

사람 타액내 Testosterone의 초감도 효소면역측정법

윤용달 · 전은현 · 이창주 · 도병록 · 이준영^{1†}

한양대학교 자연과학대학 생명과학과, ¹충북대학교 자연과학대학 생물학과

Ultrasensitive Enzymeimmunoassay for Testosterone in Human Saliva

Yong-Dal Yoon, Eun-Hyun Chun, Chang-Joo Lee, Byung-Rok Do and Joon-Yeong Lee^{1†}

Department of Life Sciences, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791

¹Department of Biology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

요 약: 남성 및 여성의 타액내 testosterone의 농도를 측정하기 위하여 초감도 효소면역측정법 (ultrasensitive enzymeimmunoassay; EIA)을 정립하고, 이 EIA를 이용하여 한국인 정상 여성 및 남성의 타액에서 testosterone의 정상농도를 얻고자 하였다. 정상 월경주기를 가진 여성 18명에서 아침 6~9시 사이에 타액을 채취하였고, 남성의 타액도 오전 (9~10시) 중에 채취하였다. EIA의 표지물질로는 horseradish peroxidase를 사용하였고, 기질은 ABTS [2,2'-azino-di(3-ethyl-benzthiazoline sulphonic acid)]를 사용하였다. 항원 항체 결합형과 비결합형의 분리를 용이하게 하기 위해 항혈청을 microcrystalline cellulose에 mixed anhydrohydride 방법을 이용하여 부착시켜 사용하였다. 항원항체 결합 후 기질을 첨가하여 반응을 시키고 발색시켜 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 본 EIA의 특성을 방사면역측정법 (RIA)과 비교하여 평가하였다. 본 실험에서 정립된 EIA의 감도 (sensitivity)는 약 25 pg/tube 이하이었고, 표준시료를 첨가해 측정치와 기대치를 비교한 정확도 (accuracy)는 측정치 (Y) = 0.96 X 기대치 (X) - 0.89이었고 상관계수 (r)는 0.985이었다. 본 실험에서 생산하여 사용한 항체의 역가는 1/56,000이었고, 항체의 교차반응(cross-reaction)을 다른 8종의 steroid를 이용하여 조사한 결과 5 α -dihydrotestosterone (DHT)와 52%로 나타났으나 다른 steroids와는 0.1% 이내의 교차반응도를 나타내었다. 정밀도 (precision)는 intra-assay variation과 inter-assay variation의 변이계수 (coefficient of variation)가 10% 내외로 만족할 만한 범위에 들었다. 본 실험 방법을 타액과 혈청내 testosterone 농도 측정에 응용하여 RIA의 결과와 비교하여 본 바 상관관계가 타액에서 r=0.969, 혈청에서 r=0.990으로 두 결과가 잘 일치하였다. 본 실험에서 측정된 한국인 여성의 타액내 testosterone 농도는 107.7 \pm 12.0 pmol/l이었고, 남성의 타액내 농도는 274.2 \pm 22.1 pmol/l이었다. 이상의 결과로 보아 본 연구에서 정립된 EIA 방법은 RIA를 대신하여 소규모의 실험실에서도 활용할 수 있을 것으로 사려된다.

ABSTRACT: A few enzymeimmunoassay (EIA) for testosterone (T) have been reported but was not suitable for all biological samples. The present study was designed to develop a rapid, ultrasensitive EIA and to apply this technique for study the physiological changes of T in biological samples. Saliva samples were collected at 06:00~09:00 hour during one menstrual cycle from 18 normally menstruating women and on 09:00~10:00 hour from 20 normal men. The present study shows an established EIA for testosterone, using horseradish peroxidase (HRP), which was covalently bonded to testosterone-3-carboxymethyloxime (T-3-CMO). One batch of T-antisera was also covalently linked to microcrystalline cellulose particles by a mixed anhydride method in order to facilitate separation of bound and free steroids. The established EIA was validated in terms of sensitivity, accuracy, specificity, precisions etc., comparing with conventional radioimmunoassay. The sensitivity of the established EIA was less than 25 pg/tube. The correlation coefficients between the expected T-values and observed T-values measured by EIA or RIA were r=0.985 and r=0.941 respectively. The cross reactivity of antiserum in EIA was a little higher than that of RIA, especially by 5 α -DHT. The intra- and inter-assay precisions of the present EIA were similar to those of RIA. The present study also demonstrates that the normal T-values in saliva of Korean male & female samples are 265.65 \pm 15.80 pmol/l and 109.74 \pm 12.01 pmol/l, respectively. The present EIA seems to be established and suitable for use in the endocrinological studies. The advantages of this EIA system also might make the present T-EIA an ideal procedure for use in a routine assay of ordinary laboratory with a conventional spectrophotometer.

Key words: Testosterone, Saliva, Puberty, Menstruation, EIA.

서 론

[†]교신저자: Department of Biology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, Korea (우) 360-763 (전) 02-290-0955 (팩) 02-299-3495 e-mail: jylee24@trut.chungbuk.ac.kr

위원소를 표식자로 이용한 후로 방사 면역측정법 (radioimmunoassay: RIA)이 시작되었다 (Yalow & Berson, 1959). 이 방법은 여러 가지 생물체액내에 있는 극소량 물질의 정량분석을 가능케 했으므로 (Skelly et al., 1973) 내분비학을 비롯한 여러분야에서 광범위하게 이용되고 있다.

방사면역측정법은 높은 감도 (sensitivity)와 정밀도 (precision), 정확도 (accuracy)를 나타내며 (Cameron et al., 1975), 반응 후의 분명하고 명백한 검출을 가능케 해주는 등 여러 잇점을 가지고 있다 (Schall & Tenoso, 1981; Hunter & Corrie, 1983). 그러나 방사성 물질, 특히 감마선을 방출하는 동위원소의 짧은 반감기, 이를 다루는 데 따르는 취급자의 건강상의 위험, 폐기에 따른 문제, 고가의 실험 기구의 필요성 등 때문에 이를 대신할 방법이 필요하게 되었다 (O'Sullivan et al., 1979; Hunter & Corrie, 1983; Jeffcoate, 1985).

