

광학현미경 *In Situ* Hybridization에 의한 Viral RNA 증명

전남대학교 자연과학대학 생화학교실, 광주보건전문대학 임상병리과*

최원기 · 주경웅† · 김석홍 *

국문초록: 토끼 출혈증 바이러스에 감염된 조직을 10% 포르말린 고정, 파라핀 블록으로 보관했던 것으로 표본을 만들고 biotin 표지된 올리고뉴클레오티드 probe를 사용하는 *in situ* hybridization 기법으로 viral RNA를 조사하였다. *in situ* hybridization 기법은 핵산을 규명하는 다른 방법들에 비하여 신속하고 특이성인 높은 기법으로 모든 과정이 MicroProbe™ capillary action system에서 1-2시간 이내에 완료된다. Viral RNA는 간세포의 세포질과 신장의 피질에서 주로 관찰되었으나, 폐조직과 신장의 수질에서는 부분적으로 적색신호가 보였다. 비록 기술적인 한계를 가지고 있지만 다른 핵산 진단방법 보다 많은 장점을 가지고 있어 조직 병리학적으로 바이러스 진단하는데 하나의 독특한 기법으로 채용되리라 기대된다.

서 론

1984년 중국에서 최초로 발견된¹²⁾ RHDV는 토끼에서 급성 출혈성 질환을 일으키는 원인균으로서, 유럽과 1985년 국내를 비롯하여 다른 여러 나라에서도 발병되었다^{12,14,21)}. 현재까지 RHDV의 기본 성상¹²⁾, 임상병리학적 특성^{1,17,18,23)}, 임상화학적 특성⁶⁾, 예방 목적의 백신^{8,22)}, 적혈구응집 및 응집억제 반응^{3,20)} 등이 보고된 바 있다.

최근 분자생물학적인 수기가 발달하고 이를 이용한 *in situ* hybridization(이하 ISH로 약기함)이 광학현미경 수준에서 도입되어 진단병리학이나 세포발생학분야, 또는 virus학 등 광범위하게 응용되고 있다⁹⁾. RHDV의 분류에 대한 논쟁들이 많았지만 virion의 크기, 밀도와 형태등 분자생물학적인 자료에서 calicivirus로 증명되었다^{15,19,21)}. 분자 수준에서 RHDV genome은 약 8kb 정도의 positive-stranded RNA로 구성되어 있고¹⁵⁾, RHDV 염기서열 7437b 모두가 밝혀지므로써⁷⁾ 분자생물학적 조작이 가능케 되었다.

본 연구는 RHD에 감염되어 보관된 파라핀 표본에서 분자생물학적인 ISH 기법이 세포나 조직

중에 RHDV RNA 유전자가 존재하는지 유무와 위치 및 정도를 병리학적 진단에 응용될 수 있는지를 조사하여 실험 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1987년 2월부터 1988년 5월까지 RHD에 감염되었거나 폐사된 2-3kg 정도의 무게를 가진 앙고라 육성토 및 성토 91마리를 부검하여 간장조직, 폐조직, 신장조직을 채취하여 10% 중성 formalin에 고정한 후 파라핀 포매하여 보관된 block을 5 μ m로 박절하여 사용하였다.

2. Oligonucleotide probe

RHDV의 7437 sequences에서 82bases를 선택하여 probe로 사용하였다(Fig. 1). Oligonucleotide probe는 한국생공(Korea Biotech. KOREA)에 의뢰하여 합성하였다.

3. Probe labelling

Oligonucleotide probe의 표지는 biotin-14-dATP와 BioNick™ Labeling System(BRL, USA)을 이용하여 표지 하였다. 먼저 oligonucleotide probe(82b)가 1 \times TE buffer내 5 μ g/20 μ l로 용해되어 있는

* 논문접수 1996년 9월 28일, 수정재접수 1996년 11월 1일.

†별책요청 저자

4681 CCGAg UggCA UgCCC UUCAC CUCgg UCAUC AACUC CAUUU gUCAU UggUU gCUUU ggUCC 4740
 ↑
 OI-RHD : 3' - TAAA CAgTA ACCAA CgAAA CCAgg
 4741 gCAgC CgUUU ACAAg UCUUg UgCUg AAAUU ggCUU ACACU gCUCC AACCU gUACg AggAC 4800
 ↑
 CgTCg gCAAA TgTTC AgAAC ACgAC TTTAA CCGAA TgTgA CgAgg TTggA CATgC TCCTg - 5'
 (Complementary to position 4717~4800b)

Fig. 1. Oligonucleotide probe for *in situ* hybridization.

