

In situ hybridization에 의한 소 바이러스성 설사증 바이러스의 검출

박남용 · 홍기강 · 정치영 · 조경오 · 이봉주 · 박영석 · 박형선 · 권창희*

전남대학교 수의과대학
국립수의과학검역원*
(1999년 2월 18일 접수)

Detection of bovine viral diarrhea virus by *In situ* hybridization

Nam-yong Park, Ki-kang Hong, Chi-young Chung, Kyoung-oh Cho, Bong-joo Lee,
Young-seok Park, Hyung-seon Park, Chang-hee Kweon*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University
National Veterinary Research and Quarantine Service*

(Received Feb 18, 1999)

Abstract : Detection and distribution of bovine viral diarrhea virus(BVDV) was studied in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from two naturally infected cattle by *in situ* hybridization with a non-radioactive biotinylated probe. A 600 base pair cDNA probe from BVDV B-25 strain was used for probe.

The whole procedure of ISH to diagnose was carried out within 1~2 hours in Microprobe™ capillary action system. The biotin-labelled probe was demonstrated after hybridization under standard conditions by the application of streptoavidin and biotinylated alkaline phosphatase. Alkaline phosphatase was visualized using a fast red TR/naphthol phosphatase and the sections were counterstained with hematoxylin. We have obtained the result of positive reactions in digestive tract(sm1.all intestine and colon) and epidermis of tongue in the state of the intact tissues.

The result suggested that *in situ* hybridization method can be considered as a useful diagnostic technique for detection of specific nucleic acid sequences of BVDV.

Key words : bovine viral diarrhea, *in situ* hybridization, cattle, Togavirus, BVD.

서 론

소 바이러스성 설사증(bovine viral diarrhea, BVD)은 *Togavirus*과의 *pestivirus*의 감염에 의한 것이며 임신한 소의 유산, 미이라 변성 등 번식장애를 일으키고 소화기계에 미란, 궤양 및 설사를 특징으로 하는 급성 질병이다^{1,4}. 소가 주요한 숙주이지만 다른 반추수인 양, 염소, 야생 반추류와 돼지에도 감수성이 있으며^{3,4} 사람에서도 BVD 바이러스에 대한 중화항체가 확인된 바 있다⁵.

소 바이러스성 설사증 바이러스(BVDV)는 절족동물의 매개에 의해 전파되는 다른 *Togavirus*와 달리 이미 감염되어 있는 숙주와의 접촉, 분변이나 오줌에 의해서 또는 흡입 등으로 주로 감염되며^{1,2} 임신한 소에서는 태반을 통한 감염과 인공수정시 정액을 통한 전파도 보고되었다^{3,4,10}.

BVD는 1946년 미국에서 처음 보고된 이후 현재 미국, 캐나다, 일본, 호주, 유럽, 남아프리카 등 전세계적으로 BVDV에 대한 중화항체 보유율이 50-90%에 이르고 있으며^{3,4} 국내에서도 1987년에 석과 서⁶에 의해 BVDV의 감염이 의심되는 한우, 육우, 젖소에서 BVDV를 처음 분리함으로써 처음 확인되었고, 혈청중화시험 결과 45% 전후가 이 바이러스에 대한 중화항체를 보유하고 있는 것으로 나타나^{7,8} 우리나라에서 대단히 중요한 소의 질병으로 간주되고 있다.

BVD에 감염된 소는 면역기능 억제작용에 있어서¹⁻³ 다른 호흡기 질병과의 합병증 예가 많은 것으로 확인되었고⁹, 소화기계 점막상피세포의 손상 이외에도 태반감염된 송아지의 소뇌형성부전, 백내장 등의 다양한 병변을 일으킨다². 또한 잠복감염된 송아지나 소는 그 바이러스의 좋은 전파체로서의 역할을 하게 되는데⁴ 임상증상을 뚜렷하게 보이지 않는 예가 많으므로 야외에서의 효과적인 대책이 이루어지기 어렵고 경제적 손실이 크다^{2,7,8,10}.

