

濾紙 및 寒天 電氣泳動法에 의한 中雛血清蛋白分劃에 對한 研究

Paper and Agar Electrophoretic Studies of Serum Proteins of the Cockerels and Pullets

(全南大學校 林鳳鎬教授指導)

李 廷 敦

I 緒 論

Tiselius(1937)의 電氣泳動法の 出現에 依하여 電氣泳動에 依한 實驗이 精密化 定量化되었고 特히 蛋白化學을 비롯 高分子物質의 研究에 劃期的인 發展을 가져왔으며 이는 生物學, 化學, 醫學뿐만이 아니라 獸醫學等의 分野에 至大한 貢獻을 하고 있다.

이 電氣泳動法은 여러가지 特徵의인 實驗法을 派生케 하여 濾紙, Gel, Cellulose Acetate, Disc電氣泳動法等으로 發展하고 있으며 濾紙電氣泳動法은 Tiselius法에 比하여 裝置와 操作技術이 比較的 간편하고 血清蛋白分析에 있어서는 Lipovittellin과 Phosphoprotein等의 複合蛋白의 分析도 可能한 有利한 點을 갖이고 있으므로 널리 使用되고 있으며(1, 6, 8) Gel, 電氣泳動法은 Agar나 Starch를 支持體로하여 電氣泳動한 것으로 여 紙보다 優秀한 細分劃能力을 가지고 있다(7).

動物의 血清蛋白은 動物의 種類에 따라 量的 質의으로 相異함이 判明되어 있다. 小林等(10)은 濾紙電氣泳動法에 의하여 血清蛋白像이 動物의 種類에 따라 特徵的인 泳動像을 나타내고 各蛋白易動圖도 顯著히 다르다고 記述하고 있으며 抗體에 있어서도 人間에 있어서는 α -globulin(以下 α -glob)中에 含有되나 動物에 있어서는 반드시 그렇다고도 할수 없으며(11) 또한 Lipovittellin이 動物의 種類에 따라 顯著하게 相異함을 指適하고 있다(5). 따라서 病的 血清蛋白像은 一般的으로 非特異性이므로 그 臨床的 意義를 明確히 하기 爲하여는 各家畜의 血清蛋白各分劃像의 動態를 系統的으로 集積하지 않으면 臨床的 意義가 없을 것이다. 때문에 本實驗은 現下 우리 나라에서 主로 사육되고 있는 家禽(白色單冠 Leghron)의 血清蛋白의 正常值를 求하여 臨床面에 應用하기 爲한 基礎的 資料를 얻고져 濾紙와 寒天電氣泳動法에 의하여 研究를 하였다.

本 實驗에 使用된 家禽은 外觀上 健康하다고 認定되는 것을 가려 寄生虫檢査以外的 細密檢査는 省略하였으므로 中雛에 대한 研究를 하였다.

II 材料 및 方法

[材 料]; 同一鷄舍(光州農高)에서 飼育(平飼)되고 있는 것을 對象으로 하였고 飼料條件은 中雛의 標準에 依한 것이었으며 疫 疫種으로는 Newcastle病豫防을 爲하여 B₁ Vaccin을 供試試料로 使用하기 35~75日前에 全鷄群을 同時에 接種하였다. 中雛의 日齡은 80~120日이고, 100首의 血清을 泳動하였으나 泳動結果가 不良한 것을 除去하고 結果處理에 使用된 것은 Male 40首 Female 40首로 計 80首이다.

[採 血]; 採血時間은 午前 9~10時 사이에 局限하였고 翼下靜脈에서 各個體當 1cc式을 採血하여 30~40分間 靜置後 3,000r.p.m.으로 15~20分間 遠心分離하여 血清만을 3~0°C의 冷藏庫에 保管하고 使用하였다.

[濾紙電氣泳動法]; 小林(11), 林鳳鎬(8, 9), 朴泳俊(3)等에 準하였으며 이에 使用한 機器는 日本東洋理化學器機製인 K, I型을 使用하였다. 濾紙는 Whatman No. 1을 5×23cm로 하여 2個의 試料를 同時에 泳動하였다.

