

쏨뱅이, *Sebastiscus marmoratus*의 vitellogenin 단클론 항체생산 및 특성에 관한 연구

김영주 · 임윤규* · 여인규**†

제주특별자치도 보건환경연구원, *제주대학교 수의과대학 수의학과,
**제주대학교 해양과학대학 수산생명의학전공

Production and Characterization of vitellogenin monoclonal antibody on the Scorpion fish *Sebastiscus marmoratus*

Young-Ju Kim, Yoon-Kyu Lim* and In-Kyu Yeo**†

Institute of Environment Research, Jeju Special Self-Governing Province

**College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea*

***Department of Marine Life Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea*

In order to establish bio-marker systems for the screening of endocrine-disrupting chemicals contaminated in various environment, Vitellogenin(Vtg) bio-marker have been developed to detect Scorpion fish's(*Sebastiscus marmoratus*) Vtg. Vtg has been induced by administration of estradiol into *S. marmoratus*, and purified by gel filtration and ion-exchange chromatography from serum of the fish. After immunization of the purified Vtg into BALB/c mouse, hybridomas secreting anti-Vtg antibodies have been produced. The size of induced Vtg in the serum was about 440 kDa by gel filtration using Sepharose CL-6B. By SDS-PAGE analysis, the main band of Vtg, however, was at 175 kDa, and several minor bands have been detected with the main band. Eight different monoclonal antibodies have been produced from established hybridomas and the antibodies did not cross-react with sera from different species of fishes tested in this study except with that of *Sebastes hubbsi*. These results suggested that the monoclonal antibody of S28 and S15 can be used as capture and tracer antibodies for ELISA and ICG assays. The detection systems developed in this study can be used as Bio-marker assays to check endocrine disrupting activity of various chemicals as well as to detect known endocrine disrupting chemicals contaminated in environment.

Key words : *Sebastiscus marmoratus*, Vitellogenin, Antibody, Endocrine Disrupting Chemicals

산업혁명 이후 수많은 종류의 화학물질이 개발되어 인류의 복지증진에 기여해 왔으나, 이러한 물질 중 내분비계 장애물질(endocrine disrupting chemicals; EDs)이라 불리는 것들은 내분비계에 영향을 미쳐

인간이나 동물의 번식장애 등의 건강에 위해를 주는 것으로 큰 문제가 되고 있다(최, 등 1985; Laughlin 1986; John *et al.*, 1995; Batley, 1996; 안, 1998; 이, 1998).

EDs란 내분비 호르몬계의 정상적인 기능을 방해하는 물질로서 환경에 배출된 물질이 체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용하는 화학물질을 지칭한다(국립환경연구원, 2004; 강 등, 1999), 이러한 물질들

†Corresponding author: In-Kyu Yeo

Tel.: +82-64-754-3474, Fax: +82-64-756-3493

E-mail: ikyeo99@jejunu.ac.kr

은 정상적인 호르몬의 수용체에 작용하여 비정상적인 여러가지 생리작용을 야기시키는데(Lazier *et al.*, 1993; Lovell *et al.*, 1995), EDs는 내인성 호르몬의 활성화와 유사하거나, 정반대 작용을 하여 체내조절기능의 이상을 초래하게 되며 이 물질로 인하여 항상성, 번식, 발생과정에 관여하는 내인성 호르몬의 합성, 분비, 수송, 결합, 활성, 제거단계를 방해한다(Watson, 1995; Yadetie *et al.*, 1999).

환경오염에 의한 어류에 미치는 내분비계 장애물질에 관한 보고로는 1980년대 후반, 영국 각지에서 암수 구분이 어려운 물고기가 대량 발견된 예가 있으며, 그 원인을 조사해 본 결과, 합성세제와 유화제의 성분인 비이온성 계면활성제의 분해물인 알킬페놀이 다량 검출되었고, 그 후 학자들은 무지개송어를 키우는 수조에 알킬페놀을 투여하여 본 결과, 수컷의 정소발달이 방해받는다라는 사실을 실험적으로 밝혔다(Norbete *et al.*, 1999).

이와같은 EDS에 속하는 다양한 화학물질 각각을 대상으로 내분비교란성을 검사하거나, 그러한 물질에 노출여부를 일일이 개별적으로 검출하는 것은 매우 어렵고 비현실적이다. 그러므로 이러한 목적의 생체지표(bio-marker)를 이용한 실험시도가 진행되고 있으며(Ryu *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 1995), 이를 위한 시험방법으로는 에스트로젠성 화합물 검출을 위한 표지자로서의 Calbindin 성질을 이용한 외인성 호르몬 영향을 분석하거나, 마우스의 자궁 중량법 및 에스트로젠의 수용체 결합력을 측정하는 효모법 등 내분비장애물질의 bio-marker로서의 가능성이 밝혀지고 있다(정, 2000).

그러나 이러한 방법은 자연생태계에서의 오염정도를 파악하기에는 어려움이 있으며(Kain *et al.*, 2000), 현장에서 활용되는 방법으로는 어류의 Vitellogenin(Vtg)측정에 의한 ELISA분석법이 가장 일반적으로 활용되고 있다(Takahio *et al.*, 1994; Nilsen *et al.*, 1998; Robert *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005).

또한 Vtg은 EDs에 대한 생체지표로서 비교적 민감하며 국제적으로 시험 검증화에 대한 다량의 자료가 확보되어 있으므로, 향후 OECD에서도 채택될 가능성이 높은 것으로 알려져 있다(Farmer 1999).

Vtg합성은 어류를 포함한 난생 척추동물에서는 에스트로젠성에 의하여 암컷의 특이 난황전구 단백질로 유도되는데(Shilling *et al.*, 2000; 국립환경연구원, 2005), 그 생성과정은 간에서 합성되어 성숙된 난포에 의해 선택적으로 흡수된 후, 다양한 종류의 저분자로 분해되는 담체분자(carrier molecule)로 구성되어 있으며, 분자의 기본 골격을 보면 단백질의 구조체로서 분자량은 250~600 kDa이며, lipid material, carbohydrate components, phosphate groups 및 mineral salts로 구성되는 단백질이다(Pan *et al.*, 1969).

