

# 정제 잉어 Vitellogenin과 합성 Vitellogenin 펩타이드에 대한 항체의 반응성

문대경 · 김남수<sup>1</sup> · 김우연\*

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과, <sup>1</sup>한국식품연구원

## Reactivity of the Antibodies against Purified Carp Vitellogenin and a Synthetic Vitellogenin Peptide

Dae-Kyung Moon, Namsoo Kim<sup>1</sup> and Woo-Yeon Kim\*

Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea

<sup>1</sup>Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

Received June 2, 2006; Accepted September 13, 2006

Vitellogenin, which is found in the serum of female and male fishes exposed to environmental endocrine disrupter or estrogen hormone, is used as a biomarker for environmental contamination with an endocrine disrupter. In order to produce antibody against vitellogenin, a synthetic peptide for partial vitellogenin was injected into rabbits. In addition, by using ion exchange chromatography on DE-52, vitellogenin was purified from the serum of carp induced with 17 $\beta$ -estradiol. Polyclonal antibody against purified vitellogenin reacted well with vitellogenin in the serum of carp induced with 17 $\beta$ -estradiol and the serum of female carp, whereas polyclonal antibody against the vitellogenin peptide did not react with proteins in those samples. This may indicate that vitellogenin proteins, covalently modified largely, could not be detected by Western blotting with the polyclonal antibody against the synthetic vitellogenin peptide.

**Key words:** carp, 17 $\beta$ -estradiol, vitellogenin purification, peptide, antibody

### 서 론

세계적으로 화학 산업, 제약 및 식품공업 등의 폐수에는 강이나 지표수, 지하수와 음용수를 현저하게 오염시킬 수 있는 유해물질이 다량 함유되어 있고 이러한 오염물질 중의 한 부류로 환경호르몬을 들 수 있다. 사람이 만든 화학물질과 그들의 분해산물 중의 상당부분은 발정을 촉진하는 에스트로겐 활성을 지니고 있으며 그들의 대부분이 수계에 들어가서 한계농도 이상으로 존재하면 생식기능의 변화를 초래하게 된다.<sup>1)</sup> 수계에는 또한 식물성 에스트로겐을 망라하는 자연성 에스트로겐과 17 $\beta$ -estradiol 등의 스테로이드 에스트로겐 및 합성 에스트로겐인 17 $\alpha$ -ethinylestradiol 등도 생식기능에 영향을 미칠 수 있는 농도로 존재할 수 있다.<sup>2)</sup> 또한 스테로이드 에스트로겐은 어류에 최대 10,000배 까지 농축되어 그들의 생물활성을 증진시키는 것으로 보고되고 있다.<sup>3)</sup>

생태계에서의 내분비 교란 현상의 증거로서 어류에서의 생식

기능의 이상이 보고되고 있으며 이는 주로 환경성 내분비 교란 물질에 노출된데 따른 것이고,<sup>4,5)</sup> 이를 검증하는 유효한 생물지표로서 vitellogenin의 유도현상을 들 수 있다. 환경호르몬에 노출된 무지개송어(rainbow trout), 잉어(carp), 도미(sea bream), 연어(atlantic salmon) 등 대부분의 어류에서는 vitellogenin과 같은 지표단백질이 정상 어류보다 고농도로 분비되므로 이들을 측정하면 식용으로 하는 이들 어류의 환경호르몬 오염여부를 파악할 수 있다. Vitellogenin은 에스트로겐 의존성의 난황단백질 전구체인 phospholipoglycoprotein으로서 일반적으로 난소의 에스트로겐에 반응하여 보통 때는 암컷 어류의 혈청 내에만 존재한다. 수컷 어류나 치어의 경우에는 보통 발견되지 않지만 이들은 vitellogenin 유전자와 vitellogenin 대사조절에 필요한 에스트로겐 수용체를 가지고 있다. 따라서 에스트로겐 분비에 따라 암컷의 간에서만 합성되는 vitellogenin은 에스트로겐 활성이 의심되는 내분비계 장애물질에 수컷이 노출되었을 때에도 생성되어 이 단백질의 양이 오염된 환경의 간접적 지표로 사용될 수 있다. 수컷 어류가 환경성 내분비 교란물질(에스트로겐)에 노출되면 간에서 에스트로겐 수용체와 결합하고 vitellogenin의 발현이 촉진되어 혈액으로 이동한다. Vitellogenin 유전자가 발현되어 혈액 중에 vitellogenin이 축적되면 혈청 내 vitellogenin

