

***Babesia equi ema-1* 5' intergenic 뉴클레오타이드의 프로모터 위치 확인: I. PCR 증폭 및 제한효소지도**

곽동미

워싱턴주립대학교 수의과대학
(접수 2004. 2. 2, 게재승인 2004. 3. 15)

Identification of promoter sites in *Babesia equi ema-1* 5' intergenic nucleotide: I. PCR amplification and restriction mapping

Dong-Mi Kwak

Department of Veterinary Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine,
Washington State University, Pullman, WA 99164-7040, USA
(Received 2 February 2004, accepted in revised form 15 March 2004)

Abstract

Babesia equi ema-1 5' intergenic(IG) nucleotide was PCR amplified and analyzed for restriction sites in order to identify a promoter region in this IG nucleotide sequence. *B. equi ema-1* 5' IG specific primers identified a 1268 bp PCR product. The sequence had restriction sites for 34 restriction enzymes when analyzed by a computer program. Among them, 26 enzymes had only one restriction site, but the others had more than one sites. When four restriction enzymes(BglI, HindIII, KpnI and BamHI) were treated to digest the 1268 bp nucleotide, they had restriction sites as expected by the computer program. Information of restriction sites in the 1268 bp IG nucleotide will be applied to select restriction enzymes for cloning the IG nucleotide to a vector.

Key words : *Babesia equi*, Intergenic nucleotide, PCR, Restriction sites, Promoter

서 론

*Babesia equi*는 Apicomplexa 문에 속하는

말의 원충성 기생충으로 진드기에 의해 매개되며 감염된 말은 발열, 빈혈, 황달, 간종 및 비종 등의 증상을 나타낸다^{1,2)}. *B. equi*에서 34 kDa

¹Corresponding author

Phone : +82-1-509-335-6332, Fax : +82-1-509-335-8529

E-mail : dmkwak@vetmed.wsu.edu

의 equi merozoite antigen-1(EMA-1)은 glycosylphosphatidylinositol로 merozoite의 세포표면과 연결되어 있으며 강한 면역반응을 나타내는 항원으로 알려져 있다³⁻⁵. EMA-1의 기능은 아직까지 밝혀지지 않았으나 *B. equi*가 적혈구를 침입할 때 적혈구의 표면과 접촉하는 역할을 할 것으로 가정되고 있다¹. 또한, EMA-1은 *Theileria sergenti*와 *T. buffeli*에서의 유사한 크기의 단백질과 아미노산 구조의 33%가 동일한 것으로 알려져 있어 EMA-1의 역할을 밝히는 것은 바베시아 뿐만 아니라 다른 주혈원충에도 적용할 수 있을 가능성을 나타내었다³. 바베시아의 적혈구 침입을 차단하는 것은 이 기생충을 예방하는 것을 의미하기 때문에 EMA-1의 역할을 규명하는 것은 바베시아 연구에 있어 중요한 부분으로 보여진다.

EMA-1의 기능을 확인하기 위한 방법으로 유전자 조작을 통한 *ema-1* 유전자를 제거하여 정상 기생충과 *ema-1*이 제거된 기생충의 특성을 비교하는 것이 한 방법으로 생각되나 현재로서 이 방법은 바베시아에서 가능하지 않다. 그러나, 같은 Apicomplexa 문에 속하는 주혈원충인 *Plasmodium falciparum*의 연구에서 *P. falciparum*의 프로모터와 결합된 외부 유전자(예, luciferase)가 발현되었으며⁶ 또한, 프로모터를 이용하여 malaria 기생충의 특정 유전자를 대체하거나 변형할 수 있었다고 보고하였다⁷⁻⁹. 따라서 malaria에서 자신의 프로모터와 결합된 외부 유전자의 transfection이 가능하였고 또한 특정 유전자를 대체하거나 변형할 수 있었기 때문에, 바베시아 기생충에서도 이 방법이 가능한지를 확인하는 것은 중요한 과제로 생각된다.

위에서 언급된 연구를 수행하기 위해서는 *B. equi ema-1 5'* intergenic(IG) 뉴클레오타이드에서 프로모터가 존재하는지 그리고 있다면 어느 위치에서 나타나는지를 조사하는 것이 우선 과제라고 생각되었다. 또한, 특정의 DNA 부분을 클로닝하기 앞서 IG 뉴클레오타이드에서 어떤 제한위치가 존재하며 그 위치는 어디인지를 조사하는 것이 제한효소를 선정하는 단계에서 필요하기 때문에 이 연구에서는 *B. equi ema-1 5'* IG 뉴클레오타이드를 PCR로 증폭한

후 뉴클레오타이드를 확인하였으며 이어 제한 효소지도를 구축하였다.

