

범가자미, *Verasper variegatus*의 난황단백질 분리 및 면역학적 특성

김진한·김 윤*·김우진**·백혜자**·박중연*·한창희
동익대학교 생물학과·*국립수산진흥원 생물공학과·**국립수산진흥원 양식개발과

Purification and Immunological Characterization of Yolk Protein in Spotted Flounder, *Verasper variegatus*

Jin-Han KIM*, Yoon KIM*, Woo-Jin KIM**, Hea-Ja BAEK** Jung-Youn PARK* and Chang-Hee HAN

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

*Biotechnology Division and **Aquaculture Division, National Fisheries Research and
Development Institute (NFRDI), Kijang-gun, Pusan 626-900, Korea

The yolk protein of spotted flounder, *Verasper variegatus* was purified by precipitation with cold distilled water, followed by Sepharose CL-6B column chromatography. The purified protein was identified as vitellin by Ouchterlony's immunodiffusion test and immunoelectrophoresis. The purified vitellin from ovarian crude extracts has same antigenic determinants with the female specific serum protein, vitellogenin. The molecular weight of purified vitellin was estimated about 550 kD by gel filtration. The vitellin was composed of three major subunits with molecular weight of about 108, 85 and 31 kD, and two minor subunits. The vitellin was identified by western blot analysis using anti-vitellin antibody.

Key words : spotted flounder, yolk protein, Ouchterlony's immunodiffusion, immunoelectrophoresis

서 론

어류 난모세포는 제 1 차 감수분열 전기 상태에서 분열을 정지하고 그 크기를 증가시키면서 난세포질내에 난황을 축적하는 난황형성기 (vitellogenesis)를 거친다. 난형성과정 (Oogenesis) 중 세포질내에 다량으로 축적되는 난황단백질 (vitellin, Vn)은 대부분의 난생과 난태생 척추동물에서 수정 후 형태형성에 이용되는 영양원으로서 매우 중요하다 (Selman and Wallace, 1983; Wallace, 1985). 어류의 알을 구성하고 있는 단백질 성분 중 대부분을 차지하고 있는 난황단백질은 간에서 합성된 난황단백전구체 (vitellogenin, Vg)가 축적된 것이며, 이 난황단백전구체는 난소의 여포세포층에서 분비된 estradiol-17 β 의 자극에 의해 간에서 합성된 후 혈류를 통하여 난소로 전달되어 난모세포에 흡수된다 (Aida, 1973a). 이때 난황단백전구체는 단백질 가수분해 효소에 의해 보다 작은 난황단백질, 즉 lipovitellin과 phosvitin으로 나뉘어져서 난황구 (yolk globules)나 난황판 (yolk platelets)형태로 축적된다고 알려져 있다 (Wallace et al., 1966; Wallace and Begovac, 1985; Kanungo et al., 1990; Tyler et al., 1990). 지금까지 여러 어종을 대상으로 밝혀진 lipovitellin은 어

종에 따라 lipovitellin을 구성하는 단백질 subunit의 수와 분자량 및 면역학적 특성이 각기 다르게 나타나고 있다 (Hara and Hirai, 1978; Campell and Idler, 1980). 이러한 결과들은 어종에 따라 lipovitellin의 생화학적 특이성을 갖고 있다는 것을 보여주고 있다. 따라서 난황단백질을 분리하여 그 성질을 파악하는 것은 그 어종에 대한 알의 질을 판단하는 데 중요한 기초자료가 될 수 있다.

최근 혈중 난황단백전구체의 농도를 측정하여 난황형성 과정을 간접적으로 알아내는 RIA (radioimmunoassay) 법이나 EIA (enzymeimmunoassay)법이 개발되어 이용되고 있다 (Idler et al., 1979; Kwon et al., 1990; Han et al., 1995). 언급한 바와 같이 난황단백질이나 난황단백전구체는 종 특이성이 있기 때문에 RIA법이나 EIA법으로 난황단백전구체를 측정하는 system을 만들기 위해서는 우선 그 대상종에 대한 난황단백전구체나 난황단백질을 분리, 정제하고 이에 대한 항체를 제작하여야 한다.

