

碩士學位論文

면역학적 기법을 이용한 참굴, *Crassostrea*
*gigas*의 산란량 추정에 관한 연구



水産生物學科

姜 尙 均


110 409

2000年 12月

면역학적 기법을 이용한 참굴, *Crassostrea*
gigas 의 산란량 추정에 관한 연구

指導教授 崔 光 植

姜 尙 均

 제주대학교 중앙도서관
이 論文을 理學碩士學位 論文으로 提出함

2000年 12月

姜 尙 均의 理學碩士學位 論文을 認準함

審査委員長 이 제 희



委 員 최 광 식



委 員 이 영 돈



濟州大學校 大學院

2000年 12月

Quantification of Reproductive Output in the
Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, Using
Immunological Method

KANG, Sang-Gyun

(Supervised by professor CHOI, Kwang-Sik)



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

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

DEC. 2000

List of Figures

1. Map showing the location of sampling area, Kosong Bay, Korea.	7
2. Protocol used in the development of immunosorbents for removing cross-reactivity using glutaraldehyde.	14
3. Schematic illustration of indirect ELISA used in quantification of oyster egg protein.	17
4. Gametogenic stage of female oysters.	21
5. Gametogenic stage of male oysters.	23
6. Monthly change in reproductive stage of female and male <i>Crassostrea gigas</i> collected at Kosong Bay from January to August 2000.	25
7. Frequency distribution of reproductive stage of <i>Crassostrea gigas</i> collected at Kosong Bay from January to August 2000.	26
8. Photomicrograph of purified oyster eggs.	28
9. Percent composition of soluble protein, carbohydrate and lipid in various type of tissues.	29

Figures continued.

10. Double immunodiffusion test for examining specificity of the rabbit anti-oyster egg IgG. Interaction of the antiserum before adsorption and after adsorption with oyster eggs extract as test antigen and extracts of different tissues as controls. 1, 2: gill, 3, 4: mantle, 5, 6: adductor muscle, 7, 8: palp, 9, 10, 11, 12: eggs.30
11. ELISA for testing specificity of the rabbit anti-oyster egg IgG. Interaction of antiserum before adsorption and after adsorption with oyster eggs extract as test antigen and extracts of different tissues as controls. G: gill, M: mantle, A: adductor muscle, P: palp.31
12. Interaction of oyster egg proteins with anti-OESP IgG in ELISA. Sensitivity of anti-OESP is about 10 ng/ml ~ 300 ng/ml.32
13. Indirect immunofluorescence for testing specificity of the anti-OESP.33
14. Monthly change in the of gonad somatic index of female *Crassostrea gigas*.35

List of Tables

1. Description of gametogenic stage in <i>Crassostrea gigas</i>	9
2. Summary of immunization protocol.	13
3. Monthly variation of shell length, tissue wet weight and tissue dry weight of <i>Crassostrea gigas</i> collected at Kosong Bay from January to August 2000.	20
4. Summary of monthly mean reproductive output of female oysters measured using ELISA. GSI is total dry weight of eggs (mg) per total dry weight of oyster (mg).	36

목 차

Summary	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	
1. 시료 채집	6
2. 생식세포의 조직학적 관찰	6
3. 면역학적 방법을 이용한 번식량 추정	7
1) 알의 정제	7
2) 알 무게 산정	7
3) 성숙난의 생화학적 조성	10
(1) 단백질 정량	10
(2) 탄수화물 정량	10
(3) 지질 정량	11
4) 항체 제작	11
(1) 항체 제작	11
(2) Ouchterlony Double Immunodiffusion Test	12
(3) 교차반응 제거	12
(4) Anti-OESP (Oyster Egg Specific Protein) Rabbit Immunoglobulin (IgG) 분리	15
(5) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELIAS)	15
5) 면역세포화학적 관찰	16
6) 번식량 추정	16
III. 결 과	
1. 생식세포의 조직학적 관찰	19
2. 면역학적 방법을 이용한 번식량 추정	19
1) 알의 정제	19

2) 항체 개발	27
3) 번식량 추정	27
IV. 고찰	37
V. 요약	40
VI. 참고문헌	42
감사의 글	



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Summary

1. Quantitative measurement of GSI in oyster, *Crassostrea gigas* using immunological technique was successfully developed and applied in this study.
2. To develop polyclonal antibody, eggs were isolated from the ovaries of *C. gigas*. Average dry weight of an individual egg was estimated to be 13 ng. Total soluble protein in oyster egg account for about 41% of the total dry weight.
3. The antigen-antibody reaction was tested with double immunodiffusion, indirect ELISA and immunofluorescence. The rabbit anti-oyster egg IgG initially exhibited a weak cross-reactivity against somatic tissue. Absorbing with immunoabsorbent (glutaric dialdehyde polymerization of oyster tissue) removed this cross-reactivity. Indirect ELISA used in this study indicated that the IgG detects as little as 10 ng/ml of oyster egg protein.
4. The quantity of egg protein was determined from a standard curve constructed using optical densities of various concentrations of oyster egg standards. The total quantity of oyster egg was then estimated as follow: total eggs in an oyster = $2.45 \times$ egg protein in an oyster (determined from indirect ELISA). A gonadal somatic index (GSI) was calculated as the ratio of dry weight of oyster eggs to dry weight of total oyster tissue.

GSI = total dry weight of eggs / total dry weight of oyster

5. The mean number of eggs in female from mid-June was 100 million. The maximum estimated in this study was 200 million eggs.
6. GSI from ELISA correlated with gonadal stage measured histologically. Monthly mean GSI of female oyster was found to be the highest in mid-June (0.423 ± 0.155) and the second highest in late July (0.268 ± 0.108). Highest GSI detected in this study was 0.667 (mid-June).
7. Histological examination of oysters revealed that gonads began to mature in late March and Fully matured in mid-June. Spawning activities of oysters were observed between May and August with two peaks in late June and late August.

I. 서 론

참굴, *Crassostrea gigas*는 연체동물문의 부족강 (Class Pelecypoda), 익형목 (Order Pteriomorphia), 굴과 (Family Ostreidae)에 속하는 종으로, 담수의 영향을 받는 기수 지역이나 만조선의 바위에 붙어살며, 우리 나라와 일본을 비롯한 아시아의 모든 나라에 분포한다 (Melbourne et al., 1996; Muzammil, 1975; 권 등, 1993). 우리 나라의 경우 1950년대부터 굴양식이 시도되었고, 1960년대 말 경남 일원 해역을 중심으로 본격적인 양식이 시작되었다 (최 등, 1997). 그 동안 천해의 소만을 중심으로 굴 양식장이 개발되어 1997년 현재 995건 7,966 ha에 이르며 생산량이 20만톤으로, 우리나라 전체 수산양식 생산고에서 가장 높은 비중을 차지하고 있다 (수산연감, 1998-1999). 양식 개발의 초기에는 시설량의 확대와 더불어 생산량도 증가하였으나, 1990년 이후 굴의 생산량은 해에 따라 변동폭이 크고 불안정한 양상을 나타내고 있다 (배와 한, 1998). 이와 같은 현상은, 우리 나라 굴양식이 주로 내만역인 남해안을 중심으로 시작된 이래 어장노화 현상이 증대되고 빈번한 수질오염에 의한 적조발생과 유류오염 등 어장환경이 악화되고 있기 때문이다. 이와 같은 요인으로 인해 단위 면적당 생산량이 감소하고, 육질부의 비만이 떨어짐은 물론 자연채묘까지 부진한 실정에 있다 (이와 박, 1997).

굴을 포함한 대부분의 해산 이매패류들은 동일종이라도 해수유동, 수온과 염분 등의 물리화학적 환경요인 및 먹이생물과 경쟁생물 등의 생물학적 요인에 의해 성장과 발육, 생물학적 최소 크기 등에 큰 차이를 보인다. 특히, 해수유동은 여과섭식자인 굴의 먹이섭취 활동에 직접적인 영향을 미치는 환경인자로 알려져 있다 (윤, 1996; Loosanoff and Davis, 1953; Wildish and Kristmanson, 1985; Winstead, 1995). 또한 산란은 그 대상 종의 보존뿐만 아니라 동일지역에 서식하는 다른 생물의 먹이로도 중요하며 (Loosanoff, 1965), 번식량 (reproductive output) 및 비만도는 서식지역의 환경오염 및 대상 종의

영양상태와 질병을 monitoring 하기 위한 지표로도 이용된다 (Michael and Galf, 1990). 따라서 해산 이매패류의 번식수단 및 생활사를 이해하기 위해서는, 번식이나 생활사에 관한 속성을 보다 정량적으로 확인하고 동시에 개체군 생태학적인 시각에서 연구되어야 한다 (윤, 1996).

해산 이매패류의 산란에 관한 기존 연구들이 조직학적인 방법과 산란유도에 의한 방법에 국한되어, 생식소와 다른 조직이 구분되지 않는 대다수의 이매패류의 산란을 정량적으로 산정 하는데 어려움이 있다 (Eble and Scro, 1996; Lucas, 1982). 조직학적인 방법으로는 난경을 측정하는 방법, 생식세포의 발달단계를 조직 슬라이드 상에서 관찰하고 수치화 하여 비교하는 방법 (Behzadi et al., 1997; Sprung, 1983; Xie and Burnell, 1994), 전체 단면적에 대한 생식소 단면적의 percent 비율을 계산하는 방법 (Chung et al., 1993), 생식소의 두께를 측정하는 방법 (Loosanoff and Engle, 1942; Loosanoff, 1965) 등이 번식 연구에 널리 이용되어 왔으나, 이러한 방법들은 준정량적인 방법 (semi-quantitative)이고, 시간이 많이 소요되는 단점이 있다. 산란유도에 의한 방법은 수온자극 및 화학약품 처리에 의해 산란된 알을 계수하거나 알의 무게를 측정하는 방법 (Cox and Mann, 1992; Kent et al., 1998)으로 조직학적인 방법에 비해, 직접적인 방법이라고 할 수 있으나, 산란 유도된 알이 개체가 생산한 모든 알을 대표할 수 있는가 하는 문제와 산란 직전의 개체에만 적용이 가능하다는 한계가 있다 (Choi et al., 1993; Cox and Mann, 1992). 또한 굴을 비롯한 대부분의 해산 이매패류들은 생식소가 다른 조직과 구분되지 않으며, 개체군 내 분산형 산란 (asynchronous spawning)이 수 차례에 걸쳐 이루어지기 때문에 Gonad Somatic Index (GSI)를 표현하는데 어려움이 있었다 (Lucas, 1982). 이러한 이유로 육질 건중량, 패각내부피 (shell cavity volume) 및 패각 건중량의 상관관계로 표현되는 비만도(condition index)로 GSI를 대신하였다 (Rainer and Mann, 1992).

이 연구에서는 참굴, *Crassostrea gigas*의 정량적인 번식량을 측정하기 위하여 면역학적인 분석 방법을 사용하였다. 항원과 항체의 특이적인 반응을 이

용한 여러 가지 면역학적인 연구방법은 생물과학분야 전반에서 응용되고 있으며 해양생물학 분야에서도 그 이용이 증가하고 있다 (Paugam et al., 2000). 해양생물의 바이러스 질병 진단이나 기생충 진단 (Montes et al., 1996; Parker and Lewis, 1995; Sitja-Bobadilla and Woo, 1994), 형태학적으로 분류가 어려운 부유 유생의 동정 (Demers et al., 1993; Paugam et al., 2000) 및 해양의 먹이 사슬 연구를 위한 장내용물 분석 (Hentschel and Feller, 1990; Pierce et al., 1990) 등에 많이 이용되었으며, 특히 Suzuki et al. (1992)은 항체를 참굴, *C. gigas*에서 vitellin-like을 분리하는데 이용하였고, Choi et al. (1993, 1994)은 면역학적 분석 방법을 이용하여 대서양 굴, *C. virginica*의 번식량을 정량적으로 측정하였다.

이 연구는 면역학적 분석 방법을 이용하여 참굴, *C. gigas*의 정량적인 번식량을 측정함으로써 참굴의 번식 생리에 관한 기초 자료를 수집하는데 목적을 두었다.



