

Effect of concentration, pressure, and cut-off size on removing phospholipase A₂ in bee venom by ultrafiltration

Ji-yeon Lee^{1,★}, Il Kwang Kim², Jong Soo Lee³, Eui Kyung Kim⁴ and Choul-Goo Kim^{1,★}

¹Chungjin Biotech, Hanyang University, 1271 Sa3-dong, Sangrok-gu, Ansan-si, Gyeonggi-do 426-791, Korea

²N. CosmeCeutical Co., Ltd, Wonkwang Univ., 460 Iksan-daero, Iksan-si, Jeollabuk-do 570-749, Korea

³College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-go, Daejeon 305-764, Korea

⁴Department of Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju 660-701, Korea

(Received July 11, 2014; Revised October 8, 2014; Accepted October 10, 2014)

Ultrafiltration을 이용한 봉독의 phospholipase A₂ 제거에서 농도, 압력, 분자크기의 영향

이지연^{1,★} · 김일광² · 이종수³ · 김의경⁴ · 김철구^{1,★}

¹한양대학교 창업보육센터 청진바이오텍, ²원광대학교 창업보육센터 앤코스메슈,

³충남대학교 수의과대학, ⁴경상대학교 수의과대학

(2014. 7. 11. 접수, 2014. 10. 8. 수정, 2014. 10. 10. 승인)

Abstract: The effects of concentration, pressure, and molecular size on removing allergenic substance (phospholipase A₂) in bee venom by ultrafiltration were investigated. The membrane pore sizes were selected based on the molecular weight of the main compounds. The conditions of concentration and pressure were selected randomly. As results, we obtained the optimum condition (1 mg/mL, 20 psi, 10,000 dalton) for removing PLA₂ at constant concentration of melittin and apamin and confirmed the separation results by HPLC and SDS-PAGE.

요 약: 한외여과법을 이용하여 봉독의 알러지 원인성분인 PLA₂를 제거하기 위하여 압력, 농도, 분자크기의 영향을 조사하였다. 봉독의 주요성분 분자량을 바탕으로 한외여과막의 투과크기를 선정하고 농도와 압력을 달리하였다. 그 결과, melittin과 apamin 함량은 유지되면서 PLA₂를 제거하는 최적조건(1 mg/mL, 20 psi, 10,000 dalton)을 찾았으며, 이를 HPLC와 SDS-PAGE로 확인하였다.

Key words: honey, bee venom, phospholipase A₂, ultrafiltration

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-400-3707 Fax : +82-(0)31-400-3709

E-mail : dorothy_1j@biovenom.com

1. 서 론

봉독요법은 약 2000년 전부터 벌의 꿀무늬에 있는 독침을 이용하여 경혈 및 아시혈(자기 신체의 아픈 부위)에 순간적으로 시침하는 것으로 침과 뜸, 약의 효과를 동시에 느끼게 하여 치료 효과가 매우 높은 민간요법의 하나이다.¹ 이는 인체의 면역기능을 활성화 시켜, 각종 통증 질환 및 염증 질환의 치료제로 활용되었다.^{2,3}

봉독에 관한 연구는 1990년경부터 활발히 진행되고 있으며, 항암효과를 포함한 다양한 생리작용 및 약리작용에 대한 기전이 점차 알려지고 있다. 봉독은 무색, 투명한 점성이 있는 액체로 강한 쓴맛이 나는 방향성 물질이다. 비중은 1.13, pH는 5.2~5.5이고, 물과 산에 쉽게 용해되지만 알코올에는 거의 용해되지 않는다. 냉동상태에서는 봉독활성을 장기간 유지할 수 있지만, 산화성 물질에 의해서는 쉽게 파괴된다.⁴ 봉독의 성분은 약 40 가지로 Enzyme, peptide, nonpeptide, physiologically active amines, carbohydrate, lipids, amino acid, 등으로 나눌 수 있다. Enzyme의 주요성분으로 phospholipase A₂ 이하(PLA₂), hyaluronidase와 peptide의 주요 성분인 melittin, apamin 그리고 nonpeptide의 주요 성분 histamin, dopamine, noradrenaline 등으로 구성되어 있다. 이들은 봉독의 항균, 항염, 진통, 항암, 단순포진, 다발성 경화증, 종양, 해열과 adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 분비촉진 등의 작용기전을 일으킨다.⁵

