

# 참돔(*Pagrus major*)의 혈장 卵黃蛋白前驅體에 대한 酵素免疫測定法과 卵巢成熟의 早期判定\*

한창희 · 양문호\*\* · 백재민\*\* · 임상구 · 김광현\*\*\*

동의대학교 자연과학대학 생물학과

\*\*국립수산진흥원

\*\*\*동의대학교 자연과학대학 미생물학과

## Enzymeimmunoassay for the Plasma Vitellogenin and Early Determination of Ovarian Maturation in Red Seabream, *Pagrus major*

Chang-Hee Han, Mun-Ho Yang\*\*, Jae-Min Paek\*\*, Sang-Koo Lim  
and Kwang-Hyun Kim\*\*\*

Department of Biology, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea

\*\*National Fisheries Research and Development Agency, Kigang-Kun,  
Pusan 626-900, Korea

\*\*\*Department of Microbiology, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea

### ABSTRACT

In red seabream, *Pagrus major* the female specific protein in the vitellogenic female serum was identified by Ouchterlony's immunodiffusion test and immunoelectrophoresis. The female specific serum protein might be vitellogenin based on the results of the immunological analysis for the male and vitellogenic female sera and crude egg extracts. Also, it was identified by the immunodiffusion test that the purified yolk protein from ovarian egg extracts has antigenic identities shared with the female specific serum protein.

To study the relationship between the maturational stages of gonad and plasma levels of vitellogenin, these were measured from the late resting period (January) to the vitellogenic period (April) by the modified enzymeimmunoassay (EIA) using antiserum against yolk protein. The level of plasma vitellogenin began to increase in February (previtellogenesis stage) and continuously increased with the ovarian growth during the vitellogenesis period (March to April). The plasma vitellogenin levels were significantly different between the females and the males in February.

Validation for the modified EIA system was tested. The absorbance curve of serial

\* 이 연구는 1991년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임(과제번호: KOSEF 911-1506-045-2).

dilutions of serum from the vitellogenic female was paralleled to the standard curve of yolk protein;  $109 \pm 5.6\%$  recovery was achieved by the modified EIA. And the intraassay coefficients of variation were less than 10% within the concentration ranging from 31.3 ng/ml to 1,000 ng/ml.

These findings suggest that the sex determination in adult red seabreams could be possible by using the modified EIA as early as in February.

## 서 론

중요한 양식대상 어종인 참돔, *Pagrus major*에 대하여 인위적인 생식소 성숙 및 조기 산란을 도모하기 위한 많은 연구들이 보고되어지고 있다(松浦 1972; 福所 1986; Watanabe *et al.* 1984). 그러나, 이러한 실험을 하는 동안 친어가 산란을 하기 전까지는 사육되고 있는 친어의 생식소가 성숙중에 있는지, 또는 어느 정도의 성숙단계에 있는지에 대해서는 외관상 관찰에 의하여 정확히 판정하기에 매우 어렵다. 생식소 성숙단계를 정확히 알기 위해서는 사육중인 친어들 중 일부를 정기적으로 채집한 후 난소를 적출하여 조직학적으로 조사되어야 한다. 따라서 이러한 성숙 실험을 하기 위해서는 많은 양의 사육이 필요하게 된다. 만일 사육되고 있는 암컷의 난소가 초기 성숙단계에서 완숙단계에 이르기까지 살아있는 채로 생식소 성숙 단계를 정확히 추적할 수 있다면 인위적인 생식소 성숙 촉진에 대한 사육실험을 할때, 보다 적은 수의 친어로도 충분히 실험을 할 수 있을 뿐만 아니라, 보다 체계적으로 실험을 수행할 수 있다. 그리고 생식소 성숙 초기에 암·수를 구별할 수 있다면 종묘생산을 하는데 친어 관리를 계획적으로 할 수 있다.

어류에 있어서 난소의 성숙은 여포세포층에서 생성, 분비된 estradiol-17 $\beta$ 의 자극에 의하여 간세포 내에서 난황단백전구체(vitellogenin)의 상태로 생합성된 후, 혈중으로 방출되어 혈류를 따라 난포세포내에 축적됨으로써 이루어 진다(Pickering and Dockray 1972; Aida *et al.* 1973; Pickering 1976; Cambell and Jalabert 1976; Wallace and Selman 1981; Wiegand 1982). 그러므로 혈장 난황단백전구체의 양이 증가함에 따라 난소도 성숙하기 때문에 혈중에 존재하는 난황단백전구체의 양적 변동을 측정하여 난소의 성숙단계를 간접적으로 추정할 수 있다. 난황단백전구체의 消長에 대하여 이미 연어류인 *Oncorhynchus nerka* (Ridgway *et al.* 1962)와 *Salmo salar* (Fine and Drillhon 1983), 그리고 미꾸리, *Misgurnus anguillicaudatus* (Teranishi *et al.* 1981)에서 면역학적인 방법에 의하여 조사된 보고가 있었다. 최근에는 혈중 난황단백전구체의 양적 변동을 보다 정확하게 측정하기 위해 방사선면역측정법(radioimmunoassay: RIA)을 이용하고 있다(Idler *et al.* 1979; So *et al.* 1985). 그러나, RIA는 방사선 물질의 취급에 대한 위험성 때문에 근년에 효소항체를 이용하여 항원이나 항체를 측정할 수 있는 여러가지 효소면역측정법(enzymeimmunoassay: EIA)에 대한 system들이 개발되어 발표되고 있다(Tijssen 1987; Kemeny and Challacombe 1988).

본 연구에서는 참돔의 혈장 중에 있는 난황단백전구체의 변동을 추정할 수 있는 간편한 효소면역측정법을 고안하고 그 타당성을 조사한 후, 이 방법을 이용하여 난소발달에 따른 혈장 난황단백전구체의 양적인 변동을 조사하였다. 그리고 이 방법으로 생식소 초기에 암·수 구별을 용이하게 할 수 있는지를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 난황단백질 분리 및 항체 제작

#### (가) 재 료

암·수 참돔 혈청에 대한 항체를 제작하기 위하여 1991년 4월 국립수산진흥원 여천수산종묘배양장에서 사육하고 있는 성숙중인 500~1,000 g의 암·수 참돔 각각 10마리를 채집하여 혈액은 꼬리 부분의 척추하동맥으로부터 5 ml의 일회용 주사기를 이용하여 채혈하였으며, 채혈된 혈액으로 부터 3,000×g에서 30분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 또한 난황단백질의 분리를 위하여 성숙한 난소를 절취하여 생리식염수로 난소 난을 세척하였다. 이들 재료들은 실험에 사용할 때까지 -60℃에서 보관하였다.

#### (나) 난황단백질의 분리

난소난 2 g을 10 ml의 0.5N NaCl이 함유된 0.02M PB (phosphate buffer, pH 7.0)을 넣어 glass homogenizer로 마쇄한 후 10,000×g, 4℃에서 30분간 원심분리하여 상등액을 분취하였다. 이 상등액 1 ml에 100%포화시킨 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 3 ml첨가하여 충분히 혼합시킨 후, 10,000×g에서 30분간 침전물을 원침시켰다. 침전물은 다시 상기한 PB에 용해시킨 후 0.02M PBS (phosphate buffer saline, pH 7.0)로 투석하여(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제거하여 이를 粗난황단백추출액으로 하였다. 조난황단백추출액은 상기한 PBS를 이용하여 sepharose CL-4B gel chromatography column (φ20 mm×600 mm)으로 gel여과를 하였다. 이때 용출유속은 20 ml/hr로 한 분획당 3.5 ml로 하였으며, gel여과로 용출된 각 분획은 280 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

#### (다) 항 혈청 및 흡수항체 제작

성숙한 암·수 참돔의 혈청, 난소난 추출액 그리고 난황단백질에 대한 항 혈청은 Newbould (1965)의 방법을 변형하여 토끼에 면역시켜 얻었다. 항원은 동량의 Freund adjuvant를 혼합하여 乳化시켜 사용하였다. 1회째 항원투여는 항원 1 ml에 complete adjuvant 1 ml를 혼합하여 피하 주사하였다. 2회째 부터는 항원투여는 항원 1 ml에 incomplete adjuvant 1 ml를 혼합하여, 1회째 항원투여 후 1주일 간격으로 4회에 걸쳐 같은 양의 항원을 같은 방법으로 피하에 투여하였다. 마지막으로 항원을 투여한 후 1주일 후에 토끼의 경동맥을 절단하여 채혈하였다. 채혈한 혈액은 4℃에서 하루 밤 방치한 후 3,000×g에서 30분간 원심분리하여 항 혈청을 얻었다. 분리된 항 혈청은 사용할 때까지 -40℃에 보관하였다. 흡수 항체는 성숙한 암 참돔의 혈청에 대한 항 혈청 1 ml에 수 참돔의 혈청 1 ml를 넣어 37℃에서 3시간 배양한 후 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻었다. 흡수 항체는 사용할 때까지 -40℃에 보관하였다.

