

어류 혈액 염색에 Diff-Quick kit의 적용 가능성 검토

박성우[†] · 김동완 · 최민순
군산대학교 수산생명의학과

Application of a Commercial Diff-Quick Kit for Fish Hematology

Sung-Woo Park[†], Dong-Wan Kim and Min-Soon Choi

Department of Aqualife Medicine, Kunsan National University, Kunsan, 573-701, Korea

Application of a commercial Diff-Quick kit for fish hematology was evaluated. Diff-Quick stain was incomplete in staining not only the nucleus and cytoplasm but also granules of leucocytes that were stained in solution I and II for five seconds. However, when the staining time changed to 5 seconds in solution I and 10 seconds in solution II, followed by washing with deionized distilled water, the kit showed the similar results as in May-Grunwald Giemsa stain. The results indicate that the kit can be used in fish hematology for rapid staining.

Key words: Diff-Quick kit, Fish hematology.

Diff-Quick kit는 말라리아 원충의 검사용 시약으로 개발되었으며, 고정액과 용액 I (호산성 염색액) 및 용액 II (호염기성 염색액)의 3종류로 구성되어 있다. 고정액은 triarylmethane의 메탄올 용액 (1.8 mg/l)이며, 용액 I은 sodium azide-preserved buffer에 xanthene을 1 g/l 농도로 녹인 용액이다. 용액 II는 sodium azide-preserved buffer에 azure A (0.625 g/l)와 methylene blue (0.625 g/l)를 용해시킨 액이다.

Diff-Quick 염색은 염색성이 Wright 염색, Giemsa 염색 표본과 마찬가지로 뛰어날 뿐만 아니라 염색액간에 세척이 필요없이 최종적으로 증류수에 세척하기만 하면 된다. 따라서 실제의 염색 소요시간이 매우 짧기(실제 염색시간, 15초 외 증류수 세척 시간) 때문에 임상진단용으로 사용되고 있다. 인간 의학 분야에서는 혈액, 골수 채취액, 종양의 세포진단 등 신속한 염색을 요하는 경우뿐만 아니라 병리학에서의 동결절편과

*Helicobacter pylori*의 염색 (blue), 정자의 염색 (15초-5초-5초) 등에 광범위하게 사용되고 있다. 또한 어병학에서도 조직의 도말 또는 스탬프 표본내의 *Kudoa* sp. (Yokoyama *et al.*, 2000), *Myxidium* sp.와 *Leptotheca* sp. (Tun *et al.*, 2000; Tin *et al.*, 2000; Yasuda *et al.*, 2002), *Paramoeba* (Parsons *et al.*, 2001) 등의 염색과 병리조직표본의 염색 (Liyana *et al.*, 2003)에 사용되어 왔지만, 어류 혈액에 적용한 예는 아직 없다. 그래서 Diff-Quick kit를 수산 혈액학에 응용하기 위하여 제조업자의 지시에 따라 시험해 본 결과, May-Grunwald Giemsa 염색에 비해 염색성에 떨어지는 결과로 나타났다.

본 연구에서는 시판의 Diff-Quick kit를 어류 혈액의 염색에 적용하기 위한 최적의 염색시간, 반복사용 가능성 및 세척 용액에 따른 염색성의 변화를 조사하여 최적 염색조건을 설정하고자 실시하였다.

[†]Corresponding Author : Sung-Woo Park, Tel : 063-469-1884,
E-mail : psw@kunsan.ac.kr

재료 및 방법

군산대학교 연구실에서 순치 사육중인 뱀장어 (체장 60-65 cm, 체중 195-228 g)의 뱀장어 5마리를 사용하여 염색조건을 설정하였다. 뱀장어는 채혈하기 전 Park (1996)의 방법에 따라 24시간 전에 *Salmonella abortusequi*의 리포다당 (Lipopolysaccharide, LPS, Sigma)을 멸균생리식염수에 현탁시킨 LPS액 (0.1mg/ml) 또는 *Edwardsiella tarda* 포르말린 사균 (10 mg/ml)을 복강에 0.1 ml 주사하였다. 뱀장어는 0.5%우레탄에 마취 후 헤파린 처리 멸균플라스틱 주사기를 사용하여 동맥구에서 채혈하였다.

채혈한 혈액은 슬라이드 글라스에 도말한 다음 May-Grunwald Giemsa 염색을 실시하고, 일부는 Hemacolor와 Diff-Quick (Sysmex Co., Japan) 염색을 실시하였다. Diff-Quick 염색은 제조업자의 지시에 따라 고정액에 5초간 dipping하면서 고정된 다음 여과지로 여분의 고정액을 제거한 다음 Solution I에 5초간 염색하였다. 여과지로 여분의 Solution I을 제거한 다음 Solution II에 5초간 염색하고 증류수에 색소가 용출되지 않을 때까지 (약 5초간) 세척한 다음 공기 중에 건조하였다. 건조한 염색표본은 mounting medium (Leica)로 봉입한 다음 현미경으로 검경하면서 염색성을 비교하였다.