재료 및 방법

기생충 유전자

B. equi Florida genomic DNA는 *B. equi*에 감염된 말의 혈액으로부터 분리되었다¹). 바베시아 DNA 분리는 시판되는 kit(Puregene, Genta Systems, USA)을 사용하여 지시된 방법으로 하였다.

B. equi ema-1 5' IG 뉴클레오타이드의 PCR 증폭

B. equi ema-1 5' IG 뉴클레오타이드를 증폭하기 위한 primer로는 5'-TAGTTAATTATGGGAAGCTTG-3'를 forward primer로, 5'-CTTGACAGAAATTCCTCACCC-3'를 reverse primer로 사용하였다. PCR에 의한 증폭산물은 1268 bp로 예상되었다.

B. equi ema-1 5' IG 뉴클레오타이드를 증폭하기 위하여 10 ng *B. equi* genomic DNA가 각 1 μ M의 forward와 reverse primer와 함께 45 μ l의 PCR supermix high fidelity (Invitrogen, USA)에서 다음의 PCR 조건으로 실행하였다. 요약하면, preamplification denaturation으로 95 $^{\circ}$ C에서 4분 동안 처치한 후, denaturation 과정으로 95 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing 과정으로 58 $^{\circ}$ C에서 30초 그리고 extension 과정으로 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초를 설정하여 35 cycle을 거친 다음 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 더 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

Agarose 겔 전기영동

PCR 증폭산물을 확인하기 위하여 1 μ l의 PCR 증폭산물을 ethidium bromide(500 ng/ml)가 함유된 1%의 agarose 겔에서 전기영동하였다. 전기영동은 100 V에서 40분간 TAE buffer(40 mM tris-acetate, 1 mM EDTA)에서 실행하였고 증폭유무는 자외선광으로 판단하였다. 증폭산물의 크기를 측정하기 위하여 1 kbp plus DNA ladder(12,000-100 bp, Invitrogen)를

사용하였다.

PCR 증폭산물의 sequencing

Sequencing을 위하여 PCR 증폭산물은 pCR2.1 벡터를 함유한 TOPO TA cloning kit(Invitrogen)을 사용하였다. Sequencing은 M13 forward와 reverse primer로 하였다.

제한효소 절단위치 확인

PCR 증폭산물이 어떤 제한효소에 의해 절단되는지 그리고 그 위치를 조사하기 위하여 Hypertext DNA sequence display(http://pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_map/start)를 이용하여 분석하였다.

PCR 증폭산물을 제한효소로 절단

PCR 증폭산물이 실제로 제한효소에 의해 예상되는 위치에서 절단되는지를 조사하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다. 배양은 200ng의 PCR 증폭산물이 10U의 BglI(Promega), HindIII, KpnI 및 BamHI(이상 Invitrogen)과 37°C에서 3시간동안 실행하였다. 배양후 각 반응은 위에서 언급한 것처럼 agarose 겔에서 전기영동하였다.

결 과

B. equi ema-1 5' IG 뉴클레오타이드의 PCR 증폭

B. equi genomic DNA를 *ema-1* 5' IG 뉴클레오타이드 특이 primer로 PCR 증폭한 결과는 Fig 1에 나타내었다. 증폭산물은 1268 bp에서 확인되었다. 이 증폭산물이 PCR에 의한 것인지 아니면 *B. equi* genomic DNA 자체에서 유래한 것인지를 확인하기 위하여 primer없이 PCR하였을 때 어떠한 DNA도 확인할 수 없었다.

PCR 증폭산물의 sequence 및 제한효소절단위치

B. equi ema-1 5' IG 뉴클레오타이드의

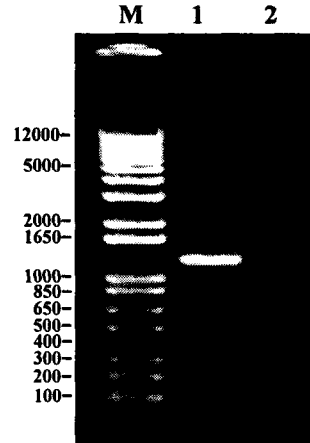


Fig 1. PCR amplification of *Babesia equi ema-1* 5' intergenic(IG) nucleotide. *B. equi* merozoite DNA(10 ng, lane 1) was amplified with a *B. equi ema-1* 5' IG nucleotide specific primer set(see text). As a control, *B. equi* merozoite DNA(10 ng) was treated without the primer set(lane 2). M, 1 kb plus DNA ladder, whose sizes (bp) were marked on the left. The estimated product size generated were analyzed in agarose gel(1%) and visualized by ethidium bromide staining. An arrow on the right refers to the PCR product generated at 1268 bp.

