

(서울대학교 文理科大學 化學科) (4290. 5. 受理)

## 페이퍼 에레크트로포레시스에 관한 研究

(第一報)

계란단백의 移動도에 關하여

張 世 憲                      金 始 中

### Studies on the Paper Electrophoresis, I

#### On the Mobility of Egg Albumin(Ovalbumin)

The mobilities and the electrophoretic phenomena of human serum albumin, and of horse serum albumin, etc., on paper were reported, but there is no information about the mobility and the electrophoretic phenomena of ovalbumin. In this study they are determined and considered at various time durations.

The mean value of this mobility is compared with the value determined by the electrophoresis in solution. Also, the mobilities of the electroendosmotic flow, which affect on the mobility seriously, are determined at various time durations.

Apparatus and method used, are a closed-system type and a method with electrode vessels.

It is concluded that:

1) The mobilities of ovalbumin have the nearly constant mobilities at six and eight hours of time durations, but it decreases at ten hours of long time duration. Their mean value is  $(0.243 \pm 0.003)$ cm./hr./v./cm. toward anode at PH 8.0.

2) Under these experimental conditions, ovalbumin cannot be separated into three fractions (A1, A2, A3) on paper.

3) Most of the factors, which affect on the mobility, are fixed by the initial experimental conditions, but the electroendosmotic flow due to the characteristic capillarity of paper is measured.

Then, the mean value of its mobilities shows the good constancy, and the value is  $(0.073 \pm 0.0003)$ cm./hr./v./cm. toward cathode at pH 8.0.

4) By the above facts, if the same paper and the same experimental conditions are chosen, it may be preferred to determine the mobility of the electroendosmotic flow once time, even when many observations are required.

Dept. of Chem.,

Coll. of Lib. Arts & Sci.,

Seoul National University.

Sei Hun Chang

Si Joong Kim

### I. 緒 論

콜로이드시스템에서 콜로이드 알갱이들의 나타내는 電氣포레시스의 現象을 利用하여, 蛋白質과 같은 많은 高分子化合物의 精製, 그들의 混合物에서 各 單一物質에로의 分離, 및 그들의 移動度の 測定 등이 많이 研究되어 왔다. 또 한편, 이러한 콜로이드시스템에서의 研究外에 眞짜 溶

액에서의 이온포레시스의 現象을 利用하여 眞짜 溶液內에서의 各 이온의 精製, 分離, 移動度の 測定도 많이 研究되었다.

그러나 比較的 간단하고, 便利한 크로마토그라피의 理論과 技術이 發展됨에 따라 上述한 바와 같은 電氣포레시스 或은 이온포레시스와 分配크로마토그라피와를 結合하므로써, 간단히, 便利하게, 帶電하는 物質의 分離가 可能케 되었던 것이다. 이 電氣포레시스 或은 이온포레시스를 結合시킨 分配크로마토그라피의 原理와, 分別帶의 移動도에 關한 理論은 1946年 Consden, Gordon, Martin 에 의하여 提出되었으며, 이들은 젤리狀으로 만든 시리카겔의 板狀體에 適當한 直流를 通하여, 시리카겔 속에서 溶質이 展開될 때 電氣포레시스를 일으켜, 分別帶를 이루게 하므로써, 몇몇 아미노酸의 分離를 可能케 하였던 것이다. 이러한 分離法에는 다만 分配作用에 依한 分離外에, 이온 또는 帶電된 알맹이의 移動度 및 이온들의 解離恒數의 差異가 重要な 要素가 되는 것이다. 그러나, 얼마後에 이러한 電氣포레시스를 젤리板에서 行하는 代身 濾紙上에서 일으키는, 이른바 페이퍼 에레크트로포레시스가 發展하게 되었으니, 그 代表的인 方法은 우선 1948年 Wieland 와 Fischer 에 의하여 몇몇 아미노酸이 分離되고, 다음으로 Durrum 에 의하여 各種 아미노酸과 몇몇 蛋白質이 分離되었다. 따라서 여러 研究者들에 의하여 化學的 및 醫學的 研究로서 그들의 目的에 適合한 여러가지의 裝置를 考案하여 Zwitterion을 形成하는 모든 生物化學的 物質의 微量의 分離, 移動度 및 等電點의 測定, 또 그 斑點을 利用한 光學的 方法에 의한 定量分析等, 또 한편 無機陽, 陰 이온의 分離, 移動度の 測定, 그 이온溶液에서의 各 水素이온 濃度에서 存在하는 이온들의 相對的 量의 比率等이 測定되어 많은 興味를 끌게 되어서, 이제 까지 이에 關한 論文이 約 三百餘種에 達하고 있다.

