

유동세포분석에 의한 참전복(*Haliotis discus hannai*) 세포내 DNA 함량 분석 최적화

박인석*

한국해양대학교 해양생명과학부

A flowcytometric determination of DNA content in Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* cell

In-Seok Park*

Division of Marine Bioscience, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Republic of Korea

*Corresponding author

In-Seok Park

Tel. 051-410-4321

E-mail. ispark@kmou.ac.kr

Received: 28 January 2020

First Revised: 13 February 2020

Second Revised: 12 May 2020

Revision accepted: 14 May 2020

Abstract: The level at which analyses of DNA content might contribute more significantly to the genetic mechanisms of evolution lies in the events of speciation. The object of this study was to investigate the DNA content of abalone (*Haliotis discus hannai*) and determine the optimal tissue samples for measuring the DNA content of abalone by flowcytometry without fixation. The DNA content (pg/nucleus) of gill tissue (2.5 ± 0.08), which was contaminated with protozoa, was significantly lower than that of muscle tissue (3.2 ± 0.02), mantle tissue (3.2 ± 0.02) ($p < 0.05$), and a standard reference standard, while the DNA contents of muscle tissue and mantle tissue were higher than that of the standard reference. Considering the results of this study, DNA content analysis with flowcytometry is an acute and rapid method by which muscle tissue and mantle tissue are the most appropriate sample for measuring the DNA content of abalone without fixation.

Keywords: abalone (*Haliotis discus hannai*), DNA content, flowcytometry, tissues

서 론

전복(abalone)은 연체동물, 복족류, 원시복족목, 전복과에 속하는 패류로 우리나라에서 널리 식용되는 산업적 가치가 있는 중요한 수산생물이다. 우리나라에 서식하는 주요 전복은 참전복(북방전복, *Haliotis discus hannai*), 말전복(*H. gigantea*), 까막전복(*H. discus*), 시볼트전복(*H. sieboldii*), 오분자기(*H. diversicolor aquatilis*) 및 둥근전복(*H. discus*)

등 6종이 있는바, 시중에 유통되고 있는 전복의 대부분은 양식산 참전복이다(Kim *et al.* 2017; Cho *et al.* 2018).

이러한 전복류(*Haliotis* spp.)의 세계 양식 총생산량은 2000년에는 2,540톤에 불과하였으나, 2015년에는 139,594톤으로 약 55배 증가하였으며(FAO 2017), 2016년 국내 전복류 양식 생산량은 약 12,000톤으로서 이러한 국내·외 전복 양식 생산량의 증가 추세는 앞으로도 지속될 것으로 예상되고 있기 때문에, 전복을 대상으로 한 다양한 연구가

수행되고 있다(NFFC 2000; Kim *et al.* 2017).

유동세포분석기(flowcytometry)는 유액 상태의 패류 세포 집단을 대상으로 세포 크기, 세포 내부 조성 정도, 세포 주기 분석 및 세포기능 인지 등과 같은 한 세포가 갖는 여러 특징을 분석 가능하다(Vanparys *et al.* 2006). 이러한 유동세포분석은 이매패류에서 혈구세포 집단의 분리나 확인으로부터 이매패류의 면역학과 병리학 연구 분야로 그 영역이 확대되고 있으며, DNA 함량과 세포주기 측정은 유동세포분석의 주요 기능이 되고 있다(Ashton-Alcox *et al.* 2001; Da Silva *et al.* 2004; Park 2019, 2020a, 2020b). 최근 기기 발전, 환산방법 개선과 향상된 시약기능 등으로 유동세포분석기는 DNA 함량 분석에 그 사용 효과의 장래성을 보이고 있다(Estevam *et al.* 2011; Park 2019).

