

등전점 전기영동에 의한 서해산 해산어의 근형단백질의 전기영동에 관한 연구

김종배[†] · 최선남 · 이근우 · 정용현

군산수산전문대학 수산가공과

Electrophoretic Patterns of Sarcoplasmic Proteins in Mid-West Korean Sea Fishes by Thin Layer Polyacrylamide Gel Isoelectrofocusing

Jong-Bae kim[†], Sun-Nam Choi, Gun-Woo Lee and Yong-Hyun Jung

Dept. of Sea-Food Processing, National Kunsan Fisheries College, Kunsan 573-400, Korea

Abstract

In order to identify hard distinct 12 fish species (shiba shrimp *Metapenaeus joyneri*, fleshy shrimp *Penaeus orientalis*, ridgetail prawn *Palaemon carinicauda*, yellow croaker *Pseudosciaena manchurica*, croaker *Nibea albiflora*, *Collichthys fragilis*, brown sole *Limanda herzensteini*, frog flounder *Pleuronichthys cornutus*, *Areliscus rhomaleus*, stone flounder *Kareius bicoloratus*, harvest fish *Pampus argenteus*, flag fish *Goniistius zonatus*) by seeing with naked eye in Kunsan coastal area, sarcoplasmic protein in the supernatant was used for isoelectric focusing. For getting supernatant, fish muscle tissue was blended with two times deionized water and centrifuged (at 4°C, 12,000rpm for 15min). Isoelectric focusing of sarcoplasmic protein carried out on a LKB Multiphor II using polyacrylamide gel plate (2mm thickness, pH 3.5-10°C, pH 5-8 gradient, at 10°C for 1.5, 3 hours). In case of uncertain protein pattern, pH gradient was modified to narrow pH gradient, and executed 2-D electrophoresis using conventional polyacrylamide gel electrophoresis. Most of fishes except yellow croaker and *Collichthys fragilis* were distinguished by isoelectric focusing. The protein maps of 2-D electrophoresis for analyzing two protein bands at similar positions (pH 5, 6) between the two fish species showed the differences of the estimated molecular weights, 11,700 (pH 5.0) and 87,000 (pH 6.0).

Key words : fish species, sarcoplasmic protein, isoelectric focusing, 2-D electrophoresis, molecular weight

서 론

어종의 구별은 일반적으로 관능적 방법에 의한 외부적 특성에 의존하고 있다. 이러한 육안적 관찰방법은 간단한 가공(두절 또는 fillet 등)만 하여도 그 특성이 결여되어 서로 다른 어종의 견본과 비교 관찰이

어려워진다. 그러나 어류의 구성성분중 단백질의 조성은 동일 어종에서 유전적으로 거의 같기 때문에 구성단백질을 검정하는 전기영동법이 어종의 구별에 많이 이용 되어졌다. 어육의 근형단백질과 효소류에 대한 통상의 전기영동도에 관한 많은 연구¹⁻⁴⁾가 있지만, 이들 전기영동도를 이용하여 어종을 구별하는데는 영동의 조건 (gel의 소재 및 조제 방법, buffer의

[†]To whom all correspondence should be addressed

종류, 영동장치의 종류, 통전조건)과 실험자의 숙련도에 따라 재현성에 현저한 차이를 나타내기 때문에 AOAC⁹⁾의 규정을 엄격히 지키도록 되어 있다. 그러나 신속성과 재현성이 요구되는 현대의 유통체계에서는 적용이 어려운 반면, 통상의 전기영동법과 완전히 원리가 다른 등전점 전기영동은 구성단백질이 carrier ampholyte의 isoelectric zone에 각각 일치하는 범위로 농축되어 명확하고 재현성 있는 전기영동상을 얻을 수 있다. Lundstrom^{2,3)}은 polyacrylamide gel과 전분 gel를 이용하여 14종의 원심분리된 어류근형 단백질과 10종의 원심분리된 어류근형단백질 및 직접 어육조직을 등전점 전기영동하여 어종판별에 photographic standard로 사용 가능성을 제안하였고, 山本, 鈴木⁴⁾은 6목 41종의 어류를 어체부위, 보관조건, 어체의 대소 및 변이종 별로 등전점 전기영동의 적용시 문제점과 기초적인 제반요인에 대하여 동일종내에서도 변이종과 개체간에 서로의 차이⁵⁾가 인식되기 때문에 항상 나타나는 단백질 pattern을 이용한 비교 동정과 근인종간에서 차이를 검출하기 위한 pH범위의 변경, 2차원 전기영동법의 병용, 단백질 염색법을 달리한 minor성분비교와 효소들의 종특이성 이용을 제안하였다.

