

Anti-idiotypic 항체를 이용한 17β -Estradiol 측정을 위한 Time-resolved Fluoroimmunoassay

金允奎 · 金昌圭 · 朴成敏 · 李致鎬 · 李元暢 · 崔榮淑* · 金鍾培

建國大學校 畜產大學 動物資源研究所

Time-resolved Fluoroimmunoassay for the Measurement of 17β -Estradiol using Anti-idiotypic Antibody

Kim, Y. K., C. K. Kim, S. M. Park, C. H. Lee, W. C. Lee, Y. S. Choi and J. B. Kim

Animal Resource Research Center, Kon-Kuk University

SUMMARY

A competitive type immunoassay method for 17β -estradiol(E_2) based on the idiotypic anti-idiotypic antibody and time-resolved fluorescence is described.

The anti-idiotypic antibody(Ab2) produced to E_2 binding site of the primary idio-type antibody (Ab1) was labelled with europium and was allowed to compete with E_2 standards or serum sample for the binding sites of Ab1 which was bound to 2nd antibody captured onto the surface of microtitre plates.

Fluorescence measured by time-resolved fluorometer was inversely proportional to the concentration of E_2 over the range 5~500pg/well. The sensitivity of the assay was 5pg per well which was compatible with that of radioimmunoassay using the same Ab1 and 3H - E_2 as a tracer. One great advantage of this method described here was to enable antibodies to be labelled instead of haptens, and thus makes it easier to develop sensitive and robust immunoassay systems specially for haptens.

I. 緒 論

17β -estradiol(E_2)를 비롯한 스테로이드 호르몬 및 각종 생물학적 중요성을 갖는 물질을 측정하는데 있어서 抗原 抗體反應의 원리에 의한 免疫分析法 (immunoassay), 특히 放射性 물질을 이용하는 radioimmunoassay(RIA)가 가장 널리 이용되어 왔다(Stanczyk 등, 1980;Frànek 등, 1983). 그러나 RIA는 放射性 同位元素가 갖는 단점들, 즉, 짧은 半減

期, 안전상의 問題點, 방사성 동위원소의 취급과 廢棄 處理의 난점 등을 가지고 있어, 이러한 문제를 극복하기 위해 비방사성 동위원소를 이용하는 免疫分析法 開發에 많은 연구가 진행되어 왔다.

지금까지 개발된 방법 중에서 가장 널리 이용되고 있는 방법들로는 酵素를 이용한 enzyme immunoassay(EIA; Exley와 Abuknesha, 1978; Meyer 등, 1990), 化學發光體를 이용한 chemilluminescence immunoassay(CIA; Linder 등, 1981; Boever 등, 1985; Boever 등, 1986), 螢光物質을 이용한 fluor-

* 建國大學校 의과대학부속 민중병원 임상병리과

"본 논문은 動物資源研究센터의 1991년도 자체 研究費와 과학기술처 지원 UR 협상대응 농업기술개발 연구과제 연구비로 수행하였음".

escence immunoassay(FIA:Aalberse, 1973; Arends와 Nerquard-Pedersen, 1986) 등이 있으며, 특히 FIA는 안정성, 反復 測定性 및 簡便性 등의 장점이 있으나 측정상에서 나타나는 높은 background 螢光性 때문에 분석상의 感度가 制限될 뿐 아니라 正確性이 결여되는 단점이 있어 보편화되지 못했다.

그러나 최근에 개발한 time-resolved fluoroimmunoassay(TR-FIA)는 FIA에서 주로 사용되는 umbelliferone이나 fluorescein isothiocyanate(FITC) 등의 형광물질과 비교해 볼 때 fluorescent decay time이 매우 긴 europium(Eu) chelate를 螢光 標識物質로 사용함으로써 試料 自體에 함유된 형광성 물질때문에 나타나는 비특이적 螢光性(non-specific fluorescence)과 빛의 산란(light scattering)에 의해 증가되는 background signal을 감소시킬 수 있는 장점이 있다(Lovgren 등, 1985; Dechaud 등, 1986; Bador 등, 1987).

또한 Eu를 표지물질로 사용하는 TR-FIA는 sample을 반복적으로 excitation시켜(1,000 time/a second), 높은 signal-noise ratio를 나타내는 장점이 있어 RIA와 대체할 수 있는 새로운 非放射性 免疫 分析法으로 평가를 받고 있다(Lovgren 등, 1984).

