

중합효소연쇄반응을 이용한 한우에 감염된 *Theileria sergenti*의 신속한 검출

채준석*** · 이주목*** · 권오덕*** · 박진호* · 채진상***

전북대학교 수의과대학*, 전북대학교 생체안전성연구소**

전북대학교 자연과학대학***

(1995년 9월 21일 접수)

Rapid detection of *Theileria sergenti* by the polymerase chain reaction in Korean cattle

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

Jin-ho Park*, Keon-sang Chae***

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University**·Bio-safety Research Institute, Chonbuk National University**

College of Natural Science, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea***

(Received Sep 21, 1995)

Abstract : To make the genomic DNA probe of *Theileria sergenti*, the merozoites were purified from erythrocytes of Korean cattle. The previous studies on the probe of *T. sergenti* had resulted in two probes as KTS1 and KTS3 DNA fragment.

Nucleotide sequence of both ends of the KTS1 and KTS3 were determined in order to design primers for polymerase chain reaction. A pair of an upper primer(5'-CCTCTTGAAGTCATCCATGT-3'; nucleotide position 48) and a lower primer(5'-CACTGAGCTG GAAAGAGCTA-3'; nucleotide position 156) in pKTS1 were synthesized. The anticipated PCR product was 128bp in length. To examine the sensitivity of the PCR, KTS1 DNA and purified *T. sergenti* DNA were serially diluted by tenfolds with distilled water. The primers were sensitive enough to detect 4 μ g of the authentic template DNA and 4fg of the purified *T. sergenti* DNA by PCR. Furthermore, when the blood was serially diluted by two-folds with 0.9% saline, the pair could detect up to 0.00029%(about 164 parasites in 10 μ l of blood) of *T. sergenti* infection in bovine erythrocytes by PCR. In a comparison of microscopic and PCR detection of *T. sergenti* in the same samples from Chonbuk area, 47 and 51 out of 70 sample(67.1%) were positive by the former and by the latter method, respectively.

Key words : bovine, *Theileria sergenti*, sequencing, PCR amplification.

서 론

*Theileria sergenti*는 진드기가 매개하는 주혈원충으로서 소의 적혈구에 기생하여, 단독감염으로도 발

증되지만 특히 다른 질병과 복합감염이 되거나 강한 스트레스를 받게 되면 더욱 심한 임상증상을 나타내고 때로는 폐사하는 경우도 있다. 특히 진드기가 서식하는 지역의 방목장에서는 theileriosis로 인한 피해가 매우 심하며 이러한 현상은 전국적으로 확산되

어 있는 실정이다. 우리나라에서는 *T sergenti* 감염율은 전¹⁾의 보고에 의하면 년 평균 93.5%, 이와 김²⁾의 보고에 의하면 전북지역의 진드기 서식지역 방목장에서 감염율이 100%라고 하였다. 따라서 이로 인한 피해를 줄이기 위하여 치료방법이나 효과적인 예방법에 관한 연구가 활발히 진행중에 있다.

*T sergenti*의 감염여부는 Giemsa 염색한 혈액도말 표본을 광학현미경으로 관찰, 진단하고 있으나^{1,5)}, 이 방법에는 한계가 있어서 적혈구중에 원충이 많이 나타나지 않는 상태에서는 진단하는데 매우 어려운 문제점을 가지고 있다. 그러므로 단클론항체를 이용한 간접형광항체(indirect fluorescent antibody; IFA)법, 면역전기영동(immunoelectrophoresis)법, western blot analysis, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 등을 이용하여 진단하는 방법들이 보고되어 있고⁶⁻¹¹⁾, 최근에는 주혈원충성 질병의 진단 및 예방에 관하여 유전공학적인 연구가 활발히 진행되고 있다¹²⁾. Matsuba et al¹³⁾은 DNA probe를 이용하여 일본의 *T sergenti*의 genome를 분석하였으며, Hirano와 Kirisawa¹⁴⁾는 DNA probe를 사용하여 *T sergenti*에 감염된 소를 검출하는 방법에 관하여 보고하였다. 한편 동위원소를 이용한 Southern hybridization 방법, 비방사선 물질을 이용한 검출방법들도 개발되어 이용되고 있다. 즉, Hirano와 Kirisawa¹⁴⁾, Kajiwara et al¹⁵⁾ 및 Tanaka et al¹⁶⁾은 *T sergenti*의 특이 DNA probe에 biotin으로 label한 probe를 이용하여 dot blot hybridization 방법에 의한 *T sergenti*의 진단방법을 보고한 바 있다. 그러나 이들 방법은 실험방법의 난이성, 시료의 비경제성 그리고 시간의 과다소요 등으로 임상에 적용하기에는 많은 문제점이 있어 아직은 실험적인 차원에서만 이루어지고 있는 실정이다. 따라서 최근에는 특이염기배열을 시험관내에서 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)법을 이용하여 극미량의 DNA를 증폭시켜 단기간내에 진단하는 방법들이 연구되고 있다¹⁷⁻²¹⁾.

저자 등²²⁾은 한우로부터 *T sergenti* DNA를 추출하여 radioactive hybridization 방법에 의한 기초연구를 보고한 바 있으며 또한 이것을 토대로 하여 한국에서 분리한 *T sergenti*의 DNA probe를 제작하고, 이를 비방사선 물질로 label하여 Southern hybridization 방법을 통해 그 유용성 여부를 확인하였다²³⁾.

따라서 DNA sequencing를 통해 DNA probe의 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 primer를 합성한 다음, PCR 증폭방법을 이용하여 한우에 감염된 *T sergenti*에 대한 정확하고 간편한 진단방법을 찾아보고자 본 연구를 실시하였다.

***T sergenti* :**

실험실 보관 원충주 : 실험에 사용한 *T sergenti*는 전북 진안지역에서 사육되고 있는 한우 10두로부터 채혈한 혈액을 Giemsa 염색하여, *T sergenti*를 진단하고, 이 원충을 비장적출한 6개월령의 한우에 인공감염시켜서 유지 보관하면서 이 원충주(stock)를 기본 실험에 사용하였다.

원충분리 : *T sergenti* merozoites를 순수분리하기 위하여 비장적출한 송아지에 *T sergenti*를 감염시켜 정맥 혈액의 적혈구 감염율이 15~20%로 증가하였을 때 채혈하고, 이를 Sugimoto et al²⁴⁾의 방법에 따라 *T sergenti* merozoites를 분리한 후 pellet은 -70℃에 보관하면서 필요에 따라 사용하였다.

DNA 추출 : *T sergenti* merozoites DNA는 Matsuba et al²⁵⁾의 방법으로 추출하였으며, 모든 DNA의 조작은 Sambrook et al²⁶⁾의 방법에 준하여 실시하였다.

T sergenti DNA의 대조로는 소의 백혈구와 소의 신장세포를 세포배양한 것으로부터 DNA를 추출하여 사용하였다. 이들 DNA의 추출은 혈액도말표본을 Giemsa 염색하여 진단한 결과 *T sergenti*에 감염이 되지 않은 건강한 소에서 혈액을 채취하여 백혈구층을 회수하였다. 백혈구는 Ficoll hypaque(d=1.077, Sigma) 용액에 중층한 다음, 원심(1,000g, 10분)하여 순수분리하였다. 소의 백혈구와 신장세포 DNA는 *T sergenti* DNA 처리와 동일한 방법으로 추출하였다.

