

염전위충 감염자충과 성충의 DNase 활성 비교

곽 동 미¹

워싱턴주립대학교 수의과대학

Comparison of DNase Activities from Infective Larvae vs Adult Worms of *Haemonchus contortus*

Dongmi Kwak¹

Department of Veterinary Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, WA 99164-7040, USA

Abstract : DNase activity from infective larvae of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* was characterized and compared to that from whole worm. DNase activity from infective larvae was detected throughout pHs 4-10, but high activity was detected under acidic conditions. The activity was not inhibited by 10 mM EDTA at pH 5.0, but was significantly inhibited at pH 7.0. The activity produced DNA fragments with mixtures of 3'-hydroxyls (OH) and 3'-phosphates (P) at each pH with predominance of 3'-P. A unique DNase activity at 37 kDa was identified from infective larvae on zymograms. The 37 kDa DNase was detected only at pH 5.0, but not at pH 7.0, and this activity was not inhibited by EDTA at pH 5.0. These characteristics of the 37 kDa infective larval DNase resemble those of classic acidic DNases (e.g., DNase II). In contrast, 34, 36 and 38.5 kDa DNase activities were shown to be specific for whole worm. This result demonstrated that DNases in *H. contortus* are regulated during development.

Key words : infective larvae, DNase, activity, *Haemonchus contortus*, parasite.

1. 서 론

흡혈 선충류들은 사람과 동물에서 중요한 기생충증을 일으킨다. 이 기생충들의 구충은 주로 화학약제를 사용해 왔다. 그러나 최근 이들 약제에 대한 내성이 심각한 상태에 이르고 있으며 현재 사용되고 있는 많은 약제에 대한 내성을 나타내고 있다⁹. 또한, 현재까지 이들 기생충에 대한 효과적인 백신이 없는 것도 이들을 효과적으로 제거하지 못하는 이유 중의 하나이다. 유일하게 백신이 적용되는 것은 기생충의 자충을 방사선으로 조사하여 사용하는 것인데 널리 적용되고 있지 않는 실정이다⁸. 그러므로, 좀더 효과적인 백신을 찾기 위해서는 기생충 자체에 대한 더 많은 연구가 요구되어 진다.

백신의 가능성을 보여준 것 중 효소들에 대한 연구가 많이 있었다. 그중 단백질을 분해하는 효소에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다^{10,12,14}. 반추수의 제4위에 기생하는 흡혈 선충인 염전위충(*Haemonchus contortus*)에 존재하는 cysteine proteinases나 metallopeptidase에 대한 항체가 숙주동물에서 효과적인 방어를 나타내었다. 위의 결과로 볼 때 기생충 체내에 존재하는 효소에 대한 항체가 어떻게 만들어지며 또 생산된 항체가 어떻게 기생충 체내로 들어가 방어효과를 나타내는 지는 잘 알려져 있지 않지만 기생충 체내의 단백질을 사용하여 숙주의 방어면역을 유도하는 것은 잘 알려진 방법이다^{13,15}. 염전위충의 DNase에 대한 항체가 생산되는지는 아

직 연구된 바가 없지만 염전위충에 존재하는 다른 효소에 대한 항체가 기생충증을 방어하는데 기여를 하였으므로 기생충의 DNase도 항원으로서의 가능성이 보여진다. 기생충의 DNase가 숙주동물의 방어기전에 관여할 수 있다는 것은 *Trichinella spiralis*에서 확인되었다⁷. 이 연구에서 *T. spiralis*에서 분비/배설된 DNase에 대한 항체가 기생충의 DNase를 불활화하였다. 이것은 기생충의 DNase가 구충의 목적으로 사용될 수 있는 가능성을 나타낸다. 다른 예로는 Epstein-Barr virus에 감염된 사람에서 virus DNase 특이 항체를 보유하고 있는 것으로 확인되었으며 이 항체는 virus 감염에 대한 진단의 목적으로도 이용되고 있다⁶. 위의 경우에서 보듯이 숙주동물의 DNase와는 다른 기생충의 특이 DNase는 구충의 목적으로 뿐만 아니라 진단의 목적으로도 이용될 수 있음을 나타내었다. 그러므로, 숙주동물이 기생충 특이 DNase에 대한 항체를 보유함으로써 예방효과를 나타내는지를 규명하는 것은 하나의 중요한 연구과제로 보여진다.

