

RIA 및 CIA 에 의한 혈장과 우유내 Progesterone 측정

이경찬 · 정태영 · 정길생 · 김종배*

건국대학교 축산대학 축산과, 축산가공학과*

Measurement of Progesterone in Plasma and Milk by RIA and CIA

Lee.K.C., T.Y.Chung, K.S.Chung, and J.B.Kim*

College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were carried out : (1) to investigate the changes of progesterone in plasma, whole milk and skim milk during oestrus cycle and pregnancy and ; (2) to evaluate a chemiluminescence Immunoassay(CIA) as an alternative method by measuring the progesterone concentrations in skim milk by RIA and CIA.

The results obtained in these experiments were summerized as follows :

1. Plasma progesterone levels in non-pregnant Holstein during oestrus cycle were relatively low until day 8 after oestrus. And then, the progesterone level began to increase and reached a peak with 6.3ng/ml on day 14 and then declined rapidly to 1.5ng/ml and 2.2ng/ml on day 18 and 20, respectively.
2. Whole milk progesterone level in pregnant Holstein increased from 1.0ng/ml on oestrus to 16.0ng/ml on day 8 and then remained from 11.0ng/ml on day 10 to 22.0ng/ml on day 22.
3. In non-pregnant Holstein, whole milk progesterone level was 1.5ng/ml on oestrus and began to increase rapidly from day 6 after oestrus and exhibited a range of levels, 17.8~20.0ng/ml from day 6 to day 16 after oestrus.
4. Skim milk progesterone levels in pregnant Holstein were a range of 130~490pg/ml at the time of oestrus and began to increase continually till then showing constant levels ranging from 1300pg/ml on day 10 to 1650pg/ml on day 22.
5. In non-pregnant Holstein, skim milk progesterone level was 160pg/ml on oestrus and began to increase from 190pg/ml on day 2 after oestrus to day 8 and then keep constant levels ranging from 1050 to 1300pg/ml from day 8 to day 16 and then decreased to 240~450pg/ml from day 18 to day 22 after oestrus.
6. The results obtained from CIA for the analysis of skim milk progesterone were in good agreement with the values derived by RIA. ($r=0.914$)

본 연구는 한국과학재단 지원 연구비에 의하여 수행된 것임.

I. 緒 論

卵巢의 黃體細胞에서 주로 分泌되고 胎盤, 副腎, 그리고 精巢에서 소량으로 分泌되는 progesterone은 受精과 着床, 妊娠維持와 分娩에 直接的으로 關聯하는 hormone으로서 특히 卵巢機能을 測定하는데 있어서 progesterone은 매우 중요한 의미를 지니고 있다.

최근에는 乳汁內 progesterone濃度を 測定하여 發情의 早期診斷 및 早期妊娠診斷을 하는 연구가 活潑히 行進되어 임상적용이 거의 보편화 되고 있다.

Progesterone分析은 거의 대부분 放射性 同位元素(isotopic)를 사용한 Radioimmunoassay (RIA)로 하고 있다. 그러나 RIA는 放射性 同位元素를 이용한다는 점에서 많은 問題點을 야기하고 있다(Kim, 1983). 최근 이러한 문제점을 보완하기 위해 방사성 동위원소 대신 非放射性 物質을 이용한 免疫分析法, 즉 酵素를 이용한 Enzyme Immunoassay (EIA : Weckman, B.K.V. and Arton H.W.M. Schuurs, 1975; Arnstadt, K.I. and W.F. Cleere, 1981; Stanly et al., 1985), 螢光物質을 이용한 Fluorescence Immunoassay (FIA : Nakamura, 1979), 化學發光體를 이용한 Chemiluminescence Immunoassay (CIA : Kohen et al., 1979; Pazzagli et al., 1981; Kim, 1983) 등이 開發되어 應用되고 있다.

本 研究에서는 發情週期中인 Holstein乳牛의 血漿(plasma)과 全乳(whole milk), 脫脂乳(skim milk)內의 progesterone濃도를 RIA에 의해 分析하여 妊娠牛와 非妊娠牛의 progesterone濃度變化와 差異를 調査하고, 脫脂乳內 progesterone濃도를 CIA와 RIA로 동시에 測定·比較分析함으로써 CIA의 利用可能性을 調査하고자 本 研究를 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 試料의 準備

1) 血漿 및 progesterone抽出過程

國立種畜院에서 飼育되고 있는 發情週期中인 4頭의 Holstein乳牛의 頸靜脈으로부터 30일간 2일 간격으로

血液抗凝固劑(EDTA : 1 mg/ml)가 添加된 tube에 採取하여 遠心分離하였고 사용시까지 -20°C 에 凍結保管하였다.