어류에 있어서 각종 환경 오염물질에서 유래되는 각종 미량의 성분(산업용 화학물질의 원료, 살충제, 제초제, 농약류, 유기 중금속류, 다이옥신류, 기타식품 및 식품 첨가물)들에 의해 에스트로젠성 효과(Seligman *et al.*, 1988; Patricia *et al.*, 2000)를 나타내어 수컷에서 산란기 암컷만 나타내는 Vtg이 검출된다는 보고가 다수 존재한다(Copeland *et al.*, 1985; Sumpter *et al.*, 1981). 또한 최근 몇몇 선진국에서 이미 해양성 어류에 대한 Vtg의 항체를 개발하여 *in vitro* system에서 여러 가지 내분비계 장애물질에 대한 효과를 조사하는 연구가 진행되고 있으나, 아직 국내에서는 이에 대한 연구가 일천하며 특히 이들 연구의 대상도 담수어에 국한되어 해양환경 등에서의 다양한 환경오염 분석에는 미흡한 점이 많다고 할 수 있다.

한편, 연안은 해양으로 유입되는 오염물질들이 축적되는 곳으로 이러한 장소의 조사 연구는 해양환경 오염(Ketil *et al.*, 1997)을 추정함에 도움이 될 것으로 판단된다. 그러므로, 해양어류 중에서 전 세계적인 분포를 보이며, 연안 정착성인 쏨뱅이(*Sebastiscus marmoratus*)를 대상으로 해양오염의 여부를 조사한다면 이상적인 Bio-Marker로서 유용한 자료가 될 것

으로 사료된다.

이를 위하여 본 연구는 내분비계 교란물질의 검출을 위한 진단법을 개발하기 위한 실험의 일환으로 해양의 연안에서 손쉽게 획득이 가능한 쏨뱅이 (*Sebastiscus marmoratus*)를 활용하여 Vtg항체를 개발하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험 동물

Vtg유도 및 항체 생산을 위해서 제주대학교 해양 과학연구소에서 인공 부화된 5주령의 쏨뱅이(체중 94~144 g) 암컷 8 마리, 수컷 2 마리를 공시하였다. 단클론 항체를 생산하는 Hybridoma의 개발을 위하여 (주)바이오링크에서 구매한 4 주령의 SPF, BALB/c 마우스를 공시하였다.

Vtg 합성유도

실험실 양식수조의 쏨뱅이에 MS222 (Sigma, USA)를 처리하여 마취시키고 각각의 무게를 체크한 후, 2~3마리의 혈액 1 ml를 채취하여 pre serum 으로 보관하였다. Vtg 합성을 유도하기 위하여 Estradiol benzoate(E₂, 삼양화학주식회사)를 어체 kg당 1 mg씩 복강 내에 주사하였다. 다음 5일 후 동량의 E₂를 재 주사하였다. 첫 번째 주사 10일 후에 쏨뱅이들을 얼음에 채워 마취시킨 후 물고기 꼬리 부분을 절단하여 혈액을 채취하였다.

이들 혈액시료에 sodium azide를 0.01%, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 1 mM농도가 되도록 첨가하여 응고시킨 다음 원심분리 (×1,500 g, 10min, 4℃)하여 혈청을 얻었다. 분리된 혈청과 쏨뱅이 난소는 70℃냉동실에 보관하며 실험에 사용하였다.

SDS-PAGE

E₂를 접종한 쏨뱅이 혈청과 난소 단백질을 전기영

동하기 위한 SDS-PAGE는 Biorad (USA)의 Mini protein II system을 이용하여 SDS-PAGE (7.5 % polyacrylamide Separating gel)를 실시하였고, stacking gel은 3.5%의 gel을 사용하였다. 혈청 및 난소단백 2 µl와 증류수 98 µl를 혼합한 용액 5 µl와 SDS sample buffer 5 µl를 섞고, size maker는 10 µl에 sample buffer 5 µl를 가하고 3분간 100℃에서 끓인 후 급속히 식혔다. 전기영동 할 시료를 loading한 후 50 V, 10 mA/gel로 bromo phenol blue dye가 stacking gel을 벗어날 때까지 영동한 후, 100 V로 전압을 올려 전기영동을 종료하고, 50% methanol과 10% glacial acetic acid가 함유된 고정액에 1 시간 고정한 뒤 Comassie Brilliant Blue Reagent-250 (0.1%) 0.05 g + Acetic acid (10%) 5 ml + Methanol (50%) 25 ml + DDW 20 ml을 섞은 액으로 2시간 염색하였다. 탈색은 Acetic acid (10%) 5 ml + Methanol (50%) 25 ml + DDW 20 ml가 섞인 용액으로 탈색하였다.

Vtg 정제

1) Gel filtration

Vtg을 함유하는 쏨뱅이 혈청 2 ml를 Sepharose CL-6B가 충전된 pyrex glass column (850×16 mm)을 통과시켜 Vtg분획을 회수하였다. Elution buffer는 100 mM Tris-buffer, pH7.8 (containing 0.02% NaN₃, 1.0 mM PMSF)를 사용하였으며 용출속도는 0.6 ml/min의 조건으로 5 ml씩의 분획을 취하였고, 이 전 과정을 4℃의 cold chamber 내에서 실시하였다.

2) Vtg의 분자량 확인

Gel filtration을 통하여 확인한 Vtg의 주 band에 해당하는 용출양상을 gel filtration calibration kit (Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 쏨뱅이 Vtg의 분자량을 알아보려 하였다. Elution volume

parameter K_{av} 값은 kit 내의 설명서의 공식대로 아래와 같이 계산하였다. 즉, V_e = elution volume for the protein, V_o = column void volum, V_t = total bed volume 일 때,

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \text{로 계산하였다.}$$

이후, K_{av} 값과 표준분자의 logarithm 값의 함수 그래프를 그린 후 분자량을 추정하였다.

3) Ion exchange chromatography

Gel filtration 법으로 정제한 Vtg가 함유된 분획은 모두 합하여, 추가적인 ion exchange chromatography를 위하여 DEAE Sepharose가 충전된 관(350×16 mm)에 가하여 정제작업을 실시하였다. 용출을 위한 NaCl의 농도는 0.0 M~0.5 M까지의 경사를 주었다. 용출 속도는 분당 0.6 ml로 정하였으며, 분획은 각각 5 ml씩 취하였다. SDS-PAGE를 통하여 Vtg가 확인된 분획은 따로 취하여 실험동물의 면역과 항체확인을 위한 ELISA용 항원으로 사용하였다.

