

初期 妊娠豚에 있어서 子宮分泌蛋白質의 電氣泳動像과 免疫抑制力에 관한 研究

김경순 · 정영채 · 김창근 · 한기영* · 김형태 · 윤종택 · 김종대 · 최선호

중앙대학교 산업대학 축산학과

A Study on Electrophoretic Pattern and Immunosuppressive Activity of Uterine Secretory Protein in Early Pregnant Sows

Kim, K.S., Y.C.Chung, C.K.Kim, K.Y.Han*, H.T.Kim, J.T.Yoon,
J.D.Kim and S.H.Choi

Department of Animal Science, Chung-Ang University

SUMMARY

The experiment was carried out to study the profile of uterine specific protein during early pregnancy in sows and to test it's immunosuppressive activity. Uterine protein samples were obtained by flushing the uterine horn on Day 3, 6, 9, 12 and 15 of the estrous cycle and the pregnancy respectively and the protein concentration of each sample was determined. The change of uterine protein was examined by 15% polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) and molecular weight was investigated by sodium dodecyl sulfate(SDS)-PAGE. The immunosuppressive activity of uterine secretory protein was investigated according to the lymphocyte blastogenesis response to a mitogen.

The results of this experiment are summarized as follows :

1. The uterine protein during estrous cycle and early pregnancy was relatively constant up to Day 9, but increased on Day 12. Maxium total protein values were found on Day 15. The concentration of serum proteins were about 82-95 mg during estrous cycle, but decreased to about 70-82 mg during early pregnancy.

2. The proteins components similar electrophoretic patterns(PAGE) that were no differences (band ; a, b, c, d, e, f, g, i) on Days 3, 6 and 9 of the estrous cycle and pregnancy. But there were more 2 bands specifically on Day 12 of the pregnancy and on Day 15 of estrous cycle and showed more 4 bands on Day 15 of early pregnancy. They seemed to be acidoprotein and their average molecular weight were 38, 000, 22, 300 and 12, 600.

3. When uterine protein were added 500 μ g/ml, there was no immunosuppressive activity on Day 3 of estrous cycle and lymphocyte blastogenesis was slightly suppressed on Day 3 of pregnancy. The

* 안성농업전문대학 축산학과(Dept. of Animal Science, An Seoung National Agricultural Junior College)

immunosuppressive activity on Day 9 of estrous cycle and pregnancy appeared in 500 $\mu\text{g/ml}$ and 150 $\mu\text{g/ml}$, respectively the uterine protein on Day 12 and 15 showed immunosuppressive activity, which at the level of 150 $\mu\text{g/ml}$ during non-pregnancy and at the level of 100 to 125 $\mu\text{g/ml}$ during early pregnancy, respectively.

I. 緒 論

家畜의 繁殖效率을 增進시키기 위하여 性成熟의 早期化, 早期受胎, 繁殖間隔(空胎期)의 短縮, 産子數의 增加, 胎兒死亡率의 減少, 性比調節 등 여러 가지 方法이 있겠으나 近來에 와서는 受胎率 및 産子數를 增加시키기 위한 方法의 하나로 免疫學에 기초를 둔 繁殖生理學的 研究가 많이 수행되고 있다.

돼지의 경우 着床을 前後하여 높은 早期胚 死滅率을 나타내고 있는데 그 원인이 環境과 遺傳的 要因 및 母體의 免疫學的 反應 등이 관련된 複合的인 要因에 기인되는 것으로 생각되고 있으나 아직 解明되어 있지 않다. 이 중에서도 妊娠初期 母體의 免疫體系의 抑制力이 着床과 關여하는 것으로 보고되어 있다. 돼지에서 妊娠初期 子宮이 形態學的 變化에 關하여 Perry와 Rowlands(1962)는 脈管의 增殖, 子宮腺의 발달과 螺旋化, 白血球浸潤등과 더불어 授精後 13~18日頃에는 子宮粘膜에 주름이 생기며 子宮內膜의 增殖과 肥大로 授精後 13日때의 길이 가 121cm에 달한다고 하였다. 이러한 子宮變化에 關하여 Guthrie 등(1972), Ford와 Christenson(1979) 및 Magness 등(1986)은 Progesterone의 影響에 의한 것이라고 보고한 바 있다.

