

## 혈청 Progesterone 측정을 위한 효소면역분석법 개발에 관한 연구

김정우·이옥연

단국대학교 농과대학

### Studies on Development of Microplate-EIA for the Determination of Serum Progesterone

Kim, J. W. and O. Y. Lee

College of Agriculture, Dankook University

#### SUMMARY

A simple and sensitive microplate enzyme immunoassay(EIA) was developed for the determination of progesterone concentration in serum, 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 5 pg-120 pg /well and intra- and inter-assay coefficients of variation for progesterone standard curve (1.0ng~10.0ng /ml) were ranged 2.5~9.9% and 1.7~8.0%, respectively, determination coefficient of the regression equation of our standard curve( $R^2=0.990\pm 0.007$ ) were high, and this is the same level as that of commercial kit (Hormonost Bio-Lab, Germany,  $R^2=0.98\sim 0.99$ ). The progesterone concentration of serum determined by both kits (Work & Bio-Lab) were significantly correlated ( $r=0.95$ ,  $P<0.01$ ) although a little higher value were resulted in our kit than that of commercial kit.

It generally is these results indicated that the microplate-EIA can be used for the determination of progesterone in serum, as well as, for the determination of the early pregnancy diagnosis.

#### I. 서 론

현재까지 가장 보편적으로 사용하고 있는 난소기능 촉진 방법은 estrogen이나 progesterone의 농도를 측정하는 것이며, 발정감지 및 임신진단의 판정여부는 plasma 및 milk내 progesterone 수준에 의해 확인할 수 있다. Progesterone 농도의 측정에 관해서는 국내 여러 연구자들에 의해서 실시되고 있다. 그러나 측정에 이용된 방법은 대부분 RIA (radioimmunoassay. Collins and Hennam, 1976)법에 준하여 이루어지고

있는 실정이다. 더우기 이 측정법은 radioisotope의 취급에 대한 위험성과 많은 경비를 필요로 한다는 점에서 산업화에 활용하기에는 여러가지 문제점을 갖고 있어(Arnstadt, 1984) 이런 난점에 대한 보완대책으로 개발된 방법이 효소를 marker로 이용한 Enzyme immunoassay(EIA) 방법이다(Schurs and Van Weeman, 1977; Arnstadt, 1983; Arnstadt and Adamopoulou, 1982).

EIA 측정법의 민감도, 재현도, 기자재의 가격, 측정에 소요되는 비용들이 RIA법에 비해 많은 이점이 있으므로 해외연구자들은 EIA법의 표준화에 관한 개발

\* 이 논문은 1993년도 동물자원연구센터 지원연구비에 의하여 수행되었음.

연구에 더 많은 관심을 갖고 있다(Karg, 1984).

본 실험실에서는 정확도 및 재현도가 매우 높은 milk progesterone 양적 측정용 임신진단 kit (MPT Kit)를 개발한 바 있다(김 등, 1990). 이 kit의 측정 정확도는 해외에서 시판중인 Bio-Lab사(Germany)의 'Hormonost progesterone'kit(정밀측정용)와 비교한 결과 높은 상관도( $r=0.95$ ,  $P<0.01$ )를 보여주고 있다.

한편, 해외에서 시판 중인 대표적인 제품들과 Bio-Lab사 제품과의 정확도 비교에서 Ovucheck (Cambridge vet. Science, GB.)는 84.3%, Progestassay (Pitman-Moore, USA)는 78.1% Reprostrip(Nochtech, Island)는 83.9%, Enzygnost (Hoechst, IQ<Bio>UK)는 78.5%로서 측정의 정확도가 낮은 것으로 보고되었다(Sobiraj et al., 1989).

이들 진단 kit들은 반정량 측정법으로 측정의 정확도가 낮아서 현장에서 직접 사용하기에는 아직 더 개발되어야 할 것으로 판단된다. 그러나 본 실험실에서 개발된 진단 kit는 시판중인 상기의 진단 제재들 보다 측정 정확도(95%)가 높기 때문에 임상시험에서 우수한 결과가 있을 것으로 추정된다.

한편, 이 kit는 milk progesterone의 농도반응만을 측정할 목적으로 제작된 임신진단 kit로서 젖소에서는 활용이 가능하나, 乳生産이 불가능한 처녀소와 육우 및 기타 축종에서는 사용이 불가능했다.

