

적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*의 세포표면 특이항원 단백질의 분리

김광현* · 한창희¹ · 이재훈 · 김병우 · 이복규¹
동의대학교 미생물학과, ¹동의대학교 생물학과

Isolation of a Specific Antigen Protein on Cell Membrane of *Cochlodinium polykrikoides*, Red Bloom Algae. Kim, Kwang-Hyeon*, Chang-Hee Han¹, Jae-Hun Lee, Byung-Woo Kim, and Bok-Kyu Lee¹. Department of Microbiology, Dongeui University, 614-714, Busan, Korea, ¹Department of Biology, Dongeui University, 614-714, Busan, Korea – To establish a rapidly immunochemical identification on a dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides*, a specific antigenic protein as a maker on the cell membrane was isolated. The cell membranes of *C. polykrikoides* and *Gymnodinium sanguineum* were harvested by centrifugation after osmotic shock. The membrane proteins of both cells were solubilized in 50 mM Na-carbonate contained 1mM DTT, and separated the proteins on SDS-PAGE. Immuno-blot on the solubilized membrane proteins of the both cells was performed with antiserum against the solubilized membrane proteins of *C. polykrikoides*. A 120 kDa membrane protein of *C. polykrikoides* had remarkably different antigenicity from that of *G. sanguineum*.

Key words: *Cochlodinium polykrikoides*, identification, cell membrane, specific antigenic protein

최근 들어 해양오염의 증가와 부영양화로 연안환경이 악화되어 감에 따라 우리나라에서 규조류 및 각종 편모조류에 의한 적조 발생회수가 90년대 이후부터 급증하고 있으며, 이로 인한 각종 양식 어패류의 대량 폐사 등 산업적 피해도 막대한 양에 이르고 있다[5, 6, 13, 20]. 이들 적조를 일으키는 원인 생물 중에도 특히 문제가 되는 것은 유독성 와편모 조류로서 이들이 생산하는 유독 성분들에 의하여 어패류가 폐사하여 양식에 어려움을 주고 있다[13, 17, 20]. 이들 중 특히 *Cochlodinium polykrikoides*는 1982년 이후 우리나라에서 계속적으로 적조를 일으킨 원인 생물 중에 하나이며, 고밀도(10,000 cells/ml 이상)로 넓은 해역에서 발생하여 막대한 피해를 일으켰다[14, 19]. *C. polykrikoides*는 현재 우리나라 및 일본 부근에서만 출현하는 무각, 점액성 와편모 조류이고 *Gymnodiniaceae*과에 속하며, 어패류를 폐사시키는 적조 원인 생물이다[15]. 또한, *Gymnodinium*속의 조류도 와편모 조류로서 *C. polykrikoides*과 동일한 과(family)에 속하며, 전 세계적으로 많이 발생하는 적조 원인생물로 보고되고 있어 [3, 4, 8, 11, 22, 24, 26, 27], 이에 대한 동정은 몇 가지가 고안되어 있으나[7, 9, 18, 21, 25] *C. polykrikoides*에 대한 동정은 형태학적 분류 이외에 생화학적 방법을 이용한 동정법이 거의 연구되어 있지 않다. 특히, 이들 2종의 세포들을 구별하기 위하여 단순히 현미경을 이용한 형태학적인 분류에

만 의존하면 이들이 단세포로 존재할 경우에는 전문가들조차도 이들 세포를 구별하는데 혼란을 초래할 가능성이 있다 (Fig. 1). 따라서, 본 연구에서는 국내에서 발생하는 적조 원인 생물 중에서도 형태학적으로 유사한 *C. polykrikoides*와 *G. sanguineum*을 사용하여 이들 2종의 와편모 조류를 생화학적으로 간단히 구별할 수 있도록 일종의 marker로서 *C. polykrikoides*의 세포막에 존재하는 특이항원 단백질을 분리하고자 하였다.

재료 및 방법

적조생물 및 배양방법

본 실험에 사용된 적조생물은 *Cochlodinium polykrikoides* 과 *Gymnodinium sanguineum*으로 국립수산진흥원 적조 생물과에서 분양 받았다. 이들 적조생물들의 배양을 위해 f/2 배지가 사용하였으며[10], 23°C의 항온기에서 정지 배양을 행하였다. 이때 조도는 3,000 Lux 이상을 유지하였으며 광 조사는 14 L : 10 D로 행하였다.

