

# 齒根膜蛋白質의 生合成에 關한 研究

서울大學校 大學院 齒醫學科 矯正學 專攻

(指導教授 梁 源 植)

鄭 夏 翊

## —目 次—

- I. 序 論
- II. 實驗材料 및 方法
- III. 實驗結果
- IV. 考 察
- V. 結 論
- 參 考 文 獻
- 英 文 抄 錄

## I. 序 論

齒根膜(齒周韌帶)의 結締組織은 齒牙를 支持하고 外力에 對한 방어기능을 가진 것으로 알려져 있지만 아직도 基質構成成分이 힘의 平衡을 어떻게 유지하는가는 알려진 바가 적다.

Löe 와 Listgarlen(1968)은 collagen 은 齒根膜의 主要한 構造蛋白質이라고 하였다. 齒根膜의 collagen 은 自己放射法을 利用한 實驗에서 齒根膜이 살아있는 한 급격히 合成되고 分解된다고 하였다(Carneiro 와 Leblond, 1966; Skougaard et al, 1970; Sodek, 1976; Sodek et al, 1977). 또한 이와 相反되는 견해로 Orłowski(1974; 1976)는 生體實驗으로 白鼠齒根膜 蛋白質에  $^3\text{H}$ -proline 이 總編入率은 상당히 많이 나타나나 collagen 分子내로의 編入은 매우 적다고 하였다. 한편 Rossman(1975)등도 사람과 hamster 에서 分離한 齒根膜을 배양실험하여 Orłowski(1974)의 관찰과 一致한다고 보고하고 있다.

한편 Rippin(1976, 1978)은 白鼠臼齒齒根膜의 自己放射法實驗으로 年齡이 증가함으로써  $^3\text{H}$ -proline 의 轉換率이 감소되나 他組織보다는 비교적 높다고 報告하고 있다. 本教室의 一聯의 研究로서 齒根膜의 化學的 性狀 및 巨大分子 代謝와 齒牙에 矯正力을 주었을 때 일어날 수 있는 變化를 觀察하기 위한 計劃으로 種에 따르는 齒根

膜의 蛋白質 組成, 특히 collagen 의 分布에 關해 崔(1979)가 實驗한 바 있다. 따라서 本 研究은 사람 및 韓牛의 齒根膜을 分離摘出하여  $^3\text{H}$ -proline 이 含有하는 培養液에서 培養하여 蛋白質合成能을 觀察하였다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1) 實驗組織의 準備

서울大學校 齒科大學 附屬病院에 來院한 患者에서 矯正을 目的으로 발치할 下顎小白齒를 無菌의으로 摘出하였다.

拔去한 齒牙는 附着된 齒根膜 주위 結締組織을 제거하고 나서 氷冷 Krebs-glucose, pH 7.0 내에서 齒根膜이 치아에 부착된 것을 쉽게 분리하기 위해 0.1% trypsin과 0.1% collagenase용액내에서 37°C에서 15分間 培養하였다. 그후 齒膜根은 齒牙에서 手術刀로 끊어 모아서 10% fetal calf serum 을 함유한 Krebs-Ringer 溶液內에서 trypsin과 collagenase를 不活性化시키고 다시 따뜻한 Krebs-glucose용액을 사용하여 혈액과 잔사를 제거하기 위해 세척하였다.

또한 韓牛의 齒根膜은 마장동 서울시 도축장에서 획득하여 즉시 하악골을 적출, 얼음상자에 넣어 운반한 후 上記와 같은 方法을 사용하여 分離摘出하였다.