II. 재료 및 방법

1. 시료 채집

채집지역인 경상남도 고성군에 위치한 고성만은 수면적이 약 17.5 km², 수심 약 7 m 내외로 입구는 병목 모양을 하여 자란만과 연결되어 있으며, 우리나라 연승수하식 양식 굴 생산량의 70% 이상을 차지하고 있다 (Fig. 1).

실험에 사용된 참굴, *Crassostrea gigas*는 1998년 6-7월 치패를 바다에서 채묘하여 1년간 조건대에서 단련 과정을 거친 후, 양성장에 옮겨진 3년생 월하 양식 굴로, 총 660개체가 실험에 사용되었다. 먼저, 알에 특이적으로 발현되는 항체의 개발을 위해 1999년 6월 산란기에 성숙한 굴 개체를 채집하여 알을 분리하였다. 조직학적인 관찰과 번식량 (reproductive output)을 추정하기 위해 2000년 1월부터 동년 8월까지 매달 60개체씩을 채집하였으며 특히, 산란기인 5월부터 8월까지의 15일 간격으로 채집하였다.

시료는 실험실로 옮겨서 각장을 버니어캘리퍼스를 이용하여 0.1 mm단위까지 측정하였고, 개각하여 육질을 분리하고 육질중량을 전자저울로 1 mg 단위까지 측정하였다. 육질중량 측정 후, 30개체는 조직슬라이드 제작을 위하여 bouin's fixative에 고정하였고, 나머지 30개체는 번식량 (reproductive output) 추정을 위해 -70℃에서 냉동 보관하였다.

2. 생식세포의 조직학적 관찰

조직학적 관찰을 위한 참굴 시료는 NOAA의 생식세포 분석 방법(Powell, 1993)에 따라 외투강, 생식세포, 소화맹낭 및 아가미 등이 포함되도록 5 mm 두께의 횡단면으로 자른 후 Bouin's fixative에 24~48시간 고정하였다. 고정이

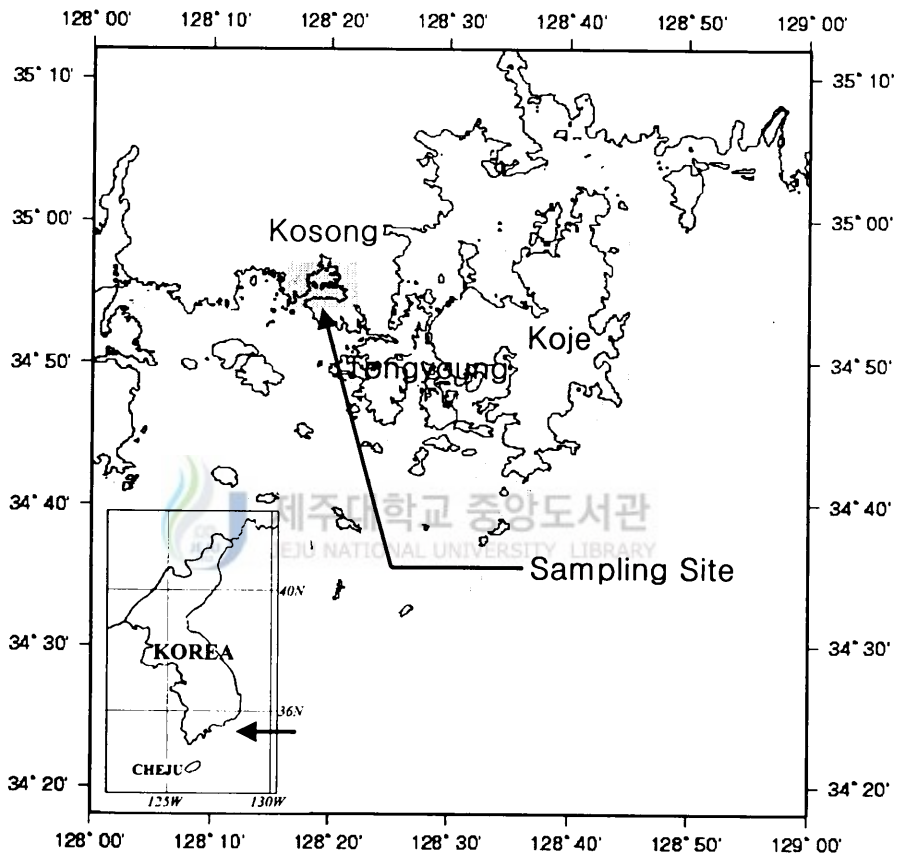


Fig. 1. Map showing the location of sampling area, Kosong Bay, Korea.

완료된 조직은 흐르는 물에 수세한 뒤, 자동 탈수기를 이용하여 탈수하였고 파라핀으로 포매하고 마이크로톰으로 두께 4 μm 의 절편을 제작하였다. 각각의 절편은 Bovine Serum Albumin (BSA)를 접착제로 사용하여 슬라이드 위에 부착하였고 Harris' Hematoxylin과 eosin Y로 비교 염색한 후, 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 생식세포의 발달 정도는 Powell et al. (1993)이 제시한 기준에 따라 7등급으로 구분하여 기록하였다 (Table 1).

3. 면역학적 방법을 이용한 번식량 추정

1) 알의 정제

알의 정제를 위해 사용된 참굴, *Crassostrea gigas* 는 경상남도 고성군 고성만의 연승수하식 양식장에서 산란기인 1999년 6월에 채집하였다. 채집된 굴은 실험실로 옮긴 뒤, 개각하여 육질을 제거하고 스포이드로 생식소를 포함하고 있는 외투강 조직의 일부를 취해서 광학현미경으로 암·수를 구분하였다. 그 중, 성숙한 암컷의 외투강을 절개하여 petri dish에 올려놓고, 생식소 부위를 압박하여 알을 분리하였다. 분리된 알은 일정량의 Phosphate-Buffered Saline (PBS : 0.15 M NaCl, 0.003 M KCl, 0.01 M NaH_2PO_4 , 0.01 M KH_2PO_4 , pH 7.4)과 혼합한 뒤, 망목의 크기가 100 μm 인 체로 거대불순물을 걸러주었다. 알-PBS 혼합액은 다시, 망목의 크기가 60 μm 인 체로 알 이외의 미세 불순물을 제거한 후, 저속으로 원심분리 (1000 R.P.M., 10 min.)하여 상등액 내의 잔여 불순물을 제거하고, PBS로 10회 세척하여 순수 분리하였다. 정제된 알은 광학현미경 관찰 후, 사진 촬영하였다 (Choi et al., 1993).

2) 알 무게 산정

Table 1. Description of gametogenic stage in *Crassostrea gigas*.

Developmental stage	Numerical code	Condition of Gonad
Sexually undifferentiated	1	Little or no gonadal tissue visible
Early development	2	Follicles beginning to expand
Mid-development	3	Follicles expanded and beginning to coalesce; no mature gametes present
Late development	4	Follicles greatly expanded and coalesced, but considerable connective tissue remaining; some mature gametes present
Fully developed	5	Most gametes mature; little connective tissue remaining
Spawning		Gametes visible in gonoducts
	6	Reduced number of gametes; some mature gametes still remaining; evidence of renewed reproductive activity
Spawned	7	Few or no gametes visible; gonadal tissue atrophying

순수 정제된 참굴 알은 40 ml 튜브에서 일정량의 PBS와 혼합시키고, subsample을 취하여 혈구계수기로 4회 반복 계수한 후, 튜브 내 전체 알의 수를 추정하였다. 계수된 참굴 알은 -70 °C에서 냉동시킨 후, 동결건조하여 총건조중량을 측정하였다. 알 하나의 건조중량은 총건조중량을 전체 알의 수로 나누어 추정하였다.

$$\text{Egg dry weight} = \text{Total dry weight of eggs} / \text{Total number of eggs}$$

3) 성숙난의 생화학적 조성

(1) 단백질 정량

단백질은 BCA protein assay kit (Pierce)를 사용하여 정량하였다. 동결 건조된 알을 막자사발에서 1차 분쇄한 후, 분쇄된 시료 10 mg과 PBS 용액 10 ml를 15 ml 원심관에서 혼합하고, 초음파 파쇄기로 1분간 균질화하였다. 균질화된 시료-PBS 혼합액을 원심분리 (7000 R.P.M., 4 °C, 30 min.)하여 상등액을 취한 후, 3회 반복 실험하였다. 희석된 시료 0.1 ml를 각각 표지된 시험관에 옮기고, 시약 (BCA kit) 2.0 ml와 혼합한 뒤, 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 시료 및 표준단백질 0.1 ml와 시약 (BCA kit) 2.0 ml를 37 °C에서 30분 반응시키고, 분광광도계를 이용하여 562 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 단백질로 BSA (2.0 mg/ml)를 100~1000 µg/ml로 희석하여, 시료와 동일한 방법으로, 시약과 반응시키고 각각의 흡광도를 측정한 후, 흡광도에 대한 단백질 농도의 정량곡선을 구하였다. 정량곡선을 이용하여 수용성 단백질의 함량을 추정하고, 알 무게에 대한 퍼센트 값으로 환산하였다.

(2) 탄수화물 정량

동결건조된 알 시료를 일정량의 PBS와 혼합하고 (0.5 mg/ml) 초음파 파쇄기로 균질화시켰다. 균질화된 시료-PBS 혼합액을 원심분리(7000 R.P.M., 4 °C, 30 min.)하여 상등액을 취한 후, 3회 반복 실험하였다. 희석된 시료 1 ml에 10% 페놀 1 ml를 반응시키고 다시, 황산 5 ml와 상온에서 10분간 반응시킨 후, 분광광도계를 이용하여 485 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준 탄수화물로 10% soluble agar를 50~500 µg/ml로 희석하여, 시료와 동일한 방법으로 10% 페놀과 황산에 반응시키고 각각의 흡광도를 측정한 후, 흡광도에 대한 단백질 농도의 정량곡선을 구하였다. 정량곡선을 이용하여 탄수화물 함량을 추정하고, 알 무게에 대한 퍼센트 값으로 환산하였다 (Dubois et al, 1956).

(3) 지질 정량



동결건조된 참굴 알 시료 200 mg을 15 ml의 지질 추출 용매 (Bligh and Dyer, 1959)와 혼합한 뒤, 초음파 파쇄기로 균질화시켰다. 유기용매와 혼합된 시료에 크로로폼 4 ml를 넣고 반응시킨 후, 증류수 4 ml를 넣고 균질화하였다. 공극의 크기가 1.2 µm인 유리섬유필터지 (GF/C Whatman)로 여과하여 불순을 제거하고, 메탄올-증류수 층과 크로로폼-지질 층으로 분리될 때까지 상온에 보관하였다. 이 중 크로로폼-지질 층을 취하여 실온에서 건조시킨 뒤, 전자 저울을 이용하여 지질 함량을 측정하고 알 무게에 대한 퍼센트 값으로 환산했다 (Bligh and Dyer, 1959).

4) 항체 제작

(1) 항체 제작

정량적인 번식량 추정에 사용할 항체 개발을 위해 0.5 mg/ml (in PBS, pH 7.4) 농도의 참굴 알 단백질 추출물 0.5 ml와 동일량의 Freund's Complete Adjuvant (FCA)를 혼합하여 토끼의 등 피하, 대퇴부 및 귀동맥에 주사하였고 2주 후, 동일한 항원 단백질과 Freund's Incomplete Adjuvant (FIA)를 혼합하여 격주 간격으로 3회 주사하였다. 마지막 주사 2주 후, 귀동맥에서 혈액을 채취하고 혈청을 분리하였다 (Table 2).

