

In situ hybridization 조직화학법을 이용한 오제스키병 바이러스 동정

김순복 · 서정향 · 문운경*

경상대학교 수의과대학
경남가축위생시험소*
(1994년 3월 21일 접수)

Identification of Aujeszky's disease virus by *in situ* hybridization

Soon-bok Kim, Jung-hang Sur, Oun-kyung Moon*

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
Kyongnam Veterinary Service Laboratory*

(Received March 21, 1994)

Abstract : The purpose of this study was to establish a rapid diagnostic method detecting Aujeszky's disease virus (ADV) DNA in the cultured cell monolayers (PK-15) and tissue sections of ADV(NYJ-1-87)-infected rats and pigs by *in situ* hybridization(ISH).

Detection of specific ADV-DNA in infected cells was conducted by radiolabeled ISH method using ³²P-labeled DNA probe (BamHI 7 fragment) which contains a 6.3 Kb ADV-DNA insert.

Where ADV-DNA was detected by radiolabeled ISH, the deposition of black photographic grains occurred in the nuclei and the cytoplasm of ADV-infected cells. Positive hybridization signal was often observed in the spinal trigeminal nucleus of the pons, the nucleus of the trigeminal ganglion neuron and the epithelial cells of tonsillar crypts. The results suggested that ISH is considered as a highly sensitive and reliable tool for confirmative diagnosis of this viral disease.

Key words : radiolabeled *in situ* hybridization, Aujeszky's disease virus

서 론

오제스키병은 1987년 국내에서 첫 발생이 있는 이래 점차 전국적으로 확산되고 있는 양상을 띄고 있고 거의 모든 포유동물에 감수성을 가지면서 특히 소, 개, 고양이, 어린돼지에서는 치명적으로 경과하는 무서운 전염병으로써 환축이나 잠복감염(latency)개체를 통한 전파

가 이루어지기 전인 감염초기에 신속확진하여 감염개체를 도살하는 방역대책이 요구되는 질병이다.¹

최근 바이러스성 질병의 진단에 있어 *in situ* hybridization 기법은 가장 높은 감수성과 특이성을 보이는 신속한 진단수단으로 알려지고 있으며 원인바이러스의 분리동정을 거치지않고 조직절편상의 감염세포 내에서 바이러스핵산을 동정하는 방법으로써, 바이러

*이연구는 92년도 한국과학재단 연구비지원에 의한 결과임(과제번호 : 921-1500-002-2).

*이 논문은 서정향의 박사학위논문의 일부 업적으로 제출되었음.

스가 복제되고 있는 급성감염기 뿐만아니라 잠복감염 상태에서 검출이 가능하고, 또 바이러스감염세포가 조직절편내 한개만 존재하여도 검출이 가능하며, 조직형태학적 구조를 그대로 유지하면서 바이러스 존재부위를 확인할 수 있는 장점을 가지고 있어 오늘날 조직절편내 각종 핵산검출법으로 많이 연구되고 있다.²⁷

본 연구는 *in situ* hybridization 기법을 이용하여 오제스키병 바이러스(ADV) 인공감염 돼지와 랫트의 장기조직절편 및 단층배양세포(cultured cell monolayer)에서 바이러스 DNA를 검출함으로써 본 병을 신속하게 확진할 수 있는 간이진단법을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 : 15-25 주령의 Fisher계 랫트 10 수에다 ADV(NYJ-1-87/10⁷ TCID₅₀/0.2ml) 매수당 20 μ l 씩을 비강접종하여 3-4 일후 폐사체로부터 장기를 절취하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하면서 냉동절편하였고 일부는 10% 중성 포르말린에 고정하여 파라핀포매 하였다. 실험돼지는 혈청반응 음성으로 확인된 40일령 렌드레이스종 자돈 3두에다 ADV 1ml 씩을 비강접종 6-7 일후 부검하여 위의 방법으로 처리하였으며, 또한 경남 양산지역에서 병성감정의뢰된 자연감염돈 3두의 포르말린고정 조직을 함께 공시하였다.

