

Progesterone 測定을 위한 免疫分析法的 最適條件에 관한 研究

康元峻*, 高大煥*, 李景廣**, 金鍾培* , 鄭吉生*

* 建國大學校 畜産大學

** 韓國科學技術院 遺傳工學研究所

Optimization of Immunosay Procedures for the Measurement of Progesterone

Kang, W. Jo, D. H. Koh, K. K. Lee, J. B. Kim and K. S. Chung

* College of Animal Husbandry
Kon-Kuk University

** KAIST

Abstract

This research was carried out to investigate the optimal conditions associated with the RIA procedures such as a bridging phenomena, prozone effects and a new separation methods etc.

The results obtained were summarized as follows:

1. The IgG fractions of donkey anti-rabbit IgG sera were purified by Protein-A-Sepharose affinity column, which indicates that Protein-A an affinity for IgG class of donkey antiserum.
2. In coating the IgG fraction on polystyrene tubes, incubation conditions made no differences between 2 hr at room temperature and overnight at 4°C.
3. There were no significant differences between 1st antibody-coated tube and 2nd antibody-coated tube as a separation method when compared in terms of reproducibility. A better reproducibility may be expected if the titers of 1st antibody for the progesterone to be assayed and of corresponding 2nd antibody are reasonably high.
4. The titers of anti-progesterone antibody for ^3H -progesterone and progesterone-11HS- ^{125}I were 1:300 and 1:700 in liquid-phase, and 1:100 and 1:300 in solid-phase for the separation methods.
5. A bridging phenomena in which a standard curve is long and shallow were observed when progesterone-11HS- ^{125}I was used for the tracer, but not in ^3H -progesterone.
6. A prozone effect in a solid -phase system, especially 1st antibody-coated tube method was observed which the degree of inhibition was significantly different although zero bindings look the same. In this case, the titration curve should be made both in the absence and in the presence of appropriate amount of competitor, standard, respectively.

I. 緒 論

1959年 Yollow와 Berson이 Plasma Insulin을 測定할 수 있는 Radroimmunoassay(이하 "RIA"라 약함)를 發明한 이래 生命科學 특히 內分泌學 나아가 繁殖學 研究에 미친 영향은 실로 革命的이었다. (Chard, 1978)

RIA의 基本原理는 測定하고자 하는 物質에 放射 性同位元素로 標識한 Tracer가 試料속의 抗原과 抗体에 對해 경쟁성 反應을 할때 Tracer가 抗体와 反應할 수 있는 정도는 試料속의 抗原의 量에 反比例 하게 된다. 따라서 Tracer의 反應程度와 아는 농도의 標準試料과의 關係를 나타내는 標準曲線을 作成할 수 있어, 이것에 의해 試料를 測定하게 된다. (Collins와 Hennam, 1976).

대부분의 免疫分析法, 특히 RIA에서 free fraction과 Bound fraction의 分離는 거의 必須的이다. 本 研究에서는 分離方法中에서 Solid-phase와 관련된 문제점, 특히 Prozone 現象(Nakamura 등, 1979)에 對해 檢討·分析하여 그 해결방안을 모색하고, 또한 새로운 分離方法으로 2次抗体를 Plastic tube에 Coating시킨 方法을 개발하여 그 利用可能性 및 長短點을 비교·검토하고, hapten分析時 抗体가 hapten을 물론 Tracer合成時 사용된 bridge group도 함께 認知하므로써 야기되는 bridging 現象(Nordblom 등, 1979)을 이해·검토하고자 本 연구를 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. 材 料

1.1 Buffer의 製造

1.1.1 Assay 및 Washing Buffer

抗原·抗体反應 및 Solid-phase RIA에서 反應이 끝난 후 洗滌할 때에는 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 NaH_2PO_4 를 각각 0.05M로 하여 pH7.4로 調定한 후 NaCl 9 g/l, Gelatin 1g/l 와 NaN_3 0.5g/l 를 첨가하여 완전히 溶解시켜 4°C에 保管하면서 사용하였다.

1.1.2 Coating Buffer

抗体를 polystyrene tube(Luckham Ltd., U.K)에

coating시킬 때 抗体稀釋用으로 buffer는 使用된 14.4g의 Sodium barbital과 1g의 NaN_3 를 1ℓ 에 溶解하여 사용했으며 이때의 pH는 9.6이었다.

