

한우의 임신 초기 혈장단백질 발현 양상 분석

김평희^{1,2}, 배성훈^{1,2}, 오석두³, 고응규¹, 양병철¹, 김명직¹, 진동일², 성환후¹, 황성수^{1,*}

¹농촌진흥청 축산과학원 응용생명공학부, ²충남대학교 축산학과, ³국립진주산업대학교 동물생명공학과

Proteomic Analysis of Plasma Protein during Early Pregnancy in Korean Native Cattle (Hanwoo)

Pyung-Hee Kim^{1,2}, Seung-Hoon Bae^{1,2}, Seok-Doo Oh³, Yeoung-Gyu Ko¹, Byoung-Chul Yang¹, Myung-Jick Kim¹, Dong-Il Jin², Hwan-Hoo Seong¹ and Seongsoo Hwang^{1,*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, Suwon, Gyeonggi-do 441-706, Korea

²Division of Animal Science & Resources, Chungnam University, Daejeon 305-764, Korea

³Dept. of Animal Science and Biotechnology, Jinju National University, Jinju, Kyongnam 660-758, Korea

ABSTRACT

This study was performed to identify and analyze the specifically expressed plasma proteins during early pregnancy in both pregnant and non-pregnant Hanwoo. Blood samples were collected at 0 (the day of AI), 2, 3, 4, 7, and 11 weeks after AI from pregnant ($n=3$) and non-pregnant ($n=4$) Hanwoo, respectively. The hematological parameters were measured. After 2-dimensional electrophoresis using serum, normalized protein spots were selected for the significant expression variation deviated over two fold in its expression level between two groups. Among 17 spots selected, 15 were identified as albumin, IgG1 heavy chain constant region, haptoglobin, ferrochelatase, fibrinogen, hemopexin. 5 spots were expressed only in non-pregnant specific. The spot identification of 1105 and 6106 was decreased after 3 weeks from AI. However, 2/17 spots were still unidentified. Further studies are needed to analyze the function of the proteins associated with early pregnancy.

(Key words : 2-dimensional electrophoresis, early pregnancy, plasma protein, Hanwoo)

서론

소 수태물(conceptus)의 착상은 병치(apposition)와 유착(adhesion) 그리고 임신 약 19일경부터 시작되는 부착(attachment) 등의 순서로 진행이 된다(Guillomot, 1995). 임신 약 30일까지 영양막세포와 모체간에 느슨한 부착이 형성되고, 약 30~33일 태아와 모체간의 접촉면이 편평 모양의 상피세포 층에서 굴곡층(undulation) 모양으로 변화가 일어나며, 이러한 형태적 변화는 융모막 융모와 성숙 소 태반의 특성인 자궁와(uterine crypts)를 형성한다고 보고하였다(King 등, 1979). 즉, 임신 초기 착상이 정상적으로 일어나기 위해서는 태아의 정상적 발달뿐만 아니라 태아를 위한 모체 자궁도 발달이 잘 이루어져야만 한다.

이렇듯 정상적인 임신이 이루어지기 위해서는 태반의 혈관을 통해 모체로부터 산소나 영양 성분 등이 적절하게 공급이 되어야만 한다(Hoffer-Goeres 등, 2007). 또한, 특정 시기와 목적에 맞게 분비되는 호르몬과 단백질들은 혈액을 통해 목표 기

관에 전달되어 신체의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하고 있다(성 등, 2006; Taponen 등, 1999; Turzillo와 Fortune, 1990). 하지만 여전히 혈액 내 성분의 발현 양상 및 역할에 대해서는 알려진 것이 많지 않은 것이 사실이다.

