

## ***In situ* PCR에 의한 alcelaphine herpesvirus-1 (AHV-1)의 진단법 개발 및 다른 분자생물학적 진단법들과의 비교**

김옥진\*

미국 농무부 동물질병연구소

### ***In situ* PCR for the Detection of Alcelaphine Herpesvirus-1 and Comparison with other Molecular Biological Diagnostic Methods**

Okjin Kim\*

United States Department of Agriculture - ARS, ADRU

Alcelaphine herpesvirus 1 (AHV-1) is a causative agent of malignant catarrhal fever which is a fatal and a lymphoproliferative syndrome. AHV-1 is a gamma herpesvirus, which induces frequent latent infection and often difficult to detect its antigens or specific nucleic acids because of its low viral copies in the infected tissues. A new method, *in situ* PCR, is developed for the detection of AHV-1 nucleic acid in this study. Target sequences of AHV-1 open reading frame 50 gene were detected within AHV-1 infected MDBK cells. As compare with other molecular biological methods for the detection of AHV-1, *in situ* PCR was found to be more sensitive than *in situ* hybridization and to be less sensitive than nested PCR. However, nested PCR cannot afford to observe and differentiate AHV-1 infected cells. *In situ* PCR amplifies a target sequence within cells that can be visualized microscopically with increased sensitivity compared to detection by *in situ* hybridization. *In situ* PCR has wide applications for sensitive localization of low copy AHV-1 viral sequences within cells to investigate the role of viruses in a variety of clinical conditions and also provide the rapid, sensitive, and specific detection of AHV-1 infection.

**Keywords:** alcelaphine herpesvirus-1; AHV-1; herpesvirus; *in situ* PCR; *in situ* hybridization; PCR

## 서 론

Alcelaphine herpesvirus-1 (AHV-1)은 gamma herpesvirus로서 반추류에 치명적인 malignant catarrhal fever (MCF)를 유발하며, 급성 질병형의 병리조직학적 소견은 임파구 침윤, 임파조직의 증식 및 혈관염 등을 특징으로 한다<sup>1</sup>. 임상적으로 증상이 유사하여, 진단이 어려운 질병으로는 mucosal disease, infectious bovine rhinotracheitis, foot-and-mouth disease와 rinder pest 등이 있으며, 이들의 병인론적인 진단은 바이러스를 분리하거나, 혈중 항체의 검사 및 바이러스 항원을 직접적으로 확인하는 방법으로 수행되어 왔다<sup>2</sup>. 그러나, 바이러스 분리는 그 분리가 어렵고 세포배양에 따르는 오랜 시간이 필요하기 때문에 빠른 진단을 필요로 하는 이들 질병의 진단법으로는 여러 가지 제약을 가지고 있다. 또한, 조직내 항원을 검출하거나 혈중 항체를 검출하는 방법은 유사 바이러스들 간의 교차 반응으로 인한 검사결과의 특이도가 문제가 될 수 있다. 최근, 분자생물학의 발달로 바이러스의 핵산을 검출하는 방법이 진단기법으로서 부각되고 있으며, 이러한 기법들에는

특이 염기서열을 선택적으로 증폭하여 그 존재를 검출할 수 있는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)이 보고되고 있다. PCR은 미소량의 바이러스 존재라도 검출할 수 있는 높은 민감도를 가진 방법이지만, 병인론 연구시 바이러스의 조직내 분포와 target 세포의 관찰을 허용하지 않는 점이 사용의 제한점이 되고 있다<sup>3</sup>. 한편, 세포내 바이러스 특이 핵산의 분포를 검출할 수 있는 방법으로 *in situ* hybridization이 개발되어 바이러스 감염증의 진단 및 병인론 연구를 위하여 유용하게 이용되고 있다<sup>4</sup>. 그러나, *in situ* hybridization은 세포내 1-20의 낮은 copy 수의 핵산 가닥을 검출하지 못하는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 제한점은 잠복감염 또는 불현성 감염을 유발하는 바이러스의 연구에서는 *in situ* hybridization은 성공적인 결과를 제공하지 못할 수 있음을 말해준다<sup>5</sup>. AHV-1에 감염된 동물의 lymph node로부터 10<sup>5</sup>개 세포당 1개 세포에서 DNA 또는 바이러스 항원에 양성반응을 확인할 수 있었다는 연구들로부터 AHV-1이 매우 낮은 copy 수로 조직내 분포함을 알 수 있다<sup>6,7</sup>. 또한, AHV-1은 herpesvirus로서 잠복감염을 유발하기 때문에 병원성 연구를 위한 방법으로 민감도

