

러시아범안열원충(*Theileria sergenti*) 국내 분리주의 33 kDa piroplasm protein 유전자 크로닝 및 염기서열

강승원*, 최은진, 권창희

농촌진흥청 수의과학연구소

초록: *T. sergenti* 국내 분리주의 면역항원인 33 kDa의 piroplasm surface protein 유전자를 크로닝하였다. 크로닝된 *T. sergenti*의 33 kDa에 해당하는 유전자의 염기서열을 분석한 결과 총 869 bps의 염기와 283개의 아미노산을 확인하였다. 또 이들 분석결과를 일본주의 염기서열 및 아미노산 조성비 비교 분석하였던 바 각각 99.4, 98.9%의 homology를 나타내었으므로 두 주간의 p33 유전자는 거의 일치하는 것으로 판명되었다.

서 론

러시아범안열원충(*Theileria sergenti*)는 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등의 극동아시아 지역에 넓게 분포하고 있는 주혈원충으로 우리나라에서는 진드기가 밀집서식하는 지역뿐만 아니라 그밖의 지역에서 사육되고 있는 소들은 거의 대부분 이 원충에 감염되어 있는 실정이다(Chon, 1970; Lee and Kim, 1987).

러시아범안열원충에 감염된 소는 발열, 빈혈, 식욕부진, 황달 등의 임상증상을 보이며 특히 분만, 수송, 착유, 고온 등과 같은 스트레스나 다른 합병증이 있으면 쇠약, 비유량 감소, 발육부진 등이 발현하게 되며 심한 경우 폐사에 이르기기도 한다(Chon, 1970; Kim and Son, 1984).

현재까지 러시아범안열원충의 진단은 혈액도말표본의 Giemsa 염색에 의한 광학현미경적 관찰(Baek et al., 1993)이 관행적인 진단방법이지만 매우 낮은 원충 감염상태와 내과성 감염인 경우 검출하기가 어렵고, 다른 주혈기생충과 형태학적 구별이 곤란하다. 또한 혈청학적 진단법은 야외에 적용할 경우 진드기매개질병의 특이성 높은 감염진단이 용이하지 못한 실정이어서 특이성 및 민감성 높은 신속 정확한 진단방법을 개발하기 위하여 분자생물학적 방법을 도입하고 있다. 근래 일본에서는

*Theileria*속 원충 merozoite의 piroplasm surface protein 중에서 p33, p32, p30 등에 해당하는 부위의 유전자를 크로닝하고 염기서열을 분석하여(Kawazu et al., 1992; Matsuba et al., 1993; d'Oliveira et al., 1996; Kubota et al., 1996) 이들 유전자에 대한 특이 primer를 이용한 PCR 기법을 진단에 이용하고 있다.

본 연구는 국내 러시아범안열원충주의 p33에 해당하는 유전자의 크로닝을 시도하였으며, 크로닝된 유전자의 염기서열을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

표준원충주

농촌진흥청 수의과학연구소에서 계대 중인 러시아범안열원충(성환주, 1981)를 분양받아 genomic DNA 분리에 사용하였다.

Genomic DNA 분리

러시아범안열원충 genomic DNA 분리는 Sambrook et al.(1989)과 Tanaka et al.(1993)의 방법을 준하여 추출하였다. 즉, 광학현미경하에서 약 16%의 감염물을 나타낸 계대우의 혈액 10 ml을 채혈, EDTA로 처리, 적혈구만을 분리하여 증류수와 0.4% saponin 용액을 넣고 3회 세척한 다음 상층액을 제거하였다. 침전물에 extraction buffer[10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 100 mM EDTA(pH 8.0), 0.5% SDS, 20 µg/ml RNase]를 첨가하여 부유시킨 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 proteinase K를 넣고 50°C에

*논문접수 1997년 2월 6일, 게재확정 1997년 3월 20일.

*별책 요청 저자

서 30분간 반응시킨 후 실온에서 10분간 방치시킨 다음 일반적인 phenol 추출법을 적용하였다. 추출된 DNA는 70% cold ethanol로 세척하고 TE buffer로 재부유시킨 다음 실험에 사용하였다.

