

## 꼭저구(*Chaenogobius annularis*)의 난황단백질에 대한 다클론 항체와 단클론 항체를 이용한 Vitellogenin ELISA System

강봉정 · 정지현<sup>1</sup> · 이재용 · 김명희 · 한창희<sup>†</sup>

동의대학교 자연과학대학 분자생물학과, <sup>1</sup>한국해양연구원

### Vitellogenin ELISA System Based on Monoclonal and Polyclonal Antibodies against Vitellin of Floating Goby (*Chaenogobius annularis*)

Bong-Jung Kang, Jee-Hyun Jung, Je-Yong Lee<sup>1</sup>, Myung-Hee Kim and Chang-Hee Han<sup>†</sup>

Major of Molecular Biology, Division of Life Science, Dong-eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>1</sup>South Sea Institute, KORDI, Geoje, 656-830, Korea

**ABSTRACT** : Vitellogenins(VTGs) are the precursor of egg-yolk proteins in most oviparous species from invertebrates to vertebrates. In oviparous vertebrates, VTGs are synthesized in the liver and transported through the blood to oocytes. In female fish, concentrations of plasma VTG increase rapidly at onset of vitellogenesis in the normal reproductive cycle. Male fishes also possess the gene for VTG, but plasma concentrations of the protein typically remain small, presumably due to low levels of endogenous estrogens. However, exposure of males to exogenous estrogenic mimics can result elevated. Therefore, the VTG in fish can be used as a useful biomarker for appropriate tools of endocrine disrupting compounds effects. In this studies, we prepared the test methods that can measure the plasma VTG level in the gobies that live in polluted area with mimic estrogen. For the purpose, we purified VTG of floating goby(*Chaenogobius annularis*) and prepared specific monoclonal and polyclonal antisera to yolk protein, then developed a sandwich competitive ELISA system for measurement of plasma VTG levels. Validation for the ELISA system using monoclonal and polyclonal antibodies against VTG was tested. The absorbance curve of serial dilutions of serum from vitellogenic female was paralleled to the standard curve of VTG, but normal male was not paralleled. The developed sandwich ELISA system was measured for VTG levels in plasma of common goby(*Acanthogobius flaviman*) and javeline goby(*A. hasta*) as well as in plasma of floating goby(*C. annularis*).

**Key words** : Vitellogenin, Floating goby, Monoclonal antibody, Polyclonal antibody.

**요 약** : 무척추동물에서 척추동물에 이르기까지 대부분의 난생동물들의 난황 단백질의 전구체를 vitellogenin(VTG)이라 한다. 난생 척추동물에서 VTG는 간에서 합성되어 혈액을 통해 난세포로 전이된다. 암컷 어류는 정상적인 생식주기에서 난황단백전구체 형성이 시작되면 혈중 농도는 급격히 증가하게 된다. 수컷도 VTG의 유전자를 가지고 있기 때문에 낮은 수준의 내인성 에스트로겐으로 아주 적은 양의 단백질이 있을 수 있다. 그렇지만 수컷에 외인성 에스트로겐 유사물질에 노출되면 그 양은 증가하게 된다. 따라서 어류에서 VTG는 내분비계 장애물질 효과를 조사하는 유용한 생물학적 추적자로 사용할 수 있다. 이 연구에서는 에스트로겐 유사물질에 오염된 지역에 서식하는 망둑어류의 혈중 VTG의 수준을 정량할 수 있는 방법을 제공하고자 한다. 이러한 목적을 위해 꼭저구(*Chaenogobius annularis*)의 VTG를 분리하고, 이에 대한 단클론 항체와 다클론 항체를 제작하여 혈중 VTG 수준을 정량할 수 있는 sandwich 경합 ELISA system을 만들었다. 난황 단백질에 대한 단클론 항체와 다클론 항체를 사용한 ELISA system에 대한 타당성 검토를 하였다. 순차적으로 희석한 암컷의 혈청에 대한 흡광도 곡선은 VTG 표준농도의 곡선과 평행하였으나 수컷의 혈청에 대한 흡광도 곡선은 평행하지 않았다. 이 VTG에 대한 sandwich ELISA system으로 꼭저구(*C. annularis*)의 혈중 VTG의 수준을 정량뿐만 아니라 문절망둑(*Acanthogobius flaviman*)과 풀망둑(*A. hasta*)의 혈중 VTG 수준을 정량할 수 있다.