1.2 Dextran-Coated-Charcoal의 製造

Liquid-phase RIA에서 free와 bound fraction을 分離하기 위하여 10g의 Charcoal과 1g의 dextran을 1ℓ 의 Assay buffer에 溶解하여 4°C에 保管하면서, 사용하기 전에는 반드시 4°C ice bath 에서 magnetic sterrer로 混습시키면서 사용하였다.

1.3 抗 体

本 研究에서 사용된 抗体는 Progesterone-11HS-BSA*를 免疫原으로 하여 토끼에 注射하여 生産한 1次抗体와 토끼의 IgG를 망나귀에 주사하여 生産된 Donkey-antiRabbit IgG 즉 2次抗体를 사용하였다. 이들 抗体는 모두 Protein-A Sepharose affinity column(Sigma, Ltd., U.K)으로 分離·精製하여 사용하였다.

1.4 Tracer

Tracer로는 $[1,2,6,7-^3\text{H}]-\text{Progesterone}$ (250 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$; New England Nuclear, V. S. A)과 Progesterone-11HS- ^{125}I (15 $\mu\text{Ci}/\text{mM}$; Radioassay systems laboratorres, V. S. A)를 사용하였으며, 전자는 Benzene와 Ethanol을 1:9로 섞은 溶液으로 10배 희석하여 이것을 stock solution으로 하였으며, 이들의 總 cpm은 10,000~12,000으로 測定하였다.

1.5 Scintillation Liquid 및 放射線 測定

^3H 의 Counting을 위한 Scintillation Liquid는 POPOP 250mg(Sigma, V. S. A), PPO 10g(Packard, V. S. A)과 Naphthalene 100g을 再蒸溜시킨 Dioxane 1ℓ 에 완전히 溶解하여 사용했으며, 放射線 測定은 1219 Rack Beta와 1272 Clini Gamma(LKB, Wallac)로 하였다.

1.6 이상에서 言及되지 않은 기타 試藥들은 Junsei Chemi Co., Ltd.(Japan)의 제품으로 Analytical Grade를 사용하였다.

2. 實驗方法

2.1 抗体의 分離 및 精製

抗体를 Coating시킬 때 效率를 높이기 위하여 Protein-A Sepharose affinity powder를 0.01M phosphate buffer(pH7.0)에 swelling시켜서 Syringe

column (1.8×10cm)에 packing하며 phosphate buffer로 평형시킨 후 0.5ml의 Rabbit anti-progesterone血清 혹은 Donkey anti-rabbit IgG血清을 3회 反復通過시켜 反應시킨 후 같은 buffer로, U.V. Spectrophotometer (Spectronic 21, Bausch & Lomb)로 280nm에서 吸光度(O. D = Optical Density)가 0.01이하로 떨어질 때까지 充分히 Washing한 후 1.0M의 acetic acid로 용출시킨다. 용출된 抗体로 280nm에서 吸光度를 測定하여 抗体가 있는 fraction을 判定하여 4℃에 保管하였다.

2.2 1次 및 2次 抗体를 Plastic tube에 Coating시키는 方法

2.1항에 의해 分離·精製된 抗体를 Coating buffer로 稀釋하여 Fig. 1의 과정에 의해 抗体를 Coating시켰다.

2.3 RIA 過程

Add 0.2ml for 1st Ab

Add 0.3ml for 2nd Ab

↓
Incubation at 4℃ for overnight

↓
Decant

↓
0.3% BSA in saline (0.2ml or 0.3ml)

↓
Incubation at room temp. for 30-60min

↓
Decant

Fig. 1. Antibody coating procedure.

2.3.1 Liquid-phase RIA

分離方法으로 Dextran-Coated-Charcoal을 利用한 Liquid-phase RIA는 Fig. 2에 준하여 실시하였다. ³H-Progesterone의 경우 計測 前에 5ml의 scintillation liquid를 첨가하였다. 最終反應程度(% binding)의 계산에서는 total을 제외한 모든 tube의 計數수치에서 N. S. B. (Non-specific binding)의 수치를 減한 후 계산하였다.

2.3.2 Solid-phase RIA

1次 抗体를 coating시킨 tube의 使用法(1st Ab-coated tube method)과 2次 抗体 coating시킨 tube의 使用法(2nd Ab-coated tube method)의 과정은 Fig. 3과 같다.

