

전자현미경 *In Situ* Hybridization에 의한 Viral RNA의 진단에 관한 연구

전남대학교 자연과학대학 생화학교실, 광주보건전문대학 임상병리과*

최원기 · 주경웅[†] · 김석홍*

국문초록: 토끼 바이러스성 출혈증의 원인체를 실험 토끼에 접종하여 증식을 유도하고 간장에서 hematoxylin & eosin 염색에서 조직학적 진단과 세포내 viral RNA의 소재를 결정하기 위해 post-unicryl 포매한 block의 절편을 사용하여 단 염색과 전자현미경적 *in situ* hybridization을 시도하였다. 토끼 출혈증 viral RNA의 보합 결합에 이용하는 probe는 4717에서 4800(84bases)까지 oligonucleotide를 5'말단에 biotin-CE phosphoramidite로 표지하여 사용하였다. 보합결합물의 증명은 신호 표지로서 antibiotin antibody-10nm gold를 사용하였으며, hybridization이나 증명은 기존 protocol에서 약간의 변형을 사용하였다. 0.02% glutaraldehyde에서 고정하고 unicyrl resin 포매한 표본, biotinylated oligonucleotide probe, antibiotin antibody-10nm gold로 실험한 결과 증강된 신호를 얻을 수 있었다. 특히 전자현미경을 생략하므로써 실험 과정을 간단하게 하여 신속한 결과를 얻을 수가 있었다. 전자현미경 *in situ* hybridization을 통하여 토끼 출혈증 바이러스의 주요 표적은 간세포로 감염 세포의 세포질 내 미토콘드리아와 핵사이에서 immuno gold입자가 뚜렷하게 표지됨으로서 viral RNA를 증명할 수 있었다.

서 론

최근 광학현미경에서 분해할 수 없는 분자의 관련 위치를 전자현미경에서 결정할 수 있게 하였다. ISH는 전자현미경적 수준에서도 시행되어 세포의 초미세 형태학적 관찰과 함께 세포질이나 핵내 특히 DNA나 RNA의 국지화가 가능해졌다^{1,3,5,6,9,10,21,29,33}. 지금까지 보고된 대부분의 전자현미경적 ISH는 조직을 고정하기 전에 ISH를 시행하고 포매 후 절편을 제작하여 관찰하는 포매전 방법(pre-embedding method)이 이용되고 있으나^{1,3,5,29}, 이 방법은 여러 가지 단점을 지니고 있다. 그러므로 최근에는 조직을 고정하고 포매하여 절편을 제작한 후 ISH를 시행하는 포매 후 방법(post-embedding method)이 시도되고 있다^{10,11,17,21,26}. 그러나 이 방법도 조직을 채취하여 고정하는 과정에서 고정액과 포매제의 선택, 절편 제작과정,

ISH에 이용되는 각종 시약의 선택 등에 따라 그 결과에 많은 차이가 나타난다고 제시되어 졌다¹¹.

Rabbit haemorrhagic disease virus(이하 RHDV)는 비리온의 크기, 밀도 등 바이러스의 분자생물학적인 자료에서 calicivirus로 증명되었고^{22,25,28}, RHDV의 genome은 약 8kb 정도되는 positive stranded RNA로서²³, poly A를 제외한 총 7437개 염기서열이 완전하게 증명되어⁷ 분자생물학적으로 진단이 활발하게 진행되고 있다.

저자들은 분자생물학적 ISH반응을 전자현미경에 응용하고자, 조직학적 소견을 감염지표로 하여 viral RNA를 증명하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험토끼와 접종

자연 사육된 몸무게 2.7±0.3kg 정도의 Newzealand White 종인 토끼를 RHD가 발생되지 않은 전남 장성군의 농장에서 운반하여 임상 조사 및 실험 재료로 사용하였다. 실험 전에 채혈하여 분 바이러스에 대한 hemagglutinin inhibition test 후

* 논문접수 1996년 9월 28일, 수정재접수 1996년 11월 11일.

[†]별책요청 저자

항체가 음성인 개체만 암수 구별 없이 실험군으로 사용하였다. 본 질병으로 폐사한 토끼로부터 얻은 간장 조직을 Hanks' BSS(Sigma)을 사용하여 Homogenizer 74005(Biospec product)로 10%(W/V) 유제액을 만들어 HIMAC SCR 20BA centrifuge (Hitachi, Japan)로 4℃에서 1100×g 30분간 냉각 원심하여 상층액을 얻었다. 용해된 RNA를 170μl 1% BSA-PBS(pH 7.2)로 희석시켰다. Amicon 8400(Beverly, MA 01915, USA) 필터 장치 (Pmax, 75psi, 5.3kg/cm²)에서 DIAFLO Ultrafiltration membrane을 사용하여 여과시켜 여과된 액을 실험에 사용하였다.

