약학회지 제27권 제2호 117~124 (1983)
Yakhak Hoeji, Vol. 27, No. 2

血清 3, 5, 3′-Triiodothyronine 測定을 위한 酵素—免疫 分析의 開發 硏究

李 姬 珠
德成女子大學

(Received February 15, 1983)

Hee Joo Lee
Faculty of Pharmacy, Duk Sung Women's College, Seoul 132, Korea

Development of Homogeneous Enzyme Immunoassay for Serum 3, 5, 3′-Triiodothyronine Determination

Abstract—For development of EMIT-T_3 assay, the conjugation of 3, 5, 3′-triiodothyroformic acid NHS ester to G6PDH was attempted in various reaction conditions. Up to now, the best conjugation condition was the ratio of T_3-NHS:G6PDH=100 in 25% carbitol-Tris buffer at pH 9, 0°C during overnight. The obtained T_3-G6PDH conjugates usually had 20% residual enzyme activity which was inhibited by 40~70 % with various anti-T_3 antibodies. Utilizing the conjugate I and an antibody (S2633G), a useful standard curve for T_3 assay was obtained in the range of 0 to 5ng/ml with 499 EMIT units of separation.

甲狀腺에서 分泌되는 호르몬은 L-thyroxine (T_4)과 3, 5, 3′-triiodo-L-thyronine (T_3)이다. 血中 T_4는 대부분 血漿단백질들 즉 thyroid binding globulin (TBG, 혈중 T_4 75%가 TBG에 결합되어 있음), thyroid binding prealbumin(TBPA, 15%), 그리고 血清 albumin(10%)등에 결합되어 不活性 상태로 循環하며(總 T_4의 99.9%), 소량만이 活性型 遊離 T_4로 순환하고 있다(0.025 %). T_3는 90%가 T_4로 부터 형성되며, 代謝가 빠른 것으로 보아 갑상선 호르몬 기능을 나타내는 主活性物質로 고려되고 있다.

현재 甲狀腺 機能異常 診斷에 중요하게 고려되는 것은 혈중 總 T_4量(正常 8.4μg/100ml), T_3量(正常 0.12μg/100ml) 및 thyroid 호르몬과 결합하지 않고 남아 있는 TBG量(이후 遊離 TBG라 함)등이다.[1] 실제 血中 활성형 유리 T_4量이 호르몬 기능 異常과 직접적인 관계가 있다고 생각되나, 이는 量이 너무 적어서(正常 유리 T_4 2.1ng/100ml) 직접 測定할 수 없고, T_4量과 유리 TBG量의 比로서 나타내 지는 free thyroxine index(FTI, 正常 0.8~2.9)가 診斷에 이용되고 있다.[1,2]

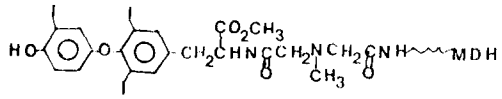
$$\text{free } T_4 + \text{free TBG} \rightleftarrows T_4\text{-TBG} \qquad [\text{free } T_4] \propto \frac{[T_4\text{-TBG}]}{[\text{free TBG}]} \propto \frac{[\text{total } T_4]}{[\text{free TBG}]} = \text{FTI}$$

이들 세가지 要因들 즉 總 T_4, T_3, 및 유리 TBG(항응 T_3-uptake test로 측정됨)가 현재 radioimmunoassay(RIA)法에 의해 分析되고 있다.[1~2] 그러나 최근 EMIT®(enzyme-multiplied immunoassay technique=homogeneous enzyme immunoassay, Syva Co.) 分析法이 개발되면서, 血中 總 T_4量은 EMIT®-T_4 분석법(酵素 malate dehydrogenase, MDH 이용)에 의해 간편하게 측정하

게 되었다.[1,4,5]

EMIT®法은 酵素-hapten 結合體의 효소활성이 抗 hapten抗體 결합으로 감소 또는 증가됨을 基礎로한 분석법이다.[6-10] 이 방법은 이와 같이 抗原—抗體 反應을 이용하는 것으로 RIA법이나 마찬가지로 特異性을 갖는다. 그리고 實用性 면에서 EMIT 분석법의 敏感度는 RIA법과 유사하다.[11] 여기에 더해서 EMIT법은 몇가지 장점을 갖고있다. (1) 이 방법은 homogeneous assay로 分析 도중에 結合 및 非結合된 檢體를 분리할 필요가 없다(RIA는 반드시 분리해서 측정함). (2) EMIT법은 radioistope 대신에 酵素反應을 이용하는 것으로, 일반실험실에서 안전하게 그리고 간편하게 活用될 수 있다.

