



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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

강도다리, *Platichthys stellatus*  
lysozyme의 분자학적  
특성과 발현 분석



2011년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

박효진

이 학 석 사 학 위 논 문

강도다리, *Platichthys stellatus*  
lysozyme의 분자학적  
특성과 발현 분석

지도교수 박 수 일

이 논문을 석사학위논문으로 제출함.

2011년 2월

부경대학교대학원

수산생명의학과

박 호 진

박효진의 이학석사 학위논문을 인준함.

2011년 2월



주 심 이학박사 정 현 도 (인)

위 원 이학박사 정 준 기 (인)

위 원 이학박사 박 수 일 (인)

## 목 차

목 차 .....	i
Abstract .....	iii
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	5
1. <i>Streptococcus parauberis</i> 에 감염된 강도다리 lysozyme 활성 분석 .....	5
1. 1. 실험어 .....	5
1. 2. 균주 준비 .....	5
1. 3. 체표 점액 Lysozyme activity 조사 .....	5
1. 4. 혈청 lysozyme activity 조사 .....	6
2. 강도다리 Lysozyme gene의 molecular cloning .....	7
2. 1. Total RNA 분리 .....	7
2. 2. First strand cDNA 합성 .....	7
2. 3. Degenerated Primer 제작 .....	8
2. 4. Subcloning and DNA sequencing .....	11
2. 5. 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR .....	11
2. 6. 3' RACE-PCR .....	12
3. Semi quantitative RT-PCR analysis .....	13
3. 1. 정상 강도다리의 조직별 lysozyme gene analysis .....	13
3. 2. <i>S. parauberis</i> 감염 후 강도다리 lysozyme gene analysis ..	14
4. 통계학적 분석 .....	14
III. 결 과 .....	16
1. <i>S. parauberis</i> 감염 후 lysozyme 활성 변화 .....	16

2. 강도다리의 lysozyme C와 G의 특성 .....	18
3. 조직별 lysozyme gene profiles .....	24
4. <i>S. parauberis</i> 인위감염 후 강도다리 lysozyme gene profiles ..	26
IV. 고 찰 .....	29
V. 요 약 .....	35
VI. 감사의 글 .....	37
VII. 참 고 문 헌 .....	39



Molecular characterization and expression analysis of lysozyme in Starry  
flounder, *Platichthys stellatus*  
Hyo Jin Park

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

### Abstract

Flatfish have arisen world wide as important candidates for diversification in aquaculture. In Korea, the starry flounder, *Platichthys stellatus* is considered as an alternative species to olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, according to its high commercial value. The aquaculture of starry flounder had begun on east of Korea from 2006, the first mass mortality occurred in 2007 by infection of *Streptococcus parauberis*, which is gram-positive bacteria with single peptidoglycan layer on the cell wall.

Fish innate immune response is activated by granular leukocyte and macrophage at the initial stage of infection. Lysozyme is an important molecules in the innate immune system and other inner organs. The key role is catalysis of  $\beta$ -1, 4-glycosidic bond hydrolysis of peptidoglycan layer. Therefore, lysozyme has been considered as one of the most effective defense factor against bacterial infection, including *S. parauberis*.

Lysozyme activity of skin mucus and serum was investigated after abdominal injection with *S. parauberis* and physiological saline as control. The lysozyme activity of skin mucus increase immediately after injection, and reached peak level after 8 hour post-injection, but it decrease gradually thereafter. Control group activity did not show any significant change. Lysozyme activity of serum reached the highest level at 4 h post infection. At 5 day of post-injection, the activity level of lysozyme decrease, still kept

higher level than control even if decreased. The control group activity increase gradually, after injection.

In this study, Chicken (C)- and Goose (G)-type lysozyme cDNAs were cloned and characterized. Also the tissue expression profiles of each type of lysozyme genes were investigated in the normal starry flounder and successively after injection with *S. parauberis* .

For cloning of two type lysozyme genes, partial fragments were amplified using degenerated primers, and Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR was performed. C-type lysozyme cDNA full-length is 625 bp, including a 5'-untranslated region (UTR) of 28 bp and a 3'-UTR of 165 bp. The 432 open reading frame (ORF) encodes a protein of 143 deduced amino acid, including 8 conserved cysteine residues and 2 catalytic residues, Glutamic acid (Glu) and Aspartic acid (Asp). G-type lysozyme cDNA full-length is 870 bp, including a 5'-UTR of 129 bp and a 3'-UTR of 174 bp. The 567 ORF encodes a protein of 188 deduced amino acid, including 2 catalytic residues Glu and Asp.

The semi quantitative reverse transcription (RT)-PCR was used to determine the tissue expression profiles of lysozyme genes. In normal state of starry flounder, C-type lysozyme mRNA was expressed in spleen, liver and gill, and G-type lysozyme was expressed in various tissue including heart, kidney, spleen, gut, intestine, liver and gill.

Lysozyme C was up-regulated after 72 h post injection with *S. parauberis* in kidney and spleen, but not increase in liver of starry flounder. It Lysozyme G was increase after 4 h post injection in kidney, spleen and liver, and decrease after 72 h post injection.

# I. 서론

지금까지의 해산 양식 산업은 양식 어종이 한정되어 있고, 과밀 양식, 수질환경 악화와 어류 질병으로 인한 대량 폐사 등 많은 문제가 대두되면서 새로운 양식어종 개발이 요구되고 있는 실정이다. 양식 어종의 다양화와 양식 기술개발을 위한 노력으로 2006년에 강도다리의 양식 기술이 확립되어 시장에 양식 기술과 종묘가 보급되고있다. 이 어종은 해수와 담수 지역을 오가며 서식이 가능하고 냉수대와 같은 갑작스러운 수온 변화에도 적응이 빠르며 강한 내병성을 가지고 있어 앞으로의 양식 산업에 있어 넓치에 이은 대표 양식어종으로 높은 경제적인 가치가 기대되고 있다. 하지만 2007년에 연쇄구균 *Streptococcus parauberis*에 의한 대량폐사가 처음으로 보고된 이후로 같은 세균에 의한 피해가 지속되고 있으며, 이 병원체에 감염된 어체는 단기간에 폐사에 이르게 된다 (조 등, 2007).

어류의 면역체계는 포유류와 마찬가지로 선천적 면역반응과 획득성 면역반응으로 구분된다. 어류의 경우 고등 척추동물에 비해 획득성 면역반응을 유도하는데 많은 시간이 필요로 하는데 반해 선천적 면역반응은 단시간에 광범위한 외부 인자에 대해 방어 작용을 하기 때문에 어류의 선천적 면역체계에 대한 중요성이 강조되어 왔다. 선천적 면역반응은 체표 점액층의 물리적 방어 작용으로 외부인자가 체내로 침입하는 것을 막아주고 macrophage의 phagocytosis에 의해 병원체를 처리해주며 granular leukocyte에 의해 분비된 lytic enzyme, transferrin, interferon, proteinase, lectin과 agglutinins 같은 체액성인자들은 혈액과 점액층에서 활성화되어 병원체에 의한 감염을 막아준다. 또 이런 선천적 면역작용이 cytokine의 단계적인 반응을 유도하여 획득성 면역반응을 활성화시킨다 (Cole et al., 1997;

Patrzykat et al., 2001; Tort et al., 2003; Magnadottir et al., 2005; Bergljót, 2006; Shailesh and Sahoo, 2008).

Lysozyme은 병원체의 구성물에 결합하여 직접 분해작용을 하는 lytic enzyme 중 하나로 macrophage등 여러 장기에서 분비되어 세균의 peptidoglycan layer의  $\beta$ -1, 4-glycosidic bond를 가수분해한다. 세포벽이 single peptidoglycan layer로 구성된 gram-positive 세균에 대해 직접적인 항균작용을 일으키고 gram-negative 세균의 세포벽을 가수분해하여 다른 면역인자의 항균작용을 도와주기 때문에 중요한 선천적 면역인자 중 하나로 인식되고 있다 (Afzal et al., 1977; Andre et al., 1991; Bergljót, 2006; Lien et al., 2008; Saurabh and Sahoo, 2008). Lysozyme은 Hen egg white에서 처음 분리된 chicken (C)-type lysozyme, emden goose의 egg white에서 처음 분리된 goose (G)-type, starfish에서 처음 분리되어 알려진 invertebrate (I)-type, bacteriophage T4에서 분리된 phage-type, *Streptomyces erythraeus*에서 분리된 bacterial-type과 식물에서만 분리 가능한 plant-type으로 분류되고 있다. 최근에는 어류의 C-type과 G-type lysozymes의 유전자 구조와 기능을 밝히는 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Jolles and Jolles, 1975; Weaver et al., 1985; Wanga et al., 2005; Callewaert and Michiels, 2010).

어류의 lysozyme C는 Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Turbot *Scophthalmus maximus*, Zebrafish *Danio rerio* 에서 그 유전자의 구조가 밝혀져 있다 (Dautigny et al., 1991; Liu et al., 2002). Lysozyme G의 유전자 구조가 밝혀진 어종에는 Orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*, Large yellow croaker *Pseudosciana crocea*, Atlantic cod

*Gadus morhua* L, Yellow perch *Siniperca chuatsi* 등이 있다 (Yin et al., 2003; Sun et al., 2006; Zheng et al., 2007; Larsen et al., 2009). Common carp *Cyprinus carpio*, Olive flounder *Paralichthys olivaceus*, Brill *Scophthalmus rhombus*와 Grass carp *Ctenopharyngodon idellus* 에서는 lysozyme C 와 G의 유전자 구조가 모두 밝혀져 있다 (Fujiki et al., 2000; Hikima et al., 2000; Hikima et al., 2001; Savan et al., 2003; Ros a et al., 2008; Xing et al., 2010).

