한국어병학회지 제24권 제1호
J.Fish Pathol., 24(1) : 39~45 (2011)

단 보

수온에 따른 넙치의 특이 항체 반응

김위식 · 장민석* · 정성주* · 김석렬** · 박명애** · 이정호*** · 명정인*** · 오명주*†

전남대학교 수산과학연구소, *전남대학교 수산생명의학과, **국립수산과학원 병리연구과,
***국립수산과학원 육종연구센터

Specific antibody response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* by water temperature

Wi Sik Kim, Min Seok Jang*, Sung Ju Jung*, Seok Ryel Kim**, Myoung Ae Park**, Jeong Ho Lee***, Jeong In Myeong*** and Myung Joo Oh*†

The Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 556-901, Korea
**Department of Aqualife Medicine, College of Fisheries and Ocean Science, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea*
***Pathology Division, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea*
****Genetics & Breeding Research Center, National Fisheries Research & Development Institute, Geoje 656-842, Korea*

The specific antibody response of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* to different water temperature were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In the rearing temperature of 15℃, first anti-bovine serum albumin (BSA) antibody titer was appeared after 14 days of immunization, whereas 24～48 days post-immunization (PI) resulted maximum antibody titer in all 5 experimental fish with optical density (OD) values 1.94～3.04. At the end of the experiment (84 days), 0.03～1.28 OD values were observed. In the rearing temperature of 12～13℃, first antibody titer was found 28 days PI in 2 out of 5 fish. Three fish shown high OD titer (1.88～2.68) between 56 and 70 days and OD values of 0.49 to 2.35 were observed at 84 days. However, the anti-BSA antibodies of two fish showed less than 0.8 OD values until 84 days. In the rearing temperature of 10℃, specific antibody appeared at 56 days, maximum antibody titer was observed at 70 days in 2 out of 5 fish (OD values: 1.37～1.53) and 1.00 to 1.11 OD values were observed at 84 days. Rest 3 fish showed OD values of 0.12 to 0.68 much below to that of other 2 fish, throughout the experimental period. In conclusion, specific antibody response of olive flounder at high temperature was much faster, higher and longer than that at lower temperature.

Key words : Antibody detection, Enzyme-linked immunosorbent assay, Olive flounder, Water temperature

†Corresponding Author: To whom correspondence Myung-Joo Oh
Tel. and Fax: 061-659-3173
E-mail: ohmj@chonnam.ac.kr

항체 검출 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)는 혈액 내의 특정 항원에 대한 항체의 존재를 검사하는 방법으로 저렴한 비용으로 다수의 샘플 처리가 가능하고 검출 감도가 높아 사람이나 가축에서는 병원체의 감염 이력의 파악, 건강상태의 모니터링, 백신의 효능 검증 등의 목적으로 널리 사용되고 있다.

어류도 포유류와 마찬가지로 항원에 노출되면 체내에 항체가 형성된다는 사실이 증명되면서 (Corbel, 1975; Wilson and Warr, 1992), 다양한 연구자들에 의해 항체검출 ELISA가 어류에 적용되었다 (Yoshimizu *et al*., 1992; LaPatra, 1996; Watanabe *et al*., 1998; 2000; Okuda *et al*., 2006). 하지만 어류의 항체는 포유류의 immunoglobulin G (IgG)와는 달리 친화력이 낮은 IgM으로 구성되어 있어 (Wilson and Warr, 1992; Tort *et al*., 2003) 어류를 대상으로 항체 검출 ELISA를 적용시, 포유류에서 나타나지 않는 문제점들이 보고되었다. 특히 어류 항체의 비특이적 반응에 의한 높은 백그라운드로부터 유발되는 낮은 재현성의 문제는 (Olesen *et al*., 1991; Höglund and Pilström, 1995; Kibenge *et al*., 2002; Kim *et al*., 2007) 국제수역사무국 (OIE)에서 항체 검출 ELISA를 진단법으로서 받아들이지 않는 이유가 되고 있다. 그러나 최근 Kim *et al*. (2007)의 연구에 따르면 항체 검출 ELISA에서 어류의 IgM은 블로킹제에 비특이적으로 흡착하여 높은 백그라운드를 유발하며, 어류혈청을 5% skim milk로 전처리 과정을 경유하여 ELISA를 실시함으로써 어류 혈청 중의 특이 항체만을 검출하는 것이 가능하다고 보고하였다. 또한 Kim *et al*. (2008)의 연구에서는 impuritiy 항원에 의한 비특이적 반응이 문제시될 경우, 혈청학적으로 이종 항원을 병행한 ELISA 시스템으로 특이 항체만을 검출하는 것이 가능하다고 보고하였다. 이와 같이 어류에서도 항체검출 ELISA법을 사용하여 항원에 대한 특정 항체만을 검출하는 것이 가능하므로 항체 검출 ELISA는 진단법으로 유용하게 사용되어 질 수 있음이 시사되었다.

