

Purificación de la hormona luteinizante (LH) en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y desarrollo de un inmunoensayo específico

Purification of luteinizing hormone (LH) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and development of a specific immunoassay

J Mateos¹, E Mañanós^{1*}, P Swanson², M Carrillo¹, S Zanuy¹

¹ Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (CSIC), Torre la Sal s/n, 12595-Ribera de Cabanes (Castellón), España.

* E-mail: evaristo@iats.csic.es

² Northwest Fisheries Science Center, NMFS, 2725 Montlake Blvd. East, Seattle, WA 98112, USA.

Resumen

La hormona luteinizante (LH), secretada por la glándula hipofisaria, regula los procesos de maduración gonadal, ovulación/espermación y puesta en vertebrados. El presente trabajo describe la purificación de la LH de un pez teleosteo, la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), mediante triple cromatografía en columna (gel filtración, intercambio iónico y FPLC). Las subunidades α y β de la LH se aislaron mediante rHPLC. El peso molecular de la LH se estimó, mediante SDS-PAGE, en 31 kD y el de sus subunidades α y β en 12 y 22 kD, respectivamente. Se obtuvieron anticuerpos específicos contra la subunidad LH β (AbLH β), que fueron utilizados para desarrollar un inmunoensayo tipo ELISA. La sensibilidad del ELISA fue de unos 0.65 ng mL⁻¹ (Bi/Bo 80%) y los coeficientes de variación intra e interensayo, de 11.7% ($n = 8$) y 11% ($n = 10$), respectivamente. La validación del ensayo mostró paralelismo entre la curva patrón (LH) y muestras de plasma e hipófisis de lubina, así como con extractos hipofisarios de otras especies de peces perciformes. Mediante ELISA, se analizaron los niveles plasmáticos de LH en lubinas sometidas a tratamiento de inducción hormonal a la puesta, por inyección simple de diferentes dosis de GnRHa ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-LHRH). Todos los tratamientos provocaron un marcado incremento de la LH plasmática a los 90 min después de la inyección, manteniéndose elevados durante 24 h. En conclusión, el ELISA puesto a punto es un inmunoensayo sensible y preciso, apropiado para cuantificar LH en muestras biológicas de lubina y representa una valiosa herramienta para realizar estudios sobre la endocrinología de la reproducción de esta especie.

Palabras clave: reproducción, hormona luteinizante, inmunoensayo, lubina, peces.

Abstract

The luteinizing hormone (LH) is a key regulator of the processes of gonad maturation, ovulation/spermiation and spawning in vertebrates. The present study describes the purification of LH from pituitaries of a teleost fish, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), by three-step chromatography (gel filtration, ion-exchange and FPLC). The LH α and β subunits were isolated by rHPLC. The molecular weight of LH was estimated, on SDS-PAGE, at 31 kD, and for its α and β subunits, at 12 and 22 kD, respectively. Specific antibodies against the sea bass LH β subunit (AbLH β) were obtained and used to develop a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which had a sensitivity of around 0.65 ng mL⁻¹ (Bi/Bo 80%) and intra- and inter-assay coefficients of variation of 11.7% ($n = 8$) and 11% ($n = 10$), respectively. Validation of the assay showed parallelism between the standard curve and plasma and pituitary samples from sea bass, as well as with pituitary extracts from other perciform fishes. We measured, using ELISA, plasma LH levels in female sea bass given a single injection of different doses of GnRHa ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-LHRH), as a hormonal therapy for spawning induction. All treatments increased plasma LH levels after 90 min of the injection and were maintained elevated during 24 h. In conclusion, the immunoassay developed is sensitive and accurate, useful for LH analysis in biological samples of sea bass, and represents a valuable tool for studies on the reproductive endocrinology of this species.

Key words: reproduction, luteinizing hormone, immunoassay, sea bass, fish.

Introducción

La lubina europea (*Dicentrarchus labrax* L.) es una de las especies más importantes en la acuicultura europea y también una especie modelo en el estudio de la endocrinología de peces. La lubina se reproduce espontáneamente en cautiverio, pero su reproducción todavía presenta serios problemas, tales como la desincronización de los reproductores y la reducida

Introduction

The European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) is one of the most important aquaculture species in Europe and an important research model for studies on fish reproductive endocrinology. In captivity, sea bass reproduces spontaneously, but its reproduction still presents serious problems, such as desynchronization of the broodstock and diminished quantity

cantidad y calidad de los huevos (Carrillo *et al.* 1995), problemas que son comunes a muchas especies cultivadas. Estas disfunciones hormonales pueden solucionarse con el desarrollo y aplicación de terapias hormonales adecuadas, pero esto requiere un conocimiento exhaustivo de la biología reproductiva de la especie estudiada. En el caso de la lubina, se ha obtenido gran cantidad de información en los últimos años, gracias en parte al desarrollo de inmunoensayos específicos para hormonas y proteínas críticas, tales como la vitelogenina (Mañanós *et al.* 1994), esteroides sexuales (Prat *et al.* 1990), hormonas tiroideas (Cerdá-Reverter *et al.* 1996) y GnRHs (Kah *et al.* 1994).

Las gonadotropinas (GTHs), hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH) (llamadas previamente GTH1 y GTH2, respectivamente en teleósteos; Querat *et al.* 2000), son hormonas clave en el control de la reproducción de vertebrados, incluidos los peces. Se sintetizan en la glándula hipofisaria y se secretan al torrente sanguíneo, para regular todos los procesos de la reproducción. La FSH controla principalmente los primeros estadios de la gametogénesis, mientras que la LH regula la maduración gonadal, ovulación, espermiación y puesta (Swanson *et al.* 2003). La secreción de las GTHs está regulada desde el cerebro, principalmente por el neuropéptido GnRH. Durante la fase de maduración final de la gónada el GnRH estimula la secreción de LH, induciendo así la ovulación/espermiación y la freza (Breton *et al.* 1993).

El uso de análogos sintéticos del GnRH (GnRHa) es una terapia extendida a todas las especies de vertebrados, para el tratamiento de diferentes disfunciones reproductivas. En acuicultura, los tratamientos con GnRHa se utilizan para la inducción de la freza, con un éxito variable dependiendo de la especie (Zohar y Mylonas 2001). La optimización y desarrollo de terapias GnRHa eficaces depende en gran medida de la posibilidad de analizar LH plasmática en los animales tratados, como medida de la potencia de estos tratamientos para inducir la secreción hipofisaria de LH. La disponibilidad de un inmunoensayo para la LH también es una herramienta importante para determinar perfiles hormonales durante el ciclo reproductivo de una especie, ya que provee información sobre el estado de los reproductores y su respuesta potencial a tratamientos hormonales exógenos.

Estructuralmente, las GTHs son glicoproteínas dimericas, relacionadas con la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica (CG). Todas ellas están constituidas por una subunidad α común, denominada subunidad α de glicoproteínas (GP α) y una subunidad β , específica de cada una de las hormonas. Ambas subunidades se sintetizan de manera independiente y se unen, de forma no covalente, para constituir el dímero biológicamente activo, de manera que únicamente la subunidad β confiere la especificidad hormonal al dímero (Hearn y Gomme 2000). Por ello, el desarrollo de inmunoensayos específicos se ha basado en el uso de anticuerpos contra las subunidades β y no contra las hormonas completas (dímero), ya que la inmunización contra la subunidad α produce anticuerpos que reconocen indistintamente las cuatro

and quality of the eggs (Carrillo *et al.* 1995). These problems are general in most farmed fish. The development of appropriate hormonal therapies for the control of reproduction is critical to reduce these reproductive dysfunctions, but they require a comprehensive knowledge of the reproductive biology of the species. A great deal of information has been obtained in the last few years on the reproductive endocrinology of sea bass, and this has been possible because of the development of specific immunoassays for critical proteins and hormones, such as vitellogenin (Mañanós *et al.* 1994), sexual steroids (Prat *et al.* 1990), thyroid hormones (Cerdá-Reverter *et al.* 1996) and GnRHs (Kah *et al.* 1994).

The gonadotropins (GTHs), that is, the follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) (previously named GTH1 and GTH2, respectively, in teleosts; Querat *et al.* 2000), are key hormones in the control of reproduction in vertebrates, including fishes. They are synthesized in the pituitary gland and released into the bloodstream for the regulation of all processes related to reproduction: FSH controls mainly the first stages of gametogenesis, while LH regulates final gonad maturation, ovulation, spermiation and spawning (Swanson *et al.* 2003). The release of GTHs is controlled from the brain by the neuropeptide gonadotropin-releasing hormone (GnRH). In the final stages of gonadal maturation, GnRH stimulates the synthesis and secretion of LH, which in turn promotes ovulation/spermiation and spawning (Breton *et al.* 1993). In all vertebrates, treatment with synthetic analogues of GnRH (GnRHa) is a useful therapy in fertility trials and the treatment of several reproductive dysfunctions. In fish aquaculture, GnRHa treatments are widely used to induce spawning, with variable success depending on the species (Zohar and Mylonas 2001). The development of efficient GnRHa-based spawning induction therapies depends on our ability to measure the LH releasing potency of these treatments. The availability of a LH immunoassay is also an important tool to follow hormonal profiles during the reproductive cycle of a given species, providing information on the reproductive performance of the broodstock and its potential response to exogenous hormonal treatments.

