

韓牛에 있어서 *Theileria sergenti*의 抗原性에 關한 研究

白秉杰·金秉洙·李宰求

全北大學校 獸醫科大學

(1990. 2. 28 접수)

Study on the antigenicity of *Theileria sergenti* merozoite in Korean native cattle

Byeong-kirl Baek, Byeong-su Kim, Jae-ku Rhee

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received Feb 28, 1990)

Abstract: A splenectomized 5-month-old calf was inoculated with cryopreserved *Theileria sergenti* infected blood originated from naturally infected Korean native cattle in Chonbuk district. At peak parasitemia (40.1%), blood was collected, washed, lysed and then the *T sergenti* merozoite was isolated by differential centrifugation. Antigenic profile of isolated *T sergenti* organism was analyzed by SDS-PAGE and western blotting techniques. Coomassie blue stained SDS-PAGE gel revealed at least twelve protein bands of approximately 14Kd, 28Kd, 30Kd, 34Kd, 36Kd, 38Kd, 41Kd, 56Kd, 66Kd, 72Kd, 97Kd and 116Kd in the merozoite homogenate. In western blot, although *T sergenti* antigen recognized by specific anti-*T sergenti* antibodies demonstrated 28Kd, 30Kd, 38Kd, 56Kd, 58Kd, 66Kd, 97Kd and 116Kd proteins. False positive reactions were also observed in normal bovine serum with *T sergenti* and normal erythrocytic antigens. Therefore, predominant proteins of *T sergenti* merozoite antigen were found to be 28Kd, 30Kd, and 41Kd proteins of molecular weights. On going studies we will analyze the relative importance of those antigens for immunity of *T sergenti* in Korean native cattle.

Key words: *Theileria sergenti*, SDS-PAGE, western blot, molecular weight.

緒 論

타이레리아病은 Ixodidae科 진드기 媒介性 傳染病으로 우리나라에서는 *Theileria sergenti*가 分布하며, 韓半島 全域에 걸쳐 風土病化되어 있는 原蟲性 住血寄生 蟲病^{1,4}으로 지역에 따라 차이는 있지만 젖소 100%, 韓牛 87.3%의 높은 感染率을 나타내고 있다.^{4,5} 感染 初期에 發熱과 貧血 症床을 수반하며 體重感少, 流産 그리고 治療하지 않으면 높은 幣死率을 가져올뿐만 아니라, 恢復 後에는 保菌牛로서 疫割을 하며, 再 感染時 免疫은 形成되나 臨床症床이 再現되고 있다. 우리나라에 있어서의 타이레리아病에 대한 研究는 病原體

의 分離, 診斷, 血清學的 分布 調査가 이루어진 바 있지만¹⁻⁸ 이의 豫防을 위한 商業用 백신은 아직 開發, 使用되지 못하고 있다. 그러나 최근에 弱毒化시킨 感染血液으로 제조한 백신에 대한 研究가^{6,9} 進行되고 있어 타이레리아病에 의한 經濟적 損失을 최소화할 수 있다고 期待되는 사이지만, 養畜農家에서는 이의 豫防 目的으로 진드기 구충제를 濫用하고 있는가 하면, 獸醫師의 診斷없이 각 種 抗生劑를 使用하고 있는 實情이다.

現在 타이레리아病을 免疫學的으로 豫防하기 위하여 여러가지 方法이 擧論되고 있다. 즉, 病毒性이 비교적 弱한 菌株을 接種시켜 豫備免疫을 形成하는 方法,¹⁰⁻¹²

이 論文은 1989년도 文敎部 學術研究助成費에 의하여 研究되었음(畜産開發研究所).

感染 淋巴球 培養產物 接種方法,^{13,14} 純化菌株의 組織 培養產物 接種 方法,¹¹ 感染 赤血球 培養產物 接種 方法,^{11,12} 人工感染後 治療를 통한 免疫形成 方法^{11,12} 등이 있으며, 앞으로는 抗原에 대한 단클론 抗體의 생산¹⁵ 및 유전자 適合 등의 方法에 의한 백신 開發이 可能한 바,¹⁶ 著者 등은 현재 國內에서 流行하는 타이페리아病에 대한 백신개발의 基礎 研究로서 全北地方 韓牛에서 分離한 *T sergenti* 菌株를 비장적출 韓牛 송아지에 人工 接種시킨 後 感染血液으로 부터 얻은 抗原의 構成을 糾明하고자, SDS-PAGE와 western blot 技術로 抗原性을 免疫酵素學的으로 觀察하였기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

