

Establishment for Improving Productivity of Cattle by Fecal Steroid and Milk Urea Nitrogen Analysis

I. Development of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Progesterone and Milk Urea Nitrogen Analysis in Cattle

Chung-Boo Kang, Woo-Song Ha¹, Ji-In Kwon, Young-Sang Yu, Chul-Ho Kim and Soo-Dong Kwak[†]

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea,

¹College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

This study was carried out to determine the blood and milk progesterone by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and milk urea nitrogen (MUN) in cows. MUN and protein concentration were determined using automated infared procedures. The optimum conditions of ELISA system was investigated including the first and second antibody titres, bound percent, and enzyme conjugate and also the factors on MUN and protein concentration by sampling procedures and addition of preservatives. Progesterone antibodies did not react to pregnenolone, testosterone, estrone, estradiol-17 β , aldosterone, cortisol, corticosterone and 11 α -dehydroxycortisone (DOC), but reacted with only progesterone. The intra and inter-assay coefficient of variation 4.5%, 6.1~9.4% when used of bovine serum. The morning, MUN concentration (17.6 ± 2.8 mg/100 ml) in the 13 herds was similar to that of evening MUN concentration of the lactating cows from the same herd. A significant relationship between morning and evening milk samples of upper parameters was found $r = 0.93$. Difference in MUN concentration with sampling procedures and using of preservatives were investigated.

Key Words: Enzyme-linked immunosorbent assay, Progesterone, Double antibody, Early pregnancy diagnosis, Milk urea nitrogen, Cattle

서 론

국내의 축산농가, 낙농가들이 가장 고민하고 있는 대상의 하나가 각종 요인에 의한 번식장애의 피해임은 이미 입증된 상태에 있다³⁹⁾. 번식장애에 의한 피해를 줄이기 위한 노력은 광범한 만한 상황이나 좀처럼 개선되지 않고 있는 실정에 있음을 주지의 사실이다. 선진외국에서도 각종 방법이 동원되고 있으나 이중 하나가 호르몬 분석법이 되고 있다. 가장 큰 이유 중의 하나가 초기에, 언제라도 가능하다는 점이라 할 수 있겠다. 그러나 여기에서도 해결해야 할 여러 문제점이 내재하고 있다. 항혈정의 항체기를 포함한 안정되면서도 재

현성이 높은 기법 개발이 절실히 요구되기 때문이다. 그러면 서도 특수한 시설과 장소를 요구하지 않고 환경오염 등의 문제가 없는 분석법의 개발에 주력하지 않을 수 없는 상황에 있다.

포유류에서의 생식활동은 성성숙 (puberty)에 의해 시작, 노화에 의해 종료되는 특성을 갖고 있어 성행동 역시 호르몬의 존성으로, 소와 사람과 같이 완전 성주기 동물에서의 호르몬 특히 steroid 호르몬의 분비 상태는 생리적으로는 물론 임상적으로도 그 의미가 매우 크다.

Corner와 Allen¹⁶⁾에 의해 황체에는 임신 유지에 필요한 물질이 있음을 Butenandt와 Schmidt¹¹⁾는 이 물질의 구조식을 밝혀 progesterone으로命名하였다. Zander⁶⁰⁾는 妊娠婦의 혈액 중에서 progesterone을 검출하게 됨을 계기로 性狀에 관한 연구 못 지 않게 측정에 관한 관심이 아주 고조되어 각종 측정법이 개발되어 가고 있다.

소의 조기 임신진단 방법으로 국내에서는 대부분이 직장검사, 최근에는 초음파 진단에 의존하여 실시되고 있는 상황에 있으나 여기에는 많은 경험과 숙련을 요함은 물론이고 더욱이 직장검사의 경우 자체의 한계가 있어 어려움이 많다.

*논문 접수: 2002년 10월 26일

수정제접수: 2002년 12월 5일

[†]별책 요청 저자: 광주동, (우) 660-701 경남 진주시 가좌동 900, 경상대학교 수의과대학

Tel: 055-751-5813, Fax: 055-751-5803

e-mail: sdkwak@nongae.gsnu.ac.kr

*본 연구는 한국과학재단 (과제번호 R01-2000-000-00210-0) 지원으로 수행되었음.

더욱이 최근에는 사양, 육종 기술의 개발로 소의 비유능력은 크게 향상되어 가고 있는 반면 번식장애는 오히려 종전보다 증가하는 추세에 있다. 이와 같은 상황에서 번식장애에 의한 피해를 줄여 생산실적을 향상시키기 위해서는 분만 후 빠른 시일내에 난소 또는 자궁의 이상을 조기에 알아내어 조기에 치료하고, 수정 후 역시 되도록 빠른 시일내에 적어도 수정 후 20일 이내에 알아내어 임신되지 않은 경우는 신속히 여기에 알맞은 대책이 요구된다.

인공수정에 의한 수태율은 선진외국에서도 경산우에서도 대개 50~60%, 미경산우에서는 70~80% 정도이기 때문에⁹⁾ 경산우의 경우 적어도 40% 정도는 임신(수태)되지 않는 것으로 생각하여 되도록 빠른 시간내에 임신감정을 실시하여 수태되지 않은 예에 대해서는 이의 원인을 파악하여 필요한 처치를 하여 신속히 재수정을 실시하는 것이 공태일수의 연장(간격)을 줄이는 지름길이 된다^{4-6,8-10,49-51,54,55)}.

일반적으로 노련한 수의사의 직장검사에 의한 소의 임신 진단은 수정 후 40일 전후(실제는 40일 이후)로 이 시기에 수태되지 않은 것이 확인되더라도 실제상의 재수정은 분만 후 60일 이후가 된다¹⁷⁾.

최근에는 국내에서도 여기에 대한 대책으로 소의 혈액 또는 우유 중의 progesterone 농도의 측정은 난소내 황체의 기능을 가늠할 수 있어 분만 후 난소기능의 회복 상태를 파악하는 데에도 이용되고 있다^{11,13-15,23,24,31-33,36-40,60)}.

소의 발정주기 중 progesterone 농도는 개체의 차이, 시료의 종류 및 측정 방법에 따라서 약간의 차이가 있으나 일반적으로 난소내 기능황체의 존재 유무에 대한 기준치는 혈장, 혈청 및 탈지유에서는 1 ng/ml, 전우에서는 3 ng/ml 그리고 유^{11,13-15,23,24,31-33,36-40,60)}에서는 30 ng/ml를 기준으로 하고 있다^{44,45)}.

대부분의 steroid 호르몬의 전구체인 cholesterol은 주로 혈장에서 공급되나, 소량은 acetyl-CoA로부터 mevalonic acid, squalene을 거쳐 steroid 생성세포 자신이 de novo 할 수 있는 체제를 갖추고 있는 것만 보더라도 이의 중요성을 이해할 수 있다 하겠다.