어류에서 항체검출 ELISA를 적용하기 위해서는 항원에 대한 특이 항체가를 측정할 수 있을 뿐만 아니라 사육환경에 따른 어체 내의 특이 항체 반응에 대한 정보가 요구된다. 어류의 경우, 포유류와 달리 수온, 오염물질 등의 다양한 환경조건에 따라 면역반응이 달라지므로 (Le morvan *et al*., 1998; Engelsma *et al*., 2003; Nakayama *et al*., 2008), 다양한 환경 조건에서의 면역반응에 대한 정보는 ELISA 결과를 분석하는 데 매우 중요하다. 그러나 항체 검출 ELISA법을 이용하여 다양한 환경조건에서 어체 내의 특이 항체 반응을 조사한 연구는 거의 보고되어 있지 않다.

본 연구에서는 국내 주요 양식어종인 넙치 (*Paralichtys olivaceus*)를 대상으로 항체 검출 ELISA법을 적용하기 위한 기초연구로서 넙치에 항원을 접종한 후 사육 수온에 따른 특이 항체 반응을 항체 검출 ELISA를 사용하여 조사하였다.

재료 및 방법

실험어

경상남도 거제시에 위치한 국립수산과학원 어류육종연구센터에서 사육중인 건강한 넙치 (전장: 32~36 cm, 체중: 325~479 g)를 실험에 사용하였다. 각각의 넙치는 개체별로 구별할 수 있게 tagging하였으며, 수온은 15±1℃, 12-13℃ 및 10±1℃로 유지된 1.5톤 수조에 각 10마리씩 수용하여 1주일간 순치시킨 후 실험에 사용하였다. 실험어에는 유수식으로 사육수를 공급하였고, 사료 투여는 상업용 pellet 사료를 사용하여 1일 1회 투여하였다.

Bovine serum albumin (BSA) **면역 및 혈청 분리**

15±1℃, 12~13℃ 및 10±1℃ 수온에 사육 중인 넙치 (각 5마리)에 BSA를 1 mg/ 200 μl 농도로 조정하여 복강에 주사한 후, 0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70, 84일째 미부정맥에서 채혈하여 원심분리 (6000 rpm, 4℃, 20 min)하여 혈청을 분리하였다. 대조구 (수온별 각 5마리)는 PBS 200 μl를 넙치의 복강에 주사한 후 위와 동일한 방법으로 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 실험에 사용하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

