

# 感染性肝臟壞死病毒之原位雜交技術之建立

徐亞莉、陳敏心、余敦平、吳金湧

中央研究院動物研究所

## 一、前言

感染性胰臟壞死病毒(Infectious Pancreatic Necrosis Virus IPNV)為世界性的魚類病原體(4, 7)。主要宿主包括一些極具經濟價值的魚類, 如河鱒(brook trout)、鮭魚、鱒魚、石斑、吳郭魚、鱸魚、虱目魚、鰻魚等為其宿主。感染病徵包括胰臟潰爛、泄殖孔腫大、背鰭及尾鰭潰爛等(7), 對受感染的魚苗更可造成高達90-100%的死亡率; 受感染的魚隻即使因產生抗體而倖存下來, 也會成為IPNV的帶原者而將病毒以垂直或水平的傳染方式將病毒分別帶至魚卵或其它魚隻, 受感染的魚隻常因體弱, 易受二次感染, 造成死亡, 對水產養殖業造成極大損失。因此, 建立快速及有效的檢測系統診斷初期感染的魚隻快速處理, 以減輕損失是十分必要的。目前, 我們利用in situ hybridization(原位雜交)技術檢測培養細胞之IPNV感染。許多實驗已証實In situ hybridization對診斷被病毒感染的組織及細胞非常靈敏準確, 並可知道病毒基因體在宿主細胞的確實位置(5, 6, 8, 9, 13, 17, 18)。此外, 為達安全、快速、靈敏及準確, 乃以biotin-labelled RNA probe(1, 5, 11)與細胞內IPNV的RNA分子進行RNA-RNA hybridization, 再以strepto-avidin-biotin-alkaline phosphatase complex與probe上的biotin鍵結, 最後以酵素受體NBT (Nitro blue tetrazolium)及BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)呈色, 以普通光學顯微鏡觀察即可看到藍紫色的訊號(5, 11)。此一技術建立後, 擬運用至活魚組織的診斷, 可了解IPNV在魚體器官中之分佈情形; 甚至可將此技術推廣到其它水產動物病原體, 如文蛤呼腸孤病毒(Hard Clam Virus, CAV)的感染檢測, 以減低水產養殖業的損失。

## 二、材料及方法

### (一)、細胞培養與病毒感染

將HSE-214 (Chinook Salmon Embryo Cells)培養於已用subbing solution (0.1% gelatin+0.01% CrK (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> • H<sub>2</sub>O)(12, 14)處理過的蓋玻片上，於18°C下培養約16-24小時使其長成單層(mono-layer)後，以感染性胰臟壞死病毒(Infectious Pancreatic Necrosis Virus IPNV)之AB、CV-1、E1S、PV、SP、T42G、TS-1及VR-299八株(strains)病毒分別感染，取MOI (multiplicity of infection)約10，感染8-10小時後，根據前人實驗證得此時其RNA產量最大(4)，遂於此時以1XPBS (Phosphate-buffered saline)洗兩次將病毒液洗去，加入4% paraformaldehyde於4°C下固定一小時(12)，再以75%及95%酒精脫水；於通風處晾乾後，可在室溫下長期保存。

除了以IPNV感染的細胞外，對照組分兩組，一為不經感染但相同處理的細胞；二為經由文蛤呼腸孤病毒(Hard Clam Virus CAV)感染以同樣條件處理的細胞。

### (二)、Probe之製備

#### 1. 萃取質體(Plasmid Isolation)

J. C. Leong等於1986年利用IPNV之SP strain的A及B段RNA合成兩種cDNA並分別接至pT7-2載體(vector)上，轉殖至E. coli中，即得到pT72 / A及pT72 / B兩種質體(7)。於37°C下大量培養此種E. coli約16-24小時，以10,000rpm於4°C下將菌體離下，用Solution I (50mM Glucose+25mM Tris-HCl, pH8.0+10mM EDTA, pH8.0)將細胞膜打破，再以Solution II (0.2N NaOH+1% SDS)使菌體DNA denature，於冰上作用5分鐘後再以Solution III (3M KOAc, pH4.8)使菌體蛋白質denature，冰上作用10分鐘後便以15,000 rpm, 4°C將雜質離下，取上清液經2-3次phenol / chloroform萃取，加入1 / 10體積3M NaOAc, pH5.2及2-3倍體積100%酒精，於-70°C下沉澱30分鐘以上。

