Korean J. Ichthyol. 4 (1), 96~104, 1992 韓魚誌, 4(1), 96~104, 1992

짱뚱어, *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)의 肝 筋肉組織內 蛋白質 電氣泳動 分析 및 蛋白質, RNA 含量 變化

鄭義泳・李敏雄*・李根光**・崔秀慶*・吳永男***
群山大學校 海洋開發學科・* 東國大學校 應用生物學科
** 群山大學校 水族病理學科・*** 群山大學校 海洋開發研究所

앞서 보고한 雌性 짱뚱어 肝組織의 蛋白質 電氣泳動分析 및 蛋白質, 核酸의 함량 변화 조사에 이어서 雄性 짱뚱어, *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)의 性成熟에 따른 간조직과 雄性 및 雌性 짱뚱어의 筋肉組織內 蛋白質 電氣泳動分析과 定量 및 RNA 含量 變化를 조사하였다.

간과 근육을 이루고 있는 단백질을 SDS-PAGE 분석한 결과 雄性 짱뚱어의 肝組織을 이루고 있는 단백질은 대개 분자량이 15.8~101.5kd 사이에 존재하였고, 전체 19개의 밴드가 나타났다.

雄性 및 雌性 짱뚱어의 근육 조직을 이루고 있는 단백질 밴드도 거의 동일하며 분자량이 대개 16.9~116.5kd 사이에 존재하였다. 전체 23개의 밴드가 나타났다.

또한 雄性 짱뚱어의 간조직에 있어서, 단백질 함량은 정소의 成熟期인 6월에 최고값을 나타냈으며, 放精期인 7월과 退化期인 8월에는 점차로 감소하는 경향을 보였다. 근육조직에서는 雌・雄性 모두 6월에 최고값을 나타내었으나, 그후 점차 감소하여 7월에 최저값을 나타내었다가 8월에는 약간 증가하는 경향을 보였다.

雄性 짱뚱어의 간조직과 雄性 및 雌性 짱뚱어의 근육조직의 총RNA 함량은 成熟期(6월)에 최고값을 나타내었고, 産卵期(7月) 및 退化期(8月)로 되면서 점차 감소하였다.

緖 論

우리나라 西海岸의 汽水域에 서식하는 짱뚱어 *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaus)는 망둥어과에 속하는 어류로서 몸에는 푸른 반점이 있고, 갯벌에서 포복도약하는 특징을 갖는 水陸兩生魚로 미식가들이 즐겨찾는 어류로 널리 알려져 있다(Chung *et al.*, 1989).

그러나 현재는 이들 자원이 연안의 각종 환경오염으로 인해 점차 감소하여 극히 한정된 지역에서만 서식하고 있어 이들 어류에 관한 연구가 매우 시급한 실정이다. 지금까지 本 種에 관해 硏究・報告된 것은 日本産 짱뚱어의 分布와 成長(Onohara, 1980; Igita, 1985), 生活史(Uchida, 1932), 年齡의 特徵(Tsukamoto *et al.*, 1983), 産卵(Uchida, 1931)과 人工增植(Dotsu and Nakano, 1982; Koga *et al.*, 1989 a,b,c; Noda and Koga, 1990 a,b; Yuzuriha and Koga, 1990)들의 연구가 이루어져 있다. 우리나라에서는 本 種의 형태학적인 측면(Ryu, 1979; 1980)과 생태(Ryu, 1991)에 관해 연구 보고된 것을 비롯하여, 性成熟(Chung *et al.*, 1989; 1991 a,b), 농약에 의한 급성 독성 및 아가미의 組織病理學的 硏究(Cho and Chung, 1989)가 있으며, 核形分析 및 核酸定量(Chung *et al.*, 1991 a), 雌性 짱뚱어 간 세포의 활성 변화 및 간 조직의 단백질, 핵산 함량에 관한 연구(Chung *et al.*, 1991 a,b)등의 연구가 보고되어 있다. 따라서 本 硏究에서는 雄性 짱뚱어의 性成熟에 따른 肝組織과, 雄性 및 雌性 짱뚱어의 근육조직내 단백질의 전기영동과 정량, RNA 함량변화를 조사한 결과 性成熟 時期에 따른 本 種의 生化學的, 分子生物學的 特性변화에 관한 基礎資料를 얻었기에 보고한다.

