

虱目魚所分離出兩段核醣核酸病毒之特性研究

Characteristics of A Birnavirus Isolated from *Chanos chanos*

陳嫩玫·陳家全·陳秀男·郭光雄

M. M. Chen, J. C. Chen, S. N. Chen and G. H. Kou

Abstract

This study attempts to investigate the characteristics and pathogenicity of milk fish virus (designated as MV) isolated from cultured milk fish (*Chanos chanos*).

When MV was inoculated into CCT (color carp testis) cell culture system and observed using electron microscope, inclusion bodies and non-enveloped icosahedral free virions with a diameter of 55-65 nm were observed. MV was demonstrated to be stable in neutral and acidic solution, as well as in organic solvents such as ether and chloroform. Metabolic inhibitor studies show that this virus possesses RNA as their genetic materials. The results obtained from nucleic acid electrophoresis, neutralization, and immunoblotting tests revealed that MV is Ab strain of Infectious Pancreatic Necrosis virus (IPNV).

When MV was inoculated intraperitoneally into juvenile milk fish, no clinical signs were observed within one-month's interval after inoculation. However, the virus could be isolated from the experimental fish.

緒 論

虱目魚 (*Chanos chanos*) 養殖歷史已達三百年以上，主要養殖區在東南亞一帶，例如菲律賓、臺灣及印度尼西亞，而在臺灣虱目魚養殖更佔漁業養殖之大宗。雖然養殖歷史悠久，但有關虱目魚之疾病研究資料甚少，目前有關報告指出在細菌性疾病病原包括 *Vibro*, *Flexibacter*, *Aeromonas* 等，黴菌性疾病亦有過報告，但是均缺乏菌種之鑑定及病原性之研究，主要診斷方法便是以光學顯微鏡觀察有無菌絲之存在。有關養殖虱目魚病毒研究，除 Tung 於 1983 年 (Tung, 1986) 曾分離出疑似感染性胰臟壞死病毒 (Infectious Pancreatic Necrosis Virus, IPNV) 外，皆無任何其他研究報告。

本研究報告乃針對養殖虱目魚所分離出來的感染性胰臟壞死病毒進行連串之研究以了解其形態，生物及生化上之特性。

實 驗 方 法

一、魚類細胞株、病毒及化學藥品

本實驗所採用的細胞株 (cell lines) 包括 CHSE-214 (Chinook Salmon Embryo) 細胞

(Nim *et al.*, 1970); RTG-2 (Rainbow Trout Gonad) 細胞 (Nicholson, 1971); BF-2 (Bluegill Fry) 細胞 (Wolf & Mann, 1980); TO-2 (Tilapia Ovary) 細胞 (Chen, 1983); LF (Louch Fin) 細胞 (Chen, 1989)。

初級細胞包括病毒持續性感染細胞 (Persisten Infection cells, PI cells), 錦鯉魚鰭細胞 (Color Carp Fin cells, CCF cells), 錦鯉魚腦細胞 (Color Carp Brain cells, CCB cells), 錦鯉魚鰓細胞 (Color Carp Gill cells, CCG cells), 錦鯉魚生殖腺細胞 (Color Carp Testis cells, CCT cells), 大肚魚細胞 (TOP-minnow cells, TM cells)。這些細胞分別以 Ueno (1982) 所述的方法進行繼代培養。

本實驗所採用的病毒包括 Ab 株 IPN 病毒, Sp 株 IPN 病毒, VR-299 株 IPN 病毒, 以上三種病毒為美國加州大學 Dr. R. P. Hedrick 所贈送, EVE 病毒為日本東京水產大學的 Professor T. Sano 所贈。

抗血清包括 Anti-IPN Ab serum, Anti-IPN Sp serum, Anti-IPN VR-299 serum 及 Anti-EVE serum, 均為 Dr. R. P. Hedrick 所贈送。

本實驗病毒乃於 1983~84 年間在屏東地區虱目魚苗養殖場利用 CHSE-214 或 TO-2 細胞用如 Ueno (1982) 所述之方法分離出。在本實驗中稱之為虱目魚病毒 (Milk fish virus), 簡稱 MV。這些分離出的病毒保存於 -70°C 冷凍箱內。本實驗所應用之化學試劑購自 Sigma Chemical Company, St. Louis, U. S. A., 而培養基、牛犢血清、抗菌、抗黴菌劑及胰蛋白酶 (Trypsin) 等則購自 M. A. Bioproducts U. S. A.。

二、培養基

本實驗所用之細胞除了 CHSE-214, RTG-2, BF 三種以 MEM 培養基加 10% 胎牛血清, 培養於 18°C , 其他的細胞均以 L-15 培養基加 10% 胎牛血清 (L-15-10% FCS) 培養於 31°C 。當細胞接種病毒後則移於 18°C 中培養。

三、病毒感染力分析 (Viral Infectivity Assay)

病毒感染力的測定採用 TCID₅₀ 病毒感染力測定的方法 (Chen and Kou, 1981)。將細胞接種於 96 孔的微量平板 (microplate) (Nuclon), 每小孔加 0.1 ml 的細胞懸浮液, 懸浮液之細胞密度約 1.6×10^6 cells/ml。置於恆溫箱中, 等細胞長至 80% 滿即可接種連續稀釋之病毒溶液, 病毒接種後 4~7 天即可觀察每一孔內細胞之病理變化 (Cytopathic Effect, CPE)。

四、虱目魚病毒的活體接種實驗 (Inoculation MV to Milk Fish)

本實驗所採用的虱目魚約 7~9 公分長, 共有 200 隻, 分成 20 個水族箱飼養, 每箱 10 隻。這 20 箱分成四組, 包括浸泡病毒組, 注射病毒組, 浸泡對照組及注射對照組。每組各一箱, 共四箱成一個小單位, 置於最相近的條件環境中。

