

碩士學位請求論文

제주도산 조랑말 혈청중의
Haptoglobin과 Transferrin
Phenotypes의 분포에 관한 연구

指導教授 吳 文 儒



濟州大學校 教育大學院

生物教育專攻

丁 安 나

1985 年度

제주도산 조랑말 혈청중의
Haptoglobin과 Transferrin
Phenotypes의 분포에 관한 연구

이를 教育學 碩士學位 論文으로 提出함.



濟州大學校 教育大學院 生物教育專攻

提出者 丁 安 나

指導教授 吳 文 儒

1985年 7月 日

丁안나의 碩士學位 論文을 認准함.

濟州大學校 教育大學院

主 審  제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

副 審 _____ 인

副 審 _____ 인

1985 年 月 日

目 次

구 분 초 록	1
I. 서 론	2
II. 재 료 및 방 법	4
III. 결 과 및 고 찰	7
IV. 적 요	14
V. 참 고 문 헌	15



(Abstract)

**Study on the Phenotypes distribution of Haptoglobin(Hp) and
Transferrin(TF) in the serum of ponies in Cheju-do**

Choung An-Na

Biology Major

Graduate School of Education Cheju National University

Cheju Korea

Supervised by Professor Oh Moon-You

The haptoglobin and transferrin phenotypes of ponies raising in Cheju-do, were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis and gel scanning by densitometer.

Only Hp 1-1 phenotype of haptoglobin and Tf D of transferrin were demonstrated in the sera of 100 ponies, showing monomorphism, respectively.

It could be suspected that these results were caused by the inbreeding, but it needs further study on the components of the serum proteins of the horses to verify the above results.

* A thesis submitted to the Committee of the Graduate School of Education, Cheju National University in partial fulfillment of the Requirements for the degree of Master of Education in July, 1985.

I . 서 론

Smithies(1955)가 한천 겔 전기영동법에 의해 동물의 혈청 단백을 여러 성분으로 분석하는 방법을 발표한 이래, 가축의 혈청 단백질 성분의 개체변이와 유전에 관한 연구는 현저한 진전을 보여왔다(Mogi 등, 1970).

혈청 단백질의 한 성분인 haptoglobin (HP)은 α_2 -globulin에 속하는 헤모글로빈 결합 당단백질이라고 Jayle(1956)등에 의해 처음 발표되었다(Allison, 1959). Smithies(1955)는 전분 겔 전기영동법을 이용하여 사람의 혈청에서 전형적인 3종류의 haptoglobin 형(HP 1-1, HP 2-2 및 HP 2-2)을 발견하였다. Connell 등(1962)은 haptoglobin을 6가지 subtype들(HP 1F-1F, HP 1F-1S, HP 1S-1S, HP 2-1F, HP 2-1S, HP 2-2)로 분리했고 이들 subtype들은 3가지 대립인자 HP^{1F} , HP^{1S} , HP^2 에 의해 표현되고 있음을 보고 하였다. 또한 Braend와 Stormont(1964)는 전분 겔 전기영동법을 이용하여 말의 혈청에서 haptoglobin의 개체적 차이를 설명하려 했으나 개체변이는 나타나지 않았다고 보고하였다.

Transferrin은 철분대사에 관여하는 중요한 단백질로서 철분을 운반하는 기능을 나타내고, 분자량은 약 80,000 정도이다(Maeda 등, 1980). Transferrin의 표현형을 식별하는 방법으로는 전분 겔, 한천 겔, 등전점 전기영동법이 보고되었다(Kuehnl과 Spielmann, 1978). 전분 겔 전기영동법에 의해 Smithies(1957)는 최초로 사람의 혈청에서 transferrin C. homozygote만을 보고했고(Pascali 등, 1982), Kuehnl과 Spielmann(1978), Thymann(1978)은 등전점 전기영동 방법으로 transferrin C (TFC) subtype들을 TFC_1 , TFC_2 ,

