

혈청내의 Progesterone 측정을 위한 Chemiluminescence Immunoassay의 개발에 관한 연구

경희대학교 의과대학 산부인과학교실(불임클리닉)

이기순 · 서병희 · 이재현

건국대학교 축산대학 축산가공학과

김 종 배

Development of Chemiluminescence Immunoassay for Progesterone in Serum

K.S. Lee, M.S., B.H. Suh, M.D. and J.H. Lee M.D

*Infertility Clinic, Department of Obstetrics and Gynecology, Collage of Medicine,
Kyung Hee University*

J.B. Kim, Ph.D.

*Department of Animal Products Science, Science, Collage of Animal Husbandry,
Kun-Kuk University*

= Abstract =

Development of a solid-phase chemiluminescence immunoassay for the detection of progesterone in serum extract was described.

The chemiluminescence immunoassay was established utilizing anti-progesterone monoclonal antibody that coated on polystyrene tubes and progesterone-ABEI conjugate as tracer. The light yield generated from antibody bound conjugate was counted on clinilumat luminometer by oxidation with microperoxidase and peroxide. The chemiluminescence immunoassay was high specific and accurate and detects as little as 3.9 ng/ml of progesterone. The intra-assay CV ranged from 6% to 11.5% and inter-assay CV ranged from 13.6% to 18.7%. This assay system was good correlated with conventional kit radioimmunoassay system ($r=0.98$).

서 론

배란후 형성되는 황체세포(corpus luteum)에서 주로 분비되고 태반, 부신 그리고 정소에서도 소량으로 분비되는 progesterone은 수정과 착상 그리고 임신유지와 분만에 직접적으로 관련하는 steroid hormone으로 특히 난소기능 측정에 있어서 이 hormone분석은 번식생리학과 임상학적으로 매우 중요한 의미를 갖고 있다(Collins & Hennam, 1976). Progesterone측정을 위해 지금까지 가장 널리 사용되고 있는 방법

은 방사성동위원소를 이용한 Redioimmunoassay (RIA)이다. 그러나 RIA는 방사성물질을 취급해야 한다는 점에서 야기되는 제문제들-짧은 반감기 및 자체붕괴로 인한 안정도의 결여, 건강상의 해로움, 폐기물처리의 난점 그리고 고가의 장비 및 유지비 때문에 사용에 제한을 받고 있다. 이에 따라 최근에 이들 단점을 보완하면서 RIA의 장점을 갖는 비방사성물질을 이용한 면역분석법개발이 활발하게 이루어지고 있고 일부는 실용화까지 되고 있는 추세이다(Kohen et al, 1981; Bourque et al, 1986; Marcus & Durnford, 1988).

지금까지 주로 개발되어온 비방성면역분석법에서는 효소를 이용한 enzymeimmunoassay (EIA; Schuur & Van Weeman, 1977), 형광물질 이용한 fluorescenceimmunoassay (FIA; Smith et al, 1981) 또한 가장 최근엔 화학발광체를 이용한 chemiluminescenceimmunoassay (CIA; Barnard et al, 1985) 등이 있다. 이중 특히 CIA는 다른 방법들에 비해 안정도와 감도가 좋다는 장점이 있어 관심의 대상이 되고 있다.

본 연구는 petroleum ether로 추출된 혈청내의 progesterone을 측정하기 위해 고도의 특이성과 affinity를 갖는 단일클론항체(이병철, 1988)를 이용한 CIA를 개발하고 이 방법의 이용가능성을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Progesterone-3-caboxymethyl oxime(CMO), N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), N-hydroxysuccinimide (N-HS), dimethylformamide (DMF) 그리고 microperoxidase는 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 aminobutylethylisoluminal (ABEI)는 LKB(Sweden)에서 항체를 coating 하기 위한 polystyrene tube는 Sarstedt (West German)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 항체의 생산 및 분리정제

Progesterone에 대한 단일클론항체는 건국대학 생화학실험실에서 hybridoma를 분양받아 BaLb/c 생쥐의 복강에서 in-vivo 배양하여 복수를 통해 대량생산 하였다. 복수내의 항체는 포화 ammonium sulfate로 침전하여 분리정제하였다(Garvey et al. 1977). Ammonium sulfate로 분리정제된 항체는 더 이상의 분리과정없이 tube에 coating하여 분석에 이용하였다.

