



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

수산학석사 학위논문

붉바리(*Epinephelus akaara*) 장거리
수송을 위한 적정수온 구명



2017년 2월

부경대학교 대학원

수 산 생 물 학 과

조 민 식

수산학석사 학위논문

붉바리(*Epinephelus akaara*) 장거리
수송을 위한 적정수온 구명

지도교수 김 종 명

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함.

2017년 2월

부경대학교 대학원

수 산 생 물 학 과

조 민 식

조민식의 수산학석사 학위논문을 인준함.

2017년 02월



주심 농학박사 김창훈 (인)

위원 수산학박사 민병화 (인)

위원 이학박사 김종명 (인)

목 차

Abstract	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험어 및 조건	4
2. 채혈 및 혈액분석	4
3. RgHsp70의 cloning 및 sequencing	5
4. RgHsp70 full-length cDNA 분리 (3' and 5' RACE)	7
5. RgHsp70 발현분석(RT-PCR and qPCR)	8
6. 통계분석	8
III. 결 과	9
1. 실험어의 생존율 및 유영행동	9
2. 코티졸 및 글루코스 변화	10
3. Ht 및 Hb	11
4. AST 및 ALT	12
5. Total protein, NH ₃ 및 삼투질 농도	12
6. RgHsp70 full-length cDNA	14
7. RgHsp70 발현	19
IV. 고 찰	21

V. 요 약	27
감사의 글	28
참고문헌	29



Optimal Water Temperature for Long Distance Transportation of Red-spotted Grouper (*Epinephelus akaara*)

Min-Sik Cho

Department of Fisheries Biology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Red-spotted grouper *Epinephelus akaara* has been drawing more attention as one of the potential mariculture fish in Korea. To study the physiology associated with its culture and long-distance transport, we evaluated the changes in blood composition in red-spotted grouper at different water temperature (12°C, 15°C, 18°C and 21°C). The biochemical characteristics of the blood in experimental fishes were analyzed upon exposure at each temperature condition for 48hr. Physiological parameters investigated were hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), plasma cortisol and glucose, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), NH₃, osmolality and total protein (TP), respectively. While little difference was observed in total protein among the experimental group, levels of Ht and Hb, AST and ALT, NH₃ and osmolality were increased upon exposure to 12°C. Levels of the plasma cortisol and glucose were also increased at 12°C as compared to 21°C group. The result suggests that critical lower limit for red-spotted grouper is 12°C. For molecular analysis, heat shock protein 70 (Hsp 70) was

identified from red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). The cDNA of red-spotted grouper Hsp70 (designated RgHsp70) was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length of RgHsp70 cDNA was 2,152 bp, consisting of a 5'-terminal untranslated region (UTR) of 105 bp, 3'-terminal UTR of 274 bp, and an open reading frame (ORF) of 1,773 bp encoding a polypeptide of 590 amino acids. RgHsp70 contained all the three classical Hsp70 family signatures with a theoretical molecular weight of 64.94 kDa and an estimated isoelectric point of 5.20. Multiple alignment and phylogenetic analysis revealed that RgHsp70 gene shared a high similarity with other Hsp70 genes in fish. RgHsp70 mRNA was predominately expressed in the liver together with a reduced expression in head-kidney tissue. Expression of RgHsp70 in livers was gradually increased as compsure temperature was changed 21 °C to 12 °C. In this study, we investigated the effects of lower water temperature on physiological conditions of a novel red-spotted grouper and found that heat shock protein 70 may be an important molecule involved in immune response.

I. 서론

수온은 어류의 대사, 생리활성, 성장, 건강도, 생존 및 번식에 영향을 미치는 가장 중요한 요인 중 하나이다(Schreck, 1982; Adam, 1990; Santos and Pacheco, 1996; Cataldi et al., 1998). 그러나 어류양식에 있어 급격한 수온의 변화는 수송, 감금, 선별, 고밀도 등과 마찬가지로 어체에 스트레스 요인으로 작용하게 된다. 어체가 스트레스 요인에 노출되게 되면 1차적으로 시상하부-뇌하수체-간신선축의 활성이 높아지며, 이로 인해 cortisol이 혈중으로 분비되며(Perry and Reid, 1993; Wendelaar Bonga, 1997; Chang and Hur, 1999), 2차적 반응으로는 불-이온의 불균형, 간세포의 파괴에 의한 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)의 증가, 심장박동, 산소소비의 증가 및 에너지 동원의 증가, 즉 혈중 글루코스의 상승과, 총 단백질의 감소 및 NH₃의 상승이 여러 경골 어류에서 보고되고 있다(Park et al., 2016; Yang et al., 2016).

Heat shock protein (HSP)은 원핵생물, 효모, 식물에서 진핵생물까지 모든 생물에서 계통발생학적으로 잘 유지 및 보존되어져 있으며, 세포 내에 어디에서나 다양하게 존재하며 주로 단백질을 용해시킨다(Srivastava, 2002; Miliani et al., 2002). 대부분의 Hsps는 구조적인 요인으로 발현되는 것으로 알려져 있지만 (Most Hsps are constitutively expressed), 다양한 생리학적 혼란이나 스트레스 요인, 높은 온도, 산소의 급증, 독소, 세균의 감염과 기타 다른 환경적 요인으로 인해 높은 조절능을 보이며, 단백질의 변성효과를 가져온다(Srivastava, 2002; Yenari et al., 1999). Hsps는 일반적인 조건이나 스트레스 (both normal and stressful conditions)로 인한 조건 모두에서 필수적인 생물학적 기능을 수행한다. Hsps는 세포기관 사이에서 단백질의 전좌(translocation), 복잡하고 다양한 소단위(subunit)의 결합이나 분해, 스트레스로 인한 단백질의 변형으로 퇴화, 병리학적인 요인에 의한 단백질의 응집과 분해, 정상적인 조직내의 세포 생존능을 강화시키는 등의 기능을 수행하는 것으로 여겨지고 있다(Srivastava, 2002; Zmijewski et al., 2004, Robert, 2004). Hsps는 전사조절, 스트레스 반응과 분자의 진화에 관한 연구에 유용하게 이용되며 (Srivastava, 2002; Morimoto, 1998; Lindquist,

1999; Feder and Hofmann, 1999), 분자량에 따라서 Hsp는 Hsp 90 (85-95kDa), Hsp 70 (68-73kDa), Hsp 60과 Hsp 47, 낮은 분자량의 Hsps (16-24kDa)의 등급으로 나눌 수 있다(Park et al., 2007).

Hsp 70은 분자 샤페론(molecular chaperone)에 의해 세포내 단백질을 보호하고, 이 단백질과 함께 일시적인 상호작용의 기능을 수행한다(Feder ME and Hoffmann GE, 1999; Park et al., 2007). 세포 내 단백질이 손상을 입었을 때 높은 발현능을 보이고, 다양한 스트레스로 발생하는 heat shock factors(HSFs)에 의해 변성된 단백질을 세포질(cytosol) 내에서 다른 Hsps와 함께 HSFs를 분열시키면서 단백질을 활성화시킨다. 이러한 스트레스 요인에 따라 Hsp70은 세포 내에서 단백질의 다양한 전사와 합성을 유발하며, 단백질 기능과 구조의 회복을 돕는다(Wang et al., 2009). Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala* (Ming et al., 2010), channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Song et al., 2016), zebrafish *Danio rerio* (Graser et al., 1996), rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Ojima et al., 2005), humphead snapper *Lutjanus sanguineus* (Zhang et al., 2011) 등 많은 경골어류에서 Hsp70에 대한 분자특성과 동정 및 발현에 대한 보고가 있었다.

바리과 어류는 전 세계 3조원 이상의 시장규모를 가지고 있고, 중화권을 비롯하여 동남아시아, 일본과 우리나라에서도 고가로 소비되며, 최근에는 수산물 시장의 확대로 그 수요가 계속적으로 증가하고 있는 고급 해산 어류이다(Park et al., 2016). 특히, 붉바리는 바리과 어류 중에서도 식감이나 맛이 좋아 그 수요가 증가하고 있으며, 이를 충족시키기 위해 중국과 동남아시아 지역에서 붉바리의 종묘생산 및 양성기술개발을 시도하고 있는 실정이다. 붉바리(*Epinephelus akaara*)는 한국, 일본 등 서태평양 해역의 암반에 주로 서식하고, 온대성 어종으로 알려져 있으며 한국과 일본에서 고급 어종으로 소비되며 그 수요가 증가하고 있는 추세이다. 최근, 우리나라에서도 붉바리의 이러한 국제적 소비시장을 고려하여 국립수산물과학원 수산종자(Golden Seed Project, GSP)사업단에서는 붉바리의 종묘생산 기술을 확립한 바 있으며, 생산된 종자를 대만 등 중화권 시장에 수출을 시도하고 있다. 그러나, 아직 수온 등 장거리 수송 적정조건은 밝혀져 있지 않은 상태이다.

본 연구에서는 수온별 붉바리의 혈액생리학적 반응과 수온별 스트레스 반응으로 Hsp mRNA 발현을 조사함으로써 장거리 수송을 위한 적정수온을 구명하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험어 및 조건

실험어인 붉바리는 2015년 2월에 국립수산물과학원 GSP 사업단에서 종묘 생산(제주대학교 해양과환경연구소)한 것을 2015년 6월에 국립수산물과학원(부산 기장군) 실내 사육실의 유수식 원형수조(1 ton)에 수용하여 10일동안 순치 사육하였다. 이 기간 동안 수온은 $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 염분은 33 ± 0.1 psu, 광주기는 10L:14D였으며 상업용 사료를 하루에 2번 만복으로 공급하였다. 실험어의 크기는 11.3 ± 1.5 cm, 전중은 53.4 ± 5.4 g이었다.

