

석사학위논문

2차원 전기영동에 의한 적혈구 단백질의  
유전적 변이에 관한 연구

제주대학교 대학원

생물학과



1988년 12월

STUDIES ON THE GENETIC VARIATION IN  
ERYTHROCYTE LYSATE BY TWO-DIMENSIONAL  
GEL ELECTROPHORESIS

Sung-Soo Hong

(Supervised by Professor Moon-You Oh)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1988. 12.

# 2차원 전기영동에 의한 적혈구 단백질의 유전적 변이에 관한 연구




지도교수 오 문 유

홍 성 수

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

1988년 12월 일

홍성수의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	이	응	필	
위 원	오	문	유	
위 원	고	석	찬	

제주대학교 대학원

1988년 12월 일

# 목 차

ABSTRACT .....	1
I. 서 론 .....	2
II. 재료 및 방법 .....	4
III. 결 과 .....	6
IV. 고 찰 .....	11
V. 적 요 .....	14
REFERENCES .....	15



---

## Abstract

Two-dimensional gel electrophoresis followed by silver-staining has been employed to study genetic variation of red cell lysates in Cheju population.

Total 2,891 polypeptides were identified of which 98 polypeptides appeared as the combination of a normal and a variant polypeptide.

Heterozygosity index of Cheju population calculated as  $3.3 \pm 0.23\%$ . The heterozygosity in Korean(Cheju)population was compared with those in other populations.



## I. 서 론

집단유전학 분야의 연구에 전기영동법이 도입된 이래 인류와 동물의 자연집단의 유전적 변이량에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다. 집단의 유전적 변이량을 정확하게 측정하는 것은 진화와 유전학적 측면에서 이론적 및 실제적으로 중요한 과제라 할 수 있다. 자연집단을 조사하게 되면 유전적 다형현상(polymorphism)을 흔히 볼 수 있으며, 인류집단에서 다형현상은 매우 유용한 genetic marker로서 활용되고 있다. 그리고 유전적 변이와 high-resolution genetic mapping에 대한 연구는 표현형(p henotype)을 검출할 수 있는 변이(variant)분석에 의존하는 데 인류에서는 DNA 염기 배열(DNA sequence)의 변화, DNA 절단길이 변화의 다형현상(DNA restriction fragment length polymorphism), 염색체의 형태(chromosomal morphology), 단백질의 전기이동도(protein electrophoretic mobility), 혹은 단백질의 기능(protein function)등의 변화로 검출되는 분자수준의 변이(molecular variant)를 분석함으로써 진행되고 있다.

Harris(1980)는 유럽인 집단에서 1차원 전기영동법과 선별염색법을 사용해서 검출할 수 있는 효소의 유전자좌위(enzyme loci)104개를 조사해서 이 중 23.1%인 24개가 다형현상을 보인다고 하였다. 따라서 이들의 결과에서 산출된 좌위당 average heterozygosity는 6.3%에 달한다고 보고 하였다. 하지만 단백질의 net charge를 변화 시키지 않는 아미노산 치환이나 효소 활성의 상실을 수반하는 돌연변이는 allozyme electrophoresis로 검출되지 않기 때문에 6.3%의 heterozygosity는 최소의 값으로 생각할 수 있다. sample bias의 문제를 고려한다고 할 때 이런 제한성 때문에 1차원 전기영동법과 선별염색법으로 분석하는 routine enzyme survey로 부터 전반적인 유전적 변이량(total genetic variability)을 정확하게 유추하는 것은 문제점이 있다고 볼 수 있다.

유전적 변이를 연구하는 또 다른 방법은 O'Farell(1975)에 의해 개발된 2차원 전기영동법을 사용하는 것인데, Wanner등(1981)은 이미 알려진 유전적 변이체(genetic vari

ant)의 90%는 2차원 전기영동법으로 구분할 수 있다고 보고 하였다.

