

Theileria sergenti DAN probe를 만들기 위한 기초 연구

김명철 · 이주목 · 권오덕 · 채준석 · 김홍섭
전북대학교 수의과대학
(1993년 6월 25일 접수)

A study for a construction of *Theileria sergenti* DNA probe

Myeong-chul Kim, Joo-mook Lee, Oh-deog Kwon, Joon-seok Chae, Heung-seob Kim

Department of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

(Received June 25, 1993)

Abstract : This study was attempted to develop a method for detection of *Theileria sergenti* infection on the basis of hybridization of parasite DNA with a probe.

For construction of a *T. sergenti* genomic library, *T. sergenti* DNA was digested completely with Bam-HI and the fragments were ligated into the Bam-HI site of pUC-19 before transformation of *Escherichia coli* strain JM83.

To detect clones containing the parasite's DNA sequences, a genomic DNA library of *T. sergenti* constructed in pUC-19 was screened by cracking and Southern hybridization.

Seven colonies were chosen from 29 colonies which were screened by transformation of *Escherichia coli* strain JM83. Seven transformants were confirmed from seven colonies by cracking. The sizes of transformants were about 5 Kb, 5.7 Kb, 4.3 Kb, 7.75 Kb, 7.85 Kb, 5.8 Kb, 3.8 Kb, respectively.

DNA inserts, *T. sergenti* DNA, and bovine DNA were hybridized with radio-labelled *T. sergenti* DNA. Two(pT₁, pT₁) of the seven inserts and *T. sergenti* DNA reacted strongly but another 5 inserts and bovine DNA showed weak reaction.

All of the DNA inserts were not reaction. but *T. sergenti* DNA were very weakly and bovine DNA were strongly reacted to hybridization with radio-labelled bovine DNA.

Therefore, we obtained total 7 *T. sergenti* DNA fragments in this study.

Key words : Bovine, *Theileria sergenti*, DNA probe.

서 론

소에 기생하는 *Theileria sergenti*(*T. sergenti*)는 우리나라 뿐 아니라 일본, 시베리아 등 극동지역에 넓게 분포되어 있는 주혈원충으로서 진드기가 서식하는 지역에서 사육되는 소들은 그 대부분이 이 원충에 감염되어 있는 실정이다.^{1~4}

*T. sergenti*에 감염된 소는 분만, 수송, 고온 등 각종 stress나 혹은 다른 질병과 합병증이 발생하는 경우에는 원충의 감염율이 증가되면서 고열과 빈혈 등의 임상증상이 발현하게 되며 심한 경우에는 폐사하기도 한다.^{5~8}

현재로는 이 질병의 매개체인 진드기를 효과적으로 확실하게 구제할 수 없는 상태일 뿐만 아니라 원충에 대한 특이예방법이 개발되어 있지 않은 상태이므로 조기

*이 논문은 1992년도 교육부 학술진흥재단의 자유공모과제 학술조성비에 의한 연구논문 일부임.

진단과 더불어 조기치료만이 이 원충으로 인한 경제적 손실을 최소화시킬 수 있는 방법이다.⁹⁻¹³

지금까지의 *T. sergenti*의 진단은 혈액도말표본에 의한 현미경 관찰이 가장 실용적인 방법으로서 주로 이용되고 있는 실정이다. 그러나 이 방법은 원충감염율이 낮을 때에는 현미경관찰로서 발견하기가 어렵고, 많은 시간이 소요된다. 최근에는 혈청학적인 진단방법으로 겔침강반응(Gel precipitation test), 간접 형광항체법(Indirect fluorescent antibody method, IFA), enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 등이 응용되어 오고 있기는 하나^{14,15} 이러한 혈청학적 진단방법은 아직 야외조사에 사용하기에는 불편한 점이 많다. 따라서 신속하며 정확한 진단방법을 개발하기 위하여 최근 세균이나 바이러스에서 이용되고 있는 유전공학적 기법을 이용한 진단법의 개발이 시도되고 있다. 최근 일본에서 *T. sergenti*의 DNA를 분리정제한 후 genomic library를 구축한 다음, hybridization probe를 거쳐서 감염여부를 검사하는 hybridization assay를 기초로 한 새로운 진단방법이 보고되고 있는 바^{16,20} 이와같은 probe는 감지력이 매우 뛰어나 감염률이 낮을 때에도 진단이 가능한 것으로 보고되고 있다.