곽과 Jasmer⁵의 연구에 의하면 염전위충에서 7가지 이상의 다양한 DNase들이 존재한다는 것이 보고되었다. 이 DNase들은 pH, 분자량(Mr) 및 EDTA에 대한 영향으로 판정되었으며 특이한 것은 몇 DNase는 포유류에서 알려지지 않은 독특한 특성을 갖고 있었다는 것이다. 예를 들면, 포유류에서 알려진 거의 모든 DNase는 중성 pH에서 EDTA에 의해 활성이 억제되었지만^{5,11} 염전위충의 몇 DNase들은 중성 pH에서 EDTA에 의해 활성이 억제되지 않았다⁵. 숙주동물과 다른 특성을 나타내는 DNase들이 예방, 치료 및 진단의 목적으로 이용 가능한지를 조사하기 위해서는 좀더 자세한 분석

¹Corresponding author.
E-mail : dmkwak@vetmed.wsu.edu

이 요구된다. 즉, 기생충의 조직 특이 효소, 성충 특이 효소, 감염자충 특이 효소 및 분비/배설되는 효소에 대한 종합적인 연구를 바탕으로 효과적인 백신 후보를 선별할 필요가 있을 것이다. 성충과 자충에 공통적으로 존재하는 DNase는 좋은 백신 후보가 될 것으로 추정된다.

이 연구에서는 위에서 언급된 연구를 수행하기 위한 기초 자료를 마련하기 위하여 염전위충의 감염자충과 성충에 존재하는 DNase를 분석하고 발육과정에서 이들 효소들이 어떻게 조절되는지를 조사하고자 plasmid DNA 분해 실험, zymogram 분석 및 3'-말단 확인 실험 등을 이용하여 연구를 수행하였던 바 그 결과를 이에 보고한다.

재료 및 방법

기생충

염전위충의 감염자충은 Jasmer 등³의 방법에 따라 염전위충에 감염된 양의 분변을 젖은 vermiculite에서 10일 동안 25°C에서 배양하여 얻었으며 현미경하에서 형태를 관찰하였다. 자충은 Bearman 장치를 사용하여 회수되었으며 회수된 자충은 PBS로 5회 세척한 후 Tris 용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4)으로 3회 더 세척하였다. 세척된 자충의 균질액은 용해용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 10 µM E-64, 1 µM pepstatin A)에서 유리 균질기로 만들었으며 균질액은 10,000 g에서 원심분리하여 상청액을 실험에 사용하였다. 모든 과정은 얼음 위에서 수행하였다. 양성 대조군으로 염전위충 성충을 사용하였으며 위의 언급된 용해 용액으로 균질액을 만들었다. 음성 대조군으로 자충을 마지막으로 세척한 용해용액을 사용하였다.

Plasmid DNA 분해 실험

DNase 활성은 plasmid DNA 분해 실험으로 확인하였다. 기생충 샘플(400 ng)과 plasmid DNA(400 ng)는 20 µl 반응으로 처리하였다. 활성에 대한 pH의 영향을 보기 위하여 pH 4.0-10.0 (20 mM Tris-HCl)에서 배양하였으며, 2 mM CaCl₂와 2 mM MgCl₂의 존재하에서 실시하였다. 배양은 37°C에서 1시간(성충) 혹은 8시간(자충)동안 하였다. 배양후 70°C에서 10분간 처리함으로 DNase를 불활화하였으며 그후 모든 샘플들을 agarose gel(0.8%)에서 전기영동하였고 ethidium bromide로 염색한 후 자외선광으로 plasmid DNA의 분해정도를 확인하였다. 음성 대조군은 위와 동일하게 8시간 동안 배양하였다.

DNase 활성에 대한 억제제의 영향을 보기 위한 실험은 pH 5.0과 7.0에서 실행하였으며 활성에 금속이온의 필요를 확인하기 위하여 금속이온 chelator인 EDTA(10 mM)를 사용하였고, 또한 비특이적인 DNase 억제제인 aurintricarboxylic acid (ATA, 100 µM)도 사용하였다.