DNA sequencing : 채 등²³⁾이 보고한 plasmid pKT-S1과 pKTS3에서 PCR primer를 design하기 위하여 probe로 사용한 pKTS1의 2.4kb와 pKTS3의 1.5kb DNA의 염기서열 조사는 Sanger et al의 chain-termination DNA sequencing method를 따라 실험하였다. DNA sequencing 반응은 DNA sequencing kit(Sequenase Version 2.0, USB)를 사용하였으며, 동위원소의 label은 α-³²S-dATP를 사용하였다. Sequencing primer로 pUC19에 흔히 사용하는 forward primer와 reverse primer를 각각 사용하였다. Sequencing에 사용한 plasmid DNA는 alkaline lysis 방법으로 추출한 후 polyethylene glycol(PEG)에 침전하여 회수하였다.²⁷⁾ 즉, 추출된 plasmid DNA는 RNase와 37℃에서 1시간 반응시킨 후 여기에 4M NaCl 200μl를 첨가하여 이 액중의 PEG 최종농도는 13%가 되도록 혼합하여 4℃에서 30분간 방치하였다. 이것을 미세원심분리기로 4℃에서 10,000g로 30분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 70% ethanol 세척하여 냉

동진공진조시킨 다음, TE에 녹여 sequencing에 사용하였다. Sequencing용 plasmid DNA 4 μ g을 2N NaOH와 2mM EDTA가 각각 1/10 용량이 첨가된 증류수에 녹여 37°C에서 30분간 반응시킴으로써 DNA를 denature시킨 후 1/10 용량의 3M sodium acetate와 2배의 100% ethanol을 넣어 -70°C에서 30분간 정제시킨 후 4°C에서 10,000g로 20분간 원심하였다.

상층액은 버리고 침전된 DNA는 70% ethanol로 세척한 후 70 μ l DW에 용해하여 reaction buffer 2 μ l와 primer 1 μ l를 가하여 68°C의 heating block에서 2분간 방치시킨 후 30분 이상에 걸쳐 35°C 이하까지 서서히 식히면서 annealing 하였다. 여기에 10 μ M(1,000Ci/mmol) α -³²S-dATP 0.5 μ l, 0.1M DTT(1 μ l, diluted labelling mixture 2 μ l, diluted Sequenase[®](Version 2.0) 2 μ l를 넣고 실온에서 5분간 반응시킨 다음, termination mixture G, A, T, C가 각 들어 있는 튜브에 위의 시료를 3.5 μ l씩 옮겨 37°C에서 5분간 반응시킨 다음, 반응 정지액(95% formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) 4 μ l를 첨가하였다. 반응이 끝난 각 시료는 6% acrylamide gel에 loading하여 1,600volts로 전기영동을 실시한 후 gel을 건조시킨 다음, X-ray 필름에 감광시켜 그 결과를 판독하였다.

Primer design : Probe로 사용한 pKTS1의 2.4kb와 pKTS3의 1.5kb DNA 단편의 염기서열을 결정한 것으로 부터 PCR 증폭을 하기 위한 primer의 design은 Primer Analysis Software(Oligo[®] 4.1, Wojciech Rychlik, NBI)를 이용하였다.

Primer 합성 : Sequence로 부터 설계한 KTS1-forward, KTS1-reverse, KTS3-forward 그리고 KTS3-reverse의 upper, lower primer는 Table 1에 표시하였으며, 각 primer는 Gene Assembler Special(Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden)를 사용하여 합성하였다. 합성된 primer는 암모니아수 내에서 55°C로 8시간 이상 반응시킨 후 건조시킨 다음, 200 μ l의 TE에 용해하여 Ultrafree[®]-MC(0.45 μ m filter unit, UFC 3 OHV 25)로 800g에서 1분간 원심하여 여과하였다. 이를 A₂₆₀에서 O.D.를 측정하여 최종 100pmole/ μ l 농도로 조정한 후 -20°C에 보관하면서 필요에 따라 희석하여 실험에 사용하였다.

Primer, enzyme 및 template 농도 최적화 : PCR 증폭시 primer와 enzyme 그리고 template 등의 최적 농도를 알아내기 위하여 Table 3에서와 같이 각각 농도변화를 주어 PCR 증폭을 실시하였다.

PCR 증폭 : PCR 증폭을 하기 위해 10pmole/ μ l의

upper, lower primer 각각 2 μ l, 1.25mM dNTP 4 μ M 10x PCR buffer(100mM Tris-HCl(pH 8.3), 500mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.1%(w/v) gelatin) 5 μ l, Taq DNA polymerase 1unit와 template(10ng/ μ l) 0.5 μ l를 혼합하고 H₂O를 첨가하여 총량이 50 μ l로 하였으며, 감염혈액 시료에서는 시료 DNA를 template로 5 μ l를 사용하였다. 증발을 방지하기 위해 이 혼합액 상층부에 mineral oil을 1적 떨어뜨렸다. PCR 증폭을 위한 조건으로서 변성은 96°C에서 3분간 그리고 이어서 96°C에서 30초동안 실시하고, annealing은 60°C에서 1분 그리고 polymerization은 72°C에서 1분간 35cycle로 PCR 증폭을 실시하였다. 그후 72°C에서 3분간 더 polymerization시켰다. 유전자 증폭기는 TEMP-TRONIC(BARNSTEAD/Thermolyne Co, USA)을 사용하였다.

PCR 증폭을 위한 소의 혈액내 DNA 준비 : 방목 중인 소의 *T. sergenti* 감염여부를 조사하기 위한 PCR 증폭용 혈액시료 DNA는 전북지역에서 70두의 소로부터 채혈하여 Kawasaki[®]의 방법을 변형하여 분리하였다. 즉, 채혈한 혈액 0.1ml을 0.9% NaCl 0.5mg과 혼합하여 13,000g로 원심한 후 침전물을 상기한 바의 동일한 방법으로 3회 세척하였다. 마지막 원심후 cell pellet에 lysis buffer K [LBK; 1x PCR buffer(10mM Tri-HCl; pH 8.3, 50mM KCl, 0.01%(w/v), gelatin, 1.5mM MgCl₂), 0.5% Tween 20, 100 μ g/ml proteinase K] 100 μ l를 넣고 56°C에서 45분간 반응시켰다. 이를 95°C에서 10분간 DNA를 변성시켜 원심분리하여 5 μ l의 상층액을 취해 PCR 증폭시 template로 사용하였다.

PCR 증폭된 DNA 분석 : PCR 증폭이 끝난후 증폭된 product를 확인하기 위하여 PCR 반응액 10 μ l를 10% acrylamide gel에서 250volts로 2시간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난후 gel은 ethidium bromide 용액에서 염색하여 UV transilluminator 위에서 관찰하였다.