注射病毒組及注射對照組的虱目魚先以 MS-222 (Ethyl maminobenzoate methane sulfonic acid salt, Tricaine methane sulfonate) 0.01% 浸泡, 等虱目魚失去知覺, 即可進行病毒接種注射。注射病毒組腹腔注射 0.05 ml 的病毒液 (每條魚注射 5×10^7 TCID₅₀/濃度)。注射對照組腹腔注射 0.05 ml 的培養過細胞的培養基, 注射完畢立刻移置於乾淨流動的海水中, 等魚恢復知覺即可放入魚箱中飼養。浸泡病毒組一起泡於 15 公升的病毒液 (2×10^{10} viruses/l sea water) 中 1 小時, 換用乾淨海水浸泡三次後, 放入魚箱中飼養。浸泡對照組則用稀釋 50 倍的養過細胞的培養基 15 公升, 浸泡 1 小時, 然後改用乾淨海水浸泡三次, 便可放入魚箱中飼養。分別記錄其死亡情形。

感染後及對照組之虱目魚於實驗進行後每隔七天採樣一次, 每次採樣每組各採 2 隻, 每隻都採肝、腸、脾、及腎四種器官。分別分離病毒。同時並取出一小部份器官進行電子顯微鏡病毒觀察實驗。

五、虱目魚病毒在不同溫度下的增殖 (Multiplication of Milk Fish Virus at Different Temperature)

採用的溫度為本實驗室恆溫箱所調的溫度，分別是 4°C、18°C、31°C、37°C 四種溫度。

將虱目魚病毒以上述方法接種到含 CCT 細胞之 96 孔微量平板中，分列置於 4°C、18°C、31°C 及 37°C 下，於第 7 天觀察細胞病理變化的情形，並記錄之。

六、酸鹼度對虱目魚病毒力價的影響 (Infectivity of Milk Fish Virus in Solution with Different pH)

病毒液以 pH 3, 5, 7, 9, 11 分別做 10 倍稀釋，並以 PBS (無 EDTA) 緩衝液 (pH 7.6) 10 倍稀釋病毒當做實驗對照組。不同處理之病毒液一起置於 18°C 中 1 小時，然後進行 10 倍連續稀釋以 96 孔微量平板測病毒的力價。

七、氯仿 (Chloroform) 及乙醚 (Ether) 對虱目魚病毒力價的影響 (Sensitivity of Milk Fish Virus to Chloroform and Ether)

(一) 氯仿處理對病毒力價的影響 (Effect of Chloroform)

新鮮病毒懸液以 600 g 離心 10 分鐘，以去除細胞碎片，取 1 ml 上清液加 0.5 ml 氯仿，另外取 1 ml 上清液加 0.5 ml Saline 做為對照組，在室溫下搖晃 10 分鐘，以 600 g 離心 10 分鐘，取上層 0.2 ml 測病毒力價。

(二) 乙醚處理對病毒力價的影響

取 1 ml 新鮮病毒懸浮液於試管中，加入 0.25 ml 乙醚，另一支試管亦加 1 ml 病毒懸浮液，但加 0.25 ml Saline 做為對照組，蓋緊蓋子，並用膠帶封起來，置於 4°C 中 24 小時，且定時搖晃數分鐘，處理結束後病毒液倒於滅菌過的培養皿中，蓋子半蓋，讓乙醚揮發掉，各取 0.2 ml 測病毒力價。

八、代謝抑制物試驗 (Metabolic Inhibitor Test)

在決定虱目魚病毒之核酸型之實驗則採用 Actinomycin D (Act. D) 及 FUDR (5-fluoro-2'-deoxyuridine) 兩種去氧核醣核酸代謝抑制物來進行實驗。

直接以 L-15-2% FCS 稀釋 Actinomycin D 成 0.2 µg/ml, 0.5 µg/ml 及 1 µg/ml 三種濃度，並將 FUDR 稀釋成 100 µM/ml。

病毒直接以上述之各種濃度的 L-15-2% FCS+Actinomycin D 或 L-15-2% FCS+FUDR 溶液做 10 倍連續稀釋，接種於 96 孔微量平板上，於 18°C 下靜置 6 小時倒掉病毒液，以 PBS 沖洗每個微量孔，經沖洗兩次後再加入 L-15-2% FCS 0.1 ml，置於 18°C 下培養 7 天。

九、病毒的生長曲線 (Growth Curve of Virus)

為了瞭解病毒的增殖模式，以期在最短的時間內收集得最高濃度的病毒液，所以採用此實驗，實驗方法如下所述：

首先將虱目魚病毒接種 20 個 25 cm² 培養瓶中，接種濃度為 0.1 m.o.i. (multiplicity of infection)，置於 18°C 中讓病毒吸附一個小時後以 PBS (無 EDTA) 緩衝液清洗三次，再於每個培養瓶中加入 8 ml L-15 培養基含 2% 胎牛血清。置於 18°C 中每隔 6 小時取出一瓶測定病毒力價。培養基的部分取 0.1 ml 測病毒力價。細胞內病毒 (cell-associated virus) 部份則採下列處理以取出。培養瓶細胞層先以 PBS (無 EDTA) 緩衝液清洗三次，加入 8 ml 的 PBS (無 EDTA) 緩衝液，置於 -70°C 冷凍庫中，結凍後取出解凍，再回 -70°C 中冰凍，再取出解凍，如此重覆約 2~3

次，於倒立顯微鏡下觀察看到細胞都因冰晶作用而碎裂，浮起後，取 0.1 ml 此病毒溶液測其力價。

十、虱目魚病毒對各種細胞株之感染性 (Infectivity of MV Virus Against Various Cell Cultures)

本實驗所擬測定的細胞包括上述的 TO-2 細胞，LF 細胞，及持久性病毒感染的 TO-2 株，BF-2 細胞，錦鯉魚生殖腺細胞株，錦鯉魚腦細胞株，錦鯉魚鱗細胞株，TM (Top-minnow) 細胞 (Wang, 1987)，RTG-2 細胞，CHSE-214 細胞 (Nims *et al.*, 1970) 等 11 種細胞株。按前所述接種病毒方法接種病毒，於 18°C 恆溫箱中，連續觀察 6 天並測所產生病毒的力價。

十一、實驗病毒之感染機制 (Mechanism of Milk Fish Virus)