따라서, 본 연구는 과학재단의 연구비 지원에 의해 serum progesterone kit를 개발하기 위한 선행과제로서 이미 자체개발된 milk progesterone 측정과정의 원리를 응용하여, 혈청내 progesterone 농도 측정법을 정립하고, 산업에서의 실제 응용 및 학문 연구에서의 활용을 목적으로 그 가능성을 타진하고자 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Progesterone 단일클론항체 및 특이성

단일클론항체의 생산은 김 등(1990)에 보고한 방법으로 생산된 항체를 사용하였으며, progesterone 단일클론 항체의 specificity를 RIA법으로 조사하였던 바, 11-hydroxyprogesterone, 11-hydroxyproges-

terone, deoxycorticosterone과 corticosterone과는 2%미만으로 낮은 교차반응을 나타내었다. 또한 cortisol, testosterone, estradiol과 androsterone등과는 반응정도가 0.1% 이하로 거의 교차반응을 나타내지 않았으나, 17-hydroxyprogesterone 및 20-hydroxyprogesterone과는 각각 5.9%, 33.9%로 다소 높게 나타난다. 20-hydroxyprogesterone은 혈액 및 우유중에 거의 함유되어 있지 않으므로 progesterone 측정을 위한 면역분석에 이 항체를 사용하였다.

## 2. Progesterone 측정을 위한 Microplate EIA 과정

### 1) Buffer와 Solution의 제조

Assay buffer는  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.04M), NaCl (0.15M), BSA(0.1%)와 Thimerosal (0.02%)를 증류수(pH 7)에 용해하여 사용하였으며, Washing buffer는 Tween20을 PBS(0.05M, pH7.4)에 혼합하여 최종농도가 0.05%로 조정 한 후 사용하였고, coating buffer는  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.015M,  $\text{NaHCO}_3$  0.035M과 Thimerosal 0.02%를 증류수 1,000 ml에 용해하여 조제하였다.

Substrate buffer는 NaAc,  $3\text{H}_2\text{O}$  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%  $\text{H}_2\text{O}$   $100\mu\text{l}$ 를 25ml의 substrate buffer와 사용직전에 혼합하여 사용하였다. TMB stock solution은 300mg의 TMB를 50ml DMSO에 용해시킨 후 암실에 보관하면서 사용하였다.

### 2) 단일클론 항체의 피복

Coating buffer로 평형시킨 항체를 microplate의 각 well에  $200\mu\text{l}$ 씩 분주하여 4℃에서 overnight incubation 시킨 후 이를 제거하고, 0.3% BSA  $300\mu\text{l}$ 를 분주한다. 실온에서 30분간 방치한 다음 세척액(0.05% Tween 20)으로 충분히 세척한 후 4℃에 보관하면서 사용하였다.

### 3) HRP-Progesterone(HRP-P)의 작성

Progesterone-3-CMO 5mg, Dicyclohexyl car-

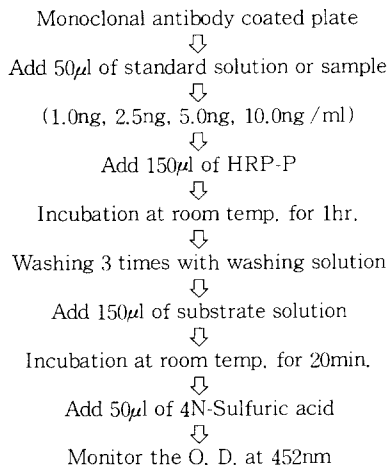
bodimide(DCC) 2.768mg과 N-Hydroxy- Succinimide(NHS) 1.45mg을 N,N-Dimethylformamide(DMF) 0.5mg에 용해시켜 실온에서 2시간 동안 활성화 시킨 다음 원심분리(2,500rpm, 10min)하여 progesterone ester 로 취한다. 미리 용해한 HRP 4mg을 0.2ml의 progesterone ester와 혼합하여 실온에서 2시간 반응시킨 다음 urea 제거 후 3일간 투석시킨 후 sephadex G25 column을 이용하여 유리 progesterone을 제거한 뒤 10% BSA용액을 최종농도가 0.1%가 되도록 첨가하여 -20℃에 보관하면서 측정에 사용하였다.

#### 4) Progesterone standard의 작성

Progesterone의 표준농도는 10mg의 progesterone (Sigma, PO 130)을 정량하여 ethyl alcohol에 용해시킨 후, progesterone 농도가 1000ng/ml이 되도록 유리병에 분주하여 incubator에서 증발시킨다. 표준농도의 범위는 10ng/ml로 부터 1.0ng/ml에 이르기까지 측정 목적에 따라 progesterone이 제거된 serum으로 희석하여 작성하였다.

