

桑蠶의 血液과 消化液에 있어서 蛋白質과 Amylase 活性에 관한 電氣泳動的 研究

文在裕 · 朴光義 · 姜錫權 · 金啓明* · 李相夢* · 朴熙正
서울대학교 農科大學 · *農村振興廳 蠶業試驗場

Electrophoretic Studies on Haemolymph Protein, Digestive Fluid Protein
and Digestive Amylase Activity in the Wild Silkworm, *Theophila mandarina*.

Jae Yu Moon, Kwang E. Park, Seok Kwon Kang, Kye Myeong Kim,*
Sang Mong Lee* and Hee Chung Park
College of Agriculture, Seoul National University
*Sericultural Experiment Station, Rural Development Administration

Summary

The haemolymph protein, digestive fluid proteins and digestive fluid amylase activity of wild silkworm, *Theophila mandarina* those of the were studied by polyacrylamide gel electrophoresis. In addition, they was also compared with silkworm.

1. 6 main protein bands in female and 7 main protein bands in male were detected in the larval haemolymph of *T. mandarina* where as 8 and 7 main protein bands in female and male of *B. mori* were observed.

Some differences in the haemolymph protein bands of *T. mandarina* and *B. mori* were observed.

2. 15 protein bands and 12 protein bands were found in the larval digestive fluid of *T. mandarina* and *B. mori* respectively. Some differences in the mobility of digestive fluid proteins of *T. mandarina* and *B. mori* were noticed.
3. Larval digestive fluid amylases were anionic and moved near the tracking dye in both *T. mandarina* and *B. mori*. Mobility of the digestive fluid amylases relative to bromophenol blue were 0.019 and 0.020 in *T. mandarina* and *B. mori* respectively.

緒 論

뽕밭등에 野生하는 桑蠶(*Theophila mandarina*)은 그 形態 및 生態가 家蠶(*Bombyn mori*)과 상당히 비슷하므로 일찌기 susaki (1898)가 遺傳學的인 면에서 研究를 행한 이래, 그동안 많은 研究가 행하여져 왔다

즉, Suski (1898), Kawaguchi (1923)등에 의해서 遺傳學的인 면에서 家蠶과의 近緣性이 확인되었으며, 染色體數에 있어서 家蠶이 n=28, 日本産 桑蠶은 n=27 이지만, 이것들의 雜種에 있어서는 家蠶에 있는 2本の

染色體와 桑蠶의 1本の 染色體가 府合하는 것이 細胞學的으로도 증명되고 있다(Kawaguchi, 1923). Yoshitake (1968)는 日本에 野生하는 桑蠶의 血液 酸性 phosphatase 및 血液, 皮膚 esterase 酵素型에 대하여 비교 검토한 結果, 桑蠶과 家蠶에 있어서 酵素型の 分布에 어느정도 差異는 있지만, 兩種間의 近緣性이 인정되었다.

本 研究에 있어서는 桑蠶과 家蠶에 있어서 蛋白質의 質의인 면에서의 兩種間의 近緣性 關係를 알기 위한 일 환으로서, polyacrylamide gel 電氣泳動法을 사용해서 우리나라 뽕밭에 野生하는 桑蠶의 血液, 消化液 蛋白

質과 消化液 amylase活性을 家蠶의 그것과 비교조사 하였다.

材料 및 方法

1. 桑蠶 및 家蠶의 血液, 消化液 準備

(1) 桑蠶의 血液과 消化液: 1984年 春蠶期 서울大農大 甁밭에 野生하는 5齡 3日째 幼蟲을 採集하여 解剖法에 의해서 血液과 消化液을 採取하였다.

採取한 血液은 冷凍保存하면서 필요에 따라 溶血해서 電氣泳動用 試料로 사용하였다.

