

Digoxigenin-labeled *in situ* Hybridization 을 이용한 오제스키병의 진단

김순복¹, 문운경², 송근석³, 여상건¹

¹경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소, ²수의과학연구소, ³유한양행

Digoxigenin-labeled *in situ* Hybridization for Diagnosis of Aujeszky's Disease in Pigs

Soon-Bok Kim¹, Oun-Kyung Moon², Geun-Suk Song³, Sang-Geon Yeo¹

¹Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, ²National Veterinary Research Institute and ³Yooohan Pharmasutical Co.

Abstract. The objective of this study was to develop digoxigenin (DIG)-labeled *in situ* hybridization (ISH) test for diagnosis of Aujeszky's Disease (AD) in infected organs. Specific DNA with well conserved gene sequences encoding gp50 antigen in AD virus (ADV) was obtained by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. A pair of oligonucleotide primers used in PCR allowed amplification of a 217 bp sequence from the gp50 ADV gene. The DNA was then labeled with DIG by primer labeling method for use as probe in ISH test to detect ADV nucleic acids in various tissue. Positive hybridization was demonstrated by dark pigmentation in nuclei and cytoplasm of ADV infected cells particularly in brain, tonsillar crypt epithelium, and pulmonary alveolar cells. This result suggests that ISH is a valuable sensitive and rapid diagnostic test for AD.

Key words : Digoxigenin-labeled *in situ* hybridization, Aujeszky's disease

서 론

오제스키병은 거의 모든 포유동물에 감수성을 가지면서 자돈과 소, 양, 개 등에서는 치명적으로 경과하는 급성 전염병이다. 또한 회복한 돼지에서 오제스키병 바이러스(Aujeszky's disease virus, ADV)는 잠복감염을 일으켜 긴장상태가 나빠지거나 장거리수송 등의 스트레스가 가해지면, 회복 개체내에 숨어있던 바이러스 genome이 다시 복제를 시작하여 다른 동물을 감염시키는 감염원으로 작용하게 된다.¹ 오제스키병은 이러한 잠복감염의 특성과 광범위한 동물의 감수성으로 인하여 일단 만연하고 나면 피해가 막대할 뿐만아니라, 박멸이 매우 어려워 다른개체에 전파가 이루어지기 전인 감염초기 신속히 진단하여 감염개체를 도살하는 방역대책이 특히 요구되는 질병이다.¹

In situ hybridization(ISH)은 유전자간의 동질성 여부를 확인할 수 있는 hybridization 기법을 형태학에 도입한 것으로 세포내에 존재하는 DNA 또는 RNA를 동정하는 것이며, 조직절편내 바이러스 검출에 대한 응용 가능성이 알려진 이래 각종세포^{2,5} 및 바이러스^{6,9}의 특이핵산을 검출하는 방법이다. 이 방법은 특히 분리동정에 장기간을 요하는 바이러스성 질병의 신속한 진단수단으로 활발한 연구의 대상이 되고 있다.

최근 바이러스성 질병의 진단에 있어 ISH 기법은 높은 감수성과 특이성을 보이는 신속한 진단수단으로 알려지고 있다. 즉, 원인바이러스의 분리동정을 거치지 않고 조직절편상의 감염세포내에서 바이러스 핵산을 확인하므로써, 바이러스가 복제되고 있는 급성감염기^{6,9} 뿐만아니라 잠복감염(latent infection) 상태에서도 검출이 가능하다.^{10,11} 또 바이러스 감염

세포가 조직절편내 한개만 존재하여도 검출이 가능하며, 조직형태학적 구조를 그대로 유지하면서 바이러스 존재부위를 확인할 수 있는 장점을 가지고 있어 오늘날 조직절편내 각종 핵산 검출법으로 많이 연구되고 있다.^{11, 12}

비방사능 ISH 기법은 방사능 ISH 기법이 2~3 일 정도의 검출기간을 요하는데 비하여 20시간 이내로 진단 소요시간이 짧고, 표지 DNA probe의 안정성이 1년 이상으로 방사능 ³²P 표지 probe의 반감기 14일에 비하여 매우 높다. 또한 반응 후 조직절편상의 비특이적인 배경염색이 거의 없어 판독이 용이하고, 방사능 동위원소의 취급에서 오는 위험과 환경오염의 가능성을 배제할 수 있는 등의 장점을 가지고 있다.^{6, 11}

