

단백질과 色素 Coomassie blue G250과의 결합능력

朴 魯 東 · 李 淵 · 申 容 光

전남대학교 농과대학 농화학과
(1982년 11월 10일 수리)

Dye-binding Capacities of Proteins using Coomassie blue G250 in an Acidic Solution

Ro-Dong Park, Yeon Lee and Yong Kwang Shin

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chonnam National
University, Kwang-ju, Korea

ABSTRACT

Coomassie blue G250 produced metachromatic effect with some solvents. The absorptivity and molar absorptivity of the dye in ethanol were 82.4 and 70.4×10^3 at maximum absorption wavelength 610nm, respectively. The dye had a red form ($\lambda_m = 465\text{nm}$) in ethanol-phosphoric acid-water solution and converted to a blue form ($\lambda_m = 590\text{nm}$) after binding to protein. Absorbance at 590nm gave linear responses with respect to protein contents. The dye-binding capacities of proteins varied considerably with the content and source of proteins. Under the experimental condition the dye-binding capacities of bovine serum albumin, cytochrome C and γ -globulin were 110, 103, and 88 μg coomassie blue G250 bound per 100 μg protein, respectively.

서 론

단백질의 定量과 定性을 위한 신속하고 단순한 方法의 하나로서 1944년 Frankel-Conrat와 Cooper가¹⁾ 발표한 色素結合法(dye-binding method)은 단백질 중의 염기성 아미노산 殘基와 酸性色素(Orange G, Amido Black 10B, Eosine 등)와의 定量的 結合에 根據를 두고 있다.^{2,3)}

이 色素 結合법은 여러 종류의 곡식과 곡류 가공물, 사료, 우유, 肉類, 생선 등에서^{4~12)} 단백질을 定量하는 데에 널리 이용되어 왔을 뿐만 아니라 電氣泳動 후에 단백질을 檢索하는 수단으로도

사용되 왔다^{13,14)}. 또한 이 方法은 조작이 쉽고 간편하여 作物의 高蛋白質 品種의 育種에 필요한 mass screening 수단으로 주목받고 있다.^{5~8)}

이렇게 多様な 이용과 可能性에도 불구하고 단백질과 色素와의 結合에 관한 基礎的 研究는 미흡한 편으로 단백질의 色素結合能力은 반응액의 수소이온 농도에 의존하며¹⁴⁾ 단백질 중의 염기성 아미노산의 함량과 높은 相關을 갖는다는⁴⁾ 정도가 알려져 있다. 한편 Wilson은³⁾ 色素와 염기성 아미노산 殘基 사이에 형성되는 주된 結合(electrovalent association) 이외에도 적기는 하지만 또 다른 二次結合(secondary bond), 즉 色素와 단백질 중의 비염기성 아미노산 部分 혹은 이미 결합

된 색소 사이에 疎水的 結合이 형성될 가능성을 제시한 바 있다.

本 研究는 酸性溶液 中에서 色素 Coomassie blue G250(CBG250)과 3가지 단백질과의 반응 특성을 究明하고 그 定量關係를 제시하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시 약 : Bovine serum albumin(BSA, Cohnfraction V), Cytochrome C(horse heart Type II-A), γ -Globulin(bovine, Cohn fraction II.)을 미국 Sigma社에서 구입하여 標準蛋白質로서 사용하였다. 단백질 용액은 γ -Globulin은 0.1M NaCl 수용액에, 나머지 둘은 재증류수에 녹여 조제하였다.

단백질 시약은 CBG250(Sigma社 製品, 含量 75%) 100mg을 50ml의 99.5% ethanol에 녹인 다음 85%(w/v)의 磷酸 100ml를 가하고 재증류수로 1로 채우고 濾紙(Toyo filter No. 5)로 여과하여 調製하였다.¹²⁾

실험방법 : CBG250을 0.1%(w/v)되게 ethanol에 녹이고 이를 ethanol, methanol-acetic acid-water(5 : 1 : 5, v/v), 물, 5M NaCl, 15% Trichloroacetic acid (TCA)로 100배로 희석하여 可視光線領域에서 吸光 Spectrum을 조사하였다. 또한 단백질 용액과 단백질 시약 混合液의 可視光線과 자외선 吸光特性을 조사하였다.

