

마레병 진단에 있어서의 형광항체법의 응용

김 우 호 역

- ...다음은 지난 6월 15일 대한 양계협회와 현대양계사가 '공동주체한 일본...○
- ...오사까(大阪) 대학의 나이토 박사의 학술 강연회의 내용을 강원대학...○
- ...의 김우호 박사가 초역한 것이다.○

형광항체(螢光抗體, FA)법이란, 조직절편(組織切片)이나 도말(塗抹)표본 및 조직배양상에서 항원-항체반응(抗原-抗體反應)을 일으켜 항원-항체반응이 갖는 높은 특이성을 이용하여 생체(生體)의 조직세포의 생물학적 활성, 고분자 물질(예: 바이러스, 릿켓치아, 세균, 조직, 항원, 효소 등)을 동정하는 방법이다. 그러나 항원-항체반응 자체는 보통의 광학현미경하에서는 관찰되지 못하므로 사전에 이 항체에 형광색소(螢光色素)로 표식(標識)을 하여 형광현미경하에서 관찰하는 것이다.

마레크병(MD)이 허피스바이러스에 의하여 일어난다는 것이 밝혀진 이래 형광항체법은 조직배양표본이나 조직절편(凍結組織切片, Cryostat)표본에 있어서의 MD 바이러스(MDV)의 증명 및 닭혈청중의 항 MDV항체의 측정에 응용되게끔 되었다.

본인 등은 MD 병제혈청의 글로블린 분획(分劃)에 형광색소인 FITC를 결합시킨 FA직접법을 써서 조직배양표본과 생체조직동결 절편표본에 있어서의 MDV항원을 증명하였다. 또한 본인 등(1970)은 가토항체(家兔抗鷄)감마글로블린 FITC 표지항체를 사용하는 간접법에 의하여 닭혈청중의 MDV 항원에 대한 항체가(抗體價)의 측정이 가능함을 밝혔다.

1. FA직접법에 의한 MDV항원의 증명

MD 형광표지항체(진단용)를 사용하는 FA직

접법에 의하여 MDV감염 DEF, QUEF 및 CEF 배양세포나 CK배양세포와 반응시키면 특이형광은 대체로 병소(focus)를 형성하는 세포부위에 일치하여 확인된다.

또한 MD 병제피부조직의 동결절편표본을 만들어 MDV의 항원의 분포를 조사하여 보면 특히 우모모근부(羽毛毛根部)의 상피세포층(上皮細胞層)에 있어서 저명한 특이형광이 확인된다.

술법(術法):

1) 덮개유리위에 피검병제(被檢病鷄)의 모근부 및 다른 장기조직의 동결절편을 만들거나 또는 단층으로 배양된 세포표본의 덮개유리를 직접 냉아세톤으로 약 10분간 고정후 건조시킨다.

2) 이 덮개유리 위에 고정된 표본에 MD형광표지항체(건조된 진단용 상품인 경우에는 PBS로 용해시켜)를 적하(滴下)한 다음 반응용상자에 넣어 37°C에서 그 시간 항온기(恒溫器)속에서 반응시킨다.

3) 동시에 다른 표본에 항 MDV혈청(동결건조된 참고표준 항MDV혈청의 경우에는 PBS로 용해시켜)을 적하하고 반응 상자에 넣어 37°C에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 약 1분간 씻어내어 건조시킨 다음 MD형광표지 항체를 2에서와 마찬가지로 다시 반응시킨다.

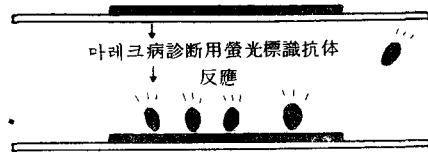
4) 2), 3) 모두 반응시간이 끝나면 진탕기(shaker)를 이용하여 흔들리게 하면서 약 15분

간 씻어낸다. 이때 3~5분마다 새로운 PBS로 교환한다.

5) 표본의 물끼를 뺀다음 표본면에 완충(緩衝) 그리세린을 적하, 깨끗한 형광현미경용 슬라이드면에 부착하도록 놓은 다음 형광현미경으로 관찰한다.

판정 :

2)의 반응으로 표본세포에 특히 형광을 확인한 부위가 3)에 반응에서 특히 형광이 소실되거나 감약된 경우를 양성으로 판정한다.



덮개유리 위에 고정된 닭모근 절편, 또는 다층으로 배양된 세포.

2. FA간접법에 의한 MDV항체가의 측정

FA간접법에 의한 닭혈청의 MDV에 대한 항체가의 측정에서, MDV병계혈청은 160배 이상의 항체가를 나타낸다. 또한 일견 건강한 성계의 혈청도 거의 40배 이상의 항체가를 나타내며 항체가에게 병계혈청과 구별되지 못한다.

일반적으로 병아아리는 부화후 3주령까지는 모계로부터의 이행항체(移行抗體)를 지니고 있으며 3주이후에는 항체가는 소실한다. 오염계사에서 사육된 닭은 5~6주령에서 항체가의 상승이 확인되는 것이다.

지금까지의 연구성적에 의하면 MDV의 감염과 FA 간접법에 의한 항체검출과는 일치한다는 것이 밝혀지고 있다. 따라서 6주령 이후의 닭에서 항체가를 40배이상 나타내는 것이 한 계사내에 5수이상 검사하여 그것들의 거의 전부에 확인될 경우 그 계사는 MDV로 오염되어 있다고 생각되는 것이다.

술법 :

1) MDV 감염세포가 고정되어 있는 덮개(형광항체적접법 MDV항원)위에 2배 또는 4배 단계희석(段階稀釋)한 각 피검혈청을 적하한다. 이때 덮개를 메니큐어로 격벽(隔壁)을 지어 4등분 하여 놓으면 각 희석혈청의 혼합을 방지할

수 있는 것이다.

2) 반응상자에 넣어 건조하지 않도록 하여 37°C에서 30분간 항온기 속에서 반응시킨다.

3) 이어 표본을 꺼내어 진탕기를 이용, PBS로 약 15분간 덮개를 씻는다. 이때 3~5분마다 새로운 PBS로 교환한다.

4) Cover slip 표본 전체면에 capillary pipette를 사용하여 가토항체(家兔抗鷄) γ -globulin 형광표지항체(결동건조제물의 것은 PBS로 용해)를 덮는다.

5) 2), 3)의 순서를 반복 조작한다.

6) 무형광 완충 그리세린을 뿔구어서 슬라이드 상에 붓입시킨후 형광현미경으로 관찰한다.

판정 :

참고표준(參考標準) 항MDV혈청(항체가 1 : 160, UV+, BV++)을 참고로하여 다음표에 의거 판정하나 이때 항원용 cover slip상의 병소(focus)를 형성한 감염세포가 형광을 발하므로 이 병소를 지표로하여 관찰한다.

UV려기(勵起)	BV려기	판 정
≡	≡	양성(+)
≡	≡	
+	+	
±	+	음성(-)
-	±	
-	-	

≡ 강한 특이 형광이 인정되는 것
 ≡ 명확한 형광이 인정되는 것
 + 약한 형광이 인정되는 것
 ± 특이 형광의 판단이 곤란한 것
 - 특이 형광이 없는 것

덮개위에 고정된 MDV 감염세포

피검혈청을 2배 또는 4배 단계 희석한 것을 격벽된 cover slip의 각각에 덮은 결과

