

**THESIS**

**FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE**

**Development of Immunological Probe to Assess  
Reproductive Effort of Black Lip Pearl Oyster  
(*Pinctada margaritifera*, Linnaeus 1758) in Chuuk  
State, Federated State of Micronesia**

**Hee-Do Jeung**

**Department of Biotechnology**

**GRADUATE SCHOOL**

**JEJU NATIONAL UNIVERSITY**

**2010. 02.**

# CONTENTS

ABSTRACT .....	iii
LIST OF FIGURES .....	vi
LIST OF TABLES .....	viii
1. INTRODUCTION .....	9
2. MATERIALS AND METHODS .....	11
2.1. Black lip pearl oyster sampling .....	11
2.2. Biochemical analysis of eggs .....	13
2.2.1. Total carbohydrate .....	13
2.2.2. Total protein .....	13
2.2.3. Total lipid .....	14
2.2.4. Total ash .....	15
2.3. Preparation of antibody .....	15
2.3.1. Development of BLP oyster egg specific antibody .....	15
2.3.2. Antibody titration .....	17
2.3.3. Removing the cross-reactivity .....	20
2.3.4. Antibody specificity and sensitivity .....	21
2.3.4.1. Western blotting .....	21
2.3.4.2. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	22
2.3.4.3. Immunofluorescence staining .....	22
2.4. Comparison of egg specific protein with other bivalve species .....	23
2.4.1. Electrophoresis .....	23
2.4.2. Western blotting .....	24

2.4.3. Indirect-ELISA.....	25
2.5. Measurement of reproductive effort using indirect-ELISA.....	25
3. RESULT.....	26
3.1. Biochemical composition of <i>P. margaritifera</i> eggs.....	26
3.2. Specificity and sensitivity of black lip pearl oyster egg specific IgG.....	29
3.3. Characterization of the <i>P. margaritifera</i> egg specific protein.....	33
3.4. Optimization of indirect-ELISA.....	37
4. DISCUSSION.....	39
4.1. Biochemical properties of <i>P. margaritifera</i> eggs.....	39
4.2. Specificity and sensitivity of egg specific IgG.....	41
4.3. Characterization of the egg specific protein.....	44
4.4. Optimization of indirect-ELISA.....	47
5. CONCLUSION.....	49
REFERENCES.....	50

## ABSTRACT

To develop black lip pearl oyster (BLP oyster) egg-specific polyclonal antibody and quantify reproductive effort, black lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* was collected from Chuuk State, Federated State of Micronesia and *P. margaritifera* eggs were purified. Biochemical composition of ripe eggs of *P. margaritifera* was similar to that observed in other marine bivalves. The total proteins (45.5%) and lipids (21.5%) are the main components of eggs while ash (11.5%) and carbohydrate (5.8%) are the low composition. To develop a specific antibody against to *P. margaritifera* egg protein, the homogenized extracts of BLP oyster eggs were immunized to a New Zealand white rabbit during 8 weeks and antiserum was purified 1 and 2 weeks after last immunization. Cross reactivity of rabbit antiserum to other tissue proteins were removed using an immunoabsorbent and then purified a specific IgG (anti-BLP oyster egg protein specific IgG) by precipitation methods and dialysis. Western blotting showed that anti-BLP oyster egg protein specific IgG reacted with egg proteins of about 270, 150, 100, 47, 44 and 23 kDa under reducing condition. For indirect Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), anti-BLP oyster egg protein specific IgG detected between 0.07 – 20 µg/ml of BLP oyster egg protein.

6 species of marine bivalves egg proteins including *P. margaritifera* were characterized by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under native and denaturing condition, western blotting and indirect ELISA. As a result, one major single band around 420 kDa under native PAGE was observed as a common protein in all bivalves while 1 or 2 minor bands also identified. On the other hand, it showed the broad range protein patterns under denaturing condition. Western blotting using 6 species of marine bivalves egg proteins showed that anti-BLP oyster egg protein specific IgG only detected in black lip pearl oyster egg protein. In addition, we investigated the specificity of anti-BLP oyster egg protein specific IgG against two isolate of black lip pearl oysters collected from Chuuk State and Tahiti. There is no difference between the geographical variations in egg protein of oysters.

Indirect-ELISA was optimized to measure reproductive effort using purified anti-BLP oyster egg protein specific IgG. From the result, using egg protein mixed with somatic tissue protein for standard preparation was the most reliable method then using only egg protein to measure reproductive effort. The result suggested that 1000 times dilution sample extract as antigen with 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of anti-BLP oyster egg IgG was optimum condition of indirect-ELISA.

In conclusion, a specific IgG against black lip pearl oyster egg protein was

successfully developed and will therefore be used in the specific and sensitive quantification of the reproductive effort in the Black lip pearl oyster. And also this results could be supplied the basic information about reproductive biology in bivalves.



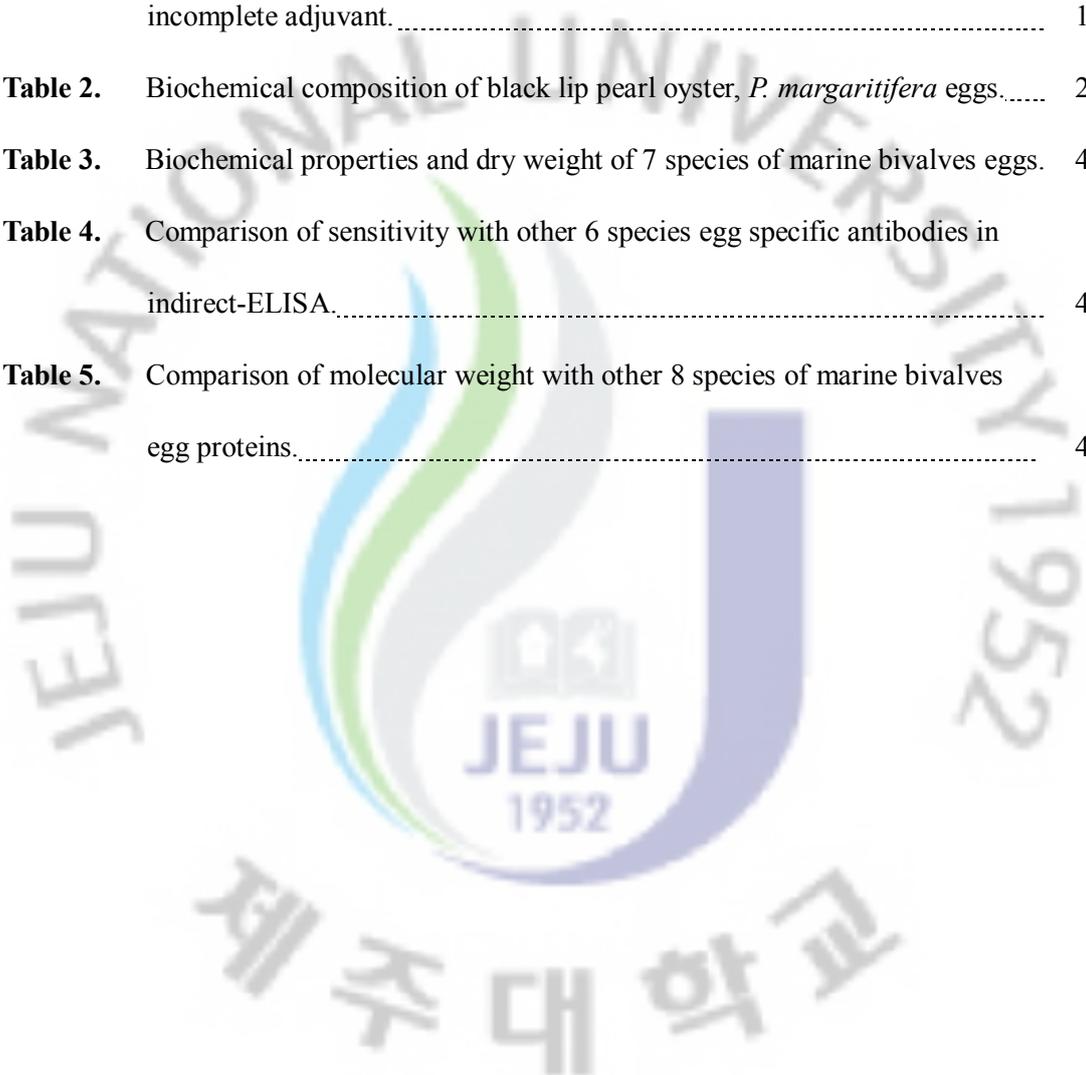
## LIST OF FIGURES

<b>Fig. 1.</b>	Map showing the sampling area.....	12
<b>Fig. 2.</b>	Illustration of haemagglutination test.....	18
<b>Fig. 3.</b>	Result of haemagglutination test. A: control rabbit serum, B: rabbit antiserum after 8 weeks.....	19
<b>Fig. 4.</b>	Egg purification was performed from ripe BLP oyster. A, anatomy of ripe BLP oyster, Ad: adductor muscle, Go: gonad, M: mantle, B, purified eggs, C, histology of ripe ovary, scale bar: 100 $\mu$ m.....	27
<b>Fig. 5.</b>	Specificity of BLP oyster egg protein specific antibody was confirmed by western blotting. A, antiserum used as primary antibody (1:5000) was weakly bound with other tissue proteins, B, purified IgG used as primary antibody (1:1000) was bound only BLP oyster egg protein, ①, BLP oyster eggs extract, ②, molecular weight marker, ③, BLP oyster somatic tissue extract, ④, BLP oyster digestive gland extract, ⑤, BLP oyster male gonad extract.....	30
<b>Fig. 6.</b>	Sensitivity of BLP oyster egg specific antibody was confirmed by indirect-ELISA. A, antiserum used as primary antibody (12.8 $\mu$ g/ml) was weakly bound with male somatic tissue extract (pink trendline), B, purified IgG used as primary antibody (6.3 $\mu$ g/ml) was could be detected 0.07-20 $\mu$ g/ml of BLP oyster egg protein, Blue trendline, antibody reacted with BLP oyster eggs extract, Pink trendline, antibody reacted with BLP oyster somatic tissue extract.....	31
<b>Fig. 7.</b>	Localization of egg specific protein using anti-BLP oyster egg specific IgG on ripe ovary by immunofluorescence assay. A, control, primary antibody	

	was absent, B, immunofluorescence assay: primary antibody was used anti-BLP oyster egg specific IgG (1:100) for 1 hr.....	32
<b>Fig. 8.</b>	Characterization of marine bivalves egg proteins under native PAGE. ①, molecular weight marker, ②, <i>P. margaritifera</i> eggs extract, ③, <i>C. gigas</i> eggs extract, ④, <i>C. ariakensis</i> eggs extract, ⑤, <i>S. kegaki</i> eggs extract, ⑥, <i>M. edulis</i> eggs extract, ⑦, <i>R. philippinarum</i> eggs extract.....	34
<b>Fig. 9.</b>	Characterization of marine bivalves egg proteins under denatured SDS-PAGE. A, non-reducing condition, B, reducing condition, ①, molecular weight marker, ②, <i>P. margaritifera</i> eggs extract, ③, <i>C. gigas</i> eggs extract, ④, <i>C. ariakensis</i> eggs extract, ⑤, <i>S. kegaki</i> eggs extract, ⑥, <i>M. edulis</i> eggs extract, ⑦, <i>R. philippinarum</i> eggs extract.....	35
<b>Fig. 10.</b>	Characterization of marine bivalves egg proteins by western blotting. Anti-BLP oyster egg specific IgG (1:5000) was used as primary antibody and 6 species of egg proteins (0.2 µg/µl) was used as antigen. A, non-reducing condition, B, reducing condition, ①, molecular weight marker, ②, <i>P. margaritifera</i> eggs extract, ③, <i>C. gigas</i> eggs extract, ④, <i>C. ariakensis</i> eggs extract, ⑤, <i>S. kegaki</i> eggs extract, ⑥, <i>M. edulis</i> eggs extract, ⑦, <i>R. philippinarum</i> eggs extract.....	36
<b>Fig. 11.</b>	Result of test to establish optimal condition using Indirect-ELISA. A, anti-BLP oyster egg specific IgG (3.5 µg/ml) was used as primary antibody, B, anti-BLP oyster egg specific IgG (2.3 µg/ml) was used as primary antibody, GSI line, reliable egg protein, 100, 500, 1000, 2000, egg protein dilution factor.....	38

## LIST OF TABLES

<b>Table 1.</b>	Immunization procedure. FCA: freund's complete adjuvant, FIA: freund's incomplete adjuvant.....	16
<b>Table 2.</b>	Biochemical composition of black lip pearl oyster, <i>P. margaritifera</i> eggs.....	28
<b>Table 3.</b>	Biochemical properties and dry weight of 7 species of marine bivalves eggs.	40
<b>Table 4.</b>	Comparison of sensitivity with other 6 species egg specific antibodies in indirect-ELISA.....	43
<b>Table 5.</b>	Comparison of molecular weight with other 8 species of marine bivalves egg proteins.....	45



## 1. Introduction

진주는 아주 오랜 옛날부터 부와 권력의 상징으로 사용되었다. 이러한 가치를 갖는 진주를 생산하는 진주조개는 *Pinctada*, *Pteria* 속에 속하는 조개를 지칭하며, 이 두 속은 Pteriidae 과에 속한다. Pteriidae 과에 속하는 진주조개에는 아코야 진주를 생산하는 *Pinctada fucata* (Gould 1850), *P. martensii* (Dunker 1873), *P. radiata* (Leach 1814), *P. imbricate* (Röding 1798)가 있고, 흑진주를 생산하는 *P. margaritifera* (Linnaeus 1758)와 남양진주를 생산하는 *P. maxima* (Jameson 1932)가 있으며, 이들은 주로 열대 지방 혹은 아열대 지방에 분포를 한다 (Southgate and Lucas 2008). 이 중 흑진주조개는 인도-태평양 산호초 지역에 걸쳐 분포하고 그 중 프랑스 폴리네시아의 산호초에 많이 서식하며, 흑진주조개는 다른 종들보다 크기가 커서 더 큰 진주를 생산할 수 있는 장점이 있다 (Pouvreau et al. 2000).

