韓家衛誌 第25卷 第3號
Korean J Vet Serv(2002) 25(3) : 295~297

배양세포에서 전염성조혈장기괴사증 바이러스항원의 면역조직화학적 검출

문운경, 이민권*, 진영배**, 김순복**[1]

국립수의과학검역원, 경상남도축산진흥연구소 북부지소*
경상대학교 수의과대학 동물의학연구소**[1]
(접수 2002. 8. 9, 게재승인 2002. 9. 24)

Immunohistochemical detection of infectious hematopoietic necrosis virus antigens in cell cultures

Oun-Kyung Moon, Min-Kwon Lee*, Young-Bae Jin**, Soon-Bok Kim**[1]

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-016, Korea
**Northern Branch, Gyeongnam Livestock and Veterinary Research Institute, Hapchon, 678-800, Korea*
***[1]Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*
(Received 9 August 2001, accepted in revised from 24 September 2002)

Abstract

This experiment was done to set up the immunohistochemical detection method for infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV) antigens in the monolayers of CHSE-214 cell cultures inoculated with IHNV. Specific identification of IHNV antigens was detected in the cytoplasms of infected cells by the use of monoclonal antibodies to glycoproteins. The specific positive signal was observed as a distinct red color. The result showed that streptavidin alkaline phosphatase immunohistochemistry specifically identified IHNV antigens in infected cultured cells.

Key words : Immunohistochemistry, Infectious hematopoietic necrosis virus, Cell culture

서 론

전염성조혈장기괴사증(infectious hematopoietic necrosis; IHN)은 연어와 송어류의 치어에 주로 감염하는 바이러스성 전염병으로써, 피부가 검게 변하고, 복부지느러미의 출혈, 안

[1]Corresponding author
Phone : 055-751-5816, Fax : 055-759-8061
E-mail : sbk@nongae.gsnu.ac.kr

구돌출, 복부 팽대 및 아가미가 창백하게 변하는 증상을 보이다가 폐사하는 급성 전신성 전염병이다[1,2]. 전염성조혈장기괴사증 바이러스(infectious hematopoietic necrosis virus ; IHNV)는 우리 나라를 위시해서 북미주와 동남아 등지에 널리 분포되어 있으며, 양식산업에 상당한 피해를 주고 있는 전염성 질환이다[3].

원인 바이러스를 분리 동정하지 않고 바이러스 항원을 검출하여 신속하게 확진할 수 있는 면역조직화학적 진단기법을 확립할 목적으로 IHNV를 접종한 CHSE-214 단층배양세포에서 alkaline-phophatase 면역염색법으로 IHNV 항원을 검출하였다.

재료 및 방법

슬라이드글라스 위에 CHSE-214 세포가 monolayer를 형성하도록 Complete RPMI 배지에서 먼저 증식 배양한 다음에 IHNV (ATCC 22090, 10^3 $TCID_{50}$/㎖)를 접종한 뒤, 15℃에서 1~3일간 배양한 후 면역조직화학 염색을 실시하였다.

배양세포의 면역염색을 위하여, 먼저 슬라이드를 PBS(0.1M phosphate buffered saline) 용액에다 1회 세척한 다음, 95% 에틸알콜과 빙초산을 3 : 1로 섞은 용액에다 10분간 고정하여 건조 수세하였으며, 이렇게 처리한 슬라이드는 4℃에 저장하면서 면역염색에 사용하였다. 면역염색을 위하여 block 용액(Super block TM, blocking buffer in PBS, No 37515, Pierce)으로 30분간 전처리 하여 수세한 다음 1차 항체로서 anti-glycoprotein 단크론 항체[4]를 dilution buffer(PBS + 0.2% bovine serum albumin)에 100배 희석하여 1시간 감작시킨 후 10분간 수세하였다. 연결항체로서 biotinylated antimouse 면역혈청(DAKO LSAB 2 kit)을 10분간 처리한 다음, strepavidin alkaline phsphatase로 10분 감작하여 fast red로 발색하였고, hematoxylin으로 대조 염색한 후에 glycerol mounting medium(DAKO No C563)으로 mounting 하였다.