材料 및 方法

1. 實驗生物

본 실험에 사용한 짱뚱어 *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)는 1989년 4월부터 10월까지 전남 영암군 삼호면 潮間帶(Fig. 1)에서 손으로 採集하여 活魚狀態로 운반하여 사용하였으며, 實驗은 成熟期(6월 하순), 産卵期(7월 하순), 退化期(8월 하순)로 나누어 실시하였다.

2. 組織의 分離

活魚 狀態의 짱뚱어를 실험실에 운반하여 蛋白質 含量과 총RNA 含量을 定量分析하기 위하여 간과 근육조직을 1g씩 채취한 후 同量의 인산 緩衝溶液(pH7.0)과 혼합하여 유리 균질기를 이용 4℃ 상태에서 均質化시켰다. 이것을 다시 초음파 분쇄기(Braum-sonic 1510)로 200w에서 30초씩 超音波 粉碎를 15~20회 실시하여 세포를 완전히 파괴한 후 3,000×g로 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 -70℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

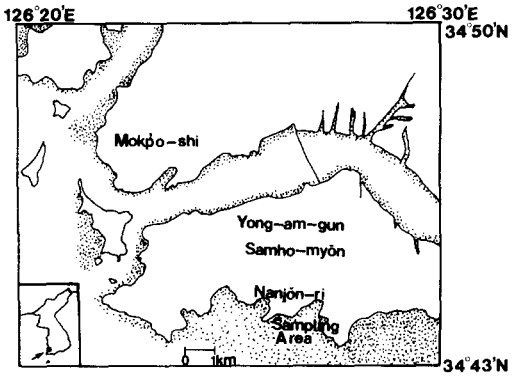

Fig. 1. A map of showing sampling area.

3. SDS-PAGE 전기영동분석

전기영동은 O'Farrel(1975)과 Laemnli(1970)의 방법을 절충하여 실시였다. 먼저 분리한 단백질 시료에 SDS 완충액 (4% SDS, 4% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.12M Tris-base, 0.02% bromophenol blue)을 동량 첨가한 후 100℃에서 3분간 열처리하였으며, 分子量 測定을 위해 분자량 측정용 단백질 (Pharmacia fine chemicals)도 동일한 조건으로 처리한 후 10% SDS-polyacrylamide gel에서 70V로 7시간 전개하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 1% Comassi brilliant blue G-250으로 1시간 염색하고, 50% methanol과 75% acetic acid 혼합용액으로 1시간 固定 脫色시킨 후, 5% methanol과 75% acetic acid 혼합용액을 사용하여 탈색시켜 Densitometer (AMAG)를 이용하여 단백질 樣相을 분석하였다.

4. 蛋白質의 定量分析

蛋白質 定量은 Lowry(1951)법을 변형하여 실시하였으며, 0.01% Bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 그 흡광도를 측정한 후 표준곡선을 작성하고, 試料의 단백질 흡광도를 측정한 후 표준곡선과 비교하여 含量을 계산하였다.

흡광도 측정은 Spectrophotometer (UV-120-02 Shimadzu, Japan)를 이용하여 660nm에서 측정하였다.

5. RNA 定量

RNA는 Schneider(1957) 방법을 절충하여 定量하였다.

結果 및 考察

1. SDS-PAGE 蛋白質 電氣泳動 分析

成熟期인 6월에 雄性 짱뚱어의 肝組織과 筋肉組織, 雌性 짱뚱어의 근육조직을 SDS-PAGE 전기영동으로 분석한 결과는 Table 1과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 짱뚱어를 구성하고 있는 간조직과 근육조직은 분자량이 작은것(15.8kd)에서 부터 큰것(116.5kd)까지 다양하게 구성되어 있는 것으로 나타났다. 간조직을 이루고 있는 단백질은 대개 분자량이 15.8~101.5kd 사이에 존재하였으며, 전체 19개의 밴드가 나타났는데 그중 47.8kd의 분자량을 갖는 밴드는 다른 밴드와는 달리 폭이 넓고 염색 강도가 강했다. 또한 雄性, 雌性 짱뚱어의 근육조직을 이루고 있는 단백질은 분자량이 대개 16.9~116.5kd에 존재하고 있으며, 전체 23개의 밴드로 되어있고, 이중 35.0kd을 갖는 밴드는 다른 밴드와는 달리 폭이 넓고 염색도가 강한 반면, 51.0, 59.6, 81.1kd의 분자량을 갖는 밴드는 35.0kd의 분자량을 갖는 밴드보다 약간 폭이 좁지만 염색 강도가 강하게 나타났다.

