



포르말린 폭로에 따른 스쿠티카충의 유전체 발현 특성

서정수*† · 정승희** · 지보영** · 권문경** · 황지연*
*국립수산과학원(연구소) · **국립수산과학원(연구관)

Characterization of Transcriptome Expression in Scuticociliate, *Miaminesis avidus* under Formalin Exposure

Jung-Soo SEO*† · Sung-Hee JUNG** · Bo-Young JEE** · Mun-Gyeong KWON** · Jee-Youn HWANG*
*National Institute of Fisheries Science (researcher) · **National Institute of Fisheries Science (senior researcher)

Abstract

Scuticociliate are one of the main parasite affecting the flounder aquaculture industry, causing significant economic losses in Korea. Aquatic formalin has been approved to treat against external parasitic infestation in flounder aquaculture pond. To investigate metabolic effect after treating the parasitic agent aquatic formalin in scuticociliate *Miaminesis avidus*, the transcriptome analysis was conducted. Through exposing with low concentration(10~50 ppm) of formalin for 96 hr, parasite transcriptomes were sequenced cDNA libraries in the GX Plex sequencer. A total of million read for control and formalin treated group were assembled in 187,210 and 177,959 contigs, respectively. After normalization and assembling with house keeping gene(β -actin), transcripts were assigned to biological processes and functions after annotation in Gene Ontology(GO). Specifically, 10 exclusive transcripts were up- or down-regulated for control and formalin treated group, respectively. Our results provide valuable genetic information for further analysis of the biological responses mechanism of aquatic formalin exposure in *M. avidus*.

Key words : Formalin, Scuticociliate, *Miaminesis avidus*, Transcriptome, Formaldehyde

I. 서론

전 세계적으로 수산양식 산업의 급속한 성장으로 인한 수산생물의 생산량 증가와 더불어 양식생물의 질병발생이 증가함에 따라 양식현장에서 수산용의약품의 사용빈도가 증가하고 있는 실정이다. 수산용의약품의 사용은 수산생물의 질병을 예방·치료 및 안전한 수산식품의 생산에 있어 매우 중요한 영향을 미치고 있다. 국내 수산용의약품 판매시장은 300 억원대 시장으로 동물용의약

품 8,000 천원의 대략 4% 이내로 매우 작은 시장이며, 판매의약품이 항생·항균제, 수산용백신 및 대사소화기계 의약품이 많은 판매범위를 차지하고 있다.

국내외 양식어류에 발생하는 기생충성 질병을 치료하기 위해 수산용 포르말린이 일반적으로 수십년 동안 구충제로 사용되어 왔다. 국내의 수산용 포르말린은 2006년도에 국립수의과학검역원(현 농림축산검역본부)으로부터 품목허가 받아 현재는 11개사 11개 제품이 판매되고 있으며 넓

† Corresponding author : 051-720-3022, jsseosoo@korea.kr

* 이 논문은 2018년 국립수산과학원 수산생물 방역프로그램 개발·운영 지원에 의해 수행되었음.

치에서 발생하는 외부기생성 원충류(*Ichthyobodo* sp., *Scuticociliatida*)에 대하여 100~200 ppm, 1시간 약욕 및 무지개 송어와 연어의 난에 감염하는 수생균(*Sprolegnia* spp.)에 1,000~2,000 ppm, 15분 약욕의 용법·용량으로 사용하도록 허가되어 있다 (NIFS 2016).

국외에서는 수산용 포르말린이 미국, 호주, 캐나다 등에서 수산용의약품으로 품목허가 되어, 양식장의 외부 기생충 및 곰팡이성 질병에 대한 치료약제로 사용되어 왔다(Schnick, 1991; Rach et al., 1997).

