

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

II. Progesterone 측정에 대한 酵素免疫測定方法의 확립

姜正夫·愼鍾旭·崔尙龍

慶尙大學校 獸醫科大學

(1988.7.6 접수)

Studies on enzyme immunoassay for determining progesterone of bovine plasma and its clinical application.

II. Establishment of enzyme immunoassay for progesterone

Chung-boo Kang, Jong-uk Shin, Sang-yong Choe

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

(Received July 6, 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, enzyme conjugate and gelatin were invested.

The sensitivity, recovery rate and reproducibility by this assay were also analyzed.

The results obtained were as follows:

1. The suitable supplementation level of gelatin was 0.2%. As the gelatin level increased to 1%, coefficient variation of interassay was shown to be irregular.
2. The optimum dilution rate of enzyme conjugate was 30 times. Enzyme activity was greatly fluctuated depending on the minor condition of enzyme conjugate technique. Therefore, it was considered to be checked when determined.
3. The sensitivity of the assay was 12 pg/tube.
4. Recovery rate was decreased when the amount of sample was too little or too much, but the recovery rate was high as 97.8% when the amount of sample between 50 and 200 μ l.
5. Mean intra-assay and inter-assay coefficient of variation was 4.5% and 5.9%, respectively.

By using liquid phase double antibody enzyme immunoassay, progesterone in plasma can be detected, and also this assay system is applicable to study on physiological function of progesterone and to diagnosis of reproductive disorders.

Key words: progesterone, enzyme conjugate, recovery rate, assay system, enzyme immunoassay.

緒 論

혈액중의 progesterone 測定法으로서는 生物學的¹⁾, 比

色²⁾, gas chromatography³⁾ 및 螢光測定法⁴⁾과 radioimmunoassay(RIA)⁵⁾가 이용되고 있으나 RIA는 이종에서 測定感度 및 再現性이 아주 높아 지금도 널리 활용되

* 本 研究는 1987年度 韓國科學財團研究費 支援에 의하여 수행되었음.

고 있다.⁶⁻⁸

그러나 RIA에서는 radioisotope를 사용해야 하는 특수성 때문에 특수한 시설과 장소를 요할 뿐만이 아니고 폐기물 처리의 어려움, 인체의 오염 가능성 및 radioisotope의 반감기가 짧은 점 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 개발되게 되었다.

EIA는 steroid 홀몬에 대한 측정⁹⁻¹²을 계기로 Dray 등¹³에 의해 progesterone 측정이 처음 실시되었으며 생리능상의 특징으로 특히 소의 발정감정,¹⁴ 임신 및 번식장애 진단,^{15,16} 분만후 난소기능 회복상태,¹⁷ 번식장애시 치료효과의 관정^{18,19}에도 크게 활용 가능한 것으로 밝혀져 가고 있어 이의 분석법의 개발이 절실한 실정에 있다.

EIA에서는 B/F 분리를 하지 않는 방법^{13,15}과 B/F 분리에 固相法을 이용하는 방법²⁰ 등이 있으나 前者의 경우 交叉反應 및 精度에 문제가 있는데 비해 後者는 실사가 비교적 간편하고 시간단축 등의 잇점은 있으나 測定感도가 약간 낮아 이를 보완하기 위한 한 방법으로 MCA(monoclonal antibody) 개발 등에 의한 응용이 시도되기도 하나²¹ 현 단계에서는 앞서의 一抗體法을 보완한 二抗體法이 特異성과 精度가 RIA보다 높고 안정²²⁻²⁴한 사실은 前報²⁵에서 밝힌바 있다.

본 연구에서는 크게 시설과 장소를 요하지 않고 누구나 쉽게 활용할 수 있는 液相에 의한 酵素免疫測定法の 확립으로 실제 응용 및 연구에 활용코져 測定系의 기본이 되는 二抗體와 擔體의 최적조건을 구하여 보고²⁵한데 이어 測定系 전반에 관련된 제반조건에 대한 분석을 실시하였다.