및 $TFC_1 - C_2$ 의 3 종류로 분류하여, 이들의 유전은 TFC_1 과 TFC_2 의 두 유전자에 의하여 지배된다고 발표되었다. Kirk 등(1962)은 TFC subtype들 보다 전기영동상에서 이동속도가 느린 TF을 발견하고 그것을 transferin D (TFD)로 보고 하였으며, Giblett (1969)와 Wang 등(1966, 1967)은 TFC형 보다 영동상에서 이동속도가 빠른 transferrin을 발견하여 TFB라 명하였다. Braend와 Stormont (1964)가 tris-citrate-EDTA-borate 전분 겔 전기영동법을 이용해 Shetland 조랑말과 Thoroughbred, Arabian과 Appaloosa 말 집단에서 혈청내 beta-globulin (transferrin) 표현형에 대한 유전적 기초자료를 만들었다. 이들에 의해서 transferrin은 16개의 subtype이 보고 되었으며, 이것들은 6개의 대립유전자(TF^D , TF^F , TF^H , TF^M , TF^O , TF^R)에 의해 지배되고 있음이 밝혀졌다. 그 후 Gahne(1965)은 tris-citrate-lithium hydroxide-borate 전분 겔 전기영동법에 의해 Italy의 말 집단에서 TF^M 을 제외한 이들 대립유전자를 모두 발견할 수 있었고 이외에 TF^F 유전자를 subtype TF^{F1} 과 TF^{F2} 로 분류하였으며, McGuire와 Weitkamp (1980)는 Polyacrylamide 겔 전기영동법에 의해 표현형 Tf F의 subtype F_1 과 F_2 를 확인한 바 있다.

본 연구는 제주도산 조랑말 집단의 유전적 구조를 밝히는 연구의 일환으로 Polyacrylamide 겔 전기영동법에 의해 haptoglobin과 transferrin의 표현형 분포를 조사하여, 다른 말 집단과의 유전적인 유연관계를 조사하는 기초자료를 제공하고자 실시하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험재료

농가에서 사육되고 있는 제주도산 조랑말 100 두에서 채혈하여 분리한 혈청을 -20°C 이하에서 보관하였다가 사용했다.

2. 전기영동실험

(1) Haptoglobin

Lee 와 Oh (1983) 의 방법에 의해서 헤모글로빈 $5\mu\text{l}$, 혈청 $50\mu\text{l}$, 소량의 crystal sucrose, bromophenolblue (BPB) $5\mu\text{l}$ 를 혼합한 다음 이중 $15\mu\text{l}$ 를 취하여 실험재료로 사용하였다.

겔의 조성은 7.5%의 acrylamide와 0.38%의 N, N'-methylene bis-acrylamide를 포함하는 용액과 0.09%의 ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)를 포함하는 0.09 M의 tris-boric acid buffer (PH 8.29)를 4:1로 혼합한 다음, N, N, N', N' - tetra-methylethylene - diamine (TEMED)와 ammonium persulfate를 각각 0.1%와 0.067%가 되게 하여 사용하였다.

Electrode buffer는 EDTA가 0.09%인 0.09 M의 tris-boric acid buffer (PH 8.9)를 사용하였으며 전기영동은 50 mA로 7시간 동안 실시하였다.

(2) Transferrin

혈청 50 μ l, 소량의 crystal sucrose, BPB 5 μ l 를 혼합하고, 이중 15 μ l 를 취하여 공시재료로 사용하였다.

겔의 조성은 acrylamide 15 %와 N, N'-methylene bisacrylamide 0.4 % 인 용액과 3 M의 tris-HCl buffer (PH 8.2)를 2 : 1로 혼합하여 이를 3 / 5로 희석하고 TEMED와 ammonium persulfate를 각각 0.07 %와 0.05 %가 되게 혼합하여 사용하였다.

Electrode buffer는 0.01 M tris-0.08 M glycine (PH 8.9)를 사용하였으며 50 mA로 4시간 동안 전기영동을 실시하였다.

3. 염색 및 탈색법

전기영동이 끝난 다음 haptoglobin을 분석하기 위해서는 Braend와 Stormont (1964)의 방법을 택하였으며 염색액은 benzidine 0.01 %, dimethyl sulfoxide 0.33 %, acetic acid 0.33 % 그리고 hydrogen peroxide가 0.33 %인 용액을 사용하였다.

Transferrin은 전기영동이 끝난 다음 Kuehnl과 Spielmann (1978)의 방법으로 coomassie brilliant blue (R 250, Sigma)로 30분 동안 염색한 다음 destaining solution으로 탈색시켰다. 염색액은 coomassie brilliant blue (R 250, sigma) 0.25 % methanol 45 % 그리고 acetic acid가 9 %인 용액을 사용하였고, 탈색액은 ethanol 30 % acetic acid 7.7 %가 되게 하여 사용하였다.

