

한우에서 임신 초기 발현 차이 혈장 단백질의 단백질체학적 분석

김평희^{1,**} · 권대진¹ · 오건봉¹ · 이휘철¹ · 양병철¹ · 임기순¹ · 민관식² · 윤종택² · 진동일³ · 박수봉¹ · 황성수^{1,†}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오공학과, ²한경대학교 생물환경정보통신전문대학원, ³충남대학교 축산학과

Proteomic Analysis of Differentially Expressed Plasma Proteins during Early Pregnancy in Hanwoo

Pyung-Hee Kim¹, Dae Jin Kwon¹, Keon-Bong Oh¹, Hwi-Cheul Lee¹, Byoung-Chul Yang¹, Gi-Sun Im¹, Kwan-Sik Min², Jong-Taek Yoon², Dong-Il Jin³, Soo-Bong Park¹ and Seongsoo Hwang^{1,†}

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

²Hankyong National University, Anseong 456-749, Korea, ³Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

ABSTRACT

This study was performed to comprehend the plasma proteins expressed specifically during early pregnancy in pregnant or non-pregnant Hanwoo using proteomic analysis technique. Plasma samples (0, 2, 3, 4, 7, and 11 weeks after AI) were obtained from pregnant (P, n=3) or non-pregnant (NP, n=4) Hanwoo, respectively. To evaluate proteins differentially expressed, 2-dimensional electrophoresis (2DE) was conducted. Normalized protein spots were selected for the significant expression variation deviated over two fold in its expression level between two groups. Molecular functions of the proteins were DNA binding, protein binding, hemoglobin binding, ferrochelatase and transporter activity and arylestera, respectively. According to western blotting, haptoglobin was specifically expressed only in NP group during early pregnancy; however, paraoxonase 1 was highly expressed in pregnant group. Based on these results, pregnancy was maintained successfully by the activation of specific plasma proteins associated with immune system and antioxidant regulation during early pregnancy in Hanwoo.

(Key words : Plasma protein, Early pregnancy, 2DE, Haptoglobin, Paraoxonase 1)

서 론

정상적으로 임신이 이루어지기 위해서는 다양하고도 복잡한 현상들이 체내에서 일어나게 되는데 특히, 모체로부터 태반의 혈관을 통해 산소나 기타 여러 물질들이 태아에게 적절하게 공급이 되어야만 한다(Hoffer-Goeres 등, 2007; Bae 등, 2008; Hwang 등, 2009). 이를 조절하기 위해서 시상하부, 뇌하수체 및 자궁 등의 기관에서 특정 시기와 목적에 맞게 분비되는 호르몬과 단백질들은 혈액을 통해 목표기관에 전달되어 태반과 태아의 발달 등 신체의 항상성 유지에 중요한 역할을 담당하고 있다(Taponen 등, 1999; 성 등, 2006; 황 등, 2008).

하지만 정상적 임신 유지를 위해 모체와 태아 간에 주고 받는 물질들을 혈액에서 발굴하여 분석하는 것은 매우 어려운 것이 사실이다. 최근 생식의학 연구 분야에서 2차원 전기영동법 등 고도의 단백질체학적(proteomic) 분

석 기술의 개발과 이를 응용한 다양한 기법들의 발달로 인하여 체내에서 일어나는 번식생리학적 현상들에 대한 이해뿐만 아니라 임신과 관련된 여러 다양한 현상들에 대해서도 진단 또는 예측이 가능한 마커의 발굴 등이 가능하게 되었다(Jarkovska 등, 2010).

2차원 전기영동법을 이용하여 사람의 성숙 또는 미성숙 난포에서 채취한 난포액에 존재하는 단백질의 발현 양상을 분석한 이후(Spitzer 등, 1993), 번식생리 관련 연구분야에서 다양하면서도 발전적인 단백질체학적 접근이 이루어지고 있다(김 등, 2008; Jarkovska 등, 2010).