종래의 기존 면역 분석법들은 특히 hapten抗原인 경우 공통적으로 대개 항원에 標識物質을 표지시킨 것을 사용하고 있는데, 이 경우 抗體에 標識物質을 標識 시킨 것을 사용한 소위 two-sites sandwich법을 개발할 수 없어 면역분석법의 Kit화를 제한하는 단점이 있다.

1976년 Strayer와 Kôhler가 newborn mice 血清에서 auto anti-idiotypic anti-T15 항체를 발견한 이래, 一次 抗體(idiotypic antibody)의 抗原과의 結合 部位(antigen combining site)를 인지하는 二次 抗體, 즉 anti-idiotypic 항체는 주로 immune response의 調節物質으로써 작용하는 抗體의 生物學的 役割과 수용체에 관한 연구, 그리고 각종 virus性 疾病에 대한 vaccine으로서 이용 등의 여러 분야에서 많은 연구가 진행되어 왔다(Kôhler 등, 1989; Kennedy 등, 1986; Keay 등, 1989; Linder 등, 1988).

그러나 최근 anti-idiotypic 抗體가 抗原처럼 一次 抗體(Ab 1)와 競爭反應을 하는 성질을 이용하여, anti-idiotypic 抗體(Ab 2)에 標識物質을 標識시켜

tacer로 사용하는 새로운 免疫分析法이 개발되므로 해서, 특히 hapten과 같은 分子量이 작은 물질분석에 새로운 전기를 마련하였다(Ludwig 등, 1987; Barnard와 Kohen, 1990).

따라서 본 연구에서는 국내에서는 전혀 시도되지 못한 卵胞호르몬 E₂의 一次 抗體에 대한 anti-idiotypic 抗體(Ab 2)와 標識物質로 螢光性인 europium을 사용하는 TR-FIA법을 이용하여 기존 방법인 RIA와 비교함으로써 이 방법의 이용 가능성을 조사하여 얼마간의 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗材料

Europium(Eu)을 抗體에 標識(labeling)시키기 위한 Eu-chelate 시약과 Eu standard를 Pharmacia 사로부터 구입 사용하였다. 螢光增幅溶液(enhancement solution) 제조를 위해 tri-n-octylphosphine oxide(TOPO), tenoyltrifluoroacetone (TTA)은 Sigma사에서, triton-X 100은 LKB사에서 구입하여 사용하였다.

그밖에 각종 buffer 제조를 위해 bovine serum albumin(BSA, fraction IV), bovine gamma globulin, diethylene triamine pentacetic acid (DTPA), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)등을 Sigma사에서 구입하였다.

2. 實驗方法

1) 緩衝溶液的 製造

抗體 coating을 위한 acidic coating buffer(pH 3~4)는 27.2g의 sodium dihydrogen phosphate monohydrate를 1 liter의 2차 증류수에 녹여 준비하였고, basic coating buffer(pH 9.6)는 1.5g anhydrous sodium carbonate, 2.93g anhydrous sodium bicarbonate, 그리고 0.2g의 sodium azide를 1 liter의 2차 증류수에 녹여 제조하였다.

Time-resolved fluoroimmunoassay(TR-FIA)에 사용된 assay buffer(pH 7.75)는 1 liter의 2차 증류수에 6.0g의 tris-(hydroxymethyl)-aminoethane, 9.0g의 sodium chloride, 0.5g의 sodium azide, 0.1 ml의 Tween 20#, 그리고 8mg의 diethylamine

triamine pentaacetic acid(DTPA)를 녹여 1N HCl로 pH를 7.75로 적정시킨 후 5g의 BSA(RIA grade, Sigma)와 0.5g의 Bovine gamma globulin을 첨가하여 사용하였다.

Washing을 위해 사용된 washing buffer는 15g의 tris-(hydroxymethyl)-aminomethane, 225g의 sodium chloride, 10g의 sodium azide와 1.25ml의 Tween 20#을 1 liter의 2차 증류수에 녹인 후 1N HCl로 pH를 7.75로 적정시키고, 다시 증류수에 50배 희석시켜 사용하였다.

