

이질아메바 병원성 분리주에서 발현되는 항원 단백질을 coding하는 cDNA

임경일*, 최종태, 홍용표, 김태은, 라미숙

연세대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대의학연구소

초록: 이질아메바 병원성 분리주에서 특이적으로 발현되는 mRNA를 동정하고자 differential display reverse transcription-polymerase chain reaction(DDRT-PCR)을 수행하여 병원성 특이 증폭산물을 확인하였다. 한국인에서 검출한 이질아메바 병원성 분리주 YS-27과 비병원성 *Entamoeba dispar* 분리주인 S 16으로부터 정제한 mRNA를 주형으로 11개의 arbitrary primer와 3개의 one base anchored oligo-dT₁₁M(M: A, C, 또는 G)의 조합을 이용, DDRT-PCR을 실시한 결과 31개의 분획이 YS-27주에서만 증폭된 것으로 확인되었다. 이 31개 DNA 중 21개는 cysteine proteinase 유전자와 상동성을 나타내었다. YS-27주로부터 제작된 cDNA library를 나머지 DNA를 탐침으로 사용, 검색하여 최종 4개의 clone을 얻었다. 이 4개의 clone을 이용, immunoscreening을 수행한 결과, 이 clone들은 이질아메바 감염자 혈청과 양성반응을 나타내고 있었다.

서 론

이질아메바는 인체에 침범하여 장 아메바증, 아메바성 간 농양 등의 질병을 유발한다. 그러나, 일부 씨스트를 배출하면서도 증상을 보이지 않는 사람들도 있어 이질아메바의 병원성에 대한 문제가 논의되어 왔다. 이질아메바의 병원성과 비병원성 분리주는 인체에 침습성 질병을 유발할 수 있는 능력에서 뿐 아니라 생화학적 특징에서 차이가 발견된다. 즉, 이질아메바의 병원성과 관련된 생화학적 molecule에는 surface lectins, cytolytic ion channel forming protein, phospholipases (Ravdin, 1986), proteinase(Keene *et al.*, 1986) 등이 있다. 이 중에서 특히 cysteine proteinase는 이질아메바의 병원성 분리주의 중요한 병원성 요인과 많은 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다(Lushbaugh *et al.*, 1985; Leippe *et al.*, 1991). 이질아메바의 5가지 동위효소에 대한 전기영동 양상을 cellulose acetate electrophoresis 방

법을 이용하여 분석한 결과, 종(species) 및 주(strain)간에 주행양상이 다르다고 보고되었으며(Reeves and Bischoff, 1968), 최근 분자유전학 분야의 발달과 더불어 이미 확인된 이질아메바에 대하여 분자유전학적 방법으로 새롭게 분석해야 할 필요성이 대두되었다. 이질아메바의 종 및 주를 구분하고 병원성과 비병원성을 분류하기 위한 분자생물학적 방법으로 restriction fragment length polymorphism(RFLP) marker와 polymerase chain reaction(PCR) 등이 발달되어 왔다(Garfinkel *et al.*, 1989; Tannich *et al.*, 1989).

최근 개발된 arbitrary primer와 3개의 one base anchored oligo-dT primer를 사용하는 differential display reverse transcription-polymerase chain reaction(DDRT-PCR) 분석법을 이용하면 비교하고자 하는 표본 간의 mRNA상에서 유전자 발현의 양적 또는 질적 차이를 구별할 수 있다(Liang and Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1994). 이 방법은 3가지 one base anchored oligo-dT primer와 mRNA poly(A) tail이 시작되는 부위의 선택적 결합에 의해 mRNA의 역전사를 수행한 후, 역전사시 사용한 동일한 oligo-dT가 부착된 primer와 arbitrary 10-mer primer를 이용한 PCR 반응을 수행하는 것이다(Nishio *et al.*, 1994).

• 논문접수 1997년 6월 20일, 게재확정 1997년 9월 1일.

• 이 연구는 1995년도 교육부 학술연구 조성비(기초의학)에 의하여 이루어졌음.

*별책 요청 저자

본 연구는 한국인에서 검출되어 배양하고 있는 이질아메바 병원성 분리주와 비병원성 *Entamoeba dispar* 분리주를 대상으로 병원성과 관련있을 것으로 생각되는 유전정보를 찾고자 하였다.