Oligonucleotide primer 제조

Oligonucleotide primer 합성은 Kawazu et al.(1992)이 보고한 p33 유전자의 nucleotide sequence를 참고로 하였으며 forward primer: 5'-TAT GTT GTC CAA GAG ATC GT-3'(20 mer; 2-21 base position)와 reverse primer: 5'-TGA GAC TCA GTG CGC CTA GA-3'(20 mer; 869-850 base position)를 합성하여 oligonucleotide purification cartridge(OPC grade)로 정제시킨 다음 실험에 사용하였다.

Polymerase chain reaction(PCR)

PCR은 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 100 pM primers (forward 및 reverse), Taq DNA polymerase 2.5 unit와 template DNA 500 ng이 함유된 반응 혼합액 50 μl를 denaturation 94°C/15초, annealing 55°C/20초, extension 72°C/1분의 조건으로 DNA Gene ATAQ controller (Pharmacia, LKB)에서 30회 반복 실시하였으며, 최종 반응후 72°C에 3분간 추가 polymerization 하였다. PCR 반응 후 시료 10 μl를 gel loading buffer[0.25% bromphenol blue, 40% sucrose in TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)]로 혼합하여 ethidium bromide(0.5 μg/ml)가 함유된 0.8% agarose gel에 loading한 후, TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)에서 전기영동하여 증폭된 DNA를 확인하였다.

러시아병안열원충 국내 분리주의 33 kDa piroplasm 단백질 유전자의 크로닝 및 염기서열 분석

국내 분리주 러시아병안열원충의 33 kDa piroplasm 단백질 유전자를 PCR 반응으로 증폭시킨 다음 pUC19의 Sma I에 크로닝하였고, DNA 염기서열분석은 DNA sequencing kit(USB)를 이용하여 Sanger et al.(1977)의 dideoxy chain termination 방법으로 실시하였다. 유전자 염기서열은 DNAsis program(Hitachi software Engineering Co.)을 이용하여 분석하였다(Fig. 1).

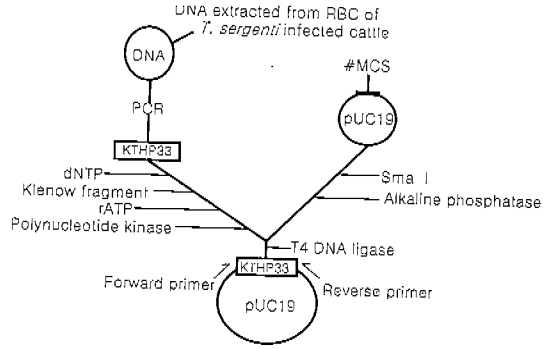


Fig. 1. Cloning and sequencing procedures of p33 gene of *T. sergenti* isolated from Korea.

*Cloning procedure of p33 gene (KTHP33) are sequentially as the line. Each reagents, treated restriction endonucleases and modifying enzymes are indicated above the line.

*MCS: multi cloning sites of pUC19.

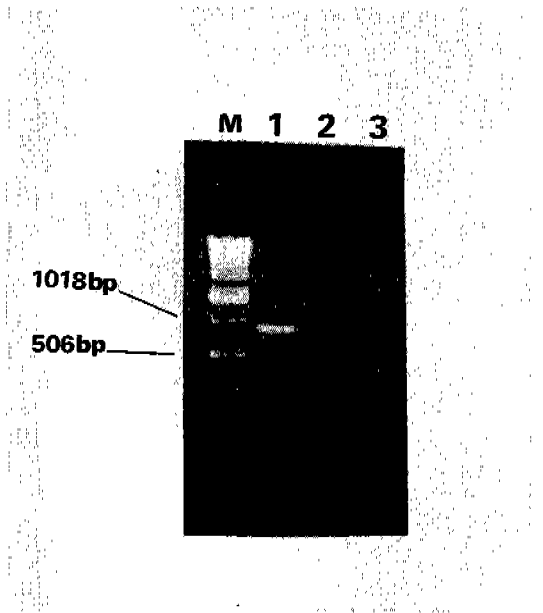


Fig. 2. Amplification of p33 gene by PCR. M; 1 Kb DNA ladder, lane 1; *T. sergenti*, lane 2; *B. ovata*, lane 3; *A. marginale*.

