

소의 조기 임신진단 kit의 개발 II. 조기 임신진단 kit의 개발

姜 正 夫 · 李 孝 宗 · 崔 尙 龍

慶尙大學校 獸醫科大學

(1991. 2. 11 접수)

A study on production of early pregnancy diagnostic kit in cattle

II. Production of early pregnancy diagnostic kit

Chung-boo Kang, Hyo-jong Lee, Sang-yong Choe

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

(Received Feb 11, 1991)

Abstract: Most progesterone enzyme immunoassays(EIA) are used liquid-phase double-antibody or single-antibody separation. These methods consume considerable time and reagents because of the requirements for several washing and centrifugation steps involving the reactants.

Because of these several problems, we were prompted to develop an effective enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) system that would be equal or superior to RIA for assay of progesterone.

The results were obtained as follows.

1. Cross reaction of the progesterone antiserum with other steroids determined was shown with progesterone(100%), 11α -deoxycorticosterone(2.271%), but the other steroids were shown below 0.9%.
2. Standard curve for progesterone ELISA was shown available difference according to progesterone concentration from 0 to 1,000pg/ml.
3. The lower limit of sensitivity was 0.2pg/well
4. Progesterone concentration was 1.6ng/ml for before parturition, and that was below 0.5ng/ml for after parturition.

This development enzyme-linked immunosorbent assay for progesterone can be detected pregnancy diagnosis in cattle, and also applicable to research on physiological function including such as reproductive disorders.

Key word: Pregnancy diagnosis, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), progesterone, cattle

緒 論

혈액중의 progesterone 測定法으로는 Hooker와 Forbes¹에 의한 生物學的, Short의 比色², Van der Molen

과 Aakvaag³에 의한 gas chromatography 및 Short와 Levett⁴에 의한 螢光測定法, Abraham et al.에⁵ 의한 radioimmunoassay(RIA)가 있으나 이중에서 RIA는 測定感度 및 再現성이 아주높아 지금도 널리 활용되고

本 研究는 1990年度 韓國科學財團研究費 支援에 의해 수행되었음.

있다.⁶⁻⁸

그러나, RIA에서는 radioisotope를 사용해야 하는 특수성 때문에 특수한 시설과 장소를 요함은 물론 인체의 오염가능성, 폐기물 처리의 어려움, 사용하는 radioisotope의 반감기가 너무 길거나 짧은점 등으로 해서 사용에는 많은 제약과 어려움이 있어 앞서의 radioisotope 대신 酵素를 marker로 이용하는 酵素免疫測定法(enzyme immunoassay, EIA)이 개발되게 되었다.

EIA는 steroid 호르몬에 대한 측정⁹⁻¹²을 계기로 Dray et al.¹³에 의해 처음 progesterone 측정이 실시되었는데 특히 생리기능상의 특징으로 소의 발정감정¹⁴, 임신 및 번식장애 진단,^{15,16} 분만후 난소기능 회복상태,¹⁷ 번식장애에서 치료효과의 판정등^{18,19}에도 바로 활용 가능해 안정되면서도 새로운 분석법의 개발이 매우 절실한 실정에 있다.

EIA에는 液相法과 固相法등이 있는데 前者의 경우는 交叉反應 및 精度에 약간 문제가 있고 後者는 실사가 간편하면서도 시간단축등의 잇점은 있으나 아직까지는 測定感度가 약간 낮은 점이 있다.^{13,15,20}

저자들은 앞서의 液相法(一抗體法)의 문제점을 보완한 二抗體法의 확립으로 特異성과 精度면에서 RIA보다 높고 안정한 사실을 보고한바 있다.^{21,22}

본 연구에서는 저자 등이 개발, 보고한^{21,22} 液相에 의한 酵素免疫測定法을 개량하여 液相에 의하지 않은 固相에 의한 새롭고도 精度가 높은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 개발코져 titer가 높은 progesterone 항원형의 획득 및 抗 BSA抗體 除去를 실시, 보고²³ 한데 이어 측정계 전반에 걸친 검토를 실시하여 보고하는 바이다.

材料 및 方法

표준용액 조제용 : progesterone으로는 progesterone (4-pregnene-3,20-dione; Sigma 社製)으로 조제시에는 조제에 사용한 모든 용기는 증류수 洗淨後 無水 methanol로 처리시킨 다음 건조된 것을 사용시까지 4°C에 보존하여 실시하였다.

Progesterone은 無水 methanol로 용해시켜 恒溫室(4°C)에서 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 및 1,000pg/ml의 절대량으로 조절해 사용하였다.

