

한우에 감염된 *Theileria sergenti* merozoite의 순수분리와 genomic DNA probe에 관한 연구

채준석 · 이주목 · 권오덕 · 채건상*

전북대학교 수의과대학
전북대학교 자연과학대학 분자생물학과*
(1994년 1월 29일 접수)

Genomic DNA probe and purification of *Theileria sergenti* merozoites in Korean cattle

Joon-seok Chae, Joo-mook Lee, Oh-deog Kwon, Keon-sang Chae*

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea
Department of Molecular Biology, Chonbuk National University*

(Received Jan 29, 1994)

Abstract : To make the genomic DNA probe of *Theileria sergenti*, the merozoites were purified from bovine erythrocytes. The infected erythrocytes were lysed by *Aeromonas hydrophila*(Ah-1) hemolysin, and the parasites were isolated by ultracentrifugation on a Percoll discontinuous density gradient. For construction of a *T sergenti* genomic DNA library, *T sergenti* DNA was digested with *Pst*I and the fragments were ligated into the *Pst*I site of pUC19 before transformation of *Escherichia coli* JM83. Out of thousands of transformants obtained by transformation of *E coli* JM83 with the genomic library, three plasmids were chosen. The sizes of the inserted DNAs were 2.9kb(2.4kb and 0.5kb) in pKTS1, 4.3kb in pKTS2 and 1.5kb in pKTS3, respectively.

The DNA fragments used as probe KTS1(2.4kb), KTS2(4.3kb) and KTS3(1.5kb) were labeled digoxigenin-11-dUTP for the Southern hybridization. In Southern hybridization, all of the probes(KTS1, KTS2 and KTS3) reacted specifically to *T sergenti* DNA, but not to bovine leucocyte DNA. In order to find out the sensitivities of the digoxigenin-11-dUTP-labeled KTS1 and KTS3 as the probes, purified merozoite DNA and bovine DNA (control) were checked by dot blot hybridization with the probes. Both of the probes, KTS1 and KTS3, detected as minimum amount of 975pg of the *T sergenti* DNA, but not bovine DNA even to 500ng.

Key words: bovine, *Theileria sergenti*, DNA probe, Southern hybridization, dot blot hybridization

서 론

Theileria sergenti(*T sergenti*)는 진드기가 매개하는 주혈원충으로서 소에 감염이 되면 적혈구에 기생하게 된다¹. 특히 다른 질병과 복합감염이 되거나 강한 스트레

스를 받게 되면 심한 임상증상을 나타내게 되며 때로는 폐사하게 되는 경우도 있다². 이와 같이 진드기가 서식하는 지역의 방목장에서는 Theileriosis로 인한 피해가 매우 심할 뿐만 아니라 이러한 현상은 전국적으로 확산되어 있는 실정이다. 따라서 이로 인한 피해를 줄이기

이 논문은 1992년도 교육부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

위하여 다각적으로 연구가 되고 있으나 아직 완전한 치료방법이나 효과적인 예방법을 찾아내지 못하고 있는 상황이다.

또한 *T sergenti*의 진단방법으로서는 혈액도말 표본을 Giemsa 염색하여 광학현미경으로 관찰하여 진단하고 있으나^{1,3} 이 방법에는 한계가 있어서 적혈구중에 원충이 많이 나타나지 않은 상태에서는 진단하기가 매우 어려운 문제점을 가지고 있다. 그러므로 최근에는 주혈 원충성 질병의 진단 및 예방에 관하여 유전공학적인 측면에서 연구가 활발히 진행되고 있다^{4,5}. Matsuba et al⁶은 DNA probe를 이용하여 일본의 *T sergenti*의 genome을 분석하였으며, Hirano et al⁷은 DNA probe를 사용하여 *T sergenti*에 감염된 소를 검출하는 방법에 관하여 평가 보고하고 있다.

최근에는 주혈원충성 질병에 있어서도 유전공학적인 진단 방법으로서 동위원소를 이용한 Southern hybridization방법, 특히 염기서열을 polymerase chain reaction(PCR) 증폭에 의하여 진단하는 방법등이 연구되고 있다^{8,9,10}. 또한 비방사선 물질을 이용하여 검출할 수 있는 방법들도 개발되어 이용되고 있다. 즉 Hirano et al⁷, Kagiwara et al¹¹, Tanaka et al¹²은 *T sergenti*의 특이 DNA에 biotin으로 label한 probe를 이용하여 dot blot hybridization 방법에 의한 진단방법을 보고한 바 있다.

