

Southern hybridization과 중합효소연쇄반응을 이용한 한국과 일본의 *Theileria sergenti* 비교

채준석*** · 이주목*** · 권오덕*** · 이승옥* · 채건상*** · Misao Onuma****

전북대학교 수의과대학*, 전북대학교 생체안전성연구소**
전북대학교 자연과학대학*** · 북해도대학 수의학부****

(1995년 9월 21일 접수)

Comparative analyses of *Theileria sergenti* isolated from Korea and Japan
by Southern hybridization and polymerase chain reaction

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

Seung-ok Lee*, Keon-sang Chae***, Misao Onuma****

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***

Department of Epizootiology, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan****

(Received Sep 21, 1995)

Abstract : The *T sergenti* DNA fragments used as probes of KTS1(2,4kb) and KTS3(1.5kb) were labeled with digoxigenin-11-dUTP for the Southern hybridization. *T sergenti* DNAs from different geographic locations(Korea; Chonbuk, Kyungbuk, Chungnam, Kangwon, Cheju island, Japan; Shintoku, Shintoku 9209, Shintoku 9201, Shintoku 9202, Shintoku 9102) which had been digested with *Pst* I and *Eco*R I were probed by the digoxigenin-11-dUTP-labeled KTS1 and KTS3. As the results, the samples from Chonbuk, Kyungbuk, Cheju island in Korea and Shintoku, Shintoku 9209, Shintoku 9201, Shintoku 9102 in Japan were positively reacted, but the others from the other locations not reacted.

In the conformation test of *T sergenti* DNA from different geographic locations, all of the samples were positively detected by PCR amplification.

Key words : *Theileria sergenti*, Southern hybridization, dot blot hybridization, sequencing, PCR amplification.

서 론

진드기 매개성 주혈원충성 질병인 theileriosis로 인한 피해는 상당히 광역화되어 있지만 이에 관하여 활발히 연구가 진행되고 있는 지역은 한국에 인접한 일본, 러시아, 중국 등 극동지역의 나라이며 theileriosis 중 *T sergenti*, *T orientalis* 그리고 *T buffeli*는 종간의 확실한 특성이 밝혀져 있지 않은 상태여서 이들 종

간의 특성을 확실히 밝히고자 하는 연구도 최근 속속 발표되고 있다¹⁾. Kawazu 등²⁾은 *T sergenti*와 *T buffeli* 원충의 표면단백에 관한 비교와 유전자의 특정 sequence를 비교하였으며 *T sergenti*, *T orientalis* 그리고 *T buffeli*를 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)법으로 비교 분석한 바 있다.

김 등³⁾은 한우로부터 *Theileria sergenti*(*T sergenti*) DNA를 추출하여 radioactive hybridization 방법에 의

한 DNA probe에 관한 기초연구를 보고한 바 있으며, 채 등⁵은 *T sergenti* merozoite의 순수분리와 이것을 토대로 하여 한국에서 분리한 *T sergenti*의 DNA probe를 제작하고, 이를 비방사선 물질로 label하여 Southern hybridization 방법을 통해 그 유용성 여부를 확인한 바 있다⁵.

또한 채 등⁵이 보고한 KTS1 probe를 이용하여 sequencing을 실시한 후 primer를 디자인하여 얻어진 결과를 가지고 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR법)을 이용한 진단법을 개발하였다.

따라서 이 실험에서는 저자 등이 제작한 probe와 primer를 이용하여 한국주와 일본주간의 유전자에 대한 차이 유무를 확인해 보기 위하여 Southern hybridization과 PCR 증폭방법을 이용하여 이를 비교하여 보았다.

재료 및 방법

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 유지보관하면서 이 원충주(stock)를 기본실험에 사용하였다.

국내 야외 원충주 : 실험에 제공된 원충주는 진드기 서식지역인 방목장에서 사육중인 한우에서 분리하였으며, 우리나라 전국 5개도(전북, 경북, 충남, 강원 및 제주)에서 각각 10두씩 감염우를 선별하여 원충을 수집하였다. 원충의 수집은 방목중인 한우로부터 채혈한 혈액도말표본을 Giemsa 염색하여 *T sergenti*의 감염이 확인된 소로부터 200ml씩 채혈한 다음, 적혈구내에 있는 *T sergenti*를 분리하여 실험에 사용하였다.