前者의 경우 最終反應量은 0.2ml, 後者의 경우 0.3ml이며 計數方法은 2.3.1항과 동일하다.

Unit : ml

Tubes Reagents	Total	N. S. B	Zero	Standard
Buffer	0.4	0.2	0.1	-
Ab	-	-	0.1	0.1
Standard	-	-	-	0.1
Tracer	0.1	0.1	0.1	0.1

↓
Incubation at 4℃ for overnight

Charcoal	-	0.2	0.2	0.2
----------	---	-----	-----	-----

↓
Centrifuge at 1500 rpm for 10 min. at 4℃

Supernatant	0.4	0.4	0.4	0.4
Scintillation Liquid	5.0	5.0	5.0	5.0

↓
Counting for 60 sec.

Fig. 2. Procedure of standard curve in liquid phase

Unit : ml

*tube Reagents	Total	N. S. B	Zero	Standard
Assay Buffer	-	0.2	0.1	-
1st Ab**	-	-	0.1	0.1
Standard	-	-	-	0.1
Tracer	0.1	0.1	0.1	0.1

↓
Incubation at 4℃ for overnight

↓
Decant

↓
Washing with 0.5ml of assay buffer except total

↓
Counting for 60 sec.

Fig. 3. Procedure for standard curve in solid phase using 1st or 2nd Antibody coated tube

* Plain tubes were used for Total and N. S. B.

III. 結果

1. Protein-A Sepharose affinity column에 의한 抗体의 分離 및 精製

Plastic tube에 coating시키기 위한 抗体의 分離精製는 Protein-A를 Sepharose에 固定化시킨 Protein-A Sepharose column을 이용했다. 1ml의 抗血清인 Donky anti-rabbit IgG sera를 column에 通過시킨 후, phosphate buffer로 充分히 洗滌하고 1M acetic acid로 용출시켰을 때 1ml씩 collection했던 바 80% 이상이 처음 3 fraction에서 용출되었다. 이것은 결국 당나귀의 IgG는 Protein-A와 反應한다는 사실을 의미한다 하겠다.

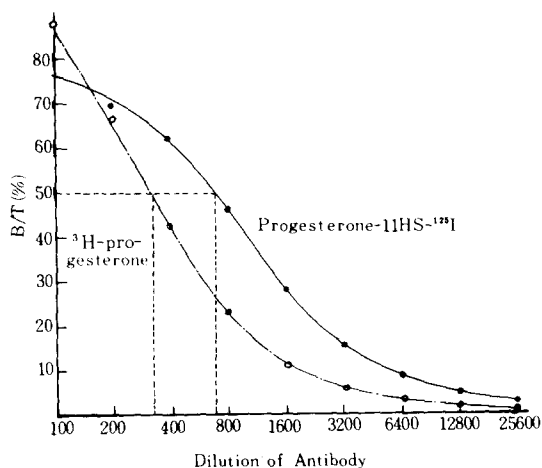


Fig. 4. Titration curves with ³H-Progesterone and Progesterone-11HS-¹²⁵I

3. Solid-phase RIA

3.1 1次 抗体를 coating시킨 tube

標準曲線을 만들기 위한 抗体의 titer를 결정하기 위해 Fig. 6과 Fig. 7과 같이 Progesterone의 存在下에서 抗体稀釋曲線을 作成하였다. 各 Fig. 에 나타난 바와 같이 ³H-Progesterone을 사용했을 때에는

2. Liquid-phase RIA

Fig. 4는 tracer로 ³H-Progesterone과 Progesterone-11HS-¹²⁵I을 사용하여, 分離方法으로 Dextran-coated-charcoal을 사용한 抗体稀釋曲線을 나타낸 것이다. 50%의 反應을 나타내는 抗体의 稀釋을 titer라고 할 때 tracer로 ³H-Progesterone과 Progesterone-11HS-¹²⁵I을 사용했을 때의 titer는 각각 약 1:300과 약 1:700이었다. 이것들로 標準曲線을 作成했을 때 Fig. 5와 같은 曲線을 얻었다. 이때 Progesterone-11HS-¹²⁵I으로 얻은 曲線이 ³H-Progesterone보다 완만한 曲線을 나타낸 것은 抗体에 對한 Progesterone-11HS-¹²⁵I의 親和度가 ³H-Progesterone보다 높기 때문에 발생하는 Bridging現象 때문인 것으로 사료된다. (Scarlsbrick등, 1975).

