

꽃게 유생시기별 RNA/DNA, 단백질, Trypsin 및 Chymotrypsin 활성 변화

김수경* · 서형철¹ · 조영록¹ · 김아름¹ · 이운호² · 장인권¹

*동해수산연구소, 국립수산물과학원, 30-6, 강원 강릉

¹갑각류연구센터, 국립수산물과학원, 357-945, 충남 태안

²남해수산연구소, 국립수산물과학원, 전남 여수

서론

꽃게, *Portunus trituberculatus* (Miers)는 우리나라 동해의 안인진 이남에서 제주도에 이르기까지 남해와 간석지가 발달한 서해연안에 많이 서식하고 있으며(Kim, 1973) 중국대륙 연안, 일본연안 등 극동아시아 지역에 광범위하게 분포하고 있다. 국립수산물과학원 갑각류 연구센터에서 2004년 조기종묘생산 성공으로 꽃게가 당해연도에 상품크기로 성장하여 고가에 판매가 될 수 있으며 대량 양식기술의 발달로 축제식 양식의 새로운 종으로 대두되고 있다. 꽃게에 관한 연구로는 유생발생(Aikawa, 1929), 일반생태 및 번식(Oshima, 1938; Song et al., 1988; 서, 2003) 및 유생의 호흡대사에 관한 생리(Morioka et al., 1988)등 기초적인 연구가 수행되었으나 유생발달단계별 효소 및 생화학적 분석은 전무한 상태이다

재료 및 방법

2004년 4월 10일 부화된 유생을 15톤 콘크리트 사각수조에 대량사육을 하면서 발달 단계별로 총 500마리씩 채취하여 크기에 따라 3~50마리씩 동결건조하여(-56℃, 24시간) 무게를 측정하고 Tris-HCl용액 500 μ l에 마쇄를 하여 원심분리(4℃, 1시간)한 후, 상등액을 10 μ l씩 취하고 TE 40 μ l로 희석을 한 후, 0.2 nmol의 Na-benzoyl-L-arginin-4 methyl coumarinyl-7-amid (Bachem사, 0.5% dimethyl-sulfoxide, Merck, Germany) 기질용액을 250 μ l 첨가하여 형광광도계 (Fluoroskan Ascent FL, 30℃, 5분)로 Trypsin을 측정하였다. Chymotrypsin은 상등의 방법으로 추출하고 0.1 mM의 N-succinyl-(Ala)₂-prol-phe-p-nitroanilide (SAPPNA, Sigma, Germany) 250 μ l를 첨가하여 분광광도계로 410 nm에서 5분 동안 1분 간격으로 측정하여(25℃, PowerWave XS, Bio-Tek, USA) 단백질 mg당 1분 동안의 흡광도의 변화로 나타내었다(ABS/mg/min). RNA와 DNA는 상등의 방법으로 마쇄된 균질액을 100 μ l 취하여 0.2% TE-SDS (Sodium dodecyl sulfate)을 20 μ l 첨가하여 최종농도를 0.01% TE-SDS로 조절하고 Clemmesen (1993) 방법에 의해 형광광도계로 측정을 하였다(Fluoroskan Ascent FL, Thermo사, Germany).

결과 및 요약

Trypsin은 chymotrypsin과 함께 간체장에서 다량 검출되는 단백질 분해효소로서 60%이상의 총단백질 분해에 관여하며 유생시기에 변태와 관계하여 생리적인 변화를 이해할 수 있는 지표가 된다. 그림 1에서 보면 trypsin 활성은 zoea기부터 소량(2.25~10.86 nmol/ind./min) 검출이 되나 megalopa기에 이르러 38.67 nmol/ind./min로 증가하고 Crab1기에 이르러 265.4 nmol/ind./min로 급격하게 증가를 하였다. Chymotrypsin의 경우는 Zoea 3기까지는 검출이 되지 않았으며 4기에 이르러 0.10 ABS/mgProtein/min로 나타났고 Crab 1기에 0.44 ABS/mg protein/min로 증가하는 경향을 보임으로 유생초기의 단백질분해효소로서 chymotrypsin이 작용하지 않는 것으로 나타났다. 효소화적인 측면에서 보면 megalopa기에서 crab 1기로 발달시 가장 큰 변화를 갖는 것을 알 수 있었다.