Theileriosis로 인한 피해가 문제되는 국가는 매우 많지만, 이 중에서도 *T sergenti*가 문제시되고 있는 국가는 한국, 일본, 러시아, 중국등 극동지역과 동남아시아에서 문제가 되고 있다. 또한 *T sergenti*, *T orientalis*, *T buffeli*는 종간의 확실한 특성이 규명되어 있지 않은 상태여서 이에 관한 연구의 필요성이 매우 높아서 최근에는 이에 관한 연구도 발표되고 있다¹³. 한편, *T sergenti*에 있어서도 한국주와 일본주간에 차이의 유무를 밝히는 등 유전공학적 방법을 동원한 연구 분야가 실로 광범위한 실정이다.

연구자 등¹⁴은 한우로부터 *T sergenti* DNA를 추출하여 radioactive hybridization 방법에 의한 기초연구를 보고한 바 있으며, 저자 등은 이것을 토대로 하여 비방사선 물질을 사용한 DNA 검출방법을 이용하여 *T sergenti* DNA probe를 제작하고 이를 진단에 응용할 수 있는 방법을 모색해 보고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

T sergenti 원충 : 실험에 사용한 *T sergenti* 원충은

전북 진안지역에서 사육되고 있는 한우로부터 채혈한 혈액을 Giemsa 염색하여, *T sergenti*를 확인하고 이 원충을 비장적출한 6개월령의 한우에 인공감염시켜서 유지 보관하면서, 이 원충주(stock)를 실험에 사용하였다.

원충의 순수분리 : 순수분리한 *T sergenti* merozoites의 DNA를 추출하기 위해 비장적출한 송아지에 *T sergenti*를 감염시켜 감염율이 15~20%로 증가하였을 때 채혈하여 이를 실험에 이용하였다. *T sergenti* merozoites의 분리는 Sugimoto et al¹⁵의 방법에 따라 분리하였다.

DNA의 추출 : *T sergenti* merozoites DNA는 Matsuba et al⁶ (1992)의 방법으로 추출하여 *T sergenti*의 특이 DNA 단편을 얻었다. 이의 대조로는 소의 백혈구 DNA를 사용하였으며, 이 백혈구 DNA의 추출은 *T sergenti*에 감염이 되지 않은 건강한 소에서 혈액을 채취하여 원심분리로서 백혈구층을 회수하였다. 백혈구의 분리는 Ficoll hypaque(Sigma) 용액에 중층이 되도록 하여 원심분리하여 백혈구를 분리하였다. 소의 백혈구 DNA 추출은 *T sergenti* DNA 처리와 동일한 방법으로 추출하였다.

T sergenti 유전자 은행의 제조 : 모든 DNA의 조작은 Sambrook et al¹⁶의 방법에 따랐다. *T sergenti* merozoites DNA를 *Pst*I로 절단하여 이미 *Pst*I로 절단된 선형의 pUC19 플라스미드에 재조합하였다. 이 재조합된 DNA들을 *E coli* JM83에 삽입시키기 위하여 김 등¹⁴의 방법에 준하여 형질전환시켰으며, 이들 형질전환체들로부터 재조합된 플라스미드들을 분리하여 유전자 은행으로 사용하였다.

플라스미드 DNA의 추출 : 형질전환된 *E coli* JM83으로부터 재조합 플라스미드 DNA를 alkaline method에 준하여 추출하였다¹⁹.

이 분리된 시료는 -20℃에서 보관하면서 필요에 따라 실험에 사용하였다.

Southern hybridization : 재조합 플라스미드 pKTS1, pKTS2, pKTS3에 삽입된 *T sergenti* DNA 단편만을 elution하여 각각 probe로 사용하였다. probe로 사용한 삽입된 DNA 단편의 이름은 KTS1(2.4kb), KTS2(4.3kb) 그리고 KTS3(1.5kb)로 각각 명명하였다.

비방사선 물질을 사용한 Southern hybridization에서는 공급자의 추천에 따라 DIG DNA labeling and detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하였다.

Probe의 labeling : probe에 비방사선 물질인 DIG-11-dUTP를 random prime 방법²⁰에 따라 표지하여 사용하였다.

Electroblot : *T. sergenti* DNA 및 대조로 이용한 소의 백혈구 DNA를 각각 *Pst*I 제한효소로 37°C에서 4시간 반응시킨 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 nylon membrane(GeneScreen™, Dupont)에 electro-transfer하였으며, 그 방법은 GeneScreen 제조회사의 추천방법에 준하여 실시하였다.