材料 및 方法

표준용액용 progesterone은 progesterone(4-pregnene-3,20-dione; Sigma 社製)을, 一抗體用 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 효소로는 β -D-galactosidase(Boehring Mannheim 社製)를, 酵素基質로는 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (Nakarai 社製)를, 抗酸化劑로는 2-mercapto-ethanol(Fluka 社製)를, 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,

溶媒는 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, 透折膜은 standard cellulose dialysis tubing(Spectrum medical 社製)를 사용하였다

抗原標識酵素 (11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate- β -galactosidase conjugate) : Tamamura 등²⁶의 방법을 보완하여 실시하여 column 후 酵素活性이 가장 높은 分割을 사용하여 前報²⁵에서 밝힌 一抗體와 반응시켜 結合率 60% 이상의 것만 사용하였다.

測定感度 : 最少檢出量은 표준 progesterone 절대량 0 Pg에 대한 O.D.值의 평균치에서 표준편차의 2배의 값을 뺀 O.D.值에서 여기에 대한 progesterone양을 표준곡선에서 구하였다.

回收率 : progesterone 절대량(0-500 pg)별로 소의 혈장(20~500 μ l씩)을 가해 石油 ether로 抽出하여 回收率을 구하였다.

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

結 果

Gelatin의 농도 : 각종 예비실험 단계에서 gelatin의 첨가가 반응물의 형성 및 안정성에도 효과가 있음이 밝혀져 至適條件을 구한 결과 1%에서 가장 높게 나타났으나 반복 처리 결과 불안정성이 있어 사용이 곤란 하였으나 0.2~0.25%에서는 가장 안정성이 높았다 (Fig 1 참조).

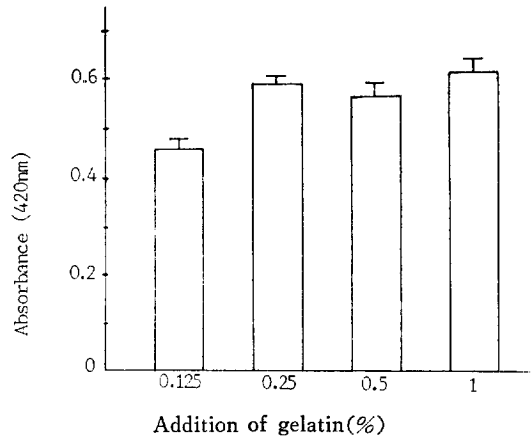


Fig 1. Diagram of gelatin added from 0.125 to 1% (dilution rate of first antibody and normal rabbit serum was 15,000 and 1,000 times, respectively). The values are mean \pm S.D. N=5.

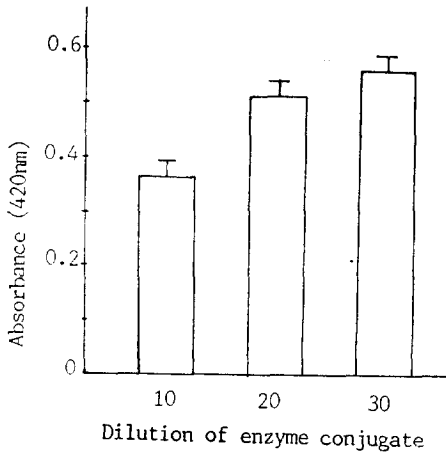


Fig 2. Diagram of enzyme conjugate dilute from 10 to 30 times(dilution rate of first, second antibody and normal rabbit serum was 15,000, 20 and 1,000 times, respectively. Gelatin concentration was 0.2%). The values are mean±S.D. N=5.