2) 항체의 생산 및 분리 정제

二次抗體로 사용된 rabbit anti-rat polyclonal 항체는 normal rat 혈청으로부터 분리한 rat IgG를 100

$\mu\text{g/ml}$ 濃度로 2주 간격으로 토끼에 皮內注射(intra-dermal injection)하여, 抗體 生成을 확인한 후 booster 注射하여 얻은 抗血清으로부터 Affi-Gel protein A MAPS II Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 정제되었다. 5ml의 Affi-Gel protein A agarose가 충전된 column에 2ml의 항혈청을 부하시킨 후 40ml의 結合緩衝溶液(binding buffer, pH 9.0)으로 column을 세척하였다. Affi-Gel protein A agarose에 결합되어 있는 抗體를 20ml의 용출완충액(elution buffer, pH 3.0)으로 용출시킨 후 UV spectrophotometer(Kontron 860, USA)로 280 nm에서 흡광도를 측정하므로써 정제된 항체의 농도를 결정하였다.

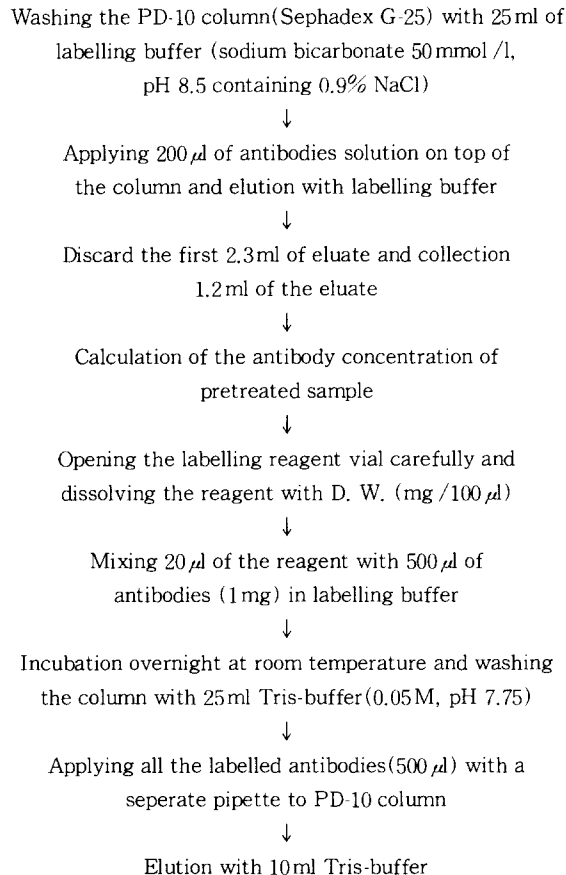


Fig. 1. Conjugation of europium chelate to anti-idiotypic mAb for time-resolved fluoroimmunoassay(TRFIA).

一次 抗體로 사용된 rat anti-17 β -estradiol 단일클론항체(Ab1)와 tracer로 사용된 mouse anti-idiotypic 단일클론항체(Ab2)는 Israel Weizmann 연구소 Dr. F. Kohen(Dept. of Hormone Research)로부터 기증 받아 사용하였다.

3) Eu-chelate로 標識된 항체의 準備

E₂에 대한 anti-idiotypic 항체에 Fig. 1과 같은 방법으로 Eu-chelate를 결합시켰다. 합성된 tracer(anti-idiotypic Ab-Eu*)의 예상된 구조는 Fig. 2와 같다.

4) 螢光增幅溶液(Enhancement solution)의 製造

Eu-chelate로부터 Eu를 解離시켜, 새로운 착화합물(lanthanide chelate)을 형성케 함으로써 그 형광성을 증폭시키는 螢光增幅溶液(enhancement solution)을 1liter의 0.1M sodium acetate buffer(pH 3.2)에 tenoyltrifluoroacetone(TTA) 1.6 mmol, tri-n-octyl phosphine oxide(TOPO) 110 mol, triton X-100 2ml을 녹여 제조하여 사용하였다(Jeffrey등, 1987).

5) TR-FIA에 의한 E₂의 測定

E₂의 측정을 위해 Fig. 3과 같은 TR-FIA를 수행하

였다. DELFIA용 12 well strip(LKB, Wallac, Finland)에 10 μ g/ml의 농도로 coating된 二次 抗體(rabbit anti-rat IgG)를 一次 抗體(Ab 1)와 결합시킨 후 一次 抗體와 결합하지 않은 이차항체를 blocking시키기 위하여 normal rat serum(NRS)을 첨가하여 30분간 preincubation시켰다. 여기에 1,000 pg/well부터 2pg/well 농도로 희석된 E₂와 합성된 tracer(anti-idiotypic Ab-Eu*)를 함께 첨가하여 Fig. 4와 같이 경쟁반응시켰다. 모든 반응이 끝난 후 螢光增幅溶液을 첨가하여 Eu으로부터 나오는 빛의 양을 delay time(ms) 0.4, window time(ms) 2.4, dead time(ns) 10.0 조건하에서 time-resolved fluorometer (1230 ARCUS, LKB)로 측정하였다.