결 과

Oligonucleotide primer의 특이성

러시아병안열원충에 감염된 소의 적혈구에서 추출한 DNA를 작성된 primer를 이용하여 PCR 반응을 시킨 후 증폭유전자를 분석하였던 바, agarose

```

CTATGTTGTC CAAGAGATCG TTCAACGTAC TTTGCCTAGG ATACTTCCTT ATCGTCTCTG CTACCGCCGC AGAGGAAAA 80
CTATGTTGTC CAAGAGAACG TTCAACGTAC TTTGCCTAGG ATACTTCCTT ATCGTCTCTG CTACCGCCGC AGAGGAAAA 80
AAAGATGCAA AGGCTGAAGA GAAGAAGGAC TTAACCTCTG AAGTTAACGC CACCGCAGCC GAACATTTTA AAGTCGACGC 160
AAAGATGCAA AGGCTGAAGA GAAGAAGGAC TTAACCTCTG AAGTTAACGC CACCGCAGCC GAACATTTTA AAGTCGACGC 160
CTCAAACGCCA ACGACGTCG TTTTACTGCG CGAAGAGGGA TACCGCATCA AGACACTCAA GGTCGGAGAT AAGAACCTGT 240
CTCAAACGCCA ACGACGTCG TTTTACTGCG CGAAGAGGGA TACCGCATCA AGACACTCAA GGTCGGAGAT AAGAACCTGT 240
ATACCGTAGA TACTTCCAAG TTCACCCCAA CTGTGCGCCA CAGACTGAAG CATGCTGACG ACCTGTTCTT CAAGCTCAAC 320
ATACCGTAGA TACTTCCAAG TTCACCCCAA CTGTGCGCCA CAGACTGAAG CATGCTGACG ACCTGTTCTT CAAGCTCAAC 320
CTGTCCCACG CAAAGCCATT GCTGTTCAAG AAGAAGACTG ACAAGGATTG GGTTCATTC AGCTTCGCCC AGTACCTCGA 400
CTGTCCCACG CAAAGCCATT GCTGTTCAAG AAGAAGACTG ACAAGGATTG GGTTCATTC AGCTTCGCCC AGTACCTCGA 400
*
TGAAGTGGTA TGAAGGAGA AGAAGGAAGT AAAAGACCTC GACGCATCCA AGTTCGCAGA CGCAGGTCTT TTCGCCGCTG 480
TGAAGTGGTA TGAAGGAGA AGAAGGAAGT AAAAGACCTC GACGCATCCA AGTTCGCAGA CGCAGGTCTT TTCGCCGCTG 480
AGGCTTTCGG TACCGAAAAG CTGTACAAC TCAATTGAAA CTTCAAGGTC AAGAAGGTCA TGTTCCGAGGA GAAGGACGTT 560
AGGCTTTCGG TACCGAAAAG CTGTACAAC TCAATTGAAA CTTCAAGGTC AAGAAGGTCA TGTTCCGAGGA GAAGGACGTT 560
*
GGAGATTCAA ACAAGGCCAA ATACACCGCT GTCAAAGTTT ACGTCGGTTT CGATGAGAAG AAAGTCGTAA GACTCGACTA 640
GGAGATTCAA ACAAGGCCAA ATACACCGCT GTCAAAGTTT ACGTCGGTTT CGATGAGAAG AAAGTCGTAA GACTCGACTA 640
CTTCTACACT GGTGATGAGA GATTCAAGGA GGTTACTTTC AAATTGGTAG ACGGAAAATG GAAGAAGGTT GAGCAGAGCG 720
CTTCTACACT GGTGATGAGA GATTCAAGGA GGTTACTTTC AAATTGGTAG ACGGAAAATG GAAGAAGGTT GAGCAGAGCG 720
*
AAGCAAACAA GGATTTGCAC GCCATGAACA GTGCTTGGCT TTCGGACTAC AAGCCTCTTG TCGACAAGTT CTCACCACTT 800
AGGCAAACAA GGATTTGCAC GCCATGAACA GTGCTTGGCC TTCGGACTAC AAGCCTCTTG TCGACAAGTT CTCACCACTT 800
GCCGTTCTCA GCGCGGTTCT CATCGCCTCC CTCGCAGTAT TCTATTATCT CTAGGCGCAC TGAGTCTCA 869
GCCGTTCTCA GCGCGGTTCT CATCGCCTCC CTCGCAGTAT TCTATTATCT CTAGGCGCAC TGAGTCTCA 869
    
```