전기영동시 product의 크기를 확인하기 위하여 10bp DNA ladder(Gibco BRL, USA)를 사용하였으며, 음성대조로는 template만을 넣지 않고 PCR 증폭을 실시하였고, 양성대조로는 primer를 설계하였던 KTS1 DNA와 *T. sergenti*를 감염시킨 비장적출한 소에서 분리한 *T. sergenti* DNA를 template로 각각 5ng을 사용하였다. *T. sergenti* DNA에 대한 대조로서는 소의 백혈구 DNA와 소의 신장세포를 배양한 세포로부터 추출한 DNA를 각각 5ng씩 사용하였다.

결 과

pKTS1과 pKTS3의 DNA sequence : Probe로 사용한 KTS1과 KTS3 DNA 단편을 가지고 있는 pKTS1과 pKTS3 plasmid에 있는 *T. sergenti* DNA의 부분염기서열을 조사한 결과 Fig 1에서와 같이 pKTS1 plasmid DNA에서는 forward 쪽에서 164개의 염기서열을 확인하였으며, reverse 쪽에서 185개의 염기서열을 확인하였다. 그리고 pKTS3 plasmid DNA에서는 forward 쪽에서 134개의 염기서열을 확인하였으며, reverse 쪽에서 197개의 염기서열을 확인하였다.

Primer design 결정 : KTS1과 KTS3 DNA의 부분 염기서열을 확인한 것으로 부터 Table 1과 Fig 2에서와 같이 primer를 design하였다. KTS1 DNA의 부분 염기서열중 forward 쪽에서는 upper primer(KTS1-FU)로 24번째의 염기부터 20-mer의 염기(5'-TCAGGAACTAAGATCCCACA-3')로 하였으며, low-

er primer(KTS1-FL)로는 102번째의 염기부터 20-mer의 염기(5'-AGATCCATTCATGTTGTTGC-3')로 하였다. 이것을 primer로 한 증폭된 DNA의 크기는 98bp로 디자인하였다. KTS1 DNA의 부분염기서열중 reverse 쪽에서는 upper primer(KTS1-RU)로 48번째의 염기부터 20-mer의 염기(5'-CCTCTTGAAGTCATCCATGT-3')로 하였으며, lower primer(KTS1-RL)로는 156번째의 염기부터 20-MER의 염기(5'-CACTGAGCTGGAAAGAGCTA-3')로 하였다. 이것을 primer로 한 증폭된 DNA의 크기는 128bp로 디자인하였다.

KTS3 DNA의 부분염기서열중 forward 쪽에서는 upper primer(KTS3-FU)로 3번째의 염기부터 20-mer의 염기(5'-TGTGGACCTACGAAACTGC-3')로 하였으며, lower primer(KTS3-FL)로는 59번째의 염기부터 19-mer의 염기(5'-CTGAACTTCAGGTC-

KTS1 forward	10	20	30	40
GGGGG CGTGG GTTTG ATCCC TGGTC AGGAA CTAAG ATCCC				
ACATG CCATG GAGCA TGGCC AGGAA ATTAA AATTA AAAAA				
AAGAA AGAAA TAATG CCGCT TGCAA CAACA TGAAT GGATC				
TAGAG ATTAT CATAc TAAGC GAAGA AAGTC AGAAA GAGAA				
AGACA AATAC CACAC AGTAC TACTT ATATG TGGAA TCTTA				
AAAA.				
KTS1 reverse	10	20	30	40
AAACA GTCGT TAAGT TTCAT CATGT ACATC CTCAG GTCCA				
TCAGG TACCT CTTGA AGTCA TCCAT GTATA TCTCA TAGAT				
CCCGT AGACG TTCGT GAAAA ACGTA TTAAG CTCTG TCAGT				
ATTCC ATTTT TAAAT AGCAC TGTCA TAAAC TCGTT TAGCT				
CTTTC CAGCT CAGTG GAAAG TTAGC AGCCA TGTAC TCTGC				
TAGCT TCGCC TTTAT TGGTC TGAAG.				
KTS3 forward	10	20	30	40
GCTGT GGGAC CTACG AAACT GCTCG GCGCC GGTGA CGAGG				
TGAAG GCGAC ACCAG GACTG ACGGA CCTGA AGTTC AGCCC				
GCACG ACCCG AACAT GCTGC TGACG TGC GC GAAGG ACGAC				
ACAAC GAAGT CTGG.				
KTS3 reverse	10	20	30	40
GCCTT CTTCC GAACC TGTGC GCCAG GTCCT TGAAG TAGGC				
CGTGT CCTGG GCGTA TGTGT AGAGC ACGCA CAGTC CTCCT				
TCCAG TCGCG CAGGC TGCTG TACTC CAGGA CTCCC TCCAC				
GTCGT TGTGC ATCAC CATGA AGAGC AGGTT CAGGA AGGGG				
TCCTT TCTCG TCTTC ACCAC CTTGC TCATA CTCTC CA. . .				

Fig 1. Nucleotide sequences of parts in the KTS1 and KTS3 DNA fragments. The KTS1 and KTS3 inserts of *Theileria sergenti* were derived from the 2.4kb and 1.5kb DNA elements in pKTS1 and pKTS3, respectively.

CGTCA-3')로 하였다. 이것을 primer로 한 증폭된 DNA의 크기는 75bp로 디자인하였다.

KTS3 DNA의 부분염기서열중 reverse 쪽에서는 upper primer(KTS3-RU)로 56번째의 염기부터 20-mer의 염기(5'-TGTGTAGAGCACGCACAGTC-3')로 하였으며, lower primer(KTS3-RL)로는 131번째의 염기부터 20-mer 염기(5'-AACCTGCTCT-

TCATGGTGAT-3')로 하였다. 이것을 primer로 한 증폭된 DNA의 크기는 95bp로 디자인하였다.

Primer의 합성농도 : Primer를 합성한 후 증류수 190 μ l에 용해하여 파장 260nm의 분광광도계에서 흡광도를 측정 한 결과, Table 2에서와 같이 KTS1-FU는 0.1743, KTS1-FL은 0.1954, KTS1-FU는 0.3820, KTS1-RL은 0.2234이었으며, KTS3-RU는 0.1388,

Table 1. PCR primers designed from KTS1 and KTS3 DNA sequences

Primer	Length (-mer)	Nucleotide sequence, 5' to 3'	Nucleotide position ^a	PCR product size(bp)
KTS1-F ^b	Upper	TCAGGAACTAAGATCCCACA	24	98
	Lower	AGATCCATTCATGTTGTTGC	102	
KTS1-R ^b	Upper	CCTCTTGAAGTCATCCATGT	48	128
	Lower	CACTGAGCTGGAAAGAGCTA	156	
KTS3-F	Upper	TGTGGGACCTACGAAACTGC	3	75
	Lower	CTGAACTTCAGGTCCGTC	59	
KTS3-R	Upper	TGTGTAGAGCACGCACAGTC	56	95
	Lower	AACCTGCTCTTCATGGTGAT	131	

a; The number indicate the 5' end position of each primers.

b; F and R mean a DNA sequence determined by a forward and a reverse primer in pUC19, respectively.