따라서 서해 군산지방에서 어획유통되는 어류 및 갑각류중 서로 다른 종임에도 외부의 특성이 비슷하여 주부는 물론 상인들조차 구별이 어려운 8종의 어류(참조기, 수조기, 황갈달이, 도다리, 박대, 돌가자미, 병어, 아홉동가리)와 3종의 갑각류(중하, 대하, 밀새우)를 신속하고 재현성이 높은 polyacrylamide

gel를 사용하는 등전점 전기영동법을 이용하여 종의 특성을 나타낼 수 있는 단백질 pattern을 파악하고 등전점 전기영동의 pH 범위를 변경하여 이를 확인 하였으며, 근인종간에 항상 나타나는 단백질 pattern이 비슷하여 구별이 어려운 경우 2차전개하여 차이점을 확인하였다.

재료 및 방법

재 료

실험에 사용된 재료는 Table 1과 같이 갑각류 3종을 포함한 12종의 어류를 1990년, 12월과 1991년, 1월의 2차에 걸쳐 군산시 해망동 서부어판장에서 구입하였으며, 구입후 선어 상태의 근형단백질 추출은 AOAC⁹⁾과 Lundstrom²⁾의 방법에 따라서 20g의 시료량에 2배량의 4℃ 탈이온수를 가하여 균질화한 다음 12,000rpm (average 16,000×g, 4℃), 15분간 원심분리하여 상등액에 1% glycine를 가하고, 여과(Whatmann No.1 filter paper)하였으며, Lowry방법⁶⁾으로 시료단백질량을 정량하여 10mg/ml 부근으로 조절하였다. 저장시료는 -40℃로 보관하여 사용하였으며, 근형단백질 추출시 세절하여 상기방법으로 원심분리하였다.

등전점 전기영동

등전점 전기영동에 사용된 장치는 LKB Multiphor II와 Mark II power supplier를 사용하였으며, 냉각장

Table 1. Fish species for identification and application sarcoplasmic protein contents for isoelectric focusing on polyacrylamide gel

Groups	NO.	Fish species	English name (Korean name)	Protein contents (mg/ml)*
A	1	<i>Metapenaeus joyneri</i>	Shiba shrimp (Jung-Ha)	11.5
	2	<i>Penaeus orientalis</i>	Fleshy shrimp (Dae-Ha)	10.3
	3	<i>Palaemon carinicauda</i>	Ridgetail prawn (Mil-Saeu)	13.3
B	4	<i>Pseudosciaena manchurica</i>	Yellow croaker (Cham-Jogi)	15.5
	5	<i>Nibea albiflora</i>	Croaker (Su-Jogi)	20.5
	6	<i>Collichthys fragilis</i>	none (Whang-Gangdali)	18.3
C	7	<i>Limanda herzensteini</i>	Brown sole (Cham-Gajami)	18.5
	8	<i>Pleuronichthys cornutus</i>	Frog flounder (Dodari)	13.7
	9	<i>Areiscus rhomaleus</i>	none (Barkdae)	13.5
	10	<i>Kareius bicoloratus</i>	Stone flounder (Dolgajami)	14.0
D	11	<i>Pampus argenteus</i>	Harvest fish (Byung-ur)	16.9
	12	<i>Goniistius zonatus</i>	Flag-fish (A-hopdongari)	15.0

