

# Enzyme immunoassay(EIA)에 의한 소의 혈중 progesterone 측정과 이의 응용에 관한 연구

## 1. 二抗體의 최적조건에 관한 연구

姜正夫 · 慎鍾旭 · 崔尙龍  
慶尙大學校 農科大學 獸醫學科  
(1988 7.29 접수)

### Studies on enzyme immunoassay for determining progesterone of bovine plasma and its clinical application: I. Optimizing double antibody for progesterone in enzyme immunoassay

Chung-boo Kang, Jong-uk Shin, Sang-yong Choe  
Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Gyeongsang National University  
(Received July 29, 1988)

**Abstract:** This experiment was carried out to determine the progesterone concentration of bovine plasma by liquid phase double antibody enzyme immunoassay.

The optimum conditions of assay-system, double (first and second) antibody and carrier (normal rabbit serum) were investigated.

The optimum dilution rate of first antibody, second antibody and normal rabbit serum was  $10 \times 10^3$  to  $15 \times 10^3$ , 20 and  $1 \times 10^3$  times, respectively.

**Key words:** bovine serum,  $\beta$ -galactosidase, liquid phase, double antibody, enzyme immunoassay.

### 緒 論

Corner와 Allen<sup>1</sup>에 의해 황체에는 임신유지에 필요한 물질이 있음이 밝혀지고 Butenandt와 Schmidt<sup>2</sup>는 이 물질의 구조식을 밝혀 progesterone으로命名하였다. Zander<sup>3</sup>가 妊娠婦의 혈액중에서 progesterone을 검출하게 됨을 계기로 性狀에 관한 연구 못지 않게 측정법에 대한 관심이 아주 고조되어 각종 측정법이 개발되어 가고 있다.

혈액중의 progesterone 측정법으로서는 生物學的<sup>4</sup>, 比色<sup>5</sup>, gas chromatography<sup>6</sup> 및 螢光測定法<sup>7</sup>, radio-immunoassay(RIA)<sup>8</sup>가 이용되고 있으나 이중에서 RIA

는 測定感度 및 再現성이 아주 높아 지금도 널리 활용되고 있다.<sup>9~11</sup> 그러나 RIA는 radioisotope를 사용해야 하는 특수성 때문에 특수한 시설과 장소를 요할 뿐만이 아니고 폐기물 처리의 어려움, 인체의 오염가능성 등으로 해서 사용에 많은 제약과 어려움이 있어 radioisotope 대신 酵素를 marker로 사용하는 酵素免疫測定法(Enzyme immunoassay:EIA)이 개발되었다.

EIA는 Engvall과 Perlmann<sup>12,13</sup> 및 Van Weemen과 Schurrs<sup>14,15</sup>의 steroid계통의 ฮอร์โมน측정을 계기로 Dray 등<sup>16</sup>에 의해 EIA에 의한 progesterone측정이 처음 실시되었으며 생리기능상의 특징으로 특히 소의 발정감정<sup>17</sup>, 임신진단<sup>18</sup>, 번식장애 진단<sup>19</sup>, 분만후 난소기능

회복상태<sup>20</sup> 및 번식장에서 치료효과의 판정<sup>21,22</sup>에도 크게 활용 가능한 것으로 밝혀져 가고 있어 이의 분석법의 확립이 시급한 실정에 있다.

EIA에서는 B/F분리를 하지 않는 방법<sup>16,18</sup>과 B/F분리에 固相法을 이용하는 방법 등<sup>23</sup>이 있으나 前者의 경우 交叉反應 및 精度에 문제가 있는데 비해 後者는 실시가 비교적 간편하고 시간단축 등의 잇점은 있으나 測定感도가 약간 낮아 이를 보완하기 위한 한 방법으로 MCA(monoclonal antibody)개발 등에 의한 응용이 시도되고 있으나<sup>24</sup> 현 단계에서는 앞서의 방법을 보완한 二抗體法에 의한 EIA가 特異성과 精度가 RIA보다 높고 안정한 것으로 알려져 있어<sup>25-27</sup> 이의 測定系 확립의 전제조건으로 본 연구에서는 二抗體(一次抗體 및 二次抗體)의 分離, 精製後의 최적조건과 擔體(정상토끼 혈청)의 최적조건을 동시에 구하기로 하였다.

