

流行性乙型腦炎病毒血凝試驗

I. 干燥血凝素的制备及其性質

周 培 安

(中國协和医学院細菌科)

朱氏^[1,2] (1954, 1955) 用流乙腦炎病毒中山株所制成的 Casals 氏^[3] 醋酮-乙醚浸漬抗原, 不僅能凝集雞血球, 且能凝集成雞血球, 給予了实用上很大的方便。但由于抗原制备繁雜, 保存不易, 故至目前尚未能被普遍采用。

Sabin & Buescher 氏^[4,5] (1950, 1951) 用 20% 感染鼠腦生理鹽水懸液上清做为血凝素, 确很簡單, 但很不穩定, 且反应时所需条件 (如酸碱度, 血球种类等) 極為嚴格, 不易掌握, 应用于臨床实际診斷上, 更为困难。

Sabin 氏血凝素特性之一, 为經冰冻一次后, 即完全失去其血凝性能^[6], 但后来經我們用苯处理, 减压蒸發干燥后, 此种已經失去了性能的血凝素, 又可恢复, 并因而獲得了較穩定的干燥血凝素。本文即为报告此种干燥血凝素的制法及其性質的研究。

材料与方法

1. 小白鼠: 本院飼养, 乳鼠, 日齡 10 天左右, 成鼠体重 12—14 克。感染方法, 10% 感染鼠腦懸液低速沉淀上清, 乳鼠腦內注射 0.02 毫升, 成鼠腦內注射 0.03 毫升。發病后, 心臟放血至死, 無菌手續取腦。

2. 血球: 采取动物之全血, 直接納入 Alsever 氏溶液^[6] 內 (約 1 份血液加 3 份該液) (Alsever 氏液: 葡萄糖 4.66 克, 食鹽 1.05 克, 枸橼酸鈉 2 克, 蒸餾水 200 毫升), 保存于 4°C 冰箱內, 最長使用 3 星期。应用前以生理鹽水洗滌 3 次, 最后用 pH 6.3—6.5 的磷酸鹽緩冲鹽水, 稀釋至 0.25% 的濃度 (每次用同一有刻度之沉淀管, 1500 轉/分沉淀 10 分鐘后, 按刻度計算血球体積)。

3. 稀釋液: 全部实验用 0.01M 的磷酸鹽緩冲鹽水, 按 Sorensen 氏法^[7] 配成需要的酸碱度, 以國光制藥厂出品的酸碱度比色管, 最后确定之。并以 0.1M KH_2PO_4 及 Na_2HPO_4 液調整。制备血凝素用 pH 8.4 的緩冲液, 試驗血凝反应时用 pH 6.3—6.5 的

緩沖液稀釋之。

4. 病毒株：中山株，于 1949 年自國外携回，曾在本科經鼠腦傳代至現在（总共傳代至少在 100 代以上）。京衛研株^①，鼠腦傳代第 43 代。協 2、協 3、協 4、協 6、協 12、協 18 等株，均为本科于 1950—1954 年內，先后自腦炎死亡者的腦組織中分离所得，曾通过鼠腦 8—15 代。

5. 化学藥品：苯（新華化学制剂研究所出品），氯仿，石油醚（petroleum ether）（E. Merk 出品）。

6. 沉淀：低速沉淀（2,000 轉/分）在室温下進行；高速沉淀（10,000 轉/分）在冷离心机內進行。

7. 血凝素制备法：以流乙病毒株所感染的乳鼠腦或成鼠腦，用 pH 8.4 的磷酸鹽緩沖鹽水（我們曾經証明用 pH 8.4 的緩沖液做成的較 pH 7.0 或 6.5 做成的血凝滴度高，且血凝素較穩定。保存在冰箱內時，滴度有先升高，然后降低的現象，在保存 3—4 天時滴度最高^[8]）。做成 10% 的懸液，放于 4°C 冰箱內 3—16 小時后，低速沉淀 10 分鐘后，取出其上清，再高速沉淀 1 小時。取出其上清液，納入一帶橡皮塞或軟木塞的硬質玻璃瓶中，加入四倍量的脂溶剂，在低温下振盪適當時間后，低速沉淀 10 分鐘。此時瓶內物質分为三層，中層为乳酪样之物質，其上下層为液体。如所用脂溶剂为苯或石油醚時，則下層为血凝素，上層为脂溶剂；如用氯仿時，上層为血凝素，下層为氯仿。小心吸出血凝素，再高速沉淀一次，上清液分裝于小瓶內，或安瓿內，于真空抽气机上抽气至干（每瓶 0.5 毫升，約需 2—3 小時），塞以橡皮塞或真空封閉，保存于冰箱內。