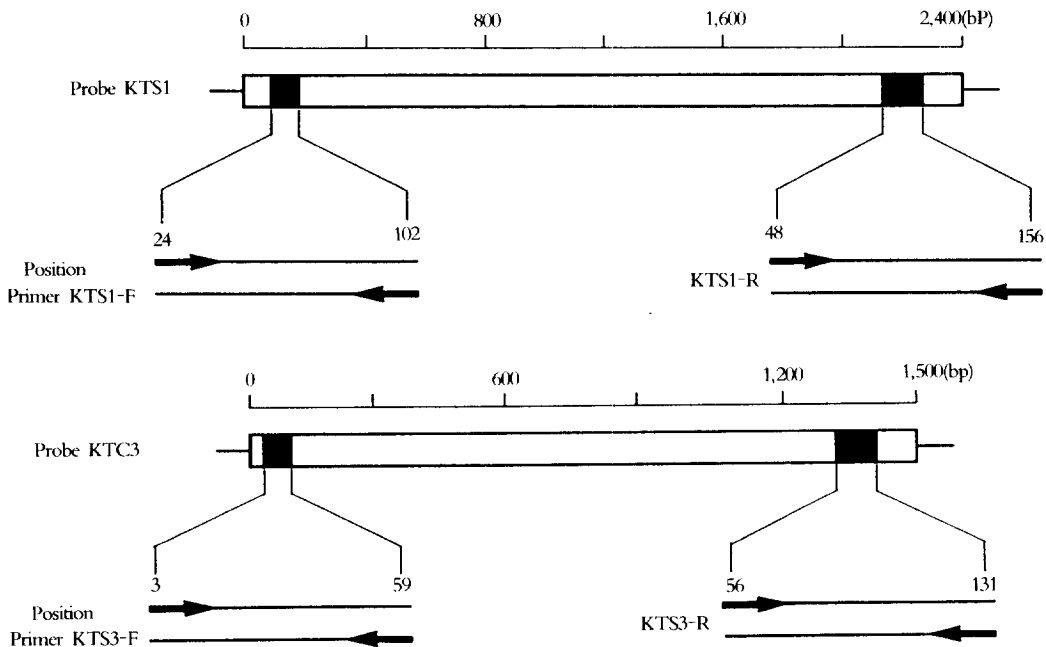


Fig 2. KTS1 and KTS3 inserts of *Theileria sergenti* were derived from the 2.4kb and 1.5kb DNA elements in pKTS1 and pKTS3, respectively.

The relative location of 98bp and 128bp PCR products to be amplified by primers in KTS1 sequences are shown in upper panel.

The arrows indicate the upper primer(→) and the lower primer(←).

The relative location of 75bp and 95bp PCR products to be amplified by primers in KTS3 sequences are shown in lower panel.

The arrows indicate the upper primer(→) and the lower primer(←).

Table 2. Results of primer synthesis

Primer		Optical density (A_{260} , nm)	Stock concentration ($pmole/\mu l$) (to 190l of DW)
KTS1-F	Upper	0.1743	151
	Lower	0.1954	184
KTS1-R	Upper	0.3820	371
	Lower	0.2234	190
KTS3-F	Upper	0.1388	125
	Lower	0.1469	147
KTS3-R	Upper	0.1725	156
	Lower	0.5450	518

a: F and R mean a DNA sequence determined by a forward and a reverse primer in pUC19, respectively.

KTS3-FL에서는 0.1469, KTS30-RU에서는 0.1725 그리고 KTS3-RL은 0.5450으로 측정되었다. 이때 각각 primer의 농도는 Table 2에서와 같이 각각 151, 184, 371, 190, 125, 147, 156 및 518 $pmole/\mu l$ 이었다.

Primer의 유용성 확인: 각각의 primer가 template DNA를 특이하게 증폭시킬 수 있는지를 확인하고자 KTS1 DNA와 KTS3 DNA를 각각 template로 하여 PCR 증폭을 실시하였다. 그 결과 Fig 3에서와 같이 *T sergenti* DNA의 대조로 사용한 소의 신장세포

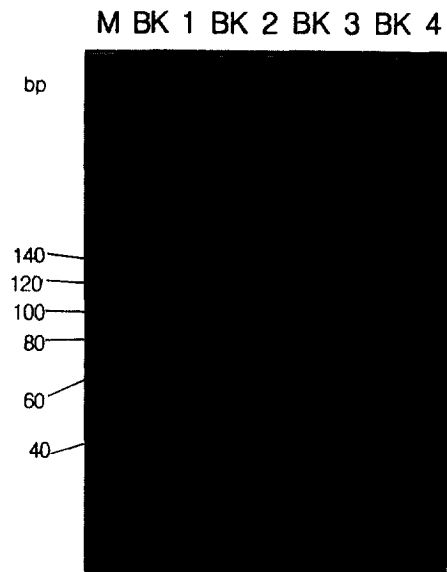


Fig 3. PCR amplifications of specific DNA fragments by PCR using designed primers.

M; marker(10bp DNA ladder), BK; bovine kidney DNA, 1; KTS1-F, 2; KTS1-R, 3; KTS3-F, 4; KTS3-R.

Table 3. Optimization of primer, enzyme and template concentrations in PCR mixtures

(A) Optimization of primer concentration

Reagent	1 ^a	2	3	4	5	6
Primer Upper(100 $pmole/\mu l$)	—	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Primer Lower(100 $pmole/\mu l$)	—	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
dNTP(1.25mM)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	5.0
10x PCR buffer	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>Taq</i> polymerase(2U/ μl)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
H ₂ O	39.25	38.25	38.45	38.65	38.85	39.05
Template ^b (10ng/ μl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Total	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

a: Numbers indicate the numbers of lanes in Fig 18

b: KTS1 DNA.

(B) Optimization of primer and enzyme concentrations

(Unit: μl)

Reagent	7	8	9	10	11	12
Primer Upper(100 $pmole/\mu l$)	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0
Primer Lower(100 $pmole/\mu l$)	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0
dNTP(1.25mM)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
10x PCR buffer	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
<i>Taq</i> polymerase(2U/ μl)	1.25	1.25	0.5	0.5	1.0	1.0
H ₂ O	37.25	35.25	38.0	36.0	37.5	35.5
Template ^b (10ng/ μl)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Total	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

b: KTS1 DNA.

(c) Optimization of template concentration

(Unit : μ l)

Reagent	13	14	15	16	17	18
Primer Upper(100pmole / μ l)	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0
Primer Lower(100pmole / μ l)	1.0	2.0	1.0	2.0	1.0	2.0
dNTP(1.25mM)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
10x PCR buffer	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Taq polymerase(2U / μ l)	1.25	1.25	0.5	0.5	1.0	1.0
H ₂ O	37.25	35.35	38.0	36.0	37.5	35.5
Template ^b (10ng / μ l)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Total	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

b: KTS1 DNA.

DNA에서는 각각의 primer 모두에서 증폭된 DNA를 확인할 수 없었으나 사용한 4쌍의 primer들중 primer KTS1-R에서 디자인한 KTS1-R upper, lower primer쌍은 특이적으로 128bp의 DNA가 증폭되었고, KTS3-F에서 디자인한 KTS3-F upper, lower primer 쌍은 75bp의 DNA가 특이적으로 증폭됨을 확인할 수 있었다. 그러나 primer KTS1-F와 KTS3-R에서 디자인된 2쌍의 primer들은 DNA의 증폭을 관찰할 수 없었다. 한편 확인된 이 두개의 primer중 KTS1-R에서 디자인한 primer 쌍이 KTS3-F에서 디자인한 primer 쌍보다 증폭된 DNA의 양이 많은 것으로 보아 진단용으로 사용하기에 용이할 것으로 판단되어 이후의 실험에서는 KTS1-R upper, lower primer 쌍을 사용하였다.