#### 5) 측정과정

혈청 중의 progesterone분석은 Van de Wiel (1983)의 방법과 김 등(1990)에 준하여 Fig. 1과 같이 enzyme immunoassay(EIA)법으로 실시하였다.



**Fig. 1. Microplate EIA procedure for the determination of serum progesterone concentration.**

### 3. 혈청 sample의 채취 및 임신조기진단

Sample의 채취는 농촌진흥청 산하 축산시험장(수원)에서 사육되고 있는 2~5산의 한우 20두를 공시하였다. 사양관리는 N. R. C. 사양표준관리에 의거 목장의 일상 관리에 준하였고, 공시우의 발정주기는 20~22일로 비교적 일정하였다. 혈청 sample은 혈청 내 progesterone의 농도를 측정하기 위하여 인공수정 당일 부터 1주일 간격으로 4주간 채취하였다. 혈액은 경정맥 및 미정맥에서 채혈, 3,000rpm에서 30분간 혈청을 원심분리하여 분석할 때까지 -20℃에 냉동보관하였고, 분석직전 30~35℃에서 용해한 후 progesterone의 양적측정에 이용하였다. 임신진단의 판정은 김 (1989)의 방법(Two sample assay법)에 의거하여 실시하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. HRP-P Conjugate의 합성과 특성

HRP 효소로 표지된 항원, 즉 HRPP는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 산화반응 조건하에서 substrate인 TMB를 반응시킨 결과 발색반응이 효과적으로 나타났으며, ELISA-reader(452 nm)에서 1pg/well까지 측정이 가능하였다.

### 2. 항체와 HRP-P의 농도별 반응조사

Conjugate인 HRP-P(20ng/well)와 항체와의 반응여부 및 standard curve 작성을 위한 항체 및 HRP-P의 적정 희석농도에 대한 titer를 결정하기 위하여 progesterone monoclonal 항체의 희석배율을 1:2500, 1:3500, 1:4000, 1:4500배로 microtiter plate에 각각 coating시킨 후, assay buffer 및 50pg/well의 농도를 가진 progesterone과 반응시킨 결과는 Fig. 2와 같다.

HRP-P의 농도를 20ng/ml로 고정시킬 경우나 5ng/ml로 고정시킬 경우에 반응의 50%가 되는 항체의 적정 희석치는 모두 1:3500으로 나타났다. 따라서 표준농도곡선의 작성시에는 1:3500으로 희석된 항체와 HRP-P의 농도를 5ng/well로 고정하여 이용하였다.

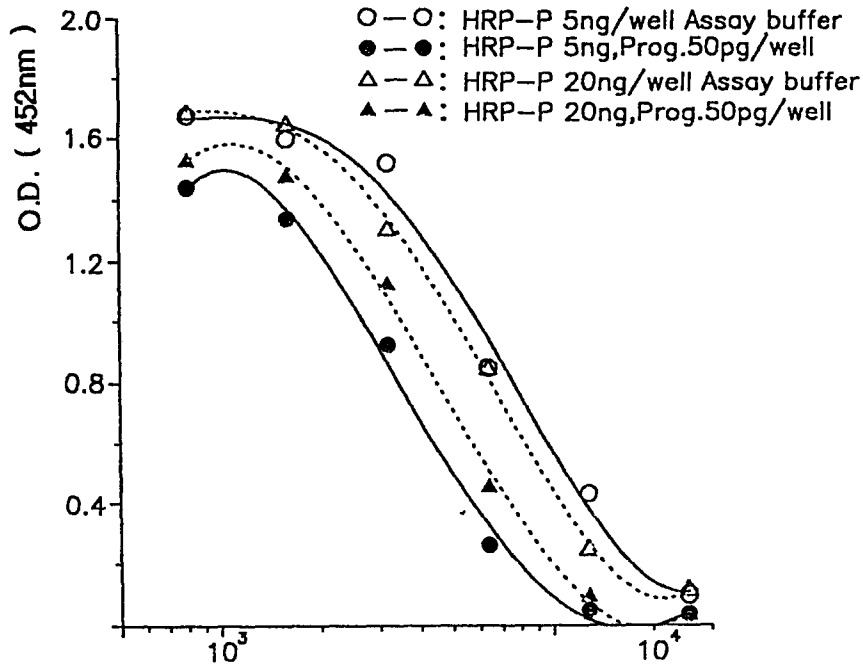


Fig. 2. Titration curves of different anti-progesterone monoclonal antibody with amount of HRP-P and it's authentic progesterone.