흑진주조개 (*P. margaritifera*) 양식을 근간으로 한 흑진주 생산은 남태평양 도서 국가에서 중요한 산업 중 하나이며, 이러한 흑진주 양식은 프랑스 폴리네시아에서 주된 경제적 역할을 하고 있으며, 연평균 생산량이 6 톤 (US \$ 175 million)을 육박한다 (Pouvreau et al. 2000). 남태평양에 위치한 Federated State of Micronesia 의 Chuuk State 에서는 현재 흑진주 조개가 흑진주 생산 외에 식용, 기념품 재료로 활용되고 있어 흑진주 조개 양식이 활발히 이루어지고 있다. 이러한 흑진주 생산량의 증가는 흑진주조개 모패의 수요를 급격히 증가시켰으며, 그로 인해 흑진주조개 자원량의 감소를 야기 시켰다 (Kang et al. 2005). Chuuk State 를 비롯한 French Polynesia 에서의 흑진주조개 양식 방법은 자연산 흑진주조개로부터 방출된 부유치패를 채묘하는 자연채묘 방식이 주를 이루고 있어 양식 산업에 필요한 충분한 양의 치패를 확보하는데 어려움이 있다 (Arnaud-Haond et al. 2003,

Kang et al. 2005). 따라서 안정적인 치패의 공급을 위해 인공종묘생산을 통한 치패의 생산 필요성이 높게 인식되고 있으나, 생활사 및 번식생리 등에 관한 기초연구 부족으로 흑진주조개의 인공종묘생산은 아직까지 성공적으로 이루어지지 않고 있다 (Kang et al. 2005).

최근 Pouvreau et al. (2000a, b)은 French Polynesia 에 서식하는 흑진주조개의 산란 전.후의 생식소 무게의 차이를 측정하는 방법으로 열대지역에 서식하는 흑진주조개의 번식 생태가 연중 산란의 양상을 보이나 주 산란기는 수온이 높은 11 월에서 5 월 사이에 일어나는 것으로 연구 보고하였다. 그러나 이매패류의 번식에 관한 연구는 온대지역의 이매패류에 비하여 매우 빈약하기 때문에, 열대 이매패류의 번식전략이나 생리에 관한 정보는 절대적으로 부족한 실정이다.

이매패류에서의 정량적인 번식량 측정은 그들의 생활사와 자원 관리에 있어서 중요한 정보로써 필요하지만, 대부분의 이매패류 생식소가 물리적으로 분리되어 있지 않고 포란수가 수백만 개를 넘어서는 어려움 때문에 어려움을 겪고 있다 (Park and Choi 2004). 하지만 최근 들어 알 단백질에 대한 특정 항체를 개발, 항체면역효소측정법 (ELISA)를 이용하여 아주 소량의 알을 정량 할 수 있는 면역학적인 방법으로 이러한 문제점을 해결 할 수 있으며 참굴 (*Crassostrea gigas*), 바지락 (*Ruditapes philippinarum*), 개조개 (*Saxidomus purpuratus*) 등의 이매패류에서 입증되었다 (Choi et al. 1993, Kang et al. 2003, Park et al. 2003; 2004; 2006).

또한 난황단백질은 배아발생 단계에서 반드시 필요한 영양원으로서 난자에 저장되는 중요한 구성 요소로서, 곤충과 척추동물의 조류, 양서류, 어류에서는 많은 연구가 보고되었지만 (Shafir et al. 1992, Hiramatsu and Hara 1996, Arukwe and Goksoyr 2003, Abbink and Flik 2007, Babin 2008, Amano et al. 2008, Tiu et al. 2009), 무척추동물에서는 최근의 몇몇 연구에 의해서 참굴 (*C. gigas*), 가리비 (*Patinopecten*

*yessoensis*), 참전복 (*Haliotis discus hannai*)의 vitellin 을 암호화하는 유전자와 생화학적 특성이 보고 되었을 뿐 (Osada et al. 1992, Suzuki et al. 1992, Matsumoto et al. 2003, Osada et al. 2004, Matsumoto et al. 2008), 흑진주조개의 난 단백질에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 이 연구의 목적은 Micronesia 의 Chuuk Lagoon 에 서식하는 흑진주조개의 번식량 측정을 위해 흑진주조개 난 단백질에 특이적인 다클론 항체를 개발하고, 개발된 항체를 이용하여 흑진주조개의 번식량 측정 및 난 단백질의 특성을 알아보는데 있으며, 향후, 양식산 흑진주조개의 인공종묘생산을 위한 기초정보를 제공하는데 있다.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Black lip pearl oyster sampling**

흑진주조개 (black lip pearl oyster, BLP oyster) 알 특이적인 항체를 제작하기 위해 2008 년 4 월경 Federated State of Micronesia 에 위치한 Chuuk State 의 한-남태평양해양연구센터에서 양성하고 있는 성숙기의 흑진주조개 30 개체를 채집하였다 (Fig. 1). 채집 된 흑진주조개의 패각을 제거한 후, 생식소 조직의 일부를 취해서 광학 현미경으로 암,수를 구분하였다. 성숙한 암컷의 난소 부위를 절개하여 페트리 디쉬 (Petri dish)에서 조직을 압박하여 알을 추출하였다. 시간이 지남에 따라 발생하는 알 사이의 혹은 조직찌꺼기와의 응집되는 현상을 방지하기 위하여 추출된 알을 0.02 mM 암모니아 수용액 (ammonium hydroxide)을 포함하는 해수 (0.45  $\mu\text{m}$  여과 및 멸균처리 됨)와 혼합하고, 망목의 크기가 100  $\mu\text{m}$  와 40  $\mu\text{m}$  인 체로 알 이외의 거대 불순물과 미세 불순물을 제거하였다.

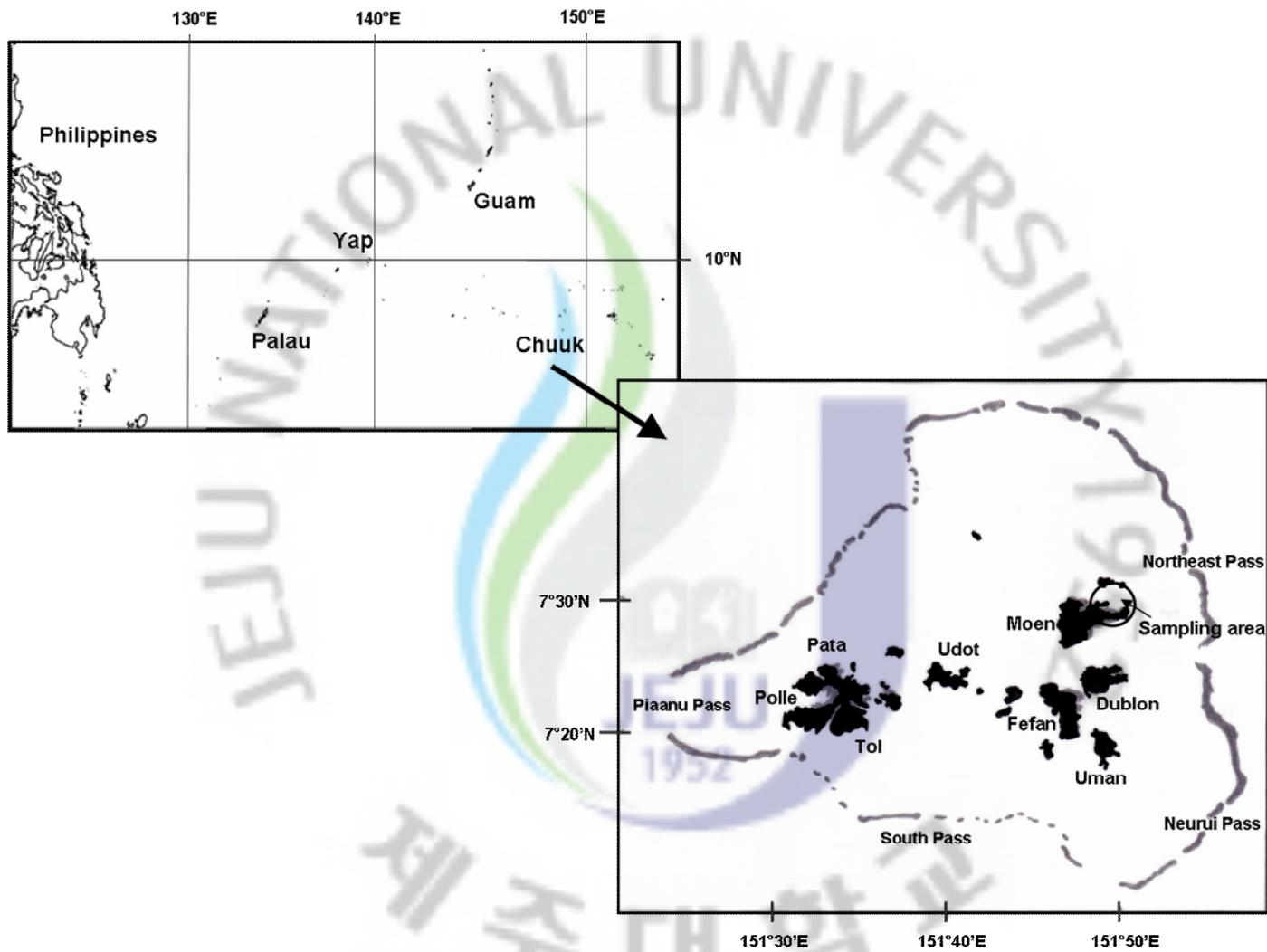


Fig. 1. Map showing the sampling area.

불순물들을 제거한 여과액을 저속으로 원심분리(190 x g, 10 분)하여 상등액 내의 잔여 불순물을 현미경하에서 확인하며 불순물이 제거 될 때까지 원심분리 과정을 5 회 반복하였다 (Park et al. 2003). 이 후 정제된 흑진주조개 알은 -75°C 에서 냉동 한 후 동결건조기를 이용하여 동결건조하였다. 동결건조를 마친 알은 막자 사발을 이용하여 분말 (egg powder)을 만들고 -20°C에 보관하였다.

## **2.2. Biochemical analysis of eggs**

### **2.2.1. Total carbohydrate**

동결건조 된 흑진주조개 알 분말 (egg powder, 약 20 mg)을 1xPBS (Phosphate buffer saline, 0.15 M NaCl, 0.01 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)용액에 혼합 후 초음파 파쇄기로 균질화 하였다. 이를 6202 x g 에서 5 분간 원심분리하여 상등액을 추출하였다. 이렇게 취한 알 추출물 100 µl 에 10% phenol 을 50 µl 첨가해주고 황산용액 500 µl 를 첨가하였다. 황산용액을 첨가하고 바로 1 분간 vortex 하여 발색 시킨 뒤 spectrophotometer 를 이용해 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 탄수화물 함량 분석을 위한 표준물질은 dextrose anhydrous 를 50-1000 µg/ml 농도로 희석하여 이용하였고, 표준물질의 탄수화물 농도와 흡광도 상관식에 따라 시료의 총 탄수화물 함량 (mg/g Tissue Dry Weight, TDWT)을 구하였다 (Taylor 1995).

### **2.2.2. Total protein**

흑진주조개 알의 단백질 함량 분석은 BCA protein assay kit (Pierce, 23227)를 이용하여 분석하였다. 동결건조 된 알 분말 (egg powder)에 0.1 M NaOH 를 가하여

37°C에서 2 시간 반응시킨 후, 6202 x g 에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 새로운 튜브에 취하였다. Western blotting 과 ELISA 와 같은 분석에는 알 분말 20 mg 정도에 1xPBS 용액을 첨가하여 부유하고 초음파 파쇄기로 균질화 한 후, 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 96 well plate 에 25 µl 씩 분주하고 BCA 을 200 µl 씩 분주해 37°C에서 30 분간 반응 시켰다. 이 plate 를 spectrophotometer 를 사용하여 562 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 함량 분석을 위한 표준물질은 BSA (bovine serum albumin)를 50-1000 µg/ml 농도로 희석하여 이용하였고, 표준물질의 단백질 농도와 흡광도 상관식에 따라 시료의 총 단백질 함량 (mg/g TDWT)을 구하였다 (Lowry et al. 1951).

### 2.2.3. Total lipid

동결건조 된 흑진주조개 알 분말 (egg powder)에 chloroform: methanol (2:1) 혼합액을 3 ml 넣고 초음파 파쇄기로 균질화 한 후 412 x g 에서 5 분간 원심분리하여 상등액을 새로운 튜브에 취하고 이를 1 차 분리액으로 명명하였다. 남은 침전물에 다시 chloroform: methanol (1:2) 혼합액을 3 ml 넣고 vortex 로 침전물을 완전히 부유시킨 뒤, 다시 412 x g 에서 5 분간 원심분리하여 상등액을 분리하고, 이를 2 차 분리액으로 명명하였다. 1 차와 2 차 분리액을 혼합하고 0.9% NaCl 을 첨가하여 4°C에서 1 시간 동안 반응 시켰다. 그 결과 chloroform + lipid 층과 methanol + water 층의 두 층으로 분리되었다. 상층의 methanol + water 층을 pipet 를 이용하여 버리고 lipid 가 녹아있는 chloroform 층을 미리 무게를 측정한 알루미늄 dish 에 붓고 건조기에서 하루 동안 건조하여 chloroform 을 제거하였다. 지방의 함량 (mg/g TDWT)은 건조 전,후의 dish 무게의 차이로 구하였다 (Bligh and Dyer 1959).

#### 2.2.4. Ash

동결건조 된 흑진주조개 알 분말 (egg powder) 100 mg 을 15 ml 규격의 자재도가니에 넣고, muffle furnace 에서 450℃로 24 시간 동안 태웠다. Ash 의 함량 (mg/g TDWT)은 muffle furnace 에서 태우기 전, 후의 도가니 무게 차이로 구하였다 (AOAC 1980).