국내외에서 수산용 포르말린의 어류 기생충 구제 효능효과 등을 연구한 다양한 논문이 보고되고 있다. 넙치 스키테카충(Jung et al., 2001), 감성돔(Myeong et al., 2013), 뱀장어(Jung et al., 2010), 농어 및 복섬에 감염된 갈리구스충 (*Caligus* sp.), 넙치 트리코디나충(*Trichodina* sp.) 및 yellowtail kingfish 베네데네아충(*Benedenia seriolae*)에 대해서도 구제 효과를 보고하였다. (Dayanadol & Grajaaywong, 1996; Sharp et al., 2004; Seo et al., 2010). 또한, 뱀장어 아가미흡충 (Møllergaard & Dalsgaard, 1987) 및 새우 *Peritrichous ciliates*(Bell et al., 1987) 구제를 위한 효능효과를 측정하였고 대부분 사용용량은 최대 200 ppm 이하로 보고되었다. 수산용 포르말린은 수온, 빛, 용존 산소 등 수계 환경 요인에 의하여 기생충 구제의 효능효과에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (Myeong et al., 2013; Woo et al., 2018; Jung et al., 2001). 국내 양식 넙치는 고밀도 육상 수조식 양식으로 치어 양식에 있어 스키테카충 질병이 만연 하다고 알려져 있어 구제제로서 수산용 포르말린 제품이 많이 사용되고 있다. 그러나, 일부 양식 어가에서는 양식 사육 환경개선보다 수산용 포르말린의 지속적 사용에 따른 스키테카충 내성이 발생되어 수산용 포르말린 효능이 감소되므로 양식현장에서는 실제 수산용 포르말린 용량을 늘려 사용하고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 국내 주요 양식어류인

넙치 기생충성 질병인 스키테카충이 수산용 포르말린 폭로(exposure)에 따른 분자생물학적 대사체계의 변화를 유전체(transcriptome)로 측정하여 스키테카충의 수산용 포르말린에 대한 영향을 분자생물학적으로 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 스키테카충 분리 및 배양

시험에 사용한 스키테카충은 2008년 6월 울산의 육상 콘크리트 수조(수온 20℃)에서 사육하던 넙치의 뇌 조직에서 Seo et al.(2013)이 보고한 방법으로 분리하여 분자생물학적으로 동정된 *M. avidus*를 사용하였다. 분리·동정된 충은 10% FBS (Sigma)와 penicillin-streptomycin 항생제 (100 units/ml-100 µg/ml, Sigma)가 첨가된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Corning)에서 배양된 CHSE-214 세포주에 접종하여 배양하였다. CHSE-214 세포주가 배양된 25 cm² T culture flask(Corning)에 충을 접종하고 20℃에서 14일마다 계대배양하면서 유지하였으며, 대량배양은 여러 개의 75 cm² T culture flask에서 충을 접종하여 배양하였다.

2. *in vitro* 상의 수산용 포르말린 투여

75 cm² T culture flask 내에서 배양된 스키테카충에 시판(피시마린, 이화팜텍(주))되는 수산용 포르말린 제품을 농도별(10, 30, 50 ppm)로 접종한 후 96시간 동안 폭로(exposure)시키면서 배양하였다. 배양된 충체는 여러 번(10회) 75 cm² T culture flask 계대배양을 하면서 동일 농도의 수산용 포르말린으로 다시 폭로(exposure) 및 배양하였다. 최종적으로 수산용 포르말린에 폭로(exposure)된 스키테카충은 CHSE-214 세포주가 없어질 때까지 배양한 후, 스키테카충을 저속원심 분리기를 이용하여 충체만을 분리하였다. 분리된 충체는 Hanks balanced salt solution(Sigma)으

로 3회 세척한 후 RNA를 뽑기 위하여 Trizol(Sigma)시약을 첨가하였다.

3. RNA 분리 및 NGS transcriptome 분석

RNA 분리를 위하여 스쿠티카충은 대조구와 수산용 포르말린 농도별 처리구에서 각각 tissue-lyser를 이용하여 잘게 분쇄하였으며, 수산용 포르말린 처리구의 샘플은 혼합하여 아래 과정을 수행하였다. 충분히 충을 분쇄한 후 chlorform을 넣어 잘 섞은 후 다시 분쇄하여 수회의 원심 분리 등을 거쳐서 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 UV spectrometry로 순도를 측정하고 후 cDNA rapid library를 제작하고자 Dynabead mRNA purification kit(Invitrogen)로 mRNA를 분리하였다. 분리된 mRNA는 Song et al.(2016)에서 보고된 다양한 전처리 과정 등을 거친 후 cDNA library를 제작하였다. 제작된 샘플은 GS Flx Plus system(Life Science)을 이용하여 시퀀싱(Sequencing)을 수행하였다.