## 서 론

<sup>†</sup> 교신저자: 부산광역시 부산진구 엄광로 995번지, 동의대학교 자연과학대학 분자생물학과. (우) 614-714, (전) 051-890-1524, (팩) 051-890-1521, E-mail: chhan@deu.ac.kr

인공 화학물질들 중에서 아직까지 내분비계 장애물질로서 미규제물질들 중 alkyl phenol(penta to nonylphenol)류, bis-

phenol A, phthalate류, styrene 등 9종은 주로 페놀수지, epoxy 수지, polycarbonate 수지 및 플라스틱 등을 제조하는데 사용되고 있으며, 이들을 이용하여 만든 제품들은 구취제, 세제, 식품과 의약품의 포장재나 용기, 캔류의 내부 코팅제 등으로 널리 이용되고 있다. 우리나라에서 이들 물질에 대한 피해사항은 아직 보고된 바는 없으나, 우리나라의 이들 물질의 연간 생산량은 환경청 1996년 통계에 의하면 penta to nonylphenol은 약 5,000톤, bisphenol A는 약 6만톤에 이르기 때문에 강과 같은 담수 수계를 통한 해양에 유출될 가능성이 매우 높아 대도시와 공업단지에 인접한 연안이나 시화호와 같은 내만 호소에는 이들 물질에 의한 수자원의 피해가 클 것으로 추정할 수 있다.

이미 bisphenol A가 에스트로겐 유사물질(mimic estrogen)로 작용하는 내분비계 장애물질이라는 보고들은 많이 볼 수 있으며(Naylor, 1992; Jobling & Sumpter, 1993; Ahel *et al.*, 1993; Andersen *et al.*, 1999), alkyl phenol 류에 속하는 nonylphenol도 무지개송어의 수컷과 미숙한 암컷의 간세포에 작용하여 난황단백전구체를 합성하게 하고 또한 수컷의 정소 발달을 억제한다는 보고(Lech *et al.*, 1996; Jobling *et al.*, 1996)가 있어 이미 mimic estrogen으로 알려져 있다. 이러한 내분비계 장애물질들은 estrogen receptor에 대한 binding 효과가 estradiol-17 $\beta$ 보다 1,000~2,000배 달하는 보고(Krishnan, 1993)가 있어, 어류에서는 50  $\mu$ M 이상의 고농도에 간에서 vitellogenin 생성 분비를 증가시킨다는 보고(Smeets *et al.*, 1999)가 있다.

그러나 생체내 유래 estrogen은 estrogen receptor에 결합된 후 일정 기간이 지나면 체내의 효소에 의해 분해되어 지속적인 활성기간이 한정되어 있지만, 인공 합성된 estrogenic chemical들은 estrogen receptor에 한번 결합되면 좀처럼 분해되지 않아 활성이 지속된다고 알려져 있어, 이러한 내분비 장애물질들의 특성으로 비록 그 활성은 약할지라도 활성의 지속성 때문에 심각한 생리학적인 장애를 야기시킬 수 있다. Estrogen 효과를 가지는 환경성 화학물질들 각각은 estrogen hormone보다 estrogen receptor에 결합하는 힘이 매우 낮기 때문에 어류에서 내분비계 장애물질의 영향에 대한 가시적인 변화는 장기간 장애물질에 노출되었을 때 나타날 수 있다. 그러나 자연생태계에 서식하는 어류에게 내분비계 장애물질에 대한 장애 효과가 가시적으로 나타났을 때는 이미 회복이 불가능한 상태에 이르게 되므로 조기에 그 장애 효과를 검사할 수 있는 방법을 개발하여 그 위해성 여부를 조사해야 한다.

본 연구에서는 낙동강, 시화호 등 공업단지를 낀 연안 해역에 널리 서식하는 망둑어류에 대하여 환경성 화학물질

들에 대한 생식 내분비계에 대한 영향을 조사하기 위하여, 우리나라 연안에 정착하여 서식하는 꼭저구(*Chaenogobius annularis*)에 대한 VTG 정량법을 개발하고 이를 이용하여 이들 해역에 서식하는 풀망둑(*Acanthogobius hasta*)과 문절망둑(*Acanthogobius flavimanus*)의 VTG에 대해서도 정량할 수 있는지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난황단백질의 분리

#### 1) 재료

산란기인 5월과 6월에 걸쳐 부산의 청사포 일대의 조간대에 서식하는 꼭저구(Fig. 1)를 채집하였다. 채집된 꼭저구는 동의대학교 어류사육시설이 되어 있는 생물생산연구실로 옮겨 수용한 후 암수에 대한 혈청과 난소란을 분리하였다. 난소로부터 분리한 난은 생리식염수로 씻은 후 난황단백질을 분리할 때까지 -80°C의 냉동고에 보관하였다.

혈액 중에 난황단백전구체(vitellogenin, VTG)를 유도하기 위하여 일부 수컷 꼭저구에 대해서 어체중 kg당 2mg의 estradiol-17 $\beta$ 를 에탄올에 녹여 3일 간격으로 3회 연속 주사하였다. 마지막 주사 후 3일 후에 척추 하동맥으로부터 주사기(23G)를 사용하여 진채혈한 후, 4°C, 10,000 $\times$ g에서 30분간 혈액을 원심분리하여 실험에 사용할 때까지 혈청을 -80°C에 보관하였다.

