

¹H-NMR 스펙트럼의 다변량통계분석을 통한 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 백신 반응의 지표물질 분석

조지영*

순천향대학교 해양생명공학과

Multivariate Analysis on ¹H-NMR Spectroscopy of Olive Flounder *Paralichthys olivaceus* Serum

Ji Young Cho*

Department of Marine Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-900, Korea

To investigate the relationship between metabolic changes in ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectra and fish vaccination, serum was collected from olive flounders treated with a formalin-killed *Edwardsiella tarda* vaccine and used for ¹H-NMR metabolite profiling. Principal component analysis and partial least squares were applied to the ¹H-NMR profile to reduce its complexity and establish class-related clusters. Relative lipid regions were distinguished in vaccinated and non-vaccinated serum. Then, the lipids were extracted from the serum and analyzed. Triolein was identified.

Key words: Metabolomics, PCA, PLS, Triolein, *Edwardsiella tarda*, NMR

서 론

최근 동식물의 대사물질 변화 분석을 통해 대사경로의 조절과 생화학적 대사 경로를 이해하고자 metabolic profiling의 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Kim et al., 2006). 대사물질의 변화를 분석하기 위해 HPLC, GC, MS 등 여러 장비들이 활용되고 있지만 복잡한 전처리 과정과 많은 시간이 소요된다. 이에 비해 핵자기공명분석(¹H-nuclear magnetic resonance: ¹H-NMR)은 전처리과정이 간단하며 정성 및 정량 분석이 가능할 뿐 아니라 재현성이 뛰어나다. 또한 여러 화합물질로부터 특정물질을 분석하고 다양한 조직과 혈청으로부터 대사체의 정보를 얻을 수 있는 유용한 분석법으로(Ala-Korpela, 1995; Griffin & Kauppinen, 2007), 다변량통계분석 기법을 적용해 데이터베이스 및 라이브러리를 통하여 복잡한 화학정보로부터 유용한 정보를 유추 및 해석할 수 있다(Brindle et al., 2003). 이러한 방법을 “metabolomics”로 정의하고 있으며 주요 대사체군의 변화 및 규명을 가능하게 한다(German et al., 2005). 지금까지의 metabolomics 연구들은 대부분이 인체대사물질 변화에 관한 연구와 식물의 표현형 차이에 대한 연구들로 국한

되어 있고 어류에 관한 연구는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구는 ¹H-NMR spectroscopy와 다변량통계분석을 통해 넙치의 대사 물질 변화를 분석하기 위해 고안되었다.

우리나라의 대표적인 양식어종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 고밀도 사육으로 인한 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum* 및 *Streptococcus iniae* 등과 같은 세균성 질병이 보고되고 있다. 그 중 *E. tarda*는 지느러미 및 복부 발적 및 충혈, 복부팽만 탈장 등을 나타내는 에드워드스감염증(edwardsiellosis)의 원인균으로 성체의 집단 폐사를 야기시켜 양식에 큰 문제가 되고 있다(Austin & Austin, 1999; Castro et al., 2006; Mohanty & Sahoo, 2007). *E. tarda*의 감염을 예방하기 위해서는 백신 접종이 가장 효과적이고 합리적인 방법으로 여겨지고 있으며 최근에 백신개발에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Kawai et al., 2004; Liu et al., 2007; Kim et al., 2009). 본 연구는 넙치의 백신 접종에 따른 대사물질의 변화를 분석하기 위한 실험으로 백신 접종 전 후의 대사물질을 비교 분석하고 백신에 반응하는 물질(vaccine-response substance; VRS)을 분석하여 indicator로서 선정하고자 하는 것이 그 목적이다. 대사물질의 변화분석을 위해서는 수소 핵자기공명분

Article history;

Received 8 March 2012; Revised 19 June 2012; Accepted 3 August 2012

*Corresponding author: Tel: +82. 41. 530. 1709 Fax: +82. 41. 530. 1638

E-mail address: jycho@sch.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 45(4) 367-371, August 2012

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2012.0367>

pISSN:0374-8111

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

석(^1H -nuclear magnetic resonance: ^1H -NMR)과 주성분분석(principal components analysis: PCA) 및 부분 최소제곱 분석(partial least square: PLS)을 실시하였다.