(2) Ouchterlony Double Immunodiffusion Test

혈청내 항체의 존재 유무와 알 이외의 비 특정 세포와의 교차반응을 확인하기 위하여 Ouchterlony double immunodiffusion test를 이용하였다 (Ouchterlony and Nilsson, 1973). 먼저, agarose 1.5 g과 barbital buffer 100 ml를 혼합하여 자력 가열교반기(100 °C) 위에서 혼합한 후, 53 °C 항온수조에 보관하였다. 수평의 바닥에 완전히 건조된 슬라이드 글라스를 놓고 Agarose Gel solution 4.5 ml를 유리판의 중앙에 부은 후 상온에서 10분, 4 °C에서 15분간 굳혀주었다. 완전히 굳은 agarose gel에 직경 2 mm gel-puncher를 이용하여 well를 만들고, test할 항혈청을 중앙의 well에 넣고 항원인 참굴 알 추출물과 대조구로 다른 부위 조직 추출물 (외투강, 아가미, 폐각근, 순관)을 각각 주변 well에 넣었다. 항혈청과 각각의 항원이 채워진 Agarose Gel을 humid chamber에 안에 넣고 상온에서 24시간 반응시키고, well에 남아 있는 불투과성 물질을 제거하기 위해 증류수로 세척한 후, 항원-항체 반응 침전밴드의 형태를 관찰하였다. 반응이 완료된 gel은 0.025% Coomassie Brilliant Blue 로 염색하였다.

(3) 교차반응 제거

알 이외의 비 특정 세포와의 교차반응은 굴의 번식량을 정량적으로 추정함

Table 2. Summary of Immunization Protocol

Time		Dosage
1st week	Initial injection [1]	500 μ g antigen in 500 μ l + 500 μ l FAC
2nd week	None	
3rd week	Booster [2]	500 μ g antigen in 500 μ l + 500 μ l FAI
4th week	Blood test	
5th week	Booster [3]	500 μ g antigen in 500 μ l + 500 μ l FAI
6th week	None	
7th week	Booster [4]	500 μ g antigen in 500 μ l + 500 μ l FAI
8th week	Blood test	

FAC : Freund's adjuvant complete FAI : Freund's adjuvant incomplete

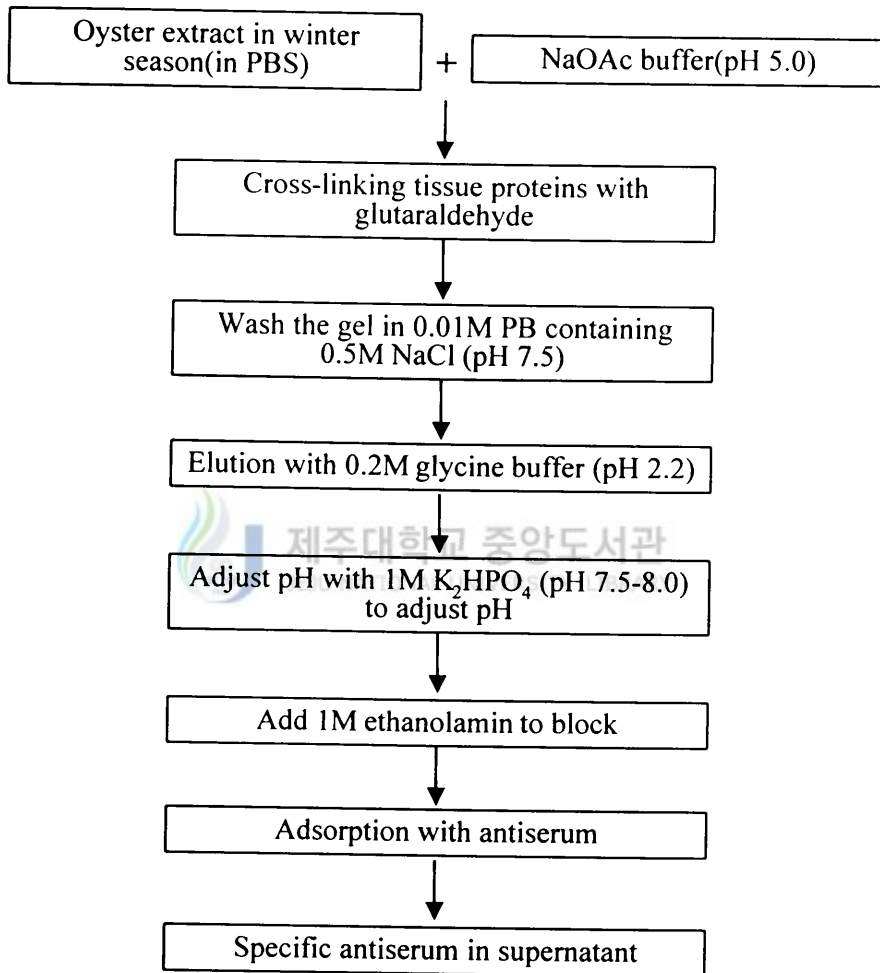


Fig. 2. Protocol used in the development of immunosorbents for removing cross-reactivity using glutaraldehyde.

에 있어, 과대평가의 요인으로 작용하기 때문에 난을 포함하지 않는 겨울철 굴 조직 추출물이 결합된 glutaraldehyde 면역 흡착제를 사용하여 제거하였다 (Fuchs and Sela, 1979). 우선, 1999년 12월에 채집된 참굴 추출물 (50 mg/ml in PBS)과 2 M Na-Acetic buffer (pH 5.0)와 혼합하고 25% glutaraldehyde를 첨가하였다. glutaraldehyde와 결합되지 않은 잔여 단백질을 제거하기 위하여 0.01M PB (containing 0.5M NaCl, pH 7.5)로 세척한 후, 0.2M glycine buffer (pH 2.2)로 용출하고 1M K₂HPO₄ (pH 7.5)로 pH를 조절하여 면역흡착제를 준비하였다. 준비된 면역흡착제와 동일량의 항혈청을 상온에서 3시간 동안 반응시킨 후, 원심분리 (3000 R.P.M., 5 min, 4°C)하여 상등액을 취하였고, Ouchterlony test와 ELISA를 이용하여 교차반응 여부를 확인하였다 (Fig. 2).

(4) Anti-OESP (Oyster Egg Specific Protein) Rabbit

Immunoglobulin (IgG) 분리

난단백질에 특이적으로 발현하는 항체 (anti-Oyster Egg Specific Protein rabbit IgG, anti-OESP rabbit IgG)를 분리하기 위해, 교차반응이 제거된 항혈청에 (NH₄)₂SO₄를 25% 포화시켜 IgG를 침전시키고 원심분리 (4000 rpm, 4°C, 10 min)하여 침전물을 분리하였다. 침전분리된 IgG는 25% (NH₄)₂SO₄로 2회 세척하고 투석한 후, 단백질을 정량하고 0.02% NaN₃를 첨가하여 분석 전까지 냉동 보관하였다 (Johnstone and Thorpe, 1996).

(5) Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

개발된 anti-OESP rabbit IgG의 난특이성과 감도 확인을 위해 indirect ELISA를 이용하였다. 항원 단백질로 참굴 알 단백질 (5.2 µg/ml)을 2배수로 2.5 ng까지 PBS (pH 7.4)로 희석하여 사용하였고, 대조구로 외투막, 아가미, 순관, 폐각근 추출물을 사용하였다. 희석된 항원 단백질을 Polystyrene

96-well ELISA microplate에 100 μ l씩 넣은 후, 상온에서 3시간 반응시키고 microplate autowasher 이용하여 PBS (containing 0.05% TritonX-100, pH7.4)로 세척하였다. 0.1% BSA (in PBS containing 0.05% TritonX-100, pH7.4)를 150 μ l 넣고 1시간 동안 blocking을 하였고, 동일한 방법으로 세척하였다. 1차 항체로 8 μ g/ml anti-OESP rabbit IgG (in PBS containing 0.05% TritonX-100, pH 7.4) 100 μ l를 넣고 1시간 반응시키고 세척 후, 2차 항체로 1/1000으로 희석된 Alkaline Phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (in PBS containing 0.05% TritonX-100, pH 7.4) 100 μ l를 넣고 1시간 반응시켰다. 발색기질로 pNPP (1 mg/ml in 0.1 M glycine buffer)를 100 μ l 주입하였고, 5분 후, stop solution으로 3M NaOH를 50 μ l 첨가하였다. microplate reader를 이용하여 405 nm 파장에서 O.D.(Optical density)를 측정하였다 (Fig. 3).

5) 면역세포화학적 관찰



개발된 anti-OESP rabbit IgG가 알에 특이적으로 반응하는지를 간접 면역형광법을 이용하여 조직슬라이드 상에서 관찰하였다. 조직슬라이드는 xylene을 이용하여 파라핀이 제거되었고, 알코올 탈수과정을 거쳐 PBS (pH 7.4)로 치환하였다. 5% BSA로 1시간 동안 Blocking을 하였고, PBS (containing 0.05% TritonX-100, pH7.4)로 10분간 3회 세척하였다. 단백질 농도 0.9 mg/ml 인 anti-OESP rabbit IgG와 1시간 반응시킨 후, 동일한 방법으로 세척하고, fluorescein isothiocyanate (FITC) - conjugated goat antibody to rabbit IgG (1: 400 dilution)를 1시간 반응시켰다. 반응이 완료된 절편은 세척을 하고 50% glycerol을 조직시료에 첨가한 후, mounting을 하였고 형광현미경 하에서 관찰하였다.

6) 번식량 추정

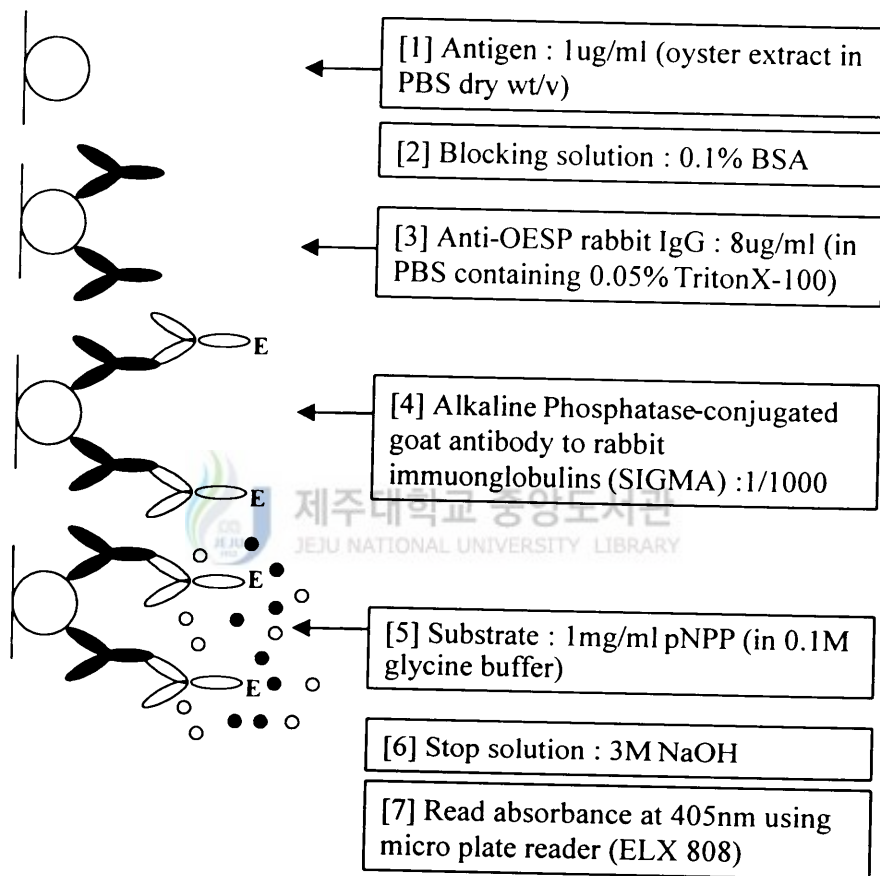


Fig. 3. Schematic illustration of indirect ELISA used in quantification of oyster egg protein.

굴의 번식량을 추정하기 위해 먼저, 굴이 포함하는 난 단백질의 양을 ELISA를 이용하여 정량하였고, 알 건조중량에 대한 알의 단백질양의 비례식을 이용하여 굴 한 개체가 가지고 있는 난 단백질양을 추정한 후, 알의 수로 환산하였다.

