J. Korean Fish. Soc. 33(1), 55~59, 2000 한수지, 33(1), 55~59, 2000

연어 생식소자극호르몬 II의 Sandwich Enzyme Immunoassay법 개발

김대중 · 한창희* · 會田勝美**
국립수산진흥원 태안수산종묘시험장, *동의대학교 자연과학대학 생물학과, **일본 동경대학 농학생명과학연구과 수권생물학과

Development of a Sandwich Enzyme Immunoassay for Salmon Gonadotropin II.

Dae-Jung KIM, Chang-Hee HAN* and **Katsumi AIDA
Taean Marine Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Taean, Chungnam, 357-940, Korea
**Department of Biology, Dong-Eui University, Pusan, 614-714, Korea **Depatment of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agriculture and Agricultural Life Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo, Tokyo, 113, Japan*

A specific and sensitive sandwich enzyme-immunoassay (EIA) using Avidin-Biotin complex was developed for the measurement of GTH II levels in pituitary content and pituitary cell culture medium of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biotin-salmon GTH II rabbit IgG (secondary antibody) was purified by a protein A sepharose affinity chromatography column and that was biotinylated by using Biotin-N-hydroxysuccinimide ester (BNHS). Non-biotin salmon GTH II rabbit IgG (first antibody) was obtained only through a protein A sepharose affinity chromatography column. The assay was performed by the so-called 'sandwich' method using a microtiter plate. A dose-response curve was obtained between 0.12 to 125 ng/㎖ of salmon GTH II. The displacement curves for pituitary extraction and pituitary cell culture medium of testosterone-treated rainbow trout were parallel to the standard curve. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) were 8.2% (N=5) and 12.5% (N=6), respectively. This assay system was used to measure the amount of GTH II that accumulated in the culture medium of dispersed pituitary cells in testosterone-treated immature rainbow trout. The accumulation was increased with the amount of salmon gonadotropin-releasing hormone. GTH II values determined by the present method were well correlated with those determined by radioimmunoassay. As a result, this assay system was found to be suitable for the measurement of GTH II for pituitary extraction and pituitary culture medium in many salmonid fishes.

Key words: sandwich EIA, RIA, GTH II, rainbow trout

서 론

어류의 양식에 있어서 필요한 시기에 충분한 양의 건강한 종묘을 안정하게 공급할 수 있는 것이 기본적인 조건이라 할 수 있으며, 그러기 위해서는 대상 어류의 성숙·산란에 관한 생리적 기구를 파악하는 것이 중요하다. 어류의 성숙·산란에 있어서도 다른 척추동물과 마찬가지로 여러 가지 호르몬들이 중요한 역할을 하고 있으며, 그 중에서도 뇌하수체에서 분비되는 생식소자극호르몬 (Gonadotropin: GTH)은 생식에 관여하는 호르몬중 가장 중요한것 중의 하나이다 (Kobayashi et al., 1987). 특히, GTH는 생식소에 작용해서 성steroid hormone의 방출을 촉진시켜 생식소의 기능발현에 중요한 역할을 담당하며 (Kobayashi et al., 1987), 이러한 GTH의 분비 동태를 밝히는 것은 어류의 생식기능 발현의 기구 구명 뿐만아니라 효율적인 종묘생산을 수행하기 위해서 친어의 생식상태를 파악하는데 중요하다. 그러나 고등 척추동물들과는 달리 어류에 있어서는 단지 한 종류의 GTH가 존재하여 생식에 관련된 전과정을 조절한다고 알려져 왔다 (Fontaine and Dufour, 1987). 그러나 연어과 어류에 있어서 2종류의 GTH (GTH I와 GTH II)가 분리·정제되어, GTH I은 난황형성기 및 정자형성기의 초기단계에 GTH II는 배란 및 배정에 관련한 최종성숙 단계에 생성·분비 된다는 것이 밝혀졌으며, 이들 GTH는 물리화학적으로 하나의 α subunit와 제각기 특이적인 β subunit가 heterodimer로 구성된 당단백질 성질의 호르몬들 이다 (Suzuki, 1988).

