

개구리목 혈색소와 혈청 단백질의 전기영동

박상윤 · 조동현 · 김상엽 · 김선균 · 김창한
(성균관대 대학원 생물학과)

Electrophoresis of the Hemoglobins and the Serum Proteins of Korean Anuran

S.Y. Park, D.H. Cho, S.Y. Kim, S.K. Kim and C.H. Kim
(Dept. of Biology, Sung Kyun Kwan Univ.)
(1974. 10. 17 접수)

SUMMARY

Serum protein and hemoglobin patterns were obtained by cellulose acetate electrophoresis for several anurans. Differences were found both in the number of components from individual animal hemoglobins and in the mobility of these components. Under the conditions employed, toad and *R. plancyi chosonica* had a single component. Other frogs showed 2-component pattern.

Sera of all anurans examined contain albumin but no prealbumin. Relatively few assayable proteins are found in serum from *B. bufo gargarizans* and differ thereby from most serum patterns examined for frogs, which show complex serum protein bands. Different species have dissimilar patterns although some of bands are apparently homologous between species.

서 론

단백질의 전기영동도 (electrophoretic pattern)는 다른자료로부터 밝혀낸 양서류의 진화관계를 보완하는데에 흔히 이용된다 (Guttman, 1973). 또한 개구리목에 있어서 형태를 근거로하여 얻은 종 사이의 유연관계는 단백질의 전기영동도에서 알 수 있는 생화학적인 상호관계와 잘 일치되기도 한다 (Schmiel and Guttman, 1974).

본 실험은 우리나라에 서식하는 개구리목에 대한 광범한 생화학적인 검토를 시도하기 위한 예비실험으로서 이루어진 것이다.

실험재료 및 방법

실험동물은 여러 지역에서 채집한 8종으로서 다음과 같다. 아무르 좁개구리, *Rana amurensis coreana* (Ra)—수색(2개체), 연천(1), 퇴계원(3); 산개구리, *Rana dybowskii*

本研究는 1974年度 産學協同財團 學術研究費의 支援에 의하여 이뤄진 것이다.

(Rd)—용문산(2); 참개구리, *Rana nigromaculata* (Rn)—의정부(8), 남해도(11), 수색(18), 연천(3), 용문산(21), 퇴계원(13); 금개구리, *Rana plancyi chosonica* (Rp)—수색(9); 울개구리, *Rana rugosa* (Rr)—남해도(5), 연천(2), 용문산(7), 퇴계원(15); 청개구리, *Hyla arborea japonica* (Ha)—수색(3), 용문산(2), 퇴계원(1), 춘천(3); 무당개구리, *Bombina orientalis* (Bo)—남해도(21), 연천(32); 두꺼비, *Bufo bufo gargarizans* (Bb)—용문산(1).

혈색소는 다음과 같이 조제하였다. 혈액은 헤파린으로 씻은 주사기와 모세관으로 심장으로부터 채혈하였다. 이 혈액을 4°C에서 3,500 rpm으로 5분간 원심분리한 다음 상층액을 모세관으로 분리하여 버린후 침전된 혈구를 0.9% NaCl로서 부유시켜 세척한 뒤에 다시 원심 분리하였다. 이같은 조작을 3회 반복하였다. 이어 원심분리한 혈구에 3배 정도의 증류수를 가하여 -20°C로 냉동시켜 혈구를 파괴하였다. 이를 원심분리하여 투명한 혈색소용액을 분리하여 시료로서 사용하였다.

혈청은 헤파린을 쓰지않고 채혈한 혈액을 4°C에서 2~3시간 방치하여 응고시킨 후에 원심분리하여 얻은 상층액을 그대로 시료로서 사용하였다. 혈색소와 혈청은 대부분 준비되는 즉시 실험에 사용하였으나 그렇지 않은 경우에는 -20°C에서 보관하였다. 혈색소와 혈청 모두 소의 혈청알부민과 동시에 전기영동시켜 소의 혈청알부민을 기준으로 비교하였다.

전기영동은 cellulose acetate strip을 사용하였으며 pH 8.6의 barbiturate buffer($\mu=0.075$)에서 실시하였다. 100V의 정전압에서 25분간 전기영동 한 뒤 혈색소와 단백질 모두 Ponceau-S로 염색하였다. 일단 염색된 cellulose acetate strip은 5% acetic acid를 세번 교환하면서 배경이 희게될 때까지 탈색한 다음 물로 씻고, 습기를 제거한 뒤에 여과지 사이에 끼워 건조, 보관하였다.