2차원 전기영동법이 사람조직에 있는 단백질(human cellular protein)분석에 최초로 적용하였을 때 단백질의 유전적 변이량은 매우 낮다고 보고 되었다. McConkey등(1979)은 human diploid fibroblast line에서 2차원 전기영동과 double label autoradiography 방법으로 유전적 변이를 연구해서 1%보다 낮은 heterozygosity index를 보고하였다. 또한 Walton등(1979)은 human fibroblast에서 0.6%의 heterozygosity를 보고한 반면, Smith 등(1980)은 human kidney에서는 유전적 변이를 관찰할 수 없다고 보고하였다. Hamaguchi등(1981)은 phytohemagglutinin stimulated peripheral blood lymphocyte에서 0.5%의 average heterozygosity를 보고하였으며, Coming(1982)은 brain에서 0.04%의 average heterozygosity를 보고 하였다.

최근들어 Goldman과 Merrill(1983)은 human lymphocyte에서 2.4%의 heterozygosity를 보고하였으며, Rosenblum등(1983, 1984)은 serum loci에서는  $6.2\% \pm 0.7\%$ 의 heterozygosity index를 보고하여 1차원 전기영동에 의한 heterozygosity와 비슷한 결과를 보여 주었다. 그리고 27개의 erythrocyte loci를 조사하여  $3.1\% \pm 0.5\%$ 의 heterozygosity index를 보고하였다.

이처럼 집단의 실제적 유전적 변이량을 측정하기 위해서 2차원 전기영동법이 광범위하게 이용되고 있지만, 국내에서는 allozyme electrophoresis에 의해서 그것도 아주 부분적인 단백질의 다형현상 연구에 국한되어 왔으므로 한국인 집단에서의 유전적 변이량에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 적혈구내의 49개의 protein loci에 대해 유전적 변이량을 heterozygosity index로 산출함으로써, Oh 등(1988)이 보고한 혈장단백질의 유전적 변이에 대한 연구 결과와 비교 검토하여 제주도 인류집단의 실제적인 genetic variation을 알아냄과 동시에 한국인 집단의 유전적 변이량을 알 수 있는 척도가 마련될 수 있을 것으로 사료된다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 준비

임의로 선택한 건강한 제주도 주민 59명의 혈액 3ml을 EDTA-bottle에 채취, 1,500g로 원심분리하여 혈장과 혈구를 분리하였다. 분리한 혈구에서 nonpolymorphonuclear leukocyte를 제거하기 위하여 Ficoll-Paque(Pharmacia)를 첨가하여 원심분리하였고, 적혈구는 0.9%의 생리식염수(NaCl)로 세척하여 1,500g로 5분간 원심분리함으로써 백혈구를 제거시켰다. 남아있는 백혈구는 같은 방법으로 2번 세척하여 완전히 제거시켰고, 3번 세척된 적혈구를 packed red cell로 -76°C에 보관하였다.

packed red cell에 1M phosphate buffer(pH 8.0)를 동량 첨가하여 세포를 용혈시켰고, 13,000g로 5분간 원심분리하여 membrane을 제거한 후 다시 13,000g로 5분간 재원심분리시켜 상등액을 취했다. 전기영동 직전에 동량의 solubilization solution [9M urea, 2% Nonidet P-40, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% Ampholine(pH 3.5~10)]을 첨가하여 2분간 13,000g로 원심분리시켜 first-dimension isoelectric focusing gel에 application 하였다.

### 2. 전기영동 및 염색

2차원 전기영동은 O'Farrell(1975)의 방법을 변형한 Mclellan등(1983)과 Celis 등(1984)의 방법에 따랐다. first isoelectric focusing은 9M urea, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% Nonidet P-40, 2% Ampholine(LKB, pH 3.5~10)을 함유하는 polyacrylamide gel로 길이 13cm, 내경 2mm 유리관속에서 중합하여 만든 후, 200V에서 15분, 300V에서 30분, 400V에서 60분간 prerunning한 다음, red cell lysate를 application하여 400V에서 17시간, 800V에서 1시간 총 7,600V·시간으로 isoelectric focusing을 실시하였다. focusing한 후 gel을 꺼내서 equilibrium buffer(2% sodium dodesyl sulfate, 5%



$\beta$ -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.06M tris-HCl pH 6.8)에 넣고 second dimension electrophoresis를 실시할 때까지  $-76^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 2차원 전기영동(SDS polyacrylamide gel)은 12.5% acrylamide gel을 사용하였으며,  $10^{\circ}\text{C}$ 에서  $30\text{mA} \cdot 5$ 시간 동안 실시하였다. 2차원 전기영동후 단백질을 검출하기 위해 Merril 등(1982, 1982)의 방법에 따라 silver staining 하였다.

