

## 흰쥐 간 세포분획법

### 1. Mitochondria 및 Microsome의 분리\*

계명대학교 의과대학 생화학교실

## 과 춘식

경북대학교 의과대학 병리학교실

## 과정식

### =Abstract=

### Cell Fractionation Method of the Rat Liver

#### 1. Isolations of Mitochondria and Microsomes

Chun Sik Kwak, Ph. D

Department of Biochemistry, Keimyung University  
School of Medicine, Taegu, Korea

Jyung Sik Kwak, MD

Department of Pathology, Kyungpook National University  
School of Medicine, Taegu, Korea

A procedure for the isolation of highly purified mitochondria and microsomes from normal rat liver is described.

The liver was homogenized in 0.25M sucrose and mitochondrial fraction was prepared by 20 to 45% sucrose linear density gradient centrifugation. Microsomal fraction was also prepared by 10 to 35% sucrose linear density gradient centrifugation.

The purity of mitochondrial and microsomal fractions confirmed by morphometry showed about 92 and 87% respectively.

Monoamine oxidase activity was found in mitochondrial and microsomal fractions which contain about 64 and 17% of the total monoamine oxidase activity respectively. About 71% of the total glucose-6-phosphatase activity was found in the microsomal fraction,

And alcohol dehydrogenase activity was only found in the cytosol fraction.

\* 본 논문은 1986년도 계명대학교 을종연구비 및 동산의료원 조사연구비로 이루어졌음.

## 서 론

동물의 간을 세포분획하여 세포 소기관을 분리하는 방법이 현재 많이 고안되어 있다<sup>1-18)</sup>. 그러나 이를 방법의 대부분은 복잡한 조작을 수반하는 원심분리법에 의한 세포분획법이다.

분자생물학과 생화학분야의 연구를 수행하는 연구실에서는 각자 자가들 실정에 알맞는 세포 분획법을 선택하여 연구를 하고 있다.

본 연구는 흰쥐간에서 mitochondria와 microsome을 비교적 간편한 조작을 행하는 원심분리법으로 분리할 수 있게 함과 동시에 높은 순도로 이들을 얻을 수 있는 방법이 있지 않을까 생각하여 시도한 것이다. 즉 흰쥐간을 적출하여 0.25M-sucrose액으로 homogenate를 만들고 이것을 sucrose linear density gradient centrifugation을 거쳐 mitochondria와 microsome을 분리하는 한편 이를 분획을 전자현미경으로 검색하여 순도를 결정하고 아울러 marker enzyme<sup>19-22)</sup>의 분포와 활성을 측정하여 검토하였던 바 추천할 만한 성적을 얻었기 때문에 본 방법을 정리하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

**동물:** 동물은 4주 이상 같은 조건으로 사육한 채 중 300~350gm 되는 Sprague-Dawley 종의 숫흰쥐 10마리를 사용하였다.

**시약:** 본 실험에 사용한 시약들 중 효소의 기질이 되는 시약들과 표품이 되는 시약들은 Sigma사의 제품 중 고순도의 제품을 선택하여 사용하였으며 그외 일반시약들은 시중에 판매되는 특급 또는 1급품을 구입하여 사용하였다.

**간적출 및 homogenate의 조제:** 쥐에서 간의 적출은 12시간 절식시킨 후 약한 ether 마취 하에서 복부대동맥으로부터 채혈하여 쥐를 실혈사시키고 이어 간 문맥으로 catheter를 넣어 4°C의 0.25M-sucrose액을 관류하여 간에 남아있는 혈액을 제거한 다음 간을 적출하였다. 적출한 간은 0.25M-sucrose액으로 씻어낸 다음 면포로 균등히 압박하여 간내 남아있는 sucrose액을 가능한 한 모두 제거하였다. 그리고는 이 간을 2~4°C를 유지하면서 잘게 썰어서 절편을 만들고 혼합하여 그 중 5gm을 취하여 9배량의 0.25M-sucrose액(2~4°C)을 넣어

teflon glass homogenizer(Thomas사 제품 chamber clearane 0.005~0.007 inch)로 2~4°C를 유지하면서 400 rpm의 속도로 마쇄하여 간 homogenate(10w/v%)를 만들었다.