본 연구는 오제스키병을 신속하게 확진할 수 있는 비방사능 digoxigenin(DIG)-labeled ISH 기법을 확립함과 동시에 진단적 감염장기와 해부학적 부위를 선별하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 접종 및 시료채취

ADV에 대한 혈청항체 음성으로 확인된 40일령 랜드레이스종 자돈 6두에게 ADV의 NYJ-1-87주를 2 ml(10^7 TCID₅₀ /0.2 ml) 씩 비강접종하고 6~7 일 후에 부검하여 각종장기를 절취한 뒤 파라핀 포매하였으며, 일부 조직은 냉동절편을 위하여 -70°C에 저장하였다. 또한 경남 양산지역에서 병성감정 의뢰된 자연감염돈 3두의 포르말린고정 및 파라핀 포매 조직을 함께 공시하였다.

DIG-labeled ISH

ADV DNA로부터 probe를 생산하기 위하여 먼저 polymerase chain reaction(PCR)을 실시하였다. Template DNA는 plasmid pBR325내에 cloning된 ADV DNA로서 6.3Kb 크기의 *Bam*HI 7 fragment(gp50, gp63 및 gI 부위 유전자; Dr. Osorio, Nebraska Univ.)를 사용하였다. PCR에 사용된 sense 및 antisense primer는 한국생명공학연구소에 의뢰 제작하였으며, gp50의 conserved sequence에 상보적이며 각각 5'CACGGAGGACGAGCTGGGGCT3' 및 5'GTCCACGCCCGCTTGAAGCT3'의 염기서열로 구성된 것으로서 217 bp를 증폭할 수 있는 것이었다. PCR kit의 protocol에 따라 10x buffer 10 μ l, ADV DNA 4 μ l, dNTPs(A,T,G,C) 각 2 μ l, sense

및 antisense primer 각 5 μ l, taq DNA polymerase 0.5 μ l 및 증류수 67.5 μ l를 섞어 전체용량이 100 μ l가 되도록 혼합한 다음 PCR을 실시하였다. PCR 반응을 위하여 94°C 에서 1분간 denaturation 시켰고 55°C에서 1분간 annealing 하였으며 72°C에서 1분간 polymerization 하여 한 cycle 당 3분씩 모두 30 cycle 증폭시켰다. 이어서 1.5% agarose에서 전기영동하여 증폭된 217 bp의 band를 확인한 다음 gene clean kit으로 분리하여 이것을 DNA probe 생산에 사용하였다(Fig. 1). Primer labeling 방법으로 이 DNA에 DIG을 labeling하여 probe를 생산하고자 100°C에서 10분간 denaturation 시킨 DNA 10 μ l, hexanucleotide primer 2 μ l, dNTPs labeling mixture 2 μ l, 증류수 4 μ l, Klenow enzyme 1 μ l를 얼음 위에서 잘 섞은 다음 37°C에서 60분간 반응하였다. 이어서 0.2 M EDTA(pH 8.0) 2 μ l를 첨가하여 반응을 중단시킨 후 4 M LiCl 2.5 μ l, -20°C로 미리 냉각시킨 ethanol 75 μ l를 넣고 -20°C에서 2시간 침전하였다가 12,000g 에서 20분간 원심하여 얻은 DNA pellet을 70% cold ethanol로 수세하고 진공건조 후 TE buffer(100 mM tris, pH 7.5, 1 mM EDTA) 50 μ l에 다시 녹였다. Hybridization을 위한 효소 전처리 과정으로서 5 μ m 두께로 제작된 파라핀 절편을 먼저 xylene에서 탈파라핀한 다음 100% ethanol에 이행 건조하여 PBS에서 5분간 침적하였으며, deproteinization을 위하여 실온에서 20분간 0.2 N HCl에 처리 후 proteinase K(40 μ g/ml, Sigma)로 PBS에서 37°C, 30분간 소화시킨 다음 4% paraformaldehyde에 1분간 재고정하여 PBS로 3회 수세 후 ethanol에 이행탈수 건조하였다. Hybridization을 위하여는 hybridization buffer(5 x SSC, 1% blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS, 50% formamide)를 -20°C에 저장하면서 사용 직전에 녹인 후 이 용액에다 labeled ADV-DNA probe를 20-50배가 되도록 희석하여 조직절편위에 한방울씩 떨어뜨린 다음 coverglass로 덮어 매니큐어로 밀봉하였다. 이 슬라이드를 100°C에서 10분간 denaturation 시킨 후 10분간 냉각하는 과정을 2회 반복한 다음 100°C에서 한번 더 denaturation 시켜 42°C의 moisture chamber내에서 12-20시간 동안 hybridization 시켰으며, 이어 coverglass를 제거하고 PBS로 수세하였다. 이 슬라이드를 buffer 1(0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 20°C) 용액에 1분간 수세하고 buffer 2(blocking stock solution,