Table 1. Estimated molecular weights of polypeptides separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis from liver tissue of male and muscle tissues of *B. pectinirostris*

Mol. Wt. (k dalton)		
Liver	Muscle	
Male	Male	Female
101.5	116.5	116.5
99.2	112.2	112.2
97.2	106.8	106.8
95.0	105.8	105.8
93.0	100.4	100.4
86.5	100.2	100.2
84.2	98.2	98.2
80.0	96.1	96.1
74.8	90.8	90.8
70.5	88.6	88.6
65.0	81.1	81.1
58.5	77.9	77.9
47.8	75.8	75.8
40.3	74.8	74.8
36.0	71.3	71.3
29.8	65.0	65.0
27.5	60.7	60.7
23.2	59.6	59.6
15.8	51.0	51.0
	35.0	35.0
	29.8	29.8
	26.5	26.5
	16.9	16.9

2. 蛋白質 含量分析

雄性 짱뚱어의 性成熟에 따른 간조직과 雄性과 雌性 짱뚱어의 筋肉組織을 구성하고 있는 단백질 함량과 양적 변화는 Table 2와 Fig. 3에 나타난 바와 같이, 肝組織을 이루고 있는 단백질 함량은 成熟期인 6월에는 5.044±0.121 *mg/g*, 放精期인 7월에 4.480±0.052 *mg/g*, 退化期인 8월에 4.320±0.118 *mg/g*으로 점차로 감소되는 것으로 나타났다. 또한 雄性 짱뚱어의 근육조직을 구성하고 있는 평균 단백질 함량은 6월에 2.548±0.120 *mg/g*, 7월에 1.600±0.091 *mg/g*으로 거의 두배가 감소 되었으며, 8월에는 약간 증가되어 1.680±0.112 *mg/g*이었다. 雌性 짱뚱어의 근육조직내 평균 단백질 함량은 成熟期인 6월에 2.688±