PCR 증폭산물의 양방향 sequence는 Fig 2에 나타내었으며 1268 bp 뉴클레오타이드가 확인되었다.

PCR 증폭산물의 sequence가 어떤 제한효소에 의해 절단되는지를 조사하기 위하여 컴퓨터 프로그램을 이용하여 분석하였던 바, 34종의 제한효소에 의해 절단될 수 있었으며 그 위치들은 Fig 2에 표시하였다. 그 제한효소들은 Acc65, ApaI, AseI, BaeIa, BaeIb, BciVI, BfrBI, BglI, BlnI, BmgBI, BmrI, Bpml, BpuE1, BsaXa, BsaXb, BseRI, BsmI, BspLU, BsrDI, BsrGI, BstZI, Eco57, EcoNI, HindIII, KpnI, NcoI, NdeI, NsiI, PflMI, PspOM, SacI, SanDI, SphI 및 XcmI이었다. 이들 가운데 한 곳에서 절단하는 제한효소는 Acc65,

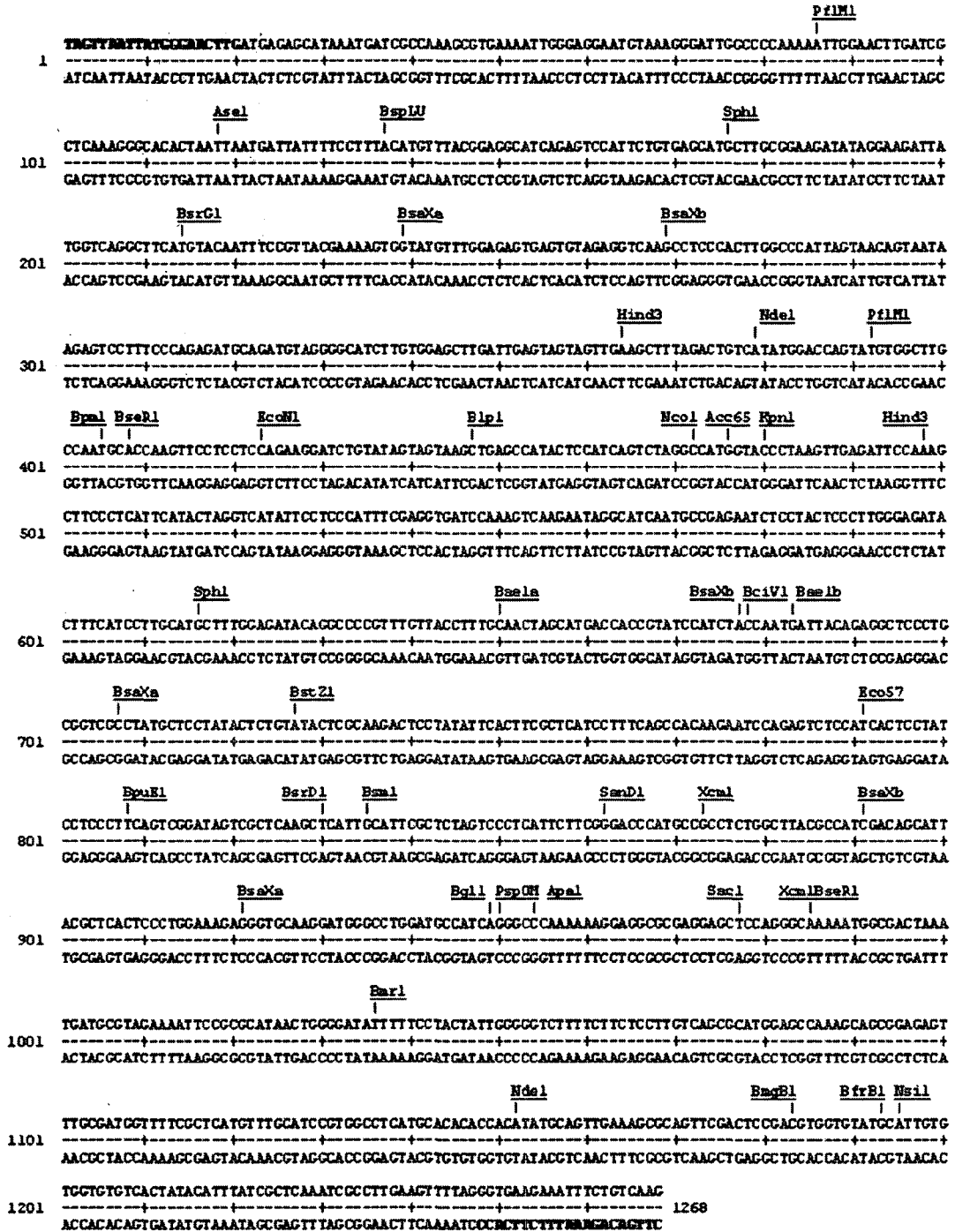


Fig 2. Identification of restriction sites on the nucleotide sequence of *Babesia equi ema-1* 5 intergenic nucleotide, which was PCR amplified and sequenced. Restriction sites of individual restriction enzymes were marked above the bidirectional sequence. The forward and reverse primers used for PCR amplification were in bold.

Apal, AseI, Baela, Baelb, BciVI, BfrB1, BglI, BlnI, BmgBI, BmrI, BpmI, BpuE1, BsmI, BspLU, BsrDI, BsrGI, BstZI, Eco57, EcoNI, KpnI, NcoI, NsiI, PspOM, SacI과 SanDI로 모두 26종이 확인되었다. 나머지 8종의 제한효소들은 하나보다 많은 절단위치를 지니고 있었다.

몇 제한효소에 의한 PCR 증폭산물의 절단

PCR 증폭산물이 Fig 2에서 예상된 것과 같은 위치에서 제한효소에 의해 절단되는지를 확인하기 위하여 4종의 제한효소(BamHI, BglI,

HindIII 및 KpnI)로 절단하였다(Fig 3). BamHI은 절단위치를 지니고 있지 않았으며 음성 대조군으로 사용하였다. BglI은 뉴클레오타이드 949 위치에서 그리고 KpnI은 뉴클레오타이드 480 위치에서 각각 하나의 절단위치를 지니고 있었다. HindIII는 뉴클레오타이드 364 및 498 위치에서 두 절단위치를 지니고 있었다. 각 제한효소의 예상된 절단위치는 Fig 3A에 나타내었다.