적조생물의 계측

배양된 적조생물들은 Park 등이 기술한 방법[20]에 따라 Lugol시약을 가하여 Sedwick-Rafter 계측판에서 광학 현미경(Olympus BH-2)으로 측정하였다.

적조생물의 막 단백질의 분리

적조생물(6,000 cells/mL)의 배양액 2 L를 원심분리(3,000

*Corresponding author
Tel. 82-051-890-1533, Fax. 82-051-890-1532
E-mail: kimkh@dongeui.ac.kr

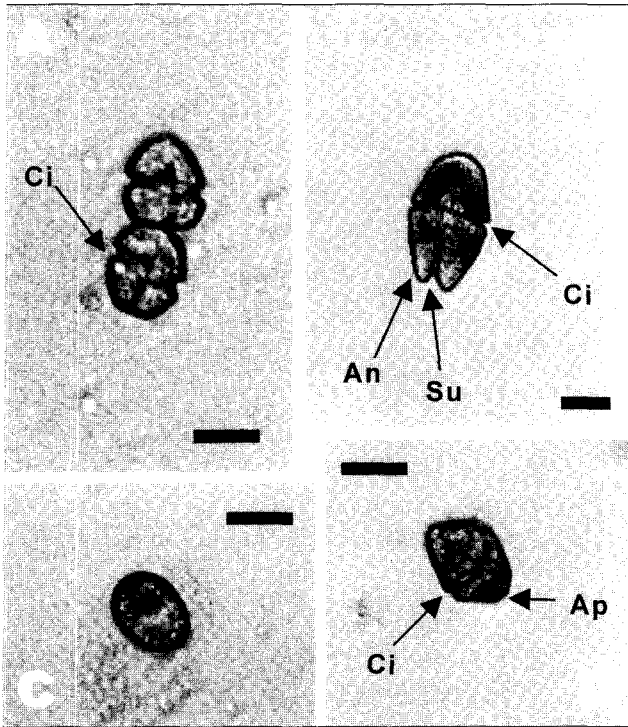


Fig. 1. Morphological Shape of *C. polykrikoides* and *G. sanguineum*.

The cells were observed by optical microscope and scale bars mean 20 μ m. A, fused cell of *C. polykrikoides*; B, single cell of *G. sanguineum*. C, cyst of *C. polykrikoides*; D, single cell of *C. polykrikoides*; An, antapical horn; Ap, apical horn; Ci, cingulum.

rpm, 20 min)하여 상층액은 제거하고 세포만을 수집하였다. 이 수집된 세포를 증류수에 현탁시킨 후 4°C에서 1시간 동안 방치하여 삼투압으로 세포를 터뜨려 파괴하였다. 파괴된 적조생물의 세포는 원심분리(6,000 rpm, 15 min)하여 세포질에 함유된 수용성 물질들을 모두 제거하고, 남은 침전물은 세포막 단백질로 사용하였다.

막 단백질 항원 조제

조제된 막 단백질에 1 mM DTT(Dithiothreitol)가 함유된 50 mM Na_2CO_3 (pH 10.4) 500 μ l를 가하고 incubation(37°C, 1.5 hr)하여 막 단백질을 용해시켰다. 그 후 용해된 액은 원심분리(13,000 rpm, 5 min)를 행하여 모으고, 100 mM Tris·HCl 완충액을 가하여 pH를 8.0으로 조정후 항원 단백질로 사용하였다.

특이 항원 단백질의 분리

상기의 막 단백질을 용해하는 방법과 동일한 방법으로 1 mM DTT가 함유된 50 mM Na_2CO_3 에 적조생물의 세포막 단백질을 용해하였다. 용해된 막 단백질은 Laemmli의 방법 [16]에 따라 전기영동(SDS-PAGE; 15% separating gel, 20 mA)을 행하였으며, 또한 Bio-Rad사의 안내서에 따라

immuno-blot를 행하였다. 그 후 *G. sanguineum*의 막 단백질에는 없고 *C. polykrikoides*의 세포막에만 존재하는 120 kDa 단백질 band를 SDS-PAGE로부터 절취하여 Amero 등이 기술한 방법 [2]에 따라 동결 건조시켜서 특이단백질의 항원으로 사용하였다.