\*Corresponding author  
Phone: 82-31-675-3063; Fax: 82-31-675-0405  
E-mail: wykim@cau.ac.kr

이 최대 1,000,000배 증가된다고 보고되고 있다.<sup>6,7)</sup>

Vitellogenin 유도현상의 감응도가 이와 같이 매우 높기 때문에 이를 이용하여 *in vitro*와 *in vivo*에서 에스트로젠 물질의 영향평가를 수행하고 있으며,<sup>8-10)</sup> 이를 위해서는 vitellogenin에 대한 고감도의 정성 및 정량적 분석기법 개발이 필수적이므로 이를 위한 다양한 원리의 관련연구가 시도되고 있다. 현재 외국에서 연구되고 있는 vitellogenin 검사법을 크게 분류하면 유전자 발현산물인 vitellogenin 자체를 검색하는 방법과 유전자 수준에서 간접적으로 검색하는 방법으로 구분할 수 있다.<sup>11,12)</sup> 전자의 방법으로는 전기영동 및 Western blotting 결과를 비교하여 정량하는 방법<sup>13)</sup>과 효소면역분석법을 위주로 하는 면역분석법 등<sup>14-18)</sup>이 보고되고 있고 후자의 방법으로는 전사 산물인 mRNA를 분석하는 RT-PCR 방법 등<sup>19-21)</sup>이 보고되고 있다. 이들 중 vitellogenin 직접측정법으로 보다 신뢰성 있는 면역분석법의 일반적인 검출한계는 1~2 ng/ml로 보고되고 있으며,<sup>22,23)</sup> 다클론 항체를 이용한 실험에서는 일반적으로 동종에서 제조한 항체만이 동종의 vitellogenin을 정확하게 정량 할 수 있으나 몇몇 vitellogenin 항체의 경우에는 동일 목에 속하는 다른 어류의 vitellogenin과 교차 반응성이 알려지고 있다.<sup>24-26)</sup>

현재 환경호르몬 분석에 대하여는 GC-MS, LC-MS 등 기기 분석법을 위주로 국내에서도 연구개발이 활발하게 이루어지고 있으나, 환경호르몬에 노출된 생태계의 구성인자(예, 식용어류 등)에서 나타나는 생물지표단백질의 농도변화 등에 대해서는 국내에서의 관련연구가 미흡한 실정이다. 이들 지표단백질들은 식품원료의 환경호르몬 오염여부를 모니터링 하는데 매우 유용하고 특히 vitellogenin의 경우 환경호르몬에 의한 유전자 발현에 의해 어류 등에서 매우 큰 농도변화를 보여주는 매우 민감한 지표이므로 이를 측정하는 기술이 국내에서도 시급하게 정립되어야 하며 이를 위한 기반기술로서의 vitellogenin 단백질의 발현 및 정제와 이를 이용한 항체생산 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 외국의 경우에는 vitellogenin 정제에 대한 연구 결과가 발표되었으나,<sup>27,28)</sup> 국내에서는 현재 식용어류의 환경호르몬 오염여부와 관련된 연구결과를 거의 찾아보기 어렵고 vitellogenin의 정제와 이의 항체 생산에 대한 연구가 별로 되어 있지 않다. 그리고 외국에서 제작한 항체의 경우 그 항체가 효율적으로 국내산 잉어의 vitellogenin에 적용되지 않을 수도 있다.

본 연구에서는 에스트로젠인 17 $\beta$ -estradiol을 잉어에 주사하여 vitellogenin을 유도하고 유도된 vitellogenin을 정제하며 이에 대한 항체를 만들고자 한다. 그리고 vitellogenin 부분 서열에 대한 펩타이드를 합성하고 이에 대한 항체를 만든 후 두 종류의 항체 반응성을 비교하고자 한다.

## 재료 및 방법

**재료.** MS-222, 17 $\beta$ -estradiol, peanut oil, protease inhibitor cocktail, Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, anti-rabbit IgG-AP는 Sigma(USA)에서 구입하였다. DE-52는 Whatman(England)에서 그리고 PVDF(polyvinylidene fluoride) membrane은 PALL Corporation(USA)에서 구입하였으며, 기타 시약은 분석용 시약을 사용하였다.

