

단일클론항체를 이용한 Milk Progesterone Test(EIA) 측정법의 개발 과 이에 의한 소의 발정 및 임신조기진단의 정확도 향상에 관한 연구

김정우 · 홍승욱

단국대학교 농과대학

Development of Milk Progesterone Test(EIA) using Monoclonal Antibody and It's Application to Estrus- and Early Pregnancy Detection in Dairy Cattle

Kim, J.W. and S.W. Hong

College of Agriculture, Dankook University

SUMMARY

A simple and sensitive microplate enzyme immunoassay(ELISA) was developed for progesterone, based on progesterone monoclonal antibody as anti-progesterone, horseradish peroxidase(HRP) as enzyme-label and tetramethylbenzidine(TMB) as substrate. The assay has a sensitivity of 5pg-120pg/well and intra- and inter assay coefficients of variation for progesterone standard curve(0.1ng-3.2ng/ml) were ranged 4.4-10.6% and 5.6-12.6%, respectively.

They assay is performed in less than two hours and provide reliable values to differentiate among samples from day 0(A.I.), day 14 and day 19. The discriminatory levels for early pregnancy diagnosis are [>10 ng(day 19) & decreasing rate <1.5 : pregnancy] and [≤ 7 ng & decreasing rate ≥ 1.5 : non-pregnancy]. The accuracy of the pregnancy diagnosis for cows classified as positive(pregnancy) and negative(non-pregnancy) were 96% and 100%, respectively.

I. 緒 論

지금까지 가장 보편적으로 사용되어 오고 있는 난소 기능 측정을 위한 직접적인 방법은 난소에서 분비하는 호르몬 즉 estrogen이나 progesterone의 농도를 측정하는 것이다.

Progesterone 정량을 위해서 현재 가장 널리 사용되고 있는 방법은 방사성 동위원소를 이용한 Radio immunoassay(RIA : Collins and Hennen, 1976)이나 이것은 방사성 동위원소를 이용해야 한다는 점과,

고가의 기계설비와 기술과 많은 경비를 필요로 한다는 점에서 산업화에 활용하기에는 여러 가지 문제점을 갖고 있어(Arnstadt, 1984) 최근에는 비방사성 동위원소를 이용한 면역분석법, 즉 효소를 이용한 Enzyme immunoassay(EIA : Schurs and Van Weeman, 1977 ; Arnstadt, 1983 ; Arnstadt and Adamopoulou, 1982) 방법의 개발이 활발히 진행되고 있으며 이외에도 화학발광체를 이용한 Chemiluminescence immunoassay(CIA : Barnard et al, 1985 ; Pazzagli et al, 1981 ; 강 등,

1 이 논문은 1989년도 문교부 지원 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

1985; 이 등, 1987) 등이 개발되어 일부 임상에 적용되고 있다.

그러나 아직 이 세가지 방법은 체계적으로 각 방법의 장·단점을 비교·평가 분석한 연구사례는 많지 않은 실정이다. 한편 측정법의 민감도, 재현도, 기자재의 가격, 측정에 소요되는 비용 등의 비교에 있어서 EIA는 RIA에 비해 많은 이점이 있으므로 현재 해외연구자들은 EIA법의 표준화에 관한 개발연구에 더 많은 관심을 갖고 있다(Karg, 1984).

Progesterone 정량을 위한 EIA법의 개발에 있어서 사용된 효소로서는 Horseradish-peroxidase (HRP) (Arnstadt et al., 1981; Chang et al., 1983; Marcus et al., 1986; Munro et al., 1984; Van de Wiel et al., 1982; Wimpy et al., 1986), β -Galactosidase(Foulkes et al., 1982; Nakao et al., 1983; Sauer et al., 1981, 1986)와 Alkaline Phosphatase(AP) (Sauer et al., 1985) 등이 있다. 이들 효소(conjugate)들을 이용한 측정법의 측정감도는 대체적으로 비슷하나 conjugation에 대한 효율성은 β -Galactosidase가 HRP나 AP보다 매우 양호하며 측정감도도 좋은 편이지만 정제된 효소의 가격이 매우 고가이므로(HRP가격의 150배) 이 효소의 사용상 단점으로 지적되고 있다(Tijssen, 1985).

