

魚肉蛋白의 貯藏狀態別 Disc 電氣泳動 分劃像의 比較研究

서울大學校 醫科大學 附屬病院

任 仁 順

서울 保健 專門學校

崔 興 敏 · 韓 良 一

Comparative Studies on Disc Electrophoretic Analysis of Fish Muscle Proteins in Stock Patterns.

Ihm In Soon

Seoul National University Hospital.

Choi Hung Min, Han Yang Il

Seoul Health Junior College

= Abstracts =

The authors carried out experiment based on *Pseudociaena manchurica* and *Cololabis saira* about what the fish muscle protein changed after being stocked. It resulted in the below and followed much improvement in medium of making polyacrylamide gel:

After salting the *Pseudociaena manchurica* and *Colobabis saira*, there after refrigerating and freezing of order it could be concluded by disc-electrophoresis that analytic pattern was most being in number by refrigerating at *Pseudociaena manchurica*, the second by salting and freezing. As it were: refrigerating is most suitable for saving protein.

緒 論

Polyacrylamide gel 의 small column 에 의한 Disc electrophoresis 는 Ornstein⁶⁾ 과 Davis^{2,3,7,9)} 에 의해서 개발되어 蛋白 其他物質分離에 使用한 새로운 方法이다.

이에 관해서는 Samuel Raymond 外^{8,9)} R. A. Reisfeld 外⁷⁾ I. M. Mackie⁴⁾, 西川勲 外¹⁾ J. Broome⁵⁾ 등에 의한 많은 研究報告가 있다.

즉 이 方法은 蛋白의 分離에 관해서 상당히 면밀한 分劃像을 볼 수 있어서 以前까지의 未備되었던점을 많이 發見 補充할 수 있게 하였는데 著者는 魚肉 蛋白의 貯藏에 따른 蛋白質의 變化를 Polyacrylamide gel 에 의한 Disc-electrophoresis 로서 比較 研究하는 본 研究를 實施하였다.

이 論文은 1969 年度 서울大學校 醫科大學 附屬病院 臨床 研究費의 補助를 받은 것임.

實驗材料 및 方法

Disc electrophoresis 는 polyacrylamide gel 로서 構成된 一部分의 column 에서 수행했다. 즉 蛋白試料와 混合된 large-pore anticonvection gel 과 electrophoretic concentration 이 일어나는 large-pore spacer gel 과 electrophoretic separation 이 이루어지는 small-pore gel 을 連續시켜서 泳動 分離하는 것이다.

(1) 供試藥劑

이번 使用한 藥劑는 다음과 같다.

A 液 ;

1 N HCl 24ml, Tris(Trishydroxymethyl-aminomethane) 18.25g, Acrylamide 19.0g, BIS(N,N'-methylene bisacrylamide) 1g 과 함께 증류수를 加해서 100 ml 로함.

B 液 ;

D MAPN(β -dimethylaminopropionitrile) 1.0 ml, 증

류수를 가해서 100 ml로 함.

C液 ;

Ammonium persulfate 1.0 g에 증류수를 가해서 100 ml로 함.

D液 ;

5 N HCl 12 ml, Tris 7.5 g, TEMED (N,NN',N'-tetramethylethylen diamine, anhydrous) 2.87 ml 증류수를 가해서 50 ml로 함.

E液 ;

Acrylamide 10 g, BIS 2.5 g, 증류수를 가해서 40 ml로 함.

F液 ;

Riboflavin 4.0 g, 증류수를 가해서 100 ml로 한 후 여과함.

G液 ;

泳動用緩衝液으로서 Tris 6 g, Glysin 28.8 g, 증류수를 가해서 1000 ml로 만드는데 사용할 때 마다 10 배로 희석한다.

H液 ;

蛋白染色液으로서 Amido black 10 B 1 g, acetic acid (7%) 100 ml, methanol 500 ml, 증류수 400 ml를 혼합한다.

I液 ;

脫色液으로서 7%의 acetic acid solution을 쓴다.