8. 血凝試驗法：在室温下進行，干燥血凝素以 pH 8.4 的磷酸鹽緩沖鹽水稀釋后再以 pH 6.3—6.5 的磷酸鹽緩沖鹽水，按倍比稀釋，每管內 0.5 毫升。然后加入 0.25% 的血球懸液 0.5 毫升，振盪后放置冰室內（8°C）2 小時，按 Salk 氏法^[9]記錄結果。

实验結果

（一）干燥血凝素制造过程的研究

1. 用苯与减压蒸發处理血凝素

將感染鼠腦懸液高速沉淀上清，加苯 4 倍，在振盪器上（于 8°C 冰室內）振盪 30 分鐘后，取出鼠腦懸液。再高速沉淀一次，不經冰冻，在真空抽气机上，抽气 30 分鐘、60 分鐘或抽干后，分別檢定血凝素的滴度及其凝集現象。結果如表 1。

表 1 中第 3 批血凝素，未經苯处理前，沒有凝集血球的作用；第 20 批，有凝集但不規則，第 8 批原有 1:10,240 的滴度。經苯处理抽气至干后，三批血凝素都出現了很規則

表 1 用苯及干燥处理血凝素后的結果

血凝素制造批数	血 凝 滴 度			
	高速沉淀上清液	苯 处 理 后		
		抽气 30 分鐘	抽气 60 分鐘	抽 干 后
3	0	0	有凝集但不規則	凝集規則1:1280
8	1:10240	0	有凝集但不規則	凝集規則1:640
20	凝集不規則	0	有凝集但不規則	凝集規則1:640
健康鼠腦懸液	1:40	0	0	0

注：〔0〕血凝滴度 <1:20。

的血凝現象。

当未抽干前，只抽气 30 分鐘，完全不能凝集血球，抽气 60 分鐘后，凝集不規則。發生这种現象的原因，后来証明是苯有高度抑制血凝的作用。如將苯經 1:10,240 倍稀釋（最后稀釋倍数 = 1:40,960）仍有完全抑制 8 單位血凝素的作用。

未經苯处理之第 8 批血凝素，真空干燥后，虽有血凝作用，但很不規則。

原有 1:40 非特异性血凝滴度的健康鼠腦懸液，經苯处理及干燥后，則全被除去。

同时比較了在真空抽气前，將苯处理过的血凝素，在冷冻状态下抽干，結果血凝滴度較抽干前不冰冻者低一倍。

2. 用苯处理的方法、時間、与血凝素及感染力的关系

將高速沉淀后之感染鼠腦上清懸液（此懸液制好后，曾在冰箱內放过24小时），分成 5 等份，按下列方法進行試驗：

- （1）懸液 + 苯 4 倍——在冰室內于振盪机上振盪 30 分鐘。
- （2）懸液 + 苯 4 倍——放冰室內 24 小时，間或用手搖动之。
- （3）懸液 + 苯 4 倍——放冰室內 48 小时，間或用手搖动之。
- （4）懸液 + 苯 4 倍——放冰室內 72 小时，間或用手搖动之。
- （5）懸液——放冰室 96 小时后，加苯 4 倍，在振盪机上振盪 70 分鐘。

各份用苯处理后，即用低速沉淀分离出鼠腦懸液，分裝于小試管内，在真空抽气机上抽干（約 3 小时左右）。然后以 pH 8.4 的緩冲液稀釋至原量，分別檢定其血凝滴度，并每份接种小白鼠 5 只（腦內注射 0.03 毫升）观察病毒是否已被滅活，結果如表 2。

由表 2 可以看出，以加苯 4 倍，放冰室內 72 小时間或搖动的方法最好，因所得血凝滴度最高，而感染力最低。

表2 苯处理方法与血凝滴度及感染力的关系

处 理 方 法	血 凝 滴 度	感 染 力
懸液+苯在振盪机上振盪 30 分鐘	1:1280	5/5*
懸液+苯放在冰室内 24 小时間或搖动	1:1280	5/5
懸液+苯放在冰室内 48 小时間或搖动	1:5120	2/5
懸液+苯放在冰室内 72 小时間或搖动	1:10240	1/5
懸液放冰室内 96 小时后+苯在振盪机上振盪 30 分鐘	1:5120	3/5

* 分母——被注射的小白鼠数,分子——小白鼠死亡数。

3. 不用脂溶剂处理血凝素的比較

同上高速沉淀感染鼠腦上清懸液,分別用苯、石油醚、氯仿依上法处理,制成干燥血凝素。試驗結果以苯处理者,血凝滴度为 1:20,480,以石油醚处理者为 1:10,240,而以氯仿处理者为 <1:20, 故三者之中以苯为好。

