

In situ Hybridization에 의한 토끼 출혈증(rabbit haemorrhagic disease)의 신속·간편한 진단

박남용 · 조호성 · 조경오 · 김상집 · 박형선
전남대학교 수의과대학 수의병리학교실

Rapid and Easy Diagnosis of Rabbit Haemorrhagic Disease by *In Situ* Hybridization

Nam-Yong Park, Ho-Seong Cho, Kyoung-Oh Cho, Sang-Jip Kim and Hyung Seon Park
Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

Abstract: Recently various molecular diagnostic techniques have been used to identify rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), a causative agent responsible for acute hepatitis and disseminated intravascular coagulation in rabbit. But they were hard to perform and time consuming. To detect RHDV in a rapid and easy way, we developed biotinylated oligonucleotide probe within ORF 1 region encoding the polyprotein of RHDV in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues from various tissues of 20 rabbits naturally infected with RHDV. Our *in situ* hybridization (ISH) was quickly carried out within two hours by MicroProbe capillary action system. The ISH produced a positive reaction in liver, kidney and lung. In conclusion, ISH with a biotinylated oligonucleotide probe provided a useful diagnostic method for detecting RHDV.

Key words: rabbit, rabbit haemorrhagic disease, *in situ* hybridization

서 론

토끼 출혈증(Rabbit hemorrhagic disease; RHD)은 토끼의 바이러스성 질병으로서 고열, 의기소침, 괴성, 발작 및 비출혈을 수반하거나 임상증상이 없이 폐사하는 치명적인 급성 열성 전염병이다.¹ 1984년 중국에서 처음 발생한 이래 많은 나라에서 발생이 보고되었으며 우리나라에서는 경기와 강원지역에 걸쳐 1985년 이후 발생되고 있다.^{1,4}

처음 본 질병의 원인에 대해서 많은 논란이 있었으나 전자현미경적 소견과 물리화학적, 분자생물학적 방법들을 통해 RHD 바이러스는 현재 칼리시바이러스과로 분류되었으며 7437 nucleotides로 구성된 positive single-stranded RNA virus이다.⁵⁻⁶

RHD의 주요병리 소견은 기관지의 심한 울혈 및 출혈, 간의 미만성 괴사와 폐, 심장, 비장 및 신장 등의 출혈성 손상 등이다. 이 질병의 전파는 감염된 토끼가 종토로 분양되거나 상거래로 이동될 때에 이루어지는데^{4,7,8} 토끼의 사양관리 불량 등으로 건강상태가 나빠지거나, 털깎기 및 수송과 같은 각종 스트레스가 있는 가운데 본 질병의 병원체가 양토가의 상호방문, 털 깎는 사람의 양토장 순방 작업, 토끼털의 유통과정인 국제간의 무역거래로 신속하게 전파되는 것은 불가피한 현실이다.⁴

RHD 진단 방법으로써 기존의 임상소견 및 병리조직학적 관

찰 외에 전자현미경적 관찰, 혈청학적검사인 HA, ELISA법과 바이러스의 분리·동정을 통한 확인 등이 있다.⁹⁻¹² 그러나, 이러한 방법의 수행은 진단에 신속하게 응용되기에는 어려운 점이 있다. 따라서, 최근 분자생물학적 기법을 이용한 PCR법과 *In situ* hybridization (ISH)을 이용한 RHD 바이러스의 검출을 시도한 문헌이 보고되었다.^{13,14} 그러나, PCR 기법은 바이러스 유전자를 증폭하기 때문에 소수의 바이러스가 존재할 때도 진단이 가능하지만 실험과정 중 오염 여부에 따라 결과에 많은 영향을 줄 뿐 아니라 조직 내에서 바이러스 분포 등은 알기 어려운 단점이 있다. 이런 단점을 보완하면서 병리조직학적 검사와 병용하여 진단할 수 있는 것이 ISH 기법이다. 이 ISH는 병리조직실험에서 일상적으로 실시하는 포르말린 고정 후 파라핀 포매된 조직절편을 가지고 실험할 수 있으며 조직이나 세포내에 바이러스의 분포를 알 수 있어 정성, 정량적 분석도 가능하다.¹⁴ 하지만 통상적인 ISH 기법은 2일 이상 소요되는 단점이 있다.¹⁴

따라서 기존의 ISH 방법을 보완 개선하여 2시간 이내에 조직내의 바이러스 유전자를 검출할 수 있는 MicroProbe™ capillary action system (Fisher BiotechR)을 RHD 바이러스의 검출에 적용하여 신속·정확한 진단법을 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

1987년 부터 1993년까지 전남대학교 수의과대학 병리학교실에 병성 감염이 의뢰되어 임상 증상 및 병리조직학적 소견상 RHD로 진단되었던 20 증례들의 포르말린 고정조직을 이용하였다.