Monoclonal anti-Vtg antibody 분비 Hybridoma 개발

1) 마우스 면역

정제된 항원단백을(1.4 mg/ml) Freund's complete adjuvant(FCA)를 동량으로 혼합하여 충분히 emulsion상태로 만든 다음 건강한 4주령의 BALB/c 마우스의 복강 내에 접종하고 매 2주 후 같은 요령으로 접종하였다.

제 2차, 3차, 4차 면역 시에는 Freund's incomplete adjuvant (FIA)와 항원을 동량으로 혼합하여 면역시켰다. 마지막 접종 2주 후에는 항원 50 μ l를 마우스의 꼬리 동맥에 24시간 간격으로 3회 정맥 접종하고, 24시간 경과 후, 세포융합에 들어갔다. 한편 SP/2 myeloma 세포는 약 2~3주 전부터 DMEM (10% FBS)에 배양하여 세포융합을 준비하였다.

2) 세포융합

면역된 BALB/c 마우스를 안락사 시킨 후, clean bench 내에서 무균적으로 비장의 세포를 단일세포로 분리하여 준비하였다. SP/2 세포는 두 번째 세척할 때 배양된 세포와 함께 원심분리 하였으며, 침전된 세포의 pellet이 비장세포의 그것과 같도록 조정하였다. 이 후, 비장세포와 myeloma cell을 혼합하여 융합 세포를 형성시켜 배양하였다.

3) clone 선택

항체생산의 확인은 마우스에 면역용으로 사용되었던 항원을 coating buffer (100 mM Na₂CO₃; pH 9.6)로 28배(5 μ g/ml) 희석하여 실시하였다(김 등., 1995).

Vtg의 MAb 생산

1) 마우스 복수를 통한 대량 생산

개발된 hybridoma들은 1주일 전에 미리 pristane (2, 6, 10, 14-tetra-methyl-pentadecane, Sigma USA)을 복강 내로 0.2 ml 접종하여 감각시킨 BALB/c mouse (약 12 주령 이상)에 각각 $5 \times 10^6 \sim 10^7$ cell씩 복강 내에 접종하여 7일~10일간 관찰하며 복수를 채취하였다. 복수에 함유된 MAb의 역가는 ELISA 실험을 통하여 확인하였으며, 역가가 높고 western blot에서 Vtg와 반응하는 4개의 clone (S10, S15, S16, S28)을 택하여 정제한 후, Vtg 검출용 ELISA 및 Immunochromatographic assay에 capture 및 tracer antibody로 사용하였다.

2) MAb의 정제 (Affinity chromatography)

Affinity gel 제조는 agarose(Sigma, USA) 2 g을 1 mM HCl 7 ml에 용해시킨 후 gel packing을 하여 1 mM HCl을 400ml 가량 흘려 세척하였다.

그 다음 이 gel을 0.1 M NaHCO₃ (pH8.3 with 0.5 M NaCl)에 5 ml에 희석하고 goat anti mouse IgG (10 mg/ml) 5 ml를 첨가하여 실온에서 2 시간 동안 rotation

시킨 후 blocking agent로 0.2 M glycine을 첨가하고 4°C의 냉실에서 하룻밤 정치했다.

제조한 gel을 packing한 후 0.1 M NaHCO와 0.1 M acetate buffer를 50ml 정도씩 순차를 바꿔가며 5회 가량 실시한 다음 준비된 gel에 20 mM phosphate buffer를 100 ml 가량 흘려주었다. 이 때 protein A gel, protein G gel은 상품화된 것을 사용하였다.

Affinity chromatography에 사용될 gel packing을 실시하되 gel 내에 기포가 생기지 않도록 사용되는 buffer들은 멸균하여 미리 가스를 제거한 후 사용하였다. Gel을 20 mM phosphate buffer(pH7.2)를 사용하여 100 ml이상 충분히 washing 후 elution buffer(3 M NaSCN)를 50 ml가량 넣어 준 후 다시 20 mM phosphate buffer(pH7.2)로 충분히 씻어내었다.

그리고 단백질이 측정되지 않을 때 BALB/c mouse복수를 gel과 충분히 반응을 일으킬 수 있도록 흘린 후 다시 20 mM phosphate buffer(pH7.2)로 단백질이 측정되지 않을 때까지 washing하였다.

그 다음 3 M NaSCN을 흘려주면서 1 ml씩 분획을 받아 단백질이 관찰될 때 5분간 입구를 막아 충분히 반응 시킨 후 단백질을 받았으며 단백질이 측정된 분획은 20 mM phosphate buffer(pH 7.2)에서 4°C overnight 시켜 투석 액은 4시간 간격으로 3회 바꿔 주었다.

분획을 취한 후 20 mM phosphate buffer(pH7.2 with 0.01% sodium azide)에서 보관하였으며 IgM type의 경우 2 mM phosphate buffer(pH 6.0)에서 투석하면서 투석이 끝난 분획은 원심분리(4°C ×6,000g 10분 KONTRON Centrikon T-324)하고 IgG type의 경우는 상층 액을 회수하여 같은 방식으로 3회 정도 더 원심 분리 하였다.

이 상층 액을 회수하여 추후의 실험에 적용하였고 Affinity chromatography 후에 정제된 MAb는 OD 280 nm 의 흡광도로 단백질량을 대략적으로 측정하였으며, ELISA를 통하여 역가를 확인하였다

MAb 특성 조사

1) 이종 어류의 Vtg과 교차반응

Smeets 등(1999)은 잉어에서 유도된 Vtg가 금붕어와 교차반응을 일으킨다고 주장하고 있어, 해수 어류에서도 민물고기와 같은 현상을 점검하기 위하여 이미 개발되어 제주대학교 수의학과 공중 보건학 교실에 보유하고 있는 다른 어류Vtg의 MAb들과 항원적인 교차반응을 ELISA를 통하여 확인하였다.

즉, 각종 어류 serum [E₂ 처리된 솜뱅이 수컷, 처리하지 않는 수컷, 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 암수, 산천어(*Oncorhynchus masou*) 암수, 우럭볼락(*Sebastes schlegeli*), 잉어(*Cyprinus carpio*)]을 적절히 희석하여 흡착시킨 micro ELISA plate에 각 MAb를 희석하여 분주하고 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 이후 HRP labeled goat anti-mouse IgG를 가하고 실온에서 40분간 반응시켜 ABTS로 발색시켜 항체가를 조사하였다.