6) RIA에 의한 E₂의 測定

본 연구에서의 TR-FIA법과 그 감도(sensitivity)를 비교하고자 [2,4,6,7,16,17-³H]E₂(Amersham)를 tracer로 사용하여 radioimmunoassay(RIA)를 실시하였다. 반응 종결 후 Rackbeta 1217/18(LKB, Sweden)을 사용하여 상등액속에 존재하는 방사선량을 측정하였다.

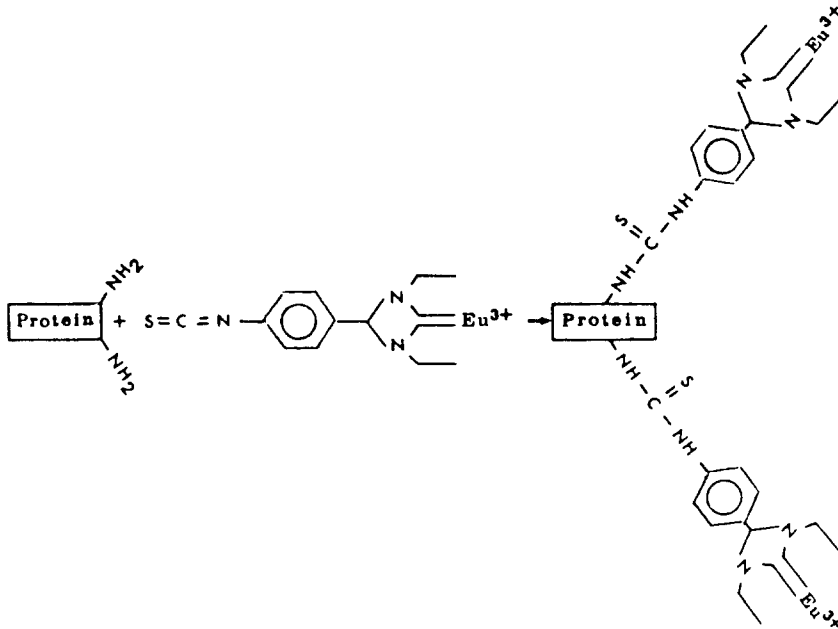


Fig. 2. Proposed structure of synthesized anti-idiotypic Ab-Eu*.

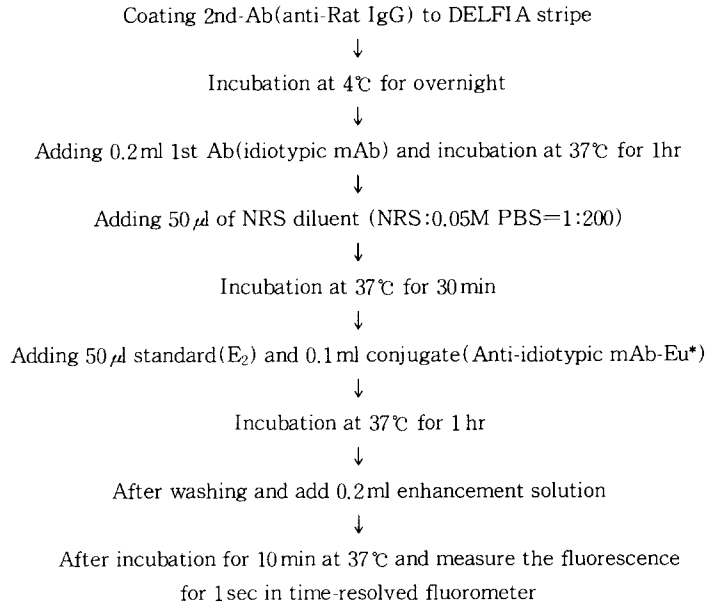


Fig. 3. Procedure for TR-FIA using the anti-idiotypic Ab-Eu*.