실험 토끼에 대한 접종을 하기 전에 먼저 RHDV에 감염된 토끼로부터 분리되어 보관된 접종 유제의 적혈구 응집반응은 microtiter system으로 실시하였다²³. 접종 재료의 hemagglutinin 역가는 log₂ 7이었고, 토끼 대퇴부 근육 내 2ml 주사 후에 사육시켰다²³. 정상군(이하 N으로 약기함)과 hematoxylin & eosin 염색으로 세포 구조의 변화, 출혈 등의 조직학적 경검을 통하여 RHDV에 감염 되었다고 예상되는 접종군(이하 T라 약기함)의 간장 조직을 실험 재료로 사용하였다. 정상군은 농장에서 운반 즉시 접종 실험하기 전에 무균적으로 장기를 채취하여 재료로 이용하고 접종군은 접종 후 폐사 직후 장기를 채취하여 실험에 사용하였다.

2. Oligonucleotide probe

Gregor 등⁷에 의해 밝혀진 RHDV의 7437 sequences 중 84 bases를 선택하여 ISH probe로 사용하였다(Fig. 1). Oligonucleotide probe의 구성을 보면, adenine이 28 frequency, cytosine이 20 frequency, guanine이 20 frequency, thymine이 16 frequency이고, 기타 여분의 frequency 1개를 가져서 모두 85개로 되어있다. Purine과 pyrimidine의 비는 48:36으로 1.33이며, 분자량은 25943.066g/mole이었다.

Oligonucleotide의 합성은 DNA synthesizer (OLIG1000M, BACKMAN, USA)를 이용하여 5'말단에서부터 nucleoside monomers를 하나씩 연결해 가면서 전체 84 bases 완성될 때까지 화학반응을 반복였다. 여기서 일어나는 화학반응은 하나의 단계, 즉 하나의 monomer가 부착되는 과정이 1 cycle로 하였으며 4 단계로 이루어지게 하였다.

3. Unicryl embedding block

N군과 T군 간장 조직을 1mm³ 크기로 잘라서 4% paraformaldehyde와 0.02% glutaraldehyde로 4℃에서 24시간 고정된 후 cacodylate 완충액으로 세척하였다. 그리고 계열 알코올로 탈수하고 전자현미경 ISH를 위하여 uranyl resin(Bio cell international)을 사용하였다. Uranyl resin에 포매된 조직은 4℃에서 48시간, 실온에서 24시간, 자외선 램프에 노출시켜 중합하였다.

4. Toluidine blue stain

Ultramicrotome(LKB2088, Bromma, Japan)에서 1μm로 thick-section한 표본을 slide glass에 부착하여 사용하였다. 대조와 실험 절편이 부착된 slide 위에서 1% toluidine blue용액 1 drop을 떨어뜨리고 10초간 염색한 후 광학현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

5. In Situ Hybridization

단염색 표본을 광학현미경으로 관찰하여 특정 부위를 정하고, 삭정한 뒤 80nm의 초박절편을 만들었다. Grid는 nickel(120hole)을 사용하였으며, Formvar막으로 피막하여 사용하였다. 표본을 parlodion-carbon이 코팅된 gold grid에 부착시키고, hybridization전에 절편은 조직 내에 있는 내인성 과산화 효소 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂용액으로 15분간 처리하였고, PGB에서 15분간씩 2회 반응시켰다. 증류수로 5분간 수세한 후, PBS(pH 7.0)로 5분간 세척하였다.

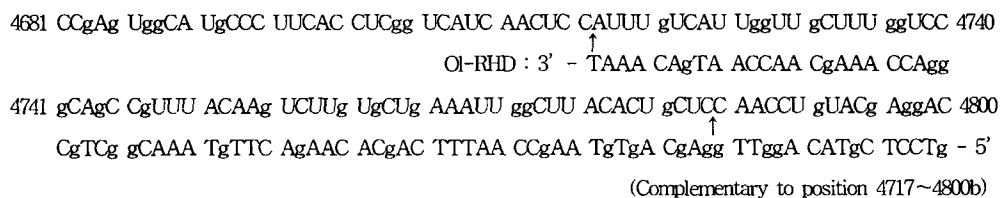


Fig. 1. Oligonucleotide probe for *in situ* hybridization.

