

碩 士 學 位 論 文

급격한 수온 스트레스에 대한 전복류의
생리학적 변화에 관한 연구



濟 州 大 學 校 大 學 院

海 洋 生 物 工 學 科

金 泰 亨

2005年 12月

급격한 수온 스트레스에 대한 전복류의 생리학적 변화에 관한 연구

指導教授 呂寅圭

金泰亨

이 論文을 理學碩士 論文으로 提出함



2005年 12月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

金泰亨의 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 全裕珍 印

委 員 許文洙 印

委 員 呂寅圭 印

濟州大學校 大學院

2005年 12月

Studying the Acute water-temperature Stress
on Physiological changes of Abalone

Tae-Hyung Kim

(Supervised by Professor In-Kyu Yeo)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOTECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2005. 12.

목 차

| | |
|---|----|
| List of Figures | i |
| List of Tables | iv |
| Abstract | v |
| | |
| I. 서 론 | 1 |
| | |
| II. 재료 및 방법 | |
| | |
| 1. 실험진북 | 4 |
| 2. 생존율 측정 | 4 |
| 3. 혈림프(Hemolymph) 수 측정 | 5 |
| 4. 항산화효소 측정 | 5 |
| 5. SDS-PAGE 분석 | 9 |
| 6. Western blot | 11 |
| 7. RT-PCR | 12 |
| 8. 통계처리 | 13 |
| | |
| III. 결 과 | |
| | |
| I. 참전복(<i>Haliotis discus hannai</i>) | |
| 1. 수온자극에 의한 생존율의 변화 | 14 |
| 2. 수온자극에 의한 혈림프 수의 변화 | 15 |
| 3. 항산화효소 변화 | 16 |
| 4. SDS-PAGE 분석결과 | 18 |
| 5. Western Blot 분석 결과 | 19 |
| 6. 수온변화 시간에 따른 HSP70 mRNA의 양적 변화 | 20 |

| | |
|---|----|
| II. 시볼트전복(<i>Haliotis sieboldii</i>) | |
| 1. 수온자극에 의한 생존율의 변화..... | 22 |
| 2. 수온자극에 의한 혈림프 수의 변화..... | 23 |
| 3. 항산화효소 변화..... | 24 |
| 4. SDS-PAGE 분석결과..... | 26 |
| 5. 수온변화 시간에 따른 HSP70 mRNA의 양적 변화..... | 27 |
| III. 오분자기(<i>Haliotis diversicolor aquatilis</i>) | |
| 1. 수온자극에 의한 생존율의 변화..... | 29 |
| 2. 수온자극에 의한 혈림프 수의 변화..... | 30 |
| 3. 항산화효소 변화..... | 31 |
| 4. SDS-PAGE 분석결과..... | 33 |
| 5. 수온변화 시간에 따른 HSP70 mRNA의 양적 변화..... | 34 |
| IV. 고 찰..... | 36 |
| V. 요 약..... | 42 |
| VI. 참 고 문 헌..... | 44 |
| 감사의 글..... | 50 |

List of Figures

- Fig. 1. Experiment abalone, A: *Haliotis discuse hannai*, B: *Haliotis sieboldii*, C: *Haliotis diversicolor aquatilis*.
- Fig. 2. Take a blood sample in abalone.
- Fig. 3. Extraction of protein.
- Fig. 4. Procedures for protein assay by Lowery method.
- Fig. 5. Procedures for measurement of SOD activity.
- Fig. 6. Procedures for measurement of catalase activity.
- Fig. 7. Set up of Whatman paper (blotting paper), gel and PVDF between the plate electrodes. Blotting paper and PVDF are used in the same Size as the gel.
- Fig. 8. Survival rates of the juvenile abalone, *Haliotis discuse hannai* exposed to acute Water-temperature stress.
- Fig. 9. Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in juvenile abalone, *Haliotis discuse hannai* exposed to acute Water-temperature stress.
- Fig. 10. Changes of catalase (CAT) activity in juvenile abalone, *Haliotis discuse hannai* exposed to acute Water-temperature stress.
- Fig. 11. Heat shock protein 70(HSP-70) in gill of juvenile abalone(*Haliotis discus hannai*) exposed to acute Water-temperature stress. 10% SDS polyacrylamide gels.
- Fig. 12. Immunodetection of heat shock protein 70(HSP-70) in gill of juvenile abalone(*Haliotis discuse hanai*) exposed to acute Water-temperature stress. 10% SDS polyacrylamide gels (A) and Western blots (B).

- Fig. 13. Effect of acute Water-temperature stress on β -Actin mRNA and HSP-70 mRNA of hepatopancreas in juvenile abalone (*Haliotis discuse hannai*).
- Fig. 14. Effect of acute Water-temperature (30°C) stress on HSP-70 mRNA of hepatopancreas in juvenile abalone (*Haliotis discuse hannai*).
- Fig. 15. Survival rates of the juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute Water-temperature stress.
- Fig. 16. Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute Water-temperature stress.
- Fig. 17. Changes of catalase (CAT) activity in juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute Water-temperature stress.
- Fig. 18. Heat shock protein 70(HSP-70) in gill of juvenile abalone(*Haliotis sieboldii*) exposed to acute Water-temperature stress. 7.5% SDS polyacrylamide gels.
- Fig. 19. Effect of acute Water-temperature stress on β -Actin mRNA and HSP70 mRNA of gill in juvenile abalone (*Haliotis sieboldii*).
- Fig. 20. Effect of acute Water-temperature stress on HSP70 mRNA of gill in juvenile abalone (*Haliotis sieboldii*).
- Fig. 21. Survival rates of the abalone, *Haliotis diversicolor aquatilis* exposed to acute Water-temperature stress.
- Fig. 22. Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in abalone, *Haliotis diversicolor aquatilis* exposed to acute Water-temperature stress.
- Fig. 23. Changes of catalase (CAT) activity in abalone, *Haliotis diversicolor aquatilis* exposed to acute Water-temperature stress.
- Fig. 24. Heat shock protein 70(HSP-70) in gill of juvenile abalone(*Haliotis diversicolor aquatilis*) exposed to acute Water-temperature stress. 7.5% SDS polyacrylamide gels.

Fig. 25. Effect of acute Water-temperature stress on β -Actin mRNA and HSP-70 mRNA of hepatopancreas in abalone (*Haliotis diversicolor aquatilis*).

Fig. 26. Effect of acute Water-temperature stress on HSP70 mRNA of gill in abalone (*Haliotis diversicolor aquatilis*).



List of Tables

Table 1. Compositions of reagents related to SDS gel

Table 2. Regents for preparaing gel for SDS-PAGE

Table 3. Oligonucleotide of primers for heat shock protein70 and β -actin

Table 4. Variations of hemolymph factors of juvenile abalone (*Haliotis discus hannai*) to exposure of acute water temperature

Table 5. Variations of hemolymph factors of juvenile abalone (*Haliotis sieboldii*) to exposure of acute water temperature

Table 6. Variations of hemolymph factors of abalone (*Haliotis diversicolor aquatilis*) to exposure of acute water temperature



Abstract

This study was conducted to investigate hemolymph, antioxidant enzyme activity (catalase and superoxide dismutase), Heat Shock Protein 70 (HSP70) and HSP70 mRNA variation in hemolymph, hepatopancreas and gill of abalone (*Haliotis discus hannai*, *Haliotis sieboldii* and *Haliotis diversicolor aquatilis*) cultured under several acute water temperatures. Abalones were cultured at 10, 15, 20, 25 and 30°C, for 0, 6, 12, 24 and 48 hours, respectively. Survival rate of *Haliotis discus hannai*, *Haliotis sieboldii* and *Haliotis diversicolor aquatilis* were 100% at 10, 15, 20 and 25°C. However, that were 90% in *Haliotis discus hannai*, 0% in *Haliotis sieboldii* and 6% in *Haliotis diversicolor aquatilis* at 30°C. Hemolymph counts of *Haliotis discus hannai* and *Haliotis sieboldii* were not a significant difference. However, *Haliotis diversicolor aquatilis* was a tended to be decreased at 24 hours in 25°C and at 12, 24 and 48 hours in 30°C. Also, Hemolymph counts of *Haliotis discus hannai* according to acute water temperature stress were not presents a visible change. Acute water temperatures was shown as many stress factors at primary in *Haliotis sieboldii*. Hemolymph counts were inhibited by low water temperatures (10 and 15°C) and induced by high water temperatures (25 and 30°C) compare to control (20°C). However, at high water temperatures were recovered in length of time. Hemolymph counts of *Haliotis diversicolor aquatilis* were increased at 15 and 25°C, and decreased at 10 and 30°C compare to control (20°C).

The superoxide dismutase (SOD) activity was increased in hepatopancreas of *Haliotis discus hannai* at all water temperature conditions compared to the control (20°C). The SOD activity at high water temperature (25 and 30°C) tended to be increased after 12 hours, and was increased immediately after exposure to low water temperature (10 and 15°C), and then was recovered to starting level after the increase. Also, catalase (CAT) activity in hepatopancreas was increased in all the groups except for at 10°C than the control (20°C). The SOD activity in *Haliotis sieboldii* was a tended to be

decreased immediately after exposure to water temperature at all water temperature conditions compared to the control (20°C). Also, Low water temperature (10 and 15°C) was high activity at 24 hours, but a tended to be decreased at 48 hours. 25°C experiment was a tended to be decreased compared to the control. Catalase activity was decreased immediately after exposure to water temperature at 10 and 25°C water temperature conditions compared to the control, and then was recovered to the initial level after increment. Also, 15°C experiment was high activity at 6 hours, and then was recovered to the initial level after increment. 30°C experiment was observed to a tended to be decreased as culture time. The SOD activity in *Haliotis diversicolor aquatilis* was a tended to be increased immediately after exposure to water temperature at 10, 15 and 30°C water temperature conditions compared to the control (20°C). After exposure to water temperature at 10 and 15°C water temperature conditions were decreased to the control level, and then were tended to be increased at 48 hours. 30°C experiment was a tended to be increased by 6 hours and to be decreased since 12 hours. 25°C experiment was not a significant difference. Catalase (CAT) activity was increased immediately after exposure to water temperature at 10 and 15°C water temperature conditions compared to the control, and then was recovered to the initial level after increment at 48 hours. 30°C experiment was a tended to be increased by 6 hours and to be decreased since then that low activity at 24 and 48 hours.

Gill sample of *Haliotis discus hannai* was a normal reaction to HSP 70 antibody. Western blot result of 30°C experiment was present to HSP 67 and HSP 74 in addition to HSP 70.

The HSP70 mRNA expression in *Haliotis discus hannai* was more increased at 30°C compared to those at 10, 15, 20 (control) and 25°C. *Haliotis sieboldii* was more increased at all water temperature conditions compared to the control (20°C) and at 48 hours of 25°C. *Haliotis diversicolor aquatilis* was more increased at all water temperature conditions compared to the control (20°C), at 6 and 12 hours of 10°C, at 6 hours of 15°C, at 6, 12, 24 and 48 hours of 25°C and at 48 hours of 30°C.

As a result, it was observed that rapid change of water temperature caused stress in *Haliotis sieboldii* and *Haliotis diversicolor aquatilis* than *Haliotis discus hannai* which were raised in 20°C. Also, low water

temperature and high water temperature stress were a competitive effect on a living body activity.



I. 서론

제주도 해역에서 생산되는 수산물은 과거에는 어류를 포함한 패류, 해조류 등과 같은 다양한 종에서 많은 양이 생산되었으나 최근 급속한 산업화와 많은 양식 시설물 등이 들어섬에 따라 많은 어족 자원이 감소되는 현상이 나타나고 있다. 이 중 과거에 많은 양이 생산되어 제주도 수산물 생산에 많은 기여를 하였던 전복과 소라등과 같은 패류등은 현재 과거와 비교했을때 많은 양이 감소되어 미미한 양만이 포획되고 있으며, 이에 따라 해녀와 같은 어민들의 소득감소로 이어지고 있다. 이러한 현상은 제주도 해역 뿐만 아니라 우리나라의 많은 연안해역의 발전소, 제철공장, LNG 저장 기지로부터 냉·온배수의 연안해역 방류 및 다양한 화학물질이 수계로 유입됨에 따라 이루어지고 이로 인해 연안환경의 오염이 심화되고 있으며, 수온 상승이 유발되어 연안 자원량이 급속도로 감소되고 있는 것으로 알려지고 있다(Kim and Kim, 2001).

이러한 산업발달에 따른 환경적 변화는 해양 생물들에게는 많은 물리·화학적 스트레스 요인으로 작용을 한다. 특히, 복족류인 전복과 같이 이동성이 매우 제한적인 패류에 있어서는 어류와 달리 급격한 환경 변화에 대처하는 능력이 매우 부족하다고 여겨지며, 연안환경 오염에 따른 피해를 많이 받을 것이라 생각된다.

따라서, 최근의 수산 산업은 빠르게 양식 산업으로 전환되고 있고 많은 수산 생물 종들이 양식화 되고 있으며 그 중 대부분이 어류가 차지하고 있다. 어류를 제외하면 전복, 굴 등과 같은 패류 및 새우류와 같은 갑각류가 양식되고 있다. 그 중에서 육상 양식이 가능한 전복은 남해안 일대에서 많이 양식되고 있으며, 어류 양식과 비교할 때 충분한 경제가치가 있으며 경쟁력이 있는 품종중의 하나이다.

한편, 최근 양식 산업이 급속한 발달로 물리·화학적 스트레스에 의한 양식 생물의 질병이나 스트레스 등에 관한 많은 연구가 이루어지고 있으며, 이러한 연구들은 양식 산업에 많은 도움을 주고 있다. 하지만 이러한 연구 대부분이 어류에 국한되어 지고 있으며, 일부 전복 등과 같은 패류에 관한 연구가 이루어지고 있지만 어류 종들과 비교하면 미미한 실정이다. 현재까지 패류에 있어서의 스트레스에 관한 연구는 온도, 염분, 용존산소, 수용밀도, 소음, 진동 등 물리적 스트레스

(Drew et al., 2001; Holliday et al., 1993; Jung et al., 2004; Mgaya, Y.D. and J.P. Mereer, 1995; Shin et al., 2002))와 일부 화학적 스트레스(Han et al., 2003; Kim, 1997)에 관한 연구가 이루어져 있으며, 이러한 스트레스는 질병에 대한 내성을 감소시키고, 성장률의 감소, 먹이 섭취율의 감소 및 호흡 대사율의 변화를 유발한다고 알려져 있다(Agnar and Albert, 2003; Brown et al., 1995; Harris et al., 1998, 1999; Chen and Chen, 2000; Laughlin and Linden, 1983; Laughlin and Neff, 1980, 1981; Maule et al., 1989; Pedro et al., 2004; Tsuchiya, 1983; Cheng et al., 2004). 그러나 이러한 연구는 양식산업을 위한 기초 연구에 그치고 있어 패류에 있어서의 스트레스에 대한 생리학적인 반응 및 적응 메카니즘을 이해하기에는 부족한 점이 많다. 따라서 이러한 패류가 생태계에서 겪게 되는 환경 스트레스 등과 같은 변화에 의해 야기되는 생리적 변화 등에 관한 연구가 절실하게 요구되어진다.

