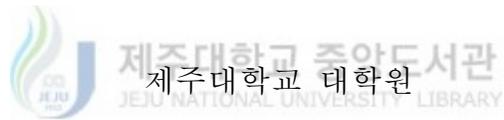


석사학위논문

넙치 비텔로제닌에 대한 단일클론항체



수의학과

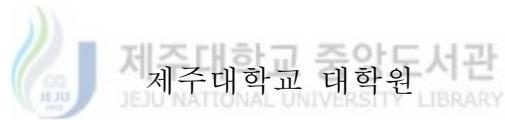
정 우 준

2003년

2월

석사학위논문

넙치 비텔로제닌에 대한 단일클론항체



수의학과

정 우 준

2003년

2월

넙치 비텔로제닌에 대한 단일클론항체

지도교수 임윤규

정 우 준

이 논문을 수의학 석사학위 논문으로 제출함



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2003년 2월

정우준의 수의학석사논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교대학원

2003년 2월

Monoclonal Antibodies to the Vitellogenin of Flounder(*Paralichthys olivaceus*)

Woo-Jun Jung

Department of Veterinary Medicine, Graduate School
Cheju National University,
Jeju, Korea

Abstract

Monoclonal antibodies against Vitellogenin(Vtg) of flounder(*Paralichthys olivaceus*) were produced to apply as the immunodetectors in biomarker system for the detection of environmental endocrine disruptors (EDs). Vtg was purified from the serum of the flounder by gel permeable chromatography after induction of Vtg by administration of estradiol intraperitoneally to the fish. BALB/c mice were immunized with the purified Vtg five times and the spleen cell were fused with the myeloma cell line (SP/2). Hybridoma clones secreting specific antibodies against Vtg were selected and propagated in the ascites of the pristane primed BALB/c mice. From the Ascites monoclonal antibodies against Vtg were purified and their binding properties were confirmed by western blot assay. Three IgG1 type and one IgM type monoclonal antibodies reacted specifically with the Vtg which was degraded into various size proteins in western blot assay. These antibodies could be applied as the usefull detectors of immunoassay for the detection of Vtg providing that optimum condition be set up.

Key words : Monoclonal antibody, Vitellogenin, Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

목 차

I. 서	론1
II. 재료 및 방법4	
III. 결	과9
IV. 고	찰 14
V. 참 고 문 헌 16	
VI. 요	약 21



I. 서 론

20세기에 급속히 발달한 화학산업에 의하여 양산된 비료, 농약 및 의약품 등은 인류의 복지 증진에 많은 기여를 해왔지만, 이들 화학물질 중에 유기염소화합물, 공업용화합물, 농약류, 유기취소(bromine)화합물, 중금속 및 유기금속, 식물 및 합성에스트로젠 등을 포함한 수십 종의 화합물은 최근에 커다란 문제가 되고 있는 소위 내분비계 장애물질(Endocrine Disruptors : EDs)로 의심되고 있다(이 등, 2002).

EDs는 내분비계의 정상적인 기능을 교란시키는 환경오염물질을 통칭하여 것으로서, 일본에서는 ‘환경호르몬’이라 불리기도 한다(최 등, 1998). 내분비교란물질은 독성이 높거나 특별한 화학물질이라기보다는 농약, 플라스틱 및 세정제처럼 일상생활에서 흔히 접할 수 있는 생활용품의 구성성분으로서, 이러한 물질이 자연계를 오염시키고 잔류하여 생물의 내분비계의 정상적인 기능을 방해한다고 한다(강과 이, 1998).

Bergeron등에 의하면 실험실용 플라스틱의 재료로 쓰이는 Bisphenol A는 사람에게 있어 에스트로젠 수용체(estrogen receptor: ER)에 결합하여 프로게스테론 수용체의 mRNA와 그 단백질을 발현시키며 자궁내막세포주에서 그 증식을 유발시켰다고 하였다(Bergeron *et al.* 1999). Farbolini등(1999)에 의하면, Rat에서 Bisphenol A는 비사회적 행동을 유발시킨다고 보고되었다. Ackermann등은 오랜 기간동안 Nonylphenol에 노출되었던 어린 무지개 송어에서 성선의 분화가 관찰되었음을 보고하였다(Ackermann *et al.* 2002).

이등(2002)은 EDs가 끼치는 영향의 end point가 종래의 독성과 같은 개체의 죽음으로써 끝나는 것이 아니고, 중의 멸종이므로 인간과 야생동물에 대한 영향을 고려해야한다고 보고하였으며 EDs의 연구 필요성이 증대되고 있다.

EDs는 성호르몬 유사작용을 일으키는 대표적인 피해가 보고 되고 있다(Bergeron *et al.* 1999; Ackermann *et al.* 2002). 현재까지 알려진 대부분의 환경호르몬은 불포화 벤젠고리를 가지며 분자크기는 매우 작아 분자량 300 Da 정도로, estradiol-17 β (E₂)를 비롯한 성호르몬과 유사한 점이 많음을 보고하였다(여와 최, 2000). 에스트로젠은 성성숙을 자극 또는 발현시키는 성스테로이드 호르몬으로(양 등, 2000) 각종 환경 오염물질에서 유래되는 각종 미량의 성분(산업용 화학물질의 원료, 살충제, 제초제, 농약류, 유기 중

금속류, 다이옥신류, 기타식품 및 식품 첨가물)들이 생체 내에 유입되어 마치 에스트로젠과 유사한 작용을 한다고 보고하였다(Korach, 1993; Stone, 1994).