최근의 보고에 따르면, 세포증식, 호르몬 분비 및 기관 발달과 관련이 있는 임신 관련 단백질들(pregnancy-associated proteins)이 존재하는 것으로 보고되고 있다(Taponen 등, 1999). 소에서는 임신기간 중 요낭액(allantoic fluid) (Georage, 2008)과 양수(amniotic fluid) (Buhimschi, 2007)에서 임신 관련 특정 단백질이 존재한다는 것이 보고하기도 하였다. 또한, 많은 연구에서 태아의 발달, 태반

* 본 과제는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: PJ007056) 연구비로 실시되었음.

** 최근 근무지: 경기 안양 만안 안양6동 국립수의과학검역원 세균과

† Corresponding author : Phone: +82-31-290-1761, E-mail: hwangss@rda.go.kr

및 자궁의 환경과 관련된 단백질에 대해 조직학적, western blotting 및 2차원 전기영동법을 이용하여 분석한 내용들이 보고되고 있다. 하지만 임신기간 중 혈장 단백질에서 임신과 관련된 단백질의 발현 및 기능에 대해서는 거의 알려진 것이 없다고 해도 과언이 아니다.

따라서 본 연구는 임신 또는 비임신된 한우에서 임신 초기 혈장 단백질의 발현 양상을 비교·분석하여 임신 초기에 자궁 내 환경 변화를 이해하는데 도움이 되고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시동물

공시축은 농촌진흥청 국립축산과학원(<http://www.nias.go.kr>)에서 사육하고 있는 정상적인 발정주기를 나타내는 한우 3~7년 생의 미경산 및 경산우 10두를 시험에 공시하였다. 공시축의 처리는 김 등(2006)의 방법을 일부 변경하여 실시하였다. 간단히 요약하면 공시축의 발정주기에 상관없이 progesterone releasing intravaginal device(CIDR-plus, InterAg, New Zealand)를 질 내에 7일간 삽입하고 CIDR를 제거하면서 PGF₂α 25 mg을 투여한 다음 판매 중인 한우 동결정액을 이용하여 인공수정을 2차례 실시하였다. 임신진단은 인공수정 후 60일경에 초음파(Sono 600, Medison Co., Seoul, Korea)를 이용한 진단과 직장검사를 병행하여 실시하였다.

호르몬 분석

인공수정을 실시한 날로부터 매 일주일 단위로 총 11주 동안 경정맥에서 채혈한 다음 용혈이 생기지 않도록 하여 실험실로 운반하였다. Progesterone(P4) (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA)의 농도 분석은 ELISA 키트(Endocrine Technologies Inc. Newark, CA, USA)를 이용하여 450 nm 파장의 ELISA reader(Microplate Autoreader, Bio-Rad, USA)로 각 샘플당 2반복하여 측정하였다.

혈장 단백질 추출

혈액을 145×g로 20분간 원심분리하여 혈장을 분리한 다음 상층액만 회수하여 분석할 때까지 냉동보관하였다. 혈장 단백질 추출은 김 등(2008)의 방법에 따라 진행되었다. 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°C에서 21,000×g로 1 시간 동안 원심 분리하여 상층액 중 100 ul를 이차원전기영동의 시료로 사용하였다.

2차원 전기영동

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 12~16시

간 정도 reswelling 되었다. Strip 당 시료는 각각 200 ug씩을 사용하였으며, Multiphore II system(GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA)을 이용하여 제조회사의 사용매뉴얼을 준수하여 20°C에서 IEF를 수행하였다. 이차적으로 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG Strips을 1% DTT를 함유한 equilibration buffer(50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 전처리하였으며, 곧 바로 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°C에서 최종적으로 1.7 kVh가 되게 전개하였다. 이차원 전기영동이 완료된 이차원 젤의 단백질은 Oakley 등(1980)의 방법에 따라 은염색(silver stain)으로 시각화되었으며, 질량분석기에 의한 단백질 동정을 위하여 glutaraldehyde 처리 단계는 생략되었다. 단백질 spots의 발현 변화 확인을 위한 정량적인 분석은 PDQuest software(version 7.0, BioRad)를 이용하여 수행하였다. 각 spot의 quantity는 total valid spots의 intensity로 평준화(normalization) 되었으며, 대조군에 비해 두 배 이상의 유의한 발현 변화를 보여주는 단백질 spots을 선정하였다.