Oligonucleotide probe가 ml당 200ng이 포함된 hybridization 용액[AmrescoR; yeast tRNA와 salmon sperm DNA 각각 100µg/ml 50% formamide in 4×SSC(standard sodium citrate)]을 제조하고, 이 보합결합 용액 10µl를 떨어뜨린 siliconized sterile slides위에 미세절편이 부착된 grid를 놓고 37°C 습실에서 3시간 실시하였다. 습실은 4×SSC안에 50% formamide로 평형을 유지시켰다. hybridization 후에 여분의 probe를 제거하기 위하여 grid를 PGB로 5분간씩 6회를 세척(jet washing)하고 biotin detection protocol을 시행하였다. 표본을 0.1% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 5% 정상 염소혈청(TBS; 20mM Tris-HCl pH 8.2, 0.9% NaCl, 20mM Na₂S₂O₃)으로 덮어 30분간 반응시켰다. 그리고 10% BSA가 포함된 PGB로 1:25 희석된 10nm gold particles(AuroProbe One, Janssen Life Sciences)이 결합된 염소 antibiotin antibody로 가하고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 PGB로 5분간씩 3회 세척하고 0.1M cacodylate buffer로 5분간씩 3회 시행하였다. Protein G는 1% glutaraldehyde를 사용하여 실온에서 10분간 고정하였다. 이어서 0.1M cacodylate buffer로 5분간씩 3회 세척하고, 증류수에서 10분간 수세하였다. 대조염색은 3% uranyl acetate에서 37°C에서 7분간 전자염색을 시행하고, lead citrate에서 3분간 실시하였다. 음성 대조표본인 N군은 probe의 hybridization 단계에서 probe를 첨가하지 않고 hybridization 반응시킨 후, 투과 전자현미경(JEM-100, CX, JEOL)으로 가속전압 80KV 하에서 20,000× 사진 촬영하였다.

결 과

1. Hematoxylin & Eosin stain

정상 N군(Fig. 1A)에 비해서 T군에서는 간세포의 지방 변성, 간소엽간 결합 섬유질의 심한 담소관의 증식과 괴사 등이 보였으며, 기도 점막하출혈 등의 소견은 RHD에 감염된 토끼에서의 기존의 병리학적 소견과 동일하였다(Fig. 1B).

2. Toluidine blue stain

특히 자연사한 T군의 경우 간세포의 공포변성, 혈관 주위에 단핵세포 침윤 등이 보였으며 충혈과 괴사가 심하게 나타나 있었다(Fig. 2B). 이는 H & E stain과 일치하였다.

3. In Situ Hybridization

조직이 낮은 glutaraldehyde에 고정된 재료였기 때문에 이들 세포들의 형태학적 변화에 대해서도 명확히 할 수는 없었으나, viron과 함께 간세포의 핵외막 가까이 미토콘드리아와의 사이에서 미세한 viral RNA gold 과립들이 2~3층으로 배열된 것을 볼 수 있었다(Fig. 3B). 이상과 같은 결과로 보면 RHDV의 전자현미경적 소견에서 간세포의 세포질에서 나타나고, viral RNA particles 이 핵 외막쪽에 몰려 분포되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

전자현미경 ISH를 포매전에 시행하는 방법은 동결절편 조직이나 고정액으로 고정한 조직을 포매하기 전에 ISH를 시행하므로써 DNA나 RNA의 분포 양상을 입체적으로 관찰할 수 있는 방법으로 알려져 왔다. 그러나 사용되는 probe나 황금 과립의 조직내 침투가 한정되므로 ISH 시행 후 삭정시 관찰하고자 하는 조직이 손실되기 쉽고, 조직이 고정되지 않는 상태에서 장시간 조작하므로 세포의 손상이 일어나 전자현미경적 관찰시 인위적인 구조 변화와 viral RNA의 정확한 국지화가 어렵게 될 수 있다. 또한 포매전에 ISH를 시행하므로써 그 후의 조작과정에서 부착된 probe나 황금 입자의 소실이 있을 수 있다. 그러므로 최근에는 조직을 고정하고 포매한 후 grid에 조직을 얹어 이를 ISH하는 방법이 개발되고 있다. 포매 후 방법은 조직의 고정, 탈수, 포매제의 침투 및 polymerization, 절편제작, 단백질소의 처리, RNA의 변성, hybridization, probe detection 및 전자 현미경적 관찰 단계로 이루어져 있다. 이 과정에서 선택되는 시약의 종류와 시행 방법에 따라 그 결과에 많은 차이가 있으며¹¹⁾, 이러한 점은 본 연구에서도 관찰할 수 있었다. 조직 고정액은 전자현미경적 관찰을 위한 첫 단계이므로 대단히 중요하고 전자현미경적 ISH의 장점인 세포내 소기관의 형태를 관찰할 수 있는가 하는 점을 결정하게 된다. RNA 유지에 관하여, 고정제에 glutaraldehyde를 첨가하면 강도가 감소된다^{8,13)}. Binder 등은¹⁰⁾ 낮은 농도의 glutaraldehyde로 고정 후 mRNA의 좋은 검출을 보였다고 하였다. 또한 1% glutaraldehyde의 사용으로