**잉어에서의 vitellogenin 유도.** 수돗물 중의 염소를 제거하기 위하여 미리 물을 받아놓고 1~2일 정도 지난 후에 양어조에 물을 옮기고 용존 산소를 유지시켜주기 위해서 공기펌프를 설치하였으며 수온을 일정하게 유지시켜 주기 위해 기온을 18°C로 맞춰주었다(Fig. 1). 건강한 잉어 6마리를 양어조에서 1주일정도 적응시킨 후 최종농도 0.01%의 MS-222 마취제 용액을 작은 수조에 넣고 잉어를 5분 정도 마취시켰다. 2마리는 대조군으로 주사하지 않고 각각 2마리씩 peanut oil과 methanol/chloroform(1:1) 용매에 녹인 17 $\beta$ -estradiol을 잉어중량 100 g 당 1 mg 농도로 복강에 주사하였다. Peanut oil 10 ml에 80 mg 호르몬을 녹인 것은 잉어 100 g 당 125  $\mu$ l를 주사하였으며, methanol/chloroform(1:1) 용매 1 ml 당 50 mg 호르몬을 녹인 것은 잉어 100 g 당 20  $\mu$ l를 주사하였다. 깨끗한 물에 잠시 깨어날 때까지 담근 후, 기력을 회복하면 양어조에 다시 넣어 주었다. 7일 후에 다시 마취한 후 상기와 동일한 양을 복강에 2차 주사하였다. 그리고 2차 주사 7일 후에 잉어를 10분간 마취하고 잉어의 옆줄을 따라 비스듬히 주사기를 찌러 넣어 대동맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액은 채취하자마자 protease inhibitor cocktail을 5% 되도록 첨가하고 상온에서 30분 방치하여 적혈구가 응고되도록 기다린 후, 4,000 rpm에서 30분 동안 원심분리를 하여 상등액(혈청)을 얻었다. 혈청을 500배 희석한 뒤 7% acrylamide gel을 사용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다.<sup>29)</sup>

**잉어 혈청으로부터 vitellogenin 정제.** Vitellogenin이 유도된 잉어의 혈청을 DEAE-cellulose(DE-52)를 사용하여 4°C에서 정제하였다. 완충액 A(5%의 protease inhibitor cocktail을 포함한 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0)를 40 ml 흘려준 20 ml의 DE-52 칼럼에 10배 희석된 잉어 혈청 5 ml를 1.5 ml/min의 유속으로 흘려주었다. 완충액 A 25 ml를 더 흘려주어 씻어준 후, NaCl gradient로 완충액 A와 완충액 B(1 M NaCl이 포함된 완충액 A)를 40 ml씩 흘려주어 vitellogenin을 정제하였다. 정제한 시료는 7% acrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE를 실시하여 확인하였다.

**정제된 vitellogenin을 이용한 항체제작.** Vitellogenin 정제된 것을 항원으로 사용하여 항체를 제작하였다. 정제된 vitellogenin을 전기영동 한 후, 염색 용액(0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% glacial acetic acid)에서 30분간 염색한 후, 탈색 용액(10% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 1시간 정도 탈색시키고 탈색 용액을 바꾸어 하룻밤 방치하였다. 탈색시킨 gel에서 vitellogenin band를 잘라 액화질소에서 얼리고 파쇄한 후 동결 건조한 항원을 600  $\mu$ l의 PBS buffer(100 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)에 녹였다. 다음 과정의 항체 제작은 랩프런티어(서울, 한국)에 의뢰하였다. PBS에 녹인 항원에 600  $\mu$ l의 Freund's complete adjuvant를 섞어 점성이 강한 현탁액이 생길 때까지 혼합한 후, 3 ml 주사기에 옮겨 21 gauge의 바늘을 이용, 토끼의 등 부위 피하 2-3곳에 나누어 주사하였다. 2주 뒤에 항원을 Freund's incomplete adjuvant에 녹인 후 2차 주사를 놓았고, 다시 일주일 뒤에 동일한 방법으로 3차 주사를 놓은 후, 일주일 뒤에 토끼의 이정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액

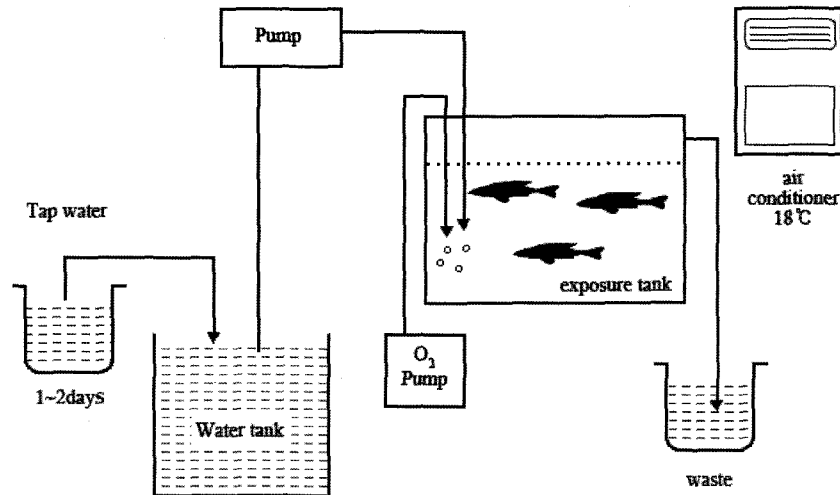


Fig. 1. Incubator facilities to culture carp.