한편 지금까지의 호르몬 측정법은 방사선면역측정법 (radioimmunoassay: RIA)이 주로 사용되어져 왔으며, 이 방법에서는 방사선 동위원소 (radioisotope: RI)를 사용하기 때문에 안전성, 경제성등의 많은 문제점은 동반하고 있다. 특히 RI는 특정한 시설, 사용 자격자가 있는 기관에서 밖에 사용할 수 없으며 또한 RI를 사용할 때 생기는 방사선 폐기물는 사회적 문제가 되고 있어서 RIA법의 실용화는 여러 가지 제약을 받고 있다. 최근 RI를 사용하지 않은 호르몬측정법, 효소면역측정법 (enzymeimmunoassay: EIA)이 개발되어, RIA법을 대신할 수 있는 측정법으로써 연구되어져 왔으며 (Edwards, 1985; Tijssen, 1985), 이 측정법의 이용으로 사회적 문제을 해결할 수 있을 뿐만아니라 호르몬 측정기술의 광범위한 보급이 기대 되어진다. 어류 내분비학 분야에서도 생식관련 호르몬들중 GTH II의 competitive EIA 측정계가 개발되어, 연어 GTH IIβ 항체를 이용해서 무지개 송어 GTH II의 혈중 및 뇌하수체 배양액중의 농도변화 (Salbert et al., 1990)와 잉어 GTH IIβ 항체를 이용하여 뇌하수체 세포배양액중의 금붕어 GTH II 농도변화 (Kah et al., 1989)에 대해서 연구되어 있다. 그러나 항원에 표지하는 competitive assay법은 이론적으로 항체에 표지하여 이용하는 sandwich assay법 보다도 감도 (sensitivity)가 낮다고 알려져 있다 (Edwards, 1985; Tijssen, 1985).

따라서 본 연구에서는 Avidin-Biotin complex를 이용한 연어 GTH II의 Sandwich EIA계의 확립과 측정계의 간소화, 감도 및 안정도의 향상을 도모하여 시설이 불충분한 연구기관에서도 실용화하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

실험어

미성숙한 암 · 수 무지개 송어 (체중: 약 100 g)를 14℃에 순치하여 실험어로 사용했다.

Testosterone (T)의 경구투여

T의 경구투여는 시판중인 송어용 펠렛 1 kg에 대하여 25 mg의 T을 녹인 ethanol용액 100 ㎖을 뿌려서, 18시간 실온에서 건조시켜 제조한 펠렛을 투여하였다. 펠렛은 매일 체중의 1.5%의 사료공급률이 되도록 1일에 2회로 나누어서 30일간 투여하였다.

뇌하수체 세포의 분리 및 세포배양

실험어는 2-phenoxyethanol (200 ppm)을 이용해서 마취시킨 후, 뇌하수체를 빠르게 적출해서 Amano et al. (1992)의 방법으로 뇌하수체 추출물을 제조하였다. 또한 적출한 뇌하수체를 세포분리 및 세포배양을 하기 위하여 방냉상태의 Hank's balanced salt solution [HBSS (Gibco Lab., New York, USA); 25 mM HEPES, 4 mM $NaHCO_3$ and 1% antibiotic-antimycotic agent (Gibco Lab.) pH 7.5]에 침적시켰다. 그 후 HBSS 완충액으로 씻은 뒤, 멸균시킨 면도날로 잘게 단편으로 만들었다. 뇌하수체 단편들은 Kim et al. (1999)등의 방법에 따라 collagenase-DNase로 처리하여 뇌하수체 세포를 분리시켰다. 분리된 세포는 25 mM HEPES, 4 mM $NaHCO_3$ 10% fetal bovin serum (FBS; Gibco Lab.)가 포함된 RPMI-1640 (pH 7.5; Sigma, St. Louis, USA) 배양액에 현탁했다. 세포수는 hemocytometer로 계산하였고, 세포생존율은 0.1% trypan blue로 계산하였으며 이때 세포생존율은 90%이상 이었다.