4. Gel Scanning

염색을 마친 겔들을 각 개체별로 절단, 412nm와 465nm에서 (Yokohama 등, 1979) scanning하여 비교 검토하고 412 nm에서의 densitometer tracing을 작성했다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

제주도산 조랑말 100두에서 채혈하여 분리한 말 혈청을 polyacrylamide 겔 (PH 8.9) 전기영동법에 의해 haptoglobin 을 분석한 결과는 그림 1에 보는 바와 같이 HP 1-1 형만의 검출되어 이를 더욱 명백히 하기 위하여 gel scanning 을 한 결과 monomorphic 한 양상을 나타내었다 (그림 2).

이는 전분 겔 전기영동법을 이용하여 말의 혈청에서 haptoglobin 의 개체적 차이를 설명하려 했으나 개체변이가 나타나지 않았다는 Braend 와 Stormont (1964) 의 보고, Shim 과 Bearn (1964) 의 사람 및 원숭이, 고양이, 쥐, 말의 혈청내 haptoglobin subtype 들에 대한 보고에서 사람을 제외한 다른 동물에서는 HP 1-1 형만이 검출되어 monomorphic 한 양상을 나타낸

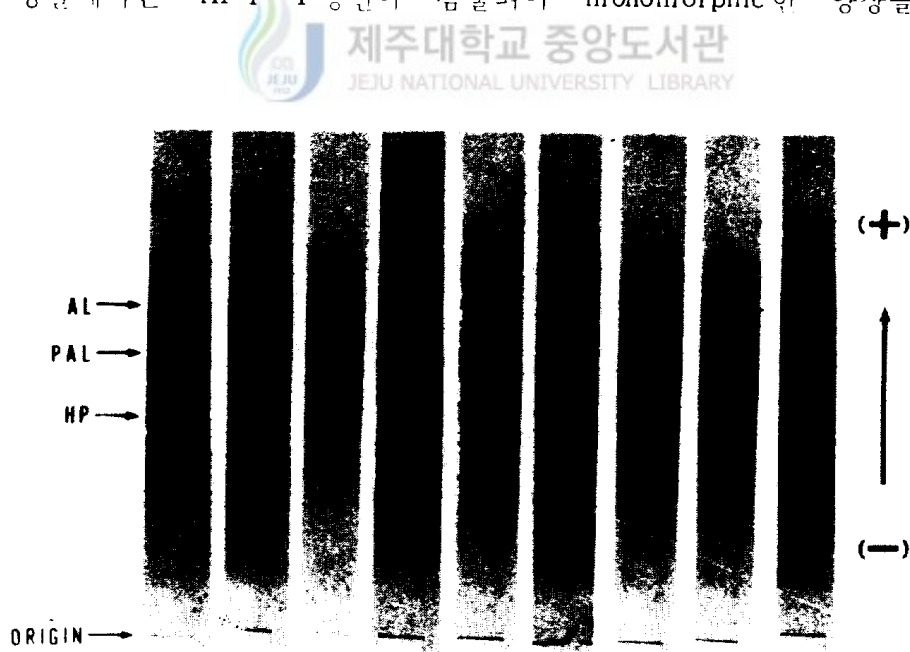


Fig. 1. Haptoglobin phenotypes of horse sera by polyacrylamide gel electrophoresis.

