

# 솜뱅이(*Sebastiscus marmoratus*)의 Vitellogenin 분석을 위한 효소면역측정법(ELISA) 및 면역크로마토그래피분석법(ICG) 개발

여인규 · 임윤규<sup>1\*</sup>

제주대학교 해양과학대학 수산생명의학전공, <sup>1</sup>제주대학교 수의과대학 수의학과

## Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) and Immunochromatography Assays (ICG) for Analysis of Vitellogenin in the Scorpion Fish *Sebastiscus marmoratus*

In-Kyu Yeo and Yoon-Kyu Lim<sup>1\*</sup>

Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 64234, Korea  
<sup>1</sup>College of Veterinary, Jeju National University, Jeju 64234, Korea

We tested biomarker systems [enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatography assay (ICG) kits] for the screening of endocrine-disrupting chemicals in contaminated environments using antibodies resulting from 17 $\beta$ -Estradiol-induced vitellogenin (Vtg) in the wild scorpion fish *Sebastiscus marmoratus*. Monoclonal antibodies of two clones (S28 and S15) were used as capture and tracer antibodies for ELISA and ICG assays. ELISA detected Vtg at levels greater than 0.1  $\mu$ g/mL, while ICG detected Vtg at levels greater than 1  $\mu$ g/mL. However, the ICG system was able to detect antibodies from 17 $\beta$ -Estradiol-induced Vtg serum that had been diluted 1,000 times. Our results suggest that previously developed biomarker assays can be used as detection systems to detect known endocrine-disrupting chemicals in contaminated environments, and to measure their activity

Key words: Vitellogenin, Monoclonal antibodies, ELISA, Immunochromatography

### 서 론

Vitellogenin (Vtg)은 난생동물의 난황 전구체로, Estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)의 자극에 의해 간에서 합성되어 혈액으로 분비되는 것으로 알려져 있다(Ng and Ider, 1983; Mommsen and Walsh, 1988). 최근의 연구에 의해 Vtg의 합성이 E<sub>2</sub>와 같은 내인성 인자에 의해 유도되는 것 이외에도, 환경 오염을 일으키는 화학물질에 의해서도 그 합성이 유발되는 것으로 알려져 수해양 동물을 대상으로 환경오염에 대한 biomarker로서 Vtg에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Jean MW et al., 1995; Hashimoto et al., 2000; Yeo and Choi, 2000).

한편, 외인성의 화학물질이 내분비계에 영향을 미치는 물질을 내분비계 장애물질 (Endocrine disrupting chemicals; EDs)

이라고 불리고 있으며, 이러한 물질들은 내분비계에 영향을 미쳐 인간이나 동물의 번식장애 등의 건강에 위해를 주는 것으로 큰 문제가 되고 있다(Laughlin, 1986; John et al., 1995; Batley, 1996; An, 1998). 어류 생태계에 미치는 영향으로는 펄프공장 하류에 서식하는 농어류(*Percalleviatilis* sp.)에서 성숙지연, 생식기의 퇴축, 성징의 결여 등이 관찰되었으며(Schwaiger et al., 1998; Tyler and Routledge, 1998), 오염지역의 강이나 호수 등에 서식하는 어류들의 수컷 생식능 저하, 혈장 중의 성선자극호르몬 또는 스테로이드의 저하, 2차 성징의 미숙 등 지금까지 다양한 사례가 보고되고 있다(Theo et al., 1993; Knudsen et al., 1997; Shilling et al., 2000).

우리나라 제주도의 경우에는 양식산업이 발달하여 해안선을 따라 양식장들이 많고 청정해역으로서 수산자원의 보존에 많

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0459>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 48(4) 459-465, August 2015

Received 24 February 2015; Revised 24 June 2015; Accepted 8 July 2015

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3367 Fax: +82. 64. 756. 3354