#### 2) 난황단백질 분리

난황단백질을 분리하기 위하여 성숙한 난소 1g을 0.15M NaCl이 첨가된 TBS(0.02M Tris-HCl pH 8.0, 0.1% NaN<sub>3</sub>, 0.01% EDTA, 1mM PMSF) buffer를 첨가하여 homogenizer로 마쇄한 후 원심분리(10,000rpm, 30min, 4°C)하여 상층액을 취하였다. 이 상층액에 70%가 되도록 ammonium

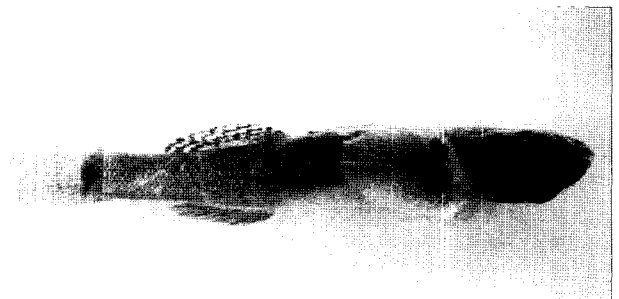


Fig. 1. Photograph of a floating goby(*Chaenogobius annularis*) collected in tidal pool of Chungsapo, Pusan.

sulfate를 넣고 4°C에서 완전히 녹인 후 12,000rpm에 30분간 4°C에서 원심분리하였다. 상등액은 버리고 pellet에 0.15M NaCl이 첨가된 TBS를 넣고 완전히 용해한 뒤 투석막에 넣어 4°C에서 TBS buffer로 투석시켰다. 투석된 혈청단백질 분획은 DEAE-cellulose(직경: 약 2.6cm 높이: 6cm)를 사용한 open column으로 혈청단백질을 분리하였다. 혈청 단백질 시료는 3배의 TBS buffer로 평형시킨 뒤 column에 흘려주었고 linear NaCl gradient(0.0~0.5M)로 분리하여 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 분리된 난황단백질 분획은 SDS-전기영동으로 확인하였고, 실험 전까지 -80°C에 보관하였다.

### 3) Gel Electrophoresis

SDS-PAGE는 Laemmli 방법에 따라 8% acryl amide gel을 사용하였으며 단백질 염색은 Coomassie brilliant blue R-250으로 하였다. 분자량 측정을 위한 표준단백질은 Sigma사의 high molecular weight range marker(205,000, 116,000, 97,000, 84,000, 66,000, 55,000, 45,000, 36,000 Da)를 사용하였다.

## 2. 항체의 제작

### 1) Monoclonal 항체

#### (1) Mice 면역

분리된 꼭저구의 VTG(약 50 µg)는 동량의 Freund's complete adjuvant와 섞어 두 마리의 Balb/C mice에 복강 내 주사하여 면역시킨 후, 일주일 간격으로 정제된 VTG(약 30 µg)와 동량의 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 2회 주사하였다. 마지막 주사 후 면역 확인을 위해 mice 혈액으로 immunoblotting하였고, 면역 확인 후 hybridoma cell 제작 3일 전에 50 µg VTG로 booster하였다.

#### (2) Hybridoma 제작

단클론 항체(Monoclonal antibodies, Mabs)는 Harlow & Lane(1988) 방법을 변형하여 제작하였다. 분리된 꼭저구 난황단백질을 mice에 주사하여 면역시킨 mice의 비장세포를 분리한 후 myeloma cell(sp2/0-Ag14)과 약 7:1의 비율로 polyethylene glycol 1500(Boehringer Mannheim, Germany, 75mM Hepes 50% PEG w/v)을 이용하여 융합시켰다. 융합된 세포들은 RPMI-1640(RPMI 1640 Gibco Laboratories), 15% fetal bovine serum, HAT(0.1mM hypoxanthine aminopterin과 0.016mM thymidin)에 희석하여 96 well tissue culture plate(NUNC)에 well 당  $6 \times 10^5$  cell을 넣어 37°C,

5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하여 융합된 hybridoma cell들을 선택하였다.

항체의 생성을 확인하기 위하여 배양 15일 후 colony를 형성한 well의 상층액을 대상으로 western blotting 방법에 의하여 검사하였다.

### (3) 복수 항체 제작

항체 생성이 확인된 hybridoma cell은 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium) 배지로 tissue culture flasks에서 대량 배양되었다.

7일 전에 500 µL pristane을 주사한 2마리 Balb/C mice에  $5 \times 10^6$  hybridoma cell을 수확하여 0.5ml PBS에 현탁하여 각각 복강 내 주사하였다. 복강 주사 후 7~15일 뒤 복수가 최대 생성되면 경추 탈골시킨 후 복부로부터 복수를 채취하였다. 채취된 복수는 원심분리(3,000g, 30min, 4°C)한 후 상층을 취한 후 포화 ammonium sulfate와 1:1의 비율로 첨가하여 4°C에서 12시간 정치시켜 IgG를 침전하였다. 침전된 IgG는 원심분리(3000×g, 30min, 4°C)하여, PBS에 용해하여 투석한 후 항체로 사용하였다.