The GTHs are dimeric glycoproteins, structurally related to the thyroid stimulating hormone (TSH) and the chorionic gonadotropin (CG). They consist of a common α subunit, named glycoprotein α (GP α) subunit, and a hormone specific β subunit. Both subunits are synthesized independently in the pituitary and bound non-covalently to form the bioactive dimer, in which the β subunit determines the hormone specificity of the dimer (Hearn and Gomme 2000). The development of specific immunoassays have been based on the use of antibodies against the β subunits and not against the whole dimeric hormones, because immunization against the α subunits would produce antibodies recognizing similarly all four glycoprotein hormones. On the other hand, because of the structural differences between LH β s from different species, in some cases it is necessary to produce specific antibodies for the hormones of each species of interest. The amino acid sequence

glicoproteínas. Por otro lado, debido a diferencias estructurales, se hace necesario en algunos casos producir anticuerpos específicos para las hormonas de cada especie de interés. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la LH β de teleosteos presenta un porcentaje de identidad que varía entre 50% y 98%, con homologías elevadas (>90%) entre miembros de la misma familia, pero reducidas entre especies de diferentes órdenes (Querat *et al.* 2000, Mateos *et al.* 2003). De esta forma, anticuerpos contra la LH β de una determinada especie pueden reconocer de forma similar a las LH β s de especies de la misma familia, pero no de otras y en menor grado cuanto mayor es la distancia filogenética entre las especies.

En las últimas décadas se han puesto a punto radioinmunoensayos (RIAs) o enzaimunoensayos (ELISAs) para la LH de varias especies de peces. Ambos tipos de inmunoensayos tienen características similares de sensibilidad y precisión, pero los ELISAs tienen la ventaja de usar trazadores marcados con enzimas en lugar de radioisótopos, lo que evita el uso de radioactividad en el ensayo (Engvall 1980). El objetivo del presente trabajo fue, en primer lugar, la purificación y caracterización de la LH de lubina y en segundo lugar, el desarrollo de un ELISA específico que permitiese, por primera vez, analizar niveles plasmáticos e hipofisarios de LH en esta especie. Con ello se dispondría de una valiosa herramienta inmunológica para el estudio de la endocrinología de la reproducción de esta apreciada especie.

Material y métodos

Purificación de la LH

Se obtuvieron hipófisis (400, 2.6 g de peso húmedo) de lubinas adultas, machos y hembras, que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C , hasta su procesamiento. Las hipófisis se homogeneizaron mecánicamente en una solución fría de acetato de amonio al 10%, con pH 7.2, conteniendo PMSF 1 mM. El homogenizado se dejó en agitación durante 1 h a 4°C y se centrifugó (5000 g, 45 min, 4°C) para eliminar sólidos. El sobrenadante se ajustó hasta una concentración de 40% de etanol, añadiendo lentamente etanol absoluto, en frío, y se dejó en agitación toda la noche a 4°C para solubilizar las glicoproteínas. Tras centrifugación (15,000 g, 20 min, 4°C), el sobrenadante se ajustó hasta 85% de concentración alcohólica (manteniendo PMSF 1 mM), añadiendo lentamente etanol absoluto, en frío, y se guardó a 4°C toda la noche, sin agitación, para precipitar las glicoproteínas. Tras centrifugación (20,000 g, 30 min, 4°C), se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar al aire para evaporar el exceso de etanol.

El extracto alcohólico se disolvió en bicarbonato de amonio 50 mM, a pH 7.8 y se aplicó a una columna de gel filtración Superdex G100 Superfine (Pharmacia LKB Biotechnology, NJ) de 2.5×100 cm. La muestra se eluyó en bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7.8, con un flujo de 0.5 mL min^{-1} . Se recogieron fracciones de 1 mL cada 2 min y se leyó la absorbancia

identidades of the teleost LH β s range from 50% to 98%, with high homologies (>90%) for species of the same family but low for species of different orders (Querat *et al.* 2000, Mateos *et al.* 2003). Thus, LH β antibodies for a given species may probably recognize similarly the LH β of fishes from the same family, but the degree of recognition diminishes for phylogenetically distant species.

In the last decades, radioimmunoassays or enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for LH have been developed for several fish species. Both types of immunoassays have similar characteristics of sensitivity and accuracy, but ELISAs have the advantage of using enzyme-labeled tracers instead of radioactive tracers, thus avoiding the use of radioactivity on the assay (Engvall 1980). The objective of the present study was, first, the purification and characterization of LH from sea bass and, second, the development of a specific sea bass LH ELISA that would allow, for the first time, the analysis of plasma and pituitary LH levels in this species. The availability of this immunological tool will permit further studies on the reproductive endocrinology of this valuable fish species.

Material and methods

Purification of sea bass LH

Four hundred pituitaries (2.6 g wet weight) were collected from sexually mature male and female sea bass, and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Pituitaries were homogenized in 10% ammonium acetate, pH 7.2, 1 mM PMSF, on ice, using a mechanically-driven glass Teflon homogenizer. The homogenate was stirred for 1 h at 4°C and centrifuged (5000 g for 45 min at 4°C) to eliminate debris. The supernatant was adjusted to 40% ethanol, 1 mM PMSF, by slow addition of ice-cold ethanol and stirred overnight at 4°C to solubilize glycoproteins. After centrifugation (15,000 g for 20 min at 4°C), the supernatant was adjusted to 85% ethanol, 1 mM PMSF, by slow addition of ice-cold ethanol and kept at 4°C overnight without stirring, for the precipitation of glycoproteins. The precipitate was centrifuged (20,000 g for 30 min at 4°C), the supernatant discarded and the pellet air-dried to eliminate excess of ethanol. Prior to gel filtration, the moist pellet was dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8.

The ethanol extract was fractionated by gel filtration chromatography on a Superdex G100 Superfine column (2.5×100 cm, Pharmacia LKB Biotechnology, NJ). The sample was eluted with 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8, at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} . Fractions of 1 mL were collected every 2 min and the absorbance monitored at 280 nm. Fractions comprising each peak were pooled and lyophilized. The presence of GTHs or their subunits was monitored by characteristic elution on SDS-PAGE and reversed-phase high performance liquid chromatography (rpHPLC). The presence of GTHs in the fractions of the subsequent chromatographic steps was tested using similar techniques.

a 280 nm. Las fracciones pertenecientes a cada pico se mezclaron y liofilizaron. La presencia de LH o sus subunidades, en los diferentes picos, se detectó por elución característica en SDS-PAGE y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (rpHPLC).

Los picos de interés, conteniendo potencialmente LH o subunidades, se disolvieron en bicarbonato de amonio 50 mM, a pH 7.8, y se sometieron a cromatografía de intercambio iónico (IEC) en una columna DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia LKB) de 1×5 cm. La muestra se eluyó con un gradiente por pasos de bicarbonato de amonio 100, 200, 500 y 1000 mM, a pH 7.8, recogiendo fracciones de 3 mL cada 9 min. Las fracciones pertenecientes a cada pico se mezclaron, liofilizaron y analizaron para detectar la presencia de LH y subunidades.

El pico seleccionado, conteniendo LH, se disolvió en bicarbonato de amonio 150 mM, a pH 7.8, y se sometió a cromatografía FPLC en columna de gel filtración Superdex 75 Hiload (Pharmacia LKB) de 1.6×60 cm, recogiendo fracciones de 4 mL cada 20 min. La muestra se eluyó en el mismo tampón. Las fracciones pertenecientes a cada pico se mezclaron y liofilizaron. La presencia e identidad de la LH y sus subunidades se determinó mediante rpHPLC, SDS-PAGE y secuenciación *N*-terminal de aminoácidos.

Aislamiento y análisis de las subunidades de la LH

Las subunidades de LH se aislaron mediante rpHPLC, en una columna C18 TSK gel ODS-120T (0.46×25 cm; tamaño partícula de 5 μm , Tosoh, Japón) usando un sistema de HPLC de bomba binaria (Konik Inc., FL). Las muestras se eluyeron con un gradiente lineal de acetonitrilo del 20 al 50%, conteniendo 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA), durante 60 min, a una temperatura de columna de 40°C y un flujo de 1 mL min⁻¹. Los picos de proteínas del rpHPLC se analizaron en SDS-PAGE, espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación *N* terminal de aminoácidos. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poli(acrilamida) al 5% en la zona de hacinamiento y al 15% en la de separación (SDS-PAGE), bajo condiciones no reductoras y las proteínas se visualizaron con tinción de plata.

La espectrometría de masas MALDI-TOF la realizó el Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Madrid, España). Para el análisis, las muestras liofilizadas de las subunidades purificadas se disolvieron en 10 μL de acetonitrilo al 50% y TFA al 0.1%, a una concentración de 10 pmol μL^{-1} y se mezclaron con un volumen equivalente de ácido trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxycinnámico saturado en acetonitrilo 30% y TFA 0.1%. La muestra (0.5 μL de la mezcla) se depositó en una punta de sonda de acero inoxidable, se secó a temperatura ambiente durante 5 min y se midió en espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Reflex II, Bremen, Alemania).