일본 야외 원충주 : 일본의 Shintoku 지역에서 사육되는 5두(Shintoku, Shintoku 9209, Shintoku 9201, Shintoku 9202, Shintoku 9102)의 소로부터 수집한 원충과 원충의 DNA를 北海道大學 獸醫學部 Onuma M교수로 부터 제공받아 실험에 사용하였다.

원충분리 : *T sergenti* merozoites를 순수분리하기 위해 비장적출한 송아지에 *T sergenti*를 감염시켜 경정맥 혈액의 적혈구 감염율이 15~20%로 증가하였을 때 채혈하여 Sugimoto et al⁶의 방법에 따라 분리하였으며 hemolysin은 Asao et al⁷의 방법으로 *Aeromonas hydrophila*(Ah-1) 배양액에서 추출하여 사용하였고,

회수된 원충 pellet은 -70℃에 냉동보관하면서 필요에 따라 사용하였다.

DNA 추출 : *T sergenti* merozoites DNA는 Matsuba et al⁸의 방법으로 추출하였다. 즉, 정제된 원충을 0.1%(w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS) 및 1mg/ml proteinase K가 첨가된 TNE 완충액(10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 넣어 60℃의 수조에서 약 16시간 반응시켰다. 그리고 RNase A를 20 μg/ml로 첨가하여 1시간 처리한 후 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25 : 24 : 1, v/v)로 처리하여 단백질을 제거한 다음, TE(10mM Tris-HCl; pH 7.5, 1mM EDTA; pH 8.0)용액 중에서 72시간 투석하였다. 투석된 시료를 한번 더 phenol extraction하여 단백질을 완전히 제거하고 DNA를 ethanol로 침전시켜 냉동건공건조한 후 TE에 녹여 냉동보관하면서 시료로 사용하였다.

T sergenti DNA의 대조로는 소의 백혈구 DNA를 사용하였으며, 이 백혈구 DNA의 추출은 혈액도말 표본을 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 백혈구 DNA는 *T sergenti* DNA 처리와 동일한 방법으로 추출하였다.

DNA probe로 사용한 *T sergenti* DNA 단편 : 모든 DNA의 조작은 Sambrook et al⁹의 방법에 준하여 실시하였으며, 본 실험에서 사용한 DNA probe는 채 등⁵이 보고한 재조합 plasmid pKTS1(5.59kb)과 pKTS3(4.13kb)의 KTS1(2.4kb)과 KTS3(1.5kb) DNA 단편을 사용하였다.

Southern hybridization : 재조합 plasmid pKTS1과 pKTS3에 삽입된 *T sergenti* DNA 단편만을 electro-elution하여 각각 probe로 사용하였다. 비방사선 물질을 사용한 Southern hybridization과 dot blot hybridization에서는 DIG DNA Labeling and Detection Kit-(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하였으며, 채 등⁵의 보고와 동일한 방법으로 실시하였다.

PCR 증폭 : PCR 증폭을 위한 primer와 반응조건 그리고 template 준비는 채 등⁵의 방법과 동일하게 실시하였다.

PCR 증폭을 위한 반응조건으로서 변성을 96℃에서 3분간 그리고 이어서 96℃에서 30초동안 실시하고 annealing은 60℃에서 1분 그리고 polymerization은 72℃에서 1분간 35cycle로 PCR 증폭을 실시하였다. 그후 72℃에서 3분간 더 polymerization시켰다. 유전자 증폭기는 TEMP-TRONIC(BARNSTEAD/Thermolyne Co, USA)을 사용하였다.

PCR 증폭이 끝난 후 증폭된 product를 확인하기 위하여 PCR 반응액 10 μ l을 10% acrylamide gel에서 250volts로 2시간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 ethidium bromide 용액에서 염색하여 UV transilluminator 위에서 관찰하였다.

전기영동시 product의 크기를 확인하기 위하여 10bp DNA ladder(Gibco BRL, USA)를 하였으며, 양성대조로는 primer를 설계하였던 KTS1 DNA와 *T. sergenti*를 감염시켜 비장적출한 소에서 분리한 *T. sergenti* DNA를 template로 각각 5ng을 사용하였고, *T. sergenti* DNA에 대한 대조로서는 소의 백혈구로부터 추출한 DNA를 5ng 사용하였다.

