

소의 네오스포라증에 대한  
유전자 재조합 백신개발에 관한 연구  
Studies on the recombinant vaccine  
development of Neosporosis in cattle

연구기관 : 중앙대학교 생물학과

세부기관 : 국립수의과학검역원

세부기관 : 국립보건원

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “소의 네오스포라증에 대한 유전자 재조합 백신개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “네오스포라 특이 다가 항원에 대한 단클론항체의 생산과 유전자재조합백신의 방어효과 검증” 및 네오스포라 특이 다가항원 및 백신후보물질의 유전자 클로닝 및 발현에 관한 연구)의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 15 일

주관연구기관명 : 중앙대학교

총괄연구책임자 : 송철용

협동연구기관명 : 국립수의과학검역원

협동연구책임자 : 강승원

협동연구기관명 : 국립보건원

협동연구책임자 : 김동수

# 요 약 문

## I. 제 목

소의 네오스포라증에 대한 유전자 재조합 백신개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

소는 매우 중요한 경제적 가축으로 국내 축산농가의 소득 및 가공식품 수출을 통한 국가경쟁력 확보에 매우 중요하다. 그러나 소에서 빈번히 일어나는 유산, 사산, 조산은 농가소득의 감소에 따른 막대한 경제적 손실을 야기하는 매우 중요한 문제로 대두되어 왔다. 소에서 유산을 일으키는 다양한 감염성 질환에 의한 유산은 감염원의 규명 및 대책 수립이 미흡하기 때문에 아직도 해결되지 않은 중요한 문제점으로 남아있는 실정이다.

전세계적으로 소에서 유산, 사산, 기형송아지의 출산 등을 일으키는 감염성 질환으로 최근 주목되고 있는 네오스포라증(Neosporosis)은 비교적 최근에 밝혀진 질병으로 네오스포라 원충(*Neospora caninum*)의 감염에 의해 일어난다(Dubey *et al.*, 1988; Barr *et al.*, 1991). 네오스포라 원충은 아직까지 정확한 분류학적 위치가 규명되지 않았지만 토크소플라즈마(*Toxoplasma gondii*)와 매우 유사한 원충으로 알려져 있다.

국내의 경우, 최근에 네오스포라증에 의한 소 유산이 발생율이 증가되는 실정이다. 전국의 소를 대상으로 항체 양성율을 측정한 결과, 제주도를 제외한 지역의 소에서 약 8.3%의 항체 양성율이 나타났다(조영미 등, 1998; 허권 등, 1998).

국내에서도 소 유산과 사산이 목장에서 발생하는 가장 해결하기 어려운 문제로 간주되고 있으므로 이에 대한 보다 체계적이고 적극적인 연구가 이루어져야할 것으로 생각된다.

국내에서도 이 질병의 발생이 예측되며 엄청난 피해를 주고 있는 것으로 추측할 수 있으나 농장 내로 질병이 유입되지 않도록 하는 임시적인 차단방역과 감염개체의 도태가 피해를 최소화하기 위한 임시대책인 실정이다. 따라서, 본증의 만연에 의한 중대한 손실이 예측된다면 질병의 조기 진단을 통한 조기치료법 개발 및 백신개발을 통한 질병의 예방 등에 대한 조속한 국가적 대책수립이 절실히 요구된다고 할 수 있을 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 네오스포라 특이 다가항원 및 백신후보물질의 탐색
- 2) 네오스포라 특이 다가항원 및 백신후보물질의 생화학적, 분자생물학적 및 면역학적 특성연구
- 3) 유전자 재조합 기술을 이용한 백신 후보물질 클로닝 및 대량생산체계 구축
- 4) 네오스포라 특이 다가항원에 대한 단클론 항체의 생산
- 5) 네오스포라 백신 효능 검증을 위한 실험동물 모델의 확립
- 6) 네오스포라 유전자재조합 다가백신의 동물실험을 통한 백신 효과 검증
- 7) 네오스포라 특이 항원 및 단클론항체를 이용한 네오스포라증 진단을 위한 기본 기술 연구

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 1) 최근 시판되고 있는 네오스포라 백신의 경우, 아직도 crude 항원으로 제조되고 있는 바, 본 연구의 결과를 현재 소동물(gerbil)에서 확인하였으나, 추후 개, 소 등 대동물에 적용시켜 검증해 본다면 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 사료된다.
- 2) 다가 항원 개념을 진단시약 개발에 적용한다면 좀 더 신속, 정확한 진단제로 응용할 수 있으리라 사료된다.

## SUMMARY

### (영문 요약문)

Neosporosis has been reported from at least 13 countries and is suspected to have a larger worldwide distribution. Considering the large number of bovine neosporosis cases throughout the world, relatively few successful isolations have been reported.

Since *Neospora caninum* was first isolated from naturally infected dogs, and subsequently from dogs and cattle, it has only been maintained by tissue culture, because it could not be maintained *in vivo*. Growth rate and productivity of *N. caninum* tachyzoites in three kinds of cells, Vero cell, HsF cell and CAPE cell, were compared. Vero cell was selected as host cell for higher growth rate and productivity than HsF cell and CAPE cell. Mice treated with dexamethason ( $20\mu\text{g/ml}$ ) in water for 5 days were inoculated intraperitoneally with the two fold of sarcoma 180. Peritoneal fluid enriched in tachyzoites were again recovered 3 days after infection and used for the next passage. The tachyzoites from mice model system were much more (43 times) than that of Vero cells.

We constructed cDNA library from *N. caninum* tachyzoites, and

cloned DG1, DG2, SAG1, SAG2, SOD and proteinase gene which have prominent antigenicity with sera from neosporosis positive cattles.

The genes, DG1, DG2, SAG1, SAG2, SOD and proteinase, which had an open reading frame of 700bp, 650bp, 969bp, 1,206bp, 606bp and 2,598bp, respectively, were expressed using *E. coli* system and characterized.

The *in vitro* neutralization test using these monoclonal antisera of each recombinant proteins compared with serum of *N. caninum* tachyzoite crude antigen. The neutralization titers of SAG2 and DG1 were higher than those of others.

In vaccination and challenge infection using mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*), protection ratio of DG1-SAG2 complex antigen was higher than that of crude antigens and single antigen.

These results presented that vaccination with dual complex of recombinant proteins(DG1 and SAG2) could neutralized the *N. caninum* tachyzoites and protect experimental animal model system.

## CONTENTS

- 1) Culture and supply of *Neospora* tachyzoites for study
- 2) Study on enhanced method for mass culture of *Neospora*
- 3) Isolation of *Neospora* from aborted bovine fetus
- 4) Production of recombinant protein of *Neospora* tachyzoites in *E.coli*
- 5) Monoclonal antibody production of various antigens of *Neospora* tachyzoites in mouse
- 6) Diagnosis of Neosporosis and its epidemiological analysis
- 7) Experimental inoculation for evaluation of recombinant protein
- 8) Recovery of oocysts from dog
- 9) *Neospora* neutralization test
  - a) Antibody titer of anti-recombinant protein monoclonal antibody
  - b) Neutralization test
- 10) Vaccination and challenge infection



# 목 차

제 1장 연구개발과제의 개요 .....	1
1. 연구개발의 목적 .....	1
2. 연구개발의 필요성 .....	2
1) 기술적 측면 .....	4
2) 경제·산업적 측면 .....	6
3) 사회·문화적 측면 .....	7
3. 연구개발의 범위 .....	8
4. 기술도입의 타당성 .....	9
5. 연차별 연구개발 목표와 내용 .....	10
제 2장 국내·외 기술개발 현황 .....	12
제 3장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	14
1절. 연구수행내용 .....	14
가. 제 1 세부과제 .....	14
1. <i>N. caninum</i> 의 배양 .....	14
2. <i>N. caninum</i> tachyzoites의 순수분리 .....	14
3. 네오스포라 특이 항원의 탐색 .....	14
4. RNA 추출 .....	15
5. Complement DNA(cDNA) 합성 .....	15
6. 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR) .....	16
7. PCR 산물의 클로닝 .....	17
8. 염기서열 분석(nucleotide sequence analysis) .....	17
9. Colony hybridization .....	18
10. <i>N. caninum</i> 다가항원의 정제 및 생화학적 특성 분석 .....	19
1) Fe-SOD 와 proteinase의 유전자 클로닝 .....	19

2) 재조합 단백질의 발현 및 정제 .....	20
3) SDS-PAGE 및 Western blot .....	21
4) 재조합 SOD의 생화학적 특성분석 .....	21
(1) 효소의 활성 측정 .....	22
(2) 등전점 관찰 .....	23
(3) 효소활성에 대한 억제인자 (inhibitor)의 효과 .....	23
(4) 효소활성에 대한 pH의 영향 .....	24
(5) Fe-SOD 의 단계별 발현양상 .....	24
(6) 간접 면역형광법 .....	25
(7) 항원성 관찰 .....	25
5) 네오스포라 단백질분해효소의 생화학적, 면역학적 특성분석 ...	26
(1) <i>N. caninum</i> 단백질분해효소의 발현 .....	26
(2) substrate gel electrophoresis .....	27
(3) 억제인자의 영향 .....	27
(4) 재조합효소활성에 미치는 최적 온도 .....	28
(5) 재조합효소활성에 미치는 pH 영향 .....	28
(6) 기질 특이성 .....	28
(7) 열안정성 .....	29
나. 제 2 세부과제 .....	30
1. <i>N.caninum</i> tachyzoite의 야외주 순수분리 .....	30
2. 네오스포라 대량 배양법 연구 .....	30
3. ELISA법을 이용한 네오스포라 진단 및 역학분석 .....	31
4. 재조합 유전자의 중화능 실험. ....	32
1) 항혈청 역가 측정 .....	32
2) 중화능 실험 .....	32
3) 재조합 다가 항원의 항체의 방어능 시험 .....	33
다. 제 3 세부과제 .....	34
1. cDNA library의 제작 .....	34

2. Immunoscreening .....	34
3. 염기서열 분석 .....	35
4. <i>N. caninum</i> 의 다가항원 클로닝 .....	35
1) 유전자 클로닝 .....	35
2) 염기서열 분석 .....	37
3) 발현 .....	37
5. 단클론항체(Monoclonal antibody)생성 .....	38
1) 항원의 면역 .....	38
2) 융합실험 .....	39
3) 스크리닝, 클로닝 및 항체분리 .....	40
2절. 연구결과 .....	41
가. 제 1세부과제 결과 .....	41
1. 네오스포라 특이항원의 탐색 .....	41
2. 네오스포라 Fe-SOD cDNA fragment의 염기서열 분석 .....	41
3. <i>E. coli</i> 에서의 융합단백질 발현 .....	43
4. 재조합 Fe-SOD 의 생화학적 특성 .....	48
1) 발현 단백질의 활성에 미치는 억제인자의 효과 .....	48
2) 효소활성에 대한 pH의 영향 .....	48
3) 등전점 .....	50
4) 항원성 관찰 .....	50
5) Stage-specific expression .....	51
6) <i>N. caninum</i> 의 Fe-SOD의 분포 위치 .....	52
5. Proteinase의 생화학적 특성분석 .....	53
1) 네오스포라 proteinase cDNA fragment의 염기서열 분석 .....	53
2) <i>N. caninum</i> 단백질분해효소의 발현 .....	54
3) substrate gel electrophoresis .....	55
4) 억제인자의 영향 .....	55
5) 최적 온도와 pH의 영향 .....	57

6) 기질 특이성 .....	58
7) 열안정성 .....	59
6. SOD와 proteinase 재조합 단백질의 단클론항체의 생산 .....	60
7. 단클론 항체의 세포내 침투억제기전 효과 분석 .....	61
나. 제 2세부과제 .....	62
1. 네오스포라의 배양 및 공급 .....	62
2. 네오스포라 대량 배양법 연구 .....	63
3. <i>N. caninum</i> tachyzoite의 야외주 순수분리 .....	64
4. ELISA법을 이용한 네오스포라 진단 및 역학분석 .....	65
5, 6. 인공감염 동물실험 .....	71
7. 재조합 다가 항원의 중화능 시험 .....	75
1) 항혈청 역가 측정 .....	75
2) 중화능 시험 .....	76
3) 재조합 다가 항원의 항체 방어능 시험 .....	81
다. 제 3세부과제 결과 .....	85
1. Immunoscreening .....	85
2. SAG1 및 SAG2 유전자의 클로닝 .....	85
3. 발현 .....	89
1) 재조합특이 항원 및 백신후보물질의 정제 .....	89
2) 단클론항체의 생산 .....	94
(1) 융합실험 결과 .....	94
4. SAG1과 SAG2 재조합 단백질의 대량 생산 .....	95
5. 단클론 항체의 세포내 침투억제기전 효과 분석 .....	95
제 4장 참고자료 및 문헌 .....	97

# 제 1장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구개발의 목적

*Neospora caninum*이 소의 유산을 일으키는 중요한 병원체라는 사실이 Dubey 등(1988)에 의해 밝혀진 후 이에 대한 많은 연구가 수행되어 왔다. 그 결과 *N. caninum*의 발견 당시 *Toxoplasma gondii*와 숙주조직 내에서 생활사(life cycle) 및 항원성의 유사성 때문에 어려움이 많았던 진단상의 문제점 해결에 상당한 진보가 있었다. 지금까지 *N. caninum*을 진단하기 위한 방법으로 여러 진단법이 개발되었는데, 그 중 특이항체를 이용한 면역조직염색법, 간접형광항체검사법 및 효소면역항체검사법이 현재 널리 이용되고 있다.

그러나, 네오스포라증을 치료 및 예방하기 위한 기초적인 연구는 비교적 활발하게 이루어지지 않은 실정이다. 치료제 연구로써 세포배양을 통해 이 원충의 증식형에 대한 효과적인 약제 선발시험의 결과, 설파디아진(sulfadiazine), 트리메토프린(trimethoprin), 라살로시드(lasalocid), 모넨신(monensin) 등의 약제가 원충의 분열증식을 억제함으로써 어느 정도 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다(Lindsay and Dubey, 1989b; Lindsay and Dubey, 1990a). 또한 마우스 인공감염 후 약제치료 실험을 실시한 결과, 설파디아진이 가장 효과가 좋은 것으로 나타난 바 있다(Lindsay and Dubey, 1990b). 그러나, 소에 대해서는 아직까지 특효약제가 보고된 바 없을 뿐 아니라, 이들 약제는 치료제라기 보다는 단지 감염초기의 임상증상을 완화하는 것이라는 점을 감안해 보았을 때 치료제의 개발이 시급한 문제임에 틀림없다. 그럼에도 불구하고 유전자 재조합 방법에 의한

백신개발은 전무한 상태인데 충체를 이용한 백신개발은 *N. caninum*의 실험실 배양상 매우 어려움으로 백신으로 이용할 수 있는 대량 항원의 확보가 사실상 불가능하기 때문이라 생각된다. 따라서 과거에 주로 이루어졌던 *N. caninum*의 감염에 의한 병리현상 및 역학조사 연구에서 탈피하여 *N. caninum*의 생화학적, 면역학적 연구가 수행되어 오고 있다. 그 일환으로 최근 들어 활발히 연구되고 있는 분야가 *N. caninum* 항원의 생화학적, 면역학적, 분자생물학적 연구이다(Fuchs *et al.*, 1998; Hemphill, 1996; Hemphill *et al.*, 1997; Hemphill and Gottstein, 1996; Liddell *et al.*, 1998). 그러나 아직 연구단계가 초보적이므로 치료제 및 백신개발을 하여 반드시 선행되어야만 하는 병원성 기작의 규명 및 기능성 단백질을 포함한 항원구조에 대한 연구는 절대적으로 미흡한 실정이다. 따라서 *N. caninum* 항원의 특성분석을 통한 연구개발이 절실히 요구되고 있다고 생각된다. 그러므로 본 연구진은 생화학적, 면역학적 방법을 이용하여 *N. caninum*의 항원분석을 통해 특이항원 및 백신후보물질을 선별함과 동시에 이를 기초로 유전자재조합기술을 이용한 백신개발 연구를 실시하고자 한다.

## 2. 연구개발의 필요성

소는 매우 중요한 경제적 가축으로 국내 축산농가의 소득 및 가공식품 수출을 통한 국가경쟁력 확보에 매우 중요하다. 그러나 소에서 빈번히 일어나는 유산, 사산, 조산은 농가소득의 감소에 따른 막대한 경제적 손실

을 야기하는 매우 중요한 문제로 대두되어 왔다. 유산을 일으키는 요인으로는 물리, 화학, 생물학적 요인 등이 있는데, 화학적 요인 중에는 약물 또는 독성에 의한 요인이 있으며, 생물학적 요인 중에는 유전적, 호르몬, 영양학적, 감염성 요인이 있다. 이들 중 감염성 요인은 각종 병원성 미생물 감염에 의해 유산, 사산, 조산이 발생한다. 감염성 유산은 비감염성 유산과 달리 집단적으로 발생할 수 있다.

세계적으로 소에서 유산, 사산, 기형송아지의 출산 등을 일으키는 감염성 질환으로 최근 주목되고 있는 네오스포라증(Neosporosis)은 비교적 최근에 밝혀진 질병으로 네오스포라 원충(*Neospora caninum*)의 감염에 의해 일어난다(Barr *et al.*, 1991; Dubey *et al.*, 1988). 네오스포라 원충은 아직까지 정확한 분류학적 위치가 규명되지 않았지만 톡소플라즈마(*Toxoplasma gondii*)와 매우 유사한 원충으로 알려져 있다. 네오스포라증에 의한 소의 유산은 4세령에서 가장 많이 일어나고, 임상적으로 정상적인 태아를 분만하는 경우에도 만성감염을 나타내며, 유량감소 현상이 나타낸다(Agerholm and Barr, 1994; Dubey *et al.*, 1990; Holdahl *et al.*, 1995; Jadin and Dubey, 1992; Otter *et al.*, 1995; Ogino *et al.*, 1992;). 유산은 산발적으로 수주 이내에 집단적으로 또는 한 집단에서 계속적으로 일어나며, 습관성 유산이 일어난다는 보고도 있다(김재훈 등, 1998a).

국내에서 현재까지 *N. caninum* 원충이 직접 분리되어 확인된 바는 없으나, 네오스포라증에 의한 소 유산이 발생했다는 보고가 있다(김대용 등, 1997). 또한, 전국의 소를 대상으로 항체 양성율을 조사한 결과, 제주도를 제외한 지역의 소에서 약 8.3%의 항체 양성율이 나타났으며, 개개의 목장별 및 개체별 *N. caninum* 항체 양성율이 본 질병이 만연되어 있는 미국

이나 뉴질랜드와 대체로 유사한 것으로 보고된 바 있다(조영미 등, 1998; 허권 등, 1998). 그러므로 국내에서도 *N. caninum*이 중요한 유사산의 원인체로 존재하며 유사산을 유발한다고 추론할 수 있을 것이다.

네오스포라증이 알려진 후 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고 아직도 이들 원충의 생태, 역학, 진단제 및 치료제, 예방 및 관리 등 해결되지 못한 부분이 많다. 국내에서도 이 질병의 만연으로 막대한 피해가 예측되며, 또한 인수공통감염증(Zoonosis)을 일으킬 가능성이 있는 원충이므로 국민보건을 위해 안전한 축산물 공급차원에서 범국가적 장단기 대책을 조속히 수립하여 감염원의 규명, 예방 및 관리대책을 수립하여 실행 할 것을 촉구하는 바이다. 그러므로 본 연구는 네오스포라증에 대한 유전자재조합기술을 이용한 백신 및 조기 진단제를 개발함으로써 앞으로 예견되는 축산농가의 피해 예방과 안전 축산물 공급, 그리고 외화 획득에도 기여될 것으로 확신하는 바이다.

### 1) 기술적 측면

세계적으로 소의 유사산과 관련된 새로운 원인체로써 비교적 최근에 알려지기 시작한 *N. caninum*은 개에서 후구 마비로 폐사를 일으키고, 소, 양, 염소나 말에서 태아 사망 및 유산을 동반하는 원인체이다. 현재까지 *N. caninum*에 의한 자연발생 유산, 실험동물 감염실험, 진단법 개발 및 원인체 분리 등에 관한 연구는 상당히 많은 수행되었다. *N. caninum*의 진단 부분에서도 많은 진보가 이루어졌는데, H&E 염색 조직표본의 관찰, 중합효소연쇄반응(PCR), 효소면역항체 검사법(ELISA), 간접형광항체검사법(IFAT) 및 면역조직염색법(Immunohistological staining test) 등이 이



용되고 있다(허권 등, 1998; Lally *et al.*, 1996; Lindsay and Dubey, 1989a; Wounda *et al.*, 1997; Yamage *et al.*, 1996). 이들 검사법 중 특이 항체를 이용한 간접형광항체 검사법이 가장 유용한 것으로 알려져 있다.

네오스포라의 예방을 위한 백신 및 치료제를 위한 연구는 아직까지 미흡한 실정이

다. 세포배양을 통해 이 원충의 증식형에 대한 효과적인 약제 선발시험의 결과 몇몇 약제가 원충의 분열증식을 억제함으로써 어느 정도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Lindsay and Dubey, 1990a; Lindsay and Dubey, 1989b). 또한 마우스에 인공감염 후 약제치료 실험을 실시한 결과 설파다이아진이 가장 효과가 좋은 것으로 나타났다(Lindsay and Dubey, 1990b). 그러나 소에 대해서는 아직까지 특효약제는 보고된 바 없을 뿐 아니라, 이들 약제는 치료제라기 보다는 단지 감염초기의 임상증상을 완화하는 것으로 이 방법은 본 원충에 노출을 차단하는 방법이다. 따라서 보다 탁월한 치료제의 개발 및 감염을 예방할 수 있는 백신의 개발이 매우 시급하고 중요하다고 할 수 있을 것이다. 그러나 *N. caninum*의 실험실 배양상의 어려움으로 인해 백신으로 이용할 수 있는 대량의 총체 항원의 확보가 사실상 불가능하기 때문에 백신의 개발이 지연되고 있는 상황이다.

본 연구에서는 *N. caninum* 항원의 생화학적, 면역학적 특성 분석을 통해 특이 항원과 백신후보물질을 선별하여 그 유전자를 클로닝하고 대량 발현시키는 유전자재조합기술을 이용하여 네오스포라증을 예방할 수 있는 백신을 개발함으로써 축산농가 소득의 증대 및 국가경쟁력 향상에 이바지하고자 한다.

## 2) 경제·산업적 측면

소의 유, 조, 사산은 국내 뿐 아니라 전 세계적으로 낙농업의 최대 경제적 손실 요인 중 하나로써 매년 엄청난 경제적 손실을 야기하고 있으나 이에 대한 정확하고 체계적인 연구분석이 이루어지고 있지 않다. 더욱이 최근에 와서는 소의 유, 조, 사산이 증가하는 추세에 있는데, 이에 대한 체계적인 조사와 원인분석을 통한 대책을 조속히 수립함으로써 축산농가의 생산성을 증대시키고, 경제성을 향상시키는 것이 절실히 요구되고 있다.

국내 소에서 임신 3개월 이후에 여러 가지 원인에 의해 태아사가 발생하여 확인되는 경우가 우군에서 약 5%(3-8%) 정도로 추정되고 있으며, 유산의 원인이 집중된 목장에서는 이를 훨씬 상회하여 발생하는 것을 볼 수 있다. 또한 육안적으로 확인이 어려운 임신 3개월 이전의 유산 및 태아사로 인한 번식을 저하는 이보다 더 많은 경제적 손실을 초래하고, 더욱이 습관성 유산이 발생할 수 있는 것이 더욱 문제시된다.

