

조피볼락 (*Sebastes schlegeli*) 황체형성호르몬 II. 조피볼락 LH 특성 및 혈중 ELISA계 개발

김대중 · 박민우 · Ichiro KAWAZOE* · Katsumi AIDA*

국립수산과학원 양식연구팀 · *일본 동경대학 수산학과

서론

생식선자극호르몬 (GTH)은 척추동물의 번식 내분비 조절에 있어서 가장 중요한 호르몬이며, 물리화학적 및 내분비 기능이 서로 다른 두 종류인 여포자극호르몬 (FSH) 및 황체형성호르몬 (LH)이 뇌하수체에서 합성·분비되어지며, 난황형성 및 생식세포의 분화/발달을 촉진하는 중추적인 기능을 담당한다 (Suzuki et al., 1988). 두 종류의 GTH (FSH, LH)는 각각 공통의 α 쇄와 호르몬 특이적인 β 쇄의 이량체로 구성되어 있다. 그러나 FSH와 LH에 관한 정보는 대부분 난생 경골어류에서 많이 축적되어있지만, 태생 어류에서는 보고된 예가 거의 없다.

양볼락과에 속하는 조피볼락은 연안의 암초지대에 정착하여 서식하며, 국내의 대표적인 양식대상종으로, Kim et al (2005)에 의해 뇌하수체 GTH α , FSH β 및 LH β cDNA 전 염기 서열이 밝혀져 Northern blot 분석 결과 FSH β mRNA level은 난황형성기에 급격히 증가 후 감소하지만, LH β mRNA level은 배란시기에 가장 높았으며 산출후에 감소하여 생식년주기동안 FSH와 LH는 서로 다른 시기에 생합성을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 본 연구에 있어서는 볼락류의 임신기간중 LH의 역할을 구명할 목적으로 우선 ELISA법에 의한 혈중 LH 측정계를 개발한 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

1. FPLC에 의한 intact RF LH 및 HPLC에 의한 RF LH subunit 정제와 항체 생산

성숙중인 조피볼락 뇌하수체 (742마리, 동결건조 685mg)를 0.2M Ammonium Acetate (pH 9.0, 20mM PMSF와 50mM EDTA 포함)로 추출한후, FPLC에 연결된 Sephacryl-100 gel 크로마토그래피 ($\Phi 2.6 \times 70\text{cm}$)을 용출용 Buffer 50mM A.A(pH 9.0)로 균질화 시킨후 유속 3ml/200s/tube로 용출하여 peak를 얻었다. 전기영동으로 확인후 peak를 FPLC에 연결된 DE-52 음이온 크로마토그래피 ($\Phi 10 \times 100\text{mm}$)에 Stepwise법으로 50, 100, 200, 400, 1000mM로 용출용 Buffer A.A (pH 9.0) 농도를 증가시켜 각 Peak를 얻었다. 음이온 크로마토그래피 200mM A.A (pH 9.0)에서 용출된 peak들은 다시 FPLC에 연결된 Superdex HR 75 gel 크로마토그래피 ($\Phi 1.0 \times 30\text{cm}$)을 용출용 Buffer 50mM A.A(pH 9.0)로 균질화 시킨후 유속 2ml/200s/tube로 용출하여 peak를 얻었으며, 차후 ELISA system의 coating Ag과 표준물질로 사용하였다. 또한 Peak를 동결건조 후 역상 HPLC (Wakosil II 5C18-HG, $0.46 \times 25\text{cm}$)에 흡착시켜 acetonitrile의 농도구배를 만들어 용출하였다. 정제되어진 RF (조피볼락) GTH α , LH β 에 대한 특이항체를 토끼에 주사하여 제작하였다.