此部份實驗採用電子顯微鏡超薄切片的觀察，以瞭解虱目魚病毒進出寄主細胞的情形。

本實驗所採用的樣品有二種，一種是感染 10 天後未被破壞分解的細胞，另一種是以病毒吸附細胞 1 個小時後即收集起來的細胞，二種樣品於 25 cm² 面積的培養瓶中分別以 rubber policeman 刮下來，連培養基一起以 2,000 g 離心 10 分鐘倒掉上清液，取沈澱 (pellet) 物做電子顯微鏡的觀察。

十二、病毒的純化 (Purification of Milk Fish Virus)

有關病毒純化方法則依據 Dobos & Rowe (1977), Dobos *et al.*, (1979) 所應用之方法略加修改而進行。

十三、蛋白質的電泳分析 (Electrophoresis of Proteins)

純化病毒蛋白質之分析，係根據 Laemmli (1970) 的不連續 Tris-glycine 緩衝液系統修改而成，採用 SDS-polyacrylamide 平板膠體電泳法。膠體包括 4.5% stacking gel 和 10% separating gel 兩部份。

電泳所採用的電泳緩衝液 (electrode buffer) 為 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 1% SDS (pH 8.5)。

純化的病毒加入 1½ 倍體積的 electrophoresis sample buffer，混合均勻，然後取 10 μl 小心的置於樣品溝槽中。以 12 mA 電泳 4 個小時，等到樣品到達膠體最底部後，停止電泳，以 silver stain (Merrill *et al.*, 1981) 染色。

十四、核酸的電泳分析 (Electrophoresis of RNAs)

本實驗乃根據 Shatkin 等 (1986) 的方法略為修改而成。採用 SDS-polyacrylamide 平板膠體電泳法。

在電泳之前，虱目魚病毒需經下列處理 (Hedrick *et al.*, 1984)。收集一瓶 25 cm² 面積培養瓶的病毒液 (約 8 ml)，以 2,000 g 離心 10 分鐘 (KUBODA, KS-5000)，取上層之病毒懸浮液加入 sodium N-Lauroylsarcosine (Sigma Chemical Co.) 至 0.1% (W/V)，混合均勻後，130,000 g 離心 45 分鐘 (4°C)。倒掉上層液，沈澱物以 0.1 ml TNE 緩衝液打散，混合均勻，再加入 sodium dodecyl sulfate (SDS) 至 0.5% 及 proteinase K (Sigma Chemical Co.) 至 200 μg/ml，混合均勻後置於 37°C 中 1 小時，然後加入 0.1 ml SDS sample buffer (Laemmli, 1970)，便可用於電泳分析。

核酸的電泳膠體包括 4.5% stacking gel 和 9% separating gel 兩部份，電泳強度 12 mA，電泳 12 個小時，電泳結束後採用銀染色法染色。

十五、中和試驗 (Neutralization Test)

本實驗所用的抗血清有 Anti-IPN Ab serum, Anti-IPN Sp serum, Anti-IPN VR299

serum 及 Anti-EVE serum 四種，所採用的病毒液為 100 TCID₅₀/ml 的虱目魚病毒液。

首先將抗血清分別做 6 倍連續稀釋，到 6¹⁰ 倍稀釋。取 1 ml 各稀釋倍數的各種抗血清，加上 1 ml 100 TCID₅₀/ml 的病毒懸浮液，混合均勻。另外，取 1 ml L-15-2% FCS 加 1 ml 100 TCID₅₀/ml 病毒懸浮液，混合均勻，做對照組。這些混合液都一起置於 18°C 中 1 小時（需時常搖晃），然後測病毒力價。

十六、胜肽免疫轉印法 (Immunoblotting of Peptide Map)

細胞接種病毒，待出現明顯細胞病變後，收集病毒液及殘留的細胞，離心取沉澱物，以 SDS-PAGE 電泳做出胜肽圖譜，將此圖譜電泳轉印到 nitrocellulose paper 上，經尿素洗去 SDS 後以 IPN-Ab strain 的抗體與之結合，再以 HRP-ProA 使之呈色。

結 果

一、虱目魚病毒對虱目魚之病原性 (Pathogenicity of MV to Milk Fishes)

實驗中之虱目魚養殖一個月，在剛開始幾天食慾較差，爾後皆正常。在這段期間也遇到幾次寒流，死了六隻，經解剖觀察，未發現有眼觀病變。實驗組與對照組之死亡率並未有顯著差別。採樣自注射病毒組及浸泡病毒組的內臟器官（包括肝、脾、腸、腎）皆可分離出病毒，而對照組之虱目魚體則不能分離出任何病毒。第二週及第四週採得病毒接種虱目魚的肝臟及腎臟，電子顯微鏡觀察，在細胞質內可找到病毒顆粒（圖 1、2），但是數量不多，也沒有發現病毒包涵體的存在。

二、不同溫度對虱目魚病毒力價的影響 (Multiplication of Virus in Different Temperature)

