

까막전복(*Haliotis discus discus*)의 선천성 면역반응 기작 연구

Molecular insight into the innate immune systems in disk abalone, *Haliotis discus discus*

주관연구기관	제주대학교
연구책임자	이제희
발행년월	2013-04
주관부처	교육과학기술부
사업관리기관	한국연구재단
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201300034392
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 17:34:32

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

중견연구자지원사업(핵심연구) 최종보고서

양식A101

① 부처사업명(대)	기초연구사업			보안등급(보안, 일반)	일반			
② 사업명(중)	중견연구자지원사업			공개가능여부(공개, 비공개)	공개			
③ 세부사업명(소)	핵심연구(개인)							
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초	④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)						
⑤ 과제명	국문	까막전복(<i>Haliotis discus discus</i>)의 선천성 면역반응 기작 연구						
	영문	Molecular insight into the innate immune systems in disk abalone, <i>Haliotis discus discus</i>						
⑥ 주관연구기관	제주대학교							
⑦ 협동연구기관								
⑧ 주관연구책임자	성명	이제희		직급(직위)				
	소속부서	해양의생명과학부		전공				
⑨ 연구개발비 및 참여연구원수 (단위: 천원, M·Y)								
년도	정부출연금(A)	기업체부담금			정부외출연금(B)	상대국부담금(F)	합계 G=(A+B+E)	참여연구원수
		현금(C)	현물(D)	소계 E=(C+D)				
1차년도	97,000			0			97,000	6
2차년도	97,000			0			97,000	5
3차년도	97,000			0			97,000	7
4차년도				0			0	
5차년도				0			0	
합계	291,000	0	0	0	0	0	291,000	18
⑩ 총연구기간	2010. 05. 01 - 2013. 04. 30 (36 개월)							
⑪ 다년도협약연구기간	2010. 05. 01 - 2013. 04. 30 (36 개월)							
⑫ 당해연도연구기간	2012. 05. 01 - 2013. 04. 30 (12 개월)							
⑬ 참여기업	중소기업수	대기업수		기타	계			
					0			
⑭ 국제공동연구	상대국연구기관수		상대국연구개발비		상대국연구책임자수			
<p>관계규정과 모든 지시사항을 준수하면서 이 연구개발사업을 성실히 수행하였으며 아래와 같이 최종보고서를 제출합니다.</p> <p style="text-align: center;">2013년 4월 14일</p> <p style="text-align: center;">주관연구책임자 : 이 제 희 (인)</p> <p style="text-align: center;">주관연구기관장 : 제주대학교 총장 (직인)</p> <p style="text-align: center;">교 육 과 학 기 술 부 장 관 귀 하</p>								

※ 주요항목 작성요령

- ② 공개가능여부 : 기초연구사업은 공개를 기본으로 함. 단 불가피하게 비공개(평가용도 이외에는 연구보고서 배포를 제한하는 경우)로 하는 경우 사유를 공문으로 제출 및 양식 중 <연구내용 및 결과>의 10.기타사항 란에 명확히 기재함
- ⑤ 과제명 : 당초 연구과제(과제명 변경을 재단에서 승인받은 경우는 승인된 과제명)명을 기재함
- ⑨ 정부출연금 : 전체 연구기간의 연도별 연구비를 기재함
참여연구원수 : 연구책임자를 제외한 참여연구원 수 기재
- ⑩ 총연구기간 : 연구시작일 부터 연구종료일 까지 총 연구기간을 기재

※ 셀 보호된 내용 수정방법 : 해당셀 선택>마우스 우측버튼 클릭>표셀속성 선택>셀 선택>셀보호 해제

「중견연구(핵심연구) 협약연구기간 적용 안내」

선정연도	연구기간	총 연구기간	다년도 협약기간	당해연도 협약기간	비고
2010년	3년	2010.5.1~2013.4.30	2010.5.1~2013.4.30	2012.5.1~2013.4.30	
2011년	2년	2011.5.1~2013.2.28	2011.5.1~2013.2.28	2012.5.1~2013.4.30	

< 목 차 >

I. 연구계획 요약문

1. 국문요약문	4
----------------	---

II. 연구결과 요약문

1. 국문요약문	5
2. 영문요약문	6

III. 연구내용

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	11
3. 연구수행 내용 및 결과	13
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	73
5. 연구결과의 활용계획	76
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	77
7. 주관연구책임자 대표적 연구실적	77
8. 참고문헌	78
9. 연구성과	78
10. 기타사항	87

〈 연구계획 요약문 〉

양식 A201

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ■ 전복은 국내 양식 산업에 있어서 고부가가치를 지니는 매우 중요한 종으로써, 그 생산성 향상을 위해 먹이, 수온, 밀도, 광주기, 산란유도 등의 생리학적 연구들이 대부분 수행되어져 왔으나 체계화된 분자생물학적 연구는 미비한 실정이다. 현재 생명의학 연구 분야에서는, 유전자의 발현 pattern을 연구하기 위해 high throughput screening을 가능하게 하는 microarray기술이 도입되었으며, 그 이용범위가 지속적으로 확대되어가면서 다양한 생리현상을 규명하는데 이용되어지고 있다. 하지만, 주요 병원성 감염에 따른 해양 무척추 동물의 면역반응과 환경요인의 변화에 의한 스트레스 반응들을 연구하기 위한 microarray 기술 적용은 아직까지 매우 미비하다 ■ 본 과제의 최종 목표는 GS-FLX titanium을 이용하여 까막전복의 유전체 정보를 대량으로 (1,500,000 reads) 밝혀 15K oligonucleotide microarray를 구축함으로써, 병원체, 환경 오염물질, 해양환경에 기인한 스트레스에 반응하는 면역관련 유전자의 발현정보를 분석하고, 까막전복 (<i>Haliotis discus discus</i>)의 방어 메커니즘을 이해하고자 한다. 		
연구결과	<ul style="list-style-type: none"> ■ 소량으로 발견되는 유전자를 획득하기 위하여 생물학적, 물리화학적, 합성 면역자극 물질을 이용하여 까막전복의 면역반응 유도 ■ 까막전복의 조직으로부터 total RNA 추출, mRNA 분리, cDNA 합성 및 normalization ■ GS-FLX titanium을 이용한 cDNA의 염기서열 분석 (1,500,000 reads) ■ 전복의 15K oligonucleotide chip 제작 ■ Microarray 분석을 위한 면역반응 유도 <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스, 박테리아, scuticociliate, perkinsus, polyI:C, LPS, interferon, 중금속, 내분비교란물질 ■ 15K oligonucleotide chip을 이용한 microarray 실험 및 분석 ■ Microarray 분석으로 확보한 면역관련 유전자의 full-length cDNA 클로닝 ■ 면역관련 유전자의 재조합 단백질 생산 및 특성 분석 ■ Real-time PCR을 이용한 면역관련 유전자의 발현 분석 		
연구결과 의 활용계획	<ul style="list-style-type: none"> ■ 바이러스, 박테리아, 기생충과 같은 면역반응을 활성화시키는 병원성 생물에 대한 면역반응 메커니즘 연구를 위한 다양한 신호전달 관련 유전자를 확보할 수 있음. ■ 이 연구과제를 통해 제작될 15K oligonucleotide chip은 면역조절자에 의해 활성화된 생물의 면역반응을 유전자 수준에서 분석할 수 있게 하며, 해양환경을 모니터링하는 환경독성학 연구에 응용할 수 있음. ■ 면역반응 기작에 관련된 유전학적 자료를 바탕으로 전복양식에서 문제가 되고 있는 질병들에 대한 효과적인 치료와 예방에 대한 방법을 개발함으로써 전복양식의 생산량의 증가와 함께 전복양식의 경쟁력 또한 상승 시킬 수 있을 것임. ■ 해양 무척추동물의 면역체계 및 스트레스에 대한 방어체계 연구가 전 세계적으로 미약한 수준이기 때문에 우수 기술을 먼저 선점할 수 있고, 이에 대한 연구 수행 결과는 양식종인 전복, 굴 등을 포함하는 다양한 무척추 동물의 질병 원인 규명 및 치료 등에 활용할 수 있음. 		
중심어	까막전복	면역 활성화	생체방어기작
	Genome Sequencer FLX (GS FLX) 시스템	Oligonucleotide chip	Microarray
	재조합 단백질	cDNA	Real-time PCR

☞ 작성시 유의사항

- 1) 연구계획서(지원신청서) 제출시의 국문 연구요약문을 그대로 작성함 (당초내용을 복사 사용 가능함)
- 2) 본 요약문의 내용은 외부에 공개할 수 있음
- 3) 반드시 1페이지 이내로만 기재함

〈 연구결과 요약문 〉

〈한글요약문〉

양식A 202

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 전복은 국내 양식 산업에 있어서 고부가가치를 지니는 매우 중요한 종으로써, 그 생산성 향상을 위해 먹이, 수온, 밀도, 광주기, 산란유도 등의 생리학적 연구들이 대부분 수행되어져 왔으나 체계화된 분자생물학적 연구는 미비한 실정이다. 현재 생명의학 연구 분야에서는, 유전자의 발현 pattern을 연구하기 위해 high throughput screening을 가능하게 하는 microarray기술이 도입되었으며, 그 이용범위가 지속적으로 확대되어가면서 다양한 생리현상을 규명하는데 이용되어지고 있다. 하지만, 주요 병원성 감염에 따른 해양 무척추 동물의 면역반응과 환경요인의 변화에 의한 스트레스 반응들을 연구하기 위한 microarray 기술 적용은 아직까지 매우 미비하다 ▶ 본 과제의 최종 목표는 GS-FLX titanium을 이용하여 까막전복의 유전체 정보를 대량으로 (1,500,000 reads) 밝혀 135K oligonucleotide microarray를 구축함으로써, 병원체, 환경 오염물질, 해양환경에 기인한 스트레스에 반응하는 면역관련 유전자의 발현정보를 분석하고, 까막전복 (<i>Haliotis discus discus</i>)의 방어 메커니즘을 이해하고자 하였다. 		
연구결과	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 면역자극원을 이용한 까막전복의 면역, 생리적, 화학적 스트레스에 반응 하는 유전자의 전사활성 유도 ▶ GS-FLX titanium을 이용한 cDNA의 염기서열 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 1,593,772개의 reads 분석 - 34,700개의 unigene을 확보 ▶ 135K 전복 oligonucleotide chip 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 34,771개의 transcript를 확보하였고 이를 이용하여 135K oligonucleotide chip (12x135K)을 제작 ▶ 135K oligonucleotide chip을 이용한 microarray 실험 및 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 면역유도물질을 주입한 전복과 대조군으로 0.9% saline이 주사된 전복으로부터 6시간 및 24시간째에 아가미 조직을 적출하고 RNA를 분리, 135K oligonucleotide chip을 이용한 발현변화 분석을 수행 ▶ 50개 이상의 full-length cDNA cloning <ul style="list-style-type: none"> - GS-FLX data를 기반, RACE등을 이용하여 총 51개의 면역관련 유전자의 full-length의 염기서열을 획득 ▶ 총 6개의 재조합 단백질 획득 및 bioactivity test를 이용한 기능분석 ▶ 총 15개의 면역관련 유전자의 Real-time PCR을 통한 유전자 발현양상 분석 		
연구결과의 활용계획	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 바이러스, 박테리아, 기생충과 같은 면역반응을 활성화시키는 병원성 생물에 대한 면역반응 메커니즘 연구를 위한 다양한 신호전달 관련 유전자를 확보할 수 있음. ▶ 이 연구과제를 통해 제작한 135K oligonucleotide chip은 면역조절자에 의해 활성화된 생물의 면역반응을 유전자 수준에서 분석할 수 있게 하며, 해양환경을 모니터링하는 환경독성학 연구에 응용할 수 있음. ▶ 면역반응 기작에 관련된 유전학적 자료를 바탕으로 전복양식에서 문제가 되고 있는 질병들에 대한 효과적인 치료와 예방에 대한 방법을 개발함으로써 전복양식의 생산량의 증가와 함께 전복양식의 경쟁력 또한 상승 시킬 수 있을 것임. ▶ 해양 무척추동물의 면역체계 및 스트레스에 대한 방어체계 연구가 전 세계적으로 미약한 수준이기 때문에 우수 기술을 먼저 선점할 수 있고, 이에 대한 연구 수행 결과는 양식종인 전복, 굴 등을 포함하는 다양한 무척추 동물의 질병 원인 규명 및 치료 등에 활용할 수 있음. 		
중심어	까막전복	면역 활성화	생체방어기작
	Genome Sequencer FLX (GS FLX) 시스템	Oligonucleotide chip	Microarray
	재조합 단백질	cDNA	Real-time PCR

※ 표양식 변경 및 삭제불가능하며 이미지, 수식, 표의 삽입을 금지하고 특수문자 기호는 전각기호만을 이용하여 작성함

※ 본 요약문은 정보제공용으로 활용되므로 핵심적인 내용을 중심으로 이해하기 쉽도록 기재하고 한 장 이내로 작성함

〈 SUMMARY 〉

양식 A 203

Purpose & contents	<ul style="list-style-type: none"> ▶ The commercial importance of disk abalone and recent high mortality associated with infectious diseases, environmental factors (temperature, salinity, and chemical pollutants) has raised the urgent need for a more systematic study on immune and stress defense systems in abalone at molecular level. ▶ Measurement of gene-expression profiles using microarray technology is becoming increasingly popular among the biomedical research community for molecular understanding of immune system. However, microarray concept is poorly applied to understand the host pathogen interactions, evaluation of environmental stress and defense mechanisms in marine molluscs. ▶ The overall goal of the project is to understand the host defense mechanisms of disk abalone, <i>Haliotis discus discus</i> by identifying immune related genes and their transcriptome profiles with respect to disease infections, physical stress factors and environmental pollutants using GS-FLX based oligonucleotide microarray. 		
Result	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Treatment of abalone with immune stimulants (biological, physical, chemical and synthetic stimulants) in order to induce immune related genes which are rarely expressed. ▶ Analysis of cDNA sequence using GS-FLX titanium <ul style="list-style-type: none"> - Analyze 1,593,772 reads - Obtained 34,700 unigenes ▶ Construction of 135K oligonucleotide chips <ul style="list-style-type: none"> - Construction of 135K oligonucleotide chip (12x135K) using 34,771 contigs ▶ Analysis of gene expression using 135K oligonucleotide chips <ul style="list-style-type: none"> - Analysis of gene expression in gill tissue treated with immunogen at 6 h and 24 h ▶ Molecular cloning and analysis of full-length cDNA ▶ Production of recombinant proteins and functional characterization of immune related genes <ul style="list-style-type: none"> - 6 recombinant proteins ▶ Expression analysis of the immune genes by real-time PCR <ul style="list-style-type: none"> - 15 immune genes ▶ Understanding the biological/signaling pathways and their interactions of various immune-stress response systems for better molecular insight of abalone host defense mechanisms. 		
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Many genes were discovered and these will greatly enable future studies of immune defense mechanisms in marine mollusks ▶ Possible application of abalone 135K oligonucleotide microarray in environmental toxicological studies ▶ Since immune stimulant at controlled level can boost effectiveness of the immune system, our overall results could be used to find out effective treatments for a variety of infections in aquaculture species. ▶ Provide sound basement for research community to deeper investigation of biodefense mechanisms and comparative analysis in different invertebrate species 		
Keywords	<i>Haliotis discus discus</i>	Immune activation	Biodefense mechanism
	Genome Sequencer FLX (GS FLX) system	Oligonucleotide chip	Microarray
	Recombinant protein	cDNA	Real-time PCR

※ 표양식 변경 및 삭제불가능하며 이미지, 수식, 표의 삽입을 금지하고 특수문자 기호는 전각기호만을 이용하여 작성함
 ※ 본 요약문은 정보제공용으로 활용되므로 핵심적인 내용을 중심으로 이해하기 쉽도록 기재하고 한 장 이내로 작성함

< 연구내용 및 결과 >

양식A301

- ◎ 1. 연구개발과제의 개요 ~ 10. 기타사항을 항목에 따라 작성함
- ◎ 제목 14point, 소제목 12point, 본문내용은 10point로 작성하며, 줄 간 간격은 조정 가능함
- ◎ 연구내용 및 결과(1번부터 10번까지)는 100페이지 이내로 작성함
- ◎ 내용 작성과 관련한 설명내용(청색 박스로 표시된 부분)은 내용 작성 시 제거하고 기술함

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구의 필요성 및 중요성

- 전복은 국내 양식 산업에 있어서 고부가가치를 지니는 매우 중요한 종이나 전 세계적으로 여러 지역의 다양한 전복에서 병원체 감염에 의한 대량 폐사가 보고되고 있으며, 이는 커다란 경제적 손실을 안기고 있다 (Hooper et al., 2007). 표 1에 최근 보고된 전복의 질병과 원인 미생물을 나타내었다. 전복의 생산성 향상을 위해 먹이, 수온, 밀도, 광주기, 산란유도 등의 생리학적 연구들이 대부분 수행되어져 왔으나 체계화된 분자생물학적 연구는 수행되어지지 않았다. 현재 생명의학 연구 분야에서는, 면역시스템의 분자적 이해를 위해 high throughput screening을 가능하게 하는 microarray기술이 도입되면서 유전자 발현정보를 대량으로 분석하게 되었고, 그 이용범위가 지속적으로 확대되어가면서 다양한 생리현상을 규명하는데 이용되어지고 있다. 하지만, 주요 병원성 감염에 따른 해양 무척추 동물의 면역반응과 환경요인의 변화에 의한 스트레스 반응들을 연구하기 위한 microarray 기술의 적용은 아직까지 매우 미비하다.
- 전복의 면역반응은 서식환경의 조건, 병원균, 연안환경의 생태와 함께 매우 복잡하게 얽혀 서로 영향을 받는다. 전복을 포함한 대부분의 해양 무척추동물들은 외부물질에 대한 방어 능력이 선천면역에 의존되며, 척추동물에서 발견되는 후천면역능력 같이 높은 특이성을 가지는 방어 능력은 존재 하지 않는 것으로 알려져 있다 (Loker et al., 2004). 모델동물로서 연구가 잘 이루어진 초파리 (*Drosophila melanogaster*), 꼬마선충 (*Caenorhabditis elegans*) 등을 통한 연구를 바탕으로 선천면역은 3가지 기본 구성으로 이루어진다고 알려져 있다. 첫 번째, 자신의 것과 자신의 것 이외의 것을 구분하고, 두 번째로, 외부로부터 침입한 물질을 불활화하거나 사멸시킨다. 마지막으로, 질병에 걸리거나 손상된 세포들을 인지하여 제거한다. 포식작용과, 흡소닌화, melanization, hemocyte coagulation, 항균 물질 생산 반응들이 선천면역의 필수 반응들을 유도한다. 이러한 필수적인 선천면역 반응을 유도하는 pattern recognition receptors (PRRs), hemolymph coagulation, 항균 펩타이드 (AMP), respiratory burst 활성을 가지는 단백질, prophenoloxidase-activating systems (proPO)와 같은 단백질들이 적절하게 존재할 때 면역반응이 효율적으로 이루어지기 때문에, 이러한 유전자들의 전사 반응은 매우 세밀하게 조절되어진다 (Mydlarz et al., 2006, Iwanaga et al., 2005). 면역 유도 단백질들의 유전학적 분석을 통해 전복의 면역시스템이 병원체를 어떻게 인식하고 방어하는지에 관한 기작을 이해할 필요성이 있다.
- 이러한 필요성에 따라 이 연구과제는 전복으로부터 GS-FLX cDNA sequencing을 통해 수많은 새로운

유전자들을 동정하고, 동정된 유전자들의 기능과 상호작용을 분석하는데 중점 목표를 두고 있다. 또한 이 연구를 통해 밝혀진 염기서열 정보를 바탕으로 아직 연구가 이루어지지 못한 다른 해양 무척추동물의 유전자들을 클로닝할 수 있으며, 확인된 새로운 면역관련 유전자의 발현 정보는 앞으로 전복 이외의 해양무척추동물의 면역체계를 연구하는데 중요한 자료로 사용될 것이다.

- 본 연구의 최종 목표는 GS-FLX를 이용하여 분석된 전복의 유전체 정보를 바탕으로 oligonucleotide microarray를 구축하고, 이를 사용하여 환경 오염물질 및 다양한 환경요인변화에 의한 생리적 스트레스, 그리고 질병감염에 의한 면역관련 유전자의 유전체 발현정보를 분석함으로써 까막전복 (*Haliotis discus discus*)의 면역반응 메커니즘을 이해하는데 중점을 두고 있다.

표 1. 전복의 질병 현황

Disease name	Abalone species	Causative agents	Country	
Virus infections				
Crack shell disease (Amyotrophia)	<i>Haliotis diversicolor</i>	Different virus strains	China	
	<i>H. discus hannai</i>	Spherical virus	Australia	
	<i>H. discus discus</i>	Virus like particles	South Africa	
Viral ganglioneuritis	<i>H. rubra</i>	Herpes-like virus	Japan	
	<i>H. laevigata</i>		Australia	
Viral mortality	<i>H. hannai</i>	Spherical virus type I, II, III & IV	Australia	
	<i>H. diversicolor</i>			
Bacterial infections				
Abalone vibriosis	<i>Haliotis rafescens</i>	<i>V. aliginolyticus</i>	Korea	
	<i>H. diversicolor supertexta</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	Taiwan	
	<i>H. discus hannai</i>	<i>Vibrio spp</i>	China	
White spots in necrotic muscle	<i>H. diversicolor supertexta</i>	<i>V. fluvialis, V. campbellii,</i>	Australia	
		<i>Pseudomonas fluoresces</i>	South Africa	
		<i>Candidatus xenohaliotis</i>	Japan	
Blister disease	<i>H. discus hannai</i>	<i>Perkinsus olseni/atlanticus</i>	China	
		<i>V. carchariae</i>	Japan	
		<i>V. fluvialis II</i>	China	
Fungi infection				
Foot tubercles	<i>Haliotis sieboldii.</i>	<i>Haliphthorous milfordensis</i>	Japan	
Shell mycosis	<i>H. australis</i>		New Zealand	
	<i>H. virginea virginea.</i>			
Parasite infections				
Perkinsus	<i>Haliotis spp</i>	<i>Perkinsus olseni</i>	Australia	
		<i>Perkinsus atlanticus</i>	Spain	
		<i>Perkinsus marinus</i>		
Kidney Coccidia	<i>H. midae,</i>	<i>Ciliates-Margolisiellahaliotis</i>	USA,	
	<i>H. spadicea</i>			China
	<i>H. rubra</i>			Australia
	<i>H. laevigata</i>			
Withering disease	<i>H. cracheridii</i>	Rickettsiales-like prokaryote	USA, Mexico	

나. 연차별 연구의 목표 및 내용

(1) 1차년도(2010년)

■ 1차년도 연구 목표

다양한 면역 자극물질을 이용하여 면역 활성화시킨 전복으로부터 구축된 cDNA의 염기서열을 Genome Sequencer FLX titanium system을 통해 1,500,000 reads를 분석하고, 이 결과를 바탕으로 새로운 면역 관련 유전자들을 탐색하여 Short Read Archive (SRA) 데이터베이스를 구축하고자 함.

■ 1차년도 연구 내용 및 범위

연구내용	연구범위	비고
<p>■ 소량으로 발현되는 유전자를 획득하기 위하여 생물학적, 화학적, 합성 면역자극 물질을 이용하여 까막전복의 면역반응 유도</p>	<p>● 생물학적 면역반응 유도</p> <p>- 바이러스 1종 (viral haemorrhagic septicaemia virus), 박테리아 3종 (<i>Vibrio alginolyticus</i>, <i>Vibrio parahaemolyticus</i>, <i>Lysteria monocytogens</i>), 기생충 1종 (scuticociliate)을 이용하여 까막전복에 공격실험을 수행하여 면역반응 유도</p>	
	<p>● 합성 면역자극 물질을 이용한 면역반응 유도</p> <p>- Polyinosinic:polycytidylic acid, lipopolysaccharide, interferon 등을 이용한 면역 반응 유도</p>	
	<p>● 물리, 화학적 스트레스에 따른 반응 유도</p> <p>- 수온, 염분, 중금속, 내분비 교란물질에 대한 노출 실험 수행</p>	
<p>■ 까막전복의 조직으로부터 total RNA 추출 및 mRNA 분리</p>	<p>● total RNA 추출</p> <p>- 면역반응이 유도된 전복의 hemocyte, gill, digestive tract, hepatopancreas, gonad, mantle, muscle 조직들로부터 total RNA 추출</p> <p>- 각 조직으로부터 추출한 total RNA를 3그룹 (hemocyte, gill; digestive tract, hepatopancreas; gonad, mantle, muscle)으로 나누어 섞은 다음 mRNA를 분리함.</p>	
<p>■ 3그룹으로 나누어 분리한 mRNA를 이용하여 normalized cDNA 제작</p>	<p>● Normalized cDNA 제작</p> <p>- SMART 방법을 이용한 cDNA 합성 및 double strand specific nuclease를 이용한 normalization 수행</p>	
<p>■ GS-FLX titanium을 이용한 cDNA의 염기서열 분석</p>	<p>● Normalized cDNA의 염기서열 분석</p> <p>- GX-FLX system을 이용한 cDNA 염기서열 분석</p> <p>- 3개 그룹의 cDNA를 각각 500,000개 이상의 reads를 확보</p> <p>- 확인한 염기서열의 분석</p>	

(2) 2차년도 (2011년)

■ 2차년도 연구 목표

1차년도 연구로부터 확보한 유전자의 염기 서열과 기존의 EST 서열 모두를 복합적으로 분석하고 가능한 많은 수의 unigene을 이용하여 15K oligonucleotide chip을 제작한다, 제작한 oligonucleotide chip을 이용하여 다양한 병원균, 스트레스 요소, 면역 자극에 대해 반응하는 면역관련 유전자와 스트레스 반응 유전자를 탐색한다.

■ 2차년도 연구 내용 및 범위

연구내용	연구범위	비고
<p>■ 15K 전복의 oligonucleotide chip 제작 및 면역관련 유전자 확보를 위한 면역반응 유도</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 전복의 15K oligonucleotide chip 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 기존의 EST data와 1차년도에 GS-FLX sequencing으로 확보할 data를 복합적으로 분석하여 15,000개 이상의 unigene 확보 - Unigene 염기서열을 이용한 15K oligonucleotide chip 제작 ● Microarray 분석을 위한 면역반응 유도 및 처리 시간에 따른 조직 적출 <ul style="list-style-type: none"> - 바이러스 1종 - 박테리아 1종 - Scuticociliate 1종 - Perkinsus 1종 - PolyI:C - LPS - Interferon - 중금속 (Cd, Cu) - 내분비 교란물질 (PCBs, PAHs, TBT) 	
<p>■ 15K oligonucleotide chip을 이용한 microarray 실험 및 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● RNA 분리, microarray 실험 및 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 면역반응이 유도된 전복의 조직들로부터 RNA 추출 - 각 처리조건에 적절한 조직으로부터 분리한 RNA를 이용하여 microarray 실험 	

(3) 3차년도 (2012년)

■ 3차년도 연구 목표

2차년도 microarray 분석으로 확보할 면역관련 유전자의 full-length cDNA를 클로닝한 다음 대장균과 insect cell 발현시스템을 이용하여 재조합 단백질을 생산하고 재조합 단백질들의 기능 및 특성을 분석한다. 전복의 면역반응에 관여하는 유전자들의 기능과 특성을 생화학적, 분자생물학적 방법으로 확인함으로써 전복의 선천성 면역반응 기작에 대한 개념을 확립하고자 함.

■ 3차년도 연구 내용 및 범위

연구내용	연구범위	비고
------	------	----

<ul style="list-style-type: none"> ■ Microarray 분석으로 확보한 면역관련 유전자의 full-length cDNA 클로닝 	<ul style="list-style-type: none"> ● GS-FLX sequencing과 microarray 분석으로 확보한 면역관련 유전자 50개 이상의 full-length cDNA cloning <ul style="list-style-type: none"> - Partial 염기서열을 이용한 클로닝할 유전자의 primer 제작 - RACE를 이용한 유전자 클로닝 	
<ul style="list-style-type: none"> ■ 면역관련 유전자의 재조합 단백질 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ● 발현 시스템을 이용한 재조합 단백질의 생산 <ul style="list-style-type: none"> - pET, pMAL expression system을 이용한 재조합 단백질 생산 - Baculovirus expression system을 이용한 재조합 단백질 생산 	
<ul style="list-style-type: none"> ■ Real-time PCR을 이용한 면역관련 유전자의 발현 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ● Microarray 분석으로 확인한 면역관련 유전자 발현의 정밀 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 각 면역유도 조건과 처리 시간에 따른 유전자 발현정도를 real-time PCR을 이용하여 분석 	
<ul style="list-style-type: none"> ■ 면역관련 유전자의 재조합 단백질의 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ● 재조합 단백질의 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 전복의 hemocyte와 확립된 <i>in vitro</i> 분석 방법을 이용하여 특성 분석 	

다. 연구의 최종목표

- 전복의 선천성 면역체계를 이해하기 위해 병원체를 감염시키거나 물리적, 화학적 스트레스를 준 개체로부터 GS-FLX를 이용하여 대량의 transcriptome을 분석하고 oligonucleotide chip기술을 이용하여 면역관련 유전자와 다양한 외부 스트레스에 반응하는 biomarker를 대량으로 탐색하고자 함.
- GS-FLX sequencing과 oligonucleotide microarray로 확보한 면역관련 유전자의 분석으로 전복의 면역체계에 관여하는 방어 요소들에 대한 분자생물학적 이해를 넓히고, 전복 이외의 해양연체동물과 병원체간의 상호작용, 면역조절반응, 신호체계를 이해 할 수 있는 바탕을 구축하고자 함.

2. 국내외 기술개발 현황

- 최근 해양 환경에 있어서 연체동물의 중요성이 부각되고 있으며, 지난 10년간 몇몇 연체동물로부터 linkage map, 유전체학 그리고 단백질체학에 기초한 연구가 수행되어지고 있다. 이를 토대로, 해양 연체동물의 성장과 질병 감수성, 그리고 다양한 환경인자에 대한 내성에 관여하는 유전자들의 분자적 연구가 수행되어지고 있다 (Saavedra et al., 2006). 하지만 이러한 해양 연체동물의 유전체 연구는 곤충과 선충 등의 육상 동물과 비교하였을 때 시작 단계에 불과하다.
- 유전자 정보은행인 NCBI의 GenBank 데이터베이스에 전복의 유전자 정보는 약 2,000개의 염기서열이 등록되어져있다 (EST 제외). 이렇듯 아직까지 전복의 유전체 자료는 매우 부족한 실정이다 (그림 1). 현재 전복을 제외한 다른 연체동물들에서 몇몇 EST 서열들이 분석되어 있지만, 현재까지 밝혀진 EST

서열의 양은 다른 동물들의 유전체 정보에 비하여 매우 적은 수준이며, 면역관련 유전자의 EST 서열은 더욱 미비한 실정이다. 전복의 면역과 스트레스 조절 시스템에 대한 분자 수준에서의 이해를 위해서는 많은 수의 유전정보를 구축하고 있어야 하지만 아직까지는 유전 정보가 매우 제한적이기 때문에, 전복의 면역 메커니즘에 대한 종합적인 이해가 이루어지지 못하고 있다. 이렇듯, 전복과 같은 연체동물로부터 분석된 유전자 정보가 부족하기 때문에, 전복을 포함한 연체동물의 면역기작에 관한 연구의 대부분은 단일 또는 소수 유전자의 기능분석에 기초한 연구가 주를 이루었다.

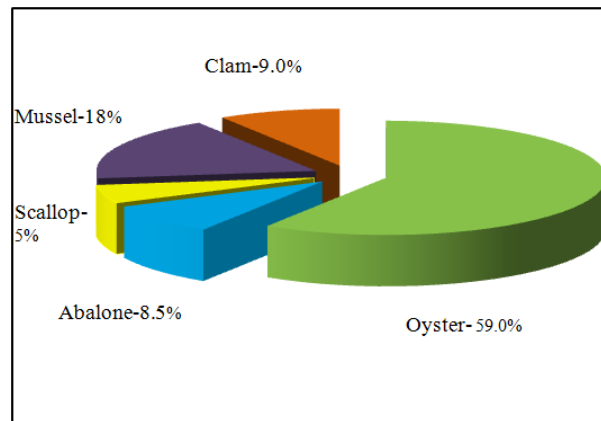


그림 1. 연체동물에 속하는 종들의 유전체 분석 비율

- 북미와 프랑스에서는 참굴에서 주로 발병하는 병원균인 *Perkinsus marinus*의 감염에 따른 참굴의 6000개의 cDNA를 포함하는 microarray를 공동연구를 통해 제작하였고, EST library 구축을 통한 연구가 진행되고 있지만 (Hedgecock et al., 2005), 현재까지 이루어진 대부분의 연구에서는 hemocyte migration, concentration respiratory burst activities 등의 간접적인 parameter에 기초하여 면역반응에 대한 연구를 진행해 오고 있다. 이러한 간접적인 parameter로는 분자수준에서 면역반응 기작에 대한 명확한 이해가 쉽지 않다. 척추동물과 무척추동물에 적용할 수 있는 다양한 *in vitro* 실험들이 있지만 전복과 같은 연체동물의 면역반응은 척추동물의 면역시스템과의 차별성을 가지기 때문에, 무척추 동물의 면역시스템을 분석하기에는 그 적절성을 확신할 수 없다. 이러한 이유로 전복을 포함한 연체동물들의 면역반응 기작에 대한 이해를 위해서는 연체동물에서 특이적으로 이용 가능한 *in vitro* 실험들의 개발이 필요하다. 간접적인 parameter가 아닌 양식 생물의 건강과 상태를 판별 할 수 있는 직접적인 parameter를 찾아냄으로써 분자수준에서의 면역기작에 대한 명확한 이해가 가능할 것이다.
- 생물의 면역반응과 같은 생리현상을 규명하기 위해서는 단일 유전자 분석을 통한 접근은 매우 제한적이므로 최근에는 생물정보학과 유전체 분석 기술의 접목을 통한 large scale의 유전자 발현 연구에 관심이 집중되고 있다. 새로운 유전자의 검색으로 세포의 다양한 반응 기작을 이해하기 위해서는 동시에 수많은 데이터를 분석하여 높은 정확성의 신뢰할 수 있는 결과를 도출할 수 있어야 한다. 그러므로 최근에는 해양 연체동물의 하나인 참굴 (*Crassostrea gigas*)의 경우, 새로운 유전자들의 screening을 위해 Institute of Oceanology of Chinese Academy of Sciences (IOCAS)와 Beijing Genomics Institute (BGI)가 공동으로 International Oyster Genome Consortium (OGC)을 설립하고 *Crassostrea gigas* genome project를 수행해 오고 있다. 또한 국내에서는 한양대학교에서 microarray를 이용하여 게놈의 유전자 발현 조절부위를 분석하기 위한 연구가 이루어졌으며, 부경대학교에서는 수산물과 양식장 환경에 존재하는 병원성 *Vibrio* 균의 monitoring을 위한 microarray system을 개발하기 위한 연구를 수행하였다.

3. 연구수행 내용 및 결과

가. 1차년도 연구수행 내용 및 결과

■ 면역조절자 (stimulant)를 이용한 면역 유전자의 활성화

감염되지 않은 건강한 동물에서 항균 펩타이드 (antimicrobial peptides)와 interferon (IFN)등과 같은 중요 면역반응 유전자는 발현되지 않는다. 이러한 이유로 면역 자극을 주지 않은 동물로부터 만들어진 cDNA library를 이용한 유전자 탐색으로는 중요한 면역 반응 유전자를 확보하기 쉽지 않다. 따라서 이 연구에서는 다양한 병원 생물(Virus, Bacteria, Scuticociliate 등), 합성 면역조절자 (PolyI:C, LPS 등), 중금속, 내분비교란물질 등을 이용하여 면역시스템을 자극함으로써 면역과 스트레스에 반응하는 유전자의 전사활성을 유도하여 많은 수의 면역관련 유전자를 확보하였다.

1. 연구수행 내용

1) 면역 및 스트레스 반응 유전자의 전사 활성화 유도

평균 체중 80-100 g의 건강한 까막전복 (*Haliotis discus discus*)을 전복양식장으로부터 구입하여, 각각의 실험구별로 4개의 그룹으로 나누어 80 L의 수조에서 20±1°C의 수온을 유지하여 1주일간 적응 시켰다.

전복의 면역 시스템을 활성화 시켜서 특이적 면역 반응 유전자들의 전사를 유도하고 다양한 스트레스와 중금속 및 내분비 교란물질에 반응하는 스트레스 반응 유전자들을 유도하기 위하여 다양한 물질을 전복의 근육에 주입하였다.

1-1) 박테리아와 LPS를 통한 면역유전자의 활성화 유도

박테리아와 LPS (Lipopolysaccharide)에 의한 면역유전자의 활성화를 유도하기 위하여 다음의 *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus* 의 3 종의 병원성 박테리아와 LPS를 이용하였다. 각각의 균을 진탕배양한 후 각 배양액 250 ul씩을 모아서 원심분리하고, 이를 500 ul의 PBS (Phosphate buffer saline)에 재부유 시킨 후, 각각의 전복의 근육에 100 ul씩 주입하였다. LPS는 PBS를 이용하여 10 mg/ml 농도의 stock solution을 준비하고, 이를 100 ul씩 전복의 근육에 주사하여 면역 유전자의 전사 활성을 유도하였다.

1-2) 바이러스와 Poly I:C를 이용한 면역유전자의 활성화 유도

바이러스에 의한 전복의 면역 유전자의 전사 활성화 유도를 위하여 Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)와 Polyinosinic:cytidylic acid (Poly I:C)를 이용하였다. VHSV는 FHM cell line을 이용하여 24 well tissue culture plate에서 증식시켰고, 10 % FBS와 항생제 (100 IU penicillin/ml와 100 mg/ml의 streptomycin)를 포함한 minimum essential medium에서 배양하였다. 전복 1개체당 1X10⁸ pfu/ml의 VHSV를 주입하였고, poly I:C는 전복당 100 ug을 PBS에 용해시켜 근육에 주사하였다.

1-3) 물리, 화학적 스트레스에 따른 반응 유전자의 전사활성화 유도

전복의 온도 및 염분 등에 의한 스트레스에 반응하는 유전자의 전사를 활성화시키기 위하여, 저염분 (25‰)의 해수에 노출시키고, 고수온 (28°C)의 해수에 전복을 노출시켜 관련 유전자들의 전사활성을 유도하였다. 전복의 중금속과 내분비 교란물질등의 화학적 스트레스 요인에 대한 관련유전자들의

전사활성을 유도하기 위하여 중금속 (CdCl₂: 10 ppm, CuSO₄: 10 ppm, HgCl₂: 5 ppm)과 내분비교란물질 (βNF: 25 ppm, Aroclor1254: 10 ppm, TBT: 2 ppm)을 PBS에 녹여 각 전복의 근육에 주사하였다.

2) GS-FLX를 이용한 전사체 분석

면역과 환경 스트레스, 중금속 및 내분비 교란물질에 의해 유전자의 전사활성이 유도된 전복의 hemocyte, gill, mantle, digestive tract, hepatopancreas, muscle, gonad 등의 조직을 적출하여 액체질소에서 동결시키고 RNA분리 전까지 -80°C에서 보관하였다. 각 조직의 total RNA는 Tri reagent를 이용하여 추출하고 PolyAtract mRNA isolation system (Promega)을 이용하여 mRNA를 분리하여 사용 전까지 -80°C에서 보관하였다. 260 nm의 파장에서 흡광광도계를 이용하여 추출된 mRNA의 농도와 순도를 측정하였다.