E-mail address: yklim@jejunu.ac.kr

은 노력을 기하고 있어 연안 해역에 대한 환경 모니터링의 중요성이 매우 높은 지역이라고 할 수 있다. 따라서 이러한 환경의 관리보전과 안전한 양식 산업의 육성을 위해 인근해역의 내분비교란 정도를 파악하는 것은 매우 중요한 과제라고 여겨진다. 최근 몇몇 선진국에서 이미 해양성 어류에 대한 Vtg의 항체를 개발하여 내분비계 장애물질에 대한 효과를 조사하는 연구가 진행되고 있다(Smeers et al., 1999). 본 연구진에서도 이전 연구를 통하여 연안해역의 썸뱅이(*Sebastes marmoratus*)의 Vtg 단클론 항체를 생산하였으며(Kim et al., 2013), 생산된 Vtg의 항체를 이용한 내분비교란 물질의 신속 진단법의 개발은 연안생태계의 화학물질 오염정도를 파악하는데 매우 유용하게 활용될 수 있다. 특히 Kim et al. (2013)에 의하면, 연안 정착종인 썸뱅이 Vtg의 생산 항체는 암컷 특이 단백질로 납치(*Paralichthys olivaceus*) 및 산천어(*Oncorhynchus masou*) 등의 혈청 Vtg와는 교차반응이 이루어지지 않고 유사 어종인 우럭볼락(*Sebastes hubbsi*)의 혈청 Vtg에서만 교차반응이 나타나 종 특이성이 강한 것으로 보고되고 있어 일정한 영역에서 환경변화를 감시하는데 매우 유용한 종으로 판단된다.

일반적으로 항원항체반응을 이용하여 검체를 손쉽게 분석하는 방법으로는 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이 가장 보편적으로 이용되고 있다. ELISA는 매우 민감한 검출법으로서 재현성 및 특이성이 매우 높으며, 무엇보다도 다량의 시료를 동시에 처리할 수 있다는 장점을 가지고 있다(Dixon-Holland and Katz, 1991). 우리나라에서 Vtg에 대한 ELISA의 측정법을 통하여 내분비 장애물질에 대한 측정을 시도한 것은 붕어(*Carassius auratus*)의 Vtg ELISA 시스템을 이용한 보고(Lee et al., 2004)가 있으며, 해산어인 문치가자미(Kim et al., 2006) 및 참돔(Han et al., 1995) 난소의 발달과정 등을 판단하기 위해서도 Vtg의 ELISA 기법이 활용되어졌다. 이처럼 ELISA는 성숙수의 지표뿐만이 아니라 환경오염을 측정하는 지표로서 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 여겨진다. 그러나 현장에서 단 시간 내에 검정을 하기에는 부적합하기 때문에 현장에서 손쉽고 정확하게 신속히 측정하는 기법으로는 면역크로마토그래피분석법(immunochromatography, ICG)이 주로 사용되고 있다. 이러한 ICG의 기법은 식품의 안전성 검사는 물론 독성물질의 분석 등을 위해 많은 연구가 이루어지고 있으며, 이를 바탕으로 ICG의 현장 적용 실험도 증가하고 있는 추세라고 할 수 있다(Van Emon and Chuang, 2013; Scognamiglio et al., 2014).

이에 본 연구에서는 해양어류 중에서 전 세계적인 분포를 보이며, 연안 정착성인 썸뱅이(*Sebastes marmoratus*)의 Vtg를 Bio-marker로서 활용하여 연안의 내분비교란정도를 파악하기 위한 연구의 일환으로, 자체 생산한 Vtg 항체를 이용하여 다량의 시료를 검출할 수 있는 ELISA 및 현장 간이검사법으로 활용 가능한 ICG 분석법을 각각 개발하고 이에 대한 특성에 대하여 파악하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### ELISA 개발

#### ELISA plate의 준비

본 연구진에서 생산 정제된 MAb (Kim et al., 2013)는 확인된 단백질농도에 따라 10 µg/mL되게 각각 희석배수를 정하고 coating buffer로 희석하여 ELISA plate에 100 µg씩 분주하여 4°C에서 16시간 흡착시켰다. 흡착이 완료된 plate는 blocking buffer를 well당 200 µL씩 분주하여 4°C에서 2시간 동안 정지한 후 PBS로 3회 세척하고 건조시켜 냉장보관하며 Vtg분석에 사용하였다.

#### HRP- MAb conjugate 제작

Two-step glutaraldehyde법으로 접합체를 제작하였다(Wilson et al., 1978). 즉 Horseradish Peroxidase (Sigma, USA) 10 mg을 0.1 M phosphate buffer (containing 1.25% glutaraldehyde) 0.2 mL에 용해한 후 실온에 18시간 정치하였다. 이를 PD10 column (Pharmacia, Sweden)에 여과하여 잔여분의 glutaraldehyde를 제거하고, 5 mg/mL의 항체 1 mL와 섞은 후 1 M sodium carbonate-bicarbonate 100 µL를 가하여 pH를 9.5까지 올려주었다. 그 후 냉장온도에서 24시간 정치시키고 접합이 완료된 반응액에 0.2 M lysine 0.1 mL를 가하여 잔여반응기를 masking을 한 후 PBS에 투석하였다.

