

## Negative stain을 이용한 Rotavirus의 투과전자현미경적 구조

권 중 균

### An Electron Microscopic Structure of Rotavirus by Negative Stain

Jung Kyun Kwon

(Received November 20, 1994)

#### ABSTRACT

The Rotaviruses are members of the family *Reoviridae* and are the major cause of severe childhood gastroenteritis worldwide. Recently, electron microscopy has been used to detect non-group A rotaviruses to determine a relatively high resolution structure of the rotavirion. Mature, infectious virions (double-shelled particles) have a diameter of approximately 70nm, and have a capsid structure composed of two concentric protein layers. We have studied patient's stool specimen by negative staining technique complete removal of sucrose suspension.

This negative staining technique that could be carried out in about 30 minutes and that could be used with crude stool specimen was an advantage of major significance.

Removal of sucrose in the sample by has been completed washing with distilled of sucrose and by washing with distilled water. Ultrastructurally, typical feature of rotavirus has a double capsid construction with an inner capsid of 55nm and on outer 65-70nm diameter can be clearly demonstrated.

**Key words:** Rotavirus, Negative stain, Positive stain.

#### 서 론

*Reoviridae*의 일원인 Rotavirus는 사람이나 여러 종류의 다양한 동물(특히 말, 돼지, 소, 원숭이)에게 있어

서 급성초기 위장염을 일으키면서 설사를 동반하는 원인체로 알려져 있다. Rotavirus는 개발도상국에서 해마다 백만명 이상의 사상자(Snyder & Merson, 1982; De Zoysa & Feachem, 1985; Kapikian & Chanock, 1985)를 낸다고 보고되고 있으며, rotavirus는 전세계적으로

발견되어가고 있는 실정이며 특히 설사환자에게서 자주 발견된다.

Bishop(1973)은 급성 설사증을 앓는 소아의 십이지장 생검조직을 전자현미경으로 관찰하여 처음으로 보고하였다. 우리나라에서는 rotavirus에 의한 설사증은 11월에 최고치를 이룬다. 유아 급성설사 중 HRV(human rotavirus)에 의한 설사환자가 60.8%였고, HRV와 대변세균배양검사가 모두 음성으로 나타난 것은 30.6%였으며, 세균성인 Shigella, Salmonella, Enteropathogenic E. coli(EPEC), Yersinia enterocolitica 등이 나머지를 차지하였다고 보고하였다(Kim *et al.*, 1988). 즉 전체 위장염 환자에서 HRV 항원 양성율이 매우 높다는 것을 보여주었고 특히 2세 이내에 83.1%가 분포하고 있어 외국의 경우와 통계적으로 비슷하였다. 또 설사의 성상은 82.2%가 수양성을 보이며 점액성변과 혈변이 동반된 경우도 있었으며, 설사의 지속기간은 평균 4.7일이며, 대부분 발열과 구토가 먼저 나타났다고 하였다(Kim *et al.*, 1985). Rotavirus의 감염진단은 감염시 장점막내에 존재하였다가 대변으로 배출되는 virus입자를 증명하는 방법들이 사용되고 있다. HRV에 대한 감염의 진단은 ELISA 등의 효소면역 측정법과 direct 전자현미경법이 많이 이용되고 있다. Kim 등(1990)에 의하면 HRV는 A, B, C, D, E, F의 6개군으로 나누어지며, ELISA 등에 의한 효소면역법으로는 A군에 관한 것만이 검출이 가능하며 나머지는 전자현미경에 의한 방법과 RNA 전기영동에 의해서 검출될 수 있다고 하였다. 특히 원인을 virus성 위장염의 경우 직접전자현미경을 하면 가장 효과적이고 신속하며 경제적이다 하였다(Kim *et al.*, 1990).

특히 rotavirus는 전자현미경에서 특징적으로 나타나는 진단에 결정적인 역할을 한다고 하였다. 이에 저자는 설사 환자들의 설사변을 얻어 직접 전자현미경으로 rotavirus를 발견하는 방법을 이용하여 신속하게 진단할 수 있는지를 알아보고 투과전자현미경에서 rotavirus의 미세구조를 관찰하고자 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

서울지역 종합병원에 입원한 환자의 기저귀에 묻은 설사변.

## 2. 염색용액

### 1) 2% PTA(phosphotungstic acid; Mallinckrodt Inc) 염색용액의 조제

PTA 1g을 증류수 50ml에 용해시킨 후 5% KOH로 pH 6.0으로 조절하였다.