HP, haptoglobin ; PAL, post-albumin ; AL, albumin

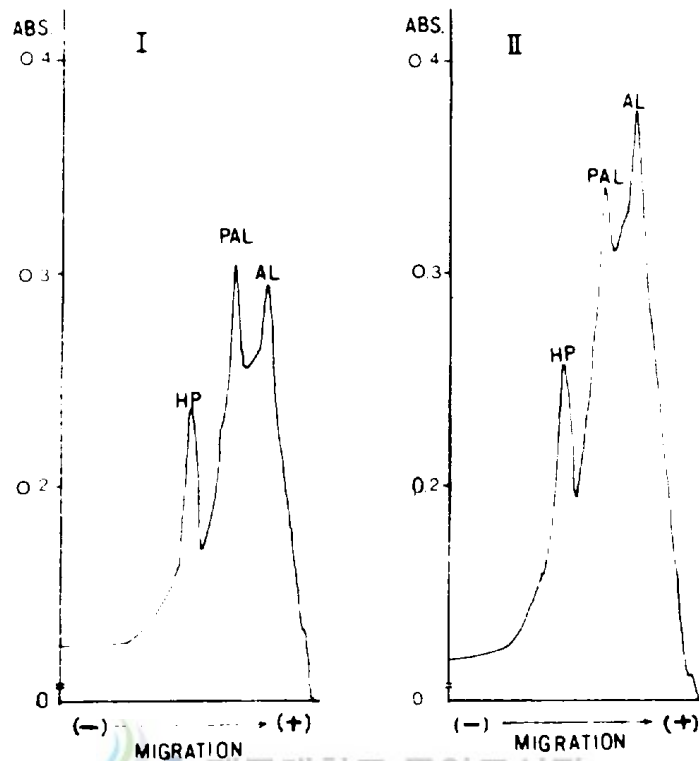


Fig. 2. Densitometer tracings (412nm, I and 465nm, II) of haptoglobin phenotypes separated by polyacrylamide gel electrophoresis. HP, haptoglobin; PAL, post-albumin; AL, albumin

것과 같은 결과를 보여 주었다. 이러한 monomorphic 한 양상이 실험 방법상의 차이에 따른 결과인지 여부를 확인하기 위하여 사람의 혈청을 가지고 동일한 방법으로 전기영동을 실시한 결과 3 가지 Phenotype 이 확인되지만 말인 경우는 HP 1-1 형 1 가지 Phenotype 만이 확인되고 다만 이동속도가 다른 결과를 보여주고 있어 (그림 3, 4), 실험방법상의 차이에서 오는 결과가 아님을 확인할 수 있었다.

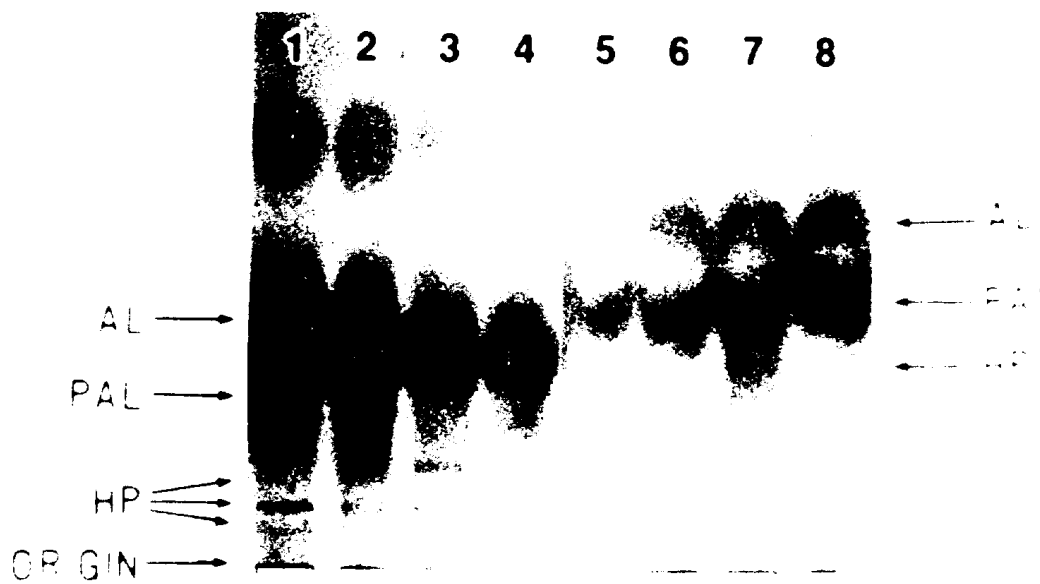


Fig. 3. Comparison of human haptoglobin phenotypes with horse haptoglobin phenotype by polyacrylamide gel electrophoresis. From No.1 to 4 are human samples and from No.5 to 8 are horse samples.

Anode is at the top.