EDs는 정상적인 성호르몬에 의해 유발되는 암컷에서만 합성되는 난황전구물질인 Vitellogenin(Vtg)이 합성되는 현상을 수컷에서도 일으킬 수가 있다(Korach, 1993; Stone, 1994; 여와 최, 2000). 그 예로, Allen등은 영국의 각 지역에 서식하는 넙치를 대상으로 조사를 벌인 결과 수컷 넙치에서 높은(>100,000 ng/ml) Vtg가 검출되었음이 보고하였다(Allen *et al.* 1999).

에스트로젠 유사작용을 유발시키는 내분비 교란물질의 대책으로서, 물질의 규정과 선별된 시험방법을 개발하고 그것을 적용하는 것이 현 시점에서 가장 필요한 연구일 것이다. 그러므로 이러한 물질들이 생체에 영향을 미칠 때 나타나는 현상으로 이들의 교란 작용의 유무를 스크리닝 할 수 있는 biomarker의 개발은 시급히 이루어져야 할 것이며, 어류의 Vitellogenin(Vtg)의 측정을 응용한 일련의 검출방법은 이러한 목적을 달성하기 위한 유용한 도구가 될 것이다.

어류의 난세포는 성장함에 따라 난 세포질에 난황물질을 축적하며 이들 난황물질은 어중에 따라 조성이 다소 차이가 있지만 구성 성분중 대부분이 단백질이다(Barman *et al.*, 1964; Jared and Wallace, 1968., 김등., 1997). Vtg은 난생동물의 난황 전구체로, 여포세포로부터 분비된 에스트로젠의 자극에 의해 간장에서 합성되어 혈액으로 분비된다(Ng and Ider, 1983; Mommsen and Walsh, 1988). Pan등(1969)에 의해 이름이 명명된 Vtg 은 간에서 생산되어 성숙된 난포에 선택적으로 흡수되는 담체분자(carrier molecule)로 구성되어 있으며 250~600 kDa 분자량으로 기본 골격인 단백질의 구조에 lipid material, carbohydrate components, phosphate groups, 그리고 mineral salts 등을 포함하고 있는 물질이다(Pan *et al.*, 1969; Wahli *et al.*, 1981). 일반적으로 어류는 종에 따라 매년 정해진 계절에 각각의 번식기를 맞이하는 주기성을 보이면서 생식세포 즉, 알과 정자를 생산 및 방출한다. 정상 치어나 수컷의 물고기에서는 체내에 Vtg가 발현될 정도의 에스트로젠은 존재하지 않기 때문에 Vtg는 난생동물 암컷의 성성숙기에만 발견되는 암컷 특이 단백질로 알려져 있다(Bon *et al.*, 1997).

따라서 Vtg가 난황 단백질로서 정상적인 수컷에서는 만들어지지 않는 특성을 이용하여 내분비 장애물질의 estrogen성 효과를 평가하는데 매우 유용한 Biomarker로 이용 될 수 있으며(Hansen, *et al.*, 1998), 관련된 연구가 다수 보고되었다(Cope *et al.*, 1985; Goodwin *et al.*, 1991; Sumpter *et*

al., 1995; Heppell *et al.*, 1995).

국내에서는 이에 관련된 연구가 별반 이루어지고 있지 않은 실정이다. 그러므로, 본 연구는 미지의 EDs의 screening에 응용할 biomarker 측정을 위한 면역학적 검사법을 개발하기 위한 기본소재인 특이 단클론항체를 개발하기 위하여 수행되었으며 개발된 단클론 항체와 넵치 Vtg와의 반응특성을 조사하였다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물

Vtg 항원을 얻기 위한 낚치는 제주대학교 해양 연구소에서 인공 부화되어 사육된 암컷 2미를 사용하였으며, 체중은 500~600g 범위에 있었다.

단클론항체를 얻기 위한 면역과 복수의 생산은 6주령 및 8주령의 암컷 SPF BALB/c 마우스(대한바이오링크, 한국)를 사용하였으며, 다클론항체의 생산을 위해서는 제주도내 토끼농가에서 구입한 12주령의 New Zealand White 계통의 암컷토끼 2수를 사용하였다.

2. Vtg 합성 유발

혈액시료는 낚치의 복강내로 에스론주사액(삼양약화학주식회사, E₂로서 2mg/ml)을 제 1일 및 제 7일에 체중 500g당 4mg 복강내 주사하여 Vtg를 유도한 후, 제 17일에 미부정맥으로부터 전채혈하여 얻었다. 원심분리한 (1,500 x g, 10 min, 4 °C) 혈청은 -70°C 냉동실에 보관하며 실험에 사용하였다.

3. Vtg 정제

Gel permeable chromatography법으로 Vtg를 정제하였다. 즉, 혈청 0.5ml를 0.1M Tris-HCl (pH 7.8, containing 1.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)로 평형시킨 Sepharose CL-4B gel(Pharmacia LKB, Sweden, 1.5 × 30cm)에 가하여 0.5 ml/min의 flow rate 조건으로 시행하였다. 3ml씩의 분획을 취하여 단백량을 측정하였고, 전기영동을 실시하여 단백질분리특성을 조사하였다. 전과정은 4°C의 냉실에서 수행하였다. 단백량은 Bradford법으로 측정하였다. Vtg로 예상되는 분획(175 kDa)을 -70°C에 보관하며 면역원 및 항원으로 사용하였다.

4. SDS PAGE

Biorad(USA)의 Mini protean II system을 이용하여 SDS-PAGE(7.5 % polyacrylamide Separating gel)를 실시하였고, stacking gel은 4.5%의 gel을 사용하였다.