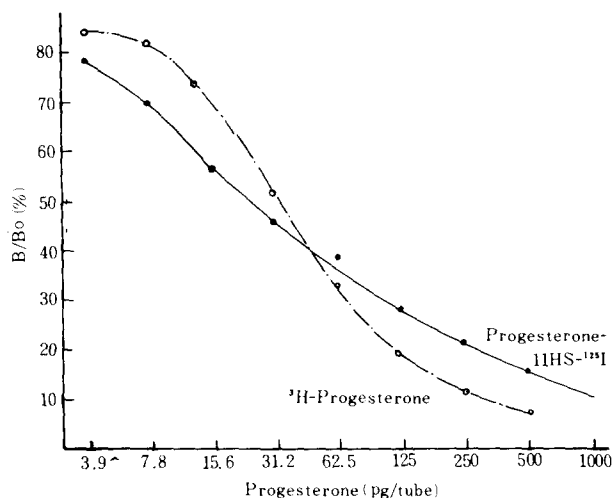


Fig. 5. Standard curves with ³H-Progesterone and Progesterone-11HS-¹²⁵I

약 1:100, Progesterone-11HS-¹²⁵I은 약 1:400으로 두 Tracer간에는 Liquid-phase에서와 같은 차이를 나타냈다. 이와 같이 Solid-phase가 Liquid-phase보다 낮은 titer를 나타내는 것은 稀釋한 抗体가 100% coating되지 않았기 때문인 것으로 사료된다. Progesterone-11HS-¹²⁵I을 사용했을 때 Fig. 6과 같은 Prozone現象이 나타났다 (Parsons, 1981).

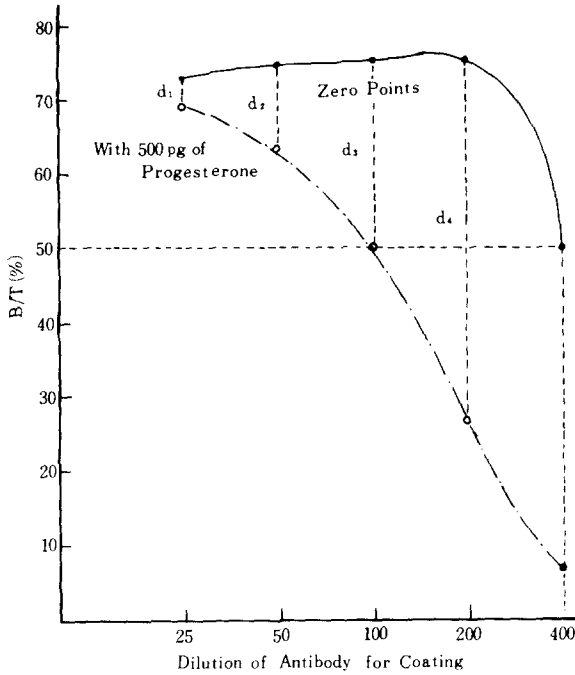


Fig. 6. Titration curve with progesterone-11HS-¹²⁵I in a Solid-phase

위에서 결정된 抗體의 titer로 標準曲線을 作成하였던 바 Fig. 8의 結果를 얻었다. Liquid-phase 에서와 같이 (Fig. 5 참조), Progesterone-11 HS-¹²⁵I을 사용했을 때 完滿한 結果를 나타내는 Bridging 現象이 나타났다.

3.2 2次抗體를 coating시킨 tube

Donkey anti-rabbit IgG를 plastic tube에 coating시켜 free와 bound fraction을 分離시키는 方法을 適正化시킴에 있어서, 1次抗體의 titer 결정은 coating을 위한 2次抗體의 稀釋을 각기 달리하여 調査하였다.

Fig. 9는 1次抗體의 稀釋을 달리했을 때 coating을 위한 2次抗體의 稀釋이 미치는 影響을 Progesterone-11HS-¹²⁵I을 사용하여 나타낸 것으로 1次抗體의 稀釋이 1:500보다 낮을 때 Zero 反應에서 2次抗體의 稀釋程度도 1:100에서 1:800까지 현저한 감소현상을 나타내었다. 그러나 500pg의 Progesterone의 存在下에서는 2次抗體의 稀釋이 1:800을 제외한 나머지의 反應程度는 1次抗體의 농도와 비례관계를 나타내었다.