***Theileria sergenti*의 分離 및 增菌**: 全北 山間地域에서 飼育하고 있는 韓牛에서 *T sergenti*임이 形態學的으로 認定되는 菌株를 液體窒素에 보존하면서 試驗菌株로 使用하였으며, *T sergenti* 感染血液을 多量 얻고자 5個月齡 비장적출 韓牛(No. 62)에 血液 1.5ml ($5.63 \times 10^6/\mu\text{l}$)을 筋肉接種한 後 赤血球內 蟲體를 確認하고자 血液塗抹標本을 製作, Giemsa 染色하여 赤血球內 蟲體를 確認함과 아울러 寄生率을 調査하였다. 人工感染 後 30日째에 無菌的으로 採血한 다음 抗原 分離에 使用하였다.

赤血球로 부터의 抗原 分離: 비장적출한우에서 얻은 *T sergenti* 感染血液은 Dzandu 등¹⁷과, 白 등¹⁸의 方法으로 赤血球를 溶血시킨 다음, 헤모글로빈을 除去시켰다. 抗凝固劑(heparin)로 處理한 全血을 원심분리하여 血漿과 軟層(buffy coat)를 除去시킨 後 赤血球를 세척액[5mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 1.0mM EDTA, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), pH7.4, 0~4°C]으로 3회 세척(2,000rpm/15min)한 다음, 溶血液(5mM Tris-HCl, 7mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF, pH8.0, 0~4°C)을 加하여 遠沈 赤血球를 30倍 稀釋하였다. 이를 다시 遠心分離(15,000g/30min, 0~4°C)하여 赤血球 細胞膜과 細胞基質을 除去시키는 作業을 反復遂行하여 最終 沈澱物의 中央部에 위치한 淡赤褐色 沈澱物質만을 얻었다.¹⁷⁻¹⁹ 이 沈澱物質을 Giemsa 染色하여 *T sergenti*의 merozoite (Fig 2)임을 確認한 後, PBS(140mM NaCl, 7.3mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, 2.7mM KCl, 3.0mM NaNO₃, pH7.4)로 10倍 稀釋하여 20kilocycle에서 超音波粉粹한 液을 원침한 후 上層液을 抗原으로 使用하였다. 한편 *T sergenti*를 人工感染시키기 前의 赤血球를 前記 方法과 同一하게 處理하여 얻은 赤血球性 物質을 對照抗原으로 하였다. 抗原液은 Lowry 등²⁰의 方法으로

蛋白質質量을 測定, 0.1mg/ml씩 되게 蒸溜水로 稀釋, Laemmli 方法²¹에 準하여 SDS-PAGE 하였다.

T sergenti 感染 陽性 및 陰性血清 準備

陽性血清: 비장적출 한우에서 얻은 *T sergenti* 1.5ml 을 5個月齡의 韓牛(No. 64)에 筋肉接種한 後 30일째에 採血, 塗抹標本을 製作, Giemsa 染色하여 *T sergenti*의 感染이 확인된 血液으로 부터 分離한 血清을 陽性血清으로 하였다.

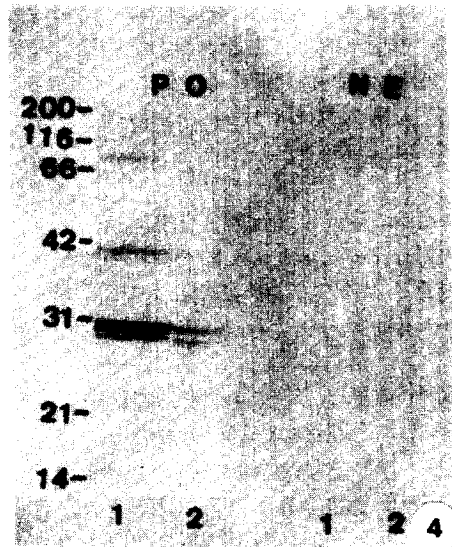
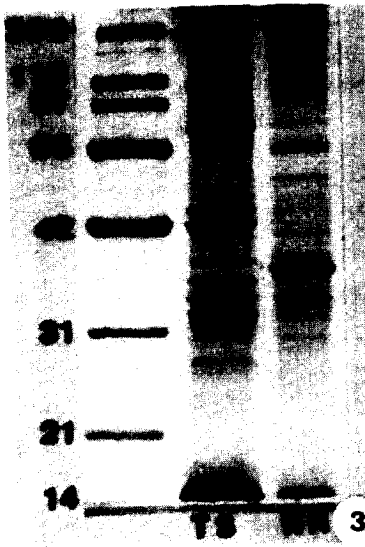
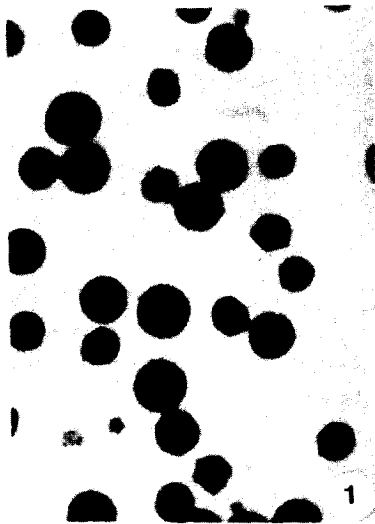
陰性血清: 上記 韓牛(No. 64)에게 *T sergenti*를 感染시키기 前의 血清을 陰性을 陰性血清으로 하였다.