재료 및 방법

실험어 사육

실험어는 양식장(극동수산, 경북 포항)에서 생산된 넙치(평균 50 ± 7 g)를 사용하였고 200리터 원형수조에 동일한 사육밀도로 30마리씩 수용을 하였다. 사료는 배합사료(조단백질 52% 이상)를 사용하였으며 사료공급량은 어체중의 0.1-3.5%를 1일 1회 공급하였으며 급이 횟수, 수온, 환수량 등 모든 양식 조건을 동일하게 사육하였다. 실험 기간 중의 사육 수온은 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 를 유지하였다.

백신제작

*E. tarda*를 1% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion broth (BHIB)에 접종하여 25°C 에서 24시간 동안 배양하였으며 세균 배양액에 포르말린(37% formaldehyde)을 최종적으로 0.3% 농도가 되도록 처리하여 실온에서 1시간 정치한 후 4°C 에서 24시간 동안 두어 불활화 시켰다. 불활화된 세균 배양액은 6,520 rcf에서 20분 동안 원심분리하여 수확하였고 0.02% NaN_3 가 첨가된 멸균 생리식염수에 습중량 100 mg/mL의 농도로 희석하여 4°C 에 보관하였다.

백신 투여

포르말린으로 불활화시킨 *E. tarda*를 멸균 생리식염수로 희석한 후 MS-222로 마취된 넙치의 복강 내에 0.1 mL를 주사하였다. 백신 효능검증의 어체 크기는 직경 15 cm, 무게 50 g으로 주사가 가능한 가장 작은 크기의 어체로 선택하여 실험을 진행하였으며 백신의 농도는 10 mg/kg bodyweight로 실험을 진행하였다. 응집기반응 (Kim et al., 2009)을 통해 항체가 형성 여부를 확인하였다.

혈청분리

넙치를 MS-222로 마취한 후 미부혈관에서 채혈하여 상온에서 1시간, 4°C 에서 24시간 방치한 후 5,900 rcf에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리된 혈청은 -80°C 에 나누어 보관하며 분석에 사용하였다.

^1H -NMR 분석

혈청은 진공농축기(JEIO Tech, Korea)를 이용하여 농축하였고 용매 D_2O 에 녹여 200 μL 의 샘플을 5 mm Shigemi NMR tube에 주입하였다. ^1H -NMR spectra의 측정은 Jeol JNM-

ECP 500 NMR spectrometer를 사용하여 500 MHz에서 측정하였다. NMR분석은 nt 32, 63, 128 scan으로 실시하여 최적의 분석조건을 확인하였으며 온도에 따른 peak pattern의 변화를 알아보기 위하여 128 scan을 기준으로 하여 온도 20°C , 25°C , 30°C 로 설정하여 실행하였으며 splitting이 가장 많은 3.5-4.0 ppm 영역의 peak들을 비교하였다. 모든 실험은 5반 복구로 실행하였다. Pulse sequence는 $\text{RD-}90^\circ\text{-t1-}90^\circ\text{-tm-}90^\circ\text{-FID}$ 로 하였으며 1.5 s의 relaxation delay로 실시하였다. NMR spectra는 0-12 ppm까지 scan 하였고 X-WINNMR (version 2.1, Bruker GmbH, Germany)을 이용하여 calibration을 실시하였다.

다변량통계분석

각각의 혈청으로부터 얻어진 ^1H -NMR 스펙트럼은 peak의 chemical shift와 split pattern 그리고 integral 값을 이용하여 정리하였고 data 간격은 0 ppm부터 12 ppm으로 조정하였다. ^1H -NMR 스펙트럼 데이터는 Matlab (version 6.5)에 도입하였고 Unscramber (version X1.0) 이용하여 total metabolite에 대한 주성분분석(PCA)과 부분최소 제곱법(PLS)을 실시하였다. PCA는 자료의 변수들이 가진 정보를 최대한 확보할 수 있는 적은 수의 새로운 변수를 생성하는 것으로 새로운 변수를 주성분(principal component)이라 하며 자료가 보여주는 변이를 최대한 설명할 수 있는 주성분을 선택한다(Massart and Vandeginste 1988; Joo and Cho 2005). PC는 scores와 loading값으로 나타내며 PCA분석을 통해서 대조구 대비 실험구의 차별성 및 신뢰성을 확인하였다(Brindle et al. 2003). PLS는 작은 변이를 설명하는 변수를 제외시킴으로써 차원축소를 통해 안정적인 결과를 얻을 수 있는 방법으로 PLS분석을 통하여 score plot에서 clustering을 확인하고 loading plot에서 indicator로 추측되는 인자를 탐색하며 VIP value를 이용하여 인자의 중요도를 확인하였다. PCA와 PLS-DA 분석에서 component는 7로 설정하였으며 non-linear iterative partial square algorithm (NIPALS)으로 실행하였다.