을 상온에서 1시간 동안 방치시킨 후, 3,000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 새 tube로 옮기고 4°C에서 하룻밤 방치한 후, 혈청 이외의 찌꺼기를 제거하였다. 이렇게 하여 얻어진 혈청에 0.02% NaN<sub>3</sub>를 넣어 -70°C에서 보관하였다.

**항체 확인을 위한 ELISA.** Coating buffer(0.068 M NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.032 M Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>)에 정제한 vitellogenin(Fig. 3의 fraction E6)을 2 µg/ml가 되게 넣은 후, 96 well microplate의 각 well에 100 µl씩 가하고, sealing하여 하룻밤 정지하였다. 항체를 PBS-T buffer(150 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween 20)에 1/1,000에서부터 1/100,000까지 희석시켰다. Plate를 4°C에서 꺼내어 coating buffer를 제거하고 well 당 150 µl의 wash buffer(PBS-T)로 3회에 걸쳐 세척 한 후, 희석시킨 항체를 세로열 기준으로 각 100 µl씩 넣고, sealing하여 실온에서 1시간 동안 방치한 후, 다시 150 µl wash buffer로 3회에 걸쳐서 세척하였다. 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated goat Ab against rabbit IgG)를 1/5,000까지 희석을 시켜 각 well 당 100 µl씩 가하고, sealing하여 실온에서 1시간 동안 방치한 후 세척하였다. 이렇게 준비된 plate에 각 well 당, 100 µl의 substrate mixture [1 mg tetramethyl benzidine (TMB)/ml methanol 1 ml에 7 µl의 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣은 후, 9 ml TMB substrate buffer(Sigma P-4809)에 첨가를 넣어 30분간 반응시켰다. Well 당 50 µl의 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 반응을 멈추고 microplate reader(BIO-RAD Model 550, USA)를 이용하여 492 nm에서 측정하여 항원을 주사하기 전의 토끼의 혈청과 비교하고 항체 생성을 확인하였다.

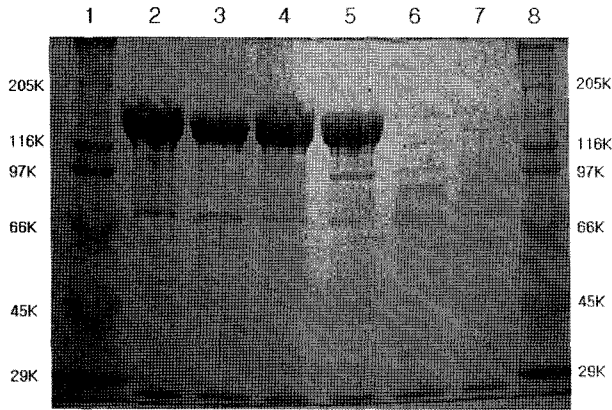
**합성 peptide에 대한 polyclonal antibody 제작.** Vitellogenin의 짧은 peptide를 합성할 최적의 지역을 선택하여 랩프론티어에 의뢰하여 peptide를 합성하였으며 이것에 대한 항체를 제작 의뢰하였다.

**Western blotting.** Vitellogenin이 유도된 잉어와 그렇지 않은 잉어의 혈청을 500배 희석하여 SDS-PAGE하고, Mini Trans-Blot Cell(BIO-RAD, USA)을 이용하여 Bio-Rad manual에 따라 PVDF membrane에 100 V로 하룻밤 동안 transfer 시켰다. Transfer된 PVDF를 5분 동안 washing buffer(0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.5% TX-100, 0.08% SDS)에서 씻어