HP, haptoglobin; PAL, post-albumin; AL, albumin

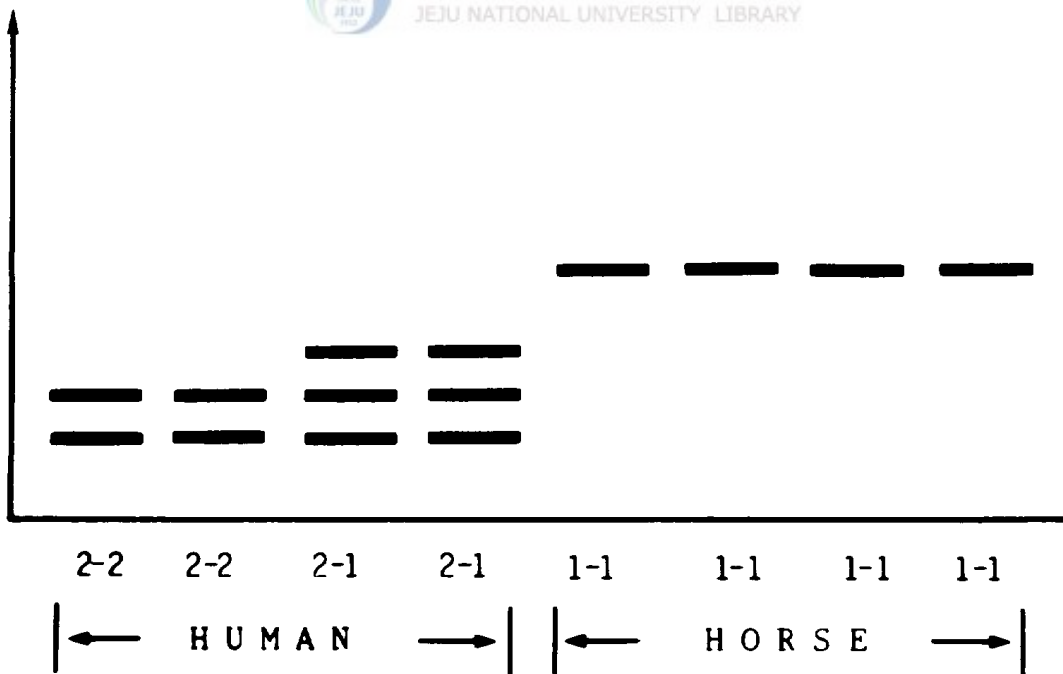


Fig. 4. Diagram of human and horse's haptoglobin phenotypes in Fig.3. Anode is at the top.

Transferrin의 전기영동상은 그림 5에서 보는 바와 같으며 그 중에서 하나를 412 nm와 465 nm에서 gel scanning을 행하고 densitometer tracing을 비교 검토하여 (그림 6), electrophoretic pattern에서의 각 band의 흡광도 차가 크게 나타나는 파장인 412 nm에서 그림 5에 몇가지 겔을 각각 Scanning하여 조사한 결과 개체별로 transferrin의 전기영동상의 양적인 차이는 인정할 수 있었으나 표현형은 Tf D homozygote만이 검출되어 monomorphic한 양상을 보여 주었다. (그림 7)

말 집단내 transferrin에 관한 연구로는 tris-citrate-EDTA-borate 전분 겔 전기영동법을 이용해 Shetland 조랑말과 Thoroughbred, Arabian 과 Appaloosa 말 집단에서 6개의 대립유전자 (Tf^D, Tf^F, Tf^H, Tf^M, Tf^O, Tf^R)에 의해 지배되고 있는 16개의 Subtype들이 나타났다고 보고된 바가 있으며 (Braend와 Stormont, 1964), tris-citrate-lithium hydroxide-borate

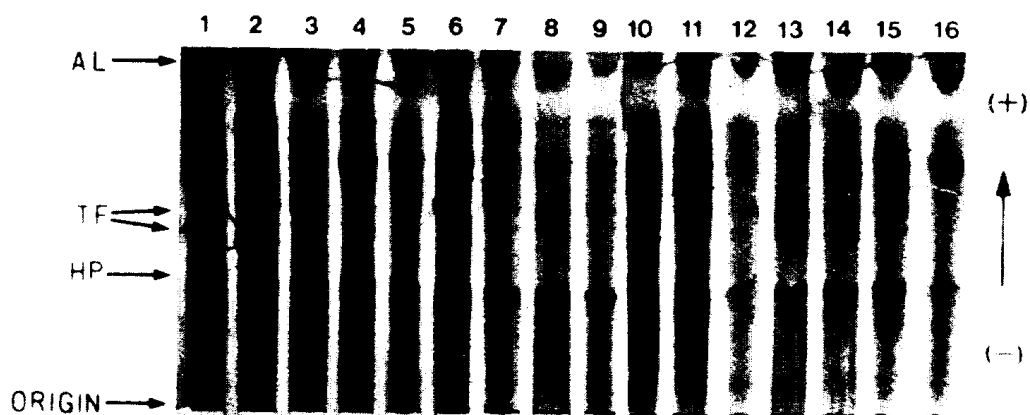


Fig. 5. Transferrin phenotypes of horse sera by polyacrylamide gel electrophoresis.

