

(서울大學 文理科大學 化學科) (4290. 5. 受理)

페이퍼 에레크트로포레시스에 關한 研究 (第一報)

계란단백의 移動度에 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 $(0.243 \pm 0.003) \text{cm./hr./v./cm.}$ 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 $(0.073 \pm 0.0003) \text{cm./hr./v./cm.}$ 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 大分子化合物의 精製, 그들의 混合物에서 各 單一物質에로의 分離, 및 그들의 移動度의 測定等이 많이 研究되어 왔다. 또 한편, 이러한 콜로이드시스템에서의 研究外에 진짜 溶

液에서의 이온포레시스의 現象을 利用하여 진짜
溶液內에서의 各 이온의 精製, 分離, 移動度의
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 바
와 같은 電氣포레시스 或은 이온포레시스와 分
配크로마토그라피와를 結合하므로서, 간단히,
便利하게, 帶電하는 物質의 分離가 可能하게 되었
던 것이다. 이 電氣포레시스 或은 이온포레시스
를 結合시킨 分配크로마토그라피의 原理와, 分
別帶의 移動度에 關한 理論은 1946年 Consden,
Gordon, Martin ⁽¹⁾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 하므
로서, 몇몇 아미노酸의 分離를 可能하게 하였던 것
이다. 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한 要素가 되
는 것이다. 그러나, 얼마後에 이러한 電氣포레
시스를 젤리板에서 行하는 代身 濾紙上에서 일
으키는, 이른바 페이파 애레크트로포레시스가 發
展하게 되었으니, 그 代表的인 方法은 우선 1948
年 Wieland ⁽²⁾와 Fischer ⁽³⁾에 의하여 몇몇 아미노酸
이 分離되고, 다음으로 Durrum ⁽⁴⁾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 여려가지의 裝置를
考案하여 Zwitterion 을 形成하는 모든 生物化
學的 物質의 微量的分離, 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의 测定, 그 이온溶液에서의 各 水素이온
⁽⁵⁾濃度에서 存在하는 이온들의 相對的 量의 比率
等이 测定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 있으
며, 또 이 시스템 각각에 電極그릇을 使用하는
것과 電極그릇을 使用하지 않고 電極을 直接 緩

⁽⁹⁾ 衡溶液을 적신 濾紙에 接觸시키는 方法이 考案
되었다.

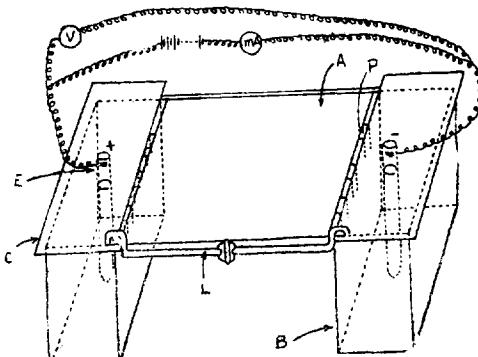
本論文은 이와같은 方法들 中에서 密閉式시스템
과 電極그릇을 使用하는 方法으로서, 上述한
바와 같은 諸般性質을 利用하여서, 이제까지 사
람血清 Albumin, 犬血清 Albumin ⁽¹⁰⁾의 移動度에 關
한 報告와 그들의 定量的 考察은 提出된 바 있
으나, 계란단백의 ovalbumin ⁽¹¹⁾에 關한 諸般報告가
아직 없기에, 이의 移動度 및 移動度에 重大하
게 影響을 주는 電氣오스모시스現象을 考察하여,
이 移動度를 補正하고, 溶液에서의 電氣포레시
스에 의한 데ータ와 比較하므로서, ovalbumin의
濾紙上에서의 電氣포레시스의 現象을 考察 하
였다.

II. 裝置 및 實驗

A) 裝置

使用的 裝置의 上斜面에서 본 모양을 그림 1
에 그렸다. 이것은 過去에 쓰인 한 裝置를 修
正한 것이다. 裝置는 크게 세개의 基本部分으
로 되어 있다. 即 1) 溫度調節用인 절연된 물자
체들과 이들 사이에 끼워지고 緩衡溶液에 적신
濾紙 2) 두개의 電極그릇 3) 兩쪽 그릇에 담긴
緩衡溶液의 表面높이를 같게 하여 靜水壓을 最
少로 하기 為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_3BO_3 와 0.2 M KCl 의 混合溶液(再結晶한 H_3BO_3 12.41 g 와 再結晶한 KCl 14.91 g 을 1000 ml. 的 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 ml로 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 cm의 쪽지로 削어서 使用하였다. 研究된 바에 依하면⁽⁸⁾ 濾紙를 셧거나, 셧지 않거나 間에 電氣오스모시스의 性質에는 變化를 주지 않으므로 여기서는 셧지 않고 그대로 쪽지로 만들어 使用하였다.

