

Dot blot hybridization에 의한 malignant catarrhal fever virus의 진단법 개발

김옥진*

미국 농무부 동물질병연구소

Development of dot blot hybridization method using non-radio labeled probes for the diagnosis of malignant catarrhal fever

Okjin Kim*

USDA-ARS, Animal Disease Research Unit, WSU, Pullman, WA 99164-6630, USA

Abstract: Malignant catarrhal fever (MCF) is a systemic disease of ruminants caused by a gamma herpesvirus, ovine herpesvirus 2 (OvHV-2). Dot blot hybridization (DBH) protocols for detecting and differentiating this MCF virus were developed. OvHV-2 specific primer pairs, 556/555, were used for the amplification of target DNA. Then, the amplified DNA was labeled with incorporation of digoxigenin (DIG). The Dig-labeled probe was able to detect and differentiate specifically OvHV-2 DNA. This DBH technique can be applied to confirm the presence of MCF virus on clinical samples and to differentiate specifically between OvHV-2 infection and other viral infections.

Key words: dot blot hybridization, malignant catarrhal fever, ovine herpesvirus 2

서 론

Malignant catarrhal fever (MCF)는 gamma herpesvirus인 ovine herpesvirus 2 (OvHV-2)의 감염에 의하여 발생하는 감염병으로서, 반추류에 고열과 점막의 염증 및 전신림파구 증식이 의한 치명적인 임상결과를 초래한다.¹ OvHV-2 감염은 전세계적으로 발생하고 있으며, 자연숙주로 알려져있는 양에서는 증상이 없으나, 바이러스를 분비함으로써, 주변의 다른 반추류에 전염원의 역할을 하는 것으로 추정되고 있다. OvHV-2에 감수성이 있는 반추류로는 소,² 사슴,³ 비스온(bison)⁴ 등이 있으며, 최근에는 돼지에도 감수성이 있다고 보고되었다.⁵ 이들 감수성 동물들에서 OvHV-2 감염증은 경제적으로 심한 손실을 끼치는 것으로 파악되고 있다.⁶ 임상적으로 증상이 유사하여, 진단이 어려운 질병으로는 mucosal disease, infectious bovine rhinotracheitis, foot-and-mouth disease와 rinder pest 등이 있으며, OvHV-2의 병인론적인 진단은 바이러스를 분리하는 방법이 확립되어있지 않고, 항원을 검출하는 방법 또한, 어렵기 때문에 바이러스 핵산을 검출하는 방법에 의존하고 있다.^{7,8} 바이러스 핵산을 검출하는 방법으로는 특이 염기서열을 선택적으로 증폭하여 그 존재를 검출할 수 있는 PCR이 주로 이용되고 있다. 하지만, PCR은 미소량의 바이러스 존재라도 검출할 수 있는 높은 민감도를

가진 방법이지만, 증폭단계에서 미소량의 오염에 의한 의양성이나 비특이반응에 의한 의양성이 발생할 확률이 높기 때문에 때때로 결과의 해석에 어려움을 갖게된다.⁹ 또한, PCR 수행을 위하여는 증합효소와 thermal cycler 등의 고가의 시약과 장비가 필요하다. 한편, 바이러스 핵산을 검출할 수 있는 다른 방법 중의 하나로서, nylon membrane을 이용한 dot blot hybridization (DBH)은 그 과정이 간단하고, 비용이 저렴하며, 높은 특이도를 갖는 방법으로 보고되고 있다.¹⁰

본 연구는 MCF의 진단법으로 이용되고 있는 OvHV-2 핵산 검출을 위한 특이적인 방법으로서, non-radioactive probe를 사용한 DBH 방법을 개발하고자 수행되었다.