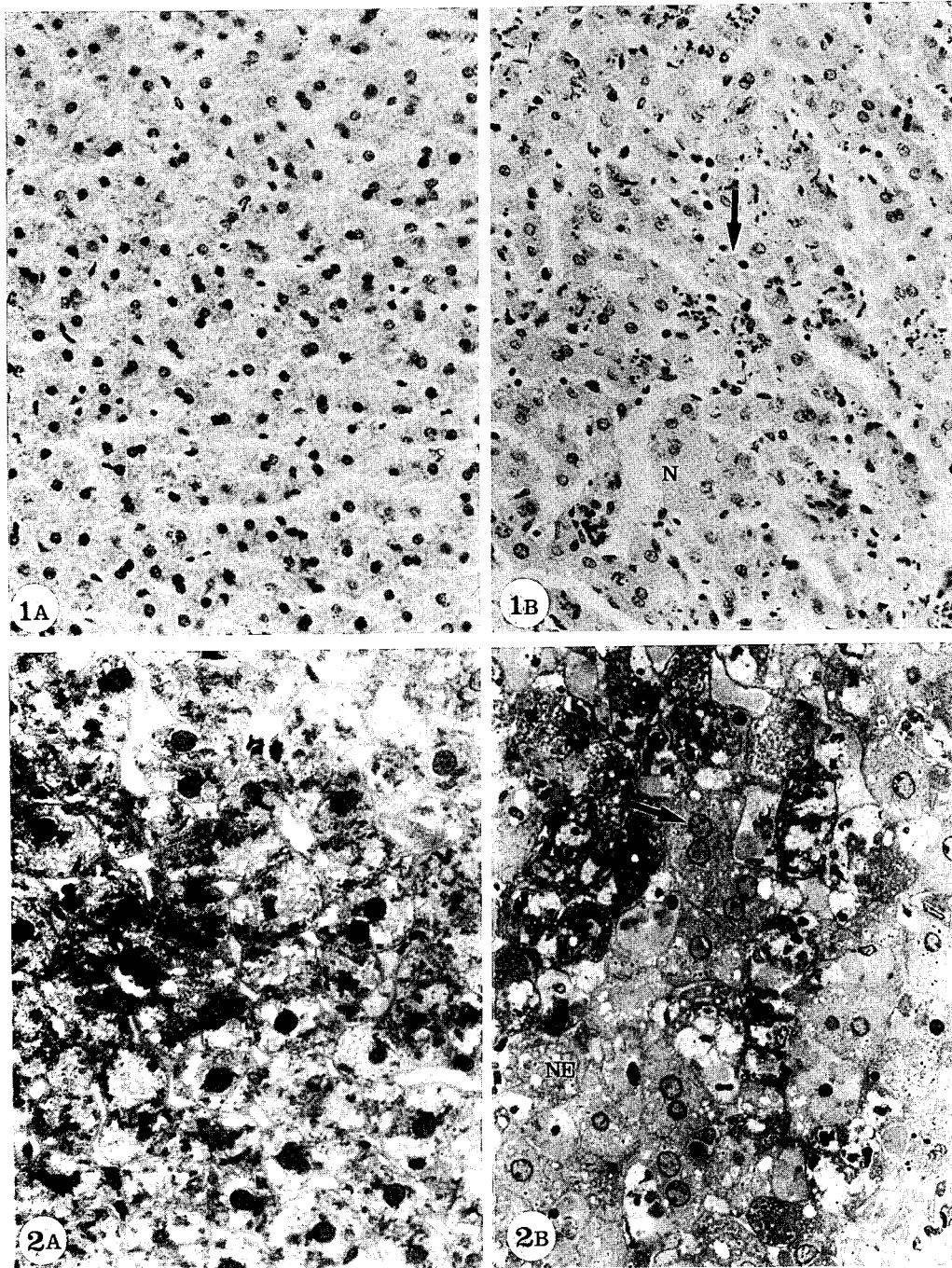


Fig. 1. The morphological changes on hematoxylin & eosin stain of normal cells and RHDV infected liver cells. Negative control of liver tissue(1A) and appearing in the cytoplasm of degenerated hepatocytes of natural sudden death cases(1B). Infected cells are easily recognized by multiple necrosis(N) and severe haemorrhage (arrow). (1A)N, (1B)T. 200 ×