Standard Marker(sigma, USA)를 5 μ l, 넙치 혈청시료는 3 μ l 씩 loading하였다. Sample을 loading한 후 10mA/gel로 영동장치에 전원을 40V에서 bromphenol blue dye가 stacking gel을 벗어 날 때까지 약 20~30분 running하고 이후에는 100V으로 증압시켜 1시간 영동 하였다.

1 시간 고정(50% methanol, 10% glacial acetic acid) 후, 염색액(Commasie Brilliant Blue Reagent-250) 0.05g, Acetic acid 5ml, Methanol 25ml, DDW 20ml)에서 80분간 염색하고 탈색액(Acetic acid 5ml, Methanol 25ml, DDW 20ml)을 이용하여 탈색하였다.

5. 마우스 면역



마우스 면역은 넙치의 Vtg(1.0 mg/ml) 150 μ l를 취하여 동량의 Freund's complete adjuvant(FCA)와 유탁시켜 Balb/c 마우스의 복강내에 접종하여

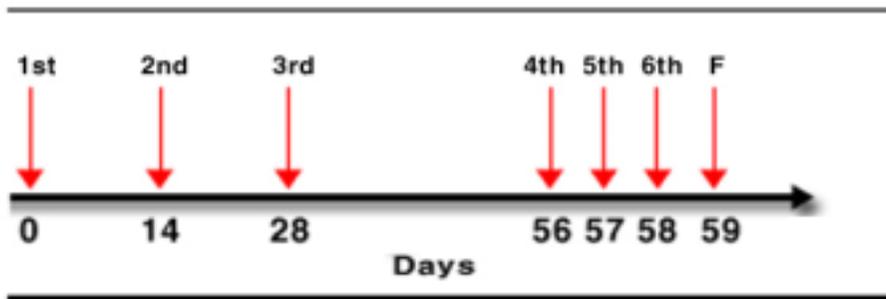


Figure 1. Mouse immunization schedule.

Vtg and FCA Emulsion(1st), Vtg and FIA Emulsion(2nd, 3rd), only Vtg inoculated to mouse. And Day 59, Fusion(F) myeloma celline with mouse spleen cells.

실시하였다. 면역 2주째 동량의 항원과 Freund's incomplete adjuvant (FIA)의 유제액을 복강내로 면역시켰다. 그 후 6주째에 동량의 항원만을 마우스의 복강 내에 24시간 간격으로 3회 접종하였으며, 최종접종 후 24시간 후에 경추탈구시켜 살처분하고 얻어낸 spleen 세포를 세포융합에 공여하였다(Figure 1).

6. Hybridoma 작성

면역된 BALB/c 마우스의 심장을 통해 전체혈 한 후, 70%의 EtOH를 마우스 전체에 spray하여 소독하고 Clean bench내로 이동시켜 무균적으로 비장을 취하였다. 비장은 주사침등으로 파괴시키고 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, 10mM HEPES added, pH 7.0)을 가하고, 400 mesh의 망을 이용하여 세포를 분리하였으며, 이후 washing media로 3회 원심(1,000rpm, 3분)세척하였다. 이 때 사용된 모든 배지는 37℃로 유지하였다.

Midlog phase 상태로 배양된 SP/2 myeloma cell은 1회 세척 후, 비장세포와 혼합하여 2회 더 세척하였다. 배지를 완전히 제거한 상태에서 침전된 세포들을 부드럽게 tapping 하여 cell이 tube바닥에 골고루 퍼지게 한 후, PEG를 가하여 세포융합이 이루어지도록 하였다.

PEG 처리는 다음과 같이 실시하였다 즉, 1분에 걸쳐 총 1ml의 PEG용액을 가하며 가볍게 혼합한 30초 후에 washing medium 1ml를 1분간 가하였다. 30초 정지 후 washing medium 2ml를 1분간 가하고 washing medium 8ml를 30초간 가하였다. 30초 정지 후에 washing medium 10ml를 30초 동안 가하고 pipett을 이용하여 뭉친 세포를 풀어 주도록 했다.

융합액은 DMEM(Gibco, added 18% FCS, pH 7.0) 100ml에 피펫으로 고르게 희석하여 96 well tissue culture plate에 소분(100 μ l/well)하였다. 소분 24시간 경과 후 HAT supplement(Gibco, 미국)를 추가하여 융합된 Hybridoma 세포주만을 7일간 선택적으로 배양하였다.

Hybridoma 세포주만 관찰되기 시작하면 HT supplement(Gibco, 미국)를 2일 동안 추가해주었다. 세포의 증식정도에 따라 배양액 교환주기를 증가시켰다.

7. Hybridoma 선별

육안적으로 증식이 확인된 well은 수시로 배양상층액을 회수하여 ELISA를 실시하여 특이항체의 분비를 확인하였다. 항체확인을 위한 ELISA는 다음과 같다. 즉, 면역용으로 사용되었던 항원을 coating buffer(100 mM Na₂CO₃; pH 9.6)로 10 µg/ml되게 희석하여 이를 96 well plate에 100 µl씩 각각 분주하고 4 °C에서 16시간 흡착시켰다. 이 후, 각 well에 0.2 %BSA PBS-T(100 mM, pH 7.2, containing 0.05 %(v/v) Tween-20) 50 µl와 배양상층액 50 µl를 가하고 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 well은 PBS로 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate를 0.2 % BSA PBS-T(100 mM, pH 8.4, containing 0.05 %(v/v) Tween -20) 에 1,000배 희석하고 각 well에 100 µl씩 분주하고 실온에서 30분간 반응 후, PBS로 3회 세척하고 chromogen buffer(alkaline phosphate substrate solution added Citrate buffer, pH 4.0)에 22'-azino-bis (3-ethybenzthiazoline-6 sulfonic acid; ABTS) 0.1%를 용해시키고, 과산화 수소를 전체 양의 0.02%로 함유한 용액을 각 well에 100µl씩 분주하고 실온에 30분간 방치하였다가 이를 405nm와 reference 492nm에서 optical density를 측정하였다. Fusion cell에서 항체가 생성 확인되는 well의 세포를 24well로 옮겨 배양 하였다.