이들 중 progesterone, estrogen (estradiol)은 난포의 발육촉진, 황체기능 유지, 임신 성립과 유지에 필수적이기에 이들에 대한 동태 파악은 생식생리의 변화상을 가능하는데 매우 중요한 자료가 되고 있기에 이의 활용에 대한 연구가 다각도로 진행되고 있다.

국내의 축산농가 및 낙농가들의 경영상의 가장 큰 애로는 각종 원인에 의한 번식장애로 미약 발정, 발정주기의 불명확, 각종 난소 질환, 유량 감소, 사료비 낭비 등과 같은 피해만이 아니고 이중 상당수는 도태에 이르는 경우가 많아 경제적 손실이 너무도 큰 테 있다.

소의 번식장애는 현재 우군 관리시 가장 문제가 되고 있는 유방염, 빨굽병과 함께 국내 목장의 3대 질병 중의 하나로

이로 인한 피해는 너무도 큰 것으로 알려져 있다. 번식장애의 한 요인인 수태율 저하로 인한 경제적인 피해만 하더라도 연간 1,300억 원 이상에 이를 것으로 추정되고 있을 정도로 심각하다. 그러나 국내 한, 유우에 발생하고 있는 번식장애에 대한 구체적이고도 체계적인 대책이 마련되어 있지 않은 상태에 있어 여기에 대한 대책은 무엇보다 시급하다 하겠다^{32,33)}.

가축 특히 한우와 유우의 증식률과 두당 생산성 향상으로 합리적인 경영 향상으로 전호시키기 위해서는 먼저 인공수정의 적기 파악과 더욱이 수정 이후에는 생체에 아무런 영향을 주지 않으면서도 조기에 수정 여부를 알아낼 수 있는 임신진단 기술이 절실히 요청된다.

종래의 steroid 호르몬 특히 혈액 중의 progesterone 측정법으로는 여러 방법들이 시도된 바 있으나 Abraham 등¹¹⁾에 의해 시도된 radioimmunoassay (RIA)는 측정감도 및 재현성이 높아 지금도 활용되고 있다.

국내에서도 progesterone 분석은 많으나^{12,13,32,33,39)} 본 연구진을 제외한 경우, 모두가 RIA에 의한 것이기에 RIA에서는 radioisotope을 사용하지 않을 수 없는 특수성 때문에 특수시설과 장비, 사후처리시설, 반감기가 너무 길거나 때로는 너무 짧은 점, 환경오염의 가능성 등이 있고 이외에도 언제, 어디서나 누구라도 쉽게 측정할 수 없는 난점이 있어 선진외국에서는 radioisotope 대신 효소를 marker로 이용한 효소면역측정법 (enzyme immunoassay 즉 EIA)을 개발한 바 있다.

Dray 등¹⁹⁾에 의해 EIA에 의한 progesterone 측정은 그 동안 방법상의 개선, 우수항혈청의 획득 등으로 하여 소의 성주기 확인, 조기 임신, 난소의 기능 회복 상태, 번식장애 진단 및 번식장애우에 대한 치료 효과의 판정 등에 널리 활용되고 있다^{15,18,31)}.

EIA는 초기의 액상법과 고상법 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)으로 구분, 전자의 경우는 교차반응과 측정감도에 문제가 있고 후자는 실시가 간편하고 판독이 아주 용이한 잇점은 있으나 아직까지는 측정감도가 약간 낮은 점이 있다. 저자는 앞서의 문제점을 보완하기 위해 2항체법의 확립^{34,35)}으로 특이성과 강도를 높이기 위한 방편으로 항체가 가높은 항혈청을 획득하여 ELISA를 위한 조건검토에 이어 소의 성주기, 조기 임신진단 등에 활용코자 하였다.

최근의 선진외국의 연구 보고에 의하면 혈중에 존재하는 요소태질소 (blood urea nitrogen; BUN) 수준과 우유내에 존재하는 요소태질소 (milk urea nitrogen; MUN)의 수준은 거의 같으나¹⁸⁾ 이들의 동태는 사료급여의 수준만이 아니고 각종 대사성 질환을 야기시킴이 판명되어 있다^{7,22,25)}.

낙농 및 목장경영에 소요되는 경비 중 사료비가 차지하는 비중은 50~60%로 현재 전세계적으로 급등하고 있는 곡물값으로 인하여 국내 농가에서 이 비중은 더 커질 우려가 높다⁶⁰⁾.

또한 비효율적인 사료급여로 인해 발생하는 대사성 질병과 특히 젖소의 번식장애, 배란지연 및 수태율 감소, 발굽병 및 유량의 현저한 감소 등은 막대한 경제적인 손실을 초래함이 알려져 있다. 그러므로 급여하는 사료내의 영양소의 농도(에너지/단백질 비율)와 이용도를 고려한다면 사료비용의 절감과 질병 억제를 통한 젖소의 생산력 향상을 가져올 수 있을 것으로 판단된다.

이러한 관계로 MUN 함량을 모니터링 함으로써 원유의 등급 결정과 유대 지불 및 미생물 수, 열에 대한 안전성 등에 관련된 생산공정 관리 및 유질 개선에 비효율적인 사료급여 개선으로 특히 대사성에 효율적인 목장 관리와 집단/개체 관리를 위한 관리 지표로 크게 활용되고 있다.

현재까지 선진외국에서도 MUN 분석으로 번식장애 여부의 가늠 등 (추측)에 활용²⁰⁻²²⁾은 하고 있으나 실제 번식장애와의 구체적인 관련성, 이중에서도 steroid 호르몬 특히 progesterone의 동태 및 이들의 기능, MUN과 progesterone이 생체내 미치는 영향은 물론이고 국내의 경우 이와 같은 연구가 체계적으로 전혀 이루어지고 있지 않은 안타까운 실정에 있어 이들의 기전을 체계적으로 규명하기 위하여 MUN 분석을 위한 제반 조건도 동시에 검증키로 하였다.

재료 및 방법

一次抗體의 分離 및 精製

New Zealand white rabbit (3匹, 평균 체중 1.5 kg)에 11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-BSA를 항원으로 하였고 면역 방법, 투여 간격, 항체가의 측정, 항혈청의 分離 및 精製는 Nakao⁴⁴⁾의 방법에 준하였으나 항원량이 1,000 pg으로 많은 점과 항체가 측정에는 ELISA와 RIA로 항체가의 제2 상승 시기에 千採血을 실시하였다.

一次抗体는 anti-rabbit IgG (H+L) goat IgG serum (Seikagaku Co. Tokyo, Japan)을 항원으로 하여 면양에 면역접종하였으며 Nakao^{44,45)}의 방법에 의하여 정제하였다.

표준용액의 주제

조제에 사용한 모든 용기는 중류수 洗淨後 無水 methanol로 처리, 건조시키는 것을 사용시까지 4°C에 보존하여 실시하였다.