이러한 이유로 Andrieu 등 (1979)은 bacteriophages를 이용하여 haptens의 농도측정을 가능케 한 viroimmunoassay (VIA)를 개발하였고, 효소를 표식자로 이용한 효소면역측정법 (EIA; Dawson et al., 1978), luminol이나 그 유도체 또는 aminobutyl-ethylisoluminol (ABEI)로 감도를 증가시킨 화학섬광면역측정법 (chemiluminescence immunoassay; CIA) (Schroeder et al., 1977; Botti et al., 1982; Thorpe et al., 1985; De Boever et al., 1986; Yoon & Kim, 1987; Yoon et al., 1988), 또는 형광 물질 표식자 (fluorescent label)를 이용한 형광 면역측정법 (fluorescence immunoassay; FIA)등이 개발되어 왔다 (Soini & Hemmila, 1979; Allaman et al., 1981; Shah et al., 1984).

일반적으로 효소면역측정법을 사용할 때에는 비교적 보존기간이 길며 싼 시약을 사용할 수 있고, 취급시의 위험이 적어 소규모의 실험실에서도 쉽게 이용할 수 있으며, 효소의 다양성으로 인해 한 시료 내에서 여러 물질의 동시 정량이 가능하여 보편적으로 쓰이는 방법의 하나가 되었다 (Blake et al., 1982; Dhar et al., 1986). 그러나 steroid 호르몬의 EIA 측정법은 근래에 와서 개발되어 경쟁적 결합을 응용한 heterogeneous assay (Tallon et al., 1984)를 시행하거나, 분리 단계 없이 효소의 활성도로 steroid의 정도를 측정하는 homogeneous assay가 이용되고 있다 (Kohen et al., 1978). 그러나 아직도 steroid EIA가 완전히 정립되지 못하고 있는 상태이다.

Testosterone측정은 남성의 성기능 부전 (hypogonadism), Klinefelter's 증후군, testicular feminization 등의 모니터링에 이용된다. 여성의 경우 hirsutism, Stein-Leventhal 증후군, testosterone을 생성하는 종양 등의 내분비적 이상을 진단하고 치료해 나가는 데 매우 중요하다 (Elder & Lewis, 1985). 따라

서 소량의 혈액, 뇨, 타액 등에서 RIA나 EIA를 이용하여 testosterone을 측정하려는 시도가 이루어져 왔다 (Chan & Yeung, 1986; Hanquez et al., 1987). 특히 타액내 testosterone 농도는 생물학적으로 활성을 가진 steroid 농도를 측정하기에 합당하다고 보고되었다 (Khan-Dawood et al., 1984).

본 실험에서는 적은 규모의 실험실에서도 일반적인 분광광도계를 이용하여 쉽게 testosterone을 정량분석할 수 있는 방법을 개발하고자 항체를 생산하고, testosterone-horseradish peroxidase conjugate (T-HRP)를 표식자로 이용한 초감도 효소면역 측정법을 정립하고자 하였다. 또한 이 방법을 사람의 타액내 testosterone 농도 측정에 응용하여 이용 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

20~27세의 건강한 여성을 선택하여 월경 1주기 (32.2±3.7 day) 동안 타액을 채취하였다. 즉 매일 아침 일어난 직후 물로 입안을 씻어내고 약 20~30분 후부터 플라스틱 용기에 타액을 받았다. 5 ml 이상씩 모은 후 바로 4°C 냉장실에 보관하였다. 건강한 20~23세의 남성 타액은 무작위로 오전 (9~10시)에 받아 바로 저온 냉동기 (deep freezer, So-Low Environmental Equip. Co.)에 보관하였다. 혈액은 상박정맥에서 채취하여 응결시킨 후 4°C에서 1500×g로 10분 동안 원심분리하여 혈청을 분리한 후 -30°C 저온 냉동기에 보관하였다.

2. 시약 및 원충액

본 실험에 사용한 시약 중 표준시료 및 효소가 부착된 표식자를 합성하기 위하여 testosterone (T), T-3-O-carboxymethylloxime (T-3-CMO), N,N-dimethylformamide, tri-n-butylamine, isobutylchloroformate, horseradish-peroxidase (HRP EC 1.1.1.7, type VI)등은 Sigma 제품을 구입하였다. Solid-phase antiserum을 제조하기 위하여 microcrystalline cellulose (type 20), 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI)등의 시약도 Sigma 제품을 사용하였다. Thiomerosal, 2,5-diphenyloxazole (PPO), gelatin, sodium acetate trihydrate, bovine serum albumin (BSA), sodium azide 등의 시약도 Sigma 제품을 사용하였다. Scintillation cocktail을 제조하기 위하여 toluene, Triton X-100 은 Polyscience 제품을 구입하였다. EIA의 기질로 사용한 ABTS는 Boehringer Mannheim GmbH에서 구입하였다. 한편 NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, Tween 20, 30% H₂O₂는 Merck 제품을 사용하였다. 그 외에 Sephadex G-25 column과 dextran T-70은 Phar-

macia 제품을, charcoal (Norit A)은 Amend 제품을, diethyl ether는 Squibb & Sons 제품을 사용하였다.

RIA에 사용된 assay buffer는 0.1% (w/v) gelatin을 함유한 phosphate buffered saline (GPBS, pH 7.3~7.4)을 사용하였다. 즉, NaH_2PO_4 2.35 g과 Na_2HPO_4 11.6 g, NaCl 8.8 g, Thimerosal 0.1 g, gelatin 1 g을 1l의 증류수에 녹였다. 유리상태의 testosterone과 결합형을 분리하기 위하여 dextran coated charcoal (DCC)을 사용하였다. DCC는 0.0625 g dextran T-70을 100 ml의 GPBS에 용해시킨 후 0.625 g의 charcoal을 첨가하였다. dextran이 charcoal에 덮이게 하기 위하여 4°C에서 30초 이상 교반하고 4°C에 보관하였다. Scintillation cocktail은 3.75 g의 PPO를 500 ml의 toluene에 용해시킨 후 250 ml의 Triton X-100을 넣어 혼합하였다.

EIA의 assay buffer는 0.1% (w/v) BSA를 함유한 phosphate buffered saline (PBS)을 사용하였다. 기질 완충액 (substrate buffer)으로는 sodium acetate trihydrate 7.4 g과 Na_2HPO_4 3.3 g을 용해시킨 후 glacial acetic acid를 사용하여 pH 5로 조정하였다. 세척 완충액 (washing buffer)으로는 0.05% Tween 20을 함유한 기질 완충액을 사용하였다. 반응정지액 (stop solution, pH 2.8)에는 17.68 g의 citric acid, 4.5 g의 Na_2HPO_4 , 0.078 g의 sodium azide를 100 ml의 증류수에 용해시켜 사용하였다. 기질로는 ABTS 30 mg을 기질 완충액 100 ml에 용해시킨 후 80 μl 의 H_2O_2 를 첨가하여 사용하였다.