4. 유전체의 BLAST 및 Gene Ontology (GO) 분석

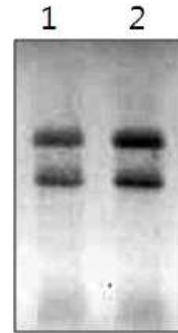
GS Flx 기기를 이용하여 시퀀싱(Sequencing)은 Auto assembler에 의하여 assembly를 실시한 후 기기의 Newbler assembly program(ver 2.6)을 이용하여 transcriptome은 자동적으로 contig를 만든 후, blast search를 수행하였다. NCBI blast 수행 데이터는 상용화된 Blast2GO version 2.5(Gotz et al., 2008) 프로그램을 이용하여 Gene Ontology(GO)등을 분석하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 스쿠티카충의 RNA 순도

CHS-214에서 순수 배양되어진 스쿠티카충 및 수산용 포르말린을 96시간 폭로(exposure)시켜 배

양한 스쿠티카충을 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 분리한 스쿠티카충의 RNA 순도는 [Fig. 1]에서 보는 바와 같이 매우 순도가 높게 나타났다.



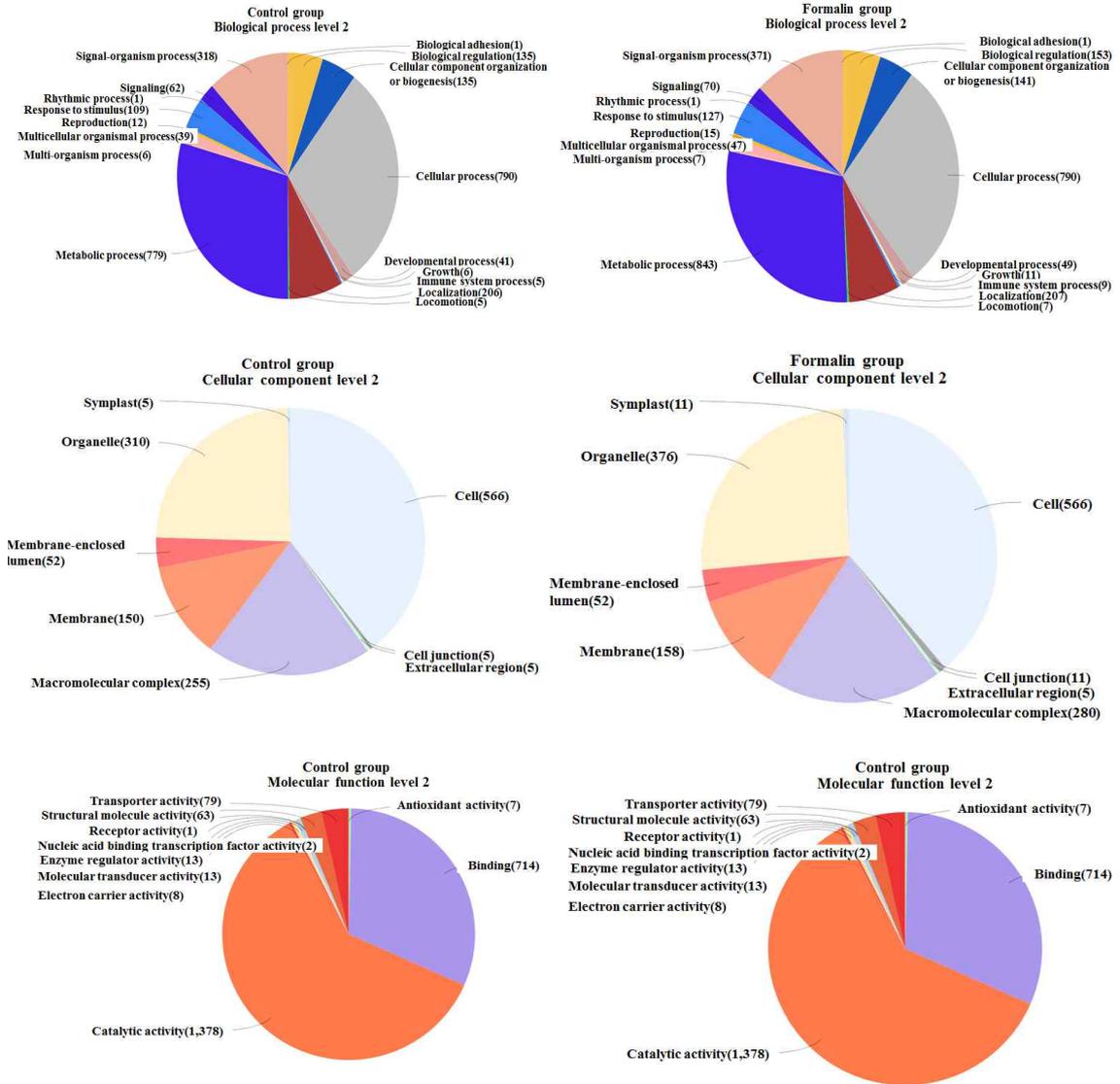
[Fig. 1] RNA identification of scuticociliate, *Miaminesis avidus*. 1; parasite in 0 ppm formalin exposure (Control), 2; parasite in 10~50 ppm formalin exposure for 96 hour.