Primer, enzyme 및 template 최적농도 : PCR 증폭시 primer와 enzyme 그리고 template 등의 최적농도를 알아내기 위하여 Table 3에서와 같이 각각에 농도변화를 주어 PCR 증폭을 실시한 결과 Fig 4의 lane 16에서 보는 바와 같이 primer(10pmole / μ l)는

각각 2 μ l, dNTP(1.25mM)는 4 μ l, Taq polymerase(2U / μ l)는 0.5 μ l 그리고 template(100pg / μ l)는 0.5 μ l에서 by-products가 가장 적게 형성되었으며, dimmer도 나타나지 않았고, 증폭된 128bp product가 깨끗하게 형성되었다.

감염혈액으로부터 시료 template를 회수하여 PCR 증폭시 template 양에 대한 결과를 알아보기 위하여 시료 No. 1(감염율 4.1%, No.2(감염율 0.2%) 그리고 No. 3(감염율 1%)의 동일한 template 5 μ l와

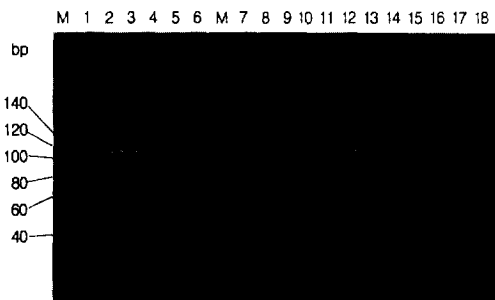


Fig 4. Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products.

The DNA was stained by ethidium bromide and visualized by illumination of UV lamp. PCR mixtures were prepared as those shown in Table 3. M: marker(10bp DNA ladder).

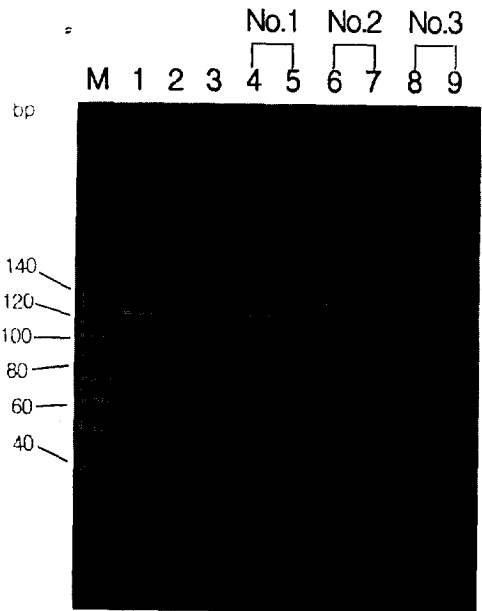


Fig 5. PCR amplification of *Theileria sergenti* DNA a from infected bovine.

Volumes of DNA templates were 5 μ l(lane 4, 6, 8) and 30 μ l(lane 5, 7, 9). M: marker(10bp DNA ladder), lane 1: positive control(KTS1 DNA), lane 2: bovine leucocyte DNA, lane 3: bovine kidney DNA, lane 4~5; No. 1. lane 6~7; No. 2, lane 8~9; No. 3. Parasitemia of No. 1, 2 and 3 were 4.1%, 0.2% and 1%, respectively.

30 μ l를 각각 비교한 바 5 μ l에서는 128bp 위치에서 증폭된 DNA를 확인할 수 있었으나, 30 μ l에서는 전혀 band를 관찰할 수 없었다(Fig 5 참조).

PCR로 증폭 가능한 최소량의 DNA양 결정: PCR 증폭시 음성대조로는 template를 넣지 않고 반응시킨 것을, 양성대조로는 KTS1 DNA와 비장적출한 소로부터 *T. sergenti* merozoite DNA를 추출하여 사용하였으며, *T. sergenti*에 대한 대조로는 *T. sergenti*에 감염되

지 않은 소의 백혈구 DNA 및 소의 신장세포를 배양한 세포로부터 DNA를 추출하여 사용하였다.

Fig 6과 같이 음성대조와 소의 백혈구, 신장세포 DNA 모두에서 전혀 증폭된 DNA를 관찰할 수 없었으나 KTS1과 *T. sergenti* merozoite DNA에서는 증폭된 128bp DNA를 확인할 수 있었다. Probe로 사용한 KTS1 DNA를 4ng부터 10배씩 연속희석하여 PCR 증폭을 실시한 결과 4ag까지 검출할 수 있었다

Table 4. Comparison of the PCR method and microscopic examination to detect *Theileria sergenti* infection

Cattle No.	Microscopy (Parasitemia, %) ^a	PCR result	Cattle No.	Microscopy (Parasitemia, %) ^a	PCR result
1	6.2	+	36	0.2	+
2	4.1	+	37	0.1	+
3	0.0	-	38	0.2	+
4	2.4	+	39	0.0	-
5	1.0	+	40	0.0	-
6	0.1	+	41	0.0	-
7	0.3	+	42	0.0	-
8	0.0	-	43	0.1	+
9	0.0	-	44	0.1	+
10	0.5	+	45	0.0	-
11	3.2	+	46	0.3	+
12	0.7	+	47	0.0	-
13	0.7	+	48	0.8	+
14	0.7	+	49	0.0	-
15	1.0	+	50	0.2	+
16	0.0	+	51	0.0	-
17	0.0	-	52	0.9	+
18	2.5	+	53	0.3	+
19	2.3	+	54	0.0	-
20	0.4	+	55	0.1	+
21	1.8	+	56	0.0	-
22	1.9	+	57	0.1	+
23	1.5	+	58	0.5	+
24	0.5	+	59	0.1	+
25	3.3	+	60	0.0	-
26	1.5	+	61	0.2	+
27	1.2	+	62	0.2	+
28	2.9	+	63	0.2	+
29	0.9	+	64	0.2	+
30	0.1	+	65	0.1	+
31	0.4	+	66	0.0	+
32	0.0	-	67	0.0	-
33	0.0	+	68	0.5	+
34	1.4	+	69	0.0	-
35	0.0	+	70	0.0	-
Total				70	70
Positive				47	51
Negative				23	19
Detection rate(%)				67.1	72.8

a: parasitemia(%)=infected erythrocytes/three thousand erythrocytes.

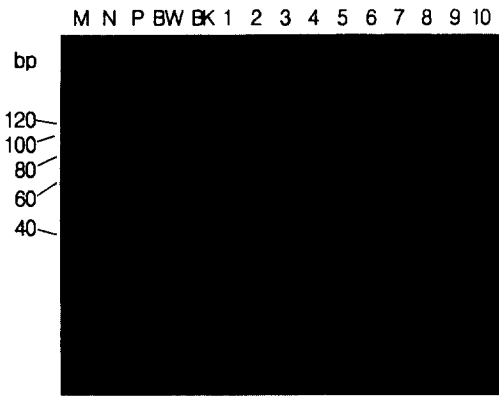


Fig 6. Determination of the minimum amount of the KTS1 DNA for PCR using a primer pair of KT-S1-R.

