

ELISA에 의한 소의 혈청 progesterone 농도 측정

姜正夫 · 孫民守 · 李恩錫 · 曹圭完 · 金哲浩*

경상대학교 수의과 대학
경상남도 가축위생시험소*
(1993년 6월 5일 접수)

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for determination of progesterone concentration in bovine serum

Chung-boo Kang, Min-soo Son, Eun-sug Lee, Kyu-woan Cho, Chur-ho Kim*

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
Gyeongsangnam Do Veterinary Service Laboratory*

(Received June 5, 1993)

Abstract : This study was carried out to determine the progesterone concentration for serum by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) in bovine adult at estrous, pregnant, after parturition and male, female calves of 1 month old, respectively.

The results obtained were summarized as follows :

1. The assay has a sensitivity of 0.1 ng/ml.
2. Intra and inter-assay coefficient of variation were 4.5%, 6.1~9.4% when used for the determination of progesterone in samples of bovine serum.
3. The percentages of recovery for progesterone added were between 88.0 to 88.9%.
4. Progesterone concentration of adult bovine serum at estrus, pregnant and after 1 day of parturition were 0.37 ± 0.16 , 7.1 ± 1.0 , 0.13 ± 0.02 ng/ml, respectively.
5. There was no differences in serum progesterone concentration of calves both male(0.16 ± 0.03 ng/ml) and female(0.15 ± 0.04 ng/ml) on 1 month old.

From these results, progesterone determination by ELISA is very applicable to detect of early pregnancy diagnosis, factorial analysis of reproductive disorder, and also reproductive physiological functions such as veterinary therapeutic measures and monitoring of cyclicity.

Key words : enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), progesterone, coefficient of variation, serum, bovine.

서 론

혈액중의 progesterone 測定法으로는 Hooker와 Forbes¹에 의한 생물학적, Short²의 비색, Van der Molen과 Aakvaag³에 의한 gas chromatography 및 Short와 Lev-

t⁴에 의한 형광측정법, Abraham et al⁵에 의한 radioimmunoassay(RIA)가 있으나 이 중에서 RIA는 측정감도 및 재현성이 아주 높아 지금도 널리 활용되고 있다.⁶⁻⁸ RIA에서는 radioisotope를 사용해야 하는 특수성 때문에 특수한 시설과 장소를 요함은 물론 인체의 오염가능성,

폐기물 처리의 어려움, 반감기가 너무 길거나 때로는 너무 짧은 점 등으로 해서 사용에는 많은 제약과 어려움이 있어 radioisotope 대신 효소를 marker로 이용하는 효소면역측정법(enzyme immunoassay, EIA)이 개발되게 되었다.

EIA는 steroid hormone에 대한 측정⁸⁻¹²을 계기로 Dray et al¹³에 의해 처음 progesterone 측정이 실시되었는데 특히 생리기능상의 특징으로 소의 발정감정¹⁴, 임신 및 번식장애 진단¹⁵⁻¹⁶, 분만후 난소의 기능회복상태¹⁷, 번식장애에서 치료효과의 판정¹⁶⁻¹⁹ 등에도 바로 활용 가능해 안정되면서도 새로운 분석법의 개발이 매우 절실한 실정에 있다.

EIA에는 液相法과 固相法이 있는데 전자의 경우 교차반응 및 측정감도에 약간 문제가 있고 후자는 실시가 간편하면서도 시간단축 등의 잇점은 있으나 아직까지는 측정감도가 약간 낮은 점이 있다.^{13, 15, 20}

저자 등은 앞서의 액상법(일항체법)의 문제점을 보완한 2차 항체법의 확립으로 특이성과 측정감도면에서 RIA보다 높고 안정한 사실을 보고한 바 있다.²¹⁻²³ 액상에 의한 효소 면역측정법을 개선하여 액상법에 의하지 않고 단클론성항체를 사용한 고상에 의한 새롭고도 측정감도가 높은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 개발^{24, 25} 하였고, 이와는 달리 종래의 면역접종 방법을 개선하여 titer가 매우 높은 progesterone의 항혈청을 얻게 되었고 이의 항혈청중에 함유된 항 BSA 항체를 제거한 후 이를 항체로 이용하는 측정법도 확립하였다.^{26, 27}

따라서 본 연구에서는 본 연구자가 개발한 앞서의 ELISA법의 임상활용 여부를 검토코져 발정기, 임신기 및 분만후의 유우 및 송아지를 대상으로 하여 혈중 progesterone 분석을 실시하였다.