재료 및 방법

1. 이질아메바 배양 및 한국 분리주

병원성 이질아메바 한국 분리주인 YS-27 (Chang et al., 1995)은 TYI-S-33(Diamond et al., 1978) 배지에서 무균 배양하였고, PCR 방법과 RFLP 분석법에 의해 비병원성으로 확인된 *Entamoeba dispar* S 16주(Lee and Hong, 1996)는 Robinson 배지(Robinson, 1968)에서 배양하여 대조군으로 실험에 사용하였다.

2. mRNA의 분리 및 정제

Total RNA의 분리는 Chomczynski 및 Sacchi(1987)의 방법을 변형하여 사용했다. 이질아메바 세포 1 × 10⁷개당 1 ml 변성용액(4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)과 0.1 ml 2 M sodium acetate(pH 4.0)을 첨가하고, RNA Tack™ resin(Biotecx Lab., USA)을 사용하여 원심침전시켰다. Total RNA는 oligo-dT₂₅가 부착된 자석(Dynal A.S., Norway)을 이용하여 mRNA를 순수 분리했다(Espelund et al., 1990).

3. Single stranded cDNA의 합성

mRNA를 주형으로 one base anchored oligo-dT primer(5'-TTTTTTTTTTM-3': M은 A, G, 또는 C)를 사용하여 single stranded cDNA를 제조하였다. 증합효소 연쇄반응 튜브 3개에 mRNA 40 ng씩을 첨가하고 각각 2 μM의 primer를 넣어 혼합한 후 역전사 증합효소 완충액(25 mM Tris-Cl, pH 8.3, 37.6 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM DTT)을 넣었다. 실온에서 250 mM dTNP, 30 unit RNasin, 4 mM sodium pyrophosphate, AMV 역전사 증합효소 10 unit를 첨가한 후 PCR 온도순환기(Perkin Elmer cetus 9600, USA)를 이용, 42°C에서 1시간 동안 역전사 증합반응을 시키고 70°C에서 10분간 방치하여 AMV 역전사 증합효소를 비활성화시켰다.

4. Polymerase chain reaction

Single stranded cDNA 30 pg을 넣고 증합효소 연쇄반응 혼합액으로 250 μM dNTPs, PCR 완충액, 0.38 μM의 arbitrary primer 및 cDNA 합성 시에 사용한 것과 동일한 primer를 각각 0.4 μM씩 첨가한 후 1.5 unit의 Taq DNA 증합효소를 혼

합하였다. 이 반응액을 94°C에서 5초간 변성, 42°C에서 60초간 결합, 72°C에서 90초간 합성하는 순환 과정을 40회 반복하여 증합효소 연쇄반응을 수행했다. 반응이 끝난 후 시료는 4°C에 보관하였다.

5. Differential display

증합효소 연쇄반응을 통해 증폭된 DNA는 Liang et al.(1994)의 방법을 변형하여 5% polyacrylamide gel상에서 전기영동하였고, silver nitrate 염색으로 증폭된 DNA 분획상을 비교하는 differential display를 수행하였다.

6. Slot blotting

PCR 증폭산물의 DNA를 용출한 후 이 DNA를 주형으로 one base anchored oligo-dT primer와 arbitrary primer를 사용, 병원성 특이 PCR 증폭 산물을 재증폭하였다. 재증폭된 DNA를 nylon membrane에 고정시키기 위해서 nylon membrane을 slot blot manifold(Hoeffer PR648)에 장착한 후 slot에 DNA가 남아있지 않을 때까지 통과시켰다. Membrane을 분리해서 밤새 건조시키고 DNA hybridization을 수행할 때까지 상온에서 보관하였다.

7. DNA hybridization

병원성 YS-27주와 비병원성 S 16주의 증폭산물을 geneclean spin kit를 이용하여 정제한 다음, 95°C에서 5분 동안 열변성시켰다. Hybridization 반응을 시키기 위해 hybridization 용액에서 1시간 동안 65°C에서 prehybridization시켰다. 여기에 8 ml hybridization 용액을 붓고 열변성된 탐침을 넣어 65°C에서 밤새 반응시켰다. Blot을 5분간 2회 도포 완충액으로 도포하고 Avidin-AP conjugate 농축액을 도포 완충액에 1:5,000으로 희석한 다음 첨가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. CSPD 농축액을 1:100으로 희석하여 blot에 첨가한 후 5분간 반응시켰다. blot을 부분 건조시킨 후 cassette(Kodak Co, USA) 내에 Kodak XAR X선 필름(Sigma Co, USA)을 장착하여 30분 형상화했다.