In situ hybridization을 위한 조직 준비

10% 중성 포르말린에 고정된 토끼의 기관, 폐, 간, 신장, 심장, 소장, 부신 등의 각종 장기를 파라핀 포매하여 5 μ m로 박절한 다음 조직절편을 ProbeOn™ plus slide (Fisher BiotechR, USA)에 부착하여 실험에 이용하였다.

Oligonucleotide probe 제작 및 biotin 표지

Probe는 RHDV의 genome 가운데 multalin 프로그램(<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)을 이용하여 strain 간에 상동성이 높으며 특이성이 높은 부위인 ORF 1 부위의 polyprotein을 코딩하는 염기서열을 결정하였다. Oligonucleotide probe (5'-CCA GTG GAC GCC TAT GGA ACC CTG GTC AGG ACC CTC ACC GGG GCT GCT ACT TTT TCA GAC GAC CCG GTT TCC ACA ACA ATC ATC TGT TCC AAC TGC ACA A-3')는 5'말단에 biotin을 표지하였다 (Bioneer, Korea).

In situ hybridization

In situ hybridization의 모든 과정은 MicroProbe™ capillary action system (Fisher BiotechR)을 이용하여 수행하였다(Table 1). 이 과정은 slide를 맞대어 생기는 틈에 시약이 스며들고 제거되는 원리인 모세관 현상을 이용한 것으로 Brigati et al.¹⁵의 방법에 준하여 수행하였다.

Deparaffinization

Histochoice™ clearing agent (AmrescoR)를 사용하여 110°C에서 2분간 반응시키는 과정을 5회 반복하고 100% 에탄올에서 3번씩 2회 세척하여, dewaxing agent를 제거하고 탈수시켰다.

Enzyme predigestion

조직절편내로 probe의 투과성을 증가시키고 핵산을 노출시키기 위하여 단백분해 효소인 pepsin (Research Genetics)을 첨가하여 110°C에서 2분 30초간 반응시켰다.

Heat denaturation and hybridization

조직 절편내 viral RNA를 변성시키기 위해 Prehybe Plus (Research Genetics)를 110°C에서 3분간 반응시킨 후, 계속하여 biotinylated oligonucleotide probe를 적용하여 110°C에서 1분간 반응시키고, 15-30초간 냉각시킨 다음 105°C 2분 반응 15-30초간 냉각, 105°C 30초 반응 1분간 냉각, 95°C 30초 반응 2분 냉각, 85°C 30초 반응 3분 냉각, 85°C 30초 반응 4분

Table 1. Procedure of *in situ* hybridization for the detection of rabbit haemorrhagic disease virus

step	reagent	cycle	time	temp
Deparaffinization	Dewaxingagent	5	2 min	110°C
Dehydration	Auto Alcohol	10	1 wash	RT*
Protein Digestion	Pepsin	1	2 min	110°C
Probe Enhance	Prehybe Plus	1	3 min	110°C
	Probe/Tissue	1	1 min	110°C
		1	15-30 sec	RT
	Probe/Tissue	1	2 min	105°C
		1	15-30 sec	RT
	Probe/Tissue	1	30 sec	105°C
Denaturation		1	1 min	RT
Hybridization	Probe/Tissue	1	30 sec	95°C
		1	2 min	RT
	Probe/Tissue	1	30 sec	85°C
		1	3 min	RT
	Probe/Tissue	1	30 sec	85°C
		1	4 min	RT
Washing	2 X SSC	4	5 sec	RT
Peroxidase Inhibition	Auto Blocker	1	2 min	50°C
Washing	2 X SSC	4	5 sec	RT
Detection	STREP-AP	1	10 min	50°C
Chromogen Enhancer	Probe Lock	1	1 wash	RT
Chromogen	Stable fast TR/NP	2	10 min	50°C
Washing	Auto Wash	2	1 wash	RT
Counterstain	Auto Hematoxylin	1	1 min	RT
Washing	Distilled water	2	1 wash	RT
Buffering	Immuno/DNA buffer	1	1 wash	RT
Washing	Distilled water	2	1 wash	RT

*RT: Room temperature

동안 냉각시키는 일련의 과정을 반복하여 probe가 조직중의 표적 핵산에 결합하도록 하였다. 결합하지 않은 probe를 제거하기 위하여 PostHybe Wash (2X SSC, Research Genetics) 액으로 5초간 4회 세척하고, 내인성 peroxidase를 억제하기 위하여 Auto Blocker (Research Genetics)로 2회 수세하였다.