최근 2차원 전기 영동 기법을 이용하여 임신 초기 양수(amniotic fluid)와 요낭액(allantoic fluid) 등에서 임신 관련 단백질의 발현 차이를 분석하였다고 보고하였으며(Riding 등, 2008; Kim 등, 2006), 복제 동물의 태반 조직을 분석하여 복제 태아의 비정상적 발달에 영향을 미치는 특정 단백질의 발현 양상을 밝혀내는 등 임신에 따른 모체나 태아의 변화 등에 관한 연구가 활발히 진행이 되어오고 있다(Lee 등, 2007; Kim 등, 2005). 하지만 2차원 전기 영동 방법을 이용하여 임신 초기 혈액에서의 단백질 발현 양상을 분석한 결과는 거의 없다고 해도 과언이 아니다.

따라서 본 연구는 2차원 전기 영동 방법을 이용하여 인공 수정을 통해 임신 또는 비임신 한우의 혈액에서 임신 기간의 경과에 따른 특이 발현 혈장단백질의 발굴 및 발현 양상을 살

* 본 과제는 농촌진흥청 축산과학원 정상과제 연구비로 실시되었음.

* Correspondence : E-mail : hwangss@rda.go.kr

해보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용된 시약 및 초자 등의 제품은 각 제조사에 따라 표시하였으며, 별도 표기가 없는 것은 Sigma-Aldrich(Mo. USA) 제품을 사용하였다.

2. 공시동물

공시축은 농촌진흥청 축산과학원에서 사육하고 있는 정상적인 발정주기를 나타내는 한우 3~7년 생의 미경산 및 경산우 10두를 시험에 공시하였다. 공시축의 처리는 김 등(2006)의 방법을 약간 변경하여 실시하였다. 간단히 요약하면 공시축의 발정 주기에 상관없이 progesterone releasing intravaginal device(CIDR-plus, InterAg, NewZealand)를 질 내에 7일간 삽입하고 CIDR를 제거하면서 PGF₂α 25 mg을 투여한 다음 인공수정을 실시하였다. 임신 진단은 인공수정 후 60일경에 초음파(Sono 600, Medison Co., Seoul, Korea)와 직장 검사를 실시하였다.

3. 혈액성상 분석

인공수정을 실시한 날로부터 매 일주일 단위로 총 12주 동안 경정맥에서 채혈을 하였다. 채혈 후 용혈이 생기지 않도록 잘 흔들어 준 다음 hemavet 950(Drew Scientific Inc., Connecticut, USA)를 이용하여 혈액성상을 분석하였다.

4. 단백질 추출

혈장 단백질 추출은 다음과 같이 진행되었다. 임신($n=3$) 또는 비임신($n=4$)된 한우 혈액을 145 × g로 20분간 원심분리한 후 분리된 혈장 10 ul에 200 ul의 7 M urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% pharmalyte(pH 3.5~10, Amersham Biosciences, NJ, USA), 1 mM benzamidine로 구성된 시료 용액을 혼합하여 20분 동안 교반(vortexing)하였으며, 15℃에서 21,000 × g로 1 시간 동안 원심 분리하여 상층액 중 100 ul를 이차원 전기 영동의 시료로 사용하였다.

5. 이차원 전기 영동

일차 Isoelectric focusing(IEF)를 위하여 IPG strips(pH 4~10 NL, 24 cm, Genomine Corp., Pohang, Korea)은 7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 1% DTT, 1% pharmalyte로 구성된 reswelling 용액으로 상온에서 12~16시간 정도 reswelling 되었다. Strip 당 시료는 각각 200 ug씩을 사용하였으며, Multiphore II system(GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA)을 이용하여 제조회사의 사용 매뉴얼을 준수하여 20℃에서 IEF를 수행하였다. 이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips

