

PT-PCR 法에 의한 Infectious Pancreatic Necrosis Virus의 早期診斷

강호성 · 공희정 · 구현나 · 박정우* · 손상규** · 박명애** · 김진우** · 김한도

釜山大學校 分子生物學科, 蔚山大學校 微生物學科*, 國立水產振興院 病理科**

Rapid and Sensitive Detection of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Ho Sung Kang, Hee Jeong Kong, Hyun Na Koo, Jeong Woo Park*
Sang Kyu Sohn**, Myung Ae Park**, Jin Woo Kim** and Han Do Kim

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Department of Microbiology, Ulsan University, Ulsan 680-749, Korea

**Department of Pathology, National Fisheries Research and Development Institute, Kijang-gun, Pusan 626-900, Korea

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is an economically important fish pathogen since it causes the high-mortality disease in early stage of hatchery-reared fishes. In order to develop a rapid, sensitive and highly specific detection method for IPNV, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out using the oligonucleotide primers selected from the sequence of VP2, a major capsid polypeptide of IPNV. As little as 40ng of purified IPNV dsRNA was detected by RT-PCR amplification, but no amplification products were obtained when nucleic acid genomes from other fish pathogens such as IHNV were used as RT-PCR templates. *in situ* RT-PCR detected IPNV directly in tissues of early stage of, IPNV-infected *Paralichthy olivaceus*, avoiding purification of virus and viral genome. These results show that RT-PCR and *in situ* RT-PCR methods are useful for the rapid and sensitive identification of IPNV.

Key words : IPNV, RT-PCR, *in situ* RT-PCR

序 論

Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV)는 주로 6개월 미만의 치어에 감염하는 魚類 바이러스로 (Trust, 1986), 家禽類의 infectious bursal disease virus와 초파리 (*Drosophila melanogaster*)의 Drosophila X virus 등과 함께 Birnaviridae family에 속한다 (Brown, 1986 ; Dobos

et al., 1979). IPNV는 2개의 절편으로 이루어진 double-strand RNA를 게놈으로 가지며, genome segment A로 부터 발현되는 단백질은 구조단백질인 VP2와 VP3, 비구조단백질인 NS이다 (Duncan et al., 1987). VP2 (52-54 kDa)는 혈청형 특이적 항원으로 인식되어지는 부위이며, VP3 (31 kDa)는 viral capsid 내부에 있는 구조단백질이며, NS (29 kDa)는 protease activity를 가진

본 연구는 '96 수산특정연구개발사업과제 연구비지원에 의하여 수행되었음.

다 (Macdonald and Dobos, 1981). Genome segment B에서 발견되는 VP1은 분자량이 109 kDa인 virion-associated RNA dependent RNA polymerase로 작용한다(Gorbalenya and Koonin, 1988). 현재 4종류의 IPNV의 혈청형 즉 Ab, SP, VR-299, DRT가 알려져 있다 (Park et al., 1989).

IPNV는 전세계적으로 연어나 송어 등의 담수어에서 많이 발견되고 있으며, 최근 농어류, 가자미, 청어류, 뱀장어와 각종 해산어, 연체동물류에서도 발견되면서 경제적으로 중요한 어류 병원체로 인식되고 있다. 1980년대 후반부터 IPNV의 동정과 특성에 대한 생화학적, 면역학적 연구가 활발히 진행되고 있는데, 특히 어류 양식산업의 경제적인 측면을 고려할 때 IPNV 바이러스의 감염 여부를 신속, 정확하게 진단할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다. 바이러스 감염을 진단하는 방법으로는 direct immunofluorescence, counterimmunoelectrophoresis (Dea and Elazhary, 1983), enzyme immunoassay (Rodak et al., 1988), coagglutination test (Kimura et al., 1984), immunodot blot (Hsu et al., 1989) 등이 이용되고 있다. 그러나 이들 방법은 시간이 많이 걸리는 바이러스 증식 단계를 필요로 하기 때문에 바이러스 감염을 신속, 정확하게 발견하기에는 어려운 점이 많다. 따라서 본 연구에서는 IPNV 바이러스를 좀 더 빠르고 정확하게 진단하는 방법을 개발하고자, 최근 극소량의 특정 RNA를 증폭시키는 방법으로 각광을 받고 있는 역전사-중합효소연쇄반응법 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)으로 (Lopez-Lastra et al., 1994), 국내에서 발견되는 IPNV를 조기 진단할 수 있는지 그 가능성을 조사하였다. 그리고 RNA 분리없이 조직 그 자체를 대상으로 RT-PCR을 행하는 방법으로, 세포에 유전자 copy number가 10개 미만의 경우에도 추적이 가능하며 실험방법이 쉽고 시간이 적게 걸리는 장점이 있는 *in situ* RT-PCR 방법을 이용하여 (Emble-