#### 4. 유전적 변이 분석을 위한 polypeptide의 선택

silver staining gel에 나타난 spot를 기초로, variability로 간주되는 bias에 관계없이 49개의 polypeptide를 선택하였고, reproducibility, intensity, relative isolation 등의 기준을 만족시키는 polypeptide에 한하여 유전적 변이에 대한 분석을 실시하였다(Rosenblum, 1982). 또한 유전적 변이에 대한 분석을 하기 위해 편의상 6개의 구획(A, B, C, D, E, F)으로 나누었으며, 왼쪽 방향으로 acidic side, 오른쪽 방향은 basic side로 구분하였다. 그리고 유전적 변이를 보이는 polypeptide를 확인하기 위해서 부, 모, 자식으로 구성된 10가계의 red cell lysate를 control로 사용했다.

이렇게 유전적 변이를 분석하여 average heterozygosity index로써 유전적 변이량을 산출하였다.



### Ⅲ. 결 과

본 연구에 사용된 polypeptide의 position은 Fig. 1과 같으며, 49개의 polypeptide를 선택하여 분석하였다.

Hardy-Weinberg 법칙에 따른 검정 결과를 토대로 variant의 빈도에 대한 수치를 Table 1에 나타내었다. 59명 각자에서 분석된 49개의 polypeptide중 6개의 polypeptid

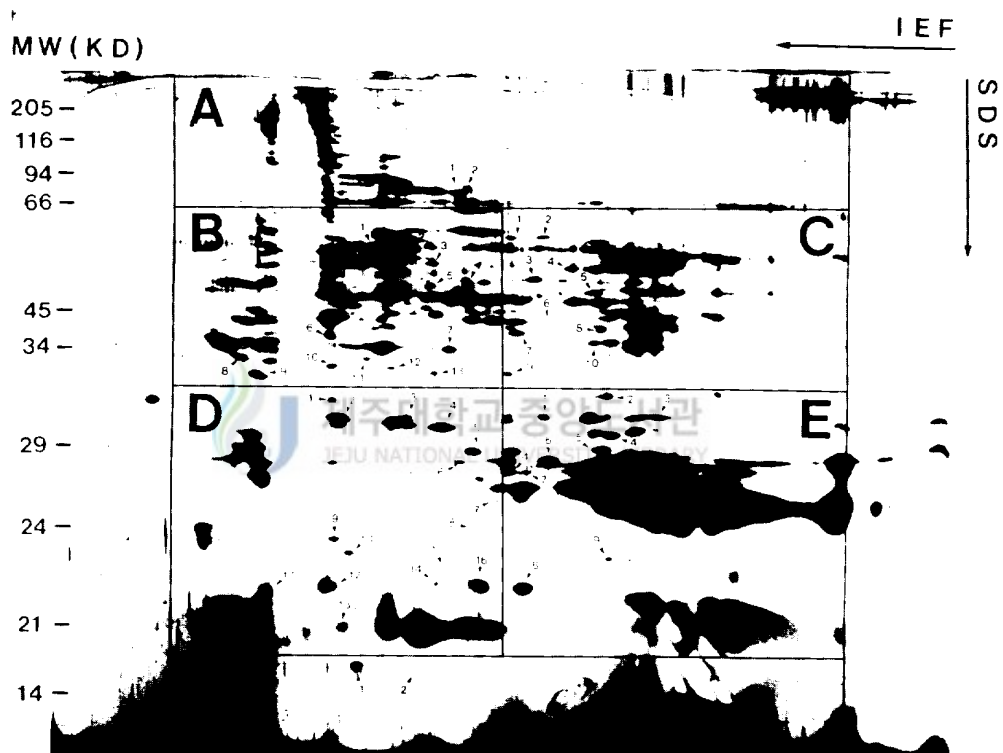


Fig. 1. Pattern of red cell lysate polypeptides separated by two-dimensional gel electrophoresis. The pattern is subdivided into convenient regions (A, B, C, D, E, and F), and the polypeptides scored for genetic variation are designated. The pattern was oriented with acidic side to left and basic side to the right.