(2) 供試 材料

供試材料로서는 참조기 (*Pseudosciaena manchurica*)와 콩치 (*Cololabis saira*)의 背面筋肉을 1日, 2日, 3日 5日 10日間 鹽藏, 冷蔵 (5°C), 冷凍 (-20°C) 시킨 후 근육 5g을 homogenizer로 分碎하여 그 液을 試料로 使用하였다.

(3) 實驗方法

電氣泳動裝置本體의 下端에 scotch tape를 붙여 固定한 후 第1層(細孔 gel) 試藥을 調整하여 本體 下側의 赤線까지 流入한다. 細孔 gel 調整은 A液과 B液을 2:1의 比로 混合하고 다음에 C液을 1의 比로 섞는다. 本體에 細孔 gel을 流入한 후 gel層의 上端을 水平으로 하기 위하여 gel化 되기 前에 少量의 증류수를 서서히 떨어뜨려 重合한다. 3~5分間 光線을 쬐면 完全히 gel化 된다.

다음 第1層上에 重層된 증류수를 完全히 제거한 후 (本體를 거꾸로 해서 가볍게 上下로 振盪시켜 여과지를 대어서 吸水한다) 第2層(粗孔 gel) 試藥을 調整하여 上側의 赤線까지 流入한다. 粗孔 gel은 D液, E液 F液과 증류수를 1:2:1:4의 比로 混合한다. 粗孔

gel을 流入시킬 때 重層되기前 이 溶液의 少量을 사용하여 第1層의 表面을 洗滌하였다. (液을 넣고 가볍게 흔들어서 本體를 거꾸로 하여 除去하였다) 이 경우도 第1層과 같은 方法으로 少量의 증류수를 넣어 重層했다 第2層은 螢光燈(20 w)으로 10 cm의 距離에서 60分間 照射하였다. 最初 淡黃色을 나타내며(riboflavin의 色) gel化에 따라서 白濁化된다.

다음 第2層上의 水分을 除去 후 第2層에 쓰인 混合液中的 증류수 대신에 試料를 混合한 溶液을 第2層上에 流入한다. (第2層上 5 mm) 第2層과 같은 方法으로 光重合한다. 第3層(試料層)이 굳은 후 下端의 scotch tape를 除去하고 緩衝液을 上下의 緩衝液槽에 넣어 電流을 通한다. 上側의 緩衝液槽에는 陰極, 下側의 緩衝液槽에는 陽極으로 하전시킨다. 定電流로서 泳動을 한 電流는 30 mA 이었고, 泳動을 실시할 때의 溫度는 5°C를 유지하였으며 한번 使用한 緩衝液은 다시 使用하지 않았다. 또한 泳動中 蛋白質의 移動을 식별하기 위하여 0.001%의 Bromphenolblue 용액을 각각의 column에 두 방울씩 떨어뜨려 移動을 確認하였고 下端에서 5 mm까지 泳動을 하고 電流를 정지시킨 다음 抽出棒을 使用하여 第1層을 밀어 내어 染色箱子에 넣었다. 蛋白質의 染色은 第1層을 H液에 20分間 담가서 染色한 후 I液을 使用하여 脫色하였다. 脫色은 background가 無色透明할때 까지 반복하였으며 染色 및 脫色時의 溫度는 30°C를 유지하였다. 完全히 脫色된 gel의 保存은 7%의 acetic acid solution에 담갔다.

또한 上記 操作이 完了된 第1層을 densitometer에 걸어 graph로 圖示하였다.

實驗結果 및 考察

참조기 (*Pseudosciaena manchurica*)와 콩치 (*Cololabis saira*)를 1日, 2日, 3日, 5日, 10日間, 鹽藏, 冷蔵, 冷凍한 것을 polyacrylamide gel을 使用하여 disc-electrophoresis로 영동한 結果 다음 그림과 같은 成績을 얻었다.

i) 참조기의 鹽藏, 冷蔵, 冷凍에 관하여,

참조기의 신선한 재료를 電氣泳動한 결과 그 分劃像은 7개(A,C,E,F,H,I,J)의 泳動帶가 나타났다(그림 1).