### 2) Polyconal 항체 제작

#### (1) 토끼 면역

분리된 꼭저구 난황단백질을 동량의 Freund's complete adjuvant와 섞어 두 마리의 뉴질랜드산 화이트 토끼의 임파선에 주사하여 면역시킨 후, 일주일 간격으로 분리된 꼭저구 난황단백질을 Freund's incomplete adjuvant와 섞어 피하에 2회 주사하였다. 마지막 주사 후 면역 확인을 위해 토끼 혈액으로 immunoblotting하였고, 전체혈 3일 전에 분리된 난황단백질로 booster하였다.

#### (2) 항혈청 분리

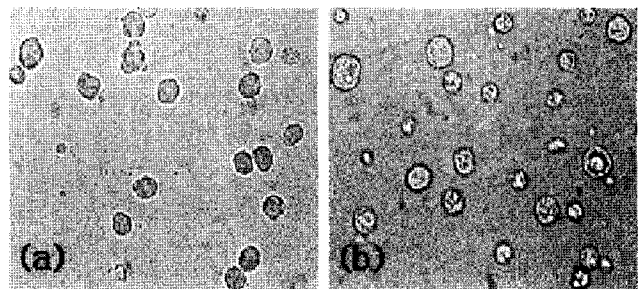


Fig. 2. Microphotography of myeloma cells(a) and hybridoma cells(b).

경동맥으로부터 전 채혈한 후 24시간 비동화시킨 후 3,000G에서 원심분리하여 항혈청을 분리하였다. 분리된 항혈청은 VTG에 대한 ELISA system에 사용할 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 3. Bioassay System 구축

#### 1) Sandwich ELISA System protocol

**First antibody I coating** : 제작된 단일클론 항체는 0.5M sodium carbonate buffer(pH 9.6)로 희석하여 ELISA용 96 well plate에  $100\ \mu\text{L}$  씩 분주 후 12시간  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다.

**Blocking** : Well 표면에 coating되지 않은 antibody는 PBST(0.05% Tween 20 in PBS)로 5분간 3회 세척하여 제거하였고 비특이적인 결합을 막기 위해 BBS(Borate-buffered saline in 1% BSA)를 well plate에  $200\ \mu\text{L}$  씩 분주 후  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 배양하였다.

**Sample and standard incubation** : 배양된 plate는 PBST로 3회 세척한 뒤 혈액 시료와 standard를 antibody-dilution buffer(1% BSA in PBS)에 희석하여 각 well에  $100\ \mu\text{L}$  씩 분주하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 배양하였다.

**First antibody II incubation** : Plate는 PBST로 3회 세척 후 제작된 polyclonal 항체를 antibody-dilution buffer (1% BSA in PBS)에 희석하여 각 well에  $100\ \mu\text{L}$  씩 분주하여 2시간 동안  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다.

**Second antibody incubation** :  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 배양 후 plate는 PBST로 3회 세척하였고, biotinylated-anti-rabbit IgG 항체를 antibody-dilution buffer(1% BSA in PBS)에 희석하여 각 well에  $100\ \mu\text{L}$  씩 분주하여 1시간  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다.

**ABC reagent(horseradish peroxidase-streptavidin conjugate) incubation** : 같은 방법으로 plate를 3회 세척 후 PBST에 ABC reagent를 희석하여, 각 well에  $100\ \mu\text{L}$  씩 분주하여 30분간 실온에서 배양하였다.

**Visualization of the reaction** : Plate를 3회 세척 후 33',55'-tetramethyl benzidine(TMB) 용액에 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 첨가한 발색액을 well당  $100\ \mu\text{L}$  씩 분주하여 15분 동안 발색시킨 후 0.5M의  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 로 정지시켰다. 발색정지 후 흡광도는 450 nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

#### 2) Antibody 희석 농도 결정

본 assay에서는 first antibody I로 단일클론 항체를, first antibody II로는 polyclonal 항체를 이용하였고 sandwich

ELISA 각 단계에 사용될 항체의 희석 농도를 결정하기 위하여 각 항체의 희석 농도를 달리하여 상기의 assay법에 적용하여 희석 농도에 따른 standard의 반응 정도를 확인한 뒤 최적의 희석 농도를 결정하였다.

#### 3) 혈청의 희석 농도 결정

본 ELISA system의 시료인 혈청의 적정 희석 농도를 결정하기 위하여 정상 수컷 혈청 성분이 본 system에 끼치는 영향 유무를 확인해야 한다. 따라서 먼저 수컷 혈청을 0배, 1,000배, 10,000배의 희석 농도가 되도록 standard에 첨가 후 본 system으로 측정하여 표준곡선을 비교하여 결정하였고, 수컷 혈청과  $\text{E}_2$  처리된 수컷 혈청을 결정된 희석 농도로 희석하여 본 assay로 측정하여 확인하였다.