M; marker(10bp DNA ladder), N; a negative control without a template, P; probe KTS1 DNA, a positive control with KTS1 DNA as a template, BW; noninfected bovine leucocyte DNA, BK; noninfected bovine kidney cell DNA. Lane 1~10; the amount of the template is 4ng, 400pg, 40pg, 4pg, 400fg, 40fg, 4fg, 400ag, 40ag and 4ag of KTS1 DNA obtained from pKTS1 plasmid.

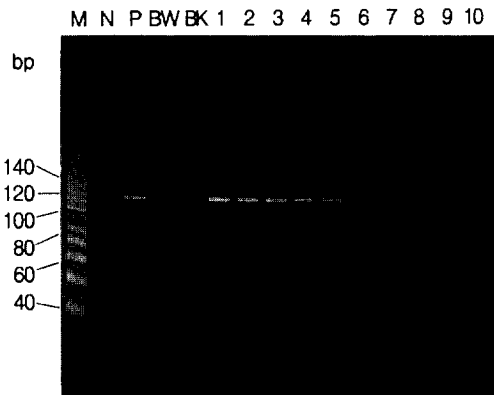


Fig 7. Determination of the minimum amount of the *Theileria sergenti* DNA for PCR using a primer pair of KTS1-R.

M; marker(10bp DNA ladder), N; a negative control without a template, P; probe KTS1 DNA, a positive control with KTS1 DNA as a template, BW; noninfected bovine leucocytes DNA, BK; noninfected bovine kidney cell DNA. Lane 1~10; the amount of the template is 4ng, 400pg, 40pg, 4pg, 400fg, 40fg, 4fg, 400ag, 40ag and 4ag of DNA obtained from *T. sergenti* merozoite.

(Fig 6 참조). 또한 비장적출한 소에 감염시킨 *T. sergenti* merozoite를 회수하여 DNA를 추출한 후 4ng

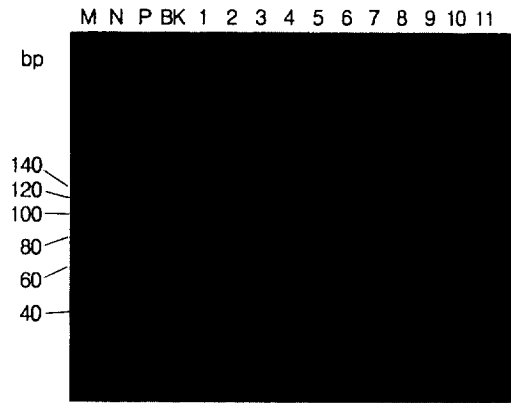


Fig 8. Determination of the sensitivity of the *Theileria sergenti* infected bovine blood by PCR using a primer pair of KTS1-R.

M; marker(10bp DNA ladder), N; a negative control without a template, P; probe KTS1 DNA, a positive control with KTS1 DNA as a template, BK; noninfected bovine kidney cell DNA. Lane 1~11; the template is 5 μ l of total DNA isolated from blood infected by *T. sergenti* at the frequency of 0.15%, 0.075%, 0.037%, 0.018%, 0.0093%, 0.0046%, 0.0023%, 0.0011%, 0.00058%, 0.00029% and 0.00014%. Blood was 0.3% parasitemia and the number of erythrocytes was 5.62 \times 10⁶/ μ l.

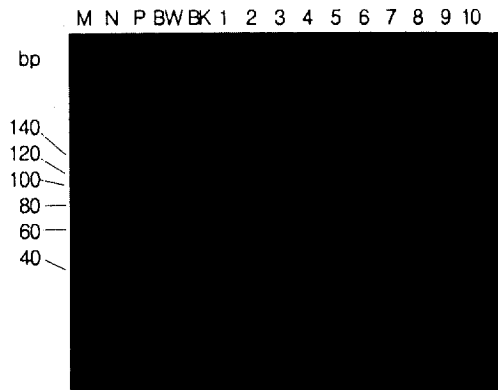


Fig 9-A. PCR amplification for detection of *Theileria sergenti* infection in cattles.

The results are shown in the ethidium bromide-stained 10% acrylamide gel. M; marker(10bp DNA ladder), N; a negative control without a template, P; probe KTS1 DNA, a positive control with KTS1 DNA as a template, BW; noninfected bovine leucocyte DNA, BK; noninfected bovine kidney cell DNA. Lane 1~10; The amount of template is 5 μ l of DNA obtained from bovine blood(No. 1~70).

부터 10배 연속희석하여 PCR 증폭을 실시한 결과 4 μ 까지 검출할 수 있었다(Fig 7 참조).

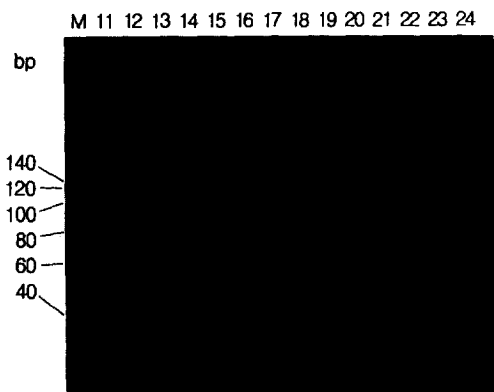


Fig 9-B. Continued.

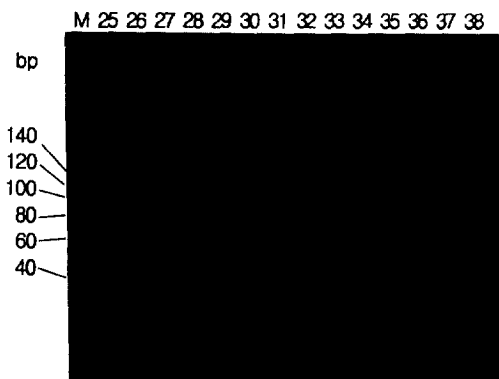


Fig 9-D. Continued.

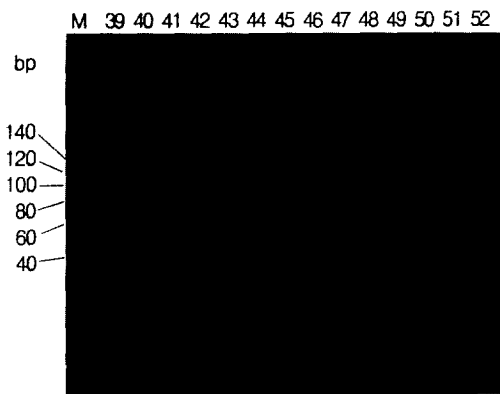


Fig 9-C. Continued.

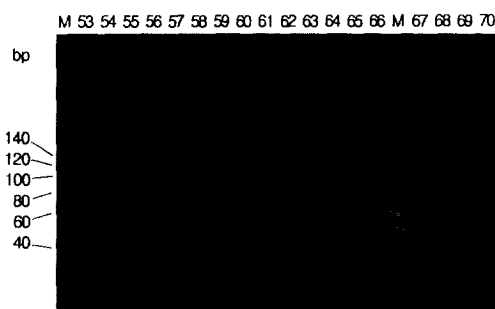


Fig 9-E. Continued.