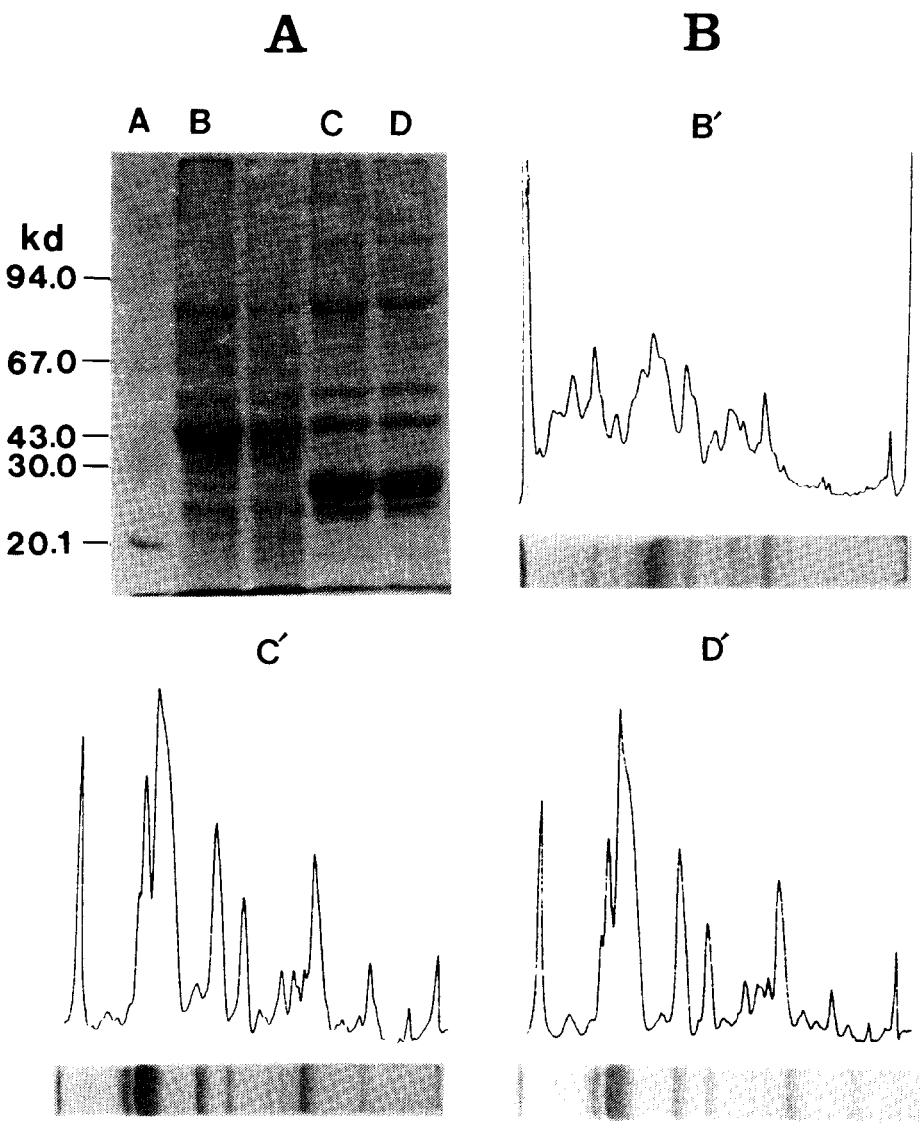

Fig. 2. A : Electrophoretic analysis by 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of total proteins of liver tissue of male and proteins of muscle tissues of *B. pectinirostris*.

B : Densitograms of electrophorized total proteins of liver tissue of male, and muscle tissues of *B. pectinirostris*.

The molecular weights of the standard protein markers shown in lane A : Phosphorylase b, 94,000 ; albumin, 67,000 ; ovalbumin, 43,000 ; carbonic anhydrase, 30,000 ; trypsin inhibitor, 20,100 and α-lactalbumin, 14,000.

Lane B and B' : liver (♂) Lane C and C' : muscle (♂)

Lane D and D' : muscle (♀)

Table 2. Protein contents of liver tissue of male and muscle tissues of *B. pectinirostris* (Mean±SE)

Months	Parts		Protein contents (*mg/g*)
June	L*	(♂)	5.044±0.121
	M**	(♂)	2.548±0.120
	M	(♀)	2.688±0.123
July	L	(♂)	4.480±0.052
	M	(♂)	1.600±0.091
	M	(♀)	1.840±0.132
August	L	(♂)	4.320±0.110
	M	(♂)	1.680±0.112
	M	(♀)	1.880±0.111

*L : liver **M : muscle

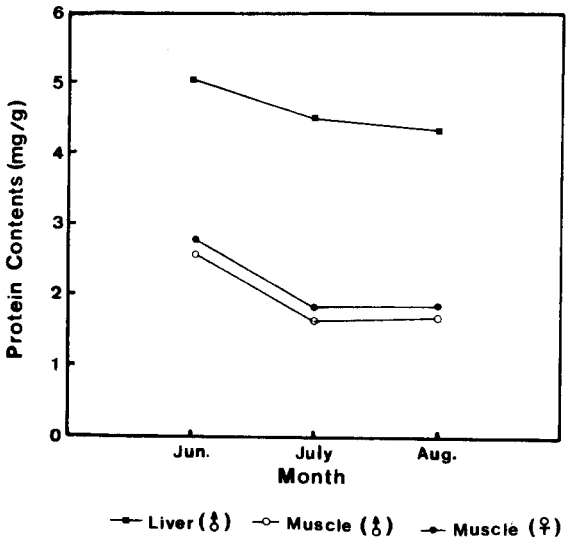

Fig. 3. Changes in protein contents of liver tissue of male and muscle tissues of *B. pectinirostris*.

0.123 *mg/g*, 産卵期인 7월에 1.840±0.132 *mg/g*, 退化期인 8월에는 1.880±0.111 *mg/g*으로 나타나, 7월에 비해 거의 같거나 아주 적은 양이 증가한 것으로 나타났다. Mustafa와 Archana(1982)는 어류 간조직의 단백질 함량은 보통 섭식물에 영향을 받는다고 하였다. 절식시킨 어류와 영양물을 섭이시킨 어류의 간조직과 뇌조직에서 단백질 함량을 조사한 결과 영양물을 섭이한 어류에서 단백질 함량이 증가하였다고 하였다.