El análisis de la secuencia de aminoácidos del extremo *N* terminal se llevó a cabo en el Centro Nacional de Biotecnología (CSIC, Madrid, España), con un secuenciador Precise Protein Sequencing System (model 494, Applied Biosystems, CA). Las secuencias que se obtuvieron se compararon con

The lyophilized fractions containing putative LH were dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8, and subjected to ion-exchange chromatography (IEC) on a DEAE-Sepharose CL-6B column (1×5 cm, Pharmacia LKB). Unabsorbed proteins were eluted with the same buffer. Adsorbed proteins were eluted with a stepwise gradient of 100, 200, 500 and 1000 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8, at a flow rate of 20 mL h⁻¹. Fractions of 3 mL were collected every 9 min. Fractions comprising each peak were pooled, lyophilized and tested for the presence of GTHs and their subunits.

The peak containing putative LH was subjected to gel filtration chromatography on a Superdex 75 Hiload column (1.6×60 cm, Pharmacia LKB), at a flow rate of 12 mL h⁻¹. The sample was dissolved and eluted with 150 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8. Fractions of 4 mL were collected every 20 min and the absorbance monitored at 280 nm. Fractions comprising protein peaks were pooled and lyophilized. The presence and identity of LH and its subunits were determined by rpHPLC, SDS-PAGE and *N*-terminal amino acid sequencing.

Isolation and analysis of LH subunits

The LH subunits were isolated by rpHPLC on a C18 TSK gel ODS-120T column (0.46×25 cm, 5- μm particle size, Tosoh, Japan), using a HPLC system with binary pump (Konik Inc., FL). The samples were eluted with a linear gradient of 20–50% acetonitrile, containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), for 60 min, at a column temperature of 40°C and a flow rate of 1 mL min⁻¹. Protein peaks from the rpHPLC were analyzed by SDS-PAGE, MALDI-TOF mass spectrometry and *N*-terminal amino acid sequencing. Electrophoresis was performed on 5% stacking and 15% separating SDS-polyacrylamide slab gels (SDS-PAGE), under non-reducing conditions, and the proteins were visualized after silver staining.

The MALDI-TOF mass spectrometry was performed at the National Center for Biotechnology (CSIC, Madrid, Spain). For analysis, lyophilized samples of purified subunits were dissolved in 10 μL of 50% aqueous acetonitrile and 0.1% TFA, at a concentration of 10 pmol μL^{-1} , and mixed to an equal volume of saturated trans-3, 5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid in 30% aqueous acetonitrile and 0.1% TFA. The sample (0.5 μL of the mixture) was deposited on a stainless steel probe tip, allowed to dry at room temperature for 5 min and measured on a Bruker Reflex II MALDI-TOF mass spectrometer (Bremen, Germany).

The *N*-terminal amino acid sequence analysis of the LH subunits was performed at the National Center for Biotechnology (CSIC, Madrid, Spain), using a Precise Protein Sequencing System Sequenator (model 494, Applied Biosystems, CA). The sequences obtained were compared to similar sequences from the BLAST-2 service protein database.

Preparation of LH β subunit antibodies (AbLH β)

The purified LH β subunit was used to immunize two rabbits. Lyophilized LH β was resuspended in 0.9% NaCl, at a

secuencias similares en el servicio BLAST-2 de bases de datos de proteínas del NCBI.

Preparación de los anticuerpos (AbLH β) de la subunidad LH β

Se inmunizaron dos conejos con la subunidad LH β purificada. El liofilizado (LH β) se resuspendió en NaCl 0.9%, a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, y se guardó alicuotado a -80°C . Se aplicó una primera inyección de 1 mL, de una emulsión preparada al 50% con solución de LH β (50 μg) y adyuvante completo de Freund, administrada en siete puntos bajo la piel dorsal. Posteriormente, los conejos recibieron cinco inyecciones sucesivas, cada una de 50 μg de LH β disueltas en adyuvante incompleto de Freund, dadas cada cuatro semanas y aplicadas en cuatro puntos, bajo la piel de cada ingle. La titulación del anticuerpo se determinó por ELISA. Al final del proceso de inmunización se sangraron los conejos, el suero se separó por centrifugación (2000 g, 20 min, 4°C) y se guardó a -80°C .

Desarrollo y validación del ELISA de LH

Se puso a punto un ELISA competitivo específico para la LH de lubina, basándonos en los protocolos descritos para los ELISAs de la vitelogenina de lubina (Mañanós *et al.* 1994) y de la LH de lubina americana (Mañanós *et al.* 1997), quedando establecido como sigue:

1. Recubrimiento ("coating") de los pocillos de las microplacas (96-well Maxisorp, NUNC) con LH β de lubina (1 ng/0.1 mL/pocillo) preparada en tampón carbonato 50 mM, a pH 9.6, durante toda la noche a 4°C . Tres pocillos por placa se recubrieron con la misma concentración de albúmina (BSA, Sigma) para determinar la unión no específica (NSB). Después del recubrimiento, se lavaron los pocillos (3×1 min) con tampón PBST (tampón fosfato 10 mM, 0.9% NaCl y 0.05% Tween-20, pH 7.2).
2. Saturación (30 min a 37°C), con 200 μL /pocillo de tampón de ensayo (tampón PBST con suero de cabra normal al 2%). Lavado (3×1 min) con tampón PBST.
3. Incubación con anticuerpos específicos (AbLH β) y muestras/patrón. Previamente, patrón y muestras se preincubaron durante una noche a 4°C con AbLH β (dilución final 1/80,000), en tubos, diluido en tampón de ensayo. Tras la preincubación, las muestras y el patrón se dispensan por duplicado (100 μL /pocillo) en los pocillos recubiertos y se incuban durante 90 min a 37°C . Los pocillos NSB y cinco pocillos recubiertos con LH β (ligado máximo, Bo) sólo reciben solución de AbLH β .
4. Incubación con anticuerpos secundarios. La unión del complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante la

concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and stored aliquoted at -80°C . For the first injection, each rabbit received 1 mL of an emulsion prepared with equal volumes of LH β solution (50 μg of LH β in 0.9% NaCl) and Complete Freund's Adjuvant, given at several points under the dorsal skin. Five subsequent injections, each of 50 μg of LH β dissolved in Incomplete Freund's Adjuvant, were given under the skin every four weeks, until no increase in the antibody titer was detected. The titer of the antibody was tested by ELISA on 96-well plates (high-binding, Costar Corporation, MA), by incubating LH β coated wells with serial dilutions of immune serum and further development with HRP-labeled goat anti-rabbit antibodies (BioRad). At the end of the immunization procedure, the rabbits were bled and the serum was separated by centrifugation (2000 g, 20 min, 4°C) and stored at -80°C .

Development and validation of the LH ELISA

A competitive ELISA was developed, based on the protocol described for ELISAs of sea bass vitellogenin (Mañanós *et al.* 1994) and striped bass LH (Mañanós *et al.* 1997) and adapted as follows:

1. Coating the wells of 96-well microplates (Maxisorp, NUNC) with sea bass LH β (1 ng/0.1 mL/well), dissolved in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6, overnight at 4°C . Three wells were coated with the same concentration of bovine serum albumin (BSA, Sigma) to determine the non-specific binding. After coating, the wells were washed (3×1 min) with PBST buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.9% NaCl and 0.05% Tween-20).
2. Saturation of the wells (30 min at 37°C) with 200 μL /well of assay buffer (PBST buffer, containing 2% normal goat serum). Washing (3×1 min) with PBST buffer.
3. Incubation with specific antibodies (AbLH β) and samples/standard. Before distribution into the wells, standard and unknown samples were first preincubated with AbLH β (final dilution 1/80,000) in tubes (overnight at 4°C). The standard curve ranged from 0.2 to 26 ng mL^{-1} of LH. All the samples were diluted in assay buffer. After preincubation, samples and standards were dispensed in duplicate (100 μL /well) into the coated wells and incubated for 90 min at 37°C . The non-specific binding wells and five LH β coated wells (maximum binding, Bo) received only AbLH β solution. After incubation, the wells were washed (3×1 min) with PBST buffer.
4. Incubation with secondary antibodies. Bound antigen-antibody complexes were detected by incubation (100 μL /well, 30 min at 37°C) with HRP-labeled goat anti-rabbit IgG (GAR-HRP, affinity purified ETA grade, BioRad), diluted at 1/3000 in assay buffer. After incubation, the wells were washed (3×1 min) with PBST buffer.

incubación (100 μL /pocillo, 30 min, 37°C) con IgG de cabra contra conejo marcada con HRP (GAR-HRP, affinity purified ETA grade, BioRad), diluida 1/3000 en tampón de ensayo. Tras incubación, lavado (3 \times 1 min) con tampón PBST.

5. Revelado del color por adición de 100 μL /pocillo de TMB (BioRad). La reacción (en oscuridad a temperatura ambiente) se para tras 20 min, añadiendo 100 μL /pocillo de H_2SO_4 1 N. Se determinaron las absorbancias a 450 nm, usando un lector automático de microplacas (BioRad).