Fig. 3. The comparison of nucleotide sequence between KTHP33 (Korean isolate) and JTHP33 (Japanese isolate). Asterisks (*) indicate the sites showing different sequence.

Table 1. Summary of nucleotide and amino acids comparison of p33 gene between KTHP33 and JTHP33

Designation	KTHP33 ^{a)}	
	No. of different nucleotides (sequence homology, %)	No. of different amino acids (sequence homology, %)
JTHP33 ^{b)}	5/849(99.4)	3/283(98.9)

^{a)}Korean isolate.

^{b)}Japanese isolate by Kawazu *et al.*

gel에서 850-870 bp 상당의 증폭산물(KTHP33)을 검출할 수 있었다. 그러나 동일조건하에서 증폭을 시도한 다른 주혈기생충인 *Babesia ovata*, *Anaplasma marginale*의 DNA 재료에 대해서는 어떠한 증폭산물도 발견할 수 없었다(Fig. 2).

러시아범안열원충 국내 분리주의 33 kDa piroplasm 단백질 유전자 염기서열 분석

크로닝된 850-870 bp(KTHP33) 상당의 부분을 gel에서 추출한 다음 pUC19 vector의 *Sma* I 부위에 크로닝한 다음 DNA sequencing하였던 바 869 bp의 염기서열을 갖는 것으로 판정되었으며 단백질

을 합성하는 ATG codon으로부터 시작되는 283개의 아미노산을 확인할 수 있었다. 한편 본 실험에서 결정된 p33의 염기서열 및 해당단백질을 Kawazu *et al.*(1992)이 보고한 일본주의 p33 유전자(JTHP33)와 비교 분석한 결과 nucleotide 서열이 99.4%의 homology를 나타내었으며(Fig. 3). 아미노산 조성에 있어서는 6번째 아미노산인 Thr이 Ser로, 203번째 Ser이 Phe로, 253번째 Pro가 Leu로 대체되어 있었다. 또한 단백질의 비교분석 역시 약 98.9%의 homology를 나타내었다(Fig. 4 및 Table 1).

