DNA 추출없이 전혈을 이용한 PCR-전기영동법에 의한 소의 타일레리아병 진단

강성호* · 장상민 · 채준석[†] · 김용성^{††}

전북대학교 화학과

전북대학교 생체안전성연구소

경남대학교 생명화학공학과

(2003. 1. 23 접수)

Diagnosis of Bovine Theileriosis by Direct PCR and Electrophoresis from Whole Blood Without DNA Extraction

Seong Ho Kang*, Sangmin Jang, Joon-Seok Chae[†], and Yongseong Kim^{††}

Department of Chemistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

[†]Bio-safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

^{††}Division of Chemistry and Chemical Engineering, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

(Received, January 23, 2003)

요 약. 소의 타일레리아병 진단을 위해 DNA 추출과정 없이 전혈에서 바로 증합효소연쇄반응(PCR)을 통하여 *T. buffeli*(*buffeli/orientalis/sergenti*)의 16S rRNA 유전자 단편을 증폭시킨 뒤, 증폭된 DNA를 전기영동법으로 분석하는 방법을 개발하였다. 특히 유전자 단편의 증폭을 위해 formamide를 사용하여 혈액세포를 용해시켰으며, 단백질의 응고를 줄이기 위해 낮은 반응온도를 사용하는 FoLT(Formamide Low Temp.) PCR법을 이용하였다. 전혈 100-200 nL를 바로 PCR 증폭에 사용하였으며, PCR 산물(816-bp DNA)은 전기영동법으로 분석하였다. 본 결과는 *T. buffeli*에 감염된 소의 혈액으로부터 정제된 DNA를 사용하여 얻은 실험결과와 잘 일치하였다.

주제어: 타일레리아병, 진단, 증합효소연쇄반응, 전혈

ABSTRACT. We have developed a direct polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis method for the diagnosis of bovine theileriosis from whole blood DNA analysis without DNA extraction. The technique employed a FoLT (formamide, low temp.) technique and was utilized in the diagnosis of bovine theileriosis. Formamide solubilize the blood cells, and the lowered incubation temperatures reduced protein coagulation. 100-200 nL of whole blood and PCR reagents were introduced directly into a PCR tube. After the amplification, the PCR product (816-bp DNA) was introduced into the electrophoresis system. The results of this analysis were consist with those obtained using purified DNA.

Keywords: *T. buffeli*(*buffeli/orientalis/sergenti*), Direct PCR, Whole Blood, Diagnosis

1. 서 론

국내에서 발병되는 소의 '타일레리아병'은 진드기 매개성 전염성 질병으로서 *Theileria buffeli*(*T. buffeli/orientalis/sergenti* 그룹)^{1,2}가 원인체로 알려져 있으며,^{3,4}

병원성 및 임상증상으로는 임파구계의 증식에 따른 림프조직의 탈진과 백혈구 감소현상이 일어난다. 주로 봄부터 진드기가 활동하는 시기에 방목장에 나간 송아지에서 심하게 임상증상이 나타나며, 1년생 이상은 면역성을 가져 거의 임상증세를 나타내지 않으나, 심한 스

트래스를 받을 때 또는 면역력이 저하되었을 경우에 임상증상을 발현한다. 한번 감염되면 치료제에 의해서도 완전히 병원체가 사라지지 않으며, 잠복상태에서 오랫동안 남아있다.⁵ 타일레리아병의 진단은 임상증상과 혈액도말 표본을 만들어 적혈구 내에 감염된 원충을 찾거나,^{5,6} 보다 정확한 방법은 표적성 임프질의 조직을 구경이 큰 주사바늘로 천자하여 만든 도말표본으로부터 임파구에 기생하는 분열체를 검출하는 방법과 혈청학적인 진단방법으로 보체결합반응(Complement fixation test, CFT), 간접형광항체법(Indirect immunofluorescent test, IFAT), 효소표식면역흡착시험(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 등을 통해 진단을 하고 있다.⁵ 치료제로는 diminazene diaceturate(Berenil[®]) 나 buparvaquone 등이 어느 정도 효과가 있으며, chlortetracycline을 질병 초기에 부여한다.^{5,7} 그러나 완치시킬 효과적인 약품은 없다. 따라서 예방 및 관리가 최우선적인 치료이며, 진단기를 구제하거나 백신으로 약독화한 종을 주사하여 면역성을 부여하는 방법이 있다. 이를 위해서는 빠르고 정확한 *Theileria* 원충의 검출방법이 중요하며, 최근에는 유전자 증폭기술인 “중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)”을 주로 이용하고 있다.⁸⁻¹⁰