따라서 저자는 한국의 소에 있어서 *T. sergenti*에 감염된 혈액중의 원충을 발견하기 위해 *T. sergenti* DNA probe를 제작하여 radioactive hybridization 방법을 이용한 진단법이 이용될 수 있는지의 여부를 판단하기 위한 기초 실험으로서 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

***T. sergenti* 원충** : 본 실험에 사용한 *T. sergenti* 원충은 전북 진안지역에서 채취하여 본 실험실에서 사육하고 있는 소에 감염유지시키고 있는 원충을 사용하였다. 본 실험을 위하여 감염우에서 채취한 *T. sergenti* 감염적혈구를 비장적출한 송아지의 경정맥에 접종한 후 감염율이 13~15%에 도달한 혈액을 채취하여 원충을 분리하여 사용하였다.

혈액을 채취하여 glass bead로 섬유소를 제거시킨 다음, CF-11 Fibrous medium column를 통과시켜 백혈구를 제거하였다. 회수된 적혈구는 PBS(phosphate buffer saline)로 세척한 후 적혈구가 20% 되도록 PBS로 희석하고 0.5% saponin을 넣어 용혈시켰다. 이것을 polycarbonate membrane(pore size : 5 μ m)이 장착된 holder을 통과시켜서 *T. sergenti* 원충을 얻었다.

DNA의 분리 : 원충이 함유되어 있는 용액에 DNase I 용액을 가하여 최종농도가 1 μ g/ml 되도록 하고 이를 37°C에서 30분간 반응시켜서 소의 chromosomal DNA를

제거하였다. 이 용액에 SDS와 proteinase K가 각각 0.5% 및 50 μ g/ml가 되도록 혼합한 후 56°C에서 60분간 반응시켰다.

이어서 sample : CsCl를 V : W = 1 : 1로 혼합하고 ethidium bromid(EtBr)를 넣어 70,000rpm에서 16시간 원심분리하여 원충의 DNA를 회수하였다.

원충의 특이한 DNA단편을 얻기 위하여 소의 백혈구 DNA(bovine DNA)를 대조로 사용하였으며 백혈구 DNA의 추출을 위한 혈액은 원심분리하여 백혈구층을 회수하였다. 백혈구와 Ficoll hypaque용액을 층층이 되도록 하여 원심분리함으로써 백혈구를 순수 분리하였다. 그다음 단계는 DNase I 처리없이 *T. sergenti* DNA 처리와 동일한 방법으로 백혈구 DNA를 회수하였다.

이와같은 방법으로 회수된 *T. sergenti*와 백혈구 DNA를 butanol extraction하여 EtBr를 제거하고, TE [10mM Tris-HCl(pH 7.5), 1mM EDTA(pH 8.0)]용액중에서 24시간 정도 투석하였다. 투석된 시료는 phenol extraction하여 ethanol에서 침전시킨 다음, 냉동건조하여 TE에 녹여 시료로 사용하였다.

제한효소처리 : *T. sergenti* DNA의 절단은 Bam-HI 제한효소(KOSCO)를 사용하여 37°C에서 1시간 30분 반응시켰다. 이것을 phenol extraction하고 ethanol에서 침전시켜 DNA 절편을 얻었으며, 이를 TE 20 μ l에 녹여서 냉동보관하여 실험에 사용하였다.

Ligation : Bam-HI 제한효소처리에 의해 절단된 vector DNA(pUC-19)와 *T. sergenti* DNA를 1 : 3.5의 비율로 혼합하고 T₄ DNA ligase와 T₄ DNA ligation buffer를 사용하여 16°C에서 16시간 반응시켜 ligation된 DNA를 얻었다.

Transformation : *Escherichia coli* strain JM 83을 LB 배지(Luria Bertani : 0.5% NaCl, 1.0% Bacto-trypton, 0.5% Bacto-yeast extract)에 접종한 후 37°C에서 11시간 동안 배양한 다음, 1ml을 취하여 100ml LB 배지에 옮겼다. 이것을 37°C에서 O.D가 0.4가 될 때까지 배양한 후 이 배양액 50ml을 4°C에서 5,000rpm으로 5분간 원심분리하였다.