항체의 생산 및 정제

*C. polykrikoides*의 용해된 전체 막 단백질 항원과 SDS-PAGE로 분리한 120 kDa의 특이항원 단백질은 모두 Tris·HCl 완충액으로 pH를 8.0으로 조정하고, 토끼의 피하에 1주일 간격으로 5회 주사하여 항체를 생산시켰다. 이때 Freund's complete adjuvant(Sigma) 1 ml는 항원과 잘 섞은 후 처음 주사에만 사용되었으며, 주사된 항원 단백질량은 100 μ g/회였다.

마지막 항원을 주사하고 1주일 후에 면역된 토끼의 혈액을 채취하여 효소항체법 [23]으로 항체 생성을 확인한 후 토끼의 경동맥을 통해 혈액 모두를 회수하고 혈청을 분리시켰다. 분리된 혈청은 56°C에서 30분간 가열하여 보체를 비활성화시킨 후 Na_2SO_4 로 염석과 투석을 행하고, Johnstone 등이 기술한 방법 [12]에 따라 Protein A Sepharose 4B(Sigma Co. p9424)를 이용하여 *C. polykrikoides*의 전체 막단백질과 특이단백질인 120 kDa 단백질에 대한 항체를 각각 정제하였다.

Immuno-blot

Bio-Rad사의 안내서에 따라 항원을 SDS-PAGE를 행한 후 nitro-cellulose membrane에 항원 단백질을 blotting시켰다. Blotting된 항원 단백질은 peroxidase가 결합된 anti-rabbit-antibody가 함유된 immuno-blot kit(Bio-Rad Co.)를 사용하여 안내서에 따라 *C. polykrikoides*로부터 제조된 항원 단백질을 immuno-blot하였다.

결과 및 고찰

적조생물의 배양

본 실험에 사용된 적조생물인 *C. polykrikoides* 및 *G. sanguineum*를 생육시킨 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 배양 7일까지 급격히 증가하였으나, 그 이후는 생육이 서서히 진행되었다. 특히 *G. sanguineum*는 배양한지 10일에 최고에 도달하였으며, *C. polykrikoides*는 20일까지 계속 증가하였다. 또한 이들 적조생물의 배양온도는 예비실험 결과 22~23°C가 적당하였으며, 특히 *C. polykrikoides*은 배양 19일째에는 cell의 수가 ml 당 9,000마리까지 배양되어 field에서 적조가 발생하는 양만큼 대량으로 배양되었다.

막 단백질의 분리 및 확인

*G. sanguineum*과 *C. polykrikoides*의 세포로부터 알카리에

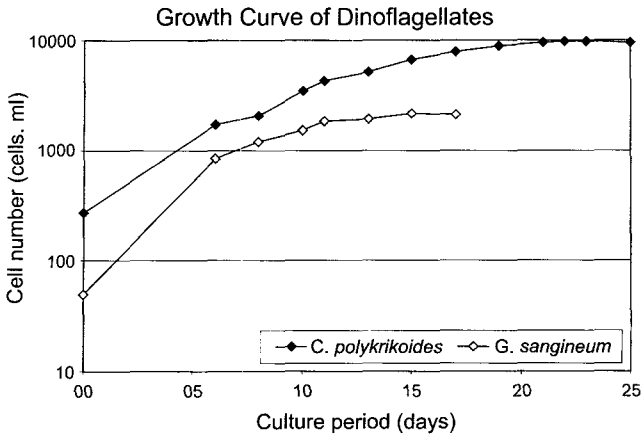


Fig. 2. Growth curve of *C. polykrikoides* and *G. sanguineum*. Each strain was cultured in f/2 medium at 23°C (14 L : 10 D) and cells were directly counted with Sedwick-Refter counting plate by microscope.