PCR은 DNA를 증폭하는 *in vitro* 방법중의 하나로, PCR을 이용하면 과거에는 감지할 수 없었던 유전자의 미세한 변화나 미량의 유전자를 쉽게 인식할 수 있어 보다 정확한 질병의 진단이 가능하다. 따라서 잠복형 타일레리아 원충을 검출하는데 효과적으로 이용할 수 있으며, 감염정보를 확보, 함으로서 사육관리에 도움이 될 수 있다. 하지만 질병진단을 위한 PCR 방법을 빠르게 적용시키는데 중요한 제한점 중의 하나는 임상시료를 직접적으로 PCR에 적용하기 어렵다는 것이다. 이것은 실제 임상시료에서 직접 검출하기에는 질병에 관련된 원인체의 DNA의 양이 너무 적거나, PCR을 방해하는 많은 물질들이 있기 때문이다. 즉, 실질적인 임상시료에서 직접적인 DNA 증폭이 어려운 이유는 PCR을 하기 전에 DNA나 표적물질을 정제하는 단계가 필요하기 때문이다. 임상에서 PCR에 기본을 둔 실험의 단계는 이론적으로 임상시료를 가지고, DNA 정제, PCR증폭, 결과의 해석, 질병진단의 순서로 실험이 행해진다. 이런 경우 많은 노동력과, 비용, 시간, 시료오염 등 많은 문제점을 가지고 있다.

PCR에서 DNA를 정제하는 방법에는 일반적으로 케놀과 클로로포름을 이용한 방법,¹¹ 염,¹² 염기¹³를 사용

하여 DNA를 추출 혹은 정제하는 방법 등이 있다. 빠른 PCR 반응을 위해 부분적으로 정제된 DNA를 사용하기도 하고,¹⁴ 빠른 DNA 추출을 위해 혈액에 열과 세면활성제를 동시에 처리하는 방법이나,¹⁵ 수-수십 μ L의 전혈을 이용하여 DNA의 추출과정 없이 PCR을 하는 방법^{16,20} 등이 보고되고 있다. 또한 formamide와 낮은 온도를 이용한 formamide low-temperature PCR(FoLT PCR)방법을 이용하여 전혈에서 바로 PCR을 하여 DNA를 증폭할 수 있는 연구가 보고되고 있다.²¹⁻²³ FoLT PCR법은 화학물질인 formamide를 사용하여 혈액세포를 용해시키고, 낮은 온도에서 반응을 시키므로 단백질의 응고를 줄일 수 있는 장점이 있다.²⁴ 하지만, μ L 이하의 극소량의 혈액을 가지고 DNA 추출과정 없이 바로 질병진단이나 임상에서 FoLT PCR방법을 적용한 예는 아직 많지 않다. 특히, 소의 타일레리아병 진단에 FoLT PCR방법을 사용한 예는 아직까지 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 DNA 정제과정을 기치지 않고 μ L 이하의 전혈을 사용하여 바로 PCR을 하여 DNA를 증폭시킨 뒤, 전기영동을 하여 소의 타일레리아병을 진단할 수 있는 새로운 PCR-전기영동법을 보고한다. 본 연구의 결과는 기존의 DNA 정제과정을 기치는 일반적인 PCR방법에 비해 짧은 분석시간, 적은 시료의 양, 시료오염의 방지, 자동화의 용이성 등에 대해 장점이 있다.

실 험

시약 및 시료

본 실험에 사용한 시약 및 재료에서 10x PCR buffer, 25 mM MgCl₂, formamide와 ethidium bromide는 Promega 사(Madison, WI, USA)에서, nuclease free water는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 2.5 mM dNTP mix, Taq DNA polymerase (5 U/ μ L)는 Super-Bio 사(한국)에서 구입하였다. *T. buffeli(buffeli/orientalis/sergenti)*의 16S rRNA 유전자 단편을 증폭시키기 위한 primer는 forward primer, 5'-AAA CTG CGA ATG GCT CAT-3'와 reverse primer, 5'-ACA TCC TTG GCA AAT GCT-3'로 100 pmol/ μ L를 제노텍(한국)에서 공급받아 10배로 희석하여 사용하였다. 증폭된 DNA의 크기는 816 bp이다. 100-bp DNA ladder(100 μ g/mL)는 제네피아(한국)에서 구입하여 사용하였다. 증류수는 0.22 μ m-membrane filter Millipak[®] 40이 결합되어 있는 Milli-Q TM-Milli-RO[®] Water System(Bedford, MA, USA)에서

Table 1. The ratio of PCR reaction mixtures (total volume: 10 μ L.)