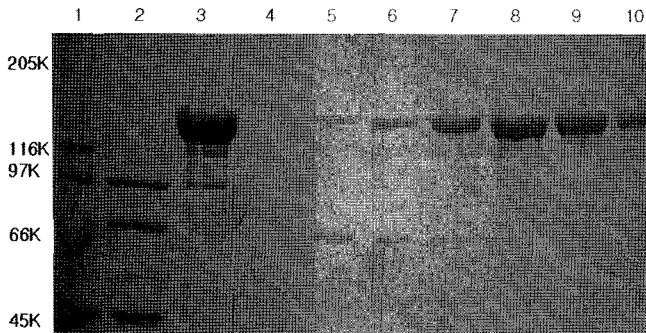
준 후 30분 동안 5% blocking solution(washing buffer, 5% nonfat dry milk)을 넣고 잘 섞어 항체의 비특이적 결합을 막았다. Vitellogenin을 정제하여 제작한 항체를 1:5,000의 비율로 넣은 5% blocking solution에 PVDF를 담가 30분 동안 결합을 유도하고, washing buffer로 10분씩 4번 세척하였다. 그 후 PVDF를 5% blocking solution에 1:30,000 비율로 2차 항체인 anti-rabbit IgG-AP를 첨가한 용액에 넣어 결합을 유도하고, washing buffer로 10분씩 4번 세척하였다. 마지막으로 NBT solution(100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.33 mg NBT/ml) 15 ml와 BCIP solution(2.5 mg BCIP/50 µl dimethylformamide)을 섞은 substrate buffer를 처리하여 band가 보일 때까지 반응을 시켰다.

## 결과 및 고찰

**유도된 잉어로부터의 vitellogenin 정제 및 항체 제작.** 혈청을 500배 희석한 후 7% acrylamide gel을 사용하여 Fig. 2와 같이 SDS-PAGE를 실시하였다. 혈청을 500배로 희석했음에도 약 180K의 vitellogenin이 현저하게 유도된 것이 확인되었으며, 17β-estradiol에 노출되면 어류에서 최대 백만배까지 증가된다는 보고<sup>6)</sup>가 사실임을 알 수 있었다. 약 29K 부분의 단백질 band와 약 180K 부분의 vitellogenin band를 비교해볼 때 17β-estradiol에 의해 유도된 것과 유도되지 않은 것의 농도가 29K 보다 낮은 분자량의 band의 경우는 비슷한데 비하여, 유도된 잉어 혈청에서 약 180K 부분 band만 확실하게 증폭되었음을 볼 수 있었으며 (lanes 2-5), 희석율과 다른 band와의 차이로 생각해볼 때 혈청의 대부분 단백질이 vitellogenin일 것으로 예상되었다. 해부하기 전 암수 구별이 어려워 주사를 할 때 암수 각각에 다른 용매를 사용하지 못했지만, 17β-estradiol을 녹이기 위해 사용한 peanut oil과 methanol/chloroform(1:1) 중 어떤 용매를 사용하는 것에 대한 차이는 특별히 없어 보였으며, 유도된 잉어가 암컷인지 수컷인지에 따라 vitellogenin의 발현량의 차이도 없어 보였다. 또한, 유도되지 않은 암컷의 혈청에도 vitellogenin이 원래 존재하지만 그 양이 많지 않아서 500배 희석의 혈청에



**Fig. 2. SDS-PAGE for the vitellogenin in carp serums.** Lane 1, high and low molecular weight standard markers; lanes 2 and 3, 500-fold diluted serum of male carp 1 and 2 induced with 17 $\beta$ -estradiol dissolved in methanol/chloroform (1 : 1), respectively; lanes 4 and 5, 500-fold diluted serum of female carp 1 and 2 induced with 17 $\beta$ -estradiol dissolved in peanut oil, respectively; lanes 6 and 7, 500-fold diluted serum of female carp and male carp without induction, respectively; lane 8, high and low molecular weight standard markers.

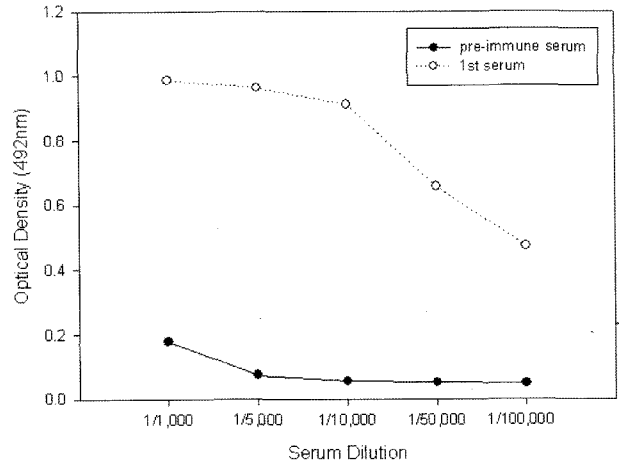


**Fig. 3. SDS-PAGE for the vitellogenin purified on DE-52 column from serum of a carp induced with 17 $\beta$ -estradiol.** Lane 1, high molecular weight standard marker; lane 2, low molecular weight standard marker; lane 3, 500-fold diluted serum of a carp induced with 17 $\beta$ -estradiol; lane 4, flow-through fraction (F1); lanes 5-10, purified fractions (E1-E6).