상층액을 버리고 침전된 cell를 차가운 wash buffer [100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 5mM Tris-Cl(pH 7.5)]로 세척한 후 다시 4°C에서 5분간 5,000rpm으로 원심분리한 다음, 상층액을 버렸다. 여기에 25ml의 차가운 Ca⁺⁺ buffer [250mM KCl 75mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, Tris-Cl(pH 7.5)]를 첨가하여 침전된 cell를 풀어서 30분동안 얼음속에서 반응시켰다. 이 competent cell를 4°C에서 4,000rpm으로 4분간 원심분리하여 침전시켜서 상층액을 제거하고 다시 1ml의 차가운 Ca⁺⁺ buffer를 넣어 조

심스럽게 풀었다.

Ligation한 DNA 50 μ l 에 이 competent cell 100 μ l 을 분주하고 이를 얼음속에서 1시간 반응시켰다. 이 혼합액을 42°C에서 90초간 heat shock을 가한 후 10ml의 LB 배지로 옮겨서 110분간 배양하였다. 이 배양액 1ml당 ampicillin이 25 μ g 되도록 첨가하여 다시 20분간 배양하였다. Ampicillin이 50 μ g/ml가 포함된 MacConkey agar plate에 전기한 배양액 500 μ l 분주 도말하고 37°C에서 12시간 배양함으로써 white colony를 얻게되었다.

Cracking : Transformant를 확인하기 위해서 cracking buffer(2N NaOH 25 μ l, 10% SDS 50 μ l, 500mM EDTA 10 μ l, H₂O 915 μ l) 25 μ l 가 들어있는 eppendorf tube에 white colony를 넣어 잘 혼합하였다. 이것을 15,000rpm에서 잠깐 원심분리하였으며 이를 68°C에서 1시간 반응시킨 후 15,000rpm으로 20분간 원심분리시켰다. 이로부터 상층액을 취해 0.7% agar gel에서 80 volt로 전기영동하여 colony의 DNA를 확인하였다.

Mini-scale Preparation of plasmid DNA : Transformation하여 얻어진 white colony를 5ml의 LB broth에 접종하여 12시간 배양하였다. 이 배양액을 eppendorf tube에 옮겨 harvest한 cell에 차가운 용액 I [50mM glucose, 10mM EDTA(pH 8.0), 25mM Tris-Cl(pH 8.0)]100 μ l 을 혼합한 다음, 실온에서 5분간 방치시켰다. 여기에 다시 차가운 용액 II (0.2N NaOH, 1.0% SDS) 200 μ l 를 가하여 얼음에서 5분간 방치시키면 용액이 점성을 띠게 된다. 이 시료에 차가운 용액 III (5M potassium acetate 60ml, glacial acetic acid 11.5ml, distilled water 28.5ml)을 150 μ l 넣고 얼음에서 5분간 보관한 후 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층의 DNA부유액을 다른 eppendorf tube에 옮긴다. phenol : chloroform : isoamylalcohol 이 49 : 49 : 2의 비율로 혼합된 액과 전기한 DNA부유액을 동량 혼합하여 격렬하게 진탕시켰다. 이를 실온에서 2분간 원심분리하여 상층액을 취하고, 한번 더 phenol extraction을 하였다. 여기에 같은 양의 chloroform을 첨가하여 격렬하게 진탕한 다음, 2분간 원심분리한 상층액을 한번 더 chloroform 처리를 하였다. 이 처리액의 두배가 되는 차가운 ethanol을 혼합하여 실온에서 5분간 원심분리하였다. 이렇게 얻은 pellet을 70% ethanol로 세척하여 진공 건조시켰다. 이 시료는 TE에 녹여 -20°C에서 보관하고 필요에 따라 실험에 사용하였다.

Transfer and Hybridization of DNA : Transformant가 *T. sergenti* DNA의 절편인가를 확인하기 위하여 *T. sergenti* DNA와 bovine DNA를 각각 probe로 사용하여 hybridization을 실시하였다.

1) Probe의 nick translation : *T. sergenti* DNA와 bovine

DNA를 Bam-HI으로 자른 절편을 probe로 사용하기 위하여 Rigby et al²¹의 방법에 따라 nick translation을 수행하였다.

T. sergenti DNA, bovine DNA 각각 3 μ l, Nick translation buffer 2.5 μ l, 0.5mM dNTP-dAPT 1 μ l, α -³²P dAPT 5 μ l, H₂O 10 μ l 를 혼합하였다. 여기에 DNase I (1/50,000) 2.5 μ l 와 DNA polymerase I 1 μ l 를 넣고 16°C에서 60분동안 반응시킨 후 0.5M EDTA 1 μ l 를 넣었다. 이것을 TEN (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 100mM NaCl)으로 세척된 Sephadex G-50 column에 loading하여 TEN 완충용액으로 가득 채운 뒤 fraction column을 열고 시료를 200 μ l 씩 취했다.