Buffer Solution은 Venoral-Na(Sodium diethyl barbiturate) 0.3g (Veronal (diethyl barbituric acid) 1.84g Distilled Water 1l(PH 8.6 0.05)로 하였다. 電解槽의 PH變化를 피하기 爲하여 每回마다 兩側의 電解槽를 交替하였고 血清의 注加는 陰極側의 濾紙端에서 5cm 되는 處에 基線을 設定하고 基線上에 micropipette로 0.005ml의 血清을 線狀으로 塗布하였으며 血清을 注加하기 前에 濾紙의 兩端을 兩極槽에 浸漬하여 毛細管現象에 의하여 Buffer가 濾紙를 축이게 하였고 塗布된 血清이 마르기 前에 基線까지 올라오게 하였다. 電解槽는 300cc들이 4個를 使用하였으며 兩2個式의 連結는 Buffer로 充滿된 U字 유리管을 사용하였다. 電極은 Platinum을 使用하였고 電壓은 5~6Volt/cm(길이) 0.25A/cm(幅)를 泳動時間은 12~13時間동안 繼續維持하였다. 따라서 泳動箱溫은 15~18°C를 유지시켰다. 泳動이 끝난 濾紙는 105°C에서 5~7분 동안 乾燥시켜 Brom phenol blue染色液(B. P. B)0.05g Mercuric

Chloride 1.9g, Acetic acid 2.0cc Distilled water 100cc에서 10~20分間 染色하여 3個의 1% Acetic acid 液槽에서 非分割性 染色部分을 完全히 脫色하여 60°C로 15分間 乾燥시킨후 保管 하였다.

[寒天電氣泳動法]; Bussard法⁽³⁾을 林鳳鎬⁽⁹⁾에 의하여 變更한 方法에 準하였으며 4個의 緩衝液槽를 使用하였고 이들의 連結과 pH變化防止는 濾紙方法에서와 同一하게 하였다. Buffer는 Sodium barbiturate 15.85g를 Distilled Water 770ml에 溶解시켜 0.1N HCl 230ml를 加하여 1,000ml가 되게 하였다(pH 8.2, ± 0.05). Plate는 Slide Glass 를 使用하였으며 寒天은 Difco의 Bacto-Agar를 사용하고 5%寒天液을 만들어 凝固시킨후 約 1cm³ 크기로 切斷하여 2~3日間 蒸溜水를 每日 2~3回 交替하면서 沈漬하여 두었다가 Agar Plate를 만들때 5%寒天塊 10g를 15ml의 蒸溜水와 25ml의 Buffer를 注加하여 56°C의 恒溫에서 끓인 후 水平을 유지한 Slide glass板上에 1枚當 2.5ml를 注加하여 約 1mm 두께의 Agar plate를 만들었다. Agar plate은 2個를 만들어 同時에 2個의 Sample를 泳動하였으며 基線은 Agar plate의 3/5되는 곳에 橫으로 1mm넓이의 Trench(溝)를 1cm가량 길게 만들고 2/5된 部分을 陰極으로 하였으며 Buffer와 Agar Plate와의 連結은 5×8cm의 Whatman No.1으로 하였고 血清은 Micro-Pipette로 0.002ml가량 Trench에 注加하였다. 電極은 Platinum을 使用하였고 電壓은 290~300 Volt, 電流는 10~12mA, 泳動時間은 2時間 30分間 乃至 3時間으로 하였다. 泳動이 끝난 Agar plate는 55~58°C의 恒溫器內에서 50~60分間 乾燥시킨후 Amido

Black 10B 1% Solution (Methanol, distilled water Acetic acid=4:5:1의 混合液을 溶媒로 하여 A液ido Black 10B를 1%가 되게 용해한다.)에서 3~5分間 染色시킨後 [蒸溜水에서 2~3回 水洗後 methanol 4, Distilled water 5, Acetic acid 1의 溶液에서 4~5分間 浸漬後 室溫이나 55~58°C의 恒溫器內에서 乾燥시킨後 保管하였다.

[測定]; 保管시켜둔 Paper는 流動 Paraffin을 塗布하여 Densitometer에 依하여 各分割을 測定하고 Agar Plate는 Densitometer의 載物 glass에 流動 Paraffin에 젖는 Paper(Whatman No. 1)를 두겹으로 바른 뒤 그 위에 Agar Plate를 얹어 各分割을 測定하였다. 名分割面積은 Planimeter에 의하여 測定하였으며 測定值를 百分比로 換算하여 計算하였다.

Ⅱ 實驗成績 및 考察

臨床面에서 건강하다고 認定되는 中雛 血清 蛋白質을 濾紙 및 寒天電氣泳動에 의하여 分析하고 分割에 對한 命名은 Comon(4, 12)等에 準하여 Albumin(以下 Alb) αglobulin(以下 α-glob) β-globulin(以下 β-glob) γ-glob로 하였다.

試驗個體數는 寒天電氣泳動法(以下 A E)에서 Cockereils(以下 ♂) 22首, Immature Pullets(以下 ♀) 22首, 濾紙電氣泳動法(以下 P.E) ♂ 18首, ♀ 18首로 計 80首를 對象으로 하였다. 이들의 個體別 測定數值는 表 1에 雌雄別 個體別로 平均値(̄), 信賴限界值(C.L.) Pange의 計算值를 表示하였다.

Table 1. Average Composition of Serum Proteins in the Healthy Cockoreils and pullets.