본 논문에서는 범가자미 알의 특성을 밝히고 혈중 난황단백전구체에 대한 RIA법이나 EIA법의 체계를 세우는 기초 자료를 얻기 위하여 조난황단백추출액에서 난황단백질을 분리하고 이에 대한 항체를 제작하여 이들의 생화학적 및 면역학적 특성을 밝혔다.

본 연구는 1993년도 과학기술처 특정연구개발비에 의해 수행되었음.

재료 및 방법

1. 재료

1992년 12월부터 1994년 1월까지 여천 근해에서 채집한 암수 범가자미를 각각 30마리를 대상으로 3ml 주사기를 이용하여 각 개체의 미병부 척추 하동맥으로부터 혈액을 채혈한 후 10,000×g에서 30분간 4°C에서 원심분리하였다. 분리된 혈청은 실험에 사용될 때까지 -80°C에 보관하였다. 범가자미의 성숙란은 0.9% saline액으로 세척하여 -80°C에 보관하였다.

2. 항혈청 및 흡수 항혈청 제작

성숙한 암수 혈청에 대한 항혈청은 Newbould (1965)의 방법을 약간 변형하여 만들었다. 1회째 항원주사는 성숙한 암수 범가자미의 혈청 1ml과 같은 양의 complete freund's adjuvant를 혼합하여 유화시켜 New Zealand white에 피하주사하였다. 2회째부터 항원주사는 혈청 1ml과 같은 양의 incomplete freund's adjuvant를 혼합하여 1주일 간격으로 3회에 걸쳐 토끼에 피하주사하였다. 마지막으로 항원을 투여 1주일 후 토끼의 경동맥을 절단하여 전채혈하였다. 채혈한 혈액은 37°C에서 1시간 정도 응고시킨 다음 4°C에서 12시간 배양 후 항혈청을 분리하여 -80°C에서 보관하였다. 성숙란으로부터 분리한 난황단백질 (250 µg/ml)에 대한 항혈청은上記한 범가자미 혈청에 대한 항혈청 제작과 동일한 방법으로 만들었다. 흡수 항혈청은 성숙한 암컷 혈청에 대한 항혈청 1ml에 수컷 혈청 1ml를 혼합하여 37°C에서 5시간 동안 반응시킨 후 10,000×g에서 30분간 원심분리후 -80°C에서 보관하였다.

3. 난황단백질의 분리

난황단백질 분리는 Hara and Hirai (1978) 방법에 따라 하였다. 성숙한 난소 2.5g을 2% NaCl과 0.1% NaN₃ 들어 있는 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액 5ml에 넣고 균질기로 마쇄한 후 10,000×g에서 30분간 4°C에서 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액에 10배 부피의 4°C 증류수를 넣고 충분히 혼합하여 4°C에서 1시간 배양한 후 10,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 이를 2회 더 반복하여 침전물을 상기한 완충액으로 용해하였다. 용해된 난황단백질은 Sepharose CL-6B column (φ2.5 cm×88 cm)을 사용한 gel filtration에 의해 12 ml/hr 속도로 3 ml/tube씩 분획하였다. 분자량 측정용 표준단백질은 thyroglobulin (669 kD), apoferritin (443 kD), β-amylase (200 kD), alcohol dehydrogenase (150 kD), bovine serum al-

bumin (66 kD)과 carbonic anhydrase (29 kD)를 사용하였다.

4. 면역전기영동 및 면역확산

(1) 면역 전기영동 (Immunoelectrophoresis)

면역전기영동은 Garbar and Williams (1953)의 방법에 따라 하였다. 100 mM Tris-HCl (pH 8.6) 완충액을 사용하여 1%의 agarose gel을 만들었다. 전기영동용 완충액은 200 mM Tris-HCl (pH 8.6)을 사용하였으며, 면역 전기영동은 gel의 폭 1 cm당 1.5 mA로써 2시간 30분간 하였다.

(2) 면역확산 (Ouchterlony's immunodiffusion test)

100 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 완충액을 사용하여 1%의 agarose 용액을 만들어 면역확산용 지지체를 제작하여 침강반응을 조사하였다.

5. 전기영동

(1) Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 15% glycerol, 0.012% BPB에 난황단백질을 용해시킨 후 Davis (1964)의 방법을 변형하여 PAGE를 하였다. Stacking gel은 3%, separating gel은 5%을 사용하여 150V constant voltage로 12시간 동안 전기영동 후, 0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% acetic acid용액으로 염색하고, 7.5% methanol, 7.5% acetic acid용액에서 탈색하였다.