ELISA결과 양성을 보이는 clone은 따로 24 well plate에 옮겨 배양을 하여 지속적인 항체 분비를 확인한 후, 96 well plate의 well당 0.5개가 되도록 희석하여 분주하고 1주일간 배양하였다. Colony를 형성한 well의 배양상층액이 ELISA에서 양성반응을 보이는 clone은 따로 선택하여 증식시킨 후, 일부는 동결하여 보관하고 일부는 단클론항체의 대량생산을 위하여 pristane이 처리된 BALB/c 마우스의 복강내로 접종하였다.

8. 항체의 생산 및 정제

단일클론항체의 대량 생산을 위하여Pristane(2,6,10,14-tetra-methyl-pentadecane, Sigma, USA)은 미리 준비된 Balb/c 마우스에 1두당 800µl씩 접종하였고, 일주일 후 hybridoma cell을 마우스 복강내로 접종(10⁷ cell/head)하였다. 약 일주일 후부터 생산된 복수로 인해 마우스의 복부가 팽대해지면 복부로부터 복수를 채취하였다.

복수는 세포주의 항체 타입에 따라 정제하였다. IgG type의 항체는

ammoniumsulfate($(\text{NH}_2)_4\text{SO}_4$)를 45% 되게 가하고 실온 30분간 교반하였다. 원심분리(3000 ×G, 4°C, 30분)하여 면역글로불린을 침전시켰다. 침전된 항체를 20mM phosphate buffer에 용해시키고, 이를 원심분리(5000 ×G, 4°C, 30분)하여 상청액을 취하였다. IgM type의 항체는 2mM phosphate buffer(pH 6.0)에서 5회 투석하여 침전된 물질을 2000 ×G, 4°C, 10분 원심분리하여 채취하였고 이를 phosphate buffer(20mM)에 부유시켰다.

9. Hybridoma 세포주의 동결보관

Mid log phase의 배양세포를 원심분리(1,000 x g, 2분)하여 침전된 세포(2×10^6 cell/ml)에 냉동보관용 배지(10 % DMSO: Dimethyl suloxide 8 ml + DMEM 80 ml qs)에 부유하여, 이를 각각 1.8ml 냉동 보관용 ampule에 1.5ml씩 나누어 분주하였다.

Ampule은 다공성의 포장지로 밀봉하여 -70°C의 냉동고에 하룻동안 정치하여 서서히 감온시킨 후 액체질소로 이동시켜 보관하였다.

10. Western blot



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

SDS-PAGE를 실시한 gel을 blotting beffer(20 mM Tris-HCl, 160 mM glycine, 20 % methanol pH 8.3)내에서 100 V, 350 mA에서 2시간 nitro cellulose membrane에 전사하였다. 그 후 항체의 비특이적 결합을 막기 위해 3% bovin serum albumin과 0.05% Tween 20이 함유된 0.1M Tris buffered saline (TTBS, pH7.4)을 이용하여 40분 상온에서 약하게 흔들면서 blocking 시켰다. Blocking이 끝난 후 TBS-T(0.05% Tween20 in TBS)로 5분씩 3회 세척 한다. 세척 후 정제되어진 항체의 TBS-T로 20분간 반응하였다. 5분간 TBS-T로 3회 세척하고 TBS-T에 1000배 희석시킨 goat anti-mouse IgG와 goat anti-mouse IgM 용액에서 20분간 반응시켰다. 3회 세척 후, DAB(0.1%)와 0.03% H_2O_2 가 함유된 PBS (pH 7.2)로 발색하여 생산된 MAb의 항체 결합 반응부위를 확인하였다.

III. 결 과

1. Vtg의 합성유도와 정제

대조군으로 쓰인 E₂ 미처리 수컷과 미성숙 암컷의 혈청은 동일한 패턴을 보였다(Figure 2). E₂ 처리 수컷과 암컷에서는 미처리 대조군에서 나타나지 않은 밴드가 175 kDa 부근에 나타났다. 난소는 homogenization 처리 후 원심분리(5000 rpm, 10 min)처리 후 상층액을 테스트에 사용하였는데 약 50 kDa와 38 kDa부근의 band가 나타났다. Gel filtration에 사용된 시료는 E₂ 접종 암컷 serum과 미성숙 수컷의 serum 각각 500 μ l씩이었다. 얻어