세포배양은 세포현탁액을 2.5×10^5 cells/㎖로 조정해서, 0.1% poly-L-lysin으로 코팅한 48 well plate에 500 ㎕씩 분주했다. 그 후, FBS가 포함된 RPMI-1640배양액으로 18℃, 3일간 princubation해서 세포를 well plate에 부착시켰다. 그 후, 0.1% BSA가 포함된 배양액을 500 ㎕씩 분주하여 씻은 뒤, FBS가 없는 새로운 RPMI-1640 배양액으로 교환하였다. 이때 well에 각 농도 (10^{-11}~10^{-6} M)의 salmon type gonadotropin-releasing hormone (sGnRH; Peninsula Lab., Belmont, CA, USA)를 제각기 투여하여 18℃에서 24시간 동안 방출된 GTH II 농도를 측정하였다. 실험종료후, 세포생존율은 90% 이상이었다.

Radioimmunoassay (RIA)

^{125}I 표지 GTH II의 제작 및 assay 방법은 Kim (1997)의 방법에 따랐다. GTH II의 RIA계에 있어서 GTH I의 교차율은 2.1%였다. GTH II의 RIA계에 있어서 intraassay (assay 內) 및 interassay (assay 間)의 변동계수는 7.0% (n=5), 11.5% (n=6) 였다.

Hormone

GTH II, EIA계의 특이성을 조사하기 위하여 연어 (*Oncorhynchus keta*) GTH I, growth hormone (GH), prolactin을 日本 北里大學의 Kawauchi 교수로 부터 제공받았다.

Biotin 표지 및 Non-Biotin GTH II 항체의 제작

Biotin 표지에 이용된 연어 GTH II 항체와 standard hormone는 日本 東京大學 水族生理學研究室에서 제작한 것을 이용했다. Protein A sepharose (Phamacia, Sweden) affinity chromatography column을 280 nm의 UV-monitor (ATTO, Japan)에 연결하여 rabbit IgG의 peak을 얻었다. 그 후 rabbit IgG 농도를 2~10 mg/㎖로 조정하기 위해서 Ultrafiltration (Amicon, USA) 방법으로 농축하였다. 농축된 IgG (2.9 mg/㎖) 5 ㎖를 Biotin 표지 및 Non-Biotin rabbit IgG로 제조하기 위하여 2.5 ㎖씩 나누었다. Biotin 표지 rabbit IgG의 제조는 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 Biotin (long arm)-N-hydroxysuccinimide ester (BNHS; Vector Lab. USA)로 표지 시켰다. Biotin으로 표지된 GTH II의 rabbit IgG를 각각 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, glycin으로 반응 정지시켜 4℃에서 24시간 동안 PBS (pH 7.2) 완충액으로 투석하여 Biotin 표지 GTH II rabbit IgG를 얻었다. 또한 Non-Biotin rabbit IgG로 이용된 GTH II 항체는 단지 Protein A sepharose affinity chromatography column을 통해서 얻어진 rabbit IgG를 사용하였다.

EIA sandwich법에 의한 GTH II의 측정

Step 1. Non-Biotin GTH II rabbit IgG를 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6)에 희석하여 microtiter plate (NUNC IMMUNO II 96 F)의 well에 200 ㎕씩 넣어 실온 (25℃)에서 2시간 방치하였다.

Step 2. 각 microtiter plate를 0.1 M PBS-0.01% Tween 20 (PBST)로 3회 세척 (Bio-rad microplate washer)한 뒤, 1% BSA을 0.1 M PBS (pH 7.2)에 녹인 용액을 microtiter plate well 에 제각기 300 ㎕씩 넣어 실온 (25℃)에서 2시간 방치하였다.

Step 3. Microtiter plate를 PBST로 3회 세척한 뒤, standard hormone과 시료 (배양액과 뇌하수체 추출액)을 제각기 PBS tween-20에 희석하여 각 well에 200 ㎕씩 넣어 4℃에서 18시간 혹은 실온에서 2시간 방치하였다.

Step 4. Microtiter plate를 PBST로 3회 세척한 뒤, Biotin 표지 GTH II rabbit IgG를 제각기 PBS tween-20에 희석하여 각 well에 200 ㎕씩 넣어 실온에서 2시간 방치하였다.

Step 5. Microtiter plate를 PBST로 3회 세척한 뒤, 10 ㎖ PBS tween-20에 peroxidase-ABC kit (Vector Lab. USA)의 A regent와 B regent을 한방울씩 넣어 희석한 용액을 각 well에 200 ㎕씩 넣어 실온에서 2시간 방치하였다.