동결건조된 참굴 시료를 막자사발에서 1차 분쇄한 후, 분쇄된 시료 10 mg과 PBS 용액 10 ml를 15 ml 원심관에서 혼합하고, 초음파 파쇄기로 1분간 균질화하였다. 균질화된 시료-PBS 혼합액을 원심분리 (7000 R.P.M., 4 °C, 30 min.) 하여 상등액을 취하여 1 µg/ml (dry wt/v)로 희석시킨 후, 3회 반복 실험하였다 ((5) ELISA 참조).



Ⅲ. 결 과

이 연구에 사용된 참굴의 평균 각장은 74.0 ± 11.6 mm ~ 91.6 ± 14.9 mm 범위였고, 평균 육질중량은 5.475 ± 1.773 g ~ 12.276 ± 3.688 g 범위였고, 평균 건조중량은 0.697 ± 0.274 g ~ 3.280 ± 1.079 g이었다 (Table 3).

1. 생식세포의 조직학적 관찰

생식세포의 조직학적 관찰을 위한 조직 슬라이드는 조사 기간 동안 월별 30 개체씩, 총 330개체를 제작하였다. 생식세포의 발달 정도는 NOAA의 생식세포 분석방법(1993)에 따라 7등급으로 구분하여 기록하였다 (Fig. 4, 5).

참굴의 생식세포 발달과정을 관찰한 결과, 2월에 생식소포낭이 확장되는 일부 개체가 관찰되었으나, 조사 개체 중 76%가 미분화된 생식세포를 갖는 회복기에 있었다. 3월에는 생식소 발달 단계가 2등급인 개체가 63%로 채집된 대부분의 개체들의 생식세포가 발달 초기에 있었다. 6월 중순에 채집된 개체들 중 83%가 성숙기로 완숙한 난을 포함하고 있었고, 6월 말과 8월 말에는 부분적으로 산란을 하였거나, 생식세포를 재흡수하는 개체가 전체의 90%를 차지하였다. 이는 산란기간 동안 두 번의 개체군 산란이 이루어진 것으로 판단된다 (Fig. 6, 7).

2. 면역학적 방법을 이용한 번식량 추정

1) 알의 정제

Table 3. Monthly variation of shell length, tissue wet weight and tissue dry weight of *Crassostrea gigas* collected at Kosong Bay from January to August 2000 (mean \pm SD).

Month	Mean shell height (mm)	Mean tissue wet weight (g)	Mean tissue dry weight (g)
26 Jan	74.0 \pm 11.6	7.515 \pm 2.983	1.544 \pm 0.862
25 Feb	78.8 \pm 9.2	10.206 \pm 2.585	2.209 \pm 0.518
30 Mar	80.0 \pm 12.6	8.440 \pm 2.143	2.100 \pm 0.546
26 Apr	82.2 \pm 10.4	10.789 \pm 2.651	2.760 \pm 0.718
30 May	83.6 \pm 9.9	8.636 \pm 1.950	1.504 \pm 0.330
15 Jun	84.9 \pm 11.2	12.276 \pm 3.688	3.280 \pm 1.079
28 Jun	84.6 \pm 12.9	7.369 \pm 2.992	0.808 \pm 0.286
12 Jul	82.9 \pm 11.4	5.475 \pm 1.773	0.878 \pm 0.231
27 Jul	86.9 \pm 13.0	7.616 \pm 2.806	0.917 \pm 0.362
10 Aug	91.6 \pm 14.9	6.474 \pm 1.865	0.893 \pm 0.284
29 Aug	88.3 \pm 13.6	5.720 \pm 1.904	0.697 \pm 0.274

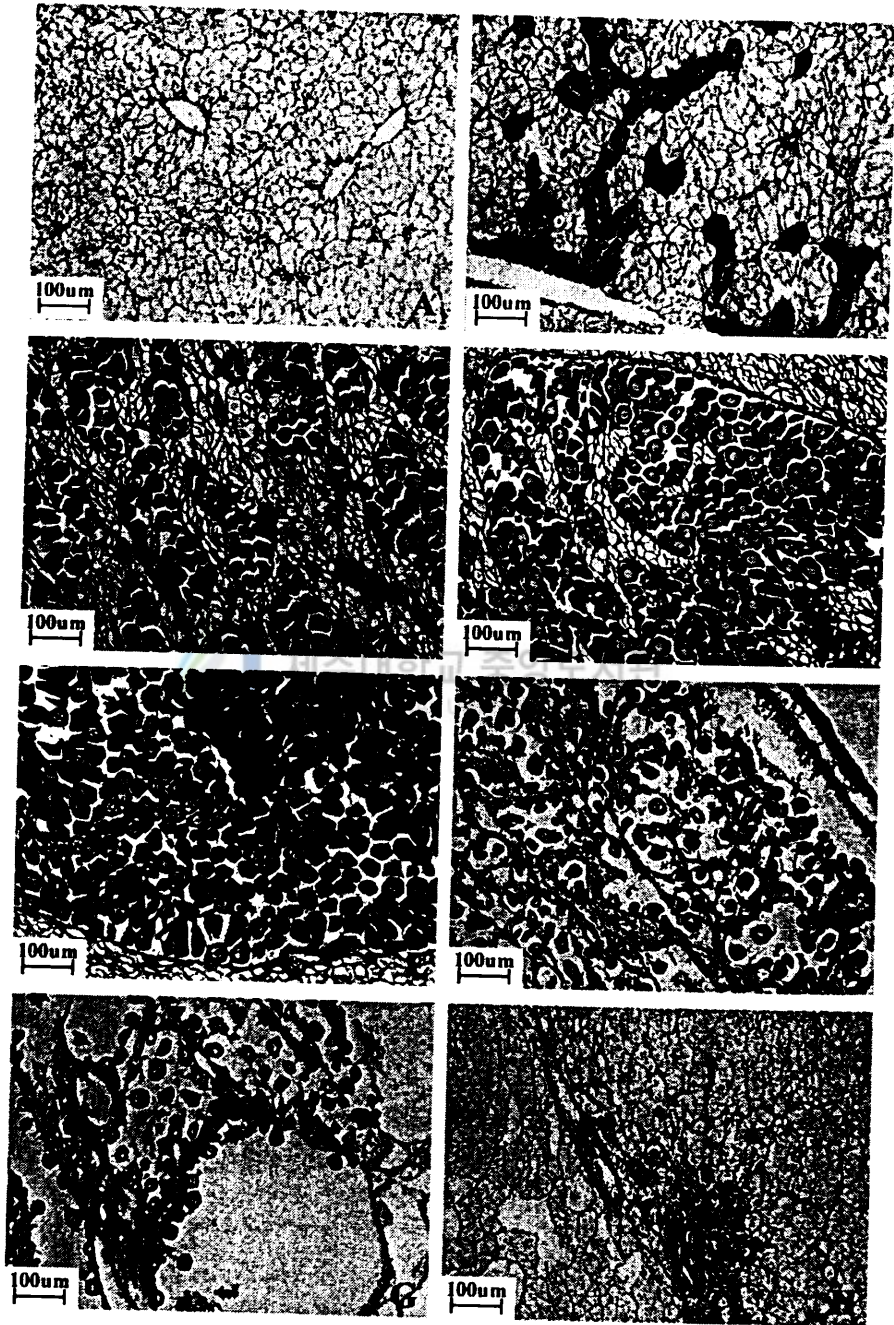


Fig. 4. Gametogenic stages of female oyster. (A) Sexually undifferentiated stage: cross section of undifferentiated ovary containing no gonadal tissues. (B) Early development stage: Follicles beginning to expand and developing ovary with early vitellogenic oocytes. (C) Mid development stage: Follicles expanded and invade the interfollicular connective tissue. Mid developed ovaries with primary oocytes and vitellogenic oocytes. (D) Late development stage: Follicles greatly expanded and some mature oocytes present, but considerable connective tissue remaining, premature ovary with oocytes at all stages of development. (E) Fully developed stage: Fully matured ovaries filled with ova and most gametes are mature. (F) Spawning stage: Reduced number of ova and some mature ova and oocytes still remaining. (G) Spawning stage: spawned ovary with some ova and the spaces vacated by spawned ova. Spawning stage: spawned ovary largely devoid of ova. And gonadal tissue atrophying (H).



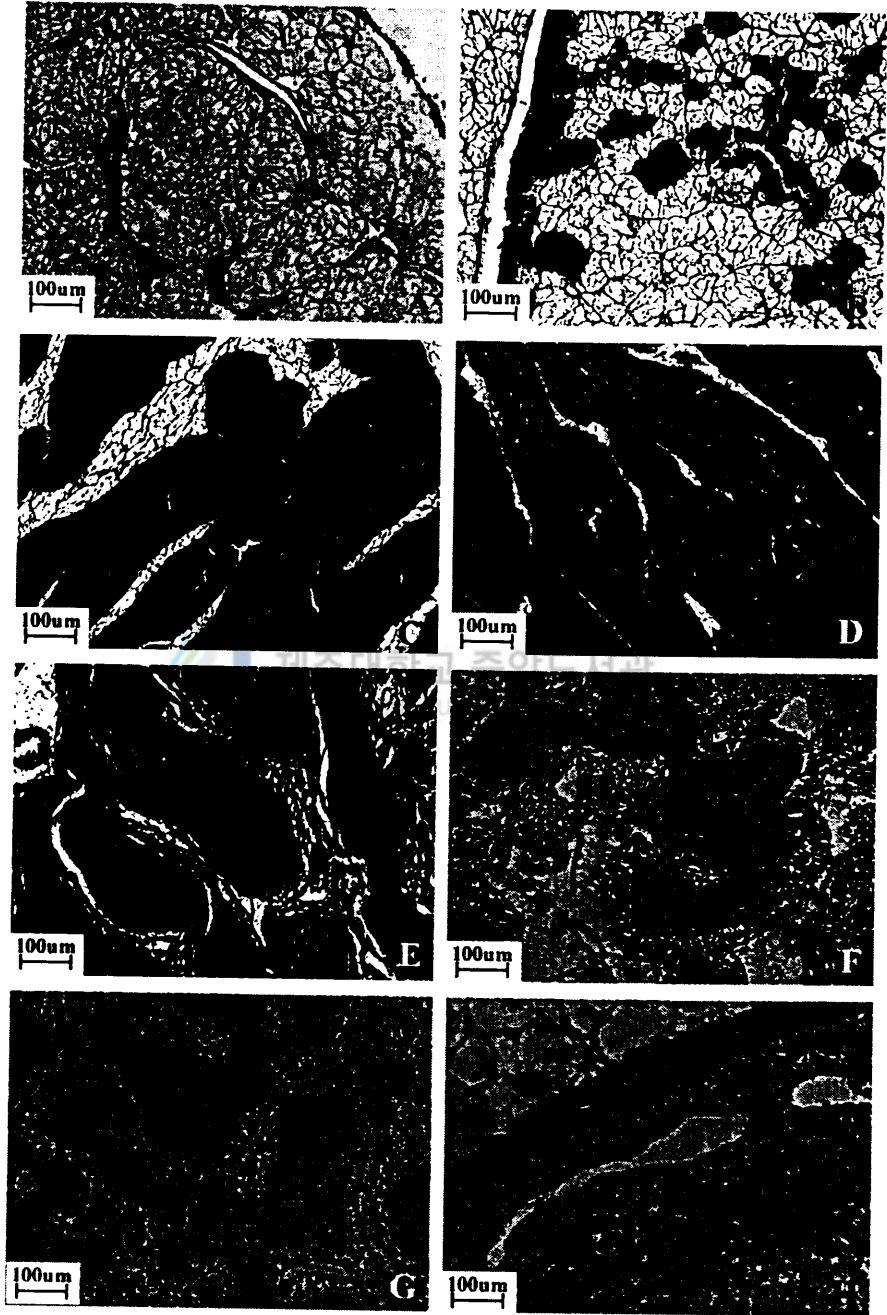


Figure 5. Gametogenic stage of male oysters. (A) Sexually undifferentiated stage: cross section of undifferentiated testis containing no gonadal tissues and very thin longitudinal follicle wall. (B) Early development stage: Follicles beginning to expand and growing testis with primary spermatocytes. (C) Mid development stage: Follicles expanded and invade the interfollicular connective tissue. Mid developed testes with spermatozoa columns of spermatocytes coalesce centrally in testes. (D) Late development stage: Follicles greatly expanded and coalesced with some mature spermatozoa present, but considerable connective tissue remaining. (E) Fully developed stage: Fully matured testes filled with spermatozoa and most gametes are mature and little connective tissue remaining. (F) Spawning stage: Reduced number of spermatozoa and some mature spermatozoa still remaining. (G) Spawned stage: spawned testes appear to be devoid of spermatozoa although relict spermatozoa may be present. And gonadal tissue atrophying (H).