최근 들어 미국 캘리포니아주에서는 젖소의 유산을 일으키는 질병 중 네오스포라가 약 12%를 차지하는 가장 중요한 유산 원인체라는 것이 밝혀졌으며, 이 지역에서만 연간 약 3천5백만달러 상당의 경제적 손실을 초래하는 것으로 평가되어 유산과 관련된 원인체 중 가장 중요한 병원체로 주목받고 있다(Anderson *et al.*, 1991; Jamaluddin and James, 1991). 국내의 경우 전국지역별 소의 네오스포라 항체 역가를 조사한 결과, 제주도를 제외한 전국 항체 양성율이 8.3%로 확인되었다. 그러나 국내에서 아직까지 *N. caninum* 원충의 분리능이 이루어지지 않았으나 전국에 걸쳐 감염이 이루어져 있음을 추론할 수 있었다. 그리고 현재까지 구체적인 역학조

사 및 적절한 예방조치가 시행되지 않은 실정이며 유산이 발생했다 하더라도 축산농가의 인식부족으로 인해 정확한 유산의 원인 규명이 어려운 상태이므로 네오스포라증에 의한 유산율은 추측하고 있는 것보다 더 막대할 것으로 생각된다. 더욱이, 현재 치료제의 개발이 미흡한 상황에서 감염 자체를 사전에 방지할 수 있는 백신을 개발 생산하여 보급하는 것이 축산농가의 생산성 증대 및 육성에 시급한 실정이다. 또한, 백신 개발로 인한 특허권 및 지적소유권 획득 뿐 아니라 나아가서는 네오스포라 백신의 수출을 통한 외화획득에도 지대한 공헌을 할 수 있으리라 생각된다.

### 3) 사회·문화적 측면

우리 나라의 식생활이 서구화되어 가고 있음에 따라 육류 및 유가공식품의 소비가 점차 증가하고 있는 시점에서 유산에 의한 경제적 손실은 단순한 경제적 손실을 떠나서 큰 사회적 문제로 대두될 수밖에 없다. 더욱이, 수입 자유화와 더불어 전면적인 수입개방으로 인한 축산농가의 존립 자체가 위태로운 상황에서 가축생산성의 저하는 농민들의 사회적 소외감 및 축산 의욕의 상실로 연결될 수 있을 것이다. 따라서, 국내 축산농가를 보호하고 의욕고취를 위해서 국가차원에서의 노력이 시행되어져야 할 것이다.

소 유산의 병원체인 *N. caninum*은 실험적으로 유인원에게 감염시킨 결과 감염에 성공하였다는 보고가 발표되어 인수공통감염증(Zoonosis)을 유발할 수 있을 가능성이 높다고 생각된다. 이에 대한 명확한 연구가 이루어져 안정된 농축산물 공급에 기여할 것이며, 사회적 문제도 사라질 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 네오스포라와 연관된 소의 감염 및 유산을 예방함으로써 축산농민들의 애로사항 해결 및 축산농가의 의욕 향상을 유도함으로써 침체되어 있는 국내 축산업의 일부분을 회복시키는데 기여할 수 있을 것이라 생각된다. 또한, 감염을 예방하므로 안정된 축산물 공급으로 사회적 문제점을 해결될 것으로 생각된다. 더욱이 장기간 소외된 분야로 간주되어 왔던 우리 농촌에 대한 국가차원의 배려로 인식됨으로써 농민과 진정으로 함께 하는 국민정부로써의 면모를 정립할 수 있을 것이다.

### 3. 연구개발의 범위

현재 우리 나라의 목축양식은 역우에서 육우로 전환되고 있는 시점이며 지속적으로 증가하고 있는 육류 및 유가공식품의 소비는 목축생산량의 증대를 절실히 요구하고 있다. 그러나 지속적으로 일어나고 있는 소의 유산, 사산, 조산은 목축생산량을 크게 감소시킴에 따라 막대한 경제적 손실을 야기하고 있는 실정이다. 더욱이 수입자유화에 따른 육류 및 유가공식품의 대량 수입은 국내 축산농가의 존립 자체를 위협하고 있는데, 이러한 현 상황에서 농민의 사기 저하는 국내 축산업의 기반을 일순간에 무너트릴 수 있는 중대한 문제이다. 네오스포라증의 만연이 예견되어지고 있음에도 불구하고 이에 대한 범국가적인 차원의 대책이 미흡하며, 국내 연구역시 극히 미미한 실정이다. 따라서 조기진단법 및 백신개발에 대한 적극적인 국가적 차원의 대책이 수립되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구가 원활히 수행되어 효율이 뛰어난 유전자재조합 백신이 개발

된다면 축산농가의 생산성 향상에 따른 소득증대를 도모할 수 있을 뿐 아니라 특허 및 지적소유권의 확보로 축산기술의 국가경쟁력 향상도 도모할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 백신의 수출을 통한 외화획득도 기대해 볼 수 있을 것이며, 본 연구를 수행하며 축적되는 기술은 다른 원충성 감염질환에 대한 백신개발 연구에도 널리 응용될 수 있을 것이다.

#### 4. 기술도입의 타당성

본 연구를 수행함에 있어 요구되는 생화학적, 면역학적 및 분자생물학적 기술은 본 연구진의 오랜 연구 경험 및 축적된 연구기술로 충분히 해결할 수 있을 것으로 생각되며, 특정기술의 도입 없이도 훌륭히 연구를 수행할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 선진 외국에서도 이에 대한 연구가 아직 초기 단계이므로 기술 도입에 앞서 국내 기술의 자체 개발 또는 개선을 통한 연구로 기술우위를 확보함이 타당하다고 생각된다. 그러나, 본 연구를 수행함에 있어서 최근 연구 경향과 특정 기술이 요구된다면 해외 연구소 및 대학과의 긴밀한 협조를 통해 습득하면 무난하리라고 생각된다.

## 5. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년 도 (19 99 ~2 000 )	네오스 포라 특이 다가항 원 및 백신후 보물질 의 탐 색	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 네오스포라의 배양 및 공급 네오스포라 원충을 동물세포에 감염, 배양시켜 회수함으로써 연구과제 전 반에 이용될 네오스포라 원충을 공급한다. host cell(숙주세포)로서 vero cell 및 human foreskin fibroblast (hs68) cell 사용, host cell 이 약 70% 자랐을 때 <i>Neospora caninum</i> tachyzoite를 접종, 매 3-4일 간격으로 sub culture, harvest한 후 분리 정제하고 -80℃에 보관</li> <li>2. 네오스포라 대량 배양법 연구 네오스포라의 대량 인공배양 체계를 연구 구축할 예정이다. 세포배양이 아닌 마우스 복강내 배양을 통한 대량 배양법 연구는 mouse의 dexametasone 처리하고, sarcoma 180 cell을 mouse 복강내 접종, sarcoma180 cell이 감염된 mouse 복강내에 Neospora 접종, sarcoma 180 cell내에서 Neospora 증식확인</li> <li>3. 네오스포라 항혈청 수집 네오스포라에 감염된 개 또는 소의 항혈청을 수집한다. 간접형광항체 반응을 이용한 항체 검사를 이용하여, 반복 유산 등 네오스포라로 의심되는 목장에서 항혈청 수집한다. 외래 병성감정을 통한 네오스포라 항체 조사 및 항혈청 수집한다.</li> <li>4. 네오스포라 특이 다가항원의 정제 및 생화학적 특성 분석 특이 다가항원을 개 및 소의 항혈청을 이용하여 면역학적 방법(Western blot 및 ELISA)을 통해 분석 선별한다. 선별된 특이 다가항원을 크로마토그라피 방법을 이용하여 정제하고 생화학적 특성을 분석한다.</li> <li>5. 네오스포라 cDNA library의 제작 네오스포라에 있는 cDNA library를 분리하기 위하여 total RNA와 mRNA를 분리하여 mRNA를 주형으로 cDNA를 합성하고 library construction kit을 이용하여 cDNA library를 제작한다. total RNA 와 mRNA 분리는 네오스포라에서 mRNA 분리는 총체 30mg (wet weight)을 채취하여 Oligotex Direct mRNA Kit를 이용하여 제작사의 방법에 따라 mRNA를 순수 분리한다. cDNA 합성 및 library 제작은 주형은 총체에서 얻은 poly (A+) RNA를 사용하였고, cDNA를 합성하기 위하여 cDNA synthesis kit를 사용한다. library 제작은 library construction kit을 이용하고 특정 cell에 packaging 한다.</li> <li>6. 네오스포라 백신 후보물질의 탐색 cDNA library를 네오스포라 항혈청 및 특이 다가항원 분석을 통해 면역시켜 제조한 항혈청을 이용하여 immunoscreening을 실시, 항원성이 강력한 백신 후보물질을 재차 선별한다. packaging 된 cell은 배지에서 배양하며 colony blot과 southern blot을 이용하여 네오스포라 항혈청에 특이적으로 반응하는 colony들을 선택한다. 선택된 colony들에 대한 automatic sequencing kit을 이용하여 염기서열을 분석하고 다른 gene들과의 상동성을 조사한다.</li> <li>7. 백신후보물질의 정제 및 생화학적 특성 규명 cDNA library의 immunoscreening 과정을 통해 선별된 백신후보물질의 유전자를 분리하고 염기서열을 분석한다.</li> </ol>

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (200 1 ~20 02)	네오스 포라 유전자 재조합 백신의 특성분 석 및 효능 평가	<p>1. 네오스포라 배양 및 항혈청 수집 본 연구 전반에 이용될 항혈청을 감염된 개 또는 소에서 수집한다. 네오스포라에 감염된 개 또는 소의 항혈청을 수집한다. Host Cell(숙주세포)로서 Vero cell 및 Human foreskin fibroblast(Hs68) cell 사용, Host cell 이 약 70% 자랐을 때 <i>Nepsora caninum</i> tachyzoite를 접종, 매 3-4일 간격으로 subculture, Harvest한 후, 분리한 다음, 정제하여 -80℃에 보관한다. 간접형광항체 반응을 이용한 항체 검사를 하여, 반복 유산 등 네오스포라로 의심되는 목장에서 항혈청 수집하고, 또한, 외래 병성 감정을 통한 네오스포라 항체 조사 및 항혈청 수집한다.</p> <p>2. 단클론항체의 대량 생산 체계 구축 2차년도에 생산, 특성을 분석한 단클론항체의 생산 체계를 구축함으로써 본 연구 전반에 이용할 뿐 아니라 본 연구과제와 연관지어 추후에 진행하고자 하는 진단법 개발 등에 이용하고자 한다.</p> <p>3. 네오스포라 유전자재조합 백신의 생산 체계 구축 2차년도 연구를 통해 클로닝하고 발현시킨 유전자 재조합 백신후보물질의 생산체계를 구축하고 생산함으로써 백신의 효능 평가 연구에 이용한다. 단클론항체 생산은 ascitic fluid법을 이용한다.</p> <p>4. 동물실험을 통한 유전자 재조합 백신의 효능 평가 1차년도와 2차년도를 통해 연구 개발된 백신 효능 평가법을 기초로 하여 생산한 유전자재조합 백신의 효능 평가를 실시한다. 그 결과를 통해 개발된 백신의 효능이 검증되면 이에 대한 특허출원 및 상품화단계에 돌입한다.</p>

## 제 2장 국내·외 기술개발 현황

*N. caninum*이 소의 유산을 일으키는 중요한 병원체라는 사실이 Dubey 등(1988)에 의해 밝혀진 후 이에 대한 많은 연구가 수행되어 왔다. 그 결과 *N. caninum*의 발견 당시 *Toxoplasma gondii*와 숙주조직 내에서 생활사(life cycle) 및 항원성의 유사성 때문에 어려움이 많았던 진단상의 문제점 해결에 상당한 진보가 있었다. 지금까지 *N. caninum*을 진단하기 위한 방편으로 여러 진단법이 개발되었는데, 그 중 특이항체를 이용한 면역조직염색법, 간접형광항체검사법 및 효소면역항체검사법이 현재 널리 이용되고 있다.

그러나, 네오스포라증을 치료 및 예방하기 위한 기초적인 연구는 비교적 활발하게 이루어지지 않은 실정이다. 치료제 연구로서 세포배양을 통해 이 원충의 증식형에 대한 효과적인 약제 선발시험의 결과, 설파다이아진(sulfadiazine), 트리메토프린(trimethoprin), 라살로시드(lasalocid), 모넨신(monensin) 등의 약제가 원충의 분열증식을 억제함으로써 어느 정도 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다(Lindsay and Dubey, 1989b; Lindsay and Dubey, 1990a). 또한 마우스 인공감염 후 약제치료 실험을 실시한 결과, 설파다이아진이 가장 효과가 좋은 것으로 나타난 바 있다(Lindsay and Dubey, 1990b). 그러나, 소에 대해서는 아직까지 특효약제가 보고된 바 없을 뿐 아니라, 이들 약제는 치료제라기 보다는 단지 감염초기의 임상증상을 완화하는 것이라는 점을 감안해 보았을 때 치료제의 개발이 시급한 문제임에 틀림없다. 그럼에도 불구하고 유전자 재조합 방법에 의한 백신개발은 전무한 상태인데 충체를 이용한 백신개발은 *N. caninum*의 실



험실 배양상 매우 어려움으로 백신으로 이용할 수 있는 대량 항원의 확보가 사실상 불가능하기 때문이라 생각된다. 따라서 과거에 주로 이루어졌던 *N. caninum*의 감염에 의한 병리현상 및 역학조사 연구에서 탈피하여 *N. caninum*의 생화학적, 면역학적 연구가 수행되어 오고 있다. 그 일환으로 최근 들어 활발히 연구되고 있는 분야가 *N. caninum* 항원의 생화학적, 면역학적, 분자생물학적 연구이다(Fuchs *et al.*, 1998; Hemphill, 1996; Hemphill *et al.*, 1997; Hemphill and Gottestein, 1996; Liddell *et al.*, 1998). 그러나 아직 연구단계가 초보적이므로 치료제 및 백신개발을 위해 반드시 선행되어야만 하는 병원성 기작의 규명 및 기능성 단백질을 포함한 항원구조에 대한 연구는 절대적으로 미흡한 실정이다. 따라서 *N. caninum* 항원의 특성분석을 통한 연구개발이 절실히 요구되고 있다고 생각된다. 그러므로 본 연구진은 생화학적, 면역학적 방법을 이용하여 *N. caninum*의 항원분석을 통해 특이항원 및 백신후보물질을 선별함과 동시에 이를 기초로 유전자재조합기술을 이용한 백신개발 연구를 실시하고자 한다.

## 제 3장 연구개발 수행내용 및 결과

### 1절. 연구수행내용

#### 가. 제 1 세부과제

##### 1. *N. caninum*의 배양

*N. caninum*의 tachyzoites를 Minimum Essential Medium Alpha( $\alpha$ -MEM)를 이용하여 배양한 Vero cell에 접종하여 배양하였으며 약 75%가 감염되었을 때 수거하여 실험에 이용하였다.

##### 2. *N. caninum* tachyzoites의 순수분리

감염된 세포를 플라스크로부터 수확하여 1,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 약간의 PBS가 남은 상태에서 pellet을 부유시켜 주사기(23G)로 세포를 파괴시키는 과정을 3회 반복하였다. 이를 PBS로 평형된 PD-10 column(Sephadex G-25M)에 통과시킨 후 PBS로 용출하였다.

##### 3. 네오스포라 특이 항원의 탐색

네오스포라 특이 항원을 탐색하기 위해 Western blot을 실시하였다. Vero cell lysate와 정제된 *N. caninum* lysate를 이용하여 SDS-PAGE를 실시하고 Western blot을 실시하였다. Gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이적한 다음 3% skim milk가 함유된 phosphate-buffered saline/Tween20(PBST) 용액으로 비특이반응을 차단한 후 세척하였다. 네

오스포라에 감염된 소의 혈청을 3% skim milk가 함유된 PBST에 1:3,000으로 희석하여 첨가하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 세척하였다. 세척 후 peroxidase conjugated anti-bovine IgG(Sigma)를 3% skim milk가 포함된 PBST에 1:3,000으로 희석하여 첨가한 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, PBST로 30분동안 세척한 다음 Enhanced Chemi Luminescence(ECL, Amersham Pharmacia)를 이용하여 제조사의 실험 방법에 따라 발색하였다.

#### 4. RNA 추출

순수 분리한 *N. caninum* tachyzoites를 수집하고 Trizol reagent 1ml을 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 다음 chloroform 0.2ml을 첨가하고 15초 동안 완전히 혼합하여 상온에서 15분간 방치하였다. 이를 4℃, 12,000g에서 15분간 원심 분리한 후 무색의 수층을 분리하여 새로운 튜브에 옮기고, isopropanol 0.5ml을 첨가하여 상온에서 10분간 방치한 다음 4℃, 12,000g에서 8분간 원심 분리한 후 침전물을 75% 에탄올 1ml으로 세척하여 RNA pellet을 건조시켰다. 침전물은 10 $\mu$ l DEPC 처리한 증류수로 현탁시켜 cDNA 합성을 위한 주형으로 사용하였다.

#### 5. Complement DNA(cDNA) 합성

추출한 RNA를 주형으로 10mM dNTP 5 $\mu$ l, 5X RT 완충용액 4 $\mu$ l, MMLV reverse transcriptase(200U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l, oligo(dT)-M4 adapter primer 1 $\mu$ l, RNase inhibitor 1 $\mu$ l, RNA 시료 8 $\mu$ l의 혼합액을 첨가한 다음 37℃에서 10분, 42℃에서 50분, 94℃에서 3분, 4℃에서 5분간 방치하여

cDNA를 합성하였다.

## 6. 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)

*N. caninum*의 cDNA를 주형으로 하여 degenerate oligonucleotide primer를 제작하였다(Table 1).

합성된 cDNA를 시료로 사용하여 dNTP(10mM) 1 $\mu$ l, 10X PCR 완충 용액 5 $\mu$ l, Taq DNA polymerase 1 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 4 $\mu$ l, forward primer(10pmol) 1 $\mu$ l, reverse primer(10pmol) 1 $\mu$ l와 cDNA 3 $\mu$ l를 혼합한 후, 최종용량이 50 $\mu$ l가 되도록 멸균 증류수를 첨가하고 mineral oil을 한 방울 첨가하여 증충한 다음 DNA Minicycler(MJ Reserch)를 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭 cycle은 총 30회 실시하였으며, predenaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 5분, cycle당 denaturation은 94 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing은 55 $^{\circ}$ C에서 1분, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 실시하였으며 최종적으로 final extension은 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 실시하였다. PCR 증폭에 의해 생성된 DNA 산물은 1.2% agarose gel에서 전기 영동한 후 ethidium bromide(EtBr)로 염색하여 확인하였다.

**Table 1. Degenerate oligonucleotide primers for amplification of Fe-SOD and proteinase gene fragment from *N. caninum*.**

Primer	Sequence
SODF	5'-AAGCACCATGCGGGCTACGTC-3'
SODR	5'-AAGCCATGCCCATCCTGAGCC-3'
proteinase 1F	5'-GAATTCCAATGAGGGCGTTCGCATATCC-3'
proteinase 2F	5'-GAATTCCAGAACTTGGCGGGGATCGG-3'
proteinase R	5'-CTCGAGTCACACAATTAATCCTACAAC-3'

## 7. PCR 산물의 클로닝

PCR 증폭 산물은 GeneClean Kit(Bio 101)를 이용하여 정제하였으며 정제된 PCR 산물은 TOPO TA cloning kit(Invitrogen)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 pCR 2.1 vector에 직접 클로닝 하였다. 이를 *E. coli* TOP10 competent cell(Invitrogen)에 첨가 혼합하여 얼음에서 30분간 방치한 다음 42℃에서 30초동안 열충격을 주어 형질전환 시키고 800 $\mu$ l의 SOC 배지를 첨가하여 37℃에서 1시간동안 진탕 배양하였다. 형질전환된 *E. coli*는 ampicillin(100  $\mu$ g/m)을 포함한 agar plate에 도말하여 37℃에서 하룻밤 배양하였다. 형질 전환된 *E. coli*에서 plasmid DNA는 Wizard plus minipreps DNA purification system(Viogen)을 이용하여 정제하였으며, PCR 증폭 산물의 존재 여부는 염기서열 분석을 통해 확인하였다.

## 8. 염기서열 분석(nucleotide sequence analysis)

클로닝된 유전자의 염기서열 분석은 순수 정제된 plasmid DNA를 주형으로 하여 ABI prism dye terminator cycle sequencing ready reaction

kit(Perkin-Elmer)를 이용하여 실시하였다. 즉, 정제된 plasmid DNA  $2\mu\text{l}$ , dye terminator ready mix  $4\mu\text{l}$  와  $3.2\text{pmole}$ 의 primer를 혼합하고 멸균 증류수로 최종 부피가  $10\mu\text{l}$ 가 되도록 하였다. 이때 사용한 sequencing primer는 M13 forward primer와 M13 reverse primer이었으며, sequencing 반응은  $96^{\circ}\text{C}$ 에서 10초,  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 5초,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 4분간, 25회 실시하였다. 반응이 끝난 후 여분의 primer 및 dye terminator reaction mix 및 기타 여분의 물질의 제거는 다음과 같은 방법을 따라 실시하였다. 반응 용액에 3M sodium acetate(pH 4.6)  $2\mu\text{l}$ , 95% 에틸알콜  $50\mu\text{l}$ 를 첨가한 후 2시간 동안  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동실에 방치한 다음  $14,000\text{g}$ 에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 DNA 침전물은 70% 에탄올로 2회 세척하여 여분의 물질을 제거하였다. 염기서열 분석에 사용된 gel은  $1\times$  TBE 완충용액과 8M urea가 함유된 5% polyacrylamide(19:1) sequencing gel을 사용하였으며, 전기영동의 모든 조건은 automatic sequencer에 연결된 컴퓨터의 sequencing analysis software에 의해 조절하여 실시하였다. 실험 과정은 준비된 sequencing 반응물에 loading dye  $4\mu\text{l}$ 를 첨가하고  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 가열한 후 바로 얼음 속에 넣어 냉각시켰다. 혼합된 시료  $1.5\mu\text{l}$ 를 취해 gel에 loading 한 다음  $3,000\text{volt}$ 로  $52^{\circ}\text{C}$ 에서 8시간동안 전기영동하였다.

## 9. Colony hybridization

제조한 cDNA library(제 3세부과제)의 선별에 이용할 probe로는 *N. caninum* Fe-SOD의 PCR산물을 사용하였으며, Digoxigenin DNA labeling and detection kit(Boehringer Mannheim)를 이용하여 labeling하

었다. 즉  $1.38 \times 10^6$ 개의 plaque가 nylon membrane( $1.2 \mu\text{m}$  pore size; surface contains 50% amino and 50% carboxyl groups; each 82 mm diameter)로 이적하였다. Plaque를 포함하는 membrane들은 DIG-labeled probe와 hybridization시켰다. Hybridization은 standard hybridization 완충용액에서  $50^\circ\text{C}$ , 16시간 반응시켰으며, 세척은  $2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}/0.1\% \text{SDS}$  용액으로 실온 및  $68^\circ\text{C}$ 에서 15분씩 2회 세척하였다. Membrane을  $1 \times$  blocking-용액으로 30분간 반응시킨 후 maleic acid 완충용액으로 2회 15분간 세척 후 NBT 및 X-phosphate-용액을 첨가하여 발색된 spot을 관찰하여 선별하였다. 선택된 클론으로부터 plasmid를 정제하여 염기서열을 분석하였다.

## 10. *N. caninum* 다가항원의 정제 및 생화학적 특성 분석

### 1) Fe-SOD 와 proteinase의 유전자 클로닝

분석된 *N. caninum* SOD 유전자의 열린해독틀(open reading frame)의 N 말단과 C 말단에 각각 *Bam*HI 과 *Xho*I 의 제한효소 인식부위를 첨가한 primer[Forward primer(NcSODF): 5'-GGATCCATGGTATTCAC-TTTACC-3'; reverse primer (NcSODR): 5'-CTCGAGTCATTTCAAG-GCATTGTC -3']를 제작하고 이를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응 후 PCR 반응 산물은 TA 클로닝을 하였다. 집락들을 선별한 후 플라스미드를 정제하여 *Bam*HI 과 *Xho*I 제한효소로 절단한 후, 전기 영동을 실시하여 insert의 유무를 확인하였다. *Bam*HI 과 *Xho*I 제한효소로 절단하여 얻은 네오스포라 Fe-SOD 유전자를 발현벡터인 pGEX-4T-2 (Pharmacia)에 삽입한 후 *E. coli* DH5  $\alpha$  를 이용하여 클로닝하였다. 클론

체들은 ampicillin(100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 LB 고체배지에서 선별하였다. 선별된 클론체에서 재조합 플라스미드를 분리하고 발현 숙주인 *E. coli* BL21에 다시 형질전환 시켰다. 분석된 *N. caninum* serine proteinase 유전자의 열린해독틀(open reading frame)의 N 말단과 C 말단에 각각 *Bam*H I 과 *Eco*R I 의 제한효소 인식부위를 첨가한 primer를 제작하고 이를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응 후 PCR 반응 산물은 TA 클로닝을 하였다. 집락들을 선별한 후 플라스미드를 정제하여 *Bam*H I 과 *Eco*R I 제한효소로 절단한 후, 전기 영동을 실시하여 insert의 유무를 확인하였다. *Bam*H I 과 *Eco*R I 제한효소로 절단하여 얻은 네오스포라 serine proteinase 유전자를 발현벡터인 pGEX-4T-2(Pharmacia)에 삽입한 후 *E. coli* BL21에 형질전환시켰다.

