

## Tilapia(*Oreochromis niloticus*)의 血清과 蛋白質의 transferrin의 多型現像에 關한 研究

沈彦和, 尹鍾萬, 金柱雄, 朴弘陽  
建國大學校 畜産學校 魚類 遺傳育種學 研究室

### Studies on Polymorphism of Transferrin of Serum Proteins in Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Un-Hwa Sim, Jong-Man Yoon, Kye-Yung Kim, and Hong-Yang Park  
Department of Animal Science, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea.

#### ABSTRACT

This study was taken to isolate transferrin fractions from the sera of tilapia(*Oreochromis niloticus*) by physico-chemical analyses such as the rivanol precipitation, iron-staining method, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and  $^{59}\text{FeCl}_3$  autoradiography, and to calculate gene frequencies by using Hardy-Weinberg Law.

The results obtained in this experiment were summarized as follow :

1. The transferrin fraction is composed of several components possessing relative lower electrophoretic mobilities and higher molecular sizes than the albumin components.
2. When different staining method was compared with transferrin in band, it was not found difference.
3. It was concluded that the optimum ratio of rivanol to serum was 2 : 1 and this ratio was used in all further fractionation.
4. The molecular weight of transferrin component was about  $70,000 \pm 2,000$ .
5. Tilapia transferrin fractionations were found to be polymorphic.
6. There transferrin variants(A, B and C) have been found in tilapia(*Oreochromis niloticus*) and Tf types were assumed to be controlled by three codominant alleles Tf A, Tf B and Tf C. Six different phenotypes can be theoretically expected Tf AA, Tf AB, Tf AC, Tf BB, Tf BC, and Tf CC. Only five types of these were observed and Tf CC types(homozygotes) was not found.
7. The frequencies of the three allele Tf A, Tf B and Tf C were 0.795, 0.15 and 0.055 respectively.

#### 序論

動物 血清 蛋白質에 關한 研究는 Smithies(1955)에 依한 starch gel과 Raymond(1959)에 依한

polyacrylamide gel 電氣泳動法の開發로 急進展하게 되었으며, 遺傳的으로 支配되는 血清 蛋白質 및 酵素의 檢出이 容易해져 이에 對한 研究가 活潑하게 進行되고 있다.

血清 蛋白質 중 檢出이 容易하고 一般的으로 利用되는 蛋白質인 transferrin(siderophilin, iron-binding protein)은 鐵分 및 여러가지 다른 金屬 이온과 結合하기 爲한 自體의 特異能力에 의해 特徵지워  $\beta$ -globulin의 機能的인 名稱으로서, 一般的으로 transferrin은 集團내 어느 하나의 蛋白質에 둘 혹은 그 以上の 分子 變異體를 나타내는 高度의 蛋白質 多型現像(protein polymorphism)을 보여주고 있고, 사람과 다른 動物에서는 많은 研究가 되어 있는 反面에 魚類에서는 基礎的인 研究만이 이루어져 있을 뿐이다.

現在 우리나라에서 發表된 血清 蛋白質 및 transferrin에 對한 遺傳的인 研究는 韓等(1986)에 의한 競走馬와 朴等(1989)에 의한 魚類에서 報告된 바 있다.

魚類의 血清 transferrin polymorphism에 關한 研究가 여러 淡水·海水魚種에서 報告되었는데, Creyssel等(1966)이 carp(*Cyprinus carpio*) 血清에서 3個의 對立遺傳子 transferrin system을 發現했으며, Moeller와 Naevdal(1966)은 Gadoid fish(*Gadus pollachius*)에서 3個의 對立遺傳子, Valenta等(1976)은 carp(*Cyprinus carpio*) 혈청에서 7個의 transferrin 變異體가 存在함을 證明하였다. 또한 Fujino와 Kang(1968)은 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*)에서 3個의 對立遺傳子, Tsuyuki等(1969)은 Pacific halibut(*Hippoglossus stenolepis*)에서 4個의 對立遺傳子를 發見했으며, Hershberger(1970)는 강송어(*Salvelinus fontinalis*), Moeller(1970)는 대서양 연어(*Salmo salar*), Utter等(1970)은 은연어(*Oncorhynchus kisutch*), Wright等(1970)은 강송어(*Salvelinus fontinalis*)에서 모두 3個의 對立遺傳子, Utter等(1972)은 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*)에서 모두 2個의 transferrin 變異體를 發見하였다. 이같은 現像은 各 zones의 蛋白質이 標識子(genetic marker)로 利用함은 물론 品種의 起源, 進化課程, 系統分類 그리고 遺傳的 集團構造를 糾明할 수 있다고 報告하였다.

