

참굴 *Crassostrea gigas* 의 정량적 산란량 측정을 위한 면역학적 기법 개발

강상균 · 불가코프 · 최광식 · 김윤*

제주대학교 해양생산과학부 · *국립수산진흥원 남해수산연구소

서론

굴을 포함한 대부분의 해양 무척추동물들은 동일종이라도 먹이조건과 온도조건에 의해 성장과 발육, 번식초기연령이나 최소번식 크기 등에 큰 차이를 보인다. 굴의 번식수단 및 생활사를 이해하기 위해서는 번식이나 생활사에 관한 속성을 보다 수량적으로 확인하고 동시에 개체군 생태학적인 지견을 가질 필요가 있다 (윤, 1996). 대서양산 굴, *Crassostrea virginica*에 대하여 Lee and Heffernan (1991)은 알의 지질과 단백질 조성을 밝히고 생화학적 특성을 보고하였으며, Choi et al. (1993)는 면역학적 방법을 이용하여 번식량에 대한 정량적인 연구를 보고한 바 있으나, 이와는 대조적으로 참굴 *C. gigas*의 알 및 번식량에 대한 연구는 미비한 실정이다.

이 연구는 1)알의 정제 기술 개발 및 발생기간 중 영양원과 에너지원으로 중요한 2)알 내의 단백질, 탄수화물 및 지질 조성을 밝히고 3)참굴의 정량적인 산란량을 추정하기 위한 면역학적인 기법을 개발함으로써 참굴의 번식 생리에 관한 기초 자료를 수집하는데 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

분석에 사용된 참굴, *Crassostrea gigas* 는 경상남도 고성군 고성만의 연승수하식 양식장에서 산란기인 1999년 6월에 채집하였다. 채집된 굴은 광학현미경으로 암·수를 구분하였고 그 중, 성숙한 암컷의 외투강을 절개하여 Petri dish에 올려놓고 생식소 부위를 압박하여 알을 분리하였다. 분리된 알은 일정량의 Phosphate-Buffered Saline (PBS, pH 7.4)과 혼합한 후, 망목 크기 100 μm 인 채와 60 μm 인 채로 불순물을 걸러주었고, 저속으로 원심분리 (1000 R.P.M., 10 min., 4°C)하여 상등액 내의 잔여 불순물을 제거하였다. 정제된 알은 광학현미경을 이용하여 관찰하였다 (Choi et al., 1993).

순수 정제된 참굴 알의 수를 혈구계수기를 이용하여 추정하였고 동결건조하였다. 총 건조중량을 측정한 후, 총 건조중량을 전체 알의 수로 나누어 참굴 알 하나의 건조중량을 추정하였다 (Egg Dry Weight = Total Dry Weight of Eggs / Total Number of Eggs). 알에 포함된 단백질은 BCA Protein assay Kit를 이용하여 정량하였고, 탄수화물은 페놀-황산 정량법

(Dubois et al, 1956), 지질은 크로로폼-메탄을 정량법 (Bligh and Dyer, 1959)을 이용하여 각각 정량하였다.

항체 개발을 위해 0.5 mg/ml (in PBS, pH 7.4) 농도의 참굴 알 단백질 0.5 ml와 동일량의 Freund's Complete Adjuvant (FCA)를 혼합하여 토끼의 등 피하 및 대퇴부에 주사하였고 2주 후, 동일한 항원 단백질과 Freund's Incomplete Adjuvant (FIA)를 혼합하여 격주 간격으로 3회 주사하였다. 마지막 주사 2주 후, 귀동맥에서 혈액을 채취하였다. 항혈청과 알을 제외한 다른 조직과의 교차반응은 항원 단백질이 결합된 glutaraldehyde 흡착제를 사용하여 교차반응을 제거하였고, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 25% 포화시켜 IgG를 침전·분리하였다 (Sara F and M. Sela, 1979). 개발된 항체의 특이성과 감도 확인을 위해 ELISA를 이용하였다. 항원 단백질로 참굴 알 단백질 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 2배수로 5 ng까지 희석하여 사용하였고, 대조구로 외투막, 아가미, 순관, 폐각근 추출물을 사용하였다. 1차 항체로 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rabbit anti-oyster eggs IgG, 2차 항체로 1/500으로 희석된 Alkaline Phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG를 각각 사용하였다. 발색기질로 1 mg/ml pNPP (in 0.1 M glycine buffer)를 사용하였고, microplate reader를 이용하여 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 요약

정제된 참굴 알을 광학현미경으로 관찰한 결과, 알 이외의 불순물이 발견되지 않았다. 알의 무게와 생화학적 조성은 *C. virginica* 알과 유사하였는데, 참굴 알 하나의 무게는 13 ng 정도로 추정되었고, 단백질이 41.3%, 탄수화물이 11.7%, 지질이 25.5% 포함되어 있었다 (Lee and Heffernan, 1991). ELISA 결과, glutaraldehyde 흡착제를 이용하여 교차반응을 제거시킨 항체는 참굴 알에 특이적으로 반응하였으며, 감도는 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위였다.

사 사

이 연구는 해양수산부의 수산특정연구, '패류양식장에서 지속적인 생산성 유지를 위한 최적 생산기술 개발' 과제의 일환으로 수행되었습니다. 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Choi, K.S., D.H. Lewis, E.N. Powell and S.M. Ray. 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 375-398.
- Gallagher, S. and J.A. Smith. 1995. One dimensional gel electrophoresis of proteins. In *Current Protocols in Molecular Biology*. (Ausubel et al, eds.) Unit 10.2. Green Publishing and Wiley-Interscience, New York.

Lee, R.F. and R.B. Heffernan. 1991. Lipid and proteins in Eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)) and Northern quahogs (*Mercentaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). Journal of Shellfish reaearch. Vol. 10. No. 1: 203-206.

Sara F. and M. Sela. 1979. Immunochemistry : Immunoadsorbents. volume 1. 3rd ed. Oxford Alden Press, 10.1-10.6.