### 2) 4% UA(uranyl acetate; Merck) 염색용액의 조제

UA 2g을 증류수 50ml에 용해시킨 후 24시간 이상 침전되기를 기다려서 상층액을 취한 후 0.2 $\mu$ m 구멍크기의 여과지 millipore 여과시(Green filter A25B)로 멸균여과한 뒤 사용하였다.

## 3. Formvar membrane grid제작

1) 준비물 : Formvar(원액 또는 분말; Hitachi), chloroform, 증류수, coplein jar, glass slide, 사각 jar, filter paper, dry oven.

### 2) 방법

① Chloroform으로 0.2% formvar 용액을 만들었다.

② Formvar가 완전용해된 후 coplein jar에 넣어 안정되게 하였다.

③ 유리 slide를 청결히 하여 coplein jar 속의 0.2% formvar 용액속에 넣었다가 꺼내 slide를 filter paper 위에 세워서 건조시켰다.

④ 사각 jar에 증류수를 가득 붓고 건조된 slide를 증류수 표면에 닿게 하여 증류수 수면에 formvar 막을 형성하게 한다.

⑤ 300mesh의 grid를 증류수 표면에 떠있는 균일한 formvar 위에 하나씩 얻는다.

⑥ 청결한 filter paper를 유리 slide 크기 정도로 만든 다음 증류수에 떠있는 formvar 지지막에 grid가 올려져 있는 위에 겹치게 하여 걷어내어 건조시켰다.

⑦ 약 37°C 정도의 dry oven에서 건조한 후 formvar membrane grid를 사용하였다.

## 4. 방법(PTA method)

1) 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 10-20% 현탁액을 만들고 stool specimen을 희석한 후

2) 30초간 vortex mixer로 혼합하였다.

3) 5-10분 동안 3,000rpm에 원심분리하였다.

4) 상층액 (upperpart) 500 $\mu$ l을 30% sucrose 400ml에 접종하였다.

5) 2시간 동안 50,000rpm 초 원심기에 의해 상층액 (supernatant)을 추출한다.

6) Pellet을 20 $\mu$ l 증류수에 녹인다.

7) 1일 이내의 신선하고 따뜻한 formvar-carbon filmed grid를 완성하여 사용하는 것이 좋다. 또한 grid는 구멍이 적은 300mesh가 좋다.

8) Parafilm을 간결히 깔고 상층액, 증류수, 염색액 (negative stain solution)을 올려놓는다.

9) 염색은 2% PTA 용액 20 $\mu$ m 정도로 10분간 염색한다. 염색액의 pH는 potassium hydroxide로 pH 6.5에 맞추어야 한다.

10) 10분 동안 incubater하며 drop 위에 막면이 아래로 향하게 놓는다.

11) Incubate가 끝나면 끝이 뾰족하게 만든 filter paper로 수분을 흡착시켜 건조시킨다. (filter paper로 grid에 묻어 있는 용액을 적당히 빨아들여 점과 얼룩을 방지하여야 한다)

12) Grid를 건조시킨 후 곧 관찰한다.

## 결 과

Formvar 지지막에 시료를 붙이고 negative stain에 의한 virus 입자의 크기와 형태를 관찰하였다. Rotavirus는 구형 또는 난원형으로 직경이 70nm이고 전자밀도가 높아 외투막 (outer capsid)의 구조형태가 정확히 보였다 (Figs. 5, 6, 7, 8). Rotavirus는 두층의 외투막으로 구성되어 있고, 55nm 직경의 내측 capsid와 65-70nm 직경의 외측 capsid로 구성되어 있다. 그 외표면은 평활하였고 규칙적인 삼각형의 여러면으로 격자모양을 이루고 있는 것이 잘 관찰되었다. 또 60개의 가는 spike로 되어 있다고 하는데 이러한 spikes가 보이며 (Figs. 7, 8), smooth outer surface으로 보인다. 심지 (central protein core)가 빠져나가 외투막만 보이는 경우도 자주 관찰되었으며, 중심단백질 심지 (central protein core 또는 inner core)은 이 실험에 의한 전자현미경상에서는 보이지 않았다.