이 BVD 바이러스에 대한 많은 연구가 있었는데 배지에서 양 태아의 뇌세포를 이용한 바이러스 존재확인¹¹, BVDV에 감염된 육용 송아지에서 혈소판 감소증과 출혈의 보고¹² 그리고 태반감염된 송아지의 대퇴골과 경골의 골절¹³, 무균상태의 어린 양을 이용하여 BVD의 감염력과 병원성의 비교⁹ 등은 진단분야가 아닌 분야의 최근 연구경향이다.

BVD 진단방법에는 다른 바이러스 진단에 흔히 사용되고 있는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)¹⁴, 정액을 이용한 형광항체시험¹⁵ 등 혈청학적 진단방법과 조직내 항원검출을 위한 면역형광항체염색법³ 그리고 바이러스의 분리, 동정을 통한 확인 등이 있다. 그러나 면역형광항체기법은 특이반응이 일어날 수 있기 때문에 진단하는데 신속하게 응용되기에는 어려운 점이 있고 바이러스의 분리는 그 실험과정이 너무 길고 매우 조심스럽게 이루어져야 하며 오염이 되지 않아야 하는 등 여러가지 어려운 점이 많고 시간과 노력이 많이 소요되는 단점 때문에 실용적이지 못하다.

국내에서는 1987년 석과 서⁶가 최초로 소 바이러스성 설사증 바이러스 분리에 성공하였고, 권 등¹⁶이 바이러스의 구조단백질에 관한 이화학적 성상연구 등 현재에는 더욱 발전하여 백신개발과 진단에 응용되는 중요한 cDNA 작성¹⁷ 등 분자생물학적 수준에서의 활발한 연구¹⁸가 이루어지고 있다.

요즘들어 유전공학의 발전에 힘입어서 크게 발전되어진 분자생물학은 이제 질병의 진단 뿐 아니라 친자확인, 종의 분류 등에 폭넓게 이용되고 있다^{19,20}. 이러한 발전에 힘입어서 특이 감염성 질병진단에 큰 기여를 하게 된 polymerase chain reaction(PCR)을 이용한 진단기법이 BVD를 진단하는데 응용되었다²¹. PCR 기법과 함께 분자생물학기법 중의 하나인 *in situ* hybridization(ISH) 기법은 세포나 조직에서 존재하고 있는 바이러스의 특정한 핵산부위를 검출해낼 수 있는 첨단기법으로 소개되었다^{17,19,22}.

이 ISH는 특히 세포나 조직의 형태가 유지된 상태에서 바이러스계통을 확인할 수 있기 때문에 아주 유용하며 병리조직실험에서 보편적으로 실시하는 포르말린 고정후 파라핀 포매된 조직절편을 가지고 실험할 수 있기 때문에 조직이나 세포내에 바이러스의 분포를 알 수 있어 정성·정량적 분석을 할 수 있다^{19,23}.

이 기법에 응용되는 핵산 probe는 cDNA나 oligonucleotide probe 등을 플라스미드나 박테리오파아지를 이용하여 증폭, 대량생산할 수 있는 장점이 있다¹⁹.

그리고 기존에 포매되어 있던 파라핀 조직절편을 이용하여 역추적이 가능하고²²⁻²⁴ 임상증상이 유사한 우역, 악성 카타르열, 아까바네병 등의 확실한 감별진단^{17,18}이 가능할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 자연발병된 소의 BVD 질병을 진단하기 위하여 소 바이러스성 설사증 바이러스인 BVDV의

coat protein을 암호화한 cDNA를 nick translation에 의해 biotin을 labelling 하여 probe를 제조하고 자연발병된 소의 장기들의 조직절편들에 대해서 ISH를 수행하여 BVDV의 감염을 확인할 목적으로 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 : 1989년과 1995년 국내 모 농장에서 심한 침흘림, 설사 그리고 구강점막의 궤양을 특징으로 나타내는 소의 조직을 병리조직학적 검사와 분변의 전자현미경 관찰을 통하여 소 바이러스성 설사증(BVD)으로 확인하였다. 자연발생에 BVD를 대상으로 포르말린 고정된 파라핀 포매조직을 이용하였다.