ton et al., 1992; Patterson et al., 1993), 치어조직이나 세포에 감염된 IPNV 바이러스의 조기 발견에 활용할 수 있는지도 동시에 조사하였다.

材料 및 方法

1. CHSE-214 세포배양

Chinook salmon embryonic CHSE-214 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% 항생제(penicillin/streptomycin)가 포함된 Dulbecco's modified Eagles' medium (DMEM) 배지를 사용하여 18°C로 배양기에서 배양하였다.

2. 바이러스 및 바이러스 유전자의 분리

CHSE-214 세포에 IPNV를 감염시키고 5일 후 cytopathic effect를 보이면 성장배지를 수거하고 4,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 세포의 파편을 제거하였다 (Chung et al., 1978). 바이러스를 포함하고 있는 성장배지에 5% (w/v) PEG, 2.2% (w/v) NaCl을 처리하고 10,000 rpm에서 1시간 원심분리하여 바이러스 침전물을 얻었다. 침전물을 TNE 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 녹여서 40%, 30%, 20% CsCl₂ (w/w) 농도구배 원심분리함으로써 IPNV를 순수분리하였다.

분리된 IPNV 바이러스에 digestion solution (0.2 M Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS, 1 mg/ml proteinase K)를 65°C에서 2시간 처리하고 phenol-chloroform (1:1)을 이용하여 RNA를 추출하였다. 4°C에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 취하고 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)로 씻어준 후 0.3 M sodium acetate (pH 5.2)와 ethanol를 처리해서 -70°C에서 침전시켰다. 4°C에서 15,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 침전된 RNA를 얻어서 70% ethanol로 한번 씻어주고 TE 완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA)에 녹인 후 형광분석법으로 정량하였다.

3. 감염세포로부터의 RNA templates 준비

바이러스를 분리하지 않고 IPNV가 감염된 어류세포로부터 RT-PCR에 사용될 RNA templates를 얻고자, cytopathic effect를 보이는 IPNV가 감염된 CHSE-214 세포의 성장배지를 수거하여 원심분리로 세포파편을 제거하고, 얻어진 상층액 45 μ l에 0.75 M KCl, 30 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1 mg/ml proteinase K를 5 μ l 넣고 65°C에서 2시간 반응시킨 후 proteinase K를 95°C에 10분간 가열하여 불활성화시켰다 (Lopez-Lastra et al., 1994). Sec-butanol로 여러번 씻음으로써 농축시키고, 이를 RT-PCR에 template로 이용하였다.

4. RT-PCR 조건

순수분리된 IPNV의 dsRNA나 IPNV가 감염된 세포배양액을 대상으로 RT-PCR을 실시하였으며, 먼저 90% DMSO를 처리하여 RNA를 변성시켰다. 1 μ g/ μ l RNA에 sense, antisense primer 각각 20 pmole씩 넣고 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 M dNTPs, 8 units reverse transcriptase, 1 unit RNase inhibitor, 1.5 units Taq polymerase를 넣어서 반응시켰다. 역전사는 95°C에서 5분간 변성시킨 후 42°C에서 15분간 수행하였으며, PCR은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 하여 30회 반복하였다. 얻어진 RT-PCR 산물은 1.5% agarose 겔 전기영동으로 분석하고 Etidium Bromide (EtBr) 염색으로 관찰하였다.