Zymogram 분석

DNase의 Mr과 생화학적 특성을 조사하기 위하여 zymo-

gram 분석을 하였다. Zymogram은 SDS-PAGE에 DNase의 기질인 salmon sperm DNA (200 µg/ml)가 첨가된 것을 사용하였다. 샘플(50 µg)들을 전기영동한 후 zymogram gel을 37°C에서 40시간 동안 배양하였으며 ethidium bromide를 처리한 후 자외선광에서 검게 나타나는 곳이 DNase의 활성을 나타내며 미리 염색된 분자량 표준(Rainbow molecular mass standards, 14.3-220 kDa, Amersham, Pis-cataway, NJ, USA)을 이용하여 DNase의 Mr을 결정하였다. Gel의 배양은 pH 5.0 혹은 7.0에서 실시하였고 각각 2 mM CaCl₂와 MgCl₂ 혹은 10 mM EDTA의 존재하에서 실행하였다.

Plasmid DNA 3'-말단 확인

DNase 활성에 의해 생성된 plasmid DNA의 3'-말단(3'-OH 혹은 3'-P) 확인은 광과 Jasmer의 방법^{4,5}으로 하였다. 간략히 설명하면, 샘플(0.4 µg)에 함유된 DNase에 의해 분해된 plasmid DNA(1 µg)는 두 그룹(각 400 ng plasmid)으로 나누었는데, 한 그룹은 calf intestinal alkaline phosphatase (ALP, 4 U)를 처리하였으나 다른 한 그룹은 ALP를 처리하지 않았다. Phosphatase의 처리는 50 µl 반응으로 37°C에서 1시간 동안 진행하였으며 이어서 phosphatase 처리된 그룹과 처리되지 않은 그룹의 각 20 ng plasmid (2.5 µl)는 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT, 6 U, Roche, Indianapolis, IN, USA)와 10 µl 반응으로 37°C에서 1시간 동안 배양되었다. Nucleotides는 biotinylated dideoxyadenosine triphosphate (Bt-ddATP, 250 pmol, PerkinElmer, Boston, MA, USA)를 사용하였다. 각 반응들은 0.8% agarose gel에서 전기영동되었으며 그후 DNA 단편들은 nylon membrane (Roche)으로 옮겨진 후 그 membrane은 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase로 처리되었다. 연결된 DNA 3'-말단의 확인은 enhanced chemiluminescence detection system (Amersham biosciences, Piscataway, NJ, USA)으로 하였고, 신호는 X-ray film에 기록하였다. 각 반응의 신호는 chemilumager 4000 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)으로 정량되었고, ALP 처리된 그룹의 신호를 처리되지 않은 그룹의 신호로 나누어 비율을 얻었으며, 이 비율로 DNA의 3'-말단이 3'-OH인지 3'-P인지 아니면 둘 다 혼합되어 있는지를 확인하였다⁵. 이 비율들은 포유류에서 밝혀진 전통적인 산성 및 중성 DNase들에서 얻은 비율을 기준으로 산정하였다.

결 과

pH 영향

염전위충 감염자충에 존재하는 DNase 활성은 pH 4.0에서 10.0까지 넓은 범위에서 나타났으나 산성 pH에서 DNase 활성이 높게 나타났다 (Fig 1). 자충 샘플 자체에서 genomic DNA가 어느 정도 있는지를 확인하기 위하여 plasmid DNA 없이 자충만으로 한 샘플에서는 확인할 수 없을 정도의 적은 DNA가 확인되었다 (Fig 1, lane S).