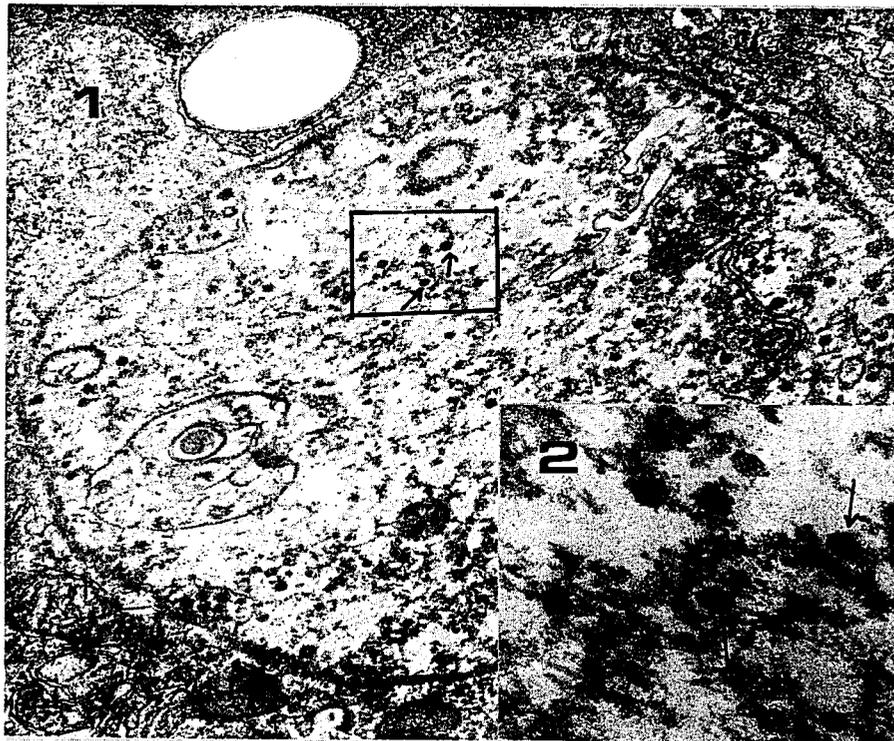


圖 1 34,000×，人工感染病毒之虱目魚腎臟細胞，顯示細胞中病毒顆粒之存在。

圖 2 109,000×，圖 1 黑框中之部份放大。

將虱目魚病毒做 10 倍連續稀釋，置於不同溫度中，測得各溫度下的力價，如表 1 所示。由此表可知，虱目魚病毒最適合生長溫度為 18°C。

表 1 溫度對病毒力價的影響

Temp.	4°C	18°C	31°C	37°C
TCID ₅₀ /ml	10 ^{5.8}	10 ^{9.1}	10 ^{8.5}	10 ⁴

三、酸鹼度對虱目魚病毒力價的影響 (Multiplication of Virus in Solution with Different pH)

由表 2 得知在 pH 3-9 的環境中對病毒力價並沒有什麼顯著影響，在 pH 7-9 應該是最適合病毒生長的酸鹼範圍，pH 11 則對病毒活性之影響較大，使病毒力價下降達 10⁴，顯然此病毒對酸的忍受度較強。

表 2 不同酸鹼度處理對病毒力價的影響

pH	3	5	7	9	11	Control (pH 7.6)
TCID ₅₀ /ml	10 ^{8.2}	10 ^{8.2}	10 ^{8.67}	10 ^{8.67}	10 ^{4.67}	10 ^{8.8}

四、氯仿及乙醚對病毒力價的影響 (Sensitivity of Milk Fish Virus to Chloroform and Ether)

實驗結果如表 3 所示，可以明顯看出，以氯仿及乙醚處理過的病毒其力價和以生理鹽水 (0.85% NaCl) 處理的病毒之力價沒有顯著差異，所以 MV 應該是不具外套膜的病毒。

表 3 氯仿及乙醚對病毒力價的影響

Treatment	Chloroform	Saline	Ether
TCID ₅₀ /ml	10 ^{8.7}	10 ^{8.8}	10 ^{9.5}

五、代謝抑制物對病毒生長的影響 (Metabolic Inhibitors Test)

本實驗採用 100 μM FUDR 及 1 μg/ml, 0.5 μg/ml, 0.2 μg/ml 等三種不同濃度的 Actinomycin D 溶液分別與 MV 病毒作用後，其活性皆未受到抑制，此結果證實 MV 病毒為一種 RNA 型病毒 (表 4)。

表 4 代謝抑制物對病毒力價的影響

Virus	Treatment	Concentration	Titer TCID ₅₀ /ml
Milk fish virus	Saline	—	10 ⁹
	FUDR	100 μM/ml	10 ⁹
	Actinomycin D	1 μg/ml	10 ^{9.1}
		0.5 μg/ml	10 ^{8.5}
		0.2 μg/ml	10 ^{8.3}

六、病毒的生長曲線 (Virus Growth Curve)

MV 在 18°C 下的生長曲線如圖 3 所示。細胞內 (CAV) 和培養液內 (RV) 均含有病毒顆粒。病毒在感染第 4 個小時，RV 部份測不出病毒力價，CAV 的部份測出病毒力價為 10^2 TCID₅₀/ml，感染第 6 個小時以後，病毒力價如圖 3 所示。在前 60 小時時，病毒力價一直在持續性的上升，而且 CAV 比 RV 上升得快且力價高，但第 60 小時後，CAV 的部份力價下降至 RV 之下，到第 72 小時之後，力價便趨於穩定，CAV 的部份約維持在 $10^{8.5}$ TCID₅₀/ml 左右，RV 的部份力價約維持在 $10^{9.6}$ TCID₅₀/ml 左右。