DNA 4 μ l와 BioNick™ Labeling System의 10 \times dNTP mix(dCTP, dGTP, dTTP/each 0.2mM;biotin-14-dATP; Tris-HCl,pH 7.8), 100mM β -mercaptoethanol, 100 μ g/ml nuclease-free BSA) 5 μ l 그리고 36 μ l의 고압증기 멸균한 H₂O를 넣어 총 반응량을 50 μ l로 하여 잘 섞은 후 짧은 시간 원심 (15000 \times g, 5 sec)하여 16 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 반응을 중단시키기 위해 300mM EDTA 5 μ l를 가하고, 1/10 volume cold absolute ethanol을 가하여 -70 $^{\circ}$ C에 1시간 에탄올 침전 과정을 반복하였다. 원심하여 얻은 DNA pallet를 10 μ l의 1 \times TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5;1mM EDTA)에 녹여 hybridization cocktail(AmrescoR, 45% formamide)에 최종 200ng/ml가 되게 희석하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

4. In situ hybridization

MicroProbe™ capillary action system (FisherBiotech[®])을 이용하였다. ProbeOn™ Plus slide(FisherBiotech[®]) 두 장을 서로 맞대어 생기는 틈새로 시약이 모세관 현상에 의해 스며들고, 흡수성이 좋은 pad 위에서 시약을 쉽게 제거할 수 있었다.

5. Preparatory phase

Histochoice™ clearing agent 1 \times (Amresco[®])를 사용하여 110 $^{\circ}$ C, 2분간 정치하는 과정을 5회, 100% ethyl alcohol에서 5번씩 수세하는 과정을 2회 반복하였다.

6. Enzyme precipitation

Pepsin(Research Genetics 750152)에 110 $^{\circ}$ C, 2분간 노출시켰다.

7. Heat denaturation & hybridization

Prehybe plus(Research Genetics 750124)에 110 $^{\circ}$ C, 3분간 부치 한 다음 biotin으로 표지된 oligonu-

cleotide probe DNA를 사용, 110 $^{\circ}$ C, 2분간 정온반응, 30초간 냉각, 105 $^{\circ}$ C, 2분간 정온반응, 30초 냉각, 95 $^{\circ}$ C, 30초간 정온반응, 2분 냉각, 85 $^{\circ}$ C, 30초간 부치 3분 냉각, 85 $^{\circ}$ C, 30초 정온반응, 4분 냉각 시켰고, postHybe wash(2 \times SSC, Research Genetics 750110)로 2분간 1회 수세하였다.

8. Detection

Streptoavidin-alkaline phosphatase detection system (Research Genetics 750144)를 이용 50 $^{\circ}$ C, 15분간 부치시켰다.

9. Chromogen

Probe Lock(Research Genetics 750148)처리 후, Stable Fast TR salt/Naphthol phosphate(Research Genetics 750152)를 50 $^{\circ}$ C에서 10분과 15분간 2회 반응시키고, Auto wash(Research Genetics 750108)로 2회 수세하였다.

10. Counterstain

Autohematoxylin(Research Genetics 750107)으로 대조염색하여 증류수로 4번 수세하였으며, 1 \times Immuno/DNA buffer(Research Genetics 750124)로 1회, 증류수에서 2회 수세하였다.

11. Mounting & microscopic detection

Crystal/Mount(Biomedica M-02)를 2-3 방울 떨어 뜨려 봉입하고 광학현미경에서 경검하였다.

12. Control for *in situ* hybridization

Alu I/II mix probe(Research Genetics 551013)를 사용하여 ISH 전 과정을 시행하였다.

결 과

토끼의 바이러스성 출혈증을 진단하기 위하여 광학현미경적 *in situ* hybridization을 시도하였다.

