

韓國產 *Semisulcospira gottschei*의 電氣泳動的 研究

忠北大學校 師範大學 科學教育科

金 昌 漢

= Abstract =

Electrophoretic Study of *Semisulcospira gottschei* in Korea

Chang Han Kim

Department of Science Education, Chungbuk National University

Genetic variations of *Semisulcospira gottschei* in Korea were investigated by means of starch gel-electrophoresis. The results are as follows;

1) Eight loci of α -Gpd, Mdh-2, Pept-1, Pgm-2, Gp-1, Gp-2, Gp-3 and Gp-4 were monomorphic, and 8 loci of Mpi, Mdh-1, Pgi, Got, Pept-2, Pept-3, Pgm-1 and Sdh showed genetic variations.

2) Means of allele per locus (\bar{A}) and polymorphism (P) were revealed 0.64 and 0.44, respectively.

The value of heterozygosity (H_G) showed a little more than heterozygosity H_D . ($H_D=0.09$, $H_G=0.13$)

3) Genetic variation appears to be due to loci of Got, Pept, Pgi, and Sdh, all of which of the H_D values are high.

緒 論

各種 動物의 단백질에 대한 電氣泳動的 比較研究는 Smith(1955)에 의하여 starch gel 전기영동과, cellulose acetate strip 그리고 Davis(1964)에 의한 polyacrylamide gel을 이용한 電氣泳動法이 제안된 이후 많은 學者들에 의하여 研究發展되었고 Hunter 및 Markert(1957) 이후 전기영동에 의한 isozyme 研究가 활발하게 進行되고 있는데 Hubby 및 Lewontin(1966)과 Harris(1966)에 의하여 초파리 및 인류집단의 遺傳的 변이 조사가 발표되는 등 여러 생물군에 대한 遺傳的 변이정도가 밝혀졌다(Stone *et al.*, 1968; Prakash *et al.*, 1969; Selander and Yang, 1969; Gormens *et al.*, 1980; Yang *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1982; Yang and Park, 1982) 또한 Selander(1976)는 현재까지 보고된 문

헌을 토대로 하여 각 생물군의 遺傳的 변이정도를 비교한 결과 일반적으로 초파리를 비롯한 곤충류, 무척추동물, 植物들은 척추동물에 비하여 약 3배 정도 높은 遺傳的 變異를 갖고 있음을 밝혔고 또한 脊椎動物中에서 兩棲類의 遺傳的 變異가 가장 높고 鳥類는 그 變異程度가 가장 낮음을 밝힌바 있다(Yang and Patton, 1981). 한편 Ukoli(1974)는 *Biomphalaria*(freshwater snail)의 foot muscle을 試料로 하여 esterase의 電氣泳動 pattern을 보고하였고 Chung(1984)은 Bithyniidae의 蛋白質을 分析 比較研究하였다.

우리나라에서 다슬기에 대한 研究는 Kwon 및 Choi(1982)와 Kwon 및 Park(1984)에 의하여 의미호에 서식하는 다슬기의 一種인 *Semisulcospira gottschei*의 發生 단계에 따른 齒舌에 관한 형태적인 研究와 Kil(1976, 1977)에 의한 太白山脈을 中心으로 주름 다슬기 *Semisulcospira forticasta* 分布와 생태적인 연구 및 전라

북도 담수패에 대한 연구를 하였으며 그후에 Kim 및 You(1986)는 *Semisulcospira gottschei*의 胚發生에 따른 isozyme의 電氣泳動的 研究를 發表하였고 Kim 및 Kim (1986)이 *Semisulcospira*의 生物學的 性狀 및 電氣泳動的 研究에서 種間 形態의 特征과 電氣泳動的 差異를 發表하였을 뿐이다.

著者は 본 研究에서 *S. gottschei* isozyme의 自然集團 內에서 생긴 遺傳的 變異程度를 究明하고 變異 locus를 알아보고자 본 實驗을 試圖하였다.