본 연구는 이러한 유동세포분석에 의해서 DNA 함량 조사는 패류 진화의 유전적 기작을 예측하게끔 하여 종분화를 파악할 수 있다는 관점의 일환으로, 신속한 DNA 함량 파악을 위하여 참전복의 미고정(nonfixation)된 아가미, 근육 및 외투막 조직을 사용하여 참전복의 DNA 함량을 조사하였으며, 아울러 DNA 함량 조사에 사용된 참전복 조직들을 대상으로 참전복 DNA 함량 조사에 적절하고 효과적인 조직을 구명하고자 조직학적 조사를 실시하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 참전복(*H. discus hannai*)은 2019년 5월에 부산광역시(한국)의 수산시장에서 구입하였으며, 한국해양대학교 수산유전육종학 사육실(한국)에서 3개의 100L 사각수조에 수조당 각 50마리씩 수용 후, 20°C 수온에서 공기공급하며 사육하였다. 실험에 사용된 참전복의 평균 각장은 13.7 ± 0.26 cm, 평균 각폭은 7.2 ± 0.48 cm, 평균 무게는 220.1 ± 13.9 g이었다.

무작위로 표본된 30마리의 전복을 20°C의 수온에서 200 ppm의 염산리도카인(Chinwhoa chemical Co, Korea)/1,000 ppm NaHCO₃ (Sigma, USA)로 마취하였다. 마취된 각 전복 표본으로부터 아가미, 근육 및 외투막조직을 추출하여 petri dish에서 면도날로 세절하였다. 세절된 각 조직에 200 μ L의 extraction buffer (Cystain UV Precise T Kit; Partec, Görlitz, Germany)을 첨가 후 핵막을 제거하기 위하여 30초간 pipetting하였다. 연속으로 30 μ m 여과

주사기로 여과 후 각 표본들을 시험관에 수집하였다. 수집된 각 세포들은 Cystain UV Precise T Kit (Partec, Görlitz, Germany)를 사용하여 상온에서 15분간 염색하였다. 상대적인 DNA 함량을 측정하기 위하여 각 조직세포들을 Park (2019, 2020a, 2020b)의 방법에 의거 유동세포분석기(Partec PA-II flowcytometry, Germany)를 사용하여 분석하였다. DNA 함량이 2.8 pg DNA nucleus⁻¹인 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*) 적혈구를 standard reference로 사용하였다(Park *et al.* 1999).

전복 각 조직세포들의 DNA 함량을 분석하였으며, 전복 DNA 함량 분석에 안정적이고 적절한 조직 파악을 위하여 본 연구에 사용된 전복 아가미조직을 대상으로 조직학적 연구를 실시하였다. 전복 아가미조직을 추출 후 10% 중성포르말린용액(100 mL formalin, 6.5 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 4.5 g KH₂PO₄ and 900 mL DW: Sigma, USA)으로 24시간 고정하였다. 고정된 전복 아가미조직은 기존의 조직학적 방법에 의거 ethanol (Sigma, USA)로 탈수, xylene (Sigma, USA)으로 투명화시켰고 paraffine으로 포매하였다. 이후 전복 아가미조직 표본은 6 μ m로 연속절편하여 Mayer's hematoxyline과 eosin Y-phloxine B로 염색하여 생물현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany) 하에서 관찰하고 사진촬영하였다. 각 실험에 사용된 전복 개체수는 30마리였으며, 전체 3반복 실험을 실시하였고, SPSS (SPSS 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)로 Student's *t*-test ($p < 0.05$)를 실시하여 유의성 검정을 하였다.

결과 및 고찰

Figure 1의 대표적인 diagram에 나타난 바와 같이 참전복(*H. discus hannai*)의 flowcytometry channel의 수는 아가미는 68 (Fig. 1a), 근육은 83 (Fig. 1b), 외투막은 84 (Fig. 1c) 그리고 standard reference인 미꾸라지(*M. mizolepis*)는 74 (Fig. 1d) 이었다. 3 반복 실험한 각 조직의 DNA diagram 결과를 대상으로 standard reference로 사용한 미꾸라지 DNA 함량인 2.81 pg nucleus⁻¹ (Park *et al.* 1999) 기준한 상대 DNA 함량으로 계산한 결과는 Table 1과 같다. 계산된 참전복의 각 조직에서의 DNA 함량은 아가미가 2.5 ± 0.08 pg nucleus⁻¹, 근육이 3.2 ± 0.02 pg nucleus⁻¹ 그리고 외투막이 3.2 ± 0.02 pg nucleus⁻¹이었다(Table 1). 참전복의 DNA