일반적으로 스트레스를 받게 되면 생체내에 활성산소(superoxide, hydrogen peroxide, peroxy radical, hydroxy radical 등)가 발생하는 것으로 알려져 있다. 활성산소는 생체 내에서 다른 물질과 결합하려는 화학적 산화력이 강해서 세포나 기관의 막을 공격하여 세포의 기능을 손상시킨다(Ferraris et al., 2002). 이러한 활성산소에 대하여 체내에서는 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase (CAT) 등을 생성하여 세포기능 손상을 막는 것으로 알려져 있고(Chance et al., 1979; Wendel and Feuerstein, 1981), 이러한 항산화효소는 온도 변화에 의해 효소 활성이 증가 하는 것으로 보고되고 있다(Parihar et al., 1996; Parihar et al., 1997). 또한, 이와 유사한 결과로 해산어류인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에서도 온도 변화에 따라 2 h에서 4 h까지 SOD 및 CAT가 증가하였다는 연구결과가 있다(Yang and Yeo, 2004). 이처럼 항산화효소의 활성은 생체내의 스트레스 반응과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

한편, 최근 환경변화로 인한 스트레스 반응은 세포레벨의 분자생물학적인 방법에 의해 연구되어지고 있다(Snyder et al., 2001). 수온 변화와 같은 외부의 열 충격은 생체내 중요한 방어 기작으로서 열충격단백질(Heat Shock Protein, HSP)을 생성시키게 되고, 생성된 HSP는 세포내에서 합성된 단백질의 정확한 3차 구조를 유지시켜 주는 것으로 알려져 있다(Welch, 1991; Young et al., 1993). 이러한 HSP는 분자 구조의 크기에 따라 여러 종류가 있으며, 이 중에서 가장 활발히 연구되어지고 있는 것이 분자량

70 kDa의 HSP70 이다.

전복은 복족강(Gastropoda), 원시복족목(Archaeogastropoda), 전복과(Haliotidae)에 속하며 전세계에 70여종이 분포하고 있다고 알려져 있으며(Lindberg, 1992), 이 중 어획 대상이 되는 대형종은 20여종으로 주로 온대 수역에서 많이 생산되고 있다. 우리나라 연안에 서식분포하는 전복류로서는 제주도 북쪽인 남해안 이북에서 서식하는 한류계인 참전복(*Haliotis discus hannai*)과 수심 25 m 층의 2월 달 평균수온이 12℃가 되는 등온선을 경계로하여 남쪽인 제주도에 서식하는 난류계 대형종인 시볼트전복(*Haliotis sieboldii*), 까막전복(*Haliotis discus*), 말전복(*Haliotis gigantea*) 그리고 제주도에 서식하는 소형종인 오분자기(*Haliotis diversicolor aquatilis*)등 5종이 알려져 있다. 한편, 이러한 5종의 전복중 핵형분석에서 오분자기만이 32개 (2n=32)의 염색체를 갖고 나머지 4종은 36개 (2n=36)의 염색체를 갖는다는 연구 결과가 있으며(Arai et al., 1982: 1988), RAPD 분석에 의한 위 5종의 계통유전학적 유연관계를 조사한 연구결과 다른 4종(참전복, 시볼트전복, 말전복 및 까막전복)보다 오분자기의 계통유전학적 유연관계가 가장 먼 것으로 나타났으며, 시볼트전복과 말전복, 참전복과 까막전복의 계통유전학적 유연관계가 가까운 것으로 나타났다(Kim et al., 2000).

따라서, 본 실험에서는 제주도에서 생산되는 전복류 중 서식하는 수역대와 종이 서로 다르다고 알려진 참전복(*Haliotis discus hannai*), 시볼트전복(*Haliotis sieboldii*), 오분자기(*Haliotis diversicolor aquatilis*)를 이용하여 급격한 수온 스트레스에 대한 항산화효소인 SOD 및 CAT의 변화와 HSP70 mRNA의 발현 등을 측정하여 스트레스에 대한 생리학적 지표를 설정하고자 본 연구를 실시하였고, 이러한 연구를 기초로 고부가가치를 창출하는 전복 양식 산업에 물리적 스트레스 대한 경쟁력을 확보할 수 있는 종에 대한 기초 자료를 제공하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험전복

실험에 사용된 전복은 3종으로, 참전복(*Haliotis discus hannai*), 시볼트전복(*Haliotis sieboldii*), 오분자기(*Haliotis diversicolor aquatilis*)를 제주수산연구소 패류육종연구센터에서 분양받아 사용하였다. 참전복의 경우 평균 각장 3.95 ± 0.03 cm, 각폭 2.58 ± 0.02 cm, 전중량 8.88 ± 0.25 g인 치폐를 사용하였으며, 시볼트전복은 평균 각장 4.35 ± 0.03 cm, 각폭 2.93 ± 0.02 cm, 전중량 7.95 ± 0.25 g인 치폐를 사용하였고, 오분자기는 평균 각장 4.16 ± 0.02 cm, 각폭 2.80 ± 0.01 cm, 전중량 11.2 ± 0.20 g인 성폐를 사용하였다(fig. 1). 실험 전복은 미리 20℃에서 2주 또는 2달 동안 사육하며 순치시킨 후 순환여과가 가능한 30 L 규모의 수조로 옮겨 10, 15, 20(대조구), 25 및 30℃의 수온 스트레스를 각각 주었으며, 이 때 염분농도는 $30.0 \pm 0.5\%$ 을 유지시켰고 PVC파이프(Ø 20 cm, L 20 cm)를 세로로 절단한 은신처(shelter)를 넣어서 공기를 공급하였다. 예비 사육기간에 먹이는 다시마를 충분히 공급하였으며, 실험구당 30마리의 전복을 실험에 사용하였고, 실험개시 후 각 수조에 넣어진 사육수의 수온이 목표치에 도달한 순간을 0 h로 정하여 0, 6, 12, 24 및 48 h째에 각각 5마리의 전복으로부터 혈구와 아가미 조직, 간부위의 조직 샘플을 채취하여 -70℃로 보관하며 분석에 이용하였다.

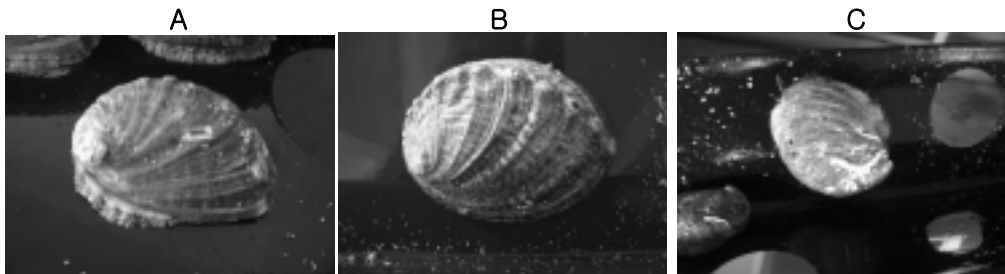


Fig. 1. Experiment abalone, A: *Haliotis discuse hannai*, B: *Haliotis sieboldii*, C: *Haliotis diversicolor aquatilis*.

2. 생존율 측정

실험개시 후, 0, 6, 12, 24 및 48 h째에 폐사한 개체를 각각 조사하였다. 폐사 개체의 계수는 은신처(shelter)와 수조 벽면에 부착능력이 없고, 유리봉으로 발과 촉수를 자극하여도 반응이 없는 개체를 선택하여 조사하였다.

3. 혈림프(Hemolymph) 수 측정

혈림프 수 측정은 실험개시 후, 0, 6, 12, 24 및 48 h째에 전복의 심장 옆 혈관으로부터 바늘 규격 26 GX 1/2 인 1 ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취한 후 0.9% 생리식염수로 10배 희석하여 혈구 계산판을 이용하여 살아있는 혈림프를 계수하였다(fig. 2).

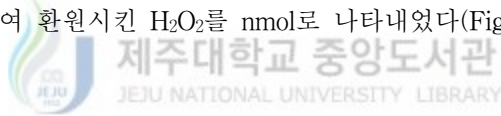


Fig. 2. Take a blood sample in abalone.

4. 항산화효소 측정

항산화효소는 간부위를 적출하여 SOD 및 CAT를 각각 분석하였다. 간부위를 적출 후 약 0.1 g을 0.9% NaCl에 3회 세척한 다음 KCl (1.17%)을 함유한 100 mM

phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화하였다. 균질화된 시료는 원심분리(1,000 rpm, 15 min, 4°C)에 의해 지방 및 침전물을 제거하였다. 균질액은 다시 원심분리 (13,000 rpm, 20 min, 4°C)한 후 상등액을 항산화 효소 측정용 시료로 사용하였다(fig. 3). 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 표준 단백질로서 BSA (bovine serum albumin)를 사용하여 spectrophotometer를 이용 750 nm에서 측정하였다(Fig. 4). SOD는 pyrogallol의 자동 산화율이 억제되는 양을 측정하는 Marklund and Marklund (1974)의 방법으로 측정하였으며, 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 1.3 ml 에 간장 균질액 25 ul을 넣은 후 45 ul의 3 mM pyrogallol 용액을 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 325 nm의 파장에서 측정하였고, 효소활성의 1단위는 반응액 중의 pyrogallol의 산화를 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다(Fig. 5). CAT활성도 측정은 H₂O₂를 기질로 사용하여 spectrophotometer에 의해 240 nm 파장에서 H₂O₂가 환원되어 감소하는 흡광도로서 효소 활성도를 측정하는 Nelson and Kiesow (1972)의 방법에 의하여 측정하였으며, 효소 활성도의 단위는 1분간에 1 mg의 단백질이 반응하여 환원시킨 H₂O₂를 nmol로 나타내었다(Fig. 6).



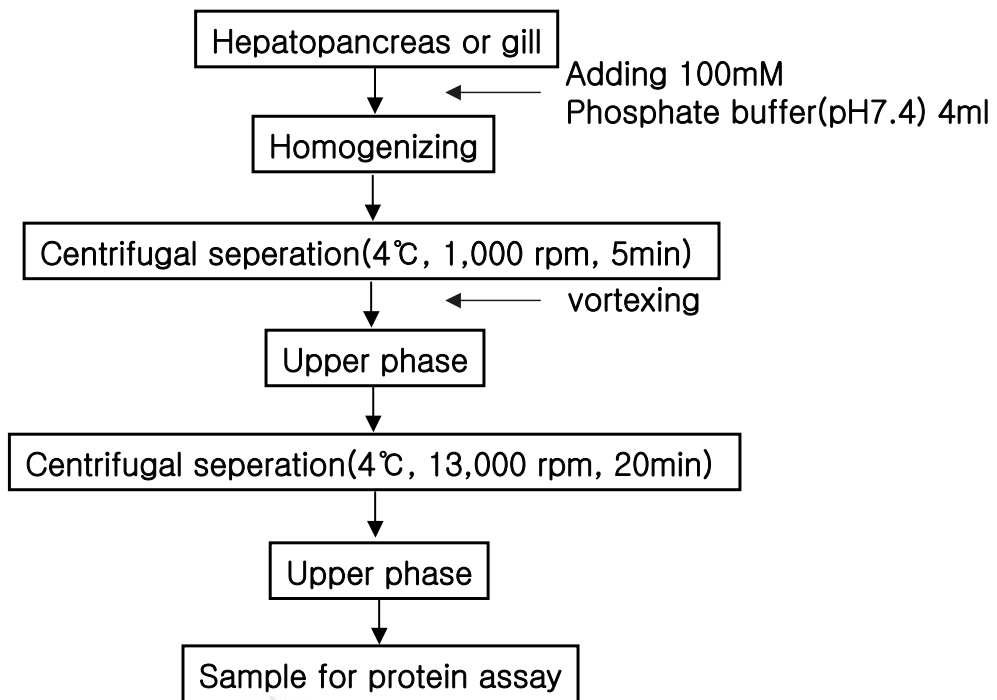


Fig. 3. Extraction of protein.

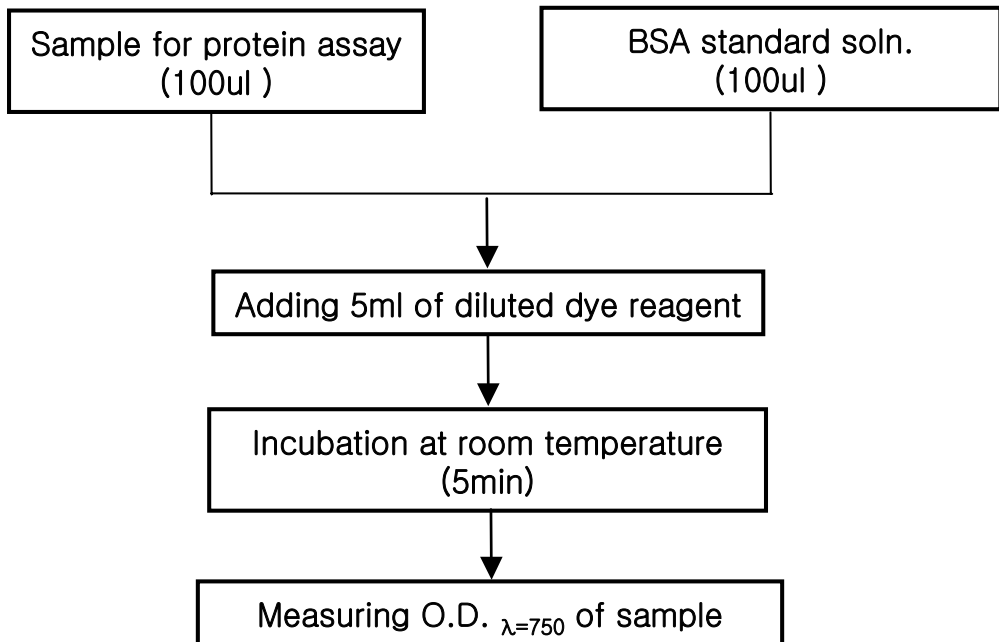


Fig. 4. Procedures for protein assay by Lowery method.