한편 EIA법에서 HRP의 기질(substrate)로서 Orthophenylene diamine(OPD), 2,2-Azino-di(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) (ABTS), 5-Aminosalicylic acid(5-AS)와 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine hydrochloride(TMB) 등이 이용되고 있다(Bos et al., 1981; Porstman et al., 1985).

상기의 기질 중 OPD와 TMB는 enzyme의 농도가 낮은 수준에서도 민감도가 가장 좋은 것으로 보고되었으며 특히 최근까지는 OPD를 사용하는 경우가 대부분이었다(Arnstadt et al., 1981; Kamonpatana et al., 1982; Wiel et al., 1982). 그러나 OPD는 인체에 해로운 발암성 물질로서 이의 취급에 유의해야 하는 단점을 가지고 있기 때문에 비발암성 물질인 TMB(trimethylbenzidine)를 기질로 이용하려는 연구가 시도되고 있다(Holland et al., 1974; Weemen, 1985).

한편, Köhler와 Milstein(1975)이 단일클론항체를 분비하는 잡종세포를 개발한 이래 생명과학 연구분야에

일대 혁신을 가져왔고, 그 이후 이에 관한 많은 연구가 이루어져 기초연구는 물론 각종 진단시약 및 치료용 그리고 생리활성물질의 정제 등 산업적 이용까지 발전하게 되었다(Andrew A. John, 1982). 특히 국외의 여러 연구자들에 의해 progesterone에 대한 단일클론항체의 생산이 보고된 바 있으며(Fantl et al., 1981; Kohen & Lichter, 1986; White, 1983) 이를 이용하여 progesterone 정량을 위한 면역분석법의 개발이 활발히 진행되고 있다(Nebel, 1988).

이와 관련된 국내의 연구상황은 아직 미흡한 상태이며 단일클론항체를 이용한 측정법 개발에 대한 확립된 사례보고는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 과학재단의 연구비 지원에 의해 생산한 affinity와 특이성이 좋은 progesterone 단일클론항체(김 등, 1990)와 비발암성 물질인 TMB를 이용하여, 측정설비와 경비를 절감하면서도 소규모 실험실에서 간편하게 활용할 수 있는 progesterone 정량을 위한 면역분석법(Microplate EIA)을 확립하고, 이를 이용하여 생산능가의 우수종 progesterone의 농도를 측정하여 췌소의 임신조기진단법으로서의 가능성 및 진단의 정확도를 조사할 목적으로 실시하였다.

II. 材料 및 方法

1. Progesterone 단일클론항체

1) 단일클론항체의 생산과 분리정제

Progesterone 단일클론항체의 생산은 progesterone-3-(O-carboxymethyl)oxime-Bovine serum albumin(P-3CMO-BSA)을 Eshhar 등(1981)의 방법에 의거 합성하여, 이를 면역원으로 생후 6~8주된 BALB/c mouse의 복강내에 주사하여 항체 생성이 확인된 BALB/c 생쥐의 비장(spleen)으로부터 분리된 비장세포와 종양세포(SP2/0-Ag14)를 융합하여 잡종세포(hybridoma cell)군을 작성하였다.

항체의 검증(screening) 결과 강한 양성반응을 보인 well의 hybridoma 군을 선별하여 배양한 후 BALB/c mouse의 복강내에 주입하여 생성된 복수를 취하는 *in vivo* 법으로 항체를 대량생산하였다. 복수로부터 수집된 단일클론항체의 분리정제는 먼저 Neoh 등(1986)의 방법에 따라 지방제거 후, Protein A-Sepharose CL-4B Affinity Chromatography법(Ey, 1978)으

로 실시하였다(김 등, 1990).

2) 단일클론항체의 특이성

Progesterone 단일클론항체의 specificity를 RIA 방법으로 조사하였던 바, 11α -hydroxyprogesterone, 11β -hydroxyprogesterone, deoxycorticosterone 과 corticosterone 과는 2% 미만으로 낮은 교차반응을 나타내었다. 또한 cortisol, testosterone, estradiol 과 androsterone 등과는 반응정도가 0.1% 이하로 거의 교차반응을 나타내지 않았으나 17α -hydroxyprogesterone 및 20α -hydroxyprogesterone 과는 각각 5.9%, 33.9%로 다소 높게 나타났다. 그러나 20α -hydroxyprogesterone 은 혈액 및 우유중에 거의 함유되어 있지 않으므로 progesterone 측정을 위한 면역 분석에 이 항체를 사용하였다.

