

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

魚類結病毒與魚類反轉錄病毒共感染時之干擾研究(一)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2311-B-002-105-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生命科學系

計畫主持人：齊肖琪

計畫參與人員：齊肖琪

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 8 月 10 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

# 成果報告

魚類結病毒與魚類反轉錄病毒共感染時之干擾研究(一)

計畫類別： 個別型計畫       整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2311-B-002-105-

執行期間：92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：齊肖琪

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究

計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

執行單位：國立台灣大學生命科學系

中華民國 93 年 8 月 6 日

## 中文摘要

本計劃在探討石斑魚神經壞死症病毒(Grouper Nervous Necrosis Virus, GNNV)和鱧魚反轉錄病毒(Snakehead Retrovirus, SnRV) 共感染同一寄主細胞株時會發生的干擾現象。將 SnRV 感染石斑魚鰭細胞株 GF-1，使之成為有 SnRV 持續性感染的 SGF-1 細胞。在 SGF-1 細胞核酸萃取物中可測到 SnRV 的 cDNA，細胞上清液中測到 SnRV 的 RNA，又用 SGF-1 細胞上清液感染新的 GF-1 細胞，感染後的細胞核酸萃取物中可再度測到 SnRV 的 cDNA，證明 SGF-1 細胞上清液中有感染活性的 SnRV 病毒顆粒，因此證明 SnRV 在 SGF-1 細胞中可以完成生活史。將 GNNV 以相同感染劑量(Multiplicity of infection, MOI)，同步感染相同細胞數目的 GF-1 及 SGF-1 兩組細胞，並觀察兩組細胞中病毒核酸與力價的日變化，結果顯示 (1) SnRV 的反轉錄酶 (Reverse Transcriptase, RT) 會完整地把 GNNV 的兩條單股遺傳 RNA 序列反轉錄為 cDNA，使 GNNV 生活史中產生了原來沒有的新階段；(2) GNNV 的 cDNA 於感染後的第三天開始出現，且隨感染時間增加而增加；(3) GNNV RNA 的產量在兩組細胞系統中沒有差異；(4) SnRV RNA 的量在 SGF-1 細胞中會隨著感染 GNNV 天數的增加而遞減；(5) SGF-1 細胞感染 GNNV 第三天到第五天所收的上清液，在 GF-1 和 SGF-1 兩個系統中所定出來的力價有明顯差距，第四天的上清液在 GF-1 細胞中定出來的力價比在 SGF-1 細胞定出來的力價高出  $10^4$  倍，推測力價的差距與 GF-1 細胞上有兩種病毒的受器可用，而 SGF-1 細胞因 SnRV 的持續性感染造成 SnRV 受器的關閉，只有 GNNV 受器可用有關連。

關鍵詞：石斑魚神經壞死症病毒、鱧魚反轉錄病毒、共感染、石斑魚鰭細胞株

## ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the interference of grouper nervous necrosis virus (GNNV) and snakehead retrovirus (SnRV) during the co-infection of the same host cell line. A SnRV-persistent infected cell line SGF-1 was induced by inoculating the SnRV into GF-1 cell line. The cDNA of SnRV was detected in the nucleic acid extract of SGF-1 cells, and the genomic RNA of SnRV was also detected in the culture supernatant of SGF-1 cells. Moreover, the supernatant of SGF-1 cells was used for the infection of GF-1 cells, and SnRV cDNA was once again detected in infected GF-1 cells indicating that there were infectious particles of SnRV in the supernatant of SGF-1 cells, and the life cycle of SnRV could be completed in the SGF-1 cells. Synchronous infection of GNNV in GF-1 cells and SGF-1 cells was done for the observation of daily changes of the nucleic acids and the titers of the viruses. The results revealed that (1) the SnRV reverse transcriptase (RT) could completely reverse-transcribed GNNV single-stranded RNA1 and RNA2 into cDNA during the co-infection in SGF-1 cells, and created a new cDNA stage in the life cycle of GNNV; (2) the cDNA appeared in SGF-1 cells since the third day after GNNV infection, and the amount of the cDNA increased as the days increased; (3) the amount of GNNV RNA in either infected GF-1 cells or SGF-1 cells were very similar; (4) the SnRV RNA decreased as the infection days increased; (5) the titers of the supernatants of GNNV-infected SGF-1 cells during the third day to the fifth day determined in GF-1 cells were very different from the titers determined in SGF-1 cells, and the titer of the fourth day determined in GF-1 cells was  $10^4$  times higher than that determined in SGF-1 cells. This phenomenon could be related with that the receptors of GNNV and SnRV were available on GF-1 cells, while the receptors of SnRV were closed on SGF-1 cells owing to the SnRV-persistent infection, and only GNNV receptors were available on SGF-1 cells.