鹽藏, 冷蔵, 冷凍한 것은 그림 3, 4, 5에 圖示하였다. 定性的인 區分은 더욱 實驗을 繼續하여야 明白히 究明되겠지만 本 實驗에서는 蛋白質의 分劃像만을 比較 검토하였다. 貯藏狀態別의 分劃像을 보면 먼저 鹽藏에 있어서는 제 1일부터 영동대의 一部가 소실되기 시작하여 10일 경과한 후에는 영동대가 4개(A,E,F,I)나 소실되어 3개(C,H,I)의 영동대만이 남아 있었다(그림 3).

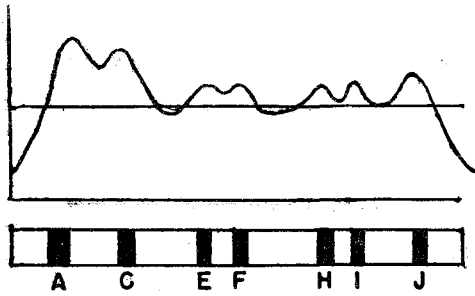


Fig 1. Polyacrylamide gel disc-electrophoresis patterns of fresh *Pseudosciaena manchurica*.

냉장한 경우에 있어서는 영동대가 1개만 소실 되고 신선한 재료와 거의 같은 分劃像이 계속 유지되었다(그림 4) 냉동에 있어서는 제 3일째 부터 영동대의 일부가 소실되기 시작하여 제 10일에는 영동대 3개(E,I,J)가 소실되어 4개(A,C,F,H)의 영동대만이 남아 있었다(그림 5).

이는 魚肉(참조기) 蛋白質의 저장에 있어서 냉장을 하는 것이 손실이 가장 적어 제일 効果的이라는 것을 제시하는 것이었으며 鹽藏하는 것 보다는 冷凍시키는 것이 蛋白質損失防止의 效果가 많다는 것을 意味하는 것이다.

ii) 콩치의 鹽藏, 冷蔵, 冷凍에 관하여,

콩치에 있어서의 신선한 材料를 電氣 泳動한 결과 영동대가 7개(B,D,E,F,G,I,J) 나타났었다(그림 2).

鹽藏, 冷蔵, 冷凍한 것은 그림 6, 7, 8에 圖示하였다. 貯藏狀態別의 分劃像을 보면 먼저 鹽藏에 있어서는 제 2일부터 영동대가 소실되기 시작하여 제 10일에는 영동대 3개(D,E,G)가 소실되어 4개(B,G,I,J)의 영동대만이 남아있었고(그림 6) 냉장에 있어서는 제 1일 부터 영동대가 소실되기 시작하여 제 10일에는 鹽藏과 마찬가지로 4개(B,D,I,J)의 영동대만을 나타내었다(그림 7) 냉동도 제 1일부터 영동대가 소실되기 시작하여 제 10일에는 4개(B,D,G,I)의 영동대를 남겼으며(그림 8) 鹽藏, 冷蔵, 冷凍이 같은 결과를 나타내었다.

iii) 貯藏狀態別에 따른 蛋白質의 保存效果에 대하여, 각 영동대의 물질에 대하여 定性的으로는 밝히지 못하여 무엇이 消失되었는지는 더욱 研究를 거듭하여야 밝혀지겠으나 참조기와 콩치를 鹽藏, 冷蔵, 冷凍하였을 때 냉장을 하는 것이 가장 많은 수의 영동대가 남게 되어 定量的인 立場에서 볼 때 魚肉의 筋肉蛋白質의 保存에 있어서 效果가 큰 것을 알 수 있었다.

要 約

이상의 결과를 요약하면 참조기(*Pseudosciaena man-*

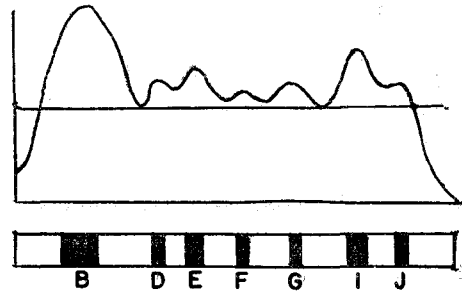


Fig. 2. Polyacrylamide gel disc-electrophoresis patterns of fresh *Cololabis saira*.

churica)와 콩치(*Cololabis saira*)를 鹽藏, 冷蔵, 冷凍하였을 경우에 참조기를 냉장한 것이 가장 效果적이었고 그 외는 거의 같은 결과를 나타내었다. 즉 참조기는 냉장하였을 경우가 蛋白質의 損失을 제일 적게 한다는 것을 알 수 있다.