(2) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Estradiol-17β를 처리하지 않은 수컷 혈청, estradiol-17β를 처리한 수컷 혈청, 성숙한 암컷 혈청과 분리된 난황단백질을 Laemmli sample buffer (80mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 15% glycerol, 0.012% BPB)에 용해시켜 100°C에서 10분간 boiling한 후 Laemmli (1970) 방법에 따라 SDS-PAGE을 하였다. Stacking gel은 5%, separating gel은 10%을 사용하여 150V constant voltage로 6시간 동안 전기영동하였다. 염색 및 탈색용액은 위의 PAGE와 동일한 것을 사용하였다. 분자량 측정용 표준단백질은 myosin (205 kD), β-galactosidase (116 kD), phospholylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD)와 carbonic anhydrase (29 kD)를 사용하였다.

6. Western blot

SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 Towbin et al. (1979)의 방법에 따라 7V에서 6시간 동안 nitrocellulose (NC)막으로 전사시킨 후 Ponceaus S 용액 (0.2%

ponceaus S, 3% trichloroacetic acid, 3% sulfosalicyclic acid)으로 전사여부를 확인하였다. (NC) 막에 단백질의 비특이적인 결합을 막기 위하여 3% bovine serum albumin (BSA)/Tris-buffered saline (TBS) 용액으로 2시간 동안 실온에서 배양한 후 TBS용액으로 3번 세척하였다. 1:10으로 희석된 토기에서 얻은 난황단백질에 대한 항혈청을 NC 막에 첨가하여 5시간 실온에서 배양한 후 TBS용액으로 3번 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG으로 1시간 동안 실온에서 배양하고 TBS로 5번 세척한 후 66 μ l의 nitro blue tetrazolium (NBT)와 33 μ l bromo chloro indolyl phosphate (BCIP)가 포함된 10 μ l alkaline phosphatase buffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5)에서 발색반응하였다.

결 과

1. 난황단백질의 분리

Sephacryl CL-6B chromatography column을 이용하여 조난황단백추출액에서 난황단백질을 분리 용출한 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 3개의 peak로 분획되었다. 분획된 3개의 peak 중에서 암컷 혈청에 존재하는 암컷 특이 혈청단백질과 동일한 항원성을 갖는 peak를 찾아내기 위하여 흡수항혈청을 이용하여 용출된 peak I, II, III (PI, PII, PIII)에 대한 Ouchterlony 면역확산 test를 하였다.

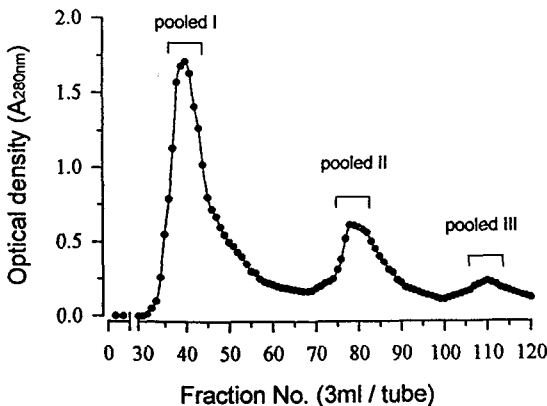


Fig. 1. Chromatographic elution pattern of crude egg extracts in spotted flounder. The proteins were precipitated by cold distilled water and fractionated by Sepharose CL-6B column chromatography. The column was developed with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 2% sodium chloride and 0.1% sodium azide. The column was eluted at a flow rate of 12 ml/hr and each fraction of 3 ml was collected.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 PII는 흡수항혈청에 대하여 1개의 침강선을 형성한 반면, PI과 PIII는 흡수항혈청에 대하여 침강선을 형성하지 않았다. 이러한 결과로 보아 peak II만이 암컷 특이 혈청단백질과 동일한 항원성을 갖는 난황단백질이 존재하는 peak임을 알 수 있었다. 또한 PII를 모아 전기영동한 결과, 수컷 혈청에는 존재하지 않고 estradiol-17 β 를 처리한 수컷 혈청과 성숙한 암컷 혈청에만 존재하는 서로 동일한 단일 band로 나타났다 (Fig. 3).