2) Secondary antibodies 및 IgG Fc receptor와의 반응성

ELISA plate에 E₂ 처리한 솜뱅이 혈청을 coating하고 적당히 희석된 MAb를 가하여 반응시킨 후, HRP labeled goat anti-mouse IgG, IgM, Protein A 및 Protein G와의 반응여부를 각각 관찰하였다.

결과 및 고찰

Vtg의 induction

자연 상태에서 환경오염물질에 의해 유발을 증명하기가 쉽지 않기 때문에 인위적으로 유도하였으며 이 확인실험은 E₂처리 10일 후에 채취한 혈청과 투여 전 채취한 암, 수컷 혈청을 Maitre 등(1979)과 Anthoy 등(2003)이 실시한 것과 같이 전기영동 처리하여 Vtg의 특이한 밴드 분자를 확인하고자 하였다.

그 결과 E₂를 처리하지 않은 암, 수컷 솜뱅이의

혈청에서는 Vtg 밴드가 형성되지 않았으나 E₂를 처리한 암, 수컷 혈청에서는 미처리 대조군에서 보이지 않았던 밴드가 175 kDa 부근에서 나타나 합성유도가 확인 되었다.

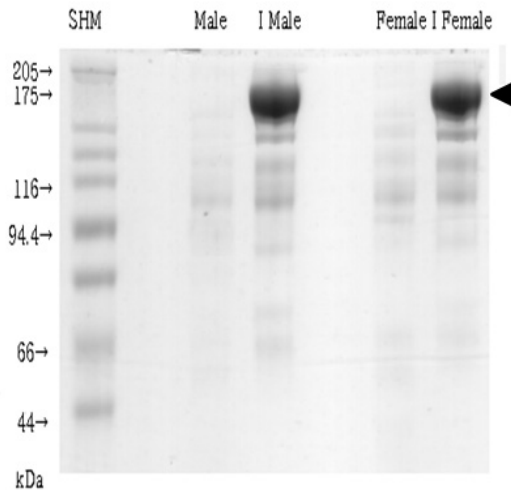


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of Vtg (arrowhead) in serum of Scorpion fish treated or non-treated with E₂ (SHM: high molecular marker, Male: normal male serum, I Male: E₂ treated male serum, Female: normal female serum, Female: E₂ treated female serum)

Vtg의 purification

1) Gel permeable chromatography

유도된 Vtg를 정제하기 위하여 gel permeable chromatography 한 결과를 Bodil *et al.* (1998)의 방법으로 gel filtration profile로 나타내었다 (Fig. 2).

Gel filtration profile를 통하여 Vtg 단백질농도일 것으로 예측되는 fraction No.12~28번에 대하여 SDS-PAGE 통하여 Vtg 유도여부를 확인한 결과, Vtg의 분리 시작은 17번에서 시작하여 25, 26번까지 함유되고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

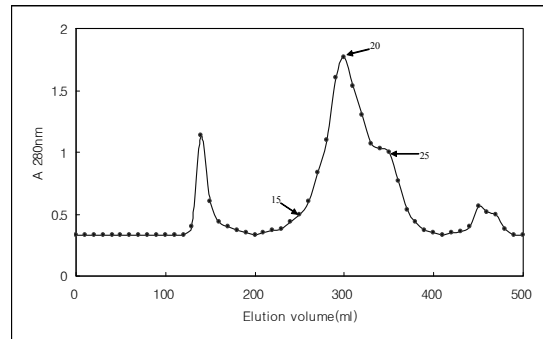
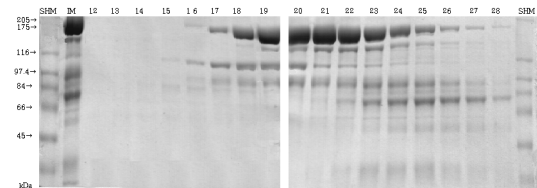


Fig. 2. Gel filtration profile of Vtg-induced Scorpion fish' serum.



※SHM : Sigma High Marker, IM: E₂ Induction Male fish of plasma Scorpion fish.

Fig. 3. SDS-PAGE profile of Vtg fractions from gel filtration of serum of Scorpion fish (Fraction No.12~28).

2) Ion exchange chromatography

본 연구에서는 가장 많은 Vtg 함유량을 가진 것으로 추정되는 No.20번에서 23번까지 pool 시킨 다음 이를 최종 5 ml가 되도록 4℃에서 PBS에 overnight 동안 2~3회 가량 투석액을 교체하면서 투석을 실시하였고 Vtg이라고 예상되는 분획(175 kDa)을 Ion-exchange를 실시하여 Vtg를 확정하고자 하였다.

또한 Marcelo 등(1995)과 Mananos 등(1994)이 주장한 바와 같이 그 외에도 다른 sub unite가 molecular marker protein과 같은 위치에 존재하고 있는 것으로 보아 E₂에 의해 유도된 물질이 존재를 확인 할 수 있었으며 이를 재확인하기 위한 방법으로 이들 물질을 Ion exchange chromatography로 정제 후 SDS-PAGE를 통하여 Vtg를 확인 하였다.

그 결과, Ion exchange chromatography는 Fig. 4에서

와 같이 용출된 각 peak에 No. 1~5번까지 fraction 중 fraction No. 4, 5번에 Vtg가 포함되어 있는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 이에 NaCl 0.4 M 이후에 나타나는 2개의 peak를 이루는 분획들을 취하여 정제된 Vtg를 마우스의 면역과 Hybridoma screening을 위한 ELISA 항원으로 사용하였다.

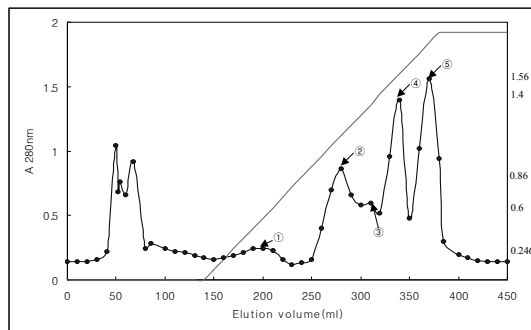


Fig. 4. Ion-exchange chromatography profile of fractions from the gel filtration of the estradiol-treated male Scorpion fish serum (Fraction No.12~28 pool serum).