SDS-PAGE: 抗原液의 단백질 造成을 알아보기 위하여 Laemmli 方法²¹에 準하여 電氣泳動을 실시하였다 (Protein II Cell, Bio-Rad). 抗原液과 對照抗原液을 동량의 sample treatment buffer에 각각 섞어 5분간 重湯한 후 5% stacking gel과 10% running gel(각 1.24% C_{Bis})로 구성된 전개용 gel에 적용하고 150볼트/plate의 조건으로 泳動하였다. 이것을 coomassie brilliant blue R250液으로 염색한 후 脫色液으로 脫色, 건조시켰다(KPL). 이때 分子量 標準단백질(14~200Kd, Bio-Rad)을 동시에 泳動하여 각 단백질 band의 分子量을 측정하였다.

Enzyme linked immunoelectrotransfer blotting technique (western blot): 電氣泳動한 겔內의 抗原과 抗體를 免疫學的으로 觀察하고자 Tsang 등²²과 Towbin 등²³의 方法에 準하여 western blot를 실시하였다. 즉, 上記의 電氣泳動한 겔을 0.45μm nitrocellulose (Schleicher & Schull Co)에 sandwich처럼 接觸시킨 후 電氣移動液(25mM Tris, 192mM glycine, 4.7M methyl alcohol)內에서 30볼트로 5時間, 90볼트에서 1時間 電氣移動시켰다. 이 膜을 겔로부터 분리 0.2%되게 Tween 20이 함유된 PBS(pH7.4)에 24시간 방치(4°C)한 후, 血清을 0.05%되게 Tween 20이 함유된 PBS (pH7.4)로 1:200 稀釋, 1時間 接觸시켰다. 血清을 除去한 다음 0.1%되게 Tween 20이 함유된 PBS(pH7.4)로 10분/3회 세척 後, phosphatase로 표지된 bovine IgG antibody(goat, KPL)를 1:1000으로 稀釋, 1時間 接觸시킨 後, 0.1%되게 Tween 20이 함유된 PBS (pH7.4)로 10분/2회 세척한 다음, PBS (pH7.4)로 10분간 다시 세척하였다. 이 nitrocellulose 膜에 基質溶液(BCIP : NBT : 0.1M Tris buffer/1:1:10 混合, KPL)을 넣어, 免疫酵素學的으로 나타나는 polypeptide의 反應帶(band)를 觀察하였다.

結 果

***T sergenti*의 抗原 生産**: 비장적출 송아지(No. 62)



Legends for figures

Fig 1. *Theileria sergenti* infected erythrocyte.

Fig 2. Giemsa-stained smear of purified *Theileria sergenti* merozoite.

Fig 3. 10% SDS-PAGE with Coomassie blue staining.

Fig 4. Western blot of purified *Theileria sergenti* merozoite and Normal antigen reacted with positive serum and negative serum.

Remarks: 1: *T sergenti* antigen.

2: Normal RBC antigen.

PO: Positive serum.

NE: Negative serum.

에 *T sergenti*을 근육接種한 後 30日째에 採血하였으며, 이때 赤血球內 寄生率은 40.1%(Fig 1), 赤血球 總數는 $5.21 \times 10^6/\mu\text{l}$, 白血球 總數는 $9,360/\mu\text{l}$ 그리고 赤血球容積值(Ht) 19%였다.