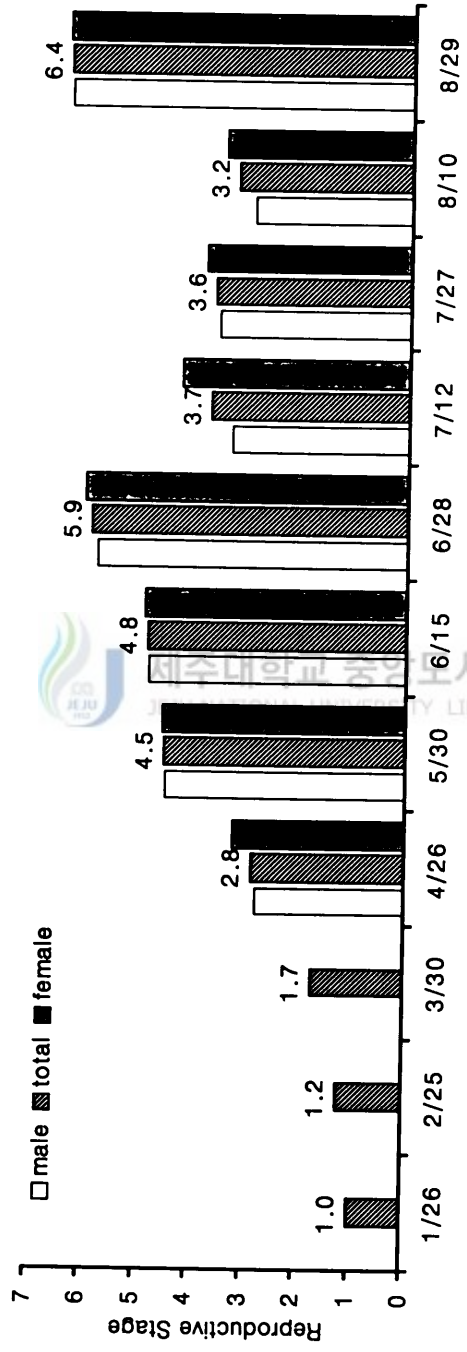


Fig. 6. Monthly change in reproductive stage of female and male *Crassostrea gigas* collected at Kosong Bay from January to August 2000.

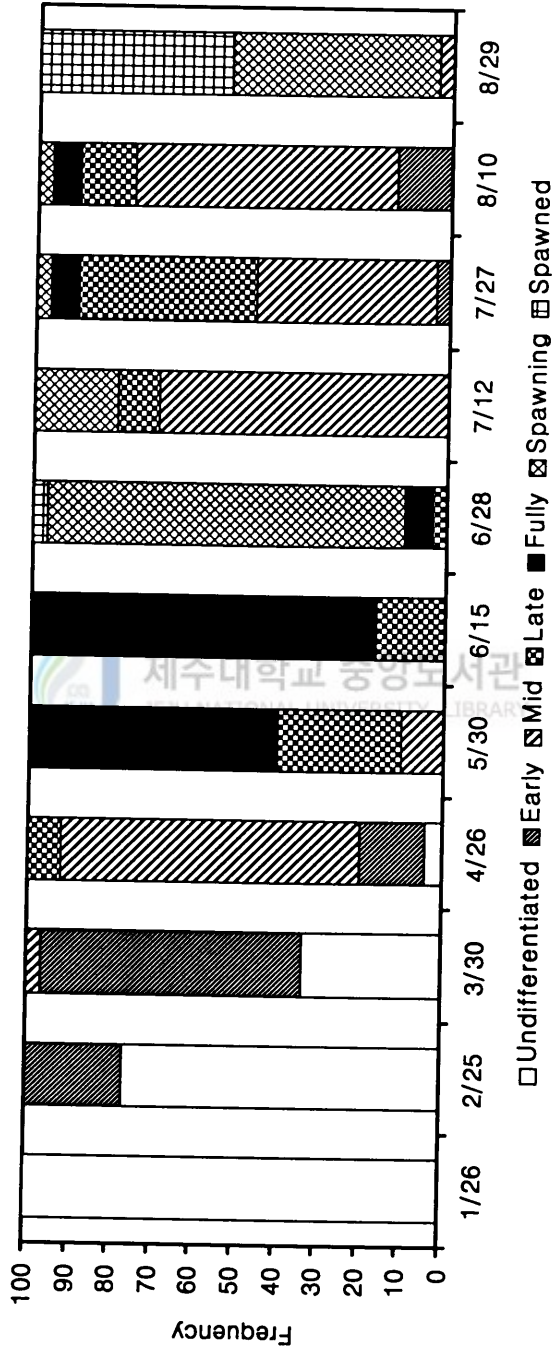


Fig. 7. Frequency distribution of reproductive stage of *Crassostrea gigas* collected at Kosong Bay from January to August 2000.

분리된 알을 광학현미경으로 관찰한 결과, 알 이외의 불순물은 거의 발견되지 않았고(Fig. 8), 알 하나의 무게는 13 ng으로 추정되었다. 단백질량은 41.3%로 아가미, 외투막, 순관, 폐각근의 단백질량에 비해 2배 이상 높은 수준이었고, 탄수화물이 11.7%, 지질이 25.5% 포함되어 있었다 (Fig. 9).

2) 항체 개발

항체와 알 이외의 비 특정 세포와의 교차반응은 glutaraldehyde 면역흡착제를 이용하여 제거하였고, Ouchterlony double immunodiffusion test, ELISA와 immunofluorescence를 통하여 확인하였다. Fig. 10은 교차반응의 유무를 확인하기 위한 double immunodiffusion test의 결과이다. 면역흡착전의 항혈청과 면역흡착 후의 anti-OESP rabbit IgG를 동일조건의 항원들과 반응시켰다. 면역흡착 전, 항체와 알 이외의 다른 부위 조직과의 교차반응 침전밴드가 약하게 관찰되었으나 면역흡착 후, 전혀 관찰되지 않았다. 교차반응이 제거된 anti-OESP rabbit IgG는 알에 특이적으로 반응하였으며, 생식세포가 아직 발달하지 않은 12~2월에 채집된 굴 추출물과 산란기 수컷 굴 추출물에는 반응하지 않았다. ELISA에서도 동일하게 반응하였고 (Fig. 11), 감도는 $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ ~ $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 범위였다 (Fig. 12). 간접 면역형광법을 이용한 조직학적 관찰 결과, anti-OESP rabbit IgG는 난세포의 세포질에 특이적으로 반응하였고, 난세포 핵, 소화맹낭, 위, 장 등의 다른 부위 조직과는 반응하지 않았다 (Fig. 13).

3) 번식량 추정

개발된 anti-OESP rabbit IgG를 이용한 참굴의 정량적인 번식량 측정에 ELISA를 사용하였다. 알 하나의 건조중량에 대한 난단백질량의 비례식을 이용하여, ELISA에서 추정된 총 난단백질의 양으로부터 알의 총 건조중량을 환

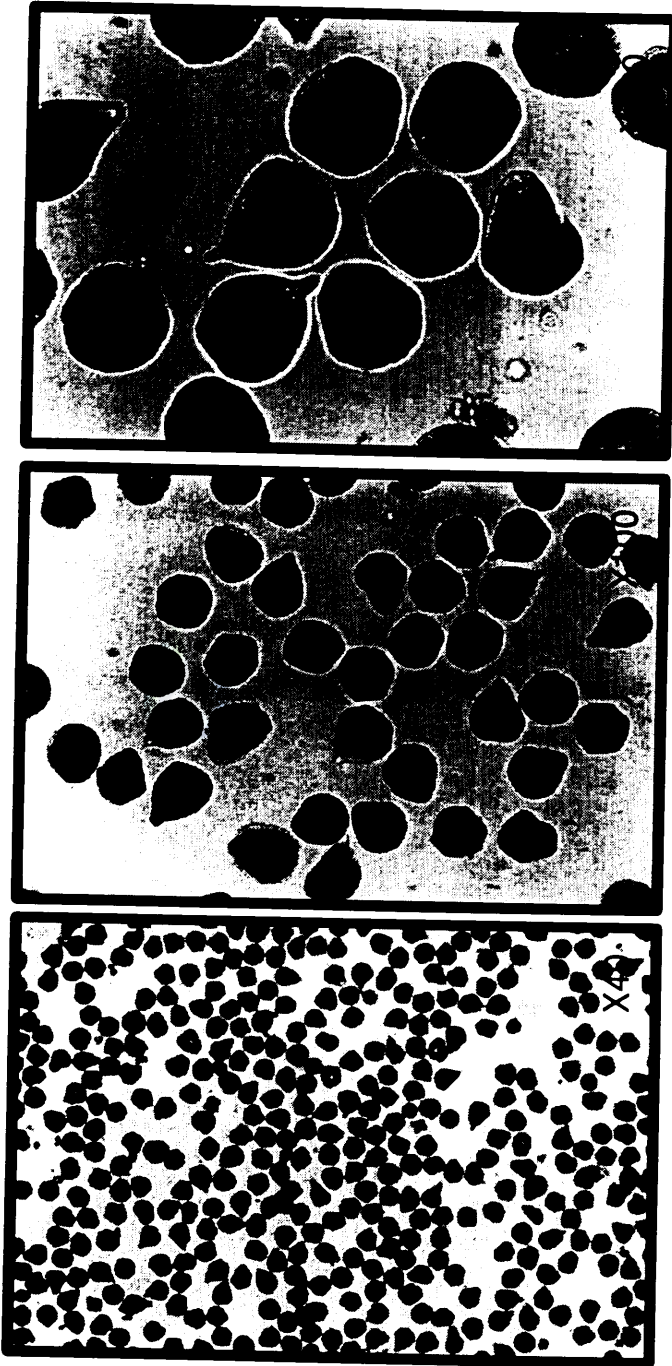
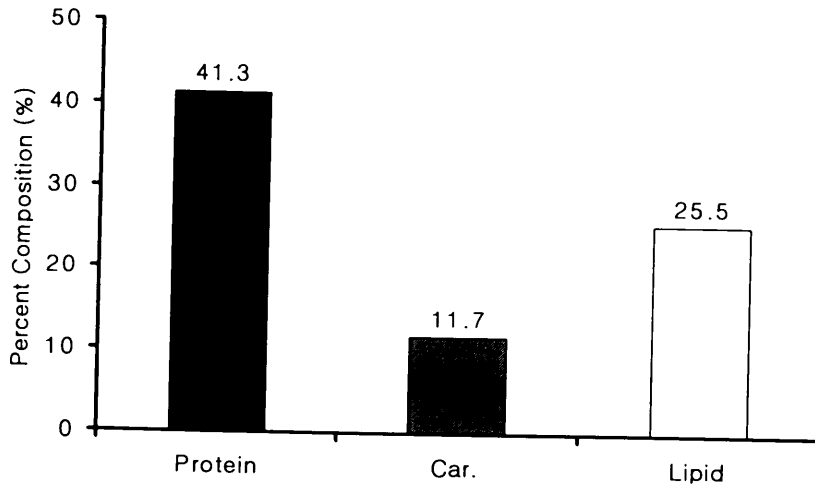


Fig. 8. Photomicrograph of purified oyster eggs.