隨後以15,000 rpm, 4°C, 30分鐘將質體自酒精鹽沉澱中離出，並以70%酒精於同樣的情況下離5分鐘將多餘的鹽洗去，抽乾後，以TE buffer(10mM Tris-HCl, pH7.4+1mM EDTA, pH8.0)或0.1%DEPC (diethylpyrocarbonate)水溶解沉澱物，經1% agarose gel分析，以ethidium bromide或以銀染法染色。

所得的質體往往含有許多E. coli的RNA，必須再用RNase A於37°C作用30分鐘。而後以限制酶(restriction enzyme) Bam HI及Sal I分別作用於質體pT72 / A及pT72 / B上，將插入的cDNA與載體pT7-2上SP6RNA polymerase promoter間切開；可得

pT72 / A約5.7 Kb, pT72 / B約5.4Kb (圖一)。

## 2. 離體轉錄作用(in vitro transcription)

取已知濃度DNA約 1 ug, 各加 1 ul, 10mM ATP, CTP, GTP 及 biotin-16-UTP, 2 ul 10X transcription buffer (0.4M Tris-HCl, pH8.0+60mM MgCl<sub>2</sub>+100mM DTT (dithiothreitol)+20mM spermidine+100mM NaCl+1 unit / ul RNase inhibitor), 40 unit T7 RNA polymerase及10 unit RNase inhibitor; 總體積為20 ul於37°C下作用1.5-2.5小時, 作用完畢後以20 unit DNase 在37°C下作用15分鐘去除多餘的DNA template, 再用phenol / chloroform萃取, 並加入1 / 10體積3M NaOAc, pH 5.2及2-3倍體積100%酒精, 於-70°C下沉澱並保存(1, 17, 18)。

自RNA的酒精鹽沉澱中取10 ul離心, 最後的沉澱以4-5 ul 0.1% DEPC水溶解, 取其中的0.5 ul點於Hybond N+membrane上, 其餘的則用1% formaldehyde agarose gel分析, 再以ethidium bromide染, 可在2.7 Kb處看到一條band; 若繼續以50mM NaOH及10mM NaCl處理45分鐘, 使大分子RNA易被轉漬, 再



圖一 抽得的質體DNA及經限制酶作用後之圖譜。Lane 1.  $\lambda$  DNA經限制酶Hind III處理所得之DNA圖形; Lane 2. pT72 / A質體DNA; Lane 3. pT72 / A質體DNA經限制酶Bam HI處理所得之DNA圖形, 其分子量約5.7 Kb; Lane 4. pT72 / B質體DNA; Lane 5. pT72 / B質體DNA經限制酶Sal I作用所得的圖形, 其分子量約5.4 Kb。

以0.1M Tris-HCl, pH7.2處理45分鐘及20X SSC (3M sodium chloride+0.3M sodium citrate)浸泡1小時，經真空抽氣轉漬機轉漬到immobulin transfer membrane或Hybond N+membrane 1.5小時，轉漬完畢後若使用的membrane為immobulin transfer membrane，則必須再以紫外線燈進行cross-link 4分鐘使RNA分子與membrane緊密鍵結。

Biotin-labelled probe 可用 BluGene 或 DNA Detection System (BRL)兩種kits呈色。兩者之差別在後者的alkaline phosphatase多接了一個biotin分子，形成streptoavidine-alkaline phosphatase-biotin複體，再與受質(substrate) NBT (Nitro blue tetrazolium)及BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)行呈色反應，產生紫色訊號。所得的mRNA其大小約pT72 / A為2.9 Kb, pT72 / B為2.8 Kb (圖二)。