1) *In situ* hybridization을 위한 조직의 준비 : 자연발병된 소의 부검시 채취한 허 그리고 소장, 대장 등의 주요 장기를 10% 중성 포르말린에 고정한 후 파라핀 포매하여 5 μ m로 박절된 파라핀 조직절편을 ProbeOn™ plus slide(fisher biotech®)에 마운팅하여 *in situ* hybridization 실험에 이용하였다.

2) BVD-cDNA : 소 바이러스성 설사증 바이러스(B-25주)의 mRNA를 분리한 후 reverse transcriptase에 의해 제조된 cDNA(600bp)중 coat protein을 암호화하고 있는 부위중 pUC-19의 EcoRI 인식부위에 삽입된 DNA를 수의과학연구소 권장회 연구관으로부터 제공받아 사용하였다.

3) Probe labelling : 제공받은 cDNA를 spectrophotometer(260nm)를 이용하여 흡광도를 측정하여 농도를 결정 한 후에 biotin-14-dATP와 BioNick™ labelling system (BRL, USA)를 이용하여서 BVD 바이러스의 cDNA fragment에 표지하였다.

먼저 BVD-cDNA(600bp)가 1X TE buffer내 5 μ g/20 μ l로 용해되어 있는 DNA 4 μ l와 BioNick™ labelling system의 10X dNTP mix(0.2mM each dCTP, dGTP, dTTP, 0.1mM dATP, 0.1mM biotin-14-dATP, 500mM Tris-HCl(pH 7.8), 100mM β -mercapto-ethanol, 0.5mM MgCl₂, 100 μ g/ml nuclease-free bovine serum albumin 5 μ l와 10X enzyme mix 5 μ l 그리고 36 μ l의 autoclaved H₂O를 넣어 잘 섞은 후 가볍게 원심(15,000 \times g for 5 sec)하여 16 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시켰다. 이때의 총 반응량을 50 μ l로 하였다.

다음은 더이상의 반응을 중단시키기 위해 300mM EDTA 용액 5 μ l를 가하고 repeated ethanol precipitation을 실시하는 과정으로 1/10 volume의 3M sodium acetate와 2

volume cold absolute ethanol을 가하여 -70 $^{\circ}$ C에 1시간 정지한 후 원심하여 얻은 DNA pellet을 70% 에탄올로 세척, 건조시켜 10 μ l의 1 \times TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA)에 녹여 hybridization cocktail(amresco®, 45% formamide)에 최종 200ng/ml이 되게 희석하여 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

4) *In situ* hybridization : *In situ* hybridization의 모든 과정은 MicroProbe™ capillary action system(fisher biotech®)을 이용하였으며 ProbeOn™ plus slide를 맞대어 생기는 틈새 사이로 모세관현상에 의하여 적은 양의 시약이 쉽게 스며들게 하고 흡수성이 좋은 pad 위에 slide를 놓아 반응하고 남은 시약이 쉽게 제거되는 원리를 이용한 것으로 Brigati *et al*²⁵의 방법에 따라서 1~2시간내에 수행하였으며 그 과정은 다음과 같다(Table 1).

(1) Preparatory phase : ProbeOn™ plus slide 위에 부착한 파라핀 절편조직의 탈파라핀 과정으로 Histochoice™ clearing agent 1 \times (amresco®)를 사용하여 110 $^{\circ}$ C에서 2분간 정지하는 과정을 5회 반복하고 100% 에탄올에서 3번씩 수세를 2회 반복하였다.

(2) Enzyme predigestion : 탈파라핀 조직절편내로 probe의 투과성 증진과 핵산이 잘 노출되도록 단백분해효소인 pepsin(research genetics 750102)을 첨가하여 110 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시켰다.