이 중 가장 특징적인 주성분은 melittin으로 건조봉독의 40~50%를 함유한다. 1954년에 Neumann과 Habermann에 의해 직접 용혈성 요소로 처음 발견되었고, 1972년 Habermann에 의해 적혈구 용해시의 세포막 활성이 관찰되었다.² 구조적으로 26 개의 아미노산을 함유하고 있으며, 대식세포의 이동을 강하게 억제하고, phospholipase A₂와 상승적으로 작용하여 서로의 활성성을 증가시킨다. 뇌하수체와 부신피질체계를 자극하여 catecholamine과 cortisone 분비를 촉진하고,⁴ 리소좀의 세포막을 안정화시켜 항염증 작용을 한다. 또한 용해, 효소, 통증유발, 방사능저항성 작용 등이 있다. Apamin은 건조봉독의 2~3%에 지나지 않지만 신경계에 작용하고, melittin과 같이 항염증 작용을 한다고 알려져 있다. Mast cell degranulating (MCD) peptide는 mast cell의 용해와 histamine의 확산을 증가시킨다. PL A₂는 hyaluronidase와 함께 강력한 항원성을 나타내며, 인지질을 파괴하여 세포용해 촉매작용을 하고 봉독의 확산을 도와준다. 또한 allergen의 주요성분이다.^{2,3,6} 봉독의 allergen으로는 불안감, 두드러기,

가려움증, 구토, 경련, 설사 등이 수반될 수 있고, 호흡기 장애가 있을 시 현기증, 실신, 호흡곤란 등의 부작용이 있을 수 있으므로 임상에서는 신중을 가해야 한다.² 이렇듯, 봉독의 성분 중 PL A₂는 효소성분의 대부분을 차지하는 물질로 봉독에 민감한 사람들의 90% 정도에서 이에 대한 immunoglobulin E (IgE)항체가 발견된다.¹ 따라서 봉독약침요법을 임상에 사용할 때에는 안전을 위하여 알려지 발생원인 성분을 원천적으로 차단하여야 한다. 본 연구에서는 PL A₂를 완전히 제거하고 주성분이 melittin과 apamin으로 구성되는 분리정제봉독을 얻기 위하여 한외여과법을 사용하였다. 한외여과에서의 압력, 농도, 분자크기를 조절하여, PL A₂ 분리에 대한 최적조건을 구하였으며, high performance liquid chromatography (HPLC)와 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 확인하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

2.1.1. 봉독시료

국내에서 사육중인 서양종 꿀벌(*Apis mellifera* L.)의 봉독을 봉독채집장치((주)청진바이오텍, 한국)를 사용하여 채집하고 봉독의 간이정제방법²을 통해 불순물을 제거한 후 -56 °C에서 -75 °C의 온도로 동결 건조하여 분말형태인 순수 봉독(PBV)을 사용하였다.

2.1.2. 시약 및 용매

함량분석에 사용된 봉독의 지표물질은 멜리틴(melittin; from bee venom, Sigma-Aldrich), 아파민(apamin; from bee venom, Sigma-Aldrich), 포스포리파아제 A₂(PL A₂; from bee venom, Sigma-Aldrich)을 구입하여 추가 정제과정 없이 사용하였고, 용매로는 acetonitrile(이하 AN; Sigma-Aldrich), trifluoroacetic acid(이하 TFA; Sigma-Aldrich)를 사용하였다. SDS-PAGE 실험에는 30% acrylamide/bis solution(Bio-Rad, USA), Tris-HCl(Tech&I, BTH-9180-500M), SDS(Bio-Rad), APS(Bio-Rad), TEMED(Bio-Rad)을 구입하여 gel을 만들었고, coomassie brilliant blue G-250(Bio-Rad)와 destaining solution(Bio-Rad)을 사용하였다. Precision plus protein dual xtra standards(Bio-Rad)을 구입하여 marker로 사용하였다. 0.78~0.81 μs/cm의 전도도를 가지는 HPLC용 증류수(덕산, Korea)를 0.2 μm filter paper(Phenomenex, USA)로 filter후 사용하였다.