血漿內 progesterone抽出은 0.1ml의 血漿에 2ml의 petroleum ether를 넣고 vortex로 1분간 잘 混合한 후 dry ice로 온도를 낮춘 methanol로 血漿을 凍結하고, 凍結되지 않은 petroleum ether부분은 다른 유리 tube로 옮겨 37°C incubator에서 蒸發시켰다. 여기에 1ml의 PBS를 넣고 충분히 混合한 후 37°C 에서 30~50분간 放置한 후 分析을 실시하였다.

2) 乳 汁

京畿道 南陽州郡의 個人農場에서 飼育되고 있는 5頭의 發情週期中인 Holstein乳牛로 부터 午後搾乳(afternoon milking)시에 약 10ml씩 30일간 2일 간격으로 採取하여 -25°C 에서 凍結시켜 保管하였다.

凍結保管된 全乳는 37°C 에서 서서히 融解되어 사용전에 PBS에 50배 稀釋되어 RIA過程에 의해 分析되었다. 脫脂乳의 準備는 37°C 에서 完全히 融解한 후 3000 rpm에서 20분간 遠心分離하여 脂肪層 除去한 후에 分析되었다.

2. 實驗材料

本 研究에 이용된 實驗材料로서 tracer인 progesterone-11 hemisuccinate-aminobuthylethyl-isoluminol(P-11HS-AB-EI), monoclonal progesterone抗體 그리고 standard progesterone은 F. Kohen博士(Dept. of Hormone Research, The Weismann Institute of Science, Rehovot, Israel)로 부터 寄贈받은 것으로 사용하였고, RIA를 위한 $[1, 2, 6, 7^3\text{H}]$ -progesterone ($250\ \mu\text{Ci/ml}$)은 New England Newclear(U.S.A)로 구입하여 사용하였다.

Polyclonal 抗體는 progesterone-11 hemisuccinate-bovine serum albumin(P-11 HS-BSA; Sigma, U.S.A)을 免疫原(immunogen)으로 하여 家兔에 注射하여 얻은 rabbit anti-progesterone-11 hemisuccinate-bovine serum albumin(Rabbit anti-P-11 HS-BSA)抗體로서 直接 生産하여 사용하였다.

抗體·抗原反應(antibody-antigen reaction)을 위한 緩衝溶液은 PBS(phosphate buffered saline)로서 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 Na_2HPO_4 를 각각 0.05M로

조정한 후 NaCl 9g, gelatin 1g과 NaN₃ 0.5g을 1 l의 2次蒸溜수에 完全히 溶解시킨 후 4°C에 保管하면서 사용하였다.

Free와 bound fraction을 分離하기 위하여 사용된 dextran coated charcoal은 1g의 dextran (Sigma, U.S.A)을 100ml의 PBS에 녹인 것으로서 4°C에 保管하면서 사용하였다.

酵素인 microperoxidase(Sigma, U.S.A)로서 Na N₃를 添加하지 않은 PBS에 1mg/ml濃度로 만들어서 사용하였으며 過酸化水素水(30%, Santoku Chem. (Ltd), Japan)은 100배 稀釋하여 사용하였다.

³H의 counting을 위해 사용된 scintillation liquid는 250mg의 POPOP(Sigma, U.S.A), 10g의 PPO(Packard, U.S.A.)와 naphtalene 100g을 再蒸溜시킨 dioxane에 溶解시킨 것을 直接 製造하여 사용하였다.

3. 實驗方法

1) RIA의 過程

抗體로서 polyclonal抗體인 rabbit anti-P-11 HS-BSA을 이용하고 分離方法으로서 dextran coated charcoal을 이용한 RIA의 기본적인 過程은 Fig. 1과 같으나 charcoal을 添加하여 遠心分離한 후 上層液 (supernatant) 0.2ml을 取하여 scintillation liquid 5ml을 添加하여 잘 混合한 후 LKB의 liquid scintillation counter (1211 Rackbeta, Wallac, Finland)로 60초간 測定하였다.

2) CIA의 過程

Traeer로서 progesterone에 化學發光體인 aminobuthylethylisoluminol을 bridge인 hemisuccinate을 이용해 共有結合시킨 P-11 HS-ABEI를, 分離方法으로서 dextran coated charcoal을 이용한 CIA의 과정은 charcal을 添加한 후 遠心分離하여 上層液 0.2

unit : μ l				
Tube	Total	N.S.B.	Zero	Standard of sample
Reagent				
Assay Buffer	400	200	100	-
Standard or Sample	-	-	-	100
Antibody	-	-	100	100
Conjugate	100	100	100	100
↓				
Overnight Incubation at 4°C				
↓				
D.C.C	-	200	200	200
↓				
Centrifuge at 4°C, 1500 rpm for 10 min.				
↓				
Collect 200 μ l of supernant in other tube				
↓				
5N NaOH	100	100	100	100
Microperoxidase	100	100	100	100
H ₂ O ₂ (automatic injection)	200	200	200	200
↓				
Count for 10 sec.				