diluted 1:10 in buffer 1) 용액에 30분간 처리한 후 polyclonal sheep anti-DIG Fab fragment의 alkaline phosphatase conjugate를 buffer 2에 1:500으로 희석하여 실온에서 40분간 감작하였다. 이어서 buffer 1에서 15분간씩 2회, buffer 3(100 mM tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5, 20°C)에서 2분간 수세한 뒤 chromogen(NTB solution 45 μ l, X-phosphate solution 35 μ l, buffer 10 ml)으로 암소에서 6-7시간 발색하였다. buffer 4(10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 20°C)에 5분간 수세후 methyl green으로 20-30분간 대조염색하여 wet mounting 하였다.

결 과

ADV 접종 돼지군은 접종 2일째부터 발열, 기침, 식욕부진, 침울을 보이다가 3일째에는 비루, 호흡곤란, 식욕절폐, 근진전, 발작, 선회운동, 유연 등의 증상을 일으켰으며 6일째에는 2두가 폐사하였고 나머지 1두는 정상으로 회복하였다. 그리고 임상증상이 현저한 다른 3두는 접종 4일째 도살 부검하였다. 감염동물의 뇌조직에서는 신경세포변성괴사, 위관성원형세포침윤, 교세포증가증 및 신경세포의 호산성핵내봉입체 등을 볼 수 있었다.

조직절편에서 비방사능 물질인 DIG으로 표지한 ADV-DNA probe를 이용하여 ADV 핵산동정을 시도하였던 바, 바이러스 감염세포내에서 높은 감수성과 특이성을 보이는 흑갈색 색소침착의 양성반응을 관찰할 수 있었으며(Fig. 2), 인공감염 돼지의 각종 장기에 대한 핵산 검출에서는 대뇌, 편도 상피 및 폐장의 폐포탈락상피에서 흔히 양성반응이 관찰되었다. 중추신경계내의 특이 양성반응은 돼지에서는 대뇌의 olfactory bulb, parietal cortex(Fig. 3), callosal sulcus, corpus callosum(Fig. 4) 주위에서 높은 빈도로 관찰되었으며 medullar, pons, cerebellum에서는 빈도가 현저히 낮았다.

고 찰

ADV는 주로 비강과 구강을 통해 자연감염되며 비인두와 편도상피에서 일차증식이 일어나고, 여기에서 임파성 전이를 하거나 삼차신경, 후각신경 및 설인신경을 타고 중추신경계로 가게 되는데 바이러

스주에 따라 다소 양상을 달리하나 대개 상부호흡기도와 중추신경계에 친화성을 갖는다.^{11,14} 본 실험의 인공감염 돼지에서도 대뇌, 편도 상피 및 폐장의 폐포탈락상피에서 바이러스 핵산을 흔히 검출할 수 있었으며 진단을 위한 시료채취는 이러한 부위를 선택하는 것이 좋을 것 같다. 중추신경계내의 특이 양성반응은 돼지에서는 대뇌의 olfactory bulb, parietal cortex, callosal sulcus, corpus callosum 주위에서 높은 빈도로 관찰되는데 반해, medullar, pons, cerebellum에서는 빈도가 현저히 낮아 돼지에서 중추신경계의 바이러스 이동은 주로 olfactory nerve를 경유한다는 사실을 알았다. 그리고 척수에서는 양성반응을 볼 수 없었으며 이는 바이러스가 연수를 거쳐 척수에 도달하기 전에 이미 폐사하는 것으로 생각된다.

