

In situ hybridization에 의한 돼지 뇌심근염 바이러스의 검출

오상현 · 박남용 · 정치영 · 조경오 · 이봉주 · 박영석 · 박형선

전남대학교 수의과대학
(1999년 2월 18일 접수)

Detection of porcine encephalomyocarditis virus by *in situ* hybridization

Sang-hyeon Oh, Nam-yong Park, Chi-young Chung, Kyoung-oh Cho,
Bong-joo Lee, Young-seok Park, Hyung-seon Park

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received Feb 18, 1999)

Abstract : The purpose of this study was to establish a rapid, reliable diagnostic method detecting Encephalomyocarditis virus(EMCV) RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of EMCV naturally infected pigs by cDNA probe of EMC K₃, the EMCV strain isolated from Korea. Using a biotin-labelled nick translated probe for the cDNA marker. We made up for some defects of radiolabeled method.

In situ hybridization(ISH) technique, differently from the other nucleic acid hybridization methods, is able to detect the virus genome specifically in the state of the intact shapes of cells and/or tissues. We succeeded in performing the experiment to detect the EMCV within 1~2 hours using the MicroProbe™ capillary action system.

In this study, we observed highly specific positive signals of red color by staining the paraffin-embedded tissue sections of naturally EMCV-infected pig organs or tissues, including brain, heart, kidney and lacrimal gland with the Fast Red TR salt/Naphtol phosphate chromogen. The results suggested that this ISH method is considered as a highly sensitive and reliable tool for molecular biologic diagnosis of the EMC viral disease.

Key words : EMCV, *in situ* hybridization, cDNA probe, retrospective study.

서 론

돼지의 뇌심근염 바이러스(Encephalomyocarditis virus : EMCV) 감염증은 picornavirus科 cardiovirus屬 뇌심근염 바이러스가 원인체로서 신생자돈의 폐사와 함께 유산, 사산, 미이라 변성 등의 번식장애를 특징으로 하는 생산성 저하의 질병이다^{1,2}.

EMC 바이러스는 single strand RNA genome를 갖고 있으며 4개의 서로 다른 capsid protein의 icosahedral 구조를 갖고 있으며 물리, 화학적 성상은 다른 picornavirus와 유사하나 aphovirus와 같이 0.1M halide 존재시 pH 5~6에서 불안정한 특징을 갖는다^{3,4}.

뇌심근염 바이러스에 의해 유발되는 돼지의 질병은 1958년 파나마에서 Murnane *et al*⁵에 의해 급성 치사성 질병으로 최초 보고된 후 1960~1966년 사이 미국 플로리다에서 많은 신생자돈의 폐사 원인중의 하나로 보고되었고⁶ 호주에서는 1970년 이 질병으로 인해 수백마리의 돼지가 폐사함으로써 자돈 폐사의 주요한 원인체로 간주되었으며⁷⁻⁹ 뉴질랜드¹⁰, 남아프리카¹¹ 그리고 쿠바⁴ 등에서 보고되었다. 본 질병은 바이러스 독주에 따라 이병율과 폐사율이 달라서 발생지역에 따라 상당한 차이가 있는데 호주와 뉴질랜드에서는 70% 폐사율을 보임으로써 본 바이러스가 유일한 병원체라 하였으며⁷⁻¹⁰, 플로리다에서는 본 바이러스와 함께 다른 여러 원인체가 복합되어 폐사를 일으키며⁶, 캐나다에서는 폐사한 자돈으로부터 바이러스 항체가 검출되는 경우가 있으나 모돈에 번식장애를 유발하지 않는다고 하였으며^{12,13}, 영국에서는 임상증상이 나타나지 않은 도축에서도 28%의 항체가 검출되어¹⁴ EMC 바이러스 병원성은 바이러스 주에 따라 다른 것으로 간주되고 있다. 또한 최근에서 유산된 태아에서 바이러스가 분리됨으로써¹⁵ 태반감염을 통해 번식장애의 중요한 요인으로 간주되었으며 사람에서는 신경성 질환을 보이는 환자에서 분리된 바 있어^{16,17} 혈청학적 조사를 한 결과 사람에서도 흔히 항체가 검출되었으나 대부분 증상을 발현하지 않으며 뇌염, 심근염 및 당뇨병과는 직접적인 관계가 없다고 하였다^{18,23}.

뇌심근염 바이러스는 비교적 광범위한 숙주동물에 갖고 있는데 영장류, 코끼리, 사자, 다람쥐, 몽구스, 너구리 그리고 설치류 등이며 감수성이 가장 높은 동물은 돼지이고 랫드와 마우스는 EMCV의 자연숙주이며 돼지에

대한 중요한 보균동물로 알려져 있다^{2,20-22}. 이 바이러스에 감염시 유발되는 주요한 소견은 설치류에 뇌염과 심근염을 일으키고 돼지와 영장류 및 아프리카 코끼리에서는 심근괴사를 동반하는 심근염을 일으키며^{16,20} 마우스에서는 EMCV의 D 변이주가 당뇨병을 유발시키기 때문에²⁴⁻²⁷ 랫드, 기니피, 햄스터 등의 실험동물을 이용하여 사람의 당뇨병을 연구하고 있다²⁸⁻³⁰.

