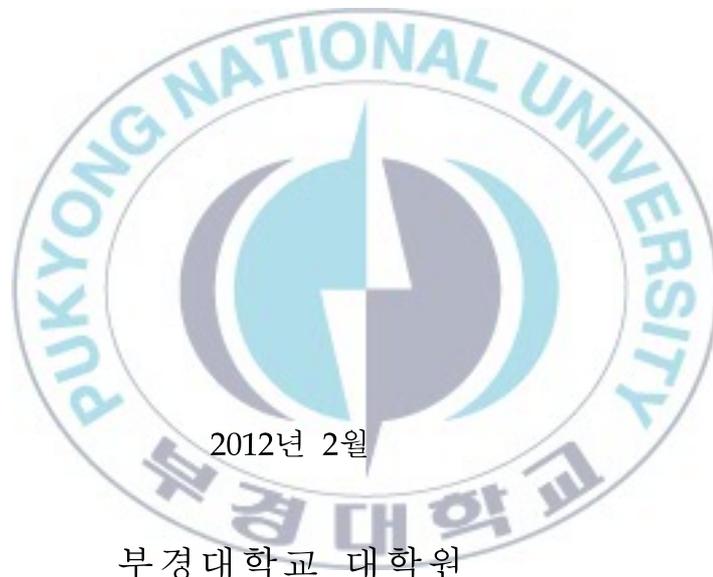


이 학 석 사 학 위 논 문

과산화수소 약욕이 넙치 *Paralichthys
olivaceus*의 아가미 점액과 lysozyme에
미치는 영향



부경대학교 대학원

수산생명의학과

황 분 욱

이 학 석 사 학 위 논 문

과산화수소 약욕이 넙치 *Paralichthys
olivaceus*의 아가미 점액과 lysozyme에
미치는 영향

지도교수 박 수 일

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.



2012년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

황 분 옥

황분옥의 이학석사 학위논문을 인준함.

2012년 2월



주 심 부 허 민 도 (인)

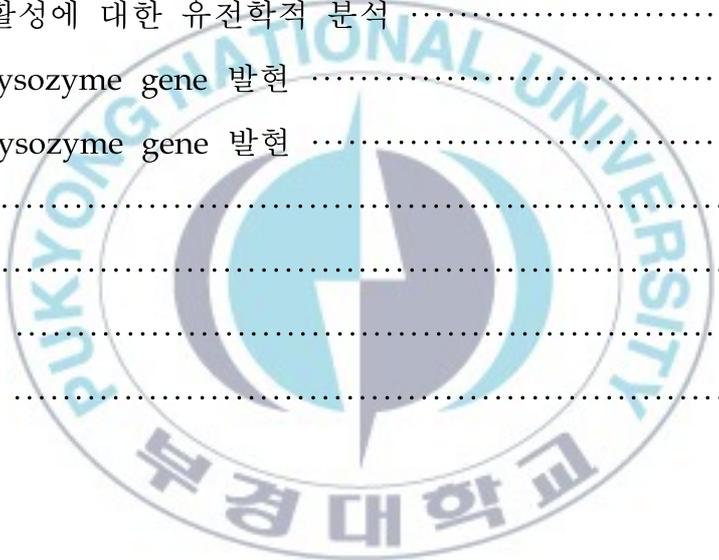
위 원 강 주 찬 (인)

위 원 박 수 일 (인)

목 차

목 차	i
Abstract	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 시험어 및 사육	5
2. 소독제 및 약육	5
3. 시험어의 점액세포와 조직학적 변화 분석.....	7
3.1. 시험어의 아가미 채취 및 처리.....	7
3.2. 조직 표본 제작	7
3.3. 아가미 조직의 Alcian blue/Periodic acid-Schiff (AB/PAS) 염색	8
3.4. 아가미 조직 표본으로부터 점액세포 계수	8
4. 과산화수소에 대한 실험어의 면역학적 활성 분석	9
4.1. 아가미 점액과 혈청 분리	9
4.2. 아가미 점액 lysozyme activity 조사	9
4.3. 혈청 lysozyme activity 조사	10
5. 시험어의 lysozyme 활성에 대한 유전학적 분석	11
5.1. Total RNA 분리	11
5.2. First strand cDNA 합성	11
5.3. Primer 제작	12

5.4. Standard Plasmid 정제 및 DNA sequencing	15
5.5. Real-time quantitative PCR	15
6. 통계학적 분석	17
III. 결과	18
1. 아가미의 조직학적 관찰	18
2. 점액세포의 변화	20
3. 면역학적 분석	22
3.1. 아가미 점액 lysozyme activity	22
3.2. 혈청 lysozyme activity	22
4. lysozyme 활성화에 대한 유전학적 분석	24
4.1. C-type lysozyme gene 발현	24
4.2. G-type lysozyme gene 발현	24
IV. 고찰	27
V. 요약	31
VI. 감사의 글	33
VII. 참고문헌	35



Effects of Hydrogen peroxide in the gill mucus and lysozyme
of olive flounder *Paralichthys olivaceus*

Bun Ok Hwang

Department of Aquatic Life Medicine, the Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Hydrogen peroxide is a safe substance that will be decomposed into H₂O and O₂ in the water easily. Although it was approved only as disinfectant of fish culturing system, some fish farmers try it to control external parasitic disease in Korea. However, little informations are available for toxicity or side effect of hydrogen peroxide on the culturing fish from exposure. This study was performed to get basic informations from olive flounder, *Paralichthys olivaceus* which exposed to the different conditions of hydrogen peroxide. The aimed informations are histopathological change of gill mucous cells, effect on the immunological activity and gene expression of lysozyme in the gill.

From the histopathological observation of hydrogen peroxide treated olive flounder, there were slight increasing aneurysms in the gill

lamella according to concentration and treating time. This seemed to mean the adverse effect of hydrogen peroxide on the gill artery or blood vessel even if the impact will be reversible and minor. During test period, the number of mucous cell was changed according to the treatment conditions but did not show any significant variations in the exposed concentration of hydrogen peroxide. These results suggested that mucus cell could response rapidly to the stimulation with differentiation in number of the cells.

When lysozyme activity were checked in the gill mucus and the serum, the former showed immediate activated response then decrease but the latter showed gradual activation to the hydrogen peroxide exposure.

The gene expression level of C-type and G-type lysozyme in the gill were surveyed. The levels of gene expression in the gill were increased in all the 3rd test groups and subsequently decreased significantly after the 5 days test groups. But the gene expression levels in head kidney and liver did not show any significant changes during experiment. Highly increased gene expression levels in the gill after hydrogen peroxide exposure will be considered an immunological response for replenish with lysozyme in the gill mucus. And the rapid decreased gene expression level of the 5 days test group indicated that expression activity of lysozyme gene could not recover during experiment.

These results indicate that the mucus cell of gill could recover in morphological but not functionally including lysozyme activity and

gene expression from gill damage caused by hydrogen peroxide exposure. Thus, it will be suggested to be careful for treatment hydrogen peroxide to fish disease control because of its adverse effects to fish.



I. 서론

어류는 수중에서 끊임없이 병원성 미생물의 침입 위협에 노출되어 있으며, 여러 다양한 수질 환경 변화에 대응하고 있다. 아가미와 장관의 표면은 점막으로 덮여있어서 체내에 있으나 외부의 영향을 받게됨으로써, 항시 외래 이물질 등에 대해 물리적, 화학적 및 세포성 장벽을 형성하고 있다. 이 중에서도 특히 아가미는 외부환경에 직접 노출되어 있어서 점막이 수중의 다양한 미생물이 어체 내로 침입하는 것을 막아내는 1차적 방어선으로서 매우 중요한 기능을 수행하고 있다.

중요한 mucosal organ인 경골어류의 아가미 조직은 4쌍의 새궁으로 이루어져 있으며, 이들 각각은 후외측 방향으로 향한 두 개의 새엽이 호흡상피세포로 덮인 새판을 가지고 있다. 아가미 조직의 기본 기능 단위인 filament들은 결합조직과 근육조직의 interbranchial septum에 의해 지지되어 있다 (Wilson and Laurent, 2002). 호흡상피조직은 가스 및 이온 이동, nitrogenous waste excretion, hormone 생산능 등 여러 가지 기능을 수행하고 (Evans et al., 2005) 아가미의 점액을 분비하는 점액세포는 상피조직의 outer layers에 위치하며 작은 구멍으로 수중 표면과 접촉하고 있다 (Kumari et al., 2009). 점액의 주성분인 mucopolysaccharides (mucin)에는 중성과 산성의 두 성질 성분이 존재하고, 표면과 접촉하고 있는 구멍으로 exocytosis함으로써 분비된다 (Diaz et al., 2001). 담수 Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)에서는 중성 mucin이 더 많고, 해수 Atlantic salmon에서는 산성 mucin 양이 더 많다 (Roberts et al., 2003). 점액세포에는 세포 내 과립이 없는 mucous goblet cells와 세포 내 과립이 존재하는 serous goblet cells가 있으며, 점액세포에서 분비되는 mucin은 병원체가 어체 표면에 부착하여

집락을 형성하는 것을 막아주고 외부환경 변화에 따른 생리적 변화에 대해 항상성을 유지시키는 역할을 한다고 알려져 있다 (Zuchelkowski et al., 1985; Shephard et al., 1994).