이러한 研究에 使用되는 裝置와 方法에는, 定性的인 分離에만 잘 利用되는 開放式시스템과, 定量的 目的으로 使用되는 密閉式시스템이 있으며, 또 이 시스템 各各에 電極그릇을 使用하는 것과 電極그릇을 使用하지 않고 電極을 直接 緩

衝溶液을 積진 濾紙에 接觸시키는 方法이 考案되었다.

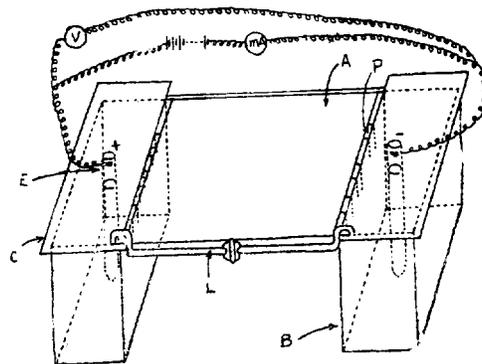
本論文은 이와같은 方法들 中에서 密閉式시스템과 電極그릇을 使用하는 方法으로서, 上述한 바와 같은 諸般性質을 利用하여서, 이제까지 所稱 血清 Albumin, 말血清 Albumin의 移動도에 關한 報告와 그들의 定量的 考察은 提出된 바 있으나, 제란단백의 ovalbumin에 關한 諸般報告가 아직 없기에, 이의 移動度 및 移動도에 重大하게 影響을 주는 電氣오스모시스現象을 考察하여, 이 移動도를 補正했고, 溶液에서의 電氣포레시스에 의한 메타와 比較하므로써, ovalbumin의 濾紙上에서의 電氣포레시스의 現象을 考察하였다.

## II. 裝置 및 實驗

### A) 裝置

使用한 裝置의 上斜面에서 본 모양을 그림 1에 描하였다. 이것은 過去에 쓰인 한 裝置를 修正한 것이다. 裝置는 크게 세개의 基本部分으로 되어 있다. 即 1) 溫度調節用인 絶緣된 물자 젤들과 이들 사이에 끼워지고 緩衝溶液에 積진 濾紙 2) 두개의 電極그릇 3) 兩쪽 그릇에 담긴 緩衝溶液의 表面높이를 같게 하여 靜水壓을 最少로 하기 爲한 水準管으로 되어 있다.

그림 1.



Apparatus

- A: water-jackets and glass plates(0.6×42×18 cm)
- B: Electrode vessel, paraffinized(10×5×15 cm)
- C: Cover on the electrode vessel(0.4×7×20 cm glass plate)
- E: Electrode(Carbon rod, 1.5 cm in dia. and 20 cm in length)
- L: Leveling tube
- P: Filter paper strip.

緩衝溶液; Clark and Lubs 氏의 緩衝溶液으로서 0.2 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 와 0.2 M KCl 의 混合溶液(再結晶한 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 12.41 g 와 再結晶한 KCl 14.91 g 을 1000 ml 의 蒸溜水에 녹힘) 750 ml 와 0.2 M NaOH 溶液 60 ml 를 混合하고, 蒸溜水로서 3000 ml 로 稀釋하여서 pH 8.0 인 緩衝溶液을 使用하였다.

濾紙쪽지: 使用되는 濾紙는 그들의 電氣오스모시스의 性質이 그 種類에 따라 크게 다르게 나타난다. 여기서는 Whatman No. 1 濾紙를 3×60 cm 의 쪽지로 끊어서 使用하였다. 研究된 바에 依하면 濾紙를 씻거나, 씻지 않거나 間에 電氣오스모시스의 性質에는 變化를 주지 않으므로 여기서는 씻지 않고 그대로 쪽지로 만들어 使用하였다.