을 1% DTT를 함유한 equilibration buffer(50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 전처리 하였으며, 곧바로 2.5% iodoacetamide를 함유한 equilibration buffer로 10분간 추가로 처리하였다. 전처리가 완료된 strips을 SDS-PAGE gels(20×24 cm, 10~16%) 위에 배열시키고, Hoefer DALT 2D system(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)을 이용하여 20℃에서 최종적으로 1.7 kVh가 되게 전개하였다. 이차원 전기 영동이 완료된 이차원 젤의 단백질은 Oakley 등(1980)의 방법에 따라 은염색(silver stain)으로 시각화되었으며, 질량 분석기에 의한 단백질 동정을 위하여 glutaraldehyde 처리 단계는 생략되었다. 단백질 spots의 발현 변화 확인을 위한 정량적인 분석은 PD-Quest software(version 7.0, BioRad)를 이용하여 수행하였다. 각 spot의 quantity는 total valid spots의 intensity로 정규화(normalization) 되었으며, 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현 변화를 보여주는 단백질 spots을 선정하였다.

6. 질량 분석을 위한 단백질 절편화

단백질 spots은 modified porcine trypsin(Promega, CA, USA)을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해되었다. Trypsin에 의해 잘려진 단백질 단편들은 수용액 상태로 회수되었고, C18 ZipTips(Millipore, Bedford, IL, USA)을 이용하여 1~5 ul 부피로 탈염 및 농축되었다.

7. 단백질 동정

질량 분석기는 Ettan MALDI-TOF(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)를 사용하였다. Mass spectrum의 분석을 위해서 trypsin의 자가분해에 의해 생성된 펩타이드의 ion peak m/z (842.510, 2211.1046)를 표준 peaks로 이용하였다. 분석이 완료된 mass spectrum으로부터 단백질 동정을 위하여 ProFound 검색 엔진(<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>)을 이용하였다. 한편, SPITC 반응이 일어난 단백질 단편들은 PSD(post-source decay) 모드에서 y-ion을 가지는 아미노산에 대하여 누적 peaks을 얻고, 단백질 절편의 mass spectrum을 구하였다. 누적된 peak을 이용하여 Ettan MALDI-TOF software에서 읽어진 아미노산 서열은 PepFrag (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl/pepfrag.html>) 프로그램을 이용하여 동정하였다.

결과 및 고찰

본 연구의 목적은 임신 또는 비임신 한우의 혈액에서 임신 기간의 경과에 따른 혈장단백질의 발현 양상을 살펴보고자 실시하였다.

임신 및 비임신 소의 혈액 성상 분석 결과는 Table 1과 같다. 백혈구(정상 범위 4~12 K/ul), 적혈구(5~10 M/ul) 및 혈소판(200~800 K/ul) 모두 임신 또는 비임신군에서 정상 범주에

Table 1. Analysis of hematological parameters for pregnant or non-pregnant Hanwoo

Parameters		Weeks after AI					
		0	2	3	4	7	11
WBC (K/uL)	P	6.7±2.0	5.7±1.4	6.9±2.2	5.8±1.5	7.2±1.6	7.0±1.3
	NP	6.8±0.8	6.3±0.5	6.5±0.4	6.4±0.8	8.0±1.5	7.3±1.7
RBC (M/uL)	P	7.7±0.2	8.2±0.7	7.8±0.4	7.7±0.3	7.3±0.2	7.9±0.7
	NP	7.4±0.8	7.6±0.9	7.6±1.1	7.4±0.6	8.0±0.8	7.7±1.0
PLT (K/uL)	P	373±106	284± 98	244±175	293±60	334±103	370± 97
	NP	338± 70	341±109	331±116	279±66	362±107	306±248

An experiment was conducted to study the hematological parameters. All samples used were measured at least twice.

포함되어 임신의 진행에 따른 혈액성상의 변화는 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 또한, 본 연구 결과에는 나타나지 않았지만, 혈액 내 총 단백질 농도를 측정된 결과, 두 그룹에서 임신 기간에 따른 농도 차이는 나타나지 않았다.

혈액을 이용한 단백질 분석기법은 질병의 진단과 약물 반응 등에 적용될 수 있는 커다란 잠재력을 가지고 있다. 하지만 혈청이 다량 첨가되어 있어 분석을 실시하는데 많은 어려움이 있는 것도 사실이다. 특히 대부분의 biomarker들은 저분자량 단백질로서 이들을 분석하기 위해서는 혈청단백질로부터 분리해야만 한다(Ahmed 등, 2003; Fu 등, 2005).