실험어 50마리를 히터 및 냉각기가 설치된 순환여과식 50 L 사각플라스틱 수조(수용적 40 L) 5개에 10마리씩 수용하여 각 수조의 수온을 3시간만에 10, 12, 15, 18, 21°C 로 맞추었으며, 이 후 48시간동안 유지하였다. 모든 실험은 2반복으로 수행하였다.

2. 채혈 및 혈액분석

(1) 실험재료

모든 실험어를 실험 48시간째, 150 ppm tricaine methan sulphonate, MS-222 (Sigma-Aldrich, USA) 로 마취시킨 뒤, heparin sodium (Sigma-Aldrich, USA) 처리한 1 mL 주사기를 사용하여 실험어의 미부혈관으로부터 채혈하였다. 채혈 직후 혈액의 일부는 헤마토크리트(hematocrit, Ht)와 헤모글로빈(hemoglobin, Hb) 분석을 위해 사용하였으며, 나머지 혈액은 20분간 방치한 다음 원심분리(4°C , 8000 rpm, 10분)하

여 분석 전까지 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다.

Ht는 혈액을 모세유리관에 넣어 원심분리(10000 rpm, 15분)하여 Ht측정판(Micro-haematocrit reader, Hawksley Co, UK)으로, Hb은 자동생화학분석기(Fuji dry-chem 4000i, Fujifilm Co., Japan)로 측정하였다. 혈장의 글루코스 및 total protein (TP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), NH₃는 자동생화학분석기, 삼투질 농도는 삼투압측정기(Vapro 5520, WESCOR Co., USA)로 측정하였다. 혈장 cortisol 농도는 fish cortisol ELISA kit (Cusabio Biotech, China)를 상법에 따라 분석하였다.

3. RgHsp70의 cloning 및 sequencing

붉마리 Hsp70 full-length cDNA의 분리를 위해 이전에 보고된 orange-spotted grouper Hsp70 (Accession No. FJ600726) sequence를 토대로 제작한 primer는 Table 1에 나타내었다.

Total RNA는 실험어로부터 적출한 간 조직으로부터 TRizol Reagent (Gibco/BRL, USA)를 이용하여 추출하였다. 분리된 1μg의 Total RNA를 주형으로 하여 Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (Roche, USA)를 이용하여 제작자의 지시에 따라 cDNA를 합성하였다. PCR은 TaKaRa Taq (TaKaRa, Japan)을 이용하여 수행하였고, 그 조건은 다음과 같다: 95℃에서 3분 동안 initial denaturation 과정을 거친 후에, 95℃에서 30초 동안 denaturation, 56℃에서 30초 동안 annealing, 72℃에서 1분 동안 extension 반응을 30 주기 수행한 후에, 마지막 주기에서 5분 동안 extension 반응을 시켰다. 증폭된 PCR 산물은 agarose gel에 전기영동 하여 얻어진 DNA 밴드를 잘라내고 정제하였다. 준비된 DNA 산물을

pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)와 ligation 시킨 후, DH5 α competent cells (RBC Life Sciences, Korea)를 이용하여 형질전환 하였다. Plasmid DNA는 LaboPass Plasmid DNA Purification Kit (Cosmo, Korea)를 이용하여 분리하였고 염기서열을 확인하였다.

확인된 nucleotide, amino acid sequence와 multiple sequence alignment는 Genetyx ver. 8.0을 사용하여 분석하였다. Hsp70 cDNA의 sequence는 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 비교, 분석하였다. 불바리 Hsp70의 계통발생분석은 MEGA4 software package에서 neighbor-joining (NJ) 법을 이용하여 분석하였다. 이전에 보고된 Hsp70 family의 아미노산 분석을 위해, 다양한 경골어류들과 비교하였으며, 2,000번의 bootstrap 반복, 수행하여 확인하였다.

Primer name	Sequence (5'-3')
For qRT-PCR amplification:	
OgHsp70 F	GCCAAGAGACTGATTGGAAG
OgHsp70 R	CTCAAACAGAGAATCGATCTC
RgHsp70 F-1	TGAGGTCAAGTCCACAGCAG
RgHsp70 R-1	TGGCAAGATCAGTGAAGACG
RgHsp70 F-2	TGTTGTCGCTGATGTCCTTC
RgHsp70 R-2	TTCATCCTTCTCGGCAGTCT
β -actin F	GGACACGGAAAGGATTGACA
β -actin R	CGGAATTAACCAGACAAATC

Table 1. Primer used in this study.

4. RgHsp70 full-length cDNA 분리 (3' and 5' RACE)

불바리의 Hsp70 full-length cDNA sequence를 얻기 위해 oligo (dT) anchor primer (5'-CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA T(T)₁₈-3')와 CapFishing™ adaptor(Seegene, Korea)를 이용하여 합성하였다. 간의 RACE-Ready cDNA를 template로 하여 target primer(TP)와 gene specific primer(GSP)를 이용한 일련의 RACE-PCR을 진행하였다.

3' RACE 분리는 5 µL의 3' RACE cDNA, 1 µL의 10 mM 3' RACE target primer(5'-CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA T-3'), 1 µL의 10 mM 3' RACE HSP70-specific primer(5'-GCC ATC CTG TCT GGT GAC AAG TCT GAG-3')와 25 µL의 SeeAmpTaq Plus Master Mix가 포함된 50 µL PCR 시약을 이용하여 분리하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분 간 denaturation 과정을 거친 후에, 94℃에서 40초 동안의 denaturation, 62℃에서 40초 동안의 annealing, 72℃에서 1분 동안의 extension반응을 40주기 수행한 후에, 마지막 주기에서 5분 동안 extension 반응을 시켰다.

5' RACE 분리는 5 µL의 3' RACE cDNA, 1 µL의 10mM 5' RACE target primer (5'-GTC TAC CAG GCA TTC GCT TCA T-3'), 1 µL의 10mM 5' RACE HSP70-specific primer (5'-CAG CTC TCT TGT TGT CGC TGA TGT CCT TC-3')와 25 µL의 SeeAmpTaq Plus Master Mix가 포함된 50 µL PCR시약을 이용하여 분리하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분 동안 initial denaturation 과정을 거친 후에, 94℃에서 40초 동안 denaturation, 62℃에서 40초 동안 annealing, 72℃에서 1분간 extension 반응을 40주기 수행한 후에, 마지막 주기에서 5분 동안 extension 반응을 시켰다.

증폭된 PCR산물은 1% agarose gel을 이용한 전기영동을 통해 분리하였으며, 그 다음 과정은 앞에서 서술한 cDNA의 합성방법과 동일하다.

5. RgHsp70 발현분석(RT-PCR and qPCR)

조직별 발현분석을 위하여 정상어로부터 간, 두신, 후신, 비장, 아가미, 장, 뇌와 근육을 적출했고, 수온별 간 조직의 발현분석을 위해 수온별 50 L 사각수조에서 3마리씩 샘플링하여 48시간 후에 간 조직을 적출 한 뒤, total RNA와 cDNA를 확보하여 RT(reverse transcription)-PCR 및 real-time PCR 분석에 사용되었다. Total RNA와 cDNA의 분리는 위의 동일한 방법을 통해 확보하였다.

조직별 발현분석 및 수온별 간 조직에서 Hsp70 gene의 mRNA transcription을 조사하기 위해, real-time PCR 반응조건은 다음과 같다. 95℃에서 20초 동안 denaturation, 56℃에서 20초 동안 annealing을 총 40회 실시하였다. 마지막 주기에서 5분동안 extension 반응을 시켰다. 본 연구에서 이용된 primer들은 Hsp70 gene의 full-length cDNA sequence를 바탕으로 하여, forward primer와 reverse primer를 제작하였다. 사용된 Hsp70 specific primer (forward and reverse)와 대조구로 사용된 house keeping gene으로 알려진 β -actin primer는 Table. 1에 나타내었다.

6. 통계분석

분석결과와 자료값은 평균±표준오차로 나타내었으며, SPSS 통계프로그램(ver. 18.0)을 사용하여 one-way-ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 유의성을 검정하였다($P < 0.05$).

Ⅲ. 결 과

1. 실험어의 생존율 및 유영행동

실험어는 10℃ 구에서 48시간째에 전량 폐사하였고, 12, 15, 18 및 21℃ 구에서는 모두 생존하였다. 또한, 15, 18, 21℃ 구에서는 실험어가 정상적인 유영활동을 보였으나(Fig. 1A), 12℃ 구에서는 유영 없이 바닥에 가라앉은 상태를 확인하였다(Fig. 1B).

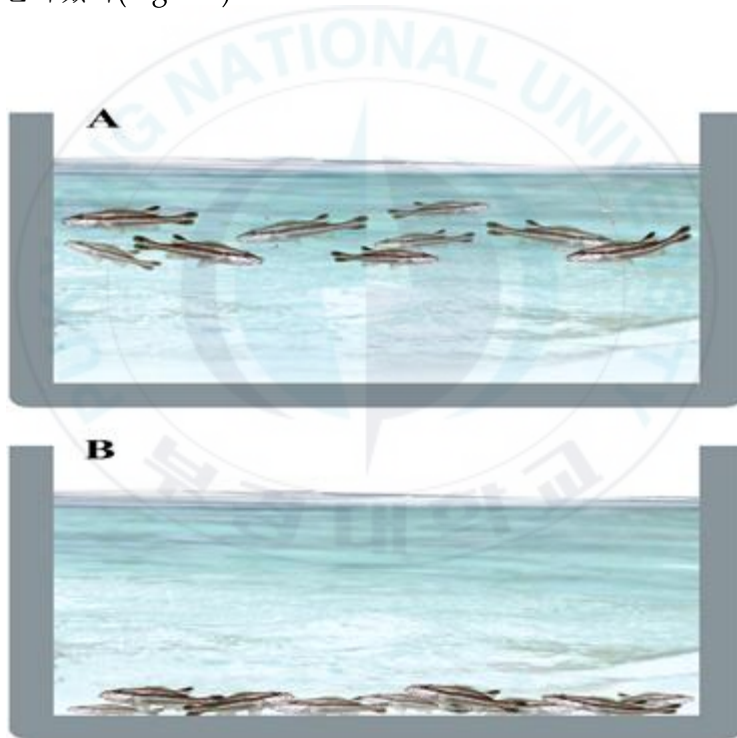


Fig. 1. Swimming behaviors of red-spotted grouper *Epinephelus akaara* at acclimated different water temperature (A : 15, 18 and 21℃, B : 12℃).