단백질과 色素와의 定量的 結合關係를 조사하기 위하여 단백질 용액 0.1ml에 5.0ml의 단백질 시약을 가하고 잘 混合한 후 10분에서 1시간 사이에 spectrophotometer(Shimadzu MPS 5000)로 波

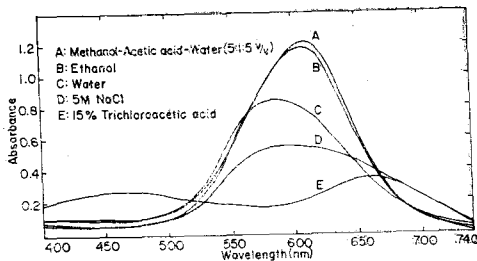


Fig. 1. Absorption spectra showing metachromatism(color change) of Coomassie blue G250 in various solvents. A stock solution of 1.0g/liter Coomassie blue G250 in ethanol was diluted with the final solvent to give 10mg/liter.

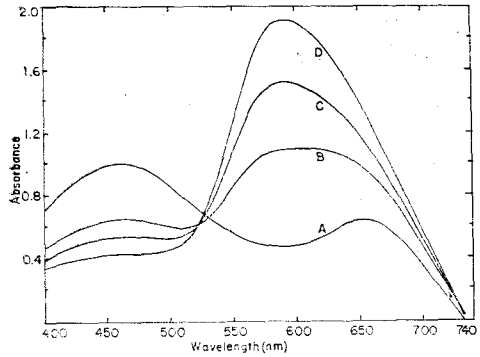


Fig. 2. Absorption spectra of bovine serum albumin-Coomassie blue G250 complexes. 3.0ml protein reagent was added to 0.1ml protein solution containing O(A), 0.5(B), 1.0(C) and 2.0mg/ml(D), mixed and scanned in a Shimadzu MPS 5000 spectrophotometer.

長 590nm에서 吸光度를 測定하였다.

단백질의 色素結合能力은 단계적으로 희석한 단백질 시약의 吸光度를 465nm에서 測定하여 標準曲線을 作成하고, 여러 濃度の 단백질 용액 0.1ml를 단백질 시약 3.0ml와 반응시켜 465nm에서 吸光度를 測定하고 未反應한 色素의 含量을 標準曲線으로 부터 읽어내어 蛋白質-色素 複合體를 형성한 CBG250의 含量을 결정하였다.

결과 및 고찰

Absorption Spectra : 가시광선영역에서 CBG 250은 溶媒에 따라 相異한 吸光 Spectra를 나타냈다(Fig. 1). Ethanol과 methanol-acetic acid-water(5 : 1 : 5, v/v) 용액중에서는 最大吸光波長(λ_m)이 610nm였는 데에 비하여 水溶液에서는 λ_m 이 585nm로 靑色移動하였고 吸光度는 ethanol 溶液의 그것에 비하여 약 30% 減少하였다. 한편 5M NaCl과 15% TCA용액에서는 吸光度가 더욱 減少하였으며, 15% TCA용액에서는 λ_m 이 660nm로 赤色移動하고 460nm에서 새로운 吸光帶가 형성되는 것처럼 보였다.

CBG250의 ethanol용액의 λ_m 610nm에서의 吸光係數(a, absorptivity)는 82.4(色素 含量을 100%로 환산하였을 때)였으며 물 吸光係數(ϵ , molar absorptivity)는 70.4×10^3 이었다. 이 測定值들은 Wilson이¹³⁾ methanol을 용매로 하여 波長 605nm에서 測定하여 보고한 $a=89.0$ 과 $\epsilon=76 \times 10^3$ 과 근

사한 값이었다.

단백질과 CBG250의 복합체 : Fig. 2는 BSA와 CBG250 복합체의 흡광 spectra를 보여주고 있는데, 색소는 ethanol-인산-水溶液에서 갈색($\lambda_m = 465\text{nm}$)을 지나 일단 단백질과 결합하면青色($\lambda_m = 590\text{nm}$)으로 변환되었다. 단백질의 농도가 높아짐에 따라 465nm에서의 흡광은 弱해지는데 590nm에서의 흡광이 增加하였다. 波長 590nm에서 형성된 새로운 흡광帶는 단백질과 CBG250이 반응하여 어떤 형태의 복합體化合物을 만들었음을 시사하는 것으로 볼수 있는데, 이 복합體는 波長 312nm에서도 새로운 흡광帶를 형성하였다.