Key words: grouper nervous necrosis virus (GNNV), snakehead retrovirus (SnRV), co-infection, grouper fin cell line (GF-1 cell line)

## 報告內容

### 一、前言、研究目的及文獻回顧

魚類病毒性神經壞死症(Viral Nervous Necrosis disease, VNN disease)是目前全世界海水養殖魚類的重要病毒性疾病，得過此病例的魚種超過 32 種(Mundy et al., 2002)，每年都造成魚苗及幼魚的大量死亡。此症的病原體被稱為神經壞死症病毒(NNV)，有兩條單股,正意 RNA，RNA1 負責轉譯 RNA dependent RNA polymerase (RdRp)，RNA2 負責轉譯鞘蛋白質，因此在分類上屬於結病毒科(Nodaviridae)中的魚類結病毒(Fish nodavirus or nodavirus) (Nishizawa et al., 1995)。

病毒性神經壞死症最早發生在日本、東南亞，之後是西歐沿海國家及地中海國家，這兩年則擴散至北美西岸，成為世界性的分佈。NNV 可以經由種魚垂直傳染(Arimoto et al.,1992; Mushiake et al.,1994; Fukuda et al.,1996)，也可以經由共養而水平傳染(Glazebrook et al., 1990; Le Breton et al., 1997)，在用來餵食海水魚的餌料生物中也有測到 NNV 的記錄，所以餌料生物也可能是傳播此病毒的媒介(Chi and Lo, 1998)。海水魚的種魚多半自海中的捕捉，NNV 最早的起源至今仍不清楚。

可以用來研究 NNV 的細胞株不多，最早被發現對 NNV 有感受性的細胞株是 SSN-1 細胞株，此細胞株來自有魚類反轉錄病毒(fish retrovirus)持續性感染的鱧魚魚花(striped snakehead fry)，在建立成細胞株之後，繼代培養中仍然有該病毒的持續性感染，在 SSN-1 細胞株中的 C type retrovirus 被命名為 SnRV (Frerichs et al., 1991)。C-type retrovirus 在許多魚種中被發現過，自然界很多魚種是 retrovirus 持續性感染的天然寄主(Frerichs et al., 1991)，NNV 的寄主範圍也十分廣汎，至少在 32 種魚種發現過，因此，在自然界這兩種病毒有可能同時感染相同的寄主。當這兩種病毒共同感染一個寄主時，會發生什麼樣的演變，對於病毒的散佈、演化、感染力有沒有什麼影響，至今尚無任何報告發表。