T sergenti抗原의 SDS-PAGE: *T sergenti*感染 赤血球를 溶血, 헤모글로빈과 赤血球 基質物질을 제거시킨 殘存物질을 SDS-PAGE하였던 바 Fig 3의 제 2 lane에서 보는 바와 같이 많은 band물질이 觀察되었으나, 이 중에서 뚜렷한 band만을 기술하면 다음과 같다. 즉, 14Kd, 28Kd, 30Kd, 34Kd, 36Kd, 38Kd, 41Kd, 56Kd, 66Kd, 72Kd, 97Kd 그리고 116Kd 등의 band 물질이 비교적 뚜렷히 觀察되었다. Fig 3의 제 3 lane은 對照抗原으로서 30~34Kd, 36Kd, 42Kd, 58Kd, 66Kd, 97Kd 그리고 116Kd의 物質이 觀察되었다. 따라서 SDS-PAGE에 의한 *T sergenti* 感染 赤血球로 製造한 抗原性 物質은 28Kd, 31Kd, 38Kd, 56Kd, 72Kd, 97Kd 그리고 116Kd 등이었다.

Western blot所見: *T sergenti* 抗原과 對照 抗原을 SDS-PAGE한 겔을 nitrocellulose 膜에 電氣移動시킨 後 *T sergenti*의 感染 陽性 血清(PO)과 反應시킨 바, Fig 4에서 보는 바와 같이 *T sergenti*抗原(1번 lane)에서 뚜렷한 band로서 나타난 polypeptide의 MW는 28Kd, 30Kd, 36Kd, 38Kd, 41Kd, 48Kd, 56Kd, 58Kd, 66Kd, 97Kd 그리고 116Kd 등이었으며, 對照 抗原(2번 lane)과 陽性血清(PO)과의 反應에서는 28Kd, 30Kd, 41Kd 그리고 56Kd에서만 아주 미약한 反應을 나타냈다.

한편 *T sergenti* 抗原과 陰性血清(NE)과의 反應(3번 lane)에서는 41Kd, 97Kd 그리고 116Kd 物質이 아주 微弱한 反應을 보였으며 對照 抗原과 陰性血清(NE)과의 反應(2번 lane)에서는 거의 band가 觀察되지 않았다.

以上的 免疫酵素學的 反應 結果를 要約하면, *T sergenti* 抗原에 대한 陽性血清과의 特異 反應을 보인 抗原性 物質은 8개의 polypeptide이었으나, 이 중 강한 反應을 보여 *T sergenti* 菌株의 特異 抗原物質로서 特定될 수 있는 것은 28Kd, 30Kd 그리고 41Kd 등이었다.

考 察

우리나라에 있어서의 韓牛와 젓소의 타이레리아病은 마베시아病과 더불어 진드기 媒介 原蟲性 疾病의 하나로 *Haemaphysalis longicornis*에 의하여 傳播되고 있으며,^{4,9} 1930년에 Yakimoff와 Dekhtereff에 의하여 최초로 *Theileria sergenti*로 命名된 바 있지만 일지

기 Neitz et al²⁵는 타이레리아를 *Piroplasmidea* 亞目 (Wenyon 1926), *Theileridae* 科 (Du Toit, 1918), *Theileria* 屬 (Bettenlourt, Franca and Borges 1907)으로 分類하였다.

韓國에 分布하고 있는 *T sergenti*의 分離 同定은 매개곤충의 種, 淋巴節內 schizont의 出現時期, 病原性을 考慮하건네 蘇聯의 *T sergenti* 菌株과 同一 種으로, 他 地域에 分布하고 있는 *T orientalis*보다 病原性이 강한 것으로 報告되어 있으며,²⁶ 菌株에 따라 病原性은 약간씩 다르지만, 貧血症床, 體重減少, 泌乳量減少, 流產, 斃死 등을 야기시키고 있음은 周知의 사실이다.^{2,3,16} 이에 의한 經濟的 損失을 최소화 하기 위하여 그 동안 多量의 진드기 구충제가 使用되었으나 진드기의 生活史의 特性, 吸血 後 土壤內 生存, 驅蟲劑 撤布技術과 施設의 未備, 畜舍와 周圍環境 등은 진드기의 效果의인 驅蟲 效果를 低下시키고 있어, 우리나라 全域에 廣範圍하게 分布되어 있는 *Haemaphysalis longicornis*에 의한 *T sergenti*의 發病豫防은 어려운 問題라고 思料되는 바 이다.