The numbers indicate the independent horse sera.
HP, haptoglobin; TF, transferrin; AL, albumin

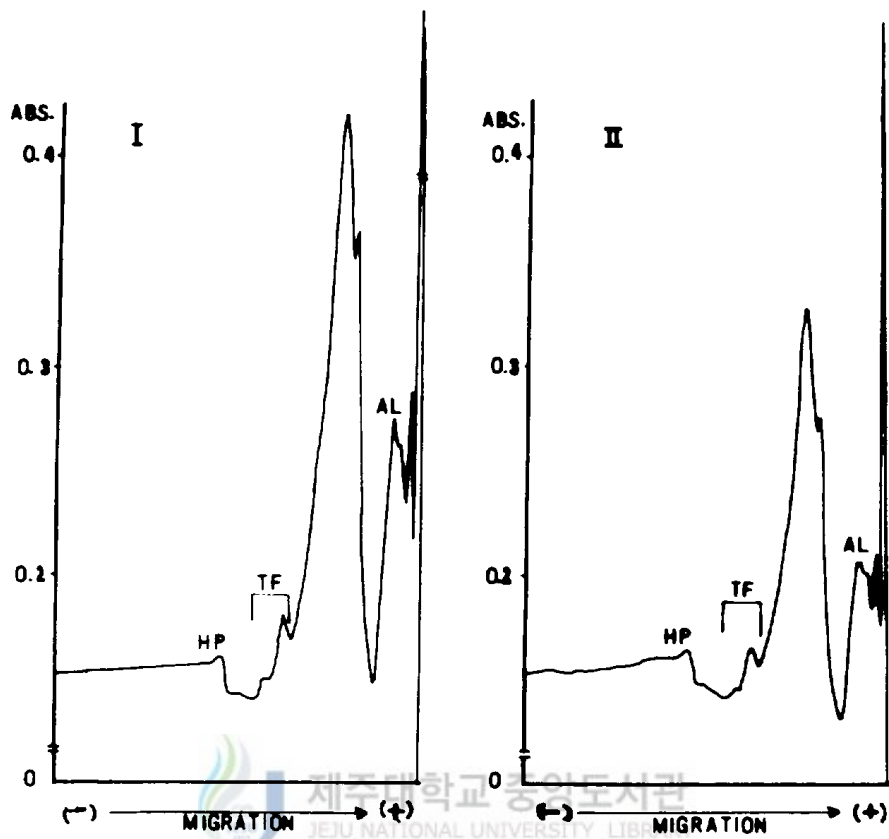


Fig. 6. Densitometer tracings (412nm, I and 465nm, II) of transferrin phenotypes separated by polyacrylamide gel electrophoresis. The applied sample was the horse serum (Number 1) represented at Fig. 5.
HP, haptoglobin; TF, transferrin; AL, albumin

전분 겔 전기영동법에 의해 Italy의 말 집단에서도 16가지 subtype들이 보고되었고 (Gahne, 1965), 최근에 본 연구와 동일한 방법으로 행한 미국의 말 집단에서의 연구결과는 8가지 Subtype들이 확인되었으나 (McGuire와 Weitkamp, 1980), 본 연구에서는 monomorphic하게 Tf D homozygote만이 나타나고 있어 매우 흥미로운 결과로 생각되며 왜 이러한 현상이 나타나는지에 대해서는 여러 종류의 혈청단백에 대한 연구가 이루어