Table 1. Genetic variation observed for six red cell lysate polypeptides among 59 individuals of Cheju population.

	B-001	B-011	C-006	D-014	D-012	E-007
Normal	48	33	52	36	44	28
Normal/Variant	11	26	7	20	15	19
Variant				3		12
Total	59	59	59	59	59	59
P	0.907	0.780	0.941	0.941	0.873	0.636
Q	0.093	0.220	0.059	0.220	0.127	0.364
X*	0.624	4.727	0.350	0.004	1.250	5.450

Note : A total of 49 spots were scored of which only these six polypeptides showed genetic variation. Criteria for selection were as described in text. The genetic nature of the variation was in all instances confirmed by the presence of the same variant in the parents.

\* Test for agreement with Hardy-Weinberg equilibrium proportions.

e가 genetic variant로 산출되었다. 총 2,891 polypeptide 중 98개의 genetic variant가 관찰됨으로써 average heterozygosity index가  $3.3\% \pm 0.23\%$ 로 산출되었다 (Table 2).

조사된 6개의 variable polypeptide는 다음과 같이 간단하게 요약하였다.

#### B-001

이 polypeptide는 약 60,000 dalton으로 11개의 variant가 관찰되었으며 (Table 1), normal spot에서 basic side로 약 1mm 정도 떨어져 나타났다 (Fig. 2a). normal spot는 일련의 3개 spot 중 하나였으며, 다른 2개의 spot는 B-001의 acidic side로 이동되어 나타나 3개의 spot 모두가 같은 variation을 보여주는 것 같으나 관찰된 전기영동적 이동의 spot의 크기로 구분될 수 있었다.

#### B-011

이 polypeptide는 분자량이 약 40,000 dalton으로 variant는 26개체에서 관찰되었다 (Table 1). variant는 normal spot보다 2.5mm 정도 basic side로 이동한 spot였다. normal과 variant의 gene frequency는 각각 0.78과 0.22였다.

C-006

이 polypeptide는 약 45,000 dalton으로 7개의 variant가 관찰되었으며, variant는 분자량을 축으로 normal polypeptide보다 약 3mm 정도에 나타나 분자량의 차이가 있음을 보였다(Fig. 2c). normal과 variant의 gene frequency는 각각 0.94와 0.06이었다(Table 1).

D-014

이 polypeptide는 약 20,000 dalton으로 분자량의 차가 현격한 20개의 variant가 관찰되었는데, normal position보다 약 3mm 위에 나타났다(Fig. 3e). normal과 variant에 대한 gene frequency는 각각 0.78과 0.22였다(Table 1).

D-012

이 polypeptide는 약 20,000으로 variant는 normal보다 약 5mm 정도 acidic side에 나타났다(Fig. 2d). normal과 variant에 대한 gene frequency는 각각 0.87과 0.13이었다(Table 1).

E-007

이 polypeptide는 약 30,000 dalton으로 19개의 variant가 관찰되었다(Fig. 2e). variant는 normal spot에서 acidic side로 약 10mm 정도 떨어져 나타났는데 세분된 부위에서 그 variant spot는 D부위에 위치해 있었지만, invariant인 D-006인 D부위에서의 spot와 중복되지 않아 위치상에 있어 서로 다르게 구분되었다(Fig. 1).

Table 2. Summary of polymorphisms identified by 2-D gel electrophoresis.

	No. loci surveyed	No. loci polymorphic	Heterozygosity	
			N/V combination	
Erythrocyte	49	6	N/V combination	98
			Total polypeptides	2,891
			Average heterozygosity=3.3±0.23%	