### 材料 및 方法

표준용액용 progesterone은 progesterone(4-pregnene-3,20-dione; Sigma社製)을, 一次抗體用 항원은 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-BSA(Sigma社製)를, 標識用 항원은 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone-hemisuccinate(Sigma社製)를, 標識抗原用 효소는  $\beta$ -D-galactosidase(Boehring Mannheim社製)를, 酵素基質로는 o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside(Nakarai社製)를, 抗酸化劑로는 2-mercapto-ethanol(Fluka社製)을, 反應停止劑로는 sodium carbonate(Merck社製)를 사용하였다.

표준용액 조제용 progesterone溶解는 特級 Methanol(Kishida化學社製)을, 標識酵素 縮合用 시약중 酸化劑로는 isobutyl chloroformate(Tokyo Kasei社製)를, 中和劑로는 tri-n-butylamine(Kishida社製)을, 溶媒로서는 DMF(N-N-dimethylformamide; Kishida社製)를, 酵素標識抗原 精製에는 sephadex G-25(Pharmacia fine chemicals社製)를 사용하였다.

Adjuvant는 Freund의 complete 및 incomplete(Difco laboratories社製)를 사용하였다.

一次抗體의 分離 및 精製 : New Zealand white rabbit(3匹, 평균체중 1.5kg)에 11 $\alpha$ -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-BSA를 항원으로 하여 면역접종해 作製하였다.

면역방법, 투여간격, 항체가 측정, 항혈청의 分離 및 精製는 거의 NakaO<sup>28</sup>의 방법에 준하였으나 항원량이 1,000pg으로 많았고, 항체가 측정에는 EIA의 필요 때 마다 RIA로 항체가의 가장 상승시기를 포착해 全採血을 실시한 점이 달랐다.

二次抗體의 分離 및 精製 : NakaO<sup>28</sup>의 방법에 의거 토끼의  $\gamma$ -globulin을 순수분리한 후 이를 항원으로 하여 兪양에 接種시켜 作製하였다.

면역방법, 투여간격, 항체가 측정, 항혈청의 分離 및 精製 역시 NakaO<sup>28</sup>의 방법에 거의 의거 실시하였다.

표준용액의 조제 : 조제에 사용한 모든 용기는 증류수 洗淨後 無水methanol로 처리해 건조시킨것을 사용시까지 4°C에 보존하여 실시하였다. 표준용액용 progesterone은 progesterone을 無水methanol로 용해시켜 4°C의 恒溫室에서 1,000pg/0.2ml을 먼저 作製하여 4°C에 보존하였다가 측정시 0, 25, 50, 100, 200, 500 및 1000 pg의 progesterone 절대량으로 조절해 사용하였다.

### 結 果

최적조건의 검토 이전 여러단계의 각종 예비실험을 통해 이를 토대로 하여 실시한 결과는 다음과 같았다.

一次抗體(antiprogesterone rabbit serum)의 농도 : 一次抗體의 최적 반응조건을 구하기 위하여 擔體는 10 $\times$ -2 $\times$ 10<sup>8</sup> $\times$ 까지, 二次抗體는 1 $\times$ -100 $\times$ 까지의 단계적 희석으로 항원량을 일정하게 하여 본 실험조건과 같이하여 검토한 결과 擔體는 10<sup>8</sup> $\times$ 희석이, 二次抗體는 20 $\times$ 희석에서 吸光度值(O.D.)가 가장 높게 나타나 이후의 조건검토에서는 이를 일정하게 한 다음 一次抗體의 희석배율만을 달리한 결과 10-15 $\times$ 10<sup>3</sup> $\times$ 에서 O.D.가 가장 높았고, 20 $\times$ 10<sup>3</sup> $\times$  이상에서는 낮게 나타났다(Fig 1).