배양세포 : 먼저 PK-15 세포를 1% fetal calf serum 이 첨가된 MEM 배지에다 70-80% 정도 monolayer가 형성되도록 배양한 다음 바이러스 원액 0.5-1.5 ml를 접종하여 1 시간 감작후 배양액에 7시간 동안 배양하였다. 감염된 배양세포가 부착된 슬라이드는 0.1M sodium phosphate buffer solution(PBS)에 수세후 95% EtOH: glacial acid (3:1) 희석용액에다 20분간 고정시킨다음 탈수 건조시켜 4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 공시하였다.

***In situ* hybridization (ISH) :** Plasmid pBR 325내에 cloning된 BamH1 7 fragment에 ADV-DNA가 transformation된 E.coli(DH5 α ; Dr.Osorio, Lincoln University, Nebraska)를 LB broth에 배양한 후 Birnboim & Doly 및 Ish-Horowicz & Burke의 alkali lysis 방법을 사용하여 ADV-DNA를 분리하였으며, pBR 325 및 BamH1 7 fragment의 분자량 측정을 위하여 Hind III로 절단된 lamda phage DNA를 marker로 사용하여 6.3 kb에 상당하는 ADV-DNA를 확인한 후(Fig 1), 2% low melting point agarose gel에서 phenol extraction법으로 BamH1 7 fragment pellet를 추출하여 1xTE buffer에 용해시켜 방사선표지에 사용

할 때 까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

DNA probe labeling을 위해서 [*a*-³²P]-dCTP(250 μ ci, Amersham)와 MegaprimeTM DNA labeling kit (Amersham)를 사용하였으며 먼저 ADV-DNA(100ng/4 μ l in 1xTE buffer) 5 μ l와 primer 5 μ l 및 증류수 11 μ l를 희석한 후 95-100 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓여 denaturation시켜 single-strand DNA로 만든 다음, 여기에다 megaprime reaction buffer의 dNTP 중 dATP, dGTP, dTTP용액을 각각 4 μ l씩 [*a*-³²P]-dCTP용액 5 μ l, reaction buffer 5 μ l 및 enzyme용액 2 μ l를 전체 용량이 50 μ l가 되게 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 더 이상의 반응이 진행되는 것을 막기 위해 2M EDTA용액 5 μ l를 첨가한 뒤 Spinocolumn(Sephadex G-50)을 통과하여 얻은 isotope labeled ADV-DNA probe를 실험에 사용하였으며, labeling 정도를 알기 위하여 polypropylene tube용액에 옮긴 후 scintillation center에서 측정해 본 결과 9x10⁷cpm/150 μ l 수준이었다.

조직내 probe의 투과성을 증진시키기 위한 전처리과정으로써 탈파라핀한 조직절편 슬라이드를 0.2N HCl에 20분간 처리하여 2xSSC(3M NaCl, 0.3M Na₂Citrate, 2H₂O)용액내에서 70 $^{\circ}$ C, 30분간 반응시킨 다음 1 μ g/ml proteinase-K(10mM tris, pH 7.4, 2mM CaCl₂) 용액에서 37 $^{\circ}$ C, 15분간 처리한 후 5% paraformaldehyde 용액에 고정하여 조직을 탈수 건조하였다.

Target DNA의 denaturation을 위해서는 deionized formamide 용액내 0.1xSSC에 65 $^{\circ}$ C, 15분간 조직절편을 가열한 후 ice cold 0.1xSSC 용액에서 2분간 처리한 다음 알콜에 탈수 건조하였다.