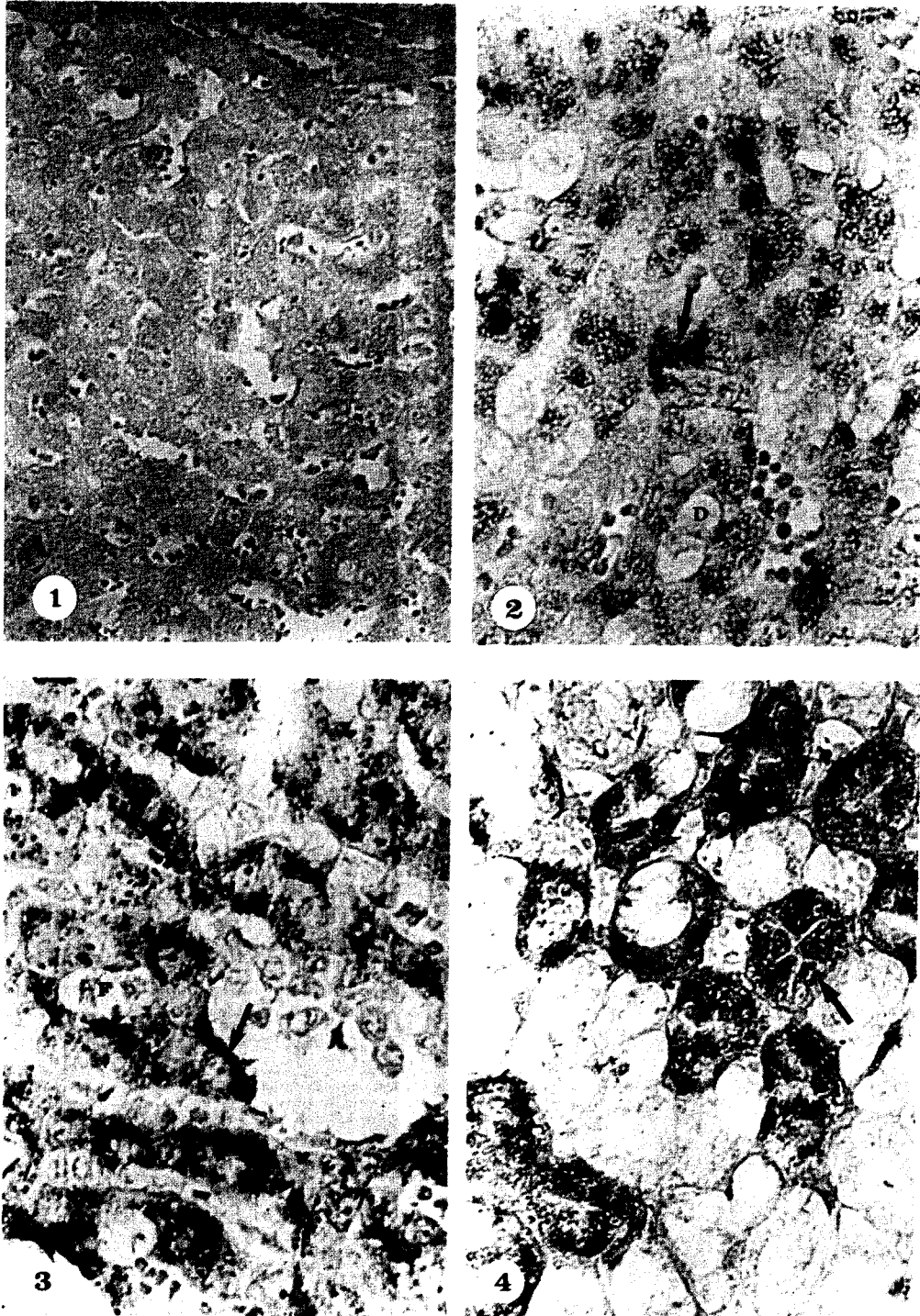


Fig. 1. Negative control for *in situ* hybridization, liver tissue of normal rabbit 200 \times . **Fig. 2.** Red pigmentation(arrow), indicating the presence of RHD viral nucleic acids, appearing in the cytoplasm of degenerated hepatocytes(D) 400 \times . **Fig. 3.** RHD viral persistence signal(arrow) in the fatty changed cytoplasm(F) of hepatocytes 400 \times . **Fig. 4.** Cortex of kidney, showing the red pigmentation(arrow) of cytoplasm of renal glomerular epithelium 400 \times .

Gregor 등에⁷⁾ 의해 7437b로 밝혀진 RHDV RNA sequences에서 oligonucleotide probe를 제작하고 biotin으로 표지하여 조직 내에서 hybridization 시킨 후 avidin-biotin complex 기법으로 신호를 증명하였다. 먼저 ISH 전 과정에 대한 이상 유무를 판정하기 위해 human과 most mammal genome probe인 Alu I/II mix probe가 세포의 핵에서 genomic DNA를 적색으로 염색하므로써 ISH의 모든 과정이 이상이 없음을 증명하였다(Fig. 1). MicroProbe™ capillary action system(Fisher Biotech[®])에서는 극미량의 시약으로 단시간 내에 조작이 가능하였다.