2. Progesterone 측정을 위한 Microplate EIA 과정

1) Buffers 와 Solutions 의 제조

Assay buffer 는 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.04M), NaCl (0.15M), BSA (0.1%)와 Thimerosal (0.02%)를 증류수 (pH 7)에 용해하여 사용하였으며 washing buffer 는 Tween 20을 PBS (0.05M, pH 7.4)에 혼합하여 최종농도가 0.05%로 조정된 후 사용하였고 coating buffer 는 Na_2CO_3 0.015M, NaHCO_3 0.035M 과 Thimerosal 0.02%를 증류수 1,000ml에 용해하여 조제하였다.

Substrate buffer 는 $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 13.6g을 1,000ml의 증류수에 용해시킨 후 포화된 citric acid를 이용하여 pH를 5.5로 조정하여 사용하였으며 substrate solution은 TMB stock solution $400\mu\text{l}$ 와 1% H_2O_2 $100\mu\text{l}$ 를 25ml의 substrate buffer와 사용 직전에 혼합하여 사용하였다. TMB stock solution은 300mg의 TMB를 50ml DMSO에 용해시킨 후 암실에 보관하면서 사용하였다.

2) 단일클론항체의 피복

Coating buffer로 평형시킨 항체를 microplate의 각 well에 $200\mu\text{l}$ 씩 분주하여 4°C에서 overnight incubation시킨 후 이물 제거하고 0.3% BSA $300\mu\text{l}$ 를 분주한다. 실온에서 30분간 방치한 다음 세척액(0.05% Tween 20)으로 충분히 세척한 후 4°C에 보관하면서 사용하였다.

3) HRP-Progesterone(HRP-P)의 합성

Progesterone-3-CMO 5mg, Dicyclohexyl carbodiimide(DCC) 2.768mg과 N-Hydroxy-Succinimide(NHS) 1.45mg을 N,N-Dimethylformamide(DMF) 0.5mg에 용해시켜 실온에서 2시간 동안 활성화시킨 다음 원심분리(2,500rpm, 10min)하여 progesterone ester로 취한다. 미리 용해한 HRP 4mg을 0.2ml의 progesterone ester와 혼합하여 실온에서 2시간 반응시킨 다음 urea 제거후 3일간 투석시킨 후 Sephadex G25 column를 이용하여 유리 progesterone을 제거한 뒤 10% BSA 용액을 최종농도가 0.1%가 되도록 첨가하여 -20°C 에 보관하면서 측정에 사용하였다.

4) Progesterone standard 의 작성

Progesterone의 표준농도는 일정량의 progesterone(Sigma, PO 130)을 정량하여 일정량의 benzene에 용해시킨 후 용액은 progesterone의 농도가 100 ng/ml이 되도록 유리병에 분주한 후 incubator에서 증발시킨다. 표준농도의 범위는 50 ng/ml로부터 0.05 ng/ml에 이르기까지 측정목적에 따라 assay buffer로 희석하여 작성하였다.

5) 측정 과정

항체가 피복된 microtiter plate를 이용하여 progesterone의 농도를 측정하는 과정은 Fig. 1과 같다.

3. 우유 Sample 의 채취 및 임신 조기진단

Sample의 채취는 충청남도 천원군과 아산군에 소재한 10개 목장에서부터 무작위로 선발된 45두의 젖소로부터 저녁착유(후착유)를 수집하였다. 우유 sample은 개체별로 인공수정 당일, 수정 후 14일경과 수정 후 19일경에 각 3회씩 채취하여 확립된 측정방법에 의하여 progesterone의 양적측정을 실시하였다. 임신진단의 판정은 김(1989)의 방법(Two sample assay 법)에 의거하여 실시하였다.