血中 T_3 및 유리 TBG의 측정을 EMIT법을 이용하여 개발 하려고 시도된 적이 있다. 이때 T_3를 bovine serum albumin 또는 globulin에 결합하여, 이를 抗原으로 sheep에 투여하여 여러batch의 抗體를 얻었었다(Table Ⅱ), 효소로는 MDH를 선택, 결국 T_3-MEMIDA/MDH結合體 (**1**)가 EMIT 성공 가능성을 보여 硏究가 진행되었었는데, 결국 完成되지 못했었다.



1 (T_3-MEMIDA/MDH)

EMIT분석법에 의한 T_3 및 유리 TBG 分析의 實用化가 재시도 되었다. 새로운 시도에서 효소로서 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, D-glucose-6-phosphate: NAD^+ oxidoreductase; EC 1.1.1.49, *Leuconostoc mesenteroides*에서 분리된 것 사용)와 T_3 유도체로 3,5,3′-triiodothyroformic acid를 선택했다. 효소 G6PDH는 그간에 다른 藥物의 EMIT분석에 많이 이용(digoxin을 위시한 15종의 藥品)[12,13] 개발되었고, MDH보다 관리하는데 안전하므로 선택된 것이다.[14] 한편 이 효소는 다른 효소들 보다 많은 hydrophobic 부위를 갖고 있음이 알려졌다. 그리해 hydrophobic性이 큰 thyroid가 가지가 긴 유도체로 효소에 결합되면, 효소내 hydrophobic部位에 hydrophobic 결합을 해 묻혀버리면, 항 T_3항체에 인식되지 못해 결합되기 어렵게 되고, 그리해 항체가 酵素活性에 영향을 줄 수 없으리라 생각되었다. 가지가 짧은 3,5,3′-triiodothyroformic acid는 G6PDH에 결합되었을 때 (**2**), 자유로 움직이지 못하고 효소 表面에 뻗혀 나와 있어, 쉽게 항체에 인식·결합하게 되고 그리해 T_3-G6PDH 결합체의 효소활성에 어떤 변화를 주게 되리라고 기대되었다.

2 (T_3-G6PDH)

檢體內(血清) T_3分析은 일반 EMIT분석이나 마찬가지로 一定量의 抗 T_3抗體와 結合하게 하고 남은 抗體를 T_3-G6PDH와 結合하게 한 후, 殘存한 T_3-G6PDH의 活性을 基質 glucose-6-phosphate (G6P)와 보조효소nicotinamide adenine dinucleotide 산화형(NAD^+)를 써서 反應率로 측정, 標準曲線과 비교 검체내의 T_3량을 측정하고자 했다. 즉 검체내 T_3量이 적으면, T_3-G6PDH와 結合할 抗體量이 많아, 活性酵素 結合體量이 적어 효소가 촉매하는 反應率이 낮을 것이고, T_3量이 많으면 반대 결과가 오리라 기대된다.

$$T_3(\text{검체}) + Ab + T_3\text{-G6PDH} \rightleftarrows \underset{\text{不活性}}{T_3Ab} + \underset{\text{活性}}{Ab\text{-}T_3\text{-G6PDH}} + T_3\text{-G6PDH}$$

$$\text{glucose-6-phosphate} + NAD^+ \xrightarrow{T_3\text{-G6PDH}} \text{6-phosphogluconolactone} + NADH \ (340nm)$$

EMIT-T_3가 完結되면, 유리 TBG의 측정은 一定量의 T_3로 포화시킨 후에 여분의 T_3를 EMIT-T_3 법에 의해 측정하고자 한다.