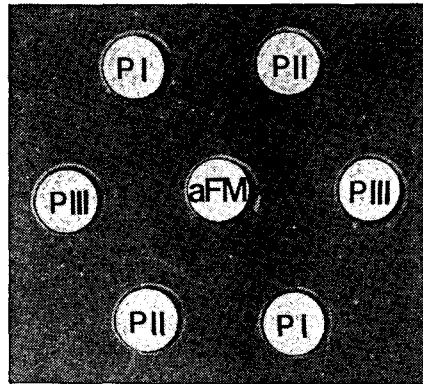


Fig. 2. Ouchterlony's immunodiffusion test of peak I, II and III. Fractions near the peak I, II, and III were pooled. PI, peak II; PII, peak I; PIII, peak III; aFM, antiserum against female specific serum protein.

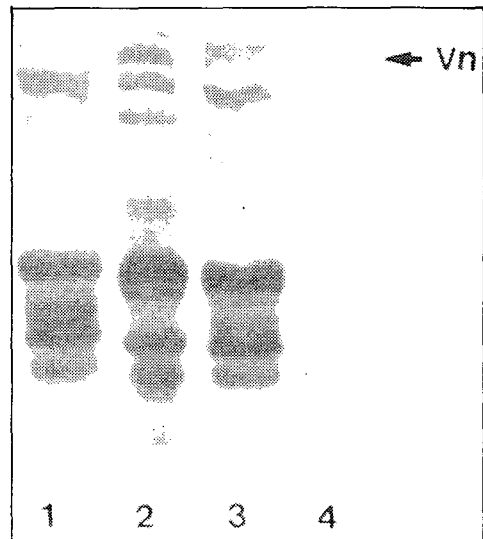


Fig. 3. PAGE of mature male serum (lane 1), E₂-treated male serum (lane 2), mature female serum (lane 3) and purified Vn (lane 4).

2. 난황단백질의 특성

PII의 면역학적 특성을 조사하기 위하여 분리된 PII를 항원으로 사용하여 토끼에 면역하여 항혈청 (aVn)을 만들었다. 분리한 난황단백질의 항원성을 조사하기 위하여 분리한 난황단백질에 대한 항혈청과 수컷 혈청에 대한 항혈청을 이용하여 조난황단백 추출액, 성숙한 암수 혈청 및 분리한 난황단백질에 대하여 면역전기영동 및 Ouchterlony 면역확산 test를 하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 조난황단백추출액, 분리한 난황단백질 및 암컷 혈청들은 조난황단백추출액에 대한 항혈청에 대하여 1개의 명료한 침강선이 형성되는 반면, 수컷 혈청에 대해서는 전혀 침강선이 형성되지 않았다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 분리한 난황단백질에 대한 항혈청에 대하여 수컷 혈청에서는 침강선이 형성되지 않았지만 분리한 난황단백질과 암컷 혈청에서는 각각 1개의 침강선이 형성되면서 서로 융합하고 있었다. 이 결과로 보아 분리한 난황단백질은 암컷 혈청에 존재하는 난황단백전구체와 동일한 항원성을 가지고 있음을 알 수 있다.

분리한 난황단백질의 분자량을 겔여과법에 의하여 분석한 결과, 분자량이 약 550 kD 이었다 (Fig 6). 이 난황단백질을 SDS-PAGE한 결과, 5종의 band로 분리되었으며 (Fig. 7A), Fig. 8에 나타난 바와 같이 표준단백질을 근거로 분자량을 측정한 결과 분자량이 108, 103, 85,

80, 31 kD이었고, 5종의 band는 각각 약 108, 85, 31 kD인 3종의 major band와 103, 80 kD인 2종의 minor band로 구성되었다. 또한 SDS-PAGE에 의해 분리된 난황단백

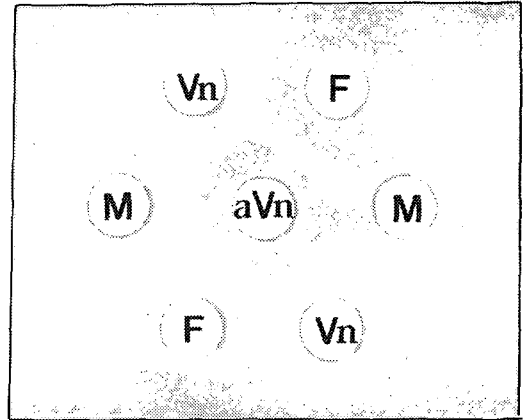


Fig. 5. Ouchterlony's immunodiffusion test of mature male serum, mature female serum and purified vitellin. M, mature male serum; F, mature female serum; Vn, purified vitellin; aVn, antiserum against purified vitellin.

