

박사학위논문

쏨뱅이 Vitellogenin을 Bio-marker로  
이용한 내분비교란물질 검출계 개발



제주대학교 대학원

수의학과

김 영 주

2005 년 7 월

# 쏨뱅이 Vitellogenin을 Bio-marker로 이용한 내분비교란물질 검출계 개발


지도교수 임 윤 규

김 영 주

이 논문을 수의학 박사학위 논문으로 제출함

2005 년 7월

김 영 주의 수의학 박사학위 논문을 인준함

 제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY  
심사위원장 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)  
위 원 \_\_\_\_\_ (인)

제주대학교 대학원

2005년 7 월

Development of the Bio-assay Systems for  
Detecting endocrine-disrupting chemicals with  
Vitellogenin of Scorpion fish (*Sebasticus  
marmoratus*) as a marker

Young-Joo, Kim

(Advised by professor Yoon-Kyu, Lim)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF PHILOSOPHY IN VETERINARY MEDICINE

2005. 7.

DEPARTMENT OF VETERINARY MEDICINE  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

# 목 차

List of Tables .....	v
List of Figures .....	vi
ABSTRACT .....	ix
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 실험 동물	
2. Vtg induction	
3. SDS-PAGE	
1) SDS-PAGE gel 제조 준비	
2) 전기영동시료 준비	
3) SDS-PAGE	
4. Vtg 정제 .....	9
1) Gel filtration	
2) Vtg 의 분자량 확인	
3) Ion exchange Chromatography	
5. Monoclonal anti-Vtg antibody 분비 Hybridoma 개발 .....	10
1) 마우스 면역	
2) 세포융합	
3) MAb 분비 clone 선택	
4) 융합 세포의 동결보관	

6. MAb 특성 조사 .....	16
1) Western blot	
2) 이중 어류의 Vtg과 교차반응	
3) Secondary antibodies 및 IgG Fc receptor와의 반응성	
7. MAb 생산 .....	17
1) 마우스 복수를 통한 대량 생산	
2) MAb의 정제 (Affinity chromatography)	
8. 실험실적 Screening system (ELISA kit) 개발 .....	19
1) ELISA plate 준비	
2) HRP-MAb conjugate 제작	
3) Antibodies pair 결정	
9. ICG kit 개발 .....	20
1) Colloidal 골드 제작	
2) MAb-Gold 접합체 제조	
3) Membrane 선정	
10. <i>In vitro</i> 검출계 확립 .....	22
1) 간세포 1차 배양법 확립	
2) 동결 속도의 비교	
3) 동결보존제의 비교	
4) <i>In vitro</i> system의 결정	
Ⅲ. 결 과	
1. Vtg의 induction .....	27
1) SDS-PAGE	
2. Vtg의 purification .....	28
1) Gel permeable chromatography	

2) Ion exchange chromatography	
3. Vtg의 분자량 .....	32
4. Monoclonal anti-Vtg antibody .....	33
1) 항체정제 (Affinity chromatography)	
2) MAb의 역가	
3) Western blot	
4) 이종 어류의 Vtg과 교차반응	
5) Secondary antibodies 및 IgG Fc receptor와의 반응성	
5. ELISA kit 개발 .....	39
1) Antibodies pair 결정	
2) Vtg 검출 한계	
3) 민감도 및 특이도	
6. ICG kit 개발 .....	46
1) Colloidal 골드	
2) MAb-Gold 접합체 검출한계	
3) 민감도 및 특이도	
7. <i>In vitro</i> 검출계 .....	50
1) 간세포 1차배양	
2) 동결보존제 농도의 비교	
3) 동결 속도의 비교	
4) <i>In vitro</i> 분석계의 확립	
IV. 고찰 .....	56
V. 결론 .....	63

VI. 참고문헌 ..... 65

VII. 요약 ..... 85



## List of Tables

Table 1. Components of 20nm plain colloidal gold .	21
Table 2. Components of 40nm plain colloidal gold	21
Table 3. Antibody titers of monoclones after affinity chromatography purification of anti-Scorpion fish' Vtg.	33
Table 4. Patterns of monoclonal(S09 <i>et al.</i> , 7ea) antibody cross reaction with E <sub>2</sub> treated and not treated Scorpion fish' and other spp. fish's serum.	37
Table 5. Patterns of monoclonal(S09 <i>et al.</i> , 7ea) antibody reaction with protein A, B, IgG and IgM of Scorpion fish	39
Table 6. A comparison of SDS PAGE & ELISA test.	44
Table 7. A comparison of SDS PAGE & ICG test.	50





## List of Figures

Fig. 1. Mouse immunization schedule for Hybridoma preparation. ....	11
Fig. 2. Immunization and purification procedure for monoclonal antibody production. ....	12
Fig. 3. Scheme of in vitro detection system for EDs in unknown sample. ....	23
Fig. 4. SDS-PAGE analysis of vitellogenin in serum of Scorpion fish treated or non-treated with E <sub>2</sub> . ....	28
Fig. 5. Gel filtration profile of Vtg-induced Scorpion fish' serum. ....	29
Fig. 6. SDS-PAGE profile of vitellogenin fractions from gel filtration of Scorpion fish' serum(Fraction No12~28). ....	30
Fig. 7. Ion-exchange chromatography profile of fractions from the gel filtration of the estradiol-treated male Scorpion fish' serum(Fraction No.12~28 pool serum). ....	31
Fig. 8. Comparison of Vtg concentration among the Ion exchange chromatography fractions. ....	31
Fig. 9. 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). ....	32

Fig. 10. Antibody titer of ascites fluids 7-10days after injection of hybridoma producing anti-Scorpion fish' Vtg. ....	34
Fig. 11. Western blot profile of Vtg induced serum, egg and negative control. ....	35
Fig. 12. Western blot profile of various monoclonal antibodies on Vtg induced Scorpion fish' serum. ....	36
Fig. 13. Western blot profile of various monoclonal antibodies on Scorpion fish' egg. ....	36
Fig. 14. The optimal dilution condition of HRP labeled MAb for sandwich ELISA to detect Scorpion fish' Vtg. ....	39
Fig. 15. Conditioning of ELISA for the decision of MAb pair using Vtg in Scorpion fish' serum partially denatured by repeated freezing and thawing. ....	41
Fig. 16. Conditioning of ELISA for the decision of MAb pair using freshly prepared Vtg from Scorpion fish' serum. ....	41
Fig. 17. Conditioning of ELISA for the decision of MAb pair using negative serum of Scorpion fish. ....	42
Fig. 18. ELISA profile using different concentration of vitellogenin of Scorpion fish. ....	43
Fig. 19. Detection of Scorpion fish' Vtg by using developed ELISA. ....	45
Fig. 20. Absorbance spectrum of 20nm colloidal gold. ....	46

Fig. 21. Absorbance spectrum of 40nm colloidal gold. ....	46
Fig. 22 Transmission Electron Micrograph of 40nm & 20nm Gold Colloid. .....	47
Fig. 23. Immunochromatographic assay for the detection of Scorpion fish' Vtg. ....	49
Fig. 24. Comparison of detection limit between ELISA and ICG. ....	49
Fig. 25. Liver cells cultured in L-15 medium. ....	51
Fig. 26. A survival rate of liver cells after freezing preservation. ....	52
Fig. 27. A survival rate of liver cells using different DMSO concentration. .....	53
Fig. 28. A survival rate of liver cells using slow freezing preservation. ....	53
Fig. 29. A survival rate of liver cells using quick freezing preservation. .....	54
Fig. 30. SDS-PAGE profile of culture supernatant after treatment of E <sub>2</sub> and 2,4-D. ....	55

## ABSTRACT

In order to establish bio-marker systems for the screening of endocrine-disrupting chemicals contaminated in various environment, ELISA and Immunochromatography(ICG) kit have been developed to detect Scorpion fish's(*Sebastiscus marmoratus*) Vitellogenin(Vtg). Vtg has been induced by administration of estradiol into Scorpion fish and purified by gel filtration and ion-exchange chromatography from fish's serum. After immunization of the purified Vtg into BALB/c mouse, hybridomas secreting anti-Vtg antibodies have been produced.

The size of induced Vtg in fish's 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*. Monoclonal antibody of S28 and S15 have been used as capture and tracer antibodies for ELISA and ICG assays. The minimal amount of Vtg detected by ELISA and ICG assays were 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively.

The condition of cell preservation has been tested to set up *in vitro* detection system using liver cell of Scorpion fish. The optimal concentration of DMSO in freezing medium was 15% and the viability of liver cells was 51.3% after preservation in liquid nitrogen.

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.



## I. 서 론

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 1993; 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, 1998; 강 등, 1999). 이러한 물질들은 정상적인 호르몬의 수용체에 작용하여 비정상적인 여러가지 생리작용을 야기 시키는데(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, 활성화, 제거단계를 방해한다(Watson, 1995; Yadetie *et al.*, 1999).

오늘날 널리 사용되고 있는 합성물질 또는 식물에서 만들어지는 천연물질 중 상당수가 체내 내분비계에 대한 장애물질로 밝혀져 있으며, 이들 물질들은 파충류, 어류, 조류 및 포유류 등의 야생동물에 심각한 영향을 주어 개체 수 감소 및 성(性)의 혼란 등을 야기하는 것으로 알려져 있다(국립환경연구원, 2005). 야생동물에서의 상황을 미루어 볼 때, 정자수 감소 등을 포함한 현재와 미래의 인간의 건강에 대해서도 심각한 영향을 끼칠 것으로 염려되고 있다.

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(Folmar *et al.*, 1996; Nornerte *et al.*, 1999).

한편, 일본에서는 1996년부터 1997년에 걸쳐 도쿄의 다마강에서 수십 ppt, 쓰미다강에서는 수백 ppt 농도로 알킬페놀이 검출되었다 하며(Shioda *et al.*, 2000), 이와 동시에 수컷 잉어의 비율이 현저히 낮아진 것이 발견되었다.

그 밖에 펄프공장 하류에 서식하는 농어류(*Perca fluviatilis*)에서 성숙지연, 생식기의 퇴축, 성징결여 등이 관찰되었고(Routledge *et al.*, 1998; Schwaiger *et al.*, 1998; ), 오염지역의 강이나 호수 등에 서식하는 물고기들의 수컷 생식능 저하, 혈장 중의 성선자극호르몬 또는 스테로이드의 저하, 2차 성징의 미숙 등 지금까지 다양한 사례가 보고되었다(Theo *et al.*, 1993; Knudsen *et al.*, 1997; 최 등, 1998; Shilling *et al.*, 2000).

국내에서는 붕어 및 황소개구리에서 이성생식세포 출현빈도, 체내 내분비계 교란물질의 축적도, 수컷의 난황단백질 농도 및 내분비계 교란물질의 환경중농도 등을 종합적으로 고려할 때 아직까지 내분비계 교란물질에 의한 영향은 없는 것으로 판단되나, 이상생식세포 출현빈도, 난황단백질 농도가 상대적으로 높은 지점이 다수 나타나는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 지점에서는 보다 상세한 검사가 요구된다고 하였다(Rodger *et al.*, 2000; 국립환경연구원, 2004).

이러한 내분비계 장애를 일으킬 수 있다고 추정되는 물질로는 각종 산업용 화학물질(원료물질), 살충제 및 제초제 등의 농약류, 유기 중금속류, 다이옥신류, 식물에 존재하는 식물성 에스트로젠(phytoestrogen) 등의 호르몬 유사물질과 Diethylstilbestrol(DES)과 같은 의약품으로 사용되는 합성 에스트

로젠류 및 기타 식품, 식품 첨가물 등이 있으며(강 등, 1998), 과거 세계생태보전기금(WWF) 목록에는 67종(다이옥신류 등 유기염소계 물질 6종, DDT 등 농약류 44종, 펜타~노닐 페놀, 비스페놀 A, 디에틸헥실프탈레이트 등, 프탈레이트 8종, 스티렌 이합체, 삼합체, 벤조피렌, 2, 4-디클로로페놀 등 기타물질 4종)의 화학물질이 등재되어 있다.

일본 후생성에서도 산업용 화학물질, 의약품, 식품첨가물 등의 142종(디에틸 프탈레이트 등, 가스제 9종, 플라스틱에 존재하는 물질 17종, 다이옥신 등 산업장 및 환경오염물질 21종, 농약류 75종, 수은 등 중금속 3종, DES 등 합성 에스트로젠 8종, 식품 및 식품 첨가물 3종, 식물에 존재하는 에스트로젠 유사호르몬 6종)의 물질을 내분비계장애물질로 분류하고 있다(최 등, 1998). 일반적으로 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(Jean *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1995; Ryu *et al.*, 1999), 이를 위한 시험방법으로는 에스트로젠성 화합물 검출을 위한 표지자로서의 Calbindin-D<sub>9k</sub>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 많은 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; Louise *et al.*, 1999; 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 산란기 암컷만 나타내는 Vtg이 수컷에서 검출된다는 보고가 다수 존재한다(Copeland *et al.*, 1985; Sumpter *et al.*, 1995). 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 해양환경오염(Ketil *et al.*, 1997)을 추정함에 도움이 될 것으로 판단된다. 그러므로, 해양어류 중에서 전 세계적인 분포를 보이며, 연안 정착성인 쏨뱅이(*Sebastes marmoratus*)를 대상으로 해양오염의 여부를 조사한다면 이상적인 Bio-marker로서 유용한 자료가 될 것으로 사료된다. 이를 위하여, 본 연구는 내분비계 교란물질의 검출을 위한 진단법을 개발하기 위하여 수행 되었으며, 쏨뱅이의 Vtg에 대한 항체를 개발하고 이를 이용하여 Vtg의 정량 및 정성용 면역분석법을 개발하였다(Smeers *et al.*, 1999).

한편, EDs에 의한 Vtg 합성유도의 여부를 확인하기 위한 *in vitro* 검출계를 확립하기 위하여, 썸뱅이의 간세포를 배양하고 이의 동결 및 해동법의 최적 조건을 조사하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

Vtg유도 및 항체 생산을 위해서 제주대학교 해양 연구소에서 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.

### 2. Vtg induction

실험실 양식수조의 쏨뱅이에 MS222 (Sigma, USA)를 처리하여 마취시키고 각각의 무게를 체크한 후, 2~3마리의 혈액 1 ml를 채취하여 pre serum으로 보관하였다. Vtg 합성을 유도하기 위하여 Estradiol benzoate(E<sub>2</sub>; 삼양화학주식회사)를 어체 kg당 1 mg씩 복강 내에 주사하였다. 다음 5일 후 동량의 E<sub>2</sub>를 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, 10분, 4°C)하여 혈청을 얻었다. 분리된 혈청과 개복하여 취한 쏨뱅이 난소는 -70°C 냉동실에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 3. SDS-PAGE

E<sub>2</sub>를 접종한 쏘뻥이 혈청과 난소 단백질을 전기영동하기 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 gel 을 사용하였다.

#### 1) SDS-PAGE gel 준비

Separating gel을 만들기 위한 시약은 다음과 같이 준비하였다. 즉, 30% acrylamide (29 g acrylamide + 1 g N, N'-methylene bis acrylamide), 1.5M Tris-HCl(pH8.8), 0.5M Tris-HCl(pH6.8)을 조제한 후, 50 ml conical tube에 30% acrylamide solution 2.5 ml, 10% SDS 100  $\mu$ l, 1.5 M Tris-HCl 2.5 ml, 증류수 4.85 ml를 가하였다. Plate에 분주하기 직전에 10% ammonium per sulfate(APS) 100  $\mu$ l와 TEMED 10  $\mu$ l를 섞어 alumina plate와 glass plate 사이에 액 중에 기포가 없이 분주하였다.

Comb의 끝에서 1 cm정도의 stacking gel 용 공간을 남겨 두고, 산소를 접촉하는 경계면이 중화반응이 잘 일어나지 않기 때문에 water-saturated n-butanol을 가득 채워 산소와 접촉을 막고 gel이 수평이 되어지도록 하였다. 30여분 지난 후에 gel이 굳어지면 water-saturated n-butanol을 버리고 3 MM paper를 이용하여 protein band의 resolution을 막기 위해 water-saturated n-butanol을 완전히 제거하였다.

Stacking gel제조를 위하여 30% acrylamide solution 850  $\mu$ l, 10% SDS 50  $\mu$ l, 1.0M Tris-HCl(pH6.8) 625  $\mu$ l, 증류수 3.4 ml를 혼합하였다. Plate에 분주하기 직전에 10% APS 50  $\mu$ l와 TEMED 5  $\mu$ l를 섞고 plate 상단까지 분주한 후 comb을 꽂았다. 30분 정도 경과하여 gel이 굳어진 것이 확인되면 comb을 조용히 뽑아내고 DDW로 몇 차례 씻어 내었다. Gel caster를 떼

어낸 후에 gel 밖에 묻어 있는 acrylamide를 완전히 제거하고 gel running tank에 장착한 후 upper tank와 lower tank에 running buffer를 채워 전기영동준비를 완료하였다.

## 2) 전기영동시료 준비

혈청 및 난소단백 2  $\mu\text{l}$ 와 증류수 98  $\mu\text{l}$ 를 혼합한 용액 5  $\mu\text{l}$ 와 SDS sample buffer (4% SDS-10% stock 400  $\mu\text{l}$  + Mercaptanethanol 100  $\mu\text{l}$  + 0.2% BpB-10% stock 20  $\mu\text{l}$  + 0.125 M Tris-HCl: 1M stock 125  $\mu\text{l}$  + 30% Glycerin : 87% stock 345  $\mu\text{l}$  + DW 10  $\mu\text{l}$ ) 5  $\mu\text{l}$ 를 섞고, size maker는 10  $\mu\text{l}$ 에 sample buffer 5  $\mu\text{l}$ 를 가하고 3분간 100°C에서 끓인 후 급속히 식혔다.

간단한 원심분리를 통하여 뚜껑에 맺힌 수증기를 모으고 sample를 준비하여, 준비된 gel에 첫 번째 comb에는 standard marker를 5  $\mu\text{l}$ , 각 sample은 각각 3  $\mu\text{l}$ 씩 loading하고 나머지 comb에는 순차적으로 sample를 loading 했다.

## 3) SDS-PAGE

전기영동 할 시료를 loading한 후 50 V, 10 mA/gel로 bromo phenol blue dye가 stacking gel을 벗어날 때까지 영동한 후, 100 V로 전압을 올려 전기영동 시켰다. Bromo phenol blue dye가 바닥에 올 때 전기영동을 종료하고, 50% methanol과 10% glacial acetic acid가 함유된 고정액에 1 시간 고정된 뒤 Commassie 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.