Dot blot hybridization : probe로 사용된 *T. sergenti* DNA인 KTS1과 KTS3 단편의 감도를 확인해 보고자 정제된 *T. sergenti* merozoites DNA와 그 대조로 소의 백혈구 DNA를 각각 18.7ng 부터 2배 연속 희석하여 nylon membrane에 흡착시킨 후, probe에 DIG-11-dUTP로 label하여 dot blot hybridization을 실시하였다.

결 과

***T. sergenti* merozoites의 분리 :** *T. sergenti*을 비장적출한 송아지에 인공감염시켜서 원충의 적혈구내 감염율이 15~20%로 증가되었을 때(Fig 1) 원충을 순수분리하여 DNA를 추출하였다. 원충을 정제한 결과는 Fig 2에서와 같이 Percoll층의 40%와 60%의 경계면상에서 깨끗하게 정제되었으며, 60% Percoll의 바닥면에서는 Fig 3과 같이 veil도 분리하여 회수할 수 있었다.

Probe로 사용할 재조합 DNA의 분리 : *T. sergenti* 유전자 은행을 제조하기 위하여 *T. sergenti* DNA와 vector로 사용한 pUC19를 각각 *Pst*I으로 절단하고 서로 재조합시켜 *E. coli* JM83을 형질전환하였다. 그 결과로 얻어진 형질전환체에서 삼입단편의 존재를 확인하기 위하여 3개의 형질전환체로부터 분리한 재조합 플라스미드 DNA를 *Pst*I 제한효소로 절단하였던 바 Fig

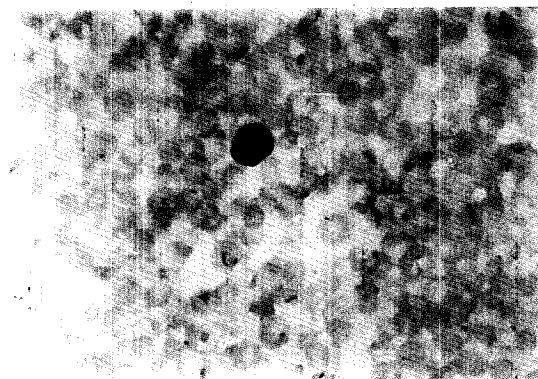


Fig 1. *Theileria sergenti*-infected-erythrocytes in peripheral blood from splenectomized calf (Giemsa stain, x1,000).

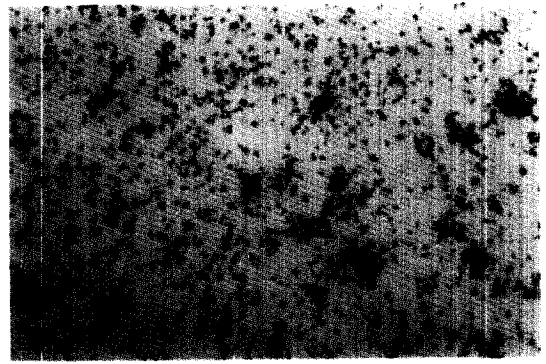


Fig 2. Purified merozoites from *Theileria sergenti*-infected-erythrocytes by means of gradient separation with Percoll(Giemsa stain, x1,000).

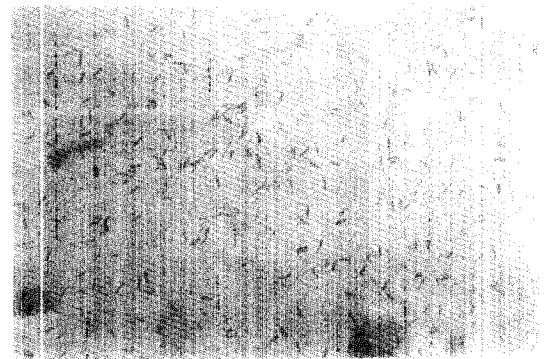


Fig 3. Purified veils from *Theileria sergenti*-infected-erythrocytes in bottoms of 60% Percoll by discontinuous density gradient(Giemsa stain, x 1,000).