실험결과 및 고찰

실험한 종의 혈색소는 대체로 1~2개의 밴드로 분리되었다 (Fig. 1). 실험결과 두꺼비와 금개구리에서는 단일 밴드가 나타나고, 기타 개구리에서는 모두 2개의 밴드로 구성된 혈색소를 가지고 있었다. 이러한 결과는 여지전기영동법으로 밝혀진 사실과 대략 잘 일치된다 (Rodnan and Ebaugh, 1957). 그러나 Dessauer *et al.* (1957)에 따르면, 같은 여지전기영동법으로 분리한 Bufonidae와 Hylidae의 혈색소는 3개의 밴드로 구성되어 있었으며, Microhylidae에서는 단일밴드가, 개구리과에서는 2개의 밴드가 나타났었다. 이러한 점으로 미루어 보아 Rodnan과 Ebaugh (1957) 및 Wieme (1965)의 해석과 같이 혈색소의 전기영동도에서 종이나 속등의 특징이 잘 반영되지 않음을 알 수 있다. 따라서 혈색소의 전기영동만으로는 개구리목의 계통학적 유연관계와 관련된 단서를 얻기는 힘든 것으로 생각된다.

여러 지역에서 채집된 실험동물의 혈청단백질에서는 다형현상이 발견되지 않았다. 아마도 이는 실험 개체수가 적은데에 원인이 있는 것으로 생각되기도 하지만, 그 보다는 cellulose acetate 전기영동법이 비교적 분리능력이 좋지 못한데에 기인되는 것으로 본다. 전체적으로 보아 혈청단백질의 전기영동도는 종에 따른 특징을 잘 나타내고 있다 (Fig. 2). 또한 실험한 모든 종에서 prealbumin이 나타나지 않았다. 이는 개구리목에 공통적인

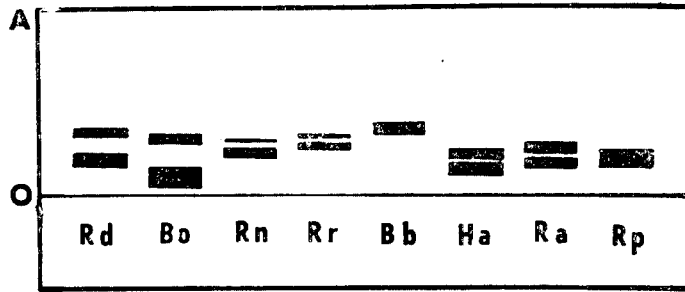


Fig. 1. Haemoglobins of anuran species are separated in pH 8.6 barbiturate buffer. Electrophoresed for 25 minutes at constant voltage of 100 volts on cellulose acetate strips. O means origin; A, anodal side. For species names see the text.

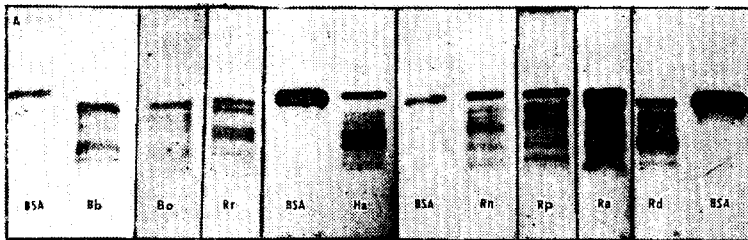


Fig. 2. Serum proteins of anuran species are separated in pH 8.6 barbiturate buffer. Electrophoresed for 25 minutes at constant voltage of 100 volts on cellulose acetate strips. O means origin, A, anodal side. For species names see the text.

현상으로 추측되는데, Nelson과 Guttman (1973)은 Microhylidae에서, 10종과 *Bombina variegata*에서도 prealbumin을 확인할 수 없었다(Huchon *et al.*, 1968).

두꺼비를 제외하고 모든 종에서 albumin이 뚜렷이 나타나는데, 두꺼비 만은 albumin과 postalbumin 사이가 분명하게 분리되지 않았다. 특히 옴개구리와 아무르 좁개구리에서는 albumin이 2개의 밴드로 구성되어 있다. 두꺼비의 경우 albumin이 다른 개구리보다 느리게 이동하여 독특한 전기영동도를 보여준다.