가 매우 높은 방법이 요구되고 있다. 최근에, PCR과 *in situ* hybridization의 장점을 공유하고 있는 *in situ* PCR이 개발되어 바이러스, 중앙 및 발생학 분야의 연구를 위한 효과적인 방법을 제공하고 있다. *In situ* PCR은 감염된 세포에 한 개의 바이러스까지도 검출할 수 있는 매우 높은 민감도를 가지고 있으며, 동시에 조직내 특이핵산의 분포를 확인할 수 있는 방법으로 보고되고있다<sup>5,8</sup>.

본 연구는 세포내 매우 낮은 copy 수로 존재하는 바이러스 중 하나인 AHV-1의 분자생물학적 진단법들로 사용되고있는 PCR과 *in situ* hybridization를 비교하고, 조직내 AHV-1의 극소량의 바이러스 분포를 확인할 수 있는 *in situ* PCR을 개발하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 세포배양 및 시험군구성

Bovine epithelial kidney cell line MDBK (ATCC CCL 22)를 60개의 25 cm<sup>2</sup> culture flask에 10% fetal bovine serum과 100 ug/ml gentamicin, 350 ug/ml L-glutamine이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium으로 배양하였다. 배양 후 3일에 세포가 단층으로 배양된 것을 확인하고, 음성대조를 위한 5개 flask를 제외하고 나머지 MDBK 배양세포에 AHV-1 strain C500을 접종하였다. 접종 후 6, 12, 24, 48 및 72시간에 각각 3개 flask의 세포를 PCR, *in situ* hybridization, *in situ* PCR을 위한 재료로 사용하였다. 또한, 각각의 시간에 AHV-1을 접종하지 않은 MDBK세포를 음성대조군을 위한 재료로 사용하였다.

### DNA extraction

AHV-1 접종 후 각각의 시간에 감염된 MDBK 세포를 1X trypsin으로 처리하여, 세포를 모은 후, 1500 rpm에서 5분간 원심하고, 재부유한 감염세포로부터 AHV-1 특이핵산 증폭을 위한 PCR검사를 위하여 DNA를 추출하였다. DNA 추출은 세포부유액 500 ul에 0.2% SDS와 10 mg/ml proteinase K를 첨가 후 37°C에서 3시간 반응시키고, phenol/chloroform을 사용하여 단백질을 제거한 후 ethanol 침전과정을 거쳐, DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 100 ul의 DEPC 처리된 증류수로 재부유하고, OD<sub>260</sub>에서 정량 후 PCR 검사에 사용하였다.

### Cytospin

AHV-1 C500 strain에 감염 후 6, 12, 24, 48 및 72시간에 감염된 MDBK 세포를 각 시간별로 3개 flask와 음성대조를 위한 1개의 flask로부터 trypsin 처리를 하여 세포부유액을 모은 후 1500 rpm에서 5분간 원심하고, 재부유한 후 세포부유액을 cytospin 2 (Shandon Inc., USA)를 이용하여 1000 rpm에서 5분동인 원심하여 silane-coated slide (Sigma, USA)에 부착 후 4% paraformaldehyde에 10분간 고정 후 건조하고, *in situ*

hybridization과 *in situ* PCR 검사에 사용하였다.