SSN-1 細胞株可接受 Fish nodavirus 的感染，並會在感染數天後出現細胞病變(Frerichs et al., 1996)。SSN-1 細胞株對 NNV 有很好的複製能力，病毒力價可達  $10^{9-10}$  TCID<sub>50</sub>/ml (Iwamoto et al., 1999)。目前被廣泛用來研究或增殖 NNV。雖然有報告提出假設，SnRV 的感染可能造成寄主細胞的改變，而引發細胞可以接受 NNV 的感染，但至目前為止還無任何證據可以證明，所以，SnRV 的持續性感染與 SSN-1 細胞對 NNV 有感受性，二者之間有沒有關連尚待求證。當以 SSN-1 細胞株來研究 NNV，SnRV 與 NNV 是共存於寄主細胞中，SnRV 有 Reverse Transcriptase (RT)，會將 SnRV 自己的單股 RNA 反轉成 cDNA，然後插入寄主的基因體中，但會不會也將 NNV 單股的 genomic RNA 反轉成 cDNA 而改變 fish nodavirus 的生活史？若 NNV 的生活史因此被改變，對於改變後的 NNV 子代感染新的寄主細胞時有無增進或減弱的影響？這兩種病毒在共感染期間，各自核酸的消長如何？這些問題都是本計劃想要探討的內容。

此研究需要一個有 SnRV 持續性感染的細胞株，但也要有一株無 SnRV 感染卻

對 NNV 有感受性的細胞株作為對照，因為 SnRV 有 arginine tRNA binding site (Hart *et al.*, 1996)，所以很難經由株化(cloning) 得到 SnRV-free 的 SSN-1 細胞 (Iwamoto *et al.*, 2001)。GF-1 細胞株是繼 SSN-1 細胞株之後，一株對 NNV 有很好感受性的細胞株，此細胞株來自健康的石斑魚鰭組織，NNV 在 GF-1 細胞株複製後的力價可達  $10^{8.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml (Chi *et al.*, 1999)。至目前為止，沒有在 GF-1 細胞中測到其他病毒的持續性感染。所以可以用 GF-1 細胞株感染 SnRV，使成為一株 SnRV 持續性感染的細胞株，並用原來的 GF-1 細胞株作為負對照，來進行 *in vitro* 方面的研究。

## 二、結果與討論

### 1. SnRV 可感染得上 GF-1 細胞並在其中完成其生活史

本實驗將含有 SnRV 的 SSN-1 細胞上清液用來感染 GF-1 細胞，培養數日後分別取感染細胞及其上清液的核酸萃取物，測到細胞中有有 SnRV 的 cDNA 存在，上清液中有 SnRV 的 RNA 存在(圖 1)，表示 SnRV 可以感染 GF-1 細胞，並有 SnRV 的 cDNA 插入寄主細胞核酸中，造成持續性感染，且有新的 SnRV 病毒釋放到上清液中，把此 SnRV 持續性感染的 GF-1 細胞改命為 SGF-1 細胞。將 SGF-1 細胞上清液感染新的一盒 GF-1 細胞，又可於感染後的 GF-1 細胞中測到 SnRV 的 cDNA (圖 1)，證明瞭 SGF-1 細胞上清液中存在具感染力的 SnRV 病毒顆粒。因此證明 SnRV 可於 SGF-1 細胞中完成其生活史。

### 2. SnRV 的反轉錄酶(RT)可以完整地將 GNNV 的 RNA1 及 RNA2 反轉成 cDNA

將 GNNV 感染 SGF-1 細胞，然後萃取細胞的 DNA，分別用 GNNV RNA1 及 RNA2 的專一性引子對進行 PCR 檢測，發現 GNNV 的兩條單股 genomic RNA 皆會被轉錄成為 cDNA (圖 2, 3)，又以 Inverse PCR 的方式來夾 NNV cDNA，進行定序與比對，發現 SnRV 能將 NNV RNA1 與 RNA2 的全長完整地反轉錄，兩條 cDNA 內容與已發表的 greasy grouper NNV RNA1, RNA2 的 cDNA 序列相似度分別為 97% 及 98%。因此，GNNV 與 SnRV 在 SGF-1 細胞中的共感染可以改變 GNNV 的生活史，使 GNNV 增加了一個 cDNA 的階段。推測 NNV RNA 上必有讓 SnRV RT 辨認之反轉錄開始決定位。已知 Retrovirus RT 反轉錄起始決定位，需要辨認病毒核酸上的 primer binding site (PBS) 序列，且此段序列的前後 RNA 所形成之二級結構，亦會影響反轉錄效率 (Aiyar *et al.*, 1992)。SnRV 的 PBS 位於其 RNA 5'端第 84-102 bp 處 (Hart *et al.*, 1996)，因此本實驗選取 SnRV 5'端前 110 bps 序列，與 NNV RNA1、RNA2 正負股序列用 GCG 系統加以比對，電腦比對結果顯示，不論 NNV 之 RNA1 或 RNA2 與 SnRV 5'端 110 bps 序列最高的相似度都小於 50%，因此尚不能確定以電腦比對而得到之最高相似度的 NNV RNA 序列就是我們要找的 SnRV RT 反轉錄的開始決定位。