### (三)、原位雜交 (In Situ Hybridization)

將固定在玻片上並被病毒感染的細胞取出，以Solution I (0.1M Tris-HCl, pH8.0+0.05M EDTA, pH8.0)潤濕，再加入20 ug / ul proteinase K及Solution I的混合液於室溫(25°C)下作用15-25分鐘，以顯微鏡觀察；當細胞開始變圓且細胞邊緣，即細胞膜，變模糊時必



圖二 經離體轉錄作用(in vitro transcription)所得之RNA. A Lane。即以pT72 / A之插入DNA (insert)為模板(template)合成之RNA其分子量為2.9 Kb; B Lane。即以pT72 / B之插入DNA(insert)為模板(template)合成之RNA，其分子量為2.8 Kb。

須馬上停止反應，以2XSSC洗兩次，加入20% glycerol於室溫下作用30分鐘以增加細胞抗凍抗熱的能力，同樣以2X SSC洗兩次，加上95% formamide並覆上siliconized 蓋玻片(14)，於70°C denature細胞內病毒RNA (2, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18)，為避免細胞因高熱受破壞，所採方法主要有二：(1)70°C下3分鐘，冰上數分鐘，重覆五次；(2)70°C下5分鐘，冰上數分鐘；再於70°C下3分鐘，冰上數分鐘，重覆兩次。此兩種方法主要得視proteinase K作用程度而定。此步驟完畢後亦以2X SSC洗兩次並取出siliconized slide，加入40 ug / ul salmon sperm DNA與hybridization solution (50% formamide+0.3M NaCl+100mM Tris-HCl, pH8.0+1mM EDTA, pH8.0+10% dextran sulfate+Denhardt's solution，包括0.02% Ficoll, 0.02% polyvinyl-prolidone)於室溫下進行prehybridization一小時，使其先與細胞內非病毒之核酸序列發生hybridize，以防止non-specific binding; salmon sperm DNA在使用前必須先以100°C denature 10-15分鐘。完畢後以2X SSC洗兩次，加入含2-5 ng / 蓋玻片 biotin-labelled RNA，及500ug / ml tRNA之hybridization buffer，於42°C下進行16-20小時，再用5mM DTT處理10-15分鐘，2.5ug / ml RNase A 於37°C下作用30分鐘去除未作用的RNA probe，再分別以2X, 1X, 0.1X SSC於50-52 °C下分別洗兩次10分鐘，三次15分鐘及三次15分鐘(2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18)。

作呈色反應時，先以buffer I (0.1M Tris-HCl, pH8.0+0.15M NaCl)潤濕，再以buffer II (0.03g BSA+0.1M Tris-HCl, pH7.2+0.1M NaCl)於65°C下blocking 60-90分鐘。而後以每片100 ul的量加入streptoavidin buffer (2 ul SA / ml buffer I)於室溫下作用20分鐘，並以2-4 ml的buffer I洗15分鐘，兩次；再加入biotin-alkaline phosphatase (1 ul biotin-AP / ml buffer I)於室溫下作用20分鐘，亦以2-4 ml的buffer I洗15分鐘，再用2-4 ml的buffer III (0.1M Tris-HCl, pH9.5+0.1M NaCl+0.05M MgCl<sub>2</sub>)洗15分鐘，最後以visualization solution (4 ul NBT + 3 ul BCIP / ml buffer III)進行呈色(1, 5, 8, 11, 14) 3-4小時，呈色完畢後用termination buffer(20mM Tris-HCl, pH7.5+0.5mM EDTA, pH8.0)停止反應並以75%及95%酒精褪去背景顏色。

