

Alcelaphine herpesvirus 1 진단을 위한 PCR-dot blot hybridization의 개발

김옥진^{1*} · Hong Li²

¹서울대학교 의과대학 실험동물학교실, 서울대학교 의과대학 특수생명자원 연구센터

²미국 농무부 동물질병연구소

(게재승인: 2003년 10월 7일)

Development of PCR-dot blot hybridization for the diagnosis of alcelaphine herpesvirus 1

Okjin Kim^{1*} and Hong Li²

¹Department of Laboratory Animal Sciences and Center for Animal Resource Development,
College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

²USDA - ARS, Animal Disease Research Unit, Pullman, WA 99164, USA

(Accepted: October 7, 2003)

Abstract : The aim of the present study was to develop a sensitive and specific assay for the diagnosis of alcelaphine herpesvirus 1 (AIHV-1) which is a cause agent of malignant catarrhal fever in ruminants. AIHV-1 is a gamma herpesvirus, which is frequent latent, and it is often difficult to detect its antigens or specific nucleic acids because of its low genomic copies in the infected tissues. In this study, polymerase chain reaction (PCR)-dot blot hybridization (DBH) assay for detecting AIHV-1 DNA was developed and evaluated for its sensitivity and specificity as comparison with PCR and DBH alone. The developed PCR-DBH was more sensitive than PCR or DBH alone and also very specific. The results showed that the sensitivity of PCR-DBH were higher and stronger than those of PCR and DBH alone. This PCR-DBH assay can be applied efficiently to confirm the presence of AIHV-1 virus on clinical samples and to differentiate specifically between AIHV-1 infection and other viral infections.

Key words : PCR, dot blot hybridization, PCR-dot blot hybridization

서 론

Alcelaphine herpesvirus 1 (AIHV-1)은 gamma herpesvirus로서, ovine herpesvirus 2 (OvHV-2)와 함께 malignant catarrhal fever (MCF)의 원인체이며, 반추류에 고열과 점막의 염증 및 전신림파구 증식에 의한 치명적인 임상결과를 초래한다 [15]. 바이러스 감염증의 병인론적인 진단은 바이러스를 분리하거나, 혈중 항체의 검사 및 바이러스 항원을 직접적으로 확인하는 방법으로 수행되어 왔다 [13]. 그러나, 바이러스 분리는 그 분리가 어렵고 세포배양에 따르는 오랜 시간이 필요하기 때문에 빠른 진단을 필요로 하는 이들 질병의 진단법으로서 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 특히 염기서열을 선택적으로 증폭하여 그 존재를 검출할 수 있는 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)이 보고되고 있다. AIHV-1에 감염된 동물의 lymph node로부터 10⁵개 세포당 1개 세포에서 DNA 또는 바이러스 항원에 양성반응을 확인할 수 있었다는 연구들로부터 AIHV-1이 매우 낮은 copy 수로 조직내 분포함을 알 수 있다 [2, 14]. 또한, AIHV-1은

*Corresponding author: Okjin Kim

Department of Laboratory Animal Sciences, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea
[Tel: 82-2-740-8077, Fax: 82-2-763-5206, E-mail: kimoj@snu.ac.kr]