이외에도 점액세포의 주요한 면역 성분인 lysozyme은 leucocyte, monocyte, macrophage, neutrophils에서 생성되는 mucolytic enzyme으로, 항균작용 뿐만 아니라 polymorphonuclear leucocytes와 macrophage를 활성화로 직접적인 식작용 촉진이나 옹소닌 작용에 의한 간접적인 식작용 촉진 역할을 한다 (Saurab et al., 2008). 어류에서는 주로 두신, 아가미, 체표, 소화관 그리고 난에 분포되어 있다 (Demers et al., 1997).

Lysozyme은 크게 6가지 유형으로 나뉜다: chicken-type lysozyme (C-type), goose-type lysozyme (G-type), invertebrate-type lysozyme (I-type), T4 phage lysozyme, bacterial lysozyme 그리고 plant-type lysozyme 등이 보고되어 있다. 이 중에서 C-type과 G-type은 척추동물에서 가장 먼저 보고되었으며, I-type은 무척추동물에서 가장 먼저 보고되었다. 어류의 C-type lysozyme은 Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), turbot (*Scophthalmus maximus*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*), zebrafish (*Danio rerio*)에서 (Hikima et al., 2000; Dautigny et al., 1991; Fujiki et al., 2000; Liu et al., 2002), G-type은 Japanese flounder, common carp, orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*), mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)등을 대상으로 보고되어 있다 (Hikima et al., 2001; Sun et al., 2006; Yin et al., 2003). 이들의 활성화와 점액세포의 변화와 관련된 연구 결과는 잘 알려져 있지 않다. 최근 들어서 세균 침입에 따른 어류의 lysozyme 유전자

발현 동태에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 예를 들면 Atlantic cod (*Gadus morhua*)에 heat-killed *Vibrio anguillarum* 백신을 주사한 후 혈액 내 G-type lysozyme 유전자 발현을 조사한 결과 7일 후 가장 높게 나타났으며 (Christopher et al., 2008), *Aeromonas salmonicida*를 공격 주사 한 후 3시간째에 G-type lysozyme 발현양이 증가하여 24시간 후에도 현저하게 높은 발현양을 유지하였다 (Christopher et al., 2010). 그리고 turbot에서는 lipopolysaccharide와 병원성 Gram 양성세균과 Gram 음성세균을 주사하였을 때 신장과 비장에서 G-type lysozyme 발현양이 증가하였으나 C-type lysozyme 발현양은 G-type에 비하여 현저하게 낮은 수치를 나타내었다 (Zhao et al., 2011). *Edwardsiella tarda*를 공격주사한 Indian major carp (*Labeo rohita*)의 경우는 공격시험 후 6~12시간째에 신장에서 C-type과 G-type lysozyme 유전자 발현양이 눈에 띄게 증가하였다 (Mohanty et al., 2010). 이와 같이 어류는 주로 신장 또는 비장에서 lysozyme 유전자 발현의 변화를 볼 수 있으며 발현 특성을 어종이나 자극제에 따라 다르게 나타남을 알 수 있었다.

lysozyme activity는 나이, 계절 변화 및 생식 시기 등의 stress conditions에 따라서 활성의 다양성이 유도된다고 보고되어 있다. 과산화수소는 어류 병원체를 제어하기 위해 사용되고 있을 뿐만 아니라 양식장에서 수조나 사육수의 소독제로 잘 알려져 있다. 그렇지만 과산화수소의 어류의 세포에 대한 독성이 알려져 있으며 넙치, 조피볼락 및 감성돔에 각각 201, 269 및 139 ppm에서 반수치사를 나타낸다는 보고가 있다 (박 등, 2008).

과산화수소 약육이 양식산업 현장에서 다양하게 이용되고 있으나, 이 약품이 양식 넙치에 미치는 영향에 대한 평가는 미미하다. 특히, 어

체에서 외부환경과 접하는 면적이 가장 많은 조직인 아가미 조직의 활성과 비특이적 면역 작용에 미치는 영향을 밝히는 것은 어체의 건강관리 및 생산성의 확보에 매우 시급하고 중요한 일이라 생각된다. 그래서 본 연구에서는 과산화수소 약욕이 아가미의 상피조직에 존재하는 점액 세포수의 변화에 미치는 영향과 함께 stress indicator로 알려져 있는 lysozyme의 활성 변화 및 C-type과 G-type lysozyme의 어체 내 분포 및 유전자 동태 변화를 분석하고자 하였다.



II. 재료 및 방법

1. 시험어 및 사육

시험에 사용한 넙치 *Paralichthys olivaceus*는 제주도 소재의 육상 수조식 양어장으로부터 건강한 개체를 구입하였다. 평균 체중 56.4 g, 평균 전장 17.8 cm이었으며 넙치를 수온 $12.43 \pm 0.73^{\circ}\text{C}$, 염분농도 $35.46 \pm 0.15\%$, 용존산소 농도 $7.81 \pm 0.33 \text{ mg/l}$ 및 pH 8.25 ± 0.04 인 해수를 1.5 t 수조에서 실험 기간 동안 먹이를 급여하지 않고 반유수식으로 관리하였다. 분석을 위한 시료 채취는 Table 1과 같이 수행하였다. 시험어체에서 나타나는 변화가 과산화수소만의 영향임을 입증하기 위하여 시험 기간 동안 어체의 건강 상태를 면밀히 관찰하였다.

2. 소독제 및 약욕

넙치 양식장의 사육 수조 소독제로 사용되고 있는 과산화수소 (30%, Hydrogen peroxide, Junsei)를 원액으로 사용하였다. 과산화수소의 시험어에 대한 영향을 알아보기 위하여 원액을 각각 100, 300과 500 ppm의 농도로 해수에 희석한 후 3일 동안 연속적으로 매일 1시간씩 시험어를 약욕시켰다.

Table 1. Plan for hydrogen peroxide bath and sampling from each treatment to olive flounder, *Paralichthys olivaceus*

groups	treatment	objective	number of tested fish	surveyed organ	note
1st	daily 1h bath for successive 3 days	histology	3	gill	promptly changed
		immunology	5	gill mucus, blood	hydrogen peroxide
		genetics	3	gill, liver, head kidney	bath water to normal sea water after bath
2nd	daily 1h bath for successive 3 days	histology	3	gill	promptly changed
		immunology	5	gill mucus, blood	hydrogen peroxide
		histology	3	gill	bath water to normal sea water after each successive bath
3rd	daily 1h bath for successive 3 days	immunology	5	gill mucus, blood	successive bath
		genetics	3	gill, liver, head kidney	treatment with 24hrs interval
		histology	3	gill	
5 days	sampling 5 days after 3rd bath	immunology	5	gill mucus, blood	
		genetics	3	gill, liver, head kidney	
		histology	3	gill	
12 days	sampling 12 days after 3rd bath	immunology	5	gill mucus, blood	
		histology	3	gill	

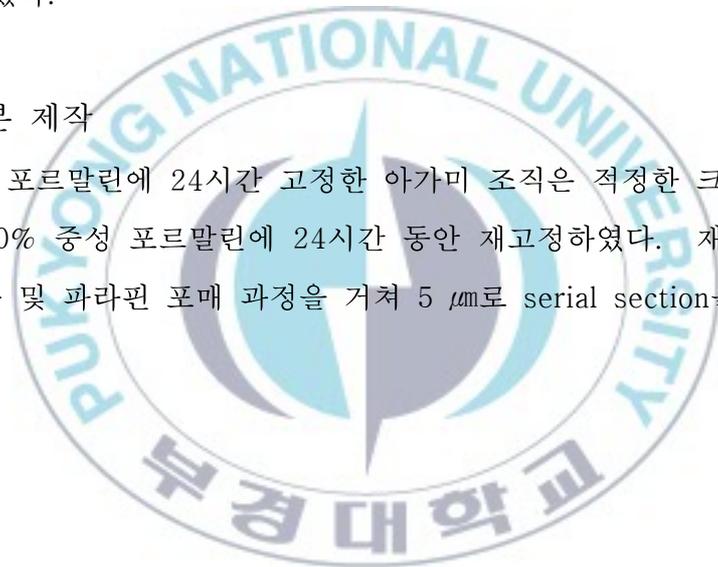
3. 시험어의 점액세포와 조직학적 변화 분석

3.1. 시험어의 아가미 채취 및 처리

과산화수소에 의한 아가미 점액세포와 조직학적 변화를 관찰하기 위해 첫 번째, 두 번째, 세 번째 약육한 시험어와 약육 후 5일과 12일 경과한 각각의 시험어를 채포하여 2-phenoxyethanol로 마취시킨 다음 분석용 시료를 채취하였다. 대조구는 과산화수소 처리를 하지 않은 시험구로서 과산화수소수 처리 시험어와 동일한 방법으로 분석용 시료를 채취하였다. 시험어는 control (0), 100, 300 및 500 ppm의 각 시험구 넓치 3마리를 임의로 채포한 후 아가미를 분리하여 10% 중성 포르말린 용액에 고정시켰다.