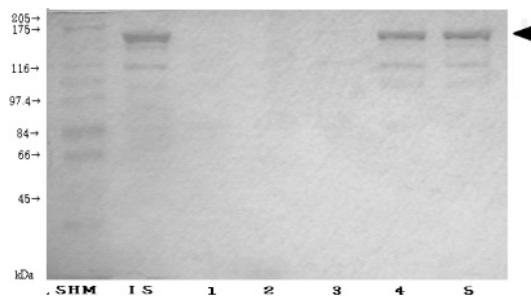


Fig. 5. Comparison of Vtg (arrowhead) concentration among the Ion exchange chromatography fractions.

Vtg의 분자량

Gel filtration을 통하여 확인한 Vtg의 주 band에 해당하는 용출양상을 gel filtration calibration kit (Pharmacia Biotech, Sweden)를 이용, 분자량에 대한 각 분자의 K_{av} 값을 구하기 위한 요소들의 값은 아래와 같았다.

$$V_o = 142 \text{ ml}, V_e \text{ of ferritin} = 309 \text{ ml},$$

$$V_e \text{ of Vtg} = 312 \text{ ml}$$

$$V_e \text{ of catalase} = 337 \text{ ml}, V_t = 1.3 \times 1.3 \times 3.14 \times 85 = 451 \text{ ml}$$

이 때 ferritin, catalase 및 쏨뱅이 Vtg의 K_{av} 값은 각각 0.540, 0.631 및 0.550으로 계산되었다. 이 수치에 따라 각 분자의 K_{av} 값을 환산하여 그래프로 나타내어 쏨뱅이 Vtg의 분자량을 환산한 결과 약 440 kDa 인 것으로 나타났다 (Fig. 6). 이러한 쏨뱅이 혈청에서의 Vtg의 분자량 확인은 본 연구에서 처음으로 시도되어졌으며, 타 연구의 지표로 활용될 것으로 판단된다.

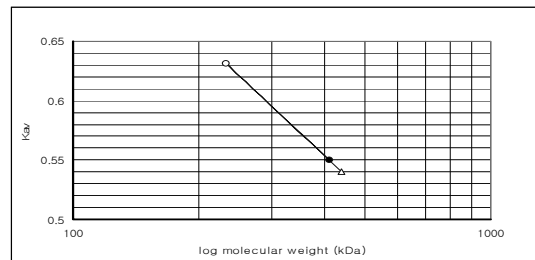


Fig. 6. Calibration curve using the high molecular weight gel filtration calibration kit on Sepharose CL-4B (open circle: catalase, open triangle: ferritin, solid circle: Vtg of Scorpion fish).

Monoclonal anti-Vtg antibody

1) 항체정제 (Affinity chromatography)

Vtg 특이 항체를 정제하기 위하여 ELISA와 western blot을 통하여 역가가 높은 항체, S10, S15, S16, S28번을 James 등(1997)이 사용한 protein G sepharose gel을 사용하여 IgG 분자를 3M NaSCN으로 용출하여 투석 후 상층액을 얻었다. 정제된 MAb의 항체가 확인을 Table. 1과 같이 OD 280 nm의 흡광도로 대략의 단백질량의 흡광도 1.3일 때 1.0 mg/ml로 환산한 결과, 각 항체의 단백질 함량은 S10은 5.0 mg/ml, S15는 12 mg/ml, S16은 1.0 mg/ml, S28은 6.0 mg/ml로 확인되었고 이를 추후의 실험에 적용하였다

(Andrew *et al.*, 1992).

Table 1. Antibody titers of monoclones after affinity chromatography purification of anti-Scorpion fish' Vtg

sample	OD ×5	Vol. ×10	Protein Con.. mg/ml	titer (×100)	volum e(ml)
S10	1.113	0.555	5.0	6	5
S15	2.746	1.203	12.0	5	6
S16	0.256	0.107	1.0	4.5	3
S28	1.027	0.730	6.0	5	6

2) MAb 의 역가

세포융합 중 의의 있는 항체를 보인 clone S10, S15, S16, S28번을 각각 5×10^6 - 10^7 cell 씩 복강 내에 접종하여 7일~10일간 관찰하며 복수를 채취하여 정제 후 항체 역가를 ELISA를 통하여 조사한 결과, 동 복수 액 S10, S15, S16, S28번에서 각각의 항체는 500배 이상의 희석역가의 항체를 나타내었다(Fig. 7). 이를 western blot에서 Vtg과 반응하는 항체를 정제한 후, Vtg검출용 ELISA 및 Immunochromatographicassay 에 ture 및 tracer antibody로 사용하였으며 각 단백질 농도와 역가를 기준으로 tracer 및 capture로서의 조건을 조사하였다.

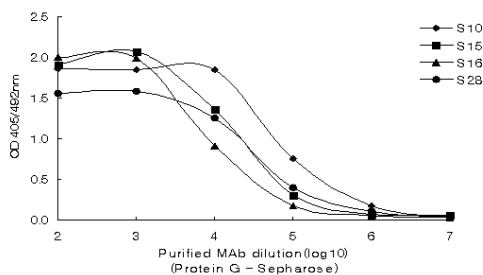


Fig. 7. Antibody titer of ascites fluids 7-10days after injection of hybridoma producing anti-Scorpion fish' Vtg.

3) Western blot

Michae 등(1996)와 동일한 방법으로 E₂에 의해서

유도된 Vtg 함유 혈청, 음성혈청과 알 단백질에 대하여 SDS-PAGE를 걸어 크기별로 분리하였다 (Fig. 8). 그 후 nitrocellulose filter를 이용하여 transfer한 후 goat anti-mouse IgG-HRP conjugate를 이용하여 발색시킨 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 그 결과 E₂에 유도된 혈청과 알에서 Vtg의 밴드가 특이적으로 확인되어졌다.