결 과

전국 각 지역의 *T. sergenti* 원충채취 : 전국 5개 지역(전북, 경북, 충남, 강원, 제주)의 방목장에서 *T. sergenti*에 감염된 소의 혈액을 채취하여 원충 DNA를 추출하기 위한 혈액채취상황은 Table 1와 같다. 채취한 혈액중의 *T. sergenti* 감염율은 0.6~8.8%였다.

비장적출수술후 감염시킨 송아지에서는 15.6%일 때 원충을 분리하여 *T. sergenti* merozoite DNA를 추출하였다.

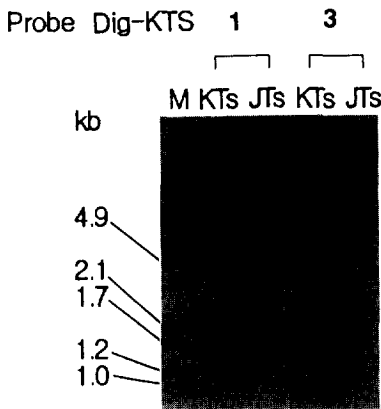


Fig 1. Southern hybridization of *Theileria sergenti* DNA with KTS1 and KTS3 probes.

Korean *T. sergenti* DNA(KTs) and Japanese *T. sergenti* DNA(JTs) were digested with *Pst* I, electrophoresed on 0.7% agarose gel, and transferred to a nylon membrane. The membrane was hybridized separately with digoxigenin-11-dUTP-labeled KTS1 and 3 probe. M; marker(pBR328) DNA/*Eco*RI).

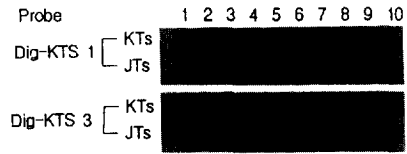


Fig 2. Dot hybridization of purified Korean and Japanese *Theileria sergenti* DNA using KTS1 and KTS3 probes.

Five microliters of DNA samples of Korean and Japanese *T. sergenti* were spotted onto a nylon membrane.

Lane 1; 18ng, lane 2; 9ng, lane 3; 4.5ng, lane 4; 2.3ng, lane 5; 1.2ng, lane 6; 600pg, lane 7; 300pg, lane 8; 150pg, pane 7; 75pg, lane 10; 36pg, KTs; Korean *T. sergenti* DNA, JTs; Japanese *T. sergenti* DNA.

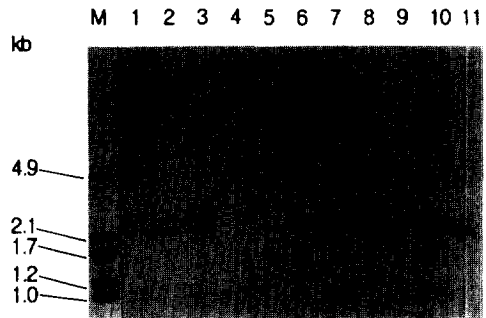


Fig 3. Southern hybridization of *Theileria sergenti* DNAs by the KTS1 probe.

Korean *T. sergenti* DNAs and Japanses *T. sergenti* DNAs were digested with *Pst* I, electrophoresed on 0.7% agarose gel, and transferred to a nylon membrane. The membrane was hybridized with digoxigenin-11-dUTP-labeled KTS1 probe. M; marker(pBR328) DNA/*Eco*RI, lane 1~6; Korean *T. sergenti* DNAs(1; splenectomized calf, 2: Chonbuk, 3; Kyungbuk, 4; Chungnam, 5; Kangwon, 6; Cheju), lane 7~11; Japanese *T. sergenti* DNAs(7; Shintoku, 8; Shintoku 9209, 9; Shintoku 9201, 10; Shintoku 9202, 11; Shintoku 9102).