## 결 과

### 1. 꼭저구에 대한 VTG 정량법

#### 1) 난황단백질 분리 및 항체의 제작

성숙중인 꼭저구 암컷의 난소로부터 분리한 난으로부터 추출한 조난황단백질 추출액을 ion-exchange chromatography(DE-52 column)로 분리한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 2개의 주요 peak가 나타났으며 이들 각 fraction에 대한 SDS-PAGE 양상은 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4-1에서 화살표로 표시한 주요 난황단백질이라고 생각되는 단백질 band를 잘라내어 마우스와 토끼를 이용하여 각각 단클론 항체와 다클론 항체를 제작하였다. 제작된 항체들이 난황단백질에 대한 특이적인 항체인가를 확인하기

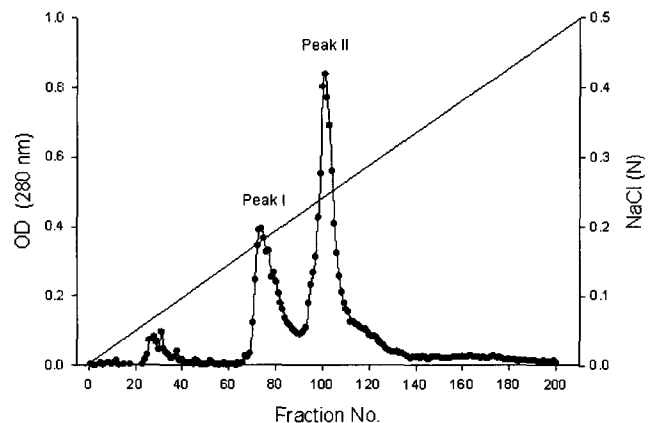


Fig. 3. Elution patterns of ovarian egg extraction of floating goby by ion-exchange chromatography using DE-52 column.

위하여 암컷의 혈청과 난소난 추출물에 대한 Western blotting을 하여 그 결과를 Fig. 4-2에 나타내었다. Fig. 4-2에서 보는 바와 같이 본 연구에서 제작된 항체는 난황단백질과 그 전구체에 대한 항체임을 확인할 수 있었다.

또한 꼭저구의 난황단백질에 대한 항체가 다른 망둑어, 문절망둑과 풀망둑의 VTG에도 반응성을 가지는가를 확인하기 위하여 E<sub>2</sub>를 처리한 문절망둑과 풀망둑에 대하여 Western blotting을 한 결과 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서처럼 꼭저구의 난황단백질에 대한 항체는 문절망둑의 VTG와 동일한 항원성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

따라서 꼭저구의 난황단백질에 대한 항체를 이용하면 문

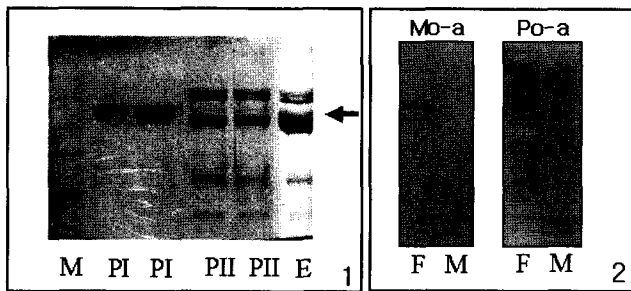


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of yolk proteins purified from ovarian egg extraction by ion-exchange chromatography using DE-52 column(1), and western blot analysis of sera of female and male using antibody against purified yolk protein(2). M: marker; PI: peak I; PII: peak II; E: egg extraction; Mo-a: monoclonal antibody; Po-a: polyclonal antibody; F: female serum; M: male serum.

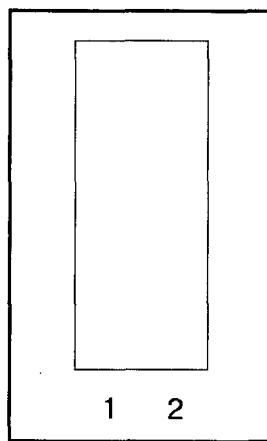


Fig. 5. Western blot analysis of two female gobies(*Acanthogobius flavimanus* and *A. hasta*) sera using monoclonal antibody against yolk protein of floating goby (*Chaenogobius annularis*). 1: *Acanthogobius flavimanus* serum; 2: *Acanthogobius hasta* serum.

절망둑은 물론이고 VTG의 아미노산 서열에 있어서 90% 이상 상동성을 가지는 풀망둑의 VTG 정량을 위한 ELISA system 구축에 이용할 수 있다고 본다.