G. M(Geiger-Muller) counter로 loading peak를 찾아내 그 fraction을 probe로 사용하였다.

2) **Electroblot** : Recombinant plasmid DNA와 *T. sergenti* DNA 그리고 bovine DNA를 각각 Bam-HI 제한효소로 37°C에서 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료를 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 gel을 0.2N NaOH, 0.6M NaCl용액으로 실온에서 1시간에 3번 세척하였다. Gene screen membrane을 gel의 크기에 맞추어 자른 다음 0.025M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄(pH 6.5) 용액에 20분간 침적하였다. Whatman 3MM 4장과 pad 2개를 0.025M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄(pH 6.5) 용액에 적신다. 여과지 2장을 pad위에 올려 놓고 gel을 그 위에 올려 놓은 다음 gene screen membrane으로 덮고 다시 2장의 여과지를 gene screen membrane위에 덮어 샌드위치 처럼 중첩하여 0.025M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄(pH 6.5) 용액을 채운 electroblot kit에 넣어서 4°C에서 1A로 3시간동안 DNA 절편을 gene screen membrane에 electro-transfer하였다.

Transfer가 끝난 Gene screen membrane을 0.025M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄(pH 6.5) 용액으로 씻은 다음, 실온에서 건조시켜서 80°C에서 4시간동안 진공건조시켰다. Nick translation에 의해 ³²P로 radio-label된 *T. sergenti* DNA와 bovine DNA를 각각 probe로 southern hybridization을 실시 하였다.

3) **Hybridization of DNA** : Prehybridization buffer [50% formamide(deionized), 0.2% polyvinyl-pyrrolidone(M.W. 40,000), 0.2% bovine serum albumin, 0.2% ficoll(M.W 400,000), 0.05M Tris-HCl(pH 7.5), 1.0M NaCl, 0.1% sodium pyrophosphate, 1.0% SDS, 1.0% dextran sulfate, denatured salmon sperm DNA(\geq 100 μ g/ml)]가 들어 있는 tube안에 gene screen membrane을 넣고 42°C에서 6시간 반응시켰다. 이 tube에 hybridization buffer [50% formamide(deionized), 0.2% polyvinyl pyrrolidone(M.W 40,000), 0.2% bovine serum albumin-

e, 0.2% ficoll (M.W 400,000), 0.05M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1% sodium pyrophosphate, 1.0% SDS, denatured salmon sperm DNA ($\geq 100 \mu\text{g}/\text{ml}$)와 radioactive probe를 넣고 42°C에서 24시간 반응시켰다. 그 다음 hybridization solution을 제거하고 membrane을 세척하기 위해 0.3M NaCl과 0.06M Tris-HCl (pH 8.0) 및 0.002M EDTA가 포함된 용액 100ml로 실온에서 5분 간격으로 2번 세척하고, 0.3M NaCl, 0.006M Tris-HCl (pH 8.0), 0.002M EDTA, 1.0% SDS가 포함된 용액 100ml로 60°C에서 30분간격으로 2번 세척하였다. 그리고 0.03M NaCl, 0.06M Tris-HCl (pH 8.0), 0.0002M EDTA가 포함된 용액 100ml로 실온에서 30분씩 2번 세척하였다. Membrane을 건조시킨 후 X-ray cassette에 넣고 그 위에 X-ray film을 넣어서 감광시킨 후 현상하였다.

결 과

*T. sergenti*에 감염된 소로부터 채혈하여 이를 비장적출한 송아지에 집종감염시켜서 원충을 증식시킨 후 원충을 순수 분리하여 DNA를 추출하였다.

이 추출된 *T. sergenti* DNA와 vector로 사용한 pUC-19을 Bam-HI로 절단하고 *T. sergenti* DNA를 pUC-19의 Bam-HI site에 접합시켜 *Escherichia coli* JM83에 transformation하였다. 이를 배양하여서 *Escherichia coli* colony 300개 중 29개의 white colony를 얻었다. 그중 7개의 white colony를 cracking 한 결과 이 DNA들이 각각 pUC-19과는 다른 위치에 band가 형성되어 있는 점을 보아 *T. sergenti* DNA 절편들이 pUC-19에 접합되어 있다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 1). Fig 2에서 보는 바와 같이 lane 1은 λ /Hind III 인 marker이고, lane 2는 pUC-19/Bam-HI이며, lane 3에서 9까지는 각각 pT₁~pT₉이라고 명명하였다. Lane 10은 *T. sergenti* DNA/Bam-HI, lane 11은 bovine DNA/Bam-HI이다.