뇌심근염 바이러스가 돼지에 감염되면 20주령까지의 자돈에서는 뇌염 및 심근염을 일으키고 모돈에서는 임신말기에 유산 및 사산을 유발한다². EMC 바이러스 감염시 뇌에서는 병변이 발견되지 않으며 심장에서만 관찰되고 폐수종, 흉수, 복수가 출혈성 심부전으로 인해 속발성으로 발생하기도 한다¹². 심장에서의 병변은 심장의 종대와 심근의 출혈 그리고 백색의 괴사반점이 2~15 mm의 크기로 존재하며 좌심실보다는 우심실에서 흔히 관찰되는 것으로 보고되었다. 조직학적으로는 심근에 단핵세포가 국소적 또는 미만성으로 침윤하는 심근염이 특징적으로 관찰되며 경우에 따라 심근섬유의 변성, 괴사, 석회화가 관찰되기도 한다³¹. 또한 수막의 출혈, 혈관주위 단핵세포의 침윤과 함께 신경세포의 변성이 뇌에서 관찰된다.

최근 국내에서도 박 등³⁶이 번식장애를 수반하는 돼지의 뇌심근염 바이러스 감염증에 대해 임상증상 및 병리소견을 종합하여 최초 발생보고한 후, 하 등³⁷은 바이러스를 분리 보고하였고, EMC 바이러스의 국내분리주를 이용 마우스 및 자돈에 실험접종하여 광학 및 전자현미경적 연구도 수행하였으며^{38,39} 자돈 및 햄스터를 실험동물로 공하여 병리학적 소견의 검사와 바이러스 항원의 면역조직학적 검출을 시도하였으며^{40,41} EMC 바이러스 국내 분리주에 대한 유전자 염기서열을 분석하고 cDNA를 합성, 마우스에 인공감염시켜 얻은 장기로부터 바이러스를 검출하기 위해 *in situ hybridization*(ISH)을 실시하여 실제적으로 응용할 수 있는 기초적 연구를 수행하는 등의 연구가 진행되고 있다⁴².

EMC 바이러스를 비롯하여 바이러스 질병을 진단하는 일반적인 진단방법으로는 원인바이러스를 배양한 후 분리·동정하거나 항체의 검출 또는 항체를 통한 항원검출 등의 혈청학적 진단 그리고 광학 및 전자현미경을 이용한 병리조직학적 검사를 통해 세포내 봉입체나 바이러스를 확인하는 방법 또한 면역조직학적 염색을 통해 조직내 항원을 검출하는 방법 등이 있다. 그러나 바이러

스의 배양·분리법은 가장 확실한 진단방법이긴 하지만 많은 노력과 시간 그리고 비용이 많이 들고 무엇보다도 바이러스 분리율이 낮기 때문에 실제로 응용하기 어렵고 면역조직화학적 방법은 검출하려고 하는 항원 단백질이 조직의 고정, 단백질분해효소 처리 등의 과정중에 변성되기 쉽고 항원간의 교차반응으로 인한 비특이적인 결과가 단점으로 지적되고 있다⁴³.

이러한 바이러스의 진단분야에 Haase *et al*⁴⁴은 *in situ* hybridization 방법을 도입하여 배양세포와 조직절편상에서 measles 바이러스의 RNA를 검출하였고 Brigati *et al*⁴⁵ 등은 파라핀 절편에서 biotinylated probe를 이용하여 adenovirus와 cytomegalovirus의 genome을 검출함으로써 특히 진단병리분야에서 바이러스 진단에 ISH가 좋은 검사방법임을 입증해주었으며 현재 많이 활용되고 있는 실정이다.

ISH는 핵산 probe를 이용하여 세포나 조직중의 DNA나 RNA를 검출하는 분자병리학적 검사방법으로 다른 핵산 hybridization(Southern blot, Northern blot) 방법과는 달리 세포나 조직의 형태가 그대로 보존된 상태에서 viral genome을 직접 확인할 수 있어서 특이성이 가장 높은 검사방법이며 파라핀 절편을 이용할 수 있고 아주 적은 검체물도 검사가 가능하다⁴³. 또한 급성 감염은 물론 잠복 감염이라도 원인바이러스가 존재한다면 그 핵산을 검출할 수 있다^{44,45}.

일반적으로 picomavirus과의 바이러스는 7,500 nucleotide의 RNA를 가지고 있으며⁴⁶ EMC 바이러스가 속하는 picomaviridae의 cardiovirus속 바이러스는 genome의 5'말단에 150-330bp 크기의 Poly(c) tract를 가지고 있는데 이 부위의 염기서열의 차이와 그 크기로서 종류를 구별한다.