子宮蛋白質은 血清에서 기원되는 것으로서 妊娠初期 子宮液中的 蛋白質 變化를 보면 Murray 등(1972)과 Squire 등(1972)은 蛋白質濃度가 發情週期 2~4日에 2~3 mg/ml이었으나 15日頃에는 약 43 mg/ml으로 증가하며 發情週期 8日以前에는 分子量 90,000 이상 3개의 分劃(I, II, III)만이 나타나고 12日頃에는 分劃 IV(MW 45,000)와 V(MW 15,000)가 나타나기 시작한다고 하였고 이 중 分劃 V는 子宮液中 總蛋白質量의 20%를 차지하며 6개 이상의 酸性蛋白質로 構成되어 있는 반면에 血清에서는 子宮蛋白質의 分劃 IV와 V는 나타나지 않는다고 하였다. 또한 Murray 등(1978)은 發情週期 8日 때의 子宮蛋白質의 免疫抑制能力이 1,250 $\mu\text{g/ml}$ 에

서 나타났지만 15日에는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 水準에서도 抑制力이 나타났다고 하였으며 또한 15日에 나타나는 分劃 IV와 V를 비교 試驗한 결과, 分劃 IV는 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 添加區에서도 抑制力을 나타내지 않았으나 分劃 V는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 添加에서 약 30%이하로 抑制力을 나타냈다고 보고하였다.

한편 이와 같은 子宮蛋白質에 대하여 토끼(Urzua 등, 1970; Arthur와 Daniel, 1972)와 생쥐(Jacobs 등, 1987)에서 각각 보고된 바 있다. 따라서 본 실험은 돼지에서 妊娠初期의 子宮狀態 및 血清과 子宮液中 蛋白質의 變化 및 子宮蛋白質의 免疫抑制能力을 조사함으로써 着床率의 향상과 早期胚 死滅을 減少시킬 수 있는 基礎資料를 얻고자 실시하였다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 供試動物

供試動物은 屠殺場에서 屠殺되는 2元 또는 3元交雜種중에서 生體重 100 kg 이상의 非妊娠豚과 妊娠豚의 卵巢와 子宮을 供試하였으며 生殖器에 缺陷이 없는 個體만을 선별 이용하였다.

2. 血清, 子宮採取 및 子宮液의 採取

耳靜脈에서 血液 10 ml를 채혈한 다음 1,000×g에서 20분간 遠心分離하여 血清을 分離한 후 供試前까지 -20°C 에 보관하였다. 子宮은 屠殺場에서 屠殺直後 卵管과 子宮頸部를 봉합사로 結紮하여 摘出した 다음 冷蔵保存하여 1시간 이내에 實驗室로 운반하였고 生理食鹽水 40~60 ml를 子宮頸管部로 注入하여 卵管으로 灌流하여 13,000×g에서 20분간 遠心分離後 0.45 millipore filter로 濾過한 후 供試前까지 -20°C 에 보관하였다.

3. 蛋白質의 電氣泳動

Lowry 등(1950)의 方法에 따라 總蛋白質量을 定하여 PAGE는 Davis(1964), Hedrick과 Smith

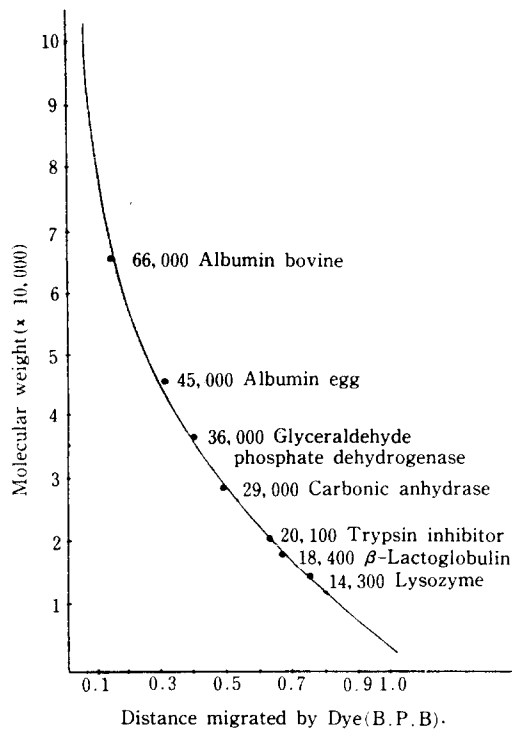


Fig 1. Protein standard curve by SDS-PAGE

(1968) 및 Rodbard 등(1974)의 방법을 변형하여 15% Gel 농도로 Gel緩衝液(Tris-con. sulfate buffer pH 9.0) 및 電氣泳動緩衝液(Tris-boric acid pH 9.0)을 사용하여 120 V, 6 시간 電氣泳動한 후 Coomassie Blue R 250 로 염색하여 조사하였고蛋白質의 分子量 測定은 SDS-PAGE 로 Weber 와 Osborn(1969)의 방법을 변형하여 10% Gel 농도로 Gel緩衝液(0.1 M Sodium phosphate buffer, 0.2% SDS pH 7.2) 및 電氣泳動緩衝液(Gel緩衝液에 蒸溜水를 1:1로 稀釋)을 사용하여 20 mA, 8 시간 電氣泳動하여 조사하였다.

4. 子宮液의 免疫抑制力 測定

子宮液의 免疫抑制力은 Murray 등(1978)의 방법에 따라 淋巴球의 blastogenesis을 測定하여 調査하였다.