### 2) 分離한 齒根膜의 組織培養

分離한 齒根膜 組織은  $^3\text{H}$ -proline 과 ascorbic acid (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )가 含有된 Krebs-glucose, pH 7.0에서 各培養條件에 따라 培養하였다. 各 實驗의 特殊한 條件은 다음 Table과 Figure에 記述하였다. 一定時間 培養후 培養液과 培養組織을 分離하였다. 그후 組織은 pH 7.0의 0.01M phosphate buffer내에서 均質化하였다. 그후 培養液과 組織의 蛋白質이 sodium dodecyl sulfate(SDS)와 급속히 結合하도록하고 各種酵素를 不活性化시키기 위해 最終濃도가 1%가 되도록 SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol 을 加하고 즉시 沸騰浴上에서 2分間 加熱했으며 蛋白質에 編入되지 않은 amino 酸을 除去하기 위해 0.1% SDS

는 함유된 pH 7.0의 0.01M phosphate buffer에서透析하여 試料材料로 使用하였다. 各試料의 總蛋白質 合成量은 scintillation counter (Nuclear Enterprise Co.)를 利用하여 同位元素( $^3\text{H}$ )을 測定하였다.

### 3) Agarose gel column chromatography에 의한 分離齒根膜蛋白質의 分劃

18歲된 實驗對象의 小白齒의 齒根膜을 3時間동안 培養하여 얻은 蛋白質의 性狀을 관찰하기 위해 SDS-agarose gel chromatography를 Jimenez et al.(1971)의 方法으로 施行하였다.

chromatography는 85×1.5cm의 column(Pharmacia Chem Co.)에 0.1% SDS가 함유된 6% agarose Biogel A-5M (200~400 mesh)를 넣어 施行하였으며 column에서 溶出되는 液을 各 3ml의 分劃으로 받아서 一部를 同位元素  $^3\text{H}$ 를 測定하였고 이때 同位元素가 많이 검출되는 peak의 分劃을 모아 同量의 12N HCl에 分解하여 hydroxyproline 量을 定量하였다.

### 4) 合成된 蛋白質의 SDS-acrylamide gel 電氣泳動에 의한 分子量 測定

電氣泳動은 Murphy et al.(1972)의 方法으로 施行하였다. 즉 5% acrylamide gel을 使用했고 cross-linker는 표준量의 半을 사용했다. gel은 電氣泳動後 消失을 적게 하기 위하여 즉시 冷所에서 차게 하고 1.5mm 分劃으로 細切하여 30% 過酸化水素水에 溶解시켜 scintillation cocktail에 희석하여 scintillation counter로 測定하여 各分劃의 peak를 얻었다. gel 分劃에 따르는 分子量을 찾기 위해 標準物質로 rat tail의 collagen의  $\alpha$ - 및  $\beta$ -chain과 牛血清 albumin을 電氣泳動하여 Comassie blue로 염색하여 同位元素 peak의 比較 gel로 살았다.

### 5) Hydroxyproline의 定量

各試料은 6N이 되도록 HCl을 加해 封管한후 105°C에서 24時間 加水分解하였다. 이 加水分解液을 蒸發접시에 넣어 蒸發시킨후 0.01N HCl에 溶出시켜 Juva와 Prockop(1966)의 方法으로 定量하여 水酸化된 百分率을 구하였다.

## III. 實驗 結果

### 1) 培養齒根膜의 $^3\text{H}$ -proline 總編入量과 Hydroxyproline 合成率 :

13歲, 18歲 및 47歲된 사람에서 채취한 齒根膜을 5.0 microcurie  $^3\text{H}$ -proline과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  ascorbic acid가 함유된 Krebs-glucose 용액에 3時間 동안 37°C에서 培養한후 培養組織과 培養液에 編入된  $^3\text{H}$ -proline 量을 測定한 結果는 Table 1에서 보는 바와 같다.