First strand cDNA synthesis는 RevertAid™ H Minus First strand cDNA synthesis kit을 이용하였다. 2개 또는 3개의 조직에서 분리한 mRNA를 동량으로 섞은 다음 3 µg의 mRNA에 GsuI 제한효소 부위를 포함하는 oligo(dT) primer (5'-GAG CTA GTT CTG GAG (T)₁₆VN-3')를 1 µl 첨가하고 DEPC-treated water를 이용하여 12 µl의 volume을 맞춰주고 잘 섞어준 후, 70°C에서 5분간 배양 반응 후, 얼음으로 옮겨 냉각시켜 주었다. 이 반응 혼합액에 5X reaction buffer 4 µl와 Riboblock™ Ribonuclease inhibitor (20 U/µl) 1 µl, 10 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, 5-methyl-dCTP) 2 µl를 첨가하여 잘 섞어 주고, 37°C에서 5분간 반응시켰다. 이후에 RevertAid™ HMinusM-MuLVRT(200U/µl) 1 µl를 첨가하고 42°C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 70°C에서 10분간 효소를 inactivation 시켜주고, 얼음으로 옮겨 냉각시켜 주었다. 10 M ammonium acetate 4.2 µl과 반응액의 2배 volume의 차가운 100 % ethanol을 첨가한 후 -80°C에서 5분간 방치하고, 4°C, 13,000 RPM에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후에 70% ethanol을 이용하여 rinse하였다. 침전된 RNA/DNA hybrid의 pellet을 건조 시킨 후 nuclease free water 20 µl에 재 부유 시켰다. Second strand cDNA의 합성을 위하여, 합성된 First strand cDNA에 10 mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 2µl, 10X reaction buffer for DNA polymerase I 8 µl, nuclease-free water 66.8 µl, RNase H 0.2 µl (1 U)와 DNA Polymerase I 3 µl (30 U)을 첨가하고 잘 섞어준 후, 15°C에서 2시간 동안 반응 시켰다. 반응이 끝난 후 5 µl의 0.5 M EDTA를 첨가하였다. 반응액에 deionized water를 첨가하여 200 µl를 맞춰주고, 추가로 20 µl의 3M sodium acetate, 2 µl의 glycogen (15 mg/ml), 600 µl의 absolute ethanol을 첨가하고 -80°C에서 30분간 방치 후, 4°C 13,000 RPM에서 30분간 원심분리하여 ds cDNA를 침전시켰다. 70%의 ethanol을 이용하여 wash하고, 70 µl의 water에 ds cDNA를 resuspension 시켰다. Poly A tail을 제거하기 위하여 65 µl의 ds cDNA에 8.6 µl의 10X Tango buffer, 8.6 µl의 10X SAM, 1 µl의 BSA (10 mg/ml), 2 µl의 GsuI (2 µl)와 0.8 µl의 water를 첨가하고 30°C에서 4시간 동안 반응시켜 poly A tail을 절단하고, 65°C에서 20분간 불활성화 시켰다.

합성된 cDNA는 Genome Sequencer FLX System (Roche Applied Science, Indianapolis, IN)을 이용하여 염기서열을 분석하였고, 밝혀진 염기서열은 Newber assembler를 이용하여 분석하였다.

당초 연구계획서에서는 double strand specific nuclease를 이용하여 cDNA를 normalization한 다음 GS-FLX titanium을 이용하여 분석하고자 하였으나 normalization을 수행할 경우 polyA를 제거할 수 있는 방법이 없어 위에서 언급한 RevertAid™ H Minus First strand cDNA synthesis kit을 사용하여 polyA를 제거한 다음 transcriptome을 분석하였다. Normalization한 cDNA를 사용하여 transcriptome을 분석할 경우 소량으로 발견되는 유전자를 밝혀낼 확률은 높지만 GS-FLX titanium의 특성상 homopolymer가 있을 경우 다른 부위의 염기서열 분석을 masking하게 되어 homopolymer가 없을 경우와 비교하여 전체적으로 40%이상의 data를 잃게 된다. 따라서 이 과제에서는 연구를 더 효과적으로 수행하기 위하여 normalization을 수행하지 않고 polyA를 제거한 다음 transcriptome을 분석하여 1,500,000 read 이상을

분석하였으며 추가적으로 Solexa Hiseq를 이용하여 144백만 read를 분석하여 12Gb의 염기서열을 확보하였다.

2. 결과

1) GS FLX sequencing

GS-FLX sequencing analysis data는 표 2과 그림 2에, aligned read distribution은 그림 3에 나타내었다. 박테리아, 바이러스 및 LPS 등의 면역 유전의 활성을 유도하는 면역 자극 물질과, 수온 및 염분에 의한 유전자의 반응 유도, 그리고 중금속 및 내분비 교란물질을 이용하여 다양한 유전자의 전사활성을 유도한 전복의 각 조직으로부터 RNA를 분리하여 3개의 그룹으로 나누어 각 그룹 당 50만 reads씩 150만 reads를 분석하고자 하였다 (그룹1: hemocyte와 gill; 그룹2: digestive tract과 hepatopancreas; 그룹 3: gonad, mantle, muscle). 평균 read의 길이는 348 bp를 나타내었다. Hemocyte와 gill 그룹에서는 383,934개, digestive와 hepatopancreas를 섞은 그룹에서는 594,311개, 그리고 마지막으로 mantle, muscle과 gonad를 섞은 그룹에서는 615,257개의 reads가 분석되어, 전체적으로 1,593,772개의 reads가 분석되어 목표치인 150만 reads보다 많은 양의 reads가 분석되었다. 3개의 그룹에서 각각 132 Mb, 205 Mb, 217 Mb의 염기가 분석되어 종합적으로 총 555 Mb가 분석되었다. 전체 read중에 1,431,699개의 reads가 align되었고, 전체 분석된 염기서열 중 90.5%에 달하는 502,372,808 bp가 align되어 신뢰할 수 있는 자료로 판명되었다. Aligned read distribution은 그림 3에 나타내었다. Reads 분포도를 보면 400~550 bp의 read가 주를 이루고 있는 것을 확인할 수 있었다. GS-FLX를 통하여 확보된 데이터를 가지고 sequence assembly 작업을 진행하였다. 전체 reads중에서 79.3% 정도의 1,264,147개의 reads가 assemble되었다. Assemble 결과 30,987개의 isotig와 107,113개의 singleton 서열을 확보하였다. Isotig 분석결과 1.2 kb의 평균 길이를 나타내었고, 총 37 Mb의 isotig 염기서열을 분석할 수 있었다.

GS-FLX titanium을 이용하여 얻은 isotig 염기서열 중에서 면역과 물리적 또는 중금속 및 내분비교란물질 등의 스트레스에 반응하는 주요 유전자로 알려져 있는 서열과 BlastX를 수행한 결과 유사한 isotig들을 각 35개씩 요약하여 각각 표 3, 4, 5에 나타내었다. Isotig 염기서열을 이용하여 Blast X로 분석하여 유사한 염기서열을 가지는 클론을 이용하여 GO를 분석하였다. Biological process에 의한 분류(그림 5), cellular component에 의한 분류(그림 6), molecular function에 의한 분류(그림 7)에 나타내었고, 그림 4은 biological process, molecular function, cellular component의 비율을 종합적으로 나타내었다.

표. 2. Analysis summary

		Hemo, gill	Dige, hepa	Mant, musc, Gona	sum
	num Reads	383,934	594,311	615,527	1,593,772
run data	num Bases	132,157,447	205,030,611	217,903,482	555,091,540
	avg.Read Length	344.22	344.99	354.01	348.29
Align result	num Aligned Reads	341,775	534,908	555,016	
		89.02%	90.00%	91.03%	
	num Aligned Bases	118,735,895	185,893,570	197,743,343	
		89.84%	90.67%	91.70%	
	inferred Read Error	1,909,025	2,910,283	2,746,419	
		1.61%	1.57%	1.30%	
consensus result	num Aligned Reads	1,431,699, 89.83%			
	num Aligned Bases	502,372,808, 90.50%			
	inferred Read Error	7,565,727, 1.51%			%
	number Assembled	1,264,147			79.32
	number Partial	153,415			9.63
	number Singleton	107,113			6.72
	numberRepeat	15,497			0.97
	numberTooShort	23,027			1.44
	numberOutlier	30,573			1.92
isogroup	numberOfIsogroups				21,075
	avgContigCnt				2.1
	largestContigCnt				3,638
	numberWithOneContig				17,104
	avgIsotigCnt				1.4
	largestIsotigCnt				100
	numberWithOneIsotig				17,767
isotig	numberOfIsotigs				30,987
	avgContigCnt				2.5
	largestContigCnt				17
	numberWithOneConitg				17,792
	numberOfBases				37,589,401
	avgIsotigSize				1,213
	N50IsotigSize				1,656
	largestIsotigSize				13,958

Read Align

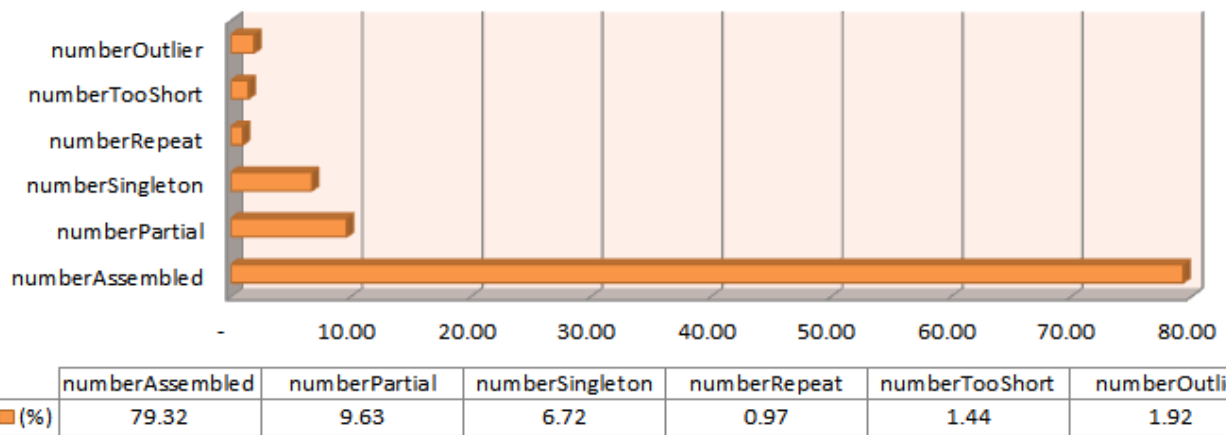
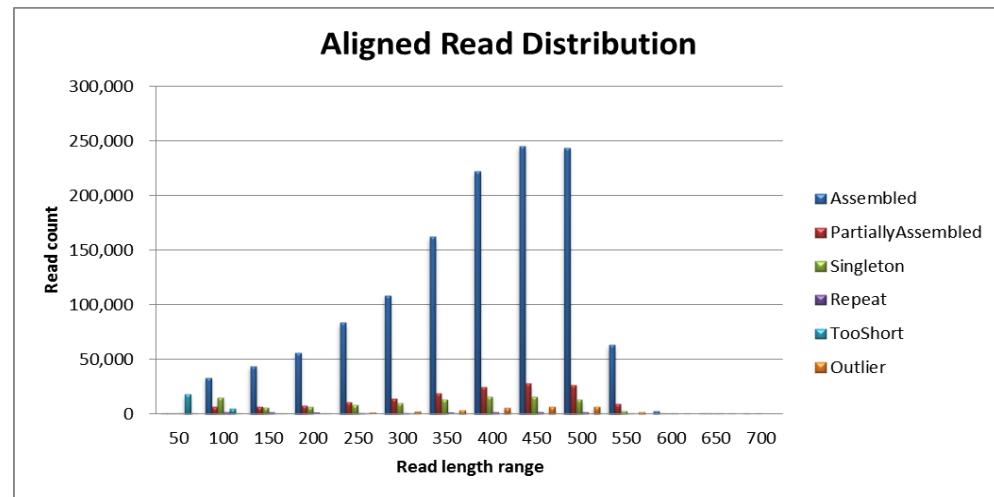


그림. 2.

	Assembled	PartiallyAssembled	Singleton	Repeat	TooShort	Outlier
50	503	106	468	27	17,778	5
100	33,176	6,509	15,011	2,064	4,887	539
150	43,904	6,732	6,082	1,809	243	631
200	56,100	7,857	6,300	1,344	84	756
250	83,330	10,802	8,193	1,167	25	1,370
300	108,138	13,711	9,960	1,110	9	2,172
350	162,161	18,841	13,140	1,382	1	3,611
400	222,024	24,346	15,934	1,771	0	5,485
450	245,394	27,740	15,824	1,969	0	6,790
500	243,740	26,603	13,190	1,890	0	7,041
550	62,842	9,504	2,940	910	0	2,091
600	2,752	646	68	53	0	76
650	79	18	1	1	0	6
700	4	0	1	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0
800	0	0	0	0	0	0
850	0	0	0	0	0	0
900	0	0	1	0	0	0
950	0	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0
	1,264,147	153,415	107,113	15,497	23,027	30,573



	Assembled	PartiallyAssembled	Singleton	Repeat	TooShort	Outlier
50	0.04%	0.07%	0.44%	0.17%	77.21%	0.02%
100	2.62%	4.24%	14.01%	13.32%	21.22%	1.76%
150	3.47%	4.39%	5.68%	11.67%	1.06%	2.06%
200	4.44%	5.12%	5.88%	8.67%	0.36%	2.47%
250	6.59%	7.04%	7.65%	7.53%	0.11%	4.48%
300	8.55%	8.94%	9.30%	7.16%	0.04%	7.10%
350	12.83%	12.28%	12.27%	8.92%	0.00%	11.81%
400	17.56%	15.87%	14.88%	11.43%	0.00%	17.94%
450	19.41%	18.08%	14.77%	12.71%	0.00%	22.21%
500	19.28%	17.34%	12.31%	12.20%	0.00%	23.03%
550	4.97%	6.19%	2.74%	5.87%	0.00%	6.84%
600	0.22%	0.42%	0.06%	0.34%	0.00%	0.25%
650	0.01%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.02%
700	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
750	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
800	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
850	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
900	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
950	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
1000	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

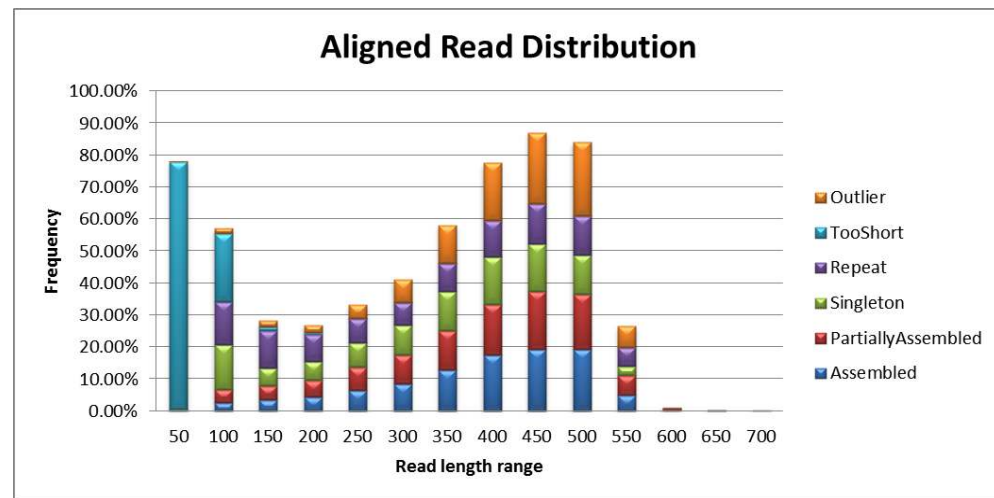


그림. 3. Aligned read distribution

표 3. GS-FLX sequence 분석을 통해 확보한 면역관련 유전자 isotig 요약

	Name	Description	E-Value
1	isotig27120	Toll-like receptor 22b [<i>Salmo salar</i>]	2.00E-16
2	isotig20752	toll [<i>Drosophila virilis</i>]	8.00E-09
3	isotig19167	toll-like receptor 3 [<i>Paralichthys olivaceus</i>]	1.00E-12
4	isotig19896	toll, putative [<i>Ixodes scapularis</i>]	3.00E-14
5	isotig27567	Toll receptor [<i>Chlamys farreri</i>]	8.00E-103
6	isotig28411	toll-like receptor 22 [<i>Danio rerio</i>]	2.00E-23
7	isotig29326	PREDICTED: similar to toll [<i>Acyrtosiphon pisum</i>]	4.00E-04
8	isotig30079	Toll9 [<i>Culex quinquefasciatus</i>]	5.00E-12
9	isotig15767	Toll-like receptor (AGAP012387-PA) [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	1.00E-25
10	isotig20808	PREDICTED: similar to toll-like receptor 3, partial [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	5.00E-13
11	isotig16460	Toll receptor [<i>Chlamys farreri</i>]	2.00E-17
12	isotig19178	PREDICTED: toll-like receptor 2 type-2-like [<i>Xenopus (Silurana) tropicalis</i>]	4.00E-24
13	isotig19847	PREDICTED: toll-like receptor 2-like [<i>Callithrix jacchus</i>]	5.00E-13
14	isotig24822	Toll-like receptor 22 [<i>Danio rerio</i>]	4.00E-21
15	isotig21682	Toll-like receptor 18 [<i>Danio rerio</i>]	2.00E-21
16	isotig28186	PREDICTED: toll-like protein 1-like, partial [<i>Callithrix jacchus</i>]	6.00E-15
17	isotig23261	PREDICTED: similar to toll-like receptor Tlr1.1 [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	2.00E-07
18	isotig20830	PREDICTED: toll-like receptor 2-like [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>]	6.00E-18
19	isotig07692	inhibitor of nuclear factor-kappaB protein [<i>Pinctada fucata</i>]	5.00E-66
20	isotig07318	inhibitor of nuclear factor-kappaB protein [<i>Pinctada fucata</i>]	2.00E-64
21	isotig27524	PREDICTED:inhibitorofkappalightpolypeptidegeneenhancer in B-cells, kinase gamma-like [<i>Saccoglossus kowalevskii</i>]	9.00E-10
22	isotig07317	inhibitor of nuclear factor-kappaB protein [<i>Pinctada fucata</i>]	2.00E-64
23	isotig23933	nuclearfactorinterleukin3regulated-likeprotein[<i>Haliotis discus discus</i>]	2.00E-132
24	isotig11967	PREDICTED:similartonuclearfactorI/X,partial[<i>Acyrtosiphon pisum</i>]	6.00E-91
25	isotig09656	MYD88_SHEEPRecName:Full=Myeloiddifferentiationprimaryresponseprotein MyD88	8.00E-49
26	isotig09657	MYD88_SHEEPRecName:Full=Myeloiddifferentiationprimaryresponseprotein MyD88	8.00E-49
27	isotig23933	nuclearfactorinterleukin3regulated-likeprotein[<i>Haliotis discus discus</i>]	2.00E-132
28	isotig10467	Interleukinenhancer-bindingfactor2homolog[<i>Lepeophtheirus salmonis</i>]	1.00E-120
29	contig05335	interleukin-1receptor-associatedkinase1-bindingprotein1 [<i>Haliotis diversicolor</i>]	5.00E-97
30	isotig10466	Interleukinenhancer-bindingfactor2homolog[<i>Lepeophtheirus salmonis</i>]	1.00E-120
31	isotig12081	PREDICTED:similartointerleukinenhancerbindingfactor3, partial [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]	0
32	isotig23032	AF494209_1 interleukin 17 receptor-like protein short form [<i>Mus musculus</i>]	1.00E-11
33	isotig24818	interleukin 17 [<i>Crassostrea gigas</i>]	2.00E-04
34	isotig25763	interleukin 17 [<i>Crassostrea gigas</i>]	2.00E-07
35	isotig15760	Interferon-inducible GTPase 5 [<i>Esox lucius</i>]	2.99E-31

표 4. GS-FLX sequence 분석을 통해 확보한 온도 반응 유전자 요약

	Name	Description	E-Value
1	isotig21272	small 22kd heat shock protein [Chlamys farreri]	9.00E-22
2	isotig24808	PREDICTED:similar to Heat shock 70kDa protein 4L (Osmotic stress protein 94) (Heat shock 70-related protein APG-1) isoform 3 [Canis familiaris]	1.00E-63
3	isotig06929	heat shock protein 20.6, putative [Ixodes scapularis]	4.00E-16
4	isotig10873	small heat shock protein II [Rhipicephalus annulatus]	4.00E-10
5	isotig10872	small heat shock protein II [Rhipicephalus annulatus]	4.00E-10
6	isotig26988	heat shock protein 60 [Biomphalaria glabrata]	2.00E-93
7	isotig21761	heat shock protein 70 [Cristaria plicata]	3.00E-177
8	isotig07614	heat shock protein 22 isoform 1 [Venerupis philippinarum]	6.00E-33
9	isotig15949	heat shock protein 40A [Venerupis philippinarum]	2.00E-162
10	isotig23889	heat shock protein hsp16, putative [Schistosoma mansoni]	2.00E-22
11	isotig12559	heat shock inducible protein 70 [Haliotis diversicolor]	0
12	isotig07617	heat shock protein 22 isoform 1 [Venerupis philippinarum]	6.00E-33
13	isotig12558	heat shock inducible protein 70 [Haliotis diversicolor]	0
14	isotig03497	heat shock cognate protein 70 [Haliotis diversicolor]	0
15	isotig07613	heat shock protein 22 isoform 1 [Venerupis philippinarum]	6.00E-33
16	isotig07616	heat shock protein 22 isoform 1 [Venerupis philippinarum]	6.00E-33
17	isotig07615	heat shock protein 22 isoform 1 [Venerupis philippinarum]	6.00E-33
18	isotig24058	heat shock protein HSP70-12A, putative [Ixodes scapularis]	4.00E-44
19	isotig07618	heat shock protein 22 isoform 1 [Venerupis philippinarum]	6.00E-33
20	isotig06931	heat shock protein 20.6, putative [Ixodes scapularis]	5.00E-16
21	isotig12436	PREDICTED:cold shock domain containing E1, RNA binding-like [Saccoglossus kowalevskii]	0
22	isotig12437	PREDICTED:cold shock domain containing E1, RNA binding-like [Saccoglossus kowalevskii]	0
23	isotig01278	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
24	isotig01285	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
25	isotig01255	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
26	isotig01279	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
27	isotig07992	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]	2.00E-38
28	isotig01263	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
29	isotig01268	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
30	isotig07991	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]	2.00E-38
31	isotig01276	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
32	isotig01260	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
33	isotig01281	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
34	isotig01282	heat shock protein 90 [Haliotis discus hannai]	0
35	isotig07993	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]	2.00E-38

표 5. GS-FLX sequence 분석을 통해 확보한 중금속 및 내분비 교란물질에 반응하는 유전자 요약

	Name	Description	E-Value
1	isotig11283	putativealpha class glutathione-s-transferase [Haliotis discus discus]	2.00E-95
2	isotig07171	glutathione-S-transferase [Haliotis diversicolor supertexta]	2.00E-152
3	isotig26515	sigma class glutathione-s-transferase [Haliotis discus discus]	1.00E-23
4	isotig06920	sigma class glutathione-s-transferase 3 [Haliotis discus discus]	1.00E-89
5	isotig07172	glutathione-S-transferase [Haliotis diversicolor supertexta]	2.00E-152
6	isotig09613	glutathione-s-transferase [Haliotis discus discus]	6.00E-121
7	isotig12303	sigma class glutathione-s-transferase 2 [Haliotis discus discus]	8.00E-111
8	isotig10066	glutathione-S-transferase isoform 2 [Haliotis discus discus]	9.00E-90
9	isotig09354	omega class glutathione-s-transferase 1 [Haliotis discus discus]	4.00E-137
10	isotig07380	putative glutathione-s-transferase [Haliotis discus discus]	1.00E-111
11	isotig11284	putativealpha class glutathione-s-transferase [Haliotis discus discus]	1.00E-65
12	isotig07320	glutathione-s-transferase [Haliotis discus discus]	2.00E-96
13	isotig08785	mu class glutathione-s-transferase [Haliotis discus discus]	1.00E-119
14	isotig07381	putative glutathione-s-transferase [Haliotis discus discus]	1.00E-111
15	isotig10065	glutathione-S-transferase isoform 2 [Haliotis discus discus]	1.00E-90
16	isotig09355	omega class glutathione-s-transferase 1 [Haliotis discus discus]	4.00E-137
17	isotig07321	glutathione-s-transferase [Haliotis discus discus]	2.00E-96
18	isotig19651	metallophosphoesterase domain-containing protein [Dictyostelium discoideum AX4]	3.00E-50
19	isotig06826	tissue inhibitor of metalloproteinase [Haliotis diversicolor]	2.00E-67
20	isotig09930	Metallothionein family protein [Trichomonas vaginalis G3]	7.00E-10
21	isotig14636	thioredoxin peroxidase 1 [Haliotis discus discus]	1.00E-143
22	isotig21184	thioredoxin reductase 1 [Gallus gallus]	1.00E-131
23	isotig10322	Thioredoxin domain-containing protein 9 [Salmo salar]	2.00E-69
24	isotig14169	thioredoxin peroxidase 2 [Haliotis discus discus]	3.00E-112
25	isotig21866	thioredoxin 2 [Haliotis discus discus]	2.00E-93
26	isotig18826	thioredoxin-related protein 14 [Branchiostoma belcheri tsingtauense]	4.00E-33
27	isotig25349	thioredoxin-like protein [Aplysia dactylomela]	2.00E-74
28	isotig25304	PREDICTED: similar to thioredoxin-like protein [Nasonia vitripennis]	1.00E-94
29	isotig10323	Thioredoxin domain-containing protein 9 [Salmo salar]	2.00E-69
30	isotig18944	cytochrome P450 CYP12A2 [Musca domestica]	1.00E-34
31	isotig12312	CYP356A1 [Crassostrea gigas]	2.00E-104
32	isotig04698	cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum]	6.00E-146
33	isotig04697	cytochrome P450 family 4 [Cyphoma gibbosum]	5.00E-147
34	isotig18944	cytochrome P450 CYP12A2 [Musca domestica]	1.00E-34
35	isotig15572	CYP356A1 [Crassostrea gigas]	5.00E-65

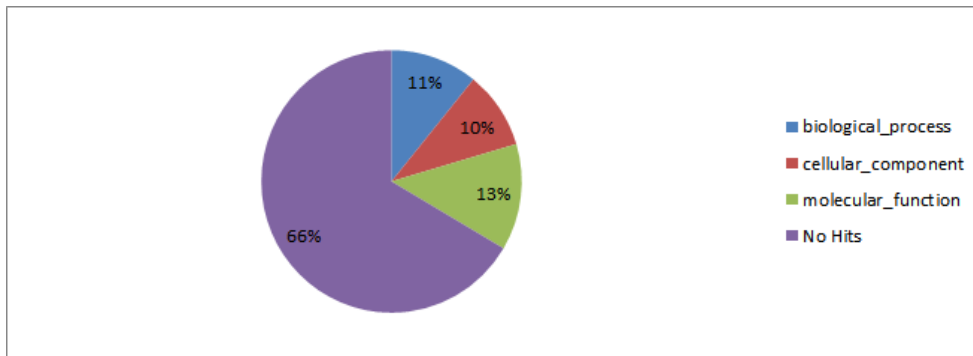


그림 4. Gene ontology analysis of GS-FLX sequencing data

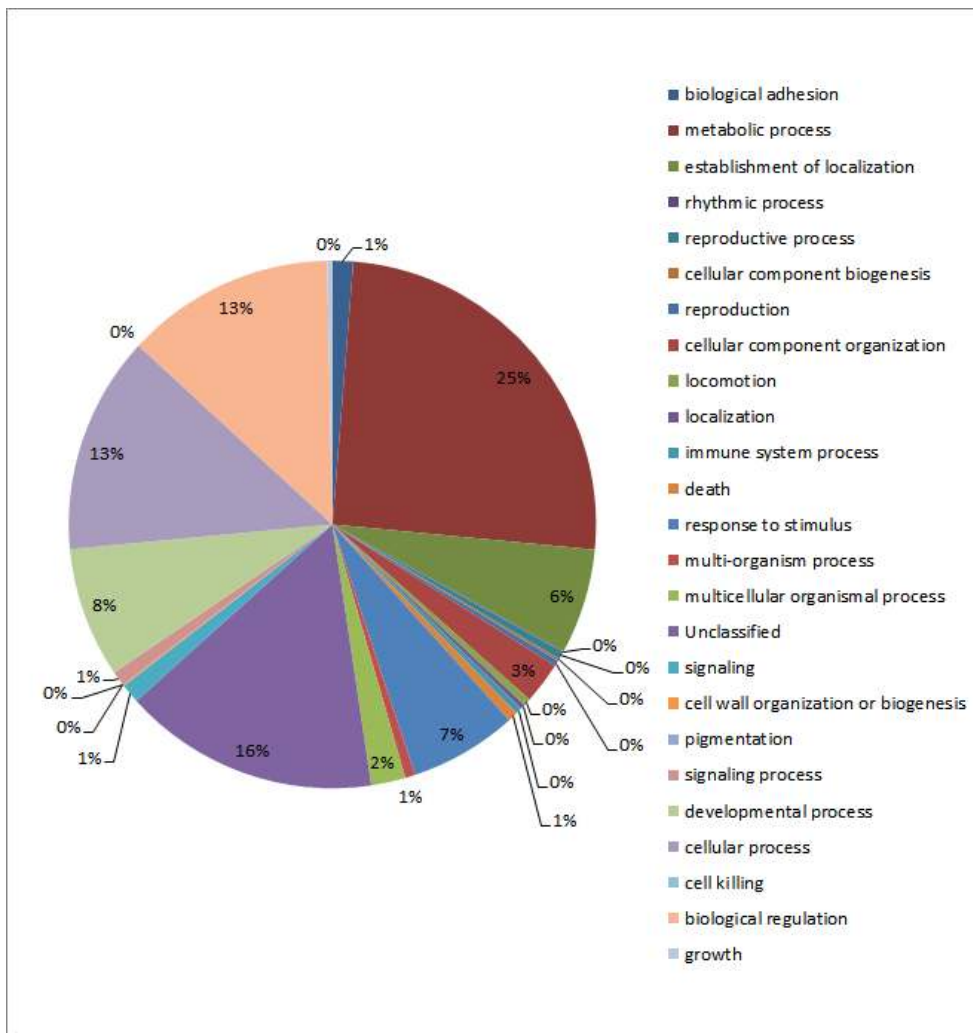


그림 5. Gene ontology analysis (biological process) of GS-FLX sequencing data

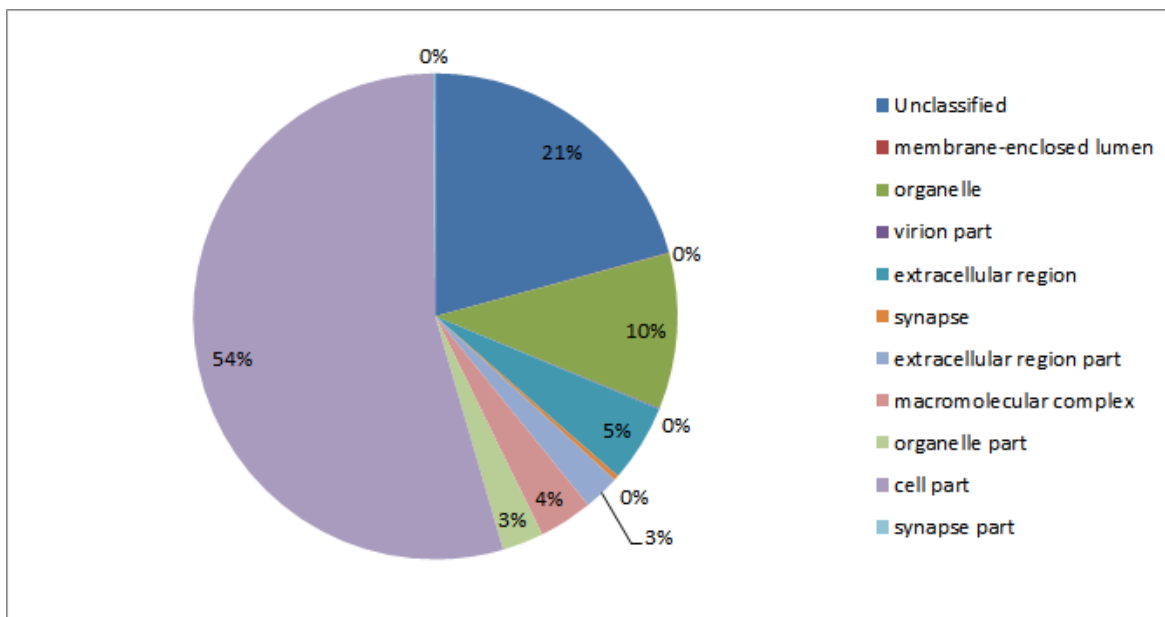


그림 6. Gene ontology analysis (cellular component) of GS-FLX sequencing data

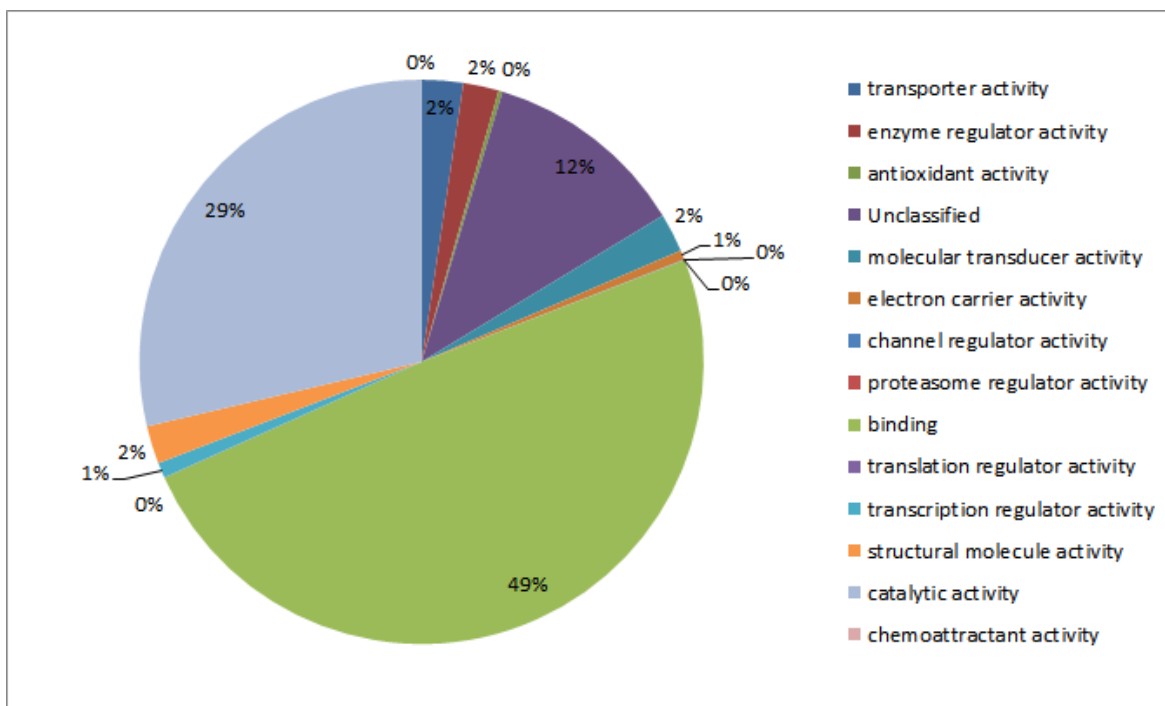


그림 7. Gene ontology analysis (molecular function) of GS-FLX sequencing data

2) Solexa Hiseq을 이용한 sequencing

GS-FLX titanium을 이용한 GS-FLX sequencing이외에 Solexa를 이용하여 더 많은 양의 전복의 transcriptome sequence를 추가로 분석하였다. GS FLX titanium이 read 길이가 400 bp 인데 반하여 Solexa는 100 bp 정도로 짧은 read 길이를 가지지만, 더 많은 read의 분석이 가능하여 추가적으로 수행하였다.

Solexa를 통하여 얻어진 결과의 base distribution을 표 6에 나타내었다. Solexa 분석은 pooled RNA를 두 개의 pooled RNA로 나누어 양방향으로 나누어 분석하였으며, 각 pooled-RNA에서 분석된 base는 각각 7,946,928,460 base였고, 읽혀진 read는 각 두 개의 pooled-RNA에서 각각 78,682,460개의 read를 분석할 수 있었다. Solexa를 통한 sequencing data의 assembly 결과는 표 7에 나타내었다. 분석된 전체 reads는 144,626,114 reads를 분석하였고, 전체 읽혀진 bases는 12,790,816,495 base로 약 12 Gb의 염기서열을 분석하였다. 전체 595,496개의 contig가 assemble되었고, 전체 contig가 포함하는 염기는 93,471,654 base pair였다. 가장 긴 contig의 size는 4,718 base pair를 나타내었다. Solexa 분석을 통하여 얻어진 서열을 Blast하여 확보한 면역관련 유전자, 물리적 스트레스에 반응하는 유전자, 중금속 및 내분비교란물질에 반응하는 것으로 알려진 유전자들을 각 20개씩 표 8, 9, 10에 나타내었다.

표 6. Base distribution.

Sample	seq info	Base_A	Base_C	Base_G	Base_T	Base_N	Total Bases	Read Count
pooled-RNA	s_3_1_pooled-RNA	2,186,373,286	1,738,832,741	1,828,103,586	2,192,963,474	655,373	7,946,928,460	78,682,460
	s_3_2_pooled-RNA	2,170,379,874	1,709,504,598	1,862,599,841	2,203,382,633	1,061,514	7,946,928,460	78,682,460

표 7. Assembly result.

