

## 범가자미, *Verasper variegatus* 수컷에서 estradiol-17β에 의해 유도된 vitellogenin의 면역학적 특성

김윤 · 김우진\* · 백혜자\* · 김경길 · 방인철\*\* · 한창희\*\*\*  
국립수산진흥원 생물공학과 · \*국립수산진흥원 양식개발과 · \*\*국립수산진흥원 남해수산연구소 · \*\*\*동의대학교 생물학과

## Immunological Characteristics of the Vitellogenin Induced by Estradiol-17β in Male Spotted Flounder, *Verasper variegatus*

Yoon KIM, Woo Jin KIM\*, Hea Ja BAEK\*, Kyung Kil KIM, In Chul BANG\*\* and Chang Hee HAN\*\*\*

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

\*\*Aquaculture Divison, South Sea Research Institute, NFRDI, Yosu 550-120, Korea

\*\*\*Department of Biology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

Vitellogenin (Vg) was purified from plasma of estradiol-17β (E<sub>2</sub>)-treated spotted flounder, *Verasper variegatus*, by precipitation with cold distilled water, followed by fractionation using a Sepharose CL-6B column chromatography. E<sub>2</sub>-induced protein was identified as Vg by SDS-PAGE and western blot analysis. The molecular weight of the purified Vg was estimated 175 kD as determined by SDS-PAGE. In order to measure the Vg level, monoclonal antibodies against Vg were produced by hybridoma technique. Purified Vg was immunized into Balb/c mice and then the spleen cells from mice were fused with NS-1 myeloma cells. The hybridoma cells were screened by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and subcloned by limiting dilution. The hybridoma clones which secreted antibodies highly reactive to the purified Vg were designated as 4D6. Its specificity was demonstrated by western blot from plasma of untreated, E<sub>2</sub>-treated male fish, and purified Vg.

Key words : Vitellogenin, SDS-PAGE, western blot, monoclonal antibodies, hybridoma

### 서 론

어류의 난세포는 성장함에 따라 난 세포질에 난황물질 을 축적하며 이들 난황물질은 어종에 따라 조성이 다소 차이가 있지만 수분이 55~75%, 단백질이 20~33%, 지질이 1~25%, 회분이 0.7~2.2%의 조성을 보인다 (Barman et al., 1964; Jared and Wallace, 1968). 이처럼 난단 백질은 수분을 제외하면 가장 많은 부분을 차지하고 있 으며 난단백질의 대부분은 난황단백질로 이루어져 있다. 난황단백질은 난소의 여포세포층에서 분비되는 estradiol-17β (E<sub>2</sub>)의 자극에 의해 간에서 phosphoglycoprotein 인 난황단백전구체, 즉 vitellogenin (Vg)의 상태로 합성 되어 혈류로 방출된 후 receptor-mediated endocytosis에 의해 난세포내에 흡수되어 축적된다 (Ansari et al., 1971; Deeley et al., 1975; Chapman et al., 1978; Yusko et al., 1981; Selman and Wallace, 1982; Wallace, 1985; Opresko and Walsh, 1987; Mommsen and Walsh, 1988). 난황단백 전구체는 성숙중인 암컷에 특이적으로 존재하는 것이지만 (Plack et al., 1971; Aida et al., 1973b), 수컷에

estrogen을 처리하면 인위적으로 유도되기도 한다 (Wallace and Jared, 1968; Plack et al., 1971; Aida et al., 1973a; Emmerson and Petersen, 1976; Campbell and Idler, 1980). 최근에는 이러한 난황단백전구체의 양적인 변동을 측정함으로써 어류의 성숙 상태를 간접적으로 추정할 뿐만 아니라 성숙기에 있는 암수의 구별에도 이용하고 있다 (Hara, 1978; Hara et al., 1980; Ohta et al., 1984; So et al., 1985; Kwon et al., 1990; Goodwin et al., 1992; Han et al., 1995; Choi et al., 1996). 특히 채집되는 양이 한정 되고 고가의 대형종인 범가자미와 같은 어종에 대하여 주기적인 난성숙 상태를 파악하기 위해서 혈중의 난황단 백전구체의 측정계를 마련한다는 것은 매우 중요한 일이라고 하겠다. 따라서 이러한 난황단백전구체의 측정계를 만들기 위해서는 난황단백질과 난황단백전구체의 분리가 선행되어야 하고 이들의 면역학적 특성이 조사되어야 한다.