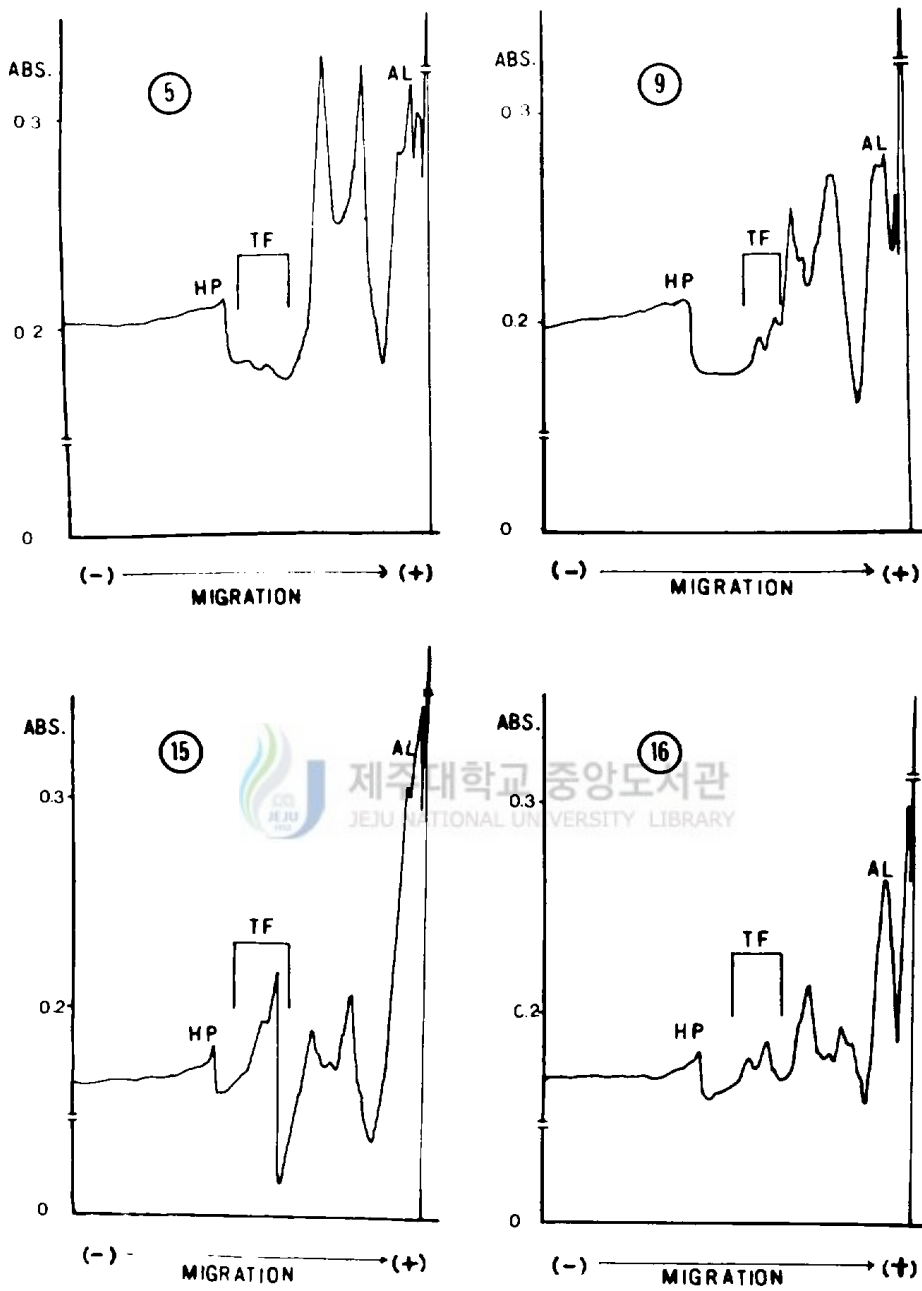


Fig. 7. Densitometer tracings of transferrin phenotypes separated by polyacrylamide gel electrophoresis. The applied samples were the horse sera (Number 5, 9, 16 and 17) represented at Fig.5. HP, haptoglobin; TF, transferrin; AL, albumin

진 후에야 밝혀질 수 있을 것으로 보이나 원서로서는 제주도 내에서 사
육되고 있는 말의 이용도가 낮아짐으로 해서 사육두수가 현저히 감소되고
있기 때문에 근친간의 교배로 인한 결과가 아닌가 추정할 수 있는 정도
에 불과하여 이에 대한 더 많은 연구를 해볼 필요가 있을 것으로 사료
된다.