3.2. 조직 표본 제작

10% 중성 포르말린에 24시간 고정한 아가미 조직은 적절한 크기로 잘라 새로운 10% 중성 포르말린에 24시간 동안 재고정하였다. 재고정된 조직은 탈수 및 파라핀 포매 과정을 거쳐 5 μ m로 serial section을 수행하였다.



3.3. 아가미 조직의 Alcian blue/ Periodic acid-Schiff (AB/PAS) 염색

아가미의 조직학적 변화를 관찰하기 위해 시험구별로 시험어 3마리씩 4개의 새엽을 조직 표본으로 제작하였으며, Dezfuli et al. (2010)의 방법에 따라 AB/PAS 염색을 실시하여 조직을 관찰하였다. 조직 표본의 염색 과정은 xylene과 ethanol을 이용한 deparaffinization 과정을 거친 후 acetic acid에 2분, pH 2.5 alcian blue에 1시간, 증류수 30초, acetic acid 30초, 증류수 30초, 0.3% Na₂CO₃ solution에 20분, 증류수 30초, periodic acid에 7분, 수세 5분, 증류수 30초, Schiff's reagent에 10분, NaHSO₃ solution에 3분씩 3번, 수세 5분, 증류수 30초의 염색 과정을 마친 다음 ethanol과 xylene을 이용한 Dehydration 과정을 거치는 순서로 염색하였다.

3.4. 아가미 조직 표본으로부터 점액세포 계수

아가미 조직 내 점액세포 수의 변화를 관찰하기 위해 시험구별 시험어 아가미 조직 내 점액세포를 광학현미경으로 관찰하였다. 점액세포의 수는 Roberts et al. (2003)의 방법에 따라 광학현미경 100배의 배율에서 10개의 2차 새엽 사이에 있는 점액세포수 (10 inter-lamellar)를 각 조직 표본 당 3부분이상 계수하였다.

4. 과산화수소에 대한 실험어의 면역학적 활성 분석

4.1. 아가미 점액과 혈청 분리

과산화수소수를 처리한 실험어의 면역학적 활성 변화를 알아보기 위하여 아가미 점액과 혈청의 lysozyme을 지표로 삼았다 (Table 1). 아가미 점액 채취 및 혈청 분리를 위해 실험어를 2-phenoxyethanol로 마취시킨 후 아가미 점액 시료는 Klesius et al. (2008)에 따라 잘라낸 아가미의 표면을 슬라이드 글라스로써 긁어서 모은 다음 그 점액의 2배 정도되는 50 mM Sodium Phosphate Buffer (PB, pH 7.4)를 넣고 homogenizer로 마쇄하였다. 마쇄한 아가미 점액을 12,000 × g, 20분 동안 4°C에서 원심 분리한 다음 상정액을 점액 시료로 사용하였다.

혈청 분리를 위해 1회용 주사기를 사용하여 실험어의 미부 정맥에서 채혈하였다. 채취한 혈액은 상온에서 1시간 방치하고 다시 4°C에서 2~3시간 정치해둔 다음 6,000 × g, 10분 동안 4°C에서 원심 분리하여 얻은 상정액을 혈청 시료로 사용하였다.

4.2. 아가미 점액 lysozyme activity 조사

Takahashi et al. (1986)의 방법에 따라 실험어의 아가미 점액 lysozyme 활성을 측정하였다. 시험용 균액은 *Micrococcus lysodeikticus*를 pH 7.4인 5 mM PB로 현탁하여 530 nm에서 0.6이 되도록 미리 조정해 둔다. 96 well plate의 각 well에 4배까지 단계 희석한 아가미 점액 시료 25 µl에 균액 175 µl를 첨가하여 상온에서 0분 반응 후 흡광도를 측정하고 30분 동안 5분 간격으로 흡광도 530 nm에서 감소량을 측정하였다. 흡광도 값이 0.001 감소한 것을 1 unit으로 나타내었다.

4.3. 혈청 lysozyme activity 조사

시험어의 혈청 lysozyme 활성은 Lange et al. (2001)의 방법에 따라 측정하였다. 시험용 균액은 *M. lysodeikticus*를 pH 6.2인 50 mM Phosphate Buffer로 현탁하여 0.4 mg/ml 농도로 제조하였다. 96well plate의 각 well에 4배까지 단계희석한 혈청 시료 25 μ l에 균액 75 μ l를 첨가하여 상온에서 0분 반응 후 흡광도를 측정하고 30분 동안 5분 간격으로 흡광도 600 nm에서 감소량을 측정하였다. 흡광도 값이 0.001 감소한 것을 1 unit으로 나타내었다.



5. 시험어의 lysozyme 활성화에 대한 유전학적 분석

5.1. Total RNA 분리

넙치에서 아가미, 간 그리고 두신을 무균적으로 분리하여 1 ml의 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 처리 후 homogenizer로 분쇄하였다. 분쇄한 시료는 RNA를 분리하기까지 -70°C 에 보관하였다.

냉동 보관한 시료를 4°C 에서 녹인 후 실온에서 5분간 방치한 다음 분석에 사용하였다. Chloroform 200 μl 를 첨가하여 강하게 shaking한 후 실온에서 2분간 반응시키고 원심 분리 (12000 rpm, 15분, 4°C)하였다. 분리된 상정액에 동량의 chloroform을 첨가하고 강하게 진탕한 후 실온에서 2분간 반응시킨 다음 원심 분리하였다. 상정액을 분리하여 Isoprophyl alcohol 500 μl 를 첨가하고 부드럽게 혼합한 후 실온에서 7분간 반응시키고 원심 분리하였다. 상정액을 버리고 침전물에 70% alcohol 1 ml을 첨가하여 원심 분리하였다. 상정액을 제거한 다음 침전물을 상온에서 건조시킨 후 RNase free water에 녹여 사용 전까지 -70°C 에 보관하였다.

5.2. First strand cDNA 합성

Total RNA를 DNase (Invitrogen)로 처리한 후 Superscript II First-Strand Synthesis System (Invitrogen)을 이용하여 제조사의 매뉴얼대로 cDNA를 합성하였다.

5.3. Primer 제작

넙치 lysozyme C 와 G type gene의 partial fragments를 얻기 위해 GenBank에 등록되어 있는 *Paralichthys olivaceus* (AB 050469, AB 050590) lysozyme C와 G -type mRNA sequences를 근거로 하여 primer sets (LysC-F, LysC-R, LysG-F and LysG-R)를 제작하였다. 제작한 primer의 sequence는 Table 2와 3에 나타내었다.

Lysozyme C와 G type primer의 적절한 annealing 온도를 결정하기 위해 넙치 조직에서 얻은 cDNA에 10 × buffer (Takara, Shiga, Japan) 2 μl, 200 μM dNTP 1.6 μl, 0.5 U Taq DNA polymerase (*r*Taq, Takara) 0.2 μl 그리고 primers를 첨가하고 3차 deionized water로 total volume을 20 μl 되도록 조절한 후 RT-PCR을 수행하였다. PCR product 확인은 3% agarose gel상에서 시행하였다. Primer의 RT-PCR 조건은 Table 4에 나타내었다.