(3) Heat denaturation & hybridization : 조직절편내 target virus 핵산을 변성시키기 위해 prehybe plus(research genetics 750124)를 110 $^{\circ}$ C에서 3분간 반응시킨 후 15~30초간 cooling 하였다. 계속하여 biotinylated cDNA probe를 적용하여 110 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응 15~30초간 cooling, 105 $^{\circ}$ C 2분 부치 15~30초 cooling, 105 $^{\circ}$ C 30초 부치 1분 cooling, 95 $^{\circ}$ C 30초 부치 2분 cooling, 85 $^{\circ}$ C 30초 부치 3분 cooling, 85 $^{\circ}$ C 30초 부치 4분동안 cooling 시켜 annealing 하도록 하였다.

결합하지 않은 probe를 제거하기 위하여 posthybe wash (2 \times SSC, research genetics 750125) 액으로 5초간 4회 수세하였다. 그리고 시료에 존재하는 peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 Auto blocker(research genetics 750110)로 2회 수세하였다.

(4) Detection : Streptoavidin-alkaline phosphatase detection kit(research genetics 750144)를 이용하여 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킴으로써 strepto-avidin phosphatase가 조직내에 존재하는 BVD 바이러스의 RNA와 융합된 biotinylated probe

Table 1. Procedure for *In situ* hybridization

Reagent	Cycle	Time	Temp
Auto dewaxing	5	2 min	110℃
Auto alcohol	3	1 wash	RT
Auto alcohol	3	1 wash	RT
Pepsin	1	2 min	110℃
Prehybe plus (Probe enhancer)	1	3 min	110℃
Probe	1	1 min	110℃
Cooling	1	15-30 sec	RT
Probe	1	2 min	105℃
Cooling	1	15-30 sec	RT
Probe	1	0.5 min	105℃
Cooling	1	1 min	RT
Probe	1	0.5 min	95℃
Cooling	1	2 min	RT
Probe	1	0.5 min	85℃
Cooling	1	3 min	RT
Probe	1	0.5 min	85℃
Cooling	1	4 min	RT
Posthybe wash(2X SSC)	4	5 sec	RT
Auto blocker	1	2 min	50℃
Posthybe wash(2X SSC)	4	5 sec	RT
STREP-AP detection system	1	10 min	50℃
Probe lock(chromogen enhancer)	1	1 wash	RT
STABLE FAST TR/NP chromogen	1	10 min	50℃
STABLE FAST TR/NP chromogen	1	15 min	50℃
Auto wash	1	1 wash	RT
Auto wash	1	1 wash	RT
Auto hematoxylin	1	1 min	RT
Distilled water wash	2	1 wash	RT
1X immuno/DNA buffer	1	1 wash	RT
Distilled water wash	2	1 wash	RT

RT : Room temperature.

가 상호결합을 이루도록 하였다. 이것은 biotin과 streptavidin의 강한 결합력을 이용한 것이다.

(5) Chromogen : Chromogen을 반응시키기 전에 alkaline-phosphatase의 결합력을 증대시키기 위해 probe lock(chro-

mogen enhancer, research genetics 750148)을 처리하였고 alkaline-phosphatase에 대한 발색제로 red signal을 나타내는 stable fast TR salt/naphthol phosphate(research genetics 750152)를 50℃에서 10분씩 2회 반응시킴으로써 양성반응을 강하게 나타내도록 하였다.

그런 다음 auto wash(research genetics 750108)로 2회 수세하여 조직염색과정중에 잔류되었을 모든 시약을 완전히 수세하였다.

(6) Counterstain : 적색으로 염색된 양성반응을 확인하기 위하여 auto hematoxylin(research genetics 750107)으로 대조염색하여 증류수로 4번 수세하였으며 1× immuno/DNA buffer로 1회 수세한 후 다시 증류수에 2번 수세하였고 조직이 건조되지 않도록 하여 crystal/mount(bio-media M-02)를 2~3방울 떨어뜨려 마운팅한 뒤 광학현미경으로 관찰하였다.

(7) Control : 대조군으로 BVD에 감염되지 않았던 소의 정상 소장과 대장조직을 10% 중성 포르말린에 고정된 후 파라핀 포매한 조직절편을 target tissue와 함께 ISH 기법을 실시하여 발색반응을 서로 비교하였다.