2. 코티졸 및 글루코스 변화

혈장 코티졸은 12℃에서 31.2 ± 5.2 ng/mL로 15℃, 18℃에서의 17.6 ± 0.9 , 20.0 ± 3.0 ng/mL보다 유의하게 높았다(Fig. 2A). 또한 글루코스도 마찬가지로, 12℃ 구가 다른 실험구 보다 유의하게 높은 것으로 확인되었다(Fig. 2B).

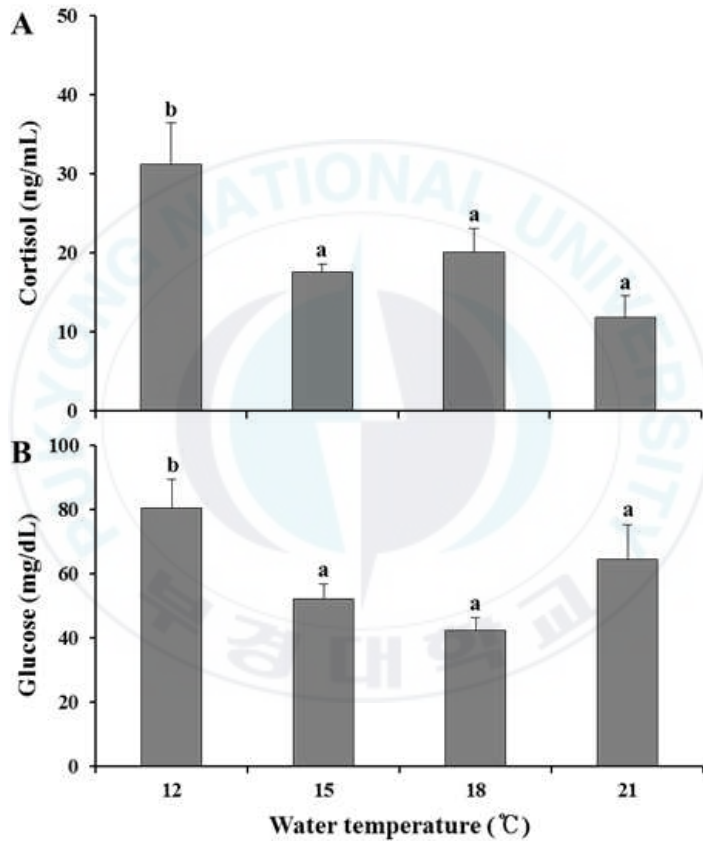


Fig 2. Levels of plasma cortisol (A) and glucose (B) in red-spotted grouper *Epinephelus akaara* acclimated at different water temperature. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=10). Different letters denote significant difference among each group (P < 0.05).

3. Ht 및 Hb

12℃ 및 15℃의 Ht는 각각 24.4 ± 2.1 , 24.3 ± 2.2 %로 18℃ 및 21℃ 구의 17.3 ± 2.6 , 14.5 ± 1.0 % 보다 유의하게 높았다(Fig. 3A). 또한, Hb도 Ht와 같은 변화 양상을 보였다(Fig. 3B).

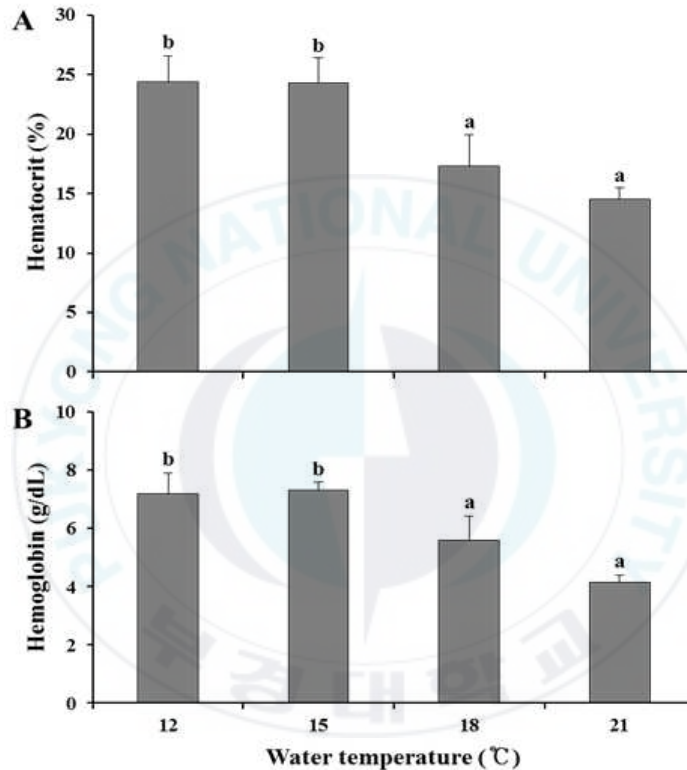


Fig. 3. Level of hematocrit (A) and hemoglobin (B) in red-spotted grouper *Epinephelus akaara* at acclimated different water temperature. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=10). Different letters denote significant difference among each group (P < 0.05).

4. AST 및 ALT

혈장 AST는 12℃ 순치어류에서 52.2 ± 6.8 U/L로 15, 18 및 21℃구의 39.4 ± 8.5 , 30.8 ± 12.1 및 15.8 ± 4.0 U/L보다 높았다(Fig. 4A). 그러나 ALT에서는 실험구 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 4B).

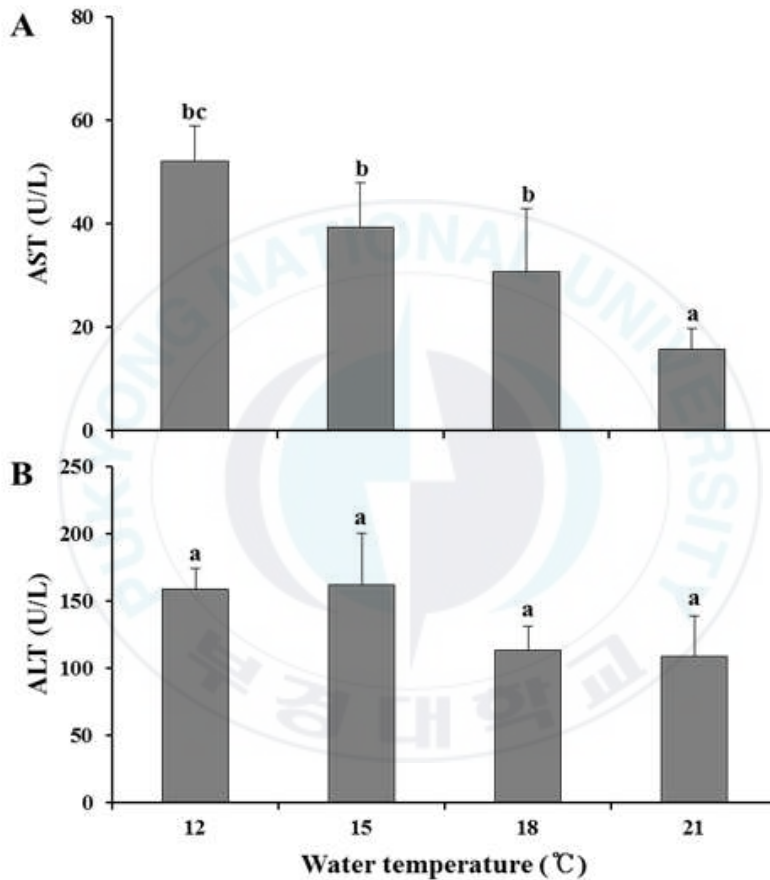


Fig. 4. Plasma AST (A) and ALT (B) levels in red-spotted grouper *Epinephelus akaara* at different water temperature. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=10). Different letters denote significant difference among each group ($P < 0.05$).

5. Total protein, NH₃ 및 삼투질 농도

혈장 내 total protein은 실험구 간 통계적인 차이를 보이지 않았으나, NH₃ 및 삼투질 농도에서의 12℃ 구가 각각 290.0 ± 18.7 U_g/dL, 419.0 ± 40.3 mmol/kg으로 다른 실험구보다 유의적인 차이를 보였다(Fig. 5).