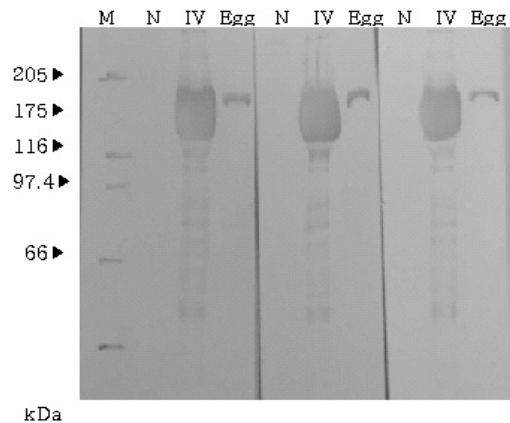


Fig. 8. Western blot of Vtg induced serum of Scorpion fish, egg and negative control.

Fig. 9과 Fig. 10에서는 항체정제를 통하여 얻어진 단클론 항체에 대하여 SDS-PAGE와 western blot을 통하여 175 kDa의 Vtg밴드를 확인 한 결과로, S09번에서 S35번까지 모두가 Vtg 밴드로 확인되었고 단클론 항체의 clone들은 Vtg 함유 혈청의 Vtg 밴드와 특이적인 반응을 보여 난황과 반응한 경우에도 모두 Vtg에 해당하는 약 175 kDa의 단백질과의 반응이 확인되었다. 분해를 보면 알의 단백질에서는 단일 밴드가 확인된 반면, 유도된 혈청의 단백질에서는 추가 되는 175kDa 이외에도 다수의 밴드가 확인되어졌다. 어류의 간세포에서 합성된 Vtg은 난모세포에 흡수되어 Cathapsin D효소계의 작용에 의하여 Phosvitin, Lipovitellin 및 β -component로 분해된다고 하였으며 (Wiley, 1979; Hara, 1980), 본 연구에서도 E₂를 투여한 쏜뱅이의 암컷에서 뿐 아니라 동시에 투여한 수컷의

혈중에도 Vtg가 형성되었음을 알 수 있었고 SDS-PAGE 상은 lipovitellin으로 여겨지는 약 175 kDa의 부근에 혈청단백의 대부분에 해당하는 밴드를 확인하였다(Takahio *et al.*, 1999). 따라서 이러한 결과는 Vtg의 경우 일반적으로 3개의 sub-unit으로 형성되어 있으며, Vtg이 난황내로 선택적으로 흡수된 후 바로 저분자의 난황성분으로 분해되어 기전 초기단계 난황임을 기인한 것으로 사료 된다 (Akihiko *et al.*, 1997; Hartiling *et al.*, 1999; Mouchel *et al.*, 1996; Reader *et al.*, 1992).

본 실험의 접합체 희석조건은 Fig. 10에서와 같이 충분한 반응에 필요한 접합체의 양을 결정하기 위한 실험으로 희석단계에 따른 표준반응곡선이 이루어지는 범위 내에서의 적당한 희석배수를 취할 때, 각 접합체는 $\times 400$ 부터 $\times 1,600$ 배 희석 값 사이에서 용량에 비례하는 표준 곡선의 값을 보였으므로 편의상 $\times 500$ 배를 희석배수로 결정하고 이후의 실험에 적용하였다.

또한 plate의 흡착을 위한 MAb의 선정 시 S10, S15, S28의 경우는 $\times 1,000$ 및 $\times 2,000$ 배의 희석 시에도 충분한 capturing capacity를 보여주었으며, 이는 특이 항체의 정제도가 높은 것으로 평가되어졌다.

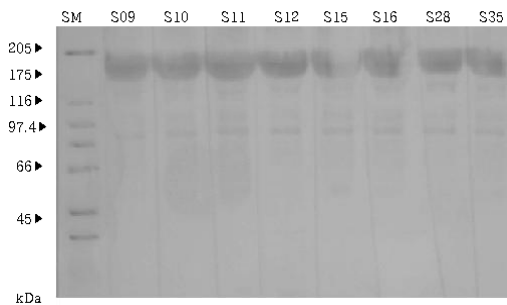


Fig. 9. Western blot of profile of various monoclonal antibodies on Vtg induced serum of Scorpion fish.

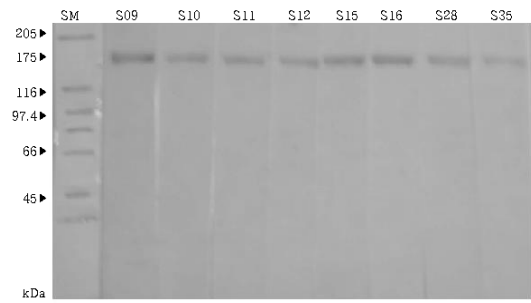


Fig. 10. Western blot profile of various monoclonal antibodies on egg of Scorpion fish.

4) 이종 어류의 Vtg과 교차반응

기존의 연구에 의해 본 연구진에서 확보되어 있는 다른 종의 어류 MAb (E_2 처리된 쏨뱅이 수컷, 처리하지 않는 수컷, 낚치 암·수, 산천어 암·수, 우럭 및 잉어)들에서 유래한 Vtg들과의 항원적인 교차반응을 ELISA를 통하여 확인하였다. 그 결과, 쏨뱅이의 Vtg에 대한 MAb clone은 E_2 를 처리한 쏨뱅이 혈액과 산란기 암컷 우럭의 혈액은 교차반응을 보였으며, 여타의 이종 어류의 혈액과는 반응하지 않는 결과를 보였다 (Table 2).

8종의 쏨뱅이 Vtg에 대한 단 클론 항체들은 공시한 어류 중 우럭볼락, *Sebastes hubbsi*의 혈청과만 교차반응을 보이는 이유는 쏨뱅이와 우럭이 같은 과에 속하는 어종으로 유사한 어종에서는 교차반응이 용이하게 나타나는 것으로 여겨진다.

5) Secondary antibodies 및 IgG Fc receptor와의 반응성

ELISA plate에 E_2 처리한 쏨뱅이 혈청을 coating하고 적당히 희석된 단클론 항체를 가하여 반응시킨 후, HRP labeled goat anti-mouse IgG, IgM protein A 및 protein G와의, 반응여부를 각각 관찰하였다. 그 결과 Table 3와 같이 4개의 clone이 모두 IgG 타입인 것으로 확인되었다.