질량분석을 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, C18ZipTips(Millipore, Bedford, IL, USA)을 이용하여 1~5 ul 부피로 탈염 및 농축되었다.

단백질 동정

질량분석기는 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 검색엔진(<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>)을 이용하였다. 한편, SPIC 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.

Western Blot Analysis

총 단백질이 30 ug이 되도록 정량한 다음 SDS-PAGE를 실시하였다. 분리된 단백질은 25 mM tris, 193 mM Glycine 및 5%(V/V) 메탄올이 첨가된 용액(transfer buffer)에서 PVDF membrane(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 옮겨지도록 하였다. 단백질 이동은 transfer tank(Hoefer, USA)에서 80 V, 4°C 조건으로 2시간 동안 통전을 실시하였다. 전달이 끝난 다음, PVDF membrane은 TBS; 20mM Tris-HCl(pH 7.6); 154 mM NaCl 및 1%(V/V) Tween-20(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)이 첨가된 Tris-

buffered saline에서 수차례 세척을 실시하였다. 세척이 끝난 PVDF membrane은 비특이적 항체 결합을 방지하기 위하여 blocking buffer(5% non-fat dry milk)에서 1시간 동안 처리하였다. PVDF membrane을 3차례 이상 Tris-buffered saline으로 세척을 실시한 다음 제1차 항체(1:1,000)가 첨가된 용액에 침지하여 4°C에서 밤새도록 교반을 실시하였다. Tris-buffered saline으로 3차례 이상 세척을 실시한 다음, 제2차 항체(1:10,000)가 첨가된 용액에서 30분 동안 반응을 유도하였다. 항원-항체 결합을 가시적으로 확인하기 위하여 enhanced chemiluminescent detection kit(ECL kit, Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 처리하였으며, X-ray 필름에 노출을 실시하여 밴드의 강도를 확인하였다.

통계분석

모든 데이터는 mean±standard deviation(SD) 값으로 나타내었다. 모든 결과는 3회 이상 반복 실험을 실시하여 얻은 결과를 바탕으로 통계 분석을 실시하였다. One-way analysis of variance(ANOVA) 방법을 활용하여 각 처리군 간의 차이를 확인하였다. P값이 0.05 이하일 때에만 통계적 유의차를 인정하였다.

결 과

본 실험에 공시된 한우에서 인공수정 후 임신 초기 동안의 P4 농도 변화를 측정하였다(Fig. 1). 임신군에서 인공수정 후 2주차부터 P4의 농도가 높아져 임신 초기 동안

높은 수준을 유지하였다. 하지만 비임신군의 경우 P4의 농도가 3주를 단위로 주기적으로 변화하는 경향을 나타내었다.

임신 또는 비임신 한우의 혈장에서 2차원 전기영동 방법을 이용하여 2배 이상의 발현 차이를 나타내는 17개의 spots을 발굴하였으며, 각 spot에 대한 분석 결과는 Table 1과 같았다(김 등, 2008). Positive matrix factorization (PMF) 또는 chemical assisted fragmentation(CAF) 분석법을 통해 분석된 17개의 동정된 spots은 알부민, IgG, haptoglobin, ferrochelatae, fibrinogen, hemopexin, paraoxonase 1 및 Rab27a 등으로 확인되었다.

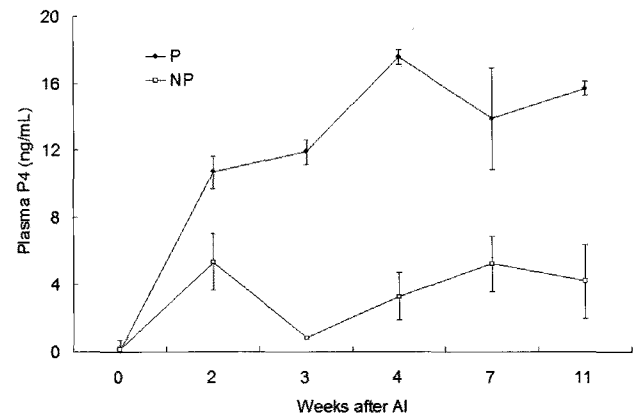


Fig. 1. Expression of plasma progesterone levels during early pregnancy in Hanwoo.