標識抗原用 효소로는 progesterone-3CMO-peroxidase (Sigma社製)를, 酵素基質으로는 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline sulphonic acid) diammonium salt (ABTS; Baehringer Mannheim, W-Germany)를, 反應停止劑로는 0.15M hydrofluoric acid(HF)와 1.0M

EDTA acid(tetrasodium salt)를 사용하였으나 HF 용액에는 0.006M NaOH 용액을 첨가해 사용하였다.

Progesterone 항원형은 前報²³에서 분리, 정제한 것으로 단백질(항체) 농도는 coating buffer 5μg/ml로 희석하여 50μl/well로 하여 coating 하였다.

Coating buffer: Na₂CO₃ 1.59g, NaHCO₃ 2.93g, NaN₃ 0.2g을 증류수로 용해시켜 0.05M-sodium bicarbonate 용액(pH 9.6)으로 作製하여 사용하였다.

交叉反應: 11α-hydroxyprogesterone-hemisuccinate-BSA를 항원으로 토끼에 면역접종 시켜 획득한 항원형에 대한 다른 steroid와의 交叉反應은 Abraham²⁴의 방법에 준하여 구하였다.

ELISA에 의한 progesterone 측정: progesterone 측정은 檢體는 血漿 100μl에 石油 ether(特級) 2ml을 취해 30秒間 mixing 후 -70°C의 deep freezer에 靜置(10分間)하여 상층액의 추출액을 12×75mm의 corning tube로 옮겨 실온에서 건조시킨 다음 사용하였다. 표준곡선용 표준용액(0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 및 1,000 pg/ml)은 50μl씩을 13×100mm corning tube에 취해 65~68°C의 water bath 속에서 증발시켜 건조된 것을 사용하였으나 이때 수증기의 잔류가 없도록 세심한 배려를 하여 실시하였다.

Progesterone 抗體는 측정 예정 3일전에 50μl/well로 하여 Dynatech immulon® 1 plate(Dynatech Lab. USA)에 coating 후 사용시까지 sealing하여 4°C에 보존하여 사용하였다.

Progesterone conjugate 용량 및 반응시간, 基質液, 反應停止液 등에 대한 세부사항은 Fig 1과 같았다, 반응후의 흡광도 측정은 Dynatech MR 700 plate reader(Dynatech Laboratories, USA)로 실시하였다.

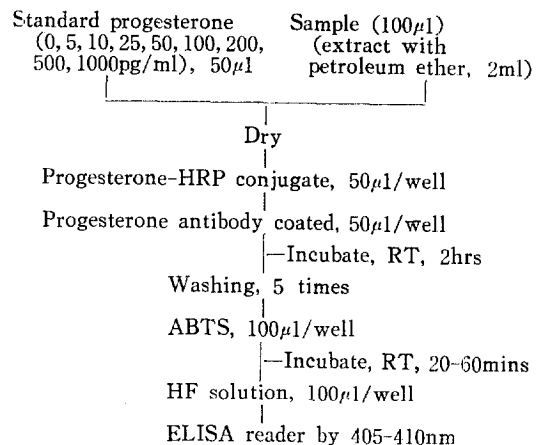


Fig 1. Enzyme-linked immunosorbent assay for progesterone.

結 果

交叉反應: 11 α -hydroxyprogesterone hemisuccinate-BSA를 항원으로 하여 획득한 항혈청에 대한 다른 steroid와의 交叉反應은 Table 1과 같았다.

Progesterone과는 100.0%, 11 α -deoxycorticosterone과는 2.271%, testosterone과는 0.118%, corticosterone과는 0.999%이었으나 이 이외의 다른 steroid와는 매우 낮음을 알 수 있었다.

Table 1. Cross reaction of antiserum to 11 α -hydroxyprogesterone hemisuccinate-BSA with various steroids

Steroid	Cross reaction(%)
Progesterone	100.0
Pregnenolone	0.002
Estrone	0.0001
Estradiol-17 β	0.003
Aldosterone	0.009
Hydrocortisone(Cortisol)	0.008
Cortisone	0.009
Corticosterone	0.999
Testosterone	0.118
11 α -deoxycorticosterone	2.271

우 낮음을 알 수 있었다.

標準曲線: 앞서 언급한 바와 같은 조건으로 실시한 progesterone 표준용액에 대한 표준곡선은 Fig 2와 같이 각 농도별에 따른 차이가 뚜렷함을 알 수 있었다.