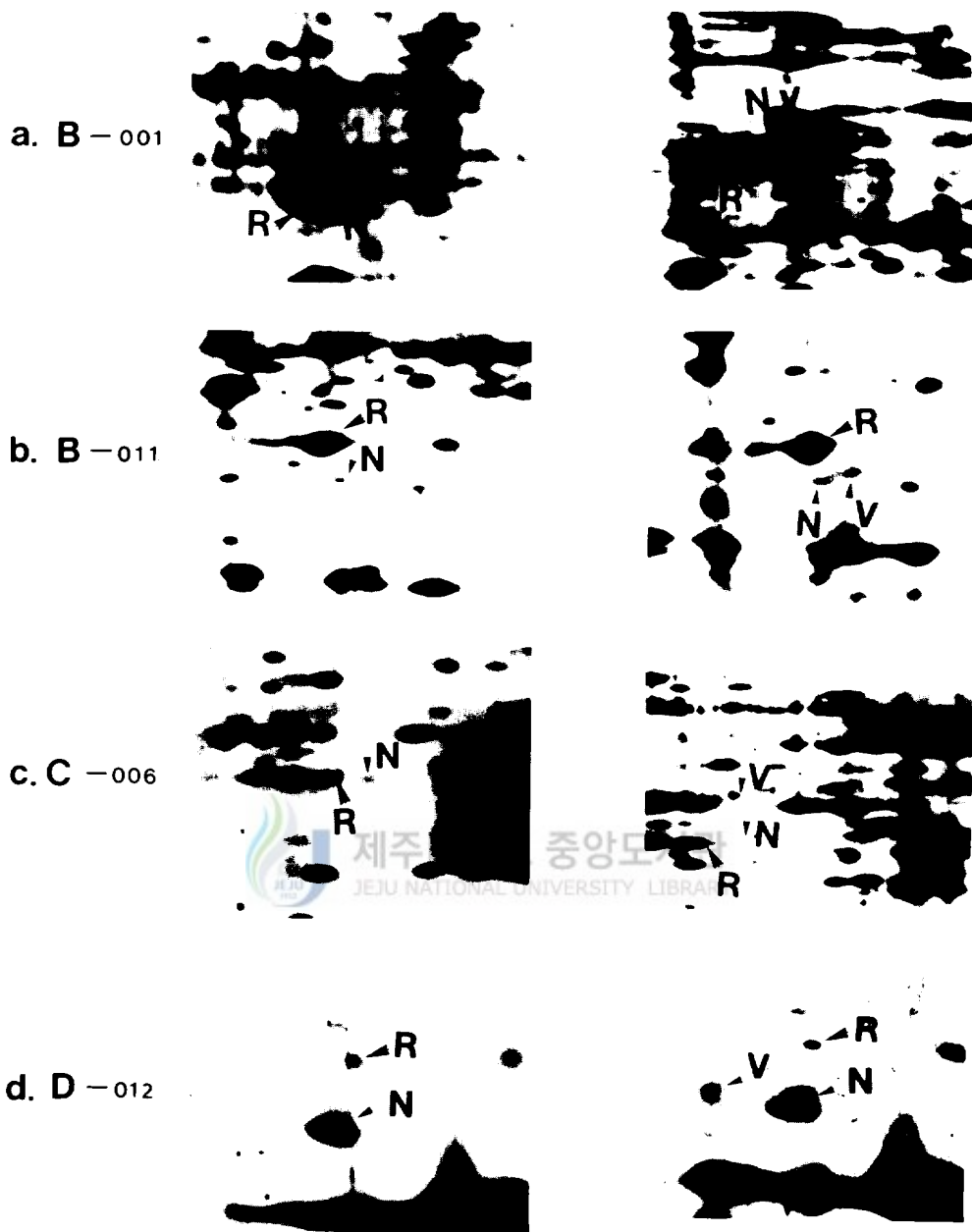


Fig. 2. Sections of the two-dimensional gels showing the variants (V) and the corresponding normal (N) polypeptides. In all photos, a convenient reference spot (R) has been designated.



Fig. 2. Sections of the two-dimensional gels showing the variants (V) and the corresponding normal (N) polypeptides. In all photos, a convenient reference spot (R) has been designated.

## IV. 고찰

본 연구에서는 49개의 polypeptide가 variability로 간주되는 bias에 관계없이 분석하는데 선택되어 그 중 6개의 variant가 관찰되었다.

이 6개의 variant중 2개의 spot(C-006, D-014)가 분자량의 차에 의한 것으로 관찰되었다. 이와 같은 현상은 Oh 등(1988)의 plasma protein에 대한 연구에서도 분자량이 다른 variant polypeptide가 관찰되었고, Rosenblum 등(1983)의 2차원 전기영동법을 이용한 heterozygosity 연구에서도 같은 결과를 보고하였다.