Table 1. Incorporation of  $^3\text{H}$ -proline and hydroxylation of  $^3\text{H}$ -proline by human periodontal ligament

Age (years)	Total counts (cpm)	Degree of hydroxylation (%)*
13	67,690	1.46
18	32,120	1.83
47	19,190	0.74

\* Values are  $^3\text{H}$ -hydroxyproline/total  $^3\text{H}$  × 100

즉 13歲되는 어린이의 齒牙의 齒根膜은 약 68,000cpm 정도 編入되었고 18歲에서는 32,000cpm 정도이고 47歲에서는 약 19,000cpm 정도 編入되었다. 이러한 것으로 보아 年齡이 증가함에 따라 編入量이 감소하는 경향이 보였다. 또한 collagen 生合成能力의 척도가 되는 hydroxyproline을 測定하기 위해서 試料을 6N HCl에 넣어 封管한후 105°C에서 24時間 加水分解후 測定한 結果 hydroxyproline 編入率도 13歲의 경우 1.46%, 18歲에서 1.83%가 47歲에서는 0.74%로 青年期에 비하여 老年期에서 감소되었다. 이와같이 蛋白質내로 編入된  $^3\text{H}$ -proline 중 少量만이  $^3\text{H}$ -hydroxyproline으로 水酸化되었다.

### 2) 生合成된 齒根膜蛋白質의 Gel filtration chromatography에 의한 分子量과 그 性狀

18歲 되는 사람의 小白齒에서 分離한 齒根膜組織을  $^3\text{H}$ -proline이 함유된 Krebs-glucose液에서 培養하여 얻은 生合成된 齒根膜蛋白質의 分子量을 測定하기 위한 方

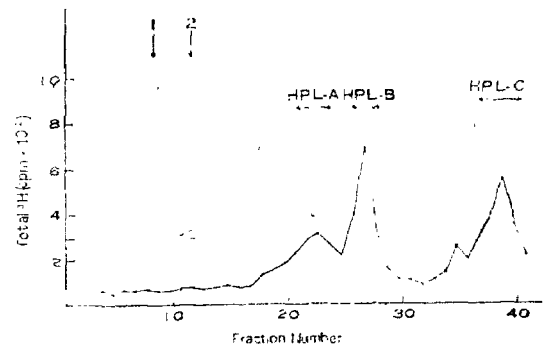


Fig. 1. Agarose gel chromatography of labeled proteins from human periodontal ligaments. Thirty thousand counts per minute of labeled protein sample was chromatographed on a column (1.5×85cm) of 6% agarose. Fraction size was 3.0ml, and aliquots were counted in scintillation counter. 1, marker  $\beta$ -chain of rat tail collagen; 2, marker  $\alpha$ -chain of rat tail collagen. Double arrows represent fractions combined that were assayed for  $^3\text{H}$ -hydroxyproline content (see Table 2).

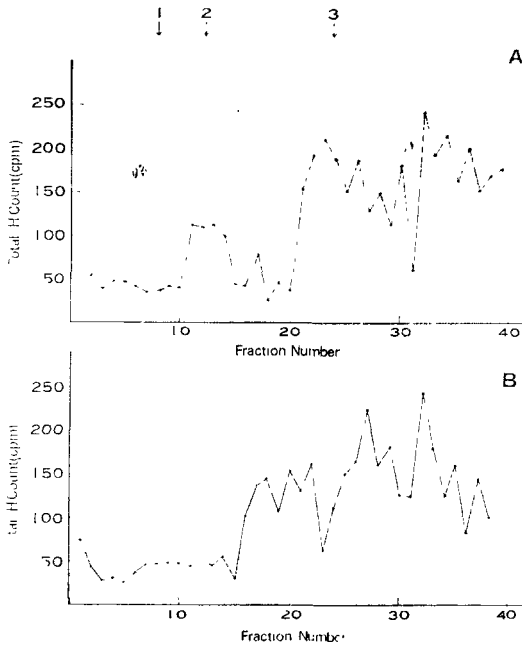
법에 따라 gel filtration chromatography로 분획한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

즉 培養齒根膜組織은 數種의 異型分子量을 갖는 分子로 分布되었고 procollagen 位置에는 peak가 거의 나타나지 않았으며 collagen의  $\alpha$ -와  $\beta$ -chain 分子量에 해당되는 位置에서의 peak에서는 아주 소량의 放射線 同位元素만이 檢出되었고 collagen 分子보다 分子量이 적은 分劃에서는 巨大 peak를 보았다. 各 巨大 peak의 溶出液을 모아  $^3\text{H}$ -proline의 水酸化率을 測定하여 어떤 collagen의 分解産物이 存在하는가를 測定한 結果는