본 저자는 토끼의 간조직과 신장조직 그리고 폐조직에서 ISH를 시행한 결과, 간조직의 변성된 간세포 세포질에서 적색의 강한 양성 반응을 확인할 수 있었으며(Fig. 2, 3), 신장에서는 수질과 수질 부위의 세뇨관 상피세포에서 고르게 양성 반응이 관찰되었다(Fig 4). 폐조직에서는 폐기관지 상피세포의 세포질 내에서 국소적으로 약한 양성 반응을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 다음과 같다.

1. 간세포의 세포질, 신장의 세뇨관 및 폐조직 등에서 RHD 바이러스 존재를 나타내는 적색의 강한 양성 반응을 관찰할 수 있었다.
2. 기존의 파라핀 블록을 이용한 실험을 통해 역추적 조사가 가능하였다.
3. 본 실험을 통하여 *in situ* Hybridization 기법은 토끼에서 치명적인 질환인 토끼 바이러스성 출혈증을 진단하는데 매우 신속하며 정확한 진단 기법임을 알 수 있었다.

고 찰

RHDV의 분자생물학적인 자료에서 이 virus의 병인체는 27-40nm 정도의 calicivirus로서 icosahedral, nonenveloped virions, capsid surface의 형태학적인 특징을 가지고 있다. 추출 정제 후 8kb 정도의 single stranded RNA virus로 확인되었다^{15,19)}. virion의 크기, 밀도와 형태가 calicivirus로 증명되었다^{15,19,21)}. 분자 수준에서 RHDV genome은 약 8kb 정도의 positive-stranded RNA로 구성되어 있음이 밝혀졌으며¹⁹⁾, 이 7437bases 서열이 밝혀지므로써⁷⁾ 분자생물학적인 조작을 가능케 하였다.

본 실험은 RHD 바이러스에 감염된 조직으로 파라핀 절편을 만들어 viral RNA의 진단을 위하

여 ISH 기법을 사용하였다. nucleotide probe를 20-50bases 정도로 probe의 길이를 짧게 하면 조직 투과성이 좋아 민감도를 높일 수 있지만 비특이적인 결합을 일으킬 수 있는 단점이 있는 것으로 보고되고 있기 때문에²¹³⁾, 본 실험에서 사용된 84 oligonucleotides는 다른 FCV, HCV등의 염기서열과 겹치지 않게 하여 특이성을 높게 해주었다.

ISH 전 과정에 대한 control을 잡기 위해 control genomic DNA를 oligonucleotide probe로 세포핵에서 적색으로 증명하고, negative control은 정상 토끼의 간조직을 사용하여 probe 처리를 제외한 모든 과정을 시행하였다. 단백분해효소를 이용하여 절편내로 probe 투과성의 증진과 핵산이 잘 노출되도록 하였고, 보합결합 온도와 시간을 다른 저자들이^{4,10)} 보고한 것 보다 약간 높고 길게 사용하므로써 개선된 신호를 얻을 수 있었다. Probe lock으로 alkaline-phosphatase의 역할을 증대시키고, 발색제는 적색을 나타내는 Stable Fast TR salt/Naphthol phosphate(Research Genetics 750152)로 양성 반응을 강하게 나타내도록 하였으며, 극미량의 시약을 사용하기 때문에 과정 진행 중에 조직이 건조되지 않도록 하는 것은 가장 주의해야 할 사항이다. ISH의 검출제는 alkaline phosphatase가 peroxidase에 비하여 양성 반응을 더 민감하게 검출되며¹⁶⁾, alkaline phosphatase에 대한 발색제는 적색을 나타내는 Fast Red TR salt/Naphthol phosphate를 사용하여 시각적 효과를 얻을 수 있었다. 비특이적인 결합을 없애기 위하여 수세하여 내인성 peroxidase의 활성을 억제하였다. 몇몇 저자들은 절편을 열변성이나 단백분해효소로 전처리를 하면 보합결합능이 증강된다고 보고하고 있다¹¹⁾.