### 3. GNNV 在 SGF-1 細胞與在 GF-1 細胞中 RNA 複製量的比較

以同步驟同 GNNV 劑量感染同細胞數目的 SGF-1 及 GF-1 細胞，收取感染五天後的細胞碎片，萃取全部的 RNA，定量後取相同量的 RNA，先系列稀釋，再將各稀釋度的 RNA，以 GNNV RNA2 專一性的引子進行 RT-PCR。結果 GNNV RNA2 在 SGF-1 及 GF-1 細胞中的複製量一樣多，顯示 GNNV 與 SnRV 在 SGF-1 細胞中的共感染對於 GNNV RNA 的複製量並無促進或抑制的效果。

#### 4. GNNV 感染 SGF-1 細胞後 GNNV cDNA 及 SnRV RNA 量的變化

將 GNNV 感染 SGF-1 後，收取第一到六天的細胞上清液及細胞觀察日變化，萃取 DNA，以 GNNV 專一性引子對進行 PCR。結果發現 GNNV 感染 SGF-1 第三天後，方可檢測到 NNV 之 cDNA，且會持續以一定的數量存在到感染後第六天（圖 4A）。以 real time PCR 檢測相同的細胞樣本，結果同樣在感染第三天後才可測到 NNV 的 cDNA，cDNA 的量並隨感染天數增加而增加。反之，自 GNNV 感染 SGF-1 的細胞中萃 RNA，以 SnRV 專一性引子對進行 RT-PCR 檢測，結果從感染的第三天起就無法檢測到 SnRV 的 RNA（圖 4B），若以 nested PCR 檢測，則延長到感染後第四天無法測到 SnRV 的 RNA；以 real time PCR 重複檢測 SnRV 的 cDNA，也顯示 SnRV cDNA 的量會隨感染天數的增加而遞減。SnRV RNA 的量減少，有下列兩點推測：(1) NNV 的 RNA 片段較短，複製較快，搶走了大部分細胞中的資源，使細胞資源快速且大量的被耗盡，造成 SnRV 可用資源減少，SnRV RNA 的複製與包裝效率下降；(2) Guo 等（2003）發現 NNV 之  $\alpha$  蛋白（鞘蛋白質前身）會進入寄主細胞核中，而 Lyles（2002）研究指出，許多 RNA 病毒的蛋白質會進入寄主細胞核中，並抑制寄主 DNA 轉錄 RNA，因此推測 SnRV RNA 的減少可能是因為插在寄主 genome 中之 SnRV cDNA 的反轉錄受到抑制所致。