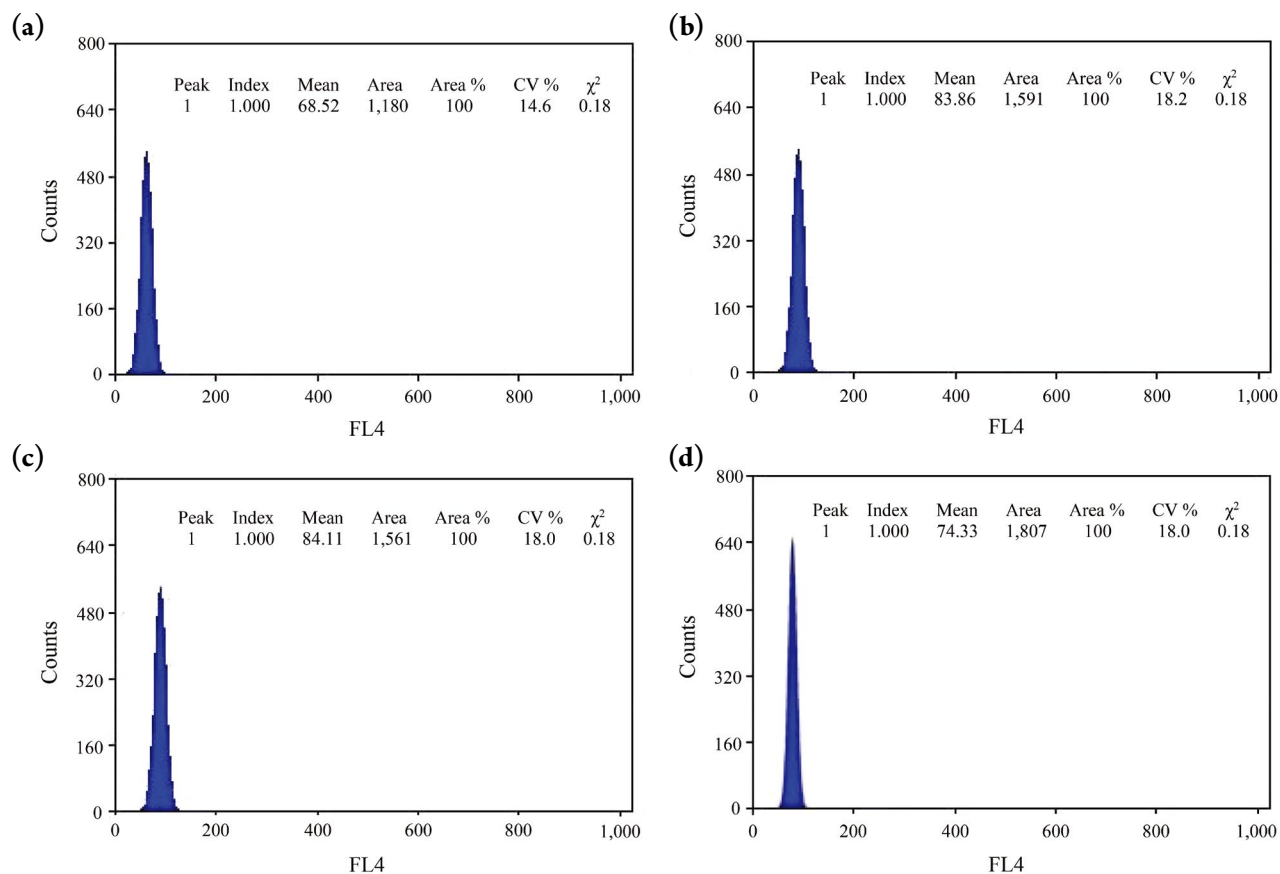


Fig. 1. Representative flowcytometry diagrams for the (a) gill, (b) muscle, and (c) mantle tissues of abalone, *Haliotis discus hannai*, and (d) mud loach, *Misgurnus mizolepis* (standard reference). The flowcytometry gain value was 382.5 in each group. Fluorescence 4 (FL4) represents red fluorescence.