#### 4. Vtg 정제

##### 1) Gel filtration

Vtg을 함유하는 썸뱅이 혈청 2 ml를 Sepharose CL-6B가 충전된 pyrex glass column (850×16 mm)을 통과시켜 Vtg분획을 회수하였다. Column은 GradiFrac™ system (Pharmacia Biotech, Sweden)에 적용시켜 chromatography의 전 과정을 실시하였다. Elution buffer는 100 mM Tris-buffer, pH7.8 (containing 0.02% NaN<sub>3</sub>, 1.0 mM PMSF)를 사용하였으며 용출속도는 0.6 ml/min 의 조건으로 5 ml씩의 분획을 취하였고, 이 전 과정을 4°C의 cold chamber 내에서 실시하였다. Vtg를 함유하는 분획은 따로 합하여, 추가적인 순수분리를 위하여 ion exchange chromatography에 제공하였다.

##### 2) Vtg의 분자량 확인

Gel filtration을 통하여 확인한 Vtg의 주 band에 해당하는 용출양상을 gel filtration calibration kit (Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 썸뱅이 Vtg의 분자량을 알아보려 하였다. 참고로 molecular weight marker로는 blue dextran 2000 (void volume 측정용), ferritin (440 kDa, from horse spleen), catalase (232 kDa, from bovine liver), aldolase (158 kDa, from rabbit muscle) 등을 사용하였다.

Elution volume parameter Kav 값은 kit 내의 설명서의 공식대로 아래와 같이 계산하였다. 즉, Ve = elution volume for the protein, Vo = column void volum, Vt = total bed volume 일 때,

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

이후, Kav 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 충진된 관 (350×16 mm)에 가하여 정제작업을 실시하였다. 용출을 위한 NaCl의 농도는 0.0 M~0.5 M까지의 경사를 주었다. 용출속도는 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.

## 5. 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  $\mu$ l를 마우스의 꼬리 동맥에 24시간 간격으로 3회 정맥 접종하고, 24시간 경과 후, Fig. 1과 같은 일정에 따라 세포융합에 들어갔다.

한편 SP/2 myeloma 세포는 약 2~3주 전부터 DMEM (10% FBS)에 배양하여 세포융합을 준비하였다.

### 2) 세포융합

Fig.2와 같이 면역된 BALB/c 마우스를 안락사 시킨 후, clean bench 내에서 무균적으로 비장을 취하여 50 ml conical tube에 화염멸균 시킨 mesh

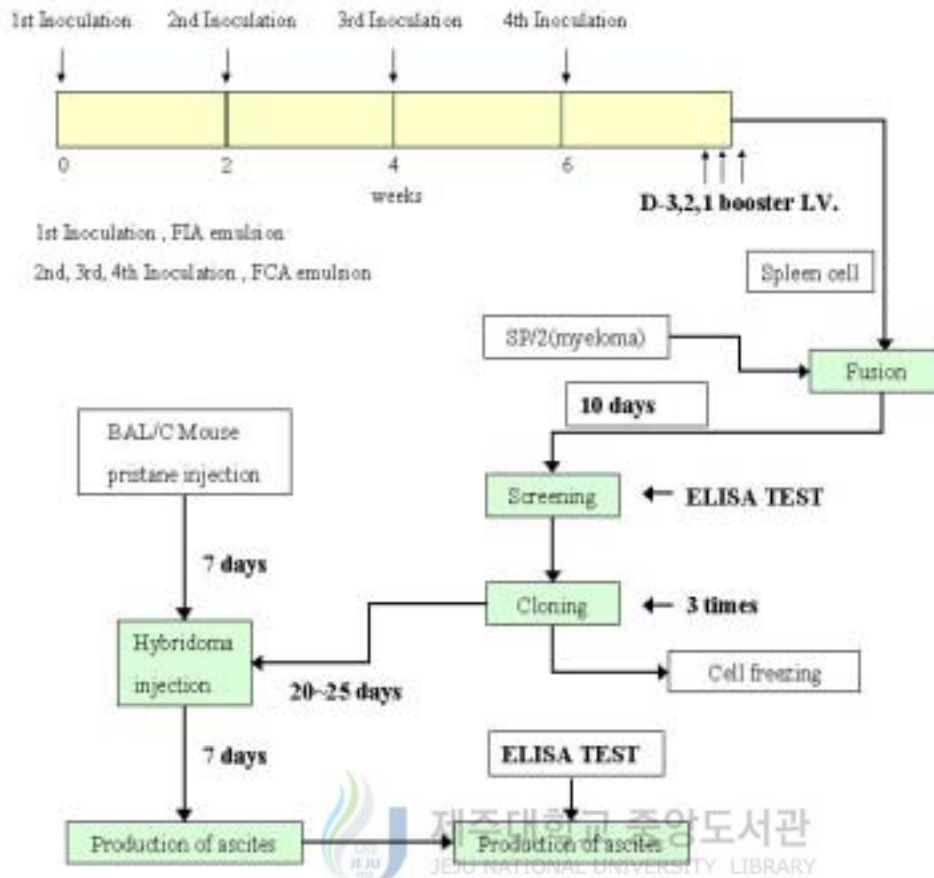


Fig. 1. Mouse immunization schedule for Hybridoma preparation.

1st: Vtg and FCA Emulsion 2nd,3rd: Vtg and FIA Emulsion  
F : Fusion of myeloma cell line with mouse spleen cells in 42days.

(400목)를 이용하여 비장의 세포를 단일세포로 분리하고 DMEM에 부유시켰다. 결합조직제거 및 세척은 15 ml conical tube에 FBS를 2.5 ml씩 부어 놓고 부유된 비장 세포를 각 시험관 당 약 10 ml씩 gradient가 깨어지지 아니하도록 서서히 가하고 상층을 형성하도록 하고 15분 정도 방치하여 무거운 조직을 갈아 앉힌 후, 상층의 spleen cell을 그대로 회수하여 washing



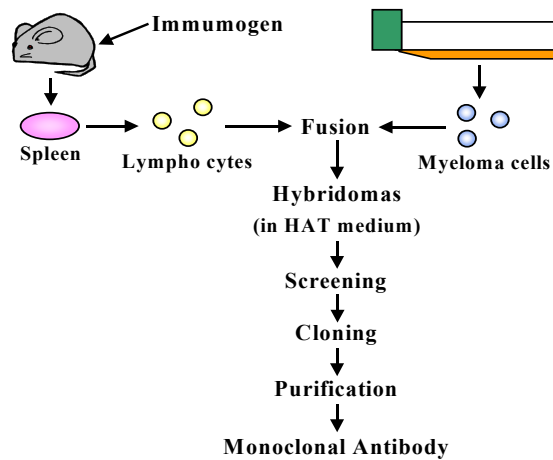


Fig. 2. Immunization and purification procedure for monoclonal antibody production.

media로 3회 원심(1,600 rpm, 4분)세척하였다.

SP/2 세포는 두 번째 세척할 때 배양된 세포와 함께 원심분리 하였으며, 침전된 세포의 pellet이 비장세포의 그것과 같도록 조정하였다. 이 후, 비장 세포와 myeloma cell을 혼합하고 washing medium으로 2회 더 원심분리 세척하고 마지막 세척 후에 medium을 완전히 제거하였다.

세포의 융합을 위하여 침전된 세포들을 부드럽게 tapping하여 cell이 tube 바닥에 골고루 퍼지게 한 후에 PEG 1500을 1분에 걸쳐 점적하고, 단계적으로 washing medium를 가하여 주었다. 융합된 세포들은 96well plate에 분주하여 37°C의 배양기에 배양시켰다.

### 3) MAb 분비 clone 선택

세포 융합을 실시한 후 매일 현미경하에서 융합여부와 세포의 증식정도를 매일 관찰한 바 fusion 후 8일째부터 한 두 개의 클론이 생산되기 시작하여 15일 후에는 많은 량의 클론이 관찰되었다.

처음 2주 동안에는 주당 3회 정도의 배지(Dulbecco's modified eagle's medium에 hypoxanthine 50 mM, aminopterin 0.2 mM, thymidine 8 mM과 10% fetal calf serum을 함유한 선택배지)를 갈아 주었고 그 후 96 well이 1/3정도의 세포 량이 증식된 후에는 매일 배지를 교환 하여 주었다.

항체의 생산 확인은 96 well 속에 cell량이 2/3 정도 채워졌을 때 배양에 사용되었던 배지를 뽑아내고 이것을 검액으로 마우스에 면역용으로 사용되었던 항원을 coating buffer (100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9.6)로 28배(5 µg/ml) 희석하여 이를 96 well plate에 100 µl씩 각각 분주하고 4°C에서 overnight 시키고 다음 날 PBS로 4회 세척했다.

비 특이적인 항원의 결합을 억제하기 위하여 0.2% BSA PBS(100 mM, pH8.4)를 200 µl를 분주하고 4°C에서 30분간 정치했다가 PBS로 4회 세척하고 각 well에 0.2% BSA PBST [100 mM, pH8.4, containing 0.05%(v/v) Tween-20] 50 µl와 배양에 사용되었던 배지 50 µl를 분주하고 한편 양성 과 음성 control은 양성인 경우는 cell fusion 전에 채혈 보관 중인 혈청 10 µl를 PBS 100 µl에 희석하여 이것은 양성 control로, 음성은 PBS 200 µl를 사용했다.

이를 실온에서 30분 간 방치 했다가 PBS로 4회 세척하고 rabbit-anti mouse horseradish IgM peroxidase conjugate를 0.2% BSA PBST [100 mM, pH8.4, Containing 0.05%(v/v) Tween-20] 에 1,000배 희석하고 각 well에 100 µl씩 분주하고 실온에서 30분간 방치 한 후에 PBS로 4회 세척하고 alkaline phosphate substrate solution으로 citrate B(pH4.0)에 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid) 0.1%와 0.02%의 과산

화수소를 함유한 액을 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주하고 실온에 30분간 방치했다가 이를 405 nm와 reference 492 nm에서 reading하였다. 그 OD 값을 측정 한 결과, 양성 OD 값은 3.646, 음성 OD 값은 0.049로 측정되어 fusion cell에서 항체가 생성 확인되는 1.0이상의 OD 값을 보이는 well을 2차 clone 선택하기 위하여 24 well로 옮겨 배양 했다.

24 well에 옮겨진 24시간 후 500  $\mu$ l의 DMEM의 배지를 추가하고 48시간 후에 동 배양액을 추출하여 0.2% BSA PBST [100 mM, pH8.4, containing 0.05%(v/v) Tween-20] 로 4배 희석하고 E<sub>2</sub>처리 수컷 쏘망이의 혈청과 자연산 수컷의 혈청을 buffer(100 mM Na<sub>2</sub>CO, pH 9.6)로 각각  $\times 10$ ,  $\times 10^2$ ,  $\times 10^3$ ,  $\times 10^4$ ,  $\times 10^5$ ,  $\times 10^6$  희석하였다. 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주하여 37°C에서 4시간 coating 후에 이를 털어내고 비 특이적인 항원의 결합을 억제하기 위하여 0.2% BSA PBS(100 mM, pH8.4)를 200  $\mu$ l를 분주하였다.

4°C에서 30분간 정치했다가 PBS로 4회 세척하고 각 well에 0.2% BSA PBST [100 mM, pH8.4, Containing 0.05%(v/v) Tween-20] 액으로 1차 OD측정에서 가장 높은 OD 값을 보인 검체를  $\times 4$ ,  $\times 8$ ,  $\times 16$ ,  $\times 32$ ,  $\times 64$  희석하고 이를 각 well에 분주하고 실온에서 30분 간 방치 했다가 PBS로 4회 세척 했다. Rabbit anti-mouse horseradish IgM peroxidase conjugate를 0.2% BSA PBST [100 mM, pH8.4, Containing 0.05%(v/v) Tween-20] 에  $\times 1,000$ 배 희석해서 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주하고 실온에서 30분간 방치 한 후에 PBS로 4회 세척하고 alkaline phosphate substrate solution으로 citrate B(pH4.0)에 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6 sulfonic acid) 0.1%와 0.02%의 과산화수소를 함유한 액을 각 well에 100  $\mu$ l씩 분주하고 실온에 30분간 방치하였다가 이를 405 nm와 reference 492 nm에서 reading하여 가장 적절한 OD 값을 보인 희석 검체는 항원은  $\times 1,000$ 배, 항체는 4배의 희석배수를 찾아냈다.

#### 4) 융합세포의 동결보관

상기 2차 clone 선택에서 적정 항원 희석배수를 선택해서( $\times 10^3$ ) E<sub>2</sub>처리 솜뎡이 혈청과 비 처리 혈청을 ELISA 실험 후 이를 405 nm와 reference 492 nm에서 reading하여 OD값이 1.5이상 되는 검체를 최종적으로 선발 하여 일단 원하는 항체가 분비한다고 판단되는 융합 세포 주는 limiting dilution방법으로 1,2차 클로닝을 수행하여 융합세포 집단이 하나의 세포로부터 유래되는 클론이 되게 했다.

융합세포의 장기배양에 따른 변성을 방지하고 융합세포의 대량 확보차원에서 일차적으로 배양된 세포를 검사방법 개발 이전까지 보관하려는 절차 중 하나이다. 우선 bottle에 배양된 세포를 현미경하에서 세포가 bottle 표면에 골고루 전량 자람을 관찰한 후 배양배지 전량을 추출하고 새로운 배지로 교체하고 24시간 후에 이를 적당한 충격을 가하여 표면에 부착된 세포를 떨어내고 배양용기를 세로로 세워 30분간 37°C에서 방치 후 이를 멸균된 conical tube에 분리 해 냈다.

그리고 1,600 rpm에서 10분간 원심하고 상층은 제거해 버리고 침전물을 냉동보관용 배지(10% DMSO: Dimethyl sulfoxide 8 ml+DMEM 80 ml)를 5 ml을 추가하고 이를 살살 흔들어서 충분히 분유시킨 다음, 이를 각각 1.8 ml의 냉동 보관용 ampule에 1.5 ml씩 나누어 분주하고 ampule 표면은 완충제로 쌓아서 우선은 -70°C에서 충격을 줄이기 위하여 보관하였다가 다음날 -170°C로 동결 보전하였다.

## 6. MAb 특성 조사

### 1) Western blot

본 시험법은 구조를 알고 있는 항원결정기와 반응하는 항체를 이용하여 단백질 물질 중에서 원하는 단백질(antigen)만을 찾아내는 방법으로, 분석하고자 하는 단백질 sample을 SDS-PAGE를 걸어 크기별로 분리한 다음, nitrocellulose 같은 filter에 transfer하고 transfer가 제대로 되었는지 여부를 물로 씻으면 지워지는 염색방법으로 SDS-PAGE를 실시한 gel을 blotting buffer(20 mM Tris-HCl, 160 mM glycine, 20% methanol pH8.3)내에서 100 V 350 mA에서 2시간 nitrocellulose membrane에 전사하였다. SDS-PAGE가 완료된 gel을 blotting buffer (20 mM Tris-HCl, 160 mM glycine, 20% methanol pH8.3)내에서 2시간 nitrocellulose paper에 흡착시켰고(100 V, 350 mA), blotting이 끝난 NC paper를 gel에서 분리하여 3% BSA와 0.1 M Tris buffered saline (TBS with 0.05% Tween 20, pH7.4)으로 4°C에서 하룻밤 blocking한 후 배양상층액과 4시간동안 반응시켰다. 이후 TBS-T(0.05% Tween 20 in TBS)로 5분간 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG-HRP conjugate 1시간 반응시킨 후 1% DAB와 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 함유된 PBS(pH7.2)로 5분간 발색하였다.

### 2) 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 (E<sub>2</sub> 처리된 쏜뱅이 수컷, 처리하지 않는 수컷, 넙치

암.수, 송어 암.수, 우럭, 잉어)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 조사 했다.

### 3) Secondary antibodies 및 IgG Fc receptor와의 반응성

ELISA plate에 E<sub>2</sub> 처리한 쏘뱅이 혈청을 coating하고 적당히 희석된 MAb를 가하여 반응시킨 후, HRP labeled goat anti-mouse IgG, IgM, Protein A 및 Protein G와의 반응여부를 각각 관찰하였다.

## 7. 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 용

해시킨 후 gel packing을 하여 1 mM HCl을 400ml 가량 흘려 세척하였다.

그 다음 이 gel을 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (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 정 치했다.

제조한 gel을 packing한 후 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 와 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 기 포가 생기지 않도록 사용되는 buffer들은 멸균하여 미리 가스를 제거한 후 사용하였다. Gel을 20 mM phosphate buffer(pH7.2)를 사용하여 100 ml 이상 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 투 석액은 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 원심분리 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

## 8. 실험실적 Screening system (ELISA kit) 개발

### 1) ELISA plate 준비

정제된 MAb는 확인된 단백질농도에 따라 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 각각 희석배수를 정하고 coating buffer로 희석하여 ELISA plate에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 4°C에서 16시간 흡착시켰다. 흡착이 완료된 plate는 blocking buffer를 well당 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주하여 4°C에서 2시간동안 정치한 후 PBS로 3회 세척하고 건조시켜 냉장보관하며 Vtg분석에 사용하였다.

### 2) HRP-MAb conjugate 제작

Two-step glutaraldehyde법으로 접합체를 제작하였다 (Wilson *et al.*, 1978). 즉 Horseradish Peroxidase (Sigma, USA) 10mg을 0.1M phosphate buffer (containing 1.25% glutaraldehyde) 0.2 ml에 용해한 후 실온에서 18시간 정치하였다. 이를 PD10 column (Pharmacia, Sweden)에 여과하여 잔여분의 glutaraldehyde를 제거하고, 5 mg/ml의 항체 1 ml과 섞은 후 1 M sodium carbonate-bicarbonate 100  $\mu\text{l}$ 를 가하여 pH를 9.5까지 올려주었다. 냉장온도에서 24시간 정치시키고 접합이 완료된 반응액에 0.2 M lysine 0.1 ml를 가하여 잔여 반응기를 masking을 한 후 PBS에 투석하였다.



### 3) Antibodies pair 결정

Lammissou 등(1996)이 실시한 단클론 항체의 pair 결정은 정제된 단클론 항체의 coating 농도와 접합체 농도를 일정하게 주고, Vtg계단 희석하여 linearity를 확인하고자 하였다. 이때 항원으로 MAb(S10, S15, S16, S28)를 coating buffer로 희석하여 100  $\mu$ l씩 분주하고 coating후, 4°C에서 overnight 시킨 후에 PBS (0.2% BSA, 0.05% NaN<sub>3</sub>)를 200  $\mu$ l씩 각 well에 첨가하여 4°C에서 1시간 후에 E<sub>2</sub> 처리한 쏘뎅이 serum을 dilution buffer로 500배 희석하여 분주하고 실온에서 30분간 반응시키고 HRP conjugate(S10, S15, S28)를 100~12,500배 희석하여 실온에서 30분간 반응 시킨 후에 ABTS로 실온에서 30분 반응시켜 405 nm (reference 492 nm) OD값을 측정하였다.

## 9. ICG(Immunochromatographic assay) kit 개발

Colloid gold는 음전하를 가진 비 친수성 액체로 단백질과는 비공유적으로 결합하기 때문에 면역 글로브린과 같은 거대분자들은 적색의 colloid gold와 결합하므로 Vtg와 같은 면역글로브린과 결합한 colloid gold입자로 항원분자를 직접 검출하는데 응용하고자 하였다 (Haasnoot *et al.*, 1996).