VRS 성분 분리 및 분석

^1H -NMR 분석과 다변량통계분석을 통해 백신을 첨가한 경우와 그렇지 않은 경우에 지질함량이 차이가 나는 것을 확인하였고 혈청으로부터 VRS 성분을 분리하기 위해 우선 hexane을 이용하여 지질층(total lipid)을 분리하였다. Hexane 추출층에 메탄올을 첨가하여 극성성분을 완전히 제거하였고, 비극성층을 TLC (thin layer chromatography)를 이용하여 전개용매 hexane/ether (6:1)로 분리하였다. 대조군에 비해 함량에 차이를 보이는 band (R_f 0.7)를 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR, FAB-MS를 이용하여 구조분석을 실시하였다.

결과 및 고찰

넙치 혈청성분의 변화를 분석하고 health indicator를 찾기 위해 *E. tarda* 불활화 백신을 넙치의 복강 내 주사하였다. 백신 접종 14일 후 혈청을 분리하여 응집가 반응을 통해 불활화 백신에 대한 항체가 형성되었음(2^{10} antibody titer)을 확인하였

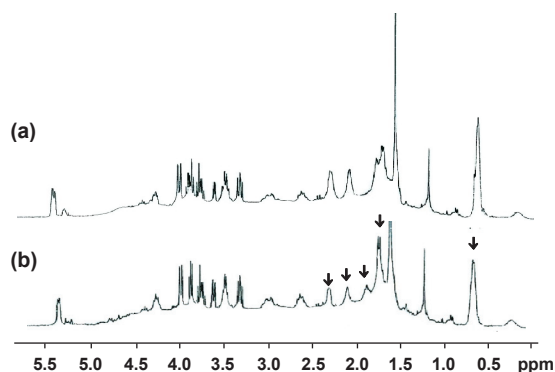


Fig. 1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of olive flounder *Paralichthys olivaceus* serum obtained from non vaccinated fish (a) and from vaccinated fish (b). Arrows indicate distinguished peak regions from non vaccinated fish serum.

고 $^1\text{H-NMR}$ 분석에 사용하였다. 온도에 따른 $^1\text{H-NMR}$ peak의 pattern을 확인하기 위해 온도조건을 20, 25, 30 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정하여 splitting이 가장 많은 3.5-4.0 ppm 영역의 peak들을 비교하였다. Peak pattern은 같았으며 온도변화에 따른 peak pattern에 변화가 없는 것으로 판단되어 분석온도는 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였다. 백신을 처리한 경우의 혈청과 백신을 접종하지 않고 사육한 넙치의 혈청의 $^1\text{H-NMR}$ 은 Fig. 1에 나타내었고 0.65부터 5.18 ppm에서 peak를 확인할 수 있었다. 대부분의 chemical shift에서 처리군과 대조군의 차이를 나타나지 않았으며 0.65 ppm과 1.53-2.22 ppm에서 차이를 나타내었다.

각 peak의 integral값과 split pattern 및 relative compounds (metabo-types)는 Table 1에 나타내었다. 0.65 ppm은 methyl기를 나타내며 가장 많은 integral값을 가지는 $\delta 1.53$ 은 지질성분의 반복되는 methylene $[(\text{CH}_2)_n]$ 을 나타낸다. 1.53 ppm부터 3.21 ppm은 lipid 성분의 methylene의 peak이며 3.40 ppm부터 4.38 ppm은 아미노산과 glycerol의 methine으로 확인된다. 두 실험구의 NMR spectra는 methine 부분은 유사한 형태로 나타나고 있으며 methylene 부분의 peak 값의 변화를 확인할 수 있다. $^1\text{H-NMR}$ 을 통하여 얻은 metabolite profiling의 다변량분석을 위해 PCA와 PLS-DA분석을 실시하였다.