Sample	Blood (%)	MgCl ₂ (mM)	10x PCR buffer (%)	dNTP (mM)	Primer(μ M)		Formamide (%)	Taq ³	NW ⁴ (%)
					Up ¹	Down ²			
1	2	0	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	50
2	2	0.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	48
3	2	1.0	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	46
4	2	1.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	44
5	2	2.0	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	442
6	2	2.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	40
7	2	3.0	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	38
8	2	3.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	36
9	2	4.0	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	34
10	2	4.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	32
NW	20	1.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	46
NC ⁵	2	1.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	44
PC ⁶	2	1.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	44

¹Up: forward primer. ²Down: reverse primer. ³Taq: Taq DNA polymerase. ⁴NW: Nuclease free water. ⁵NC: whole blood of non-infected bovine. ⁶PC: purified DNA from whole blood of infected bovine.

제조된 것을 사용하였고, 그 밖의 모든 화학시약은 시약등급을 사용하였다.

Polymerase Chain Reaction

최적 PCR 반응혼합물의 비율을 조사하기 위해 소의 혈액 100-200 μ L를 사용하여 총 10- μ L의 반응혼합물을 Table 1과 같은 다양한 비율로 혼합하여 200- μ L thin-wall polypropylene PCR tube에서 PCR을 하였다. Ethidium bromide는 하나의 dye로 사용하였다. PCR 반응은 thermal cycler(Perkin-Elmer model 9600, USA)을 사용하여 incubation은 1주기로 80 °C에서 10분동안 한 뒤, 변성(denaturing)은 80 °C에서 30초, 합성개시물질 결합(annealing)은 40 °C에서 1분, DNA 신장(extension)은 60 °C에서 1분동안 25-70 주기로 하였고, 60 °C에서 7분동안 1주기 hold의 순서로 실행하였다. 혈액의 양과 MgCl₂의 영향을 조사하기 위한 PCR의 조건은 Table 2과 3과 같다. 전혈을 사용한 PCR과 정제된 DNA를 사용한 PCR과의 DNA 증폭효율을 조사하기 위한 정제된 DNA는 QIAGEN사의 "Blood and Body Fluid Spin Protocol"법³⁶에 따라 소의 혈액에서 DNA를 정제하였다.

Slab Gel Electrophoresis

PCR 후 1% agarose gel(Sigma)에서 PCR 산출물 4.5 μ L와 ethidium bromide 1 μ L를 혼합해 5.5 μ L를 젤에 주입한 뒤, 140 V에서 70분동안 전기영동을 하였다. 100-bp DNA ladder는 PCR시료와 함께 젤에 주입하였다. 전기영동이 끝난 젤을 꺼내어 ethidium bromide에 5분

간 염색 후 탈색하여, UV 검출기인 Gel Doc 2000(Bio-RAD, USA)를 사용하여 증폭된 816-bp DNA 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

PCR을 하기 위해 사용된 시약들 중에서 MgCl₂는 효소의 활성에 필요한 시약이므로, DNA의 증폭에 영향을 미칠 것으로 추론되어, 먼저 *T. buffeli*에 감염된 소의 혈액과 임상 소에서 정제된 DNA를 대조로 하여, Table 1의 조건에서 실험하였다. 전혈을 200 μ L로 고정 한 뒤, MgCl₂의 양을 0 mM에서 0.5 mM 씩 증가시키며, PCR 반응주기를 30 cycle에서 50 cycle로 증가시키면서 반응주기에 따른 영향을 조사하였다. 25 cycle에서는 MgCl₂의 농도에 상관없이 증폭된 816-bp DNA를 검출할 수 없었으나, 30 cycle과 35 cycle에서는 3.5 mM 이상과 2.0 mM 이상의 MgCl₂ 농도에서, 40 cycle에서는 1.5 mM MgCl₂ 이상에서 (Fig. 1A), 50 cycle에서는 1.0 mM MgCl₂ 이상에서 (Fig. 1B) 증폭된 DNA를 검출할 수 있었다. 하지만 70 cycle(Fig. 1C) 이상의 반응주기에서 2.0 mM 미만의 농도에서는 증폭된 DNA를 검출할 수 없었다.