Step 6. Microtiter plate를 PBST로 3회 세척한 뒤, 3,3′5,5-tetramethylbenzidine (TMB)를 0.1 M acetic acid buffer (pH 5.5)를 녹여 사용 직전에 3 ㎕ H_2O_2를 첨가한 기질액을 각 well에 200 ㎕씩 넣어 암실에서 20분간 진탕하였다. 그 후, 2 M H_2SO_4를 25 ㎕씩 넣어 반응정지 시켜 autometic microplate reader (Bio-Red, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정했다. 흡광도는 microplate reader standard curve program (Bio-Rad)에서 계산하여 농도로 환산하였다.

통계학적 분석

각 농도의 sGnRH처리에 의한 GTH II 농도 변화의 통계처리는 분산분석후, Duncan's new multiple range test를 사용하여 분석하였다. 또한 RIA와 sandwich EIA에 의해서 측정된 각 GTH II 농도는 Student's *t* test를 사용하여 분석하였다.

결 과

연어 GTH II IgG 정제

GTH II에 대한 rabbit 항혈청은 protein A sepharose column을 통해서 rabbit IgG를 정제했다. 그 때의 용출 pattern을 Fig. 1에 나타냈다. 그 결과 2개의 peak가 얻어졌으며, 그 중 peak B를 모아서 Biotin 및 non-Biotin rabbit IgG로 이용하였다.

GTH II EIA계의 표준곡선과 뇌하수체 세포배양액 및 뇌하수체 추출물중 GTH II 측정 가능성 검토

Non-Biotin rabbit IgG는 800배, Biotin rabbit IgG는 400배로 희석하여 사용했을 때 항원-항체 반응의 특이성이 가장 높았다 (data not shown). Sandwich법 EIA계의 연어 GTH II 표준곡선과 무지개 송어의 뇌하수체 세포배양액 및 뇌하수체 추출물중 GTH II 측정 가능성을 조사하여 Fig. 2에 나타냈다. GTH II standard hormone은 0.12 ng/mℓ에서 125 ng/mℓ까지 농도반응 관계를 나타내는 표준곡선을 얻었으며, 흡광도 50%의 농도인 약 15.6 ng/mℓ 부근에서 intraassay (assay 內)와 interassay (assay 間)의 변동계수를 조사한 결과 변동계수율은 각각 8.2%, 12.5%였다.

GTH II 표준곡선과 뇌하수체 세포배양액 및 뇌하수체 추출물중 GTH II 측정 가능성을 검토하기 위하여 세포배양액와 뇌하수체 추출액을 흡광도 50% 부근에서 GTH II의 표준곡선과 각 시료들의 희석곡선을 평행성 검정 (2×2 점법, $P<0.05$)을 통하여 검토한 결과, 뇌하수체 세포배양액과 뇌하수체 추출액의 희석곡선은 제각기 GTH II 표준곡선과 일치하였다. 이러한 결과로부터 본 연어 GTH II sandwich법 EIA계는 무지개 송어의 뇌하수체 세포배양액과 뇌하수체 추출액중, GTH II 농도의 측정이 가능하였다.

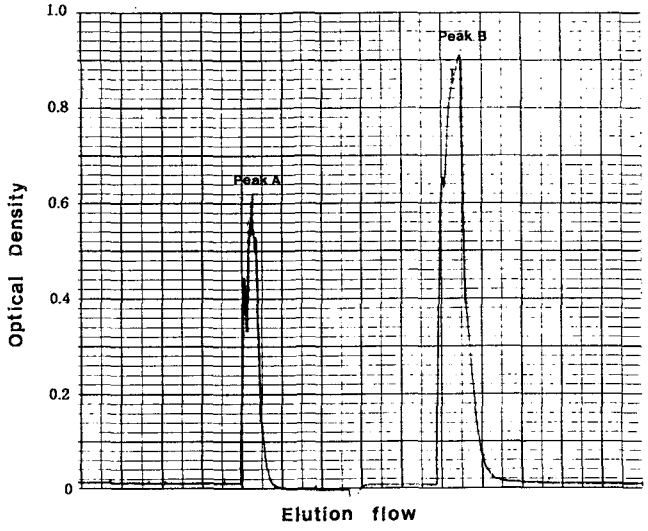

Fig. 1. Elution profiles of salmon GTH II antibody through a Protein A sepharose affinity chromatography column.