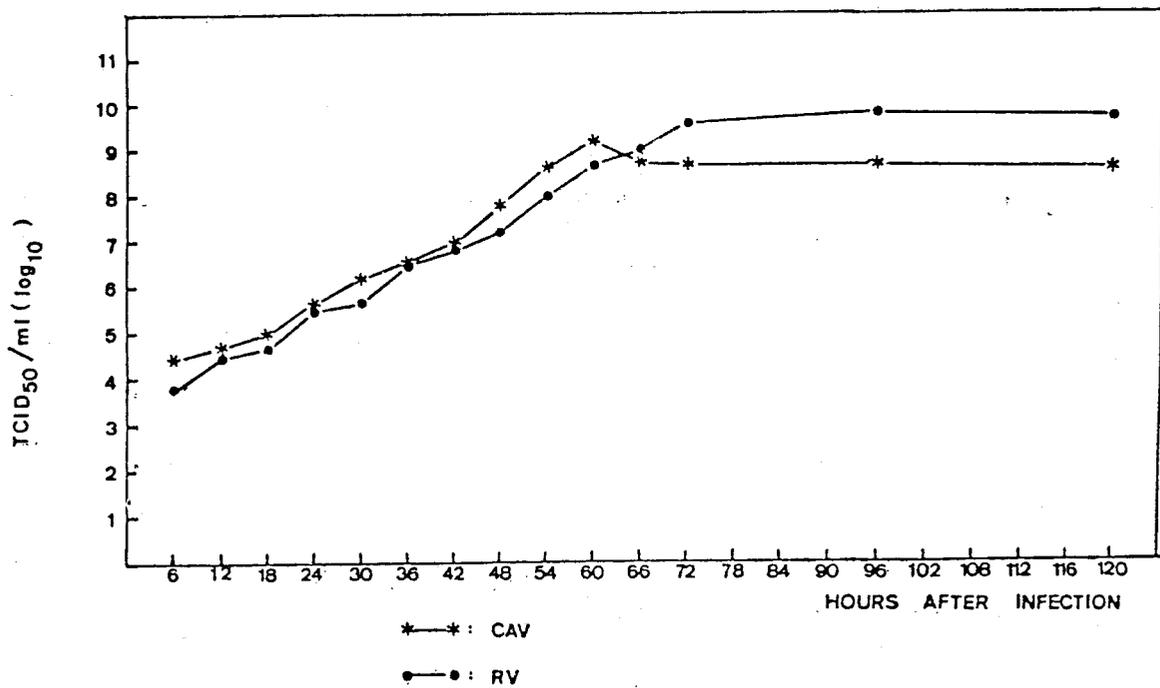


圖 3 病毒在 18°C 下的增殖曲線。

七、病毒在不同細胞中的增殖 (Infectivity of MV Against Various Cell Cultures)

11 種魚類細胞株對病毒的接受性及病毒力價如表 5 所示。PI 細胞是 IPN 病毒持續性感染細胞株，MV 對它沒有感染力，LF 細胞在第一次感染時力價相當高，約 $10^{7.33}$ TCID₅₀/ml，但是，以第一次感染所得的病毒液再接種到 LF 細胞上，LF 即不再出現細胞病變，以後的再感染也都沒有細胞病變。CCF, CCB, CCG 及 CCT 等四種細胞都是錦鯉魚的細胞株，但是只有 CCT 有感受性而且病毒產生力價很高。表 5 並顯示出，鱈來源細胞對 MV 感受性皆不好，生殖腺細胞對 MV 則感受性相當高，病毒力價也高。

八、電子顯微鏡的觀察 (Electron Microscopic Observation)

CCT 胞細在感染 MV 一個小時及感染十天所做成的薄切片，觀察結果如圖 4~11。圖 4、5、6、7 及 8 是 MV 感染 1 小時的結果。圖 4 (5500×) 顯示一個完整的 CCT 細胞，包含細胞核、核仁、粒線體及內質網等胞器。圖 5 (40000×) 顯示幾個大小約 60 nm 的病毒顆粒 (箭頭所指)，在照片中央偏左處，有細胞膜的凸起，正圍著病毒顆粒準備吞噬。由病毒整齊排列在膜上來看，這一帶應有兩處病毒進入細胞的接受位置 (receptor site) 的存在。圖 6 (110000×) 顯示兩個大小約 63 nm 的病毒顆粒排在細胞膜的接受位置上，其中一個已被吞噬 (viropexis)，另一個緊接著也將被吞噬。圖

表 5 虱目魚病毒在不同魚類細胞株中的力價

Cell cultures	Abbreviation	CPE	Titer TCID ₅₀ /ml
Tilapia ovary cells	TO-2	+	10 ^{10.33}
Persistent infection cells	PI	-	—
Louch fin cells	LF	+	10 ^{7.33}
—	—	-	—
Blue gill cells	BF-2	+	10 ⁸
Color carp fin cells	CCF	-	—
Color carp brain cells	CCB	-	—
Color carp gill cells	CCG	-	—
Color carp testis cells	CCT	+	10 ⁹
Top-minnow cells	TM	-	—
Rainbow trout gonad cells	RTG	+	10 ^{6.75}
Chinook salmon cells	CHSE-214	+	10 ^{8.67}

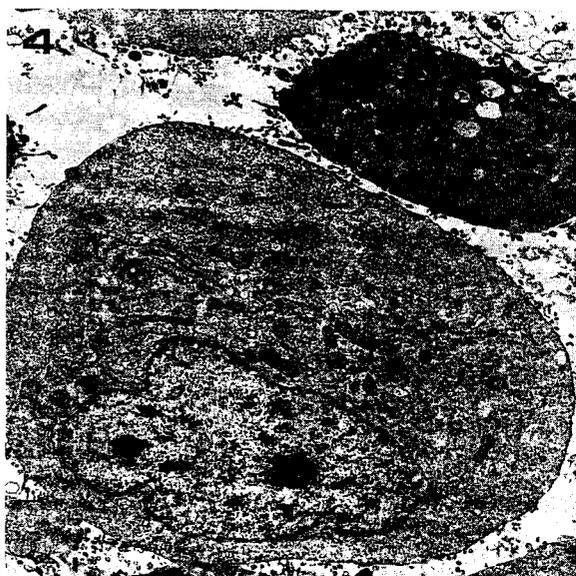


圖 4 5,500×, 完整的 CCT 細胞。



圖 5 40,000, 顯示病毒顆粒吸附在細胞膜之病毒接受位置 (receptor sites) 上。

7 (48000×) 顯示一個剛被吞噬的病毒顆粒, 大小約 63 nm。圖 8 (48000×) 顯示已進入細胞質內的病毒顆粒, 圖之右方為細胞核。

圖 9 (7800×) 顯示一個被病毒感染的細胞, 在細胞質內有兩團病毒團, 即一般所稱的包涵體 (inclusion body), 由包涵體中排列整齊的病毒顆粒可看出應該為六角形的構造, 不具外套膜。圖 10 (110,000×) 可清楚看到整個包涵體, 在包涵體外層為膜狀物, 病毒顆粒呈六角形, 不具外套膜 (non-enveloped) 且為單層外套 (single capsid)。圖 11 (13,600×) 中央區域是一個被分解了的細胞, 和圖 4 比較之下可發現它的胞器都已被分解不成形, 細胞膜也已破裂, 在這個細胞區域內, 分散著許多病毒顆粒。