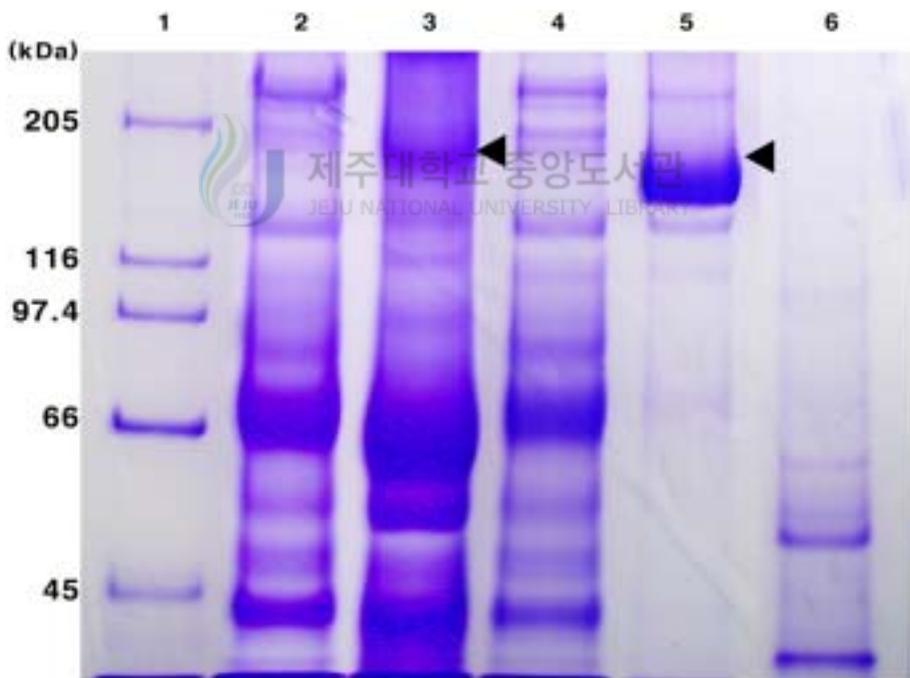


Figure 2 SDS-PAGE patterns of Sigma high range marker(lane 1), male serum(lane 2), E₂-treated male serum(lane 3), immature female serum(lane 4), E₂-treated female serum(lane 5) and homogenized ovary(lane 6). The proteins were analyzed by SDS-PAGE and then either Coomassie-stained.

진 peak(figure 3)는 모두 세 개였으며 처음과 마지막 피크는 거의 일치하는 위치에서 피크를 보였다. 두 번째 peak에서 E2접종 녀체의 혈청(A)이 5ml 먼저 나타나기 시작했다. 두 번째 peak의 분획을 SDS-PAGE로 비교해본 결과 분리된 fraction을 SDS-page로 검증결과 Vtg의 분리가 이루어져 175kDa부근에 밴드가 나타났다(Figure 3).

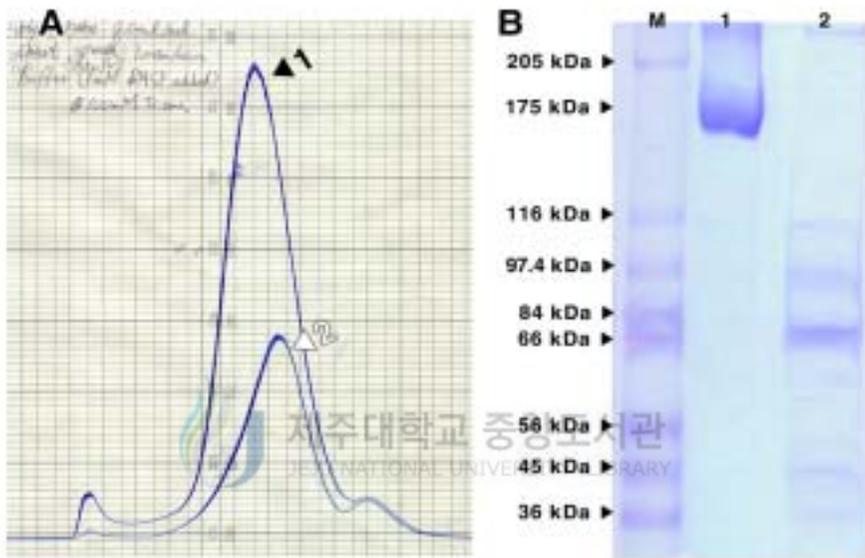


Figure 3. A: Elution pattern made a comparison E₂ treated female serum(fraction 1) and male serum(fraction 2) of gel-chromatography.
 B: SDS-PAGE of fraction 1 and 2

2. 단클론 항체

단일 클론항체를 얻기 위해 세포융합을 한 결과 총 5개의 지속적으로 항체를 분비하는 positive 클론이 생성되었다(table 1). Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 결과 Ig G(G1 type)와 Ig M에 대하여 강한 반응성을 보였다. 생산된 단일클론항체의 Vitellogenin에 대한 특이도를 조사하기 위해 실시한 ELISA의 반응 결과 F12는 수컷의 혈청과도 반응을 보였고, 그 외의 F03, F16, F20, F21은 E2투여된 녀체의 혈청과의 반응만을 보였다. F21의 경우 IgM(μ chain specific)에 대해 반응하였다. 모든 생산된 항체는 protein A와 protein G에 대해 반응을 나타내지 않았다.

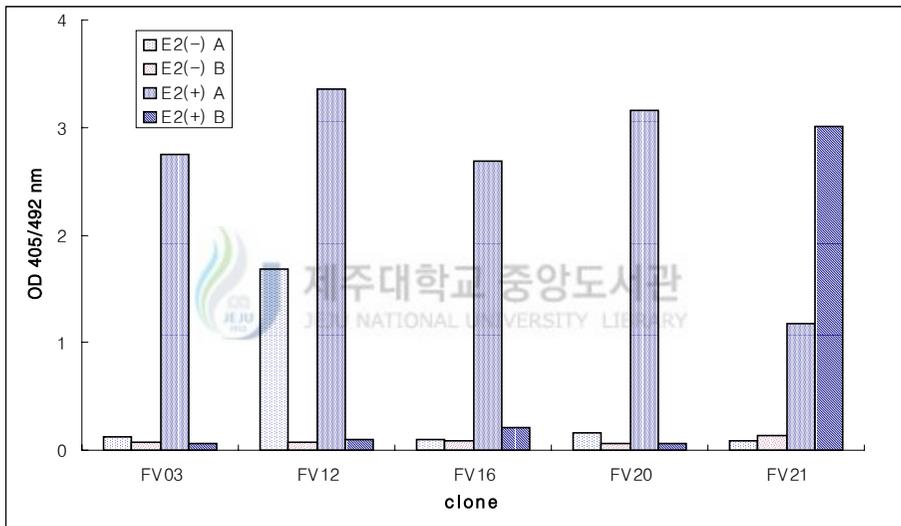


Figure 4. Vtg EIA, specificity test of MAb Estradiol 17- β positive(E2(+)) and negative(E2(-)) serum coating ELISA. Group A was used goat anti-mouse IgG HRP conjugator to secondary antibody, and group B was used goat anti-mouse IgM HRP conjugator to secondary antibody.