Sample	Contig					Quality Trim Read	
	Contig	All contig bases	Avg. contig size	Max. contig size	N50	Total Reads	Total reads bases
pooled-RNA	595,496	93,471,654	157	4,718	154	144,626,114	12,790,816,495

표 8. Blast result (면역 관련 유전자 20개)

No	Contig Name	Description	E-value
1	NODE_712913	PREDICTED: similar to toll-like receptor Tlr1.1 [Strongylocentrotus purpuratus]	0.00002
2	NODE_1549625	toll-like receptor 3 [Paralichthys olivaceus]	
3	NODE_877033	toll-like protein [Tribolium castaneum]	7.00E-04
4	NODE_1287756	Toll-like receptor 2 [Ovis aries]	1E-22
5	NODE_1040626	PREDICTED: similar to toll-like receptor 3, partial [Strongylocentrotus purpuratus]	7E-14
6	NODE_1104246	Toll-like receptor 1 [Hirudo medicinalis]	0.0002
7	NODE_1119408	PREDICTED: toll-like receptor 7-like [Saccoglossus kowalevskii]	0.0000001
8	NODE_1143640	PREDICTED: toll-like receptor 4-like [Xenopus (Silurana) tropicalis]	1E-23
9	NODE_981785	PREDICTED: toll-like receptor 8-like [Xenopus (Silurana) tropicalis]	1.00E-17
10	NODE_445564	AF296673_1 toll-like receptor 10 [Homo sapiens]	4.00E-05
11	NODE_436637	Toll receptor [Chlamys farreri]	4.00E-04
12	NODE_647608	PREDICTED: toll-like receptor 2-like [Saccoglossus kowalevskii]	4.00E-04
13	NODE_477950	PREDICTED: inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon-like [Sus scrofa]	9.00E-09
14	NODE_236626	NF-kappa-B-activating protein [Trichinella spiralis]	4.00E-07
15	NODE_679473	inhibitor of kappab kinase epsilon [Culex quinquefasciatus]	3.00E-30
16	NODE_599199	nuclear factor kappa B [Amphimedon queenslandica]	3.00E-11
17	NODE_1549234	inhibitor of nuclear factor-kappaB protein [Pinctada fucata]	7.00E-22
18	NODE_1427282	PREDICTED: similar to Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 2 [Strongylocentrotus purpuratus]	7.00E-09
19	NODE_1359868	PREDICTED: inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein like [Danio rerio]	8E-16
20	NODE_1813974	IkappaB kinase [Ciona intestinalis]	3E-09

표 9. Blast result (물리적 스트레스에 반응하는 유전자 20개)

	Contig Name	Description	E-value
1	NODE_22479	Heat shock protein 4 [Danio rerio]	1E-37
2	NODE_580543	Heat shock factor protein 5 [Harpegnathos saltator]	4.00E-16
3	NODE_271934	heat shock protein 70 [Plutella xylostella]	3E-22
4	NODE_216129	small heat shock protein II [Rhipicephalus annulatus]	3E-11
5	NODE_380063	heat shock protein 70 (HSP70)-interacting protein, putative [Ixodes scapularis]	2E-23
6	NODE_1046787	heat shock protein 60 [Biomphalaria glabrata]	2E-42
7	NODE_935989	heat shock protein 70 [Botryllus schlosseri]	6E-38
8	NODE_958225	PREDICTED: activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1-like [Saccoglossus kowalevskii]	2E-24
9	NODE_1319679	heat shock protein 70 [Helicoverpa zea]	6E-29
10	NODE_2431636	heat shock protein 70 [Crassostrea hongkongensis]	5E-36
11	NODE_2107294	heat shock protein, putative [Schistosoma mansoni]	1E-22
12	NODE_2286480	PREDICTED: heat shock protein HSP70-12A, putative-like, partial [Saccoglossus kowalevskii]	6E-45
13	NODE_294901	PREDICTED: similar to ATPase, histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like domain containing protein, partial [Ciona intestinalis]	4.00E-08
14	NODE_220611	AF321770_1 HSPC011-like protein [Ophiophagus hannah]	2E-44
15	NODE_76878	Hsp70, putative [Ixodes scapularis]	4E-13
16	NODE_934248	PREDICTED: stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)-like [Saccoglossus kowalevskii]	2E-36
17	NODE_1282529	PREDICTED: HSPB1-associated protein 1-like [Saccoglossus kowalevskii]	1E-19
18	NODE_1442975	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1 [Mus musculus]	1E-26
19	NODE_2325179	PREDICTED: DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9-like [Saccoglossus kowalevskii]	0.0009
20	NODE_3437982	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3 [Danio rerio]	8E-29

표 10. Blast result (중금속 과 내분비 교란물질에 반응하는 유전자 및 항산화 관련 유전자)

No	Contig Name	Description	E-value
1	NODE_468463	cytochrome P450 [Haliotis diversicolor]	5E-56
2	NODE_227476	PREDICTED: cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog [Xenopus (Silurana) tropicalis]	4E-38
3	NODE_761268	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2-like [Bos taurus]	5E-13
4	NODE_704386	PREDICTED: similar to cytochrome P450 3A80, partial [Ornithorhynchus anatinus]	4E-32
5	NODE_733336	cytochrome P450 1A [Stenotomus chrysops]	5E-12
6	NODE_388794	PREDICTED: catalase [Taeniopygia guttata]	1E-36
7	NODE_610279	superoxide dismutase [Cu-Zn] [Megathura crenulata]	2E-15
8	NODE_1093948	PREDICTED: superoxide dismutase-like, partial [Saccoglossus kowalevskii]	9E-09
9	NODE_216058	selenium-dependent glutathione peroxidase [Cristaria plicata]	3E-12
10	NODE_1016490	PREDICTED: glutathione peroxidase 7-like [Saccoglossus kowalevskii]	1E-09
11	NODE_1084037	thioredoxin peroxidase 1 [Haliotis discus discus]	3E-38
12	NODE_798430	selenium-dependent glutathione peroxidase [Haliotis discus hannai]	1E-81
13	NODE_90636	thioredoxin domain containing 16 [Bos taurus]	2E-11
14	NODE_684229	PREDICTED: thioredoxin domain containing like [Saccoglossus kowalevskii]	5E-26
15	NODE_19266	glutaredoxin 3 [Ictalurus furcatus]	7E-17
16	NODE_1070613	thioredoxin-like protein [Aplysia dactylomela]	3E-40
17	NODE_1190443	thioredoxin-like 1 [Salmo salar]	8E-16
18	NODE_1214627	PREDICTED: glutaredoxin 2-like [Saccoglossus kowalevskii]	1E-14
19	NODE_349500	metallothionein [Citrus jambhiri]	1E-11

나. 2차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 연구수행 내용

1) Transcript 분석 및 oligonucleotide chip 제작

기존의 cDNA library 제작 및 EST 분석으로 확보한 unigene 5180개와 1차년도에 GS-FLX titanium으로 분석한 transcriptome 중 polarity 확인(blastx를 이용하여 각 transcript의 polarity 확인)이 가능한 transcript 29,591개 (contig 11,460개 ; singleton 18,131개) 등 모두 34,771개 transcript를 이용하여 probe 디자인을 의뢰하였다 (Roche NimbleGen, Inc). 한 개의 transcript당 여러 개의 probe를 디자인함으로써 transcript내 probe의 위치에 따른 변이를 줄이고자 하였다. 전체 34,771개 transcript 중 34,747개 transcript는 각 transcript당 4개의 probe, 9개의 transcript는 3개의 probe, 8개의 transcript는 2개의 probe, 7개의 transcript는 1개의 probe를 디자인하여 총 139,038개의 probe를 디자인하였으며, 139,038개 probe를 12x135K platform에 array하여 12개의 다른 유도반응에서 확보한 RNA를 이용하여 microarray를 할 수 있게 준비하였다.

2) Oligonucleotide chip 실험을 위한 전복의 면역반응 유도

■ 전복 채집

실험에 사용한 실험동물인 까막전복 (*Haliotis discus discus*)은 귀덕종묘배양장으로부터 평균 체중량 50 g, 평균 shell-length 8 cm의 전복을 구입하였다. 250 L의 PVC 시험수조 9개에 40마리씩 나누어 20±1°C의 항온실에서 일주일간 순치하였다. 먹이는 자연 상태에서 주요 먹이인 갈조류 미역 (*Undaria pinnatifida*)을 충분한 양으로 급이 하였고, 하루에 한번씩 75%의 해수를 환수하였다.

■ Microarray 분석을 위한 면역반응 유도 및 처리 시간에 따른 조직 적출

다양한 면역자극물질에 따른 전복의 면역반응을 유도하기 위하여 Scuticociliates (1.87×10^5 CFU/abalone), bacteria mixture (*Listeria monocytogenes*; 1×10^4 CFU/abalone, *Vibrio parahaemolyticus*; KCTC2729; 1×10^4 CFU/abalone), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV; 1×10^8 PFU/abalone), polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C; 500 μ g/abalone), Lipopolysaccharide (LPS; 500 μ g/abalone), Cadmium (20 ppm/abalone), tributyltin (TBT; 5 ppm/abalone)을 이용하여 면역 반응을 유도하였다. 각각의 면역유도물질 및 병원균은 0.9% saline 용액을 이용하여 녹이거나 재부유 시켜 실험에 사용하였고, 전복 1미당 100 ul를 근육에 주사하였고, 동량의 0.9% saline 용액만을 주사한 전복들을 대조구로 사용하였다. 각각의 면역유도자들을 주사한 후 6, 24시간 후에 각 처리구별로 4마리의 전복으로부터 gill 조직을 적출하고 액체질소에서 동결 후 RNA를 분리하기 전까지 -70°C 에서 보관하였다.

■ Total RNA 분리

각 그룹별로 4마리의 전복으로부터 40 mg의 아가미 조직을 이용하였다. 총 160 mg의 조직을 이용하여 Qiazol reagent (Qiagen, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 2 mL의 Qiazol reagent에 각 그룹당 160 mg의 아가미 조직을 넣은 후 homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 5분간 상온에서 반응 후 400 ul의 chloroform을 첨가 후 3분간 상온에서 반응 시키고, 얼음에 보관하였다. 4°C , $12,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리 후 total RNA를 포함하는 상등액을 회수하였고, 회수된 상등액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 RNA를 침전 시켰다. 4°C , $12,000 \times g$ 에서 원심분리 후 상등액을 제거하고 75%의 에탄올을 첨가하여 세척한 후에 4°C , $12,000 \times g$ 에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후에 상등액을 완전히 제거하고 RNA pellet을 10분간 상온에서 건조 후, 100 ul의 RNase free water에 녹였다. Total RNA는 분광광도계 (Smart spec plus spectrophotometer; BioRad, UK)를 사용하여 정량하였다.

■ RNA 시료의 Quality control (QC)

Oligonucleotide chip 실험을 위한 cDNA 합성과 cDNA labeling을 위해서는 RNA의 quality가 매우 중요하기 때문에 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)를 이용하여 sample RNA의 quality control (QC) analysis를 수행하였다. cDNA를 합성하기에 앞서 RNA의 sample이 순도가 적절한지 spectrophotometric QC analysis를 수행하였다. 성공적인 Oligonucleotide chip 실험을 위해서는 RNA의 농도가 $1.0 \mu\text{g}/\text{ul}$ 이상이어야 하며, $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 과 $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$ 의 조건을 만족해야 한다. 모든 RNA sample이 1.99~2.04로 요구조건에 모두 만족하는 결과를 나타내었으며, RNA농도 또한 $1.31 \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{ul}$ 로 모두 기준치 이상의 농도를 나타내었다 (표 11). 본 연구에 사용된 Array format은 $12 \times 135\text{K}$ arrays로 총 $10 \mu\text{g}$ 의 total RNA를 사용하여 실험을 수행하였다.

표 11. cDNA 합성을 위한 RNA sample의 QC analysis 결과

No.	260/280	260/230	280	260	ng/ul	10 μ g	DW	Total vol.
1	2.02	2.00	33.03	66.69	2667.54	3.75	6.25	10.00
2	2.01	1.77	30.83	61.86	2474.50	4.04	5.96	10.00
3	2.03	1.73	34.32	69.82	2792.72	3.58	6.42	10.00
4	2.02	1.80	32.66	66.12	2644.64	3.78	6.22	10.00
5	1.99	1.45	26.57	52.97	2118.86	4.72	5.28	10.00
6	2.02	1.50	29.49	59.58	2383.04	4.20	5.80	10.00
7	2.02	1.71	32.82	66.17	2646.96	3.78	6.22	10.00
8	2.04	1.73	31.37	64.03	2561.36	3.90	6.10	10.00

9	2.01	1.52	29.74	59.68	2387.18	4.19	5.81	10.00
10	1.99	1.31	29.72	59.11	2364.38	4.23	5.77	10.00
11	2.01	1.57	30.71	61.82	2472.78	4.04	5.96	10.00
12	1.99	1.49	26.37	52.47	2098.80	4.76	5.24	10.00

■ cDNA합성 및 QC

cDNA의 합성은 Superscript Double-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 수행하였다. QC분석을 마친 RNA 시료 10 µg에 1 µl을 첨가 후 최종 volume이 11 µl가 되도록 하여 70°C에서 10분간 반응 후 얼음물에서 5분간 안정화 시킨 후, 5X first strand buffer 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl, 10 mM dNTP Mix 1 µl를 첨가하여 최종 volume이 18 µl가 되도록 하고 42°C에서 2분간 반응시킨다. 추가적으로 2 µl의 SuperScript II를 첨가하고 42°C에서 60분간 반응하였다. First strand 반응액 20 µl에 DEPC water 91 µl, 5X Second Strand Buffer 30 µl, 10 mM dNTP Mix 3 µl, 10 U/µl DNA ligase 1 µl, 10 U/µl DNA Polymerase I 4 µl, 2 U/µl RNase H 1 µl를 첨가하여 최종 volume 150 µl를 맞추고 16°C에서 2시간동안 반응 시킨 후, 2 µl의 5 U/µl T4 DNA polymerase를 첨가하고 16°C에서 5분간 더 반응시켰다. RNase A를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응하여 RNA를 제거하고 phenol:chloroform:isoamyl alcohol을 clean up하고 ethanol 침전법으로 정제 하였다. 합성된 cDNA의 QC는 표 12에 나타내었다. 기준 농도 100 ng/µl의 농도와 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$ 과 $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$ 을 모두 만족하는 결과를 나타내었다.

표 12. 합성한 cDNA의 QC 및 labeling에 사용된 농도와 양

No.	Sample ID	260/280	260/230	280	260	ng/µl	1µg	dw	Total vol.
1	1	1.84	2.14	1.57	2.89	144.65	6.91	33.09	40.00
2	2	1.90	2.13	1.63	3.10	154.96	6.45	33.55	40.00
3	3	1.82	2.27	1.63	2.97	148.58	6.73	33.27	40.00
4	4	1.83	2.24	1.64	2.99	149.25	6.70	33.30	40.00
5	5	1.85	2.08	1.45	2.70	134.83	7.42	32.58	40.00
6	6	1.85	2.30	1.60	2.96	148.12	6.75	33.25	40.00
7	7	1.83	2.24	1.78	3.25	162.51	6.15	33.85	40.00
8	8	1.81	2.19	2.01	3.65	182.25	5.49	34.51	40.00
9	9	1.85	2.22	1.59	2.93	146.66	6.82	33.18	40.00
10	10	1.81	2.19	1.68	3.04	152.07	6.58	33.42	40.00
11	11	1.81	2.23	1.61	2.92	146.20	6.84	33.16	40.00
12	12	1.82	2.14	1.66	3.02	150.77	6.63	33.37	40.00

■ cDNA labeling 및 microarray hybridization

cDNA sample은 NibleGen One-Color DNA Labeling Kit (NimbleGen, USA)을 이용하여 수행하였다. 1 µg의 cDNA sample을 Cy-3 random nonamer를 이용하여 Cy3 labeling 하고 정제하였다. 정제된 labeled cDNA는 ND-100 spectrophotometer (NanoDrop, USA)를 이용하여 정량 하였다. Labeled cDNA sample을 42°C에서 16-20시간 동안 NimbleGen Expression array에 혼성화 하고, 혼성화된 Array는 NimbleGen MS 200 Microarray scanner set을 이용하여 532 nm의 파장으로 Scan하였다.

■ Data analysis 및 통계 분석

Array data export 공정과 분석은 NimbleScan v2.5를 이용하여 수행하였다. Raw data는 NibleScan v2.5의

Gene expression RMA algorithm에 의해서 추출되었다. 각각의 array에서 각 유전자의 신호강도는 2535개의 유전자 각각의 모든 24개의 탐침의 Averaging spot replicates에 의해 각 배열에서 각각의 유전자의 신호 강도를 결정하였다. 유전자의 신호 강도는 logarithm에 의해 변환되었다. 통계상의 발현 데이터의 유의성은 발현이 변화한 정도 차이를 이용하여 결정하였다. Hierarchical cluster 분석은 complete linkage와 유사도의 측정에 의한 euclidean distance를 이용하여 분석하였다. mRNA 데이터의 정량, 이미지 분석에 Nimblescan v2.5 소프트웨어가 사용되었고, 다른 모든 분석 공정에는 R scripts가 사용되었다.

2. 결과

대조구로 0.9%의 saline을 주입한 전복의 아가미로부터 분리된 RNA를 사용하였고, 7개 그룹의 면역유도물질을 주사한 전복에서 대조구에 비하여 변화된 발현량을 분석하였다. 표 13~42 까지 각 실험별로 가장 높은 유의적 발현 변화를 보이는 20개의 유전자를 나타내었다. 또한 그림 8에 각 반응별로 발현 증가 및 감소된 유전자의 수를 그래프로 나타내었다. 그림 9는 hierarchical cluster image를 그림으로 나타내었다. 붉은 색은 2배 이상으로 발현이 증가된 유전자를 나타내고, 녹색은 2배 이상 발현이 감소된 유전자를 나타내고 있으며 검은색은 유의적인 발현의 변화를 보이지 않은 유전자를 나타내고 있다. 이러한 hierarchical cluster image를 비교하여 비슷한 유전자 발현 패턴을 보이는 그룹끼리 분류하였다 (그림 10). 박테리아 24시간제와 VHSV 처리 그룹이 비슷한 발현 패턴을 보였다. 크게 4개의 그룹으로 분류되었으며, 박테리아 6시간, VHSV, ciliates 24시간 cadmium, poly I:C 6시간에서 비슷한 발현 패턴을 보이는 그룹으로 분류되었고 두 번째로 LPS 24시간, 박테리아 24시간 poly I:C 24시간이 비슷한 발현 패턴을 보이는 그룹으로 분류되었다. 세 번째로는 ciliate 6시간과 LPS 6시간이 비슷한 발현 패턴을 보이는 것으로 나타났으며, TBT를 처리한 전복에서는 다른 실험구와 가장 다른 발현 패턴을 나타낸 것을 확인 할 수 있었다. 종합적으로 6시간제의 발현패턴과 24시간제의 발현패턴이 서로 달라 동일한 시간대의 실험구끼리 서로 같은 발현 패턴을 나타내는 그룹으로 분류된 것을 확인 할 수 있었다. Oilogonucleotide chip 실험을 통하여 얻어진 위와 같은 결과는 이러한 발현 패턴 분석을 통하여 전복이 외부 물질에 의한 면역반응이 short term과 long term에서 분자적 수준에서 어떻게 반응이 이루어지며 어떻게 변화하는지 이해하는데 중요한 자료로 사용될 수 있을 것으로 보인다.

2-1) Bacteria mixture를 주사한 전복에서의 발현변화

Bacteria mixture를 주사한 전복과 0.9% saline을 주사한 전복간의 발현 차이를 135K oligonucleotide chip 을 이용하여 분석하였다. 주사 6시간 후의 전복에서 발현의 증가를 보인 유전자는 표 13에 나타내었다. 주사 6시간 후에는 Leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein이 95.0 배로 가장 큰 발현 증가를 나타내었 으며, defensin (25.0배), GTPase (19.8배), interferon-induced 44-like protein (5.3배) 등의 잘 알려진 면역유전자들에서 높은 발현 변화를 나타내었으며, 이들 유전자를 포함하여 총 402개의 유전자에서 2배 이상의 발현증가를 나타내었다. 한편, GTP-binding protein 6-like (-40.2 배), Super cysteine rich proteins (-13.4배), glucagon-like peptide 2 receptor (-9.8배), perlucin 5 (-8.5배)등의 유전자에서 유의적인 발 현 변화가 관찰되었으며, 이들 유전자를 포함한 총 428개의 유전자에서 2배 이상 유의적인 발현변화가 관찰 되었다 (표 14).

주사 24시간 후에는 대조구에 비하여 bacteria mixture를 주사한 전복에서도 6시간제 시료에서와 같이 leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein이 71.6배, defensin이 63.8배로 매우 높은 발현 증가를 나타내었으며, 총 606개의 유전자에서 2배이상의 유의적인 발현 증가를 나타내었으며(표 15), 550개의 유전자가 발현 감소를 나타내었다 (표 16). 6시간에 비하여 24시간 후에 더 많은 유전자에서 유의적인 발현변화를

나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

추가적으로 bacteria mixture 주사 후 6시간째 시료를 대조구로 하여 24시간째에 나타나는 발현 변화를 관찰하였다 (표 35 와 36). GTP-binding protein 6-like (11.9배), interferon induced 44 like protein (10.4배), sodium solute transporter bito-a (9.5배)등의 유전자를 포함한 490개의 유전자에서 유의적으로 증가된 발현 변화를 나타내었으며, notch (-22.4배), temptin (-11.7배)등의 유전자를 포함한 426개의 유전자에서 2배 이상의 유의적인 발현 감소를 나타내었다.

2-2) VHSV를 주입한 전복에서의 발현변화

VHSV를 주입후 6시간과 24시간 후에 아가미로부터 RNA를 분리하고 0.9% saline을 주입한 대조구와 비교하였다 (표 17 와 18). 항균 펩타이드로 알려진 defensin이 44배로 가장 높은 발현 증가를 나타내었으며, 선천면역에서 중요한 pathogen pattern 인지 단백질인 peptidoglycan recognition protein(26배)과 perlucin 3 (28.0배), transposase (26.6배)등이 가장 높은 유의적 발현차를 나타내었고, 총 381개의 유전자에서 2배 이상의 유의적 발현 증가를 나타내었다. 2배 이상의 유의적 발현감소를 나타낸 유전자는 434개로 notch (-41배), GTP-binding protein (-31.3배), ATPase tupe 13A3-like (-31.4)등의 유전자에서 매우 높은 발현 차를 나타내었다.

2-3) Scuticociliates를 주입한 전복에서의 발현변화

Scuticociliates를 주입한 후 6시간에는 912개, 906개의 유전자가 각각 2배 이상 증가 및 감소가 이루어져 매우 많은 유전자들의 발현 변화를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. Scuticociliates를 주입한 전복에서도 박테리아를 주입한 실험구와 비슷하게 leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein (104배), defensin (62.3배)등이 매우 유의적으로 높은 발현증가를 나타내었으며, temptin (42.9배), calomodulin2 (23.0배)등의 유전자에서도 매우 높은 발현 차를 나타내었다 (표 19). Plasma membrane H⁺-ATPase (-65.8배), pol-like protein (-38.2배), low-density lipoprotein receptor-related protein 12-like (-34.3배)등의 유전자에서 매우 높은 발현 변화를 나타내었다 (표 20).

24시간째에도 defensin (58.9배), leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein (20.0배)등의 유전자들이 6시간째에서와 비슷하게 매우 높은 발현증가를 나타내었으며 (표 21), perlucin 5 (-57.4), fibronectin tupe III domain protein (-21.1)와 같은 유전자에서는 낮은 발현 감소를 나타내었으며, 총 647개의 유전자가 유의적인 발현의 감소를 나타내었다 (표 22).

Ciliates를 주입 후 24시간째에는 6시간째에 비해서 pol-like protein (61.5배), xylolinase homolog (50.5배), plasma membrane H⁺-ATPase (48.0배), GK24369 (44.7배)등 736개의 상향 조절되는 유전자(표 37)와 838개의 하향조절 되는 유전자 (표 38)를 확인 할 수 있었다.

2-4) Poly I:C를 주입한 전복에서의 발현변화

대조군과 Poly I:C를 처리 후 6시간 및 24시간째를 각각 비교하여, 상향 또는 하향 조절되는 유전자 20개를 표 23-26에 나타내었다. Poly I:C에 의해서 6시간째에 2배 이상 상향조절 되는 유전자 712개, 하향 조절되는 유전자 1195개를 최종 확인 하였다(표 23 과 24). 24시간째에서는 상향 조절되는 유전자 1114개, 하향 조절되는 유전자 1002개를 최종확인 하였다(표 25 와 26). 6시간째에 비하여 24시간에 상향 또는 하향 된 유전자는 각각 1256개, 950개로 각각 확인되었으며, 상향 조절된 유전자에는 Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), defensin, caspase-3 등의 주요 면역유전자들이 포함되어 있었다 (표 39 와 40).

2-5) LPS를 주입한 전복에서의 발현 변화

LPS를 주입한 전복에서는 6시간째에 GTPase (34.5배), Transposes (28.9배), CTL-6 (25배)등 929개의 유전자에서 발현이 상향 조절되었고, leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein (-209배), GABA-a receptor 3-like protein (-52배)등 1272개의 유전자에서 발현이 하향 조절되는 결과를 확인하였다 (표 27 과 28). 24시간째에는 상향조절 되는 유전자 863개와 하향 조절되는 유전자 928개를 확인할 수 있었다. Carboxypeptidase B, transposase, CTL-6등의 유전자는 6시간째와 24시간째에서 모두 10배 이상 높게 상향 조절 되는 결과를 나타내었으며, GTPase, cAMP responsive element binding protein 등의 유전자는 6시간째에 매우 높은 발현은 보였으나 24시간째에는 유의적인 발현 변화를 보이지 않았다 (표 29 와 30). 360개의 유전자가 6시간째에는 발현이 유의적으로 상향 조절되었으나 이 유전자들이 24시간째에는 유의적으로 발현이 하향 조절되는 결과를 나타냄을 확인 할 수 있었다 (표 41 와 42).

2-6) Cadmium을 주입한 전복에서의 발현 변화

Cadmium을 주입한 그룹에서는 temptin이 42배의 발현 증가를 보여 가장 높은 발현 변화를 나타내었으며, 항균 펩타이드인 defensin역시 카드뮴에 의해서 16.9배의 발현 증가를 나타내었다. 이들 유전자를 포함해 발현이 상향 조절되는 431개의 유전자를 확인 할 수 있었고 (표 31), 하향 조절되는 유전자 431개를 확인하였다 (표 32).

2-7) TBT를 주입한 전복에서의 발현 변화

TBT를 주입한 전복에서는 samll heat shock protein 26이 364배로 매우 높게 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 그 외에도 다양한 heat shock protein들이 매우 높은 수준으로 발현이 상향 조절되는 것을 확인할 수 있었다. 2000가지 이상의 유전자의 발현이 상향 조절되는 것을 확인할 수 있었으며(표 33) 발현이 감소된 유전자 역시 1700 여개 (표 34)로 매우 많은 유전자들에게 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

박테리아와 박테리아의 세포벽 구성물질인 LPS 두가지 실험구에서 모두 2배 이상의 발현이 증가된 유전자는 81개, 발현이 감소된 유전자는 72개로 확인 되었다. 또한 VHSV와 poly I:C를 처리한 양쪽 실험구에 2배 이상의 발현 증가를 보이는 유전자는 84개, 발현 감소를 보이는 유전자는 131개로 각각 확인 되었다. 모든 실험구에서 유의적으로 2배 이상의 발현 증가 및 감소를 나타낸 유전자는 각각 21개씩으로 표 43 과 44에 나타내었다. 박테리아에 의해서 발현이 증가되거나 감소 하지만 VHSV에서는 유의적인 차이를 보이지 않는 유전자가 각각 74개, 167개의 유전자가 확인되었다. 또한 VHSV에서는 유의적으로 발현이 증가되었지만 poly I:C에서는 유의적인 차를 나타내지 않거나 감소된 유전자가 17개, poly I:C에서는 발현이 증가되었으나 VHSV에서 감소된 유전자 2개가 확인 되었다. 2차년도 연구수행을 통하여 이러한 각 면역 유도물질에 반응하는 유전자 목록을 확보하였고, 각 면역 반응간의 발현 차를 통하여 병원균에 따른 관련 면역 유전자의 signal map을 작성할 수 있을 것으로 사료된다. Oligonucleotide chip 실험을 통하여 확보된 유전자들에 대하여 3차년도에는 real-time RT-PCR과 재조합 단백질을 통한 bioactivity test를 통하여 전복 면역반응에 대한 메커니즘을 분자수준에서 더욱 자세하게 접근하였다.

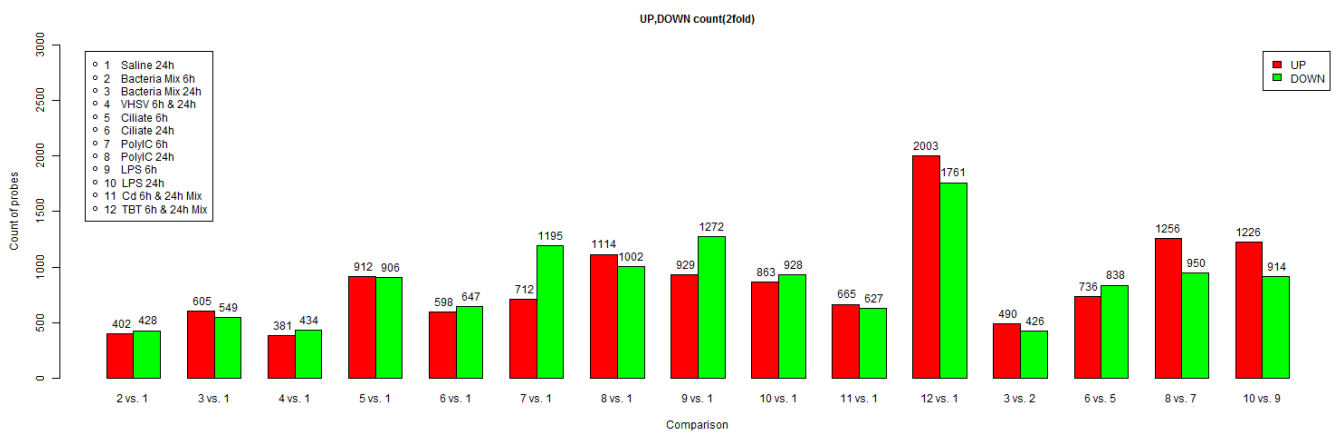


그림 8. Signal up, down count (≥ 2 -fold)

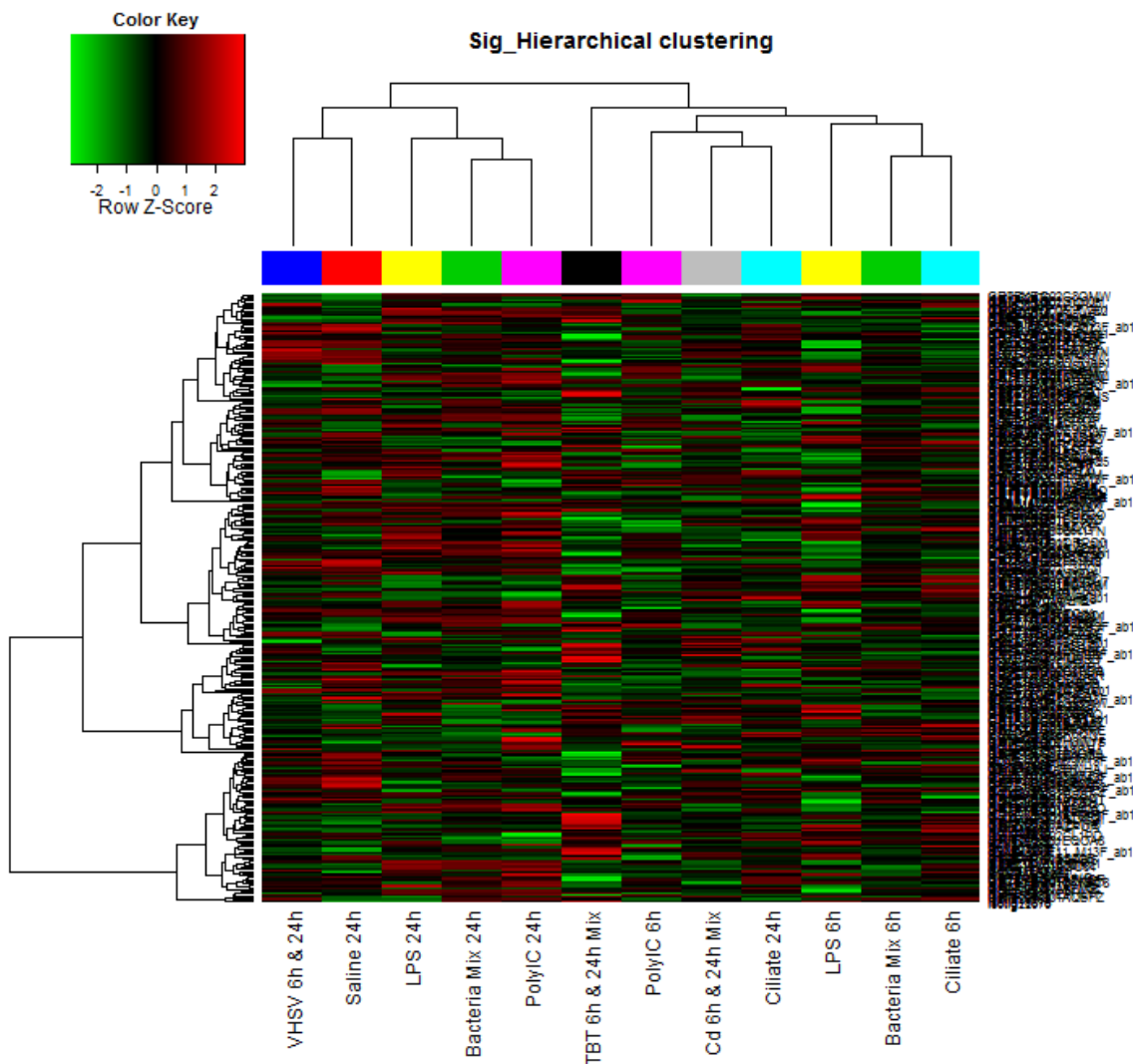


그림 9. Hierarchical clustering image

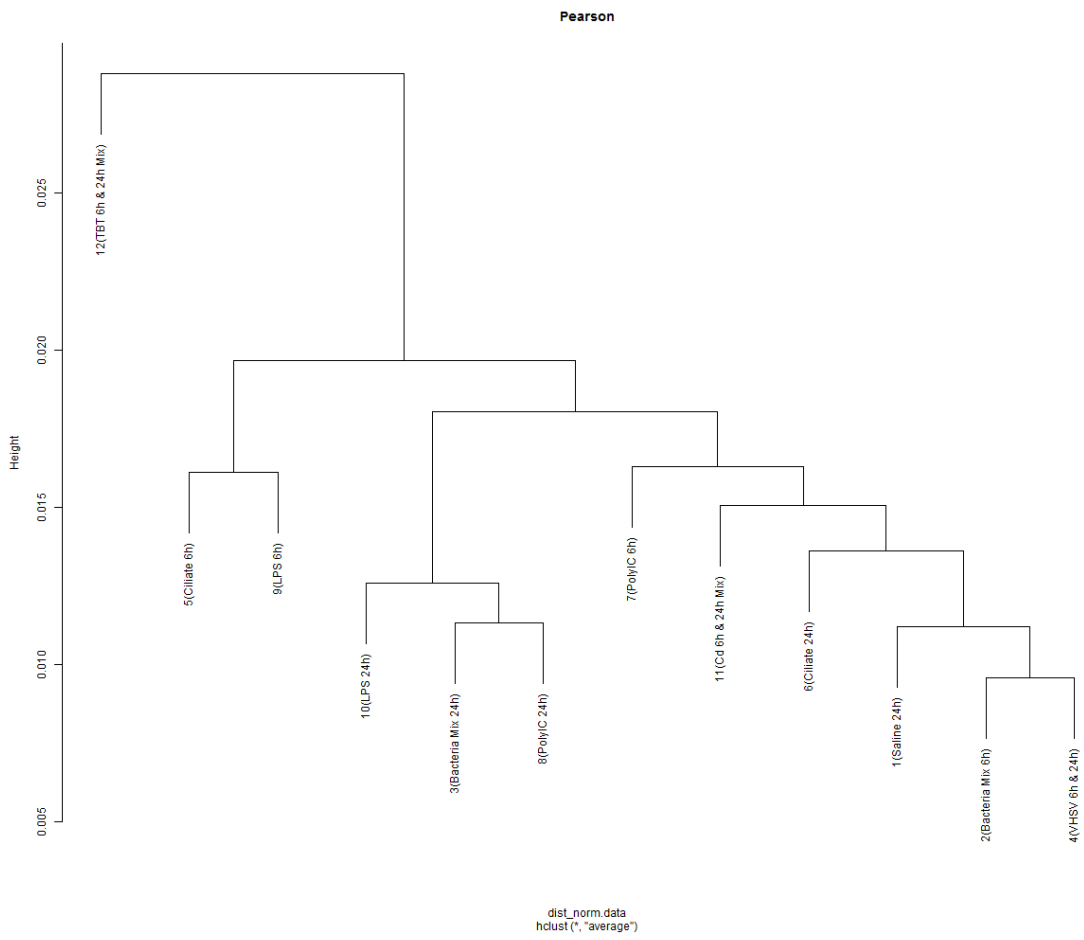


그림 10. Hierarchical clustering

☒ 13. Bacteria challenge 6h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	isotig29971	95.01353	leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein [Haliotis discus discus]
2	GR7FYRG01AESF2	55.44047	C.elegans protein M01B2.12, partially confirmed by transcript evidence [Caenorhabditis elegans]
3	isotig24770	27.00855	putative perlucin 3 [Haliotis discus discus]
4	GR7FYRG01BMCRF	25.89641	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
5	isotig15565	25.57857	defensin [Haliotis discus discus]
6	GR7FYRG01A3GR9	23.7908	PREDICTED: hypothetical protein [Ciona intestinalis]
7	GR7FYRG01D6JVN	23.60855	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
8	GR7FYRG01CSZMY	22.86378	predicted protein [Nematostella vectensis]
9	GSPZ16V01EDDWU	21.6249	temptin [Haliotis discus discus]
10	GR7FYRG01A6H3N	20.95254	predicted protein [Nematostella vectensis]
11	GR7FYRG01EDUUY	19.89271	GTPase, IMAP family member 7 [Oncorhynchus mykiss]
12	GR7FYRG01BDIOX	17.57938	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
13	isotig02961	17.45165	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]
14	GSPZ16V01B5CTU	17.01625	temptin [Haliotis discus discus]
15	GR7FYRG01BMEZY	16.86677	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
16	GR7FYRG01BGNQD	14.80688	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
17	GR7FYRG01CTFPQ	14.17188	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
18	GR7FYRG01BXGBQ	13.63477	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
19	GSPZ16V01EX15F	12.99072	temptin [Haliotis discus discus]
20	cDNA_16_B12_F_ab1	12.95393	-

☒ 14. Bacteria challenge 6h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BVT0X	-149.347	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
2	isotig26599	-40.1963	PREDICTED: similar to Ferric-chelate reductase 1 (Stromal cell-derived receptor 2) (SDR-2) [Ciona intestinalis]
3	GSPZ16V01EJT6G	-29.6252	PREDICTED: putative GTP-binding protein 6-like [Pongo abelii]
4	isotig31621	-22.5877	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
5	GR7FYRG01BSL8J	-21.3278	hypothetical protein BRAFLDRAFT_224574 [Branchiostoma floridae]
6	isotig10990	-20.7823	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
7	GSPZ16V02GGBTK	-19.3353	unnamed protein product [Homo sapiens]
8	isotig29530	-17.3557	hypothetical protein BRAFLDRAFT_194349 [Branchiostoma floridae]
9	isotig30668	-17.1344	hypothetical protein TRIADDRAFT_56978 [Trichoplax adhaerens]
10	GR7FYRG01ALB5R	-16.0652	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
11	GR7FYRG02FLM16	-15.5445	PREDICTED: ATPase type 13A3-like [Saccoglossus kowalevskii]
12	GR7FYRG01C3TM3	-14.6045	hypothetical protein TcasGA2_TC006098 [Tribolium castaneum]
13	GR7FYRG01EHRVC	-14.3184	AGAP010466-PA [Anopheles gambiae str. PEST]
14	cDNA_52_F12_M13_F_ab1	-13.4165	super cysteine rich protein; SCRIP [Homo sapiens]
15	K1008_AB_ab1	-13.2504	-
16	isotig07205	-13.1056	hypothetical protein BRAFLDRAFT_171338 [Branchiostoma floridae]
17	GR7FYRG02IGUK9	-13.1048	GA27861 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]
18	isotig05824	-9.97262	hypothetical protein NCER_102544 [Nosema ceranae BRL01]
19	GSPZ16V02HEPFG	-9.78071	glucagon-like peptide 2 receptor, isoform CRA_a [Mus musculus]
20	isotig10991	-9.73305	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]