이와같은 현상은 coating된 2次抗體의 농도가 포

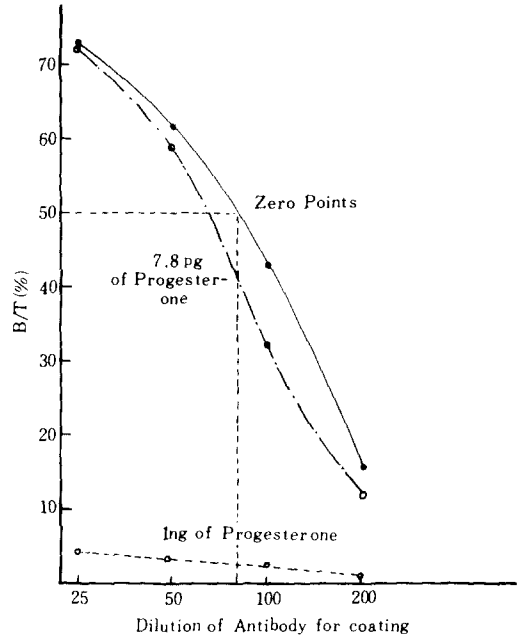


Fig. 7. Titration curve with ³H-Progesterone in a solid-phase

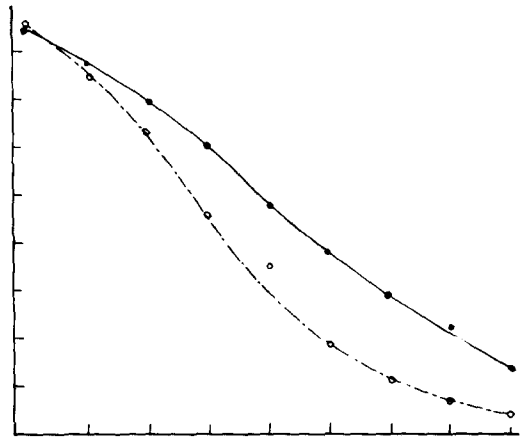


Fig. 8. Standard curves for progesterone in a solid-phase RIA.

화시킬 수 있는 1次抗體의 농도는 제한되어 있기 때문인 것으로 사료된다. Fig. 9에 의하면 coating을 위한 2次抗體를 1:100으로 했을 때 50%의 反應을 나타내는 1次抗體의 稀釋은 약 1:300과 1:900의 두 점을 나타냈지만 titer를 1:900으로 하여 標準曲線을 作成하였던 바 Fig. 8과 비슷한 曲線을 얻을 수 있었다.