시료를 처리하는 과정에서 시료에 남게된 sucrose를 완전제거하지 않은 처리군에서는 negative stain에서의 결과와는 반대의 개념인 positive stain이 된 rotavirus

가 관찰되었다 (Figs. 1, 2, 3, 4). sucrose를 완전제거하지 않은 rotavirus는 상당히 강한 contrast를 보이는 virus로 보였다.

## 고 찰

Formvar 지지막으로 처리한 시료는 전자선에 의한 투과성이 비교적 좋고 전자선 조사에도 비교적 잘 견디는 강도있는 지지막이다. 이 formvar 지지막에 의한 rotavirus의 미세구조 및 외부형태를 관찰함으로써 설사의 원인체인 rotavirus의 모양과 특징 그리고 크기 등에 의한 진단을 쉽고 명확하게 할 수 있다는 큰 장점이 있다. 이러한 장점을 이용하여 영, 유아의 설사시 분변을 이용한 virus의 직접적인 확인관찰로서 정확한 진단이 가능하다. 물론 본 결과도 몇개의 시료에서는 rotavirus가 나타나지 않은 시료도 있어 formvar 지지막에 virus가 흡착되지 않는 시료 또는 시료처리과정에서 정제, 추출되지 않으므로 인한 시료의 미숙한 처리로 virus가 음성으로 처리될 경우도 발생할 수 있으리라 여겨진다. 그러므로 rotavirus에 대한 ELISA 또는 LATEX 등의 효소면역측정법을 함께 시행하여 확인하는 것도 전자현미경에 의한 rotavirus를 확인하는 방법 못지않게 중요한 문제이며, 진단과 치료에 영향을 미친다.

ELISA 또는 LATEX 등의 효소면역측정법은 rotavirus의 항체가 아닌 항원 (VP6)을 찾는 실험이며, 혈청형 (serotype) VP4와 VP7을 찾는 것은 rotavirus의 진단을 위한 것이라기 보다는 rotavirus의 혈청형의 지역에 따른 분포를 보아 적절한 rotavirus 백신을 만들기 위한 이유라고 (Kim *et al.*, 1990) 하였다. 그러므로 효소면역측정법에서의 rotavirus의 검증은 VP6 항원을 찾는 것이고 현재 ELISA 등의 효소면역측정법에 의한 rotavirus의 진단은 분변 검체에서 항원 (VP6)을 찾아내는 것으로 6 group 중 A group에 속하는 rotavirus의 항원 (VP6)만을 찾는 실험에 그치고 있다.

전자현미경의 관찰을 위한 negative stain은 미세구조 관찰이 매우 우수한 관찰 방법으로 해상력이 높고 염색방법도 비교적 단순하고 간단하다. 이러한 우수한 장점이 있어 전자현미경 검사가 쉽게 이용할 수 있는 방법이지만 몇가지 주의할 점들이 있다. Virus나 phage와 같이 외피나 외투막이 외부의 영향에 쉽게 변화되지 않는 것들에 유용하다. 쉽게 수축되거나 함몰이 일어나거

나 찌그러져 변형된 모습을 나타내므로 본래의 형태와 모습을 관찰하지 못할 경우가 있다. 또한 본 실험에서 시료의 처리 과정중 시료에 존재하는 sucrose에 의해서 positive stain으로 나타나 rotavirus의 전형적인 모양을 관찰하기 어려워지는 경우가 있었다. 하지만 중류수를 이용하여 PTA 염색전에 3회수세를 함으로서 sucrose를 제거할 수 있었으며 rotavirus의 outer capsid를 명확히 관찰할 수 있는 결과를 얻어냈다.

Rotavirus의 전자현미경적 검증 이외에도 혈청학적 검사는 Yolken(1979) 등이 개발한 ELISA법과 또 개량된 ELISA법을 이용하기도 한다. 또한 최근 국내에서는 LATEX 방법으로 혈청학적 검사를 하는 경우가 많아졌다. 이외에도 rotavirus는 Immuno-electro-osmophoresis, 면역형광법, Viral RNA gel electrophoresis, Radioimmunoassay (RIA), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Latex agglutination (LATEX), Reversed passive haemagglutination, 보체 결합시험 (complement fixation test), immune adherence hemagglutination assay, cryo electron microscopic SEM or TEM 등의 여러 방법을 통하여 항원성, 면역성, vaccine 개발, double-stranded RNA genome의 변화를 추적 관찰하고 있다.

