

Progesterone 측정을 위한 液相 酵素免疫測定法の 최적조건에 관한 연구

姜正夫·崔日寬·孫民守·許周衡·金哲浩*

경상대학교 수의과대학
경상남도 가축위생시험소*
(1991년 12월 7일 접수)

Optimization of liquid phase enzyme immunoassay for determining of progesterone

Chung-boo Kang, Il-kwan Choi, Min-soo Son, Ju-hyeong Hur, Chur-ho Kim*

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

*Gyeongsangnam Do Veterinary Service Laboratory**

(Received Dec 7, 1991)

Abstract : This study was carried out to develop an effective liquid-phase double antibody enzyme immunoassay for determining of progesterone.

The optimum conditons of assay system, 1st and 2nd antibodies, enzyme conjugate, and time reaction were invested.

The bovine plasma progesterone level in dairy cattle and Korean native bulls were also analyzed.

The results obtained were as follows:

1. The reproducibility of petroleum ether was superior to that of ethyl ether as extract solvent of progesterone in plasma.
2. The optimum dilution rate of 1st and 2nd antibody was 30,000 and 10 times, respectively. After the reaction of enzyme conjugate to progesterone 1st antibody, and then 2nd antibody competition reaction was enough for over 1hr.
3. Average plasma progesterone level in 4 pregnant and 9 nonpregnant Holstein was 2.5 ± 0.5 and $0.7 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$, respectively. Average plasma progesterone level of 10 Korean native bulls was $0.1 \pm 0.001 \text{ ng/ml}$

From these results, by using liquid phase double antibody enzyme immunoassay for progesterone is applicable to detect of early pregnancy diagnosis, factorial analysis of reproductive disorder, and also reproductive physiological function such as monitoring of cyclicity during the post-partum period.

Key words : enzyme immunoassay, liquid phase, progesterone, double antibody, cattle

緒 論

Comer와 Allen¹에 의해 황체에는 임신유지에 필요한 물질이 있음이 밝혀지고 Butenandt와 Schmidt²는 이 물질의 구조식을 밝혀 progesterone으로命名하였다. Zan-

der³가 임신부의 혈액중에서 progesterone을 검출하게 됨을 계기로 성상에 관한 연구 못지않게 측정에 대한 관심이 아주 고조되어 각종 측정법이 개발되어 가고 있다.

혈액중의 progesterone 측정법으로서는 생물학적⁴, 比

色⁵, chromatography⁶ 및 형광측정법⁷, radioimmunoassay(RIA)⁸가 이용되고 있으나 이중에서 RIA는 측정감도 및 재현성이 아주 높아 지금도 널리 활용되고 있다.⁹⁻¹¹ 그러나 RIA는 radioisotope를 사용해야 하는 특수성 때문에 특수한 시설과 장소를 요할 뿐만이 아니고 폐기물 처리의 어려움이 있어 radioisotope 대신 효소를 marker로 사용하는 효소면역측정법(enzyme immunoassay, EIA)이 개발되었다.

EIA는 Ergv.¹¹과 Perlmann^{12,13} 및 Van Weemen과 Schurrs^{14,15}의 steroid계통의 홀몬측정을 계기로 Dary 등¹⁶에 의해 EIA에 의한 progesterone측정이 처음 실시되었으며 생리기능상의 특징으로 가축 특히 소의 발정감정¹⁷, 임신진단¹⁸, 번식장애 진단¹⁹, 분만후 난소기능회복상태²⁰ 및 번식장애시 치료효과의 판정^{21,22}에도 크게 활용가능한 것으로 밝혀져 EIA의 개발이 시급한 실정에 있다.

EIA에서는 B/F분리를 하지 않는 방법^{16,18}과 B/F분리에 液相法 및 固相法을 이용하는 방법 등이 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)개발에 의한 방법을 본 저자 등은 보고한 바 있다.^{24,25}

본 연구에서는 거의 시설과 장소를 요하지 않고 누구나 쉽게 활용할 수 있는 液相에 의한 progesterone의 酵素免疫測定方法的 확립으로 실제 응용 및 연구에 기여코져 測定系의 기본이 되는 二抗體의 최적조건, 回收率, 再現性 등 측정계 확립에 대한 보고^{26,27}에 이어 여기에서 특히 문제가 되는 추출용매에 대한 비교, 반응시간, 一次抗體와 二次抗體 및 enzyme conjugate의 최적비율 등에 대한 분석과 동시에 소의 혈중 progesterone측정을 실시토록 하였다.