二次抗體(antirabbit  $\gamma$ -globulin sheep serum)의 농도 : 一次抗體의 至適 反應범위는 10-15 $\times$ 10<sup>3</sup> $\times$ 희석배율임이 밝혀져 一次抗體는 15 $\times$ 10<sup>3</sup> $\times$ 로, 擔體는 10<sup>3</sup> $\times$ 로하여 二次抗體의 희석배율만을 달리한 결과 60 $\times$  이상에서는 측정 불가능이었고, 5 $\times$ 에서는 20-40 $\times$ 에 비해 낮았으나 20 $\times$ 에서 가장 높았다(Fig 2).

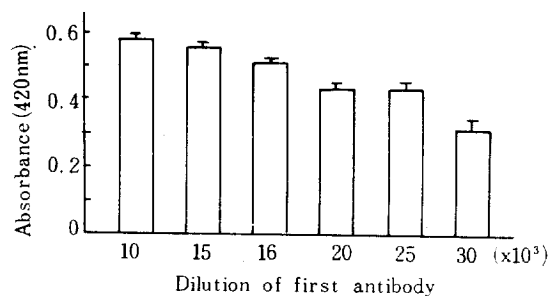


Fig 1. Diagram of first antibody diluted from 1 $\times$  10<sup>4</sup> times(dilution rate of second antibody and normal rabbit serum was 20 and 1,000 times, respectively). The values are mean $\pm$ S.D. N=5.

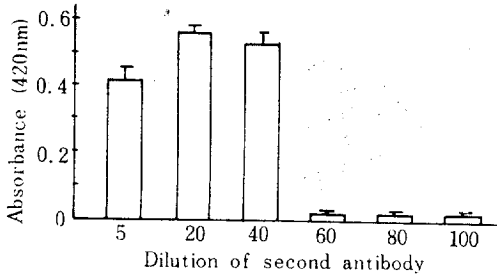


Fig 2. Diagram of second antibody diluted from 5 to 100 times(dilution rate of first antibody and normal rabbit serum was 15,000 and 1,000 times, respectively). The values are mean±S.D. N=5.

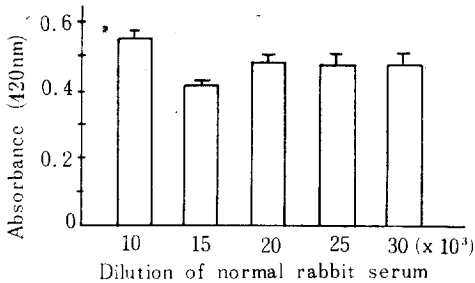


Fig 3. Diagram of normal rabbit serum diluted from 1,000 to 3,000 times(dilution rate of first and second antibody was 15,000 and 20 times, respectively). The values are mean±S.D. N=5.

擔體의 농도: 一次抗體는  $15 \times 10^3 \times$ 로, 二次抗體는  $20 \times$ 로하여 검토한 결과 Fig 3에서와 같이  $10^3 \times$ 의 희석배율이擔體의 최적농도이었다.

### 考 察

EIA에 의한 progesterone의 측정은 Dray 등<sup>19</sup>에 의해 처음 실시된 이래 여러 측정법이 개발되고 있는데 초기의 一抗體法에 의한 반응에서는 침전물의 형성이 어렵거나 되더라도 극히 미약해 측정결과 불안정성이 높고 感度 역시 낮음이 알려져 있으나<sup>28</sup> 二抗體法으로 앞서의 一抗體法을 개선한 EIA는 特異性 및 精度가 RIA와 비교해 조금도 손색이 없음이 밝혀져 있다.<sup>26,27</sup>