DNA probe를 이용한 한국과 일본의 *T. sergenti* merozoite 비교 : 한국과 일본에서 분리한 *T. sergenti* merozoites로부터 추출한 유전자들의 차이를 확인하기 위하여 *T. sergenti* merozoites DNA를 *Pst* I 제한효소로 절단하고, probe KTS1과 KTS3를 이용하여

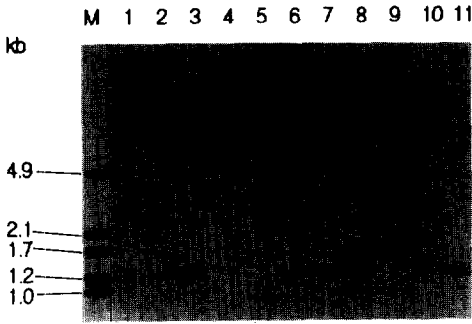


Fig 4. Southern hybridization of *Theileria sergenti* DNAs by the KTS3 probe.

Korean *T sergenti* DNAs and Japanese *T sergenti* DNAs were digested with *Pst* I, electrophoresed on 0.7% agarose gel, and transferred to a nylon membrane. The membrane was hybridized with digoxigenin-11-dUTP-labeled KTS3 probe. M; marker(pBR328 DNA/*Eco*RI), lane 1~6; Korean *T sergenti* DNAs(1; splenectomized calf, 2; Chonbuk, 3; Kyungbuk, 4; Chungnam, 5; Kangwon, 6; Cheju), lane 7~11; Japanese *T sergenti* DNAs(7; Shintoku, 8; Shintoku 9209, 9; Shintoku 9201, 10; Shintoku 9202, 11; Shintoku 9102).

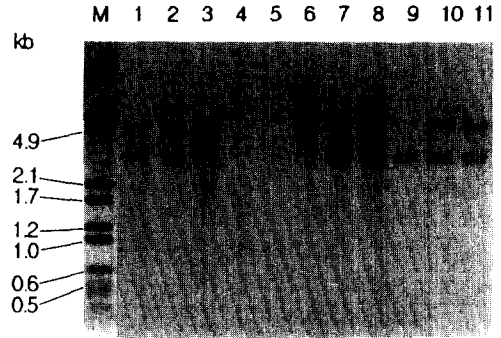


Fig 6. Southern hybridization of *Theileria sergenti* DNAs by the KTS3 probe.

Korean *T sergenti* DNAs and Japanese *T sergenti* DNAs were digested with *Eco*RI, electrophoresed on 0.7% agarose gel, and transferred to a nylon membrane. The membrane was hybridized with digoxigenin-11-dUTP-labeled KTS3 probe. M; marker(pBR328 DNA/*Eco*RI), lane 1~6; Korean *T sergenti* DNAs(1; splenectomized calf, 2; Chonbuk, 3; Kyungbuk, 4; Chungnam, 5; Kangwon, 6; Cheju), lane 7~11; Japanese *T sergenti* DNAs(7; Shintoku, 8; Shintoku 9209, 9; Shintoku 9201, 10; Shintoku 9202, 11; Shintoku 9102).

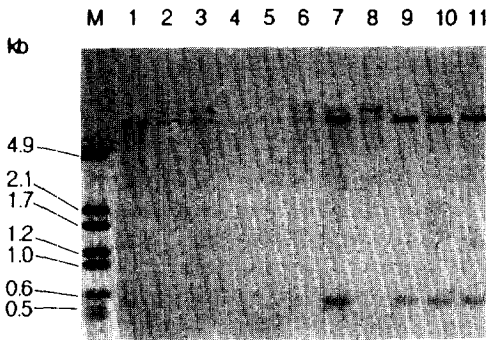


Fig 5. Southern hybridization of *Theileria sergenti* DNAs by the KTS1 probe.