Transformant의 크기를 확인하기 위하여 recombinant plasmid를 정제하여 Bam-HI로 절단, 0.7% agarose gel에 전기영동하여 DNA를 분석하였다. 그 결과 Fig 2에서 보는 바와 같이 vector에 삽입된 DNA 절편의 크기가 대략 5kb, 5.7kb, 4.3kb, 7.75kb, 7.85kb, 5.8kb, 3.8kb이었다.

이어서 Ordinary alkaline method로 획득한 transformant가 들어있는 plasmid DNA로 southern hybridization을 실시하였다. *T. sergenti* DNA를 probe로 하여 southern hybridization한 결과 (Fig 3) pT₁~pT₉에서는 모두 양성반응이 나타났다. 대조로 사용한 *T. sergenti* DNA에서는 강한 반응이 나타났으나 bovine DNA는 그 반응이 약하였다. Fig 4에서 보는 바와 같이 bovine DNA를 probe

로 하여 southern hybridization을 실시한 결과 pT₁~pT₉는 반응이 없었으며 *T. sergenti* DNA는 매우 약하게 나타났고 bovine DNA는 강한 반응이 나타났다.

고 찰

진드기를 매개로 하여 소에 감염되는 주혈원충인 *Theileria*종은 세계적으로 널리 분포되어 있으나 우리나라의 소에 감염되어 있는 *Theileria*종은 *T. sergenti*로 알려져 있으며¹⁻⁴, 이로 인한 양축농가의 피해는 실로 막대하다.⁵⁻⁸ 그러므로 많은 연구자들이 그 피해를 줄일 뿐만 아니라 효과적이고 간편한 진단과 치료 그리고 예방법 등을 알아내기 위하여 많은 노력을 하고 있다.

현재로는 원충감염의 진단법으로 IFA, Precipitation test, ELISA와 같은 혈청학적 진단법과 함께 야외에서 주로 이용되고 있는 Giemsa's stain에 의한 광학현미경 검사법 등이 응용되고 있다.¹⁴⁻¹⁵ 그러나 이러한 방법들은 집단검색이나, 감염율이 낮은 경우에는 시간이 오래 걸릴 뿐만 아니라 원충을 발견하기가 매우 곤란하다.

따라서 Kajiwaru 등은¹⁶ DNA probe를 이용한 hybridization 방법을 이용하여 매우 낮은 감염율에서도 감염 여부를 식별할 수 있었다고 보고하였다. 이들은 원충 DNA 15pg (원충 1,200개), 또는 적혈구에 감염된 원충이 8,000개만 있으면 ³²P로 labell된 probe로 이들을 식별할 수 있었다고 한다.

본 실험에서도 이러한 probe 제작을 위한 기초연구를 실시한 바 *T. sergenti* 원충을 혈청에서 분리하는 과정에서 small lymphocyte 혹은 다른 미생물이나 이종단백질이 오염된 경우에는 DNA 작업이 매우 어려워지는 것이 가장 큰 문제중의 하나였으며 따라서 이에 대한 세심한 주의가 필요하였다.

한편 kajiwaru 등¹⁶은 bovine kidney cell을 배양하여 primary bovine kidney cell에서 DNA를 추출해서 이를 대조용으로 사용하였다. 그러나 우리 실험에서는 *T. sergenti*에 감염되지 않은 소의 백혈구로부터 DNA를 추출하여 대조용으로 사용하였다. 그 이유는 probe용 시료에는 미량의 소 백혈구가 혼입하게 되므로 이 백혈구 DNA와 *T. sergenti* DNA를 확실히 구별할 필요가 있기 때문이다.