材料 및 方法

공시동물 : 본 실험에 사용한 유우는 본 대학교 부속 동물 사육장에서 사육중인 임상적으로 아무런 이상이 없는 Holstein종 25두로, 여기에는 1개월령 송아지 10두(우 5두, 송 5두)와 성우 15두이며, 성우의 성주기는 발정기, 임신기, 분만기인 것을 각각 5두씩 사용하였다.

채혈 및 혈청분리 : 공시동물의 경정맥으로부터 각각 5ml를 채혈, 채혈한 혈액은 실온에서 약 1시간 방치하여 응혈시킨 후 4℃ 12시간 보존하여 1500×g로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리, 분리한 혈청은 progesterone 측정시까지 -20℃에 냉동 보존하였다.

Coating buffer 및 assay buffer, 세척액과 효소기질 용액, 반응정지액, enzyme conjugate 및 progesterone 표준

용액의 제조는 姜 등²⁷의 방법에 의거하여 실시하였다.

결합율(% bound) : progesterone을 함유한 일정 표준 용액의 흡광도치를 progesterone이 전혀 함유되지 않은 상태의 용액의 흡광도치로 나누후 여기에 100을 곱하여 나타내었다.

변동계수(coefficient of variation) : 표준편차에 100을 곱한후 평균으로 나누어서 나타내었다.

회수율 : 발정기 유우의 혈청 0.1ml에 1.0 ng/ml 및 2.0 ng/ml의 progesterone 표준용액을 각각 첨가하여 측정하였다.

혈중 progesterone 농도측정 : 姜 등²⁷(1991)의 방법에 준하여 실시하였다.

結 果

Progesterone 표준용액에서의 결합율(% bound) 및 변동계수 : progesterone 표준용액에서의 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 및 20.0 ng/ml에 대한 ELISA plate별 중복 실험에서의 각각 3 plates에서의 평균 결합율은 0.1 ng/ml에서는 93.9±1.7%, 20 ng/ml에서는 10.5±0.7% 이었고, 측정간 변동계수는 전자에서는 1.8%, 후자에서는 6.6%이었고, 각 plate에서의 측정내 변동계수는 후자에서도 4.5%이하이었다(Table 1).

재현성 : 본 연구에서의 재현성을 조사하기 위하여 측정내 변동계수(Intra-assay coefficient of variation) 및 측정간 변동계수(Inter-assay coefficient of variation)를 측정한 결과 측정내 변동계수는 4.5%, 측정간 변동계수는 6.1~9.4%이었다(Table 2, 3).

회수율 : 발정기 유우의 혈청(progesterone 농도, 0.25 ng/ml) 0.1ml에 progesterone 표준용액 1.0 ng/ml 및 2.0 ng/ml씩을 각각 첨가하여 실시한 결과 전자에서는 88.0%, 후자에서는 88.9%의 회수율을 나타내었다(Table 4).

임신기, 발정기 및 분만후의 혈중 progesterone 농도 : 각 group별 5두에 대한 평균 progesterone의 농도는 수정후 25~35일로 이후 임신 및 분만이 확인된 그룹에서는 7.10±1.0 ng/ml으로 높았고, 발정기에서는 평균 0.37±0.16 ng/ml, 분만후 1일째는 평균 0.13±0.02 ng/ml으로 매우 낮았다(Table 5).

1개월령의 암·수송아지에서의 혈청 progesterone 농도 및 결합율 : 1개월령의 암송아지의 혈중 progesterone 농도는 Table 4에서와 같이 평균 0.16±0.03 ng/ml, 수송아지에서는 평균 0.15±0.04 ng/ml으로 성별에 따른 차이를 볼 수 없었다.

개체별간의 결합율은 약간의 차이가 있었으나 성별에 따른 차이는 나타나지 않았고 결합율은 92.2% 이상이었다(Table 6).