본 연구는 ISH 기법을 이용하여 뇌심근염 바이러스(EMCV)에 자연감염된 돼지 장기의 포르말린 고정, 파라핀 절편으로부터 biotin을 표지한 cDNA probe를 이용하여 바이러스 핵산을 검출함으로써 본 병을 신속하게 확진할 수 있는 분자생물학적 진단법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 : 1989년 10월부터 12월 사이 국내 모 양돈장에서 신생자돈의 폐사 와 유산, 사산, 조산, 미이라화 등의 모돈의 번식장애를 특징으로 돼지 뇌심근염으로

진단된 자연발병의 7일령 미만 신생자돈 20두의 포르말린 고정된 파라핀 포매조직을 이용하였다.

자연발병 돼지의 *in situ* hybridization을 위한 조직 처리 : 폐사된 자돈의 부검시 채취한 뇌, 심근, 신장, 누선, 간, 폐, 부신 등의 장기를 10% 중성 포르말린에 고정 한 후 파라핀 포매하여 5 μ m의 파라핀 조직절편을 ProbeOn™ Plus slide(Fisher Biotech®)에 부착하여 *in situ* hybridization 실험에 사용하였다.

Plasmid DNA 정제와 EMCV-DNA probe의 생산 : Plasmid pUC 19내에 EMCV cDNA fragment가 transformation된 *E coli* 균주(XL1-Blue)를 KIST 유전공학연구소의 김원용 박사로부터 분양받았다.

먼저 EMCV cDNA의 insert의 확인과 probe 제작을 위해 1.5% agar와 ampicillin이 첨가된 LB 배지에 균주를 접종하여 Thermo-controller에서 약 8시간 정도 배양한 후 균주를 회수하여 ampicillin이 첨가된 LB broth에서 shaking 배양후 Birnbiom & Doly, Ish-Horowicz & Burke의 alkali lysis 방법을 응용하여 EMCV-cDNA를 분리하였다.

37 $^{\circ}$ C에서 15시간 정도 shaking 배양한 균액 1.5ml을 4 $^{\circ}$ C에서 2분간 10,000rpm으로 원심하여 상층액은 버리고 100 μ l의 GTE buffer(50mM glucose, 25mM Tris·Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, pH 8.0)을 첨가 vortexing하여 부유시킨 후 200 μ l의 lysis buffer(0.2M NaOH, 1% SDS)를 첨가, 조심스럽게 혼합한 후 ice에서 5분간 반응시켰다. 여기에 냉장보관된 150 μ l의 5M potassium acetate와 glacial acetic acid 용액을 첨가하여 잘 섞은 후 ice에서 10분간 반응시킨 후 450 μ l의 5M LiCl₂(21.195g/100ml)을 첨가 ice에서 5분간 반응시킨 다음 4 $^{\circ}$ C 15,000rpm에서 10분간 원심시켜 상층액을 새로운 Eppendorf tube에 옮겨 600 μ l의 isopropyl alcohol을 가하여 ice에서 5분간 반응시킨 후 원심하여 상층액을 버리고 침전된 pellet을 70% EtOH로 수세하였다.

침전된 pellet은 vaccum에 건조시킨 후 RNase A(1 μ g/ml)를 함유하는 50 μ l의 TE buffer(10mM Tris·Cl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹인 다음 -20 $^{\circ}$ C에서 추출된 plasmid DNA를 보관하였다.

EMCV-cDNA fragment의 확인을 위해 restriction enzyme인 EcoRI(NEB, USA) 효소와 Reaction-buffer(50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, Dithiothreitol(DTT))를 넣은 후 37 $^{\circ}$ C incubator에 1시간 반응시킨 후 ethidium bromide(EtBr)가 함유된 (1%) agarose gel 상에서 50V,

30분간 전기영동하였다.

pUC 19와 EMCV-cDNA fragment의 분자량 측정을 위하여 1Kb DNA Ladder(BRL, USA)를 marker로 사용하였고 UV상에서 392bp에 해당하는 EMCV-cDNA fragment를 확인한 후 667 polaroid film을 사용하여 촬영하였다 (Text-fig 1).

Text-fig 1. Agarose gel electrophoresis of cDNA fragment from pUC19 plasmid digested with restriction enzyme *EcoRI*.
Lane M : 1Kb DNA Ladder
Lane A, B, C : pUC 19 recombinant/*EcoRI*.

Plasmid DNA를 제외한 EMCV-cDNA fragment(392bp)를 순수하게 정제하기 위해 Wizard™ Maxipreps DNA purification system(Promega USA)를 이용하여 large scale preparation을 실시하였다. 여기에서 정제된 pUC19+EMCV-cDNA fragment를 *EcoRI* 효소로 자른 후 (1%) agarose gel에 옮겨 전기영동한 후 392bp에 해당하는 band를 절단하여 phenol extraction 방법으로 DNA 절편으로 추출하였다.

추출된 EMCV-cDNA fragment pellet은 1× TE buffer에 용해시켜 biotin labeling 때까지 -2℃에서 보관하였으며 농도측정을 위해 spectrophotometer(Beckman, DU68)로 260nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 다음 probe 제작을 위

해 이용하였다.

Probe labeling : EMCV-cDNA fragment의 표지는 biotin-14-dATP와 BioNick™ labeling system(BRI, USA)을 이용하여 표지하였다.