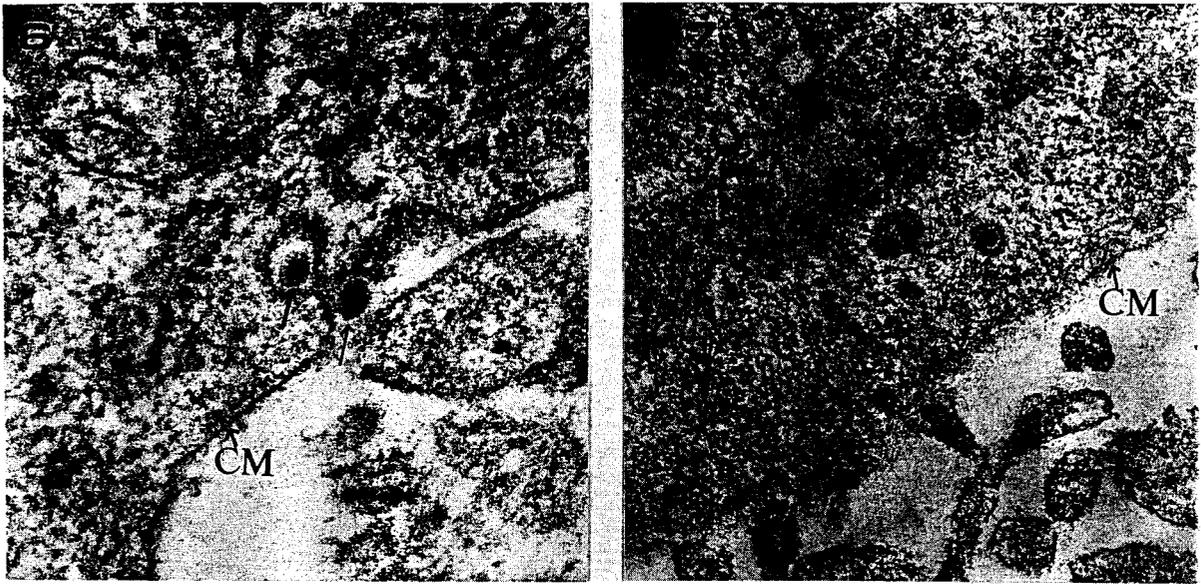


圖 6 110,000×，病毒顆粒被細胞包圍，形成囊胞 (vesicle)。

圖 7 48,000×，病毒顆粒經由囊胞送入細胞質中。

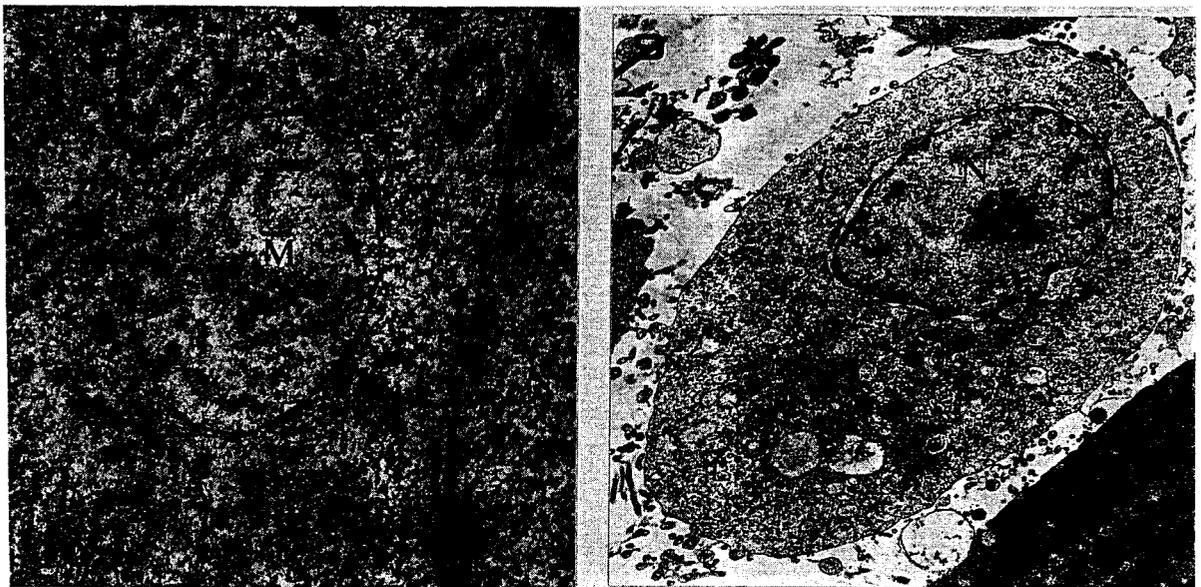


圖 8 48,000×，經由囊胞送入的病毒顆粒，到達細胞核附近。

圖 9 7,800×，病毒感染一段時間後，可觀察到細胞質中的病毒包涵體。

九、蛋白質的電泳分析 (Electrophoresis for Proteins)

純化後的病毒蛋白質電泳分析結果顯示有三條蛋白質帶 (未圖示)，其中有一條非常不明顯，這是因為蛋白質量不夠。

十、核酸的電泳分析 (Electrophoresis for Nucleic Acid)

圖 12 共有五種病毒核酸，由左向右依次為 MV, IPN-Ab, IPN-Sp, IPN-VR299, EVE。這五種病毒核酸除了 VR299 有明顯不同外，其餘四種都非常接近。每一種病毒核酸都只有兩個 band，所