2. RF LH의 steroidogenic activity 조사

난황형성기 (GSI; 2.4) 난소를 채취하여 Koya et al. (2004) 방법에 따라 L15배양액으로 충분히 세정한 후, 습중량 100mg의 여포조직을 내포하는 난을 24 well-plate에서 0, 20, 200, 2000ng의 RF intact LH를 포함하는 배양액을 1 ml씩 넣어 15°C에서 배양했다. 18시간 배양후, 배양액을 모아 E2 농도를 RIA법으로 정량 했다.

3. Competitive ELISA법에 의한 조피볼락 혈중 LH 측정계 개발

Mananos et al. (1997) 방법을 변형시켜 coating Antigen과 표준물질 (Standard)은 intact RF LH를 이용하였고, 특이 항체는 RF LH β 를 이용하였다. RF LH ELISA 측정계에 있어서 성숙한 조피볼락 암컷 (GSI: 8.2) 뇌하수체의 추출물 및 해파린처리 혈장과의 평행선 검정을 실시하였으며, 측정계의 변동계수를 조사하기 위하여 최소검출량, inter- 및 intra-assay를 조사하였다. 또한 난황형성기의 조피볼락 암컷에 GnRHa를 주사하여 혈중 LH 농도를 ELISA 측정계로 조사하였다.

결과 및 요약

Gel-크로마토그래피 및 DE-52 음이온 컬럼에서 분획된 Peak를 2-ME로 환원 및 비환원시켜 SDS-PAGE로 분석한 결과, DE-52 음이온 컬럼 A.A 200mM 농도에서 LH-like를 분취하였다. 그후, 분취물을 동결건조 후, 산성 (0.1% TFA) 조건하에서 역상 HPLC에 흡착시켜 22~66% acetonitrile의 농도구배를 만들어 용출하여 얻어진 Peak를 SDS-PAGE 및 Tuna LH β 항체를 이용한 Western Blot에 의해 RF (조피볼락) GTHa, LH β 를 정제하였다. 또한 RF intact LH (GTHa + LH β)에 의한 steroid 생성 능력을 조사하기 위해 난황형성기의 난소를 18시간 배양하여 배양액에 분비된 E2 농도를 RIA로 측정한 결과, E2 농도는 고농도의 intact LH 농도에 의해 유의적으로 반응하였다. RF LH β subunit에 대한 특이항체를 이용한 RF LH의 Competitive ELISA 계에 있어서 성숙한 뇌하수체 추출물과 혈장은 표준물질(standard)과 2 X 2 점검법에 의한 평행선 검증 결과 평행하게 나타났으며, 측정계의 최소 검출량 (감도)는 200 pg/mL 였으며, 50% 결합부위에서 intra-assay (assay 내) 및 inter-assay (assay 내)의 변동계수는 각 5.2%(n=6), 7.8% (n=12) 였다. 또한 또한 난황형성기의 조피볼락 암컷에 GnRHa를 주사하여 혈중 LH 농도를 RF LH ELISA 측정계로 조사한 결과 주사후 1시간 후에 혈중 LH 농도가 증가하기 시작하여 주사 12시간 후에는 가장 높은 수치를 나타내었으며, 그후 서서히 감소하였다.

참고문헌

- Kim DJ, Cho YC, Sohn YC. 2005. Molecular characterization of rockfish (*Sebastes schlegeli*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis. *Gen Comp Endocrinol.* 141, 282-290.
- Koya Y, Mori H, Nakagawa M. 2004. Serum DHP Levels in Pregnant and Non-pregnant Female Rockfish, *Sebastes schlegeli*, Viviparous Teleost, and its Production by Post-ovulatory Follicles. *Zool. Sci.* 21, 565-573
- Mananos EL, Swanson P, Stubblefield J, Zohar Y. 1997. Purification of Gonadotropin II from a Teleost Fish, the Hybrid Striped Bass, and Development of a Specific ELISA. *Gen Comp Endocrinol.* 108, 209-222.
- Suzuki K, Nagahama Y, Kawachi H. 1988. Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol.* 71, 452-458.