Lymphocyte blastogenesis의 誘起와 測定을 조사하기 위하여 非妊娠豚에서 5ml 血液을 채혈하여 Balance salt solution(BSS)로 稀釋(1:1)한 다음 시험관에 Ficoll-paque液 3ml를 첨가하고 400×

g에서 30분간 遠心分離한 후 BSS로 3회 세척하였다. 分離된 淋巴球는 RPMI-1640 medium(Gibco)-10% Fetal calf serum에 2×10^6 cell/ml이 되도록 조정하였다. 96 well microtiter plate에 淋巴球浮遊液 100 μ l, 子宮液 100 μ l 및 mitogen을 well당 1 μ g水準으로 添加하여 5% CO₂, 95% air, 37.5°C인 CO₂ incubator에 3일간 培養시켰다. 2일후(淋巴球 수확 12시간전)에 1 μ Ci(³H)-thymidine을 각 well에 添加하였으며, 다시 12시간 후 上記 淋巴球浮遊液을 fiber pad에 모은 후 Oven(70°C)에서 30분간 건조시킨 후 試驗管에 옮겨 5ml scintillation液(5g PPO and 52.5 mg PoPoP/1,000 ml toluene)을 넣고 혼든 다음 Liquid scintillation counter로 thymidine 흡수를 1분동안 測定하여 계산하였다.

III. 結果 및 考察

1. 血清 및 子宮液中 蛋白質의 變化

非妊娠 및 妊娠豚의 血清 및 子宮液中 蛋白質 含量의 變化를 보면 Fig.3과 각 시기별 血清蛋白質의

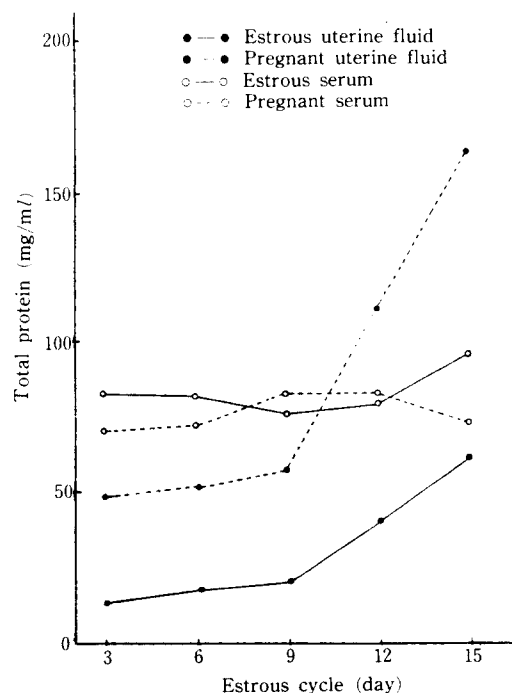
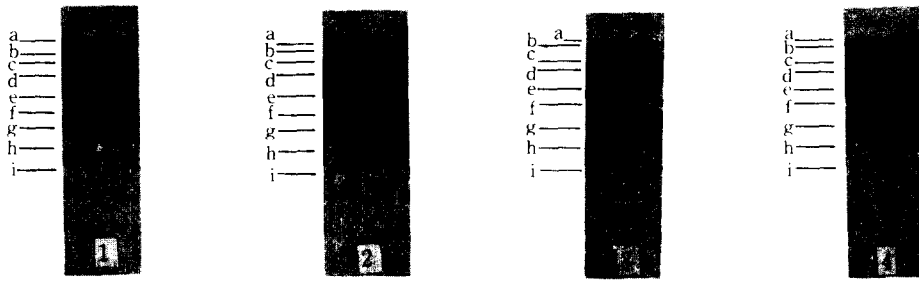


Fig 2. Change of total protein in serum and uterine fluid



1. Estrous serum on Day 3(PAGE, pH 9.0)
2. Estrous serum on Day 15(PAGE, pH 9.0)
3. Pregnant serum on Day 3(PAGE, pH 9.0)
4. Pregnant serum on Day 15(PAGE, pH 9.0)

Fig 3. Electrophoretic pattern of estrous and pregnant serum

변화를 非妊娠과 妊娠 3日째에는 82 mg/ml와 70 mg/ml이었으며 9日에는 75 mg/ml와 82 mg/ml이었고, 15日에는 95 mg/ml와 71 mg/ml을 나타내어 시간경과에 따라 蛋白質濃度の變化는 없었으나 妊娠 血清의 蛋白質濃도가 非妊娠에 비하여 다소 낮아지는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 子宮蛋白質이 血清에서 起源되어진다는 Beier(1978)의 보고에서 妊娠血清蛋白質이 子宮液으로 轉移되어진 것으로 설명할 수 있었다.