B) 實驗

電極그릇마다 각각 1000 ml의 緩衝溶液을 넣고, 電極을 깐 뚜껑으로 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 ml에 10 分間 담근다. 이 濾紙를 유리막대에 걸어 濾紙에 과잉으로 묻은 緩衝溶液을 멀어트린 다음, 밑 유리판 위에 놓인 밑 물자체 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 sheet를 펴 놓고 윗 물자체, 壓縮用 유리판 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 當 10 mg) 0.005 ml 를 마이크로피펫으로서, 表示한 原點에 멀어트리고, 한 濾紙쪽지에는 電氣오스모시스의 흐름의 指示藥으로서 0.01 M H_2O_2 0.005 ml 를 마이크로피펫으로서, 表示한 原點에 멀어트리고, 即時 윗 polyethylene sheet, 윗 물자체, 윗 壓縮用 유리판들을 놓는다. 이 操作이 끝나면 바로 直流 290±5 V의 電壓을 전다.勿論 이 回路에는 볼트메터, 미리암메터가 挿入되어 있고, 그때 4.5±0.5 mA의 電流가 흘렀다. 電源으로서는 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. 한시간마다 볼트메터, 미리암메터, 물자체의 물의 溫度를 읽었으며, 이때 溫度는 10±2°C로 유지 되었다.

所定의 時間이 經過한 다음, 回路를 끊고, 即時 電極그릇에 담긴 濾紙의 兩端을 끊어 버리고, 試料를 멀어트린 두장의 쪽지를 유리판 위에 놓아 100°C 電氣乾燥器 속에서 20分間 말린다. 이 말린 濾紙쪽지를 着色試藥(1% $HgCl_2$ 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 取하여 과잉으로 묻은 着色試藥이 全部 떠나져, 셧은 溶液의 色이 變하지 않을 때 까지(4~5回 程度) 셧고, 同樣으로 20分間 다시 말린다. 다음에 NH₄OH 가 든 병의 입언저리에 이 말린 濾紙 쪽지를 대면, NH₃ 깨스로 말미암아, 陽極쪽에 青色斑點이 나타난다. 한편 電氣오스모시스의 흐름의 指示藥을 멀어트린 濾紙는, 움직이지 않고, 直接 檢出藥(0.1M AgNO₃ 와 8% NH₄OH 와 6 M NaOH 와의 같은 量 씩으로 된 混合溶液)을 끊으면, 2~3分後에 陰極 쪽에 青色斑點이 나타난다. 이와같이 하여, 얻은 試料에 의한 두개의 斑點은 斑點의 각각의 中心을 取하여 原點에서 이 中心까지의 거리를 재고, 그것들을 平均하여 한 實驗의 테ータ로 取했고, 電氣오스모시스의 흐름의 指示藥에 의한 斑點의 거리測定도 同一한 方法으로 测定하여 테ータ로 삼았다.

III. 結果 및 考察

A) 察考

移動度의 計算은 下式을 使用하였다.

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

M= 移動度, d_1 ; 試料의 移動거리 d_2 ; 電氣오스모시스의 흐름의 指示藥의 移動거리, Q; 電氣場의 세기 t; 時間 d_2 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 에ЛЕクト로포雷시스에 의한 帶電한 알맹이의 移動度는 알맹이의 帶電, 크기, 모양,兩等性質, 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의 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 각時間마다의 폐ータ를 표 I에 적었고, 그림 II에는 平均電氣場의 세기를 5.30 ± 0.01 V/cm로 보아 移動거리—시간의 관계를 그리었다.

표 I. Ovalbumin의 移動度(The Mobility of Ovalbumin)

PH=8.0(KCl+H₃BO₃+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 electro- endosmotic 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 경우에서는, 그 앞의 것들에 比하여, 約 5.6%의 減少를 보이고 있다. 한편 電氣오스모시스의 흐름의 移動度는 時間に 無關하게 一定

하여 變하지 않으므로(표 II) 이러한 現象은 試料가 H₃BO₃+KCl+NaOH 緩衝溶液과 長時間 接觸하므로서, 어떤 生物化學的 變化를 이르켜, 試料에 變質을 招來하여 보다 낮은 移動度를 나타냈다고 생각된다.

如何든 이들의 平均값과 溶液에서의 電氣포레

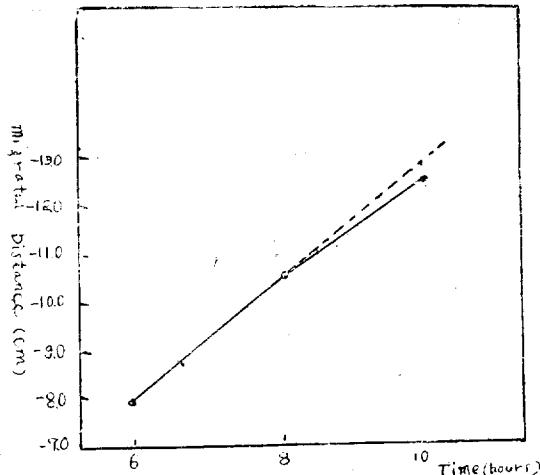


그림 II Ovalbumin의 시간에 따른 이동거리.
(Migrated Distance of Ovalbumin at Various Time Duration, pH=8.0(KCl+H₃BO₃+NaOH buffer mixture).