3. 고체상 항혈청(Solid-phase-antiserum)의 합성

본 실험에 사용된 항혈청은 T-3-CMO를 Erlanger 등 (1959)의 방법을 이용하여 BSA에 접합시킨 후 토끼에 주사하여 면역반응을 유발시켜 항체를 생산하였다. 고체상 항혈청은 항혈청을 cellulose입자에 부착시켜 합성하였다. 먼저 cellulose입자를 활성화시키기 위해 CDI 2.5 g을 100 ml의 acetone에 녹이고 여기에 20 g의 microcrystalline cellulose 입자를 넣어 1시간 동안 실온에서 magnetic stirrer를 이용하여 교반시켰다. 이를 Buechner funnel을 통해 여과시킨 후 acetone 200 ml로 2번 세척하였다. 활성화된 cellulose 입자를 여과지 위에 놓고 공기 중에서 건조시킨 후 1 g씩 vial에 넣어 -20°C에서 보관하였다. 이들 활성화된 cellulose 입자를 0.1 M sodium bicarbonate용액 (pH 8.1) 5 ml에 넣어 혼합하고 500 μl 의 항혈청을 넣어 18시간 동안 실온에서 교반시켰다. 이 solid-phase-antiserum을 100 ml의 bicarbonate 용액에서 30분간 세척하고 1300 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 따라 버리고 반복하여 세척하였다. 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) 100 ml을 이용하여 같은 방법으로 2번 세척하고 다시 0.1% BSA (w/v)

와 0.01% sodium azide를 포함한 0.1 M phosphate buffer로 세척하고 10 ml의 PBS에 넣어 4°C에 보관하였다. cellulose입자가 붙은 후의 항혈청의 역가를 solid-phase RIA 방법을 이용하여 측정하였다.

4. Testosterone과 효소의 접합

Enzyme label은 Dawson 등 (1978)의 mixed anhydride method를 이용하였다. T-3-CMO 2 mg을 0.5 ml dimethylformamide에 녹여 4°C에서 10분 동안 식히고 tri-n-butylamine과 isobutylchloroformate를 각각 3 μl 씩 넣어 4°C에서 10분간 교반시켰다. 여기에 미리 4°C로 냉각시킨 HRP 수용액 (10 mg의 peroxidase + 0.5 ml의 증류수 + 0.5 ml dimethylformamide + 15 μl 의 1 N NaOH 수용액)에 넣어 4°C에서 3시간 동안 교반시켰다. 이를 dialysis tube에 옮긴 후 PBS를 갈아주면서 48시간 동안 투석시켰다. 이를 더 정제하기 위해 Sephadex G-25 column (Prepacked PD-10)을 사용하여 유리 상태의 HRP와 T-3-CMO가 HRP와 부착된 분획을 fraction collector (2112 RediRac fraction collector, LKB Bromma)를 이용하여 받았다. 각 분획에서 T-3-CMO-HRP의 활성도를 찾기 위하여 403 nm에서 흡광도 값을 읽었다. 또 1:100으로 희석된 각 분획의 용액을 고체상 항혈청과 37°C에서 2시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도 값을 읽었다. T-3-CMO-HRP가 있는 분획은 모아 4°C에서 보관하였다.

5. 효소 면역 측정법

정립된 효소면역 측정법은 아래와 같이 실시하였다. 즉 저온 냉동기에 보관되어 있는 시료를 4°C에서 녹인 후 5 ml의 타액을 따서 시험관 (12 \times 75mm)에 담았다. 2000 \times g에서 4°C로 15분간 원심 분리시켜 불순물을 가라앉히고 상층액을 다른 시험관(Kober tube, 15 \times 150mm)에 옮겨 10 ml의 diethyl ether를 첨가하였다. 혈청은 1 ml 따서 5 ml의 diethyl ether를 첨가하였다. 이들을 1분간 교반하고 실온에서 10분 동안 방치하여 수용액과 ether 층을 분리하였다. 이를 저온 냉동기에서 10분간 얼려 상층액을 vial이나 시험관에 옮기고 37°C 항온 수조에서 ether를 증발시켰다. 건조된 추출물은 100 μl (타액), 1 ml (혈청)의 PBS에 녹여 4°C에 보관하였다. 추출된 100 μl 의 시료와 testosterone의 표준 용액 100 μl 씩에 적정 농도(1:100)로 희석된 100 μl 의 T-3-CMO-HRP tracer를 넣어 교반하였다. 그리고 100 μl 의 solid-phase-antiserum (1:600)을 넣어 다시 교반한 후 4°C에서 18~24시간 항원 항체 반응을 유발시켰다. 반응 후 항원 항체 결합형을 분리해 내기 위해 3 ml의 세척완충액을 넣고 vortex하여 10분간 방치하였다. 그

후 1300×g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 따라 버린 후 다시 한번 반복하여 세척하였다. 여기에 1 ml씩의 기질용액을 넣고 빛을 차단한 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 150 uI씩의 반응 정지액을 넣어 반응을 정지시키고 교반하여 5분간 원심분리 하였다. 상층액은 420 nm에서 분광광도계 (Shimadzu double beam spectrophotometer, UV-150-02)를 이용하여 흡광도 (absorbance)값을 읽었다.

6. 방시면역측정법

RIA는 Yoon et al (1981)의 방법을 변형한 liquid-phase RIA의 본 실험에서 개발한 solid-phase RIA의 2가지 방법을 사용하였다.

1) Liquid-phase RIA

효소면역 측정에서와 같이 ether로 시료를 추출한 후 타액은 1:1, 혈청은 1:50 비율의 GPBS로 녹였다. 500 uI의 시료와 testosterone 표준용액 500 uI씩에 3H-testosterone 100 uI (약 10,000cpm)와 testosterone antiserum (1 : 56,000)100 uI씩을 넣어 교반하였다. total과 non-specific binding (NSB)시험관에는 antiserum 대신 GPBS 100 uI씩을 넣었다. 항원 항체의 반응은 4°C에서 18~24시간 동안 실시하였다. 항원과 항체의 결합형을 분리해 내기 위해 200 uI의 DCC를 넣고 교반하여 10분간 방치하고 500×g로 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 mini vial에 옮긴 후 3 ml의 scintillation cocktail을 넣고 혼합하였고 1시간 후 beta counter (Packard Tri-Carb Scintillation spectrometer Model 4530, counting efficiency 64%)로 방사능을 측정하였다. bound %를 Y축, 표준용액의 농도를 X축으로 하는 표준곡선에서 농도를 읽음으로써 시료 내의 hormone치를 결정하였다.