한편 子宮液中 蛋白質의 濃度變化를 보면 非妊娠과 妊娠 3日째에 각각 12 mg/ml와 48 mg/ml이던 것이 이후 점차 增加하여 15日에는 60 mg/ml와 160 mg/ml로써 시간경과에 따라 점차 증가하는 경향을 나타내었으며 子宮液中 蛋白質含量이 非妊娠豚에 비하여 현저히 높게 나타났다.

이 결과는 Murray 등(1972)이 發情週期中 子宮液中 總蛋白質量이 3日경에는 약 3 mg이었으나 이후 점차 增加하여 15日경에 약 43~50 mg을 나타내었다는 보고에 비하여 蛋白質量에는 차이가 있었으나 점차 增加하는 경향은 一致된 결과였다.

2. 단백질의 電氣泳動像 및 相對的 濃度の 變化

1) 血清

發情週期 및 妊娠初期에 있어서 血清中 蛋白質分離像은 發情週期에 따라 큰 차이가 없이 9개 分割으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Murray 등(1978)이 發情週期 15日까지의 血清中의 蛋白質像이 시간경과에 따라 큰 차이가 없다고한 보고와는 유사하나

本實驗에서는 h와 i의 band가 추가로 나타났으며 이 band의 相對的 濃도가 非妊娠에서 각각 0.42%와 0.3%였고, 妊娠에서는 각각 0.4%와 0.34%로서 약간의 차이가 있었다. 그러나 이는 電氣泳動法에 기인된 차이로서 思料된다(Fig.3).

2) 子宮液

發情週期 및 妊娠初期 子宮液 蛋白質의 電氣泳動像과 相對的 濃度の 變化는 Fig.4와 5 및 Table 1과 같다.

非妊娠豚에서 發情週期 3, 6 및 9日의 子宮蛋白質은 8개의 band로서 큰 變化가 없었으나, 12日과 15日에 2개의 band(h, j)가 추가적으로 나타났다. 또한 妊娠豚에서도 3, 6 및 9日에 8개 band가 나타난 것은 非妊娠과 유사하였으나, 12日과 15日에는 다소 다른 h, j, k 및 l 4개의 band(h, j, k, l)가 나타났다. 이들 band의 相對的 濃도는 Table 1에서 보는 바와 같이 a~g band는 發情週期에 따라 큰 차이가 없었으나 發情週期 및 妊娠 12日에 h가 각각 6.3%, 7.0%, i band가 각각 7.4%, 7.1%, j band가 각각 3.0%, 3.3%로 發情週期에 비하여 妊娠期에 약간 增加현상을 나타냈으며 15日에는 h band 각각 8.5%, 10.3%, i band가 각각 9.7%, 10.4%, j band 4.4%, 8.7%였다. 또한 妊娠期에만 특이적으로 나타나는 k band가 1.2%, l band가 0.9%로 나타나서, 15日에도 妊娠豚에서 增加하는 현상을 나타냈다. 이들의 分子量을 알고자 SDS-PAGE를 시도한 결과 妊娠 12日과 15日에 分子量 38,000(MW), 26,000(MW), 22,300(MW), 12,

600(MW)이 증가하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Murray 등(1978)이 發情週期 12日과 15日에 PAGE로 분석한 결과 pH 9.0에서 酸性蛋白質 band 4개가 나타났다는 보고와 차이가 있었으나, 本實驗에서 h, i, j 3개 band가 나타난 결과는 유사하였다. SDS-PAGE의 결과는 Murray 등

(1978)이 發情週期에 45,000(MW), 15,000(MW)이 12日과 15일에 특징적으로 나타났다는 것과一致하였으며, 非妊娠期에 비하여 妊娠期에 38,000(MW), 22,300(MW), 12,600(MW)가 증가하는 것으로 나타나서 妊娠期가 非妊娠期에 비하여 酸性蛋白質이 증가하는 것으로 확인되었다.