#### Antibodies pair 결정

Sandwich ELISA에 적용하기 위한 단클론 항체 pair의 결정은, 정제된 단클론 항체의 coating 농도와 접합체 농도를 일정하게 결정한 후, 계단 희석한 Vtg를 반응시켜 이상적인 linearity를 보이는 단클론항체 조합의 확인을 통하여 실시하였다. ELISA plate에 coating 한 MAb는 사전 연구 결과에서 얻어진 4개의 clone 인 S10, S15, S16 및 S28을 사용하였으며, HRP 접합체로는 MAb S10, S15 및 S28를 각각 사용하여 실시하였다.

### ICG 개발

Colloidal gold는 음전하를 가진 비 친수성 입자로서 단백질과는 비공유적인 결합체를 형성할 수 있기 때문에, 이를 MAb와 결합시켜 Laminar flow 방식으로 Immunochromatography assay법을 개발하여 시료 중의 Vtg 항원분자를 직접 검출하고자 수행하였다(Haasnoot et al., 1996).

#### Colloidal 골드 제작

Beesley et al. (1989)의 colloidal gold 기술방법을 응용하여 Table 1, 2와 같은 조성으로 20 nm colloidal gold를 제작하였다. 철저히 세척, 건조된 초자 비이커에 주사용 증류수(중외제약) 89 mL를 가하고 hot plate를 사용하여 60°C로 가열하며 교반하였다. 가열되는 동안 1% tri-sodium citrate 4 mL에 증류수 6 mL를 가하여 10 mL가 되도록 준비해 두고 수온 60°C가 확인되면 1% gold chloride [Tetrachloroauric (III) acid trihydrate,

Sigma G-4022, USAJ 1 mL를 넣어 교반함과 동시에 준비해 둔 sodium citrate액 10 mL를 한 번에 가하였다. 온도를 유지하며 1시간 정도 더 교반하면서 반응액의 색상변화를 관찰하여 포도 주 빛과 같은 암적색을 보이면 100℃로 온도를 올려 15분간 끓이면서 교반하였다. 또한 40 nm colloidal gold를 제조하기 위하여, 사전에 제조된 20 nm colloidal gold 25 mL에 증류수 153 mL를 가하고, 끓는 상태에서 1% tri-sodium citrate 2 mL를 추가하였다. 이후, 1% gold chloride 2 mL를 증류수 18 mL에 가하여 희석한 액을 1 mL/min의 속도로 점적하며 점차적인 입자 성장을 유도하였다. 그 후 약 20분간 추가적으로 끓여낸 후 실온에 정치하여 보관하며 접합에 사용하였다.

MAB-Gold 접합체 제조

Gold 접합체를 만들기 위한 시작 조건은 접합전의 colloidal gold 즉, plain gold의 OD 514 nm의 값이 1.0이 되게 하고 단백질 농도는 0.1 mg/mL이 되도록 하였다. Plain gold의 산도는 0.1% NaOH로 맞추다가 미세한 조정 시에는 0.01% NaOH를 사용하였다.

접합체 제조를 위하여 pH 7.5로 조정된 plain gold 10 mL에 antibody를 점적한 후 30분간 정치하였다. 이후 NaOH로 pH를 9.0까지 올리고, 10% BSA (10 µL/mL gold)를 가한 후 10분간 정치하여 안정화시킨 다음 원심분리(10,000 g, 30 min, 4℃)하여 맑은 상층액을 걸어내고 gold 접합체 희석액으로(1% T-20, 1% BSA, 2-3% Score in 100 mM PB) 재 부유시켰다.

Membrane

Nitrocellulose transfer membrane (Whatman, SP 003, USA)을 3 mm 폭으로 절단한 후, 정제된 항체(S16)를 1 mg/mL를 1.0 µL씩 넣고 dotting하여 실온에서 건조한 후 ICG에 사용하였다.