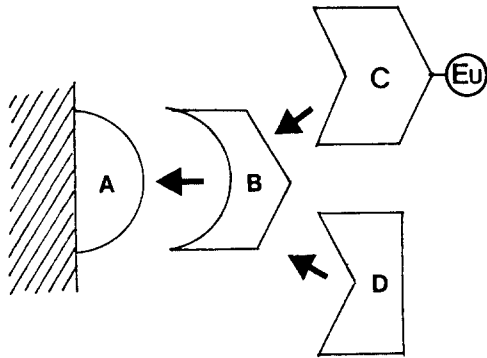


Fig. 4. Schematic representation of TR-FIA principle using anti-idiotypic antibody.

- A: 2nd antibody(rabbit anti-rat IgG) absorbed to the tube
- B: Anti-E₂ monoclonal antibody(idiotypic Ab)
- C: Tracer(anti-idiotypic Ab-Eu*)
- D: 17 β -estradiol

III. 結果

1. Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA)

1) 抗體 稀釋曲線(Titration curve) 作成

본 분석방법에서 1차 항체로 사용된 idiotypic 항체 (rat anti-E₂ mAb)의 적정농도를 결정하기 위해 tracer(anti-idiotypic Ab-Eu*) 농도를 1:1,000으로 고정시키고 一次 抗體의 IgG 분획을 1:100(100 g/ml)에서 1:6,400(1.76 μ g/ml)까지 assay buffer에 희석시켜 TR-FIA를 실시하였다. 이때 경쟁성 정도를 조사하기 위해 각 항체의 농도마다 E₂ standard를 1 ng/well씩 공히 첨가하였으며, 二次 抗體(rabbit anti-rat IgG)를 10 μ g/ml의 농도로 acidic coating buffer(0.2M sodium dihydrogen phosphate monohydrate, pH 4.0)와 basic coating buffer(0.3M sodium bicarbonate, pH 9.6)에 각각 희석시켜 coating하여 二次 抗體 coating 정도를 비교하였다. Fig. 5에 나타난 결과와 같이 1차 항체의 농도가 희석됨에 따라 항체 희석곡선과 경쟁곡선이 일정하

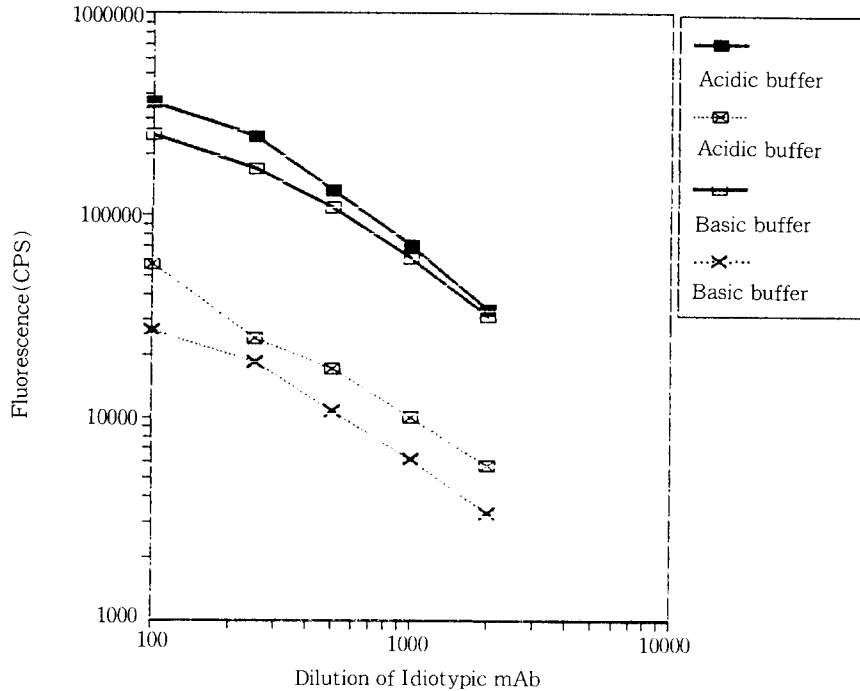


Fig. 5. Titration curve of idiotypic Ab with anti-idiotypic Ab-Eu* in the presence (.....) and absence (—) of E₂ (1 ng/well) in TR-FIA

게 감소되었고, 2nd-Ab coating을 위해 사용한 acidic과 basic coating buffer의 비교에서는 acidic coating buffer가 다소 높은 fluorescence 값을 나타내었다.

이 결과로 볼 때 1차 항체의 적정농도는 어느 농도에서도 경쟁성이 좋게 나타나 크게 문제되지 않았으며, 二次 抗體의 coating buffer는 acidic buffer가 좋은 것으로 사료된다.