## 2) 꼭저구 VTG 정량을 위한 ELISA System 티당성 검토

### (1) 항원의 희석 농도 결정

ELISA용 plate의 well내에 혈청 단백질들을 흡착시킬 때와 항원 항체 반응이 일어날 때 시료의 혈청 중에 존재하는 항원 이외의 단백질이나 지방 성분 등에 의한 영향을 파악하고, 혈중 VTG 농도를 정량할 때 적당한 혈청의 희석 범위를 조사하기 위하여 수컷 혈청 농도가 0%, 0.0001%, 0.001%가 되도록 3가지의 0.1M sodium carbonate buffer를 만들었으며, 이들 각각의 완충액을 사용하여 VTG standard를 만들었다. VTG standard는 8단계로 나누고 1에서 8까지 standard 농도를 각각 1,000ng/mL, 500ng/mL, 250ng/mL, 125ng/mL, 62.5ng/mL, 31.3ng/mL, 15.6ng/mL, 7.9ng/mL로 제작하였다. 이들 각 3종류의 표준곡선을 비교하여 Fig. 6에 나타내었다. 이 Fig. 6에서 보는 바와 같이 0.001%의 수컷 혈청이 첨가된 표준곡선은 혈청이 첨가되지 않은 표준곡선보다 전체의 흡광도가 낮으며 또한 서로 평행하지 않았다. 그러나 0.0001%의 수컷 혈청이 첨가된 표준곡선은 혈청이 첨가되지 않은 표준곡선보다 전체적인 흡광도는 다소 낮게 나타났지만 두 곡선은 서로 평행하고 있었다. 이러한 결과로 조사 대상 어류의 혈청은 10,000배로 희석하여 사용하여야 하며, VTG standard를 제작할 때는 0.0001%의 수컷 혈청이 첨가된 0.1M sodium carbonate buffer를 사용하였다.

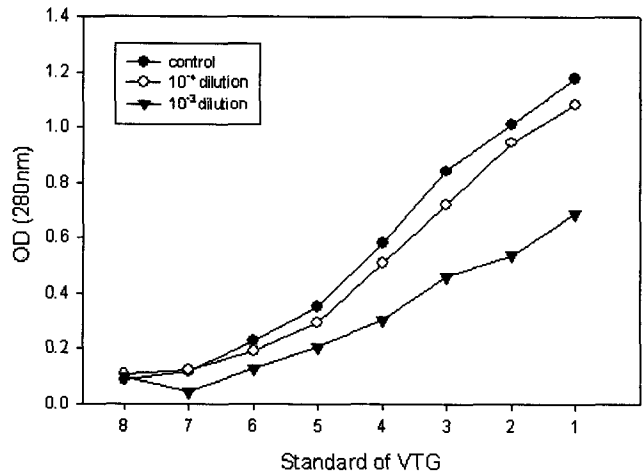


Fig. 6. Standard curves affected by diluted male sera added into serial dilutions of yolk protein.

(2) VTG에 대한 특이성

본 ELISA system에 사용하는 난황단백질에 대한 항체의 반응성과 혈청내의 VTG에 대한 특이성을 나타내는지를 확인하기 위하여 수컷 혈청을 1,000배, 2,000배, 4,000배, 8,000배, 16,000배, 32,000배, 64,000배 그리고 120,000배까지 6단계로 나누어 본 VTG에 대한 ELISA system을 적용하여 흡광도를 측정하고 곡선과 VTG에 대한 표준곡선과 비교하여 Fig. 7에 나타내었다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 수컷 혈청의 희석 농도에 따른 흡광도는 거의 변하지 않았으며, 흡광도는 0.02에서 0.18사이의 값을 보여 항원과 항체에 대한 반응이 거의 일어나지 않았음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 본 VTG 정량을 위한 ELISA system에 사용되고 있는 꼭저구의 난황단백질에 대한 항체들은 수컷 혈청 단백질에 대해서는 거의 반응성이 없음을 보여주었으며, 혈청내의 VTG에 대해서 높은 특이성을 보여주었다.

2. 꼭저구의 난황단백질 항체를 이용한 망둑어류의 VTG에 대한 ELISA System

상기한 꼭저구의 난황단백질에 대한 단클론 항체와 다클론 항체를 이용한 VTG 정량 ELISA system이 꼭저구 이외의 망둑어류의 VTG를 정량하는데 적용이 가능한지를 파악하기 위하여 문절망둑과 풀망둑의 성숙한 암컷 혈청들을 10,000배, 20,000배, 40,000배, 80,000배로 희석하여 standard와 동일한 희석 비율로 만들어 본 VTG assay system에 의해 흡광도를 측정하여 표준곡선과 평행선을 검정하여 Fig. 8에 나타내었다.

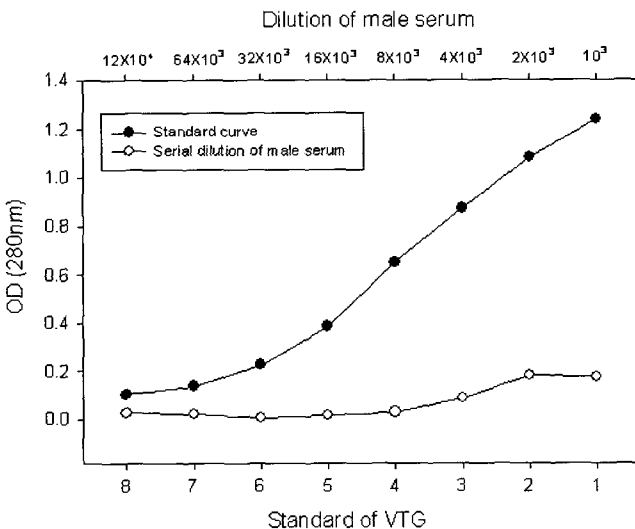


Fig. 7. Absorbance curves for the serial dilutions of mature male serum and standard curve.