Prasad, B.V.V. 등(1988)에 의하면 투과형 전자현미경으로 simian rotavirus(원숭이 신장에서 추출한 rotavirus)를 동결 전자현미경(freeze EM)으로 관찰하였던 바 40 Å (1 Å = 0.1nm)의 분해능을 가진 직경 705 Å 입자를 가지며 막 또는 이중막(double and single-shelled)의 구조를 갖는 rotavirus를 관찰하였다고 한다. 구형의 rotavirus는 이중의 단백질막이 중심 단백질 심지(central protein core or inner core)을 싸고 있으며 RNA virus(genomic double-stranded RNA)이다(Estes *et al.*, 1983; Kapikian & Chanock, 1990; Prasad *et al.*, 1990). 또한 외투막(outer capsid)은 단백질막으로 이루어져 있고 외투막(outer capsid)의 표면부위에 spike vesible이 있는데 spike vesible을 포함한 직경은 765 Å 이라고 한다. central protein core가 빠져나간 즉 외투막이 벗겨진 상태의 rotavirus가 많이 나타나기도 하며 중심단백질 심지(central protein core or inner core)은 잘 발견되지 않았다.

Formvar 지지막에 시료를 흡착시켜 negative 염색

을 한 본 실험은 동결할단법(cryo freeze etching method)에 의한 관찰방법보다는 해상력이 떨어져 보였으나 본 실험에서는 negative stain으로 rotavirus를 높은 배율의 전자현미경에서 잘 관찰할 수 있었다.

## 결 론

Rotavirus는 유아 설사의 원인체인데 전자현미경에서 특징이 잘 나타나 진단에 결정적인 역할을 한다. 이에 stool specimen을 이용하여 negative stain을 시행하여 신속한 진단방법으로 이용할 수 있는 rotavirus의 미세구조를 관찰하였다. 방법에서의 문제점을 파악하고자 했으며, 그 결과 처리과정 중에 시료에 잔존해 있는 sucrose에 의하여 negative stain의 결과와는 반대의 개념인 positive stain이 된 rotavirus가 관찰되었다. positive stain이 된 rotavirus는 강한 contrast를 나타내 보였으며, 시료를 붙인 grid를 중류수에 3회 희석하였다. rotavirus의 외투막과 외피면의 미세구조가 잘 관찰되었다. 또 염색용액은 UA 보다는 PTA 용액이 높은 배율에서 관찰해야 하는 virus의 구조관찰에 효과적이었다. negative stain을 위한 formvar 지지막은 실험 바로전에 만들어서 사용한 시료에서 관찰하였기에 보고 한다.

## 감사의 글

이 논문을 위하여 원고교정, 재료와 자료정리 등 여러 모로 도와주신 한양대학교 의과대학 해부학교실 정호삼 교수님과 병리학교실 박문향교수님, 병리학교실 정영섭 선생님께 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. & Ruck, B.J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet* II: 1281-1283.
- Brandt, C.D., Kim, H.W., Rodriguez, W.J. *et al.*, 1981. Comparison of Direct Electron Microscopy, and Rotavirus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Gastroenteritis Viruses in Chil-