### *In situ* PCR

AHV-1 C500 strain에 감염 후 6, 12, 24, 48 및 72시간에 cytospin을 사용하여 silane-coated slide에 준비된 FMSK 세포를 멸균된 PBS에 세척 후, 40 ug/ml의 Proteinase K (Roche, USA)로 37°C에서 30분간 단백질 분해과정을 수행하였다. 이후, 4% paraformaldehyde에 후고정을 하고, 멸균된 PBS와 DEPC처리된 증류수에 세척한 slide들을 *in situ* PCR thermal cycler (Perkin-Elmer, Gene Amp *in situ* PCR system 1000)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR을 위한 반응조성물은 한 샘플당 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 uM digoxigenin-11-dUTP (Roche, USA), 190 uM dTTP, 200 uM dATP, dCTP, dGTP, 1X PCR buffer, 1 uM C500-3 및 C500-4 primer, 1X self seal reagent (MJ research, USA), 5U Ampli Taq Gold (Roche, USA)를 함유하였고, 준비된 slide에 30 ul를 적용 후 cover slip을 덮고, 94°C 5분 denaturation 과정과 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분의 cycle을 35회 실시하여 digoxigenin에 표지된 AHV-1의 특이 핵산을 세포내에서 증폭하였다. 이후, Anti-digoxigenin-AP Fab Fragment (Roche, USA)와 반응시키고, 기질인 nitroblue tetrazolium (NBT)과 5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphate (BCIP)를 섞어 발색시킨 후 methyl green으로 배경염색하고 광학현미경으로 관찰하였다.

### *In situ* hybridization

AHV-1의 특이 DNA 검출을 위한 *in situ* hybridization은 porcine epidemic diarrhea virus의 검출에 사용된 Kim 등<sup>4</sup>의 방법을 변형하여 사용하였으며, 이의 과정을 간략히 설명하면 다음과 같다. AHV-1 open reading frame 50에 특이적인 C500-1, C500-2, C500-3 및 C500-4 primer를 사용한 nested PCR을 통하여 273 bp의 AHV-1 특이 핵산 증폭물을 얻었다. 이후, Wizard DNA purification system (promega, USA)을 이용하여 purification한 AHV-1 PCR 핵산증폭물을 Digoxigenin (DIG) DNA labelling and detection kit (Roche, USA)로 임의 표지하여 시험에 사용될 probe를 준비하였다. AHV-1 C500 strain에 감염 후 cytospin을 사용하여 slide에 준비된 FMSK 세포를 PBS에 세척 후, 단백질 분해과정과 후고정 과정을 거친 후, 0.25%의 acetic acid를 함유한 Triethanol-HCl에서 acetylation과정을 거쳤다. Digoxigenin-labelled DNA probe를 1 ng/ul 농도로 standard hybridization buffer (4×SSC Buffer, 50% Deionized formamide, 0.1% lauryl sulfate, 1×Dendhart soln, 0.4 mg/ml Salmon sperm DNA, 10% Dextran sulfate)로 희석하여 95°C에 10분간 denaturation시킨 후 바로 얼음에 정체 후, 50 ul를 준비된 slide에 적용하고 45°C humidified oven에서 15-16시간동안 hybridization 과정을 수행하였다. 이후, anti-digoxigenin-AP에 반응시키고, alkaline phosphatase의 기질인

NBT/BCIP (Roche, USA)를 섞어 발색시킨 후 methyl green으로 배경염색하고, 광학현미경으로 관찰하였다.