오늘날 住血寄生蟲에 의한 經濟的 損失을 최소화 하기 위하여 治療 또는 豫防 目的으로 사용하는 약제들로서 berenil, parmaquine, premaquine, oxytetracycline, 비소劑, 안티몬劑 그리고 항말리아劑 등과 같은 抗生物質 등이 있다.^{5-8,10} 특히 乳牛인 경우에는 診斷없이 分娩直前의 多量의 抗生物質을 使用하는 등 經濟的 被害를 最小화하기 위한 努力을 하고 있으나 이들 藥劑의 濫用은 一般細菌의 抗生物質에 대한 耐成形成 및 食肉 衛生學의 國民健康을 威脅하고 있다.

우리나라에 있어서 소의 타이레리아病에 대한 研究는 疫學의 研究,²⁻⁴ 血清學的 診斷,¹ 原因菌의 分離,⁷ *T sergenti*와 *Babesia ovata*와의 生物學的 關連性에 대한 試驗⁷ 등이 있었으며, 免疫學的 豫防을 위한 研究 사업이 보고되고 있으나 *T sergenti* 충체에 대한 抗原 構成을 밝히기 위한 報告는 아직 접할 수 없지만 *T sergenti*가 유행되고 있는 외국에서는 이미 *T sergenti*의 電子顯微鏡의 研究,^{27,30} 抗原構成 및 特異 抗原 분리를 위한 研究가 이루어진 바 있어^{28,29,31,32} 우리 나라에 있어서의 *T sergenti*에 대한 抗原構造, 免疫能力試驗 등과 같은 研究에 활용할 수 있다고 사료되는 바 이다.

著者 등은 光學顯微鏡 下에서 形態學的으로 *T sergenti*로 사료되는 균주를 比장적출 송아지에게 接種하여, 赤血球內 寄生率이 40.1%이 달하는 感染赤血球를 Dzandu 등¹⁷의 方法으로 溶血, merozoite를 얻고

자 고속 원심분리하여 沈澱物質을 收集하였으며, 이를 超音波粉碎하여 이의 抗原성을 밝히고자 Laemmli 法²¹에 準하여 抗原을 電氣泳動하였던 바 *T sergenti* 抗原의 特異 蛋白質로서 인정되는 물질의 분자량 (MW)은 Fig 3에서 보는 바와 같이 여러 band 물질이 觀察되었으나 非感染 赤血球를 처리하여 얻은 對照 抗原에서 나타난 band 物質을 제외하면 *T sergenti* 特異 polypeptide 物質로서 칭할 수 있는 것은 約 12個 정도이었다. 이를 다시 Tsang 등²²과 Towbin 등²³의 方法으로 western blot을 시행하였던 바 *T sergenti* merozoite의 特異 抗原物質로서 認定될 수 있는 것의 分子量은 28Kd, 30Kd 그리고 41Kd 등이었다. Ohgitani 등²⁹이 *T sergenti*의 特異 抗原을 SDS-PAGE와 western blot 技法을 이용하여 抗原構造를 觀察한 例와 本 實驗의 結果는 약간의 差異가 認定되고 있다. Ohgitani 등²⁹는 *T sergenti*에 感染된 赤血球를 얻어 saponin으로 용혈, 투석막을 이용하여 층체를 수집, 水溶性 抗原으로 SDS-PAGE하여 10개의 band (15.5, 18.3, 19.5, 23.5, 29.5, 32, 55, 64, 70 그리고 120Kd)를 觀察하였으며, Western blot에서는 23.5, 29.5, 32, 55, 64, 70 그리고 96Kd의 band를 觀察하였다. 이들 중에서 15.5Kd는 本 例에서는 나타나지 않았는데 이는 hemoglobin 또는 hemozoin으로서 本 實驗의 세척과정 중에 제거되었을 것으로 사료된다. 著者 등이 特異 抗原으로서 주장하고 있는 28Kd, 30Kd 그리고 41Kd과는 정확히 일치하는 物質은 없으나, 이에 해당하는 물질로서는 29.5Kd, 32Kd 그리고 55Kd 등인 것으로 짐작된다. 이같은 差異는 抗原의 處理技術, SDS-PAGE의 技術, 겔의 濃度 그리고 MW 決定 方法의 個人的 差異 등에서 올 수 있는 實驗의 差異라고 생각된다. *T sergenti*의 抗原物質의 구성을 SDS-PAGE나 Western blot 方法으로 비교한 예는 흔치 않지만, 種 同定과 단크론 抗體와의 特異反應物質 糾明을 위한 研究가 있다.^{31,32} 즉, Kobayashi 등은³² *T sergenti*의 赤血球內 merozoite에 대한 單크론 抗體를 이용한 western blot에서는 6개의 hybridoma 중 4개는 32Kd, 2개는 23Kd 物質과 강한 反應을 報告하였으며, Shirakata 등³⁰은 單크론 抗體를 *T sergenti* merozoite 표면에 결합시킨 후, protein A-colloidal gold (PAG)에 의한 免疫學的 기법으로 처리하여 이를 전자현미경 (IEM)으로 관찰하였을 때 merozoite 膜에서의 抗原性物質은 32Kd임을 확인한 바 있다. 이는 本 例의 western blot에서 特異 抗原 抗體反應 band로 觀察된 30Kd의 物質에 該當되는 것으로 思料되며, 이상의 보고들을 종합하여 볼 때, 일본의 *T sergenti* 菌株과 韓