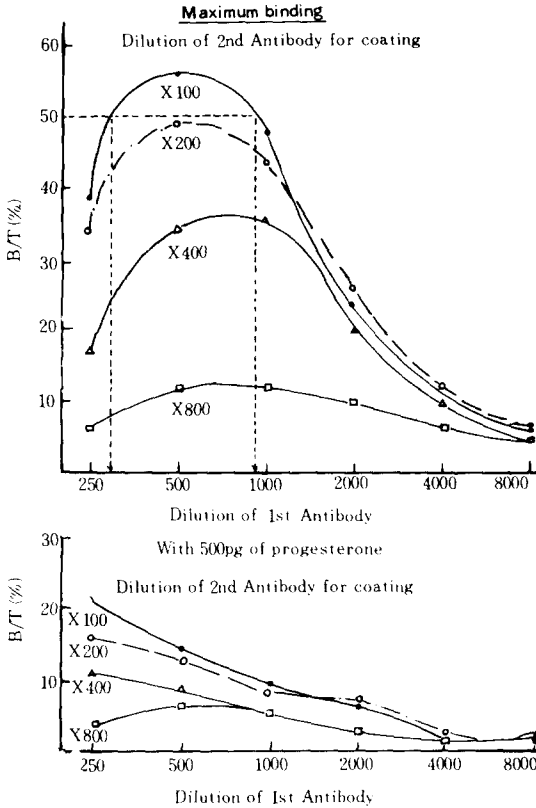


Fig. Titration of 1st Ab with varying dilution of 2nd Ab for coating

IV. 考 察

1. Bridging 現象에 對하여

Progesterone-11HS-¹²⁵I을 사용했을 때 ³H-Progesterone보다 titer가 높고 標準曲線의 경사가 완만하게 나타나는 것은 Progesterone抗体가 Progesterone은 물론 ¹²⁵I을 Progesterone에 labelling시키기 위해 사용된 henisuccinate 즉, bridge group도 認和하기 때문에 이와같은 bridge group없이 labelling될 수 있는 ³H-Progesterone보다 親和도가 훨씬 強해서 反應競爭者인 Progesterone이 쉽게 교체되지 못하기 때문에 일어나는 현상이다. (Nordblom 등, 1979) 이것은 Fig. 10과 같이 免疫原을 合成할 때 사용된 bridge group과 tracer의 그것이 같을 때, 즉 homologous system일 때 더욱 현저하게 나타난다. (Cameron 등, 1973) 그러나 Bridging 現象은 항상 일어나는 것이 아니기 때문에 抗体를 바꿀 때

마다 새롭게 조사할 필요가 있다. ³H를 제외한 ¹²⁵I 등 특히 比較放射性物質 즉, 酵素, 螢光物質, 化學發光體등을 이용한 比較放射性免疫分析에서는 測定하고자 하는 物質에 직접 labelling시킬 수 없기 때문에 이와같은 Bridging 現象이 빈번히 나타난다.

Corrie 등 (1981)은 이 Bridging 現象을 해결하기 위하여 heterologous system을 도입하였다. 즉 免疫原과 tracer에 서로다른 bridge group을 사용하여 標準曲線의 경사도를 향상시켰다. 그러나 이 문제를 해결하기 위한 조직적인 연구사례는 없기에 抗体의 反應點의 化學的 特性과 결부시켜 연구해야 할 과제라고 생각된다.

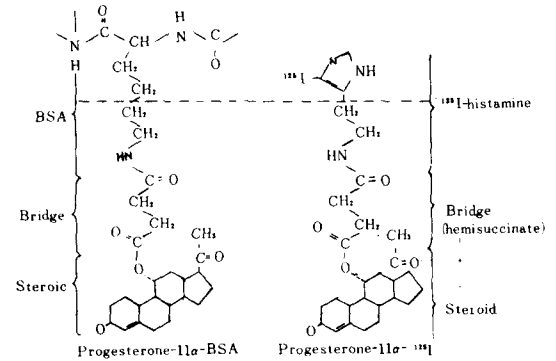


Fig. 1. Similarity in structure of progesterone-11 α -BSA antigen and progesterone-11 α -¹²⁵I radioligand.

2. Prozone 現象에 對하여

Prozone 現象은 항상 일어나고, 또한 문제시되는 것은 아니다. Tracer의 specific activity가 낮을 때나, 純度가 떨어질 때, 혹은 抗体에 對한 親和도가 낮을 때, 反應程度가 50%미만을 나타내어 titer를 결정하기 어려운, 심각한 Prozone 現象을 초래할 때가 있다. 本 研究에서는 이와같은 사례가 발생하지는 않았지만 세심한 注意를 要한다. 비록 50%反應을 나타내주는 titer를 결정할 수 있다 하더라도 Solid-phase에서 titer를 결정할 때에는 항상 un-labelled ligand와 병행해서 inhibition 정도도 함께 조사해야 할 필요가 있다. (Parsons, 1981) 특히 50%反應을 구할 수 없을 경우에는 더욱 그러하다.

Prozone현상이 일어나는 기전에 대해선 아직 자세한 연구보고가 없다. Fig.6에 나타난 결과를 관찰할 때, coating을 위한 1次抗体的 稀釋이 1:25, 1:50, 1:100 그리고 1:200까지 Zero 反應에서는 거의 차이가 없지만, 500pg의 Progesterone 存在下에서는 反應程度가 현격한 차이를 나타내고 있다. 이와 같은 현상은 liquid-phase에서는 설명이 가능하지만 solid-phase는 相互矛盾을 나타낸다. 즉, Zero 反應이 같다는 것은 tube속에 coating된 抗体的 양이 같다는 것을 의미한다. 만약 이것이 사실이라면 1:25에서와 1:200에서 500pg의 Progesterone 存在下의 反應에서도 같은 정도의 反應이 일어나야 한다. 그러나 Fig.6에 나타난 바와 같이 d'과 d''는 상당한 차이가 있다. 이 사실은 곧 tube속에 있는 抗体的 실제량이 다르다는 것을 의미한다 하겠다. 그러면서도 Zero 反應이 같다는 사실은 결국 抗体가 plate tube에 hydrophobis 反應에 의해 直接coating되어 있는 것과 그렇지 않은 또 다른 Zone 즉, Prozone을 形成하는 2 가지 형태로 存在한다고 思料된다.