參 考 文 獻

- 1) 西川 勲 外; *Changes of Bovine Milk protein by Heating as Revealed by Polyacrylamide-Electrophoresis* 農化, 第 41 卷 第 12 號. pp. 675~679, 1967.
- 2) 青木 幸一郎, 中 莖 榮三, 大井 優一: *電氣泳動實驗法* 廣川書店. 東京, 1965.
- 3) Daruch J. Davis: *Disc electrophoresis-II, Method and Application to Human Serum proteins, Part II. Clinical Applications*, pp. 404-427.
- 4) I.M. Mackie.: *Species Identification of Cooked Fish by Disc electrophoresis*, *Analyst*, Vol. 93, pp. 458-460. July, 1968.
- 5) J. Broome: *A Rapid Method of Discelectrophoresis*, *Nature*, pp. 179-180 July 13, 1963.
- 6) Leonard Ornstein: *Discelectrophoresis-I Background and Theory*.
- 7) R.A. Reisfeld, U.J. Lewis, D.E. Williams.: *Disc Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gels*, *Nature*, pp. 281-283. July 21, 1962.
- 8) Samuel Raymond, Lewis Weintraub: *Acrylamide Gel as a Supporting Medium for Zone Electrophoresis*, *Science*. 130. p. 711. 1959.
- 9) Samuel Raymond, Masumi Nakamichi Barbro Aurell: *Acrylamide Gel as an Electrophoresis Medium*, *Nature*, pp. 697-698, August 18, 1962.

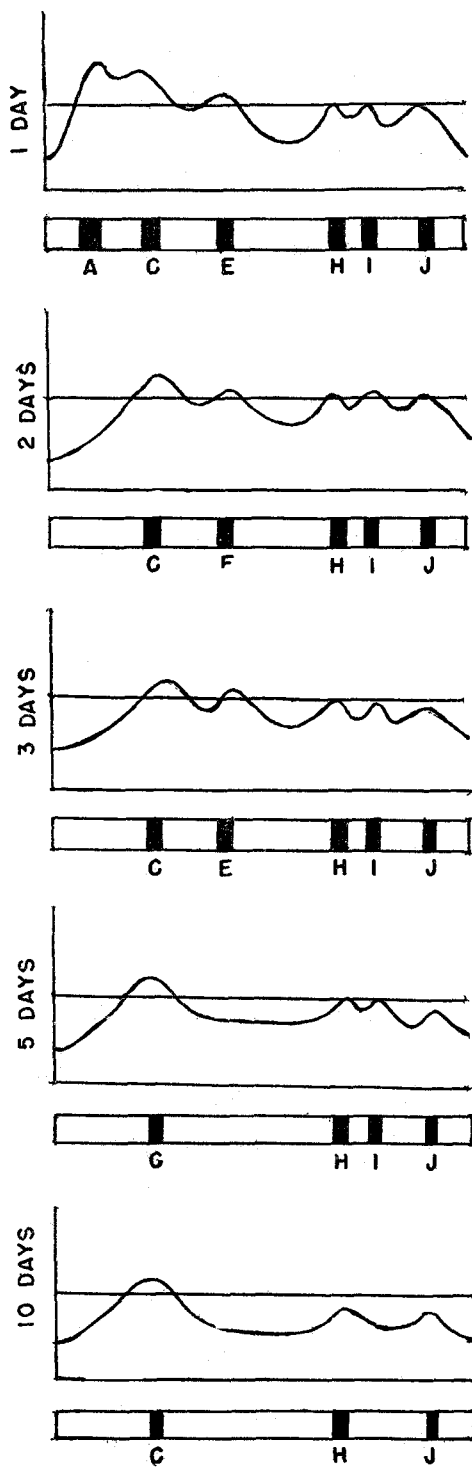


Fig. 3. Polyacrylamide gel disc electrophoresis patterns of *Pseudosciaena manchurica* in salting