이러한 목적을 위해 우리들은 범가자미의 난황단백질 과 난황단백전구체와의 구조적인 특성과 면역학적인 특 성을 조사하기 위하여 난황단백질을 분리하여 이들에 대

한 특성을 조사한 바 있다 (Kim et al., 1997, in press). 본 연구에서는 혈중의 난황단백전구체를 분리하여 이미 조사된 난황단백질과의 면역학적인 관계를 조사하기 위하여 수컷에 E<sub>2</sub>를 처리하여 난황단백전구체의 합성을 유도하고 처리된 수컷으로부터 난황단백전구체를 분리하였으며 이들에 대한 면역학적인 특성을 밝히고 난황단백전구체에 대한 단클론항체를 만들어 난성숙과 관련된 난황단백전구체의 양을 측정할 수 있는 ELISA (Enzyme Linked-Immunesorbent Assay)를 만드는 데 이용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료

1991년 5월 경남 거제도 인근 해역에서 어획된 전장 20 cm 내외, 체중 200 g 전후의 만 1년생 범가자미를 실내 콘크리트 원형수조 (직경 5 m, 수심 1.2 m)에 옮겨 계속 성육시켰다. 재료로는 1993년 3월에 사육중인 범가자미 중 무작위로 인위적 복부 압박에 의하여 정상 정자 활력 상태를 확인한 후 BIC Tag system으로 개체 tagging 한 다음 1994년 11월 성숙기 이전인 수컷 (전장 35 cm, 체중 1.5 Kg)을 사용하였다.

### Hormone처리 및 혈액 채취

성숙한 수컷 범가자미를 10 mg E<sub>2</sub>/kg을 가슴지느러미 기저부를 통해 복강에 주사하여 Vg 합성을 유도하였다. E<sub>2</sub>는 99% ethanol (25 mg E<sub>2</sub>/1.0 ml ethanol)에 녹여 주사하기 전 0.9% NaCl로 4배 희석하였다. 48시간 간격으로 2회 주사하고 48시간 후 채혈하였다. Vg을 분리하기 위하여 혈액을 원심분리하여 혈청을 -80°C에 보관하였다가 사용하였다.

### Vitellogenin 분리

Vg의 분리는 Hara and Hirai (1978)의 방법에 따라 실시하였다. 1 ml의 E<sub>2</sub> 처리한 수컷 혈청과 10배 부피의 cold water와 혼합하여 4°C에서 1시간 동안 배양한 후 10,000×g에서 15분간 원심분리하여 Vg 성분을 침전시켰다. 이를 2회 반복한 후 침전물을 2% NaCl, 0.1% NaN<sub>3</sub>가 함유된 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액으로 용해하였다. 용해된 용액을 Sepharose CL-6B column ( $\phi$ 2.5 cm 88 cm)에 loading하여 12 ml/hr 속도로 3 ml씩 분획하였다.

### Vitellogenin에 대한 폴리클론항체 제작

Vg에 대한 항혈청은 Newbould (1965)의 방법을 약간

변형하여 만들었다. 분리된 Vg (250  $\mu$ g/ml)을 동량의 Freund's complete adjuvant와 유화시켜 New Zealand white에 피하주사하였다. 1주일 후 Vg을 동량의 Freund's incomplete adjuvant와 유화시켜 1주일 간격으로 3회 피하주사하였다. 마지막 주사 1주일 후에 토끼의 경동맥을 절단하여 전체혈하였다. 채혈한 혈액은 37°C에서 30분간 비동화시키고 4°C에서 배양 후 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다.

### Vitellogenin에 대한 단클론항체 제작

Vg에 대한 단클론항체를 Köhler and Milstein (1975) 방법에 의해 만들었다. 분리된 범가자미 Vg (50  $\mu$ g/ml)을 동량의 Freund's complete adjuvant와 유화시켜 6주된 암컷 Balb/c에 복강주사하였다. 1주일 후 Vg을 동량의 Freund's incomplete adjuvant와 유화시켜 1주일 간격으로 3회 복강주사하고, 마지막 주사 3일 후 비장세포를 취하였다. 비장세포와 NS1 myeloma cell을 5:1의 비율로 섞은 후 polyethylene glycol (PEG) 용액 (45% PEG, 5% DMSO, 50% serum free DMEM)을 사용하여 세포 융합시켰다. 융합된 세포를 HAT 배지 (1×10<sup>-4</sup> M hypoxanthine, 4×10<sup>-7</sup> M aminopterin, 1.6×10<sup>-5</sup> M thymidine in DMEM)에 현탁시킨 후 96 well microtiter plate에 100  $\mu$ l씩 넣었다. Vg에 대한 항체를 생산하는 hybridoma를 screening 하기 위하여 clone에서 상층액을 취하여 ELISA와 western blot으로 확인하고 선별된 hybridoma를 limiting dilution으로 subcloning하였다. 세포융합용 NS1 myeloma 세포는 부산대학교 분자생물학과 김한도 교수로부터 분주받았다.