항체 검출 ELISA

항체 검출 ELISA는 Kim *et al.* (2007)과 김 등 (2009)의 방법에 준해 실시하였다. ELISA plate (Nunc, Denmark)에 5 ㎍ BSA/ 50 μl를 각 well에 분주한 후, 37℃에서 overnight하여 항원을 coating하였다. Tween-20이 0.05% 포함된 PBS (T-PBS)로 3번 세척하였고 5% skim milk를 380 μl씩 넣어 20℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체로는 넙치 혈청을 5% skim milk로 희석 (40배)하여 1시간 반응시킨 후, 시료 당 2개의 well에 50 μl씩 분주하였고, 2차 항체로서는 5% skim milk로 10배 희석된 항 넙치 immunoglobulin M (IgM) monoclonal anitbody (M7C3-4, Shin *et al*., 2007)를 50 μl씩 분주하였으며, 3차 항체로서 5% skim milk로 1000배 희석된 peroxidase conjugated 항 마우스 IgG 돼지 혈청 (DakoCytomation, Denmark)을 50 μl씩 분주하였다. 각각의 항체 반응은 20℃에서 1시간 동안 반응하였다. T-PBS로 5번 수세하였고 ELISA 발색액 (100 mM Na_2HPO_4, 50 mM citric acid, 1 mg/ 1 ㎖ *o*-phenylenediamine, 0.03% H_2O_2)을 각 well에 50 μl씩 분주한 후 20℃에서 15분 동안 발색하였다. 각 well에 2N H_2SO_4를 50 μl씩 넣어 발색 반응을 중지시킨 후 ELISA plate reader (Spectra max 340, USA)로 492 nm에서 OD값을 측정하였다.

통계 분석

항체 검출 ELISA로 얻은 결과는 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Ver. 18) 프로그램을 이용하여 ANOVA test를 시행하였고, 사후분석으로 수온구간별 시간경과에 따른 항체가의 유의적인 차이를 확인하기 위해 Tukey test를 실시하였다 ($p<0.05$).

결과 및 고찰

사육수온에 따른 넙치의 특이 항체 반응을 조사하기 위해 15℃, 12～13℃ 및 10℃ 수온에 사육중인 넙치에 BSA를 면역시킨 후 주기적으로 혈액을 취해 BSA에 대한 항체가를 측정하였다 (Fig. 1). 수온 15℃에서는 BSA 접종후 14일째부터 특이 항체가를 나타내는 개체가 확인되었고 (OD값: 0.69), 28～42일에는 모든 개체 (5개체)에서 가장 높은 항체가 (OD값: 1.94～3.04)가 관찰되었다 (Fig. 1A). 항체가는 28일과 42일을 기점으로 천천히 떨어지기 시작하였으며, 면역 84일째는 OD값이 0.03～1.28로 감소되었다. 수온 12～13℃에서는 수온 15℃보다 14일 늦은 시점인 28일째부터 항체가를 확인할 수 있었다 (OD값: 0.14～0.25) (Fig. 1B). 5개체 중 3개체에서 56～70일에 가장 높은 항체가 (OD값: 1.88～2.68)가 확인되었으며, 그 후 항체가는 천천히 떨어지기 시작하여 면역 84일째에는 0.49～2.35의 OD값이 관찰되었다. 그러나 2개체의 경우는 면역 84일까지 0.8 이하의 OD값을 나타내었다. 수온 10℃에서는 수온 15℃보다 42일 늦은 시점인 56일째부터 항체가가 확인되었다 (OD값: 0.11～0.83) (Fig. 1C). 5개체 중 2개체에서 면역 70일째 가장 높은 항체가가 (OD값: 1.37～1.53)가 확인되었으며, 그 후 항체가는 천천히 떨어지기 시작하여 면역 84일째에는 1.00～1.11의 OD값이 관찰되었다. 이에 반해 3개체