염색시간에 따른 염색성과 과립의 염색성의 변화를 조사하기 위하여 Solution I과 Solution II에 염색하는 시간을 10초, 20초, 30초 및 60초로 변화시켜 May-Grunwald Giemsa 염색과 비교하였다. 또 과립의 염색성의 변화를 조사하기 위하여 Solution I과 Solution II에 5-10초, 10-5초, 10-20초 및 20-10초간 염색하여 증류수로 세척한 다음 염색성을 비교하였다.

염색후의 azure 과립의 용출의 정도를 비교하기 위하여 세척용액으로서 이온교환수와 수도수를 사용하여 5초-5초, 5-10초 및 10초-5초간 염색 후 각각의 세척용액으로 세척하여 염색성을 비교하였다.

뱀장어 이외의 어류는 군산대학교 양어장에서 사육중인 한국산 메기 (*Silurus asotus*), 금붕어 (*Carassius carassius*), 잉어 (*Cyprinus carpio*) 및 털라피아 (*Oreochromis niloticus*)의 말초혈액의 도말표본을 Diff-Quick kit로 5-10초로 염색 후 이온교환수로 세척한 다음 염색성을 관찰하였다.

파라핀 조직절편에 대한 염색성을 알아보기 위해 백점병에 감염된 황복의 아가미 조직 절편을 탈 파라핀 후 증류수로 함수한 다음 Solution I과 Solution II에 각 25초간 염색한 다음 증류수로 세척하고 에탄올로 탈수, xylene로 투명한 다음 봉입하여 검경하였다. 세균의 단염색에 활용은 슬라이드글라스에 Solution II를 한방울 떨어 뜨린 다음 그 위에 미리 한천 평판에서 배양하여둔 대장균을 도말하여 카바글라스로 덮은 다음 현미경으로 검경하였다.

결과 및 고찰

May-Grunwald Giemsa 염색과 제조업자의 시간에 따라 Hemacolor 및 Diff-Quick kit로 염색한 뱀장어 말초혈액의 염색상을 Fig. 1에 나타내었다. 3종류의 염색법 중에서 May-Grunwald Giemsa 염색이 핵, 세포질 및 과립의 염색성의 구분이 분명한 가장 좋은 결과를 나타내었다 (Fig. 1A). Hemacolor 염색은 핵이 농축된 모양으로 진하게 염색되며, 적혈구 핵의 가장자리는 염색이 불완전하였다. 또한 백혈구는 세포질의 호산성의 염색이 강하며 특히 전구의 세포질도 호산성으로 염색되었다. 세포질도 호염기성이 저하되며, 과립의 염색도 불완전하였다 (Fig. 1B). Diff-Quick 염색은 핵의 염색성이 불량하며 핵내에 미염색의 부분도 남아있었다. 또한 세포질의 호염기성도 저하되었으며, 과립의 염색도 불량하였다 (Fig. 1C). 이러한 결과로 3종류의 염색법 중에서 시간이 많이 소요되지만 May-Grunwald Giemsa 염색이 백혈구의 핵, 세포질 그리고 세포질 내 과립의 염색성에서 가장 양호하였다.

Diff-Quick kit의 염색시간에 따른 염색상의 변

화를 Fig. 2에 나타내었다. 10초, 20초 및 30초간 염색하였을 때는 핵과 세포질이 완전히 염색되며, 세포질의 호염기성은 증가하지만 과립구의 과립은 여전히 불선명하였다 (Fig. 2 A-C). 그러나 60초간 염색하였을 때는 핵과 세포질은 비슷하게 염색되지만 다른 염색시간에 비해 백혈구의 세포질의 호염기성이 저하되며, 세포질속의 과립은 존재의 확인이 불분명하게 되었다 (Fig. 2. D).

염색시간을 5-10초, 10-5초, 10-20초 및 20-10초로 하였을 때의 염색성의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 5-10초간 염색하였을 때는 백혈구의 세포질의 호염기성이 약화되어 호중구내의 과립의 관찰은 불가능하나 단구의 세포질이 염색됨으로 단구와 호중구의 구분은 가능하였다 (Fig. 3A). 10-5초로 하였을 때는 단구와 호중구의 염색성이 저하되면서 과립의 염색성도 저하되어 단구와 호중구의 구분이 불가능하였다 (Fig. 3B). 10-20초로 염색하였을 때는 백혈구의 세포질의 호염기성이 증가되고, 과립의 관찰 및 백혈구의 구분이 곤란하였다 (Fig. 3C). 20-10초로 염색하였을 때는 적혈구는 핵의 염색이 옅어지지만 세포질은 잘 염색되고, 백혈구도 핵의 염색이 옅어지면서 세포질의 호염기성이 감소되어 과립의 종류 및 단구와 호중구의 구분이 곤란하였다 (Fig. 3D).