유전자분석에서, 임상시료에서 직접 DNA를 증폭하는 것은 시료의 정제나 여러 전처리 단계를 피할 수 있어 바람직하다. 비록 혈액은 매우 복잡하고 오염되기

Fig. 1. PCR amplification of the 816-bp *Theileria buffeli* gene using purified DNA at different $MgCl_2$ concentrations and different cycles of (A) 40, (B) 50 and (C) 70. $MgCl_2$ concentrations: Lane 1, 0 mM; lane 2, 0.5 mM; lane 3, 1.0 mM; lane 4, 1.5 mM; lane 5, 2.0 mM; lane 6, 2.5 mM; lane 7, 3.0 mM; lane 8, 3.5 mM; lane 9, 4.0 mM, and lane 10, 4.5 mM. N: whole blood of non-infected bovine. P: purified DNA from the whole blood of infected bovine. L: 100-bp DNA ladder (100 μ g mL⁻¹).

하지만, 혈액 안의 DNA의 양은 상대적으로 일정하다. 혈액을 이용한 PCR법의 직접적인 문제는 혈액에서 어떻게 DNA polymerase의 활성을 잃지 않고 표적 DNA

로 도달하게 하는 것이다.^{23,27} 우리는 이러한 문제를 해결하기 위하여 formamide와 낮은 온도를 사용하여 혈액세포를 용해시켰다. 하지만, DNA 침체과잉없이 전혈을 가지고 소의 *T. buffeli*를 검출하기 위해 PCR을 하는 것은 쉽지 않다. *T. buffeli*는 적혈구에 기생하는 인자이므로^{3,4} 적혈구가 일반적으로 DNA의 증폭을 저해하는 사실에 비쳐볼 때, PCR에서 DNA증폭에 서로 상반되는 관계에 있으므로, 소의 전혈에 있는 혈장이나 혈청의 양이 PCR 조건에 영향을 미친다. 따라서 먼저 침체된 DNA에서의 결과(Fig. 1)를 토대로 40 cycle의 PCR 반응주기에서 0.5 mM, 1.5 mM 및 3.0 mM $MgCl_2$ 농도에서(Table 2) 소의 혈액의 양에 대한 PCR의 영향을 다시 조사하였다.

Fig. 2에서 보여주듯이 2.4%의 혈액(lane 3)보다는 1.2%의 혈액(lane 6)에서 증폭된 816-bp DNA의 밴드가 진함을 알 수 있었다. 1.5 mM $MgCl_2$ (lane 3)보다는 3.0 mM $MgCl_2$ (lane 6)에서 DNA 증폭이 더 잘되었다. 또한 3.0 mM과 4.5 mM $MgCl_2$ 의 농도와 1-3% 전혈의 양에 따른 DNA 증폭을 비교하기 위해 Table 3와 같은 조건에서 PCR을 다시 하였다. Fig. 3에서 보여주듯이 3 mM $MgCl_2$ 에서는 전혈의 양이 가장 적은 100 nL, 1% (lane 2)에서 가장 좋은 PCR 결과를 보여주었다. 특히, 이 조건에서는 다른 부산물 없이 원하는 816-bp DNA만을 증폭할 수 있었다. 하지만 4.5 mM $MgCl_2$ 에서는 1%의 전혈에서 (lane 5) 원하는 DNA를 얻을 수 없었고, 2% (200 nL)와 3% (300 nL)의 전혈에서 (lane 6과 7) 증폭된 816-bp DNA를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 일반적으로 혈액의 양이 적은 조건에서 PCR의 효율이 좋으나, 절대적인 값은 $MgCl_2$ 의 농도에 의존하므로 먼저 적절한 $MgCl_2$ 의 농도 선택이 첫 번째로 결정되어야 함을 보여준다. 하지만 $MgCl_2$ 의 농도가 너무 높으면 비록 816-bp DNA의 증폭이 많이 되지만, 원하

Table 2. Ratio of PCR reagent at the 0.5 mM, 1.5 mM and 3.0 mM $MgCl_2$ (total volume: 10 μ L.)