牛에 寄生하는 *T sergenti* 色株는 抗原성이 비슷한 것으로 짐작된다.

이와 같은 *T sergenti*의 抗原의 特異性은 타이레리아 백신제조에 필요한 基礎知識으로 活用될 수 있을 것으로 기대한다.

結 論

韓牛에 寄生하는 *Theileria sergenti*의 抗原성을 밝히고자 비장적출 송아지(5개월령)에 *T sergenti*를 筋肉接種시킨 후 寄生率이 40.1%에 達하였을 때 採血, 赤血球를 세척, 용혈한 다음, 分別 遠心分離法에 의하여 *T sergenti* merozoite를 얻었다. 이것을 超音波粉碎한 후 원심분리하여 얻은 上層液에 대하여 SDS-PAGE한 후 coomassie blue로 染色한 결과 최소한 12個 이상의 많은 polypeptide(14Kd, 28Kd, 30Kd, 34Kd, 36Kd, 38Kd, 41Kd, 56Kd, 66Kd, 72Kd, 97Kd 그리고 116Kd)가 觀察되었다. 이 중에서 정상 소의 赤血球에서 유래하는 것으로 보이는 것은 제외하면 28Kd, 30Kd, 41Kd, 56Kd, 66Kd, 72Kd, 97Kd 그리고 116Kd 등이 *T sergenti*의 구성 단백질인 것으로 밝혀졌다.

한편 *T sergenti* 抗原 蛋白質을 Western blot에 의하여 *T sergenti* 陽性血清과 반응시켜 8개의 polypeptide (28Kd, 30Kd, 38Kd, 56Kd, 58Kd, 66Kd, 97Kd 그리고 116Kd)가 抗原성이 있는 것으로 나타났으나, 陰性血清 및 對照 抗原에 의하여 나타난 band를 除外하면 *T sergenti*에 있어서 特異 抗原, 抗體 反應이 越等한 polypeptide는 28Kd, 30Kd과 41Kd 등이었다.

參 考 文 獻

1. 전 영. 韓牛의 바베시아와 타이레리아 원충의 감염실태 조사. 대한수의학회지 1978;18(1):23~26.
2. 김인철, 손재영. 진드기의 기생이 적은 목장에서 *Theileria sergenti* 感染 乳牛의 분만후 血液상 및 비유량의 변동에 관한 研究. 한축지 1983;25(5):464~469.
3. 김인철, 손재영. 진드기의 기생이 많은 목장에서 *Theileria sergenti* 감염유우와 분만전후 혈액상 및 비유량의 변동에 관한 연구. 한축지 1984;26(2):137~144.
4. 장두환. Theileriosis(沿岸熱)의 역학적 연구 —沿岸熱의 국내현황과 그 매개 참진드기의 생태조사—. 기생충학 잡지 1974;12:14~20.
5. 이주목, 김명철. 쯤소의 파이로프라스마증의 효과적인 집단검체과 치료방법에 관한 연구. 대한수의