특히 우리나라에 導入되어 飼育되고 있는 生化學的인 系統에 대해서는 研究한 경우가 많지 않은 Cichlid科의 하나인 tilapia를 生産性이 높고, 成長率이 높은 品種으로 만들어 내고자, transferrin을 遺傳的으로 標識子로서 利用하여 이 物質을 分離, 抽出하였으며, 더 나아가 集團의 構造를 밝혀냄으로서 集團間的 類似도를 比較함은 물론 種 判別을 爲한 基礎 研究로서 本 實驗을 試圖하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 試驗 期間 및 場所

本 研究는 1987年 9月 10일부터 1989年 6月 9일까지 建國大學校 畜産大學 魚類遺傳育種學 研究室에서 實施하였다.

### 2. 試驗 材料

#### 1) 供試魚

Transferrin의 分離 抽出을 爲해 本 實驗室에서 飼育하고 있는 tilapia와 獨逸 Goettingen 大學 校에서 種이 確認된 *Tilapia nilotica* 그리고 遺傳子 頻度(gene frequency)와 遺傳子型 頻度(genetic frequency)를 計算하기 爲해서 100 마리를 供試魚로 利用하였다.

#### 2. 試藥 및 器具

Acrylamide(Sigma, U.S.A), N, N'-methlenebisacrylamide(Sigma, U.S.A), SDS(Sigma, U.S.A), Trizma base 및 HCl, TEMED, Ammonium persulfate(Junsei Chem. Co., Japan), Glycine(Junsei Chem. Co., Japan)을 電氣泳動用 試藥으로 利用하였고, centrifuge(Kubota K/R 600 Co., Japan),

electrophoresis Unit(LKB 2117 Multiphor, Sweden), gel dryer(KMC), densitometer(Dual-length spectroscanner Model CS-930, Shimadzu, Japan) 그리고 凍結乾燥機(EYELA, Tokyo Rikaki Co., Japan)를 利用하였다.

### 3. 試驗 方法

#### 1) 血清 採取 및 血清 分離 方法

Tsuyuki 等(1969)의 方法을 應用하여 물고기를 quinaldine(Sigma, U.S.A)으로 麻酔시킨후 죽이지 않고, 즉시 18G 注射器를 利用하여 caudal artery 및 vein으로 부터 血液을 採取한 후 血清을 분리시켰다. 血液을 採取한 후 25ppm의 kanamycin과 1%의 NaCl 溶液이 포함된 水族館에서 2 주동안 治療후 다시 原水族館으로 돌려 보냈다.

#### 2) SDS-Polyacrylamide Gel 電氣泳動法

Weber *et al.*(1969)의 方法을 변형시켜서 실시하였다.

#### 3) Serum transferrin의 分離 抽出

(1) Iron-staining; Giblett *et al.*(1969)의 方法을 변형하여 綠色의 transferrin bands를 確認하였다.

(2) Rivanol-precipitation; 이 方法을 Patras와 Stone(1961)의 方法을 변형시켰다.

(3)  $^{59}\text{FeCl}_3$ 를 利用한 autoradiography

Giblett *et al.*(1959)의 方法을 변형하여 利用하였다.

#### 4) Transferrin의 分子量 測定

transferrin의 純粹하게 分離시킨 다음, 分子量을 측정하기 爲해서 cytochrome c(M.W.12,400), carbonicanhydrase(29,000), BSA(63,000), alcohol dehydrogenase(150,000),  $\beta$ -amylase(200,000)를 standard marker(Sigma, U.S.A)로 利用하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 實施하였다.

#### 5) Densitometry

電氣泳動, 染色 그리고 脱色이 끝난 gel을 280nm에서 測定하여 sera와 transferrin fraction의 密度差를 調査하였다.

#### 6) 表現型의 決定과 系統分析

Rivanol 沈澱을 한 모든 samples은 電氣泳動에 依해서 表現型 및 遺傳子 頻도와 遺傳子型 頻도를 測定하였다.

## 結果 및 考察

### 1. Transferrin의 分離 抽出

Fig.1은 tilapia 血清 蛋白質을 나타낸 것인데, 本 研究室에서 飼育된 tilapia와 獨逸産 *Oreochromis niloticus*와 類似한 band를 나타내고 있으며, 이는 같은 *Oreochromis niloticus*가 아닌가 思慮된다.