**Mitochondria 및 microsome의 분리:** Mitochondria 및 microsome의 분리는 도 1에 정리해 두었다. 즉 10w/v% 간 homogenate를 Dupont Sorvall 50ml polycarbonate 원심관에 넣고 이것을 Dupont Sorvall SS-34 aluminium fixed angle rotor에 넣어 Dupont Sorvall RC-5B refrigerated superspeed centrifuge로 2,500 rpm(average relative centrifugal force: 571g, 이하 average RCF로 약함)으로 10분간 원심분리하여 조직의 미마쇄부분과 핵부분(P-1 pellet)을 제거한 다음 그 상청액(S-1 supernatant)을 50ml polycarbonate 원심관과 SS-34 rotor와 RC-5B refrigerated superspeed centrifuge를 사용하여 10,000 rpm(average RCF: 7.796g)에서 20분간 원심분리하여 pellet(P-2 pellet)과 상청액(S-2 supernatant)을 얻었으며 이 pellet은 0.25M sucrose 액 2ml에 혼탁시켰다. 그리고는 gradient former(ISCO model 570)를 사용하여 10ml polycarbonate 원심관(Dupont Sorvall)에다 20w/v%와 45w/v%의 sucrose액으로 20에서 45w/v%, 용량 6ml가 되도록 sucrose linear density gradient 용액을 만든 후에 원심관 상부에 P-2 pellet의 0.25M sucrose 혼탁액을 0.5ml 부하시키고 큰 Dupont Sorvall T865 titanium fixed angle rotor에 넣고 Dupont Sorvall OTD 65B ultracentrifuge를 사용하여 25,000 rpm(average RCF: 45,200g)에서 20분간 원심분리하였다. 이 과정(C-3과정)에서 얻은 상청액(S-3 supernatant)은 제거해 버리고 남은 pellet(P-3 pellet)을 다시 0.25M sucrose액으로 재 혼탁시킨 다음 P-2 pellet을 만든 과정(C-2과정)과 같은 요령으로 원심분리하여 P-3 pellet을 세척하였다. 바로 이 과정(C-4과정)에서 얻어진 pellet(P-4 pellet)이 mitochondria 분획인 것이다.

한편 C-2과정에서 얻어진 상청액(S-2 supernatant)은 30ml polycarbonate 원심관과 T865 rotor 그리고 OTD 65B ultracentrifuge를 사용하여 38,000rpm(average RCF: 104,400g)에서 60분간 원심분리하여 상청액(S-5 supernatant)과 pellet(P-5 pellet)을 얻었다. 즉 이 과정(C-5과정)에서 얻어진 상청액(S-5 supernatant)이 cytosol 분획인 것이다. 그리고는 C-3과정에서와 같은 요령으로 만