#### (라) 전기영동, 면역전기영동 및 면역확산 실험

전기영동 : 5% polyacrylamide gel을 이용하여 Davis (1964)의 방법을 응용하여 normal PAGE 전기영동을 행하였다. 단백질 band의 염색은 coomassie brilliant blue R-250을 45% ethanol과 45% acetic acid에 녹혀 0.25%의 농도로 한 염색액을 사용하였다.

면역전기영동 : 0.1M tris buffer (pH 8.6)을 사용하여 agarose 1.2%의 용액을 만들어 영동용 gel을 제작하였다. 영동용 완충액은 0.2M tris (pH 8.6)을 사용하였으며, 通電은 지지체의 폭 1 cm당 1.5 mA로써 1시간 동안 행하였다.

면역확산 : 0.1M PB (pH 7.4)을 사용하여 agarose 1.2%용액을 만들어 Ouchterlony의 면역확산용 지지체를 제작하여, 이미 만들어 놓은 참돔 암·수 혈청에 대한 항 혈청, 흡수항체 및 난황단백질에 대한 항 혈청 각각에 대하여 암·수 혈청, 난소난에서 추출한 조난황단백추출액 그리고 정제된 난황

단백질에 대한 침강반응을 조사하였다.

## 2. 효소면역측정법

### (1) Enzymeimmunoassay (EIA) system

Engvall and Perlmann (1972)의 항체를 측정하기 위한 방법을 변형하여 Fig. 1에 나타난 모식도와 같은 방법으로 혈장내의 난황단백전구체의 양을 측정하기 위한 EIA system을 설정하였다.

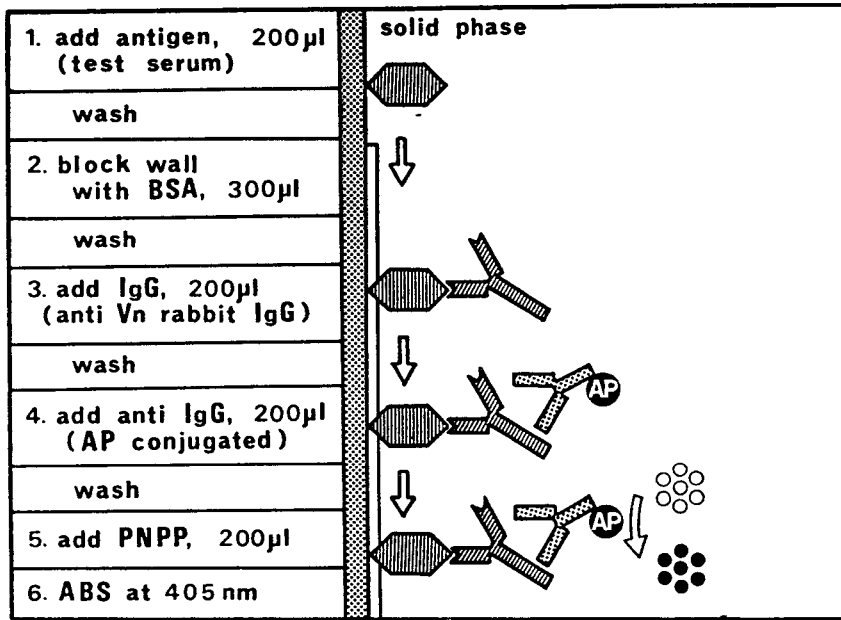


Fig. 1. Schematic procedure of the modified enzymeimmunoassay (EIA) for vitellogenin. 96-well EIA plate (Nunc-Immuno Plate Maxisorp F96 Certificate, A/S Nunc) were used as solid phase. AP; goat anti-rabbit IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate. PNPP; p-nitrophenylphosphate.

우선 희석한 시료의 혈청과 下記한 standard를 200 µl씩 EIA용 well plate (Corning Biological Product사 제품)의 well에 넣어 4°C에서 하루밤을 방치하여 well에 항원을 부착시킨 후, 0.05% Tween 20, 0.15N NaCl 그리고 0.02% NaN<sub>3</sub>가 포함된 0.1M phosphate buffer (pH 7.2, 이하 PBS-TA라함)로 well을 3회 세척하였다. 항체를 well에 넣을 때 항원이 붙지 않은 여분의 well 벽에 항체가 붙지 않도록 하기 위하여 0.01% NaN<sub>3</sub>가 함유된 PBS (pH 7.2)로 희석한 1%의 BSA (bovine serum albumin)용액을 300 µl씩 각 well에 넣어 27°C에서 2시간 동안 방치시켜 BSA를 흡착시킨 후 PBS-TA로 3회 세척하였다. 이어서 이미 제작된 난황단백질에 대한 토끼의 항 혈청을 PBS-TA로 2,500배 희석하여 각 well에 200 µl씩 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후, well표면에 흡착된 항원과 결합되게 하였다. 그 후 PBS-TA로 3회 세척한 뒤 alkaline phosphatase가 표지된 항 토끼 IgG 염소항체(Sigma제품)를 PBS-TA로 8,000배로 희석한 것을 각 well에 200 µl씩 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS-TA로 3회 세척하였다. 이어서 p-nitrophenylephosphate를 0.5 mM

MgCl<sub>2</sub>이 함유되어 있는 10% diethanolamine buffer (pH 9.8)로 0.1%용액이 되도록 용해하여 각 well에 200  $\mu$ l씩 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 이들의 반응을 정지시키기 위하여 5N NaOH를 100  $\mu$ l씩 넣었다. 황색으로 발색된 이들 각 well에 대하여 405 nm에서 흡광도 측정을 하였다.

## (2) Standard 제작

토끼에 면역시켜 얻은 항 난황단백혈청을 PBS-TA로 2,500배로 희석하여 정량에 사용하였다. 또한 gel여과에 의하여 분리한 난황단백질을 0.1M sodium carbonate buffer (pH 9.6)으로 희석하여 7.8 ng/ml에서 1,000 ng/ml까지 8단계의 standard를 제작하였다.

암 혈청내의 난황단백전구체를 EIA용 plate의 well에 흡착시킬 때, 그리고 난황단백질에 대한 항체와 결합할 때 저해작용이 일어날 수 있는 혈청내의 다른 혈청성분의 영향을 조사하기 위하여 수 참돔 혈청 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1%를 함유하고 있는 0.1M sodium carbonate buffer (pH 9.6)로 standard를 제작하여 상기한 방법으로 반응시켜 standard를 제작할 때, 또는 시료를 제작할 때 첨가되어야 할 수 참돔의 혈청 농도를 결정하였다.

Standard는 수 참돔 혈청 0.001%가 함유된 0.1M sodium carbonate buffer (pH 9.6)로 희석하여 제작하였으며, 성숙중인 암 참돔 혈청 시료는 같은 sodium carbonate buffer로 50,000배로 희석시킨 후 0.001%의 수 참돔 혈청이 함유되어 있는 상기의 sodium carbonate buffer를 사용하여 assay계내의 측정 범위에 들어갈 수 있도록 희석하였다.

## (3) Assay계의 타당성 조사

본 assay계를 이용할 때 암 혈청내에 존재하는 난황단백전구체에 대한 특이성을 조사하기 위하여 성숙중인 암 참돔과 미성숙한 암 참돔의 혈청 그리고 수 참돔 혈청을 50,000배에서 6,400,000배까지 희석하여 상기한 assay방법에 적용시켜 흡광도를 측정 하였다.

Assay계의 유효성을 확인하기 위하여 성숙중인 암 참돔의 혈청을 50,000배에서 1,600,000배까지 희석하여 이들 각각에 대하여 본 assay방법으로 흡광도를 측정하여 표준곡선과 평행성을 조사하였다.

수 참돔의 혈청에 일정한 양의 난황단백질(100~400 ng/ml)을 첨가하여 본 assay방법으로 첨가된 난황단백질의 양을 측정하여 첨가량과 회수량과의 비율로부터 회수율을 구하였다. 그리고, 동일한 양의 난황단백질을 6회 반복 측정하여 이들의 변동계수도 아울러 조사하였다.