GTH II EIA계의 특이성 검토

Sandwich법 GTH II EIA계의 특이성을 조사하기 위하여 뇌하수체내 다른 hormone과의 교차반응을 Table 1에 나타냈다. 그 결과 GTH II의 EIA계에 있어서 GTH I는 2.9%의 교차반응률을 나타내었지만, GH와 Prolactin에 대해서는 0.5%이하의 교차반응률을 나타내었다.

뇌하수체 세포배양계에 있어서 sGnRH자극에 의한 GTH II 분비량의 sandwich EIA계와 RIA계의 비교 검토

Testosterone를 경구투여한 미성숙 무지개 송어의 뇌하수체 세포배양계에 있어서 sGnRH 투여에 의한 GTH II 분비량의 변화를 sandwich EIA와 RIA로 비교 검토한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 그 결과 EIA와 RIA의 양 측정계는 저농도 sGnRH (10^{-11}~10^{-9} M) 투여에 의해서 GTH II 분비량은 농도구배적으로 증가하였으나, 고농도 sGnRH (10^{-8}~10^{-6} M) 투여에 의해서는 GTH II 분비량이 더 이상 증가하지 않는 유사한 분비 양상을 나타내었다. 또한 각 농도의 sGnRH의 자극에 의해 분비된 GTH II 농도를 sandwich EIA와 RIA로 비교 검토한 결과 유의한 차이를 나타내지

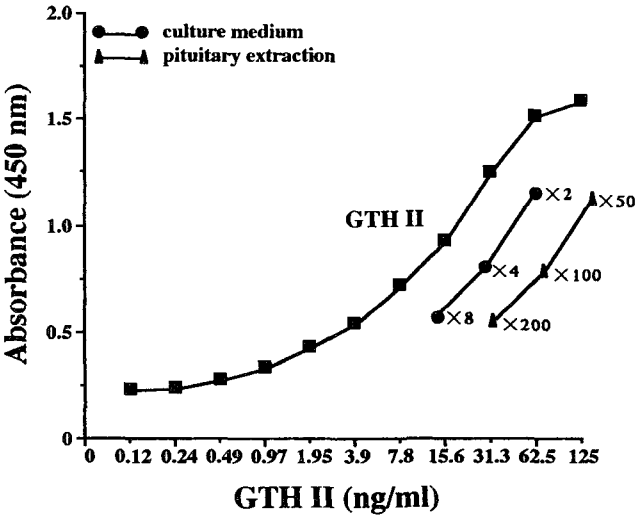

Fig. 2. Specific binding curves for serial dilutions of pituitary cell culture medium and pituitary extract of testosterone-treated immature rainbow trout in salmon GTH II sandwich EIA. Each point represents the average of duplicate determinations.

Table 1. Pecentage cross reaction of various pituitary peptide hormones with salmon GTH II rabbit IgG

Tested peptide hormone	% Cross reaction
GTH II	100
GTH I	2.9
Growth hormone	<0.5
Prolactin	<0.5

않았으나, sandwich EIA에 의해서 측정된 GTH II 농도가 RIA에 의해서 측정된 GTH II 농도보다 4~7%정도 높았다.

고 찰

Avidin-Biotin complex를 이용한 연어 GTH II의 sandwich법 EIA계에서 standard hormone농도가 0.12~125 ng/㎖ 농도범위에서 용량반응곡선이 얻어져, 본 sandwich법 EIA계에서 무지개 송어의 뇌하수체 세포배양액 및 뇌하수체내 GTH II의 농도측정이 가능하게 되었다.