herpesvirus로서 잠복감염을 유발하기 때문에 병원성 연구를 위한 방법으로 민감도가 매우 높은 방법이 요구되고 있다. 이러한 이유로, AIHV-1의 진단법으로는 민감도가 높은 PCR이 널리 사용되고 있는 실정이다. 그러나, PCR 또한 오염에 의한 위양성 (false positive) 반응과 조직내 PCR inhibitor들에 의한 위음성 반응 (false negative)들이 문제가 될 수 있음이 보고되고 있다 [1, 3, 12]. 다른 분자생물학적 진단법으로 *in situ* hybridization과 dot blot hybridization (DBH)은 PCR과 다르게, 증폭과정에서 오는 오염문제를 피할 수 있고, 특정 염기서열과 hybridization을 통한 특이적인 반응을 얻을 수 있기 때문에, 그 결과에 높은 신뢰도를 가질 수 있는 것으로 알려져 있다 [12]. 그러나, 바이러스 핵산검출을 위한 DBH는 그 조작이 간편하고, 특이도가 높은 반면, 핵산 증폭과정을 거치지 않기 때문에 PCR에 비하여 민감도가 낮은 것으로 보고되고 있다 [6, 8, 18]. AIHV-1은 gamma herpesvirus로 자주 잠복감염을 유발하여 감염된 조직내에 매우 낮은 농도로 존재하기 때문에 그 진단이 매우 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서, AIHV-1에 의한 잠복감염 개체의 진단과, 바이러스 기전 연구를 위해서는, 보다 민감한 진단 방법들의 개발이 요구되어지고 있다. 본 연구는 gamma herpesvirus로서 잠복감염을 유발하여, 조직내 매우 낮은 copy 수로 존재하는 바이러스인 AIHV-1의 극소량의 바이러스 분포를 확인할 수 있는 PCR-DBH를 개발하고자 수행되었다.

재료 및 방법

Polymerase chain reaction

AIHV-1 open reading frame 50의 염기서열에 특이적인 outer primer인 C500-1과 C500-2 (Table 1)를 사용하여 PCR을 수행하였다 [11]. Primer의 nucleotide position은 alcelaphine herpesvirus 1의 DNA polymerase 염기서열에 기초하였다 [7, 11]. PCR을 위한 반응조성물은 2 µg의 template DNA, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 400 µM의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche, USA), 20 pmol primer C500-1 및 C500-2, 5 U Taq DNA

polymerase (Roche, USA)가 100 µl의 반응용량에 각각 포함되도록 하였다. Thermal cycler 9700 (Perkin-Elmer, USA)을 이용하여 94°C 5분간 preheating 과정 후, 94°C 30초, 55°C 1분, 72°C 1분의 cycle을 40회 실시한 후 72°C 7분의 최종 extension 단계를 거쳐 AIHV-1에 특이 핵산을 증폭하였다.

Non-radioactive labeling probe

AIHV-1 open reading frame 50의 염기서열에 특이적인 inner primer인 C500-3과 C500-4 (Table 1)를 사용하여, PCR을 수행하고 증폭된 273 bp의 AIHV-1 DNA에 non-radioactive 물질인 digoxigenin (DIG)을 표지하여 DBH에 사용될 probe를 준비하였다. 증폭된 AIHV-1 DNA는 Wizard DNA purification system[®] (Promega, USA)을 이용하여 purification하였고, 이 후 purification된 핵산증폭물을 10분간 끓인 후 바로 얼음에 식혀 denaturation시키고, Hexanucleotide mixture와 dNTP labeling mixture를 섞은 후, Klenow enzyme을 추가하고 37°C에서 20시간 반응하여, DIG이 임의 표지된 probe를 얻었다. 이 후, 0.2 M EDTA (pH 8.0)를 추가하고, 65°C에서 10분간 가온하여 효소활성을 제거 후, 시험에 사용될 때까지 -20°C에 보관하였다.

PCR-dot blot hybridization

준비된 DIG-labeled probe를 사용하여 AIHV-1을 검출할 수 있는 PCR-DBH의 protocol을 개발하였다. 개발된 PCR-DBH의 과정은 다음과 같았다. Nylon membrane (Roche, USA)을 시험에 사용 가능한 크기로 자른 후, C500-1과 C500-2 primer 쌍을 사용하여 얻은 검사 재료 PCR 증폭물 (amplicon) DNA 2 µl를 membrane에 적용하고, 샘플이 마르기 전에 tip 끝으로 샘플의 적용 부위를 눌러 위치를 표시한 후, 샘플의 위치를 다른 종이에 적어 기입하였다. 샘플 DNA가 적용된 membrane을 상온의 denaturation buffer에 5분간 적용한 후, 상온의 neutralizing buffer에 5분간 적용하였다. 1% SDS가 함유된 2X SSC buffer로 2분 세척 후, UV cross-linker (Stratagene, USA)를 사용하여, membrane에 DNA를