Kajiwaru 등¹⁶은 *T. sergenti* genomic library를 구축하기 위하여 pUC-18을 vector로 그리고 배양균주로는 *Escherichia coli* strain JM109를 사용하여 colony hybridization 방법에 준하여 선택된 colony로부터 plasmid DNA를 회수하였다. 그러나 저자 등은 pUC-19과 *Escherichia coli* strain JM83를 사용하였는 바 pUC-19과 DNA의 접합체가 JM83 균주에 transformation이 되면 MacConkey 배

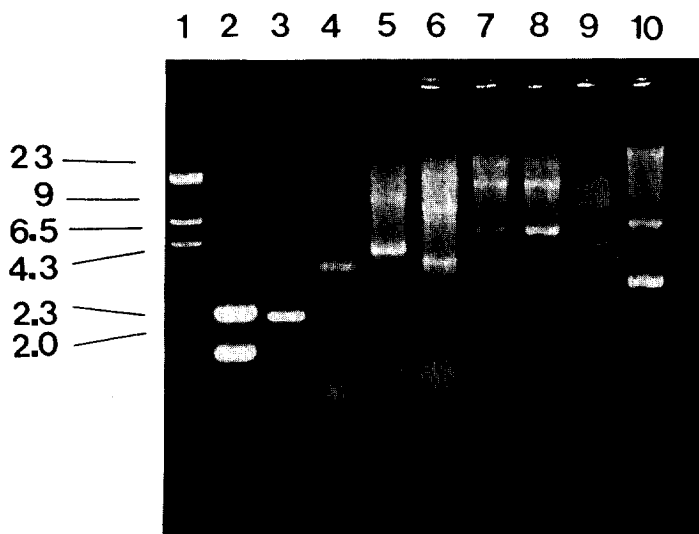


Fig 1. Transformants that were ligated into the Bam-HI site of pUC-19 electrophoresed on 0.7% agarose gel.

lane 1: λ /Hind III, lane 2: pUC-19, lane 3: pUC-19/Bam-HI

lane 4-10: Transformants that were ligated into the Bam-HI site of pUC-19.

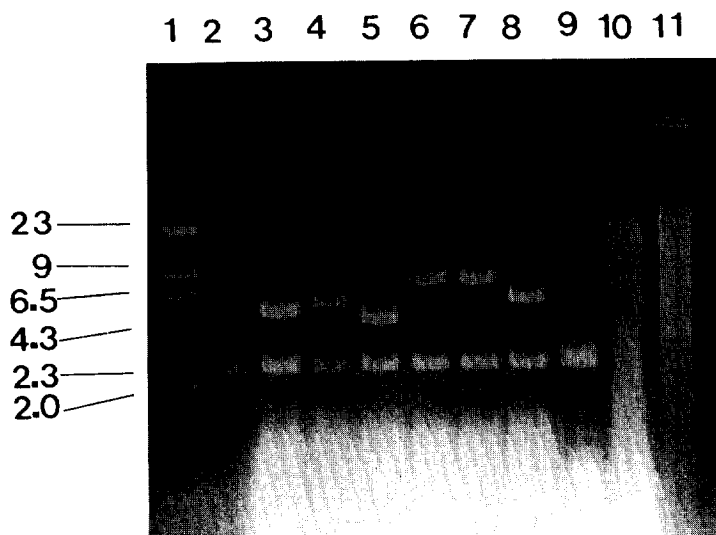


Fig 2. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids, *T. sergenti* DNA, and bovine DNA which were digested with Bam-HI.

lane 1: λ /Hind III, lane 2: pUC-19/Bam-HI.

lane 3-9: *T. sergenti* DNA insets (pT₁-pT₇), lane 10: *T. sergenti* DNA/Bam-HI.

lane 11: bovine DNA/Bam-HI.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

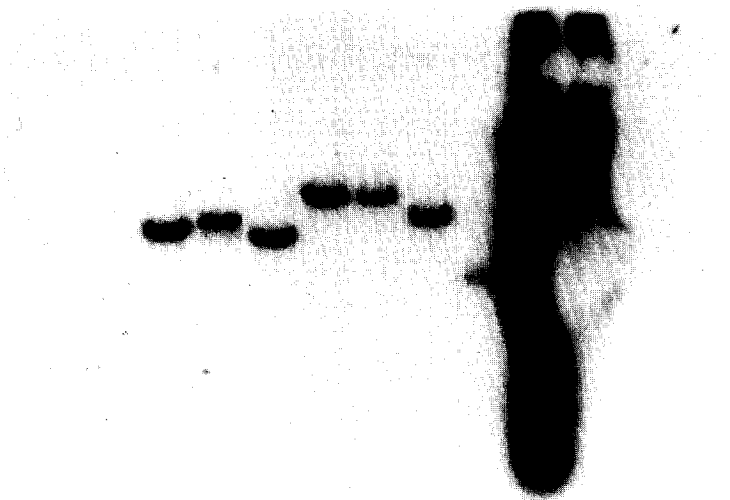


Fig 3. Gene screen membrane were hybridized with ^{32}P -labelled *T. sergenti* DNA.