표준용 약용 progesterone은 progesterone을 無水 methanol로 용해시켜 4°C의 恒溫室에서 5,000 pg/ml을 먼저 作製하여 4°C에 보존하였다가 측정시 0, 25, 50, 100, 200, 500 및 1000 pg의 progesterone 절대량으로 조절하여 사용하였다.

抗原標識酵素 (11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate- β -galactosidase conjugate)

Nakao 등⁴⁴⁾의 방법을 보완, 실시하여 column 후 효소활성이 가장 높은 분획을 사용하여 前報³²⁾에서 밝힌 一次抗體와 반응시켜 結合率 60% 이상의 것만 사용하였다.

측정감도

最少檢出量은 표준 progesterone 절대량 O Pg에 대한 O.D 치의 평균치에서 표준편차의 2배의 값을 뺀 O.D.치에서 여기에 대한 progesterone 양을 표준곡선에서 구하였다.

재현성

回收率檢定에 사용한 소의 혈장으로 재현성의 검토는 測定間 變動係數 (6회 반복)와 測定內 變動係數 ($N=6$)의 분석으로 구하였다.

Coating buffer 및 assay buffer, 세척액과 효소기질용액, 반응정지액, enzyme conjugate 및 progesterone 표준용액의 제조는 [\[34\]](#)의 방법을 보완하여 실시하였다.

변동계수 (coefficient of variation)는 표준편차에 100을 곱한 후 평균으로 나누어서 나타내었다.

회수율은 발정 초기 유우의 혈중 progesterone 농도 확인 (0.25 ng/ml) 후 1.0 ng/ml 및 2.0 ng/ml 의 progesterone 표준용액을 각각 첨가하여 측정하였다.

혈중 progesterone 농도 측정은姜 등 (1991)^{34,35}의 방법에
준하여 실시하였다.

공시동물

개체별 번식기록과 관리가 확실하고 성주기가 확인된 50두 이상의 착유우를 보유하고 있는 목장의 유우 (Holstein)와 20두 이상의 한우를 보유하고 있는 목장을 대상으로 하여 실시하였다. 본 연구에 사용된 유, 한우의 산차수는 1~7산차 (평균 3.4), 연령은 2~10(평균 5.2)년이었다.

발정감정은 통상적인 종래의 발정증후의 관찰 및 직장검사에 의한 성숙난포의 확인으로 실시하였다. 발정감정이 어려운 경우는 개체별 기록에 의거 호르몬 분석 후 이를 성주기와 관련시켜 판단, 이후의 재료로 사용하여 조기 임신진단에 활용하였다.

발정관찰 역시 분만 후 10일부터 90일까지 매일 오전, 오후 육안적으로 관찰하였고 직장검사는 원칙적으로 10일 간격으로 하여 실시하였다.

혈액 및 유즙 채취

중기 임신진단을 위한 샘플로 혈액은 공시동물의 경정맥

또는 미정맥에서 각각 5 ml를 채혈하여 실온에서 약 1시간 응혈시켜 4°C 12시간 이상 보존하여 1,500×g로 20분간 원심 분리하여 분리한 혈청은 측정시까지 -70°C에 냉동보존하여 사용하였다. 채취시 Na₂EDTA 처리한 혈액은 거의 대부분 1시간 이내에 1,500×g로 같은 조건으로 하여 혈장을 분리, 보존하였다.

유즙 채취는 각 공시우로부터 착유 직후 (後催乳)의 유즙을 오후 착유시 分房에 관계없이 채취하여 즉시 원심분리가 되지 않을 때에는 즉시 4°C 냉장고에 보관하여 가능한 한 2시간 이내에 3,000×g, 20분간 저온 원심분리하여 상층액인 지방층은 절단시켜 제거한 다음 탈지유만을 채취하여 혈액에서와 같은 요령으로 하여 분석시까지 -70°C에 보존하여 사용하였다. 유즙은 혈액 채취와는 달리 시료 채취가 매우 용이할 뿐더러 유, 한우의 생체반응에 영향이 없을 것으로 판단되어 인공수정 전후, 수정 후는 수정 당일로부터 수정 후 23~24일 경까지의 유즙을 매일 같은 조건으로 채취하여 조기 임신진단에의 활용 여부의 검토에는 물론 발정 확인 여부에의 가능성도 동시에 검토키로 하였다.

임신 확인은 호르몬 분석법 외 수정 후 40일경 전후 때로는 60일을 전후하여 직장검사법에 의하여 실시하였으며 최종 확인은 이후의 분만 여부의 확인을 통하여 실시하였다.

혈중 및 유즙에서의 progesterone 농도 측정

혈액은 앞서 언급한 바와 같은 방법으로 하여 혈청 또는 혈장을, 유즙은 탈지유를 각각 이용하여 전처리 과정을 거쳐 실시하였다.

혈청 또는 혈장 및 탈지유에서의 전처리 과정은 sample 용량을 각각 100 µl 씩으로 하여 petroleum ether (N-hexane도 병용) 2 ml를 첨가하여 완전 용해시킨 후 -70°C 또는 -20°C 냉동고에 30초 이상 보관하여 얼게 한 후 용매제에 함유된 상층액만을 회수하여 60°C 이하의 incubator에서 용매액을 완전 증발시킨 후 분석에 사용하였다.

원유 채취 방법 및 시기

경남산학연구회 소속 목장의 개체별, 분방별 원유를 채취하여 실시하였다. 시료 채취 방법 및 시기는 첫 젖 (foremilk)과 끝 젖 (postmilk), 그리고 간이유량계를 이용한 종합우유 (composite milk)를 용도에 맞게 아침·저녁으로 채취하였으며, 채취한 원유는 냉장 상태에서 보관, 유성분 검사를 실시하였다.

원유 보존제

원유검사시 널리 사용하고 있는 2종류의 보존제를 사용하였다. Potassium dichromate (Merck Co. Frankfort, Germany)는 원유검사용을 구입하여 원유에 0.2%로 하여 azidiol은 150 mg의

chloramphenicol (Sigma Co. St. Louis, MO, USA)를 1 ml ethanol에 녹인 후 중류수 60 ml과 3.6 g의 sodium azide (Wako, Co. Tokyo, Japan), 그리고 4.5 g의 trissodium citrate dihydrate (Junsei Chemical Co. Tokyo, Japan)에 혼합하였다. 혼합물은 50°C 항온수조에서 완전히 녹인 다음 중류수로 총량을 100 ml로 조정하여 원유 30 ml에 azidiol 50 µl를 첨가하여 사용하였다.

원유검사시의 온도

유성분 분석시 원유의 온도에 따른 결과치를 비교하기 위하여 목장 원유를 각각 냉장 (10°C)과 실온 (20°C) 상태에서 그리고 40°C 항온수조를 이용하여 일정 시간 동안 반응시킨 후 원유의 온도가 각각 30°C와 40°C에서 유성분 검사를 실시하였다.