材料 및 方法

1. 재료의 채집

실험에 使用된 재료는 경기도 남한강에서 총 20개체를 채집 試料로 使用하였다. 실험실 내에서 전기영동에 사용할 腹足筋(foot muscle)을 각 개체별로 취하여 -75°C에서 냉동시켰다.

2. 전기영동

전기영동 방법은 Selander등(1971)과 Yang(1980)의 방법에 의하여 horizontal starch-gel electrophoresis를 하였다. Starch는 Sigma社 제품을 사용하였는데 11.3% gel을 만들어 전기영동에 사용하였다.

각 개체에서 적출한 근육은 4°C에서 glass-homogenizer로 grinding한 후 원심분리기(Sorvall, USA)를 사용하여 49,000 g로 20분간 저온 원심분리하여 그 상층액을

얻어 전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동에 사용한 buffer 및 isozyme의 종류는 Table 1과 같다.

그리고 buffer의 조성 및 isozyme의 염색은 다음과 같다.

가) Buffer

Tray buffer (pH 8.0)

- Tris HCl250.0 g
- Citric acid (H₂O)99.0 g
- Deionized H₂O-3 l

Gel buffer (pH 8.0)

- Tray buffer1 part
- Deionized H₂O29 part

나) Isozyme 염색액

a) Got

- 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0)50 ml
- Pyridoxal-5'-phosphate0.5 ml
- L-Aspartic acid200 mg
- α-Ketoglutaric acid100 mg
- Fast blue BB Salt150 mg
- * Incubated at 37°C in dark chamber

b) Mdh

- 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0)40 ml
- 0.2 M Malate5 ml
- NAD1 ml
- NBT2 ml
- PMS0.5 ml
- * Incubated at 37°C in dark chamber

c) Pgi

- 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0)30 ml
- 1 M MgCl₂10 ml
- F-6-P4 ml
- G-6-PDH20 units
- NADP1 ml
- MTT2 ml
- PMS1 ml

d) Pgm

- 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0)5 ml
- D.W25 ml
- G-1-Phosphate5 ml
- G-2-6-Phosphate2 ml
- MgCl₂5 ml

Table 1. Buffer system and stains for electrophoresis

Buffer	Isozyme	Volt/ running time
Continuous tris citrate II (T.C.II) pH 8.0	Mannose phosphate isomerase (M Pi)	110V/2.5 hr.
	α-Glycerophosphate dehydrogenase (α-GPd)	
	Malate dehydrogenase (Mdh)	
	Phosphoglucose isomerase (Pgi)	
	Glutamic oxaloacetate transaminase (Got)	
	Peptidase (Pept)	
	Phosphoglucomutase (Pgm)	
	Sobital dehydrogenase (Sdh)	
General protein (Gp)		

- G-6-PDH.....40 units
 NADP.....0.5 ml
 MTT0.5 ml
 PMS0.2 ml
- e) Sdh
 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0)50 ml
 Sorbitol500 ml
 NAD0.5 ml
 NBT0.5 ml
 MTT0.2 ml
 PMS0.1 ml
- f) α Gpd
 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0)50 ml
 MgCl₂1 ml
 α -DL-Glycerophosphate40 ml
 NAD2 ml
 NBT0.5 ml
 MTT0.5 ml
 PMS0.3 ml
- g) Mpi
 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0)50 ml
 D-Mannose-6-Phosphate1 ml
 NADP.....1.5 ml
 MTT2 ml
 PGI50 units
 G-6-PDH.....40 units
 PMS1 ml
- h) Pept
 0.2 M Tris-HCl(pH 8.0)50 ml
 1 M MnCl₂0.2 ml
 DL-Leucyl-DL alanine.....40 ml
 Snake Venome10 ml
 Peroxidase20 ml
 O-dianisidine HCl10 ml
- i) General protein (Gp)

전기영동후 얻어진 isozyme pattern을 이용하여 유전자 빈도를 산출하고 % polymorphism(P)와 heterozygosity(H)값을 다음의 공식에 의해 산출하여 유전적 변이 정도를 구명하고 타 taxa와 비교, 검토하였다.