### 2.3. Preparation of antibody

#### 2.3.1. Development of BLP oyster egg specific antibody

정량적인 번식량 측정에 사용할 항체 개발을 위해 순수 분리한 흑진주조개 알 분말 (egg powder)을 1xPBS 용액에 녹여 단백질 농도가 0.5 mg/ml 가 되도록 준비하였다. 준비된 흑진주조개 알 단백질 추출물 0.5 ml 와 같은 양의 Freund's complete adjuvant (FCA)를 혼합하여 총 1 ml 의 항원을 준비하고, 토끼의 등 피하에 4-5 군데에 나누어 주사하였다. 첫 면역전 토끼의 귀동맥에서 혈액을 채취하여 이를 negative control 로 이용하였다. 첫 면역 2 주 후, 0.25 mg/ml 의 동일한 항원 단백질 0.5 ml 과 Freund's incomplete adjuvant (FIA)를 동량 혼합하여 총 4 차례 면역화 하였다 (Table 1). 면역화 하는 동안 Table 1 에서 보는 바와 같이 항체 역가를 알아보기 위해 test bleeding 을 하여 혈청을 분리하였다.

Table 1. Immunization procedure. FCA: freund's complete adjuvant, FIA: freund's incomplete adjuvant.

Time	Procedure	Dose of antigen
1 <sup>st</sup> day	Control serum	Test bleeding
1 <sup>st</sup> day	Fist injection	500 µg/ml egg protein + FCA
2 weeks	1 <sup>st</sup> booster	250 µg/ml egg protein + FIA
4 weeks	2 <sup>nd</sup> booster	250 µg/ml egg protein + FIA
5 weeks	3 <sup>rd</sup> booster	250 µg/ml egg protein + FIA
7 weeks	4 <sup>th</sup> booster	250 µg/ml egg protein + FIA
8 weeks	1 <sup>st</sup> bleeding	Bleeding
9 weeks	2 <sup>nd</sup> bleeding	Bleeding

### 2.3.2. Antibody titration

면역화 된 토끼의 혈액으로부터 분리된 혈청 내 항체의 역가를 측정하기 위해 혈구 응집 반응실험을 실시하였다. 사람 혈액을 EDTA 가 처리된 tube 에 3 ml 정도 채혈하였다. 세척작업을 위해 혈액에 1xPBS 를 7 ml 첨가하고, 1660 x g 에서 5 분간 원심분리하여 침전물을 취하였다. 동일한 세척작업을 3 회 실시하여 적혈구 (RBC, Red blood cells)를 분리하였다. 분리된 적혈구를 혈구 응집 반응을 위한 시료로 사용하기 위해 1xPBS 용액에 최종농도가 1%가 되도록 하였다. 1% RBC 에 formalin 을 8%가 되도록 첨가하여 37°C에서 20 시간 동안 진탕하여 적혈구를 안정화 하였다. 이 후 formalin 이 처리된 1% RBC 와 0.05 mg/ml tannic acid 를 1:1 로 섞어주어 적혈구를 코팅하였다. 코팅된 적혈구에 항원 물질로 흑진주조개 알 단백질 추출물을 1:1 비율로 섞어주고 10 분간 상온에서 반응시켜 적혈구의 준비과정을 마쳤다. 토끼에서 면역화 과정에서 채혈한 negative control 혈청 및 test bleeding 혈청을 100 배 희석하고, 56°C에서 30 분간 열처리를 하여 complement 를 비활성화 하였다. 이후 96-well plate 에 혈청을 2 배수 희석하였다. 2 배수 희석된 96-well palte 에 미리 코팅처리 한 적혈구를 10 µl 씩 분주하고 3 시간 후 응집반응을 보아 항체 역가를 결정하였다 (Fig. 2). 항원 면역 8 주 후 채취한 혈청에서 1:1600 의 항체 역가를 확인하였고 (Fig. 3), 이에 주사를 종료하고 두 번에 걸쳐 혈액을 100 ml 이상 채취하여 혈청을 분리하고 -70°C에 보관하였다.

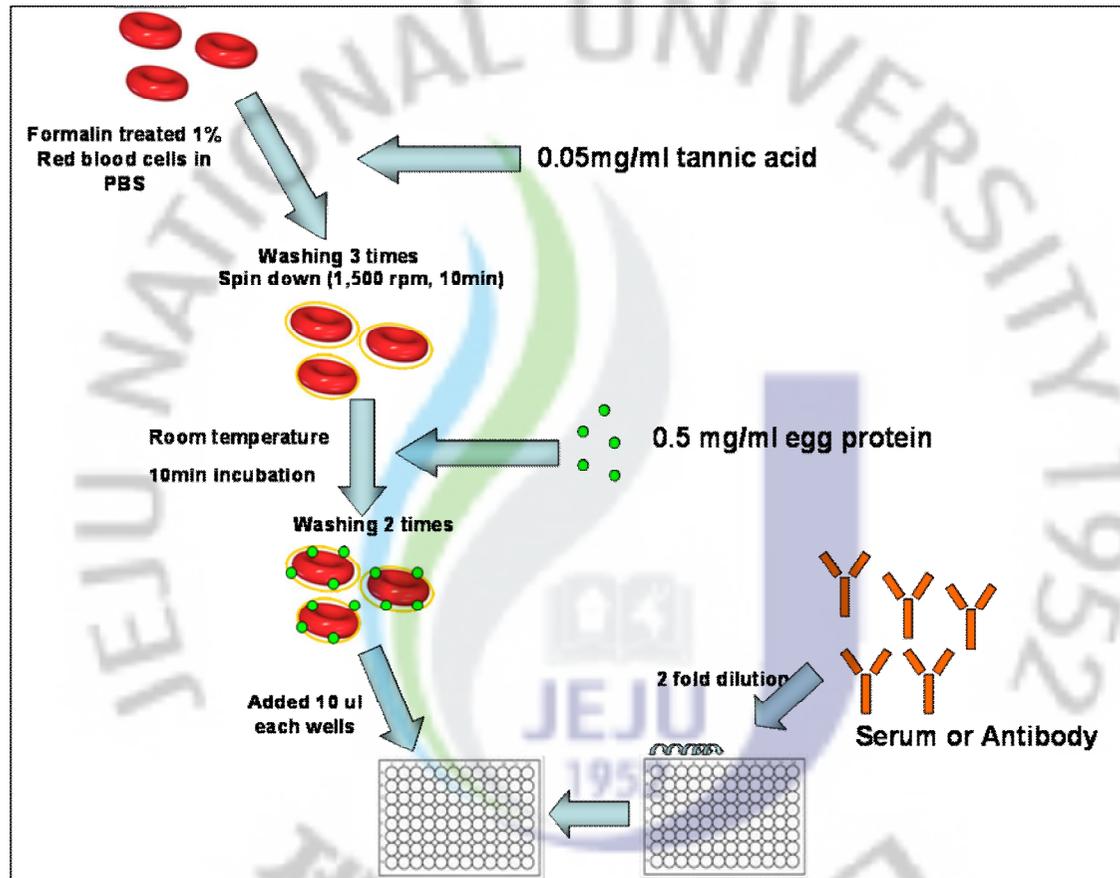


Fig. 2. Illustration of haemagglutination test.

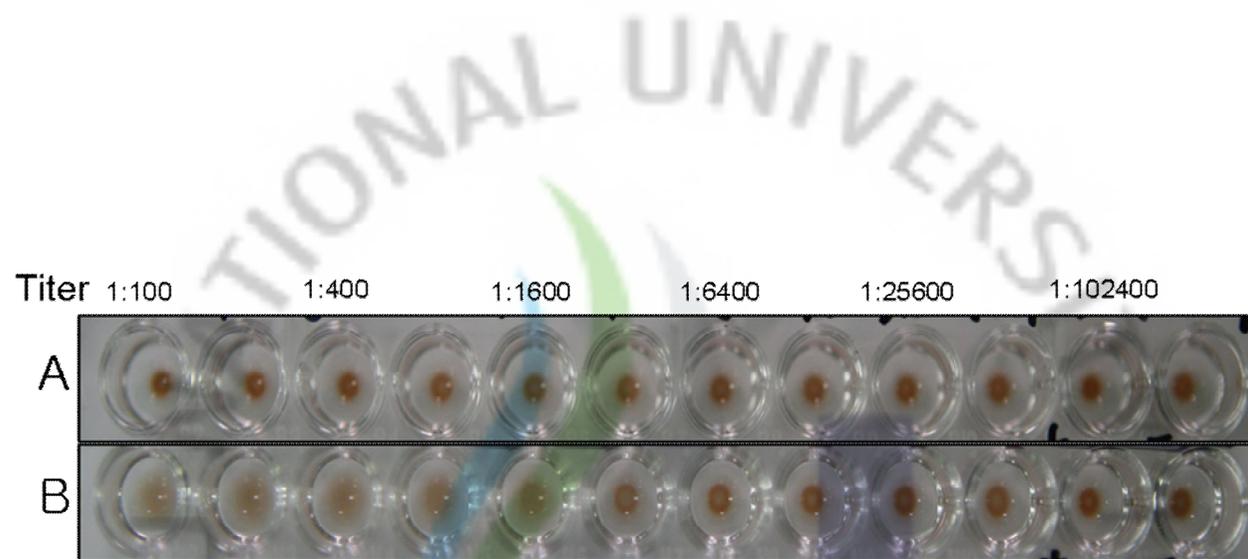


Fig. 3. Result of haemagglutination test. A: control rabbit serum, B: rabbit antiserum after 8 weeks.

### 2.3.3. Removing the cross-reactivity

분리된 항혈청을 이용하여 western blotting 과 ELISA 를 수행한 결과, 알 이외의 조직 세포와의 교차반응이 미약하게 있는 것을 확인하였다. 따라서 알 이외의 조직 세포와 반응하는 비특이적인 항체를 제거하기 위해 알을 포함하지 않는 흑진주조개 수컷의 개체를 사용하여 수컷 개체 추출물로 면역 흡착제를 제작하여 교차반응을 제거 하였다. 동결건조 하여 분말로 만든 흑진주조개 수컷 개체 5g 을 50 ml 의 1xPBS 용액에 녹이고 초음파 파쇄기를 이용해 균질화 하였다. 이 후, 3614 x g 에서 10 분간 원심분리 후 상등액을 취하였다. 이렇게 얻은 수컷 개체 추출물에 10 ml 에 2M Na-acetate buffer (pH 5.0)를 혼합하고 4 ml 의 25% glutaraldehyde 를 천천히 섞어주고 3 시간 동안 반응 시켰다. 3 시간 후, glutaraldehyde 와 결합되지 않은 잔여 단백질을 제거하기 위해 PBS 로 세척하고, 200 ml 의 0.2M glycine buffer (pH 2.8)를 넣고 30 분간 반응 시킨 뒤 1660 x g 에서 5 분간 원심분리해 침전물을 모았다. 침전물에 100 ml 의 1 M  $K_2HPO_4$  를 첨가하여 3 분 정도 반응시키고 1660 x g 에서 5 분간 원심분리해 침전물을 취한 뒤 100 ml 의 1 M ethanolamin 을 섞어주고 over night 하여 면역흡착제의 준비를 마쳤다. 토끼로부터 분리 된 항혈청 (2 배 희석)을 면역흡착제와 동량으로 혼합하여 실온에서 3 시간 동안 반응 시켰다. 반응액을 1660 x g 에서 5 분간 원심분리하여 상등액을 취하고 NaOH 를 이용하여 pH 를 6 으로 맞추었다. 교차반응이 제거된 혈청에서 IgG 를 분리해 내기 위해 포화된 ammonium sulfate 용액을 이용하여 침전반응을 실시하였다. 교차반응이 제거된 혈청에  $(NH_4)_2SO_4$  를 40% 포화시켜 4°C에서 6 시간 동안 반응시켜 IgG 를 침전시켰다. 2962 x g 에서 30 분간 원심분리하여 IgG 를 모았다. 수집된 IgG 에 면역흡착제와 반응 시킨 혈청량의 1/2 정도의 1xPBS 와 혼합하고,

dialysis tubing 을 이용하여 하루 동안 투석하여 IgG 분리를 마쳤다. 분리된 IgG 는 분석 전까지 냉동 보관하였다.

#### 2.3.4. Antibody specificity and sensitivity

##### 2.3.4.1. Western blotting

개발한 항체의 특이성을 확인하기 위하여, 항혈청과 교차반응 제거 후 IgG 를 western blotting 을 이용해 확인하였다. 흑진주조개의 알 분말 (egg powder)과 기타조직 분말 (foot, gill, mantle, muscle, digestive gland, testis)을 1xPBS 에 녹여 초음파 분쇄하여 상등액을 취하고 단백질 농도가 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  가 되도록 희석하였다. 준비된 추출물들을 각각 10  $\mu\text{l}$  씩 분주하여 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 하였다. 분리된 단백질을 PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane (PIERCE, 88114)에 20 V 에서 1 시간 30 분 동안 transfer 하였다. Transfer 된 membrane 은 5% skim milk in TBS-T (tris buffered saline solution containing tween 20)로 1 시간 동안 blocking 하였다. 1 차 항체로 개발한 흑진주조개 난 단백질에 특이적인 항체를 1:1000 으로 5% skim milk in TBS-T 에 희석하여 (교차반응 제거 전에는 항혈청을 1:5000 으로 희석하여 주었다) 2 시간 동안 반응 시켰다. TBS-T 로 15 분씩 3 차례 세척한 후 washing buffer (TBS-T)에 2 차 항체 (goat anti-Rabbit IgG HRP, KOMA)를 1:3000 으로 희석하여 1 시간 동안 반응 시켰다. TBS-T 로 15 분씩 3 차례 세척한 후, peroxidase 와 luminol 을 1:1 로 섞어 membrane 에 뿌려준 후 1-2 분 정도 반응 시켜준 뒤 암실에서 ECL 반응을 30 초 간격으로 3 분간 촬영하였다.