박 등은^{117,18)} 토끼 급성 출혈증의 원인체인 바이러스는 병리학적 및 조직학적 소견으로 간장과 폐등의 장기에서 관찰될 뿐만 아니라 신장에서도 관찰할 수 있다고 하였다. 본 실험에서도 간장, 신장, 폐등에서 RHD RNA virus의 존재를 확인할 수 있었다. 간조직과 신장조직에 비하여 폐조직에서 약하게 반응되는 것은 파종성 출혈증을 일으키는 RHDV가 급성으로 진행된 시기의 표본일 것이라고 생각되었다. 잘 알려진 Northern과 Southern등의 dot-blotting에 비하여 ISH는 조직을 유화시키거나 추출하는 과정을 거치지 않고 특수한 세포에서 흥미 있는 특이 서열을 결정하는데 장점이 있다. 또한 Northern blot-

ting이 전령 RNA의 발현 여부만을 밝히는 것임에 비하여 ISH는 전령 RNA가 발현되는 정확한 부위를 밝힐 수 있는 방법이다. 그러므로 세포생물학이나 유전학 연구에서 ISH는 파라핀 절편된 조직에서 특이 핵산의 위치를 결정하는데 유용한 기법으로 되었다^{29,10}.

Probe의 표지는 S35, P32 등 방사선 동위원소나 biotin, digoxigenin 등을 이용하지만 동위원소 취급에는 주의와 폐기물 처리 등의 여러 가지 문제점을 가지고 있으며, 무엇보다도 검사소요시간이 오래 걸리기 때문에 신속한 결과를 요하는 임상진단 기법으로는 채용하기가 어려움이 있다. 따라서 보다 안전하고 신속한 검사방법이 요구되어 왔다. 본 실험에서는 biotin-14-dATP로 표지한 oligonucleotide probe를 사용하였고 MicroProbe™ capillary action system을 이용하므로써 기존의 바이러스 동정이 수일 내지 일주일 정도 소요되는 것에 비하여, 1-2시간이라는 짧은 시간 내에 신속한 실험을 수행한 결과 감염된 세포질속에서 RHDV의 존재를 지시하는 적색의 양성 반응을 관찰할 수 있었다. 내인성인 biotin으로 인한 위양성 결과를 배제하기 위해 정상조직을 1차 항체 처리만을 제외하고 실시한 ISH에서 음성을 나타냈다. 이상 토끼 출혈증에 감염된 토끼의 간조직을 포르말린에 고정, 파라핀 절편에서 단시간 내에 조직내 바이러스 핵산을 검출하므로써 바이러스 감염을 유발하는 병원체의 확인이 가능하였고, 신속한 검사를 요하는 임상병리검사에 쉽게 이용할 수 있을 것이며, 재료는 포르말린에 장기간 보존하여 파라핀 블록을 제작하는 것보다는 즉시 블록을 제작하는 것이 좋은 결과를 얻을 수 있으나, 파라핀 블록된 상태의 바이러스의 핵산은 보호되고 있기 때문에 본 실험에서 이용된 토끼의 조직과 같이 5년 이상 보관된 포르말린 조직에서도 진단이 가능하므로 질병의 역추적 조사에도 크게 도움되리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. 박남용(1987): 토끼의 새로운 바이러스성 질환:출혈성 폐렴, 대한 수의학회지, **23**(12): 780-788.
2. 박창수(1991): The future of Biotechnology in diagnostic pathology. 제 1차 분자생물학 워크샵 초록집, 전남대학교 의과대학. 55-67.
3. 윤인중, 전윤성(1990): 토끼출혈성 바이러스의 병원성, 적혈구 응집성 및 물리화학적 요인에 대한 영향. 대한수의학회지, **30**(1).
4. Binder M, Tourmente S, Roth J, Renaud M and Gehring WJ(1985): *In situ* hybridization at the electron microscope level: localization of transcripts on ultrathin sections of Lowcryl K4M-embedded tissue using biotinylated probes and protein A-gold complexes. *J Histochem Cytochem*, **39**: 1.
5. Gall JG and Pardue ML(1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations, **63**: 378-383.
6. Cao SZ, Liu SG and Gan MH et al(1986): A preliminary report on viral Haemorrhagic pneumonia(tentative name) in rabbits. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, **12**(4): 9-11.
7. Gregor M, Christoph W and Thiel HJ(1991): Rabbit Hemorrhagic disease-Molecular Cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, **184**: 664-676.
8. Gu ZD, Wang XX and Li QX et al(1988): An inactivated vaccine against haemorrhagic pneumonia in rabbits. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, **12**(2): 50-51.
9. Hasse AT et al(1981): Measles virus nucleotide sequences.detection by hybridization *in situ*. *Science*, **21**: 672-674.
10. Lawrence JB and Singer RH(1985): Quantitative analysis of *in situ* hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucleic Acid Res*, **13**: 1777.
11. Leitch AR, Mosgoller W and Schwarzacher T, Bennett MD, Heslop-Harrison JS(1990): Genomic *in situ* hybridization to sectioned nucleic shows chromosome domains in grass hybrids. *J Cell Sci*, **95**: 335.
12. Liu SJ, Xue HP, BQ and Qian NH(1984): A new viral disease in rabbits. *anim. Husb Vet Med*, **16**: 253-255.
13. Moench TR, Gendelman HE, Clements JE, Nara O and Griff DE(1985): Efficiency of *in situ* hybridization as a function of probe size and fixation technique. *J of Virology*, **11**: 119.
14. Ohlinger VF, HAAS B, AHL R and Weiland F