Table 1. Component of 20 nm plain colloidal gold

Sol.	Vol. (mL)	Accumulated volume
DDDW	89	89
1% gold chloride	1	90
1% sodium citrate (4 mL)	10	100
DDDW (6 mL)		

Table 2. Component of 40 nm plain colloidal gold

Sol.	Vol. (mL)	Accumulated volume
20nm gold solution	25	25
DDDW	153	178
1% sodium citrate	2	180
1% gold chloride (2 mL)	20	200
DDDW (18 mL)		

결과 및 고찰

ELISA 개발

Antibodies pair 결정

Sandwich ELISA 구성을 위한 antibodies pair는, 정제된 각 MAb들을 10 µg/mL의 농도로 희석하여 capture로서 ELISA plate에 흡착시키고 Vtg가 함유된 E<sub>2</sub>처리 혈청을 반응시킨 후, HRP가 표지된 MAb들을 detector로서 각각 가하여 반응시킨 결과를 평가하여 결정하였다. Vtg 시료는 신선하게 준비된 혈

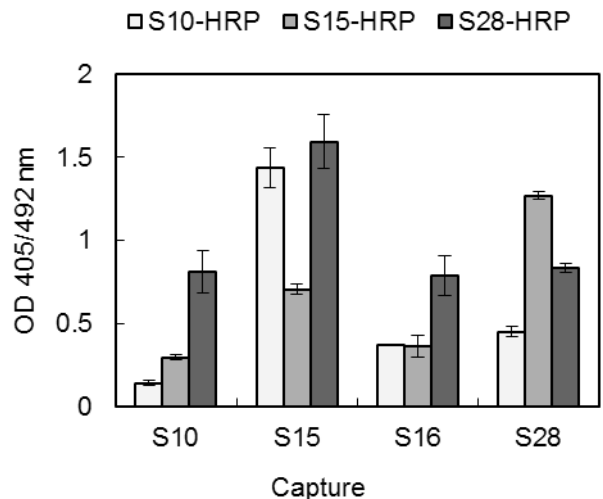


Fig. 1. Conditioning of ELISA for the decision of MAb pair using freshly prepared Vtg from Scorpion fish' *Sebastes marmoratus* serum.

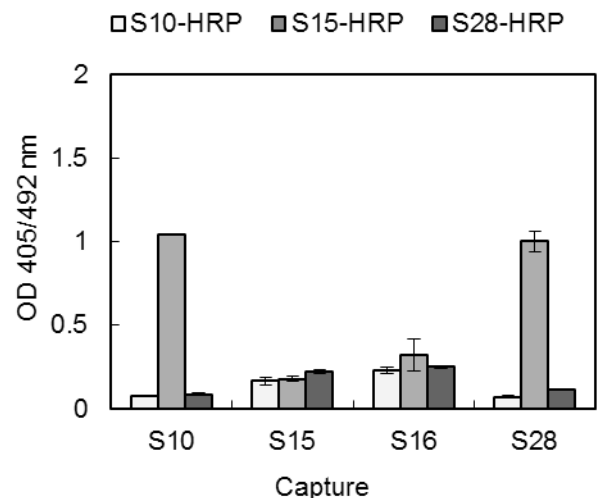


Fig. 2. Conditioning of ELISA for the decision of MAb pair using Vtg in Scorpion fish' *Sebastes marmoratus* serum partially denatured by repeated freezing and thawing.

청과 냉동 및 해동을 반복하여 Vtg의 fragment가 분해된 혈청을 대상으로 각각 ELISA를 실시하였으며, 결과는 Fig. 1 및 2에 나타내었다. 결과적으로, 신선한 Vtg 시료의 경우뿐 아니라, Vtg의 구성 fragment가 분해된 상태의 시료를 분석한 경우에서도 Vtg의 농도를 반영하고 있는 S28 및 S15를 각각 capture와 detector로 결정하였다(Fig. 1, 2). 이 경우, Vtg를 함유하고 있지 않은 혈청시료를 대상으로 실시한 ELISA에서 비특이 반응은 나타나지 않았다(Fig 3).

이러한 결과는, Vtg분자의 온전한 상태뿐 아니라 분해된 상태에서도 분리되지 않는 동일 subunit 상에 존재하는 서로 다른 epitope가 존재하는 것으로 추정되므로 이에 합당하는 분자는 약 175 kDa의 분자량을 갖는 lipovitelline으로 여겨진다.

한편, 결정된 Antibody pair를 사용하여 구성한 ELISA의 Vtg 검출 양상을 검사하기 위하여 0.01 µg/mL-1,000 µg/mL 농도에서 분석한 표준곡선은 Fig. 4에서와 같이 나타났으며, 0.1 µg/mL부터 100 µg/mL의 농도간에 용량반응의 linearity를 나타내었다. 검출의 한계는 적어도 0.1 µg/mL의 Vtg 이하로 판단되었다.