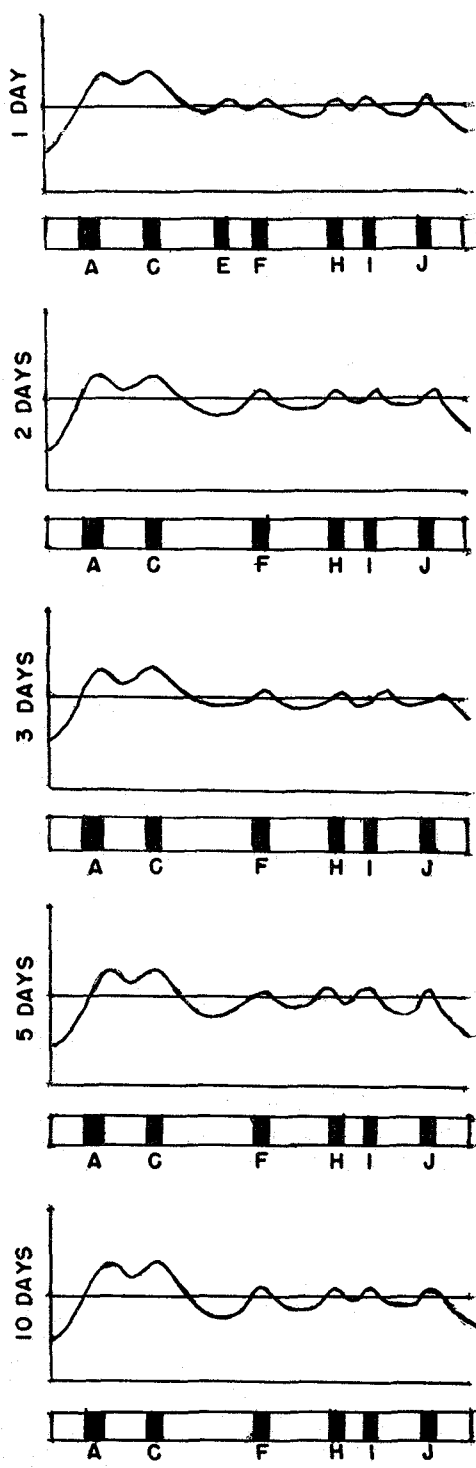


Fig. 4. Polyacrylamide gel disc electrophoresis patterns of *Pseudosciaena manchurica* in refrigerating.