*Application protein contents in filtered supernatant from the samples

치에는 20% 부동액을 넣은 물을 사용하여 10℃를 유지하도록 조절하였다. 실험에 사용된 polyacrylamide gel(두께 2mm, 크기 125×260mm)은 LKB application note 250에 따라 acrylamide (MERK제) 4.85%, N, N'-methylenebisacrylamide 0.15%, ammonium persulphate 0.05%, ampholine(pH 3.5~10, pH 5~8) 2.00%의 조성비로 pore의 크기를 결정하는 총 acrylamide농도 T:5%, 가교 결합도 C:3%로 하였다. 시료는 10mm×5mm크기의 Whatmann 3MM filter paper를 gel 표면에 놓고 micropipet를 사용하여 15μl를 추가하였으며, pH 3.5~10에서는 영동시작 45분후 application paper를 제거하였고, pH 5~8에서는 영동시작 1시간후 제거하여, 각각 1.5시간과 3시간동안 전기영동하였다. 등전점 전기영동 조건은 Lundstrom²⁾과 LKB manual⁶⁾에 따라 constant power를 25W(1W/cm)로 고정하였다. Anode와 cathode에 사용된 buffer는 pH 3.5~10에서 1M H₃PO₄와 1M NaOH이며, pH 5~8에서는 0.5M acetic acid와 0.5M NaOH이고, marker들은 cytochrome C(pI 9.28), ribonuclease(pI 8.88), myoglobin(pI 7.33, 6.88), albumin(bovine, pI 4.9)과 ovalbumin G III(pI 4.23)이며, 영동종료를 알기 위해 myoglobin과 ferritin를 anode와 cathode에 동시에 추가하였다. pH의 측정은 영동후 즉시 가장자리를 1cm 절단하여 1cm 간격으로 자른 후 8ml의 증류수에 침지하여 측정 한 후 marker들과 비교하였다. 분리된 단백질은 즉시 3.5% sulphosalicylic acid와 11.5% trichloroacetic acid를 함유한 고정액에 1시간 고정하여 ampholine를 씻어낸 후, 25% ethanol과 8% acetic acid를 함유한 탈색용액에 30분간 침지하여 잔유 ampholine를 제거하고, 0.15% coomassie brilliant blue R-250를 함유한 염색액으로 염색하였다.

2차원 전기영동

2차 전개에 사용된 전기영동법은 통상의 polyacrylamide gel전기영동법으로 acrylamide 3.45%, N, N'-methylenebisacrylamide 0.09%, ammonium persulphate 0.07%, TEMED 2.00%, tris-glycine buffer 50.00%의 조성으로 T:3.6%, C:2.6%. 두께 2mm이며 전극액은 tris-glycine buffer(pH 8.9)과 증류수를 사용하였다. 등전점 전기영동 후 plastic판과 함께 1cm 폭으로 절단하고 tris-glycine buffer(1:1)에 5분간 침지하여 gel의 pH를 조정하고 2차 전개하

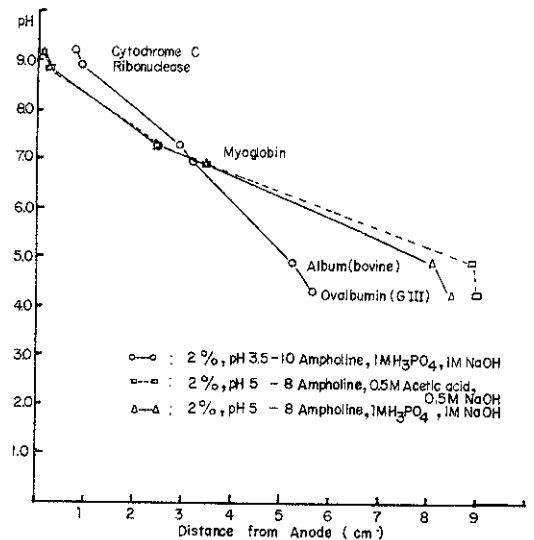


Fig. 1. Typical pH gradient curve in 5% polyacrylamide gel.

였다. Markers는 등전점 전기영동과 동일한 종류를 사용하였으며, 이동정도를 알기 위해 0.01% bromophenol blue를 넣어 전기영동을 하였다.

2차 전개를 위한 전기영동 조건은 gel 온도 10℃에서 초기 20mA, 5분간 영동 후 시료를 넣고 15V/cm, 48mA로 100분간 전개 시켰다. 영동종료 후, 11.5% trichloroacetic acid와 3.4% sulphosalicylic acid를 함유한 고정액에 1시간 고정시킨 후, 0.25% coomassie brilliant blue R-250를 함유한 염색용액에서 2시간동안 염색하였다. 분리된 영동도에서의 분자량 추정은 marker들의 이동거리율로 산정하였다.

결과 및 고찰

근형단백질 추출 후, serum bovine albumin을 사용하여 작성한 검량곡선을 이용하는 Lowry법⁷⁾으로 정량한 결과는 Table 1과 같다. 가자미와 도다리에서 약간 높게 나타났으나 대체적으로 총 단백질의 30% 전후에는 큰 차이가 없어서 등전점 전기영동시료농도에 적합하였다. 이는 김⁸⁾, 남⁹⁾, 최 등¹⁰⁾, 변 등¹¹⁾의 결과와 비슷하였다. Polyacrylamide gel상의 pH 분포는 Fig. 1과 같다. 넓은 범위(pH 3.5~10)에 marker로 사용된 cytochrome C(pI 9.28)과 ribonuclease(pI 9.88)은 서로의 간격이 1mm정도로 이는 gel판상의 pH 분포곡선이 pH 9 부근에서 급격한 곡선으로 나