*S. parauberis*는 세계적으로 Rainbow trout을 비롯하여 Japanese eel, Yellowtail, Turbot 등 다양한 어종에서 분리되며 질병을 유발하는 병원성 세균이다 (Hoshina et al., 1958; Austin and Austin, 1993; Kusuda and Salati, 1993; Toranzo et al., 1994). 우리 나라에서 어류에 질병을 유발하는 *S. parauberis*는 양식 넙치와 강도다리에서 분리되었으며 비용혈성인  $\gamma$ -용혈성 연쇄구균으로 밝혀졌다 (조 등, 2007). 넙치에서는 체색 흑화, 체표 궤양, 지느러미 출혈, 안구 백탁 및 충혈, 안구 돌출과 탈장 등을 보였고, 강도다리에서는 체표 궤양과 탈장 증상은 보이지 않았지만 안구 돌출, 안구 주변 농양 및 출혈, 주둥치 주위 출혈과 복부팽만 등의 외부증상을 보였다. 또 심외막염, 내부장기의 광범위한 염증 소견 및 장 상피조직의 결합조직에 심한 괴사가 관찰되었으나, 뇌조직에서의 충혈 및 출혈은 나타나지 않았다 (강 등, 2007; 조 등, 2007). 현재 연쇄구균 감염증에 대한 상업용 백신 개발이 활발하게 이루어지고 있으며 이미 양식장에서도 이용되고 있지만 질병을 완전히 예방하지는 못하고 있다. 어류의 질병의 근본적인 해결을 위해서는 병원체 뿐 만 아니라 병원체에 대한 어체의 면역반응을 체계적으로 연구해야 할 필요성이 강조되고 있다 (김, 2008). 하지만 연쇄구균에 감염된 강도다리

의 면역체계에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 강도다리의 비특이적 면역반응 특성을 규명하기 위하여 *S. paraueris*를 인위 감염 시킨 후 어체 내 lysozyme 활성 변화를 조사하였다. 먼저 강도다리에서 lysozyme C와 G의 cDNA를 분리하여 그 1차 구조의 특징을 밝힌 후 강도다리 조직 내 분포를 RT-PCR법으로 확인하였다. 그리고 간, 신장, 비장 조직 내에서 두 타입의 lysozyme 동태를 분석하기 위하여 RT-PCR법을 실시하여 lysozyme 활성과 lysozyme 유전자 간의 상관관계를 비교하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. *Streptococcus parauberis* 감염에 대한 강도다리 lysozyme 활성 분석

#### 1. 1. 실험어

실험에 사용한 강도다리 *Platichthys stellatus*는 경북 포항시 소재의 육상 수조식 양어장으로부터 분양받았다. 평균체중  $12.4 \pm 8.5$  g, 평균체장  $8.4 \pm 2.2$  cm의 병력이 없는 강도다리를  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 해수에서 순치시키고 실험기간 동안 1일 1회 사육수 전량을 환수시켰다.

#### 1. 2. 균주 준비

연쇄구균에 감염된 강도다리에서 분리한 *S. parauberis* PH 0710을 BHIA (1.5% NaCl)상에서  $37^\circ\text{C}$ , 48시간 배양 한 후, 멸균 생리식염수를 이용해 3회 세척하고  $1 \times 10^4$  cfu/ml 농도로 조절하였다. 실험구에는  $1 \times 10^3$  cfu/fish 농도의 균을 복강주사하였고 대조구에는 멸균 생리식염수를 0.1 ml 씩 복강주사하였다.

#### 1. 3. 체표 점액 lysozyme 활성 조사

체표 점액의 lysozyme 활성은 Palakasha et al. (2008)의 turbidimetric method에 따라 측정하였다. 실험구와 대조구의 점액은 주사 후 4, 8, 12, 24, 72와 120 h 에 각 구간에서 5마리씩 무작위로 선별하여 점액을 분리하였다. slide glass로 긁어모은 체표 점액에 20배 양 (v/w)의 PBS (0.05 mM, pH 7.4)를 첨가하여 homogenize 한 후 원심 분리 (12,000 x g, 20분, 4℃)하여 상정액을 분리한 다음 실험에 이용하였다.

96 well microplate에 25 µl의 점액 상정액과 PBS를 이용하여 흡광도 450 nm 에서 0.6이 되도록 조정된 *Micrococcus lysodeikticus* 현탁액 175 µl를 혼합하였다. 25℃에서 15분간 반응시킨 후 흡광도 450 nm에서 반응물의 흡광도 감소량을 측정하였으며 1분 동안 흡광도 값이 0.001 감소한 것을 1 unit/ml으로 나타내었다.

#### 1. 4. 혈청 lysozyme 활성 조사

혈청의 lysozyme 활성은 Sigrun et al. (2001)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 실험구와 대조구의 혈액은 주사 후 1, 4, 8, 12, 24, 72와 120 h 에 각 구간에서 5마리씩 무작위로 선별하여 미부정맥에서 분리하였다. 혈액을 실온에 30분간 방치한 다음 1시간 동안 4℃에서 보관한 후 원심 분리하여 (6,000 x g, 15min, 4℃) 얻은 상정액을 혈청 시료로 사용하였다. 96 well microplate에 혈청 시료 100 µl와 PBS (0.5 mM, pH 6.2)를 이용하여 흡광도 530 nm에서 0.6이 되도록 조정된 *M. lysodeikticus* 현탁액 100 µl을 혼합하여 25℃에서 30분간 반응 시켰다. 흡광도 530 nm에서 혼합액을 측정하여 1분 동안 감소한 흡광도 값 0.001을 1 unit/ml로 나타내었

다.

## 2. 강도다리 lysozyme의 molecular cloning

### 2. 1. Total RNA 분리

체중 126.4 g의 강도다리에서 liver와 spleen을 무균적으로 분리하여 1 ml의 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 처리 후 homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 200  $\mu$ l의 chloroform을 첨가하고 강하게 shaking한 후 실온에서 3분간 반응시켜 4°C에서 12,000 x g, 15분간 원심 분리하였다. 맑은 수층을 분리하여 동량의 isopropanol을 첨가하고 inverting한 후 실온에서 5분간 반응시킨 다음 4°C에서 12,000 x g, 15분간 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 75% alcohol 1ml로 염분을 제거한 후 4°C에서 12,000 x g, 10분간 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 pellet을 완전히 건조시킨 후 RNase free water에 녹여 사용 전 까지 -80°C에 보관하였다.

### 2. 2. First strand cDNA 합성

Total RNA 에 DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 처리 하여 genomic DNA를 최대한 제거하였다. cDNA는 SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 합성하였다. DNase를 처리한 total RNA 5  $\mu$ g와 dNTP 1  $\mu$ l, 5' CDS

primer 0.6  $\mu$ l을 E-tube에 넣고 65 $^{\circ}$ C에 5분간 반응 시킨후 얼음 위에서 1분간 반응을 중지시켰다. 10x RT buffer 2  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, DTT 2  $\mu$ l 및, RNase OUT 1  $\mu$ l를 첨가한 후 25 $^{\circ}$ C, 2분간 반응시켰다. 상온에서 Superscript II RT 1  $\mu$ l를 첨가하고 25 $^{\circ}$ C 10분간, 42 $^{\circ}$ C 50분간, 70 $^{\circ}$ C 15분간 반응시킨 후 얼음위에서 1분간 반응을 중지시킨 다음 RNase H 1  $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 20분간 반응시켰다. cDNA는 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였고 cDNA의 합성 여부는  $\beta$ -actin 발현으로 확인하였다.

### 2. 3. Degenerated Primer 제작

강도다리 lysozyme C gene의 partial fragment를 얻기 위해 GenBank에 등록되어 있는 Olive flounder (AB 050469), Brill (AB 355630), Turbot (AJ 250732) 그리고 Rainbow trout (AF 321519)의 lysozyme gene mRNA sequence를 비교하여 conserved region에서 한 쌍의 degenerated primers (LysC-F, LysC-R)를 제작하였다. Lysozyme G 또한 partial fragment amplification을 위해 Olive flounder (AB 050590), Yellow perch (AY 738131), Brill (AB 355631), Common carp (AB 084624) 그리고 Grass carp (EU 835653)의 lysozyme G gene mRNA sequence를 비교하여 conserved region에서 한 쌍의 degenerated primers (LysG-F, LysG-R)를 제작하였다. 제작한 Primer는 Table 1에 나타내었다.

강도다리 조직에서 얻은 cDNA에 10 x buffer (Takara, Shiga, Japan) 2  $\mu$ l, 200  $\mu$ M dNTP 1.6  $\mu$ l, 0.5 U Taq DNA polymerase (rTaq,

Takara) 0.2  $\mu$ l 그리고 0.5  $\mu$ M degenerated primers를 첨가하고 3차 deionized water로 total volume을 20  $\mu$ l로 조절한 후 RT-PCR을 수행하였다. LysC-F와 LysC-R primers를 이용하여 94°C에서 3분간 pre-denaturation 시키고 94°C 30초의 denaturation, 66°C 30초의 annealing, 72°C 30초의 extension을 1cycle로 35cycle을 반응 시킨 후 72°C에서 7분간 final extention 시켜 lysozyme C의 partial fragment를 얻었다.

Lysozyme G의 partial fragment를 얻기 위해 LysG-F와 LysG-R primers를 이용하여 94°C에서 3분간 반응시킨 후, 94°C에서 30초, 62°C에서 30초 72°C에서 30초 반응을 1cycle로 하여 30cycle 반응시키고, 72°C에서 7분간 final extention 시켰다. PCR product의 확인은 2% agarose gel 상에서 시행하였다.