재료 및 방법

PCR

DBH의 oligonucleotide probe를 준비하기 위하여 PCR을 이용한 특이 핵산의 증폭은 OvHV-2의 바이러스 핵산 염기서열에 특이적인 primer 556과 primer 555를 사용하였다.¹¹ Primer 556인 5'-AGTCTGGGTATATGAATCCAGATG GCTCTC-3 (Nucleotide position: 121692-121722)과 primer 555 5'-TTCTC GGGTAGTGGCGAGCGAAG GCTTC-3' (Nucleotide position

121484-121510)을 사용하여 PCR을 수행하였다. Primer의 nucleotide position은 alcelaphine herpesvirus 1의 DNA polymerase 염기서열에 기초하였다.¹² PCR을 위한 반응조성물은 1 ug의 template DNA, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 400 uM의 dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche, USA), 20 pmol primer 556 및 555, 5 U Taq DNA polymerase (Roche, USA)가 50 ul의 반응용량에 각각 포함되도록 하였다. Thermal cycler 9700 (Perkin-Elmer, USA)을 이용하여 94°C 5 분간 preheating 과정 후, 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분의 cycle을 40회 실시한 후 72°C 7분의 최종 extension 단계를 거쳐 OvHV-2에 특이 핵산을 증폭하였다. PCR을 수행한 후 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기영동을 한 후 UV에서 238bp 크기의 핵산증폭물의 유무를 확인하였다.

Non-radioactive labeling probe

증폭된 238bp의 OvHV-2 DNA에 non-radioactive 물질인 digoxigenin (DIG)을 표지하여 DBH에 사용될 probe를 준비하였다. 증폭된 OvHV-2 DNA는 Wizard DNA purification system[®] (Promega, USA)을 이용하여 purification하였고, 이후 purification된 핵산증폭물을 10분간 끓인 후 바로 얼음에 식혀 denaturation시키고, Hexanucleotide mixture와 dNTP labeling mixture를 섞은 후, Klenow enzyme을 추가하고 37°C에서 20시간 반응하여, DIG이 임의 표지된 probe를 얻었다. 이 후, 0.2 M EDTA (pH 8.0)를 추가하고, 65°C에서 10분간 가온하여 효소활성을 제거 후, 시험에 사용될 때까지 -20°C에 보관하였다.

Dot blot hybridization

준비된 DIG-labeled probe를 사용하여 OvHV-2를 검출할 수 있는 DBH의 protocol을 개발하였다. 개발된 DBH의 과정은 다음과 같았다. Nylon membrane (Roche, USA)을 시험에 사용 가능한 크기로 자른 후, 검사 재료 DNA 2 ul를 membrane에 적용하고, 샘플이 마르기 전에 tip 끝으로 샘플의 적용 부위 밑을 눌러 위치를 표시한 후, 샘플의 위치를 다른 종이에 적어 기입하였다. 샘플 DNA가 적용된 membrane을 상온의 denaturation buffer에 5분간 적용한 후, 상온의 neutralizing buffer에 5분간 적용하였다. 1% SDS가 함유된 2X SSC buffer로 2분 세척 후, UV cross-linker (Stratagene, USA)를 사용하여, membrane에 DNA를 cross-link 시키고, hybridization buffer가 들어있는 sealing bag에 membrane을 넣은 뒤, DIG-labeled DNA를 적용하고 sealing하여, 50°C에서 overnight으로 반응시켰다. 다음 날, membrane을 1% SDS가 함유된 2X SSC buffer로 상온에서 5분 및 1X SSC로 65°C에서 15분간의 세척 후, 상온의 1X washing buffer로 1분, 상온의 1X blocking buffer

로 30분의 과정을 거쳤다. 이후, membrane을 anti-digoxigenin-AP (Roche, USA)에 반응시키고, alkaline phosphatase의 기질인 NBT/BCIP (Roche, USA)를 섞어 발색시킨 후 샘플 적용한 부위의 암갈색반응 유무를 관찰하였다.

Sensitivity and specificity assay

DBH의 sensitivity를 알아보기 위하여 OvHV-2 DNA를 단계 희석하여 각각을 membrane에 적용 후 DBH를 실시하였다. 적용된 OvHV-2 DNA 샘플들은 각각 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹의 viral copy를 가지고 있었다. DBH의 specificity를 확인하기 위하여 OvHV-2의 핵산과 많은 homology를 가지고 있는 같은 gamma herpesvirus group에 속하는 alcelaphine herpesvirus 1 (AIHV-1), bovine herpesvirus 4 (BHV-4)의 DNA를 추출하여, membrane에 2 ug씩 적용하고, DBH를 실시하여, DIG-labelled probe의 specificity를 확인하였다.