	*	
1	Met Leu Ser Lys Arg Ser Phe Asn Val Leu Cys Leu Gly Tyr Phe Leu Ile Val Ser Ala Thr Ala Ala Glu Glu	25
1	ATG TTG TCC AAG AGA TCG TTC AAC GTA CTT TGC CTA GGA TAC TTC CTT ATC GTC TCT GCT ACC GCC GCA GAG GAA	75
	↓	
1	Met Leu Ser Lys Arg Thr Phe Asn Val Leu Cys Leu Gly Tyr Phe Leu Ile Val Ser Ala Thr Ala Ala Glu Glu	25
1	ATG TTG TCC AAG AGA ACG TTC AAC GTA CTT TGC CTA GGA TAC TTC CTT ATC GTC TCT GCT ACC GCC GCA GAG GAA	75
26	Lys Lys Asp Ala Lys Ala Glu Glu Lys Lys Asp Leu Thr Leu Glu Val Asn Ala Thr Ala Ala Glu His Phe Lys	50
76	AAA AAA GAT GCA AAG GCT GAA GAG AAG AAG GAC TTA ACT CTC GAA GTT AAC GCC ACC GCA GCC GAA CAT TTT AAA	150
26	Lys Lys Asp Ala Lys Ala Glu Glu Lys Lys Asp Leu Thr Leu Glu Val Asn Ala Thr Ala Ala Glu His Phe Lys	50
76	AAA AAA GAT GCA AAG GCT GAA GAG AAG AAG GAC TTA ACT CTC GAA GTT AAC GCC ACC GCA GCC GAA CAT TTT AAA	150
51	Val Asp Ala Ser Asn Ala Asn Asp Val Val Phe Thr Ala Glu Glue Gly Tyr Arg Ile Lys Thr Leu Lys Val Gly	75
151	GTC GAC GCC TCA AAC GCC AAC GAC GTC GTT TTT ACT GCC GAA GAG GGA TAC CGC ATC AAG ACA CTC AAG GTC GGA	225
51	Val Asp Ala Ser Asn Ala Asn Asp Val Val Phe Thr Ala Glu Glue Gly Tyr Arg Ile Lys Thr Leu Lys Val Gly	75
151	GTC GAC GCC TCA AAC GCC AAC GAC GTC GTT TTT ACT GCC GAA GAG GGA TAC CGC ATC AAG ACA CTC AAG GTC GGA	225
76	Asp Lys Asn Leu Tyr Thr Val Asp Thr Ser Lys Phe Thr Pro Thr Val Ala His Arg Leu Lys His Ala Asp Asp	100
226	GAT AAG AAC CTG TAT ACC GTA GAT ACT TCC AAG TTC ACC CCA ACT GTC GCC CAC AGA CTG AAG CAT GCT GAC GAC	300
76	Asp Lys Asn Leu Tyr Thr Val Asp Thr Ser Lys Phe Thr Pro Thr Val Ala His Arg Leu Lys His Ala Asp Asp	100
226	GAT AAG AAC CTG TAT ACC GTA GAT ACT TCC AAG TTC ACC CCA ACT GTC GCC CAC AGA CTG AAG CAT GCT GAC GAC	300
101	Lys Phe Lys Lys Leu Asn Leu Ser His Ala Lys Pro Leu Leu Phe Lys Lys Thr Asp Lys Asp Trp Val Gln	125
301	CTG TTC TTC AAG CTC AAC CTG TCC CAC GCA AAG CCA TTG CTG TTC AAG AAG AAG ACT GAC AAG GAT TGG GTT CAA	375
101	Leu Phe Phe Lys Leu Asn Leu Ser His Ala Lys Pro Leu Leu Phe Lys Lys Thr Asp Lys Asp Trp Val Gln	125
301	CTG TTC TTC AAG CTC AAC CTG TCC CAC GCA AAG CCA TTG CTG TTC AAG AAG AAG ACT GAC AAG GAT TGG GTT CAA	375
126	Phe Ser Phe Ala Gln Tyr Leu Asp Glu Val Val Trp Lys Glu Lys Lys Glu Val Lys Asp Leu Asp Ala Ser Lys	150
376	TTC AGC TTC GCC CAG TAC CTC GAT GAA GTG GTA TGG AAG GAG AAG AAG GAA GTA AAA GAC CTC GAC GCA TCC AAG	450
126	Phe Ser Phe Ala Gln Tyr Leu Asp Glu Val Val Trp Lys Glu Lys Lys Glu Val Lys Asp Leu Asp Ala Ser Lys	150