8. Cysteine proteinase primer를 이용한 YS-27주로부터 증폭된 PCR 산물의 검색

이미 알려진 이질아메바의 cysteine proteinase sequence를 GenBank에서 검색하여 12종류의 cyteine proteinase 유전자에서 확인된 sequence 중 6종류의 cysteine proteinase 유전자로부터 500-570 bp의 sequence를 증폭할 수 있는 consensus sequence를 동정하여 다음과 같은 primer(Ent-CP, Ent-CP3r)를 제작하였다. Ent-

CP(5'-ATC-AGT-AGA-TTG-GAC-AA-3'), Ent-CP3r(5'-GTT-CCC-CAT-GAA-TTT-CTA-A-3'). 그 후 YS-27주의 genomic DNA를 PCR(95°C 30초, 45°C 30초, 72°C 30초, 45회)을 통해 증폭한 후 정제하였다. 정제한 DNA를 random primer biotin DNA labeling kit를 사용해서 cysteine proteinase 탐침을 만들고 slot blot에 의해 nylon membrane에 고정시키고 DNA hybridization에 의해 YS-27주에서만 증폭된 PCR 산물 중 cysteine proteinase 유전자로부터 발현, 증폭된 것을 검색하였다.

9. cDNA 합성 및 cDNA library 검색

이질아메바의 세포로부터 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하기 위해 AMV 역전사 효소를 이용하여 1st strand cDNA를 합성하였고, DNA polymerase I(Promega)을 이용하여 2nd strand cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA에 EcoRI/HindIII linker를 붙이고, λEXlox vector (Novagen, USA)에 ligation하였다. 이 recombinant DNA를 phage 추출물과 반응시켜 *in vitro* packaging을 실시한 후 *Escherichia coli* (ER 1647)가 존재하는 H-agar plate에 plaque를 성장시켰다. Phage를 추출한 후 chloroform을 첨가하여 보관하였다.

cDNA library를 검색하기 위해 phage를 *E. coli*(ER 1647)와 혼합하여 배양하고 nylon membrane에 blotting하였다. 병원성 아메바에서 특이적으로 증폭된 산물을 biotin으로 표지한 탐침으로 DNA hybridization을 수행하여 YS-27 특이 plaque를 찾아내었다.

10. Immunoscreening

LB 배지에 숙주세포인 BL26(DE3)(Novagen)을 37°C, 250 rpm으로 밤새 배양한 후 SM 완충액에 1:4,000으로 희석한 phage와 숙주세포 100 µl씩을 섞고 37°C에서 30분간 숙주세포에 phage가 감염되도록 하였다. 그 후 top agarose와 혼합하여 2x YT plate 위에서 배양한 후 10 mM IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)에 적신 nitrocellulose membrane(Bio-Rad Lab., USA)을 덮었다. 그리고 다시 배양하여 단백질의 발현을 유도하였다. Membrane을 TBST 용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)으로 세척하고 TBST + 1% 젤라틴으로 차단시켰다. 1차항체로 이질아메바 감염 사람 혈청을 1:600으로 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 2차항체로 alkaline phosphatase conjugate goat anti-human IgG(Caltag So, USA)를 1:10,000으로 희석하여 1시간 동안 반응시키고, membrane을 CSPD substrate로 처리한 다음

Kodak XAR X선 필름(Sigma Co, USA)에 감광시켜 양성 clone을 확인하였다.

결 과

1. PCR의 최적화 및 arbitrary primer의 검색

mRNA를 주형으로 하여 oligo-dT₁₁A, oligo-dT₁₁G, oligo-dT₁₁C primer에 대한 각각의 single stranded cDNA를 합성한 후, 70개의 arbitrary 10-mer primer를 조합으로 첨가해서 PCR을 수행하였다. 그 결과 oligo-dT₁₁A와 oligo-dT₁₁G, oligo-dT₁₁C primer를 사용한 경우 PCR이 잘 일어나는 11개의 arbitrary primer를 찾아낼 수 있었다(Fig. 1 & Table 1).