항체의 타입을 확인하기 위해 ELISA를 실시한 결과 FV03, FV12, FV16, FV20은 모두 G1 type으로 , FV21은 M type으로 밝혀졌다. Protein A, Protein G에 대한 반응성을 ELISA로 테스트한 결과 모두 반응성을 나타내지 않았다(Table 1).

MAb	type	Protein A	Protein G
FV03	G1	-	-
FV12	G1	-	-
FV16	G1	-	-
FV20	G1	-	-
FV21	M	-	-

Table 1. Type of monoclonal antibodies. Responsibility with various type of antibodies(Goat anti-mouse IgG, Goat anti-mouse IgM, Protein A, Protein G).



3. Western blot

단클론항체의 항원 접합부위를 확인하기 위해 western blot을 실행하였고(figure 5), 모든 클론의 정제 항체는 175 kDa부근에서 반응을 나타냈다. FV03과 Fv16은 116 kDa와 97.4 kDa 사이에서 주요 밴드가 나타났고, 97.4 kDa를 기점으로 같은 간격의 세 개의 밴드를 나타냈다. 수컷 혈청과 ELISA반응성을 나타내었던 FV12의 경우 84 kDa와 66 kDa 사이에서 두 개의 밴드의 반응성을 보였다. FV21은 84 kDa와 66 kDa 사이에서 밴드가 형성되었다.

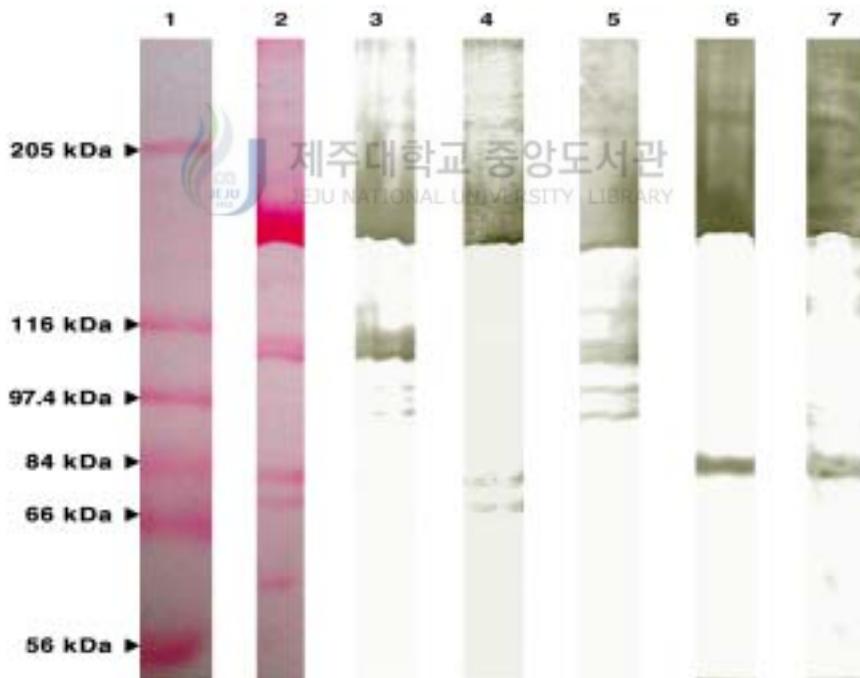


Figure 5. sds-PAGE of Marker(lane 1) and Serum(lane 2). Immunoblot analysis of FV03(lane 3), FV12(lane 4), FV16(lane 5), FV20(lane 6) and FV21(lane 7) monoclonal antibodies. After SDS-PAGE, proteins from E₂ treated flounder serum were blotted with purified MAbs.

IV. 고 찰

Vtg의 합성을 유발하기 위해 E2를 투여한 수컷과 암컷의 혈청은 sds-PAGE에서 대조군에서는 관찰되지 않는 175kDa(여등, 2000)부근의 밴드가 나타났다(Figure 1).

경골 어류의 비텔로제닌을 유발하기 위해 일반적으로 사용되고 있는 Estradiol 17 - β 를 2회 접종한 결과 미성숙 혈청 Vtg 농도에 비해 3배 이상의 높은 단백질농도를 나타내었다. 이는 Arkwe등(2001)의 연구결과에서 Nonyl phenol에 의한 혈장 단백질 농도의 상승에서와 같이 혈장내 비텔로제닌과 eggshell zona radiata protein(Zr-proteins)의 증가에 기인한 것으로 사료된다(Arkwe et al, 2001).

Vtg를 분리하기 위해 쓰이는 방법은 낮은 이온상태의 용액 내에서 침전을 유발시키는 방법과 겔 크로마토그래피법과 이온교환 크로마토그래피 등을 이용하여 분리할 수 있다(Venugopal and Kumar, 1999). 본 실험에서는 겔 크로마토그래피법을 이용한 정제를 시도하였다. 전체혈을 통해 획득된 혈청을 겔 크로마토그래피법을 통해 얻어진 피크에 해당된 분획을 모아 항원으로 사용하였다. 1997년 Hylland에 의해 연구된 문헌에서도 거의 같은 peak에서 Vtg가 분리되었음이 발표된 바 있다(Hylland, 1997; Wiley et al., 1978; 여 등, 2000).