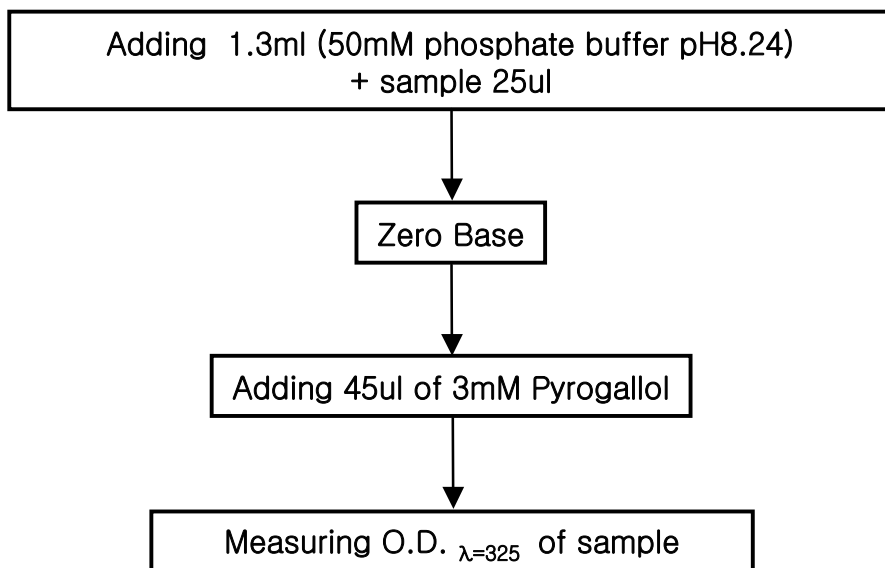


Fig. 5. Procedures for measurement of SOD activity.

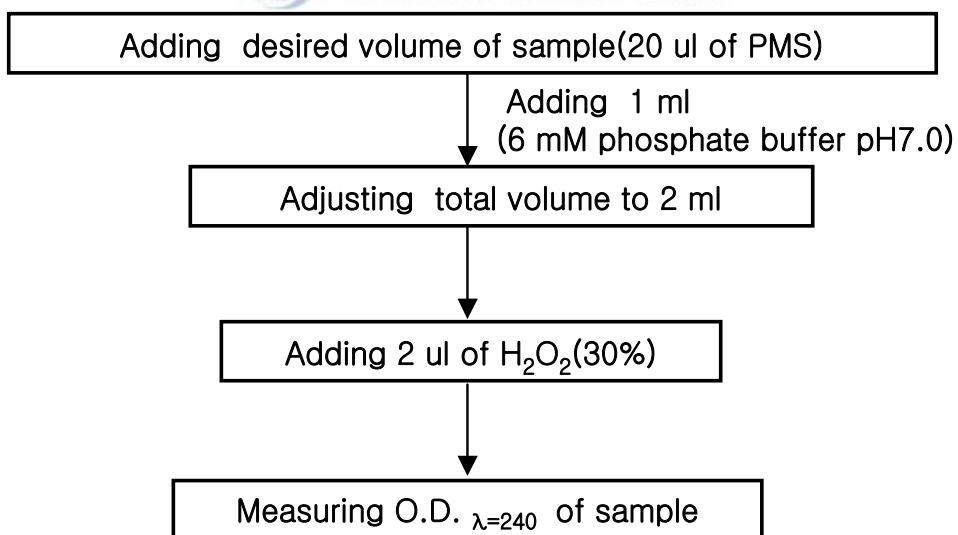


Fig. 6. Procedures for measurement of catalase activity.

5. SDS-PAGE 분석

전복의 아가미를 채취하여 분쇄 완충용액 100 mM phosphate buffer에서 호모게나이저로 분쇄하여 12,000 G에서 원심분리하였다. 상층액을 동량의 2 x Laemmli sample buffer (80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 12% β -mercaptoethanol, 15% glycerol 및 0.012% bromophenol blue)에 용해시켜 100°C에서 3분간 boiling한 후 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE을 실시하였다. 7.5~10% polyacrylamide gel을 사용하여 250 V 55 mA로 4시간 동안 전기영동을 실시한 후, 염색액 (0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol 및 10% acetic acid)에서 40분간 염색하고, 7.5% methanol, 7.5% acetic acid에서 탈색하였다. 분자량 측정용 표준단백질은 myosin (200 kD), β -galactosidase (116 kD), phospholylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD) 및 carbonic anhydrase (31 kD)를 사용하였다.

Table 1. Compositions of reagents related to SDS gel

| Solution | Component | |
|--------------------------------------|--|-------------------------------------|
| Acrylamide A | Acrylamide Methylene-bis-Acrylamide | 22.2 g 0.6 g Adjust to 100 ml |
| Lower gel buffer (4×concentrated) | 18.15g Tris base adjusted to pH 8.8 with 6N HCl | Final volume 100ml Tris 1.5M |
| Upper gel buffer (4×concentrated) | 6g Tris base adjusted to pH 8.8 with 6N HCl | Final volume 100ml Tris 0.5M |
| 10% SDS | SDS(sodium dodecyl sulfate) Distilled water | 10 g Adjust to 100 ml |
| 10% APS | Ammonium persulfate(APS) Distilled water | 0.1 g 1 ml |

Table 2. Regents for preparing gel for SDS-PAGE

| Lower gell | 7.5% | 10% | Upper gel | 7.5% |
|------------------|----------|----------|------------------|---------|
| Acrylamide A | 12.12 ml | 16.2 ml | Acrylamide A | 2.7 ml |
| Water | 14.16 ml | 10.08 ml | Water | 12 ml |
| Lower gel buffer | 9 ml | 9 ml | Lower gel buffer | 5 ml |
| 10% APS | 0.36 ml | 0.36 ml | 10% APS | 0.2 ml |
| 10% SDS | 0.36 ml | 0.36 ml | 10% SDS | 0.2 ml |
| TEMED | 0.036 ml | 0.036 ml | TEMED | 0.02 ml |
| Total volume | 36.036ml | 36.036ml | Total volume | 20.12ml |

6. Western blot

Western blot은 Towbin et al. (1979)의 방법을 변형하여 실시하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 15 V에서 4시간 동안 nitrocellulose (NC) 막으로 전사시킨 후 ponceau S 용액 (0.2% ponceaus, 3% trichloroacetic acid 및 3% sulfosalicyclic acid)으로 전사됨을 확인하였다. 그 후 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovin serum albumin과 0.05% Tween 20이 함유된 0.1 M Tris buffered saline (TTBS, pH 7.4)을 이용하여 40분 상온에서 약하게 흔들면서 blocking 시켰다. Blocking이 끝난 후 HSP-70 (Sigma, H5147)에 대한 항체를 NC막에 첨가하여 1시간 동안 실온에서 배양한 후, TBS-T (0.05% Tween20 in TBS)로 5분씩 3회 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG로 1시간 동안 실온에서 배양하고 TBS-T 용액으로 5번 세척한 후, DAB(0.1%)와 0.03% H₂O₂가 함유된 PBS (pH 7.2)로 발색을 유도하였다(Fig. 7).

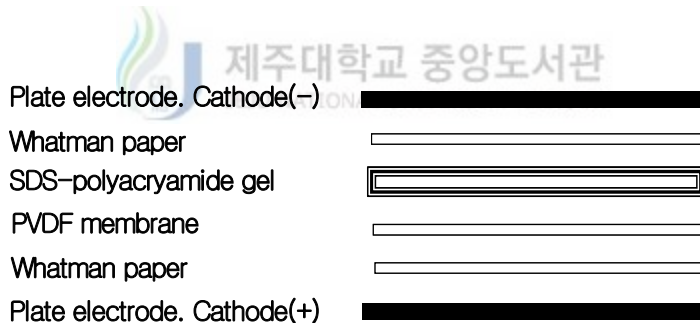


Fig. 7. Set up of Whatman paper (blotting paper), gel and PVDF between the plate electrodes. Blotting paper and PVDF are used in the same Size as the gel.

7. RT-PCR 분석

동결된 아가미 조직에서 total RNA를 (주)Bioneer tissue RNA prep mate kit를 사용하여 추출하였다. 추출된 total RNA는 -70°C 에서 보관하여 실험에 사용하였으며, PROMEGA사의 cDNA합성 kit인 ImProm- Π^{TM} reverse transcriptase kit A3800을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 PROMEGA사의 Taq DNA polymerase in storage buffer B kit을 사용하여 증폭하였다. cDNA를 증폭시키기 위하여 cDNA 2 ul, $10\times$ PCR buffer 5 ul, MgCl_2 (25 mM) 3 ul, dNTP (10 mM) 1 ul, primer (sense) 1 ul (50 pmol), antisense 1 ul (50 pmol), Taq DNA polymerase 0.5 ul 및 Nuclease-Free water 36.5 ul를 혼합하여 94°C 에서 5분간 predenaturation 시켜준 후 94°C 에서 1분간 denaturation, 50°C 에서 45초간 annealing, 72°C 에서 1분간 extension 조건으로 30회 증폭하고, 이 후 72°C 에서 5분간 더 반응시켰다. HSP70 mRNA에 대한 oligonucleotide primer를 제작 합성하였고, 양성대조로 사용하기 위해 β -actin mRNA를 제작하였다(Table 1). PCR로 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100V로 전기영동하여 분리하였으며, 100bp DNA ladder를 size marker로 사용하여 UV transilluminator 하에서 사진을 촬영하여 이미지 분석 프로그램(Labworks 4.5)을 이용하여 mRNA의 발현량을 정량하였다.

Table 3. Oligonucleotide of primers for heat shock protein70 and β -actin

| RNA species | Expected size | Primer sequence |
|---------------------|---------------|---|
| β -actin mRNA | 520bp | 5'-GACHCAGATCATGTTYGARACC-3' 5'-CCTTCTGCATRCGGTCAGC-3' |
| HSP70 mRNA | 400bp | 5'-CAGGACTTCTTCAACGGCAAG-3' 5'-GTGCTCTTGTCSACAGCTGA-3' |

bp: base pairs

8. 통계처리

각 실험에서 얻어진 자료에 대한 값의 유의차 유무는 SPSS-통계 패키지에 의한 ANOVA로 분석하여 Duncan's multiple range test로 검정하였다.



Ⅲ. 결 과

I. 참전복(*Haliotis discus hannai*)

1. 수온자극에 의한 생존율의 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 참전복의 생존율에서는 대조구(20℃)를 비롯한 다른 실험구(10, 15 및 25℃)에서는 실험종료시 까지 폐사된 개체가 발견되지 않아 100%의 생존율을 나타내었으나, 30℃ 실험구에서만 12 h 이후 폐사된 개체가 발견되었고, 최종적으로 2마리가 폐사하여 92%의 생존율을 나타내었다(Fig. 8).

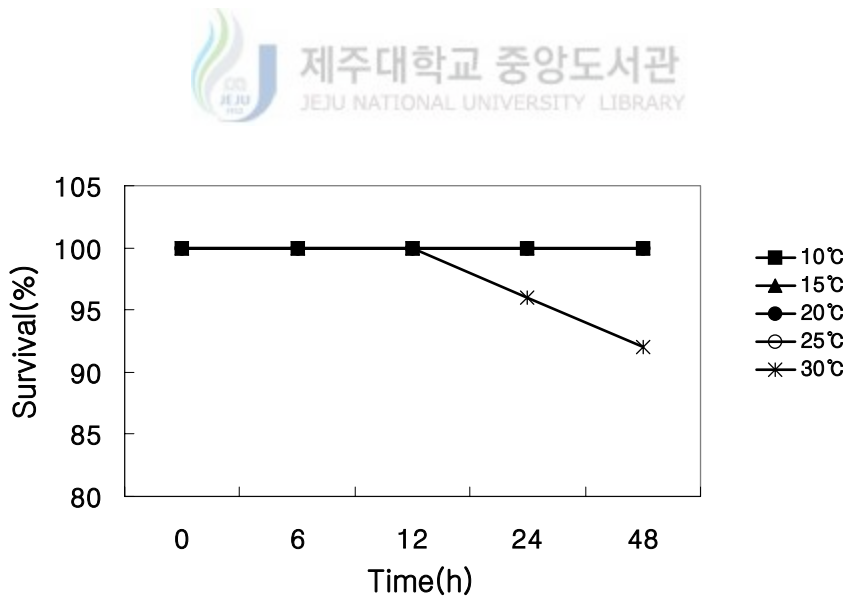


Fig. 8. Survival rates of the juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to acute Water-temperature stress.

2. 수온자극에 의한 혈림프 수의 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 참전복 혈림프 수의 변화는 10℃ 실험구에서는 대조구(20℃)와 유의차 내에서 비슷한 양상을 나타내었으나, 점차 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었고, 15℃ 실험구의 경우 실험 12 h째까지는 증가하는 경향을 나타내었으나 10℃ 실험구에서 처럼 이 후 감소하는 경향을 나타내었다. 25℃ 실험구의 경우 실험 개시 6 h째에 가장 높은 증가를 나타내다가 이 후 감소하는 경향을 나타내었고, 실험 종료시인 48h째에는 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 30℃ 실험구의 경우에는 실험 개시 12 h째까지 지속적인 증가를 하였으나, 이 후에는 빠르게 감소하는 경향을 나타내었다(Table 4).