Method	No	Component Composition (per cent) Globulins				
		Albumin	α	β	γ	A/G
Agar	mean	47.99	9.95	13.36	28.65	0.94
	±C.L	2.70	2.04	1.00	1.48	0.01
	♂ min.	36.20	8.21	10.30	19.58	0.57
	22 max.	59.79	13.48	17.99	38.29	1.49
	mean	38.38	15.83	14.07	31.29	0.63
	♀ ±C.L	1.60	1.25	1.62	1.39	0.04
	22 min.	30.70	12.06	6.09	26.40	0.45
	max.	45.00	21.10	20.00	37.10	0.83

Alb은 ♂에 있어서 A.E 47.99±2.70% P.E 51.06±2.75% ♀는 A.E. 38.38±1.60% P.E. 45.94±2.00%로 雌雄間의 量의 比는 A.E가 P.E.에 있어서 다같이

♂이 많고 t.檢定の 結果 매우 높은 有意性은 가지고 있으며 方法的인 差異點은 A. E.에서 보다 P. E에서 含量이 많음을 볼수 있다. 따라서 中雛의 Alb總量平均

은(總和를 4分) 45.78%로 中雛의 血清蛋白中 가장 많은 率을 차지하고 있음을 볼수있다.

α -glob, 은 公에 있어서 A. E. $9.95 \pm 2.04\%$ P. E. $7.17 \pm 0.57\%$ 이었고, 우는 A. E. 에서 $15.83 \pm 1.25\%$ P. E., $9.19 \pm 0.53\%$ 로 A. E., 나 P. E. 에 있어서 다같이 女가 높은 數値를 나타내며 t檢定 結果는 P. E. 에서는 有意의이나 A. E. 에서는 매우 높은 有意性을 나타내고 있었다. 總量平均은 10.51%로 中雛血清蛋白 成分中 가장 낮은 順位를 차지하고 있었다.

β -glob은 公에 있어서는 A. E., $13.36 \pm 1.00\%$ P. E., $9.03 \pm 1.03\%$ 이고, 우는 A. E., $14.07 \pm 1.62\%$, P. E. $9.63 \pm 1.60\%$ 로 A. E., 나 P. E. 에서 모두 가 높은 편이고 方法的인 面에서는 A. E. 에서 보다 P. E. 에서 높은 數値를 表示하고 있으나 t. 檢定結果는 모두 有意性을 認定할수 없었다. 總量平均値는 11.52%로 α -glob, 다음으로 많은 편이다.

γ -glob, 은 公에 있어서는 A. E., $28.65 \pm 1.48\%$ P. E. $32.93 \pm 2.13\%$ 이고 우는 A. E., $31.29 \pm 13.9\%$ P. E. $35.28 \pm 1.37\%$ 로 A. E. 에서 보다 P. E. 에서 낮고 雌雄間에 있어서는 A. E., 나 P. E. 에서 女가 높은 率을 차지 하고 있으며 P. E. 에서는 5%水準과 A. E. 에서는 7%水準에서 有意性을 가지고 있고 總量平均値는 32.01%로 Alb, 45.78%의 次位를 占有하고 있었다.

A/G는 公에 있어서 A. E., $0.94 \pm 0.01\%$, P. E., $1.16 \pm 0.04\%$ 이고 우는 A. E., $0.63 \pm 0.04\%$ P. E., $0.83, \pm 0.07\%$ 로 雌雄間의 差는 公이 높은 편이고 方法間에 있어서는 P. E. 에서 A. E. 보다 높은 率을 차지하고 있으나 有意性은 없다.

以上 中雛의 血清蛋白分劃 測定値의 量的 順位는 Alb α -glob, β -glob, γ -glob, 順으로 漸次 減少하였으며 性別로 比較하면 Alb는 公49.51%로 女42.51%보다 낮고 β -glob는 公11.18%와 女11.90%로 거의 差를 認定할수 없으며 α -glob는 公30.84%로 女33.29%보다 약간 낮은 比率을 나타내고 있다. 따라서 Alb만이 公에 있어서 女보다 含量이 많고 glob은 낮은 結果를 볼수 있다 P. E.에 있어서 A. E.보다 Alb이 높은 含量을 나타내고 있으나 Alb以外的 成分은 P. E.에서 보다 A. E.에서 높이나 나타나고 있음은 A. E.의 方法的 長點인 보다 完全한 分析能力으로 考慮되나 결코 그렇다고 斷定할 수 없으며 研究 分析 檢討를 하여 究明하여야 할 課題로 考慮된다. C. L.는 Alb에 있어서는 2.25%로 가장 幅이 넓고 α -glob, 1.60%, β -glob 1.31% α -glob 1.10%의 順位로 높아졌으며 各成分의 含量의 比에 따라 C. L.値가 比例하고 있음을 考察 할 수 있다. γ -glob의 含量의 比가 其他家畜(Cattle 26.4%, Horse 22.9% Pig 19.8%, Sheep 26.2%, Goat 78.6% Dog 13.5%)⁽⁶⁾에 比較하여

優位를 點有하고 있는 點은 試料로 使用하기 35~75日 前에 實施하였는 B₁ Vaccination의 影響으로 考慮할 수 있으나 實在 養鷄上에 있어서 2個月 또는 6個月마다 Vaccination을 하고 있으므로 臨床面에서 모순을 가져 오리라고 생각되지 않는다.