최근 알부민이나 다량의 혈청단백질을 항체를 이용하여 제거하는 방법들이 시도되기도 하였다(Govorukhina 등, 2003; Steel 등, 2003; Wang 등, 2003). Fu 등(2005)은 혈청으로부터 지질, 알부민 및 IgG를 제거하는 방법을 사용하여 약 400개 정도의 spots를 검출하였다고 보고하였다. 하지만 An 등(2004)은 혈청을 사용한 2차원 전기 영동 기법에서 660여 개의 spots를 검출하였다고 보고하여 실험 방법에 따라 많은 차이가 나타날 수 있음을 알 수 있었다.

본 연구에서 혈액을 이용한 2차원 전기 영동 방법을 실시한 결과는 Fig. 1과 같다. 800여 개의 단백질 spots이 임신 또는 비임신 소에서 발현이 되었으나, 임신 진행에 따라 2배 이상의 발현 차이를 나타내는 spots는 17개로 나타났으며(Fig. 1A), 발현 양상은 Fig. 1B와 같다. 혈청으로부터 지질 또는 알부민 성분을 제거하지 않고도 800여 개의 spots를 검출하여 포커싱이나 전처리 등 전기 영동의 방법에 따라 더욱 많은 spots를 검출하고 분석할 수 있을 것이라 사료된다. 따라서 전기 영동 장비나 시료의 농도, IPG strips 종류 및 gradient SDS-PASGE gel 등을 조합하여 각 연구자의 여건에 맞는 조건을 갖추는 것이 좋은 결과를 얻는 방법이라 사료된다.

2차원 전기 영동 방법을 이용하여 검출된 17개의 spots에 대한 분석을 실시한 결과는 Table 2와 같다. Positive matrix

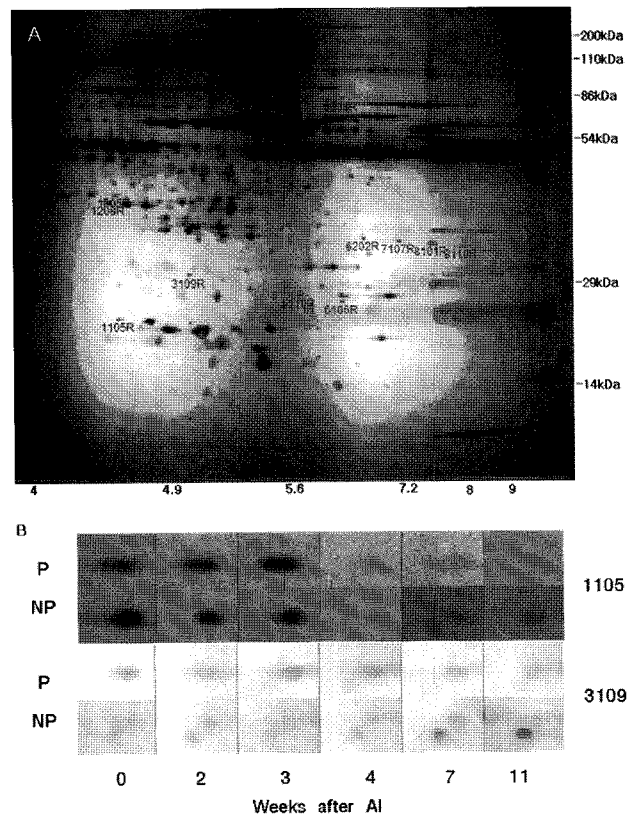


Fig. 1. Master images of a two-dimensional electrophoresis gel stained with silver stain. Serum from pregnant or non-pregnant Hanwoo after AI was separated on 20×24 cm pH 4~9 NL IPG strip and then 10~16% gradient SDS-PAGE. (A) 2DE gel image; (B) the variations of their intensity.