⌘ 15. Bacteria challenge 24h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01C5V0P	75.06141	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
2	isotig29971	71.63221	leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein [Haliotis discus discus]
3	isotig15565	63.80297	defensin [Haliotis discus discus]
4	GR7FYRG01EDUUY	32.42978	GTPase, IMAP family member 7 [Oncorhynchus mykiss]
5	isotig24770	26.37951	putative perlucin 3 [Haliotis discus discus]
6	cDNA_16_B12_F_ab1	22.84498	-
7	GR7FYRG01EOSWM	15.93451	GTPase, IMAP family member 7 [Oncorhynchus mykiss]
8	isotig18159	15.58077	unknown protein 4 [Haliotis diversicolor]
9	GR7FYRG01B495V	14.9388	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
10	isotig11040	14.43537	hypothetical protein BRAFLDRAFT_85198 [Branchiostoma floridae]
11	GR7FYRG01CWLK9	13.14175	hypothetical protein BRAFLDRAFT_88358 [Branchiostoma floridae]
12	GR7FYRG01DTK9X	12.43837	ORF78 [Cyprinid herpesvirus 3]
13	GR7FYRG01B8ZHP	12.28498	unknown protein 25 [Haliotis diversicolor]
14	GR7FYRG01BFN3S	12.13826	sodium solute transporter Vito-a [Xenopus laevis]
15	GSPZ16V01DMF7M	11.9245	hypothetical protein TRIADDRAFT_52608 [Trichoplax adhaerens]
16	isotig23882	11.11849	hypothetical protein EAG_03281 [Camponotus floridanus]
17	05_B10_AB_ab1	10.83368	-
18	isotig33338	10.81669	PREDICTED: GTPase, IMAP family member 1-like [Danio rerio]
19	GSPZ16V02H9DCQ	10.69202	lim domain binding protein, putative [Schistosoma mansoni]
20	cDNA_15_D06_F_ab1	10.2857	PREDICTED: similar to solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 12 [Monodelphis domestica]

⌘ 16. Bacteria challenge 24h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GSPZ16V02GGBTK	-40.7428	unnamed protein product [Homo sapiens]
2	GSPZ16V01EHMVW	-39.132	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
3	CL211Contig2	-18.1582	-
4	isotig10380	-17.4258	GK24369 [Drosophila willistoni]
5	GSPZ16V01B6U1D	-15.2514	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
6	cDNA_01_F09_F_ab1	-11.4576	PREDICTED: similar to BTB (POZ) domain containing 2 [Canis familiaris]
7	isotig10381	-9.2394	baf-PA [synthetic construct]
8	isotig31667	-9.09659	PREDICTED: similar to ankyrin 2,3/unc44, partial [Strongylocentrotus purpuratus]
9	GR7FYRG02IGUK9	-8.29883	GA27861 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]
10	isotig30668	-7.95568	hypothetical protein TRIADDRAFT_56978 [Trichoplax adhaerens]
11	isotig15383	-7.88597	serine protease inhibitor 2 [Crassostrea virginica]
12	GR7FYRG02JCTGH	-7.72392	predicted protein [Nematostella vectensis]
13	GSPZ16V01D935F	-7.53786	hypothetical protein BRAFLDRAFT_79791 [Branchiostoma floridae]
14	isotig29530	-7.25298	hypothetical protein BRAFLDRAFT_194349 [Branchiostoma floridae]
15	CL353Contig1	-7.16542	-
16	GR7FYRG01BFWRY	-6.9941	wurst [Culex quinquefasciatus]
17	GR7FYRG02JF7WE	-6.65211	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 2-beta-N-acetylglucosaminyltransferase [Salmo salar]
18	GR7FYRG02JR4BE	-6.62041	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
19	CL1039Contig1	-6.57405	-
20	isotig24794	-6.48317	hypothetical protein BRAFLDRAFT_61918 [Branchiostoma floridae]

Table 17. VHSV challenge 6 h and 24h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	isotig15565	44.64084	defensin [Haliotis discus discus]
2	isotig24770	28.0699	putative perlucin 3 [Haliotis discus discus]
3	isotig16641	26.8769	peptidoglycan recognition protein short form [Biomphalaria glabrata]
4	isotig12295	26.64432	transposase [Salmo salar]
5	GR7FYRG01BZOQI	25.94604	glutamate transporter protein [Platynereis dumerilii]
6	GSPZ16V01EDDWU	24.52302	temptin [Haliotis discus discus]
7	isotig12296	22.82363	transposase [Salmo salar]
8	GSPZ16V01B5CTU	14.8936	temptin [Haliotis discus discus]
9	isotig11368	13.27659	predicted protein [Nematostella vectensis]
10	isotig11184	12.46914	unknown protein 11 [Haliotis diversicolor]
11	GR7FYRG02IO21V	10.99722	PREDICTED: predicted protein-like [Saccoglossus kowalevskii]
12	GR7FYRG01B495V	10.76428	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
13	isotig25378	10.57801	histone H4 [Lodderomyces elongisporus NRRL YB-4239]
14	GR7FYRG01EDUUU	10.06025	GTPase, IMAP family member 7 [Oncorhynchus mykiss]
15	GSPZ16V02G3PCZ	9.538541	rCG63049 [Rattus norvegicus]
16	GR7FYRG01EQQ66	9.373565	hypothetical protein BRAFLDRAFT_118907 [Branchiostoma floridae]
17	isotig23882	8.81736	hypothetical protein EAG_03281 [Camponotus floridanus]
18	GR7FYRG01BM56W	8.635348	hypothetical protein Asi_1435 [Candidatus Amoebophilus asiaticus 5a2]
19	isotig26739	8.610944	putative perlucin 3 [Haliotis discus discus]
20	GR7FYRG01DBGHP	8.563261	hypothetical protein AND_15472 [Anopheles darlingi]

Table 18. VHSV challenge 6 h and 24h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GSPZ16V01A7GHT	-162.255	OSJNBa0054D14.1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2	isotig31621	-94.8755	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
3	GR7FYRG01BVT0X	-80.9585	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
4	GSPZ16V01EHMVW	-41.8368	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
5	GR7FYRG01ALB5R	-34.9903	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
6	GSPZ16V01EJT6G	-31.3538	PREDICTED: putative GTP-binding protein 6-like [Pongo abelii]
7	GR7FYRG02FLM16	-26.1676	PREDICTED: ATPase type 13A3-like [Saccoglossus kowalevskii]
8	isotig30668	-24.972	hypothetical protein TRIADDRAFT_56978 [Trichoplax adhaerens]
9	GSPZ16V02GGBTK	-23.3724	unnamed protein product [Homo sapiens]
10	GR7FYRG02IGUK9	-22.3031	GA27861 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]
11	isotig26599	-18.7889	PREDICTED: similar to Ferric-chelate reductase 1 (stromal cell-derived receptor 2) (SDR-2) [Ciona intestinalis]
12	isotig29530	-17.549	hypothetical protein BRAFLDRAFT_194349 [Branchiostoma floridae]
13	GR7FYRG01A1IM4	-17.3459	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]
14	cDNA_52_F12_M13F_ab1	-15.5114	super cysteine rich protein; SCRIP [Homo sapiens]
15	GR7FYRG02JAD59	-15.3342	PREDICTED: similar to CG32000-PA, isoform A [Apis mellifera]
16	GR7FYRG02HQKFN	-14.7982	PREDICTED: similar to CG32000-PA, isoform A [Apis mellifera]
17	GR7FYRG02HRG7S	-13.0827	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]
18	GR7FYRG02FUS4F	-12.3125	hypothetical protein BRAFLDRAFT_226996 [Branchiostoma floridae]
19	GR7FYRG02HRZLX	-11.6087	interferon-induced 44-like protein [Haliotis discus discus]
20	GSPZ16V01B6U1D	-11.3682	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]

⌘ 19. Scutica ciliates challenge 6 h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	isotig29971	104.3042	leukocytecellderivedchemotaxin1-likeprotein[Haliotisdiscus discus]
2	isotig14491	86.04809	PREDICTED:similartosynaptonemalcomplexprotein1[Monodelphis domestica]
3	GR7FYRG01AESF2	75.82784	C.elegansproteinM01B2.12,partiallyconfirmedbytranscript evidence [Caenorhabditis elegans]
4	isotig15565	62.39815	defensin [Haliotis discus discus]
5	isotig15312	53.46076	unknown protein 37 [Haliotis diversicolor]
6	GSPZ16V01EDDWU	42.90489	temptin [Haliotis discus discus]
7	isotig23882	42.22984	hypothetical protein EAG_03281 [Camponotus floridanus]
8	GR7FYRG02G6SQ4	36.26842	PREDICTED:collagenalpha-1(XII)chain-like[Xenopus(Silurana) tropicalis]
9	GSPZ16V01B5CTU	31.95605	temptin [Haliotis discus discus]
10	GR7FYRG01CWLK9	31.45293	hypothetical protein BRAFLDRAFT_88358 [Branchiostoma floridae]
11	GR7FYRG01BMCRF	29.7026	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
12	cDNA_46_H05_M13F_ab1	29.15381	cAMP responsive element binding protein [Lymnaea stagnalis]
13	GR7FYRG01A6H3N	28.4405	predicted protein [Nematostella vectensis]
14	GSPZ16V02H9DCQ	26.80094	lim domain binding protein, putative [Schistosoma mansoni]
15	GR7FYRG01D6JVN	26.15923	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
16	cDNA_08_D09_F_ab1	25.90997	conserved hypothetical protein [Trichomonas vaginalis G3]
17	isotig09200	25.81074	CTL-6 [Argopecten irradians]
18	GR7FYRG01A3GR9	25.66657	PREDICTED: hypothetical protein [Ciona intestinalis]
19	GR7FYRG01CSZMY	24.87937	predicted protein [Nematostella vectensis]
20	isotig11040	24.47281	hypothetical protein BRAFLDRAFT_85198 [Branchiostoma floridae]

⌘ 20. Scutica ciliates challenge 6 h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BVT0X	-163.225	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
2	4_G05_AB_ab1	-65.8236	plasma membrane H+-ATPase [Plantago major]
3	isotig31621	-55.1285	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
4	GSPZ16V01A7GHT	-39.7572	OSJNBa0054D14.1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
5	GR7FYRG01D2HVF	-38.2387	pol-like protein [Biomphalaria glabrata]
6	GSPZ16V02GGBTK	-37.9713	unnamed protein product [Homo sapiens]
7	isotig32144	-34.3504	PREDICTED:low-densitylipoproteinreceptor-relatedprotein12-like [Xenopus (Silurana) tropicalis]
8	CL1157Contig1	-34.0408	PREDICTED: similar to xylulokinase homolog [Strongylocentrotus purpuratus]
9	GSPZ16V01EJT6G	-28.3495	PREDICTED: putative GTP-binding protein 6-like [Pongo abelii]
10	GR7FYRG01ALB5R	-28.1007	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
11	GSPZ16V01EHMVW	-25.6072	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
12	GR7FYRG02HU5OX	-24.0493	hypothetical protein BRAFLDRAFT_119296 [Branchiostoma floridae]
13	GR7FYRG02FLM16	-23.7582	PREDICTED: ATPase type 13A3-like [Saccoglossus kowalevskii]
14	CL211Contig2	-19.4473	-
15	isotig08950	-19.4122	AChainA,4ank:ADesignedAnkyrinRepeatProteinWithFourIdentical Consensus Repeats
16	GR7FYRG01AZXQ3	-19.288	PREDICTED: Gap-Pol polyprotein-like [Saccoglossus kowalevskii]
17	isotig10990	-17.7045	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
18	isotig08951	-16.3058	AChainA,4ank:ADesignedAnkyrinRepeatProteinWithFourIdentical Consensus Repeats
19	cDNA_39_B02_M13F_ab1	-16.1363	-
20	GR7FYRG01A1IM4	-14.4307	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]

ㄎ 21. Scutica ciliates challenge 24 h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	isotig29971	104.3042	leukocytecellderivedchemotaxin1-likeprotein[Haliotisdiscus discus]
2	isotig14491	86.04809	PREDICTED:similartosynaptonemalcomplexprotein1[Monodelphis domestica]
3	GR7FYRG01AESF2	75.82784	C.elegansproteinM01B2.12,partiallyconfirmedbytranscript evidence [Caenorhabditis elegans]
4	isotig15565	62.39815	defensin [Haliotis discus discus]
5	isotig15312	53.46076	unknown protein 37 [Haliotis diversicolor]
6	GSPZ16V01EDDWU	42.90489	temptin [Haliotis discus discus]
7	isotig23882	42.22984	hypothetical protein EAG_03281 [Camponotus floridanus]
8	GR7FYRG02G6SQ4	36.26842	PREDICTED:collagenalpha-1(XII)chain-like[Xenopus(Silurana) tropicalis]
9	GSPZ16V01B5CTU	31.95605	temptin [Haliotis discus discus]
10	GR7FYRG01CWLK9	31.45293	hypothetical protein BRAFLDRAFT_88358 [Branchiostoma floridae]
11	GR7FYRG01BMCRF	29.7026	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
12	cDNA_46_H05_M13F_ab1	29.15381	cAMP responsive element binding protein [Lymnaea stagnalis]
13	GR7FYRG01A6H3N	28.4405	predicted protein [Nematostella vectensis]
14	GSPZ16V02H9DCQ	26.80094	lim domain binding protein, putative [Schistosoma mansoni]
15	GR7FYRG01D6JVN	26.15923	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
16	cDNA_08_D09_F_ab1	25.90997	conserved hypothetical protein [Trichomonas vaginalis G3]
17	isotig09200	25.81074	CTL-6 [Argopecten irradians]
18	GR7FYRG01A3GR9	25.66657	PREDICTED: hypothetical protein [Ciona intestinalis]
19	GR7FYRG01CSZMY	24.87937	predicted protein [Nematostella vectensis]
20	isotig11040	24.47281	hypothetical protein BRAFLDRAFT_85198 [Branchiostoma floridae]

ㄎ 22. Scutica ciliates challenge 24 h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BVT0X	-163.225	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
2	4_G05_AB_ab1	-65.8236	plasma membrane H+-ATPase [Plantago major]
3	isotig31621	-55.1285	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
4	GSPZ16V01A7GHT	-39.7572	OSJNBa0054D14.1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
5	GR7FYRG01D2HVF	-38.2387	pol-like protein [Biomphalaria glabrata]
6	GSPZ16V02GGBTK	-37.9713	unnamed protein product [Homo sapiens]
7	isotig32144	-34.3504	PREDICTED:low-densitylipoproteinreceptor-relatedprotein12-like [Xenopus (Silurana) tropicalis]
8	CL1157Contig1	-34.0408	PREDICTED: similar to xylulokinase homolog [Strongylocentrotus purpuratus]
9	GSPZ16V01EJT6G	-28.3495	PREDICTED: putative GTP-binding protein 6-like [Pongo abelii]
10	GR7FYRG01ALB5R	-28.1007	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
11	GSPZ16V01EHMVW	-25.6072	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
12	GR7FYRG02HU5OX	-24.0493	hypothetical protein BRAFLDRAFT_119296 [Branchiostoma floridae]
13	GR7FYRG02FLM16	-23.7582	PREDICTED: ATPase type 13A3-like [Saccoglossus kowalevskii]
14	CL211Contig2	-19.4473	-
15	isotig08950	-19.4122	AChainA,4ank:ADesignedAnkyrinRepeatProteinWithFourIdentical Consensus Repeats
16	GR7FYRG01AZXQ3	-19.288	PREDICTED: Gap-Pol polyprotein-like [Saccoglossus kowalevskii]
17	isotig10990	-17.7045	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
18	isotig08951	-16.3058	AChainA,4ank:ADesignedAnkyrinRepeatProteinWithFourIdentical Consensus Repeats
19	cDNA_39_B02_M13F_ab1	-16.1363	-
20	GR7FYRG01A1IM4	-14.4307	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]

表 23. Poly I:C challenge 6 h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GSPZ16V01EDDWU	28.17732	temptin [Haliotis discus discus]
2	isotig26443	26.03795	hypothetical protein BRAFLDRAFT_118619 [Branchiostoma floridae]
3	GSPZ16V01B5CTU	22.54026	temptin [Haliotis discus discus]
4	GR7FYRG01B495V	19.55441	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
5	isotig09184	17.66822	leukocytecellderivedchemotaxin1-likeprotein[Haliotisdiscus discus]
6	CL100Contig1	17.06599	hypothetical protein Dace_2250 [Desulfuromonas acetoxidans DSM 684]
7	GR7FYRG01DXSL1	16.99959	pairedsuperclasshomeoboxtranscriptionfactorPitx[Lymnaea stagnalis]
8	isotig24770	15.90076	putative perlucin 3 [Haliotis discus discus]
9	GSPZ16V01EX15F	14.6268	temptin [Haliotis discus discus]
10	GR7FYRG01BJ4CU	13.84065	temptin [Haliotis discus discus]
11	GR7FYRG01BZOQI	10.98486	glutamate transporter protein [Platynereis dumerilii]
12	GR7FYRG01DRX83	10.72846	PREDICTED:GTPaseIMAPfamilymember4-likeisoform1[Pongo abelii]
13	GSPZ16V02G3PCZ	10.52556	rCG63049 [Rattus norvegicus]
14	GR7FYRG01ERZ1J	10.40612	hypothetical protein BRAFLDRAFT_163910 [Branchiostoma floridae]
15	isotig05721	10.36975	sugar transporter [Loa loa]
16	GR7FYRG02JNQNF	9.525543	cytochrome P450 3A2 [Haliotis diversicolor supertexta]
17	GSPZ16V01DYBZ9	9.317037	AF225916_1 aragonite protein AP7 precursor [Haliotis rufescens]
18	GR7FYRG02G5C2T	8.44376	PREDICTED: putative tyrosine recombinase-like [Saccoglossus kowalevskii]
19	GSPZ16V02JM5Y7	8.323933	rCG63049 [Rattus norvegicus]
20	GSPZ16V01EVH85	8.223951	hypothetical protein TRIADDRAFT_26861 [Trichoplax adhaerens]

表 24. Poly I:C challenge 6 h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BVT0X	-162.002	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
2	GSPZ16V01A7GHT	-143.986	OSJNBa0054D14.1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
3	isotig27279	-82.7297	hypothetical protein TRIADDRAFT_26340 [Trichoplax adhaerens]
4	isotig31621	-81.9179	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
5	isotig29434	-60.8426	hypothetical protein BRAFLDRAFT_117011 [Branchiostoma floridae]
6	GR7FYRG01ALB5R	-45.0966	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
7	cDNA_35_D01_M13F_ab1	-40.2657	-
8	GSPZ16V02GGBTK	-37.9573	unnamed protein product [Homo sapiens]
9	GR7FYRG02FLM16	-29.2851	PREDICTED: ATPase type 13A3-like [Saccoglossus kowalevskii]
10	GSPZ16V01EHMVW	-28.8941	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
11	GSPZ16V01EJT6G	-27.7835	PREDICTED: putative GTP-binding protein 6-like [Pongo abelii]
12	GR7FYRG01BSL8J	-26.4164	hypothetical protein BRAFLDRAFT_224574 [Branchiostoma floridae]
13	isotig10990	-20.3197	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
14	GR7FYRG01A1IM4	-20.1302	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]
15	cDNA_33_E05_M13F_ab1	-19.1263	-
16	cDNA_50_B02_M13F_ab1	-17.7066	predicted protein [Nematostella vectensis]
17	cDNA_23_E12_M13F_ab1	-16.7052	predicted protein [Nematostella vectensis]
18	isotig30668	-14.7022	hypothetical protein TRIADDRAFT_56978 [Trichoplax adhaerens]
19	isotig29013	-14.6286	tumor necrosis factor alpha [Haliotis discus discus]
20	GSPZ16V01CMLXO	-12.912	PREDICTED:tiggertransposableelementderived6-like[Saccoglossus kowalevskii]

表 25. Poly I:C challenge 24h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	isotig29971	169.3511	leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein [Haliotis discus discus]
2	GR7FYRG01AESF2	38.54784	C.elegans protein M01B2.12, partially confirmed by transcript evidence [Caenorhabditis elegans]
3	isotig12295	34.74176	transposase [Salmo salar]
4	isotig12296	28.96373	transposase [Salmo salar]
5	cDNA_16_B12_F_ab1	18.6042	-
6	05_B10_AB_ab1	16.05744	-
7	isotig24697	14.55452	PREDICTED: hypothetical protein [Saccoglossus kowalevskii]
8	CL1097Contig1	13.14569	-
9	GSPZ16V01BZ90T	11.86183	predicted protein [Nematostella vectensis]
10	isotig25378	11.02194	histone H4 [Lodderomyces elongisporus NRRL YB-4239]
11	GSPZ16V01AUEWG	10.96869	predicted protein [Nematostella vectensis]
12	isotig01030	10.83886	hypothetical protein BRAFLDRAFT_122507 [Branchiostoma floridae]
13	GR7FYRG01B8ZHP	10.21253	unknown protein 25 [Haliotis diversicolor]
14	GSPZ16V02G3PCZ	10.04618	rCG63049 [Rattus norvegicus]
15	GSPZ16V01DMHWE	10.04526	PREDICTED: similar to tenascin, partial [Ciona intestinalis]
16	GSPZ16V01DX4DF	9.956088	predicted protein [Nematostella vectensis]
17	isotig22442	9.828847	hypothetical protein TRIADDRAFT_57593 [Trichoplax adhaerens]
18	GR7FYRG02IONH4	9.311815	PREDICTED: similar to NAAG-peptidase; NAALADase; prostate specific membrane antigen; PSM; PSMA [Ciona intestinalis]
19	cDNA_18_C01_F_ab1	9.021536	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]
20	isotig15565	9.019135	defensin [Haliotis discus discus]

表 26. Poly I:C challenge 24h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BVT0X	-223.006	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
2	isotig03110	-168.964	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
3	GSPZ16V01A7GHT	-164.443	OSJNBa0054D14.1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
4	isotig03108	-118.742	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
5	isotig03112	-92.9339	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
6	isotig31621	-89.8608	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
7	GSPZ16V01EHMVW	-40.7797	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
8	GR7FYRG01AIWKV	-37.7195	hypothetical protein BRAFLDRAFT_97527 [Branchiostoma floridae]
9	GSPZ16V02GGBTK	-36.2628	unnamed protein product [Homo sapiens]
10	GR7FYRG02FLM16	-34.5898	PREDICTED: ATPase type 13A3-like [Saccoglossus kowalevskii]
11	GR7FYRG02IGUK9	-28.3149	GA27861 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]
12	GR7FYRG01ALB5R	-27.6608	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
13	GR7FYRG01A1IM4	-26.4006	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]
14	GR7FYRG02HMZV3	-25.4502	PREDICTED: zinc finger protein-like [Danio rerio]
15	isotig11751	-24.9249	PREDICTED: similar to predicted protein [Hydra magnipapillata]
16	isotig10990	-23.0778	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
17	isotig21909	-22.9387	PREDICTED: reverse transcriptase SR3-right-like [Saccoglossus kowalevskii]
18	isotig02397	-22.4904	PREDICTED: talin 1 [Taeniopygia guttata]
19	isotig29530	-20.4361	hypothetical protein BRAFLDRAFT_194349 [Branchiostoma floridae]
20	GSPZ16V01CMLXO	-20.1949	PREDICTED: tigger transposable element derived 6-like [Saccoglossus kowalevskii]

表 27. LPS challenge 6 h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	cDNA_16_G12_F_ab1	61.76941	–
2	isotig23882	52.90735	hypothetical protein EAG_03281 [Camponotus floridanus]
3	isotig15312	36.46922	unknown protein 37 [Haliotis diversicolor]
4	GR7FYRG01EDUUY	34.33623	GTPase, IMAP family member 7 [Oncorhynchus mykiss]
5	cDNA_46_H05_M13F_ab1	33.74618	cAMP responsive element binding protein [Lymnaea stagnalis]
6	isotig11967	30.59468	predicted protein [Thalassiosira pseudonana CCMP1335]
7	isotig12295	28.96454	transposase [Salmo salar]
8	GR7FYRG02G6SQ4	28.79769	PREDICTED:collagenalpha-1(XII)chain-like[Xenopus(Silurana)tropicalis]
9	GR7FYRG01AESF2	25.33723	C.elegansproteinM01B2.12,partiallyconfirmedbytranscript evidence [Caenorhabditis elegans]
10	isotig09200	25.10458	CTL-6 [Argopecten irradians]
11	GR7FYRG01CWLK9	24.90826	hypothetical protein BRAFLDRAFT_88358 [Branchiostoma floridae]
12	isotig10202	23.91852	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g022330 [Sorghum bicolor]
13	isotig12296	23.89512	transposase [Salmo salar]
14	CL344Contig1	23.16759	carboxypeptidase B [Ochlerotatus epactius]
15	GSPZ16V02H9DCQ	21.62835	lim domain binding protein, putative [Schistosoma mansoni]
16	cDNA_08_D09_F_ab1	21.59529	conserved hypothetical protein [Trichomonas vaginalis G3]
17	isotig11040	20.67069	hypothetical protein BRAFLDRAFT_85198 [Branchiostoma floridae]
18	isotig15565	18.9901	defensin [Haliotis discus discus]
19	GR7FYRG01EOSWM	18.68238	GTPase, IMAP family member 7 [Oncorhynchus mykiss]
20	GSPZ16V02FNKI0	17.91906	lim domain binding protein, putative [Schistosoma mansoni]

表 28. LPS challenge 6 h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	CL1039Contig1	-661.454	–
2	isotig08246	-209.899	leukocytecellderivedchemotaxin1-likeprotein[Haliotisdiscus discus]
3	isotig08244	-169.41	leukocytecellderivedchemotaxin1-likeprotein[Haliotisdiscus discus]
4	GSPZ16V01A7GHT	-132.51	OSJNBa0054D14.1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
5	isotig08245	-91.6213	leukocytecellderivedchemotaxin1-likeprotein[Haliotisdiscus discus]
6	isotig06235	-78.4713	hypothetical protein EDI_037280 [Entamoeba dispar SAW760]
7	isotig03108	-70.5493	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
8	isotig03110	-66.3269	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
9	isotig03112	-60.3543	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
10	cDNA_50_A05_M13F_ab1	-53.933	unnamed protein product [Homo sapiens]
11	GSPZ16V01EKE3W	-52.4775	GABA-a receptor 3-like protein [Mytilus galloprovincialis]
12	4_G05_AB_ab1	-50.9316	plasma membrane H+-ATPase [Plantago major]
13	GSPZ16V01A3NAV	-39.6467	PREDICTED:sodium-andchloride-dependentglycinetransporter 1-like [Saccoglossus kowalevskii]
14	isotig05824	-38.963	hypothetical protein NCER_102544 [Nosema ceranae BRL01]
15	GSPZ16V01BS9G7	-38.8349	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1 [Bos taurus]
16	isotig22488	-36.7024	hypothetical protein BRAFLDRAFT_63397 [Branchiostoma floridae]
17	isotig26599	-33.5514	PREDICTED:similar to Ferric-chelatereductase1 (Stromalcell-derived receptor 2) (SDR-2) [Ciona intestinalis]
18	GSPZ16V02GGBTK	-32.0749	unnamed protein product [Homo sapiens]
19	GSPZ16V01EHMVW	-28.2313	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
20	GSPZ16V01EG5QP	-25.9456	GABA-a receptor 3-like protein [Mytilus galloprovincialis]

Table 29. LPS challenge 24h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01C5V0P	71.38207	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
2	GR7FYRG01BMCRF	21.54529	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
3	GR7FYRG01CSZMY	20.75421	predicted protein [Nematostella vectensis]
4	GR7FYRG01A3GR9	20.39876	PREDICTED: hypothetical protein [Ciona intestinalis]
5	CL344Contig1	20.04745	carboxypeptidase B [Ochlerotatus epactius]
6	GR7FYRG01D6JVN	19.97851	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
7	GR7FYRG01A6H3N	19.62454	predicted protein [Nematostella vectensis]
8	GR7FYRG01BDIOX	17.75742	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
9	GR7FYRG01AESF2	16.9101	C.elegansproteinM01B2.12,partiallyconfirmedbytranscript evidence [Caenorhabditis elegans]
10	isotig05721	15.59624	sugar transporter [Loa loa]
11	GR7FYRG01BGNQD	14.67542	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
12	GSPZ16V02G3PCZ	14.32425	rCG63049 [Rattus norvegicus]
13	GR7FYRG01BMEZY	14.29856	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
14	isotig18159	14.16851	unknown protein 4 [Haliotis diversicolor]
15	isotig12295	13.43876	transposase [Salmo salar]
16	GR7FYRG01B8ZHP	13.38791	unknown protein 25 [Haliotis diversicolor]
17	isotig11040	13.30097	hypothetical protein BRAFLDRAFT_85198 [Branchiostoma floridae]
18	GR7FYRG01BFN3S	13.04142	sodium solute transporter Vito-a [Xenopus laevis]
19	GR7FYRG01C0UAN	13.03676	unnamed protein product [Haliotis rufescens]
20	GR7FYRG01CTFPQ	13.02222	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]

Table 30. LPS challenge 24h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BVT0X	-230.611	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
2	GSPZ16V01A7GHT	-136.438	OSJNBa0054D14.1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
3	isotig06235	-114.747	hypothetical protein EDI_037280 [Entamoeba dispar SAW760]
4	CL1039Contig1	-99.8969	-
5	GSPZ16V02GGGTK	-41.5025	unnamed protein product [Homo sapiens]
6	GSPZ16V01EHMVW	-40.1889	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
7	isotig14348	-34.2131	FibronectintypeIIIIdomainprotein[Nitrosopumilusmaritimus SCM1]
8	isotig19947	-32.3258	PREDICTED:similartoimmunoglobulinscavengerreceptorIgSR, partial [Hydra magnipapillata]
9	isotig30668	-27.28	hypothetical protein TRIADDRAFT_56978 [Trichoplax adhaerens]
10	GSPZ16V01A0GQP	-25.2725	PREDICTED:sodium-andchloride-dependentglycinetransporter 1-like [Saccoglossus kowalevskii]
11	GSPZ16V01A838C	-21.8921	GL11339 [Drosophila persimilis]
12	GSPZ16V01A3NAV	-20.4975	PREDICTED:sodium-andchloride-dependentglycinetransporter 1-like [Saccoglossus kowalevskii]
13	isotig26845	-20.3866	hypothetical protein BRAFLDRAFT_69134 [Branchiostoma floridae]
14	GSPZ16V01BS9G7	-20.2493	sodium- and chloride-dependent glycine transporter 1 [Bos taurus]
15	GSPZ16V01EKE3W	-20.1721	GABA-a receptor 3-like protein [Mytilus galloprovincialis]
16	GR7FYRG02FUS4F	-18.8149	hypothetical protein BRAFLDRAFT_226996 [Branchiostoma floridae]
17	GSPZ16V01EG5QP	-18.8085	GABA-a receptor 3-like protein [Mytilus galloprovincialis]
18	GSPZ16V01BUUHL	-17.0792	PREDICTED:sodium-andchloride-dependentglycinetransporter 1-like [Saccoglossus kowalevskii]
19	isotig10990	-16.0031	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
20	GR7FYRG02HJVYT	-15.9086	PREDICTED:RETRrotransposon-likefamilymember(retr-1)-like, partial [Saccoglossus kowalevskii]

☒ 31. Cadmium challenge 6 h and 24h mix (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GSPZ16V02IXH0D	178.6309	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
2	GR7FYRG01BBO3Y	107.1533	heat shock protein 70kDa [Kibramoa guapa]
3	isotig27930	56.78874	heat shock cognate protein 70 [Mamestra brassicae]
4	isotig24770	51.99299	putative perlucin 3 [Haliotis discus discus]
5	GR7FYRG01AXS7D	50.43132	hypothetical protein BRAFLDRAFT_277443 [Branchiostoma floridae]
6	isotig03467	46.52337	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
7	GSPZ16V02G4IHY	44.78026	hypothetical protein, conserved [Plasmodium vivax]
8	GSPZ16V01EDDWU	42.44094	temptin [Haliotis discus discus]
9	isotig29971	40.70373	leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein [Haliotis discus discus]
10	GR7FYRG01C3MO9	36.39056	hypothetical protein BRAFLDRAFT_277443 [Branchiostoma floridae]
11	isotig03475	35.10527	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
12	isotig03479	34.03036	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
13	isotig03481	33.97584	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
14	isotig03480	33.62426	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
15	GSPZ16V02HNL96	32.45018	Keratin associated protein 6-2 [synthetic construct]
16	GSPZ16V01B5CTU	31.12751	temptin [Haliotis discus discus]
17	isotig03470	30.99522	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
18	isotig03474	29.25898	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
19	GR7FYRG01B495V	28.1519	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
20	GSPZ16V02G2ZHD	27.8027	predicted protein [Sclerotinia sclerotiorum 1980]

☒ 32. Cadmium challenge 6 h and 24h mix (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	isotig31621	-129.986	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
2	GR7FYRG01BVT0X	-121.519	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
3	isotig29530	-59.8319	hypothetical protein BRAFLDRAFT_194349 [Branchiostoma floridae]
4	GSPZ16V02GGBTK	-32.846	unnamed protein product [Homo sapiens]
5	GR7FYRG01ALB5R	-23.4729	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
6	GR7FYRG02FLM16	-22.1735	PREDICTED: ATPase type 13A3-like [Saccoglossus kowalevskii]
7	isotig10990	-20.7869	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
8	isotig30668	-20.7451	hypothetical protein TRIADDRAFT_56978 [Trichoplax adhaerens]
9	GR7FYRG01A1IM4	-20.7014	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]
10	GR7FYRG02IGUK9	-18.9533	GA27861 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]
11	GR7FYRG02HQKFN	-13.6602	PREDICTED: similar to CG32000-PA, isoform A [Apis mellifera]
12	GSPZ16V02HEPFG	-13.1688	glucagon-like peptide 2 receptor, isoform CRA_a [Mus musculus]
13	GR7FYRG02JAD59	-12.8556	PREDICTED: similar to CG32000-PA, isoform A [Apis mellifera]
14	GR7FYRG02HRG7S	-12.7486	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]
15	GR7FYRG01AIWKV	-12.0985	hypothetical protein BRAFLDRAFT_97527 [Branchiostoma floridae]
16	GR7FYRG02FUS4F	-11.2585	hypothetical protein BRAFLDRAFT_226996 [Branchiostoma floridae]
17	GR7FYRG02IOSOS	-11.093	PREDICTED: protein tyrosine phosphatase, receptor type, F-like, partial [Saccoglossus kowalevskii]
18	isotig10991	-10.6815	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
19	GSPZ16V02HJ413	-10.5834	PREDICTED: hypothetical protein LOC100492020 [Xenopus (Silurana) tropicalis]
20	GR7FYRG02H2NPA	-10.562	hypothetical protein BRAFLDRAFT_100697 [Branchiostoma floridae]

☒ 33. TBT challenge 6 h and 24h mix (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GSPZ16V02IXH0D	364.7463	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
2	isotig24366	315.7809	hypothetical protein [Haliotis diversicolor]
3	GR7FYRG01BBO3Y	194.3877	heat shock protein 70kDa [Kibramoa guapa]
4	isotig23882	179.5464	hypothetical protein EAG_03281 [Camponotus floridanus]
5	CL1120Contig1	120.2024	PREDICTED: similar to CG32512-PA [Tribolium castaneum]
6	isotig27930	115.2507	heat shock cognate protein 70 [Mamestra brassicae]
7	GR7FYRG01AXS7D	81.74244	hypothetical protein BRAFLDRAFT_277443 [Branchiostoma floridae]
8	isotig24770	79.82914	putative perlucin 3 [Haliotis discus discus]
9	isotig03467	63.97064	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
10	isotig03475	50.36042	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
11	isotig03481	49.56428	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
12	isotig03480	48.74087	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
13	isotig03479	48.14308	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
14	GR7FYRG01C3MO9	47.11802	hypothetical protein BRAFLDRAFT_277443 [Branchiostoma floridae]
15	isotig03470	45.02107	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]
16	contig16166	44.08767	hypothetical protein AND4_12277 [Vibrio sp. AND4]
17	isotig15565	41.93964	defensin [Haliotis discus discus]
18	isotig10665	40.87083	LOC496285 protein [Xenopus laevis]
19	isotig15312	37.96913	unknown protein 37 [Haliotis diversicolor]
20	isotig03474	37.82112	small heat shock protein 26 [Haliotis discus hannai]

☒ 34. TBT challenge 6 h and 24h mix (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BVT0X	-213.352	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
2	isotig31621	-68.1453	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
3	isotig28098	-44.2608	hypothetical protein BRAFLDRAFT_82399 [Branchiostoma floridae]
4	GSPZ16V02GGBTK	-33.0715	unnamed protein product [Homo sapiens]
5	GR7FYRG01ALB5R	-32.8805	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
6	GSPZ16V01EJT6G	-27.7654	PREDICTED: putative GTP-binding protein 6-like [Pongo abelii]
7	GSPZ16V01DYIUK	-16.8328	PREDICTED: similar to MEGF10 protein (KIAA1780) [Gallus gallus]
8	GR7FYRG02FLM16	-16.3855	PREDICTED: ATPase type 13A3-like [Saccoglossus kowalevskii]
9	isotig27279	-14.9209	hypothetical protein TRIADDRAFT_26340 [Trichoplax adhaerens]
10	isotig29013	-13.9977	tumor necrosis factor alpha [Haliotis discus discus]
11	GR7FYRG01A1IM4	-13.8479	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]
12	cDNA_23_E12_M13F_ab1	-13.2496	predicted protein [Nematostella vectensis]
13	GR7FYRG02IGUK9	-12.3626	GA27861 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]
14	isotig10380	-12.0111	GK24369 [Drosophila willistoni]
15	GR7FYRG02JAD59	-11.4776	PREDICTED: similar to CG32000-PA, isoform A [Apis mellifera]
16	GR7FYRG01EHRVC	-11.1459	AGAP010466-PA [Anopheles gambiae str. PEST]
17	GR7FYRG02HQBKN	-10.2586	PREDICTED: similar to CG32000-PA, isoform A [Apis mellifera]
18	cDNA_50_B02_M13F_ab1	-10.2121	predicted protein [Nematostella vectensis]
19	GR7FYRG01C3TM3	-10.1412	hypothetical protein TcasGA2_TC006098 [Tribolium castaneum]
20	CL672Contig1	-9.96003	-

Table 35. Bacteria mix 24h/bacteria mix 6h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01C5V0P	63.97449	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
2	GR7FYRG01BVT0X	44.17293	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
3	isotig26599	18.41145	PREDICTED: similar to Ferric-chelate reductase 1 (Stromal cell-derived receptor 2) (SDR-2) [Ciona intestinalis]
4	GR7FYRG01DTK9X	12.55168	ORF78 [Cyprinid herpesvirus 3]
5	GSPZ16V01EJT6G	11.93894	PREDICTED: putative GTP-binding protein 6-like [Pongo abelii]
6	isotig18159	11.76202	unknown protein 4 [Haliotis diversicolor]
7	GR7FYRG01C3TM3	11.0777	hypothetical protein TcasGA2_TC006098 [Tribolium castaneum]
8	GR7FYRG01BSL8J	10.99293	hypothetical protein BRAFLDRAFT_224574 [Branchiostoma floridae]
9	isotig31526	10.46844	interferon-induced 44-like protein [Haliotis discus discus]
10	isotig07205	10.4216	hypothetical protein BRAFLDRAFT_171338 [Branchiostoma floridae]
11	GR7FYRG01EHRVC	10.38617	AGAP010466-PA [Anopheles gambiae str. PEST]
12	cDNA_48_C10_M13F_ab1	9.972201	ATSMC3 (Arabidopsis thaliana structural maintenance of chromosome 3); ATP binding
13	GR7FYRG01BFN3S	9.503641	sodium solute transporter Vito-a [Xenopus laevis]
14	cDNA_52_F12_M13F_ab1	9.166843	super cysteine rich protein; SCRP [Homo sapiens]
15	cDNA_22_E01_M13F_ab1	9.028503	PREDICTED: hypothetical protein [Danio rerio]
16	isotig17665	8.928505	GM23267 [Drosophila sechellia]
17	05_B10_AB_ab1	8.616037	-
18	CL1097Contig1	8.209474	-
19	GR7FYRG01D87C1	7.61147	hypothetical protein VOLCADRAFT_91473 [Volvox carteri f. nagariensis]
20	isotig26443	7.520293	hypothetical protein BRAFLDRAFT_118619 [Branchiostoma floridae]