### 1) Colloidal 골드 제작

Beesly 등(1989)의 colloidal gold 기술방법을 응용하여 Table 1. 2와 같은 처방으로 20 nm gold colloidal의 제조는 철저히 세척, 건조된 초자 비이커에 주사용 증류수(중외제약) 89 ml를 가하고 hot plate에 60°C로 가열하며 교반하였다. 가열되는 동안 1% tri-sodium citrate 4 ml에 증류수 6 ml를 가하여 10 ml가 되도록 준비 해 두고 수온 60°C가 확인되면, 1% gold

chloride [Tetrachloroauric (III) acid trihydrate, Sigma G-4022, USA] 1 ml 를 넣어 교반과 동시에, 준비해 둔 sodium citrate액 10 ml을 한번에 가하였다. 온도를 유지하며 1시간 정도 교반하면서 반응액의 색상변화를 관찰하여 포도주 빛과 같은 암적색을 보이면 100℃로 15분간 끓이며 교반하였다.

또한 40 nm gold colloidal의 제조는 추가적으로 입자 size를 확대하여 40 nm 규격의 colloidal gold를 제조하기 위하여, 기 제조된 20 nm colloidal gold 25 ml에 증류수 153 ml를 가하고, 끓는 상태에서 1% tri-sodium citrate 2 ml를 추가하였다. 이후, 1% gold chloride 2 ml를 증류수 18 ml와 섞어 희석한 액을 1 ml/min의 속도로 점적하며 점차적인 입자성장을 유도하였다. 그 후 약 20분간 추가적으로 끓여낸 후 실온에 정치하여 gold-Ab conjugates의 접합에 사용하였다. 40 nm colloidal gold(5.0 O.D)의 제조는 입자 size가 40 nm인 colloidal gold를 OD가 5.0 되게 제조하고자 40 nm colloidal gold제조에 사용되는 용액들의 농도를 5배로 증가시킨 후 60℃의 조건에서 30분간 반응시키고, 60분간 끓여낸 후 접합에 사용하였다.

Table 1. Component of 20 nm plain colloidal gold.

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

Table 2. Component of 40nm plain colloidal gold.

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

## 2) MAb-Gold 접합체 제조

Gold 접합체를 만들기 위한 시작 조건은 전형적으로 plain gold의 OD 514 값이 1.0이 되게 하고 단백질농도는 0.1 mg/ml이 되도록 하였다. Plain gold의 산도는 0.1% NaOH로 맞추다가 미세한 조정 시에는 0.01% NaOH를 사용하였고 접합체 제조를 위하여 pH7.5로 조정한 plain gold 10 ml에 antibody를 점적한 후 30분간 정치하였다. NaOH로 pH를 9까지 올린 후 BSA(10 $\mu$ l of 10%/ml gold)를 가하고 10분간 정치 후 이를 원심분리( $\times 10,000$  g, 30 min, 4 $^{\circ}$ C)시켜 맑은 상층 액을 걷어내고 gold 접합체 희석액으로 재 부유하였다. Gold 전용 희석액은 적당히(1% T-20, 1% BSA, 2~3% Score in 100 mM PB) 희석하여 사용하였다.

## 3) Membrane 선정

Nitrocellulose transfer membrane(Whatman, SP 003, USA)을 3mm 폭으로 절단한 후, 정제된 항체(S16)를 1 mg/ml를 1.0  $\mu$ l씩 넣고 dotting하여 실온에서 건조한 후 Immunochromatography assay에 사용하였다.



## 10. *In vitro* 검출계 확립

Lee 등(2003)에 의하면 국내에서 자연산 어종에 대한 내분비계 장애물질의 환경 위해성 평가를 위한 대상 어종으로 송사리 등 몇 종에 불과한 것은 현재까지 시험어종으로서 실험실내에서의 사육표준화 정립이 미흡하여 실험실 내에서의 시험어종으로 적용치 못하고 있는 실정이라고 한다.

또한 솜뿔이와 같이 상대적으로 size가 큰 어류는 제한된 공간에 사육하며 실험물질을 투여하는 pilot system을 운영함은 불합리한 방법이 될 것이

다. 그래서 연안에서 자연적으로 서식하는 물고기 중에서 채집된 쏨뱅이의 각 개체별 혈중 Vtg의 검사 이외에, 인공적인 사육을 통하여 실시하는 pilot system은 비현실적인 방법으로 생각되어 금번 연구에서 제외하였다.

따라서 본 연구는 Fig.3.과 같이 쏨뱅이에서 간을 분리해 내고 적절한 처리를 통하여 간세포를 분리한 다음 초대 간세포배양을 통하여 적당히 배양된 세포를 동결보존 했다가 Vtg 유발물질을 투여하여 일정기간 배양 후 상층 액을 SDS-PAGE를 통해 Vtg 합성여부를 검사할 수 있는 *In vitro* 검출계를 구축하기 위한 방법을 확립하고자 하였다.

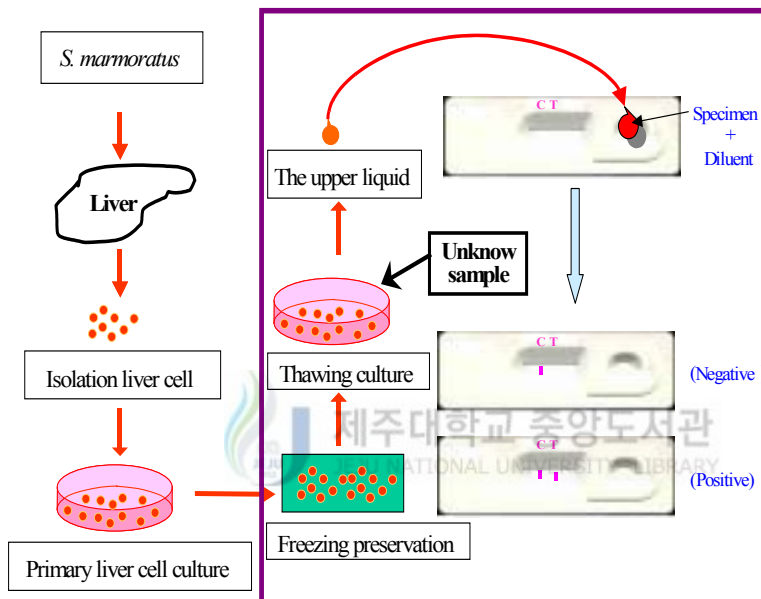


Fig. 3. Scheme of *in vitro* detection system for EDs in unknown sample.

#### 1) 간세포 1차 배양법 확립

쏘뱅이를 0.01% 2-phenoxyethanol로 마취를 시킨 후, 담낭과 함께 간장을 분리하고 간 문맥에  $Ca^{2+}$ 을 첨가하지 않은 관류용 buffer를 약 10분간 관류한(5~8 ml/min) 다음, 3 mg/ml collagenase(Sigma, USA) 및 0.98 mg/ml 소

혈청 알부민(Sigma)을 포함한 관류용 buffer에 약 20분간(5~8 ml/min), 그리고 2 mM EDTA를 첨가하여  $Ca^{2+}$  및  $Mg^{2+}$ 을 제거한 관류용 buffer에 약 10분간 각각 관류하였다. 관류 후 간장은 100 ml 비이커에 넣어  $Ca^{2+}$ -free 관류용 buffer로 3회 세척한 후, 50 ml의 관류용 buffer내에서 해부 가위로 잘게 분산시켰다. 분산된 간세포는 피펫으로 더욱 분리하여 가제로 여과시킨 후에 원심분리( $\times 700$  rpm, 2 min)를 3회 반복하여 간 실질 세포 이외의 성분(비 실질세포, 파열세포, 세포의 파편 및 적혈구 등)을 제거하였다.

간세포는 양전하를 처리한 250 ml T/C 플라스크당  $2 \times 10^6$ 개의 세포 밀도로 배양하였고 배양에는 0.2  $\mu$ m bovine insulin(Sigma), streptomycin, penicillin, 및  $NaHCO_3$ 을 첨가한 L-15 medium을 이용하였다. 간세포는 배양액 20 ml를 첨가하여 배양하였으며 사전 배양은 3일간 행하고, 배양액은 3일 간격으로 교환하면서 계속 관찰 하였다.

## 2) 동결 속도의 비교

간세포는 계대배양이 이루어지지 않기 때문에 동일한 개체로부터 결과를 얻기에 많은 어려움이 있다. 또한 간세포의 분리는 전문성을 요구하므로 내분비교란물질의 검출 실험을 위한 간세포의 사용은 매우 어려운 점이 많다.

이에 따라 간세포를 동결하여 실험자에게 제시할 경우 손쉽게 내분비교란 검정을 할 수 있을 것으로 판단되어, 세포의 동결보존법의 개발을 실시하였다.

우선, 간세포의 동결은 렛트의 비장세포 동결법을 응용하여 다음과 같은 4가지 실험구를 통하여 조사하였다. 먼저, 완속 동결구는 4°C에서 2시간을 보존한 후 -20°C에서 2시간 그리고 -80°C에서 최종보존을 하는 방법(실험구 1)과 -80°C 2시간을 거쳐 액체질소(-196°C)에 보존하는 방법(실험구 3)을 설정하였다. 급속 동결 구는 4°C에서 2시간 보존한 후 -80°C로 바로 보관하는 구(실험구 2)와 -80°C를 거쳐 -196°C로 보존하는 구(실험구 4)를 설정하였다.

### 3) 동결 보전제의 비교

세포동결 보존액으로는 10% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 이용하였고 DMSO의 농도에 따른 세포의 생존율에 대한 변화는 5%, 10%, 15%에 대하여 조사하였다. 4가지 실험구의 실험결과를 바탕으로 생존율이 높게 나타난 실험구 3과 실험구 4를 이용하여 각 실험구의 동결보존의 시간 경과에 따른 생존율의 변화를 관찰하기 위하여 보존 후의 2일, 5일, 7일, 10일 및 15일째의 동결보존 세포를 상기 방법을 이용하였으며 이를 해동한 후 생존율을 조사하였다. 세포는 collagenase 관류법으로 분리하여 800 rpm으로 분리한 후 상층액을 제거하여 실험재료로 이용하였고 50 ml의 플라스틱 튜브에 DMSO가 10%첨가된 배양액을 첨가하여 3분간 DMSO를 침투시켰다. 그 후 800 rpm, 2분간 원심분리를 하여 상층액을 제거하고 DMSO가 침투된 세포를 멸균된 1.5 ml 튜브에 넣고 동결보존을 하였다. 해동은 20~24℃의 항온수조에서 약 1분간 신속하게 해동하여 새로운 배양액을 첨가하여 3회 원심분리를 하고 세포내에 침투된 DMSO를 제거하였다. 그 후 세포의 생존율을 trypan blue로 염색하여 조사하였다.

### 4) *In vitro* system의 결정

Fig.3과 같이 썸뱅이 full sheet 형성이 확인된 liver cell 배양 well에 내분비장애물질로 예측되는 2,4-D 농약을  $\times 10^{-8}$ ,  $\times 10^{-7}$ ,  $\times 10^{-6}$ ,  $\times 10^{-5}$  희석한 물질들을 각각 배양액에 첨가하고 0, 3, 6 및 9일째를 회수하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 Vtg형성 여부는 현재의 표준방법인 단백질 분석 즉, Laemmli(1970)의 방법에 의하여 7.5% SDS-PAGE로 분리하여, Coomassie brilliant blue R-250으로 40분간 염색하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. Vtg의 induction

자연 상태에서 환경오염물질에 의해 유발을 증명하기가 쉽지 않기 때문에 인위적으로 유도하였으며 이 확인실험은 E<sub>2</sub>처리 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.

이를 위해 Biorad(USA)의 Mini protean II system을 이용한 실험으로 E<sub>2</sub>처리 10일 후에 채취한 혈청과 투여 전 채취한 암.수컷의 혈청을 전기영동 처리하여 Vtg의 특이한 밴드 분자를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 4와 같이 대조군으로 Sigma High Maker와 E<sub>2</sub> 처리되지 않는 암.수컷을 사용하였고 실험군으로는 E<sub>2</sub> 처리된 암.수컷의 혈청을 사용하여 앞서 제시된 시험 방법에 의거 실험하였다.

그 결과 E<sub>2</sub>를 처리하지 않은 암.수컷 쏘뱅이의 혈청에서는 Vtg밴드가 형성되지 않았으나 E<sub>2</sub>를 처리한 암.수컷 혈청에서는 미처리 대조군에서 보이지 않았던 밴드가 175 kDa 부근에서 나타나 합성유도가 확인되었다.

그 외에도 다른 sub unite가 molecular marker protein과 같은 위치에 존재하고 있는 것으로 보아 E<sub>2</sub>에 의해 유도된 물질이 존재가 확연히 나타났고 이를 확인하기 위한 방법으로 이들 물질을 정제 후 SDS-PAGE 및 western blot으로 재 확인하고자 하였다.

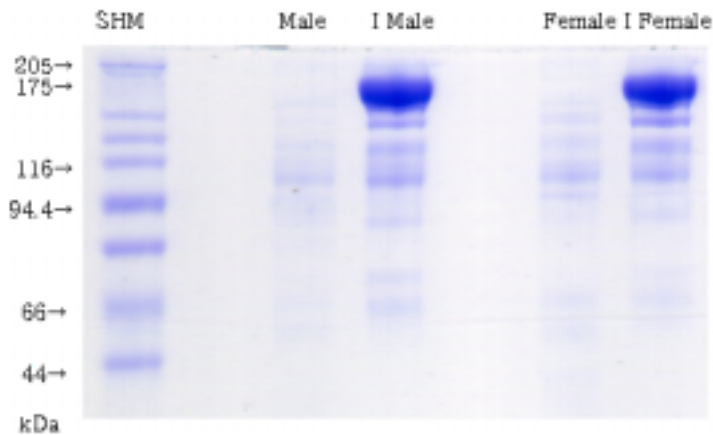


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of vitellogenin in serum of Scorpion fish treated or non-treated with E<sub>2</sub> (SHM: high molecular marker, Male: normal male serum, I Male: E<sub>2</sub> treated male serum, Female: normal female serum, Female: E<sub>2</sub> treated female serum )

## 2. Vtg의 purification

### 1) Gel permeable chromatography

Fig. 4와 같이 유도를 확인하고 유도된 Vtg의 정제를 위하여 gel permeable chromatography 한 결과 Fig. 5에 나타냄 바와 같은 gel filtration profile를 나타내었다 (Bodil *et al.*, 1998).

Fig. 5와 같이 gel filtration profile를 통하여 Vtg 단백질농도일 것으로 예측되는 fraction No.12~28번에 대하여 Fig. 4와 같이 SDS-PAGE 통하여 Vtg 유도여부를 확인한 바 Fig. 6과 같이 Vtg이 분리 시작은 17번에서 시작하여 25, 26번까지 함유되고 있음을 볼 수가 있다.

본 연구에서는 가장 많은 양이 함유되었다고 생각되는 No.20번에서 23번 까지 pool 시킨 다음 이를 최종 5 ml가 되도록 4°C에서 PBS에 overnight동안



2~3회 가량 투석액을 교체하면서 투석을 실시하였고 Vtg이라고 예상되는 분획(175 kDa)을 ion-exchange를 실시하여 Vtg를 확정하고자 하였다.

그리고 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 E<sub>2</sub>에 의해 유도된 물질이 존재를 확인 할 수 있었으며 이를 재 확인하기 위한 방법으로 이들 물질을 Ion exchange chromatography로 정제 후 SDS-PAGE를 통하여 Vtg를 확인 하고자 했다.

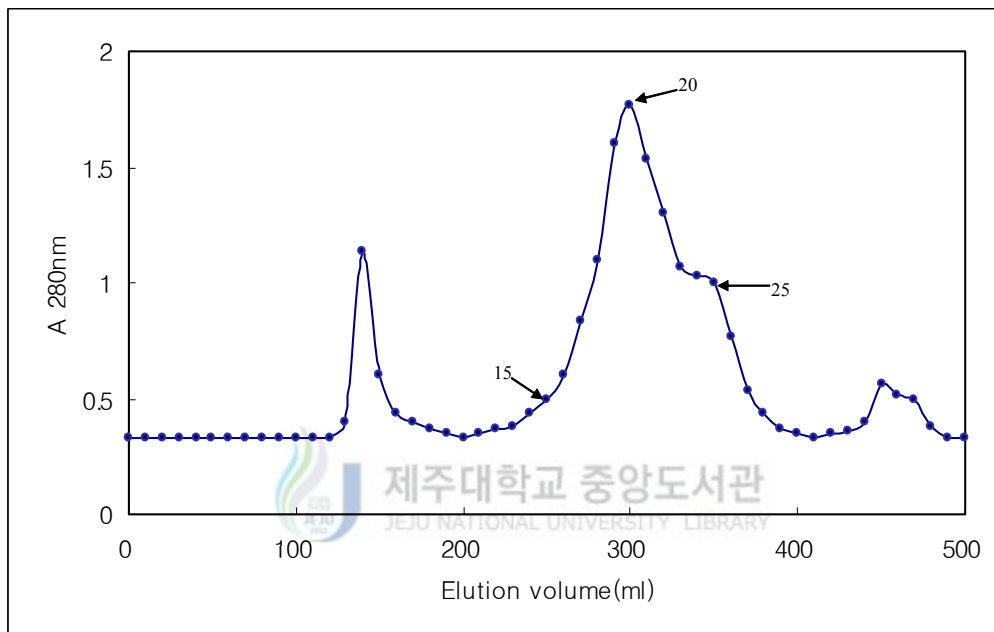


Fig. 5. Gel filtration profile of Vtg-induced Scorpion fish' serum.

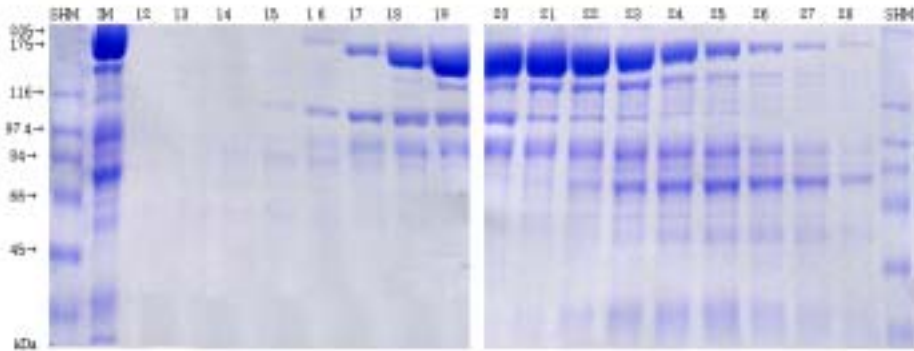


Fig.6. SDS-PAGE profile of vitellogenin fractions from gel filtration of Scorpion fish' serum(Fraction No12~28).