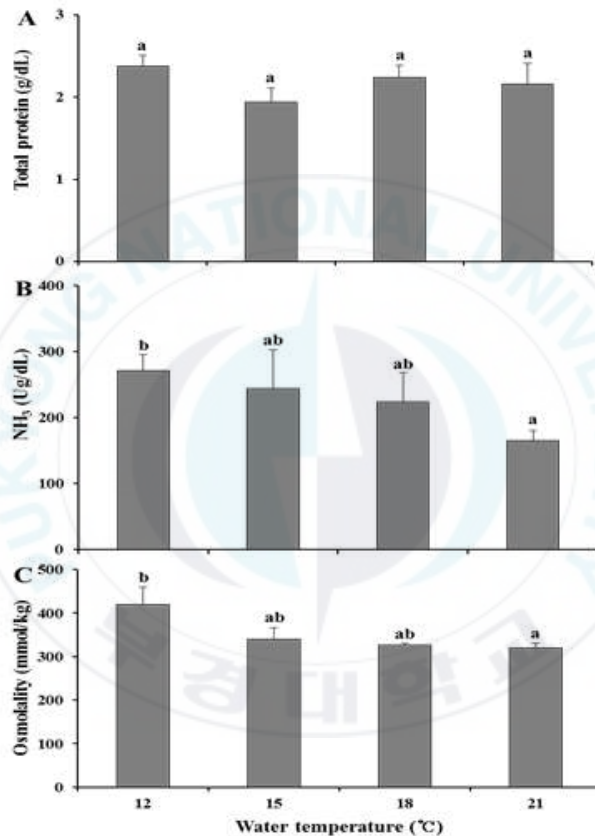


Fig. 5. Plasma total protein (A), NH₃ (B), and osmolality (C) in red-spotted grouper *Epinephelus akaara* at water temperature of 12, 15, 18 and 21°C. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=10). Different letters denote significant difference among each group ($P < 0.05$).

6. RgHsp70 full-length cDNA 확인

불바리의 간으로부터 cloning하여 RACE PCR법을 통해 RgHsp70 full-length cDNA를 확보하였다. RgHsp70 full-length cDNA는 NCBI의 BLASTX program을 통해 다른 어종에서 확인된 Hsp70 family들과의 유사성을 확인 및 분석에 이용하였다. RgHsp70 full-length cDNA의 염기서열과 추정되는 아미노산 서열 분석은 그림(Fig. 1-3)에 나타내었다. RgHsp70 cDNA의 전체 sequence의 길이는 2152 bp이고, 590개의 아미노산을 암호화하는 1773 bp의 Open Reading Frame (ORF)로 이루어져 있었다(Fig. 6).

RgHsp70 cDNA의 아미노산 비교분석은 GenBank에 등록되어 있는 다양한 어종들의 Hsp70 family 아미노산과 Genetyx 7.0 program을 사용하여 비교, 분석하였다. 그 결과, Hsp70 family signature, ATP/GTP binding site 및 EEVD consensus sequence를 다른 어종들의 Hsp70과 마찬가지로 잘 보존되어 있었다(Fig. 7).

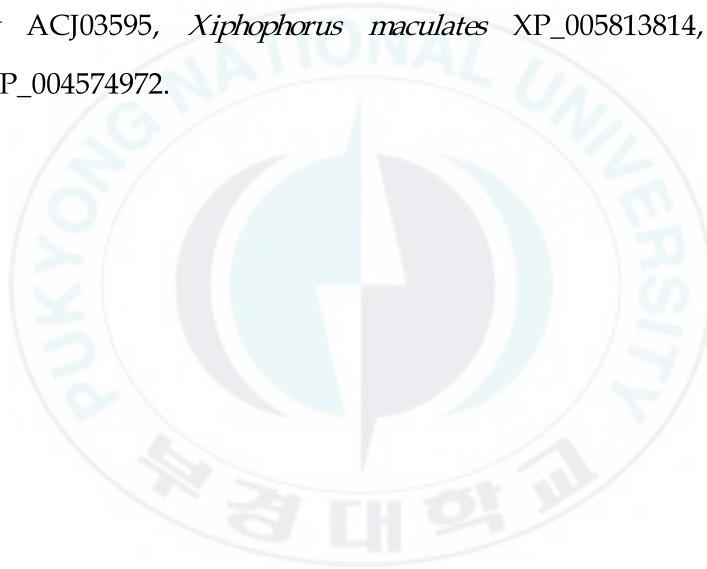
1 agagcgcgtcgtctgtcgcacccgcttgtgagaggcacaagcgctatgtggccttcacagattccgagagcgtgatcgccgatgcagcc 90
91 aagaatcaggttgccatgaaacccccaacacagttttgatgccaaacgactgattggcgaggtttgacgacacagttggtgcagtc 180
M N P T N T V F D A K R L I G R R F D D T V V Q S
181 gatataagcactgcccgtttactgtcatcaatgacaacactcgcccacaagttcaagttgaglacaaaggcgagtcgaagtcctctac 270
D M K H W P F T V I N D N T R P K V Q V E Y K G E S K S F Y
271 ccagaggagatctctcatatggtgctgactaagatgaaggagattgctgaagcctacctcggaaaaactgtcaacaatgctgttattacg 360
P E E I S S M V L T K M K E I A E A Y L G K T V N N A V I T
361 gtaccgcgctacttcaatgaactccagcgccaggccactaaggatgctggcacaatctctggcctcaatgttctggtatcatatga 450
V P A Y F N D S Q R Q A T K D A G T I S G L N V L R I I N E
451 ccaactgctgctgccatgcctatgggttggaacaagaagttgggtcagagaggaacgctcctcatctttgatcttgggtggcacttt 540
P T A A A I A Y G L D K K V G S E R N V L I F D L G G G T F
541 gatgtgtcactcttgaccatcgaggtatgcatctttgaggtcaagtcacagcagagacacacatcttggtggggagagatttcgacaac 630
D V S I L T I E D G I F E V K S T A G D T H L G G E D F D N
631 cgcattgtcaaccactcatgtgtaattcaagcgcaagtacaggaaggacatcagcgacaacagagagacgctcgtgctgctgcgacc 720
R M V N H F I A E F K R K Y K K D I S D N K R A V R R L R T
721 gcttgtgagagggaacagcgacactgtcttcagcaccagggccagatgaaatcgactctgtacagaggagtgacttctacacc 810
A C E R A T R T L S S S T Q A S I E I D S L Y E G V D F Y T
811 tcaatcaccagggcctgctttgagagctcaatgctgactgttccgtggcactctggacactgtggagaagtcgctcgtgacgccaag 900
S I T R A R F E E L N A D L F R G T L D P V E K S L R D A K
901 atggataaaggcgagatccatgacatcgtgttggctgggtcgaacccgtatccccaaagatccagaagcgtgtccagagatttctcaat 990
M D K G Q I H D I V L V G G S T R I P K I Q K L L Q D F F N
991 ggaaaggagctcaacagagacatcaatccagatgaagctgtggcctcagggacgctgtccagcctgcatcctgtctggagacaagctct 1080
G K E L N K S I N P D E A V A Y G A A V Q A A I L S G D K S
1081 gagaatgtccagagcctgctgcttctgacgtcacccctctgtccctgggtattgagacgctggagggtgcatgactgctcatcaaa 1170
E N V Q D L L L L D V T P L S L G I E T A G G V M T V L I K
1171 cgaacacccacatctctaccaagcagactcagacttccacacctactctgacaacacgactggtgctcatccaggttatagaggt 1260
R N T T I P T K Q T Q T F T T Y S D N Q P G V L I Q V Y E G
1261 gagcgtgccatgaccaaggaacaacacctgctgggcaagtttgagctgacaggaatccctcctgctcccggtggtgtccccagatcgag 1350
E R A M T K D N N L L G K F E L T G I P P A P R G V P Q I E
1351 gtgacatttgatattgatgccatggtatcatgaatgtctctgtgtagacaagagcactggcacaagagaacagatcaccatcaccaat 1440
V T F D I D A N G I M N V S A V D K S T G K E N K I T I T N
1441 gacaagggtgctctcagaagaggacattgaacgcatgtccaggaaagctgagaatacaagctgaagcagatgtccagctgacaa 1530
D K G R L S K E D I E R M V Q E A E K Y K A E D D V Q R D K
1531 gtgctgctaaagacgctggagctgtagctttcaacatgaagctgactgtggaggatgaagaactgtctgccaagatggaagac 1620
V S A K N G L E S Y A F N M K S T V E D E K L A G K I S E D
1621 ggaagcagaagattttgacaagtgaatgaggtcatcagctggctggacaagaacccggaactgccaagaagatgaatgaacatcaa 1710
D K Q K I L D K C N E V I S W L D K N Q T A E K D E Y E H Q
1711 cagaaggagctggaaggtgtgcaaccccatcatcaccagctgtaccagagtgctggtggcattgctggtatgccagagggcattg 1800
Q K E L E K V C N P I I T K L Y Q S A G G M P G G M P E G M
1801 cctgtgggtctccctgagagctggtggcgtgctcccggtggatctccggacccaacatggagggtcgatgaacagtcctcgtcc 1890
P G G F P G A G G A A P G G G S S G P T I E E V D *
1891 tcatccactactcctaagatgtttctaagaaggaacccctcttatagcacaagttaacaacagcttaagagtgcaacgttaagaataa 1980
1981 aaagtgggttcagggaacacaattattgcatggttttgacacacactgggaacaaactgttgatgggtacaaactgagctgttggctcatgt 2070
2071 cgtgtaattgtttgtatctgagatgtaactgcttgaatataaataatctgttaacccctcaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2152

Fig. 6. The cDNA and deduced amino acid sequences of RgHsp70 from red-spotted grouper *Epinephelus akaara*. Amino acid residues in the mature protein are designated with a capital letter. PCR primers used for RbHsp70 amplification primers (forward and reverse) are indicated as arrow, its polyadenylation signal sequence AATAAA and poly (A) tail are marked as box.