### 三、結果與討論

原位雜交(In situ hybridization)最主要在probe的選擇。在本實驗中我們以IPNV中SP病毒株的A及B段RNA作成的cDNA，來合成單股

mRNA，作為probe，再與IPNV RNA作RNA-RNA hybridization. RNA-RNA hybrid的穩定度比其它hybrid 高(1, 2, 17)，對於non-specific binding或未反應完的RNA probe可用RNase A處理(1, 8, 12, 13, 14, 17, 18)，減少背景顏色，相對地提高實驗準確度。特別是藉由in vitro transcription，可有效的產生所需之單股RNA。若由抽病毒RNA，經denature後再作nick translation，此對probe的量上造成很大的限制。操作in vitro transcription 時必需小心，否則合成出的RNA很容易被環境中的RNase吃掉(1)。在實驗過程中我們也找出了操作in vitro transcription時最好的條件：首先，質體DNA的好壞很重要；以限制酶處理得完全，經phenol / chloroform萃取乾淨的DNA，以1% agarose gel確定其濃度後，於65°C下加熱15分鐘除去DNase；取約1 ug的DNA於37°C下反應2-2.5小時，再加20 unit DNase去掉多餘的DNA template；跑1% formaldehyde agarose gel後，可得一條濃度高且沒有smear的RNA band。若操作得當，以in vitro transcription方法合成mRNA的效率很高，一般產量約可維持在所使用的DNA量的5-8倍左右。

確定了probe大小及濃度後，由於前人認為在操作in situ hybridization時probe大小最好維持在250-500 bases之間(1, 2, 8, 10, 12, 17)，因此我們便試著以alkaline hydrolysis, RNase A, RNase T1及S1 nuclease處理RNAprobe。雖然probe的大小減小了，但用於in situ hybridization的結果都不好。一般以放射性同位素標定的RNA probe是以alkaline hydrolysis變短，因此根據公式(1, 2)：

$$t(\text{min}) = \frac{L_0 - L_f}{kL_0L_f}$$

$L_0$  : probe起始長度

$L_f$  : probe最終長度

$k = 0.11 \text{ Kb min}^{-1}$

我們以40mM NaHCO<sub>3</sub>及60mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10.2於60°C下處理30-40分鐘，並以0.1M NaOAc, pH 6.0及0.5% glacial acetic acid中和，但此法卻不適用於biotin-labelled RNA probe，因鹼會破壞biotin與UTP間的amide鍵(1)，故往往需大量的RNA才能回收到少量的小分子RNA，於經濟上十分不合算；此外，由於biotin與UTP間的鍵結受到破壞，呈色的結果會失去原本的藍紫色而呈略帶黃綠的顆粒。以RNase A及RNase T1處理的結果，則因此兩種核酸酶活性皆很強，即使以0.1 unit處理於25°C下，處理3 ugRNA 30秒仍會吃到剩下小於0.24 bases的RNA，雖以大量RNase inhibitor(4 unit)或EDTA處理，仍無法抑制其作用，又試以低溫處理，仍會作用。如此小分子的RNA probe，於保存也十分不

易，且由於probe太小，易造成non-specific binding，過多的RNase inhibitor也會對in situ hybridization中RNase A處理未反應完的RNA probe有影響。因此我們決定不再修飾已合成的RNA，而著眼於質體上其它單一限制酶的作用位置(unique restriction enzyme site)；結果僅於pT 72 / B上找到Kpn I (7)的作用位置，經in vitro transcription得到約 1Kb的RNA，但一因IPNV各株間以 A 段相似性較多，二則比原本少了約1.4 Kb的RNA probe可能對in situ hybridization的準確度有影響；另外，對in vitro transcription的效率也必須重新考量。最後決定不再在probe上作處理，而著重在in situ hybridization的前處理上。各種probe之處理情形及結果列於表一。