Table 4. Variations of hemolymph factors of juvenile abalone (*Haliotis discus hannai*) to exposure of acute water temperature

| | Time(h) | Experimental group | | | | |
|--|---------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 10℃ | 15℃ | 20℃ | 25℃ | 30℃ |
| Hemolymph counts ($\times 10^5$ cell/mm ³) | 0 | 2.09 \pm 0.45 | 2.23 \pm 0.40 | 2.35 \pm 0.80 | 2.68 \pm 1.25 | 2.92 \pm 1.05 |
| | 6 | 2.55 \pm 0.55 | 2.67 \pm 0.75 | 2.20 \pm 0.80 | 2.74 \pm 0.65 | 3.08 \pm 0.80 |
| | 12 | 2.35 \pm 0.35 | 2.53 \pm 0.85 | 2.27 \pm 0.85 | 2.30 \pm 1.10 | 3.70 \pm 0.95 |
| | 24 | 2.02 \pm 0.60 | 2.12 \pm 0.90 | 2.29 \pm 0.85 | 2.21 \pm 0.55 | 2.62 \pm 1.00 |
| | 48 | 1.87 \pm 0.45 | 2.08 \pm 1.05 | 2.31 \pm 0.90 | 2.57 \pm 0.45 | 1.99 \pm 0.65 |

3. 항산화효소 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 SOD 활성은 시간이 경과함에 따라 모든 실험구(10, 15, 25 및 30℃)에서 대조구(20℃)보다 높게 나타났으며, 특히, 10 및 15℃ 실험구에서는 12 h째까지 급격한 활성 증가를 보이다가 24 h째에 감소하였고 48 h째에는 다시 증가하는 경향을 보였다. 25℃ 실험구에서는 12 h째 까지는 큰 활성의 증가를 보이지 않았으나 12 h 이후 급격히 증가하여 48 h째에 모든 실험구와 비교하여 가장 높은 수치를 나타내었고, 30℃ 실험구에서는 24 h째 까지는 뚜렷한 활성의 변화를 보이지 않다가 24 h 이후 급격한 활성의 증가를 나타내었다(Fig. 9, $P < 0.05$). CAT효소 활성의 경우는 0 h째에서는 모든 실험구(10, 15, 25 및 30℃)가 대조구보다 낮은 활성을 나타내었으나, 시간이 경과함에 따라 10℃ 실험구를 제외한 모든 실험구(15, 25 및 30℃)에서 대조구와 비교했을 때 높은 활성을 나타내었다. 15℃의 경우 6 h째까지 급격한 활성의 증가를 보였으며 6 h째 이후에는 큰 폭의 변동을 나타내지는 않았고, 25와 30℃의 경우에서는 시간이 경과함에 따라서 활성이 꾸준히 증가하는 경향을 나타내었고, 특히 30℃의 경우에서는 24 h째 이후로 급격한 활성의 증가를 나타내었다(Fig. 10, $P < 0.05$).

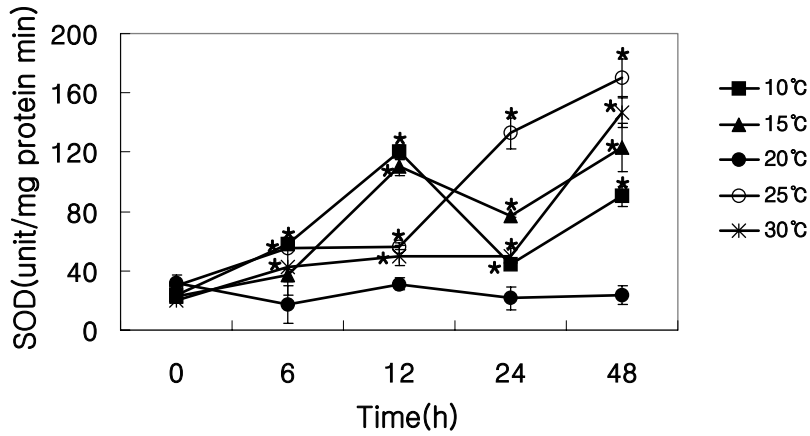


Fig. 9. Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to acute Water-temperature stress. * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

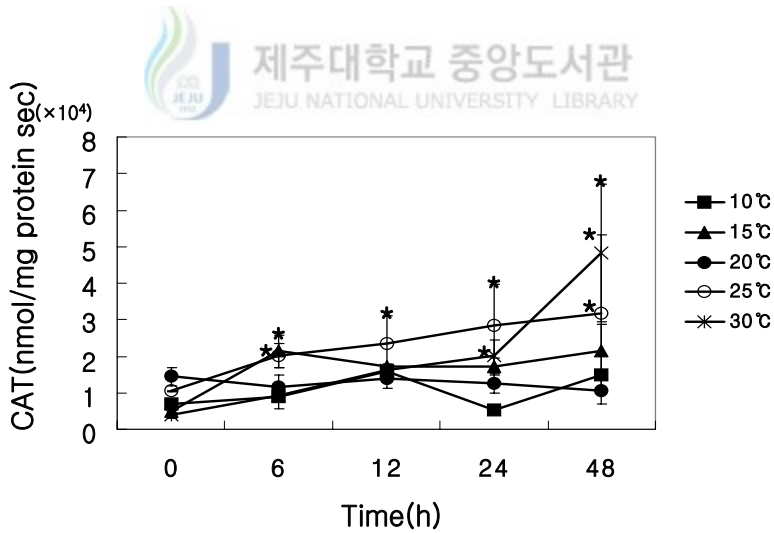


Fig. 10. Changes of catalase (CAT) activity in juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* exposed to acute Water-temperature stress. * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

4. SDS-PAGE 분석결과

급격한 수온 스트레스에 따른 HSP70의 발현여부를 알아보기 위하여 각 수온과 시간대에 따른 참전복의 아가미를 적출하여 SDS-PAGE로 분석해본 결과 30℃ 실험구에서 대조구(20℃)를 비롯한 다른 모든 실험구(10, 15 및 25℃)보다 모든 시간대에서 뚜렷한 HSP70 밴드가 확인되었다(Fig. 11).

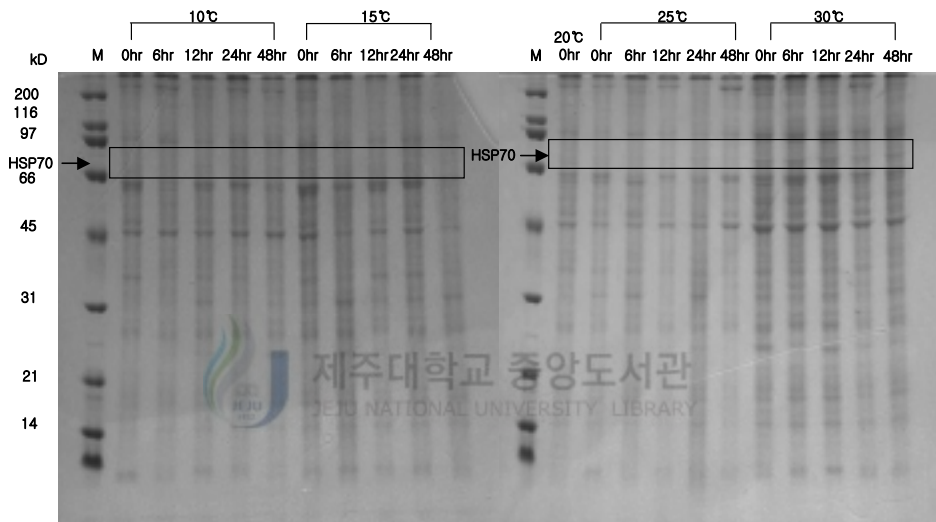


Fig. 11. Heat shock protein 70(HSP-70) in gill of juvenile abalone(*Haliotis discus hannai*) exposed to acute Water-temperature stress. 10% SDS polyacrylamide gels.

5. Western Blot 분석 결과

뚜렷한 HSP70 밴드가 나타난 30℃ 실험구와 25℃ 및 대조구(20℃)를 SDS 전기영동 후 Western Blot를 실시한 결과 30℃ 실험구에서 HSP 70을 비롯한 HSP67과 HSP 74 밴드를 확인 할 수 있었다. 그러나, 25℃ 실험구 및 대조구에서는 뚜렷한 HSP 밴드를 확인 할 수 없었으며, 25℃ 48 h째 실험구에서 희미한 HSP70 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 12).

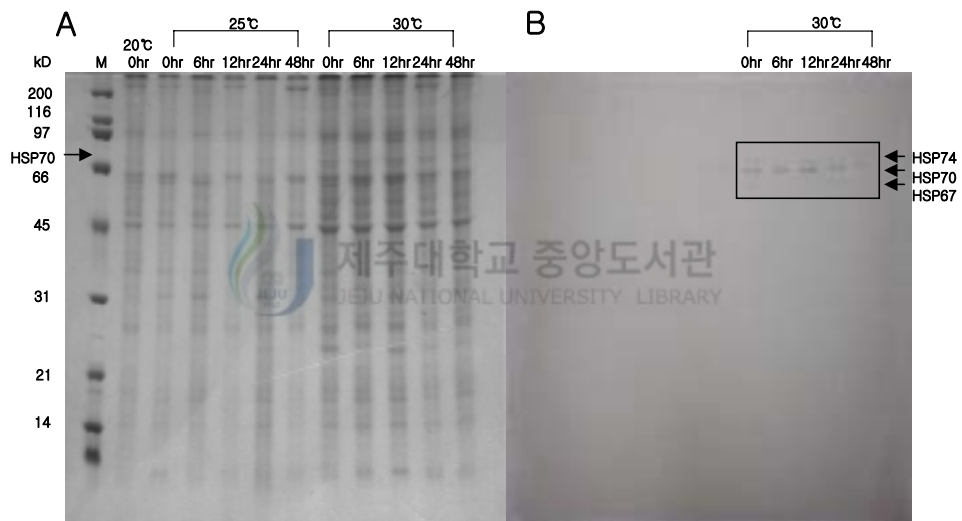


Fig. 12. Immunodetection of heat shock protein 70(HSP-70) in gill of juvenile abalone(*Haliotis discus hanai*) exposed to acute Water-temperature stress. 10% SDS polyacrylamide gels (A) and Western blots (B).

6. 수온변화 시간에 따른 HSP70 mRNA의 양적 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 HSP70의 변화를 관찰하기 위하여 수온과 시간대 별로 간부위의 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR를 통한 HSP70 mRNA의 발현은 30℃에서는 대조구에 비하여 모든 실험기간동안 HSP70 mRNA가 강하게 발현되는 것이 확인되었다. 그러나 25℃에서는 뚜렷한 HSP70 mRNA의 발현이 나타나지 않았으며, 10℃의 경우 0 h째와 12 h째에 HSP70 mRNA가 약하게 발현되었으며, 15℃의 경우 0 h째에 HSP70 mRNA가 약하게 발현되었다(Fig. 13). 가장 뚜렷한 HSP70 mRNA의 발현을 나타낸 30℃에서의 발현정도를 β -actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과, HSP70 mRNA 발현양은 12 h째 까지 상승하다가 12 h째 이후에는 증가되지 않고 지속적으로 유지되는 경향을 나타내었다(Fig. 14).

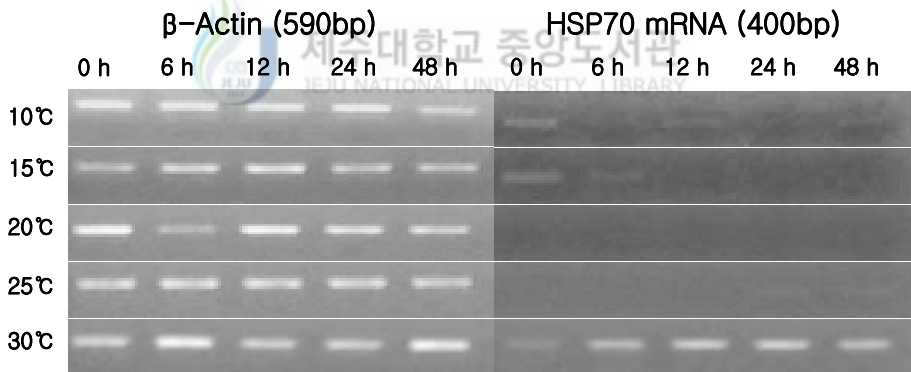


Fig. 13. Effect of acute Water-temperature stress on β -Actin mRNA and HSP-70 mRNA of hepatopancreas in juvenile abalone (*Haliotis discus hannai*).

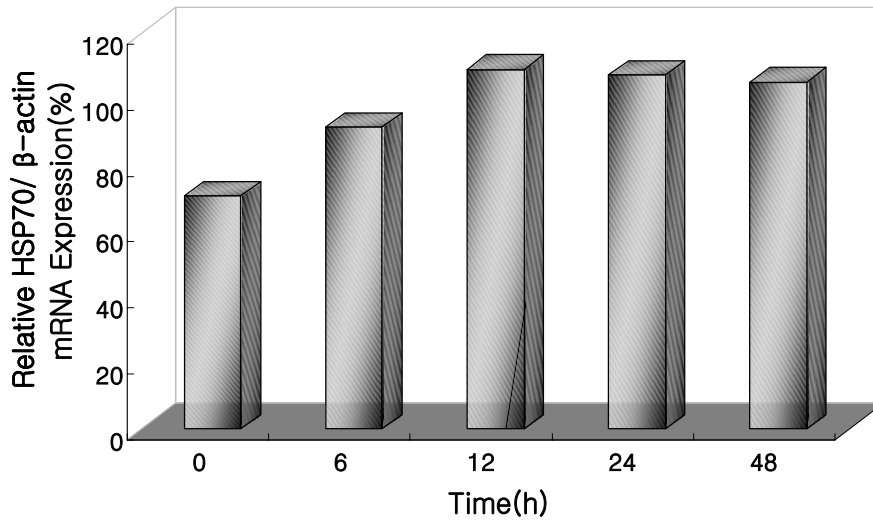


Fig. 14. Effect of acute Water-temperature (30°C) stress on HSP-70 mRNA of hepatopancreas in juvenile abalone (*Haliotis discus hannai*).

II. 시볼트전복(*Haliotis sieboldii*)

1. 수온자극에 의한 생존율의 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 생존율에서는 대조구(20℃)를 비롯한 다른 실험구(10, 15 및 25℃)에서는 실험종료시 까지 폐사된 개체가 발견되지 않아 100%의 생존율을 나타내었으나, 30℃ 실험구에서만 12 h 이후 3마리가 폐사하여 90%의 생존율을 기록하였고, 24 h째에는 전량 폐사하여 0%의 생존율을 나타내었다(Fig. 15).

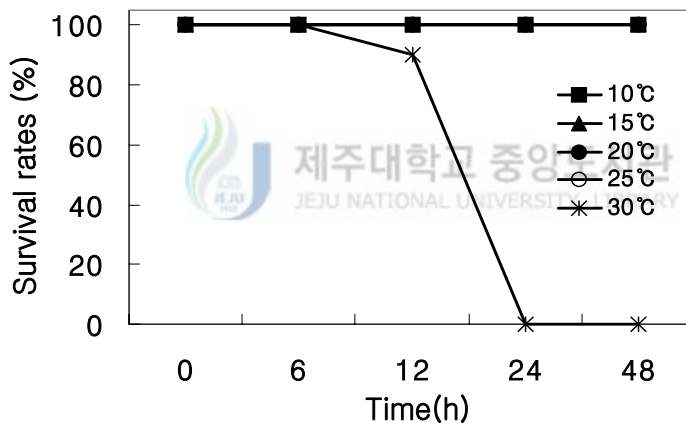


Fig. 15. Survival rates of the juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute Water-temperature stress.