Table 2. Patterns of monoclonal antibodies cross reaction with E2-treated and not treated the serum of Scorpion fish and other species of fish.

clone	SM E ₂	SM male	PO male	PO female	OM	OM female	SH	C C
S 09	++	—	—	—	—	—	++	—
S 10	++	—	—	—	—	—	++	—
S 11	++	—	—	—	—	—	++	—
S 12	++	—	—	—	—	—	+	—
S 15	++	—	—	—	—	—	++	—
S 16	++	—	—	—	—	—	++	—
S 28	++	—	—	—	—	—	++	—
S 35	++	—	—	—	—	—	++	—

*SM E₂:E₂-treated *Sebasticus marnortus* *PO : *Paralichthys olivaccus**SH : *Sebastes hubbsi* *OM : *Oncorhynchus masou* *CC : *Cyprinus carpio*

Table 3. Patterns of monoclonal antibodies reaction with protein A, B, IgG and IgM of Scorpion fish.

MAb	IgG	IgM	Protein A	Protein G
S09	+++	-	+	+
S10	+++	-	++	+++
S11	+++	-	+++	+++
S12	+++	-	+	+++
S15	+++	-	++	+++
S16	+++	-	+	+++
S28	+++	-	+	+++
S35	+++	+	+	+

이상의 결과에서 다른 내분비계 장애물질로 인해 계속적으로 수 환경이 오염되어지는 상황에서 이를 검출할 수 있는 방법을 개발하고 상품화를 위한 기초적 단계로 바다환경 중에서도 근해의 일정한 장소에 장기적으로 정착하는 쏨뱅이 Vtg을 검출 할 수 있는 방법을 개발함으로써 단기적으로는 Alkylphenol과 같은 물질의 생산과 사용 중단의 요구에서부터 장기적으로는 내분비계장애물질의 전체적인 제어가 가능한 이론적 논리 개발에 일조를 할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 환경내의 내분비교란화학물질 조사를 위한 바이오마커 시스템을 개발하기 위하여 쏨뱅이의 Vitellogenin(Vtg)을 바이오마커로서 활용하기 위하여 실험을 실시하였다. Vtg는 에스트로젠을 이용하여 유도하였으며, 어류의 혈청으로부터 겔 여과 및 이온교환크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 그 후 BALB/C 마우스를 이용하여 정제된 Vtg의 하이브리도마를 생산하여 항-Vtg의 항체를 생산하였다. 쏨뱅이로부터 유되된 Vtg의 크기는 Sepharose CL-6B을 이용한 겔 여과를 통하여 약 440 kDa 인 것으로 나타났으며 main-band는 175 kDa이었으며 몇 개의 sub-band가 발견되어졌다. 8개의 단클론 항체가 개발한 하이브리도마로부터 얻을 수 있었으며, 이 항체는 본 실험에서 조사한 어류 중 우럭볼락 *Sebastes hubbsi*을 제외한 다른 종에서는 교차반응이 이루어지지 않았다. 그 결과, 클론 S28과 S15의 단클론항체를 ELISA와 ICG assay의 추적 인자로 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구에서 개발된 검출시스템은 다양한 내분비교란 활동의 확인뿐 만이 아니라 내분

비교란화물질로 알려진 물질을 검출하는 바이오 마커 분석에 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 제주대학교 학술진흥연구비 지원사업에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Akihiko, H. and Hirai, H.: Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 59B: 339~343, 1977.
- Andrew, E.G., Grizzle, J.M., Barbara, J.T. and Estridge, H.: Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish(*Ictalurus Punctatus*). Comp. Biochem. Physiol., 101 B(3): 441~446, 1992.
- Anthony, S.P. and Nelson, J.O.: ellogenesis in male *Fundulus heteroclitus*(killifish) induced by selected estrogenic compounds. Aquat Toxicol., 64 Issue 3(20) August: 331~342, 2003.
- Batley, G.: The distribution and fate of tributyltin in the marine environment. In: Tributyltin, CAMBRIDGE, pp 152, 1996.
- Bodil, K. and Pedersen, K.L.: Vitellogenin in Zoarcas: Purification, quantification by ELISA and induction by estradiol-17 β and 4-nonyphenol. Comp. Biochem. Physiol., 120: 159~166, 1998.
- Copeland, P.A., Sumpter, J.P., Walker, J.K. and Croft, M.: Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo Gairdneri Richardson*) at Various stages of the reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol., 83B(2): 487~493, 1985.
- Farmer, P.B.: Studies using specific bio-markers for human exposure assessment to exogenous and endogenous chemical agents. Mutat Res., 428(16): 69~81, 1999.
- Hara, A., Yamauchi, K. and Hirai, H.: Studies on female-specific serum protein(vitellogenin)and egg yolk proteins in rainbow trout(*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 65B: 315~343, 1980.
- Hartling, R.C. and Kunkel, J.G.: Developmental fate of the yolk protein lipovitellin in embryos and larvae of winter flounder. Pleuronectes americanus .J. Exe. Zool., 284(6): 686~695, 1999.
- James, A.M. and Oliver, J.H.: Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, ixodes scapularis. Insect Biochem Mol Biol., 27(7): 639~649, 1997.
- John, A.M. and Korach, K.S.: Symposium on estrogen in the environment, Environmental Health Perspective, 103(7): 3~4, 1995.
- Kain, K., Bodil, K., Bjerregaard, P. and Jespersen, A.S.: Effects of nonylphenol and 17 β -oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular morphology male platyfish *Xiphophorus maculatus*. J. Exp. Biol., 201(2): 179~192, 2000.
- Ketil, H. and Carl, H.: Effects of environmental estrogens on marine fish species. Trends Analyt Chem., 16(10): 605~612, 1997.