5. *in situ* RT-PCR 조건

in situ RT-PCR은 Perkin Elmer 社의 GeneAmp In Situ PCR system 1000를 이용하여 Patterson et al. (1993)의 방법으로 실시하였다. 바이러스 감염이 확인된 넙치 치어의 근육 및 내장 조직을 준비하여 4% paraformaldehyde로 고정한 후 6~7 μ m의 두께로 잘라 이를 silane-coated slides 위에 얹고, xylene, 100% 에탄올, 95% 에탄올에 각각 5분씩 넣어 paraffin을 제

거하였다. PBS로 5분간 씻은 후, 20 μ g/ μ l proteinase K 용액을 조직에 50 μ l 처리하고 37°C에서 1시간 배양하였다. 95°C에서 1분간 가열하여 단백질분해효소를 불활성화시킨 후 조직을 80%, 95%, 100% 에탄올로 각각 5분씩 씻고 DNase 1 U/ μ l를 처리하여 DNA를 제거하였다. Slide glass에 PCR 혼합액 (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 10 pmole primers, 1 μ M dig-dUTP)와 역전사 효소를 첨가한 다음 42°C에서 15분간 cDNA를 합성하였다. 조직에 PCR 혼합액을 50 μ l씩 떨어뜨린 후 10 units의 Taq polymerase를 넣어 cDNA를 증폭시켰다. PCR은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분의 조건으로 30회 실시한 후 slides를 꺼내 PBS에 씻고 alkaline phosphatase conjugated anti-digoxigenin antibody를 4°C에서 2~4시간 처리하였다. PBS로 2번 씻은 후 Buffer C (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5)에 희석된 NBT (nitro blue tetrazolium)와 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)를 처리하고 상온에서 5~10분 반응시킨 후 발색 반응을 관찰하였다. Counterstaining은 fast green으로 10초간 실시하였다.

6. IPNV 단백질 전기영동

분리된 바이러스에 lysis buffer (PBS, 1% deoxycholate, 1% Triton X-100)를 처리하여 세포를 깬 후 14,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 단백질을 얻어 Bicinchoninic Acid법 (Smith et al., 1985)으로 정량한 후, 일정량 (50 μ g)을 취하여 동량의 2X Laemmli Sample Buffer를 섞어주고 100°C에서 5분간 가열하였다. 10% polyacrylamide 겔에서 전기영동한 후 Coomassie blue로 단백질을 염색하였다 (Laemmli, 1970)

7. 유전자 염기서열 조사

RT-PCR 결과 얻어진 증폭산물의 DNA 염

기서열을 조사하기 위하여 1.5% agarose 겔 전기영동하고 EtBr 염색으로 band를 확인한 후, band를 잘라 electroelution 방법으로 PCR product를 분리하여 DNA sequencing의 주형으로 하여 chain-termination method (Sanger method)으로 DNA의 염기서열을 결정하였다. 이를 위하여 얻어진 DNA를 열처리하여 변성시킨 후 primers와 T7 DNA polymerase, 2', 3'-dideoxynucleoside 5'-triphosphates (ddNTPs)를 넣어주고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 4°C에서 stop solution을 넣어주고 100°C에서 가열하여 변성시킨 후 8% polyacrylamide 겔 전기영동으로 분리하고 말린 후 autoradiography를 하였다.

結果 및 考察

본 연구에서 사용된 IPNV는 1994년 한국 남해안 일대에서 양식중이던 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)로 부터 분리한 IPNV SP형 바이러스이다. 감염 증상을 보인 넙치로 부터 분리한 바이러스를 CHSE-214 세포에 인위적으로 감염시킨 후 순수분리하여 얻은 바이러스 단백질을 polyacrylamide 겔 전기영동으로 조사한 결과, 109kDa, 54kDa, 31kDa 세가지 단백질로 구성되어 있었다 (Fig. 1). 이 세 단백질은 IPNV의 VP1, 혈청형 특이적인 항원부위인 VP2 그리고 VP3에 해당하는 것으로 생각되었다.