효소연역반응은 효소로 標識한 항원 또는 항체와 여기에 대한 항체 또는 항원간의 항원-항체반응이기 때문에 測定系의 조건 하나하나에 크게 영향을 받음을 周知의 사실이나 測定系의 조건검토에 대해서는 거의 되어있지 않고 있어도 보고자에 따라 달라 조건설정이 무엇보다 시급한 실정에 있다.<sup>28-30</sup>

標識酵素로는  $\beta$ -galactosidase와 horseradish peroxi-

dase(HRP)가 주로 사용되고 있으나<sup>8,29,31</sup> progesterone 측정에는 前者가 가장 적합한 것으로 알려져 본 실험에서는 前者를, 항원은  $11\alpha$ -hydroxyprogesterone-hemisuccinate를 사용해 mixed anhydride법<sup>23,25</sup>으로 縮合시켜 실시하였다. Nakao<sup>26</sup>는 一次抗體의 4000-64,000×까지의 단계적 희석결과 32,000× 이상에서는 단계별 항원량에 대한 반응율이 극히 낮아 사용 불가능이었으나 8,000×가 이상적이었음을, Munro와 Stabenfeldt<sup>32</sup>는 抗BSA抗體의 영향과의 관계에서 除去前에는 반응율이 낮았으나 除去後에는 반응율이 높아 12,800×가 가장 이상적이었음을 보고한바 있으나 본 실험에서는 抗體除去를 안한 상태에서 15,000×에서 가장 높았는데 이것은 一次抗體의 항체가 및 純도가 매우 높았기 때문으로 판단되며 抗BSA抗體 除去後에는 干涉영향도 크게 줄일수 있을 것으로 생각된다.

二次抗體는 희석하지 않고 그대로 사용한 보고<sup>26,33</sup>도 있으나 본 실험에서는 0-100×까지의 희석배율 결과 5×에서는 오히려 낮고, 20×에서 가장 반응율이 높았는데 이와같은 현상은 항체량의 과잉에서 오는 干涉효과로 생각된다.<sup>32</sup>

擔體의 희석배율은 200~800×가 좋았다는 보고가 있으나 본 실험의 예비과정에서 200~1,000×까지의 결과 1,000× 이상에서는 반응율이 낮았으나 1,000×까지는 충분히 사용가능함이 밝혀져 Yokota 등<sup>30</sup>의 성적보다 우수함을 알수 있었다.

### 結 論

二抗體法(液相)의 EIA에 의한 progesterone의 測定法の 확립을 기하고저 測定系中 一次抗體와 二次抗體, 擔體에 대한 최적조건 검토결과는 다음과 같았다.

1. 一次抗體의 최적 희석배율은  $10 \sim 15 \times 10^3 \times$ 수준이었으나,  $15 \times 10^3 \times$ 에서도  $10 \times 10^3 \times$ 와 비교해 거의 차이가 없었다.
2. 二次抗體의 최적 희석배율은 20×이었다.
3. 擔體의 최적 희석배율은  $10^3 \times$ 수준이었다.

### 參 考 文 獻

1. Corner GW, Allen WM. Physiology of the corpus luteum. II. Production of a special uterine reaction (progestational proliferation by extracts of the corpus luteum. *Am J Physiol* 1929;88: 326~332.
2. Butenandt A, Schmidt J. Über die polymorphen Modifikation des corpus-luteum hormons. *Chemische Berichte* 1934;67:2068~2071.