먼저 EMCV-cDNA(392bp)가 1× TE buffer내 5µg/20µl로 용해되어 있는 DNA 4µl와 BioNick™ Labeling system의 10× dNTP Mix(0.2mM each dCTP, dGTP, dTTP, 0.1mM dATP, 0.1mM biotin-14-dATP, 500mM Tris-HCl(pH 7.8), 100mM β-mercaptoethanol, 100µg/µl nuclease-free USA) 5µl와 10× Enzyme mix 5µl 그리고 36µl의 autoclaved H₂O를 넣어 잘 섞은 후 가볍게 원심(15,000×g for 5 sec)하여 16℃에서 1시간 반응시켰다. 이때 총 반응액은 50µl로 하였다. 다음은 더이상의 반응을 중단시키기 위해 300mM EDTA 용액 5µl를 가하고 repeated ethanol precipitation을 실시하는 과정으로 1/10 volume의 3M sodium acetate와 2 volume cold absolute ethanol을 가하여 -70℃에 1시간 정치하고 이 과정을 반복하였고, 원심하여 얻은 DNA pellet을 10µl의 1× TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA)에 녹여 Hybridization Cocktail(amresco®, 45% formamide)에 최종 200ng/ml이 되게 희석하여 -20℃에서 보관하였다.

In situ hybridization : *In situ* hybridization의 전 과정은 MicroPorbe™ capillary action system(Fisher Biotech®)을 이용하였으며 ProbeOn™ Plus slide를 맞대어 생기는 gap 사이로 capillary action에 의하여 시약이 쉽게 스며들고 흡수성이 좋은 pad 위에 slide를 놓으면 slide 사이의 시약이 쉽게 제거되는 원리를 이용한 것으로 1~2시간내에 수행하였다(Table 1).

1) Preparatory phase : ProbeOn™ Plus slide 위에 부착한 파라핀 절편조직의 탈파라핀 과정으로 Histochoice™ clearing agent 1×(amresco®)를 사용하여 110℃에서 2분간 정치하는 과정을 5회 반복하고 100% EtOH에서 5번씩 수세, 2회 반복하였다.

2) Enzyme predigestion : 탈파라핀 조직절편내 probe 투과성의 증진과 핵산이 잘 노출되도록 하는 과정으로 단백질분해효소인 Pepsin(Research Genetics 750102)에 110℃, 2분간 부치시켰다.

3) Heat denaturation & hybridization : 조직절편내 Target viral RNA와 Porbe DNA의 denature를 위해 처음 Prehybe Plus(Research Genetic 750124)에 110℃ 3분간 부치한 다음 biotinylated cDNA probe를 적용 110℃에서

Table 1. Procedure for *in situ* hybridization

Reagent	Cycle	Time	Temp
Auto dewaxing	5	2 min	110℃
Auto alcohol	3	1 wash	RT
Auto alcohol	3	1 wash	RT
Pepsin	1	2 min	110℃
Prehybe plus (Probe enhancer)	1	3 min	110℃
Probe	1	1 min	110℃
Cooling	1	15~30 sec	RT
Probe	1	2 min	105℃
Cooling	1	15~30 sec	RT
Probe	1	0.5 min	105℃
Cooling	1	1 min	RT
Probe	1	0.5 min	95℃
Cooling	1	2 min	RT
Probe	1	0.5 min	85℃
Cooling	1	3 min	RT
Probe	1	0.5 min	85℃
Cooling	1	4 min	RT
Posthybe wash(2X SSC)	4	5 sec	RT
Auto blocker	1	2 min	50℃
Posthybe wash(2X SSC)	4	5 sec	RT
STREP-AP detection system	1	10 min	50℃
Probe lick(chromogen enhancer)	1	1 wash	RT
STABLE FAST TR/NP chromogen	1	10 min	50℃
STABLE FAST TR/NP chromogen	1	15 min	50℃
Auto wash	1	1 wash	RT
Auto wash	1	1 wash	RT
Auto hematoxylin	1	1 min	RT
Distilled water wash	2	1 wash	RT
IX immuno/DNA buffer	1	1 wash	RT
Distilled water wash	2	1 wash	RT

RT: Room temperature.

2분간 부치고 15~30초간 cooling, 105℃ 2분 부치 15~30초 cooling, 105℃ 30초 부치 1분 cooling, 95℃ 30초 부치 2분 cooling, 85℃ 30초 부치 3분 cooling, 85℃ 30초 부

치 4분 cooling 시켰고, 비특이적으로 결합한 probe를 제거할 목적으로 Post Hybe Wash(2× SSC, Research Genetics 750125)로 5초간 4회 수세후 Auto Blocker(Research Genetics 750110)로 2회 수세하여 내인성 peroxidase을 억제하였다.

4) Detection : Streptoavidin-alkaline phosphatase Detection System(Research Genetics 750144)를 이용하여 50℃ 15분간 부치시킴으로써 tissue target의 바이러스 RNA와 hybridization이 된 biotinylated probe와 결합하도록 하였다. 이는 biotin와 streptoavidin의 강한 결합력을 이용한 것이다.