Table 2. Primer set for olive flounder, *Palalichthys olivaceus* lysozyme in real time PCR analysis

Primer	sequence (5' to 3')
LysC-F	ATG GAT GGT TAC CGT GGC ATC
LysC-R	AGA TGC CGT AGT CAG TGG ATC C
LysG-F	ACT TCT CAG CAG GAC AAC CTG G
LysG-R	TCG ATT CCG TAG CTC TGT CCA AC

Table 3. Primer set for olive flounder, *Palalichthys olivaceus* 18s rRNA in real time PCR analysis

Primer	sequence (5' to 3')
18S rRNA-F	CGA TGC TCT TAG CTG AGT GT
18S rRNA-R	ACG ACG GTA TCT GAT CGT CT

Table 4. Condition of reaction step and RT-PCR cycle for LysC and LysG

	Temperature (°C)	Reaction Time	Cycle(s)
Pre-denaturation	94	3 min	1
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	58	30 sec	30
Extension	72	30 sec	
Post-extension	72	7 min	1

Table 5. Condition of reaction step and RT-PCR cycle for 18s rRNA

	Temperature (°C)	Reaction Time	Cycle(s)
Pre-denaturation	94	3 min	1
Denaturation	94	30 sec	
Annealing	56	30 sec	30
Extension	72	30 sec	
Post-extension	72	7 min	1

5.4. Standard Plasmid 정제 및 DNA sequencing

Lysozyme C와 G type의 Partial cDNA fragment를 pGEM T-easy vector (Promega, Madison, WI, USA)와 4°C에서 overnight 동안 반응시켜 ligation하였다. 그 후 competent cell (*E. coli*, DH5α-) 100 μl을 첨가하여 얼음 위에서 30분간 반응시킨 후 42°C에서 1분간 Heat-shock 시켰다. 얼음 위에서 반응을 중지시킨 후 Luria-Bertani (LB, Difco, USA ; 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract) broth 1 ml을 첨가하여 37°C, 90분간 배양하였다. 배양액은 Ampicillin 50 μg/ml, X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside), (Sigma, USA) 40 μg/ml과 IPTG (Isopropylthio-β-) 10 μg/ml이 첨가된 LB agar plate에 도말한 후 37°C에서 18시간 배양하여 white colony를 선별하였다. Plasmid DNA는 GeneAll Plasmid SV mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 분리한 후 insert sequences를 확인하여 Standard plasmid로 하였다.

5.5. Real-time quantitative PCR

LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBRGreen I (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)을 사용한 real-time quantitative PCR 방법 (n=3)을 이용하여 과산화수소 처리를 한 넙치의 아가미, 간과 두신 내 lysozyme C와 G type 의 RNA양의 변화를 측정하였다. 아가미, 간과 두신을 상기에서 서술된 바와 같이 적출하여, RNA extraction solution (Invitrogen)을 이용하여 조직으로부터 total RNA를 분리하여, DNase (Invitrogen) 를 처리하였다. First-strand cDNA는 제조사의 매뉴얼에 따라서 SuperscriptTM first-strand synthesis system for RT-PCR을 이용하여 total RNA (2 μg)로부터 cDNA를 합성하였다.

넙치의 lysozyme C와 G 타입 유전자의 변화를 감지하기 위해서는 상기에서 서술된 바와 같이 특이적 primer pairs (Table 4)를 디자인하였다. 18S rRNA의 특이적 primer pair는 18S rRNA사이에서 보존된 부위를 근거로 하여 디자인하였다 (Table 3).

이러한 primers를 이용하여 증폭된 PCR product를 lysozyme C와 G transcripts를 정량하는데 이용하였다. Target mRNAs의 증폭된 부위를 포함하는 plasmid DNAs를 standard sample로서 준비하였고, 이를 단계적으로 희석하였다. PCR mixture 내에는 Lightcycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green (Roche Diagnostics GmbH)와 0.2 μ M을 포함하여 총 volume 20 μ l으로 구성되었다. 각 샘플에 대한 lysozyme C와 G의 발현양은 18s rRNA의 발현양에 의하여 정규화되었으며, relative values로 나타내었다.



6. 통계학적 분석

실험구와 대조구, 실험구들 사이의 통계학적 유의성 검증은 SPSS (SPSS, America, Chicago) 18.0 one-way Analysis of variance (ANOVA) test를 실시하였고 p-value가 0.05이하 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



III. 결과

1. 아가미의 조직학적 관찰

과산화수소에 노출시킨 넙치 아가미의 조직학적 변화를 알기 위하여 AB/PAS 염색한 조직 절편을 관찰하였다 (Fig. 1). 대조구와 비교하여 모든 시험 구간에서 특이적인 병변이 관찰되지 않았으나, 2차 새엽에서 동맥류를 보이는 개체가 있었으며 약육이 거듭될수록 동맥류의 빈도가 증가하는 경향을 보였다. 그리고 이러한 현상은 5 days와 12 days 시험 구간의 시험어에서도 관찰되었다.



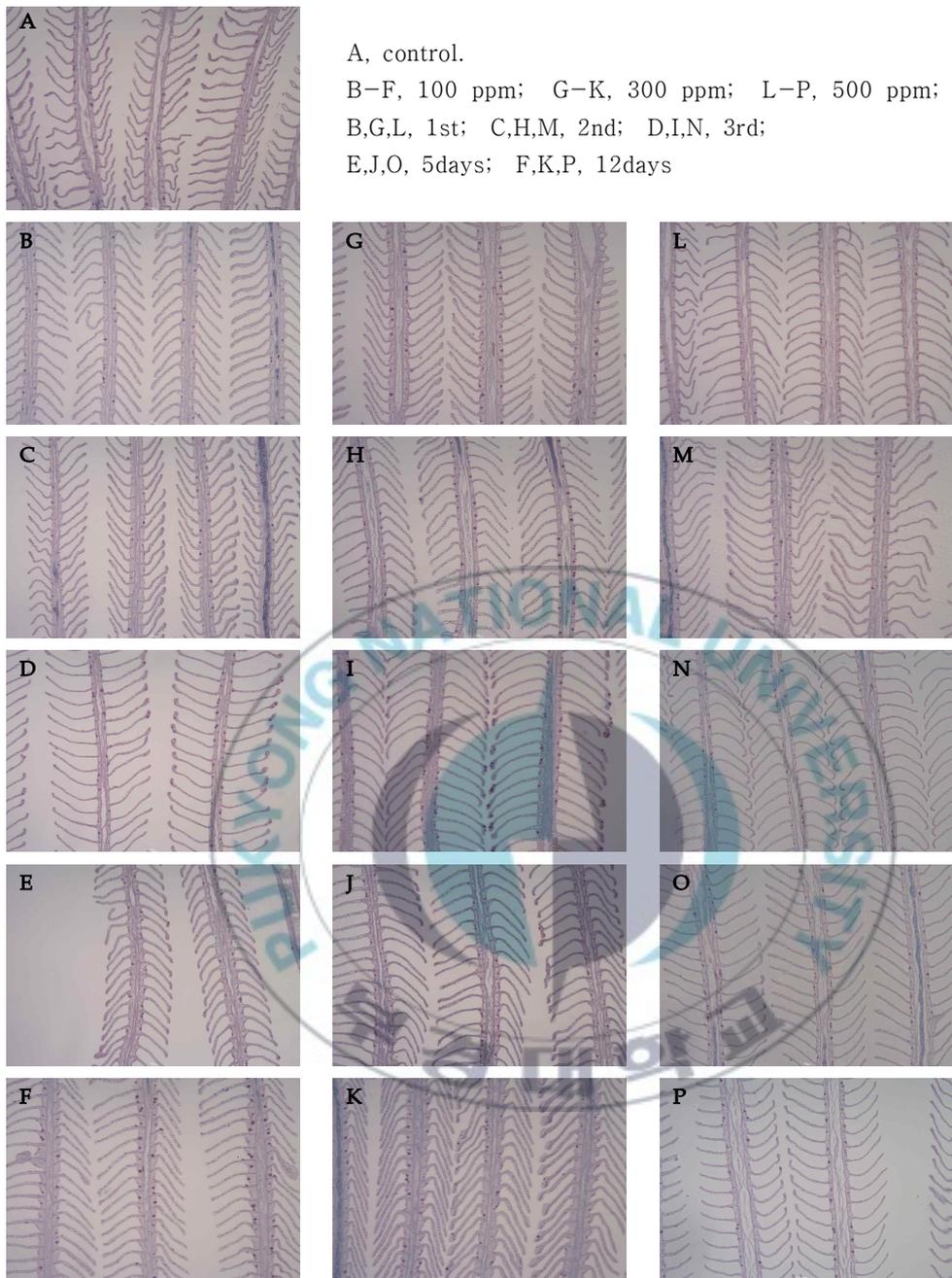


Fig. 1. Pathological observation of the hydrogen peroxide treated gill mucus cells of olive flounder *Paralichthys olivaceus*.