### Enzyme Linked-Immunesorbent Assay (ELISA)

ELISA는 Kenett (1988)의 방법에 따라 실시하였다. 96 well microtiter plates에 분리된 Vg을 coating하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였으며 대조군으로 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다. TBS-T 완충액 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)으로 3번 세척하고, 단백질의 비특이적인 결합자리를 막기 위하여 3% BSA/TBS-T로 포화시킨 후 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 TBS-T로 3번 세척하였다. 면역되지 않은 토끼의 혈청과 Vg에 대한 단클론항체를 사용하여 37°C에서 5시간 배양한 후 TBS-T로 4번 세척하였다. Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양한 후 TBS-T로 6번 세척한 다음 기질용액 (10 mg 0-pheny-

lenediamine, 4 $\mu$ l of 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 10ml of 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4.5)을 첨가하여 암실에서 발색반응을 한 후 Titertek ELISA reader를 사용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Sodium Dodecyl Sulfate-전기영동 (SDS-전기영동)

분리된 Vg, E<sub>2</sub> 처리한 수컷 혈청과 E<sub>2</sub> 처리하지 않은 수컷 혈청을 2 X Laemmli sample buffer (80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 12%  $\beta$ -mercaptoethanol, 15% glycerol, 0.012% bromophenol blue)에 용해시켜 100°C에서 10분간 boiling한 후 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-전기영동을 실시하였다. Stacking gel은 5%, separating gel은 10%를 사용하여 150V로 6시간 동안 행한 후, 0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol, 10% acetic acid에서 염색하고, 7.5% methanol, 7.5% acetic acid에서 탈색하였다. 분자량 측정용 표준단백질은 myosin (205 kD),  $\beta$ -galactosidase (116 kD), phospholylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD)와 anhydrase (29 kD)를 사용하였다.

#### Western blot

Western blot은 Towbin (1979) 등의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질을 7 V에서 6시간 동안 nitrocellulose (NC) 막으로 전사시킨 후 ponceau S 용액 (0.2% ponceaus, 3% trichloroacetic acid, 3% sulfosalicylic acid)으로 전사됨을 확인하였다. NC 막에 단백질의 비특이적인 결합을 막기 위하여 3% BSA/TBS-T 용액에서 1시간 동안 실온에서 배양한 후 TBS-T 용액으로 3번 세척하였다. 1:10으로 희석된 토끼에서 얻은 Vg에 대한 항혈청과 원액의 hybridoma의 상층액을 NC 막에 첨가하여 3시간 실온에서 배양한 후 TBS-T 용액으로 3번 세척하였다. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG와 alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG로 1시간 동안 실온에서 배양하고 TBS-T 용액으로 5번 세척한 후, 50 $\mu$ l의 nitro blue tetrazolium (NBT)와 50 $\mu$ l bromo chloro indolyl phosphate (BCIP)가 포함된 alkaline phosphatase buffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5))에서 발색반응을 하였다.

## 결 과

### 1. E<sub>2</sub>에 의한 Vg 합성 유도

수컷 범가자미에 E<sub>2</sub>를 처리한 후 Vg의 합성 유도 효

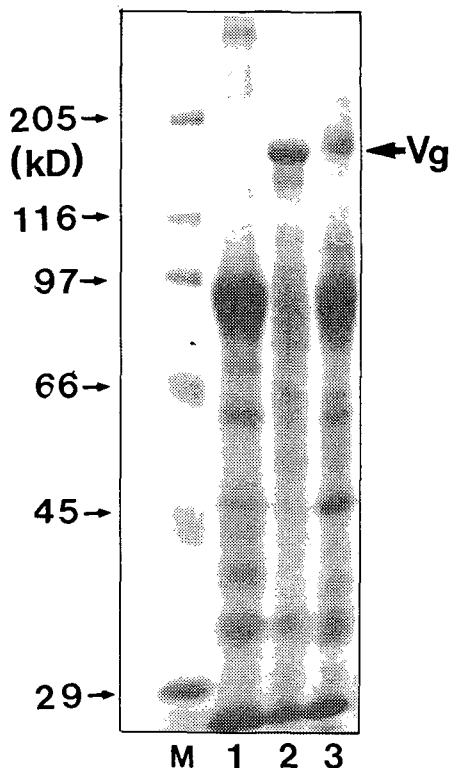
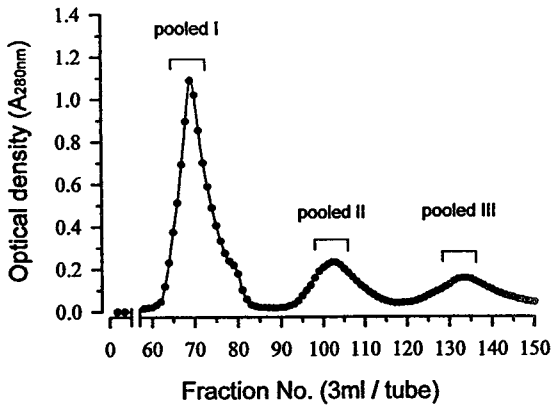


Fig. 1. Induction of Vg by estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) in male serum of the spotted flounder. The proteins from male serum (lane 1), E<sub>2</sub>-treated male serum (lane 2), and mature female serum (lane 3) were analyzed by SDS-PAGE. The arrow indicates the primary component of Vg. Lane M, the molecular weight marker proteins.