376	TTC AGC TTC GCC CAG TAC CTC GAT GAA GTG GTA TGG AAG GAG AAG AAG GAA GTA AAA GAC CTC GAC GCA TCC AAG	450
151	Phe Ala Asp Ala Gly Leu Phe Ala Ala Glu Ala Phe Gly Thr Gly Lys Leu Tyr Asn Phe Ile Gly Asn Phe Lys	175
451	TTC GCA GAC GCA GGT CTT TTC GCC GCT GAG GCT TTC GGT ACC GGA AAG CTG TAC AAC TTC ATT GGA AAC TTC AAG	525
151	Phe Ala Asp Ala Gly Leu Phe Ala Ala Glu Ala Phe Gly Thr Gly Lys Leu Tyr Asn Phe Ile Gly Asn Phe Lys	175
451	TTC GCA GAC GCA GGT CTT TTC GCC GCT GAG GCT TTC GGT ACC GGA AAG CTG TAC AAC TTC ATT GGA AAC TTC AAG	525
176	Val Lys Lys Val Met Phe Glu Glu Lys Asp Val Gly Asp Ser Asn Lys Ala Lys Tyr Thr Ala Val Lys Val Tyr	200
526	GTC AAG AAG GTC ATG TTC GAG GAG AAG GAC GTT GGA GAT TCA AAC AAG GCC AAA TAC ACC GCT GTC AAA GTT TAC	600
176	Val Lys Lys Val Met Phe Glu Glu Lys Asp Val Gly Asp Ser Asn Lys Ala Lys Tyr Thr Ala Val Lys Val Tyr	200
526	GTC AAG AAG GTC ATG TTC GAG GAG AAG GAC GTT GGA GAT TCA AAC AAG GCC AAA TAC ACC GCT GTC AAA GTT TAC	600
	*	
201	Val Gly Phe Asp Glu Lys Lys Val Val Arg Leu Asp Tyr Phe Tyr Thr Gly Asp Glu Arg Phe Lys Glu Val Tyr	225
601	GTC GGT TTC GAT GAG AAG AAA GTC GTA AGA CTC GAC TAC TTC TAC ACT GGT GAT GAG AGA TTC AAG GAG GTT TAC	675
	↓	
201	Val Gly Ser Asp Glu Lys Lys Val Val Arg Leu Asp Tyr Phe Tyr Thr Gly Asp Glu Arg Phe Lys Glu Val Tyr	225
601	GTC GGT TCC GAT GAG AAG AAA GTC GTA AGA CTC GAC TAC TTC TAC ACT GGT GAT GAG AGA TTC AAG GAG GTT TAC	675
226	Phe Lys Leu Val Asp Gly Lys Trp Lys Lys Val Glu Gln Ser Glu Ala Asn Lys Asp Leu His Ala Met Asn Ser	250
676	TTC AAA TTG GTA GAC GGA AAA TGG AAG AAG GTT GAG CAG AGC GAA GCA AAC AAG GAT TTG CAC GCC ATG AAC AGT	750
226	Phe Lys Leu Val Asp Gly Lys Trp Lys Lys Val Glu Gln Ser Glu Ala Asn Lys Asp Leu His Ala Met Asn Ser	250
676	TTC AAA TTG GTA GAC GGA AAA TGG AAG AAG GTT GAG CAG AGC GAA GCA AAC AAG GAT TTG CAC GCC ATG AAC AGT	750
	*	
251	Ala Trp Leu Ser Asp Tyr Lys Pro Leu Val Asp Lys Phe Ser Pro Leu Ala Val Leu Ser Ala Val Leu Ile Ala	275
751	GCT TGG CTT TCG GAC TAC AAG CCT CTT GTC GAC AAG TTC TCA CCA CTT GCC GTT CTC AGC GCG GTT CTC ATC GCC	825
	↓	
251	Ala Trp Pro Ser Asp Tyr Lys Pro Leu Val Asp Lys Phe Ser Pro Leu Ala Val Leu Ser Ala Val Leu Ile Ala	275
751	GCT TGG CCT TCG GAC TAC AAG CCT CTT GTC GAC AAG TTC TCA CCA CTT GCC GTT CTC AGC GCG GTT CTC ATC GCC	825
276	Ser Leu Ala Val Phe Tyr Tyr Leu ***	283
826	TCC CTC GCA GTA TTC TAT TAT CTC TAG	852
276	Ser Leu Ala Val Phe Tyr Tyr Leu ***	283
826	TCC CTC GCA GTA TTC TAT TAT CTC TAG	852