Red-spotted grouper 1-
Amazon molly 11-
Annual killifish 11-
Asian swamp eel 11-
Black porphy 11-
Grass carp 11-
Guppy 11-
Humphead snapper 11-
Japanese flounder 11-
Killifish 11-
Mummichog 11-
Nile tilapia 11-
Silver carp 11-
Southern platyfish 11-
Zebra muna 11-
Hsp70 family signature 1
Red-spotted grouper 91-
Amazon molly 91-
Annual killifish 91-
Asian swamp eel 91-
Black porphy 91-
Grass carp 91-
Guppy 91-
Humphead snapper 91-
Japanese flounder 91-
Killifish 91-
Mummichog 91-
Nile tilapia 91-
Silver carp 91-
Southern platyfish 91-
Zebra muna 91-
ATP-GTP binding site motif
Red-spotted grouper 99-
Amazon molly 99-
Annual killifish 99-
Asian swamp eel 99-
Black porphy 99-
Grass carp 99-
Guppy 99-
Humphead snapper 99-
Japanese flounder 99-
Killifish 99-
Mummichog 99-
Nile tilapia 99-
Silver carp 99-
Southern platyfish 99-
Zebra muna 99-
Hsp70 family signature 2
Red-spotted grouper 189-
Amazon molly 189-
Annual killifish 189-
Asian swamp eel 189-
Black porphy 189-
Grass carp 189-
Guppy 189-
Humphead snapper 189-
Japanese flounder 189-
Killifish 189-
Mummichog 189-
Nile tilapia 189-
Silver carp 189-
Southern platyfish 189-
Zebra muna 189-
Bipartite nuclear localization signal sequence
Red-spotted grouper 279-
Amazon molly 279-
Annual killifish 279-
Asian swamp eel 279-
Black porphy 279-
Grass carp 279-
Guppy 279-
Humphead snapper 279-
Japanese flounder 279-
Killifish 279-
Mummichog 279-
Nile tilapia 279-
Silver carp 279-
Southern platyfish 279-
Zebra muna 279-
Hsp70 family signature 3
Red-spotted grouper 369-
Amazon molly 369-
Annual killifish 369-
Asian swamp eel 369-
Black porphy 369-
Grass carp 369-
Guppy 369-
Humphead snapper 369-
Japanese flounder 369-
Killifish 369-
Mummichog 369-
Nile tilapia 369-
Silver carp 369-
Southern platyfish 369-
Zebra muna 369-
Red-spotted grouper 459-
Amazon molly 459-
Annual killifish 459-
Asian swamp eel 459-
Black porphy 459-
Grass carp 459-
Guppy 459-
Humphead snapper 459-
Japanese flounder 459-
Killifish 459-
Mummichog 459-
Nile tilapia 459-
Silver carp 459-
Southern platyfish 459-
Zebra muna 459-
Red-spotted grouper 549-
Amazon molly 549-
Annual killifish 549-
Asian swamp eel 549-
Black porphy 549-
Grass carp 549-
Guppy 549-
Humphead snapper 549-
Japanese flounder 549-
Killifish 549-
Mummichog 549-
Nile tilapia 549-
Silver carp 549-
Southern platyfish 549-
Zebra muna 549-
EVD consensus sequence

Fig. 7. Multiple-sequence alignment of the RgHsp70 with Hsp70 of 14 other fish by using ClustalX. The Hsp70 family signatures are shaded grey and the ATP/GTP binding site is boxed. The bipartite

nuclear localization signal sequences are underlined and the EEVD consensus sequence is shaded black. The Hsp70 family analyzed are as follows : *Poecilia formosa* XP_007541686, *Austrofundulus limnaeus* XP_013888455, *Monopterus albus* AGO01986, *Acanthopagrus schlegelii* AAX07834, *Ctenopharyngodon idella* ACJ03596, *Poecilia reticulata* XP_008400612, *Lutjanus sanguineus* ADO32584, *Paralichthys olivaceus* AGZ01970, *Nothobranchius furzeri* XP_015816161, *Fundulus heteroclitus* XP_012712369, *Oreochromis niloticus* NP_001266600, *Hypophthalmichthys molitrix* ACJ03595, *Xiphophorus maculatus* XP_005813814, *Maylandia zebra* XP_004574972.



RgHsp70 cDNA의 계통발생학적 분석은 Mega 4 software package와 neighbor joining (NJ)법을 사용하여 분석하였다. 다른 어종들과의 계통수 분석 결과, 다양한 경골어류들과 cluster를 형성했고, 특히 농어목 어류들인 *Dicentrarchus labrax* (AAR01102), *Epinephelus coioides* (ACN52063), *Lutjanus sanguineus* (ADO32584), *Acanthopagrus schlegelii* (AAX01834)의 높은 상동성을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

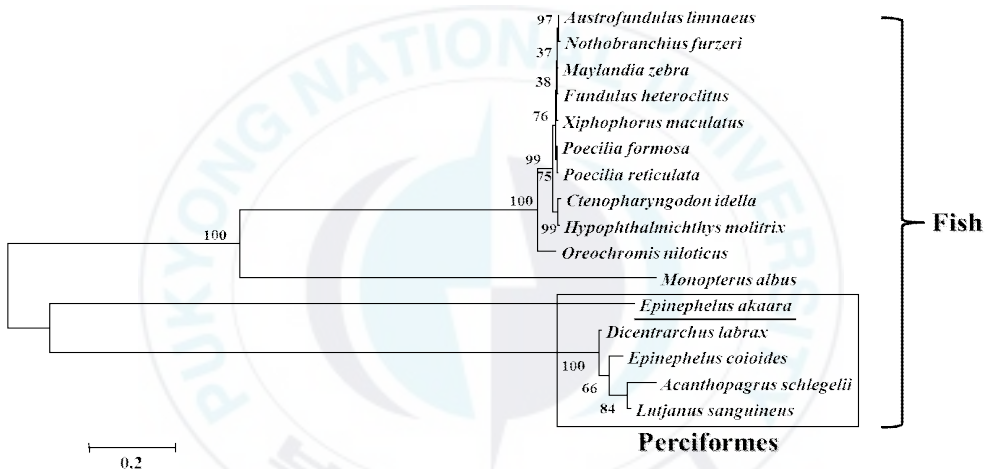


Fig. 8. Neighbour-joining tree of heat shock protein RgHsp70 and other Hsp70 members constructed with MEGA 4. The bootstrap confidence values shown at the nodes of the tree are based on 2000 bootstrap replications. The Hsp70 family fishes of selected genes are indicate within brackets and its Percifomes group are boxed.

7. RgHsp70 발현

붉바리 미성어로부터 분리한 조직들은 Quantitative real-time PCR법을 통해 RgHsp70 유전자의 발현을 분석하였다. 실험 결과, 간조직이 보였으며(Fig. 9), 다른 조직에 비해 유의적으로 높은 mRNA 발현량을 나타내었다(Fig9, $P < 0.05$).

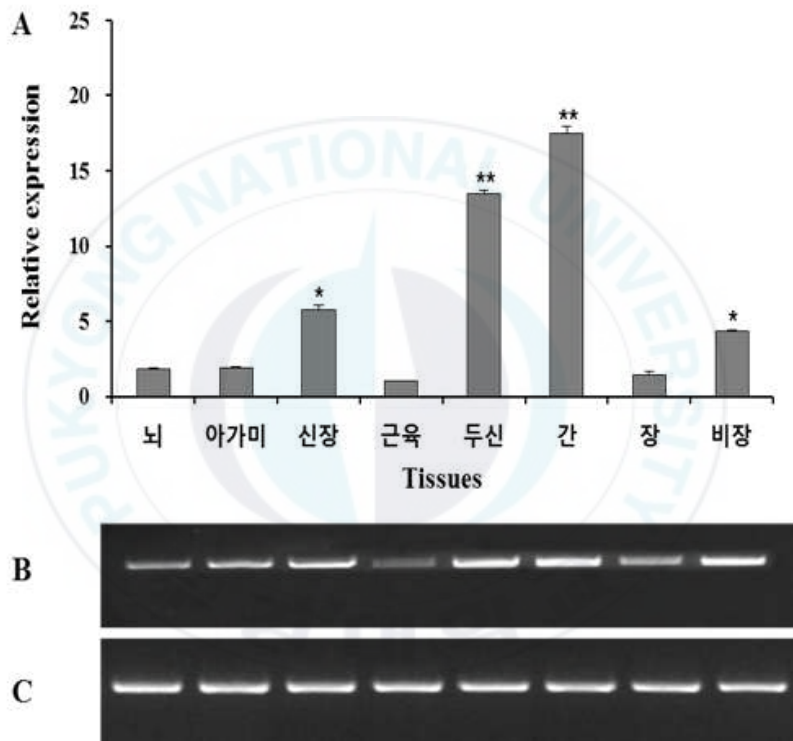


Fig. 9. Expression of RgHsp70 mRNA were analyzed in various tissues including brain, gill, trunk-kidney, muscle, head-kidney, liver, intestine, and spleen of red-sotted grouper. Data are presented as the mean relative ratio RbHsp70/ β -actin mRNA levels. Errors bars represent SEM ($n=3$) (A : qPCR, B : RgHsp70 gene, C : β -actin).

간 조직에서 유의적으로 높은 발현량을 보인 결과를 바탕으로 수온별 (21℃, 18℃, 15℃ 와 12℃) 자극 48시간 후 각각 3마리씩 sampling한 실험어의 간을 적출하여 분석에 사용하였다. 낮은 수온으로 갈수록 높은 발현능을 보였고, 12℃ 와 15℃ 그룹에서 21℃ 그룹에 비해 유의적인 차이를 보였다 (Fig. 10).