과를 확인하기 위하여 암수혈청과 함께 E<sub>2</sub>를 처리한 수컷 혈청에 대하여 SDS-전기영동을 실시하였다. 수컷 범가자미에 E<sub>2</sub>를 처리하였을 때 분자량이 약 175 kD인 혈청 단백질이 합성 유도되었으며 이 혈청단백질은 수컷의 혈청에서는 존재하지 않았고 성숙한 암컷 혈청과 E<sub>2</sub>를 처리한 수컷 혈청에는 존재함이 확인되었다 (Fig. 1). 일반적으로 어류에서 수컷 혈청에는 존재하지 않고 성숙한 암컷에는 존재하면서 E<sub>2</sub>에 의해 유도되는 혈청단백질을 암컷 특이 단백질, 즉 난황단백전구체 (Vg)로 간주되어 왔다. 따라서 범가자미 수컷에서 E<sub>2</sub>에 의해 유도되는 175 kD 혈청 단백질은 Vg임을 알 수 있다.

### 2. Vg 분리

E<sub>2</sub> 처리된 범가자미 수컷 혈청을 찬 증류수로 침전시킨 후, 침전물을 다시 Sepharose CL-6B column을 이용

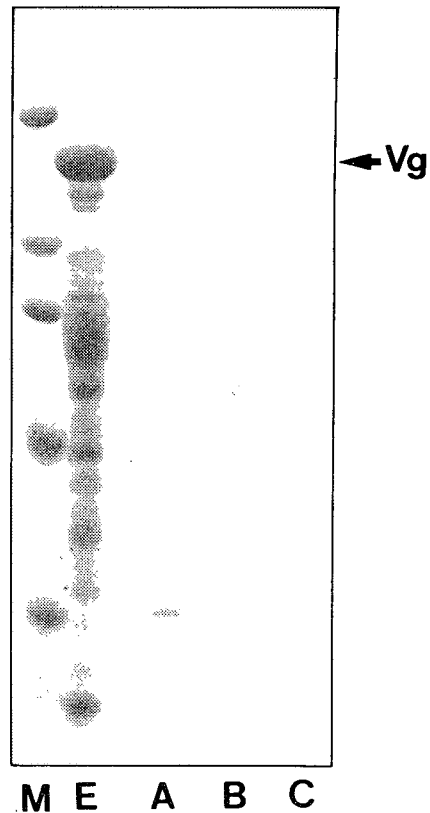


**Fig. 2.** Chromatographic elution pattern of serum proteins in E<sub>2</sub>-treated male spotted flounder. E<sub>2</sub>-treated male serum was precipitated by cold water and fractionated by Sepharose CL-6B column chromatography. The column was equilibrated with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 2% sodium chloride and 0.1% sodium azide. The bound proteins were eluted at a flow rate of 12 ml/h and collected with 3 ml fractions/each.

하여 분리한 결과 (profile)를 Fig. 2에 나타냈다. 이들 각각의 peak들을 SDS-전기영동과 western blot으로 분석한 결과 peak III (fr. no 135 전후)에서 Vg (분획)으로 추정되는 분자량 175 kD의 단일 밴드를 보였다. 이는 E<sub>2</sub> 처리에 의해 새롭게 형성된 수컷 및 성숙 암컷의 혈청단백질 (175 kD)과 전기영동상 같은 위치를 나타냈다 (Fig. 3). 분리한 Vg의 확인을 위하여 Vg와 면역반응을 가지는 범가자미의 난황단백질에 대한 항혈청 (Kim et al., 1997, in press)을 이용하여 western blot한 결과, 항혈청은 175 kD 혈청단백질을 인지하였다 (Fig. 4). 이것은 175 kD 혈청단백질은 난황단백질과 공통의 항원성을 갖는 것으로 확인되었다.

**3. Vg 확인 및 항혈청 제작 (폴리, 단클론항체)**

분리된 Vg에 대한 폴리클론항체를 만들기 위하여 peak III을 pooling한 Vg 분획 시료를 항원으로 하여 토끼에 면역시켜 항혈청을 만들었다. 만들어진 항혈청이 분리한 Vg를 인지하는지를 확인하기 위하여 성숙한 암수 혈청, E<sub>2</sub>를 처리한 수컷 혈청과 분리한 Vg에 대해 western blot을 하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이, 항혈청은 성숙한 암컷 혈청, E<sub>2</sub> 처리된 수컷 혈청과 분리한 Vg를 인지하였다. 또한 Vg에 대한 단클론항체를 만들기 위하여 분리된 Vg를 Balb/c에 면역시켰다. 혈청 역가를 조사한 후 면역된 Balb/c에서 얻은 비장세포와 NS-1 myeloma 세포를 세포융합하여 “재료 및 방법”에 명시되어 있는



**Fig. 3.** Purification of Vg from E<sub>2</sub>-treated male serum. The proteins from fraction No. 70 (lane A), fraction No. 115 (lane B), fraction No. 135 (lane C) fractionated by Sepharose CL-6B column chromatography, and E<sub>2</sub>-treated male serum (lane E) were analyzed by SDS-PAGE. Lane M, the molecular weight marker proteins.