2) Solid-phase RIA

시료와 표준용액은 효소면역측정에서와 같이 준비하였다. 각각 100 uI씩의 시료와 표준용액에 3H-testosterone 100 uI (약 10000 cpm)와 solid-phase antiserum 100 uI (1:600)를 넣어 교반하였다. NSB 시험관에는 solid-phase antiserum 대신 microcrystalline cellulose를 넣어주었다. 4°C에서 18~24시간 반응을 시킨 후 0.02% Tween 20을 함유한 saline 1 ml로 세척하고 500×g에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액은 버리고 다시 한번 세척하였다. 침전된 항원 항체 결합형은 1 ml의 0.02% Tween 20 용액을 넣어 교반한 후 minivial에 옮겨 3 ml의 scintillation cocktail을 첨가하고 1시간 후 beta-counter로 방사능을 측정하였다. 시료내 hormone의 농도측정은 liquid-

phase RIA에서와 같은 방법으로 시행하였다.

본 실험의 결과에 대한 유의성 검정은 student's t-test 방법에 따랐다.

결 과

1. 효소 면역 측정법의 정립

1) T-3-CMO-HRP 분획의 활성도 검정

HRP 효소를 T-3-CMO에 부착시킨 분획을 얻기 위해 liquid column chromatography를 실시한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. T-3-CMO-HRP의 활성도는 제10분획에서 부터 갑자기 증가하였고, 제 15분획에서 부터는 HRP의 활성이 감소하였다. 이 결과는 403 nm에서 직접 흡광도를 읽은 결과와 대동소이하였다. 이 후 본 실험에서는 T-3-CMO-HRP의 10~14분획을 합쳐 1:100으로 희석하여 사용하였다.

2) 항체의 역가 (Antibody titre) 측정

본 실험에 사용한 항체의 역가를 측정하기 위하여 일반적으로 많이 사용하는 liquid-phase RIA를 이용하여 3회 실시하였다. 50%의 치환을 나타내는 희석률은 약 1:35,000으로 나타났다으나 이후의 실험에서는 최고 표준 농도 (10 ng)와의 치환치가 가장 높은 1:56,000의 희석률을 이용하였다. 또한 항체를 결합시킨 cellulose 입자의 역가를 측정하기 위하여 solid-phase RIA를 이용한 결과, 50%의 치환을 나타내는 농도

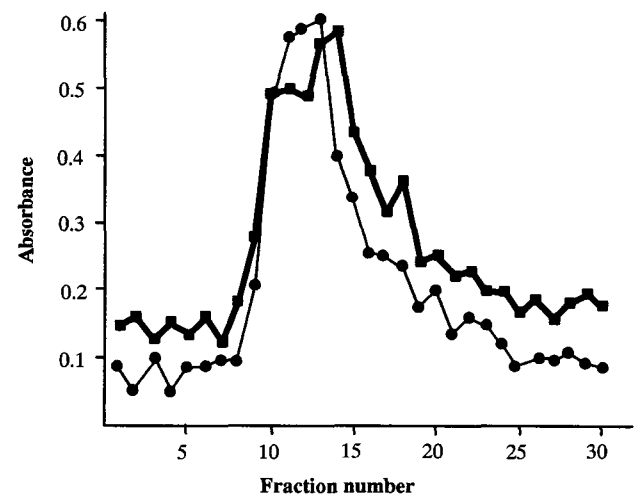


Fig. 1. Elution pattern of testosterone-HRP conjugate with Sephadex G-25 column chromatography. ●-● direct reading at 403 nm; ■-■ reading at 420 nm after incubation with antiserum and substrate.

는 1:360으로 나타났으나 EIA의 정립을 위해서는 1:600의 농도를 사용하였다.

3) 농도-반응 표준곡선 (Dose-response curve)

Testosterone의 농도에 따른 반응곡선을 EIA 및 2가지 RIA 방법으로 6회씩 실시하여 각각 Fig. 2 A, B에 나타내었다.

EIA의 농도-반응 표준곡선을 보면 (Fig. 2A) 흡광도 (absorbance)는 0.5~0.1의 범위를 나타내었다. 또한 25 pg에서부터 2 ng사이에서 농도를 측정할 수 있는 결과를 나타내었다. 한편 liquid-phase RIA (Fig. 2B)의 결과에서는 3.13 pg - 500 pg의 사이에서 만족할만한 표준곡선을 나타내었다. 위의 결과로 보아 낮은 농도에서는 liquid-phase RIA가, 비교적 높은 농도에서는 EIA가 효율적인 것을 알 수 있었다.

4) 정확도 검사 (Accuracy test)

시료내 들어있는 testosterone의 농도를 정확히 측정하는가를 알기 위하여 정확도 검사를 실시한 결과를 Fig. 3으로 나타내었다.

남성 혈청내 각종 steroid를 제거하기 위하여 charcoal cake을 만들었다. 즉 Dextran 1 g과 charcoal 1 g을 섞어 30분 이상 교반시켜 1500×g로 20분간 원침시킨 후 상등액을 제거하였다. 위의 과정을 2회 반복한 후 0.45 μm의 Milipore membrane으로 여과한 후 다시 6000×g에서 1시간 원침시켜 불순물을 제거하였다. 이 혈청에 15 ng/ml, 7.5 ng/ml, 3.75 ng/ml 되도록 testosterone의 표준시료를 첨가한 후, EIA 및 liquid-phase RIA로 10회 이상 측정하여 분석하였다. 기대치 (X)와 관측치 (Y)사이의 상관관계를 보면 EIA에 의한 측정의 경우는 관측치 (Y)=0.96X-0.89, (r=0.985), RIA의 경우는 (Y)