이러한 결과를 이전에 보고한 연구자들의 결과들과 비교하여 볼 때, ELISA에서 Vtg의 검출한계는 Steven et al. (1996)은 잉어의 혈장에서 working range는 10-100 ng/mL이며 예민도는 0.1 µg/mL를 나타내었고, Lomax et al. (1998)은 혀가자미 (*Pleuronectes vetulus*)에서 working range는 10-450 ng/mL를 Sherry et al. (1999)은 송어 (*Salmo trutta*) 의 working range는 25-500 ng/mL이며 예민도는 10.5 ng/mL를 보인다고 보고하고 있어 본 연구에서 개발된 ELISA의 검출한계와 유사하거나 우수한 검출능을 보였다고 판단된다. 또한 Aoki et al. (2010)은 자연환경에서 자란 송어(*Mugil cephalus*)를 대상으로 1 µg/mL 이상의 Vtg가 혈청에서 검출될 경우 환경오염에 따른 비정상적

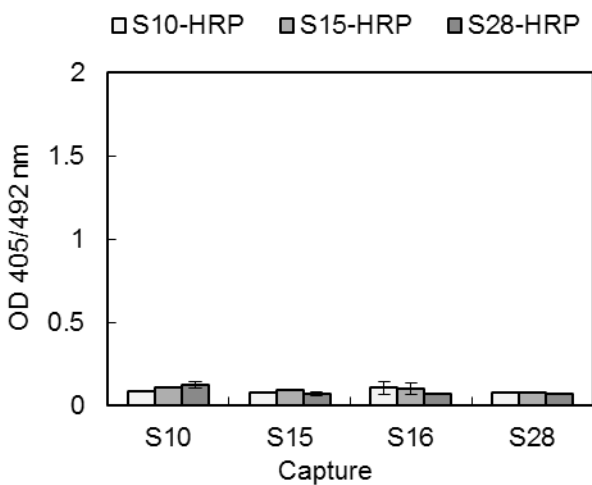


Fig. 3. Conditioning of ELISA for the decision of MAb pair using negative serum of Scorpion fish' *Sebastiscus marmoratus*.

인 수치라고 판단하고 있어, 본 연구결과에서 나타난 검출 한계인 0.1 µg/mL이하의 Vtg 농도는 현장에서 직접적으로 활용하는데 충분한 가치를 가질 것으로 여겨진다.

민감도 및 특이도

혈중 Vtg의 정성 및 정량을 위한 공인검사법은 제시되어있지 않으나, 문헌상의 연구결과는 SDS-PAGE를 통하여 Vtg형성을 확인하고 있기 때문에 reference method로서 SDS-PAGE의 결과와 비교하였다. SDS-PAGE결과를 보면 E<sub>2</sub>를 투여하여 Vtg가 합성된 양성 혈청 5건과 청정지역제주도의 사계 근해에서 비산란기에 포획한 쏨뱅이 Vtg 음성혈청 9건을 검사하여 민감도와 특이도를 각각 조사한 바 Table 3과 같이 특이도 및 민감도에서 각각 100%의 일치율을 보였다(Table 3).

한편, Lee et al. (2002)은 어류의 Vtg측정은 어류의 혈액에서 측정하는 것이 가장 바람직하며 간 조직이나 기타조직에서는 타 단백을 함유하고 있어 오차범위를 더 크게 할 수 있을 여지가 있다고 보고하고 있다. 따라서 검출 예민도에서는 매우 낮은 농도에서도 검출이 가능하나 조직 중에 타 단백질에 의한 방해 또는 오차를 일으킬 수 있기 때문에, 순수한 혈청에서 검사함이 타당할 것이며 이에 대한 심도 있는 연구가 필요할 것으로 판단된다.

ICG kit 개발 및 특성

효율적인 역학조사를 위해서는 일반적으로 현장에서의 질병

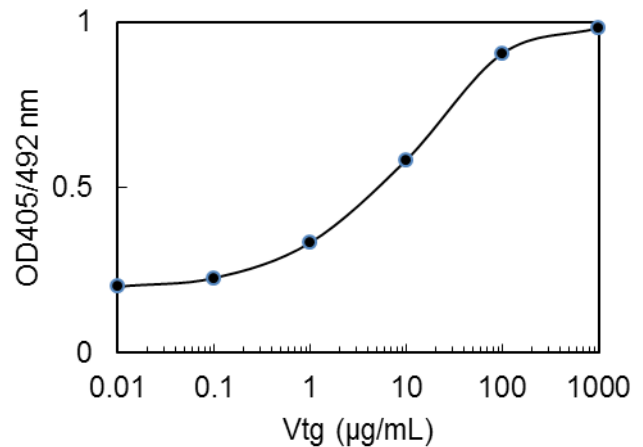


Fig. 4. Standard curve of ELISA using serially diluted Vtg of Scorpion fish' *Sebastiscus marmoratus*.