ISH 기법은 조직절편에서 바이러스 핵산을 동정하는 방법으로서 조직학적 구조를 그대로 유지하면서 잠복감염기에서도 검출이 가능한 장점을 가지며 감염세포가 조직내에 한개만 존재하여도 검출이 가능할 정도의 높은 감수성과 특이성을 가지는 방법으로 알려져 있다.¹¹ 본 실험은 ADV 감염 조직세포에서 DIG-labeled ISH 기법을 이용하여 바이러스 DNA를 동정하는 진단법을 확립하였다. 비방사능 물질인 DIG으로 표지한 ADV-DNA probe를 이용하여 바이러스감염 돼지의 장기조직절편에서 ADV 핵산동정을 시도하였던 바, 바이러스 감염세포내에서 높은 감수성과 특이성을 보이는 흑색 색소침착의 양성반응을 관찰할 수 있었다. 이상에서 얻은 결과는 기존의 바이러스 분리동정에 의한 진단이 상당기간 소요 되었음에 비하여 본 방법은 20시간 이내에 확진을 가능케 하므로 앞으로 오제스키병의 중요한 진단수단으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

ISH는 조직절편내에 한개의 감염세포만 존재하여도 바이러스 핵산 검출이 가능하기 때문에 바이러스 분리동정법에 비하여 검출율이 훨씬 높음은 물론 포르말린에 고정하여 장기간 보관되었던 조직에서도 검출이 가능한 장점이 있다.^{11,12,15,16} 본 실험에서 냉동 및 파라핀절편에서 ISH를 실시하여 결과를 비교하여본 결과 파라핀절편에서 더 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 포르말린 고정조직은 고정액내에서 오래 저장한 것 보다는 고정된 다음 파라핀에 포매한 상태로 저장한 것에서 더 좋은 검출효과를 얻을 수 있었고 일반적으로 포르말린 고정시간은 짧을 수록 좋은 것 같았다.

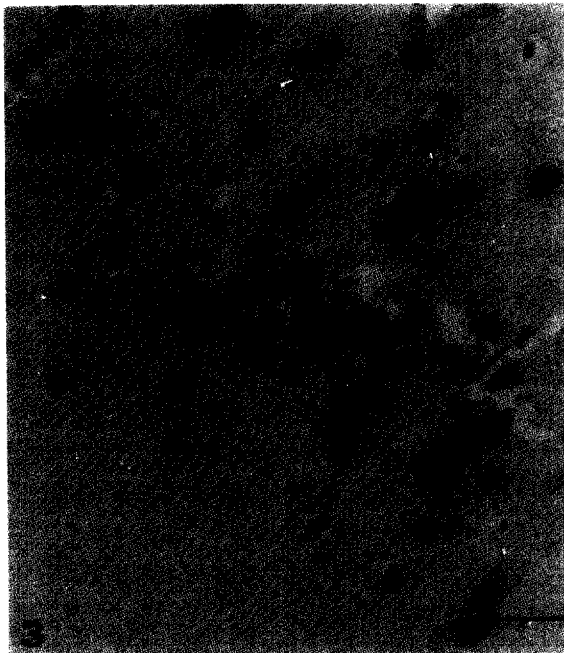
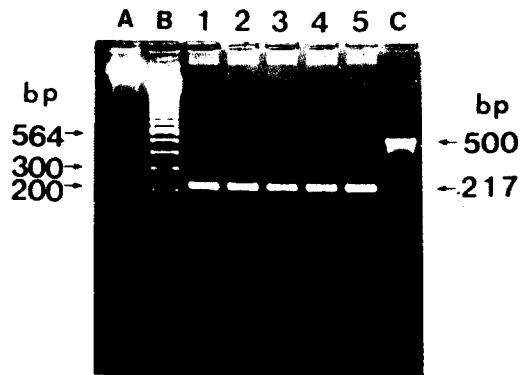


Fig. 1. ADV DNA amplified by PCR for production of digoxigenin-labeled probe: A, λ -HindIII DNA molecular marker; B, 100 bp DNA molecular marker; C, PCR control DNA; 1-5, DNAs amplified by primers for conserved sequence of recombinant ADV-gp50 clone.