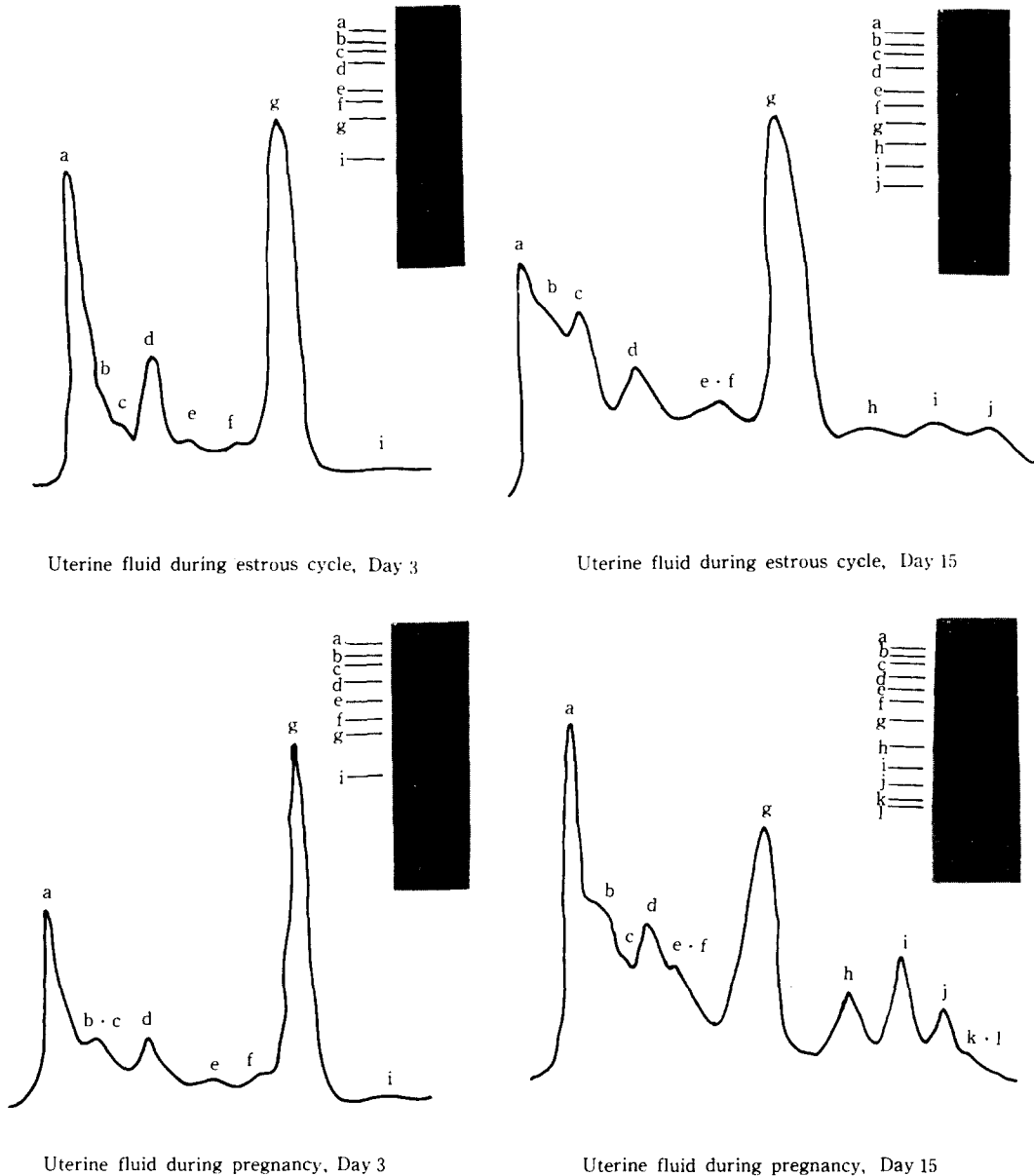


Fig 4. Electrophoretic pattern(PAGE) of uterine fluid collected during estrous cycle and early pregnancy

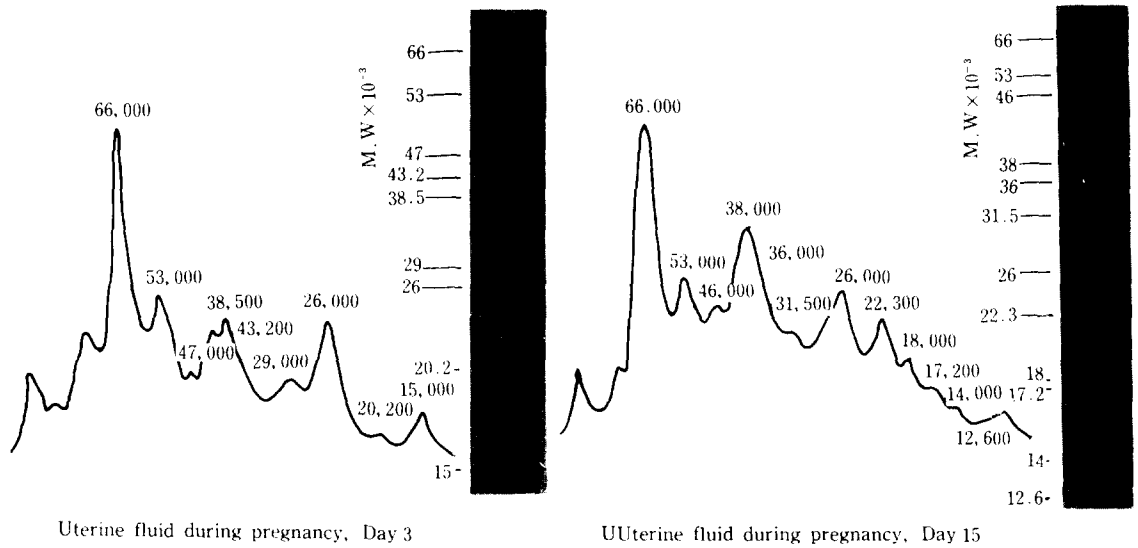


Fig 5. Electrophoretic pattern(SDS-PAGE) of uterine fluid collected during early pregnancy