Detection

Streptoavidin-alkaline phosphatase detection kit (Research Genetics)을 이용하여 50°C에서 10분간 반응시킴으로써 streptoavidin phosphatase가 조직내에 존재하는 RHD 바이러스의 RNA와 융합된 biotinylated probe에 상호 결합을 이루도록 하였다.

Chromogen

Chromogen을 반응시키기 전에 alkaline-phosphatase의 역가

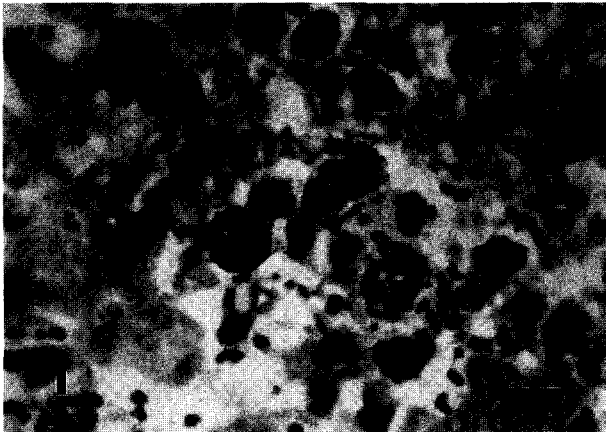


Fig. 1. Liver; rabbit. Red positive signals are detected in the cytoplasm of hepatocyte. ISH. Bar=35 μ m.

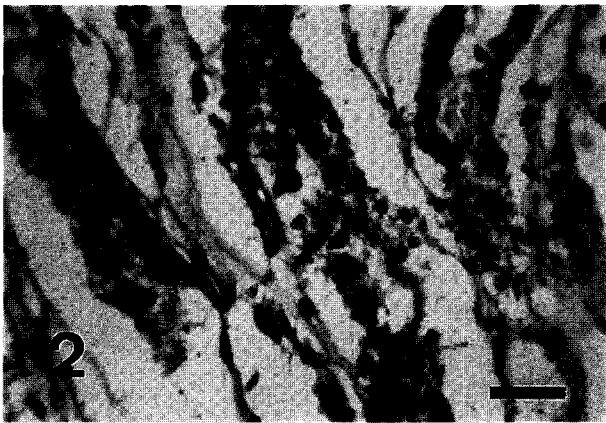


Fig. 2. Kidney; rabbit. Red positive signals are observed in the cytoplasm of renal tubular epithelium. ISH. Meyer's hematoxylin counter stain. Bar=35 μ m.

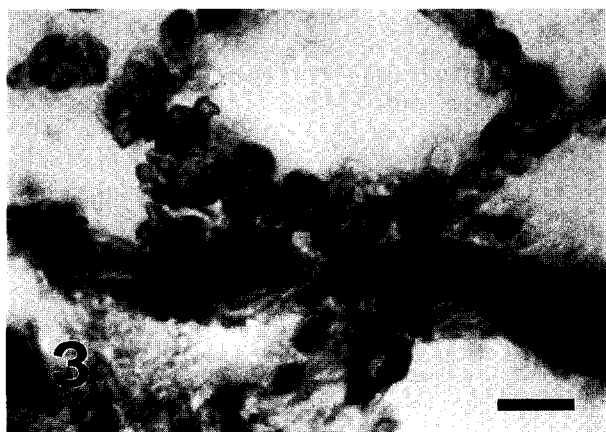


Fig. 3. Lung; rabbit. Red positive signals are found in the cytoplasm of alveolar macrophage. ISH. Meyer's hematoxylin counter stain. Bar=15 μ m.