유리 TBG(검체)+T_3+Ab+T_3-G6PDH⇌T_3-TBG+T_3-Ab+Ab-T_3-G6PDH+T_3-G6PDH

효소활성이 있고 항 T_3항체에 의해 活性이 감소되는 유효한 T_3-G6PDH 結合體를 形成하게 되었고, 이를 이용해 T_3分析을 위한 標準曲線을 얻게 되어 일차적으로 보고하는 바이다.

實 驗 方 法

試藥 및 器機—1) 緩衝液 : 0.055M Tris buffer(Trizma® 염기, Sigma사)를 pH 8.1로 조정했다

2) 酵素 : Glucose-6-phosphate dehydrogenase(Beckman)을 Tris buffer에 녹여 사용했다.

3) 基質 및 補助酵素 溶液 : 0.066M glucose-6-phosphate(G6P), 0.04M nicotinamide adenine dinucleotide 산화형(NAD^+)은 Tris buffer에 용해시켜 사용했다.

4) 3,5,3′-Triiodothyronine 標準溶液 : 25, 50, 75 및 100ng/ml(0.05N NaOH 용액)을 제조 필요량을 측정 이용했다.

5) 抗 T_3抗體 : 기존 항체 용액(Table Ⅱ 참조)을 이용했다.

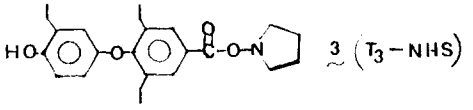
6) 기계—Syva Model 1500 Automatic Pipetter-Diluter, Gilford Stasar® Ⅲ Spectrophotometer (reading concentration range: EMIT unit 0000～6000=Absorbance 0～2×1000×2.667). 이는 microscale flow cell과 micro computer가 부착되어 있다.

G6PHD(또는 T_3-G6PHD結合體) 活性 測定—일반적으로 基質·補助효소 용액 50μl(1기질 농도)와 효소 G6PDH(또는 T_3-G6PDH 結合體)용액 및 Tris buffer를 첨가해 전체 용액이 1ml 전후되게 한다. 이 混合液을 Gilford Stasar Ⅲ flow cell에 흡입해, 30°C에서 효소반응 시작 10초에서 30초 사이에 반응결과 生成된 NADH의 uv흡수를 340nm에서 측정하여, 효소의 活性度를 비교했다. 酵素量은 효소용액을 Tris buffer로 희석조절하여 위의 反應 조건하에서 uv측정 EMIT unit로 500～1000 범위내에 있게 택했다. 경우에 따라서 각 용액 첨가량을 변화시키어, 그때마다 변화량을 지적해 준다.

T_3-G6PDH 結合體의 活性에 대한 抗 T_3抗體의 抑制試驗—효소활성 측정시험과 같은 條件下에 一定量의 抗T_3抗體를 T_3-G6PDH 結合體 첨가에 앞서 反應液에 넣어준다. 보통 항체 screening에는 50μl(excess)의 抗體原液을 사용했고, 이 조건에서 얻은 효소 활성을 結合體만의 활성에서 빼서 이 값을 결합체만의 활성에 대한 백분률을 구해 抗體에 의한 抑制 %를 구했다.

實 驗 結 果

T_3-G6PDH 結合體(2) 形成 開發—먼저 3,5,3′-triiodothyroformic acid를 G6PDH에 結合하기 위해 N-hydroxysuccinimide의 ester(T_3-NHS, 3)를 상법에 준해(DCC/THF이용) 合成했다.



최초에 結合은 G6PDH가 다른 藥物들과 결합할 때 쓰이던 조건하에서 시도되었다. 즉 25% carbitol-Tris buffer(pH 8.1)의 용매에 기질·보조효소(G6P-NADH) 존재하에 효소 G6PDH를 넣고, 이 혼합용액에 T_3-NHS를 dimethyformamide (DMF)에 녹인 것을 micro-pipetter를 써서 소량씩 첨가해서 反應을 시켰다. 그러나 hydrophobic性이 큰 T_3-NHS가 물에 전혀 섞이지 않아서 인지 결합에 성공하지 못했다.