2. DDRT-PCR 증폭산물의 분획양상

PCR 증폭산물의 분획양상을 전기영동으로 비교한 결과 다양한 분획을 관찰할 수 있었다. Oligo-dT₁₁C와 조합하여 사용한 11개의 arbitrary 10-mer primer 중 #232 primer와 조합을 이용해서

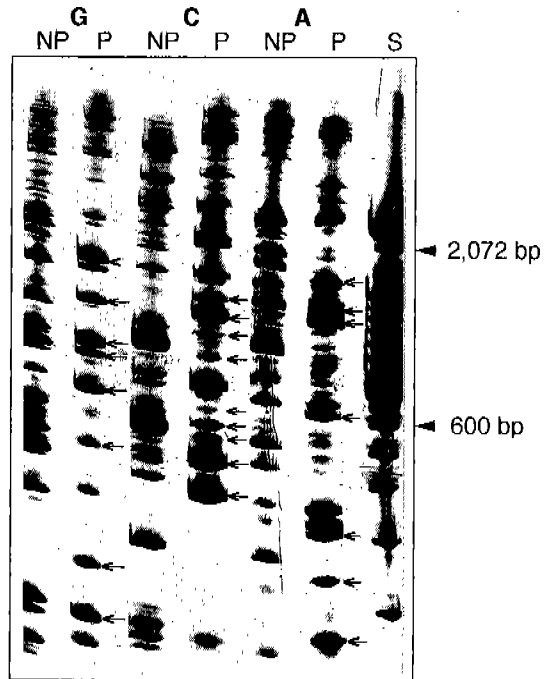


Fig. 1. An example of differential display using one base anchored oligo-dT primers and one arbitrary 10-mer primer (#228). P denotes pathogenic *Entamoeba histolytica* YS-27 and NP denotes non-pathogenic *E. dispar* S 16. Arrows denote the bands specific for pathogenic *E. histolytica* YS-27. S lane denotes standard size marker of 100 bp DNA ladder.

Table 1. Number of differential amplified fragment of the combination of 11 arbitrary 10-mer and one base anchored oligo-dT₁₁ primers

Primer Acc. No. ^{a)}	Primer Sequences	No. of Differentially Amplified Fragments		
		A	C	G
208	5' -ACG GCC GAC C-3'	3	3	7
212	5' -GCT GCG TGA C-3'	6	4	2
228	5' -GCT GGG CCG A-3'	7	9	8
235	5' -CGG TGA CAT C-3'	4	22	15
250	5' -CGA CAG TCC C-3'	6	1	3
268	5' -AGG CCG CTT A-3'	0	1	0
270	5' -TGC GCG CGG G-3'	0	2	3
282	5' -GGG AAA GCA G-3'	2	10	11
284	5' -CAG GCG CAC A-3'	11	1	2
287	5' -CGA ACG GCG G-3'	0	0	2
299	5' -TGT CAG CGG T-3'	0	1	0

^{a)}Arbitrary primer accession number of the University of British Columbia Canada

PCR을 수행한 증폭산물 분획양상은 22개의 DNA가 병원성 주에서만 증폭된 것으로 관찰되었으며, #282 primer에서 10개, #228 primer에서 9개, #212 primer에서 4개, #208 primer에서 3개, #250, #268, #284, #299 primer에서는 각각 1개의 YS-27주에만 존재하는 분획이 관찰되었다. 또, oligo-dT₁₁G primer를 사용한 경우 #232 primer와의 조합에서 15개, #228 primer에서 8개, #208 primer에서 7개, #250, #270 primer에서 각각 3개, #212, #284, #287 primer에서 각각 2개의 YS-27주에만 존재하는 분획을 관찰할 수 있었다. Oligo-dT₁₁A를 사용한 경우에는 #284 primer와의 조합에서 11개, #228 primer에서 7개, #212, #250 primer에서 각각 6개, #232 primer에서 4개, #208 primer에서 3개, #282 primer에서 2개의 YS-27주에만 존재하는 분획을 확인할 수 있었다. 3가지 one base-anchored oligo-dT primer와 11개의 arbitrary 10-mer primer(총 33개의 primer 조합)에서 증폭산물의 크기는 100-2,500 bp 사이에 분포하였고, 병원성주에서만 나타나는 분획은 모두 144개가 관찰되었다.