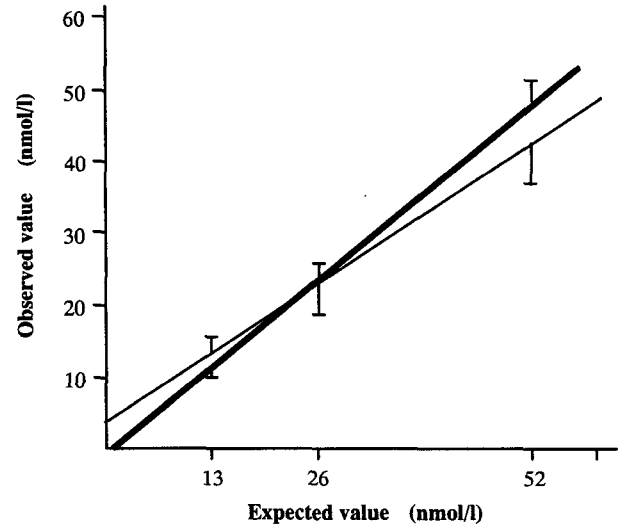


Fig. 3. Accuracy of testosterone added to serum in EIA and RIA. Bars indicate a half of SD of EIA and RIA. The correlation between expected value (X) and observed one (Y) by EIA was $Y = 0.96 X - 0.89$ ($r = 0.985$) and by RIA was $Y = 0.77 X - 3.49$ ($r = 0.899$).

$=0.77 X + 3.49$, ($r=0.941$)의 값을 나타내었다. 위의 결과로 보아 RIA에 비해 EIA의 경우는 높은 농도에서는 약간 높게, 낮은 농도에서는 약간 낮게 측정되는 경향을 나타내었으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다.

5) 감도

감도 (sensitivity)를 측정하기 위하여 2가지 방법을 사용하였다. 즉 한 assay의 감도는 평균 농도의 항체의 결합력 (binding affinity)의 역수의 1/10 값 ($s=0.1/ka$)을 사용하거나 각각의 표준곡선에서 최대 결합치 (BO)의 -2SD의 값에 해당한

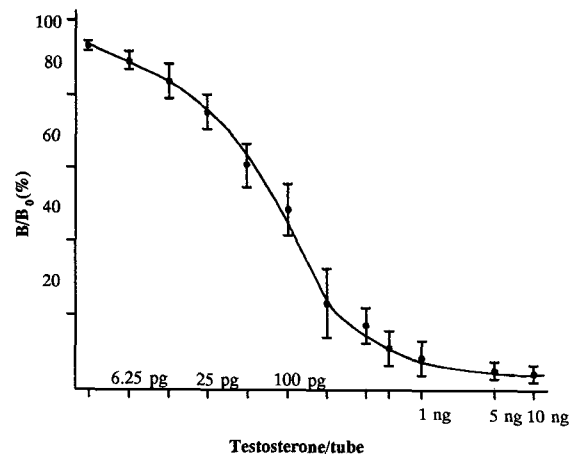
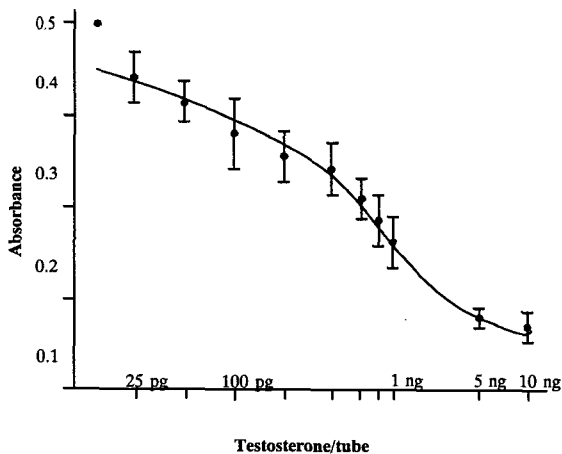


Fig. 2. The dose-response curve for testosterone from 6 successive assays in enzyme immunoassay (A) and liquid phase radioimmunoassay (B). Absorbance reading at 420 nm. Each point represents the mean ± SD.

표준농도의 값을 이용하였다. EIA의 경우는 약 25 pg/tube, liquid-phase RIA는 5 pg/tube을 나타내었다.

6) 교차 반응도

정립된 EIA 및 liquid-phase RIA에서 8종의 다른 steroid가 testosterone의 표식자와 길항적으로 항체에 부착하는 농도를 측정하여 Table 1로 나타내었다. 각각의 steroid를 10 pg - 10 ug까지의 농도로 EIA 및 RIA에 표준 시료 대신 넣어 실시한 결과 본 실험의 교차 반응율 (cross-reactivity)은 EIA가 RIA에 비하여 높은 것으로 나타났다. 특히 5 α -dihydrotestosterone (DHT)와 5 β -DHT의 교차 반응율은 EIA가 RIA보다 높게 나타났다.

7) 정밀도

본 실험에서 정립된 EIA 및 RIA의 정밀도 (precision)를 측정하기 위하여, 정상 남성의 혈청을 모아 동일 혈청을 만들어 20개 이상을 정립된 EIA 및 RIA로 측정한 결과 EIA에서는 21.56 \pm 1.62 nmol/l (n=44, CV=7.4%)를 나타내었다. 남성 타액의 intraassay variation은 EIA에서 265.65 \pm 15.80 pmol/l (n=20, CV=5.9%)로 RIA에서는 274.22 \pm 22.09 pmol/l (CV=8.1%)로 나타났다.

Interassay variation 즉 각각의 assay중 동일시료의 측정치 변화를 알아보기 위하여 3개의 시료군을 이용하여 6회 이상의 assay의 결과를 비교해 보았다 (Table 2). 위의 결과로 보아 RIA에 비해 EIA의 변이 계수가 상대적으로 적은 값을 보였으며 만족할 만한 범위 (CV=5~20%)내에 있었다.

2. 정립된 EIA 및 RIA의 응용

Table 1. Cross-reactivity of testosterone antiserum

Steroids	Cross reactivity (%)	
	EIA	RIA
Testosterone	100.00	100.00
5 α -dihydrotestosterone	52.51	41.03
5 β -dihydrotestosterone	31.73	27.48
Δ^4 -Androsten-3,17-dione	0.19	0.19
Androsterone	0.14	0.14
Progesterone	0.04	0.05
Estradiol	0.003	<0.001
β -Estradiol	<0.001	<0.001
Cortisol	<0.001	<0.001

Cross-reactions were expressed as a percentage at a level of 50% replacement for testosterone antiserum in EIA and RIA measurements.