反應條件을 재고려해 T_3-NHS를 최대한 반응액속에 미므르게 하기 위하여 용액의 pH를 9로유지하고 溶液의 飽和 조건을 제거하기 위해 기질 및 보조효소를 빼기로 했다. 그리해 다음 결합은 G6PDH를 25% carbitol-Tris buffer에 섞고, ice-bath에서, pH9로 유지하며 T_3-NHS를 DMF

에 녹인 용액을 micro-pipetter로 소량씩 가해주었다. T_3-NHS 용액을 加해가며 酵素活性을 檢査했고, 효소의 활성이 약 30% 남고(처음 효소액에 비교), 또 항T_3항체(S2015)에 의해 50% 정도 활성이 억제되는 點에서 T_3-NHS의 첨가를 끝이고, 冷室에서 하루 밤 동안 더 반응시켰다. 沈澱物(T_3-NHS 또는 triiodoformic acid)을 遠心分離除去한 후 Sephadex G-25를 이용해 정제했다. 다음 1N NH_2OH를 처리한 후(G6PDH내 NH_2基에 結合된 T_3만을 남기고, OH基에 결합된 것을 加水分解제거하기 위함), 다시 Sephadex G-25를 써서 정제하여 T_3-G6PHD 結合體 I을 얻었다. 각 반응단계에서 효소활성을 측정 原來 효소활성에 대한 比로서 Fig. 1에 표시했다. 검해서 항T_3항체(S2015, excess)에 의한 결합체의 활성억제를 결합체 자체의 활성에 대한 比로서 Fig. 1에 나타내었다. 이와 같은 과정을 걸쳐 얻은 精製 T_3-G6PDH 結合體 I는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 本來 G6PDH 活性에 比해 22% 程度의 활성이 남았고(每단계에서 100%回收 했다고 가정하고 계산했음), 항T_3항체에 의해서 효소활성이 71% 억제되었다.

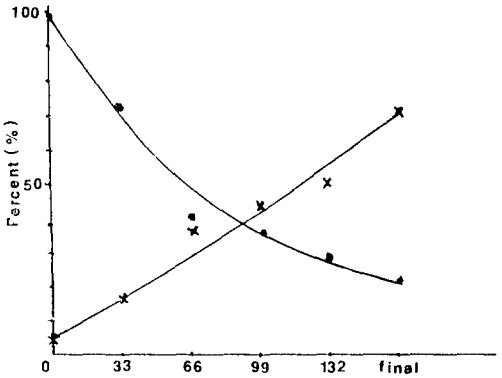


Fig. 1—Residual activity (●—●) of the T_3-G6PDH during the conjugation process I and inhibition (×—×) of the conjugate activity by an excess anti-T_3 antibody(S2015).

보다 유효성 있는 T_3-G6PDH를 얻기위해, 다시 말해 효소의 활성은 보다 적게 消失되고, 그리고 항T_3항체에 의해 보다 활성이 抑制되는 결합체를 얻기 위해 反應條件들 pH, T_3-NHS 대 G6PDH의 反應 比率, 基質 G6P(G6P가 효소결합체를 安定化 시킨다고 보고 되어 있음) 존재를 재고하며 반응들을 반복해 보았다.

먼저 T_3-NHS와 G6PDH의 반응 比率을 50, 100, 200, 및 400배로 하고, 그밖의 조건은 전과 같이 하고 반응을 시도했다. 200배 以上의 T_3-NHS를 반응시킬 때는 효소의 活性이 거의 소실되어 實用性이 없었고, 대부분의 경우 100배의 T_3-NHS를 반응시킬 때 20% 정도의 효소활성이 남고, 90% 정도(S2013F)의 효소활성 저해를 갖어옴을 알게 되었다(T_3-G6PDH 결합체 II).

다음으로 反應液의 pH가 높으면 효소 활성이 소실됨으로 반응 pH를 되도록 낮추기 위해 pH 8과 9에서 각각 결합을 시켜보았다. pH 8에서 예견대로 효소의 활성은 많이 保存되는데, 얻어진 결합체가 抗體에 의해서 活性沮害를 적게 받았다(抗體 S2013에 의해 pH 8에서 얻은 결합체는 40%억제, pH 9에서 형성된 것은 90% 억제)

끝으로 결합반응을 基質 G6P 존재하에 시도 했다. 결과적으로 活性이 보다 적게 감소되고, 그

Table I—Various T_3-G6PDH conjugates.