Fig. 2. A strong positive signal (arrow) in the nuclei of infected nerve cell. *In situ* hybridization (ISH). Bar=52.9 μ m.

Fig. 3. ADV nucleic acid detected in the infected nerve cells of parietal cortex. ISH. Bar=118 μ m.

Fig. 4. ADV nucleic acid detected in the infected nerve cells of corpus callosum. ISH. Bar=52.9 μ m.

참고 문헌

- 1 Kluge JP, Beran GW, et al. Diseases of swine. *In: Pseudorabies*, 7th ed. Leman AD ed. pp. 312-323. Iowa: Iowa State Univ Press, 1992.
- 2 Anastasi J, Le Beau MM, et al. Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hepatopoietic cells by *in situ* hybridization with a chromosome-specific probe. *Am J Pathol* **136**(1):131-139, 1990.
- 3 Sandberg M, Vuorio E. Localization of types 1,2 and 3 collagen in developing human skeletal tissues by *in situ* hybridization. *J Cell Biol* **104**:1077-1084, 1987.
- 4 Zoeller RT, Seeburg PH, et al. *In situ* hybridization histochemistry for messenger ribonucleic acid(mRNA) encoding gonadotropin releasing hormone (GnRH):Effect of estrogen on cellular levels of GnRH mRNA in female rat brain. *Endocrinol* **122**:2570-2577, 1988.
- 5 Herrington CS, Burns J, et al. Interphase cytogenetics using biotin and digoxigenin labelled probes: 1. Relative sensitivity of both reporter molecules for detection of HPV 16 in CaSki cells. *J Clin Pathol* **42**:592-600, 1989.
- 6 Walboomers JMM, Melchers WG, et al. Sensitivity of *in situ* detection with biotinylated probes of human papilloma virus type 16 DNA in frozen tissue sections of squamous cell carcinomas of the cervix. *Am J Pathol* **131**(3):587-594, 1988.
- 7 Wolf BC, Martin AW, et al. The detection of Epstein-Barr virus in Hairy cell leukemia cells by *in situ* hybridization. *Am J Pathol* **136**(3):717-723, 1990.
- 8 Ikeda T, Yoshikawa Y, et al. Detection of v- and c-erbB oncogene mRNA in cultured cells by *in situ* hybridization. *Jpn J Vet Sci* **52**:175-178, 1990.
- 9 Mcguire LJ, Huang DP, et al. Epstein-Barr virus genome in thymoma and thymic lymphoid hyperplasia. *Am J Pathol* **131**:385-390, 1988.
- 10 Brown TM, Osorio FA, Rock DL. Detection of latent pseudorabies virus in swine using *in situ* hybridization. *Vet Microb* **24**:273-280, 1990.
- 11 Osorio FA, Rock DL. A murine model of pseudorabies virus latency. *Microb Pathog* **12**:39-46, 1992.
- 12 Belak K, Funa K, Kelly R, et al. Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by improved *in situ* hybridization using biotinylated probes on paraffin-embedded tissue sections. *J Vet Med B* **36**:10-20, 1989.
- 13 김순복, 서정향, 문운경. *In situ* hybridization 조직화학법을 이용한 오제스키병 바이러스 동정. *대한수의학회지*. **34**(2):327-333, 1994.
- 14 Masic M, Erceegan M, Petrovic M. Die Bedeutung der Tonsillen fuer die Pathogenese und Diagnose der Aujeszky'schen Krankheit bei Schweinen. *Zent Blt Vet Med* **12**:389-405, 1965.
- 15 Nho HG, Sur JH, et al. Detection of canine parvovirus in naturally infected dogs with enteritis and myocarditis by *in situ* hybridization. *J Vet Diagn Invest* **9**:255-260,
- 16 Sur JH, Kim SB, et al. Study of transneuronal passage of pseudorabies virus in rat central nervous system by use of immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *Am J Vet Res* **56**(9):1195-1200, 1995.

Reprint requests from Dr. Soon-Bok Kim, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang, National University, Chirju, Republic of Korea, 660-701.

Tel. 0591)751-5816, Fax. 0591)751-5803, E-mail : sbk@nongae.gsnu.ac.kr