PCR 증폭산물이 예상한 위치에서 절단되는지를 확인한 결과는 Fig 3B에 나타내었다. BglI을 처리하였을 때 949와 319 bp의 분해된 DNA 단편과 아직 분해되지 않은 1268 bp DNA가 확인되었다. HindIII를 처리하였을 때 134, 364와 770 bp의 예상된 DNA 단편, 498(364+134)과 904(134+770) bp DNA 단편, 그리고 분해되지 않은 1268 bp DNA가 확인되었다. 이 가운데 134와 498 bp 단편은 희미하게 확인되었다. KpnI을 처리하였을 때 480과 788 bp의 분해된 DNA 단편들과 분해되지 않은 1268 bp DNA가 확인되었다. 음성 대조군으로 절단 위치가 없는 BamHI을 처리하였을 때 제한효소를 처리하지 않은 반응과 같이 1268 bp DNA만 확인되었다.

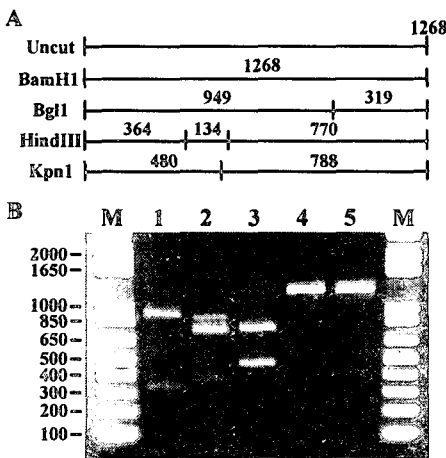


Fig 3. Digestion of PCR amplified *Babesia equi ema-1* 5 intergenic nucleotide by restriction enzymes. A, Schematic diagram of restriction sites generated by BamHI, BglI, HindIII or KpnI. Numbers indicate estimated sizes of fragments. Vertical lines indicate estimated restriction sites. B, Restriction digestion of *B equi* 1268 bp PCR product. PCR products(200 ng) were digested by 10 U of BglI(lane 1), HindIII (lane 2), KpnI(lane 3), BamHI (lane 4) or no enzyme(lane 5) at 37 oC for 3 hr. M, 1 kb plus DNA ladder, whose sizes(bp) were marked on the left. Analysis of fragmented sizes were done in agarose gel(1%) and visualized by ethidium bromide staining. <, DNA fragments detected in gel.