III. 結果 및 考察

1. HRP-P conjugate 의 합성과 특성

HRP 효소로 표지된 항원, 즉 HRP-P는 H_2O_2 의 산화반응 조건하에서 substrate인 TMB를 반응시킨

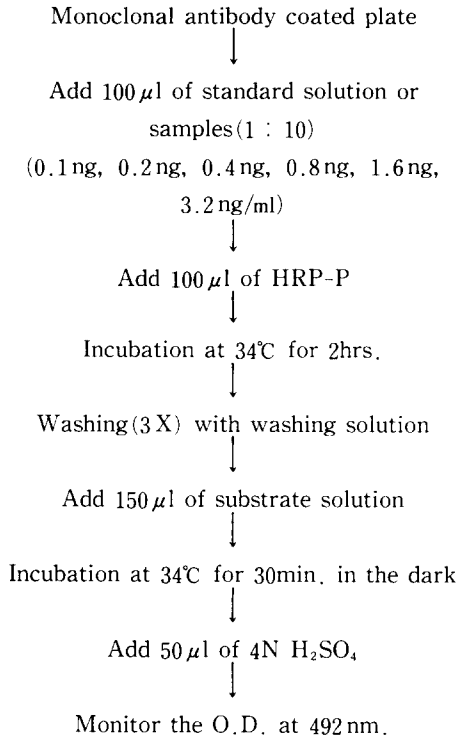


Fig. 1. Microplate-EIA procedure for progesterone concentration

결과 발색반응이 효과적으로 나타났으며 EIA-reader (492 nm)에서 1 pg/well 까지 측정이 가능하였다.

2. 항체와 HRP-P의 농도별 반응조사

Conjugate인 HRP-P (20 ng/well)와 항체와의 반응 여부 및 standard curve 작성을 위한 항체 및 HRP-P의 희석적정치 결정을 위하여 1 : 500, 1 : 1,000, 1 : 1,200, 1 : 1,400, 1 : 1,800과 1 : 16,000으로 희석된 항체를 microtiter plate에 각각 coating 시킨 후, assay buffer 및 50 pg/well의 농도를 가진 progesterone과 반응시킨 결과는 Fig. 2와 같다.

HRP-P의 농도를 20 ng/ml로 고정시킬 경우나 5 ng/well로 고정시킬 경우에서 반응의 50%가 되는 항체의 적정 희석치는 모두 1 : 4,000으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 progesterone 농도측정의 민감도를 조사하고자 1 : 4,000으로 희석된 항체를 microplate에 coating 한 후 농도가 각기 다른 progester-

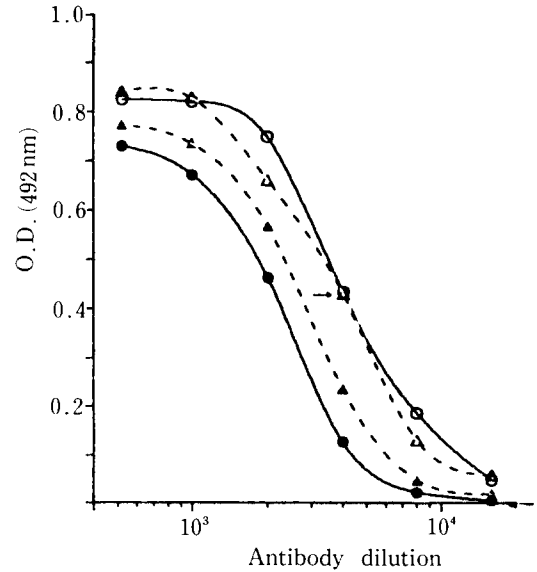


Fig. 2. Titration curve of anti-progesterone monoclonal antibody with amounts of HRP-P and its authentic progesterone.

- : HRP-P 5 ng, Prog. 50 pg/well
- ▲-▲ : HRP-P 20 ng, Prog. 50 pg/well
- : HRP-P 5 ng/well Assay buffer
- △-△ : HRP-P 20 ng/well Assay buffer

one과 HRP-P (5 ng/well)와 반응시켜 curve를 작성한바 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다.

측정감도의 범위는 5~2,560 pg/well로 나타났으며, 특히 curve 중 progesterone 농도가 10~640 pg/well의 범위 (반응비율; 80~20%)에 해당하는 부분의 경사도는 매우 급격하였다.

3. Standard curve의 작성

본 실험에서는 우유중 progesterone의 농도를 보다 편리하고도 간편하게 측정할 수 있는 방법을 정립하려는 목적으로 Fig. 3에서 이미 제시된 curve의 급경사 부분만을 이용하여 standard curve를 작성하였다.