Table 36. Bacteria mix 24h/bacteria mix 6h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BMCRF	-46.0848	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
2	GR7FYRG01A3GR9	-42.0198	PREDICTED: hypothetical protein [Ciona intestinalis]
3	GR7FYRG01CSZMY	-37.0545	predicted protein [Nematostella vectensis]
4	GR7FYRG01BMEZY	-34.9664	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
5	GR7FYRG01BXGBQ	-30.6785	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
6	GR7FYRG01A6H3N	-29.3481	predicted protein [Nematostella vectensis]
7	GR7FYRG01CTFPQ	-25.244	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
8	GSPZ16V01EHMVW	-22.4187	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
9	GR7FYRG01BDIOX	-22.1184	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
10	GR7FYRG01D6JVN	-21.9049	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
11	GR7FYRG01BGNQD	-21.1528	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
12	cDNA_57_G06_M13F_ab1	-18.1781	predicted protein [Nematostella vectensis]
13	GR7FYRG01BFWRY	-17.8408	wurst [Culex quinquefasciatus]
14	GR7FYRG01AESF2	-16.1186	C.elegans protein M01B2.12, partially confirmed by transcript evidence [Caenorhabditis elegans]
15	cDNA_65_D11_M13F_ab1	-13.9056	PREDICTED: hypothetical protein [Rattus norvegicus]
16	GR7FYRG01C8UD1	-12.6669	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
17	isotig02961	-12.1751	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]
18	GSPZ16V01EDDWU	-11.7761	temptin [Haliotis discus discus]
19	GSPZ16V01EX15F	-10.9937	temptin [Haliotis discus discus]
20	CL353Contig1	-9.85724	-

⌘ 37. Ciliates 24h/ciliates 6h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BVT0X	138.2582	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
2	GR7FYRG01D2HVF	61.56043	pol-like protein [Biomphalaria glabrata]
3	CL1157Contig1	50.58478	PREDICTED: similar to xylulokinase homolog [Strongylocentrotus purpuratus]
4	4_G05_AB_ab1	48.03953	plasma membrane H ⁺ -ATPase [Plantago major]
5	isotig10380	44.69147	GK24369 [Drosophila willistoni]
6	cDNA_62_A12_M13F	38.46284	Down syndrome cell adhesion molecule CG17800-PAI [Drosophila melanogaster]
7	isotig10381	31.8446	baf-PA [synthetic construct]
8	GR7FYRG01AZXQ3	29.99882	PREDICTED: Gap-Pol polyprotein-like [Saccoglossus kowalevskii]
9	isotig32144	28.63306	PREDICTED: low-density lipoprotein receptor-related protein 12-like [Xenopus (Silurana) tropicalis]
10	GR7FYRG01BFWRY	28.08318	wurst [Culex quinquefasciatus]
11	cDNA_65_D11_M13F	23.64042	PREDICTED: hypothetical protein [Rattus norvegicus]
12	GR7FYRG01BUGEE	19.73893	hypothetical protein BRAFLDRAFT_64071 [Branchiostoma floridae]
13	cDNA_39_B02_M13F	18.93776	-
14	isotig10990	17.89148	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
15	GSPZ16V01EHMVW	16.16859	PREDICTED: similar to notch [Hydra magnipapillata]
16	GR7FYRG01AOIGT	13.14811	hypothetical protein BRAFLDRAFT_104861 [Branchiostoma floridae]
17	isotig26443	12.86232	hypothetical protein BRAFLDRAFT_118619 [Branchiostoma floridae]
18	GSPZ16V01EJT6G	12.56985	PREDICTED: putative GTP-binding protein 6-like [Pongo abelii]
19	isotig30075	12.38582	PREDICTED: similar to Genethonin 1 (GENX-3414) [Canis familiaris]
20	isotig08950	11.9009	AChainA,4ank:ADesignedAnkyrinRepeatProteinWithFourIdentical Consensus Repeats

⌘ 38. Ciliates 24h/ciliates 6h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	isotig27279	-101.063	hypothetical protein TRIADDRAFT_26340 [Trichoplax adhaerens]
2	isotig05824	-90.6926	hypothetical protein NCER_102544 [Nosema ceranae BRL01]
3	isotig14491	-79.1251	PREDICTED: similar to synaptonemal complex protein 1 [Monodelphis domestica]
4	GR7FYRG01BMEZY	-43.5344	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
5	GR7FYRG01A3GR9	-41.6392	PREDICTED: hypothetical protein [Ciona intestinalis]
6	GR7FYRG01CSZMY	-39.6232	predicted protein [Nematostella vectensis]
7	GR7FYRG01A6H3N	-39.4869	predicted protein [Nematostella vectensis]
8	GR7FYRG01BMCRF	-39.1966	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
9	GR7FYRG01D6JVN	-37.0608	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
10	GR7FYRG01BXGBQ	-34.1702	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
11	GR7FYRG01BGNQD	-33.1339	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
12	isotig30109	-31.2052	hypothetical protein BRAFLDRAFT_63596 [Branchiostoma floridae]
13	GR7FYRG01CTFPQ	-31.0864	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
14	isotig13142	-30.0937	unknown protein 37 [Haliotis diversicolor]
15	GR7FYRG01BDIOX	-27.613	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
16	isotig15312	-24.9546	unknown protein 37 [Haliotis diversicolor]
17	cDNA_46_H05_M13F_ab1	-24.7666	cAMP responsive element binding protein [Lymnaea stagnalis]
18	cDNA_57_G06_M13F_ab1	-19.2074	predicted protein [Nematostella vectensis]
19	GR7FYRG02G6SQ4	-16.9481	PREDICTED: collagen alpha-1(XII) chain-like [Xenopus (Silurana) tropicalis]
20	GR7FYRG02IONH4	-15.4037	PREDICTED: similar to NAAG-peptidase; NAALADase; prostate specific membrane antigen; PSM; PSMA [Ciona intestinalis]

表 39. Poly I:C 24h/Poly I:C 6h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	cDNA_33_E05_M13F_ab1	74.915	–
2	isotig12295	66.62362	transposase [Salmo salar]
3	isotig12296	47.27858	transposase [Salmo salar]
4	isotig29971	44.82561	leukocytecellderivedchemotaxin1-likeprotein[Haliotisdiscus discus]
5	cDNA_35_D01_M13F_ab1	44.78811	–
6	isotig29434	40.29076	hypothetical protein BRAFLDRAFT_117011 [Branchiostoma floridae]
7	GSPZ16V01EJT6G	29.08042	PREDICTED: putative GTP-binding protein 6-like [Pongo abelii]
8	isotig01030	26.56768	hypothetical protein BRAFLDRAFT_122507 [Branchiostoma floridae]
9	isotig29013	16.40239	tumor necrosis factor alpha [Haliotis discus discus]
10	isotig31603	14.08219	hypothetical protein BRAFLDRAFT_80496 [Branchiostoma floridae]
11	isotig24697	13.79868	PREDICTED: hypothetical protein [Saccoglossus kowalevskii]
12	CL822Contig1	13.47164	–
13	CL1097Contig1	12.67476	–
14	05_B10_AB_ab1	12.52886	–
15	isotig24335	12.07038	PREDICTED: Fc receptor-like 2-like [Danio rerio]
16	GR7FYRG02H1NXI	11.20393	GALC_XENLAREcName:Full=Galactocerebrosidase;Short=GALCERase;AltName: Full=Galactosylceramidase; Flags: Precursor
17	GSPZ16V01AC5SK	11.18483	PREDICTED: hypothetical protein [Saccoglossus kowalevskii]
18	GR7FYRG01D67CN	10.9286	reverse transcriptase [Danio rerio]
19	isotig22442	9.606685	hypothetical protein TRIADDRAFT_57593 [Trichoplax adhaerens]
20	isotig16641	8.971393	peptidoglycan recognition protein short form [Biomphalaria glabrata]

表 40. Poly I:C 24h/Poly I:C 6h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	CL211Contig2	-31.233	–
2	isotig03110	-29.5057	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
3	GR7FYRG02HU5OX	-27.9396	hypothetical protein BRAFLDRAFT_119296 [Branchiostoma floridae]
4	isotig31526	-25.9818	interferon-induced 44-like protein [Haliotis discus discus]
5	GR7FYRG01BZOQI	-25.7946	glutamate transporter protein [Platynereis dumerilii]
6	isotig21909	-24.6014	PREDICTED:reversetranscriptaseSR3-right-like[Saccoglossus kowalevskii]
7	GR7FYRG01AIWKV	-24.1154	hypothetical protein BRAFLDRAFT_97527 [Branchiostoma floridae]
8	isotig03108	-24.065	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
9	GSPZ16V01EDDWU	-23.95	temptin [Haliotis discus discus]
10	isotig10096	-23.0764	hypotheticalproteinAasi_0340[CandidatusAmoebophilusasiaticus 5a2]
11	GR7FYRG01DXSL1	-21.5902	pairedsuperclasshomeoboxtranscriptionfactorPitx[Lymnaea stagnalis]
12	GR7FYRG01DP1RE	-20.3415	PREDICTED:similartoORF2-encodedprotein[Strongylocentrotus purpuratus]
13	cDNA_03_E05_F_ab1	-18.2767	predicted protein [Nematostella vectensis]
14	cDNA_22_E01_M13F_ab1	-18.0885	PREDICTED: hypothetical protein [Danio rerio]
15	CL100Contig1	-17.9677	hypothetical protein Dace_2250 [Desulfuromonas acetoxidans DSM 684]
16	isotig03112	-17.4376	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
17	GR7FYRG01BJ4CU	-16.9808	temptin [Haliotis discus discus]
18	GSPZ16V01EX15F	-16.6828	temptin [Haliotis discus discus]
19	GR7FYRG02H2NPA	-16.5615	hypothetical protein BRAFLDRAFT_100697 [Branchiostoma floridae]
20	GR7FYRG02G5C2T	-15.1932	PREDICTED: putative tyrosine recombinase-like [Saccoglossus kowalevskii]

表 41. LPS 24h/LPS 6h (up-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	isotig22488	79.86005	hypothetical protein BRAFLDRAFT_63397 [Branchiostoma floridae]
2	isotig03110	67.14875	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
3	GR7FYRG01C5V0P	64.30568	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
4	isotig03108	62.42228	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
5	isotig03112	50.97189	hypothetical protein BRAFLDRAFT_143777 [Branchiostoma floridae]
6	4_G05_AB_ab1	49.41313	plasma membrane H ⁺ -ATPase [Plantago major]
7	isotig05824	29.84723	hypothetical protein NCER_102544 [Nosema ceranae BRL01]
8	cDNA_51_A02_M13F_ab1	26.22097	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]
9	isotig25911	24.4063	hypothetical protein BRAFLDRAFT_63397 [Branchiostoma floridae]
10	GR7FYRG01D2HVF	23.21647	pol-like protein [Biomphalaria glabrata]
11	isotig08244	22.38255	leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein [Haliotis discus discus]
12	GR7FYRG01BMCRF	20.82038	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
13	GR7FYRG01A3GR9	19.76767	PREDICTED: hypothetical protein [Ciona intestinalis]
14	isotig08246	18.79134	leukocyte cell derived chemotaxin 1-like protein [Haliotis discus discus]
15	isotig26344	18.61937	hypothetical protein BRAFLDRAFT_63397 [Branchiostoma floridae]
16	GR7FYRG01A6H3N	17.48942	predicted protein [Nematostella vectensis]
17	GSPZ16V01DYIUK	17.35547	PREDICTED: similar to MEGF10 protein (KIAA1780) [Gallus gallus]
18	GR7FYRG01BMEZY	16.68962	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
19	GR7FYRG01CTFPQ	15.40301	PREDICTED: similar to predicted protein [Ciona intestinalis]
20	isotig26599	15.09936	PREDICTED: similar to Ferric-chelate reductase 1 (Stromal cell-derived receptor 2) (SDR-2) [Ciona intestinalis]

表 42. LPS 24h/LPS 6h (down-regulated genes)

No	Seq ID	Fold-change	Gene description
1	GR7FYRG01BVT0X	-74.698	hypothetical protein BC1G_05548 [Botryotinia fuckeliana B05.10]
2	isotig14348	-41.8425	Fibronectin type III domain protein [Nitrosopumilus maritimus SCM1]
3	isotig19947	-40.663	PREDICTED: similar to immunoglobulin scavenger receptor IgSR, partial [Hydra magnipapillata]
4	GR7FYRG01EDUUU	-29.4334	GTPase, IMAP family member 7 [Oncorhynchus mykiss]
5	cDNA_46_H05_M13F_ab1	-25.1025	cAMP responsive element binding protein [Lymnaea stagnalis]
6	isotig24697	-21.048	PREDICTED: hypothetical protein [Saccoglossus kowalevskii]
7	isotig15312	-20.2186	unknown protein 37 [Haliotis diversicolor]
8	GR7FYRG01EUWHT	-19.951	nephrin [Danio rerio]
9	GR7FYRG02G6SQ4	-19.2071	PREDICTED: collagen alpha-1(XII) chain-like [Xenopus (Silurana) tropicalis]
10	GSPZ16V01DYBZ9	-17.813	AF225916_1 aragonite protein AP7 precursor [Haliotis rufescens]
11	isotig13142	-15.1142	unknown protein 37 [Haliotis diversicolor]
12	isotig00500	-14.8587	hypothetical protein Cyan8802_3864 [Cyanospora sp. PCC 8802]
13	isotig33338	-13.9142	PREDICTED: GTPase, IMAP family member 1-like [Danio rerio]
14	isotig10991	-13.6446	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
15	isotig11967	-12.5594	predicted protein [Thalassiosira pseudonana CCMP1335]
16	GR7FYRG02HJVYT	-12.4552	PREDICTED: RETROtransposon-like family member (retr-1)-like, partial [Saccoglossus kowalevskii]
17	cDNA_16_G12_F_ab1	-12.0291	-
18	isotig26845	-11.9329	hypothetical protein BRAFLDRAFT_69134 [Branchiostoma floridae]
19	isotig10990	-11.9209	hypothetical protein [Gemmatimonas aurantiaca T-27]
20	GSPZ16V01AKWHG	-11.4251	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]

표 43. 모든 번역유도 실험에서 2배 이상 발현이 상향 조절된 유전자

No	Seq ID	Gene description
1	GSPZ16V02G3PCZ	rCG63049 [Rattus norvegicus]
2	GSPZ16V01DMF7M	hypothetical protein TRIADDRAFT_52608 [Trichoplax adhaerens]
3	GSPZ16V02JM5Y7	rCG63049 [Rattus norvegicus]
4	isotig23882	hypothetical protein EAG_03281 [Camponotus floridanus]
5	isotig05102	calmodulin 2 [Haliotis discus discus]
6	isotig05103	calmodulin 2 [Haliotis discus discus]
7	GR7FYRG01BM56W	hypotheticalproteinAasi_1435[CandidatusAmoebophilusasiaticus 5a2]
8	CL344Contig1	carboxypeptidase B [Ochlerotatus epactius]
9	GR7FYRG01CO2E3	unknown protein 7 [Haliotis diversicolor]
10	cDNA_08_D09_F_ab1	conserved hypothetical protein [Trichomonas vaginalis G3]
11	GR7FYRG01C0UAN	unnamed protein product [Haliotis rufescens]
12	GR7FYRG01BNNFL	Man26A [Cellulomonas fimi]
13	GR7FYRG01CAD9C	unnamed protein product [Haliotis rufescens]
14	isotig10202	hypothetical protein SORBIDRAFT_07g022330 [Sorghum bicolor]
15	GR7FYRG02FJPB5	hypotheticalproteinXFLM_00555[Xylellafastidiosasubsp.fastidiosa GB514]
16	GR7FYRG01ATT6Z	unnamed protein product [Haliotis rufescens]
17	GR7FYRG01DSS9U	unnamed protein product [Haliotis rufescens]
18	GR7FYRG01ETXQQ	xanthine dehydrogenase [Culex quinquefasciatus]
19	GR7FYRG01C1KFH	draper [Culex quinquefasciatus]
20	GR7FYRG01B495V	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
21	isotig33934	sialic acid binding lectin [Haliotis discus discus]

표 44. 모든 번역유도 실험에서 2배 이상 발현이 하향 조절된 유전자

No	Seq ID	Gene description
1	isotig31621	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
2	GSPZ16V02GGBTK	unnamed protein product [Homo sapiens]
3	GR7FYRG01ALB5R	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
4	GR7FYRG02FLM16	PREDICTED: ATPase type 13A3-like [Saccoglossus kowalevskii]
5	GR7FYRG02IGUK9	GA27861 [Drosophila pseudoobscura pseudoobscura]
6	GR7FYRG01A1IM4	hypothetical protein BRAFLDRAFT_131390 [Branchiostoma floridae]
7	GR7FYRG02JR4BE	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus]
8	GSPZ16V02GC483	unnamed protein product [Homo sapiens]
9	isotig15383	serine protease inhibitor 2 [Crassostrea virginica]
10	GR7FYRG02HMZV3	PREDICTED: zinc finger protein-like [Danio rerio]
11	isotig25390	hypothetical protein TcasGA2_TC009240 [Tribolium castaneum]
12	GR7FYRG02IYBEY	serine protease inhibitor 2 [Crassostrea virginica]
13	isotig34418	serine protease inhibitor 2 [Crassostrea virginica]
14	GR7FYRG02I9X87	PREDICTED: hypothetical protein [Saccoglossus kowalevskii]
15	GR7FYRG02ILH73	serine protease inhibitor 2 [Crassostrea virginica]
16	isotig12731	hypothetical protein BRAFLDRAFT_106563 [Branchiostoma floridae]
17	GSPZ16V01EN4YC	unnamed protein product [Paramecium tetraurelia]
18	cDNA_51_B03_M13F_ab1	Aldose 1-epimerase [Clostridium cellulolyticum H10]
19	isotig31667	PREDICTED:similar to ankyrin2,3/unc44,partial [Strongylocentrotus purpuratus]
20	GR7FYRG02JLFGK	unnamed protein product [Oikopleura dioica]
21	isotig11533	peroxinectin [Pacifastacus leniusculus]

다. 3차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 연구수행 내용

1) RACE PCR을 이용한 전복 면역 관련 유전자의 full-length cDNA 획득

GS-FLX data에서 확보한 전복 면역관련 유전자의 cDNA 서열 중 N-말단(5'), 혹은 C-말단(3')이 부족한 서열은 Rapid amplification of cDNA ends PCR (RACE PCR)을 통해 부족한 서열을 증폭하여 전체서열을 확보하였다.

■ RACE를 위한 primer 제작

GS-FLX의 data를 기반으로 하여 22-30bp 정도의 길이를 갖고 GC비율은 40-60%, Tm 65°C 이상인 조건에서 primer 간 dimer를 형성하지 않도록 하여 RACE PCR용 primer를 forward, reverse 로 한 쌍씩 제작하였다.

■ RACE를 위한 주형 1st strand cDNA 합성

(주)Seegene사의 CapFishing™ Full-length cDNA Premix kit를 사용하여 RACE PCR을 위한 주형이 되는 1st strand cDNA를 합성하기 위해 전복의 조직으로부터 추출한 2.5µg/µl 농도 total RNA 샘플을 1µl 사용하여 5mM의 dNTP 4µl, 10µM dT-adaptor 2µl, DEPC-treated water 3.5µl을 첨가하여 최종 volume이 10.5µl가 되도록 하고 75°C에서 3분간 반응시키고 나서 2분간 ice에서 식혔다. 추가적으로 5X RT buffer 4µl, 0.1M DTT 1µl, CapFishing™solution 1µl, BAS(1mg/µl) 2µl, RNase inhibitor(40U/µl) 0.5µl, Reverse transcriptase(200U/µl) 1µl을 첨가하여 최종 volume이 20µl 이 되게 하여 42°C에서 1시간 반응시킨 후 72°C에서 3분간 미리 가열한 CapFishing™adaptor 3µl 및 Reverse transcriptase 0.3µl를 넣어 42°C에서 30분간 반응시킨 후 70°C에서 15분, 94°C에서 5분간 반응하여 불활성화한 후 얼음에서 2분간 식힌 후 180µl의 증류수를 넣어 희석하여 RACE를 위한 주형 1st strand cDNA를 준비하였다.

■ 5', 3' RACE

CapFishing™ Full-length cDNA Premix kit를 이용하여 합성한 주형 1st strand cDNA로부터 다음과 같이 5', 3' RACE를 수행하여 partial 전복 면역관련유전자의 full-length 서열을 밝혔다. 1st strand cDNA 5µl, SeeAmp™TaqPlus Master Mix 25µl, 10 µM 5'-RACE primer 1µl (3' RACE인 경우 3'-RACE primer), 10 µM 3' target primer (3' RACE인 경우 5' target primer) 1µl에 증류수 18µl를 넣어 총 volume이 50 µl가 되는 RACE PCR 반응 mixture를 만들었다. 그리고 나서 94°C에서 40초, 58~68°C에서 40sec, 72°C 1분 25~35회의 cycle을 갖는 PCR을 수행하여 full-length의 cDNA를 증폭하였다. PCR 산물은 agarose gel 전기영동을 통해 band와 size를 확인한 후 Bioneer의 AccuPrep® Gel Purification Kit를 사용하여 DNA를 추출한 후 pMD20-T vector에 ligation 하여 대장균에 transformation 한 후 blue-white colony screening을 통해 벡터가 삽입된 대장균을 선별하여 배양한 후 AccuPrep® Nano-Plus Plasmid Mini Extraction Kit를 사용하여 DNA를 추출하여 (주)마크로젠사에 시퀀싱을 의뢰하여 전체염기서열을 확인하였다.

2) 제한효소를 이용한 발현벡터로의 클로닝

실제 단백질을 번역할 수 있는 부분인 open reading frame(ORF)부분을 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하여 발현 벡터인 pMAL 및 pET 벡터에 제한효소를 이용하여 클로닝하였다. 클로닝된 벡터는 (주)마크로젠으로 시퀀싱을 의뢰하여 정확한 염기서열을 확인하였다.

3) 클로닝한 유전자로부터의 재조합 단백질 생산 및 bioactivity test

■ Expression system을 이용한 재조합 단백질 생산

전복 면역관련 유전자의 ORF에서 signal peptide를 제외한 나머지 서열을 갖는 유전자를 PCR을 통해 증폭한 후 제한효소처리를 하여 pET, pMAL 벡터에 삽입이 되게 하였다. 클로닝된 재조합 벡터는 *E.coli* BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 락토스오페론의 유도물질인 isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG)에 의해 재조합 단백질의 생산을 유도하였다.

■ SDS-page를 이용한 정제단백질 확인

생산한 재조합 단백질은 Amylose resin을 이용하여 정제한 후 12% SDS-page를 통해 전기영동을 한 후 0.05% Coomassie blue-R250으로 염색한 후 밴드를 확인하였다. 단백질의 크기를 확인하기 위해 단백질 marker는 (주)Enzymomics사의 UN-STAINED protein marker를 사용하였다. 단백질은 tag 단백질인 Maltose Binding Protein과 함께 발현되어 예측된 크기보다 42.5 kDa 정도 크게 나타났다. 정제된 재조합 단백질은 bioactivity test를 위해 bovine serum albumin(BSA)를 standard로 하여 Bradford법에 의해 농도를 측정하였다.

■ 재조합 단백질의 bioactivity test

생산된 재조합 단백질은 bioactivity test에 사용하여 *in vitro* 상 면역관련 유전자의 메커니즘 반응을 확인하였다. 대조군으로는 pMAL expression system에서 tag 단백질로 사용되는 Maltose Binding Protein (MBP)을 사용하였다.

4) 면역관련 유전자의 발현 분석을 위한 Real-time PCR

■ 전복 채집

실험에 사용한 까막전복 (*Haliotis discus discus*)은 귀덕종묘배양장으로부터 평균 체중량 50 g, 평균 shell-length 8 cm의 전복을 구입하였다. 250 L의 PVC 시험수조 9개에 40마리씩 나누어 20 \pm 1 $^{\circ}$ C의 항온실에서 일주일간 순치하였다. 먹이는 자연 상태에서 주요 먹이인 갈조류 미역 (*Undaria pinnatifida*)을 충분한 양으로 급여 하였고, 하루에 한번씩 75%의 해수를 환수하였다.

■ 면역반응 유도 및 처리 시간에 따른 조직 적출

다양한 면역자극물질에 따른 전복의 면역반응을 유도하기 위하여 *Listeria monocytogenes* (1 x 10⁴ CFU/abalone), *Vibrio parahemolyticus* (1 x 10⁴ CFU/abalone), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV; 1 x 10⁸ PFU/abalone), polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C; 500 μ g/abalone), Lipopolysaccharide (LPS; 500 μ g/abalone)을 이용하였다. 각각의 면역유도물질 및 병원균은 0.9% saline 용액에 녹이거나 재부유시켜 실험에 사용하였고, 전복 1마당 100 μ l씩 근육에 주사하였다. 대조구로서 동량의 0.9% saline 용액만을 주사한 전복들을 사용하였다. 각각의 면역유도자들을 주사한 후 각 3, 6, 12, 24, 48시간 및 72시간과 120 시간별 및 처리구별로 4마리의 전복으로부터 gill, mantle, muscle, digestive tract, hepatopancreas, hemocytes, gonadal tissue (male, female) 등을 적출하였다. 적출한 조직은 액체질소에서 즉시 동결 후 RNA를 분리하기 전까지 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

■ Total RNA 분리

각 그룹별로 4마리의 전복으로부터 각 조직별로 40 mg씩 적출하여 사용하였다. 총 160 mg의 조직을 이용하여 Qiazol reagent (Qiagen, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 2 mL의 Qiazol reagent에

각 그룹당 160 mg의 조직을 넣은 후 homogenizer를 이용하여 분쇄하였다. 5분간 상온에서 반응 후 400 ul의 chloroform을 첨가 후 3분간 상온에서 반응시키고, 얼음에 보관하였다. 4°C, 12,000 x g에서 20분간 원심분리 후 total RNA를 포함하는 상등액을 회수하였고, 회수된 상등액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 RNA를 침전 시켰다. 4°C, 12,000 x g에서 원심분리 후 상등액을 제거하고 75%의 에탄올을 첨가하여 세척한 후에 4°C, 12,000 x g에서 5분간 원심분리 하였다. 원심분리 후에 상등액을 완전히 제거하고 RNA pellet을 10분간 상온에서 건조 후, 100 ul의 RNase free water에 녹였다. Total RNA는 분광광도계(Smart spec plus spectrophotometer; BioRad, UK)를 사용하여 정량하였다.

■ cDNA합성

cDNA의 합성은 Superscript Double-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 수행하였다. QC분석을 마친 RNA 시료 10 µg에 1 µl을 첨가 후 최종 volume이 11 µl가 되도록 하여 70°C에서 10분간 반응 후 얼음물에서 5분간 안정화 시킨 후, 5X first strand buffer 4 µl, 0.1 M DTT 2 µl, 10 mM dNTP Mix 1 µl를 첨가하여 최종 volume이 18 µl가 되도록 하고 42°C에서 2분간 반응시킨다. 추가적으로 2 µl의 SuperScript II를 첨가하고 42°C에서 60분간 반응하였다. First strand 반응액 20 µl에 DEPC water 91 µl, 5X Second Strand Buffer 30 µl, 10 mM dNTP Mix 3 ul, 10 U/ul DNA ligase 1 ul, 10 U/ul DNA Polymerase I 4 µl, 2 U/ul RNase H 1µl를 첨가하여 최종 volue 150 µl를 맞추고 16°C에서 2시간동안 반응 시킨 후, 2 µl의 5 U/ul T4 DNA polymerase를 첨가하고 16°C에서 5분간 더 반응시켰다. RNase A를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응하여 RNA를 제거하고 phenol:chloroform:isoamyl alcohol을 clean up하고 ethanol 침전법으로 정제 하였다.

■ Real-time PCR을 이용한 면역관련 유전자의 조직별 및 면역원 처리 시간에 따른 발현 양상

이 실험에 사용되어진 Real Time RT-PCR 방법은 SYBR Green I 법은 SYBR Green 이 PCR 반응시에 합성되는 DNA 가닥에 들어가면서 형광발색을 하게 되는데 이러한 성질을 이용하여 정량하는 방법이다. 위에서 합성된 cDNA를 이용하여 총 13개의 전복 면역관련 유전자의 조직별 및 면역원 처리 시간에 따른 발현 양상에 대해 Real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR은 합성한 4 µl의 cDNA에 7.5 µl의 2X SYBR Green Mix, 10 pmol/µl 농도의 forward 및 reverse primer 0.6 µl와 3µl의 dH₂O를 넣어 총 volume 15µl의 mixture를 만든 후 TaKaRa PCR Thermal cycler Dice TP800을 이용하여 95°C 3분 1cycle을 시작으로 94°C에서 20초 → 60°C에서 20초→ 72°C에서 30초로 이루어진 45회 cycle로 수행하였다. Internal control 은 β-actin을 사용하여 샘플들 간의 발현량을 보정하였고 2^{-ΔΔCT} (Livak) 계산법으로 산출하였다. Real-time PCR 에 사용되어진 primer 는 (표 45) 에 나타내었다. 샘플은 각각 3반복을 수행하였다.

표 45. Real-time에 사용한 유전자 특이적 primer의 서열

번호	유전자	서열 (5'-3')	비고
1	TLR	AGGTGCATGAGCGTGTATGACAGA	Forward
		TTACAGTAACACGCGTCGAACCCA	Reverse
2	IkappaB	TCACAGCGCCATCTTGACATTTGC	Forward
		TATGTCTGTGACGTCTGCACCGTT	Reverse
3	Matrix metallo proteinase	TCACCATGTCCCTCGTTGATGACA	Forward
		ATGGCCTCGAGTCCTGAAC TTTGT	Reverse
4	c-type lysozyme1	AACAGCTACTGGAATTGCGACCCT	Forward
		TCGTCACCGATGTTGCTGTTTCAGA	Reverse

5	c-type lysozyme2	TATCGATGGGTGTGCATGGCGTAT	Forward
		GTCGCAGTTCCAGTAGCTGTTGAT	Reverse
6	g-type lysozyme	TCATGGAGTTGGATGCATGAAGGC	Forward
		TCACATCGCCGTAGCAGTTGTAGT	Reverse
7	Ras family protein	TGGATATTCTCGACACAGCAGGTCAAGA	Forward
		TGGACTGTGCGTGTGGGTAGAT	Reverse
8	i-type lysozyme	AGTTGCGTCAGGGCCTACTTGAAT	Forward
		AGTACCCGAGTGTGTTGCTGTGTA	Reverse
9	MIF-1	TGCGTCTTCGCCACTGATACTTTG	Forward
		CGGGACAACATTTGCAGCCTTGTA	Reverse
10	FMRF1	CAGCTTTCTGAGGTTTGGCAGACA	Forward
		GGTGAATCGTCCAATGAGTATGCG	Reverse
11	FMRF2	TCGACTCCTATGAGGACAAAGCCT	Forward
		ATCACGCTTACGTCGGTATTGCCA	Reverse
12	kazal-type serine proteinase inhibitor	CCTCTCACATTCGTCCCTTGTGTA	Forward
		TGTGCTCAGAGGCGCTATATTGGT	Reverse
13	PGRP	GGCAAATTCAAACGCGGATTTTCCAC	Forward
		CGCAGCCGTAGAAGGCGTT	Reverse
14	Macrophage expressed protein	TTGGGCTTCGTCCTCGTTGTTAGT	Forward
		GCCTTGACCAGGCAGAACTTCAA	Reverse
15	Serpine	GCAGGTGCCACGGCAGTTATTATT	Forward
		TTGCCGATGAAGAGGTTGGCTTTG	Reverse

2. 결과

1) 전복 면역 관련 유전자의 full-length cDNA 확인

1,2차년도에 수행한 GS-FLX sequencing으로 확보한 cDNA library를 이용하여 partial 염기서열의 경우 RACE를 이용하여 총 51개의 전복 면역관련 유전자의 전체 서열을 확인하였다(표 46). 이 중 6개의 유전자는 재조합단백질 발현을 위해 제한효소를 이용하여 발현벡터에 클로닝하였다.

표 46. 면역관련 유전자 염기서열의 full-length 와 ORF

번호	유전자이름	full-length (bp)	ORF (bp)
1	Peptidoglycan recognition protein (PGRP)	1,297	534
2	Matrix Metallo proteinase	3,325	1,695
3	Cathepsin A	2,796	1,419
4	Cathepsin B	1,336	1,011
5	Goose-type lysozyme	894	792
6	Invertebrate-type lysozyme	545	396
7	Chicken-type lysozyme 1	598	441
8	Chicken-type lysozyme 2	662	432

9	IkappaB	2,095	1,133
10	Retinal dehydroganase	3,106	1,491
11	Interferon regulatory factor 1	5,222	675
12	retinoic acid-inducible gene -I(RIG-I)	3,985	3,129
13	Macrophage migration inhibitory factor 1 (MIF1)	1,146	360
14	FMRF 1	1,380	987
15	FMRF 2	1,200	612
16	TNF alpha interacting protein	4,096	2,466
17	Phosphatidylethanolamine-binding protein-like protein(PEBP)	1,143	546
18	cystatin B	1,967	306
19	Heat shock protein20	1,756	480
20	Glutaredoxin 3	1,342	990
21	cathepsin L-like cysteine proteinase	1,623	1,041
22	cathepsin L2 cysteine protease	1,193	993
23	profilin	1,518	859
24	caspase-10	1,548	1,326
25	caspase-8B	1,751	534
26	TRAF and TNF receptor associated protein	2,063	1,074
27	Ras Family Protein	2,704	552
28	Toll-like receptor family	2,940	3,804
29	beta-thymosin	551	135
30	interferon-induced 44-like protein	2,369	924
31	Rhodopsin	2,657	819
32	Interferon-inducible GTPase 5	2,641	1,266
33	Interleukin enhancer-binding factor 2 homolog	2,653	927
34	Pannexin 3	3,145	1,203
35	Pannexin 2	2,416	1,296
36	Prohibitin	1,394	819
37	serine protease	1,075	1,014
38	fasciclin 1	1,041	909
39	kazal-typeserine proteinase inhibitor	566	426
40	DMRT1	1,655	774
41	FOXL2	1,260	891
42	aquaporin 4	1,147	876
43	gelsolin	3,837	1,098
44	Macrophage expression protein	2,584	2,193
45	Serpin	2,089	1,599
46	Bcl-2	1,485	714
47	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	1,439	1,330
48	Galectin 4	2,854	1,017
49	interleukin-1 receptor-associated kinase 1-binding protein 1	1,273	750
50	Ras-related protein Rab7a	1,628	618
51	TRAF(TNF-receptor associated protein) 6	1,951	1,074

2) 클로닝한 유전자로부터의 재조합 단백질 생산 및 bioactivity test

■ Peptidoglycan recognition protein (PGRP)

Peptidoglycan recognition protein 은 선천면역계에서 외부에서 침입한 병원균을 인식하여 면역반응이 일어나게 하거나 병원균의 세포벽을 분해하여 감염을 막는다. PGRP 재조합 단백질을 이용하여 세균성장억제실험 (Bactericidal assay)를 다음과 같이 수행하였다. 정제한 재조합 단백질을 1×10^3 CFU 의 그람양성균인 *L. monocytogenes* 와 그람음성균인 *V. tapetis*에 넣어 LB 배지에 plating하여 37°C에서 하루 동안 배양한 후 colony를 확인하였다. 그 결과 전복의 PGRP 재조합 단백질은 대조구보다 세균성장이 억제되었음을 확인하였고 그람양성균보다는 그람음성균에 효과적으로 작용하는 것으로 나타났다(그림 12).

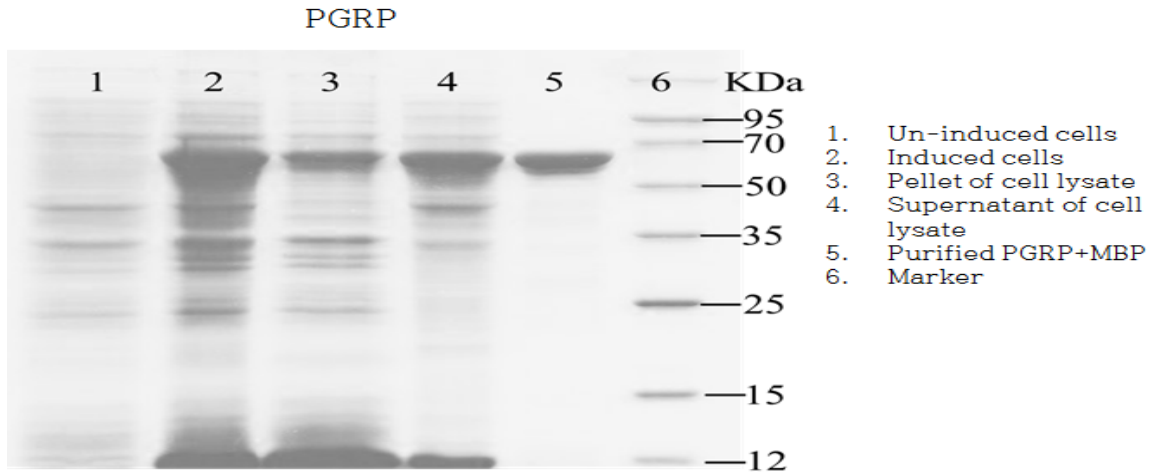


그림 11. 전복 유래 PGRP 유전자로부터 생산된 재조합 PGRP 단백질의 SDS-PAGE 결과

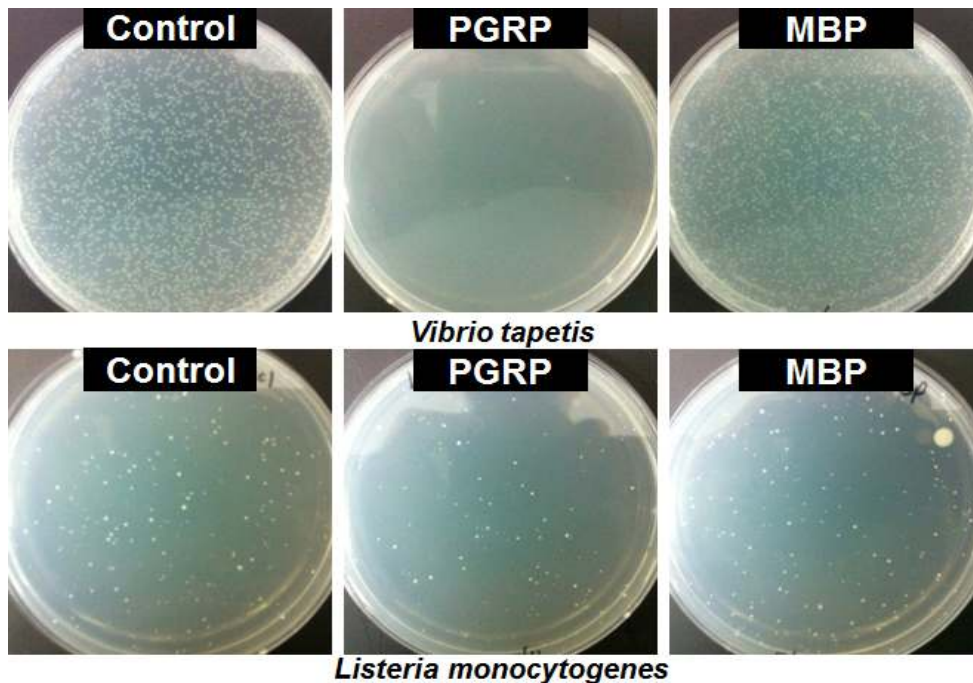


그림 12. 전복의 재조합 PGRP 단백질의 세균성장억제 실험결과

■ Goose type lysozyme (g-type lysozyme)

거위의 흰자에서 처음으로 발견되어 항균물질로써 알려져 G-type lysozyme이라 명명되었다. 척추동물군에서는 다양한 동물에서 연구가 되었으나 무척추동물에서는 연구가 미비하다. 까막전복의 g-type lysozyme 유전자에서 유래한 재조합단백질(그림 13)의 pH와 온도에 따른 항균적인 lysozyme 효소 활성에 대한 연구를 기존 *in vitro* 분석방법을 참고하여 수행하였다. 균주 *M. lysodeikticus*를 준비하여 pH 3.5~10.5 까지 온도는 0°C에서 60°C까지 준비된 버퍼에 450nm에서 0.5 농도로 풀어준다. 그리고 나서 재조합 단백질을 넣어 분해 활성을 측정하였다. 그 결과 그림 14와 같이 까막전복에서 유래한 재조합 g-type lysozyme은 pH 4에서, 온도는 60°C에서 활성을 가장 높은 활성을 갖는 것으로 나타났다.