- 학회지 1987;27(2):321~330.
6. 강영배, 장 황. *Theileria sergenti*와 *Babesia ovata*에 자연감염된 송아지에 있어서의 비장적출에 따른 일종 원충 출원소장, 농시논문집 1988; 30:7~11.
 7. 강영배, 김상의, 장 환, 위성환, 이영욱. *Theileria sergenti*야외주에 대한 성상 조사; 각종 비우에 있어서의 혈액학적 소견 및 Pamaquine 처리 효과. 농시논문집 1988;30(2):17~21.
 8. 서명득(1982). 導入牛의 진드기 매개 作血原蟲 感染像과 *Theileria sergenti*의 치료 豫防에 관한 研究. 농시보고 1982;24:57~75.
 9. 강영배, 장 황. 비장적출 송아지에 있어서의 *Haemaphysalis longicornis* 진드기를 통한 *Theileria sergenti* 感染症 인공유발 시험. 농시논문집 1989; 31(1):48~53.
 10. Purnell RE (1981). Tick-borne Diseases. *The British Vet J* 1981;137(2):221~240.
 11. Sergent E, Donatie A, Parrot L, et al. Sept. années de premunition contre les piroplasmoses (lato sensu) du boeuf(10^{ème}~16^{ème} campagnes). *Ann Inst Pasteur* 1940;65:199~203.
 12. Hashemi-Fesharki R, Sad-Del F. Vaccination of calves and milking cows with different strains of *Theileria annulata*. *Am Vet J Res* 1973;34: 1465~1467.
 13. Minami T, Fujinaga T, Furuya K, et al. Clinico-hematologic and serological comparison of Japanese and Russian strain of *Theileria sergenti*. *Natl Inst Anim Health Q* 1980;20(2):44~52.
 14. Hulliger L. Cultivation of three species of *Theileria* in lymphoid cell *in vitro*. *J Protozool*. 1965;12:649~655.
 15. Kobayashi N, Onuma M, Kirisawa R, et al. Monoclonal antibodies against Intraerythrocytic merozoites (piroplasma) of *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* 1987;49(4):697~702.
 16. Gackson GJ, Hermam R, Singer I. Immunity to parasitic animals. Appleton-Century-crofts, New York. 1985;19(2):855~870.
 17. Dzandu IK, Deh ME, Barratt DL, et al. Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins, and lipids in the same polyacrylamide gel using a double staining technique. *Pro Natl Acad Sci* 1984;81:1733~1737.
 18. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristic of hemoglobin free ghost of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963;100:119~130.
 19. 백병길, 김진호, 진찬분, 김병수, 최인혁, 이재구, 임병두. 韓牛에 있어서의 *Anaplasma marginale*의 抗原성에 관한연구. 한국수의공중보건학회지 1989;13(3):233~240.
 20. Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, et al. Protein measurements with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:253~261.
 21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(15):680~685.
 22. Tsang VCW, Peralta JM, Simons AR. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 1983;92:337~391.
 23. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Pro Natl Acad Sci* 1979;76:4350~4354.
 24. Gersoni JM, Palade GE. Protein blotting: Principle and application. *Analytical Biochemistry* 1983;131:1~15.
 25. Neitz WO, Jansen BC. A discussion the classification of the Theileridae. *Ondersteport J Vet Res* 1956;27:7~15.
 26. Uilenberg G, Perie NM, Spanjer AAM, et al. *Theileria orientalis*, a cosmopolitan blood parasite of cattle: demonstration of schizont stage. *Res Vet Sci* 1985;38:352~357.
 27. Higuchi S, Kawamura S, Yasuda Y. Scanning electronmicroscopy of *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* 1985;47:133~137.
 28. Kawazu SI, Kamio T, Yokomizo Y, et al. The immunoglobulin response in cattle to experimental infection with *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* 1988;50:1107~1108.
 29. Ohgitani T, Okabe T, Sasaki N. Antigenic properties of *Theileria sergenti* in ELISA serodiagnosis. *Jpn J Vet Sci* 1987;49(3):531~534.
 30. Shirakata S, Onuma M, Kirisawa R, et al. Localization of surface antigens on *Theileria*

- sergenti* merozoite by monoclonal antibodies. *Jpn J Vet Sci* 1989;51(4):831~833.
31. Kajikawa O, Yagi Y, Koyama H, et al. Preparation of monoclonal antibodies against *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* 1985;47(5):683~690.
32. Kobayashi N, Onuma M, Kirisawa R, et al. Monoclonal antibodies against intraerythrocytic merozoites (piroplasms) of *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* 1987; 49(4):697~702.