※SHM : Sigma High Marker, IM: E<sub>2</sub> Induction Male fish of plasma Scorpion fish'

## 2) Ion exchange chromatography

Ion exchange chromatography는 Fig. 7에서와 같이 용출된 각 peak에 No. 1~5번까지 fraction을 SDS-PAGE를 통하여 Vtg가 함유정도를 확인하고자 한바 fraction No. 4, 5번에 주로 함유되어 있음이 Fig. 8번과 같이 확인되어 NaCl 0.4M 이후에 나타나는 2개의 peak를 이루는 분획들을 취하여 정제된 Vtg를 마우스의 면역과 Hybridoma screening을 위한 ELISA 항원으로 사용하였다.

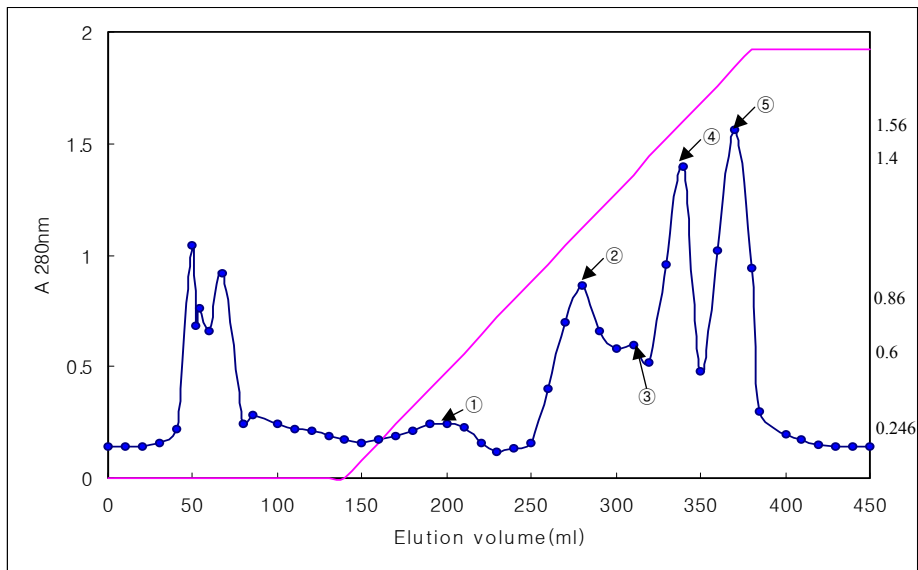


Fig. 7. Ion-exchange chromatography profile of fractions from the gel filtration of the estradiol-treated male Scorpion fish' serum (Fraction No.12~28 pool serum).



Fig. 8. Comparison of Vtg concentration among the Ion exchange chromatography fractions.

### 3. 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 썸벵이 Vtg의  $K_{av}$  값은 각각 0.540, 0.631 및 0.550으로 계산되었다. 그러므로 각 분자의  $K_{av}$  값을 환산하여 graphy를 그렸을 때, 썸벵이 Vtg의 분자량은 Fig. 9와 같이 약 440 kDa로 환산되었다.

그리고 썸벵이 혈청에서의 Vtg의 분자량 확인은 본 연구에서 처음으로 시도하여 이루어진 것으로 사료된다.

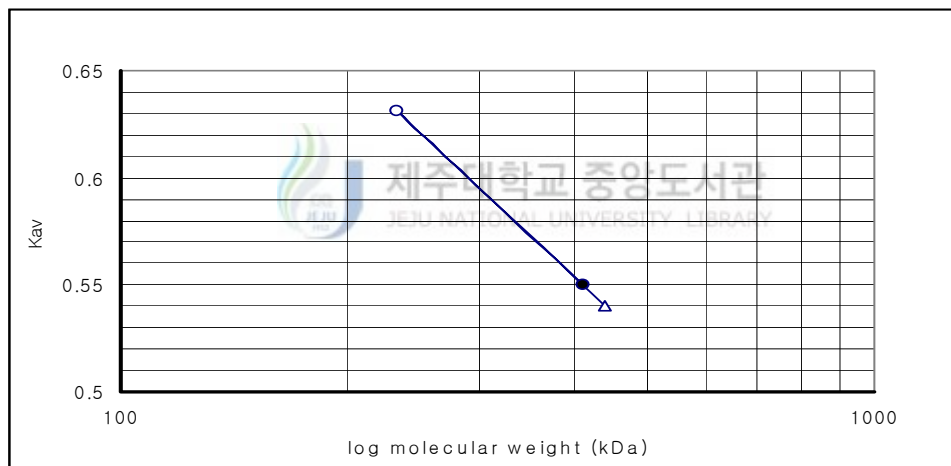


Fig. 9. Calibration curve using the high molecular weight gel filtration calibration kit on Sepharose CL-4B (open circle: catalase, open triangle: ferritin, solid circle: Vtg of Scorpion fish).

#### 4. Monoclonal anti-Vtg antibody

##### 1) 항체정제 (Affinity chromatography)

ELISA와 western blot을 통하여 역가가 높은 항체, S10, S15, S16, S28 번을 James 등(1997)이 사용한 protein G sepharose gel을 사용하여, packing 할 때 기포가 생기지 않도록 사용되는 buffer들은 미리 가스를 제거한 후 20 mM phosphate buffer(pH7.2)로 평형화 시킨 gel에 복수 액을 적용시켜 sephrose에 고정된 protein G와 결합한 IgG 분자는 3M NaSCN으로 용출하였다. 용출된 분획은 20mM phosphate (pH7.2)에서 24시간을 투석하되 4시간 간격으로 3회 이상 투석 외액을 교체하고 투석이 끝난 분획은 원심분리 (4°C ×6,000 G, 10분, KONTRON Centrikon T-324)하여 상층액을 회수하였다. 정제된 MAb의 항체가 확인을 Table. 3과 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/ml으로 확인되었고 이를 추후의 실험에 적용하였다(Andrew *et al.*, 1992).



Table 3. Antibody titers of monoclones after affinity chromatography purification of anti- Scorpion fish' Vtg.

sample	OD Vol.		Protein Con.. mg/ml	titer (×100)	volume(ml)
	×5	×10			
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  $5 \times 10^6 - 10^7$  cell 씩 복강 내에 접종하여 7일~10일간 관찰하며 복수를 채취하여 정제 후 항체 역가를 ELISA를 통하여 조사한 결과, Fig. 10과 같이 동 복수 액 S10, S15, S16, S28번에서 각각의 항체는 500배 이상의 희석역가의 항체를 나타냈다. 이를 western blot에서 Vtg과 반응하는 항체를 정제한 후, Vtg검출용 ELISA 및 Immunochromatographicassay에 ture 및 tracer antibody로 사용하였으며 각 단백질도와 역가를 기준으로 tracer 및 capture로서의 조건을 조사하였다.

## 3) Western blot

Fig. 11은 Michae 등(1996)이 실험한 바와 같이  $E_2$ 에 의해서 유도된 Vtg 함유 혈청, 음성혈청과 알 단백질에 대하여 SDS-PAGE를 걸어 크기별로 분리하였다. 그 다음 nitrocellulose 같은 filter에 transfer하고 transfer가

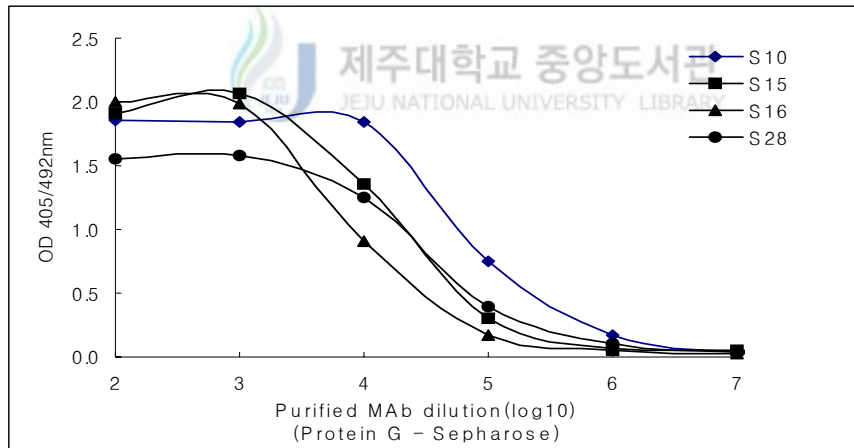


Fig.10. Antibody titer of ascites fluids 7-10days after injection of hybridoma producing anti- Scorpion fish' Vtg..

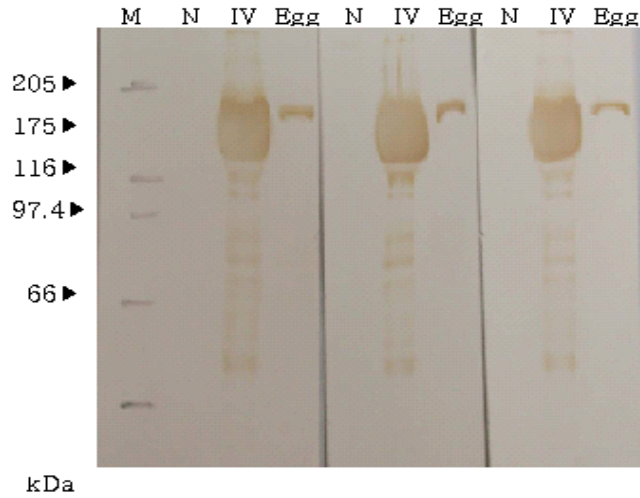


Fig. 11. Western blot of Vtg induced Scorpion fish' serum, egg and negative control.

제대로 분리되었는지 여부를 물로 씻으면 지워지는 염색방법을 사용하여 SDS-PAGE가 완료된 gel을 TBS-T (0.05% Tween 20 in TBS)로 5분간 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG-HRP conjugate 1시간 반응시킨 후 1% DAB와 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 함유된 PBS(pH7.2) 5분간 발색한 결과이다.

Fig. 12에서는 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 clone 들은 Vtg 함유 혈청의 Vtg band와 특이적인 반응을 보여 난황과 반응한 경우에도 공히 Vtg에 해당하는 약 175 kDa의 단백질과의 반응이 확인되었다.

분획을 보면 유도된 혈청과 알 단백질이 비교되는 양상인데(Akihiko *et al.*, 1997) 이것은 Reader 등(1992)과 Hartiling 등(1999)이 주장한 바와 같이 Vtg이 난황내로 선택적으로 흡수된 후 바로 저분자의 난황성분으로 분해되어 기전 초기단계 난황임을 기인한 것으로 사료 된다(Mouchel *et al.*, 1999).

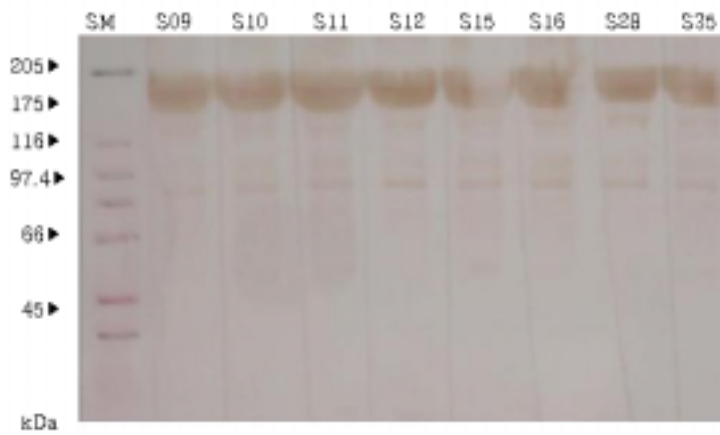


Fig. 12. Western blot of profile of various monoclonal antibodies on Vtg induced Scorpion fish' serum.



Fig. 13. Western blot profile of various monoclonal antibodies on Scorpion fish' egg.



4) 이종 어류의 Vtg과 교차반응

기 개발되어 공중 보건학 교실에 보유하고 있는 다른 어류의 MAb (E<sub>2</sub>처리된 썸뱅이 수컷, 처리하지 않는 수컷, 넙치 암,수, 송어 암.수, 우럭, 잉어)들에서 유래한 Vtg들과의 항원적인 교차반응을 ELISA를 통하여 확인하였다. 즉, 각종 어류의 serum을 적절히 희석하여 흡착시킨 micro ELISA plate에 각 MAb를 희석하여 분주하고 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 이후 HRP labeled goat anti-mouse IgG를 가하고 실온에서 40분간 반응시키고 ABTS로 발색시켰다. ELISA를 통해 다른 어류 혈청과의 교차반응을 측정 한 결과, Table. 4와 같이 썸뱅이의 Vtg에 대한 MAb clone은 E<sub>2</sub>를 처리한 썸뱅이 혈액과 산란기 암컷 우럭의 혈액은 교차반응을 보였으며, 여타의 이종 어류의 혈액과는 반응하지 않았다.

Table 4. Patterns of monoclonal(S 10 et al 7 ea) antibody cross reaction with E<sub>2</sub>-treated and not treated Scorpion fish' and other Spp. fish's serum.

clone	SME <sub>2</sub>	SM male	PO male	PO female	O M	O M female	SH	C C
S 09	++	-	-	-	-	-	++	-
S 10	++	-	-	-	-	-	++	-
S 11	++	-	-	-	-	-	++	-
S 12	++	-	-	-	-	-	+	-
S 15	++	-	-	-	-	-	++	-
S 16	++	-	-	-	-	-	++	-
S 28	++	-	-	-	-	-	++	-
S 35	++	-	-	-	-	-	++	-

\*SME<sub>2</sub>: *Sebasticus marnortus*

\*SM: *Sebasticus marnortuse*

\*PO : *Paralichthys olivaccus*

\*SH : *Sebastes hubbsi*

\*OM : *Oncorhynchus masou*

\*CC : *Cyprinus carpio*

5) Secondary antibodies 및 IgG Fc receptor와의 반응성

ELISA plate에 E<sub>2</sub> 처리한 쏘뱀이 혈청을 coating하고 적당히 희석된 단클론 항체를 가하여 반응시킨 후, HRP labeled goat anti-mouse IgG, IgM protein A 및 protein G와의, 반응여부를 각각 관찰하였다. Table 5와 같이 4개의 clone이 모두 IgG 타입인 것으로 확인되었다.

Table. 5. Patterns of monoclonal(S09, et al 7ea) antibody 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	+++	+	+	+

## 5. ELISA kit 개발

### 1) Antibodies pair 결정

Antibodies pair 결정은 정제된 MAb를 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  정도를 ELISA plate에 흡착시키고 E<sub>2</sub>혈청은 sample buffer로 2,000배 희석, well당 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 그 다음 HRP labeled MAb를 각각  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ ,  $\times 800$ ,  $\times 1,600$ ,  $\times 3,200$ 배로 희석하여 실온에서 30분간 반응시켰으며 발색제로는 ABTS 용액을 사용하고 30분간 발색시킨 후 405 nm (reference 492 nm) OD값을 측정 한 결과를 Fig. 14에 A, B, C와 같이 그래프로 나타내었다.

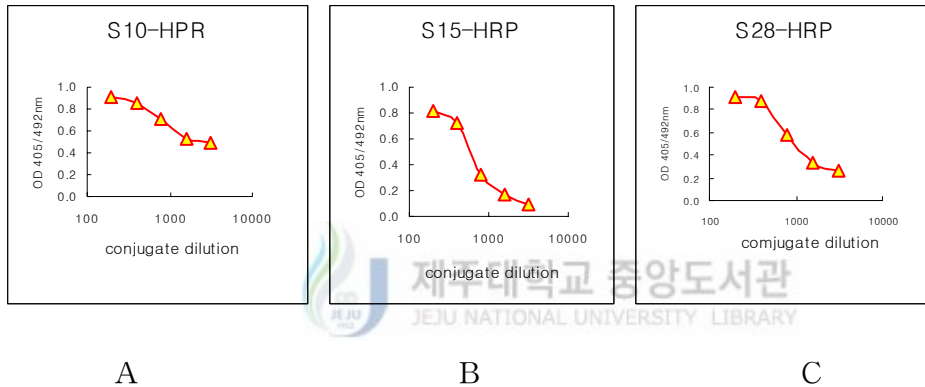


Fig. 14. The optimal dilution condition of HRP labeled MAb for sandwich ELISA to detect Scorpion fish' Vtg.

- A: The combination of HRP labeled MAb S10 conjugate and MAb S10 coated on microplate wells.
- B: The combination of HRP labeled S15 and MAb S15 coated on microplate wells.
- C: The combination of HRP labeled S28 and MAb S28 coated on microplate wells.

각 효소 접합체들은 동 그림과 같이,  $\times 1,000$ 배 희석한 용액에서 직선상의 용량 대 반응곡선이 형성되었으며 이 때의 흡광도의 값이 1.0 정도로 나타났으므로, 흡착항체의 희석조건은 각 항체별 접합체에서 공히  $\times 1,000$ 배의 희석배수로 조건을 결정하여 흡착 capture의 희석조건을 조사하였다.

접합체 희석조건은 Fig. 14에서와 같이 반응에 필요한 접합체의 충분한 양을 결정하기 위한 실험으로 희석단계에 따른 표준반응곡선이 이루어지는 범위 내에서 적당하게 희석하였다. 이 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.

한편, 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 특이항체의 정제도가 높음을 시사한다. 그러므로 이후의 조건은 상기 3가지의 MAb를 이용하여 흡착 및 효소접합체로 조건을 조사하였다.

또한 Fig.15와 같은 그래프는 MAb S10, S15 및 S28의 HRP 접합체들을  $\times 1,000$ 배 희석하고, S10, S15, 및 S28 MAb 중에서 해동을 반복하였던 혈청과 신선한 혈청, 음성 혈청을 실험 하였다. 그 결과 Fig.15에서와 같이 해동을 반복했던 혈청에서는 S15-HRP의 접합체에서 S10번과 S28번에서 높은 항체가를 보였으나 Fig.16에 나타난 것과 같이 신선한 혈청에서는 S15-HRP의 접합체에서 S28번에만 공통적으로 높은 항체가를 보이고 있다.

따라서 동결과 해동을 반복했던 혈청에서는 단백질 분해되거나 또는 Vtg 구조의 결합으로 항원항체반응에 저해를 일으킨 것으로 보이며 추후 연구할 가치가 있다고 생각한다.

S15-HRP의 접합체에 공통적으로 높은 항체가를 보인 S28번을 각각  $\times 20$ ,  $\times 1,000$ ,  $\times 2,000$ 배로 희석하여 capture로 사용하였을 때,  $E_2$ 처리 혈청의 용량별 반응곡선을 분석하여 detection limit를 평가하고자 하였다.

S15-HRP를 tracer로 사용하고 S28은 1,000배 희석한 capture의 조건에서 10,000배 이상의 희석농도까지도 검출이 가능하였으며, 상기의 조건을 ELISA의 antibodies pair로 설정하였다.