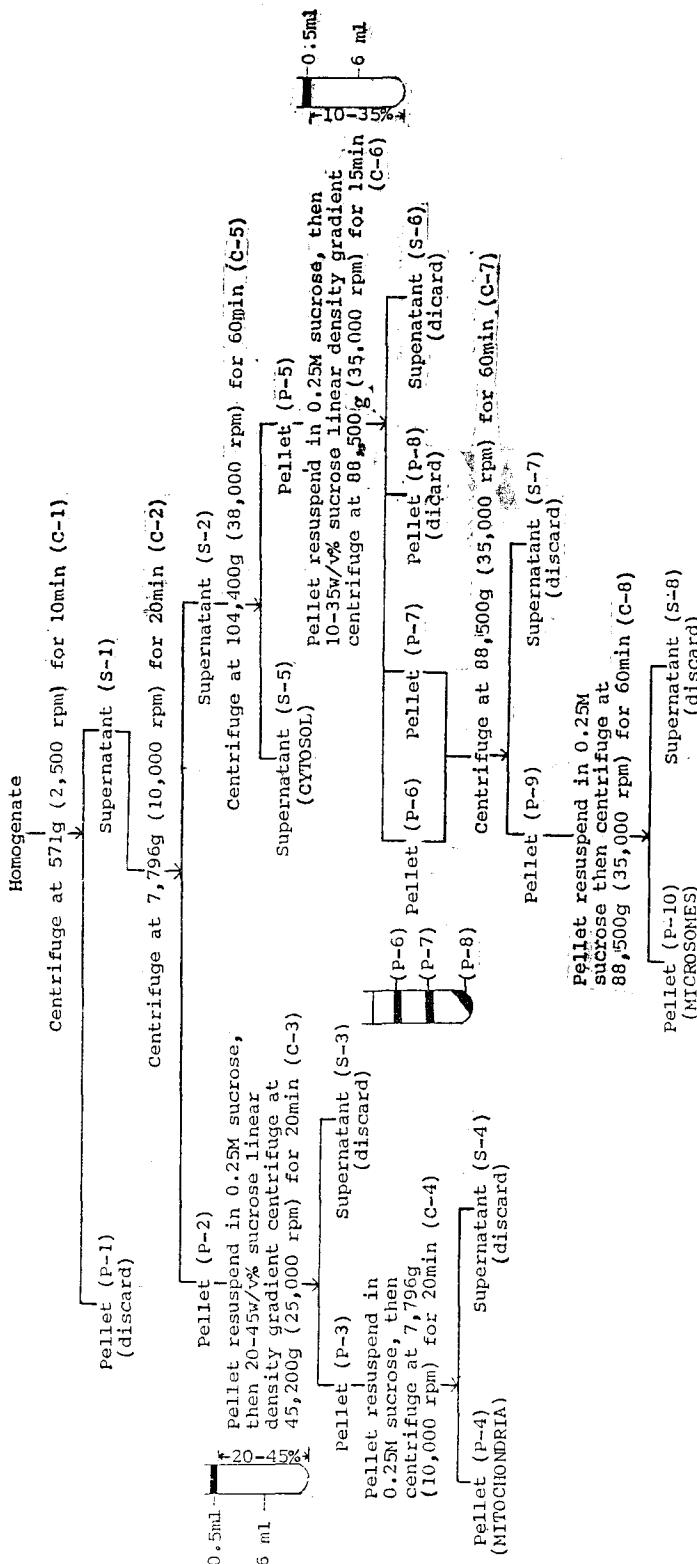


Fig. 1. Centrifugal separation scheme for mitochondria, microsomes and cytosol in rat liver homogenate. Assuming that the liver from a adult male rat weighs approximately 5g the homogenate should be about 50ml. The homogenisation medium used is 0.25M sucrose.  
 For C-1, C-2 and C-4 separations one can use 50ml polycarbonate tubes (Dupont Sorvall) in an aluminium fixed angle rotor (Dupont Sorvall, SS-34) of a refrigerated superspeed centrifuge (Dupont Sorvall, RC-5B).  
 For separations C-3, C-6, C-7 and C-8 use 10ml polycarbonate tubes in a titanium fixed angle rotor (Dupont Sorvall, T865) of an ultracentrifuge (Dupont Sorvall, OTD 65B).  
 For separation C-5 use 30ml polycarbonate tubes in a titanium fixed angle rotor (T865) of an ultracentrifuge.  
 All centrifugal force of this method are average RCF. Gradient medium preparation using a ISCO gradient former.

는 10~35% sucrose linear density gradient 용액이 들어있는 원심관 상부에 0.25M-sucrose 액 2ml에 혼탁시킨 P-5 pellet를 0.5ml 씩 부하시키고는 T865 rotor와 OTD 65B ultracentrifuge를 사용하여 35,000rpm(average RCF: 88,500g)에서 15분간 원심분리하였다. 이 과정(C-6과정)에서는 density가 상이한 3종류의 pellet(P-6, P-7, P-8 pellets)과 상청액(S-6 supernatant)이 얻어진다.

다음은 P-6과 P-7 pellet을 함께 모아서 10ml polycarbonate 원심관에 넣어 T865 rotor와 OTD 65B ultracentrifuge를 사용하여 35,000rpm(average RCF: 88,500g)에서 60분간 원심분리하여 P-9 pellet을 얻은 다음 이 pellet을 0.25M sucrose 액으로 재혼탁시켜 P-9 pellet을 만드는 과정(C-7과정)과 같은 오령으로 원심분리하여 P-9 pellet을 세척하였다. 즉 이 과정(C-8과정)에서 얻어진 pellet(P-10 pellet)이 바로 microsome 분획인 것이다.

위의 과정 중 원심분리시에는 rotor의 온도를 4°C로 유지시켰으며 그의 조작과정은 모두 얼음상자와 cold room 등을 이용하여 2~4°C를 유지도록 하였다.