본 연구에서는 성성숙에 따라서 간과 근육조직내의 단백질 함량이 크게 다르게 나타났다. 즉 성숙기에 가장 높았고, 퇴화기에는 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

3. RNA 含量分析

雄性 짱뚱어의 性成熟에 따른 간과 雄性 및 雌性 짱뚱어의 근육조직내 총 RNA 함량은 Table 3과 Fig. 4에 나타난 바와 같이, 雄性 짱뚱어의 肝組織 1gr當 相對的 총 RNA 함량은 成熟期인 6월에 0.498±0.034 *mg/g*, 방정기인 7월에 0.284±0.053 *mg/g*, 퇴화기인 8월에 0.296±0.023 *mg/g*으로 나타났다. 그리고 웅성 짱뚱어의 근육조직에서의 RNA 함량은 6월에 0.349±0.021 *mg/g*이었으며, 7월에 0.236±0.041 *mg/g*, 8월에 0.191±0.031 *mg/g*으로 성숙기인 6월에 간과 근육조직내에서 RNA 함량이 최고값을 보였고, 放精期와 退化期인 7, 8월을 거치면서 점점 줄어든 것으로 나타났다. 雌性 짱뚱어의 근육조직내 평균 총 RNA 함량은 성숙기(6월)에 0.455±0.031 *mg/g*, 방란기(7월)에 0.395±0.002 *mg/g*, 퇴화기(8월)에 0.403±0.021 *mg/g*이었다. 이 결과로 볼 때 단백질 함량과 RNA 함량은 正相關關係를 나타냈다.

Imura와 Saito(1969)는 Kokanee salmon의 일부 조직에서 핵산함량의 계절적 변화를 조사하였는데 조사한 모든 조직에서 산란기간 중에서 RNA 함량이 감소하였다고 보고하였다. 또한 Chung *et al.* (1986)의 노래미 (*Agrammus agrammus*)의 성성숙에 따른 간세포의 활성변화 연구에서 방란직전의 암컷의 간 세포질 내에는 글리코겐과 지방적들이 급격히 감소되나, 호염기성 물질(RNA)은

Table 3. RNA contents of liver tissue of male and muscle tissues of *B. pectinirostris* (Mean±SE)

Months	Parts		Total RNA (*mg/g*)
June	L*	(♂)	0.498±0.034
	M**	(♂)	0.349±0.021
	M	(♀)	0.455±0.031
July	L	(♂)	0.284±0.053
	M	(♂)	0.236±0.041
	M	(♀)	0.395±0.002
August	L	(♂)	0.296±0.023
	M	(♂)	0.191±0.031
	M	(♀)	0.403±0.021

*L : liver **M : muscle

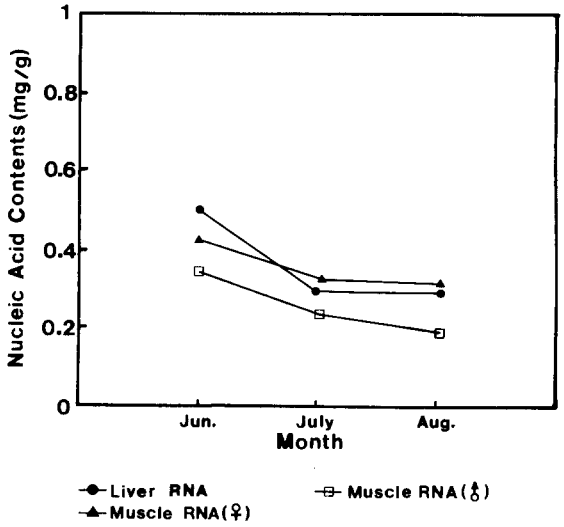

Fig. 4. Changes in RNA contents of liver of male and muscle tissues of B. pecitinirostris.