2.1.3. 기기

한외여과기(ultrafiltration)는 millipore (amicon Stirred Cell Model 8200)제품을 사용하였으며 기기에 사용된 membrane filter는 millipore (ultracel ultrafiltration discs 5,000 Dalton, 10,000 Dalton, 30,000 Dalton)제품을 사용하였다. 초정밀저울은 XP 105 (Mettler toledo, USA) 모델을 사용하였다. 분석을 위한 HPLC 분석장비는 Waters 1525 μ binary HPLC pump, Waters 486 detector, Waters 717 plus autosampler와 column은 Jupiter 4u proteo 90 Å (Phenomenex, USA)을 사용하였다. SDS-PAGE 실험에는 Mini protean tetra cell and power pac supply (Bio-rad, 165-8025)를 구입하여 사용하였다.

2.2. 한외여과를 이용한 알러지 성분 및 고분자물질 제거

건조된 정제봉독(PBV)을 증류수에 10 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL 되도록 각각의 농도에 맞추어 녹인 후 불순물을 제거하기 위해 0.45 μm (Sartorius, USA) syringe filters를 이용하여 여과하였다. 불순물과 PLA₂ 여과 제거를 위하여 여과막 기공크기를 실제 성분의 분자 크기(Tabel 1)와 비교하여 선택하였다. 봉독의 유효성분이 변성되지 않고 효과를 유지하기 위해 온도를 0~4 °C를 유지한 상태에서 증류수에 적신 한외여과막 필터를 한외여과기내에 넣고 조립하고 교반하면서 소

량의 증류수를 넣는다. 여과한 후 봉독을 녹인 수용액을 한외여과기에 넣고, 20,30,40 psi로 압력을 각각 다르게 여과하였다. 여과 후 동결건조하고 HPLC를 이용하여 함량을 분석하였다.

2.3. 봉독의 유효성분 정량 분석

봉독의 apamin, PLA₂, melittin 정량분석을 위해 waters 의 HPLC system을 이용하였으며. column은 온도를 25 °C로 설정하였다. 이동상으로는 0.2% TFA water(A)와 0.22% TFA acetonitrile(B)를 100:0 비율로 시작하여 20분간 서서히 50:50으로 용매비율을 변화시킨 후 30분간 서서히 다시 100:0 비율로 변화시켜 사용하였다. 1.0 mL/min의 유속을 유지하며 UV 220 nm에서 측정하였으며, HPLC 운전조건을 Table 2에 요약하였다.

정제봉독(PBV)의 대표적인 3 가지 주요 유효성분인 apamin, PLA₂, melittin의 지표물질인 apamin(0.5mg, 순도 ≥ 99.5%), phospholipase A₂(1 mg, 순도 ≥ 90.72%), melittin (5 mg, 순도 ≥ 92.0%)을 증류수 10 mL에 용해시키고 20, 30, 40 mL씩을 측정하고, 시료의 농도는 1.0 mg/mL로 정확히 만들어 측정하여 표준곡선정량 분석법으로 분석하였다.

시료의 각 성분 함량은 standard의 calibration curve와 각 성분의 면적을 산출하여 아래 계산식 (1)을 통해 함량을 계산하였다.

$$\text{함량(\%)} = \frac{\text{표준품재취량(mg)}}{100} \times \frac{\text{검체의피크면적}}{\text{표준액의피크면적}} \times \frac{100}{\text{검체의개취량(mg)}} \tag{1}$$

Table 1. The molecular weight of the active ingredient in purified bee venom.