Fig. 4는 progesterone 농도의 범위를 10~320 pg/well로 하여 HRP-P (5 ng/well)와 반응한 정도를 나타낸 표준곡선이다. Progesterone의 각 표준농도를 ml당으로 환산하게 되면 농도범위는 0.1 ng, 0.2 ng, 0.4 ng, 0.8 ng, 1.6 ng과 3.2 ng가 되며, 이 범위는

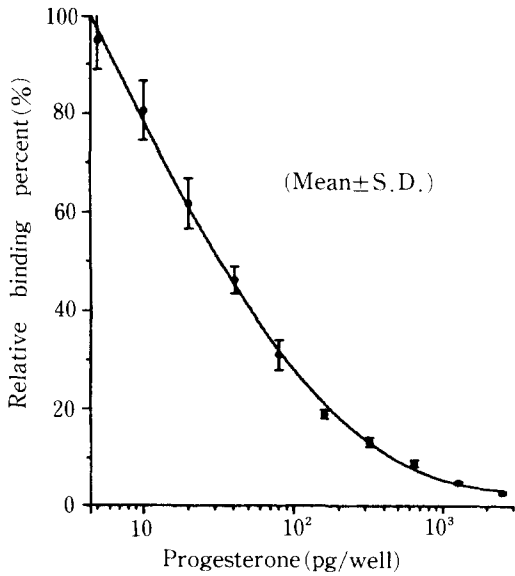


Fig. 3. Curve for progesterone dilution series using anti-progesterone monoclonal antibody.

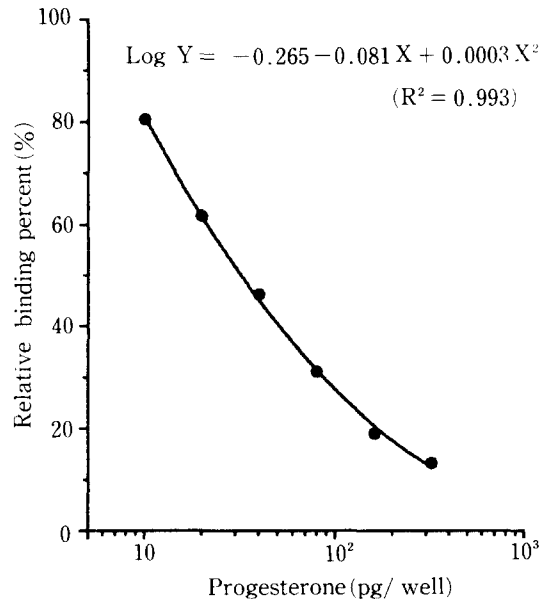


Fig. 4. Standard curve for progesterone in ELISA for milk sample estimation.

채취된 sample 을 10 배 희석하여 측정에 이용할 경우 에 정상적인 우유중의 progesterone 의 함량의 농도수 준을 포함하는 범위가 된다.

이 표준곡선에 대한 회귀 방정식은 $\log Y = -0.265 - 0.081 X + 0.0003 X^2$ 이며 R^2 는 0.993으로써 매우 높은 결정계수를 보여주고 있다.

4. 측정법(Microplate-EIA)의 정확도(precision)

Fig. 4에 제시된 표준곡선에 의하여 progesterone 양적측정시 측정의 정확도를 조사하기 위하여 이들에 대한 intra-assay와 inter-assay를 반복 실시하였던 바, Table 1에 제시한 바와 같이 intra-assay의 경

우 변이계수(C.V.)는 standard의 농도에 따라 차이는 있지만 4.4~10.6%로 나타났으며, inter-assay의 경우 5.6~12.6%로써 특히 고농도에 비하여 저농도범위에서 정확도가 저하되는 경향을 나타내고 있다.

상기의 결과는 intra-assay의 경우 Van de Wiel 등(1982)의 결과보다 정확도가 다소 저하된 수준이며 Arnstadt 등(1981), Claus 등(1985) 및 Kamonpatana 등(1982)의 결과보다는 양호한 수준을 보여주고 있다. Inter assay의 경우 Van de Wiel 등의 결과보다는 고농도 범위에서 정확도가 다소 저하되는 경향을 보이고 있으나, Arnstadt 등(1981), Kamopatana 등(1982)과 Claus 등(1985)의 결과보

Table 1. Repeatability of progesterone standard in microplate EIA.

Progesterone standard (pg/ml)	3,200	1,600	800	400	200	100
<Intra - assay> C.V. % (n = 8)	9.6	6.1	10.6	4.4	7.9	6.6
<Inter - assay> C.V. % (n = 6)	5.6	6.7	10.7	9.9	12.6	6.9

C.V. % : coefficients of variation in percent

다는 향상된 수준을 나타내고 있다.