Ⅳ. 적 요

제주도산 조랑말 집단에서 채혈한 혈청 단백을 polyacrylamide 겔 전기영동법에 의해서 haptoglobin 과 transferrin 을 각각 분석하고 gel scanning 을 하여 phenotype 을 분석한 결과, haptoglobin 은 HP1-1 형만이 검출되어 monomorphic 한 양상을 나타냈고, transferrin 은 TfD homozygote 만이 검출되었는데 이는 사육 두수가 현저히 감소되어 근친간의 교배로 인한 결과로 추정되지만 더 많은 연구가 행해진 뒤에야 밝혀질 수 있을 것으로 보인다.



REFERENCES

- Aisen, P., S.H. Koenig and W. E. Schillinger, 1970. Absence of dimers and nature of iron binding in transferrin solutions. *Nature* 226:859-861.
- Allison, A. C., 1959. Genetic control of human obin synthesis. *Nature* 183:1312-1314.
- Brand, M. and C. Stormont, 1964. Studies on hemoglobin and transferrin types of horses. *Nord. Vet. Med.* 16:31-37.
- Connell, G.E., G.H. Dixon and O. Smithies, 1962. Subdivision of the three common haptoglobin types based on "Hidden" differences. *Nature* 193:505-506.
- Fletcher, J. and E.R. Huehns, 1968. Function of transferrin. *Nature* 218:1211-1214.
- Giblett, E. R., 1969. "Genetic markers in human blood." Chapter 3. Blackwell, Oxford.
- Kirk, R. L., L.Y.C. Lei, G.H. Vos, L. P. Vidyarthi, 1962. A genetical study of the orans of the Chota Nagpur Plateau (Bihar India). *Anim. J. Physiol. Anthropol.* 20:375-385.
- Kuehnl, P. and W. Spielmann, 1978. Transferrin; Evidence for two common subtypes of the Tf^C allele. *Hum. Genet.* 43:91-95.
- Lee, C. C. and M. Y. Oh, 1983. Gene frequencies and phenotypes of transferrin C subtypes and haptoglobin in Korean population. *Korean J. Zool.* 26:211-217.
- Maeda, K., H. A. McKenzie and D. C. Shaw, 1980. Nature of the heterogeneity within genetic variants of bovine serum transferrin. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 11:63-75.

- McGuire, T.R. and L. R. Weitkamp, 1980. Equine marker genes. Polymorphism for transferrin alleles, Tf^{F1} and Tf^{F2}, in thoroughbreds. *Anim. Genet.* 11:113-117.
- Mogi, K., T. Able and T. Hosoda, 1970. Studies on serum protein types in horses. *Jap. J. Zootech. Sci.* 41:400-406.
- Pascali, L., D. Ranalletta and P. Auconi, 1982. Improved typing of human serum transferrin by isoelectric focusing on ultrathin layer polyacrylamide slab gels. *Hum. Genet.* 61:39-41.
- Sandberg, K. and L. Andersson, 1984. Genetic linkage in the horses. *Hereditas* 100:199-208.
- Shim, B.S. and A.G. Bearn, 1964. The distribution of haptoglobin subtypes in various populations. Including subtype patterns in some nonhuman primates. *Anim. J. Hum. Genet.* 16:477-483.
- Smithies, O., 1957. Variations in human serum beta-globulin. *Nature* 18:1482.
- Stratil, A. and R.L. Spooner, 1971. Isolation and properties of individual components of cattle transferrin: The role of sialic acid. *Biochem. Genet.* 5:347-365.
- Thymann, M., 1978. Identification of a new serum protein polymorphism as transferrin. *Hum. Genet.* 43:225-229.
- Tomita, T., K. Mogi, K. Esaki, J. I. Hayakawa, J. I. Bito, K. Notawa, K. Kon-do and T. Hosoda, 1962. Immunogenetic studies on blood groups of the horse. *Jap. J. Zootech. Sci.* 33:265-271.
- Wang, A. C., H. E. Sutton and A. Riggs, 1966. A chemical difference between human transferrins B2 and C. *Anim. J. Hum. Genet.* 18:454-458.
- Wang, A.C. and H. E. Sutton, 1967. Transferrin D1: Identify in australian aborigines and american negroes. *Science* 156:936-937.

Yokohama, M., M. Kuwajima, N. Miura, M. Inoue, K. Mogi and T. Hosoda, 1979.
The isolation of pure horse transferrin protein by DEAE sephadex
chromatogram and gel filtration and the production of the corresponding
specific antibody. J. Zootech. Sci. 50:705-709