Table 2. Within (Intra) and between (Inter) assay variations of male serum and saliva samples determined by EIA or RIA

intraassay variation	Saliva pmol/l (n=20)	Serum nmol/l (n=40)	
	EIA	265.65 \pm 15.83 (CV=5.9 %)	21.56 \pm 1.41 (CV=6.5 %)
RIA	274.22 \pm 22.09 (CV=8.1 %)	21.69 \pm 1.62 (CV=7.4 %)	
interassay variation	Serum Sample		
	K1	K2	K3
EIA	47.99 \pm 3.94 (CV=8.21 %)	25.12 \pm 2.11 (CV=8.42 %)	10.87 \pm 1.42 (CV=13.07 %)
RIA	43.44 \pm 6.63 (CV=15.2 %)	23.93 \pm 4.11 (CV=17.2 %)	13.12 \pm 2.10 (CV=16.3 %)

Data are expressed as the mean \pm SD and coefficients of variation (CV) are shown in parentheses. In order to check the interassay precision, three kinds of serum samples (K1, K2 and K3) for quality control were inserted in every assay batch.

1) EIA 및 RIA 측정치의 상관관계 분석

본 연구에서 정립시킨 EIA의 평가를 위하여 남성과 여성의 타액 및 혈청에서 testosterone의 농도를 EIA 및 liquid-phase RIA로 측정한 값을 비교하여 Fig. 4로 나타내었다. 타액의 testosterone 농도 (pmol/l) 측정시 EIA (Y) 및 RIA (X)의 측정치 사이에 상관계수 (correlation coefficient)는 0.969로 매우 좋은 상관관계를 나타내었다 (n=130, Y=1.0 X+7.2). 한편 혈청내 testosterone의 농도 (nmol/l) 측정에서는 EIA (Y)=1.0 \times RIA (X)+0.16의 직선관계를 나타내었다. 또 상관계수 (r)는 0.990으로 매우 높은 상관관계를 보였다.

위의 결과로 EIA의 방법에 의한 testosterone의 농도 측정 방법은 RIA에 의한 측정 방법을 대체할 수 있음을 나타내었다.

2) 여성의 월경주기 및 남성의 타액내 testosterone의 농도 변화

월경주기에 따른 여성 타액내 testosterone 농도의 변화는 없는 것으로 나타났다. 즉 여포성장시기 (follicular phase: -10 -3 day before LH surge)는 EIA 및 RIA 값이 각각 108.33 \pm 10.59 pmol/l, 107.07 \pm 9.62 pmol/l이었다. 또한 배란기에서 EIA 및 RIA 값은 110.44 \pm 14.24 pmol/l, 111.32 \pm 18.20 pmol/l였으며, 황체기 (luteal phase)에서는 110.21 \pm 10.84 pmol/l,

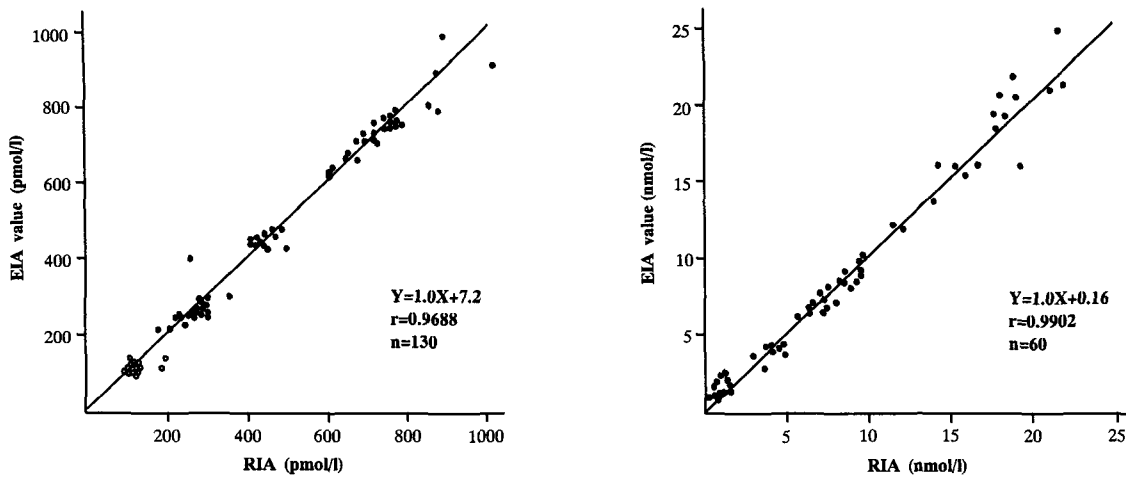


Fig. 4. Correlation between T values in saliva (A) and serum (B) determined by EIA and RIA.

106.01 ± 8.84 pmol/l로 각각 나타났다. 따라서 여성 타액내 testosterone의 정상농도는 EIA 측정시 109.74 ± 12.01 pmol/l, RIA 측정시 109.12 ± 14.58 pmol/l를 나타내었다. 한편 남성의 타액내 testosterone 농도는 265.65 ± 15.80 nmol/l (EIA), 274.22 ± 20.09 nmol/l (RIA)이었다.

고 찰

본 실험의 정확도는 EIA의 경우 r=0.985로 RIA 경우 (r=0.941)보다 조금 높게 측정되었다. low, medium, high 농도의 표준시료를 첨가한 정도관리용 시료를 측정하여 변이계수를 산출한 결과 EIA 측정시 13.17%~8.21%이었고, RIA 측정시에는 17.2%~15.2%로 EIA에서 좀더 정확한 것으로 나타나 RIA를 대신할 수 있다고 사료된다. 감도는 약 25 pg/tube로 Joshi 등 (1983)의 12 pg/tube보다는 떨어졌으나 비교적 높은 감도를 보였다. 또한 본 연구에 사용된 항체는 DHT와 높은 교차반응도를 보이므로 T와 DHT를 분리하는 과정이 필요할 것으로 생각된다. 정밀도에서는 intraassay나 interassay variation에서 모두 EIA가 RIA보다 좋은 값을 보였다. 혈청의 T 농도 측정시 EIA와 RIA간의 상관계수는 r=0.990으로 Elder & Lewis (1985)의 r = 0.94 보다 좋은 상관지수를 얻었다. 타액에서도 EIA와 RIA의 측정치 사이에는 r=0.969로 높은 상관관계를 보였다. 이는 Preti 등 (1984)의 r=0.897보다 높은 값을 보여 RIA 값과 거의 일치된다고 사려된다.