이 血清 蛋白質에서 transferrin을 純粹하게 分離하기 爲해 Fig.2에 나타난 바와 같이 iron-staining을 實施한 結果 綠色의 희미한 band를 나타내었다. A 部位가 transferrin이며, 이는 血清을 분리시킨 Fig.1의 band B와 같은 位置에 該當되는 것이다.

血清 蛋白質의 電氣泳動후 染色方法을 달리하여 比較한 結果로서 Fig.3은 amido black 10 B로 染色시킨 것이고, Fig.4는 Coomassie brilliant blue R-250으로 染色시킨 것이다. Fig.3에서 1은 血清 蛋白質이고, 2-4는 transferrin을 나타낸 것이며, Fig.4에서는 B部位가 transferrin을 나타낸 것이다.

### 2. Rivanol 침전법에 依한 transferrin의 精製

Transferrin을 最大로 精製하기 爲해 血清과 rivanol의 比率을 定하는 것이 必要하며, Fig.5와 Fig.8에 나타난 바와 같이 血清과 rivanol의 比率이 1 : 2이었을 때, transferrin band가 가장 明



Fig.1. Polyacrylamide-slab gel electrophoresis of serum of *Oreochromis* spp. A : albumin, B : transferrin, C :  $\mu$ -globulin Stained with Coomassie brilliant blue R-250.

確하게 나타났다. 이는 rivanol의 濃度가 높을수록 transferrin band는 감소한다는 것을 나타내고 있다. 이 結果를 통해서 볼 때 最適의 血清과 rivanol의 稀釋 比率은 1 : 2라는 것을 알 수 있었으며, Patras와 Stone(1961)이 提示한 1 : 3(serum : rivanol)의 比率보다는 좀 더 明確한 transferrin 分離를 나타내었다.

이렇게 分離된 transferrin을 Fig.5에서는 autoradiography로 確認하였는데, 1~5는 rivanol 침전 법에 의해서 나타난 試料에  $^{59}\text{FeCl}_3$ 를 混合시켜서 1時間동안 incubation 시킨 것을 電氣泳動한 結果이며  $^{59}\text{FeCl}_3$ 가 混合된 試料을 電氣泳動한 후, agfa X-film에 3週동안 感光시킨 후 autoradiogram으로 現像, 印畫시킨 것을 나타내고 있다.

### 3. Densitometry

Fig.6은 分離된 tilapia의 血清 및 transferrin을 電氣泳動한 후 amido black 10 B로 染色한 다음 dual-wavelength spectrometer로 densitometry를 實施한 것이다.

Tilapia의 血清과 蛋白質의 transferrin의 多型現像

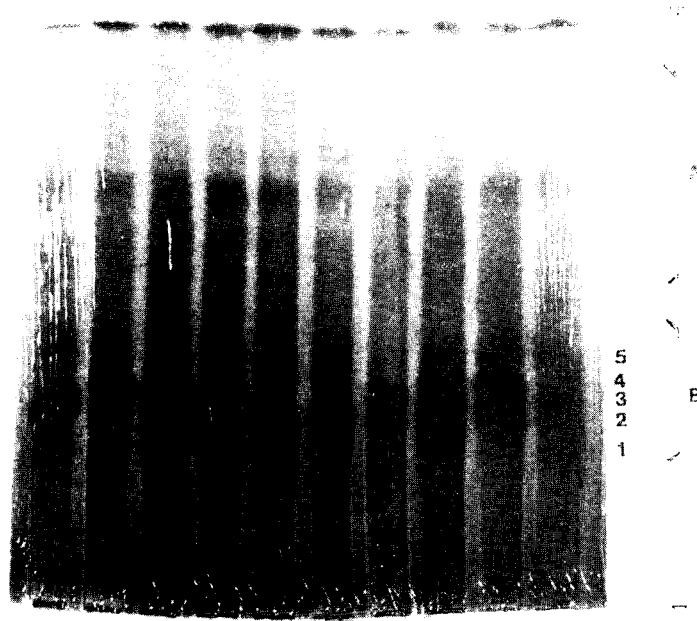


Fig.4 Polyacrylamide-slab gel electrophoresis of tilapia serum transferrin phenotypes. Samples were prepared by rivanol-precipitation method. Stained with Comassie BB R-250. A : albumin, B : transferrin.