A) % polymorphism(P) = polymorphic loci/

total loci detected.

B) Heterozygosity(H)

① H_D(direct count)=Total No. of heterozygote of population/Total No. of loci of individuals.

② H_G(by gene frequency) = $\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (1 - \sum x_i^2)$

결과 및 고찰

경기도 양평에서 채집한 *Semisulcospira gottschei*의 유전적 변이 정도를 조사하기 위하여 9개의 효소 및 단백질에서 16개의 유전자를 검출하여 이들의 유전자 빈도를 조사한 결과 α -Gpd, Mdh-2, Pept-1, Pgm-2, Gp-1, Gp-2, Gp-3 및 Gp-4의 8개 유전자(50%)는 변이가 없었고 나머지 8개의 유전자는 유전적 변이가 있었으며 유전자 간에 약간의 차이가 있었다(Table 2).

Table 2에서 보는 바와 같이 8개 polymorphic loci중

Table 2. Allele frequency at 16 loci of *Semisulcospira gottschei* in Korea

Locus	Allele	Frequency
α -Gpd	a	1.00
Mdh-2	a	1.00
Pept-1	a	1.00
Pgm-2	a	1.00
Gp-1	a	1.00
Gp-2	a	1.00
Gp-3	a	1.00
Gp-4	a	1.00
Mpi	a	0.06
	b	0.94
Mdh-1	a	0.03
	b	0.97
Pgi	a	0.25
	b	0.75
Got	a	0.13
	b	0.25
	c	0.62
Pept-2	a	0.95
	b	0.05
Pept-3	a	0.72
	b	0.28
Pgm-1	a	0.03
	b	0.97
Sdh	a	0.13
	b	0.87

에서 *Mpi*, *Mdh-1*, *Pept-2*, *Pgm-1*, *Sdh*의 5개 유전자(31%)는 매우 낮은 율의 유전자 변이를 나타내었고, 다소 변이가 있는 *Pgi*, *Got*, *Pept-3*(19%)는 2개 또는 3개의 대립인자를 갖고 있었다. 16개의 유전자는 모두 dominant allele을 공유하고 있었으며 그 빈도는 0.851 이상이었으며, 다만 *Got*의 allele은 0.65로서 낮은 값이었다.

*S. gottschei*의 유전적 변이 정도를 조사하기 위하여 유전자당 평균 대립인자 수(\bar{A}), 다형성의 빈도 [% polymorphism(P)] 및 이형 접합자 빈도 [heterozygosity(H)] 값을 구한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서 보는 바와 같이 *S. gottschei*의 유전적 변이 정도를 살펴보면 유전자당 평균 대립인자수(\bar{A})는 0.64로서 양서류의 $\bar{A}=1.308$ 에 비하면 상당히 작다고 할 수 있으며 평균 %polymorphism(P)값은 0.44로서 land snail의 $P=0.437$ 과 비슷하였고(Selander, 1976) 어류의 평균 $P=0.31$ 과(Ayala, 1982) 척추동물의 평균 $P=0.300$ 보다는 높은 값이었다.

Heterozygosity(H)값은 직접 관찰된 이형접합자 빈도(H_D)와 유전자 빈도에 의한 이형 접합자의 예측 빈도(H_G) (Selander, 1976)를 산출하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 $H_D=0.09$, $H_G=0.13$ 으로 H_G 값이 H_D 에 비하여 약간 큰 값을 알 수 있다. 이는 inbreeding, assortive mating 혹은 sampling error

Table 3. Polymorphism and heterozygosity of *Semisulcospira gottschei* in Korea

Mean of allele per locus (\bar{A})	% Polymorphism (P)	Heterozygosity	
		Direct count (H_D)	by gene frequency (H_G)
0.64	0.44	0.09	0.13

의 결과로 사료된다.