따라서 본 측정법의 정확도는 평균적으로 10%이하로서 일반적인 생물학적 측정방법의 정확도 범위내에 있기 때문에 progesterone의 정량법으로 충분히 이용이 가능한 것으로 판단된다.

5. 임신 조기진단의 정확도 및 발정기 측정

김(1989)의 방법에 의거하여 우유 sample을 인공수정 실시 후 14일경(Day 14)과 19일경(Day 19)에 각각 채취하여 progesterone의 농도를 측정할 후 이들간의 증감율 정도와 Day 19의 절대농도를 동시에 고려하여 임신의 여부를 판정하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 Day 19의 절대농도가 10ng/ml 이상이고 감소율이 1.5 미만을 positive(임신)으로 판정하고, 같은 시기의 농도가 7ng/ml 이하이고 감소율이 1.5 이상을 negative(비임신)로 판정할 경우 이들의 진단정확도는 각각 96%와 100% 수준으로 나타났다.

이와 같은 positive에 대한 판정 결과는 Arnstadt 등(1985; 80%), Pennington 등(1976; 76%), Heap 등(1976; 82%), Hoffmann 등(1976; 78%)과 Dobson 등(1976; 81%)의 성적보다 현저히 우수한 것으로 나타났다. 한편 negative로 판정된 19두 중, 인공수정시기의 지연으로 불임이 된 개체는 3두(15.8%)이고 배란의 지연으로 불임이 된 개체는 10두(52.6%)로 나타났으며 나머지 6두(31.6%)는 본 실험의 성적상 원인규명이 불가능하였다.

Rattenberger 등(1983)에 의하면 불임의 주원인은 발정기의 잘못 포착, 인공수정 시기 조작의 미숙, 배란의 지연, 난소기능의 장애와 호르몬체제의 남용 등을 들고 있다. 따라서 본 결과에서 원인규명이 불가능한 불임개체는 난소기능의 장애나 호르몬의 남용 등으로

인한 것으로 추측된다.

IV. 摘要

본 연구는 progesterone 단일클론항체와 비발암성 물질인 TMB를 이용하여, 소규모실험실에서 간편하게 활용할 수 있는 progesterone 정량을 위한 면역분석법(Microplate EIA)을 확립하고, 이를 이용하여 생산농가의 우유중 progesterone의 농도를 측정하여 최초의 임신조기진단법으로서의 가능성 및 진단의 정확도를 조사할 목적으로 실시하였다.

1. Progesterone 단일클론항체 및 HRP P(conjugate)와 TMB(substrate)를 이용하여 확립된 Microplate EIA 법으로 progesterone의 농도를 측정할 결과 측정의 민감도가 매우 양호하여 5pg/well 수준까지 측정이 가능하였다.

2. 0.1ng/ml로 부터 3.2ng/ml까지의 progesterone 농도를 이용하여 standard curve를 작성한 결과 회귀곡선 방정식의 결정계수(R^2)는 0.993으로 매우 높았으며, 반복측정시 intra assay 및 inter-assay에 대한 변이계수(C.V. %)는 각각 4.4~10.6%와 5.6~12.6%로서 측정의 정확도가 양호한 수준으로 나타났다.

3. Two Sample Assay법에 의하면 임신진단시 Day 19의 milk progesterone 농도가 10ng/ml 이상이고 감소율이 1.5배 미만을 임신우로, 7ng/ml 이하이고 감소율이 1.5배 이상을 비임신우로 진단할 경우 판정의 정확도는 각각 96%와 100%로 나타났다.

4. Microplate EIA 법은 측정의 민감도와 정확도가

Table 2. The accuracy of pregnancy diagnosis by aid of both milk progesterone concentration (Day 19) and decreasing rate

Result of rectal palpation		Classification of pregnancy diagnosis(ng/ml)			Total
		Positive (over 10, dec. <1.5)	Doubtful (7~10)	Negative (under 10, dec. >1.5)	
Pregnancy	No. cows (%)	25 (96%)	0	1 (4%)	26 (100%)
Non-pregnancy	No. cows	0 (0%)	0	19(100%)	19 (100%)

dec. : decreasing rate = (Conc. of progesterone at Day 14 - Day 19) / Day 19

높고 안정되어 임신 조기진단 및 각종 난소기능의 이상 유무 측정에 간편하고 저렴하게 이용할 수 있는 것으로 판정되었다.