factorization(PMF) 또는 chemical assisted fragmentation(CAF) 분석을 통해 분석된 15개의 동정된 spots는 알부민, IgG, haptoglobin, ferrochelatase, fibrinogen 및 hemopexin 등으로 확인

Table 2. Protein profound list determined by peptide mass fingerprint / common assembly format sequencing analysis

	Spot ID	%	Accession No.	Protein information	pI	kDa
PMF	1105	14	gi 27806631	Ferrochelatase	9.5	47.49
	3109*	19	gi 7547266	IgG1 heavy chain constant region	6.1	36.51
	4308	20	gi 229552	Albumin	5.8	67.78
	5307	18	gi 30794280	Albumin	5.8	71.3
	6202*	46	gi 9581739	Haptoglobin	9.8	11.28
	6608	20	gi 30794280	Albumin	5.8	71.3
	8101*	81	gi 546981	Golgi adaptor protein beta 1 subunit	9.7	3.9
	8110	46	gi 9581739	Haptoglobin	9.8	11.28
MS/MS	1208	14	gi 114053183	Paraoxonase 1	5.24	39.82
	1305	13	gi 6980816	Chain C, modified Bovine Fibrinogen	5.49	46.55
	5106	1	gi 83764016	Prepro complement component C3	6.41	187.18
	5110*			Same as 5106		
	5111		gi 158138561	Prepro complement component C3	6.41	187.18
	7404	9	gi 77736171	Hemopexin	7.9	52.176
	7409	10	gi 75812954	Fibrinogen, alpha polypeptide	6.73	66.971
CAF	6106			Unknown	5.2	24.86
	7107*			Unknown	6.1	45.21

* Expressed only in non pregnant Hanwoo.

되었다. 하지만 2개의 단백질은 현재까지 모든 포유동물에서 일치하는 유전자가 없는 것으로 나타나 추가적인 분석을 실시하여야 할 것으로 사료된다.

동정된 15개의 spots 중에서 3109(IgG1), 6202(Haptoglobin), 8101(Golgi adaptor protein beta 1 subunit), 5110(prepro complement component C3) 및 7107(unknown)은 비임신군에서는 인공수정 후 기간의 경과에 따라 점점 강하게 나타나는 경향을 보이지만, 임신군에서는 임신기간의 경과에도 불구하고 발현하지 않거나 아주 약하게 발현하는 것들로 확인되었다. 이러한 결과는 임신 개체에서 많은 단백질들이 발현할 것이라는 예상과 다른 결과로서 상당히 흥미로운 결과라 할 수 있겠다.

Haptoglobin은 생체내의 반응에 따라 분비되어 헤모글로빈과 결합을 하는데, 이는 박테리아가 증식 또는 성장하는 데 필요한 철분의 이용을 억제하는 것으로 알려져 있다(Wassell, 2000). 혈액 내에서 haptoglobin이 낮은 농도를 보이는 경우는 간세포 장애, 전염성 단핵구증, 체내 조직에의 출혈, 선천성 결손 등이 원인이다(이와 이, 1996; Burtist와 Ashwood, 1994). 본 연구에서는 임신군에서 발현하지 않거나 또는 발현이 점차 감소하는 경향을 나타내는 반면, 비임신군에서는 3~4주 간

격으로 강한 발현을 나타내 주기적인 발현 양상을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 임신과 관련하여 heptoglobin의 농도가 낮아지는 직접적인 원인과 기전에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