고 찰

주혈원충의 적혈구 침입에 관여하는 인자를 찾는 것은 질병 예방과 통제에 중요한 단서를 제공할 것으로 생각된다. *B equi* EMA-1은 기생충이 적혈구 침입시 적혈구와 접촉하여 기생충이 적혈구안으로 침입할 때 중요한 역할을 할 것으로 가정되어 왔지만 아직까지 그 기능은 밝혀지지 않고 있다. EMA-1의 기능을 밝히는 것이 어려운 이유는 바베시아에서 유전자 조작(제거, 대체 또는 변형)을 통한 단백질의 기능을 밝힐 수 있는 방법은 아직 정립되지 않았기 때문이다. 그러나, 최근 말라리아 연구로 주혈원충에서도 유전자 조작을 통한 세포내 유전자의 기능을 밝힐 수 있는 가능성을 보여주었다. *P falciparum* 자신의 프로모터와 외부 유전자(예, luciferase)로 기생충을 transfection

하였을 때 기생충체내에서 luciferase의 활성이 확인되었으며⁶⁾, 더 나아가 특정 유전자의 대체나 변형도 발견하였다고 보고하였다⁷⁻⁹⁾. 이 연구는 기생충의 프로모터를 이용하여 기생충의 특정 유전자 조작을 유도하고 나아가 세포내에서의 기능도 밝힐 수 있는 가능성을 보여준 것이기 때문에 바베시아에서도 이 방법이 가능한지를 확인해 보고자 수행되었다.

B. equi ema-1 5' IG 뉴클레오타이드에서 프로모터의 기능이 있는지는 아직 알려진 보고가 없으나 컴퓨터 프로그램을 통해서 분석하였을 때 프로모터로 예측되는 위치가 확인되었다. 이 연구는 프로모터로 예측되는 뉴클레오타이드를 클로닝하고 형질전환하기에 앞서 IG 뉴클레오타이드에서 제한효소위치를 확인하였다. 이것은 IG 뉴클레오타이드를 벡터에 클로닝할 단계에서 어느 제한효소를 선택할지를 결정해야하기 때문이다. *B. equi ema-1* 5' IG 뉴클레오타이드 특이 primer로 PCR 증폭하였을 때 1268 bp의 증폭산물이 확인되었다. 이 1268 bp는 기생충 genomic DNA를 primer없이 처리하였을 때는 확인되지 않았기 때문에 *B. equi ema-1* 5' IG 뉴클레오타이드 특이 primer에 의한 증폭이었음을 나타내었다. 또한, 이 결과에서는 나타내지 않았지만 PCR 증폭산물이 *ema-1*의 IG nucleotide인지를 증명하기 위하여 *ema-1* 특이 reverse primer와 여기서 사용된 forward primer를 이용하여 PCR 증폭하였을 때 IG 뉴클레오타이드와 일부의 *ema-1* 뉴클레오타이드도 확인하였다. 이것은 PCR 증폭산물이 *B. equi* 특이이고 *ema-1* 특이임을 나타내는 것이다.

B. equi ema-1 5' IG 1268 bp 뉴클레오타이드를 절단하는 제한효소는 총 34종이었으며 그 가운데 26종은 오직 하나의 절단위치를 지니고 있었다. 이 결과는 다음 단계의 연구에서 IG 뉴클레오타이드를 클로닝할 때 이용될 것이다. 예를 들면, 1268 bp 모두를 클로닝하고자 하면 34종의 제한효소 외의 다른 제한효소를 사용하여야 할 것이고 두 부분으로 나누어 클로닝하고자 하면 하나의 제한위치를 지니고 있는 제한효소가운데 선택할 것이다. 또한, 하나의 절

단위치를 지니고 있는 26종의 제한효소 가운데 벡터로 이용할 plasmid에서 절단위치를 갖고 있지 않는 제한효소가 선택될 것이다.