양성 대조군으로 사용된 성충에서도 DNase 활성은 pH

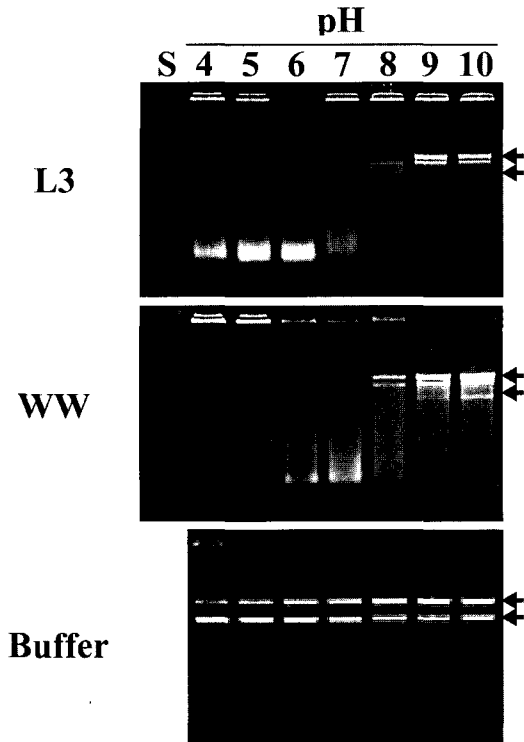


Fig 1. pH effects on *Haemonchus contortus* DNase activities. Samples (400 ng protein) from *H. contortus* infective larvae (L3) or whole worm (WW) were incubated with plasmid DNA (400 ng) at 37°C for 8 hr (L3) or 1 hr (WW) in buffers at pH 4.0 to 10.0 containing 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂. S, samples of infective larvae or whole worm without plasmid. Infective larvae-washed lysis buffer was incubated for 8 hr as a negative control. The digested products were analyzed in agarose gel (0.8%) and visualized by ethidium bromide staining. Arrows on the right refer to estimated sizes of two forms of DNA in undigested plasmid at 4 (upper) and 2.5 (lower) kilo base pairs, respectively.

4.0에서 10.0까지 넓은 범위에서 나타났으나 산성 pH에서 비교적 높게 나타났다. 성충(1시간 배양)에서의 DNase 활성은 자충(8시간 배양)의 활성보다 높게 나타났다.

음성 대조군인 자충을 마지막으로 세척한 용해용액에서는 Fig 1에서 보는 것과 같이 pH 4.0-10.0에서 plasmid DNA의 분해는 거의 확인되지 않았으며 분해되지 않은 2.5와 4 kbp의 plasmid DNA만 확인되었다.

DNase 활성 억제제의 영향

DNase 활성에 대한 억제제들의 영향은 Fig 2에서와 같다. 감염자충의 DNase 활성은 10 mM EDTA가 첨가된 pH 5.0에서 약간의 억제를 보였지만 완전히 억제되지는 않았다. 그러나, pH 7.0에서는 거의 대부분의 활성이 EDTA에 의해 억제되었다. 양성 대조군인 성충의 DNase 활성은 자충에서 보여준 그것과 비슷하게 나타났는데, 산성 pH에선 EDTA에 의해 활성이 억제되지 않았고 중성 pH에선 EDTA에 거의 대부분 억제되었다.

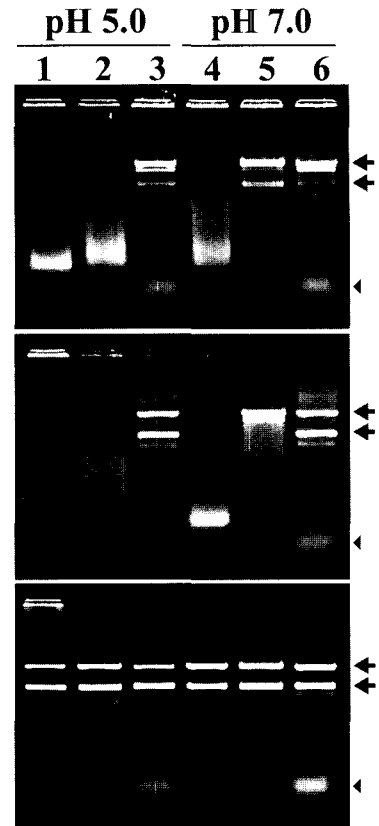


Fig 2. Effects of EDTA and aurintricarboxylic acid (ATA) on *Haemonchus contortus* DNase activities. Samples (400 ng protein) from *H. contortus* infective larvae (L3) or whole worm (WW) were incubated with plasmid DNA (400 ng) at 37°C for 8 hr (L3) or 1 hr (WW) in buffers at pH 5.0 (lanes 1-3) or 7.0 (lanes 4-6) containing 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂ (lanes 1 & 4), 10 mM EDTA (lanes 2 & 5) or 100 μM ATA with 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂ (lanes 3 & 6). Lysis buffer without sample was incubated for 8 hr as a negative control. The digested products were analyzed as described in Fig 1. Arrows on the right refer to estimated sizes of two forms of DNA in undigested plasmid at 4 (upper) and 2.5 (lower) kilo base pairs, respectively. The arrow head points to background staining that was caused by ATA.

DNase의 비특이적 억제제인 ATA에 대해서는 자충과 전체 균질액의 DNase 활성이 pH 5.0과 7.0에서 거의 모두 억제되었다.

Zymogram 분석

염전위층의 감염자충에 존재하는 DNase의 Mr과 그 특성은 Fig 3에서 나타내었다. 자충에서의 DNase 활성은 37 kDa에서 확인되었으나, 그 활성은 pH 5.0에서만 확인되었고 pH 7.0에서는 거의 확인할 수 없을 정도로 미약하였다. 양성 대조군인 성충에선 pH 5.0과 7.0에서 34, 36 및 38.5 kDa DNase들이 확인되었다.