2. 수온자극에 의한 혈림프 수의 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 혈림프 수의 변화는 10℃ 실험구에서는 대조구(20℃)와 비슷한 양상을 나타내었으며, 15℃ 실험구의 경우 실험 0 h째에는 유의적으로 감소하는 경향을 나타내다가 6 h째에는 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었고 실험 종료시 까지 이러한 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 25℃ 실험구의 경우 6 h째에 유의적인 증가를 나타내었으나 이 후 감소하는 경향을 나타내었으며 실험 종료시인 48 h째에는 급격히 증가하는 경향을 나타내었고, 30℃ 실험구의 경우에는 0 h째에는 급격히 증가하였다가 6 h째부터 감소하는 경향을 나타내어 12 h 이 후 전량 폐사하여 더 이상의 측정은 이루어지지 않았다(Table 5).

Table 5. Variations of hemolymph factors of juvenile abalone (*Haliotis sieboldii*) to exposure of acute water temperature

| | Time(h) | Experimental group | | | | |
|--|---------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 10℃ | 15℃ | 20℃ | 25℃ | 30℃ |
| Hemolymph counts (×10 ⁵ cell/mm ³) | 0 | 1.79±0.60 | 1.52±0.20 | 2.25±0.80 | 2.68±1.45 | 3.20±1.05 |
| | 6 | 1.55±0.55 | 3.07±0.95 | 1.80±0.80 | 2.74±0.75 | 1.78±1.10 |
| | 12 | 1.95±1.35 | 2.43±1.85 | 1.75±0.85 | 1.90±1.20 | 1.70±1.05 |
| | 24 | 1.98±0.90 | 2.92±0.90 | 2.20±0.85 | 1.71±0.35 | |
| | 48 | 1.90±0.60 | 3.37±1.45 | 2.43±0.90 | 3.57±0.75 | |

3. 항산화 효소 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 SOD 활성은 실험 0 h째에는 30℃ 실험구를 제외한 모든 실험구(10, 15 및 25℃)에서 대조구(20℃)보다 낮게 나타났으나, 10 및 15℃ 실험구에서는 12 h 이 후 24 h째에는 급격한 활성 증가를 보이다가 48 h째에 감소하였다. 또한, 25℃ 실험구에서는 전 실험 기간동안 대조구(20℃)보다 낮은 활성을 나타내는 경향을 나타내었으며, 30℃ 실험구의 경우에는 실험 개시 후부터 실험 개체가 전량 폐사한 12 h째까지 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 16, $P < 0.05$). CAT 효소 활성의 경우는 0 h째에서는 10 및 25℃ 실험구에서 대조구보다 낮은 활성을 나타내었고, 시간이 경과함에 따라 10℃ 실험구는 증가하는 경향을 나타내다가 24 h 이후에는 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 또한, 15℃ 실험구에서는 6 h과 24 h째에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 25℃ 실험구의 경우 실험 개시 시인 0 h과 6 h째에는 대조구(20℃)보다 낮은 활성을 나타내었으나, 점차 회복하는 경향을 나타내다가 48 h째에 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고, 30℃ 실험구의 경우 6 h째부터 유의적으로 감소하는 경향을 나타내다가 12 h 이후 전량 폐사하였다(Fig. 17, $P < 0.05$).

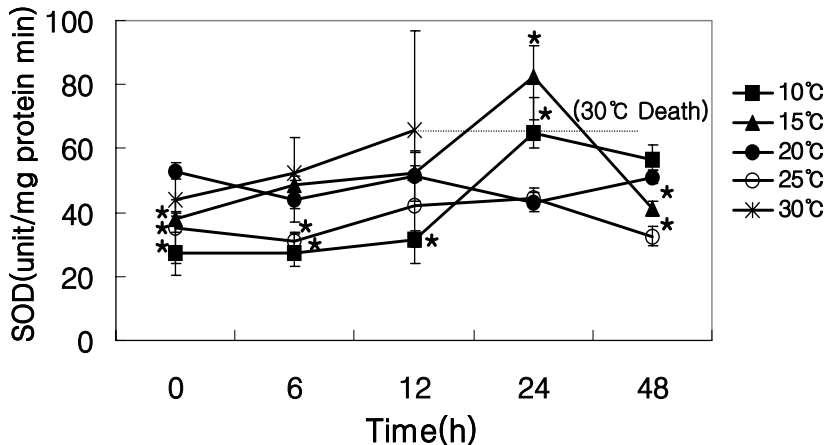


Fig. 16. Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute Water-temperature stress. * $P < 0.05$ as compared to control (20℃).

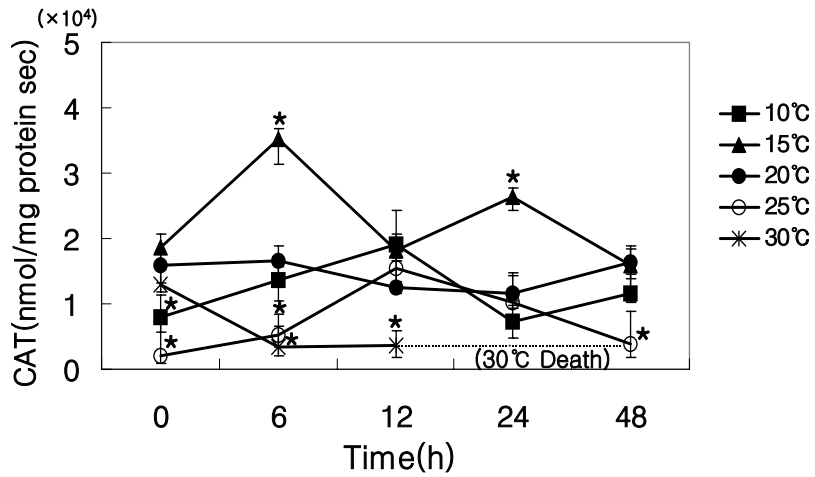


Fig. 17. Changes of catalase (CAT) activity in juvenile abalone, *Haliotis sieboldii* exposed to acute Water-temperature stress.
 * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

4. SDS-PAGE 분석결과

급격한 수온 스트레스에 따른 HSP70의 발현여부를 알아보기 위하여 각 수온과 시간대에 따른 시볼트전복의 아가미를 적출하여 SDS-PAGE로 분석해본 결과 30℃ 실험구에서 대조구(20℃)를 비롯한 다른 모든 실험구(10, 15 및 25℃)보다 뚜렷한 HSP70 밴드를 확인할 수 있었으며, 시간이 지남에 따라 밴드가 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 18).

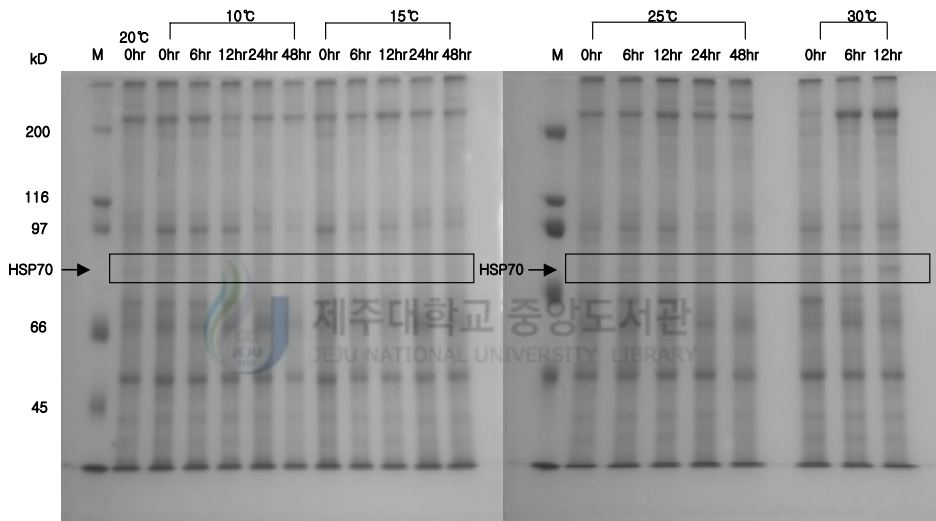


Fig. 18. Heat shock protein 70(HSP-70) in gill of juvenile abalone(*Haliotis sieboldii*) exposed to acute Water-temperature stress. 7.5% SDS polyacrylamide gels.

5. 수온변화 시간에 따른 HSP70 mRNA의 양적 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 HSP70의 변화를 관찰하기 위하여 수온과 시간대 별로 아가미 조직에서 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR를 통한 HSP70 mRNA의 발현은 20℃(대조구)와 25℃ 48 h 시간점을 제외한 모든 실험구에서 HSP70 mRNA가 발현되는 것이 확인되었다. 특히, 30℃에서는 가장 뚜렷한 HSP70 mRNA의 발현이 나타났으며, 6 h째까지 발현이 높게 나타나다가 12 h째 발현이 감소하였고, 이후 모두 폐사하였다. 25℃ 실험구의 경우 6 h째까지 일정한 HSP70 mRNA의 발현을 나타내었으나 12 h째에 감소하기 시작하여 24 h째에는 발현이 나타나지 않았다. 또한, 저수온 스트레스인 10과 15℃인 경우 10℃에서는 실험 개시부터 종료시인 24 h까지 HSP70 mRNA가 일정하게 계속 발현되었으며, 15℃ 실험구의 경우 12 h째에 조금 감소하여 발현되는 경향을 나타내었다(Fig. 19). HSP70 mRNA의 발현정도를 β -actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과, 저수온 스트레스 실험구인 10과 15℃ 실험구에서는 15℃ 실험구보다 10℃ 실험구에서 높은 발현을 나타내었으며 두 실험구 모두 실험개시부터 종료시 까지 일정한 발현을 나타내었고, 고수온 스트레스인 25와 30℃ 실험구의 경우 30℃ 실험구에서 0과 6 h째에 가장 높은 HSP70 mRNA 발현양을 나타내었으며, 25℃ 실험구의 경우 12 h째 까지 일정한 발현을 나타내다가 24 h째부터 점차 감소하기 시작하여 48 h째에는 발현이 나타나지 않았다(Fig. 20).

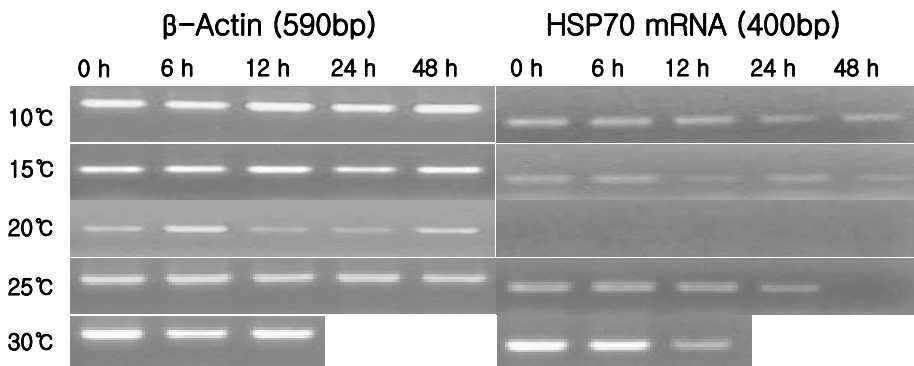


Fig. 19. Effect of acute Water-temperature stress on β -Actin mRNA and HSP70 mRNA of gill in juvenile abalone (*Haliotis sieboldii*).

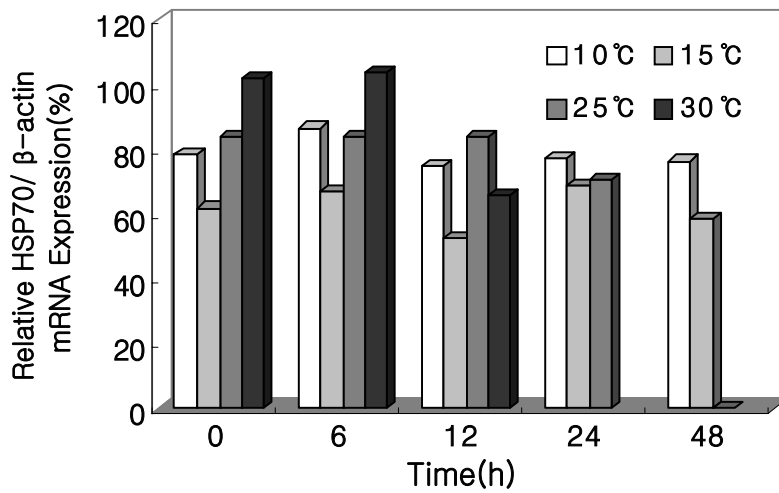


Fig. 20. Effect of acute Water-temperature stress on HSP70 mRNA of gill in juvenile abalone (*Haliotis sieboldii*).

Ⅲ. 오분자기(*Haliotis diversicolor aquatilis*)

1. 수온자극에 의한 생존율의 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 오분자기의 생존율에서는 대조구(20℃)를 비롯한 다른 실험구(10, 15 및 25℃)에서는 실험종료시 까지 폐사된 개체가 발견되지 않아 100%의 생존율을 나타내었으나, 30℃ 실험구에서만 12 h 이후 3마리가 폐사하여 90%의 생존율을 기록하였고, 24 h째에는 4마리가 더 폐사하여 76%의 생존률을 기록하였으며, 마지막 48 h째에는 2마리만 생존하고 전량 폐사하여 6%의 생존율을 나타내었다(Fig. 21).

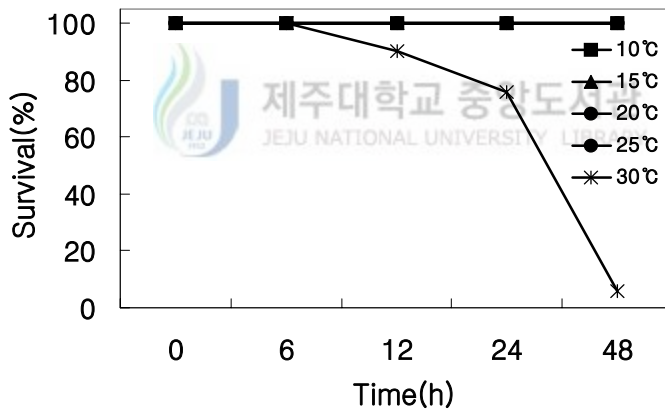


Fig. 21. Survival rates of the abalone, *Haliotis diversicolor aquatilis* exposed to acute Water-temperature stress.