(A)



(B)

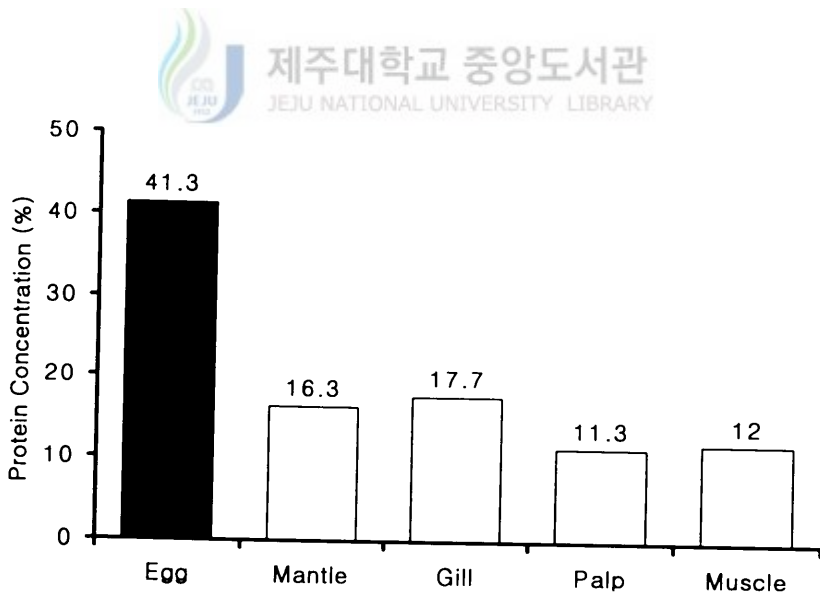


Fig. 9. (A) Percent composition of soluble protein, carbohydrate and lipid in oyster egg. (B) Percent composition of soluble protein in various type of tissues.

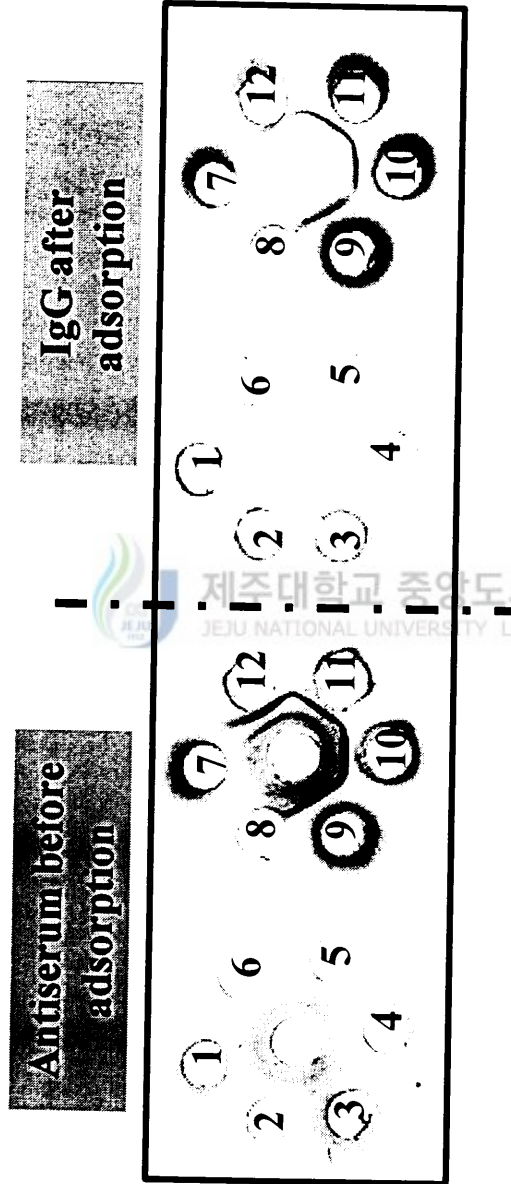


Fig. 10. Double immunodiffusion test for examining specificity of the rabbit anti-oyster egg IgG. Interaction of the antiserum before adsorption and after adsorption with oyster eggs extract as test antigen and extracts of different tissues as controls. 1, 2: gill, 3, 4: mantle, 5, 6: adductor muscle, 7, 8: palp, 9, 10, 11, 12: eggs.

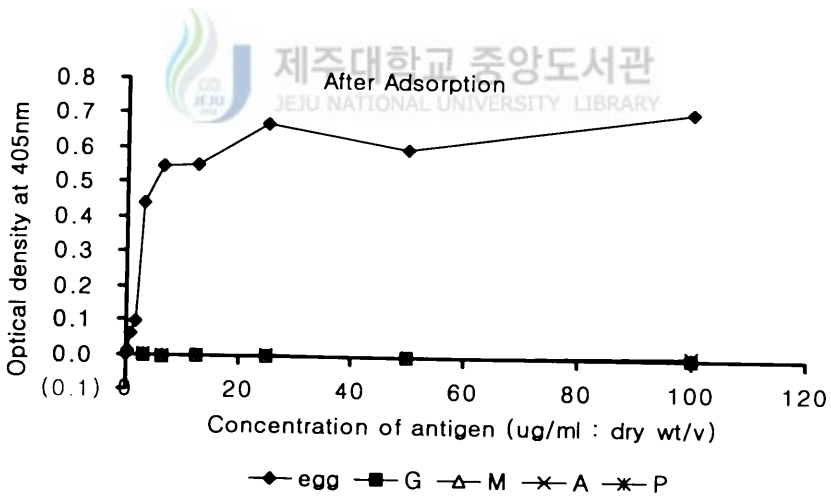
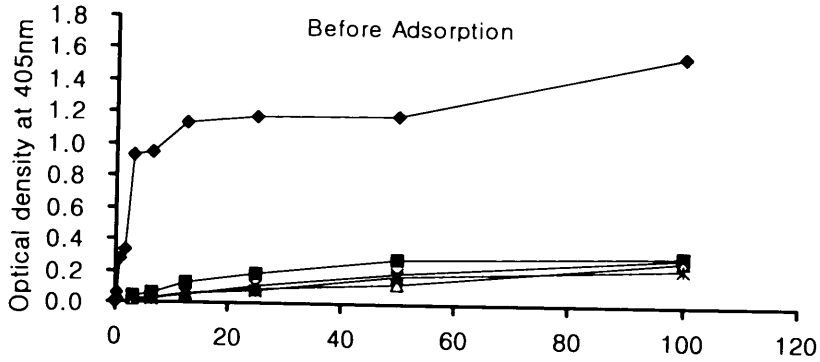


Fig. 11. ELISA for testing specificity of the rabbit anti-oyster egg IgG. Interaction of antiserum before adsorption and after adsorption with oyster eggs extract as test antigen and extracts of different tissues as controls. G: gill, M: mantle, A: adductor muscle, P: palp.

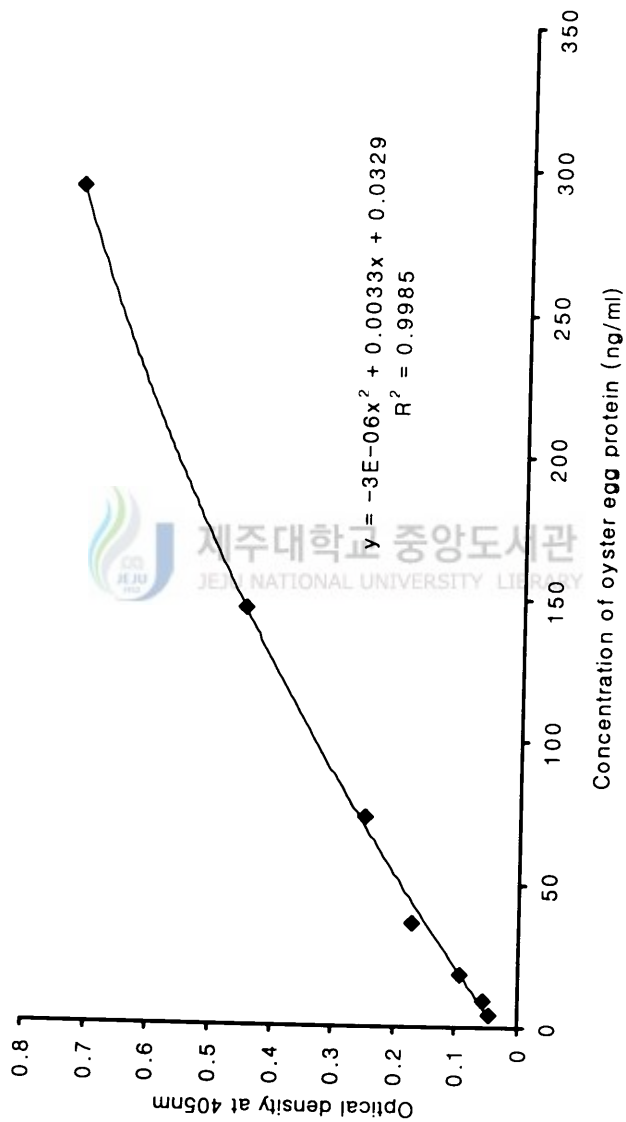


Fig. 12. Interaction of oyster egg proteins with anti-OESP IgG in ELISA. Sensitivity of anti-OESP is about 10 ng/ml ~ 300 ng/ml.

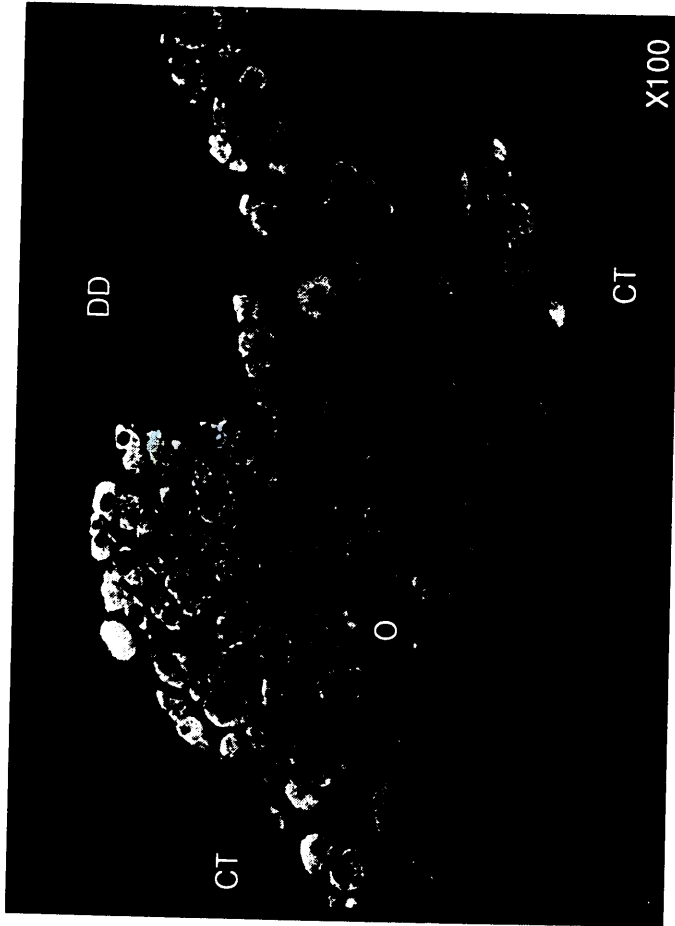


Fig. 13. Indirect immunofluorescence for testing specificity of the anti-OESP. Oocytes (O) reacted with rabbit anti-OESP IgG, but digestive diverticula (DD) and connective tissue (CT) did not.

산하였다. GSI는 개체의 총 건조 중량에 대한 알의 건조 중량 비율로 계산하였다.

Eggs dry wt. in an oyster = $K \times$ Concentration of egg protein in an oyster
[K : Egg dry wt. / Concentration of egg protein = 13 ng / 5.3 ng = 2.45]

GSI = (total dry weight of eggs / total dry weight of oyster) \times 100

Number of eggs in an oyster = Eggs dry wt. in an oyster / Egg dry wt.

