

제초제 검출 키트 개발을 위한 식물 해독효소 고정화 연구

조현영 · 이진주 · 공광훈★

중앙대학교 자연과학대학 화학과
(2010. 2. 10. 접수, 2010. 2. 16. 승인)

Study on the immobilization of plant glutathione *S*-transferase for development of herbicide detection kit

Hyun-Young Cho, Jin-Joo Lee and Kwang-Hoon Kong★

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Chung-Ang University, Seoul, 156-756, Korea

(Received February 10, 2010; Accepted February 16, 2010)

요 약: Glutathione *S*-transferase는 식물의 해독작용에 중추적인 역할을 하는 화학 효소이다. 본 연구에서는 제초제 검출 키트 개발에 응용을 위하여 식물 해독작용에 중추적인 역할을 하는 glutathione *S*-transferase의 고정화 방법을 연구하였다. Chloroacetanilide계 제초제에 높은 효소 활성을 보이는 벼 유래 *Os*GSTF3에 공유결합을 통한 polystyrene-alkylamine 비드와 리간드결합을 통한 agarose-aminoalkyl 비드, 포괄법을 통한 Na-alginate 비드를 이용하여 고정화를 실시하였다. 정제된 *Os*GSTF3 10 mg을 사용하여 고정화 하였을 때 0.62 mg/g 비드로 polystyrene-alkylamine에 가장 효율적으로 고정화 되었다. 고정화 된 *Os*GSTF3의 효소 활성은 야생형의 30%를 나타내었으며, 재사용에 의한 효소활성 측정시 3회 까지 처음 활성의 80% 이상을 유지하였다.

Abstract: Glutathione *S*-transferase is known to play a crucial role in detoxification in many cases. To develop a herbicide detection biosensor, we in this study attempted to immobilize glutathione *S*-transferase enzyme on solid supports, polystyrene and agarose, and Na-alginate. These matrixes were attractive materials for the construction of biosensors and might also have utility for the production of immobilized enzyme bioreactors. We also compared the activities of glutathione-*S*-transferase immobilized *Os*GSTF3 and free *Os*GSTF3. The specific activity of the free enzyme in solution was 3.3 higher than the immobilized enzyme. These results suggest that 50% of the enzyme was bound with the catalytic site in polystyrene-alkylamine bead and immobilized enzymes showed 80% remaining activity until 3 times reuse.

Key words: biosensor, glutathione *S*-transferase, herbicide detoxification, protein immobilization

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-820-5205 Fax : +82-(0)2-825-4736

E-mail : khkong@cau.ac.kr

1. 서 론

효소를 화학적 또는 물리적 방법에 의하여 불용성 담체(matrix)에 고정시킴으로써 이들의 이동성을 제한하는 것을 효소 고정화(enzyme immobilization)라고 한다. 고체 지지체에 단백질을 고정화 하는 기술은 바이오센서(biosensor), 바이오리액터(bioreactor) 등의 형태로 바이오산업과 생의학 분야에 다양하게 응용되고 있다.^{1,2} 효소나 균체를 적당한 방법으로 고정화함으로써 외부 조건 변화에 대한 효소의 민감성 감소, 사용 후 분리의 용이성, 불용성에 의한 연속 반응에 이용 용이성과 같은 여러 가지 이점을 확보할 수 있다. 확산 시 물질전달 저항 때문에 효소반응의 효율성이 저하되는 점과 효소의 작용 부위가 불활성화 될 수 있다는 단점이 있기는 하지만 효소의 응용과 실용성 면에서 뛰어 나기 때문에 효소의 고정화 기술은 널리 이용되고 있다.^{2,4}