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 ovalbumin의 移動度는 A₁이 燐(12)(13)

酸鹽緩衝溶液의 pH 8.0, 이온強度 0.1, 0°C에서 6.49×10^{-5} cm/sec로 알려져 있고, 이것을 時單位로換算하면 -0.234 cm/hr/v/cm가 되는데, 이것과本實驗에서 얻은 平均값 $-(0.243 \pm 0.003)$ cm/hr/v/cm와 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°C인 보다 높은 온도였기 때문에, 보다 큰 값을 나타냈다고 생각된다.

報告된 바에 의하면, Ovalbumin은 A₁, A₂, A₃로 電氣포레시스的으로 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 II에 이에 關한 데ータ를 적었고, 그림 III에 平均電氣場의 세기를 5.30±0.01 v/cm로 보아서 시간—이동거리의 關係를 그리었다.

표 II (The mobility of electroendosmotic flow)

pH=8.0 (KCl+H₃BO₃+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 cm	Migrated distance per hour cm/hr	Mobility cm/hr/v/cm
	Hour	v/cm			
6	1	5.20	2.2	0.37	0.071
6	2	5.26	2.3	0.38	0.072
6	3	5.26	2.2	0.37	0.070
6	4	5.45	2.5	0.42	0.077
Mean		5.29	2.3	0.39	0.073
8	1	5.26	3.0	0.38	0.074
8	2	5.27	3.0	0.38	0.072
8	3	5.34	3.2	0.40	0.073
8	4	5.35	3.2	0.40	0.073
Mean		5.31	3.1	0.39	0.073
10	1	5.17	3.8	0.38	0.074
10	2	5.26	3.9	0.39	0.072
10	3	5.39	4.0	0.40	0.074
10	4	5.39	4.0	0.40	0.074
Mean		5.31	3.9	0.39	0.074
Mean		(5.30±0.01)		0.39	(0.073±0.003)

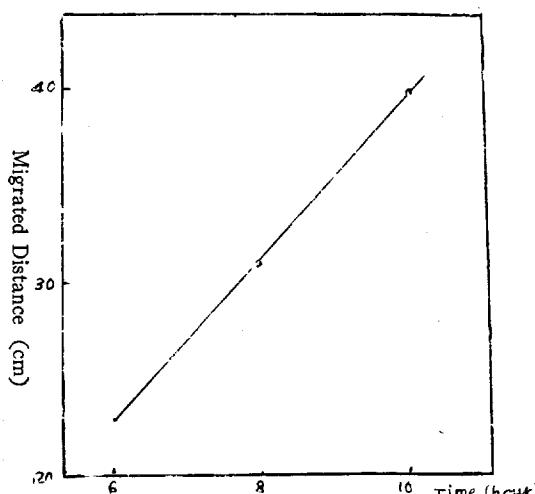


그림 III. 電氣오스모스의 흐름을 주는 指示藥의 시간에 따른 移動距離 (Migrated Distance of Electroosmotic Fow Indicator at Various Time Durations). pH=8.0(KCl+H₃BO₃+NaOH buffer mixture) Ionic strength=0.1 Mean strength of electric field 5.30±0.01 v/cm. Electric current 4.5±0.5 mA. Temp.=10±2°C.

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 II에서 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의 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 移動度가 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 移動度는 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 兩端 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, 각 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를 쓴다면, 이 흐름의 移動度는 한 種類의 濾紙에 對하여 한번 測定하기만 하면, 여러번 實

驗할 때 각各 測定하지 않아도 無妨할것으로 생각된다. 即 흐름의 指示藥으로서 0.01 MH₂O₂를 쓰고, 上述한 바와 같은 實驗條件를 썼을 때, Whatman No. I 濾紙에서 일어나는 電氣오스모시스의 흐름의 移動度는 時間에 無關하게 (0.073±0.0003)cm/hr/v/cm이라는 것을 알게 된다.

IV. 結論

1. 페이파 에렉트로포레시스에 의한 계란단백 Ovalbumin의 移動度는 8時間까지는 時間に 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. 계란단백 Ovalbumin의 A₁, A₂, A₃의 分離는 上述한 바와 같은 實驗條件에 의하여서는 分離되지 않았다.

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

4. 電氣오스모시스의 흐름의 移動度는 같은 濾紙를 使用하고 같은 實驗條件를 쓰면, 여러번 實驗할 때 각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.* **38** (1948) 29
- 3) Durrum, E.L.: *J. Am. Chem. Soc.* **72** (1950) 2943
- 4) Kunkel and Tisellius, 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 Tisellius, 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