확인된 DNase의 EDTA에 대한 효과를 비교하였던 바 pH 5.0에서 확인된 자충의 37 kDa DNase는 EDTA에 의해 그

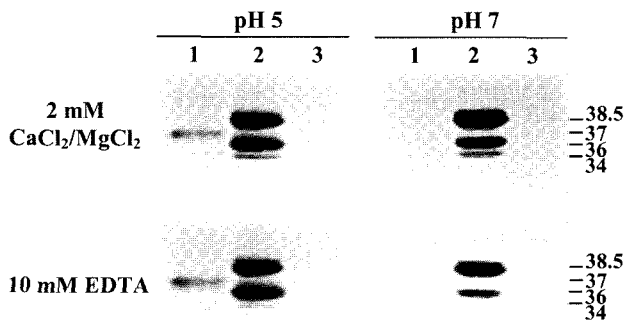


Fig 3. Zymographic analysis of DNase activity in *Haemonchus contortus*. Samples (50 µg protein) of infective larvae (lane 1), whole worm (lane 2) or lysis buffer (lane 3, same volume) were separated on zymogram gel and incubated in buffers (pH 5.0 or 7.0) containing 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂ or 10 mM EDTA. Mrs of DNases were estimated by staining the gel with ethidium bromide and visualizing by UV illumination. Molecular markers are indicated in kDa on the right.

활성이 억제되지 않았다. 반면, 성충에서 보인 36과 38.5 kDa DNase들의 활성은 pH 5.0과 7.0에서 EDTA에 의해 억제되지 않았다.

음성 대조군으로 사용된 자충의 세척액에는 DNase 활성이 확인되지 않았다.

Plasmid DNA 3'-말단 확인

자충의 DNase가 어떤 3'-말단 (3'-OH 혹은 3'-P)을 만드는지를 확인한 결과는 Fig 4에서 나타내었다. pH 5.0에서 자충의 DNase에 의해 생긴 3'-말단의 비율은 19.2이었고 pH 7.0에서의 비율은 4.7이었다.

반면, 성충에서의 비율은 pH 5.0과 7.0에서 각각 9.3과 5.4이었다.

음성대조군으로 사용된 자충 세척액은 표시가 거의 보이지 않았다.

고 찰

염전위충 감염자충과 성충의 특이 DNase를 조사하기 위하여 감염자충과 성충의 DNase 활성을 비교 분석하였다. 감염자충에서 DNase 활성은 넓은 pH 영역(pH 4.0-10.0)에서 나타났으며 산성 pH(pH 4.0-6.0)에서 비교적 높게 나타났다. 또한, 이 활성은 pH 5.0에서 10 mM EDTA에 저항성을 나타내었다. 감염자충의 DNase에 의해 생성된 3'-말단의 비율은 pH 5.0과 7.0에서 각각 19.2와 4.7을 나타내었다. 비율 19.2와 4.7은 생성된 DNA 말단이 3'-OH와 3'-P가 혼합되어 있음을 나타내나, 비율 19.2는 3'-OH가 5%이며 3'-P가 95%임을 나타내며 비율 4.7은 3'-OH가 21%이며 3'-P가 79%임을 나타낸다. 이 결과는 염전위충 감염자충에선 3'-P를 생산하는 DNase가 훨씬 많이 존재함을 나타낸다. 특이한 것은 감염자충의 37 kDa DNase가 pH 5.0에서만 확인