한편, 1105(ferrochelatase)과 6106(unknown) spot들의 경우, 임신군에서 3주차까지 발현되다가 이후부터 사라지는 것을 확인할 수 있었으며, 이후 완전히 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 비임신군에서는 전혀 나타나지 않았다. Ferrochelatase는 환원헤마틴 생합성 경로(heme biosynthetic pathway)의 최말단 효소로서 프로토포르피린(protoporphyrin)에서 heme이 생성되는 단계에 작용을 한다고 알려져 있다(Shibuya 등, 1995; Straka 등, 1991). 이러한 기능이 있는 ferrochelatase의 활성이 감소할 경우, 사람이나 소에서 프로토포르피린증(protoporphyrin)이라는 선천성 대사장애가 생기게 된다(Todd, 1994; Bloomer 등, 1982; Ruth 등, 1977). 이 유전자 역시 임신의 유지와 관련하여 현재까지 알려진 것이 별로 없어 임신 이외의 생체 조절 기전과 관련되어 발현된 것이 아닌가 생각된다.

본 실험에서는 인공수정 후 11주에 걸쳐 임신 및 비임신소에서 발현 차이를 보이는 혈장단백질들의 발현 양상을 분

석하여 정리하였다. 현재까지 이들 발굴 단백질들의 기능 중에서 임신과 관련된 기능들은 보고된 바가 많지 않아, 향후 이들에 대한 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 2차원 전기 영동 방법을 이용하여 인공수정을 통해 임신 또는 비임신 한우의 혈액에서 임신 기간의 경과에 따른 특이 발현 혈장 단백질의 발굴 및 발현 양상을 살펴보고자 실시하였다. 인공수정으로 임신($n=3$) 및 비임신($n=4$) 된 한우로부터 0(the day of AI), 2, 3, 4, 7 및 11주차에 혈액을 채취하여 혈액 성분 분석 및 2차원 전기 영동에 공시하였다. 혈액이화학적 분석을 실시한 결과 백혈구, 적혈구 및 혈소관 등의 항목에서 두 그룹간에 차이가 나타나지 않았다. 2차원 전기 영동 방법으로 혈액을 분석한 결과, 2배 이상의 발현 차이를 보이는 단백질을 선별하여 동정 및 분석하였다. 발굴된 17개의 spots 중에서 동정된 15개의 단백질은 알부민, IgG1 heavy chain constant region, haptoglobin, ferrochelatase, fibrinogen 및 hemopexin 등으로 확인되었다. 이들 17개의 단백질 중에서 5개는 비임신 특이적 단백질로 확인되었으며, 1105와 6106 spot은 임신 3주차 이후부터 사라지는 단백질로 확인되었다. 하지만 2개의 단백질은 여전히 비동정되었다. 따라서 이들 발굴 단백질들의 임신과 관련된 기능에 대한 분석이 필요한 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfin D, Talmadge K, Georgiou H, Quinn M and Rice G. 2003. An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics* 3:1980-1987.
- An JY, Fan ZM, Zhuang ZH, Qin YR, Gao SS, Li JL and Wang LD. 2004. Proteomic analysis of blood level of proteins before and after operation in patients with esophageal squamous cell carcinoma at high-incidence area in Henan Province. *World J. Gastroenterol.* 10:3365-3368.
- Bloomer JR, Morton KO, Reuter RJ and Ruth GR. 1982. Bovine protoporphyria: Documentation of autosomal recessive inheritance and comparison with the human disease through measurement of heme synthase activity. *Am. J. Hum. Genet.* 34:322-330.
- Burtist CA and Ashwood ER. 1994. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd ed. WB Saunders Company. Philadelphia, pp. 688-691.
- Fu Q, Garnham CP, Elliott ST, Bovenkamp DE and Van Eyk JE. 2005. A robust, streamlined, and reproducible method for proteomic analysis of serum by delipidation, albumin and IgG depletion, and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 5:2656-2664.
- Govorukhina NI, Keizer-Gunnink A, van der Zee AG, de Jong S, de Bruijn HW and Bischoff R. 2003. Sample preparation of human serum for the analysis of tumor markers. Comparison of different approaches for albumin and gamma-globulin depletion. *J. Chromatogr. A.* 1009:171-178.
- Guillomot M. 1995. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49:39-51.
- Hoffer-Goeres KA, Batchelder CA, Bertolini M, Moyer AL, Famula TR and Anderson GB. 2007. Angiogenesis in day-30 bovine pregnancies derived from nuclear transfer. *Cloning and Stem Cells* 9:595-607.
- Kim HR, Kang JK, Yoon JT, Seong HH, Jung JK, Lee HM, Park CS and Jin DI. 2005. Protein profiles of bovine placenta derived from somatic cell nuclear transfer. *Proteomics* 5:4264-4273.
- Kim YS, Kim MS, Lee SH, Choi BC, Lim JM, Cha KY and Baek KH. 2006. Proteomic analysis of recurrent spontaneous abortion: Identification of an inadequately expressed set of proteins in human follicular fluid. *Proteomics* 6:3445-3454.
- King GJ, Atkinson BA and Robertson HA. 1979. Development of the bovine placentome during the second month of gestation. *J. Reprod. Fertil.* 55:173-180.
- Lee SY, Park JY, Choi YJ, Cho SK, Ahn JD, Kwon DN, Hwang KC, Kang SJ, Paik SS, Seo HG, Lee HT and Kim JH. 2007. Comparative proteomic analysis associated with term placental insufficiency in cloned pig. *Proteomics* 7:1303-1315.
- Oakley BR, Kirsch DR and Morris NR. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105:361-363.
- Riding GA, Jones A, Holland MK, Hill JR and Lehnert SA. 2008. Proteomic analysis of bovine conceptus fluids during early pregnancy. *Proteomics* 8:160-177.
- Ruth GR, Schwartz S and Stephenson B. 1977. Bovine protoporphyria: the first non-human model of this hereditary photosensitizing disease. *Science* 198:199-201.
- Shibuya H, Nonneman D, Tamassia M, Allphin OL and Johnson GS. 1995. The coding sequence of the bovine ferroche-