2) 標準曲線(Standard curve) 作成

E₂ standard를 1,000 pg/well부터 2 pg/well의 농도로 double dilution하여, 1:2,000(5 μg/ml)의 농도로 희석된 一次 抗體와 반응시키므로써, Fig. 6과 같은 표준곡선을 얻었다. E₂의 측정범위는 5~500 pg/well 정도였으며, 감도는 5 pg/well로 나타났다.

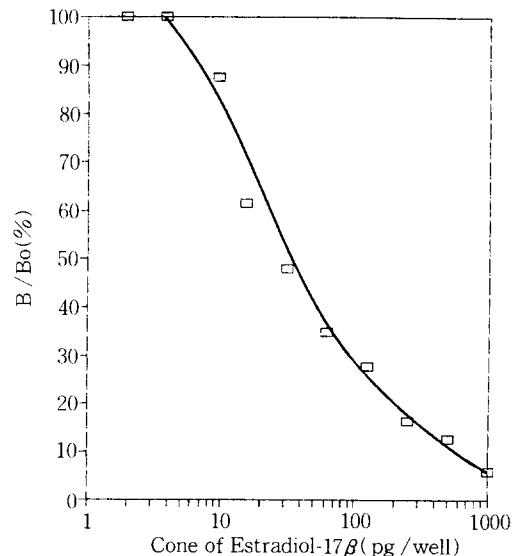


Fig. 6. Standard curve of 17β-estradiol in TR-RIA.

2. Radioimmunoassay(RIA)

RIA 상에서 항체(idiotypic 항체)의 적정농도를

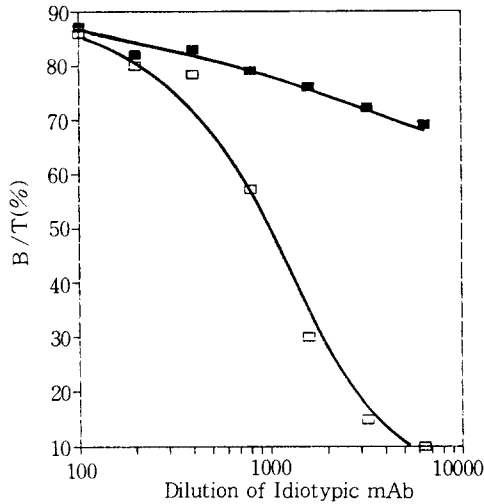


Fig. 7. Titration curve of idiotypic Ab in the presence(□) and absence(■) of E_2 (1 ng/well) in RIA.

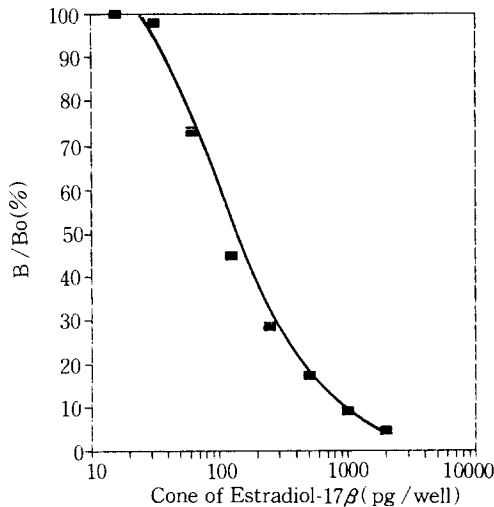


Fig. 8. Standard curve of 17β -estradiol in RIA.

결정하기 위해 항체를 1:100($100\mu\text{g/ml}$)에서 1:6, 400($1.76\mu\text{g/ml}$)로 희석하여, 동위원소가 표지된 tracer($^3\text{H-E}_2$)와 반응시키므로써 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 1 ng/well의 E_2 가 공히 첨가된 경쟁곡선이 항체농도가 1:400 지점부터 급격히 떨어졌으며, 1:2,000지점에서 가장 큰 경쟁성을 보였다. 이 결과에

의해 항체농도를 1:2,000으로 하여 E_2 의 표준곡선을 작성하였다(Fig. 8). RIA에 의한 E_2 측정범위는 20~500 pg/well이었고, 감도는 20 pg/well 정도로 나타났다.