이상의 plasma protein variant로 보고된 polypeptide중 2개의 polypeptide는 2D gel에서 분자량에 의한 mobility의 차로 관찰되었지만, 이런 variant의 원인 및 polypeptide의 구조적 변형에 대해서는 확실히 밝혀진 바 없다. 그러나 이전의 연구에서 보면, molecular charge를 변화 시키는 single amino acid의 치환이 2D gel에서는 polypeptide의 전하나 분자량을 변화시킬 수 있다는 것을 입증하고 있으며(Leavitt, *et al.* 1982), neutral amino acid 치환도 1D gel에서 polypeptide의 molecular weight를 변화시킨다는 것이 밝혀졌다(Wilson, *et al.* 1981).

Rosenblum 등(1983)의 plasma polypeptide 연구에서 32개의 spot 중 14개의 spot가 이미 알려진 동일 polypeptide와 일치하였고, 본 연구에서 scoring된 polypeptide에서는 어떤 spot와도 동일하지 않았다. plasma polypeptide 연구에서 scoring 하기 위해 선택된 2개의 spot가 1차 gene product와 그리고 같은 polypeptide가 변형된 경우는 동정하지 않았는데 이런 2개의 spot중 1개의 spot를 scoring 하지 않는 것은 heterozygosity를 산출해 내는데 있어 그 index가 6.2%에서 6.5%로 증가되는 것을 알 수 있었다. transferrin,  $\alpha$ -1-antitrypsin,  $\alpha$ -Fibrinogen과 같은 여러가지 다른 plasma polypeptide에서도 variant의 부위에 같은 모양의 multiple spot가 다양하게 나타나는데 이는 바로 1차 gene product와 파생된 spot가 여러개 존재한다는 것으로 잘 설명되어 질 수 있다(Rosenblum, *et al.* 1983, Anderson, *et al.* 1979). 본 연구에서 6개의 variant

spot보다 더 많은 변화가 나타나는 것처럼 보였으나 scoring된 spot중 어떤 spot도 동일하지 않았고, 변화된 spot도 없었기 때문에 variant를 구분할 수 있었다. 이렇게 해서 산출된 heterozygosity index는  $3.3 \pm 0.23\%$ 로 나타났다.

Humant tissue에서 2D-PAGE를 이용하여 산출된 heterozygosity index는 Table 3과 같으며, i) fibroblastic cell line, kidney, brain, lymphocyte에서는 약 1% 이하였고, ii) lymphocyte와 red cell lysate에서는 2%~3%, iii) plasma에서는 6%~8%로 3개의 group으로 구분할 수 있었다. 이처럼 여러 다양한 cell, tissue, body fluid에서 2D-PAGE에 의해 산출된 heterozygosity index가 다소의 variation을 보여 주고 있는데, 이에 대해 여러 의견들이 제시되고 있다. 첫째 single polymorphic polypeptide의 첨가나 결여가 scoring된 polypeptide와는 다르기 때문에 heterozygosity index를 1%~2% 증가 또는 감소시킬 수 있고, 둘째, 이런 차이점은 protein 동정에 있어서 silver staining에 기인될 수 있다는 것인데, Goldman(1983)과 Merril(1982)의 lymphocyte polypeptide 연구에서 autoadiography 방법이 사용되어 2.4% heterozygosity index로 산출된 것을 보면 알 수 있다. 결국, 그 차이점을 분석하는데 있어 불확실한 spot를 선택함을 기준으로 하였을 때 기인될 수 있다는 것인데, 바로

Table 3. Heterozygosity indices of population surveyed by 2-D gel analysis in various human tissues.

Population	Tissue	Average heterozygosity	Reference
Caucasoids	Brains	0.04 %	Coming(1982)
Caucasoids	Kidneys	no genetic variation	Smith <i>et al.</i> (1980)
Caucasoids	Fibroblasts	1.0 %	McConkey <i>et al.</i> (1979)
Caucasoids	Fibroblasts	2.0 %	Goldman <i>et al.</i> (1985)
Japaneses	Lymphocytes	0.5 %	Hamaguchi <i>et al.</i> (1981)
Caucasoids	Lymphocytes	2.4 %	Goldman & Merril(1983)
Caucasoids	Plasmas	6.2 %	Rosenblum <i>et al.</i> (1983)
Caucasoids	Plasmas	8.0 %	Asakawa <i>et al.</i> (1985)
Korean	Plasmas	7.6 %	Oh <i>et al.</i> (1988)
Caucasoids	Erythrocytes	3.1 %	Rosenblum <i>et al.</i> (1984)
Korean	Erythrocytes	3.3 %	<i>this study</i>



scorable polypeptide을 선택하는 기준 등의 차이에 기인한다고 볼 수 있다. 따라서 2D gel에서 crowded 부위의 variant를 정확하게 scoring할 수 있는지는 의문스럽다는 것이다.