고 찰

한편 *T. sergenti*의 감염여부를 신속히 확인할 수 있는 방법개발을 위하여 *T. sergenti*의 DNA를 분리하지 않고, *T. sergenti*가 감염된 혈액 자체를 이용하여 PCR을 수행하였다. *T. sergenti*에 감염된 혈액(감염율: 0.3%, 적혈구수: $5.62 \times 10^6 / \mu\text{l}$)을 0.9% 생리식염수로 2배 연속희석하여 $5 \mu\text{l}$ 의 template를 취하여 반응성을 확인하여 본 결과 0.00029%의 감염율(원충 164개/ $10 \mu\text{l}$ 혈액)까지 검출할 수 있었다(Fig 8 참조).

실제로 위와 같은 방법으로 *T. sergenti*의 감염여부를 확인할 수 있는지 알아보기 위하여 전북지역의 방목장에서 사육중인 두개 목장의 소 70두로 부터 혈액을 채취하여 *T. sergenti*의 진단을 위하여 혈액도말표본의 현미경검사법과 PCR 증폭을 실시하여 이들을 비교하였다. 그 결과 Fig 9(A~E)과 Table 4에서와 같이 혈액도말표본에서는 67.1%의 검출율을, PCR 증폭법에서는 72.8%의 검출율을 보였다.

Southern hybridization은 임상적으로 진단에 적용하기에 너무 복잡한 단계와 시간이 걸릴 뿐 아니라 고도의 기술이 필요한 점 등이 아직은 어려운 문제로 남아 있다.

따라서 채 등¹¹⁾이 사용한 probe KTS1과 KTS3 DNA 단편을 토대로 하여 재조합된 plasmid pKTS1과 pKTS3을 sequencing하여 밝혀진 염기서열 중에서 primer를 디자인하였다. 디자인된 primer중 유용성을 확인하기 위하여 4개의 primer에 대한 PCR product를 확인해 본 결과, Fig 3에서와 같이 KTS1-R upper, lower primer 쌍과 KTS3-F upper, lower primer 쌍만이 증폭된 DNA가 확인되었으며, 나머지는 증폭된 DNA를 확인할 수 없었다. KTS1-R은 KTS3-F보다 product의 양과 크기가 커서 증폭된

DNA의 양을 확인하기가 용이하였다. 따라서 본 실험에서는 KTS1-R의 primer 쌍을 사용하였다. 이 primer 쌍을 이용하여 PCR 증폭한 product는 크기가 128bp로써 실험적으로는 10% acrylamide gel에서 정확하게 확인되었으나 2% agarose gel에서도 확인이 가능하므로 임상적으로는 2% agarose gel을 이용하여 진단하는 것이 편리할 것으로 생각된다. PCR products의 크기(78bp)가 작은 예는 Furuya et al¹⁰⁾의 *Rickettsia tsutsugamushi*의 PCR 진단에서도 찾아 볼 수 있었다.

PCR 증폭시 by-products나 dimmer 등이 형성되지 않고 원하는 products만이 증폭될 수 있는 primer, Taq, polymerase, dNTP 등의 농도 및 template의 양을 결정하기 위하여 Table 3에서와 같이 PCR 혼합액을 만들어 확인한 결과 Fig 4에서와 같이 Lane 16에서 가장 명료한 band를 확인할 수 있었다. 또한 annealing 온도에 있어서는 Primer analysis software(Oligo[®] 4.1, Wojciech Rychlik, NBI)에서 55°C가 적당하다고 디자인하였지만 온도를 5°C 높여 60°C로 PCR 증폭을 실시한 결과 by-product가 거의 형성되지 않았다. 따라서 이 조건에서 PCR 증폭을 실시하였다.

혈액에서 간편하고 빠른 시간내에 template을 취하여 PCR 증폭을 실시하는 방법들은 여러가지가 있으나 본 실험에서는 Kawasaki¹¹⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. Fig 5에서와 같이 template의 양을 5 μ l와 30 μ l를 각각 사용하여 PCR 증폭을 실시한 바 template 양이 많다고 원하는 product가 증폭되는 것은 아니었다. 이것은 template를 취할 때 LBK 용액이 혼합되어 PCR에 영향을 주는 것이 아닌가 생각된다. 본 실험에서는 LBI 용액을 제조할 때 적혈구를 용혈시키기 위하여 Tween 20을 사용하였으나 Tanaka et al¹²⁾은 template를 제조할 때 lysis buffer 용액에 hemolysin을 사용하였다. 이 방법이 원충의 DNA를 추출하는데 더 효과적인지에 관해서는 추후 비교실험을 해보아야 할 것으로 생각한다.

Primer KTS1-R을 이용하여 디자인한 primer 쌍의 KTS1 DNA에 대한 감도를 확인해 보고자 PCR 증폭한 결과, Fig 6에서와 같이 4 μ g template까지 특이적으로 증폭된 DNA를 확인할 수 있었으나, Fig 7에서는 *T. sergenti* DNA를 추출한 것을 template로 사용하여 PCR 증폭을 실시한 결과에서는 4 μ g까지 검출할 수 있었다. Fig 8은 감염혈액을 직접 처리하여 template를 얻은 것으로서 PCR 증폭을 실시한 결과에서는 0.00029%의 감염율까지 검출(원충 164개/10 μ l 혈액)할 수 있었다.

Tanaka et al¹²⁾이 *T. sergenti* DNA를 추출하여 PCR 증폭을 실시한 결과에서는 500 μ g까지 검출할 수 있었으며, 감염혈액을 연속희석하여 직접 처리하여 template를 취하여 PCR 증폭시킨 점과 0.00009%의 감염율까지 검출(원충 164개/10 μ l 혈액)하였다고 보고하였다.

이 실험에서 원충을 순수분리하여 추출한 *T. sergenti* merozoite DNA에 있어서 PCR 증폭의 결과는 Tanaka et al¹²⁾의 보고보다 검출율이 100배 이상 높았으나 혈액중에서 직접 template를 취하여 PCR 증폭한 결과에 있어서는 검출율이 약간 낮게 나타났다. 따라서 혈액중에서 직접 template를 취하여 PCR 증폭시 검출율을 높일 수 있는 방법은 template를 얻는 방법에 있어서 더욱 더 효과적인 방법을 찾는 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

이러한 PCR 기법을 이용한 진단방법이 hybridization 방법에 의한 진단보다는 경제성 및 특이성면에서 더욱 효과적이며 빠른 시간내에 진단할 수 있는 방법으로 판단되었다. 그리고 이 실험에서 밝혀진 nucleotide sequence들은 어떤 특성을 가지고 있는 유전자인지 Genbank[™]을 통하여 확인해 볼 필요가 있으며 앞으로 이에 관한 검증이 요구된다.