우유성분 분석

원유 중 지방, 단백질, 유당, 요소태질소 및 체세포수는 Mikoscan-4,000 Serier (FOSS Electric Co., Copenhagen, Denmark)로 분석하였다. 검사기기의 정확한 결과를 얻기 위하여 지방은 Gerber법²⁷⁾, 단백질은 Kjeldahl법²⁸⁾, 유당은 HPLC법²⁶⁾, 체세포수는 직접현미경법²⁹⁾에 의해서 각각 측정된 결과치에 의하여 기기를 보정하였다.

결 과

1차항체 (antiprogesterone rabbit serum)의 최적희석농도는 5×10⁴ 이었다.

2차항체 (antirabbit γ-globulin sheep serum)의 최적희석농도는 6.8×10² 이었다.

표준곡선에 대한 최소 측정감도는 0.2 pg/well 이었다.

Progesterone에 대한 항체가 및 結合定數 (association constant)

종래의 면역접촉 방법에 의하여 획득한 다크론성 항혈청에서의 항체가를 RIA 및 ELISA로 분석한 결과 RIA 및 ELISA 관계없이 1.5×10⁵ 이었으나 오차범위는 RIA가 9.8%로 ELISA 7.8%로 RIA가 높았다. 결합정수는 2×10⁹ 이었다.

교차반응률

항혈청을 사용한 교차반응 pregnenolone과는 0.002%, estrogen과는 0.0001%, testosterone과는 0.118%로 1% 이내로 매우 낮았고 11α-deoxycorticosterone과는 2.271%로 다소 높았다.

Bovine serum albumin (BSA)의 polymer

Irshad 등³⁰⁾이 사람의 B형간염의 표면항원 (hepatitis B surface antigen, HBsAg)을 BSA 重合體로 만들어 김출한 보고의

Table 1. Intra-assay precision of the analysis to progesterone using bovine serum

Indicator	Replications						Mean \pm SD	C.V. (%)***
	1	2	3	4	5	6		
Optical density	0.230	0.227	0.234	0.243	0.229	0.220	0.230 \pm 0.007	
% Bound*	22.9	22.7	23.4	24.3	22.9	22.0	23.0 \pm 0.699	
Progesterone**	5.8	6.0	5.6	5.4	5.7	6.2	5.8 \pm 0.261	4.5

*: % Bound = E/E0 \times 100, E: absorbance reading of sample, E0: absorbance reading of zero standard, **: ng/ml, ***: C.V. = coefficient of variation

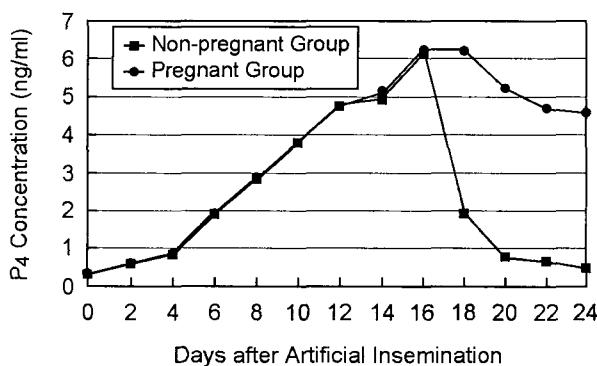


Fig. 1. Changes of plasma progesterone concentration in pregnant and non-pregnant Holstein groups.

내용에 근거하여 중합시킨 BSA 重合體 생성능은 2.5% glutaraldehyde 용액에서 가장 높았고 획득한 분자량 크기는 5×10^5 이었다.

항BSA항체의 제거

항BSA항체의 제거는 항혈청을 앞서의 BSA polymer로 37°C, 30분간 incubation 이어 10,000 rpm, 20분간 원심분리 또는 8,000 rpm, 30분간 (4°C) 원심분리한 상층액에서는 전혀 검출되지 않았다. 대조 확인을 위하여 BSA 농도를 0.1 μ g/ml로 하여 BSA polymer를 10⁶배 희석시켜 ELISA 측정한 결과에서도 뚜렷한 양성반응을 나타내어 앞서의 과정에서의 항BSA항체의 완전 제거 (흡수)되었다.

ELISA의 조건검토

재현성 조사

측정내 변동계수 (intra-assay coefficient of variation)

재현성을 조사하기 위하여 동일 개체의 소의 같은 혈청에서 이용하여 6회에 걸쳐 실시한 측정내 변동계수는 4.5%이었다 (Table 1 참조).

측정간 변동계수 (inter-assay coefficient of variation)

개체가 다른 4마리의 유우의 혈액을 이용, 각 개체별로 똑같은 시료 (혈청)에서의 3회 반복 실시한, progesterone 농도의

측정간 변동계수는 6.1%에서 9.4% 사이이었다. Bound %에 대한 변동계수는 개체별의 progesterone 농도에 따라서 차이가 있었으나 변동계수는 1.2%에서 5.7% 범위이었다.

회수율 조사

Progesterone 농도가 확인된 개체의 progesterone 농도 (0.25 ng/ml)를 기준으로 한 대조군과 대조군에다 각각 일정량을 첨가한 상태에서의 회수율은 여기에 1.0 ng/ml를 첨가한 상태에서 1.12 ng/ml로 89.6%의 회수율을, 2.0 ng/ml를 첨가한 상태에서는 2.06 ng/ml로 91.6%의 회수율을 나타내었다.

혈중 및 유즙에서의 progesterone 농도 측정

ELISA 기법에 의한 Progesterone 농도 분석과 이후의 확인에서 임신이 확진된 Holstein 76두와 비임신이 확진된 Holstein 23두에서 실시한 수정일 (A. I. O) 또는 발정일 (DO)에서의 혈청 또는 혈장에서의 Progeserone 농도는 0.26~0.86 ng/ml의 범위로 임신군에는 0.36 \pm 0.14 ng/ml, 비임신군에서의 유의성은 인정되지 않았다. 또한 혈청과 혈장에서의 progesterone의 농도 차이는 볼 수 없었다. 탈지유에서의 수정 당일의 progesterone 농도는 혈청 또는 혈장보다는 다소 낮았다 (0.21 \pm 0.04). 정상적인 성주기가 확인된 한우 83두에서 수정일의 임신군에 있어서의 progesterone 농도는 0.21 \pm 0.38 ng/ml, 비임신군에서는 0.28 \pm 0.41 ng/ml로 Holstein 유우와 비교하여 크게 차이가 없었다.

수정 당일로부터 2일 간격으로 채혈과 유즙 채취를 실시하여 Holstein 유유에서 임신군과 비임신군에서의 분석 결과는 Fig. 1과 같았다.