미사용의 Diff-Quick 염색액과 약 40배 정도를 염색하고 밀봉하여 보존하였던 염색액을 사용하여 염색한 결과는 Fig. 4에 표시한 것처럼 적

혈구 및 백혈구의 염색성에는 차이가 없어 사용한 염색액은 차광하여 보존한 다음 재사용할 수 있어 staining jar등을 이용하면 반복사용이 가능하다고 생각된다.

세척용액에 따른 염색성의 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 5-5초로 염색 후 이온교환수로 세척하였을 때는 적혈구의 핵은 불완전하게 염색되고, 백혈구의 핵과 세포질도 옅게 염색되지만 과립의 관찰은 가능하였다 (Fig. 5A). 5-5초간 염색하고 수도수로 세척하였을 때 적혈구의 핵이 염색되지 않았다 (Fig. 5B). 5-10초간 염색하고 이온교환수로 염색하였을 때는 적혈구와 백혈구의 핵 염색이 양호하고 세포질내의 과립도 잘 보존됨과 동시에 백혈구의 구분도 가능하였다 (Fig. 5C). 5-10초로 염색 후 수도수로 세척하였을 때는 적혈구의 핵은 염색이 불량하고 백혈구의 핵도 자주색으로 염색되었다. 백혈구의 과립은 잘 보존되었으며, 혈구간의 구분도 가능하였다 (Fig. 5D). 10-5초간 염색하고 이온교환수로 염색하였을 때는 적혈구와 백혈구의 핵이 잘 염색되고 백혈구의 세포질이나 과립도 잘 염색되었다. 그러나 백혈구의 과립이 너무 진하게 염색되는 경향이지만 혈구의 구분은 가능하였다 (Fig. 5E). 10-5초간 염색하고 수도수로 세척하였을 때는 적혈구와 백혈구의 핵 염색이 불량하지만 과립은 보존되었다 (Fig. 5F).

뱀장어 이외의 메기, 금붕어, 잉어 및 틸라피아의 말초혈액을 Diff-Quick kit로 5-10초간 염색하고 이온 교환수로 세척한 결과는 Fig. 6에 나타

Fig. 1. Microphotographs of eel (*Anguilla japonica*) blood cells stained with May-Grunwald Giemsa (A), Hemacolor (B), and Diff-Quick kit (C). Bars indicate 10 μ m.

Fig. 2. Microphotographs of eel peripheral blood stained with the solutions I and II of Diff-Quick kit for 10 (A), 20 (B), 30 (C), and 60 seconds (D). Bars indicate 10 μm .

Fig. 3. Microphotographs of eel blood cells stained with Diff-Quick for different times. Blood smears treated with solution I and solution II for 5 and 10 second (A), 10 and 5 seconds (B), 10 and 20 seconds (C), 20 and 10 seconds (D), respectively. Bars indicate 10 μm .

Fig. 4. Microphotographs of eel blood cells stained with Diff-Quick for 5 seconds in fixative, 10 seconds in solution I, and 5 seconds in solution II. Blood smears were treated with new (A) and used (B) solutions. Bars indicate 10 μm .

Fig. 5. Microphotograph of eel peripheral blood stained with Diff-Quick for different times and, followed by washing with deionized water (A, C & E) or tap water (B, D & F). Blood smears were treated for 5 seconds according to the manufacturer's instructions (A, B) and for 5 seconds and 10 seconds (C, D), or 10 seconds and 5 seconds (E, F) in solution I and solution II, respectively. Bars indicate 10 μm .

Fig. 6. Microphotographs of peripheral blood stained with Diff-Quick kit solution I and solution II for 5 and 10 seconds, respectively. A, Korean catfish (*Silurus asotus*); B, goldfish (*Carassius carassius*); C, common carp (*Cyprinus carpio*); D, tilapia (*Oreochromis niloticus*). Bars indicate 10 μ m.

Fig. 7. Microphotograph of gill of river puffer infected with *Cryptocaryon irritans*. The section was treated for 25 seconds with Diff-Quick solution I and solution II, respectively. Bar indicates 100 μ m.

내었다. 이 들 어류의 말초혈액도 뱀장어와 마찬가지로 적혈구 및 백혈구의 핵과 세포질의 염색이 양호하였으며, 백혈구의 과립도 잘 보존되어 백혈구의 구분도 가능하였다.