Fig.1. Procedure of CIA

ml을 취하는 과정까지는 RIA와 同一하며 최종의 化學反應은 上層液 0.2ml에 5N NaOH를 添加하여 60°C에서 1시간, 실온에서 30분간 追加反應시킨 후 0.1ml의 microperoxidase 溶液을 注入하고 자동 microspenser (Hook & Tucker instruments (Ltd), Surrey, U.K)로 0.2ml의 過酸化水素水を 注入하므로서 化學發光反應을 유발시킨다. 이때 發生되는 빛의 양은 LKB Luminometer (M 1250)로 10초간 積分함으로써 mV 단위로 測定되었다.

III. 結果 및 考察

1. Titration Curve

標準曲線 (standard curve) 作成을 위한 抗體의 最適濃度, 즉 titre를 결정하기 위하여 polyclonal 抗體의 抗體稀釋曲線 (antibody dilution curve), 즉 titration curve를 P-11 HS-ABEI (CIA)와 ³H-progesterone (RIA)을 tracer로 하여 作成하였을때 Fig.2와

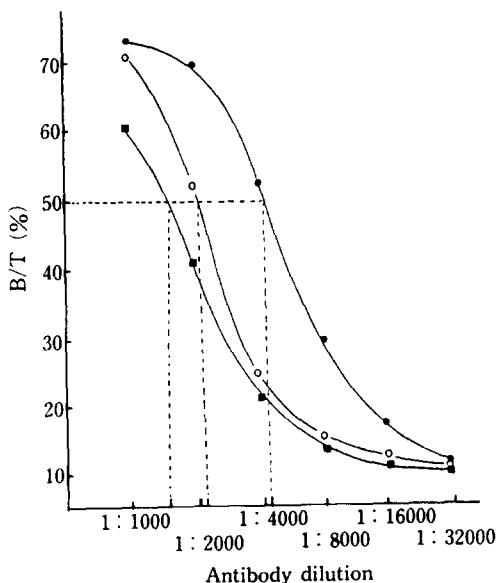


Fig.2. Comparison of antibody dilution curves by RIA and CIA using poly- and monoclonal antibodies

- CIA with rabbit anti-P-11 HS-BSA
- CIA with monoclonal antibody
- RIA with rabbit anti-P-11 HS-BSA

같은 結果를 얻었다.

Fig.2에 나타난 바와 같이 polyclonal 抗體인 Rabbit anti-P-11HS-BSA의 titre는 P-11HS-ABEI를 tracer로 사용한 CIA에 있어서는 1:4,000 그리고 ³H-progesterone을 tracer로 사용한 경우 1:2,500으로 CIA에서 더 높게 나타났다. 이것은 tracer에 대한 抗體의 affinity가 서로 다른데서 기인되는 現象으로 간주되어진다.

2. Standard Curve

Titration curve (Fig.2)에서 結定된 titre를 사용하여 RIA와 CIA 방법으로 standard curve를 作成하였을 때 Fig.3과 같은 結果를 얻었다.

Fig.3에서 보는 바와 같이 세 curve 모두 3.9pg/tube까지 測定이 가능한 비슷한 感度 (sensitivity)를 나타내었으며 curve의 傾斜度 (slope)에 있어서는 monoclonal 抗體를 이용한 CIA, rabbit-anti-P-11 HS-BSA 抗體를 이용한 RIA에 있어서는 비슷한 감도를 나타내었으나 polyclonal 抗體를 이용한 CIA에 있

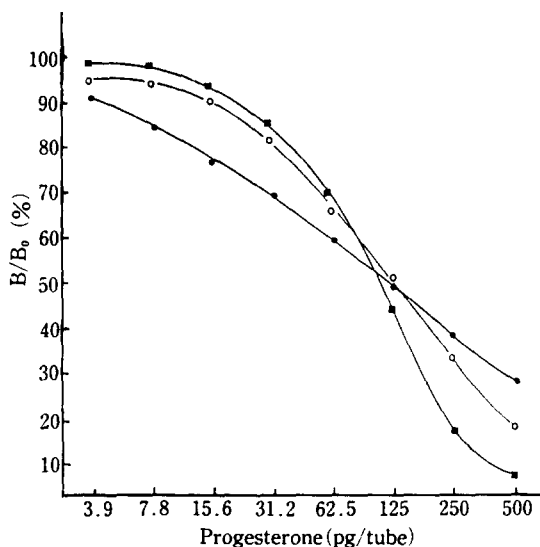


Fig.3. Comparison of standard curves by RIA and CIA with polyclonal and monoclonal anti-progesterone antibodies

- CIA with rabbit anti-P-11 HS-BSA
- CIA with monoclonal antibody
- RIA with rabbit anti-P-11 HS-BSA

어서는 다소 緩慢한 傾斜度를 나타내었다.