5) Chromogen : Chromogen을 반응시키기 전에 alkaline-phosphatase의 역가를 증대시키기 위해 Probe Lock (Chromogen Enhancer, Research Genetics 750148)을 처치하였고 alkaline-phosphatase에 대한 발색제는 적색을 나타내는 Stable Fast TR salt/Naphthol Phosphate(Research Genetics 750152)를 50℃에서 10분씩 2회 반응시킴으로써 양성반응을 강하게 나타내도록 하였고 Auto Wash (Research Genetics 750108)로 2회 수세하여 조직염색과정 중의 모든 시약을 완전히 수세하였다.

6) Counterstain : 적색으로 염색된 양성반응을 확인하기 위하여 Auto Hematoxylin(Research Genetics 750107)으로 대조염색하여 증류수로 4번 수세하였으며 1× Immuno/DNA buffer로 1회 수세한 후 다시 증류수에 2번 수세하였고 조직이 건조되지 않도록 하여 Crystal/Mount (biomeda M-02)를 2~3방울 떨어뜨려 봉입하고 광학현미경으로 검경하였다.

결 과

In situ hybridization에 의한 조직내 EMC viral RNA의 검출 : *In situ* hybridization(ISH)을 이용한 돼지 뇌심근염의 진단을 확립하기 위해 돼지 뇌심근염의 국내 발병중례에서 분리된 바이러스주인 K₃로부터 biotin 이 표지된 cDNA probe를 이용하여 뇌심근염에 자연감염된 돼지 조직의 파라핀 조직절편내에서 ISH를 실시한 결과 심장에서는 심외막과 심내막 부위의 심근섬유 세포질내에 적색의 강한 양성반응이 나타났으며 심외막의 경우 심외막을 따라 양성반응이 고르게 나타나는 반면 심내막쪽은 국소적인 양성반응이 관찰되었다(Fig 1, 2). 소뇌에서도 양성반응이 관찰되었으며(Fig 3, 4) 신장에

서는 피질부위와 수질부위의 세뇨관 상피세포에서 강한 양성반응이 나타났는데 피질부위에서는 강한 양성이 피질 전반에 걸쳐 세뇨관 상피세포의 세포질내에 고르게 나타났으며 수질부위에서는 국소적으로 세뇨관 상피세포의 세포질내에 강한 양성반응이 관찰되었다(Fig 5, 6). 누선에서는 소엽 선방세포의 세포질내에 양성반응이 미만성 또는 국소적으로 관찰되었다(Fig 7, 8). 폐, 비장 등 다른 실질장기 및 조직에서는 음성반응을 나타냈다.

고 찰

국내에서 자연발생한 돼지 뇌심근염 증례의 유산 태아와 미이라 태아에서 분리된 돼지 뇌심근염 바이러스주 EMC K₃의 cDNA probe에^{37,42} biotin을 표지하여 뇌심근염에 자연감염된 돼지 조직의 포르말린 고정, 파라핀 절편에서 뇌심근염 바이러스 핵산 검출을 위해 *in situ* hybridization(ISH)을 실시하였다. ISH는 최근 분자생물학의 발달과 함께 진단 병리분야에 도입되기 시작하여 각광을 받고 있는 기법인데 핵산 hybridization 기법을 조직 형태학에 도입한 것으로 핵산 probe를 이용 세포나 조직 중에 존재하는 DNA나 RNA를 검출하는 기법으로 감염성 질병중 특히 바이러스 질병에 많이 이용되고 있다^{42-45,47}.

현재 ISH에 사용되고 있는 probe는 cDNA probe(nick translated probe), RNA probe 그리고 oligonucleotide probe의 3가지가 있는데 RNA probe는 ISH에 이용되는 시약이나 검체중에 ribonuclease가 있어 DNA에 비해 불안정한 단점이 있고⁴⁸, 20~50bp(base pairs)의 oligoprobe는 probe의 길이가 짧기 때문에 조직을 잘 투과할 수 있어 높은 민감성을 나타내는 반면 비특이적인 결합을 일으킬 수 있는 단점이 있다⁴³. cDNA probe는 크기가 대개 100~400bp 정도로 조직내 complement target nucleic acid와 hybridization이 잘되기 때문에 현재 cDNA probe를 많이 사용하고 있다⁴³. 또한 probe의 표지는 현재 동위원소나 biotin, digoxigenin 등을 이용하는데 방사선 동위원소로는 S³⁵, P³²를 가장 많이 이용하고 있다^{42,47,48}. 하지만 동위원소는 취급하는데 주의를 요하고 폐기물의 처리 등에 따른 여러가지 문제점 그리고 무엇보다도 검사시간이 오래 걸리기 때문에 방사선 동위원소를 표지한 probe를 신속한 검사를 요하는 임상검사에 이용하기에는 어려움이 있다. 본 실험에서는 plasmid pUC 19내에 cloning된 EMCV-

cDNA fragment(392bp)를 restriction enzyme인 EcoRI로 절단하여 1% agarose gel 상에서 분리한 다음 biotin-14-dATP로 표지한 cDNA probe를 사용하였고 MciroProbe™ capillary action system을 이용함으로써 기존의 바이러스 동정이 수일 내지 일주일 정도 소요되었음에 비해 1~2시간이라는 비교적 짧은 시간에 신속한 실험을 수행한 결과 감염 세포의 세포질내에 EMC 바이러스 존재를 나타내는 적색의 양성반응을 관찰할 수 있어서 앞으로 돼지 뇌심근염의 진단에 중요한 수단으로 활용될 수 있을 것이다.