**Polymerase Chain Reaction**

AHV-1 C500 strain에 감염 후 6, 12, 24, 48 및 72시간에 추출된 DNA에서 AHV-1의 특이 핵산을 검출하기 위한 PCR은 AHV-1 open reading frame 50의 염기서열에 특이적인 primer를 사용하였다<sup>9</sup>. C500-1 primer인 5'-TACGGG GAGCCCTGACATTTTCATCTCTCTTTTG-3' (Nucleotide position: 73917-74014)과 C500-2 primer 5'-ATAACTGGTTGATGTGGCAGATGCATCTAT-3' (Nucleotide position: 74292-74321)을 사용하여 PCR을 수행한 후, C500-3 primer인 5'-TCTGGC CCGTGCTGCAGCAAGACTCTCTCAG-3' (Nucleotide position: 73986-74014)와 C500-4 primer 5'-TATAGTAGAATCCCGTCTGAGTGGTAGCTG-3' (Nucleotide position: 74230-74259)을 사용하여 nest PCR을 수행하였다. 1차 PCR을 위한 반응조성물은 1 ug의 template DNA, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 uM의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche, USA), 20 pmol C500-1 및 C500-2 primer, 5 U Taq DNA polymerase (Roche, USA)가 50 ul의 반응용량에 각각 포함되도록 하였다. Thermal cycler 9700 (Perkin-Elmer, USA)을 이용하여 94°C 5분의 denaturation 과정 후, 94°C 30초, 55°C 1 min, 72°C 1분의 cycle을 40회 실시한 후 72°C 7분의 최종 extension 단계를 거쳐 AHV-1에 특이 핵산을 증폭하였다. 1차 PCR을 수행하여 얻은 특이 핵산의 증폭물 2 ul를 C500-3과 C500-4의 primer를 사용하여, 1차 PCR과 동일한 반응조성물과 Thermal cycler의 동일 조건으로 nest PCR을 수행한 후 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기영동을 한 후 UV에서 273 bp 크기의 핵산증폭물의 유무를 확인하였다.

**결 과**

**Polymerase Chain Reaction**

AHV-1 C500 strain에 감염 후 6, 12, 24, 48 및 72시간에 추출된 DNA에서 AHV-1의 특이 핵산을 검출하기 위한 nested PCR을 수행한 결과는 Fig. 1과 같았다. C500-1과 C500-2 primer를 사용하여 1차 PCR을 수행하였을 때는 전기영동 후 육안으로 관찰할 수 있을 정도의 핵산이 증폭되지 못하였다. C500-3과 C500-4 primer를 사용하여 nested PCR과정으로 1차 증폭된 핵산을 다시 증폭하였을 때, AHV-1 감염 후 각 시간별로 각각 3개 flask에서 추출한 NP-6-1, NP-6-2, NP-6-3, NP-12-1, NP-12-2, NP-12-3, NP-24-1, NP-24-2, NP-24-3, NP-48-1, NP-48-2, NP-48-3, NP-72-1, NP-72-2, NP-72-3의 샘플들로부터 273 bp의 AHV-1에 특이적인 밴드를 확인할 수 있었다. 반면, AHV-1에 감염되지 않은 MDBK 세포로부터 추출한 DNA 샘플에서는 nested PCR의 결과, 반응을 확인할 수 없었다.

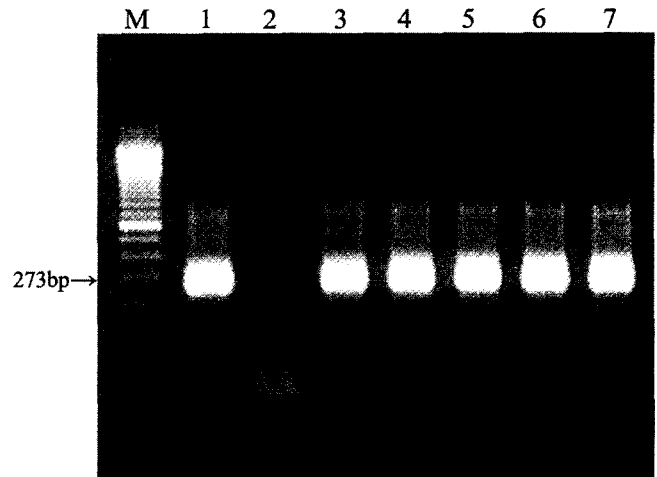


Fig. 1. Gel electrophoresis of amplicons by nested PCR. M, 100-bp DNA ladder; 1, Positive control; 2, Negative control; 3, 6 hours after infection; 4, 12 hour after infection; 5, 24 hours after infection; 6, 48 hour after infection; 7, 72 hour after infection.