3. YS-27주에서 증폭된 DNA의 고유성 분석

YS-27주와 S 16주의 DDRT-PCR 증폭산물을 모아 제조한 cDNA 탐침을 이용하여 DNA slot blot hybridization을 수행한 결과 31개의 병원성 증폭산물들이 실제로 YS-27주에만 존재하는 mRNA로부터 증폭된 DNA임을 간접 확인하였다 (Fig. 2 & Table 2).

4. Cysteine proteinase primer를 이용한 YS-27주로부터 증폭된 PCR 산물의 검색을 위한 slot blot

Ent-CP와 Ent-CP3r의 primer를 사용해서 YS-

27주 DNA를 PCR 증폭한 결과 target 크기가 약 510 bp인 증폭산물을 확인하였다. 이어 cysteine proteinase 탐침을 이용해서 DNA hybridization을 수행한 결과, 31개의 YS-27 specific PCR 증폭산물 중에서 21개가 cysteine proteinase의 mRNA로부터 증폭된 산물임을 알 수 있었다.

5. cDNA library 검색

Cysteine proteinase를 coding하고 있는 것으로 확인된 21개의 증폭산물 중 임의로 4개를 선택하여 cDNA library를 검색한 결과 탐침과 hybridization된 clone 3개를 동정할 수 있었다.

6. Immunoscreening

31개의 병원성 특이적인 증폭산물 중 cysteine proteinase를 coding하고 있는 21개를 제외한 나머지 10개의 증폭산물 중에서 #232와 oligo dT-G, #250과 oligo dT-G, #282와 oligo dT-G, #282와 oligo dT-C의 조합으로부터 증폭된 510, 540, 400, 870 bp의 크기를 갖는 4개의 증폭산물을 선택해서 cDNA library를 검색, 단일 clone을 확보하고 이들을 *in vitro* protein induction시켰다. 이 질아메바에 감염된 사람의 혈청을 사용하여 immunoscreening한 결과 이들 4개의 증폭산물들이 anti-*Entamoeba histolytica* 사람 혈청과 반응하는 단백질을 coding하고 있는 유전자로부터 발현된 mRNA로부터 증폭된 cDNA임을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 이질아메바에 감염되지 않은 사람 혈청과 반응하는 clone은 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구는 이질아메바로부터 병원성과 관련된 단백질을 coding하고 있는 유전자를 찾아내기 위한

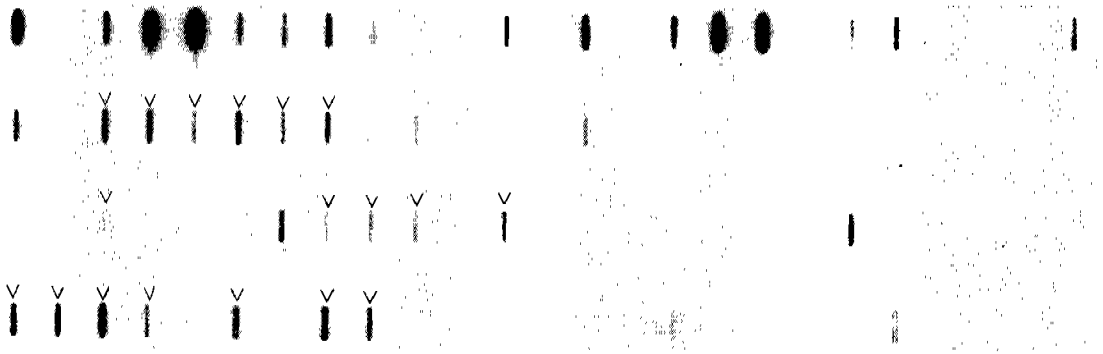


Fig. 2. Identification of DDRT-PCR amplicons of differentially expressed genes by DNA slot blot analysis using the pooled DDRT-PCR products as hybridization probes. Duplicated sets of the reamplified PCR products of the selected 31 YS-27 specific amplicons were immobilized onto nylon membranes. Each membrane was hybridized with the pooled DDRT-PCR products from *Entamoeba histolytica* YS-27 (left) and from *E. dispar* S 16 (right), respectively. Amplicons representing differentially expressed mRNA are indicated by arrow-heads.