## 3. 난소 성숙에 따른 혈장 난황단백전구체의 변동

1992년 1월부터 4월 까지 매월 참돔 20마리씩 채집하여 실험실에 장치한 사육수조내에서 수용하였다. 이들의 난소 성숙단계를 조직학적으로 조사하고 혈장 난황단백전구체의 양을 측정하기 위하여 우선 5 ml 1회용 주사기로 척추하동맥으로 부터 채혈하였으며, 채혈된 혈액으로 부터 3,000 $\times$ g에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리 보관하였다. 그 후 친어를 해부하여 생식소를 적출하여 암·수를 구분하고 암컷의 난소는 0.01 g범위까지 무게를 측정하여 GSI (gonadosomatic index: 생식소중량  $\times$  100 / 체중)를 산출하였고, 생식소는 Bouin액에 고정한 후 상법인 paraffin절편법에 의하여 5  $\mu$ m의 두께로 연속 절편하여 Mayer's hematoxyline과 eosin으로 이중 염색하여 관찰하였다. 그리고 혈장내의 난황단백전구체 양은 상기한 효소면역측정법에 의하여 측정하였다.

## 4. 혈장 난황단백전구체의 양적 변동에 의한 암수의 구별

혈장 난황단백전구체의 존재와 변동을 조사하여 早期에 암·수 구별 할 수 있는 방안을 찾아내기 위하여 우선 암·수 구별이 되지 않은 7마리에 각각 labeling하여, 1992년 1월 10일 부터 4월10일까지

지 자연조건에서 여천 수산종묘 배양장에 있는 20 ton의 원형수조에 수용하면서 매월 꼬리부분의 척추하동맥으로부터 250~300  $\mu$ l혈액을 뽑아 3,000 $\times$ g에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이 혈청내에 있는 난황단백전구체의 양은 상기한 효소면역측정법에 의하여 정량하였다. 각 개체에 대한 암·수 구별의 판정은 실험이 끝난 후 해부하여 생식소의 조직학적 조사에 의하였다.

## 결 과

### 1. 암 특이혈청 단백질의 존재와 난황단백질과의 관계

성숙 중인 암 참돔과 수 참돔의 혈청에 대한 면역전기영동 양상은 Fig. 2에 나타내었다. 조난황단백추출액(E)은 암 참돔 혈청에 대한 항체(aF)에 대하여 시료의 원점 부근에 2개의 침강선이 뚜렷하게 형성되었지만, 수 참돔 혈청에 대한 항체(aM)에 대해서는 전혀 침강반응이 나타나지 않았다. 그리고 수 참돔 혈청(M)은 수 참돔 혈청에 대한 항체(aM)에 대하여 시료의 원점부근과 양극쪽으로 뚜렷한 1개의 침강선이 형성되었고 그외에 약한 2~3개의 침강선이 양극쪽에 형성되었으며, 암 참돔 혈청에 대한 항체(aF)에 대해서도 수 참돔 혈청에 대한 반응과 같은 양상의 침강반응이 나타났다. 그러나 암 참돔 혈청(F)은 수 참돔 혈청에 대한 항체(aM)에 대해서는 원점부근에 1개의 뚜렷한 침강선이 형성되었지만, 암 참돔 혈청에 대한 항체(aF)에 대해서는 원점부근에 2개의 뚜렷한 침강선이 형성되어 수 참돔 혈청에서 나타나지 않은 또 다른 하나의 침강선이 나타났다.

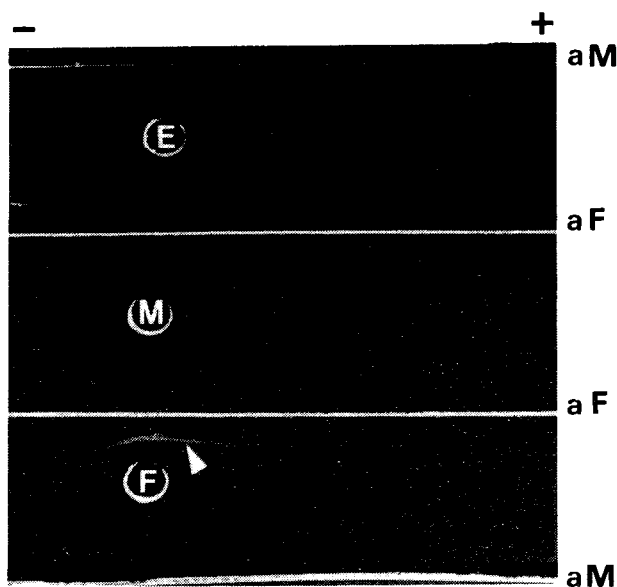


Fig. 2. Immunoelectrophoresis of crude egg extracts (E), matured female serum (F) and male serum (M) against antibody to male serum (aM) and to matured female serum (aF). Arrow indicates a precipitin line of female specific serum protein.

Fig. 2의 면역전기영동 결과에서 보여주고 있는 암 참돔 혈청에서만 특이적으로 나타나는 암 특이성 혈청단백질의 존재를 명확히 구명하기 위하여 암 혈청에 대한 항체에 수 참돔 혈청을 넣어 수 참돔의 혈청단백질에 대한 항체를 제거시킨 흡수항체와 암수 참돔에 대한 항체들을 이용하여, 암·수참돔의 혈청과 조난황단백추출액을 면역전기영동한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 흡수항체(aF-M)에 대하여 난황단백추출액(E)은 원점부근에 2개의 뚜렷한 침강선이 형성되었으며, 암 참돔 혈청(F)은 1개의 침강선이 형성되었다. 그러나 수 참돔의 혈청(M)은 흡수항체(aF-M)에 대하여 전혀 침강선이 형성되지 않았다. 따라서 암 참돔 혈청에는 수 참돔 혈청에 존재하지 않은 암 특이혈청단백질이 존재하고 있음을 보여준다.

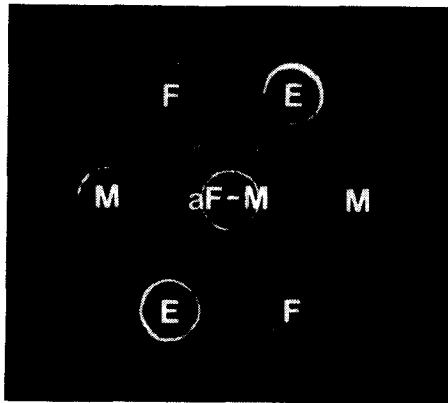


Fig. 3. Immunoelectrophoresis of crude egg extracts (E), matured female serum (F) and male serum (M) against antibody to matured female serum absorbed with male serum (aF-M) and to matured female serum (aF).

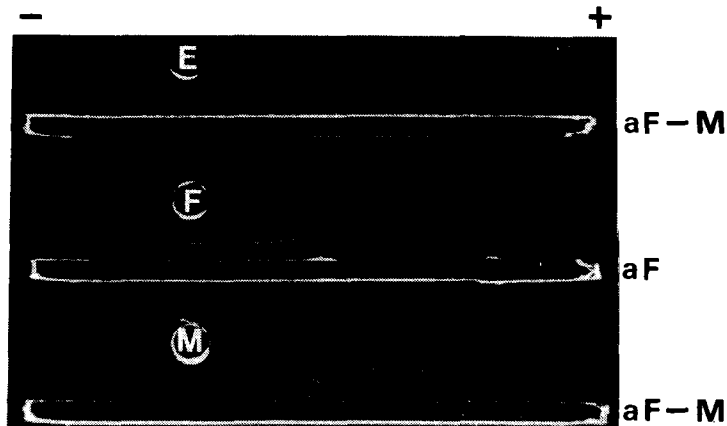


Fig. 4. Ouchterlony's immunodiffusion test of crude egg extracts (E), matured female serum (F) and male serum (M) against antibody of matured female serum absorbed with male serum (aF-M).

이러한 암 침돔 혈청중에 존재하는 암 특이혈청단백질과 난소난으로 부터 얻은 조난황단백추출액에 존재하는 난황단백질과는 동일한 항원성을 갖는지를 알아보기 위하여 이들에 대하여 Ouchterlony면역확산 test를 하여 Fig. 4에 나타내었다. 흡수항체(aF-M)에 대하여 수 침돔 혈청(M)은 전혀 침강반응이 일어나지 않은 반면, 암 침돔 혈청(F)과 조난황단백추출액(E)에 대하여 뚜렷한 침강반응이 나타나고 있었으며, 이들은 서로 융합하고 있어서 서로 동일한 항원성을 가지고 있음을 보여주고 있다.