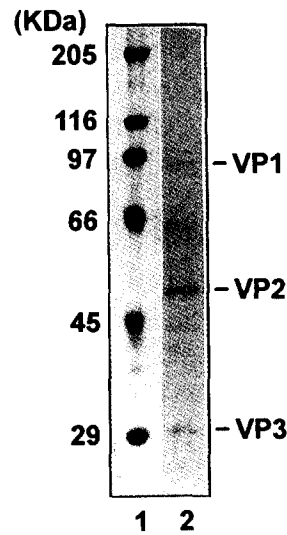


Fig. 1. Gel electrophoresis of IPNV virion proteins. IPNV was purified as described in Materials and Methods and the viral polypeptides were separated by 10% SDS-PAGE and visualized by Coomassie Blue staining. Lane 1, molecular weight marker ; lane 2, virion proteins.

IPNV를 조기진단하는 기술을 개발하고자 IPNV SP 혈청형의 항원성단백질을 발현하는 VP2 유전자에서 비교적 변이성이 적은 부분에 대해서 RT-PCR과 *in situ* RT-PCR을 실시하였다. 컴퓨터 프로그램 (PRIMER DETECTIVE)을 이용하여 6가지의 primer를 선정하여 실험에 이용하였다 (Table 1). RT-PCR을 위한 주형을 얻을 때는 nuclease의 활성을 막기위해서 proteinase

Table 1. Primer sequences, identification number, map position in VP2 sequence (IPNV SP strain) and orientation

Primer sequence	Identification number	Map position in VP2 sequence	Primer orientation
AACACAAACAAGGCAACCGC	set A-I	134-153	sense
CGTTCAGAGCATAGAGACCG	set A-II	485-466	antisense
ATCCAAAGCTCCCACTACC	set B-I	443-462	sense
GTGTCACCATGTCTTGAGG	set B-II	1289-1270	antisense
GCCTATGAGAAGATGACACC	set C-I	1190-1209	sense
TCCTCTGACTATGTCTCTCC	set C-II	1483-1464	antisense

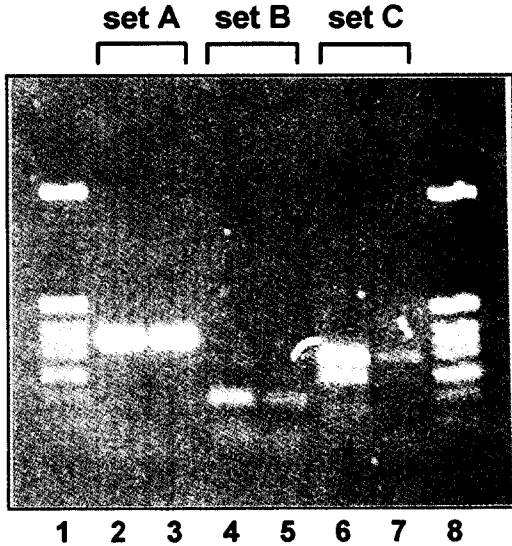


Fig. 2. RT-PCR using the purified IPNV dsRNA as templates. Viral RNA was isolated from purified IPNV as described in Materials and Methods and RT-PCR was performed using primer sets A, B, and C (lanes 2, 4, 6, PCR-30 cycles; lanes 3, 5, 7, PCR-25 cycles). The RT-PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and EtBr staining. Lanes 1 and 8, marker; lanes 2-3, primer set A; lanes 4-5, primer set B; lanes 6-7, primer set C.

K (1 mg/ml)를 처리하고, 100°C에서 10분간 열처리하여 바이러스의 dsRNA를 변성시키고 90% DMSO를 처리하였다. RT-PCR 결과 Primer 조합 A의 경우 352 bp의 산물이 얻어졌고 조합 C의 경우 293 bp의 증폭산물이 생성되어 원하는 크기의 PCR product가 얻어졌다(Fig. 2). 조합 B의 경우 예상되는 크기보다 작은 약 200 bp의 산물을 얻었는데, 이는 조합 B primer에 의해 증폭되는 VP2 gene 부위가 RT-PCR 과정에서

증폭을 중단시키는 2차 구조를 형성하였거나 primer가 인지하는 부위가 유전자 변이를 일으켜 나타난 결과로 생각된다 (Fig. 2).