Table 2. DDRT-PCR products hybridized only with the probe synthesized from the pooled DDRT-PCR products of *Entamoeba histolytica* YS-27

Primer combinations	Size (bp)	Primer combinations	Size (bp)	Primer combinations	Size (bp)
dT-A : 212	800	dT-C : 284	220	dT-G : 232	1,400
dT-A : 250	800	dT-C : 232	1,000	dT-G : 232	1,300
dT-A : 250	600	dT-C : 232	990	dT-G : 232	1,100
dT-A : 250	480	dT-C : 232	800	dT-G : 232	1,000
dT-A : 250	350	dT-C : 232	700	dT-G : 232	900
dT-A : 228	850	dT-C : 232	620	dT-G : 232	800
				dT-G : 232	620
				dT-G : 232	500
				dT-G : 232	480
				dT-G : 232	430
				dT-G : 250	550
				dT-G : 250	380
				dT-G : 282	400
				dT-G : 282	280

기초연구로서 병원성 분리주(YS-27)와 비병원성 분리주(S 16) 간에 mRNA 발현상의 차이를 관찰하기 위해서 DDRT-PCR 분석법을 수행하였다. DDRT-PCR 분석법은 조직에 따라 특이적으로 발현되는 mRNA의 동정(Liang and Pardee, 1992), 동일조직에서 분화단계별로 발현되는 mRNA의 동정(Sun et al., 1994) 및 병원체의 감염에 따른 숙주의 유전자 발현차이를 비교하는데(Hunbank and Schatz, 1994) 성공적으로 응용된 바 있다. 기존의 PCR 방법에 의해 DNA 조각을 증폭하기 위해서는 target DNA template에 상보적인 염기서열을 갖는 2개의 specific oligonucleotide primer

가 필요하며, 이들의 합성을 위해서는 target DNA에 대한 염기서열 정보가 전제되어야 한다. 그러나 기존에 알려진 아메바의 DNA 염기서열정보의 절대적 부족으로 응용성의 한계가 있어, 이 연구에서는 PCR법의 단점을 보완하기 위해서 DDRT-PCR법을 사용하였다. 이 방법의 2개의 비교하고자 하는 집단에 있어서 mRNA의 차이를 동정하는 방법으로 기존의 PCR법과 다른 점은 염기서열의 정보가 전제되지 않은 arbitrary primer와 한 개의 base가 부착된 oligo dT primer를 이용하여 무작위적으로 증폭함으로써 mRNA상의 차이를 관찰할 수 있는 방법이다.

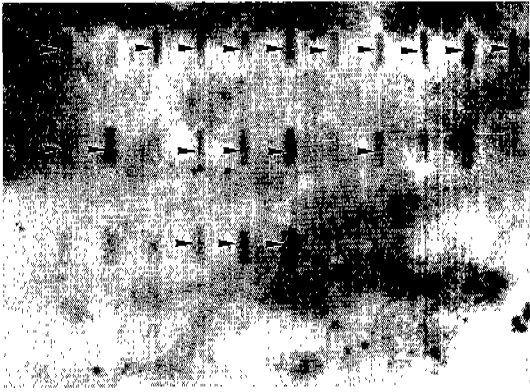


Fig. 3. Identification of DDRT-PCR amplicons of *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase genes by DNA slot blot analysis. PCR reamplified products of the selected 31 unique amplicons for the YS-27 were immobilized onto nylon membrane and hybridized with the PCR amplified sequences of the *E. histolytica* cysteine proteinase genes. Twenty-one amplicons representing differentially expressed cysteine proteinase mRNA are indicated by arrows.