3. 2次抗체를 Wating시킨 tube의 使用法에 對하여

1次抗체를 coating시킨 tube의 문제점이라면 抗体를 일정하게 coating시키기가 어렵다는 점이다. 따라서 反復性등 免疫分析法에 직접적인 영향을 미치게 된다(Kim, 1983). 이 문제점을 해결하기 위하여 1次抗体대신 2次抗체를 coating시킨 tube를 사용하였다. 이론적으로 1次抗체를 포화시킬 수 있는 양이상만 coating된다면 비록 균일하게 coating 되지 않았더라도 1次抗体와는 달리 分析에 직접적인 영향을 미치지 않을 것이다. 그러나 2次抗체를 사용할 때에는 다음과 같은 점들을 고려해야 된다고 思料된다. 즉, 1次抗体的 titer가 상당히 높고 1次抗体에 對한 2次抗体的 親和度 및 titer가 상당히 높을때 이 方法의 장점을 最大化시킬 수 있고 充分한 이용의 가치가 있다고 思料된다. 그렇지 못한 경우 주의깊은 適正化가 先行되어야 할 것이다. 특히 1次抗体的 titer가 낮을 경우에는 添加되는 抗体的 量이 反應하는 coating된 2次抗体보다 상대적으로 많을 경우 反應減少現象을 나타내어 2개의

titer가 생긴다. 이때에는 낮은 농도 즉, 높은 稀釋을 titer로 결정하여야 할 것이다.

이 方法의 또 다른 장점이라면 liquid-phase나 2次抗체를 cellulose와 같은 particle에 共有結合시킨 Solid-phase法등에 비해 遠心分離過程이 필요하지 않다는 점이다. 따라서 이 方法을 이용하는 것은 경우에 따라 매우 유리한 分離方法이 될 수 있다고 思料된다.

4. Liquid와 Solid-phase의 長·短點 및 ³H-Progesterone과 Progesterone-11HS-¹²⁵I의 長·短點에 對하여

Liquid-phase에서는 free와 bound fraction을 分離하기 위하여 Dextran-coated-charcoal을 첨가하여 4℃에서 遠心分離를 해야만 하는 복잡한 과정과 遠心分離機와 같은 高價의 機器를 要하는 반면에 Solid-phase에서는 吸出과 洗滌으로 간단히 free와 bound fraction을 分離할 수 있다는 유리한 점이 있으나 Liquid-phase에서 보다 反復性이 다소 떨어지는 경향이 있다. ³H-Progesterone을 사용했을 때에는 高價의 Scintillation vial과 Scintillation liquid가 별도로 필요한 반면에, Progesterone-11HS-¹²⁵I를 사용했을 경우에는 free fraction을 제거한 후 즉시 count할 수 있다는 장점이 있다. 물론 ¹²⁵I의 半減期가 ³H보다 짧아 安定度가 떨어진다는 短點이 있다.

이러한 장·단점들을 고려해 볼 때 RIA에서 分離方法으로는 1次抗体나 2次抗체를 coating시킨 tube를 이용하는 Solid-phase, tracer로는 Progesterone-11HS-¹²⁵I이 더 유리한 점이 있다고 思料된다. 그러나 放射性物質은 취급과 관련된 제 문제점들 즉,

- ① 짧은 半減期 및 자체붕괴로 인한 安定度의 결여
- ② 健康上 위해로운 점
- ③ 폐기물 처리의 단점
- ④ 放射性 測定器機 및 기기유지비의 高價
- ⑤ 放射性物質 취급을 위한 특별면허 요구에 의한 사용상의 제한점등을 내포하고 있어 장기적인 입장에서 생각할때 위와 같은 문제점들을 해결·보완할 수 있는 非放射性免疫分析法(Nonisotopic immunoassay)의 개발이 절실히 요구된다.