分娩前後에 따른 progesterone 농도의 변화: 分娩前 26日에서 分娩後 10日까지의 血中 progesterone 농도를 ELISA로 분석한 결과는 Fig. 3과 같이 分娩前에는 1.3~1.6ng/ml이었으나 분만직후 부터는 0.5ng/ml 이하의 수준으로 分娩前後에 따른 뚜렷한 변동을 볼 수 있었다.

測定感度: 표준용액에 대한 최소 測定感度は 0.2pg/well이었다.

考 察

EIA에 의한 progesterone 측정은 Dray 등¹³에 의해 처음 실시 되었으나 지금까지의 一抗體法에 의한 液相 상에서의 측정에서는 抗原-抗體반응이 미약해 測定感도가 낮고 測定內 變動係數 및 測定間 變動係數가 높아 어려움이 있었다.¹³⁻¹⁶

二抗體法으로 一抗體法을 개선한 液相의 EIA에서는 特異性 뿐만 아니라 精度에서도 一抗體法과는 달리 RIA와 비교해서도 조금도 손색이 없음이 입증되어 가고 있으나 測定系 하나 하나에 대한 조건선택이 되어

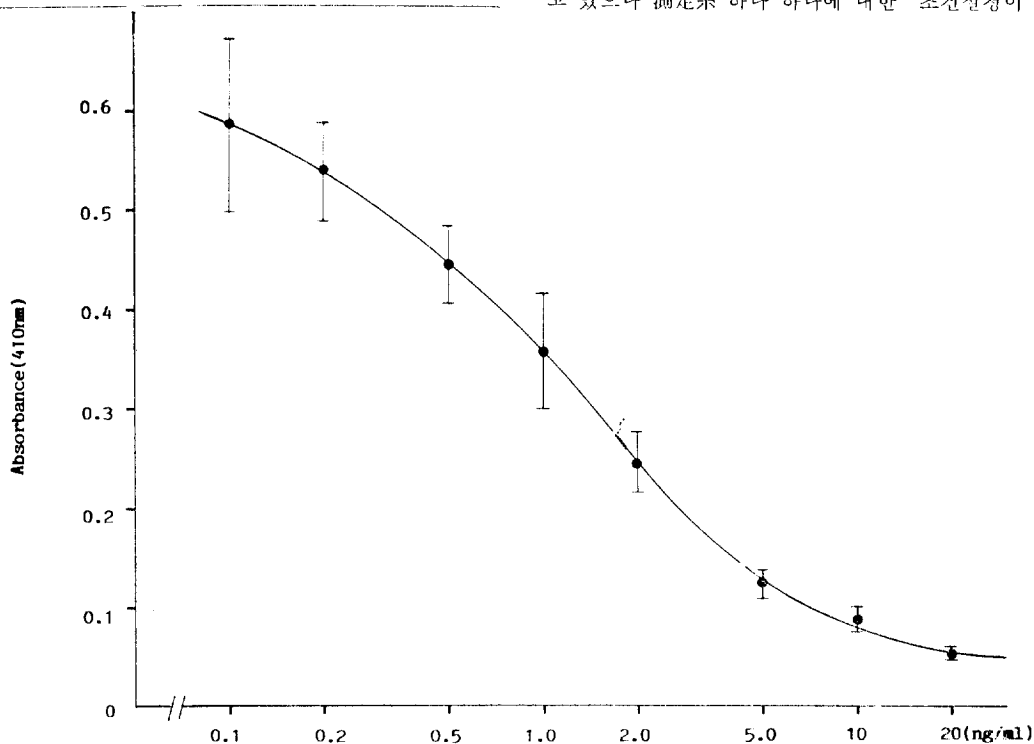


Fig 2. Standard curve for enzyme-linked immunosorbent assay of progesterone.