材料 및 方法

표준용액용 progesterone은 progesterone(4-pregnen-3, 20-dione; Sigma社製)을, 일차항체용 항원은 11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-BSA (Sigma社製)를, 標識用 항원은 11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate(Sigma社製)를, 標識抗原用 효소는 β -D-galactosidase(Boehring Mannheim社製)를, 효소기질로는 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (Nakarai社製)를, 항산화제로는 2-mercapto-ethanol(Fluka社製)을, 반응정지제로는 sodium carbonate(Merck社製)를 사용하였다.

표준용액 조제용 progesterone용매는 특급 methanol (Kishida化學社製)을, 標識酵素 縮合用 시약중 산화제

로는 isobutyl chloroformate(Tokyo Kasei社製)를, 중화제로는 tri-n-butylamine (Kishida社製)을, 용매로서는 DMF(N-N-dimethylformamide, Kishida社製)를, 抗原標識酵素 정제에는 sephadex G-25(Pharmacia fine chemicals社製)를 사용하였다.

표준용액의 조제: 조제에 사용한 모든 용기는 증류수 洗淨후 무수methanol로 처리해 건조시킨 것을 사용시까지 4℃에 보존하여 실시하였다. 표준용액용 progesterone은 progesterone을 무수methanol로 용해시켜 4℃의 항온실에서 1,000pg/0.2ml을 먼저 작제하여 4℃에 보존하였다가 측정시 0, 25, 50, 100, 200, 500 및 1,000pg의 progesterone절대량으로 조절해 사용하였다.

一次抗體(antiprogestrone rabbit serum, APS), 二次

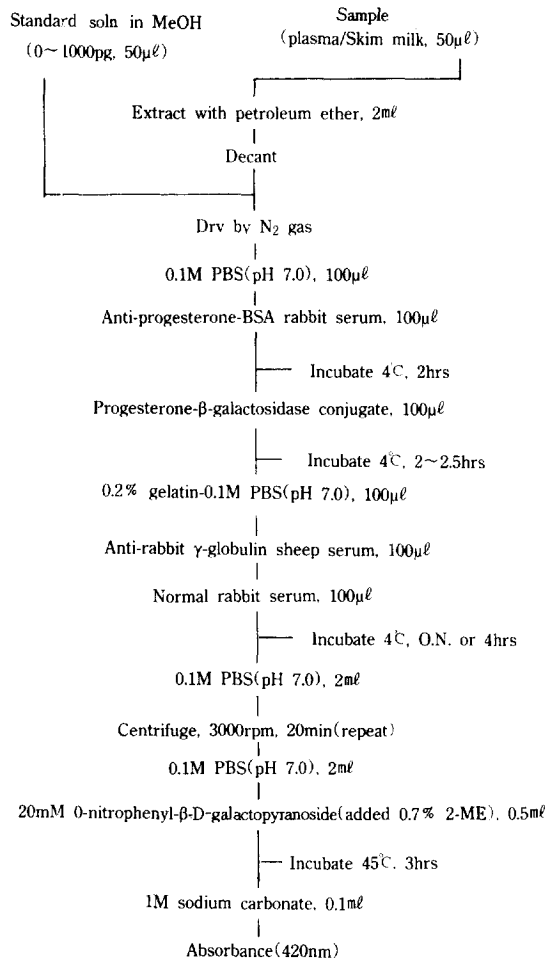


Fig 1. Liquid-phase enzyme immunoassay of progesterone.

抗體(antirabbit r-globulin sheep serum : ARGs), 항원 표지효소 (11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate- β -galactosidase conjugate, P- β -Gal)는 姜 등의 방법²⁷에 의거 작제한 것을 사용하였다. 혈중 progesterone 추출 용매로는 특급 petroleum ether 및 ethyl ether(和光純藥社製)를 사용하였다.