El ensayo se validó para muestras de plasma e hipófisis de lubina. El plasma se obtuvo por centrifugación (3000 g, 15 min, 4°C) de sangre extraída de lubinas adultas, machos y hembras, por punción caudal, usando jeringas y tubos heparinizados. El plasma, guardado a -80°C se utilizó directamente en el ELISA, a la dilución apropiada, sin ningún procesado adicional. Las hipófisis se obtuvieron de los mismos animales y se extrajeron por homogeneización en 0.5 mL de tampón fosfato 10 mM, a pH 7.2, NaCl al 0.9%, en frío, usando un polytron. El homogeneizado se dejó reposar en hielo 30 min y se centrifugó (2500 g, 30 min, 4°C) para eliminar sólidos. Posteriormente se congeló a -80°C hasta su análisis por ELISA, sin ningún procesado adicional.

Para el experimento de tratamiento hormonal se utilizaron lubinas hembras adultas (4 años, 0.8 ± 0.25 kg), mantenidas en instalaciones nuestras en condiciones naturales de luz y temperatura (16°C durante el experimento) y en estado de maduración final oocitaria (diámetro oocitos ~ 450 μm). Los peces se distribuyeron en tanques circulares de 3000 L, en cuatro grupos homogéneos ($n = 6$) y se trataron con 5, 25 ó 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de GnRH α ([D-Ala⁶, Pro⁹ Net]-LHRH, Sigma), o bien recibieron una inyección de solución salina (controles). Los tratamientos se aplicaron una sola vez sobre peces anestesiados (inmersión en 300 ppm fenoxietanol, Sigma), por inyección intraperitoneal y, posteriormente, se muestrearon a 1.5, 3, 6, 12 y 24 h post-tratamiento (pt), para la obtención de sangre por punción caudal, usando jeringas y tubos heparinizados. El plasma se obtuvo por centrifugación (3000 g, 15 min, 4°C) y se guardó a -80°C para el posterior análisis de LH por ELISA.

Estadística

Todos los datos se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Para el experimento de inducción hormonal, las diferencias entre las medias se analizaron entre los diferentes grupos, para cada punto de muestreo, mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguida del test de rango LSD (diferencias significativas mínimas). Previa y respectivamente, se verificaron la normalidad y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Bartlett. La significación se aceptó en todos los casos a $P < 0.05$. Para los cálculos del ELISA, las curvas sigmoideas

5. Color development was performed by addition of 100 μL /well of TMB peroxidase substrate solution (BioRad). The reaction (complete darkness at room temperature) was stopped after 20 min by addition of 100 μL /well of 1 N H_2SO_4 . Absorbances were read after 5 min at 450 nm, using an automatic microplate reader (BioRad).

Validation of the assay was performed over plasma and pituitary samples of sea bass. Plasma was obtained by centrifugation (3000 g for 15 min at 4°C) of blood collected from adult male and female sea bass, using heparinized syringes and tubes. The plasma, stored at -80°C , was used in ELISA, at the right dilution, with no other additional processing. Pituitaries were collected from similar fishes and were homogenized in 0.5 mL of 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, 0.9% NaCl, on ice and centrifuged (2500 g for 30 min at 4°C) with a polytron to eliminate debris. Pituitary extracts were stored at -80°C until analysis by ELISA, with no other additional processing.

For the experiment of hormonal induction, we used post-vitellogenic female sea bass (four years old, BW 0.8 ± 0.25 kg, oocyte diameter ~ 450 μm), reared in our facilities under natural photoperiod and temperature conditions (16°C at the beginning of the experiment). Fishes were distributed in 3000-L circular tanks in four homogenous groups ($n = 6$) and were treated with 5, 25 or 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRH α ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-LHRH, Sigma) or saline (controls). Treatments were applied as a single intraperitoneal injection. Blood samples were obtained at 1.5, 3, 6, 12 and 24 h post-treatment (pt). The plasma was obtained by centrifugation (3000 g for 15 min at 4°C) and stored at -80°C until analysis of LH by ELISA.

Statistics

All data are expressed as mean \pm standard error of the mean. For the experiment of hormonal induction, mean differences were studied between groups, for each sampling point, by an analysis of variance, followed by a least significant difference range test. Previously, the Kolmogorov-Smirnov test and Bartlett's test verified normality and homogeneity of variances, respectively. In all cases, significance was accepted at $P < 0.05$. For data calculations in ELISA, sigmoid curves were linearized using the logit transformation: $\text{logit}(B/B_0) = \ln(B - N/B_0 - B)$, where B represents the binding of each point, B_0 the maximum binding and N the non-specific binding. Parallelism between displacement curves was tested by the analysis of covariance. Linear regressions were tested by the method of least squares.

Results

Purification of sea bass LH and subunits

The LH was purified from pituitaries of adult male and female sea bass by ethanol extraction and several chromatographic steps (fig. 1). The elution of the pituitary extract on gel

se linealizaron usando la transformación logit, $\text{logit}(B/B_0) = \ln(B-N/B_0-B)$, siendo B la unión de cada punto, B_0 la unión máxima y N la unión no específica. El paralelismo entre las curvas de desplazamiento se analizó mediante el análisis de la covarianza. Las regresiones lineales se analizaron por el método de los mínimos cuadrados.

Resultados

Purificación de la LH y sus subunidades en la lubina

La LH se purificó a partir de hipófisis de lubinas adultas mediante extracción alcohólica y varios pasos de cromatografía (fig. 1). La elución del extracto alcohólico hipofisario en cromatografía de gel filtración, dió lugar a seis picos principales (fig. 1a) cuyo análisis por SDS-PAGE y rPHPLC mostró la presencia de posible LH en el pico G4. La elución del pico G4 en SDS-PAGE, en condiciones no reductoras, mostró, junto con otras proteínas, una banda predominante de 31 kD, la cual se disociaba en dos bandas menores de 12 y 22 kD en condiciones reductoras. En rPHPLC, el pico G4 dió lugar a varios picos, detectándose las proteínas de 12 y 22 kD en los picos que eluyeron a 40 y 45 min. La secuenciación de aminoácidos *N*-terminal de estos dos picos, los identificó como las posibles GP α y LH β de lubina. También se detectaron subunidades GP α y LH β libres en las fracciones G5 y G6, que eluyeron cerca del pico G4, mientras que las fracciones G1, G2 y G3 contenían otras proteínas.

La separación del pico G4 en cromatografía de intercambio iónico (IEC) dió lugar a cinco picos (fig. 1b). Mediante SDS-PAGE y rPHPLC, la posible LH se detectó en las fracciones eluidas a 500 mM (pico IEC4), mientras que se detectaron subunidades libres eluidas a 200 mM. La purificación final de la LH se realizó por FPLC, con cromatografía de gel filtración, sobre el pico IEC4 (fig. 1c). Las subunidades α y β se aislaron mediante rPHPLC (fig. 2). La mayoría de las subunidades se obtuvieron a partir del pico de IEC que eluyó a 200 mM, aunque de otros picos de IEC se obtuvieron cantidades menores.

La identidad y pureza de la LH y de sus subunidades se analizó mediante SDS-PAGE, rPHPLC, espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación de aminoácidos *N*-terminal. En SDS-PAGE, la preparación de LH dió lugar a una sola banda proteica (fig. 2), con un peso molecular alrededor de 30 kD, similar al descrito para las LHs de otras especies. En rPHPLC, bajo condiciones ácidas, la LH intacta se separó en dos picos (fig. 2) y cada pico dió lugar en SDS-PAGE a una sola banda proteica, en posiciones apropiadas al peso molecular esperado para las posibles subunidades LH α y β , en torno a 12 y 22 kD, respectivamente (fig. 2). La secuenciación de aminoácidos *N*-terminal mostró residuos únicos en cada pico del rPHPLC, indicando la pureza de las preparaciones. La secuencia del extremo *N*-terminal de la preparación de GP α fue Y-P-S-M-D-L-S-N-M-G y de la LH β fue F-Q-L-P-P-C-Q-L-I-C, correspondiendo ambas con las secuencias aminoacídicas de las subunidades de la LH de lubina,