Fig. 2. Toluidine blue stain of livers. Multiple solitary coagulative necrosis(NE) of hepatocytes is scattered. Some nuclei of them lose basophilia and are wash out(arrow). (2A)N, (2B)t. 400 ×

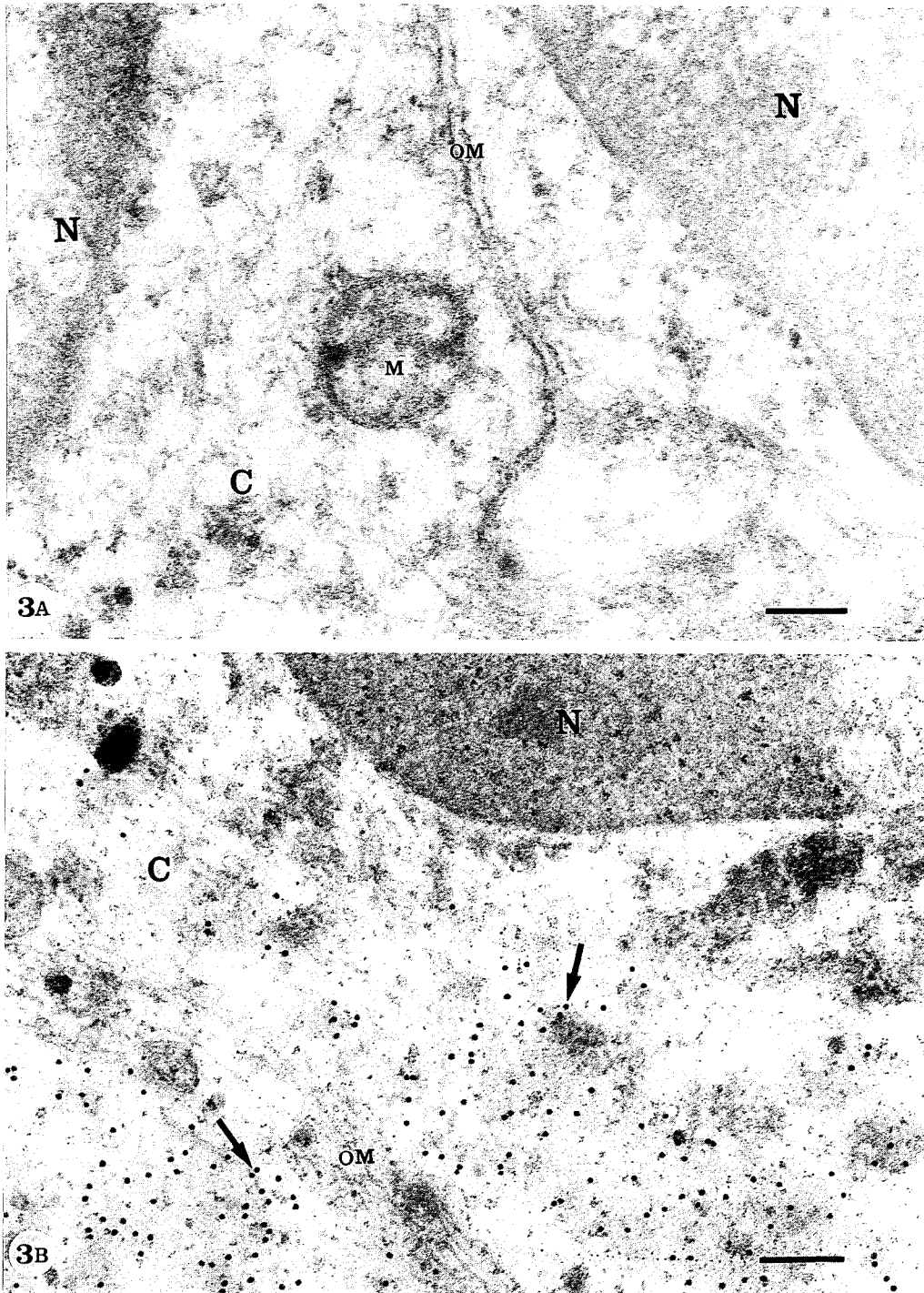


Fig. 3. Gold particles signal on electron microscopic *in situ* hybridization of hepatic cells embedded in Unicryl, hybridization with oligonucleotide probe. Negative control of hepatic cell(3A) and clusters of viral RNA gold particles(arrow) are seen in the cytoplasm and the particles are closely attached to the outernuclear membrane of sudden death case(3B). C, cytoplasm; M, mitochondria; N, nucleus, OM, outernuclear membrane; V, virion. (3A)N, (3B)T. Original magnification 28,000 \times , bar=1 μ m.