Table 1. PCR primers: sequences and positions

Primers	Sequences (5'-3')	Nucleotide position ^{a)}
C500-1	TACGGGAGCCCTGACATTCATCTCTTTTG	73917-74014
C500-2	ATAACTGGTTGATGTGGCAGATGCATCTAT	74292-74321
C500-3	TCTGGCCCGTGCTGCAGCAAGACTCTCAG	73986-74014
C500-4	TATAGTAGAATCCCGTCTGAGTGGTAGCTG	74230-74259

^{a)}All nucleotide positions in the DNA polymerase sequence of AIHV-1 (C-500) [7].

cross-link 시키고, hybridization buffer가 들어 있는 sealing bag에 membrane을 넣은 뒤, DIG-labeled DNA를 적용하고 sealing하여, 50°C에서 3시간 반응시켰다. 이후, membrane을 1% SDS가 함유된 2X SSC buffer로 상온에서 5분 및 1X SSC로 65°C에서 15분간의 세척 후, 상온의 1X washing buffer로 1분, 상온의 1X blocking buffer로 30분의 과정을 거쳤다. 이후, membrane을 anti-digoxigenin-AP (Roche, USA)에 반응시키고, alkaline phosphatase의 기질인 nitroblue tetrazolium (NBT)와 5-bromocresyl-3-indolyl-phosphate (BCIP) (Roche, USA)를 섞어 발색시킨 후 샘플 적용한 부위의 암갈색반응 유무를 관찰하였다.

민감도와 특이도 평가

개발된 PCR-DBH의 sensitivity를 알아보기 위하여 purified AIHV-1 DNA를 단계 희석하여 각각을 membrane에 적용 후 PCR-DBH를 실시하였다. 적용된 AIHV-1 DNA 샘플들은 각각 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 pg의 DNA를 가지고 있었다. 이들 검사재료들을 C500-1/C500-2 primer 쌍을 이용하여, PCR을 수행 후 얻은 핵산 증폭물을 nylon membrane에 적용 후, 준비된 DIG-labeled probe로 hybridization 과정을 거치고, 특이반응 유무를 NBT/BCIP의 발색반응으로 확인하였다. 또한, PCR-DBH의 specificity를 확인하기 위하여 AIHV-1의 핵산과 많은 homology를 가지고 있는 같은 gamma herpesvirus group에 속하는 ovine herpesvirus 2 (OvHV-2), bovine herpesvirus 4 (BHV-4)의 DNA를 추출하여, PCR-DBH를 수행하여 specificity를 확인하였다. PCR 단독 수행의 sensitivity를 알아보기로, 단계 희석된 purified AIHV-1 DNA 샘플들인 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 pg의 DNA를 가지고 C500-1/C500-2 primer에 의한 PCR을 수행 후, ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기영동을 한 후 UV에서 404 bp 크기의 핵산 증폭물의 유무를 확인하였다. 또한, DBH 단독 수행의 sensitivity를 알아보기로, purified AIHV-1 DNA를 단계 희석된 purified AIHV-1 DNA 샘플들인 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 pg의 DNA를 가지고 각각을 직접 nylon membrane에 dot blot으로 적용 후 DIG-labeled probe로 3시간 hybridization을 실시하여, DBH 단독 수행의 민감도를 평가하였다.

결 과

PCR-DBH의 민감도와 특이도

Non-radioactive probe를 이용한 PCR-DBH의 결과, 1 pg의 purified AIHV-1 DNA 까지도 검출할 수 있었다

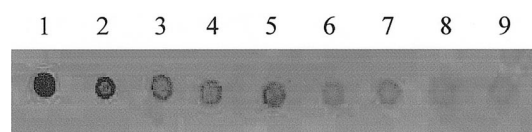


Fig. 1. PCR-dot blot hybridization of AIHV-1. 1, PCR amplicon of 10^8 pg; 2, PCR amplicon of 10^7 pg; 3, PCR amplicon of 10^6 pg; 4, PCR amplicon of 10^5 pg; 5, PCR amplicon of 10^4 pg; 6, PCR amplicon of 10^3 pg; 7, PCR amplicon of 10^2 pg; 8, PCR amplicon of 10 pg; 9, PCR amplicon of 1 pg.