Table 1. 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	Ferrochelatae	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			Rab27a	5.2	24.86
	7107			Haptoglobin isoform 1	6.1	45.21

This data was quoted from Kim et al., (2008).

Table 2. Functional lists of the plasma proteins identified

Name	Spot ID	Molecular function
Ferrochelatase	1105	Ferrochelatase activity
	4308	
Albumin [<i>Bos taurus</i>]	5307	DNA binding
	6680	
AP-1 beta'=Golgi adaptor	8101	Transporter activity
Paraoxonase 1 [<i>Bos taurus</i>]	1208	Arylesterase
IgG1 heavy chain constant region	3109	Protein binding
Prepro complement component C3	5106	Protein binding
	5110	
Complement component 3	5111	Protein binding
Hemopexin [<i>Bos taurus</i>]	7404	Heme transporter
Rab27a	6106	GTPase activity
Haptoglobin isoform 1	7107	Hemoglobin binding
	6202	Hemoglobin binding
Haptoglobin [<i>Bos taurus</i>]	8110	
Chain C, The crystal structure	1305	
Fibrinogen, alpha polypeptide	7409	Blood coagulation activity

동정된 단백질의 분자적 기능(molecular function)을 분류한 결과 몇몇 기능적 그룹이 있는 것으로 나타났다(Table 2). 주로 DNA binding(spot 4308, 5307, 6680), protein binding(spot 3109, 5106, 5110, 5111) 및 hemoglobin binding(spot 6202, 7107, 8110) 등이 많았으며, 이외에 ferrochelatase activity(spot 1105), arylesterase(spot 1208), transporter activity(spot 8101), hemo transporter activity(spot 7404) 및 GTPase activity(spot 6106) 등으로 확인되었다.

2차원 전기영동법을 통해 특이적으로 발현되는 단백질을 western blotting 방법으로 확인한 결과는 다음과 같았다. Hemoglobin binding과 관련이 있는 것으로 분석된 heptoglobin의 발현은 임신군에서는 전혀 발현이 나타나지 않았으나, 비임신군에서는 지속적으로 나타나는 것을 확인하였다($p<0.05$) (Fig. 2). 반면에 항산화와 관련이 있는 것으로 알려진 peroxinase 1(PON 1)의 경우 임신군에서 착상이 일어나는 시기로 알려진 4~7주 사이에 유의적으로 높아졌다가($p<0.05$) 이후 낮은 수준으로 발현되는 것으로 나타났다.

고 찰

소에서 임신 초기 태아가 안전하게 착상하기 위해서는

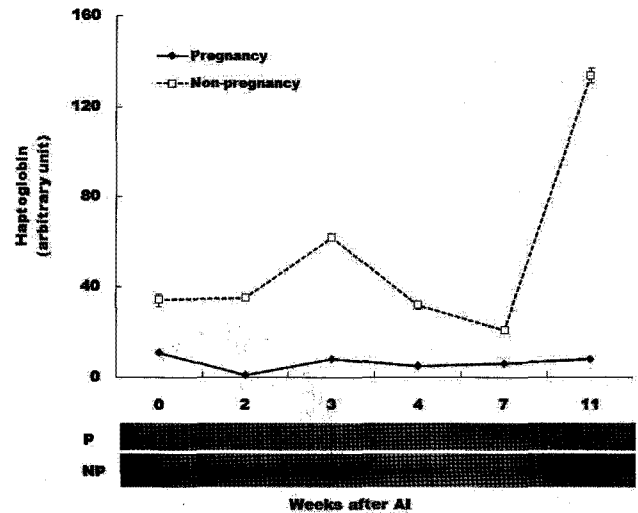


Fig. 2. The expression levels of haptoglobin in pregnant or non-pregnant Hanwoo during early pregnancy. P vs. NP: $p<0.05$ (0~7 weeks); $p<0.01$ (11 week).