Fig. 2에서 보인 바와 같이 단백질과 CBG250이 복합體를 만드는 경우에는 波長 522nm에서 同吸光點(isosbestic point)을 형성하였으나 대조구만은 여기서 벗어났다. 이것은 CBG250이 반응조건에서 2가지 이상의 형태로 존재할 가능성을 시사하는 것으로 Wilson³⁾ 제시했던 염기성 아미노산殘基와 CBG250 사이의 결합 이외에 또 다른 결합을 그 原因으로 고려해 볼수 있었으나 究明할 수 없었다.

波長 590nm에서 吸光도와 단백질 濃度 사이의 相關曲線은 Fig. 3과 같았다. 낮은 濃度(50~500 $\mu\text{g/ml}$)에서는 3 단백질이 모두 吸光도와 직선

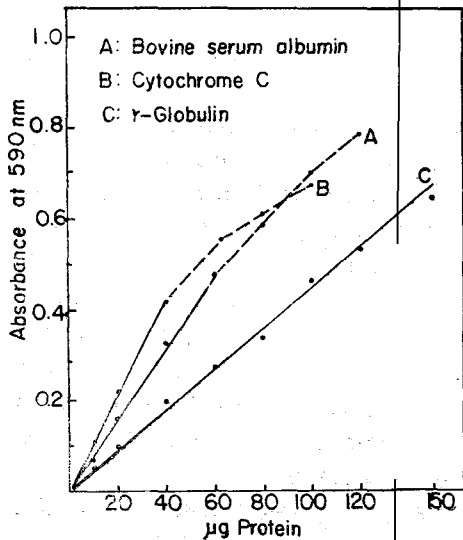


Fig. 3. Relationship between protein content and absorbance at 590nm. To 0.1ml protein solution, 5ml protein reagent was added, mixed and measured absorbance.

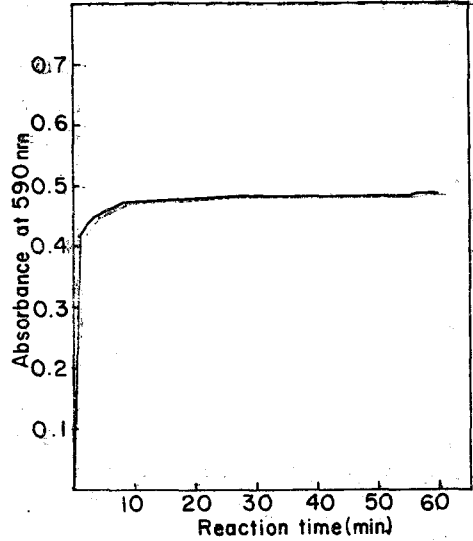


Fig. 4. Protein-dye complex formation rate and color stability.

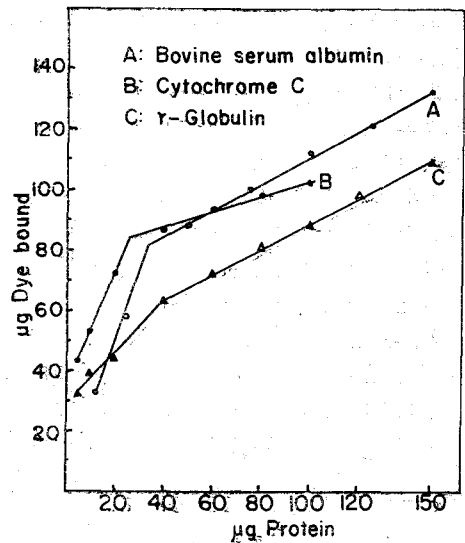


Fig. 5. Dye-binding capacities with respect to the contents of three proteins.

관계를 유지하나 이 범위 이상에서는 γ -Globulin을 제외하고는 직선관계에서 벗어났다. 직선관계의 범위에서도 $A_{590}/(10\mu\text{g protein/ml})$ 는 Table 1에 보인 바와 같이 단백질에 따라 서로 다른 값을 나타냈다. 반응조건에서 단백질과 CBG250은 신속하게 복합體를 형성하여 混合 후 8분이면 반응이 完結되었고, 또한 복합體는 반응용액 중에서 대단히 安定하여 침전이 쉽게 일어나지 않았다(Fig. 4).