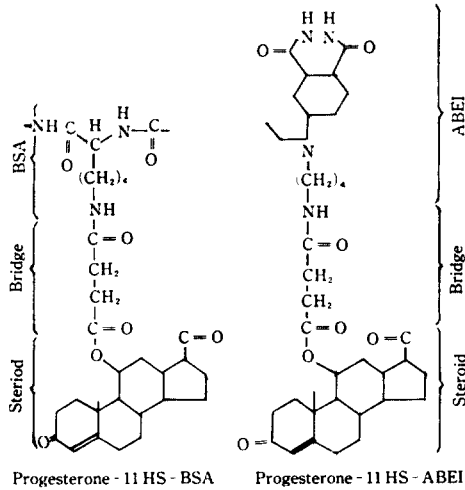


Fig. 4. Structures of progesterone-11HS-BSA immunogen and progesterone-11HS-ABEI conjugate

이러한 現象은 免疫原(immunogen) 合成時에 사용된 bridge group, 즉 hemisuccinate(HS)가 tracer 合成時에도 同一하게 사용되어, 특히 polyclonal 抗體가 progesterone은 勿論 bridge group인 HS도 인

지하기 때문에 생기는 소위 “bridging 現象”(Nordblom, 1979)의 結果라고 생각된다.

3. 發情週期中의 血漿, 全乳, 脫脂乳內 progesterone 濃度變化

1) 血漿內 progesterone 濃度 變化

發情週期中 血漿內 progesterone 濃度變化를 調査하기 위하여 發情週期가 비교적 일정한 Holstein 非妊娠牛의 頸靜脈으로 부터 30일간 2일간 間격으로 血液를 採取하여 progesterone의 濃度變化를 RIA 方法으로 測定한 結果는 Fig. 5와 같았다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 發情 2일전 0.9 ng/ml 이던 血漿內 progesterone 濃度는 發情後 8일까지 낮은 濃度를 維持하다가 그후 급격히 增加하기 시작하여 發情後 14일에 最高水準인 6.3 ng/ml, 18일에는 1.5 ng/ml, 20일에는 0.2 ng/ml로서 最低水準을 나타내었다.

이러한 結果는 發情期에 0.92 ng/ml, 黃體期에 4.57 ng/ml의 水準을 보고한 Wettmann 등 (1972)의 結果와 類似하였으나 1979년에 Battra 등에 보고한 結果보다는 다소 높은 것으로 나타났다.