Korean *T sergenti* DNAs and Japanese *T sergenti* DNAs were digested with *Eco*RI, electrophoresed on 0.7% agarose gel, and transferred to a nylon membrane. The membrane was hybridized with digoxigenin-11-dUTP-labeled KTS1 probe. M; marker(pBR328 DNA/*Eco*RI), lane 1~6; Korean *T sergenti* DNAs(1; splenectomized calf, 2; Chonbuk, 3; Kyungbuk, 4; Chungnam, 5; Kangwon, 6; Cheju), lane 7~11; Japanese *T sergenti* DNAs(7; Shintoku, 8; Shintoku 9209, 9; Shintoku 9201, 10; Shintoku 9202, 11; Shintoku 9102).

hybridization한 결과 Fig 1에서와 같이 probe KTS1은 한국과 일본의 원충주 모두 2.4kb 위치에서 반응을 나타내었고, probe KTS3은 한국의 원충주에서는 반응을 나타내었으나 일본의 원충주에서는 전혀 반응을 관찰할 수가 없었다. 또한 Fig 2의 dot blot hybridization 결과를 보면 probe KTS1과 한국의 원충주에서는 강한 반응을 보였고, 일본의 원충주에서는 약한 반응을 보였으나 probe KTS3는 한국의 원충주에서만 반응을 보였고, 일본의 원충주에서는 전혀 반응을 하지 않았다.

따라서 한국의 5개도와 일본의 Shintoku 지역(Shintoku, Shintoku 9209, Shintoku 9201, Shintoku 9202 및 Shintoku 9102)에서 분리한 *T sergenti* microzoite를 probe KTS1과 KTS3를 이용하여 각각 비교하고자 *T sergenti* DNA를 각각 *Pst*I과 *Eco*RI를 효소절단하여 Southern hybridization를 실시한 결과는 Fig 3~6과 같다. 즉, *T sergenti* DNA를 *Pst*I으로 효소절단하여 probe KTS1로 hybridization한 결과, 한국의 충남에서 분리한 원충 DNA에서는 반응하지 않았으나 다른 원충 DNA에서는 2.4kb 위치에서 반응함을 관찰할 수 있었다(Fig 3). *T sergenti* DNA를 *Pst*I으로 효소

Table 1. Parasitemia and geographical location of *Theileria sergenti* merozoites DNA sample in Korea and Japan

Nation	Geographical location	Parasitemia (%)	Southern hybridization				PCR
			Pst I		EcoR I		
			P1	P3	P1	P3	
Korea	Splenectomized calf	15.6	+	+	+	+	+
	Chonbuk	2.1	+	+	+	+	+
	Kyungbuk	1.4	+	+	+	+	+
	Chungnam	8.8	-	-	+	+	+
	Kangwon	0.6	+	-	+	-	+
	Cheju island	7.2					
Japan*	Shintoku	/	+	+	+	+	+
	Shintoku 9209	/	+	+	+	+	+
	Shintoku 9201	/	+	-	+	-	+
	Shintoku 9202	/	+	+	+	+	+
	Shintoku 9102	/	+	+	+	+	+

P1: probe KTS1, P3: probe KTS3

*: Japanese stocks were supplied by Onuma M, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University in Japan.

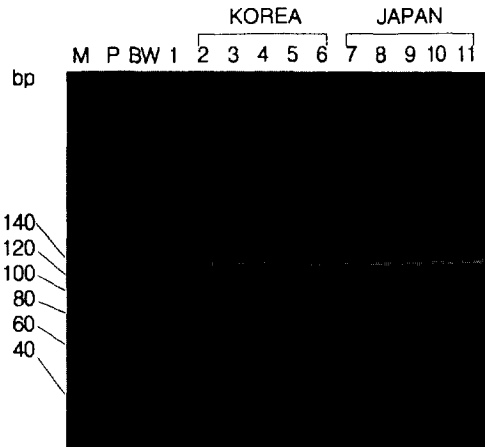


Fig 7. PCR amplification using *Theileria sergenti* DNA as a template from different geographic locations in Korea and Japan.

A total of 10ng of DNA from each samples was used. As a template, KTS1(lane P as a positive control), bovine leucocyte DNA(lane BW as a negative control), and *T. sergenti* DNA from various region-(lane 1~12) were used.

Lane M; marker(10bp DNA Ladder), lane 1; splenectomized calf, lane 2~6; Korea(2; Chonbuk, 3; Kyungbuk, 4; Chungnam, 5; Kangwon, 6; Cheju island), lane 7~11; Japan(7; Shintoku, 8; Shintoku 9209, 9; Shintoku 9201, 10; Shintoku 9201, 11; Shintoku 9102).