採取한 消化液은 3,000 rpm에서 15分間 원심한 上澄液을 冷凍保存하면서 電氣泳動用 試料로 사용하였다

(2) 家蠶의 血液과 消化液: 1984年 春蠶期 서울大農大 蠶室에서 甁잎으로 飼育한 누에品種 七寶蠶 및 大造의 5齡 3日째 누에를 사용해서 血液과 消化液을 채취하였다.

採取한 血液은 電氣泳動用 試料로서 冷凍保存하였으며, 消化液은 3,000 rpm에서 15分間 원심한 上澄液을 電氣泳動用 試料로서 冷凍保存하면서 사용하였다.

2. 桑蠶 및 家蠶의 血液, 消化液 蛋白質의 polyacrylamide slab gel 電氣泳動

verticatype slab gel 電氣泳動裝置에 의해서 血液 및 消化液 蛋白質의 電氣泳動을 行하였다. acrylamide gel은 濃度 7.5%, gel 크기 13.8cm×15cm, gel 두께 2mm로 하였으며 泳動用 緩衝液을 pH8.3 tris-glycine 으로 하였다.

血液(10倍)과 消化液(10倍)을 10 μ 씩 사용하여 40mA의 定電流에서 2時間정도 泳動하였다.

泳動종료후, gel은 7% acetic acid에 용해한 0.05% coomassie brilliant blue R-250으로 1日間 染色하고 7% acetic acid에서 數日間 脫色을 한후 건조 및 사진촬영하였다.

3. 桑蠶 및 家蠶의 消化液 amylase 活性

消化液 amylase活性帶의 檢出은 Disc電氣泳動法과 요도-진분반응을 이용하였다.

즉, (1) Disc 電氣泳動은 Davis (1964) 方法에 준하여 7.5% polyacrylamide gel의 gel column (5×130 mm)을 으르하였다.

泳動用 緩衝液을 pH8.3 tris-glycine으로 해서 消化液(原液) 10 μ 를 사용해서 gel column당 3mA의 定電流에서 2時間정도 泳動하였다.

(2) M/5 borax-N/10 NaOH 緩衝液(pH9.2) 100ml에 starch 0.5g와 agarose 1.0g을 넣어 끓인 starch-agarose 溶液을 15×15×2cm의 plastic tray에 부어

starch-agarose layer를 만들었다.

泳動한 gel은 緩衝液 (pH9.2)에 넣어 미리 15分間 incubation한 후, 다시 굳은 starch-agarose layer 위에 놓아 37°C에서 30分間 incubation하였다.

그 다음에, gel을 제거하고 starch-agarose layer를 iodine/KI 溶液에 12時間정도 浸漬한 후 사진촬영하였다. 이 때 amylase 活性을 나타내지 않은 부분은 요도-진분반응에 의하여 거의 黑色으로 染色이 되는데 반하여, 活性을 나타내는 부분은 透明하게 된다.

結果 및 考察

1. 桑蠶 및 家蠶의 血液蛋白質의 電氣泳動像

桑蠶의 5齡 3日째 幼蟲 및 家蠶의 5齡 3日째 누에의 血液蛋白質의 polyacrylamide slab gel電氣 泳動像을 Fig. 1에 표시하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이, 桑蠶의 雌幼蟲에서는

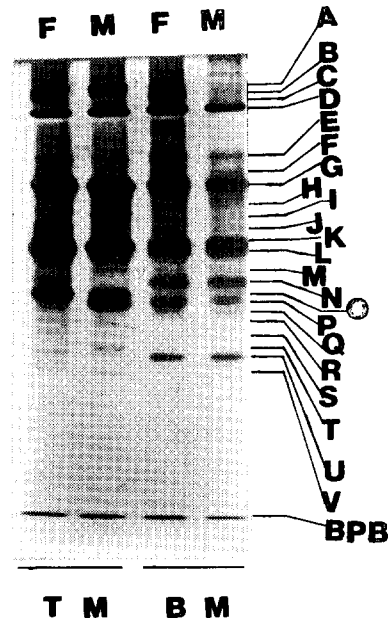


Fig. 1. Electrophoretic patterns of haemolymph protein in the TM and BM.