Table 1. Primer set for the starry flounder *Platichthys stellatus* lysozyme cDNA cloning

Name	Sequence (5'-3')	Description
LysC-F	GAIGGMTCCAIYGACTAYGGC	Degenerated primer
LysC-R	AIGCMACCCAKGCBCYGATBC	
LysC 5'-1	CTTCCAGATCAACAGTCGCT	5' RACE of C-type
LysC 3'-1	TCCTGACAGATGATATCAGC	3'-RACE of C-type
LysC RT-F	AACTACAACACAAGAGCCAC	Semi quantitative
LysC RT-R	TATCATCTGTCAGGAGCGCAC	RT-PCR of C-type
LysG-F	ARIGGWGGTGGACACACTGC	Degenerated primer
LysG-R	TYTGTACCCTGAGCTCTGGC	
LysG 5'-1	AACCAAGATCTCAGTGCCTTGG	1st 5'-RACE of G-type
LysG 5'-2	TCTCTGCTCCAGCCAGGAAAC	nested 5' RACE of G-type
LysG 3'-1	AGTAGATCAACACACAACCG	1st-3'-RACE of G-type
LysG 3'-2	TGGAGACTACTCCAATGACG	nested 3'-RACE of G-type
LysG RT-F	ACAATGGCACAGACGGACATGC	Semi quantitative
LysG RT-R	AGATGATGGCAGCAATGAGAGC	RT-PCR of G-type

## 2. 4. Subcloning and DNA sequencing

Partial cDNA fragments는 pGEM T-easy vector (Promega, Madison, WI, USA)와 4°C에서 overnight 동안 반응시켜 ligation하였다. 그 후 competent cell (*E. coli*, DH5 $\alpha$ -) 100  $\mu$ l을 첨가하여 얼음 위에서 30분간 반응시킨 후 42°C에서 1분간 Heat-shock 시켰다. 얼음 위에서 반응을 중지시킨 후 LB (Luria-Bertani), (Difco, USA) broth 1ml을 첨가하여 37°C, 90분간 배양하였다. 배양액은 Ampicillin 50  $\mu$ g/ml, X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), (Sigma, USA) 40  $\mu$ g/ml과 IPTG (Isopropylthio- $\beta$ -) 10  $\mu$ g/ml이 첨가된 LB (1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1.5% agar) plate에 도말한 후 37°C, 18시간 배양하여 white colony를 선별하였다. Plasmid DNA는 GeneAll Plasmid SV mini kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 이용하여 분리 한 후 insert sequences를 확인하였다.

## 2. 5. 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR

PCR을 통해 확인한 partial fragment sequences를 근거로 하여 RACE-PCR법을 행하기 위한 gene specific primers를 제작하였다. SMART RACE cDNA Amplification kit (Clontech Laboratories)를 이용하여 1  $\mu$ g의 Total RNA로부터 5' RACE-PCR에 이용할 first-strand cDNA를 합성한 후 RACE-PCR을 실행하였다. Lysozyme C의 5' RACE-PCR을 위해 specific primer인 LysC 5'-1와 adaptor primer를 이용하여 94°C에서 3분간 반응시킨 후 94°C에서 30초, 57°C에서 30초 72°C에서 30초 반응을

1cycle로 하여 32cycle 수행한 후 72℃에서 7분간 final extention 시켰다.

Lysozyme G는 LysG 5'-1과 adaptor primer를 이용하여 94℃에서 3분간 반응시킨 후 94℃에서 30초, 58℃에서 30초 72℃에서 30초 반응을 1cycle로 하여 30cycle 수행한 후 72℃에서 7분간 final extention 과정을 수행하였다. Gene의 amplification의 정확도를 높이기 위해 second PCR을 수행하였다. First 5' RACE-PCR 결과물을 10배 희석하여 template로 사용하였고, gene specific primer인 LysG 5'-2 primer와 NUP primer을 이용하여 94℃에서 3분, 35cycle의 94℃에서 30초, 63℃에서 30초 72℃에서 30초간 반응시킨 후, 72℃, 7분의 final extension의 과정을 수행하였다. PCR product는 위와 같은 방법으로 pGEM T-easy vector (Promega)를 이용하여 ligation 한 후 cloning 하여 얻은 white colony의 plasmid DNA에서 insert sequence를 확인하였다.

Sequence data는 Genetyx program을 사용하여 조합하였으며 DNA Data Bank of Japan (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp>)의 BLAST program으로 분석하였다. Amino acid alignment는 CLUSTAL W multiple sequence alignment program (Thompson et 1994)에 의해 결정하였다.

## 2. 6. 3' RACE-PCR

1 µg의 total RNA를 이용하여 합성된 first-strand cDNA는 lysozyme C를 위한 3' RACE-PCR은 gene specific primer, LysC 3'-1와 adaptor primer와 함께 pre-denaturation 94℃에서 3분, 35cycle의 94℃에서 30초, 57℃에서 30초 72℃에서 30초, final extention 72℃에서 7분의 과정을 통

해 증폭시켰다.

Lysozyme G의 3'-RACE-PCR은 gene specific primer, LysG 3'-1과 adaptor primer를 이용하여 94℃에서 3분 반응 후, 94℃에서 30초, 48℃에서 30초 72℃에서 30초 반응을 1cycle로 35cycle 수행하고, 마지막으로 72℃에서 7분간 반응시켰다. First 3' RACE-PCR 결과물의 10배 희석액을 template로 사용하였고 LysG 3'-2 primer와 NUP primer를 이용하여 second PCR을 수행하였다. 반응 조건은 94℃에서 3분간 반응시킨 후 94℃에서 30초, 53℃에서 30초 72℃에서 30초 반응을 1cycle로 하여 35cycle 수행하고 72℃에서 7분간 final extension하였다.

PCR product는 상기와 같은 방법으로 cloning 후 insert sequence를 Genetyx program과 DDBJ의 BLAST program으로 분석하고, CLUSTAL W multiple sequence alignment program을 통해 Amino acid alignment를 결정하였다.

### 3. Semi quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis

#### 3. 1. 정상 강도다리 조직별 lysozyme gene analysis

체중 126.4 g의 강도다리에서 심장, 두신, 비장, 위, 장, 간, 아가미를 적출한 후 각 조직에서 상기와 동일한 방법으로 total RNA를 분리하였다. 그리고 2 µg/µl의 total RNA에 DNase (Invitrogen)를 처리한 후

Superscript II First-Strand Synthesis System (Invitrogen)을 이용하여 제조사의 매뉴얼대로 cDNA를 합성하였다. 각 조직에서 lysozyme C와 G을 증폭시키기 위한 gene specific primers, LysC RT-F과 LysC RT-R, LysG RT-F와 LysG RT-R을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 결과는 2% agarose gel 상에서 나타나는 발현 양상으로 확인하였다.

### 3. 2. *S. parauberis* 감염 후 강도다리 lysozyme gene analysis

Lysozyme 활성 분석과 동일한 방법으로 시험균주 *S. parauberis* PH0710을 준비하여 평균 체장  $13.8 \pm 0.6$ 의 강도다리에 복강주사하였다. 대조구는 0.1 ml의 멸균 생리식염수를 복강주사하였고 주사 후 4, 8, 12, 24, 72와 120 h에 각 시험구에서 3마리씩 무작위로 선별하여 간, 신장과 비장을 분리한 후 Trizol reagent (Invitrogen) 1 ml을 처리하여 homogenization하였다. cDNA 합성은 상기 정상어의 RT-PCR 에서와 동일한 절차를 수행하였다. Lysozyme C와 G의 mRNA levels는 LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)을 이용하여 real-time quantitative PCR법으로 측정하였다. Lysozyme C와 G mRNAs를 측정하기 위해 정상 강도다리의 tissue lysozyme gene profiles analysis에 사용된 primer pairs를 이용하였다.

## 4. 통계학적 분석

실험구와 대조구 사이의 통계학적 유의성은 SPSS 17.0 ver.을 이용하

여 paired t-test를 실시하였고 p-value가 0.05일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.



### Ⅲ. 결 과

#### 1. *S. parauberis* 인위감염 후 lysozyme 활성 변화

Fig. 1의 (A)에서 *S. parauberis*에 감염된 강도다리의 체표 점액의 lysozyme 활성 결과를 나타내었다. 실험구의 lysozyme 활성은 주사 후 4 h에 활성 수치가 1100 unit/ml로서 대조구에 비해 2배 이상 높게 나타났다. 주사 후 8시간 쯤 가장 높은 수치를 보인 후 24 h까지 대조구와 유의적인 차이를 보였다. 이후 lysozyme 활성이 감소하여 72 h부터는 대조구와 유사한 활성 수치를 나타냈다. 반면, 대조구는 주사 후 활성에 큰 변화를 보이지 않았다.

Fig. 1의 (B)에서 세균 주사 후 혈청 lysozyme 활성 변화를 나타내었다. 실험구는 주사 후 4 h에 30 unit/ml의 활성을 보이면서 최고의 활성 수치를 나타냈다. 주사 후 24 h까지 높은 활성을 보이다 72 h이후 활성이 떨어지지만 대조구와 유의적인 차이를 보이며 높은 활성이 지속되는 것을 확인할 수 있었다. 대조구의 활성은 주사 후 24 h까지 점차적으로 증가한 다음 72 h이후 감소하였다.