#### 2.3.4.2. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체의 민감도를 indirect ELISA 로 확인해 보았다. 항원 단백질로 흑진주조개 알 추출물을 PBS-T (PBS containing 0.05% Triton X-100)로 희석하여 사용하였고, 대조구로 수컷 개체의 조직 추출물을 사용하였다. 교차반응 제거 전에는 알 단백질의 농도를 18  $\mu\text{g/ml}$ , 수컷 개체 조직 추출물 22.5  $\mu\text{g/ml}$  를 2 배수 희석하였었고, 교차반응 제거 후에는 알 단백질 농도를 20  $\mu\text{g/ml}$ , 수컷 개체 조직 추출물 20  $\mu\text{g/ml}$  를 2 배수 희석하여 항원 단백질로 사용하였다. 희석된 항원 단백질을 polystyrene 96-well ELISA microplate 에 100  $\mu\text{l}$  씩 분주 후, 4°C에서 over night 하여 반응 시키고, microplate autowasher 를 이용하여 PBS-T 로 세척하였다. 1% BSA in PBS-T 를 150  $\mu\text{l}$  넣고 1 시간 동안 blocking 을 하였고, 전과 동일한 방법으로 세척하였다. 1 차 항체로 개발한 항체 6.3  $\mu\text{g/ml}$  (교차반응 제거 전에는 12.8  $\mu\text{g/ml}$  농도의 항혈청 사용)를 100  $\mu\text{l}$  씩 분주하고 1 시간 반응시키고 세척 후, 2 차 항체로 1  $\mu\text{g/ml}$  goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-conjugated 를 100  $\mu\text{l}$  씩 분주하고 1 시간 반응시켰다. 발색기질로 p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 발색시약으로 사용하여 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.3.4.3. Immunofluorescence staining

개발된 항체가 흑진주조개 알 단백질에 특이적인지 면역형광법을 이용하여 관찰하였다. 조직슬라이드는 xylene 을 이용하여 파라핀을 제거하였고, 알코올 탈수과정을 거쳐 PBS-T 로 치환하였다. 조직슬라이드를 10 mM sodium citrate buffer (pH 6)에 담가주고 전자렌지에서 5 분 동안 조직슬라이드를 끓여주었다. 30 분간 식힌

뒤, PBS-T 로 5 분간 세척하고, 5% BSA in PBS-T (blocking buffer)로 1 시간 정도 blocking 하였다. 이 후, PBS-T 로 10 분씩 3 차례 세척 하였다. 개발된 흑진주조개 난 단백질에 특이적인 항체를 blocking buffer 에 1:100 으로 희석하여 1 차 항체로 4°C에서 over night 으로 반응 시켰다. Negative control 에는 1 차 항체가 없는 blocking buffer 와 반응 시켜주었다. 1 차 항체를 붙인 조직슬라이드를 PBS-T 로 10 분씩 3 회 세척 한 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat antibody to rabbit IgG 를 blocking buffer 에 1:400 으로 희석하여 1 시간 동안 반응 시켰다. PBS-T 로 10 분씩 3 회 세척한 후 50% glycerol 로 mounting 하였다. 이 후 형광현미경 하에서 관찰 하였다.

## 2.4. Comparison of egg specific protein with other bivalve species

### 2.4.1. Electrophoresis

흑진주조개 알 단백질의 분자적 특성과 다른 이매패류 종의 알 단백질이 갖는 분자적 특성을 5% native electrophoresis 와 10% SDS-PAGE 를 이용하여 비교하여 보았다. 이를 위해 흑진주조개 알 분말과 참굴 (*C. gigas*), 강굴 (*Crassostrea ariakensis*), 가시굴 (*Saccostrea kegaki*), 담치 (*Mytilus edulis*), 바지락 (*R. philippinarum*)의 알 분말을 각각 20 mg 씩 측정 후, protease inhibitor 인 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)가 1 mM 포함된 1 ml 의 PBS 를 첨가하여 주었다. vortex 를 이용하여 알 단백질이 충분히 녹아 들어가게 한 후, 10 초간 초음파 파쇄하여 균질화 하였다. 이 후 6202 x g, 4°C에서 10 분간 원심분리하고 상등액을 취하였다. BCA protein assay kit (Pierce, 23227)를 이용하여 단백질 정량을 하고, 각각의

알 단백질 추출물의 농도가 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  가 되도록 4x sample buffer 와 혼합하였다. 이때, 10% SDS-PAGE 의 경우 4x sample buffer 에  $\beta$ -mecaptoethanol 이 첨가 된 것과 첨가되지 않은 두 가지의 sample buffer 를 알 단백질과 혼합하여 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분간 변성시켜 준비하였다. 5% native gel 과 10% SDS-polyacrylamaide gel 에 각종의 알 단백질을 30  $\mu\text{l}$  씩 분주하고 전기영동 해 주었다. 전기영동이 끝난 후 gel 을 조심이 유리판에서 분리한 후, coomasie brilliant blue R-250 으로 염색을 하여 밴드패턴을 확인하였다.

#### 2.4.2. Western blotting

개발된 항체가 해산 이매패류에 속하는 종들 간의 교차반응을 확인하기 위해 western blotting 을 하였다. 또한 다른 지역에서 성장한 흑진주조개에 대해 개발된 항체가 항원 다양성을 갖는지 확인하기 위해 Tahiti 에서 채집된 흑진주조개 암컷 생식소를 동결건조하여 분말로 만들고 비교실험 하였다. 흑진주조개를 포함하는 6 종의 해산 이매패류의 난 단백질과 Tahiti 에서 채집된 흑진주조개 암컷 생식소 단백질의 농도를 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  가 되도록 4x sample buffer 와 혼합 하고 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분간 변성 후, 10% SDS-PAGE 를 하였다. Sample buffer 는  $\beta$ -mecaptoethanol 이 첨가된 조건과 첨가되지 않은 조건 모두 western blotting 을 실시하였다. 시행방법은 위의 방법과 동일하며, 1 차 항체로 개발된 흑진주조개 난 단백질에 특이적인 항체를 1:5000 으로 희석하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 over night 하여 반응 시키고, 2 차 항체 (goat anti-rabbit IgG HRP, KOMA)는 1:3000 으로 희석하여 상온에서 한 시간 동안 반응 시켰다.

### 2.4.3. Indirect-ELISA

개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체의 다른 이매패류와 중간 교차반응의 민감도를 확인하기 위해 indirect ELISA 를 하였다. 흑진주조개를 포함하는 6 종의 해산 이매패류의 난 단백질을 20 µg/ml 가 되도록 PBS-T 에 희석하여 항원 단백질로 사용하였다. 대조구로는 흑진주조개 수컷 개체의 조직 추출물 (20 µg/ml)을 사용하였다. 6 종의 해산 이매패류 난 단백질과 대조구 단백질을 polystyrene 96-well ELISA microplate 에 2 배수 희석을 2 반복으로 해 주었다. 시행방법은 위의 방법과 동일하며, 1 차 항체로 개발된 흑진주조개 난 단백질에 특이적인 항체를 1:2000 으로 희석하여 사용하였고, 2 차 항체로 goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-conjugated 를 1:1000 으로 희석하여 사용하였다.

### 2.5. Measurement of reproductive effort using indirect-ELISA

개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 정량적인 번식량 측정에 적용하였을 때, 최적의 실험 조건을 찾기 위해 indirect-ELISA 를 실시하였다. 흑진주조개 알 분말과 흑진주조개 수컷 조직 개체 분말을 1 mM PMSF 를 포함한 1xPBS 와 혼합하여 단백질 농도가 20 µg/ml 가 되도록 준비하였다. Standard curve 를 그리기 위해 흑진주조개 난 단백질 20 µg/ml 를 2 배수 희석을 하여 이용하였으며, 흑진주조개 수컷 조직 단백질 (20 µg/ml)을 negative control 로 이용하였다. 흑진주조개 알 분말과 흑진주조개 수컷 조직 분말을 혼합하여 각각 흑진주조개 알의 무게가 3 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg 이 되도록 100 mg 씩 (GSI sample)을 준비하고, 5 ml 의 1 mM PMSF 를 포함한 1xPBS 와 혼합하였다. 인위적으로 만든 GSI (gonad somatic index, %) sample 의 희석배수를 100 배, 500 배, 1000 배, 2000 배 희석하였을 때,

계산되는 난 단백질량을 비교하였다. 1 차 항체로 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 3.5  $\mu\text{g/ml}$ , 2.3  $\mu\text{g/ml}$  로 이용하였을 때, 계산되는 난 단백질량을 비교하였다. 마지막으로 2 차 항체로 goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-conjugated 를 1  $\mu\text{g/ml}$  농도로 실험을 실시하였다. 시행방법은 위와 같았다.

### 3. Result

#### 3.1. Biochemical composition of *P. margaritifera* eggs

흑진주조개의 생화학적 조성분 분석과 항체 개발을 위한 알 정제 작업은 성공적으로 이루어 졌고 (Fig. 4), 이때 알의 크기는 평균 54.77  $\mu\text{m}$  (48.0 ~ 60.5  $\mu\text{m}$ , N=11)였으며, 이는 성숙시기의 조직에서의 알의 크기인 평균 48.65  $\mu\text{m}$  보다 큰 사이즈였다 (33.8 ~ 58.2  $\mu\text{m}$ , N=11).

동결건조 된 알 분말의 단백질, 탄수화물, 지방 및 무기질 함량은 Table 2 에 나타내었다. 흑진주조개 알의 생화학적 조성은 단백질, 지방, 탄수화물, 무기질의 순으로 구성되어 있었다. 단백질은 40-51%의 비율을 차지하고 있었으며, 1xPBS 에 녹여 수용성 단백질만 분석하였을 때 30~41%의 비율을 나타냈다. 탄수화물은 4-7%, 지방은 20-22%, 무기질은 11-12%의 비율을 차지하고 있었다.

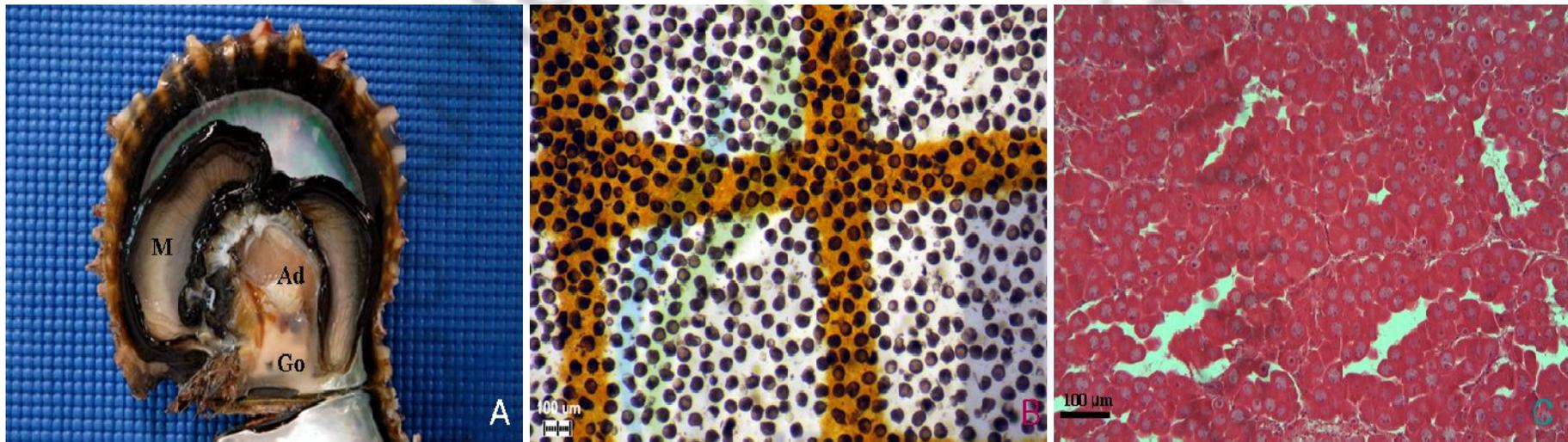


Fig. 4. Egg purification was performed from ripe BLP oyster. A, anatomy of ripe BLP oyster, Ad: adductor muscle, Go: gonad, M: mantle, B, purified eggs, C, histology of ripe ovary, scale bar: 100 µm.

Table 2. Biochemical composition of black lip pearl oyster, *P. margaritifera* eggs.

	Total protein	Total carbohydrate	Total lipid	Total ash
Percentage (mean, %)	45.5	5.8	21.5	11.5
Range (%)	40 - 51	4 - 7	20 - 22	11 - 12

### 3.2. Specificity and sensitivity of the black lip pearl oyster egg specific IgG

흑진주조개로부터 분리한 알 단백질을 항원으로 토끼의 피하 조직에 첫 번째 주사 후, 4 차례 boosting (2, 4, 5 주와 7 주)을 실시하고 마지막 boosting 1 주 후 (최초 항원주사 8 주 후)와 2 주 후 (최초 항원주사 9 주 후) 에 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다 (Table 1). 분리된 혈청 내 항체 역가를 확인하기 위해 항원 단백질이 코팅 된 적혈구를 이용한 혈구응집반응에서 최초 항원주사 8 주 후의 혈청으로부터 1:1600 의 항체 역가가 관찰되었다 (Fig. 3). 분리된 항혈청의 특이성을 확인하기 위해 흑진주조개의 조직 항원 단백질을 이용하여 western blotting 을 실시하였다. 항혈청은 흑진주조개 알을 포함하여 약하게 모든 조직에서 항원-항체 반응이 나타났지만 (Fig. 5a and Fig. 6a), 흑진주조개 수컷 조직 추출물로 제작된 면역흡착제를 이용하여 교차반응을 제거하고 수집한 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체와의 항원-항체 반응에서는 흑진주조개 알 단백질에서만 반응이 관찰되었다 (Fig. 5b and Fig. 6b). 성숙시기의 암컷 흑진주조개 조직상에서의 면역형광염색에서도 개발된 항체가 정확하게 흑진주조개 난 단백질에 반응하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 7). 민감도 측정을 위한 indirect-ELISA 분석 결과 교차반응 제거 후에 0.07 – 20 µg/ml 농도의 난 단백질 측정이 가능한 민감도를 보여 주었다 (Fig. 6b).