Fig. 1에서 바와 같이 정상적인 성주기가 확인된 유우 99두를 대상으로 실시한 결과 인공수정 후 18~24일 사이에 발정 재귀현상을 보였거나 이후 확인에서 임신되지 않았던 23두의 비임신군과 임신한 76두에 대한 일령별 경과에서 인공수정 후 14, 16일까지는 임신 여부에 관계없이 거의 차이를 볼 수 없었다. 그러나 수정 후 20일 이후부터는 현저한 차이를 나타내었다 ($P<0.01$).

임신군에서는 6.21 \pm 1.30 ng/ml 이었고 비임신군과 임신군

Table 2. Effect of milk sample temperature on milk component analysis (Mean \pm S.D; N=39)

Temperature (°C)	Fat (%)	Protein (%)	Lactose (%)	MUN (mg/dl)
10	4.21 \pm 0.15 ^a	3.32 \pm 0.10	4.93 \pm 0.09 ^b	5.39 \pm 1.72 ^a
20	4.38 \pm 0.16 ^a	3.32 \pm 0.08	4.87 \pm 0.06 ^b	7.04 \pm 2.64 ^a
30	4.70 \pm 0.18 ^b	3.34 \pm 0.08	4.78 \pm 0.06 ^a	19.7 \pm 1.55 ^b
40	4.81 \pm 0.17 ^b	3.33 \pm 0.11	4.78 \pm 0.06 ^a	18.3 \pm 1.58 ^b

a, b: Mean significantly different in same column ($P<0.05$)

Table 3. Comparision of MUN, protein and lactose concentrations by sampling procedures in quarter milk (Mean \pm S.D, N=31)

Samples	Protein (%)	Lactose (%)	MUN (mg/dl)
Foremilk	3.58 \pm 0.52	4.51 \pm 0.38	9.26 \pm 3.79
Postmilk	3.35 \pm 0.56*	3.91 \pm 0.48*	15.90 \pm 10.47*

*Postmilk is significantly lower or higher than foremilk ($P<0.05$)

에서의 인공수정 후 20일, 22일, 24일에서의 농도는 비임신군에서는 0.83 ± 0.49 , 0.68 ± 0.51 , 0.47 ± 0.50 ng/ml로 1.0 ng/ml 이하이었으나 임신군에서는 5.25 ± 0.41 , 4.73 ± 1.45 , 4.62 ± 1.26 ng/ml로 임신군과 비임신군에서의 차이가 커 ($P<0.01$) 조기 임신진단 여부에의 활용에는 인공수정 후 18일 이후, 가능하면 20~24일 사이에서의 progesterone 측정은 매우 큰 임상적인 의의가 있음을 알 수 있었다.

우유성분 분석시의 상관관계

Milkoscan 검사장비의 보정을 위하여 지방, 단백질, 유당, 체세포수를 측정한 다음 검사기기를 보정한 결과의 상관관계는 모두 0.95 이상이었다.

원유의 온도에 대한 영향

Milkoscan으로 유성분 분석시 원유의 온도에 따른 결과를 비교하기 위하여 냉장 상태에 있는 원유 15개의 시료를 10°C , 20°C , 30°C , 40°C 의 상태에서 유성분 검사를 실시한 결과는 Table 2와 같이 단백질은 원유의 온도에 영향을 받지 않지만, 지방, 유당, MUN은 반응온도에 따라 매우 큰 차이를 나타내었다. 원유의 온도가 낮을수록 지방 함량과 MUN치는 낮아, 특히 MUN의 경우는 기기가 허용하는 오차범위인 ± 3 mg/dl 보다 훨씬 낮았다. 유성분 분석시 적절한 온도 상태에서 최적화를 확인한 후 검사를 실시해야 함이 입증되었다. 원유온도 40°C 에서 항온수조 10분 정도 가온 처리한 후 분석함이 적합하였다.

시료 채취 방법에 따른 변화

Table 3에서와 같이 시료 채취 방법 및 분방별 원유간에서

의 분방별 MUN 농도에서의 차이는 크지 않았으나 첫 젖과 끝 젖 사이의 단백질, 유당 및 MUN 농도는 단백질과 유당의 경우는 첫 젖이, MUN은 끝 젖이 매우 높게 나타났다 ($P<0.05$).

채취시기에 따른 변화

아침·저녁 우유간의 단백질 및 MUN치의 상관관계는 각각 0.96와 0.92로 시료 채취 시간별에 대한 유의성은 나타나지 않았으나 보다 더 많은 검체에 대한 검증이 필요할 것으로 판단된다.

보존제에 따른 변화

원유검사시 보존제로 현재 국내에서 널리 사용중인 potassium dichromate와 azidol을 이용하여 MUN 농도 변화를 130개 시료를 대상으로 한 결과 보존제가 처리되지 않는 대조군 (14.28 ± 4.01 mg/100 ml)에 비하여 potassium dichromate 첨가시 (18.01 ± 4.26 mg/100 ml)가 유의성 있게 높게 나타났다.

고찰

EIA에 의한 progesterone의 측정은 Dray 등^[19]에 의해 처음 실시된 이래, 여러 측정법이 개발 즉, 효소를 표지물질로 사용하는 enzyme immunoassay (EIA)에 의한 progesterone 측정은 종래의 일항체법에 의한 액상 상태에서의 측정법에서는 항원-항체반응이 미약해 측정감도가 낮고 측정내 변동계수 및 측정간 변동계수가 높아 어려움이 있었다^[34]. 二抗體法으로 一抗體法을 개선한 EIA는 特異性 및 精度가 RIA와 비교해 조금도 손색이 없음이 밝혀져 가고 있으나 측정계에 대한 조건검토에 대해서는 거의 되어 있지 않고, 되어 있어도 보고자에 따라 달라 测定系의 조건설정이 시급한 실정에 있어 저자는 二抗體 및 擔體의 최적조건을 보고^[34,35]한 바 있다.

測定感度는 12 pg/tube로서 Yokota 등^[59]이 보고한 homologous EIA의 18 pg/tube 보다는 높았으나 heterologous EIA 8 pg/tube 보다는 낮아, 앞으로 heterologous EIA 측정계의 개발로 더욱더 신뢰성 및 감도를 높여 나가야 될 것으로 생각된다. 일항체법을 개선한 액상의 EIA인 이항체법에서는 특이성 뿐만 아니라 측정감도에서 일항체법에서는 특이성 뿐만 아니라

측정감도에서 일항체법과는 달리 RIA와 비교해서도 조금도 손색이 없음이 입증되고 있으나 측정계 하나 하나에 대한 조건설정이 실시되어야 하는 난점이 있고 또한 항체에 결합된 항원과 결합되지 않은 항원 (B/F)을 분리하기 위해 원심분리 등의 번거로운 과정이 필요하다. 이에 비해 고상법은 조작이 간편하고 신속히 수행할 수 있어 임상영역에 응용할 수 있는 가능성이 매우 높다. 본 연구에 사용한 ELISA 방법은 Munro 와 Stabenfeldt⁴³⁾의 방법을 일부분 개선한 고상법으로 측정감도, 회수율 및 재현성이 hormone 분석의 주류를 이루고 있는 RIA 성적과 비교해 전혀 손색이 없음이 밝혀졌다.