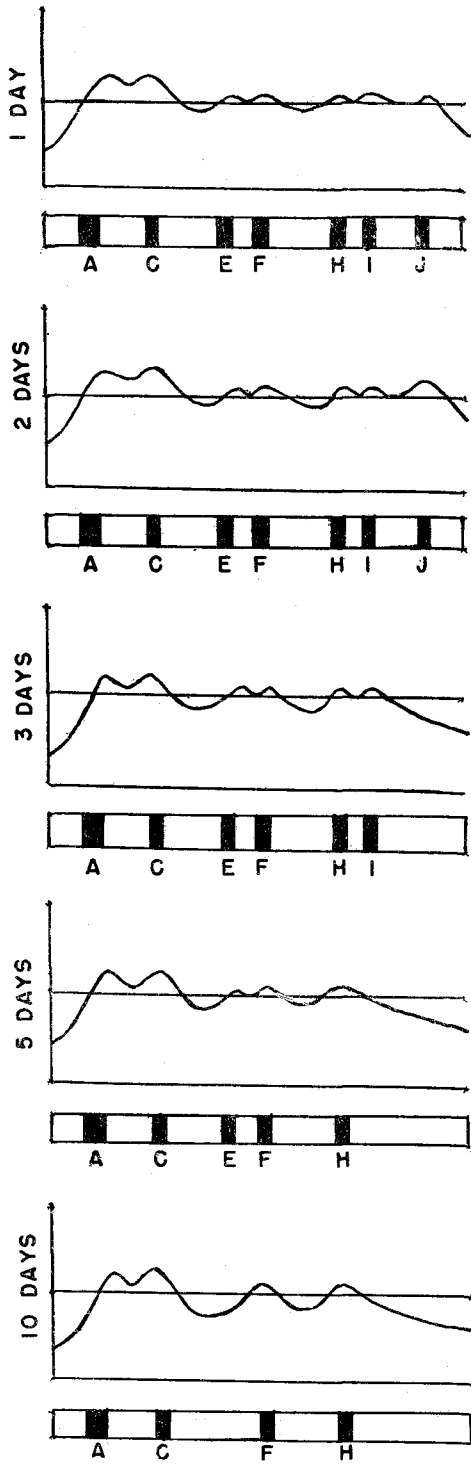


Fig. 5. Polyacrylamide gel disc-electrophoresis patterns of *Pseudosciaena manchurica* in freezing.

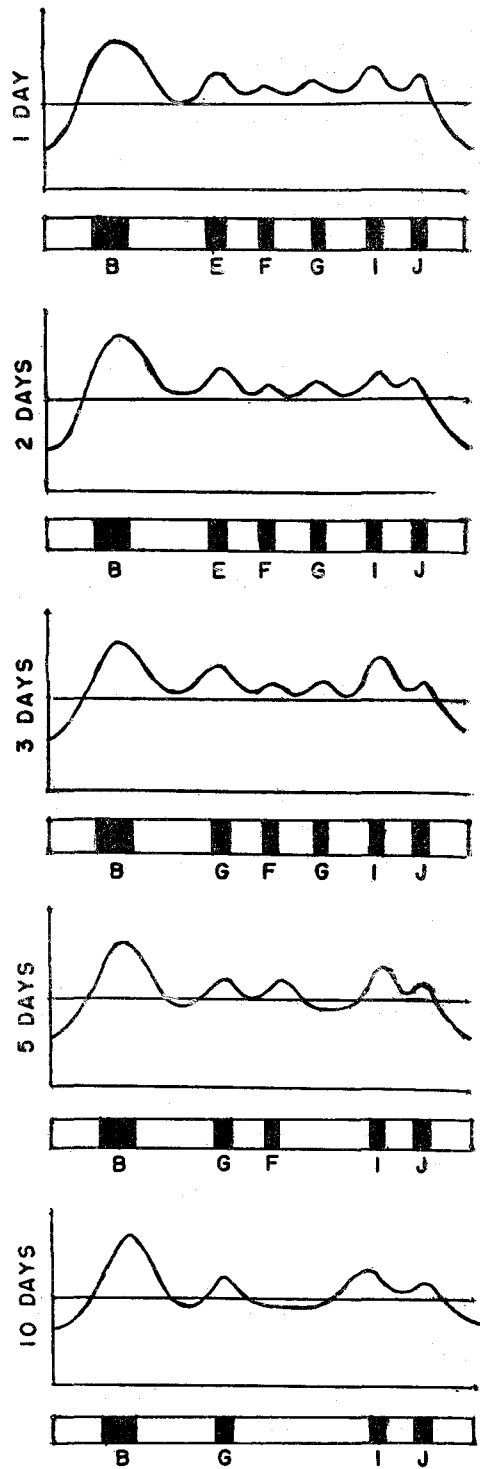


Fig. 6. Polyacrylamide gel disc-electrophoresis patterns of *Cololabis saira* in salting.