단백질의 色素結合能力 : 본 實驗條件에서 단백질

Table 1. Summary of dye-binding properties of three proteins

Protein	Range for linear response ^{a)} (μg)	$A_{590}/(10\mu\text{g/ml})$ at linear range ^{a)}	Dye-binding capacities ^{b)} (μg CBG250 bound to)		
			20	50	100 μg protein
BSA	5~60	0.46	50	88	110
Cytochrome C	5~40	0.57	72	90	103
γ -Globulin	5~150	0.25	45	67	88

a) 5.0ml of protein reagent was added to 0.1ml of protein solution and b) 3.0ml of protein reagent to 0.1ml of protein solution.

질의 CBG250에 대한 결합능력은 얼마나 되는지를測定한 결과는 Fig. 5와 같았다. 단백질 함량 30 μg 을 전후하여 그 결합능력이 현저하게 변하였고 단백질마다 독특한 결합様相을 나타냈다. 濃度 1.0mg/ml인 경우 BSA는 110 μg CBG250/100 μg protein으로 最大結合능력을 보인 반면 γ -Globulin은 88로 最小結合능력을 나타냈다. 그러나 단백질 함량에 대해 色素 pool의 크기가 커지면 즉 더욱 낮은 단백질 濃度 범위에서는 그 様相이 뒤바뀌었다(Table 1).

Wilson³⁾은 단백질과 CBG250과의 結合비가 1.4mg dye/mg protein일 것이라고 推論한 바 있다. 그러나 本 實驗에서 드러난 바와 같이 그 結合當量은 단백질의 種類 및 濃度에 따라 차이가 있었다.

抄 錄

3가지 단백질과 CBG250과의 반응에 의해서 생성되는 複合體의 分光學的 性質과 結合當量을 測定하였다.

CBG250은 사용한 몇 가지 溶媒에 따라 最大吸光波長(λ_m)이 移動하였으며, ethanol용액 중 λ_m 610nm에서 吸光係數는 82.4, 물 吸光係數는 70.4 $\times 10^3$ 이었다.

CBG250은 ethanol-磷酸-水溶液에서 갈색($\lambda_m = 465\text{nm}$)을 가지나 일단 단백질과 결합하면 靑色($\lambda_m = 590\text{nm}$)으로 變換되었으며, 波長 590nm에서의 吸光度와 단백질 함량 사이에는 제한된 범위에서 비례關係를 나타냈다. 반응조건에서 단백질과 CBG250은 신속하게 複合體를 형성하였다.

단백질의 CBG250에 대한 結合當量은 단백질의 種類와 함량에 따라 현저하게 변하였다. BSA, Cytochrome C, γ -Globulin의 그것은 각각 110, 103, 88 μg CBG250/100 μg protein이었다.

사 의

저자들은 本 原稿를 읽고 유익한 批評을 하여 주신 단국대학교 식품 영양학과 金成坤 박사님께 誠摯한 謝意를 표합니다.

참 고 문 헌

1. Frankel-Conrat, H. and Cooper, M.: J. Biol. Chem., 154 : 239(1944)
2. Fazekas de ST. Groth, S.: Biochim. Biophys. Acta, 71 : 377(1963)
3. Wilson, C.M.: Anal. Biochem: 96 : 263(1979)
4. IRRI: In 'IRRI Annual Report', pp.27~43. (1969)
5. 박노동, 서용택 : 농어촌개발연구(전남대), 16(1) : 35(1981)
6. 김성곤, 이춘영, 박훈 : 한국식품과학회지, 3 : 101(1971)
7. 김성곤, 허문희, 이춘영 : 한국식품과학회지, 4 : 235(1972)
8. Esen, A.: Cereal Chem., 57 : 129(1980)
9. Moran, E.T.: J. Nutr., 79 : 239(1963)
10. Osone, K. and Takagi, T.: Japan J. Breeding, 20 : 301(1970)
11. Udy, D.C.: Cereal Chem., 31 : 389(1954)
12. Bradford, M.M.: Anal. Biochem., 72 : 248 (1976)
13. Davis, B.J.: N.Y. Acad. Annuals, 121 : 404 (1964)
14. Reisner, A.H., Nemes, P., and Bucholtz, C.: Anal. Biochem., 64 : 509(1975)