2. 수온자극에 의한 혈림프 수의 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 오분자기 혈림프 수의 변화는 10℃ 실험구에서는 실험개시 후 0 h째에는 감소하는 경향을 나타내었으나, 실험이 진행될수록 점차 증가하여 24 h째에는 대조구(20℃)와 비슷한 수준으로 회복되었으며, 48 h 이 후에는 다시 감소되는 경향을 나타내었다. 15℃ 실험구의 경우에는 실험개시 후 0 h째에는 대조구보다 높아지는 경향을 나타내었으나, 시간이 지날수록 점차 감소하여 유의오차내의 대조구와 비슷한 수준으로 회복되는 경향을 나타내었으며, 25℃ 실험구의 경우 6 h째까지는 증가하는 경향을 나타내었으나, 24 h째에는 유의적으로 낮아지며, 48 h 이후에 대조구와 비슷한 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다. 30℃ 실험구의 경우에는 실험 개시시인 0 h째에는 다소 감소하는 양상을 나타내었으나, 이 후에는 25℃와 같은 양상으로 6 h째까지는 증가하는 경향을 나타내었으며, 실험이 진행될수록 계속 감소하여 폐사되는 개체가 나타나기 시작하는 시점인 12 h째부터는 대조구보다 유의적으로 낮게 감소되는 경향을 나타내며, 실험 종료시인 48 h째까지 감소하는 경향을 나타내었다(Table 6, $P<0.05$).



Table 6. Variations of hemolymph factors of abalone (*Haliotis diversicolor aquatilis*) to exposure of acute water temperature

| | Time(h) | Experimental group | | | | |
|--|---------|--------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| | | 10℃ | 15℃ | 20℃ | 25℃ | 30℃ |
| Hemolymph counts ($\times 10^5$ cell/mm ³) | 0 | 1.05±0.30 | 1.82±0.40 | 1.45±0.40 | 1.85±0.45 | 1.09±0.15 |
| | 6 | 1.26±0.25 | 1.06±0.35 | 1.54±0.40 | 1.99±0.35 | 1.96±0.40 |
| | 12 | 0.99±0.35 | 0.95±0.45 | 1.55±0.45 | 1.22±0.35 | *0.52±0.35 |
| | 24 | 1.52±0.15 | 1.32±0.25 | 1.80±0.35 | *0.86±0.55 | *0.50±0.35 |
| | 48 | 0.92±0.30 | 1.17±0.35 | 1.40±0.50 | 1.32±0.25 | *0.44±0.30 |

* Asterisks indicate significant difference from the control ($P<0.05$)

3. 항산화 효소 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 오분자기의 SOD 활성은 실험 0 h째에는 25℃ 실험구를 제외한 모든 실험구(10, 15 및 30℃)에서 대조구(20℃)보다 높게 나타났으나, 10 및 15℃ 실험구에서는 6 h 이 후 24 h째까지 급격한 활성 감소를 보이다가 48 h째에 다소 증가하였다. 또한, 30℃ 실험구에서는 6 h째까지 증가하는 경향을 나타내었으나, 폐사된 개체가 나타나는 시점인 6 h 이 후 12 h째부터는 급격히 감소하는 경향을 나타내었으며, 25℃ 실험구의 경우 전 실험 기간동안 대조구(20℃)와 비슷한 활성을 나타내는 경향을 나타내었다(Fig. 22, $P<0.05$). CAT효소 활성의 경우는 0 h째에서는 10 및 15℃ 실험구에서 대조구보다 높은 활성을 나타내었고, 시간이 경과함에 따라 10℃ 실험구는 감소하는 경향을 나타내다가 24 h 이후에는 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 15℃ 실험구에서는 12 h째까지 감소하는 경향을 나타내었으나, 24 h 이후부터는 대조구와 비슷한 수준으로 회복되는 경향을 나타내었고, 25℃ 실험구의 경우 실험 개시 시인 0 h째부터 계속 증가하는 경향을 나타내다가 24 h째 이 후에는 감소하는 경향을 나타내었으나 대조구(20℃)와 유의오차 내에서의 비슷한 수치를 나타내었다. 그리고, 30℃ 실험구의 경우 6 h째까지는 증가하는 경향을 나타내었으나, 이 후에는 감소하는 경향을 나타내다가 폐사 개체가 나타나는 12 h 이후 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 24 h 이 후 유의적으로 낮은 수치를 기록하였다(Fig. 23, $P<0.05$).

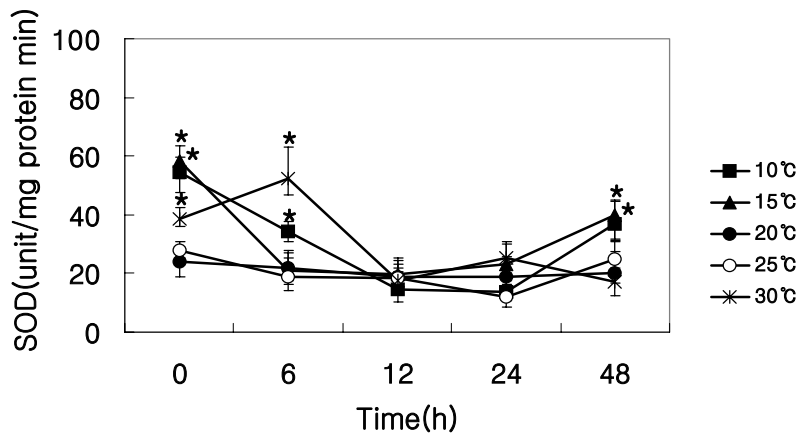


Fig. 22. Changes of superoxide dismutase (SOD) activity in abalone, *Haliotis diversicolor aquatilis* exposed to acute Water-temperature stress. * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

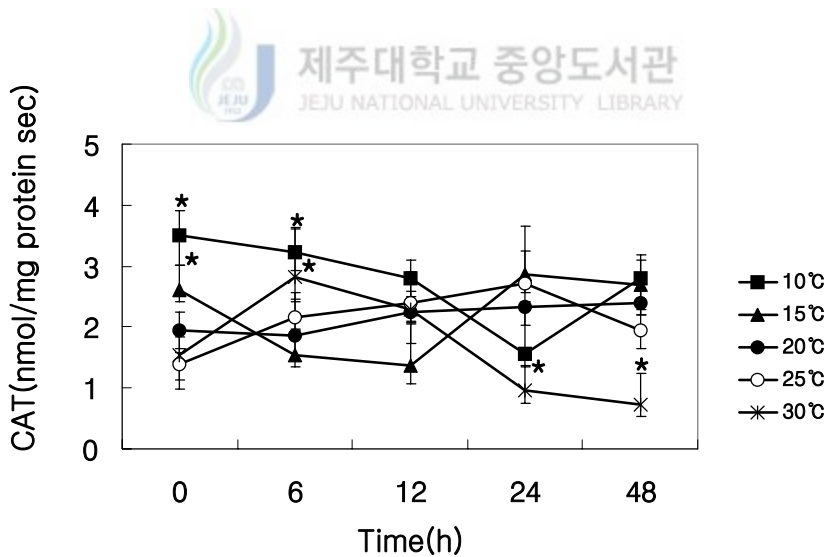


Fig. 23. Changes of catalase (CAT) activity in abalone, *Haliotis diversicolor aquatilis* exposed to acute Water-temperature stress. * $P < 0.05$ as compared to control (20°C).

4. SDS-PAGE 분석결과

급격한 수온 스트레스에 따른 HSP70의 발현여부를 알아보기 위하여 각 수온과 시간대에 따른 오분자기의 아가미를 적출하여 SDS-PAGE로 분석해본 결과 모든 실험구에서 대조구(20℃)보다 뚜렷한 HSP70 밴드가 확인되었다(Fig. 24).

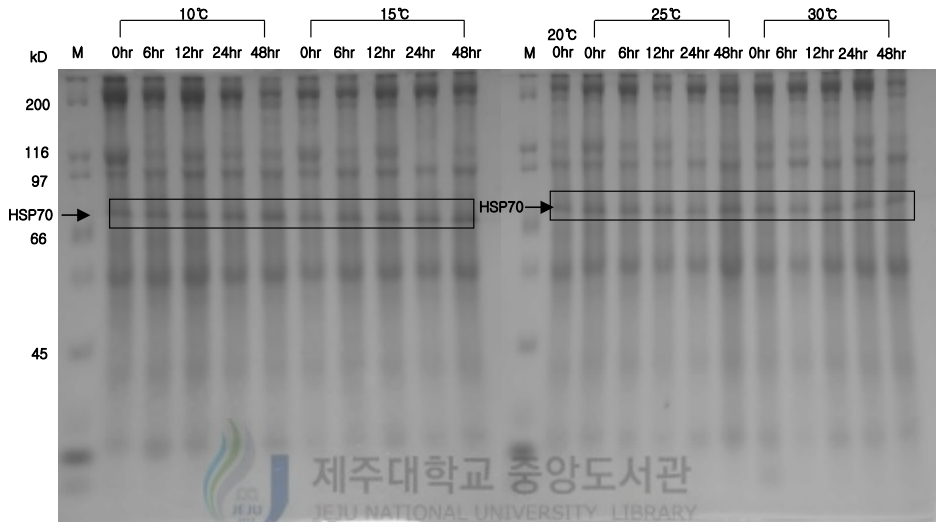


Fig. 24. Heat shock protein 70(HSP-70) in gill of juvenile abalone(*Haliotis diversicolor aquatilis*) exposed to acute Water-temperature stress. 7.5% SDS polyacrylamide gels.

5. 수온변화 시간에 따른 HSP70 mRNA의 양적 변화

급격한 수온 스트레스에 따른 HSP70의 변화를 관찰하기 위하여 수온과 시간대 별로 오분자기의 아가미 조직 샘플을 적출하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 RT-PCR를 통한 HSP70 mRNA의 발현은 10°C 실험구 6 h과 12h, 15°C 실험구 6 h, 20°C(대조구) 실험구 전구간, 25°C 실험구 6 h 이후 전 구간과 30°C 실험구 48 h 시간대를 제외한 모든 실험구에서 HSP70 mRNA가 발현되는 것이 확인되었다. 특히, 30°C에서는 가장 뚜렷한 HSP70 mRNA의 발현이 나타났으며, 0 h째에서 발현이 가장 높게 나타나다가 6 h째부터 발현이 감소하는 경향을 나타내다가 48 h째에는 발현이 나타나지 않았고, 25°C 실험구의 경우 0 h째에 뚜렷한 HSP70 mRNA의 발현을 나타내었으나 6 h째부터는 발현이 나타나지 않았다. 또한, 저수온 스트레스인 10과 15°C인 경우 10°C에서는 실험 개시시인 0 h째에 발현이 나타났으나 이후 6 h과 12 h째에는 발현이 나타나지 않다가 24 h째부터 발현이 되어 48 h째에 높은 HSP70 mRNA 발현을 나타내었고, 15°C 실험구의 경우 10°C 실험구와 비슷한 발현 양상을 나타내었으나 15°C 실험구와는 달리 12 h째부터 발현이 나타나 실험 종료시까지 점점 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 25). HSP70 mRNA의 발현정도를 β -actin mRNA를 기준으로 나타낸 결과, 저수온 스트레스 실험구인 10과 15°C 실험구에서는 15°C 실험구보다 10°C 실험구에서 다소 높은 발현을 나타내었으며 두 실험구 모두 실험개시시인 0 h째에는 발현이 나타났으나, 6 h 이후부터 12 h째까지는 발현이 나타나지 않다가 다시 발현이 증가하며 종료시 까지 일정한 발현을 나타내었고, 고수온 스트레스인 25와 30°C 실험구의 경우 30°C 실험구에서 0과 6 h째에 가장 높은 HSP70 mRNA 발현양을 나타내다가 다소 감소하는 양상을 나타내었으며, 25°C 실험구의 경우 0 h째에 높은 발현을 나타내다가 이후 48 h째까지 발현 양상이 나타나지 않았다(Fig. 26).

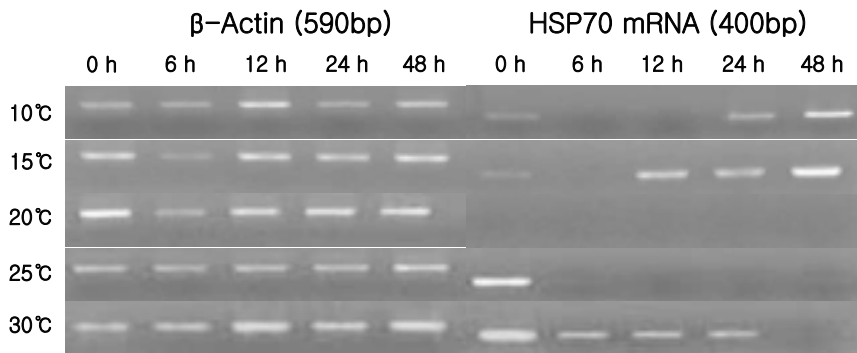


Fig. 25. Effect of acute Water-temperature stress on β -Actin mRNA and HSP-70 mRNA of hepatopancreas in abalone (*Haliotis diversicolor aquatilis*).

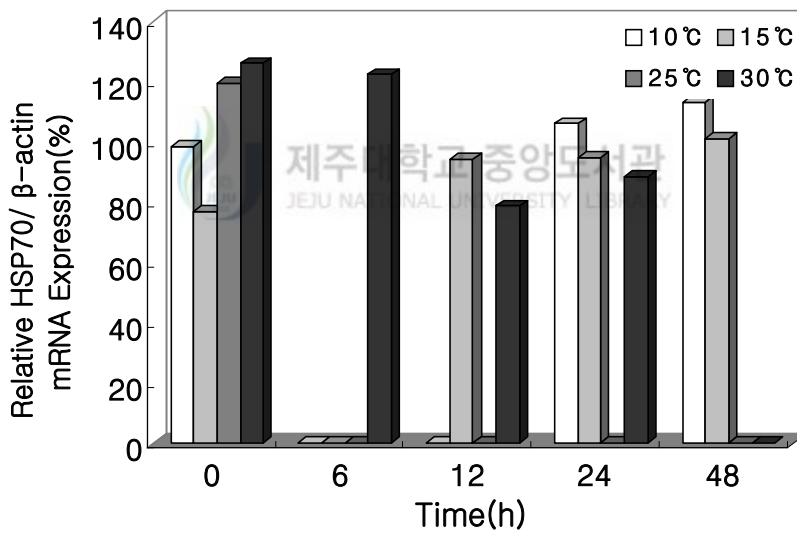


Fig. 26. Effect of acute Water-temperature stress on HSP70 mRNA of gill in abalone (*Haliotis diversicolor aquatilis*).