## 2. 난황단백질의 정제와 난황단백전구체와의 면역학적 관계

조난황단백추출액을 sepharose CL-4B gel chromatography column에 의하여 용출한 pattern을 Fig. 5에 나타내었다. fraction No. 24에 작은 peak-I과 fraction No. 50에 보다 큰 peak-II가 나타났다. 이들 중 peak-II를 모아 이들에 대하여 normal PAGE 전기영동한 결과(Fig. 6), 단일 band가 나타났으며, 이 peak-II를 토끼에 면역시켜 항체를 얻었다.

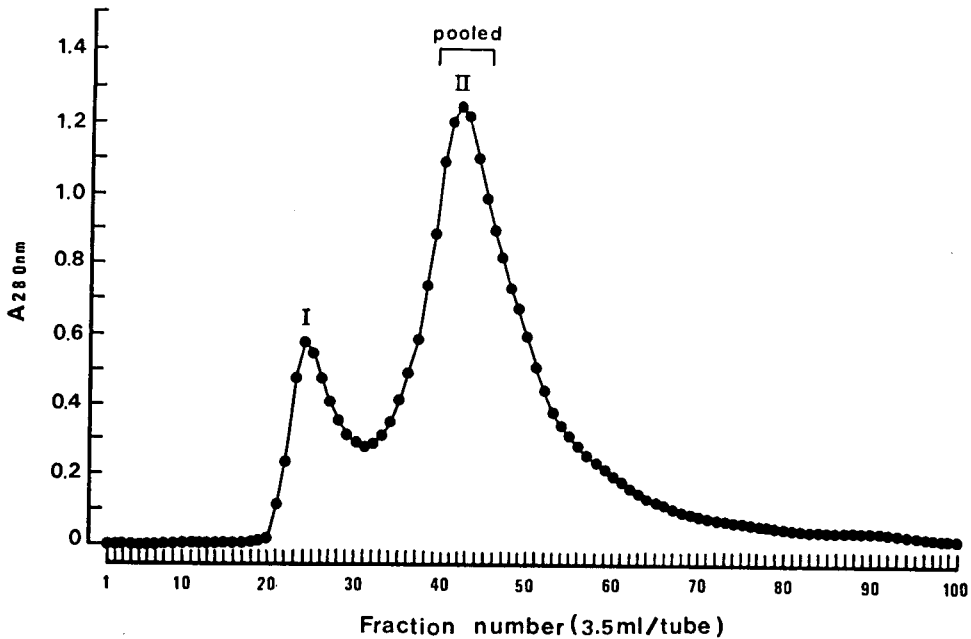


Fig. 5. Elution pattern of yolk proteins isolated from crude egg extracts on Sepharose CL-4B gel chromatography. Fractions near the peak II were pooled.

peak-II의 난황단백질이 암 특이혈청단백질과 동일한 항원성을 가지고 있는지를 밝히기 위하여 peak-II에 대한 항체와 암 침돔 혈청에 대한 항체를 이용하여 암·수 침돔의 혈청과 분리한 peak-II 단백질에 대하여 면역전기영동한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 분리된 난황단백질의 항체(aY)에 대하여 암 혈청(F)은 시료의 원점 부근에 1개의 뚜렷한 침강선이 형성되었지만 수 혈청(M)은 전혀 침강선이 형성되지 않았다. 그리고 분리된 난황단백질(YP)은 암 혈청에 대한 항체(aF)와 난황단백질에 대한 항체(aYP)에 대하여 시료의 원점부근에 1개의 뚜렷한 침강선이 형성되었다.



난황단백질에 대한 항체에 대하여 침강선을 형성하는 단백질들이 서로 공동의 항원성을 가지고 있는지를 밝히기 위하여 암·수 혈청과 분리된 난황단백질을 난황단백질에 대한 항체에 대하여 Ouchterlony의 면역확산 실험 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 수 혈청(M)은 난황단백질에 대한 항체(aYP)에 대하여 침강반응이 일어나지 않았지만, 암 혈청(F)과 분리된 난황단백질(YP)은 aYP에 대하여 1개의 침강선이 형성되었으며 또한 이들 침강선은 서로 융합하고 있었다. 따라서 분리된 난황

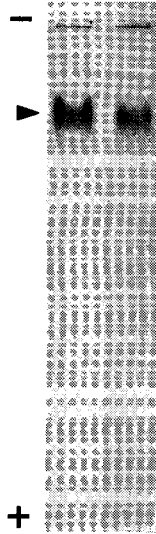


Fig. 6. 5% polyacrylamide gel electrophoresis of purified yolk protein (Peak II was pooled as Fig. 5).

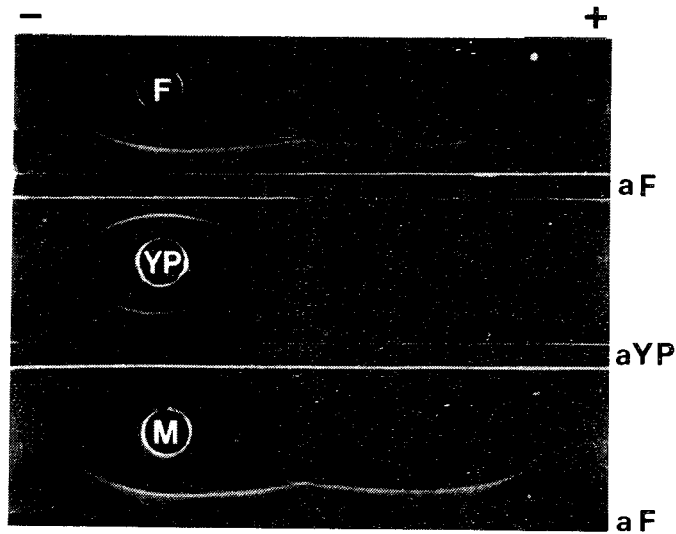


Fig. 7. Immunoelectrophoresis of purified yolk protein (YP), matured female serum (F) and male serum (M) against antibody to matured female serum (aF) and to purified yolk protein (aYP).

단백질과 암 혈청내에 존재하는 암 특이혈청단백질과는 공동의 항원성을 가지고 있음을 알 수 있었으며, 또한 이 암 특이혈청단백질은 난황단백질을 형성하는 주성분인 난황단백전구체임도 알 수 있었다.

### 3. 효소면역측정법

암 특이혈청단백질, 즉 난황단백전구체(vitellogenin)와 조난황단백추출액으로부터 정제한 난황단백질과 공동의 항원성을 갖고 있음이 확인되므로써, 난황단백질에 대한 항체를 이용하여 혈장 난황단백전구체에 대한 효소면역측정법의 타당성을 조사하였다.

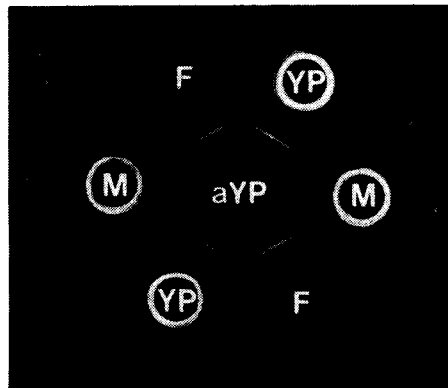


Fig. 8. Ouchterlony's immunodiffusion test of purified yolk protein (YP), matured female serum (F) and male serum (M) against antibody to purified yolk protein (aYP).

Fig. 9는 EIA용 plate의 well내에 항원을 흡착시킬 때 시료의 혈청 중에 존재하는 항원 이외의 혈청 단백질이 항원 흡착에 미칠 수 있는 영향을 조사한 결과이다. 0.1%와 0.01%의 수 참돔 혈청이 첨가된 표준곡선은 혈청이 첨가되지 않은 표준곡선보다 전체의 흡광도가 낮으며 또한 서로 평행하지 않았다. 그러나 0.001%의 수 참돔 혈청이 첨가된 표준곡선은 혈청이 첨가되지 않은 표준곡선 보다 전체적인 흡광도는 낮지만 두 곡선은 서로 평행하고 있었다. 그리고 0.0001%의 수 참돔 혈청이 첨가된 표준곡선은 혈청이 첨가되지 않은 표준곡선과 거의 일치하고 있었다. 이러한 결과부터 시료를 희석할 때나 standard를 제작할 때는 0.001%의 수 참돔의 혈청이 첨가된 0.1M sodium carbonate buffer를 사용하였다.

assay계가 난황단백전구체에 대해서만 특이성을 갖는가를 조사한 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 난황단백전구체가 존재하는 성숙한 암 참돔 혈청은 희석농도에 따라 일정하게 흡광도가 떨어지는 반면, 미숙한 암 참돔의 혈청과 수 참돔의 혈청은 희석농도에 관계없이 거의 같은 흡광도를 보여주었으며, 또한 이들의 흡광도는 0.05에서 0.02의 범위로 낮은 값을 보여주고 있었다.