2. 스쿠티카충의 유전체 분석

수산용 포르말린은 양식장 내에서 발생하는 외부 기생충 및 수생균을 구제하는 화학물질로 미국, 캐나다, 한국 등에서 허용되어 사용되고 있는 수산용의약품이다(Voorhees and Barnes, 2016).

수산용 포르말린의 투여에 따른 어류 내성 영향은 여러 논문에서 발표되었으나, 외부기생충 구제로서 사용 시 기생충의 생화학적 영향에 대한 연구는 전무한 편이다. 수산용 포르말린은 다양한 외부환경 중 수온 등에 의하여 약품의 활성에 영향을 많이 받는다고 알려져 있다(Woo et al., 2018). 본 연구에서 차세대염기서열기(GX Flex)를 이용하여 대조구 및 수산용 포르말린 처리 스쿠티카충으로부터 187,210 및 177,959 contig 유전체를 각각 얻었다. 얻어진 샘플의 스쿠티카충 RNA level 내 각 대사체계 process상의 단백질 발현 패턴을 분석하기 위하여 Blast2GO를 이용한 gene ontology를 수행하였다([Fig. 2]).

포르말린 폭로에 따른 스키타카충의 유전체 발현 특성



[Fig. 2] Gene Ontology(GO) annotation associated with the transcriptome of *M. avidus*.

Biological process 결과에 따르면, 전체적인 단백질의 구성성분 패턴은 변화가 없으나, primary metabolic process에 관련된 유전자들이 수산용 포르말린 처리에 따라 증가하며, 대체적으로 세포 내 대사에 관련된 유전자 수의 발현이 증가함을 알 수 있었다. 마찬가지로 세포 내 구성성분 (Cellular component)의 변화를 조사하였을 때에도

수산용 포르말린 처리에 따라 세포 내 성분 유전자가 대조구에 비해 전체적으로 증가함을 알 수 있었다. 마지막으로 분자 기능(molecular function)의 변화를 조사하였을시에도 두 그룹간에는 전체적인 패턴 변화가 없으나 수산용 포르말린 처리에 따라 관련 유전자들이 증가됨을 알 수 있었다. 현재까지 스키타카충 transcriptome의 GO 분

석을 수행한 연구는 없으나 어류 병원체이면서 섬모충인 백점충의 GO 분석을 통한 Biological process, cellular process 등의 자료를 비교하였을 시에 섬모충 간 유사한 형태를 가짐을 알 수 있었다(Cassidy-Hanley et al., 2011).

본 논문은 스쿠티카충을 10회 계대 배양동안 지속적으로 수산용 포르말린에 폭로(exposure) 후 스쿠티카충 RNA 유전자의 transcriptome을 분석하였다. RNA transcriptome 분석을 위해 대조구 및 수산용 포르말린 폭로 그룹의 RNA 유전자는 house keeping 유전자인 β -actin 유전자 발현량으로 normalization 시켰다.

<Table 1>에서 보는 바와 같이 NCBI blast를 수행하였을 시에 대조구에 비해 3배 이상 증가하는 상위 10개의 유전자는 모두 섬모충의 유전자 정보로 나타나나, 대부분 유전적 기능이 알려져

있지 않은 것으로 나타났다. 그러나, 수산용 포르말린 처리 시 up-regulation되는 유전자 중 von Willebrand factor type A는 말라리아의 숙주 감염에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Pihlajamaa et al., 2013).