Table 1. Bound percent and coefficient variation for serial standard solution of progesterone

Plate	Concentration of standard progesterone(ng/ml)							
	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10	20
1	96.3	93.6	78.4	55.3	43.6	28.5	17.5	11.2
2	92.2	90.5	73.7	56.0	43.2	26.6	16.3	10.7
3	93.5	88.7	71.4	52.9	40.0	26.5	15.2	9.6
Mean±SD	93.9±1.7	90.9±2.1	74.5±2.9	54.7±1.3	42.3±1.6	27.2±0.9	16.3±0.9	10.5±0.7
C.V.(%)**	1.8	2.3	3.9	2.5	3.8	3.3	5.9	6.6

* : Bound percentage = $E/E_0 \times 100$, E : absorbance reading of sample E_0 : absorbance reading of zero standard

** : C.V. = Coefficient of variation.

Table 2. Intra-assay coefficient of variation in progesterone analysis by ELISA using bovine serum

Item	Replications						Mean ± SD	C.V.(%)**
	1	2	3	4	5	6		
O.D.	0.230	0.227	2.234	0.243	0.229	0.220	0.230±0.007	
% Bound*	22.9	22.7	23.4	24.3	22.9	22.0	23.0 ± 0.699	
Progesterone (ng/ml)	5.8	6.0	5.6	5.4	5.7	6.2	5.8 ± 0.261	4.5

* : % Bound = $E/E_0 \times 100$, E : absorbance reading of sample E_0 : absorbance reading of zero standard

** : C.V. = coefficient of variation.

Table 3. Inter-assay coefficient of variation in progesterone analysis using four different pools of bovine serum by ELISA

Plate	Pool A		Pool B		Pool C		Pool D	
	%Bound	Pro(ng/ml)**	% Bound	Pro(ng/ml)	% Bound	Pro(ng/ml)	% Bound	Pro(ng/ml)
1	90.9	0.19	85.7	0.29	45.3	1.55	30.2	3.6
2	90.5	0.20	81.5	0.36	41.7	1.80	30.5	3.5
3	88.4	0.23	82.9	0.34	43.8	1.70	26.8	4.3
Mean±S.D.	89.7±1.1	0.21±0.02	83.4±1.76	0.33±0.03	43.6±1.47	1.68±0.1	29.2±1.7	3.8±0.36
C.V.(%)**	1.2		2.1		3.4		5.7	

* : % Bound = $E/E_0 \times 100$, E : absorbance reading of sample E_0 : absorbance reading of zero standard

** : C.V. = coefficient of variation.

*** : Pro(ng/ml) = progesterone(ng/ml).

Table 4. Recovery rate for bovine serum which was added progesterone by ELISA

Progesterone added(ng/ml)	Initial concentration(ng/ml)	Progesterone recovered(ng/ml)	Progesterone recovery rate(%)
0	0.25	-	-
1.0	0.25	1.1	88.0
2.0	0.25	2.0	88.9

Table 5. Progesterone concentration of bovine serum in several reproductive stages

Stage	No. of head	Concentration(ng/ml)
Pregnancy(25~35 day)	5	7.10±1.0
Estrous	5	0.37±0.16
Parturition(after 1 day)	5	0.13±0.02

考 察

효소를 표지물질로 사용하는 enzyme immunoassay (EIA)에 의한 progesterone 측정은 Dray 등¹³에 의해 처음 실시 되었으나 종래의 일항체법에 의한 액상상태에서의 측정법에서는 항원-항체반응이 미약해 측정감도가 낮고 측정내 변동계수 및 측정간 변동계수가 높아 어려움이 있었다.¹³⁻¹⁶ 일항체법을 개선한 액상의 EIA인 이항체법에서는 특이성 뿐만 아니라 측정감도에서 일항체법과는 달리 RIA²⁸와 비교해서도 조금도 손색이 없음이 입증되고 있으나 측정계 하나 하나에 대한 조건설정이 실시되어야 하는 단점이 있고 또한 항체에 결합된 항원과 결합되지 않은 항원(B/F)을 분리하기 위해 원심 분리 등의 번거로운 과정이 필요하다.²⁹⁻³³ 이에 비해

Table 6. Progesterone concentration and bound percent in male and female calves serum on 1 month age