Sample	Blood (%)	$MgCl_2$ (mM)	10x PCR buffer (%)	dNTP (mM)	Primer(μ M)		Formamide (%)	Taq ³⁾	NW ⁴⁾ (%)
					Up ¹⁾	Down ²⁾			
1	2.4	0.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	50
2	2.4	1.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	44
3	2.4	3.0	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	38
4	1.2	0.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	51
5	1.2	1.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	45
6	1.2	3.0	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	39

¹⁾Up: forward primer. ²⁾Down: reverse primer. ³⁾Taq: Taq DNA polymerase. ⁴⁾NW: Nuclease free water.

Fig. 2. Gel electrophoresis of the 816-bp PCR products (stained with ethidium bromide) from *Theileria buffeli* under various conditions. Lane 1, 2.4% (v/v) whole blood and 0.5 mM MgCl₂; lane 2, 2.4% (v/v) whole blood and 1.5 mM MgCl₂; lane 3, 2.4% (v/v) whole blood and 3.0 mM MgCl₂; lane 4, 1.2% (v/v) whole blood and 0.5 mM MgCl₂; lane 5, 1.2% (v/v) whole blood and 1.5 mM MgCl₂; lane 6, 1.2% (v/v) whole blood and 3.0 mM MgCl₂; lane 7, 100-bp DNA ladder. PCR cycle=40.

Fig. 3. Gel electrophoresis of the 816-bp PCR products from *Theileria buffeli* under various conditions. Lane 1, 100-bp DNA ladder; lane 2, 1.0% (v/v) whole blood and 3.0 mM MgCl₂; lane 3, 2% (v/v) whole blood and 3.0 mM MgCl₂; lane 4, 3.0% (v/v) whole blood and 3.0 mM MgCl₂; lane 5, 1.0% (v/v) whole blood and 4.5 mM MgCl₂; lane 6, 2.0% (v/v) whole blood and 4.5 mM MgCl₂; and lane 7, 3.0% (v/v) whole blood and 4.5 mM MgCl₂. PCR cycle=40.

결론

지 않는 부산물이 또한 생성된다(Fig. 3의 lane 6과 7). 따라서, Fig. 2와 Fig. 3의 결과를 종합해 볼 때, 소의 혈액에서 "타일레리아병"을 진단하기 위해 816-bp의 DNA를 증폭하여 분석하는 경우, 최적의 혈액의 양과 MgCl₂의 농도는 100-200 nL인 1-2% (v/v) 전혈과 3.0 mM MgCl₂(Fig. 2의 lane 6과 Fig. 3의 lane 2)이었고 반응 주기는 40 cycle 이었다.

소의 전혈에서 DNA 정제과정을 거치지 않고 곧바로 BoLT PCR으로 *T. buffeli*의 16S rRNA 유전자 단편을 증폭시킨 뒤, 증폭된 816-bp DNA를 전기영동으로 분석하여 소의 타이레리아병을 진단하는 방법을 개발하였다. Formamide를 사용하여 혈액세포를 용해시켰으며, 단백질의 응고를 줄이기 위해 80 °C 이하의 낮은 반응 온도를 사용하였다. PCR에 시약 중에서 MgCl₂의 농도

Table 3. Ratio of PCR reagent at the 3.0 mM and 4.5 mM MgCl₂ (total volume: 10 µL)

Sample	Blood (%)	MgCl ₂ (mM)	10x PCR buffer (%)	dNTP (mM)	Primer(µM)		Formamide (%)	Taq ³⁾	NW ⁴⁾ (%)
					Up ¹⁾	Down ²⁾			
14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1	0.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	39
3	2	1.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	38
4	3	3.0	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	37
5	1	0.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	33
6	2	1.5	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	32
7	3	3.0	10	0.25	0.4	0.4	16	0.4	31

¹⁾Up, forward primer; ²⁾Down, reverse primer; ³⁾Taq, Taq DNA polymerase; ⁴⁾NW, Nuclease free water; ⁵⁾100-bp DNA ladder.

와 primer의 농도가 FOLL PCR의 효율에 큰 영향을 주었다. *T. buffeli*는 적혈구에 기생하기 때문에, 전혈의 양이 DNA의 증폭효율 및 PCR의 성공 유 부에 중대한 영향을 주는 것을 알 수 있었다. MgCl₂ 농도와 전혈의 양에 따른 증폭된 DNA의 양의 비교에서, DNA 밴드의 크기나 색의 밝기로 비교하였을 때 3.0 mM MgCl₂에서 원하는 816-bp DNA만을 얻을 수 있었다. 또한, 전혈의 양이 적을수록(200 μ l 이하) DNA 증폭이 더 효율적임을 알 수 있었다. 즉, MgCl₂ 농도가 높으면 비특이적 밴드가 늘어나고 PCR 산물의 패턴이 변화함을 알 수 있었다.