결과 및 고찰

IHNV는 연어과 어류에 감염하여 경제적으로 큰 손실을 입히는 *rhabdovirus*이며, 이 바이러스는 glycoprotein, nucleoprotein, 2종의 membrane protein(M1, M2) 및 non-virion protein의 5종의 단백질로 구성되어 있다. 분리주의 종류에 따라 혈청학적으로 각기 다른 양상을 보이고 있는데, 어떤 분리주는 다클론성 항체에서 각기 다른 중화반응을 보이기도 하고, 단클론성 항체를 사용한 혈청중화반응과 형광항체법에서는 분리주의 glycoprotein이나

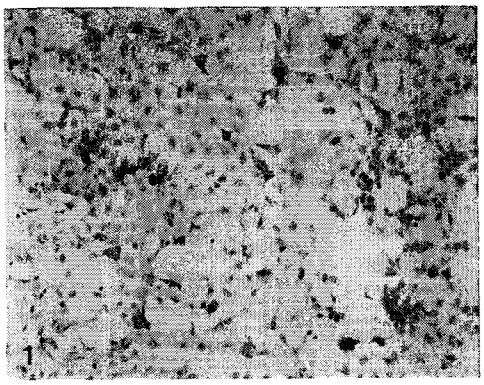

Fig 1. Positive signal showing red pigmentation in IHNV-inoculated CHSE-214 cell culture immunostained with streptavidin alkaline phosphatase. × 32.

Fig 2. Positive signal in IHNV-inoculated CHSE-214 cell culture immunostained with streptavidin alkaline phosphatase. × 161.

nucleoprotein에 대한 항원성의 변이가 보고되기도 하였다[4,5]. 본 실험에서는 2종의 anti-glycoprotein 단클로 항체를 사용하여 IHNV를 접종한 CHSE-214 단층배양세포에서 alkaline phosphatase 면역조직화학 염색을 실시한 결과, IHNV 항원의 존재를 나타내는 특이적인 적색의 양성반응을 관찰할 수 있었다(Fig 1, Fig 2). 반대로 바이러스를 접종하지 않은 대조군 배양세포에서는 양성반응을 볼 수 없어 특이성이 높음을 확인할 수 있었다. 면역조직화학법은 짧은 시간 내에 바이러스 항원을 세포에서 직접 확인할 수 있기 때문에, 바이러스성 질병을 진단하는데 있어 원인바이러스를 분리 동정하지 않고 신속하게 확진할 수 있는 진단기법으로 널리 보급되고 있으며[6~8], 본 실험 결과에서 보는 바와 같이 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 기법은 IHN 진단법으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

IPNV는 아가미, 식도 및 위분문부 상피세포를 통해 침입하며 viremia를 거친 뒤, 각종 장기의 상피세포 또는 결체조직으로 파급된다. 본 실험에서 IHNV 항원 양성반응이 세포질내에 국한하여 관찰되는 것으로 미루어, 바이러스의 복제는 주로 세포질내에서 일어나는 것으로 생각된다.

결 론

본 실험에서는 2종의 anti-glycoprotein 단클론항체를 사용하여 IHNV를 접종한 CHSE-214 단층배양세포에서 streptavidin alkaline phosphatase 면역조직화학 염색을 실시한 결과, IHNV 항원의 존재를 나타내는 특이적인 적색의 양성반응을 관찰할 수 있었으며, 바이러스 항원은 감염세포의 세포질 내에서 검출되었다. 이상의 결과에서 단클론 항체를 이용한 면역조직화학 기법은 IHN 진단법으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Robert RJ. 2001. Fish Pathology. 3rd ed W. B. Saunders : 233~238.
2. Bruno DB, Poppe TT. 1996. A colour atlas of salmonid diseases. Academic Press : 26~28.
3. Park MA, Sohn SD, Lee SD, et al. 1993. Infectious hematopoietic necrosis virus from salmonides cultured in Korea. *J Fish Pathol* 16 : 471~478.
4. Ristow SS, de Avila JA. 1991. Monoclonal antibodies to the glycoprotein and nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV) reveal differences among isolates of the virus by fluorescence, neutralization and electrophoresis. *Dis Aqua Organisms* 11 : 105~115.
5. Danton M, Ristow SS, Hattenberger-Baudouy AM, et al. 1994. Typing of French isolates of infectious hematopoietic necrosis virus(IHNV) with monoclonal antibodies using indirect immunofluorescence. *Dis Aqua Organisms* 18 : 223~226.
6. 김순복. 1999. Immunohistochemical diagnosis of infectious pancreatic necrosis. 한국수의병리학회지 3(1) : 1~5.
7. Sur JH, Kim SB, Osorio FA, et al. 1995. 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.
8. 김순복, 서정향, 문운경. 1990. Avidin-boitin complex for immunohistochemical diagnosis of Aujeszky's disease and hog cholera. 대한수의학회지 30(4) : 435~440.