Hybridization을 위하여는 위의 과정을 거친 슬라이드에다 hybridization cocktail(2xSSC, 45% deionized formamide, 0.01M tris Cl pH 7.4, 0.001M EDTA, 1xDenhardt's solution, 10% dextran sulfate, 0.25mg/ml calf thymus DNA, 1x10⁵cpm/slides radiolabelled ADV-DNA probe)을 35 μ l씩 도포하여 cover glass로 덮고 rubber cement로 봉한 후에 95-105 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 probe DNA와 target DNA를 먼저 denaturation 시킨 다음 ice cold plate에서 5분간 냉각하여 45 $^{\circ}$ C incubator에 overnight 하였다.

현상을 위하여는 먼저 hybridization이 끝난 슬라이드를 NTB2(Kodak) 유체에 2-3회 담궜다가 20분간 건조한 후 광선이 차단된 슬라이드상자에 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 24-96시간동안 노출시켰으며, D-19(Kodak)에서 4분간 처리후 liquid fixer와 증류수 희석(4:1)용액에 8분간

고정하여 탈수하였고, hematoxylin & eosin 또는 methyl green으로 대조염색하여 광학현미경 관찰하였다.

Autoradiography : Hybridization이 끝난 슬라이드를 45°C incubator에서 꺼내어 조직이 다치지않도록 cover glass를 조심스럽게 제거한 다음 washing solution(2xSSC, 10mM tris, 1mM EDTA, ddH₂O, 40% deionized formamide)에 5분간 수세후 0.3M ammonium acetate가 첨가된 50%, 70%, 95%, 100% EtOH용액에 각각 5분간씩 처리 건조하여 X-ray 필름 카셀에 옮겨 그 위에 X-ray film을 덮고 -70°C에서 노출시켰다.

결 과

병리학적 소견 : ADV 접종 랫트는 접종 2일째부터 식욕부진과 침울해지기 시작하여 3일째에는 4-16주령의 대부분 접종군에서 비루, 소양증, 호흡곤란, 운동실조등을 일으키며 폐사하였고 20주령접종군의 일부는 5일째까지 생존하는 개체도 볼 수 있었다. 돼지접종군은 접종 2일째부터 발열, 기침, 식욕부진을 보이다가 3일째에는 비루, 호흡곤란, 식욕절폐, 근진전, 발작, 선회운동, 유연등의 증상을 일으켰으며 6일째에는 2두가 폐사하였고 나머지 1두는 정상으로 회복하였다. 감염 동물의 뇌조직에서는 신경세포피사, 위관성원형세포침윤, 교세포증가증등을 관찰할 수 있었으며, 배양세포에서는 호산성핵내봉입체(Fig 2)를 쉽게 볼 수 있었다.

In situ hybridization (ISH)기법을 이용한 세포내 ADV-DNA검출 : 오제스키병의 ISH 진단법 확립을 위하여 바이러스 인공감염 배양세포 및 인공감염랫트와 돼지의 조직절편에서 실시한 ADV핵산 검출성적은 다음과 같다. ADV 감염 배양세포는 바이러스 접종 6-7시간후 CPE가 진행되기 시작할 때 슬라이드를 고정하였으며 감염된 세포의 핵과 세포질내에서 흑색의 photographic grain 침착을 보이는 양성반응을 관찰할 수 있었으며(Fig 3), 이러한 소견은 ADV-DNA의 존재를 나타내는 것으로 특이성과 감수성이 아주 우수하여 세포내 존재하는 ADV의 높은 검출효과를 인정할 수 있었다. 이는 또한 동일한 슬라이드에서 ISH 실시전에 선행한 autoradiography 소견(Fig 4)과도 서로 일치하였다. 인공감염랫트의 중추신경계조직에서는 교뇌(pons)의 spinal trigeminal nucleus(Fig 5)과, trigeminal ganglion의 신경세포핵에서 ADV-DNA가 검출되었고, 감염돼지의 중추신경계 및 편도선 조직절

편에서는 뇌간(brain stem) 내 연수와 교뇌의 spinal trigeminal nucleus(Fig 6), trigeminal ganglion의 신경핵(Fig 7) 및 편도상피세포(Fig 8)에서 ADV-DNA의 존재를 나타내는 photographic grain의 침착을 관찰할 수 있었다.