Table 3. A comparison of SDS PAGE & ELISA test

ELISA kit	SDS PAGE (Ref. method)		Subtotal
	Positive	Negative	
Positive	5	0	5
Negative	0	9	9
Subtotal	5	9	14

Sensitivity: 5/(5+0)×100= 100% Specificity: 9/(9+0)×100= 100%

진단 및 생리적인 변화를 진단하기 위한 방법으로 면역학적인 방법을 이용한 신속 진단법이 이용되고 있다(Paek et al., 2000). 이에 본 연구에서도 현장에서의 효율적인 신속진단을 위하여 ICG의 개발을 시도하였다.

Colloidal 골드 제작

구경 20 nm 및 40 nm 로 제조된 Colloidal gold를 spectrophotometer로 파장 별 흡광도를 측정한 결과 20 nm 입자의 경우는 523 nm의 파장에서 최대 흡광을 보였으며, 40 nm 입자의 경우는 536 nm의 파장에서 최대 흡광을 보였다.

MAb-Gold 접합체의 검출한계

Gold-Ab 접합체를 위한 antibodies pair는 ELISA에서 결정 한 S15와 S28을 그대로 적용하였다. S28 MAb를 약 3 mm 폭으로 오려 낸 NC paper에 1 µL 점적하여 건조시킨 후, S15-gold 접합체와 솜뱀이 혈청의 혼합액 100 µL를 가한 96 well plate의 well에 삽입하여 전개시켰으며, Fig. 5와 같이 Vtg 양성 혈청 1,000배 희석액까지 양성반응이 나타났다. 즉 1.0 µg/mL 이상의 농도에서 혈청의 Vtg 유무를 판단할 수 있는 것으로 나타났다(Fig. 5).

민감도 및 특이도

SDS-PAGE로 검사하였을 때 Vtg가 양성인 혈청 5건과 제주도 사계 근해에서 포획한 비 산란기의 솜뱀이 혈청 9건을 검사하

여 조사한 민감도와 특이도는 각각 100%로 나타났다(Table 4).

특히, 민감도 특이도가 공히 100%를 보이는 이유는, E<sub>2</sub>에 의하여 합성이 유도된 실험동물의 혈중에는 상대적으로 고농도의 Vtg가 존재하며, E<sub>2</sub>에 의한 합성 유도가 없을 경우에는 전혀 Vtg가 존재하지 않기 때문인 것으로 판단된다.

일반적으로 IGG법으로 검출한계 1.0 µg/mL로 ELISA법에서 나타난 검출한계 0.1 µg/mL과 민감도에 있어 차이가 있지만, Aoki et al. (2010) 등이 밝힌 자연환경에서의 이상징후를 나타내는 최저 농도인 1.0 µg/mL를 ICG법으로 충분히 검출할 수 있을 뿐만이 아니라, ICG법이 가지는 편리성과 신속성에서 유용함을 보여주므로 현장에서 신속히 검사 할 수 있는 방법으로 이를 상품화 연구를 통한다면 역학조사에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 여겨지고 있다.

OECD의 화학물질 가이드라인에서는 ELISA kit를 이용한 Vtg검사방법으로 접근하고 있어 머지않은 시기에 공식적인 인정이 예측되고는 있지만 검사의 결과를 도출하기 위해서는 ELISA의 민감도 높은 검출법 이외에도 현장에서 사용 가능한 신속한 검사방법이 요구되어 질것으로 판단된다.

본 연구에서도 시, 공간적 제약과 전문성을 필요로 하는 ELISA기법의 단점을 보완하기 위하여 보다 간편하고 신속한 검정 방법인 ICG kit 개발을 통해 예민도는 다소 떨어지나 어디에서도 간단한 실험기구를 통하여 screening test를 실시 할 수 있는 방법을 제시하고자 ICG의 개발을 꾀하였으며, 이를 통해 시·공간적 제약 없이 동시 다발적으로 지역과 시간의 한계를 극복한 역학조사에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 연구는 에스트로젠성 효과를 검정하는 Vtg 검정방법을 국내에서 확립하여 최근 문제가 되고 있는 여러 가지 내분비계 장애물질의 위해 가능성에 대한 연구기반을 구축하고 향후 국내에서의 Vtg 검정법을 확립하기 위한 기초연구가 될 것으로 판단된다. 특히, 여러 가지 복잡한 기기 분석방법에만 의존하는 검사 방법(NaKada et al., 1999)을 면역학적인 방법인 솜뱀이 Vtg을 Bio-marker로 이용, 보다 간편하고 효과적인 역학 조사의 방법을 제시 함으로서, 환경오염의 모니터링을 위해 다양한 분야에서 Vtg를 보다 쉽게 모니터링 함으로서, 앞으로 환경오염물질의 역학 조사에 매우 유용하게 활용될 것으로 판단된다. 또한 국가적으로도 유해물질의 인체 유입경로를 사전 차단 할 수 있는 계기가 될 것으로 여겨진다.