VI. 고 찰

서식하는 수역대와 종이 서로 다르다고 알려진 참전복, 시볼트전복, 오분자기를 20℃에서 2주에서 2개월간 순치시킨 후, 수온수온별(10, 15, 20(대조구), 25 및 30℃)에서 적응기간별(0, 6, 12, 24 및 48 h)로 혈구와 아가미 간부위 샘플을 채취하여 수온 스트레스에 대한 생리학적 변화를 조사하였다. 참전복에서 생존율을 조사한 결과 30℃ 실험구에서만 12 h 이후 2마리가 폐사하여, 30℃ 실험구에서 12 h 이후 폐사가 이루어지기 시작하여 24 h째에 전량 폐사한 시볼트전복과 12 h 이후 폐사가 시작되어 48 h째에는 2마리가 최종적으로 생존한 오분자기보다 급격한 수온 스트레스에 대한 저항력이 높게 나타났다. 이는 30℃ 고수온에서는 20℃에서 순치된 개체라도 12 h째부터 생리적인 한계점에 도달하고 있음을 간접적으로 보여주는 것으로 판단되며, 우리나라 남해안 및 제주도 근해에서 서식한다고 알려진 시볼트전복과 오분자기보다 우리나라 전역에 서식한다고 알려진 참전복이 급격한 수온 변화에서 적응력이 강하다는 것을 보여주는 결과라 여겨진다. 또한 참전복은 본 실험에서 사용된 전복들중 가장 얕은 수심에 서식한다고 알려져 있으며, 이는 다른 종보다 수온변화가 많은 환경에 서식하는 참전복이 급격한 수온 변화에 대해 다른 종보다 적응력을 갖을 수 있는 요인이라 여겨진다.

또한 본 실험에서는 스트레스와 대사의 지표로 많이 사용되는 혈액 샘플(Cho et al., 2002; Vijayan and Moon, 1994)을 전복의 심장 옆 혈관에서 주사기를 이용하여 채취한 뒤, 혈림프(Hemolymph)를 계수하여 급격한 수온 스트레스에 따른 혈림프 수의 변화를 조사하였는데, 패류의 혈림프는 상처의 수복, 패각의 재생, 영양물질의 소화와 수송, 배설 및 생체방어에 관여한다고 알려져 있다. 그 결과 참전복과 시볼트전복에서는 개체간의 유의적인 차이는 나타나지 않았고 오분자기 25℃ 실험구 24 h째와 30℃ 실험구 12 h 이후 48 h째에만 유의적인 감소를 나타내었다. 그러나 참전복에서는 급격한 수온 스트레스에 대해 혈림프의 변화가 거의 나타나지 않았으며 30℃ 실험구의 경우 24 h째까지 증가하는 경향을 나타내다가 이후 급격히 감소하는 경향을 나타내었는데, 이는 참전복에서 급격한 수온스트레스에 대한 폐사가 나타나기 시작하

는 시점인 24 h제인 결과와 상관관계를 나타내는 결과라 여겨진다. 시볼트전복에서는 급격한 수온 스트레스 초기에 많은 스트레스 요인으로 작용하는 것으로 나타났으며, 저수온 스트레스인 경우 혈림프 생성을 저해하는 생리 활성이 나타나고, 고수온 스트레스일 경우 혈림프 생성을 많이 하는 생리 활성이 효과가 나타났다. 하지만, 고수온 스트레스의 경우 일정 시간이 지남에 따라 혈림프 생성이 억제 되어 대조구 실험구인 20℃ 실험구의 수준으로 회복하는 경향을 나타내었으나, 25℃ 실험구의 경우 24 h 이후에 혈림프 생성이 급격히 증가하는 것으로 나타났고, 저수온 스트레스인 15℃ 실험구의 경우 초기 저해 되었던 혈림프 생성이 시간이 지남에 따라 증가 되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 시볼트 전복이 초기 급격한 수온 스트레스에 대한 생리 반응이 시간의 지남에 따라 회복 반응으로 나타나는 것으로 보여지며, 30℃와 같은 고수온 스트레스를 단시간에 급격하게 받게 될 경우 생리적 방어 한계점에 도달해 유의적인 혈림프 수의 증감 없이 폐사되는 것으로 보여진다. 마지막으로 오분자기의 경우 급격한 수온스트레스에 대해 5℃ 내외의 수온 스트레스 상황에서는 혈림프 수가 증가하는 경향을 나타내었고, 10℃ 내외의 스트레스에서는 혈림프 수가 감소하는 경향을 나타내었으며, 모든 실험구에서 급격한 수온 스트레스가 혈림프 수의 증감에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 특히, 폐사가 나타나는 실험구인 30℃ 실험구의 경우 폐사된 개체가 나타나는 시점인 12 h째 이후 급격한 감소가 나타났는데, 이는 참전복과 시볼트전복에서도 마찬가지로 체내 스트레스에 대해 방어의 한계점에서는 혈림프 수가 급격히 줄어들어 폐사에 이르게 되는 것으로 여겨지는 결과이며, 전복의 체내에서 방어가 이루어 질 수 있는 스트레스 상황에서는 체내에서 혈림프를 조절하여 스트레스에 대해 저항한다는 것을 나타내는 결과라 여겨진다.

스트레스에 의해 발생하는 활성산소는 어떤 유해물질이나 약물 등에 노출되었을 때 병적 상태에서는 이들이 과다하게 생성되어 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있다 (Goldberg and Stern, 1977; Simon et al., 1981; Moody and Hassan, 1982). 이런 생체에서 발생하는 활성산소에 의한 단백질, 핵산 및 생체막 손상은 SOD 및 CAT 등 항산화효소에 의해 방어된다. 항산화효소의 방어 기작을 보면 SOD 및 CAT는 활성산소를 보다 안정된 물질로 환원시키는데, 그 중 SOD는 superoxide radical (O_2^-)를

H_2O_2 와 O_2 ($2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$)로 전환시키며, 이 전환된 H_2O_2 를 CAT가 O_2 와 H_2O ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$)로 분해하여 활성산소를 형성하기 전에 생체에 무해한 분자들로 전환시킨다(Forman and Fridovich, 1973). 일반적으로 어류에서 이러한 항산화효소는 어종, 조직 및 계절에 따라 항산화 활성이 변화하는 것으로 알려져 있다(Aksnes and Njaa, 1981; Gabryelak et al., 1983; Wdzieczak et al., 1981). 또한 Parihar et al. (1996, 1997)는 온도 증가에 의한 스트레스로 실험 후 4 h까지 SOD 효소활성 등이 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서는 패류인 전복을 이용하여 실험한 결과, 참전복의 경우 SOD 활성은 모든 실험구에서는 증가하는 경향을 나타내었으나, 고수온에서 12 h 이후 급격한 상승을 나타내었으며, 저수온에서는 수온 스트레스 자극 직후에 증가한 후 감소하는 경향을 나타내었고, CAT에 있어서는 고수온에 있어서 지속적인 상승을 나타내었다. 시볼트전복의 SOD 활성은 실험 개시후 0 h째에는 모든 실험구가 대조구 (20°C)보다 감소하는 경향을 나타내었으며, 10 및 15°C 실험구의 경우 24 h째에 가장 높은 활성을 나타내었고, 25°C 실험구의 경우에는 대조구보다 낮은 활성을 나타내었다. CAT 활성 또한, 15°C 실험구를 제외한 전 실험구가 대조구 보다 낮은 활성을 나타내었고, 15°C 실험구 역시 24 h째 이후로는 회복되는 경향을 나타내었다. 오분자기의 SOD 활성은 실험 개시후 0 h째에는 25°C 실험구를 제외한 전 실험구($10, 15$ 및 30°C)에서 증가하는 경향을 나타내었고, 이후 10 및 15°C 실험구의 경우 감소하여 대조구와 비슷한 활성을 나타내다가 48 h째에 다시 증가하는 경향을 나타내었으며, 30°C 실험구의 경우 6 h째까지 증가하는 경향을 나타내다가 12 h째 이후부터는 감소하였고, 25°C 실험구의 경우 대조구와 유의적인 차이는 나타나지 않았다. CAT 활성은 10 및 15°C 실험구의 경우 실험 개시 0 h째에 유의적으로 증가하였다가 점차 낮아지는 경향을 나타내어 48 h째에는 대조구와 비슷한 수준으로 회복되었으며, 30°C 실험구의 경우 6 h째까지 증가하는 경향을 나타냈으나, 이후 감소하여 24 및 48 h째에는 유의적으로 낮은 활성을 나타내었다. 이상의 결과를 보면 20°C 에서 순치된 전복에서 항산화효소의 변화는 전복 종에 따라 다르게 나타나는 것으로 나타났으며, 시볼트전복과 오분자기의 경우 급격한 수온스트레스가 참전복에 비해 많은 스트레스 요인으로 작용한다고 여겨진다. 이러한 이유는 시볼트전복과 오분자기의 서식환경이 참전복에 비해 비교적 수심이 깊고, 수온의 변화가 적은 난류성 환경에서 서식하는데

기인하는 것으로 여겨진다. 또한, 생체나 방어 기작이 가지는 한계를 넘어선 수온 스트레스인 30℃에 노출되었을 경우에는 SOD 활성은 증가하는 경향을 나타내며, CAT 활성은 감소하는 경향을 나타내었는데, 이러한 결과로 비추어 볼 때 30℃와 같은 한계 스트레스 상황에서는 SOD가 superoxide radical를 H₂O₂와 O₂로 전환시키기는 하지만 이 전환된 H₂O₂를 CAT가 O₂와 H₂O로 분해하는 능력이 떨어져 생체내 유해한 활성산소를 제거하지 못하고 있음을 보여주는 결과라 여겨진다. 이상의 결과를 보면 20℃에서 순치된 전복에서의 항산화효소는 저수온으로의 급격한 변화가 보다 빠른 생리적인 순응을 위해 작용하는 데 반하여 고수온에서는 스트레스 초기의 변화에는 생리적인 순응 반응이 나타나지 않지만 12 h 이후에는 급격한 스트레스로 작용하여 순응하기 위해 작용하는 것으로 판단된다. 그러나 이러한 급격한 생리적인 순응에도 불구하고 30℃ 이상의 수온에서는 생리적인 방어 기작을 능가하여 폐사에 이르게 하는 것으로 판단된다.

한편, Snyder et al. (2001)는 31℃에서 1 h의 열충격을 가한 전복의 소화샘을 Western blot 한 결과 세 개의 밴드(HSP67, HSP70 및 HSP74)가 나타난다고 보고하고 있다. 본 연구진에서 참전복의 아가미 샘플을 이용하여 HSP70의 항체를 사용한 결과에서도 30℃ 실험구의 Western blot의 결과에서 HSP70의 밴드 외에 HSP67 및 HSP74가 확인되었다. Amro et al. (2003)은 참굴, *Crassostrea gigas*에서 수온 내성을 증가시키기 위하여 HSP 계열 단백질이 발현되는 것으로 보고하고 있어, 전복에서도 HSP의 발현이 수온 내성에 깊이 관여 하는 것으로 추측된다.

또한, 분자레벨에서의 스트레스 지표로 널리 사용되어 지고 있는 HSP70 mRNA의 발현은 참전복의 경우 30℃의 실험구에서만 모든 시간대(0, 6, 12, 24 및 48 h)에서 HSP70 mRNA가 강하게 발현되었고, 10 및 15℃ 실험구의 경우에는 설정 수온에 도달하는 0 h째에 HSP70 mRNA가 약하게 발현되었다. 시볼트전복의 경우 대조구(20℃)와 25℃ 실험구 48 h째를 제외한 모든 실험구에서 발현되었고, 오분자기에서는 10℃ 6 및 12 h째와 15℃ 6 h째, 25℃ 실험구 0 h째를 제외한 모든 시간대와 30℃ 실험구 48 h째를 제외한 시간대에서 발현이 나타났다. 이러한 결과는 참전복이 경우 급격한 수온 스트레스에 의한 HSP70의 발현은 저수온으로의 변화에서는 생리적으로 스트레스에 대한 빠른 순응을 하는 것으로 판단되나, 10℃ 이상의 수온 상승이 이루

어졌을 때에는 HSP70의 발현량이 급속도로 증가 되어 HSP의 생성 기작이 급속도로 진행되고 이러한 스트레스가 12 h 이상 지속될 경우 생리학적 방어 기작이 한계에 도달하여 폐사에 이르게 될 것으로 추정되며, 시볼트전복의 경우 저수온과 고수온 모두 시볼트전복에서는 많은 스트레스 요인으로 작용한다는 것을 보여주며, 설정 수온에 도달하는 0 h째 부터 HSP70 mRNA가 발현되어 실험 종료시인 48 h째까지도 발현이 계속 나타난 10 및 15°C와 같은 저수온에 대한 회복 반응은 다소 많은 시간이 필요할 수 있다는 것을 간접적으로 보여주는 결과라고 생각된다. 오분자기의 경우에는 10 및 15°C 실험구의 경우 저수온 스트레스가 초기에 스트레스 요인으로 작용하다가 일정시간이 지날수록 많은 스트레스 요인으로 작용하는 것으로 나타났으며, 25°C의 경우 0 h째에는 많은 스트레스 요인으로 작용하였으나 이후 25°C 수온에 적응하여 스트레스 요인으로서 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고, 30°C 실험구의 경우 0 h째에 가장 높음 발현을 나타내다가 점차 발현이 감소하는 것으로 보아 급격한 수온스트레스와 같은 물리적 한계 상황에서는 생체나 방어기작인 HSP70 mRNA가 방어기작으로서 최대한 방어를 하나 시간이 흐름에 따라 방어기작이 한계 상황에 도달하게 되어 폐사에 이르게 되는 것으로 여겨진다.

이상의 결과로, 20°C에서 순치된 시볼트전복과 오분자기는 참전복보다 급격한 수온 스트레스 반응에 민감하게 반응하는 것으로 보여지며, 저수온이나 고수온 스트레스 모두 생체의 활성을 저해하는 효과를 가져올 수 있을 것이라 여겨진다. 그러나 저수온 스트레스의 경우에는 고수온 스트레스가 미치는 생체 방어 기작에 대한 영향보다 적은 영향을 줄 것이라고 생각되며, 25°C 이상의 고수온 스트레스에 노출되었을 때 나타나는 생리학적 방어기작과 비교하여 보다 빠르게 작용하여 순응하는 것으로 생각되어진다. 또한, 시볼트전복의 경우 25°C의 수온 스트레스의 경우에도 실험 종료시인 48 h째에 헴림프 수, SOD 및 CAT등이 급격히 변화하는 것으로 보아 25°C의 수온 스트레스 또한 장기간에 노출되었을 경우 심한 스트레스 요인으로 작용할 수 있을 것이라 여겨진다. 본 실험에 사용된 전복 3종 모두 일정 수온 이상의 고수온에 노출되었을 경우 생체 내 과도한 생리학적 방어기작이 작용하여 항산화효소 및 HSP 발현을 증가시키는 것으로 판단된다. 그러나 이러한 변화에 대한 종합적인 검토를 위해서는 좀 더 장기간에 걸친 연구와 각 장기간의 발현 양상에 대한 세부적인 연구가

추가되어야 할 것으로 판단되며, 더 많은 진복 종들을 대상으로 하여 실험을 진행함으로써 각 진복 종들간의 수온 스트레스에 대한 생리학적 차이점을 알아봐야 할 것이라 여겨진다.