Table 1. Gene frequencies of transferrin types in *Oreochromis* spp.

Numbers of animals	Gene frequencies		
	Tf A	Tf B	Tf C
100	0.795	0.15	0.055

Table 2. A chi-square test for goodness of fit by the Hardy-Weinberg Law of transferrin phenotypes in *Oreochromis* spp.

Phenotypes	Number of animals	
	Observed	Expected
Tf AA	66	63.2
Tf AB	17	23.85
Tf AC	10	8.745
Tf BB	6	2.25
Tf BC	1	1.65

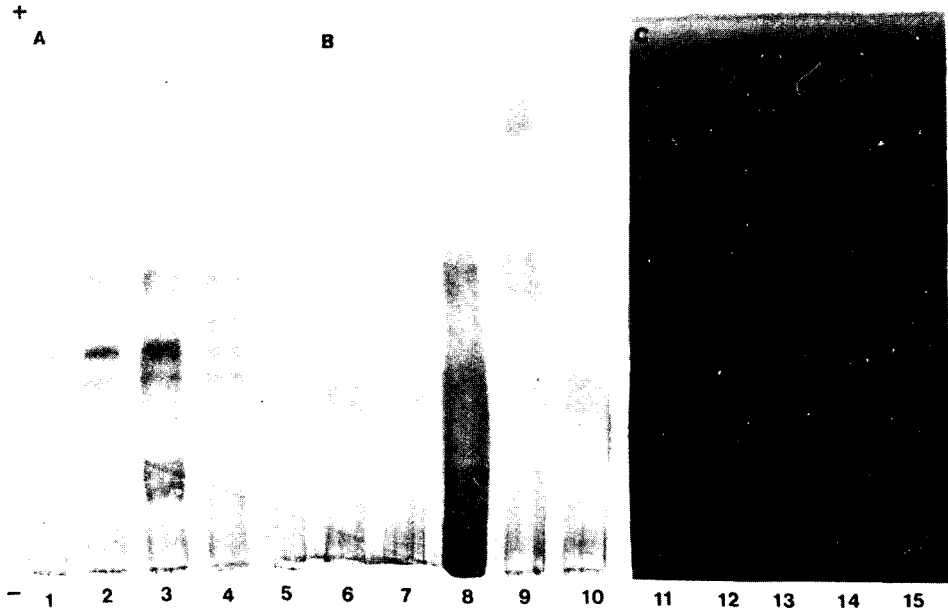


Fig.5 Polyacrylamide gel electrophoresis of each tilapia transferrin with rivanol-precipitation(1-5), mixture of sera and  $^{59}\text{FeCl}_3$  (6-19) and its autoradiography with  $\text{FeCl}_3$ . To 25 $\mu\text{l}$  of the serum was added 10 $\mu\text{l}$  of  $^{59}\text{FeCl}_3$  solution with activity of 0.1 $\mu\text{Ci}$ , corresponding to 0.003 $\mu\text{g}$ . After incubation the mixture was subjected to electrophoresis, and the gels were exposed to agfa medical X-ray films for 3 weeks. Arrow is transferrin fraction.

## 要約

本實驗은 rivanol沈澱法, iron-staining method, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 그리고  $^{59}\text{FeCl}_3$  autoradiography를 利用하여 tilapia (*Oreochromis niloticus*) 血清으로 부터 transferrin을 分離 抽出하며, Hardy-Weinberg 法則을 利用하며 遺傳子 頻度와 遺傳子型 頻度を 推定하기 爲하여 試圖하였다.

本實驗에서 얻어진 結果는 다음과 같다.

1. Tilapia의 transferrin은 albumin보다 相對的으로 느린 電氣泳動度와 높은 分子量의 크기를 가졌고, globulin 보다는 빠른 電氣泳動度와 낮은 分子量을 나타내었다.
2. 染色方法을 달리하여 transferrin의 band를 比較하였을 때, 별다른 差異를 發見하지 못했다.
3. Rivanol 對 血清의 比率은 2 : 1이 가장 適合했고, 모든 分割에 이 比率을 利用하였다.
4. Transferrin의 分子量은 略 70,000 $\pm$ 2,000을 나타내었다.
5. Transferrin의 種內 多型現象을 나타내었다.
6. 3個의 transferrin 變異體(A, B 그리고 C)가 發見되었고, Tf型은 3個의 共同 優性 對立遺傳子(Tf A, Tf B 그리고 Tf C)에 의해 調節되며, 6個의 可能한 表現型(Tf AA, Tf AB, Tf AC,