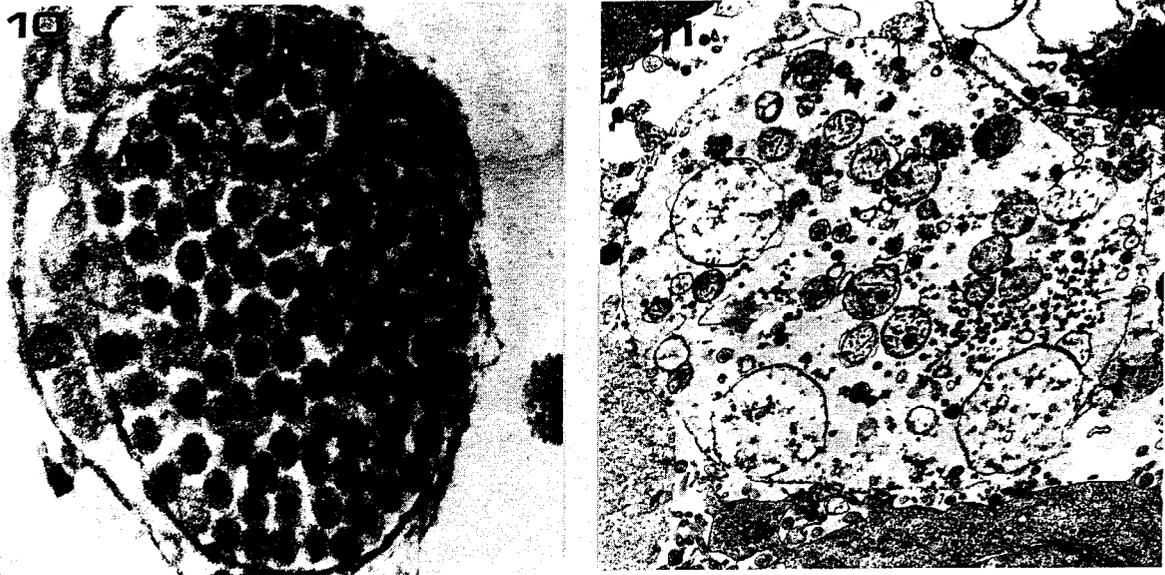


圖10 110,000×，完整的病毒包涵體。

圖11 13,600×，被病毒分解了的細胞，在此區域內可看到許多病毒顆粒。

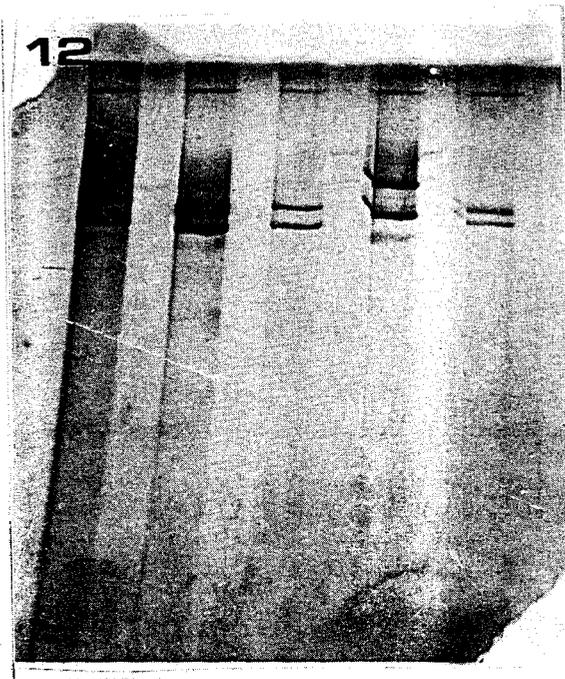


圖12 病毒核酸電泳圖。由左到右依序為 MV, IPN-Ab, IPN-Sp, IPN-VR299 及 EVE。

以這五種病毒的核酸都是兩段式的 (disegmented)。

圖 13 圖示自左右分別為 MV+MV, MV+IPN-Ab, MV+IPN-Sp, MV+IPN-VR299 及 MV+EVE。很明顯可看出 MV 和 IPN-VR299 最不同而和 IPN-Ab 最相似。

十一、血清中和試驗 (Neutralization Test)

由表 6 可看出 Anti-IPN-Ab serum 對 MV 的效果最好，Anti-IPN-Sp serum, Anti-EVE

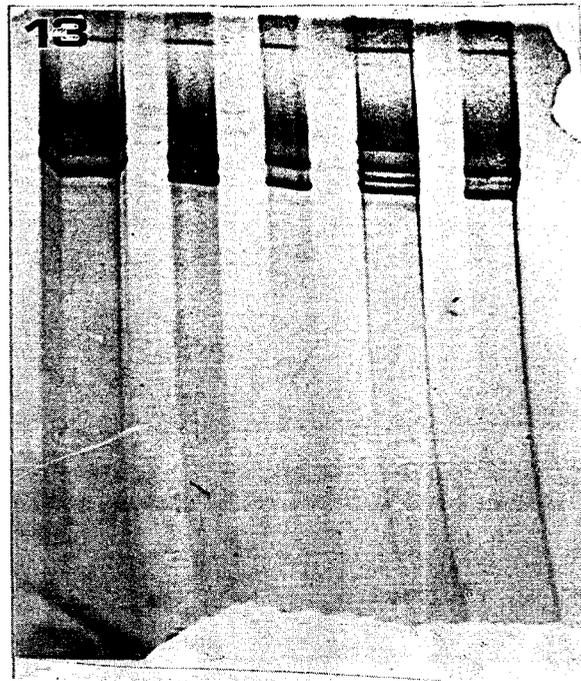


圖13 病毒核酸電泳圖，由左到右依序為 MV+MV, MV+IPN-Ab, MV+IPN-Sp, MV+IPN-VR299 及 MV+EVE。

表6 虱目魚病毒對 Anti-IPNV Ab, Anti-IPNV Sp. Anti-IPNV VR 299 及 Anti-EVE 四種血清的中和試驗

Virus	Antiserum	TCID ₅₀ /ml
Milk fish virus	Anti-IPNV Ab	6 ^{4.2}
	Anti-IPNV Sp	6 ^{5.5}
	Anti-IPNV VR 299	6 ^{6.67}
	Anti-EVE	6 ^{5.57}

serum 對 MV 效果差不多。所以，MV 應較類似 IPN-Ab。

十二、胜肽免疫轉印法 (Immunoblotting of Peptide Map)

結果如圖 14 所示。由左向右分別是 MV, IPN-Ab, IPN-Sp 及 IPN-VR299。由此圖很明顯看出 MV 和 IPN-Ab 之免疫電泳圖一樣的，而 IPN 之 Ab, Sp 及 VR299 三個 strain 之間亦有明顯的相關性。

討 論

在虱目魚活體接種病毒實驗中，虱目魚死亡率為零，而魚體做病毒的分離及電子顯微鏡觀察，均可證實有病毒的存在，所以虱目魚應該為 MV 的帶原者 (carrier)。IPN 病毒之一顯著特徵即為它可在寄主體內複製很久而不引起臨床症狀，此現象在發現 IPN 病毒的 Wood 等人即已注意到。