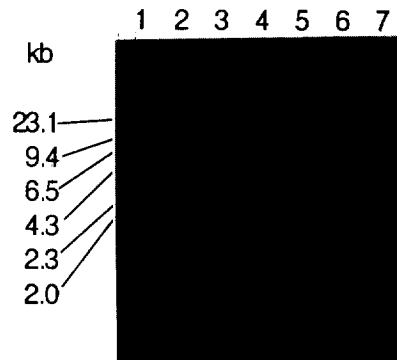


Fig 4. Recombinant plasmids having *Theileria sergenti* DNA fragment. Lane 1: λ /HindIII, lane 2: pUC19/*Pst*I, lane 3-5: recombinant plasmids isolated from transformants obtained by transformation with ligation mixture of (*T. sergenti* DNA with a linear pUC19), lane 6: *T. sergenti* merozoite DNA/*Pst*I, lane 7: bovine leucocyte DNA/*Pst*I

4에서와 같이 3개의 플라스미드(lane 3, 4, 5)가 모두 삽입단편을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 이들 형질전환된 플라스미드에 대해서 pKTS1, pKTS2 그리고 pKTS3라고 각각 명명하였다.

이 vector에 삽입된 DNA 절편의 크기는 Fig 4에 표시된 바와 같이 2.9kb(lane 3, 2.4kb(KTS1)와 0.5kb), 4.3kb(lane 4, KTS2), 1.5kb(lane 5, KTS3)였다. Lane 1은 λ /HindIII인 marker이고, lane 2는 pUC19 DNA를 PstI 효소로 완전히 절단한 것이며, lane 3, 4 그리고 5는 재조합 플라스미드, Lane 6은 *T sergenti* DNA, lane 7은 소의 백혈구 DNA로서 각각 PstI 제한효소로 완전히 절단한 것을 0.7% agarose gel에서 전기영동한 사진이다.

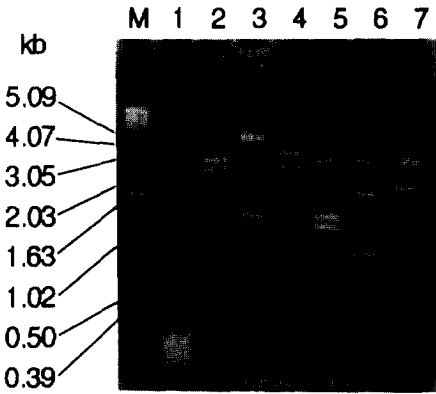


Fig 5. Restriction analysis of pKTS1 plasmid DNA with PstI, HindIII and BamHI.

M: Marker(1 kb DNA ladder), lane 1: pUC19/PstI, lane 2: pKTS1/PstI, lane 3: pKTS1/HindIII, lane 4: pKTS1/BamHI, lane 5 to 7 were doubly digested as follows; lane 5: pKTS/PstI & HindIII, lane 6: pKTS1/HindIII & BamHI, lane 7: pKTS1/PstI & BamHI

pKTS1에 삽입된 *T sergenti*의 DNA 절편에는 Fig 5의 lane 2에서와 같이 삽입된 DNA 단편(2.9kb)내에 PstI site가 1개 위치하고 있어서 2개의 단편이 존재하고 있음을 알 수 있었다. 그러므로 이들 단편의 크기를 확인하여 본 결과 2.4kb와 0.5kb였다. 이 중 2.4kb만을 clonation하여 probe로 사용하였다. 또한 probe로 사용한 KTS1과 KTS3을 여러 가지 제한효소를 사용하여 절단하여 본 바 Fig 5에서와 같이 KTS1에서 만이 PstI, HindIII, BamHI site가 존재하고 있음을 확인하였으며, KTS1은 enzyme site를 결정하기 위하여 이중절단(double digestion)을 실시하여 제한효소 지도를 작성하였다(Fig 6).

Probe로 사용할 DNA 절편의 유용한 확인 : 이렇게 확인된 plasmid DNA에서 *T sergenti*가 삽입된 단편만을 electroelution하여 probe로 사용하였다. 이들 삽입단편이 *T sergenti* DNA의 단편인지를 확인하기 위하여 probe KTS1(2.4kb), probe KTS2(4.3kb), probe KTS3(1.5kb)에 DIG-11-dUTP를 label하여 *T sergenti* DNA와 Southern hybridization을 실시하였다. 그 결과 한우로부터 분리한 *T sergenti*(KTs) merozoite DNA에서는 Fig 7에서 보는 바와 같이 각기 삽입단편의 크기와 일치하는 위치에서 probe KTS1, 2, 3 모두가 반응을 나타내었다. 그러나 소의 백혈구로부터 분리한 DNA(B)에서는 probe KTS1, 2, 3 어느 것에도 반응하지 않았다. 따라서 이들 3개의 삽입 단편은 *T sergenti* DNA임이 확인되었으며, 또한 이 삽입 단편의 유전자 염기배열은 소의 백혈구 DNA와 상동성이 없는 것으로 확인되었다.