EIA에 의한 Progesterone 측정 : Progesterone 측정의 檢體는 혈장으로 혈장 50 μ l (100 μ l 도 무방)에 petroleum ether (특급) 2ml를 취해 30초 이상 mixing하여 상층 액만을 decantation 하여 질소 gas 또는 56°C의 water bath에 넣어 petroleum ether를 완전히 증발시킨 다음 Fig 1과 같이 하여 흡광도 측정은 UV/Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer 社製, 420nm)로 측정하였다.

結 果

抽出溶媒 : 혈장량을 10, 20, 50 μ l 씩으로 하여 혈중 progesterone 추출용매로 널리 사용되고 있는 petroleum 및 ethyl ether를 사용하여 姜 등의 방법²⁶에 의거 radioimmunoassay(RIA)로 실시한 결과 petroleum ether에서는 cpm치가 최고 5500으로 높았고 재현성 역시 높았으나 ethyl ether에서는 최고치가 5000cpm이하로 낮았으며 재현성 역시 불안정하였다. 혈장량은 적을수록 cpm치

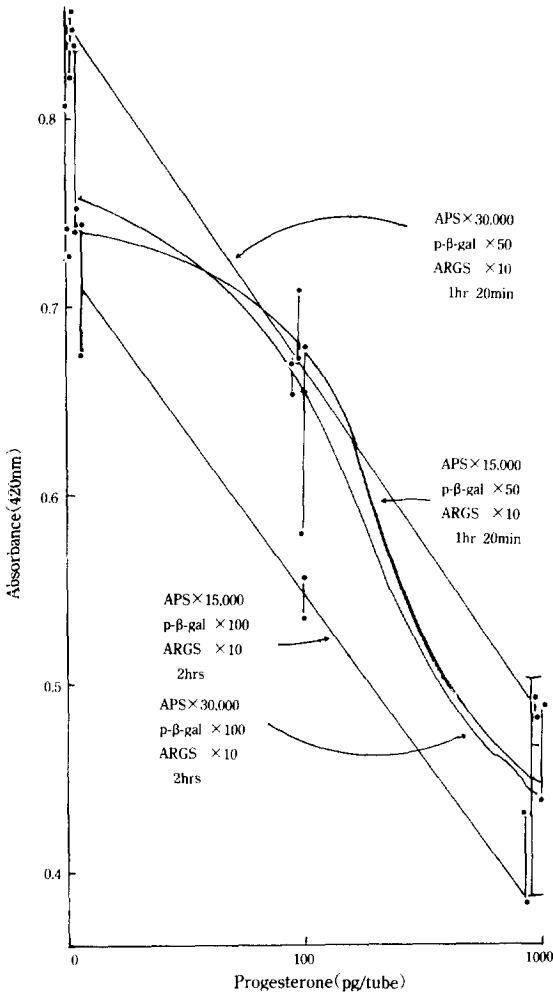


Fig 2. Optical density for progesterone to the dilution of 1st, 2nd antibodies and conjugate by enzyme immunoassay.

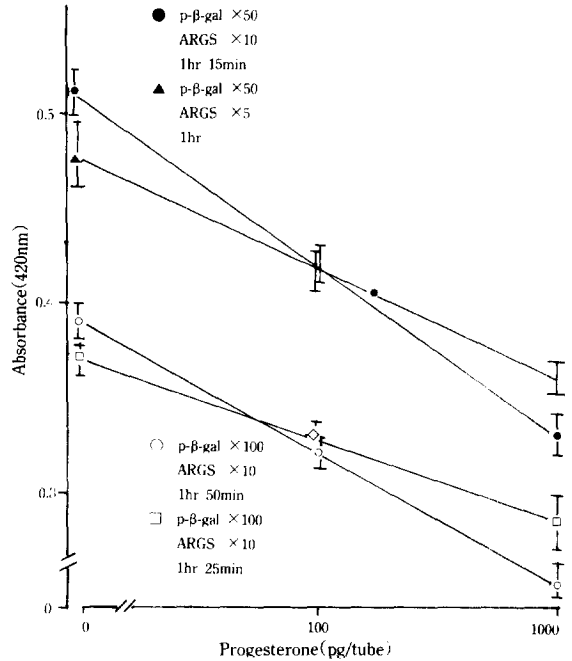


Fig 3. Optical density for progesterone to the dilution of conjugate and 2nd antibody, time reaction by enzyme immunoassay.