글루타티온 전달효소(Glutathione S-transferase; GSTs, EC 2.5.1.18)는 친전자성 중심을 갖고 있는 기질과 삼중펩티드인 글루타티온(Glutathione; GSH, γ -Glu-Cys-Gly)의 포합반응을 촉매하는 전형적인 제 2형(Phase II) 해독 효소이다.^{5,6} GSH의 티올(thiol)기(-SH)가 thiolate (R-SH)로 이온화되어 반응성이 커진 티올기는 소수성 기질의 친전자성 중심을 공격하여 GSH-친유성 포합 화합물을 형성하며 수용성을 증가시킨다. 이러한 효소의 기능은 다양한 화합물들과 외래성 이물질들의 포합반응 및 해독작용에 있어서 매우 중요하게 작용한다. 이러한 역할을 하는 GST는 동물, 식물뿐만 아니라 곰팡이, 박테리아에 걸쳐 거의 모든 종에서 나타난다.^{6,8} 식물 GST는 외부로부터 유입되는 독성물질 중 식물의 병충해 방지를 위해 처리하는 제조제나 살충제 등을 기질로 하여 글루타티온 포합반응을 촉매 한다. 이러한 식물 GST의 제조제 해독작용으로 인해 식물 GST에 대한 관심이 집중되고 있다. 식물 GST는 Phi, Tau, Lambda, dehydroascorbate reductase (DHAR), Theta, Zeta로 나뉘며, 이 중 Phi와 Tau 타입 GST가 제조제 해독작용에 중요한 역할을 담당하고 있다.^{9,10} 이들 식물 GST 중에서 Phi 타입 GST는 주로 chloroacetanilide계 제조제에 대해서 특이성을 보이고, Tau 타입 GST는 diphenyl ether계 제조제에 대해 특이성을 보이는 것은본 연구실의 이전 연구를 통해서도 이미 확인 되었다.¹¹

본 연구에서는 chloroacetanilide계 제조제에 높은 효소 활성을 나타내는 벼 유래 Phi 타입 글루타티온 전

달 효소 OsGSTF3에 대해 효과적인 고정화 방법을 연구하여 제조제 검출 키트 개발에 응용하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약

글루타티온 전달 효소의 기질로 사용된 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB), 1,2-epoxy-3-(*p*-nitrophenoxy)propane (EPNP), ethacrynic acid (ETA), cumene hydroperoxide (CP), 4-nitrophenethyl bromide (4-NPB), glutathione, 제조제 기질인 atrazine, metolachlor, alachlor, fluorodifen, acifluorfen, acetoachlor, pretilachlor은 Riedel-deHaën (Seelze, Germany)사의 제품을 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (Dicamba)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) 제품을 이용하였다. 그 외 agarose, isopropyl- β -D-thiogalactopyD-toside (IPTG), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), sodium lauryl sulfate (SDS), trizma[®] Base, glycerol, k-tamycin motosulfate는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) 제품을, 30% acryl amide, protein assay 시약은 Bio-Rad사(Hercules, USA)의 제품을, perfect protein marker는 Novagen (Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였다. Potassium phosphate (monobasic), potassium phosphate (dibasic)은 Kanto Chemical Co. (Tokyo, Japan) 제품을 glutathione sepharose 4B는 Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) 제품을 butanol, sodium chloride, acetic acid는 Duksan Pure Chemical Co. (Kyonggi, Korea) 제품을 potassium chloride, glycine은 Daejung (Incheon, Korea) 제품을 사용하였다. 그 외 buffer를 만들기 위한 시약과 사용한 모든 시약은 일급 및 특급 시약을 사용하였다.

2.2. 균주와 발현벡터

고정화에 사용된 OsGSTF3의 발현을 위해 T7 promoter와 terminator를 포함하고 있는 발현 벡터 pET-26b(+)는 Novagen (Darmstadt, Germany)으로부터 구입하였고, 형질전환을 위해 발현용 숙주인 DH5a는 RBC (Seoul, Korea), BL21 star (DE3)는 invitrogen (California, USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

2.3. OsGSTF3의 발현 및 정제

고정화에 이용할 OsGSTF3은 다음과 같이 준비하였다.¹⁰ pET-OsGSTs/BL21 (DE3)를 대량발현하기 위해

30 µg/mL의 kanamycin이 포함된 1L LB 배지에 2~3 시간 동안 37°C에서 배양하였다. UV로 OD₆₀₀ (optical density) 값을 측정하여 0.3~0.4에 이르면, 발현유도제인 IPTG를 최종농도가 0.4 mM 되도록 첨가 한 뒤, 각 효소의 최대 효율을 나타내는 시간까지 배양하여 대량발현을 유도하였다. 발현된 배양액은 4°C, 10,000 g, 10 분간 원심분리 한 뒤 상층액을 제거하여 균체만 포집하였다.