IV 結論

健康하다고 認定되는 白色單冠 Leghorn中雛 公40首 女40首에 對하여 濾紙 및 寒天電氣泳動法을 利用하여 血清蛋白을 分析測定하여 正常値를 決定하고 性別 方法의 差異點을 比較檢討 하였다.

Table 2. Mean Value of the Serum Proteins

Alb.	{A.E. ♂	$47.99 \pm 2.70\%$	♀	$38.23 \pm 1.60\%$
	{P.E. ♂	$51.06 \pm 2.72\%$	♀	$45.94 \pm 2.00\%$
α -glob.	{A.E. ♂	$9.95 \pm 2.04\%$	♀	$15.83 \pm 1.25\%$
	{P.E. ♂	$7.17 \pm 0.57\%$	♀	$9.19 \pm 0.53\%$
β -glob.	{A.E. ♂	$13.36 \pm 1.00\%$	♀	$14.07 \pm 1.62\%$
	{P.E. ♂	$9.03 \pm 1.03\%$	♀	$9.63 \pm 1.60\%$
γ -glob.	{A.E. ♂	$28.65 \pm 1.48\%$	♀	$31.26 \pm 1.39\%$
	{P.E. ♂	$32.93 \pm 2.13\%$	♀	$35.28 \pm 1.37\%$
A/G.	{A.E. ♂	$0.94 \pm 0.01\%$	♀	$0.63 \pm 0.04\%$
	{P.E. ♂	$1.16 \pm 0.04\%$	♀	$0.86 \pm 0.07\%$

2) 性別間에 있어서 各成分含量에 對한 有意性은 β -glob에서 만이 有意性이 認定되지 않으나 餘他 成分間에서는 매우 높은 有意水準을 나타냈다.

V 參考文獻

1. 青木, 口莖: 電氣泳動實驗法, 廣川書店. 1966.
2. Bussard A. and Perrin, D: Electrophoresis in agar plates, J. Lab. & Clin. Med. 46; 689 ~701. 1955.
3. 朴泳준: 濾紙泳動法에 依한 成犬의 正常血清蛋白分劃에 關한 研究, 全南大學校. 農山漁材開發研究. 3; 1965.
4. Common, R. H. Mckinley, W. P. and Maw, W. A: Filter Paper Electrophoresis of Avian Serum Protein, Science. 118; 86, 1963.
5. Deuel, H. J: The Lipids, I, Biochemistry, Newyork, Inter-Science Publishers, Inc. 1955 (Cited from 3.)
6. 友田勇: 日本獸醫學雜誌, 24; 6, 1962.
7. 平井, 鳥尾: 電氣泳動法, 共立全書. 1958.
8. 林鳳호: 血清蛋白分劃에 對한 研究, 大韓獸醫學會誌 4; 1, 1964.
9. 林鳳호: 濾紙電氣泳動法에 依한 韓牛, 豚의 正常血清蛋白分劃에 對한 研究, 大韓獸醫學會誌. 5; 1.

1965.

10. 小林外7人：日本獸醫學雜誌 15; 6, 2301.
11. 小林茂三郎：紙電氣泳動法の實察，南江堂 1956.
12. Mckinley, W.P. Oilver, W.F. Maw. W.A.

and Common, R.H. Filterpaper Electrophoresis of serum protein of the Doemstic Fowls, Proc. soc. Exptl. Biol. Med. 84; 346~351. 1953.

Paper and Agar Electrophoretic Studies of Serum Proteins of the Cockerels and Pullets

Chung Don Lee, D. V. M.

College of Agriculture, Jeon Nam University

ABSTRACT

Normal value of serum proteins of cockerels and pullets was obtained by seperating serum proteins of 80(♂40, ♀40)immature domestic fowls for routine clinical application purpose, using paper and agar electrophoresis.

The concentration count of serum proteins which were fractionated was determined by using densitometer and planimeter.

The fractionation value of serum proteins of cockerels and pullets was indicated in the table 1.

The composition of serum proteins by paper and agar electrophoresis showed remarkable differences between cockerels and pullets, but only β -globulin could not found difference between them