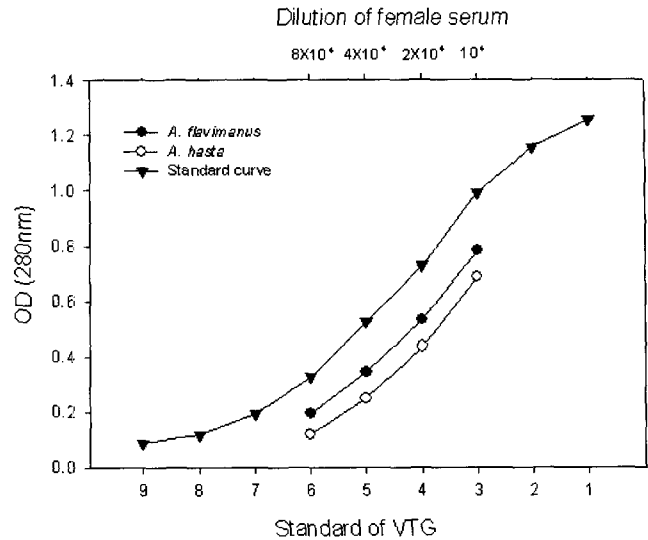


Fig. 8. Absorbance curves of VTG standard and serial dilutions of mature female sera of common goby (*Acanthogobius flavimanus*) and javeline goby (*A. hasta*).

고 찰

최근 외인성 E<sub>2</sub>가 암컷, 수컷과 미성숙한 개체들의 혈중 VTG를 유도할 뿐 아니라(Ng & Idler, 1983; Utarabhand & Bunlipatanon, 1996; Wallace, 1985; Tyler & Sumpter, 1990), 다양한 PCBs나 알킬페놀류와 pesticides 등의 유사 에스트로젠 등도 VTG 생성을 유도한다고 보고되면서(Edmonds et al., 1997; Flouriot et al., 1995; Jobling et al., 1996; Palmer et al., 1998), VTG는 난생동물들에서 자성호르몬의 효과를 조사하기 위한 주요한 생물학적 지표로 주목 받고 있다. 이러한 이유로 지금까지 혈중 VTG를 직접 정량할 수 있는 다양한 측정계가 확립되어 왔는데, 크게 radio-immunoassay(RIA)법과 enzyme immunoassay(EIA)법으로 나눌 수 있다. 첫 번째로 RIA법은 Idler et al.(1979)에 의해 확립되어 무지개송어(Sumpter, 1985), Salmo salar(So et al., 1985), 잉어(Tyler & Sumpter, 1990) 등의 어류에서 사용되었으나 방사선 물질을 VTG에 표지하는 방법이 어렵고, 안전성과 경제성에 낮다는 단점을 가지고 있다. 두 번째로는 VTG를 표지하지 않고 직접 VTG를 측정할 수 있는 EIA법을 들 수 있는데, sole(*Solea vulgaris*)(Nunez et al., 1989), Atlantic sturgeon(*Acipenser sturio*)(Cuisset et al., 1989), 대서양 연어(*Salmo salar*)(Olin et al., 1989), channel catfish (*Ictalurus punctatus*)(Goodwin et al., 1992), striped bass (*Morone saxatilis*)(Kishida et al., 1992) 등에서 사용되었다. EIA법을 이용한 측정계의 대부분은 다클론 항체를 이용

하였는데(Mourot & Le-Bail, 1995; Mosconi *et al.*, 1998; Nilsen *et al.*, 1998), 다클론 항체만을 이용한 방법은 유전적으로 가까운 다양한 종들과 교차결합할 수 있고, 항체 제작 방법은 간편하나, 민감도가 떨어져 혈액 성분들과 비특이적인 결합을 초래하는 단점을 가지고 있다. 최근 단클론 항체를 이용하여 VTG를 측정하는 방법이 개발되었는데(Heppell *et al.*, 1995) 항체 제작 방법이 까다로운 단점을 가지고 있으나 종에 특이적으로 반응하는 장점이 있어 민감한 ELISA계 확립에 사용되고 있다(Heppell *et al.*, 1995; Mourot & Le-Bail, 1995).

본 연구에서는 VTG에 대한 단일 클론 항체를 이용하여 혈청 중에 있는 VTG를 특이적으로 반응을 유도하여 반응한 후 VTG에 대한 다클론 항체를 결합 반응시켜 반응성을 증폭시키는 민감한 정량법으로 다 클론항체만을 이용한 직접법보다 특이적으로 VTG에만 반응할 수 있는 sandwich ELISA system을 확립하였다. 본 연구에서 확립한 ELISA system이 혈청 내 VTG 정량에 사용 가능한지 그 타당성을 조사하였다.