OsgSTF3 균체는 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 5 mL로 균일화시킨 뒤, 초음파 파쇄기를 이용하여 4°C, 30~40 watts, amplitude 8% 조건으로 10 분간 세포막을 파괴하였다. 이때의 과정은 열이 많이 발생하므로 얼음 위에서 실시하였다. 균 파쇄 후 10,000 g, 4°C로 20 분간 원심 분리하여 단백질과 다른 세포 불순물들을 분리하였다. 여기서 얻은 상층액을 앞에서 사용한 20 mM potassium phosphate buffer

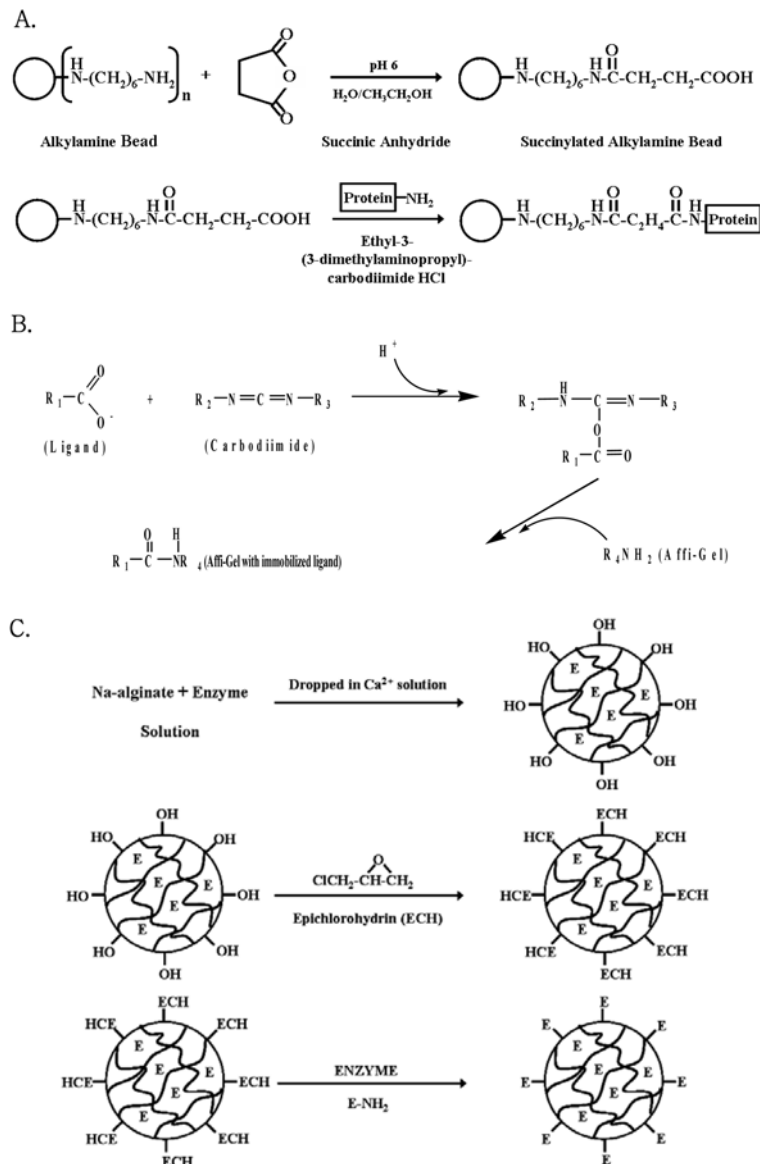


Fig. 1. Immobilization scheme of GSTs. A. Covalent binding immobilization of GST by using alkylamine beads; B. Covalent binding immobilization of GST by using Aminoalkyl agarose; C. Entrapment immobilization of GST by using Na-alginate gel beads.