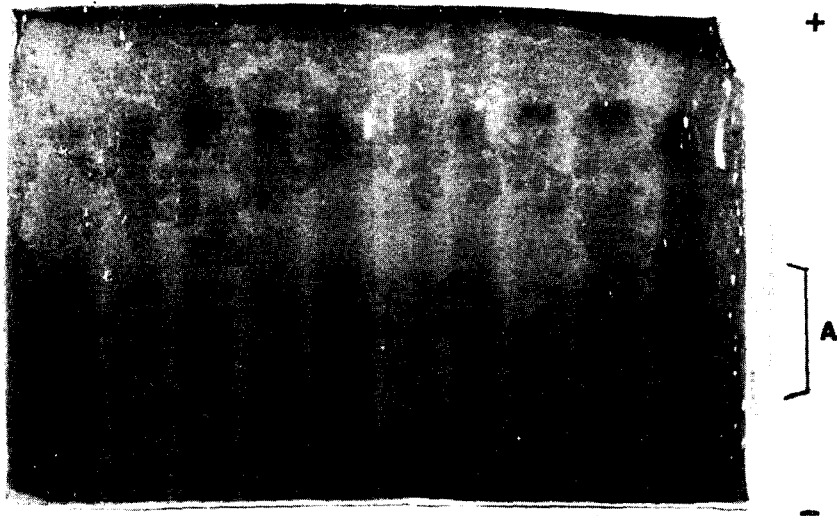


Fig.2 Identification of transferrin by iron-staining after polyacrylamide slab gel electrophoresis of serum of *Oreochromis* spp. A : transferrin

#### 4. Transferrin의 分子量 測定

Fig.7에 나타난 바와 같이 standard marker를 이용한 10% SDS-polyacrylamide gel로 電氣泳動한 結果로서 分子量의 크기는 各各  $48,000 \pm 2,000$ 과  $70,000 \pm 2,000$ 으로 나타났는데, 이는 人間の Tf 分子量의 크기가 90,000이라고 報告한 Bezkorovainy와 Refelson(1964) 보다는 훨씬 낮게 나타났고, 68,000이라고 報告한 Charlwood(1963)와 잉어 transferrin의 분자량이 70,000이라고 보고한 Valenta *et al.*(1966)과 아주 유사하게 나타났다.

Palmor와 Sutton(1971)은 California hagfish transferrin의 分子量이 略 44,000으로 測定된 反面에 Asien *et al.*(1972)은 같은 魚種에서 여러가지 方法을 利用하여 75,000-80,000의 값을 가져다 고 報告하였다.

#### 5. Transferrin의 表現型 分類

採取된 모든 血清을 rivanol로 沈澱시킨 후, 表現型을 定하기 爲해 電氣泳動을 實施한 結果 polyacrylamide gel 電氣泳動에서 3個의 Tf 變異體를 發見했으며, 血清의 電氣泳動的 易動度에 따라 Fig.8에 提示한 바와 같이 易動도가 가장 빠른 順으로 A, B C로 定하고, 그에 對한 表現型은 各各 AA, AB, AC, BB, BCA 型으로 分類되었다.

Fig.8에서 B部位는 rivanol 沈澱法에 의해서 얻어진 transferrin으로 나타났고, 한개 혹은 두개의 band로 확인되었으며, 이것은 3個 對立遺傳子를 包含하는 共同 優性 對立遺傳子임을 示峻하였으나, 6번째로 나타날 可能性 있는 表現型인 CC 型은 實驗에서 나타나지 않았다.