**Table 2.**  $^3\text{H}$ -hydroxyproline content of labeled proteins isolated by gel filtration chromatography

Sample	Fractions combined	Total counts (cpm)	Degree of hydroxylation (%)*
HPL-A	20-23	17,100	3.12
HPL-B	25-27	19,880	2.38
HPL-C	36-39	8,720	3.03

\* Values are  $^3\text{H}$ -hydroxyproline/total  $^3\text{H} \times 100$



**Fig. 2.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins by isolated human periodontal ligaments.

The samples were treated as described in Material and Method. A, Eighteen year old sample; B, Forty seven year old sample; 1, Marker  $\beta$ -chain of rat tail collagen; 2, Marker  $\alpha$ -chain of rat tail collagen; 3, Marker bovine serum albumin.

Table 2에서 보는 바와 같다. 즉 모든 peak에서 水酸化率은 적어서 2~3%에 不遇하여 활발하게 collagen 合成을 하는 組織의 特性을 가지고 있지 않다.

### 3) 培養齒根膜에서 合成된 蛋白質의 SDS-acrylamide gel 電氣泳動에 의한 分劃

18歲와 47歲의 하악소구치에서 分離한 齒根膜은  $^3\text{H}$ -proline이 含有된 Krebs-glucose 培養液에서 3時間동안 培養하여 얻은 齒根膜蛋白質의 分子量特性을 究明하기 위해 disc 電氣泳動하여 얻은 結果는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

즉 18歲의 人에서 分離된 培養齒根膜의 蛋白質分劃은 collagen의 特性을 갖는 位置에서 적은 量의  $^3\text{H}$ -proline이 檢출되었고 分子量이 약 68,000 정도 되는 albumin에 一致하는 위치에서 많은 量이 檢출되었으며 더욱 低分子量을 갖는 位置에서 多樣한 分布를 이루고 있다. 또한 年齡이 증가되는 경우 collagen 合成의 活性은 더욱 떨어져 collagen 特性에 해당하는 위치의 peak는 거의 볼 수 없었고 低分子量으로 옮겨갈수록 異型分子를 갖는 蛋白質이 檢出되었다.

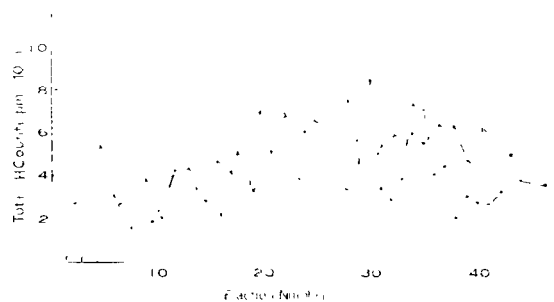
### 4) 分離한 牛前齒 齒根膜의 蛋白質 合成

2歲된 韓牛의 前齒齒根膜을 實驗方法에서 記述한바와 같이 처리하고  $^3\text{H}$ -proline이 含有된 培養液에 3時間 培養하여 培養齒根膜組織과 分泌蛋白質을 分離抽出하여 이에 編入된  $^3\text{H}$ -proline 量을 測定하고 또한 이들 試料의 水酸化率을 測定한 結果는 Table 3에서 보는 바와 같다.

**Table 3.** Incorporation of  $^3\text{H}$ -proline into proteins by isolated periodontal ligament of bovine incisor.

Samples	Total counts (cpm)	Degree of hydroxylation (%)*
Tissue	9,000	1.63
Secretion	89,380	0.27

\* Values are  $^3\text{H}$ -hydroxyproline/total  $^3\text{H} \times 100$



**Fig. 3.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of tissues and secreted proteins synthesized by isolated bovine periodontal ligaments.