IV. 考 察

본 연구에서 labelled-antibody 기법과 경쟁반응(competitive assay)을 기본원리로 하여, Eu이라는 형광물질을 표지물질로 사용하고 항원과 경쟁반응을 하는 anti-idiotypic 항체를 이용해서 17β -estradiol(E_2)을 측정할 수 있는 새로운 면역분석법인 TR-FIA(Altamirano et al, 1991)의 이용가능성을 검토하였다. TR-FIA의 가장 큰 장점은 decay time이 긴 Eu 표지물질을 사용하지 않으므로써 다른 형광성 표지물질들의 가장 큰 문제점인 background 문제를 제거시킬 수 있다는 점과 분석방법의 Kit화에 있어서 특히 분자량이 적은 hapten의 경우 이론적으로 가장 민감한 소위 표지된 항체를 이용하는 two-site sandwich법을 개발할 수 있다는 점에서 본 방법은 큰 의미를 지닌다고 할 수 있겠다.

1960년에 소개된 경쟁반응에 의한 면역분석법은 펩타이드, 단백질 등의 각종 생리활성물질의 측정에 있어 높은 감도를 보여주었는데, 저분자 물질의 항원인, 즉 hapten 일 경우 직접 항원에 표지물질을 표지하기가 어려워서 그 범위가 극히 제한되어 왔다. Eu-chelate를 표지물질로 사용하는 TR-FIA의 경우도 ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), diethylene triamine pentaacetic acid(DTPA), diethylene triamine tetraacetic acid(DTTA) 등의 현재까지 개발된 Eu 이온을 chelation하는 물질이 모두 protein에만 결합되도록 제한되어 있어서, E_2 와 같은 hapten의 경우엔 표지로서 europium을 이용하는 것이 불가능했다. 그러나 본 연구에서는 면역분석법상에서 항원과 똑같은 활성을 지닌 anti-idiotypic antibody를 이용함으로써 이 문제를 해결했다.

TR-FIA에 의한 E_2 측정상에 감도는 방사성 동위원소를 이용한 RIA와 비교해 볼 때 훨씬 낮은 수준을 보였다. 이 결과는 효소를 이용한 EIA 등에 비해 TR-FIA의 tracer로 사용된 Ab-Eu*이 비특이적 결합

이 적고, Eu 자체가 항체의 활성화에 영향을 주지 않으며 높은 특이적 활성을 갖기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 지금까지 대개 RIA에 의존해 온 각종 호르몬을 비롯한 각종 미량성분 분석에 있어서 TR-FIA가 RIA를 대체할 수 있는 방법으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 ELISA와 RIA를 대체할 수 있는 방법으로 폭넓게 이용되기 위해서는 Eu 이외의 다른 lanthanide 이온과 hapten에 이용할 수 있는 새로운 chelating reagent에 관한 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것이며 또한 실제 임상에 적용하기에 앞서 보다 많은 다른 조건의 시료들을 분석하여 적정 조건을 확립할 필요가 있다고 사료된다.

V. 摘要

17 β -Estradiol(E_2) 측정을 위한 새로운 면역분석법으로 E_2 에 대한 idiotypic 항체(Ab 1)와 anti-idiotypic 항체(Ab 2)를 이용하여 경쟁반응원리에 의한 time-resolved fluoroimmunoassay(TR-FIA)를 확립하였다. 표지물질로 사용된 형광물질인 Eu-chelate를 mouse 단일클론항체인 anti-idiotypic 항체에 표지시켜 microtiter plates에 피복된 二次 抗體와 결합한 Ab1에 대해 E_2 와 경쟁반응을 시켰다.

반응이 끝난 후 반응치 못한 자유부를 세척해 내고 time-resolved fluorometer로 형광성을 측정하였을 때 그 정도는 5~500 pg/well 범위내에서 E_2 의 농도에 비례하여 일정한 비율로 감소하였다. 이때의 감도는 5 pg/well 정도였으며 이것은 같은 항체 Ab1과 tracer로 $^3H-E_2$ 를 사용한 RIA의 결과 20 pg/well보다 훨씬 낮은 수준이었다.

본 방법의 가장 큰 장점의 하나는 E_2 에 직접 표지시키지 않고 항체에 표지시킬 수 있다는 점이다. 이는 특히 E_2 와 같은 hapten 분석을 위한 면역분석법 개발을 보다 용이케 할 수 있어 그 이용이 기대된다.

VI. 引用文獻

1. Aalberse, R. C. 1973. Quantitative fluoroimmunoassay. Clin. Chem. Acta., 48:109-111.
2. Altamirano-Bustamaute, A., G. Barnard and

and F. Kohen. 1991. Direct timeresolved fluoroimmunoassay for serum oestradiol based on the idiotypic antiidiotypic approach. J. Immunol. Method. 138. 95-101.