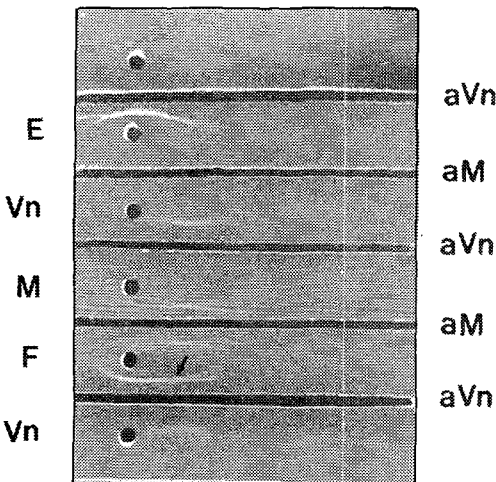


Fig. 4. Immunoelectrophoresis of mature male serum, mature female serum, crude egg extracts and purified vitellin. Arrow indicates a precipitin line of female specific serum protein. M, mature male serum; F, mature female serum; E, crude egg extracts; Vn, purified vitellin; aM, antiserum against mature male serum; aVn, antiserum against purified vitellin.

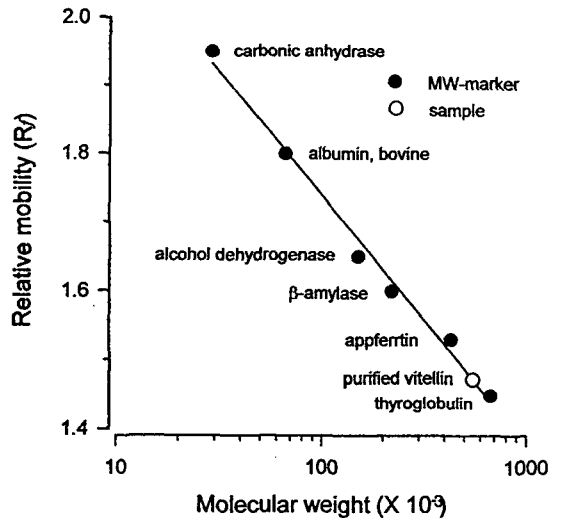


Fig. 6. Determination of molecular weights of purified vitellin by Sepharose CL-6B column chromatography. The molecular weights of purified vitellin were estimated to be about 550 kD. Thyroglobulin (669 kD), apoferritin (443 kD), β-amylase (200 kD), alcohol dehydrogenase (150 kD), bovine serum albumin (66 kD), and carbonic anhydrase (29 kD) were used as the molecular weight marker proteins in Sepharose CL-6B column chromatography.

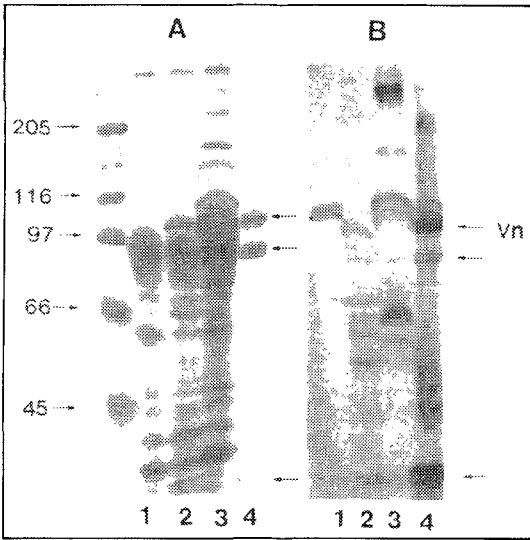


Fig. 7. SDS-PAGE and immunoblot of mature male serum (lane 1), E₂-treated male serum (lane 2), mature female serum (lane 3) and purified Vn (lane 4). After SDS-PAGE, proteins were either Coomassie-stained (panel A) or blotted with antiserum against purified vitellin (Panel B). M, the molecular weight marker proteins. Arrow indicates a major subunits of purified vitellin.