Fig. 4. The comparison of amino acid sequence between KTHP33 and JTHP33. Arrows indicate the sites showing different amino acid.

고 찰

러시아병안열원충의 33 kDa는 소 병안열원충 내에서 많은 부위를 차지하는 단백질로서 가장 면역원성이 높은 부위이며(Sugimoto *et al.*, 1991; Kawazu *et al.*, 1992), 면역전자현미경적 검사와 biotin에 의한 표면 표지기술에 의해서 병안열원충의 표면에 산재되어 있음이 증명되었다(Shirakata *et al.*, 1989). 또한 러시아병안열원충의 piroplasm 중 면역유일부위의 단백질로 Kawazu *et al.*(1992)은 33 kDa 및 34 kDa를, 그리고 우리나라에서는 34 kDa를 보고하고 있다(Baek *et al.*, 1992a). 이와같은 분자량의 차이는 염기서열 분석결과 매우 높은 유사성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 30 kDa대의 성숙 단백질, 즉 33 kDa 및 34 kDa의 출현은 당쇄연결 기능부위 존재때문일 것으로 사료되고 있다. 소 유래 33 kDa 및 34 kDa는 Western blot상에서 병안열원충 종간에 특이성을 보이지만 33 kDa 및 34 kDa의 유전자 재조합 단백질은 종간의 특이성을 보이지 않고 있다. 이는 감염된 소에 의해서 인식되어진 병안열원충 면역유일부위에 후전위(post-translation)가 일어나 중간 특이 epitopes을 형성하는 것으로 추정되고 있으며, 이를 증명하기 위해서는 진핵세포를 사용하여 후전위(post-translation)가 증명되어야 한다고 사료된다.

한편 33 kDa의 기능에 대하여는 아직 알려진 바 없으나 흥미롭게도 33 kDa의 예상 아미노산 서열은 Lys-Glu-Lys(KEK)와 Lys-Glu-Leu(KEL)을 포함하고 있는데 이것들은 혈액내 발육단계에 있는 말라리아의 표면항원 일부와 일치하고 있다(Molano *et al.*, 1992). 이 아미노산 절편들은 말라리아 감염시 적혈구 수용체(EBA-175)의 ligand와 원충 merozoite 주표면항원사이에 일어나는 상호작용에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Kemp and Cowman, 1990). 또한 Kawamoto *et al.*(1990)은 소 적혈구의 표면에 부착하거나 혈구 내로 침입하는 러시아병안열원충 표면의 구조에 관한 연구에서 33 kDa가 숙주세포와의 상호작용에 중요한 역할을 하고 있음을 밝히고 있다. 이와같은 33 kDa 내에 존재하는 반복 아미노산은 감염우 내에서 교차항체 생산에 관여하는 것으로 사료되고 있다.

본 실험에서는 러시아병안열원충의 33 kDa piroplasm 단백질에 대한 국내분리주 유전자의 크로닝 및 염기서열을 분석하고자 하였던 바, 실제 본 실험에서 규명된 KTHP33의 염기서열과 아미노산 조성은 JTHP33의 염기서열 및 아미노산 조성 과 비교할 때 각각 99.4, 98.9%의 homology를 나타내어 두 주의 p33 단백질은 거의 일치하는 것

을 확인할 수 있었다.

소에 있어서 진드기 매개 주혈원충성 질병인 theileriosis의 진단은 최근 Kim(1995)이 러시아 병안열원충의 태반감염 성립을 보고함에 따라 기존의 진단법을 보완하면서 조기에 신속 정확하게 러시아병안열원충 감염우를 검출하기 위한 방법이 절실히 요구되고 있다. 이러한 실정을 감안할 때 국내 러시아병안열원충 merozoite 분리주의 주요 항원대로 보고된 p33 유전자의 분석된 염기서열은 분자생물학적 진단기술의 개발이나 더 나아가서 유전자의 발현을 통한 예방약의 생산에 유용할 것으로 생각된다(Matsuba *et al.*, 1995). 또한 PCR 진단의 경우 염기서열의 차이에서 나타날 수 있는 진단 오차를 감안할 때 본 실험에서 규명된 KTHP33의 염기서열은 국내에서 만연된 러시아병안열원충의 특이적인 진단을 위한 기초자료로서 활용할 수 있다고 본다.