(pH 7.0)로 평형화시킨 GSH-Sepharose 또는 *S*-hexyl GSH-agarose 친화 컬럼 크로마토그래피에 1 mL/min의 속도로 흘려주며 흡착시켰다. 컬럼 내의 불필요한 단백질을 제거하기 위해 50 mM potassium chloride를 포함하고 있는 20 mM potassium phosphate (pH 7.0) 용액으로 씻어준 뒤, OD₂₈₀을 측정하여 더 이상의 불순물을 포함하지 않음을 확인하였다. 10 mM GSH를 포함하고 있는 50 mM Tris-Cl (pH 8.0)로 목적 단백질을 1 mL/min의 속도로 용출하였다. 얻어진 분획은 GST의 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)와 글루타티온 (GSH)으로 GST 활성 및 OD₂₈₀을 측정하여 높은 흡광도와 활성을 보이는 분획만 모아 20 mM potassium phosphate (pH 7.0)로 투석하였다. 정제된 효소의 순수도는 SDS-PAGE를 통해 확인하였으며, 모든 실험은 효소의 변성을 고려해 4 °C에서 진행하였다.

2.4. 효소의 고정화

2.4.1. Polystyrene-akylamine 비드 고정화법

50 mM KPB (pH 6.0) 25 mL에 10~15개 polystyrene-akylamine 비드를 넣고 1.0 g의 succinic anhydried를 첨가하여 15 시간 동안 실온에서 반응한 후 상층액을 제거한 뒤 증류수로 비드를 세척하였다. 세척이 끝난 비드에 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide HCl (EDC) 200 mg과 증류수를 넣고 pH 10.0에 맞추고 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응물의 상층액을 제거한 뒤 증류수로 비드를 세척하고 효소를 첨가한 뒤 교반하였다. 이때의 pH는 5.0에 맞추었으며 4 °C에서 12시간 이상 반응하였다. 반응이 끝난 후 증류수로 비드를 세척하고, 종이 타월로 비드를 건조하여 4 °C에 보관하였다(Fig. 1A).

2.4.2. 아가로스-aminoalkyl 비드 고정화법

증류수와 아가로스-aminoalkyl 비드를 1:1로 희석한 뒤 천천히 교반하면서(자석 젓개를 사용하지 않는다) 효소를 첨가한 뒤 1 N HCl로 pH 4.7~5.0으로 맞추었다. 2~10 mg의 EDC를 첨가한 후 다시 pH 4.7~5.0으로 맞추고 상온에 3 시간 이상 실온에 놓아두었다(Fig. 1B). 반응이 끝난 비드는 증류수로 세척한 후 원심 분리하여 비드만 모아 4 °C에 보관하였다.

2.4.3. Na-alginate 겔 비드 고정화법

1% Na-alginate soln 95 mL에 효소를 첨가 한 후 0.27 M CaCl₂ 수용액에 떨어뜨려 효소가 alginate에 포함된 비드가 형성되게 하였다. 형성된 비드를 두 번

정도 증류수로 세척한 후 0.027 M CaCl₂에 4 °C에서 24 시간 동안 놓아두었다. 그 후 EDC 처리를 하여 비드의 표면을 변형시켰다. 변형된 비드와 epichlorohydrin을 1:1로 희석한 뒤, 25 °C에서 12 시간 동안 교반하며 반응시켰다. 반응물에 효소를 첨가하여 25 °C에서 12 시간 동안 반응시킨 뒤 증류수로 세척하고, 사용하기 전까지 완충용액에 넣어 4 °C에 보관하였다(Fig. 1C).