결 론

한우에 감염된 *T. sergenti*에 관한 정확하고 신속한 진단방법을 찾아보고자 유전공학적인 방법을 이용하여 본 실험을 수행하였다. *T. sergenti*에 감염된 한우의 적혈구내 *T. sergenti* merozoite를 순수분리하여 얻은 DNA로 *T. sergenti*의 유전자 은행을 제조하였다. 이중 3개의 *T. sergenti* genomic DNA 단편을 얻어 probe로서의 사용여부를 확인하기 위하여 Southern hybridization과 dot blot hybridization을 실시하였으며, 이중 2개의 probe(KTS1, KTS3)로부터 primer 쌍을 디자인하여 PCR 증폭으로 *T. sergenti*를 진단하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. KTS1 DNA로부터 reverse 방향에서 20-mer의 upper primer(5'-CCTCTTGAAGTCATCCATGT-3', nucleotide position 48), 20-mer의 lower primer(5'-CACTGAGCTGGAAAGAGCTA-3', nucleotide position 156)를 합성하였고, 이를 이용하여 *T. sergenti* DNA를 PCR 증폭시킨 결과 128bp의 DNA 단편이 증폭되었다.

2. Probe로 사용한 KTS1 DNA를 순수분리하여 PCR 증폭시킨 결과, 4 μ g의 KTS1 DNA 양까지 검

출되었다.

3. *T. sergenti* merozoite를 분리한 후 DNA를 추출하여 PCR 증폭시킨 결과, 4fg의 merozoite DNA 양까지 검출할 수 있었다.

4. *T. sergenti* 감염혈액에서 직접 DNA를 추출하여 PCR 증폭한 결과, 적혈구내 감염율 0.00029% 까지 검출(원충 164개/10 μ l 혈액)할 수 있었다.

5. 전북지역의 방목장에서 사육중인 한우 70두로부터 채혈하여 *T. sergenti*의 검출율을 조사하여 본 바 Giemsa 염색에 의한 방법에서는 67.1%의 검출율을 나타내었으며 같은 시료를 PCR 증폭에 의한 방법에서는 72.8%의 검출율을 나타내었다.

참고 문헌

1. 南哲郎, 牛 *Theileria*病, 南哲郎, 藤永徹 編著, 獸醫住血微生物病. 東京; 近代出版, 1986; 149~169.
2. Takahashi K. Studies on the infection and immunity of *Theileria sergenti*. *J Coll Disting* 1976; 6: 179~248.
3. 전영, 국내 소의 주혈원충과 그 혈액학치에 관한 조사연구. 농시보고 1971; 12: 81~85.
4. 이주목, 김명철. 쫓소의 파이로플라즈마증의 효과적인 집단검색과 치료방법에 관한 연구. 대한수의학회지 1987; 27: 321~330.
5. 한정희, 이주목. *Theileria* 감염우 혈액의 임상혈액학적 조사. 전북대학교 농대논문집 1984; 15: 91~96.
6. Yohihara K, Nakamura Y, Fujisaki K. et al. Bovine monoclonal antibody specific to *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* 1990; 52: 1333~1335.
7. Higuchi S, Kawamura S. Studies on the isolation and characterization of *Theileria*: particularly on the applicability to passive hemagglutination test. *Kitasato Arch Exp Med* 1979; 52: 1~4.
8. 전영, 김동성. 간접형광항체법에 의한 한우 타이레리아병의 혈청학적 진단에 관한 연구. 농사시험연구보고 1977; 제19호: 27~32.
9. Tanaka M, Ogitani T, Okabe T, et al. Protective effect against intraerythrocytic merozoites of *Theileria sergenti* infection in calves by passive transfer of monoclonal antibody. *Jpn J Vet Sci* 1990; 52: 631~633.
10. Tanaka M, Okabe T, Sasaki N. Monoclonal internal image anti-idiotype antibodies of *Theileria sergenti* merozoite surface antigen. *Jpn J Vet Sci* 1990; 52: 813~818.
11. Kobayashi N, Onuma M, Kirisawa R, et al. Monoclonal antibodies against Intraerythrocytic merozoites-(Piroplasms) of *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* 1987; 29: 697~702.
12. Ogitani T, Okabe T, Sasaki N. Antigenic properties of *Theileria sergenti* in ELISA serodiagnosis. *Jpn J Vet Sci* 1987; 49: 531~534.
13. McLaughlin GL, Ruth JL, Jablonski E, et al. Use of enzyme-linked synthetic DNA in diagnosis of falciparum malaria. *Lancet* 1987; 3: 714~715.
14. Gajadhar AA, Marquardt WC, Hall R, et al. Ribosomal RNA sequences of *Sarcocystis muris*, *Theileria annulata* and *Cryptocodium cohnii* reveal evolutionary relationships among apicomplexans, dinoflagellate, and ciliates. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45: 147~154.
15. Ellis J, Hefford C, Baverstock PR, et al. Ribosomal DNA sequence comparison of *Babesia* and *Theileria*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 54: 87~96.
16. Posnett ES, Ambrosio RE. DNA probes for the detection of *Babesia caballi*. *Parasitology* 1991; 102: 357~365.
17. Posnett ES, Fehrser J, Waal DT, et al. Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animal using a DNA probe. *Vet Parasitol* 1991; 39: 19~32.
18. Allsopp BA, Allsopp MTEP. *Theileria parva*: genomic DNA studies reveal intra-specific diversity. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 28: 77~84.
19. Mucenski CM, Guerry P, Buesing M, et al. Evaluation of synthetic oligonucleotide probe for diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. *Am J Trop Hyg* 1986; 35: 912~920.
20. Barker RH, Brandling-Bennett AD, Koech DK, et al. *Plasmodium falciparum*: DNA probe diagnosis of Malaria in Kenya. *Exp Parasitol* 1989; 69: 226~233.
21. Barker RH, Suebsaeng L, Rooney W, et al. Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 1986; 231: 1434~1436.
22. Conrad PA, Thomford JW, Marsh A, et al. Ribosomal DNA probe for differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* isolates. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1210~1215.
23. 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.
24. Hirano A, Kirisawa R, Evaluaton of high sensitive DNA probe for the detection of *Theileria sergenti* in-

- fection in cattle. *J Vet Med Sci* 1991; 53: 933~935.
25. Kajiwara N, Kirisawa R, Onuma M, et al. Specific DNA probe for the detection of *Theileria sergenti* infection in cattle. *Jpn J Vet Sci* 1990; 52: 1199~1204.
 26. 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.
 27. 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: 169~176.
 28. 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.
 29. 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.
 30. Kawamori F, Akiyama M, Sugieda M, et al. Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*. *J Vet Sci* 1993; 55: 749~755.
 31. Tanaka M, Onoe S, Matsuba T, et al. Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2565~2569.
 32. 김명철, 이주목, 권오덕 등. *Theileria sergenti* DNA probe를 만들기 위한 기초 연구. 대한수의학회지 1993; 33(3): 479~486.
 33. 채준석, 이주목, 권오덕 등. 한우에 감염된 *Theileria sergenti* merozoite의 순수분리와 genomic DNA probe에 관한 연구. 대한수의학회지 1994; 34: 387~394.
 34. Sugimoto C, Sato M, Kawazu S, et al. Purification of merozoites of *Theileria sergenti* from infected bovine erythrocytes. *Parasitol Res* 1991; 77: 129~131.
 35. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; 1.1~18.88.
 36. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitor. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74: 5463~5467.
 37. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; 1: 1.40~1.41.
 38. Kawasaki ES. Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. eds. Innis Ma, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, Inc., San Diego 1990; 146~152.
 39. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, et al. Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2628~2630.