Classification	Ingredient	Molecular weight
Enzyme	Phospholipase A ₂ , B	<13 KDa
	Hyaluronidase	38 KDa
	Phosphatase	50-160 KDa
	α-Glucosidase	51 KDa
Peptide	Melittin	2.8 KDa
	Apamin	2.0 KDa
	MCD peptide	2.6 KDa
	Procamine, Pamine	0.4 KDa
	Minimine	≤6.0 KDa
	Adolapine	11.5 KDa
	Protease inhibitor	9.0 KDa
	Fertiapine	≤3.0 KDa
Active amines and amino acids	Histamine	0.12 KDa
	Dopamine	0.15 KDa
	Noradrenalin	0.17 KDa
	Aminobutyric acid	0.18 KDa
	α-amino acids	0.18 KDa

Table 2. Quantitative analysis conditions of purified bee venom using HPLC

Instrument	Pump	Waters 1525 μ binary HPLC pump
	Detector	Waters 486 detector
	Autosampler	Waters 717 plus
	Column	Phenomenex Jupiter 4u proteo 90A
Mobile phase	A: 0.2% TFA in water B: 0.22% TFA in acetonitrile	
UV absorbance	220 nm	
Column temperature	25 °C	
Injection volume	20 μL	
Folw rate	1.0 mL/min	
Gradient	min A(%) B(%)	
	Ini. 100 0	
	20 50 50 50 100 0	

Table 3. Staking gel and separating gel composition for SDS-PAGE.

20% separating gel		5% staking gel	
DW	700 μ L	DW	3.4 mL
30% acrylamide mix	6.6 mL	30% acrylamide mix	830 μ L
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	2.5 mL	1.0M Tris-HCl (pH8.8)	630 μ L
10% SDS	100 μ L	10% SDS	50 μ L
10% APS	100 μ L	10% APS	50 μ L
TEMED	4 μ L	TEMED	5 μ L

2.4 SDS-PAGE Pattern

Laemmli의 SDS-PAGE 방법(1970)^{3,7}을 이용하였으며, 20%의 gel 조성을 만들고 고정된 glass plate에 약 10 mL 정도 분주한 후 평형을 맞추기 위해 물을 약 1~2 mL 정도 분주하여 separating gel을 굳히고, 위에 분주한 물을 제거하고 staking gel 조성물 약 5 mL 을 분주 후, gel이 굳기 전에 comb를 끼워 굳히고 staking gel까지 굳으면 comb를 제거하여 SDS PAGE gel을 완성시킨다(Table 3).

SDS PAGE로 확인하고자 하는 분획과 sample buffer (Laemmli 2x Concentrate, sigma, S3401)를 1:1 비율로 혼합하고, 90 °C의 water bath에서 5분 동안 중탕시킨다. Gel의 comb에 marker 5 μ L, sample 30 μ L 씩 loading하고, gel을 SDS PAGE 탱크에 끼워서 running buffer (25 mM Tris, 192 mM 글리신, 0.1% SDS, pH 8.3)를 채워주었다. SDS PAGE power supply 통하여 staking gel에서 60V로 약 30 min동안 작동시키고, separating gel에서 120V로 약 60-90 min동안 작동시킨다. 시료의 성분은 power supply에서 흘러주는 전류를 따라 gel에서 분자량 별로 분리되고, coomassie brilliant blue G-250 염료와 destaining solution으로 염색/탈색 후 band를 확인하여 봉독의 알레르기 유발물질인 hyaluronidase, PLA₂등의 물질이 분리되었는지 확인하였다.

3. 결 과

3.1. HPLC를 이용한 정량분석의 정확도

정제봉독의 주요 유효성분인 apamin, PLA₂, melittin의 정량을 분석하기 위해 정확성을 검증하기 위해 지표물질을 20, 30, 40 μ L로 loading하여 크로마토그램 (Fig. 1)과 calibration curve(X축: amount, Y축: Peak area) (Fig. 2)를 작성하였다.