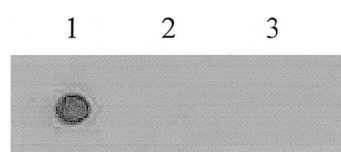


Fig. 2. Specificity of PCR-dot blot hybridization of AIHV-1. The AIHV-1 probe was not reacted with other gamma herpesviruses, OvHV-2 and BHV-4, which have high homology in their sequences. However, PCR-DBH using AIHV-1 template DNA resulted in strong positive signal. 1, AIHV-1 DNA; 2, OvHV-2 DNA; 3, BHV-4 DNA.

(Fig. 1). 이들 반응은 바이러스의 양이 많을 수록 보다 강한 반응으로 진한 암갈색의 반응 결과물을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 개발된 PCR-DBH의 특이도를 확인하기 위하여, AIHV-1과 같은 gamma herpesvirus group에 속하는 OvHV-2, BHV-4의 바이러스 핵산을 사용하여 PCR-DBH를 실시한 결과, 적용된 AIHV-1은 강한 양성 반응을 보였으나, OvHV-2와 BHV-4에서는 반응이 관찰되지 않아, 특이도가 매우 높음을 알 수 있었다(Fig. 2).

PCR 단독과 DBH 단독의 민감도

PCR 단독 수행에 의한 민감도를 평가한 결과, C500-1/C500-2 primer 쌍을 사용한 PCR은 10^2 pg의 purified AIHV-1 DNA까지 검출할 수 있었다 (Fig. 3). 이들 반응은 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기영동을 한 후 UV에서 404 bp 크기의 밴드로 관찰되었으며, 바이러스의 양이 많을 수록 보다 두꺼운 밴드로 관찰되었고, PCR 단독 수행으로는 10 pg과 1 pg의 purified AIHV-1 DNA를 검출할 수 없음을 알 수 있었다 (Fig. 3). 또한, DBH 단독 수행에 의한 민감도를 평가한 결과, DBH 단독으로는 10^4 pg의 purified AIHV-1 DNA까지 검출할 수 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 이들 반응은 AIHV-1 DNA 양이 많을 수록 보다 강한 반응으로 진한 암갈색의 반응 결과물을 관찰할 수 있었고, 10^3 , 10^2

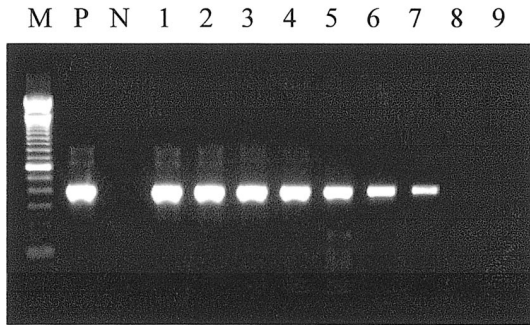


Fig. 3. Gel electrophoresis of amplicons by AIHV-1 PCR using primer C500-1 and C500-2. M, 100-bp DNA ladder; P, Positive control; N, Negative control; 1, 10^8 pg AIHV-1 DNA; 2, 10^7 pg AIHV-1 DNA; 3, 10^6 pg AIHV-1 DNA; 4, 10^5 pg AIHV-1 DNA; 5, 10^4 pg AIHV-1 DNA; 6, 10^3 pg AIHV-1 DNA; 7, 10^2 pg AIHV-1 DNA; 8, 10^1 pg AIHV-1 DNA; 9, 1 pg AIHV-1 DNA.

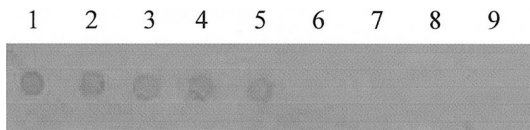


Fig. 4. Hybridization was performed with digoxigenin-labeled AIHV-1 DNA probe. Hybrids were detected by an antibody-conjugate (anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate) and subsequent enzyme-catalyzed color reaction with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitro blue tetrazolium salt (NBT). 1, 10^8 pg AIHV-1 DNA; 2, 10^7 pg AIHV-1 DNA; 3, 10^6 pg AIHV-1 DNA; 4, 10^5 pg AIHV-1 DNA; 5, 10^4 pg AIHV-1 DNA; 6, 10^3 pg AIHV-1 DNA; 7, 10^2 pg AIHV-1 DNA; 8, 10^1 pg AIHV-1 DNA; 9, 1 pg AIHV-1 DNA.