- Laughlin, R.B.: Bioaccumulation of tributyltin : The link between environment and organism. In : Proceeding of the Oceans '86 Conference, 4. *Organotin symposium*. 1,206~1,209, 1986.
- Lazier, C.B. and Mackay, M.E.: Vitellogenin gene in prepression in teleost fish. Hochacka and Mommsen(EDs). *Biochem. Mol. Biology of fishes*, 2: 391~405, 1993.
- Li, C.R., Kim, K.T., Kang, Y.J., Kim, A., Kang, S.W. and Park, J.S.: A novel enzyme-linked immunosorbent assay system for the quantitative analysis of *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 59(7): 997~1003, 2005.
- Lovell, A.J. and Richard, A.H.: Effects of estrogenic chemicals on development. *Environmental Health Perspective*, 103(7): 63~67, 1995.
- Mananos, E.S., Zanuy, F.L., Menn, M. and Nunez, J.: Sea bass(*Dicentrarchus labrax L*) vitellogenin. I- Induction, purification and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107B: 205~216, 1994.
- Marcelo, M., Falchuk, K.H. and Vallee, B.L.: Vitellogenin and Lipovitellin: Zinc Proteins of *Xenopus laevis* Oocytes. *Biochemistry*, 34: 10,851~10,858, 1995.
- Maitre, J.L., Catherine, L.G. Stephane, D., Martin, T. and Valotaire, Y. : Measurement of vitellogenin from rainbow trout by rocket immunoelectrophoresis: Application to the kinetic analysis of estrogen stimulation in the male. *Can. J. Biochem. Cell Bio.*, 63: 987~987, 1979.
- Michae, J.A., Hugh, O.S., Fumio, M. and David, E.H.: In vitro Modulation of 17 β Estradiol-induced Vitellogenin Synthesis and Estrogen Receptor in Rainbow Trout(*Oncorhynchus mykiss*) Liver cells by β -Naphthoflavone. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 137: 210~218, 1996.
- Mouchel, N., Valerie, T., Alexis, B., Pennec, J.P.L. and Wolff, J.: Characterization of vitellogenin from rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). *Gen.*, 174: 59~64, 1996.
- Nilsen, B., Berg, K., Arukwe, A. and Goksoyr, A.: Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring. *Marine Environ Res.*, 46, 153~157, 1998.
- Norberte, K., Giesy, J.P. and Berg, M.V.D.: In Vitro Vitellogenin Production by Carp(*Cyprinus carpio*) Hepatocytes as a Screening Method for Determining (Anti)Estrogenic Activity of Xenobiotics. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 157: 68~76, 1999.
- Patricia, B.H., Thomas, W. and Willy, M.: Nonyphenol affects the granulation pattern of epidermal mucous cells in rainbow trout. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 46(1): 34~40, 2000.
- Pan, M.L., Bell, W.J. and Telfer, W.H.: Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science*, 165: 393~394, 1969.
- Reader, S. and Pelletier, E.: Bio-sorption and degradation of butyltin compounds by the marine diatom *Skeletonema costatum* and the associated bacterial community at low temperature. *Bull. Eviro. Contam.*, 48: 599~607, 1992.
- Robert, L.R., Morin, Y., Courtenay, S.C. and Robichaud, P.: Purification of vitellogenin from smooth

- flounder(*Pleuronectes putnami*) and measurement in plasma by homologous ELISA. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol., 139(2): 235~244, 2004.
- Ryu, B.H.: Vitellogenin as a bio-marker of endocrine disruptor in the aquatic environment. JFHS., 14(4): 408~414, 1999.
- Scott, A.H., Denslow, N.D., Folmar L.C. and Sullivan, C.V.: Universal assay of vitellogenin as a bio-marker for environmental estrogens. Environmental Health Perspective, 103(7): 9~15, 1995.
- Seligman, P.F., Valkirs, A., Stang, P.M. and Lee, R.F.: Evidence for Rapid Degradation of Tributyltin in marina. Poll. Bull., 19(10): 531~534, 1988.
- Shilling, A.D. and Williams, D.E.: Determining relative estrogenicity by quantifying vitellogenin induction in rainbow trout liver slices. Toxicol Appl. Pharmacol., 164(3): 330~335, 2000.
- Smeets, J.M., Rankouhi, T.R. Nichols, K.M. Komen, H., Kaminski, N. E. Giesy, J.P. and Van den Berg, M.: *In vitro* vitellogenin production by carp(*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening for de-termining (anti)estrogenic activity of xenobiotics. Toxicol Appl. Pharmacol., 157(1): 68~76, 1999.
- Sumpter, J.P.: The purification and radioimmunoassay of vitellogenin from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Abstr. Int. Symp. Comp. Endocrinol., 9th, pp 243, 1981.
- Takahio, M., Nobutuki, O., Tadashi, A., Sullivan, C.V. and Hara, H.: Two Forms of vitellogenin, Yielding two distinct lipovitellins, Play different roles during Oocyte maturation and early development of *Barfin flounder*, *Verasper moseri*, a Marine teleost that Spawns pelagic eggs. J Dev. Biol., 213: 18~32, 1999.
- Takahio, M., Tokio, W. and Akihiko, H.: Purification and establishment of ELISA for vitellognin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). Comp. Biochem. Physiol., 109 B(4): 545~555, 1994.
- Wastson, C.S., Pappas T.C. and Gametchu, B.: The other estrogen receptor in the plasma membrane : Implications for the actions of envirnmental estrogens. Environmental Health Perspective, 103(7): 41~50, 1995.
- Wiley. H.S., Lee, O.K. and Wallace, R.A.: New Methods for Purification of Vertebrate vitellogenin. Anal Biochem., 97: 145~152, 1979.
- Yadatie F., Arukwe, A., Goksoyr, A. and Male, R.: Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Alantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. Sci. Total Environ., 233: 201~210, 1999.
- 강경선: 내분비계 장애물질에 대한 국외반응. 한국식품과학회지, 32(2) 29~42, 1999.
- 국립환경연구원: 환경이슈와 이해. 3~6, 2004.
- 국립환경연구원: 내분비계 장애물질 이해. 15~19, 2005.
- 김용대, 김한: Aflatoxin B1에 대한 단클론 항체의 생성. 충북의대 학술지, 5(1): 15~24, 1995.
- 안이선: Distribution and Bioaccumulation of Organatin Compounds Inside Cheju Harbor and Sonsan Harbor. Department of environmental engineering graduate school Cheju national

- university, pp 82, 1998.
- 이영순: 내분비교란성(환경성)물질(Endocrine Disruptors, EDs)에 대한 최근의 연구동향과 우리의 대응 방안. 1998.
- 정의배: 환경에 노출된 에스트로젠성 화합물 검출을 위한 표지자로서의 Calbindin-D9k. The Korean Society of Toxicology, 5~7, 2000.
- 최의소, 조광명: 환경공학. 청문각, 12~13, 1985.
-
- Manuscript Received : November 05, 2013
Revised : December 06, 2013
Accepted : December 13, 2013