서는 SDS-PAGE 상으로는 vitellogenin이 거의 보이지 않았다.

Fig. 2의 vitellogenin의 발현된 양을 살펴보면 정제과정 없이 항체를 만들어도 충분할 것이라고 생각되었지만 혈청 안에 각종 호르몬, 다당류, 혈소판, 항체 등 여러 물질들을 제거하기 위해 잉어의 혈청을 DE-52 chromatography를 통해 Fig. 3와 같이 정제를 하였다. NaCl gradient(0-1 M NaCl)를 걸어주어 약 66K의 단백질과 vitellogenin이 순수 분리되는 것을 알 수 있었다. 이 중에서 가장 깨끗한 fraction(E6)의 vitellogenin 부분만을 오려서 토끼에 주사하여 항체를 제작하였고, Fig. 4의 ELISA 결과를 보면 항원을 주사하지 않은 preimmune serum에 비하여 1st serum(1차 채취 serum)의 반응도가 뚜렷하여 항체가 잘 만들어졌음을 알 수 있었다.

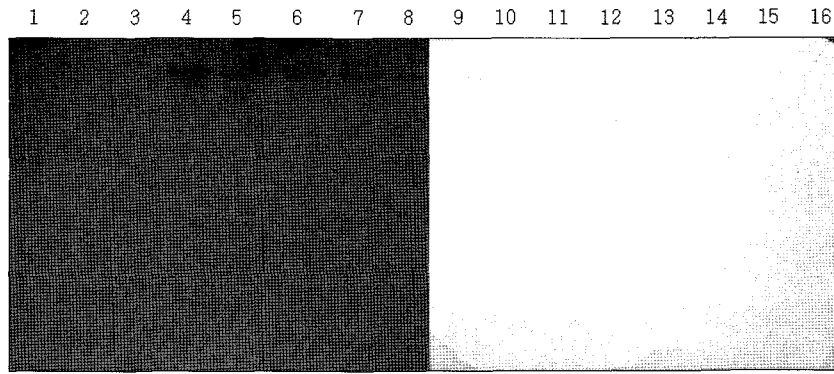
**정제 vitellogenin과 합성 peptide에 대한 polyclonal antibody의 반응성.** 정제 vitellogenin에 대한 항체의 경우는 반응성이 좋아서 잉어 혈청 중의 vitellogenin을 Western blotting 실험에서 잘 인식하였다. 이 항체를 이용한 Western blotting에서 유도되



**Fig. 4. ELISA for the polyclonal antibody against the purified vitellogenin from a carp induced with 17 $\beta$ -estradiol.**

지 않은 수컷의 경우는 vitellogenin이 검출되지 않았으나, 유도된 수컷의 경우 다량의 vitellogenin이 검출됨을 알 수 있었다. 유도되지 않은 암컷의 경우는 전기영동 gel(Fig. 3)에서는 vitellogenin이 거의 보이지 않지만, 정제한 vitellogenin에 대한 항체로 Western blotting을 한 Fig. 5의 lane 3에서 보여 주듯이 유도되지 않은 암컷 잉어에서도 소량의 vitellogenin이 존재함을 확인할 수 있다. 정제된 vitellogenin에 대한 항체를 이용한 Western blotting 실험에서 단백질 molecular weight marker나 다른 혈청 단백질과 반응하지 않는 반면에 vitellogenin band에 특이적으로 잘 반응하는 것으로 보아서 항체가 잘 만들어졌음을 확인할 수 있었다.