## 2) 재조합 단백질의 발현 및 정제

형질 전환된 *E. coli* BL21을 ampicillin(100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 LB배지에 접종하고 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양하여 흡광도 600nm에서 0.6이 되게 배양한 후 IPTG(1mM)를 첨가하여 발현을 유도하였다. 지속적으로 배양하면서 배양 시간별 재조합 단백질의 발현 양상과 발현위치 및 분자량을 SDS-PAGE와 Western blot을 실시하여 확인하였다. 재조합 단백질을 정제하기 위하여 IPTG로 유도시킨 10ml의 배양 균주를 PBS로 세척한 후, 1ml의 PBS로 현탁시켜 glass bead로 파쇄하고, 14,000rpm에서 15분간 원심 분리하여 침전시켰다. 원심 분리한 상층액은 완충용액으로 평형시킨 Glutathione Sepharose 4B column을 통과시킨 후 PBS로 흡착되지 않은 단백질을 완전히 제거하고 elution buffer(10mM glutathione in 50mM



Tris-HCl pH 8.0)로 흡착된 단백질을 용출, 정제하였다.

### 3) SDS-PAGE 및 Western blot

SDS-PAGE는 Laemmli등(1970)의 방법을 이용하여 실시하였다. 즉, 10.0% resolving gel과 4% stacking gel을 제조한 후 각 well에 20 $\mu$ l씩 항원시료를 첨가하여 표준분자량 marker와 함께 170V에서 1시간 전기영동하였다. 전기 영동이 끝난 후, gel은 0.1% Coomassie blue로 염색한 다음 10% acetic acid와 30% methanol이 함유된 용액으로 탈색하였다. Western blot은 Towbin과 Gordon(1984)의 방법을 이용하여 실시하였다. Gel 내의 단백질을 100V에서 1시간 동안 nitrocellulose membrane으로 이적시키고 3% skim milk가 함유된 phosphate-buffered saline/ Tween 20(PBST) 용액으로 비특이반응을 차단한 후 세척하였다. 세척후 anti-GST antibody를 3% skim milk가 함유된 PBST 에 1:3,000으로 희석한 용액을 첨가하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 세척하였다. 이어서 peroxidase conjugated anti-mouse IgG(Sigma)를 3% skim milk가 포함된 PBST에 1:3,000으로 희석하여 첨가한 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, PBST로 30분동안 세척한 후 Enhanced Chemi Luminescence(ECL, Amersham Pharmacia)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 발색시켰다.

### 4) 재조합 SOD의 생화학적 특성분석

발현된 단백질의 효소 활성을 탐지하기 위해서 native gel electrophoresis를 실시한 후 Beauchmph와 Fridoovich(1971)의 방법에 따

라 활성부위 염색을 실시하였다. 먼저 10.0%의 polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동을 실시한 다음, 전기 영동이 끝난 gel은 0.25mM nitro blue tetrazolium(NBT), 30  $\mu$ M riboflavin, 1mM EDTA, 20mM TEMED 가 함유된 50mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.8)에 침적하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 30분간 반응시킨 다음 용액을 제거하고 증류수를 첨가한 후 약 30분간 광유도를 실시하였다. 정제된 SOD 가 함유하고 있는 금속 이온의 종류를 확인하기 위해 억제인자 실험을 실시하였다. 즉, 정제된 효소에 sodium azide(최종농도 5mM과 10mM), potassium cyanide(최종농도 5mM 과 10mM) 그리고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(최종농도 5mM과 10mM)를 각각 첨가하고 효소의 활성도를 앞서 서술한 방법에 따라 실시하였다. 또한 각각의 반응액을 native gel electrophoresis를 실시한 다음 활성 부위 염색을 실시하였다.

### (1) 효소의 활성 측정

효소활성의 측정은 hypoxanthine과 xanthine oxidase의 존재하에 생성되는 superoxide radical에 의해서 neotetrazolium chloride (NTC) 의 환원을 억제하는 반응원리를 이용한 Noritake 등 (1982) 의 방법에 따라 측정하였다(Fig 2). 즉, 시험관에 0.5M sodium phosphate 완충용액 (pH7.5) 10 $\mu$ l, 16% Triton X-100 5 $\mu$ l, 10mM EDTA 0.5 $\mu$ l, 1.2mM NTC 15 $\mu$ l, 4mM hypoxanthine 5 $\mu$ l와 시료 10 $\mu$ l를 첨가하고 총 용량이 100 $\mu$ l되도록 멸균 증류수를 첨가하여 혼합한 후, 40 U xanthine oxidase (Sigma, USA) 0.5 $\mu$ l를 다시 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 반응억제 용액 (1M formate buffer, pH 3.5; 10% Triton X-100, 40%

formaldehyde) 100 $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 다음 ELISA reader (540 nm)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 unit로 표시하기 위해 표준 SOD (bovine liver; Sigma) 을 이용하여 표준곡선 (standard curve) 을 작성하였으며 NTC의 환원을 50% 억제하는 효소의 약을 1 unit로 정하였다.

## (2) 등전점 관찰

SOD의 등전점 (isoelectric point)은 ampholine PAGplate gel (Pharmacia; pH 5.5-8.5)상에서 발현된 단백질에 중점을 두어 결정하였다. sample을 isoelectric focusing standards에 두개를 나란히 놓고 loading한 다음 4 $^{\circ}$ C에서 2.5h동안 1.5 watts/cm 으로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후, pH gradient 는 표면 전극에서 측정되고 PAGplate는 두 부분으로 나뉘게되는데 한 면은 Coomassie Brilliant Blue 로 염색하고 다른 면은 rivoflavin/nitro blue tetrazolium (NBT) 방법에 의한 SOD 효소활성 염색을 하였다.

## (3) 효소활성에 대한 억제인자 (inhibitor)의 효과

정제된 SOD가 함유하고 있는 금속이온의 종류를 확인하기 위해 다음과 같이 억제인자 실험을 실시하였다. 즉, 정제된 효소에 sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ; 최종농도 5mM 과 10mM), potassium cyanide (KCN; 최종농도 5mM 과 10mM) 그리고 hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 최종농도 5mM 과 10mM) 를 각각 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 후, 앞서 서술했던 SOD 활성도 측정법에 따라 잔존 활성도를 측정 비교하였다.

#### (4) 효소활성에 대한 pH의 영향

효소의 활성화에 미치는 pH의 영향을 관찰하기 위해 다양한 pH의 완충 용액을 사용하여 정제된 효소의 활성도를 측정하였다. 즉, 앞서 언급했던 SOD 활성측정 실험에서 이용한 완충용액 대신 pH 6.0에서 pH 7.0까지는 50mM sodium phosphate 완충용액, pH 8.0에서 pH 9.0까지는 50mM Tris-HCl 완충용액, 그리고 pH 10.0에서 pH 11.0까지는 50mM glycine - NaOH 완충용액을 사용하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 각각의 pH에서의 효소활성을 측정 비교하였다.

#### (5) Fe-SOD 의 단계별 발현양상 (Stage-specific expression of Fe-SOD)

순수 분리된 tachyzoites 또는 bradyzoites에 Trizol reagent (GIBCO-BRL)를 사용하여 total RNA를 추출하였고, oligo-dT primer를 이용하여 AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, Wis.)으로 역전사 시켰다. Fe-SOD gene의 stage-specific transcription을 결정하기 위해서, 각각 stage-specific *N. caninum* 의 cDNA 20 ng으로 PCR을 수행함으로써 Fe-SOD gene을 증폭시켰다. 여기에 사용된 primer는 *N. caninum* Fe-SOD specific primer (NcSODF 와 NcSODR)이고 증폭시키는 조건은 앞서 기술한 바와 동일하다. 단백질 상에서 Fe-SOD 의 stage-specific expression을 알아보기 위해서, *N. caninum*의 tachyzoites 와 bradyzoites의 total 단백질을 immunoblot해서 분석하였다. 각 단계에서 total 단백질 10 µg 을 SDS-PAGE로 분리한 다음, nitrocellulose

membrane (0.45  $\mu\text{m}$ ; Bio-Rad)에 이적시켰다. 이후의 방법은 면역이적법과 동일한 방법으로, 1차 항체는 다클론 항체를 1:1,00 (v/v)으로 희석하여 첨가하였다.

#### (6) 간접 면역형광법( Indirect immunofluorescence )

원충에서 SOD 분포 위치를 관찰하기 위해 제조된 항체를 이용하여 간접 면역형광법을 실시하였는데 그 방법은 다음과 같다. 24 well microplates상에 18mm coverslips를 넣고 vero cells를 배양한 후, 24시간 동안 순수 정제된 *N. caninum* tachyzoites를 감염시켰다. 감염된 세포를 5분간 cold methanol로 고정시킨 후 coverslips를 PBS로 씻어주고 blocking buffer (PBS, 1% BSA, 50mM glycine) 로 반응시킨다. 재조합 SOD 항체(rabbit) 와 *N. caninum* 항체( mouse)를 1:25 비율로 희석한 다음 1시간동안 반응시킨 후 PBS로 3번 세척하였다. 2차 항체는 goat anti-rabbit-fluorescence isothiocyanate (FITC) conjugate (Sigma)와 goat anti-mouse-tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) conjugate (1:200) (Sigma)를 200배 희석하여 30분간 반응시켰다. PBS로 세척 후에 specimens를 Mowiol (Calbiochem, San Diego, Calif)을 처리한 후 형광현미경 (Axiophot, Carl Zeiss Co., Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

#### (7) 항원성 관찰

정제된 효소의 항원성을 관찰하기 위해 Towbin 등 (1979) 의 방법에 따라 Western blotting을 실시하였다. 정제된 효소는 SDS-PAGE로 전기

영동을 실시하고, gel 상에서 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 이적시켰다. 이때 사용된 완충용액은 Tris-glycine (pH 8.0)이며, 4℃를 유지하면서 100V에서 45분, 150V에서 15분을 전이시킨 후 membrane은 blocking 완충용액 (PBST-1X PBS, 0.05% Tween20; 3% skim milk)으로 실온에서 하룻밤 blocking 하였다. Blocking이 끝난 후 PBST로 10분씩 3회 membrane을 세척하고, 1:50으로 희석된 양성 소의 혈청과 정상 소의 혈청으로 2시간동안 천천히 흔들어 주면서 실온에서 반응시켰다. 반응이 완료된 membrane은 PBST로 10분간 3회 세척하고, peroxidase-conjugated anti-bovine IgG (Sigma)를 blocking 용액에 1:1,000 으로 희석하여 2시간 반응시킨 다음 PBST로 10분간 3번 세척하였다. 세척 후 membrane을 기질용액 (0.5 mg/ml 3,3-diamino-benzidine; 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0.1M PBS, pH 7.4)에 반응시킨 다음 실온에서 1분간 반응하고 증류수로 반응을 종료시켜 nitrocellulose membrane상의 반응여부를 비교 관찰하였다.

## 5) 네오스포라 단백질분해효소의 생화학적, 면역학적 특성분석

### (1) *N. caninum* 단백질분해효소의 발현

*N. caninum* serine proteinase 유전자의 열린해독틀 (open reading frame)의 N 말단과 C 말단에 각각 *Bam*H I 과 *Xho* I 의 제한효소 인식부위를 첨가한 primer를 제작하고 이를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응 후 PCR 반응 산물은 TA 클로닝을 하였다. 집락들을 선별한 후 플라스미드를 정제하여 *Bam*H I 과 *Xho* I 제한효소로 절단한 후, 전기 영동을 실시하여 insert의 유무를 확인하였다. *Bam*H I 과 *Xho* I 제한효소로

절단하여 얻은 네오스포라 serine proteinase 유전자를 발현벡터인 pGEX-4T-2 (Pharmacia)에 삽입한 후 *E. coli* DH5  $\alpha$ 를 이용하여 클로닝 하였으며 screening 및 발현시켜 정제하였다.

### (2) substrate gel electrophoresis

단백질 분해효소를 gel 상에서 관찰하기 위하여 시료에  $\times 5$  activity sample buffer(2% SDS, 2% sucrose, 0.01% bromophenol blue in 0.125M Tris-HCl(pH 6.8)를 넣고 12% polyacrylamide gel로 전기연동하였다. 전기연동이 끝난 gel은 1% gelatin이 함유된 12% polyacrylamide gel과 같이 2.5% Triton X-100용액에 침적하여 실온에서 20분간 처리하여 SDS를 제거하였다. 그 후 두 gel을 겹쳐서 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)완충용액에 침적시킨 다음 37°C 항온기에서 2시간 반응시키고, amido black(Sigma, USA)으로 염색하여 활성이 나타난 위치를 확인하였다.

### (3) 억제인자의 영향

정제된 효소활성에 억제인자가 미치는 영향을 관찰하기 위해 정제된 효소를 억제인자가 포함된 50mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그리고 기질인 azocasein을 75  $\mu$ l첨가하였다. 반응 혼합물을 37°C에서 2시간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 실험에 사용한 억제인자는 diisopropyl fluorophosphate (DFP, 10 mM), phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF, 5 mM), L-trans-epoxy-succinyl-leucyl-amido-(4-guanidino)-butane(E-64, 20  $\mu$  M), Leupeptin(200  $\mu$  M), Pepstatin A(0.1  $\mu$  M), N- $\alpha$

-p-tosyl-L-lysine-chloromethyl keton(TLCK, 200  $\mu$ M),  
 N-tosyl-L-phenyl-alanine chloromethyl ketone(TPCK, 200  $\mu$ M),  
 iodoacetic acid(50  $\mu$ M), 1, 10-phenanthroline(25mM),  
 Ethylenediaminetetracetic acid(EDTA, 10mM)이다. 억제인자는 모두  
 Sigma에서 구입하였다.

#### (4) 재조합효소활성에 미치는 최적 온도

효소활성의 최적 온도를 관찰하기 위해 azocasein을 기질로 이용하여  
 효소 반응액을 4 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C 및 80 $^{\circ}$ C 항온기에서 2시간 동안 기질과 각  
 각 반응시킨 다음 활성도를 측정하였다.

#### (5) 재조합효소활성에 미치는 pH 영향

효소활성의 최적 pH를 관찰하기 위해 완충용액의 pH를 일정한 간격  
 으로 변화시키면서 활성도를 측정하였는데, pH 4.0에서 5.0까지는 50 mM  
 sodium phosphate 완충용액, pH 7.5에서 8.5까지는 Tris-HCl완충용액 그  
 리고, pH 9.0에서 10.0까지는 50 mM glycine-NaOH완충용액을 각각 사용  
 하여 azocasein을 이용하여 활성도를 측정한 후 가장 높은 활성을 보인  
 pH를 최적 pH로 결정하였다.

#### (6) 기질 특이성

다양한 chromogenic peptides에 대한 정제된 효소의 기질 특이성을  
 관찰하였다. 기질로는 10 mM Gly-Pro-Leu  $\beta$ -Naphthylamide,  
 N  $\alpha$ -Benzyl-Arg-Gly-Phe-Phe- Leu  $\beta$ -Naphthylamide,



N-Succinyl-Gly-Gly-Phe p-Nitroanilide, N-Acetyl-Ile-Glu- Ala-Arg p-Nitroanilide, N-Acetyl-Ala-Ala-Pro-Met p-Nitroanilide, N-CBZ-Leu-Leu-Glu  $\beta$ -Naphthylamide, p-Gly-Phe-Leu p-Nitroanilide, N-Succinyl-Ala-Ala-Pro- Phe p-Nitroanilide, N-CBZ-Gly-Gly-Leu p-Nitroanilide 등을 사용하여 정제된 효소를 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 용해시킨 후, peptide기질을 최종농도가 100  $\mu$ M이 되도록 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 15분간 반응시킨 다음  $\beta$ -Naphthylamide는 340 nm, p-Nitroanilide는 400 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 활성도를 선정하였다.

#### (7) 열안정성

재조합 효소의 열안정성 관찰은 azocasein을 기질로 이용하여 실시하였다. 정제된 효소 10  $\mu$ l, Tris-HCl(pH 8.0)완충용액 100  $\mu$ l를 혼합하여 4 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C에서 2, 4, 16 및 24시간동안 반응시킨 후 5% azocasein용액 35  $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 잔 활성도를 측정하였다.

## 나. 제 2 세부과제

### 1. *N.caninum* tachyzoite의 야외주 순수분리

*Neospora*는 우리 나라를 비롯한 여러 나라에서 분리 보고가 있으나 혈청학적 검사를 통한 *Neospora*의 존재를 보고한 국가 수에 비하면 상당히 적은 국가에서만 분리에 성공하였다. 이렇듯 *Neospora*의 분리에 어려운 이유는 가검물을 시험관내에서 세포에 접종한 후 상당히 오랫동안 유지 관찰을 하여야만 하기 때문에 그 과정동안 오염 등의 문제로 인하여 실패할 확률이 높았기 때문이다. 그러나 마우스의 복강에 sarcoma cell과 가검물 유제를 섞어서 접종한 결과 *Neospora*를 분리할 수 있었다. 혈청학적(IFAT)으로 양성을 나타낸 모축의 유산태아 뇌와 척수를 유제로 만들고 sarcoma 180 세포와 섞어서 dexametason이 10일간 처리된 ICR 마우스의 복강에 접종하였다. 접종 후 4일부터 복수액에서 *Neospora* 원충을 확인할 수 있었으며 기존에 알려진 primer를 이용하여 PCR과 sequencing을 수행하였으며 Nc-Kr2로 명명하였다.

### 2. 네오스포라 대량 배양법 연구

네오스포라의 배양 및 공급을 위해 3가지 세포주를 이용하여 *N. caninum* tachyzoites의 증식 실험을 실시하였다. *N. caninum* tachyzoites의 증식 능력은 Vero cell 745.5%, HsF cell 663.6%, CAPE cell 672.7%로 나타났으며 증식기간은 6일, 2개월, 2주로 각각 나타나 증식능력 및 증식기간에 서 Vero cell이 가장 우수하였다. 여러 세포주들 가운데 선발된 Vero cell을 이용하여 flasks내에 약 70% monolayer를 형성하였을 때 *N. caninum*

tachyzoites를 매 3-4일 간격으로 계대배양을 한 후 분리 정제하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 공급하였다.

많은 양의 *N. caninum* tachyzoites 확보를 위하여 마우스와 sarcoma 180 cell을 이용한 배양이 시도되었다. Dexamethason( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 음수를 통해 10일간 처치된 ICR mice에 *N. caninum* tachyzoites( $2.5 \times 10^6$ )와 host cell로 sarcoma 180 세포를 첨가하여 복강내 주입한 후 4일째 마우스를 희생하여 복수액을 회수하였다. 회수된 복수액은 23G와 26G의 주사기를 이용, 차례로 back and forth 과정을 거쳐 sarcoma 180세포를 최대한 파괴한 후  $8\mu\text{m}$  membrane filter와  $3\mu\text{m}$  membrane filter를 이용하여 순수분리 하였다. 순수분리된 *N. caninum* tachyzoites를 2-4배의 srcoma 180 cells과 혼합하여 dexamethason( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 음수를 통해 10일간 처치된 ICR mice의 복강에 재접종을 하였다.

### 3. ELISA법을 이용한 네오스포라 진단 및 역학분석

*Neospora caninum*은 우리나라에서도 지역에 따라 다르지만 10~20%의 항체보유율과 유산태아로부터 원충의 분리가 보고된 바 있으며, 현행 진단법으로 IFA(간접형광항체반응법) test를 사용하고 있다. IFA의 장점은 소량의 진단항원(*Neospora caninum* tachyzoite)으로도 수행가능하지만, crude항원에 기인한 교차반응, 결과판독에 있어 주관성의 개입, 표준화의 어려움, 그리고 많은 양의 샘플을 검사하기에는 비실용적이라는 단점들이 있어 ELISA법을 개발하게 되었다. 검사혈청은 100배 희석하였으며, HRPO가 conjugate되어 있는 2차항체는 10,000배로 희석하고 substrate는 ABTS를 사용하였다. 표준양성혈청의 OD는 1.2정도, 표준음성혈청의 OD는 0.09정도로 고정하였으며, S/P(Sample/Positive) ratio가 0.5이상

일 경우 양성으로 판단하였다. 또한 기존의 상품화된 IDEXX *Neospora* ELISA kit와의 일치도(agreement)를 알아본 결과, *k-value*가 0.793으로써 높은 일치도를 보였다.

개발된 ELISA법을 이용하여 강원, 충북, 충남 지역 소재 목장을 대상으로 혈청을 수집하여 네오스포라 감염율을 조사하였다.

#### 4. 재조합 유전자의 중화능 실험.

##### 1) 항혈청 역가 측정

발현된 재조합단백질 SOD, DG1, DG2, SAG1 및 SAG2에 대한 polyclonal antibody 및 monoclonal antibody를 이용하여 중화능 실험을 실시하였다. polyclonal antibody생산을 위하여 각각의 재조합 단백질을 토끼 피하에 200 $\mu$ g/ml씩의 항원을 동량의 complete adjuvant와 혼합하여 1차 접종을 하였고, 2주 후에 incomplete adjuvant와 혼합하여 2차 접종하였다. 최종 접종 2주 후에 채혈 후 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. 각 항원에 대한 항혈청의 역가는 간접형광현미경법(IFA)을 통하여 확인하였다. monoclonal antibody를 이용한 중화능 시험을 hybridoma cell배양액을 사용하였다.

##### 2) 중화능 실험

각 재조합 단백질에 대한 역가측정에서 *Neospora* tachyzoite crude antigen보다 항체가가 높게 나온 재조합단백질 항체에 대한 중화능 시험을 측정하였다.

중화실험을 위하여 8 well Chamber slide에 Vero cell을 3시간 정도 배양하였다. 항혈청을 32배에서 256배까지 2진 희석한 후 *Neospora tachyzoites*를 37℃에서 1 시간동안 반응시켰다. Vero cell이 배양되고 있는 각 well에 항혈청과 반응된 *Neospora tachyzoites*를  $1 \times 10^4$ 씩 접종하고, 1시간 후에 새 배지로 교환하였다. 접종 3일 후에 Giemsa's stain으로 염색하여 감염된 세포 수를 확인하였다.

### 3) 재조합 다가 항원의 항체의 방어능 시험

재조합단백질들의 *N. caninum tachyzoites*의 공격에 대한 방어능 측정을 위하여 *N. caninum tachyzoites*에 감수성있는 gerbil에 DG1, SAG2, DG1-SAG2 및 *N. caninum tachyzoites crude* 항원을 complete Freund's adjuvant와 혼합하여 마리당 100 $\mu$ g씩 s.c로 접종하였다. 2주후 2차 접종을 하였고 다시 2주후에  $1 \times 10^8$  마리의 *N. caninum tachyzoites*로 공격접종을 하였다.

## 다. 제 3 세부과제

### 1. cDNA library의 제작

*N. caninum*의 poly(A) mRNA는 oligotex mRNA kit를 이용하여 원충으로부터 분리하였다. Double stranded cDNA는 ZAP-cDNA synthesis kit(Stratagene)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 합성하였다. 합성된 cDNA 100ng을 1 $\mu$ l의 UNI-Zap XR vector(Stratagene)에 T4 DNA ligase를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 ligation시킨 후 Gigapack II Gold packaging extract(Stratagene)를 이용하여 phage particles로 22 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 *in vitro* packaging을 실시하였다. 이를 대장균 SURE strain에 형질도입시켜 총  $1.38 \times 10^6$ 개의 clone을 얻었다.