고 찰

ISH는 분자생물학의 hybridization기법을 형태학에서 도입한 것으로 세포내에 존재하는 DNA 또는 RNA를 동정하는 것이며 바이러스 검출에 대한 응용 가능성이 알려진^{8,10}이래 각종세포^{2,11-13} 및 바이러스^{6,7,14,15}의 specific target nucleic acid를 검출하는 방법으로써 특히 분리 동정에 장기간을 요하는 바이러스성 질병의 신속한 진단수단으로 최근 활발한 연구의 대상이 되고있다. 본 실험에서 방사성동위원소 ³²P로 표지한 ADV-DNA probe를 이용하여 바이러스감염 단층배양세포와 랫트 및 돼지의 장기조직절편에서 ADV 핵산동정을 시도하였던 바, 바이러스 감염세포내에서 높은 감수성과 특이성을 보이는 흑색과립침착의 양성반응을 관찰할 수 있었으며 기존의 바이러스동정에 의한 진단이 한달 이상 소요되었음에 비해 본 방법은 2-3일내에 진단이 가능함으로써 앞으로 오제스키병의 중요한 진단수단으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

ISH는 조직절편내에 한개의 감염세포만 존재하여도 바이러스핵산 검출이 가능하기 때문에 바이러스 분리동정법에 비해 검출율이 훨씬 높음은 물론 포르말린에 고정하여 장기간 보관되었든 조직에서도 검출이 가능한 장점이있다. 본 실험에서 냉동 및 파라핀절편에서 ISH를 실시하여 결과를 비교하여 본 결과 오히려 파라핀절편에서 더 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 포르말린고정조직은 고정액내에서 오래 저장한 것 보다는 파라핀포매후의 상태로 저장한 것에서 더 좋은 결과를 얻을 수 있었고 일반적으로 포르말린 고정시간은 짧을 수록 좋은 것 같았다.

ADV는 약 145 Kb 크기 DNA의 linear genome을 둘러싼 enveloped nucleocapsid로 구성된 150-180nm 정도의 비교적 큰 바이러스로써 glycoprotein에 대응하는 유전자클로닝은 g I, g II, g III, gp50, gp63 및 gB 등이 알려져있으며,¹⁶ 본 실험에 사용한 DNA probe는 ADV유전자중 g I, gp50 및 gp63에 대응하는 유전자로써 두반복되는 반전(inverted repeat)유전자사이에 위치하는 6.3Kb에 상당하는 BamH1 7 fragment를 사용하였다. DNA probe의 표지의 선택에 있어 방사선동위

결론

원소는 biotin 이나 digoxigenin 같은 비방사선물질에 비해 취급이 까다롭다는 결점은 있으나 DNA probe의 크기에 있어 후자가 500bp 이하로 작아야하는데 비해 전자는 그 크기에 별로 구애받지않는 장점이 있다.^{5,17}

ADV는 주로 비강과 구강을 통해서 자연감염되어 비인두와 편도선에서 일차증식이 일어나며 여기에서 임파성전이를 하거나 삼차(trigeminal nerve), 후각(olfactory nerve) 및 설인신경(glossopharyngeal nerve)을 타고 중추신경계로 가게 되는데, 바이러스주에 따라 다소 양상을 달리하나 대개 상부호흡기도와 중추신경계에 친화성을 갖는다.^{1,18} 본 실험동물에서도 연수 교뇌와 편도선에서 바이러스핵산을 검출할 수 있었으며 랫트와 돼지의 중추신경계내 검출부위가 다소 상이한 점이 관찰되었으나 이는 해부학적 구조의 차이에 따라 바이러스이동에 변화를 준 결과로 보여지며 앞으로 중추신경계내 바이러스 이동신경로를 추구해 볼 필요가 있다고 생각된다. 바이러스 복제는 핵내에서 capsid의 상태로 일어나 핵막과 endoplasmic reticulum을 통해 세포질내로 이동한 다음 golgi장치내에서 이중막을 취하면서 완전한 virion의 형태를 갖추게 되는데¹⁹ 본 실험에서도 바이러스의 존재를 나타내는 흑색의 photographic grain 침착이 주로 감염세포의 핵과 세포질에서 관찰되어 이와같은 사실을 뒷받침해주고 있었다.