T_3-G6PDH conjugate	Reaction pH	T_3-NHS/G6PDH	Remained activity %	Inhibition % (S2633)
I	9	132	22	35
II	9	100	20.6	44.4
III	9	250 (with G6P)	30.8	43.3

러면서 항체에 의해서 보다 활성이 억제되는 結合體를 얻게되었다(T_3-G6PDH 결합체 Ⅲ). 이와 같이 여러 反應條件 하에서 얻은 결합체들을 Table Ⅰ에 모아 놓았으며, 아래에 가장 效果的인 結合體를 얻는 상세한 實驗過程을 예로 보인다.

이렇게 해서 얻은 결합체들의 酵素反應性은 5時間 동안 일정한 linear 상태를 보였으며, 4°C에서 8週間 活性에 변화 없이 안정했다.

T_3-G6PDH 結合反應—G6PDH 저장용액(2.76mg/ml) 7ml*를 ice-bath에서 냉각·저어 주며 Tris buffer-carbitol(0.5ml—2.5ml 각각) 혼액을 syringe-pump로 약 20分에 걸쳐 혼합했다. 이 혼합액을 3N NaOH溶液으로 pH9로 조절하였다. 건조 DMF 300μl에 27.9mg의 T_3-NHS를 녹인 용액을 140μl 취해(T_3-NHS/G6PDH=100) micro-pipetter로 80分에 걸쳐 위의 酵素溶液에 혼합해 주었다. 이 反應液을 冷室에서 교반하며 하루밤 동안 반응시킨 후, 침전을 원심분리 제거했다. 용액(9.3ml)을 Tris buffer를 써서 sephadex G-25 column(120ml)을 통해 정제해 28ml의 酵素液을 얻었다. 이 효소액을 3.6N NH_2OH(pH 8.53) 8ml 와 혼합, 상온에서 1.5時間 반응시킨 후, 다시 원심분리 했다. 上等液中 18.5ml을 다시 Sephadex G-25 column(230ml) 및 Tris buffer를 써서 정제해서 최종 T_3-G6PDH(結合體 Ⅱ, 37.5ml)을 얻었다. 이 結合體는 1:20로 희석해서 50μl를 취해 일반 활성 측정 조건하에서(단 時間은 반응시작 10초에서 60초 간에 반응률 측정) 측정할 때 EMIT unit 1059의 반응률을 보였고, 항체(S2633, 50μl)에 의해 44.4% 억제를 보였다.

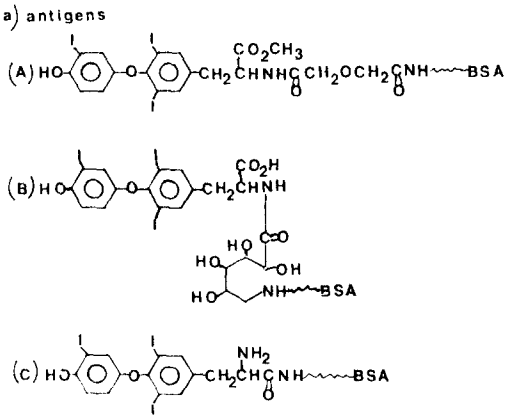
*반응액에 G6P를 첨가해 줄 경우에는 200mg의 G6P를 0.2N NaOH 1ml에 녹여, 이 용액에 첨가해 주고, 다음의 반응은 대부분 같고, T_3-NHS/G6PDH 比를 250되게 T_3-NHS를 반응액에가 해주었다.

抗T_3抗體 Screening—既存 항T_3항체들에 의한 T_3-G6PDH의 活性 抑制率을 검사하였다. Table Ⅱ에서 보는바와 같이 대개의 항체들은 T_3-G6PDH Ⅰ의 활성을 40~70% 억제시키며, 항체 단백질이 효소자체의 활성을 일부는 감소시킴을 볼 수 있다.

Table II—Screening of inhibition activities of anti-T_3 antibodies upon T_3-G6PDH I and G6PDH activities.