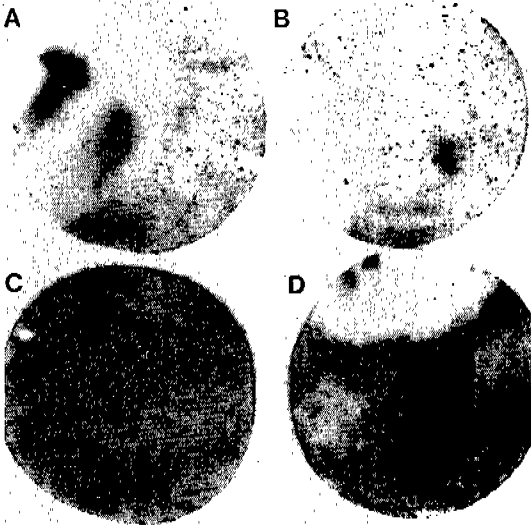


Fig. 4. Result of the immunoscreening. Dots on each blot denote the positive clones detected by anti-*Entamoeba histolytica* human serum. (A) clone #232-G, (B) clone #250-G, (C) clone #282-G, (D) clone #282-C.

본 연구에서는 DDRT-PCR에 의해 총 144개의 분획이 병원성 아메바에서만 나타나는 것을 확인하였고, 이들 중에서 YS-27주에만 존재하는 mRNA로부터 증폭된 cDNA를 다시 동정하기 위해서

DNA slot blot hybridization을 수행한 결과, 31개의 증폭산물이 YS-27주에서 발현이 증가된 mRNA로부터 특이적으로 증폭된 것임을 확인할 수 있었다. 이들 31개의 YS-27주 특이 증폭산물의 특성을 규명하기 위해 cysteine proteinase 유전자의 일부분을 탐침으로 사용하는 DNA slot blot hybridization을 수행한 결과, 21개의 증폭산물이 cysteine proteinase mRNA로부터 증폭된 DNA임을 확인할 수 있었다. Cysteine proteinase와 이질아메바 병원성과의 상관관계는 이질아메바 감염시 관찰되는 병원성이 이질아메바가 분비한 proteinases와 밀접하게 연관되어 있다고 보고된 바 있다(Gitler *et al.*, 1984; Lushbaugh *et al.*, 1985). Ravdin(1986)은 thiol(cysteine) proteinase와 몇몇 molecule들이 이질아메바의 병원성에 기여한다는 것을 밝혔다. 이질아메바에서 정제된 proteinase는 cytopathic effect를 야기하며, cysteine proteinase의 specific, irreversible inhibitor는 trophozoites에 의한 tissue culture monolayer cell의 파괴를 억제한다고 밝혀져(Keene *et al.*, 1986), 이질아메바 감염시 proteinase가 깊이 관여할 것으로 생각된다.

최근 병원성 아메바에서만 특이적으로 발현되는 항원을 조절하는 유전자를 분리하고 그 특성을 분석하여 병원성과 비병원성 이질아메바 감염의 구별을 가능하게 하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(Huber *et al.*, 1987a & b; Orozoco *et al.*, 1993). 따라서 국내에서 발생하는 이질아메바성 질환의 정확한 진단과 병의 조기발견을 통해 신속한 치료가 이루어질 수 있도록 병원성 아메바주에서만 특이적으로 발현되는 단백질을 지배하는 유전자를 확보하기 위해서 병원성 분리주로부터 조성된 cDNA library를 검색하여 병원성 strain-specific cDNA clone을 찾아내고 이 cDNA clone을 *in vitro* protein induction 시킨 후 immunoscreening으로 검색하여 YS-27주에서 특이적으로 발현되는 단백질을 coding하고 있는 유전자를 동정하고자 하였다. 그 결과 YS-27주 탐침에 의해 확인된 31개 증폭산물 중에서 cysteine proteinase 탐침에 의해 동정된 분획 21개를 제외한 나머지 10개 중 4개의 증폭산물이 환자의 혈청을 이용한 immunoscreening을 통하여 확인되었다. 확인된 4개의 단백질을 coding하고 있는 cDNA clone의 특성은 아직 확인하지 못하였다. 그러나 이들의 최종산물이 실제로 여타 아메바에는 존재하지 않는 단백질일 가능성이 매우 높다. 앞으로 이 clone의 sequencing이 이루어진다면 이를 이용해서 이질아메바종의 병원성과 관련된 기초정보를 얻을 수 있을 것이다.