그리고 Fig. 11은 난황단백질의 standard과 암 혈청내에 존재하는 난황단백전구체가 본 효소면역

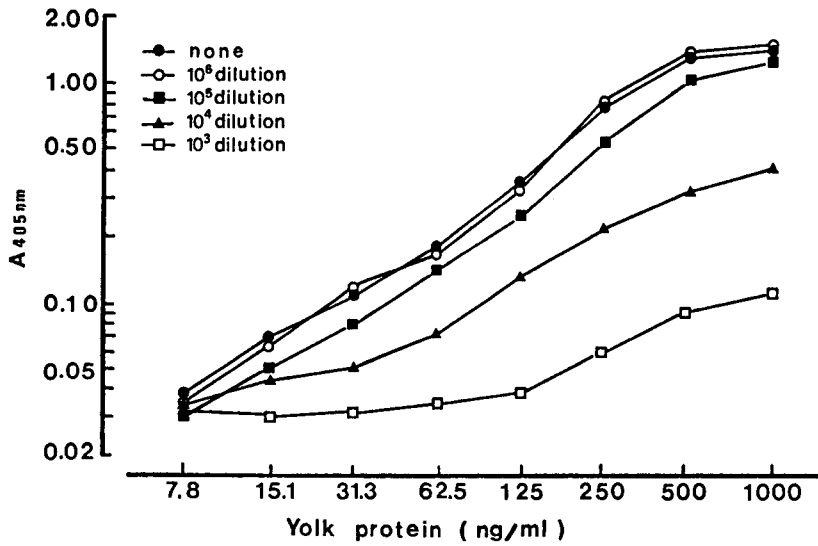


Fig. 9. Standard curves affected by diluted male sera added into serial dilutions of yolk protein.

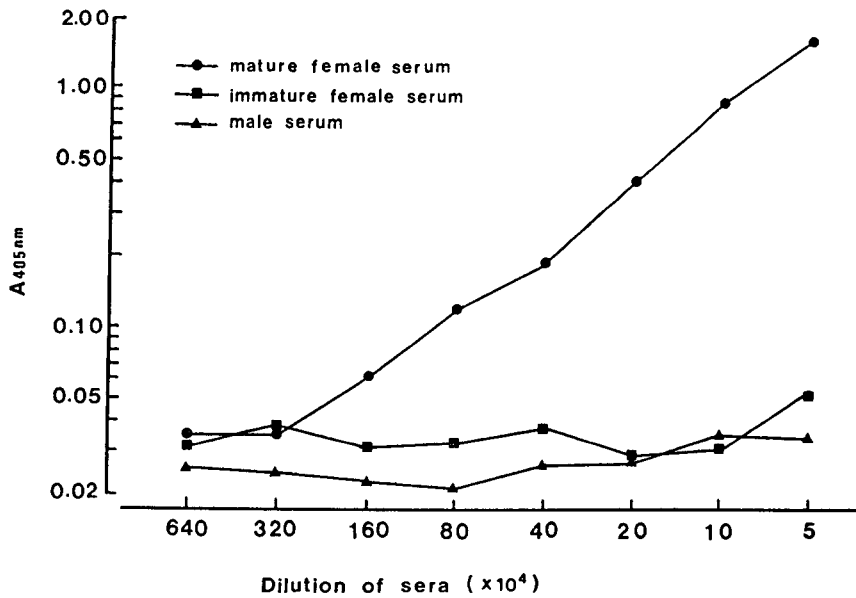


Fig. 10. Absorbance curves for the serial dilutions of matured and immature female sera and male serum.

측정법을 적용시킬 때 서로 같은 경향으로 반응하는지를 알아보기 위하여 standard의 표준곡선과 암 혈청의 반응곡선에 대하여 평행선 검정을 한 결과를 보여주고 있다. standard 31.3 ng/ml에서 1,000 ng/ml까지의 회귀직선과 50,000배에서 1,600,000배까지 희석한 암 혈청 시료의 회귀직선은 각각  $\text{Log } Y = 0.959 \text{ Log } X - 1.878$  ( $R = 0.996$ )과  $\text{Log } Y = 0.942 \text{ Log } X - 1.882$  ( $R = 0.998$ )이었으며, 이들 두 직선의 평행성에 대한 유의한 차이는 없었다.

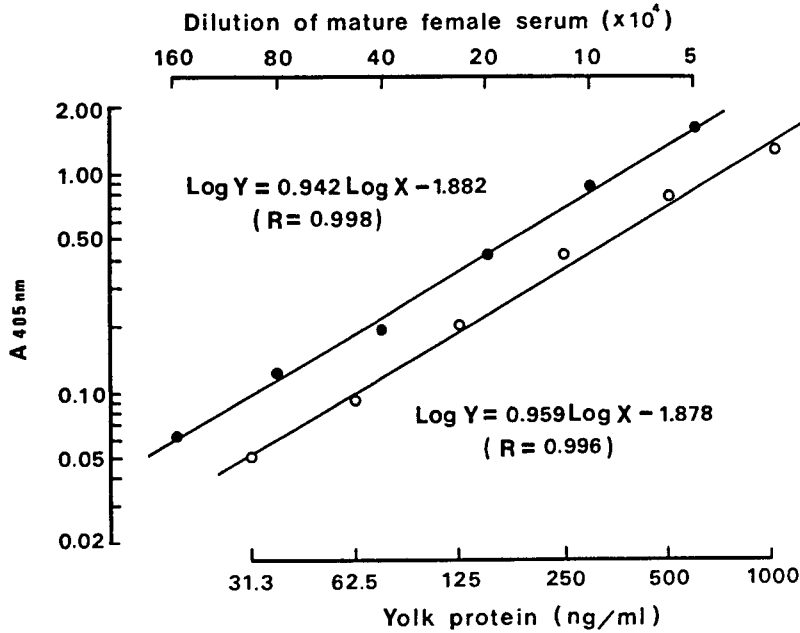


Fig. 11. The relationship between the standard curve for yolk protein and the absorbance curve for serial dilutions of matured female serum.

Assay계의 회수율을 조사하기 위하여 수 참돔의 혈청에 정제된 난황단백질을 넣어 100,000배로 희석시켰을 때 각각 100, 200, 300, 400 ng/ml되게 만든 시료( $n=9$ )에 대하여 본 효소면역측정법을 적용시켜 첨가된 난황단백질의 양을 측정 한 결과(Fig. 12), 각 시료에 대하여  $113.2 \pm 11.3$ ,  $211.6 \pm 17.5$ ,  $339.5 \pm 24.7$ ,  $430 \pm 32.4$  ng/ml로 측정되었고 이들에 대한 회수율은  $109.9 \pm 5.6\%$ 이었으며, 또한 이들의 상관계수  $R=0.990$ 이었다.

Table 1에 나타난 바와 같이 assay내의 변동계수는 1,000 ng/ml에서 31.3 ng/ml의 범위에서는 10%이내이었으며, 15.6 ng/ml와 7.8 ng/ml에서는 15.3% 및 19.5%로서 10%이상으로 나타났다.

#### 4. 난소 성숙에 따른 혈장 난황단백전구체의 변동

1992년 1월 10일부터 4월 10일까지 매일 암 참돔의 평균 GSI의 변동과 평균 혈장 난황단백전구체의 양적인 변동을 Fig. 13에 나타내었으며, 난소의 조직학적인 변화는 Fig. 14에 나타내었다. GSI와 난황단백전구체 양의 변동을 보면(Fig. 13), 1월의 GSI는 0.14으로 매우 낮은 상태이었으며, 2월에도 GSI가 0.25로 유의한 변동은 없었다. 그러나 난황단백전구체의 양은 1월에 0.43 mg/ml에서 2월에 0.84 mg/ml로 유의한 상승을 보였다( $P < 0.01$ ). 2월에서 3월에 접어들면서 GSI가 급격하게 상승

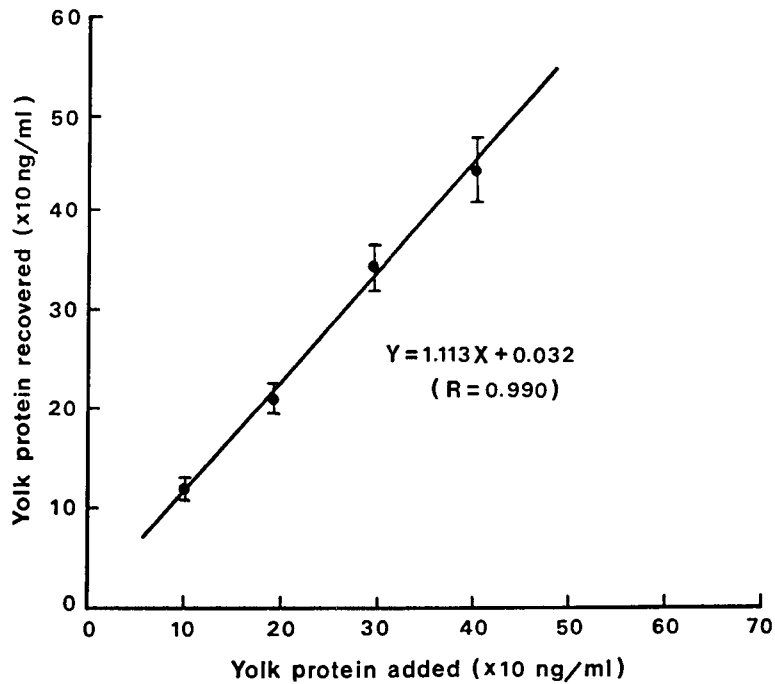


Fig. 12. Recovery test for the yolk protein added to pooled male serum.