REFERENCES

- Baek BK, Choi IH, Kim BS, *et al.* (1992a) Immunogenicity and protective efficacy of solubilized merozoite-enriched *Theileria sergenti* immunogens. I. Protection against homology stabilize challenge. *Korean J Parasitol* **30**: 133-140.
- Baek BK, Lim BM, Lee YJ, *et al.* (1993) Study on infection of *Theileria sergenti* in neonatal calves. *Korean J Vet Res* **33**: 665-671.
- Chon Y(1970) Hematological survey on hematozoa of cattle in Korea. *Res Rep off RDA* **13**: 81-87.
- d'Oliveira C, Tijhaar EJ, Shiels BR, van-der-Weider M, Jongejan F (1996) Expression of genes encoding two major *Theileria annulata* merozoite surface antigens in *Escherichia coli* and a *Salmonella typhimurium* aroA vaccine strain. *Gene* **172**(1): 32-39.
- Kawamoto S, Takahashi K, Onuma M, Kurosawa T, Sonoda M (1990) Invasion of bovine erythrocytes by *Theileria sergenti* piroplasms *in vitro*. *Jpn J Vet Sci* **52**: 1261-1263.
- Kawazu S, Sugimoto C, Kamio T, Fujisaki K (1992) Analysis of the genes encoding immunodominant piroplasm surface proteins of *Theileria sergenti* and *Theileria buffeli* by nucleotide sequencing and polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* **56**(1): 169-175.
- Kemp D, Cowman A (1990) Genetic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Adv Parasitol* **29**: 75-149.
- Kim JH (1995) Study on the placental infection of

- Theileria sergenti*. Chonbuk National University, Doctor's thesis
- Kim YC, Son JY (1984) Studies on the change of blood and dairy quantity after delivery of *T. sergenti*-infected dairy cattle in the stock farm parasitic on ticks. *Korean J Ani Sci* **26**: 137-144.
- Kubota S, Sugimoto C, Onuma M (1996) Population dynamics of *Theileria sergenti* in persistently infected cattle and vector ticks analysed by a polymerase chain reaction. *Parasitol* **112**(pt5): 437-442.
- Lee JM, Kim MC (1987) Studies on the effective diagnosis and treatment of bovine piroplasmosis. *Korean J Vet Res* **27**: 321-330.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1989) Molecular cloning: Laboratory manual NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Matsuba T, Sugimoto C, Hattori M, Sako Y, Fujisaki K, Onuma M (1995) Expression of a 32 kilodalton *Theileria sergenti* piroplasm surface protein by recombinant baculoviruses. *Int J Parasitol* **25**(8): 939-943.
- Molano A, Segura C, Guzman F, et al. (1992) In human malaria protective antibodies are directed mainly against the Lys-Glu ion pair within the Lys-Glu-Lys motif of the synthetic vaccine SPf 66. *Parasit Immunol* **14**: 111-124.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. Although manual 2nd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press 1.3-9.58.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 5463-5467.
- Shirakata S, Onuma M, Kiarisawa R, et al. (1989) Localization of surface antigen on *Theileria sergenti* merozoite by monoclonal antibodies. *Jpn J Vet Sci* **51**: 831-833.
- Sugimoto C, Kawazu S, Kamio T, et al. (1991) Protein analysis of *Theileria sergenti/buffeli/orientalis* piroplasms by two dimensional gel electrophoresis. *Parasitol Res* **102**: 341-346.
- Tanaka S, Onoe S, Matsuba T (1993) Detection of *Theileria sergenti* infection in cattle by polymerase chain reaction amplification of parasite-specific DNA. *J Clin Microbiol* **31**: 2565-2569.

-Abstract-

Cloning and sequencing of p33 in a Korean isolate of *Theileria sergenti*

Seung-Won KANG*, Eun-Jin CHOI and Chang-Hee KWEON

National Veterinary Research Institute, RDA, Anyang 430-016, Korea

The gene encoding the 33 kDa piroplasm surface protein of *Theileria sergenti* isolated in Korea was cloned and the nucleotide sequence was determined by dideoxy chain termination method. The cloned gene corresponds to 869 bp encoding an open reading frame of 283 amino acids. Comparison of the sequence between Korean and Japanese isolates showed 99.4% homology rate in the nucleotide sequence and 98.9% homology rate in the amino acid sequence.

Key words: *Theileria sergenti*, Korean isolate, 33 kDa piroplasm surface protein, nucleotide sequence

[*Korean J. Parasitol.* **35**(2): 105-110, June 1997]

*Corresponding author