가 높았다.

一次 및 二次 抗體 : Fig 2에서와 같이 一次抗體(APS)는 15,000배 희석에서는 흡광도치가 일정하지 않았으나 30,000배 희석에서는 안정된 상태였고 흡광도치 역시 높았다.

二次抗體(ARGs)는 예비실험 결과에서도 10배 희석이, 본 실험에서도 역시 같은 결과를 얻었으며 檢體를 제외한 일차항체와 항원표지 효소를 반응시킨 후 이차항체와의 반응은 1시간 이상이면 충분한 것으로 나타났다.

抗原標識酵素 : 항원표지효소(P- β -gal)를 50배 및 표준용액의 항원과 항원표지 효소에 이차항체(ARGs)를 경합시켜 반응시킨 결과는 항원표지 효소는 50배

考 察

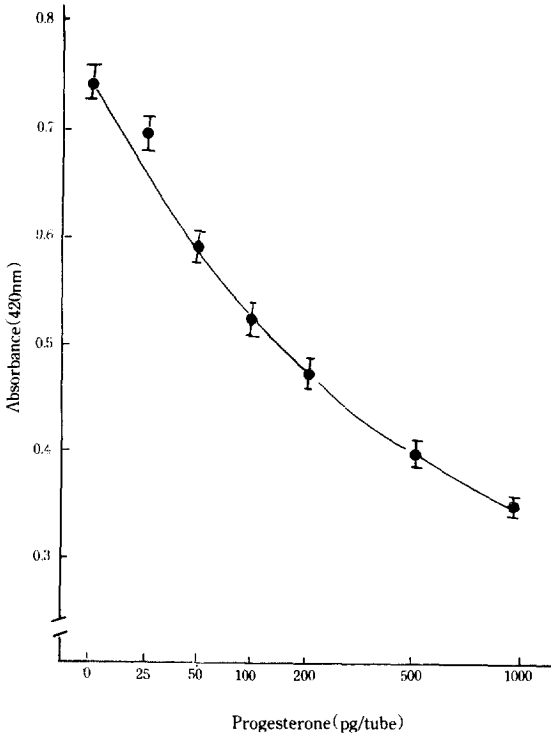


Fig 4. Standard curve for progesterone by liquid-phase enzyme immunoassay.

Table 1. Plasma progesterone level by EIA in pregnant and nonpregnant Holstein cows and Korean native bulls

Item	Breed	No.	Progesterone (ng/ml)
Pregnant	Holstein	4	2.5±0.5
Non-pregnant	Holstein	9	0.7±0.2
Growing bull	Korean native	10	0.1±0.001

회석에서 흡광도치가 0.5전후로 높았고, 100배 회석에는 0.4 이하로 낮았으며 이차항체 역시 10배 회석에서 흡광도치가 높았고, 항원량에 따른 변화 역시 컸다(Fig 3).

標準曲線: 일차항체, 이차항체 및 항원표지효소 등에 대한 조건을 토대로 하여 progesterone 절대량 0-1000 pg에 대한 표준곡선은 Fig 4와 같았다.

Progesterone 농도: 2~4산의 임신우 4두(Holstein) 및 비임신우 9두(Holstein)에 대해 EIA에 의한 progesterone 농도는 전자에서는 평균 2.5±0.5ng/ml이었고 후자에서는 평균 0.7±0.2ng/ml이었다.

국내 재래종 육성우 10두에 대한 결과는 평균 0.1±0.001ng/ml이었다(Table 1).