확인된 probe KTS1, KTS2 그리고 KTS3 중에서도 특히 probe KTS1과 KTS3이 강한 반응을 나타냈으므로 이 2개의 probe를 가지고 *T sergenti* DNA의 검출 감도를 알아보기 위하여 *T sergenti* DNA와 소의 백혈구 DNA를 2배연속 희석하여 dot blot hybridization한

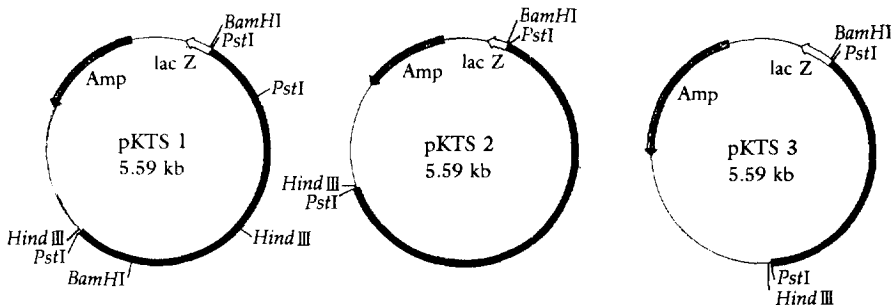


Fig 6. Schematic diagram of pKTS1, pKTS2, pKTS3.

pKTS1, pKTS2 and pKTS3 were constructed by recombination of 2.9kb, 4.3kb and 1.5kb fragments(PstI-digested *T sergenti*) with PstI-digested pUC19(2.69kb), respectively.

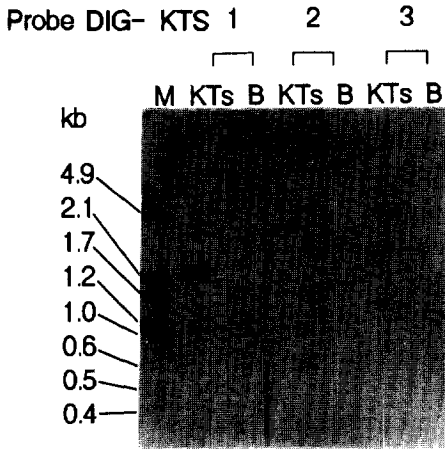


Fig 7. Southern hybridization of *Theileria sergenti* DNA and bovine DNA with KTS1, KTS2 and KTS3 probe. Korean *T sergenti* DNA (KTs) and bovine leucocyte DNA (B) were digested with *Pst*I, electrophoresed on 0.7% agarose gel, and transferred to nylon membrane. The membrane was hybridized with digoxigenin-11-dUTP-labeled KTS1, KTS2 and KTS3 probe. M: pBR328 DNA/*Eco*RI

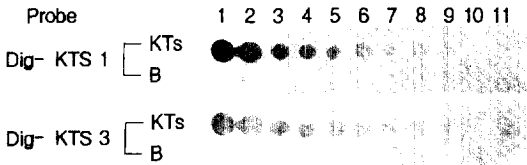


Fig 8. Dot hybridization of purified *Theileria sergenti* DNA and bovine DNA using KTS1 and KTS3 as probes. Five microliters of DNA samples of *T sergenti* and bovine leucocyte were spotted onto nylon membrane. lane 1; 500 ng, lane 2; 250 ng, lane 3; 125 ng, lane 4; 62 ng, lane 5; 31 ng, lane 6; 15 ng, lane 7; 7 ng, lane 8; 3 ng, lane 9; 1.8 ng, lane 10; 975 pg, lane 11; 487 pg. KT: Korean *T sergenti* DNA, B: bovine DNA.

결과, Fig 8에서 보는 바와 같이 *T sergenti* DNA에서는 probe KTS1, KTS3 모두 975pg까지 검출이 되었다. 그러나 소의 백혈구 DNA에서는 두개의 probe 모두에 대해서 전혀 반응을 하지 않았다.

진드기 매개성 주혈 원충성 질병으로서 아직도 완전한 예방효과를 거두지 못한 babesiosis나 theileriosis에서도 특히 *T sergenti*는 우리 나라의 방목장에서 사육되고 있는 소에서 가장 문제가 큰 중요한 질병 중의 하나이다. 따라서 최근에는 이들 질병에 대하여 유전학적인 측면에서 연구가 시도되고 있는 실정으로서 최근에는 DNA probe를 개발하여 유전학적 측면에서 진단하는 hybridization 기법들이 연구되고 있다.^{11,21,22,23,24}

*T sergenti*에 있어서 현재까지 연구된 바로는 *T sergenti* DNA probe의 제작^{7,11}과 cDNA의 library를 이용한 단백질의 검정등⁸ 최신 분자생물학적기법을 이용한 연구들을 수행하였다. PCR 증폭을 이용한 진단방법^{9,10}과 백신개발을 위한 단백질질의 생산등에 관한 연구²⁵와 함께 *Theileria* spp간의 유전학적인 관계의 규명등⁸ 다양한 연구들이 이 방면에 관한 새로운 연구분야로 부각되고 있다.