일반적으로 competitive EIA계에 있어는 hormone에 alkaline phosphatase와 peroxidase에 의한 표지방법이 이용되어져 왔으며 (Masaya et al., 1986, 1988; Kar et al., 1987), 이러한 효소와 hormone를 결합시키는 가교제로 bis-diazotized benzidine (BDB)를 주로 사용해 왔다. 그러나 BDB는 수용성으로 단백질중의 histidine과 tyrosine에 반응하기 쉬우며, 대부분의 효소는 histidine과 tyrosine의 활성부위 혹은 그 근처에 존재하기 때문에 BDB의 결합에 의해서 효소활성이 현저하게 상실되는 가능성과 BDB에 의한 결합은 불안정하여 분해되기 쉽다고 보고하고 있다 (Masaya et al., 1986). 한편 항체에 Biotinylation시키는 표지법이 개발되어 EIA계에 이용되어져 왔으며, 이러한 Biotin 표지법은 특이성과 감도가 높아서 hormone과 같은 미량으로 분비되는 측정계에 이용되고 있다 (Tijssan, 1985). 본 연구에 있어서 salmon GTH II rabbit IgG 농도와 Biotin-N-hydroxysuccinimide ester (BNHS) 농도를 1 : 25로 조정하여 표지하였다. 항체와 BNHS의 결합비는 EIA

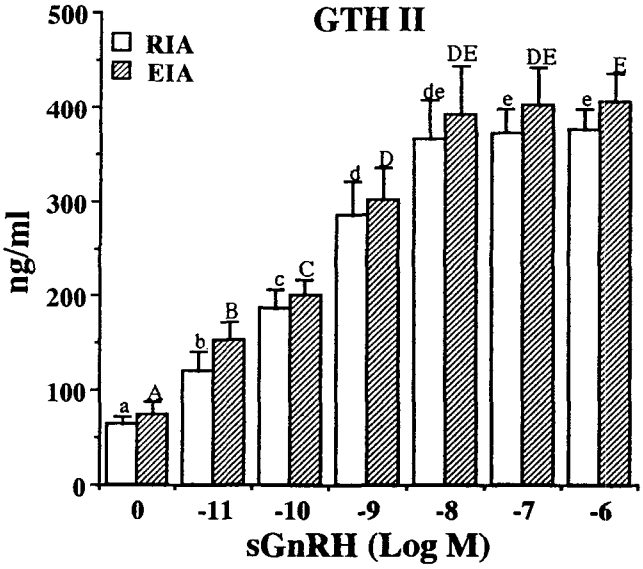

Fig. 3. Effects of different concentrations of sGnRH on GTH II release from cultured pituitary cells of testosterone-treated immature rainbow trout. GTH II concentrations in the culture media were determined by RIA and sandwich EIA using Avidin-Biotin complex. Values are the mean ± SE of six replicates. A significant difference ($P<0.05$, by Duncan's multiple range test) was observed between columns indicated by different letters.

계의 감도에 큰 영향을 미치는 것이 알려져 있다 (Tijssan, 1985). 본 연구에서 얻어진 결합비가 적절한지에 관해서는 차후에 검토가 필요하다고 추측되어진다.

또한 본 연구에서는 표지후 미반응의 BNHS와 salmon GTH II rabbit IgG를 투석방법에 의해서 이루어졌다. 이 방법에서는 투석후 Biotin 표지 salmon GTH II rabbit IgG 용액중에 유리 (free) 상태의 BNHS가 공존할 가능성이 있으며, 이러한 유리상태의 BNHS 공존은 blank (background) level을 높여 감도를 저하시키는 것이 보고되어져 있다 (Chang et al., 1998). 본 연구에서 최소검출량 (측정감도)이 약 0.58 ng/㎖ 였던 원인의 한가지는 이러한 점에 의한 것이지 않을까 추측된다. 차후에 유리상태의 BNHS 제거방법에 여러 가지 검토가 필요하다고 추측되어진다. 측정치의 오차정도를 알아보기 위하여 변동계수률을 조사한 결과 intraassay (assay 內)의 변동계수률은 8.2%, interassay (assay 間)의 변동계수률은 12.5%로 나타났다. 현재까지 GTH II EIA계에 있어서 변동계수률을 조사한 보고가 없어 직접적으로 비교 고찰할 수는 없지만, Kobayashi et al. (1987)가 동일 GTH II 항체를 가지고 실시한 RIA 결과에서 intraassay의 변동계수률 6%, interassay의 변동계수률 7.9%에 비교해서 약간 높았다. 그러나 일반적으로는 intraassay의 변동계수률은 10%이내, interassay의 변동계수률은 20%이내를 요구하기 때문에 본 연구의 양 변동계수률의 결과를 토대로 본 EIA계는 안정적인 측정계라 판단된다.