Preparation of clinical samples

개발된 DBH가 실제 MCF의 진단에 이용될 수 있는지를 알아보기 위하여, MCF로 진단된 5마리 소의 조직을 각각 채취하여, 병리조직학적 검사 및 추출된 DNA를 사용하여 DBH를 실시하였다. DNA 추출은 각 동물에서 임파절, 비장, 뇌, 간장, 폐장 및 소장으로부터 각각 소량의 조직을 무균적으로 채취하여 멸균된 PBS에 혼합하여, homogenization한 후, 1000 rpm으로 5분간 원심하고, 상층액 500 ul에 0.2% SDS와 20 mg/ml proteinase K (Roche, USA)를 첨가 후 37°C에서 3시간 반응시키고, phenol/chlorform을 사용하여 단백질을 제거한 후 ethanol 침전과정을 거쳐, DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 100 ul의 DEPC 처리된 증류수로 재 부유하고, OD₂₆₀에서 정량 후 DBH에 사용하였다.

결 과

Sensitivity and specificity of DBH

Non-radioactive probe를 이용한 DBH의 결과, OvHV-2 10⁴ copy의 바이러스 핵산까지 검출할 수 있었다(Fig. 1A). 이들 반응은 바이러스의 양이 많을수록 보다 강한 반응으로 진한 암갈색의 반응 결과물을 관찰할 수 있었다(Fig. 1A). 개발된 DBH의 특이도를 확인하기 위하여, OvHV-2와 같은 gamma herpesvirus group에 속하는 AIHV-1, BHV-4의 바이러스 핵산을 dot blot하여, DBH를 실시한 결과, 시험에 사용된 DIG-labeled probe는 OvHV-2의 핵산에 강한 반응을 보였으나, AIHV-1, BHV-4와는 반응하지 않아, 특이도가 매우 높음을 알 수 있었다.

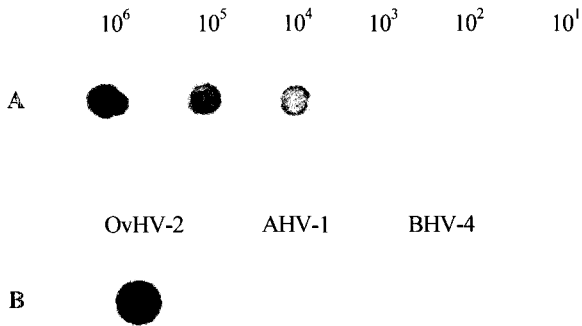


Fig. 1. Sensitivity and Specificity of OvHV-2 probe. Hybridization was performed with digoxigenin-labeled OvHV-2 DNA probe. Hybrids were detected by an antibodyconjugate (anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate) and subsequent enzyme-catalyzed color reaction with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) and nitro blue tetrazolium salt (NBT). A. Sensitivity assay. The detection limitation of OvHV-2 probe was 10^4 viral copies. B. Specificity assay. The OvHV-2 probe was not reacted with other similar gamma herpesviruses-AIHV-1 and BHV-4, but only with OvHV-2 DNA.

Histopathological finding of clinical samples

기발된 DBH가 실제 임상샘플에서 효과적으로 사용될 수 있는지를 알아보기로, MCF로 진단된 5마리 소의 장기로부터 DNA를 추출하여 DBH를 실시하고, 각각의 조직의 병리조직

검사를 실시하였다. 병리조직학적검사 결과 동물에 따라 정도의 차이는 있었으나, 전신 장기에 임파구의 증식 및 침윤(Fig 2A), 혈관염 및 혈관의 섬유소성 괴사(Fig. 2B) 소견이 관찰되었다. 식도, 위, 소장 및 대장 등의 소화기 점막에서는 심한 괴사와 염증세포침윤이 관찰되었다.

Dot blot hybridization of clinical samples

실제 MCF로 진단된 5마리 소의 장기로부터 DNA를 추출하여 DBH를 실시한 결과는 Fig. 3과 같다. 반응에 정도차이는 있으나, 5마리 소로부터 각각 준비된 조직으로부터, OvHV-2에 특이적인 반응을 확인할 수 있었다. 반면, AIHV-1 및 BHV-4와는 반응하지 않아, DBH의 특이도를 확인할 수 있었다.