Webb 등⁵⁷⁾은 소의 혈장 progesterone을 RIA법으로 재현성을 조사한 바 측정내 변동계수가 4.0 ng/ml 이하 농도에서는 4.8%, 4.0 ng/ml 이상에서는 13.2%이었으며 측정간 변동계수는 12.1%로, Hoffmann 등²⁴⁾은 RIA에서 3~7%로, Cleere 등¹⁵⁾은 소의 혈장 progesterone 농도 측정에서의 측정내 변동계수는 5%를 넘지 않았으며 측정간 변동계수는 9% 정도였고 우유 중에서는 측정내, 측정간 변동계수는 8~13%로, Kamonpatana 등³¹⁾은 측정내 변동계수는 13.56%, 측정간 변동계수는 13.45%를 보고하였다.

본 실험에서 측정내 변동계수는 4.5%, 측정간 변동계수는 6.1~9.4%로서 Webb 등⁵⁷⁾과 Kamonpatana 등³¹⁾보다는 유사한 결과를 나타내어 재현성에는 아무런 문제가 없음이 확인되었다.

Nakao^{44,45)}는 EIA 액상법에 의한 회수율은 98.1±11.4%로, Kamonpatana 등³¹⁾은 EIA법으로 0.5 ng/ml 첨가시는 110%, 2.5 ng/ml 첨가시는 71.24%의 회수율을, Cleere 등¹⁵⁾은 혈장에서는 81.4~92%, 우유에서는 98~106.4%의 회수율을 보고한 바 있다. Hoffmann 등²⁴⁾은 RIA법에 의해 93~100%의 회수율을, Wendorf 등⁵⁴⁾은 89%의 회수율을 보고하여, 본 실험에서의 회수율 1.0 ng/ml 첨가시에 88.0%, 2.0 ng/ml 첨가시에는 88.9%로서 Kamonpatana 등³¹⁾의 성적보다는 약간 높았으나 Cleere 등¹⁵⁾의 성적과 유사한 회수율을 나타내었다.

Kishimoto 등⁴⁰⁾에 의하면 소의 혈장 progesterone 농도는 발정종료 수일간의 성주기(비임신)나 임신 중의 소에서 모두 0.3 ng/ml로 낮게 유지되었으나 그 후 서서히 증가하여 비임신우 성주기 13일에서 5.3 ng/ml로 최고치를 나타내었으나 성주기 22일째에 0.4 ng/ml로 급속히 감소했고, 임신우는 4 ng/ml 전·후의 높은 농도를 계속 유지했다고 하였다.

Henricks 등²³⁾에 의하면 소의 혈중 progesterone 농도는 인공수정 후 서서히 증가하여 12일째 9.9 ng/ml의 농도를 나타내어 33일째까지 지속되었다가 39일째는 13.9 ng/ml의 수준이었으며, 비임신 예에서는 12일까지 7 ng/ml의 수준으로 서서히 증가하여 15~18일째까지 같은 수준을 유지하다가 감소하기 시작하여 21일째 1.2 ng/ml로 감소하였다고 보고하였다.

Kamonpatana 등³¹⁾의 보고에 의하면 Swamp buffalo에서 발

정기의 혈장 progesterone의 농도는 0.09±0.13 ng/ml, 임신 24, 27, 30일째는 각각 1.38±0.54, 1.17±0.48, 1.26±0.33 ng/ml으로 인공수정의 적기는 progesterone 농도가 0.5 ng/ml 이하일 때라고 보고한 바 있다.

본 실험에서의 발정기 progesterone 농도는 0.37±0.16 ng/ml로 Henricks 등²³⁾의 보고와 거의 일치하였으며, 임신기의 progesterone의 농도는 7.1±1.0 ng/ml로 Henricks 등²³⁾의 성적보다는 약간 낮고 Kishimoto 등⁴⁰⁾의 성적보다는 다소 높았는데 여기에 대해서는 개체간의 차이 등 여러 요인이 관여될 것으로 판단되어 앞으로 더욱더 많은 검토가 필요한 것으로 생각되나 본 연구에서의 결과는 임신진단에서의 활용에는 물론 난소기능 파악에도 충분히 응용 가능한 것으로 판단된다⁵⁸⁾.

Progesterone 농도를 측정하여 조기 임신진단을 실시할 때 그 검사시기는 비임신우의 경우 황체가 퇴행되어 다음 발정주기로 들어가고 임신우에서는 황체가 계속 존속되는 수정 후 19~24일에 일반적으로 실시되고 있다. 앞서의 성적에서 나타난 바와 같이 혈액 및 탈지유 중의 progesterone 농도 측정에 의한 조기 임신진단의 가능시기를 검토하기 위하여 비임신우와 임신우를 대상으로 수정 후 24일까지 progesterone 농도를 측정하였다. 수정 후 20일과 24일에 progesterone 농도는 비임신우는 1 ng/ml, 이하인 반면 임신우는 3 ng/ml 이상으로 나타나 기존의 보고들처럼 수정 후 20~24일 사이에 탈지유 중 progesterone 농도의 기준치를 2 ng/ml으로 할 때 조기 임신진단의 가능성성이 확인되었다.

Progesterone 농도 측정에 의한 임신양성진단율이 100%가 안 되는 원인으로는 발정주기가 18일 이하이거나 24일 이상과 같은 비정상적인 발정주기, 수태 후 1회의 早期死, 그리고 생식기관의 비정상 상태 등이 되고 있다¹³⁾. Bulman과 Lammig^{9,10)}은 배의 조기사가 수정 후 31~59일 사이에 12% 정도가 일어나기 때문에, 수정 후 두번쨰 발정주기인 38일과 46일 사이에 Progesterone 농도를 한번 더 측정하면 임신양성진단율을 높일 수 있다고 보고되어 있다. 본 연구에서는 수정 후 24일에 Progesterone 농도 측정에 의해 임신으로 진단되었던 76두 중에서 4두가 수정 후 60일에 직장검사에 의해 早期死으로 확인되었다. 이의 원인으로는 비정상적인 발정주기 혹은 1회의 早期死 등이 그 원인일 것이라 생각되나 여기에 대해서는 종합적인 추적과 분석이 필요할 것으로 판단된다.