**Marker enzyme의 활성도 측정:** 10개의 간을 각각 세포분획하여 얻은 mitochondria와 microsome 분획들은 각각 10ml의 0.25M sucrose 액으로 혼탁시켰으며 cytosol 및 homogenate와 함께 바로 효소 시료로 사용하였다.

Alcohol dehydrogenase(EC 1.1.1.1, ADH)의 활성도 측정은 ethanol과 NAD<sup>+</sup>를 기질로 하여 37°C에서 3분간 반응시키는 동안에 340nm 파장에서 최대흡수대를 갖는 NADH가 생성되므로 증가되는 흡광도를 측정하여 그 효소활성을 정량하는 Koivula 등의 법<sup>23)</sup>에 의하였다.

Monoamine oxidase(EC 1.4.3.4, MAO)의 활성도 측정은 tyramine을 기질로 사용하여 37°C에서 20분간 반응시키는 동안에 유리되는 인산을 정량하여 효소 활성도를 나타내는 Swanson의 법<sup>24)</sup>에 의하였다.

Glucose-6-phosphatase(EC 3.1.3.9, G-6-Pase)의 활성도 측정은 glucose-6-phosphate를 기질로 하여 30°C에서 5분간 반응시키는 동안에 유리되는 인산을 정량하여 효소 활성도를 나타내는 Swanson의 법<sup>25)</sup>에 의하였다.

본 실험에서는 채택한 효소 활성도 측정법들의 정확도를 높이기 위하여 같은 시료에 대하여 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다. 그리고 효소 측정에

사용한 분광광도계는 Computer controlled enzyme spectrophotometer(Varian cary 210)였다.

**단백정량:** 효소액 중의 단백정량은 0.5N-perchloric acid와 methanol-ether 혼합액(3:1)으로 단백을 정제하는 Colowick 및 Kaplan 법<sup>26)</sup>으로 효소액 중의 단백을 정제한 다음 bieret 법<sup>27)</sup>으로 정량하였다.

**Mitochondria 및 microsome의 전자현미경적 검색:** 흰쥐 간 5gm으로부터 분리된 mitochondria와 microsome의 분획을 microcentrifuge tube에 각각 넣어 microcentrifuge(Fisher model 235A)를 사용하여 4°C에서 5분 동안 13,000rpm에서 원심분리한 뒤 상청액을 제거하고 침전물을 2.5% glutalaldehyde 용액(0.1M phosphate buffer, pH 7.4, 4°C)으로 2시간 동안 전고정을 하였다.

그 후 실온에서 상기한 바와 같이 원심분리하고 0.1M phosphate buffer로 세척하여 1% OsO<sub>4</sub> 용액(0.1M phosphate buffer, pH 7.4)으로 2시간동안 후고정하였다. 고정된 침전물을 0.1M phosphate buffer로 세척한 후 계열 ethanol로 탈수하고 propylene oxide로 치환시켜 Luft 방법<sup>28)</sup>에 의한 epon 혼합물로 표매하였으며 표매된 침전물을 dia-tome knife를 이용 Porter Blun MT-2B ultramicrotome으로 40~60 nm 두께로 초박절하여 Reynolds 방법<sup>29)</sup>에 의해 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자 염색을 하여 JEOL JEM-100CX 전자현미경으로 가속전압 80kv에서 관찰하였다. 그리고 mitochondria 분획은 4,800배, microsome 분획은 14,600배로 각각 10군데씩 촬영하였다.

본 실험에서 얻어진 성적 중 mitochondria 및 microsome의 순도 결정은 형태계적법 중 수 및 면적의 계측에 주로 이용되는 Weibel<sup>30)</sup>의 점계수 계측법(point counting planimetry)을 이용하여 결정하였다. 즉 촬영한 mitochondria 및 microsome 분획의 사진들을 2.3배로 확대 인화하여 가로 세로 5mm 간격의 모눈이 그려진 투명한 비닐용지를 이용하여 mitochondria와 microsome이 차지한 모눈의 교차점수를 계산하였고 동시에 그의 구조물이 차지한 교차점의 수도 함께 계산하였다.