Table 1. $^1\text{H-NMR}$ resonances of olive flounder serum *Paralichthys olivaceus* of non vaccinated fish (a) and vaccinated fish (b)

Bucket region (δ)	Multiplicity	Integral value (a)	Integral value (b)	Assignment
0.65	-	11.88 \pm 0.2588	8.08 \pm 0.1924	LDL, HDL methyl
0.82	d	0.998 \pm 0.0602	1.016 \pm 0.068	amino acids
1.05	s	1.99 \pm 0.0778	1.982 \pm 0.0349	methyl
1.53	-	46.8 \pm 1.1045	32 \pm 0.3391	Lipid $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$
1.58	d	11.946 \pm 0.0838	1.892 \pm 0.0602	Lipid $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$
1.64	m	3.802 \pm 0.1656	2.522 \pm 0.0526	Lipid $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n$
2.05	-	3.874 \pm 0.1303	2.49 \pm 0.1233	lipid CH_2
2.22	-	3.91 \pm 0.0675	2.502 \pm 0.1055	lipid CH_2
2.58	t	2.002 \pm 0.1234	1.906 \pm 0.0713	lipid CH_2
2.95	m	1.918 \pm 0.1491	1.974 \pm 0.0666	-
3.21	t	3.896 \pm 0.0635	3.956 \pm 0.0907	amino acids, glycerol, glucose CH
3.40	q	4.006 \pm 0.0727	3.964 \pm 0.0564	amino acids, glycerol, glucose CH
3.55	d	1.944 \pm 0.0666	1.956 \pm 0.0817	amino acids, glycerol, glucose CH
3.65	t	3.842 \pm 0.1201	3.746 \pm 0.188	amino acids, glycerol, glucose CH
3.80	dd	3.904 \pm 0.0786	4.006 \pm 0.027	amino acids, glycerol, glucose CH
3.96	d	3.934 \pm 0.0882	3.808 \pm 0.1543	amino acids, glycerol, glucose CH
4.20	t	1.896 \pm 0.0823	1.886 \pm 0.0586	glucose
4.38	-	0.9564 \pm 0.0415	1.024 \pm 0.0329	-
5.21	-	0.978 \pm 0.0396	0.616 \pm 0.0167	lipid CH
5.28	d	3.872 \pm 0.1577	3.972 \pm 0.0817	lipid CH

PCA분석의 loading plot과 scores plot을 나타냈으며 sample 1-5는 대조구의 sample이며 sample 6-10은 실험구(백신접종 후 얻은 혈청)의 sample로 나타내었다. Scores plot에서 실험구와 대조구 sample의 확연한 차이를 보이며(Fig. 2-a) loading plot의 correlation 결과 0.65, 1.53, 1.64, 2.05, 2.22, 5.21 ppm의 peak가 중앙값에서 가장 멀리 나타나 다른 peak들과 구분되는 것을 확인할 수 있다(Fig. 2-b). PLS분석에서는 PCA에서 보다 대조구와 실험구의 샘플이 더욱 명확하게 구분되는 것을 확인할 수 있어 regression coefficients의 VIP value를 확인한 결과 0.65, 1.53, 2.05, 2.22 ppm의 peak가 가장 두드러지게 구분되었으며 이 peak들은 지질성분의 나타내는 methylene과 methyl기로 확인되었다(Fig. 3).