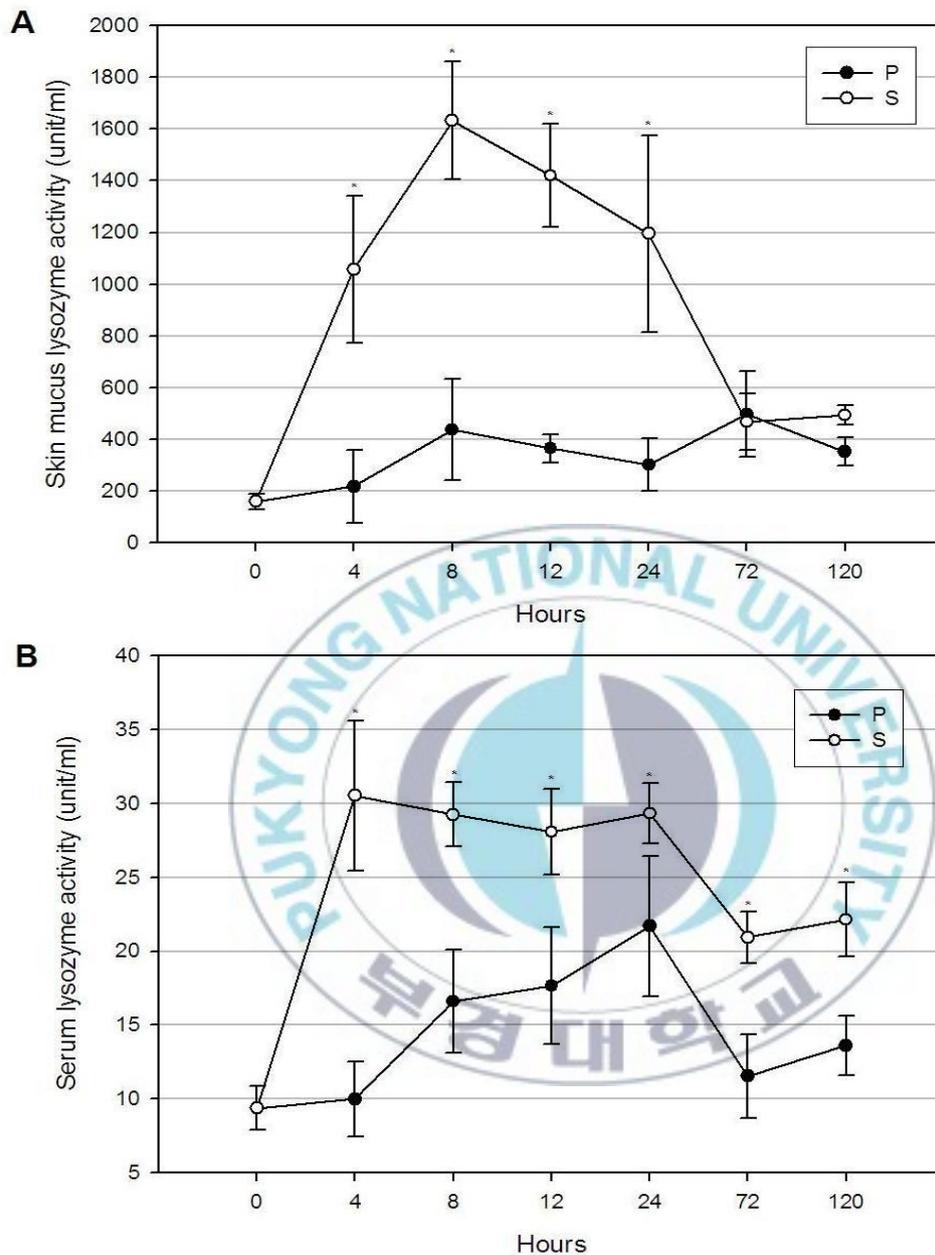


Fig. 1. Change of lysozyme activity in skin mucus (A) and serum (B) of starry flounder *Platichthys stellatus* after injection intraperitoneally with 0.1ml of  $1 \times 10^3$  cfu of *S. parauberis*. P, physiological solution; S, *S. parauberis*

## 2. 강도다리의 lysozyme C와 G의 특성

다른 어종의 conserved region에서 제작한 degenerated primer를 이용하여 얻은 PCR product를 DDBJ의 BLAST를 통해 분석한 결과, 강도다리 lysozyme C와 G의 partial fragment라는 것을 확인할 수 있었다.

Partial fragment에서 제작한 gene specific RACE primers를 이용해 증폭시킨 강도다리 lysozyme C full cDNA sequence는 625 bp로서 143 deduced amino acid를 발현하였으며, 15 amino acid의 signal peptide가 N-terminus에서 확인되었다. 28 bp의 5' untranslated region (UTR)과, 432 bp의 open reading frame (ORF), 165 bp의 3' UTR이 full length에 존재하고 있다 (Fig. 2). Fig. 3에는 강도다리를 비롯한 olive flounder, yellow perch, tiger puffer, brill, turbot, sole, rainbow trout, common carp, grass carp의 lysozyme C의 아미노산 배열의 alignment를 나타내고 있다. 8개의 conserved cysteine 잔기와 2개의 catalytic 잔기를 확인하였다. Olive flounder의 lysozyme C와의 상동성은 79%로 가장 높은 상동성을 보였으며 brill과 76%, yellow perch와 74%, turbot과 73%의 상동성을 보여 Flatfish사이에서 lysozyme C가 높은 상동성의 관계에 있음을 확인할 수 있었다. 이에 비해 common carp의 lysozyme C와는 29%라는 낮은 상동성을 보였다.

강도다리의 lysozyme G의 partial fragment에서 제작한 gene specific primers를 이용해 증폭시킨 결과물로 1차구조를 결정하였다. 확인된 full length cDNA는 총 870 bp로서 188 deduced amino acid를 발현하였으며, 129 bp의 5' UTR, 567 bp의 ORF와 174 bp의 3' UTR을 포함하

고 있으나 N-terminus에서 signal peptide가 발견되지 않았다. 또한, 강도다리의 lysozyme G에서도 2개의 catalytic residues의 존재를 확인하였다 (Fig. 4). Fig. 5에 Multiple sequence alignment analysis로 lysozyme G의 amino acid sequence를 나타냈다. Brill의 lysozyme G와는 76%, yellow perch와는 74%, Olive flounder와는 73%의 상동성을 나타내어 Flatfish사이의 G type lysozyme에서도 높은 상동성을 확인할 수 있었다. 이에 비해 grass carp와는 55%의 비교적 낮은 상동성을 보였다.



```

1 ACGCGGGGACATCAGCTGAGGATCATCATGAGGTCTCTGGTGTTCCTGCTTCTCGTGGC 60
1 M R S L V F L L L V A 11
61 CGTGGCCGGCGCTCGAGTCTACGAACGCTGTGAACTCGCCCGAGTGCTGAAGAGCCAAGG 120
12 V A G A R V Y E R C E L A R V L K S Q G 31
121 GATGGACGGCTACCGGGGCAACAGCCTGGCCAACTGGGTTTGTCTGAGTCATGGGGAATC 180
32 M D G Y R G N S L A N W V C L S H G E S 51
181 GAACTACAACACAAGAGCCACCAACCACAACACCGATGGATCCACAGACTACGGCATCTT 240
52 N Y N T R A T N H N T D G S T D Y G I F 71
241 CCAGATCAACAGTCGCTGGTGGTGTAAACAACGGCCAGACGGCCACTTCTAATGCCTGTAA 300
72 Q I N S R W W C N N G Q T A T S N A C N 91
301 CATCAGATGCAGTGCCTCCTGACAGATGATATCAGCGTGGCGATCAACTGTGCCAAACG 360
92 I R C S A L L T D D I S V A I N C A K R 111
361 AGTGGTCCAGGATCCAGCCGGGATCGGAGCCTGGGTGGCGTGGCGTTCGTAACGTCCGGG 420
112 V V Q D P A G I G A W V A W R R N C R G 131
421 CCGTGACCTGTGCTCCTATCTGGCAGGATGTAGACTGTAAAACCAACATCTGGAACCTGT 480
132 R D L S S Y L A G C R L * 144
481 CCACATGAGGCTCCAGACAGTTTCTTCTTCTCAAGTGAATTATTAATCTTTACTGAAGT 540
541 CTGTACTTCATTTACCTGATCAGAGAAGAGAAAACGTGGTGATTCCACCTGGTTCTGCTCA 600
601 AATCTTAATAAACATCTGATTCCT (A)n 625

```

Fig. 2. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of starry flounder *Platichthys stellatus* lysozyme C gene. The signal peptides are boxed. Asterisk indicates the stop codon and underline represents polyadenylation signal.

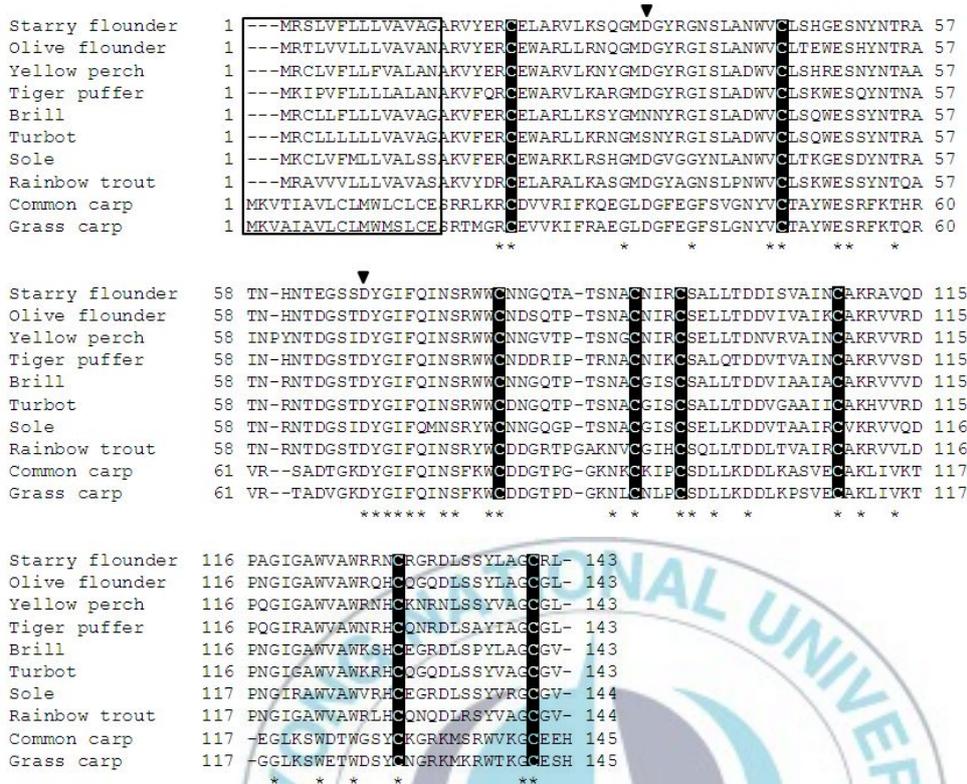


Fig. 3. Amino acid sequence alignment of starry flounder *Platichthys stellatus* lysozyme C with sequences from other species. Asterisks indicate identical residues. Signal peptide is boxed and conserved cysteine residues are shaded. Arrowheads indicate the catalytic residues.