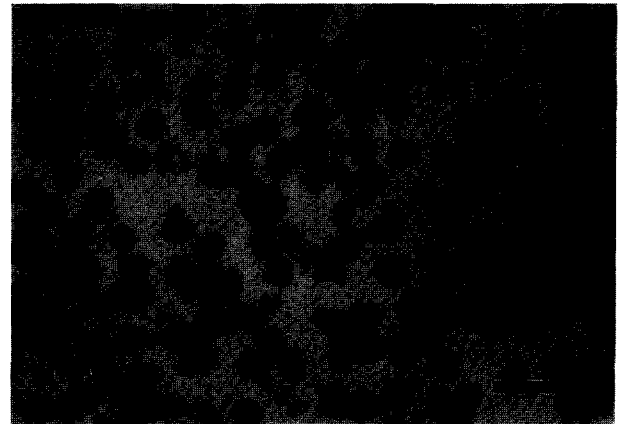


Fig. 4. Lymph node; rabbit. Alu positive control. Red positive signals for Alu gene are visible in the nucleus of mononuclear cell of lymph node. ISH. Meyer's hematoxylin counter stain. Bar=35 μ m.

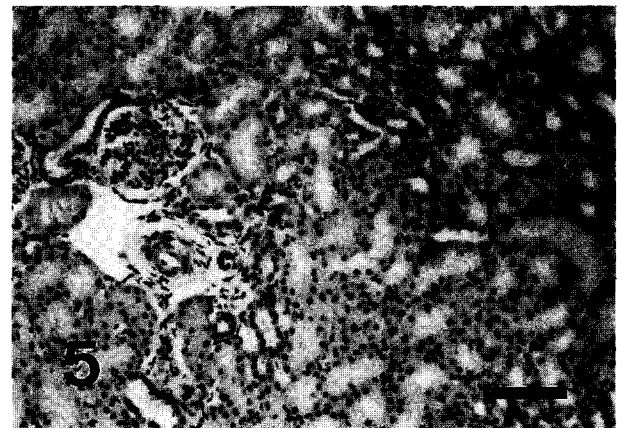


Fig. 5. Kidney; rabbit. Mock-infected kidney as a negative control. ISH. Meyer's hematoxylin counter stain. Bar=60 μ m.

발색제로 Red signal을 나타내는 stable Fast TR salt/ Naphthol Phosphate (Research Genetics)를 50°C에서 10분씩 2회 반응시킴으로써 양성 반응을 강하게 나타내도록 하였다. 이 후 Auto Wash (Research Genetics 750108)로 2회 수세하여 실험과정 중 남아있던 모든 시약을 완전히 세척 하였다.

Counterstain

적색으로 염색된 양성 반응을 확인하기 위하여 auto hematoxylin (Research Genetics)으로 대조 염색하여 증류수로 4번 수세하였으며 1X Immuno/DNA buffer로 1회 수세한 후 다시 증류수에 2번 수세하였고 조직이 건조되지 않도록 하여 Crystal/Mount(Biomedica M-02)를 2-3방울 떨어뜨려 마운팅한 뒤 광학현미경으로 관찰하였다.

Control

양성 대조군으로는 포유동물의 공통 유전자에 해당되는 부위에 상보적인 Alu I/II mix probe를 사용하였고, 또한 본 실험실에 의뢰된 가검물중 RHDV의 분리 및 동정에 의해 확진

를 증대시키기 위해 Probe Lock (Chromogen Enhancer, Research Genetics)을 처리하였고 alkaline-phosphatase에 대한

된 토끼의 각 장기를 이용하였으며, 음성 대조군으로는 RHDV에 감염되지 않았던 토끼의 정상조직을 사용하였다.

결 과

Hybridization 조건 확립

최적의 hybridization 조건 확립을 위해 다수의 반복 실험을 실시하였다. 실험의 전체 과정에서 여러 조건들 중 펩신의 반응시간이 실험결과에 가장 중요한 영향을 주었다. 조직이 형태와 염색의 강도를 유지하기 위한 조건을 확립하기 위해 30초 간격으로 5분까지 반응시간을 적용한 바 2분 30초의 pepsin (2 mg/ml)의 반응시간이 가장 적절하였다. 또한 probe의 농도가 실험 결과에 많은 영향을 줄 수 있었는데 동일한 조직에서 probe의 농도가 0.1 ng/μl 인 경우 미약한 양성 반응을 보이기 시작하였으며 가장 적절한 농도는 1-2 ng/μl 이었다.