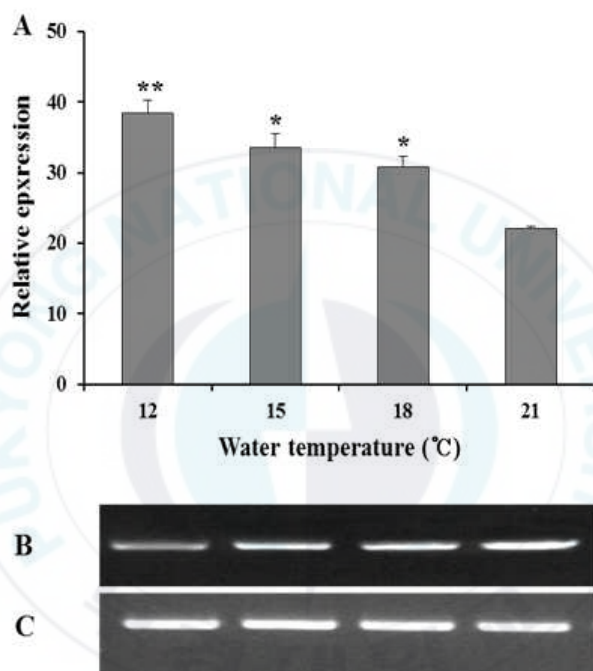


Fig. 10. Expression of heat shock protein 70 mRNA in the liver of red-spotted grouper at differential temperatures (12, 15, 18 and 21°C). The relative levels of Hsp70 transcript were quantified by the expression level of the β -actin transcript. Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent cDNA samples with three replicates from each red-spotted grouper *Epinephelus akaara* stimulated temperatures livers sampled at 48 h. Asterisks indicate significant difference ($P < 0.05$) as determined by one-way ANOVA (A : RgHsp70, B : β -actin).

IV. 고 찰

수온의 변화는 어류양식에 있어 심각한 스트레스로 인한 피해로 대량폐사를 발생시킴에 따라 경제적 손실이 일어나기도 한다. 해양생물인 어류나 무척추동물의 면역시스템은 수온과 다양한 환경적인 요인으로부터 적응 및 방어수단으로 이용된다(Holmskov et al., 2003). 경골어류에 있어 Hsp70 gene의 면역 및 생물학적인 기능을 밝히는 것은 앞으로 많은 기초적 지식을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서는 수온이 붉바리의 스트레스에 미치는 영향을 확인하기 위하여 수온변화에 따른 실험구의 cortisol 및 glucose, Ht 및 Hb 등의 혈액학적 분석을 실시하였다. 이를 위하여 붉바리의 간으로부터 얻어진 Hsp70 gene을 cloning하고, 생물학적 정보분석 및 이전에 보고된 다양한 Hsp70 gene들과 어떤 연관성을 가지는지에 관한 연구와 조직별 발현 및 수온별 발현패턴 및 혈액학적 성상에 관해 분석함으로써 어류의 면역체계에 있어 담당하고 있는 주요 생리학적 및 생물학적 기능을 밝혀보고자 하였다.

수온변화에 따른 48시간 후의 붉바리는 모든 그룹에서 100%의 생존율을 보였으나, 저수온(12, 15°C) 그룹에서 유영활동력이 현저하게 떨어지는 것이 관찰되었다. 이러한 결과로 미루어보아, 48시간 동안 붉바리는 12°C 까지 생존에 대한 내성을 가지고 있는 것으로 알 수가 있었다. 붉바리의 혈장 cortisol 및 glucose 농도는 Fig. 2에 나타내었다. Cortisol과 glucose 농도는 저수온인 12°C에서 21°C에 비해 유의적으로 가장 높은 결과값을 나타내었다. 양식어류에게 영향을 미치는 스트레스 요인 중 하나인 수온은 어체의 혈중 cortisol을 상승시킴에 따라, 심장박동, 산소소비, 에너지동원의 증가, 물과 이온의 평형이 무너지게 된다(Tomasso et al., 1980; Eddy, 1981; Carmichael et al., 1984; McDonald and Miligan, 1997). 어류

의 혈장 내 cortisol과 glucose는 대표적인 스트레스 지표이다(Wedemeyer and Yasutake, 1977). 본 연구와 마찬가지로, 감성돔(Choi et al., 2006)과 조피볼락(Do et al., 2016)에서도 스트레스 요인에 따라 혈장 내 cortisol과 glucose 농도의 급격한 증가패턴을 확인하였다.

전혈의 분석을 통해 Ht 및 Hb 농도변화를 관찰한 결과, Ht와 Hb값이 저수온에서 유의적으로 높은 수준이 관찰되었다(Fig. 3). 일반적으로 혈액학적 지표들의 변화는 스트레스의 2차적 반응으로 나타나는데(Barton and Iwama, 1991), 이 중 Ht는 혈중의 적혈구 용적을 나타내며, 이는 스트레스 환경 노출 시 항상성을 유지하려는 기능을 수행하고(Iwama et al., 1989), Hb는 스트레스 등을 받게되면 산소결합능력이 감소하면서 Ht 수치에도 영향을 준다고 알려져 있어(Vinodhini and Narayanan, 2009), 본 연구에서는 저수온에 따른 붉바리가 스트레스를 받으면서 Ht와 Hb 수치가 동시에 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 저수온 그룹의 붉바리 개체에서 그 값이 유의적으로 증가한 것으로 보아 수온에 따른 스트레스에 의해 불균형화 된 항상성을 유지하고, Hb가 급격히 증가함에 따라 체내 산소 결합 및 수송을 원활히 하기 위해 유의적으로 높은 값이 나타난 것으로 사료된다.

AST 분석 결과, AST는 21°C에 비해 12°C인 저수온 그룹에서 높아지는 경향을 보였지만, ALT는 실험구 간에 유의적인 차이가 보이지 않았다. AST와 ALT는 아민기 전이효소로 척추동물의 간 기능을 나타내는 일반적인 지표가 되고 특히, 어류에서는 간, 비장 등의 세포에 주로 분포하며 수온변화, 저산소, pH, 암모니아, 중금속 등에 의한 스트레스 반응으로 인해 그 수치가 증가하게 된다(Pan et al., 2003). 본 연구에서도 저수온에서 비슷한 결과값을 나타내었고, Do et al., 2016과 Park et al., 2016의 조피볼락과 능성어의 연구에서도 스트레스에 따른 AST, ALT가 증가하는 경향

을 보여주고 있다.

혈장 내 총 단백질(TP)과 NH_3 및 삼투질 농도는 Table 1에 나타내었다. 먼저 총 단백질은 실험구 간에 통계적인 차이를 보이지 않았으나, NH_3 및 삼투질 농도에서는 12°C 구가 15, 18 및 21°C 구보다 유의적으로 높게 나타났다. 총 단백질은 어류의 건강도나 영양상태 및 질병진단의 지표로 활용되고 있으며(Turner, 1937; Ozaki, 1978; Yangisawa and Hashimoto, 1984), 환경적 요인인 계절에 따른 수온(Nakagawa et al., 1977; Siddiqui, 1977)과 수질(Byrne et al., 1989), 기타 스트레스(McLeay and Brown, 1979)로 인해서 변화가 일어난다(Ishioka (1980). 하지만, 본 연구에서는 혈장 내 총 단백질의 값이 실험구 간에 통계적인 차이를 보이지 않아 추후, 계속적인 분석이 필요할 것으로 사료된다. 또한, NH_3 는 간 조직이 손상되거나 그에 따른 기능의 감퇴로 인해 혈중 농도가 증가한다(Randall and Tsui, 2002). 본 연구에서도 12°C 에서 다른 실험구에 비해 낮은 수온에서의 스트레스로 인해 그 값이 증가하였고, 이러한 결과는 Yang (2016)의 연구에서 조피볼락(black rockfish)과 참전복(abalone)이 수온과 염분 스트레스에 따라 급격히 증가하는 것을 보고한 바 있다. 어류는 환경적, 화학적 요인에 따른 스트레스를 받게 되면 이온과 삼투질 농도간의 불균형이 일어나게 되며, 이 후에는 조직의 괴사나 질병의 저항력 감소가 발생하고, 세포 내 삼투 요인의 생존 및 생리적 한계를 벗어나게 된다면 폐사를 유발하게 된다(Eddy, 1981; Hildreth and stickle, 1980; Cheng et al., 2002). 또한, 일정한 염분을 유지함으로써 세포 내외의 이온 경사를 유지하는 것으로 알려져 있다.

붉바리 full-length cDNA는 바리과에 속하는 GenBank에 등록된 orange-spotted grouper의 Hsp70 염기서열을 바탕으로 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)의 방법을 통해 확보하였다. 확보된

Hsp70 sequence는 NCBI의 BLASTX program을 통해 어류 및 다른 생물 종에서 확인된 Hsp70 gene들과의 유사성과 분석에 이용하였다. Hsp70은 총 2152 bp로써, 590개의 아미노산 잔기로 암호화하는 1773 bp의 ORF를 포함하고 있었다. 그리고 3'UTR에는 polyadenylation signal (AATAAA), poly A(+) tail을 확인하였다 (Fig. 1).

Hsp70은 수온이나 환경변화 또는 오염이 스트레스 요인으로 작용하여 높게 발현되는 스트레스성 단백질로 알려져 있다(Beckmann et al., 1990). 다양한 요인에 의해 나타나는 충격으로부터 자신을 보호함으로써 항상성 (homeostasis)을 유지하는 중요한 역할을 담당한다(Sanders, 1993; Iwama et al., 1999; Ackerman and Iwama, 2001). 이러한 Hsp70 cDNA 염기서열을 포함한 Hsp family signature들과 ATG/GTP binding motif site를 포함한 EEVD consensus sequence가 Hsp70 gene이 가지는 생물학적 기능을 수행함에 있어 주요할 것으로 여겨진다.