*S. gottschei*의 이형접합 빈도값은 land snail의 $H=0.150$ (Salander, 1976)에 비하면 거의 유사한 값을 알 수 있고, 참개구리의 $H_D=0.04$, $H_G=0.0425$ 에 비하면 거의 3배 가량 높음을 알 수 있었다(Yang, 1980).

각 유전자별로 H_D 값을 구한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서와 같이 8개 polymorphic loci중에서 *Got*에서 빈도가 가장 커서 $H_D=0.54$ 였고, *Pept-3*는 그 다음으로 $H_D=0.40$ 이었고, *Pgi*는 $H_D=0.38$ 이며, *Sdh*는 $H_D=0.22$ 였다. 그밖의 유전자의 H_D 값은 모두 10% 미만이었다. 따라서 *S. gottschei*의 유전적 변이는 주로 상기의 유전자에 기인 한다고 사료된다.

Mdh-1, 유전자의 H_D 값이 0.05로서 *Drosophila* 28종의 $H_D=0.06$ 과는 유사하였고, 4종의 곤충의 $H_D=0.012$ 보다는 상당히 큰 값을 알 수 있었으며(Selander, 1976), *S. gottschei*에서 가장 큰 변이를 나타냈던 *Got*의 $H_D=0.54$ 는 *Drosophila*의 $H_D=0.022$, 곤충(3屬中 4種)의 $H_D=0.016$ 보다 2배 내지 3배 가량 큰 값을 알 수 있었다(Selander, 1976).

結 論

한국산 *Semisulcospira gottschei*의 유전변이 정도를 조사하기 위해 starch-gel electrophoresis를 실시한 결과는 다음과 같다.

1) α -Gpd, *Mdh-2*, *Pept-1*, *Pgm-2*, *Gp-1*, *Gp-2*, *Gp-3*, *Gp-4*의 8개 유전자는 변이가 없었고 *Mpi*, *Mdh-1*, *Pgi*, *Got*, *Pept-2*, *Pept-3*, *Pgm-1*, *Sdh*의 8개 유전자는 유전적 변이가 있었다.

2) 유전자당 평균대립인자(\bar{A})와 다형성의 빈도(P)는 각각 0.64, 0.44로 나타났으며 이형접합자 빈도값은 $H_D=0.09$, $H_G=0.13$ 으로 H_G 값이 H_D 에 비하여 약간 크게 나타났다.

Table 4. Individual heterozygosity of *Semisulcospira gottschei* in Korea

Isozyme	<i>Mpi</i>	α -Gpd	<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh-2</i>	<i>Pgi</i>	<i>Got</i>	<i>Pept-1</i>	<i>Pept-2</i>
H_D	0.10	0.00	0.05	0.00	0.38	0.54	0.00	0.09
Isozyme	<i>Pept-3</i>	<i>Pgm-1</i>	<i>Pgm-2</i>	<i>Sdh-2</i>	<i>Gp-1</i>	<i>Gp-2</i>	<i>Gp-3</i>	<i>Gp-4</i>
H_D	0.40	0.06	0.00	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00