### 3. Standard curve의 작성

본 실험실에서는 혈청 내 progesterone 농도에 대한 측정방법 확립에 목적을 두고 Fig. 2에서 이미 제시된 curve의 급경사 부분만을 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

Fig. 3은 progesterone 농도의 범위를 100~1000pg/well로 하여 HRP-P(5ng/well)와 반응한 정도를 나타낸 표준곡선이다. Progesterone의 각 표준농도를 ml당으로 환산하게 되면 농도범위는 1.0ng, 2.5ng, 5.0ng, 10.0ng/ml이 되며, 이 범위는 정상적인 serum 중의 progesterone 함량의 농도수준을 포함하는 범위가 된다.

이 표준곡선에 대한 회귀방정식은  $\text{Log} = 3.57 + 9.91X - 2.46X^2$ 이며, 결정계수( $R^2$ )는 0.997로써 매우 높게 나타났다.

### 4. 측정법(Microplate-EIA)의 재현도 및 정확도 검사

Fig. 3에서 제시된 표준곡선에 의하여 progesterone 양적측정시 측정의 정확도를 검사하기 위하여 이들에 대한 Intra-assay와 Inter-assay를 반복 실시하였던 바 Table 1에 제시한 바와 같이 Intra-assay에서는 변이계수(C.V.)의 분포가 2.5~9.9% 수준으로 나타났으며, 특히 progesterone의 농도가 1.0ng/ml 이상에서는 4% 이하의 수준을 보여 측정치에 대한 높은 정확도를 보여주고 있다. Inter-assay의 경우, 변이계수의 분포는 1.7%~8.0%로 나타났으며, progesterone의 농도가 2.5ng/ml 이상과 1.0ng/ml 이하의 수준에서 더욱 높은 측정의 재현도를 보여주고 있다.

한편, Prakash 등(1987)은 substrate로써 TMB와 polyclonal antibody를 이용하여 second antibody technique를 개발하였으며, 이에 대한 정확도(precision)는 inter-assay의 경우 5.2%~5.4%이었으며, intra-assay의 경우 6.0%~9.5%로 보고된바 재현도 및 민감도가 높은 것으로 나타난다. 그러나 이 방법을 이용하여 sample을 분석할 경우 분석의 소요

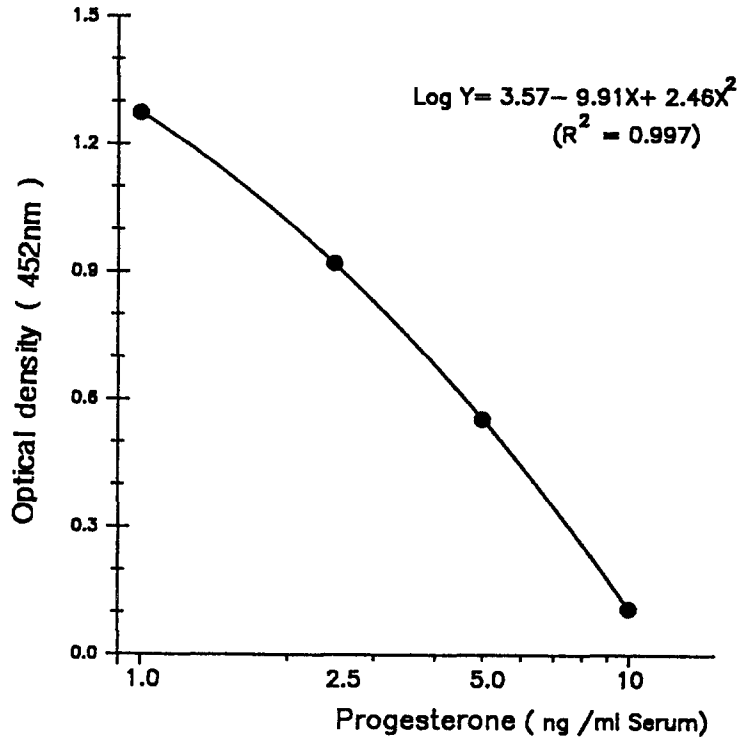


Fig. 3. Standard curve for enzyme-linked immunosorbent assay of serum progesterone