## 성 적

**Mitochondria 와 microsome의 미세구조:** Mitochondria의 대부분은 외막, cristae 및 기질의 전자밀도가 찬조직 절편에서 관찰된 바와 유사하였으

Table 1. Statistical data of mitochondrial fractionations by point to point morphometry

Electron micrograph	Mitochondria (%)	Other structures (%)
1	223 (91.4)	21 ( 8.6)
2	228 (93.1)	17 ( 6.9)
3	247 (89.8)	28 (10.2)
4	242 (93.1)	18 ( 6.9)
5	218 (86.9)	33 (13.1)
6	230 (90.9)	23 ( 9.1)
7	242 (96.8)	8 ( 3.2)
8	235 (94.0)	15 ( 6.0)
9	272 (94.8)	15 ( 5.2)
10	248 (92.5)	20 ( 7.5)
Mean±SD	238.5±14.7 (92.3±2.6)	19.9±6.7 (7.7±2.6)

나 일부는 outer compartment의 확장이 일어났다. 그러나 이러한 소견은 시료의 전자현미경적 처리 과정에서 혼히 야기될 수 있는 인공산물로 생각되며 mitochondria 분리 과정에 일어날 수 있는 구조적 손상과는 구별이 되었다. 그리고 microsome은 크고 작은 소포로 나타났으며 ribosome이 부착된 RER과 이들이 없는 SER로 구별할 수 있었으며 이들 내강의 전자밀도는 간 조직 절편에서 판찰된 바와 같이 비교적 낮았다(도 2 및 3).

**Mitochondria 및 microsome의 순도:** 본 실험에서 고안한 세포 분획법으로 분리된 흰쥐 간의 mitochondria와 microsome의 순도를 보면 표 1 및 2와 같다. 즉 mitochondria는 그 순도가 92.3±2.6%였으며 microsome은 그 순도가 86.7±5.0%였다.

**Mitochondria, microsome 및 cytosol에서의 marker enzyme의 분포:** 본 실험에서 고안한 세

Table 2. Statistical data of microsomal fractionations by point to point morphometry

Electron micrograph	Microsome (%)	Other structures (%)
1	130 (88.4)	17 (11.6)
2	101 (77.7)	29 (22.3)
3	92 (89.3)	11 (10.7)
4	99 (84.6)	18 (13.4)
5	101 (87.1)	15 (12.9)
6	108 (92.3)	9 ( 7.7)
7	133 (80.6)	32 (19.4)
8	144 (82.3)	31 (17.7)
9	136 (92.5)	11 ( 7.5)
10	156 (92.3)	13 ( 7.7)
Mean±SD	120±21.2 (86.7±5.0)	18.6±8.3 (13.1±4.9)

포분획법으로 분리한 흰쥐 간의 mitochondria, microsome 및 cytosol의 분포와 그량을 보면 표 3과 같다.

Mitochondria의 marker enzyme인 MAO<sup>20)</sup>는 homogenat의 활성도를 100%라 했을 때 mitochondria 분획은 63.8±5.1%, microsome 분획은 17.2±2.1%였으며 cytosol에도 3.8±1.0%나 존재하고 있었다.

Microsomes의 marker enzyme인 G-6-Pase<sup>19)</sup>는 homogenate의 활성도를 100%라 했을 때 microsomes 분획은 70.8±6.8%, mitochondria 분획은 8.2±2.3% 그리고 cytosol 분획은 1.9±0.4% 존재하였다.

Cytosol의 marker enzyme인 ADH는 cytosol에만 존재했는데 homogenate의 활성도를 100%라 했을 때 cytosol 분획은 114.1±7.8%나 되었다.

Table 3. Subcellular distribution of alcohol dehydrogenase (ADH), monoamine oxidase (MAO) and glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) in rat liver

Marker enzyme	Homogenate (enzyme activity)	Homogenate	Mitochondria	Microsomes	Cytosol
			(P-4 fraction)	(P-10 fraction)	(S-5 fraction)
ADH	23.2 ± 4.5	100	0	0	114.1±7.8
MAO	0.329± 0.068	100	63.8±5.1	17.2±2.1	3.8±1.0
G-6-Pase	109.7 ± 16.5	100	8.2±2.3	70.8±6.8	1.9±0.4

All values are expressed as mean±SD of 10 experiments.

Enzyme activities are expressed as ADH=n mol NADH/mg protein/min, MAO=n mol NH4+/mg protein/min and G-6-Pase=n mol Pi/mg protein/min.

P-4, P-10 and S-5 fractions were described in Fig. 1.