2.5. 효소의 단백질 정량 및 SDS-PAGE

정제된 효소의 단백질 정량은 Bradford (1976)¹¹ 방법에 따라 측정하였으며, 595 nm에서 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 표준 곡선을 작성한 뒤, 단백질 농도를 측정하는데 이용하였다. alkyamine polystyrene과 aminoalkyl 아가로스 비드에 고정화된 단백질 양은 고정화 반응이 끝난 반응 튜브의 상층액의 단백질 정량을 통해 정하였으며, Na-alginate gel 비드에 고정화된 단백질 양은 3% trisodium citrate 용액에 37 °C에서 12 시간 동안 반응시켜 alginate 겔을 해리시켜 비드에 결합된 단백질 양을 측정하였다. 단백질 정량은 야생형 효소와 동일하게 측정하였다. 정제된 단백질의 순수도는 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. SDS-PAGE는 Laemmli (1970)¹² 방법에 따라 12.5%의 겔을 만들어 사용하였다. 영동이 끝난 겔은 coomassie brilliant blue R-250을 사용하여 염색하였고, 충분한 탈색을 통해 효소의 순수도를 확인하였다. 이때 사용한 분자량 표준 단백질은 Phosphorylase b (97.4 kDa), Bovine serum albumin (66.2 kDa), Ovalbumin (45.0 kDa), Carbonic anhydrase (31.0 kDa), Soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), Lysozyme (14.4 kDa)을 포함하고 있는 Bio-Rad의 Low range marker를 사용하였다.

2.6. 고정화 효소의 활성도 측정

고정화된 효소와 고정화되지 않은 야생형에 대해 GST의 대표적인 기질인 GSH과 CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene)의 포합반응을 통해 효소학적 특성 비교를 하였다. 야생형의 CDNB에 대한 활성도는 GST에 공통적인 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)를 기질로 사용하여 측정하였다. 100 mM potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)에 1 mM CDNB와 1 mM 글루타티온(GSH), 효소를 첨가하여 혼합한 뒤 340 nm에서 UV/VIS spectrophotometer를 이용해서 1 분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다. 효소 활성 단위는

1 분당 1 μmole 의 생성물 형성을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다. 고정화된 효소는 반응용기에 고정화 효소와 기질을 혼합한 뒤 5 분간 상온에서 반응시킨 상층액을 취하여 야생형과 동일한 방법으로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 효소의 고정화

식물 GST의 응용을 위해 chloroacetanilide계 제초제에 효소 활성을 보이며 발현과 정제가 쉬운 *OsGSTF3*을 선택하여 효소의 고정화를 하였다(Fig. 2). 효소의 고정화는 공유결합을 통한 polystyrene-alkylamine 비드와 리간드결합을 통한 아가로스-aminoalkyl 비드, 포괄법을 통한 Na-alginate 비드법을 이용하였다. 고정화를 위해 정제된 *OsGSTF3*를 1 mg/mL되게 준비하였다. 정제된 *OsGSTF3* 10 mg을 사용하여 고정화한 효소의 양은 Table 1에 나타내었다.

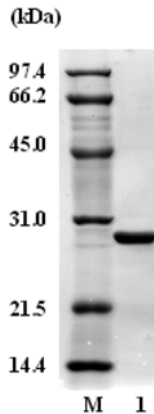


Fig. 2. SDS-PAGE of *OsGSTF3*. Lane M, SDS-low range molecular weight marker; lane 1, purified *OsGSTF3*.

Table 1. Immobilization efficiency and activity of *OsGSTF3*

Method	Immobilized Protein Concentration ($\mu\text{g/g}$ bead)	Relative Enzyme Activity ($\mu\text{mol/min per mg}$)
Free <i>OsGSTF3</i>	-	7.6 ± 0.6
Polystyrene-alkylamine	0.62	2.3 ± 0.7
Agarose-aminoalkyl	0.036	ND
Na-alginate	0.052	ND

Values are Means \pm S.D., generally based on $n \geq 5$. ND; Not detected activity

3.2. 고정화 효소의 특성 조사

고정화된 효소에 야생형 상태의 효소학적 특성이 보존되어 있는지 알아보기 위해 고정화된 효소의 활성도를 측정하였다. 효소의 활성도는 GST의 대표 기질인 GSH과 CDNB를 사용하여 두 기질의 포합반응을 측정하였다. 아가로스-aminoalkyl 비드에 고정화된 *OsGSTF3*의 경우 GSH과 CDNB의 포합반응을 나타내지 않았으며, Na-alginate 비드에 고정된 *OsGSTF3*은 CDNB에 기질인 에탄올에 비드가 용해되어 활성도 측정이 불가능하였다. 야생형 *OsGSTF3*은 CDNB에 대해 $7.6 \mu\text{mol/min per mg}$ 의 비활성도를 나타낸 반면 polystyrene-alkylamine 비드에 고정된 *OsGSTF3*은 $2.3 \mu\text{mol/min per mg}$ 으로 야생형과 비교해 30%에