Fig. 2에서 생성된 PCR product 중 조합 A 증폭산물의 염기서열을 Havarstein et al. (1990)의 IPNV VP2 sequence와 비교해 조사한 결과 IPNV의 SP strain과 유사하다는 것을 DNA 수준에서 확인하였다 (Fig. 3). 조사된 120 개의 염기 중에서 8개의 염기가 차이가 있었는데 이 역시 바이러스 DNA의 다양성에 기인한 것으로 생각된다.

RT-PCR에 의한 IPNV 조기진단의 sensitivity를 조사하고자, 분리된 바이러스 DNA를 농도별로 희석하여 primer 조합 A로 RT-PCR을

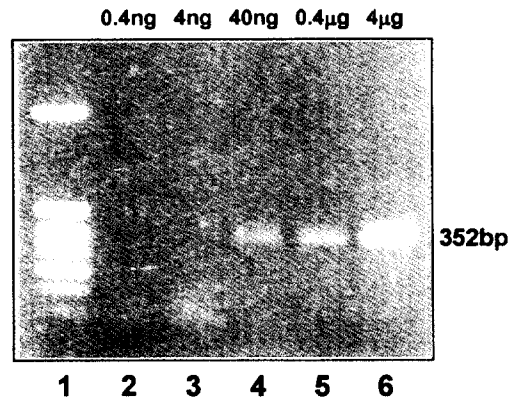


Fig. 4. Sensitivity of RT-PCR. Viral dsRNA was isolated from IPNV and different amounts of RNA were amplified by RT-PCR using primer set A. The PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and EtBr staining. Lane 1, DNA marker; lane 2, 0.4ng RNA; lane 3, 4ng RNA; lane 4, 40ng RNA; lane 5, 0.4 g RNA; lane 6, 4 g RNA.

```

171   TTATGCTTCC AGAGACTGGA CCAGCAAGCA TCCCGGACGA CATAACGGAG AGACACATCC
product  ----- C---- A--- T ----- A-
231   TAAAACAAGA GACCTCGTCA TACAACCTAG AGGTCTCCGA ATCAGGAAGT GGCATTCTTG
product  ----- T----- C--C----- --G-----
    
```

Fig. 3. Alignment of segment A (171-290) of the IPNV-SP strain (upper line) and RT-PCR set A product (lower line). The sequence for the IPNV-SP strain is from Havarstein et al. (1990).

수행하였다. 반응 후 전체 반응물 50 μ l 중 5 μ l를 취하여 1.5% agarose 젤 전기영동으로 확인한 결과, vius RNA가 40 ng 정도의 작은 양이 존재할 때도 이를 검출할 수 있는 것으로 나타났다 (Fig. 4).

아울러 RT-PCR의 특이성을 조사하고자 IPNV 이외에 어류에 자주 감염되는 또 다른 병원체로 알려진 Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV)도 대조군으로 실험하였다. IPNV에 대해서 특이적으로 결정된 primer는 IHNV의 DNA를 주형으로 할때 PCR 산물을 만들지 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

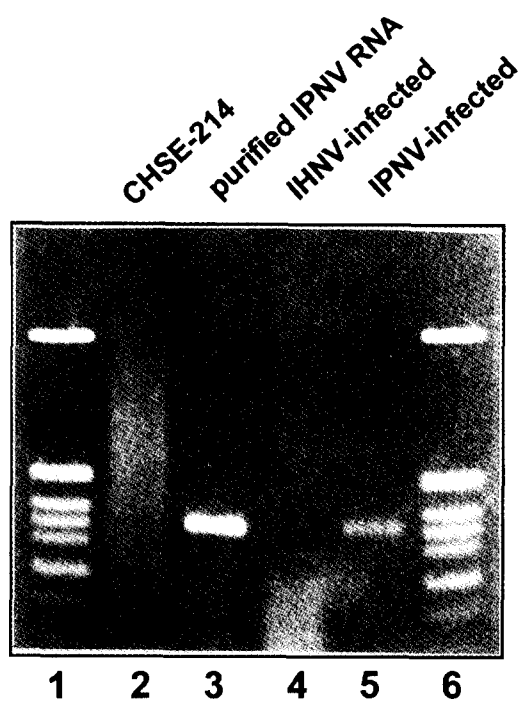


Fig. 5. Specificity of RT-PCR using primer set A. RNA templates were directly prepared from virus-infected CHSE-214 culture media without virus purification as described in Materials and Methods and then amplified by RT-PCR. The PCR products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis and EtBr staining. Lanes 1 and 6, DNA marker; lane 2, uninfected CHSE-214 cells; lane 3, purified IPNV; lane 4, IHNV-infected CHSE-214 culture media; lane 5, IPNV-infected CHSE-214 culture media.