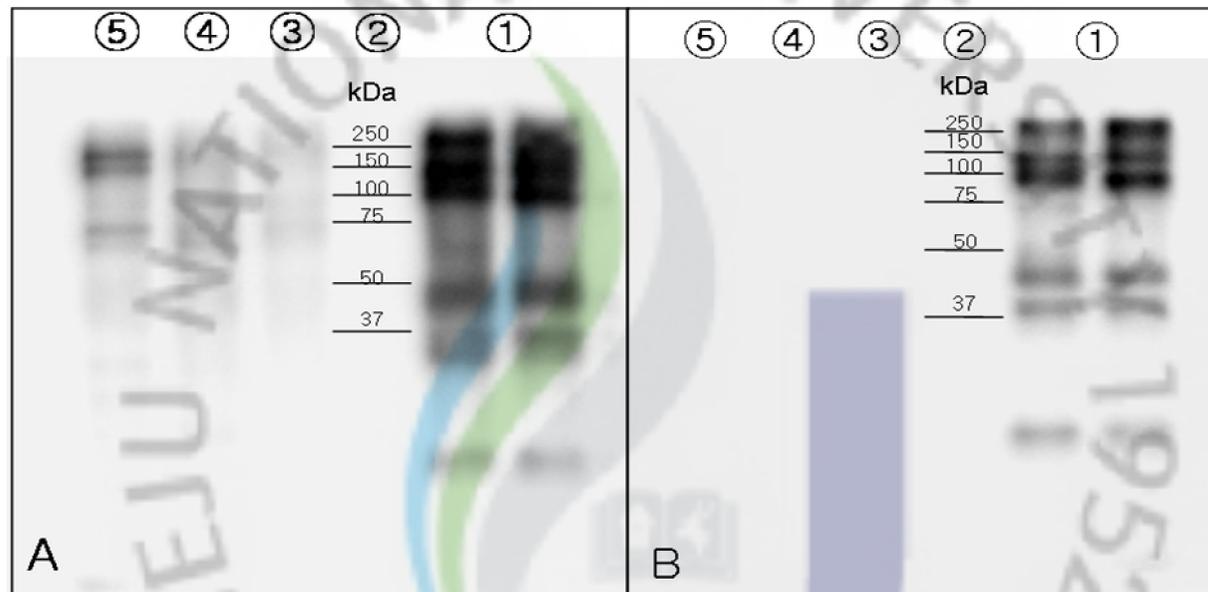


Fig. 5. Specificity of BLP oyster egg protein specific antibody was confirmed by western blotting. A, antiserum used as primary antibody (1:5000) was weakly bound with other tissue proteins, B, purified IgG used as primary antibody (1:1000) was bound only BLP oyster egg protein, ①, BLP oyster eggs extract, ②, molecular weight marker, ③, BLP oyster somatic tissue extract, ④, BLP oyster digestive gland extract, ⑤, BLP oyster male gonad extract.

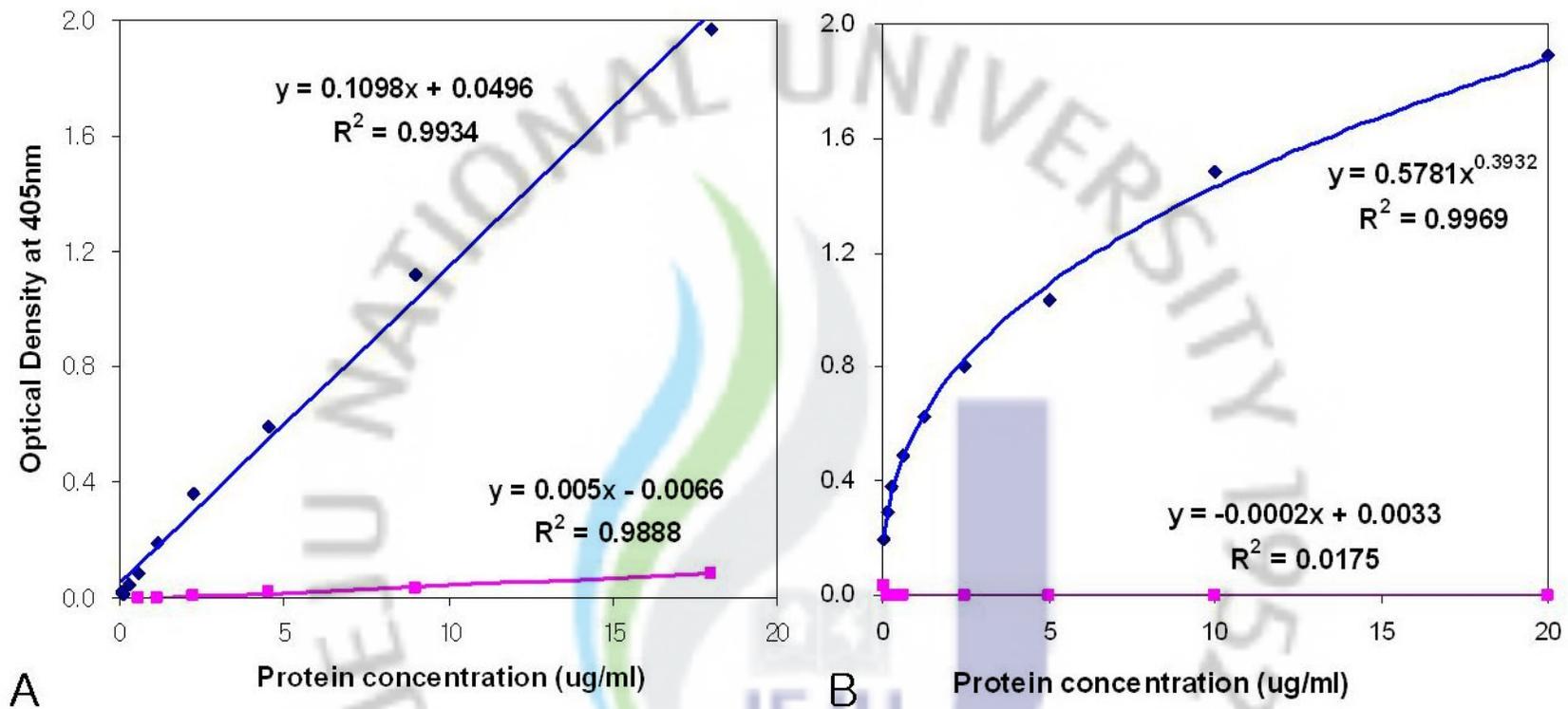


Fig. 6. Sensitivity of BLP oyster egg specific antibody was confirmed by indirect-ELISA. A, antiserum used as primary antibody (12.8 µg/ml) was weakly bound with male somatic tissue extract (pink trendline), B, purified IgG used as primary antibody (6.3 µg/ml) was could be detected 0.07-20 µg/ml of BLP oyster egg protein, Blue trendline, antibody reacted with BLP oyster eggs extract, Pink trendline, antibody reacted with BLP oyster somatic tissue extract.

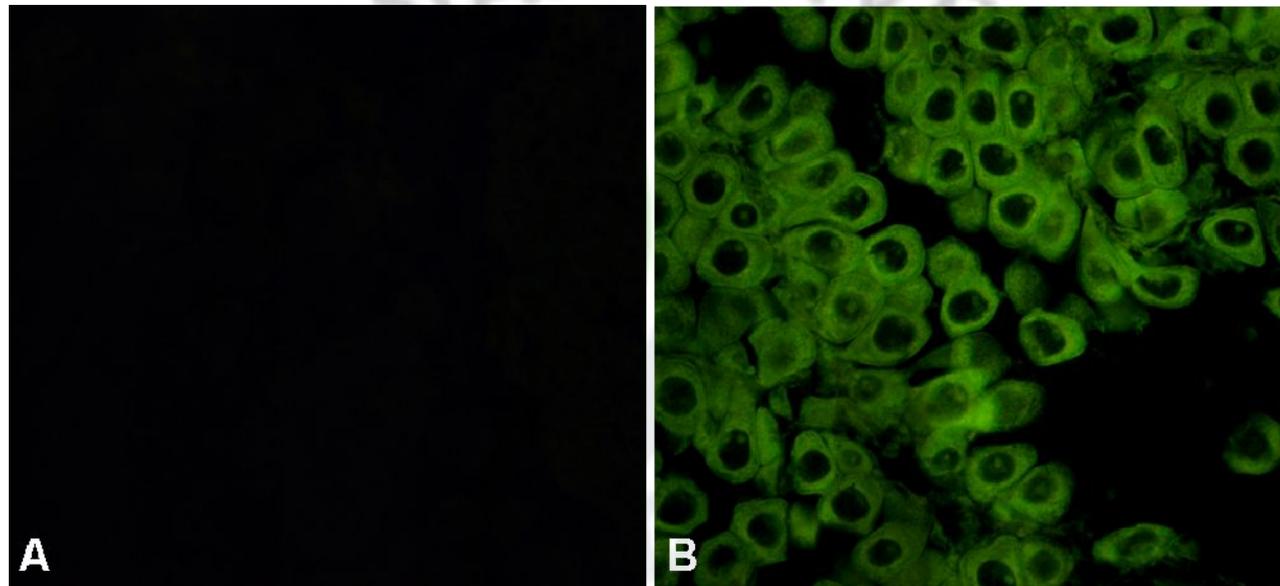


Fig. 7. Localization of egg specific protein using anti-BLP oyster egg specific IgG on ripe ovary by immunofluorescence assay. A, control, primary antibody was absent, B, immunofluorescence assay: primary antibody was used anti-BLP oyster egg specific IgG (1:100) for 1 hr.

### 3.3. Characterization of the *P. margaritifera* egg specific protein

해산 이매패류 알을 구성하는 단백질의 중간 특징을 분석하기 위해 6 종의 해산 이매패류 알 단백질을 native-PAGE 를 수행하여 구성 단백질의 크기를 확인한 결과, 담치 (*M. edulis*)를 제외하고 5 종의 알 단백질은 약 420 kDa 에서 한 개의 major band 를 갖고 있었으며, 종에 따라 한 개 또는 두 개의 minor band 도 관찰되었다 (Fig. 8). 이와 달리, non-reducing 과 reducing 조건하에서는 고분자에서 저분자량까지 다양한 크기의 단백질 subunit 들이 확인되었다 (Fig. 9). 특히, reducing 조건 하의 단백질 전기영동시 분자량 47 과 39 kDa 의 두 개의 major band 가 모든 종에 공통적으로 관찰되었다 (Fig. 9).

따라서 이 연구에서 개발한 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용하여 이매패류내 공통 항원의 존재 유무를 확인하기 위해 western blotting 으로 분석하였다. 그 결과는 reducing 조건에서 실시한 western blotting 결과에서 강굴 (*C. ariakensis*)의 알 단백질 중 약 70 kDa 의 분자량을 갖는 단백질 분자와 아주 미약한 교차반응이 있는 것이 관찰 되었지만, 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체에 대한 공통 항원이 존재하지 않았으며, 개발된 항체는 흑진주조개 난 단백질에 특이적으로 친화력을 갖고 있음이 확인되었다 (Fig. 10).

이와 더불어 Chuuk State 와 Tahiti 로부터 채집한 흑진주조개 알에 대한 항원 다양성 유무를 확인하기 위해 이 연구에서 분리된 알과 Tahiti 에서 채집된 흑진주조개 암컷 생식소의 단백질을 이용하여 western blotting 을 하였다. 그 결과, 서식 지역에 관계없이 이번 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체는 분자량이 약 270, 150, 100, 47, 44, 23 kDa 의 6 개 항원 단백질에 대한 항원-항체 반응이 동일하게 관찰 되었다.

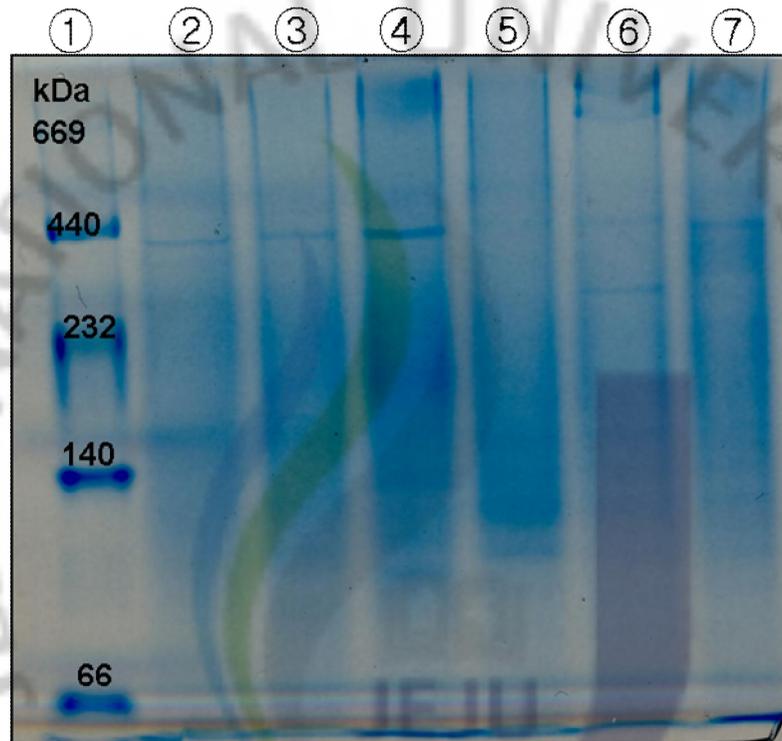


Fig. 8. Characterization of marine bivalves egg proteins under native PAGE. ①, molecular weight marker, ②, *P. margaritifera* eggs extract, ③, *C. gigas* eggs extract, ④, *C. ariakensis* eggs extract, ⑤, *S. kegaki* eggs extract, ⑥, *M. edulis* eggs extract, ⑦, *R. philippinarum* eggs extract.