조사 기간 동안 월별 30개체씩, 총 330개체를 번식량 추정에 사용하였다. Fig. 14은 산란기 동안의 GSI 값의 변화를 나타내는 그래프이다. 1월과 2월에 채집된 개체들은 anti-OESP와 반응하지 않았으며, 3월에는 실험에 사용된 30개체 중 한 개체만이 anti-OESP와 반응하였다. 6월 중순, 가장 높은 42.3%, 7월 말, 26.8%로 두 번의 peak를 보이며, 8월 말, 6.8%로 가장 낮게 나타났다. 두 번의 peak는 산란기 동안 2회의 개체군 산란 증거로 판단된다. GSI 값의 변화는 생식세포의 발달 정도와 일치하였다. Table 4는 번식량 추정결과를 요약한 표이다. 번식량 추정에 사용된 개체들의 평균 각장은 77.2 ± 12.5 mm ~ 91.7 ± 17.6 mm 범위였고, 평균 건조중량은 0.697 ± 0.274 g ~ 3.280 ± 1.079 g이었다. 평균 GSI는 6월 중순에 최대 0.423 ± 0.155 , 8월 말에는 최소 0.068 ± 0.069 이었다. 개체별 최대 GSI는 0.667로 6월 중순에 채집된 개체였고, 최소 GSI는 0.011로 6월 말에 채집된 개체였다. 참굴 포란수는 4월에서 8월 산란기 동안 평균 30,200,000개였으며, 산란직전인 6월 중순에 평균 102,600,000개였고, 개체별 최대 196,300,000개였다.

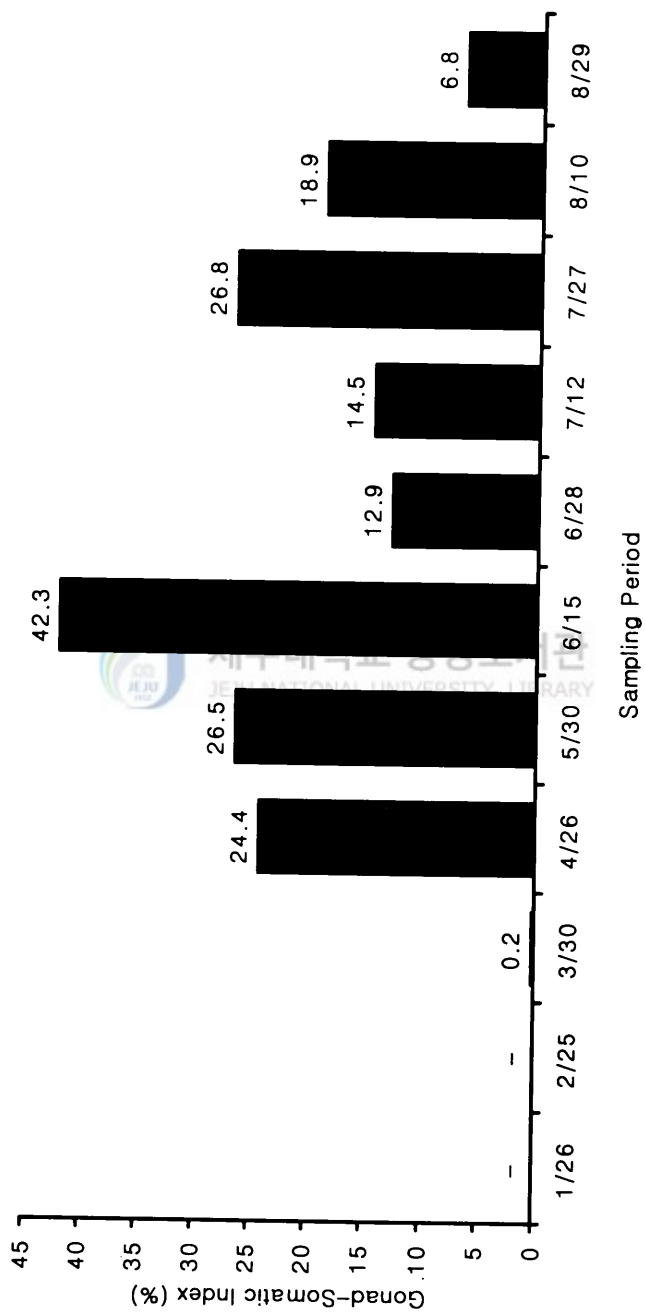


Fig. 14. Monthly change in the of gonad somatic index of female *Crassostrea gigas*.

Table 4. Summary of monthly mean reproductive output of female oysters measured using ELISA. GSI is total dry weight of eggs (mg) per total dry weight of oyster (mg).

Month	Mean shell height (mm)	Mean tissue dry weight (g)	Mean GSI (mg/mg)	Highest GSI	Lowest GSI	N
26 Jan	74.1	1.544	-	-	-	-
25 Feb	77.6	2.209	-	-	-	-
30 Mar	74.3	2.100	0.002	-	-	-
26 Apr	81.0	2.760	0.244	0.433	0.079	11
30 May	83.3	1.504	0.265	0.34	0.112	26
15 Jun	88.7	3.280	0.423	0.667	0.017	25
28 Jun	77.2	0.808	0.129	0.482	0.011	13
12 Jul	80.4	0.878	0.145	0.247	0.044	21
27 Jul	85.8	0.917	0.268	0.454	0.052	22
10 Aug	91.7	0.893	0.189	0.414	0.034	14
29 Aug	82.6	0.697	0.068	0.256	0.012	12

IV. 고 찰

참굴 *C. gigas* 알의 분리는 정량적인 번식량 측정을 위한 Immunological probe를 준비하는데 있어서 중요한 실험 단계이다 (Choi et al., 1993). 성숙한 굴의 생식소를 압박하여 1차적으로 알을 분리하였다. 분리된 알-PBS 혼합액을 망목의 크기가 100 μm 채와 60 μm 인 채로 걸러주고, PBS를 10회 세척하였다. 광학현미경 관찰 결과, 분리된 알은 불순물이 거의 발견되지 않아서, 다른 이매패류의 난의 발생과 생태학적 특성을 연구하는데 이용 가능한 방법이라고 판단되었다 (Fig. 8). 산란기 성숙한 참굴 알 하나의 무게는 13 ng 정도로 추정되어 12-13 ng인 *C. virginica* 알의 무게와 유사하였다 (Choi et al., 1993; Lee and Heffernan, 1991). 산란기 참굴 알의 생화학적 분석 결과, 단백질이 41.3%, 탄수화물이 11.7%, 지질이 25.5% 포함되어 있었다. *C. virginica*가 각각 50%, 9%, 21%인 것과 비교하여, 단백질 성분은 다소 낮으나 탄수화물과 지질성분은 높은 수준이다 (Lee and Heffernan, 1991) (Fig. 9).

교차반응 확인을 위한 ELISA와 double immunodiffusion test에서, 면역흡착전 항혈청 (anti-oyster egg serum)은 알뿐만 아니라 외투막, 폐각근, 순관 및 체조직에도 약하게 반응하였는데 (Fig. 10, 11), 이는 최초 분리된 알-PBS 혼합액 내에 체조직 성분이 부분적으로 포함되어 나타난 결과이거나 (Choi et al., 1993), 난단백질이 다른 조직단백질과 동일한 항원 결정기 (antigenic determinant)를 갖고 있기 때문에 생긴 결과라고 판단된다. 이러한 체조직과의 교차반응은 굴 개체가 포함하는 난단백질의 양을 추정함에 있어서 과대평가의 요인으로 작용한다. 교차반응을 제거하기 위해, 활성화된 glutaraldehyde에 난단백질을 포함하지 않는 겨울철 굴 조직단백질을 부착시켜 면역흡착제를 준비하였다. 준비된 면역흡착제와 동일량의 항혈청을 반응시켜 교차반응을 제거하였고, 교차반응이 제거된 항혈청에

(NH₄)₂SO₄를 25% 포화시켜 IgG를 분리하였다. 개발된 항체 (anti-OESP rabbit IgG: anti-Oyster Egg Specific Protein rabbit IgG)는 12월, 1월, 2월에 생식세포가 아직 발달하지 않은 굴과 수컷에는 반응하지 않았다. Suzuki et al. (1992)는 *C. gigas*에서 vitellin-like protein의 분리를 위해, 알 추출물에 대한 항혈청을 동일양의 정소 추출물과 흡착시켜 암컷 단백질에 특이적으로 반응하는 항체 (anti-FSP rabbit IgG)를 얻었다. anti-FSP rabbit IgG는 암컷의 hemolymph와 반응하였지만 이 연구에서 개발된 anti-OESP rabbit IgG는 암컷의 hemolymph와 반응하지 않았다. 면역전기영동 상에서 anti-OESP rabbit IgG는 산란기 굴 조직 추출물과 반응하여 anti-FSP의 경우와 동일한 하나의 침전밴드를 형성하였다. 개발된 anti-OESP rabbit IgG는 참굴 알에 특이적인 단백질의 분리와 그 특성을 연구하는데 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

이 연구는 개발된 anti-OESP rabbit IgG를 이용하여 참굴의 번식량을 정량적으로 추정하였다. 4월에서부터 8월 산란기 동안 참굴, *C. gigas*의 평균 GSI는 0.216였고, 평균 포란수는 33,900,000개였다. Dame (1976)과 Deslous-Paoli and Heral (1980)은 *C. gigas*의 번식량을 [식-1]에 의해 얻었으며, 63%와 53%로 각각 보고하였다. Cox and Mann (1992)은, 굴 개체를 갈아서 알을 계수하는 방법으로, 산란기 동안 *C. virginica*의 포란수를 평균 5,600,000, 최대 45,900,000개로 보고하였다. Choi et al (1993)은 면역학적인 방법을 이용하여 산란기 동안 *C. virginica*의 포란수를 평균 21,100,000개로 보고하였고, 이 연구와 동일한 방법으로 [식-2] GSI를 추정하여 월평균 최대 20.1%로 보고하였다. 이 연구에서 *C. gigas*의 포란수는 30,200,000개로 Choi et al. (1993)이 보고한 바와 유사하였으나, 다른 연구 결과들과는 2.5배에서 6배까지 차이를 보였다.

[식-1] Reproductive Effort

= annual cost of reproduction / somatic tissue of the whole animal

[식-2] Reproductive Effort

$$= \text{total dry weight of eggs} / \text{total dry weight of oyster}$$

평균 GSI는 6월 중순, 최대 0.423 ± 0.155 , 8월 말, 최소 0.068 ± 0.069 이었다. 개체별 최대 GSI는 0.667로 6월 중순에 채집된 개체였고, 최소 GSI는 0.011로 6월 말에 채집된 개체였다 (Table 4). 동일한 시기에 채집된 개체들 사이에서도 GSI와 포란수에 큰 차이를 보이는 이유는, 개체군 내 분산형 산란 (asynchronous spawning)이 원인으로 보고되고 있다 (Cox and Mann, 1992; Lucas, 1982).

생식세포의 조직학적 관찰한 결과와 정량적으로 추정된 GSI 값의 변화는 잘 일치하였다. 3월 말경에 생식소의 발달이 시작되며, 생식세포의 성숙은 수컷보다 암컷이 빠른 것으로 관찰되었다. 조직학적 관찰 결과와 GSI의 값에 비추어 개체군 내에 6월 말 전기 산란, 8월 말 후기 산란이 이루어진 것으로 추정되어 인접한 통영만의 산란시기와 일치하였다 (Park et al., 1999). 후기산란 직전인 7월말의 GSI 값이 26.8%로 전기산란 직전인 6월 중순의 GSI 값보다 낮은 이유는 먹이의 계절적인 차이 (배와 한, 1997)와 8월에 잦은 장마로 인한 저염 스트레스가 8월 산발적인 산란의 원인으로 작용했기 때문이라고 판단된다.