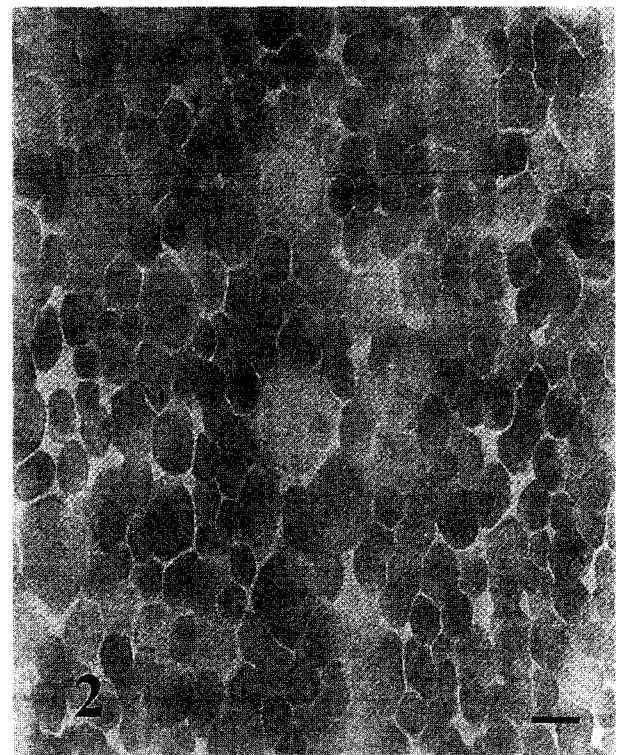
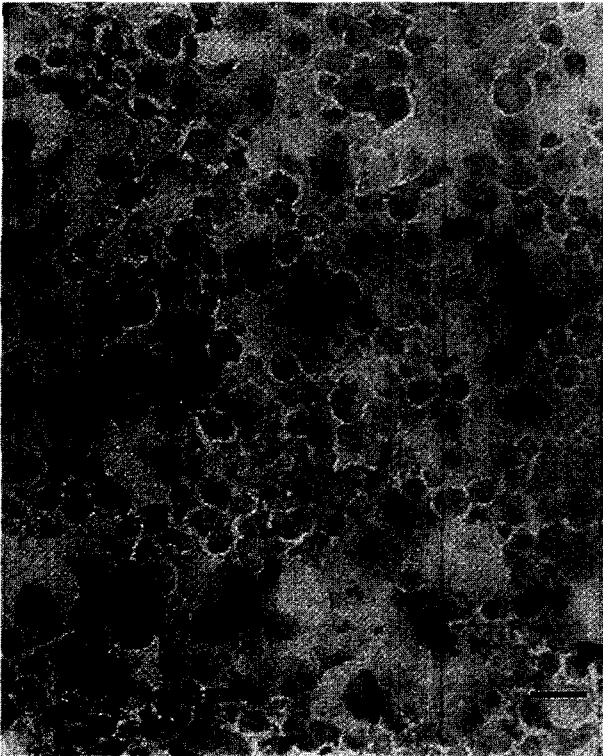