### 2. Immunoscreening

제작된 cDNA library는 네오스포라 항혈청을 이용하여 immunoscreening을 실시하였다. 검색에 이용된 1차 항체는 국립수의과학 검역원으로 부터 분양받은 bovine serum을 BLOTTO에 1:100으로 희석하여 사용하였고, anti-bovine IgG(AP conjugate, Promega)를 BLOTTO에 1:7,500으로 희석하여 2차 항체로 사용하였다. Immunoscreening을 위한 nitrocellulose(N/C) filter 제작은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 숙주 세포 200 $\mu$ l당 1 $\mu$ l의 phage mixture를 혼합하고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 가볍게 흔들어 준 후 48 $^{\circ}$ C로 데워진 top agar를 200 $\mu$ l에 3ml씩 첨가하여 LB plate 위에 얇게 덮이도록 부어 주었다. 37 $^{\circ}$ C에서 4-6시간 정도 배양한 뒤 plaque이 보이기 시작하면 N/C filter paper(Portran BA 83, Schleichert

& Schuell)를 덮어 주고 filter와 agar 배지 위에 indian ink로 표시한 뒤 37°C에서 2-4시간 정도 배양을 하였다. 배양 후 filter를 분리하여 Tris buffered saline(TBS)으로 5분씩 3회 세척하고 BLOTTO 용액에서 1시간 동안 blocking하였다. 이를 TBS로 3분씩 3회 세척하고 1차 항체를 넣어 16시간 동안 반응시켰다. 다시 TBS로 5분씩 3회 세척하고 2차 항체를 넣어 2-4시간 반응시켰다. TBS로 5분씩 3회 세척한 다음 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate(BCIP)와 nitro blue tetrazolium(NBT) 기질을 넣어 반응시켰다. 반응이 끝나면 증류수로 세척하고 0.5M EDTA로 반응을 정지시킨 뒤 양성반응을 보이는 plaque들을 확인하였다.

### 3. 염기서열 분석

Immunoscreening을 통하여 얻은 양성 plaque는 멸균된 팁 끝으로 찍어서 5% chloroform을 포함한 SM 완충액 200 $\mu$ l에 부유시킨 후 이를 insert를 확인하기 위한 주형으로 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR을 실시한 후 PCR 산물은 1% agarose gel상에 전기영동하여 확인한 후 염기서열을 분석하였다. 확인된 염기서열을 Genbank에 등록된 *N. caninum*의 gene data와 비교하였다.

### 4. *N. caninum*의 다가항원 클로닝

#### 1) SAG1, SAG2 & NCDG1, NCDG2의 유전자 클로닝

*N. caninum*의 SAG1(29kDa)과 SAG2(35kDa)의 유전자를 클로닝하기 위한 일환으로, 확인된 SAG 유전자의 염기서열을 근거로 하여 primers를

제작하였다. 제작된 primers를 이용하여 PCR을 실시하였으며 반응이 끝난 후 PCR 반응 산물은 1% agarose gel에 전기영동을 실시하여 PCR 산물을 확인하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 Qiaquick gel extraction kit™(Qiagen)를 이용하여 정제하였다. 분리된 PCR 산물은 pCR 2.1 벡터에 ligation한 후 *E. coli* INV  $\alpha$ F competent cell에 형질전환시켰다. 형질전환된 cell은 ampicillin(100 ug/ml)과 X-gal(40 ug/ml)을 포함한 LB agar 배지에 도말하여 37°C 항온기에서 하룻밤 배양하였다. 형질전환 여부를 확인하기 위해 LB broth에서 *E. coli*를 진탕배양한 후 QIAprep spin miniprep kit™(Qiagen)를 이용하여 plasmid를 분리하였고, 제한효소를 처리하여 insert의 유무를 확인하였다. 확인된 insert는 Amersham automatic sequencer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

*N. caninum*의 NCDG1과 NCDG2의 유전자를 클로닝하기 위한 일환으로, 확인된 dense granule proteine 유전자의 염기서열을 근거로 하여 primers를 제작하였다. 제작된 primers를 이용하여 PCR을 실시하였으며 반응이 끝난 후 PCR 반응 산물은 1% agarose gel에 전기영동을 실시하여 PCR 산물을 확인하였다. 증폭이 확인된 PCR 산물은 Qiaquick gel extraction kit™(Qiagen)를 이용하여 정제하였다. 분리된 PCR 산물은 pCR 2.1 벡터에 ligation한 후 *E. coli* INV  $\alpha$ F competent cell에 형질전환시켰다. 형질전환된 cell은 ampicillin(100 ug/ml)과 X-gal(40 ug/ml)을 포함한 LB agar 배지에 도말하여 37°C 항온기에서 하룻밤 배양하였다. 형질전환 여부를 확인하기 위해 LB broth에서 *E. coli*를 진탕배양한 후 QIAprep spin miniprep kit™(Qiagen)를 이용하여 plasmid를 분리하였고, 제한효소를 처리하여 insert의 유무를 확인하였다. 확인된 insert는



Amersham automatic sequencer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

## 2) 염기서열 분석

Immunoscreening을 통하여 얻은 양성 plaque는 멸균된 팁 끝으로 찍어서 5% chloroform을 포함한 SM 완충액 200 $\mu$ l에 부유시킨 후 insert를 확인하기 위한 주형으로 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR을 실시한 후 PCR 산물은 1% agarose gel상에 전기영동하여 확인한 후 염기서열을 분석하였다. 확인된 염기서열을 Genbank에 등록된 *N. caninum*의 gene data와 비교하였다.

## 3) 발현

*N. caninum* 유전자는 발현 vector인 pGEX-4T-2(Pharmacia)와 ligation하였다. Ligation된 혼합용액 10 $\mu$ l를 100 $\mu$ l competent cell BL21에 첨가하고 얼음에 30분간 방치한 후 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 열충격을 주었다. 여기에 500 $\mu$ l의 SOC medium을 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 배양하였다. 배양된 이들 용액을 LB/ampicillin(100 $\mu$ g/ml) agar plate에 일정량씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 배양하였다. 배양된 집락들을 선별하여 3ml의 LB/ampicillin(100 $\mu$ g/ml) 배지에 배양하여 OD<sub>600</sub>에서 흡광도가 0.6이 될 때까지 배양한 후 이들 중 1ml씩을 취하여 냉장보관하고 나머지 용액에 iso  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 1mM이 될 때까지 첨가한 후 다시 30 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양하였다. 배양 후 원심분리(13,000rpm, 10min)를 실시하여 상층액을 제거하고 SDS-PAGE용 sample buffer를 동량첨가한 후 12.5% gel에서 전기영동하여 예상된 용합단백질이 나오는 집락을 확인하

었다.

*N. caninum*의 NCDG1(700bp)과 NCDG2(550bp) 유전자는 발현vector인 pMal (Pharmacia)와 ligation시켜 형질전환된 *E.coli* BL21을 ampicillin( $100\ \mu\text{g/ml}$ )이 첨가된 LB배지에 접종하고  $37^\circ\text{C}$ 에서 진탕배양하여 흡광도 600 nm에서 O.D값이 0.6이 되도록 배양한 후 IPTG를 최종농도가 0.6 mM이 되도록 첨가하여 발현을 유도하였다. 재조합 단백질을 정제하기 위하여 IPTG로 유도시킨 10ml의 배양 균주를 침전시켜 원심분리한 상층액은 완충용액으로 평형시킨 glutathion Sepharose 4B column을 통과시킨 후 PBS로 흡착되지 않은 단백질을 완전히 제거하고 elution buffer( $10\text{mM}$  glutathione in  $50\text{mM}$  Tris-HCl pH 8.0)로 흡착된 단백질을 용출, 정제하였다.

## 5. 단클론항체(Monoclonal antibody)생성

### 1) 항원의 면역

마우스 항체를 생산하는 형질세포를 얻기 위하여 생후 6주된 BALB/c 마우스의 복강에 NCDG 1 & 2 와 SAG 1 & SRS 2 항원을 1회의 면역단백질량이  $100\ \mu\text{g}$ 이 되도록 3회에 걸쳐 면역하였다. 1차 면역은 항원을 같은 양의 Freund's complete adjuvant(FCA)로, 잘 섞어  $0.4\ \mu\text{l}$ (항원단백량  $100\ \mu\text{g}$ )를 마우스 복강내에서 주사하고 6주후에 같은 방법으로 2차 면역을 실시하였다. 4주후에 폐흡충 분비배설항원에 같은양의 Freund's incomplete adjuvant를 섞어서 3차 면역을 실시하였고, 3주후에 항원  $0.2\text{ml}$ ( $100\ \mu\text{g}$ )를 정맥내에 주사하여 3일 후에 융합실험을 실시하였다.

## 2) 융합실험

각 항원으로 면역된 BALB/c 마우스의 경동맥에서 혈액을 채취하고 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 SF DMEM으로 3번 세척하면서 비장에 붙은 조직들을 제거한 후 비장세포를 취했다. 원심관내에서 5분간 방치하여 세포부유 상층액을 다른 원심관으로 옮겨서 1,000rpm에서 10분간 원심하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하여 실험관 내의 세포침사를 잘 흔들어주고 적혈구 제거시 비장세포의 손상을 줄이고 또 세포 적응을 위하여 2ml의 FBS를 가한 후 동일조건으로 원심 분리하여 상층액을 버리고, 적혈구를 용혈시키기 위하여 2ml의 0.83% HEPES-NH<sub>4</sub>Cl 용액을 첨가하여 2분간 흔들고 2ml의 FBS를 넣어 원심 분리하였다. 이어서 2회 더 SF DMEM으로 원심하였다. 세포 융합에 사용한 마우스 종양세포는 Sp2/OAg14를 사용하였다. Sp2/O종양세포는 FBS DMEM(15% FBS ;penicilin 100U/ml;streptomycin 100  $\mu$ g/ml;HEPES 2mM)에서 계대 배양하였으며 세포 융합실시 7일 전에  $6.6 \times 10^{-5}$ M 8-azaguanine을 첨가하여 배양하였다. 세포융합과정은 Kohler와 Milstein (1978)의 방법에 따랐으며 세포융합시에 Sp2/O cell을 SF DMEM으로 원심 분리하여 FBS를 제거하였다. 마우스 비장세포와 종양세포를 각각  $1.4 \times 10^8$ 개와  $6.1 \times 10^7$ 를 섞어 SF DMEM으로 3회 원심 세척한 후 최종 침전세포에 polyethyleneglycol 3,500 1ml을 1분에 걸쳐 첨가하고 여기에 SF DMEM 1ml과 20ml를 각각 1분과 4분간 흔들면서 넣어주고 원심 분리하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 융합세포들을 20% FBS DMEM 40ml에 부유시켜 96 well tissue culture plate에 200  $\mu$ l/well씩 분주하고 5% CO<sub>2</sub>와 과포화 습도가 유지된 37°C incubator에서 배양하였다.

### 3) 스크리닝 , 클로닝 및 항체분리

융합된 세포만을 선택배양하기 위하여 DMEM에 HAT를 첨가한 액 (HAT FBS DMEM)  $100\mu\text{l}/\text{well}$ 씩을 융합 1일, 2일, 3일, 5일, 6일 까지 갈아주고 7일부터는 FBS DMEM에 HT를 첨가한 액  $10\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 갈아주면서 융합세포의 증식여부를 현미경 관찰하였다. HT배지로 선택배양을 시작한지 5~7일 사이에 배양액을 거두어 항원에 대한 항체를 분비하는 well을 ELISA법으로 검색하였다. ELISA검사 결과, 항체 분비가 확인되면 해당 well의 일부는 HT FBS DMEM으로 융합세포를 제한 희석하여 각 well에  $200\mu\text{l}$ 씩 분주하여 7~10일간 배양하면서 융합세포의 증식여부를 현미경 관찰하였으며 나머지 well의 항체반응 세포들은 액체질소탱크에 보관하여 다음 단계 클로닝에 대비하였다. 배양 3~5일 사이에 한 세포로부터 증식하여 세포집락을 형성한 well을 40배로 검경하여 세포집락이 well의 반을 형성할 때 다시 항원에 대한 항체분비를 ELISA로 결정하였다. 단클론 항체를 정제하기 위하여 Protein G Sepharose 4 Fast Flow(Pharmacia, Sweden) gel을 이용한 affinity chromatography를 실시하였다.

## 2절. 연구결과

### 가. 제 1세부과제 결과

#### 1. 네오스포라 특이항원의 탐색

네오스포라 특이 항원의 탐색을 위해 *N. caninum* lysate와 네오스포라 항혈청을 이용하여 Western blot을 실시하였다. Western blot 결과 분자량 약 80, 67, 45, 35 및 29 kDa의 항원이 특이적으로 인식되었다(Fig. 1).

#### 2. 네오스포라 Fe-SOD cDNA fragment의 염기서열 분석

*N. caninum*의 cDNA를 주형으로 하여 제작한 degenerate oligonucleotide primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과, 증폭된 PCR 반응 산물의 크기는 약 600bp 이었다. 이를 gel에서 정제하고 TA vector에 클로닝한 후 *E. coli*에 형질 전환하고 배양하고 PCR 반응 산물이 삽입된 균락을 선별하였다. 선별된 균락을 LB 액체배지에 배양하고 plasmid를 분리한 다음 제한효소인 *Bam*HI과 *Xho*I으로 소화시킨 후 전기영동을 실시하여 *N. caninum* Fe-SOD의 gene fragment를 정제하였다. 정제된 gene fragment를 <sup>32</sup>P로 labeling한 다음 이를 probe로 이용하여 *N. caninum*의 cDNA library를 colony hybridization 방법을 이용하여 screening하였다. 그 결과 2개의 양성 colony를 선별할 수 있었으며 이를 배양하여 plasmid를 정제하고 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 결과, 606bp로 구성된 열린 해독틀(open reading frame)을 가지고 있는 Fe-SOD유전자의 염기서열을 확인할 수 있었으며 예상되는 아미노산은

202개이었다(Fig. 2). Fe-SOD의 N말단과 C말단에 해당하는 염기서열을 근거로 하여 primers(NcSODF와 NcSODR)를 제작하여 Fe-SOD유전자의 클로닝을 실시하였다. 클로닝된 *N. caninum* Fe-SOD 유전자에는 금속이온의 결합에 관여하는 것으로 생각되어지는 4개의 아미노산, His<sup>25</sup>, His<sup>94</sup>, Arg<sup>173</sup> 및 His<sup>177</sup>이 모두 존재하였다. 또한, Fe-SOD와 Mn-SOD의 구분에 지표가 되는 5개의 아미노산, Ala<sup>89</sup>, Gln<sup>90</sup>, Tyr<sup>97</sup>, Ala<sup>158</sup> 및 Gly<sup>159</sup>도 모두 존재함을 알 수 있었다. 기존에 보고된 타종의 Fe-SOD의 아미노산 서열과 *N. caninum* Fe-SOD의 아미노산 서열을 비교해 본 결과(Fig. 3), *Toxoplasma gondii* Fe-SOD와 90%로 가장 높은

A B



**Fig. 1. Western blot analysis of *N. caninum*.** Lane A, Vero cell lysate control; Lane B, *N. caninum* lysate.

상동성을 보였으며, *Plasmodium falciparum* Fe-SOD와 58.8%, *Trypanosoma cruzi* Fe-SOD와 49.5%의 상동성을 보였다(Table 2).

### 3. *E. coli* 에서의 융합단백질 발현

*E. coli* 내에서 TA 클로닝하여 얻은 플라스미드를 *Bam*HI과 *Xho*I으로 절단하여 insert를 확인하였으며, 이를 agarose gel에서 정제하여 역시 *Bam*HI과 *Xho*I으로 절단하고 agarose gel에서 정제한 pGEX-4T-2 벡터에 클로닝하였다. 재조합 여부는 플라스미드를 *Bam*HI과 *Xho*I으로 절단하여 3.9kb의 벡터와 606bp의 insert를 분리함으로써 확인하였다(Fig. 4). 정확한 insert DNA의 크기가 확인된 플라스미드는 *E. coli* BL21에 형질 전환하였으며 1mM IPTG를 이용하여 단백질 발현을 유도하였다. 발현된 단백질은 SDS-PAGE를 실시하여 확인하였다(Fig. 6). 발현된 GST 융합 단백질의 분자량은 약 50kDa이었으며 GST를 제거한 발현 단백질의 분자량은 약 24kDa이었다.

M	V	F	T	L	P	P	L	P	Y	A	Y	D	A	L	15
atg	gta	ttc	act	tta	ccc	ccg	ctc	cca	tat	gcg	tat	gac	gcg	ctt	45
											+				
A	P	H	I	S	A	D	T	L	Q	F	H	H	G	K	30
gct	ccc	cat	atc	agc	gcg	gac	aca	ctt	cag	ttt	cac	cat	ggc	aag	90
H	H	A	G	Y	V	A	K	L	N	G	F	I	E	G	45
cac	cat	gcg	ggc	tac	gtc	gct	aag	ttg	aac	ggc	ttc	att	gaa	gga	135
T	A	F	A	G	K	T	L	E	E	V	V	R	S	S	60
acc	gct	ttt	gcg	gga	aag	act	ctc	gaa	gag	gtg	gtc	cgc	tcg	tct	180
T	G	A	I	F	N	N	A	A	Q	V	W	L	H	T	75
act	gga	gca	att	ttt	aat	aat	gca	gct	caa	gtg	tgg	aac	cac	act	225
F	Y	F	N	S	M	K	P	P	T	A	G	G	G	G	90
ttc	tac	ttc	aac	agc	atg	aag	ccg	cca	aca	gca	ggt	ggt	ggt	gga	270
K	P	T	G	R	L	L	D	E	I	N	K	E	F	T	105
aag	cca	act	ggg	aga	ctt	ctg	gac	gag	ata	aac	aag	gaa	ttc	acg	315
S	V	E	K	F	K	E	E	F	S	K	V	A	A	G	120
tct	ggt	gag	aag	ttc	aag	gaa	gag	ttt	tcg	aag	ggt	gcc	gct	ggc	360
H	F	G	S	G	W	A	W	L	V	W	D	K	Q	G	135
cac	ttt	ggc	tca	gga	tgg	gca	tgg	ctt	gtc	tgg	gac	aaa	cag	ggc	405
K	K	V	G	I	E	Q	T	H	D	A	G	T	P	I	150
aag	aaa	ggt	gac	att	gag	cag	acg	cat	gat	gcg	tgc	acg	ccg	ata	450
											+				
T	E	Q	M	K	V	P	L	L	C	C	D	V	W	E	165
acg	gag	cag	atg	aag	gtg	ccg	ctt	ctt	tgc	tgt	gat	ggt	tgg	gag	495
H	A	Y	Y	L	D	R	K	N	D	R	P	A	Y	I	180
cat	gcc	tac	tat	ctg	gac	aga	aag	aac	gac	aga	cca	gcg	tac	atc	540
K	A	W	W	E	V	V	N	W	D	F	A	S	K	N	195
aaa	gca	tgg	tgg	gag	ggt	ggt	aac	tgg	gac	ttc	gcc	agc	aag	aac	585
L	D	A	L	K	N	D									202
ttg	gac	aat	gcc	ttg	aaa	tga									606

**Fig. 2. Nucleotide and deduced and acid sequence of *N. caninum* Fe-SOD gene.** The putative metal binding residues are conserved in Fe-SODs marked by pluses on top. Residues which are primary candidates for distinguishing Fe-SODs from Mn-SODs are indicated by asterisks on the top.



```

N. caninum M V F T L P P L P Y A Y D A L - A P H - I S A D T L Q F H H G K H H A G Y V A K L N G F I - E G 45
T. gondii M V F T L P P L P Y A H D A L - A P H - I S S E T L Q F H H G K H H A G Y V A K L N G F I - E G 45
P. falciparum M V I T L P K L K Y A L N A L - S P H - I S E E T L N F H Y N K H H A G Y V N K L N T L I - R D 45
P. malariae M V I T L P K L K Y A L N A L - S P H - I S E E T L N F H Y N K H H A G Y V N K L N T L I - K D 45
P. ovale M V I T L P K L K Y A L N A L - S P H - I S E E T L N F H Y N K H H A G Y V N K L N T L I - K D 45
P. vivax M V I T L P K L K Y A L N A L - S P H - I S E E T L N F H Y N K H H A G Y V N K L N T L I - K D 45
E. histolytica M S F Q L P Q L P Y A Y N A L - E P H - I S K E T L E F H H D K H H A T Y V N K L N G L V - K G 45
T. cruzi M V F S I P P L P W G Y D G L A A K G - L S K Q Q V T L H Y D K H H Q G Y V T R K L N A A A Q T N 47
T. vaginalis M F T M E H P - - - A Y L K T G L P G F L T Q H A V E V H V T I K H H Q S Y I D T A N K L I - V G 44

N. caninum T A F A G K T L E E V V - R S S T G A I F N N A A Q V W N H T F Y F N S M K P P T A - G G G G K 91
T. gondii T A F A G K T L E E V I - R T S T G A I F N N A A Q V W N H T F Y F S S M K P P M S - G G G G E 91
P. falciparum T P F A E K S L L D I V - K E S S G A I F N N A A Q I W N H T F Y W D S M - - - G P D C G G E 88
P. malariae T P F A E K S L L D I V - K E S S G A I F N N A A Q I W N H T F Y W D S M - - - G P D C G G E 88
P. ovale T P F A E K S L L D I V - K E S S G A I F N N A A Q I W N H T F Y W D S M - - - G P D C G G E 88
P. vivax T P F A E K S L L D I V - K E S S G A I F N N A A Q I W N H T F Y W D S M - - - G P D C G G E 88
E. histolytica T E Q E H K T L E E L I K Q K P T Q A I Y N N A A Q A W N H A F Y W K C M - - - C - G C G V K 88
T. cruzi S A L A T K S I E E I I - R T E K G F I F N L A A Q I F N H T F Y W E S M - - - C - P N G G 89
T. vaginalis S G F E G K F I E E I I - Q K A Q G P L F N N V A Q H F N H S P F W K S L - - - S - A E K V A 86

N. caninum P T G - R L L D E I N K E F T S V E K F K E E F S K V A A G H F G S G - - W A - W L - V W D K Q 13
T. gondii P T G - R L L D E I K K E F T S V E N F K D E F S K V A A G H F G S G - - W A - W L - V W D K Q 13
P. falciparum P H G - E I K E K I Q E D F G S F N N F K E Q F S N I L C G H F G S G - - W G - W L A L - - N N 13
P. malariae P H G - G I K E K I Q E D F G S F N N F K E Q F S N I L C G H F G S G - - W G - W L A L - - N N 13
P. ovale P H G - E I K E K I Q E D F G S F N N F K E Q F S N I L C G H F G S G - - W G - W S A L - - N N 13
P. vivax P H G - E I K E K I Q E D F G S F N N F K E Q F S N I L C G H F G S G - - W G - W L A L - - N N 13
E. histolytica P S E - Q L I A K L T A A F G G L E E F K K K F T E K A V G H F G S G - - W C - W L - V - E H 12
T. cruzi E P T G K L A D E I N A S F G S F A K F K E E F T N V A V G H F G C G L A W P - V K - D - T N 13
T. vaginalis V P A - H V A E L L K K N F G S V E K F Q E T F T A K A S T V F G S G - - W A Y L Y - K - - T K 12

N. caninum G K K V G I E Q T H D A W T P I T E - Q M K V P L L C C D V W E H A Y Y L D R K N D R P A Y I R 18
T. gondii G K K V G I E Q T H D A G T P I T E - P M K V P L L C C D V W E H A Y Y L D R K N D R P A Y I K 18
P. falciparum N N K L V I L Q T H D A G N P I K D - N T G I P I L T C D I W E H A Y Y I D Y R N D R A S Y V K 17
P. malariae N N K L V I L Q T H D A G N P I K D - N T G I P I L T C D I W E H A Y Y I D Y R N D R A S Y V K 17
P. ovale N N K L V I L Q T H D A G N P I K D - N T G I P I L T C D I W E H A Y Y I D Y R N D R A S Y V K 17
P. vivax N N K L V I L Q T H D A G N P I K D - N T G I P I L T C D I W E H A Y Y I D Y R N D R A S Y V K 17
E. histolytica G K L E I I D T H D A V N P M T N - G M K - P L L T C D V W E H A Y Y I D T R N N R A A Y L E 17
T. cruzi S G K L K V Y Q T H D A G C P L T E P N L K - P L L T C D V W E H A Y Y V D Y K N D L A G Y V 18
T. vaginalis D G K L E I T G Q Y S N A A N P V K D - G L T - P I L T V D T W E H A W Y I D Y E N R K A E Y F R 17

N. caninum A W W E V V N W D F A S K N - - - - L D N A L - K 20
T. gondii A W W N V V N W D F A S K N - - - - L E N A L - K 20
P. falciparum A W W N L V N W N F A N E N - - - - L K K A M K K 19
P. malariae A W W N L V N W N F A N E N - - - - L K K A M Q K 19
P. ovale A W W N L V N W N F A N E N - - - - L K K A M Q K 19
P. vivax A W W N L V N W N F A N E N - - - - L K K A M Q K 19
E. histolytica W W N V V N W K F V E E Q - - - - L 19
T. cruzi A F W N V V N W K N V E R Q - - - - L 19
T. vaginalis N Y W N H V N W N F V E Q R L K A A G L 19

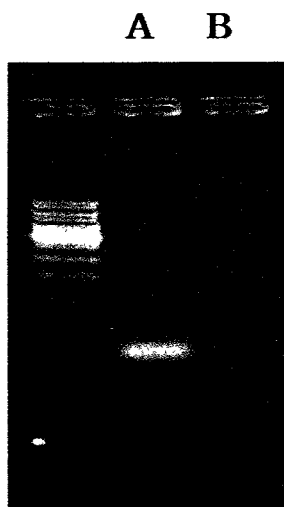
```

Decoration ': Box residues that match the Consensus exactly.)