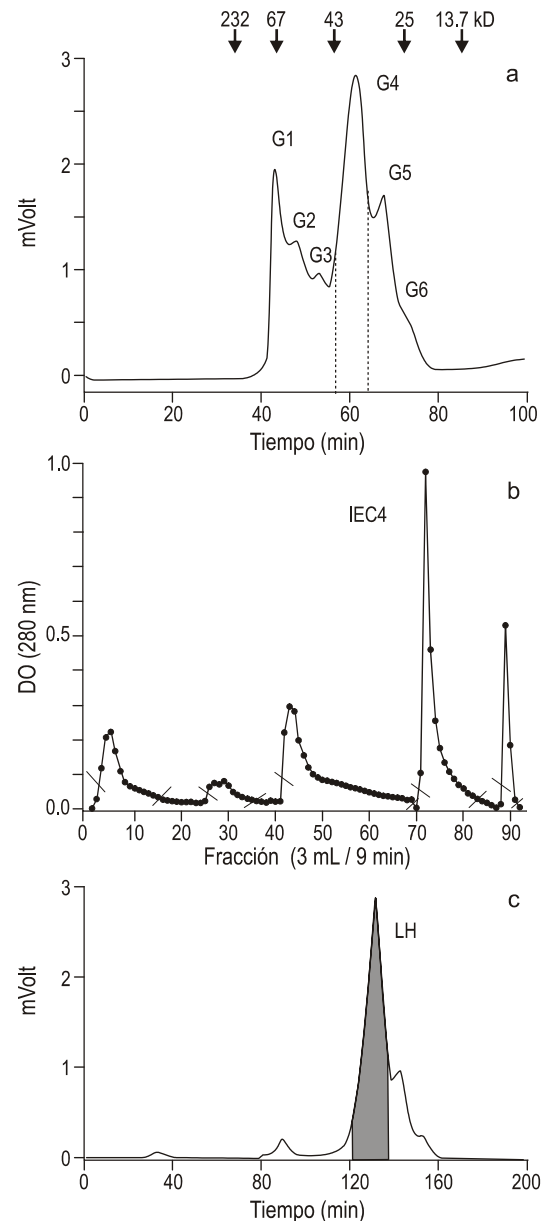


Figura 1. Purificación de la hormona luteinizante (LH) de lubina por cromatografía en tres etapas sucesivas. (a) Exclusión molecular en Superdex G100 del extracto alcohólico. La posible LH se detectó en el pico G4. La posición de patrones de tamaño proteico se muestra en la parte superior. (b) Intercambio iónico en DEAE-Sephacel CL-6B del pico G4. La muestra se eluyó con diferentes concentraciones de tampón bicarbonato de amonio (50, 100, 200, 500 y 1000 mM, aplicados en las fracciones 0, 24, 40, 68 y 87, respectivamente). La posible LH se detectó en el pico IEC4. (c) FPLC del pico IEC4, en columna Superdex 75 de exclusión molecular.

Figure 1. Chromatographic procedure for the purification of luteinizing hormone (LH) in sea bass. (a) Gel filtration of the pituitary ethanol extract on Superdex G100. The LH-like protein was detected on peak G4. The position of protein weight markers is given on top. (b) Ion-exchange of peak G4 on DEAE-Sephacel CL-6B. The sample was eluted with a stepwise gradient of ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8 (50, 100, 200, 500 and 1000 mM, given on fractions 0, 24, 40, 68 and 87, respectively). The LH-like protein was detected on peak IEC4. (c) Gel filtration (FPLC) of peak IEC4 on Superdex 75.

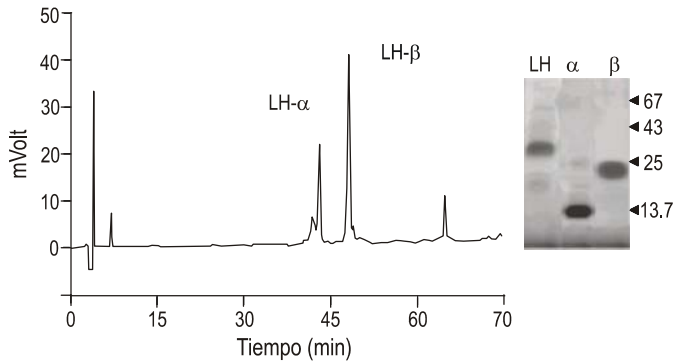


Figura 2. Purificación de las subunidades α y LH β mediante rpHPLC. La muestra (LH intacta) se disolvió en TFA 0.1% y se eluyó con un gradiente lineal de acetonitrilo 20–50%, en una columna ODS-120T TSK-GEL. Se recogieron fracciones de 1 mL por min. El gel de la derecha muestra la elución en SDS-PAGE (condiciones no reductoras) de LH intacta y de sus subunidades α y β , aisladas por rpHPLC. La posición de los marcadores de tamaño se muestra a la derecha en kD.

Figure 2. Isolation of LH α and LH β subunits by rpHPLC. The sample (intact LH) was dissolved in 0.1% TFA and eluted with a linear gradient of 20–50% acetonitrile, 0.1% TFA, on an ODS-120T TSK-GEL column. Fractions of 1 mL were collected every minute. The gel on the right shows the elution on SDS-PAGE, under non-reducing conditions, of intact LH (sample before treatment for rpHPLC) and the rpHPLC isolated α and β subunits. The position of the weight markers is given on the right in kD.

deducidas de sus respectivos cDNAs (Mateos *et al.* 2003). El análisis de las subunidades de la LH por espectrometría de masas MALDI-TOF, dió pesos moleculares de 12.395 kD para la GP α y 15.134 kD para la LH β .

Desarrollo y validación del ELISA de la LH de lubina

Se desarrolló un ELISA competitivo para analizar niveles de LH en muestras de sangre e hipófisis de lubina. La LH intacta se usó para la curva patrón, la subunidad LH β para revestir (“coating”) los pocillos y los AbLH β de lubina para la detección. En la puesta a punto del ELISA se realizaron pruebas de dilución para determinar las diluciones adecuadas del antígeno (paso de recubrimiento) y del anticuerpo específico (paso de competencia), para conseguir valores de absorbancia máxima (B_0) alrededor de 1. Los mejores resultados de sensibilidad y exactitud se obtuvieron con tiempos de incubación comprendidos entre 75 y 120 min, a 37°C (en las microplacas), precedidos por una preincubación durante toda la noche a 4°C. En la incubación del anticuerpo secundario (GAR-HRP), los valores B_0 alcanzaron la saturación a los 20 min y con concentraciones no mayores de 1:3.000. En condiciones óptimas, el límite de detección de la curva patrón estuvo alrededor de 25 pg/pocillo (B_i/B_0 85%) y 50% de desplazamiento ocurrió a 80 pg/pocillo (B_i/B_0 50%). En la figura 3 se muestra una curva patrón típica del ELISA, junto con desplazamientos paralelos de curvas de dilución de muestras de plasma e hipófisis. La precisión del ensayo se determinó calculando los coeficientes de variación (CV) intra e interensayo. El intraensayo,

filtration chromatography produced six major peaks (fig. 1a). Analysis by SDS-PAGE and rpHPLC showed the presence of an LH-like protein on peak G4. Elution of peak G4 on SDS-PAGE under non-reducing conditions showed, together with other proteins, a major protein band of 31 kD, which dissociated into two minor bands of 12 and 22 kD under reducing conditions. On rpHPLC, peak G4 was resolved in several peaks, which corresponded to single proteins as shown by the SDS-PAGE analysis. The 12 and 22 kD proteins were detected on peaks eluted at 40 and 45 min. The *N*-terminal sequencing of these two peaks indicated that they corresponded to putative sea bass GP α and LH β , respectively. Free GP α and LH β subunits were also detected on fractions G5 and G6, which eluted close to peak G4, while fractions G1, G2 and G3 contained other proteins.

Peak G4 was resolved in five different peaks on IEC (fig. 1b). Putative LH was detected, by SDS-PAGE and rpHPLC, on fractions eluted at 500 mM (peak IEC4), while free subunits were eluted at 200 mM. Final purification of putative LH was achieved from the IEC4 peak, by gel filtration on FPLC (fig. 1c). The isolation of LH α and β subunits was performed by rpHPLC (fig. 2). Subunits were mostly obtained from the IEC peak eluted at 200 mM ammonium bicarbonate, although some amounts of free subunits were also obtained from other IEC peaks or after dissociation of intact LH.

Identity and purity of the isolated sea bass LH and its subunits was tested by SDS-PAGE, rpHPLC, MALDI-TOF mass spectrometry and *N*-terminal amino acid sequencing. On SDS-PAGE, the intact LH preparation was resolved as a single protein band (fig. 2), with the expected molecular weight of an LH protein (around 30 kD). On rpHPLC, under acidic conditions, the intact LH preparation was separated into two peaks (fig. 2) and each peak was resolved on SDS-PAGE as single protein bands, at positions corresponding to the expected molecular weight of putative LH α and β subunits, around 12 and 22 kD, respectively (fig. 2). The *N*-terminal amino acid sequencing of the rpHPLC peaks revealed single *N*-terminal residues for each peak, indicating the purity of the preparation. The *N*-terminal sequence of the putative GP α preparation was Y-P-S-M-D-L-S-N-M-G, while that of the putative LH- β was F-Q-L-P-P-C-Q-L-I-C, which corresponded to the known amino acid sequences of sea bass LH subunits deduced from their respective cDNAs (Mateos *et al.* 2003). Analysis of the LH subunits by MALDI-TOF mass spectrometry gave molecular weights of 12.395 kD for GP α and 15.134 kD for LH β .