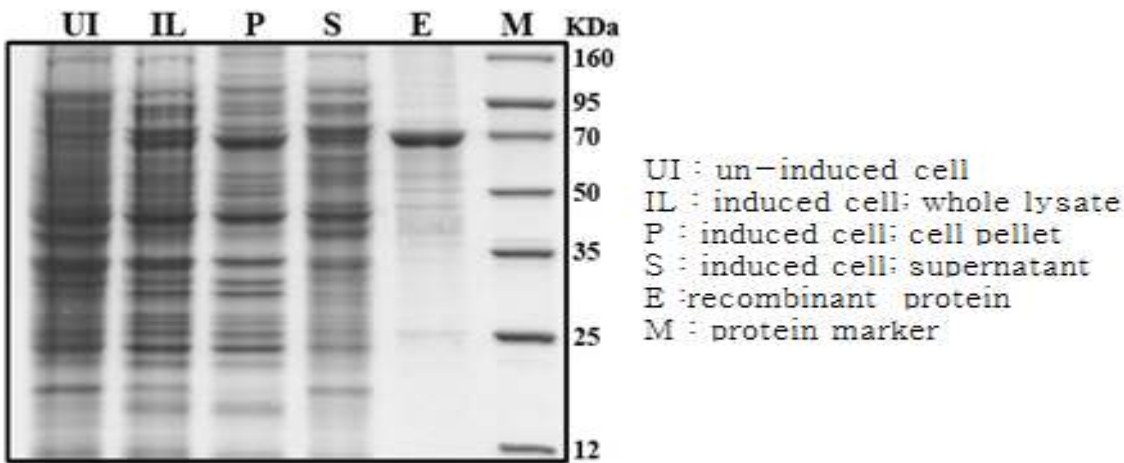


그림 13 . 전복 유래 g-type 유전자로부터 생산된 재조합 g-type 단백질의 SDS-PAGE 결과

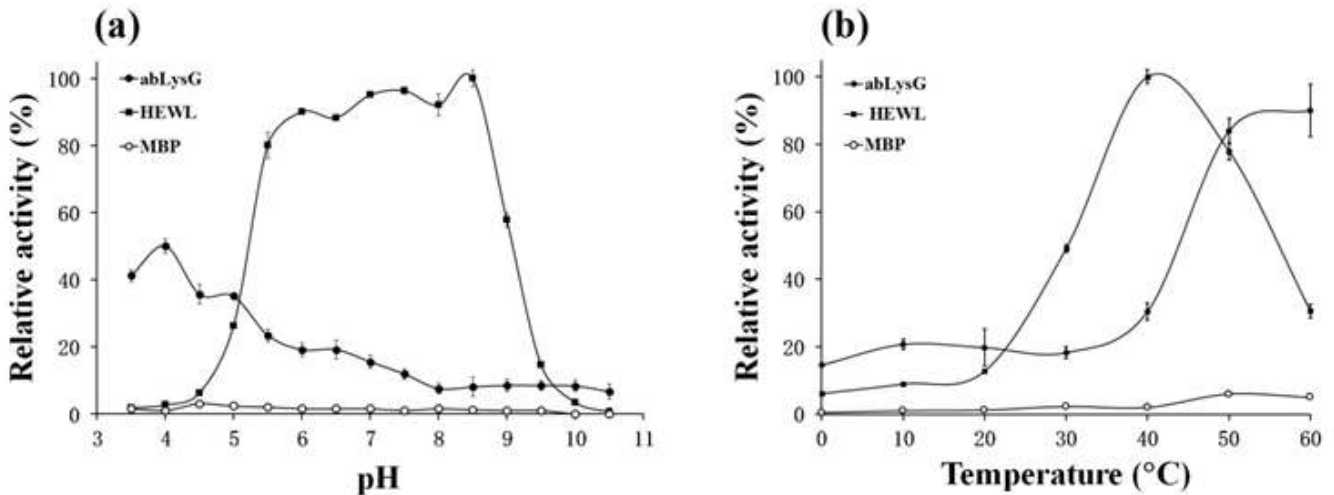


그림 14. *M. lysodeikticus* 에 대한 전복 g-type lysozyme의 용해활성. (a) pH에 따른 활성 ; (b)온도에 따른 활성

■ Chicken-type lysozyme (c-type lysozyme) 1,2

전복에서 유래한 2개의 재조합 chicken type lysozyme (그림 15) 단백질을 정제 후 lysozyme activity를 다양한 박테리아에 적용하여 보았다. 먼저 그람양성균인 *M. lysodeikticus* 와 *Streptococcus iniae* 및 그람음성균인 *V. salmonicida*, *V. parahemolyticus*, *Edwardsiella tarda* 등 5종의 균을 OD₄₅₀ 에서 0.5~0.6이 될 때까지 배양한 후 원심 분리하여 상층액을 제거 후 버퍼에 재부유 시켰다. 이후 15 μ g의 c-type lysozyme 단백질을 넣어 분광흡광계를 이용, 30분동안 정량적으로(kinetic) 측정하였다. 대조군으로는 hen egg white lysozyme (HEWL)을 사용하여 비교하였다. 실험 결과 전복의 c-type lysozyme 1의 경우 *V. salmonicida* 에서 비교적 강한 항균활성을 나타내었고, c-type lysozyme 2의 경우 *M. lysodeikticus* 에서 강한 활성을 나타내었다 (그림 16).

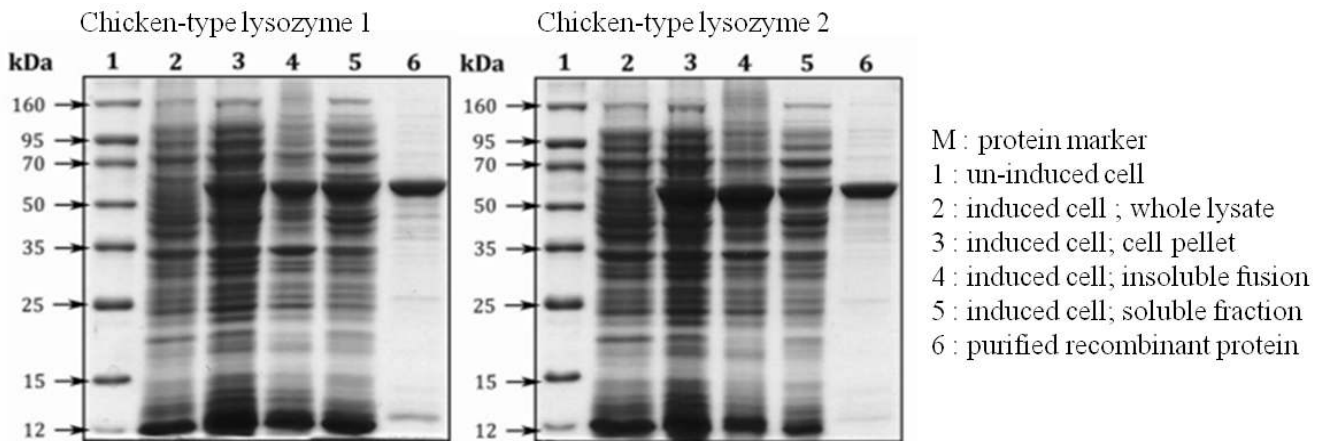
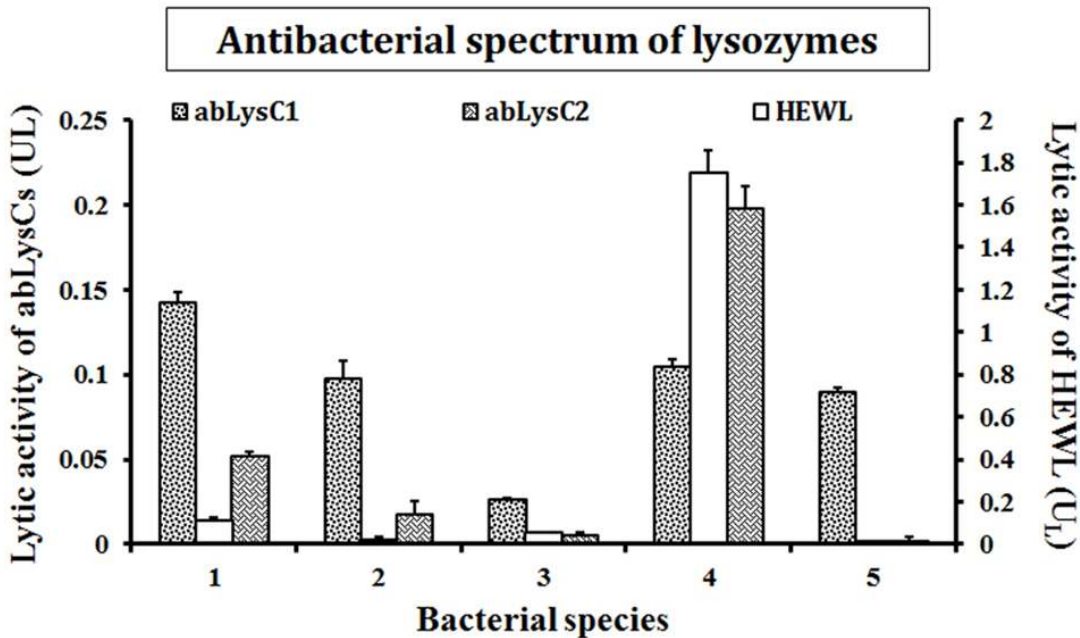


그림 15. 전복유래 c-type lysozyme 1,2 유전자로부터 생산된 재조합단백질의 SDS-PAGE 결과



1: *V. salmonicida*; 2: *V. parahemolyticus*; 3: *E. tarda*; 4: *M. lysodeikticus*; 5: *S. iniae*

그림 16. 전복의 재조합 c-type lysozyme의 항균실험 결과

■ Invertebrate type lysozyme(i-type lysozyme)

무척추동물로부터 유래한 lysozyme으로 pMAL-c2X expression vector을 이용하여 클론 후 *E. coli* BL21 (DE3) system에서 overexpression 시켜 그림 17과 같은 크기의 재조합 i-type lysozyme 정제단백질을 얻을 수 있었다. 정제된 재조합 i-type lysozyme의 활성을 여러 조건의 pH 및 온도에 따라 실험해 본 결과 pH4와 60°C에서 가장 높은 활성을 갖는 것으로 나타났다 (그림 18).

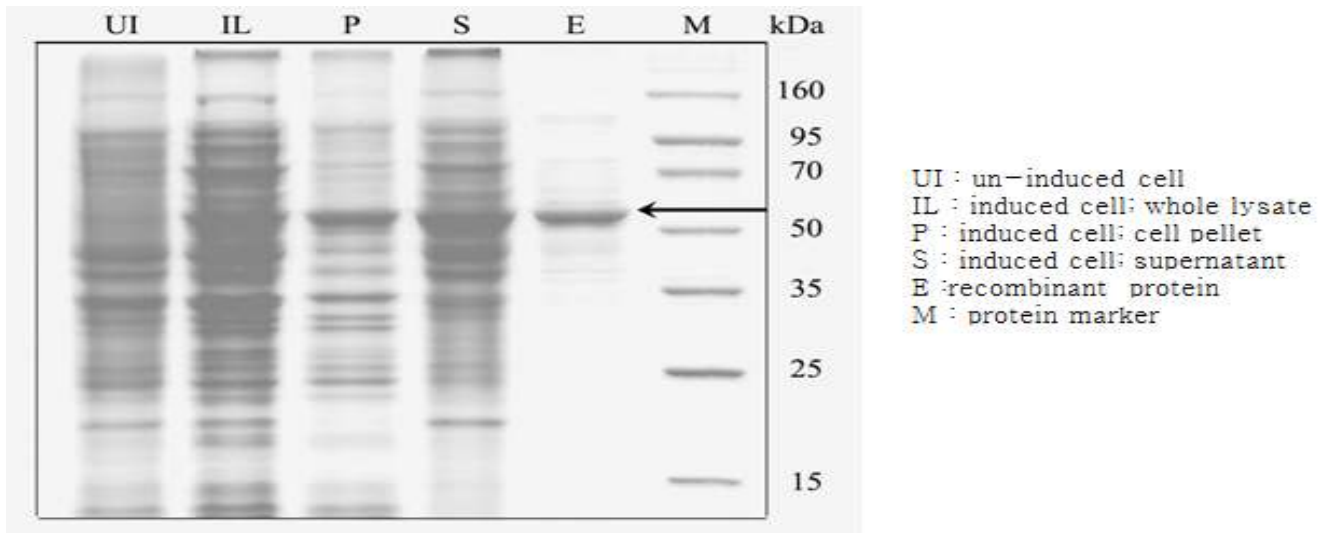


그림 17. 전복 유래 i-type lysozyme 유전자로부터 생산된 재조합 i-type lysozyme 단백질의 SDS-PAGE 결과

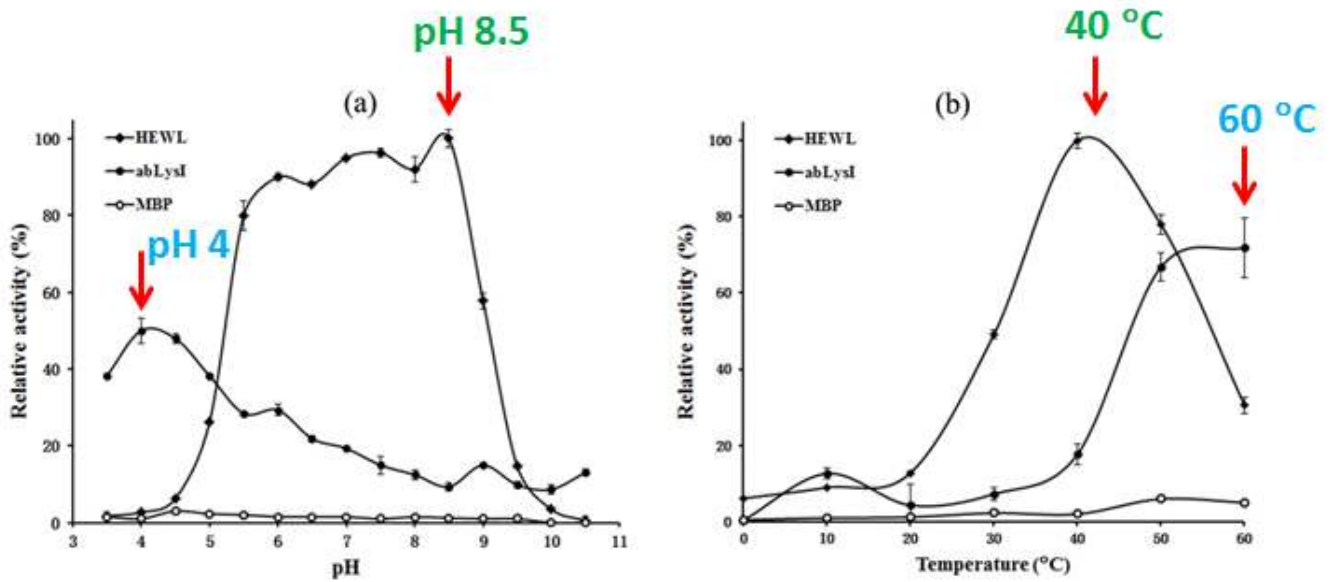


그림 18. 전복 i-type lysozyme의 *M. lysodeikticus*에 대한 용해활성. (a) pH에 따른 활성 ; (b)온도에 따른 활성

■ Cystatin B (cysteine proteinase inhibitor B)

병원균에서 생산되는 cysteine계 단백질분해효소(cysteine proteinase)는 각종 질병을 발발하는 원인이 된다. 따라서 숙주는 그것을 저해하기 위한 기전을 지니는데 그 중 하나가 cystatin B로 알려져 있다. 까막전복에서 유래한 cystatin B 유전자의 재조합 단백질(그림 19)을 이용하여 cysteine계 단백질분해효소 억제작용을 하는 지 실험을 수행하였다. 0.1M의 potassium phosphate buffer(PPB)에 1mg/ml 농도로 녹인 papain(Sigma, P3375)을 준비하여 재조합 단백질을 농도별첨가한 후 10 %의 trichloroacetic acid를 넣어 37°C에서 30분간 반응시켜 원심분리 후 상층액을 흡광분광계로 측정하여(400nm) 단백질 분해 저해활성을 보았다. 그 결과 전복에서 유래한 cystatin B 유전자의 재조합 단백질은 단백질분해 저해활성이 있으며 면역계에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 보인다 (그림 20).

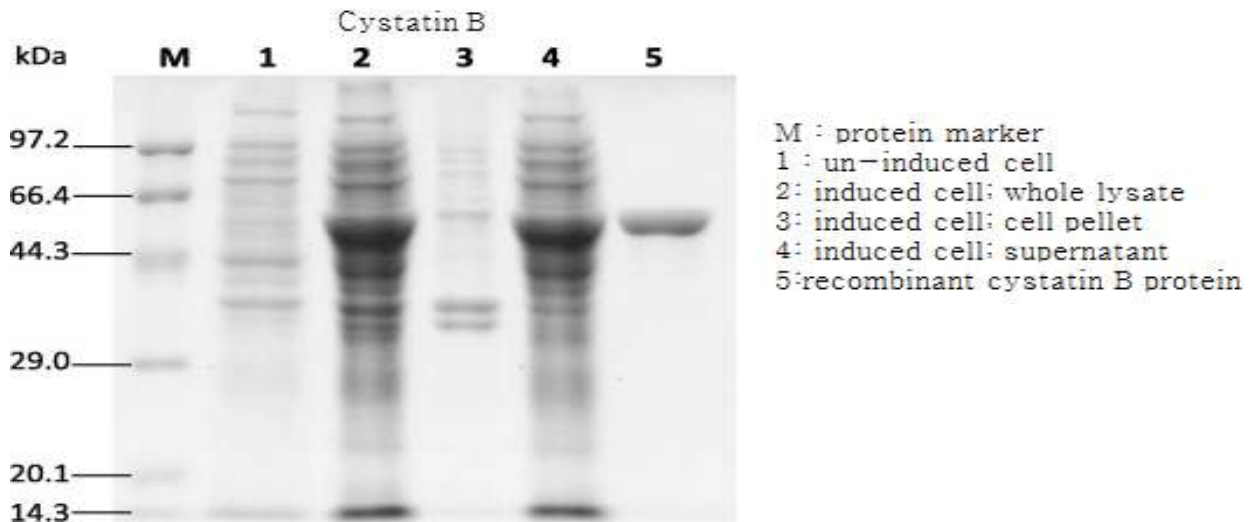


그림 19 . 전복 유래 cystatin B 유전자로부터 생산된 재조합 cystatin B 단백질의 SDS-PAGE 결과

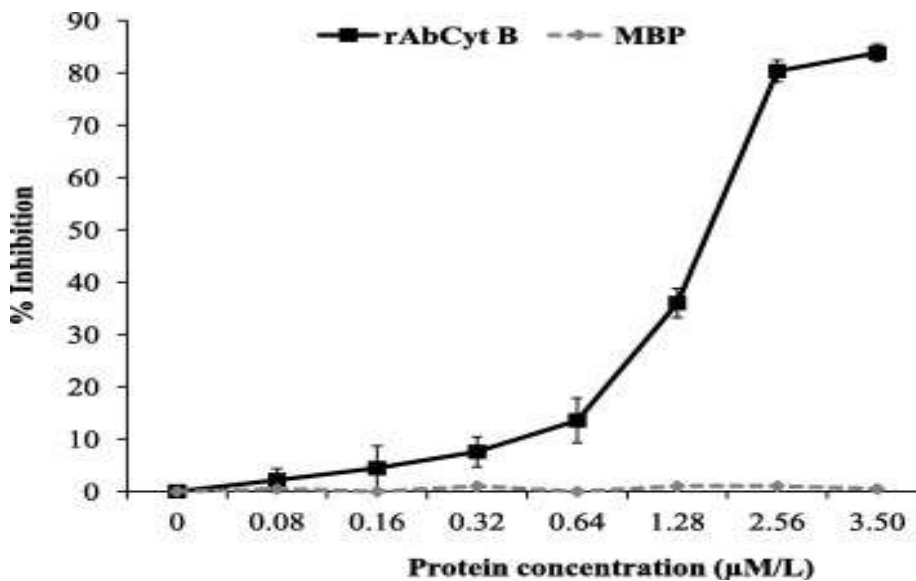


그림 20 . 전복의 재조합 cystatin B 단백질의 단백질분해저해활성

3) Real-time PCR을 이용한 면역관련 유전자의 발현 분석

건강한 전복의 여러 조직에서 면역관련 유전자의 발현 분석을 해 본 결과 Toll-like receptor, Matrix Metalloproteinase(MMP)은 hemocyte(혈구)에서 유의적으로 발현이 높은 것으로 나타났다. Macrophage migration inhibit factor-1 (MIF-1) 및 FMFR2의 경우는 mantle조직에서 발현이 높게 나타났다. 그 외에도 FMRF1은 digestive tract (소화관), kazal-type serine proteinase inhibitor는 hepatopancreas (간췌장), Ras family protein은 muscle (근육)에서 각각 발현이 높게 나타나는 것을 관찰하였다. 또한 다양한 면역자극 물질에 대하여 전복의 면역반응을 Real-time PCR을 통해 조직별로 혹은 시간별로 나타나는 패턴분석을 이해하여 분자적 수준의 면역관련 유전자들의 발현을 분석하였다.

■ TLR (Toll-like receptor)

TLR은 hemocyte에서 가장 높은 발현을 하는 것으로 나타났다(그림 21). 감염실험시 아가미조직 내에 발현은 *V.parahemolyticus*에서는 24시간때 대조구에 비해 3.1배(그림 22)로 유의적인 상향조절이 일어난 후 평형상태가 되었고 LPS와 VSHV 감염에서는 모두 48시간째 7.1배, 2.48배 (그림 23)로 유의적인 상향조절 후 다시 감소하여 평형상태가 됨을 관찰하였다. hemocyte에서는 VHSV감염에서 3시간째 1.9배, LPS 자극과 *V.parahemolyticus* 감염에서는 6시간에서 각각 2.35배, 1.9배로 상향조절이 되었다가 평형상태로 하향조절이 된 것을 관찰하였다. 따라서 전복의 TLR 유전자는 다른 생물체에서 하는 역할과 마찬가지로 박테리아와 바이러스감염에 유의적으로 발현하여 면역메커니즘에 관여하는 것으로 보인다.

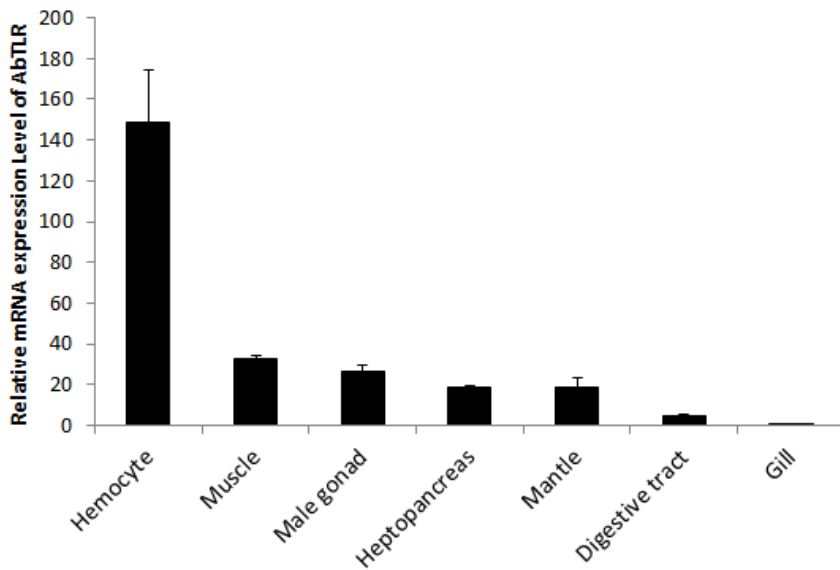


그림 21. 전복 TLR 유전자의 조직별 발현분포

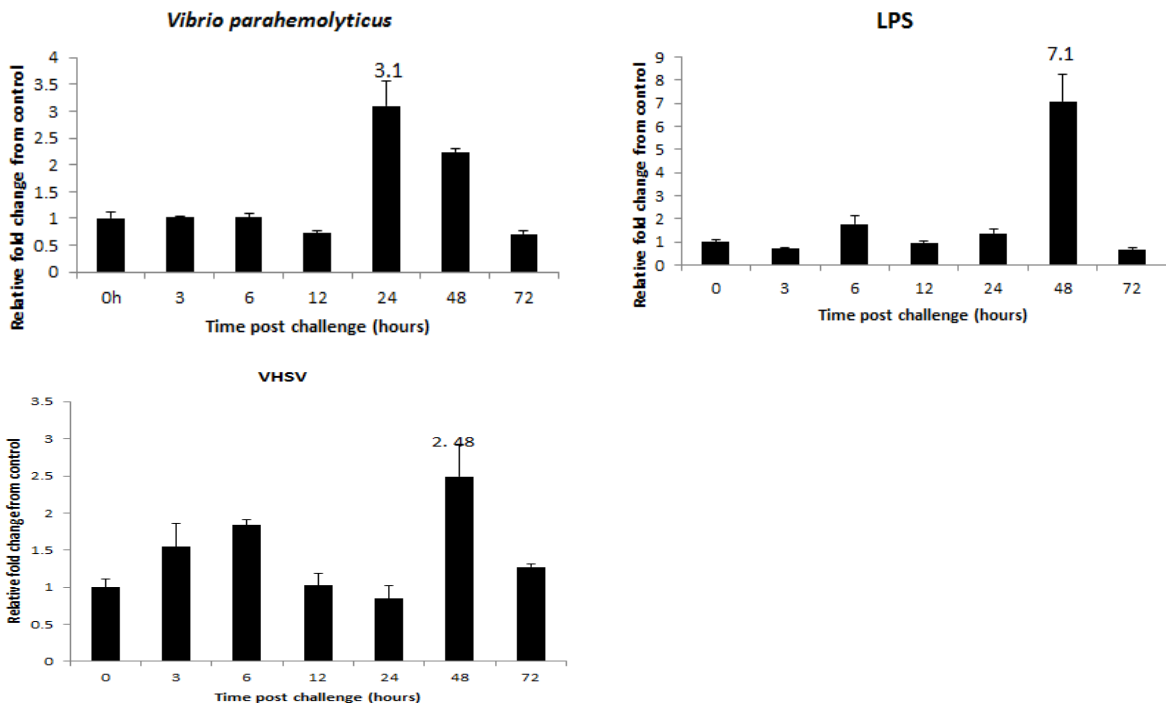


그림 22. 전복 gill 조직에서 면역자극(*V. parahemolyticus*, LPS and VHSV)에 따른 TLR 유전자의 발현 양상의 발현 양상

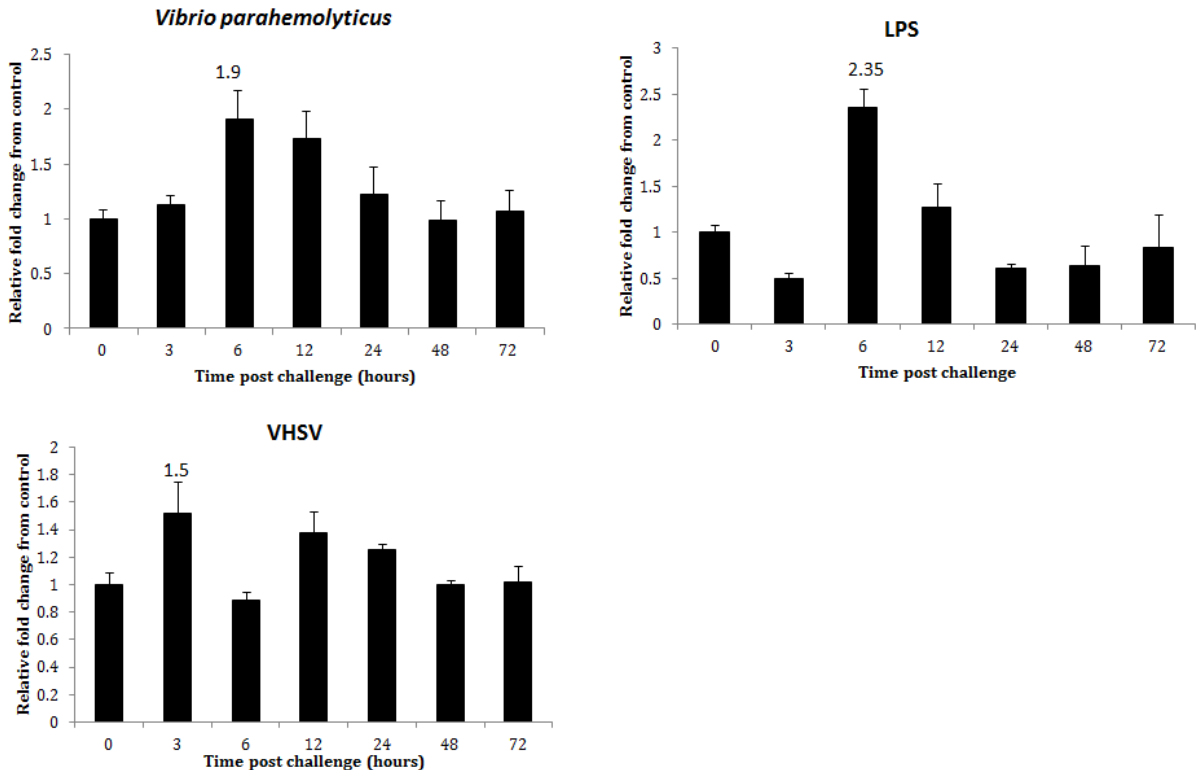


그림 23. 전복의 hemocyte 조직에서 면역자극에 따른 TLR 유전자의 발현 양상

■ Matrix metalloproteinase(MMP)

MMP는 hemocyte에서 가장 높은 발현을 하는 것으로 나타났다 (그림 24). MMP는 세포외 기질을 분해하여 조직의 흡수와 재형성에 필수적이다. 따라서 hemocyte는 이러한 세포재생에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 면역자극원 유도실험에서는 hemocyte에서 *V. parahemolyticus* 와 VHSV, Poly I:C를 접종 하였을 때 각각 4.47 배, 2.53배, 1.63 배로 12시간에서 가장 높은 발현을 보였고, LPS 및 *L. monocytogenes* 감염시 6시간에서 각각 5.68, 2.14배로 상향조절됨을 관찰하였다 (그림 25). 대부분 박테리아 감염시에 가장 높은 발현을 나타내는 것으로 보아 MMP 유전자는 특히 박테리아 감염에 관련된 면역기능에 관여하는 것으로 여겨진다.

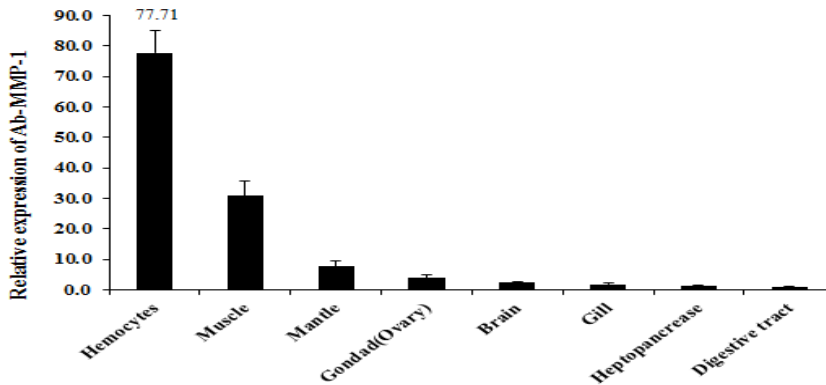


그림 24. 전복 MMP 유전자의 조직별 발현분포

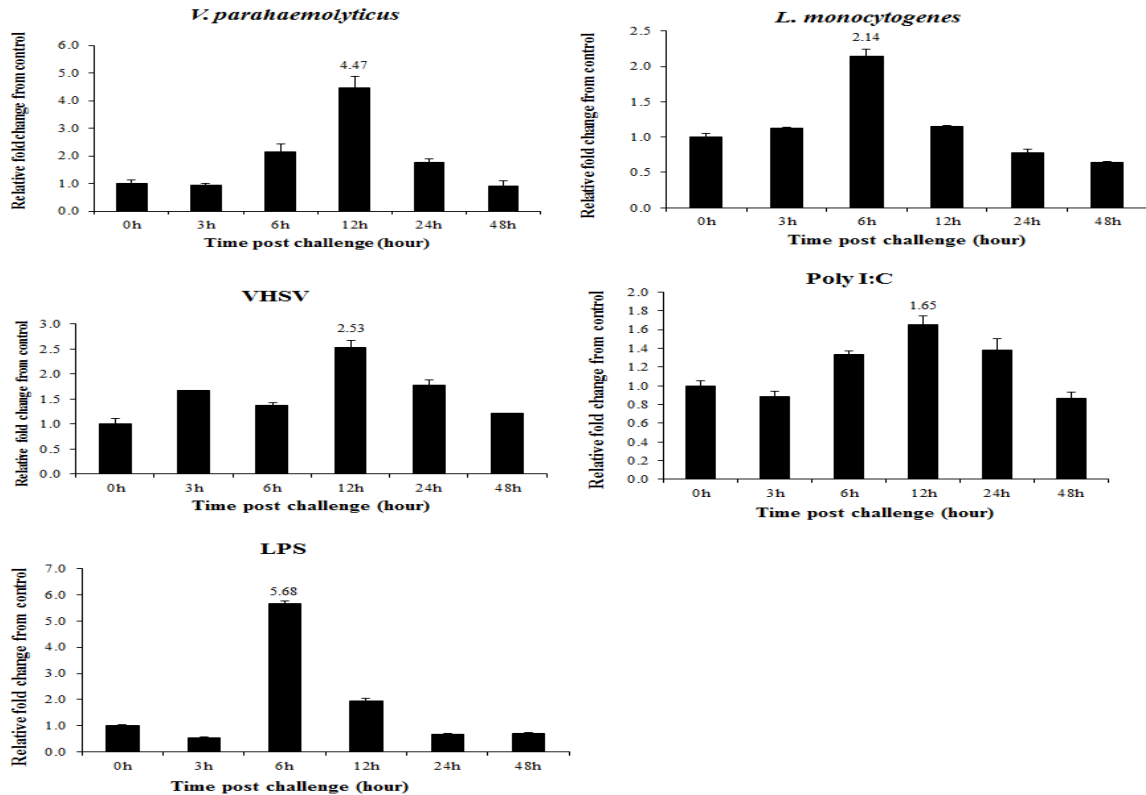


그림 25. 전복의 hemocyte 조직에서 면역자극에 따른 MMP 유전자의 발현 양상

■ Invertebrate type lysozyme(i-type lysozyme)

전복의 i-type lysozyme은 hepatopancrease에서 709배로 유의적으로 가장 높은 발현을 하는 것으로 나타났다 (그림 26). 또한 면역자극실험에서는 *V. parahemolyticus* 가 6시간째 51.66배, VHSV에서는 24시간에서 41.73 배로 다른 면역원보다 유의적으로 높은 발현값을 보이는 것으로 나타났다. 또한 *V. parahemolyticus* 및 VHSV 감염 시에도 효율적으로 면역반응을 일으킴을 알 수 있었다 (그림 27).