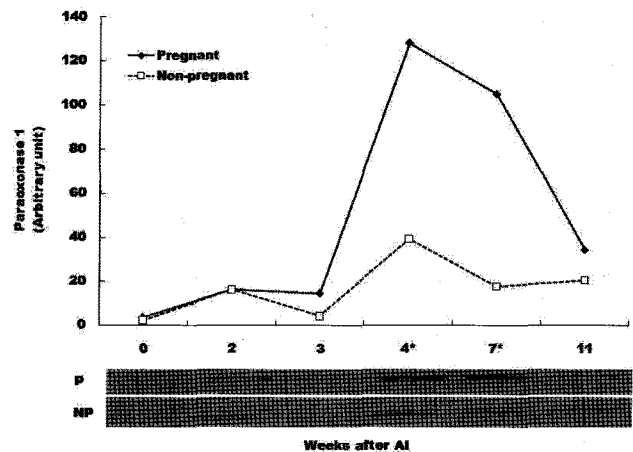


Fig. 3. The expression levels of paraoxonase 1 in pregnant or non-pregnant Hanwoo during early pregnancy. P vs. NP: $p<0.05$ (3, 11 week); $p<0.01$ (4, 7 week).

모체의 자궁환경이 매우 극적인 변화를 겪게 된다. 이를 위해서는 모체로부터 다양한 호르몬 또는 단백질 등이 분비되어 혈액을 통해 관련 기관으로 전달되기 때문에 모체의 혈액은 자궁 내 환경을 이해하는데 매우 중요한 시료가 될 수 있다. 하지만 혈액 중에서 다량의 알부민 성분이 포함되어 있기 때문에 단백질체학적 접근이 어려웠던 것이 사실이다.

최근 혈액 내 다량으로 존재하는 단백질(알부민, IgG, transferrin 및 fibrinogen 등)들을 제거할 수 있는 제품들이 개발되면서 혈장 또는 난포액 등 체내에서 회수한 용액을 분석할 수 있는 방법들이 개발되고 있는 실정이다 (Govorukhina 등, 2003; Steel 등, 2003; Wang 등, 2003; Jarkovska 등, 2010).

본 연구는 임신 초기 기간 동안에 임신 또는 비임신된 한우의 혈액을 주기적으로 채취하여 혈장을 분리한 다음, 이들 간에 특이적으로 발현 차이를 보이는 단백질들을

발굴하고, 그 발현 차이를 살펴보고자 실시하였다. 임신 또는 비임신된 한우에서 임신 진행에 따라 2배 이상의 발현 차이를 나타내는 spot 17개 중에서 IgG, haptoglobin, Golgi adaptor protein beta 1 subunit 및 prepro complement component C3 등은 비임신군에서 강하게 발현하는 것으로 분석되었다(Table 1) (김 등, 2008). Prepro complement component C3(5106, 5110 및 5111)의 경우 동정된 spot이 동일한 크기에서 발현이 되었지만 전하(pH)에서 차이가 나서 다른 위치에서 발현하는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 해당 단백질의 인산화 등이 일어난 것으로 추정할 수 있겠다. 하지만 이 단백질이 비임신군에서만 강하게 발현하는 것으로 나타나 초기 임신 유지와 어떠한 관련이 있을 것인지에 대해서는 추가적인 기능 분석을 실시하여야만 할 것이다.

Haptoglobin은 헤모글로빈과 결합하는 기능으로 알려져 있으며, 혈액 내에서 haptoglobin 농도가 낮은 경우 간세포 장애, 전염성 단핵구증, 체내 조직에의 출혈 또는 선천성 결손 등이 원인인 것으로 보고되었다(이와 이, 1996; Burtist와 Ashwood, 1994). Haptoglobin은 급성기 면역 반응(acute phase response)에 관여하는 것으로 알려져 있으며, haptoglobin의 증가는 prostaglandin의 합성을 억제하여 결과적으로 lymphocyte의 활성을 강하게 하여 면역 기능을 강화시키는 것으로 보고되고 있다.