Tissue protein            ······  
Secreted protein        ×-×-×

즉 培養齒根膜組織에 總編入된 量은  $9.0 \times 10^6$ cpm 정도로서 水酸化率은 1.63%이며 分비蛋白質에 總編入量은  $8.9 \times 10^4$ cpm 정도로서 水酸化率은 0.27%였다.

또한 牛齒根膜組織과 分泌蛋白質의 分子種을 究明키 위해 電氣泳動한 像을 보면 Fig. 3에서 보는 바와 같이 매우 다양한 分子量을 갖는 分劃으로 나타났으며 水酸化率이 적은 것파 一致하게 collagen chain에 해당되는 分劃보다 他蛋白質의 分劃에서 많은 同位元素의 peak를 보았다.

#### IV. 考 察

結締組織에서 細胞外 巨大分子가 合成되고 分解되는 率은 그 組織의 性狀을 나타내고 어떻게 그 機能을 行하 나를 보여줄 수 있다. 結締組織 基質내의 巨大分子合成과 전환은 發育期 組織의 成長과 成熟組織 및 再生組織의 再編成 등을 하도록 하는 一種의 섬세한 平衡과정을 밝게 된다. 齒根膜의 結締組織이란 齒牙를 支持하는 機能을 가진 것으로 알려 있지만 基質構成成分의 生動力學을 고려한 것에 관해서는 아직도 알려진 바가 적다. 한편 結締組織蛋白質合成에 관하여 서로 相反되는 견해가 있어 Carneiro와 Leblond(1966) Skougaard et al. (1970) Sodek(1976)과 Sodek et al. (1977)등은 특히 collagen의 合成이 活潑하다 하였으나 Page와 Ammous(1974), Orłowski(1974)와 Rossman et al. (1973)등은 collagen 合成은 他 蛋白質合成에 비해 상당히 적다고 하였다.

本實驗에서는 이상과 같은 差異를 究明코져 사람과 韓牛의 齒根膜을 分離抽出하여  $^3\text{H}$ -proline이 含有된 培養液에 一定時間 培養後 SDS와  $\beta$ -mercaptoethanol 처리를 하여 抽出한 蛋白質의 性狀을 究明하여 意義있는 結果를 얻었다. 즉 前실험을 통하여  $^3\text{H}$ -proline의 編入量이 큰 것으로 보아 分離齒根膜組織은 살아있는 狀態로서 蛋白質을 分泌하고 있는 것으로 思料된다.  $^3\text{H}$ -proline은 상당한 비율로 培養齒根膜蛋白質內로 編入이 되었고 年齡이 증가하는 경우 編入量이 감소하는 경향을 보였다. 한편  $^3\text{H}$ -proline의 總編入量은 많으나  $^3\text{H}$ -proline이 水酸化되는 率이 적은 것으로 보아 collagen은 合成되는 蛋白質의 小量分劃으로 나타났다. 또한 培養齒根膜 蛋白質을 agarose gel column에 chromatography 하여 이미 아는 分子量의 蛋白質과 比較한 결과(Fig 1) 소량의 proline이 collagen의 獨特한 分子量인 10萬 정도에서 編入되었고 대부분의  $^3\text{H}$ -proline은 低分子量을 갖는 蛋白質에서 檢出되었다. column chromatography에서 얻은 各 peak를 모아  $^3\text{H}$ -hydroxyproline양을 比較해 보면 어떤 分子量의 分劃에서도 collagen의 hydroxyproline 分子비에 해당하는 量만큼은 미치지

못하고 있다.

培養齒根膜에서 合成된 蛋白質의 SDS-gel 電氣泳動에 의한 分劃에서 있어서도 collagen特性을 갖는 分子量 位置에서는 적은 量의  $^3\text{H}$ -proline만이 檢出되었고 低分子量의 異型蛋白質의 分布가 두드러지게 나타나고 있고 年齡이 증가할수록 collagen合成의 活性은 더욱 떨어져 있는 것으로 나타났다.