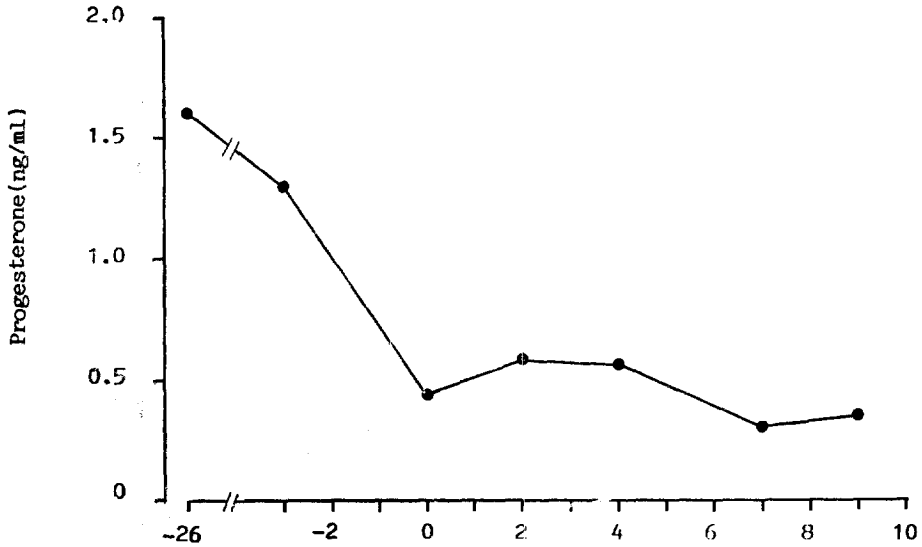


Fig 3. Change of progesterone concentration on days before(-) and after parturition. Parturition(0)

야 하는 난점을 안고 있다.²⁵⁻²⁸

저자 등이 보고²²한 二抗體法에서는 測定內 및 測定間 變動係數가 각각 4.5%, 9.5%로 RIA의 성적과도 일치하여 실제활용에는 아무런 문제가 없으나 반응시간의 단축, 안정성 및 精度를 더욱더 높여 안정된 방법을 개발하기 위해서는 종래의 液相化에 의한 분석에서 탈피하여 固相化에 의한 개발이 무엇보다도 절실히 요망된다.

Munro 등³⁰은 progesterone의 ELISA 측정(固相化)에서 抗 BSA 抗體의 존재가 측정에 크게 干涉해 測定感도가 낮음을 보고한 바 있다.

저자 등이 製作한 progesterone의 항혈청에서도 상당량의 抗 BSA 抗體가 존재함이 확인되어 BSA多量體의 作製後 吸着시험결과 완전히 제거하였음을 밝힌바 있다.²³ Progesterone 항혈청을 사용한 交叉反應에서는 progesterone과는 100.0%, pregnenolone과는 0.002%, 11 α -deoxycorticosterone과는 2.271%이었고 이외의 다른 steroid에 대해서는 매우 낮았는데 이는 Nakao²⁹의 pregnenolone과의 19.52%, 11 α -deoxycorticosterone과의 10.11%에 비교해 매우 낮음을 알 수 있었는데 이와 같은 현상은 저자 등²³이 製作한 항혈청의 titer가 훨씬 높고(2배 이상) 또한 抗 BSA 抗體 역시 제거되었기에 交叉反應이 매우 낮은 것으로 생각된다.

Kang과 Kim³¹이 보고한 progesterone의 단클론성 항체와의 交叉反應 성적과 거의 일치하여 親和性에는 차이가 있을지 몰라도 항혈청 자체로서는 우수함을 알

수 있었다.

0, 10, 20, 50, 100, 500 및 1,000pg/ml progesterone 농도의 표준곡선에서 농도별에 따른 차이가 Munro 등³⁰이 보고한 내용보다 커 측정에는 아무런 문제가 없음을 알 수 있었다.

分娩前後에서의 progesterone의 변동은 임신중에는 1ng/ml 이상으로 높고 발정기 및 非妊娠中에는 1ng/ml 이하로 낮았다는 보고내용¹³⁻¹⁹과는 거의 일치 하였으나, 임신중의 progesterone 농도가 다소 낮은 점은 개체별에 따른 차이도 고려되어 앞으로 많은 개체에 대한 동시 분석이 필요할 것으로 생각되나 임신진단에는 활용 가능성이 밝혀졌다.

앞으로 임신진단 활용에는 물론 분만후의 난소기능 회복상태, 치료효과와 판정등에 대한 활용 여부 등에 대한 체계적인 분석이 필요할 것으로 느껴진다.

結 論

종래의 一抗體 및 二抗體法을 포함한 液相에 의한 progesterone 측정법(EIA)을 개발하여 간단하고 신속하면서도 測定感도가 높은 ELISA Kit를 개발한 결과는 다음과 같았다.

1. Progesterone 항혈청에 대한 progesterone을 포함한 다른 steroid와의 交叉反應은 progesterone과는 100.0%, 11 α -deoxycorticosterone과는 2.271%이었으나 이외의 다른 steroid와의 交叉反應은 0.9% 이하이었다.

2. 0~1,000pg/ml의 progesterone 표준용액에 대한 표준곡선에서는 농도별에 따른 명확한 차이를 볼 수 있었다.

3. 最底 測定感度は 0.2pg/well이었다.

4. 分娩前後에 따른 progesterone의 변동은 分娩前에는 1.3~1.6ng/ml이었으나 분만 후 10일까지는 0.5 ng/ml 이하의 수준이었다.