Table 1. The intraassay coefficients of variation for measuring of serum yolk protein

Standard ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mean ( $\mu\text{g/ml}$ )	SD ( $\mu\text{g/ml}$ )	CV (%)	N
1.0000	1.1201	0.1086	9.7	6
0.5000	0.5605	0.0404	7.2	6
0.2500	0.2683	0.0188	7.0	6
0.1250	0.1274	0.0085	6.7	6
0.0625	0.0756	0.0041	5.4	6
0.0313	0.0381	0.0033	8.7	6
0.0156	0.0150	0.0023	15.3	6
0.0078	0.0082	0.0016	19.5	6

SD; standard deviation, CV; coefficient of variation, N; number of assay

하면서 3.44%에 이르고 그 후 4월까지 계속 상승하고 있었다. 그리고 난황단백전구체의 양도 GSI의 변동과 거의 같은 양상으로 상승하여, 혈중 난황단백전구체의 양은 3월에 7.16 mg/ml, 4월에 9.36 mg/ml이었다.

난소의 조직학적인 변화를 보면(Fig. 14), 1월의 난소내의 난모세포들은 거의 퇴화흡수되어가는 상태였고(Fig. 14-1), 2월에 접어들면서 난소내에는 초기성장단계에 있는 난모세포들로 이루어져 있

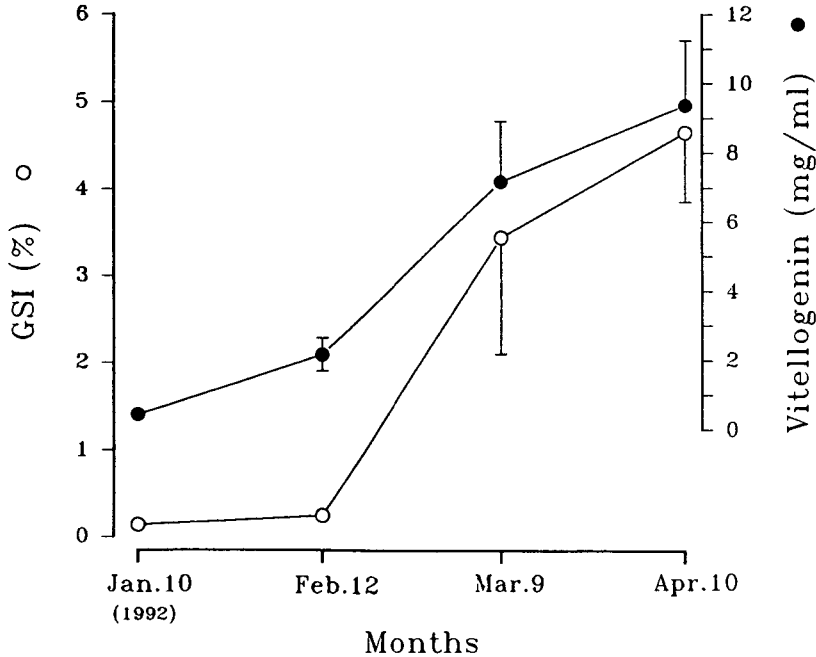


Fig. 13. Changes in GSI (open circle) and plasma vitellogenin (closed circle) levels in red seabream during January to April, 1992.

었으며, 아직 난황구의 형성이 일어나지 않은 상태이었다(Fig. 14-2). 그러나 3월에 이르러서는 난황구의 축적이 이루어지고 있는 난모세포들이 나타나기 시작하며(Fig. 14-3), 4월의 난소내에는 거의 모든 난모세포들이 난황구를 축적하고 있는 난황형성기에 들어있었다(Fig. 14-4).

#### 5. 혈장 난황단백전구체의 양적변동에 의한 암수의 구별

혈장 난황단백전구체의 양적 변동을 조사함으로써 암·수 구별이 가능한지를 알아보기 위하여 외관상으로 암·수 구별이 불가능한 시기인 1월 10일에서 4월 10일까지 임의로 7마리를 선택하여 사육하면서 매월 개체별 혈장 난황단백전구체의 양적 변동을 조사하여 Fig. 15에 나타내었다. 실험이 끝난 후 생식소의 관찰에 의하여 암·수를 구분한 결과 7마리중 3마리는 수컷이었고 4마리는 암컷이었다. 수컷들은 1월부터 4월까지 혈중 난황단백질의 양은 거의 검출되지 않았으나, 암컷들은 1월부터 혈중 난황단백질의 농도는 0.36 mg/ml에서 0.6 mg/ml범위에 있었으며, 수컷들과는 유의한 차이를 보여주고 있었다( $P < 0.05$ ). 더욱이 2월부터는 암컷들은 난황단백전구체의 농도가 개체별로 각각 0.88 mg/ml, 1.00 mg/ml, 1.45 mg/ml, 1.78 mg/ml으로 유의한 상승을 보여주고 있었으며, 3월에는 3.62 mg/ml에서 9.62 mg/ml의 범위에, 4월에는 8.20 mg/ml에서 13.56 mg/ml의 범위에 있어서 수컷들과는 현격한 차이를 보여주고 있었다.