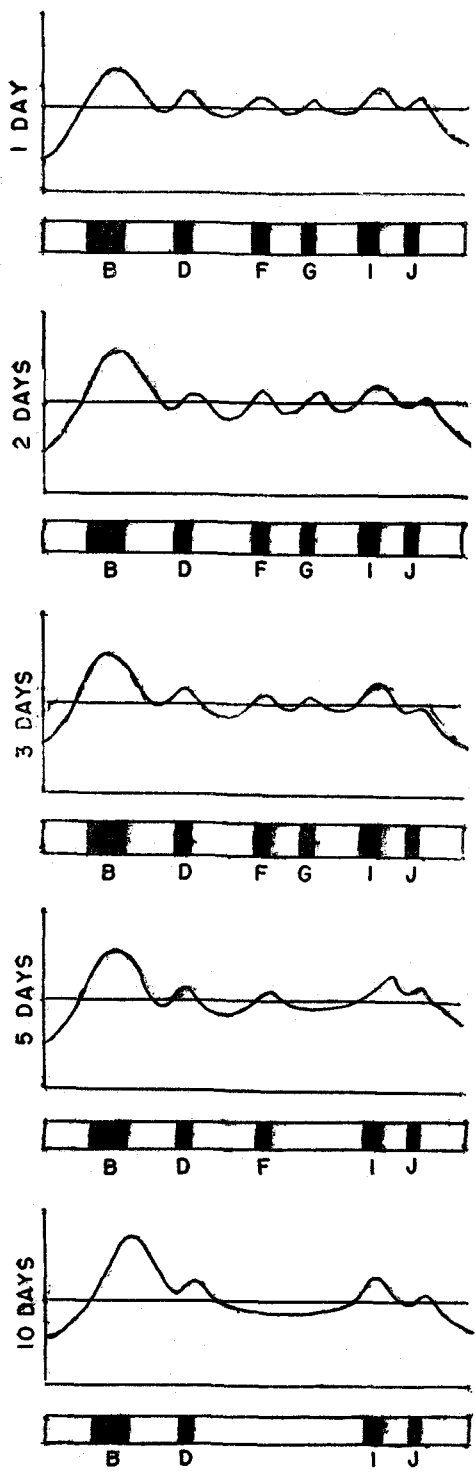


Fig. 7. Polyacrylamide gel disc-electrophoresis patterns of *Cololabis saira* in refrigerating.

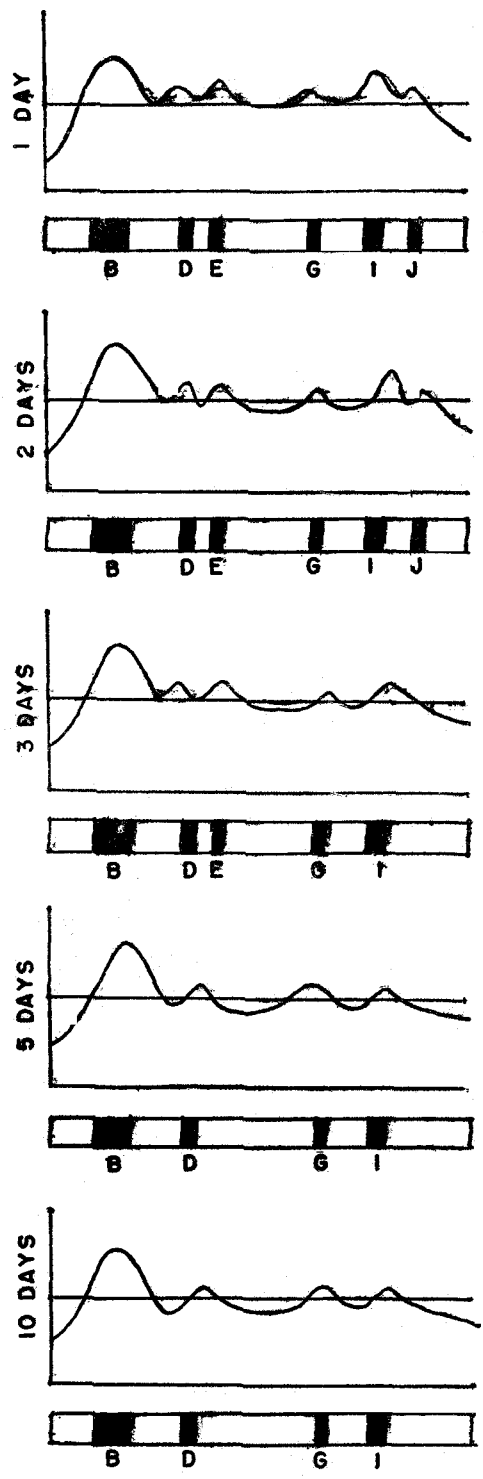


Fig. 8. Polyacrylamide gel disc-electrophoresis patterns of *Cololabis saira* in freezing.