Table 1. Relative concentrations of fractionized serum and uterine proteins in nonpregnant and pregnant sow(%)

Day	Non-pregnancy										Pregnancy									
	Serum protein(%)					Uterine protein(%)					Serum protein(%)					Uterine protein(%)				
Band	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15	3	6	9	12	15
a	15.0	14.3	13.7	14.2	17.0	15.2	20.1	16.8	16.2	15.5	18.0	16.0	17.2	18.4	17.3	16.6	13.3	15.1	14.3	11.2
b	9.9	10.1	8.0	8.9	9.0	10.0	12.4	6.2	7.3	7.0	6.3	7.0	7.2	7.0	7.0	9.5	12.3	7.3	6.3	5.5
c	5.6	4.5	4.9	5.0	6.0	6.5	6.4	7.9	6.3	7.9	8.1	8.3	6.1	6.9	7.1	5.4	7.6	8.0	8.1	8.7
d	6.8	13.0	10.6	10.3	10.3	15.5	10.0	12.1	8.0	5.1	12.0	15.3	13.2	14.1	14.0	10.9	9.5	13.7	10.1	6.0
e	3.6	3.9	4.9	3.9	3.0	3.1	4.2	3.9	2.7	5.1	4.1	3.0	3.3	2.0	3.8	3.3	5.0	4.2	3.2	3.0
f	2.4	2.6	3.3	1.8	1.9	3.5	3.7	3.7	2.8	1.7	3.1	3.1	3.3	2.6	3.0	3.7	4.7	4.9	3.5	2.1
g	56.0	51.1	53.9	55.0	52.0	45.3	42.5	47.0	40.0	35.1	47.7	46.7	49.0	48.1	47.0	49.6	44.3	43.3	37.1	32.0
h	0.4	0.3	0.4	0.5	0.5				6.3	8.5	0.4	0.3	0.4	0.5	0.4				7.0	10.3
i	0.3	0.2	0.3	0.4	0.3	0.9	0.7	2.4	7.4	9.7	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	1.0	3.3	3.5	7.1	10.4
j									3.0	4.4									3.3	8.7
k																				1.2
l																				0.9

3. 子宮液 단백질의 免疫抑制作用

非妊娠 및 妊娠 子宮蛋白質의 免疫抑制能力을 보면 Fig.6 에 나타난 바와 같다.

한편 本 實驗에서 妊娠 3, 6, 9, 12 및 15 일의 子宮液의 免疫抑制力이 非妊娠子宮液보다 현저히 높았던 점, 그리고 電氣泳動液 h, i, j band 외에 k, l band 가 특이적으로 나타난 점은 Segerson 등(1984)

이 소에서 非妊娠 및 妊娠 子宮蛋白質 200 $\mu\text{g/ml}$ 添加時 각각 對照試驗管의 약 49%와 32% 水準으로 低下되고 400 $\mu\text{g/ml}$ 添加時 각각 약 37%와 15% 水準으로 低下하여 妊娠 子宮蛋白質이 免疫抑制能力이 더 큰 것으로 나타났다고 보고한 것과 일치하며 PAGE 및 SDS-PAGE 로 電氣泳動하였을때 分子量 40,000 이하에서 2 종의 蛋白質이 妊娠 子宮液에