저자 등¹⁴이 이미 발표한 *T sergenti* DNA probe를 만들기 위한 기초연구를 토대로한 실험에서는 원충의 순수분리가 가장 어려운 문제로서 백혈구의 혼입을 방지하고 용혈된 적혈구막의 분리등이 가장 어려운 문제였으며, 거둬진 실험에서 *T sergenti*에 감염된 소의 혈액으로부터 *T sergenti* merozoite 원충을 순수 분리하는 방법으로서 Sugimoto et al¹⁵의 방법이 가장 효과적인 방법임을 알 수 있었다. Fig 2에서와 같이 순수한 merozoite 원충의 정제와 아울러 veil(Fig 3)도 회수할 수 있어서 결국 이 원충이 *T sergenti*임을 인정할 수 있었다. Saponin이나 증류수 또는 용혈용 완충액등으로 용혈을 시킨 경우에는 원충의 회수율이 낮고 백혈구의 혼입으로 인하여 순수한 원충 DNA만을 얻을 수가 없었다.

Fig 4에서와 같이 pUC19와 pKTS1, pKTS2, pKTS3 그리고 *T sergenti*, 소의 백혈구 DNA를 *Pst*I 제한효소로 완전히 절단하였던 바 lane 2의 pUC19 DNA는 2.69kb 위치에서 1개의 band가 형성되었으며, 재조합 플라스미드 DNA에서는 각각 2개 또는 3개의 band가 형성되었다. 2.69kb의 위치에 나타나는 것은 pUC19 플라스미드 DNA이고 다른 위치에서 나타나는 band는 vector인 pUC19 플라스미드 DNA에 *T sergenti* DNA 단편이 삽입된 것으로 확인되었다. 즉 lane 3에서는 pKTS1에 2.4kb와 0.5kb(RNA로 인하여 band가 사진 상에서 보이지 않음, Fig 5에서 확인이 가능), lane 4에서는 pKTS2에 4.3kb, lane 5에서는 pKTS3에 1.5kb DNA 단편들이 vector에 삽입된 clone을 얻을 수 있었

다. 또한 lane 6의 *T sergenti* merozoit DNA와 lane 7의 bovine DNA도 *Pst*I 제한효소로 완전 절단하여 그 DNA의 성상을 관찰하였다.

pKTS1에 있어서는 pUC19 vector에 *T sergenti* DNA의 *Pst*I site 단편이 2개가 들어간 것을 확인하고, 제한효소 지도를 작성하면서 enzyme site의 위치 결정을 위하여 *Eco*RI, *Hind*III, *Bam*HI, *Kpn*I, *Sph*I, *Sac*I 제한효소로 절단 하였던 바 pKTS1에 삽입된 DNA 단편에는 *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI site가 존재함을 확인하고, 이들 3가지 제한효소로 이중절단을 실시하여 제한효소 지도를 작성하였다(Fig 6).

pKTS3은 위의 제한효소로 절단하여 보았던 바 enzyme site가 나타나지 않았다.

김 등¹⁴의 보고에 의하면 *T sergenti* DNA와 소의 백혈구 DNA 전체를 각각 probe로 사용하여 Southern hybridization을 실시한 경우 *T sergenti* DNA와 소의 백혈구 DNA간에는 서로 약간의 상동성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 본 실험에서는 삽입된 DNA를 각각 probe로 사용하여 Southern hybridization을 실시한 결과(Fig 7 참조) 소의 백혈구 DNA에서는 전혀 반응이 없는 것으로 보아 vector에 삽입된 *T sergenti* DNA 단편은 bovine DNA와는 서로 상동성이 없는 염기배열을 가진 것으로 생각된다.

T sergenti 유전자 은행의 제조는 Kajiwara et al¹¹이 처음으로 보고하였으며, 이 실험에 사용한 표지 DNA의 크기는 5.6kb, 11.5kb의 비교적 큰 DNA단편을 사용하였다. 또한 ³²P-labeled probe를 사용하여 dot blot hybridization을 실시하면 *T sergenti* DNA를 15pg까지 검출할 수 있었으며, biotin을 label한 경우 5.6kb DNA단편을 표지로 사용하여 125pg까지 검출되었고, 11.5kb DNA단편을 사용하면 250pg까지 검출할 수 있어서 동위원소를 이용하는 방법이 감지력이 뛰어나다고 하였다.