스쿠티카충의 RNA transcriptome의 down level을 분석하면 cathepsin L-like cysteine protease, Leishmanolysin family protein 유전자가 영향을 많이 받음을 알 수 있었다<Table 1>. 스쿠티카충의 cathepsin L like cysteine protease 및 Leishmanolysin family protein은 이전 논문에서 기생충의 외부 병원체 침입에 대한 방어에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Ahn et al., 2007; Seo et al., 2013). 수산용 포르말린의 장기간 폭로(exposure)는 스쿠티카충의 대사체계 중 방어 관련 단백질의 감소에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

<Table 1> Genes showing differential transcription expression between control/formalin treated group

No.	Contig Name	Upper/down	e-value	Target description	Putative Gene Function
1	Scu1094	4.21	7.76E-69	von Willebrand factor type A domain containing protein [Tetrahymena thermophila]	Cell defence system Immune system
2	Scu1226	3.70	2.43E-10	Myo-inositol-1-phosphate synthase family protein [Tetrahymena thermophila]	Cell structure Phosphate metabolism
3	Scu2870	3.20	3.64E-43	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2]	Not known
4	Scu147	3.17	1.04E-07	ABC transporter family protein [Tetrahymena thermophila]	Cell defence system
5	Scu2450	3.15	2.43E-10	hypothetical protein TIHERM_00727500 [Tetrahymena thermophila]	Not known
6	Scu698	3.09	2.97E-22	hypothetical protein TIHERM_00812660 [Tetrahymena thermophila]	Not known
7	Scu5851	3	1.94E-73	hypothetical protein TIHERM_00456900 [Tetrahymena thermophila]	Not known
8	Scu829	2.95	9.18E-151	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2]	Not known
9	Scu5995	2.95	4.27E-103	ubiquitin family protein, putative [Ichthyophthirius multifiliis]	Immune system
10	Scu978	2.92	5.54E-33	EGF-like domain containing protein [Tetrahymena thermophila]	Developmental process
11	Scu3089	0.097	7.07E-75	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2]	Not known
12	Scu3947	0.171	1.57E-35	cathepsin L-like cysteine protease [Philasterides dicentrarchi]	Immune system
13	Scu1209	0.172	3.93E-78	Leishmanolysin family protein [Tetrahymena thermophila]	Immune system
14	Scu3068	0.205	7.10E-91	hypothetical protein PISG_04401 [Salpingoeca sp. ATCC 50818]	Not known
15	Scu11025	0.247	7.41E-06	leishmanolysin family protein, putative [Ichthyophthirius multifiliis]	Immune system
16	Scu3770	0.251	3.64E-43	Sugar transporter family protein [Tetrahymena thermophila]	Cell structure Cellular signaling process
17	Scu775	0.269	4.25E-34	hypothetical protein TIHERM_01586460 [Tetrahymena thermophila]	Not known
18	Scu3221	0.294	1.08E-36	hypothetical protein [Paramecium tetraurelia strain d4-2]	Not known
19	Scu9001	0.295	1.04E-07	VSP [Giardia intestinalis ATCC 50581]	Cellular signaling process
20	Scu985	0.311	2.87E-76	leishmanolysin family protein, putative [Ichthyophthirius multifiliis]	Immune system

포르말린 처리에 따른 스키테카충 RNA 유전자들을 조사하였을시에 기생충 내성에 관여할 것으로 보아지는 유전자는 나타나지 않으며, 대부분 기생충의 생체 대사와 관련된 단백질의 발현에 영향을 받는 것으로 나타났다. 향후, 스키테카충에 대하여 수산용 포르말린 처리 농도 및 시간에 따라 Real-time RT-PCR을 이용하여 본 연구에서 추정된 개별 유전자의 변화 추이를 더 조사할 필요가 있다.

본 연구결과들을 종합하여 보면, 수산용 포르말린의 장기간 폭로(exposure)로 인하여 특이적으로 움직이는 유전자 그룹을 알 수 있으나, 스키테카충의 내성을 유발시키는 특별한 유전 인자는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 수산용 포르말린의 폭로(exposure)가 스키테카충의 내성에는 관여하지 않는 것으로 보아지며(Woo et al., 2018), 수산용 포르말린의 사용 시 넘치의 구충 효능효과가 떨어지는 것은 수온 등 외부 환경변화에 영향을 많이 받는 것으로 추정된다.