lane 1 : λ /Hind III, lane 2 : pUC-19/Bam-HI, lane 3-9 : pT₁-pT₇.
lane 10 : *T. sergenti* DNA/Bam-HI, lane 11 : bovine DNA/Bam-HI

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Fig 4. Gene screen membrane were hybridized with ^{32}P -labelled bovine DNA.

lane 1 : λ /Hind III, lane 2 : pUC-19/Bam-HI, lane 3-9 : pT₁-pT₇.
lane 10 : *T. sergenti* DNA/Bam-HI, lane 11 : bovine DNA/Bam-HI

지상에서 white colony로 발현되는 성질이 있기 때문이다. 이 white colony를 cracking하여 0.7% agarose gel에서 전기영동함으로써 transformant를 확인하였다. 그 결과 pUC-19 band보다 상층부에 위치가 서로 다른 band가 형성되어 있었으며 이것은 pUC-19에 DNA의 절편이 접합되었음을 확인해주는 것이었다(Fig 1).

Southern hybridization을 실시하기 위하여 전술한 white colony들로부터 plasmid DNA를 추출하였다. 이 recombinant plasmid DNA는 Bam-HI 제한효소로 절단하여 0.7% agarose gel에서 전기영동시킨 결과 pT₁-pT₇의 band는 역시 그 위치가 서로 다를 수 있었다(Fig 2). 이와 함께 대조군인 *T. sergenti* DNA와 bovine DNA도 전술한 바와 같은 동일한 방법으로 처리하여 전기영동하였다. *T. sergenti* DNA를 probe로 하여 hybridization한 바 pT₁-pT₇에서는 각기 감광반응에 차이가 있었으며 특히 pT₁와 pT₁은 강한 반응이 나타난 반면 pT₂, pT₃, pT₇에서는 그 반응이 약한 편이었다.

대조로 사용한 *T. sergenti* DNA와 bovine DNA에서는 *T. sergenti* DNA는 강한 반응이 나타난 반면 bovine DNA에서는 그 반응이 매우 약하였다(Fig 3).

Bovine DNA를 probe로 하여 hybridization한 경우에 pT₁-pT₇에서는 아무런 반응이 나타나지 않았으며 대조인 *T. sergenti* DNA에서는 약한 반응이 그리고 bovine DNA에서는 강한 반응이 나타남을 알 수 있었다(Fig 4).

이러한 결과 7개의 band는 *T. sergenti* DNA의 절편임을 알 수 있었으며 특히 이 중에서 가장 강한 반응이 나타난 pT₁가 *T. sergenti*에 대한 감지력이 가장 우수할 것으로 생각된다. 그러나 혈중에 존재할 가능성이 있는 다른 미생물이나 숙주의 DNA와도 비교실험을 해야 할 필요가 있으며 한편 *T. sergenti*만의 특이한 DNA를 얻기 위해서는 원충의 분리와 DNA정제과정에서 오염되지 않도록 순수분리할 필요가 있다. 앞으로 *T. sergenti*만의 특이 transformant를 얻기 위한 연구를 더 계속할 필요가 있으며 이러한 과정을 통하여 보다 감지력이 높은 probe를 찾아내야 할 것으로 생각된다.

결 론

T. sergenti DNA를 probe로 하여 southern hybridization에 의한 *T. sergenti* 감염 진단방법에 관한 실험을 실시하였다. *T. sergenti* DNA에 대한 probe를 얻기 위해서 pUC-19과 *Escherichia coli* strain JM 83을 사용하여 *T. sergenti* genomic library를 구축하고, southern hybridization을 실시하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 29개의 white colony를 얻어 그중 7개의 colony를

cracking한 결과 크기가 서로 다른 7개의 transformants를 확인할 수 있었다.

2. Transformants의 크기는 각각 15kb, 5.7kb, 4.3kb, 7.75kb, 7.85kb, 5.8kb, 3.8kb이었다.

3. *T. sergenti* DNA를 probe로 하여 southern hybridization한 결과 7개의 transformants중에서 pT₁와 pT₁은 강한 반응을, pT₂, pT₃, pT₃, pT₆, pT₇은 약한 반응을 나타냈으며, 대조군인 *T. sergenti* DNA는 강한 반응을, bovine DNA는 약한반응을 나타냈다.