Hirano et al⁷은 8개의 clone을 만들어 그 중 5.5kb와 5.1kb의 2개를 probe로 사용하여 Southern hybridization을 실시하였으며, 5.1kb DNA를 *Dra*I 제한효소로 절단하여 2.0kb, 1.2kb, 0.8kb, 0.6kb, 0.5kb 크기의 단편으로 나누어 biotin을 이용한 dot blot를 실시한 결과 2.0kb의 단편에서 감지율이 가장 높아 2pg까지 검출할 수 있었다고 보고하였다.

그러나 본 실험에 있어서 표지로 사용한 크기는 2.4kb와 1.5kb DNA 단편으로서 Fig 7에서와 같이 표지 KTS1과 3에서 강한 반응을 나타내었다. 따라서 이 2개에 DIG-11-dUTP를 label한 표지를 사용하고, 이때의 *T sergenti*와 bovine DNA는 제한효소로 절단하지 않은

linear DNA 상태에서 nylon membrane에 전사하여 dot blot hybridization을 실시하였다. 그 결과 Fig 8에서와 같이 *T sergenti* DNA에서만 975pg까지 검출할 수 있었다. 그러나 소의 백혈구 DNA에서는 전혀 반응이 나타나지 않은 것으로 보아 *T sergenti* merozoite 원충은 소의 백혈구가 혼입되지 않은 순수한 원충에서 추출된 DNA라고 생각되며, 저자등이 제작한 *T sergenti* DNA 표지는 소의 유전자와는 다른 *T sergenti*에 대한 특이성이 있다고 생각된다. 그러나 다른 원충성 질병이나 세균, 바이러스 등의 항원 DNA와는 아직 비교가 되지 못하였으므로 앞으로 이에 관한 실험이 필요하다고 생각된다.

이 실험에 있어서의 감지율은 Hirano et al⁷이나 Kajiwara et al¹¹의 보고보다는 낮았지만 순수한 *T sergenti* DNA 유전자 은행을 제조하였으므로 그 clone을 이용하여 다음의 실험을 진행할 수 있으리라고 본다. 이러한 Southern hybridization은 임상적인 진단에 적용하기에는 너무 복잡한 단계와 시간이 걸리는 점, 또한 고도의 기술이 필요한 점 등으로 아직 어려운 문제를 가지고 있다.

따라서 이것을 토대로 하여 probe로 사용한 *T sergenti* DNA 단편의 염기서열을 알아 primer를 design하여 oligonucleotide를 합성한 다음 특이 염기서열을 PCR 증폭에 의하여 진단하는 방법을 개발하여 임상진단에 이용할 수 있는 실험이 진행되어야 하리라고 생각한다.

결 론

*T sergenti*에 감염된 소의 적혈구내 *T sergenti* merozoite는 CF-11, Ah1-hemolysin과 Percoll을 이용하여 순수분리하였으며, 이로 부터 얻은 DNA를 *Pst*I 제한효소로 완전히 절단한 후 pUC19와 재조합하여 *E coli* JM83을 형질전환하여 *T sergenti*의 유전자 은행을 제조하였다. 형질전환된 플라스미드로부터 *T sergenti* genomic DNA 단편을 얻어 probe로서의 사용여부를 알아보기 위하여 비방사선 물질인 digoxigenin-11-dUTP를 label하여 Southern hybridization과 dot blot hybridization을 실시하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *T sergenti*의 유전자 은행으로부터 재조합 플라스미드를 얻어 여기에 포함된 *T sergenti* DNA를 probe로 사용할 수 있었다. probe로 사용한 *T sergenti*의 DNA 삽입단편의 크기는 각각 2.4kb, 4.3kb, 1.5kb였다.

2. *T. sergenti* DNA와 소의 백혈구 DNA를 *Pst*I 효소로 절단한 후 nylon membrane에 옮긴 것과 probe KTS1(2.4kb), probe KTS2(4.3kb) 그리고 probe KTS3(1.5kb) DNA 단편을 각각 digoxigenin-11-dUTP로 label하여 hybridization한 결과, probe KTS1, KTS2, KTS3 모두 *T. sergenti* DNA에서는 probe의 크기와 동일한 위치에서 DNA 단편과 hybridization함을 알 수 있었으며, 소의 백혈구 DNA에서는 전혀 hybridization하지 못하였다.