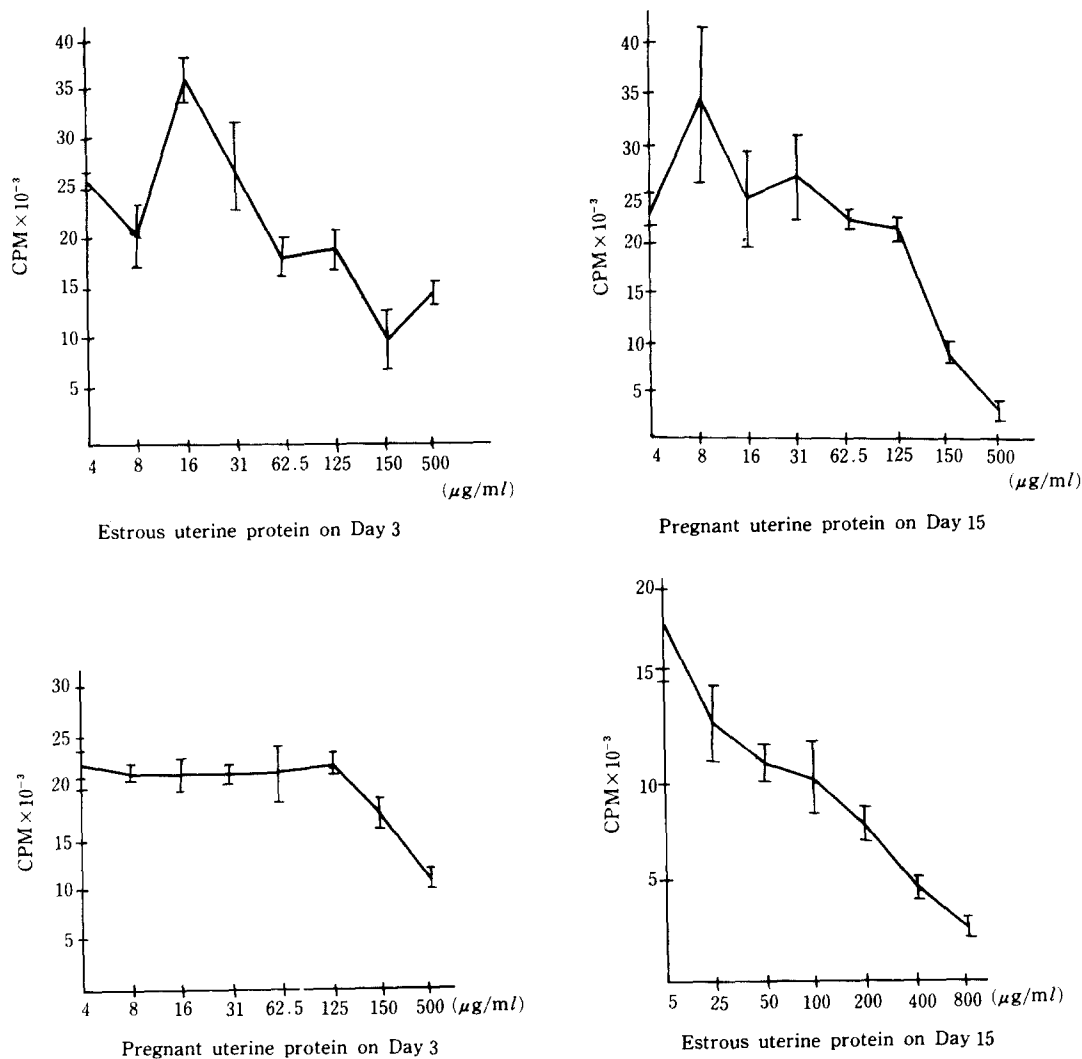


Fig 6. Immunosuppression of concanavalin A-induced blastogenesis by dialyzed, lyophilized pig uterine protein. Each point represents mean count per minutes \pm S.D of thymidine uptake by 8 replicate cultures of porcine lymphocytes containing 1 μg concanavalin A.

서 더 큰 비율로 나타난 것도 본 실험의 결과를 뒷받침할 수 있었다.

한편 妊娠 9~15 일에서 나타난 免疫抑制能力을 지닌 것으로 나타난 子宮蛋白質은 돼지에서 分子量 15,000 인 Progesterone 유래의 酸性蛋白質로 보고 되어 있고 (Murray 등, 1978), 妊娠 10.5 일과 16~18 일에 돼지 conceptus 는 分子量 20,000~25,000, 35,000~50,000 인 2 개의 蛋白質을 분리한다는 보고 (Godkin 등, 1982) 를 볼 때, 본 실험에서 妊

娠 15 일에 나타나는 分子量 38,000, 22,300 및 12,600 (MW) 의 band 는 胎兒 및 Progesterone 유래 蛋白質의 混合物인 것으로 추정되었다.

IV. 摘 要

本 실험은 돼지에서 發情週期和 妊娠週期和 妊娠 初期의 子宮液中 蛋白質의 變化와 蛋白質의 免疫抑制力을 조사하고자 시도하였다. 子宮液은 發情週期

및 妊娠 3, 6, 9, 12, 15 日에 각각 子宮角을 灌流하여 子宮液中에 蛋白質특성을 조사하였다. 子宮液蛋白質의 變化는 15% Polyacrylamide gel electrophoresis, 分子量測定은 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 로 조사하였다. 子宮液蛋白質의 免疫抑制力은 Concanavalin A 로 유기된 淋巴球 blastogenesis 의 抑制정도로써 측정하였다.

1. 子宮液의 總蛋白質量은 非妊娠 및 妊娠期, 모두 3~9 日까지는 일정한 濃度였으나, 12 日에 增加되어 15 日에 최고치를 나타냈다. 한편 血清蛋白質의 濃度는 發情週期에 82~95 mg/ml 이었으나 妊娠에는 70~82 mg/ml 로 다소 감소되는 경향이였다.