### B) 實 驗

電極그릇마다 各各 1000 ml 의 緩衝溶液을 넣고, 電極을 낀 뚜껑에 덮고, 같은 緩衝溶液을 채운 水準管을 걸고 콕크를 열어 놓는다. 鉛筆로 陽極, 陰極, 原點(中央)의 表示를 한 세 濾紙쪽지를 같은 緩衝溶液 400 ml 에 10 分間 담근다. 이 濾紙를 유리막대에 걸쳐 濾紙에 과잉으로 묻은 緩衝溶液을 떨어트린 다음, 밀 유리판 위에 놓인 밀 물자켓 위에 polyethylene sheet(0.1×42×18 cm)를 펴고, 이 위에 3 cm 간격으로 세 濾紙쪽지가 서로 平行하며, 表示한 原點이 자켓의 中央에 오도록 놓고, 濾紙의 兩端들은 그릇의 溶液에 담근다. 다음에 그 위에 같은 polyethylene sheet 를 펴 놓고 밀 물자켓, 壓縮用 유리板 四枚를 차례로 놓고 20 分間 기다린 다음, 水準管의 콕크를 닫는다. 다음에 두장의 濾紙쪽지에는 試料(硫安法에 의하여 만들고 물 1 ml 당 10 mg) 0.005 ml 를 마이크로피펫으로서, 表示한 原點에 떨어트리고, 한 濾紙쪽지에는 電氣오스모시스의 흐름의 指示藥으로서 0.01 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.005 ml 를 마이크로피펫으로서, 表示한 原點에 떨어트리고, 卽時 密 polyethylene sheet, 밀 물자켓, 밀 壓縮用 유리板들을 놓는다. 이 操作이 끝나면 바로 直流 290±5 V 의 電壓을 건다. 勿論 이 回路에는 볼트메터, 미리암메터가 插入되어 있고, 그때 4.5±0.5 mA 의 電流가 흘렀다. 電源으로서 8 A, 1.5 V A— 乾電池를

直列로 連結하고, 또 100 V 蓄電池를 함께 直列로 連結하여 使用하였다. 한시간 마다 볼트메터, 미리암메터, 물자켓의 물의 溫度를 읽었으며, 이때 溫度는 10±2°C 로 유지 되었다.

所定の 時間이 經過한 다음, 回路를 끊고, 卽時 電極그릇에 담긴 濾紙의 兩端을 끊어 버리고, 試料를 떨어트린 두장의 쪽지를 유리板 위에 놓아 100°C 電氣乾燥器 속에서 20 分間 말린다. 이 말린 濾紙쪽지를 着色試藥(1% HgCl<sub>2</sub> 와 0.05% Bromphenol blue를 포함한 2% HAc 溶液 200 ml) 에 20 分間 담근 다음, 유리판 위에 놓고 100°C 電氣乾燥器 속에서 말리고, 다음에 5% HAc 溶液 100 ml 씩을 취하여 과잉으로 묻은 着色試藥이 全部 떠러져, 씻은 溶液의 색이 變하지 않을 때 까지(4~5回 程度) 씻고, 同樣으로 20 分間 다시 말린다. 다음에 NH<sub>4</sub>OH 가 든 병의 입 언저리에 이 말린 濾紙 쪽지를 대면, NH<sub>3</sub> 개스로 말미암아, 陽極쪽에 靑色斑點이 나타난다. 한편 電氣오스모시스의 흐름의 指示藥을 떨어트린 濾紙는, 움직이지 않고, 直接 檢出藥(0.1M AgNO<sub>3</sub> 와 8% NH<sub>4</sub>OH 와 6 M NaOH 와의 같은 量 씩으로 된 混合溶液)을 뿜으면, 2~3 分後에 陰極 쪽에 靑色斑點이 나타난다. 이와같이 하여, 얻은 試料에 의한 두개의 斑點은 斑點의 各各의 中心을 取하여 原點에서 이 中心까지의 距離를 재고, 그것들을 平均하여 한 實驗의 테-타로 取했고, 電氣오스모시스의 흐름의 指示藥에 의한 斑點의 距離測定도 同一한 方法으로 測定하여 테-타로 삼았다.

### III. 結果 및 考察

#### A) 考察

移動度の 計算은 다음 式을 使用하였다.

$$M = \frac{d_1 \pm d_2}{Qt}$$

M = 移動度, d<sub>1</sub>; 試料의 移動거리 d<sub>2</sub>; 電氣오스모시스의 흐름의 指示藥의 移動거리, Q; 電氣場의 세기 t; 時間 d<sub>2</sub>의 符號는 試料와 指示藥이 같은 方向으로 移動하면 -를 取하고, 反對方向으로 移動하면 +를 取한다.