TM: 3rd day of 5th instar larvae in the *Teophila mandarina*.

BM: 3rd day of 5th instar larvae in the *Bombyx mori* (silkworm variety; Chilbo Jam).

F: femall, M: male

A, B,and V show protein components. BPB: Bromophenol blue.

6本(B, D, E, G, L, O)의 主要 band와 數個의 微量 band가 檢出되었으며, 雄幼蟲에서는 7本(B, D, E, F, L, O, P)의 主要band와 數個의 微量 band가 檢出되었다.

한편, 家蠶에서 암누에에는 8本(C, D, E, F, L, N, P, U)의 主要 band와 數個의 微量 band가 檢出되었으며, 숫누에는 7本(D, E, G, L, N, P, U)의 主要 band와 數個의 微量 band가 檢出되었다.

桑蠶에 있어서 雌雄別로 보면은, 主要 band에 있어서 雌幼蟲에서는 P-band가 존재하지 않았으나 雄幼蟲에서는 P-band가 존재하며, 微量 band에 있어서 雌幼蟲에서는 N-band가 존재하나 雄幼蟲에서는 M-band가 존재한다.

桑蠶과 家蠶과를 비교해 보면, 主要 band에 있어서 桑蠶의 幼蟲은 雌雄다같이 O-band가 존재하나 家蠶에 있어서 존재하는 N-band와 U-band가 존재하지 않으며, 微量 band에 있어서 桑蠶의 幼蟲은 雌雄다같이 家蠶에 존재하지 않는 P, R, S, T, U 등의 band가 존재하였다.

哺乳類에서 albumin을 함유한 주요한 血液蛋白質이 肝臟에서 合成되는 것과 같이, 거의 모든 昆蟲들의 血液蛋白質은 脂肪體에서 合成되어 血液으로 分泌되는 것이라고 생각된다. 그러나, 일부의 血液蛋白質은 表皮細胞 등에서 만들어져 분비될 가능성도 있다.

昆蟲들의 血液蛋白質은 많은 研究者들에 의해서 數種의 蛋白質成分들의 起源이나 生理的 機能뿐만 아니라 分類의 目的에서 研究되고 있다.

血液은 직접 體組織에 貯해 있기 때문에, 變態를 하는 동안 血液蛋白質은 分化와 관련된 代謝的 活性에 관한 많은 情報를 얻기 위해서도 많은 研究가 行하여지고 있다. 그런데, 근래 昆蟲들의 血液蛋白質은 acrylamide 등의 gel 電氣泳動法 등의 여러가지 蛋白質 分離技術의 발달로 인해서 分離, 精製가 쉽게 이루어지고 있다.

家蠶의 血液蛋白質에 관해서, 河口等(1983)은 polyacrylamide gel disc 電氣泳動法을 사용해서 5齡누에의 雌雄別 日數別 血液蛋白質을 조사하였으며, 李等(1984)은 polyacrylamide gel slab 電氣泳動法을 이용해서 우리나라에 보존종인 195品種들의 血液蛋白質을 조사하였다. 그러나, 桑蠶에서는 polyacrylamide gel 電氣泳動法에 의한 血液蛋白質에 대한 調査가 아직 없는 실정이다.

따라서, 本 研究를 통해서 桑蠶의 5齡 3日째 幼蟲에서 조사된 血液蛋白質成分을 分離, 精製하여 그 生理學的인 性狀과 機能을 究明하여야 되며 家蠶과 비교해서 차이가 있는 蛋白質成分들의 生理學的인 意義도 解明하여야 될 것이다.