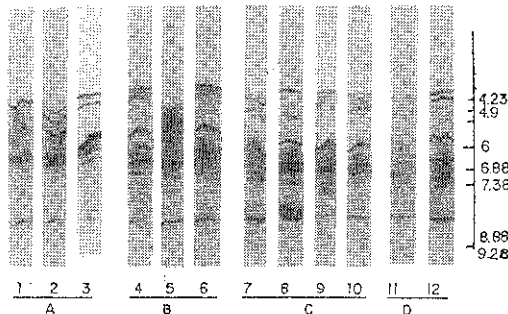


Fig. 2. Isoelectric focusing patterns of sarcoplasmic proteins on pH 3.5-10 PAG plate. 1-12 are sample number, A-D are sample groups.

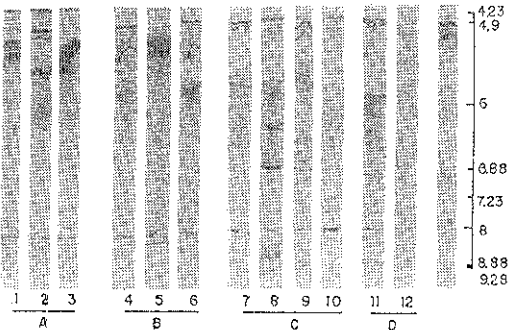


Fig. 3. Isoelectric focusing patterns of sarcoplasmic proteins on pH 5-8 PAG plate. 1-12 are sample number, A-D are sample groups.

타나며, pI 4.9의 albumin (bovine F-V)와 pH 4.23의 ovalbumin G III에서도 같은 현상이 일어남을 알 수 있었다. 협소한 pH 범위 (pH 5~8)에서도 pH 7.5 이상과 pH 5.5 부근에서부터 동일한 현상을 나타내었다.

광범위한 (pH 3.5~10) 범위의 등전점 전기영동상과 협소한 범위 (pH 5~8)의 전기영동상 및 2차 전개한 영동상은 어종별로 Fig. 2, 3, 4, 5와 같다. Fig. 2와 3에서와 같이 A group 3종의 갑각류는 중하속의 중하 (*Matapenaeus joyneri*)와 줄새우속의 밀새우 (*Palaeomon carinicauda*), 보리새우속의 대하 (*Penaeus orientalis*)로 중하와 대하는 서로 비슷한 단백질띠를 가지고 있으나 pH 4~5부근에서 대하가 서로 다른 등전점을 가지는 단백질띠가 확인되어, 중하와 구별이 가능하였고 밀새우의 경우, pH 4.5이하에서 2개, pH 5~7.5부근에서 6개이상의 단백질띠가 중하와 대하에서는 찾아볼 수 없어 완전히 다른 종임이 판명되었다. 이를 확인하기 위하여 pH 5~8의 협소한 범위로 영동한 결과 pH 5부근에서 4개의 단백질띠가 중

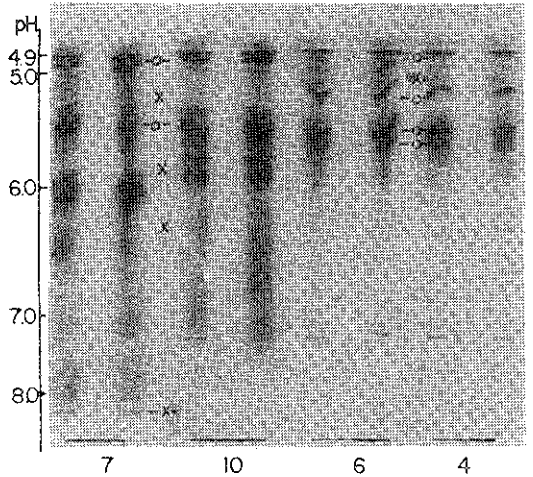


Fig. 4. Isoelectric focusing patterns of sarcoplasmic proteins on pH 5-8 PAG plate. Sample numbers of 7-10 and 4-6 are not distinctive species.