아미노산의 비교분석은 불바리 Hsp70 gene cDNA와 GenBank에 등록되어 있는 14종의 어류와 Genetyx 7.0 program을 사용하여 비교 분석하였다. 불바리 Hsp70 gene cDNA signal peptide와 Hsp70 family signature 및 motif가 잘 보존되어 있는 것으로 나타났다. Hsp70은 heat shock protein 그룹 중 하나로써, 다른 생물 종에서 많이 알려져 있다. 그리하여 Hsp70 family와의 아미노산 비교 결과, 다른 어류의 Hsp70과 마찬가지로, 다양한 수온 및 환경 변화에 적응함에 있어 중추적인 기능을 할 것으로 추정되는 Hsp70 family signature, ATG/ GTP binding site motif 및 EEVD consensus sequence를 확인할 수 있었다.

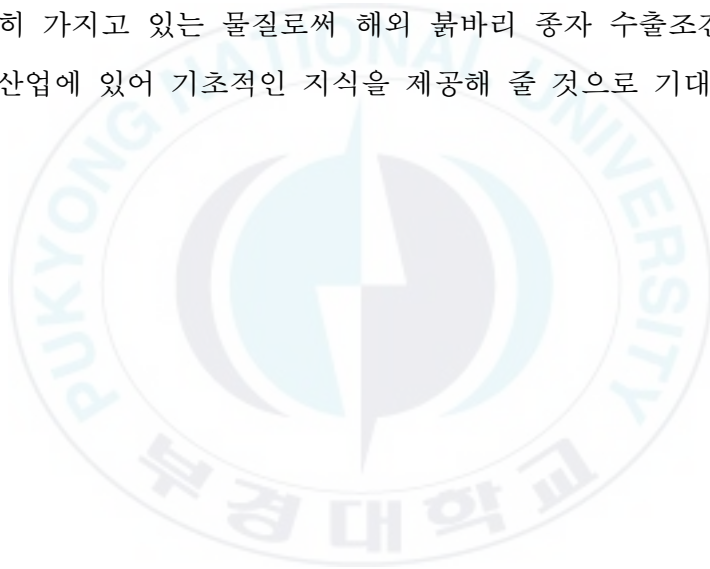
계통발생학적 분석은 Mega 4 software package와 neighbor joining법을 사용하여 분석하였다. 다른 어종들과 계통수 분석 결과, 다양한 경골어류와 cluster를 형성하고 있었으며, 특히 농어목 어류와 가장 근접한 결과를

나타내었다. *Dicentrarchus labrax* (AAR01102) 93.1%, *Epinephelus coioides* (ACN52063) 91.0%, *Lutjanus sanguineus* (ADO32584) 83.9%, *Acanthopagrus schlegelii* (AAX01834) 82.9%의 상동성을 확인하였다. 계통 발생학적 분석에서도 마찬가지로, 다른 어종의 Hsp70 family와 cluster를 잘 형성하고 있었음을 알 수 있었다. Hsp70은 원핵생물에서 진핵생물, 식물에서 곤충, 포유류, 사람에 이르기까지 다양하게 분포하고, 어느 조직 내 세포에 존재한다. 또한, 온도는 생물체의 성장, 번식, 분포에 영향을 미치는 중요한 요인으로 작용하는데, 일교차나 계절적 온도 변화 등에 따른 스트레스는 생물체의 생리학적 및 생태학적 상태에 영향을 미치고 있다. 특히, 수중생물은 미세한 온도변화에도 생존에 위협을 받는 것으로 알려져 있다(Logue et al., 1995). 이러한 Hsp70은 온도변화에 따른 유지와 적응 및 비자가 인식시스템에 있어 매우 중요한 단백질로써의 역할을 수행한다(Konstantina and Ioannis, 2006). 이러한 결과로, 본 연구에서 확인된 붉바리 Hsp 70 유전자에서도 특징적인 sequence를 나타난 바, 다른 생물 종에서 알려진 정보와 마찬가지로 중요한 생물학적 기능을 수행할 것으로 여겨진다.

건강한 붉바리 미성어로부터 분리한 다양한 조직으로부터 real-time PCR법을 통해 Hsp70 gene의 조직별 발현을 분석한 결과, 간에서 높은 발현을 확인할 수 있었다. 이러한 분석을 토대로 하여 48시간 후, 수온별 (21, 18, 15, 12°C) 붉바리의 간 조직을 적출하여 Hsp70의 발현능을 확인한 결과, 수온이 낮을수록 Hsp70 발현량은 증가하였고, 21°C보다 낮은 수온인 12°C에서 현저한 차이값을 보였다. 어류에 있어 연골어류의 간은 10-20%이며, 부레 대신 간의 지질로 부력조절에 관여한다고 보고되어지고 있으며, 경골어류의 경우는 4-10%를 차지하고 있다고 알려지고 있다 (Chen et al., 2011). 어류의 산란기 동안 암컷의 경우 간이 매우 커지게

되며, 어종에 따라 수컷보다 2-3배나 되기도 한다. 자성 호르몬의 분비가 활발하게 되므로 간에서 난소의 난황 단백질의 합성 등이 활발해지기 때문이다(Listinsky et al., 1998). 또한, 인간과는 달리 조혈작용이 없지만, 다량의 간세포를 함유하고 있으며 탄수화물 대사, 단백질 대사, 지방대사, 간에서 장으로 배설되는 호르몬을 조절하는 기능을 가지는 담즙을 생성하는 등의 주요한 기능을 담당하는 조직이다(Sharp and Secombes, 1993).

결과적으로, RgHsp70 gene은 붕바리의 생체를 유지하는데 영향을 미침과 더불어, 수온 및 환경변화에 있어 면역체계를 강화시키고 생물학적 활성을 충분히 가지고 있는 물질로써 해외 붕바리 종자 수출조건의 기반확립과 양식산업에 있어 기초적인 지식을 제공해 줄 것으로 기대된다.



V. 요약

바리와 어류는 전 세계 3조원 이상의 시장규모를 가지고 있고, 중화권을 비롯하여 동남아시아, 일본과 우리나라에서도 고가로 소비되며, 최근에는 수산물 시장의 확대로 그 수요가 계속적으로 증가하고 있는 고급 해산 어류이다. 바리와 어류 중에서도 붉바리는 식감이나 맛이 좋아 그 수요가 증가하고 있으며, 대만 등 중화권 시장에 수출을 시도하고 있으나 아직 수온 등 장거리 수송 적정조건은 밝혀져 있지 않은 상태이다. 본 연구에서는 수온별 붉바리의 혈액생리학적 반응과 heat-shock protein(Hsp70) full-length cDNA를 통한 발현을 분석함으로써 장거리 수송을 위한 적정 수온을 구명하고자 하였다. 실험어는 10℃ 구에서 48시간째에 전량 폐사하였고, 12, 15, 18 및 21℃ 구에서는 모두 생존하였다. 또한, 15, 18, 21℃ 구에서는 실험어가 정상적인 유영활동을 보였으나, 12℃ 구에서는 유영 없이 바닥에 가라앉은 상태를 확인하였다. 혈장 코티졸, 글루코스, hematocrit(ht), hemoglobin(Hb), aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), NH₃ 및 osmolality가 12℃ 구에서 15, 18 및 21℃ 구보다 유의하게 높았다. 붉바리 Heat shock protein(Hsp) 70 full-length cDNA는 간으로부터 cloning하여 RACE PCR법을 통해 확보하였고, 확보된 RgHsp70 full-length cDNA는 NCBI의 BLASTX program을 통해 다른 어종에서 확인된 Hsp70 family들과의 유사성을 확인 및 분석하였다. 붉바리 Hsp70 cDNA의 전체 sequence의 길이는 2152 bp이고, 590개의 아미노산을 암호화하는 1773 bp의 Open Reading Frame(ORF)로 이루어져 있었다. 조직별 발현분석 결과, 간에서 높은 mRNA 발현량을 보였고, 수온별(12, 15, 18 및 21℃) 자극 48시간 후, 간을 적출하여 발현량을 분석한 결과 낮은 수온으로 갈수록 높은 발현능을 보였다.

감사의 글

뒤늦게 시작한 석사과정을 무사히 끝낼 수 있을까 하는 의문을 가지고 시작하였는데 벌써 마무리의 시점이 왔습니다. 회사를 다니며 석사과정을 진행하다 보니 쉽지 않은 일들이 많았는데 그때 마다 조언과 도움을 주신 모든 분들에게 감사의 뜻을 전해드리고자 합니다.

부족한 부분이 너무나 많았던 저에게 항상 웃으며 해답의 길로 인도해주신 김종명 교수님 너무나 감사합니다. 학문뿐만 아니라 삶의 지침서로 보고 배우겠습니다.

논문심사 및 조언을 해주신 김창훈 교수님 진심으로 감사합니다. 또한 저의 실험에 많은 도움과 아낌없는 관심을 보내 주신 민병화 박사님 감사합니다.

또한 실험에 많은 조언과 도움을 준 박형준씨에게도 감사의 인사 전합니다. 실험실에 자주 가지 못하는 선배를 위해 신경 써준 미진이와 졸업 을 위해 같이 고생하고 많은 도움을 준 복기도 너무나 고맙다. 실험실 갈 때 마다 반겨주며 시험 때나 발표 때 항상 응원해준 경묘, 여름이도 고맙다.

마지막으로, 아들이 뒤늦게 공부한다고 걱정과 격려를 해주신 부모님 감사합니다. 제가 석사과정을 무사히 마칠 수 있도록 아낌없이 내조를 해준 지혜야 너무나 사랑한다. 또한 아빠가 힘들 때 항상 힘이 되어준 우리 딸 하율이 사랑한다.

제 논문에 도움을 주신 모든 분들께 감사의 인사 드리며 논문을 바칩니다.