¹H-NMR 분석과 다변량통계분석을 통해 백신처리를 통한 넙치의 혈청성분 중 지질성분의 함량에 차이가 나는 것을 확인할

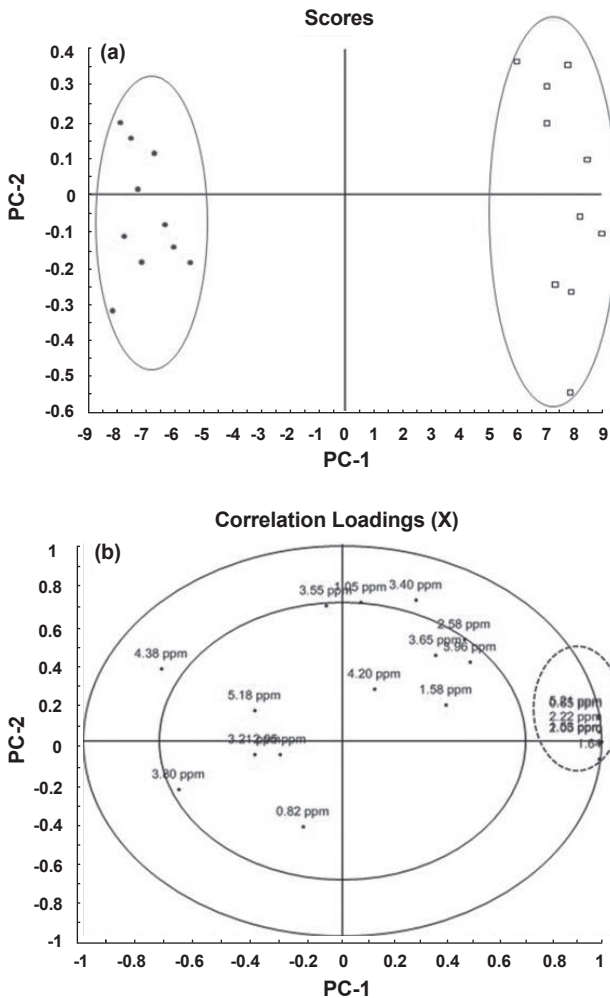


Fig. 2. PCA scores plots (a) and loading plots correlation (b) based on total region of ¹H-NMR spectral data. Key: (●) non vaccinated fish sera, (□) vaccinated fish sera. The open lined circle indicates distinguished peaks from non vaccinated fish serum.

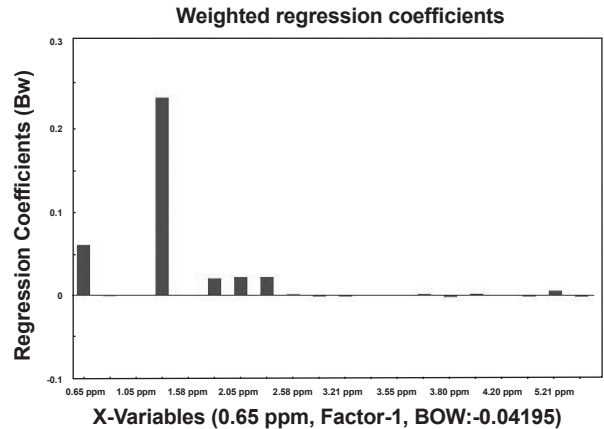


Fig. 3. PLS regression coefficients based on data from ¹H-NMR spectra.

수 있었고 TLC를 통해 대조군과 구별되는 band를 분리하여 구조분석을 실시하였다. 물질은 FAB-MS 분석결과 분자량이 885.43로 나타났으며 NMR (¹H, ¹³C)과 MS를 통해 분자식은 C₅₇H₁₀₄O₆로 확인되었다. ¹³C-NMR을 통해 14.0과 14.1 ppm 사이에서 3개의 지방산 methyl carbon (C-18, 18'18''), 22.8-29.1 ppm 사이의 9개의 methylene carbon (C-(3',4',17')×2, C-3'', 4'', 17''), 29.4-30 ppm 사이의 18개의 methylene carbon (C-(5', 6',7',12'-15')×2, C-5'', 6'',7'',12''-15''), 31.9- 33.9 ppm 사이의 12개의 methylene carbon (C-(2',8', 10',11')×2, C-2'',8'',10'',11'')을 확인하였고, 130.5 ppm에 6개의 methine carbon (C-(9', 10')×2, C-9'', 10'')을 확인하였다. 또한 65.1 ppm에 2개의 glycerol methylene carbon (C-1, C-3), 69.5 ppm에 glycerol methine carbon (C-2)을 확인하였고 173.5 ppm에서 3개의 carbonyl carbon (C-1'×2, C-1'')을 확인하였다. ¹H-NMR에서는 ¹³C-NMR에 상보되는 3개의 지방산 methyl proton과 42개의 methylene proton, 6개의 methine proton을 나타냈으며 2개의 glycerol methylene proton과 1개의 glycerol methane proton을 확인하였다. NMR과 MS의 data 분석결과 glycerolipid로 확인되었으며 Ramsewak et al. (2001)가 보고한 문헌의 자료와 비교한 결과 triolein으로 확인되었다(Fig. 4).

몇몇 문헌에서 특정 노출에서 어류의 혈청성분 중 triglyceride의 변화를 보고한 바 있다. Tilapia Nilotica (*Oreochromis niloticus*)의 사육에서 항산화효과는 증대를 위해 마늘을 섭취시킨 경우 혈청내 triglyceride의 함량이 감소하였으며(Metwally, 2009), African catfish (*Clarias gariepinus*)의 양식에서 potassium permanganate (KMnO₄)으로 chemotherapeutant를 시킨 경우, 역시 혈청내 triglyceride의 함량은 감소하였다(Kori-Siakpere et al. 2011). 어류의 혈청에서 triglyceride는 내재성의 에너지원으로(Jeon et al., 1995) 혈청내에서의 변화는 이화작용의 결과로 나타난 것으로 볼 수 있다. 본 연구를 통해 넙치에 백신을 접종한 경우 항체가는 증가하였고 triglyc-