한편, plate의 흡착을 위한 MAb의 선정 시 S15 및 S28의 경우는  $\times 1,000$  및  $\times 2,000$ 배의 희석 시에도 충분한 capturing capacity를 보여주었다. 이는 특이항체의 정제도가 높음을 시사한다. 그러므로 이후의 조건은 상기 2가지의 MAb를 이용하여 흡착 및 효소접합체로 조건을 조사하였다. Fig. 17은

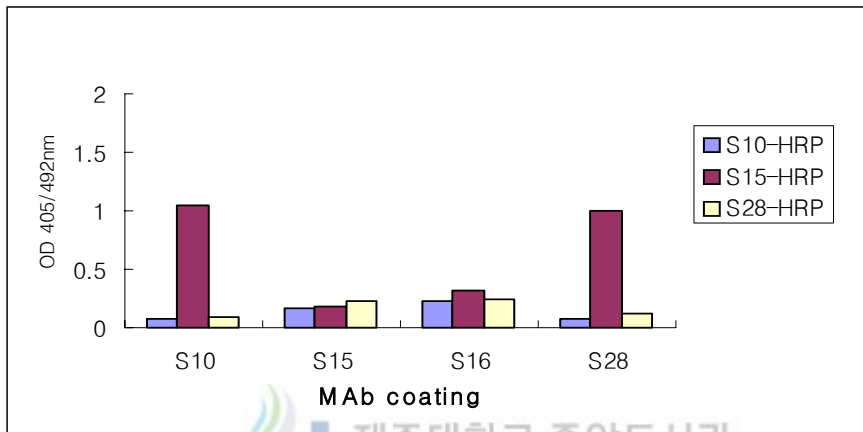


Fig. 15. Conditioning of ELISA for the decision of MAb pair using Vtg in Scorpion fish' serum partially denatured by repeated freezing and thawing.

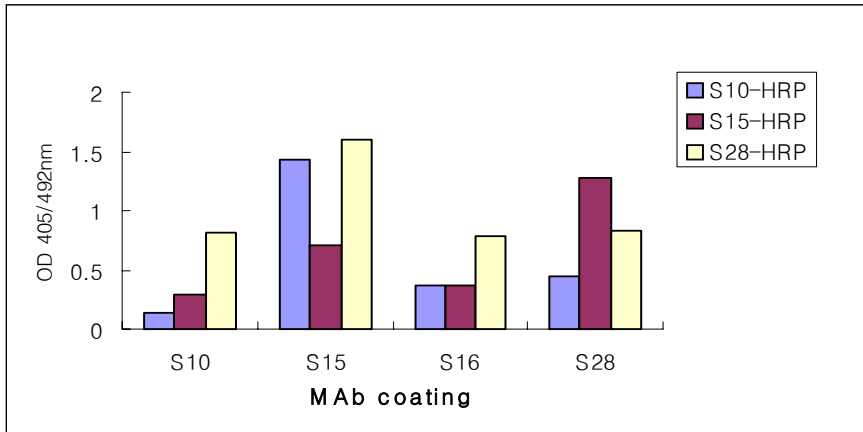


Fig. 16. Conditioning of ELISA for the decision of MAb pair using freshly prepared Vtg from Scorpion fish' serum.

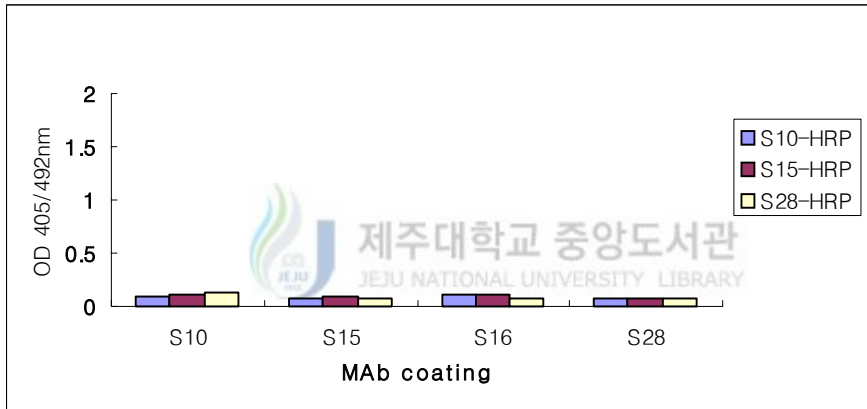


Fig.. 17. Conditioning of ELISA for the decision of MAb pair using negative serum of Scorpion fish.

Fig.15, 16에 대한 음성 control로 어느 항원, 항체의 반응조건에서 항체가 미약함을 보여 주고 있다.

## 2) Vtg 검출 한계

본 실험에서는 검출한계를 산출하기 위해서 지정된 ELISA system을 이용하였다. Vtg의 검출한계를 측정하기 위하여 S28 MAb를  $\times 1,000$ 배 희석하여 (약  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) ELISA plate에 coating하고, 쏨뱅이 Vtg 농도는  $1 \text{ mg}/\text{ml}$ 이 포함되어 있는 혈청을 계단 희석하여 반응시켰다.

Tracer로는 S15-HRP를 conjugate buffer를  $\times 1,500$ 배 희석하여 실온에서 30분간 반응시켰으며, ABTS로 발색시켜 흡광도는 OD 405/492 nm에서 측정하였다. 본 과제에서 개발한 ELISA 법으로는 Fig. 18과 같이 적어도  $1.0 \text{ ng}/\text{ml}$ 의 Vtg까지 검출이 가능하였음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

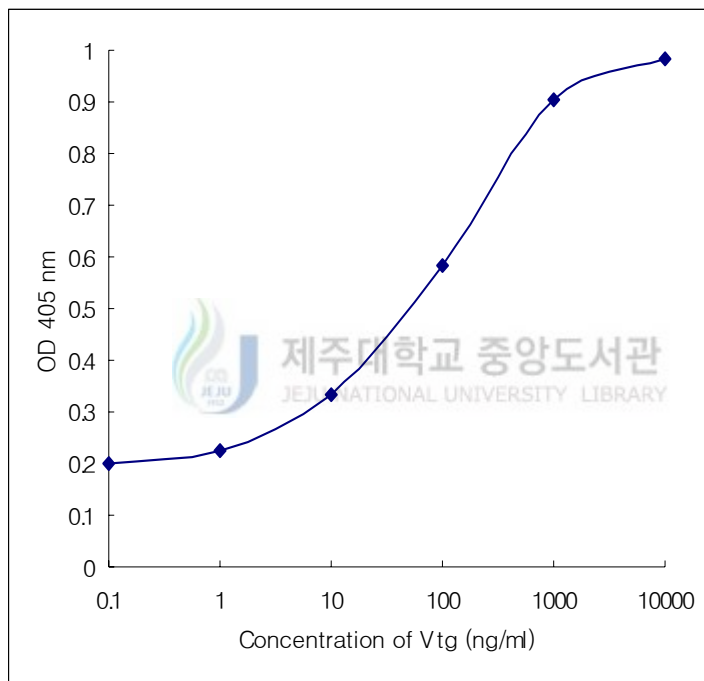


Fig. 18. ELISA profile using different concentration of vitellogenin of Scorpion fish

### 3) 민감도 및 특이도

현재 Vtg의 정성 및 정량 공인검사법은 제시되어있지 않으나, 문헌상의 연구결과는 SDS-PAGE를 통한 Vtg형성을 확인하고 있기 때문에 reference method로서 SDS-PAGE의 결과와 비교 할 수 있다. SDS-PAGE결과를 보면 E<sub>2</sub>를 투여하여 Vtg가 합성된 양성 혈청 5건과 청정지역 제주도의 사계 근해에서 비 산란기에 포획한 솜뱅이 Vtg 음성혈청 9건을 검사하여 민감도와 특이도를 각각 조사한 바 Table. 6과 같이 특이도에서는 이론에 여지가 없었고 ELISA의 실험 조건들을 결정하고 앞서 민감도

Table. 6. A comparison of SDS PAGE & ELISA test.

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

Sensitivity:  $5/(5+0)*100= 100\%$  Specificity:  $9/(9+0)*100= 100\%$



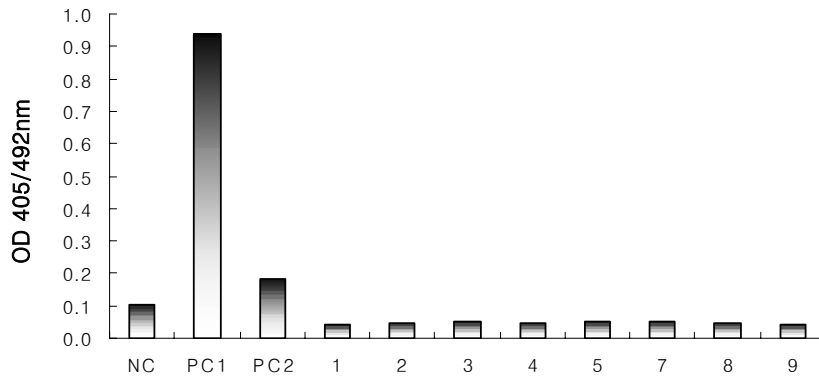


Fig.. 19. Detection of Scorpion fish' Vtg by using developed ELISA.

-NC: Negative control,

-PC1: Positive control 1 E<sub>2</sub> treatment serum,

-PC2: Positive control 2(Scorpion fish' egg),

-1~9: Scorpion fish' serum.

와 특이도를 조사한 혈청을 실제 쏨뱅이 음성혈청, E<sub>2</sub> 처리 쏨뱅이 혈청, 알을 가진 쏨뱅이 혈청과 청정지역 사계에서 포획한 쏨뱅이 9마리를 시험한 바 Fig. 19와 같이 음성에서는 항체가 미량으로 검출되지 않음을 보여주어 앞서 제시된 조건이 실험조건으로 만족한 결과라고 사료된다.

## 6. ICG kit 개발

### 1) Colloidal 골드

구경 20 nm 및 40 nm 로 제조된 Colloidal gold를 spectrophotometer로 파장별 흡광도를 측정한 결과 Fig. 20, 21.에서와 같이 20nm 입자의 경우는 523 nm의 파장에서 최대 흡광을 보였으며, 40 nm 입자의 경우는 536 nm 의 파장에서 최대 흡광을 보였다.

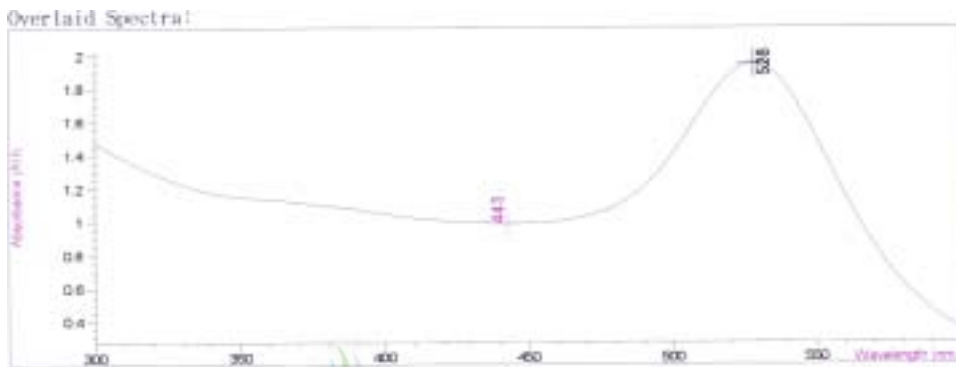


Fig. 20. Absorbance spectrum of 20 nm colloidal gold.

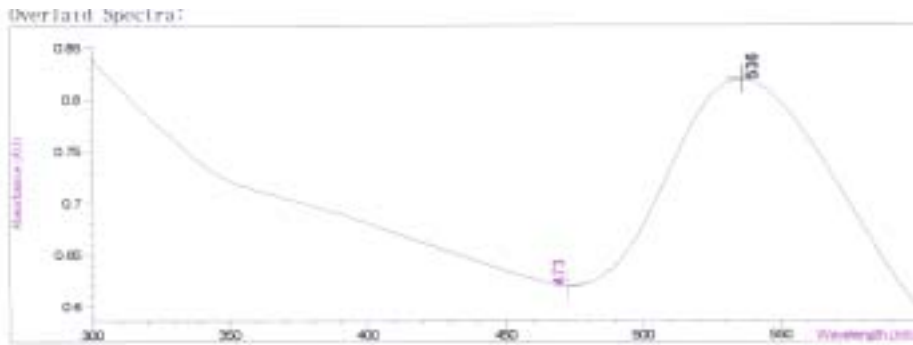


Fig.. 21. Absorbance spectrum of 40nm colloidal gold.

전자현미경으로 검경하였을 때 Fig.22에서와 같이 각각 40 nm 및 20 nm 구경의 입자가 확인되었다. 제조된 colloidal gold 부유액은 현장적용 측정 방법으로서 Immunochromatographic assay kit의 Gold-Ab 접합체로 사용이 적합한 것으로 사료되었다.

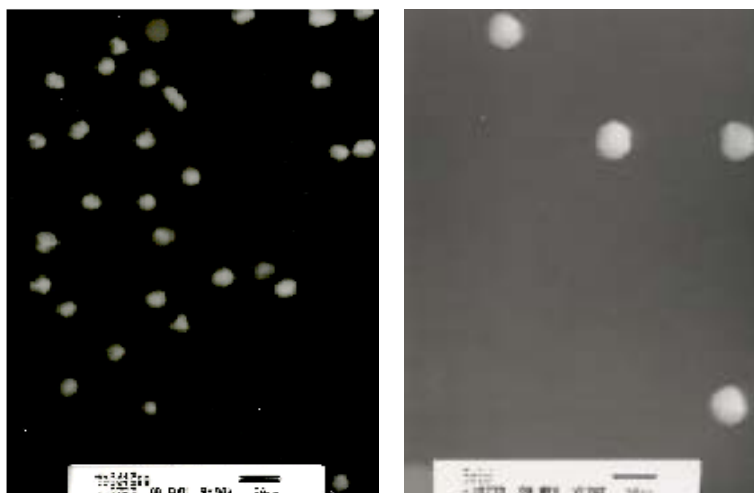


Fig.. 22. Transmission Electron Micrograph of 40 nm& 20 nm Gold Colloid.

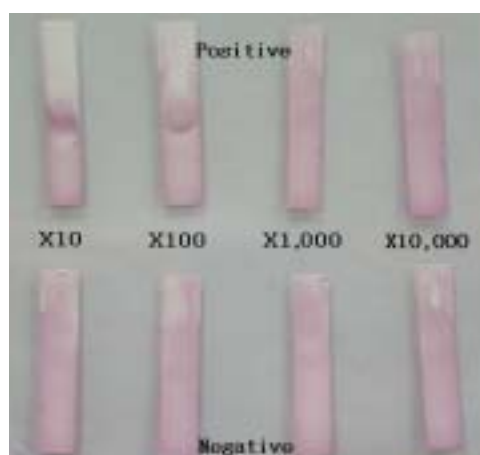
## 2) MAb-Gold 접합체의 검출한계

Gold-Ab 접합체를 위한 antibodies pair는 ELISA에서 결정한 S15 와 S28을 적용하였다. S28 MAb를 약 3 mm 폭으로 오려 낸 NC paper에 1  $\mu$ l 점적하여 건조시킨 후, S15-gold 접합체와 솜땀이 혈청을 적당한 비율로 혼합한 액에 담그어 막상으로 전개시켰을 때 Fig. 23과 같이 Vtg 양성 혈청  $\times 1,000$ 배 희석 액까지 검출반응이 나타났다.

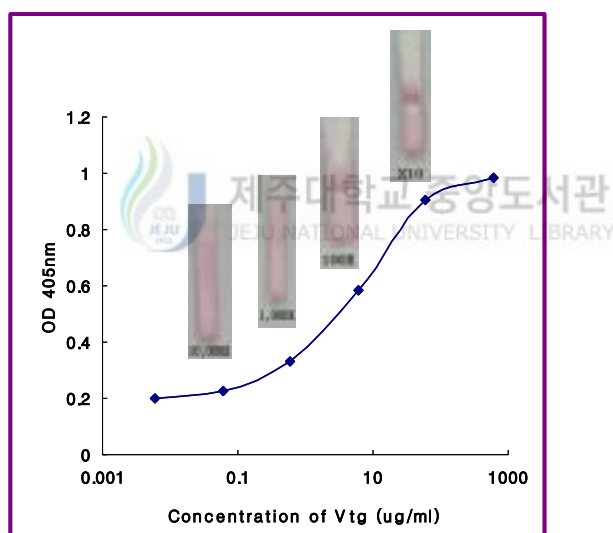
### 3) 민감도 및 특이도

SDS-PAGE로 검사하였을 때 Vtg이 양성인 혈청 5건과 제주도 사계 근해에서 포획한 비 산란기의 쏨뱅이 혈청 9건을 검사하여 조사한 민감도와 특이도는 각각 100%였다. 그 결과에 따른 비교표를 Table 7에 나타내었다. ELISA의 민감도 및 특이도의 비교 시와 마찬가지로, 아직까지 Vtg를 정성 및 정량의 공인검사법이 제시되어 있지 않고 있으나, 문헌상의 연구결과는 SDS-PAGE를 통하여 Vtg형성을 확인하고 있기 때문에 reference method로서 SDS-PAGE의 결과와 비교하였다. 특히, 민감도 특이도가 공히 100%를 보이는 이유는, E<sub>2</sub>에 의하여 합성이 유도된 실험동물의 혈중에는 상대적으로 고농도의 Vtg가 존재하기 때문이며, E<sub>2</sub>에 의한 합성유도가 없을 경우에는 전혀 Vtg가 존재하지 않기 때문인 것으로 사료된다.

또한 Fig. 24와 같이 ELISA와 ICG법으로 검사한 결과에서 그 검출 한계를 비교한 결과, ELISA인 경우는 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 까지 검사가 가능함을 보였으나 ICG법에서는 1  $\mu\text{g/ml}$ 까지 검사가 가능함을 보여 예민도에서는 ICG법에서 떨어지나 현장에서 특별한 기기를 이용하지 않아도 screening test가 가능한 이점들이 있어 이를 활용한다면 효과적인 역학조사가 될 수 있을 것으로 본다.



Fig, 23. Immunochromatographic assay for the detection of Scorpion fish' Vtg.



Comparison of Detection limit between ELISA and ICG

Fig. 24. Comparison of detection limit between ELISA and ICG.

Table 7. A comparison of SDS-PAGE & ELISA test

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

가. Sensitivity:  $5/(5+0)*100= 100\%$  나. Specificity:  $9/(9+0)*100= 100\%$

## 7. *In vitro* 검출계

### 1) 간세포 1차 배양

썸뱅이의 간세포는 collagenase에 의해 분리되어 배양 1일에는 대부분이 단일세포로 되어있고 배양 bottle바닥에 부착되어 있지 못한 세포도 관찰되나 배양 2일부터는 살아있는 세포 대부분이 바닥에 부착되어 2~3개의 세포로 증식되는 것이 관찰되었다. 그리고 배양 3일에는 배양 2일보다 세포증식이 많이 일어나 세포가 덩어리진 것이 관찰되며 배양 5일에는 증식되었다가 죽은 세포덩어리도 관찰되었다(Fig. 25).