참고문헌

- Ackerman PA and Iwama GK. 2001. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to Vibriosis. J. Aquat. Anim. Health 13, 173-180.
- Adam SM. 1990. Biological indicators of stress in fish. American Fish. Soc. Bethesda MD. pp. 1-8.
- Barton BA and GK Iwama. 1991. Physiological change in fish from stress in aquaculture with emphasis in the response and effects of corticosteroids. Annu. Rev. Fish. Dis. 1: 3-26.
- Beckmann RP, Mizzen LE and Welch WJ. 1990. Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. Science. 248, 850-854.
- Byrne P, D Speare and HW Ferguson. 1989. Effects of a cationic detergent on the gills and blood chemistry of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Dis. Aquat. Org. 6: 195-196.
- Carmichael GJ, JR Tomasso, BA Simco and KB Davis. 1984. Characterization and alleviation of stress associated with hauling largemouth bass. Trans Am Fish Soc 113: 778-785.
- Cataldi E, P Di Marco, A Mandich and S Cataudella. 1998. Serum parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipenseriformes): effects of temperature and stress. Comparative Biochemistry and Physiology. 121: 351-354.
- Chen J, Xiao S and Yu Z. 2011. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*). Fish

Shellfish Immunol. 30, 750-754.

Cheng W, SP Yeh, CS Wang and JC Chen. 2002. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity levels. Fish and Shellfish immunol. 16: 295-306.

Choi CY, BH Min, NN Kim, SH Cho and YJ Chang. 2006. Expression of HSP90, HSP70 mRNA and change of plasma cortisol and glucose during water temperature rising in freshwater adapted black porgy, *Acanthopagrus schlegli*. J. Aquaculture. 19(4): 315-322.

Do YH, BH Min, YD Kim and MS Park. 2016. Changes on hematological factors and oxygen consumption of Korean rockfish *Sebastes schlegeli* in high water temperature. JFMSE. 28(3): 738-745.

Eddy FB. 1981. Effects of stress on osmotic and ionic tegulation in fish. (in) Pickering AD (Eds). Stress and Fish. Academic Press, London. 77-102.

Feder ME and Hofmann GE. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol. 61, 243-282.

Graser RT, Malnar-Dragojevic D and Vincek V. 1996. Cloning and characterization of a 70kDa heat shock cognate (hsc70) gene from the zebra fish (*Danio rerio*). Genetica. 98, 273-276.

Hildreth JE and WB Stickle. 1980. The effects of temperature and

- salinity on the osmotic composition of the southern oyster *Drill*,
Thais Haemastoma. Biol. Bull. 159: 148-161.
- Ishioka H. 1980. Stress reactions in the marine fish. J. Stress reactions
induced by temperature change. Bull. Jap. Sci. Fish. Soc. 46:
523-532
- Iwama GK, JC McGeer and MP Pawluk. 1989. The effects of five fish
anaesthetics on acidbase balance, hematocrit, blood gases, cortisol,
and adrenaline in rainbow trout. Can.J. Zool. 67: 2065-2073.
- Iwama GK, Vijayan MM, Forsyth RB and Ackerman PA. 1999. Heat
shock proteins and physiological stress in fish. Am. Zool. 39,
901-909.
- Kang GY, Song CB and Lee JH. 2003. Cloning of Growth Hormone
Complementary DNA from Red-Spotted Grouper (*Epinephelus akaara*)
and Its Expression in *E. coli*. Journal of Aquaculture 16(2), 110-117.
- Konstantina M. and Ioannis KZ. 2006. Molecular cloning and
characterization of two homologues of mannose-binding lectin in
rainbow trout. Fish Shellfish Immunol. 21, 305-314.
- Lindquist S. 1986. The heat-shock response. Annu Rev Biochem 55,
1151-1191.
- Listinsky JJ, Siegal GP and Listinsky CM. 1998. Alpha-L-fucose: a
potentially critical molecule in pathologic processes including
neoplasia. Am. J. Chin. Pathol. 110, 425-440.

- Logue J, Tikku P and Cossins AR. 1995. Heat injury and resistance adaptation in fish. *J. Ther. Biol.* 20, 191-197.
- McDonald DG and CL Milligan. 1997. Ionic, osmotic and acid base regulation in stress. In: *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Iwama, Pickering AD, Sumpter JP and Schreck CB, eds. Cambridge University Press. London. U.K. 119-114.
- McLeay DJ and DA Brown. 1979. Stress and chronic effects of untreated and treated bleached kraft pulpmill effluent on the biochemistry and stamina of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. board Can.* 36: 1049-1059.
- Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B and Scharner A. 2002. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia* 18, 563-575.
- Ming J, Xie J, Xu P, Liu W, Ge X, Liu B, He Y, Cheng y, Zhou Q and Pan L. 2009. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). *Fish Shellfish Immunol* 28(3), 407-418.
- Morimoto RI. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Gene Dev* 12, 3788-3796.
- Nakagawa H, M Kayama and K Ikuta. 1977. Electrophoretic evidence

- of seasonal variation of carp plasma albumin. J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ. 16: 99-106.
- Noh CH, Kim KS, Myoung JG, Cho JK, Yun NJ, Lim HK and Bang IC. 2015. The Hatchability of Fertilized Eggs of Interspecific Hybrid between Red Spotted Grouper (*Epinephelus akaara*) and Brown-Marbled Grouper (*E. fuscoguttatus*). KOREAN JOURNAL OF ICHTHYLOGY 27, 16-20.
- Ojima N, Yamashita M and Watabe S. 2005. Quantitative mRNA expression profiling of heat-shock protein families in rainbow trout cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 329, 51-57.
- Ozaki H. 1978. Physiology of fish, Vol. 1, blood. Circulation. Midori-shobo. Tokyo, 326 p.
- Pan CH, Chein YH, Hunter B. 2003. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 297: 107-118.
- Park JY, JM Park, CK Hong, K.M Kim and JK Cho. 2016. Physiological and biochemical of blood on low temperature stress in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, Ichthyology. 28(1): 1-8.
- Park H, Ahn IY and Lee HE. 2007. Expression of heat shock protein 70 in the thermally stressed Antarctic clam *Laternula elliptica*. Cell Stress Chaperones. 12, 275-282.
- Randall DJ and TKN Tsui, 2002. Ammonia toxicity in fish. Mar. Pollut.

- Bull. 45: 17-23.
- Robert J. 2004. Evolution of heat shock protein and immunity. Dev Comp Immunol 27, 449-464.
- Sanders BM. 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. Crit. Rev. Toxicol 23, 49-75.
- Santos MA and M Pacheco. 1996. *Anguilla Anguilla* L. Stress biomarkers recovery in clean water and secondary treated pulp mill effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety. : 96-100.
- Schreck CB. 1982. Stress and rearing of salmonids. Aquaculture 28:241-249.
- Sharp GJE and Secombes CJ. 1993. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. Fish Shellfish Immunol. 3, 119-129.
- Siddiqui N. 1977. Seasonal, size and comparative study of plasma proteins of four airbreathing freshwater fishes. Proc. Indian Acad. Sci. Sect. B. 85: 384-390.
- Siddiqui N. 1977. Changes in blood plasma mineral concentration with feeding spawning and size of air-breathing catfish (*Claria batrachus*). Zool. Jahrb. 81: 81-89.
- Song L, Li C, Xie Y, Liu S, Zhang J, Yao J, Jiang C, Li Y and Liu Z. 2016. Genome-wide identification of Hsp70 genes in channel catfish and their regulated expression after bacterial infection. Fish Shellfish Immunol 49, 154-162.

- Srivastava P. 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2, 185-194.
- Tomasso JR, KB Davis and NC Parker. 1980. Plasma corticosteroid and electrolyte dynamics of hybrid striped bass (whiteth bass×striped bass) during netting and hauling. *Proc. World Maricult. Soc.* 11: 303-310.
- Turner AH. 1937. Serum protein measurements in the lower vertebrates. II. In marine teleosts and elasmobranchs. *Biol. Bull.* 73: 511-626.
- Vinodhini R and M Narayanan. 2009. The impact of toxic heavy metal on the hematological parameters in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Iranian J. Environ. Health Sci. Eng.* 6: 23-28.
- Wang Z, Wu Z, Jian J and Lu Y. 2009. Cloning and expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850) responding to bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol* 26, 639-645.
- Wedemeyer GA and WT Yasutake. 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. U.S. Fish and Wildlife Service Technical 89.
- Wedemeyer GA and DJ Mcleay. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: *Stress and Fish*. Pickering AD. ed. Pergamon Press. London. U.K. 247-275.
- Xu Y, Zheng G, Dong S, Liu G and Yu X. 2014. Molecular cloning, characterization and expression analysis of HSP60, HSP70 and HSP90 in golden apple snail, *Pomacea canaliculata*. *Fish Shellfish*

Immunol. 41, 643-653.

- Yanagisawa T and K Hashimoto, 1984. Plasma albumins in elasmobranchs. Nissuishi. 50: 1083.
- Yang SJ. 2016. Study on the optimum condition and health asseement for long distance transport of rockfish, *Sebastes schlegeli* and abalone, *Haliotis discus hannai*. Dr. Pukyong National University.
- Yenari MA, Giffard RG, Sapolsky RM and Steinberg GK. 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). Mol Med Today 5. 525-531.
- Zhang X, Huanying P, Zaohe W and Jian J. 2011. Molecular characterization of heat shock protein 70 gene transcripts during *Vibrio harvei* infection of humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*. Fish Physiol. Biochem. 37, 897-910.
- Zmijewski MA, Macario AJL and Lipinska B. 2004. Functional similarities and differences of an archaeal HSP70 (DnaK) stress protein compared with its homologue from the bacterium *Escherichia coli*. J Mol Biol 336, 539-549.