2) 全乳內 progesterone 濃度 變化

發情週期中의 全乳內 progesterone 濃度 變化를 調査하기 위하여 5頭의 妊娠 및 非妊娠 Holstein 乳牛로

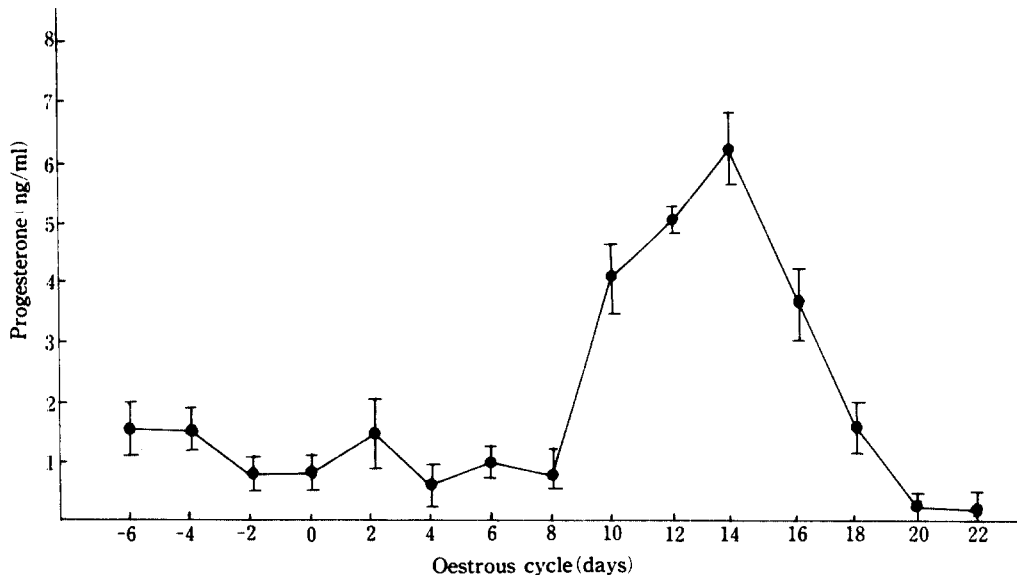


Fig. 5. Changes of progesterone levels in plasma during oestrus cycle

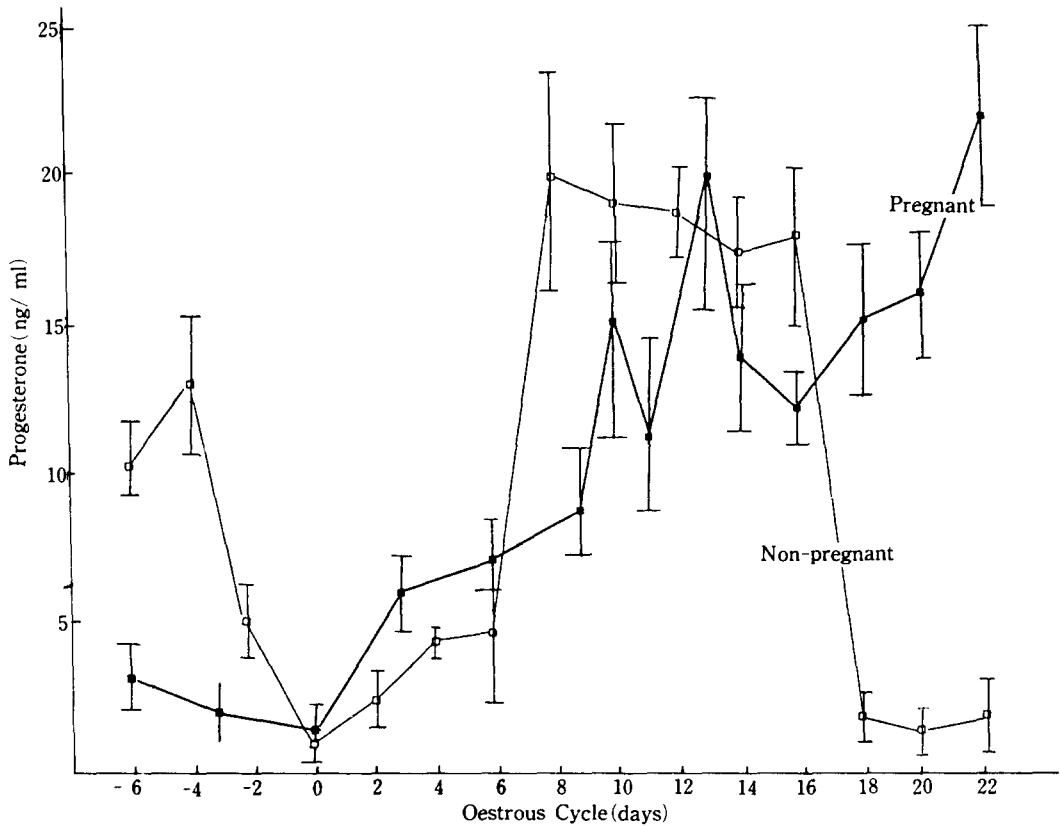


Fig. 6. Changes of progesterone levels in whole milk from non-pregnant and pregnant cows.

부터 午後搾乳(afternoon milking), 끝젖(last milk)을 30일간 2일 간격으로 採取 RIA로 調査하였던바 그 結果는 Fig. 6에서 보는 바와 같다.

Fig. 6에 나타난 바와 같이 妊娠牛의 경우 發情日에 1.0 ng/ml에서 점차 增加하기 시작하여 發情後 10일부터는 11 ng/ml~21 ng/ml까지의 높은 水準을 유지하였으며 發情後 22일에는 最高水準인 22 ng/ml의 높은 水準을 나타냈다.

非妊娠牛의 경우에는 發情日에 1.5 ng/ml로서 매우 낮은 水準을 유지하다가 갑자기 增加하기 시작하여 發情後 8일부터 16일까지 17.8~20.0 ng/ml로서 평균 18.6 ng/ml을 유지하였다.