理論上而言，若proteinase K處理的好，細胞內的病毒RNA又denature的完全，加上好的single strand RNA probe，則大於500 bases的RNA probe應可進入細胞發生hybridization。故在以proteinase K及95% formamide處理時特別小心，尤其細胞在此二步驟很容易lyze，必須常以倒立顯微鏡觀察。通常我們採25℃以proteinase K處理15-25分鐘，但必須得視細胞及病毒感染情況而定，通常T42G, TS-1及CV-1的毒力較強，以MOI=10的條件下感染，常於感染後8小時便有CPE現象產生；若細胞有輕微CPE現象，以proteinase K處理，常不到15分鐘便開始變圓，細胞膜界線不清；若細胞核顏色變淡且細胞質與細胞核顏色變成雜灰色，表示細胞已lyze，無法進行以後的處理。以95% formamide denature細胞內病毒RNA，也必須視proteinase K處理情況而定，一般採70℃下4分鐘，冰上數分鐘，重覆兩次後，再於70℃下3分鐘，冰上數分鐘。若proteinase K作用後細胞變圓且細胞膜不明顯，則採70℃下加熱3分鐘，冰上數分鐘，重覆4-5次。作用完後亦必須以顯微鏡觀察。表二將說明各種因proteinase K、20% glycerol、及95% formamide處理上的變化對細胞的影響。

作hybridization時，我們以65℃，15分鐘處理RNA probe打開次級結構(secondary structure)使RNA 成線形(linear form)，加熱後再vortex一下，插在冰上防止renature；我們曾比較過未經加熱處理與加熱處理兩種情況，發現以65℃下加熱15分鐘並vortex的效果最好。此外，由於hybridization的溫度，時間及probe的量都會影響hybridization的結果(1, 5, 6, 12, 14, 17)；我們曾分別試過以42℃、45℃、及47℃三種溫度，18-24與36-48小時兩種時間，以及一倍、兩倍、三倍的probe量來作，發現以42℃下hybridize 16-24小時的效果最好；至於probe的量上改變並無明顯變化。這可能原因有二：一為在42℃下18-24小時下細胞內病毒RNA與RNA probe的hybridization情形已達飽合，故過長的時間及過多的probe並無顯著改善hybridization的結果；二因我們是以每片玻片100 ul的(probe+hybridization buffer)混合液並覆蓋上 siliconized 蓋玻片使

其作用反應，一旦混合液流失，則即使以長時間及多量的probe來作，仍無法改善結果。另一個影響hybridization的結果則在hybridization後洗的處理過程；由於使用的probe與細胞內病毒RNA同源性(homology)高，

表一 各種核酸酶對RNA probe不同處理條件下之影響\*。

| 核酸酶種類                              | 作用溫度(°C)           | 作用時間(min)                       | 抑制劑                           | 結 果***                                                   |
|------------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------|
| RNase A<br>0.1 µg                  | 15, 25             | 0.5, 1, 2, 5,<br>10, 15, 20, 30 | 0.5M<br>EDTA                  | None                                                     |
| RNase T1<br>2 units                | 0, 15, 25          | 0.5, 1, 5, 10,<br>15, 25, 30**  | 0.5M<br>EDTA                  | 0.24 Kb有<br>淡的band                                       |
| RNase T1<br>0.1 unit               | 0, 15, 25          | 0.5, 1, 5,<br>10, 15            | 0.5M<br>EDTA                  | 同上                                                       |
| RNase T1<br>2 units                | 0, 15, 25          | 0.5, 1, 5, 10,<br>15, 25, 30    | RNase<br>inhibitor<br>4 units | 抑制效果較<br>EDTA好，<br>有smear<br>band出現<br>但大部分仍<br>在0.24 Kb |
| RNase T1<br>0.1 unit               | 0, 15, 25          | 0.5, 1, 5,<br>10, 15,           | RNase<br>inhibitor<br>4 units | 同上                                                       |
| S1 nuclease<br>2 unit /<br>0.1unit | 0, 15,<br>25, 37** | 0.5, 1, 5,<br>10, 15            | 0.5M<br>EDTA                  | 一條完全<br>smear band<br>0.24 Kb處<br>的band較<br>淡            |

\*： 反應總體積為10 ul，含3 ug mRNA及2 ug tRNA以防止核酸酶作用太快；反應前先將RNA溶液於65°C下加熱15 min打開二級結構，而後加入核酸酶進行反應。反應完畢立即以1% de-natured agarose gel分析。