유단백질과 MUN 검사는 유우의 사료급여프로그램의 적정성 여부를 판단하는데 유용한 지표로 이용되고 있기 때문에 목장에서 정기적으로 우유를 채취하여 분석하는 것은 사료를 효율적으로 급여하고 생산성을 향상시키는데 매우 중요하다 하겠다^{18,41,46~48,52,53,56)}. 그러나 우유는 외부 환경과 생리적 조건에 의해서 변동되며, MUN 농도는 높지 않게 정확한 검사 결과를 얻기 위해서는 MUN 수치에 영향을 줄 수 있는 요인에 대한 다각적인 검토가 요망된다 하겠다.

MUN 농도 분석시 원유의 온도가 낮을수록 MUN 수치가 낮아 기기가 허용하는 오차범위 (± 3 mg/100 ml)를 상회하여 적절한 온도에서 표준화해야 하는 것으로 확인되었다. 이러한 관계로 MUN 검사시 정확한 결과를 얻기 위해서는 다른 검사법들과의 정기적인 비교 실험, 실험 방법 및 조건 등 검사 과정에 대한 표준화가 필요로 할 것으로 판단된다^[42,52,53].

유성분의 변화는 착유 시간의 간격에 따라서 차이가 커, 지방은 아침과 저녁 착유간의 차이가 심한 것으로 알려져 있으나 아침·저녁 착유 우유간의 단백질 및 MUN 상관관계가 각각 0.96와 0.92로 나타나 시료 채취에 의한 결과 차이는 크지 않는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 개체우유의 MUN 수준은 아침 우유보다는 오후 우유가 약간 높고, 사료급여 시점에 따라 약간의 차이는 보일 수 있으나, 하루 2번 착유하는 경우 착유 전 12시간 동안의 MUN 수준을 반영하고, 요소는 수용성으로 유선과 혈액 사이의 농도 차이에 의하여 쉽게 이동하여 혈액과 우유 중의 농도는 거의 유사한 결과를 보였다는 보고를 뒷받침해 주는 결과라고 생각된다.

Milkoscan에 의한 MUN 검사는 신속하게 대량의 시료를 분석할 수 있지만 시료의 운반 거리가 멀면 시료 자체의 신선도가 떨어지는 단점을 보완하기 위한 방편으로서의 보존제 사용에서 외국의 경우 MUN 검사시 보존제로 bronopol이 권장되고 있지만^[38,52], 현재 국내에서 원유검사시 보존제로는 potassium dichromate와 azidiol이 널리 사용되고 있으나 본 연구에서는 보존제가 처리되지 않은 대조군에 비하여 potassium dichromate 첨가군이 3 mg/dl 이상의 유의성 있는 차이를 나타내었다. 이는 potassium dichromate이 유성분 중 지방, 단백질, 유당, 체세포수의 검사시 보존제로 사용할 수 있지만 MUN 검사시 보존제를 사용할 경우에는 azidiol이 더욱 적합하였다는 지적과 동일한 결과라고 판단된다^[42]. 따라서 potassium dichromate를 사용할 경우에는 결과 판독시에는 앞서의 조건도 고려해야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 유단백질과 MUN 검사로 유우의 영양 상태를 정확하게 평가, 분석하기 위해서는 먼저 정확한 기기 보정 및 올바른 시료 채취와 결과 해석 등이 필요할 것으로 판단되나 이상의 결과에서 향후의 영양 및 사양 관리 측면에서의 활용은 충분할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) Abraham GE, Swerdloff R, Tulchinsky D, Hopper K and Odell WD (1971): Radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocr Met*, **32**: 619-626.
- 2) Arnstadt KJ and Cleere WF (1981): Enzyme-immunoassay of progesterone in milk from cows. *J Reprod Fert*, **62**: 173-180.
- 3) Ball PJH (1978): The relationship of ages and stages of gestation to the incidence of embryonic death in dairy cattle. *Res Vet Sci*, **25**: 120-122.
- 4) Ball PJH and Jackson NW (1979): The fertility of dairy cows inseminated on the basis of milk progesterone measurements. *Br Vet J*, **135**: 537-540.
- 5) Ball PJH (1982): Milk progesterone profiles in relation to dairy herd fertility. *Br Vet J*, **135**: 546-551.
- 6) Booth JM, Davies J and Holdsworth RJ (1979): Use of the milk progesterone test for pregnancy determination. *Br Vet J*, **135**: 478-488.
- 7) Broderick GA and Clayton MK (1997): A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. *J Dairy Sci*, **80**: 2964-2971.
- 8) Bulman DC, Hewitt DS and Lamming GE (1978): The measurement of milk progesterone in suckled cows. *Vet Rec*, **103**: 161-162.
- 9) Bulman DC and Lamming GE (1978): Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *J Reprod Fert*, **54**: 447-458.
- 10) Bulman DC and Lamming GE (1979): The use of milk progesterone analysis in the study of oestrus detection, herd fertility and embryonic mortality in dairy cows. *Br Vet J*, **135**: 559-567.
- 11) Butenandt A and Schmidt J (1934): Über die polymorphen Modifikation des corpus-luteum hormones. *Chemische Berichte*, **67**: 2068-2071.
- 12) Choi HS, Kang BK and Lee CG (1990): Studies on the improvement of reproductive efficiency in Korean native cows. -Development of radioimmunoassay for progesterone- Korean *J Vet Res*, **30**: 171-175.
- 13) Choi HS, Kang BK, Son CH and Suh GH (1990): Studies on the improvement of reproductive efficiency in Korean native cows. -Plasma progesterone concentration for monitoring ovarian activity in the postpartum period. *Korea J Vet Sci*, **30(4)**: 515-523.
- 14) Claus R, Karg H, Zwiauer D, Von Butler I and Pirchron F (1983): Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cow by progesterone assay in milk-fat. *Br Vet J*, **139**: 29-37.
- 15) Cleere WF (1984): A high performance, high through-out enzyme immunoassay for the analysis of progesterone in plasma or milk. *Irish Veterinary Journal*, **39**: 6-14.
- 16) Corner GW and Allen WM (1929): Physiology of the corpus