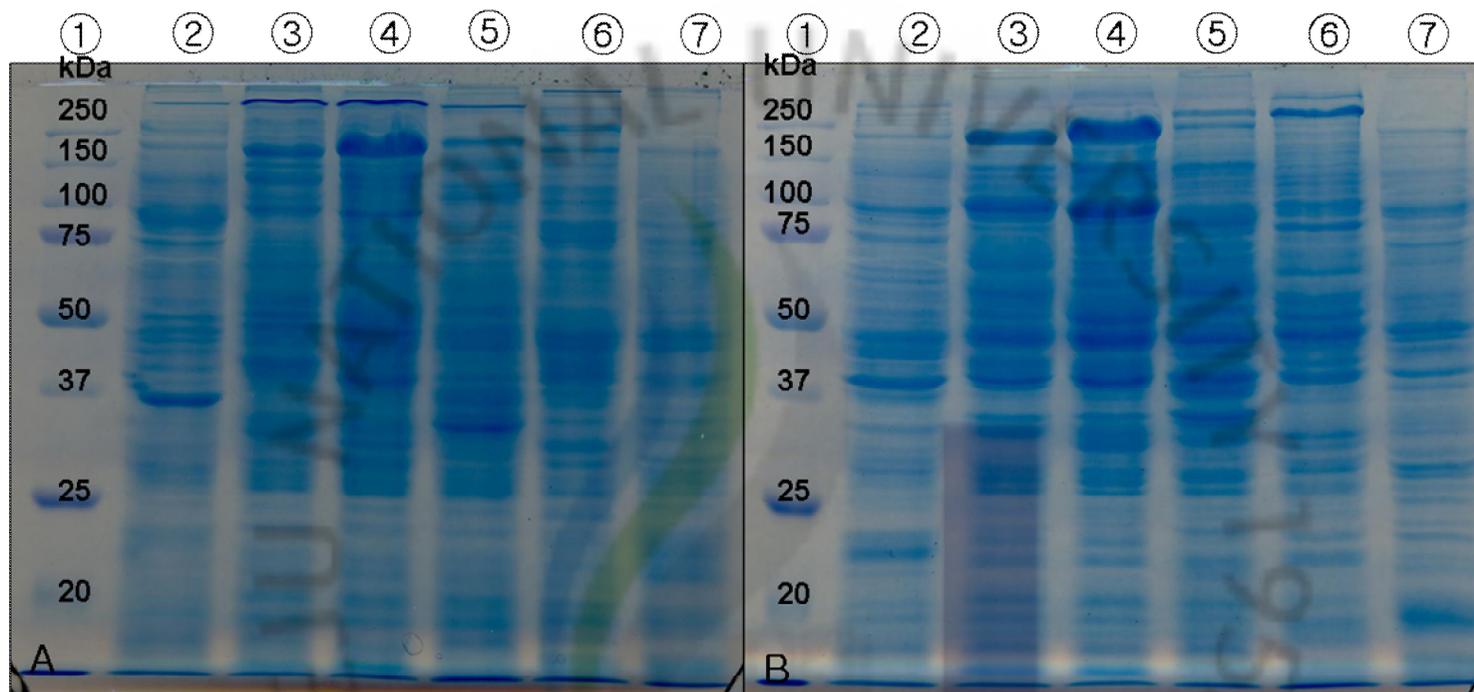


Fig. 9. Characterization of marine bivalves egg proteins under denatured SDS-PAGE. A, non-reducing condition, B, reducing condition, ①, molecular weight marker, ②, *P. margaritifera* eggs extract, ③, *C. gigas* eggs extract, ④, *C. ariakensis* eggs extract, ⑤, *S. kegaki* eggs extract, ⑥, *M. edulis* eggs extract, ⑦, *R. philippinarum* eggs extract.

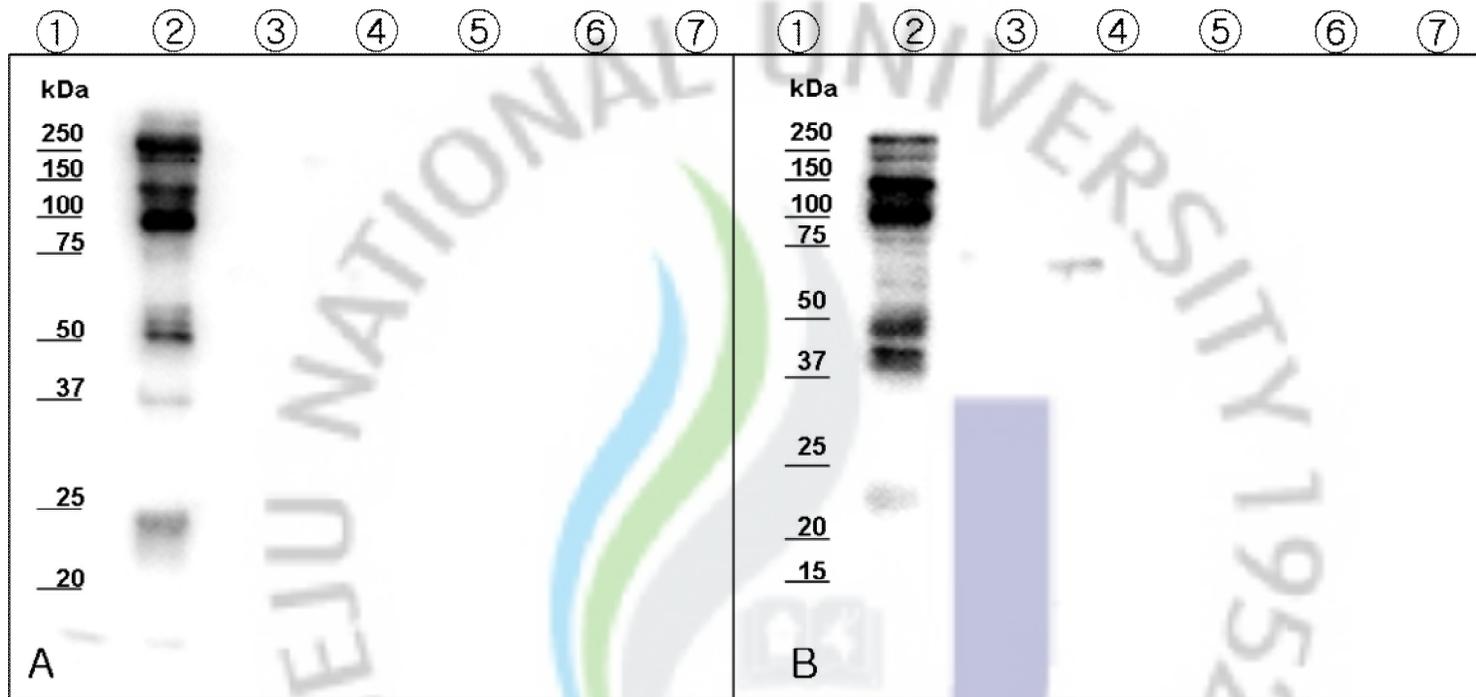


Fig. 10. Characterization of marine bivalves egg proteins by western blotting. Anti-BLP oyster egg specific IgG (1:5000) was used as primary antibody and 6 species of egg proteins (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) was used as antigen. A, non-reducing condition, B, reducing condition, ①, molecular weight marker, ②, *P. margaritifera* eggs extract, ③, *C. gigas* eggs extract, ④, *C. ariakensis* eggs extract, ⑤, *S. kegaki* eggs extract, ⑥, *M. edulis* eggs extract, ⑦, *R. philippinarum* eggs extract.

### 3.4. Optimization of indirect-ELISA

향후 흑진주조개의 번식량 측정을 위해 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용하여 indirect-ELISA 의 최적 설정을 알아보았다. 먼저, 흑진주조개 알 분말과 수컷 개체의 조직 분말을 1xPBS 와 혼합하여 표준물질과 대조구로 이용하였고, 이 실험에서 나타난 수용성 난 단백질의 조성비는 30.3%였다. 이후, 난 단백질량 측정을 위해 인위적으로 흑진주조개 알 분말과 수컷 개체 조직 분말을 섞어 4 개의 sample 을 만들었으며(GSI sample), 제작된 GSI sample 은 각각 알 분말의 양이 3 mg, 10 mg, 20 mg, 30 mg 이었다. 이 GSI sample 의 실제 측정된 난 단백질 량은 85.664  $\mu\text{g/ml}$ , 316.0  $\mu\text{g/ml}$ , 670.182  $\mu\text{g/ml}$ , 1049.364  $\mu\text{g/ml}$  로 나타났다. 사용된 알 분말의 무게를 이용해 산출할 수 있는 이론적인 GSI sample 내 난 단백질의 양이 90.9  $\mu\text{g/ml}$ , 303.0  $\mu\text{g/ml}$ , 600.6  $\mu\text{g/ml}$ , 900.9  $\mu\text{g/ml}$  인 것을 감안 하였을 때, 제작된 GSI sample 의 난 단백질량의 실측값과 이론값은 거의 차이가 없었다. 따라서 GSI sample 이 indirect-ELISA 에서 정확하게 측정이 되는지 GSI sample, anti-BLP oyster egg IgG 의 조건을 다르게 하여 확인하였다. 표준물질로써 1xPBS 용액에 흑진주조개 알 분말을 녹여 단백질 농도를 20  $\mu\text{g/ml}$  로 만들어 2 배수 희석하여 이용하였고, 그 결과 0.3 ~ 5  $\mu\text{g/ml}$  의 구간에서 신뢰도 ( $R^2$ ) 0.9917 의 로그 그래프를 얻을 수 있었다. 하지만 Fig. 11 에서 보듯이 standard curve 를 이용해 계산된 GSI sample 의 난 단백질량 값은 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체의 농도에 의한 차이는 나타나지 않았으나, 항원 단백질의 희석배수에 따른 차이가 있었으며, GSI sample 을 500 배 희석하여 항원 단백질로 사용하였을 때 가장 근사치의 값이 계산되었다.

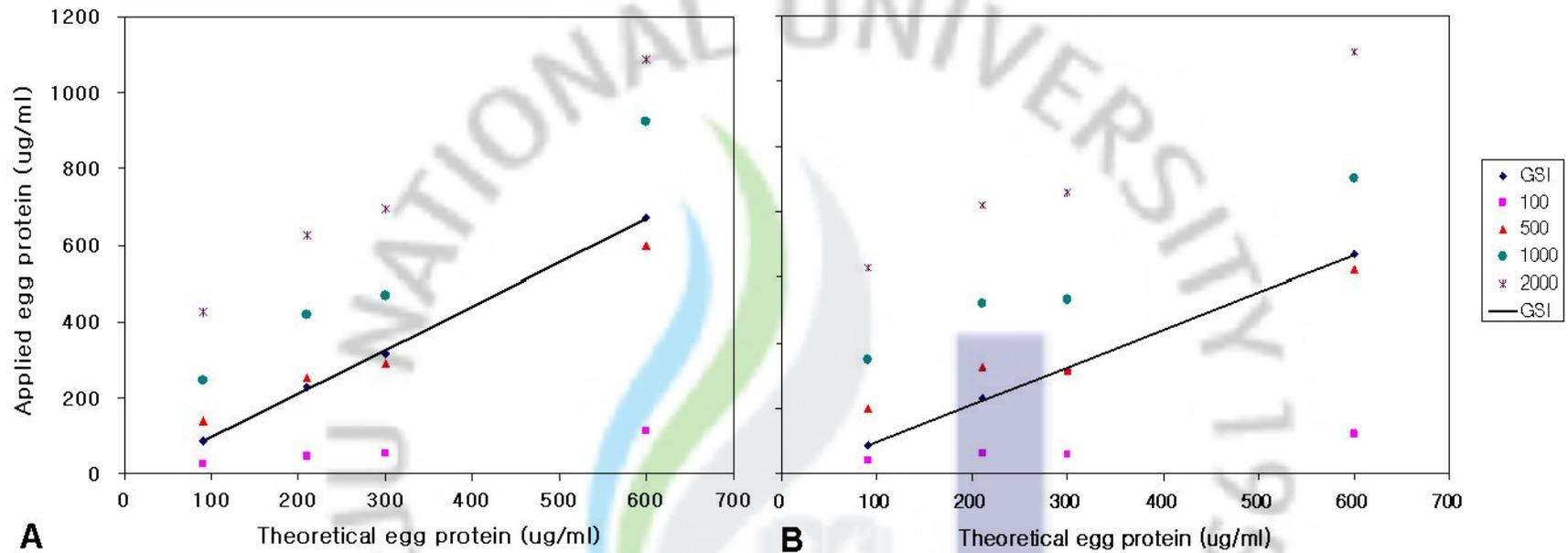


Fig. 11. Result of test to establish optimal condition using Indirect-ELISA. A, anti-BLP oyster egg specific IgG (3.5  $\mu\text{g/ml}$ ) was used as primary antibody, B, anti-BLP oyster egg specific IgG (2.3  $\mu\text{g/ml}$ ) was used as primary antibody, GSI line, reliable egg protein, 100, 500, 1000, 2000, egg protein dilution factor.

반면 제작된 GSI sample 의 흡광도와 이론적인 난 단백질량을 기준으로 standard curve 를 나타내었을 때는 희석배수에 상관없이 모든 조건에서 신뢰도 (R2)가 0.99 를 넘는 직선의 상관식이 나타났다.

## 4. Discussion

### 4.1. Biochemical properties of *P. margaritifera* eggs

이 연구에서 흑진주조개 알의 생화학적 구성은 단백질 함량이 가장 높았으며 (평균 45.5%), 지방 (평균 21.5%), 무기질 (평균 11.5%), 탄수화물 (평균 5.8%) 순서로 나타났다. 흑진주조개 알의 생화학적 조성비를 다양한 해산 이매패류 알의 생화학적 조성비와 비교하여 Table 3 에 나타내었다. 흑진주조개 알의 생화학적 조성비는 다른 이매패류 알의 생화학적 조성비와 같이 단백질이 가장 많고 지방, 탄수화물의 순서의 패턴을 보였다. 백합류에 속하는 *M. mercenaria* 의 알의 경우 단백질 40%, 지방 14%, 탄수화물 8%의 조성비를 나타내는 것으로 보고가 되었고 (Lee and Heffernan 1991), 개조개 (*S. purpuratus*)의 알의 경우 단백질 37.44%, 지방 11.4%, 탄수화물 10.83%의 조성비를 보였다 (Park et al. 2005). 또한, 대서양굴 (*Crassostrea virginica*)의 알의 생화학적 조성비는 단백질 50%, 지방 21%, 탄수화물 9%로 (Lee and Heffernan 1991), 참굴 (*C. gigas*) 알의 경우는 단백질 41%, 지방 25.5%, 탄수화물 11.7%로 (Kang et al. 2003), 강굴 (*C. ariakensis*) 알의 경우는 단백질 51.1%, 지방 24.1%, 탄수화물 5.3%로 (Kim et al. in preparation) 각각 보고되었다.