**Fig 3. Alignment of the deduced amino acid sequence of Fe-SOD of *N. caninum* with those of other known parasitic protozoa Fe-SODs. Gene are introduced to maximize alignment.**

**Table 2. Comparison of the deduced amino acid sequence of Fe-SOD from *N. caninum* with those of the others known Fe-SODs**

Species	Homology(%)
<i>Toxoplasma gondii</i> Fe-SOD	92.1
<i>Plasmodium falciparum</i> Fe-SOD	57.1
<i>Plasmodium vivax</i> Fe-SOD	56.6
<i>Plasmodium malariae</i> Fe-SOD	56.8
<i>Plasmodium ovale</i> Fe-SOD	52.6
<i>Entamoeba histolytica</i> Fe-SOD	36.9
<i>Trypanosoma cruzi</i> Fe-SOD B	
<i>Trichomonas vaginalis</i> Fe-SOD	



**Fig. 4. Analysis of Fe-SOD gene amplified by the PCR using Fe-SOD primers with cDNA from *N. caninum*. Lane A, 1kb DNA ladder; Lane B, amplified Fe-SOD PCR products; and Lane C, negative control.**

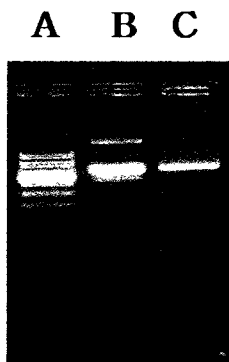


Fig. 5. Gel electrophoresis of DNA fragments digested by *Bam*HI and *Xho*I for identification of pGEX-4T-2 expression vector containing SOD gene fragment. Lane A, 1kb DNA ladder; Lane B, pGEX-4T-2 only; and Lane C, recombinant plasmid containing Fe-SOD PCR products.

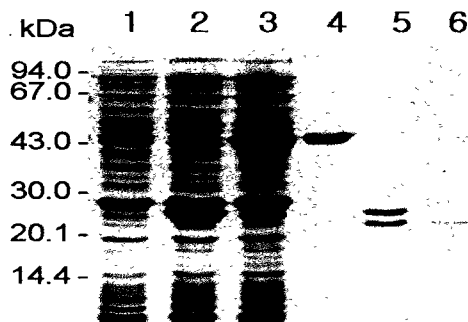


Fig 6. Analysis of expression and purification of *N. caninum* recombinant Fe-SOD. Lane 1: uninduced *E. coli* lysate; Lane 2: IPTG-induced *E. coli* lysate (pGEX-4T-2); Lane 3: IPTG-induced *E. coli* lysate (pGEX-4T-2/Fe-SOD); Lane 4: purified GST/Fe-SOD fusion protein(50kDa); Lane 5: GST/Fe-SOD fusion protein after treatment of thrombin (26kDa); Lane 6: purified recombinant Fe-SOD of *N. caninum*.(23kDa).

#### 4. 재조합 Fe-SOD 의 생화학적 특성

##### 1) 발현 단백질의 활성에 미치는 억제인자 (inhibitor)의 효과

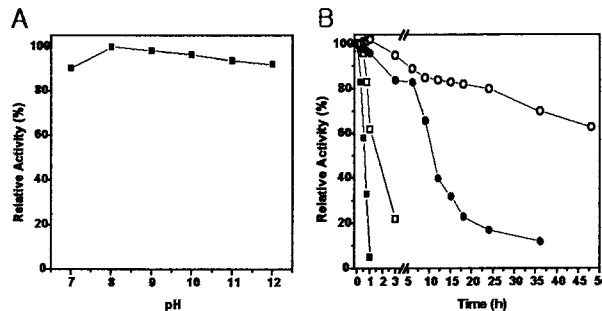
정제된 SOD 효소가 함유하고 있는 금속이온의 종류를 확인하기 위해 SOD 활성에 azide, cyanide, hydrogen peroxide가 미치는 영향을 관찰하였다. 정제된 효소의 활성은 정제된 SOD의 활성도를 100%로 하여, azide에서 각각 101.60%, 98.39%, cyanide에서는 94.35%, 89.90%로 활성이 억제되지 않았으나, hydrogen peroxide에서는 각각 53.22%, 34.67%로 활성이 크게 억제됨을 알 수 있었다. 그 결과, *N. caninum*은 Fe이온을 함유하는 Fe-SOD임을 확인하였다(Table 3 )

##### 2) 효소활성에 대한 pH의 영향

정제된 SOD의 활성에 미치는 pH의 영향을 관찰하기 위해 완충 용액의 pH를 변화시켜 활성실험을 실시한 결과, pH 7.0에서 pH 12.0까지는 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었지만, pH 8.0에서 최고의 활성을 나타냄을 관찰할 수 있었다 (Fig. 7A). 정제된 효소의 열 안정성을 측정한 결과, 열에 대해 안정된 양상을 나타내었다. 즉 70℃에서 1시간까지 약 80% 이상의 활성을 유지함을 알 수 있었다. 그러나, 그 이후에는 활성이 급격히 저하되어 100℃에서는 활성이 급속히 저하되었고, 1시간 이후에는 약 98%의 활성이 소실되었다(Fig. 7B).

**Table 3. Sensitivity of the *N.caninum* SOD to various inhibitors**

Inhibitor(Concn)	Inhibition rate(%)
Control	100.0
KCN (5mM)	94.4
(10mM)	89.9
NaN <sub>3</sub> (5mM)	101.6
(10mM)	98.4
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5mM)	53.2
(10mM)	34.7



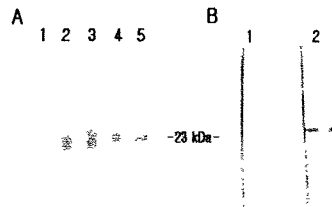
**Fig 7. Characterization of expressed Fe-SOD of *N. caninum*. (A) Effect of pH on enzyme activity.** SOD activity was assayed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 50 mM Tris-HCl buffers (pH 8.0 to 9.0) and 50 mM glycine-NaOH buffers (pH 10.0 to 12.0). Maximal activity was shown as 100%. (B) Thermal stability of enzyme. The purified enzyme was incubated at various temperatures for indicated times and then residual enzyme activities were measured. Maximal activity was shown as 100%. 37°C (○), 50°C (●), 70°C (□) and 100°C (■).

### 3) 등전점

정제된 효소의 등전점(isoelectric point; pI)을 isoelectric focusing 방법으로 측정한 결과, 재조합 Fe-SOD 의 등전점은 pI 7.1으로 중성 단백질이었다.

### 4) 항원성 관찰

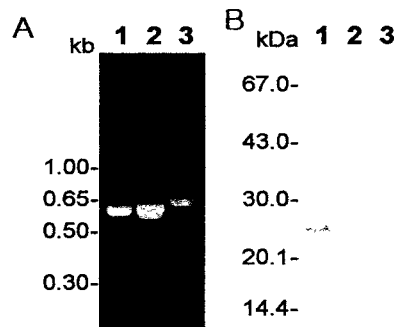
발현된 재조합 단백질의 항원성을 관찰하기 위하여 *N. caninum* 에 감염된 소혈청 과 음성 소혈청을 western blotting 한 결과, 양성 소혈청에서 강한 항원성을 보였으나 음성 소혈청에서는 반응이 보이지 않았다 (Fig. 8A). 재조합 Fe-SOD 와 *N. caninum*의 crude extract로 SDS-PAGE를 실시하여 제조된 anti-SOD 항체와 western blot를 실시한 결과 23 kDa 위치에 band가 관찰되어 발현된 재조합 단백질이 *N. caninum* 의 Fe-SOD 임을 확인할 수 있었다. 또한 제조된 anti-SOD 항체가 *N. caninum* Fe-SOD 를 검출할 수 있음을 확인하였다(Fig. 8B).



**Fig. 8. Western blot analysis of purified enzyme with parasite-infected cattle sera and antigenicity with *Neospora caninum* crude extracts and anti-Fe-SOD monoclonal antibody.** (A) 12.5% polyacrylamide SDS-PAGE and electrophoresis transfer of purified Fe-SOD onto nitrocellulose membranes. Lane 1: Normal serum; Lane 2~5: Cattle serum of infected *Neospora caninum*. (B) Western blot. Lane 1: *N. caninum* crude extracts; Lane 2 : purified recombinant Fe-SOD.

### 5) Stage-specific expression

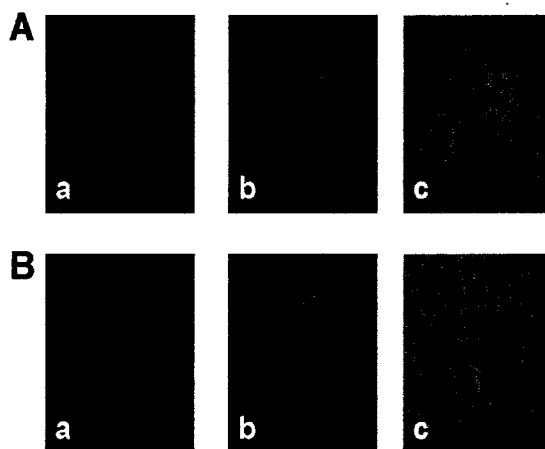
RT-PCR 분석결과 Fe-SOD 는 parasite stage에서 모두 증폭되었고 (Fig. 10), SOD specific primers로 증폭시킨 genomic DNA는 약 650bp 크기로 나타났다. 또한 *N. caninum* 의 Fe-SOD 발현은 재조합 단백질에 대한 혈청을 사용하여 immunoblot을 실시한 결과, RT-PCR 분석과 일치함을 보임으로 Fe-SOD는 tachyzoites와 bradyzoites에 모두에서 존재함을 알 수 있었다(Fig. 9).



**Fig. 9. Expression of Fe-SOD in two developmental stages of *N. caninum*.** (A) RT-PCR. Total RNAs were purified from bradyzoites and tachyzoites and the mRNA (20 ng) reverse-transcribed into cDNA, respectively. Fe-SOD gene was amplified from cDNA with Fe-SOD specific primers. Equal amounts of PCR mixtures were separated on agarose gel and stained with ethidium bromide. lane 1: bradyzoites cDNA; lane 2: tachyzoites cDNA; lane 3: genomic DNA. Molecular weight markers (kb) are shown on the left side of the figure (B) Immunoblot. Equal amounts of total proteins (10 g) from bradyzoites and tachyzoites were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with polyclonal antibodies raised against recombinant protein. lane 1: purified recombinant Fe-SOD; lane 2: bradyzoites; lane 3: tachyzoites. Molecular weight markers (kDa) are shown on the left side of the figure.

#### 6) *N. caninum*의 Fe-SOD의 분포 위치

제조된 anti-SOD 항체를 이용하여 *N. caninum* 내에서의 Fe-SOD 의 분포 양상을 확인하고자 간접 면역형광법을 실시하였다. 감염된 vero cell 상에서의 Intracellular 와 extracellular tachyzoites 모두 immunofluorescence staining 한 결과 SOD 는 tachyzoites의 entire surface에 분포함을 확인할 수 있었다(Fig. 10).



**Fig. 10. Indirect immunofluorescence staining of *N. caninum* tachyzoites.** (A) Surface staining. (B) Intracellular staining Fe-SOD was stained using affinity-purified anti-Fe-SOD antibodies followed by FITC-conjugated anti-rabbit- antibody (a). The entire parasite was stained with anti-*N. caninum* antibody followed by TRITC-conjugated anti-mouse antibody(b). Phase contrast microscope (c).



## 5. Proteinase의 생화학적 특성분석

### 1) 네오스포라 proteinase cDNA fragment의 염기서열 분석

*N. caninum*의 cDNA를 주형으로 하여 제작한 oligonucleotide primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과, 증폭된 PCR반응산물의 크기는 serine proteinase 1의 크기는 2,598bp와 serine proteinase 2의 크기는 1,882 bp이었다(Fig 11 a, b). 이를 gel에서 정제하고 TA vector에 클로닝한 후 *E.coli*에 형질 전환하고 배양하고 PCR반응 산물이 삽입된 균락을 선별하였다. 선별된 균락을 LB액체배지에 배양하고 plasmid를 분리하여, 제한효소인 BamH I 과 EcoR I 으로 처리한 후 insert를 확인했고, *E. coli* BL21에 형질전환하여 1 mM IPTG를 이용하여 단백질 발현을 유도하였다. 발현된 단백질은 SDS-PAGE 및 western blot을 실시하여 확인한 결과 발현된 GST 융합단백질의 분자량은 약 90kDa이었고, GST를 제거한 발현 단백질의 분자량은 약 63 kDa이었다. 발현된 재조합유전자에 대한 산물을 정제하여 이를 분자생물학적 특성 연구를 실시하였고, 네오스포라증에 대한 pathogenesis에 미치는 영향을 간접적 실험을 실시하였고, 수의과학검역원에서 동물실험을 실시하였다.



**Fig 11.** Gel electrophoresis of DNA fragments digested by BamH I and EcoR I for identification of recombinant plasmid containing serine proteinase 1 & 2 gene fragment. lane M : 1kb ladder; lane A: a recombinant plasmid containing serine proteinase 1(pro1); lane B: pro1 fragments digested by restriction enzyme (EcoR I/BamH I ;arrow a), lane C: recombinant plasmid containing pro2; lane D: pro2 fragments digested by restriction enzyme(EcoR I/BamH I ;arrow b).

## 2) *N. caninum* 단백질분해효소의 발현

*N. caninum* serine proteinase 유전자의 열린해독틀 (open reading frame)의 N 말단과 C 말단에 각각 *Bam*H I 과 *Xho* I 의 제한효소 인식부위를 첨가한 primer를 제작하고 이를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응 후 PCR 반응 산물은 TA 클로닝을 하였다. 집락들을 선별한 후 플라스미드를 정제하여 *Bam*H I 과 *Xho* I 제한효소로 절단한 후, 전기 영동을 실시하여 insert의 유무를 확인하였다. *Bam*H I 과 *Xho* I 제한효소로 절단하여 얻은 네오스포라 serine proteinase 유전자를 발현벡터인

pGEX-4T-2 (Pharmacia)에 삽입한 후 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 이용하여 클로닝 하였으며 screening 및 발현시켜 정제하였다.

### 3) substrate gel electrophoresis

단백질 분해효소를 gel 상에서 관찰하기 위하여 시료에  $\times 5$  activity sample buffer(2% SDS, 2% sucrose, 0.01% bromophenol blue in 0.125M Tris-HCl(pH 6.8)를 넣고 12% polyacrylamide gel로 전기연동하였다. 전기연동이 끝난 gel은 1% gelatin이 함유된 12% polyacrylamide gel과 같이 2.5% Triton X-100용액에 침적하여 실온에서 20분간 처리하여 SDS를 제거하였다. 그 후 두 gel을 겹쳐서 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)완충용액에 침적시킨 다음 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 2시간 반응시키고, amido black(Sigma, USA)으로 염색하여 활성이 나타난 위치를 확인하였다.

### 4) 억제인자의 영향

정제된 효소활성에 억제인자가 미치는 영향을 관찰하기 위해 정제된 효소를 억제인자가 포함된 50mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 그리고 기질인 azocasein을 75 $\mu$ l첨가하였다. 반응 혼합물을 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 실험에 사용한 억제인자는 diisopropyl fluorphosphate (DFP, 10 mM), phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF, 5 mM), L-trans-epoxy-succinyl-leucyl-amido-(4-guanidino)-butane(E-64, 20  $\mu$  M), Leupeptin(200  $\mu$  M), Pepstatin A(0.1  $\mu$  M), N- $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine-chloromethyl keton(TLCK, 200  $\mu$  M),

N-tosyl-L-phenyl-alanine chloromethyl ketone(TPCK, 200  $\mu$ M), iodoacetic acid(50  $\mu$ M), 1, 10-phenanthroline(25mM), Ethylenediaminetetracetic acid(EDTA, 10mM)이다. Cysteine proteinase의 특이 억제인자인 E-64 및 iodoacetic acid 와 aspartic proteinase특이 억제인자인 pepstatin A에 의해서는 효소활성이 억제되지 않았다. 그리고, serine proteinase의 특이 억제인자인 DFP와 PMSF에 의해 효소활성이 7.4%와 18.1%로 크게 억제됨을 알 수 있었다(Table 4). 이상의 결과로 보아 정제된 효소는 serine계열의 단백질 분해효소임을 알 수 있었다.

**Table 4 . Effect of recombinant proteinase inhibitors on the enzyme activity**

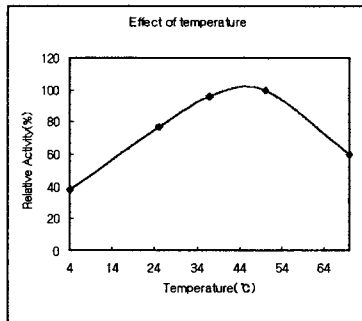
Inhibitors	Concentration (mM)	Relative activity (%)
Control		100%
Cysteine class		
E-64	0.02	83.2
Iodoacetic acid	0.05	89.0
Cysteine and serine class		
Leupeptin	0.2	70.4
TPCK	0.2	45.0
TLCK	0.2	57.1
Serine class		
DFP	10.0	7.4
PMSF	5.0	18.1
Aspartic class		
Pepstatin A	0.0001	91.3
Metallo class		
EDTA	10.0	55.1
1,10-Phenanthroline	25.0	72.4

### 5) 재조합효소활성에 미치는 최적 온도와 pH의 영향

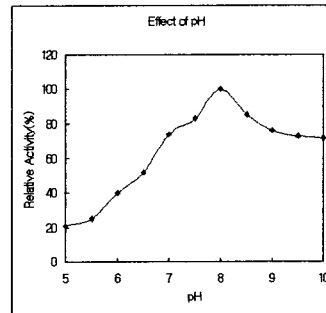
효소활성의 최적 온도를 관찰하기 위해 azocasein을 기질로 이용하여 효소 반응액을 4℃, 37℃, 50℃ 및 80℃ 항온기에서 2시간 동안 기질과 각각 반응시킨 다음 활성도를 측정하였다. 그 결과 pH 6.0부터 서서히 활성이 증가되기 시작하여 pH 8.0이상에서는 효소 활성이 점차 감소되었다.

효소활성의 최적 pH를 관찰하기 위해 완충용액의 pH를 일정한 간격으로 변화시키면서 활성도를 측정하였는데, pH 4.0에서 5.0까지는 50 mM sodium phosphate 완충용액, pH 7.5에서 8.5까지는 Tris-HCl 완충용액 그리고, pH 9.0에서 10.0까지는 50 mM glycine-NaOH 완충용액을 각각 사용하여 azocasein을 이용하여 활성도를 측정한 후 가장 높은 활성을 보인 pH를 최적 pH로 결정하였다. 온도가 효소활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 반응 온도를 변화시켜 재조합된 효소의 활성을 측정한 결과 50℃에서 최대 활성이 나타났으며, 그 후부터는 서서히 감소하였다(Fig. 12)

(a)



(b)



**Fig 12. Effect of pH and temperature on the activity of purified enzyme.** (a) The enzyme activity was assayed in 50 mM sodium acetate buffers(pH 5.0–5.5), 50 mM sodium phosphate buffers(pH 6.0–7.5), 50 mM Tris-HCl buffers(7.5–8.5) and 50 mM Glycine-NaOH buffers(pH 9.0–10). Maximal activity was shown as 100%. (b) The purified enzyme was assayed of the incubation at various temperatures for 2 h and the proteinase activity was assayed. Maximal activity was shown as 100%

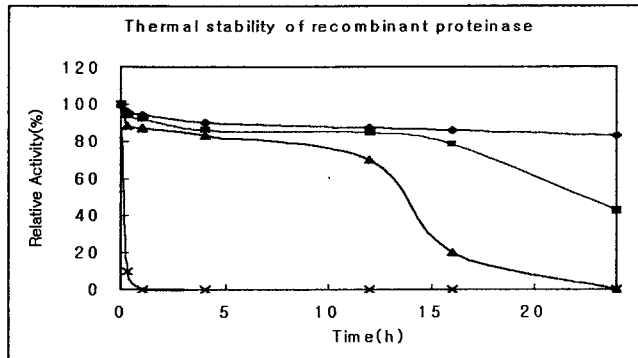
## 6) 기질 특이성

다양한 chromogenic peptides에 대한 정제된 효소의 기질 특이성을 관찰한 결과, 10 mM Gly-Pro-Leu  $\beta$ -Naphthylamide는 0.68%, N $\alpha$ -Benzyl-Arg-Gly-Phe-Phe-Leu  $\beta$ -Naphthylamide는 0.00%, N-Succinyl-Gly-Gly-Phe p-Nitroanilide은 23.77%, N-Acetyl-Ile-Glu-Ala-Arg p-Nitroanilide은 85.5%, N-Acetyl-Ala-Ala-Pro-Met p-Nitroanilide은 3.81%, N-CBZ-Leu-Leu-Glu  $\beta$ -Naphthylamide은 0.10%, p-Gly-Phe-Leu p-Nitroanilide은 1.48%, N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-Nitroanilide는

32.78%, N-CBZ-Gly-Gly-Leu p-Nitroanilide은 35.66%의 relative reaction을 나타내었다. 이들 기질들을 사용하여 정제된 효소를 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)완충용액에 용해시킨 후, peptide기질을 최종농도가 100  $\mu$ M이 되도록 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 15분간 반응시킨 다음  $\beta$ -Naphthylamide는 340 nm, p-Nitroanilide는 400 nm에서 각각 흡광도를 측정, 활성도의 결과다. 기질 특이성은 N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Met p-NA에 대해 높은 효소활성을 보였으며, N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Met p-NA에 대한  $V_{max}$ 값과  $K_m$ 값은 각각  $3.4 \times 10^{-3}$  M과  $1.7 \times 10^{-3}$  M이었다.

#### 7) 열안정성

재조합 효소의 열안정성 관찰은 azocasein을 기질로 이용하여 실시하였다. 정제된 효소 10  $\mu$ l, Tris-HCl(pH 8.0)완충용액 100  $\mu$ l를 혼합하여 4 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C에서 2, 4, 16 및 24시간동안 반응시킨 후 5% azocasein 용액 35  $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 잔존 활성도를 측정하였다. 그 결과, 효소가 4 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C에서는 최소한 24시간까지는 50% 이상의 활성을 유지하여 비교적 안정하였으나, 50 $^{\circ}$ C에서는 12시간까지 71%, 16시간에는 20% 미만으로 감소되었으며, 24시간 후에는 효소활성이 완전히 소실되었다. 80 $^{\circ}$ C에서는 30분만에 효소의 활성이 완전히 소실되는 것으로 관찰되었다. 따르는 열에 비교적 불안정한 것으로 나타났다(Fig. 13).