2. 점액세포의 변화

Fig. 2에 각각의 농도별 과산화수소 약욕 후 아가미 상피 조직에 분포하는 점액세포 수의 변화를 측정된 결과를 나타내었다. 100 ppm 시험구에서는 유의적인 변화가 없었으나, 300 ppm 시험구에서는 1st 시험구에서 대조구보다 유의적으로 증가하다가 3rd 시험구까지 유의적으로 감소한 후 5 days 시험구에서 대조구와 비슷한 수치를 나타내었다. 500 ppm 시험구에서는 약욕 후 바로 샘플링한 1st 시험구에서 유의적으로 감소하였다가 이후 5 days 시험구까지 증가하였다. 그러나 12 days 시험구에 들어서는 유의적인 변화를 나타내지 않았다.



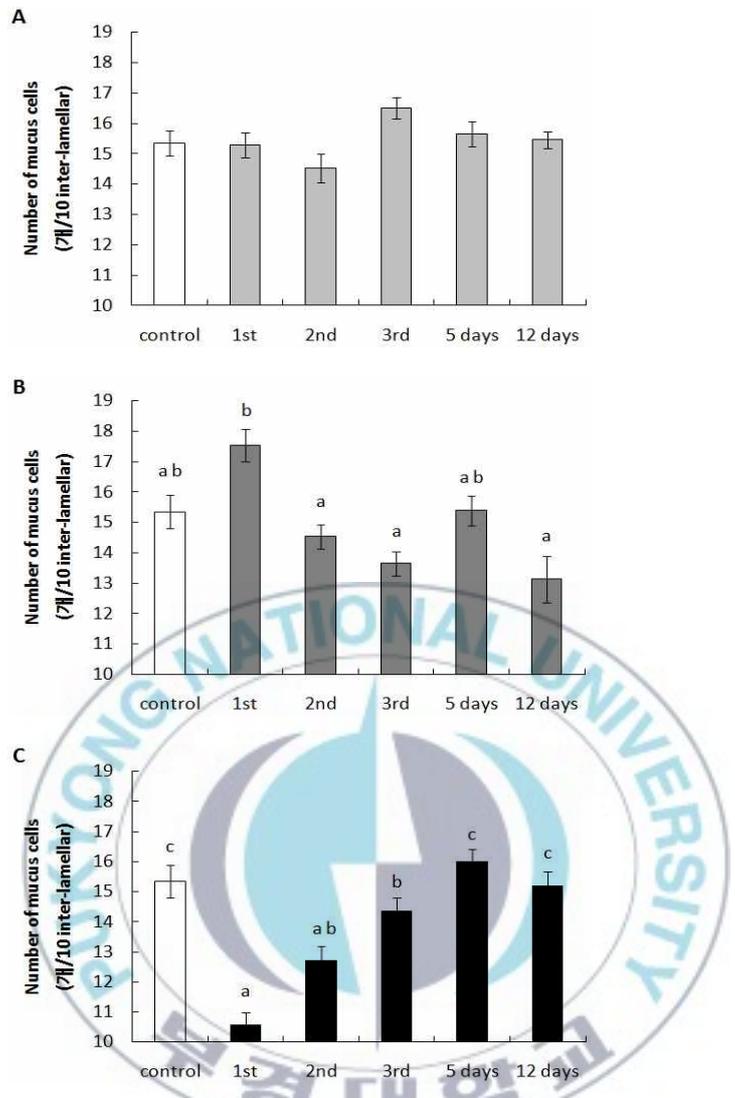


Fig. 2. The effect of the hydrogen peroxide treatment on the number of gill mucus cells of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. A, 100 ppm; B, 300 ppm; C, 500 ppm. Dissimilar letters indicate values within the hydrogen peroxide treatment groups that were significantly (one-way ANOVA, $p < 0.05$) different from each other, values are means \pm standard error.

3. 면역학적 분석

3.1. 아가미 점액 lysozyme activity

과산화수소에 노출된 넙치의 아가미 점액 lysozyme 활성 변화를 조사한 결과를 Fig. 3A에 나타내었다. 과산화수소의 농도별 시험어에서 분리해낸 아가미 점액이 lysozyme 활성에 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 시간이 경과함에 따라 모든 농도별 시험구에서 유의적으로 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 한편, 100 ppm과 300 ppm 처리 시험구에서는 1st 시험구가 대조구에 비하여 유의적으로 증가한 후 12 days까지 활성이 꾸준히 감소하였다. 그러나 500 ppm 시험구에서는 3rd 시험구까지 활성을 유지하다가 5 days 시험구부터 활성이 유의적으로 감소하였다.

3.2. 혈청 lysozyme activity

과산화수소에 노출된 넙치의 혈청 lysozyme 활성 변화를 Fig. 3B에 나타내었다. 과산화수소의 시험 농도별 시험구 사이에 유의적인 활성 변화를 보이지 않았으며, 모든 농도별 시험구에서 시간이 경과함에 따라 점차적으로 그 활성이 증가하는 양상을 나타내었다. 500 ppm 처리구의 1st 시험구 lysozyme 활성이 대조구에 비하여 유의적으로 증가하여 3rd 시험구까지 비슷한 활성이 지속된 후 5 days에 유의적으로 증가하기 시작하여 12 days 시험구에서는 그 활성이 급격하게 증가하였다. 그러나 100 ppm 시험구와 300 ppm 시험구 사이에서는 1st, 2nd와 3rd 시험구까지 유의적인 활성변화의 차이를 보이지 않다가 12 days 시험구에서만 급격하게 활성이 증가하였다.

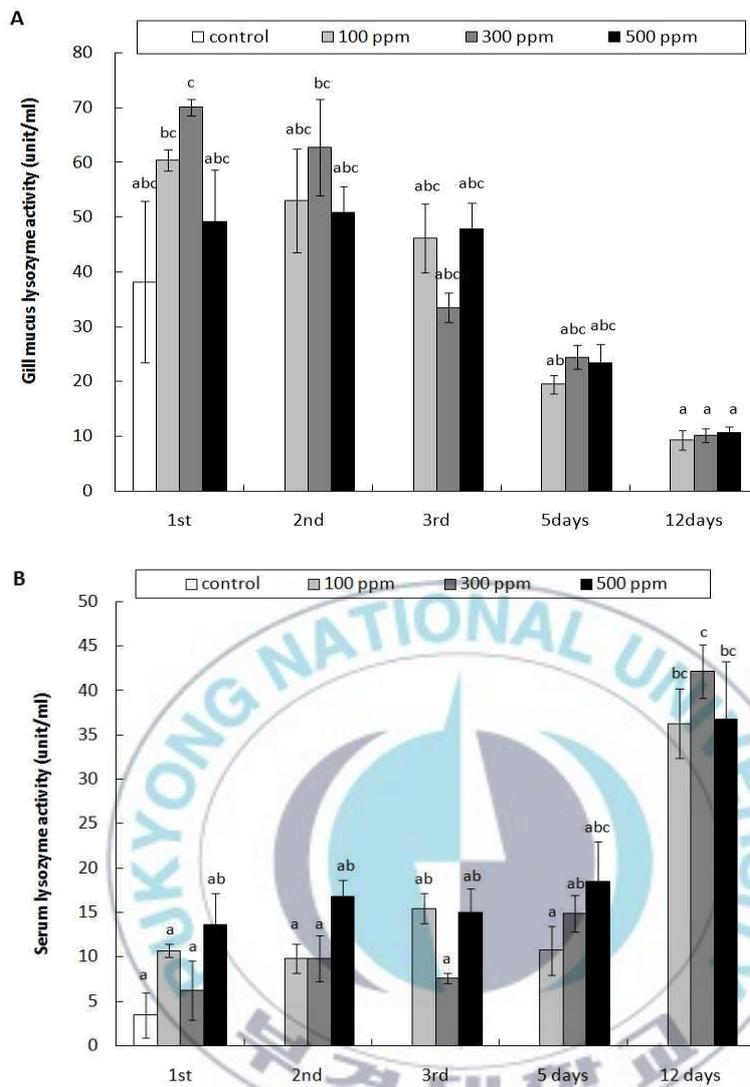


Fig. 3. The effect of the hydrogen peroxide treatment on the lysozyme activity in the gill mucus of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dissimilar letters indicate values within the hydrogen peroxide treatment groups that were significantly (one-way ANOVA, $p < 0.05$) different from each other, values are means \pm standard error.

4. lysozyme 활성화에 대한 유전학적 분석

4.1. C-type Lysozyme gene 발현

과산화수소액에 약욕시킨 넙치의 아가미, 두신 및 간에서 C-type lysozyme mRNA의 발현양을 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

시험어 아가미의 C-type lysozyme mRNA양이 농도별 시험구에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 모든 농도별 시험구에서 3rd 침지 시까지 증가하였다가 5 days 시험구에서 유의적으로 급격한 감소를 나타내었다.