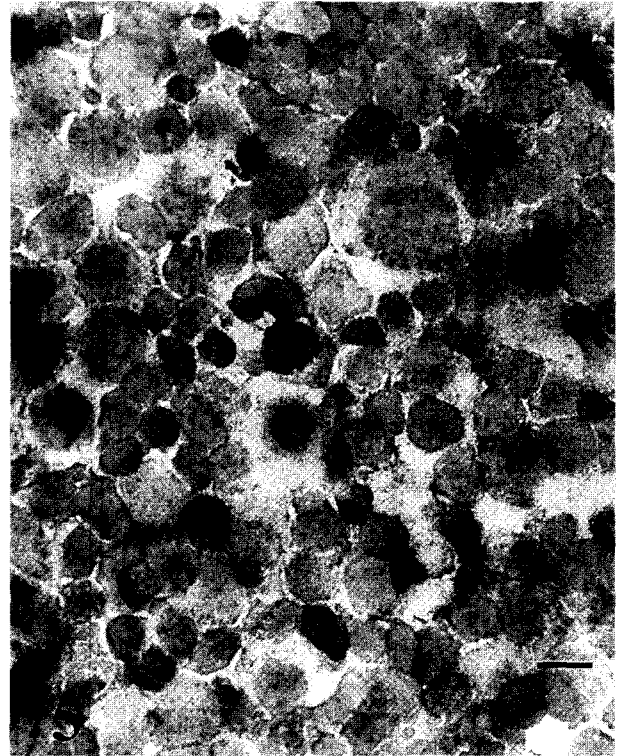
Fig. 2. *In situ* hybridization of MDBK cells of 12 hours after infection. No specific dark brown signals are present. NBT/BCIP colorization, methylgreen counterstain. Bar=50 µm.

***In situ* PCR**

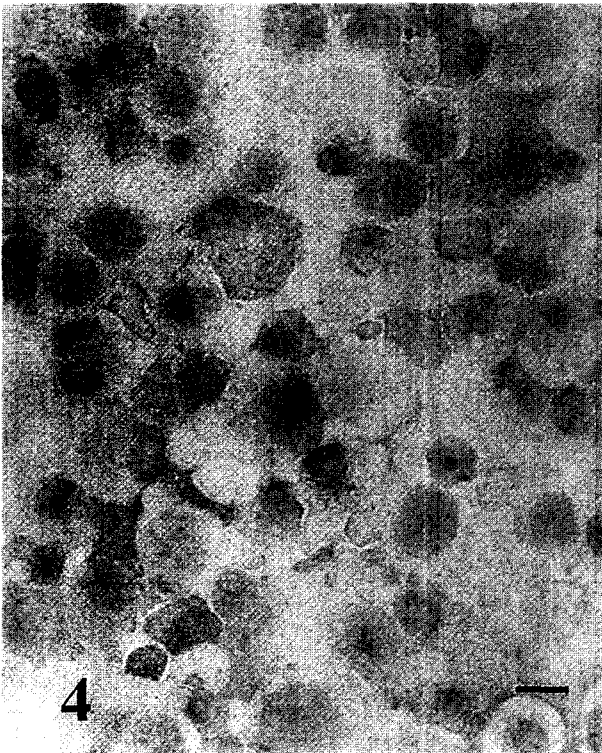
AHV-1에 감염 후 시간별로 cytospin을 이용하여 준비된 slide들의 *in situ* PCR을 수행한 결과, 감염 후 12시간 이후의 MDBK 세포들에서, AHV-1의 특이핵산의 증폭을 확인할 수 있는 암갈색의 발색 반응들이 관찰되었다(Fig. 3). 감염 후 시



**Fig. 3.** *In situ* PCR of MDBK cells of 12 hours after infection. Specific dark brown signals are present in the nuclei or cytoplasm of AHV-1 infected cells. NBT/BCIP colorization, methylgreen counterstain. Bar=50  $\mu$ m.



**Fig. 5.** *In situ* PCR of MDBK cells of 24 hours after infection. There are a lot of specific strong signals in the nuclei or cytoplasm of AHV-1 infected cells. NBT/BCIP colorization, methylgreen counterstain. Bar=50  $\mu$ m.



**Fig. 4.** *In situ* hybridization of MDBK cells of 24 hours after infection. Some signals are observed but they are weak. NBT/BCIP colorization, methylgreen counterstain. Bar=50  $\mu$ m.