*T. buffeli*에 감염된 소의 혈액으로부터 추출된 DNA를 사용하여 얻은 실험결과와 전혈을 바로 사용한 결과가 잘 일치 하는 것으로 볼 때, 본 분석방법은 DNA를 정제하는 전처리과정없이 μ l 이하의 극소량의 전혈을 사용하여 빠른 시간 내에 소의 타일레리아병을 진단할 수 있는 방법임을 제시한다.

본 연구는 "전북대학교 2002년도 전반기 신임교수 연구비"에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Gubbels, M.J.; Hong, Y.; van der Weide, M.; Qi, B.; Nijman, I.J.; Guangyuan, L.; Jongejan, F. *Int. J. Parasitol.* **2000**, *30*, 943-952.
- Gubbels, M.J.; Yin, H.; Bai, Q.; Liu, G.; Nijman, I. J.; Jongejan, F. *Parasitol Res.* **2002**, *88*(13 Suppl 1), S28-32.
- Onuma, M.; Kakuda, T.; Sugimoto, C. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **1998**, *21*(3), 165-177.
- 채준석; 이주목; 권오덕; 이승욱; 채건상. *대한수의학회지*. **1996**, *36*, 187-193.
- 이주목; 김명철. *대한수의학회지*. **1989**, *27*(2), 321-330.
- Nam, C. R.; Cheol, D. Y. *Diagnosis of veterinary hemoparasitic disease*; Tokyo modern print; 1986, p 149-169.
- 김 두. *대한수의학회지*. **1993**, *33*(1), 137-143.
- Choi, E. J.; Kang, S. W.; Kwon, C. H.; Jeong, W. S.; Yoon, Y. D.; Song, H. *J. Korean J. Parasitol.* **1997**, *35*(2) 111-117.
- Innis, M. A. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press; 1990.
- 채준석, 이주목, 권오덕, 이승욱, 채건상. *대한수의학회지*. **1996**, *36*(1), 187-193.
- Gross-Bellard, N.; Oudet, P.; Chambon, P. *Eur. J. Biochem.* **1973**, *36*, 32-38.
- Miller, S. A.; Dykes, D. D.; Polesky, H. F. *Nucl. Acids Res.* **1998**, *16*, 1215.
- Klitsch, M.; Neuhuber, F. *J. Forensic Sci.* **2000**, *45*(3) 669-673.
- Ferre, F.; Garduno, F. *Nucl. Acids. Res.* **1989**, *17*, 2141.
- Casareale, D.; Pottathil, R.; Diaco, R. *PCR Methods and Applications*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1992; p 149-153.
- Mercier, B.; Gaucher, C.; Feugeas, O.; Mazurier, C. *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*(19), 5908.
- McCusker, J.; Dawson, M. T.; Noone, D.; Gannon, F.; Smith, T. *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*(24), 6747.
- Panaccio, M.; Georges, M.; Hollywell, C.; Lew, A. *Nucl. Acids Res.* **1993**, *21*(19), 4656.
- Makowski, G. S.; Davis, E. L.; Aslanzadeh, J.; Hopfer, S. M. *Nucl. Acids Res.* **1995**, *23*(18), 3788-3789.
- Grevelding, C. G.; Kampkötter, A.; Hoffmann, M.; Schäfer, U.; Kunz, W. *Nucl. Acids Res.* **1996**, *24*(20), 4100-4101.
- Panaccio, M.; French, M.; Lew, A. *Methods in Neurosciences*. **1995**, *26* 3-14.
- Panaccio, M.; Georges, M.; Lew, A. *BioTechniques*. **1993**, *14*, 238.
- Zhang, Y.; He, Y.; Yeung, E. S. *Electrophoresis*. **2001**, *22*, 2296-2302.
- Michael Panaccio, M.; Lew, A. M. In *PCR Technology Current Innovations* Griffin, H. G.; Griffin, A. M.; Ed.; CRC Press: USA, 1994; p 151-157.
- 이양한, 임시근, 강필원, 최동호, 윤종호, 한민수. *한국분 석과학회지*. **1999**, *12*(3), 260-264.
- QIAGEN. *QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook*, QIAGEN: USA, September 2001, p 27-29.
- Panaccio, M.; Lew, A. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1151.