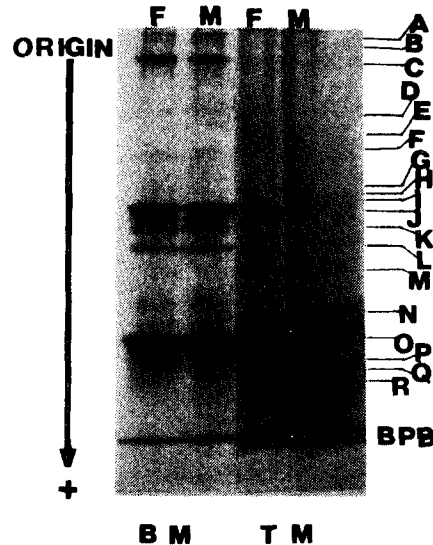


Fig. 2. Electrophoretic patterns of digestive fluid protein in the BM and TM.

BM: 3rd day of 5th instar larvae in *Bombyx mori* (Daizô).

TM: 3rd day of 5th instar larvae in *Theopila mandarina*.

F: femall, M: male

A, B,and R show protein components.

2. 桑蠶 및 家蠶의 消化液蛋白質의 電氣泳動像

桑蠶의 5齡 3日째 幼蟲 및 家蠶의 5齡 3日째 누에의 消化液蛋白質의 polyacrylamide slab gel 電氣泳動像을 Fig. 2에 표시하였다.

Fig. 2에서 보는바와 같이, 桑蠶에서는 15本(A, C, E, F, G, H, I, J, L, M, N, O, P, Q, R)의 band가 檢出되었으며, 家蠶에서는 12本(B, C, D, F, I, J, K, L, O, P, Q, R)의 band가 檢出되었다.

그런데, 桑蠶과 家蠶과를 비교해보면, 桑蠶에서는 누에에 없는 M, N-band등이 존재하며, 家蠶에서는 桑蠶에 없는 D, K-band등이 존재한다.

누에의 消化液중에는 바이러스불활성물질인 적색형광 단백질이 존재하고 있다. 그런데, 이 적색형광단백질은 이미 向井(1968)에 의해서 分離된 이래, 최근에 精製되어 그 生理學的 性狀이 밝혀지고 있다. 또한 林屋(1976)에 의해서 이 적색형광단백질의 生成機構도 밝혀지고 있다.

그러나, 桑蠶에 있어서는 消化液중에 존재하는 적색형광단백질등에 관해서 조사된바 없다.

따라서, 本 研究를 통해서 檢출된 桑蠶의 消化液蛋

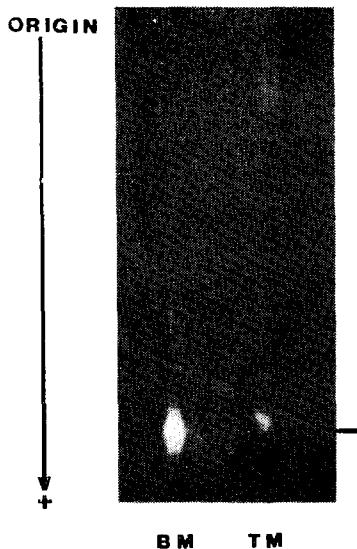


Fig. 3. Amylase zymogram with starch following polyacrylamide gel disc electrophoresis of female larval digestive fluid from BM and TM.

BH: 3rd day of 5th instar larvae in the *Bombyx mori* (Daizō).

BM: 3rd day of 5th instar larvae in the *Theophila mandarina*.

白質에 관해서 生化學的인 性狀을 家蠶과 비교해서 차이가 있는 蛋白質成分의 生化學的인 意義도 解明되어야 할 것이다.

3. 桑蠶 및 家蠶의 消化液 amylase 活性

桑蠶의 5齡 3日째 幼蟲 및 家蠶의 5齡 3日째 누에의 消化液 amylase zymogram을 Fig. 3에 표시하였다.