용해된 막 단백질을 전기영동(SDS-PAGE) 한 결과 Fig. 3A에서 보는 바와 같이 120, 60 및 45 kDa 크기의 3가지 주 단백질이 존재하였다. 또한, 이들을 immuno-blot한 결과 Fig. 3B에서 보는 바와 같이 양 세포의 표면에는 40~45 kDa 크기의 공통된 항원이 존재하였다. 따라서 이들 단백질은 동일한 과(family)에 속하는 외편모조류의 공통된 항원일 가능성이 있다. 한편, 이들 중 120 kDa의 막 단백질은 SDS-PAGE상에서 양 세포 모두에 존재하였지만(Fig. 3A), *C. polykrikoides*의 막 단백질 항체를 사용한 immuno-blot상에서는 *C. polykrikoides*의 막 단백질에만 뚜렷이 120 kDa 크기의 단백질이 나타났으며, *G. sanguineum*의 동일한 크기의 단백질에는 항체결합에 의한 band가 나타나지 않았다(Fig. 3B). 따라서 양 세포의 120 kDa 크기의 막 단백질은 항원성에서 서로 차이가 있어 이 120 kDa의 막 단백질만을 분리하

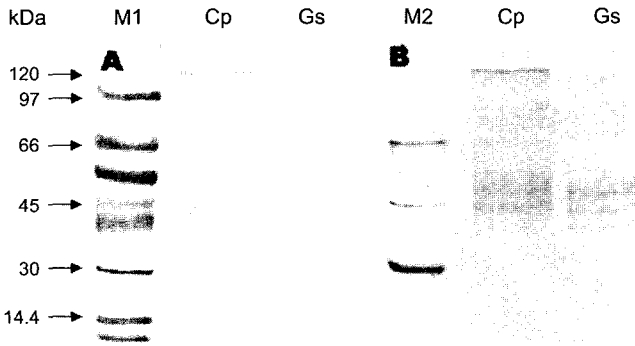


Fig. 3. Pattern of SDS-PAGE and immuno-blot on membrane proteins. A indicates pattern of SDS-PAGE on membrane proteins solubilized in 50 mM Na₂CO₃ and B indicates immuno-blot of membrane proteins solubilized in 50 mM Na₂CO₃. The anti-serum against membrane proteins of *C. polykrikoides* was used. M1, molecular marker; M2, blotting marker; Cp, *C. polykrikoides*; Gs, *G. sanguineum*.

여 면역항체법으로 2종의 적조생물을 구별할 수 있을 것이라고 사료된다.

특이항원 단백질의 분리 및 확인

*C. polykrikoides*의 세포막 단백질 중 *G. sanguineum*의 막 단백질과는 그 항원성이 다른 120 kDa의 막 단백질을 SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 120 kDa의 막 단백질과 이에 대한 항체를 사용하여 immuno-blot를 행한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 *G. sanguineum*의 막 단백질과는 전혀 반응이 나타나지 않았으나, *C. polykrikoides*의 120 kDa 막 단백질과만 반응이 되어 2종의 세포에 존재하는 120 kDa의 막 단백질 사이에는 항원성에서 차이가 있음을 확인하였다. 따라서, 이는 *C. polykrikoides*와 *G. sanguineum*는 모두 동일한 *Gymnodiniaceae*과에 속하므로 양 세포의 표면에는 공통 항원(40~45 kDa)도 존재하지만, 종(species)이 다르기 때문에 *C. polykrikoides*에서 *G. sanguineum*과는 항원성이 다른 120 kDa의 막 단백질이 분리되었다.

생화학적으로 적조생물의 세포를 동정하기 위한 방법에는 유전자를 이용하는 방법[1, 9], 세포표면의 당과 특이적인 반응을 하는 lectin을 이용하는 방법[7] 및 세포표면의 단백질을 이용한 항체법[18, 21, 25] 등이 있다. 이들 중 유전자와 lectin을 이용한 방법은 세포동정에는 활용할 수 있으나, 정량에는 고가의 장비가 필요하며 그 과정이 복잡하기 때문에 어려움이 있다. 그러나, 효소면역학적인 방법은 특별히 고가 장비가 필요 없으며, 단지 ELISA(Enzyme linked immuno-assay)측정에 필요한 reader만으로 세포의 동정뿐만 아니라 그 양도 쉽게 측정할 수 있는 장점이 있어 분리된 120 kDa의 특이항원 단백질을 이용하면 적어도 *G. sanguineum*와 *C. polykrikoides*이 혼재되어 있는 field에서도 *C. polykrikoides*만을 구별할 수 있다. 따라서 *C. polykrikoides*에 이 120 kDa의 특이 단백질을 이용한 효소면역학적인 방법을 이용하