한편 백점충에 감염된 황복 아가미의 파라핀

조직 절편을 탈 파라핀, 함수과정을 거친 다음 Diff-Quick 염색액에 각 25초간 염색하였을 때 조직의 구조는 Fig. 7에 나타낸 것처럼 HE염색에 비해 선명하지 못하지만, 핵과 세포는 구분이 가능하였고, 혈관내의 혈구도 잘 염색되었다. 점액세포는 공포로, 연골세포의 염색질은 염색되지 않았지만 핵은 염색되었고, 결합조직은 호염기성으로 염색되는 경향이였다. 또 기생충인 백점충은 청색으로 염색되었다. 세균을 염색하였을 때는 청색으로 염색되는 것과 염색되지 않는 것이 있었으며, 염색된 것도 활발히 움직이고 있어, 형태의 관찰은 곤란하였지만 세균의 존재는 확인할 수 있었다 (미제시).

이상의 결과를 종합하면 Diff-Quick염색은 염색의 소요시간이 짧고 염색액의 재사용이 가능한 등 많은 잇점이 있다. 그러나 염색 시간과 세척용액에 따라서 핵과 세포질의 염색성 및 과립의 염색성에 변화가 일어나는 문제점이 있었다. 따라서 본 연구에서 Diff-Quick kit를 사용하여

염색시간을 solution I에 5초, Solution II에 10초 간 염색하고 이온 교환수로 세척하면 어류의 혈구 염색에 활용이 충분히 가능하다는 결론을 얻었다. 그러나 혈구의 구분을 위해서는 혈구의 형태와 염색성에 관한 충분한 지식이 필요한 것은 말할 것도 없고, Diff-Quick 염색을 일상용으로 사용하기 전에 May-Grunwald Giemsa 염색법으로 각 혈구의 염색 정도를 비교한 후에 사용할 것을 권장하고 싶다.

요 약

수산 혈액학에 시판의 Diff-Quick kit를 사용할 수 있는지의 여부를 검토하였다. 제조사의 지시에 따라 뱀장어의 말초혈액의 도말표본을 염색하였을 때는 핵의 염색성이 불량하여 핵 내에 미염색의 부분도 남아 있고, 또한 세포질의 호염기성도 저하되었으며, 백혈구 과립의 염색도 불량하여 상법으로 사용하는 May-Grunwald Giemsa 염색에 비해 염색성이 나빴다. 그러나 염색 시간을 변경하여 solution I에 5초, solution II에 10초 염색 후 이온교환수로 세척하였을 때 양호한 결과를 얻었으며, 혈구의 분류도 가능한 것으로 나타났다. 이러한 염색 조건을 다른 어종인 메기를 비롯한 3종의 어류의 말초혈액의 도말표본에 적용해본 결과 이들 어류의 혈액 염색에도 적용 가능한 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 군산대학교 수산과학연구소에서 출현한 학술연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Liyanage, Y. S., Yokoyama, H., and Wakabayashi, H.: Dynamics of experimental production of *Thelohanellus hovorkai* (Myxozoa: Myx-

osporea) in fish and oligochaete alternate hosts. *J. Fish Dis.*, 26: 575-582, 2003.

Park, S.-W.: Changes in the number and PAS reaction of neutrophils from the kidney and peripheral blood of eel (*Anguilla japonica*) intraperitoneally injected with pathogenic fish bacteria and foreign materials. *Kunsan Natl. Univ. Fish. Sci. Res.*, 12: 125-137, 1996

Parsons, H., Nowak, B., Fisk, D., and Powell, M.: Effectiveness of commercial freshwater bathing as a treatment against amoebic gill disease in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 195: 205-210, 2001.

Tun, T., Ogawa, K., and Wakabayashi, : Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). *Fish Pathol.*, 25: 63-72, 2002

Tun, T., Yokoyama, H., Ogawa, K., and Wakabayashi, H.: Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. *Fish Pathol.*, 35: 145-156, 2000

Yasuda, H., Ooyama, T., Iwata, K., Tun, T., Yokoyama, H., and Ogawa, K.: Fish to fish transmission of *Myxidium* spp. (Myxozoa) in cultured tiger puffer suffering from emaciation disease. *Fish Pathol.*, 37: 29-33, 2002

Yokoyama, H., Inoue, D., Sugiyama, A., and Wakabayashi, H.: Polymerase chain reaction and indirect fluorescent antibody technique for the detection of *Kudoa amamiensis* (Multivalvulida: Myxozoa) in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathol.*, 35: 157-162, 2000.

Manuscript Received : January 22, 2004

Revision Accepted : April 26, 2004

Responsible Editorial Member : Sung-Ju Jung
(Yosu Univ.)