방법에 따라 HAT 배지에서 세포융합된 clone을 선별하였다. 세포융합 7일 후에 hybridoma가 보이기 시작하였으며, 그 이후 분열을 왕성히 하면서 clone을 형성하였다 (Fig. 6). Table 1에 나타난 바와 같이, 세포융합된 18개 hybridoma 중 Vg에 대해 가장 높은 반응성을 보이는 4D6 clone을 ELISA에 의해 선별하였다. 그리고 4D6 clone을 2번 limiting dilution으로 subcloning하여 단클론을 만들었다. Fig. 7에 나타난 바와 같이, 4D6 단클론항체가 Vg를 인지하는지를 알아보기 위하여 4D6 clone의 상층액을 이용하여 western blot을 한 결과, 4D6 항체는 E<sub>2</sub> 처리되지 않은 수컷 혈청은 인지하지 못하고 E<sub>2</sub> 처리한 수컷 혈청과 분리한 Vg는 인지하였다.

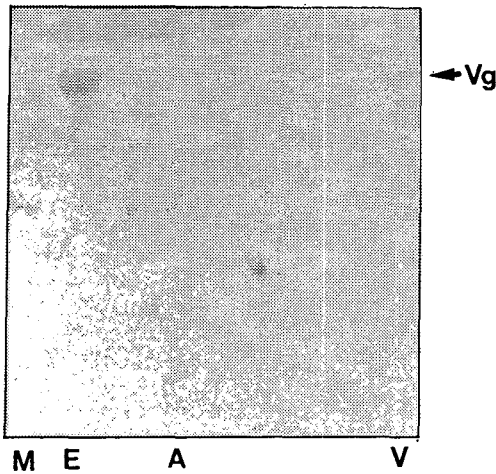


Fig. 4. Identification of Vg by immunoblot with anti-serum raised against spotted flounder vitellin. Vg was purified as described in the legend of Fig. 3 and analyzed by SDS-PAGE, and then blotted with anti-vitellin. Lane M, male serum; lane E, E<sub>2</sub>-treated male serum; lane A, fraction No 70; lane V, purified Vg.

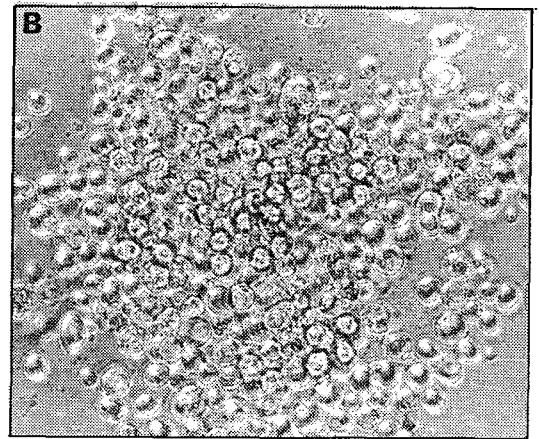
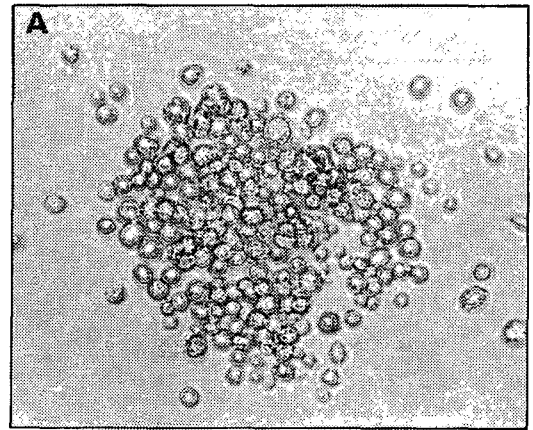


Fig. 6. Growth patterns of hybridoma cells after cell fusion. Spleen cells from Balb/c immunized with purified Vg were fused with NS1 myeloma cells and hybridoma cells were screened as described in "Materials and Methods". Hybridoma cells on 9 days (panel A) and 13 days (panel B) after plating.