Table 1. Mean values of the flow cytometric peak and the DNA content of gill, muscle, and mantle tissues from abalone, *Haliotis discus hannai**

	Mean value			DNA content (pg nucleus ⁻¹)		
	Gill	Muscle	Mantle	Gill	Muscle	Mantle
Mean ± SE	66.4 ± 2.12 ^a	84.5 ± 0.45 ^b	83.8 ± 0.57 ^b	2.5 ± 0.08 ^a	3.2 ± 0.02 ^b	3.2 ± 0.02 ^b

*The DNA content of mud loach, *Misgurnus mizolepis* (2.81 pg nucleus⁻¹; Park *et al.* 1999), was used as a standard reference in this study. Flowcytometry was conducted using red fluorescence (fluorescence 4). The gain value was 382.5 in each group. Values (means ± SE) in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). Representative flowcytometry diagrams for gill, muscle and mantle of this Table are shown in Fig. 1.

함량에 있어 근육과 외투막은 $3.2 \pm 0.02 \text{ pg nucleus}^{-1}$ 로 동일한 반면, 아가미는 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$). An *et al.* (2007)이 보고한 부화 후 4년생 전복의 고정된 외투막 DNA 함량 ($3.36 \text{ pg nucleus}^{-1}$)과 비교 시, 본 연구 결과는 참전복의 DNA 함량에 있어 유사한 결과치를 보여주고 있다.

Hinegardner (1974)는 더욱 일반화된 연체동물은 더욱 특화된 종보다 높은 DNA 함량을 가진다고 하였으나 González-Tizón *et al.* (2000)은 이러한 가정은 보편성이 없다고 하였다. 패류를 대상으로 한 중간 분류 및 배수화 판별 시 3가지 영역의 기법이 대체적으로 사용되는 바, 첫째는 coulter counter로 적혈구 핵 크기 판별 (Thorgaard *et*

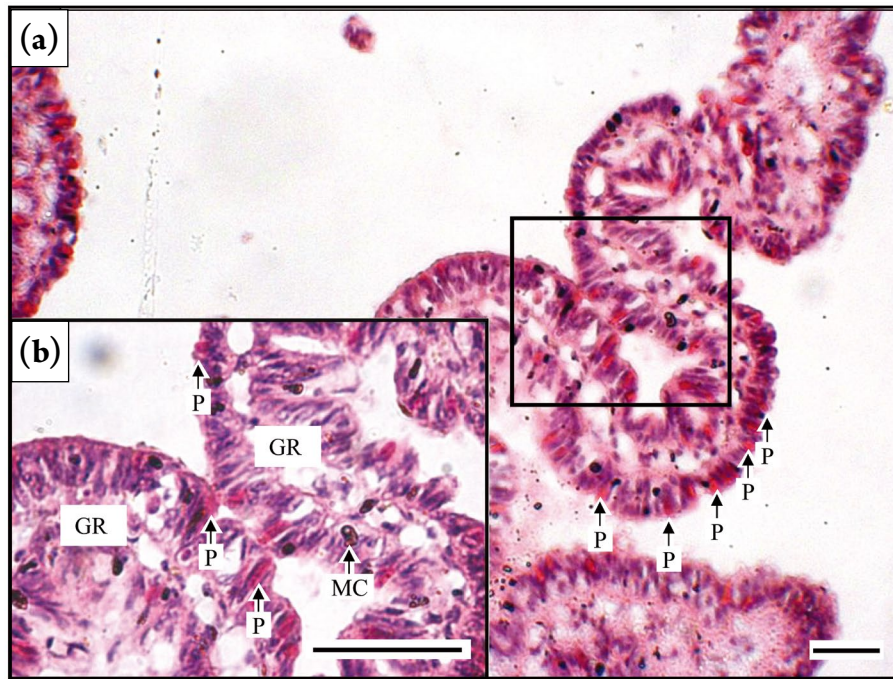


Fig. 2. Histological appearance of gill tissue from abalone, *Haliotis discus hannai*. (a) Cross-section of a gill; (b) high-power view of the area indicated by the thick black box in this Fig. a. Note that many protozoa were observed in the gill rakers (arrows). GR: gill raker; MC: mucous cell; P: protozoa. Scale bars, 10 μ m.