크로마토그램을 통해 봉독의 주요 3 가지 유효성분의 머무름시간(apamin: 10.7 min, PLA₂: 16.4 min,

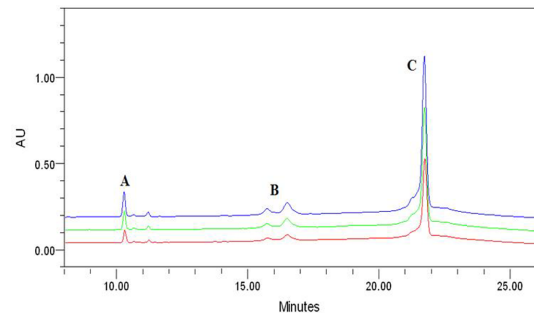


Fig. 1. Chromatogram of standard. A: apamin B: phospholipase A₂ C: melittin

melittin: 21.9 min)⁸과 peak를 확인하고 실험의 재연성을 확인하였다(Fig. 1).

검정곡선은 apamin, PLA₂, melittin 각각의 주입량 대비 peak 면적비를 산출하여 계산하였고 상관계수를 이용하여 높은 정확도를 검증하였다.

Apamin의 상관계수(R²)는 1.0000로 높은 유의수준으로 보였고 PLA₂, melittin의 경우도 상관계수(R²)가 0.9999, 0.9994로 높은 유의수준을 보였다(Fig. 2).

4.2. 다양한 조건에 따른 유효성분의 변화

증류수를 이용하여 10 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL 각각의 농도에 맞추어 녹인 봉독액을 압력과 분획분자량(cut off size)를 달리하여 한외여과하고 동결건조 후 정확성이 검증된 HPLC를 이용하여 함량을 측정하였다. 그 결과 phospholipase A₂의 경우 5,000 Dalton, 10,000 Dalton에서 제거가 되었으며 30,000 Dalton에서는 제거 되지 않았다. 이는 PLA₂의 분자량이 13,000 Dalton으로 5,000 Dalton, 10,000 Dalton에 비해 cut-off pore size가 큰 30,000 Dalton에서 완전히 걸리지 않고 일부 유출되기 때문으로 보인다. 또한 압력에 따라 정제봉독을 녹인 수용액의 농도에 상관없이 30 psi에서 함량이 낮고 20 psi, 40 psi에서 높은 일정한 패턴을 보였다(Fig. 3). 낮은 함량을 보인