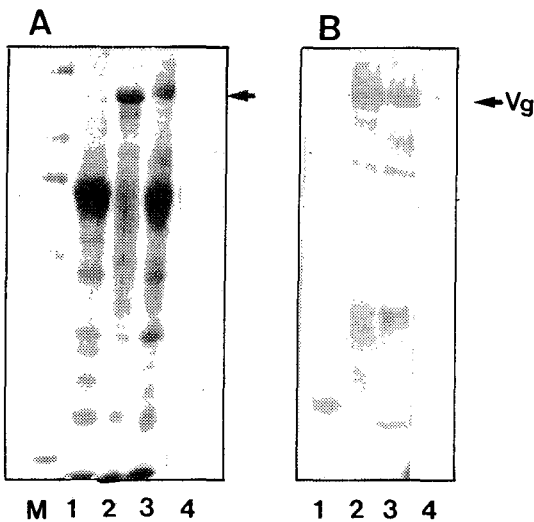


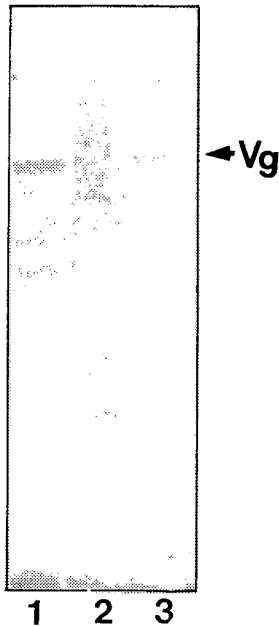
Fig. 5. SDS-PAGE (panel A) and immunoblot (panel B) patterns of male serum (lane 1), E<sub>2</sub>-treated male serum (lane 2), mature female serum (lane 3) and purified Vg (lane 4). The proteins were analyzed by SDS-PAGE and then either Coomassie-stained or blotted with antiserum raised against purified Vg. Lane M, the molecular weight marker proteins.

본 연구에서는 어류에서 Vg의 합성을 유도하는 데 가장 널리 사용되고 있는 (Campbell and Idler 1980; Lim et al., 1991; Kishida et al., 1992) estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)를 이용하여 수컷 범가자미의 Vg를 유도하고 분리하였다. 어류에서 E<sub>2</sub> 처리한 후 혈장에서 합성 유도되는 단백질중 가장 많이 합성 유도되는 단백질이 Vg임이 많이 알려져 있으며 SDS-PAGE 상에서 Vg는 monomer상태의 분자로 확인되어 왔다 (Emmerson and Petersen, 1976; Hori et al., 1979; Kishida et al., 1992; Kwon et al., 1993; Kwon and Mugiya, 1994). 본 연구에서도 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 E<sub>2</sub> 처리한 수컷 혈청에서 Vg의 합성이 유도되었고 SDS-PAGE 상에서 monomer로 되어 있으며 그 분

**Table 1. Immunoreactivity of the supernatants of hybridoma to purified Vg by ELISA**

Hybridoma	OD*	Hybridoma	OD
1C 9	0.016	3D 9	0.066
1E 3	0.027	3F 5	0.049
1F10	0.023	3F11	0.053
1G 2	0.077	3G 8	0.101
2B 3	0.056	4A 3	0.052
2B 6	0.012	4C 5	0.067
2D 7	0.050	4D 6	0.125
2H 9	0.054	4E 1	0.081
3A 5	0.026	preimmune serum	0.000
3B 8	0.069		

\*The values represent OD<sub>405</sub>. Supernatants of hybridoma were tested by ELISA for the immunoreactivity against purified Vg. The values represent the means of 3 separate ELISA results.



**Fig. 7. Immunoblot analysis of 4D6 monoclonal antibodies.** After SDS-PAGE, proteins from E<sub>2</sub>-treated male serum (lane 1), male serum (lane 2) and purified Vg (lane 3) were blotted with 4D6 clone culture medium. The arrow indicates purified Vg.

자량은 약 175 kD 이었다. 또한 성숙한 암컷의 Vg와 E<sub>2</sub>에 의해 유도된 수컷의 Vg와는 같은 분자량을 가지는 같은 단백질을 면역학적인 조사에서 알 수 있었다. 무지개 송어와 농어에서 분리한 Vg도 monomer 형태로 되어있으며 그 분자량도 범가자미와 매우 유사하며 분자량이