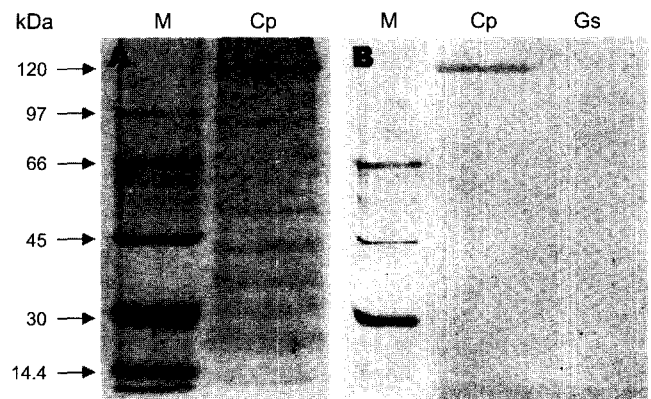


Fig. 4. Immuno-blot on specific protein of *C. polykrikoides*. A indicates immuno-blot with anti-serum against the 120 kDa protein of *C. polykrikoides* and B indicates immuno-blot with purified IgG against the 120 kDa protein of *C. polykrikoides*. M, blotting marker; Cp, *C. polykrikoides*; Gs, *G. sanguineum*.

년 해양에 존재하는 *C. polykrikoides*의 수를 정확히 측정하여 적조발생에 필요한 중요한 지표로 활용될 수 있을 것이라고 사료된다.

요 약

우리나라 연안에 주로 발생하는 적조인 *Cochlodinium polykrikoides*를 빠르고 정밀한 생화학적인 방법으로 측정하기 위한 일종의 maker로서 *C. polykrikoides*의 세포막에 존재하는 특이 항원성을 가진 막 단백질을 분리하였다. 먼저, *C. polykrikoides*와 *Gymnodinium sanguineum*의 세포를 삼투압으로 터뜨린 후 원심분리하여 세포막을 모았다. 그 후 양 적 조생물의 세포막은 1 mM DTT가 함유된 50 mM Na-carbonate로 용해하고 SDS-PAGE행하여 용해된 막 단백질을 분리하였다. SDS-PAGE로 분리된 막 단백질은 *C. polykrikoides*의 세포 막 단백질로 제조한 항혈청을 사용하여 immuno-blot한 결과 *C. polykrikoides*의 120 kDa의 단백질이 *G. sanguineum*의 동일한 크기의 막 단백질과는 서로 다른 항원성을 나타내었다.

감사의 글

국립수산진흥원 적조생물과의 김 학균 박사님과 이 삼근 박사님께 적조생물을 분양해 주신데 대해 감사드립니다.