시험어를 두신에서 100과 500 ppm에 침지시킨 시험구에서는 두신 시료의 lysozyme mRNA양이 경과시간에 따른 유의적인 변화가 없었으나, 300 ppm 시험구에서 대조구와 비교하여 1st 침지하였을 때에는 유의적으로 감소하였다가 이후 5 days까지 점차 증가하였다.

시험어의 간 C-type lysozyme 발현 양에서는 과산화수소액의 침지나 처리 시간에 따른 유의적인 변화를 보이지 않았다.

4.2. G-type Lysozyme gene 발현

과산화수소액에 침지시킨 시험어의 아가미, 두신 및 간에서 발현된 G-type lysozyme의 발현 양을 조사한 결과는 Fig. 5에 나타내었다.

시험어의 아가미 조직에서 발현된 G-type lysozyme mRNA양은 모든 농도별 시험구간에서 3rd 시험구가 유의적인 증가를 보였다가 5 days에는 급격히 감소하였다.

시험어의 두신과 간에서 G-type lysozyme mRNA 발현 양은 침지 시간이나 농도에 따른 유의적인 변화가 관찰되지 않았다.

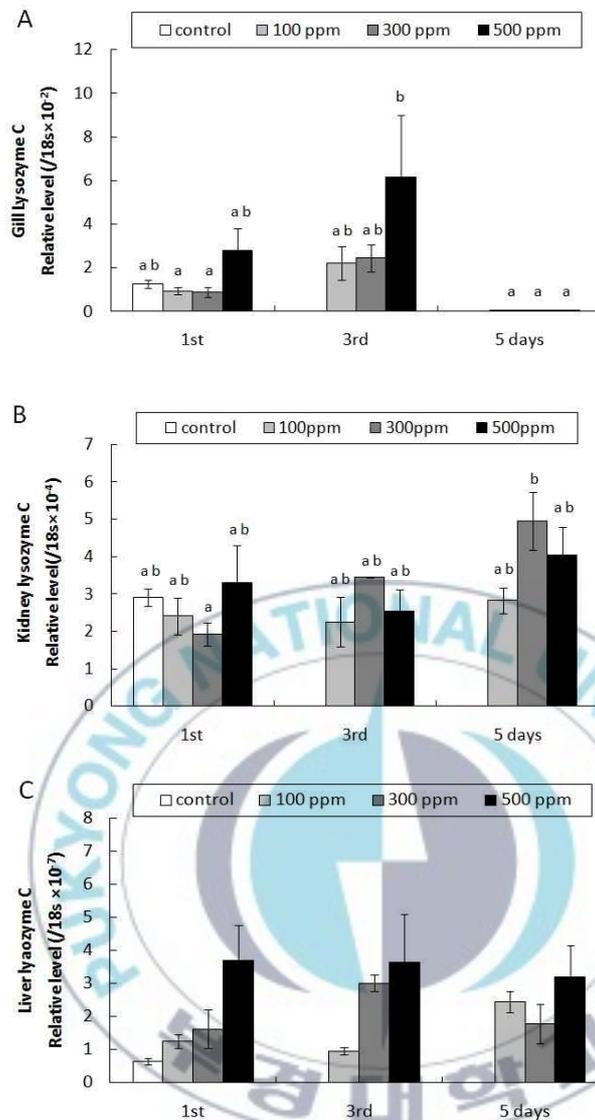


Fig. 4. The effect of hydrogen peroxide treatment on the relative expression levels of C-type lysozyme in the gill, kidney and liver of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dissimilar letters indicate values within the hydrogen peroxide treatment groups that were significantly (one-way ANOVA, $p < 0.05$) different from each other, values are means \pm standard error.

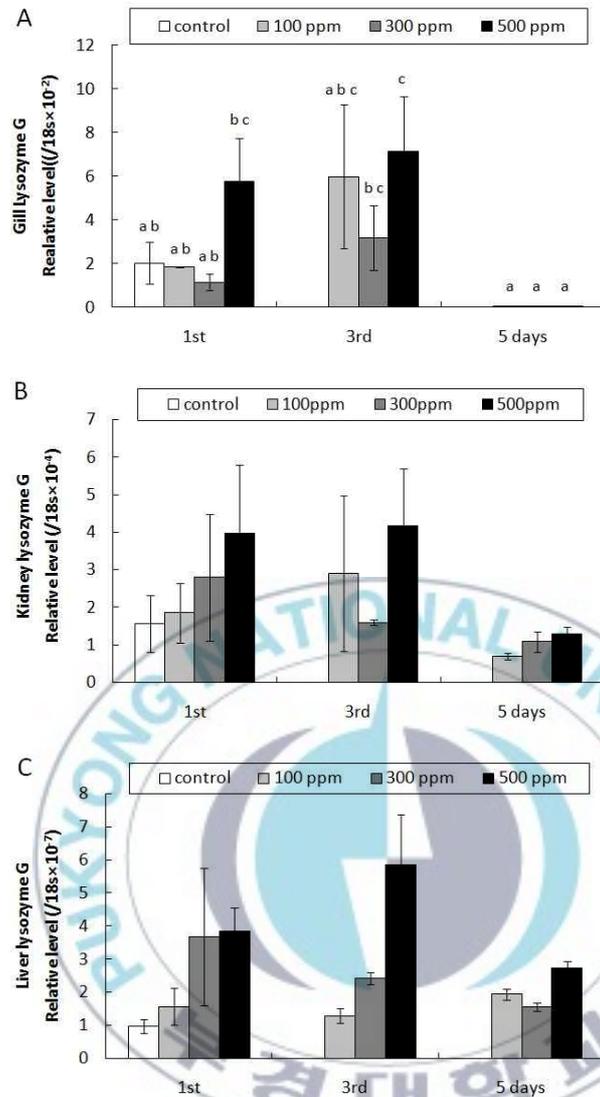


Fig. 5. The effect of hydrogen peroxide treatment on the relative expression levels of G-type lysozyme in the gill, kidney and liver of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dissimilar letters indicate values within the hydrogen peroxide treatment groups that were significantly (one-way ANOVA, $p < 0.05$) different from each other, values are means \pm standard error.

IV. 고찰

과산화수소는 수중에서 물과 산소로 분해되어 환경문제를 야기하지 않으며 살균력이 강한 물질이다. 이러한 특성 때문에 미국 FDA에서는 양식 어류의 일부 곰팡이성 질병과 세균성 질병에 대한 치료제로, 일본에서는 수산 동물의 외부 기생충 구제제로 허가되어 사용되고 있다. 예를 들면 과산화수소는 해수어에 대해서 scuticella를 구제하거나 일부 세균성 질병을 치료하는데 효과적이라는 보고가 있다 (Harikrishnan et al., 2010). 우리 나라에서는 과산화수소를 양어장의 소독제로 허가하고 있으나, 일부 양어장에서 외부 기생충의 구제 효과가 있는 것으로 알려져 있을 뿐 어체에 미치는 과산화수소의 독성에 관해서는 박 등 (2008)과 김 등 (2009)의 연구에 불과하다. 본 연구에서는 과산화수소 약욕이 넙치의 아가미 점액세포와 비특이적 면역지표인 lysozyme에 미치는 영향을 알아보고, 이 약품의 부작용에 대한 기초 자료를 얻고자 하였다.

과산화수소액의 침지가 넙치의 아가미에 미치는 영향을 조직병리학적으로 조사한 결과 Fig. 1에서 보이는 바와 같이 침지 농도와 시간에 따라 아가미 새관의 동맥류가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 병리현상이 비록 가역적이고 그 정도가 경미한 편이라 하더라도, 과산화수소가 넙치의 혈관에 국소적인 자극을 심하게 줄 수 있는 물질임을 알 수 있다.

과산화수소액의 약욕이 넙치의 아가미 점액세포 수 변화에 미치는 영향에 대하여 관찰하였다. 그 결과 과산화수소액의 침지 농도와 경과 시간에 따라 아가미 점액세포 수의 변화 양상이 다소 차이가 있는 것으로 나타났으나, 반응 후 시간이 경과함에 따라 점차 안정되어 가는 것을 알 수 있었다. Isabelle et al. (2011)은 무지개송어에 황화철 ($FeSO_4$

7H₂O)을 작용시켜 아가미 점액세포 수를 조사한 결과, 점액세포의 수가 감소하는 현상이 나타났다고 하였다. 그리고 Monteriro et al. (2009)은 나일틸라피아 (*Oreochromis niloticus*)에 구리 (Cu)를 작용시킨 시험에서 저농도로 만성 노출시켰을 때에는 시간 경과에 따라 점액세포의 크기가 증감하였으나, 고농도 노출 시에는 크기가 지속적으로 작아지는 현상을 관찰하였다. 이와 같이 어류가 외부의 자극성 물질에 노출되면 아가미 점액세포가 수적인 변화나 크기의 변동 등을 통하여 외부 자극에 의한 어체 생리적 손상을 줄이기 위해 다양하게 대응하는 것으로 볼 수 있다. 본 연구에서 과산화수소액의 시험 농도나 시간에 따라 관찰된 다양한 아가미 점액세포의 수적 변화로 이러한 자극에 대한 적응 반응의 일환으로서 신속하게 대응하는 것으로 생각된다.