3. probe KTS1 과 KTS3를 가지고 *T. sergenti* DNA의 검출 감도를 알아 보기 위하여 *T. sergenti* DNA와 소의 백혈구 DNA를 2배 연속 희석하여 dot blot hybridization한 결과 probe KTS1과 KTS3 모두 975pg까지 *T. sergenti* DNA를 검출할 수 있었으며, 소의 백혈구 DNA에서는 두개의 probe 모두가 전혀 반응이 나타나지 않았다.

참 고 문 헌

- 南 哲郎. 獸醫住血微生物病. 近代出版 1986; 149-169.
- Takahashi K. Studies on the infection and immunity of *Theileria sergenti*. *J Coll Diring* 1976; 6:179-248.
- 이주목, 김명철. 적소의 파이로프라스마증의 효과적인 集團檢索과 治療方法에 關한 研究. 대한수의사회지 1987; 27:321-330
- Gajadhar AA, Marquardt WC, Hall R, et al. Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptocodium cohnii* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellates, and ciliates. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45:147-154.
- Ellis J, Hefford C, Baverstock PR, et al. Ribosomal DNA sequence comparison of *Babesia* and *Theileria*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 54:87-96.
- Matsuba T, Kawakami Y, Iwai H, et al. Genomic analysis of *Theileria sergenti* stocks in Japan with DNA probes. *Vet Parasitol* 1992; 41:35-43.
- Hirnro A, Kirisawa R. Evaluation of high sensitive DNA probe for the detection of *Theileria sergenti* infection in cattle. *J Vet Med Sci* 1991; 53:933-935.
- Kawazu S, Sugimoto C, Kamio T, et al. Analysis of the genes encoding immunodominant piroplasm surface proteins *Theileria sergenti* and *Theileria buffeli* by nucleotide sequencing and polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 56:169-175.
- Bishop R, Sohanpal B, Kariuki DP, et al. Detection of a carrier state in *Theileria parva*-infected cattle by the polymerase chain reaction. *Parasitology* 1992; 104:215-232.
- Allsopp B, Carrington M, Baylis H, et al. Improved characterization of *Theileria parva* isolates using the polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 35:137-148.
- Kajiwara N, Kirisawa R, Onuma M, et al. Specific DNA prove for the detection of *Theileria sergenti* infection in cattle. *Jpn J Vet Sci* 1990; 52:1199-1204.
- Tanaka M, Matsuba S, Onoe S, et al. Biotin-labeled genomic DNA probe for detection of *Theileria sergenti* and its nucleotide sequence. *J Protozool Res* 1992; 2:34-39.
- Sugimoto C, Kawazu S, Sato M, et al. Priliminary biochemical characterization of 'veil' structure purified from *Theileria sergenti*-, *T. buffeli*- and *T. orientalis*-infected bovine erythrocytes. *Parasitology* 1992; 104:207-213.
- 김명철, 이주목, 권오덕 등. *Theileria sergenti* DNA probe를 만들기 위한 기초 연구. 대한수의학회지 1993; 33:479-486.
- Sugimoto C, Sato M, Kawazu S, et al. Purification of merozoites of *Theileria sergenti* from infected bovine erythrocytes. *Parasitol Res* 1991; 77:129-131.
- Asao T, Kinoshita Y, Kozaki S, et al. purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect Immun* 1984; 46:122-127.
- Asao T, Kozaaki S, Kato K, et al. Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *J of Clinic Microbiol* 1986; 228-232.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. CSH 1989.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Extraction and purification of plasmid DNA*. *Molecular cloning*. 2nd ed. CSH 1989; 1:1.21-1.52.
- Kessler C. *Nonradioactive labeling methods for nucleic acids*. *Nonisotopic DNA probe techniques*. AF 1992; 29-92.
- Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, et al. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitive parasite detection assay.

Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:3356-3360.

22. Franzen L, Westin G, Shabo R, et al. Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium Falciparum*. *Lancet* 1984; 3:525-528.
 23. Moseley SL, Echeverria P, Seriwatana J, et al. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *J Infect Dis* 1982; 145:863-869.
 24. Welburn SC, Gibson WC. Cloning of a repetitive DNA from the rickettsia-like organisms of tsetse flies (*Glossina* spp.). *Parasitology* 1989; 98:81-84.
 25. Kawazu S, Sugimoto C. Molecular cloning and immunological analysis of immunodominant piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* and *T buffeli*. *J Vet Med Sci* 1992; 54:305-311.
-