2) 항체의 Coating

분리정제된 항체는 barbiturate buffer(70mM, pH 9, 8)로 희석하여 polystyrene tube에 0.2ml 씩 분주하여 4°C에서 하루동안 반응시킴으로서 coating하였다.

3) Progesterone-ABEI conjugate의 합성

Progesterone-3-CMO는 carbodiimide를 이용하여 ABEI와 conjugation하였다. 0.5ml의 DMF 용액에 5mg의 progesterone-3-CMO와 5mg의

DCC, 5mg의 N-HS를 넣어 상온에서 두시간동안 반응시켜 이때 생성된 urea는 원심분리하여 제거하고 활성화된 progesterone-N-HS ester를 함유하는 상등액 50ul와 ABEI용액 (5mg ABEI / 0.5ml 0.13M NaHCO₃, pH 8.0)을 다시 두시간 동안 상온에서 반응시켜 conjugation하였다. 이렇게 합성된 conjugate는 ethyl acetate로 추출하고 다시 evaporator내에서 ethyl acetate를 제거한후 methanol에 녹이고 이를 다시 thin layer chromatography (TLC)에서 분리정제하였다. TLC의 전개용매는 chloroform과 methanol을 60:40으로 섞어 사용하였고 분리시 conjugate의 Rf치는 0.75였다. 분리된 conjugate는 ethanol에 녹여 -20°C에서 보관하며 사용하였다.

4) 혈청의 추출

0.1ml의 2ml의 petroleum ether를 첨가하여 2분간 vortex mixer로 혼합하여 5분간 1,500RPM에서 원심분리하고 동결하여 ether층을 분리한 후 다시 evaporator내에서 ether를 제거하였다. 추출된 혈청은 1ml의 0.05%의 tween-20을 함유한 0.05M phosphate buffer, pH 7.4,에 녹여 분석에 사용하였다.

5) Radioimmunoassay 방법

Progesterone 측정에 사용한 RIA는 ICN Biomedical (England)의 IRMA Kit를 사용하였다. 분석방법은 progesterone에 대한 항체가 coating되어있는 tube에 0.1ml의 혈청과 0.9ml의 ¹²⁵I으로 표지된 progesterone 용액을 넣어 37°C에서 2시간 경합반응을 시켰다. 반응후 용액부분을 제거하고, 세척함으로써 비반응물질을 제거하고 Beckman γ -counter로 1분간 측정하였다.

이 분석방법의 감도는 0.15-80ng/ml이고 intraassay -variance는 9.7%, interassay -variance는 14.6%였다.

6) Chemiluminescence immunoassay 방법

항체가 coating된 tube에 0.1ml의 추출된 혈청 용액 혹은 progesterone standard(0.19-100ng/ml)용액을 넣고 0.1ml의 희석된 progesterone-ABEI conjugate를 넣어 37°C에서 2시간 경합반응시킨다. 반응후 반응하지 못한 부분을 흡입하여 제거한뒤 각 tube에 0.2ml의 5N NaOH를 첨가하여 60°C에서 1시간 반응시키고 상온에서 30분간 냉각하였다. 냉각시킨후 0.3ml의 microperoxidase (5ug/ml)와 0.3ml의 peroxide를 첨가하여 항체와 결합된 tracer를 Berthod Clinilumat luminometer (West German)로 측정하였다.

결 과

1) CIA의 감도(sensitivity)

CIA에 의한 표준곡선은 progesterone standard를 100에서 0.19ng/ml까지 2배희석하여 tracer와 항체가 coating된 tube내에서 경쟁반응시킨뒤 semi-log scale에서 작성하였다. Zero standard(progesterone농도가 0ng/ml)와 현격한 차이를 나타내는 최소의 progesterone 농도를 감도(sensitivity)로 정할때 감도는 0.39ng/ml이었다.

그림 1은 작성된 표준곡선을 나타낸다.