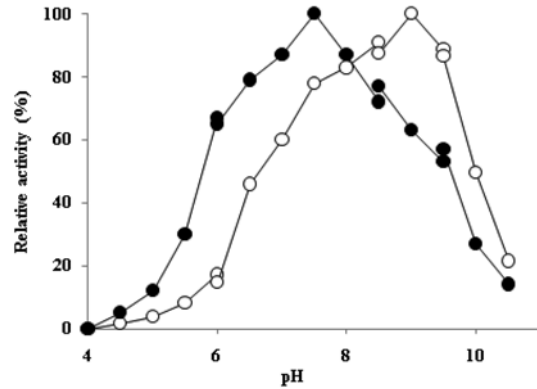


Fig. 3. Effect of pH on free *OsGSTF3* and polystyrene-alkylamine immobilized *OsGSTF3*. The buffer conditions as follow: pH 4.0-6.0, 200 mM citrate-sodium phosphate buffer; pH 6.0-8.5, 200 mM potassium phosphate buffer, pH 8.5-9.5, 200 mM Tris-HCl buffer; pH 9.5-10.5, 200 mM Glycine-NaOH buffer. The maximum activity was expressed that free *OsGSTF3* (—○—) and immobilized *OsGSTF3* (—●—).

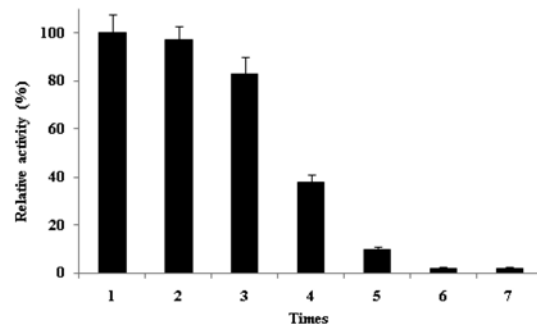


Fig. 4. Relative activity of polystyrene-alkylamine immobilized *OsGSTF3* by reuse.

해당되는 활성값을 보였다. polystyrene-alkylamine 비드에 고정화된 OsGSTF3는 3회 사용까지는 80% 이상의 활성값을 유지하였으며, 4회에서 부터는 40%이하로 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 고정화된 OsGSTF3의 pH 안정성은 pH 7.0~8.5 이었으며 pH 7.5에서 최적 pH를 나타내었다.