페이퍼 에레크트로포레시스에 의한 帶電한 알맹이의 移動度는 알맹이의 荷電, 크기, 모양, 兩쪽性質, 緩衝溶液의 濃度와 그의 이온強度,

粘性度 濾紙의 種類, 濾紙의 毛細管現象에 의한 電氣오스모시스等の 복잡하고도 많은 要因에 의하여 變動하게 된다. 그러나, 이런 여러 要因中 大部分은 처음의 實驗條件으로 미리 調節할 수 있으나, 濾紙의 獨特한 毛細管現象에 의한 電氣오스모시스는 처음 實驗條件으로 調節할 수 없

으며, 이는 別途로 測定하여야 한다,

이와 같은 것을 고려하여, 移動度에 關한 各 時間 마다의 測-타를 표 I 에 적었고, 그림 II 에는 平均電氣場의 세기를  $5.30 \pm 0.01$  V/cm 로 보아 移動거리-시간의 關係를 그렸다.

표 I. Ovalbumin 의 移動度(The Mobility of Ovalbumin)  
 PH=8.0(KCl+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>+NaOH buffer mixture) Ionic strength=0.1  
 Temp.=10±2°C Electric current=4.5±0.5 mA.

Time	strength of Electric field	Migrated distance	Migrated distance of electroendosmotic flow indicator	Total migrated distance	Migrated distance per hour	Mobility (uncorrected)	Mobility (Corrected)
Hour	v/cm	cm	cm	cm	cm/hr	cm/hr/v/cm	cm/hr/v/cm
6   1	5.20	-5.4	+2.2	-7.6	-1.27	-0.173	-0.244
6   2	5.26	-5.4	+2.3	-7.7	-1.32	-0.172	-0.251
6   3	5.26	-5.6	+2.2	-7.8	-1.30	-0.173	-0.247
6   4	5.45	-5.8	+2.5	-8.3	-1.38	-0.178	-0.253
Mean	5.29	-5.6	+2.3	-7.9	-1.32	-0.174	-0.249
8   1	5.26	-7.0	+3.0	-10.0	-1.25	-0.169	-0.243
8   2	5.27	-7.3	+3.0	-10.3	-1.29	-0.173	-0.245
8   3	5.34	-7.5	+3.2	-10.7	-1.34	-0.177	-0.250
8   4	5.35	-7.4	+3.2	-10.6	-1.33	-0.176	-0.249
Mean	5.31	-7.3	+3.1	-10.4	-1.30	-0.174	-0.247
10   1	5.17	-8.1	+3.8	-11.9	-1.19	-0.157	-0.230
10   2	5.26	-8.4	+3.9	-12.3	-1.23	-0.166	-0.234
10   3	5.39	-8.9	+4.0	-12.9	-1.29	-0.165	-0.239
10   4	5.39	-8.6	+4.0	-12.6	-1.26	-0.160	-0.234
Mean	5.31	-8.5	+3.9	-12.4	-1.24	-0.161	-0.234
Mean	5.30±0.01				-(1.29±0.01)	-(0.17±0.003)	-(0.243±0.003)

(The positive values are toward the cathode, and the negative values are toward the anode.)

移動度는 一般으로 時間이 길어질수록 약간의 감소를 보이고 있다. 6時間과 8時間에서는 서로 좋은 一致性을 보이고 있다. 그러나, 10時間의 경우에는, 그 앞의 것 들에 比하여, 約 5.6%의 減少를 보이고 있다. 한편 電氣오스모시스의 흐름의 移動度는 時間에 無關하게 一定

하여 變하지 않으므로(표 II) 이러한 現象은 試料가 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>+KCl+NaOH 緩衝溶液과 長時間 接觸하므로써, 어떤 生物化學的 變化를 이르게, 試料에 變質을 招來하여 보다 낮은 移動度を 나타냈다고 생각된다.

如何든 이들의 平均값과 溶液에서의 電氣포레

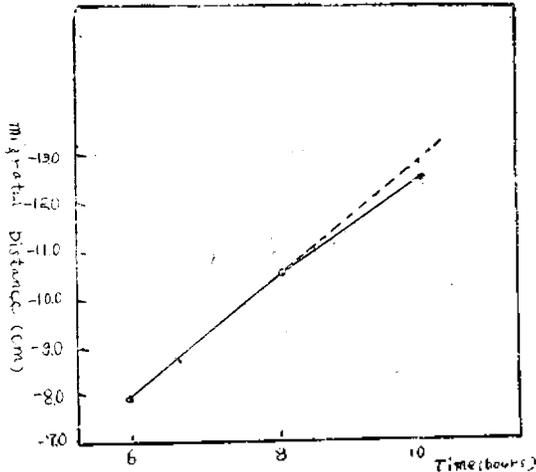


그림 1 Ovalbumin 의 시간에 따른 이동거리.  
(Migrated Distance of Ovalbumin at Various Time Duration, pH=8. (KCl+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>+NaOH buffer mixture). Ionic strength=0.1.