#### 5. GNNV 感染 SGF-1 細胞第四天的上清液在 GF-1 與 SGF-1 兩種細胞中定力價有明顯落差

本項實驗有兩組數據，第一組實驗是以同劑量的 GNNV 同步感染 GF-1 及 SGF-1 細胞，分別以 GNNV/GF-1 及 GNNV/SGF-1 來代表，在第五天收取細胞上清液測力價，每種上清液定力價時都分別用兩種細胞(GF-1, SGF-1)來測定。GNNV/GF-1 上清液中只含 NNV 一種病毒，以 GF-1 定力價時，力價為  $10^{7.7}$  TCID<sub>50</sub>/ml；GNNV/SGF-1 上清液中同時含有 GNNV 及 SnRV 兩種病毒，在 GF-1 細胞中所定出來的病毒力價為  $10^{11.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml，比 GNNV/GF-1 的上清液力價高了  $10^{3.8}$  TCID<sub>50</sub>/ml。已知 SnRV 的感染並不會使 GF-1 細胞出現 CPE，所以 GNNV/SGF-1 的上清液在 GF-1 細胞定出的力價較高之可能原因有下列兩個假設：(1) 力價的決定是以觀察 CPE 為準則，而 GNNV 與 SnRV 一起消耗 GF-1 細胞資源，強化了 CPE 現象，使得 GNNV/SGF-1 上清液在 GF-1 細胞中的力價顯高；(2) SnRV 以尚不知道的機制使 GNNV 在 SGF-1 細胞中的複製量提高，所以 GNNV/SGF-1 細胞上清液中所含有的 GNNV 比 GNNV/GF-1 上清液中的量多。然

而，當 GNNV/GF-1 上清液用 SGF-1 測定力價時，GNNV 與 SnRV 也是同時存在 SGF-1 細胞中，但 SGF-1 細胞所測得的力價卻和以 GF-1 細胞(無 SnRV 共感染)測得的力價差不多，因此上述第一種假設的可能性低。又 GNNV/GF-1 或 GNNV/SGF-1 的上清液以 SGF-1 測定力價時，力價也相當，所以 SnRV 在寄主細胞中與 GNNV 的共存並不會提高 GNNV 的複製量，因此上述的第二個假設的可能性也不大。

GNNV/SGF-1 上清液以 GF-1 測得的力價遠高於 GNNV/SGF-1 以 SGF-1 測得的力價，也高於 GNNV/GF-1 以 SGF-1 測得的力價，若比較三者的差異，則在於以 GF-1 測力價時，GF-1 上 SnRV 的進入受器是開啟的，而 GNNV/SGF-1 上清液中 NNV 與 SnRV 是同時感染 GF-1，因此提出第三個假設：當 NNV 感染 SGF-1 時，上清液會出現 NNV 病毒顆粒、SnRV 病毒顆粒，也可能出現 SnRV 的外鞘錯包 NNV cDNA 或 RNA 的重組病毒顆粒，但 GF-1 是沒有 SnRV 帶原的細胞株，所以細胞上提供 SnRV 進入的受器是開放的，因此 NNV 的 genome 進入 GF-1 細胞的管道除了 NNV 的受器，還多了 SnRV 的受器，而帶原 SnRV 的 SGF-1 細胞，SnRV 受器則被關閉，造成同是 GNNV/SGF-1 細胞上清液，但 NNV genome 進入 GF-1 細胞的數量會比進入 SGF-1 細胞多，故在 GF-1 細胞測得的病毒力價比在 SGF-1 細胞測得的高。

本項目的第二組實驗是以相同 GNNV 感染劑量感染 SGF-1 細胞，然後觀察 NNV cDNA、SnRV RNA 及 GNNV/SGF-1 上清液在 GF-1 與 SGF-1 細胞測定的力價之日變化。結果無論以 GF-1 或 SGF-1 細胞來測定 GNNV/SGF-1 上清液之病毒力價，病毒力價都會隨著感染天數的增加先上升後下降，但以第四天所收取之細胞上清液病毒力價最高。每日所收的病毒上清液在 GF-1 細胞中所測定的力價比在 SGF-1 細胞中所測定的力價要高出  $10^4$  倍(表 1)。照上述第三個推測，即 GNNV/SGF-1 上清液中可能有 SnRV 外鞘錯包 NNV cDNA 的重組病毒顆粒，造成感染第四天的上清液在 GF-1 與 SGF-1 兩細胞系統測得之力價有明顯差距，然而病毒力價第四天之後又逐日降低，推測是因為包裝錯誤的病毒顆粒是異常的，在室溫下結構不穩定，容易被分解，又 SnRV 的 RNA 於第四天後降低到 nested PCR 都測不到的程度，故 SnRV 的鞘蛋白質產量也大幅降低，造成感染後第 6 天的細胞上清液中，幾乎沒有這種包裝錯誤的病毒顆粒，所以在 GF-1 與 SGF-1 所測到的病毒力價就非常接近了。