Lysozyme은 수중 동물의 유해물질 등 외부자극에 대한 반응 지표로 많이 사용되고 있다. Brown trout를 고염도의 환경에 노출시켰을 경우 lysozyme 활성이 증가하였고 Nile tilapia를 2주 동안 산성의 환경에 노출시킬 경우에도 활성이 증가하였다 (Marc et al., 1995; Dominguez et al., 2005). 중금속에 노출된 무지개송어의 경우에도 혈청 lysozyme 활성이 증가하였다 (Sanchez et al., 1999).

본 실험에서 건강한 넙치를 과산화수소에 농도별로 노출시켜 경과 시간에 따른 아가미 점액과 혈청의 lysozyme 활성을 측정하였다 (Fig. 3). 점액 lysozyme 활성은 1st 시험구가 대조구와 비교하여 유의적으로 증가한 후 12 days까지 그 활성이 꾸준히 감소하는 경향을 보였다. 그리고 농도별 유의적인 차이는 보이지 않았으나 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 즉, 아가미 점액은 외부환경에 대한 즉각적인 반응으로 lysozyme activity가 1st 시험구부터 급격히 증가한 후 점차 활성이 감소하였다. 그리고 혈청 lysozyme의 활성은 아가미 점액과 비교하

였을 때 점차적인 증가를 보여 아가미 점액 lysozyme과는 서로 다른 특성을 나타내었다.

이러한 lysozyme 활성과 점액세포 수의 조사 결과를 정리해 보면, 과산화수소의 농도에 따라 넙치의 반응 특성이 달라지는 것으로 생각된다. 300 ppm 시험구의 넙치 아가미 조직에서는 과산화수소 자극으로 점액세포 수가 증가하며 점액 분비량과 lysozyme의 활성이 증가하였다가 이후 반복된 약육으로 세포의 기능이 약화되어 활성이 감소한 것으로 사료된다. 500 ppm 시험구에서는 과산화수소의 과도한 자극으로 인하여 점액세포 자체가 손상을 받아 다른 시험구에 비해 점액세포 수가 약 1/3배 이하로 감소하였다. 그럼에도 불구하고 lysozyme 활성에서 대조구와 유의차를 나타내지 않았던 것은 살아있는 점액세포의 보상 작용으로 세포당 분비량이 증가되었을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 이에 대해서는 차후 보완 연구가 필요할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 과산화수소 약육으로 인한 넙치의 아가미, 두신, 간의 C-type과 G-type lysozyme 유전자 발현양 변화를 조사한 결과 (Fig. 4, 5) 아가미에서 C-type lysozyme 유전자 발현양은 모든 농도의 3rd 시험구에서 증가하였다가 5 days 시험구에서 유의적으로 급격히 감소하였으나 두신과 간에서는 시간이나 농도에 따른 특이적인 변화를 보이지 않았다. 그리고 G-type lysozyme 유전자 발현양의 경우도 500ppm 시험구의 아가미 조직에서 일시적인 증가를 보인 것을 제외하면 모든 농도 시험구에서 3rd 시험이 유의적인 증가를 보였다가 곧 급격히 감소하였다. 그러나 두신과 간에서는 시간이나 농도에 따른 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 현상은 아가미 조직에서 발현되는 두 type의 lysozyme 모두 과산화수소의 자극으로 소모된 아가미 점액 내 lysozyme의 양을 보충시키기 위한 자기 방어 반응으로 사료된다.

또한 5 days에 발현양이 급격히 감소된 것으로 보아 본 실험 기간 동안 lysozyme 유전자 발현 기능이 회복되지 않은 것으로 사료된다.

본 연구에서 넙치를 과산화수소에 노출시킨 후 5일째까지의 반응 특성을 정리해 보면, 아가미 점액세포가 수적으로는 안정을 되찾은 것으로 보이지만, lysozyme 활성이나 아가미의 lysozyme 유전자 발현 양으로 볼 때 과산화수소의 자극으로 인한 손상을 복구하지 못한 것으로 보인다. 따라서 단기간 내에 어체에 대해 과산화수소를 반복 노출시키는 것은 어체의 아가미 기능과 비특이적 면역력 약화로 넙치의 성장 지연이나 질병의 감염 가능성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.



V. 요약

과산화수소는 수중에서 물과 산소로 분해되어 환경문제를 야기하지 않으며 살균력이 강한 물질이다. 우리 나라에서는 과산화수소를 양어장의 소독제로 허가하고 있으나, 일부 양어장에서 외부 기생충의 구제 효과가 있는 것으로 알려져 있을 뿐 어체에 미치는 과산화수소의 독성에 관한 연구는 부족하다. 따라서 본 연구에서는 과산화수소 약욕이 넙치의 아가미 점액세포와 비특이적 면역지표인 lysozyme에 미치는 영향을 알아보고, 이 약품의 부작용에 대한 기초 자료를 얻고자 하였다.

과산화수소액의 침지가 넙치의 아가미에 미치는 영향을 조직병리학적으로 조사한 결과 침지 농도와 시간에 따라 아가미 새판의 동맥류가 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 병리 현상이 비록 가역적이고 그 정도가 경미한 편이라 하더라도, 과산화수소가 넙치의 혈관에 국소적인 자극을 심하게 줄 수 있는 물질임을 알 수 있다.

과산화수소액의 약욕이 넙치의 아가미 점액세포 수 변화에 미치는 영향에 대하여 관찰하였다. 그 결과 과산화수소액의 시험 농도나 시간에 따라 관찰된 다양한 아가미 점액세포의 수적 변화로 이러한 자극에 대한 적응 반응의 일환으로서 신속하게 대응하는 것으로 생각된다.

건강한 넙치를 과산화수소에 농도별로 노출시켜 경과 시간에 따른 아가미 점액과 혈청의 lysozyme 활성을 측정하였다. 아가미 점액은 외부환경에 대한 즉각적인 반응으로 lysozyme activity가 1st 시험구부터 급격히 증가한 후 점차 활성이 감소하였다. 그리고 혈청 lysozyme의 활성은 아가미 점액과 비교하였을 때 점차적인 증가를 보여 아가미 점액 lysozyme과는 서로 다른 특성을 나타내었다.

이러한 lysozyme 활성과 점액세포 수의 조사 결과를 정리해 보면,

과산화수소의 농도에 따라 넙치의 반응 특성이 달라지는 것으로 생각된다. 이에 대해서는 차후 보완 연구가 필요할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 과산화수소 약육으로 인한 넙치의 아가미, 두신, 간의 C-type과 G-type lysozyme 유전자 발현양 변화 (mRNA level, gene expression level)를 조사한 결과 아가미에서 두 type lysozyme 유전자 발현양 (mRNA level, gene expression level)은 모든 농도의 3rd 시험구에서 증가하였다가 5 days 시험구에서 유의적으로 급격히 감소하였으나 두신과 간에서는 시간이나 농도에 따른 특이적인 변화를 보이지 않았다. 이러한 현상은 아가미 조직에서 발현되는 두 type lysozyme 모두 과산화수소의 자극으로 소모된 아가미 점액 내 lysozyme의 양을 보충시키기 위한 방어 반응으로 사료된다. 또한 5 days에 발현양이 급격히 감소된 것으로 보아 본 실험기간동안 lysozyme 유전자 발현 기능이 회복되지 않은 것으로 사료된다.

본 연구에서 넙치를 과산화수소에 노출시킨 후 5일째까지의 반응 특성을 정리해 보면, 아가미 점액세포가 수적으로는 안정을 되찾은 것으로 보이지만, lysozyme 활성이나 아가미의 lysozyme 유전자 발현양으로 볼 때 과산화수소의 자극으로 인한 손상을 복구하지 못한 것으로 보인다. 따라서 단기간 내에 어체에 대해 과산화수소를 반복 노출시키는 것은 어체의 아가미 기능과 비특이적 면역력 약화로 넙치의 성장 지연이나 질병의 감염 가능성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 감사의 글

대학원 생활 동안 저를 이끌어 주시고 지도해주신 박수일 지도교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 또한 많은 지도와 조언을 해주신 허민도 교수님, 강주찬 교수님, 정현도 교수님, 김기홍 교수님과 정준기 교수님께도 감사드립니다.