Individual	Male		Female	
	No.	% Bound*	Progesterone(ng/ml)	% Bound
1	88.4	0.21	91.8	0.16
2	93.1	0.15	93.1	0.15
3	90.9	0.17	88.6	0.21
4	91.9	0.16	97.4	0.11
5	96.5	0.12	97.6	0.10
Mean ± SD	92.2 ± 2.7	0.16 ± 0.03	93.7 ± 3.4	0.15 ± 0.04

* : % Bound = $E/E_0 \times 100$, E : absorbance reading of sample
 E_0 : absorbance reading of zero standard

고상법³⁴⁻³⁸은 조작이 간편하고 신속히 수행할 수 있어 임상영역에 응용할 수 있는 가능성이 매우 높다. 본 연구에 사용한 ELISA 방법은 Munro와 Stabenfeldt³⁸의 방법을 일부분 개선한 고상법으로 측정감도, 회수율 및 재현성이 hormone 분석의 주류를 이루고 있는 RIA 성적과 비교해 전혀 손색이 없음이 밝혀졌다.²⁵⁻²⁷

고상법의 단점으로 지적되고 있는 이른바 “edge effect”에 대하여 Arnstadt와 Cleere³⁴는 coating시에 감작조건을 조절하면 well간의 변동을 1~3% 정도로 줄일 수 있었으며 그러한 결함이 있는 plate라면 안쪽 60 well만 사용하면 이 변동을 줄일 수 있다고 하였다. 본 실험에서도 edge effect로 생각되는 변동은 나타나지 않아 이들의 주장을 뒷받침할 수 있었다.³⁴

Webb 등³⁸은 소의 혈장 progesterone을 RIA법으로 재현성을 조사한 바 측정내 변동계수가 4.0 ng/ml이하 농도에서는 4.8%, 4.0 ng/ml 이상에서는 13.2%이었으며 측정간 변동계수는 12.1%로, Hoffmann 등³⁹은 RIA에서 3~7%로, Heap 등⁴⁰은 RIA로 우유에서 18.9%를 보고한 바 있다. EIA법으로 재현성의 측정은 Arnstadt와 Cleere³⁴에 의하면 우유중에서 측정내 변동계수는 4.8~7.7%, 측정간 변동계수는 7.4~9.2%로, Cleere 등⁴¹은 소의 혈장 progesterone 농도 측정에서의 측정내 변동계수는 5%를 넘지 않았으며 측정간 변동계수는 9%정도였고 우유중에서는 측정내, 측정간 변동계수는 8~13%로, Kamonpatana 등³⁵은 측정내 변동계수는 13.56%, 측정간 변동계수는 13.45%를 보고하였다.

본 실험에서 측정내 변동계수는 4.5%, 측정간 변동계수는 6.1~9.4%로서 Webb 등³⁸과 Kamonpatana 등³⁵의 성적보다는 낮고 Hoffmann 등³⁸과 Arnstadt와 Cleere³⁴의 성적과 유사한 결과를 나타내어 재현성에는 아무런 문제가 없음이 확인 되었다.

Nakao³³는 EIA역상법에 의한 회수율은 98.1 ± 11.4%로, kamonpatana 등³⁵은 EIA법으로 0.5 ng/ml 첨가시는 110%, 2.5 ng/ml 첨가시는 71.24%의 회수율을, Cleere 등⁴¹은 혈장에서는 81.4~92%, 우유에서는 98~106.4%

의 회수율을 보고한 바 있다. Hoffmann 등³⁸은 RIA법에 의해 93~100%의 회수율을, Wendorf 등⁴²은 89%의 회수율을 보고하여, 본 실험에서의 회수율 1.0 ng/ml 첨가시에 88.0%, 2.0 ng/ml첨가시에는 88.9%로서 Kamonpatana 등³⁵의 성적보다는 약간 높았으나 Cleere⁴¹와 Endorf⁴³ 등의 성적과 유사한 회수율을 나타내었다.

Kishimoto 등⁴³에 의하면 소의 혈장 progesterone 농도는 발정종료 수일간의 성주기소(비임신)나 임신중의 소에서 모두 0.3 ng/ml으로 낮게 유지되었으나 그후 서서히 증가하여 비임신우는 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 등⁴⁴에 의하면 소의 혈중 progesterone 농도는 인공수정후 서서히 증가하여 12일째 9.9 ng/ml의 농도를 나타내어 33일째까지 지속 되었다가 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.