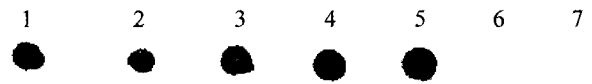


Fig. 3. Detection of OvHV-2 DNAs from clinical samples by dot-blot hybridization. 1, Animal No. 1 tissue mixture extracted DNA; 2, Animal No. 2 tissue mixture extracted DNA; 3, Animal No. 3 tissue mixture extracted DNA; 4, Animal No. 4 tissue mixture extracted DNA; 5, Animal No. 5 tissue mixture extracted DNA; 6, AIHV-1 DNA; 7, BHV-4 DNA

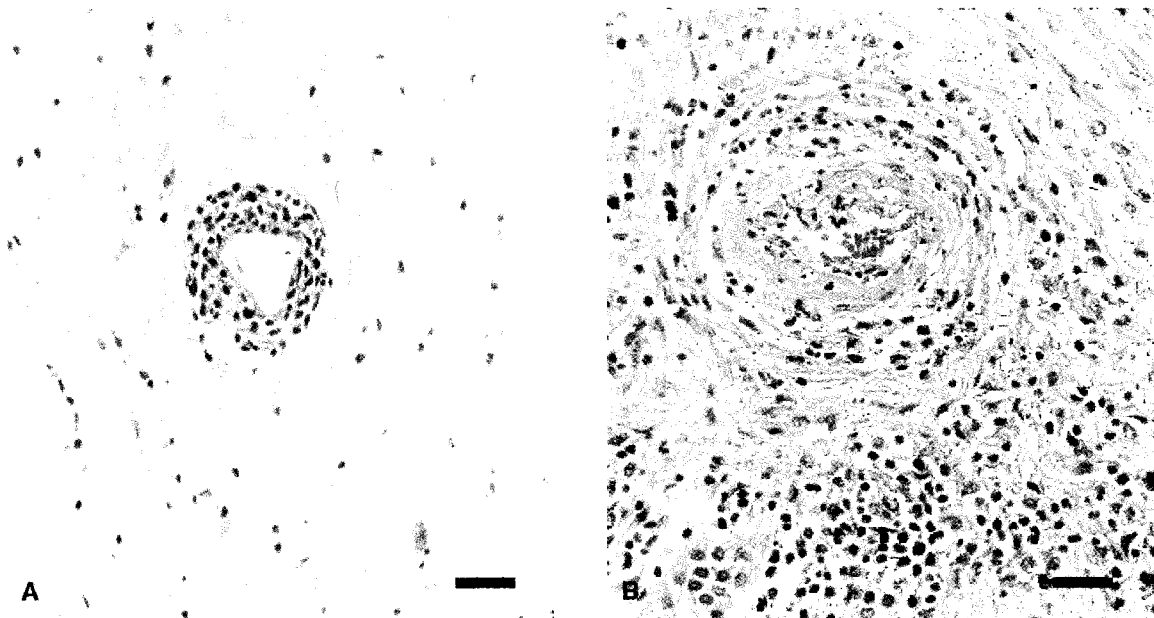


Fig. 2. A. Cerebrum; cow. Cerebrum of animal No. 1. Note a perivascular cuffing. H&E, Bar=80 um. B. Adrenal gland; cow (No. 5). A fibrinoid vascular necrosis and arteritis are observed. H&E, Bar=80 um.