V. 요약

1. 이 연구는 참굴의 번식 생리에 관한 기초 자료를 수집하기 위해, 면역학적인 분석 방법을 이용하여 참굴, *Crassostrea gigas*의 번식량을 정량적으로 측정하였다.
2. 조직학적 관찰 결과, 3월에 생식세포가 발달하기 시작하였고, 6월 중순에 완전히 성숙하였으며, 6월말과 8월말에 산란이 이루어진 것으로 추정되었다.
3. 난단백질에 특이적으로 발현하는 항체 (anti-OESP rabbit IgG) 개발을 위해 성숙한 참굴 암컷에서 알을 분리하였다. 이렇게 분리된 알 하나의 무게는 약 13 ng 으로 추정되었다. 알이 갖고 있는 단백질량은 41.3%이고, 탄수화물 11.7%, 지질 25.5% 였다. 특히, 단백질의 양은 아가미, 외투막, 순관, 폐각근의 단백질량과 비교했을 때 2배 이상 높은 수준이었다.
4. 번식량을 추정하기 위해 개발된 anti-OESP rabbit IgG는 최저 10ng/ml의 난단백질을 적정할 수 있었고, double immunodiffusion test, ELISA 및 immunofluorescence에서 알에 특이적으로 반응하였다.
5. 개발된 anti-OESP rabbit IgG를 이용한 참굴의 정량적인 번식량 측정에 ELISA를 사용하였다. 알 하나의 건조중량에 대한 난단백질량의 비례식을 이용하여, ELISA를 이용해 추정된 총 난단백질의 양으로부터 알의 총 건조중량을 추정하였다. GSI는 개체의 총 건조 중량에 대한 알의 건조 중량 비율로 계산하였다.

$$\text{Eggs dry wt. in an oyster} = K \times \text{Concentration of egg protein in an oyster}$$

[K : Egg dry wt. / Concentration of egg protein = 13 ng / 5.3 ng = 2.45]

GSI = total dry weight of eggs / total dry weight of oyster

Number of eggs in an oyster = Eggs dry wt. in an oyster / Egg dry wt.

6. 월평균 GSI는 6월 중순에 최대치(0.423 ± 0.155)를 보였고, 8월말 최저치(0.068 ± 0.069)를 보였다.

7. 참굴 포란수는 4월에서 8월 산란기 동안 평균 30,200,000개였으며, 산란 직전인 6월 15일에 평균 102,600,000개, 최대 196,300,000개로 추정되었다.



VI. 참 고 문 헌

- 권오길, 박갑만, 이준상. 1993. 한국패류도감. 아카데미 서적. 서울. p.356.
- 배평암, 한창희. 1998. 양식어장 환경요인이 참굴 (*Crassostrea gigas*)의 성장에 미치는 영향. 한국양식학회지, 11(3): 391~400.
- 윤성규. 1996. 무척추동물의 번식과 생활사. 아카데미 서적. 서울. pp.13~14. (English translation, Kyushu University, Japan)
- 이채성, 박영제. 1997. 동해안 참굴 양식에 관한 연구. 한국양식학회지, 10(2): 105~112.
- 최우정, 전영열, 박정흠, 박영철. 1997. 한산·거제만의 환경특성이 양식 굴의 비만에 미치는 영향. 한국수산학회지, 30(5): 794~803.
- 한국수산회. 2000. '98-'99 수산연감. 동양문화 주식회사. 서울. pp.385, 468~469.
- Behzadi S., K. Parivar and P. Roustaian. 1997. Gonadal cycle of pearl oyster, *Pinctada fucata* (Gould) in norrheast persian gule, iran. J. Shellfish Res., 16(1): 129~135.
- Bligh E. G. and W. J. Dyer. 1956. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. Can. J. of Biochem. Physiol., 37: 911~917.
- Eble A. F. and R. Scro. 1996. General Anatomy, pp.5, 59. In "The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*" (ed. V. S. Kennedy and R. I. E. Newell). Maryland Sea Grant College Publication.
- Choi K. S., E. N. Powell, D. H. Lewis and S. M. Ray. 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Aquacult. Fish. Manage., 24: 375~

398.

- Choi K. S., E. N. Powell, D. H. Lewis and S. M. Ray. 1994. Instantaneous reproductive effort of the American oyster, *Crassostrea virginica*, in galveston bay, texas measured by a protein a immunoprecipitation assay. Biol. Bull., 186(1): 41~61.
- Chung E. Y., S. Y. Kim and Y. G. Kim. 1993. Reproductive ecology of the purple shell, *Rapana venosa*(Gastropoda: Muricidae), with special reference to the reproductive cycle, depositions of egg capsules and hatchings of larvae. Korean J. Malacol., 9(2): 1~15.
- Cox C. and R. Mann. 1992. Temporal and spatial changes in fecundity of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) in the james river, virginia. J. Shellfish Res., 11(1): 49~54.
- Crosby M. P. and L. D. Gale. 1990. A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. J. Shellfish Res., 9(1): 233~237.
- Dame R. F., 1976. Energy flow in an intertidal oyster population. Estuarine Coastal Marine Science., 4: 243~253.
- Demers A., Y. Lagadeuc, J. J. Dodson and R. Lemieux. 1993. Immunofluorescence identification of early life history stages of scallops (Pectinidae). Mar. Ecol. Prog. Ser., 97: 83~89.
- Deslous-Paoli, L. M. and M. Heral. 1980. Valeurs caloriques de la chair de l'huitre *Crassostrea gigas* Tumberg: estimation directe et biochimique. Conseil Permanent International pour l'exploration de la mer CM 1980/K 11~16.
- Dubois M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, 28: 350~356.

- Fuchs S. M. Sela. 1979. Immunoabsorbents, pp.10.1~10.6. In "Handbook of Experimental Immunology" (ed. W. D. Weir). Blackwell Scientific Publications.
- Hentschel B. T., and R. J. Feller. 1990. Quantitative immunoassay of the proventricular contents of white shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus) : a laboratory study. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 139: 85~99.
- Johnstone A., and R. Thorpe. 1996. Purification of immunoglobulins, constituent chains and fragments, pp.61~100. In "Immunochemistry in Practice". Blackwell Scientific Publications.
- Kent G. N., G. B. Maguire, M. John, M. Cropp and K. Frankish. 1998. Broodstock conditioning, spawning induction, and larval rearing of the stepped venerid, *Katylisia scalarina* (Lamarck 1818). J. Shellfish Res., 17(4): 1065~1070.
- Lee R. F. and P. B. Heffernan. 1991. Lipids and proteins in eggs of eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)) and northern quahogs (*Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). J. Shellfish Res., 10(1): 203~206.
- Loosanoff V. L. and J. B. Engle. 1942. Accumulation and discharge of spawn by oyster living at different depths. Biol. Bull., 82: 413~422.
- Loosanoff V. L. and H. C. Davis. 1953. Temperature requirements for maturation of gonads of northern oysters. Biol. Bull., 103: 80~96.
- Loosanoff V. L. 1965. Gonad development and discharge of spawn in oysters of long island sound. Biol. Bull., 129: 546~561.
- Lucas A. 1982. Evaluation of reproductive effort in bivalve molluscs. Malacologia, 22: 183~187.

- Montes J. F., M. Durfort and J. García-Valero. 1996. When the venerid clam *Tapes decussatus* is parasitized by the protozoan *Perkinsus* sp. it synthesizes a defensive polypeptide that is closely related to p225. *Dis. Aquat. Org.*, 26: 149~157.
- Muzammil A. 1975. Speciation in living oysters. *Adv. mar. Biol.*, 13: 357~397.
- Ouchterlony O., and L. A. Nilsson. 1973. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis, pp.19.1~19.44. In "Handbook of Experimental Immunology" (ed. D. W. Weir). Blackwell Scientific Publications.
- Parker R. W. and D. H. Lewis. 1995. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio vulnificus* hemolysin to detect *V. vulnificus* in environmental specimens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2): 476~480.
- Park M. S., H. J. Lim, Q. Jo, J. S. Yoo and M. J. Jeon. 1999. Assesment of reproductive health in the wild seed oysters, *Crassostrea virginica*, from two locations in Korea. *J. Shellfish Res.*, 18(2): 445~450.
- Paugam A., M. L. Pennec, and A. F. Geneviève. 2000. Immunological recognition of marine bivalve larvae from plankton samples. *J. Shellfish Res.*, 19(1): 325~331.
- Pierce, G. J., J. S. W. Diack and P. R. Boyle. 1990. Application of serological methods to identification of fish prey in diets of seals and dolphins. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 137: 123~140.
- Powell, E. N., E. A. Wilson-Ormond, and K. S. Choi. 1993. Gonadal analysis - *Crassostrea virginica*, pp.55~62. In "NOAA Technical Memorandum NOSORCA 71, vol. 11" (ed. G. G. Lauenstein and

- A. Y. Cantillo). National Oceanic and Atmospheric Administration.
- Rainer J. S. and R. Mann. 1992. A comparison of methods for calculating condition index in eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). J. Shellfish Res., 11(1): 55~58.
- Sitja-Bobadilla A. and P. T. K. Woo. 1994. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against the pathogenic haemoflagellate, *Cryptobia salmositica* Katz, and protection against cryptobiosis in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), inoculated with a live vaccine. J. Shellfish Res., 17: 399~408.
- Sprung M. 1983. Reproduction and fecundity of the mussel *Mytilus edulis* at Helgoland (North Sea). Helgoländer Meeresunters., 36: 243~255.
- 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.
- Wildish D. J. and D. D. Kristmanson. 1985. Control of suspension feeding bivalve production by current speed. Helgoländer Meeresunters., 39: 237~243.
- Winstead J. T. 1995. Digestive tubule atrophy in eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), exposed to salinity and starvation stress. J. Shellfish Res., 14(1): 105~111.
- Xie Q. and G. M. Burnell. 1994. A comparative study of the gametogenic cycles of the clams *Tapes philippinarum* (A. Adams & Reeve 1850) and *Tapes decussatus* (Linnaeus) on the south coast of Ireland. J. Shellfish Res., 13(2): 467~472.

감사의 글

돌이켜 보매, 무척이나 즐거웠던 대학원 생활이었습니다. 변함없는 학문적 열정과 도전으로 저를 이끌어 주시고 이 실험을 할 수 있도록 모든 준비를 하여 주신 최광식 교수님과 힘겨울 때마다 항상 곁에서 위안이 되어 주었던 실험실 선·후배들이 있었기 때문이라 믿습니다.

그 동안 애써주신 분들께 이렇게 감사의 마음을 전할 수 있어 얼마나 다행인지 모릅니다. 바쁘신 와중에도 부족한 논문을 꼼꼼히 수정해 주신 이영돈 교수님, 이제희 교수님께 감사드립니다. 그리고 대학원 과정 동안 관심과 격려를 주신 이정재 교수님, 정상철 교수님, 이기완 교수님, 노 섬 교수님, 송춘복 교수님, 허문수 교수님, 여인규 교수님께 감사하는 마음을 드립니다. 또한 면역분석 실험을 위해 늘 옆에서 지켜봐 주셨고, 하나하나 지도해 주신 Pacific Institute of Bioorganic Chemistry의 초청 과학자인 Bulgakov 박사님께도 감사드립니다. 실험의 모든 과정 동안 든든한 버팀목이었던 경일이형, 창호형, 주한이형, 도형이형과 실험실 후배인 창용이, 덕임이, 대권이에게 힘들고 귀찮은 일만 부탁한 것 같아 미안합니다. 부디 준비하는 일마다 좋은 결과가 있었으면 합니다. 한번도 표현하지 못했지만 고성만 현장 채집 때마다 가족 같이 챙겨주셨던 남해수산연구소의 김성연 선생님께 늘 감사하고 있었던 마음을 전해 드리고 싶습니다.

마지막으로 끝없는 사랑과 믿음으로 막내를 뒷바라지하신 어머님과 형님, 누님들께 이제 시작에 불과한 이 논문을 드리며, 밤샘 작업으로 졸린 눈을 비비던 지예에게 고마움을 전합니다.

늘 부지런함이 넘치는... 그런 사람이 되겠습니다.