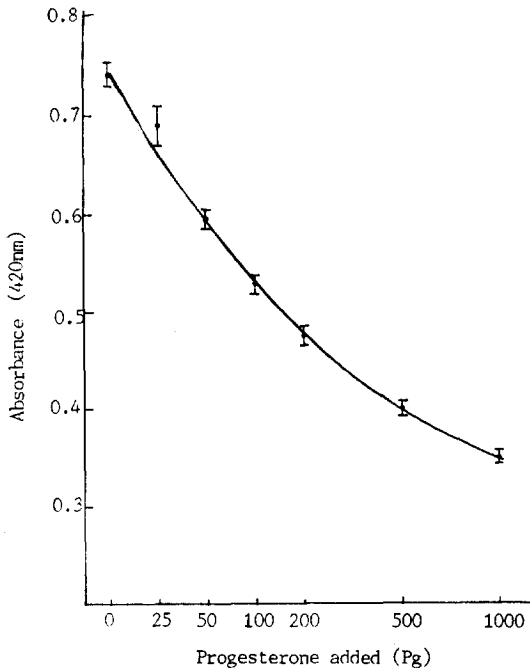


Fig 3. Standard curve for enzyme immunoassay of progesterone. The values are mean±S.D. N=3.

抗原標識酵素의 농도 : 저자가 前報에서 밝힌 二抗體擔體와 알서 밝힌 gelatin의 최적조건을 그대로 유지하고 標識酵素의 조건만을 달리 한 결과 30×의 희석

배율에서 제일 활성도가 높았다(Fig 2).

標準曲線 : 지금까지의 결과를 토대로 하여 Progesterone 절대량 0-1,000 pg에 대한 標準曲線(N=3)은 Fig 3과 같았다.

測定感度 : 最少 檢出濃度는 12 pg/tube이었다.

回收率 : 혈장 20 μl에서는 79%, 500 μl에서는 83%이었으나 50~200 μl에서는 97.8±5.4%이었다.

再現性 : 測定內 變動係數는 평균 4.5%(3265±147 pg/ml), 測定間 變動係數는 평균 5.9%(3487±207pg/ml)이었다.

考 察

EIA에 의한 progesterone 측정은 Dray 등¹³에 의해 처음 실시된 이래 여러 측정법이 개발되고 있으나 지금까지의 一抗體法의 문제점²⁶에 대해서는 前報²⁵에서 언급한 바와 같이 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^{23,24} 測定系에 대한 조건검토에 대해서는 거의 되어 있지 않고, 되어 있어도 보고자에 따라 달라²⁶⁻²⁹ 測定系의 조건설정이 시급한 실정에 있어 저자는 二抗體 및 擔體의 최적조건을 보고²⁵한바 있다.

Gelatin의 첨가는 RIA에서는 반응에 상당히 효과적인 임이 알려져 있어^{5,7} EIA에서도 활용하는 경우가 있으나^{14,22} 정확한 농도는 밝혀져 있지 않다. 본 실험결과 1% 이상의 고농도에서는 침전물의 형성에는 크게 도움이 되었으나 반응결과가 일정치 않아 사용 불가능이었으나 0.2~0.25%에서는 結合能과 安定性이 높음이 입증되었다.

抗原標識酵素의 농도는 보고자에 따라 차이가 크고 또한 分劃區에 따른 차이가 커 일정하지 않음은 周知의 사실이나^{13,28,30,31} 본 연구에서는 30×의 희석배율에서 結合能이 97%로 가장 높아 Munro와 Stabenfeldt³⁰의 20× 희석배율의 結合能 95% 보다 우수함을 알 수 있었다.

測定感度는 12pg/tube로서 Yokota 등²⁸이 보고한 homologous EIA의 18 pg/tube 보다는 높았으나 heterologous EIA의 8pg/tube 보다는 낮아 앞으로 heterologous EIA 測定系의 개발로 더욱 더 신뢰성 및 感度를 높여 나가야 될 것으로 생각된다.