2) CIA의 특이성(specificity)

CIA의 특이성은 progesterone과 유사한 steroid hormone들과의 교차반응 정도를 측정함으로써 조사하였고 교차반응은 Thorneycroft들(1970)의 방법에 의하여 구했다. 표 1은 dextrane-coated charcoal로 분리하는 radioimmunoassay와 chemiluminescence immunoassay에 의해 조사된 교차반응의 정도를 나타내는 결과로서 20 α -hydroxyprogesterone과 RIA가 12.5%, CIA가 5% 정도의 교차반응을 나타내는 등 적은 교차반응 정도를 나타냈으나 두 방법 모두 실재분석에 있어서 영향을 미칠만한 교차반응은 보이지 않았다.

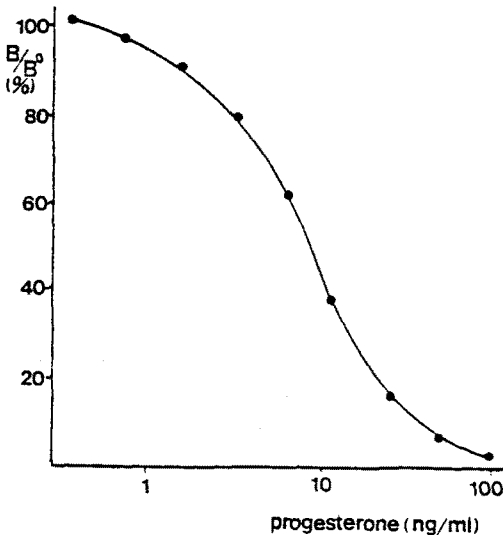


Fig. 1. Calibration curve for progesterone by CIA.

3) CIA의 정확도(accuracy)

RIA Kit assay에 의해 progesterone 농도가 0.9ng/ml로 측정된 혈청에 각각 1, 10 그리고 20ng/ml의 progesterone을 첨가한후 petroleum ether로 추출하여 CIA로 혈청중 progesterone을 측정하였다. 표 2는 이 결과를 나타내며 평균 96.23%의 recovery를 나타내었다.

Table 1. Specificity of anti-progesterone monoclonal antibody as determined by RIA and CIA

Compounds	Cross-reactivity(%)	
	RIA	CIA
Progesterone	100	100
11 α -hydroxyprogesterone	2.4	1.5
17 α -hydroxyprogesterone	<0.1	4
20 α -hydroxyprogesterone	12.5	5
11 β -hydroxyprogesterone	0.9	<0.1
Testosterone	<0.1	3
Cortisol	<0.1	<0.1
Corticosterone	<0.1	<0.1
Deoxycorticosterone	1.0	<0.1
Estradiol	<0.1	<0.1
Androsterone	<0.1	<0.1

Table 2. Recovery of progesterone from serum extract

Added progesterone	Expected value	Observed value	Recovery(%)	Bias(%)
0	0.9			
1	1.9	1.78	92.6%	-7.4
10	10.9	9.8	89.9%	-10.1
20	20.9	22.2	106.2%	+6.2
Mean			96.23%	-3.77

4) CIA의 정도검사(quality control)

Intra-assay variation과 inter-assay variation을 CIA의 정도검사로써 조사하기 위하여 각각 농도가 다른 3가지의 시료(예;고농도, 중농도, 저농도)을 만들어 전자는 10회, 후자는 4회 반복 분석하였다.

표 3에 나타난 바와 같이 intra-assay CV는 6-11.5%로 inter-assay CV는 12.6-18.7%의 수

Table 3. Analytical variation

	Sample	No. of determination	Mean \pm SD (ng/ml)	CV(%)
Intra-assay variation	pool 1	10	1.75 \pm 0.10	6
	pool 2	10	9.96 \pm 0.96	9.6
	pool 3	10	19.5 \pm 2.24	11.5
Inter-assay variation	pool 1	4	1.87 \pm 0.35	18.7
	pool 2	4	9.25 \pm 1.16	12.6
	pool 3	4	19.5 \pm 2.64	13.6