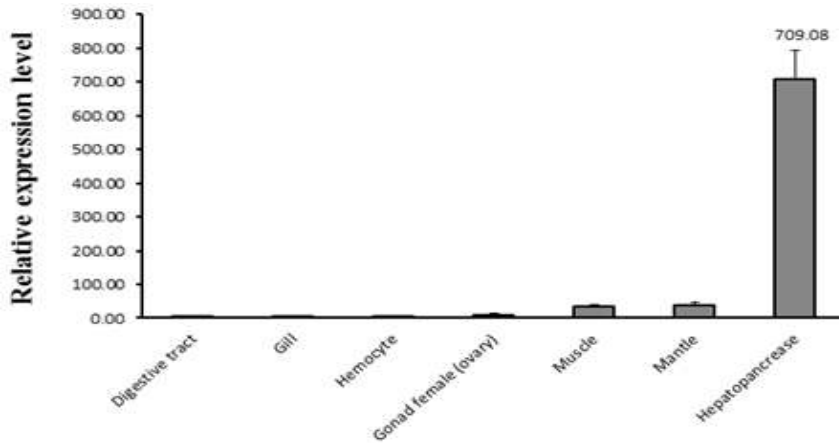


그림 26. 전복 i-type lysozyme 유전자의 조직별 발현분포

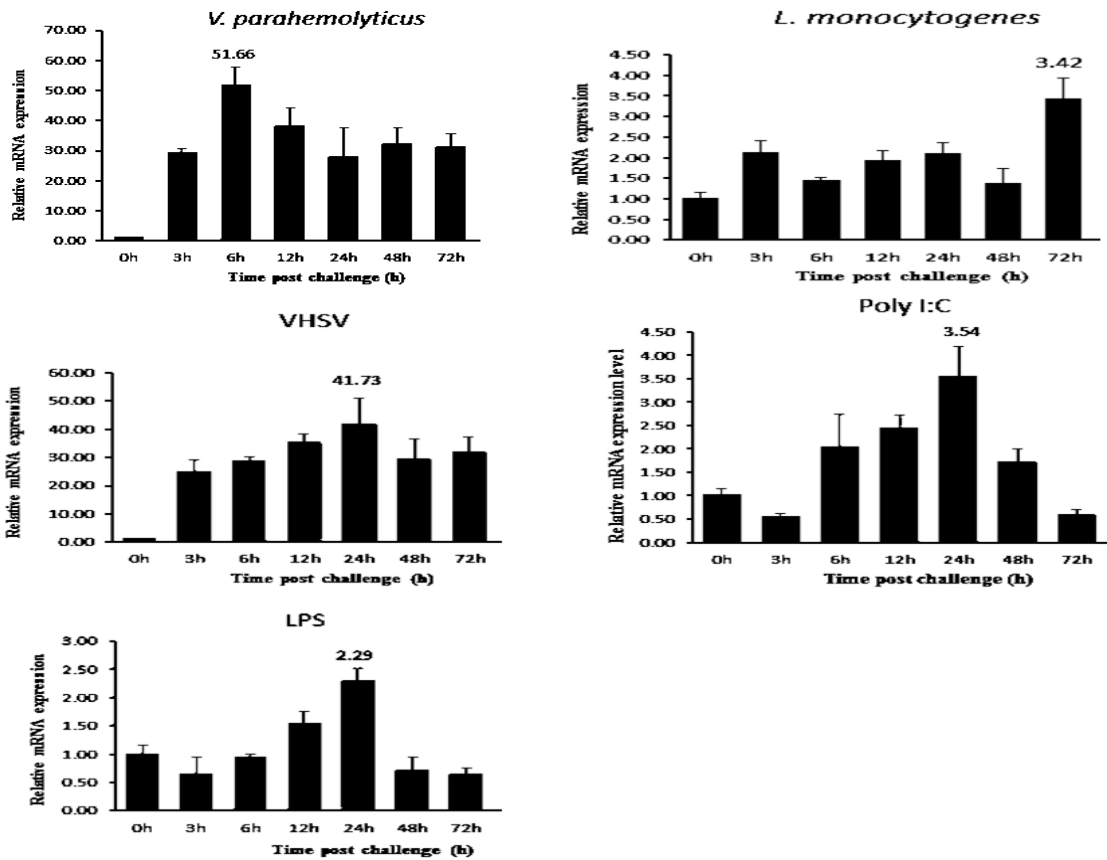


그림 27. 전복의 gill 조직에서 면역자극에 따른 TLR 유전자의 발현 양상

■ Goose type lysozyme(g-type lysozyme)

g-type은 까막전복의 mantle에서 가장 낮게 발현되는 gonad에 비해 3163 배로 가장 높은 발현을 하는 것으로 나타났다 (그림 28). *V. parahemolyticus* 및 *L. monocytogenes*, VHSV 감염시 24시간에서 가장 높게 발현하는 것으로 나타났고 각각 대조구에 비해 2.05배, 1.69배, 2.76배로 상향조절이 된 것을 확인 할 수 있었다. LPS 접종구에서는 6시간째 2배로 발현량이 증가되는 것으로 보아 (그림 29) 전복의 g-type lysozyme은 대체적으로 박테리아 및 바이러스 감염시에 면역반응에 관여하는 것으로 여겨진다.

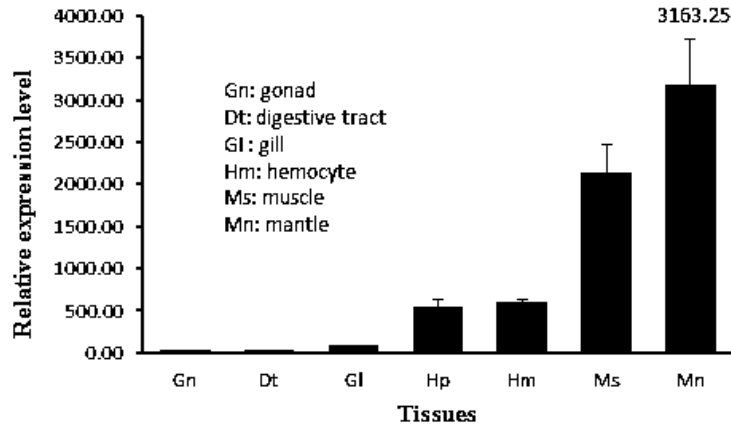


그림 28. 전복 g-type 유전자의 조직별 발현분포

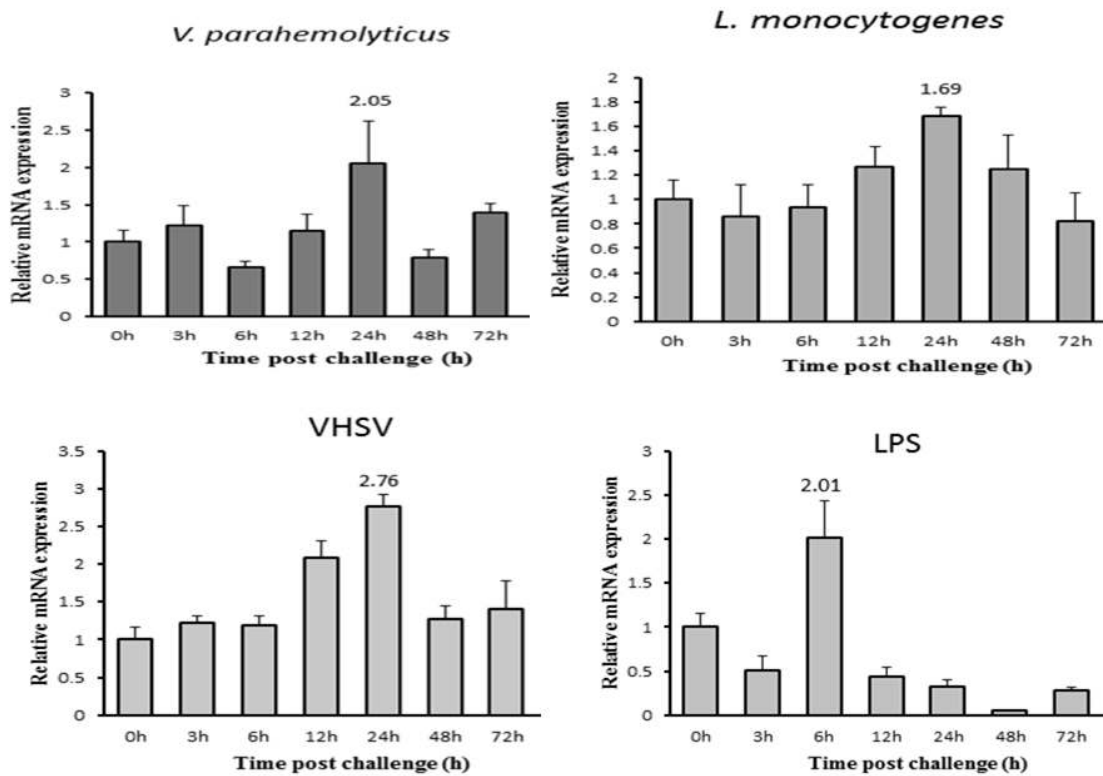


그림 29. 전복의 gill 조직에서 면역자극에 따른 g-type 유전자의 발현 양상

■ Ras family protein(RFP)

전복의 Ras family protein 유전자는 muscle에서 가장 높은 발현을 하는 것으로 나타났다 (그림 30). 전복 RFP 경우 *V. parahemolyticus* 와 VHSV 감염 시 gill 조직에서 발현량을 조사한 결과 *V. parahemolyticus*의 경우 12시간에서 VHSV의 경우 24시간째에서 약 2배의 발현량을 보였다 (그림 31). 따라서 전복의 RFP 유전자는 박테리아 및 바이러스 감염과 관련되는 면역활성과 관련이 있는 유전자인 것으로 여겨진다.

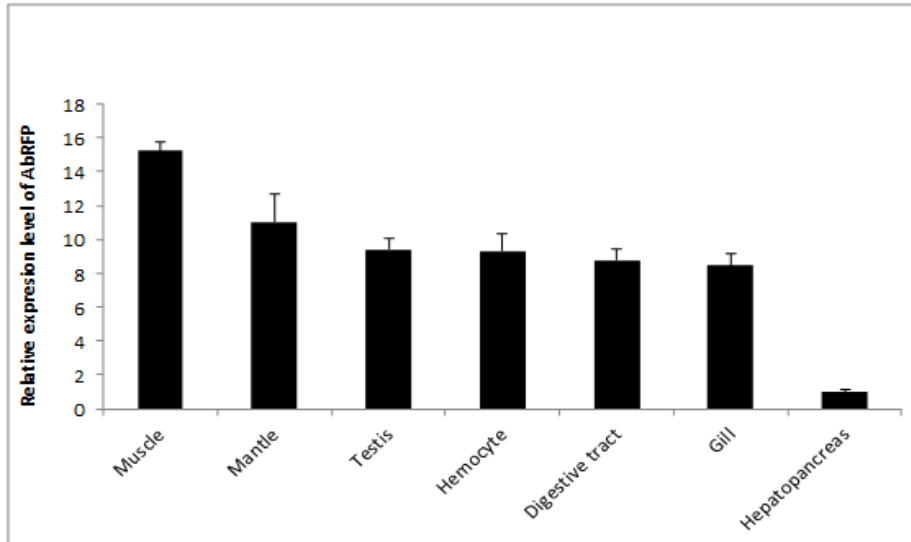


그림 30. 전복 RFP 유전자의 조직별 발현분포

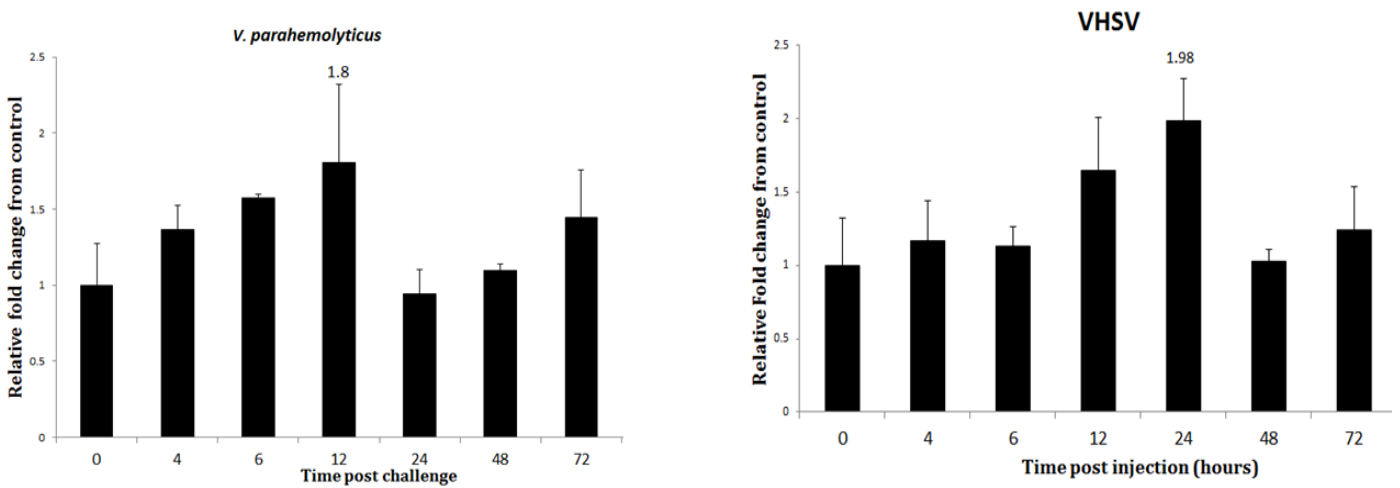


그림 31 . 전복의 gill 조직에서 면역자극에 따른 RFP 유전자의 발현 양상

■ Macrophage migration inhibit factor 1 (MIF-1)

MIF-1 유전자는 mantle에서 가장 높은 발현을 보였고 그 다음 digestive tract, hepatopancreas, gill 순으로 높은 발현양상을 보였다 (그림 32). MIF-1은 선천면역계에 있어 중요한 역할을 하는 대식세포(macrophage)의 이동을 억제하여 감염원을 제거하는데 도움을 주므로 전복의 mantle과 digestive tract 및 hepatopancreas, gill 조직은 감염에 우선적으로 반응하는 선천면역계에 중요한 조직으로 여겨진다. 또한 대부분의 감염원에서 3시간째에 상향조절이 됨을 확인하였다 (그림 33). 따라서 MIF-1 유전자는 병원체 감염에 대해서 매우 급속으로 반응하는 선천면역계 유전자로 여겨진다.

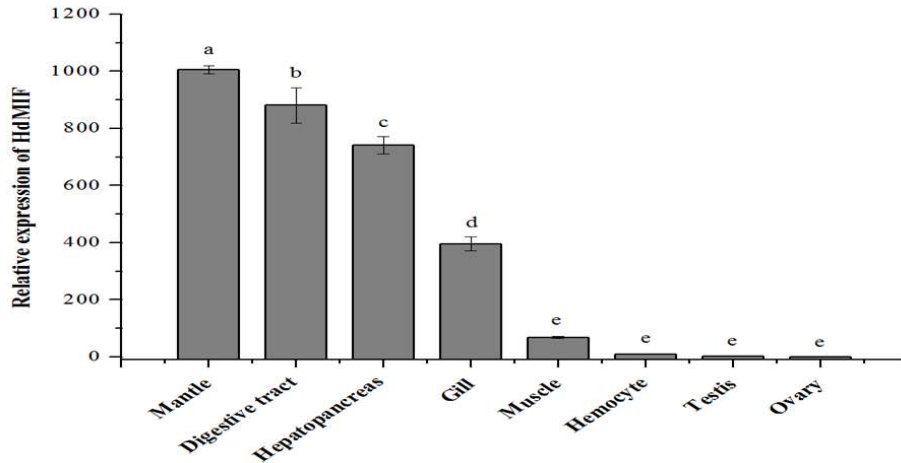


그림 32. 전복 MIF-1 유전자의 조직별 발현분포

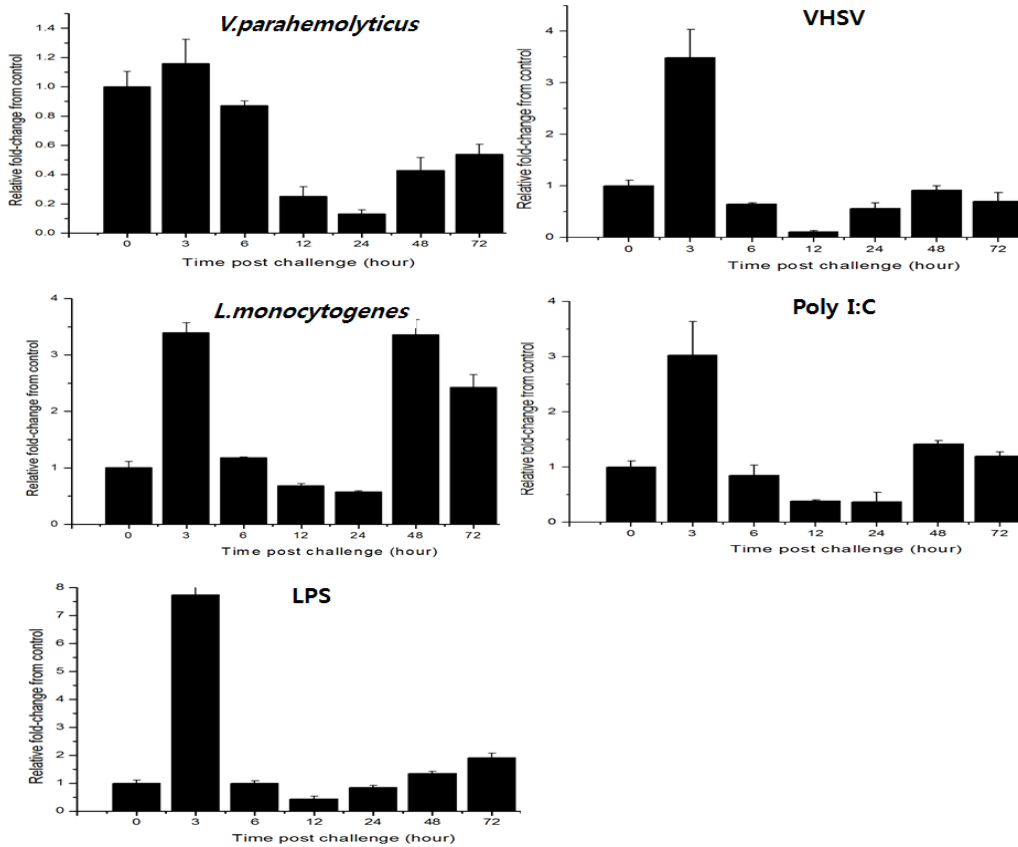


그림 33. 전복 hemocyte 조직에서 면역자극에 따른 MIF-1 유전자의 발현 양상

■ FMRF1 / FMRF2

FMRF1 유전자는 digestive tract에서 가장 높은 발현을 보인 반면 isoform인 FMRF2는 mantle에서 높은 발현을 보였다 (그림 34). FMRF1은 *V. parahemolyticus* 감염에 대하여 하향조절이 되었다 48시간째에 상향조절이 되는 반면, FMRF2는 6시간째에 가장 높은 발현을 보인 후 평형상태로 하향조절이 됨을 관찰하였다. 또한 바이러스인 VHSV감염에서는 FMRF1은 3시간째 상향조절을 보이다 하향조절 후 다시 24시간째 가장 높은 발현을 보인 후 하향조절이 됨을 관찰하였다. FMRF2의 경우 3시간째에 급속으로 높게 발현이 된 후 하향조절이 됨을 관찰하였다 (그림 35).

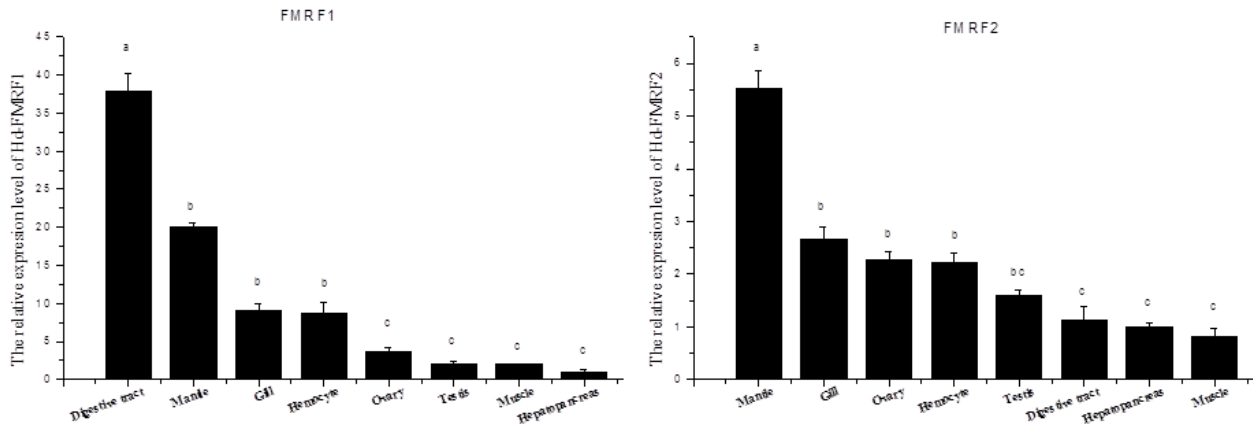


그림 34. 전복 FMRF1 및 FMRF2 유전자의 조직별 발현분포

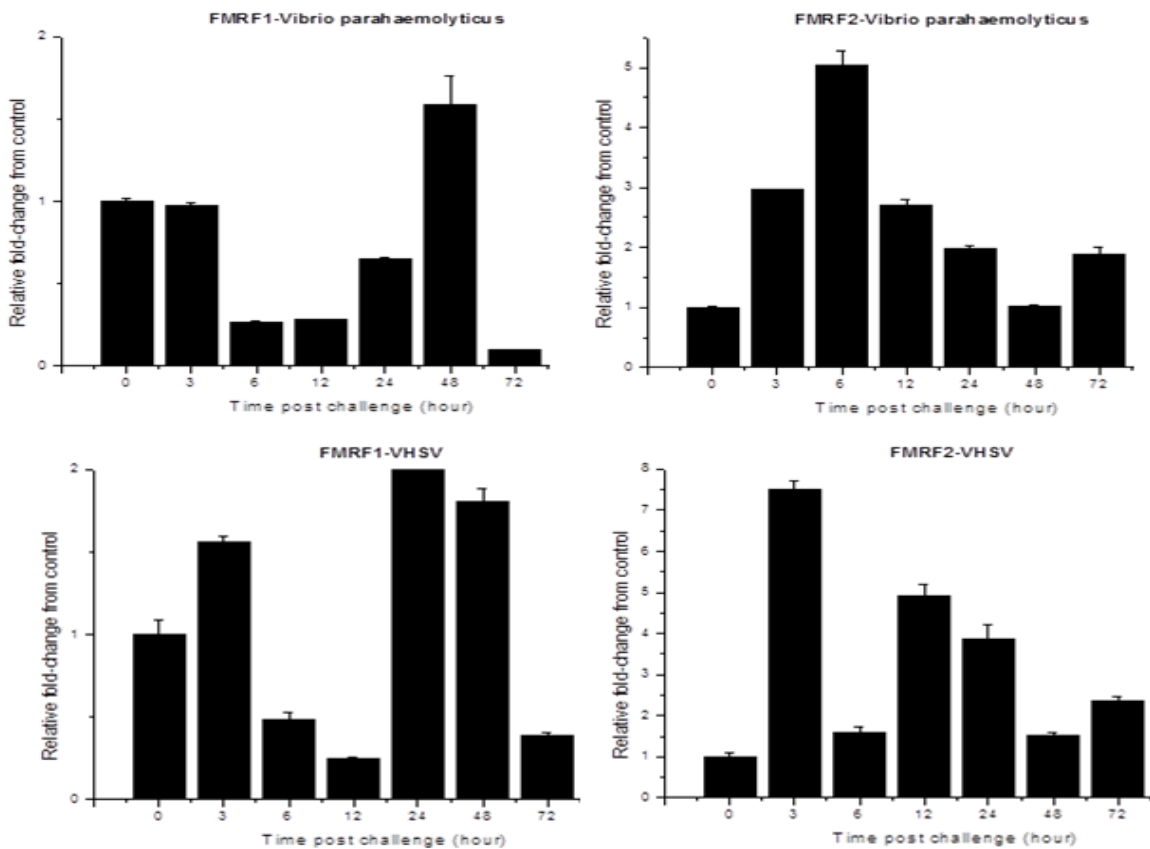


그림 35. 전복 gill 조직에서 면역자극에 따른 FMRF1 및 FMRF2 유전자의 발현 양상

■ Kazal-type serine proteinase inhibitor

전복의 kazal-type serine proteinase inhibitor 유전자는 hepatopancreas에서 유의적으로 가장 높게 발현이 되는 것으로 나타났다 (그림 36). *V. parahemolyticus* 와 VHSV의 감염 시에는 6시간째 급속으로 각각 14.44 배 및 4.5배의 높은 발현을 나타내었다 (그림 37). 따라서 박테리아와 바이러스 감염에 관여하는 면역계에 관여할 것으로 보인다.

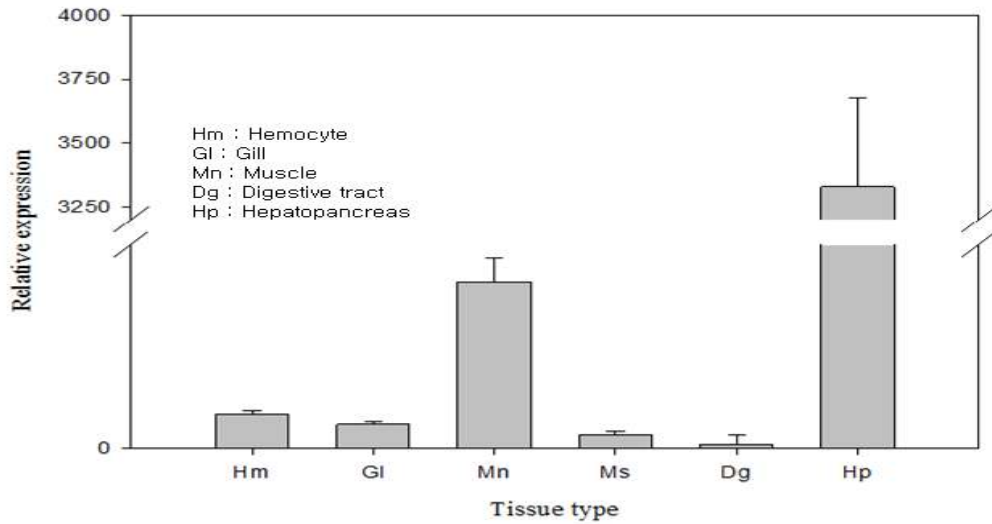


그림 36. 전복 kazal-type serine proteinase inhibitor 유전자의 조직별 발현분포

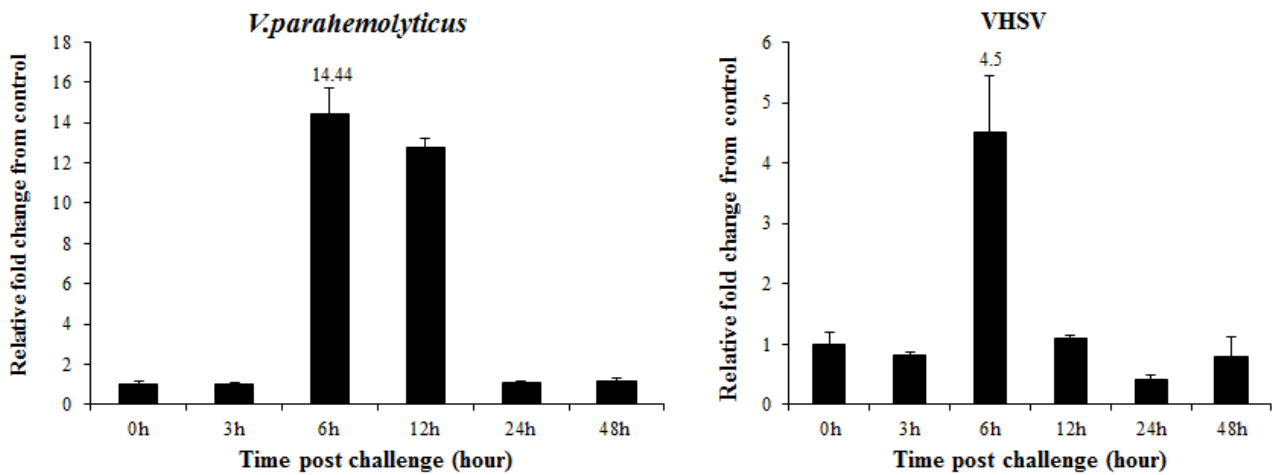


그림 37. 전복 gill 조직에서 면역자극에 따른 kazal-type serine proteinase inhibitor 유전자의 발현 양상

■ Chicken type lysozyme (c-type lysozyme) 1, 2

전복 c-type lysozyme 1의 경우 mantle에서, c-type lysozyme 2의 경우 hepatopancrease에서 높은 발현을 나타내어 c-type lysozyme family임에도 다른 조직발현분포를 보였다 (그림 28). 또한 c-type lysozyme 1의 경우 gill 조직에서 *V. parahemolyticus*의 감염에 가장 높은 발현을 보이는 반면 (그림 29), c-type lysozyme의 경우 LPS 와 VHSV의 감염시에 가장 높은 발현을 보였다 (그림 30).

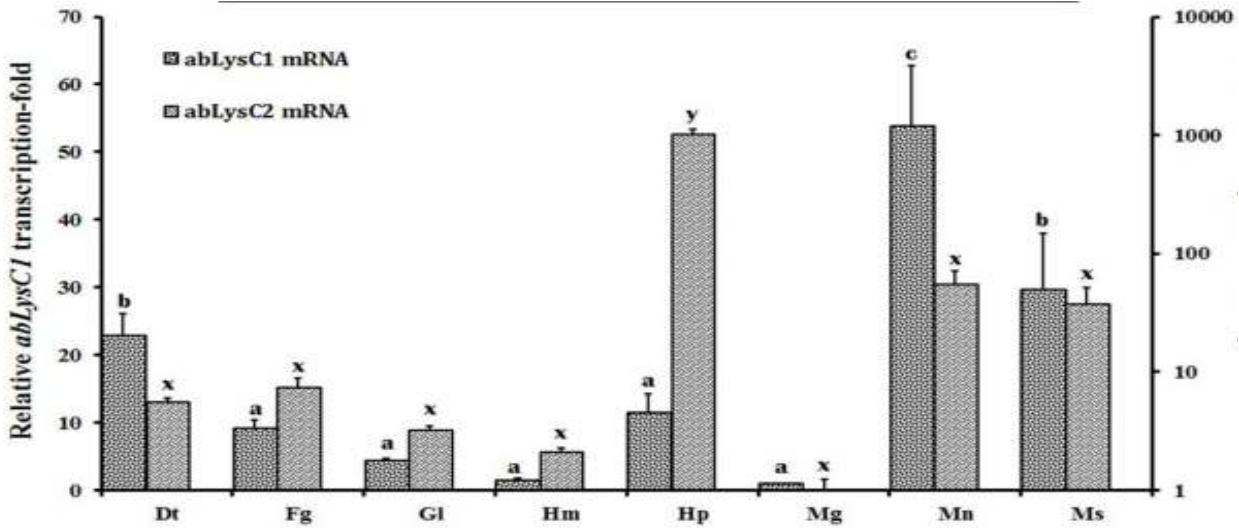


그림 28. 전복 c-type lysozyme 1 (abLysC1) 및 c-type lysozyme 2 (abLysC2) 유전자의 조직별 발현분포

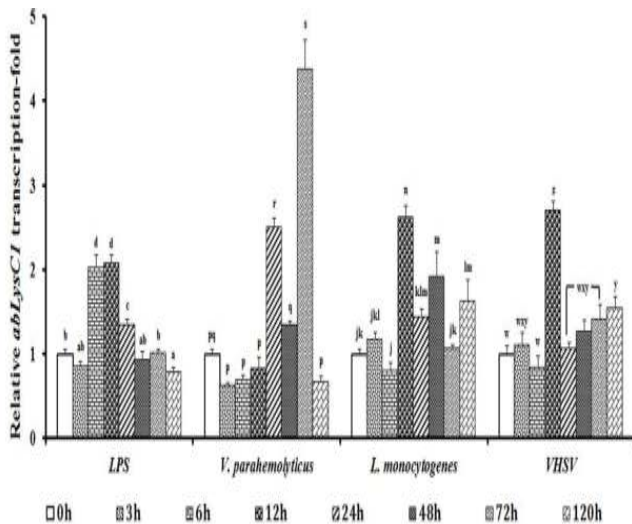


그림 29. 전복 gill 조직에서 면역자극에 따른 c-type lysozyme 1 유전자의 발현 양상

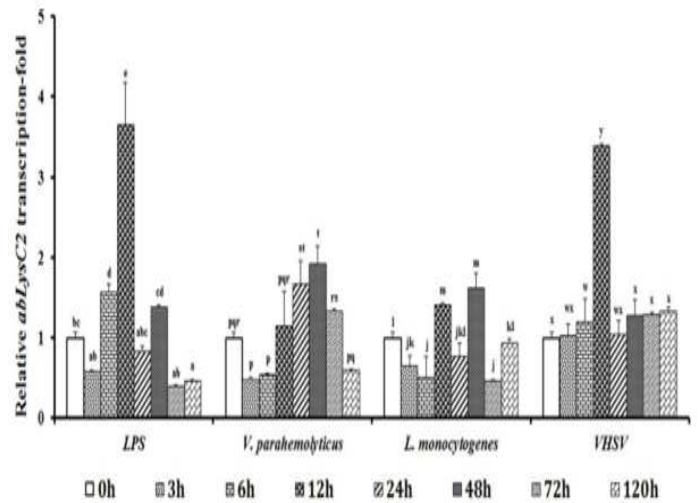


그림 30. 전복 gill 조직에서 면역자극에 따른 c-type lysozyme 2 유전자의 발현 양상

■ Peptidoglycan recognition protein (PGRP)

전복의 PGRP 유전자는 Digestive tract 및 hemocyte에서 가장 높은 발현을 보였다 (그림 31). 또한 PGRP는 박테리아의 표면을 인식하여 분해하는 것을 알려졌는데 박테리아(*L. monocytogenes*) 및 박테리아 유래 물질인 LPS 자극 실험에서 6시간째 급속으로 발현하는 것을 관찰하였다 (그림 32). 따라서 전복의 PGRP는 박테리아 감염 시 선천면역계에 관여하는 유전자로 여겨진다.

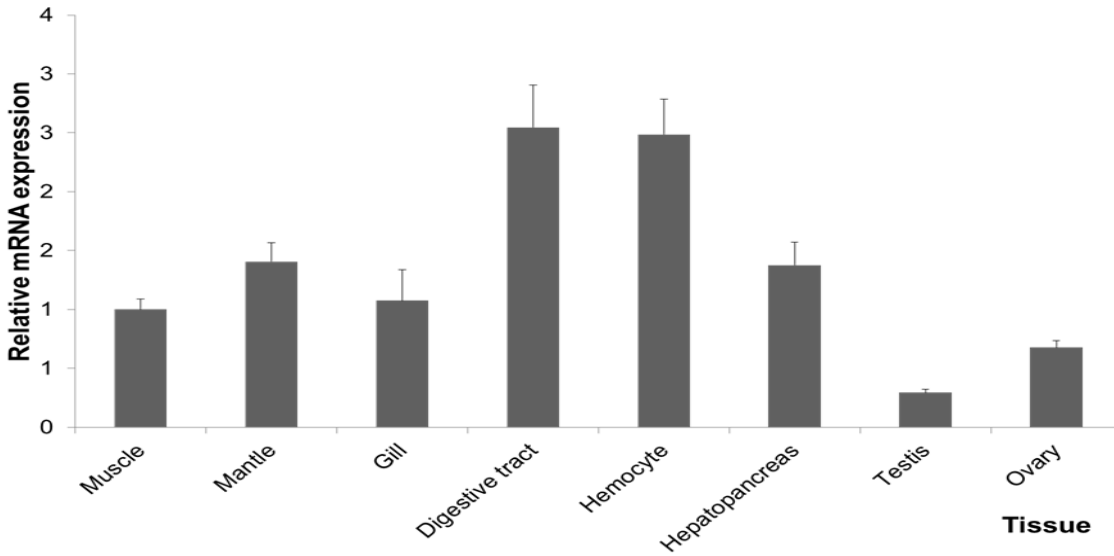


그림 31. 전복 PGRP 유전자의 조직별 발현분포

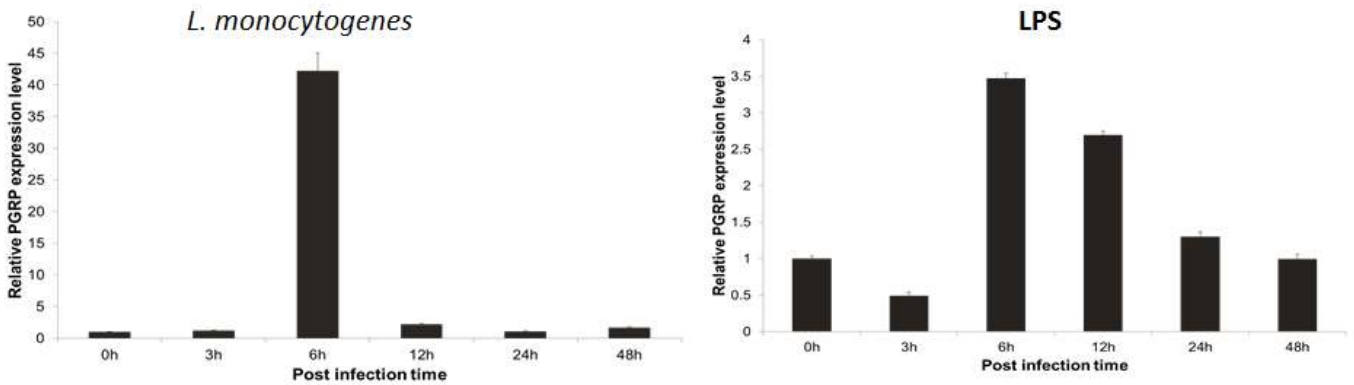


그림 32. 전복의 gill 조직에서 면역자극에 따른 PGRP 유전자의 발현 양상

■ IkappaB

전사인자인 NF- κ B를 조절하는 인자인 IkappaB는 전복에서 muscle과 mantle에서 가장 높은 발현을 보였다 (그림 33). 면역자극실험에서는 대부분의 감염에 대해 상향조절이 됨을 관찰하였는데 특히 박테리아 *V.parahemolyticus* 및 박테리아 유래 물질인 LPS에서 급속으로 높게 발현이 되는 것을 확인할 수 있었다 (그림 34). 특히 IkappaB는 LPS를 인식하는 TLR4의 downstream에 있는 것으로 알려져 전복의 IkappaB 역시 박테리아 감염에 관련되는 면역계에 역할을 하는 것으로 보인다.

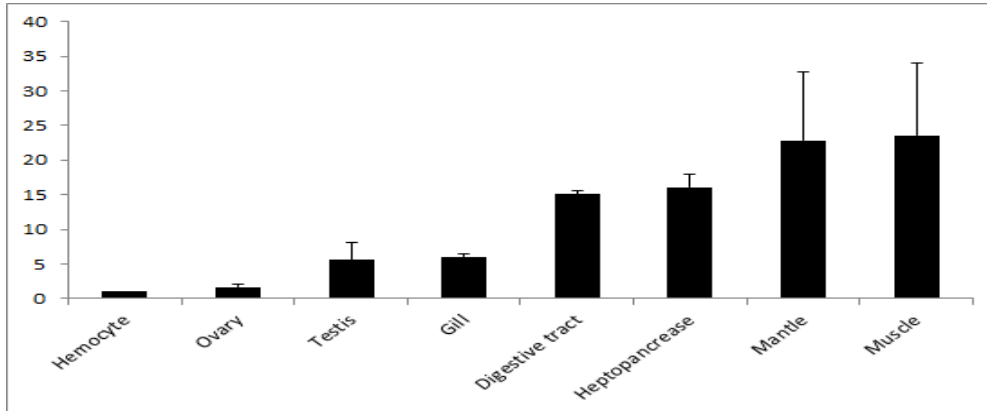


그림 33. 전복 IkappaB 유전자의 조직별 발현분포

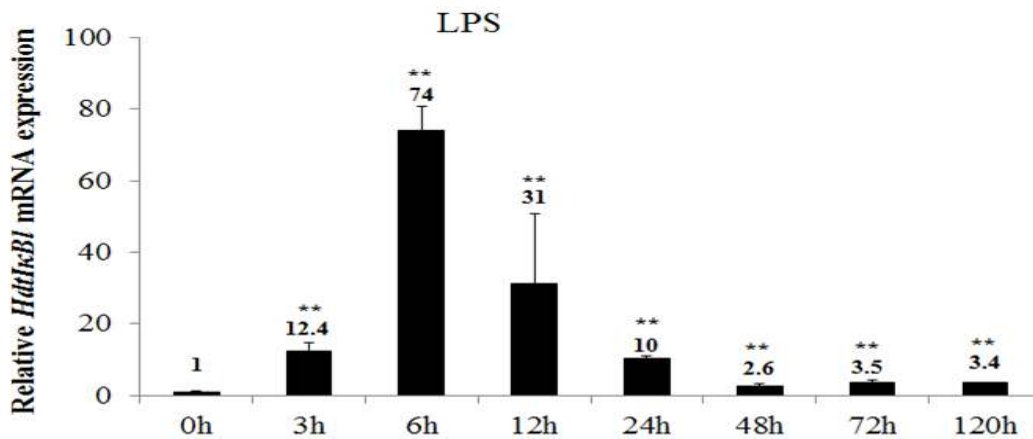
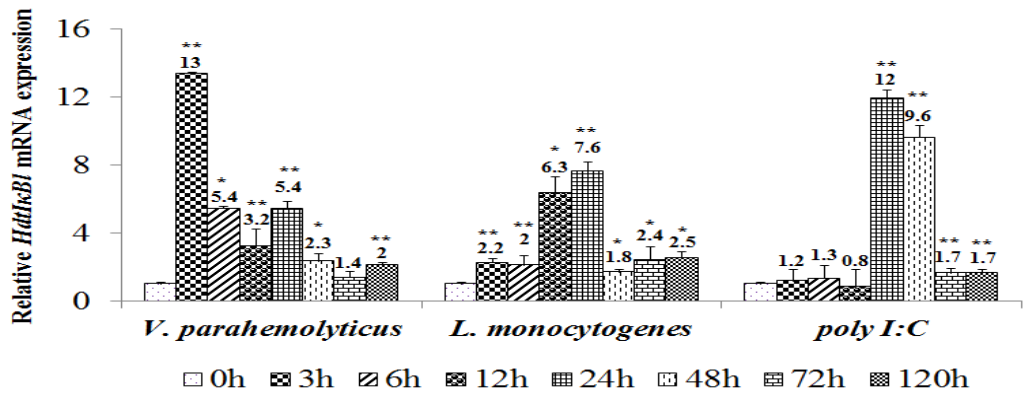


그림 34. 전복의 hemocyte 조직에서 면역자극에 따른 IkappaB 유전자의 발현 양상

■ Macrophage expressed protein (MEP)

면역계에 중추적으로 작용하는 세포인 macrophage는 다양한 면역을 자극하는 물질을 분비한다. 그 중 하나인 MEP는 맨틀과 간체장, 정소, 근육 순으로 높게 발현하는 것으로 나타났다 (그림 35). 아가미 조직을 이용한 면역자극에 따른 유전자 발현 양상 조사에서는 대부분 시간에 따른 상향 조절이 나타남이 조사되었고, 특히 *V. parahemolyticus* 감염 24시간째에 가장 높은 발현을 하는 것으로 나타났다 (그림 36). 따라서 MEP는 대부분의 면역자극 중 특히 박테리아 감염에 유의적으로 반응하여 면역계에 관여하는 것으로 여겨진다.