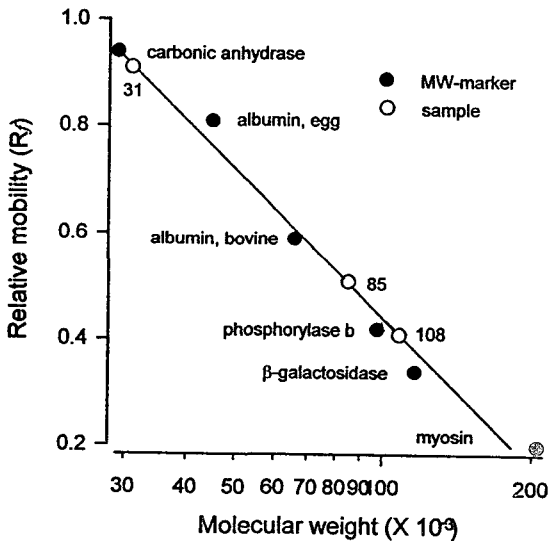


Fig. 8. Electropherogrammatic determination of molecular weights of the purified vitellin subunits. Myosin (205 kD), β-galactosidase (116 kD), phosphorylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD) and carbonic anhydrase (29 kD) were used as the molecular weight marker proteins in electrophoresis.

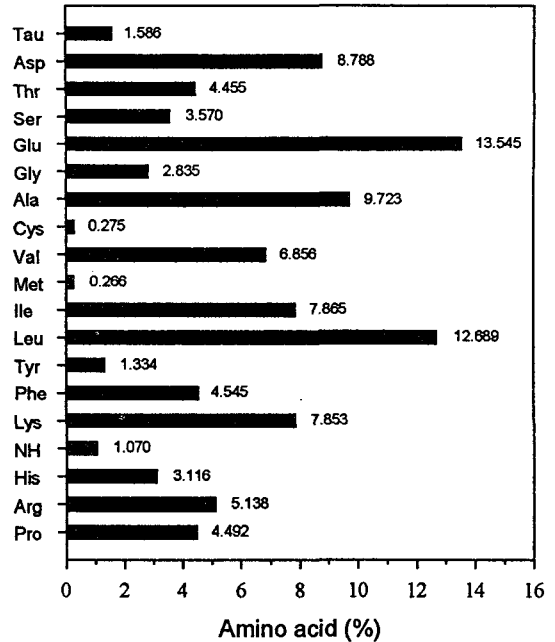


Fig. 9. Amino acid composition of the purified vitellin of spotted flounder, *V. variegatus*.

질을 난황단백질에 대한 항혈청으로 western blot한 결과, 분리된 난황단백질을 인지함을 알 수 있었다 (Fig. 7 B). 분리된 난황단백질에 대한 아미노산 구성 및 함량은 Fig. 9에 나타내었다. 아미노산의 구성은 taurine 등 18종으로 이루어져 있으며, 그중에서도 glutamate가 13.5%로 가장 높았으며 leucine, allanine, aspartate 순서로 높았고 cysteine은 0.28%, methionine은 0.27%로 가장 낮게 나타났다. 그러나 glutamine, asparagine 그리고 tryptophan은 필수 아미노산이면서도 나타나지 않았다.

고찰

어류를 포함한 많은 종에서 Vg를 분리하는데 물침전 또는 Mg²⁺-EDTA 방법이 알려져 있으며, 난황단백질 분리에도 이들 방법을 사용하여 왔다 (Wiley et al., 1979; Campbell and Idler, 1980; de Vlaming et al., 1980). 분리하기 전에 Vg가 포함된 혈청 단백질을 선택적으로 증류수로 침전시킨다. 이 방법은 매우 쉽고 간편하지만 효율성은 Vg 농도에 의존하여 농도가 5 mg/ml 이상이어야 한다. 본 실험에서는 난황단백 추출액을 증류수로 침전시킨 후 Hara and Hirai (1978) 방법에 따라 Sepharose CL-6B column chromatography에 의해 난황단백질을 분리하였다. 무지개송어와 점농어에서는 두 종류의 난황단백질이 존재하고 있음이 알려져 있으며 이를 각각 Vn I,