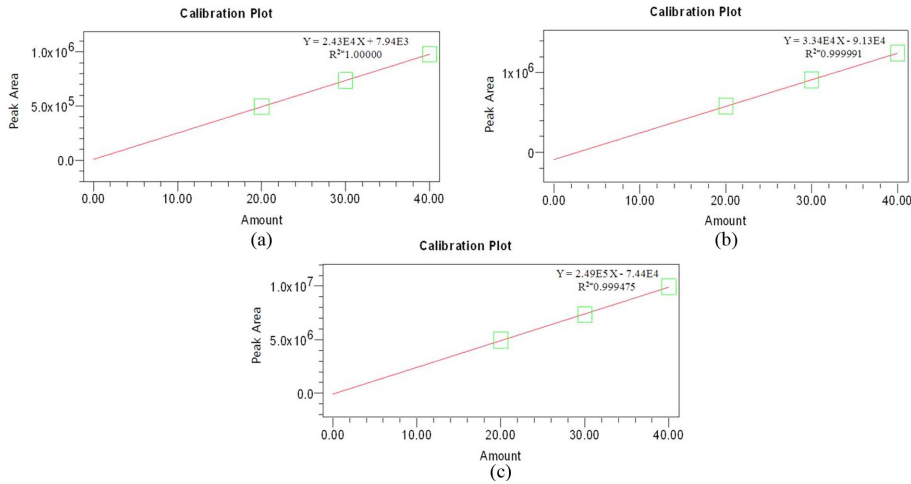


Fig. 2. Calibration curve of standard. A: Apamin B: Phospholipase A₂ C: Melittin

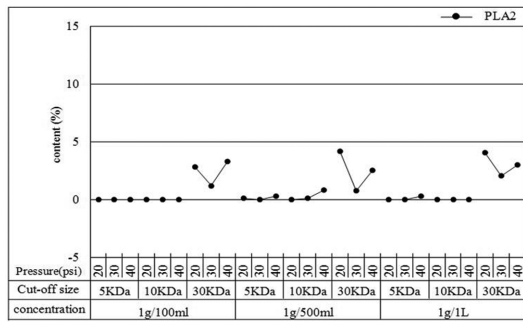


Fig. 3. Change the content of PLA₂.

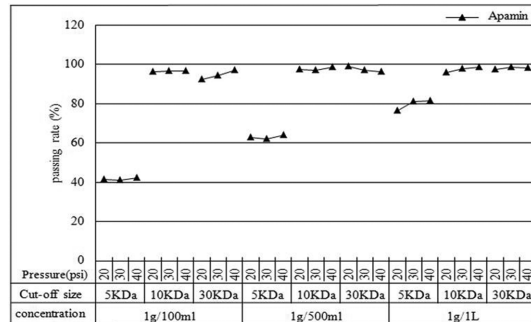


Fig. 4. passing rate of Apamin.

30 psi의 경우 같은 교반속도에서 20 psi 보다 높은 압력인 30 psi를 가하게 되면 막 표면의 밀도가 높아지는 농도분극현상⁸⁾에 의해 PLA₂가 유출되지 않았기 때문으로 보인다.

30 psi 보다 높은 40 psi를 가하게 될 경우 고압으로 인한 강제유출이 되어 30 psi 보다 높은 함량이 나타나지만 membrane filter의 수명을 단축시키는 요인이 된다.

Apamin의 경우 다양한 조건의 변화에도 정제봉독 (PBV)의 함량을(≥2-3%) 유지하였으나 5,000 Dalton에서 희석배수가 올라갈수록 통과율은 증가하지만 가장 높은 통과율을 보인 10 mg/mL에서도 80%미만으로 나타났다. 10,000 Dalton, 30,000 Dalton에서는 5,000 Dalton에 비해 cut-off pore size가 크기 때문에 95%이상의 높은 통과율을 보였다(Fig. 4).

봉독에서 가장 효과적인 성분인 melittin은 5,000 Dalton 분획분자량의 membrane filter를 사용했을 때

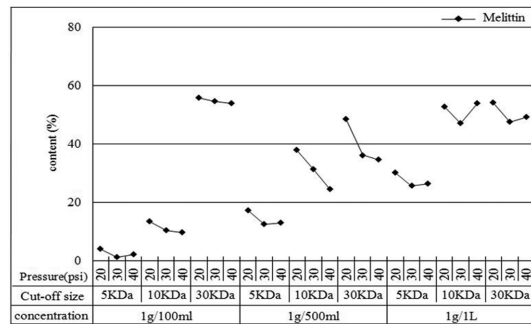


Fig. 5. Change the content of Melittin.

봉독액의 농도가 낮아질수록 함량이 올라가지만 희석 농도, 압력이 달라져도 통과율과 함량이 정제봉독에 비해 30%미만으로 나타났다. 10,000 Dalton에서도 농도가 낮아질수록 함량이 증가하였으나 30,000 Dalton의 경우에는 농도가 높을수록 함량이 증가함을 보였다. 입력변화에서도 20 psi를 가해주었을 때 가장 높은

함량을 보였는데(Fig. 5) phospholipase A₂와 마찬가지로 같은 교반속도에서 20 psi 보다 높은 압력인 30 psi 를 가하게 되면 막 표면의 밀도가 높아지는 농도분극 현상에 의해 melittin이 유출되지 않아 낮은 함량이 나타난 것으로 보이며 30 psi 보다 높은 40 psi를 가하게 될 경우 고압으로 인한 강제유출이 되어 30 psi에 비해 높은 함량이 나타난 것으로 보인다.