Lowicryl 포매된 조직에서 좋은 구조적인 보존을 보였으며 연속적인 면역 염색에서도 완전한 증명이 되었다¹⁶⁾. 그리고 일반 전자현미경 표본 제작시 이용되는 OsO₄는 ISH를 하기 위한 조직에서는 양성 결과를 얻을 수 없기 때문에 사용하지 않는다고 한다³⁾. 본 실험에서는 4% paraformaldehyde와 0.02% glutaraldehyde로 4℃에서 24시간 고정한 후 cacodylate 완충액으로 세척하였다. Unicryl은 새로운 acryl resin으로 전자현미경적 검사를 위하여 최근에 개발된 포매제이다²⁷⁾. 이 resin은 친수성이 높고 균질성의 구조를 지니고 있어 특히 전자현미경적 관찰에 좋은 결과를 얻을 수 있다고 한다. 본 연구에서도 좋은 결과를 얻을 수 있었고 배경염색의 정도도 낮았으며, block의 경화가 높아 초박절편 제작이 용이하였다. 이 resin은 연구 목적에 따라 고온과 저온에서 중합시킬 수 있으며, 온도에 민감하지 않는 조직의 경우 고온 중합법이 이용되고 있으나 면역조직화학적 방법에서는 영향이 있을 수 있으므로 본 연구에서는 저온법으로 중합시켰다. 그러므로 면역학적 방법을 위한 전자현미경적 관찰을 위한 포매제가 갖추어야 할 조건으로서는 cross-linking이 없어야 하며, 친수성이 있어야 한다. 전자현미경을 위한 포매제로 가장 많이 사용되고 있는 epon은 소수용성 제재로서 미세 구조의 관찰 면에서는 좋은 포매제이나 ISH의 포매 후 방법에서는 양성 소견이 관찰되지 않으므로 적절하지 않다. 그러므로 ISH의 포매 후 방법에서는 먼저 항원성의 복원과 친수성을 갖게 하는 처치가 선행되어야 할 것으로 생각되며, 여러 가지 방법이 개발되고 있으나 아직 좋은 결과를 얻지 못하고 있다⁹⁾. Ultra thin section을 열변성이나 hybridization의 시간 조절로 hybridization능이 증강된다고 암시하고 있다^{14,31)}. 온도 65℃는 열변성하는 것에 가까운 온도이다. 그러므로 개선된 신호를 얻을 수 없다. unicryl 포매 표본에서 특별히 고온에서 수행했을 때 형태학적으로 세세한 부분이 과정 후에 소실될 수 있으므로, 본 연구에서는 37℃에서 시행하였을 때 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 보통 viral RNA를 증명하기 위해서 사용되는 probe는 cDNA나 RNA 그리고 oligonucleotide probe를 많이 이용하고 있다³⁰⁾. DNA는 긴 sequences에서 이용하는 것이 좋으며, RNA나 oligonucleotides는 높은 효율의 hybridization을 할 수 있다고 하였다. RNA probes는

DNA probes 보다 비특이적인 결합을 낮게 해준다. 그리고 신호 강도가 보다 더 높게 나타난다고 하였다^{18,20)}. 반면에 DNA는 hybridization의 낮은 효율, RNA는 만들기가 어렵고, oligonucleotide는 cocktail로 사용하지 않으면 예민도가 떨어진다고 하였다^{21,29)}. 그러나 probe는 예민도와 특이도를 동시에 높이기 위해서는 특정 sequences의 선택이 무엇보다도 중요하므로 satellite nucleic acid가 없는 부위를 선택되어야만 한다. Oligonucleotides probes를 20-50 bases정도로 probe의 길이를 짧게 하면 조직 투과성이 좋아 민감도를 높일 수 있지만 비특이적인 결합을 일으킬 수 있는 단점이 있는 것으로 보고되고 있다¹⁹⁾. 본 실험에서는 5' 말단에 biotin-CE phosphoramidite로 표지한 84 oligonucleotides를 사용하였으며, 다른 virus의 염기서열과 겹치지 않게 하고 비교적 길게 하여 특이성을 높게 해주었다. Gold 표지의 손실을 최소화하기 위해서는 PBS에 1% glutaraldehyde로 하여 10분간 고정하고, 염색 전에 3% aqueous uranyl acetate에서 37℃-7분, lead hydroxide에 3분간 처리하였다. 황금 과립의 직경은 각각 10nm였고 관찰시 주변 조직과의 감별이 용이하였으며, 4,000배 시야에서도 과립을 인지할 수 있었다. 여분의 probe를 제거한 후 배경 염색을 줄이기 위하여 정상 염소 혈청을 사용하여 배경 염색이 나타나지 않았다.