1 ACGCGGGGACCACAGACAGAACAGACTGTACCAAACCTCCCACATTTCAGCATCAACAGGA 60  
 61 CCATCAGAGGAGTAACAAGAACAATGGGTGTGTCTACACAAGTAAAATATAATCTAATAA 120  
 121 AAACTGAACATGTGCAGGTTATGGAAACATCCGATCGTTGAGACCAGTGGAGCTTCATGG 180  
 1 M C R L W K H P I V E T S G A S W 17  
 181 CAAACTGCTCAGCAGGACAGCCTGGGATATTTCAGGTGTAAATGCATCACACACAATGGCA 240  
 18 Q T A Q Q D S L G Y S G V N A S H T M A 37  
 241 CAGACGGACATGGGCAGAATGAGTCAGTTCAAGTCCAAAATCATGAGAGTCGGTCAGAGA 300  
 38 Q T D M G R M S Q F K S K I M R V G Q R 57  
 301 CACGGAGTCGACCCTGCTCTCATTGCTGCCATCATCTCGAGAGAGTCTAGGGCCGGAAAT 360  
 58 H G V D P A L I A A I I S R E S R A G N 77  
 361 GCACTTCAAGGCGACTGGAGAGACTTTCACAACGCTTGGGGACTGATGCAGCTTCATGTT 420  
 78 A L Q G D W R D F H N A W G L M Q L H V 97  
 421 AATCCCAATGGAGGTGGACACACTGCTAAAGGTGGATGGGACAGTGAGGAACACCTCAAC 480  
 98 N P N G G G H T A K G G W D S E E H L N 117  
 481 CAAGGCACTGAGATCTTGGTTAATTTTATTAAACCGAATCAGCAATAAGTTTCCTGGCTGG 540  
 118 Q G T E I L V N F I N R I S N K F P G W 137  
 541 AGCAGAGAGCAGCAGCTCAGAGGAGGGATAGCAGCCTACACATGGGGGATGGGAATGTG 600  
 138 S R E Q Q L R G G I A A Y N M G D G N V 157  
 601 CATTCTATAGTGGAGTAGATCAACACACAACCGGTGGAGACTACTCCAATGACGTCACA 660  
 158 H S Y S G V D Q H T T G G D Y S N D V T 177  
 661 GCCAGAGCTCAGTGGTACAAAACAATGGGTACTGAAGCTGAGCAGTTTCCTGAAAGTCA 720  
 178 A R A Q W Y K N N G Y \* 189  
 721 TCAATGAAACATCACATTGTGTGTACTGTGTCAAACCTGGGCTAAATAAACGTGATGCA 780  
 781 AAGTGAAACTACAGTGCCTGTGTCTCGATGIGATCATTTGTGGAGCAGTAATTAATAATC 840  
 841 AGGATTAAGATCAGGGGTTCCCAATCTTTC(A)n 870

Fig. 4. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of starry flounder *Platichthys stellatus* lysozyme G gene. Asterisk represents stop codon and underline indicates polyadenylation signal.

```

Starry flounder      1 -MCRLWKHPIVETSGASWQTAQQDSLGYSGVNASHTMAQOTDMGRMSQPFKSKIMRVGQRHG 59
Chinese perch       1 --MGYGNIMRLETTGASWETAQQDSLAYSGERASHTMAKTDAGRMEKYRSKINSVGAKYK 58
Yellow croaker      1 --MGYGNIMRVQTTGASEKTSQQDKLGYSGVKASQAMAELDAGRMEKYRSKINSVGRRYD 58
Brill               1 --MGYANIKDVQTTGASWQTAQDKLGYSGVEASHTMAETDSGRMSKYKSKIFNVGQTCG 58
Olive flounder      1 --MSYGQIRLIVETSGASGATSQQDNLGYSGVKASHKMAEIDSGRMSKYKSKINKVQSYG 58
Tiger puffer        1 --MPYGIKIEDIKTSASDVTAQQDGLKEGGWKS SHRMAEIDSNRMENYRT IINEAGRQCD 58
Common carp         1 MAYIYGDTMKIDTTGASEATAKQDKLT IKGVEAPKLAEHDLARGEKYKNMITKVGKAKK 60
Grass carp          1 MACIYGDVMKIDTTGASDSTAKQDNLTVKGVASRKLAEHDLARMEKYKSI I I KVGRAKQ 60
                    * * * * *
                    ▼ * * * * *
Starry flounder      60 VDPALIAAI ISRESRAGNALQGDWRDFHN-----AWGLMQLHVNF--NGGGHTAKGGWD 111
Chinese perch       59 IDPALIAAI ISRESRAGNALHDGWDYDSKRGA YNGWGLMQVDVNF--NGGGHTAQGAWD 116
Yellow croaker      59 IDPALIAAI ISRESRAGNALTNGWDYSPARGQYNAWGLMQVDVNF--QGGGHTAKGAWD 116
Brill               59 IDPALIAAI ISRESRAGNALHDGWDWNP HRNAYNAWGLMQVDVNF--SGGGHTAKGAWD 116
Olive flounder      59 IEPALIAAI ISRESRAGNQLKDGWDWNPQRQAYNAWGLMQVDVNF--NGGGHTAVGGWD 116
Tiger puffer        59 VDPAVIAGI ISRESRAGNQLINGWDHCK-----AFGLMQIDVT PPPNGGGHT P V G T W D 112
Common carp         61 MDPAVIAAM ISRESRAGAVLKNGWEPAGN-----GFGLMQVDKRS-----HTFVGAWD 108
Grass carp          61 MDPAVIAAI ISRESRAGAALIDGWGDHGY-----AFGLMQIDKRY-----HTFVGACD 108
                    * * * * *
Starry flounder      112 SEEHLNQGTEILVNFINRISNKFPGWSREQQLRGGIAAYNMGDGNVHSYSGVDQHTTGGD 171
Chinese perch       117 SEEHLRQGT EILVHF INRIRNKFPGWSTEQQLKGGIAAYNMGDGNVHSYENVDENTTGD 176
Yellow croaker      117 SEEHLQQTGILVHF I K V I R N K F P G W S T E Q L K G G I A A Y N M G D G S V E D R D - V D K N T T G S D 175
Brill               117 SEEHLCOGTGILVHF I G R I R N K F P G W S G E Q H L K G G I A A Y N M G D G N V H S Y A E V D A N T T G G D 176
Olive flounder      117 SEDHLRQATGILVTF I E R I R I K F P G W S K E R Q L K G G I A A Y N M G D K N V H S Y E G V D E N T T G R D 176
Tiger puffer        113 SLEHLIQATEILVEP T E R I K T K F P R W N A D O H L K G A L A A Y N K G E K N V E S Y A S V D A K T T G K D 172
Common carp         109 SEQHVTQATEILIGF I K E I K V N F P K W T Q E Q C F K G G I A A Y N K G V S R V T S Y E N I D V K T T G L D 168
Grass carp          109 SEQHITQGT E I L I G F I K E I K A K F P Q W T Q E Q C F K G G I S A Y N A G P G N V R T Y E R M D V G T A A G D 168
                    * * * * *
Starry flounder      172 YSNDVVARAQWYKNNGY-- 188
Chinese perch       177 YSNDVVARAQWYKNNEGF- 194
Yellow croaker      176 YSNDVVARAQWYKNNKNY- 193
Brill               177 YSNDVVARAQWYKRNKF-- 193
Olive flounder      177 YSNDVVARAQWYRDNGYSG 195
Tiger puffer        173 YSNDVVARAQWYKSNMGF- 190
Common carp         169 YSNDVVARAQWFRSKGY-- 185
Grass carp          169 YSNDVVARAQWYKSKGY-- 185
                    * * * * *

```

Fig. 5. Amino acid sequence alignment of starry flounder *Platichthys stellatus* lysozyme G with sequences from other species. Asterisks indicate identical residues and arrowheads represent three catalytic residues.

### 3. 조직별 lysozyme gene profiles

정상적인 강도다리의 각 조직별 lysozyme C와 G type의 mRNA 발현 patterns를 RT-PCR을 수행한 후 3% agarose gel 상에서 확인하였다. Lysozyme C는 비장, 간 및 아가미에서 발현한 것을 확인할 수 있었다. 그리고 Lysozyme G는 두신, 비장, 위, 간, 아가미에서 강하게 발현하였으며, 심장에서는 다른 장기보다 약한 밴드가 확인되었다 (Fig. 6).





#### 4. *S. parauberis* 인위감염 후 강도다리 lysozyme gene profiles

*S. parauberis*를 복강주사한 강도다리의 간, 신장, 그리고 비장에서 lysozyme C 와 G의 발현 patterns를 3% agarose gel 상에서 알아보고자 하였다 (Fig. 7). 전반적으로 연쇄구균을 주사한 직후에 lysozyme G의 발현량이 lysozyme C에 비해서 높게 나타났다. 실험구의 lysozyme C 발현은 개체간의 차이를 보이긴 하지만 대체적으로 주사 후 72 h에 신장과 비장에서 발현정도가 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 주사 후 24 h에 신장에서 lysozyme C의 발현량이 증가하며 72 h에는 비장에서도 발현량이 증가하였다. 생리식염수를 주사한 대조구 역시 신장과 비장에서 lysozyme C의 발현량이 증가하였으며 주사 후 72 h에 발현 정도가 가장 높았지만 세균을 주사했을 때 보다 낮은 발현 정도를 나타내는 것을 알 수 있었다.

Lysozyme G는 연쇄구균과 생리식염수를 주사한 후 4 h째에 강도다리의 간, 신장, 그리고 비장에서 발현량이 증가하였으며 가장 높은 발현 정도를 나타내었으며 시간이 지남에 따라 발현 정도가 낮아졌다.