REFERENCES

- Adachi, M., Y. Sako, and Y. Ishida. 1997. Analysis of *Gymnodinium catenatum* dinophyceae using sequences of its regions and random amplified polymorphic DNA. *Fish. Sci.* **63**: 701-707.
- Amero, S. A., T. C. James, and S. C. R. Elgin. 1988. Production of antibodies using proteins in gel. pp. 355-362, In Walker J. M (ed.), *Methods in molecular biology*. vol. 3. Humana Press, Clifton, New Jersey.
- Anderson, D. M. 1989. Toxic algal bloom and red tides, pp. 11-16, In Okaichi, T., D. M. Anderson and T. Nemato (ed.), A global perspective in red tides, Elsevier, New York.
- Bockstahler, K. R. and D. W. Coats. 1993. Grazing of the mixotrophic dinoflagellate *Gymnodinium sanguinum* on ciliate Chesapeake Bay. *Marine Biol.* **116**: 477.
- Cho, C. H. 1978. On the *Gonyaulax* red tide in Jinhae Bay. *Bull. Kor. Fish. Soc.* **11**: 111-114.
- Cho, C. H. 1981. On the *Gymnodinium* red tide in Jinhae Bay. *Bull. Kor. Fish. Soc.* **14**: 227-232.
- Cho, E. S., D. W. Kang, and Y. C. Cho. 2000. Identification of *Cochlodinium polykrikoides* against *Gymnodinium impudicum* and *Gymnodinium catenatum* in field samples using FITC lectin probes. *J. Fish. Sci. Technol.* **3**: 83-87.
- Coats, D. W. and K. R. Bockstahler. 1994. Occurrence of the parasitic dinoflagellate *Amoebophrya ceratii* in Chesapeake populations of *Gymnodinium sanguineum*. *J. Eukaryotic Microbiol.* **41**: 586.
- Godhe, A., S. K. Otta, A. S. Rehnstam-Holm, I. Karunasager, and I. Karunasagar. 2001. Polymerase chain reaction in detection of *Gymnodinium mikimotoi* and *Alexandrium minutum* in field samples from Southwest India. *Marine Biotech.* **3**: 152-162.
- Guillard, R. L and J. H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedtdt) and *Detonula conferracea* (Cleve). *Gram. Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239.
- Hallegraeff, G. M. and S. Fraga. 1998. Bloom dynamic of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, with Emphasis on Tasmanian and Spanish Coastal Waters. *NATO ASI Ser. G Ecol. Sci.* **1989**: 59-80.
- Johnstone, A. and R. Thorpe. 1987. *Immunochemistry in practice*. pp. 216, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London.
- Kim, H. G., J. S. Park, and S. G. Lee. 1990. Coastal algal bloom caused by the cyst-forming dinoflagellates. *Bull. Kor. Fish. Soc.* **23**: 468-478.
- Kim, H. G., K. Matsuoka, S. G. Lee, and K. H. An. 1996. The Occurrence of a Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* From Chinhae Bay, Korea. *Bull. Kor. Fish. Soc.* **29**: 837-842.
- Kim, Y. S., Y. S. Lee, J. S. Park, and C. I. Baik. 2001. A study of the occurrence of *Cochlodinium polykrikoides* off the southern coast of Korea. *Japan Soc. Water Environ.* **24**: 871-876.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, J. S. 1996. Bioactive components from Red tides plankton, *Cochlodinium polykrikoides*, *Bull. Kor. Fish. Soc.* **29**: 156-173.
- Mendoza, H., V. Lopez-Rodas, S. Gonzalez-Gil, and A. Aguilera. 1995. The use of polyclonal antisera and blocking antibodies in the identification of marine dinoflagellates: species-specific antisera against *Gymnodinium* and *Alexandrium*. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* **186**: 103.
- Park, J. G., M. K. Jeong, J. A. Lee, K. -J. Cho, and O. -S. Kwon. 2001. Diurnal vertical migration of a harmful dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae) during a red tide in coastal waters of Namhae Island, Korea *Phycologia* **40**: 292-297.
- Park, J. S., H. G. Kim and S. G. Lee. 1988. Red tide occurrence and succession of its causative organism in Jinhae Bay. *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency* **41**: 1-26.
- Shapiro, L. P., L. Campbell, and E. M. Haugen. 1989. Immunochemical recognition of phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **57**: 219-224.
- Steidinger, K. A., G. A. Vargo, P. A. Tester and C. R. Tomas. 1998. Bloom dynamics and physiology of *Gymnodinium breve* with emphasis Maxico. *NATO ASI Ser. G Eco. Sci.* **1989**: 133-154.

23. Voller, A., D. E. Bidwell, and A. Baclett. 1980. Enzyme-linked immuno-sorbent assay. pp. 359, In Rose, N. R. and H. Friedman (eds.), Manual of clinical immunology, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington D.C.
24. Voltolina, D. 1993. The original recurrent blooms of *Gymnodinium sanguineum* Hirasaka in a shallow coastal lagoon. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* **68**: 217.
25. Vrieling, E. G., L. Peperzak, W. W. C. Gieskes, and M. Veenhuis. 1994. Detection of ichthyotoxic dinoflagellate *Gyrodinium*(cf.) aureolum and morphologically related *Gymnodinium* species using monoclonal antibodies: immunological tool. pp. 165, In Marine Ecology, Progress Series, vol.**103**, Inter Research.
26. West, T. L., H. G. Marshall, and P. A. Tester. 1996. Natural phytoplankton community responses to a bloom of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium breve* Davis off the North Carolina Coast, pp. 356-368, In Morgantown, W. Va., vol.**61**, Southern Appalachian Botanical Society.
27. Wu, Y. -L., C. -X. Zhou, Y. -S. Zhang, X. -M. Pu, and W. -H. Li. 2001. Evolution and causes of formation of *Gymnodinium sanguineum* Bloom in Yantai Sishili Bay. *Oceanologia et Limnologia.* **32**: 159-167.

(Received Apr. 30, 2002/Accepted Sep. 24, 2002)