EIA (liquid phase)에 의한 progesterone 측정은 Dray 등¹⁶에 의해 처음 실시된 이래 여러 측정법이 개발되고 있으나 지금까지의 일항체법의 문제점에 대해서는 본 저자 등이 보고²⁶한 바와 같이 이항체법으로 일항체법을 개선한 EIA는 특이성 및 RIA와 비교해 조금도 손색이 없음이 밝혀져 있으나^{29, 30}, 측정계에 대한 조건검토에 대해서는 거의 되어 있지 않고, 되어 있어도 보고자에 따라 달라 측정계의 조건설정이 시급한 실정에 있어서 저자는 이항체 및 담체의 최적조건, 측정감도, 회수율 및 재현성을 보고한 바 있다.^{26, 27} 효소면역반응은 효소로 표지한 항원 또는 항체와 여기에 대한 항체 또는 항원간의 항원-항체반응이기 때문에 측정계의 조건 하나 하나에 크게 영향을 받음은 周知의 사실이나 측정계의 조건검토에 대해서는 거의 되어 있지 않고, 있어도 보고자에 따라 조건설정이 다르게 실정이다. Nakao²⁹는 EIA에서 자신이 개발한 일차항체의 4000-64,000X까지의 단계적 희석결과 32,000X 이상에서는 단계별 항원량에 대한 반응율이 극히 낮아 사용 불가능이었으나 8,000X가 이상적이었음을, Munro와 Stabenfeldt는 ELISA에서 抗BSA 抗體의 영향과의 관계에서 제거전에는 반응율이 낮았으나 제거후에는 반응율이 높아 12,800X가 가장 이상적이었음을 보고한 바 있다.³⁴ 본 실험에서는 항체제거를 한 상태에서 30,000X에서 흡광도치가 가장 높았는데 이것은 일차항체의 항체 및 순도가 매우 높았기 때문으로 판단되며 抗BSA 抗體 제거후 干渉 영향도 크게 줄어든 것으로 생각된다. 이와같은 결과는 본 저자 등²⁶이 밝힌 바와같이 progesterone의 일차항체 중에는 상당량의 抗 bovine serum albumin(抗 BSA) 抗體의 존재확인으로도 증명할 수 있을 것으로 생각된다.³⁵ 이차항체는 희석하지 않고 그대로 사용한 보고^{29, 30}도 있으나 본 실험에서는 5X에서는 오히려 낮았고, 10X에서는 반응율이 높았고 변화의 정도 역시 커 5X에서의 이와같은 현상은 항체량의 과잉에서 오는 간섭효과로 생각되며³⁴ 앞서 본 저자 등²⁶이 밝힌 20배 희석배율과는 차이가 있으나 이것은 일차항체가의 역가가 달라진 관계로 추측된다.

항원 표지효소는 종래의 저자 등의 성적²⁷을 근거로 50배 및 100배 회석의 결과 50배에서 흡광도치가 높고 경합반응에 의한 감소 역시 현저하였고, 비특이적인 반응 역시 적음이 밝혀졌다.

유우(Holstein)에 대한 임신중과 비임신중(주로 발정기)에 대한 progesterone의 분석에서 임신중에서는 평균 2.5±0.5, 비임신중에는 평균 0.7±0.2ng/ml이었으나

이와같은 성적은 姜 등³⁷의 분반전후에 따른 발정기 및 비임신중과 임신중의 progesterone 성적 및 다른 보고내용과도 거의 일치하였다.^{16, 21, 22, 29, 34} 재래종 육성우는 평균 0.1±0.001ng/ml²으로 매우 낮아 성별에 따른 차이가 큼을 알 수 있었으나 앞으로 건유기, 비유기, 산차별에 대한 분석은 물론 분만후 난소기능회복의 지표, 치료효과의 판정 등과 관련한 체계적인 연구가 절실한 것으로 느껴진다.

結 論

본 연구에서는 거의 시설과 장소를 요하지 않고 누구나 쉽게 활용할 수 있는 二抗體法을 이용한 液相의 EIA에 의한 progesterone 측정법의 개발을 위해 추출용매, 일차항체와 이차항체, 항원표지효소, 반응시간에 대한 검토와 아울러 유우(Holstein) 및 재래종 육성우의 혈장 progesterone에 대한 분석결과는 다음과 같았다.