결 과

소 바이러스성 설사증에 감염된 것으로 확인된 소의 조직을 *in situ* hybridization(ISH)에 이용하였다. 포르말린에 고정된 조직을 파라핀 포매한 후, 소 바이러스성 설사증 바이러스의 cDNA에 비방사성 바이오틴을 표지하였다.

제작된 biotinylated cDNA는 세포나 조직에 존재하는 BVD 바이러스 핵산과 상보성 결합을 이루어 검출되는 probe이며 이 모든 과정을 MicroProbe™ capillary action system 하에서 수행하였다. 그리고 조직절편은 실험 도중에 떨어지지 않도록 ProbeOn™ plus slide에 마운팅하여 이용하였다.

질병에 감염되지 않은 소의 정상조직을 대조군으로 하고 ISH의 모든 과정을 실시한 후 광학현미경으로 검정한 결과, 정상 소화관 조직에서는 아무런 발색반응을 보이지 않았다(Fig 1). 반면 BVD에 감염된 소 2두 모두에서 회장(Fig 2, 3), 공장(Fig 4, 5) 그리고 결장의 점막상피와 특히 음와세포(crypt cell)의 세포질내에 적색의 강한 양성반응(Fig 6~8)을 나타내었으며 고유층에도 발색반응이 관찰되었다. 또한 회장의 peyer's patch의 림프구에서 양성반응이 관찰되었으며 혀의 상피세포에서도 미

약한 적색의 발색이 인정되었다. 즉, ISH의 발색반응을 통해 세포의 형태를 그대로 유지하면서 소 바이러스성 설사증 바이러스의 핵산 분포정도를 알 수 있었다.

고 찰

소 바이러스성 설사증 바이러스주(BVDV B-25)에서 재조합된 cDNA probe(600bp)에 비방사성인 바이오틴을 이용하여 표지하여 *in situ* hybridization(ISH) 수행을 위한 probe로 제작하였다. 모든 과정을 MicroProbe™ capillary action system을 이용하여 소 바이러스성 설사증에 감염된 소의 조직을 포르말린 고정된 후 파라핀 포매한 조직 절편에서 ISH 기법을 실시한 바 조직내에 존재하는 소 바이러스성 설사증 바이러스의 핵산을 검출하는 소의 조직에 적용한 ISH 기법을 개발하였다.

실험결과 소장과 결장을 비롯한 장관 용모 상피세포의 세포질에서 강한 적색반응을 확인하였는데(Fig 2-8) 이것은 병리조직검사에서 소화관 용모 상피세포의 파괴로 인한 출혈, 미란과 궤양¹⁻³ 등이 있는 병변부위와 일치하였다. 혀에서의 뚜렷한 병변은 관찰되지 않았고 적색의 반응이 인정되기는 했지만 반응은 미약한 것이었다.

BVD의 진단방법으로 가장 확실한 바이러스의 분리, 동정^{6,9,11}, 중화항체시험^{7,8}, ELISA¹⁴, 형광항체시험¹⁵ 등의 혈청학적 검사법이 주로 연구되었고 최근 분자생물학 기법의 하나인 polymerase chain reaction(PCR)²¹에 관한 연구가 이용되기도 했다. 그러나 중화항체시험이 가장 우수하고 널리 응용되고 있는 진단방법으로 현재까지 소 바이러스성 설사증의 진단에 이용되고 있다.

우리나라에서도 이 중화항체시험을 이용한 소 바이러스성 설사증의 감염실태조사에서 전국적으로 38%⁷와 호남지역에서 48%⁸의 중화항체 보유율을 확인하여 사실상 경제적인 피해를 가장 많이 끼치고 있는 소 질병중의 하나임을 입증하였다. 그러므로 BVD의 예방관리대책으로써 잠복감염으로 임상증상을 보이지 않는 소의 검색과 처리를 위해 더욱 정확한 진단법이 요구된다.