Antigen[a)]	Antibody	Inhibition of T_3-G6PDH I (%)	Inhibition of G6PDH (%)
A	S782	58.0	1.4
A	S783	56.5	5.1
A	S784	42.0	1.1
B	S2016F	70.3	4.3
B	S2013F	77.5	6.9
B	S2015F	67.4	3.7
B	S2691P	55.8	5.7
B	S2633G	35.0	—
C	S2012	71.0	5.4
C	S2009	63.0	4.6
C	S2011	46.4	4.3
C	S2008	60.1	6.3

a) antigens



EMIT®-T_3 分析을 위한 標準曲線—合成된 T_3-G6PDH가 효소활성을 갖으며, 항T_3항체에 의해 충분히 활성이 감소되므로(S2633G, 40% 정도), EMIT-T_3 분석은 本來의 意圖대로 일반

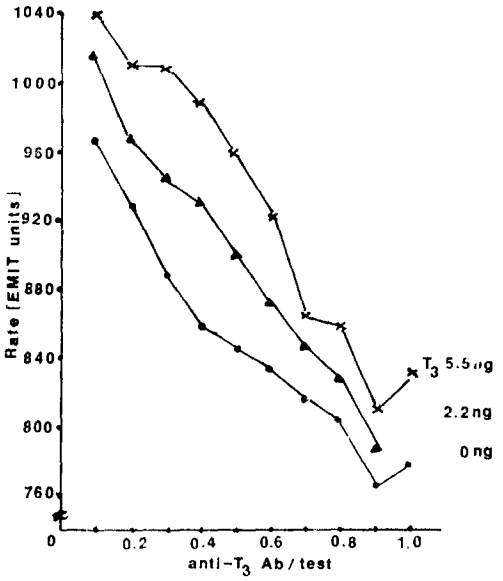


Fig. 2—The activity changes of T_3-G6PDH conjugate (I) with T_3 0ng/test (●—●), 2.2 ng/test (▲—▲), and 5.5ng/test (×—×) by different amounts of anti-T_3 Ab(S2633 G).

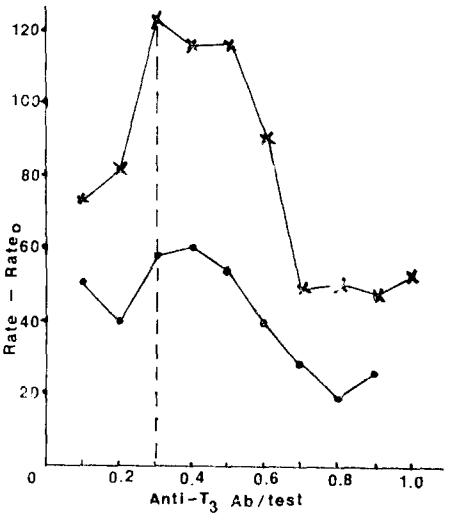


Fig. 3—The differences of reaction rates of T_3-G6PDH conjugate between T_3 0 to 2.2ng /test (●—●) and 0 to 5.5ng/test(×—×) in the different amount of anti-T_3 Ab (S2633G).

적인 EMIT®분석과 같은 原理하에 시도되었다. 臨床的으로 중요시 고려되는 T_3濃度 0~5ng/ml 이다. 그리해 T_3-G6PDH, 항T_3항체, 기질·보조효소량 및 반응 측정 時間을 각각 변해가며 최대의 分離條件을 찾으려 했다.

먼저 一定量의 T_3-G6PDH(EMITunit로 1000의 반응률을 갖는 量)과 표준 T_3 0, 2.2ng 및 5.5ng/ml 存在하에 抗體量변화에 따른 T_3-GP-6DH의 活性 變化를 보고자 했다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 각 경우 T_3-G6PDH의 활성은 항체가 증가함에 따라 減少함을 보였다. 이 結果를 각 항체 존재하에 T_3 0ng와 2.2ng/ml 및 5.5ng/ml 間에 分離狀況(T_3-G6PDH 反應 $Rate_{2.2}$-$Rate_0$ 또는 $Rate_{5.5}$-$Rate_0$)을 계산해 Fig. 3에 나타내었다. 이 그림에서 보는 바와 같이 T_3 측정은 항체 0.3μl에서 최대 分離를 보임을 알게 되었다.