牛前齒齒根膜의 蛋白質合成도 사람의 경우와 거의 같으며  $^3\text{H}$ -proline의 水酸化率은 組織蛋白質에서보다 分泌蛋白質에서 더욱 많은 것으로 보아 collagen合成은 매우 미약하다고 할 수 있다.

以上の 結果로 보아 Orłowski (1976)의 生體實驗과 Rossman등(1975)이 試驗管培養시험과 本實驗은 一致하여 즉  $^3\text{H}$ -proline의 齒根膜蛋白質 내로의 編入은 상당량 증가하나 collagen내로의 編入은 많지 않다.

이와는 相反되게 Carneiro와 Leblond (1966), Skougaard et al. (1970)과 Sodek et al. (1977) 등은 齒根膜내에서 상당한 量의 collagen이 合成되고 代謝가 급격히 일어난다고 하였다.

이와 같이 本實驗이 다른 研究者들과 差異는 實驗과 정에서 分析方法의 差異에서 기인할 수도 있고 또한 實驗에 사용한 試料의 年齡 및 種에따라 差異가 있을 것으로 思料된다.

矯正力에 의한 齒根膜의 變化에 관한 연구는 Crumley (1964), Koumas와 Matthews (1969), Baumrind와 Buck (1970), Rippin (1976, 1978), Diaz (1978)등이 蛋白質合成의 연구등을 통해 보고하고 있다.

本敎室에서 행한 齒根膜의 化學的 性狀 및 巨大分子 代謝등에 관한 本研究등과 관련하여 矯正力이 加해졌을 때의 collagen合成과 分解를 生化學的 方法 및 自己放射法을 利用한 組織學的 研究를 계속시행할 필요가 있다고 하겠다.

#### V. 結 論

本 研究는 分離抽出된 사람 및 韓牛의 齒根膜을  $^3\text{H}$ -proline 培養液으로 組織培養한 후 蛋白質合成能을 觀察하였다.  $^3\text{H}$ -proline의 蛋白質내로의 總編入量을 測定하여 본 결과 齒根膜에서의 蛋白質合成은 활발한 것으로 나타나지만  $^3\text{H}$ -proline의 水酸化率이 적어 collagen 合成은 적은 것으로 나타났다. 또한 分子量을 측정하기 위해 agarose gel chromatography와 SDS-polyacrylamide gel 電氣泳動을 試行하여 collagen分劃에 一致하는 部位에서  $^3\text{H}$ 의 量은 적고 低分子量을 갖는 他蛋白質의 分劃에서는 많은 量이 광범위하게 分布되고 있음을 보였다.

(이 論文을 시중 指導校閣하 주신 梁源植指導敎授님과 徐廷勳敎授님, 南東錫敎授님 및 전 실험과정을 돌봐 주신 口腔生化學敎室의 鄭泰英敎授님, 그리고 矯正學敎室員 諸位께 謝意를 表합니다.)