Fig. 3에서 보는바와 같이, 桑蠶의 消化液 amylase는 家蠶의 消化液 amylase와 마찬가지로 BPB부근까지 강하게 陽極側으로 移動하였다. 桑蠶의 消化液 amylase는 BPB(bromophenol blue)에 대한 상대적인 移動도가 0.019이고 家蠶의 消化液 amylase의 移動도는 0.020으로서 兩種間에 移動도가 거의 차이가 없었다.

吉武(1968)는 血液酸性 phosphatase, 血液 esterase 및 皮膚 esterase 등의 isozyme 水準으로 보아 桑蠶과 家蠶은 대단히 近緣이라고 보고한 바와 같이, 本研究에 있어서도 桑蠶과 家蠶의 消化液 amylase의 移動도가 거의 같은 점으로 보아 桑蠶과 家蠶은 상당히 近緣이라는 것을 알 수 있다. 그러나, 桑蠶의 消化液 amylase는 그 活性帶가 家蠶의 그것보다 작은 것으로 보

아 그 活性이 다소 약할 것으로 생각된다.

原和等(1980)은 家蠶의 消化液 amylase를 agarose gel 수평판전기 영동법에 의해서 조사한 결과, 活性이 강한 누에 品種과 桑蠶에서는 陰極側으로 移動하는 4本の amylase 活性帶가 檢出되었으나, 活性이 약한 누에 品種에서는 amylase 活性帶가 檢出되지 않았다. 따라서 本研究을 통해서 檢出된 桑蠶의 消化液 amylase도 4個의 isozyme이 존재할 것으로 생각된다.

摘 要

이 研究는 polyacrylamide gel 電氣泳動法을 사용해서 桑蠶의 5齡 3日째 幼蟲 및 家蠶의 5齡 3日째 幼蟲에 있어서 血液, 消化液 蛋白質의 電氣泳動像과 消化液 amylase 活性을 조사하였다.

1. 桑蠶의 血液에 있어서 雌幼蟲에서는 6本の 主要蛋白質 band가 檢出되었으며 雄幼蟲에서는 7本の 主要蛋白質 band가 檢出되었다. 그러나, 家蠶에 있어서 암 누에에 있어서는 8本, 숫누에에 있어서는 7本이 檢出되었다. 桑蠶과 家蠶과의 血液蛋白質의 電氣泳動像에 있어서 다소의 차이가 있었다.

2. 桑蠶의 消化液에서 15本の 蛋白質 band가 檢出되었으며 家蠶에서는 12本の 蛋白質 band가 檢出되었다. 桑蠶과 家蠶과의 消化液 蛋白質의 電氣泳動像에 있어서도 다소의 차이가 있었다.

3. 桑蠶의 消化液 amylase는 家蠶과 같이 陽極側 BPB 부근까지 강하게 移動하였으며 桑蠶의 消化液 amylase의 移動도는 0.019이고 家蠶의 移動도는 0.020으로서 兩種間의 移動도의 차이가 거의 없었다.

引 用 文 獻

- Davis, J. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
 川口榮作 (1923) 家蠶と野蠶との 雜種における 細胞學的研究. 動雜. 35, 427-429.
 河口豊・藤井博・土井良宏 (1983) 2眠蠶における 體液蛋白質. 日蠶雜. 52(6), 517-523.
 原和二郎 (1980) カイコ消化液 amylase isozyme의 遺傳的研究. 九州蠶絲. 11, 66.
 林屋慶三 (1976) カイコ幼蟲消化液中의 赤色螢光蛋白質의 生成機構. 日本應用動物昆蟲. 20(1), 37-43.
 李相夢・朴光義・文在裕 (1984) 家蠶의 體液蛋白質의 電氣泳動像에 대하여. 서울大農大農學研究. 9(1), 109-127.

Susaki, C. (1898) On the affinity of our wild and domestic silkworm. *Annot. Zool. Japan* 2, 33-41.
Yoshitake, N. (1968) Esterase and phosphatase poly-

morphism in natural population of wild silkworm, *Theophila mandarina*. *J. sericult. Sci. Japan.* 37 (3), 195-200.