V. 요약

본 연구는 전복, *Haliotis discus hannai*, *Haliotis sieboldii*, *Haliotis diversicolor aquatilis*를 이용하여 급격한 수온변화 스트레스에 따른 각 장기에서 혈림프수의 변화와 항산화효소의 변화, Heat Shock Protein 70(HSP70)의 발현 및 HSP70 mRNA의 변화를 조사하였다. 실험구는 10, 15, 20(대조구), 25 및 30℃로 설정하였으며, 측정 시간은 0, 6, 12, 24 및 48 h 후에 측정 하였다. 그 결과 실험 기간 중의 최종 생존율은 30℃ 실험구에서 참전복이 90%의 생존율을 나타내었고, 시볼트전복이 0%, 오분자기가 6%의 생존율을 기록하였고, 나머지 실험구(10, 15, 20(대조구), 25℃)에서는 100%의 생존율을 기록하였다. 혈림프 수의 변화는 참전복과 시볼트전복에서는 개체간의 유의적인 차이는 나타나지 않았고 오분자기 25℃ 실험구 24 h째와 30℃ 실험구 12 h 이후 48 h째에만 유의적인 감소를 나타내었다. 또한, 참전복에서는 급격한 수온 스트레스에 대해 혈림프의 변화가 거의 나타나지 않았으며, 시볼트전복에서는 급격한 수온 스트레스 초기에 많은 스트레스 요인으로 작용하는 것으로 나타났고, 저수온 스트레스인 경우 혈림프 생성을 저해하는 생리 활성이 나타나고, 고수온 스트레스일 경우 혈림프 생성을 많이 하는 생리 활성이 효과가 나타났다. 하지만, 고수온 스트레스의 경우 일정 시간이 지남에 따라 혈림프 생성이 억제 되어 대조구 실험구인 20℃ 실험구의 수준으로 회복하는 경향을 나타내었으나, 25℃ 실험구의 경우 24 h 이후에 혈림프 생성이 급격히 증가하는 것으로 나타났고, 저수온 스트레스인 15℃ 실험구의 경우 초기 저해되었던 혈림프 생성이 시간이 지남에 따라 증가되는 경향을 나타내었다. 오분자기의 경우 급격한 수온 스트레스에 대해 5℃ 내외의 수온 스트레스 상황에서는 혈림프 수가 증가하는 경향을 나타내었고, 10℃ 내외의 스트레스에서는 혈림프 수가 감소하는 경향을 나타내었으며, 모든 실험구에서 급격한 수온 스트레스가 혈림프 수의 증감에 영향을 미치는 것으로 나타났다. SOD 활성은 참전복의 경우 모든 실험구에서는 증가하는 경향을 나타내었으나, 고수온에서 12 h 이후 급격한 상승을 나타내었으며, 저수온에서는 수온 스트레스 자극 직후에 증가한 후 감소하는 경향을 나타내었고, CAT에 있어서는 고수온에

있어서 지속적인 상승을 나타내었다. 시볼트전복의 SOD 활성은 실험 개시후 0 h째에는 모든 실험구가 대조구(20℃)보다 감소하는 경향을 나타내었으며, 10 및 15℃ 실험구의 경우 24 h째에 가장 높은 활성을 나타내었고, 25℃ 실험구의 경우에는 대조구보다 낮은 활성을 나타내었다. CAT 활성 또한, 15℃ 실험구를 제외한 전 실험구가 대조구 보다 낮은 활성을 나타내었고, 15℃ 실험구 역시 24 h째 이후로는 회복되는 경향을 나타내었다. 오분자기의 SOD 활성은 실험 개시후 0 h째에는 25℃ 실험구를 제외한 전 실험구(10, 15 및 30℃)에서 증가하는 경향을 나타내었고, 이후 10 및 15℃ 실험구의 경우 감소하여 대조구와 비슷한 활성을 나타내다가 48 h째에 다시 증가하는 경향을 나타내었으며, 30℃ 실험구의 경우 6 h째까지 증가하는 경향을 나타내다가 12 h째 이후부터는 감소하였고, 25℃ 실험구의 경우 대조구와 유의적인 차이는 나타나지 않았다. CAT 활성은 10 및 15℃ 실험구의 경우 실험 개시 0 h째에 유의적으로 증가하였다가 점차 낮아지는 경향을 나타내어 48 h째에는 대조구와 비슷한 수준으로 회복되었으며, 30℃ 실험구의 경우 6 h째까지 증가하는 경향을 나타냈으나, 이후 감소하여 24 및 48 h째에는 유의적으로 낮은 활성을 나타내었다. 참전복의 아가미 샘플을 이용하여 HSP70의 항체를 사용한 결과에서도 30℃ 실험구의 Western blot의 결과에서 HSP70의 밴드 외에 HSP67 및 HSP74가 확인되었다. HSP70 mRNA의 발현은 참전복의 경우 30℃의 실험구에서만 모든 시간대(0, 6, 12, 24 및 48 h)에서 HSP70 mRNA가 강하게 발현되었고, 10 및 15℃ 실험구의 경우에는 설정 수온에 도달하는 0 h째에 HSP70 mRNA가 약하게 발현되었다. 시볼트전복의 경우 대조구(20℃)와 25℃ 실험구 48 h째를 제외한 모든 실험구에서 발현되었고, 오분자기에서는 10℃ 6 및 12 h째와 15℃ 6 h째, 25℃ 실험구 6, 12, 24 및 48 h째를 제외한 모든 시간대와 30℃ 실험구 48 h째를 제외한 시간대에서 발현이 나타났다. 이상의 결과로, 20℃에서 순치된 시볼트전복과 오분자기는 참전복보다 급격한 수온 스트레스 반응에 민감하게 반응하는 것으로 보여지며, 저수온이나 고수온 스트레스 모두 생체의 활성을 저해하는 효과를 가져올 수 있을 것이라 여겨진다.

VI. 참고 문헌

- Agnar S. and K. I. Albert, 2003. Size dependent variation in optimum growth temperature of red abalone (*Haliotis rufescens*). *Aquaculture*, 224, 353-362.
- Aksnes, A. and L. R. Njaa, 1981. Catalase, Glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *comp. Biochem. Physiol.*, 69B: 893-896.
- Amro M. H., D. P. Cheney and G. N. Cherr, 2003. Phenotypic plasticity of HSP70 and HSP70 gene expression in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for thermal limits and induction of thermal tolerance. *Biol. Bull.* 205, 160-169.
- Arai, K., H. Tsubaki, Y. Ishitani and K. Fujino, 1982. Chromosomes of *Haliotis discus hannai* Ino and *H. discus* Reeve. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48: 1698-1691.
- Arai, K., K. Fujino and M. kudo, 1988. Karyotype and zymogram differences among three species of the abalones *Haliotis planata*, *H. varia*, and *H. diversicolor diversicolor*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 2055-2064.
- Brown, P. B., K. A. Willson, J. E. Wetzel II and B. Hoene, 1995. Increased densities result in reduced weight gain of crayfish *Orconectes virilis*. *J. World Aquacul. Soc.*, 26, 165-171.
- Chance, B., H. Sice and A. Boveris, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, 59: 527-605.
- Chen, J. C. and W. C. Chen, 2000. Salinity tolerance of *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity and temperature levels. *Aquaculture*, 181, 191-203.
- Cheng W., I. S. Hsiao, C. H. Hsu and J. C. Chen, 2004. Change in water

- temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish & Shellfish Immunology. 17, 235-243.
- Cho, K. S., E. Y. Min and J. C. Kang, 2002. Changes of haematological constituents in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to HCB and PCBs. J. Kor. Fish. Soc., 35, 110-114.
- Drew, B., D. Miller, T. Toop and P. Hanna, 2001. Identification of expressed HSP's in black abalone (*Haliotis rubra leach*) during heat and salinity stresses. J. Shellfish. Research, 20(2), 695-703.
- Ferraris, M., S. Radice, P. Catalani, M. Francolini, L. Marabini and E. Chiesara, 2002. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study. Aquatic Toxicology, 59, 283-296.
- Forman, H. J. and I. Fridovich, 1973. Superoxide dismutase: A comparison of rate constant. Arch. Biochem. Biophys., 158, 396p.
- Gabryelak, T., M. Piatrowska, W. Leyko and G. Peres, 1983. Seasonal variation in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. Comp. Biochem. Physiol., 75C, 383-385.
- Goldberg, B. and A. Stern, 1977. The role of the superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte. Arch. Biochem. Biophys., 178: 218-225.
- Han, S.J., B.R. Kim, S.H. Won and J.W. Kim. 2003. Effect of Urea on the exfoliation of juvenile abalone, *Haliotis discus reeve*. J. Aquaculture. 16(4), 223-228. (in Korean)
- Harris, J. O., G. B. Maguire, S. J. Edwards and D. R. Johns, 1999. Low dissolved oxygen reduces growth rate and oxygen consumption rate of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevis* Donovan. Aquaculture, 174, 265-278.
- Harris, J. O., G. B. Maguire, S. J. Edwards and S. M. Hindrum, 1998. Effect of ammonia on growth and oxygen consumption rate for juvenile greenlip

- abalone, *Haliotis laevigata* Donovan. Aquaculture, 160, 259-272.
- Holliday, J.E., G.L. Allan, and J.A. Nell, 1993. Effects of stocking density for nursery culture of Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*). Aquaculture, 96, 7-16.
- Jung, H.T., Y.S. Kim and S.D. Choi. 2004. The change of total weight and food consumption of abalone, *Haliotis discus hannai* under a vibration and noise. j. Environmental Sciences. 13(6): 581-589. (in Korean)
- Kim, H.Y. 1997. Toxic effects of Phenol on survival and Oxygen consumption of the abalone juvenile, *Haliotis discus hannai*. j. Korean Fish. Soc. 30(3). 496-504.
- Kim, J. K. and J .H. Kim, 2001. Diffusion modeling of cold discharge on costal waters. J. Fish. Mar. Sci. Edu., 13, 132-145.
- Kim, S.K., Y.H. Jung, S.H. Han, Y.S. Oh, M.H. Ko and M.Y. Oh. 2000. Phylogenetic relationship among *Haliotis spp.* distributed in Korea by the RAPD Analysis. Korea J. Genetics 22(1): 43-49.
- Laughlin, R. B. and J. M. Neff, 1980. Influence of temperature, salinity, and phenanthrene (a petroleum derived hydrocarbon) on the respiration of larval mud crabs *Rhithropanopeus harristii*. Est. Coast. Mar. Sci., 10, 655-669.
- Laughlin, R. B. and J. M. Neff, 1981. Ontogeny of respiratory and growth responses of larval mud crabs *Rhithropanopeus harristii* exposed to different temperatures, salinities, and naphthalene concentrations. Mar. Ecol. Prog. Ser., 5, 319-332.
- Laughlin, R. B. and O. Linden, 1983. Oil pollution and Baltic mysid: Acute and chronic effects of the Water soluble fractions of light fuel oil on the mysid shirmp *Neomysis integer*. Mar. Ecol. Porg. Ser., 12, 29-41.
- Lindberg, L.J., 1992. Evolution, distribution and systematics of Haliotidae. In: *Abalone of world: Biology, Fisheries and Culture* S.A. Shepherd and I.M. Thomad, Eds., Blackwells, London, pp. 3-18.

- Lowry O.H., N.J. Rosenbrought., A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Marklund S. and G. Marklund, 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem., 47, 469-474.
- Maule, A. G., R. A. Tripp, S. L. Kaattari and C. B. Schreck, 1989. Stress alters immuno function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). J. Endocrinol, 120, 135-142.
- Mgaya, Y.D. and J.P. Mereer. 1995. The effects of size grading and stocking density on growth performance of juvenile abalone, *Haliotis tuberculata* Linnaeus. Aquaculture. 136, 297-312.
- Moody, C. S. and H. M. Hassan, 1982. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci., 79, 2855-2859.
- Nelson D. P. and L. A. Kiesow, 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). Anal Biochem. 49, 474-478.
- Parihar, M. S., A. K. Dubey, T. Javeri and P. Prakash, 1996. Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. J. Therm. Biol., 21, 323-330.
- Parihar, M. S., T. Javeri, T. Hemnani, A. K. Dubey and P. Prekash, 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. J. Therm. Biol., 22, 151-156.
- Pedro E. S., O. Lucia, M. Mario, and B. Horacio, 2004. Effect of temperature on oxygen consumption and ammonia excretion in the Calafia mother-of-pearl oyster, *Pinctada mazatlanica* (hanley, 1856). Aquaculture,

229, 377-387.

- Simon, R. H., C. H. Scoggin and D. Patterson, 1981. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, 256, 7181-7186.
- Shin, Y.K., T.S. Moon and C.H. Wi. 2002. Effects of the dissolved Oxygen concentration on the physiology of the manila clam, *Tegillarca granosa* (Linnaeus). *J. Korean Fish. Soc.* 35(5), 485-489.
- Snyder, M. J., E. Givertz and E. P. Mulder, 2001. Induction of marine mollusk stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41, 22-29.
- Son, M.H., K.C. Cho, K.K. Kim and I.K. Jeon. 2003. Optimum stocking density of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* in recirculating culture system. *J. Aquaculture.* 16(4), 257-261. (in Korean)
- Tsuchiya, M., 1983. Mass mortality in a population of the mussel *Mytilus edulis* L. caused by high temperature on rocky shores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 66, 101-111.
- Vijayan, M. M. and T. W. Moon, 1994. The stress response and plasma disappearance of corticosterone and glucose in a marine teleost sea raven. *Can. J. Zool.*, 72, 379-386.
- Wdzieczak, J., G. Zalesna., A. Bartowiak, H. Witas and W. Leyko, 1981. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase level in erythrocytes of different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68B, 357-358.
- Welch, W. J., 1991. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3, 1033-1038.
- Wendel, A. and S. Feuerstein, 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-1. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem Pharmacol.*, 30, 2513-2520.

- Yang, J.H. and I.K. Yeo, 2004. Physiological studies on acute water-temperature stress of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Kor. J. Ichthyol., 16, 19-26.
- Young, D., E. Roman., C. Moreno., R. O'Brien and W. Born, 1993. Molecular chaperones and the immune response. Phyl. Trans. R. Soc. London, 339B, 363-367.