이러한 結果는 1979년 Bulman이 보고한 發情期에 0~3 ng/ml, 黃體期에 23.1 ± 3.6 ng/ml과 類似한 結果를 보였으며, Allen 등이 1980년에 보고한 午後搾乳 전유내 progesterone 水準이 發情開始때에 2 ng/ml로 낮고 黃體期 동안에 10 ng/ml까지 增加하다가 發情

後17일경에 점차 減少하여 20일경에 最低水準을 나타냈다는 結果보다는 黃體期에 다소 높은 結果를 보였다.

또한 發情 18일 이후 妊娠牛와 非妊娠牛의 progesterone 濃度の 差異는 妊娠牛의 경우 平均 約 17.3 ng/ml, 非妊娠牛의 경우에는 약 1.7 ng/ml로서 대략 10배의 水準差異를 보였다.

3) 發情週期中의 脫脂乳內 progesterone 濃度 變化
發情期間中の 脫脂乳內 progesterone 濃度 變化를 調査하기 위하여 發情週期가 비교적 일정한 妊娠 및 非妊娠 Holstein 乳牛로 부터 午後搾乳 끝젖을 30일간 2일 간격으로 採取하여 3000 rpm에서 20분간 遠心分離하여 脂肪層을 제거한 試料를 사용하여 얻은 結果는 Fig. 7과 같다.

妊娠牛의 경우 發情開始때에 130~490 pg/ml로서 낮은 水準을 유지하던 脫脂乳內 progesterone 濃度は 점차 增加하기 시작하여 發情後 10일에 1300 pg/ml로

서 높은水準까지 도달하여 發情後 18일까지 990~1400 pg/ml까지의 높은水準까지 유지하였으며 發情後 22일에 1,650 pg/ml까지의 높은水準을維持하였다.

非妊娠牛의 경우 發情日에 脫脂乳內 progesterone 濃度는 160 pg/ml로 낮은水準을維持했으며 그후 점차增加하기 시작하여 發情後 8일에는 1250 pg/ml에 도달하여 16일까지 계속 높은水準을維持하다가 급격히減少하기 시작하여 發情後 18일부터는 240~450 pg/ml까지의 낮은水準을維持하였다.

이러한結果는 發情期에 140 pg/ml, 黃體期에 1860 pg/ml의 脫脂乳內 progesterone 濃度を 보고한 Pope 등(1976)의結果보다는 다소 낮았으나 1979년 Bulmann이 보고한 發情期에 120 pg/ml, 黃體期에 840 pg/ml의 progesterone 濃도보다는 다소 높은結果를 나타내었다. 發情 18일 이후 妊娠牛와 非妊娠牛의 脫脂乳內 progesterone 濃도 差異는 妊娠牛의 경우 평균 약 130 pg/ml로서 非妊娠牛의 경우 평균 약 340 pg/ml 보다 약 4배의 濃도차를 보였다.

또한 發情期의 脫脂乳內 progesterone 濃도는 평균 321 pg/ml로서 血漿內 progesterone 濃도인 평균 0.75 pg/ml의 40.6%였으며, 全乳內 progesterone 濃도인 평균 2.54 ng/ml의 12.6%에 불과한 것으로 나

타났다. 黃體期의 脫脂乳內 progesterone 濃도는 평균 1206 pg/ml로서 血漿內 progesterone인 평균 4.68 ng/ml의 25.7%, 全乳內의 progesterone인 평균 18.56 ng/ml의 6.4%로서 全乳와의 progesterone 濃도 差異가 가장 큰 것으로 나타났다.

4. CIA와 RIA의 比較

乳汁內 progesterone 濃도를 CIA方法으로 測定하는에 있어서 그 正確性を 알아보기 위해 同一한 試料를 두 方法, 즉 CIA와 既存의 測定方法인 RIA로서 脫脂乳內 progesterone 濃도를 測定하여 相互間의 相關關係를 調査하였던 바 Fig. 7과 Fig. 8에서 나타난 바와 같이 $r=0.914$ ($n=30$)의 相關關係를 보였다.

Fig. 7과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 CIA에 의해 測定된 脫脂乳內 progesterone 濃도의 變化는 RIA의 結果와 큰 差異가 없었으나, RIA에 비해 많은 시간과 노력, 즉 NaOH添加後 60°C에서 1시간 실온에서 30분간 追加反應後에 測定한다는 점과 測定器機가 自動化되지 않아 分析當 所要時間이 길다는 短點이 있다.

