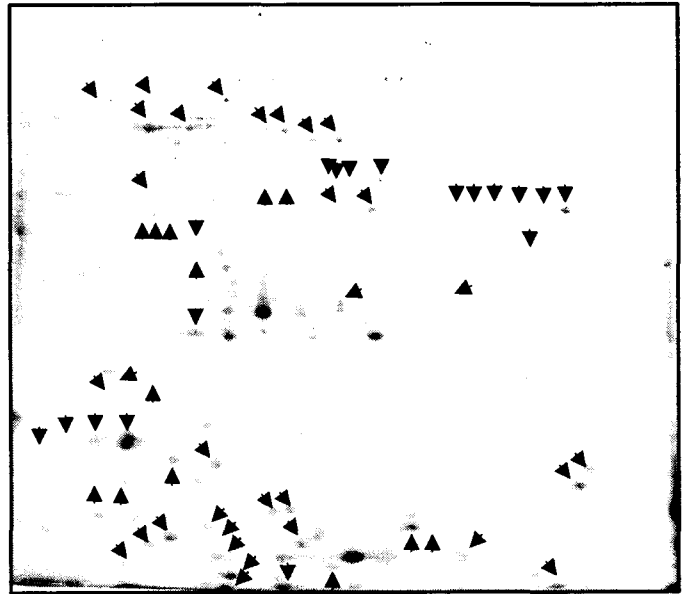
2.2.4. 겔 염색 및 탈색

전개가 끝난 겔을 coomassie Blue G250 (34% methanol, 0.1% coomassie G-250, 17% ammonium sulfate, 3% phosphoric acid)을 사용하여 이동된 겔의 단백질을 확인할 수 있도록 12시간이상 염색하였고, 0.5% acetic acid를 사용하여 탈색하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1. *N.salina* 이차원 전기영동

(A) Low light



(B) High light

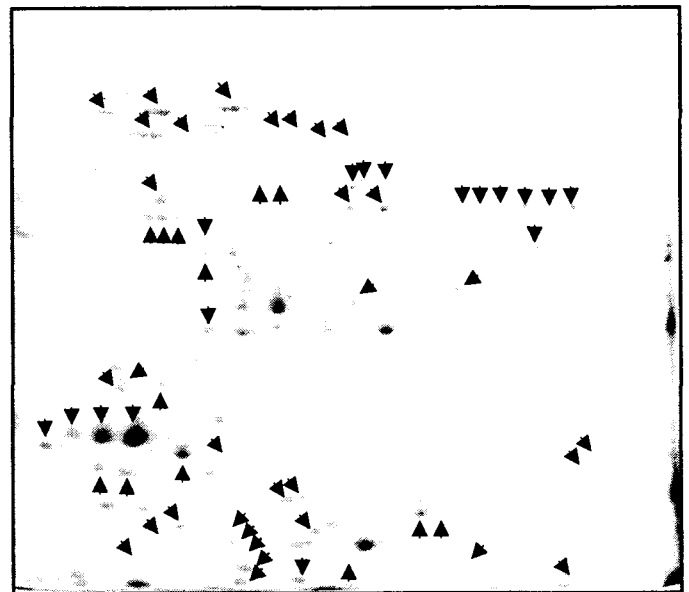
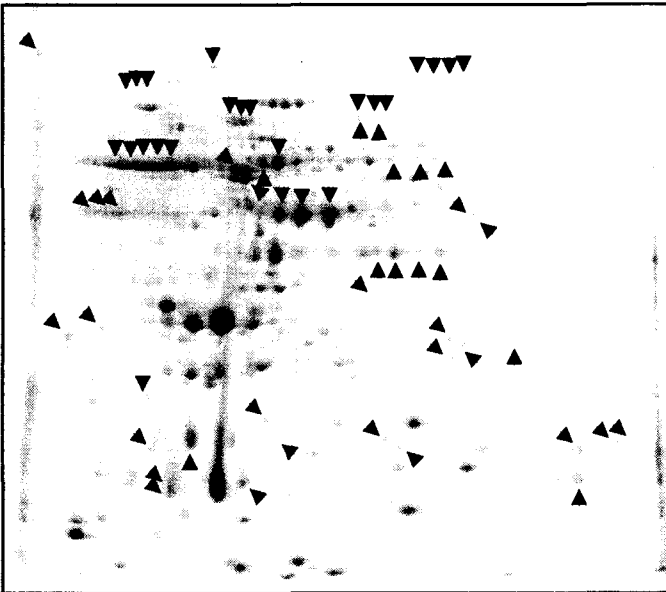


Fig. 1. 2-Dimensional gel electrophoresis of *N.salina* at low light (A) and high light (B).