절단하여 probe KTS3으로 hybridization한 결과, Fig 4에서와 같이 한국의 충남과 강원, 일본의 Shintoku 9201에서 분리한 원충 DNA에서는 반응하지 않았으나 다른 원충 DNA에서는 1.5kb 위치에서 반응을 관찰할 수 있었다. *T. sergenti* DNA를 *EcoRI*으로 효소절단하여 probe KTS1으로 hybridization한 결과 Fig 5에서와 같이 한국의 충남과 강원에서 분리한 원충 DNA에서 반응이 약하였으나 모두 주요 band 위치에서 반응함을 확인할 수 있었다. *T. sergenti* DNA를 *EcoRI*으로 효소절단하여 probe KTS3으로 hybridization한 결과는 Fig 6에서와 같이 강원과 일본의 Shintoku 9201에서 분리한 원충 DNA에서는 주요 band를 확인할 수 없었고, 한국의 충남에서 분리한 원충 DNA에서는 아주 미약한 반응이 관찰되었다. 그러나 다른 지역의 원충 DNA에서는 모두 확실한 반응을 확인할 수 있었다.

한국과 일본 원충주의 PCR 증폭 결과 : 각 지역으로 부터 수집된 *T. sergenti* merozoite에서 추출된 DNA들을 KTS1-reverse primer를 이용하여 PCR 증폭한 후 10% acrylamide gel 전기영동을 실시한 바 Fig 7에서와 같이 한국 5개지역의 방목장과 일본의 Shintoku 지역에서 채취한 *T. sergenti* DNA 모두에서 특이적으로 증폭된 128bp DNA를 관찰할 수 있었다.

고 찰

진드기 매개성 주혈 원충성 질병인 babesiosis나

theileriosis는 아직도 완전한 진단 및 예방대책을 수립하지 못하고 있다. 특히 *Theileria sergenti*는 우리나라의 방목장에서 사육되고 있는 소에서 감염율이 높다^{11,12}. 따라서 이들 질병에 대하여 유전학적인 측면에서 연구가 시도되고 있으며, 최근에는 조기에 정확한 진단 및 예방을 위하여 DNA probe를 이용한 hybridization 기법들이 연구되고 있다.¹³⁻¹⁷ Kubota et al¹⁹은 일본의 각 지역원충들로 부터 allele-specific PCR를 실시하여 3가지 형태로 나타나고 있음을 보고한 바 있다.

한국과 일본에서 분리한 *T sergenti* merozoits로 부터 추출한 유전자들의 차이를 알아보기 위하여 probe를 이용하여 hybridization한 결과, Fig 1에서와 같이 probe KTS1에서는 한국과 일본의 원충주 모두 2.4kb 위치에서 같은 반응을 나타내었으나 probe KTS3에서는 한국의 원충주에서는 반응을 나타내었고, 일본의 원충주에서는 전혀 반응을 관찰할 수가 없었다. 또한 Fig 2의 dot blot hybridization에서도 역시 같은 결과를 나타내는 것으로 볼 때 원충의 genotype에 차이가 있는 것으로 생각된다. 그래서 한국의 5개도에서 분리한 *T sergenti* 원충과 일본의 Shintoku 지역에서 분리한 원충들간의 차이를 보기 위하여 *T sergenti* DNA를 제한효소인 *Pst*I와 *Eco*RI으로 각각 절단하여 probe KTS1과 KTS3를 이용하여 Southern hybridization을 실시하였던 바 Fig 11~14에서 보는 바와 같이 지역간에 있어서 약간의 차이를 볼 수 있었다. 이것은 지역간 원충주 유전자의 차이인지 아니면 restriction fragment length polymorphisms(RFLPs)인지는 추후해 보아야 할 것으로 생각된다.

Matsuba et al¹⁸은 일본의 각기 다른 지역으로부터 *T sergenti* 원충주를 수집하여 Southern blot을 해본 결과, 지역들간의 약간씩 다른 band들의 양상을 나타내었다고 보고하였다. 또한 이들 *T sergenti*를 한국에서 제작한 PCR primer를 이용하여 한국과 일본 원충주 모두에 있어서 검출 가능한지 알아보기 위하여 PCR 증폭시킨 결과, 한국과 일본의 각 지역 모든 원충주에서 증폭된 DNA 생성물을 확인할 수 있었다. 이것은 채 등의 PCR primer sequence는 한국과 일본 원충주의 공통 sequence를 갖는 것으로 확인되었으며 진단에 이용될 수 있는 것으로 확인되었다.