사 사

이 논문은 2015년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었음.

References

An LS. 1998. Distribution and Bioaccumulation of Organatin Compounds Inside Cheju Harbor and Sonsan Harbor. Mas-

Table 4. A comparison of SDS-PAGE & ELISA test

ICG kit	SDS- PAGE (Ref. method)		Subtotal
	Positive	Negative	
Positive	5	0	5
Negative	0	9	9
Subtotal	5	9	14

Sensitivity: 5/(5+0)×100= 100%; Specificity: 9/(9+0)×100= 100%

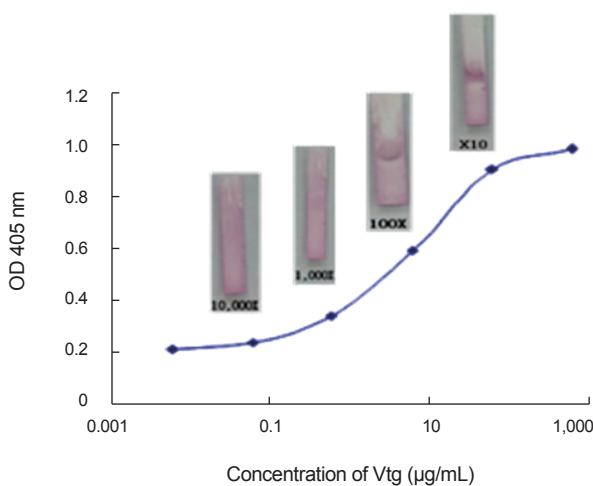


Fig. 5. Comparison of detection limit between ELISA and ICG.