\*\*： 表示在此條件下不論反應溫度 / 時間為何RNA皆已被完全作用。

\*\*\*： 此結果是以ethedium bromide染色並於UV燈下觀察記錄；0.24 Kb可能只是一些於離體轉錄作用及核酸酶作用後產生的小分子RNA片段。



表二 病毒感染細胞後，受proteinase K、glycerol、formamide等不同處理對in situ hybridization(原位雜交)的影響。hybridization temperature: 42°C, time: 18 hr; wash temperature: 52°C。

|          | proteinase K(20 mg/cc) |               | 20% glycerol | 95% formamide    |                  | result                                               |
|----------|------------------------|---------------|--------------|------------------|------------------|------------------------------------------------------|
|          | ul/<br>20 cc Solin I   | time<br>(min) |              | /cover-<br>slide | time*<br>(min)   |                                                      |
| MOI = 10 | 20                     | 10            | 90           | 100 ul           | 5, 3 X2          | EIS, PV: ++<br>Others: +<br>Some lyzed<br>Control: - |
|          |                        | 15            | 45           | 1 cc             | 5, 4.5 X2        | membrane folded                                      |
|          |                        | 7.5           | 60           | 100 ul           | 3 X5             | cell lyzed                                           |
|          |                        | 5             |              |                  | 4 X3             |                                                      |
|          |                        | 3             |              |                  | 3.5 X4           |                                                      |
|          | not treated            |               | 60           | 100 ul           | 3.5 X4           | Control: -<br>Others: -                              |
|          | 15                     | 10            | 45           | 1 cc             | 4.5 X3           | membrane folded                                      |
|          |                        | 12            | 60           | 2 cc             | 4.5 X2, 4        | Control: -<br>Others: +                              |
| MOI = 15 | 20                     | 15            | 30           | 750 ul           | 4.5 X3<br>3.5 X4 | cell lyzed<br>Except:<br>Control                     |
|          |                        | 7.5           |              | 100 ul           | 3.5 X4           |                                                      |

\*：此時間指在70°C下的作用時間，“x”表次數。

＋：有訊號，但較弱。 ++：有訊號，較強。 －：完全沒有訊號。

因此需用高嚴謹性 (high strigency) 的情況，即洗的溫度必須高於hybridization的溫度(1)；因此我們試以50°C、52°C、55°C、58°C、及60°C四種溫度進行，發現在50-52°C下以2X、1X、0.1X SSC分別洗兩次、三次而三次的效果最好，可將對照組的訊號，即因non-specific binding造成的訊號洗掉，又能保持實驗組細胞的完整性且不影響其結果。已試過的雜交時溫度及洗時溫度對實驗結果的影響列於表三。