然而，在自然的情況下，病毒包裝錯誤的機率應該很低，可是 GF-1 與 SGF-1 所測得之病毒力價差異卻高達  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml，因此造成病毒力價差異應該還有其他未知的機制。在此提出第四個假設：由於 SnRV 的病毒顆粒約是 NNV 的三倍大，且是以膜融合的方式進入細胞，當 GF-1 細胞上有 SnRV 的受器，且當 GNNV/SGF-1 上清液中同時含有 GNNV 與 SnRV 時，SnRV 進入細胞的過程中，很可能把 NNV 一起帶入，造成 GNNV/SGF-1 上清液力價比 GNNV/GF-1 上清液力價在 GF-1 細胞中測定時高出很多，SGF-1 細胞只有 GNNV 的受器可用，所以不會有 SnRV 進入時順便協助 GNNV 帶入的情形發生，所以 GNNV/SGF-1 上清



液在 GF-1 細胞中定出的力價會比在 SGF-1 細胞中定出的力價高。這個假設日後將進一步求證。

#### 6. 共感染產生之影響會因細胞株不同而有差異

為了解 GNNV 感染 SGF-1 細胞產生 NNV cDNA 的現象在其他有 SnRV 持續性感染的細胞株中是否也會發生，於是比較 GNNV 感染來自鱧科有 SnRV 持續性感染的 SSN-1 細胞株，以及來自金目鱸腦並經 SnRV 感染成為 SnRV 持續性感染的 ScBB 細胞株，同時以 GNNV 感染 SGF-1 細胞株為正對照組。結果發現，SGF-1、ScBB 細胞株在共感染下，皆可以用 PCR 檢測到 NNV 之 cDNA，但是 SSN-1 細胞株在 NNV 與 SnRV 共感染的狀況下卻檢測不到，因此，NNV cDNA 的產生，會因為不同種類寄主細胞而有不同。對此現象提出可能的解釋如下：(1) 在非自然寄主中 (SGF-1、ScBB) 產生的 SnRV RT，其辨識特定 RNA 的能力變弱，所以會做出 NNV cDNA；(2) 由於 SnRV 的 RT 進行反轉錄時會使用寄主的 tRNA 作為引子 (Weiss *et al.*, 1985)，而 SSN-1 是 SnRV 的自然寄主，因此其所提供的 RT 引子，對 SnRV RNA 的專一性高，造成 NNV 感染 SSN-1 情形下，NNV RNA 對 RT 引子的競爭力遠弱於 SnRV RNA，因此 NNV RNA 無法被反轉錄出 cDNA。但是，人為造成 SnRV 帶原之 SGF-1、ScBB 細胞株，寄主細胞所提供的 RT 引子，對 NNV RNA 的親和力與 SnRV RNA 相當，甚至可能更好，因而造成 NNV RNA 被大量的反轉錄成 cDNA。

反轉錄病毒對於寄主的影響比其他病毒來的複雜，主要是因為它有反轉錄酵素，能把自己的核酸轉成 cDNA，然後插入寄主的基因體中，但另一個影響是，它也極有可能將其他感染相同寄主的單股 RNA 病毒進行反轉錄，改變原來病毒的生活史，細胞像一個小的生態系，兩種病毒共存時就像在一個生態系中爭取生態地位(Nich)，這之間會造成兩種病毒的共演化，且因這兩種病毒在很多魚種都有天然感染的記錄，若在自然界的魚體中這兩種病毒有交會，則 fish retrovirus SnRV 雖然對魚體沒有明顯的致病性，但對致病性極強的 fish nodavirus NNV 的生活史或是在自然界的傳播方式與成功機率有何影響是值得未來進一步探討。