In situ hybridization에 이용할 수 있는 검체는 조직배양 세포, 냉동조직 절편 그리고 파라핀 절편 등이다. 생검조직의 고정은 포르말린, 에탄올과 초산의 혼합액, B₅, Bouin씨액 등에 일정시간 고정시킨 후 통상적인 방법에 따라 파라핀 블록을 만들어 5~10µm의 파라핀 절편을 제작, 이용한다. 파라핀 절편은 젤라틴, Poly-L-lysine 그리고 Elmer's glue 등으로 처리한 유리 slide에 부착하여 실험도중 조직이 떨어지는 것을 방지하는데⁴³ 본 실험에서는 ProbeOn™ Plus slide를 사용하여 조직절편이 완전히 부착되어 실험도중 떨어져 나가지 않음으로써 훌륭히 실험을 수행할 수 있었다. 또한 검체물은 포르말린에 고정하여 장기간 보관된 조직을 파라핀 포매하여 이용한 경우와 완충 포르말린에 고정된 후 바로 파라핀 블록을 제작했던 경우를 실험에 사용하였는데 포르말린에 장기간 보존하여 파라핀 블록을 제작한 경우보다 포르말린 고정후 바로 파라핀 블록을 제작한 경우에는 좋은 결과를 얻을 수 있었으며 제작된지 오래된 파라핀 포매조직을 이용함으로써 retrospective study도 가능한 실험을 수행할 수 있는 기초를 마련하였다. 본 실험에 사용한 검출계와 발색계는 biotin(vitamine H)과 streptoavidin 사이의 강한 결합력을 이용하여 complement target과 결합한 biotinylated probe를 검출할 목적으로 avidin-alkaline phosphatase를 검출계(detection system)로 이용하였는데 *in situ* hybridization의 검출계는 alkaline phosphatase가 peroxidase에 비하여 양성반응을 더 민감하게 검출하며 alkaline phosphatase에 대한 발색계는 적색을 나타내는 Fast red TR를 사용하여 훌륭한 시각적 효과를 얻을 수 있었다.

Cronin *et al*³⁸은 S³⁵를 표지한 single-stranded RNA probe를 이용한 ISH를 통해 뇌심근염 바이러스를 감염시킨 마우스의 심근 및 근육조직의 세포질내에 양성반응을 확인하였으며 조 등³⁷도 뇌심근염 바이러스를 실험적으

로 뇌심근염 바이러스를 감염시킨 자돈에서 면역조직학적 염색을 통해 심장의 괴사병변 주위 심근섬유 세포질 내 산재성으로 양성반응을 검출한 바 있다. 본 실험에서도 심근섬유 세포질내에 강한 양성반응을 보임으로써 일치되는 소견을 보였으며 또한 신장의 피질부에 있는 세뇨관 상피세포 및 혈관내피세포의 세포질내에 강한 양성반응을 나타내었는데 이는 김⁴²이 뇌심근염 바이러스 실험접종 마우스 신장에 P³²-labeled probe을 이용 *in situ* hybridization을 실시한 결과와 일치하였다. 또한 누선에서도 강한 양성반응을 보여 누선에서 나타나는 병리조직학적 소견에 따른 바이러스 감염사실을 뒷받침할 수 있었다.

이상, 돼지 뇌심근염 바이러스에 자연감염된 돼지 조직의 포르말린 고정, 파라핀 절편에 MicroProbeTM capillary action system을 이용하여 1~2시간이라는 빠른 시간내에 조직내 바이러스 핵산을 검출함으로써 바이러스나 세균감염을 유발하는 병원체의 확진이 가능하였으며 신속한 검사를 요하는 임상병리검사에 쉽게 이용할 수 있는 기초를 마련하였고 파라핀 블록을 이용하는 실험을 통해 retrospective study도 가능하리라 생각된다.

결 론

돼지 뇌심근염의 국내 발병증례에서 분리된 K₃의 cDNA probe에 biotin를 표지한 nick translated probe를 제작하여 뇌심근염 자연감염 돼지 조직의 포르말린 고정, 파라핀 절편조직에 MicroProbeTM capillary action system을 이용 1~2시간내 *in situ* hybridization을 수행하였던 바 다음과 같은 결론을 내렸다.

1. 뇌, 심장, 신장, 누선 등 감염장기의 세포질내에 뇌심근염 바이러스의 존재를 나타내는 적색의 강한 양성반응을 관찰함으로써 조직내 바이러스 핵산을 검출할 수 있었다.