IPN 病毒在魚體為全身性感染。在體內很多器官均可分離出病毒，其中以腎及脾之分離率最高，因為這兩種器官是 IPN 病毒主要複製場所 (Reno *et al.*, 1978)。本實驗中由實驗感染魚的肝、腎、



圖14 胜肽免疫轉印圖，由左到右依序為 MV, IPN-Ab, IPN-Sp 及 IPN-VR299。

脾等器官中亦可分離出病毒，此結果和 IPN 病毒類似。

MV 感染之細胞株在電子顯微鏡下觀察結果顯示，MV 進入細胞的方式是 viropexis，由細胞膜形成封套 (envelopment) 將其送入細胞中，在細胞質中增殖並形成包涵體，包涵體長到一極限後破裂，病毒逸出離開已被分解的細胞，繼續感染其他的細胞。

MV 病毒核酸經電泳顯示為兩段式，而代謝抑制物試驗結果顯示其為核醣核酸，故推斷其為兩段式核醣核酸，經由和 IPN 三個 strain 做比較結果顯示 MV 和 IPN-Ab 之核酸幾乎相同，再經血清中和實驗及免疫轉印法證實此病毒和 IPN-Ab 相同。

水產類病毒性傳染病，在美國、加拿大、法國、丹麥和日本的水產養殖業都造成極重大的經濟損失，目前臺灣也在鰻魚、虹鱒、吳郭魚及文蛤等發現病毒的感染。其中感染虹鱒的 IPN-VR299 已證實可垂直式及水平式兩種感染方式，造成虹鱒養殖上極大的困擾。尤其近年來臺灣養殖環境受到工業廢水嚴重的污染，水產養殖業更逐漸在走下坡。如何在有限的環境中養出健康品質良好的魚，則有賴環境水質的保持，品種育種的研究，魚類疾病的研究，治療藥物的開發及預防方法的發展，這些都是解決水產業走下坡刻不容緩的當前要務。

摘 要

本研究的目的擬探討自虱目魚 (*Chanos chanos*) 分離出的病毒其生化特性及了解其對虱目魚的感染性及病原性。

將虱目魚病毒接種於錦鯉魚生殖腺細胞中培養並利用電子顯微鏡觀察之，結果顯示此病毒在細胞質

增殖，可形成包涵體，病毒顆粒為二十面體，直徑約 55~65 nm，無外套膜。純化的病毒顆粒以負染色法觀察，發現此病毒僅含單層外套，共有 92 個次蛋白單位 (capsomere)。此病毒不因有機溶劑作用而降低其活性，在酸性和中性中亦很穩定，以 18°C 增殖狀況最好，其遺傳物質為核醣核酸 (RNA)。由血清中和試驗及膠體電泳分析結果發現此病毒之血清型及核酸分子量和 Ab 株的 IPN 病毒較相似。

將本病毒分別以腹腔注射及浸泡方式感染虱目魚稚魚，經一個月的觀察雖未發現有明顯的臨床症狀，但是可自魚體腎臟及肝臟分離出病毒，並可在此兩器官之電子顯微鏡切片中觀察到病毒顆粒的存在。

參 考 文 獻

- Chen, S.N. and G.K. Kou, 1981. A cell line derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) ovary. The Japanese Society of Fish Pathol., 16(3): 129-137.
- Chen, S.N., S.C. Chi, Y. Ueno and G.H. Kou, 1983. Establishment of a cell line from ovary of tilapia. Bull. Europ. Asso. Fish Pathol., 3: 1-4.
- Chen, S.N., J.H. Chen and G.H. Kou, 1989. Cell lines derived from tissues of louch (*Misgurnus anguillicaudatus*) and common carp (*Carpio cyprinus*). Reported on Fish Disease Research X (In press).
- Chen, S.N., S.C. Yeh and G.H. Kou, 1989. Three cell lines derived from tissues of color carp (*Cyprinus carpio*). Reported on Fish Disease Research X (In press).
- Dobos, P., R. Hallette, D.T.C. Kells, O. Sorensen and D. Rowe, 1977. Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus. J. Virol., 22: 150-159.
- Dobos, P., R. Hill, R. Hallett, D.T.C. Kells, H. Becht and D. Teninges, 1979. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. J. Virol., 32: 593-605.
- Dobos, P. and D. Rowe, 1977. Peptide map comparison of infectious pancreatic necrosis virus-specific polypeptide. J. Virol., 24: 805-820.
- Hedrick, R.P., R. Rosemark, D. Aronstein, J.R. Winton, T. McDowell and D.F. Amend, 1984. Characteristics of a new reovirus from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Gen. Virol., 65: 1527-1534.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of the bacteriophage T₄. Nature, 227: 680-685.
- Merril, C.R., D. Goldman, S.A. Sedman and M.H. Ebert, 1981. Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid protein. Science 211: 1437.
- Nicholson, B.L., 1971. Macromolecular synthesis in RTG-2 cells following infection with infectious pancreatic necrosis (IPN) virus. J. Gen. Virol., 13: 369-372.
- Nims, L., J.L. Fryer and K.S. Pilcher, 1970. Studies of replication of four selected virus in two cell lines derived from salmod fish. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 135: 6-10.
- Reno, P.W., S. Darley and M. Savan, 1978. Infectious pancreatic necrosis: Experimental induction of a carrier state in trout. J. Fish Rec. Bd. Can., 35: 1451-1456.
- Shatkin, A.J., J.D. Sipe and P. Loh, 1986. Separation of ten reovirus genomes segments by polyacrylamide gel electrophoresis. J. Virol., 2: 986-991.

- Tung, M. C., 1986. Pathology, Aquaculture of milkfish (*Chanos chanos*): state of the art. pp. 243-262.
- Ueno, Y. and S. N. Chen, 1982. Studies of virus isolated from Japanese eel (*Anguilla japonica*) with nephroblastoma. Institute of Zoology National Taiwan University, Master Thesis.
- Wang, S. Y., S. N. Chen and G. H. Kou, 1987. Establishment of a cell line derived from Top-minnow (*Gambusia paturelis*). The proceeding of the National Science Council, Part B: Vol. 11, No. 3: 245-252.
- Wolf, K. and J. A. Mann, 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes. In Vitro, 16: 168-179.