고 찰

MCF는 중요한 급성의 치명적인 임상결과를 초래하는 질병으로, 전세계적으로 발생이 보고되고 있다. 원인 병원체인 OvHV-2는 herpesvirus로서 평생감염증을 유발하기 때문에, 질병을 이겨내어 외관상 건강하게 보이는 동물들은 바이러스의 재활성기에 다른 동물들에 전염을 일으킨다. 따라서, MCF의 정확한 진단을 통한 감염동물의 조기발견은 이 질병의 통제를 위해 가장 중요한 부분이라 할 수 있다.¹³ 현재까지, MCF의 진단은 원인 병원체 OvHV-2 바이러스의 특이핵산을 확인하는 PCR에 의존하여왔다.^{11,13} 그러나, PCR은 증폭과정에서 발생할 수 있는 오염문제 때문에, 진단 영역에서의 사용에는 전 과정의 세심한 주의가 요구되며, 그 수행에 고가의 비용이 소요된다.⁹ 본 연구는 바이러스 핵산 검출에 의존하여야 하는 MCF의 진단법 개발을 위한 일환으로, 간편하게 nylon membrane을 이용하여 직접 hybridization을 수행하는 OvHV-2의 진단법인 DBH를 개발하고자 수행되었다. 바이러스 핵산 검출을 위한 hybridization은 ³²P 또는 ³H 등의 방사선동위원소를 표지한 probe를 사용하여 검사가 많이 수행되지만, 이들 방사선 동위원소는 취급에 따르는 위험과 처리과정에 많은 어려움이 있다.¹⁰ 따라서, 본 연구에서는 non-radioactive probe를 사용한 DBH를 개발하고자 하였다. 개발된 DBH는 non-radioactive digoxigenin을 표지한 probe를 사용하였으며, 시험 결과 특이도가 매우 높아, OvHV-2의 바이러스 핵산과 많은 homology를 가지고있는, 같은 gamma herpesvirus group인 AIHV-1 및 BHV-4의 DNA와 반응하지 않았다. 또한, 실제 MCF로 확인된 임상 샘플에서도 효과적으로 OvHV-2 핵산을 검출하였다. 따라서, 본 연구를 통하여 개발된 OvHV-2의 DBH는 현재 MCF의 진단법으로 유일하게 이용되고 있는 PCR의 여러 문제점들을 해결해줄 수 있는 대안으로 이용될 수 있을 것으로 기대되어진다. 또한, 그 조작이 간편하고, 비용이 저렴하기 때문에 향후 MCF의 진단법으로서 유용하게 사용되어질 수 있을 것으로 판단되어진다.

참고문헌

1. Plowright W. Malignant catarrhal fever virus. *In: Virus Infections of Ruminants*, ed. Dinter Z, Morein B, pp. 123-150. Elsevier, New York, USA, 1990.
2. Bridgen A, Reid HW. Derivation of DNA clone corresponding to the viral agent of sheep-associated malignant catarrhal fever. *Res Vet Sci* **50**:38-44, 1991.
3. Reid HW, Buxton D, et al. Malignant catarrhal fever in Péré-Davids deer. *Vet Rec* **121**: 276-277, 1987.
4. O'Toole D, Li H, et al. Malignant catarrhal fever in a bison (*Bison bison*) feedlot, 1993-2000. *J Vet Diagn Invest* **14**:183-193, 2002.
5. Loken T, Aleksandersen M, et al. Malignant catarrhal fever caused by ovine herpesvirus 2 in pigs in Norway. *Vet Rec* **143**:464-467, 1998.
6. Collery P, Foley A. An outbreak of malignant catarrhal fever in cattle in the Republic of Ireland. *Vet Rec* **139**: 16-17, 1996.
7. Baxter SIF, Pow I, et al. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch Virol* **132**:145-159, 1993.
8. Muller-Dobles UU, Li H, et al. Field validation of laboratory tests for clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. *J Clin Microbiol* **36**:2970-2972, 1998.
9. Taylor GR, Logan WP. The Polymerase chain reaction: new variation and an old theme. *Current Opinion in Biotechnology* **6**:24-29, 1995.
10. Chen Y, Chen Y, et al. Chemiluminescence detection of Epstein-Barr virus DNA with an oligonucleotide probe. *Clinica Chimica Acta* **298**:45-53, 2000.
11. Li H, Shen DT, et al. Investigation of sheep-associated malignant catarrhal fever virus infection in ruminants by PCR and competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **33**:2048-2053, 1995.
12. Ensser A, Pflanz R, et al. Primary structure of the alphaherpesvirus 1 genome. *J Virol* **71**:6517-6525, 1997.
13. Crawford TB, O'Toole D. Malignant catarrhal fever. *In: Current Veterinary Therapy IV: Food Animal Practice*, ed. Howard JL, pp. 306-309. W. B. Saunders, Philadelphia, USA, 1999.