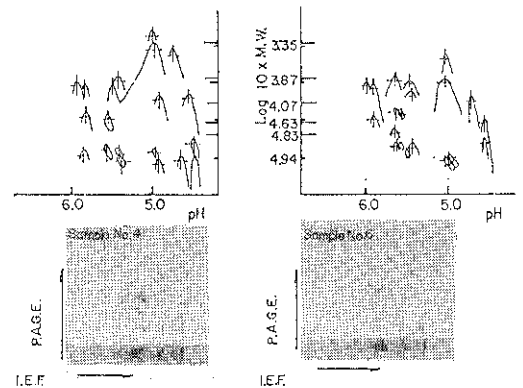


Fig. 5. 2-dimensional electrophoretic patterns of sample numbers of 4 and 6.

하에서는 나타났으나 대하에서는 3개의 단백질띠만 볼 수 있어서 종의 판별이 가능하였다. 그러나 이들 갑각류는 개체의 대소차이가 뚜렷하여 외부적 구별이 용이하였으나, 개체의 차이가 적은 대하의 치어에 대한 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

B group에서 3종의 민어속 어류인 참조기 (*Pseudosciaena manchurica*), 수조기 (*Nibea albiflora*), 황강달이 (*Collichthys fragilis*)에서는 pH 3.5~10의 gel상에서 참조기와 황강달이는 pH 5~6부근의 1개의 띠와 pH 5이하에서 참조기에 2개의 띠가 더 있는 것 외에 구별이 거의 불가능하였다. 그러나 수조기는 거의 다른 등전점을 가지는 단백질띠로 구성되어 있어서 쉽게 구별할 수 있었다. pH 5~8의 gel상에서는 참조기

의 12개 단백질띠와 황강달이의 9개 단백질띠가 농도차만 확인될 뿐 구별하기 어려웠다. 이 두 어종을 더 조사하기 위하여 2차원 전개를 한 결과, 등전점 전기영동후 통상의 polyacrylamide 시료 단백질량으로는 농도가 낮았지만 몇가지 확인가능한 영동도를 얻을 수 있었다. 따라서 2차원 전개시 농도조절 또는 염색법의 개량이 필요할 것으로 생각되었다. C group의 도다리속의 도다리(*Pleuronichthys cornutus*)와 눈가자미속의 참가자미(*Limanda herzensteini*), 돌가자미속의 돌가자미(*Kareius bicoloratus*), 참서대속의 박대(*Areliscus rhomaleus*)에서는 등전점 단백질띠가 pH 5 이하와 pH 6~7 사이에 주로 분포되어 있으며, pH 3.5~10의 조건에서는 단백질띠의 농도차로 구별이 가능했으나 이러한 경우 동시에 같은 조건이 아니면 구별이 어려울 것으로 생각되었다. pH 5~8 조건에서는 pH 4.5~5 사이에서 3개의 띠가 돌가자미와 도다리에서 비슷하였고 기타 어종은 다르며, pH 6~7의 범위에 박대는 2개의 띠가 도다리에는 1개 밖에 없었으며, pH 8~9 사이에는 박대는 2개, 도다리는 1개 밖에 나타나지 않았다. 대체적으로 pH 5~8 사이의 서로 다른 등전점 단백질띠가 분포하는 것으로 보아 Lundstrom²⁾의 yellow tail(*limanda ferruginea*)과 Gray sole(*Glyptocephalus cynoglossus*)의 영동도에서와 같이 확인 가능하나 이들 어종에서는 등전점 전기영동시 pH 범위를 변경할 필요성이 있는 것으로 나타났다.

참가자미와 돌가자미는 단백질 pattern이 비슷하여 pH 5~8(0.5M acetic acid와 0.5M NaOH)의 좁은 범위로 재영동한 결과 Fig. 4와 같이 뚜렷이 pattern을 나타냈다. pH 8 이상의 단백질띠 분포는 도다리와 박대, D group의 아홉동가리(*Goniistius zonatus*)에 나타나서 구별이 용이하였으며, 병어(*Pampus argenteus*)는 다른 어종과 아주 다른 pattern을 보여서 종의 차가 뚜렷하였다. 이러한 경향은 山田, 鈴木⁴⁾의 감성돔이나 흑대기, 태래어 등전점 단백질띠가 주로 pH 6.5 이하에 분포되어 있는 것과 비슷한 경향을 보였으며, 감성돔에서 pH 8.5 부근의 1~2개의 띠가 있어서 아홉동가리의 1개띠와 비슷하였다. 등전점 전기영동에서 얻어진 단백질 pattern의 단백질띠수는 9~12개로 SDS-PAGE를 사용한 김 등⁵⁾의 방어 16개, 남⁶⁾의 이스라엘 잉어 11개, 최 등⁷⁾의 붕어 10개, 가물치 12개와 비슷하였으나, Fig. 5와 같이 참조기와 황강달이의 근형 단백질 2차 전개시에 9~12개의 단백질띠가 21개의 분자량이 다른 단백질로 나타났