由結果及附表三知，雖然所使用的病毒皆為IPNV之病毒株，但由於

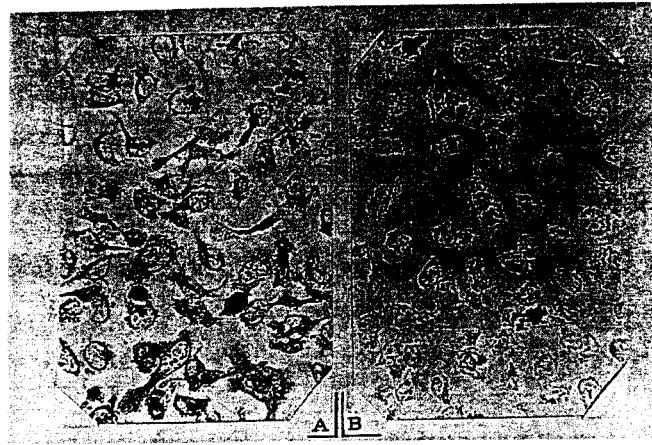
表三 雜交溫度及時間和清洗溫度對原位雜交訊號強弱之影響。

| Hybridization    |              | Washing<br>temperature (°C) | Result              |         |
|------------------|--------------|-----------------------------|---------------------|---------|
| temperature (°C) | time (hours) |                             | experiment          | control |
| 42               | 18-24        | 50                          | + +                 | -       |
|                  |              | 52                          |                     |         |
|                  |              | 55                          | -                   |         |
|                  | 36-48        | 52                          | +                   |         |
| 43               |              | 53                          | + + +               | + -     |
| 45               | 18-24        | 55                          | -                   | -       |
| 47               |              |                             | + +                 |         |
|                  | 36-48        |                             | + + + +             | + -     |
| 47               | 18-24        | 58                          | + + +               | -       |
|                  | 36-48        |                             | + + +               | + -     |
|                  |              |                             | Cells lyzed easily. |         |

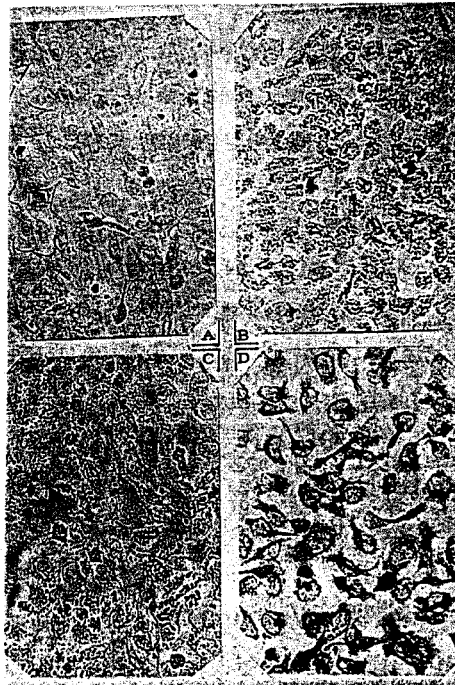
+: 表有訊號，其數目表訊號強弱。

+ -: 表在少數細胞中仍可發現微弱訊號。

感染，在未出現病理上的特徵，即CPE(cytopathic effect)現象，便可經由in situ hybridization診斷出藍紫色顆粒均勻分佈在細胞質中，與前人認為IPNV主要在寄主細胞質中進行複製(replication)相符合(4)。至於對照組中不論經HCV感染或未經感染在一般光學顯微鏡下於其細胞質中皆無藍紫色的訊息存在(圖三)。因此若能將此技術運用到魚的活體組織以檢驗疑似IPNV感染的魚隻；一旦確認後，可取下不同的組織或器官找出IPNV感染時對魚體組織的向性(tropism)而推測其感染模式。除了IPNV以外，凡是已利用病毒核酸合成的cDNA皆可以用in situ hybridization來檢驗此種病毒之感染；特別對一些潛伏期長或傳染力強的病原體及某些彼此間RNA同源性(homology)的差異及複製(replication)時間的不同，會造成實驗結果上的差異。以所用的probe, clone pT72 / A及pT72 / B合成之RNA而言，來自SP strain，理論上應在以SP感染的細胞中可得到很強的訊號；但實驗結果卻顯示出與其它以IPNV病毒株感染的細胞中訊號無明顯的強弱分別，甚至有時以CV-1或T42G感染的細胞訊號會比以SP感染的強。這可能因SP複製週期長而T42G短，在感染後8小時T42G之RNA產量可達最大，而SP卻不能；因此雖然已知T42G與SP之間的同源性最低，但仍可產生強的訊號(圖四)。



圖四 以相同情況處理經T42G及SP兩株病毒感染的細胞可明顯看出訊號強度差異。A.經T42G感染；B.經SP感染。



圖三 以離體轉錄作用所合成之RNA當做probe，與經不同病毒株感染之CHSE-214細胞進行原位雜交法之結果。A.未經任何病毒感染的細胞；B.PV病毒株感染；C.TS-1株感染；D.T42G株感染，箭頭所指為訊號所在。

由本實驗初步結果可認定藉細胞組織培養的方式並模擬IPNV的感染，原位雜交的結果除可作為預防及治療的依據外，並可提供病原體與宿主間關係的訊息(3, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18)。