세포질의 주변 구역에서 高濃度로 나타나고 있고, 방란 이후에는 이와 반대의 현상이 관찰되었으며, 숫컷의 경우 성적으로 성숙함에 따라 간세포질내에 호염기성 물질이 점차로 증가하며 암컷과 달리 글리코겐과 지방적의 양도 다량으로 관찰되는 반면, 방정기 이후에는 간세포질내의 호염기성 물질들은 감소하고 있다고 보고하였다. Aida *et al.* (1973)은 은어에서 Kaneko와 Hirose(1984)은 점망둑에서 난소가 성숙하여 감에 따라 간세포에는 호염기성인 핵산물질의 축적과 단백질 합성이 활성화된 상태를 나타내고 있으며, 방란기에는 이들 물질이 감소되는 현상이 나타나고 있다고 하였는데 이와 같은 현상은 이미 보고된 雌性 짱뚱어 (Chung *et al.*, 1991, a,b)에서도 유사하게 나타나고 있다.

引 用 文 獻

Aida, K., P. V. Ngan and T. Hibiya. 1973. Physiological studies on gonadal maturation of fishes I. Sexual difference in compensation of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. Bull. Jap. Soc. Fish. 38 (11): 1091-1106.

Cho, W. H. and E. Y. Chung. 1989. The acute toxicity and histopathological study of the gill of *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus) by the agricultural medicines (Diaton, Reldan). Marine Development Research of Kunsan Nat. Univ. 1 (1): 67-88. (in Korean)

Chung, E. Y., H. B. Kim and T. Y. Lee. 1986. Changes of the activity of the liver cells accompanied with the reproductive cycle of greening, *Agrammus agrammus* (Temminck et Schlegel). Bull. Kor Fish. Soc. 19 (1): 83-91.

Chung, E. Y., B. S. Ryu and J. R. Kim. 1989. A study on the process of the ovarian maturation of the bluespotted mud hopper, *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus). Marine Development Research of Kunsan Nat. Univ. 1 (1): 19-36.

Chung, E. Y., K. K. Lee and Y. N. Oh. 1991a. Studies on the karyotype analysis of protein and nucleic

acid contents of the muscle tissue of female *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnarus). Marine Development Research of Kunsan Nat. Univ., 3 (1): 27-38. (in Korean)

Chung, E. Y., K. K. Lee and Y. N. Oh. 1991b. Studies on changes of the activity of the hepatic cells, and variations of protein and nucleic acid contents of the liver tissue with the ovarian development phase of female *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus). Korean J. Ichthyol. 3 (1): 48-57. (in Korean)

Dotsu, R. and M. Nakano. 1982. A study on the proliferation and culture of *Boleophthalmus chinensis*. 1. Spawning behavior and collection egg by the artificial maturation. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ. 35: 1-13. (in Japanese)

Igita, K. 1985. Ecological study of *Boleophthalmus pectinirostris* II. Distribution of the juvenile and young stage in the river. Bull. Saga Pref. Ariake Fish. Exp. Stn. 7: 123-15. (in Japanese)

Imura, K. and T. Saito. 1969. Seasonal variations in the metabolic activities of tissue constituents of some fishes I. Changes in nucleic acid contents of some tissues of Kokanee salmon, *Oncorhynchus nerka* f. kenerlyi. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 20: 202-210. (in Japanese)

Kaneko, T. and I. Hirose. 1984. Annual reproductive cycle of a tidepool-living goby *Chasmichthys dolichognathusb*. Bull. Jap. Soc. Sci. fish. 50 (9): 1535-1540. (in Japanese)

K ga, H., T. Noguchi and K. Nakatake. 1989a. Studies on artificial propagation of mud skipper *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)-I Rearing of adult mud skipper. Bull. Saga Prefectural Ariake Fish. Exp. Sta. 11: 1-7. (in Japanese)

Koga, H., T. Noguchi and K. Kinoshita. 1989b. Studies on artificial propagation of mud skipper *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)-II. Collecting Eggs by artifical spawning nest and spawing conditions. Bull. Saga Prefectural Ariake Fesheries Experimental Station. 11: 9-16. (in Japanese)

Koga. H., S. Noda, T. Noguchi and I. Aoto. 1989c. Studies on artificial propagation of mud skipper *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)-III. Hatching and larval rearing. Bull. Saga Pref. Ariake Fish. Exp. Stn. 11: 17-28. (in Japanese)

Lamnli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Lowry, O. H., J. N. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Frolin phenol reagent. J. Biol. Chem., 103: 2650-275.

Mustafa, S and M. Archana. 1982. Protein, RNA and DNA levels in liver and brain of starved catfish *Clarias batrachus*. Jap. J. Ichthyol., 28 (4): 396-400.