- dren. *J. Clin. Microbiol.* 13 : 976-981.
- Cook, S.M., Glass, R.I., LeBaron, C.W., Ho M-S, 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bulletin of the World Health Organization*, 68 : 171-177.
- Estes, M.K. and Cohen, J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53 : 410-449.
- Estes, M.K. and Graham, D.Y. 1980. Identification of rotaviruses of different origins by the plaque-reduction assay test. *Am. J. Vet. Res.* 41 : 151-152.
- Estes, M.K., Palmer, E.L. and Obijeski, J.F. 1983. Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 105 : 123-184.
- Kalica, A.R., Purcell, R.H., Sereno, M.M. *et al.*, 1977. A microtiter solid phase radioimmunoassay for detection of the human reovirus-like agent in stools. *J. Immunol.* 118 : 1275-1279.
- Kapikian, A.Z., Cline, W.E., Greenberg, H.B. *et al.*, 1981. Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): Evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect. Immun.* 33 : 415-425.
- Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. 1985. In *Virology*. 863-906, Raven Press, New York.
- Kapikian, A.Z. and Chanock, R.M. 1990. Rotaviruses, In B.N. Fields and D.M. Knipe (ed.), *Virology*. p. 1353-1404. Raven Press, New York.
- Kim, K.H., Cho, Y.J., Joo, S.I. *et al.*, 1990. Importance of rotavirus and adenovirus types 40 and 41 in acute gastroenteritis in Korean children. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 2279-2284.
- Lizano, M., Lopez, S. Romero, P. Mendez, E. Soberon, X. and Arias. C.F. 1991. Rotavirus YM gene 4; analysis of its deduced amino acid sequence and prediction of the secondary structure of the VP4 protein. *J. Virol.* 65 : 3738-3745.
- Matsui, S.M., Mackow, E.R. and Greenberg, H.B. 1989. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.* 36 : 181-214.
- Matson, D.O., Estes, M.K., Glass, R.I., Bartlett, A.V., Penaranda, M., Calomeni, E., Tanaka, T., Nakata, S., Chiba, S. 1989. Human calicivirus associated diarrhea in children attending day care centers. *J. Infect. Dis.* 159 : 71-78.
- Middleton, P.J., Holdaway, M.D., Petric, M. *et al.*, 1977. Solid-Phase radiomunoassay for the detection of rotavirus. *Infect. Immunol.* 16 : 439.
- Ofit, P.A., Shaw, R.D. and Greenberg, H.D. 1986. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to surface proteins vp3 and vp7. *J. Virol.* 58 : 700-703.
- Prasad, B.V.V., Wang, G.J., Clerx, J.P.M. and Chiu, W. 1988. Three dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199 : 269-275.
- Prasad, B.V.V., Burns, J.W., Marietta, E., Estes, M. K. and Chiu, W. 1990. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature (London)* 343 : 476-479.
- Richard, M., Patrick, J.P. *et al.*, 1991. Electron microscopic reporting of gastrointestinal viruses in the united Kingdom, 1985-1987. *J. Med. Virol.* 33 : 193-198.
- Rarnig, R.F. 1982. Isolation and genetic characterization of temperature-sensitive mutants of simian rotavirus SA11. *J. Virol.* 120 : 93-105.
- Sanekata, T., Yoshida, Y., Okada, H. 1981. Detection of rotavirus in faeces by latex agglutination. *J. Immunol. Methods* 41 : 377-383.
- Shaw, A.L., Rothnagel, R., Chen, D., Ramig, R.F., Chiu, W. and Prasad, B.V.V. 1993. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell.* 74 : 693-701.
- Suzuki, H., Amano, Y., Kinbuchi, H. *et al.*, 1981. Rotavirus infection in children with acute gastroenteritis in Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30 : 293-297.
- Yolken, R.H., Kim, H.W., Clem, T. *et al.*, 1977. Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for

- detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* II. 263-267.
- Yolken, R.H. and Stopa, P.J. 1979. Analysis of Nonspecific Reactions in Ezayme Linked Immunosorbent Assay Testing for human Rotavirus. *J. Clin. Microbiol.* 10 : 703-707.
- 장혜경, 김차렬, 오성희 등. 1988. 소아 Rotavirus 설사증에 대한 고찰. *소아과*, 31 : 961-967.
- 김병길, 김덕희, 윤덕진, 진동식, 김홍동, 1985. Human rotavirus에 의한 소아의 위장염 및 그 합병증에 관한 역학적 연구. *대한의학협회지*, 28 : 901-910.

### FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Electron micrographs of rotavirus particles showing positive staining for sucrose (Original Mag. 10,000). Phosphotungstic acid stain.
- Fig. 2.** Electron micrographs of rotavirus particles showing positive staining for sucrose (Original Mag. 30,000). Phosphotungstic acid stain.
- Fig. 3.** Electron micrographs of rotavirus particles showing positive staining for sucrose (Original Mag. 60,000). Phosphotungstic acid stain.
- Fig. 4.** Electron micrographs of rotavirus particles showing positive staining for sucrose (Original Mag. 100,000). Phosphotungstic acid stain.
- Fig. 5.** Electron micrographs of rotavirus particles showing the 70nm diameter complete particles (Original Mag. 60,000). Phosphotungstic acid stain.
- Fig. 6.** Electron micrographs of rotavirus particles showing the 70nm diameter complete particles (Original Mag. 80,000). Phosphotungstic acid stain.
- Fig. 7.** Electron micrographs of rotavirus particles showing the 70nm diameter complete particles (Original Mag. 80,000). Phosphotungstic acid stain.
- Fig. 8.** Electron micrographs of rotavirus particles showing the 70nm diameter complete particles (Original Mag. 100,000). Phosphotungstic acid stain.