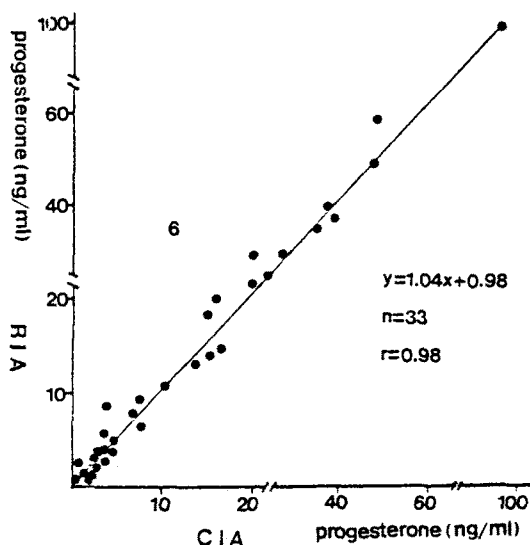


Fig. 2. Correlation between CIA and RIA.

준으로서 대체로 농도가 낮을수록 variation이 심했고 농도가 높을수록 variation이 적게 나타났다.

5) RIA와의 비교

RIA Kit assay와 CIA의 상관여부를 알아보기 위하여 임의의 혈청 33개를 두가지 방법으로 모두 분석하였다. 표 2에 나타난 바와 같이 두 분석방법의 결과는 매우 유사했으며 상관계수 $r=0.98$ 으로서 매우 높은 상관관계를 나타내었다.

고 찰

혈중 progesterone 측정은 산부인과에서 불임 여성의 진단 및 치료와, 수의산과에서 가축 특히 불임우의 진단 및 치료(Collins et al.

1981) 또는 소의 임신조기진단 (Allen et al. 1980; 정길생들, 1985)을 할 목적으로 널리 이용되고 있다. 이를 위해 가장 보편적으로 이용되고 있는 방법은 RIA이나, 선진 외국에서는 점차 비방사성 동위원소를 이용한 분석법으로 대체되고 있는 실정이다 (Schall & Tenoso, 1981).

본 연구에 개발한 CIA는 화학 발광반응을 이용한 장점의 하나는 다른것들에 비해 감도가 좋다는 점이다. 0.39ng/ml수준의 감도는 본 연구에서 함께 비교 사용한 RIA보다 다소 나은 것으로 따라서 steroid계 hormone분석에 있어서 가장 중요한 감도에 있어서는 문제가 되지않는 것으로 사료된다. 이와같이 CIA에 있어서 좋은 감도를 얻을수 있는 것은 화학발광반응의 최소측정치 (detection limit)가 동위원소의 3H , ^{125}I 그리고 ELISA에 있어서 가장 많이 사용되는 정색반응 또는 형광물질보다 낮기때문이고 또한 본 연구에서 사용한 단일 clone항체의 affinity가 좋기때문인 것으로 생각된다.

항체가 갖추어야할 가장 중요한 요건중의 하나는 특이성이다. 표 1에 나타난바와 같이 동일한 항체를 사용하고 tracer만 달리한 두 방법 RIA와 CIA를 비교하였을때 상호간에 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다. 17α -hydroxyprogesterone과의 교차반응에 있어서 CIA가 4%, RIA가 0.1%이하로서 RIA가 낮게 나타났지만 11α -hydroxyprogesterone, 20α -hydroxyprogesterone, 11β -hydroxyprogesterone에 있어서는 오히려 CIA가 낮게 나타났다. 이와 같은 차이는 항체에 대한 tracer의 affinity가 다소 다르기 때문에 일어나는 현상으로 간주되어지나 이 정도의 차이는 실제 분석에 있어서는 거의 무시해도 상관없는 수준이다.

감도와 특이성조사외에 개발된 CIA를 평가하기위해 정확도, 정도검사 그리고 RIA와의 상

관관계를 조사한 결과로 미루어 보건데 임상적으로 기초방법인 RIA 대신 충분히 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

그러나 최근 progesterone 측정에 있어서는 추출함이 없는 혈장과 혈청에 danazol 혹은 cortisol을 첨가하여 progesterone을 측정하는 소위 direct 분석법이 사용되고 있다(De Boever et al. 1984).