V. 引用文獻

- Andrew, J and W.F. John. 1982. Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press.
- Arnstadt, K.I. and W.F. Cleere. 1981. Enzyme-immuno assay for determination of progesterone in milk from cows. J. Reprod. Fert. 62 : 173-180.
- Arnstadt, K.I. & B. Schmidt-Adamopoulou. 1982. Direct enzyme immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. Br. Vet. J. 138 : 436-438.
- Arnstadt, K.I. 1982. Steroid determination in milk by enzyme immunoassay(EIA). J. Steroid Biochem. 9 : 423-424.
- Arnstadt, K.I. 1984. Progesterone-Test. Rundbrief von Forschungsgruppe Fertilitat an der Besamungsstation herbertingen 15. August. 1984.
- Arnstadt, K.I. und Anne-Rose Fischer-Arnstadt. 1985. Progesteronbestimmung also Hilfsmittel der Brunstkontrolle. 40. Jahrgang/Nr.5 vom 1 : 391-400.
- Barnard, G.J.R., J.B. Kim, J.L. Brockelbank, W.P. Collins. 1985. Recent advances in chemiluminescence immunoassay. In: Bioluminescence and chemiluminescence: Instruments and Application, Vol.1, Knox V.D.(ed), CRC Press, p151-183.
- Bos, E.S., A.A. van der Doelen, N. van Rooy, A.H.W.M. Schuurs. 1981. J. Immunoassay 2 : 187-204.
- Chang, C.F. and V.L. Estergreen. 1983. Development of a direct enzyme immunoassay of milk progesterone and its application to pregnancy diagnosis in cows. Steroids 41 : 173.
- Claus, R., E. Münster, M. Linhard. 1985. Überprüfung der Anwendbarkeit eines Mikrotiter-Enzymeimmuntest für Nachgemelk zur Fruchtbarkeit Analyse bei der Kuh. Zuchthyg. 20 : 54-60.
- Collins, W.P. and J.F. Hennam. 1976. Radioimmunoassay and reproductive endocrinology, In: Molecular aspects of medicine, H.Baum & J. Gergely(ed), Pergamon Press.
- Dobson, H. and R.J. Fitzpatrick. 1976. Clinical applications of the progesterone-in-milk test. Br.Vet.J. 132 : 538.
- Eshhar, Z., J.B. Kim, G. Barnard, W.P. Collins, S. Gilad, H.R. Lindner, F. Kohen. 1981. Use of monoclonal antibodies to pregnanediol- α -glucuronide for the development of solid phase chemiluminescence immunoassay. Steroids, 38, 89-109.
- Ey, D.L., S.J. Prowse and C.R. Jenkin. 1978. Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A sepharose. Immunochemistry, 15, 429-436.
- Fantl, V.E., D.Y. Wang, A.S. White head. 1981. Production and characterization of a monoclonal antibody to progesterone. J. Steroid Biochem., 14 : 405-407.
- Foulkes, J.A., A.D. Cookson and M.J. Sauer. 1982. AI in cattle based on daily microtitre plate enzyme immunoassay of progesterone in whole milk. Br.Vet.J. 138-515.
- Heap, R.B., R.J. Holdsworth, J.E. Godsby, J.A. Laing, and D.E. Walters. 1976. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. Br.Vet.J. 132 : 445.
- Hoffman, B., O. Gunzler, R. Hamburger and W. Schmidt. 1976. Milk progesterone for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of