소 바이러스성 설사증에 대한 연구는 바이러스 구조 단백질의 단클론항체 성장연구²⁶, Osloss주와 NADL주 등의 바이러스 RNA 염기서열이 규명되었으며 앞으로의 백신개발과 진단에 이용될 유전자 재조합 cDNA 생산 등 다양하게 이루어졌다¹⁸.

본 연구에서는 분자생물학적 기법을 이용하여 항원인

BVD 바이러스 핵산을 검출하여 정확하고 신속한 진단 기법을 개발하고자 hybridization(핵산융합) 기법을 수행하였다. 이 기법을 응용하여 임상증상을 보이지 않는 지속 감염된 소의 혈액구에서 추출한 BVD 바이러스 핵산을 검출하였으며²⁷ 여러가지 cDNA probe를 이용한 blot hybridization 등의 연구^{22,28}로 분자생물학적 기법의 응용이 가능하게 하였다.

이 핵산융합 기법은 용액을 이용한 hybridization과 solid support hybridization으로 나누어지는데³⁴ 최근 분자생물학적 기법의 발전으로 solid support hybridization에 속하는 ISH 기법이 진단분야에 도입되고 있으며 원인바이러스의 분리, 동정이 필요치 않고 핵산 probe를 이용하여 원하는 원체의 핵산을 검출한다²⁰. 최근 자동화시킨 시스템 등의 개발로 전문적인 지식이 없는 임상가도 응용할 수 있다.

그리고 이 ISH 기법은 probe 증폭에 의한 대량생산과 oligonucleotide probe의 합성기술 향상¹⁹ 등 유전자 조작 기법의 발전에 힘입어 감염성 질환이 진단에 많은 도움을 줄 것으로 기대되고 있다.

ISH를 실시하기에 앞서 가장 중요한 것은 target nucleic acid를 검출해내는데 이용되는 probe의 작성에 있다. Probe는 염기서열의 길이에 따라 20~50bp(base pairs)인 oligonucleotide probe^{29,30}, RNA probe 그리고 유전자 재조합 cDNA probe로 나눈다^{20,24}. 길이가 너무 짧은 oligonucleotide probe는 조직을 잘 투과하는 높은 민감도를 갖지만 비특이적인 결합^{24,25}을 일으키는 반면 너무 긴 것은 미약한 반응을 나타내므로 가장 적절한 길이는 50~150 bp로 보고되었다³¹.

본 실험에서는 600bp의 비교적 길이가 긴 cDNA probe를 이용하여 소장과 결장에서 강한 적색의 양성반응을 보였고 혀에서 미약한 양성반응을 관찰할 수 있었는데 H&E 염색시 상피세포의 미란과 궤양소견이 관찰되지 않은 것으로 보아 BVD 바이러스가 소화기계에 비해 혀조직에서 적은 양으로 분포하고 있었기 때문이라 사료된다.

조직이나 세포내의 target nucleic acid와 상보적인 결합을 형성한 probe를 표지하기 위해 ³²P, ³H, ¹⁴C 등의 방사성 물질과 비방사성인 바이오틴(비타민 H)³²과 digoxigenine²⁹ 등이 이용되고 있으나 방사성 물질의 폐기처리 문제와 안전성^{19,24}에 관련해 현재는 비방사성 물질을 주로 이용하고 있다^{24,33}

이러한 표지로 회장, 공장 및 결장을 포함한 소화기계

에서 나타나는 적색의 발색반응은 BVD 바이러스 핵산의 존재를 확인해주는 양성신호(positive signal)로 인정할 수 있었다. 여러가지의 cDNA을 이용한 진단연구^{22,28}가 실행되어 각각의 비교를 통한 더 우수한 probe의 개발과 함께 oligonucleotide 합성에 의한 probe의 개발은 ISH 진단기법의 발전에 기여할 것이다.

BVD 감염조직을 이용한 ISH 기법의 확립은 바이러스 분리, 배양 또는 전자현미경을 이용하여 분변으로부터 바이러스를 확인함으로써 진단되는 시간보다 훨씬 짧은 시간에 진단이 가능하였고 기존의 진단방법인 중화항체 실험을 대체하여 더욱 신속하고 정확한 진단을 수행하는데 크게 도움이 될 것이라고 사료된다.