또한 혈액채취의 번거로움을 극복하기 위해 요중 progesterone의 대사산물인 pregnandiol-3 α -glucuronide 혹은 타액속의 progesterone을 측정하는 연구도 행해지고 있다(Eshhar et al. 1981; Lequin et al. 1986; Bourque et al. 1986). 본 연구에서 사용한 affinity와 특이성이 좋은 단일클론항체와 감도가 좋은 화학발광체를 이용할 경우 direct 분석법 및 요중 혹은 타액속의 progesterone 측정도 가능하리라 사료된다.

CIA의 가장 큰 장점은 화학발광체인 ABEI가 RIA ^3H , ^{125}I 그리고 ELIS에 사용되는 효소에 비해 장기간 보존하여도 그 활성이 떨어지지 않는다는 점이다. 따라서 steroid hormone과 같은 hapten은 물론 protein계통의 각종 생리활성물질의 정량을 위한 분석법으로 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

인 용 문 헌

- Allen RM, Redshaw MR, Holdsworth R: A comparison of tritiated and iodinated tracers in the radioimmunoassay of progesterone in cow milk. *J Reprod Fert* 1980, 58, 89-93.
- Bourque J, Sulon J, Ponsart ED, Sodoyez JC, Gaspard U: A simple direct radioimmunoassay for salivary progesterone determination during the menstrual cycle *Clin Chem* 1980, 32, 948-951.
- 정길생, 김종배, 한규재, 장원준, 이경광: Solid-phase RIA에 의한 탈지유중의 progesterone 측정과 비임신진단. *건국대학교 부설 축산경영연구소 논문집* 1985, 10, 23-25.
- Collins WP, Hennam JF: Radioimmunoassay and reproductive endocrinology. In: *Molecular aspects of medicine*, Baun H, *Gergely J(eds)* Pergamon press 1976, 1, 1.
- Collins WP, Branch OM, Collins PD, Sallam HM: Biochemical indices of the fertile period in women *Int J Fertil* 1981, 26, 196-202.
- De Boever J, Kohen F, Vanderkerckhove D, Van Maele G: Solid-phase chemiluminescence immunoassay for progesterone in unextracted serum *Clin Chem* 1984, 30, 1637-1641.
- Dechaud H, Bador R, Claustrat F: New approach to competitive lanthanid immunoassay; Time-resolved fluoroimmunoassay of progesterone with labeled analyte *Clin Chem* 1988, 34 501-504.
- Eshhar Z, Kim JB, Barnard G, Collins W P: Use of monoclonal antibody to pregnandiol-3 α -glucuronide for the development of a solid phase chemiluminescence immunoassay *Steroid* 1981, 38, 89-109.
- Garvey S J, Cremer E N, Sussdroof HD: Method in immunology 2nd ed. *W A Benjamin Inc* 1977.
- Kohen F, Kim JB, Lindner HR, Collins WP: Development of a solid-phase chemiluminescence immunoassay for plasma progesterone. *Steroid* 1981, 38, 73-87.
- 이병철: Progesterone에 대한 단일클론항체 생산과 그의 특성 조사. 석사학위 청구논문, 건국대학교대학원, 1988.
- Lequin RM, Booguard AVD, Vermeulen J, Danhof M: Progesterone in saliva; Pitfalls and consequent implications for accuracy of the determination. *Clin Chem* 1986, 32, 831-834.
- Marcus GJ, Durnford R: Estradiol assay by microtitre plate enzyme immunoassay. *J Steroid Biochem* 1988, 29, 207-212.
- Schall RF, Tenoso HJ: Alternatives to radioimmunoassay; labels and methods. *Clin Chem* 1981, 17, 1157-1164.
- Schuurs AHM, Van Weeman BK: Enzyme immunoassay. *Clin Chem Acta* 1977, 81, 1-40.
- Smith DS, Al-Hakim HH and Landon J: A review of fluoroimmunoassay and immunofluorometric assay. *Ann Clin Biochem* 1981, 18, 253-274.