항상 관심 가져주시고 좋은 말씀 해주시는 국립수산과학원의 방종득 단장님, 늘 격려해주시는 김이청 단장님, 늘 밝은 미소로 힘을 북돋아주시는 김진우 과장님 감사합니다. 항상 후배들을 챙겨주시는 유병화 선배님, 이번에 박사님이 되실 경북어업기술센터의 이재일 선배님, 만나뵈 때마다 좋은 말씀 해주시는 국립수산과학원의 지보영 박사님, 조미영 박사님, 권문경 박사님, 원경미 박사님께 감사드립니다. 대학원 생활동안 선생님의 빈자리를 채워주셨던 남동해수산연구소의 이덕찬 박사님과 항상 후배들을 걱정하시고 저를 항상 믿어주시고 많이 가르쳐 주시느라 고생이 많으셨던 저의 사수 김이경 박사님, 실험실 생활동안 관심과 조언을 아까지 않으셨던 우승호 박사님께 감사드리며 대학원과 직장생활을 모두 지치지 않고 나아갈 수 있게 배려해주신 부산수산자원연구소의 이수정 선배님, 힘들 때마다 좋은 말씀과 조언을 해주셨던 경상대학교의 박찬일 교수님, 전남대학교의 김도형 교수님, 황미혜 선배님, 최현숙 선배님, 한현자 박사님, 김현정 박사님, 홍미주 선배님께도 감사의 말씀 드립니다. 후배들에게 늘 좋은 수산물을 제공해주시는 국립 수산물 품질 검사원의 이상윤 선배님, 손영찬 선배님, 강민진 선배님, 성명희 선배님, 최광진 선배님, 김은전 선배님 감사합니다. 학부 때부터 많은 격려를 해주셨던 고석형 선배님, 멀리에서도 항상 응원해주고 힘이되어 주는 손새봄 선배님, 힘들 때 웃음을 잃지 않게 해준 하수진 선배님, 조언을 아

까지 앓는 최정현 박사님, 황성돈 박사님, 김수현 선배님, 서미영 선배님께 감사드립니다. 어병예방학 실험실 생활을 즐겁게 할 수 있게 해준 한상운 선배님, 최민지 선배님, 오상현 선배님께 감사드립니다. 옆에서 묵묵하게 힘이 되어주고 실험실을 이끌어가고 있는 엄용환 선배님, 힘들 때 옆에서 응원해 주었던 Chao Qua 박사님, 항상 많은 도움을 준 김남은, 김민경 후배님, 곽진영 후배님께 감사드리며, 앞으로 실험실을 이끌어 나갈 김수현 학형님, 이소정, 이채연 후배님께 감사드리며 앞으로 나아갈 길에 힘을 북돋아 주고 싶습니다. 바쁜 실험 일정에도 많은 도움을 주시고 격려해주신 강예재 선배님, 김선영 선배님, 이 논문을 쓰면서 저의 부족한 부분을 채울 수 있게 도와준 황형준, 김보성, 이수연 후배님께 감사드립니다.

긴 대학원 생활과 힘든 시기에도 늘 격려해주시고 무한한 지지를 해주신 부모님께 감사의 말씀을 드리며 각자의 길에서 열심히 전진하고 있는 언니들과 동생에게도 감사드립니다.

마지막으로 논문이라는 작은 결실을 맺기까지 많은 관심과 걱정을 보여주신 모든 분들께 이 장을 빌어 감사의 말씀을 드리며 앞으로 더 단단해지고 발전된 모습으로 보답하겠습니다.

VII. 참고 문헌

- Dautigny A., Prager E.M., Pham-Dinh D., Jolles J., Pakdel F., Grinde B. & Jolles P., cDNA and amino acid sequences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lysozymes and their implications for the evolution of lysozyme and lactalbumin. *Journal of Molecular Evolution* 1991; 32, 187-198
- Demers N.E., Bayne C.J., The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology*, 1997; 21, 363-373
- Dezfuli B.S., Pironi F., Campisi M., Shinn A.P. and Giari L., The response of intestinal mucous cells to the presence of enteric helminths: their distribution, histochemistry and fine structure. *Journal of Fish Diseases* 2010; 33, 481-488
- Diaz A.O., Garcia A.M., Devincenti C.V., Goldemberf A.L., Mucous cells in *Micropogonias furnieri* gills: Histochemistry and Ultrastructure. *Anat. Histo. Embryol.* 2001; 30, 135-139
- Dominguez M., Takemura A., Tsuchiya M., Effects of changes in environmental factors on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research* 2005; 36, 391-397

Fujiki K., Shin D.H., Nakao M., Yano T., Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leucocyte cell-derived chemotaxin 2, glia maturation factor β , CD 45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridisation. Fish and Shellfish Immunology, 2000; 10, 643–650

Harikrishnan R., Balasundaramb C., Heo M.S., Scuticociliatosis and its recent prophylactic measures in aquaculture with special reference to South Korea. Taxonomy, diversity and diagnosis of scuticociliatosis: Part I, Control strategies of scuticociliatosis: Part II. Fish & Shellfish Immunology 2010; 29, 15–31

Hikima J.I., Hirono I., and Aoki T., Molecular Cloning and Novel Repeated Sequences of a C-type Lysozyme Gene in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*). Mar. Biotechnol. 2000; 2, 241-247

Hikima J.I., Minagawa S., Hirono I., Aoki T., Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese founder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. Biochimica et Biophysica Acta 2001; 1520, 35–44

Isabelle L., Sandrine P., Patrick P., Effects of iron on rainbow trout gill cells in primary culture. Cell Biol Toxicol 2011

Klesius P.H., Shoemaker C.A., Evans J.J., *Flavobacterium columnare*

chemotaxis to channel catfish mucus. Federation of European Microbiological Societies 2008 ; 216–220

Kumari U., Yashpal M., Mittal S., Mittal A.K., Histochemical analysis of glycoproteins in the secretory cells in the gill epithelium of a catfish, *Rita rita* (*Siluriformes*, *Bagridae*). Tissue and Cell 2009; 41, 271–280

Lange, S., Gudmundsdottir B.K. and Magnadottir B. (2001). Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish Shellfish Immunol., 11, 523–535

Liu F., Wen Z., Cloning and expression pattern of the lysozyme C gene in zebrafish. Mechanisms of Development, 2002; 113, 69–72

Marc A., Quentel C., Severe A., Le Bail P., Boeuf G. Changes in some endocrinological and non-specific immunological parameters during seawater exposure in the brown trout. Journal of Fish Biology, 1995; 46, 1065–1081

Mohanty B.R., Sahoo P.K., Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. Fish and Shellfish Immunology, 2010; 28, 613–621

Monteiro S.M., Tocha E., Mancera J.M., Fontainhas F., Sousa M., A stereological study of copper toxicity in gills of *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; 213–223

Roberts S.D., Powell M.D., Comparative ionic flux and gill mucous cell histochemistry : effects of salinity and disease status in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 2003; 134, 525–537

Sanchez D.J., Voccia I., Hontela A., Chilmonczyk S., Dunier M., Boermans H., Blakely B., Fournier M., Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo. *Environ Toxicol Chem* 1999; 18, 1492–1497

Saurab S., Sahoo P.K., Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 2008; 39, 233–239

Shephard K.L., Functions for fish mucus. *Rev. Fish Biol. Fish* 4, 1994; 401–429

Sun B.J., Wang G.L., Xie H.X., Gao Q., Nie P., Gene structure of goose-type lysozyme in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with analysis on the lytic activity of its recombinant in

Escherishia coli. Aquaculture, 2006; 252, 106–113

Takahashi Y., Itami T., Konegawa K., Enzymatic properties of partially purified lysozyme from the skin mucus of carp. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1986; 52(7), 1209–1214

Zhao L., Sun J.S., Sun L., The g-type lysozyme of *Scophthalmus maximus* has a broad substrate spectrum and is involved in the immune response against bacterial infection. Fish and Shellfish Immunology, 2011; 30, 630–637

Zuchelkowski E.M., Pinkstaff C.A., Hinton D.E., Mucosubstance histochemistry in control and acid-stressed epidermis of brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus*(LeSueur). Anat. Rec. 1985; 212, 327–335

김명석, 조지영, 김대회, 전형주, 김응오, 과산화수소의 이스라엘잉어 (*Cyprinus carpio*)에 대한 독성 및 세균과 기생충 제거 효과. 한국어병학회지 2009; 22(1), 1–7

박경희, 김석렬, 강소영, 정성주, 오명주, 시판 소독제의 넙치 *Paralichthys olivaceus*, 조피볼락 *Sebastes pachycephalus*, 감성돔 *Acanthopagrus schlegelii*에 대한 독성. 한국양식학회지 2008; 21(1), 7–12