回收率은 試料(血漿)의 양이 너무 적거나 많은 때에는 回收率이 83%로 낮아 문제가 되었으나 50~200 μl 내에서는 약 98%로 다른 보고내용과 일치 또는 그 이상으로 높았으며^{23,29} 실제 측정에서는 試料量이 주로 50~100 μl(200 μl내)가 사용되기 때문에 아무런 문제가

없음이 밝혀졌다.

測定內 및 測定間 變動係數는 4.5%, 5.9%로 RIA와 비교해⁶ 조금도 손색이 없었고 Yokota 등²⁰의 보고 내용과도 일치해 실제 활용에는 어려움은 없을 것으로 확신되나 앞으로 더욱 더 반응시간의 단축, 안정성 및 精度를 높이고 어디에서 누구라도 실시할 수 있도록 개발하기 위해서는 固相化를 위한 방법 개발과 더불어 MCA 등에 의한 적극적인 시도가 있어야 할 것으로 생각된다.

結 論

二抗體法(液相)으로 progesterone 측정을 위한 EIA 測定系의 확립을 기하고져 測定系 全般에 대한 각종 조건 검토 결과는 다음과 같았다.

1. 抗原標識酵素의 희석 최적조건은 30×이었으나 標識時의 조건에 따른 영향이 至大함을 알 수 있었다.

2. 測定感度は 12pg/tube로 혈중 progesterone 측정 활용은 충분함을 알 수 있었다.

3. 回收率은 試料量이 너무 적거나 많을 때에는 문제가 되었으나 실제 이용되는 50~100 μl에서는 아무런 문제가 되지 않았다.

4. 測定內 變動係數는 평균 4.5%, 測定間 變動係數는 평균 5.9%이었다.

이상과 같은 결과에서 EIA에 의한 progesterone 측정법의 확립은 앞으로 각종 생리작용의 연구에는 물론 病態解析에도 크게 활용 가능할 것으로 믿어진다.

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*

Edocrinol 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 Netherlands; 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 tmbes. *J of Immunology* 1972; 109:129~135.
11. Van Weemen BK, Schuur AHW. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1971; 15:232~236.
12. Van Weemen BK, Schuur AHW. Immunoassay using haptent-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. *Biochemica at 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 syst 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. Brochu M, Veilleux R, Lorrain A, et al. Monoclonal antibodies for use with ^{125}I -labelled radioligands in progesterone radioimmunoassay. *J Steroid Biochem* 1984; 21(4):4055~411.
22. Joyce BG, Wilson DW, Read GF, et al. An improved enzyme immunoassay for progesterone in human plasma. *Clin Chem* 1978; 24:2099~2102.
23. Nakao Y, Practical Y. Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta Endocrinol* 1980; 93:223~227.
24. Nakao T, Tamamura F, Tsunoda N, et al. Double antibody enzyme immunoassay of cortisol in bovine plasma. *Steroids* 1981; 38:111~120.
25. 姜正夫, 慎鍾旭, 崔尙龍. Enzymeimmunoassay에 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.
26. Tamamura F, Nakao T, Tsunoda N, et al. An enzyme immunoassay of estrone in swine serum. *Steroids* 1982; 39:657-666.
27. Van Weeman BK, Bosch AMG, Dawson EC, et al. Enzyme immunoassay of hormones. *Scandinavian J Immunol* 1978; 7(Suppl):73~82.
28. Sauer MJA, Cookson AD. Direct enzymeimmunoassay of progesterone in bovine milk. *Steroids* 1981; 38:45~53.
29. Yakata O, Nakao T, Moriyoshi M, et al. Heterologouse enzyme immunoassay of progesterone in serum and from farm animals. *J Coll Dairying* 1985; 11(1):141~161.
30. Munro C, Stabenfeldt G. Development of microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrin* 1984; 101:41~49.
31. Engvall E, Pesce AJ. Quantitation enzyme immunoassay. *Scand J of Immunol* 1978; 7(Suppl):73~129.