에서는 항체가가 천천히 상승하여 면역 84일째까지 0.12~0.68의 OD값을 나타내었다. 146일째 혈액을 취해 항체가를 측정한 결과에서는 15℃, 12~13℃, 10℃에서 각각 0.00~0.41, 0.00~0.31, 0.00~0.41의 OD값을 보여 특이 항체가 존재하는 개체도 관찰되었으나 대부분의 개체에서 항체가는 검출되지 않았다 (자료 게재 생략). PBS를 면역시킨 대조구의 넙치에서는 수온과 관계없이 모든 개체에서 항체가가 관찰되지 않았다 (Fig. 1A, 1B, 1C). 수온구간별 시간경과에 따른 항체가를 ANOVA test로 분석한 결과에서는 28일과 42일째 15℃와 12~13℃ 및 15℃와 10℃의 항체가에 유의적인 차이가 관찰되었다 (p<0.05) (Fig. 2). 이상의 결과로 넙치의 특이 항체 반응은 사육수온 15℃, 12~13℃ 및 10℃에서 형성되나 수온별로 차이를 보임을 확인할 수 있었다. 특히 항체 반응은 개체간에 차이를 보이나 수온이 높을수록 항체 형성이 빠르고 항체가도 높게 나타나는 반면 수온이 낮을수록 항체 형성이 늦고 항체가도 낮게 나타나는 것이 확인되었다. 또한 특이항체 반응의 지속기간도 수온이 높을수록 길게 나타나는 것으로 확인되었다. 유사한 결과로서 Yoon *et al*. (2010)은 넙치의 특이 항체 생성 세포 (specific antibody secreting cell)의 수는 낮은 수온 (12℃)에 의해 감소하나 높은 수온 (22℃)에 의해서는 증가한다고 보고하였다. 이와 같이 넙치의 특이 항체 반응은 사육 수온과 밀접한 연관성이 있는 것이 확인되었고, 사육 수온이 낮을수록 특이 항체 반응은 낮게 나타남이 확인되었다.

본 연구는 넙치에 항체 검출 ELISA를 적용하기 위한 기초연구로서 사육수온에 따른 넙치의 특이 항체 반응에 대한 정보를 구축하고자 하였다. 본 연구의 결과, 넙치의 특이 항체 반응은 사육 수온과 밀접한 연관성이 있음이 확인되어, ELISA를 넙치 양식 현장에 적용시 사육수온과 본 연구의 결과 (넙치의 특이 항체 반응은 사육수온 15℃, 12~13℃ 및 10℃에서 형성되나 수온이 높을수록 항체 생성시점이 빠르며, 생성된 항체의 지속기간 및 항체가가 높게 나타남)를 고려하여 ELISA 결과를 분석하여야 할 것으로 사료된다. 더욱이 사육수온뿐만 아니라 개체간에

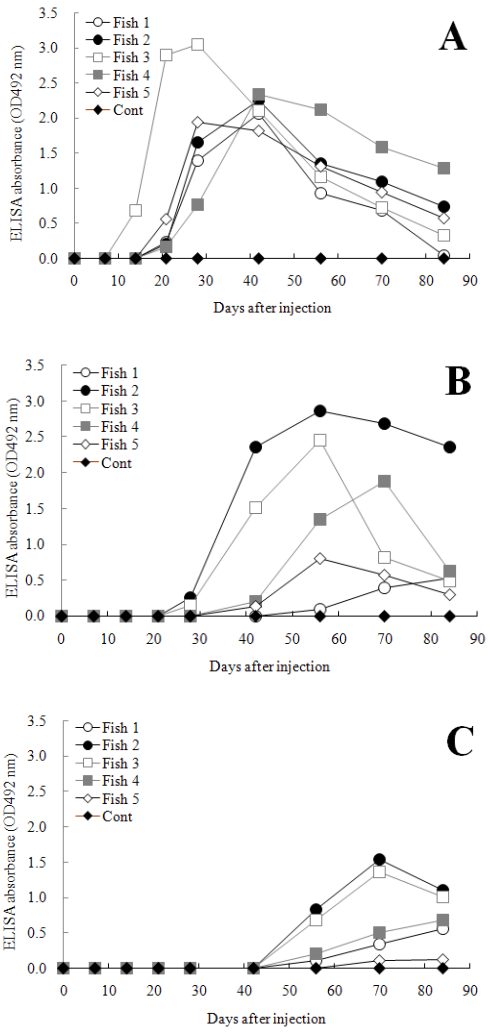

Fig. 1. Changes of specific antibody titer of olive flounder, which were cultured in water temperature 15℃ (A), 12-13℃ (B) and 10℃ (C), respectively after immunizing with bovine serum albumin (BSA). Fish serum was treated with 5% skim milk (1:40) and subjected to a BSA-detection ELISA.