Asakawa 등(1985)은 Amerindian, Japanese, Caucasoids의 plasma sample을 전기영동법으로 연구해서 Amerindian에서는  $4.5 \pm 0.6\%$ 의 heterozygosity index를, Japanese는  $5.7 \pm 0.7\%$ 의 heterozygosity index를, 그리고 Caucasoids의 경우는  $8.0 \pm 1.1\%$ 의 heterozygosity index를 나타낸다고 보고하였고, 또한 Oh 등(1988)은 제주도 집단의 plasma sample에서  $7.6 \pm 1.5\%$ 의 heterozygosity index를 보고 하였는 다.

따라서 Oh 등(1988)과 본 연구에서 수행된 제주도인 집단의 heterozygosity index를 비교하여 볼 때 (Table 4), 제주도인 집단의 실제적인 heterozygosity index는 5.45%라 할 수 있다. 이는 곧 한국인 집단의 genetic variation의 정도를 알 수 있는 척도가 될 수 있을 것으로 보이며, 앞으로 많은 연구가 수행되어 더 정확한 한국인 집단의 genetic variation을 산출함과 동시에 다른 ethnic group과의 비교 검토가 필요하다고 사료된다.

Table 4. Heterozygosity indices of Cheju population.

Tissue	Method	Heterozygosity	Reference
Plasmas	2-D, Commassie blue R-250 and silver staining	7.6%	Oh <i>et al</i> (1988)
Erythrocytes	2-D, Silver staining	3.3%	<i>this study</i>
		Combined	5.45%

## 적 요

제주도인 집단에서의 유전적 변이를 연구하기 위해 59개의 red cell lysate를 2차원 전기영동법에 의해 silver staining 하였다.

총 2,891개의 polypeptide중 98개의 polypeptide가 normal과 variant polypeptide의 combination을 이루었고, 산출된 heterozygosity index는  $3.3\% \pm 0.23\%$ 이었다. 그리고 제주도인 집단에서의 heterozygosity를 다른 인류집단의 heterozygosity와 비교하였다.



## References

- Anderson, N. L., and N. G., Anderson, 1979. Microheterogeneity of serum transferrin, haptoglobin and 2HS glycoprotein examined by high resolution two-dimensional electrophoresis. *Ann. Hum. Genet.* 40 : 371~384.
- Asakawa, J., N. Takahasi, B. B. Rosenblum and J. V. Neel, 1985. Two-dimensional gel studies of genetic variation in the plasma proteins of Amerindians Japanese. *Hum. Genet.* 70 : 222~230.
- Brown, A. J. L., and C. H. Langley, 1979. Reevaluation of level of genic heterozygosity in natural population of *Drosophila melanogaster* by two-dimensional electrophoresis. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 76 : 2381~2384.
- Celis, J. E. and R. Brave. 1984. Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. Academic press Inc, Orlando. pp. 1~36.
- Comings, D. E., 1982. Two-dimensional gel electrophoresis of human brain proteins. III. Genetic and non-genetic variations in 145 brains. *Clin. Chem.* 28 : 798~804.
- Edwards, J. J., N. G. Anderson, S. L. Nance and N. L. Anderson, 1979. Red cell proteins. I. Two-dimensional mapping of human erythrocyte lysate proteins. *Blood* 53 : 1121~1132.
- Goldman, D., and C. R. Merrill, 1983. Human lymphocyte polymorphisms detected by quantitative two-dimensional electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* 35 : 827~837.
- Hamaguchi, H., A. Ohta, R. Mukai, T. Yabe and M. Yamada, 1981.