며, 이들 서로 다른 단백질들은 등전점이 pH 5.0 부근에서 추정분자량 11,700과 87,000이고, pH 6.0 부근에서는 추정분자량이 87,000 이상인 단백질로 나타났다. 따라서 12종의 근형단백질의 등전점 전기영동도에서 2종의 어류를 제외한 모든 어종의 판별이 가능하였고, 2종의 어류인 참조기와 황강달이도 통상의 전기영동법으로 2차 전개시 분자량이 다른 단백질 구성을 확인되었다.

요 약

서로 비슷한 어종으로 약간의 저차 가공시에도 육안적 구별이 어려운 12개 어종의 등전점 전기영동 결과는 다음과 같다. 3종의 갑각류에서 대하와 중하는 밀새우와 다른 단백질 pattern이 pH 4.5 이하에서와 pH 5~7.5에서 서로 구별이 가능하였으며, pH 범위를 변경했을 때, 중하와 대하 사이의 구별은 pH 5 부근에 있는 단백질띠로 나타났지만 크기나 형태적으로 거의 같은 대하의 치어에 대한 조사가 필요할 것으로 생각되었다. 민어속 어류에서도 참조기와 황강달이는 비슷한 등전점을 가지는 단백질의 분포가 pH 5~8 사이로 나타났다. 이 분포대에서 돌가자미와 도다리에서도 비슷한 현상을 보였으며, pH 6~7, pH 8~9 범위에서 박대와 도다리는 서로 다른 단백질 분포를 보였고, 참가자미와 돌가자미는 pH 4.5, pH 6.0과 pH 8.0이하에서 뚜렷이 다른 분포를 보였다. pH 범위를 변경하여도 단백질 pattern의 구별이 어려운 참조기와 황강달이에서의 2차원 전기영동은 pH 5.0과 pH 6.0부근에 있는 단백질들에서 추정분자량 11,700과 87,000으로서 등전점 전기영동시 pH 범위 변경 및 2차원 전개 전기영동을 병용할 경우 서해안 어종(중하, 대하, 밀새우, 참조기, 수조기, 황강달이, 참가자미, 도다리, 박대, 돌가자미, 병어, 아홉동가리)의 판별에 구성 단백질의 등전점 전기영동이 신속하고 효과적임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 1989년 대학부설 연구소 학술연구조성비 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비를 지원하여 준 한국학술진흥재단에 깊은 사의를 표하는 바이다.

문헌

1. Hashimoto, K., Watabe, S., Nakagawa, T. and Sorita, K. : Electrophoretic identification of three subspecies of the genus *Lagocephalus* pufferfish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **50**(1), 115(1984)
2. Lundstrom, R. C. : Fish species identification by thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing : collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**(1), 69(1980)
3. Lundstrom, R. C. : Rapid fish species identification by agarose gel isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**(7), 38(1981)
4. Yamada, J. and Suzuki, A. : Identification of fish species by thin layer isoelectric focusing of sarcoplasmic protein. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **48**(1), 73(1982)
5. A. O. A. C. : *Official methods of analysis*, 13th ed., Association of official analytical chemists, Washington, D. C., p.300(1980)
6. Analytical electrofocusing in thin layer of polyacrylamide gel, LKB *Application Note*, p.250(1977)
7. Deutscher, M. P. : *Guide to protein purification*, enhanced alkaline copper(Lowry) protein assay. Academic Press, **182**, 57(1990)
8. 김장량, 최영준, 변재형 : 보통육과 철합육의 단백질 및 아미노산 조성의 사후변화. *한국수산학회지*, **15**(2), 128(1982)
9. 남택정 : 이스라엘 잉어의 연령별 근육단백질 조성의 비교. *한국수산학회지*, **16**(3), 191(1983)
10. 최진호, 임채환, 최영준, 변대석, 김광목, 오성기 : 천연 및 양식산 뱀장어의 단백질 및 아미노산 조성비교. *한국수산학회지*, **19**(1), 62(1986)
11. 변재형, 최영준, 김정환, 조권욱 : 보리 새우육의 부분 동결 저장중 단백질 및 아미노산의 조성변화. *한국수산학회지*, **17**(4), 284(1984)
(1991년 8월 1일 접수)