및 1 pg의 purified AIHV-1 DNA는 검출하지 못하였다(Fig. 4).

고 찰

현재까지, AIHV-1의 진단은 바이러스의 특이핵산을 확인하는 PCR 방법에 의존하여 왔다 [11, 17]. 그러나, 본 연구에서, C500-1/C500-2를 사용한 AIHV-1의 PCR은 10 pg 이하의 purified AIHV-1 DNA를 검출하지 못하였다. AIHV-1은 gamma herpesvirus로서, 자주 잠복감염을 유발하기 때문에, 조직내 매우 낮은 농도로 존재한다 [2, 17]. 이러한, 이유 때문에 AIHV-1의 진단법으로는 높은 민감도를 가진 방법이 요구되어진다. 현재까지 널리 이용되는 PCR이 비교적 높은 민감도를 가지고 있는 방법

이지만, 본 연구의 결과에서 알 수 있듯이, 미소량의 AIHV-1의 검출에 한계를 가지고 있음을 알 수 있었다. Outer primer 쌍을 이용한 PCR 이후, inner primer 쌍을 이용한 두 번째 PCR 과정을 거치는 nested PCR은 일반적인 PCR에 비하여, 민감도를 높일 수 있는 방법으로 알려져 있어, AIHV-1의 민감도를 높이는 방법으로 또한 이용되어질 수 있을 것이다. 그러나, nested PCR은 그 수행과정 중에 오염이 자주 발생하여 위양성의 결과가 유발될 수 있음이 자주 보고되고 있다 [5, 9, 10, 16]. 본 연구는 매우 높은 민감도가 요구되어지는 AIHV-1 진단법을 개발하고자 수행되었으며, 그 결과로서 높은 민감도와 특이도를 갖는 PCR-DBH를 개발하였다. 개발된 PCR-DBH는 PCR을 수행 후, DIG-labeled probe를 사용하여, hybridization을 거치기 때문에, nested PCR에 비교하여, 매우 높은 특이도를 확보할 수 있다. 바이러스 핵산 검출을 위한 hybridization은 ^{32}P 또는 ^3H 등의 방사선동위원소를 표지한 probe를 사용하여 검사가 많이 수행되지만, 이들 방사선 동위원소는 취급에 따르는 위험과 처리과정에 많은 어려움이 있다 [4]. 따라서, 본 연구에서는 non-radioactive probe를 사용한 probe를 사용하고자 하였으며, 여러 non-radioactive material 중, 현재 널리 이용되고있는 DIG을 이용하여, probe를 표지하였다. 시험에 사용된 non-radioactive DIG을 표지한 probe는 시험 결과 특이도가 매우 높아, AIHV-1의 바이러스 핵산과 많은 homology를 가지고 있는, 같은 gamma herpesvirus group인 OvHV-2 및 BHV-4의 DNA와 반응하지 않았다. 따라서, 본 연구를 통하여 개발된 AIHV-1의 PCR-DBH는 현재 AIHV-1의 진단법으로 유일하게 이용되고 있는 PCR의 여러 문제점들을 해결해 줄 수 있는 대안으로 이용될 수 있을 것으로 기대되어진다.