- luteum. II. Production of a special uterine reaction (progestational proliferation by extracts of the corpus luteum). *Am J Physiol*, **88**: 326-332.
- 17) Dawson FLM (1975): Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of ovarian function in the cows. *Vet Rec*, **96**: 218-220.
 - 18) Depeters EJ and Ferguson JD (1992): Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *J Dairy Sci*, **75**: 3192-3209.
 - 19) Dray F, Andrieu JM and Renaud F (1975): Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using β -galactosidase as label. *Biochimica et Biophysica Acta*, **403**: 131-138.
 - 20) Eicher R, Bouchard E and Bigras-Poulin M (1999): Factor affecting milk urea nitrogen and protein concentration in Quebec dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, **39**: 53-63.
 - 21) Erberdobl HF, Braasch S and Trautwein EA (1990): Concentration of urine, urea and free amino acids in milk as influenced by stage of lactation and breed of the cows. *J Animal Nutr*, **63**: 1-7.
 - 22) Ferguson JD, Galligan DT, Blanchard T and Reeves M (1993): Serum urea nitrogen and conception Rate. The usefulness of test information. *J Dairy Sci*, **76**: 3742-3746.
 - 23) Henricks DM, Lamond DR, Hill JR and Dickey JE (1971): Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer. *J Animal Science*, **33**(2): 450-454.
 - 24) Hoffman B, Gonzler B, Hamburger R and Schmidt W (1976): Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle; Methodological approaches and present status of application in Germany. *Br Vet J*, **132**(5): 469-476.
 - 25) Hof G, Vervoorn MD, Lenaers PJ and Tamminga S (1997): Milk urea nitrogen as a tool to monitor the protein nutrition of dairy cows. *J Dairy Sci*, **80**: 3333-3340.
 - 26) IDF 28B (1974): Determination of the lactose content of milk.
 - 27) IDF 105 (1981): Milk: Determination of fat content.
 - 28) IDF 20B (1993): Milk: Determination of nitrogen content.
 - 29) IDF 148A (1995): Milk enumeration of somatic cells.
 - 30) Irshad M, Gandhi BM, Chawla TC, Achaiya SK, Joshi YK and Tandon BN (1987): Studies on Hb5 Ag binding with polymerised human serum albumin by ELISA. *J Virol Meth*, **16**: 75-85.
 - 31) Kamonpatana M (1979): Oestrus control and pregnancy diagnosis in the swamp buffalo: comparison of enzyme immunoassay and radioimmunoassay for plasma progesterone. *The riogenology*, **11**(5): 399-406.
 - 32) Kang BK, Choi HS, Lee CG, Son CH and Suh GH (1990): Studies on the improvement of reproductive efficiency in Korean native cows-plasma progesterone concentrations during the estrous cycle and early pregnancy. *Korean J Vet Res*, **30**(2): 243-247.
 - 33) Kang BK, Choi HS, Lee CG, Son CH and Suh GH (1990): Studies on the improvement of reproductive efficiency in Korean native cows-The use of plasma progesterone concentrations for early pregnancy diagnosis. *Korean J Vet Res*, **30**(2): 249-253.
 - 34) Kang CB (1985): Optimization of immunoassay procedures for the measurement of progesterone. *Korean J Anim Reprod*, **9**(2): 105-112.
 - 35) Kang CB, Lee HJ and Choe SY (1991): A study on production of early pregnancy diagnostic kit in cattle. I. Production of polyclonal antibody to progesterone and removal of anti-bovine serum albumin antisera. *Korean J Vet Res*, **31**(2): 217-222.
 - 36) Karg H (1981): Physiological impact on fertility in cattle, with special emphasis on assessment of the reproductive function by progesterone assay. *Livest Prod Sci*, **8**: 233-246.
 - 37) Karg H, Claus R and Gnzler O (1980): Milk progesterone assay for assessing cyclicity and ovarian dysfunction in cattle. *Proc 9th Int Cong Reprod EAI*, 119-124.
 - 38) Kaufmann W (1982): Variation in composition of the raw material milk with special regard to the urea content. *Milchwissenschaft*, **37**: 6-9.
 - 39) Kim SC, Jo CH and Lee KW (1986): Incidence of reproductive disorders in dairy cows and their conception rate after treatment. *Korean J Vet Res*, **26**(1): 163-174.
 - 40) Kishimoto YH Kato and Mitani M (1987): Enzyme immunoassay of progesterone in bovine plasma and skim milk and its application to early pregnancy diagnosis. *J Japan Vet Me Asso*, **40**: 161-164.
 - 41) Licata E (1985): Subclinical mastitis and urea determination in cow's milk. *Obiett Doc Vet*, **6**: 65-67.
 - 42) Moon JS, Joo YS, Im SK and Jang GC (1999): Studies on the change of bulk milk composition as times and effect of preservatives. *J Korean Vet Met Assoc*, **35**(3): 186-197.
 - 43) Munro C and Stabenfeldt G (1984): Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocr*, **101**: 41-49.
 - 44) Nakao T (1980): Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta Endocr*, **93**: 223-227.

- 45) Nakao T, Sugihashi A, Kawata K, Saga N and Tsunodo N (1983): Milk progesterone levels in cows with normal or prolonged estrous cycles, referenced to an early pregnancy diagnosis. *Jpn J Vet Sci*, **45**: 495-499.
- 46) Nelson AJ (1994): Information needs of the dairy industry for health and nutrition management. *J Dairy Sci*, **77**: 1984-1991.
- 47) Okamoto M (1999): Nutritional Management for improving milk composition in High yielding dairy cow. *J Korean Dairy Sci Proceeding*, 61-89.
- 48) Oltner R and Wiktorsson H (1983): Urea concentrations in milk and blood as influenced feeding varying amounts of protein and energy to dairy cows. *Livest Prod Sci*, **10**: 457-467.
- 49) Pennington JA, Spahr SC and Lodge JR (1976): Factors affecting progesterone in milk for pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Br Vet J*, **132(5)**: 487-496.
- 50) Pennington JA, Schultz LH and Hoffmann WF (1985): Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding: Field study in dairy cattle. *J Dairy Sci*, **68**: 2740-2745.
- 51) Pope GS (1976): Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br Vet J*, **132(5)**: 497-506.
- 52) Ropstad E, Vik Mo L and Refsdal AO (1989): Levels of milk urea, plasma constituents and rumen liquid ammonia in relation to the feeding of dairy cow during early lactation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **30**: 199-208.
- 53) Roseler DK, Ferguson JD and Sniffen CJ (1993): Dietary protein degradability effect on plasma and milk urea nitrogen, and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. *J Dairy Sci*, **76**: 525-534.
- 54) Sato SK and Takahashi E (1985): Changes in serum progesterone levels and subsequent fertility in cows after artificial insemination. *Jpn J Vet Med Assoc*, **38**: 506-509.
- 55) Van de Wiel DFM, Kalis CHJ and Nasir HSS (1979): Combined use of milk progesterone profiles, clinical examination and oestrus observation for the study of fertility in the post-partum period of dairy cows. *Br Vet J*, **135**: 568-577.
- 56) Verdi RJ, Barbano DM and Dellavalle ME (1987): Variability in true protein, casein, non-protein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic milks. *J Dairy Sci*, **70**: 230-242.
- 57) Webb R (1980): Plasma progesterone and gonadotrophin concentrations and ovarian activity in post-partum dairy cows. *J Reprod Fert*, **59**: 133-143.
- 58) Wendorf GL, Lawyer MS and First NL (1983): Role of adrenals in the maintenance of pregnancy in cows. *J Reprod Fert*, **68**: 281-287.
- 59) Yokota O (1985): Heterologous enzyme immunoassay of progesterone in serum and milk from farm animals. *J Coll Dairying*, **11**: 141-161.
- 60) Zander J (1955): Progesterone in human blood and tissues. *Nature*, **174**: 406-411.