4. Bovine DNA를 probe로 하여 southern hybridization한 결과 pT₁-pT₇은 반응이 없었으며, 대조군인 *T. sergenti* DNA은 약한 반응을 나타내었으나 bovine DNA에서는 강한 반응이 나타났다.

참 고 문 헌

1. 孫濟英, 高起煥. *Theileria sergenti*, 不顯性感染牛에 對한 dexamethasone의 影響에 關한 研究. 대한수의사회지 1987 ; 20 : 93~99.
2. Pearson TW, Lundin LB. Cell-mediated immunity to *Theileria*-transformed cell lines. *Nature* 1979 ; 281 : 678~680.
3. Higuchi S, Kawamura S, Yasuda Y, et al. Scanning and transmission electron microscopy of *Theileria sergenti*. XIII the world congress on diseases of cattle and south African small animal satellite sym. Durban, South Africa 1984 ; Sepi 17 to 2.1
4. Yagi Y, Furuvchi S, Takahashi H, et al. Glycolytic enzyme activity and intermediate concentrations in *Theileria sergenti*-parasitized bovine erythrocytes. *Jpn J Vet Sci* 1988 ; 50(2) : 425~431.
5. Fujisaki K, Kamio T. Effect of constant temperatures on *Theileria sergenti* infection in salivary glands of nymphal *Haemaphysalis longicornis*. *Jpn J Vet Sci* 1988 ; 50(2) : 529~536.
6. 徐明得. 導入牛의 진드기 媒開 住血原蟲感染像과 *Theileria sergenti*의 治療豫防에 關한 研究. 農試報告 1982 ; 24(畜産, 家衛) : 57~75.
7. Higuchi S. The development of *Theileria sergenti* in the salivary glands of the tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Jpn J Vet Sci* 1986 ; 48(4) : 801~807.
8. Higuchi S. Development of *Theileria sergenti* in the ovary and eggs of the Tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Kiutsato Arch of Exp Med* 1985 ; 58(4) : 117~125.
9. Higuchi S, Kawamura S, Yasuda Y, et al. Morphological observations of the tubule of *Theileria sergenti*.

- Jpn J Parasitol* 1984 ; 33(4) : 361~364.
10. Higuch S. Morphological studies of *Theileria sergenti* IL. feeding mechanism by the cytostome of *Theileria sergenti*. *Thekitasato archives of experimental medicine* 1989 ; 56(4) 59~63.
 11. Higuch S, kawamura S. Scanning electron microscopy of *Theileria sergenti*. *Jpn J Vet Sci* 1985 ; 47(1) : 133~137.
 12. 이주목, 김명철. 쯤소의 파이로프라스마症의 효과적인 集團檢索과 治療方法에 關한 研究. 대한수의학회지 1987 ; 27(2) : 321~330.
 13. Ito T, Tsuda T. Thymus dependent adjuvant effect of *Theileria* antigen aganst herpesviruses and sheep erythrocytes in mice. *Jpn J Vet Sci* 1987 ; 49(6) : 1174~1176.
 14. Higuchi S, Kawamura S. Studies on the isolation and characterization of *Theileria* antigens ; partuculary on the applicability to passive hemagglutination test. *The kitasato archive of experimental medicine* 1979 ; 52(5) : 1~4.
 15. 金永, 金東成. 間接螢光抗體法에 依한 韓牛 타이레리아病的 血清學的 診斷에 關한 研究. 農事試驗研究報告 第19호 27~32.
 16. 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(6) : 1199~1204.
 17. Hirro A, Kirisawa R. Evaluation of high sensitive DNA probe for the detection of *Theileria sergenti* and *T. buffeli*. *J Vet Med Sci* 1991 ; 53(5) : 933~935.
 18. 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(2) : 305~311.
 19. Yagi Y, Furuuchi S, Shimzu S, et al. Separation of bovine erythrocytes infected with *Theileria sergenti* by "Percoll-Conray" density gradient. *Jpn J Vet Sci* 1987 ; 49(5) : 745~750.
 20. Ohgitani T, Okabe T, Sasaki N, et al. Antigenic properties of *Theileria sergenti* in ELISA serodiagnosis. *Jpn J Vet Sci* 1987 ; 49(3) : 531~534.
 21. Rigby PWJ, et al. Labeling deoxyribonucleic acid t- o high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113 : 237~251.
 22. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction p- rocedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979 ; 7 : 1513.