- 
- Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis : 1. Detection of genetic variant polypeptides in PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes. Hum. Genet. 59 : 215~220.
- Hamaguchi, H. , M. Yamada, M. Noguchi, 1982. Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis : 2. Genetic polymorphism of lymphocyte cytosol 64K polypeptide. Hum. Genet. 60 : 176~180.
- Hamaguchi, H. , M. Yamada, M. Shibasaki, R. Mukai, T. Yabe, and I. Kondo, 1982. Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis : 3. Frequent occurrence of genetic variant in some abundant polypeptides of PHA-stimulated peripheral blood lymphocytes. Hum. Genet. 62:142~147.
- Hamaguchi, H. , M. Yamada, M. Shibasaki and I. Kondo, 1982. Genetic analysis of human lymphocyte proteins by two-dimensional gel electrophoresis : 4. Genetic polymorphism of cytosol 100K polypeptide. Hum. Genet. 62 : 148~151.
- Harris, H. , 1980. The principle of human biochemical genetics 3rd revised ed. New York, Elsevier, North-holland, pp. 316~405.
- Leavitt, J. , D. , Goldman, C. , Meril and T. , Kakunaga, 1982. Actin mutations in a human fibroblast model for carcinogenesis. Clin. Chem. 28 : 85~860.
- McConkey, E. H. , T. Taylor and D. Phan, 1979. Human heterozygosity : A new estimate. Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 76 : 7500~7504.
- McLellan, T. , G. F. -L. Ames and K. Nikaido. 198-. Genetic variation in proteins : Comparison of one-dimensional and two-dimensional gel

- electrophoresis. *Genetic*. 104 : 381~390.
- Merril, C. R. , D. Goldman, and M. L. , Van Kkeuren, 1982. Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 3. 13~23.
- O'Farrell, P. H. , 1975. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 : 4007~4021.
- Oh, M. Y. , S. J. Kim, S. S. Hong and C. C. Lee, 1988. Studies on the genetic variation of plasma proteins in Cheju population of Korea. *Korean J. Genetics* 9 : 206~214.
- Racine, R. R. , and C. H. Langley, 1979. Genetic heterozygosity in a natural population of *Mus musculus* using two-dimensional electrophoresis. *nature* 283 : 855~859.
- Rosenblum, B. B. , N. V. Nell and S. M. Hanash, 1983. Two-dimensional electrophoresis of plasma polypeptides reveals high heterozygosity indices. *Proc. Nat'l. Acad. Sci(USA)* 80 : 5002~5006.
- Rosenblum, B. B. , J. V. Neel, S. M. Hanash, J. L. Joseph and N. Yew, 1984. Identification of genetic variants in erythrocytes lysate by two-dimensional gel electrophoresis *Am. J. Hum. Genet.* 36~601~612.
- Smith, S. C. , R. R. Racine and C. H. Langley, 1980. Lack of genetic variation in the abundant proteins of human kidney. *Genetics* 96 : 967~974.
- Walton, K. E. , O. Styer and E. I. Gruenstein, 1979. Genetic polymorphism in normal human fibroblasts as analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 254 : 7951~7960.
- Wanner, L. A. , J. V. Neel and M. H. Meisler, 1982. Separation of allelic variants by two-dimensional electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* 34 : 209~215.
- Wilson, J. M. , B. W. Baugher, L. , Landa and W. H. , Kelley, 1981. Purification and

characterization of mutant forms of the enzyme. J. Biol. Chem.  
256 : 10306~10312.

Wilson, J. M. , G. E. and W. H. , Kelly, 1983. An amino acid substitution in a mutant form of the enzyme isolated from a patient with gout.  
Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 80 : 870~873.



## 감 사

본 논문이 완성되기까지 지도와 격려를 하여 주신 오문유 교수님께 먼저 깊은 감사를 표하오며, 많은 가르침을 주신 허인옥 교수님, 이용필 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님께 감사를 드립니다.

또한, 오늘이 있기까지 여러모로 도와주신 김세재 선생님께 이 자리를 빌어 진심으로 감사드리오며, 실험실 여러 후배들에게 고마움을 전합니다.

항상 사랑으로 보살펴 주신 어머님과 누님 그리고 동생 성범에게 이 논문을 사랑으로 대신합니다.