각각 170 ± 6 kD와 180 kD이었다 (Chen, 1983; Fr mont and Raizi, 1988; Tyler and Sumpter, 1990; Manan s et al., 1994). 어류에서 Vg을 분리하기 위하여 여러가지 방법이 개발되어 왔으며, 이중 gel filtration와 ion exchange chromatography 방법이 널리 이용되어 왔다 (Hara and Hirai, 1978; Wiley et al., 1979; de Vlaming et al., 1980; Hamazaki et al., 1987; Kanungo et al., 1990). 특히 Vg을 분리하기 전에 Mg<sup>2+</sup>-EDTA에 의해 혈청 단백질을 선택적으로 침전시킨 후 다시 증류수로 침전시키는 방법이 알려져 있지만, 이 방법은 모든 어류에 적용되지 않으면서 Mg<sup>2+</sup>: EDTA 비에 의해서 Vg 분리가 차이가 있다 (Wiley et al., 1979; Campbell and Idler, 1980; de Vlaming et al., 1980; Norberg and Haux, 1985; Tyler and Sumpter, 1990; Kanungo et al., 1990). 홍송어에서 Vg을 분리할 때 혈청을 증류수로 선택적으로 침전시킨 후 Hara and Hirai (1978) 방법에 따라 Sepharose CL-6B column chromatography을 이용하여 Vg을 분리한 바 있다 (Kwon et al, 1990). 이 방법은 매우 간단, 편리하고 효율적이며 효율성은 Vg의 농도 (>5 mg/ml)에 의해 결정된다. 본 연구에서도 이 방법을 이용하여 Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 Vg을 분리하였다. 분리한 Vg에 대한 폴리클론항체를 만들어 Vg에 대한 반응성을 조사한 결과 Vg과 다른 단백질을 인지하였다. 그래서 본 논문에서는 Vg에 대한 단클론항체를 만들기 위하여 Köhler and Milstein (1975) 방법에 따라 분리된 Vg을 Balb/c에 면역시킨 다음 비장 세포를 취하여 NS1 myeloma 세포와 융합시켜 hybridoma를 만들었다. 이중 ELISA에 의해 Vg에 대한 강한 반응성을 보이는 hybridoma를 선별하고 subcloning한 후 단클론항체를 만들었다. 본 연구에서 만들어진 단클론항체는 년중 Vg의 양을 ELISA나 RIA의 방법을 이용하여

측정함으로써 범가자미의 성숙도를 측정하는 데 유용하게 이용되리라 사료된다.

## 요 약

범가자미, *Verasper variegatus*의 vitellogenin (Vg)을 분리하기 위하여 수컷에 estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>)를 처리하여 Vg의 합성을 유도하여 SDS-PAGE와 western blot으로 확인하였다. 분리된 Vg의 분자량은 175 kD 이었으며 암컷 특이단백질이었다. E<sub>2</sub>을 처리한 수컷 혈청을 찬 증류수로 침전시킨 후 Sepharose CL-6B column chromatography에 의해 Vg를 분리하였다. 분리한 Vg에 대한 항혈청을 만들어 특이성을 western blot으로 확인하였고, 또한 Vg를 대한 단클론항체를 만들기 위하여 분리한 Vg를 Balb/c에 면역시켜 비장세포와 NS1 myeloma 세포를 세포융합하여 hybridoma를 만들었다. 세포융합된 18개 clone중 효소면역측정법에 의해 Vg과 가장 반응성이 높은 clone을 4D6으로 명명하였고, 이에 대한 특이성을 E<sub>2</sub>가 처리되지 않은 수컷 혈청, E<sub>2</sub>가 처리된 수컷혈청과 분리한 Vg를 사용하여 western blot으로 확인하였다.

## 참 고 문 헌

- Aida, K., H. Hirose and M. Yokote. 1973a. Physiological studies on the gonadal maturation of fishes. II. Histological changes in the liver cells of ayu following gonadal maturation and estrogen administration. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 39, 1107~1115.
- Aida, K., P. V. Ngan and T. Hibiya. 1973b. Physiological studies on the gonadal maturation of fishes. I. Sexual differences in composition in plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 39, 1091~1106.
- Ansari, A. Q., P. J. Dolphin, C. B. Lazire, K. A. Munday and M. Akhtar. 1971. Chemical composition of an oestrogen-induced calcium-binding glycolipophosphoprotein in *Xenopus laevis*. Biochem. J., 122, 107~113.
- Barman, T. E., N. K. Bai and N. Y. Thoai. 1964. Studies on a herring-egg phosphoprotein. Biochem. J., 90, 555~558.
- Campbell, C. M. and D. R. Idler. 1980. Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross-reactivity to ovarian yolk fractions. Biol. Reprod., 22, 605~617.
- Chapman, M. J., S. Goldstein, G. L. Milla and C. L. gar. 1978. Distribution and characterization of the serum lipoproteins and their apoproteins in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). Biochemistry., 17, 4455~4464.
- 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.
- Choi, C. Y., Y. J. Chang, A. Takemura and K. Takano. 1996. Immunochemical properties of vitellogenins and egg yolk proteins in female fusilier, *Caesio diagramma*. J. Aquacult., 9, 83~92.
- 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. Comp. Biochem. Physiol., 67B, 613~623.
- Deeley, R. G., K. P. Mullinix, W. Wetekam, H. M. Kronenberg, M. Myers, J. D. Eldridge and R. F. Goldberger. 1975. Vitellogenin synthesis in the avian liver. Vitellogenin is the precursor of the egg yolk phosphoproteins. J. Biol. Chem., 250, 9060~9066.
- Emmerson, B. K. and I. M. Petersen. 1976. Natural occurrences and experimental induction by estradiol-17 $\beta$  of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus* L.). Comp. Biochem. Physiol., 54B, 433~436.
- Fremont, L. and A. Riazzi. 1988. Biochemical analysis of vitellogenin from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*): fatty acid composition of phospholipids. Reprod. Nutr. Dév., 28, 939~952.
- Goodwin, A. E., J. M. Grizzle, J. T. Bradley and B. H. Estridge. 1992. Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Comp. Biochem. Physiol., 101B, 441~446.
- Hamazaki, T. S., I. Iuchi and K. Yamagami. 1987. Purification and identification of vitellogenin and its immunohistochemical detection in growing oocytes of the teleost, *Orizyus latipes*. J. Exp. Zool., 242, 333~341.
- 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. Aquacult., 8, 1~19.
- Hara, A. 1978. Sexual differences in serum proteins of chum salmon and purification of female-specific serum protein. Bull. Jap. 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 gairdnerii*). 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., 65B, 315~320.
- Hori, S. H., T. Kodama and K. Tanahashi. 1979. Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgen. Gen. Comp. Endocrinol., 37, 306~320.