Noda, S and H. Koga. 1990a. Studies on artificial propagation of mud skipper *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)-IV. Feed of young fishes. Bull. Pref. Ariake Fish. Exp. Stn. 12: 1-6. (in Japanese)

Noda, S and H. Koga. 1990b. Studies on artificial propagation of mud skipper *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)-V. Rearing young fishes in winter. Bull. Pref. Ariake Fish. Exp. Stn. 12: 7-13. (in Japanese)

O'Farrel, P. H. 1975. High resolution two-dimesional electrophoresis of proteins J. Biol. Chem. 250: 4007-4021.

Onohara, T. 1980. Ecological study of *Boleophthalmus chinensis* (OSBECK). I. on the fish production distribution and growth. Bull. Saga Pref. Ariake fish. Exp. Stn. 7: 123-150. (in Japanese)

Ryu, B. S. 1979. A study morphological characters of *Boleophthalmidi* fish scale. Bull. Gunsan fish. J. Coll. 13 (1): 15-23. (in Korean)

Ryu, B. S. 1980. Studies on the vertebral characters of *Boleophthalmus chinensis*. Bull. Gunsan fish. J. coll. 14 (3): 83-90. (in Korean)

Ryu, B. S. 1991. Taxonomy and eclogy of mud skippers, the Subfamily Gobionellinae (Pisces, Gobiidae) from Korea. Graduated School Junbuk Nat. Univ. Phd. thesis. (in Korean)

Schneider, W. C. 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. In Colowick, S.P. and N. O. Kaplan. eds.: Methods in Enzymology. Vol. 3. Academic Press, New York, 1154pp.

Tsukamoto, M., T. Onohara, K. Ushirogawa and S. Matsuura. 1983. A study on age characters of the mud skipper *Boleophthalmus chinensis*. Bull. Jap. Soc. Sci. fish. 49 (1): 69-74. (in Japenese)

Uchida, K. 1931. Spawning of *Boleophthalmus pectinirostris* and *Periophthalmus cantonensis*. Sci. 1 (6): 226-227. (in Japanese)

Uchida, K. 1932. Life history of *Boleophthalmus pectinirostris*. Bull. Japan Soc. Sci. Fish. 7 (2): 109-117. (in Japanese)

Yuzuriha, M and H. Koga. 1990. Ecological study of mud skipper *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)-III. Appearance and distribution of larvae and Juveniles. Bull. Saga Pref. Ariake Fish. Exp. Stn. 12: 15-20. (in Japanese)

Studies on the Electrophoretic Analysis of Protein, Variations of Protein and RNA Contents of the Liver and Muscle Tissues of *Boleophthalmus pectinirostris* (Linnaeus)

Ee-Yung Chung, Min-Woong Lee*, Keun-Kwang Lee**
Soo-Kyung Choi* and Young-Nam Oh***
Department of Marine Development, Kunsan National University,
Kunsan, 573-360, Korea
* Department of Applied Biology, Dongkuk University,
Seoul, 100-715, Korea
** Department of Fish Pathology, Kunsan National University,
Kunsan, 573-360, Korea
*** Institute of Marine Development, Kunsan National University,
Kunsan, 573-360, Korea

The electrophoretic analysis, variations of protein and nucleic acid contents with sexual maturation, of the liver tissue of male, and of the muscle tissue of male and female *B. pectinirostris* (Linnaeus) were investigated.

As the result of protein analysis of the liver and muscle tissue of male by the SDS-PAGE electrophoretic analysis, the protein of the liver tissue of male was presented 15.8-101.5kd in molecular weight, and appeared 19 bands in all.

The protein bands of the muscle tissues of male and female were almost same, their bands were presented 16.9-116.5kd in molecular weight, and appeared 23 bands in all. And in the liver tissue, the protein contents of the liver tissue of male appeared the maximum in June (the mature stage) and afterwards decreased gradually in July (the spawning stage) and August (the degenerative stage). In the muscle tissues of male and female protein contents were shown the maximum in June, and afterwards decreased gradually, the minimum in July, increased a little in August.

The total RNA contents of the liver tissue of male, and their contents of the muscle tissue of male and female appeared the maximum in June (the mature stage), and afterwards decreased gradually in July (the spawnin stage) and August (the degenerative stage).