Table 1. Repeatability of serum progesterone standard in microplate EIA

Sample(ng /ml)	Number of determination	O.D. ± SD*	C.V.(%)**
Intra-assay variance			
10.0	8	0.4 ± 0.01	2.5
5.0	8	0.5 ± 0.02	2.8
2.5	8	0.6 ± 0.15	2.5
1.0	8	0.7 ± 0.03	3.8
0.0	8	0.9 ± 0.09	9.9
Inter-assay variance			
10.0	8	0.2 ± 0.03	1.7
5.0	8	0.4 ± 0.03	7.4
2.5	8	0.6 ± 0.04	8.0
1.0	8	0.8 ± 0.05	6.2
0.0	8	1.2 ± 0.03	2.4

\* O.D. : Optical density(452 nm) \*\* C.V. : Coefficient of variation(%)

시간이 길며, 사용되는 sample의 최적용량이 극미량(2ng/ml)인 것으로 보고되었다. 따라서 상기 분석법을 이용할 경우 sample 주입에 많은 경험과 숙달된

실험자가 필요하며, 항체를 두번 피복시키기 때문에 sample 측정시 많은 시간이 소요될 뿐만 아니라, 소규모 실험실에서 이용하기에는 다소 어려울 것으로 생각

된다.

본 측정법의 정확도는, sample 주입에 따른 실험오차가 적기 때문에 progesterone의 정량법으로 효율적 이용이 가능한 것으로 판단된다.

### 5. 자체 개발된 측정법과 해외에서 시판중인 KIT와의 정확도 비교검사

자체개발 kit에서의 표준농도곡선에 대한 R<sup>2</sup>값은 0.97~0.99로 매우 높게 나타났으며, 독일의 Bio-Lab 제품인 <BRG-kit, Hormonost Progesterone Mikrotiter ELISA> kit의 표준농도곡선의 R<sup>2</sup>값의 범위는 0.98~0.99로써 Fig. 4에서와 같이 자체개발 kit(DKP-kit)의 정밀도와 유사한 것으로 나타났다.

각각의 kit로 serum progesterone의 농도측정을 실시한 결과 이들간의 농도차이는 sample중 progesterone 농도의 고저에 따라 다소의 차이는 있었으며, 임신진단을 위한 기준치 범위인 1.0~10.0ng/ml에서는 자체개발 kit에서 약간 높은 수준을 보였다. 두 kit간의 농도에 대한 상관계수는 0.96으로써 매우 높은 상관도를 나타냈다. (Table 2.)

Sobiraj 등 (1989)의 비교 연구에서, 상품화된 임신진단 kit의 정확도를 비교실험한 결과 이들의 정확도의 범위는 75%~84%로써 낮은 것으로 보고하였다. 본 연구의 결과를 Sobiraj 등의 결과와 비교하면 자체개발된 kit의 측정 정확도는 매우 우수한 것으로 판명되었다.

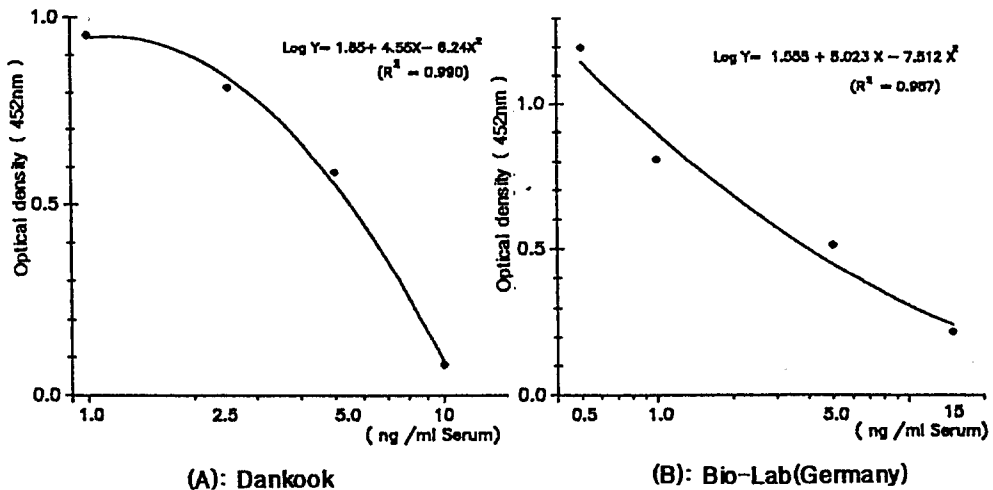


Fig. 4. Standard curve for the determination of progesterone concentration of serum sample in microplate-EIA

Table 2. Progesterone concentration for the early pregnancy diagnosis according to the methods of BRG & DKP