그러나 CIA에 있어서의 長點은 半減期가 짧은 放射性 同位元素를 labelling 한 tracer, 즉 ^3H -progesterone이나 ^{125}I -progesterone 보다 非放射性인 化學

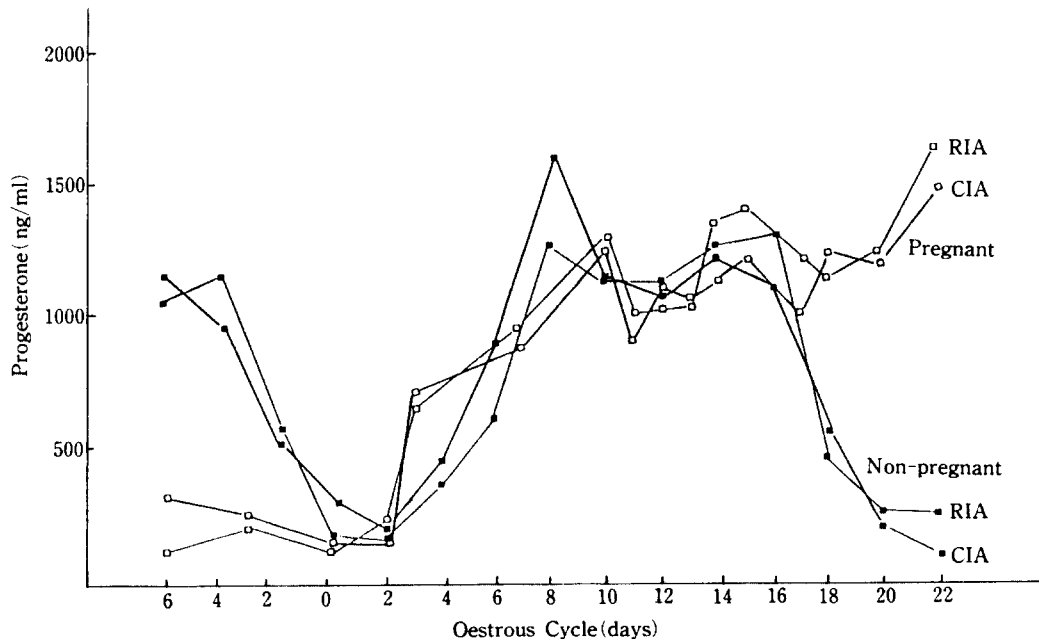


Fig. 7. Changes of progesterone levels in skim milk from non-pregnant and pregnant cows.

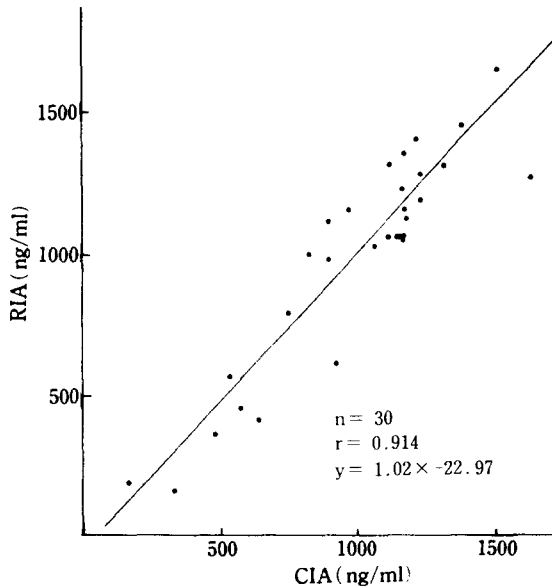


Fig. 8. Correlation between CIA and RIA for the assay of progesterone in skim milk.

發光體物質인 ABEI로 labelling 시킨 P-IIHS-ABEI의 安定性(stability)가 훨씬 좋을 뿐만 아니라 廢棄物 處理 및 健康上 해롭지 않기 때문에 特別한 免許가 필요하지 않다는 점이다. 따라서 分析해야 할 試料의 숫자가 많지 않거나, 최소한의 기초연구를 위한 방법으로는 충분히 사용할 수 있다고 思料된다.

IV. 摘 要

本 研究은 國立種畜院과 京畿道 南楊州郡의 個人 農場으로 부터 얻은 血漿과 乳汁은 發情前 5일부터 시작하여 2일 간격으로 30일간 採取하여 RIA와 CIA로 血漿, 全乳 그리고 脫脂乳內의 progesterone을 測定하여 發情週期中的 progesterone 濃度 變化를 調査하였으며, 아울러 RIA와 대체할 수 있는 非放射性 免疫 分析法인 CIA 方法의 適用可能性을 調査하기 위하여 脫脂乳內 progesterone을 CIA와 RIA로 동시에 測定하였던 바 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 血漿內 progesterone 水準은 發情後 8일까지 낮은 水準을 維持하다가 그후 급격히 增加하여 發情後 14일에 最高水準인 6.3ng/ml에 도달하였다. 그후 減少하기 시작하여 發情後 16일에는 3.6ng/ml, 18일에는

1.5ng/ml, 20일에는 2.2ng/ml로서 最低水準을 나타냈다.