- latase gene. *Biochim. Biophys. Acta.* 1231:117-120.
- Steel LF, Trotter MG, Nakajima PZ, Mattu TS, Gonye G and Block T. 2003. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol. Cell. Proteomics* 2:262-270.
- Straka JG, Hill HD, Krikava JM, Kools AM and Bloomer JR. 1991. Immunochemical studies of ferrochelatase protein: characterization of the normal and mutant protein in bovine and human protoporphyria. *Am. J. Hum. Genet.* 48:72-78.
- Taponen J, Katila T and Rodriguez-Martinez H. 1999. Induction of ovulation with gonadotropinreleasing hormone during proestrus in cattle: Influence on subsequent follicular growth and luteal function. *Anim. Reprod. Sci.* 55:91-105.
- Todd DJ. 1994. Erythropoietic protoporphyria. *Br. J. Dermatol.* 131:751-766.
- Turzillo AM and Fortune JE. 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 89:643-653.
- Wang YY, Cheng P and Chan DW. 2003. A simple affinity spin tube filter method for removing high-abundant common proteins or enriching low-abundant biomarkers for serum proteomic analysis. *Proteomics* 3:243-248.
- Wassell J. 2000. Haptoglobin: Function and polymorphism. *Clin. Lab.* 46:547-552.
- 김영훈, 고진철, 오창언, 강승률, 양보석, 오성중, 김창능, 송중용, 김일화. 2006. CIDR를 이용한 제주 한우 및 흑우의 체내 수정란 생산과 이식. *한국수정란이식학회지* 21:191-198.
- 성환후, 양병철, 황성수, 박성재, 고응규, 노환국, 양보석. 2006. Anti-inhibin serum 및 bovine follicular fluid 처리가 한우 난소의 난포 발달과 혈중 호르몬 변화에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지* 21:315-322.
- 이귀녕, 이종순. 1996. *임상병리화일*. 의학문화사. 서울, pp. 192-194.

(접수일: 2008. 3. 5 / 채택일: 2008. 3. 13)