Classification	BRG	DKP**
	P* level (ng/ml)	P level (ng/ml)
Pregnant	9.31 ± 0.67	11.12 ± 1.08
Non-Pregnant	3.35 ± 0.54	4.56 ± 0.89
R <sup>2</sup>	0.99	0.97

\* P : Progesterone \*\* DKP : Dankook microplate

### 6. Microplate-EIA kit의 경제성 조사

Progesterone 측정용 kit를 이용하여 혈액 내 progesterone 농도를 조사하는데 있어, 소요되는 품목과 그에 따른 고정비 지출에 대한 경제성 조사를 실시한 바 다음과 같다. 진단 kit에 소요되는 시약 및 일회용 제재 등의 가격은 관세 및 환율과 구입량에 의해 변동될 수 있다. 본 경제성 분석은 US dollar를 1,200원으로 고정하여 실시하였다. Microplate (96 well) 당 소요되는 경비는 1,998원으로 산출되었으며, 이를 well 당으로 환산하면 21원이 소요되는 것으로 나타났다.

다. 현재 수입되고 있는 진단용 plate의 가격은 well당 1,450(1 sample)원, plate당 139,200원으로 판매되고 있다. 그러나, 본 진단 kit에 산출된 소요경비는 노동비, 피복항체(monoclonal antibody)의 생산단가, 표준용액(standard Sol.), 그리고 생산규모에 따른 변동요인이 감안되지 않는 경비가기 때문에 평균비용의 변화폭은 다소 상승하는 경향을 나타낼 것으로 생각된다. 따라서 plate당 소요되는 평균비용의 지출 상승을 억제하는 요인으로써 plate의 대량생산으로 인한 단가의 감소를 취할 수 있다.

### 7. 혈청 내 Progesterone 농도변화

본 실험실에서 정립된 방법에 의거, 혈청내 progesterone의 시기적 농도변화를 조사하기 위하여 인공수정 당일부터 한우의 경정맥 으로부터 3주간 1주간격으로 혈청을 채취하여 progesterone의 농도변화를 EIA법으로 측정된 결과는 Fig. 5에서와 같았다.

본 연구에서 직장검사 후 임신우로 판명된 Cow No. 4058, 4078, 4092의 혈중 progesterone 농도 수준은 수정당일 <0.17~0.28ng/ml>, 1주 <5.82~6.43ng/ml>, 2주 <7.63~8.44ng/ml>, 3주 <9.57~10.42ng/ml>를 나타냈다. 이러한 결과는 발정기(수정당일)에 0.2ng/ml, 수정후 13일에 3.6ng/ml, 28일에 10.8ng/ml의 수준을 보고한 Batra 등 (1978)의 결과와 유사하였다.

임신우로 판명된 Cow No. 4053의 농도수준은 수정당일 <0.18ng/ml>부터 1주 <0.25ng/ml>까지는 매우 낮은 수준을 유지 하였고, 2주에서는 0.07ng/ml로 급상승 하였다가 그 이후 다시 감소하여 4.78ng/ml 수준으로 저하되었다. 이 우의 불임원인은 '排卵遲延現狀'으로 추정된다. 한편, 비임신된 Cow No. L-06의 경우 수정당일 부터 3주까지 매우 낮은 농도수준을 보이는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 '卵巢機能異狀'으로 추정된다.

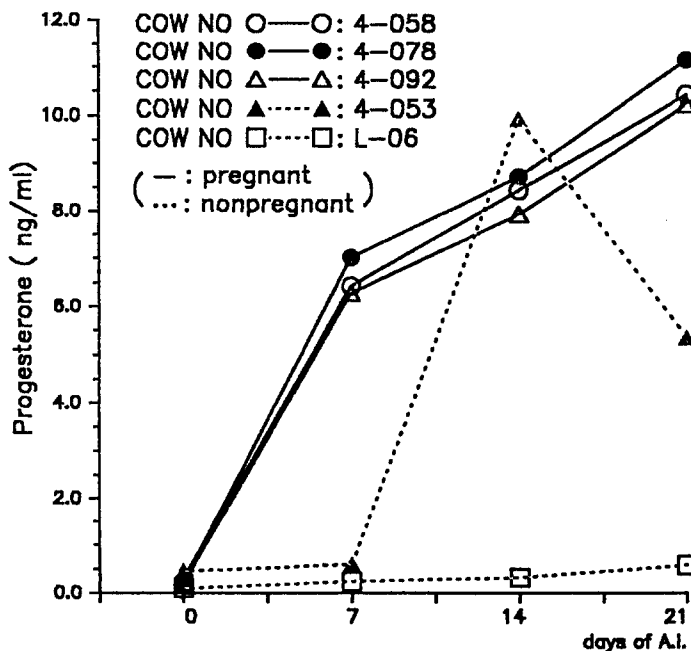


Fig. 5. Serum progesterone concentration in pregnant and non-pregnant cows during 4 weeks after A. I.