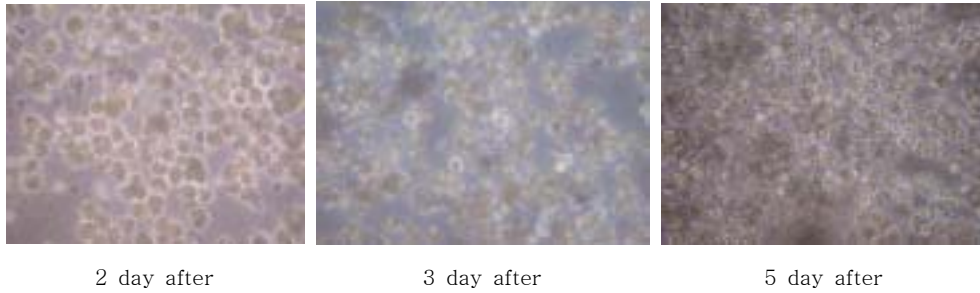


Fig. 25. Liver cells cultured in L-15 medium.

## 2) 동결조건의 비교

동결보관하며 필요시 적시에 검사 kit의 형태로 사용자에게 제시하기 위하여, 솜뱅이 간세포의 동결보존 조건을 조사하였다. 간세포의 동결실험은 실험 4구를 설정하여 실시하였다. 동결보존 전 세포는  $2 \times 10^6$ 개를 사용하였다. 실험구 1은 완속동결구로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간을 보존한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 그리고  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 최종보존을 하는 구로서 보존 후 세포의 수는  $9 \times 10^5$ 개로 약 75%의 감소를 나타냈다. 실험구 2는 급속동결구로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 보존한 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 로 바로 보관하는 구이다.

실험구 2에서는 그 생존율이 더욱 감소하여 80%의 감소를 나타내었다. 즉  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서의 간세포의 보존은 그 생존율이 극히 낮아지는 것으로 여겨진다. 그러나 액체질소에 최종 보존한 완속동결구인 실험구 3과 급속동결구인 실험구 4에서는 각각 생존율이 약 32.5% 및 30%의 감소를 나타내어  $-80^{\circ}\text{C}$  보존 실험구보다  $-80^{\circ}\text{C}$ 를 걸쳐  $-196^{\circ}\text{C}$ 보존하는 방법이 더 높은 생존율을 나타내었다. 이러한 결과로 계대배양이 이루어지지 않는 간세포를 보존하여 다양한 실험에 이용할 수 있을 것이라고 여겨진다.

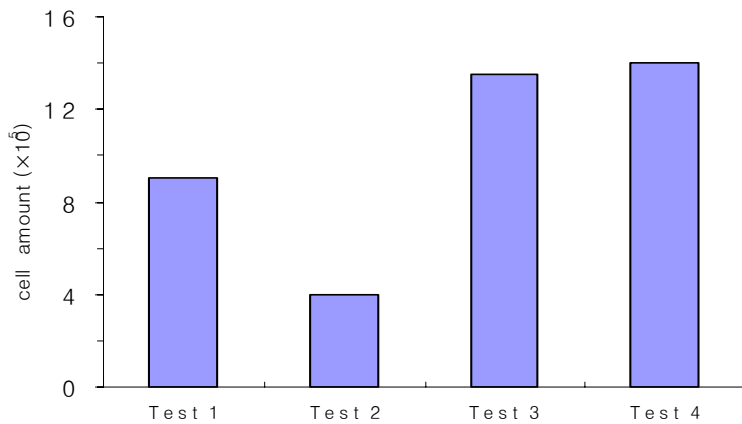


Fig. 26. A survival rate of liver cells after culture in freezing preservation.

### 3) 동결보존제 농도의 비교

동결보존액에 따른 간세포의 생존율은 Fig, 25와 같다. 간세포의 생존율은 동결보존제의 사용 전에는 82.3%를 나타내었다. DMSO의 15%가 가장 높은 51.3%를 나타내었으나, 10% 첨가구와 유의한 차이를 나타내지 않았고 5%의 첨가 구에서는 가장 낮은 생존율을 나타내었다.

안정적인 동결보존제로 알려진 1차 실험의 결과에서 액체질소에 최종 보존한 완속동결구인 실험구 3과 급속동결구인 실험구 4에서는 Fig. 26과 같이 각각 생존율이 약 32.5% 및 30%의 감소를 나타내어 -80℃ 보존 실험구보다 높은 생존율을 나타내었다.

이러한 결과로 토대로 동결보존의 경시적 경과에 따른 생존율의 변화를 조사하였다. 그 결과 완속동결법(Fig.26)을 이용한 방법 및 급속동결법(Fig. 27)을 이용한 방법에서 경시적인 변화에 따른 생존율의 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다.



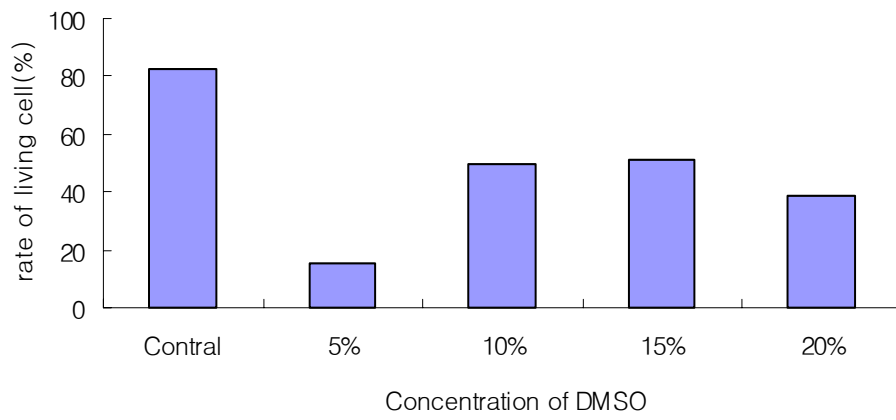


Fig. 27. A survival rate of liver cells using different DMSO concentration.



Fig. 28. A survival rate of liver cells using slow freezing preservation

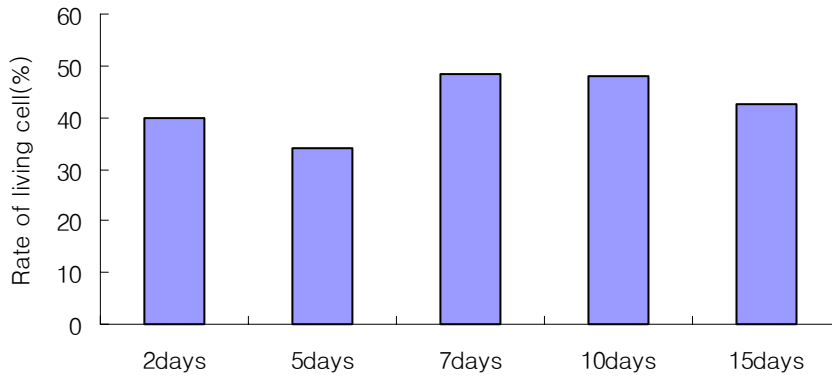


Fig. 29. A survival rate of liver cells using quick freezing preservation

Fig.28과 29는 각각 완속동결 보전과 급속동결 보전에서의 생존일수를 비교한 그림으로 완속동결 보전에서는 15일까지 보전하더라도 그 생존율이 50%를 상회함을 보였고 급속동결 보전에서는 7일과 10일에서 제일 높은 생존율을 보이면서 그 유의성은 없는 것으로 나타났다.

#### 4) *In vitro* 분석계의 확립

Full sheet 형성이 확인된 Liver cell 배양 well에 내분비교란물질로 의심되는  $E_2$ 를  $\times 10^{-6}$ 를 희석하여 투여하고, 2,4-D농약을 각각  $\times 10^{-8}$ ,  $\times 10^{-7}$ ,  $\times 10^{-6}$ ,  $\times 10^{-5}$ 배로 희석한 농약을 첨가하고 배양액을 0, 3, 6 및 9일째 회수하여 SDS-PAGE분석한 예를 아래 Fig. 29에 나타내었다. 이 Diethylstilbestrol은 Estrogenic EDs로서 잘 알려진 물질로 170 kDa 부근에 Vtg 형성이 확인되었고 2,4-D 농약에서는 가장 농도가 낮은  $\times 10^{-8}$ 에서 170 kDa 부근에서 Vtg가 형성됨을 확인하였다. 이로써 간세포배양을 통한 *In vitro* system은

미지 물질의 내분비 교란 여부를 확인함에 있어서 적합하고, 유용한 방법으로 사료되며, 배양 상층액을 취하여 개발된 ELISA 및 Immunochromatography에 적용함이 더욱 편리할 것으로 사료된다.

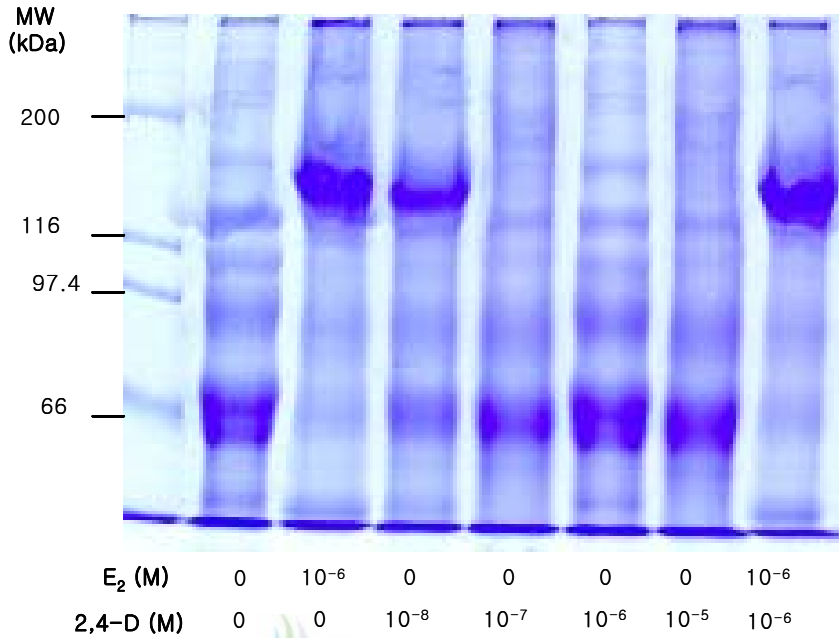


Fig. 30. SDS PAGE profile of culture supernatant after treatment of  $E_2$  and 2,4-D.

## IV. 고찰

많은 화학물질 중 내분비장애를 유발할 수 있는 물질을 구별해 내기 위하여, 현재도 규제를 받고 있는 유해화학물질, 농약, 천연 에스트로겐, 영양보조식품, 화장품 등을 포함한 86,000개 이상의 화학물질의 검색과 시험대상의 우선순위 물질로 연구를 진행하기 위한 선행연구는 먼저, 어떤 화학물질이 내분비계 장애 물질로 작용하는지를 알아내기 위한 선별 시험방법의 결정 및 이 화학물질에 피폭된 정도를 알아내기 위한 시험방법의 고안과, 결정된 선별 시험방법을 입증하기 위한 방안 및 선별시험방법을 적용 시험한 후에 어떠한 추가적인 확인시험이 필요한가에 대한 연구이므로 (황 등, 2001), EDs 검색에 요구되는 시험방법의 개발은 1차적인 필요사항이 아닐 수 없다.

그러나, EDs 검색방법은 특정전문연구기관에서만 가능한 전문적인 기자제와 기술에 의존하고 있는 것이 국내외적으로 공통적인 현황이며, 현재 일반 산업현장이나 연구기관에서 손쉽게 적용할 수 있는 측정 kit의 개발은 이루어져 있지 않은 것이 현실이다.

한편, EDs의 작용에 반응하여 일반적인 반응을 나타내는 소위 Bio-marker system이 있다면 대상물질이 가질 수 있는 미지의 내분비 교란성을 확인하는데 유용한 방법이 될 수 있을 것이며, 본 연구에서 다루고 있는 ‘어류의 Vtg 합성유도계’와 ‘Vtg정량 및 정성 kit’은 이러한 목적에 적용시키기에 적당한 도구가 될 수 있다(Brion *et al.*, 2000; Pait *et al.*, 2003).

난황성분의 전구물질인 Vtg은 원래 산란기 암컷의 간세포에서 합성되는 물질인데(Pan *et al.*, 1969), 이는 여성호르몬인 Estradiol의 작용에 의한 것으로 알려져 있다. 어류의 간세포에서 합성된 Vtg은 난모세포에 흡수되어 Cathapsin D효소계의 작용에 의하여 Phosvitin, Lipovitellin 및  $\beta$ -component로

분해된다고 하였으며(Wiley, 1979; Qallace, 1980; Hara, 2001), 본 연구에서도 E<sub>2</sub>를 투여한 쏘뱅이의 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).

이는 E<sub>2</sub> 유도에 의하여 발현된 Vtg의 양상을 보고한 이전의 보고들과 같은 맥락의 결과였다(Joseph *et al.*, 1996; Xutong *et al.*, 2001; Watts *et al.*, 2003).

또한 본 연구에서 얻어낸 monoclonal antibody들이 이들 각각의 어느 구성성분들과 반응하는 지를 확인하기 위하여 혈청과 알 단백을 reduction 조건에 따라 SDS-PAGE로 영동한 후, western blot 분석을 실시한 바 E<sub>2</sub>처리한 혈청과 산란기에 채취한 난황에서, 175 kDa의 위치를 비롯하여 작은 분자량의 구성성분으로 여겨지는 기타의 밴드와 반응하여, 뚜렷한 차이를 확인하지 못하였다.

이러한 결과로 미루어볼 때, 혈청내의 Vtg 단백질은 환원조건에도 불구하고 명확하게 구성성분의 분리가 이루어지지 않았던 것으로 판단되며, 알단백의 경우는, 쏘뱅이 알의 채취시기가 산란 초기였던 12월 초순으로 판단되었다.

ELISA 및 ICG kit에 적용할 쏘뱅이의 Vtg 특이항체를 유도할 면역원을 순수분리하기 위하여, 이전의 연구자들이 (Winter, 1992; Venugopal *et al.*, 1999; Brion *et al.*, 2000; Thybauaud *et al.*, 2000) 적용한 gel filtration 및 Ion exchange chromatography방법을 사용하여 실험한 결과, 만족할 만한 정도의 정제된 쏘뱅이의 Vtg를 얻을 수 있었으며, gel filtration법을 이용하여 표준 molecular marker와 비교한 쏘뱅이 Vtg의 분자량은 약 440 kDa로 측정되었다.

이는 Johnsen 등 (1999)이 경골류에서 Vtg의 분자량은 대략 300~600 kDa 범위라고 밝힌 것과 같은 범위의 값이다.

한편, 8종의 쏘뱅이 Vtg에 대한 단 클론 항체들은 공시한 어류 중 우럭

의 혈청과만 교차반응을 보였는데, 이는 쏘뱅이와 우럭이 같은 과에 속하는 어종인 것으로 사료된다. 접합체 희석조건은 Fig. 14에서와 같이 충분한 반응에 필요한 접합체의 양을 결정하기 위한 실험으로 희석단계에 따른 표준 반응곡선이 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 특이항체의 정제도가 높았음을 시사한다.

최적의 Antibody pair를 선정하기 위한 조건의 조사는 그림 15과 16에 나타난 바와 같이 불안정한 subunit로 구성된 Vtg 분자의 특성을 고려하여 실시하였다. 즉, 동결과 해동을 반복하여 비교적 subunit가 분리된 혈청과, 혈청분리 후 즉시  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 상대적으로 간에서 합성되어 혈중에 분비된 원형의 상태를 유지하고 있는 혈청을 동시에 공시하여 비교하였다.

검사혈청, 즉 어떠한 상태의 Vtg을 측정 할 때도, OD 1.0 이상의 반응을 보이는 조합은 S28을 capture로 사용하고 S15를 tracer로 사용할 경우로 나타났다. 그리고 Vtg분자의 구성특성으로 미루어 볼 때, 원형상태뿐 아니라 분리된 상태의 Vtg도 sandwich 형태의 결합이 같은 정도로 일어나는 S15 및 S28의 epitope라면 동일 subunit 분자의 서로 다른 부위와 결합하는 것으로 생각된다.

또한 동일 subunit 간의 결합 및 해리에도 관련이 없는 부위일 것이므로, 이에 합당하는 분자는 약 175 kDa의 분자량을 갖는 lipovitelline이 가장 적합할 것으로 추론할 수 있겠다.

결정된 MAb-pair에 의한 ELISA를 실시하였을 때, 적어도 1.0 ng/ml의 Vtg까지 검출이 가능하였음을 보여주었다.

이러한 결과를 이전에 보고한 연구자들의 결과들과 비교하여 볼 때

ELISA에서 Vtg의 검출한계는 Sherry 등(1999)이 10.5 ng/ml, Steven 등(1996)은 송어의 혈장에서 working range는 10~100 ng/ml이며 예민도는 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 를 나타내었고, Lomax, 등(1998)은 혀 가자미에서 working range는 10~450 ng/ml를, Sherry 등(1999)은 송어의 working range는 25~500 ng/ml이며 예민도는 10.5 ng/ml를 보인다고 했다.

한편 Steven 등(1996)이 주장한 검출 한계의 범위는 유사하였으나 예민도는 Steven 등(1996)이 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 을, Sherry 등(1999)은 10 ng/ml을 주장하고 있고 Johnsen, (1999)도 검출 한계를 2 ng/ml를 선임연구에서와 비슷한 결과를 보이고 있다.

그러나 Vtg 발현의 특성상 다량의 발현 혹은 전무한 발현의 양상을 띠므로 실용적인 측면에서의 비교는 의미가 없을 것으로 사료된다. 또한 예민도는 Sherry 등(1999)이 주장한 예민도 10.5 ng/ml보다 더 작은 검출 범위를 보이고 있어 기기분석 이상의 검출할 수 있는 능력을 보여 준다고 할 수 있다(Suxanne *et al.*, 1999).

Lee 등(2002)은 어류의 Vtg의 측정은 가능한 어류의 혈액에서 측정하는 것이 바람직하며 간 조직이나 기타조직에서는 타 단백을 함유하고 있어 오차범위를 더 크게 할 수 있을 여지가 있다고 한다고 주장하고 있어 예민도에서는 매우 낮은 농도에서도 검출이 가능하나 조직 중에 타 단백질에 의한 방해 또는 오차를 일으킬 수 있기 때문에 순수한 혈청에서 검사함이 타당할 것이며 이에 대한 심도 있는 연구가 필요 할 것으로 사료된다.

이러한 양상은 민감도와 특이도 확인을 위하여 비교한 표준 시험법으로서 감도가 낮은 SDS-PAGE를 채택한 점에서부터 불충분한 공시 시료를 대상으로 검사하여 공히 100%를 보인 것과도 같은 의미의 결과이다. 또한 이러한 상황은 ICG의 경우에도 동일하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

한편 효율적인 역학조사를 위해서는 일반적으로 현장에서의 질병진단 및 생리적인 변화를 진단하기 위한 방법으로 면역학적인 방법을 이용한 신속

진단법이 이용되고 있다(Paek 등, 2000).