- ter, Jeju National University, Korea.
- Aoki JY, Nagae M, Takao Y, Hara A, Lee YD, Yeo IK and Soyano K. 2010. Survey of contamination of estrogenic chemicals in Japanese and Korean coastal waters using the wild grey mullet (*Mugil cephalus*). *Sci Total Environ* 408, 660-665.
- Batley G. 1996. The distribution and fate of tributyltin in the marine environment. In: *Tributyltin: Case study of an environmental contaminant*. Cambridge University Press, USA, 139-166.
- Beesley JE. 1989. In: *Colloidal Gold: A new perspective for cytochemical marking*. In: *Microscopy handbooks*. Oxford University Press, UK, 5-12.
- Dixon-Holland DE and Katz SE. 1991. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent screening assay for the detection of sulfamethazine contamination of animal feeds. *J Assoc Off Anal Chem Intl* 74, 784-789.
- Haasnoot W, Kyung-AH K, Cazemier G, Kang W and Kang J. 1996. Evaluation of a sol particle immuno assay (SPLA) based single step strip test for the detection of sulfa dimidine residues. In *Proceedings of the Euro Residue III conference on Residues of Veterinary Drugs in Food*, Veldhoven, The Netherlands, 461-465.
- Han CH, Yang HM, Paek JM, Lim SK and Kim KH. 1995. Enzymeimmunoassay for the plasma vitellogenin and early determination of ovarian maturation in red seabream, *Pagrus major*. *J Aquaculture* 8, 1-19.
- Hashimoto S, Bessho H, Hara A, Nakamura M, Iguchi T and Fujita K. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo bay, Japan. *Mar Environ Res* 49, 37-53. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(99\)00047-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(99)00047-1).
- Jean MW, Rankouhi TR, Nichols KM, Komen HJ, Sumpter P and Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a bio-marker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103, 173-178.
- John AM and Korach KS. 1995. Symposium on estrogen in the environment. *Environ Health Perspect* 103, 3-4.
- Kim DJ, An CM and Min KS. 2006. Plasma sex steroid hormone and vitellogenin profiles during ovarian development of the wild marbled sole (*Limanda yokohamae*). *J Kor Soc* 39, 391-397.
- Kim YJ, Lim YK and Yeo IK. 2013. Production and characterization of vitellogenin monoclonal antibody on the scorpion fish *Sebasticus marmoratus*. *J Fish Pathol* 26, 239-252. <http://dx.doi.org/10.7847/jfp.2013.26.3.241>.
- Knudsen FR, Schou AE, Wiborg ML, Mona E, Tallefsen KE, Stenersen J and Sumpter JP. 1997. Increase of plasma vitellogenin concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to effluents from oil refinery treatment works and municipal sewage. *Bull Environ Contam Toxicol* 59, 802-806.
- Laughlin RB. 1986. Bioaccumulation of tributyltin : The link between environment and organism. In: *Proceeding of the oceans' 86 Conference*, 99. IEEE, USA, 1206-1209. <http://dx.doi.org/10.1109/OCEANS.1986.1160346>.
- Lee CW, Park ER, Lee MS, Ryu JS, Nam GC, Koo J, Jeon SH and Na JG. 2002. Studies on the molecular bio-markers for the endocrine disruption in fish (III). Report of NIER 24, 13-25.
- Li CR, Kim KT, Kim A, Chung KH, Kim DK, Kang SW and Park JS. 2004. Development of quantitative vitellogenin ELISAs for goldfish (*Carassius auratus*) used in endocrine disruptor screening. *J Environ Toxicol* 19, 353-357.
- Lomax DP, Roubal WT, Moore JD and Johnson LL. 1998. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in english sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Com Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 121, 425-436. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10125-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10125-6).
- Mommsen TP and Walsh PJ. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: *Fish Physiology*. Hoar W.S. and Randall D.J, ed. Academic Press, San Diego, USA, 347-406.
- Nakada N, Tomohiko I, Hajime N, Shinobu T, Yamada J, Kumata H and Takada H. 1999. Broad-spectrum analysis of endocrine disruptors in environmental samples. *Anal Sci* 48, 535-547.
- Ng TB and Ider DR. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In: *Fish Physiology*. Hoar WS, Randall DJ and Donaldson EM, ed, Academic Press, San Diego, USA, 379-404.
- Paek SH, Lee SH, Cho JH and Kim YS. 2000. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. *Methods* 22, 53-60. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2000.1036>.
- Scognamiglio V, Arduini F, Palleschi G and Rea G. 2014. Biosensing technology for sustainable food safety. *TrAC Trends Anal Chem* 62, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.007>.
- Schwaiger J and Negele RD. 1998. Plasma vitellogenin-A blood parameter to evaluate exposure of fish to xenoestrogens. *Acta Vet Brno* 67, 257-264.
- Sherry J, Gamble A, Fielden M, Hodson P, Burnison B and Solomon K. 1999. An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens. *Sci Total Environ* 225, 13-31. [http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)80014-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(99)80014-X).
- Shilling AD and Williams DE. 2000. Determining relative estrogenicity by quantifying vitellogenin induction in rainbow trout liver slice. *Toxicol Appl Pharmacol* 164, 330-335. <http://dx.doi.org/10.1006/taap.2000.8912>.
- Smeers JM, Holsteijn IV, Giesy JP, Seinen W and Van den Berg M. 1999. Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp

- hepatocyte assay. *Toxicol Sci* 50, 206-213. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/50.2.206>.
- Steven LG, Robert JG, Gimothy TS, Nancy PD, Wade LB and Trenton RS. 1997. Reconnaissance of 17 $\beta$ -Estradiol, 11-Ketotestosterone, Vitellogenin, and Gonad histopathology in common carp of United States streams [electronic resource]: Potential for contaminant-induced endocrine disruption. In : U.S. Geological Survey Open -File Report. USA, 96- 627.
- Theo C, Frederick SVS, and Ana MS. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101, 378-384.
- Tyler CR and Routledge EJ. 1998. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl Chem* 70, 1795-1804.
- Van Emon JM and Chuang JC. 2013. Development and application of immunoaffinity chromatography for coplanar PCBs in soil and sediment. *Chemosphere* 90, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.06.053.1>.
- Wilson MB and Nakane PK. 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseadish peroxidases to antibodies. In: *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. W. Knapp, K.Holubar and G.Wick, ed. Elsevier, Amsterdam, 215.
- Yeo IK and Choi MK. 2000. Effects of bisphenol a on vitellogenin synthesis in the hepatocyte primary culture in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Korean J Ichthyol* 12, 180-185.