결 론

한국과 일본의 소에 감염된 *T sergenti*의 유전자 비

교를 하기 위하여 Southern hybridization과 종합효소 연쇄반응을 이용하여 본 실험을 수행하였다. *T sergenti* genomic DNA 단편(KTS1, KTS3)을 probe로 이용하여 Soutem hybridization과 dot blot hybridization을 통해 한국과 일본의 *T sergenti* DNA를 비교하여 보았다. 또한 probe로 이용한 KTS1 DNA 단편으로부터 primer를 디자인하여 PCR 증폭으로 한국과 일본의 소에 감염된 *T sergenti*를 진단하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

한국의 5개 지역(전북, 경북, 충남, 강원 및 제주)한우와 일본 Shintoku 지역의 소(5두)로 부터 *T sergenti* DNA를 추출하여 제한효소(*Pst*I와 *Eco*RI)로 절단하고 probe(KTS1과 KTS3)로 hybridization한 결과, 한국의 전북, 경북 그리고 제주와 일본의 Shintoku, Shintoku 9209, Shintoku 9201 및 Shintoku 9102에서는 반응이 나타났으나 한국의 충남과 강원 및 일본의 Shintoku 9201에서는 반응하지 않았다.

KTS1 DNA로 부터 reverse 방향에서 20-mer의 upper primer(5'-CCTCTTGAAGTCATCCATGT-3', nucleotide position 48), 20-mer의 lower primer(5'-CACTGAGCTGGAAAGAGCTA-3', nucleotide position 156)를 합성하고, 이를 primer로 이용하여 한국의 5개 지역(전북, 경북, 충남, 강원 및 제주)의 한우와 일본의 Shintoku 지역의 소(Shintoku, Shintoku 9209, Shintoku 9201 및 Shintoku 9102)에서 *T sergenti* DNA를 추출하여 PCR 증폭한 결과, 모두에 있어서 증폭된 128bp DNA를 확인할 수 있었다.

한국과 일본의 *T sergenti* 유전자 비교분석에 있어서는 좀 더 구체적인 연구가 이루어져야 한다고 본다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 김명철, 이주목, 권오덕 등. *Theileria sergenti* DNA probe를 만들기 위한 기초 연구. 대한수의학회지 1993; 33(3) : 479~486.
 5. 채준석, 이주목, 권오덕, 채건상. 한우에 감염된 *Theileria sergenti* merozoite의 순수분리와 genomic DNA probe에 관한 연구. 대한수의학회지 1994; 34 : 387~394.
 6. Sugimoto C, Sato M, Kawazu S, et al. Purification of merozoite of *Theileria sergenti* from infected bovine erythrocyte. *Parasitol Res* 1991; 77: 129~131.
 7. Asao T, Kinoshita Y, Kozaki S, et al. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect Immun* 1984; 46: 122~127.
 8. Asao T, Kozaaki S, Kato K, et al. Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 228~232.
 9. 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.
 10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989; 1.1~18.88.
 11. 전 영. 국내 소의 주혈원충과 그 혈액학치에 대한 조사연구. 농시보고 1971; 12: 81~85.
 12. 이주목, 김명철. 젖소의 파이로프라스마증의 효과적인 집단검색과 치료방법에 관한 연구. 대한수의학회지 1987; 27: 321~330.
 13. 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.
 14. Gonzalez A, Prediger E, Huccas ME, et al. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitive parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci* 1984; 81: 3356~3360.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Welburn SC, Gibson WC. Cloning of a repetitive DNA from the rickettsia-like organisms of tsetse flies(*Glossina* spp.). *Parasitology* 1989; 98: 81~84.
 18. Matsuba T, Sugimoto C, Onoe Y, et al. Changes in the hybridization patterns of populations of *Theileria sergenti* during infection. *Vet Parasitol* 1993; 47: 215~223.
 19. Kubota S, Sugimoto C, Onuma M. A genetic analysis of mixed population in *Theileria sergenti* stocks and isolates using allele-specific polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 279~282.