오제스키병의 신속하게 확진할 수 있는 *in situ* hybridization(ISH) 진단기법을 확립하기 위하여 바이러스 인공감염 단층배양세포(cultured cell monolayer) 및 인공감염랫트와 돼지의 조직절편에서 오제스키병바이러스(ADV) DNA 검출을 시도하였다.

Plasmid pBR 325 내 cloning 된 BamH1 7 fragment(6.3Kb)를 BamH1 restriction endonuclease로 절단하여 0.7% agarose상에서 분리한 후 [α -³²P]-dCTP로 표지한ADV-DNA probe를 사용하여 ISH를 실시한 결과, 바이러스 감염세포의 핵과 세포질내에서 ADV-DNA의 존재를 나타내는 photographic grain 침착의 양성반응을 관찰할 수 있었으며, 실험동물의 조직절편에서는 연수와 교뇌의 신경세포 및 편도선상피에서 주로 양성반응이 관찰되었다. 이상에서 관찰된 양성반응은 감수성이 뛰어나 오제스키병의 높은 진단적 가치를 인정할 수 있었다.

감사의 말씀 : 이 연구를 수행함에 있어 plasmid로부터 probe DNA 추출기법에 관해 조언해 주신 경상대학교 수의과대학 여상건 박사님에게 감사드리며, ISH 기법에 관해 자문에 주신 동 의과대학 해부학교실 최완성 박사님, 그리고 방사선 표지를 도와주신 동 식물분자생물학 및 유전자조작연구소(SRC) 조무제 소장님께서도 심심한 사의를 표하는 바이다.

Legends for figures

Fig 1. Cleavage pattern of plasmid in pBR 325 digested with restriction enzyme BamH1 by 0.6% agarose gell electrophoresis. M: Hind III digested of lamda DNA. Lane 1, 2: Subcloned pBR 325 plasmid/BamH1 7 fragment.

Fig 2. Intracellular eosinophilic inclusion bodies in the ADV-infected PK-15 cell monolayer. H & E. X1000.

Fig 3. Overlying photographic grains are located intensively above the nucleus of ADV-infected PK-15. *In situ* hybridization(ISH). X400.

Fig 4. Accumulation of photographic grains in the ADV-infected PK-15. autoradiography.

Fig 5. Accumulation of photographic grains in the spinal trigeminal nucleus of the pons in a rat. ISH. X200.

Fig 6. Accumulation of photographic grains in the spinal trigeminal nucleus of the pons in a pig. ISH. X100.