### 參 考 文 獻

- Baumrind, S., and Buck, D.L.: Rate changes in cell replication and protein synthesis in the periodontal ligament incident to tooth movement, *Am. J. Orthod.* 57: 109, 1970.
- Carneiro, J. and Leblond, C.P.: Suitability of collagenase treatment for the radioautographic identification of newly synthesized collagen labeled with  $^3\text{H}$ -glycine or  $^3\text{H}$ -proline, *J. Histochem. Cytochem.* 14: 334, 1966.
- Crumley, P.J.: Collagen formation in the normal and stressed periodontium, *Periodontics* 2: 53, 1964.
- Diaz, E.A.: Periodontal ligament collagen response to tooth movement: Histochemical and autoradiographic reactions, *Am. J. Orthod.* 73: 443, 1978.
- Jimenez, S.A., Dehm, P. and Prockpp, D.J.: Further evidence for transport form of collagen: Its extrusion and Extracellular conversion to tropocollagen in embryonic tendon, *FEBS Lett.* 17: 245, 1971
- Juva, K., and Prockop, D.J.: Modified procedure for the assay of  $^3\text{H}$ -or  $^{14}\text{C}$ -labeled hydroxy proline, *Anal Biochem.* 15: 77, 1966.
- Murphy, L., Harsch, M., Mori, T., and Rosenbloom, J.: Identification of a soluble intermediate during synthesis of elastin by embryonic chick aortate, *FEBS Lett.* 21: 113, 1972.
- Koumas, H., and Matthews, J.L.: Effect of pressure on the formation of collagen in the periodontal ligament, *Am. J. Orthod.* 56: 604, 1969.
- Löe, H., and Listgarten, M.A.: *Periodontium, in Periodontal therapy* (eds., Goldman, H.M., and Cohen, D.W.), 5th ed, St. Louis: C.V. Mosby Co., 1968, pp40-44.
- Orlowski, W.A.: Rate incorporation of protein- $^3\text{H}$  into the periodontium of a rat, *J. Dent. Res.* 53 (Special Issue): Abstract No. 222, 1974.
- Orlowski, W.A.: The incorporation of  $^3\text{H}$ -proline into the collagen of the periodontium of a rat, *J. Periodont. Res.* 11: 96, 1976.
- Page, R.C., and Ammons, W.F.: Collagen turnover in gingiva and other mature connective tissues of the marmoset *Sanguinus oedipus*, *Archs Oral Biol.* 19: 651, 1974.
- Rippin, J.W.: Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces. I. Young rat molars, *J. Periodont Res.* 11: 101, 1976.
- Rippin, J.W.: Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces. II. Adult rat molars, *J. Periodont. Res.* 13: 149, 1978.
- Rossmann, L.E., Rosenbloom, J., and Robinson, P.: Biosynthesis of collagen in isolated periodontal ligament., *J. Dent. Res.* 54: 1115, 1975.
- Skougaard, M., Frandsen, A., and Baker, D.G.: Collagen metabolism of skin and periodontal membrane in the squirrel monkey, *Scand. J. Dent. Res.* 78: 374, 1970.
- Sodek, J.: A new approach to assessing collagen turnover using a microassay. A highly efficient and rapid turnover of collagen in rat periodontal tissues, *Biochem. J.* 160: 243, 1976.
- Sodek, J., Brunette, D.M., Feng, J., Heersche, J. N.M., Limeback, H.F., Melcher, A.H., and Ng, B.: Collagen synthesis is a major component of protein synthesis in the periodontal ligament in various species, *Archs Oral Biol.* 22: 647, 1977.

최선웅: 치근막의 단백질조성에 관한 연구. 미발표

STUDIES ON THE PROTEIN BIOSYNTHESIS IN ISOLATED  
PERIODONTAL LIGAMENT

Ha Ik Chung, D.D.S., M.S.D.

*Dept. of Orthodontics, Graduate School, Seoul National University.*

*(Directed by Assoc. Prof. Won Sik Yang, D.D.S., M.S.D., Ph. D.)*

.....> Abstract <.....

The purpose of this study was to pursue the biosynthesis of proteins of human and bovine periodontal ligaments *in vitro* system. The excised periodontal ligaments from human and bovine were incubated in Krebs-glucose medium containing <sup>3</sup>H-proline. After incubation the incubated periodontal ligaments were homogenized and the proteins were treated with 0.1% sodium dodecyl sulfate and  $\beta$ -mercaptoethanol. Separation of the protein fractions was performed with agarose gel column chromatography and SDS acrylamide gel electrophoresis.

The results indicated as follow:

1. Only a small percentage of <sup>3</sup>H-proline incorporated into proteins was hydroxylated to <sup>3</sup>H-hydroxyproline.
2. The labeled proteins in periodontal ligaments showed a wide distribution of molecular weight. But only small amounts of labeled protein were found that were characteristics of the molecular weight of collagen.
3. In all of the combined fractions of gel filtration, the degree of hydroxylation was small.