**Fig 13. Thermal stability of purified proteinase from *N. caninum*.** The remaining activity of the purified enzyme after incubation for various time intervals in 50 mM Tris-HCl buffers(pH 8.0) at 4°C(●), 37°C(■) , 50°C (▲) and 80 °C(×) was measured.

## 6. SOD와 proteinase 재조합 단백질의 단클론항체의 생산

### 1) 융합실험

BALB/c 마우스의 항체를 측정하고, 융합세포의 HAT 및 HT 선택배지에서 선택배양과 스크리닝하였다. SOD와 proteinase 항원에 면역된 BALB/c마우스를 2번에 걸쳐 세포융합하여 6장씩 두 항원에 대해서 96well plate에 분주하고 6일간 HAT배지에서 그리고 6일간 HT배지에서 선택배양한 결과 총 340 well(65.4%), proteinase는 총 358 well(68.9%)에서 융합된 세포의 증식을 확인하였다. 곧이어 이를 340 well, 358 well의 배양액으로 SOD와 proteinase에 대한 Ig poly 항체생산을 ELISA로 검정한 결과 흡광도 0.2이상을 기준으로 하여 42 well(12.4%), 53 well (15%)에서 항체의 생산을 확인하였다.



## 7. In Vitro 실험을 통한 단클론 항체의 세포내 침투억제기전 효과 분석

24 well plate의 coverslip에 숙주세포(vero cell)를 키운 후, 24시간 후에 SOD 와 proteinas의 단클론 항체를 처리한 후 네오스포라 원충을 첨가하여(약  $\times 10^7$ ) 함께 약 2시간동안 배양하였다. 배양 종료 후 네오스포라 원충의 수를 10배 광학현미경하에서 Giemsa염색하여 확인하고, control에 대한 저해효과율은 다음의 공식을 이용하여 산출하였다:[1-(No. of *N. caninum* per host cell treated/ No. of *N. caninum* per host cell untreated)] X 100. 그 결과 mAb SOD는 57% , proteinase는 27%의 억제효과를 보였다.

## 나. 제 2세부과제

### 1. 네오스포라의 배양 및 공급

네오스포라의 배양 및 공급을 위해 3가지 세포주를 이용하여 *N. caninum* tachyzoites의 증식 실험을 실시하였다. *N. caninum* tachyzoites의 증식 능력은 Vero cell 745.5%, HsF cell 663.6%, CPAE cell 672.7%로 나타났으며 증식기간은 6일, 2개월, 2주로 각각 나타나 증식능력 및 증식기간에서 Vero cell이 가장 우수하였다(Table 5). 여러 세포 주들 가운데 선발된 Vero cell을 이용하여 flasks내에 약 70% monolayer를 형성하였을 때 *N. caninum* tachyzoites를 매 3-4일 간격으로 계대배양을 한 후 분리 정제하여 -80℃에 보관하여 공급하였다.

Table 5. Proliferation ratio of *N. caninum* tachyzoites by cell culture

	cell type		
	Vero	HsF	CPAE
Harvest interval	6 days	2 months	2 weeks
Tachyzoite initial conc.(ml)	$1.1 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$
Tachyzoite harvest conc.(ml)	$8.2 \times 10^4 \pm 2.7 \times 10^2$	$7.3 \times 10^4 \pm 2.4 \times 10^2$	$7.3 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^2$
proliferation ratio(%)	745.5	663.6	672.7

## 2. 네오스포라 대량 배양법 연구

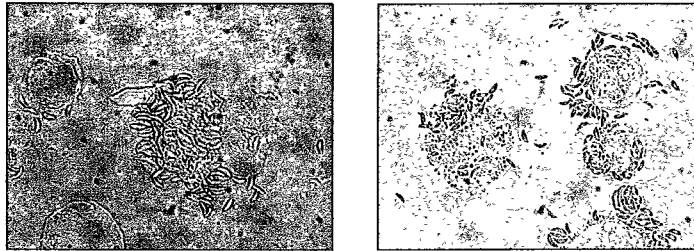
다량의 *N. caninum* tachyzoites 확보를 위하여 마우스와 sarcoma 180 cell을 이용한 배양이 시도되었다. Dexamethason( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 음수를 통해 10일간 처치된 ICR mice에 *N. caninum* tachyzoites( $2.5\times 10^6$ )와 sarcoma 180 세포를 feeder cell로 첨가하여 복강내 주입한 후 4일째 마우스를 희생하여 복수액을 회수하였다. 회수된 복수액은 23G와 26G의 주사기를 이용, 차례로 back and forth 과정을 거쳐 sarcoma 180세포를 최대한 파괴한 후  $8\mu\text{m}$  membrane filter와  $3\mu\text{m}$  membrane filter를 이용하여 *N. caninum* tachyzoites를 순수분리 하였다.

원충의 계대배양을 위하여 순수분리된 *N. caninum* tachyzoites를 2-4 배의 srcoma 180 cells과 혼합하여 dexamethason( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ )이 음수를 통해 10일간 처치된 ICR mice의 복강에 재접종을 하였다(Fig. 14).

*N. caninum* tachyzoites의 증식은 예전에 동일한 종으로 여겨졌던 *Toxoplasma*와는 달리 반드시 feeder cell이 필요하며 feeder cell이 없을 경우 증식이 이루어지지 않았다. 본 실험에서는 srcoma 180 cells을 feeder cell로 사용하였다. 마우스를 이용한 *in vivo* 배양시 Vero cell을 이용한 *in vitro* 배양(745.5%)보다 평균 43배(32,400%)의 증식율을 나타냈으며,  $5\times 10^5$ 의 *N. caninum* tachyzoites와 그 5배인  $2.5\times 10^6$ 의 *N. caninum* tachyzoites로 접종량을 비교했을 때 접종량이 증가할수록 생산된량도 증가하였으나 복수액내에 *N. caninum* tachyzoite에 감염되지 않은 sarcoma cell의 증가로 순수분리율은 낮아짐을 알 수 있었다. 또한 마우스 복강내 증식된 *N. caninum* tachyzoites의 순수분리율은 25.9-32.5%를 나타내었다 (Table 6).

**Table 6. Proliferation ratio of *N. caninum* tachyzoites by mice-inoculation**

dose of infection		product			
No. of <i>Neospora</i>	sarcoma cell	before purification	ratio (%)	after purification	ratio (%)
$5 \times 10^5$	0	none	0	none	none
$5 \times 10^5$	$2 \times 10^6$	$4 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^5$	8,000	$1.3 \times 10^7 \pm 4.3 \times 10^3$	32.5
$2.5 \times 10^6$	$10^7$	$8.1 \times 10^7 \pm 2.7 \times 10^4$	32,400	$2.1 \times 10^7 \pm 7 \times 10^4$	25.9



**Fig. 14. *N. caninum* tachyzoites in ascites fluids of mouse.**

### 3. *N. caninum* tachyzoite의 야외주 순수분리

*Neospora*는 우리나라를 비롯한 여러나라에서 분리 보고가 있으나 혈청학적 검사를 통한 *Neospora*의 존재를 보고한 국가 수에 비하면 상당히

적은 국가에서만 분리에 성공하였다. 이렇듯 *Neospora*의 분리에 어려운 이유는 가검물을 시험관내에서 세포에 접종한 후 상당히 오랫동안 유지 관찰을 하여야만 하기 때문에 그 과정동안 오염 등의 문제로 인하여 실패할 확율이 높았기 때문이다. 그러나 마우스의 복강에 sarcoma cell과 가검물 유제를 섞어서 접종한 결과 *Neospora*를 분리할 수 있었다. 혈청학적(IFAT)으로 양성을 나타낸 모축의 유산태아 뇌와 척수를 유제로 만들고 srcoma 180 세포와 섞어서 dexametason이 10일간 처리된 ICR 마우스의 복강에 접종하였다. 접종 후 4일부터 복수액에서 *Neospora* 원충을 확인할 수 있었으며 Kr2라 명명하였다. Yamage 등(1996)이 개발한 primer(Np21, Np6)를 이용하여 PCR과 sequencing을 시도하였다. Sequencing 결과를 미국 분리주인 Nc1과 비교한 결과 국내분리주와 Nc1의 PCR product 산물의 크기가 각각 334bp와 328bp이었으며 homology는 94%로 상당히 유사하나 약간을 다른 strain으로 사료되며 이에 따른 연구가 이루어져야한다고 생각된다.

#### 4. ELISA법을 이용한 네오스포라 진단 및 역학분석

*Neospora caninum*은 우리 나라에서도 지역에 따라 다르지만 10~20%의 항체보유율과 유산태아로부터 원충의 분리가 보고된 바 있으며, 현행 진단법으로 IFA(간접형광항체반응법) test를 사용하고 있다. IFA의 장점은 소량의 진단항원 (*Neospora caninum* tachyzoite)으로도 수행가능 하지만, crude항원에 기인한 교차반응, 결과판독에 있어 주관성의 개입, 표준화의 어려움, 그리고 많은 양의 샘플을 검사하기에는 비실용적이라는 단점들이 있어 ELISA법을 개발하게 되었다. 검사혈청은 100배 희석하였으며, HRPO가 conjugate되어 있는 2차항체는 10,000배

로 희석하고 substrate는 ABTS를 사용하였다. 표준양성혈청의 OD는 1.2정도, 표준음성혈청의 OD는 0.09정도로 고정하였으며, S/P(Sample/Positive) ratio가 0.5이상일 경우 양성으로 판단하였다. 또한 기존의 상품화된 IDEXX *Neospora* ELISA kit와의 일치도(agreement)를 알아본 결과, *k*-value가 0.793으로써 높은 일치도를 보였다(Table 7).

**Table 7.  $\kappa$  value between IDEXX kit and NVRQS kit**

		IDEXX ELISA KIT	
		Positive	Negative
NVRQS KIT	Positive	46	0
	Negative	4	10

$$K \text{ value} = \frac{2(46 \cdot 10 - 4 \cdot 0)}{46 \cdot 10 + 50 \cdot 14} = 0.793$$

개발된 ELISA법을 이용하여 지역별 축종별 항체가를 조사하였다. 지역별로 무작위 채혈된 한우 612두, 젖소 464두 총 1,076두에 대해 조사하였다(Table 8).

**Table 8. Number of test cattle**

district	native cattle	dairy cattle	sum
Gangwon	177	76	253
Gyungbuk	336	-	336
Daejon	-	50	50
Chungbuk	-	57	57
Incheon	-	57	57
Jeonbuk	15	35	50
Chungnam	84	189	273
	612	464	1,076

지역별로는 전북지역이 86.0%로 가장 높게 나왔으며 경북이 11.3%로 가장 낮게 나타났다. 가장 높게 나온 전북지역은 검사두수가 적으므로 추후에 보강조사가 이루어져야 될 것으로 사료된다. 그러나 전국 평균 40.6%로 나와 우리 나라에서 네오스포라에 대한 양성율이 상당히 높음을 알 수 있었다(Fig. 15).

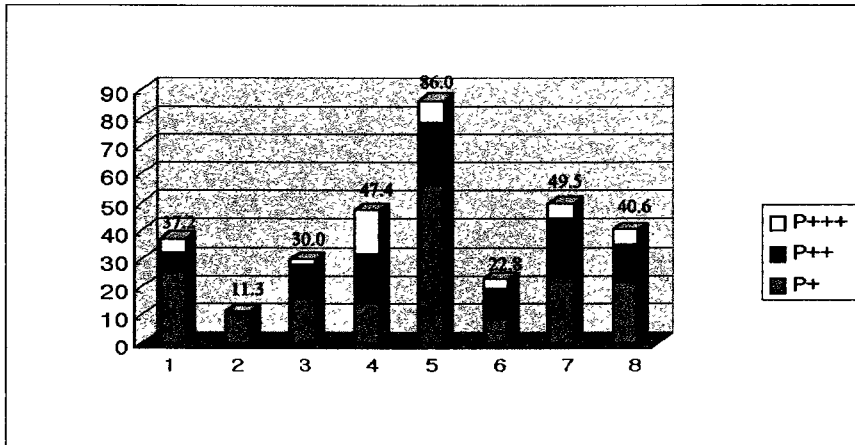
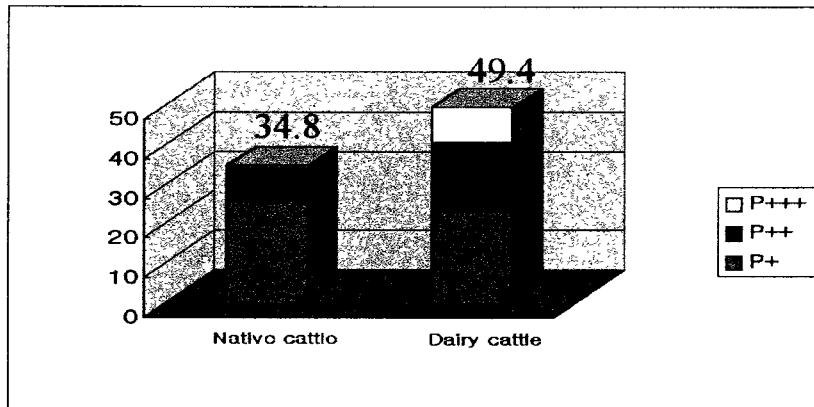


Fig. 15. Seroprevalence and positivity of cattle in 8 district. 1; Gangwon, 2; Gyungbuk, 3; Daejon, 4; Incheon, 5; Jeonbuk, 6; Chungbuk, 7; Chungnam, 8; average, P+:  $0.5 \leq SP < 0.75$ , P++:  $0.75 \leq SP < 1.0$ , P+++:  $1.0 \leq SP$

축종별로는 젖소가 49.4% 한우는 34.8%를 나타내어 한우보다 젖소에서 양성율이 높았다. 또한 SP value가 1.0이상인 P+++가 차지하는 비율도 젖소에서 높게 나타나 네오스포라에 대한 항체가도 높음을 알 수 있었다(Fig. 16).





**Fig. 16. Seroprevalence and positivity in native and dairy cattle.**  
 P+:  $0.5 \leq SP < 0.75$ , P++:  $0.75 \leq SP < 1.0$ , P+++:  $1.0 \leq SP$

한우에 있어 지역별 양성율을 조사한 결과 전북지역이 66.7%로 가장 높게 나왔으며 경북지역은 11.3%로 가장 낮게 나왔다. 강원과 충남은 각각 35.0%와 26.2%로 나타났다(Fig. 17).

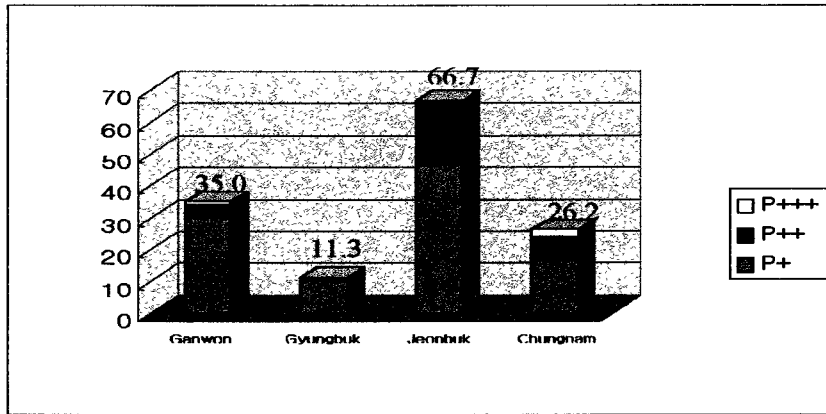


Fig. 17. Seroprevalence and positivity in native cattle in 4 district. P+:  $0.5 \leq SP < 0.75$ , P++:  $0.75 \leq SP < 1.0$ , P+++ :  $1.0 \leq SP$

젖소의 경우 지역별 양성율은 역시 전북지역이 94.3%로 가장 높게 나왔으며 충북지역이 22.8%로 가장 낮았다. 전북지역은 보다 많은 두수의 검사가 필요하다고 여겨진다(Fig. 18).

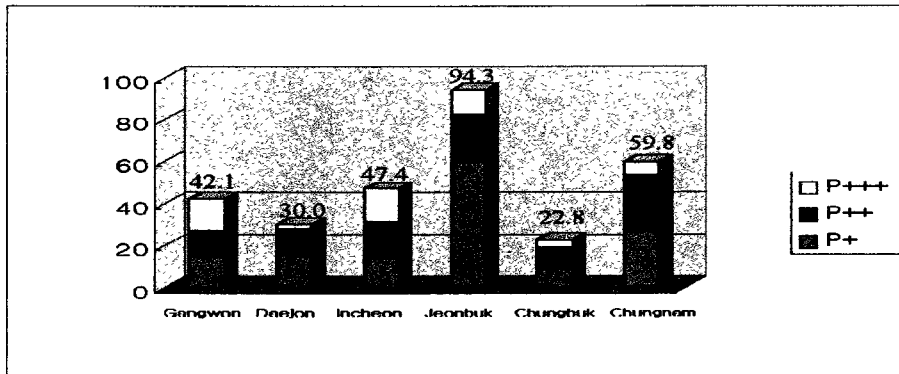


Fig. 18. Seroprevalence and positivity in dairy cattle in 6 district. P+:  $0.5 \leq SP < 0.75$ , P++:  $0.75 \leq SP < 1.0$ , P+++:  $1.0 \leq SP$

#### 5. 네오스포라 유전자 재조합단백질 효능검정을 위한 인공감염 동물 실험

유전자 재조합 단백질의 효능 검정을 위하여 마우스 및 gerbil을 이용하여 가능성을 알아보았다. 우선 마우스에 네오스포라 tachyzotes  $2 \times 10^3$ 를 s.c로 접종한 후 뇌조직을 염색하여 관찰하였다. HE 염색으로는 네오스포라의 cyst를 관찰할 수는 없었으나 뇌염, 뇌막염이 심하게 생긴 것을 관찰할 수 있었고 피사가 일어난 부위도 관찰할 수 있었다(Fig. 19). 이 뇌조직으로부터 PCR을 통하여 네오스포라의 존재를 확인 할 수 있었으며 면역염색을 통하여 네오스포라이 조직내 위치를 확인하려고 시도하고 있다 (Fig. 20). Gerbil의 뇌조직에서는 *N. caninum* tachyzoite를 확인할 수 있었다(Fig. 21).

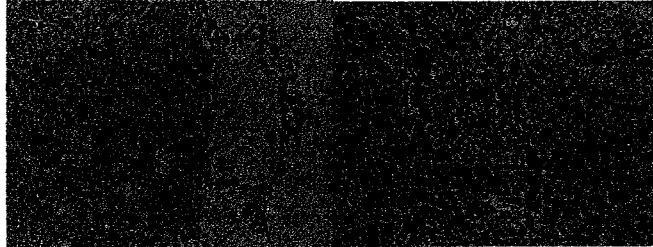


Fig. 19. The H.E stain of mouse brain tissue inoculated with  $2 \times 10^3$  tachyzoite s.c. Histology : encephalitis, meningitis and necrosis

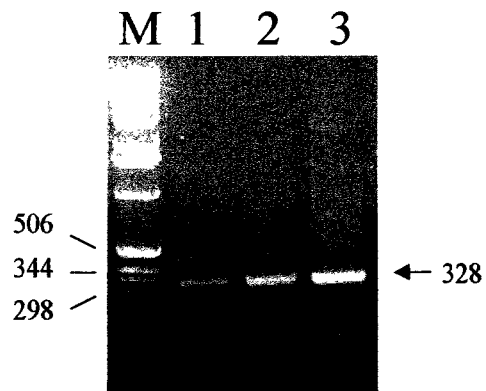


Fig. 20. Polymerase Chain Reaction of mouse brain inoculated with *Neospora* tachyzoite.

- 1: mouse brain inoculated with  $1.25 \times 10^6$  *Neospora* tachyzoite i.p
- 2: mouse brain inoculated with  $2 \times 10^3$  tachyzoite s.c p.i. 30 days
- 3: *Neospora* tachyzoite

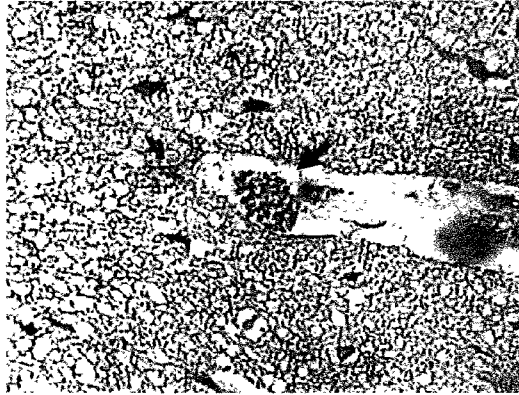


Fig. 21. *N. caninum* tachyzoite in gerbil brain. Arrow indicates *N. caninum* tachyzoite.

Gerbil은 네오스포라에 대해 매우 감수성이 있는 것으로 알려져 있어 *N. caninum* tachyzoites에 대해서 감수성 시험을 수행하였다(Table 9).  $4 \times 10^5$ 에서  $4 \times 10^1$ 까지의 네오스포라 tachyzoite를 i.p 및 s.c로 접종한 후 girbil의 생존여부를 관찰하였다.  $4 \times 10^5$  및  $4 \times 10^4$ 을 접종한 경우 i.p 및 s.c 접종 모두 폐사하였고,  $4 \times 10^3$ 을 접종한 시험군에서는 s.c접종의 경우 모두 생존하였으나 i.p로 접종한 군에서는 2마리중 1마리만 폐사하여 이들의  $LD_{50}$ 는  $4 \times 10^3$ 을 i.p로 접종하는 것임을 알 수 있었다.

**Table 9. Susceptibility of gerbil against *Neospora tachyzoite***

Group	Dosage & rout	Result
1 10ea	4×10 <sup>5</sup> i.p.	died (p.i 8 day)
		died (p.i 8 day)
2 10ea	4×10 <sup>5</sup> s.c.	died (p.i 8 day)
		died (p.i 8 day)
		died (p.i 8 day)
3 9ea	4×10 <sup>4</sup> s.c.	died (p.i 9 day)
		died (p.i 9 day)
4 9ea	4×10 <sup>4</sup> i.p	died (p.i 12 day)
		died (p.i 13 day)
5 10ea	4×10 <sup>3</sup> s.c	alive
		alive
6 9ea	4×10 <sup>3</sup> i.p.	alive
		died (p.i 11 day)
7 9ea	4×10 <sup>1</sup> s.c	alive
		alive
8 10ea	4×10 <sup>1</sup> i.p	alive
		alive

**6. 네오스포라 oocyst확보를 위한 종숙주인 개에 대한 인공감염실험**

네오스포라의 종숙주는 개임이 밝혀져 있으며 농장내에서의 감염 경로는 감염된 어미소로부터 전달되는 수직감염과 감염된 유산태아를 먹고 중

숙주인 개가 감염됨으로서 분변으로 배설되는 충란을 통해서 농장내 소들이 감염되는 수평감염을 들 수 있다. 네오스포라에 감염된 개가 농장에 존재할 경우 다량의 충란을 배설하게 되고 농장전체내 광범위하게 오염되게 됨으로서 심각한 결과를 초래하게 된다.

네오스포라에 대한 재조합 다가항원에 대한 방어능 시험은 종숙주인 개로부터 나온 oocyst로 공격접종을 통한 숙주의 방어능을 조사함으로써 결과를 얻고자 한다. 이를 위하여 개 5마리를 사육하여 조직검사를 통하여 네오스포라 양성으로 확인된 마우스 5마리의 뇌를 각각의 개에 경구를 통하여 접종하였다. 접종한 개의 분변을 정기적으로 회수하여 oocyst검사를 통하여 소량의 oocysts를 확인할 수 있었다.