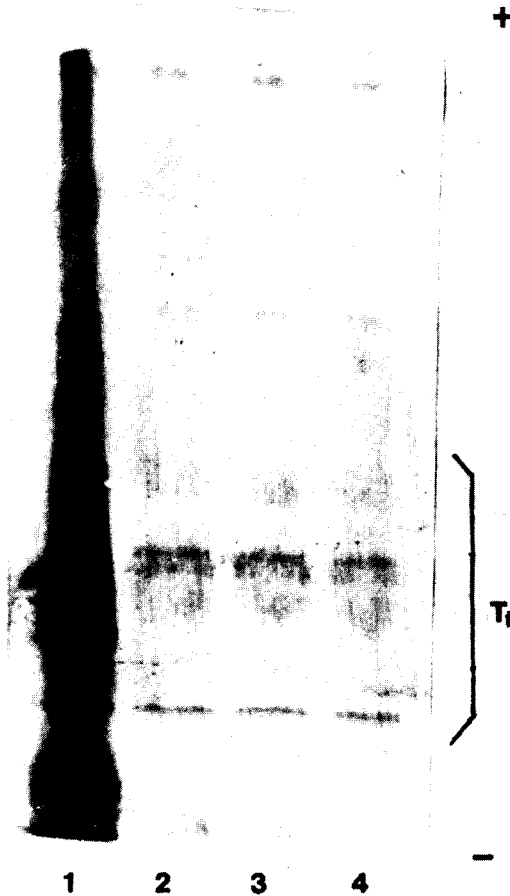


Fig.3 Polyacrylamide-slab electrophoresis of tilapia serum transferrin phenotypes. Samples were prepared by rivanol precipitation method. Staining with amido black 10B. 1 : serum, 2-4 : transferrin(Tf)

#### 6. Tf 座位의 遺傳子 頻度와 遺傳子型 頻度

血清 Tf型의 遺傳子 頻度는 Table 1에 提示한 바와 같이 Tf A 遺傳子가 0.825로 가장 높은 頻度を 나타내었고, Tf B 遺傳子가 0.125, Tf C 遺傳子가 0.055로 가장 낮은 頻度を 나타내었다.

Tf AA型이 70個로 出現頻도가 가장 높았고, 다음으로 Tf AB型이 13個, Tf AC型이 9個, Tf BB型이 7個 그리고 Tf BC型이 1個로 가장 낮은 出現頻度を 나타내었다. 위의 結果로부터 各 遺傳子 座位에 있어서 表現型의 觀測値와 遺傳子 頻度로부터 推定되어진 期待値를 Hardy-Weinberg 法則에 對한 適合度を 카이 檢定한 結果, Table 2에 提示한 바와 같이 有意性없이 나타났다( $\chi^2=8.7774$ ,  $df=4$ ,  $p<0.01$ ).



Tilapia의 血清과 蛋白質의 transferrin의 多型現像

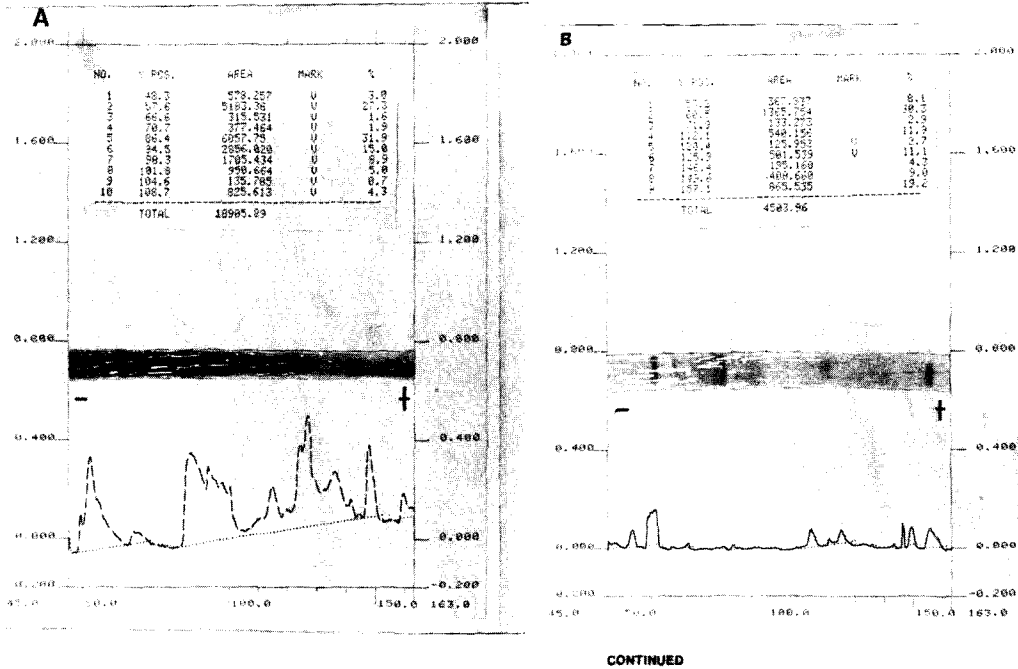


Fig.6 Diagram by dual-wavelength spectropscanner and polycryl-amide slab gel electrophoresis of serum(A) and transferrin(B) fractions of *Tilapia* spp. Gel was stained with amido black 10 B.