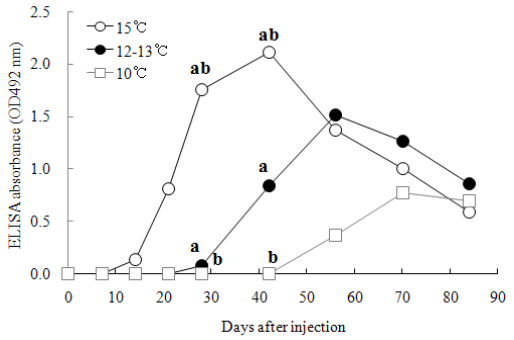

Fig. 2. Specific antibody response in serum from olive flounder kept at three different temperatures after intraperioneal injection with BSA (mean; n=5). a significant difference between 12~13℃ and 15℃ ($p<0.05$). b significant difference between 10℃ and 15℃ ($p<0.05$).

도 항체반응에 뚜렷한 차이를 보이므로 (Fig 1B, 1C의 경우, 항체가가 높게 나타나는 개체와 낮거나 거의 관찰되지 않는 개체가 관찰됨), 넙치 양식장에서 병원체의 감염 이력 파악 및 건강상태 모니터링 등을 실시할 경우, 각각의 개체를 대상으로 ELISA 결과를 분석하는 것보다는 군을 대상으로 분석하는 것이 타당할 것으로 사료된다.

사육환경에 따른 어류의 특이 항체 반응에 대한 정보는 백신의 사용시점, 백신처리 기간 등 백신 개발에 대한 유용한 정보를 제공한다. 본 연구의 결과는 저수온기에 사육중인 넙치를 대상으로 백신을 개발하는데도 유용하게 사용되어 질수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 넙치를 대상으로 항체 검출 ELISA 법을 적용하기 위한 기초연구로서 넙치에 BSA를 면역시킨 후 사육 수온에 따른 특이 항체 반응을 항체 검출 ELISA법을 사용하여 조사하였다. 수온 15℃에서는 면역 후 14일째부터 BSA에 대한 특이 항체가가 형성되는 개체가 확인되었고 (OD값: 0.69), 28~42일에 가장 높은 항체가 (OD값: 1.94~3.04)가 관찰되었으며, 면역 84일째는 0.03~1.28의 OD값이 관찰되었다. 수온 12~13℃에서는 면역 후 28일째부터 항체가가 관찰되었고 (OD값: 0.14~0.25), 3개체에서 56~70일에 가장 높은 항체가 (OD값: 1.88~2.68)가 확인되었으며, 면역 84일째에는 0.49~2.35의 OD값이 관찰되었다. 2개체의 경우는 면역 84일까지 0.8 이하의 OD값을 나타내었다. 수온 10℃에서는 면역 후 56일째부터 항체가가 확인되었고 (OD값: 0.11~0.83), 2개체에서 면역 70일째 가장 높은 항체가가 (OD값: 1.37~1.53)가 확인되었으며, 면역 84일째에는 1.00~1.11의 OD값이 관찰되었다. 이에 반해 3개체에서는 항체가가 천천히 상승하여 면역 84일째 0.12~0.68의 OD값을 나타내었다. 이상의 결과로 넙치의 특이 항체 반응은 개체별로 차이를 보이나 수온이 높을수록 항체 형성이 빠르고 항체가도 높게 나타나며, 지속기간이 길게 나타나는 것이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원 (NRF-2009-351-F00019)과 국립수산과학원(육종기술개발, RP-2011-AQ-017)의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고 문헌

Corbel, M.J.: The immune response in fish: a review. J. Fish Biol., 7: 539-563, 1975.