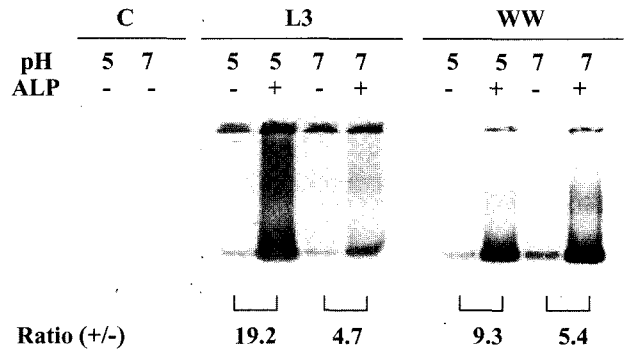


Fig 4. 3'-End labeling of DNA fragments produced by *Haemonchus contortus* DNase activities. Plasmid DNA was digested by *H. contortus* lysates (400 ng protein) from infective larvae (L3) or whole worm (WW) as described in Fig 1. Fragments were treated with (+) or without (-) alkaline phosphatase (ALP) at 37°C for 1 hr. Samples were then subjected to 3'-end labeling with terminal deoxynucleotidyl transferase. DNA (20 ng) separated on an agarose gel (0.8%) was transferred to nylon membranes. Labeled ends were detected as described in methods. C, reactions lacking worm lysates. Densitometric measures were done on exposures that produced detectable signal in each lane used to generate end labeling ratios (see methods) of densitometric signal for samples treated with (+) or without (-) ALP.

이 되었으며 그 활성은 EDTA에 의해 억제되지 않았다는 것이다. 감염자충의 37 kDa DNase가 산성 pH에서 EDTA에 의해 활성이 억제되지 않는 것은 포유동물에서 밝혀진 전통적인 산성 DNase인 DNase II의 특성과 비슷함을 나타내었다^{1,2,5}. 한편, 성충에선 3개의 DNase 활성이 34, 36 및 38.5 kDa에서 나타났으며 이들 중 36 및 38.5 kDa DNase들은 EDTA에도 활성이 억제되지 않았다. 위의 결과에서 보듯이 37 kDa DNase는 감염자충의 특이 DNase인데 반해 34, 36 및 38.5 kDa DNase들은 성충의 특이 DNase임을 나타내었다. 따라서, 염전위충은 발육단계에 따라 서로 다른 DNase 활성을 나타내었는데, 특히 34, 36 및 38.5 kDa DNase들은 성충에서 확인되었다.

염전위충 성충의 특이 34, 36 및 38.5 kDa DNase가 기생충증 치료를 위한 백신으로 사용될 수 있는지를 밝히는 것은 하나의 중요한 과제로 보여진다. 염전위충 유래의 DNase에 대한 항체가 생성되는지를 보고한 연구는 없으나, 다른 선충인 *T. spiralis*에서 분비/배설된 DNase에 대한 항체가 그 DNase를 중화시켰다는 보고⁷와 Epstein-Barr virus에 감염된 사람에서 virus DNase 특이 항체가 생산된다는 보고⁶를 고려할 때 염전위충 DNase에 대한 항체도 생산될 것으로 추정된다. 그러나, 염전위충 DNase에 대한 항체가 기생충증 치료에 어느 정도 기여할 것인가는 이 DNase가 기생충 체내에서 얼마나 중요한 역할을 감당하는지와 관련이 있을 것으로 추측된다. 또한, 기생충에 존재하는 많은 DNase를 비교 분석하여 숙주에선 나타나지 않고 기생충에만 특이적으로 나타나는 DNase를 찾게되면 그 DNase는 질병의 예방과 치료 목적뿐만

아니라 진단의 목적으로도 이용될 수 있을 것으로 추정된다.

이 연구를 통한 중요한 발견은 염전위충 DNase들은 발육 단계별로 조절된다는 것이었다. 37 kDa DNase는 감염자충의 특이 DNase로 확인되었으며 34, 36 및 38.5 kDa DNase들은 성충의 특이 DNase로 확인되었다. 그러나, 37 kDa DNase가 성충에 존재하지 않는다고 단정할 수는 없다. 그 이유는 여기에 사용된 실험방법이 아주 미약한 활성을 지니는 DNase를 확인할 수 없을 수 있기 때문이다. 특이한 것은 감염자충의 37 kDa DNase의 활성이 성충의 분비배설물에서 확인된 37 kDa DNase의 그것과 비슷하다는 것이다⁵. 이 두 DNase가 같은 DNase인지, 아니면 서로 다른 DNase들이 비슷한 활성을 나타내는지는 확인되지 않았으나, 이것을 밝히는 것은 금후의 연구과제라고 생각된다. 이 두 DNase들이 같은 DNase라면 이들 중 어느 하나의 DNase에 특이적인 항체는 자충뿐 아니라 성충에 있는 37 kDa DNase들을 불활화할 수 있을 것으로 기대되기 때문이다.