RHDV의 염기 서열이 밝혀짐에 따라 분자생물학적 기법 중에서 ISH를 이용하여 슬라이드 위에 고정시킨 세포나 조직의 세포질에 있는 RNA와 직접 결합하도록 하여 세포나 조직 중에 RHDV 유전자의 RNA가 존재하는지 유무와 정도를 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Acetarin JD, Carlemalm E and Villiger W (1986): Development of new Lowicryl resins for embedding biological specimens at even lower temperatures. *J Microsc*, **143**: 81-88.
2. Angerer LM and Angerer RC(1992): *In Situ Hybridization to cellular RNA probes*. In: *In Situ Hybridization: A practical approach*. (1st Edn) Ed:Wilkinson, Oxford University Press, Oxford, 15-32.
3. Beals TF(1992): Ultrastructure if *in situ* hybridiza-

- tion. *Ultrastruct Pathol*, **16**: 87-93.
4. Berryman MA, Porter WR, Rodewald RD and Hubbard AL(1992): Effects of tannic acid on antigenicity and membrane contrast in ultrastructural immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, **40**: 845-857.
 5. Binder M(1987): *In situ* hybridization at the electron microscopic level. *Scanning Microsc*, **1**: 331-338.
 6. Binder M, Tourmente S, Roth J, Renaud M and Gehring WJ(1986): *In situ* hybridization at the electron microscope level: Localization of transcripts on ultrathin sections of Lowicryl K4M-embedded tissue using biotinylated probes and protein A-gold complexes. *J Cell Biol*, **102**: 1646.
 7. Gregor M, Christoph W and Heinz-jurgen T(1991): Rabbit hemorrhagic disease virus-Molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome. *Virology*, **184**: 664-676.
 8. Guellec DL, Frappart L and Desprez PY(1991): Ultrastructural localization of mRNA encoding for the EGF receptor in human breast cell cancer line BT20 by *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem*, **39**: 1.
 9. Hamkalo BA, Narayanswami S and Lundgren K(1989): Localization of nucleic acid sequences by EM *in situ* hybridization using colloidal gold labels. *Am J Anat*, **185**: 197-204.
 10. Hutchinson NI, Langer-Safer PR, Ward DC and Hamkalo BA(1982): *In situ* hybridization at the electron microscopic level. Hybrid detection by autoradiography and colloidal gold. *J Cell Biol*, **95**: 609-618.
 11. Jiao R, Yu W, Ding M, Zhai Z(1992): Localization of adenovirus DNA by *in situ* hybridization electron microscopy. *Mycrosc Res Tech*, **21**: 23.
 12. John HA, Birnstiel ML and Jones KW(1969): RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, **223**: 582-7.
 13. Lawrence JB and Singer RH(1985): Quantitative analysis of *in situ* hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucleic Acid Res*, **13**: 1777.
 14. Leitch AR, Mosgoller W, Schwarzacher T, Bennett MD and Heslop-Harrison JS(1990): Genome *in situ* hybridization to sectioned nuclei shows chromosome domains in grass hybrids *J Cell Sci*, **95**: 335.
 15. Lewis ME, Sherman TG and Watson SJ(1985): *In Situ* Hybridization histochemistry with synthetic oligonucleotides: strategies and methods. *Peptides, Suppl*, **2**(6): 75-87.
 16. Lin NS and Langenberg WG(1983): Immunohistochemical localization of barley stripe mosaic virons in infected wheat cells. *J Ultrastruct Res*, **84**: 16.
 17. Mandry P, Murray B, Rieke L, Becke H and Hofler H(1993): Postembedding ultrastructural *in situ* hybridization on ultrathin cryosections and LR white resin sections. *Ultrastruct Pathol*, **17**: 185-194.
 18. Meyerowitz EM(1987): *In situ* hybridization to RNA in plant tissue. *Plant Mol Biol Rep*, **5**: 242.
 19. Moench TR, Gendelman HE, Clements JE, Nara O and Griff DE(1985): Efficiency of *in situ* hybridization as a function of probe size and fixation technique. *J Virol*, **11**: 119.
 20. Morrell JI(1989): Application of *in situ* hybridization with radioactive nucleotide probe to detection of mRNA in the central nervous system. In Bullock GR, Petrusz PP, eds. *Techniques in immunocytochemistry*(Vol 4). New York, *Academic Press*, 127.
 21. Newman GR and Hobot JA(1987): Modern acrylics for post-embedding immunostaining techniques. *J Histochem Cytochem*, **35**: 971-981.
 22. Ohlinger VF, Haas B, AHL R and Weiland F (1989): Die infektiöse hamorrhagische krankheit der kaninchen-eine durch ein calicivirus verursachte Tierseuche. *Tieraerztl. Umsch*, **44**: 284-294.
 23. Ohlinger VF, Haas B, AHL R and Weiland F and Thiel HJ(1990): Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol*, **64**: 3331-3336.
 24. Old RW & Primrose SB(1989): In Principles of