3. Arends, J. and B. Norgaard-Pedersen. 1986. Immunofluorometry of thyrotropin, from whole blood spots on filter paper, to screen for congenital hypothyroidism. Clin. Chem., 32:1854-1856.
4. Bador, R., H. Dechaud, F. Claustrat and C. Desuzinges. 1987. Europium and Samarium as Labels in Time-Resolved Immunofluorometric Assay of Follitropin. Clin. Chem., 33(1):48-51.
5. Barnard, G. and F. Kohen. 1990. Idiometric Assay : Noncompetitive Immunoassay for Small Molecules Typified by the Measurement of Estradiol in Serum. Clin. Chem., 36(11):1945-1950.
6. Boever, J. D., F. Kohen, M. Dhont and D. Vandekerckhove. 1985. Serum estradiol measurement by solid-phase chemiluminescence immunoassay and direct radioimmunoassay. Analytica Chimica Acta., 170:117-1232.
7. Boever, J. D., F. Kohen, C. Usanachift, D. Vandekerckhove, D. Leyseele and L. Vandewalle. 1986. Direct chemiluminescence immunoassay for estradiol in serum. Clin. Chem., 32(10):1895-1900.
8. Dechaud, H., R. Bador, F. Claustrat and C. Desuzinges. 1986. Laser-Excited Immunofluorometric Assay of Prolactin, with Use of Antibodies Coupled to Lanthanide-Labeled Diethylenetriamine-pentaacetic Acid. Clin. Chem., 32(7):1323-1327.
9. Exley, D. and R. Abuknesha. 1978. A Highly sensitive and specific enzyme immunoassay method for oestradiol-17. FEBS Letters, 91(2):162.

10. Frànek, M., J. Bursa and K. Hruska. 1983. Characteristics of antibodies against 17 β -oestradiol in homologous systems of radioimmunoassay. *J. Steroid Biochem.*, 19 (3):1371-1374.
11. Jeffrey, A. K., T. F. Johon and M. B. Peter. 1987. An alternative fluorescence enhancement solution for use in lanthanide-based time-resolved fluoroimmunoassays. *Clin. Chem.*, 32(12):2292-2295.
12. Keay, S., T. C. Merigan and L. Rasmussen. 1989. Identification of cell surface receptors for the 86-kilodalton glycoprotein of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:10100-10103.
13. Kennedy, R. L., J. W. Eichberg, R. E. Lanford and G. R. Dreesman, 1986. Anti-idiotypic antibody vaccine for Type B viral Hepatitis in Chimpanzees. *Science*, 232:220-223.
14. K hler, H., S. Kaveri, K. E. Thomas, W. J. W. Morrow, S. M ller and S. Raychandhuri. 1989. Idiotypic Networks and Nature of Molecular Mimicry: An Overview. *Method in Enzymology*. 178.
15. Linder, H. R., F. Kohen, Z. Eshhar, J. B. Kim and G. Banard. 1981. Novel assay procedure for assessing ovarian function in woman. *J. Steroid Biochem.*, 15:131.
16. Linder, O., T. Reshef, E. Berand, B. N. Avraham and I. R. Cohen. 1988. Antiidiotypic Network Induced by T cell Vaccination Against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Science*, 239:181-183.
17. Lovgren, T., I. Hemmila, K. Pettersson, J. U. Eskola and E. Bertoft. 1984. Determination of Hormones by Time-resolved Fluoroimmunoassay. *Talanta*, 31:909-916.
18. Lovgren, T., I. Hemmila, K. Pettersson and P. Haloneu. 1985. Time-resolved fluorometry in immunoassay. *Alternative immunoassay*. 203-217.
19. Ludwig, D. S., R. A. Finkelstein, A. E., Karu, W. S. Dallas, E. R. Ashby and G. K. Schoolnik. 1987. Anti-idiotypic antibodies as probes of protein active site: Application to cholera toxin subunit B. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:3673-3677.
20. Meyer, H. H. D., H. Sauerwein and B. M. Mutayoba. 1990. Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptoavidin amplified enzyme-immunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17. *J. Steroid Biochem.*, 35(2):263-269.
21. Stanczyk, F. Z., I. Miyakawa and U. Goebelmann. 1980. Direct radioimmunoassay of urinary estrogen and pregnenediol glucuronide during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 137:443.