위의 結果를 이용 같은 T_3-G6PDH量과 기질·효소량 및 0.3μl 항체를 써서 T_3 0ng에서 여기서 問題는 적절한 분석 protocol을 세워 臨床的으로 중요시 고려되는 T_3濃度 0~5ng/ml 範圍內에서 충분히 分離되는 표준곡선을 얻는 일이다. 그리해 T_3-G6PDH, 항T_3항체, 기질·보조효소량 및 반응 측정 時間을 각각 변해가며 최대의 分離條件을 찾으려 했다.

먼저 一定量의 T_3-G6PDH(EMITunit로 1000의 반응률을 갖는 量)과 표준 T_3 0, 2.2ng 및 5.5ng/ml 存在하에 抗體量변화에 따른 T_3-GP-6DH의 活性 變化를 보고자 했다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 각 경우 T_3-G6PDH의 활성은 항체가 증가함에 따라 減少함을 보였다. 이 結果를 각 항체 존재하에 T_3 0ng와 2.2ng/ml 및 5.5ng/ml 間에 分離狀況(T_3-G6PDH 反應 $Rate_{2.2}$-$Rate_0$ 또는 $Rate_{5.5}$-$Rate_0$)을 계산해 Fig. 3에 나타내었다. 이 그림에서 보는 바와 같이 T_3 측정은 항체 0.3μl에서 최대 分離를 보임을 알게 되었다.

위의 結果를 이용 같은 T_3-G6PDH量과 기질·효소량 및 0.3μl 항체를 써서 T_3 0ng에서

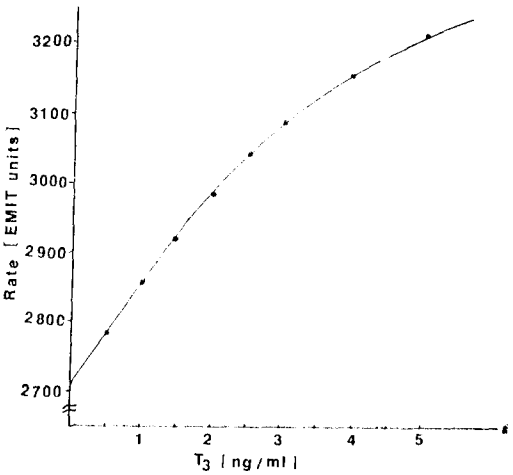


Fig. 4—Standard curve for T_3 assay. The reaction rate was measured by Gilford Ⅲ in each T_3 concentration with 0.3μl Ab(S2633G), 100μl G6P-NAD solution, 1.33μl T_3-G6 PDH (I), Tris buffer (total volume 1.8 ml), at 30°C for 15min.

5ng/ml間에 EMIT unit로 100의 分離를 보이는 표준곡선을 얻을 수 있었다. 이와 같이 各 要因을 계속 바꾸어 가며 최대조건을 찾은 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같은 0～5ng T_3/ml 間에 EMIT unit 499의 分離를 보이는 표준곡선을 얻게 되었다.

結　　論

反復된 결합반응 結果 T_3-NHS를 G6PDH에 결합시켜, 實用性 있는 T_3-G6PDH 結合體를 얻게 되었다. 현재까지 가장 效果的인 結合體를 얻을 수 있었던 過程은 효소 G6PDH를 25% carbitol-Tris buffer 용액에 녹이고, pH 9, 0°C에서 T_3-NHS를 DMF용액으로 해서 효소량의 100배 정도로 가해주고, 하루 반응시킨 후, 遠心分離, NH_2OH 처리, Sephadex G-25처리를 하는 것이었다.

이렇게 해서 얻은 결합체는 대개 本來酵素活性의 20%정도를 保有하고, 抗T_3抗體에 의해 활성이 40～70%정도 抑制되었다. 이 T_3-G6PDH결합체의 反應性을 5時間 동안 조사한 결과 계속 linearity를 보였으며, 4°C에서 8週間 조사한 結果 變化가 없었다.

한편 얻어진 T_3-G6PDH 結合體와 기존 抗 T_3抗體 (S2633 G)를 이용해 臨床的으로 중요하게 고려되는 T_3濃度(0～5ng/ml) 範圍에서 499 EMIT unit 分離를 보이는 標準曲線을 얻었다.