잉어와 마찬가지로 vitellogenin 감응성이 높은 어종인 무지개송어의 vitellogenin을 검출할 수 있게 잉어와 무지개송어의 비슷한 sequence지역을 선택하여 peptide를 합성하고자 하였다. 잉어는 정제하여 항체를 만들 것이므로 특히 무지개 송어 중심으로 서열을 선택하여 peptide 합성 후 항체를 제작하였다. 무지개 송어 vitellogenin의 짧은 peptide를 합성할 최적의 지역을 선정하기 위하여 무지개 송어 vitellogenin에 대한 domain search를 하여 다른 단백질에도 많이 있는 domain을 먼저 제외하였다. 단백질 서열의 antigenicity에 근거한 peptide region prediction을 확인한 결과 8 부위 이상에서 예상 가능 지역을 찾아내었지만, N-말단이나 C-말단 쪽에 가까운 지역을 선택하여 항체를 제작하는 것을 원칙으로 하였다. 그 중에서 N-말단에 위치하고 있는 Prediction 1(REDAKAERIHILTKSKDC)이 가장 적당할 것으로 판단되어 선택한 peptide region이 다른 단백질과 어느 정도 일치하는지 homology search를 통해 살펴본 결과 다른 종류의 단백질과 유사성이 없었기에, 이 지역을 선택한 후 peptide를 합성하고 항체를 제작하였다. 하지만 여기서 얻은 항체를 가지고 정제된 잉어 vitellogenin에 대한 Western blotting 실험을 수행하였으나 서로 반응성이 보이지 않았다 (Lanes 9-16, Fig. 5). 아마도 2가지 종의 어류 vitellogenin을 모두 검출하기 위해 무지개 송어의 서열을 중심으로 잉어의 서열과 비슷하게 선택한 서열에 문제가 있었던 것으로 생각된다. 또한 공유결합적으로 많은 변형이 일어난 vitellogenin 단백질은,



**Fig. 5. Western blotting for the vitellogenin in carp serums.** Lanes 1-8, Western blotting using the antibody against a purified carp vitellogenin; lanes 9-16, Western blotting using the antibody against a synthetic partial vitellogenin peptide; lanes 1 and 9, standard molecular weight marker; lanes 2 and 10, 1,000-fold diluted serum of a male carp without induction; lanes 3 and 11, 1,000-fold diluted serum of a female carp without induction; lanes 4 and 12, 1,000-fold diluted serum of female carp 1 induced with  $17\beta$ -estradiol dissolved in peanut oil; lanes 5 and 13, same as the above except for female carp 2; lanes 6 and 14, 1,000-fold diluted serum of male carp 1 induced with  $17\beta$ -estradiol dissolved in methanol/chloroform (1 : 1); lanes 7 and 15, same as lanes 6 and 14 except for male carp 2; lanes 8 and 16, standard molecular weight marker.

공유결합적으로 변형이 일어나지 않은 vitellogenin peptide에 대한 다클론 항체에 의해 검출되지 않는 반면에 정제하여 얻은 vitellogenin의 다클론 항체에 의해 잘 검출됨을 보여주는 결과라 할 수 있다.

앞으로 정제된 vitellogenin에 대한 항체를 이용하여 잉어를 포함한 어류에서 생물학적 지표인 vitellogenin의 양을 측정할 것이며, 본 항체는 수계의 환경호르몬 오염 정도를 측정하는 다양한 면역센서를 개발 하는데 도움이 될 것이다.

## 초 록

Vitellogenin은 어류의 난황 단백질의 전구체 물질로서 암컷 혈청에서 발견되는 단백질이며, 외부에서 에스트로겐이나 내분비계장애물질에 노출된 경우에는 수컷이나 미성숙한 암컷에서도 이의 합성이 촉진되는 것으로 보고되었다. 따라서 수컷에서 유도되는 vitellogenin은 외인성 에스트로겐 물질에 노출되었음을 암시하는 중요한 지표로 인정되고 있다.

Vitellogenin에 대한 항체를 생산하기 위하여 잉어의 vitellogenin 서열 중의 일부분에 대한 peptide를 합성한 후 그 합성 peptide에 대한 항체를 제작하였다. 그리고  $17\beta$ -estradiol을 주입한 잉어의 혈청에서 DE-52 이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 vitellogenin을 정제한 후 이에 대한 항체를 제작하였다. 본 연구에서는 상기의 합성 vitellogenin peptide에 대하여 제작한 다클론 항체와 vitellogenin 단백질에 대한 다클론 항체가 추후 에스트로겐의 지표로 사용될 수 있는지를 조사하고자 항체의 반응성을 조사하였다. 정제하여 얻은 vitellogenin에 대한 다클론 항체는 Western blotting 시  $17\beta$ -estradiol을 주입한 잉어의 혈청과 암컷 잉어의 혈청에 있는 vitellogenin과 반응한 반면에 vitellogenin peptide에 대한 다클론 항체는 이들과 반응하지 않았다. 이는 공유결합적으로 많은 변형이 일어난 vitellogenin 단백질은 vitellogenin 합성 펩타이드에 대한 항체로는 검출되지 않음을 나타낸다.