- application in Germany. *Br.Vet.J.* 132 : 469.
19. Holland, U.R., B.C. Saunders, F.L. Rose, and A.L. Walpole. 1974. The carcinogenic potential of o-toluidine. *Tetrahedron* 30 : 3299.
 20. Karg, J. 1984. Bericht zur Situation von Alternativmethoden für die Progesteronbestimmung Insbesondere für den Milchprogesterontest-im Zusammenhang mit der Einführung von Enzyme immuntests(EIA) mittels Mikrotitrationsplattenverfahren.
 21. Kamonpatana, M., D.F.M. van de Wiel, W. Koops, Leenanuruska, C. Ngramsuriyaroj and S. Usanakornkul. 1979. Oestrus control and early pregnancy diagnosis in the swamp buffalo: Comparison of enzyme-immunoassay and radio-immunoassay for plasma progesterone. *Theriogenology* 11 : 399-409.
 22. Köhler, G. and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 : 495-497.
 23. Kohen, F. and S. Lichter. 1986. Monoclonal antibodies to steroid hormones. In: "Proceedings of the international symposium on monoclonal antibodies: Basic principles, experimental and clinical applications in endocrinology", G. Forti and M. Pazzagli eds, Raven Press.
 24. Marcus, G.J. and A.J. Hackett. 1986. Use of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extractions. *J. Dairy Sci.* 69 : 818.
 25. Munro, C. and G. Stabenfeldt. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocrinol.* 101 : 41.
 26. Nakao, T., A. Sugihashi, N. Saga, N. Tsunoda and K. Kawata. 1983. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cyst and cystic corpus luteum in cows. *Am. J. Vet. Res.* 44 : 888.
 27. Nebel, R.L. 1988. On-Farm Milk Progesterone Tests. *J. Dairy Sci.* 71 : 1682-1690.
 28. Neoh, S.H., Colin Gordon, Angela Potter and Headdy Zola. 1986. The purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluids. *J. of Immunol Methods*, 91. 231-235.
 29. Pazzagli, M., J.B. Kim, G. Messeri, G. Martinazzo, F. Kohen, F. Franceschetti, A. Tommasi, R. Salerno, M. Serio. 1981. Luminescent immunoassay(LIA) for progesterone in a heterogeneous system. *Clin. Chem. Acta* 115 : 287-296.
 30. Pennington, J.A., S.L. Spahr and J.R. Lodge. 1976. Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration milk. *J. Dairy Sci.* 59 : 1528-1531.
 31. Porstmann, B., T. Porstmann, E. Nugel, and U. Evers. 1985. Which of the commonly used marker enzymes gives the best results in colorimetric and fluorimetric immunoassays: horseradish peroxidase, alkaline phosphatase or β -galactosidase? *J. Imm. Methods* 79 : 27.
 32. Rattenberger, E. und Dr. O Richter, Grub. 1983. Lösung von Fruchtbarkeitsproblemen bei Rindern durch den Milchprogesterontest. *Der Tierzuchter* 35(6/7) : 229-230.
 33. Sauer, M.J., J.A. Foulkes and A.D. Cookson. 1981. Direct enzyme immunoassay of progesterone in bovine milk. *Steroids* 38 : 45.
 34. Sauer, M.J., J.A. Foulkes and P.M.O' Neill. 1982. Use of microtitre plate EIA for direct determination of progesterone in whole milk: application of heterologous systems for improved sensitivity. *Br. Vet. J.* 138 : 522.

35. Sauer, M.J., J.A. Foulkes, A. Worsfold and B.A. Morris. 1986. Use of progesterone 11-glucuronide-alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre plate enzyme immunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle. *J. Reprod. Fertil.* 76 : 375.
36. Schuurs, A.H.W.M. and B.K. Van Weeman. 1977. Enzyme-immunoassay. *Clin. Chem. Acta* 81 : 1.
37. Tijssen, P., R.H. Burdon and P.H. van Knippenberg. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassays. Elsevier Science Publishers B.V. p.173-176.
38. Van de Wiel, D.F.M., M. Kamonpatana, c. Ngramsurjaroy, W. Koops and S. Singhajan. 1982. Enzyme immunoassay of milk progesterone : its application to estrus conformation and pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Vet. Q.* 4 : 72.
39. Van Weemen, B.K., A.H.W.M. Schuurs. 1971. *FEBS Letters* 15 : 871-874.
40. White, A. 1983. Monoclonal antibodies for steroid immunoassay. In : "Immunoassay for clinical chemistry". W.M. Hunter and J.E. T. Corrie(eds) Churchill Livingstone, pp. 339-345.
41. Wimpy, T.H., C.F. Chang, V.L. Estergreen and J.K. Hillers. 1986. Milk progesterone enzyme immunoassay : modifications and a field trial for pregnancy detection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 69 : 1115.
42. 강원준, 고대환, 이경광, 김중배, 정길생. 1985. Progesterone 측정을 위한 면역분석법의 최적조건에 관한 연구. *한국가축번식학회보* 9 : 105-112.
43. 김정우, 김중배, 정길생, 고대환. 1990. Progesterone 에 대한 단일클론항체 생산과 그 이용에 관한 연구. (과학재단 최종보고서)
44. 김정우. 1989. Milk Progesterone Test(EIA) 에 의한 임신 초기진단의 정확도 향상에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 13(3) : 149-156.