이는 음전하를 가진 비 친수성 액체인 Colloid gold는 단백질과는 비 공유적으로 결합하므로써 면역 글로브린과 같은 거대분자들은 적색의 colloid gold와 결합되는 원리로 Vtg와 같은 면역글로브린과 결합한 colloid gold입자가 점점 커짐에 따라 항원분자와 결합되는 것을 직접 관찰 할 수 있는 응용한 (Haasnoot *et al.*, 1996) ICG법으로 검출한계는 ELISA법과는 각각 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 차이가 있지만 전자는 편리성과 신속성에서 유용함을 보여 주므로 현장에서 신속히 검사 할 수 있는 방법으로 이를 상품화 연구를 통한다면 역학조사에 용이하게 사용이 가능 할 것으로 사료된다.

한편, 합성수지를 이용한 생활용품들의 원료물질인 Bisphenol, phthalate 등은 특수한 환경이나 상황에서 용출되어 EDs로 역할하고 있음이 이미 밝혀져 있으나(이 등, 2002) 조건이 일률적이지 않을 것이므로, 이러한 합성수지를 기반으로 상품을 제조하는 사업체에서는 품질관리를 위한 EDs 용출시험을 수행하여야 할 것이다.

또한, 미지의 물질이 EDs의 여부를 확인함에도 사용될 수 있는 이 분석법을 응용하기 위해서는 검사 system이 필수적이다.

그러나, 연안의 해저에 서식하는 쏨뱀이 등을 수조로 옮겨 사육하며 시험물질을 투여하여 혈중의 Vtg를 측정하는 방식은 매우 힘들고 비경제적이라 현실성이 없는 방법으로 생각된다.

그러므로 Vtg의 합성기관인 간장으로부터 분리한 세포를 이용하는 것이 보다 손쉬운 방법으로 여겨진다. 이 또한 간세포는 계대배양이 불가능한 기관에서는 필요할 때마다 개체로부터 간세포를 분리해야 하는 번거로움이 있다.

따라서 본 연구에서는 세포의 동결보존법을 응용하여 간세포동결보존을 시도하였다. 그 결과 액체질소에서의 장기보존의 가능성이 제시되었으며, 일반적인 정자 및 난자 등의 동결보존과 유사한 보존 방법을 통하여 동결 간세포 kit의 형태로 제공할 수 있을 것으로 판단된다.



이러한 동결 간세포 kit는 현장에서의 편리한 적용성을 높여 손쉽게 내분비 교란에 관한 연구 및 검정에 활용이 가능하므로 추후 추가적인 'in vitro 동결 간세포 냉동보존 조건'에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

이처럼 ELISA법은 OECD의 화학물질 가이드라인에 ELISA kit를 이용한 Vtg검사방법이 접근하고 있어 머지않은 시기에 공식적인 인정이 예측되고는 있지만 검사의 결과를 도출하기 위해여서는 시.공간적 제약과 역학의 본래 목적인 screening test에 만족 할 수 없는 단점을 보완하기 위해서는 보다 간편하고 신속한 검정 방법 개발이 필요 할 것으로 사료된다.

본 연구에서도 이러한 점을 보완하기 위해서 ICG kit와 in vitro검출계를 통하여 그 예민도는 다소 떨어지나 어디에서도 간단한 실험기구를 통하여 screening test를 실시 할 수 있는 방법을 하나로 추가적인 연구를 통하여 kit개발, 상품화가 된다면 시.공간적 제약 없이 보다 다양한 방법을 통하여 동시 다발적으로 지역과 시간의 한계를 극복할 수 있어 역학조사에 기여 할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 본 연구는 에스트로겐성 효과를 검정하는 Vtg 검정방법을 국내에서 확립하여 최근 문제가 되고 있는 여러 가지 내분비계 장애물질의 위해 가능성에 대한 연구기반을 구축하고 향후 국내에서의 Vtg 검정법을 확립하기 위한 기초연구가 될 것으로 사료된다.

특히 여러 가지 복잡한 기기 분석방법에만 의존하는 검사방법(Nakada *et al.*, 1999)을 면역학적인 방법인 솜뿔이 Vtg을 Bio-marker로 이용, 보다 간편하고 효과적인 역학 조사의 방법을 제시 할 수 있을 것이며 환경오염의 모니터링을 위해서는 다양한 분야에서 Vtg을 쉽게 모니터링 해야 할 필요성에 따라 현장 신속 측정방법을 개발하고 실용화를 통해 앞으로 환경오염 물질의 역학 조사에도 동 기법들을 이용하므로 국가적으로도 동 물질의 인체 유입경로를 비롯한 위해 요소를 사전 차단 할 수 있는 계기가 될 것으로 본다.

한편 수계 환경변화의 실태에서 보면 폐기물법의 개정으로 하수처리 오니

를 공해 상에 처리 할 수밖에 없고 Alkyphenol의 생산과 사용금지를 할 수 없다면 해양환경은 연.근해를 막론하고 내분비계 장애물질에 노출될 수밖에 없다 할 것이다.

이외 다른 내분비계 장애물질이 계속적으로 수 환경이 오염되어지는 상황에서 이를 검출할 수 있는 방법을 개발하고 상용화를 위한 기초적 단계로 바다환경 중에서도 근해의 일정한 장소에 장기적으로 정착하는 쏘뱅이 Vtg을 검출 할 수 있는 방법을 개발함으로써 단기적으로는 Alkyphenol과 같은 물질의 생산과 사용 중단의 요구에서부터 장기적으로는 내분비계장애 물질의 전체적인 제어가 가능한 이론적 논리 개발에 일조를 할 수 있을 것으로 사료된다.



## V. 결 론

환경 중의 내분비교란물질을 검출하기 위한 Bio-marker의 개발을 위하여 근해 정착성인 어류인 쏨뱅이 (*Sebaitiscus marmoratus*)에 Estradiol 제제를 복강 내에 투여하여 Vtg합성을 유도하였으며, 쏨뱅이 혈청 중의 Vtg를 gel filtration법과 ion-exchange chromatography법으로 순수분리한 후 BALB/c 마우스에 면역시켜 쏨뱅이 Vtg 특이 단 클론 항체를 분비하는 잡종세포주를 개발하였다.

쏘뱅이 Vtg에 대한 특이 단 클론 항체 pair를 Horse-radish peroxidase 혹은 40 nm구경의 colloidal gold에 접합시켜 tracer로 이용하거나, micro-ELISA plate 혹은 Nitrocellulose paper에 흡착시키고 ELISA 및 Immunochromatographic assay system의 최적조건을 조사하였다.

또한, 단층 배양한 쏨뱅이의 간세포에 검사물질의 용출 액을 가하여 Vtg 합성유도 여부를 검사할 수 있는 *in vitro* 검출계를 구축하기 위한 동결 및 동결보존재의 조건을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 쏨뱅이에서 합성된 Vtg는 SDS-PAGE로 분석하였을 때, 175 kDa의 주된 단백질 분획이 확인되었으며, 그보다 다소 작은 분자량을 보이는 부수적인 단백질 분획이 확인되었다.
2. Sepharose CL-6B를 이용한 gel filtration 법을 통하여 측정된 쏨뱅이의 Vtg는 약 440 kDa으로 확인되었다.
3. 개발된 8종의 쏨뱅이 Vtg에 대한 단 클론 항체는 우럭을 제외한 모든 공시어종의 혈청과 교차반응을 보이지 않았다.

4. ELISA를 통한 Vtg의 검출 한계치는  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였으며, SDS-PAGE와 비교한 민감도와 특이도는 100%를 나타내었다.
5. ICG법을 통한 Vtg의 검출 한계치는  $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 였으며, SDS-PAGE와 비교한 민감도와 특이도는 100%를 나타내었다.
6. *In vitro* 검출계 개발을 위한 간세포 동결보존제 농도는 DMSO 15%의 조건일 때 약 51.3%의 생존을 보였으나 10% 농도의 경우와 유의한 차이를 보이지 않았다
7. 세포동결을 위한 완속동결법과 급속동결법은 세포생존을 각각 32.5%, 30%를 나타내어 유의한 차이를 보이지 않았다.
8. Liver cell 배양 well에  $E_2$ 를  $\times 10^{-6}$ , 2,4-D 농약류를  $\times 10^{-8}$  희석 후 cell 배양액에 투여, 일정기간 배양 후 상층액을 SDS-PAGE로 확인 한 결과, 170 kDa 인근에서 밴드확인, *In vitro* 검출계 개발의 가능성이 확인되었다.

이상의 결과를 통하여 개발된 분석법은 환경중의 내분비교란물질오염과 각종 생활도구로부터 이입될 가능성이 있는 미지의 내분비교란물질의 검출과 이의 오염을 예방하기위한 Bio-marker로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## VI. 참고 문헌

Akihiko, H. and Hirai, H. 1977. Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., Vol. 59B 339~343.

Andrew, E.G., Grizzle, J.M., Barbara, J.T. and Estridge, H. 1992. Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish(*Ictalurus Punctatus*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 101 B, No. 3. 441~446.

Anthony, S.P. and Nelson, J.O. 2003. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus*(killifish) induced by selected estrogenic compounds. Aquatic Toxicology. Vol. 64 Issue 3 20 August 331~342.

Batley, G., 1996. The distribution and fate of tributyltin in the marine environment. In: Tributyltin, CAMBRIDGE, pp 152.

Beesley, J.E., 1989. Colloidal Gold: A new perspective for cytochemical marking. Microscopy Hand books 17, pp. 5~12, Royal Microscopical Society. UK.

Bodil, K. and Pedersen, K.L. 1998. Vitellogenin in Zoarces: Purification, quantification by ELISA and induction by estradiol-17 $\beta$  and

4-nonyphenol. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 120, 159~166.

Bon, E., Barbe, U., Rodriguez, J.N., Cuisset, B., Pelissero, C., Sumpter, J.P. and Menn, F.L. 1997. Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*): Establishment and Validation of an ELISA. Comp. Biochem. Physiol Vol. 117B. No.1 75~84.

Brion, F., Fracoise, R., Patrice, N., Ernard, M., Patrick, F., Erichybaudaud, T. and Jean-Marc, P. 2000. Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon(*Gobio gobio*) and chub(*Leuciscus cephalus*). Journal of chromatography B. 737, 3~12.

Brion, F., Fracoise, R., Patrice, N., Ernard, M., Patrick, F., Erichybaudaud, T. and Jean-Marc, P. 1999. Functional interactions between the estrogen receptor and the transcription activator Sp1 regulate the estrogen-dependent transcriptional activity of the vitellogenin A1 promoter. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 272. No 29. 18, 250-18, 260.

Bucci, F., Zito, G.R., Falasca, R., Federico, G. and Verdina, A. 1998. Identification of optimal conditions for detection of benzo(a)pyrene-DNA adducts by enzyme linked immunoadsorbent assays (ELISA).Anticancer Res. 1998. 18(4A): 2,669-2,674.

Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. and Meier, T. 2000. Nonyphenol affects the granulation pattern of epidermal mucous cells in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol Environ. Saf.* 46(1) 34-40.

Charles, R.T., Aerle, R.V., Hutchnson, T.H., Maddix, S. and Trip, H. 1999. An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 18. No.2. 337-347.

Copeland, P.A., Sumpter, J.P., Walker, J.K. and Croft, M. 1985. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo Gairdneri* Richardson) at Various stages of the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.83. B, No. 2. 487-493.

Daniel, P.L., Roubal, W.T., Moore, J.D. and Johnson, L.L. 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for measuring vitellogenin in English sol(*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleurnectids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 121, 425~ 436.

Desbrow, G., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P. and Waldock, M. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fraction and in Vitro Biological Screening *Environmental science & technology* Vol. 32. No. 11 1,549~1,556

Dowson, P.H., Bubb, J.N. and Lester, J.N. 1993. A study of the partitioning and sportive behavior of butyltins in the aquatic environment. *App. Organomet Chem.*,7. 623~633.

Farmer, P.B., 1999. Studies using specific bio-markers for human exposure assessment to exogenous and endogenous. chemical agents. 16. 428: 69~81.

Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Ledrean, Y. and Valotaire, G. 1997. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction : vitellogenin and estrogen receptor genes. *Molecular reproduction and development.* 48. 317~323.

Gagne, F., Pardos, M. and Blasie, C. 1999. Estrogenic effects of organic environmental extracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 62(6): 723~730.

Gilles, F., Parzad, F. and Valotaire, Y. 1996. Transcriptional and transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 124. 173~183.

Grace, D.W. and Franz, E. 1997. The Biosynthesis and Processing of Vitellogenin in the Fat Bodies of Females and Males of the Cockroach *Leucophaea maderae*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology* , Vol. 27. No.11 , 991~998.



Haasnoot, W., Kim, K., Kang, C.G. and Kang, W.J. 1996. Evaluation of a sol particle immuno assay(SPLA) based single step strip test for the detection of sulfa dimidine residues. In Proceedings of the Euro Residue III conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, Veldhoven, The Netherlands, 6~8 May, pp. 461~465.

Hara, A., Yamauchi, K. and Hirai, H. 1980. Studies on female-specific serum protein(vitellogenin)and egg yolk proteins in rainbow trout(*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. B 65B, 315~343.

Hartling, R.C., Pereira, J.J. and Kunkel, J.G. 1997. Characterization of a heat stable fraction of lipovitellin and development of an immunoassay vitellogenin and yolk protein in winter flounder(*Pleuronectes americanus*). J. Exe. Zool.15. 278(3): 156~166.

Hartling, R.C. and Kunkel, J.G. 1999. Developmental fate of the yolk protein lipovitellin in embryos and larvae of winter flounder, *Pleuronectes americanus*. J. Exe. Zool.1. 284(6): 686~695.

Hansen, P.D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., McMaster, M. and Blaise, C. 1998. Vitellogenin a bio-marker for endocrine disruptors. Trends in an alytical chemistry. vol. 17. No.7. 448~451.

Helge, K.J., Helge, T., Willassen, P.N. and Arnesen, A.M. 1999. Arctic charr(*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an

enzyme-linked immunosorbent assay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. 124, 355~362.

James, A.M. and Oliver, J.H. 1997. Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, Vol.27. No.7. 639~649.

Jean, M.W., Rankouhi, T.R., Nichols, K.M., Komen, H., Kaminski, N.J. Giesy, P. and Berg, M. 1999. In vitro Vitellogenin Production by Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes a Screening Method for Determining (Anti) Estrogenic Activity of Xenobiotics. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 157. 68~76.

Jean, M.W., Rankouhi, T.R., Nichols, K.M., Komen, H.J., Sumpter, P. and Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a Bio-marker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environmental Health Perspectives*. 103. (Suppl 7): 173~178.

John, A.M. and Korach, K.S. 1995. Symposium on estrogen in the environment, III *Environmental Health Perspective* 103, Supplement 7, 3~4.

Joseph, G.K., 1996. Serum and egg vitellogenin measurement in the Atlantic cod *Gadus morhua* and its relationship to ovarian development. <http://www.wh.who.edu/library/sos94/spsyn/pg/cod.html>

Jule, E.H., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P. and Zaman, N. 1997. Estrogenic activity in five united kingdom river detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol.16. No.3. 534~542.

Kain, K., Bodil, K., Bjerregaard, P. and Jespersen, A.S. 2000. Effects of nonylphenol and 17 $\beta$ -oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular morphology male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *The Journal of Experimental biology*. Vol. 201.(2) 179~192.

Kenneth, S.K., and John, A.M. 1995. Techniques for detection of Estrogenicity. *Environmental Health Perspective* 103, Supplement 7, 5~8.

Ketil, H. and Carl, H. 1997. Effects of environmental estrogens on marine fish species. *Trends in analytical chemistry*. vol. 16. No.10. 605~612.

Knudsen, F.R., Schou, A.E., Wiborg, M.L., Mona, E., Tallefsen, K.E., Stenersen, J. and Sumpter, J.P. 1997. Increase of Plasma Vitellogenin Concentration in Rainbow Trout(*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to effluents from oil refinery treatment works and municipal sewage. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59. 802~806.

Lamnissou, K., 1996. Vitellogenetic defects in hybrids of the species pair *drosophila virilis* and *drosophila texana*.. *Developmental Genetics* , Vol. 18 No.4. 289~295.

Laughlin, R.B., 1986. Bioaccumulation of tributyltin : The link between environment and organism. In : Proceeding of the Oceans '86 Conference, 4. *Organotin symposium*, pp. 1,206~1,209.

Lazier, C.B. and Mackay, M.E. 1993. Vitellogenin gene in pression in teleost fish. Hochacka and Mommsen(EDs). *Biochemistry and molecular biology of fishes*. vol. 2 391~405.

Lee, R.F., Valkirs, A.O. and Seligman, P.F. 1989. Importance of microalgae in biodegradation of tributyltin in estuarine waters, *Environ. Sci. Technol.*,23. 1,515~1,518.

Lee, C.W., Park, E.R., Lee, M.S., Ryu, J.S., Nam, G.C., Koo, J., Jeon S. H. and Na, J.G. 2002. Studies on the Molecular Bio-markers for the Endocrine Disruption in Fish(III). Report of NIER, Korea Vol.24. 13~25.

Lee, C.W., Park, E.R., Lee, M.S., Ryu, J.S., Nam, G.C., Koo, J., Jeon, S.H. and Na, J.G. 2003. Studies on the Environmental Risk Assessment of Endocrine Disruption Using Bio-marker( I ). Report of NIER, Korea Vol. 25 13~28.

Leal, I., White, E.E., Sahota, T.S. and Manville, J.F. 1997. Differential expression of the vitellogenin gene in the spruce terminal weevil feeding on resistant versus susceptible host trees. *Insect Biochemistry & Molecular Biology* , Vol. 27 No. 6. 569~575.

Lifen, R., Aaron, M. and John, J.L. 1996. Dimethyl formamide(DMFA) and ethylene glycol(EG) are estrogenic in rainbow trout. *Chemico-Biological Interactions* 102. 63~67

Li, C.R., Kim, K.T., Kang, Y.J., Kim, A., Kang, S.W. and Park, J.S. 2005. A novel enzyme-linked immunosorbent assay system for the quantitative analysis of *Carassius auratus*. *Chemosphere* Vol. 59 Issue 7 May 997~1003.

Louise, G.P., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, A.J., LeBlanc, G.A. and Sullivan, C.V. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123, 113~125

Lovell, A.J. and Richard, A.H. 1995. Effects of estrogenic chemicals on development. *Environmental Health Perspective* 103, Supplement 7, 63~67.

Lomax, D.P., Roubal, W.T., Moore, J.D. and Johnson, L.L. 1998. An enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) for measuring vitellogenin in English sole(*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Com Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, Dec, 121: 4, 425~436.