## 고 츠

현재 고안되어 있는 대부분의 세포분획법들은 손상받지 않은 비교적 완전한 세포소기관을 얻기 위해서 복잡 다양한 원충액들을 원심분리용 medium이나 전처리용 medium으로 사용<sup>1-18)</sup>하고 있다.

본 방법에서는 이를 배제하고 단순히 sucrose 단을 사용한 medium을 조제하여 사용하였으며 혹 이들 medium을 사용했을 때 세포소기관의 손상이나 이로 인한 enzyme들의 양적 감소가 있지 않을까 생각하여 전자현미경적 검색과 아울러 marker enzyme의 분포량을 측정하였다.

본 방법에 의해 분리된 mitochondria와 microsome은 전자현미경적 검색에서 손상을 거의 볼 수 없었다. 한편 mitochondria의 marker enzyme인 MAO<sup>20)</sup>는 본 방법으로 분리한 mitochondria 분획 중에는 총 homogenate를 100%로 했을 때 약 64% 존재하였으며 이 성적은 Baudhuin 등<sup>9)</sup>이 얻어낸 성적인 약 54%보다 더 좋은 성적이였다. 그리고 microsome의 marker enzyme인 G-6-Pase<sup>19)</sup>는 본 방법으로 분리한 microsome 분획 중에는 총 homogenate를 100%로 했을 때 약 71% 존재하였으며 이 성적은 Baudhuin 등<sup>9)</sup>과 de Duve<sup>4)</sup> 등이 얻어낸 성적인 약 74%보다는 약간 낮은치를 나타내었다. 그러나 이 치는 의의있는 낮은치는 아니라고 생각된다. cytosol 분획의 marker enzyme인 ADH<sup>21, 22)</sup>는 본 방법에서 얻어낸 cytosol 분획 중에는 총 homogenate를 100%로 했을 때 약 114%나 존재하였다. 이 성적은 총 homogenate의 ADH가 cytosol 분획의 ADH보다 감소된 치를 보여 주는 것으로서 homogenate 중에는 ADH의 저해물이 존재한다는 것을 암시해 주는 것이다. 그리고 본 방법으로 분리한 cytosol 분획 중에는 MAO와 G-6-Pase가 약간 존재하고 있다. 그러나 이것은 이미 잘 알려진 사실<sup>4, 9, 11)</sup>이기 때문에 본 방법에 의해 얻어진 cytosol 분획 중에는 세포소기관 물질이 혼재되어 있다고 볼 수는 없다. 특히 본 방법으로 분리한 mitochondria나 microsome 분획 중에 ADH가 존재치 않는 것은 잘 세척되었다는 것을 알려주는 성적인 것이다.

특히 본 방법으로 분리한 mitochondria와 microsome을 전자현미경으로 검색하여 그 순도를 측정하여 보았을 때 mitochondria는 약 92%의 순도를 나타내었으며 microsome은 약 87%의 순도를 나

타내었다.

이상 본 실험에서 판찰된 순도와 효소측정 성적으로 보아 본 방법은 흰쥐 간의 mitochondria, microsome 및 cytosol를 재료로 사용하는 연구자들에게는 추천할 만한 흰쥐간 세포분획법이라 생각된다.

## 요 약

흰쥐 간에서 mitochondria와 microsome을 비교적 간편하게 그리고 높은 순도로 분리할 수 있는 세포 분획법을 고안하여 보았다.

0.25M-sucrose액으로 흰쥐 간의 homogenate를 만들고 mitochondria 분획은 20~45% sucrose linear density gradient centrifugation으로 microsome은 10~35% sucrose linear density gradient centrifugation으로 분리하여 전자현미경으로 검색했을 때 이들 분획은 형태 변화나 손상은 거의 없었으며 mitochondria의 순도는 약 92%였고 microsome의 순도는 약 87%였다. 한편 이들 분획에서 marker enzyme를 측정했을 때 mitochondria의 MAO는 총 homogenate를 100%로 했을 때 약 64%였으며 microsome의 G-6-Pase는 약 71%였다. 그리고 cytosol 분획의 ADH는 약 114%였다.