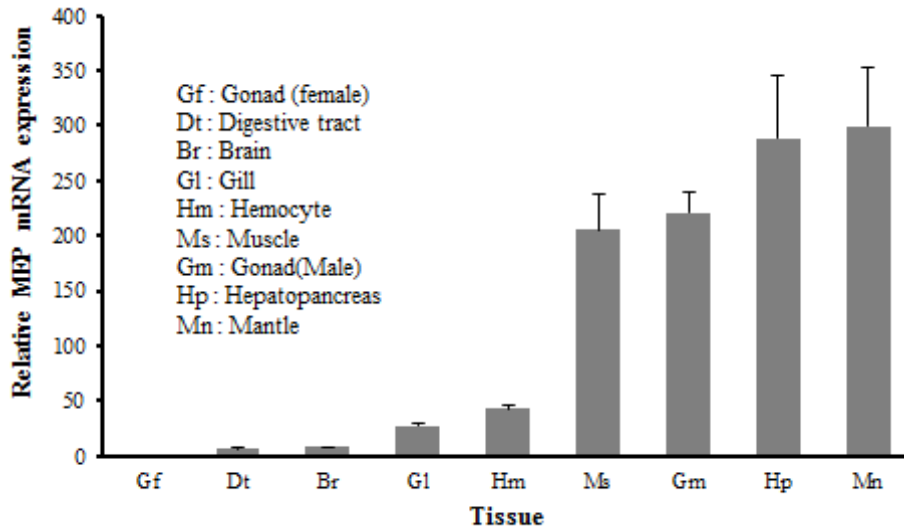


그림 35. 전복 MEP 유전자의 조직별 발현분포

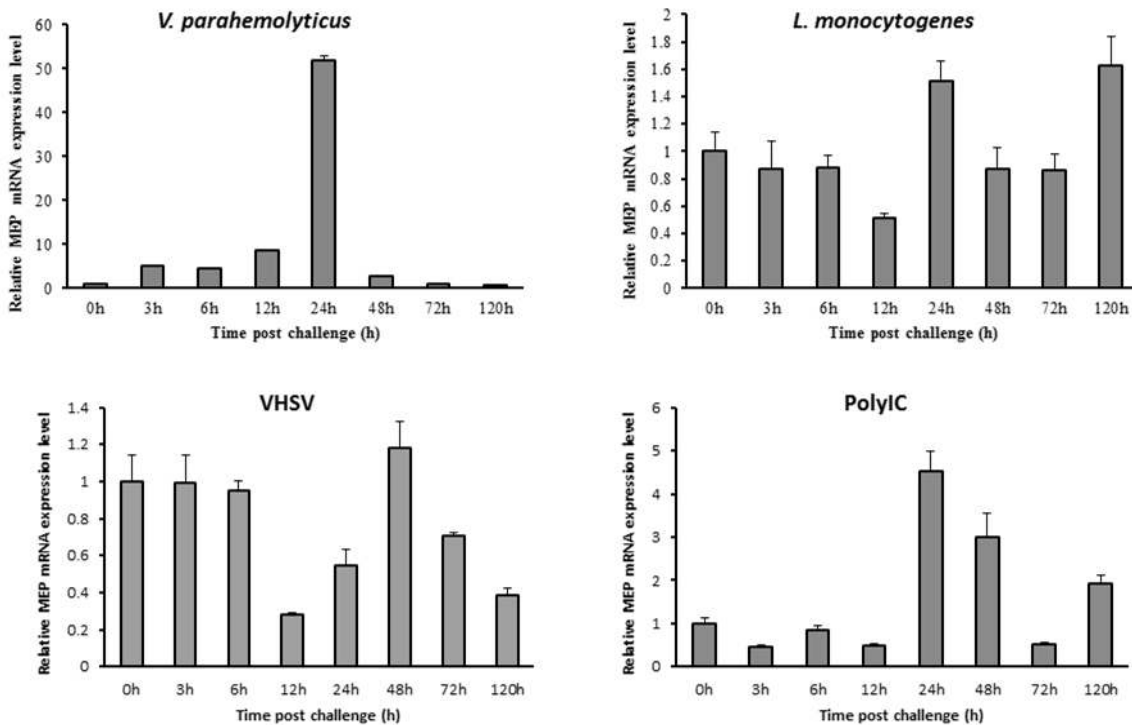


그림 36. 아가미 조직에서 면역자극에 따른 MEP 유전자의 발현 양상

■ Serine protease inhibitors (serpin)

Serpin 유전자는 serine protease inhibitors가계에 속하는 유전자로 면역계에서 호르몬 전달 및 종양억제에 관여를 한다. 전복에서 유래한 serpin 유전자는 hemocyte에서 가장 높게 발현하는 것으로 나타났고 (그림 37), 아가미 조직을 이용한 면역자극실험에서는 박테리아와 바이러스 감염 시 모두 시간에 따른 상향조절과 하향조절이 나타남을 확인하였다 (그림 38).

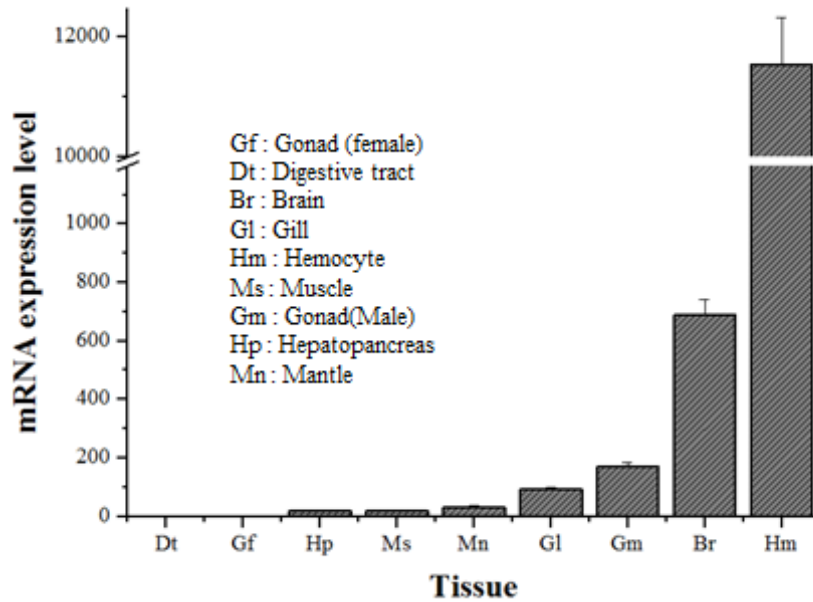


그림 37. 전복 serpin 유전자의 조직별 발현분포

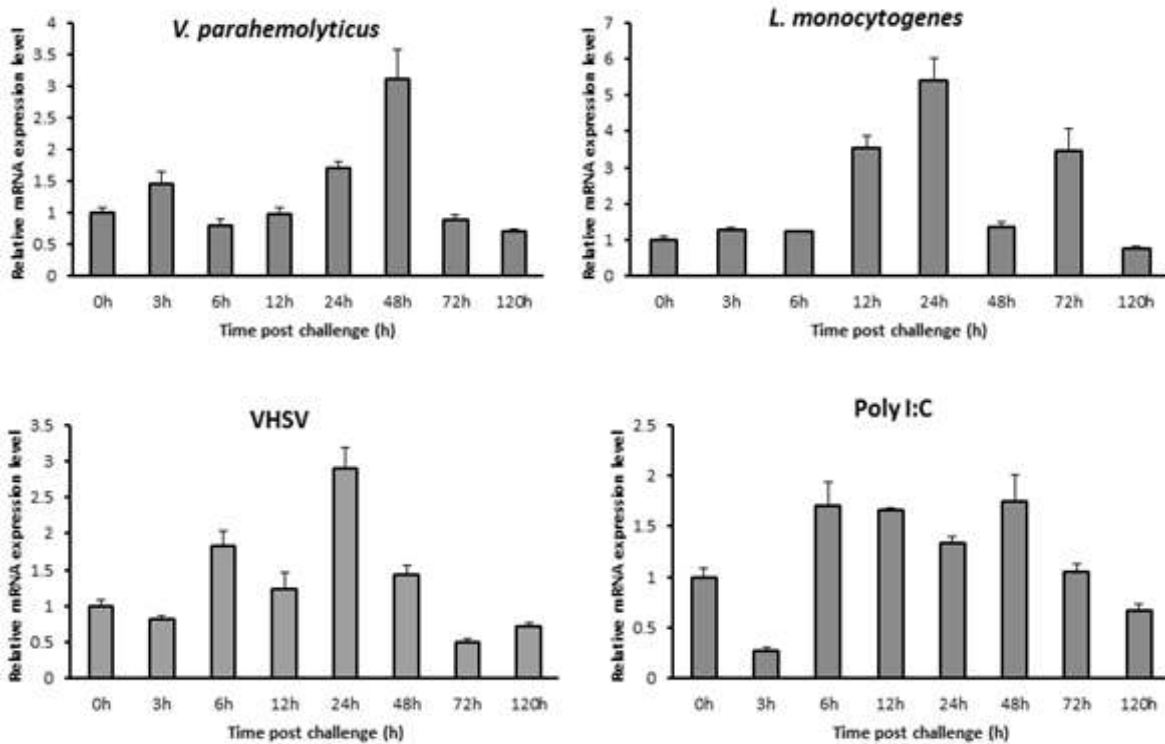


그림 38. 전복 아가미 조직에서 면역자극에 따른 serpin 유전자의 발현 양상

4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

가. 연구목표의 달성도

수행 연차	목 표	달성도	내 용
1차년도	까막전복의 면역, 생리적, 화학적 스트레스에 반응하는 유전자의 전사활성 유도	100 %	<p>목표치인 바이러스 1종 (VHSV), 박테리아 3종 (<i>V. alginolyticus</i>, <i>V. parahemolyticus</i>, <i>L. monocytogenes</i>), 기생충 1종 (scuticociliate)를 이용한 면역 반응유도 실험을 목표로 하였고, 당초 목표치로 설정한 위의 병원미생물을 이용하여 면역반응 유도를 하였다.</p> <p>합성 면역 자극 물질을 이용한 면역 반응 유도 당초 목표인 Poly I:C와 LPS를 이용한 면역 반응 유도를 수행하였다.</p> <p>당초 목표한 수은, 염분, 중금속, 및 내분비 교란물질에 대한 노출 실험을 수행하였다.</p>
	GS-FLX titanium을 이용한 cDNA의 염기서열 분석	100 %	<p>GS-FLX system을 이용하여 cDNA 염기서열을 분석하여 3개 그룹의 cDNA를 각각 500,000개 이상의 reads를 확보하여 총 1,500,000 reads를 분석하고자 하였다. GS-FLX sequencing 한 결과 Hemocyte와 gill 그룹에서는 383,934개, digestive와 hepatopancreas를 섞은 그룹에서는 594,311개, 그리고 마지막으로 mantle, muscle과 gonad를 섞은 그룹에서는 615,257개의 reads가 분석되어, 전체적으로 1,593,772개의 reads가 분석되어 목표치인 150만 reads보다 많은 양의 reads가 분석되었다. 추가적으로 Solexa Hiseq를 이용하여 12 Gb의 염기서열을 확보하였으며 assembly 결과 595천개의 contig를 확보할 수 있었다. 200 bp이상의 contig 102천개의 contig를 이용하여 Blast를 수행하여 보다 많은 발현유전자를 분석하고자 노력하였다.</p>
2차년도	15K 이상의 전복 oligonucleotide chip 제작	100 %	<p>기존의 EST data와 1차년도에 GS-FLX sequencing으로 확보한 data를 복합적으로 분석하여 34,771개의 transcript를 확보하였고 이를 이용하여 135K oligonucleotide chip (12x135K)을 제작하였다.</p>
	면역관련 유전자와 중금속 및 내분비 교란물질에 반응하는 유전자의 확보를 위한 면역반응 및 화학물질에 대한 반응 유도	100 %	<p>바이러스 1종, 박테리아 1종, Scuticociliate 1종, Poly I:C, LPS, 중금속, 내분비 교란물질 등 총 7가지 면역 유도 실험을 수행하고자 계획하였다. 당해연도 연구에서 바이러스 (VHSV), 박테리아 2종 (<i>Listeria monocytogenes</i> (Gram +), <i>Vibrio parahemolyticus</i> (Gram -), Scuticociliate (<i>Miamiensis avidus</i>), poly I:C, LPS, cadmium, TBT 등 8가지 물질을 처리하여 면역반응을 유도하였으며 3, 6, 12, 24, 48, 72, 120시간 후 hemocytes, gill, mantle, digestive tract, hepatopancreas, gonad를 적출하였다.</p>
	15K oligonucleotide chip을 이용한 microarray 실험 및 분석	100 %	<p>8개의 면역유도물질을 주입한 전복과 대조구로 0.9% saline이 주사된 전복으로부터 6시간 및 24시간째에 아가미 조직을 적출하고 RNA를 분리하였다. 이를 이용하여 다음의 15개의 조합으로 135K oligonucleotide chip을 이용한 발현변화 분석을 수행하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bacteria mixture 6h/saline 24h - Bacteria mixture 24h/saline 24h - VHSV 6h & 24h/saline 24h - Scuticociliates 6h/saline 24h - Scuticociliates 24h/saline 24h

			<ul style="list-style-type: none"> - Poly I:C 6h/saline 24h - Poly I:C 24h/saline 24h - LPS 6h/saline 24h - LPS 24h/saline 24h - Cadmium 6h & 24h/saline 24h - TBT 6h & 24h/saline 24h - Bacteria mixture 24h/bacteria mixture 6h - Scuticociliates 24h/scuticociliates 6h - Poly I:C 24h/poly I:C 6h - LPS 24h/LPS 6h
3차년도	Microarray 분석으로 확보한 면역관련 유전자의 full-length cDNA 클로닝 (50개 이상)	100 %	GS-FLX data를 기반으로 하여 full-length 혹은 partial 염기서열을 이용한 클로닝할 유전자의 primer를 제작하여 RACE등을 이용하여 총 51개의 면역관련 유전자의 full-length의 염기서열을 획득하였다.
	대장균의 발현 시스템을 이용한 면역관련 유전자의 재조합 단백질 생산 및 특성 분석 (5건 이상)	100 %	<p>pET, pMAL 벡터의 발현시스템을 이용한 재조합 단백질의 생산 및 기존에 확립된 <i>in vitro</i> 분석 방법을 이용하여 총 6개의 재조합 단백질의 bioactivity의 특성을 분석하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • PGRP 단백질 : 세균성장억제실험 • G-type 및 i-type lysozyme 단백질 : pH 및 온도에 따른 항균활성실험 • C-type lysozyme 1,2 단백질 : 세균성장억제실험 • Cytatain B : 단백질분해억제실험
	Real-time PCR을 통한 면역관련 유전자 발현 분석 (5건 이상)	100 %	<p>7개의 전복조직으로부터 얻어낸 total RNA로부터 cDNA를 합성하여 조직별로 총 15개의 면역관련유전자의 발현양상을 확인하였다. 또한 다양한 면역원 자극에 따른 유전자 발현양상을 시간대별로 확인하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 조직 <ul style="list-style-type: none"> - gill - mantle - muscle - digestive tract - hepatopancreas - hemocytes - gonadal tissue(male, female) • 시간 : 0, 3, 6, 12, 24, 48(최소) 72, 120(최대)시간 • 면역원 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Listeria monocytogenes</i> (1 x 10⁴ CFU/abalone) - <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1 x 10⁴ CFU/abalone) - viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV; 1 x 10⁸ PFU/abalone) - polyinosinic polycytidylic acid (poly I:C; 500 µg/abalone) - Lipopolysaccharide (LPS; 500 µg/abalone) • 유전자 (총 15개)

			<ul style="list-style-type: none"> - TLR - IkappaB - Matrix metallo proteinase - c-type lysozyme1 - c-type lysozyme2 - g-type lysozyme - Ras family protein - i-type lysozyme - MIF-1 - FMRF1 - FMRF2 - Kazal-type serine proteinase inhibitor - PGRP - Serpin - Macrophage expressed protein (MEP)
--	--	--	--

나. 관련분야에의 기여도

(1) 학문적, 인력양성 측면

- 기존에 연구된 무척추동물을 이용하여 연체동물의 면역과 스트레스 반응에 대한 이해를 하기에는 아직 부족한 부분이 많기 때문에, 더 많은 유전적 정보를 얻기 위한 노력이 필요하다. 이 연구과제를 통해 도출되는 유전학적 data는 무척추동물부터 척추동물까지의 면역체계의 진화적 연관성 연구에도 큰 도움이 될 것이다.
- 치패시기부터 성체까지 각 성장 단계에서 발현되는 유전자의 검색과, 발현되는 유전자들의 생리적 기능을 밝히기 위한 연구가 필요하지만, 분자유전학에 기초한 전복의 발생과정 연구는 현재까지도 미비한 실정이다. 이 연구를 통해서 구축되는 유전정보를 통해서 전복 생활사의 중요 단계별 유전자 발현 양상을 확인할 수 있으며, 제작된 oligonucleotide chip은 전복의 먹이섭식, 소화 효소활성 등과 관련된 먹이습성과 영양학적 생리현상의 연구에도 응용될 수 있을 것이다.
- 본 연구는 포스닥 1명, 박사과정생 2명, 석사과정생 2명이 수행하였다. 포스닥 1명은 본 연구실에서 2010년 2월 박사학위를 취득한 학생으로 20 여 편의 논문을 발표하여 졸업식에서 최우수 논문상을 수상하기도 하였다. 이 학생은 전복을 이용한 분자생물학적 실험 경험이 풍부하여 박사과정생과 석사과정생의 실험을 도와 이 과제를 성공적으로 이끌어 수행하였다.

(2) 기술적, 경제·산업적 측면

- 본 연구를 토대로 새로이 발견된 유용 유전자들은 그 분류군에 따라 항암, 항산화, 면역기능 강화 등의

단백질을 생산하는데 쓰일 수 있으며, 이는 의약품, 식품, 화장품 등의 산업에 적용이 가능하다.

- 면역반응 기작에 관련된 유전학적 자료를 바탕으로 전복양식에서 문제가 되고 있는 질병들에 대한 효과적인 치료와 예방에 대한 방법을 개발함으로써 전복양식의 생산량의 증가와 함께 전복양식의 경쟁력 또한 상승 시킬 수 있을 것이다.
- 다양한 유전자의 기능을 분석함으로써 병원체와 환경 스트레스로부터 방어하는 우수한 유전적 형질을 갖는 전복의 선별을 가능하게 하고, 이러한 선별을 통한 유전육종을 통하여 다양한 병원균과 스트레스에 높은 저항성을 가질 뿐만 아니라 성장속도가 빠른 전복의 안정적인 생산을 가능하게 할 것이다.
- 해양 무척추동물의 면역체계 및 스트레스에 의한 방어체계에 대한 연구가 전 세계적으로 미약한 수준이기 때문에 우수 기술을 먼저 선점할 수 있고, 이에 대한 연구 수행 결과는 양식종인 전복, 굴 등을 포함하는 다양한 무척추 동물의 질병 원인 규명 및 치료 등에 활용할 수 있다.

5. 연구결과의 활용계획

- 이 연구를 통해 확보한 면역관련 유전자의 염기서열 상동성 부위를 이용해 유전정보가 부족한 무척추동물의 유사 유전자를 클로닝하기 위한 염기서열을 제공할 수 있다.
- 바이러스, 박테리아, 기생충과 같은 면역반응을 활성화시키는 병원성 생물에 대한 면역반응 메카니즘 연구를 위한 다양한 신호전달 관련 유전자를 확보할 수 있다.
- Respiratory burst-phagocytosis activities, proPO activating, lectin agglutinin 등과 같은 선천면역연구를 위한 biomarker 유전자를 선택하여 사용할 수 있다.
- 135K oligonucleotide chip은 면역조절자에 의해 활성화된 생물의 면역반응을 유전자 수준에서 분석할 수 있게 하며, 해양환경을 모니터링하는 환경독성학 연구에 응용할 수 있다.
- 아직까지 밝혀지지 않은 전복의 유용한 유전자를 발굴하였으며, 이를 이용한 유용단백질을 산업적으로 사용할 수 있다.
- 본 연구과제의 결과를 통해서 전복과 다른 무척추동물 간의 생체방어시스템을 비교 분석하여 다양한 무척추동물의 생체방어시스템에 대한 이해를 높일 수 있다.
- 적당한 양의 면역자극물질은 질병에 대한 내성을 증가시켜 줄 수 있는 유용한 방법으로 사용될 수 있다. 이 연구에서 사용된 합성 면역 조절자 (IFN, LPS, PolyI:C)에 의한 면역 조절은 전복 면역 시스템의 강화를 유도 할 수 있으며, 면역 조절에 의한 효과는 유전 육종을 위한 질병과 스트레스에 대해서 높은

저항성을 나타내는 전복의 선별을 위한 유용한 기술로 사용 될 수 있다.

- 전복 면역유전자의 기능과 발현조건, 질병방어체계 메커니즘을 규명함으로써 전복 양식에 있어서 면역 시스템을 활성화시키는 정보를 제공하고, 이를 통해 분자유전학적 접근의 양식기술을 도입할 수 있다.
- 이 연구의 결과는 전복양식과 다른 무척추생물 양식 산업에 널리 응용이 가능하며 양식생물의 분자 수준적 면역체계에 대하여 이해하게 됨으로써 양식생물의 질병을 효과적으로 통제 및 관리할 수 있는 시스템 개발에 응용될 수 있다.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

※ 기 추진한 연구 관련 해외과학기술정보 기술

7. 주관연구책임자 대표적 연구실적

번호	논문명/특허명/기타	소속기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	논문게재일 /특허등록일	특기사항 (SCI여부)
1	First molluscan transcription factor activator protein-1 (Ap-1) member from disk abalone and its expression profiling against immune challenge and tissue injury	제주대학교	교신저자	Fish & Shellfish Immunol.	2010.12.01	SCI
2	Molluscan death effector domain (DED)-containing caspase-8 gene from disk abalone (Haliotis discus discus): Molecular characterization and expression analysis	제주대학교	교신저자	Fish & Shellfish Immunol.	2011.02.01	SCI
3	Transcriptional analysis of disk abalone (Haliotis discus discus) antioxidant enzymes against marine bacteria and virus challenge	제주대학교	교신저자	Fish & Shellfish Immunol.	2011.07.01	SCI
4	Molecular and functional characterization of HdHSP20: A biomarker of environmental stresses in disk abalone Haliotis discus discus	제주대학교	교신저자	Fish & Shellfish Immunol.	2012.07.01	SCI
5	Genomic characterization and expression profiles upon bacterial infection of a novel cystatin B homologue from disk abalone (Haliotis discus discus)	제주대학교	교신저자	Develop. Comp. Immunol.	2012.12.01	SCI

※ 대표연구실적은 총 연구기간 중 발표(게재확정 포함)된 대표적 연구실적(논문, 특허 등)을 5건 이내로 기재

※ 소속기관명 : 연구성과 발표 시 소속된 기관명을 기재

※ 역할 : 논문의 경우만 작성하며 제1저자, 교신저자, 참여저자 중 선택하여 기재

- ※ 특허등록국가 : 특허를 등록한 국가명을 한글로 기재(예시, 대한민국, 미국, 일본 등)
- ※ 특기사항에는 인용횟수나 우수논문수상 등과 같이 특별히 기술 할 필요가 있는 사항을 기재
- ※ 상기의 대표적 논문 및 특허 등록에 대한 내용은(별첨1:대표연구업적) 서식에 따라 요약문을 작성

8. 참고문헌

※ 보고서 작성 시 인용된 모든 참고 문헌을 열거

- Hooper C, Day R, Slocombe R, Handler J, Benkendorff K. 2007. Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol* 22:363-79.
- Loker ES, Adema CM, Zhang SM, Kepler TB. 2004. Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol Rev* 198:10-24.
- Mydlarz LD, Jones LE, Harvell D. 2006. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:251-88.
- Iwanaga S, Lee BL. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* 38:128-50.
- Saavedra C, Bachere E. 2006. Bivalve genomics. *Aquaculture* 256:1-14.
- Hedgecock D, Gaffney PM, Gouletquer P, Guo X, Reece K, Warr GW. 2005. The case for the sequencing the Pacific oyster genome. *J Shellfish Res* 24:429-42.

9. 연구성과

- ※ 연구성과는 먼저 연구마루 성과관리시스템(<http://maru.nrf.re.kr>)에 논문, 특허 등의 성과를 입력한 후 한글화일로 다운받아 그대로 붙이거나 글자크기 등을 편집하여 첨부함
 - 첨부된 성과관리시스템 메뉴얼 참조
 - 성과발생 시마다 지속적으로 성과관리시스템에 입력 요망(추후 조분평 또는 기타 연구보고서 제출 자료로 활용 가능)
 - 모든 연구성과는 연구개시일 이후에 이루어진 것만 인정
 - 논문은 acknowledgement와 과제번호가 기재된 실적만 인정
- ※ accepted/in press인 논문은 필요하다고 판단되면 추가로 작성가능

사업명	핵심개인연구	연구책임자	이제희	주관기관	제주대학교
과제번호	2010-0014481	과제명	까막전복(Haliotis discus discus)의 선천성 면역반응 기작 연구		

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)													
전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
0	0	8	0	0	3	17	0	0	0	0	0	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)							
학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
1	1	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)						
과학자교류		국제협력기반			학술회의개최	
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	국내	국제
0	0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)							
기술확산				연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)			
기술실시계약	기술이전	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용
0	0	0	0	0	0	0	0

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2010-00 14481	201012	First molluscan transcription factor activator protein-1 (Ap-1) member from disk abalone and its expression profiling against immune challenge and tissue injury	D e e Z o y s a , Mahanam a ; Nikapitiya, Chamilani; L e e , Youngdeu k; Lee, Sukkyoung; Oh, Chulhong; Whang, Ilson ; Y e o , Sang-Yeop; Choi, Cheol Young; L e e , Jehee;	직접입력	FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY	29(6)	국외	SCI등재	2.89	아니오	100
2010-00 14481	201102	Molluscan death effector domain (DED)-containing caspase-8 gene from disk abalone (Haliotis discus discus): Molecular characterization and expression analysis	L e e , Youngdeu k; De Z o y s a , Mahanam a ; Whang, Ilson ; L e e , Sukkyoung; Kim, Yucheol; O h , Chulhong; C h o i , C h e o l Y o u n g ; Y e o , Sang-Yeob; Lee, Jehee;	직접입력	FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY	30(2)	국외	SCI등재	3.04	아니오	70
2010-00 14481	201107	Transcriptional analysis of disk abalone (Haliotis discus discus)	D e e Z o y s a , Mahanam a ;	직접입력	FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY	31(1)	국외	SCI등재	3.04	아니오	75

		antioxidant enzymes against marine bacteria and virus challenge	Whang, Ilson; Nikapitiya, Chamilani; Oh, Chulhong; Choi, Cheol Young; Lee, Jehee;								
--	--	---	---	--	--	--	--	--	--	--	--

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2010-00 14481	201204	Mitochondrial thioredoxin-2 from Manila clam (<i>Ruditapes philippinarum</i>) is a potent antioxidant enzyme involved in antibacterial response	Umasuthan, Navaneethaier; Revathy, Kasthuri Saranya; Lee, Youngdeuk; Whang, Ilson; Lee, Jehee;	직접입력	FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY	32(4)	국외	SCI등재	3.04	아니오	70
2010-00 14481	201206	cDNA microarray analysis of disk abalone genes in gills and hemocytes after viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) challenge	De Zoysa, Mahanama; Nikapitiya, Chamilani; Oh, Chulhong; Whang, Ilson; Shin, Hyun-Jin; Lee, Jehee;	직접입력	FISH & SHELLFISH IMMUNOLOGY	32(6)	국외	SCI등재	3.322	아니오	70
2010-00 14481	201207	Molecular and functional characterization of HdHSP20: a sensitive indicator of environmental stresses in disk	Qiang Wan; Ilson Whang; Jehee Lee	직접입력	fish & shellfish immunology	33(1)	국외	SCI등재	3.322	아니오	100

		abalone Haliotis discus discus									
2010-00 14481	201210	Ferritin H-like subunit from Manila clam (Ruditapes philippinarum): Molecular insights as a potent player in host antibacterial defense	K i m , Hyowon; Elvitigala, D o n Anushka Sandaruw an; Lee, Youngdeu k; Lee, Sukkyoun g ; Whang, I l s o n ; L e e , Jehee;	직접 입 력	FISH & SHELLFISH IMMUNOLO GY	33(4)	국외	SCI등재	3.322	아니오	100

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2010-0014481	201212	Genomic characterization and expression profiles upon bacterial infection of a novel cystatin B homologue from disk abalone (Haliotis discus)	Premachandra, H. K. A.; Wan, Qiang; Elvitigala, Don Anushka Sandaruwan; De Zoysa, Mahanama; Choi, Cheol Young; Whang, Ilson; Lee, Jehee;	직접입력	DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOLOGY	38(4)	국외	SCI등재	3.268	아니오	70

학술대회 논문발표 성과정보

과제번호	발표연월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2010-0014481	201011	한국수산과학총연합회 공동학술 발표대회	Qiang Wan, Yucheol Kim, Sukkyoung Lee, Jehee Lee	Cloning and expression analysis of sex determination genes in disk abalone Haliotis discus discus	국내학술대회	대한민국
2010-0014481	201105	2011년도 춘계 한국어병학회 학술발표회	Qiang Wan; W. D. N. Wickramaarachchi; Premachandra Ajith; Jehee Lee	Characterization of disk abalone glutathione synthetase: a sensitive indicator of environmental stresses	국내학술대회	대한민국
2010-0014481	201109	The 7th KSMB Annual Meeting & International Mini-symposium, 2011	Youngdeuk Lee; Jehee Lee	Characterization of caspase-10 homologue from disk abalone (Haliotis discus discus): gene expression analysis against immune challenge	국내학술대회	대한민국
2010-0014481	201009	Aquaculture 2010 Global conference	Qiang Wan, Jhee Lee	HSP20 of disk abalone Haliotis discus discus as a novel universal	국제학술대회	대한민국

				biomarker of environmental stress		
2010-0014481	201009	Aquaculture 2010 Global conference	Qiang Wan, Jehee Lee	Exploration of biomarkers for environmental stress in disc abalone using cDNA microarray	국제학술대회	대한민국
2010-0014481	201010	Aquaculture europe 10	Mahanama De Zoysa, Yucheol Kim, Jehee Lee	Transcriptional analysis of disk abalone (Haliotis discus discus) allograft inflammatory factor-1 against immune challenge and tissue injury	국제학술대회	포르투갈
2010-0014481	201010	Aquaculture europe 10	Youngdeuk Lee, Yucheol Kim, Sukkyoung Lee, Jehee Lee	Molecular cloning of caspase-8 from disk abalone (Haliotis discus discus) and gene expression analysis with bacterial or virus challenge	국제학술대회	포르투갈
2010-0014481	201010	Aquaculture europe 10	Yucheol Kim, Mahanama De Zoysa, Sukkyoung Lee, Hyowon Kim, Jehee Lee	BRICHOS domain containing leukocyte cell-derived chemotaxin 1-like cDNA from disk abalone Haliotis discus discus	국제학술대회	포르투갈
2010-0014481	201010	Aquaculture europe 10	Qiang Wan, Yucheol Kim, Jehee Lee	Cloning and characterization of DMRT1 in disk abalone (Haliotis discus discus)	국제학술대회	포르투갈

학술대회 논문발표 성과정보

과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2010-0014481	201010	Aquaculture europe 10	Chamilani Nikapitiya, Mahanama De Zoysa, Jehee Lee	Immune response of calcium regulatory gene from disk abalone: Molecular characterization and expression analysis	국제학술대회	포르투갈
2010-0014481	201010	Aquaculture europe 10	Qiang Wan, Sukkyoung Lee, Jehee Lee	Validation of housekeeping genes as internal control for studying biomarker of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR	국제학술대회	포르투갈

2010-0014481	201010	Aquaculture europe 10	Qiang Wan, Sukkyoung Lee, Jehee Lee	cDNA cloning and expression analysis of glutathione synthetase from disk abalone <i>Haliotis discus discus</i>	국제학술대회	포르투갈
2010-0014481	201011	The 6th KSMB Annual Meeting & International Mini-symposium, 2010	Qiang Wan, Yucheol Kim, Jehee Lee	Molecular cloning and expression analysis of disk abalone HSP20, a novel universal biomarker of environmental stresses	국제학술대회	대한민국
2010-0014481	201011	The 6th KSMB Annual Meeting & International Mini-symposium, 2010	Qiang Wan, Yucheol Kim, Jehee Lee	Cloning of Dmrt1 and FoxL2 in disk abalone <i>Haliotis discus discus</i>	국제학술대회	대한민국
2010-0014481	201011	The 6th KSMB Annual Meeting & International Mini-symposium, 2010	Youngdeuk Lee, Yucheol Kim, Sukkyoung Lee, Jehee Lee	Molecular cloning and expression analysis of caspase cDNA from disk abalone (<i>Haliotis discus discus</i>) against bacteria and virus	국제학술대회	대한민국
2010-0014481	201109	Genomics in Aquaculture International Symposium 2011 (GIA 2011)	Qiang Wan; Sukkyoung Lee; W . D . N . Wickramaarachchi; Minyoung Oh; Jehee Lee	Molecular cloning and characterization of two macrophage migration inhibitory factors in disk abalone (<i>Haliotis discus discus</i>)	국제학술대회	그리스
2010-0014481	201109	Genomics in Aquaculture International Symposium 2011 (GIA 2011)	Qiang Wan; Sukkyoung Lee; W . D . N . Wickramaarachchi; Minyoung Oh; Jehee Lee	Molecular cloning and expression analysis of DMRT1 and FOXL2 in disk abalone (<i>Haliotis discus discus</i>)	국제학술대회	그리스
2010-0014481	201111	8th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture	Premachandra, H . K . A . ; Mahanama De Zoysa; Jehee Lee	A novel fasciclin 1 domain containing protein from disk abalone, <i>Haliotis discus discus</i> . Molecular characterization and temporal expression study	국제학술대회	인도

학술대회 논문발표 성과정보

과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2010-0014481	201111	8th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture	Wickramaarachchi W.D.N.; Mahanama De Zoysa; Jehee Lee	Kazal-type serine proteinase inhibitor in disk abalone (<i>Haliotis discus discus</i>):	국제학술대회	인도

			Lee	Transcriptional response upon bacterial and viral immune challenges		
2010-0014481	201111	8th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture	Premachandra, H.K.A.; Wan Qiang; Jehee Lee	Molecular cloning, transcriptional and functional analysis of Cystatin B gene from the disk abalone, Haliotis discus discus	국제학술대회	인도

학위배출인력 성과정보

과제번호	학위취득연월	학위구분	학위취득자				진로
			성명	성별	대학	학과	
2010-0014481	201102	박사		남성	제주대학교	해양생명과학	취업(박사후연구원 포함)
2010-0014481	201302	석사		남성	제주대학교	해양생명과학과	취업(박사후연구원 포함)

기타목적활용 성과정보

과제번호	활용연월	활용구분	활용내용
------	------	------	------

10. 기타사항

※ 기타 필요한 사항을 기술

[별첨1]

〈 대표 연구 성과 〉

대표연구업적 요약문			
연구업적 제목	Genomic characterization and expression profiles upon bacterial infection of a novel cystatin B homologue from disk abalone (<i>Haliotis discus discus</i>)		
연구업적 유형	학술지 게재논문(√) 저서() 역서() 특허() 국제학회 초청강연() 학술지 편집위원 참여() 기술이전() 기타()		
주관연구책임자 또는 공동연구원 성명	이제희	참여자수	7

▣ 본 과제 수행결과로 인한 대표 연구성과 작성 시 기술내용

– 교신저자

Cystatins are a large family of cysteine proteinase inhibitors which are involved in diverse biological and pathological processes. In the present study, we identified a gene related to cystatin superfamily, AbCyt B, from disk abalone *Haliotis discus discus* by expressed sequence tag (EST) analysis and BAC library screening. The complete cDNA sequence of AbCyt B is comprised of 1967 nucleotides with a 306 bp open reading frame (ORF) encoding for 101 amino acids. The amino acid sequence consists of a single cystatin like domain, which has a cysteine proteinase inhibitor signature, a conserved Gly in N-terminal region, QVVAG motif and a variant of PW motif. No signal peptide, disulfide bonds or carbohydrate side chains were identified. Analysis of deduced amino acid sequence revealed that AbCyt B shares up to 44.7% identity and 65.7% similarity with the cystatin B genes from other organisms. The genomic sequence of AbCyt B is approximately 8.4 Kb, consisting of three exons and two introns. Phylogenetic tree analysis showed that AbCyt B was closely related to the cystatin B from pacific oyster (*Crassostrea gigas*) under the family 1. Functional analysis of recombinant AbCyt B protein exhibited inhibitory activity against the papain, with almost 84% inhibition at a concentration of 3.5 μmol/L. In tissue expression analysis, AbCyt B transcripts were expressed abundantly in the hemocyte, gill, mantle, and digestive tract, while weakly in muscle, testis, and hepatopancreas. After the immune challenge with *Vibrio parahemolyticus*, the AbCyt B showed significant ($P < 0.05$) up-regulation of relative mRNA expression in gill and hemocytes at 24 and 6 h of post infection, respectively. These results collectively suggest that AbCyst B is a potent inhibitor of cysteine proteinases and is also potentially involved in immune responses against invading bacterial pathogens in abalone.