결 론

AIHV-1은 gamma herpesvirus로서, 자주 잠복감염을 유발하기 때문에, 조직내 매우 낮은 농도로 존재한다. 이러한, 이유 때문에 AIHV-1의 진단법으로는 높은 민감도를 가진 방법이 요구되어진다. 본 연구는 매우 높은 민감도가 요구되어지는 AIHV-1 진단법을 개발하고자 수행되었으며, 그 결과로서 높은 민감도와 특이도를 갖는 PCR-DBH를 개발하였다. 개발된 PCR-DBH는 PCR을 수행 후, DIG-labeled probe를 사용하여, hybridization을 거치기 때문에, nested PCR에 비교하여, 매우 높은 특이도를 확보할 수 있다. 본 연구를 통하여 개발된 AIHV-1의 PCR-DBH는 현재 AIHV-1의 진단법으로 널리 이용되고 있는 PCR의 여러 문제점들을 해결해 줄 수 있는 대안으로 이용될 수 있을 것으로 기대되어진다.

참고문헌

1. **Biesiadecka, A. and Litwinska, B.** Application of polymerase chain reaction for the detection of herpes simplex virus DNA. *Acta Microbiol. Pol.* 1997, **46**, 405-408.
2. **Brigen, A., Munro, R. and Reid, H. W.** The detection of Alcelaphine Herpesvirus-1 DNA by in situ hybridization of tissues from rabbits affected with malignant catarrhal fever. *J. Comp. Pathol.* 1992, **106**, 351-359.
3. **Broketa, M., Vince, A. and Drazenovic, V.** Non-radioactive digoxigenin DNA labeling and immunologic detection of HSV PCR products. *J. Clin. Virol.* 2001, **23**, 17-23.
4. **Chen, Y., Chen, Y., Lii, H. and Lu, Z.** Chemiluminescence detection of Epstein-Barr virus DNA with an oligonucleotide probe. *Clinica. Chimica. Acta.* 2000, **298**, 45-53.
5. **Cimino, G. D., Metchette, K. C. and Tessman, J. W.** Post PCR sterilization: a method to control carry-over contamination for the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1990, **19**, 99-107.
6. **Duggan, M. A., Inoue, M. and McGregor, S. E.** A paired comparison of dot blot hybridization and PCR amplification for HPV testing of cervical scrapes interpreted as CIN 1. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 1994, **15**, 178-187.
7. **Ensser, A., Pflanz, R. and Fleckenstein, B.** Primary structure of the alcelaphine herpesvirus 1 genome. *J. Virol.* 1997, **71**, 6517-6525.
8. **Hwang, S. J., Lee, S. D. and Lu, R. H.** Comparison of three different hybridization assays in the quantitative measurement of serum hepatitis B virus DNA. *J. Virol. Methods.* 1996, **62**, 123-129.
9. **Kwok, S. and Higuchi, R.** Avoiding false positives with PCR. *Nature.* 1989, **339**, 237-238.
10. **Levy, R., Najioullah, F. and Thouvenot, D.** Evaluation and comparison of PCR and hybridization methods for rapid detection of cytomegalovirus in clinical samples. *J. Virol. Methods.* 1996, **62**, 103-111.
11. **Li, H., Dyer, N. and Keller, J.** Newly recognized herpesvirus causing malignant catarrhal fever in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 1313-1318.
12. **McNicol, A. M. and Farquharson, M. A.** *In situ* hybridization and its diagnostic applications in pathology. *J. Pathol.* 1997, **182**, 250-261.
13. **Muller-Doblies, U. U., Li, H. and Hauser, B.** Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. *J. Clin. Microb.* 1998, **36**, 2970-2972.
14. **Patel, J. R. and Edington, N.** The detection of the Herpesvirus of bovine malignant fever in rabbit lymphocytes *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Virol.* 1980, **48**, 437-444.
15. **Plowright, W.** Malignant catarrhal fever virus, *Virus Infections of Ruminants.* pp. 123-150, Elsevier, New York, 1990.
16. **Porter-Jordan, K., Rosenberg, E. I. and Keiser, W. F.** Nested polymerase chain reaction assay for the detection of Cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *J. Med. Virol.* 1990, **30**, 85-91.
17. **Schock, A. and Reid, H. W.** Characterisation of the lymphoproliferation in rabbits experimentally affected with malignant catarrhal fever. *Vet. Microb.* 1996, **53**, 111-119.
18. **Xia, J. Q., Yason, C. V. and Kibenge, F. S.** Comparison of dot blot hybridization, polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Can. J. Vet. Res.* 1995, **59**, 102-109.