12시간 동안 high light을 가한 후 셀을 수거하여 환원수전리수로 단백질 추출한 결과 low light의 *N.salina*에서 272개의 spot이 형성이 되었다. low light를 대조군으로 high light와 비교하였을 때 생성 8개, 소멸 10개, 증가 39개, 감소 22개의 spot의 변화가 나타나서 일반 증류수로 제조된 완충용액보다 환원전리수를 이용하면 단백질 추출이 용이하였다 (Fig. 1).

3.2. *N. oculata* 이차원 전기영동

(A) Low light



(B) High light

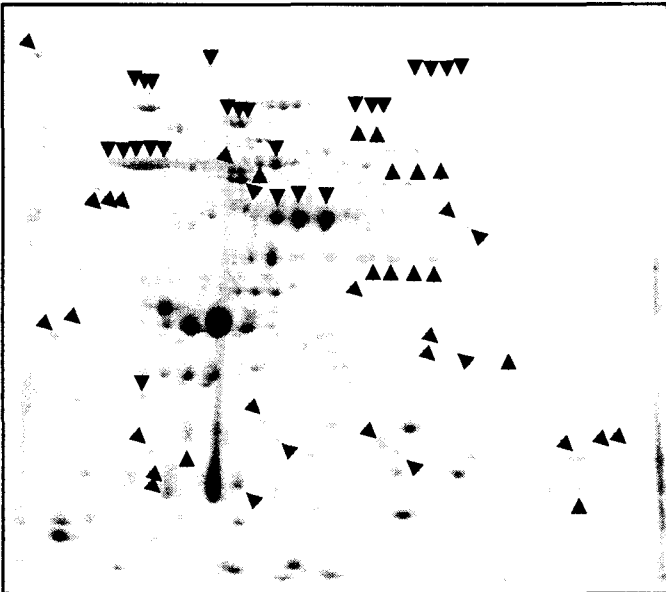


Fig. 2. 2-Dimensional gel electrophoresis of *N. oculata* at low light (A) and high light (B).

12시간 동안 high light을 가한 후 셀을 수거하여 환원수로 단백질 추출한 결과 low light의 *N. oculata*에서 569개의 spot이 형성이 되었다. low light를 대조군으로 high light와 비교하였을 때 생성 5개, 소멸 5개, 증가 65개, 감소 37개의 spot의 변화가 나타나서 일반 증류수로 제조된 완충용액보다 환원전리수를 이용하면 단백질 추출이 용이하였다 (Fig. 2).

4. 결론

미세조류를 사용하여 이차원 전기영동을 잘 수행하기 위해서는 특성상 단백질 추출이 용이하여야 한다. 그러나 미세조류의 두꺼운 세포벽이 탄수화물로 이루어져 있어 추출이 어려운 편이다. 본 연구에서는 전기분해한 환원전리수를 이용하여 단백질 추출을 해 본 결과 일반 증류수로 제조된 완충용액 보다 단백질 추출이 잘 될 수 있음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 국가지정연구실사업 (류근걸: N10302000029-03J0000-01710) 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- [1] Ingersoll, J. E., Jr., "A Contingent-Claims Valuation" *Economics* 4, 289-322, 1977.
- [2] Halis, J. S., "Should Companies Issue Warrants?" Unpublished Masters Thesis, MIT, May.
- [3] Fabrizio, K. A. and Cutter, C. N., Stability of electrolyzed oxidizing water and its efficacy against cell suspensions of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 66(8), pp.1384-1397, 2003.
- [4] Nagamatsu, Y., Tajima, K., Kakigawa, H. and Kozono, Y., Application of electrolyzed acid water to sterilization of denture base part 1. Examination of sterilization effects on resin plate. *Dent. Master J.*, 20(2), pp.148-155, 2001.
- [5] Xin, H., Zheng, Y. J., Hajime, N. and Han, Z. G., Effect of electrolyzed oxidizing water and hydrocolloid occlusive dressings on excised burn-wounds in rats. *Chin. J. Traumatol.*, 6(4), pp.234-237, 2003.