Table 3. Biochemical properties and dry weight of 7 species of marine bivalves eggs.

Species	Location	Egg dry weight (ng)	Total protein (%)	Total carbohydrate (%)	Total lipid (%)	Author
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Georgia, USA	51	40	8	14	Lee and Heffernan (1991)
<i>Saxidomus purpuratus</i>	Geoje, Korea	95	37.44	10.83	11.4	Park et al. (2005)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	Gomso Bay, Korea	22	41	-	-	Park and Choi (2004)
<i>Crassostrea virginica</i>	Georgia, USA	12	50	9	21	Lee and Heffernan (1991)
<i>C. gigas</i>	Goseong Bay, Korea	13	41	11.7	25.5	Kang et al. (2003)
<i>C. ariakensis</i>	Seomjin River, Korea	14	51.1	5.3	24.1	Kim et al. In preparation
<i>P. margaritifera</i>	Chuuk Lagoon, Micronesia	13.41	45.5	5.8	21.5	Present study

흑진주조개의 알은 같은 익각목에 속하는 참굴 (*C. gigas*), 강굴 (*C. ariakensis*), 대서양굴 (*C. virginica*)과 비교 하여 보면, 개별적인 알 무게가 12-14 ng 범위인 13.41 ng 으로 동일한 범위 안에 있었고, 생화학적 조성비 또한 단백질, 지방, 탄수화물의 순서로 알을 구성하고 있었다. 반면 개별적인 알의 무게가 51 ng 과 95 ng 으로 훨씬 큰 *M. mercenaria* 와 개조개 (*S. Purpuratus*)의 알의 생화학적인 조성비가 동일한 패턴을 보이는 것으로 보아 단백질, 탄수화물, 지방, 무기질의 생화학적 요소는 이대패류에 있어서 난의 개별적인 무게의 차이와는 상관없이 거의 동일하게 단백질, 지방, 탄수화물의 순서로 이루어져 있는 것을 알 수 있었다.

#### 4.2. Specificity and sensitivity of egg specific antibody

이 연구에서 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 개발 하였고, 개발하는 동안 western blotting 과 ELISA 를 이용하여 특이성과 민감도를 확인하였다. 그 결과, 항혈청에서 있었던 난 단백질 외 기타조직과의 교차반응은 면역흡착제를 이용해 제거하였고, 최종적으로 분리해 낸 흑진주조개 알 단백질에 특이적인 항체는 western blotting 결과 흑진주조개 난 단백질 외에 기타 조직과의 교차반응은 전혀 없었으며 (Fig. 5 and Fig. 6), 이러한 난 단백질 특이적인 점은 면역형광염색으로도 확인 되었다 (Fig. 7). 이와 관련하여 Kang et al. (2003), Park et al. (2003), Park and Choi (2004)은 그들의 연구에서 참굴 (*C. gigas*), 개조개 (*S. purpuratus*), 바지락 (*R. philippinarum*) 난 단백질에 특이적인 항체를 개발하였고, 이들의 항체의 특이성을 double-immunodiffusion test 로 확인하여 개발된 항체들이 난 단백질에만 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다. 이 연구에서는 western blotting 으로 항체의 특이성을 확인 하였으며, 이는 항원-항체 반응을 이용해 개발된 항체의 특이성을 확인한다는

점에서 같은 맥락으로 사료되며, 더 나아가 이 연구에서는 개발된 항체가 인지하는 항원 단백질의 분자적 특성을 좀 더 세밀하고 민감하게 관찰하였다 할 수 있을 것이다.

또한 indirect-ELISA 수행 결과 0.07 - 20  $\mu\text{g/ml}$  농도의 알 단백질을 검출해 낼 수 있는 민감도를 갖고 있었다. 이와 관련하여 해산 이매패류 난 단백질에 특이적인 항체들의 민감도를 Table 4에 나타내었다. Choi et al. (1993)은 대서양굴 (*C. virginica*) 난 단백질에 특이적인 항체를 개발하였으며, 이 항체의 민감도는 0.2 ~ 10  $\mu\text{g/ml}$  의 난 단백질을 검출 할 수 있었다고 보고하였다. 또한 Kang et al. (2003)은 참굴 (*C. gigas*) 난 단백질에 대한 항체의 민감도를 0.01 ~ 0.3  $\mu\text{g/ml}$  이라 보고하였고, Park et al. (2003)은 개조개 (*S. purpuratus*) 난 단백질에 대한 항체의 민감도를 0.078  $\mu\text{g/ml}$  이라 보고하였고, Park and Choi (2004)는 바지락 (*R. philippinarum*) 난 단백질에 대한 항체의 민감도를 0.23 ~ 15  $\mu\text{g/ml}$  이라 보고하였으며, Kim et al. (In preparation)은 강굴 (*C. ariakensis*) 난 단백질에 대한 항체의 민감도를 0.2 ~ 10  $\mu\text{g/ml}$  의 난 단백질을 검출할 수 있었다고 보고하였다 (Table 4).

이 연구에서 개발된 항체의 민감도를 다른 이매패류 난 단백질에 대한 항체의 민감도와 비교하여 보았을 때, 대서양굴 (*C. virginica*)과 바지락 (*R. philippinarum*), 강굴 (*C. ariakensis*) 난 단백질에 대한 항체보다는 민감하게 반응하는 것을 알 수 있고, 참굴 (*C. gigas*)과 개조개 (*S. purpuratus*) 난 단백질에 대한 항체보다는 민감도가 떨어지는 것을 알 수 있었다. 하지만 Park and Choi (2004)가 개발한 바지락 (*R. philippinarum*) 난 단백질 특이적인 항체는 0.23-15  $\mu\text{g/ml}$  의 민감도를 갖고 있으면서도 0.089g 정도의 난 단백질을 정량해 낼 수 있었고,

Table 4. Comparison of sensitivity with other 6 species egg specific antibodies in indirect-ELISA.

Species	Range ( $\mu\text{g/ml}$ )	Author
<i>Crassostrea virginica</i>	0.2 ~ 10	Choi et al. 1993
<i>Crassostrea gigas</i>	0.01 ~ 0.3	Kang et al. 2003
<i>Saxidomus purpuratus</i>	0.078	Park et al. 2003
<i>Ruditapes philippinarum</i>	0.23 ~ 15	Park and Choi 2004
<i>Crassostrea ariakensis</i>	0.2 ~ 10	Kim et al. in preparation
<i>Pinctada margaritifera</i>	0.07 ~ 20	Present study

Kim et al. (In preparation)이 개발한 강굴 (*C. ariakensis*) 난 단백질에 특이적인 항체도 0.2-8  $\mu\text{g/ml}$ 의 민감도를 갖고 있었지만 78 ng - 20  $\mu\text{g}$ 의 난 단백질을 정량해 낼 수 있는 충분한 민감도를 갖고 있었다. 이러한 결과들을 비추어 보았을 때, 이 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체도 변식량 측정이나 난 단백질을 검출해 내는데 충분히 민감하다고 할 수 있을 것이다.

### 4.3. Characterization of the egg specific protein

Vitellin 은 주요 난황 단백질로서 난생형 동물의 난에 축적이 되는 물질로 배아발생 단계에 주요 영양원으로 작용한다(Shafir et al. 1992, Arukwe and Goksoyr 2003, Babin 2008, Amano et al. 2008, Tiu et al. 2009). 흑진주조개의 알의 단백질 함량 분석 결과 1xPBS 에 녹는 수용성 단백질은 30~41%였으나, 0.1 M NaOH 를 이용해 비수용성 단백질까지 모두 측정하였을 때는 40~51%였다. 흑진주조개의 알을 구성하는 단백질의 특성을 알아보기 위해 native-, denaturing-PAGE, western blotting 을 하였고, 그 결과, native PAGE 상에서 흑진주조개 난 단백질은 약 420 kDa 크기의 하나의 밴드를 나타냈으며 (Fig. 8. lane 2), 개발된 항체가 인지하는 흑진주조개 난 단백질은 western blotting 에서 약 270, 150, 100, 47, 44, 23 kDa 의 분자량을 갖는 것으로 나타났다 (Fig. 5b and Fig. 10b). 또한, native PAGE 를 이용한 중간 난 단백질 분석 결과 참굴 (*C. gigas*), 강굴 (*C. ariakensis*), 가시굴 (*S. kegaki*), 바지락 (*R. philippinarum*)과 동일한 위치인 420 kDa 크기의 밴드를 갖고 있었고 (Fig. 8), 6 개의 해산 이매패류 알 단백질의 SDS-PAGE reducing condition 에서도 47, 39 kDa 의 메이저 밴드의 위치는 동일 하였다 (Fig. 9b). 해산 이매패류의 난 단백질대한 연구를 Table 5 에 정리하여 나타내었다.

Table 5. Comparison of molecular weight with other 8 species of marine bivalves egg proteins.

Species	Molecular weight (kDa)	Author	Methods
<i>C. gigas</i>	105, 85, 66, 64, 60, 45, 41	Suzuki et al. 1992	Western blotting
<i>C. ariakensis</i>	150, 120, 95, 90, 82, 55	Kim et al. in preparation	Western blotting
<i>C. ariakensis</i>	Non-reducing condition : 260, 240, 90, 85, 53, 48, 42, 32 Reducing condition : 70, 73, 48, 45, 35, 30	Mausumi and Choi in preparation	SDS-PAGE
<i>C. virginica</i>	76, 56, 50, 48, 18, 17	Lee and Heffernan 1991	SDS-PAGE
<i>P. yessoensis</i>	270, 60, 30	Osada et al. 1992	SDS-PAGE
<i>S. purpuratus</i>	Non-reducing condition : 163, 95 Reducing condition : 247, 200, 99, 91, 54, 47	Park et al. 2003	SDS-PAGE
<i>M. mercenaria</i>	98, 87, 68, 60, 56, 36, 19	Lee and Heffernan 1991	SDS-PAGE
<i>R. pilippinarum</i>	Non-reducing condition : 475, 84, 40 Reducing condition : 330, 96, 64, 50, 31	Park and Choi 2004	SDS-PAGE
<i>P. margaritifera</i>	Native PAGE : 420 Non-reducing condition : 270, 140, 95, 50, 37, 24 Reducing condition : 270, 150, 100, 47, 44, 23	Present study	Native PAGE Western blotting

Suzuki et al (1992)은 참굴 (*C. gigas*)의 female specific protein 의 분자량이 500 kDa 이상이며, SDS-PAGE 상에서는 7 개의 밴드인 105, 85, 66, 64, 60, 45, 41 kDa 의 분자량을 갖고 있다고 하였고, Osada et al. (1992)는 가리비 (*P. yessoensis*)의 vitellin 의 분자량이 450 kDa 이며 SDS-PAGE non-reducing condition 에서 270, 60, 30 kDa 의 분자량을 갖는다고 하였다. 또한, vitellin 은 주요 난황 단백질로서 난세포에 축적이 되고, 당과 지방, 인성분과 결합되는 복합 단백질의 거대 분자로서 이들의 생화학적 분석 결과와 함께 보았을 때, 이 펩타이드 밴드들이 vitellin 일 것으로 추정하였다. 그 외 Park et al. (2003), Park and Choi (2004), Kim et al. (In preparation)은 개조개 (*S. purpuratus*), 바지락 (*R. philippinarum*), 강굴 (*C. ariakensis*)의 암컷 개체에서 알을 순수하게 분리해 내었고, SDS-PAGE 상에서 이들의 난 단백질의 분자량을 247, 200, 99, 91, 54, 47 kDa (개조개, *S. purpuratus*), 330, 96, 64, 50, 31 kDa (바지락, *R. philippinarum*), 150, 120, 95, 90, 82, 55 kDa (강굴, *C. ariakensis*)의 5~6 개의 밴드를 각각 보고하였다. 이들은 난 단백질에 특이적인 항체를 개발하여 면역형광염색, ELISA 등의 분석 결과 난 단백질에 특이적으로 반응하는 것을 확인하였고, 난 단백질의 주요 물질이 vitellin 이라는 점을 착안하여 이들이 보고한 난 단백질의 밴드를 vitellin 일 것으로 추정하였다.

이러한 연구들과 비교하여 보았을 때, 이 연구에서 흑진주조개의 알을 순수하게 분리하였던 점과 개발된 항체가 난 단백질에만 특이적으로 반응 한다는 점에서 항체가 인지하는 6 개의 band 가 난황단백질인 vitellin 일 것으로 추정이 된다. 하지만 vitellin 이 phospholipoglycoprotein 이라는 점을 착안하여 보았을 때, 알 단백질의 좀더 세밀한 생화학적 분석이 이루어진 후에야 항체가 인지하는 6 개의 단백질 중 어느 band 가 vitellin 인지 규명할 수 있을 것이다.

#### 4.4. Optimization of indirect-ELISA

향후 흑진주조개의 번식량 측정을 위해, 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용하여 indirect-ELISA 의 최적 설정을 알아보았다. 현재까지 해산 이매패류의 번식량을 정량적으로 측정하기 위해 몇몇 종의 난 단백질 특이적인 항체가 개발되었고, indirect-ELISA 를 이용해 번식량을 측정하였다 (Choi et al. 1993, Kang et al. 2003, Park et al. 2003, Park and Choi 2004, Uddin 2008). 이들은 난 단백질을 2 배수 희석하여 얻은 흡광도와와의 상관식을 이용해 포란수를 계산하였다.