Development and validation of the sea bass LH ELISA

A competitive ELISA was developed for LH measurements in pituitary and plasma samples of sea bass, using purified intact LH as standard and specific LH β subunit antibodies for detection. For the set-up of ELISA, dilution tests were carried out to determine appropriate dilutions of the antigen (coating step) and the specific antibody (competition step) in order to get B_0 absorbance values of around 1.0. Testing different

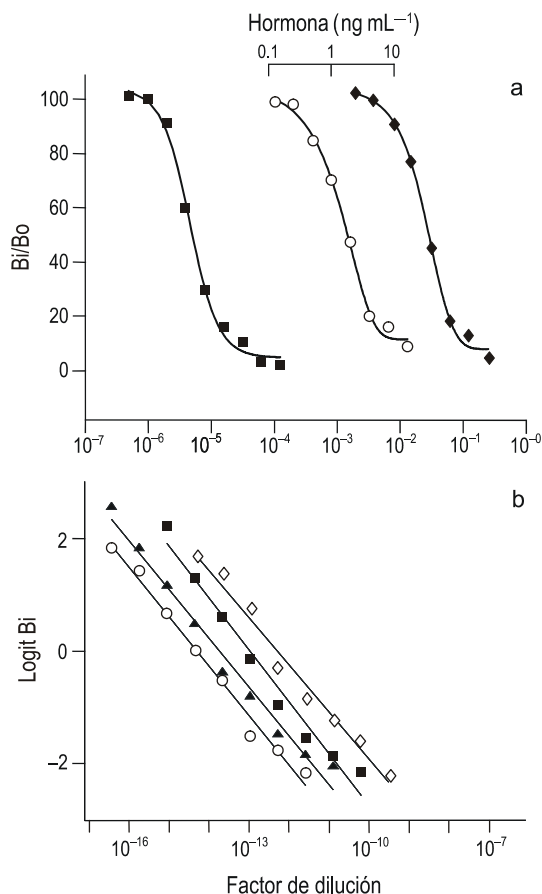


Figura 3. (a) Representación sigmoidea de una curva estándar típica del ELISA de LH de lubina (○; eje x en la parte de arriba). Las curvas de dilución de plasma de lubina (◆) y de extracto hipofisario (■; eje x en la parte de abajo) son paralelas al estándar. (b) Transformación logit de curvas de dilución de diferentes extractos hipofisarios, mostrando paralelismo entre muestras de lubina (○) y otras especies de perciformes: *Sparus aurata* (▲), *Dentex dentex* (■) y *Pagrus bogaraveo* (◇).

Figure 3. (a) Sigmoid representation of a typical standard curve of the sea bass LH ELISA (○; x axis on the top). Dilution curves of sea bass plasma (◆) and pituitary extract (■; x axis on the bottom) were parallel to the standard. (b) Logit transformation of dilution curves of pituitary extracts, showing parallelism between samples from sea bass (○) and other perciform fishes: *Sparus aurata* (▲), *Dentex dentex* (■) and *Pagrus bogaraveo* (◇).

calculado por análisis de replicados de la misma muestra dentro de un mismo ensayo, dio CVs del 13.5% ($n = 8$) y 11.7% ($n = 8$), para muestras de hipófisis con alta (B_i/B_0 $35 \pm 1.6\%$) y baja (B_i/B_0 $55 \pm 2.3\%$) concentración de LH, respectivamente. El interensayo se calculó midiendo replicados de la misma muestra en ensayos diferentes ($n = 10$), dando CVs de 8.6%, 11.0% y 6.5%, al $28 \pm 0.8\%$, $51 \pm 1.8\%$ y $73 \pm 1.5\%$ de desplazamiento (B_i/B_0), respectivamente. La curva de dilución del extracto hipofisario de lubina fue paralela a las curvas obtenidas con extractos hipofisarios de otras especies de peces (fig. 3b), lo que permite emplear el ELISA en el análisis de LH en estas especies de peces perciformes.

conditions for the competition step, the best sensitivity and reproducibility results were obtained for incubation times between 75 and 120 min at 37°C (in the microplates), preceded by an overnight preincubation at 4°C. In the incubation with the secondary antibodies (GAR-HRP), saturation of B_0 absorbance was reached at 20 min and at concentrations not higher than 1:3000. Time-course tests for step 5 showed no increase in color development after 20 min. Under the optimized conditions, the detection limit of the standard curve was around 25 pg/well (B_i/B_0 85%) and half-maximum displacement occurred at 80 pg/well (B_i/B_0 50%). A typical standard curve for ELISA is shown in figure 3, together with parallel displacements of pituitary and plasma dilution curves. The precision of the assay was estimated by calculating the intra- and inter-assay coefficients of variation (CV). The intra-assay CV, calculated by measuring replicates of the same sample within an assay, was estimated as 13.5% ($n = 8$) and 11.7% ($n = 8$) for two pituitary samples containing high (B_i/B_0 $35 \pm 1.6\%$) and low (B_i/B_0 $55 \pm 2.3\%$) concentrations of LH, respectively. The inter-assay CV, calculated by measuring replicates of the same sample in different assays ($n = 10$), was estimated as 8.6%, 11.0% or 6.5% when calculated at $28 \pm 0.8\%$, $51 \pm 1.8\%$ or $73 \pm 1.5\%$ of binding (B_i/B_0), respectively. Linearization of the sigmoid dilution curve of sea bass pituitary extract showed parallel displacement with pituitary extracts from other fish species (fig. 3b), which allowed the use of ELISA for LH measurements in these perciform fishes.

The physiological validation of ELISA was done by measuring LH plasma levels in mature female sea bass, treated with different doses of GnRH α ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-LHRH). A single injection of 5, 25 or 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRH α stimulated LH release at 1.5 h post-injection, from undetectable levels to around 30 ng mL⁻¹ (fig. 4). In controls, LH plasma levels were undetectable throughout the experiment. All doses of GnRH α maintained elevated LH plasma levels during 24 h. High (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and medium (25 $\mu\text{g kg}^{-1}$) doses of GnRH α were equally potent in inducing LH release and were significantly higher than the LH release stimulated by the low GnRH α dose (5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), at 12 h pt.

Discussion

In this study, chromatographic procedures similar to those described for the isolation of salmonid GTHs (Kawauchi *et al.* 1989, Swanson *et al.* 1991) and striped bass LH (Mañanós *et al.* 1997), have been used for the purification of LH in the sea bass. Chemical methods demonstrated that this purification procedure yielded highly purified preparations of intact LH and its α and β subunits. The molecular weight of the LH intact hormone was determined by SDS-PAGE as 31 kD, similar to that of other teleost LHs, which ranged from 27 to 39 kD, depending on the species (Swanson *et al.* 1991, Van der Kraak *et al.* 1992, Koide *et al.* 1993, Okada *et al.* 1994, Mañanós *et al.* 1997, Weltzien *et al.* 2003). The isolated LH α and β

La validación fisiológica del ELISA se realizó analizando los niveles plasmáticos de LH en hembras de lubina tratadas con diferentes dosis de GnRH α ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-LHRH). Todas las dosis de GnRH α provocaron un rápido incremento (1.5 h p.t.) de la LH plasmática, de similar magnitud, alcanzando unos 30 ng mL⁻¹ en los animales tratados, frente a niveles no detectables en los controles (fig. 4). La LH plasmática se mantuvo significativamente elevada con respecto a los controles durante 24 h en todos los grupos tratados. Dosis altas (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y medias (25 $\mu\text{g kg}^{-1}$) de GnRH α tuvieron un efecto similar en la inducción de la secreción de LH y fueron significativamente más potentes que la dosis baja (5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), entre las 6 y 12 h posteriores a la inyección.

Discusión

En este estudio se purificó la LH de lubina por métodos cromatográficos similares a los descritos para el aislamiento de las GTHs de salmónidos (Kawauchi *et al.* 1989, Swanson *et al.* 1991) y lubina americana (Mañanós *et al.* 1997). Se ha demostrado, por métodos químicos, que este procedimiento de purificación da lugar a preparaciones de gran pureza de LH intacta y de sus subunidades α y β . El peso molecular de la LH intacta determinado por SDS-PAGE fue de 31 kD, similar a los de otras LHs de teleosteos, que varían entre 27 y 39 kD, dependiendo de la especie (Swanson *et al.* 1991, Van Der Kraak *et al.* 1992, Koide *et al.* 1993, Okada *et al.* 1994, Mañanós *et al.* 1997, Weltzien *et al.* 2003). En cuanto a las subunidades α y β , que eluyeron como bandas únicas en SDS-PAGE, éstas dieron pesos moleculares de 12 y 22 kD respectivamente, valores situados en el rango de 15 a 22 kD para GP α y de 18 a 24 kD para LH β , descrito en otras especies de peces (Swanson *et al.* 1991, Van Der Kraak *et al.* 1992, Tanaka *et al.* 1993, Okada *et al.* 1994, Mañanós *et al.* 1997, Weltzien *et al.* 2003). En nuestro estudio, el peso molecular de las subunidades se determinó también con mayor precisión por espectrofotometría de MALDI-TOF, lo que dió pesos moleculares de 12.4 kD para la GP α y de 15.1 kD para la LH β . Esta sobreestimación de los valores obtenidos por SDS-PAGE, respecto al MALDI-TOF, es probablemente debida al efecto que las cadenas de carbohidratos tienen en la movilidad proteica en los geles de SDS-PAGE.

La LH purificada de lubina, eluída como un pico único en FPLC, se separó en dos picos cuando se sometió a rPHPLC en condiciones ácidas mostrando que la preparación contenía una única molécula compuesta por dos subunidades. Por otro lado, los picos en rPHPLC de las subunidades α y β tenían forma multidentada, reflejo probablemente de la presencia de diferentes isoformas glicosiladas de las subunidades. La presencia de isoformas de LH, demostrada en peces y otros vertebrados, es una característica importante de la LH, que confiere a la hormona diferentes grados de actividad biológica (Ulloa-Aguirre *et al.* 2001).