IV. 摘要

本 研究는 內分泌學 研究에 必須的으로 利用되는 RIA의 過程에서 문제시되는 點들을 分析·檢討 및 相互比較하여 試料를 보다 正確하고 經濟的으로 그리고 便利하게 測定할 수 있는 가장 알맞는 方法을 모색하기 위하여 Progesterone 測定을 위한 RIA를 標本으로 하여 實驗을 實施하였다.

이상에서 얻은 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. Donkey anti-rabbit IgG serum의 2次抗体를 Protein-A Sepharose affinity column으로 分離해 낼 수 있었다.

2. 分離·精製된 抗体를 plastic tube에 coating 함에 있어서 室溫에서 2時間 反應시킨 것은 4°C에서 15時間 以上 反應시킨 것과 별 차이가 없었다.

3. 1次 또는 2次抗体를 各各 coating시킨 tube의 反復性을 比較해 볼 때 相互 큰 差異는 없었지만, 後者의 경우 相應하는 1次抗体의 titer가 높은 경우 더 좋은 反復性이 기대되었다.

4. Liquid와 Solid-phase에서 ^3H -Progesterone과 Progesterone-11HS- ^{125}I 에 對한 抗体의 titer는 各各 1:300, 1:700과 1:100, 1:400으로 Progesterone-11HS- ^{125}I 의 親和도가 ^3H -Progesterone보다 높았다.

5. Progesterone-11HS- ^{125}I 를 tracer로 使用했을 경우 Bridging현상이 나타나 ^3H -Progesterone을 使用한 標準曲線에 비해 緩慢한 경사를 나타냈다.

6. Progesterone-11HS- ^{125}I 를 使用한 Solid-phase의 抗体稀釋曲線에서 Prozone現象이 나타났으며, 이때에는 一定한 濃度の Progesterone을 供用하여 tracer와의 경쟁정도를 반드시 함께 檢討하여 標準曲線을 作成하기 위한 抗体의 농도를 決定해야 할 것으로 思料된다.

7. Solid-phase는 遠心分離過程을 省略할 수 있다는 점에서 Liquid-phase보다는 有利하나 反復性에서는 다소 떨어졌다.

REFERENCES

1. Cameron, E.H.D. and J.J. Scarisbrick, 1973. Radioimmunoassay of Plasma Progesterone. Clin. Chem.

- 19, 1403.
2. Chard, T. 1978. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. In "Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology". T.S. Work and E. Work (eds), North-Holland publishing company.
3. Collins, W.P. and J.F. Hennam, 1976. Radioimmunoassay and reproductive endocrinology. In "Molecular aspects of medicine". H. Baum and J. Gergely (eds), Pergamon Press.
4. Corrie, J.E.T. and W.M. Hunter, 1981, ^{125}I iodinated tracers for hapten-specific Radioimmunoassays. In "Methods in Enzymology". Vol. 73 J. Langone and H. Vunakis (eds), Academic Press. p. 79.
5. Kessler, S.W. 1981. Use of Protein-A-Bearing Staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. In "Methods in Enzymology". Vol. 73, J. Langone and H. Vunakis (eds), Academic Press, p. 442.
6. Kim, J.B. 1983. Development of chemiluminescence immunoassay for the measurement of plasma steroids and urinary steroid glucuronides. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy in the University of London.
7. Nakamura, R.M., W.R. Dito and E.S. Tucker, 1979. Principles of ELISA and recent applications to the study of molecular interaction. In "Immunoassay in the clinical laboratory". p. 89.
8. Nordblom, G.D., R.E. Counsell and B.G. England, 1979. Ligand Specificity and Bridging Phenomena in Hapten Radioimmunoassays. The Ligand Quarterly, 2, 34.
9. Parsons, G.H., 1981. Antibody-coated plastic tubes in Radioimmunoassay. In "Methods in Enzymology." Vol. 73 J. Langone and H. Vunakis (eds), Academic Press, p. 224.
10. Scarisbrick, J.J. and E.H.D. Cameron, 1975. Radioimmunoassay of progesterone: Comparison of (1,2,6,7 - $^3\text{H}_4$)-progesterone and progesterone-(^{125}I)-Iodohistamine Radioligands. J. Steroid Biochem. 6, 51.