II로 구분하여 명명하고 있다. 그리고 이중 Vn I은 lipovitellin 이고 Vn II는 난황의 β 구조와 phosvitin의 복합물질 것이라고 추측하고 있다 (Jared and Wallace, 1968; Market and Vanstone, 1971; Hara and Hirai, 1978). 한편 어류의 phosvitin은 serine이 풍부한 phosphoprotein이며 난황단백질의 구성에서 3%정도 차지하며 (Campbell and Idler, 1980), 또한 trichloroacetic acid에 용해되며 Coomassie blue에는 염색이 되지 않는 분자량이 19~43 kD 정도되는 저분자의 단백질이라고 보고되어 있다 (Wallace et al., 1966; Mano and Yoshida, 1969; Wallace and Begovac, 1985). 따라서 본종에서 분리된 난황단백질은 분자량이 큰 lipovitellin이라고 할 수 있다. 무지개송어 lipovitellin의 분자량이 연구자에 따라 각각 300 kD, 290 kD, 350 kD으로 다르게 알려져 있으며 (Hara and Hirai, 1978; Campbell and Idler, 1980; Riazie et al., 1988), lipovitellin을 구성하고 있는 subunit는 분자량이 큰 90~95 kD와 분자량이 작은 15~24 kD의 2종으로 이루어져 있다 (Hara and Hirai, 1978; Chen, 1983; Babin, 1987). 한편 점농어의 lipovitellin 분자량은 gel filtration에 의해 300 kD이며, 이 lipovitellin은 분자량이 각각 98, 71.5, 22 kD인 3개의 subunit와 그외에 분자량이 작은 몇개의 subunit들로 구성되어 있다 (Kwon et al., 1990). 그리고 금붕어의 lipovitellin은 각각 110, 105 kD의 높은 분자량을 갖는 2종의 subunit와 19~25 kD의 낮은 분자량을 갖는 4종의 subunit로 이루어져 있다 (de Vlaming et al., 1980). 이와 같이 lipovitellin은 종에 따라 분자량의 크기 및 구성하는 subunit의 종류 및 분자량의 크기가 각기 다르며, 심지어는 같은 종에 있어서도 분자량의 차이가 있다. 같은 종에서의 이런 차이는 사용된 분리방법, 단백질 분해정도 및 분리동안 탈인산화에 기인 할 것으로 추정된다.

본 논문에서 조사된 범가자미의 lipovitellin 분자량은 약 550 kD 이었으며, SDS-PAGE에 의해서는 분자량이 각각 108, 103, 85, 80 kD인 4개 큰 subunit와 31 kD인 작은 subunit로 구성되어 있었다. 이중 103, 80 kD subunit는 108, 85 kD의 subunit에 대하여 sampling시 각각 분해된 subunit일 가능성도 있어 범가자미의 lipovitellin의 subunit가 아닐 수도 있다. 이러한 분자량의 크기는 타 어종과 거의 유사하였으며 subunit의 종류에서는 특히 금붕어와 유사하게 나타났으나 분자량의 크기는 약간의 차이가 있었다.

범가자미 난황단백질의 아미노산 구성에서 glutamate, leucine, alanine, aspartate이 높게 함유되어 있으며 이것은 무지개송어의 아미노산 구성과 비슷하며, 한편 taurine이라는 아미노산은 phosphopeptide를 구성하는 주된

아미노산으로서 연어류와 뱀장어의 난황단백질전구체의 아미노산 에서도 존재한다고 보고되어 있다 (Hara et al., 1980). 이와 같은 결과로 미루어 난황단백질과 난황단백질전구체의 아미노산 구성은 상당히 유사할 것으로 생각된다.

요 약

범가자미, *Verasper variegatus*의 난황단백질을 증류수로 침전시킨 후 Sepharose CL-6B column chromatography에 의해 분리하였다. 조난황단백추출액에서 분리한 난황단백질이 암컷 특이 혈청단백질과 공통의 항원성을 가짐을 Ouchterony 면역확산 test와 면역전기영동으로 확인하였다. 분리한 난황단백질의 분자량은 약 550 kD이었으며, 난황단백질을 구성하고 있는 subunits은 분자량이 각각 108, 85, 31 kD인 3종의 major subunits와 103, 80 kD인 2종의 minor subunits이었다. 분리한 난황단백질은 vitellin에 대한 항혈청을 이용하여 western blot으로 확인한 바, 면역화학적 반응을 나타냈다.