#### 三、計劃成果自評

探討 SnRV 與 GNNV 兩種病毒在石斑魚細胞中的互動是一個很新的題目，計劃執行結果比原先所提的計劃內容多做了好幾項實驗，包括(1) GNNV RNA1, RNA2 被 SnRV RT 反轉錄之後的全長定序，(2) SnRV RT 在 NNV 序列上 primer binding site 的分析，(3) GNNV 感染 SGF-1 細胞的病毒核酸與力價日變化的分析，(4) GNNV 在不同科魚類細胞株中，與 SnRV 互動模式的比較。更對所觀察到的現象提出了很多的推論與假設，提供日後研究的方向。成果自評是內容充實且有創見。

#### 五、參考文獻

Aiyar, A., D. Cobrinik, Z. Ge, H.-J. Kung, and J. Leis (1992) *J. Virol.* 66, 2464-2472.

- Arimoto, M., Mushiake, K., Mizuta, Y., Nakai, T., Muroga, K., and Furusawa, I. (1992) *Fish Pathol.* 27, 191-195.
- Chi S.C. and Lo B. J. (1998) *COA Res. Appl. Biotech. Aquat.* 156-166.
- Chi, S. C., Hu, W. W. & Lo B. J. (1999). *J. Fish Dis.* 22, 173-182.
- Frerichs, G.N., Morgan, D., Hart, D., Skerrow, C., Roberts, R.J. and Onions, D.E. (1991) *J. Gen. Virol.* 72, 2537-2539.
- Fukuda, Y., Neuyen, H.D., Furuhashi, M. and Nakai, T. (1996) *Fish Pathol.* 31, 165-170.
- Guo, Y.X., Wei, T., Dallmann, K., and Kwang, J. (2003) *Virol.* 308, 74-82.
- Hart, D., Frerichs, G.N., Rambaut, A. and Onions, D.E. (1996) *J. Virol.* 70, 3603-3616.
- Iwamoto, T., Mori, K., Arimoto, M. and Nakai, T. (1999) *Dis. Aquat. Org.* 39, 37-47.
- Munday, B.L., Kwang, J., and Moody, N. (2002) *J. Fish Dis.* 25, 127-142.
- Mushiake, K., Nishizawa, T., Nakai, T., Furusawa, I., and Muroga, K. (1994) *Fish Pathol.* 29, 177-182.
- Nishizawa, T., Masaaki, K., Nakai, T. and Muroga, K. (1995) *J. Gen. Virol.* 76, 1563-1569.

## 六、圖表

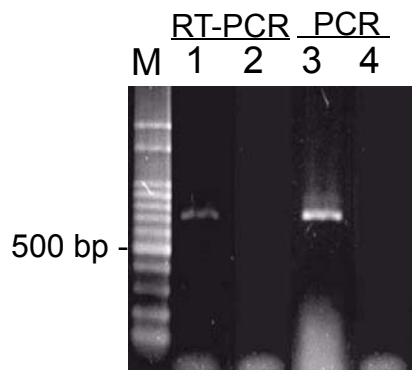


圖 1 以 RT-PCR 偵測 SGF-1 細胞上清液中的 SnRV RNA，及以 PCR 偵測被 SGF-1 上清液感染後的 GF-1 細胞中的 SnRV cDNA。1, SGF-1 細胞上清液; 2, GF-1 細胞上清液; 3, 被 SGF-1 細胞上清液感染五天後的 GF-1 細胞; 4, GF-1 細胞。M, DNA marker (Promega)。

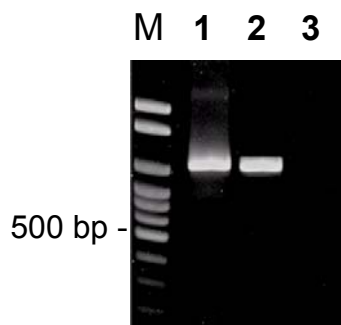


圖 2 以 PCR 偵測被 GNNV 感染後 SGF-1 細胞中的 GNNV RNA2 之 cDNA。1, 由純化的 GNNV RNA 進行 RT-PCR 後的產物當作 PCR 的 template; 2, 自 GNNV 感染後的 SGF-1 細胞中萃取 DNA 當作 PCR 的 template; 3, 自 SGF-1 細胞中萃取 DNA 當作 PCR 的 template。PCR 所用 Primers 對 GNNV RNA2 有專一性。