Mean strength of electric field 5.30±0.01 v/cm.  
Electric current=4.5±0.5 mA. Temp.=10±2°C.

시스에 의한 값과 比較하면, 溶液에서의 電氣포레시스에 의한 ovalbumin 의 移動度는 A<sub>1</sub> 이 燐

酸鹽緩衝溶液의 pH 8.0, 이온强度 0.1, 0°C 에서  $6.49 \times 10^{-5}$  cm/sec 로 알려져 있고, 이것을 時單位로 換算하면 -0.234cm/hr/v/cm 가 되는 데, 이것과 本實驗에서 얻은 平均값 -(0.243±0.003)cm/hr/v/cm 와 比較할 때, 報告된 溶液에서 電氣포레시스에 의한 값에 對하여 3.7%의 높은 값을 나타내고 있다. 이 原因으로서는, 첫째 緩衝溶液의 種類가 다르고, 둘째 온도가 10±2°C 인 보다 높은 온도였기 때문에, 보다 큰 값을 나타냈다고 생각된다.

報告된 바에 의하면, Ovalbumin 은 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> 로 電氣포레시스의으로 分離 可能하며, 이들은 各各 相異하나, 서로 비슷한 移動度를 나타내고 있다. 그러나, 本實驗에서 使用한 條件으로서는 이들이 分離되지 않았다.

B) 電氣오스모시스의 흐름

표 1 에 이에 關한 데이터를 적었고, 그림 2 에 平均電氣場의 세기를 5.30±0.01 v/cm 로 보아서 시간—이동거리의 關係를 그렸다.

표 1 (The mobility of electroendosmotic flow)

PH=8.0. (KCl+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>+NaOH buffer mixture,  
Ionic strength=0.1  
Temp. =10±2°C.  
Electric current=4.5±0.5 mA.

Time	Strength of Electric field	Migrated distance	Migrated distance per hour	Mobility
Hour	v/cm	cm	cm/hr	cm/hr/v/cm
6	1	5.20	2.2	0.071
6	2	5.26	2.3	0.072
6	3	5.26	2.2	0.070
6	4	5.45	2.5	0.077
Mean	5.29	2.3	0.39	0.073
8	1	5.26	3.0	0.074
8	2	5.27	3.0	0.072
8	3	5.34	3.2	0.073
8	4	5.35	3.2	0.073
Mean	5.31	3.1	0.39	0.073
10	1	5.17	3.8	0.074
10	2	5.26	3.9	0.072
10	3	5.39	4.0	0.074
10	4	5.39	4.0	0.074
Mean	5.31	3.9	0.39	0.074
Mean	(5.30±0.01)		0.39	(0.073±0.0003)

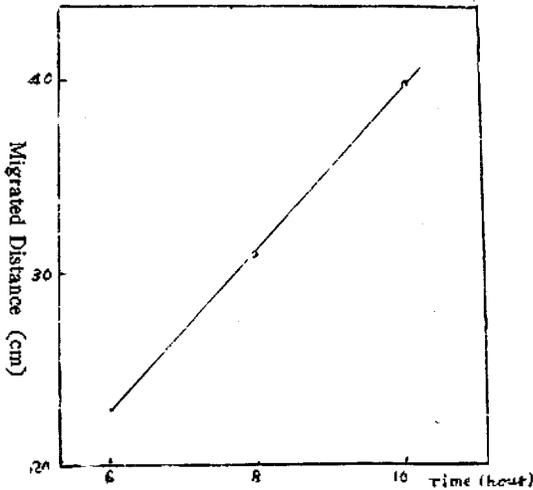


그림 11. 電氣오스모시스의 흐름을 주는 指示藥의 시간에 따른 移動距離 (Migrated Distance of Electroendosmotic Flow Indicator at Various Time Durations, pH=8.0(KCl+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>+NaOH buffer mixture) Ionic strength=0.1 Mean strength of electric field 5.30±0.01 v/cm. Electric current 4.5±0.5 mA. Temp.=10±2°C.