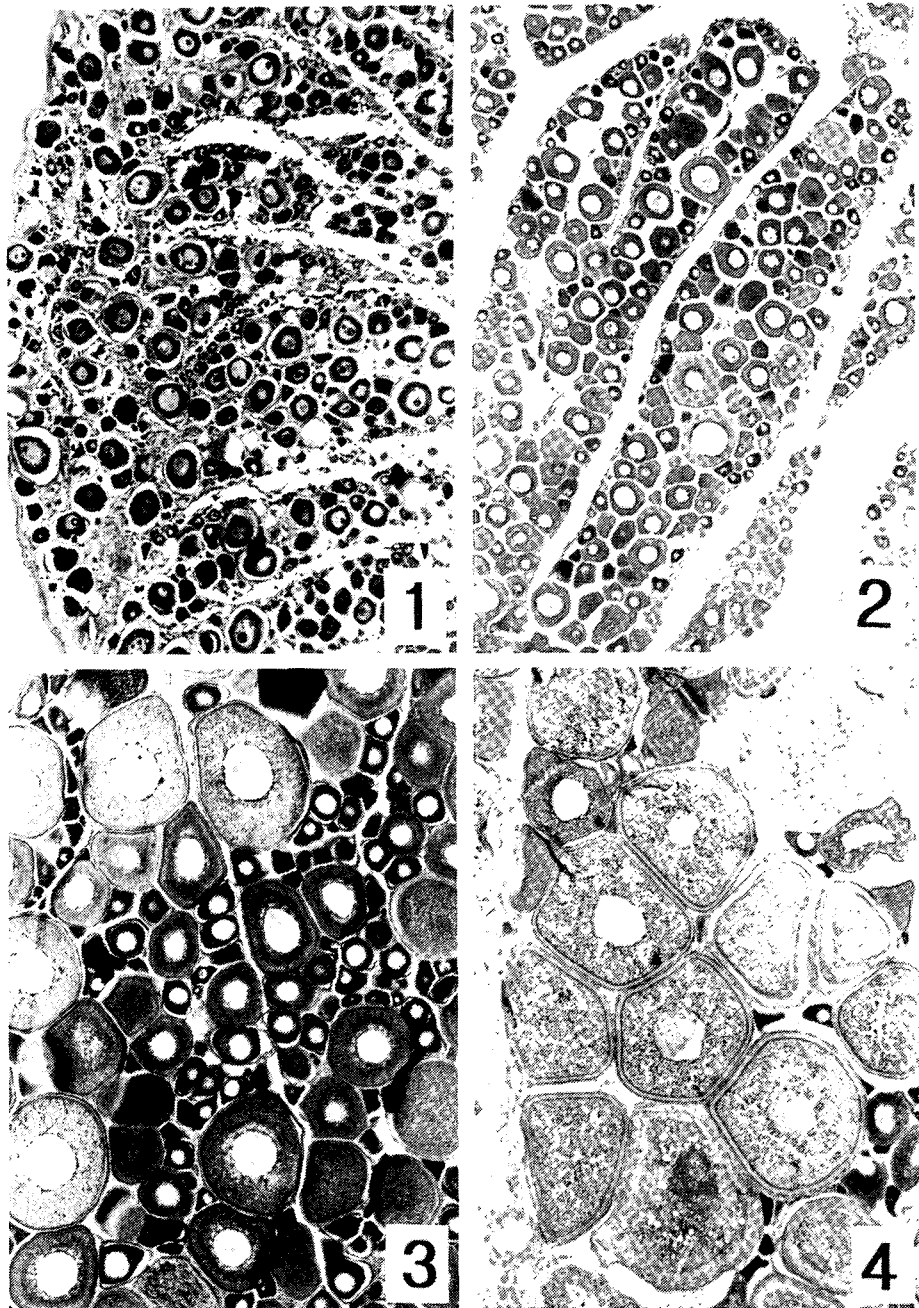


Fig. 14. Histological changes of ovaries in red seabream from January to April, 1992. 1; late resting stage (January). 2; Previtellogenesis stage (February to March). 3; early vitellogenesis stage (March to April). 4; vitellogenesis stage (April).  $\times 100$ .

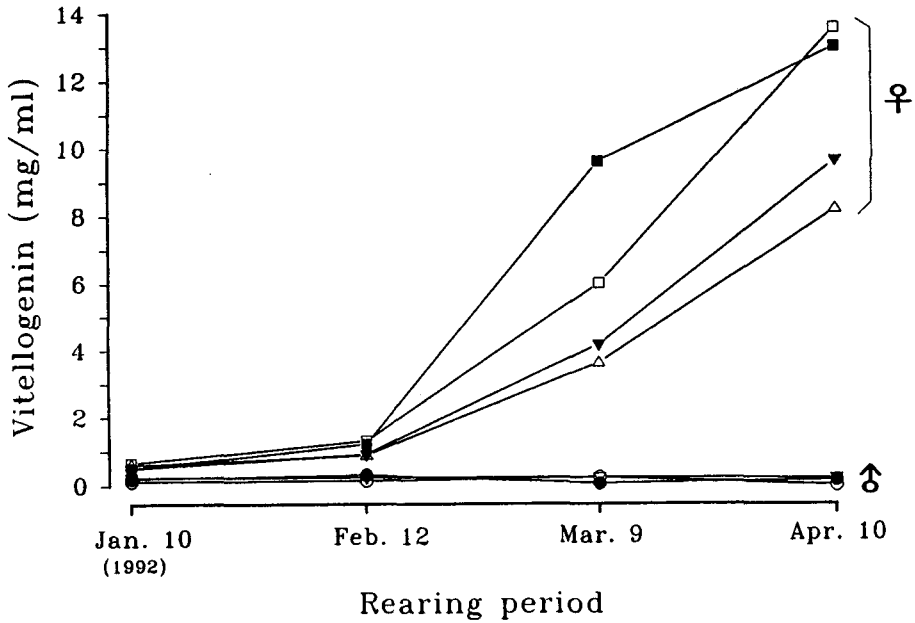


Fig. 15. Changes in plasma vitellogenin levels in seven experimental individuals (4 females and 3 males) of red seabream from January to April, 1992.

## 고 찰

성숙중인 암·수 참돔의 혈청을 토끼에 면역시켜 얻은 항 혈청을 이용하여 암·수 참돔의 혈청을 면역전기영동을 한 결과(Fig. 2), 성숙중인 암 참돔 혈청 중에는 수 참돔의 혈청 중에 전혀 존재하지 않는 암 특이혈청단백질(female specific serum protein)이 있음이 확인되었으며, 또한 흡수항체를 이용한 조난황단백질과 암·수 참돔의 혈청을 면역전기영동과 Ouchterlony면역확산 검정을 한 결과(Fig. 3 과 Fig. 4), 이 암 특이혈청단백질은 난황단백질과 공통의 항원성을 가지는 난황단백전구체를 알 수 있었다. 이러한 결과로 부터 난황단백전구체와 동일한 항원성을 가지는 난황단백질에 대한 항체를 이용하면 암 참돔 혈청내에 존재하는 난황단백전구체의 존재와 그 양을 정량할 수 있는 효소면역측정법을 만들 수 있다고 생각되었다. 따라서 우선 난황단백질을 난소난으로 부터 분리하고, 이 난황단백질에 대한 항체를 이용하여 효소면역측정법으로 암 혈장내에 있는 난황단백전구체를 정확히 측정할 수 있는지에 대하여 assay계의 타당성을 조사하였다.

Sepharose CL-4B의 gel chromatography column을 이용하여 조난황단백 추출액으로 부터 분리된 난황단백질을 토끼에 주사하여 얻은 항체를 이용하여 참돔의 암·수 혈청과 분리된 난황단백질을 면역전기영동과 Ouchterlony면역확산 검정을 실시한 결과(Fig.7 과 Fig. 8), 조난황단백질로 부터 분리된 난황단백질은 난황단백전구체와 동일한 항원성을 지니고 있음을 알 수 있었다. 따라서 난소난으로 부터 분리된 난황단백질에 대한 항체는 난황단백전구체의 효소면역 측정법에서 난황단백전구체의 항체로 사용 가능하다고 할 수 있다.

난황단백질과 난황단백전구체와의 면역학적 관계에 대해서는 많은 연구자들에 의하여 조사 보고



되어져 왔으며(Hara and Hirai 1978; Hara 1978; Hara *et al.* 1980; Hara *et al.* 1983; Matsubara *et al.* 1985). 난황단백질은 간세포에서 난황단백전구체의 상태로 만들어져 난소내의 난모세포속에 축적되어 난모세포가 성숙하게된다는 사실은 널리 알려져있다. 따라서 난황단백전구체의 합성이 얼마나 활발하게 일어나고 있는지에 따라 혈중에 존재하는 난황단백전구체의 양도 달라지게 될 것이며, 난소의 성숙도 그에 따라 달라지게 될 것이다. 그러므로 많은 연구자들은 암컷의 생식소 발달 정도를 알아내기 위해 난황단백전구체에 대한 항체나 난황단백질에 대한 항체를 이용하여 면역학적인 방법을 응용하여 혈장내에 존재하는 난황단백전구체의 양을 정량하여 왔다. Hara *et al.* (1986)은 Mancini법을 이용하여 *Salvelinus leucomaenis*의 혈장내 난황단백전구체에 대한 정량을 시도하였다. 그러나 이 방법을 이용함에 있어서 타당성 조사는 전혀 하지않았을 뿐만 아니라 정밀도도 매우 낮으며, 많은 양의 재료를 분석하기에는 면역확산용 gel을 만드는데 번거로움이 많다. 최근에는 많은 양의 재료를 정량할 수 있을 뿐만 아니라 정밀도도 높은 방사선면역측정법이 개발되었으며, 이 방법을 이용하여 대서양 연어인 *Salmo salar*에 대하여 성숙속에 따른 혈중 난황단백전구체를 정량한 바가 있다(Idle *et al.* 1979; So *et al.* 1985). 그러나 RIA법은 이용이 간편하고 정밀도가 높은 반면 방사선을 사용함에 있어서 방사선 물질 취급상의 부대시설과 방사선 폐기물 처리등의 어려움이 많이 따르게 된다. 그래서 근년에 와서는 항원과 항체를 측정하기 위한 방법의 하나로 효소가 표지된 항체를 이용한 효소면역측정법에 대하여 여러가지 방법들이 개발되어지고 있다(Tijssen 1987; Kemeny and Challacombe 1988).