Albumin의 존재여부는 계통학적으로 중요한 의미를 갖고있다. Gunther *et al.* (1961)에 따르면 하등 어류에서는 혈청 albumin이 보이지 않는다. 그러나 진화된 어류에서는 albumin이 나타난다. 따라서 어류에서는 albumin의 존재여부가 계통학적인 상관관계를 보여주고 있다. 그런데 양서류의 경우, Siren속의 salamander에서는 albumin이 확인되었으나 다른 과에서는 나타나지 않았다 (Guttman, 1965). 최근 Petrakis와 Brown(1970)은 *Ensatina*에서도 albumin을 발견하였다. 따라서 하등양서류에서는 albumin이 획일적으로 나타나지 않음을 알 수 있다. 그런데 개구리목에서는 보편적으로 albumin이 혈청중에 포함되어 있는듯 하다. 본 실험결과 모든 종에서 albumin이 나타났으며, Microhylidae에서도 albumin을 확인할 수 있었다 (Nelson and Guttman, 1973). 그런데 Caeciliidae에서도 albumin이 보이는 사실은 진화학상 흥미있는 사실이다 (Nelson and Guttman, 1973).

실험된 대부분의 동물들은 소의 혈청 albumin (BSA)과 거의 비슷한 전기영동이동도를 보인다. 그러나 무당개구리에서는 이동도가 다소 느리고, 두꺼비에서는 아주 느리다. 또한 두꺼비의 전기영동도는 비교적 단순한 밴드구성을 하고 있는데 반하여 기타 개구리목의 동물들은 비교적 복잡한 모습을 보여준다. 그러므로 혈청단백질의 전기영동도에서 두꺼비와 기타 개구리목의 다른 종들을 쉽게 구별할 수 있다.

要 約

韓國産 개구리목의 8種에 대하여 血色素와 血清단백질의 cellulose acetate 電氣泳動圖를 조사하였다.

혈색소의 전기영동도는 종에 따라 그 구성성분의 수와 이동도에 차이가 있었다. 두꺼비와 금개구리에서는 단일 밴드로 나타났고, 여타의 종에서는 2밴드로 분리되었다.

혈청단백질의 전기영동도는 종에 따른 특징을 잘 나타내고 있다. 이들 동물의 혈청단백질에서는 다형현상이 나타나지 않았다. 모든 실험재료에서 albumin은 뚜렷이 나타나지만 prealbumin은 나타나지 않았다. 두꺼비에서는 albumin과 postalbumin 사이가 분명하게 분리되지 않았다. 따라서 혈청단백질의 전기영동도에서 두꺼비와 다른 종들을 쉽게 구별할 수가 있었다.

참 고 문 헌

- Dessaur, H.C., W. Fox and J.R. Ramirez, 1957. Preliminary attempt to correlate paper electrophoretic migration of hemoglobins with phylogeny in amphibia and reptilia. *Arch. Biochem. Biophys.* **71** : 11~16.
- Gunther, G., L.L. Sulya and B.E. Box, 1961. Some evolutionary patterns in fishes' blood. *Biol. Bull.* **121** : 302~306.
- Guttman, S.I., 1965. An electrophoretic analysis of the blood proteins of the genus *Siren*. *Texas J. Sci.* **17** : 267~277.
- Guttman, S. I., 1973. Biochemical techniques and problems in anuran evolution, In J. L. Vial (Ed.) *Evolutionary Biology of Anurans*, pp.183~203, Univ. Mo. Press, Mo.
- Huchon, D., M. Th. Chalumeau-Le Foulgoc and L. Gallien, 1968. Mise en évidence, au niveau des protéines sériques de l'adulte chez *Bombina variegata* L., d'une protéine spécifique du sexe femelle. *Compt. rend. Acad. Sci. Paris* **266** : 399~402.
- Nelson, C. E. and S. I. Guttman, 1973. Serum protein, electrophoresis of some amphibia (Caecilidae, Rhinophrynidae, Microhylidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **44B** : 423~428.
- Petrakis, P. L. and C. W. Brown, 1970. A high order of heterogeneity in the serum albumin of *Ensatina eschscholtzi*, a Pacific coast salamander. *Comp. Biochem. Physiol.* **32** : 475~487.
- Rodnan, G. P. and F. G. Ebaugh, Jr., 1957. Paper electrophoresis of animal hemoglobins. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **95** : 397~401
- Schmiel, C.V. and S.I. Guttman, 1974. An electrophoretic analysis of the lens and muscle proteins of selected anurans. *Amer. Midl. Natur.* **91** : 148~159.
- Wieme, R. J., 1965. *Agar Gel Electrophoresis*, pp. 188~192, Elsevier, Amsterdam, Netherland.