Tanaka 등⁴⁵에 의하면 인공수정후 22~24일의 혈장 progesterone 농도가 1.0 ng/ml이상인 경우 임신으로 진단했을 때 약 반수 이상이 10 ng/ml으로 나타났고 비임신예의 반수가 1.0 ng/ml이하였으나 1.0 ng/ml이상의 예도 비교적 많았다고 한다.

Kamonpatana 등³⁵의 보고에 의하면 swamp buffalo에서 발정기의 혈장 progesterone의 농도는 0.09 ± 0.13 ng/ml, 임신 24, 27, 30 일째는 각각 1.38 ± 0.54, 1.17 ± 0.48, 1.26 ± 0.33 ng/ml으로 인공수정의 적기는 progesterone 농도가 0.5 ng/ml이하일 때라고 보고한 바 있다.

본 실험에서의 발정기 progesterone 농도는 0.37 ± 0.16 ng/ml로 Kishimoto 등⁴⁴과 Henricks 등⁴⁵의 보고와 거의 일치 하였으며, 임신기의 progesterone의 농도는 7.1 ± 1.0 ng/ml로 Henricks 등⁴⁵의 성적 보다는 약간 낮고

Kishimoto 등⁴⁴의 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 응용가능한 것으로 판단된다.

결 론

ELISA에 의거 발정기, 임신기, 분만후의 Holstein 성우 및 1개월령의 암·숫송아지 혈청에서의 progesterone 농도를 측정 한 결과는 다음과 같았다.

1. 본 실험에서의 측정감도는 0.1 ng/ml이었다.
2. 본 실험에서의 재현성을 조사하였던 바 측정내 변동계수는 4.5%, 측정간 변동계수는 6.1~9.4%이었다.
3. 발정기의 소의 혈청을 이용하여 progesterone 회수율을 조사한 결과 progesterone 1.0 ng/ml 첨가시는 88.0%, progesterone 2.0 ng/ml 첨가시는 88.9%의 회수율을 나타내었다.
4. 유우에서의 progesterone 농도는 발정기에서는 0.37±0.16 ng/ml, 분만기에서는 0.13±0.02 ng/ml, 임신기에서는 7.1±1.0 ng/ml이었다.
5. 1개월령의 암송아지 및 숫송아지에서의 혈청 progesterone 농도는 전자에서는 0.15±0.04 ng/ml, 후자에서는 0.16±0.03 ng/ml이었다.

이상과 같은 결과에서 ELISA에 의한 소의 혈청 progesterone 측정은 소의 조기 임신진단, 번식장애별 원인감별에는 물론 생식·생리연구에도 크게 활용 가능할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Hooker CW, Forbes RT. A bio-assay for minute amounts of progesterone. *Endocrinology* 1974 ; 41 : 158~163.
2. Short RV. Progesterone in blood. I. The chemical determination of progesterone in peripheral blood. *J Endocr* 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 Endocr Met* 1967 ; 25 : 1625~1629.
4. Short RV, Levett I. The fluorimetric determination of progesterone in human plasma during pregnancy and the menstrual cycle. *J Endocr* 1962 ; 25 : 239~245.
5. Abraham GE, Swerdloff R, Tulchisky D, et al.

- Radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1971 ; 32 : 619~626.
6. Bosch AMG, Van Hell H, Brands J, et al. Enzyme-linked immunoassay for hormones : preparation of tracer : *Comparison with radioimmunoassay in immunoenzymatic assay techniques* Ed. R Malvano Netherland-s : M Nijholl 1980 : 1~15.
7. De Villa GO, jr Roberts K, Wiest WG, et al. Aspecific 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 E, 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, Schuurs AHWA. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1971 ; 15 : 232~236.
12. Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using hapten-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 et 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 cyst 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 cosw. *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. 姜正夫, 慎鍾旭, 崔尙龍. Enzyme immunoassay에 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.
 22. 姜正夫, 慎鍾旭, 崔尙龍. Enzyme immunoassay에 의한 소의 progesterone 측정과 이의 응용에 관한 연구 II. Progesterone 측정에 대한 酵素免疫測定方法의 확립. *大韓獸醫學會誌* 1989 ; 29(1) : 21~25.
 23. 姜正夫, 崔日寬, 孫民守, 許周衡, 金哲浩. Progesterone 측정을 위한 液相 酵素免疫測定方法의 최적 조건에 관한 연구. *大韓獸醫學會誌* 1992 ; 32(3) : 429~434.
 24. Kang CB, Kim YH. Characteristics and application of monoclonal antibody to progesterone I. Production of monoclonal antibody to progesterone. *Korean J Vet Sci* 1990 ; 30(4) : 511~513.
 25. Kang CB, Kim JS. Characteristics and application of monoclonal antibody to progesterone II. Development of progesterone enzyme-linked immunosorbent assa(ELISA). *Korean J Vet Sci* 1991 ; 31(4) : 403~409.
 26. 姜正夫, 李孝宗, 崔尙龍. 소의 조기 임신진단 Kit의 개발 I. Progesterone의 항체생산 및 항 BSA 항체 제거. *大韓獸醫學會誌* 1991 ; 32(2) : 217~222.
 27. 姜正夫, 李孝宗, 崔尙龍. 소의 조기 임신진단 Kit의 개발 II. 조기 임신진단 Kit의 개발. *大韓獸醫學會誌* 1991 ; 31(2) : 223~228.
 28. Abraham GE. Solid-phase radiolimmunoassay of estradiol 17- β . *J Clin Endocr Metabo* 1969 ; 29 : 866~870.
 29. Tamamura F, Nakao T, Tsunoda N, et al. An enzyme immunoassay of estrone in swine serum. *Steroids* 1982 ; 39 : 657~666.
 30. Van Weeman BK, Bocsch AMG, Dawson EC, et al. Enzyme immunoassay of hormone. *Scandinavian J Immunol* 1987 ; 7(Suppl) : 73~82.
 31. Sauer MJA, Cookson AD. Direct enzyme immunoassay of progesterone in bovine milk. *Steroids* 1981 ; 38 : 45~53.
 32. Yakota O, Nakao T, Moriyoshi M, et al. Heterologous enzyme immunoassay of progesterone in serum and from farm animals *J Coll Dairying* 1985 ; 11(1) : 141~161.
 33. Nakao, T. Proactical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta Endocr* 1980 ; 93 : 223~227.
 34. Arnstadt KI, Cleere WF. Enzyme-immunoassay of progesterone in milk from cows. *J Reprod Fert* 1981 ; 62 : 173~180.
 35. Kamonpatana M, et al. Oestrus control and pregnancy diagnosis in the swamp buff : comparison of enzymeimmunoassay and radioimmunoassay for plasma progesterone. *Theriogenology* 1979 ; 11(5) : 399~406.
 36. Munro C, Stabenfeldt G. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocr* 1984 ; 101 : 41~49.
 37. Sauer MJ, Foulkes JA, Oneill PM. Use of microtitre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk : application of heterologous systems for improved sensitivity. *Br Vet J* 1982 ; 138 : 522~532.
 38. Webb R, et al. Plasma progesterone and gonadotrophin concentrations and ovarina activity in post-partum dairy cows. *J Reprod Fert* 1980 ; 59 : 133~143.
 39. Hoffmann B, et al. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle : Methodological approaches and present status of application in Germany. *Br Vet J* 1976 ; 132(5) : 469~476.
 40. Heap RB, et al. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. *Br Vet J* 1976 ; 132(5) : 445~464.
 41. Cleere WF, et al. A high performance, high throughput enzyme immunoassay for the analysis of progesterone in plasma or milk. *Irish Veterinary Journal* 1984 ; 39 : 6~14.
 42. Wendorf GL, Lawyer MS, First NL. Role of adrenals in the maintenance of proegnancy in cows. *J Reprod Fert* 1983 ; 68 : 281~287.
 43. Kishimoto Y, Kato H, Mitani M. Enzyme immunoassay of progesterone in bovine milk. *J Reprod Fert* 1981 ; 62 : 173~180.

- ssay of progesterone in bovine plasma and skim milk and its application to early pregnancy diagnosis. *J Japan Vet Med Assoc* 1987 ; 40 : 161~164.
44. Henricks DM, et al. Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer. *J Animal Science* 1971 ; 33(2) : 450~454.
45. Tanaka S, et al. A plasma progesterone enzyme immunoassay kit used for heifers. *J Japan Vet Med Assoc* 1988 ; 42 : 83~87.
-