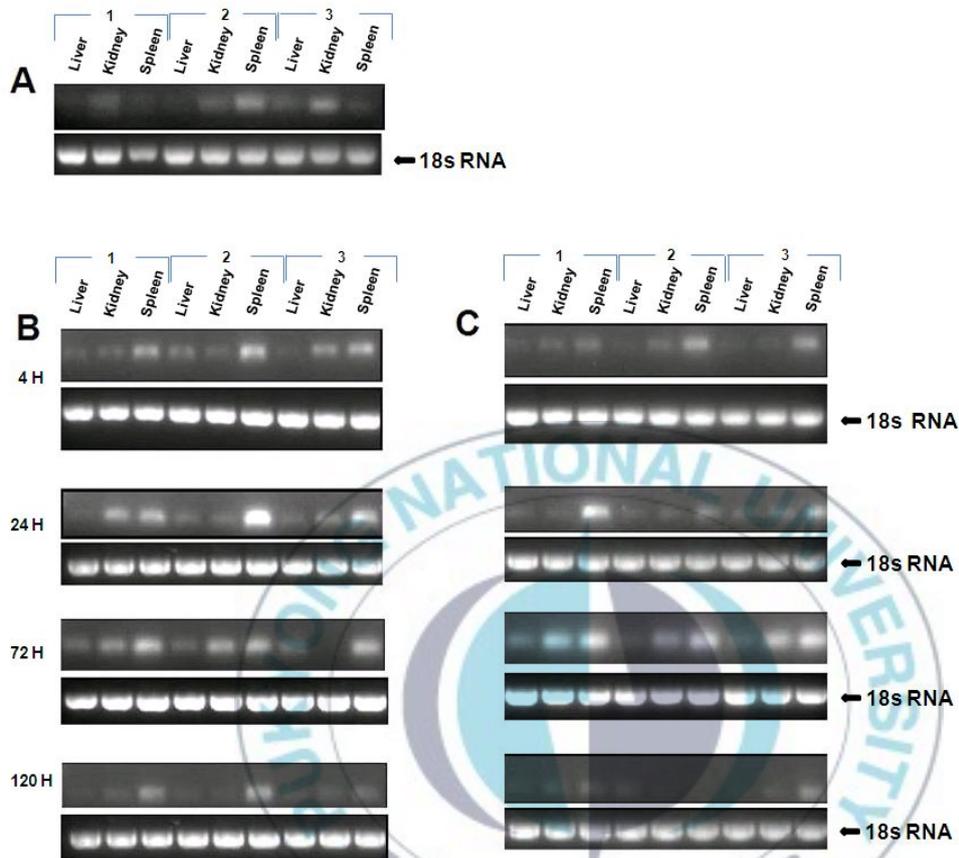


Fig. 7. Expression analysis of lysozyme C mRNA in various tissues of starry flounder *Platichthys stellatus* after injected with physiological solution and *S. parauberis* after 4, 24, 72 and 120 h. (A), non treated; (B), physiological solution; (C), *S. parauberis*

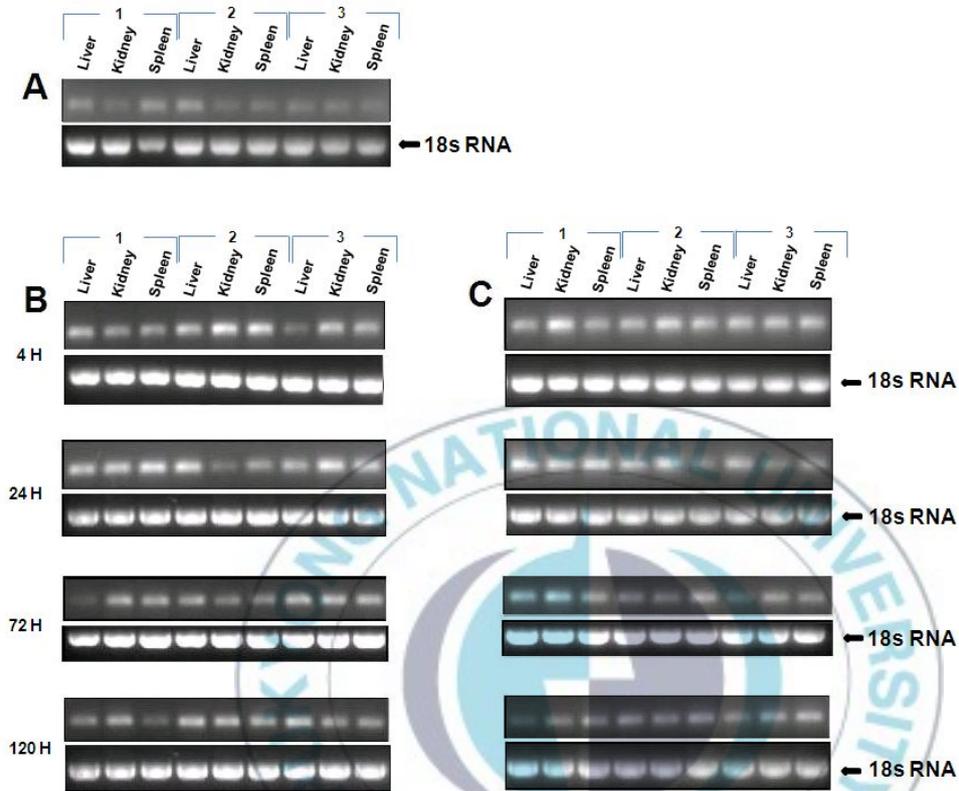


Fig. 8. Expression analysis of lysozyme G mRNA in various tissues of starry flounder *Platichthys stellatus* after injected with physiological solution and *S. parauberis* after 4, 24, 72 and 120 h. (A), non treated; (B), physiological solution; (C), *S. parauberis*

## VI. 고 찰

본 연구에서는 강도다리가 *S. parauberis* 감염 초기에 나타날 것으로 예상되는 lysozyme 활성과 2가지 type의 lysozyme 유전자 특성과 유전자 발현 특징을 분석하여 강도다리의 비특이적 면역체계에 대한 특성을 알아보고자 하였다.

건강한 강도다리의 복강에 시험세균을 인위적으로 감염시킨 후 면역반응의 지표로서 lysozyme의 활성을 알아보았다. 반수치사 농도인  $1 \times 10^3$  cfu/fish의 *S. parauberis*를 강도다리의 복강에 주사한 후, 체표 점액과 혈청의 lysozyme 활성을 조사한 결과, 주사 후 체표점액의 활성은 대조구에 비해 급격하게 증가하였으며 주사 후 72 h째에 급격히 감소하였다. 혈청의 lysozyme 활성 역시 주사 후 빠르게 활성화되었으나 대조구의 활성은 서서히 증가하였다. 두 시험구 모두 비슷한 시기에 혈청 내 lysozyme 활성이 감소되었지만 연쇄구균에 노출된 강도다리의 혈청 내 lysozyme 활성이 대조구에 비해 장시간 높게 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

Yellow croaker의 혈청 lysozyme 활성은 세균 감염된 실험구에서 주사 후 2일째 최고의 활성을 보였으며 5일째부터 활성이 낮아졌다. Yellow croaker 역시 대조구의 lysozyme 활성이 증가하여 주사 후 1일째에 실험구보다 높아졌지만 그 이후 안정을 되찾으면서 활성이 감소하는 것을 확인하였다 (Wang et al., 2009). Catfish에 *Edwardsiella ictaruri*를 인위감염했을 경우, 주사 후 2 h부터 점차적으로 활성이 증가하여 4 일째에 가장 높은 활성을 나타낸 후 8 일째 이후 감소하였다 (Bilodeau et al., 2008). 강도다리의 혈청의 lysozyme은 세균에 감염되었을 때 비교적 단기간에 활성화되

어 높은 수치를 나타냈으나, 다른 어종에 비해 lysozyme 활성이 길게 유지되지 않았음을 알 수 있었다. 그리고 catfish의 lysozyme 활성이 감소하는 시기에 폐사가 일어나기 시작했으며, 강도다리 역시 lysozyme 활성이 감소하는 72 h부터 연쇄구균에 의한 폐사가 일어나는 것을 확인하였다. 따라서 강도다리의 세균성 감염에 있어서 초기의 lysozyme 활성이 세균성 질병 감염과 어떤 연관이 있는 것으로 생각되어, lysozyme의 높은 활성을 오랜 기간 유지시키는 방안을 연구할 필요성이 요구된다.

세균 감염 후 lysozyme mRNA의 발현 패턴을 알아보기 위해 어류의 lysozyme을 구성하고 있는 Lysozyme C와 G gene에 관하여 RACE법으로 1차 구조를 분석하였다. Lysozyme C의 cDNA는 N-terminus에 존재하는 signal peptide, 8개의 conserved cysteine 잔기와 2 catalytic 잔기인 Glutamic acid (Glu) 와 Aspartic acid (Asp)를 포함하는 143 deduced amino acid를 나타냈다. Lysozyme C에서는 공통적인 4쌍의 disulfide bridges를 형성하는 8개의 cysteine 잔기와 2개의 catalytic 잔기는 현재 알려진 모든 종의 lysozyme C에서 발견되었으며 Signal peptide의 존재로 lysozyme C가 외부의 자극에 의해 분비되는 extracellular 단백질을 알 수 있다 (Dautigny et al., 1991; Hikima et al., 2000; Fujiki et al., 2000; Liu et al., 2002; Rosa et al., 2008; Xing et al., 2010).

Lysozyme G cDNA는 188 deduced amino acid로 번역되었고 2개의 catalytic 잔기로서는 Glu와 Asp를 확인하였다. Lysozyme G의 구조가 처음 밝혀진 조류에는 3개의 catalytic 잔기로서 Glu, Asp 그리고 Asp가 73, 86 및 97 amino acid position에 위치한다. 조류의 세 catalytic 잔기는 강도다리의 72, 96 및 111 position에 해당하는데 강도다리의 96 position의 Asp

는 Histidine으로 대체되었다. Common carp의 경우 조류의 97 position에 해당하는 catalytic 잔기 Asp가 proline으로 대체된 것이 밝혀졌다 (Savan et al., 2003). Kuchinke (1989)의 연구에 의하면 lysozyme G에 존재하는 3개의 catalytic 잔기 중 2개만 존재하여도 catalytic 활성을 충분히 수행할 수 있다고 한다. 강도다리의 lysozyme G에는 4개의 conserved cystein 잔기가 보존되어 있지 않고 cysteine 잔기에 의한 2개의 disulfide bond가 lysozyme의 안정적인 구조에 필요하므로 catalytic 기능에 크게 관여하지 않는 것이 생각된다 (Irwin and Gong, 2003; Kawamura et al., 2008). 또한 lysozyme G의 amino acid sequence에서는 lysozyme C의 N-terminus에 존재하는 signal peptide가 존재하지 않았다. Signal peptide의 부재는 어류의 lysozyme G에서 공통적으로 발견되는데 이는 어류의 lysozyme G가 intracellular 효소라는 것을 의미하는 것으로 볼 수 있다 (Prager and Wilson, 1974; Irwin and Gong, 2003; Yin et al., 2003; Sun et al., 2006; Zheng et al., 2007; Larsen et al., 2009).