감염자충의 DNase 활성은 zymogram gel을 pH 7.0에서 배양하였을 때 확인되지 않았으나 plasmid DNA 분해 실험에서는 비교적 높은 활성을 나타내었다. 이것은 자충의 DNase가 zymogram gel의 환경에서는 그 활성이 소실된다고 생각된다. 특히, zymogram gel에 함유된 sodium dodecyl sulfate가 단백질의 구조를 변형시킴으로 감염자충의 DNase 활성을 억제할 수 있을 것으로 보여진다. 따라서, 이 연구에서 감염자충 특이 37 kDa DNase만 확인되었지만, 실제로는 이보다 더 많은 DNase가 있을 것으로 추정된다.

결 론

염전위충에 감염된 양의 분변에서 배양된 감염자충과 성충에서 존재하는 DNase를 비교 분석하여 염전위충에서 나타난 DNase가 발육과정에서 조절되는지를 확인하기 위하여 그리고 감염자충과 성충 특이 DNase를 조사하기 위하여 감염자충과 성충에 존재하는 DNase 활성을 plasmid DNA 분해 실험, zymogram 분석 및 3'-말단 확인 실험 등을 이용하여 조사하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 염전위충 감염자충 특이 DNase는 37 kDa에서 확인되었으며, 그 활성은 pH 5.0에서만 확인되었다.
2. 염전위충 성충의 특이 DNase는 34, 36 및 38.5 kDa에서 확인되었으며, 그 활성은 pH 5.0과 7.0에서 확인되었다.
3. 감염자충 특이 37 kDa DNase는 pH 5.0에서 확인되었으며 EDTA에 의해 활성이 억제되지 않았다. 이 특성은 포유류의 산성 DNase II의 활성과 비슷하였다.
4. 성충 특이 36 및 38.5 kDa DNase들은 pH 5.0과 7.0 모두에서 EDTA에 의해 활성이 억제되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Gasmı G, Padeloup M, Pratiel G, Pitie M, Bernadou J,

- Meunier B. 31P NMR characterization of terminal phosphates induced on DNA by the artificial nuclease 'Mn-TMPyP/KHSO₅' in comparison with DNases I and II. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 2835-2839.
2. Hevelone J, Hartman PS. An endonuclease from *Caenorhabditis elegans*: partial purification and characterization. *Biochem Genet* 1988; 26: 447-461.
3. Jasmer DP, Wescott RB, Crane JW. Survival of third-stage larvae of Washington isolates of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* exposed to cold temperatures. *Proc Helminthol Soc Wash* 1987; 54: 48-52.
4. Kwak D. Characterization of DNase activity from nymph stage midgut of *Boophilus microplus* tick. *Kor J Vet Publ Hlth* 2004; 28: 51-58.
5. Kwak D, Jasmer DP. Non-classic characteristics define prominent DNase activities from the intestine and other tissues of *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol* 2003; 104: 131-139.
6. Liu MY, Cho SM, Tsai WS, Chang MH, Chen JY, Yang CS. Prevalence of antibody to Epstein-Barr virus DDDNase in children. *Intervirology* 1992; 34: 192-196.
7. Mak CH, Ko RC. Characterization of endonuclease activity from excretory/secretory products of a parasitic nematode, *Trichinella spiralis*. *Eur J Biochem* 1999; 260: 477-481.
8. McKeand JB. Vaccine development and diagnostics of *Dictyocaulus viviparus*. *Parasitology* 2000; 120: S17-S23.
9. Mortensen LL, Williamson LH, Terrill TH, Kircher RA, Larsen M, Kaplan RM. Evaluation of prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 495-500.
10. Redmond DL, Knox DP, Newlands G, Smith WD. Molecular cloning and characterisation of a developmentally regulated putative metallopeptidase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 85: 77-87.
11. Shiokawa D, Tanuma S. Characterization of human DNase I family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis. *Biochemistry* 2001; 40: 143-152.
12. Skuce PJ, Redmond DL, Liddell S, Stewart EM, Newlands GF, Smith WD, Knox DP. Molecular cloning and characterization of gut-derived cysteine proteinases associated with a host protective extract from *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 1999; 119: 405-412.
13. Smith SK, Pettit D, Newlands GF, Redmond DL, Skuce PJ, Knox DP, Smith WD. Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol* 1999; 21: 187-199.
14. Smith WD, Newlands GF, Smith SK, Pettit D, Skuce PJ. Metalloendopeptidases from the intestinal brush border of *Haemonchus contortus* as protective antigens for sheep. *Parasite Immunol* 2003; 25: 313-323.
15. Smith WD, Smith SK, Murray JM. Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol* 1994; 16: 231-241.