타액내 스테로이드의 측정이 내분비 호르몬의 변화를 예견하기에 합당하다는 보고 (Riad-Fahmy et al., 1982)가 있는 후로 타액내 스테로이드를 측정하여 생식소내 스테로이드의

분비, 즉 생식기능을 모니터링 하려는 시도가 계속되고 있다 (Truran et al., 1984; Metcalf et al., 1984). 또한 혈액내 유리스테로이드호르몬의 농도는 타액내 testosterone의 농도와 좋은 상관성을 가지고 있으므로 (Yoon et al., 1987), 혈청 및 혈장내 스테로이드의 총량보다 생물학적으로 활성을 가진 스테로이드를 측정하기에 합당하며, 채혈시 느끼는 긴장감이나, 번거로움 없이 쉽게 시료를 채취할 수 있어, 대체 시료가 될 수 있다고 보고되었다 (Khan-Dawood et al., 1984). 지금까지 대부분의 타액내 스테로이드 측정이 RIA에 의해 이루어져 왔고 (Walker et al., 1979; Ross et al., 1983; Tallon et al., 1984), 최근에는 EIA 방법을 보편적으로 이용하여 측정되고 있다 (Joshi et al., 1983; Elder & Lewis, 1985).

본 실험 결과에서 한국남성의 타액내 testosterone 농도는 EIA 경우 265.65 ± 15.80 pmol/l, RIA 경우는 274.22 ± 22.19 pmol/l로 나타났다. 그러나 지금까지 보고된 서양인의 남성 타액내 testosterone 농도를 RIA 측정시, Baxendale & James (1983)은 274 ± 73 pmol/l, Tames & Swift (1983)는 412 ± 154 pmol/l, Walker 등(1980)은 368 ± 167 pmol/l, Wang 등 (1981)은 291 ± 122 pmol/l로 보고한 결과에 비추어 한국 남성의 측정치는 낮은 편이었다. EIA로 측정한 Turkes 등(1979)은 112 ~ 312 pmol/l로 보고하고 있다. 이와 같이 변이를 보이는 것은 타액내 testosterone 농도가 하루중 시간에 따라 변화하며, 나이가 들어감에 따라 감소하는 경향이 있기 때문으로 생각된다 (Read & Walker, 1984; Besch et al., 1984). 본 실험에서는 건강한 남성의 타액을 오전 중에 채취하였으므로 오전 중에 받은 남성타액의 농도를 300 pmol/l 수준으로 보고한 Johnson et al. (1987)의 연구와 일치하는 것으로 나타났다.

본 실험에서 여성 타액내 testosterone 농도는 EIA 경우 109.74 ± 12.01 , RIA 경우는 109.12 ± 14.58 pmol/l를 나타냈다. 또한 월경주기중 난포기, 배란기, 황체기에서 현저한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 지금까지 보고된 여성 타액내 testosterone 농도는 상당한 변이를 보이고 있다. Baxendale 등 (1982)은 26.7 ± 9.0 pmol/l로, Tames & Swift (1983)는 186 ± 11 pmol/l로 보고하였다. Landman 등 (1976)은 677 ± 87 pmol/l의 높은 값을 보고하고, 난포기때 testosterone 농도가 증가한다고 하였으나 Khan-Dawood 등 (1984)은 이와 반대되는 결과를 보고하고 있으며 월경주기에 따른 변화가 거의 없다는 보고도 있다 (Judd & Yen, 1973). 이렇게 심한 변이를 보이는 것은 여성의 경우도 채취하는 시간과 생식주기에 따라 변화를 보이기 때문으로 생각된다. 월경주기에 따른 testosterone 농도 변화는 좀 더 연구, 보완되어야 할 것으로 생각된다.

위의 결과를 종합하여 볼 때 testosterone 측정을 위한 본 실험의 EIA 방법은 정립되었다고 생각되며 적은 규모의 실험실에서도 쉽게 응용하여 testosterone을 측정해 낼 수 있리라 생각된다.

인용문헌

- Allaman BL, Short F, James VHT (1981) Fluoroimmunoassays of progesterone in human serum or plasma. *Clin Chem* 27: 1176-1179
- Andrieu FM, Mahas S, Pray F (1979) Viroimmunoassay of steroid. In: *Steroid Immunoassay : Proc Fifth Tenovous Workshop, Cardiff*, (eds) Carmersn, EHD & Griffiths K, Alpha Omega Pub. pp. 189-198.
- Baxendale PM, Jacobs HS, James VHT (1982) Salivary testosterone: relationship to unbound plasma testosterone in normal and hyperandrogenic women. *Clin Endocr* 16: 595-603.
- Baxendale PM, James VHT (1983) Salivary testosterone measurements: application to physiological & pathological studies. In: *Immunoassays for Clinical Chemistry* (eds) Hunter WM & Corrie JET, Chill-Livingstone. pp. 430-435.
- Besch NF, Ruetzel CH, Younes MA., Huang NH, Besch PK (1984) Non-chromatographic determination of salivary testosterone in women. In: *Immunoasay of Steroids in Saliva, Proc Ninth Tenovus Workshop*. pp. 221-227.
- Blake C, Al-Bassam MN, Gould BJ, Marks V, Bridges JW, Riley C (1982) Simultaneous enzyme immunoassay of two thyroid hormones. *Clin Chem* 28: 1469-1473.
- Botti R, Leoncini P, Tarli P, Neri P (1982) A chemiluminescent system used to increase the sensitivity in enzymeimmunoassay. In: *Luminescent Assay Perspectives in Endocrinology & Clinical Chemistry*. pp. 163-167
- Cameron EHD, Hillier SG, Griffiths K (1975) Steroid Immunoassay. *Proc Fifth Tenovous Workshop*. Alpha-Omega Pub.
- Chan STH, Yeung WSB (1986) A new method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, 11-oxotestosterone and 11β -OH-testosterone in fish plasma using combined techniques of celite chromatography and RIA. *J steroid Biochem* 25: 1013-1021.
- Dawson EC, Denisson AEMC, Van Weemen BK (1978) A simple and efficient method for raising steroid antibodies in rabbits. *Steroids* 31: 357-366.
- De Boever JD, Kohen F, Usanachitt C, Vandekerckhove D, Leyseele D, Vandewalle L (1986). Direct chemiluminescence immunoassay for estradiol in serum. *Clin Chem* 32 : 1895-1900.
- Dhar TK, Voss E, Schoneshofer M (1986) Simultaneous EIA of cortisol and dihydroepiandrosterone sulphate from a single serum sample using a transferable solidphase system. *J Steroid Biochem* 25: 423-427.
- Elder PA, Lewis JG (1985). An enzyme-linked immunosorbent assay for plasma testosterone. *J Steroid Biochem* 22: 635-638.
- Erlanger BF, Borek F, Seiser SM, Lieberman S (1959) Steroid protein conjugates. *J Biol Chem* 234: 1090-1094.
- Hanquez C, Urios P, Desfosses B, Samake H, Lince E, Rajkowski KM, Cittanova N (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for steroid hormones with polyclonal and monoclonal antibodies; an assay for urinary aldosterone. *Clin Chim Acta* 164: 71-82.
- Hunter WM, Corrie JET (1983). *Immunoassays for Clinical Chemistry*. Churchill- Livingstone.
- Jeffcoate SL (1985) Advantages and limitations of traditional technology. In: *Alternative Immunoassay* (ed) Collins WP, John Wiley & Sons. pp. 7-12.
- Joshi UM, Shah HP, Sankolli GM (1983) Penicillinase as a marker in enzyme-linked immunosorbent assays for steroid hormones. *J. steroid Biochem* 19: 419-421.