PCR 증폭산물인 1268 bp 뉴클레오타이드가 컴퓨터 프로그램으로 예상한 것과 같은 위치에서 절단되는지를 확인하기 위하여 BamHI, BglI, HindIII 및 KpnI로 처리한 결과 예상한 위치에서 절단되었다. 특이한 것은 HindIII는 뉴클레오타이드 364와 498 두 절단위치를 지니고 있어 134, 364와 770 bp의 DNA 단편이 생성될 것을 예상하였지만 결과는 총 5개의 DNA 단편(134, 364, 498, 770 및 904 bp)이 확인되었다. 498(364+134)과 904(134+770) bp DNA 단편이 확인된 것은 사용된 10 U의 HindIII가 37 oC에서 3시간동안 배양되었을 때 1268 bp 뉴클레오타이드를 완전히 절단하지 못하고 부분적으로 절단하였기 때문이었다. 네 BamHI, BglI, HindIII 및 KpnI 제한효소를 사용하여 확인한 결과 PCR 증폭산물인 1268 bp nucleotide의 제한위치는 컴퓨터 프로그램을 통해 예측한 것과 동일한 결과를 나타내었으므로 이 결과는 클로닝 단계에서 어느 제한효소를 사용할지에 대하여 믿을만한 예측을 할 것으로 기대된다.

결 론

B. equi ema-1 5' IG 뉴클레오타이드에서 프로모터 기능이 있는지를 확인하기 위한 목적의 기초단계로, 이 연구에서는 IG 뉴클레오타이드를 PCR 증폭하여 sequencing을 한 후 어떤 제한효소에 의해 절단되는지 그리고 그 위치는 어디인지를 확인하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *B. equi ema-1* 5' IG 뉴클레오타이드 특이 primer를 이용하여 1268 bp PCR 증폭산물을 얻었다.
2. 이 1268 bp 증폭산물을 컴퓨터 프로그램으로 제한위치를 분석하였던 바, 총 34종의 제한효소가 절단위치를 지니고 있었으며 그중 26종은 하나의 제한위치, 나머지 8종은 둘 이상의 제한위치를 지니고 있었다.

3. BamHI, BglI, HindIII 및 KpnI이 컴퓨터의 예측대로 절단을 하는지를 확인하기 위하여 실제로 처치를 하였던 바, 컴퓨터 예측과 동일한 결과를 나타내었다.
4. 이 연구에서 확인된 제한효소 정보는 클로닝 단계에서 제한효소와 그 위치를 설정할 때 이용될 것이다.

참고문헌

1. Knowles DP, Kappmeyer LS, Perryman LE. 1997. Genetic and biochemical analysis of erythrocyte-stage surface antigens belonging to a family of highly conserved proteins of *Babesia equi* and *Theileria* species. *Mol Biochem Parasitol* 90 : 69-79.
2. Kumar S, Yokoyama N, Kim JY, et al. 2004. Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton. *Mol Biochem Parasitol* 133 : 221-227.
3. Kappmeyer LS, Perryman LE, Knowles DP Jr. 1993. A *Babesia equi* gene encodes a surface protein with homology to *Theileria* species. *Mol Biochem Parasitol* 62 : 121-124.
4. Knowles DP Jr, Kappmeyer LS, Stiller D, et al. 1992. Antibody to a recombinant merozoite protein epitope identifies horses infected with *Babesia equi*. *J Clin Microbiol* 30 : 3122-3126.
5. Knowles DP Jr, Perryman LE, Goff WL, et al. 1991. A monoclonal antibody defines a geographically conserved surface protein epitope of *Babesia equi* merozoites. *Infect Immun* 59 : 2412-2417.
6. de Koning-Ward TF, Speranca MA, Waters AP, et al. 1999. Analysis of stage specificity of promoters in *Plasmodium berghei* using luciferase as a reporter. *Mol Biochem Parasitol* 100 : 141-146.
7. de Koning-Ward TF, Fidock DA, Thatthy V, et al. 2000. The selectable marker human dihydrofolate reductase enables sequential genetic manipulation of the *Plasmodium berghei* genome. *Mol Biochem Parasitol*, 106 : 199-212.
8. Cowman AF, Baldi DL, Healer J, et al. 2000. Functional analysis of proteins involved in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion of red blood cells. *FEBS Lett* 476 : 84-88.
9. de Koning-Ward TF, Janse CJ, Waters AP. 2000. The development of genetic tools for dissecting the biology of malaria parasites. *Annu Rev Microbiol* 54 : 157-85.