Tf BB, Tf BC 그리고 Tf CC 중에서 5개의 表現型만이 發見되었고, Tf CC型은 발견되지 않았다.

7. 3개의 對立遺傳子 Tf A, Tf B 그리고 Tf C의 頻度는 各各 0.795, 0.15 그리고 0.055 이었다.

參考文獻

Asien, P., A., Leibman, and C.-L.sia. 1972. Molecular weight and subunit structure of hagfish transferrin. *Biochemistry*, 11 : 3461-3464.

Charlwood, P. A. 1964. Ultracentrifugal characteristics of human, monkey and rat transferrin in marine lamprey sera. *Nature*, 214 : 700-702.

Chen, F. Y. and H. Ysuyuki. 1970. Zone electrophoretic studies on the proteins of *Tilapia mossambica* and *T. hornorum* and their F1 hybrids, *T. zilli* and *T. melanopleura*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 27 : 2167-2177.

Chen, S. H. and H. E. Sutton. 1967. Bovine transferrin : sialic acid and the complex phenotype. *Genetics*, 56 : 425-430.

Creyssel, R., G. B. Richard and P. Silberzahn. 1966. Transferrin variants in carp serum. *Nature*, 212 : 1362.

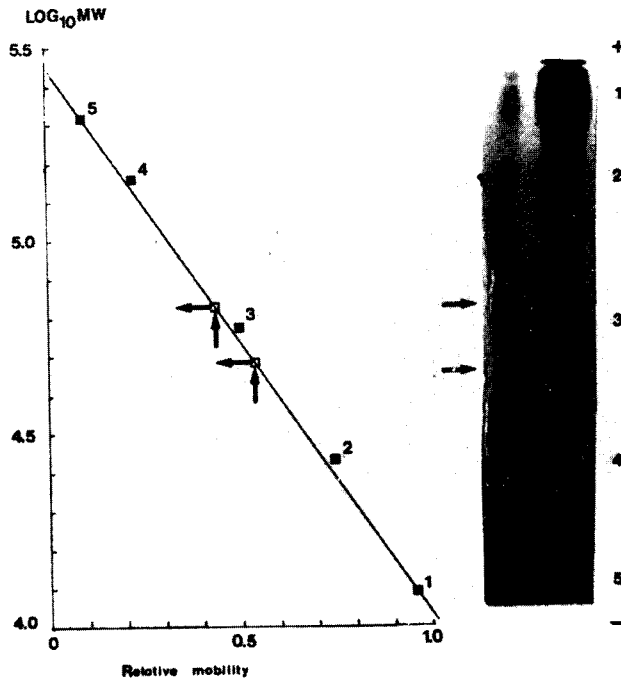


Fig.7 The molecular weight of transferrin is interpolated from its relative mobility during SDS-PAGE in vertical gel using the SDS-con-tinuous buffer system. The polyacrylamide gels used were concentration 10%. The polyacrylamide markers were 1, cytochrome C(M.W.12,400) 2, carbonic anhydrase(bovine erythrocytes) (29,000) 3, BSA(63,000) 4, alcohol dehydrogenase(yeast) (150,000) 5,  $\beta$ -amylase(sweet potato) (200,000). The arrow is transferrin fraction.

Fletcher, J. and E. R. Huehns. 1967. Significance of the binding of iron by transferrin. *Nature*, 215 : 586.

Fletcher, J. and E. R. Huehns. 1968. Function of transferrin. *Nature* 218 : 1121-1214.

Fujino, K. and T. Kang. 1968. Transferrin groups of tunas. *Genetics*, 59 : 79-91.

Giblett, E. R., C. R. Hickman and O. Smithies. 1959. Serum transferrins. *Nature*, 183 : 1589-1590.

Giblett, E. R. 1969. Transferrin, p. 126-159 in Giblett, ed. *Genetic markers in human blood*, Blackwell Scientific Publication, Oxford.