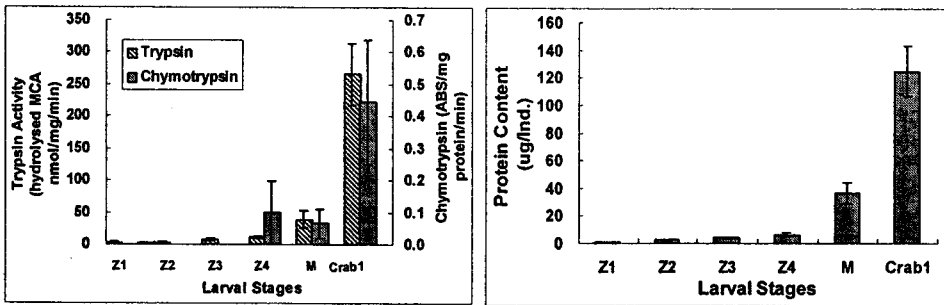


그림 1. 꽃게 유생의 발달단계별 Trypsin, Chymotrypsin의 활성 및 단백질량 변화

꽃게 유생의 발달단계별 마리당 RNA, DNA 농도의 변화와 그 비율을 보면(그림 2), megalopa기까지 RNA와 DNA의 양이 각각 마리당 0.15~2.08 μg , 0.02~0.24 μg 으로 10배정도 증가하였고, megalopa에서 crab1기에 이르러 급격하게 증가하여 마리당 12.6 μg 과 1.31 μg 으로 나타나 유생이 발달하면서 RNA와 DNA양이 점차적으로 증가하는 것으로 나타났다. R/D의 비율은 이와는 다르게 zoea 2기(10.4)와 crab 1기(9.5)에 높은 비율을 기록하였고 megalopa에 이르기 바로 전단계인 zoea 4기에 7.3으로 가장 낮은 값을 보였다. 이는 Rotifer, *Brachiurus plicatilis*,를 zoea 2기까지 공급하고 zoea 3기부터 *Artemia* sp.를 제공하며, megalpa에서부터 바지락을 혼합공급 함으로 먹이계열 및 전환에 따른 영향 유무를 좀더 세밀하게 분석하면 꽃게 유생의 초기 생활사를 이해하며 더 나은 성장을 유도할 수 있는 중요한 자료가 될 것으로 추측된다.

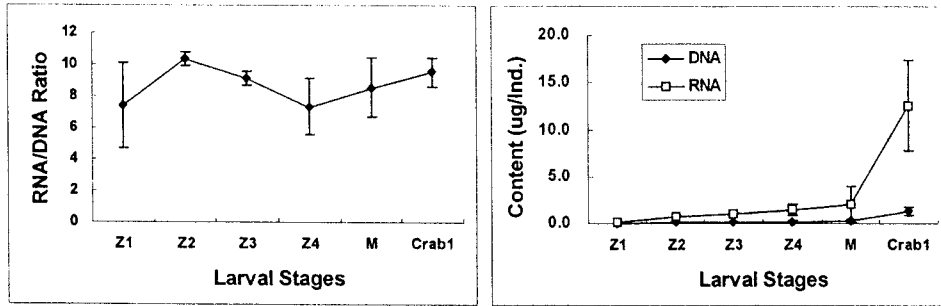


그림 2. 꽃게 유생의 발달단계별 개체당 RNA, DNA의 농도 및 비율 변화

참고문헌

- 서형철, 2003. 꽃게, *Portunus trituberculatus* (Miers)의 생식 및 성장에 관한 연구. 박사학위논문, 순천향대학교, 1-96.
- Aikawa, H., 1929. On larval forms of some Brachyura larvae. Rec. Oceanogr. Works Jap., 9: 55-87.
- Clemmesen, C., 1993. Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser. 100: 177-183.
- Kim, H. S., 1973. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea. Anomura, Brachyura. Samwha publishing company, Seoul, Vol. 14: 694pp.
- Morioka, Y., C. Kitajima and G. Hayashida, 1988. Oxygen consumption, *Portunus trituberculatus* in its early development stage. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 5(7): 1137-1141.
- Oshima, S., 1938. Biology and fishery research in Japanese blue crab *Portunus trituberculatus* (Miers). J. of Imp.I Fish. Exp. Stat. 9: 208-212
- Song, H., Y. Ding and Y. Xu, 1988. A study on the breeding habits of blue crab (*Portunus trituberculatus* Miers) in the northern coastal waters of Zhejiang. J. Zhejiang Coll. Fish. Zhejiang Schuichan Xueyuan Xuebao. 7(1): 39-46.