3) 유전적 변이는 H_D 값이 큰 Got, Pept, Pgi, Sdh의 유전자에 기인한다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Ayala, F.J. (1976) Molecular quentics and evolution. In: Molecular Evolution. CF.J. Ayala, pp 1-20 *Sinauer. Assoc. Inc.*, Sunderland, Massachusetts
- Chung P.R. (1984) A Comparative study of three species of Bithyniidae (Mollusca: Prosobranchia) *Parafossarulus manchouricus*, *Gabbia misella* and *Bithynia tentaculata* *Malacol. Rev* 17:1-66
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoretic II. Method and application to human serum protein. *Ann. N.Y. Sci.*, 121:404-427
- Gormens G.C., Bath, D.G., Sokle, M. and Yang, S.Y. (1980) The relationship of the *Anolis cristatellii* species group, Electrophoretic analysis. *J. of Herp.*, 14:269-278
- Harris, H. (1966) Enzyme polymorphism in man. *Proc. Roy. Soc. Land B.*, 164:298-310
- Hubby, J.L. and Lewontin, R.C. (1966) A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in nature populations I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54:577-594
- Hunter, R.L. and Markert, Cr. (1957) Histochemical demonstration of enzyme separated by zone electrophoresis with starch gels. *Science*, 125:1294-1295
- Kil, B.S. (1976a) Distribution and standing crops of the fresh water mollusca in the Jeonbuk Do Korea. *Kor. J. Limmel*, 9(1-2):15-30
- Kil, B.S. (1976b) Ecological Studies on the bivalves of fresh water in Korea. *Kor. J. Limnol.*, 9(3,4):27-36
- Kil, B.S. (1977) Ecological studies on the fresh water Gastropods in Korea. Distribution of *Semisulcospira forticosta* in the Taeback Range. *Kor. J. Limnol.* 10 (3-4):289-35
- Kim, C.H. and Kim, Y.K. (1986) Biological properties and electrophoretic studies of *Semisulcospira* in Korea. *Res. Rev. Chung Buk Nat' Univ.*, 32:371-386
- Kim, C.H. and You, J.B. (1986) An electrophoretical study on embryo developmental stage of the Korean *S. gottschei*. *Res. Rev. Chung Buk Nat' Univ.*, 32:231-238
- Kwon, O.K. and Choi, J.K. (1982) The studies on the molluska in the lake Uiam (2). *Kor. J. Limnol.*, 15(1-2):39-50
- Kwon, O.K. and Park, G.M. (1984) Studies on the developmental period and radula of *Semisulcospira gottschei* in the lake Uiam. *Kangweon Nat' Univ. Thesis.* 20:152-153
- Lee, H.Y., Yang, S.Y. and Choi, B.L. (1982) Genetic variation in nature populations of Korean *D. melanogaster*. *Bull. I.B. Inha Univ.*, 3:141-149
- Miyanaoka, M. (1942) Studies on the fresh water snail (*Semisulcospira*) in Korea. *Jour. Chos. Nat. Hist.* 9(3-6):114-130
- Prakash, S.I, Lewontin, R.C., Hubby, J.L. (1969) A molecular approach to the study of heterozygosity in nature populations, IV Patterns of genetic variation in central, marginal and isolated population of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 61:841-858
- Selander, R.K. (1976) Genic variation in natural populations. In: Molecular evolution CF. J. Ayala. Ed. pp 21-45. *Sinaur. Assoc. Inc.* Sunderland, Massachusetts
- Selander, R.K., Hunt, W.G. and Yang, S.Y. (1969) Protein polymorphism and genic heterozygosity in two European subspecies of house mouse. *Evolution*, 23: 379-390
- Selander, R.K., Smith, M.H., Yang, S.Y., Johnson W.E. and Gentry, G.B. (1971) Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the Old-field mouse (*Peromyscus poliomotus*). *Univ. Texas. Publ.*, 7103:49-90
- Smith, O. (1955) Zone electrophoresis in starch gel group variation in the serum Proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61:629-641
- Stone, W.S., Wheeler M.R., Johnson, F.M. and Kojima, K. (1968) Genetic variation in nature isolated population of numbers of the *Drosophila nasuta* and *Drosophila ananassac* subgroups. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 59:102-109
- Yang, S.Y. (1982) Genetic variation in natural populations of *Rana nigromaculata* in Korea. *Bull. I.B. Inha Univ.* 4:61-67
- Yang, S.Y. and Park, B.S. (1982) Genetic variation and systematics of the subfamily Acheilognathimae (cyprinidae) in Korea. *Ann. Rep. Biol. Res. Jeonbug Nat. Univ.*, 3:25-32
- Yang, S.Y. and Patton, J.L. (1981) Genetic variability and differentiation in the *Galapagos finches*. *The Auk*, 98:230-242