ISH

실험에 이용된 20마리의 기관, 폐, 간, 신장, 심장, 소장, 부신을 대상으로 ISH를 실시한 결과 간, 신장, 폐를 이용한 경우 전 예에서 강한 양성반응을 보였으며 다른 조직의 경우 음성에서 미약한 양성 반응까지 다양한 결과가 나타났다. 간에서는 간세포의 세포질에서 적색의 양성반응이 관찰되었다(Fig. 1). 대부분의 양성세포는 periportal area와 intermediate zone에서 관찰되었는데 이들 세포는 각저 있으며 핵소체가 뚜렷하였다. 신장에서는 세뇨관 상피세포의 세포질에서 양성반응이 확인되었다(Fig. 2). 또한 폐의 경우 양성반응은 대식세포에서 뚜렷하였다(Fig. 3). 양성 대조군으로 동일개체의 림프절에서 포유동물에 공통적으로 존재하는 Alu gene에 대한 probe를 이용한 결과, 양성반응을 확인함으로써 실험과정이 문제가 없음을 확인하였다(Fig. 4). 또한 음성 대조군으로 RHD 바이러스에 감염되지 않은 토끼의 신장 조직 절편을 이용한 ISH 결과 어떠한 양성반응도 관찰 할 수 없었다(Fig. 5).

고 찰

조직내에서 핵산을 직접 검출할 수 있는 ISH 기법은 probe의 종류, probe 표지방법, probe의 검출 방법 및 단백분해 효소의 전처리 과정등에 따라 다양한 과정으로 변형, 적용되어 바이러스, 세균 같은 병원체 및 유전자의 검색에 널리 이용되고 있다.¹⁶ 그러나 이러한 통상적인 ISH 기법은 2-3일 정도의 시간이 소요되어 동물의 질병을 진단하는 방법으로 적용하기에는 신속성 면에서 많은 단점을 가지고 있다.^{14,16} 따라서 이에 대한 해결 방법으로 적용할 수 있는 방법이 본 연구에서 응용한 MicroProbe™ capillary action system이다. 이 방법은 두장의 슬라이드를 맞대어 모세관현상을 이용한 방법으로 소량의 시약 사용과 함께 반응시간을 단축하여 전체 반응시간을 2시간 이내로 단축할 수 있는 효과적인 기법이다.¹⁷ 따라

서, 본 연구에서는 biotin을 표지한 oligonucleotide probe와 pepsin의 전처리를 통해 2시간 이내에 조직내에서 RHDV를 검출할 수 있는 방법을 확립할 수 있어서 기존의 진단방법 보다 많은 시약과 시간을 절약할 수 있었다.

ISH 기법의 적용에 있어 민감한 조건들로 단백분해 효소의 전처리 과정과 반응에 사용될 probe의 농도를 들 수 있다. 본 연구에서는 이들 조건의 최적화를 위해 다수의 반복 실험을 실시하였다. 핵산의 노출을 증진시킬 목적으로 사용되는 단백분해 효소로 proteinase K, trypsin, pepsin 등을 사용하여 실험에 사용한 결과 pepsin 사용이 본 실험 조건에 적합하였는데 30초 간격으로 5분까지 반응시간을 적용한 바 3분의 pepsin (2 mg/ml) 반응시간이 가장 적절하였다. 또한 probe의 농도가 실험 결과에 많은 영향을 줄 수 있었는데 동일한 조직에서 probe의 농도가 0.1 ng/μl 인 경우 미약한 양성 반응을 보이기 시작하였으며 농도가 1-2 ng/μl 였을 때 가장 적절한 반응을 보이는 것으로 나타났다. 따라서, 본 실험의 조건들은 다른 병원체를 진단할 목적으로 MicroProbe™ capillary action system을 이용하여 ISH를 시도하는 경우, 적절한 조건으로서 제시될 수 있을 것이다.

RHD에서 관찰되는 병리조직학적 소견과 실제 바이러스 복제가 일어나는 부위에 대해 서로 차이가 있다고 여러 학자들이 보고하였다.^{14,18,19} 면역조직학적 연구를 통해 RHD 바이러스의 주요 감염 세포가 간세포이며 또한 바이러스 항원이 비장, 폐의 대식세포에서 검출되었다고 하였다.^{18,19} 또한 최근 RT-PCR 및 ISH를 통한 연구에서 간, 비장, 폐, 신장, 흉선 등에서 바이러스 핵산을 검출하였다고 보고하였다.^{14,20} 이에 본 연구에서는 RHD를 가장 확실하게 진단할 수 있는 기법의 개발에 초점을 두고 감염 토끼의 여러 장기를 실시한 결과, 간, 신장, 폐를 대상으로 MicroProbe™ capillary action system을 이용한 ISH 실시의 경우 100% 양성반응을 확인할 수 있었다. 따라서 병리조직학적 소견상 RHD가 의심되는 경우라면 이들 장기 가운데 최소한의 장기만을 대상으로 하여도 RHD를 확진할 수 있으리라 생각된다.