2차원 전기영동 결과, haptoglobin이 비임신군에서 강하게 발현하는 것으로 확인이 되었다. 이를 western blotting 방법으로 재차 확인한 결과, Fig. 2에서와 같이 임신군에서는 임신 초기 동안에 전혀 발현하지 않았으나, 비임신군에서는 지속적으로 강하게 발현하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 임신 초기에 모체와 태아 간의 면역관용에 영향을 미치는 것으로 생각해 볼 수 있다. 이러한 시기에 모체가 태아를 외부 물질로 인식하여 면역 거부 반응 기전을 통해 제거하지 않도록 면역기능과 관련된 단백질들의 활성을 억제하는 것이 아닌가 사료된다.

Paraoxonase-1(PON-1)은 high density lipoprotein(HDL)과 결합된 ester 분해효소로써(Gan 등, 1991), 항산화 작용(Wiese 등, 1995; La Du 등, 1996)과 low-density lipoprotein(LDL)의 산화과정으로 인한 과산화 지질의 생산을 감소시키는 작용을 하는 것으로 보고되어 왔다(Balakrishnan 등, 1998). 최근 PON-1이 reactive oxygen species(ROS)로 인한 손상조직의 수복과 관계가 있는 것으로 보고되어 아직까지 밝혀지지 않은 기능들에 대해서 관심을 받고 있다(Mackness 등, 1996; Josse 등, 2001; Duy 등, 2003).

임신과 관련된 기능에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 거의 없다. 단지 임신 말기 또는 초기 수유기에 종종 발생하는 영양적 불균형이 일어나는 시기에 산화 스트레스(oxidative stress) 발생과 관련하여 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Roche 등, 2000). 또한, 젖소에서 분만 초기에 혈장 내 PON-1의 농도가 감소된다고 보고되었다(Turk 등, 2004). 하지만 본 연구자의 지식으로는 아직까지 임신 초기 혈액 내 PON-1의 발현에 대해서는 보고된 바가 없었다.

본 연구에서 임신 초기 혈액을 이용하여 western blotting을 실시한 결과, 예상과 같이 PON-1의 발현이 임신군 특히 4-11주에 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 임신 초기 착상이 일어나는 시기에 자궁 내

에서 항산화와 관련된 일련의 변화들이 급격히 일어난다는 것을 암시한다고 할 수 있겠다.

이상의 결과를 종합하여 보면 소의 경우 임신 약 30~33 일 경에 태아와 모체 간의 접촉면이 변화가 일어나 용모막 용모와 성숙 소 태반의 특성인 자궁와(uterine crypts)를 형성한다고 보고하였다(King 등, 1979). 이러한 시기에 면역과 관련된 단백질은 억제를 시킴과 동시에 항산화와 관련된 단백질들은 활성화시켜 착상이 원활히 이루어질 수 있도록 작용하는 것으로 판단된다.

본 실험으로 얻어진 결과를 바탕으로 얻어진 임신 특이 발현 유전자의 기능적인 분석이 진행된다면 임신 초기 자궁 내에서 일어나는 모체와 태아 간의 상호 작용에 대한 이해도를 높이고, 다양한 요인들로 진행되는 임신에 대해 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것이라 사료된다.

인용문헌

1. Bae SH, Yang BC, Joo SC, Min KS, Yoon JT, Jin DI, Kim TH, Seong HH, Hwang S (2008): Expression levels of plasma angiogenic factors during early pregnancy in Hanwoo. *Reprod Dev Biol* 32:263-267.
2. Balakrishnan SD, Anuradha CV (1998): Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. *Cell Biochemistry Function* 16:269-275.
3. Buhimschi CA, Bhandari V, Hamar BD, Bahtiyar MO, Zhao G, Sfakianaki AK, Pettker CM, Magloire L, Funai E, Norwitz ER (2007): Proteomic profiling of the amniotic fluid to detect inflammation, infection, and neonatal sepsis. *PLoS Med* 4(1): e18. 84-94.
4. Burtist CA, Ashwood ER (1994): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd ed. WB Saunders Company. Philadelphia, pp 688-691.
5. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN (1991): Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 19:100-106.
6. Govorukhina NI, Keizer-Gunnink A, van der Zee AG, de Jong S, de Bruijn HW, 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.
7. Hoffer-Goeres KA, Batchelder CA, Bertolini M, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB (2007): Angiogenesis in day-30 bovine pregnancies derived from nuclear transfer. *Cloning and Stem Cells* 9:595-607.
8. Hwang S, Chang YM, Ko YG, Yang BC, Min KS, Yoon JT, Nho WG, Kim CK, Seong HH (2009): Delayed parturition in cloned calves associated with persistently elevated placental TGF- β 1 expression. *Anim Reprod Sci* 115:290-295.
9. Jarkovska K, Martinkova J, Liskova L, Halada P, Moos J, Rezabek K, Gadher SJ, Kovarova H (2010):