## 謝 辭

本實驗承蒙行政院農業委員會經費補助(計畫編號：79農建－7.1－漁－21D及80農建－7.1－糧－121 (66))，特此致謝。

## 參考文獻

- Arrand JE. 1985. Preparation of nucleic acid probes. *Nucleic acid hybridisation*, edited by BD Hames, SJ Haggiris. pp. 16-45. 藝軒圖書出版社，台北。
- Cox KH, DV Deleon, LM Angerer, RC Angerer. 1984. Detection of mRNA in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev. Biol.* 101: 485-502.
- Cremer J, P Lichter, J Borden, OC Ward, L Manuelidis. 1988. Detection of chromosome aberrations in metaphase and inter-phase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum. Genet.* 80: 235-240.
- Dobos P, TE Roberts. 1983. The molecular biology of infectious pancreatic necrosis virus: a review. *Can. J. Microbiol.* 29: 377-384.
- Fekadu M, PW Greer, FW Chandler, DW Sanderlin. 1988. Use of the avidin-biotin-peroxidase system to detect rabies antigen in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Virol. Methods.* 19: 91-96.
- Gendelman HE, TR Moench, O Narayan, DE Griffin, JE Clements. 1985. A double labeling technique for performing immunocytochemistry and in situ hybridization in virus infected cell cultures and tissues. *J. Virol. Methods.* 11: 93-103.
- Huang MTF, DS Manning, M Warner, EB Stephens, JC Leong. 1986. A physical map of the viral genome for Infectious Pancreatic Virus Sp: analysis of cell-free translation products derived from viral cDNA clones. *J. Virol.* 60(3): 1002-1011.
- Jackson AC, DL Reimer, WH Wunner. 1989. Detection of rabies virus RNA in the central nervous system of experimentally infected mice using in situ hybridization with RNA probes. *J. Virol. Methods.* 25: 1-

12.

- Keller GH, DP Huang, MM Manak. 1989. A sensitive nonisotopic hybridization assay for HIV-1 DNA. *Anal. Biochem.* 177: 27-32.
- King M, N Contreras, RL Honeycutt. 1990. Variation within and between nucleolar organizer regions in Australian hylid frogs (Anura) shown by 18S+28S in situ hybridization. *Genetica.* 80: 17-29.
- Lewis FA, S Griffiths, RDunnicliff, M Wells, NDunning, CC Bird. 1987. Sensitive in situ hybridization technique using biotin-streptavidin-polyalkaline phosphatase complex. *J. Clin. Pathol.* 40: 163-166.
- McCabe JT, JI Morrell, R Ivell, H Schmale, D Richter, DW Pfaff. 1986. In situ hybridization technique to localize rRNA and mRNA in mammalian neurons. *J. Histochem. Cytochem.* 34(1): 45-50.
- McDougall JK, D Myerson, AM Beckmann. 1986. Detection of viral DNA and RNA by in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 34(1): 33-38.
- Pardue ML. 1985. In situ hybridisation. *Nucleic acid hybridisation*, edited by BD Hames, SJ Haggiris. pp.179-202. 藝軒圖書出版社, 台北。
- Pellissier MC, M Laffage, N Philip, EPassage, MG Mattei, JF Mattei. 1988. Trisomy 21q223 and Down's phenotype correlation evidence by in situ hybridization. *Hum. Genet.* 80: 227-281.
- Shivers RD, RE Harlan, DW Pfaff, BS Schachter. 1986. Combination of immunocytochemistry and in situ hybridization in the same tissue section of rat pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* 34(1): 39-43.
- Tai JH, AL Wang, SJ Ong, KS Lai, C Lo, CC Wang. 1991. The course of giardiavirus infection in the *Giardia lamblia* Trophozoites. *Exp. Parasitology.* 73: 413-423.
- Vakharia VN, MA Devaney, DM Moore, JJ Dunn, MJ Grubman. 1987. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J. Virol.* 61(10): 3199-3207.