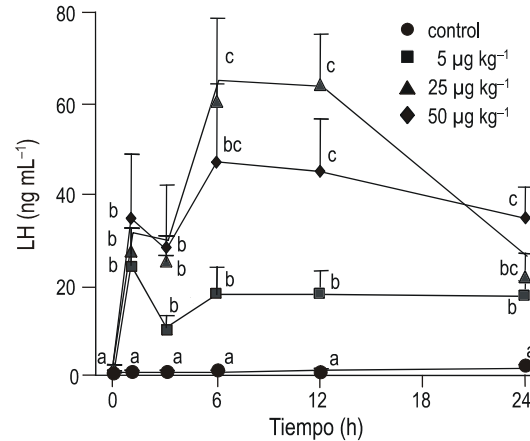


Figura 4. Estimulación de la secreción de LH en lubina mediante tratamiento con GnRH α ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-LHRH α , Sigma). Lubinas hembras, en estado de postvitelogénesis, recibieron una inyección simple (día 0) de 5, 25 ó 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de GnRH α ($n = 6$ hembras por grupo) o solución salina (control, $n = 6$). Los niveles plasmáticos de LH se midieron a 1.5, 3, 6, 12 y 24 h post-inyección, mediante el ELISA específico de LH de lubina. Datos expresados como media \pm SEM. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos en cada punto de muestreo.

Figure 4. Stimulation of LH secretion in sea bass after treatment with GnRH α ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-LHRH α , Sigma). Postvitellogenic female sea bass received a single injection (day 0) of 5, 25 or 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRH α ($n = 6$ females per group) or saline (control, $n = 6$). Plasma LH levels were measured at 1.5, 3, 6, 12 and 24 h post-injection, using the specific sea bass LH ELISA. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. Different letters indicate, in each sampling point, differences between groups.

subunits were resolved by SDS-PAGE as single bands, at positions corresponding to molecular weights of 12 and 22 kD for the α and β subunits, respectively. These values are close to those reported for other fish species, which ranged from 15 to 22 kD for GP α and from 18 to 24 kD for LH β (Swanson *et al.* 1991, Van der Kraak *et al.* 1992, Tanaka *et al.* 1993, Okada *et al.* 1994, Mañanós *et al.* 1997, Weltzien *et al.* 2003). The molecular weight of the isolated sea bass LH subunits was accurately calculated by MALDI-TOF spectrophotometry, which gave molecular weights of 12.4 kD for GP α and 15.1 kD for LH β . The overestimated values obtained by SDS-PAGE were probably caused by interference of carbohydrate residues in the mobility of the proteins on the SDS-PAGE gels.

The purified sea bass LH was fractionated by rPHPLC into two peaks, under acidic conditions, suggesting a single molecule composed of two subunits. The jagged shape of the rPHPLC peaks for the α and β subunits probably reflects the presence of different glycosylated isoforms of the subunits. The existence of LH α and β subunit isoforms has been demonstrated in fish and other vertebrates. It has been suggested that the presence of several LH isoforms is important in conferring different levels of biological activity to the hormone (Ulloa-Aguirre *et al.* 2001). In our purification protocol, no traces of FSH or FSH- β subunit were found when several rPHPLC

A pesar de una concienzuda búsqueda, mediante rpHPLC y secuenciación *N*-terminal, no se encontraron trazas de FSH β durante el proceso de purificación. Esto ha sido observado, en mayor o menor medida, en todos los estudios que han abordado la purificación de FSH β en peces no salmónidos, poniendo de relieve grandes dificultades en la purificación de la FSH en estas especies (Mañanós *et al.* 1997, Weltzien *et al.* 2003). Además, es posible que las hipófisis de lubina empleadas en nuestro proceso de purificación, tuvieran inicialmente un contenido bajo en FSH, ya que se obtuvieron de lubinas en época de prepuerta. Los estudios en salmónidos han revelado que en este momento reproductivo el contenido hipofisiario de FSH es bajo, en contraste con un alto contenido en LH, lo cual refleja el papel funcional que desempeña cada hormona en las diferentes fases del desarrollo gonadal (Breton *et al.* 1993, Slater *et al.* 1994, Swanson *et al.* 2003).

La disponibilidad de preparaciones puras de LH y LH β , así como la obtención de anticuerpos específicos LH β , permitió el desarrollo de un ELISA específico para la LH de lubina. Este inmunoensayo se optimizó a una sensibilidad de alrededor de 0.65 ng mL⁻¹, aunque se detecta desplazamiento significativo de la unión del anticuerpo a concentraciones de 0.15 ng mL⁻¹. La sensibilidad de los RIAs, previamente desarrollados para la LH de otras especies de peces, varía entre 0.3 y 7 ng mL⁻¹ (Zohar *et al.* 1990, Tanaka *et al.* 1993, Hernández *et al.* 2002), mientras que para los ELISAs de LH descritos varía entre 70 y 156 pg mL⁻¹ (Kah *et al.* 1989, Salbert *et al.* 1990, Mañanós *et al.* 1997).

Se validó el ELISA para el análisis de LH en muestras de plasma e hipófisis de lubina. Asimismo, también se demostró su validez para otras especies de Perciformes, comprobando el paralelismo de sus extractos hipofisarios con la curva patrón del ELISA y con la curva de desplazamiento de hipófisis de lubina. Este alto grado de reconocimiento inter-especies del AbLH β de lubina, probablemente es reflejo de la similitud estructural (secuencia aminoacídica) existente entre las LH β s de especies filogenéticamente cercanas (Quérat *et al.* 2000, Mateos *et al.* 2003).

El tratamiento de lubinas con GnRH α provocó una elevación brusca de los niveles de LH plasmática. El GnRH α es un potente inductor de la secreción de LH hipofisaria (Zohar y Mylonas 2001) y se utiliza ampliamente para la inducción hormonal a la puesta en especies acuícolas (Mylonas y Zohar 2001). Las dosis analizadas en este estudio (5, 25 y 50 GnRH α μ g kg⁻¹) corresponden al rango de dosis normalmente empleado en las terapias de inducción a la puesta en peces. Una inyección de GnRH α de 15 μ g kg⁻¹ induce la puesta del 100% de las hembras maduras de lubina a los 2–3 días pt (Fornies *et al.* 2001). La inducción de la puesta de huevos por el GnRH α es consecuencia de la estimulación de los procesos de maduración final de la gónada y ovulación, a través de una cascada hormonal iniciada por el efecto estimulador de la GnRH α sobre la secreción hipofisaria de LH. En nuestro estudio, analizando los niveles plasmáticos de LH, se observó una primera elevación de los niveles de LH a los 90 min de la

peaks were analyzed by *N*-terminal amino acid sequencing. Difficulties in the detection and purification of FSH have been described in almost all previous studies dealing with the purification of FSH from pituitaries of non-salmonid fish species (Mañanós *et al.* 1997, Weltzien *et al.* 2003). On the other hand, it might be possible that the content of FSH in the pituitaries used in our purification protocol was low because they were collected from sea bass in the pre-spawning period. Studies on salmonids have shown that, at this reproductive stage, the pituitary content of LH is high, whereas that of FSH is low, as corresponds to the predominant role of LH in regulating gonad maturation and of FSH in regulating the initial phases of gametogenesis (Breton *et al.* 1993, Slater *et al.* 1994, Swanson *et al.* 2003).

The sea bass LH ELISA developed has a sensitivity of around 0.65 ng mL⁻¹, although concentrations as low as 0.15 ng mL⁻¹ produced significant displacement of the binding. Previous radioimmunoassays developed for fish LHs have sensitivities ranging from 300 pg mL⁻¹ to 7 ng mL⁻¹ (Zohar *et al.* 1990, Tanaka *et al.* 1993, Hernández *et al.* 2002). The sensitivity of ELISAs described for fish LHs range from 70 to 156 pg mL⁻¹ (Kah *et al.* 1989, Salbert *et al.* 1990, Mañanós *et al.* 1997). Also, the intra- and inter-assay CV of the sea bass LH ELISA was similar to those of other fish LH immunoassays (Salbert *et al.* 1990, Tanaka *et al.* 1993, Mañanós *et al.* 1997, Hernández *et al.* 2002).

The ELISA was validated for LH measurements in plasma and pituitary extracts of sea bass. It was also validated for other perciform species by testing the parallelism of their pituitary displacement curves with the ELISA standard and the sea bass pituitary extract. This high degree of interspecies recognition of the sea bass AbLH β is probably due to the structural similarity between the LH β s of these phylogenetically related species (Quérat *et al.* 2000, Mateos *et al.* 2003).