4.3. Chromatography를 이용한 성분확인

Fig. 3, Fig. 5를 통해 알 수 있듯이 20 psi의 압력으로 10 mg/mL의 농도에서 30,000 Dalton membrane filter를 사용한 경우 여러 가지 조건 중에서도 가장 높은 melittin의 함량을 나타내었지만 phospholipase A₂가 완전히 제거되지 않고 2% 이하 함유하였다. 20 psi의 압력으로 1 mg/mL의 농도에서 10,000 Dalton membrane filter를 사용한 경우에는 1mg/mL의 농도에서 10,000 Dalton membrane filter를 사용한 조건에 비해 melittin 함량이 3% 낮았으나 phospholipase A₂가 제거되었음

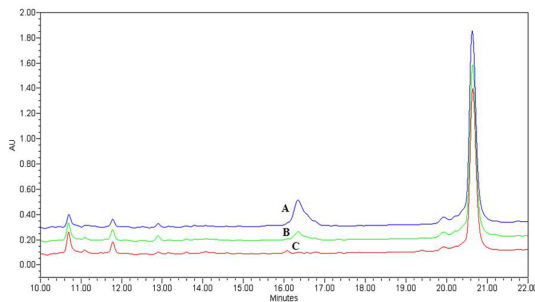


Fig. 6. A chemical analysis using HPLC. (A: Purified bee venom B: 10 mg/mL, 20 psi, 30,000 Dalton C: 1 mg/mL, 20 psi, 10,000 Dalton)

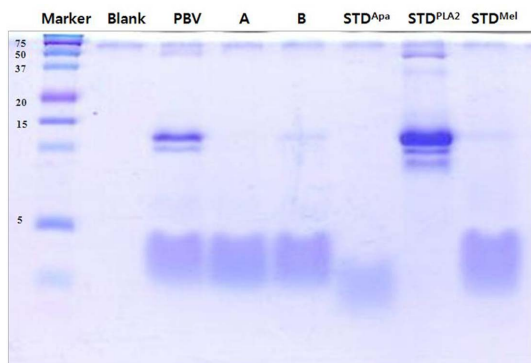


Fig. 7. A chemical analysis using HPLC. (A: 1mg/mL, 20 psi, 10,000 Dalton B: 10 mg/mL, 20 psi, 30,000 Dalton C: Purified bee venom)

을 알 수 있었으며 이를 HPLC와 SDS-PAGE를 통해 확인하였다(Fig. 6, Fig. 7).

위에서 크로마토그램을 통해 봉독의 주요 3가지 유효성분의 머무름시간(apamin: 10.7 min, PLA₂: 16.4 min, melittin: 21.9 min)과 peak를 확인한 결과를 바탕으로 PLA₂의 머무름시간인 16.4 min에서 20 psi 압력을 가해주고 10 mg/mL 농도에서 30,000 Dalton filter를 사용한 조건에서 정제봉독에 비해 낮은 PLA₂ peak를 확인할 수 있었다. 20 psi 압력을 가해주고 1 mg/mL 농도에서 10,000 Dalton filter 사용한 조건에서는 PLA₂ peak가 나타나지 않음을 확인하였다. 또한 두 조건 모두 melittin과 apamin은 정제봉독의 수준을 유지하고 있음을 알 수 있다.

SDS-PAGE를 이용한 결과 봉독의 주요 3 가지 유효성분의 standard와 정제봉독, 두 가지 조건을 함께 비교하였을 때 HPLC와 마찬가지로 20 psi 압력을 가해주고 10 mg/mL 농도에서 30,000 Dalton filter를 사용한 조건에서 정제봉독에 비해 열은 PLA₂ band를 확인할 수 있었다. 20 psi 압력을 가해주고 1 mg/mL 농도에서 10,000 Dalton filter 사용한 조건에서는 PLA₂ band가 나타나지 않음을 확인하였다.