테스트에 쓰인 Goat anti-mouse Ig G는 whole molecule에 대해 반응하는 것이므로 실제 IgG에 대해 반응성을 가지는 것은 FV03, FV12, FV16, FV20이며 μ -chain specific한 goat anti-mouse IgM에 대해 반응성을 가지는 것은 F21임을 알수 있었다(Table 1). 개발된 항체들이 모두 protein A와 protein G에 대해 반응성이 없음을 볼 때 본 Fc 부분의 결손일 것으로 예상된다.

western blot을 통해 개발된 항체의 항원에 대한 결합부위가 비텔로제닌 밴드인 175kDa부근과 비텔로제닌이 분해된 구성물질 즉, lipovitellin, phosvitin부근에서 결합을 보였음을 알수 있다. 단일클론항체중 FV03과 FV16은 175kDa의 밴드 외에도 약 100kDa에 해당되는 밴드를 보였고, F20과 F21은 83~86kDa의 밴드와 반응을 나타냈다.

본 실험을 통하여 얻어진 Vtg 단백질은 효과적으로 면역원으로서의 작용을 하였고, 단일 클론 항체의 생산에 쓰여졌다. 얻어진 단일클론 항체의 특

성은 Ig G와 Ig M에 대해 반응성을 보였다. 얻어진 항체는 Vtg 검출에 쓰였으며 western blotting의 결과 E2접종된 넙치에서 암수의 구분없이 반응을 특이적으로 보이고 있음이 밝혀졌다. 이를 토대로 본 실험을 통해 개발된 항체는 Estrogen성 물질에 노출된 유무를 판별할 수 있는 항체임이 밝혀졌다.

IgG 타입의 항체를 분비해내는 단일클론 세포주 3종과 IgM 타입의 항체를 분비해내는 단일클론 세포주 1종을 개발하였고, 이들의 분비 항체는 각각 약간의 다른 epitope을 가짐으로서 면역 크로마토그래피법에 응용할 수 있는 이점을 가지고 있다고 사료된다.



V. 참고문헌

- Ackermann, Gabriele E., Schwaiger, J., Negele, Rolf D., Fent, K., 2002. Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology* 60, pp.203-221.
- Allen Y., Matthiessen P., Scott A.P., Haworth S., Feist S. and Thain J.E., 1999., The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments--further surveys of flounder. *Sci. Tot. Environ.* 233, pp. 5-20.
- Andrew E. Geedwin, John M. Grizzle, James T., Barbara and H. Estridge. 1992. Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish(*Ictalurus Punctatus*). *Comp. Biochem. Physio.* Vol. 101 B, No.3. 441-446.
- Arukwe A., Kullman S.W. and Hinton D.E., 2001., Differential biomarker gene and protein expressions in nonylphenol and estradio-17 β treated juvenile rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). *Comp.Biochem. Physio.* Vol. 129 C, 1-10.
- Barman, T.E., N.K. Bai and N. Y. Thoai. 1964. Studies on a herring-egg phosphoprotein. *Biochem. J.*, 90, pp. 555~558.
- Bergeron, Renee M., Thompson, Tommy B., Leonard, Linda S., Pluta, Linda, 1999. Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology* 150, pp. 179-187.
- Bon, E., Barbe, U., Rodriguez, J., Cuisset, B., Pelissero, C., Sumpter, J.P. and Menn, F., 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. B Biochem. Mol. Biol.* 117, 75-84.

Charles, J.M., H.C. Cunny, R.D. Wilson and J.S. Bus. 1996. Comparativ subchronic studies in 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, amine, and ester in rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 33 : 161-165.

Colborn, T. and C. Clement, eds., 1992, Chemical induced alterations in sexual and function development: The wildlife/human connection: Advances in modern environmental toxicology, Princeton Scientific Publishing Co., v.21, 403p.

Farabollini, F., Porrini, S. and Dessi-Fulgheri, F., 1999, Perinatal exposure to the estrogenic Pollutant Bisphenol A affects behavior in male and female rats: *Pharmacology biochemistry and behavior*, v.64, No.4, pp.687-694.



Fry, D.M. and Toone, C.K., 1981, DDT-induced feminization in gull embryos: *Science*, v.231, p.919-924.

Henny,C.J.,Grove,R.A.,Hedstrom,O.R.,1996,A field evaluation of mink and otter on the lower Columbia River and the influence of environmental contaminants : Final report for Lower Columbia River bi-state water-quality program.64p.

Hylland, K. 1997. Effect of environmental oestrogens on marine fish species.In : *Trends in analytical chemistry*. Vol. 16. No.10, Norway, pp.606-612

Jared, D. W. and R. A. Wallace. 1968. Comparative chromatography of the yolk proteins of teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24, pp. 437~443.