Engelsma, M.Y., Hougee, S., Nap, D., Hofenk, M., Rombout, Jan H.W.M., van Muiswinkel, Willem B. and Lidy Verburg-van Kemenade, B.M.: Multiple acute

temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L.. Fish Shellfish Immunol., 15: 397-410, 2003.

Höglund, J. and Pilström, L.: Mechanical isolation and characterization of antigens from adult *Anguillicola crassus*. Fish Shellfish Immunol., 5: 51-60, 1995.

Kibenge, M.T., Opazo, B., Rojas, A.H. and Kibenge, F.S.B.: Serological evidence of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection in farmed fishes, using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Dis. Aquat. Org. 51: 1-11, 2002.

Kim, W.S., Mochizuki, M., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Detection of specific antibodies against infectious hematopoietic necrosis virus from rainbow trout sera by ELISA using two novirhabdoviruses. Fish Pathol., 43: 112-116, 2008.

Kim, W.S., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Non-specific adsorption of fish immunoglobulin M (IgM) to blocking reagents on ELISA plate wells. Dis. Aquat. Org., 78: 55-59, 2007.

LaPatra, S.E.: The use of serological techniques for virus surveillance and certification of finfish. Annu. Rev. Fish Dis., 6: 15-28, 1996.

Le morvan, C., Troutaud, D. and Deschaux, P.: Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish. J. Exper. Biol., 201: 165-168, 1998.

Nakayama, K., Kitamura, S.I., Murakami, Y., Song, J.Y., Jung, S.J., Oh, M.J., Iwata, H. and Tanabe, S.: Toxicogenomic analysis of immune system-related genes in Japanese flounder (*Paralichtys olivaceus*) exposed to heavy oil. Marine Poll. Bull., 57: 445-452, 2008.

Okuda, R., Nishizawa, T., Yoshimizu, M.: Infection-cycles of *Renibacterium salmoninarum* in hatcheries of masu salmon *Oncorhynchus masou* by monitoring specific antibodies. Fish Pathol., 41: 175-178, 2006.

Olesen, N.J., Lorenzen, N. and Jørgensen, P.E.V.: Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), and plaque neutralization tests (50% PNT). Dis. Aquat. Org., 10: 31-38, 1991.

Shin, G.W., Kim, Y.R., Shin, Y.S., Lee, E.G., Oh, M.J., Yoshida T. and Jung, T.S.: Purification of two different immunoglobulins (Igs) from olive flounder *Paralichthys olivaceus* and analysis of *Lactococcus garvieae* antigens by the Igs. Fish Pathol., 42: 19-28, 2007.

Tort, L., Balasch, J.C. and Mackenzie, S.: Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive response. Inmunología. 22: 277-286, 2003.

Watanabe, K., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M.: Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. Dis. Aquat. Org., 41: 219-223, 2000.

Watanabe, K., Suzuki, S., Nishizawa, T., Suzuki, K., Yoshimizu, M. and Ezura, Y.: Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. Fish Pathol., 33: 445-446, 1998.

Wilson, M.R. and Warr, G.W.: Fish immunoglobulins and the genes that encode them. Annu. Rev. Fish Dis., 2: 201-221, 1992.

Yoon, S.H., Hong S.H., Jeong, J.B. and Jeong, H.D.: Influence

of temperature shifts on the kinetics of the specific antibody secreting cells in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol. 23: 9-16, 2010.

Yoshimizu, M., Direkbusarakom, S., Nomura, T., Ezura, Y. and Kimura, T.: Detection of antibody against *Aeromonas salmonicida* in the serum of salmonid fish by the enzyme linked immunosorbent assay. Fish Pathol., 27: 73-82, 1992.

김위식, 장민석, 김종오, 김두운, 정성주, 김석렬, 박명애, 오명주: 넙치 혈청의 보존 조건이 ELISA 결과에 미치는 영향. 한국어병학회지, 22: 167-172. 2009.

Manuscript Received : Demcember 9, 2010
Revised : March 6, 2011
Accepted : March 16, 2011