2. 폐, 비장 등의 기타 장기에서는 음성의 결과를 얻었다.

이상의 결과 biotin을 표지한 cDNA probe를 이용하여 1~2시간내 *in situ* hybridization를 수행함으로써 빠른 시간내 돼지 뇌심근염을 확진할 수 있는 분자생물학적 기법을 확립하였다.

Legends for figures

Fig 1. Viral persistence in the heart by *in situ* hybridization showing multiple areas of marked positive signal. × 100.

Fig 2. High power view of heart showing marked positive signal. indicating the presence of EMC-Viral nucleic acid. × 200.

Fig 3. Viral persistence in the brain by *in situ* hybridization. × 100.

Fig 4. High power view of brain showing marked positive signal.

Fig 5. Viral persistence in the kidney by *in situ* hybridization. Kidney shows multiple areas of positive signal. × 200.

Fig 6. High power view of kidney showing marked positive signal. indicating the presence of EMC-Viral nucleic acid. × 400.

Fig 7. Viral persistence in the lacrimal gland by *in situ* hybridization. × 100.

Fig 8. High power view of lacrimal gland showing marked positive signal. × 400.

참 고 문 헌

1. Acland HM. *Encephalomyocarditis virus*. In : Pensaert MB, ed. *Virus of infections of vertebrates. II. Virus infections of porcine*. Amsterdam : Elsevier Science Publishers, 259-264, 1989.
2. Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, et al. Encephalomyocarditis virus in *Diseases of swine*. 6th ed. Iowa State Univ Press, 257-262, 1992.
3. Putnak JR, Philips BA. Picornaviral structure and assembly. *Mirobiol Rev*, 45:287-315, 1981.
4. Black DN, Stephenson P, Rowland DJ, Brown R. Sequence and location of the poly C tract in aphto and cardiovirus RNA. *Nucleic Acids Rev*, 6:2381-2390, 1979.
5. Murnane TG, Craighead JE, Mondragon H, et al. Fatal disease of swine due to encephalomyocarditis virus. *Science*, 131:498-499, 1960.
6. Gainer JH, Sandefur JR, Bigler WJ. *High mortality in a Florida swine herd infected with the encephalomyocarditis virus : An accompanying epizootiologic survey*, *Cornell Vet*, 58:31-47, 1967.
7. Acland HM, Littlejohns IR. Encephalomyocarditis virus infection of pigs : An outbreak in New South Wales. *Aust Vet J*, 51:409-415, 1975.
8. Love RJ, Grewal AS. Reproductive failure in pigs caused by encephalomyocarditis virus. *Aust Vet J*, 63:128-129, 1986.
9. Mercy AR, Peet RL, Ellis TM, et al. Encephalomyocarditis virus infection in pigs. *Aust Vet J*, 65:355, 1988.
10. Sutherland RJ, Horner GW, Hunter R, et al. An outbreak of viral encephalomyocarditis in pigs. *NZ Vet J*, 25:225, 1977.
11. Williams MC. Encephalomyocarditis virus infection. *J South Afr Vet Assoc*, 52:76, 1981.
12. Sanford SE, Derbyshire JB, Josephson GKA. Serological evidence of encephalomyocarditis virus in pig in Ontario. *Can Vet J*, 26:228, 1985.
13. Sanford SE, Rehmtulla AJ, Josephson GKA. Encephalomyocarditis virus outbreak among suckling pigs. *Can Vet J*, 30:178, 1989.
14. Sanger DV, Rowlands DJ, Brown F. Encephalomyocarditis virus antibodies in sera from apparently normal pigs. *Vet Rec*, 100:240-241, 1977.
15. Littlejohns IR. Encephalomyocarditis virus from stillborn pigs. *Aust Vet J*, 61:93, 1984.
16. Warren J. *Encephalomyocarditis viruses*. In : F.L. Horsfall and I. Tamm(Eds.), *Viral and rickettsial infections of man*, 4th ed, JB, Lippincott Company, 562-568, 1965.
17. Gajdusek DC. Encephalomyocarditis virus infection in childhood. *Pediatrics*, 16:902-906, 1955.
18. Tesh RB. The prevalence of encephalomyocarditis virus neutralizing antibodies among various human populations. *Am J Trop Med Hyg*, 27:144-149, 1978.
19. Helwing FC, Schmidt ECH. A filter passing agent producing interstitial myocarditis in anthropoid apes and small animals. *Science*, 102:31-33, 1945.
20. Simpson CF, Lewis AL, Gaskin JM. Encephalomyocarditis virus infection captive elephants. *J Am Vet Med Assoc*, 171:902-905, 1977.
21. Kilham H, Mason P, Davies JNP. Host-virus relation in encephalomyocarditis(EMC) virus infection II. Myocarditis in Mongoose. *Am J Trop Med*, 5:655-663, 1956.
22. Tesh RB, Wallance GD. Observation on the natural history of encephalomyocarditis virus. *Am J Trop Med Hyg*, 27:133-143, 1977.
23. Jonkers AH. Serosurvey of encephalomyocarditis virus neutralizing antibody in Southern Louisiana and Peruvian indian populations. *Am J Trop Med Hyg*, 10:593-599, 1961.
24. Craighead JE, Maclane MF. Diabetes mellitus induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science*, 162: 913-914, 1968.
25. Doi K, Matsuzaki H, Tsuda T, et al. Rapid development of renal lesion in diabetic DBA mice infected with the D variant of the encephalomyocarditis virus (EMC-D). *Br J Exp Pathol*, 70:275-281, 1989.
26. Yoon JW, Onodera J, Notkins AL. Virus-induced mel-