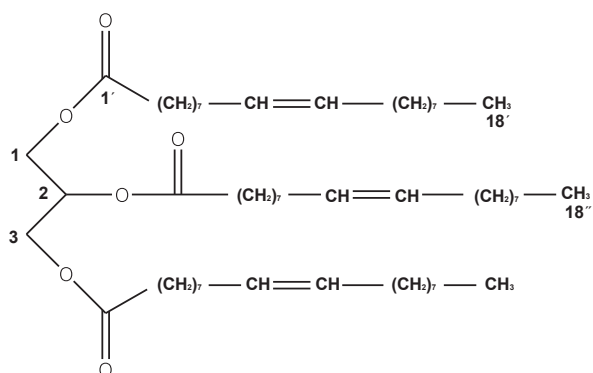


Fig 4. Structure of triolein isolated from sera of olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

eride의 함량은 감소하는 것으로 나타났고 그 성분은 triolein으로 확인되었다. 본 연구를 통해 확인된 triolein는 향후 백신 개발 및 면역보강제 개발 연구에서 효능을 확인하는 indicator로 활용하고자 한다.

사 사

이 논문은 정부재원(교육과학기술부)으로 한국연구재단의 지원을 받아 연구되었음(No. 2009-0088860).

참고문헌

- Ala-Korpela M. 1995. ¹H NMR spectroscopy of human blood plasma. *Prog Nucl Magn Reson Spectr* 27, 475-554.
- Austin B and Austin DA. 1999. Characteristics of the diseases. In: Austin B, Austin DA (ed) *Bacterial fish pathogens; diseases of farmed and wild fish*, 3rd ed, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 13-15.
- Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, Grainger DJ and Holmes E. 2003. Application of chemometrics to ¹H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *Analyst* 128, 32-36.
- Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Nunez S and Magarinos B. 2006. Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima* (L.). *J Fish Dis* 29, 541-547.
- German JB, Hammock BD and Watkins SM. 2005. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics* 1, 3-9.
- Griffin JL and Kauppinen RA. 2007. A metabolomics perspective of human brain tumours. *FEBS J* 274, 1132-1139.
- Jeon JK, Kim PK, Park YJ and Huh HT. 1995. Study of serum constituents in several species of cultured fish. *J Korean Fish Soc* 28, 123-130.
- Joo HJ and Cho JH. 2005. Pattern recognition using NMR spectral data for metabonomic analysis of urine samples from experimental animals. *Yakhak Hoeji* 49, 74-79.
- Kawai K, Liu Y, Ohnishi K and Oshima S. 2004. A conserved 37 kDa outer membrane protein of *Edwardsiella tarda* is an effective vaccine candidate. *Vaccine* 22, 3411-3418.
- Kim MS, Kim KD, Kim KW, Park MA and Kim JW. 2009. The efficacy and influence on growth of olive flounder *Paralichthys olivaceus* vaccinated against *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus iniae*. *J Fish Pathol* 22, 327-334.
- Kim SW, Koo BC, Kim JH and Liu JR. 2006. Metabolic discrimination of rice cultivars and relative quantification of major sugar compounds using ¹H NMR spectroscopy combined by multivariate statistical analysis. *J Plant Biotech* 33, 283-288.
- Kori-Siakpere O, Ikomi RB and Ogbe MG. 2011. Biochemical response of the African catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) to sublethal concentrations of potassium permanganate. *Annals Bio Res* 2, 1-10.
- Liu Y, Oshima SI and Kawai K. 2007. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Edwardsiella tarda* has protective antigenicity against *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder. *Dis Aquat Org* 75, 217-220.
- Massart DL and Vandeginste BGM. 1998. *Chemometrics: a textbook*. Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, Netherlands, 242.
- Metwally MAA. 2009. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in Tilapia Nilotica (*Oreochromis niloticus*). *World J Fish & Marine Sci* 1, 56-64.
- Mohanty BR and Sahoo PK. 2007. Edwardsiellosis in fish: a brief review. *J Biosci* 32, 1331-1344.
- Nakatsugawa T. 1983. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. *Fish Pathol* 18, 99-101.
- Ramsewak RS, Nair MG, Murugesan S, Mattson WJ and Zasadia J. 2001. Insecticidal fatty acids and triglycerides from *Dirca palustris*. *J Agric Food Chem* 49, 5852-5856.