- gene manipulation;an introduction to genetic engineering. 4th Ed., Oxford, Blackwell.
25. Parra F and Prieto M(1990): Purification of calicivirus as the causative agent of a lethal hemorrhagic disease in rabbits. *J Virol*, **64**: 4013-4015.
 26. Puvion-Dutilleul F and Puvion E(1989): Ultrastructural localization of viral DNA in thin sections of herpes simplex virus type 1 infected cells by *in situ* hybridization. *Eur J Cell Biol*, **49**: 99-109.
 27. Scala C, Cenacchi G, Ferrari C, Pasquinelli G, Preda P and Manara GC(1992): A new acrylic resin formation. A useful tools for histological, ultrastructural and immunocytochemical investigations. *J Histochem Cytochem*, **40**: 1799-1804.
 28. Smid B, Valicek L, Stepanek j, Jurak E and Lodak L(1989): Experimental transmission and electron microscopic demomonstration of the virus of haemorrhagic disease of rabbits in Czechoslovakia. *J Vet Med*, **B36**: 237-240.
 29. Stirling JW(1990): Immuno and affinity probes for electron microscopy.A review of labelling and preperation. *J Histochem Cytochem*, **38**: 145-157.
 30. Syrjanen S, Partanen P, Mantyjarvi R and Syrjanen K(1988): Sensitivity of *in situ* hybridization techniques using biotin- and 35S-labeled human papillomavirus(HPV) DNA probes. *J Virol Methods*, **19**: 225-238.
 31. Thiry M and Thiry-Blaise L(1989): *In situ* hybridization at the electron microscope level: an improved method for precise localization of ribosomal DNA and RNA. *Eur J Cell Biol*, **50**: 235.
 32. Wachtler F, Mosgoller W and Schwarzacher HG(1990): Electron microscopic *in situ* hybridization and autoradiography.localization and transcription of rRNA in human lymphocyte nucleoli. *Exp Cell Res*, **187**: 346-348.
 33. Wolber RA, Beals TF and Maassab HF(1988): Ultrastructural localization of viral nucleic acid by *in situ* hybridization. *Lab Invest*, **59**: 144-151.

=Abstract=

**Studies on *In Situ* Hybridization of Electron Microscopy for
Detection of Viral RNA**

Won-Gi Choi, Keng-Woong Joo[†] and Suk-Hong Kim^{*}

*Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chonnam National University,
Kwangju, 500-757, Korea,*

**Department of Clinical pathology, Kwangju Health College, Kwangju, 506-701, Korea*

Simple stain and electron microscopic *in situ* hybridization is studied and applied for the identification of rabbit haemorrhagic disease viral RNA in a unicyrlated preparation of the liver after inoculation of rabbit haemorrhagic disease virus. Hybridization for detection of viral RNA in unicyrl embedded tissues using complementary 84 bases oligonucleotide probe labelled by biotin CE-phosphoramidite compared with 4717~4800 sequences of rabbit haemorrhagic disease virus, modified hybridization protocol and antibiotin antibody-10nm gold as signal marker. The best results were obtained in 0.02% glutaraldehyde, Unicyrl resin cell block, biotinylated oligonucleotide probes, antibiotin-10nm gold. In this report, RHD viral RNA was distributed widely within the mitochondria and nucleus of liver cell by electron microscopic *in situ* hybridization. *In situ* hybridization has become a standard method for localizing DNA or RNA sequences in tissue or cell preparation. *In situ* hybridization is detected the virus genome in the cells and tissue as specifically compared with others nucleic acid hybridization method.

Key Words: Biotin, *In situ* hybridization, Electron microscope, Oligonucleotide probe.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(2): 257-265, December 1996]

[†]Corresponding author