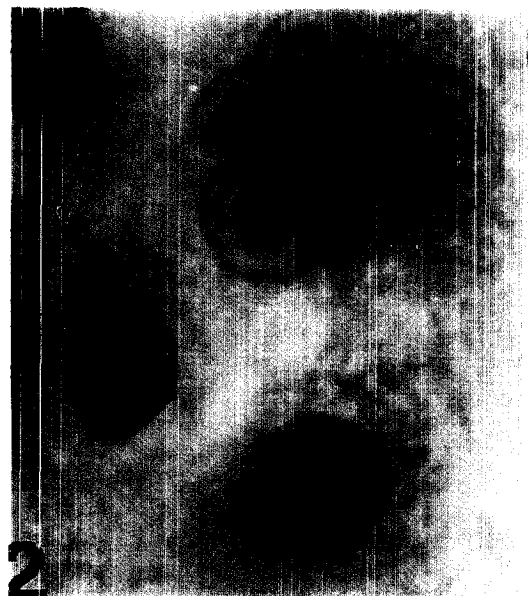
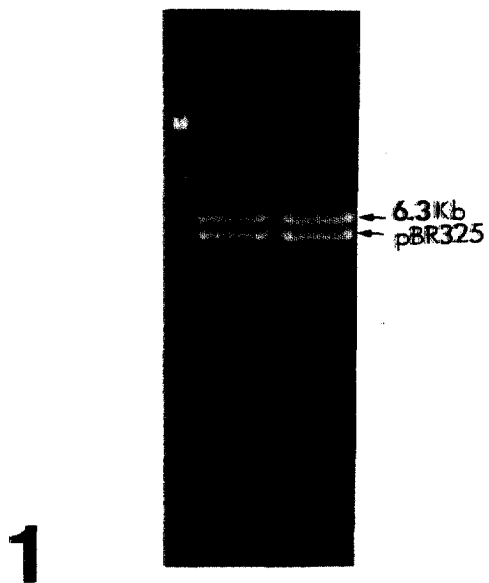
Fig 7. Accumulation of photographic grains in the nucleus of a trigeminal ganglion neuron in a pig. ISH. X200.

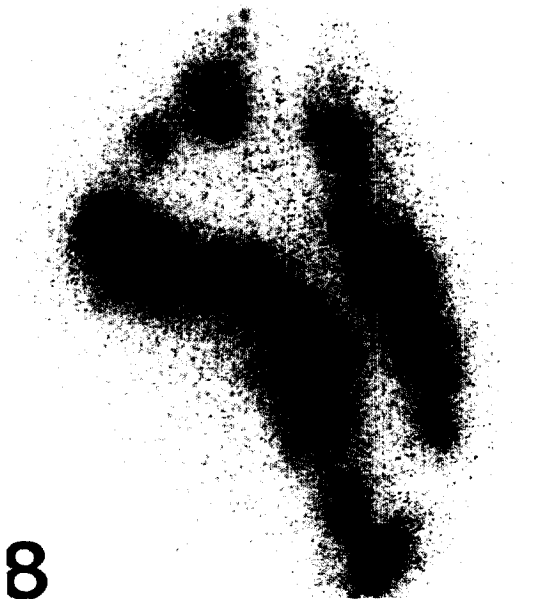
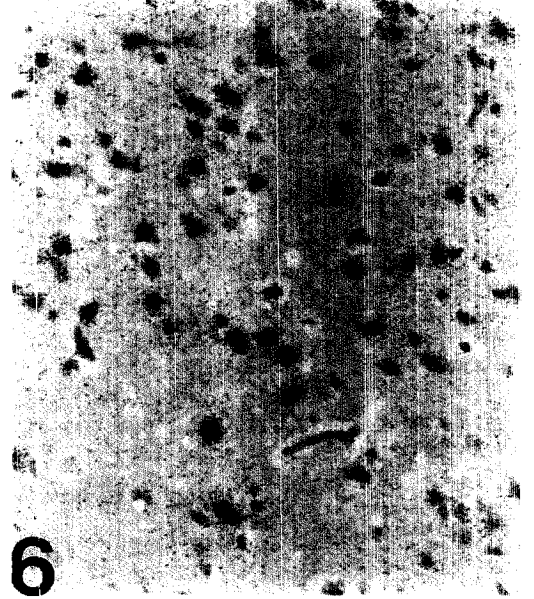
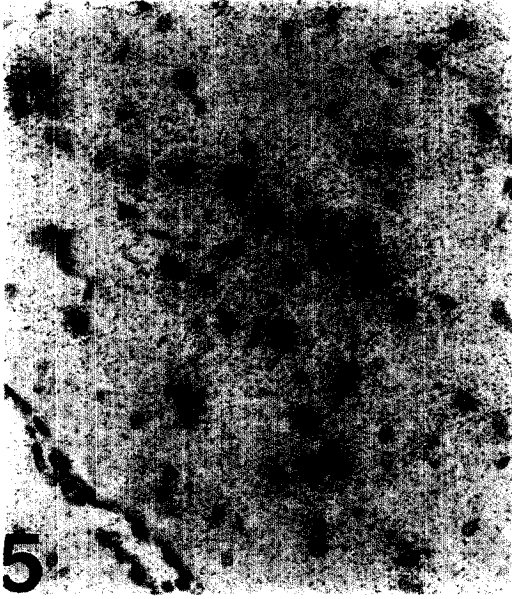
Fig 8. Photographic grains are confined to the squamous epithelial cells of the tonsillar crypts in a pig. ISH. X200.