따라서 흑진주조개의 난 단백질로만 이루어진 표준물질이 정확한 난 단백질량을 측정 할 수 있는지 확인하기 위해, 인위적으로 흑진주조개 난 분말과 수컷 전체 조직 분말을 혼합하여 3 ~ 30% 범위의 알을 포함하는 시료 (GSI sample)를 만들었다. 제작된 GSI sample 의 난 단백질 값은 이론적으로 계산된 값과 거의 같은 값을 나타내었다. 반면, 흑진주조개 GSI sample 들의 이론적인 난 단백질량을 알고 있는 상태에서, indirect-ELISA 로 난 단백질량을 측정하였을 때, Fig. 11 에서 보는 바와 같이 GSI sample 의 희석배수에 따라 측정되는 난 단백질 양은 차이가 있었다. Panheleux et al. (2000)은 계란 껍질에서 정제하지 않은 단백질 추출물을 사용하였을 때, 추출물의 농도가 진할수록 ELISA 를 이용한 단백질량 측정값이 크게 떨어지는 것을 관찰하였으며, 이 원인을 항체가 인지하는 목적 단백질과 기타 단백질의 경쟁작용 때문이라고 보고하였다. 같은 맥락으로 egg standard curve 가 0.3 ~5  $\mu\text{g/ml}$  의 구간에서 신뢰할 수 있는 log 식을 나타내고 있는데 비해, GSI sample 의 진한농도에서는 표준물질의 신뢰 범위의 최대값보다 많은 단백질을 포함하고, 낮은 농도에서는 표준물질의 신뢰 범위 최소값보다 작은 단백질을 포함하고 있기 때문에 측정값에서 많은 오차가 난 것으로 사료된다. 또한

indirect-ELISA 에서 사용된 표준물질이 난 단백질로만 이루어 졌기 때문에 GSI sample 의 조건과 다르다는 점을 착안하였을 때, Panheleux et al. (2000)이 보고한 정제되지 않은 단백질에서 목적 단백질 외의 단백질에 의한 경쟁으로 인해 낮은 결과 값이 도출 되는 것과 같은 맥락으로 볼 수 있다. 따라서 해산 이매패류의 번식량 측정을 위한 표준물질은 인위적으로 알 분말과 기타조직 분말을 섞어 만들어주어야 보다 정확한 번식량 측정이 가능 할 것으로 보인다. 이와 관련하여 흑진주조개 GSI sample 의 흡광도 값과 이론적인 난 단백질량을 기준으로 상관식을 그려 보았을 때, 모든 조건에서  $R^2$  의 값이 0.99 를 넘는 값을 나타내었다. 좀더 세밀하게 보면 GSI sample 을 100 배, 500 배 희석한 것의 흡광도 값은 동일한 값을 나타내었지만, 이후 1000 배, 2000 배 희석하면서 흡광도가 떨어지는 것을 관찰 할 수 있었으며, 항체의 농도가 희석됨에 따라 흡광도가 떨어지는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 현상은 Panheleux et al. (2000)의 연구에서 같은 단백질 농도에서 항체의 농도를 달리해주었을 때, 항체의 농도가 희석됨에 따라 흡광도가 떨어지는 현상을 나타낸 것과 같은 맥락으로 볼 수 있다.

종합하여 보았을 때, 흑진주조개 번식량 측정을 위해 indirect-ELISA 는 이 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 2.3~3.5  $\mu\text{g/ml}$  정도 사용하여도 충분히 측정이 가능할 것으로 보이며, 표준물질은 샘플의 조건과 같은 알 분말과 조직 분말을 무게의 비로 섞어 사용해야 할 것이다. 또한 샘플의 희석농도는 500 배에서 1000 배 사이로 희석을 하여야 정확한 번식량이 측정 될 것으로 사료된다.

## 5. Conclusion

이 연구는 Micronesia 의 Chuuk Lagoon 에 서식하는 흑진주조개의 번식량 측정을 위해 흑진주조개 난 단백질에 특이적인 다클론 항체를 개발하고, 개발된 항체를 이용하여 흑진주조개의 난 단백질의 특성 분석을 수행하였다. 성숙한 흑진주조개 암컷 개체로부터 순수한 알을 분리하고 생화학적인 조성분 분석을 한 결과 총 탄수화물, 단백질, 지방, 무기질의 양은 5.8%, 45.5%, 21.5%, 11.5%로 각각 나타났다. 흑진주조개 난 단백질을 항원으로 하여 총 9 주간 토끼면역을 실시하여 항혈청을 분리하였다. 항혈청에 존재하는 난 단백질 외 기타 조직과의 교차반응을 제거하고 수집한 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체의 민감도는 0.07-20  $\mu\text{g/ml}$  의 난 단백질을 검출 할 수 있는 것으로 indirect-ELISA 결과 나타났다. 제작된 항체가 인지하는 흑진주조개의 난 단백질은 270, 150, 100, 47, 44, 23 kDa 의 분자량의 6 개 단백질인 것으로 확인되었다.

해산 이매패류 중간 알 단백질의 분자적 특성 차이를 확인하기 위하여, 흑진주조개를 포함한 6 종의 해산 이매패류의 난 단백질들을 native 와 denaturing PAGE 를 수행하였고, 제작된 항체를 이용하여 western blotting 분석 및 indirect-ELISA 를 수행하였다. Native 조건 하에서 5 종의 해산 이매패류의 난 단백질은 약 420 kDa 의 단백질이 공통적으로 확인되었으며, 종에 따라 1 개 또는 2 개의 minor band 가 관찰되었다. 이와 달리 denaturing 조건에서의 난 단백질은 다양한 분자량의 범위를 나타내었다. 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용한 western blotting 과 indirect-ELISA 의 중간 난 단백질 특성 비교 분석에서는, 제작된 항체가 흑진주조개 난 단백질에만 특이적으로 반응하는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 Chuuk State 와 Tahiti 로부터 채집한 흑진주조개 알에 대한 항원 다양성 유무를

확인하기 위해 western blotting 분석을 한 결과에서도 제작된 다클론 항체는 채집 지역과 상관 없이 동일한 6 개의 항원 단백질에 반응하는 것을 관찰 할 수 있었다.

실제 번식량 측정에 있어서 indirect-ELISA 의 표준물질은 흑진주조개 알 분말과 수컷 개체 분말을 혼합하여 사용하는 것이 알 분말만 이용하여 사용한 것보다 좋은 결과를 나타낼 것으로 사료되며, 개발된 항체를 2.3-3.5 µg/ml 정도를 사용하여도 번식량 측정에 충분할 것으로 사료된다.

위 결과들을 종합하여 볼 때, 이 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체는 정량적인 번식량 측정을 하는데 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 흑진주조개 난 단백질의 특성에 대한 연구 결과는 흑진주조개의 번식 생리와 난 단백질에 관한 기초 자료로 이용될 것으로 사료된다.

## References

- Abbink, W., and G. Flik. 2007. Parathyroid hormone-related protein in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol., 152, 243-251.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1995. Official Method of Analysis of Official Analytical Chemists International 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Amano, H., M. Kitamura, T. Fujita, N. Hiramatsu, T. Todo, S. Suyama, and A. Hara. 2008. Purification and characterization of lipovitellin from Pacific saury *Coloabis saira*. Fisheries Science, 74, 830-836.
- Arnaud-Haond, S., V. Vonau, F. Bonhomme, P. Boudry, J. Prou, T. Seaman, M. Veyret, and E. Goyard. 2003. Spat collection of the pearl oyster (*Pinctada margaritifera cumingii*) in French Polynesia: an evaluation of the potential impact on genetic variability of wild and farmed populations after 20 years of commercial exploitation. Aquaculture, 219, 181-192.

- Arukwe, A., and A. Goksoyr. 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish : hepatic protein for the next generation : oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp. Hepatol.*, 2, 1-21.
- Babin, P.J. 2008. Conservation of a vitellogenin gene cluster in oviparous vertebrates and identification of its traces in the platypus genome. *Gene*, 413, 76-82.
- Bligh, E.G., and W.F. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917.
- Choi, K.-S., D.H. Lewis, E.N. Powell, and S.M. Ray. 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the American oysters, *Crassostrea virginica*, using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquac. Fish. Manage.*, 24, 375-398.
- Hiramatsu, N., and A. Hara. 1996. Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin taimen (*Hucho perryi*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 115A, 243-251.
- Kang, D.-H., H.-S. Park, S.-K. Yi, and K.-S. Choi. 2005. Reproductive condition of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus 1758) from Chuuk Lagoon, Federated State of Micronesia during the summer months in 2003. *Ocean and Polar Res.*, 27, 351-358.
- Kang, S.-G., A.A. Bulgakov, Y. Kim, and S.-Y. Kim. 2003. Enzyme-linked immuosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 282, 1-21.
- Kim, B.-K. 2009. Development of an immunological probe to measure reproductive effort of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. Master of Science Thesis. Jeju National University, Jeju, Korea.
- Lee, R.F., and P.B. Heffernan. 1991. Lipids and proteins in eggs of eastern oysters (*Crassostrea virginica* (GNELIN, 1791)) and northern quahogs (*Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). *J. Shellfish Res.*, 10, 203-206.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the

- Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 10, 203-206.
- Matsumoto, T., M.A. Nakamura, K. Mori, and T. Kayano. 2003. Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Zool. Sci.*, 20, 37-42.
- Matsumoto, T., K. Yamano, M. Kitamura, and A. Hara. 2008. Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 149, 293-298.
- Osada, M., T. Unuma, and K. Mori. 1992. Purification and characterization of a yolk protein from the scallop ovary. *Nipp. Sui. Gakka.*, 58, 2283-2289.
- Osada, M., M. Harata, M. Kishida, and A. Kijima. 2004. Molecular cloning and expression analysis of vitellogenin in scallop, *Patinopecten yessoensis* (Bivalvia, Mollusca). *Mol. Reprod. Dev.*, 67, 273-281.
- Panheleux, M., Y. Nys, J. Williams, J. Gautron, T. Boldicke, and M.T. Hincke. 2000. Extraction and quantification by ELISA of eggshell organic matrix proteins (Ovocleidin-17, Ovalbumin, Ovotransferrin) in shell from young and old hens. *Poult. Sci.*, 79, 580-588.
- Park, K.-I., J.-W. Choi, and K.-S. Choi. 2003. Quantification of reproductive output of the butter clam, *Saxidomus purpuratus* (Sowerby, 1852) using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Ocean and Polar Res.*, 25, 249-256.
- Park, K.-I., and K.-S. Choi. 2004. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): I. Quantifying eggs. *Aquaculture*, 241, 667-687.
- Park, K.-I., J.-W. Choi, and K.-S. Choi. 2005. Development of a *Saxidomus purpuratus* (Mollusca: Bivalvia) egg-specific antibody for the quantification of eggs using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Shellfish Res.*, 24, 1079-1086.
- Park, K.-I., A. Figueras, and K.-S. Choi. 2006. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*

- (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olsoni* on clam reproduction. *Aquaculture*, 251, 182-191.
- Pouvreau, S., A. Gangnery, J. Tiapari, F. Lagarde, M. Garnier, and A. Bodoy. 2000a. Gametogenic cycle and reproductive effort of the tropical blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), cultivated in Takapoto Atoll (French Polynesia). *Aquat. Living Resour.*, 13, 37-48.
- Pouvreau, S., C. Bacher, and M. Héral. 2000b. Ecophysiological model of growth and reproduction of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: potential applications for pearl farming in French Polynesia. *Aquaculture*, 186, 117-144.
- Shafir, S., M. Tom, M. Ovadia, and E. Lubzens. 1992. Protein, vitellogenin, and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *Biol. Bull.*, 183, 394-400.
- Strack, E., K.T. Wada, I. Tëmkin, P.E. Saucedo, and P.C. Southgate. 2008. Introduction, taxonomy, phylogeny, reproduction, development and Growth of pearl oyster. In: *The Pearl Oyster*. Southgate, P.C., and J.S. Lucas, eds. Elsevier, Amsterdam., 1-186.
- Suzuki, T., A. Hara, K. Yamaguchi, and K. Mori. 1992. Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.*, 113, 239-245.
- Taylor, K.A.C.C. 1995. A modification of the phenol sulfuric acid method of total sugar determination. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 53, 207-214.
- Tiu, S.H.K., H.L. Hui, B. Tsukimura, S.S. Tobe, J.G. He, and S.M. Chan. 2009. Cloning and expression study of the lobster (*Homarus americanus*) vitellogenin : Conservation in gene structure among decapods. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 160, 36-49.
- Uddin, M.J. 2008. Quantitative reproductive ecology of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* in Korean waters. Doctor of Philosophy Thesis. Jeju National University, Jeju, Korea.

## 감사의 글

학부시절부터 시작한 실험실 생활에서 많은 것을 배우고 드디어 석사학위 논문을 쓰게 되었습니다. 졸업 논문을 준비하면서 아직도 많이 부족하다는 것을 느꼈습니다. 처음 실험실에 들어왔을 때부터 이 논문이 완성되기까지 항상 관심을 갖고 지도해주신 최광식 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 바쁘신 중에도 제 논문을 심사해 주신 한국해양연구원의 강도형 박사님과 김기영 교수님께도 감사를 드립니다. 그리고 석사 과정 동안 많은 가르침을 주신 이기완 교수님, 송춘복 교수님, 허문수 교수님, 전유진 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님, 이영돈 교수님, 이경준 교수님, 정준범 교수님께도 감사를 드립니다.

실험실 생활을 하면서 많은 분들의 도움이 없었으면 혼자서는 완성하지 못하였을 것 같습니다. 우선 석사 과정 동안 많은 조언과 용기를 주신 군산대학교 박경일 교수님께 감사의 마음을 전합니다. 그리고 실험실 생활을 시작부터 지금까지 같이 동고동락하며 격려와 실험을 도와준 무척추동물양식 실험실의 양현성 선배님, Yanin Limphanont, 김봉규 선배님, Dr. Ludovic Donaghy, Dr. Md. Jasim Uddin, 김대경 박사님, 강현실 박사님과 석사학위를 같이 한 이지연 누나, 홍현기 형, 이희중 그리고 지금은 다른 곳에서 저를 응원해 주신 임나래 누나, 최규성에게 고마움을 전합니다. 또한 같은 실험실은 아니지만 항상 격려해주고 도와주는 학과 선,후배님들에게도 감사의 마음을 전합니다. 또한 실험에 필요한 샘플 채집을 해주신 해양연구원 관계자분들께도 감사 드립니다.

마지막으로 하루의 대부분을 학교에서 지내서 섭섭해 하시지만 저를 무조건 믿고 격려해주시며 응원해 주시는 부모님과 형, 친척분들께도 감사의 말을 전하고 싶습니다.