2. 蛋白質成分은 發情週期 및 妊娠 3, 6 및 9 日에 모두 蛋白質像 (band : a, b, c, d, e, f, g, i) 에 차이가 없었으나 12 日째의 子宮液은 2 개 band 가 각각 더 나타났다. 한편 妊娠 15 日에서는 9 日 이전보다 4 개 band 가 더 나타났다. 이 band 는 酸性蛋白質로 분자량이 38,000, 22,300 및 12,600 이었다.

3. 子宮液의 免疫抑制力은 發情週期 3 日의 子宮 단백질濃度 500 μ g/ml 添加에서는 抑制力이 없었으나 妊娠 3 日의 子宮蛋白質은 500 μ g/ml 添加時 다소 抑制力이 나타났다. 發情週期和 妊娠 9 日째의 子宮蛋白質의 경우는 각각 500 μ g/ml 와 150 μ g/ml 添加에서 抑制力이 나타났고 한편 12 日과 15 日에는 각각 같은 水準인 150 μ g/ml 와 100~125 μ g/ml 添加에서 抑制力이 나타났다.

V. 引用文獻

1. Arthur, A.T. and J.C. Daniel, 1972. Progesterone regulation of blastokin production and maintenance of rabbit blastocytes transferred into uteri of castrate recipients. *Fertil. Steril.*, 23 : 115-122.
2. Beir, H.M., 1978. Physiology of uteroglobin. In "Novel aspects of reproductive physiology" (Ed. C.H. Spilman & J.W. Wilks Spectrum Publ. Inc., New York. London) pp. 220-248.
3. Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. "Gel electrophoresis". Ann New York Acad. Sci., 121 : 404.
4. Ford, S.P. and R.K. Christenson, 1979. Blood flow to uteri of sows during the estrous cycle and early pregnancy : local effect of the conceptus on the uterine blood supply. *Biol. Reprod.*, 21 : 617-624.
5. Godkin, J.D., F.W. Bazer, G.S. Lewis, R. D. Geisert and R.M. Robert, 1982. Synthesis and release of polypeptides by pig conceptuses during the period of blastocyst elongation and attachment. *Biol. Reprod.*, 27 : 977-987.
6. Godkin, J.D., F.W. Bazer and R.M. Roberts., 1984. Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and effects protein synthesis. *Endocrinology*, 114 : 120-130.
7. Guthrie, H.D., D.W. Henricks and D.L. Handlin, 1972. Plasma estrogen, progesterone and lutenizing hormone Prior to estrous and during early pregnancy in pigs. *Endocrinology*, 91 : 675-679.
8. Hafez, E.S.E., 1987. Reproduction in farm animals. 5th Ed. Lea & Febiger., pp. 210-228.
9. Hedrick, J.L. and A.J. Snith, 1968. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126 : 155.
10. Jacobs, M.H. and C.R. Lyttle, 1987. Uterine media proteins in the rat during Gestation. *Biol. Reprod.*, 36 : 157-165.
11. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr. and R.H. Randal, 1961. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265.
12. Magness, R.R., L.P. Reynolds and S.P. Ford, 1986. Evidence for uterine metabolism of progesterone during early pregnancy in the pig. *Theriogenology*, 25 : 551-558.
13. McDonald, L.E., 1980. Veterinary Endocrinology and reproduction. 3th Ed. Lea & Febiger.

- er., pp. 309–312.
14. Murray, F.A., F.W. Bazer, H.D. Wallace and A.C. Wornick, 1972. Quantitative and qualitative variation in the secretion of protein by the porcine uterus during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 7 : 314–320.
 15. Murray, F.A., E.C. Segerson and F.T. Brown, 1978. Suppression of lymphocytes in vitro by porcine uterine secretory protein. *Biol. Reprod.*, 19 : 15–25.
 16. Perry, J.S. and I.W. Rowlands, 1962. Early Pregnancy in The Pig. *J. Reprod. Fertil.*, 4 : 175–188.
 17. Rodbard, D., A. Chrambach and G.H. Weiss, 1974. In *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel*, p. 62 Allen, R.C. and H.R. Maurer. (Eds.) Walter de Gruyter. Berlin and New York.
 18. Segerson, E.C., D.W. Libby, W.R. Getz and R.D. Randel, 1984. Immunosuppressive effect of uterine secretory protein from angus and brahman cows upon lymphocytes in vitro. *J. Anim. Sci.*, 59 : 1047–1058.
 19. Squire, G.D., F.W. Bazer and F.A. Murray, 1972. Electrophoretic patterns of porcine uterine protein secretions during the estrous cycle. *Biol. Reprod.*, 7 : 321–325.
 20. Urzua, M.A., R. Stambough, G. Flicknger and L. Mastroianni, 1970. Uterine and oviduct fluid protein patterns in the rabbit before and after ovulation. *Fertil. Steril.*, 21 : 860–865.
 21. Weber, K. and M. Osborn, 1969. The reliability of molecular weight determination by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244 : 4406.