참고 문헌

1. Kluge JP, Beran GW, Hill KB, et al. Pseudorabies (Aujeszky's disease). In: Leman AD ed. *Diseases of swine*. 7th ed. Iowa: Iowa State Univ Press, 1992; 312-323.

2. Anastasi J, Le Beau MM, Vardiman JW, et al. Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hepatopoietic cells by *in situ* hybridization with a chromosome-specific probe. *Am J Pathol* 1990; 131-139.
3. Brown TM, Osorio FA, Rock DL. Detection of la-





- tent pseudorabies virus in swine using in situ hybridization. *Vet Microbiol* 1990; 273-280.
4. Crabb ID, Huges SS, Hicks DG, et al. Nonradioactive in situ hybridization using digoxigenin-labeled oligonucleotides. *Am J Pathol* 1992; 579-589.
 5. Unger ER, Budgeon LR, Myerson D, et al. Viral diagnosis by in situ hybridization: Description of a rapid simplified colorimetric method. *Am J Surg Pathol* 1986; 1-8.
 6. Walboomers JMM, Melchers WG, Mullink H, et al. Sensitivity of in situ detection with biotinylated probes of human papiloma virus type 16 DNA in frozen tissue sections of squamous cell carcinomas of the cervix. *Am J Pathol* 1988; 587-594.
 7. Wolf BC, Martin AW, Neiman ES, et al. The detection of Epstein-Barr virus in Hairy cell leukemia cells by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1990; 717-723.
 8. Brahic M, Haase AT. Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 1978; 6125-6129.
 9. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analy Biochem* 1983; 6-13.
 10. Rigby PW, Diekmann M, Rhodes C, et al. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977; 237-251.
 11. Sandberg M, Vuorio E. Localization of types 1, 2 and 3 collagen in developing human skeletal tissues by in situ hybridization. *J Cell Biol* 1987; 104:1077-1084.
 12. Zoeller RT, Seeburg PH, Young III WS. 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* 1988; 122:2570-2577.
 13. Herrington CS, Burns J, Graham AK, 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* 1989; 42:592-600.
 14. Ikeda T, Yoshikawa Y, Yamanouchi K. Detection of v- and c-erbB oncogene mRNA in cultured cells by in situ hybridization. *Jpn J Vet Sci* 1990; 52:175-178.
 15. McGuire LJ, Huang DP, Teoh R, et al. Epstein-Barr virus genome in thymoma and thymic lymphoid hyperplasia. *Am J Pathol* 1988; 131:385-390.
 16. Thomas CM. Molecular biology of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. *Comp Immun Microbiol Infect* 1991; 14:151-163.
 17. Cremers AKM, Jansen WN, Wiegant J. Nonradioactive in situ hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems. *Histochem* 1987; 86:3413-3416.
 18. 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* 1965; 12:389-405.
 19. Card JP, Rinaman L, Lynn RB, et al. Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: Ultrastructural characterization of viral replication, transport and pathogenesis. *J Histochem* 1993; 13: 2515-2539.