al. 1982), 둘째는 생물현미경 하에서의 염색체 조사나 적혈구 핵 크기 판별 (Wolters *et al.* 1982), 셋째는 초 당 100 개 이상의 세포들을 연속적으로 분석하여 다양한 변이 (즉, 형태와 세포 활성)를 측정할 수 있는 유동세포분석법 (Estevam *et al.* 2011; Park 2019, 2020a, 2020b)이 있다. Coulter counter로의 적혈구 핵 크기 판별이나 생물현미경으로의 적혈구 핵 크기, 염색체 조사(비록 수산생물 유생 시기에 chopping method로 염색체 제작이 있을 수 있으나, 염색체 결과 도출에서 성체시기에서의 신장조직으로부터의 염색체 제작에 비해 어려움이 있음)에 비하여 유동세포분석법은 수산생물 유생조직으로부터도 신속하고 정확하게 DNA 함량을 분석할 수 있어, 실험적 연구나 부화장에서 종묘생산에 유효하고 우수한 도움을 줄 수 있을 것이다. 이전의 연구들(An *et al.* 2007; Jee and Chang 2012)인 경우, 참전복 DNA 함량 측정시 최소 4~24시간이 소요된 바와 비교 시 본 연구에서는 비교적 짧은 시간인 최대 30분 이내에 DNA 함량 측정이 가능하고 DNA 함량 측정에서 유동세포분석으로 인하여 더욱 정확함이 도출되었다.

참전복의 아가미조직을 조직학적으로 조사한 결과

(Fig. 2), 여타의 protobranch 종과 마찬가지로 참전복은 bipectinate 아가미로서 gill filament에 잘 발달된 cilia와 microvilli가 확인되었다(Fig. 2a). Gill filament의 상피층은 단순한 입방상피세포들과 점액세포들로 구성되었으며, 원생생물들이 다수 관찰되었다(Fig. 2b), 본 연구 결과 참전복 DNA 함량에서 아가미조직이 근육조직 및 외투막조직에 비하여 낮은 원인은, Fig. 2에서 보는 바와 같은 점액세포 내에 존재하는 다수의 원생생물에 의해 DNA 함량 측정에 영향을 받은 것으로 판단된다. 고정 (fixation) 과정을 거치지 않은 참전복 아가미조직과 외투막조직의 DNA 함량을 조사한 본 연구 결과를 아가미조직과 외투막조직에서 동일한 DNA 함량을 보인 고정 과정을 거친 An *et al.* (2009)의 보고와 비교 시, 본 연구에서는 미고정으로 인해 원생생물에 오염된 아가미는 정확한 전복 DNA 함량 측정이 불가하였다는 것으로 사료된다. 미고정에 의한 참전복 조직에서의 유동세포분석법은 참전복의 일부 조직만 사용하므로 참전복 초기 유생에서도 DNA 함량 측정이 가능함과 더불어 미고정으로 인하여 고정 과정을 거치는 DNA 함량 측정방법에 비하여 비교적 신속하게 DNA 함량 측정이 가능한 하지만, 아가미와 같은 원생생물에 오염된 조직

에서는 DNA 함량 측정이 불가한 것으로 결론 지어진다. 본 연구 결과를 고려 시, 참전복에서 고정 없이 유동세포 분석에 적절한 조직은 근육과 외투막으로 나타났으며 본 연구에 적용된 유동세포분석법은 참전복을 위시한 여과 섭이를 하는 여타 패류에서의 DNA 함량 분석 시 정확하고, 신속한 방법임이 판명되었고 차후, 적용 가능하리라 사료된다.

적 요

DNA 함량 조사는 진화의 유전적 기작을 예측하여 종 분화를 파악하게 한다. 본 연구의 목적은 참전복(*Haliotis discus hannai*)의 DNA 함량을 측정하고 유세포분석기(flowcytometry)로 고정(fixation) 없이 DNA 함량 측정에 최적인 조직들을 파악하는 것이다. DNA 함량(pg nucleus^{-1})에 있어, 원생생물에 오염된 아가미조직(2.5 ± 0.08)은 $3.2 \pm 0.02 \text{ pg nucleus}^{-1}$ 의 DNA 함량을 보인 근육 조직과 외투막조직에 비하여 유의하게 낮았고($p < 0.05$) standard reference보다도 낮은 반면, 근육조직과 외투막조직은 standard reference보다 높았다. 본 연구 결과들을 고려 시, 참전복에서 고정 없이 유동세포분석에 적절한 조직은 근육과 외투막이며 본 연구에 적용된 고정 과정이 없는 유세포분석법은 참전복 DNA 함량 분석 시 정확하고, 신속한 방법임이 판명되었다.