본 sandwich법 GTH II EIA계의 특이성을 검토한 결과 GTH I와의 교차반응률은 2.9%을 나타냈지만, GH와 prolactin과의 교차반응률은 0.5% 이하로 나타났다. 이러한 결과는 동일한 GTH II항체를 이용한 RIA 결과에서는 GTH I와의 교차반응률이 2.1%로 본 EIA계와 유사한 교차반응률을 나타냈다 (Kim, 1997). 그러나 GH와 prolactin에 관한 RIA 결과가 없어 본 EIA계와의 직접적인 비교는 할 수 없지만, 본 EIA계에서 GH와 prolactin에 대해서 거의 교차반응을 나타내지 않았다. 따라서 본 sandwich법 GTH II EIA계는 무지개 송어의 뇌하수체 세포배양액 및 뇌하수체내의 GTH II만을 인식하는 것으로 판단되며, 추후에 다른 hormone과의 교차반응도 검토가 요구된다. 한편 본 연어 GTH II EIA계에서 GTH II 표준곡선과 testosterone을 경구투여한 미성숙 무지개 송어 뇌하수체 추출물의 희석곡선이 일치하였다. 이러한 결과는 testosterone의 positive feedback에 의해 뇌하수체내 GTH II가 다량으로 합성되어 본 측정계에 특이적으로 반응하였다고 추측된다.

Testosterone처리군의 미성숙 무지개 송어의 뇌하수체 세포배양계에 있어서 sGnRH 투여에 의한 GTH II 분비량의 변화를 sandwich EIA와 RIA로 비교 검토한 결과, 양 측정계는 저농도 sGnRH (10^{-11}~10^{-9} M) 투여에 의해서 GTH II 분비량은 농도구배적으로 증가 하였으나, 고농도 sGnRH (10^{-8}~10^{-6} M) 투여에 의해서는 GTH II 분비량이 더 이상 증가하지 않는 유사한 분비양상을 나타내었다. 이러한 이유는 고농도의 peptide성질의 hormone에 의해 receptor의 down regulation 현상이 일어나 receptor가 가수분해에 의해 분해되어 버리기 때문에 일정 농도 이상의 고농도에서는 더 이상 반응하지 않는다고 하였으며 (Hazum and Conn, 1988; Huckie and Conn, 1988), 이러한 현상들은 무지개 송어와 금붕어의 뇌하수체 세포배양계에서도 관찰되어진다고

보고하였다 (Peter et. al., 1991; Kim, 1997).

본 연구에서는 뇌하수체내 및 뇌하수체 세포배양액에 존재하는 GTH II 농도를 측정할 수 있는 EIA계 개발에 주력하였다. 추후에 혈중 GTH II 농도를 측정할 수 있는 EIA계 개발이 요구된다.

요 약

무지개 송어의 뇌하수체 및 배양액에 존재하는 GTH II 농도를 측정하기 위해 Avidin- Biotin complex를 이용한 sandwich EIA계을 개발했다.

Protein A sepharose affinity chromatography을 통해서 얻어진 연어 GTH II의 rabbit IgG에 biotinylation시킨 것 (Biotin-salmon GTH II rabbit IgG)을 제2 항체로 사용하였고, Non-Biotin salmon GTH II rabbit IgG는 단지 protein A sepharose affinity chromatography에서 얻어진 IgG를 제 1 항체로 사용하였다. EIA는 sandwich법에 의해서 이루어졌으며, 효소반응 기질로는 TMB (3,3'5,5-tetramethylbenzidine)를 이용했으며, 반응후 450 nm의 흡광도에서 automatic microplate reader로 측정하였다. 그 결과, 0.12 ~ 125 ng/㎖의 범위에서 용량반응곡선을 얻었으며, 측정감도 (최소검출량)는 거의 0.58 ng/㎖ 정도 였다. 그리고 뇌하수체 추출물 및 배양액 각각의 희석곡선은 GTH II 표준곡선과 일치 하였다. 또한 이러한 GTH II의 표준곡선는 뇌하수체내 다른 peptide hormone와는 교차반응을 거의 나타내지 않았다. Testosterone을 처리한 미성숙 무지개 송어의 뇌하수체 세포배양계를 이용하여 sGnRH에 의한 GTH II 분비량을 본 sandwich EIA계와 RIA계를 비교 조사한 결과, 거의 같은 분비량을 나타냈을 뿐만아니라 같은 분비 pattern을 나타냈다. 이러한 결과로부터 본 sandwich법 EIA계에 의해서 연어과 어류의 뇌하수체 추출물 및 뇌하수체 배양액 중의 GTH II 함량 및 분비량을 측정하는데 있어서 안정된 assay계라고 생각되어진다.