以上과 같은 結果는 前에 T_3-MEMIDA/MDH system을 갖고 시도 했을 때 보다 約 1.4배 分離能의 增加를 보이는 것으로 EMIT-T_3 分析 및 더나아가 EMIT-유리 TBG 分析 實效 可能性을 보여주는 것으로 硏究는 進行되고 있다. 겸해서보다 效果的인 抗T_3抗體 大量生產도 시도되고 있다.

文　　獻

1. F.V. Lente and R.S. Galen, Determination of thyroxine by enzyme-immunoassay, in *Enzyme Immunoassay*, E.T. Maggio Ed, CRC Press (1980) p. 135.
2. J.C. Travis, *Rx RIA for Physicians*, Scientific Newsletter, Inc., Part Ⅰ. Thyroid Profiles Series. Triiodothyronine, Vol. 1, No. 3, May (1976).
   Part Ⅱ. Tests of serum thyroxine binding capacity, Vol. 1, No. 5, August (1976).
   Part Ⅲ. Thyroid stimulating hormone, Vol. 1, No. 7, October (1976).
   Part Ⅳ. Thyroxine Vol. 2, No. 1, January (1977).
3. A.A.M. Raouf, M.J. Geisow, P.O. Gorman, P. Marsden, and P.J.N. Howorth, A method for the preparation of human thyroxine-binding globulin; Its importance in the establishment of an accurate and specific radioimmunoassay. *Clinica Chimica Acta*, **104**, 25(1980).
4. E.F. Ullman, J. Blakemore, R.K. Leute, W. Eimstad, and A.P. Jaklitsch, Homogeneous immunoassay for thyroxine. *Clin. Chem.* **21**, 1011 (1975).
5. A.P. Jaklitsch, R.S. Schneider, R.J. Johannes, J.E. Lavine, and G.L. Rosenberg, Homogeneous emzyme immunoassay for T_4 in serum. *Clin. Chem.*, **22**, 1185 (1976).
6. R.S. Schneider, P. Lindquist, E.T. Wong, K.E. Rubenstein, and E.F. Ullman, Homogeneous enzyme immunoassay for opiates in urine. *Clin. Chem.*, **19**, 821(1973).
7. I. Gibbons, C. Skold, G.L. Rowley, and E.F. Ullman, Homogeneous enzyme immunoassay for proteins employing β-galactosidase. *Anal. Biochem.*, **102**, 167 (1980).
8. E.F. Ullman and E.T. Maggio, Enzyme-immunoassay: principles and practice. Syva Co. Report May (1979).
9. R.S. Schneider, D.S. Kabakoff, H.M. Greenwood, Recent developments in homogeneous immunoassay

techniques. Syva Co. Report. May (1979).

10. D.S. Kabakoff, Chemical aspects of enzyme-immunoassay, in *Enzyme Immunoassay*. E.T. Maggio Ed., CRC Press (1980) p. 71.
11. V.R. Spiehler, D. Reed, R.H. Cravey, W.R. Wilcox, R.F. Shaw, and S. Holland, Comparison of results for quantitative determmation of morphine by radioimmunoassay, enzyme immunoassay, and spectroflnorometry. *J. Forensic Sci.*, **20**, 647 (1976).
12. J.J. Chang, C.P. Crowl, and R.S. Schneider, Homogeneous enzyme immunoassay for digoxin, *Clin. Chem.*, **21**, 967 (1975).
13. K. Chegwidden, M.R. Pirio, P. Singh, J.B. Gushaw, J.G. Miller, R.S. Schneider, *Clin. Chem.*, **24**, 1056 (1978).
14. G.L. Rowley, K.E. Rubenstein, S.T. Weber, and E.F. Ullman, Mechanism by which antibodies inhibit hapten-glucose-6-phosphate dehydrogenase, in *Abstracts of the 172nd American Chemical Society National Meeting*, San Francisco, August 29, 1976, Biological Chemistry Section, Abstract No. 151.

本論文은 著者가 Syva Company(California, USA)에 근무시 수행된 것이다.