Lucie, F. and Riazi, A. 1988. Biochemical analysis of vitellogenin from rainbow trout(*Salmo gairdneri*): fatty acid composition of phospholipids. *Reprot. Nutr. Develop.* 28 (4A) 939~952.

Maguire, R.J., Carey, J.H. and Hale, E.J. 1983. Degradation of the tri-n-butyltin species in water. *J. Agric. Food Chem.*, 31. 1060~1065

Mananos, E.S., Zanuy, F.L., Menn, M. and Nunez, J. 1994. Sea bass(*Dicentrarchus labrax L*)vitellogenin. I- Induction, purification and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B, 205-216.

Marcelo, M., Falchuk, K.H. and Vallee, B.L. 1995. Vitellogenin and Lipovitellin: Zinc Proteins of *Xenopus laevis* Oocytes. *Biochemistry.* 34. 10,851~10,858

Maitre, J.L., Catherine, L.G. Stephane, D., Martin, T. and Valotaire, Y. 1979. 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.

Michae, J.A., Hugh, O.S., Fumio, M. and David, E.H. 1996. In vitro Modulation of  $17\beta$  Estradiol-induced Vitellogenin Synthesis and Estrogen Receptor in Rainbow Trout(*Oncorhynchus mykiss*) Liver cells by  $\beta$ -Naphthoflavone. *Toxicology and Applied Pharmacology* 137, 210~218.

Moore, M., Mustain, M., Deniel, K., Chen, I., Safe, S., Zacharewski, T., Gillesby, B., Joyeux, A. and Balaguer, P. 1997. Antiestrogenic Activity of Hydrolyated Polychlorinated Biphenyl Congeners identified in Human Serum. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142, 160~168.

Mouchel, N., Valerie, T., Alexis, B., Pennec, J.P.L. and Wolff, J. 1996. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Gen 174 59~64.

Nathalie, M., Valerie, T., Ben, Y. N., Pennec, J.P.L. and Wolff, J. 1997. Structure of a fish (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin gene and its evolutionary implication Gene. 197, 147~152..

Nakada, N., Tomohiko, I., Hajime, N., Shinobu, T., Yamada, J., Kumata, H. and Takada, H. 1999. Broad-spectrum analysis of endocrine disruptors in environmental samples. *The Japan Society for Analytical Chemistry* Vol. 48 No.6 535~547.

Nilsen, B., Berg, K., Arukwe, A. and Goksoyr, A. 1998. Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring. *Marine Environ Res.* 46, 153~157.

Nimrod, A.C. and Benson, W.H. 1997. ENOBIOTIC INTERACTION WITH AND ALTERATION OF CHANNEL CATFISH ESTROGEN RECEPTOR. *Toxicology & Applied Pharmacology*, Vol. 147, No. 2, 381~390.

Norberte, K., Giesy, J.P. and Berg, M.V.D. 1999. In Vitro Vitellogenin Production by Carp(*Cyprinus carpio*) Hepatocytes as a Screening Method for Determining (Anti)Estrogenic Activity of Xenobiotics. Toxicology and Applied Pharmacology. 157, 68 - 76.

Olsson, P.E., Peter, K., Charlotta, P. and Christer, S. 1995. Interaction of cadmium and oestadiol-17 $\beta$  on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biochemi. J. 307.197~203.

Patricia, B.H., Thomas, W. and Willy, M. 2000. Nonyphenol affects the granulation pattern of epidermal mucous cells in rainbow trout. Ecotoxicology and environmental safety. vol.46. No. 1, 34~40.

Paek, S.H., Lee, S.H. Cho, J.H. and Kim, Y.S. 2000. Development of Rapid one-step immunochromatographic assay. Methods, 22. 53~60.

Pan, M.L., Bell, W.J. and Telfer, W.H. 1969. Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. Science. 165, 393~394.

Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Mones, A. and Fostier, A. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of Sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. General and comparative endocrinology 78, 361~373.

Reader, S. and Pelletier, E. 1992. Bio-sorption and degradation of butyltin compounds by the marine diatom *Skeletonema costatum* and



the associated bacterial community at low temperature. Bull. Environ. Contamination., 48. 599~607.

Ren, L., Lattier, D. and Lech, J.J. 1996. Estrogenic Activity in Rainbow Trout determined with a New cDNA probe for vitellogenesis, PSG5VG1.1. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56. 287~294.

Reis-Henriques, M.A., Ferreira M. Silva, L. and Dias, A. 2000. Evidence for an involvement of vitellogenin in the estrogenic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenic oocytes. Gen. Comp Endocrinol 117(2) 260~267.

Robert, L.R., Morin, Y., Courtenay, S.C. and Robichaud, P. 2004. Purification of vitellogenin from smooth flounder(*Pleuronectes putnami*) and measurement in plasma by homologous ELISA. Comparative Biochemistry and Physiology Part B :Biochemistry and Molecular Biology Vol. 139, Issue 2, October 235~244.

Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Morris, S., Kelly, C., Kirby, S., Janbakhsh, A., Harries, J.E., Waldock, M.J., Sumpter, J.P. and Tyler, C. R. 2000. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. Environmental Science & Technology. Vol. 34. No. 8 1,521~1,528.

Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brjghty, G.C., Waldock, M. and Sumpter, J.P. 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW

effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. Environ. Sci. Technol. 32. 1,559~1,565.

Ryu, B.H., 1999. Vitellogenin as a bio-marker of endocrine disruptor in the aquatic environment. Journal of food hygiene and safety. Vol. 14 (4) pp. 408~414.

Schwaiger, J. and Negele, R.D. 1998. Plasma Vitellogenin-a blood parameter to evaluate exposure of fish to xen-oestrogens. Exposure of fish to Xenestrogens.

Scott, A.H., Denslow, N.D., Folmar L.C. and Sullivan, C.V. 1995. Universal assay of vitellogenin as a bio-marker for environmental estrogens. Environmental Health Perspective 103, Supplement 7, 9-15.

Seligman, P.F., Valkirs, A., Stang, P.M. and Lee, R.F. 1988. Evidence for Rapid Degradation of Tributyltin in marina. Poll. Bull., 19(10). 531~534.

Sherry, J., Gamble, A., Fielden, M., Hodson, P., Burnison, B. and Solomon, K. 1999. An ELISA for brown trout(*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens. Sci. Total Environ, 225: 1~2, 13~31.

Shilling, A.D. and Williams, D.E. 2000. Determining relative estrogenicity by quantifying vitellogenin induction in rainbow trout liver slice. Toxicol Appl Pharmacol. May 1; 164(3): 330~335.

Shioda, T. and Wakabayashi M. 2000. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka(*Oryzias latipes*). *Chemosphere*. 40(3) 239~243.

Shilling, A.D. and Williams, D.E. 2000. Determining relative estrogenicity by quantifying vitellogenin induction in rainbow trout liver slices. *Toxicol Appl Pharmacol* 164(3): 330~335. 1~210.

Silvia, R., Batistuzzo, D.M., Grigorios, K., Abdelmadji, K.H., Water, W. and Ryu, B.H. 1999. Vitellogenin as a bio-marker of endocrine disruptor in the aquatic environment. *Journal of food hygiene and safety*. Vol. 14 (4). 408~414.

Smeers, J.M., Holsteijn, I.V. Giesy, J.P. Seinen, W. and Van den Berg, M. 1999. Estrogenic potencies of several environmental pollutants, as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. *Toxicol Sci* 50(2): 206~213.

Smeets, J.M., Rankouhi, T.R. Nichols, K.M. Komen, H., Kaminski, N. E. Giesy, J.P. and Van den Berg, M. 1999. *In vitro* vitellogenin production by carp(*Cyprinus carpio*) hepatocytes as a screening for determining (anti)estrogenic activity of xenobiotics. *Toxicol Appl Pharmacol* 15; 157(1): 68~76.

Steven, L.G., Robert, J.G., Gimothy, T.S., Nancy, P.D., Wade, L.B. and Trenton, R.S. 1996. Reconnaissance of 17 $\beta$ -Estradiol, 11-Ketotesterone, Vitellogenin, and Gonad histopathology in common carp of United States streams: Potential for contaminant-induced endocrine disruption. U.S. Geological Survey Open -File Report. 96- 627.

Suzanne, G., Nancy, D., Steve, M., Sue, B., David, B. and Marius, B. 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese Medaka(*Oryzias latipes*)exposed to 4-tetra-Octylphenol. Environmental Health Perspectives Vol. 107 No. 5, 385~390.

Sumpter, J.P., 1981. The purification and radioimmunoassay of vitellogenin from the rainbow trout(*Salmo gairdneri*). Abstr. ,Int. Symp. Comp. Endocrinol., 9th, pp 243.

Takahio, M., Nobutuki, O.,Tadashi, A., Sullivan, C.V. and Hara, H. 1999. 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. Developmental biology 213,18~32.

Takahio, M., Tokio, W. and Akihiko, H. 1994. Purification and establishment of ELISA for vitellognin of Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 109 B. No. 4, 545~555.

Theo, C., Frederick, S.V.S., and Ana, M.S. 1993. Developmental effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives*.101. (Suppl. 5): 378~384.

Thybaudaud, J. and Porcher, M. 2000. Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*),gudgeon(*Gobio gobio*)and chub(*Leuciscus cephalus*). *Journal of chromatography B* 737 3~12.

Tyler, C.R., and Routledge, E.J. 1998. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 70, No. 9, 1,795~1,804.

Venugopal, K.J. and Kumar, D. 1999. Vitellins and vitellogenins of *Bysdercu Koenigii*(*Heteroptera:Pyrrhocoridae*)-identification ,purification and temporal pattern. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 124, 215~223.

Winter, C.E., 1992. Rhabditid Vitellogenin purification. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 189. 257~264.

Wastson, C.S., Pappas T.C. and Gametchu, B. 1995. The other estrogen receptor in the plasma membrane : Implications for the actions of environmental estrogens. *Environmental Health Perspective* 103, Supplement 7, 41~50.

Watts, M., Pankhurst, N.W., Pryce, A. and Sun, B. 2003. Vitellogenin isolation, purification and antigenic cross-reactivity in three teleost species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 134, Issue 3, March 467~476.

Wiley, H.S., Lee, O.K. and Wallace, R.A. 1979. New Methods for Purification of Vertebrate vitellogenin. *Analytical Biochemistry* 97 145~ 152.

Xutong, S. and Shicui, Z. 2001. Purification and characterization of a putative vitellogenin from the ovary of amphioxus(*Branchiostoma belcheri tsingtaunese*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 129, Issue 1 May 121~127.

Yadette F., Arukwe, A., Goksoyr, A. and Male, R. 1999. Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon in vivo by the environmental estrogen, 4-nonyphenol. *Sci. Total Environ.* 15; 233 (1-3): 20.

Zuxu Y., and Laurence, W.C. 1996. A Biochemical characterization of vitellogenins isolated from the marine fish ocean pout(*Macrozoarces americans L.*), Lumpfish(*Cyclopterus lumpus*) and Atlantic Cod(*Gadus morhua*) *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 113 B. No.2. pp 247~253.

국립환경연구원, 2004. 환경이슈와 이해 3-6pp

국립환경연구원, 2005. 내분비계 장애물질 이해, 15~19pp

강경선, 1998. 내분비 교란성 화학물질(Endocrine disruptor Chemical)이슈에 관한 문제점과 선진제국들의 대응방안과 그 시험법의 제안. 일본국립의약식품위생연구소 보고서. pp.1~13.

강경선, 이영순, 1998. 환경호르몬 문제점과 향후대책: 내분비계 장애물질에 대한 국내의 대응현황에 대하여 pp. 8

강경선, 1999. 내분비계 장애물질에 대한 국외반응. 한국식품과학회지 32(2) pp.29~42.

민 병윤, 1999. 한일양국 환경호르몬의 현황과 대책. 제1차 한일먹거리포럼 p.15~20

안이선, 1998. Distribution and Bioaccumulation of Organatin Compounds Inside Cheju Harbor and Sonsan Harbor. Department of environmental engineering graduate school cheju national university. 4~5.

정의배, 2000. 환경에 노출된 에스트로겐성 화합물 검출을 위한 표지자로서의 Calbindin-D<sub>9k</sub>. The Korean Society of Toxicology. 5~7.

이광호, 박인신, 최재천, 정동윤, 전대훈, 김형일, 최병희, 김성욱, 이선희, 니철원, 2001. 식품, 기구 및 용기·포장 중 내분비계장애 추정물질인 알킬페놀류의 모니터링. 식약청연구원보

이영순, 1998. 내분비교란성(환란성)물질(Endocrine Disrupters,EDs)에 대한 최근의 연구동향과 우리의 대응방안.

이영순, 1998. 내분비교란성(환란성) 물질에 대한 최근의 연구동향과 우리의 대응 방안. 환경운동연합 토론회

이효민,윤은경,이근영,조연숙,홍영곤,김윤희,나현수,조문희,양지선,양기화, 2002. 내분비계 장애물질의 위해성 평가(IV). The Annual Report of KFDA Vol.6 767~768.

최의소, 조광명, 1985. 환경공학. 청문각 pp.12-13.

최덕일, 류홍일, 오경희, 이철우,이상협, 박응로, 1998. 내분비장애물질이란 pp. 9.

환경부, 국립환경연구원, 1999. 어류 및 양서류의 생태조사. '99내분비계 장애물질조사·연구사업 결과보고서,5pp

황대연,김용규,강태석,황진희,임채형,강현구,구준서,이미라,임화자,민세희, 조정식,채갑용,2001. 환경호르몬에 대한 *in vivo* 반응검색을 위한 인간화 동물의 개발. The Annual Report of KFDA Vol.5 751~757.



## VII. 요약

환경 중의 내분비교란물질 Screening을 위한 Bio-marker의 개발을 위하여 쏨뱅이 (*Sebastiscus marmoratus*) Vitellogenin(Vtg) 검출용 ELISA 및 Immunochromatography법을 개발하였다. 이를 위하여 쏨뱅이에 Estradiol을 투여하여 Vtg을 발현시켰으며, 혈중의 Vtg을 gel filtration법과 ion-exchange chromatography법으로 정제하여 BALB/c 마우스에 면역시킨 후 Vtg 특이 단클론 항체를 분비하는 잡종세포를 얻어내었다.

Sepharose CL-6B를 이용한 Gel filtration 법으로 측정된 쏨뱅이 혈청중의 Vtg는 약 440 kDa로 확인되었으며, SDS-PAGE로 분석하였을 때, 175 kDa의 주된 단백질 분획과 그보다 다소 작은 분자량을 보이는 부수적인 단백질 분획이 확인되었다.

개발된 8종의 쏨뱅이 Vtg에 대한 단클론 항체는 우력을 제외한 모든 공시어종의 혈청과 교차반응을 보이지 않았다. Capture 항체로는 S28, Tracer 항체로는 S15 단클론 항체를 선정하여 개발한 ELISA로는 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Vtg의 검출 한계치를 보였으며, ICG법은 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 보였다. SDS-PAGE의 결과를 표준으로 비교한 민감도와 특이도는 ELISA와 ICG법에서 공히 100%를 나타내었다.

또한, 쏨뱅이의 간세포 배양을 이용한 *in vitro* 검출계를 구축하기 위한 세포동결조건은 동결보조제인 DMSO의 농도 15%일 때 액체질소에 보관한 경우에 세포생존율이 가장 높았다 (51.3%).

이와 같이 개발된 분석법은 환경중의 내분비교란물질오염과 각종 생활도구로부터 이입될 가능성이 있는 미지의 내분비교란물질의 검출과 이의 오염을 예방하기 위한 Bio-marker로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

마치 긴 터널을 지나온 듯한 지난 연구의 나날들을 한 줄에 무엇이랴 답을까? 하는 고민에서는 답이 없었습니다. 학문을 하고자 들어선 길에 한점 후회 없이 마침표를 찍기 위해서 가느다란 끈을 놓아버리지 않고 계속 유지할 수 있었던 사실에 모든 분들에게 감사함을 전하고 싶습니다.

가훈으로 사용된 근자필성이란 문구를 아침저녁으로 마주하며 반성하고 긴장을 풀지는 않았지만 때로는 자포자기에 빠져 며칠을 전전긍긍 데다가 결국 하지 않으면 안 될 일하기에 다시금 필을 붙잡은 경우가 몇 번이었던지 모릅니다.

이러한 근원은 제주를 입도조로 자부하고 제주사랑이 남다르신 임 윤규 교수님의 애절한 제자 사랑에서 비롯되었음을 알기에 더더욱 감사한 마음을 올리고 싶습니다. 그리고 석사과정에서 연구의 열정을 가르쳐주신 제주대학교 명예교수님이신 김 승호 교수님의 지도도 한몫을 했으리라 사료되며 이 자리를 빌어 감사에 말씀을 드립니다.

이 논문이 인쇄되기 바로 직전까지 논문 감수를 위해 애써주시고 토씨 하나하나까지 신경을 써 주신 우 호춘 위원장님, 고 용구 원장님, 여 인규 교수님, 황 규계 교수님께도 깊은 감사의 말씀을 드리는 바입니다.

한편 논문이 집필되기 까지 실험실에서 묵묵히 실험을 도와주신 수의과학 검역원 김성희 박사님, 공중 보건학 교실 이기정양에게도 감사한 마음을 전하고 싶고 더 더욱 아빠의 논문실험을 위해서 기꺼이 한 학기를 휴학해준 아들 형준이에게도 보람있는 실습이 되었기를 빌면서 고마운 마음을 전하는 바입니다. 또한 원내 모든 직원들이 관심과 도움도 크게 작용했으나 특히 수질보전과 김 길성 연구사, 김 세라 연구사, 오 태권 연구사, 김 수미 연구사와 전 직원들에게도 논문을 제작하데 여러 방면으로 도움을 주심에 감사한 말을 전하는 바입니다.

늘 걱정만 끼쳐 드리고 부족한점이 많은 아들을 끝까지 지켜 보아주신 부모님께 이제 마음에 걱정을 조금이나 덜어 드리는 것 같아 다행스럽고 그 동

안 은혜에 감사를 드립니다. 여동생과 매제, 동생과 제수씨께도 그 동안 협조에 감사한 마음을 전하는 바입니다.

또한 늘 공부하느라 바쁜 사위를 바라보시는 심정은 답답했겠지만 그저 말없이 지켜보아 주신 장인, 장모님 그리고 늘 협조를 아끼지 않은 처남들과 처남댁, 처제들과 동서들에게도 고마운 마음을 전하는 바입니다.

끝으로 남들보다 길어진 학위과정을 염려하고 때로는 질타를 아끼지 않으면서도 묵묵히 내조해 준 사랑하는 아내, 강 양림님과 보다 넓은 세상에 발을 디디기 위해 부모 곁을 떠나 멀리 서울에서 기숙사 생활에 잘 견디어주는 딸, 선리와 이 기쁨을 함께 하고자 하며 마지막으로 아들 형준군이 실속 있었던 실습으로 앞으로 생명정보공학 공부에 디딤돌이 되어 주었으며 하고 바라는 바입니다.