**Key words:** 잉어,  $17\beta$ -estradiol, vitellogenin 정제, 펩타이드, 항체

## 감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 연구과제 E063003에 의해 수행된 연구 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Jobling, S., Sheahan, D. A., Osborne, J. A., Matthiessen, P., Sumpter, J. P. 1995. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 194-202.
2. Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G., Sumpter, J. P. and Waldock, M. 1998. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1549-1558.
3. Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Petterson, M., Berg, A. H., Olsson, P-E. and Forlin, L. 1999. *Aquat. Toxicol.* **45**, 91-97.
4. Purdon, C. E., Hardiman, P. A., Bye, V. J., Eno, C., Tyler, C. R. and Sumpter, J. P. 1994. *Chem. Ecol.* **8**, 275-285.
5. Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. and Sumpter, J. P. 1998. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2498-2506.
6. Chen, T. T. 1983. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 802-810.
7. Tyler, C. R., Van der Eerden, B., Sumpter, J. P., Jobling, S. and Painter, G. 1996. *J. Comp. Physiol.* **166**, 418-426.
8. Jobling, S. and Sumpter, J. P. 1993. *Aquat. Toxicol.* **27**, 361-372.
9. Thorpe, K. L., Hutchinson, T. H., Hetheridge, M. J., Sumpter, J. P. and Tyler, C. R. 2000. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2812-2820.
10. Harries, J. E., Sheahan, D. A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J. P., Tyler, T. and Zaman, N. 1997. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 542-543.
11. Tada, N., Saka, M., Ueda, Y., Hoshi, H., Uemura, T. and Kamata, Y. 2004. *J. Comp. Physiol. B* **174**, 13-20.
12. Inui, M., Adachi, T., Inui, H., Nakazawa, M., Ueda, M.,

- Watanabe, H., Mori, C., Iguchi, T. and Miyatake, K. 2003. *Toxicol.* **194**, 43-50.
13. Versonnen, B. J., Goemans, G., Belpaire, C. and Janssen, C. R. 2004. *Environ. Pollut.* **128**, 363-371.
14. Mitsui, N., Tooi, O. and Kawahara, A. 2003. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **135**, 305-313.
15. Prakash Vincent, S. G., Keller, R. and Subramoniam, T. 2001. *Mar. Biotechnol.* **3**, 561-571.
16. Mylchreest, E., Snajdr, S., Korte, J. J. and Ankley, G. T. 2003. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* **134**, 251-257.
17. Hiramatsu, N., Shimidzu, M., Fukada, H., Kitamura, M., Ura, K., Fuda, H. and Hara, A. 1997. *Biochem. Physiol. Part C* **118**, 149-157.
18. Nichols, K. M., Snyder, E. M., Snyder, S. A., Pierens, S. L., Miles-Richardson, S. R. and Giesy, J. P. 2001. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 510-522.
19. Custodia-Lora, N., Novillo, A. and Callard, I. P. 2004. *J. Exp. Zoology* 301A, 15-25.
20. Celius, T., Matthews, J. B., Giesy, J. P. and Zacharewski, T. R. 2000. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* **75**, 109-119.
21. Thomas-Jones, E., Thorpe, K., Harrison, N., Thomas, G., Morris, C., Hutchinson, T., Woodhead, S. and Tyler, C. 2003. *Environ. Toxicol. Chem.* **22**, 3001-3008.
22. Okumura, H., Hara, A., Saeki, F., Todo, T., Shinji, A. and Yamauchi, K. 1995. *Fish Sci.* **61**, 283-289.
23. Parks, L. G., Cheek, A. O., Denslow, N. D., Heppell, S. A., McLachlan, J. A., LeBlanc, G. A. and Sullivan, C. A. 1999. *Comp. Biochem. Physiol. C* **123**, 113-125.
24. Heppell, S. A., Denslow, N. D., Folmar, L. C. and Sullivan, C. V. 1995. *Environ. Health Perspect.* **103**, 9-15.
25. Tyler, C. R., Van Aerle, R., Nilsen, M. V., Blackwell, R., Maddix, S., Nilsen, B. M., Berg, K., Hutchinson, T. H. and Goksoyr, A. 2002. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 47-54.
26. Hauptmann, P. 1991. Resonance sensors. In *Sensors: Principles and Application*, pp. 185-200, Prentice Hall International, UK.
27. Mosconi, G., Carnevali, R., Carletta, R., Nabissi, M., and Polzonetti-Magni, A. M. 1998. *Gen. Comparat. Endocrinol.* **110**, 252-261.
28. Magalhães, I., Ledrich, M.-L., Pihan, J.-C., and Falla Jairo. 2004. *J. Chromatography* **799**, 87-93
29. Laemli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.