본 실험결과, 정상적인 강도다리 조직에서 lysozyme C mRNA은 비장, 간 및 아가미에서 발현하였다. 조류와 포유류의 lysozyme C는 위와 간조직에서 특이적으로 발현한다고 알려져 있으며 (Iriwin and Wilson, 1989; Yeh et al., 1993; Irwin, 2004) 이는 포유류와 조류의 lysozyme C가 세균에 대한 방어작용 뿐 아니라 소화작용과도 연관성이 있을 것으로 여겨진다. Rainbow trout, Zebrafish, Olive flounder, Brill 및 Grass carp를 비롯한 어류에서는 소화기관인 위와 간에서도 lysozyme C가 강하게 발현 할 뿐만 아니라 조혈조직인 신장과 비장에서도 다량 분비되고, 점액층이 분포되어 있는 체표와 아가미와, 뇌, 심장 그리고 혈액에서도 발현을 확인할 수 있다

Dautigny et al., 1991; Liu et al., 2002; Hikima et al., 1997; Rosa et al., 2008; Xing et al., 2010). 본 실험에서 강도다리의 조직별 분포를 보면 간 뿐만 아니라 조혈조직중 하나인 비장과 점액이 다량 분비되어 있는 아가미에서 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 건강한 상태에서도 점액층에 다량의 lysozyme이 세균의 침입 시 대응할 수 있도록 분비하는 것으로 추정된다. 그러나 위에서는 lysozyme C가 감지되지 않았지만 간조직에서 발현하는 것으로 보아 소화효소로서의 기능과 관련성을 기대해볼 수 있을 것이다 (Dautigny et al., 1991; Liu et al., 2002; Fujiki et al., 2000; Hikima et al., 2000, 2001; Bayne and Grewick., 2001; Savan et al., 2003; Rosa et al., 2008; Xing et al., 2010).

세균 감염 후 강도다리의 lysozyme 유전자의 발현 패턴 변화를 관찰하기 위해 *S. parauberis*를 인위적으로 주사하여 간, 신장과 비장의 lysozyme mRNA 발현 변화를 조사하였다. 실험구와 멸균 생리식염수를 주사한 대조구 모두 간에서는 lysozyme C의 발현량에 큰 변화가 없었지만 주사 후 대조구의 신장에서는 24 h 이후에 약해진 발현정도를 보였고 실험구의 신장에서는 발현이 뚜렷하게 나타나 72 h 까지 유지되었다. 주사 후 4 h에 비장에서 발현 유무가 뚜렷해진 이후 120 h가 지난 후에도 비슷한 발현 정도를 유지하였다. 이는 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*와 LPS를 주사한 Sole의 lysozyme C 발현 결과와 차이가 있었다. 간을 비롯하여 신장과 비장에서 주사 후 72 h에 모두 높아진 lysozyme C의 발현양을 보였다 (Fernandez-Trujillo et al., 2008). Grass carp의 간 조직에서도 세균 감염 후 24 h만에 lysozyme C 발현양이 높아진 이후 7 day까지 점차적으로 증가하는 경향을 보였다. Grass carp의 아가미에서는 건강한 상태일 때 신장

과 비장에 비해 낮은 lysozyme C의 발현을 보였지만 세균에 감염된 이후 가장 높은 발현 수치를 나타냈다 (Xing et al., 2010). Olive flounder의 lysozyme C는 *E. tarda*에 감염된 이후 신장, 비장, 난소에서만 발현양이 증가하여 강도다리와 유사한 결과를 나타냈다 (Hikima et al., 1997).

Lysozyme G는 포유류와 조류에서 제한적인 발현 양상을 보여서 닭의 경우 골수와 폐에서만 발현을 확인할 수 있으며 포유류와 거위의 경우 신장에서 낮은 발현을 보인다. 본 연구에서는 강도다리의 Lysozyme G가 심장, 두신, 비장, 위, 간, 그리고 아가미에서 발현하였으며 C type에 비해 다양한 조직에서 발현하는 것을 알 수 있었다. 그리고 이와 유사한 현상이 여러 가지 다른 어류에서도 나타나서 심장, 신장, 비장, 장, 아가미, 혈액 등 거의 모든 조직에서 lysozyme G가 발현하는 것을 확인할 수 있다. 특히 두신과 후신, 비장과 같은 조혈조직과 혈액에서 가장 많이 발현하는 것이 밝혀졌다 (Prager and Wilson, 1974; Nakano and Graf, 1991; Irwin and Gong, 2003; Zheng et al., 2007; Rosa et al., 2008; Larsen et al., 2009; Xing et al., 2010).

Lysozyme G는 전체적으로 볼 때 세균감염 시 조혈조직과 혈액, 그리고 심장에서 그 발현양이 크게 증가하는 것을 밝힐 수 있다.

강도다리의 lysozyme G은 주사 후 4 h에 간, 신장, 그리고 비장에서 높은 발현 정도를 보인 후 시간이 지남에 따라 그 발현 정도가 낮아지는 것을 알 수 있었다. 유전학적으로 상동성이 높은 *Bril*은 *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*와 LPS를 주사 했을 때 두신에서 lysozyme G가 증가하였으며 세균보다 LPS를 주사하였을 때 더 큰 증가량을 나타냈다. 세균에 노출된 강도다리의 체표 점액과 혈청에서 lysozyme의 활성은 감염

후 4 h에 활성화되어 24 h까지 그 활성이 유지가 되었는데 이는 Lysozyme G의 발현 패턴과 유사한 것을 알 수 있었다. 주사 후 72 h 이후 혈청 내 lysozyme의 활성이 대조구보다 높은 것은 조혈조직인 신장과 비장에서의 lysozyme C의 발현과 연관이 있는 것으로 생각된다.

본 연구 결과 강도다리에서 두 종류의 lysozyme이 서로 특성이 다를 뿐만 아니라 다른 기관에서 각각의 역할을 하고 있음을 밝혔으며, 이는 *S. paruberis*와 같은 세균에 감염되었을 때 lysozyme의 활성과 유전자의 발현양상에서도 차이가 남을 밝혔다. 이러한 연구 성과는 강도다리 양식 산업화에 기여할 수 있는 기초 자료가 될 것으로 사료된다.



## V. 요약

본 연구에서는 *S. parauberis*에 의해 연쇄구균에 감염된 강도다리의 lysozyme 활성과 그의 유전자의 발현 변화를 알아보고자.  $1 \times 10^3$  cfu/fish의 *S. parauberis*를 강도다리에 복강주사하여 대조구의 체표 점액과 혈액의 lysozyme 활성 변화를 조사하였다. 체표 점액은 주사 후 4 h에 대조구에 비해 크게 증가한 후 8 h에 최고의 활성을 나타냈고 24 h까지 높은 활성을 유지하였다. 감염된 후 강도다리의 혈청 내 lysozyme 은 주사 후 4 h에 최고의 활성을 나타냈으며 24 h까지 비슷한 활성도를 유지하였다. 주사 후 72 h에 활성도 낮아졌지만 대조구와 유의적인 차이를 120 h까지 유지하였다. 대조구의 혈청 내 lysozyme 활성은 주사 후 24 h까지 점차적으로 증가하다 72 h에 급격히 활성값이 감소하였다. 어체의 lysozyme 활성과 lysozyme 유전자의 발현과의 상관관계를 lysozyme C와 G의 유전자 서열의 특성으로 조사한 결과 Lysozyme C의 cDNA full-length 625 bp에는 28 bp의 5'-UTR과 165 bp의 3'-UTR가 포함되어 있으며 432 bp의 ORF가 143 deduced amino acid로 번역된다. Lysozyme C의 유전자 서열에는 8개의 conserved cysteine 잔기와 2개의 catalytic 잔기가 존재하며 N-terminus에 15 amino acid의 signal peptides가 있어 extracellular peptide임을 확인하였다. Lysozyme G의 cDNA full-length는 870 bp의 nucleotides로 129 bp의 5'-UTR과 174 bp의 3'-UTR이 포함된다. 567 bp의 ORF는 190 deduced amino acid로 번역되며 2개의 conserved catalytic 잔기를 가지고 있다.

RT-PCR법을 통해 강도다리의 조직별 lysozyme C와 G의 발현 양상을 확인한 결과 lysozyme C는 비장, 간 및 아가미에서 발현하였으며, lysozyme G는 심장, 신장, 비장, 위, 간 및 아가미를 비롯한 다양한 조직에서 발현하는 것을 알 수 있었다.

세균 감염시 강도다리의 lysozyme C와 G의 장기별 발현 변화를 확인하여 lysozyme 활성과의 상관관계를 알아본 결과, Lysozyme C는 신장과 비장에서 주사 후 72 h에 높은 발현정도를 나타냈고 G type은 주사 후 4 h에 간, 신장, 비장에서 발현 정도가 높아졌다. 따라서 주사 후 4 h에 강도다리의 어체 내에서 lysozyme 활성이 증가한 것은 주사 후 lysozyme G의 발현량이 증가한 것과 연관이 있으며 주사 후 72 h에 혈청 내 lysozyme 활성이 대조구 보다 높은 수치를 유지한 것은 주사 후 lysozyme C의 발현량이 조혈조직에서 증가하는 현상과 관련이 있음을 시사하였다.



## VI. 감사의 글

뒤늦게 시작한 대학원 생활이 이 논문과 함께 작은 결실을 맺을 수 있도록 부족한 저를 이끌어 주시고 지도해주신 박수일 지도교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 또한 바쁘신 와중에도 부족한 제 논문에 세심한 지도를 해주신 정현도 교수님과 정준기 교수님께 감사드리며 많은 지도와 조언을 해주신 허민도 교수님, 강주찬 교수님, 김기홍 교수님께도 감사드립니다.