## IV. 적 요

본 연구는 progesterone 단일클론 항체와 비발암성 물질인 TMB를 이용하여, 고가의 시설과 장소를 요하지 않고 간편하게 활용할 수 있는 혈청내 progesterone 정량을 위한 면역분석법(Microplate-EIA)을 확립하는데 있으며, 이를 이용하여 지속적인 유생산이 불가능한 축종의 혈청내 progesterone의 농도를 측정하여 산업에서의 실제응용 및 학문연구에서의 활용 가능성을 타진하고자 실시하였다.

1. Progesterone의 표준농도를 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 ng/ml로 고정하고, 이를 492 nm 에서 O.D. 가를 측정하여 표준농도곡선을 작성한 결과, 결정계수(R<sup>2</sup>)는 0.997로 매우 높았다. 반복측정 시 intra-assay 및 inter-assay에 대한 변이계수(C.V.%)는 각각 2.5~9.9% 와 1.7~8.0% 로서 측정의 정확도가 양호한 수준으로 나타났다.
2. 자체개발 kit에서의 표준농도에 대한 R<sup>2</sup>값은 0.97~0.99 이었으며, Bio-Lab제품(독일)의 R<sup>2</sup>값은 0.98~0.99로서 이들간의 정밀도는 유사하였다. 각각의 kit로 측정된 progesterone 농도간의 상관계수는 0.96 으로서 높은 상관도를 나타냈다.
3. 한우의 혈청내 progesterone 농도를 조사한 결과 임신우의 경우 발정당일 0.17~0.28 ng/ml, 1주, 2주, 3주 각각 5.82~6.43 ng/ml, 7.63~8.44 ng/ml, 9.57~10.42 ng/ml 로 나타났다.
4. 자체개발된 면역분석법(Microtiter-EIA)으로 측정에 소요되는 평균 고정비(average fixed cost)는 노동비와 기자재 이용비 및 항체의 가격을 제외할 경우 sample 당 약 23원으로 산출되었다.
5. 자체개발된 면역분석법(Microtiter-EIA)은 측정의 민감도, 정확도 및 재현도가 높은 것으로 나타났다. 따라서 임신조기진단 및 난소기능 측정에 간편하고 저렴하게 이용할 수 있는 kit 개발의 가능성이 높은 것으로 판단된다.

## V. 인용문헌

1. Amara Vinijsanun, L. Martin, D. Y. Wang and Vera E. Fantl. 1990. Effect of a monoclonal antibody against progesterone, on embryo transport, development and implantation in laboratory mice. J. Reprod. Fertil. 2 : 395-405.
2. Andrew, J and W. F. John. 1982. Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. Academic Press.
3. 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. 151-183.
4. Chang-boo Kang, Jong-uk Shin, Sang-yong Choe. 1988. Studies on enzyme immunoassay for determining progesterone of bovine plasma and it's clinical application : I. Optimizing double antibody for progesterone in enzyme immunoassay. J. Vet. Res. 28(2) : 321-325.
5. Collins, W. P. and J. F. Hennam. 1976. Radioimmunoassay and reproductive endocrinology, In : Molecular aspects of medicine. H. Baum & J. Gergely, Pergamon Press.
6. Engval E., P. Permann. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) Quantitation assay of immunoglobulin G. Immunochimistry. 8 : 871-874.
7. Engval E., P. Permann. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) Quantitation of specific antibodies by Enzyme-labelled anti-immunoglobulin antigen coated tubes. J. Immunology. 109 : 129-135.
8. Eshhar, Z., J. B. Kim, G. Barnard, W. P. Collins, S. Giland, H. R. Lindner, F. Kohen. 1981. Use of monoclonal antibodies to pregnameidiol-glucuronide for the development of solid phase chemiluminescens. J.