결 론

BVD 바이러스 B-25 분리주의 cDNA Probe(600bp)에 바이오틴 표지를 하여 소 바이러스성 설사증에 감염되었던 소의 주요 장기를 포르말린 고정, 파라핀 포매한 조직을 이용하여 MicroProbe™ capillary action system 하에서 *in situ* hybridization(ISH)를 1~2시간 이내에 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

소장용모의 점막상피세포와 결장용모 점막상피세포의 세포질내에 소 바이러스성 설사증 바이러스의 핵산이 존재함을 증명할 수 있는 적색의 강한 양성반응을 확인하였다.

이상의 결과로 비방사성 바이오틴 표지한 cDNA Probe를 이용하여 한 두 시간 이내에 세포의 조직학적인 형태를 그대로 유지한 조직에서 소 바이러스성 설사증을 신속하게 확진할 수 있는 ISH 기법을 개발하였다.

Legends for figures

Fig 1. Non red color pigmentation, control for *in situ* hybridization(ISH). Stained normal epithelium of intestine. × 100.

Fig 2. Positive red signal in the ileal epithelium. ISH. × 200.

Fig 3. Red color showed BVD viral genome in ileal cytoplasm of ileal epithelium. ISH. × 400.

Fig 4. Red color(positive signal) appearing in the cytoplasm of jejunal epithelium. ISH. × 200.

Fig 5. Red color indicating BVD viral nucleic acid in the jejunal epithelium. ISH. × 400.

Fig 6. BVD viral nucleic acid persistence in the colonal epithelium. ISH. × 100.

Fig 7. Red color showing in the cytoplasm of colonal epithelium. ISH. × 200.

Fig 8. High magnification of colonal epithelium showing strong positive red signal in the cytoplasm of colonal epithelium. ISH. × 400.