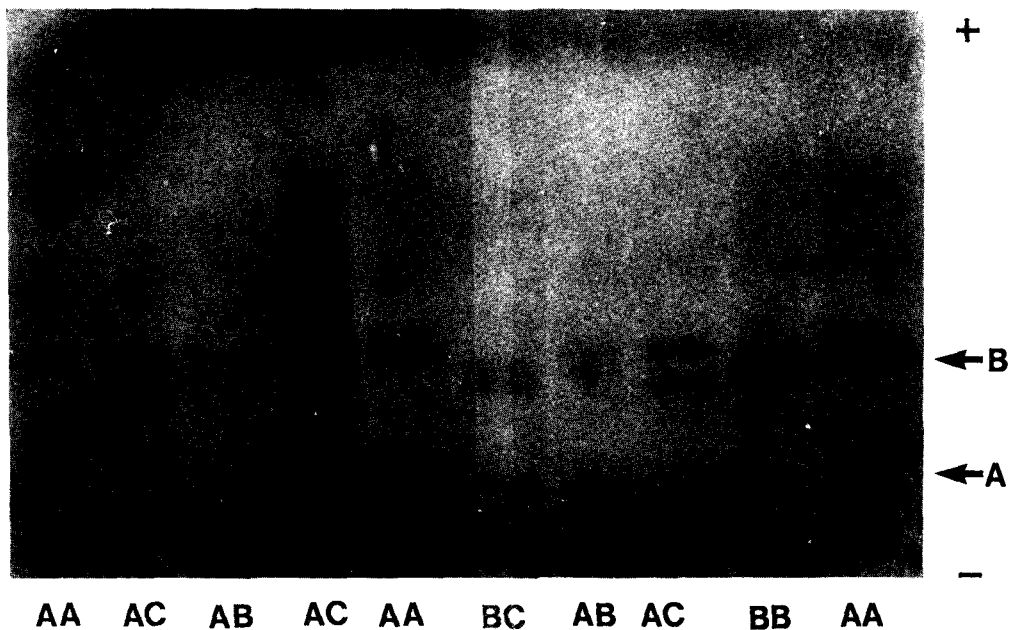


Fig.8 Seven point five percent polyacrylamide gel electrophoresis showing there variants of tilapia transferrin.

- Hershberger, W.K. 1970. Some physico-chemical properties of transferrins in brook trout. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99 : 207-218.
- Hershberger, W. K. and G. A. Pratschner, 1981, Iron-binding capacities of six transferrin phenotypes of coho salmon and poential fish health applications, *Prog. Fish. Cult.*, 43 : 27-31.
- Moeller, D. 1970. Transferrin polymorphism in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 27 : 1617-1625.
- Moeller, D. and G. Naevdal. 1966. Serum transferrin of some gadoid fishes. *Nature*, 210 : 317-318.
- Palmour, R. M. and H. E. Sutton. 1971. Vertebrate transferrins : molecular weight, chemical compositions and iron binding studies. *Biochemistry*, 10 : 4026-4032.
- Partas, B. and W. H. Stone. 1961. Partial purification of cattle serum transferrin using rivanol. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 107 : 861-864.
- Raymond, S. and Weintraub. 1959. Acrylamide gel as supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 130 : 711.
- Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gels : Group variations in the serum protein of normal human adults. *Biochem. J.* 61 : 629-641.
- Tsuyuki H., E. Roberts and E. A. Best. 1969. Serum transferrin systems and the hemoglobulins of the Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 26 : 2351-2362.
- Utter, F. M., W. E. Ames and H. O. Hodgins. 1970. Transferrin polymorphism in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 27 : 2371-2373.
- Utter, F. M. and H. O. Hodgins. 1971. Biochemical genetic variation at six loci in four stocks of rainbow trout. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 101 : 494-502.

- Valenta, M., A. Stratil, V. Slechtova, L. Kalal and V. Slechta. 1976. Polymorphism of transferrin in carp (*Cyprinus carpio* L.) : Genetic determination, isolation and partial characterization. *Biochem. Genet.*, 14 : 27-45.
- Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244 : 4406-4412.
- Wight, J. E., Jr. and L. M. Atherton. 1970. Polymorphisms for transferrin and LDH loci in brook trout populations. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99 : 179-192.
- 韓相基, 鄭義龍, 姜熙日. 1986. 競走馬의 血液型에 關한 研究. I. 血清 transferrin의 遺傳的多型. *韓畜誌*, 28(7) : 454-461.
- 尹鍾萬, 沈彦和, 朴弘陽. 1989. *Tilapia* transferrin의 分離 및 種判別 그리고 性判別 利用에 關한 研究. *畜産科學研究所 論文集*, 14 : 15-24.