電氣오스모시스의 흐름은 電氣場의 세기, 緩衝溶液의 稀釋度가 增加하면 이도 增加한다. 그러나, 표 11에서 보는 바와 같이 이 實驗에서 使用한 電氣場의 세기의 變動範圍에서는 현저한 差異를 주지 않았고, 電氣場의 세기의 增加와 移動度와의 사이에는 어떤 定量的 關係도 보이지 않았다. 다만 平均電氣場의 세기를 5.30±0.01v/cm로 유지 했을 때, 그의 移動도가 時間에 따라 無關하게 一定함을 보이고 있다.

이런 事實은, 페이파 에렉트로포레시스에서 일어나는 電氣오스모시스의 흐름을 알아내기 위하여 使用하는 指示藥이 濾紙에 吸着되지 않고, 帶電되지 않는 物質이라면, 그의 移動도는 時間에 無關하게 一定하다는 結論에 이른다. 勿論 靜水壓에 基因하는 오스모시스의 흐름도 있으나, 이것은 兩쪽 電極그릇의 緩衝溶液의 表面의 높이의 差異가 크면 增加하고 또 壓縮이 增加하면 減少하는 傾向을 가지고 있으나, 여기서는 實驗條件으로 모두 같은 높이와 같은 壓縮을 하였으므로, 各 實驗에서는 이에 起因하는 흐름의 變動은 無視했고, 모든 경우 一定하다고 본 것이다. 그러므로, 한 種類의 濾紙를 使用하고, 같은 實驗條件을 쓴다면, 이 흐름의 移動도는 한 種類의 濾紙에 對하여 한번 測定하기만 하면, 여러번 實

驗할 때 各各 測定하지 않아도 無妨할것으로 생각된다. 即 흐름의 指示藥으로서 0.01 MH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 쓰고, 上述한 바와 같은 實驗條件을 썼을 때, Whatman No. 1 濾紙에서 일어나는 電氣오스모시스의 흐름의 移動도는 時間에 無關하게 (0.073 ±0.0003)cm/hr/v/cm 이라는 것을 알게 된다.

#### IV. 結 論

1. 페이파 에렉트로포레시스에 의한 酪乳단백 Ovalbumin의 移動도는 8時間까지는 時間에 無關하게 一定한 값을 나타내지만 10時間이라는 보다 긴 時間에서는 減少하는 傾向을 나타내었다.

2. 酪乳단백 Ovalbumin의 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>의 分離는 上述한 바와 같은 實驗條件에 의하여서는 分離되지 않았다.

3. 移動도에 영향을 주는 많은 要因中, 모든 것은 固定하고, 다만 濾紙의 特性에 起因하는 電氣오스모시스의 흐름만을 考察하였으며, 이 흐름의 移動도는 時間에 無關하게 一定한 값을 나타내었다.

4. 電氣오스모시스의 흐름의 移動도는 같은 濾紙를 使用하고 같은 實驗條件을 쓰면, 여러번 實驗할 때 各各 測定하지 않고 한번만 測定하면 된다는 便利한 結論을 얻었다.

#### Literatures Cited:

- 1) Consden, R., Gorton, A.H., and Martin, A.J.P.: *Biochem. J.* **40** (1946) 33
- 2) Wieland, T., and Fischer, E.: *Naturwiss.* **58** (1948) 29
- 3) Durrum, E.L.: *J. Am. Chem. Soc.* **72** (1950)2943
- 4) Kunkel and Tiselius, A.: *J. Gen. Physiol.* **35** (1951)89
- 5) Skarira, N.: *Archiv. Kem.* **24** (1952)85
- 6) Engelke, J.L. and Strain, H.H.: *Anal. Chem.* **29** (1954)1872
- 7) Block, R.J., Durrum, E.L., and Zweig, G.: *A Manual of Paper Chromatography and paper Electrophoresis* (1955)
- 8) Strain, H.H and Wood, S.E.: *Anal. Chem.* **26** (1954)864
- 9) Wood, S.E. and Strain, H.H.: *Anal. Chem.* **26** (1954)1869
- 10) Cremer, H.D. and Tiselius, A.: *Biochem. J.* **320** (1950)273
- 11) Schwarz, v.: *Nature* **167** (1951)404
- 12) Langsworth, L.G., Cannon, R.K., and Mac Innes, D.A.: *J. Am. Chem. Soc.* **92** (1940)2580
- 13) Cann, J.R.: *J. Am. Chem. Soc.* **71** (1949)907