## 참 고 문 헌

- Barnum CP, Huseby RA: Some quantitative analyses of the particulate fraction from mouse liver cell cytoplasm *Arch Biochem* 1948; 19 : 17.
- Appelmans F, Wattiaux R, de Duve C: Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J* 1955; 59 : 438.
- Aderson NG: Studies on isolated cell components. VIII. High resolution gradient differential centrifugation. *Exp Cell Res* 1955; 9 : 446,
- de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F: Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat

- liver tissue. *Biochem J* 1955; 60 : 604.
5. Chauvean J, Moule Y, Rouiller CH: Isolation of pure unaltered liver nuclei morphology and biochemical composition. *Exp Cell Res* 1956; 11 : 317.
  6. Palade GE, Siekevitz P: Liver microsomes. An integrated morphological biochemical study. *J Biophys Biochem Cytol* 1956; 2 : 171.
  7. Neville DM: The isolation of a cell membrane fraction from rat liver. *J Biophys Biochem Cytol* 1960; 8 : 413.
  8. Maggio R, Siekevitz P, Palade GE: Studies on isolated nuclei. *J Cell Biol* 1963; 18 : 267.
  9. Baudhuin P, Beaufay H, Rahmann-Li Y, Sellinger OZ, Wattiaux R, Jacques P, de Duve C: Tissue fraction studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochem J* 1964; 92 : 179.
  10. Dorling PR, LePage RN: A rapid high yield method for the preparation of rat liver cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1973; 318 : 33.
  11. Wattiaux R: Behaviour of rat liver mitochondria during centrifugation in a sucrose gradient. *Mol Cell Biochem* 1974; 4 : 21.
  12. Begeron JJ, Posner BI, Josefsberg Z, Sikstrom R: Intracellular polypeptide hormone receptors. The demonstration of specific binding sites for insulin and human growth hormone in golgi fractions isolated from the liver of female rats. *J Biol Chem* 1978; 253 : 4058.
  13. Waddington DH, Sutherland IA, Morris, WB, Peters TJ: Subcellular fractionation of rat liver homogenates using two-polymer phase system in a toroidal-coil centrifuge. *Biochem J* 1984; 217 : 751.
  14. Yamada H, Hayashi H, Natori Y: A simple procedure for the isolation of highly purified lysosomes from normal rat liver. *J Biochem (Jpn)* 1984; 95 : 1155.
  15. Völkl A, Fahimi HD: Isolation and characterization of peroxisomes from the liver of normal untreated rats. *Eur J Biochem* 1985; 149 : 257.
  16. Hartl FU, Just WW, Köster A, Schimassek H: Improved isolation and purification of rat liver peroxisomes by combined rate zonal and equilibrium density centrifugation. *Arch Biochem Biophys* 1985; 237 : 124.
  17. Ishii H, Ishii S, Suga T, Kazama M: Developmental changes in the activities of peroxisomal and mitochondrial  $\beta$ -oxidation in chicken liver. *Arch Biochem Biophys* 1985; 237 : 151.
  18. Bachs O, Famulski KS, Mirabelli F, Carafoli E: ATP-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport in vesicles isolated from the bile canalicular region of the hepatocyte plasma membrane. *Eur J Biochem* 1985; 147 : 1.
  19. Nakai K, Takemitsu S, Kawasaki T, Yamashina I: Gel filtration of marker enzymes of plasma membrane and endoplasmic reticulum from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1969; 193 : 468.
  20. Greenawalt JW, Schnaitman C: An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J Cell Biol* 1970; 46 : 173.
  21. Arslomian MJ, Pascoe E, Reinhold JG: Rat liver alcohol dehydrogenase. Purification and properties. *Biochem J* 1971; 125 : 1039.
  22. Krasner J, Eriksson M, Yatte SJ: Developmental changes in mouse liver alcohol dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 1974; 23 : 519.
  23. Koivula T, Koivusalo M, Lindros KO: Liver aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochem Pharmacol* 1975; 24 : 1807.

24. Nagatsu T, Yagi K: A simple assay of monoamine oxidase and D-amino acid oxidase by measuring ammonia. *J Bioc-hem(Jpn)* 1966; 60:219.
25. Swanson MA: Phosphatase of liver. I. Glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 1950; 184:647.
26. Colowick SP, Kaplan NO: Method for isolation and degradation of labeled protein, in: method in enzymology, *New York Academic Press* 1957, Vol 4, p 708.
27. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum protein by means of biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177:751.
28. Luft JH: Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biochem Cytol* 1961; 9:409.
29. Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963; 17:208.
30. Weibel ER: Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 1969; 26:235.