## 7. 재조합 다가 항원의 중화능 시험

### 1) 항혈청 역가 측정

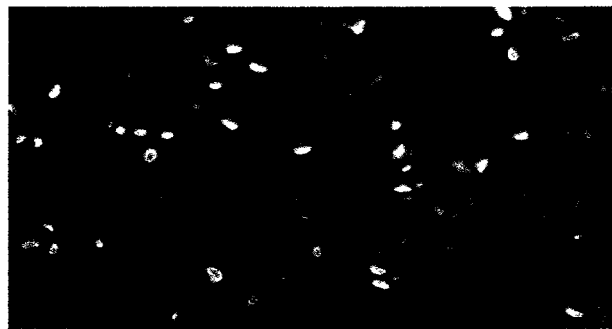
발현된 재조합단백질 SOD, Proteinase, DG1, DG2, SAG1 및 SAG2에 대한 중화능 실험은 각각의 poly 및 monoclonal antibody를 사용하였다. polyclonal antibody는 토끼를 이용하여 항혈청을 만들었으며 각 항원에 대한 항혈청의 역가는 간접형광현미경법(IFA)을 통하여 확인하였다 (Table 10; Fig. 22).

모두 6종류의 재조합단백질에 대한 항혈청을 만들기 위하여, 각각의 재조합 단백질을 토끼 피하에 200 $\mu$ g/ml씩의 항원을 동량의 complete adjuvant와 혼합하여 1차 접종을 하였고, 2주 후에 incomplete adjuvant와 혼합하여 2차 접종하였다. 최종 접종 2주 후에 채혈 후 혈청을 분리하여 실험에 사용하였다. monoclonal antibody를 이용한 중화능시험은

hybridoma cell 배양액을 이용하였다.

**Table 10. Antibody titer of recombinant protein using IFA**

No.	Antigen	Titer				
		100×	200×	400×	600×	800×
1	SOD	++	+			
2	Proteinase	++	+			
3	DG1	+++	+++	++	++	+
4	DG2	+++	++	++	+	
5	SAG1	+++	++	+	+	
6	SAG2	+++	+++	++	++	
7	<i>Neospora</i> crude Ag	+++	++	+		



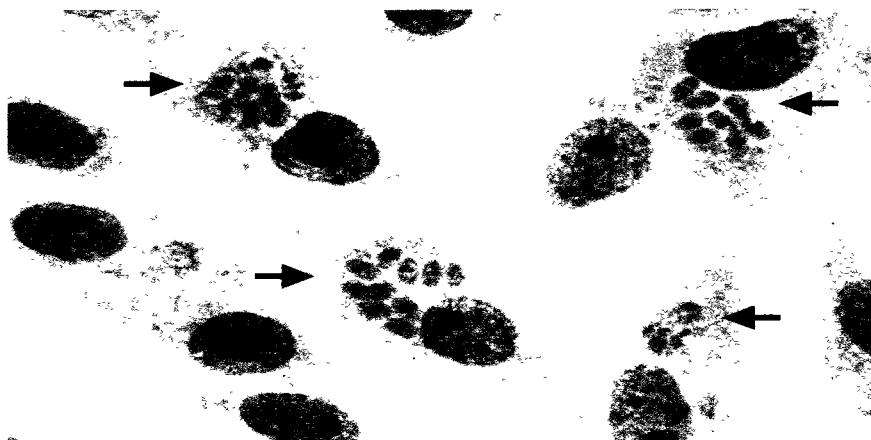
**Fig. 22. IFA of *Neospora* tachyzoites using anti-recombinant protein(monoclonal antibody).**

## 2) 중화능 시험

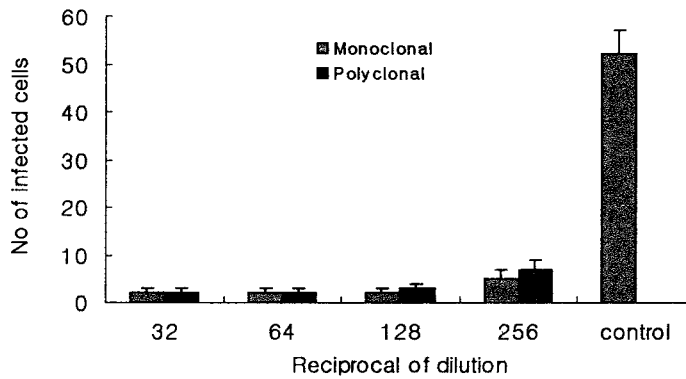
각 재조합 단백질에 대한 역가측정에서 *Neospora* tachyzoite crude antigen보다 항체가가 높게 나온 SAG1, SAG2 및 NCDG1, NCDG2, SOD,



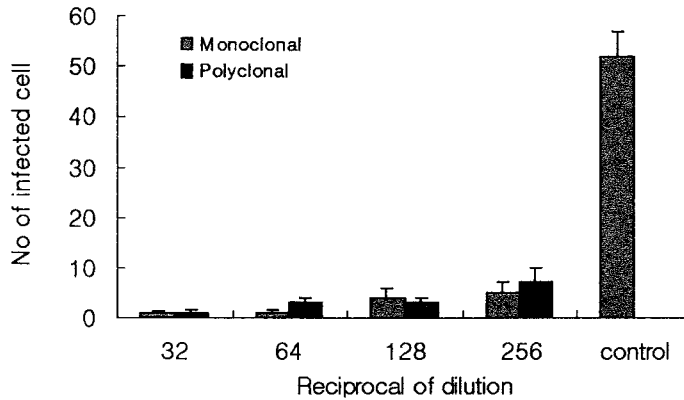
proteinase들의 다가항체에 대한 중화능 시험을 측정하였다. 중화실험을 위하여 8 well Chamber slide에 Vero cell을 3시간 정도 배양하였다. 항혈청을 32배에서 256배까지 2진 희석한 후 *Neospora tachyzoites*를 37℃에서 1 시간동안 반응시켰다. Vero cell이 배양되고있는 각 well에 항혈청과 반응된 *Neospora tachyzoites*를  $1 \times 10^4$ 씩 접종하고, 1시간 후에 새 배지로 교환하였다. 접종 3일 후에 Giemsa's stain으로 염색하여 감염된 세포 수를 확인하였다(Fig. 23).



**Fig. 23.** Giemsa's stain of Vero cell inoculated with *Neospora tachyzoites*. Arrows indicate *Neospora tachyzoites* in Vero cell.

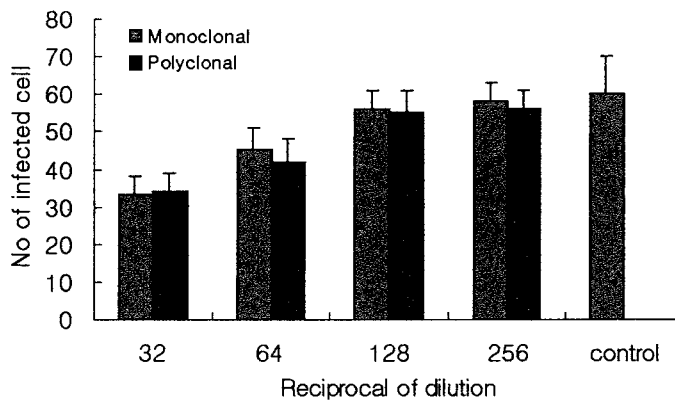


**Fig. 24. Neutralization test using monoclonal antibodies against recombinant DG 1.**



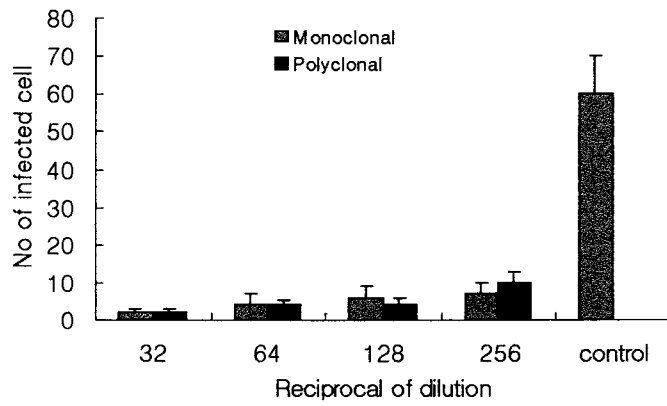
**Fig. 25. Neutralization test using monoclonal antibodies against recombinant DG 2.**

중화실험결과 PBS (Phosphate buffered saline)으로만 처리된 대조군에서는 *N. caninum* tachyzoites에 감염된 세포수가 well당 각각 52개와 56개씩 확인 할 수 있었으나 항혈청으로 처리된 well에서는 감염된 세포수가 급격히 감소하여 1:128배의 혈청희석배수까지 2-3개씩의 세포만을 확인할 수 있었다(Fig. 24). 그러나 1:32배 희석배수에서도 감염된 세포가 발견되어 완전한 중화는 이루어지지 않음을 알 수 있었다.

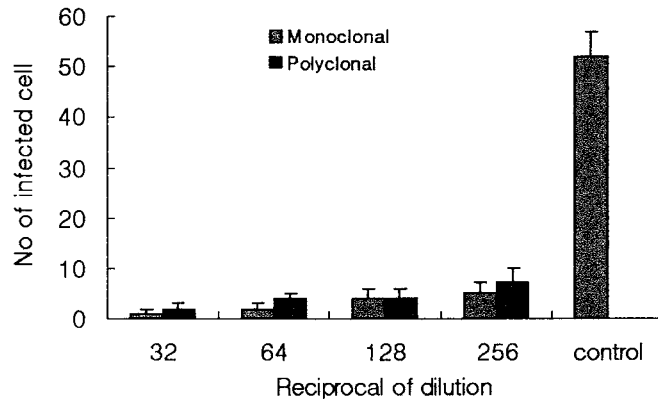


**Fig. 26. Neutralization test using monoclonal antibodies against recombinant SOD.**

SOD에 대한 항혈청을 이용한 중화실험에서는 대조군에 비하여 유의성있는 차이를 볼 수 없었다(Fig. 26). 이는 SOD가 *N. caninum*의 구조를 이루는 단백질이 아니기 때문일 것으로 여겨진다.



**Fig. 27. Neutralization test using monoclonal antibodies against recombinant SAG2.**



**Fig. 28. Neutralization test using monoclonal antibodies against recombinant SAG1.**

DG1, SAG2 다가항원에 대한 항혈청을 이용한 중화실험에서는 대조군에 비하여 유의성있는 차이를 볼 수 있었다(Fig.24, 27). 즉 32배에서 완전한 중화능을 보인 것도 있어서 각각의 재조합 단백질의 중화능에 대한 상승효과가 있는 것으로 여겨진다.

### 3) 재조합 다가 항원의 항체 방어능 시험

재조합 단백질들의 *N. caninum* tachyzoites의 공격에 대한 방어능 측정을 위하여 *N. caninum* tachyzoites에 감수성있는 gerbil에 DG1, DG2, SAG1, SAG2 및 *N. caninum* tachyzoites crude 항원을 complete Freund's adjuvant와 혼합하여 마리당 100 $\mu$ g씩 s.c로 접종하였다(Table 11, 12, 13). 2주후 2차 접종을 하였고 다시 2주후에  $1 \times 10^8$  마리의 *N. caninum* tachyzoites로 복강으로 공격접종을 하였고, 2주후에 관찰하였다.

**Table 11. Protection ratio of single-recombinant antigens to *N. canium* tachyzoites challenge in gerbil**

Antigen	No. of infected gerbil			Total	No. of survived gerbil			Total	Ratio (%)
	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd		
Control	10	6	7	23	2	1	1	3	13
crude ag	10	7	7	24	7	5	5	17	70.8
SAG1	10	6	8	24	3	1	1	5	20.8
SAG2	10	7	8	25	4	1	1	6	24.0
DG1	10	6	8	24	8	2	4	14	58.3
DG2	10	7	7	24	7	3	3	13	54.2

**Table 12. Protection ratio of dual-recombinant antigens to *N. canium* tachyzoites challenge in gerbil**

Antigen	No. of infected gerbil			Total	No. of survived gerbil			Total	Ratio (%)
	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd		
Control	10	6	7	23	2	1	1	3	13
crude ag	10	7	7	24	7	5	5	17	70.8
SAG1+SAG2	10	20	10	40	7	12	6	25	62.5
SAG1+DG1	10	20	10	40	4	9	6	20	50.0
SAG1+DG2	10	20	10	40	7	10	5	22	55.0
SAG2+DG1	10	20	10	40	7	13	6	26	65.0
SAG2+DG2	10	20	10	40	6	11	7	24	60.0
DG1+DG2	10	20	10	40	6	10	5	21	52.5

**Table 13. Protection ratio of triple-recombinant antigens to *N. canium* tachyzoites challenge in gerbil**

Antigen	No. of infected gerbil			Total	No. of survived gerbil			Total	Ratio (%)
	1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd		
Control	10	6	7	23	2	1	1	3	13
crude ag	10	7	7	24	7	5	5	17	70.8
SAG1+SAG2+DG1	10	20	10	40	8	13	6	27	67.5
SAG1+DG1+DG2	10	20	10	40	7	10	6		57.5
SAG2+DG1+DG2	10	20	10	40	6	14	7	27	67.5
SAG1+SAG2+DG1+ DG2	10	20	10	40	8	12	7	27	67.5



## 다. 제 3세부과제 결과

### 1. Immunoscreening

제작한 cDNA library를 네오스포라 항혈청을 이용하여 immunoscreening을 실시한 결과, 82개의 양성 클론들을 확인할 수 있었다. 이들에 대하여  $\lambda$ gt11-forward 및  $\lambda$ gt11-reverse primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과 wild type(non-recombinant) phage의 정상적인 증폭 단편의 크기인 182bp보다 큰 단편을 포함하고 있으며 immunoscreening 결과 항원성이 강하게 나타난 클론들 중 20개를 선택하여 염기서열을 분석하고, 이를 NCBI BLAST search program을 이용하여 GenBank에 등재되어 있는 *N. caninum* 유전자의 염기서열과 비교하였다. 그 결과, 6개의 클론에서 *N. caninum*의 SAG1과 SAG2 유전자의 염기서열을 확인할 수 있었다(Fig. 29).

### 2. SAG1 및 SAG2 유전자의 클로닝

*N. caninum*의 SAG1과 SAG2의 염기서열을 근거로 제작한 primers를 첨가하여 PCR을 실시한 후 1% TAE agarose gel 전기영동을 실시하였다. 영동한 gel을 ethidium bromide로 염색한 결과 SAG1과 SAG2의 band를 각각 1개씩 관찰하였으며, SAG1의 크기는 969bp, SAG2의 경우는 1206bp이었다(Fig. 30). 이를 발현벡터인 pGEX-4T-2에 ligation하고 *E. coli* BL21에 형질전환하였다.

1	ATG	TTT	CCT	OGG	GCA	GTG	AGA	CGC	GCC	GTC	TCG	GTG	GGT	GTG	TTC	GCC	48
1	M	F	P	R	A	V	R	R	A	V	S	V	G	V	F	A	16
49	GCG	CCC	GCA	CTG	GTG	GCG	TTC	TTT	GAC	TGT	GGA	ACT	ATG	GCA	TCA	GAA	96
17	A	P	A	L	V	A	F	F	D	C	G	T	M	A	S	E	32
97	AAA	TCA	CCT	CTA	CIT	GTC	AAT	CAA	GTT	GTC	ACC	TGT	GAC	AAC	GAA	GAG	144
33	K	S	P	L	L	V	N	Q	V	V	T	C	D	N	E	E	48
145	AAA	TCA	TCA	GTT	GCC	GTC	CTA	CTA	TCA	CCG	AAG	CTG	AAC	CAC	ATC	ACG	192
49	K	S	S	V	A	V	L	L	S	P	K	L	N	H	I	T	64
193	CTC	AAG	TGC	CCT	GAC	AAT	TCG	ACC	GCC	GTG	CCC	GCT	GCT	CIT	GGT	TAT	240
65	L	K	C	P	D	N	S	T	A	V	P	A	A	L	G	Y	80
241	CCA	ACA	AAC	AGG	ACC	GTC	TGC	CCG	GCG	GAG	TCC	GGA	GGT	CAA	ACT	TGT	288
81	P	T	N	R	T	V	C	P	A	E	S	G	G	Q	T	C	96
289	ACA	GGC	AAG	GAG	ATA	CCG	TTG	GAA	AGC	CTG	CIT	CCC	GGG	GCA	AAC	GAT	336
97	T	G	K	E	I	P	L	E	S	L	L	P	G	A	N	D	112
337	AGC	TGG	TGG	TCA	GGT	GTT	GAT	ATC	AAG	ACT	GGC	GTT	AAG	CTC	ACA	ATT	384
113	S	W	W	S	D	V	D	I	K	T	G	V	K	L	T	I	128
385	CCT	GAA	GCG	AGC	TTC	CCC	ACA	ACA	TCC	AAG	TCG	TTC	GAC	GTC	GGC	TGC	432
129	P	E	A	S	F	P	T	A	T	S	K	S	F	D	V	G	144
433	GTC	AGC	AGT	GAT	GCC	AGC	AAG	AGT	TGT	ATG	GTC	ACA	GTC	ACA	GTG	CCA	480
145	V	S	S	D	A	S	K	S	C	M	V	T	V	T	V	P	160
481	CCC	AGA	GCC	TCA	TCG	CTT	GTC	AAC	GGT	GTC	GCA	ATG	TGC	TCT	TAC	GGT	528
161	P	R	A	S	S	L	V	N	G	V	A	M	C	S	Y	G	176
529	GCA	AAC	GAA	ACT	CTC	GGC	CCT	ATC	ACA	TTG	TCC	GAG	GGC	GGA	TCT	TCT	576
177	A	N	E	T	L	G	P	I	T	L	S	E	G	G	S	S	192
577	ACG	ATG	ACC	CTC	GTT	TGC	GGC	ACG	GAT	GGG	AAG	CCA	GTT	CCT	CCT	GAT	624
193	T	M	T	L	V	C	G	T	D	G	K	P	V	P	P	D	208
625	CCT	AAG	CAG	GTT	TGT	TCT	GGG	ACG	ACC	GTC	AAG	GAT	TGT	AAA	GCA	AAA	672
209	P	K	Q	V	C	S	G	T	T	V	K	D	C	K	A	K	224
673	CCG	TTC	ACT	GAT	GTT	TTC	CCA	AAA	TTC	AGT	GCT	GAT	TGG	TGG	CAG	GGA	720
225	P	F	T	D	V	F	P	K	F	S	A	D	W	W	Q	G	240
721	AAA	CCC	GAC	ACT	AAG	GAT	GGT	GCA	AAA	CTA	ACG	ATC	AAG	AAA	GGT	GCA	768
241	K	P	D	T	K	D	G	A	K	L	T	I	K	K	G	A	256
769	TTT	CCT	CCA	AAG	GAG	GAA	AAG	TTT	ACT	CIT	GGG	TGC	AAG	AGC	GTA	TCG	816
257	F	P	P	K	E	E	K	F	T	L	G	C	K	S	V	S	272
817	AGT	CCG	GAG	GTT	TAC	TGT	ACT	GTG	CAG	GTG	GAG	GCA	GAG	CGC	GCG	AGT	864
273	S	P	E	V	Y	C	T	V	Q	V	E	A	E	R	A	S	288
865	GCA	GGG	ATC	AAG	TCG	TCG	GCT	GAA	AAT	GTT	GGT	CGC	GTT	TCC	CIT	TTC	912
289	A	G	I	K	S	S	A	E	N	V	G	R	V	S	L	F	304

913 GCT GTA ACA ATT GGA CTC GTA GGC TCG ATA GCG GCT GGC GTC GCG TGA 960  
 305 A V T I G L V G S I A A G V A \*

(A) SAG1

1 M A T H A C V V R R K A D A A C 16  
 1 ATG GCG ACG CAT GCT TGT GTG GTG AGG CGC AAG GCG GAT GCT GCT TGC 48  
 17 F A K L S A S Q S C L T A K S V 32  
 49 TTT GCC AAA CTC AGT GCG TCT CAA TCC TGT TTG ACG GCA AAA TCA GTT 96  
 33 N R S V S V F A L L F G V V L A 48  
 97 AAC CGA TCG GTC AGC GTC TTC GCG CTG CTA TTC GGC GTC GTT TTA GCA 144  
 49 V G V S G A P F K S E N E K F T 64  
 145 GTT GGG GTG TCG GGT GCG CCG TTC AAG TCG GAA AAT GAG AAG TTT ACC 192  
 65 C L P K Q G N A D Q W V A L V Y 80  
 193 TGT CTC CCG AAA CAG GGT AAT GCG GAT CAG TGG GTG GCA CTT GTG TAT 240  
 81 D S Q H S I T F A C D G G T P L 96  
 241 GAT TCT CAG CAT TCA ATC ACT TTC GCT TGT GAC GGA GGG ACG CCC CTG 288  
 97 P S K L L S E D D G L I V C N E 112  
 289 CCT TCC AAG CTT TTA AGT GAA GAT GAC GGC CTT ATA GTC TGT AAC GAG 336  
 113 S D G E D E C E K N A A P L S T 128  
 337 TCA GAC GGG GAA GAT GAA TGT GAA AAA AAT GCG GCA CCA TTG TCA ACT 384  
 129 F L P G A K K E W V T G T L Q Q 144  
 385 TTC CTT CCG GGG GCC AAA AAA GAG TGG GTG ACT GGA ACT CTT CAA CAG 432  
 145 G I K I T I P D E H Y P A T S K 160  
 433 GGA ATA AAG ATT ACA ATT CCC GAC GAG CAC TAC CCA GCT ACG TCG AAA 480  
 161 A F R V G C K A G K N V C L L H 176  
 481 GCT TTC CGT GTT GGT TGT AAG GCG GGT AAA AAT GTT TGT TTG CTC CAT 528  
 177 V Y V Q S R E S E V I G Q V A H 192  
 529 GTG TAT GTT CAG AGT AGG GAA TCA GAG GTG ATC GGA CAG GTG GCG CAT 576  
 193 C A Y S P N V R L R P I T V N P 208  
 577 TGT GCT TAT AGT CCC AAC GTA CGT CTG CGT CCA ATC ACT GTG AAT CCA 624  
 209 E N N G V T L I C G P D G K A F 224  
 625 GAA AAC AAC GGA GTG ACA TTA ATT TGC GGA CCA GAC GGG AAG GCG TTC 672  
 225 P D D Y M N H H C T E L D E C K 240  
 673 CCG GAT GAT TAC ATG AAC CAC CAT TGT ACG GAA CTA GAC GAA TGT AAA 720  
 241 E R P Y S A V F P G F S S S F W 256  
 721 GAA CGC CCT TAT TCC GCC GTG TTT CCT GGG TTC TCC AGT AGT TTT TGG 768

257	T	G	E	A	S	G	V	A	G	A	T	L	T	I	P	K	272
769	ACT	GGG	GAA	GCT	TCC	GGC	GTA	GCC	GGG	GCG	ACA	CTG	ACC	ATT	CCT	AAG	816
273	D	Q	F	P	S	T	A	Q	T	I	Y	L	G	C	T	G	288
817	GAC	CAG	TTT	CCT	TCG	ACA	GCA	CAG	ACC	ATC	TAT	TTG	GGC	TGC	ACT	GGT	864
289	H	P	D	D	K	Q	V	T	C	V	V	P	V	N	I	E	304
865	CAC	CCG	GAT	GAT	AAA	CAG	GTC	ACC	TGT	GTG	GTT	CCA	GTA	AAT	ATA	GAA	912
305	E	V	A	K	P	A	G	A	G	S	N	P	G	G	G	S	320
913	GAA	GTT	GCA	AAA	CCA	GCA	GGG	GCC	GGA	TCG	AAC	CCA	GGT	GGT	GGT	TCG	960
321	Q	P	D	Q	S	S	E	K	R	D	G	E	Q	V	N	K	336
961	CAA	CCG	GAC	CAA	TCC	TCG	GAG	AAA	CGC	GAC	GGG	GAA	CAG	GTA	AAC	AAA	1008
337	G	K	P	P	T	G	G	S	G	G	A	T	T	G	K	Q	352
1009	GGC	AAA	CCT	CCC	ACT	GGC	GGA	TCC	GGC	GGA	GCA	ACA	ACT	GGA	AAA	CAA	1056
353	N	A	S	Q	N	A	K	D	K	G	E	T	G	G	E	N	368
1057	AAT	GCA	TCC	CAA	AAC	GCG	AAG	GAC	AAG	GGG	GAA	ACA	GGA	GGA	GAG	AAC	1104
369	G	D	S	P	V	L	R	G	D	A	C	D	E	L	P	S	384
1105	GGC	GAT	TCC	CCC	GTG	TTA	AGA	GGA	GAT	GCA	TGT	GAC	GAG	TTG	CCT	TCG	1152
385	Y	V	A	L	S	A	A	S	L	T	A	T	A	I	F	A	400
1153	TAC	GTG	GCA	CTA	TCC	GCT	GCG	TCA	CTG	ACT	GCA	ACG	GCA	ATC	TTT	GCG	1200
401	Y	*															402
1201	TAC	TGA															1206

(B) SAG2.