- litus : V III. Passage of encephalomyocarditis virus resistant strains of mice. *J Gen Virol*, 37:225-232, 1977.
27. Yoon JW, Notkins AL. Virus-induced diabetes in mice. *Metabolism*, 32(suppl):37-40, 1983.
 28. Matsuzaki H, Doi K, Doi C, *et al*. Susceptibility of four species of small rodent to encephalomyocarditis (EMC) virus. *Exp Anim*, 38:357-361, 1989.
 29. Matsuzaki H, Doi K, Mitsuoka T, *et al*. Experimental encephalomyocarditis virus infection in Mogolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet Pathol*, 26:11-17, 1989.
 30. Sugawara G, Hirasawa K, Takeda M, *et al*. Acute infection of encephalomyocarditis(EMC) virus in syrian Hamsters. *J Vet Med Sci*, 53:463-468, 1991.
 31. Hill BD, Ketterer PJ, Rodwell BJ, *et al*. Encephalomyocarditis virus infection and pig disease in Queensland. *Aust Vet J*, 62:433-434, 1985.
 32. Joo HS, Kim HS, Leman AD. Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified of stillborn pig. *Arch Virol*, 100:131-134, 1988.
 33. Littlejohns IR. Encephalomyocarditis virus from stillborn pig. *Aust Vet J*, 61:93, 1984.
 34. Kim HS, Christianson WT, Joo HS. Pathologic properties of encephalomyocarditis virus isolates in swine fetuses. *Arch Virol*, 109:51-57, 1989.
 35. Kim HS, Joo HS, Bergeland ME. Serologic, Virologic and histopathologic observations of encephalomyocarditis virus infection in mummified and stillborn pigs. *J Vet Diagn Invest*, 1:101-104, 1989.
 36. 박남용, 정치영, 이창영 등. 번식장애를 수반한 돼지의 뇌심근염 바이러스 감염증. *대한수의학회지*, 30(4):441-446, 1990.
 37. 하용공, 박남용, 이봉주 등. 돼지 뇌심근염 바이러스의 분리배양. *대한수의학회지*, 31(4):479-484, 1991.
 38. 기혜영. 국내에서 분리된 돼지 뇌심근염 바이러스 접종 마우스의 병리학적 소견. 전남대학교 대학원 석사학위논문, 1-28, 1992.
 39. 박남용. 돼지 뇌심근염 바이러스의 실험적 감염에 의한 병리학적 관찰. *대한수의학회지*, 28:726-735, 1992.
 40. 윤원기, 조성환. 국내 분리 encephalomyocarditis virus의 실험적 감염 Syrian hamster에 대한 병리학적 및 면역조직학적 연구. *대한수의학회지*, 34(2):349-359, 1994.
 41. 조성환, 주한수, 김현수. 뇌심근염 바이러스의 실험적 감염자돈에 대한 병리학적 소견과 바이러스 항원의 면역조직학적 검출. *대한수의학회지*, 32(2):301-308, 1993.
 42. 김원용. Encephalomyocarditis virus의 유전자 클로닝 및 cDNA probe hybridization : 서울대학교 대학원 박사학위논문, 1-93, 1992.
 43. Park CS. *The future of Biotechnology in diagnostic pathology*. manual. Chonnam Univ Med School. 1992: 1-52.
 44. Hasse AT, *et al*. Measles virus nucleotide sequences : detection by *in situ* hybridization. *Science*, 212:672-674. 1981.
 45. Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, *et al*. Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin embedded tissue sections using biotin-labelled hybridization probes. *Virology*, 126:32-50, 1983.
 46. Baltimore D. Expression of animal virus genome. *Bacteriol Rev*, 35:235-241, 1971.
 47. Angerer LM, Stoler MH, Angerer RC. *In situ* Hybridization with RNA Probes ; and automated recipe. New York ; Oxford University press, 1987.
 48. Cromin ME, Love LA, Miller FW, *et al*. The natural history of encephalomyocarditis virus-induced myositis and myocarditis in mice ; Viral persistence demonstrated by *in situ* hybridization. *J Exp Med*, 168: 1639-1648, 1988.
 49. 김순복, 서정향, 문운경. *In situ* hybridization 조직화학을 이용한 오제스키 바이러스 동정. *대한수의학회지*, 34(2):327-333, 1994.
 50. Moench TR, Gendelman HE, Clements JE, *et al*. Efficiency of *in situ* hybridization as a function of probe size and fixation technique. *J Virol*, 11:119, 1985.