- (1987): Die infektiöse hämorrhagische Krankheit der Kaninchen-eine durch ein Calicivirus verursachte Tierseuche. *Tieraerztl Umsch*, **44**: 284-294.
15. Ohlinger VF, HAAS B, Meyers G, Weiland F and Thiel HJ(1990): Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol*, **64**: 3331-3336.
 16. Park CS, Manahan LJ and Brigati DJ.(1990): Automated Molecular Pathology. *J. of Histotechnol In Press*.
 17. Park JH, Kida H, Ueda K, Ochiai K, Goryo M and Itakura C(1991): Etiology of rabbit hemorrhagic disease spontaneously occurring in Korea. *J Vet Med*, **B38**: 49-754.
 18. Park JH, Ochiai K and Itakura C(1992): Detection of rabbit hemorrhagic disease virus particles in the rabbit liver tissues. *J Comp Pathol*, **107**: 329-340.
 19. Parra F and Prieto M(1990): Purification of a calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol*, **64**: 4013-4015.
 20. Pu BQ and Qian NH et al(1985): Micro HA and HI tests for the detection of antibody titers to so-called "Haemorrhagic pneumonia" in rabbits. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, **11**(10): 16-17.
 21. Smid B, Valicek L, Stepanek J, Jurak E and Rodal L(1989): Experimental transmission and electron microscopic demonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia. *J Vet. Med*, **B36**: 237-240.
 22. Wei JS, Yu NS and Yang YF et al(1987): Investigation on a viral haemorrhagic disease in rabbit in Yunnan province. *Chinese Journal of veterinary Science and Technology*, **8**: 20-24.
 23. Xu FN, Shen WP and Liu,SJ(1985): Study of pathology of viral haemorrhagic disease in rabbits. *Animal Husbandary and Veterinary Medicine(Xumu yu shouyi)*, **17**(4): 153-155.

=Abstract=

Identification of Viral RNA by Light Microscopic *In Situ* Hybridization

Won-Gi Choi, Keng-Woong Joo[†], Suk-Hong Kim*

*Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chonnam National University,
Kwangju, 500-757, Korea,*

Department of Clinical Pathology, Kwangju Health College, Kwangju, 506-701, Korea

In this paper, a *in situ* hybridization (ISH) has been used to investigate the yield of viral RNA expression from each organ tissues. It is studied to establish a rapidly, specific diagnostic method detecting rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) RNA in 10% formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of naturally RHDV-infected rabbits using oligonucleotide probe to be made by RHDV total sequences. Biotin was used as the oligonucleotide probe marker. *In situ* hybridization is detected the virus genome in the cells and tissue as specifically compared with others nucleic acid hybridization method. All ISH procedure of RHDV were completed to MicroProbe™ capillary action system within 1-2 hours. In this report, RHDV was distributed widely in the cytoplasm of liver cell and the cortex of kidney but lung tissue and medulla of kidney were showed to positive reaction at locally. Although not entirely free of technical limitations, nucleic acid identification holds advantages over other diagnostic tests, including exquisite sensitivity, specificity, interchangeability and speed. It is expected that, in the immediate future viral nucleic acid detection will be a prominent part of the methods used in histopathology.

Key Words: Biotin, *In situ* hybridization, Light microscope, Oligonucleotide probe.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(2): 249-255, December 1996]

[†]Corresponding author