감사의 글

본 연구를 수행하는 데 필요한 호르몬을 제공해 주신 日本 北里大學의 Kawauchi 교수에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

Amano, M., Y. Oka, K. Aida, N. Okumoto, S. Kawashima and Y. Hasegawa. (1992). Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GTH contents in the pituitary in female masu salmon, *Oncorhynchus masou*, from hatching through ovulation. Zool. Sci., 9, 375~386.

Chang, E.S., R. Keller and S.A. Chang. 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. Gen. Comp. Endocrinol., 111, 359~366.

Edward, R. 1985. Immunoassay. William Heineman Medical Books LTD. London, pp 1~44.

Fontaine, Y.A. and S. Dufour. 1987. Current-status of LH-FSH like gonadotropin in fish. p.48~56. Proceeding of the 3th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. (D. R. Idler et al.,). Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada.

Hazum, E. and P.M. Conn. 1988. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action. I. The GnRH receptor. Endocrine Reviews, 9, 379~386.

Huckle, W.R. and P.M. Conn. 1988. Molecular mechanism of gonadotropin releasing hormone (GnRH) action. II. The effector system. Endocrine Reviews, 9, 387~395.

Kah, O., A. Pontet, J. Nunez-Rodriguez, A. Calas and B. Breton. 1989. Development of an enzyme-immunosorbent assay for goldfish gonadotropin. Biol. Reprod. 40. 68~73.

Kim, D.J. 1997. Endocrinological studies on regulation of gonadotropin secretion from the pituitary gland in the rainbow trout. Ph. D. Thesis, The Univ. of Tokyo, pp. 8~17.

Kim, D.J., C.H. Han and K. Aida, 1999. Effect of activin on testosterone-primed immature rainbow trout gonadotropin release *in vitro*. J. Korean Fish. Soc., 32, 204~210.

Kobayashi, M., K. Aida, H. Sakai, T. Kaneko, K. Asahina, I. Hanyu and I. Hanyu. 1987. Radioimmunoassay for salmon gonadotropin. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 995~1003.

Masaya, G., N. Kasuga, K. Imagawa and J. Mori. 1986. An attempt of the development of solid-phase enzyme immunoassay of gonadotropin releasing hormone. Jpn. J. Anim. Reprod., 32, 172~176.

Masaya, G., K. Matsuda, J. Mori. N. Kasuga, K. Imagawa and N. Yanaihara. 1988. A doubleantibody enzyme immunoassay for determination of gonadotropin releasing hormone in bovine plasma. Jpn. J. Anim. Reprod., 34, 243~248.

Peter, R.E., V.L. Trudeau and B.D. Sloley. 1991. Brain regulation of reproduction in teleosts. Bull. Inst. Zool. Academia Sinica Monogroph, 16, 89~118.

Salbert, G., T. Bailhache, Y. Zohar, B. Breton and P. Jego. 1990. A rapid and sensitive ELISA for rainbow trout maturational gonadotropin (tGtH II): Validation on biological samples; *in vivo* and *in vitro* responses to GnRH. Gen. Comp. Endocrinol., 78, 110~122.

Suzuki, K., H. Kawauchi and Y. Nagahama. 1988. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. Gen. Comp. Endocrinol., 71, 292~301.

Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 20~32.

1999년 10월 27일 접수
2000년 1월 3일 수리