- Judd HL, Yen SSC (1973) Serum androstenedione and testosterone levels during the menstrual cycle. *J Clin Endocr Metab* 36: 475-481.
- Khan-Dawood FS, Choe JK, Dawood MY (1984) Salivary and plasma bound and free testosterone in men and women. *Am J Obstet Gynecol* 148: 441-451.
- Kohen F, Hollaender Z, Yeager FM, Carrico RJ, Boguski RC (1978) A homogeneous EIA for oestriol monitored co-enzymatic cycling reactions. In: *Enzyme-Linked Immunoassay of Hormones & Drugs*. (eds) SB Pal, Waiter de Gruyter, Berlin, New York. pp. 67-79.
- Landman AD Sandford LM, Howland BE, Dawes C, Pritchard ET (1976) Testosterone in human saliva. *Experientia* 32: 940-941.
- Metcalf MG, Evans JJ, Mackenzie JA (1984) Indices of ovulation; comparison of plasma and salivary levels of progesterone with urinary pregnanediol. *J Endocr* 100: 75-80.
- O'Sullivan MJ, Bridges JM, Marks V (1979) Enzymimmunoassay: A review. *Ann Clin Biochem* 16: 221-240.
- Preti MS, Lodi S, Busacchi P, Fillcori M, Flamigni C (1984) ELISA for salivary and plasma estriol in pregnancy. *Steroid* 43: 469-478.
- Read GF, Walker RF (1984) Variation of salivary testosterone with age in men. In: *Immunoassay of Steroids in Saliva*, Proc Ninth Tenovus Workshop, Cardiff. pp. 215-218.
- Riad-Fahmy D, Read GF, Walker RF, Griffiths K (1982) Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr Rev* 3: 367-395.
- Ross FV, Robynne AM, Richard GS (1983). Hormones in saliva: mode of entry of consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem* 29: 1752-1756.
- Schall RF, Tenoso HJ (1981) Alternatives to radioimmunoassay: labels and methods. *Clin Chem* 27: 1157-1164.
- Schroeder HR, Yeager FM, Boguslaski RC, Snoke FO, Budkier RT (1977). Immunoassay for thyroxine monitored by chemiluminescence. *Clin Chem* 23: 1132-1154.
- Shah H, Saranko AM, Harkronen M, Adlercreutz H (1984) Direct solid-phase fluoroenzymeimmunoassay of 5α -pregnane-3 α , 20 α -diol-3 α -glucuronide in urine. *Clin Chem* 30: 185-187.
- Skelly DS, Brown LP, Besch PK (1973) Radioimmunoassay. *Clin Chem* 19: 146-186.
- Soini E, Hemmila I (1979). Fluoroimmunoassay: present status and key problems. *Clin Chem* 25: 353-361.
- Tallon DF, Gosling JP, Buckley PM, Dooley MM, Cleere WF, O'Dwyer EM, Fottrell PF (1984) Direct solid phase enzyme immunoassay of progesterone in saliva. *Clin Chem* 30: 1507-1511.
- Tames FJ, Swift AD (1983). The measurement of salivary testosterone. In: *Immunoassays for Clinical Chemistry*. (eds) WM Hunter and JET Corrie. Churchill-Livingstone. pp. 410-413.
- Thorpe GHG, Kricka LJ, Mosely SV, Whitehead TT (1985) Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin Chem* 331: 1135-1341.
- Truran PL, Read GF, Pearson JF (1984) Salivary estriol in normal and abnormal pregnancies. *Brit J Obstet Gynaecol* 91: 1210-1215.
- Turkes A, Turkes AO, Joyce BG, Read GF, Riad-Fahmy D (1979) A sensitive solid-plasma and saliva. *Steroid* 33: 347-359.
- Walker RF, Read GF, Riad-Fahmy D (1979) Radioimmunoassay of progesterone in saliva: application to the assessment of ovarian function. *Clin Chem* 25: 2030-2033.
- Walker RF, Wilson DW, Read GF, Riad-Fahmy D (1980). Assessment of testicular function by the radioimmunoassay of testosterone in saliva. *Int J Androl* 3: 105-120.
- Wang C, Plymate S, Nieschlag E, Paulsen CA (1981) Salivary testosterone in men: further evidence of a direct correlation with free serum testosterone. *J Clin Endocr Metab* 53: 1021-1024.
- Yalow RS, Berson SA (1959) Quantitative aspect of reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest* 38: 1966-2016.
- Yoon Y-D, Kim SR (1987) Luminescence immunoassays and their applications for dihydrotestosterone and testosterone (I): establishment of LIA. *Kor J Fertil Steril* 14: 138-148.
- Yoon YD, Kim EI, Suh PG, Han JH, Tschai BS (1981). Testosterone radioimmunoassay and serum levels in Korean children and adult males. *Seoul J Med* 22: 490-502.
- Yoon Y-D, Lee CJ, Chun EH, Lee JY (1988) Correlation of bioavailable testosterone and dihydrotestosterone by luminescence immunoassay in serum. *Kor J Fertil Steril* 15: 83-92.