이상의 조건들을 바탕으로 확립한 ISH 기법은 기존의 방법으로 RHD를 진단하는 것 보다 시간적, 경제적 측면에서 보다 효과적인 진단법이므로 기존의 진단 방법을 대체할만한 매우 신속하고 정확한 진단 기법이라고 할 수 있겠다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(1999-1-222-002-3) 지원으로 일부 수행되었음.

참고문헌

1. Liu SJ, Xue HP, et al. A new viral disease in rabbit. *Ani Husb*

- Vet Med* **16**:253-255, 1984.
2. Gregg DA and House C. Necrotic hepatitis of rabbits in Mexico: a parvovirus. *Vet Rec* **125**:603-604, 1989.
 3. Moussa A, Chasey D, et al. Hemorrhagic disease of lagomorphs: evidence for a calicivirus. *Vet Microbiol* **33**:375-381, 1992.
 4. 박남용. 토끼의 새로운 Virus성 질환 : 출혈성 폐렴. *대한수의사회지* **24**:780-788, 1988.
 5. Ohlinger VF, Haas B, et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit haemorrhagic disease. *J Virol* **64**:3331-3336, 1990.
 6. Libermann H, Bergmann H, et al. Some physicochemical properties of the virus of rabbit haemorrhagic disease. *J Virol Med* **39**:317-326, 1992.
 7. 이치수, 박청규. 앙고라 토끼의 급성 폐사성 질병의 병인학적연구 : 소위 토끼의 바이러스성 급사병. *대한수의학회지* **27**:277-290, 1987.
 8. Wang B.O, Xu YM, et al. Rabbit hemorrhagic disease (RHD) virus induced-acute disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits. *Int'l Symp. RHD* 161-167, 1991.
 9. Xu FN, Chen WF, et al. Pathological studies of RHD. *Int'l Symp. RHD* 180-184, 1991.
 10. 박남용, 정치영, 등. 토끼의 바이러스성 출혈성 폐렴 (잠정명칭) 발생. *대한수의사회지* **23**:603-610, 1987.
 11. 윤인중, 전운성. 토끼 출혈성 바이러스의 병원성, 적혈구응집성 및 물리화학적요인에 대한 영향. *대한수의학회지* **30**:65-71, 1990.
 12. Ohlinger VF, Haas B, et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease. *J Virol* **64**:3331-3336, 1990.
 13. Le Gall-Recule G, Zwingelstein F, et al. Immunocapture-RT-PCR assay for detection and molecular epidemiology studies of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses. *J Virol Methods* **97**:49-57, 2001.
 14. Kimura T, Mitsui I, et al. Distribution of rabbit haemorrhagic disease virus RNA in experimentally infected rabbits. *J Comp Pathol* **124**:134-141, 2001.
 15. Brigati DJ, Myerson D, et al. Detection of viral genome in cultured cells and paraffin embedded tissue section using biotin-labelled hybridization probes. *Virology* **126**:32-50, 1989.
 16. Wilkinson DG. The theory and practice of *in situ* hybridization. In: *In situ* hybridization: A practical approach, ed. Wilkinson DG, 2nd ed., pp.1-23. Oxford University Press, New York, USA, 1999.
 17. 박남용, 이석윤. *In situ* hybridization에 의한 돼지 유행성 설사증의 국내발생 역추적 진단. *대한수의학회지* **37**:809-816, 1997.
 18. Park JH and Itakura C. Detection of rabbit haemorrhagic disease virus antigen in tissues by immunohistochemistry. *Res Vet Sci* **52**:299-306, 1992.
 19. Prieto JM, Fernandez F, et al. Immunohistochemical localisation of rabbit haemorrhagic disease virus VP-60 antigen in early infection of young and adult rabbit. *Res Vet Sci* **68**:181-187, 2000.
 20. Guittre C, Ruvoen-Clouet N, et al. Early stages of rabbit haemorrhagic disease virus infection monitored by polymerase chain reaction. *Zentralbl Veterinarmed* **43**:109-918, 1996.