1. 혈장내 progesterone 추출용매로는 ethyl ether보다 petroleum ether가 재현성이 높았다.

2. 일차항체의 최적희석비율은 30,000X, 이차항체의 최적희석 비율은 10X이었고, 일차항체와 항원표지효소를 반응시킨후 이차항체와의 반응은 1시간 이상이면 충분하였다.

3. 항원표지효소의 최적희석비율은 50X이었다.

4. 임신중의 Holstein 4두에 progesterone 농도는 평균 2.5±0.5, 비임신 Holstein 9두에서는 평균 0.7±0.2, 재래종 육성우 10두에서는 평균 0.1±0.001ng/ml²이었다.

이상과 같은 결과에서 liquid-phase EIA에 의한 progesterone 측정은 소의 조기임신진단, 번식장애별 원인감별에는 물론 생식생리의 연구에도 크게 활용가능할 것으로 판단된다.

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 I. 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. Malvano R. ed. Comparison with radioimmunoassay in immunoenzymatic assay techniques. *Netherlands : M Nijhoff* 1980 ; 1~15.
10. De Villa GD Jr, Roberts K, Wies 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 immunosorbent assay(ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *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, Schuur AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1972 ; 15 : 232~236.
15. Van Weemen BK, Schuur AHWM. Immunoassay using hapten-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1972 ; 24 : 77~81.
16. Dray F, Andriey JM, Penaud F. Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using β -galactosidase as label. *Biochimica et Biophysica Acta* 1975 ; 403 : 131~138.
17. Armstadt KI, Schmidt-Adamopoulou B. Direct enzyme immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *Br Vet J* 1982 ; 138 : 436~

438.

18. Nakao 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 and 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 analogue luteinizing hormone-releasing hormone fertirelin ; Desgly-LH-rthylamide 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. 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.
25. Kang CB, Kim JS. Characteristics and application of monoclonal antibody to progesterone II. Development of progesterone enzyme-liked immunosorbent assay(ELISA). *Korean J Vet Sci* 1991 ; 31(4) :
26. 姜正夫, 慎鍾旭, 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.
27. 姜正夫, 慎鍾旭, 崔尙龍. Enzyme immunoassay에 의한 소의 progesterone 측정과 이의 응용에 관한 연구. II. Progesterone 측정에 대한 효소면역측정방법의 확립. *大韓獸醫學會誌* 1989 ; 29(1) : 21~25.
28. Tamamura F, Nakao T, Tsunoda N, et al. An enzyme immunoassay of estrone in swine serum. *Steroids* 1982 ; 39 : 657~666.
29. Nakao Y. Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta Endocrinol* 1980 ; 93 : 223~227.
30. Nakao T, Tamamura F, Tsunoda N, et al. Double antibody enzyme immunoassay of cortisol in bovine plasma. *Steroids* 1981 ; 38 : 111~120.
31. Van Weeman BK, Bosch AMG, Dawson EC, et al. Enzyme immunoassay of hormones. *Scandinavian J Immunol* 1978 ; 7(Suppl) : 73~82.
32. Sauer MJA, Cookson AD. Direct enzyme immunoassay of progesterone in bovine milk. *Steroids* 1981 ; 38 : 45~53.
33. Yokota O, Nakao T, Moriyoshi M, et al. Heterologous enzyme immunoassay of progesterone in serum and from farm animals. *J Coll Dairying* 1985 ; 11(10)14~161.
34. Munro C, Stabenfeldt G. Development of microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrin* 1984 ; 101 : 41~49.
35. 姜正夫, 李孝宗, 崔尙龍. 소의 조기임신진단 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) : 217~222.
36. Engvall E, Pesce AJ. Quantitation enzyme immunoassay. *Scand J Immunology* 1978 ; 7 Suppl : 73~129.
37. 姜正夫, 李孝宗, 崔尙龍. 소의 조기임신진단 Kit의 개발. II. 조기임상진단 Kit의 개발. *大韓獸醫學會誌* 1991 ; 31(2) : 223~228.