5. 결론 및 고찰

본 연구는 한외여과법을 이용하여 알려지워인 PL A₂를 제거하고 그 외 유효성분인 apamin, melittin의 함량변화를 확인하고 유지할 수 있는 한외여과 조건을 찾고자 하였다. 한외여과효과에 영향을 미치는 압력과 수용액의 농도, filter의 분획분자량을 달리하여 다양한 조건에서 함량변화를 보았다. 봉독의 유효성분들이 가지는 분자량을 통해 filter의 분획분자량을 5,000 Dalton, 10,000 Dalton, 30,000 Dalton으로 결정하고 한외여과기에 제한되는 최대압력(75 psi)과 filter의 효율, 수명을 고려하여 압력을 20, 30, 40 psi로 선정하였다. 실제 실험을 통하여 압력이 높다고 해서 높은 함량을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 정제봉독을 녹인 수용액의 경우 1 mg/mL 보다 저농도로 한외여과하게 되면 물의 비중이 많아져 동결 건조시에 어려움이 발생하게 되고 10 mg/mL 이상으로 고농도가 되면 용액의 전도도가 높아져 단백질이 침전되는 현상과 단백질 성분 간의 결합으로 분자량의 크기가 증가하는 현상이 나타나기 때문에 1 mg/mL, 2 mg/mL, 10 mg/mL의 농도로 결정하였다.

위의 다양한 조건 변화를 통해 PL A₂가 제거되고

정제봉독의 apamin과 melittin 함량(50-60%)이 비슷한 조건(20 psi의 압력으로 1 mg/mL의 농도에서 10,000 Dalton 막필터를 사용한 조건)을 찾을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 2012년 수출전략기술개발사업의 지원을 받아 수행되었으며 김일광, 이종수, 김의경 교수님의 지도를 받아 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

1. J. C. An, K. R. Kwon, S. B. Lee and T. J. Lim, *J. Pharmacopuncture.*, **9**(3), 97-104 (2006).
2. J. D. Lee, *J. Korean Medicine*, **21**(3), 3-8 (2000).
3. J. S. Lee, G. R. Kwon and S. B. Lee, *Korean Institute of Herbal Acupuncture*, **3**(2), 153-168 (2000b).
4. H. N. Kim, S. S. Nam, Y. H. Lee and Y. T. Choi, *Korean Institute of Herbal Acupuncture*, **3**(1), 65-87 (2000).
5. K. R. Kwon, C. S. Chu, J. H. Lee, M. K. Kim and B. C. Cha, *Korean Institute of Herbal Acupuncture*, **10**(2), 93-98 (2007).
6. J. S. Choi, J. W. Park and M. S. Oh, *ISSN*, **15**(1), 141-160 (2006).
7. Laemmli, U.K., *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
8. W. S. Kim, K. H. Youm, H. W. Lee and C. S. Lee, *Korean Institute of Chemical Engineers*, **25**(6), 593-600 (1987).
9. J. S. Lee, G. R. Kwon and H. Y. Choi, *J. Pharmacopuncture*, **17**(4), 120-129 (2000a).
10. S. M. Han, K. G. Lee, J. H. Yeo, H. Y. Kweon, B. Y. Oh, Y. G. Lee, B. S. Kim, H. J. Baek and S. T. Kim, *Korean J Vet Serv.*, **29**(3), 287-295 (2006).
11. S. M. Han, K. G. Lee, J. H. Yeo, H. Y. Kweon and H. J. Baek, *Korean J Vet Serv.*, **20**(1), 53-58 (2005a).
12. S. M. Han, K. G. Lee, J. H. Yeo, H. Y. Kweon and H. J. Baek, *Korean J Vet Serv.*, **20**(2), 95-102 (2005b).
13. J. H. Park, K. H. Kim, S. M. Han, J. H. Yeo and K. K. Park, *Korean J Vet Serv.*, **22**(2), 173-179 (2007).
14. S. U. Kim, B. R. Kim, K. Heo and S. W. Lim, *J. Kor. Oriental Internal.*, **30**(4), 845-857 (2009).