- Jobling, S. and J. Sumpter. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.*, 27:361-372.
- Joseph, I. and V.S.K. Chennubhotla. 1999. Gibberellic acid and 2,4-D as regulators in laboratory culture of seaweeds. *Indian J. Mar. Sci.*, 28:66-69.
- Korach, K.S. 1993. Editorial: Surprising places of estrogenic activity. *Endocrinology*, 132:2277~2278.
- Marx, A., J. Sherry, P-D. Hansen, and B. Hock, 2000. A new monoclonal antibody against vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chemosphere* 44., 2001., 393-399.
- Mommsen, T.P. and P.J. Walsh. 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar W.S. and Randall D.J. (eds.), *Fish Physiology*. Vol. XIA, Academic Press, San Diego, pp. 347-406.
- Ng, T.B. and D.R. Ider. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. In: Hoar W.S., Randall D.J. and Donaldson E.M. (eds.), *Fish Physiology*. Vol. IX, Academic Press, San Diego, pp. 379-404.
- Pan, M. L., Bell, W.J., and Telfer, W. H. 1969, Vitellogenic blood protein synthesis by insect fat body. *Science* 165. 393-394
- Hansen, P.D. H. Dizer, B. Hock, A. Marx, J. Sherry, M. McMaster, Ch. Blaise. 1998. Vitellogenin a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in analytical chemistry*. vol. 17. No.7. 448-451.
- Stone, R. 1994. Environmental estrogens stir debate. *Science*, 265 : 308~310.

- Sumpster, J.P. and Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environmental Health Perspectives* 103(Suppl 7), pp. 173-178.
- Takahiro Matsubara and Keiichi Sawano. 1992. Sex determination fo Pacific halibut(*Hippoglossus stenolepis* Schmidt) by the immunodot blotting usion antiserum aganinst vitellogenin. *Bull. Hokkaido Natl. Fish. Res. Inst., No. 56, Mar.,pp. 17-26.*
- Venugopal, K.J., and Kumar, Dinesh, 1999, Vitellins and vitellogenins of *Dysdercus koenigii*(Heteroptera:Pyrrhocoridae) - identification, purification and temporal pattern. *Comparative Biochem. and Phsiol. Part B., 124, pp. 125-223.*
- Wahli, W., Dawid, I.B., Ryffel, G.U., Weber, R., 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science* 212, 298-304.
- Wiley, H.S., Lee Opresko, and Robin A. W., 1979. New Methods for the Purification of Vertebrate Vitellogenin. *Analytical Biochemistry* 97. 145-152.
- 강경선, 이영순. 1998. 환경호르몬 문제점과 향후대책: 내분비계 장애물질에 대한 국내외 대응현황에 대하여, pp. 8.
- 김윤, 김우진, 백혜지, 김경일, 방인철, 한창희. 1997. 범가자미, *Verasper variegatus* 수컷에서 estradiol-17 β 에 의해 유도된 vitellogenin의 면역학적 특성. *J. Korean Fish. Soc.* 30(3), pp. 480~487.
- 민병윤. 1999. 한일양국 환경호르몬의 현황과 대책. 제1차 한일먹거리포럼 p.15-20.
- 양일석, 김상근, 김주현, 김천조, 나승열, 박전홍, 유창준, 윤영원, 이상목, 이장현, 이호일, 한호재. 2000. *가축생리학* 제 3판. 아카데미서적. pp.

663-725.

여인규, 최미경. 2000. 넙치 *Paralichthys olivaceus* 초대 배양 간세포의 Vitellogenin 합성에 미치는 Bisphenol A의 영향. Korean J. Ichthyol. 12(3), pp. 180-185.

여인규, 최미경, 이영돈, 임윤규, 허문수, 이제희, 송춘복. 2000. 넙치 *Paralichthys olivaceus* 초대 간세포의 난황 전구물질 합성에 미치는 estradiol-17 β 와 2,4-D의 영향. Korean J. Ichthyol. 12(3), pp. 173-179.

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

이행석, 조은민, 류재천. 2002. Human estrogen receptor ligand binding domain (hER LBD)과 Co-activator로 구성된 효모 two-hybrid system을 이용한 내분비계장애물질 검출계의 구축. Environmental Mutagens & Carcinogens 22-3, pp. 175-182.

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

최의소, 조광명. 1985. 환경공학. 청문각 pp. 12-13.

VI. 요약

환경 내분비장애물질의 검출계로 사용될 수 있는 바이오 마커로서의 넙치(*Paralichthys olivaceus*) 비텔로제닌에 대한 단일클론항체를 4종 개발하였다. 비텔로제닌은 Estradiol이 처리된 넙치혈청으로부터 겔크로마토그래피법으로 정제하여 175 kDa에 해당하는 단백질을 분리하였고, 비텔로제닌에 대한 단일클론항체의 개발을 위해 BALB/c 마우스를 면역하는데 사용하였다. 마우스의 spleen과 myeloma 세포의 융합을 실행하여 3개의 IgG1 타입과 1개의 IgM 타입의 단일클론항체를 분비하는 hybridoma를 얻었다. 생산된 hybridoma 세포는 특이적으로 비텔로제닌과 결합하는 항체를 분비해 냈고, 이 항체를 다량 얻기 위해 pristane처리된 마우스의 복강내로 hybridoma 세포를 접종하여 항체를 포함하는 복수를 얻었다. 복수는 $10^5 \sim 10^6$ 의 역가를 보였다. 복수로부터 항체를 정제하였고, 정제된 항체의 특성을 western blot으로 검사하였을 때 175kDa와 100kDa, 86kDa 밴드에 특이적인 반응을 보였다.

본 연구를 통해 개발된 4개의 비텔로제닌 특이항체는 E2 접종 넙치 혈청에 대해 western blot에서 반응하였고, 바이오마커로서의 비텔로제닌을 면역학적 검출함에 있어 특이적 반응을 함으로써 보다 효과적이고 신속하게 검출할 수 있도록 해주었다. 개발된 항체는 E2 미처리 넙치의 혈청에 대한 반응에 비해 E2 처리 넙치의 혈청과 특이적으로 반응함을 EIA로 입증하였다. 개발된 특이항체는 이를 이용한 여러 가지 면역 chromatography의 검출계로 응용될 수 있을 것으로 사료된다.