- 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 vitellogenin incorporation by oocytes *in vitro*. *J. Exp. Zool.*, 254, 313~321.
- Kennet, R. H. 1988. Enzyme-linked antibody assay with cells attached to polyvinyl chloride plate. In *Monoclonal Antibodies Hybridoma: A New dimension in Biological Analysis* (New York and London; plenum press), 1376~1377.
- Kim, J. H., Y. Kim, W. J. Kim, H. J. Baek, J. Y. Park and C. H. Han. 1996. Purification and immunological characterization of yolk protein in spotted flounder, *Verasper variegatus*. *Bull. Korean Fish. Soc.*, (in press).
- Kishida, M., T. R. Anderson and J. L. Specker. 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.
- Köhler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495~497.
- 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.*, 41, 162~180.
- Kwon, H. C., S. Hayashi and J. Yamada. 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 $\beta$  in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B, 381~386.
- Kwon, H. C. and Y. Mugiya. 1994. Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 93, 51~60.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680~685.
- Lim, E. H., J. L. Ding and T. J. Lam. 1991. Estradiol-induced vitellogenin gene expression in a teleost fish, *Oreochromis aureus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 82, 206~216.
- Mananós, E., S. Zanuy, F. Le Menn, M. Carrilo and J. Núñez. 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. Induction, purification and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B, 205~216.
- Mommsen, T. P. and P. J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In *Fish Physiology*. vol 11A: In W.S. Hoar and D.J. Randall, eds. Academic Press, San Diego. pp. 347~406.
- Newbould, B. B. 1965. Production of allergic encephalomyelitis in rats by injection of spinalcord adjuvant into the inguinal lymph nodes. *Immunol.*, 9, 613~614.
- Norberg, B and C. Haux. 1985. Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two *Salmo* species: Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81, 869~876.
- Opresko, L. K. and H. S. Wiely. 1987. Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes. Characterization of the vitellogenin receptor system. *J. Biol. Chem.*, 262, 4109~4115.
- Ohta, H., Y. Shinriki, M. Horima and A. Hara. 1984. Early distinction of the sex of hatchery reared masu salmon, *Oncorhynchus masou*, using antiserum against egg yolk protein. *Scientific Reports of the Hokkaido Fish Hatchery*. Nakanoshima, Yoyohira-Ku, Sapporo. Japan., 39, 67~74.
- Plack, P. A., D. J. Pritchard and N. W. Fraster. 1971. Egg proteins in cod serum. Natural occurrences and induction by injections of oestradiol-3-benzoate. *Biochem. J.*, 121, 847~856.
- Selman, K. and R. A. Wallace. 1982. Oocyte growth in the sheepshead minnow: Uptake of exogenous proteins by vitellogenic oocytes. *Tiss. Cell.*, 14, 555~571.
- So, Y. P., D. R. Idler and S. J. Hwang. 1985. Plasma vitellogenin in land locked Atlantic salmon, *Salmo salar* ovananiche: Isolation, homogenous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81 (B), 63~71.
- 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. U. S. A.*, 76, 4350~4354.
- Tyler, C. R. and J. P. Sumpter. 1990. The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.*, 8, 111~120.
- Tyler, C. R., J. P. Sumpter and N. R. Bromage. 1988. 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. vol 1: In L. W. Browder, ed. *Developmental Biology*. Plenum Press, New York. pp. 127~177.
- Wallace, R. A. and D. W. Jared. 1968. Estrogen induces lipophosphoprotein in serum of male *Xenopus laevis*. *Science*, 160, 91~92.
- Wiley, H. S., L. Opresko and R. A. Wallace. 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. *Anal. Biochem.*, 97, 145~152.
- Yusko, S., T. F. Roth and T. Smith. 1981. Receptor-mediated vitellogenin binding to chick oocytes. *Biochem. J.*, 200, 43~50.