사 사

본 논문의 수정시 건설적이고 도움되는 논평을 주신 익명의 심사자들에게 감사드립니다. 아울러 본 논문의 실험시 수고하신 한국해양대학교 수산유전육종학연구실의 실원들께도 감사드립니다. 본 연구는 교육부의 연구윤리 확보를 위한 지침(교육부 훈령 제153호)과 식품의약품 안전처의 실험동물에 관한 법률(법률 제15278호) 기준을 준수하였으며, 아울러 한국해양대학교 연구윤리를 준수하였습니다.

REFERENCES

An HS, YJ Jee, SJ Han, BL Kim, EM Kim and IS Park. 2007. In-

duction of a new hybrid between *Haliotis gigantea*(♀) and *H. discus*(♂). Korean J. Genetics 29:239-244.

Ashton-Alcox KA, B Allam and SE Ford. 2001. Application of flowcytometry to bivalve pathology. pp. 85-124. In: Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 5 (Fingerman M and R Nagabhusanam eds.). Science Publishers, Plymouth, UK.

Cho JH, HG Nam and KS Oh. 2018. Processing and quality characteristics of a cultured recessive small-sized abalone *Haliotis discus hannai* extract. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 51:640-646.

Da Silva PM and A Villalba. 2004. Comparison of microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. J. Invertebr. Pathol. 85:97-104.

Estevam J, H Danaee, R Liu, J Ecsedy, W Trepicchio and T Wyant. 2011. Validation of a flow cytometry based G2M delay cell cycle assay for use in evaluating the pharmacodynamic response to Aurora A inhibition. J. Immunol. Methods 363: 135-142.

FAO. 2017. Abalone production continues to grow, coupled with continuing demand, price high and stable. GLOBEFISH-Information and Analysis on World Fish Trade. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.

González-Tizón A, A Martínez-Lage, I Rego, J Ausiós and J Méndez. 2000. DNA contents, karyotypes and chromosomal location of 18S-5.8S-28S ribosomal loci in some species of bivalve molluscs from the Pacific Canadian coast. Genome 43: 1065-1072.

Hinegardner R. 1974. Cellular DNA content of the mollusca. Comp. Biochem. Physiol. 47:447-460.

Jee YJ and YJ Chang. 2012. Cytogenetic analysis of the triploid Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. Korean J. Malacol. 28:37-43.

Kim HS, KW Lee, HS Jeong, J Kim, AY Yun, SH Cho, GA Lee and KY Kim. 2017. Effect of dietary microalgae, diatom-dominant, oil extracts on growth, body composition and shell color of juvenile abalone *Haliotis discus*. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 50:738-744.

NFFC. 2000. Marine Products in Korea. National Federation of Fisheries Cooperatives. Suhyp Publ. Co., Seoul, Korea.

Park IS. 2019. A comparative analysis of cell cycles in diploid and induced triploid tissues in marine medaka (*Oryzias dancena*). Korean J. Environ. Biol. 37:735-740.

Park IS. 2020a. Morphometric characteristics of diploid and triploid Far Eastern catfish, *Silurus asotus*. Korean J. Environ. Biol. 38:106-113.

Park IS. 2020b. Comparative analysis of sectioned-body morphometric characteristics of diploid and triploid marine medaka, *Oryzias dancena*. Korean J. Environ. Biol. 38:137-145.

- Park IS, CH Kim and DS Kim. 1999. Karyotypes and cellular DNA contents of two species in the genus *Lateolabrax* from Korea. *Fish. Sci.* 65:488-489.
- Thorgaard GH, PS Rabinovitch, MW Shen, GAE Gall, J Propp and FM Utter. 1982. Triploid rainbow trout identified by flow cytometry. *Aquaculture* 29:305-309.
- Vanparys C, M Maras, M Lenjou, J Robbens, D van Bockstaele, R Blust and W De Coen. 2006. Flow cytometric cell cycle analysis allows for rapid screening of estrogenicity in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicol. Vitro* 20:1238-1248.
- Wolters WR, CL Chrisman and GS Libey. 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, *Ictalurus punctatus* (*Rafinicsque*). *J. Fish Biol.* 20:253-258.