References

Ahn SJ, Seo JS, Kim MS, Jeon SJ, Kim NY, Jang JH, Kim KH, Hong YK, Chung JK and Lee HH(2007). Cloning, site-directed mutagenesis and expression of cathepsin L-like cysteine protease from *Uronema marinum* (Ciliophora: Scuticociliatida). *Mol Biochem Parasitol* 156(2), 191~198.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.021>

Bell TA, Arume CS and Lightner DV(1987). Efficacy of formalin in reducing the levels of *peritrichous ciliates* on cultured marine shrimp. *Journal of Fish Diseases* 10(1), 45~51.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1987.tb00717.x>

Cassidy-Hanley DM, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH, Devine C, Hossain MM, Dickerson HW and Clark TG(2011). Transcriptional profiling of stage specific gene expression in the parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Mol Biochem Parasitol* 178, 29~39.

<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.04.004>

Dayanadol Yaowanit and Grajaaywong W(1996). Effects of some chemotherapeutic agents, hypersaline and freshwater on *Caligus* sp. infection in seabass (*Lates calcarifer*). *Warasan Kan Pramong*.

Jung SH, Jee BY, Kim JD, Seo JS and Kim JW(2010). Efficacy of formalin bath against gill infections with *Pseudodactylogyrus* spp. in cultured eel *Anguilla japonica*. *Journal of Fish Pathology* 23(3), 293~302.

Jung SH, Kim JW, Jeon IG and Lee YH(2001). Formaldehyde residues in formalin-treated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegeli*), and seawater. *Aquaculture* 194(3), 253~262.
[https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(00\)00530-5](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00530-5)

Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J and Conesa A(2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 36, 3420~3435.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>

Mellergaard S and Dalsgaard I(1987). Disease problems in Danish eel farms. *Aquaculture* 67(1-2), 139~146.
[https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90019-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90019-6)

Myeong JI, Min BH, Park MS, Hwang HK, Do JW, Jeoung KI, Chang YJ and Jeong DS(2013). Tolerance and Histological Responses to Formalin of Black Seabream *Acanthopagrus schlegelii* Juveniles. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46(6), 923~929.
<https://doi.org/10.5657/kfas.2013.0923>

NIFS(National Institute of Fisheries Science) (2016). Explanation of the manual about products of fish drug, pp. 27~40, Aquatic Disease Control Division.

Pihlajamaa T, Kajander T, Knuuti J, Horkka K, Sharma A and Permi P(2013). Structure of *Plasmodium falciparum* TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) A domain highlights distinct features in apicomplexan von Willebrand factor A homologues. *Biochem J* 450(3), 469~476.
<https://doi.org/10.1042/bj20121058>

Schnick RA(1991). Chemicals for worldwide

- aquaculture. In: ADB/NACA (Eds.), Report on a Regional Study and Workshop on Fish Disease and Fish Health Management. ADB Agriculture Department Report Series No. 1. Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand, 441~467.
- Seo JW, Kim WS, Han KH, Lee SH, Yoo DJ, Kim YC and Oh MJ(2010). Parasitism of *Pseudocaligus* sp. in wild grass puffer *Takifugu niphobles*, and their treatment. *Journal of Fish Pathology* 23(1), 107~112.
- Seo JS, Jeon EJ, Jung SH, Park MA, Kim JW, Kim KH, Woo SH and Lee EH(2013). Molecular cloning and expression of analysis of peptidase genes in the fish-pathogenic scuticociliate *Miaminesis avidus*. *BMC Vet Res* 9:10
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-10>
- Song H, Yu ZL, Sun L, Gao Y, Zhnag T and Wang H(2016). De novo transcriptome sequencing and analysis of *Rapana venosa* from six different developmental stages using Hi-seq 2500. *Comparative Biochemistry and Physiology D*, 17, 48~57.
<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2016.01.006>
- Sharp NJ, Diggles BK, Poortenaar CW and Willis TJ(2004). Efficacy of Aquil-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriola* and *Zeuxapta seriola*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. *Aquaculture* 236(1), 67~83.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.02.005>
- Voorhees JM and Barnes ME(2016). Airborne Formaldehyde Levels During Simulated Formalin Egg Treatments in Vertical-Flow Tray Incubators at a Production Fish Hatchery. *Journal of Agricultural Safety and Health* 22(3), 199~207.
<https://doi.org/10.13031/jash.22.11791>
- Woo SJ, Lee SH and Chung JK(2018). Determination of formalin residue in muscle and observation of histopathological changes in freshwater and marine fish treated with formalin bath. *JFMSE* 30(1), 28~37.
<https://doi.org/10.13000/jfmse.2018.02.30.1.28>
-
- Received : 17 October, 2018
 - Revised : 06 November, 2018
 - Accepted : 16 November, 2018