참 고 문 헌

- Aida, K., P. V. Ngan and T. Hibiya, 1973a. Physiological studies of gonadal maturation of fishes. I. Sexual differences in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 39, 1107~1115.
- Babin, P. J. 1987. Apolipoproteins and the association of egg yolk proteins with plasma high density lipoproteins after ovulation and follicular atresia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Biol. Chem., 262, 4290~4296.
- Campbell, C. and D. R. Idler. 1980. Characterization of an oestradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitelligenin by the composition and radioimmunological cross reactivity to ovarian yolk fractions. Biol. Reprod., 22, 605~617.
- Chen, T. T. 1983. Identification and characterization of estrogen-responsive gene products in the liver of rainbow trout. Can. J. Biochem. Cell. Biol., 61, 802~810.
- Davis, B. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404~427.
- de Vlaming, V. L., H. S. Wiley, G. Delahunty and R. A. Wallace. 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: Induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. Ibid., 67B, 613~623.

- Grabar, P. and C. A. William. 1953. M thode permettant l, tude conjugue e des propri t s lectrophor tiques et immunochimiques d'un m lange de prot ines : Application au srum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 10, 193~194.
- Han, C. H., M. H. Yang, J. M. Paek, S. K. Lim and K. H. Kim. 1995. Enzymeimmunoassay for the plasma vitellogenin and early determination of ovarian maturation in red seabream, *Pagrus major*. *J. Aquacul.*, 8, 1~19.
- Hara, A. and H. Hirai. 1978. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 59B, 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.*, 65 (B), 315~320.
- 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.
- Jared, D. W. and R. A. Wallace. 1968. Comparative chromatography of the yolk proteins of teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24, 437~443.
- Kanungo, J., T. R. Petrino and R. A. Wallace. 1990. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* VI. Establishment and verification of conditions for vitellogenesis incorporation by oocytes in vitro. *J. Exp. Zool.*, 254, 313~321.
- Kwon, H. C., A. Hara, Y. Mugiya and J. Yamada. 1990. Enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in whitespotted charr, *Salvelinus leucomaenis*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido. Univ.*, 41 (4), 162~180.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680~685.
- Mano, Y. and M. Yoshida. 1969. A novel composition of phosvitins from salmon and trout roe. *J. Biochem. (Tokyo)*, 66, 105~108.
- Markert, J. R. and W. E. Vanstone. 1971. Egg proteins of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) : Chromatographic separation and molecular weights of the major proteins in the high density fraction and their presence in salmon plasma. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 28, 1853~1856.
- Newbould, B. B. 1965. Production of allergic encephalomyelitis in rats by injection of spinalcord adjuvant into the inguinal lymph nodes. *Immunol.*, 9, 613~614.
- Riazi, A., L. Fremont and M. T. Gozzelino. 1988. Characterization of egg yolk proteins from rainbow trout *Salmo gairdneri* (RICH). *Comp. Biochem. Physiol.*, 89B, 399~407.
- Selman, K. and R. A. Wallace. 1983. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* III. Vitellogenesis. *J. Exp. Zool.*, 226, 441~457.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76, 4350~16/4354.
- Tyler, C. R., J. P. Sumpter and N. R. Bromage. 1990. Selectivity of protein sequestration by vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exper. Zool.*, 248, 199~206.
- Wallace, R. A. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. p. 127~177. *Developmental Biology 1 Plenum (L. W. Browder,)*. New York.
- Wallace, R. A. and P. C. Begovac. 1985. Phosvitin in *Fundulus* oocytes and eggs. *J. Biol. Chem.*, 260, 11268~11274.
- Wallace, R. A., D. W. Jared and A. Z. Eisen. 1966. A general method for the isolation and purification of phosvitin from vertebrate eggs. *Can. J. Biochem.*, 44, 1647~1655.
- Wiley, H. S., L. Opresko and R. A. Wallace. 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. *Anal. Biochem.*, 97, 145~152.

1996년 12월 26일 접수

1997년 5월 8일 수리