이 결과로서 IPNV 감염에 특이적인 진단이 가능함을 알 수 있다. 또한 바이러스 분리없이 바이러스 감염된 조직, 세포로부터 신속하게 IPNV 감염을 조사하고자, IPNV 바이러스를 감염시킨 CHSE-214 세포배양액을 얻어 바이러스 분리단계를 거치지 않고 단백질분해효소 처리와 sec-butanol 처리과정을 거쳐 RNA template를 만든 후 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이, 바이러스 분리 단계를 거치지 않고도 RT-PCR amplification 반응이 원활히 일어남을 알 수 있었다.

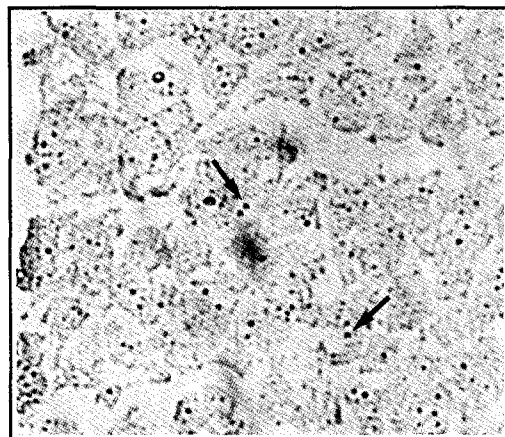


Fig. 6. *in situ* RT-PCR of young tissue from IPNV-infected *Paralichthys olivaceus*. Amplified IPNV PCR products were detected by alkaline phosphatase-conjugated digoxigenin antibody and visualized by NBT/BCIP staining (magnification, X 400). Amplified PCR products are indicated by arrows.

방사선 동위원소, 형광 등으로 표지된 cDNA나 항체를 이용한 *in situ* hybridization법이 분자생물학 분야의 기초연구 뿐만 아니라 각종 질병의 진단에서도 많이 활용되고 있는데 *in situ* hybridization과 RT-PCR 증폭법을 접목시킨 것이 *in situ* RT-PCR이다. *in situ* RT-PCR 기술로 IPNV 바이러스를 신속진단할 수 있는지 조사하기 위하여, 넙치 치어 조직에 감염된 소량의 IPNV 바이러스 RNA를 특이적으로 RT-PCR 증폭시키면서 11-dUTP-digoxigenin으로 표지한 후

증폭된 산물을 digoxigenin에 대한 항체로 면역조직화학법으로 염색하였다. 그 결과 IPNV 바이러스가 감염된 넙치 치어 조직에서 바이러스 감염 부위가 검은 색 spot으로 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 6). 그러나 Taq polymerase나 template가 없이 *in situ* RT-PCR을 한 경우에는 이러한 검은색 spot이 나타나지 않았다. *in situ* RT-PCR을 실시하는데 걸리는 시간은 조직을 준비하는 시간을 제외하면 약 6시간 정도 소요되는데 바이러스의 증식 단계를 거쳐야 하는 다른 진단방법들에 비하여 매우 짧은 시간이 걸리는 것이 특징이다. 이상의 결과를 볼 때 RT-PCR과 *in situ* RT-PCR 기술은 IPNV 바이러스 감염 여부를 신속, 정확하게 진단하는 장점을 지닌 새로운 진단기술로 활용될 수 있을 것으로 기대되며, 나아가 primer를 조정하면 IPNV 뿐만 아니라 어류에 감염되는 다른 유해 바이러스의 진단에도 사용될 것으로 생각된다.