바쁘신 와중에도 불구하고 항상 관심 가져 주시고 좋은 말씀 많이 해주신 방종득 단장님, 제가 공부할 수 있도록 좋은 계기를 만들어 주시고 늘 칭찬과 격려를 해주신 김이청 센터장님, 늘 밝은 미소로 힘을 북돋아주신 김진우 과장님 감사합니다. 항상 후배들을 사랑하는 큰 마음을 보여주시는 유병화 선배님, 저에게 실험어를 제공해주신 이재일 선배님, 만나볼 때마다 좋은 말씀 아끼지 않으신 수산과학연구소의 지보영 박사님, 조미영 박사님, 권문경 박사님, 원경미 박사님께 감사드립니다. 항상 저의 논문에 관심 가져 주시고 많은 도움을 주신 이덕찬 박사님과 이 논문이 나오는 마지막까지 저를 가르쳐 주시느라 고생이 너무 많으셨던 저의 사수 김이경 박사님, 저에게 많은 조언과 격려를 해주셨던 우승호 선배님께 감사드리며 힘들 때 마다 힘낼 수 있는 좋은 말씀 해주시고 조언과 격려 아끼지 않으신 박찬일 교수님, 김도형 교수님, 황미혜 선배님, 최현숙 선배님, 한현자 박사님, 김현정 박사님, 홍미주 선배님께도 감사의 말씀 드립니다. 후배들에게 늘 좋은 수산물을 제공해주시는 국립 수산물 품질검사원의 이상윤 선배님, 손영찬 선배님, 강민진 선배님, 성명희 선배님, 최광진 선배님, 김은전 선배님 감사합니다. 힘든 시기 마다 저에게 웃음을 주셨던 고석형 선배님, 후배들에게 실험 배우느라

힘들어도 항상 후배들을 웃게 만들어 주시는 강진영 선배님께도 감사의 말씀드립니다. 제가 실험실 생활을 함에 있어 가장 큰 힘이 되어준 최정현 선배님, 멀리서 힘든 공부 하시는 손새봄, 황성돈 선배님, 결혼하셔서 행복할 김수현 선배님께 감사드립니다. 그리고 저와 어병예방학 실험실 생활을 함께 하며 힘이 되어준 김지원, 서미영 선배님, 항상 열심히 사는 모습이 멋있는 한상윤 선배님, 최민지 후배님, 여러분들이 있어 즐겁게 실험실 생활을 할 수 있었습니다. 제가 힘들 때마다 옆에서 응원해 주고 너무 많은 도움을 주신 Chao Qua 언니, 너무 힘든 시기를 보내고 있는 황분옥, 김민철 후배님, 옆에서 많은 도움을 주고있는 너무 착하고 대견한 김남은, 김아란, 김민경, 김수현 후배님께 감사드리며 앞으로 나아갈 길에 힘을 북돋아 주고 싶습니다. 누구보다 힘들지만 든든하게 동생들을 이끌어 나가는 엄용환 학형님께도 감사드립니다. 힘들 때 마다 도움과 격려를 아끼지 않은 김광일 선배님, 진지웅 학형님, 조기택 후배님께 감사드리며 8년에 가까운 학교생활에 가장 큰 힘과 웃음을 준 03학번 동기들, 동거녀 김선영 후배님, 동료 최효선 후배님, 사랑하는 ARAME 회원들, 영원한 나의 편 상미, 선희, 은경이에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

무뚝뚝한 딸에게 무한한 지지와 사랑을 보여주신 부모님께 감사의 말씀을 드리며 너무 이쁜 조카 혜원이를 선물해주신 큰 오빠, 새언니, 오랫동안 힘든 공부하는 둘째 오빠에게도 감사드립니다.

마지막으로 제가 힘들 때마다 그 고비를 잘 넘겨서 이 자리에 올 수 있게 해주신 모든 분들께 이 장을 빌어 감사의 말씀을 드리며 앞으로 더 발전하는 모습으로 그 은혜에 보답하겠습니다.

## VII. 참고 문헌

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:3389-3402
- Bilodeau-Bourgeois L, Bosworth BG, Peterson BC. Differences in mortality, growth, lysozyme, and toll-like receptor gene expression among genetic groups of catfish exposed to virulent *Edwardsiella ictaluri*. *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 24:82-89
- Callewaert L, Aertsen A, Deckers D, Vanoirbeek KG, Vanderkelen L, Van Herreweghe JM, Masschalck B, Nakimbugwe D, Robben J, Michiels CW. A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathogens* 2008; 4:e1000019
- Callewaert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci.* 2010; 35:127-160
- Cole AM, Weis P, Diamond G. Isolation and characterization of pleurocidin, an antibacterial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:12008-12013
- Dobson DE, Prager EM, Wilson AC. Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. *J. Biol.*

Chem. 1984; 259:11607-11616

Ebran N, Julien S, Orange N, Auperin B, Molle G. Isolation and characterization of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between pore-forming properties and their antibacterial activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1467:271-280

Irwin DM, Gong ZM. Molecular evolution of vertebrate goose-type lysozyme genes. *J. Mol. Evol.* 2003; 56:234-242

Fernandes JM, Kemp GD, Smith VJ. Two novel muramidases from skin mucosa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2004; 138:53-64

Fernandez-Trujillo MA, Porta J, Manchado M, Borrego JJ, Alvarez MC, Bejar J. C-Lysozyme from Senegalese sole (*Solea senegalensis*): cDNA cloning and expression pattern. *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 25:697-700

Hancock R, Scott MG. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97:8856-8861

Hikima J, Hirono I, Aoki T. Characterization and expression of c-type lysozyme cDNA from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1997; 6:339-344

Hikima J, Hirono II, 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, Minagawa S, Hirono I, Aoki T. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 30:35-44
- Hikima S, Hikima J, Rojtinnakorn J, Hirono I, Aoki T. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene* 2003; 316: 187-195
- Jan H and Cecil C. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine* 2005; 11:S45-S53
- Jimenez-Cantizano RM, Infante C, Martin-Antonio B, Ponce M, Hachero I, Navas JI. Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozyme in brill (*Scophthalmus rhombus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 25:57-65
- Jolles J and Jolles P. The lysozyme from *Asterias rubens*. *Eur. J. Biochem.* 1975; 54:19-23
- Kuchinke W. 50 residues coded by exon 2 of chicken lysozyme carry residual catalytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 159:927-932
- Lange S, Gudmundsdottir BK, Magnadottir B. Humoral immune parameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2001; 11:523-535

- Larsen AN, Solstad T, Svineng G, Seppola M, Jørgensen T. Molecular characterisation of a goose-type lysozyme gene in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2009; 26:122–132
- Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20:137–151
- Minagawa S, Hikima J, Hirono I, Aoki T, Mori H. Expression of Japanese flounder lysozyme C cDNA in insect cells. *Dev. Comp. Immunol.* 2001; 25:439–445
- Palakasha KJ, Shin GW, Kim YR, Jung T S. Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 24:479–488
- Patrzykat A, Zhang L, Mendoza V, Iwama GK, Hancock REW. Synergy of histone-derivatives of coho salmon with lysozyme and flounder pleurocidin. *Antimicrob. Agents and Chemo.* 2001; 45:1337–1342
- Peters CWB, Kruse U, Pollwein R, Grzeschik KH, Sippel AE. The human lysozyme gene. Sequence organization and chromosomal localization. *Eur. J. Biochem.* 1989; 182:507–516
- Prager EM and Wilson AC. Widespread distribution of lysozyme g in egg white of birds. *J. Biol. Chem.* 1974; 249:7295–7297
- Richard JS, Geoffrey SB, Donna SD, Francis JM. Complete amino

- acid sequence of the goose-type lysozyme from the egg white of the black swan. *Biochemistry* 1980; 19:1814–1819
- Saurabh S, Sahoo PK. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Res.* 2008; 39: 223–239
- Savan R, Aman A, Sakai M. Molecular cloning of G-type lysozyme cDNA in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 2003; 15:263–268
- Schoentgen F, Jolles J, Jolles P. Complete amino acid sequence of ostrich (*Struthio camelus*) egg-white lysozyme, a goose-type lysozyme. *Eur. J. Biochem.* 1982; 123:489–497
- Sun BJ, Wang GL, Xie HX, 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 *Escherichia coli*. *Aquaculture* 2006; 252:106–113.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 11:4673–4680
- Tort L, Balasch J.C., Mackenzie S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunología* 2003; 22:277–286
- Wang S, Ng TB, Chen T, Lin D, Wu J, Rao P, Ye X. First report

- of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 327:820-827
- Wang SH, Wang YL, Zhang ZP, Xie FJ, Lin P, Tai ZG. Tyrosinase, a new innate humoral immune parameter in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R). *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 2009; 27:527-535
- Weaver LH, Grütter MG, Remington SJ, Gray TM, Isaacs NW, Matthews BW. Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates the changes that occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution. *J. Mol. Evol.* 1985; 21:97-111
- Yildirim M, Lim C, Wan PJ, Klesius PH. Growth performance and immune response of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing graded levels of gossypol acetic-acid. *Aquaculture* 2003; 219:751-768
- Yin ZX, He JG, Deng WX, Chan SM. Molecular cloning, expression of orange-spotted grouper goose-type lysozyme cDNA, and lytic activity of its recombinant protein. *Dis. Aquat. Org.* 2003; 55:117-123
- Zhao JM, Song LS, Li CH, Zou HB, Ni DJ, Wang W. Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein.

Mol. Immunol. 2007; 44:1198-1208

Zheng W, Liu G, Ao J, Chen X. Expression analysis of immune-relevant genes in the spleen of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*, stimulated by polyI:C. Fish Shellfish Immunol. 2006; 21:414-430

강철영, 강봉조, 문영진, 김기영, 허문수. 제주도 양식넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리한 비 용혈성 연쇄구균의 동정. 한국어병학회지 2007; 20:109-117

김주현. 면역자극물질과 이리도 바이러스 감염에 의한 돌돔 면역유전자의 발현, 부경대학교 학위논문, 2008

조미영, 이재일, 김명석, 최희정, 이덕찬, 김진우. 양식 강도다리, *Platichthys stellatus* Pallas에서 분리된 *Streptococcus parauberis*의 특성. 한국어병학회지 2008; 21:209-217