3.3. 고찰

Chloroacetanilide와 fluorodifen 계 제조제에 높은 포합반응을 보이는 OsGSTF3의 생화학적 특성을 이용해 환경오염물질이나 제조제의 제거, 잔류 농약 검출 키트로 활용하기 위해 효소의 고정화를 실시하였다. 효소의 고정화를 위한 담체로는 위의 응용 목적에 가장 적합한 비드 형태를 선택하였다. Polystyrene과 아가로스에 alkylamine과 aminoalkyl이 각각 결합된 비드 형태의 공유결합적인 고정화법과 포괄법을 통한 Na-alginate 고정화를 실시하였다. 각 지지체에 고정된 효소의 양은 polystyrene-alkylamine에 0.62 mg/g 비드로 다른 방법에 비해 10배 이상의 높은 효율을 나타낸 반면 아가로스-aminoalkyl에는 0.036 mg/g 비드로 낮은 고정화 효율을 보였다. 고정화된 효소가 담체에 결합한 뒤에도 야생형의 효소와 동일한 활성화 형태를 유지하는지 알아보기 위해 GSH과 CDNB에 대한 포합반응을 측정하였다. 측정결과 polystyrene-aminoalkyl 비드에서만 야생형에서 갖는 GST 효소의 활성을 측정할 수 있었으며 야생형의 30%의 활성을 나타내었다. 아가로스-aminoalkyl 비드에서는 효소의 고정화는 되었으나 효소 활성을 갖지 않는 것으로 보아 효소가 고정화된 위치가 효소의 활성에 영향을 주는 것으로 판단되었다. Na-alginate 비드를 이용한 고정화의 경우 alginate가 CDNB의 용매인 에탄올에 용해되어 형성된 비드의 형태를 유지하지 못하였으며, 용해된 alginate로 인해 활성 측정이 불가능하였다. 따라서 본 연구에서 실시한 세 가지 고정화 방법 중 polystyrene-alkylamine 비드를 통한 고정화 방법이 GST의 고정화에 가장 적합하다는 것을 알 수 있었다. Porous silicon을 이용한 GST 고정화의 경우 효소 사용량의 25%를 고정화 할 수 있는데 비해¹³ polystyrene-alkylamine에는 50% 이상의 결합력을 나타내는 것으로 보아 본 고정화법이 GST에 매우 효과적임을 알 수 있었다. 야생형과 고정화된 GST의 최적 pH 측정 결과 야생형 OsGSTF3은 pH 9.0에서 최적 pH를 갖는데 반해 고정화된 OsGSTF3은 pH 7.5에서 최적 pH를 나타내었다. 이러한 pH의 이동은 효소가 고정화되면서 활성 중심 부위 구조 형

성에 안정화를 준 것으로 예측된다. 또한 중성 pH 부근에서 최적 pH를 갖는 고정화된 GST의 경우 실제 시료에 처리되었을 때 보다 경제적인 것으로 판단되었다. Polystyrene-alkylamine 비드에 고정화된 OsGSTF3은 효소활성 측정 후 비드를 반응물과 분리하여 세척 후 다시 새로운 반응물에 첨가하여 효소활성을 측정할 결과 3회까지 재사용 하였을 때 처음의 80%의 활성을 나타내는 것으로 보아 제조제 제거 키트 개발시 경제적인 면에서 효율성이 있을 것이라 판단되었다. 지금까지 제조제에 포합반응을 나타내는 OsGSTF3을 이용한 고정화 GST의 실험결과를 기초로 하여 앞으로 고정화 GST의 효율성 및 안정성 증가에 대한 실험을 통해 제조제나 살충제의 제거 키트 개발 및 잔류 농약 검출키트 개발에 이용할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 중앙대학교 신진우수연구자지원사업에 의한 것임.

참고문헌

1. D. Weinrich, P. Jonkheijm, C. Niemeyer and H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **48**, 7744-7751(2009).
2. D. Brady and J. Jordaan, *Biotechnol. Lett.*, **31**, 1639-1650(2009).
3. U. Hanefeld, L. Gardossi and E. Magner, *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 453-468(2009).
4. Y. Kumada, Y. Tokunaga, H. Imanaka, K. Imamura, T. Sakiyama, S. Katoh and K. Nakanishi, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 401(2006).
5. N. Allocati, L. Federici, M. Masulli and C. D. Ilio, *FEBS J.*, **276**, 58(2009).
6. D. P. Dixon, A. Laphorn and R. Edwards. *Genome Biol.*, **3**, REVIEWS3004. (2002)
7. R. N. Armstrong, *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 131(1987).
8. D. Sheehan, G. Meade, V. M. Foley and C. A. Dowd, *Biochem. J.*, **360**, 1(2001).
9. W. R. Pearson, *Methods Enzymol.*, **401**, 186(2005).
10. R. Edwards and D. P. Dixon, *Methods Enzymol.*, **401**, 169(2005).
11. H.-Y. Cho and K.-H. Kong, *BioFactors*, **30**, 281(2007).
12. M. Jain, C. Ghanashyam and A. Bhattacharjee, *BMC Genomics*, **11**, 73(2010).

10. H.-Y. Cho and K.-H. Kong, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **83**, 29(2005).
11. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248(1976).
12. U. K. Laemmli, *Nature.*, **227**, 680(1970).
13. L. A. Delouise and B. L. Miller, *Anal. Chem.*, **77**, 1950 (2005).