要 約

Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)는 치어에 감염되어 치명적인 질병을 유발하는, 양식산업에 있어 중요한 어류 병원체이다. 본 연구에서는 IPNV를 신속, 정확하게 진단하는 방법을 개발하고자 IPNV의 항원성 단백질인 VP2 유전자 부분에서 선택한 primers를 이용하여 역전사-중합효소연쇄반응법 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. RT-PCR 증폭법으로 순수분리된 IPNV dsRNA 40 ng 정도의 적은 양도 확인할 수 있었으며, IPNV와 같은 다른 어류 병원체의 개체를 RT-PCR templates로 사용하였을 경우는 어떠한 PCR 산물도 검출되지 않는 특이성을 보였다. 특히 유전자의 분리없이 조직 그 자체를 대상으로 RT-PCR을 행하는 *in situ* RT-PCR 방법으로 IPNV가 감염된 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 치어의 조직에서 IPNV 감염을 신속하게 확인할 수 있었다.

따라서 RT-PCR 및 *in situ* RT-PCR 방법은 IPNV를 신속, 정확하게 진단하는데 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

- Brown, F. 1986. The classification and nomenclature of viruses : summary of results of meeting of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Sendai, September 1984. *Intervirology* 25 : 141-143.
- Chung, N., R. D. Macdonald and T. Yamamoto. 1978. Purification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus and comparison of polypeptide composition of different isolates. *Can. J. of Microbiol.* 24 : 19-27.
- Dea, S. and M. A. S. Y. Elazhary. 1983. Counterimmunoelectrophoresis for identification of infectious pancreatic necrosis virus after isolation in cell culture. *Can. J. of Fish. and Aquat. Sci.* 40 : 2200-2203.
- Dobos, P., B. J. 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.
- Duncan, R., E. Nagy, P. J. Krell and P. Dobos. 1987. Synthesis of the infectious pancreatic necrosis virus polyprotein detection of a virus-encoded protease, and fine structure mapping of genome segment A coding regions. *J. Virol.* 61 : 3655-3664.
- Embleton, M. J., G. Gorochoy, P. T. Jones and G. Winter. 1992. In-cell PCR from mRNA : amplifying and linking the rearranged immunoglobulin heavy and light chain V-genes within single cells. *Nucleic Acids Res.* 20 : 3831-3837.
- Gorbalenya, A. E. & E. V. Koonin. 1988. Birnavirus RNA polymerase is related to polymerase of positive strand RNA viruses. *Nucleic Acids Res.* 16 : 7735.
- Havarstein, L. S., K. H. Kalland, K. E. Christie and C. Endresen. 1990. Sequence of the large double-stranded RNA segment of the N1 strain of infectious pancreatic necrosis virus : a comparison with other *Birnaviri-*

- dae. J. Gen. Virol. 71 : 299-308.
- Hsu, Y. L., S. Y. Chiang, S. T. Lin and J. L. Wu. 1989. The specific detection of infectious pancreatic necrosis virus in infected cells and fish by immuno dot blot method. J. Fish Disease 12 : 561-571.
- Kimura, T., M. Yoshimizu and H. Yasuda. 1984. Rapid, simple serological diagnosis of infectious pancreatic necrosis virus by coagglutination test using antibody-sensitized staphylococci. Fish Pathology 19 : 25-33.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227 : 680-685.
- Lopez-Lastra, M., M. Gonzalez, M. Jashes and A. M. Sandino. 1994. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). J. Fish Disease 17 : 269-282.
- Macdonald, R. D. and P. Dobos. 1981. Identification of the proteins encoded by each genome segment of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 114 : 414-422.
- Park, J. W., J. J. Lee, G. Jeong, and Y. C. Hah. 1989. Characterization of the infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) isolated from pen-cultured rainbow trout in Korea. Kor. J. Microbiol. 27 : 225-230.
- Patterson, B. K., M. Till, P. Otto, C. Goolsby, M. R. Furtado, L. J. McBride and S. M. Wolinsky. 1993. Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by PCR-driven *in situ* hybridization and flow cytometry. Science 260 : 976-979.
- Rodak, L., Z. Pospišil, J. Tomanek, T. Vesely, T. Obr and L. Valicek. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in culture fluid and tissue homogenates of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Disease 11 : 225-235.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Harmanson, A. K. Maallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, B. J. Olson and D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150 : 76-85.
- Trust, J. T. 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. Ann. Rev. Microbiol. 40 : 479-502.