본 연구에서는 항체를 측정하기 위한 Engvall and Perlmann (1972)의 방법을 이용하여 항원의 양을 측정할 수 있는 방법으로 변형하였을 때 이 방법이 항원의 정량에 사용 가능한지의 타당성을 조사하였다. 본 연구에 이용된 assay계는 성숙한 암 참돔 혈청에 대하여 특이성을 갖고 있음을 Fig. 10에서 알 수 있었다. 그리고 난황단백질의 standard와 암 참돔 혈청에 대한 평행성 조사(Fig. 11), assay계가 난황단백전구체의 양에 대하여 얼마나 정확히 측정되고 있는지를 알아보기 위한 회수율 조사(Fig. 12) 그리고 assay계내의 변동계수의 조사 결과(Table 1)들에 의하여, 본 연구에서 설정한 난황단백전구체에 대한 효소면역측정법은 난황단백질의 농도가 1,000 ng/ml에서 31.3 ng/ml의 범위내에서는 혈장내의 난황단백전구체 농도 측정이 가능하다고 할 수 있었다.

본 연구에서 설정한 난황단백전구체의 효소면역측정법에 의하여 실제로 측정하여 난소의 발달과 난황단백전구체의 변동을 비교한 결과(Fig. 13), GSI의 변동과 혈장 난황단백전구체의 변동은 거의 같은 양상을 보여주고 있을 뿐만 아니라, 난성숙 초기에 이미 난황단백전구체의 상승이 나타났다. 따라서 혈중 난황단백전구체를 측정함으로써 난성숙초기에 성숙시기에 들어가고 있는지를 혈액을 통하여 판정할 수 있었다. 생식소 성숙에 따른 혈장내의 난황단백전구체 양의 변동에 대하여 칠성장어류인 *Lampetra japonica*와 *L. reissneri* (Fukayama *et al.* 1986) 그리고 미꾸리 *Misgurnus anguillicaudatus* (Teranishi *et al.* 1981)에서 Mancini법으로 연구된 바가 있으나 이들 연구 결과들에서도 생식소가 성숙함에 따라 혈장내의 난황단백전구체의 양도 함께 증가하는 경향을 나타내고 있어서 혈장내의 난황단백전구체의 양적 변동을 조사 함으로써 암 생식소의 발달 단계를 간접적으로 추정할 수 있음을 보여주고 있다.

그리고, 개체별 혈중 난황단백전구체의 양적인 변동을 조사한 결과(Fig. 15), 난소 성숙이 일어나기 전 1월부터 유의한 차이는 아니지만 난황단백전구체의 양에서 암·수 차이가 어느 정도 보여주었으나 2월 부터는 암·수의 차이가 나타나고 있다. 이러한 결과들로부터 참돔의 암·수 구분은 1월 이전에도 가능하리라고 생각되지만, 2월 이후 부터는 본 연구에서 설정한 효소면역측정법을 이용한 다면 명확히 암·수 구별이 가능하다고 할 수 있다.

## 요 약

난황형성 중인 암 참돔의 혈청 내에는 암 특이혈청단백질이 존재하고 있음이 Ouchterlony의 면역 확산 검정과 면역 전기영동에 의하여 밝혀졌으며, 이러한 암 특이혈청단백질은 암·수 혈청과 난추출액의 면역학적인 조사에 의해 난황단백 전구체임이 밝혀졌다. 또한 난추출액으로 부터 정제된 난황단백질은 난황전구체와 공통의 항원성이 있음도 면역학적인 조사에 의하여 알 수 있었다.

변형한 효소면역측정법의 타당성을 조사하였다. 일정 비율로 희석한 성숙중인 암 혈청의 흡광도 곡선은 난황단백질의 표준곡선과 평행하였다. 본 효소면역측정법의 평균 회수율은  $109 \pm 5.6\%$ 이었으며, 10% 이내의 assay내 변동계수 범위는 31~1,000 ng/ml이었다.

생식소의 성숙 단계에 대한 혈장내의 난황단백전구체의 양과의 관계를 조사하기 위하여 휴지기 후기(1월)부터 난황형성기(4월)까지 난황단백질에 대한 항체를 이용한 효소면역측정법에 의하여 혈장 난황단백전구체의 양을 측정하였다. 난황단백 전구체의 양은 난황형성 전기인 2월부터 증가하기 시작하여, 난황형성기(3월부터 4월) 동안에는 난이 성장하면서 계속 증가하였다. 2월부터 혈장내의 난황단백전구체의 양이 암·수에 따라 현저하게 차이가 났다. 따라서 참돔 친어의 성 구분은 효소면역 측정법에 의하여 2월부터는 명확히 할 수 있다.

## 참 고 문 헌

- Aida, K., P.-V. Ngan and T. Hibiya. 1973. Physiological studies of gonadal maturation of fish-  
I. Sexual difference in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 39: 1091~1106.
- Campbell, C. M. and B. Jalabeert. 1979. Selective protein incorporation by vitellogenin *Salmo gairdneri* oocytes in vitro. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 19: 429~437.
- Davis, B. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 404~427.
- Engvall, E. and P. Perlmann. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. quantification of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J. Immunol. 109: 129~135.
- Fine, J. N. and A. Drilhon. 1983. Etude immunologique des proteines du serum de *Salmo salar*: Etude par immunodiffusion. C. R. Soc. Biol. 157: 1937~1940.
- Fukayama, S., H. Takahashi, T. Matsubara and A. Hara. 1986. Profiles of the female-specific serum protein in the japanese river lamprey, *Lampetra japonica* (Martens), and the sand lamprey, *Lampetra reissneri* (Dybowski), in relation to sexual maturation. Comp. Biochem. Physiol. 84A: 45~48.
- Hara, A. 1978. Sexual differences in serum proteins of chum salmon and the purification of female-specific serum protein. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 44: 689~693.
- Hara, A. and H. Hirai. 1978. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 58B: 339~343.
- Hara, A., K. Yamauchi and H. Hirai. 1980. Studies on female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). Comp. Biochem.

Physiol. 65B: 315~320.

- Hara, A., K. Takano and H. Hirai. 1983. Immunochemical identification of female-specific serum protein, vitellogenin, in the medaka, *Oryzias latipes* (Teleosts). *Comp. Biochem. Physiol.* 76A: 135~141.
- Hara, A., A. Takemura., T. Matsubara and K. Takano. 1986. Immunochemical identification of female-specific serum proteins in a Viviparous fish, the White-edged rockfish (*Sebastes taczanowskii*), during vitellogenesis and pregnancy, and after estrogen treatment. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 37: 101~110.
- Idler, D. R., S. J. Hwang and L. W. Crim. 1979. Quantification of vitellogenin in Atlantic salmon, *Salmo salar* plasma by radioimmunoassay. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 38: 574~578.
- Kemeny, D. M. and S. J. Challacombe. 1988. ELISA and other solid phase immunoassays. Wiley Pub. pp. 365.
- Matsubara, T., A. Hara and K. Takano. 1985. Immunochemical identification and purification of coelomic fluid-specific protein in Chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 309~314.
- Newbould, B. B. 1965. Production of allergic encephalomyelitis in rats by injections of spinal cord adjuvant into the inguinal lymph nodes. *Immunology* 9: 613~613.
- Pickering, A. D. 1976. Effects of gonadectomy, estradiol and testosterone on the migrating liver lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L). *Gen. Comp. Endocrinol.* 28: 473~480.
- Pickering, A. D. and G. J. Dockray. 1972. The effects of gonadectomy on osmoreguration in the migration liver lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L). *Comp. Biochem. Physiol.* 41A: 139~147.
- Ridgway, G. J., G. W. Klontz and Matsumoto. 1962. Intraspecific differences in serum antigens of red salmon demonstrated by immunochemical methods. *Bull. Int. N. Pac. Fish. Comn.* 8: 1~13.
- So, Y. P., D. R. Idler, and S. J. Hwang. 1985. Plasma vitellogenin in land locked Atlantic salmon, *Salmo salar* ovananiche: Isolation, homologous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 81(B): 63~71.
- Teranishi, T., A. Hara and H. Takahashi. 1981. Changes of serum vitellogenin levels during the course of annual reproductive cycle of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 32: 281~292.
- Tijssen, P. 1987. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. Elsevier Pub. pp. 549.
- Wallace, R. A. and K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21: 325~343.
- Watanabe, T., T. Arakawa, C. Kitajima., and S. Fujita. 1984. Effect of nutritional quality to broodstock diets on reproduction of red sea bream. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 50: 495-501.
- Wiegand, M. D. 1982. Vitellogenesis in fish. In: *Reproductive Physiology of fish*. C. J. J. Richter and H. J. Goos, ed. Pudoc, Wageningen, pp. 136~146.
- 福所那彦・山本剛史. 1986. 加温循環水槽によるマダイの親魚養成と早期採卵. *水産増殖*, 34: 69~75.
- 松浦修平. 1972. マダイ卵巢卵の成熟過程と産卵數. *九大農學會誌*, 26: 203~215.