참 고 문 헌

1. Backer KH, Dubovi EJ, Hocke RL, *et al.* Epidemiology of bovine viral diarrhea-mucosal disease in beef cattle. *Compendium on continuing education*, 11:1147-1156, 1989.
2. Duffell SJ, Harkness JW. Bovine viral diarrhea mucosal disease infection in cattle. *Vet Rec*, 117:240-245, 1985.
3. Backer JC. Bovine viral diarrhea virus : A review. *JAVMA*, 190:1449-1458, 1987.
4. Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, *et al.* Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animal. 8th ed, Cornell University Press, 740-749, 1988.
5. Wilks CR, Abrraham G, Blackmore DK. Bovine pestivirus and human infection. *Lancet*, 107, 1989.
6. 석호봉, 서익수. 한국에서의 소 바이러스성 설사병에 관한 연구. 2. 발병우로부터 BVD 바이러스 분리 및 동정시험. 서울대학교 수의대 논문집, 12:151-169, 1987.
7. 석호봉, 서익수. 한국에서의 소 바이러스성 설사병에 관한 연구. 소, 돼지, 면양에서 BVD 바이러스 중화항체 분포조사. 서울대학교 수의대 논문집, 12: 63-81, 1987.
8. 이채용, 이정길, 남선문. 광주·전남지역내 소의 바이러스성 질환에 관한 혈청학적 연구. *Korean J Vet Res*, 35:615-623, 1995.
9. Jewett CJ, Kelling CL, Frey ML, *et al.* Comparative pathogenicity of selected bovine viral diarrhea virus isolates in gnotobiotic lambs. *Am J Vet Res*, 51:1640-1644, 1990.
10. Bak A, Callesen H, Meyling A, *et al.* Calves born after embryotransfer from donors persistently infected with BVD virus. *Vet Rec*, 131:37, 1992.
11. Trautwein HM, Trautwein G, Moenning V, *et al.* Infection of ovine fetal brain cell cultures with cytopathogenic and non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol*, 33:239-248, 1992.
12. Capri WV, Elliott RD, French TW, *et al.* Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *JAVMA*, 196:590-596, 1990.
13. Constable PD, Hull BL, Wicks JR, *et al.* Femoral and tibial fractures in a newborn calf after transplacental infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Rec*, 132: 383-385, 1993.
14. Durham PJK, Hassard LE. An enzyme linked immunosorbent assay for antibodies to bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol*, 22:1-10, 1990.
15. Amhad A, Dulae GC, Claude D, *et al.* Comparative valuation of the fluorescent antibodies test and microtiter immunoperoxidase assay for detection of bovine viral diarrhea virus from bull semen. *Can J Vet Res*, 55:91-93, 1991.
16. 권창희, Castro EA, 우희종. 세포 비병원성 소 설사병 바이러스의 이화학적 성장조사. *Korean J Vet Res*, 32:77-82, 1992.
17. 여상건, Cho HJ, Masri SA, 소 바이러스성 설사병 바이러스의 유전자 재조합 cDNA clone의 작성에 관한 연구. *Korean J Vet Res*, 32:389-398, 1992.
18. 여상건, Cho HJ, Masri SA. 소 바이러스성 설사병 바이러스 gp53 항원부위 유전자의 재조합 및 염기서열 연구. *Korean J Vet Res*, 35:287-295, 1995.
19. 박순희, 권두한. 핵산탐침을 이용한 감열성 질병의 진단. 제2회 산학연 심포지움 논문집(한국생화학회), 21-34, 1991.
20. 박창수. The future of biotechnology in diagnostic pathology. 제1차 분자생물학 워크샵 초록집(전남대학교 의과대학), 55-67, 1991.
21. Hertig C, Pauli U, Zanoni R, *et al.* Detection of viral diarrhea virus using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 26:65-76, 1991.
22. Kenny VB, Julia FR, Ruitang D. Comparative hybridization and nucleotide sequence information two noncytopathic isolates of bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol*, 36:69-82, 1993.
23. Singer RH, Ward DC. Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using *in situ* hybridization with a biotinlated nucleotide analog. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:7331-7335, 1982.

24. 박창수. *In situ* hybridization을 이용한 mRNA의 검출. 제11차 대한내분비학회 추계학술대회 심포지움 (별책), S.23-S.25, 1992.
25. Brigati DJ, Myerson D, Leary J, *et al.* Detection of viral genome in cultured cells and paraffin embedded tissue section using biotin-labelled hybridization probes. *Virology*, 126:32-50, 1989.
26. 권창희, Chun ZY, 우희종. 소 설사병 바이러스 구조 단백질에 대한 단클론항체 성장연구. 대한수의학회지, 32:83-90, 1992.
27. Aiken J, Jensen J, Schultz RD. Detection of bovine viral diarrhea virus genome in leukocytes from persistently infected by RNA-cDNA hybridization. *Can J Vet Res*, 54:256-259, 1990.
28. Kwang J, Littledike TE, Steve Bolin, *et al.* Efficiency of various cloned DNA probes for detection of bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol*, 28:279-288, 1991.
29. Crabb ID, Hubhes SS, Hicks DG, *et al.* Nonradioactive *in situ* hybridization using digoxigenin-labeled oligonucleotides. *American J Pathol*, 579-589, 1992.
30. Weiss LM, Chen YY. Effect of different fixatives on detection of nucleic acids from paraffin-embedded tissues by *in situ* hybridization using oligonucleotide probes. *J Histology and Cytochemistry*, 1237-1242, 1991.
31. Herrington CS, McGee JO. *Diagnostic molecular pathology a practical approach volume I* phenotyping and genotyping of Intact Cells. Oxford University Press, 69-102, 1992.
32. Liang XM, Wieczorek RL, Koss LG. *In situ* hybridization DNA probes on archival cervical smears. *J Histology and Cytochemistry*, 771-775, 1991.
33. Park Chang-soo, Manahan LJ, Brigati DJ. Automated molecular pathology : One hour *in situ* DNA hybridization. *The J Histotechnol*, 219-233, 1991.