- Proteome mining of human follicular fluid reveals a crucial role of complement cascade and key biological pathways in women undergoing *in vitro* Fertilization. *J Proteome Res* 9:1289-1301.
10. Josse D, Lockridge O, Xie W, Bartels CF, Schopfer LM, Masson P (2000): The active site of human paraoxonase (PON1). *J Appl Toxicol* 21:57-11.
 11. King GJ, Atkinson BA, Robertson HA (1979): Development of the bovine placenta during the second month of gestation. *J Reprod Fertil* 55:173-180.
 12. La Du BN (1996): Structural and functional diversity of paraoxonase. *Nat Mol* 2:1186-1187.
 13. Mackness MI, Mackness B, Durrington PA, Connelly PW, Hegele RA (1996): Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 7:69-76.
 14. Nguyen S, Sok D (2003): Oxidative inactivation of paraoxonase 1, an antioxidant protein and its effect on antioxidant action. *Free Radical Res* 37:1319-1330.
 15. Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR (1980): A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105:361-363.
 16. Riding GA, Jones A, Holland MK (2008): Proteomic analysis of bovine conceptus fluids during early pregnancy. *Proteomics* 8:160-177.
 17. Roche JF, Mackey D, Diskin MD (2000): Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci* 60-61:703-712.
 18. Spitzer D, Murach KF, Lottspeich F, Staudach A, Illmensee K (1996): Different protein patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles. *Hum Reprod* 11:798-807.
 19. Steel LF, Troiter MG, Nakajima PZ, Mattu TS, Gonye G, Block T (2003): Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol Cell Proteomics* 2:262-270.
 20. Taponen J, Katila T, Rodriguez-Martinez H (1999): Induction of ovulation with gonadotropin releasing hormone during proestrus in cattle: influence on subsequent follicular growth and luteal function. *Anim Reprod Sci* 55:91-105.
 21. Turk R, Juretic D, Geres D, Turk N, Rekec B, Simeon-rudolf V, Svetina A (2004): Serum paraoxonase activity nad lipid parameters in the earl postpartum period of dairy cows. *Res Vet Sci* 76:57-61.
 22. Wang YY, Cheng P, 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.
 23. Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJA (1995): Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 318:231-240.
 24. 김영훈, 고진철, 오창언, 강승률, 양보석, 오성중, 김창능, 송중용, 김일화 (2006): CIDR를 이용한 제주 한우 및 흑우의 체내 수정란 생산과 이식. *한국수정란이식학회지* 21:191-198.
 25. 김평희, 배성훈, 오석두, 고응규, 양병철, 김명직, 진동일, 성환후, 황성수 (2008): 한우의 임신 초기 혈장 단백질 발현 양상 분석. *한국수정란이식학회지* 23:25-30.
 26. 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.
 27. 이귀녕, 이종순 (1996): 임상병리화학. 의학문화사. 서울, pp 192-194.
 28. 황성수, 최선호, 장유민, 고응규, 양병철, 임기순, 민관식, 성환후 (2008): 체세포 복제란 이식 한우의 분만 전 혈장 Progesterone과 Estradiol-17 β 농도 변화. *한국동물번식학회지* 32:199-203.
- (접수일자: 2010. 9. 10 / 채택일자: 2010. 9. 17)