본 연구에 이용된 꼭저구의 VTG에 대한 ELISA system은 성숙한 암컷 혈청 내에 존재하는 VTG에 대하여 특이성을 갖고 있음을 Fig. 6과 Fig. 7에서 알 수 있었다. 그리고 혈청 내의 다른 단백질이나 지방이 항원 항체 반응에 저해하는지를 조사한 실험에서도 혈청을 10,000배 이상 희석하였을 때는 본 assay system에 저해하지 않음을 알 수 있었다. 또한 문절망둑과 풀망둑의 성숙한 암컷의 혈청에 대하여 꼭저구의 난황단백질의 standard와 평행성 조사에서(Fig. 8) 난황단백질의 농도가 31.3ng/mL에서 250ng/mL까지의 범위 내에서는 standard의 표준곡선과 희석한 암컷의 혈청 시료에 대한 곡선과는 서로 평행하고 있었다. 이러한 결과로 꼭저구의 난황단백전구체를 측정하기 위한 ELISA system을 이용하여 문절망둑과 풀망둑의 난황단백전구체의 정량에도 이용이 가능하다는 것을 보여주었다.

## 인용문헌

- Ahel M, McEvoy J, Giger W (1993) Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ Pollut* 79:243-248.
- Anderson HR, Bent HS, Kresten OK (1999) A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicol Environ Safety* 44:56-61.
- Cuisset B, Pelissero C, Le Menn F, Nunez J (1989) ELISA for sturgeon *Acipenser baeri* vitellogenin. First International Symposium on the Sturgeon. Bordeaux, France.
- Edmonds JSG, Fairey ER, Ramsdell JS (1997) A rapid and sensitive high throughput reporter gene assay for estrogenic effects of environmental contaminants. *Neurotoxicology*. 18:525-532.
- Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, Valotaire Y (1995) Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J Mol Endocrinol* 15:143-151.
- Goodwin AE, Grizzle JM, Bradley JT, Estridge BH (1992) Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comp Biochem Physiol* 101B:441-446.
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Heppell SA, Denslow ND, Folmar LC, Sullivan CV (1995) Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environ Health Perspec* 103:9-15.
- Idler DR, Hwang SJ, Crim LW (1979) Quantification of vitellogenin in Atlantic salmo, *Salmo salar* plasma by radioimmunoassay. *J Fish Res Bd Can* 38:574-578.
- Jobling S, Sumpter JP (1993) Detergent component in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocyte. *Aquat Toxicol* 27:361-372.
- Jobling S, Sheaban D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 15:194-202.
- Kishida M, Anderson TR, Specker JL (1992) Induction by  $\beta$ -estradiol of vitellogenin in striped bass (*Morone saxatilis*): Characterization and quantification in plasma and mucus. *Gen Comp Endocrinol* 88:29-39.
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D (1993) Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286.
- Lech JJ, Lewis SK, Ren L (1996) *In vitro* estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout. *Funda Appl*

- Toxicol 30:229-232.
- Mosconi G, Carletta CR, Nabissi M, Polzonetti-Magni AM (1998) Gilthead seabream (*Sparus aurata*) vitellogenin: purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Gen Comp Endocrinol 110:252-261.
- Mourot B, Le-Bail PY (1995) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin. J Immunol 16:365-377.
- Naylor CG (1992) Environmental fate of alkylphenol polyethoxylates. Soap/Cosmetics/Chemical Specialities for 27-35 August, 1992.
- Nilsen BM, Berg K, Arukwe A, Goksøy A (1998) Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring. Marine Environ Res 46:153-157.
- Ng TB, Idler DR (1983) Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In Fish Physiology: Reproduction Part A (Hoar, W. S., Randall, D. J. and Donaldson, E. M., eds), pp. 373-404. New York: Academic Press.
- Nunez J, Kah O, Geffards M, Le Menn F (1989) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for sole vitellogenin. Comp Biochem Physiol 92B:741-746.
- Olin T, Westman A, Decken VD (1989) Time- and temperature-dependent appearance of vitellogenin in Golgi vesicles and serum after estrogen treatment of salmon (*Salmo salar*). J exp Zool 249:213-220.
- Palmer BD, Huth LK, Pioto DL, Selcer KW (1998) Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system. Environ Toxicol Chem 17:30-36.
- Smeets Jean MW, Rankouhi TR, Nichols KM, Komen H, Kaminski NE, Giesy JP, van den Berg M (1999) *In vitro* vitellogenin production by carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening method for determining (anti)estrogenic activity of xenobiotics. Toxicol Appl Pharmacol 157:68-76.
- So YP, Idler DR, Hwang SJ (1985) Plasma vitellogenin the landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar* Ouananiche: isolation, homologous radioimmunoassay and immunological crossreactivity with vitellogenin from other teleosts. Comp Biochem Physiol 81B:63-71.
- Sumpter JP (1985) The purification, radioimmunoassay and plasma levels of vitellogenin from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. In Current Trends in Comparative Endocrinology (Eds by Lofts B Holmes WN), pp 355-357. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Tyler CR, Sumpter JP (1990) The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. Fish Physiol Biochem 8:111-112.
- Utarabhand P, Bunlipatanon P (1996) Plasma vitellogenin of grouper (*Epinephelus malabaricus*): Isolation and properties. Comp Biochem Physiol 115C:101-110.
- Wallace RA (1985) Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. In: Developmental Biology (Ed by L Browder), Pergamon Press, Elmsford, New York. Vol. 1, pp 127-177.