Treatment of mature female sea bass with GnRH α induced the expected elevation of plasma LH levels. The GnRH α is a potent inducer of LH release from the pituitary (Zohar and Mylonas 2001) and is widely used for hormonal induction of spawning in sea bass and other fish species (Mylonas and Zohar 2001). The doses tested in the present study (5, 25 and 50 GnRH α μ g kg⁻¹) are within the range of the doses used for spawning induction therapies in fish. Treatment of sea bass with a single injection of 15 μ g kg⁻¹ GnRH α induces spawning in 100% of the females at 48–72 h pt (Fornies *et al.* 2001). The induction of egg release by GnRH α is a consequence of the stimulation of gonadal maturation, through a cascade of hormonal events driven by the GnRH α -induced LH release from the pituitary. Our present work showed that the GnRH α treatment induced a first increase of plasma LH at 1.5 h pt and LH levels were maintained high above the controls for 24 h. Although the first LH surge is similarly induced by all three doses, plasma LH levels at 6 and 12 h pt were significantly higher in fish treated with high GnRH α doses than in fish treated with the low dose. It is possible that the first LH surge detected at 1.5 h pt reflects the GnRH α -induced release of the

inyección, manteniéndose niveles elevados por encima de los controles durante 24 h. A pesar de que el aumento de LH se induce de forma similar con las tres dosis de GnRHa, a las 12 h pt los niveles de LH son significativamente mayores en los peces tratados con dosis altas que en los tratados con dosis bajas. Es posible que, en una primera fase, las tres dosis de GnRHa induzcan la rápida secreción (1.5 h pt) de la LH almacenada en la hipófisis, actuando con una potencia similar, mientras que en una fase posterior (12 h pt), se podría estar produciendo también la secreción de LH sintetizada *de novo* en la hipófisis, lo cual podría estar estimulado de forma diferente por cada una de las dosis de GnRHa (Mañanós *et al.* 2002). El efecto estimulador del GnRHa sobre la síntesis de LH se ha demostrado en varias especies de peces. En lubina europea (Mateos *et al.* 2003) y carpín dorado (Khakoo *et al.* 1994), el tratamiento con GnRHa incrementa los niveles de mRNA de las subunidades GP α y LH β . Se desconoce si diferentes grados de síntesis de la LH, inducidos por diferentes dosis de GnRHa, podrían dar lugar a efectos fisiológicos distintos en el proceso de estimulación de la maduración final de las gónadas y la ovulación, y por tanto, tener consecuencias sobre la cantidad y calidad de las puestas inducidas hormonalmente.

En conclusión, se obtuvieron preparaciones de gran pureza de LH y sus subunidades α y β , a partir de hipófisis de lubina, que permitieron el desarrollo de un ELISA específico para analizar niveles de LH en muestras de plasma e hipófisis de lubina. También se ha comprobado la validez de este inmunoensayo para analizar LH en varias especies de peces filogenéticamente cercanas a la lubina. El ELISA desarrollado ha mostrado buenas características de sensibilidad, precisión y exactitud. La disponibilidad de este inmunoensayo permitirá avanzar en la investigación de la endocrinología de la reproducción de la lubina y será una herramienta habitual en la optimización de terapias hormonales de inducción a la puesta.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por la Comunidad Europea (proyecto FAIR CT97-3785) y el gobierno español (proyecto CICYT MAR1998-1542CE).

Referencias

- Breton B, Mikolajczyk T, Popek W. 1993. The neuroendocrine control of the gonadotropin (GtH2) secretion in teleost fish. In: Lalloo B, Vitello (eds.), *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*. American Geophysical Union, pp. 199–215.
- Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Cerdá J, Ramos J, Mañanós E, Bromage N. 1995. Sea bass. In: Bromage NR, Roberts J (eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, London, pp. 138–168.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Carrillo M, Kah O. 1996. Development of enzyme immunoassays for 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine: Time-course studies on the effect of food deprivation on plasma thyroid hormones in two marine teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 103: 290–300.
- LH stores of the pituitary, over which all three GnRHa doses could act similarly. The second elevation of plasma LH levels, observed at 6 h pt, could be a consequence of the GnRHa-induced release of newly synthesized LH, which could be differently stimulated by the different GnRHa doses (Mañanós *et al.* 2002). The stimulatory effect of GnRHa on LH synthesis has been demonstrated in several fish species. In immature sea bass (Mateos *et al.* 2003) and sexually mature goldfish (Khakoo *et al.* 1994), the GnRHa treatment increased the GP α and LH β subunit mRNA levels, suggesting a GnRHa stimulatory action on LH synthesis. It is not known if different degrees of stimulated LH synthesis, induced by different doses of GnRHa, may cause different physiological effects in promoting final gonad maturation and ovulation and, thus, having consequences on the quantity and quality of hormonally induced spawning.
- In conclusion, highly purified preparations of LH and its α and β subunits were obtained from pituitaries of sea bass, allowing the development of a specific ELISA for LH measurements in plasma and pituitary samples of sea bass. The ELISA was also validated for LH analysis in other perciform fishes phylogenetically related to the sea bass, and showed good characteristics of sensitivity, precision and accuracy. The availability of a sea bass LH ELISA will enable further research on the reproductive endocrinology of sea bass and will be a useful tool for the optimization of spawning induction therapies.

Acknowledgements

This study was supported by the European Union (project FAIR CT97-3785) and the Spanish Government (project CICYT MAR1998-1542CE).

- Engvall E. 1980. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Meth. Enzymol.* 70: 419–439.
- Fornies MA, Mañanós E, Carrillo M, Laureau S, Mylonas CC, Zohar Y, Zanuy S. 2001. Effectiveness of different GnRHa-delivery systems on spawning induction in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 202: 221–234.
- Hearn MTW, Gomme PT. 2000. Molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily. Part I. The glycoprotein hormones. *J. Mol. Recognit.* 13: 223–278.
- Hernández MPG, Ayala AG, Agulleiro B, García A, van Dijk W, Schulz RW. 2002. Development of a homologous radioimmunoassay for Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810) LH. *Aquaculture* 210: 203–218.
- Kah O, Pontet A, Núñez-Rodríguez J, Calas A, Breton B. 1989. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for goldfish gonadotropin. *Biol. Reprod.* 40: 68–73.
- Kah O, Zanuy S, Pradelles P, Cerda JL, Carrillo M. 1994. An enzyme immunoassay for salmon GnRH and its application to the effects of diet on brain and pituitary GnRH (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 464–474.
- Kawauchi H, Suzuki K, Itoh H, Swanson P, Naito N, Nagahama Y, Nomki M, Nakai Y, Itoh S. 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 29–38.

- Khakoo Z, Bhatia A, Gedamu L, Habibi HR. 1994. Functional specificity for salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II coupled to the gonadotropin release and subunit messenger ribonucleic acid level in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 134: 838–847.
- Koide Y, Itoh H, Kawauchi H. 1993. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTH I and GTH II, from bonito (*Katsuwonus pelamis*) pituitary glands. *Int. J. Peptide Protein Res.* 41: 52–65.
- Mañanós E, Núñez J, Zanuy S, Carrillo M, Le Menn F. 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin II-validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.* 107B: 217–223
- Mañanós EL, Swanson P, Stubblefield J, Zohar Y. 1997. Purification of gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108: 209–222.
- Mañanós E, Carrillo M, Sorbera LA, Mylonas CC, Asturiano JF, Bayarri MJ, Zohar Y, Zanuy S. 2002. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *J. Fish Biol.* 60: 328–339.
- Mateos J, Mañanós EL, Martínez-Rodríguez G, Carrillo M, Quérat B., Zanuy S. 2003. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β and LH β) and their expression during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133: 216–232.
- Mylonas CC, Zohar Y. 2001. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture* 202: 205–220.
- Okada T, Kawazoe I, Kimura S, Sasamoto Y, Aida K, Kawauchi H. 1994. Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). *Int. J. Peptide Protein Res.* 43: 69–80.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M, de Mones A, Fostier A. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 361–373.
- Quérat B, Sellouk A, Salmon C. 2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) β subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 63: 222–228.
- Salbert G, Bailhache T, Zohar Y, Breton B, Jégo P. 1990. A rapid and sensitive ELISA for rainbow trout maturational gonadotropins (tGTH II): Validation on biological samples; *in vivo* and *in vitro* responses to GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 110–122.
- Slater CH, Schreck CB, Swanson P. 1994. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A: 167–175.
- Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H, Dickhoff WW. 1991. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol. Reprod.* 44: 29–38.
- Swanson P, Dickey TJ, Campbell B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 53–59.
- Tanaka H, Kagawa H, Okazawa K, Hirose K. 1993. Purification of gonadotropins (PmGTH I and II) from red seabream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for PmGTH II. *Fish. Physiol. Biochem.* 10: 409–418.
- Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Matsumura PD, Timossi C. 2001. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch. Med. Res.* 32: 520–532.
- Van der Kraak G, Suzuki K, Peter E, Itoh H, Kawauchi H. 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 217–229.
- Weltzien FA, Norberg B, Swanson P. 2003. Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 131: 97–105.
- Zohar Y, Mylonas CC. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99–136.
- Zohar Y, Breton B, Sambroni E, Fostier E, Tosky G, Pagelson G, Leibovitz D. 1990. Development of a homologous radioimmunoassay for a gonadotropin of the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 88: 189–204.

*Recibido en febrero de 2005;
aceptado en marzo de 2006.*