## &gt;곽춘식 · 곽정식 사진부도&lt;

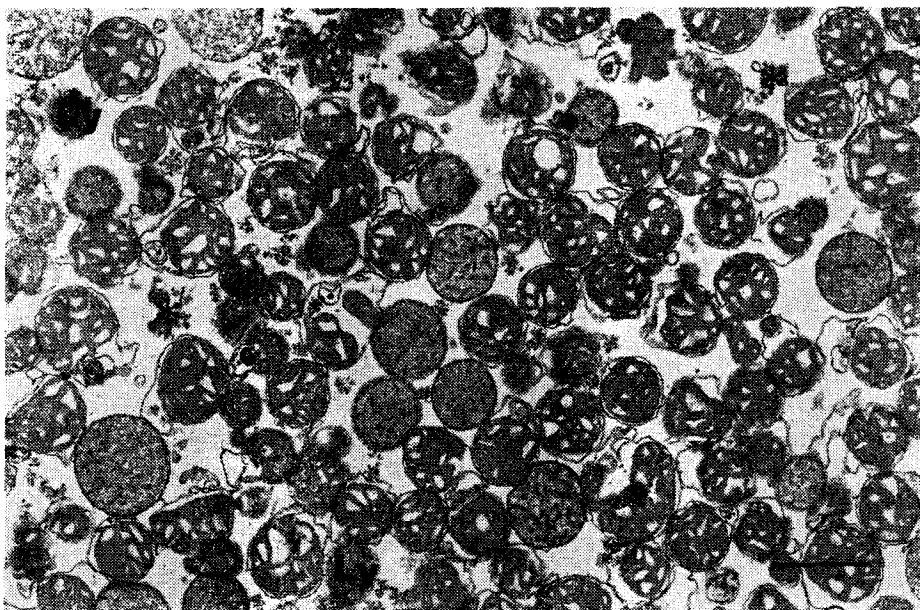


Fig. 2. Electron micrograph of mitochondrial from rat liver. Ultrathin section of purified pellet. Most mitochondria are well preserved their structures. Lysosomes(Ly) and amorphous granular structures(\*) are occasionally seen. Uranyl acetate and lead citrate. Bar=1 μm.

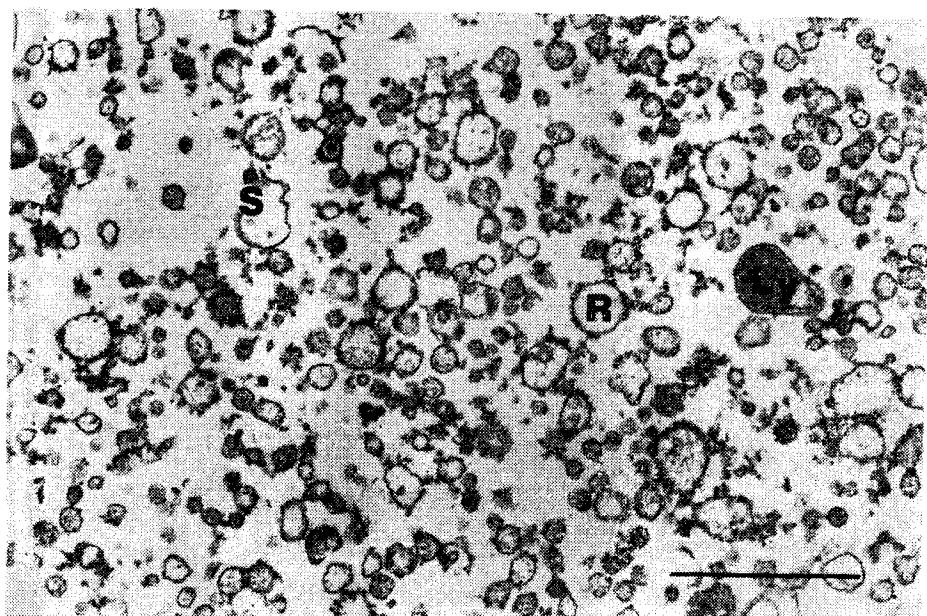


Fig. 3. Microsomal fraction of rat liver. Vesicular RER(R) and SER(S) are well demonstrated. Lysosomes(Ly) and amorphous granular material are present. Uranyl acetate and lead citrate. Bar=1 μm.