Fig. 29. Sequence analysis of selected clones from immunoscreening of *N. caninum* cDNA library with anti-*N. caninum* bovine serum. (A) SAG1. (B) SAG2.

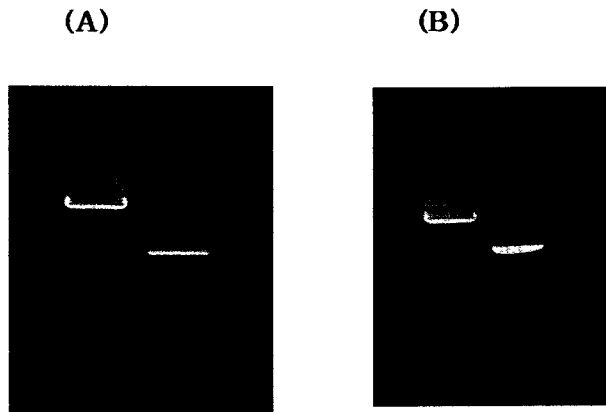


Fig. 30. Analysis of SAG1(A) and SAG2(B) gene amplified by the polymerase chain reaction(PCR).

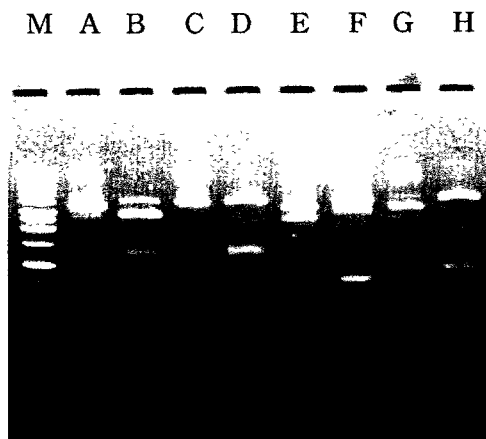
### 3. 발현

형질전환된 *E. coli*에서 SAG1의 발현은 IPTG를 이용하여 유도하였다. 용합단백질의 발현 정도를 알아보기 위해 다양한 농도의 IPTG를 첨가하여 발현을 유도한 결과 IPTG 농도가 0.3mM에서 1mM까지 다양하게 변화시켜 발현을 유도하여 보았을 때 발현정도에는 큰 차이가 없었으며, 용합단백질은 수용성 상태로 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 31).

#### 1) 제조합특이 항원 및 백신후보물질의 정제

*Neospora*의 granule protein인 NCDG1과 NCDG2를 클로닝하였다(Fig. 29). 이 크기는 700 bp와 650 bp를 보였으며, 형질전환하여 0.3 mM IPTG를 이용하여 단백질 발현을 유도하였다. 발현된 단백질은

SDS-PAGE 및 western blot을 실시하여 확인한 결과 발현된 GST 융합 단백질의 분자량은 약 72kDa, 70kDa이었고, pMal을 제거한 발현단백질의 분자량은 약 29 kDa, 27 kDa이었다. 이의 염기서열 결과는 Fig. 30에서 보여지고 있다.



**Fig. 31 Gel electrophoresis of DNA fragments digested by restriction enzyme for identification of recombinant plasmid containing SAG1, SAG2, NADG1 & 2 gene fragment. lane M : 1kb ladder; lane A, C, E, G : recombinant plasmid containing SAG1, SAG2, NADG1 & 2; lane B, D, F, H : SAG1, SAG2, NADG1 & 2 fragments digested by restriction enzyme.**

1	M	A	R	Q	A	T	F	I	V	A	L	C	V	C	G	L	16
1	ATG	GCC	CGA	CAA	GCA	ACC	TTC	ATC	GTG	GCT	CTG	TGC	GTT	TGT	GGA	CTG	48
17	A	I	A	G	L	P	R	L	A	S	A	G	D	L	A	T	32
49	GCA	ATC	GCG	GGC	CTG	CCG	AGG	CTC	GCT	AGC	GCT	GGA	GAC	TTG	GCA	ACC	96
33	E	Q	H	E	G	D	I	G	Y	G	V	R	A	Y	A	G	48
97	GAA	CAG	CAT	GAA	GGG	GAC	ATC	GGA	TAT	GGG	GTT	AGG	GCA	TAT	GCC	GGC	144
49	V	S	N	Y	D	G	D	D	D	A	A	G	N	P	V	D	64
145	GTT	TCA	AAC	TAT	GAC	GGC	GAT	GAC	GAT	GCT	GCA	GGA	AAC	CCT	GTC	GAC	192
65	S	D	V	T	D	D	A	I	T	D	G	E	W	P	R	V	80
193	TCG	GAT	GTG	ACT	GAC	GAT	GCC	ATT	ACA	GAT	GGT	GAG	TGG	CCA	CGT	GTT	240
81	V	S	G	Q	K	P	H	T	T	Q	K	G	S	L	I	K	96
241	GTA	TCG	GGG	CAG	AAG	CCG	CAC	ACG	ACT	CAG	AAA	GGC	AGC	TTG	ATC	AAG	288
97	K	L	A	V	P	V	V	G	A	L	T	S	Y	L	V	A	112
289	AAG	CTG	GCA	GTA	CCG	GTG	GTC	GGC	GCT	CTT	ACG	TCG	TAT	CTT	GTT	GCT	336
113	D	R	V	L	P	E	L	T	S	A	E	E	E	G	T	E	128
337	GAC	AGG	GTG	CTG	CCC	GAG	TTG	ACT	TCT	GCA	GAA	GAA	GAA	GGA	ACA	GAG	384
129	S	I	P	G	K	K	R	V	K	T	A	V	G	I	A	A	144
385	TCC	ATC	CCC	GGT	AAA	AAA	CGT	GTC	AAG	ACT	GCC	GTG	GGC	ATA	GCC	CGC	432
145	L	V	A	A	A	A	F	A	G	L	G	L	A	R	T	F	160
433	TTA	GTT	GCA	GCA	GCC	GCA	TTT	GCT	GGA	TTG	GGT	CTC	GCG	AGA	ACA	TTC	480
161	R	H	F	V	P	K	K	S	K	T	V	A	S	E	D	S	176
481	AGG	CAT	TTC	GTG	CCA	AAA	AAG	TCA	AAG	ACG	GTT	GCG	AGT	GAG	GAC	TCT	528
177	A	L	G	N	S	E	E	Q	Y	V	E	G	T	V	N	G	192
529	GCG	CTC	GGA	AAC	AGT	GAA	GAG	CAG	TAT	GTG	GAA	GGA	ACC	GTG	AAC	GGG	576
193	S	S	D	P	E	Q	E	R	A	G	G	P	L	I	P	E	208
577	AGC	AGT	GAT	CCG	GAA	CAG	GAG	CGG	GCG	GGT	GGG	CCT	CTT	ATC	CCG	GAA	624
209	G	D	E	Q	E	V	D	T	E	*							218
625	GGA	GAC	GAG	CAG	GAA	GTA	GAC	ACC	GAA	TAG							655

(A) NCDG 1

1	GAT	CTG	GTT	CCG	CGT	GGA	TCC	ATG	GCG	AAC	AAT	AGA	ACC	CTC	GCA	AGG	48
1	D	L	V	P	R	G	S	M	A	N	N	R	T	L	A	R	16
49	CGG	AGG	CGT	GCC	TIT	TCT	CCT	CTG	ACC	GTC	GTC	ATG	TTG	GCG	GTG	ACG	96
17	R	R	R	A	F	S	P	L	T	V	V	M	L	A	V	T	32
97	CTT	GTG	GCC	TTC	ATG	GGC	GTG	CCT	CTC	AGC	TCC	ACG	GGA	GCC	GCC	GAC	144
33	L	V	A	F	M	G	V	P	L	S	S	T	G	A	A	D	48
145	GCA	GCC	GAT	CCG	GTT	GAA	TCC	GTG	GAG	GCA	AAT	CGA	CCG	GGA	TAC	ACG	192
49	A	A	D	P	V	E	S	V	E	A	N	R	R	G	Y	T	64

193	TOG TAC GGT GAG CCG CCA GTC GCC GTG GGA ACC TCT GAA GAG TAT GTC	240
65	S Y G E P P V A V G T S E E Y V	80
241	AAC TCT TCC GAG TTA GCA GGC GGT CGT GAC AAG GGG AAC GCG GAA GCG	288
81	N S S E L A G G R D K G N A E A	96
289	GAA GAA GAA GCC GCT GAG GTT GAG ACT GAT GTT CAG CCT TCC AGC GTG	336
97	E E E A A E V E T D V Q P S S V	112
337	ACG ATT GAT ACG GAG GAA CGC GCG GCA CCC AGT CAG GTA CAG GTA CAG	384
113	T I D T E E R A A P S Q V Q V Q	128
385	CAA GAG AGA ATG GAA GAA GCT GAC GAT GCT CCG AAA CCT GTT CCG GTG	432
129	Q E R M E E A D D A P K P V P V	144
433	CGG TCG GCG GTC CCG TCT ACA GTG GCG AAA CCG CAG CAG GCA CGT CAC	480
145	R S A V P S T V A K R Q Q A R H	160
481	AGA GTC ATT GGG ACA GCG GTG ATA GCG GCA GTA GTT GCG GCA CTT CTT	528
161	R V I G T A V I A A V V A A L L	176
529	TGG AAG TTT TCG AGA CGC CGA TCG GGA GCT CCA CGT GAG GGG GGG GAA	576
177	W K F S R R R S G A P R E G G E	192
577	AAT GAA AAC GGC GGG GAG GAA AAA TAG	600
193	N E N G G E E K *	210

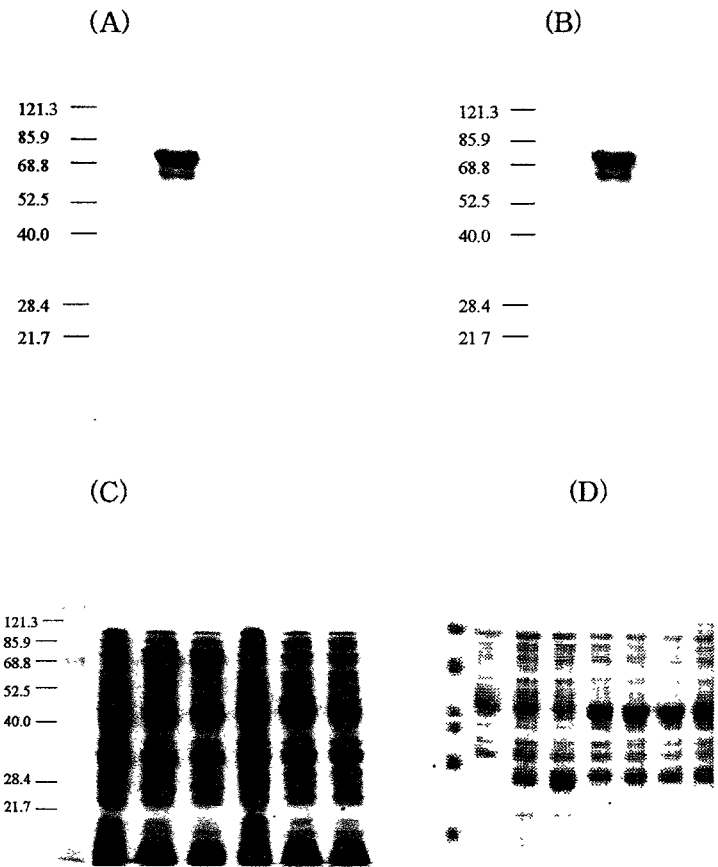
(B) NCDG 2

**Fig 32. Analysis of NCDG1(A) and NCDG2(B) gene in pCR™II**

BLAST를 이용하여 Fig. 30의 database에서 상동성 조사결과 NCDG1 cDNA를 암호화하는 예상된 protein이 *T. gondii*의 30kDa antigen (accession no. A19554)와 상당히 유사함을 나타내었다. 올해 생산된 SAG1과 SAG2의 단클론 항체를 면역학적 특성연구 중에 있다. 또, granule protein의 재조합유전자의 산물을 정제하여 네오스포라 항원을 마우스에 면역시킨 다음 마우스에서 적출한 spleen cell을 myeloma cell과 융합시켜 단클론항체를 제작하여, 생산된 단클론 항체들에 대한 진단용 단백질로서의 가치와 추후 백신 후보물질로서의 실험을 수의과학검역원에



서 실시했다.



**Fig 33. DG 1&2 expression. Analysis of fusion proteins expressed in *E. coli* BL21.** Samples were electrophoresed in 12.5% SDS-PAGE, stained with Coomassie brilliant blue R250. Lane A; the cell lysate of *E. coli* BL21; Lane B; the cell lysate of *E. coli* BL21/pGEX-4T-2; Lane C; the cell lysate of induced *E. coli* BL21/pGEX-4T-2; Lane D to G, after 2, 3, 4, and 5h induction, respectively; the cell lysate of induced *E. coli* BL21/pGEX-4T-2; M, standard marker proteins

## 2) 단클론항체의 생산

### (1) 융합실험 결과

#### ① BALB/c 마우스의 항체가 측정

SAG1과 SAG2의 항원으로 면역된 BALB/c 마우스의 혈청내 항체가 는 Table 14과 같다.

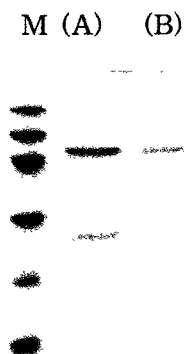
**Table 14 . Frequency of cell wells with hybrid cells from cultures in HT media after cell hybridization and secreted antibodies to SAG1 & SAG2 of *N.caninum***

Spleen donors	Fusion frequency%	Number of wells		
		Seeded	Fused	Positives(%)
A(SAG1)	74.6	252	188	21(11.2)
B(SAG1)	63.2	269	170	32(18.8)
Total	68.9	521	358	53(15)
C(SAG2)	81.7	312	255	27(10.6)
D(SAG2)	63.9	241	154	22(14.3)
Total	72.8	553	409	49(12.5)

#### ② 융합세포의 HAT 및 HT 선택배지에서의 선택배양과 스크리닝

SAG1와 SAG2 항원에 면역된 각 2마리씩의 BALB/c마우스를 2번에 걸쳐 세포융합하여 6장씩 두 항원에 대해서 96well plate(521 well, 553well)에 분주하고 6일간 HAT배지에서 그리고 6일간 HT배지에서 선택배양한 결과 SAG1은 총 358 well(68.9%), SAG2는 총 409well(72.8%)에서 융합된 세포의 증식을 확인하였다. 곧이어 이를 358 well, 409 well

의 배양액으로 SAG1과 SAG2항원에 대한 Ig poly 항체생산을 ELISA로  
 검정한 결과 흡광도 0.2이상을 기준으로 하여 모두 53 well (15%), 49  
 (12.5%)에서 항체의 생산을 확인하였다(Table 14).



**Fig. 34. Purification of Ig G in SAG1(A) & SAG2(B) monoclonal antibody of *N. caninum*.** Samples were electrophoresed in 10 % SDS-PAGE, stained with Coomassie brilliant blue R250. Lane M : standard marker.

4. SAG1과 SAG2 재조합 단백질의 대량 생산 정제하여 검역원에 제공하였다.
5. In Vitro 실험을 통한 단클론 항체의 세포내 침투억제기전 효과 분석

24 well plate의 coverslip에 숙주세포(vero cell)를 키운 후, 24시간 후에 SAG1, SAG2의 단클론 항체를 처리한 후 네오스포라 원충을 첨가하여(약  $\times 10^7$ ) 함께 약 2시간동안 배양하였다. 배양 종료 후 네오스포라원충의 수를 10배 광학현미경하에서 Giemsa염색하여 확인하여, control에 대한 저해효과율은 다음의 공식을 이용하여 산출하였다.

$[1 - (\text{No. of } N. \text{ caninum per host cell treated} / \text{No. of } N. \text{ caninum per host cell untreated})] \times 100$ . 그 결과 mAb SAG 1는 62%, mAb SAG2는 65%를 보였다.

#### 6. NCDG1, NCDG2의 재조합 단백질 발현확인 및 단클론항체 제작

NCDG1, NCDG2의 항원으로 면역된 BALB/c 마우스의 항체가를 측정, 융합세포의 HAT 및 HT 선택배지에서 선택배양과 스크리닝을 실시하여 항체생산을 확인하였고(Fig. 33), Ig G의 정제를 Affinity chromatography(Protein G-Sepharose 4 Fast Flow, Pharmacia)를 이용하여 다음과 같은 방법으로 실시하였다.

- 1) Protein G-Sepharose gel 5ml을 column에 packing한다.
- 2) packing된 gel을 binding buffer(20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0)로 washing한 후 복수액 소량(0.5-1ml)을 50 ml/h의 유속으로 column에 흘려보내어 IgG을 부착시킨다.
- 3) 동일한 유속으로 elution buffer(0.1M glycine, pH 2.5-3.0)을 흘려보내어 부착된 Ig G을 회수하고, 회수된 IgG가 포함된 용액에 1 M Tris-HCl을 소량 첨가한다.

\* 회수된 IgG는 SDS-PAGE로써 정제여부를 확인하고, Western blotting을 통하여 항원과의 반응여부를 확인하여 국립수의과학검역원에 공급하였다.

## 제 4장 참고자료 및 문헌

김대용, 황우석, 김재훈, 허권, 황의경, 이병천, 진영화, 이재진, 최상호. 1997. *Neospora*에 의한 소 유산 발생. 대한수의학회지. 37: 607-612.

김재훈, 황의경, 송현주, 진영화, 윤순식, 김대용. 1998a. *Neospora caninum*에 의한 젖소의 반복유산. 대한수의학회지. 38: 853-858.

김재훈, 송현주, 황의경. 1998b. 국내 소에서 *Neospora caninum*의 분리. 대한수의학회지 38: 139-145.

조영미, 강승원, 최은진, 정우석, 윤용덕, 황우석. 1998. *Neospora caninum* 간접형광항체진단법 개발 및 국내 가축에서의 항체가 조사. 대한수의학회지. 3: 595-599.

허권, 김재훈, 황우석, 황의경, 진영화, 이병천, 배지선, 강영배. 1998. 간접형광항체법을 이용한 국내 젖소의 *Neospora caninum*에 대한 혈청역학적 연구. 대한수의학회지. 38: 859-866.

Agerholm, J.S., and B.C. Barr. 1994. Bovine abortions associated with *Neospora* in Denmark. Acta Vet. Scand. 35: 461-464.

Anderson, M.L., P.C. Blanchard, B.C. Barr, J.P. Dubey, R.L. Hoffman, and P.A. Conard. 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 198: 241-244.

Barr, B.C., M.L. Anderson, P.C. Blanchard, B.M. Daft, H. Kinde, and P.A. Conrad. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis with protozoal infection. *Vet. Pathol.* 27: 354-361.

Barr, B.C., M.L. Anderson, J.P. Dubey, and P.A. Conrad. 1991. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions in cattle. *Vet. Pathol.* 19: 110-116.

Barr, B.C., P.A. Conrad, and R. Breitmeyer. 1993. Congenital neospora infection in calves born from cows that had previously aborted neospora-infected fetuses: Four cases(1990-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202: 113-117.

Conrad, P.A., B.C. Barr, K.W. Sverlow, M. Anderson, B. Daft, H. Kinde, J.P. Dubey, L. Munson, and A. Ardans. 1992. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine foetuses. *Parasitology* 106: 239-249.

Dubey, J.P., J.L. Carpenter, C.A. Speer, M.J. Topper, and A. Uggla. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192: 1269-1285.

Dubey, J.P., S. Miller, D.S. Lindsay, and M.J. Topper. 1990a. *Neospora caninum* associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2: 66-69.

Dubey, J.P., W.J. W.J. Hartley, D.S. Lindsay, and M.J. Topper. 1990b. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *J. Parasitol.* 76: 127-130.

Dubey, J.P., and D.S. Lindsay. 1990. Transplacental *Neospora caninum* infections in cats. *J. Parasitol.* 75: 765-771

Dubey, J.P. 1992. A review of *Neospora caninum* and neospora-like infections in animals. *J. Protozool. Res.* 2: 40-52.

Dubey, J.P., J. Rigoulet, P. Lagourette, C. Goerge, L. Longeart, and J.L. Lenet. 1996a. Fatal transplacental neosporosis in a deer. *J. Parasitol.* 82: 338-339.

Dubey, J.P., D.S. Lindsay, D.S. Adams, J.M. Gay, T.V. Baszler, B.L. Blagburn, and P. Thulliez. 1996b. Serological responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.* 57: 329-336.

Fuchs, N., S. Sonda, B. Gottstein, and A. Hemphill. 1998. Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J. Parasitol.* 84: 753-758.

Gray, M.L., B.G. Harmon, L. Sales, and J.P. Dubey. 1996. Visceral neosporosis in a 10-year old horse. *J. Vet. Med.* 58: 191-195

Hemphill, A. 1996. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infect. Immun.* 64: 4279-4287.

Hemphill, A., and B. Gottstein. 1996. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol. Res.* 82: 497-504.

Hemphill, A., N. Fuchs, S. Sonda, B. Gottstein, and B. Hentrich. 1997. Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology* 115: 371-380.

Holdahl, O.J.M., C. Bjorkman, and A. Ugglä. 1995. A case of neospora associated bovine abortion in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 36: 279-281.

Holdahl, O.J., and J.G. Mattsson. 1996. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by *in vitro* amplification of the internal transcribed spacer 1. *Parasitology* 112: 177-182.

Jamaluddin, A., and T. James. 1991. Dairy cattle abortion in California: evaluation of diagnostic laboratory data. *J. Vet. Diag. Invest.* 8: 210-218.

Jadin, J.E., and J.P. Dubey. 1992. Canine neosporosis in South africa. *Vet. Parasitol.* 44: 291-294.

Lally, N.C., M.C. Jenkins, and J.P. Dubey. 1996. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an ELISA for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3: 275-279.

Liddell, S., N.C. Lally, M.C. Jenkins, and J.P. Dubey. 1998. Isolation of the cDNA encoding a dense granule associated antigen (NCDG2) of *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 93: 153-158.

Lindsay, D.S., and J.P. Dubey. 1989b. Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *J. Parasitol.* 75: 990-992.

Lindsay, M.L., and J.P. Dubey. 1989a. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1981-1983.

Lindsay, D.S., and J.P. Dubey. 1990a. Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplex) infections in mice. *J. Parasitol.* 76: 177-179.

Lindsay, D.S., and J.P. Dubey. 1990b. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J. Parasitol.* 76: 410-413.

Ogino, H., E. Watanaba, S. and Watanaba. 1992. Neosporosis in the aborted fetus in British cattle. *Vet. Rec.* 134: 405-407.

Otter, A., H. Jeffrey, and I.B. Griffiths. 1995. A survey of the incidence



of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn fetuses in England and Wales. *Vet. Rec.* 136: 602-606.

Thilsted, J.P., and J.P. Dubey. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1: 205-209.

Wounda, W., J.P. Dubey, and M.C. Jenkins. 1997. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J. Parasitol.* 83: 545-547.

Yamage, M., O. Flechtner, and B. Gottstein. 1996. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cysts" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.* 82: 272-279.