간의 경과에 따라, 이들 암갈색 반응을 보이는 세포들은 더욱 늘어났으며, 그 반응 또한, 더 진하게 강한 반응으로 관찰되었다(Fig. 5). 암갈색의 반응은 감염세포의 핵내, 또는 세포질에서 관찰되었다. 감염 후 6시간에 고정된 ISP-6-1, ISP-6-2, ISP-6-3에서는 반응을 확인할 수 없었다(Table 1). 또한, AHV-1를 접종하지 않은 음성대조 MDBK 세포, negative-6-1, negative-12-1, negative-24-1, negative-48-1, negative-72-1에서는 AHV-1에 특이적인 반응이 관찰되지 않았다.

#### *In situ* hybridization

*In situ* hybridization의 수행 결과는 Table 1과 같았다. AHV-1에 감염 후 24시간 이후의 MDBK 세포들에서, AHV-1의 특이핵산의 증폭을 확인할 수 있는 암갈색의 발색 반응들이 관찰되었다(Fig. 4). 암갈색의 반응들은 *in situ* PCR의 결과와 유사하게 감염세포의 핵내, 또는 세포질에서 관찰되었으며, 감염 후 시간의 경과에 따라서 이들 반응을 보이는 세포들은 더욱 늘어났으나, 같은 시간에 수행된 *in situ* PCR의 결과에 비교하여 반응을 보이는 세포의 수가 더 적었으며, 그 반응의 정도도 보다 약하였다. 감염 후 6시간 및 12시간에 고정된 ISH-6-1, ISH-6-2, ISH-6-3 및 ISH-12-1, ISH-12-2, ISH-12-3에서는 반응을 확인할 수 없었다(Fig. 2). 한편, AHV-1를 접종하지 않은 MDBK negative-6-1, negative-12-1, negative-24-1,

**Table 1.** Results of nested PCR, *in situ* hybridization and *in situ* PCR as a molecular diagnostic method for the detection of alcelaphine herpesvirus-1

Method	Case No.	Sampling time (hour) after alcelaphine herpesvirus-1 infection				
		6	12	24	48	72
Nested PCR	NP-*1-1	+++ <sup>2</sup>	+++	+++	+++	+++
	NP-*2	+++	+++	+++	+++	+++
	NP-*3	+++	+++	+++	+++	+++
<i>in situ</i> hybridization	ISH-*1	-	-	+	++	++
	ISH-*2	-	-	+	++	++
	ISH-*3	-	-	+	++	++
<i>in situ</i> PCR	ISP-*1	-	+	++	+++	+++
	ISH-*2	-	+	++	++	+++
	ISH-*3	-	+	++	+++	+++

1: sampling time (hour) after alcelaphine herpesvirus-1 infection 2: -; negative reaction, +; weak positive, ++; moderate positive, +++; strong positive

negative-48-1, negative-72-1에서는 AHV-1에 특이적인 반응이 관찰되지 않았다.

## 고 찰

AHV-1의 조직내 극소량의 핵산 검출을 위하여 *in situ* PCR의 개발을 수행 한 본 연구의 결과, *in situ* PCR은 성공적으로 AHV-1의 특이 핵산을 세포내에서 증폭하였다. 이러한 연구의 결과로부터, 본 연구에서 개발된 AHV-1의 *in situ* PCR이 AHV-1의 진단 및 병원성 연구를 위한 유용한 도구로 사용될 수 있을 것으로 판단된다. Nested PCR의 결과와 비교하였을 때, 감염 후 6시간의 세포에서, nested PCR은 AHV-1의 특이 핵산을 확인할 수 있었으나, *in situ* PCR은 AHV-1의 검출에 실패하였다. Nested PCR이 1차 PCR의 수행 후 inner primer 쌍을 이용하여 다시 증폭과정을 거치기 때문에, 한 번의 PCR과정만을 거치는 *in situ* PCR이 보다 민감도가 떨어지는 방법인 것은 사실이다. 하지만, nested PCR은 병원성 연구를 위하여 요구되는 조직내 바이러스의 분포 및 감염된 세포에 대한 정보를 제공해주지 않는다. 따라서, 본 연구에 개발된, AHV-1의 *in situ* PCR은 AHV-1의 병원성 연구 및 진단에 유용한 방법으로 사용될 수 있다. 기존에 보고된 AHV-1의 조직내 핵산 검출 방법인 *in situ* hybridization의 결과에 따르면, 악하임파절의 일부 세포에서만 특이 반응이 관찰되었을 뿐, 다른 조직에서 AHV-1을 검출하지 못하였으며, 말초 혈액의 임파구를 24시간 배양하였을 때에야 임파구에서 특이 핵