2. 妊娠牛의 全乳內 progesterone 濃度는 發情日에 0.1ng/ml에서 점차 增加하기 시작하여 發情後 10일부터는 11ng/ml~21ng/ml까지의 높은 水準을 계속 維持하였다.

3. 非妊娠牛의 경우 全乳內 progesterone 濃度는 發情日에 1.5ng/ml로서 낮은 水準을 나타냈으며 發情後 6일부터는 갑자기 增加하기 시작하여 發情後 16일까지 17.8~20.0ng/ml까지의 높은 水準을 維持하다가 18일 이후부터는 1.4ng/ml로서 낮은 水準을 維持하였다.

4. 脫脂乳內 progesterone 水準은 妊娠牛의 경우 發情開始때에 130~490pg/ml로서 낮은 水準을 維持하다가 發情 10일 이후에는 990~1650pg/ml까지의 높은 水準을 계속해서 維持했다.

5. 非妊娠牛의 경우 脫脂乳內 progesterone 濃度는 發情日에 160pg/ml로서 낮은 水準을 維持하다가 發情後 8일부터 16일까지 1050~1300pg/ml까지 높은 水準을 오르내렸다. 그후 脫脂乳內 progesterone 濃度는 240~450pg/ml의 낮은 水準으로 나타났다.

6. 脫脂乳內 progesterone 濃度を CIA와 RIA 方法으로 동시에 測定하여 相關關係를 調査하였던 바 좋은 相關關係($r = 0.914$)를 보였다.

V. 引用文獻

1. Allen, S.K., M.R. Redshaw and R. Holdsworth. 1980. A comparison of titrated and iodinated tracers in the Radioimmunoassay of progesterone in the cow milk. J. Reprod. Fertil. 58: 89-93.
2. Arnstadt, S.K. and W.F. Cleere, 1981. Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cow. J. Reprod. Fertil. 62: 173-189.
3. Batra, S.K. R.C. Arora, N.K. Bachalus and R.S. Pandey. 1979. Blood and milk progesterone in pregnant and nonpregnant buffalo. J. Dairy Sci. 52: 1390-1393.
4. Bulmann, D.C. 1979. The measurement of

- progesterone in milk. *Brit. Vet. J.* 135: 460-461.
5. Foote, R.H., E.A.B. Oltenacau, H.L. Kummerfeld, R.D. Smith, P.M. Piek and R. K. Broun. 1979. Milk progesterone as a diagnosis aid. *Brit. Vet. J.* 135: 550-558.
 6. Kim, J.B. 1983. Development of chemiluminescence immunoassay for the measurement of plasma steroid and urinary steroid glucuronides. Ph. D. thesis, University of London, UK.
 7. Kohen, F., M. Pazzagli, J.B. Kim, H.R. Linder and R.C. Bouslask. 1979. An assay procedure for plasma progesterone based on antibody-enhanced chemiluminescence. *Febs Letters*. 104(1): 201-205.
 8. Nakamura, R.M. 1979. Recent advances in immunological fluorescent analytical methods, In "Immunoassays in the clinical laboratory" Alan R. Less. Ins., New York, p. 211-226.
 9. Nordblom, G.D., R.E. Counsell and B.G. England. 1979. Ligand specificity and bridging phenomena in hapten radioimmunoassay. *The Ligand Quar.* 2(4): 34-36.
 10. Pazzagli, M., J.B. Kim, G. Messeri, F. Kohen, F. Franceschetti, G. Monet, R. Salero, A Tommasi and M. Serio. 1981. Evaluation of different progesterone-isoluminol conjugates for chemiluminescence immunoassay. *Clinica Acta*. 115: 277-286.
 11. Pope, G.S., I. Majlik, P.J.H. Ball and J. D. Leaver. 1976. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Brit. Vet. J.* 132: 497-506.
 12. Stanley, C.J., A Johnson and C.H. Self. 1985. Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassays. *J. Immunol. Meth.* 83: 89-95.
 13. Weekmann, B.K.V. and A.H.W.M. Schuurs. 1975. The influence of heterologous combinations of antiserum and Enzyme-labelled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme immunoassays. *Immunochem.* 12: 667-670.
 14. Weetemann, R.P., H.D. Hafs, L.A. Edgerton and L.V. Swanson. 1972. Estradiol and progesterone in blood serum during the bovine estrus cycle. *J. Anim. Sci.* 34(6): 1020-1024.