REFERENCES

- Chang JK, Im Ki, Soh CT (1995) Axenization of *Entamoeba histolytica*, a Korean strain YS 27. *Korean J Parasitol* **33**: 387-390.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156.
- Diamond LS, Hariow DR, Unnick CCC (1978) A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **72**: 431-432.
- Espelund M, Prentice RA, Jakobsen KS (1990) A simple method for generating single stranded DNA probes labeled to high activities. *Nucleic Acids Res* **18**: 6157-6158.
- Garfinkel LI, Giladi M, Huber M *et al.* (1989) DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. *Infect Immun* **57**: 926-931.
- Gitler C, Calef E, Rosenberg I (1984) Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **307**: 73-85.
- Huber M, Garfinkel L, Gitler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblatt S (1987a) *Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA. *Mol Cloning Biochem Parasitol* **24**: 227-235.
- Huber M, Koller B, Gitler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblatt S (1987b) *Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA. *Mol Biochem Parasitol* **24**: 227-235.
- Hunbank M, Schatz DG (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* **22**: 5640-5648.
- Keene WE, Pettitt MG, Allen S, McKerrow JH (1986) The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* **163**: 536-549.
- Lee MJ, Hong ST (1996) Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in cyst-passers by immunoblot. *Korean J Parasitol* **34**: 247-254.
- Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ (1991) Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7659-7663.
- Liang P, Averboukh L, Zhu W, Pardee AB (1994) Ras activation of genes: Mob-1 as a model. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12515-12519.
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971.
- Lushbaugh WB, Hofbauer AF, Pittman FE (1985) *Entamoeba histolytica*: purification of cathepsin B. *Exp Parasitol* **59**: 328-336.
- Nishio Y, Allelo LP, King GL (1994) Glucose induced genes in bovine aortic smooth muscle cell identified by mRNA differential display. *FASEB J* **8**: 103-106.
- Orozoco E, Lazard D, Sanchez T, Sanchez MA, Hernandez R, Silva EF (1993) A variable DNA region of *Entamoeba histolytica* is expressed in several transcripts which differ in genetically related clones. *Mol Gen Genet* **241**: 271-279, 1993
- Ravdin JI (1986) Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: Studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. *Rev Infect Dis* **8**: 247-260.
- Reeves RE, Bischoff JM (1968) Classification of *Entamoeba* species of amebal enzymes. *J Parasitol* **54**: 594-600.
- Robinson GL (1968) The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **62**: 285-294.
- Sun Y, Hegamyer G, Colburn NH (1994) Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expression in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells; One is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Cancer Res* **54**: 1139-1144.
- Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH (1989) Genomic DNA differences between pathogenic *Entamoeba histolytica* and nonpathogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5118-5122.

=Abstract=

cDNAs encoding the antigenic proteins
in pathogenic strain of *Entamoeba histolytica*

Kyung-il IM*, Jong-Tae CHOI, Yong-Pyo HONG, Tae-Eun KIM and Mi-Sook LA

*Department of Parasitology and Institute of Tropical Medicine,
Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea*

The differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) analysis was performed to identify the pathogenic strain specific amplicons. mRNAs were purified from the trophozoites of the pathogenic strain YS-27 and the non-pathogenic strain S 16, respectively. Three kinds of first stranded cDNAs were reverse transcribed from the mRNAs by one base anchored oligo-dT₁₁M (M: A, C, or G) primers. Each cDNA template was used for DDRT-PCR analysis. A total of 144 pathogenic strain specific amplicons was observed in DDRT-PCR analysis using primer combinations of the 11 arbitrary primers and the 3 one base anchored oligo-dT₁₁M primers. Of these, 31 amplicons were verified as the amplicons amplified only from the mRNAs of the pathogenic strain by DNA slot blot hybridization. Further characterization of the 31 pathogenic strain specific amplicons by DNA slot blot hybridization analysis using biotin labeled probes of the PCR amplified DNA of cysteine proteinase genes revealed that 21 of them were amplified from the mRNAs of the cysteine proteinase genes. Four randomly selected amplicons out of the rest 10 amplicons were used for screening of cDNA library followed by immunoscreening and all of them were turned out to be amplified from the mRNA.

Key words: *Entamoeba histolytica*, arbitrary 10-mer primer, one base anchored oligo-dT primer, DDRT-PCR, DNA slot blot hybridization, cDNA library, immunoscreening

[**Korean J. parasitol. 35(3): 203-210, September 1997**]

*Corresponding author