산을 검출할 수 있었다고 하였다<sup>7</sup>. 이러한 기존의 연구 결과는, AHV-1이 감염된 숙주의 조직내에 매우 낮은 copy 수로 존재하는 것을 시사하며, 보다 민감한 조직내 검출 방법이 필요한 것을 잘 말해주고 있다. 본 연구의 결과, *in situ* PCR은 *in situ* hybridization 보다 낮은 바이러스 농도에 감염된 세포들도 검출할 수 있는 높은 민감도를 가지고 있으며, 또한, 감염 세포의 형태학적 관찰도 허용하는 장점을 가지고 있었다.

AHV-1은 gamma herpesvirus로서 임파구에 감염되는 것으로 추정되지만, 잠복감염으로 평상시 감염동물의 검출이 어렵고, 어떤 요인에 의해 바이러스가 증식하여 갑작스러운 병증이 발현 되는지에 관한 병원성에 대하여 알려진 정보가 거의 없는 상황이다. 따라서, 극소량의 조직내 AHV-1의 검출 및 감염세포에 대한 정보를 제공하는 AHV-1 *in situ* PCR은 매우 유용하게 사용될 것으로 판단된다. 향후, 본 연구에서 개발된 AHV-1 *in situ* PCR의 보다 많은 이용으로, AHV-1의 효과적 검출과 여러 병원인 연구에 도움을 받을 수 있을 것으로 기대된다.

## 참고문헌

- Schock A, Reid HW. Characterisation of the lymphoproliferation in rabbits experimentally affected with malignant catarrhal fever. *Vet Microb* **53**:111-119, 1996.
- Muller-Dobles UU, Li H, et al. Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. *J Clin Microb* **36**:2970-2972, 1998.
- Taylor GR, Logan WP. The Polymerase chain reaction: new variation and an old theme. *Current Opinion in Biotechnology* **6**:24-29, 1995.
- Kim OJ, Chae CH. *In situ* hybridization for the detection and localization of porcine epidemic diarrhea virus in the intestinal tissues from naturally infected piglets. *Vet Pathol* **37**:62-67, 2000.
- Liu HJ, Liao MH, et al. Comparison of two molecular techniques for the detection of avian reoviruses in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues. *J Virol Method* **80**:197-201, 1999.
- Patel JR, Edington N. The detection of the Herpesvirus of bovine malignant fever in rabbit lymphocytes *in vivo* and *in vitro*. *J Gen Virol* **48**:437-444, 1980.
- Brigen A, Munro R, et al. The detection of Alcelaphine Herpesvirus-1 DNA by *in situ* hybridization of tissues from rabbits affected with malignant catarrhal fever. *J Comp Pathol* **106**: 351-359, 1992.
- Nuovo GJ, Sinsir A, et al. *In situ* detection of PCR-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor RNA in the central nervous system. *Am J Pathol* **144**:659-666, 1994.
- Ensser A, Pflanz R, et al. Primary structure of the alcelaphine herpesvirus 1 genome. *J Virol* **71**:6517-6525, 1997.

\*Request for reprints: 김옥진, USDA-ARS, ADRU, WSU, Pullman, WA 99164-7030, USA, Tel. 1-509-335-6046, Fax. 1-509-335-8328, E-mail. kimoj@netian.com