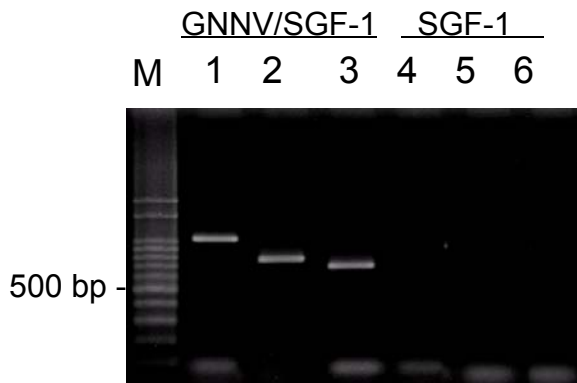


圖 3 以 PCR 偵測被 GNNV 感染後的 SGF-1 細胞中 GNNV RNA1 之 cDNA。自 GNNV/SGF-1 細胞萃取 DNA，用三組 GNNV RNA1 專一性之核酸引子對來進行 PCR。以 SGF-1 細胞當作負對照組。1,4 用 (F593,R1652); 2,5 用 (F1641,R2436); 3,6 用 (F2232,R2938) 引子對。

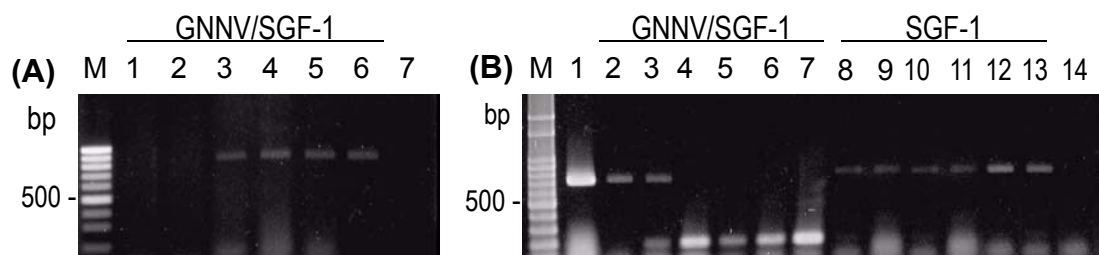


圖 4 GNNV 感染 SGF-1 細胞後病毒核酸的日變化。(A)自感染 GNNV 後 1-6 天(第 1-6 行)的 SGF-1 細胞中萃 DNA，以 GNNV 專一性的核酸引子進行 PCR，偵測 GNNV 的 cDNA，並以 SGF-1 細胞所萃取的 DNA (第 7 行)當作負對照組。(B) 自感染 GNNV 1-6 天的 SGF-1 細胞中萃 RNA，以 SnRV 專一性的核酸引子進行 RT-PCR，偵測 SnRV 的 RNA。1，以 SSN-1 上清液萃得的 SnRV genomic RNA 當作 RT-PCR 的 template，作為正對照組；2-7，自感染 GNNV 1-6 天的 SGF-1 細胞萃取的 RNA；8-13，培養 1-6 天的 SGF-1 細胞中的 RNA；8，自 GF-1 細胞中萃取的 RNA。

表 1 以 GF-1 及 SGF-1 兩種細胞系統測量感染 GNNV 之 SGF-1 細胞上清液病毒力價的日變化。病毒力價以  $\text{Log TCID}_{50}/\text{ml}$  表示。

感染天數	1	2	3	4	5	6
GF-1	3.3	5.0	9.0	12.0	8.8	7.5
SGF-1	3.0	6.0	7.5	8.0	7.0	7.3