이상과 같은 결과에서 ELISA에 의한 progesterone kit의 개발은 조기 임신진단에는 물론 번식장애 진단 등을 포함한 각종 병태연구에도 활용 가능할 것으로 판단된다.

參 考 文 獻

1. Hooker CW, Forbes TR. A bio-assay for minute amounts of progesterone. *Endocrinology* 1947; 41:158~163.
2. Short RV. Progesterone in blood. I. The chemical determination of progesterone in peripheral blood. *J Endocrinol* 1958; 16:415~425.
3. Van der Molen HJ, Aakvaag A. Determination of progesterone in human peripheral blood using gas-liquid chromatography with electron capture detection. *J Clin Endocrinol Metab* 1967; 25: 1625~1629.
4. Short RV, Levett I. The fluorimetric determination of progesterone in human plasma during pregnancy and the menstrual cycle. *J Endocrinol* 1962; 25:239~245.
5. Abraham GE, Swerdloff R, Tulchisky D, et al. Radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 32:619~626.
6. Bosch AMG, Van Hell H, Brands J, et al. Enzyme-immunoassay for hormones: preparation of tracer: *comparition with radioimmunoassay in immunoenzymatic assay techniques* Ed R Malvano Netheerlands; M Nijholl 1980; 1~15.
7. De Villa GO, jr, Roberts K, Wiest WG, et al. A specific radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 35:458~463.
8. Furuyama S, Nugent CA. A radioimmunoassay for plasma progesterone. *Steroids* 1971; 17:663~667.
9. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Quantitation assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871~874.
10. Engvall F, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J of Immunology* 1972; 109:129~135.
11. Van Weemen BK, Schuur AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1971; 15:232~236.
12. Van Weemen BK, Schuur AHWM. Immunoassay using hapten-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1972; 24:77~81.
13. Dray F, Andrieu JM, Renaud F. Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using β -galactosidase as label. *Biochimica et Biophysica Acta* 1975; 403:131~138.
14. Arnstadt KI, Schmidt-Adamopoulou B. Direct enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *Br Vet J* 1982; 138: 436~438.
15. Nakao T, Sugihashi A, Ishibashi Y, et al. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for early diagnosis in cows. *Theriogenology* 1982; 18:267~274.
16. 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.
17. 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.
18. 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 Diseases Cattle*, Tel Aviv 1980; 2: 916~933.
19. 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.

20. Joyce BG, Read GF, Fahmy DR. A specific enzyme immunoassay for progesterone in human plasma. *Steroids* 1977; 29:761~770.
21. 姜正夫, 愼鍾旭, 崔尙龍. Enzyme immunoassay에 의한 소의 Progesterone 측정과 이의 응용에 관한 연구 I. 二抗體의 최적조건에 관한 연구. 大韓獸醫學會誌 1988; 28(2):307~310.
22. 姜正夫, 愼鍾旭, 崔尙龍. Enzyme immunoassay에 의한 소의 progesterone 측정과 이의 응용에 관한 연구 II. Progesterone 측정에 대한 酵素免疫測定方法의 확립. 大韓獸醫學會誌 1989; 29(1):21~25.
23. 姜正夫, 李孝宗, 崔尙龍. 소의 조기 임신진단 Kit의 개발 I. Progesterone의 抗體生産 및 抗 BSA 抗體의 제거. 大韓獸醫學會誌 1991; 31(2):
24. Abraham GE. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol 17- β . *J Clin Endocr Metab* 1969; 29:866~870.
25. Tamamura F, Nakao T, Tsunoda N, et al. An enzyme immunoassay of estrone in swine serum. *Steroids* 1982; 39:657-666.
26. Van Weeman BK, Bosch AMG, Dawson EC, et al. Enzyme immunoassay of hormones. *Scandinavian J Immunol* 1978; 7(Suppl):73~82.
27. Sauer MJA, Cookson AD. Direct enzyme immunoassay of progesterone in bovine milk. *Steroids* 1981; 38:45~53.
28. Yakata O, Nakao T, Moriyoshi M, et al. Heterologous enzyme immunoassay of progesterone in serum and from farm animals. *J Coll Dairyng* 1985; 11(1):141~161.
29. Nakao Y. Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta Endocrinol* 1980; 93:223~227.
30. Munro C, Stabenfeldt G. Development of microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrin* 1984; 101:41~49.
31. Kang CB, Kim YH. Characteristics and application of monoclonal antibody to progesterone I. production of monoclonal antibody to progesterone. *Korean J Vet Sci* 1990;30(4):511-513.