- Immunoassay Steroids 38 : 89-109.
9. Engvall E., A.J. Pesce. 1978. Quantitative enzyme-immunoassay. Second J. immunol. 8.
  10. 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.
  11. Heap R. B., M. Gwyn, J. A. Laing and D. E. Walters. 1973. Pregnancy diagnosis in cows : Changes in milk progesterone concentration during the oestrous cycle and pregnancy measured by rapid radioimmunoassay. J. Agri. Sci. 81 : 151-157.
  12. Kang C. B., Y. H. Kim. 1990. Characteristic and application of monoclonal antibody to progesterone. I. Production of monoclonal antibody to progesterone. Korean J. Vet. Sci. 30(4) : 511-513.
  13. Kang C. B., J. S. Kim. 1991. Characteristic and application of monoclonal antibody to progesterone. II. Development of progesterone enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA). Korean J. Vet. Sci. 31(4).
  14. L. A. Hinds and L. Selwood. 1990. Plasma progesterone concentrations during pregnancy in the dasyurid marsupial, antechinus stuartii. J. Reprod. 2 : 61-70.
  15. Marcus G. T., A. J. Hackett. 1986. Use of Enzyme-Linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extraction. J. Dairy Sci. 69(3) : 818-824.
  16. Munro C., G. Stabenfeldt. 1984. Development of microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. J. Endocrin. 101 : 41-49.
  17. Nakao T., A. Sugihashi, Y. Ishibashi. 1982. Use of milk progesterone enzymeimmunoassay for early diagnosis in cow. Theriogenology. 18 : 267-274.
  18. Park J. H., E. Moestl and E. Banaberg. 1992. Development of microtitre plate enzymeimmunoassay for progesterone. J. Animal Reprod. 16(3):231-237.
  19. Pennington J. A., S. L. Spahr and J. R. Lodge. 1977. Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in milk. J. A. B. A. 45(3) : 176.
  20. Peters Ar., G. E. Lamming. 1986. Regulation of ovarian function in the post partum cow : An endocrine model. Vet Rec. 118 : 236-239.
  21. Porstmann B., E. Nugel and U. Evers. 1985. Which of the commonly used marker enzyme gives the best results in colorimetric and fluorimetric immunoassays : horseradish peroxidase or galactosidase. J. Imm. Methods. 79 : 27.
  22. P. T. Feltcher. 1989. Plasma progesterone and body weight in the pregnant and non-pregnant Kowari. J. Reprod. Fertil. 1 : 65-74.
  23. Van Weemen B. K., A. H. W. M. Schuur. 1971. Immunoassay using antigen enzyme conjugates. FEBS letters. 15 : 232-236.
  24. Van Wyk, V. 1991. Plasma progesterone-binding proteins in the cape porcupine. University of Pretoria.
  25. White A. 1983. Monoclonal antibodies for steroid immunoassay. In : Immunoassay for clinical chemistry. Cuurchill Livingstone. 339-345.
  26. 강병규, 최한선, 이정길. 1990. 한우의 번식효율 증진에 관한 연구 : Progesterone농도 측정에 의한 조기임신진단. 대한수의학회지. 30 : 249-253.
  27. 강정부, 김용환. 1990. Progesterone 단크론성 항체에 관한 특성 및 활용에 관한 연구 : 단크론성 항체의 생산. 대한수의학회지. 30(4) : 511-514.
  28. 강정부, 이효종, 최상용. 1991. 소의 조기 임신진단 kit의 개발. 2. 조기 임신진단 kit의 개발. 대한수의학회지. 31(2) : 223-228.
  29. 강정부, 신종욱, 최상용. 1989. Enzyme immunoassay(EIA)에 의한 소의 Progesterone 측

- 정과 이의 응용에 관한 연구 : Progesterone 측정에 대한 효소면역법 측정방법의 확립. 대한수의학회지. 29(1) : 21-26.
30. 김정우, 김종배, 정길생, 고대환. 1990. Progesterone에 대한 단일클론항체 생산과 그 이용에 관한 연구. 과학재단 최종보고서.
31. 김정우. 1989. Milk progesterone test(EIA)에 의한 임신 조기진단의 정확도 향상에 관한 연구. 가축번식학회지. 13(3) : 149-156.
32. 김정우. 가축의 임신진단 및 난소기능측정을 위한 면역분석법개발과 그 산업적 응용. 과학재단보고서.
33. 김정우, 홍승욱. 1990. 단일클론항체를 이용한 Milk progesterone test(EIA) 측정법의 개발과 이에 의한 소의 발정 및 임신조기 진단의 정확도 향상에 관한 연구. 번식학회지. 14(3) : 165-174.
34. 한찬규, 이남형, 박연진. 1989. 한우의 번식실태 조사. 한국번식학회지. 13 : 1-6.