3. Zander J. Progesterone in human blood and tissues. *Nature* 1955;174:406~411.
4. Hooker CW, Forbes TR. A bio-assay for minute amounts of progesterone. *Endocrinology* 1947;41:158~163.
5. Short RV. Progesterone in blood. I. The chemical determination of progesterone in peripheral blood. *J Endocr* 1958;16:415~425.
6. Van der Molen HJ, Aakvaag A. Determination of progesterone in human peripheral blood using gas-liquid chromatography with electron capture detection. *J Clin Endocr Met* 1967;25:1625~1629.
7. Short RV, Levett J. The fluorimetric determination of progesterone in human plasma during pregnancy and the menstrual cycle. *J Endocr* 1962;25:239~245.
8. Abraham GE, Swerdloff R, Tulchisky D, et al. Radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocr Met* 1971;32:619~626.
9. Bosch AMG, Van Hell H, Brands J, et al. Enzyme-immunoassay for hormones: preparation of tracer. In: Malvano R, ed. *comparison with radioimmunoassay in Immunoenzymatic assay techniques*. Netherlands: M. Nijhoff, 1980;1~15.
10. De Villa GOJr, Roberts K, Wiest WG, et al. A specific radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocr Met* 1972;35:458~463.
11. Furuyama S, Nugent CA. A radioimmunoassay for plasma progesterone. *Steroids* 1971;17:663~667.
12. Engvall E, Perlmann P. *Enzyme-linked immunochemistry* 1971;8:871~874.
13. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972;109:129~135.
14. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1971;15:232~236.
15. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using hapten-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1972;24:77~81.
16. Dray F, Andrieu JM, Renaud F. Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using  $\beta$ -galactosidase as label. *Biochimica et Biophysica Acta* 1975;403:131~138.
17. Arnstadt KI, Schmidt-Adamopoulou B. Direct enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *Br Vet J* 1982;138:436~438.
18. Kakao T, Sugihashi A, Ishibashi Y, et al. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for early pregnancy diagnosis in cows. *Theriogenology* 1982;18:267~274.
19. Nakao T, Sugihashi A, Saga N, et al. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst and cystic corpus luteum in cows. *Am J Vet Res* 1983;44:888~890.
20. 守野繁, 中尾敏彦, 角田修男等. 乳汁中 プロジェステロン測定による 分娩後の 卵巣機能の回復状況の追跡. *家畜繁殖誌* 1984;30:61~67.
21. Nakao T, Kawata K. Enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum and milk its application in monitoring the luteinization of ovarian follicular cyst after hormone treatments. *Proc Int Cong Disease Cattle* 1980;2:916~933.
22. Nakao T, Sugihashi A, Saga N, et al. A further study on the dosage of an analog luteinizing hormone-releasing hormone (fertirelin; Desgly-LH-ethylamide) for treatment of ovarian follicular cyst in cows. *Jpn J Vet Sci* 1983;45:269~273.
23. Joyce BG, Read GF, Fahmy DR. A specific enzyme immunoassay for progesterone in human plasma. *Steroids* 1977;29:761~770.
24. Brochu M, Veilleux R, Lorrain A, et al. Monoclonal antibodies for use with <sup>125</sup>Iodine-labelled radioligands in progesterone radioimmunoassay. *J Steroid Biochem* 1984;21:405~411.
25. Joyce BG, Wilson DW, Read GF, et al. An improved enzyme immunoassay for progesterone in human plasma. *Clinical Chemistry* 1978;24:2099~2102.
26. Kakao Y. Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta Endocrinol* 1980;93:223~227.

27. Nakao T, Tamamura F, Tsunoda N, et al. Double antibody enzyme immunoassay of cortisol in bovine plasma. *Steroids* 1981;38:111~120.
  28. Van Weemen BK, Bosch AMG, Dawson EC, et al. Enzyme immunoassay of hormones. *Scand J Immunology* 1978;7 (Suppl):73~82.
  29. Sauer MJA, Cooksoon AD. Direct enzyme immunoassay of progesterone in bovine milk. *Steroids* 1981;38:45~53.
  30. Yokota O, Nakao T, Moriyoshi M, et al. Heterologous enzyme immunoassay of Progesterone in serum and from farm animals. *J Coll Dairying* 1985;11:141~161.
  31. Tamamura F, Nakao T, Tsunoda N, et al. An enzyme immunoassay of estrone in swine serum. *Steroids* 1982;39:657~666.
  32. Munro C, Stabenfeldt G. Development of microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocr* 1984;101:41~49.
  33. Engvall E, Pesce AJ. Quantitation enzyme immunoassay. *Scand J Immunology* 1978;7 Suppl: 73~129.
-