(二) 干燥血凝素的性質

1. 干燥血凝素的穩定性

(1) 粉末本身的穩定性

將干燥血凝素,保存于橡皮塞之小瓶中(未用真空封閉),分別放于 4°C 及 22°C 下,定期取出一瓶,以檢定其滴度。結果如圖 1。

保存在 4°C 冰箱內者較室温下者 (22°C) 穩定,在 4°C 冰箱內 5 个月时,血凝滴度尚有 1:1280,但在 22°C 下 3 个月时,則只有 1:320 了,不过二者仍有適合于臨床应用的滴度,故此種血凝素相当穩定。

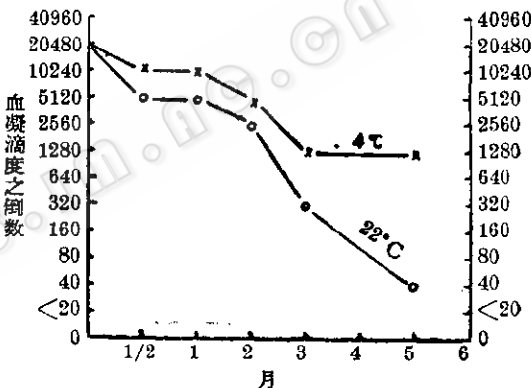


圖 1 干燥血凝素粉末之穩定性

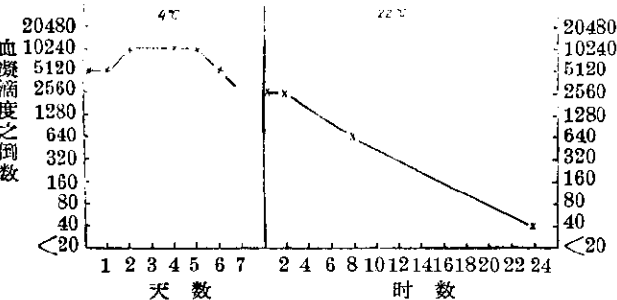


圖 2 干燥血凝素稀釋后之穩定性(pH 8.4)

(2) 稀釋后之穩定性

將干燥血凝素,用 pH 8.4 的磷酸鹽緩冲鹽水稀釋后,分別放于 4°C、22°C 下,以觀察血凝滴度之消長情况。結果如圖 2。

稀釋后之血凝素,保存于 4°C 下时,血凝滴度在第一天內不变,至第 2 天起升高,至第 5 天才开

始逐漸下降，其消長情况呈波形，放于 22°C 下者，則未見有升高現象。

(3) 对冰冻溶化之穩定性

將干燥血凝素，用 pH 8.4 的磷酸鹽緩冲鹽水稀釋后，在 -30°C 冰冻，37°C 內溶化，反复 5 次后，尙有 1:1280 的滴度（原为 1:10240），而未經苯处理干燥的感染鼠腦高速沉淀上清液，冻化一次后，滴度即完全消失。結果見表 3。

表 3 血凝素对冰冻溶化之穩定性

滴 度 血 凝 素	原 有	凍 化 次 数				
		1	2	3	4	5
干 燥 血 凝 素	1:10240	1:5120	1:2560	1:2560	1:2560	1:1280
高速沉淀上清懸液	1:40960	<1:20				

2. 各种动物血球对干燥血凝素的敏感性

用 4 种不同品种的动物血球（除去雉鷄血球），以試驗其对于干燥血凝素之敏感性，結果如表 4。

表 4 各种血球对干燥血凝素之敏感性

血球來源	動物年齡	動物數	滴 度								稀釋液對照	
			<1:80	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	凝集不規則		不凝集
來亨雞	成	4		1*		2				1		—
油 雞	雛	1				1						—
油 雞	成	1			1							—
柴 鷄	成	4		1			1				2	—
口 雞	成	2			1						1	—
綿 羊	成	2			1		1					—
貓	成	1								1		—
家 兔	成	1							1			++++

++++ 表示完全凝集， * 表示其中一只雞血球的滴度为 1:320。

同一品种之成年雞血球，有的被凝集，有的則否，故敏感性不同，所試之來亨雛雞血球 4 只中，滴度很不一致，与朱氏用醋酮-乙醚抗原所得結果相符^[1,2]，4 只柴雞血球中，一半被凝集，一半不被凝集。所試之 2 只綿羊血球，一只有与來亨雛雞相同的滴度，一只則略低。一只貓的血球，亦被凝集了，但很不規則。家兔血球在稀釋液及血凝素中，都能凝集，故为非特异性凝集。

(三) 干燥血凝素作血凝反应的条件

1. 温度

同一血凝素以同法同时做血凝反应 3 份,一份放 37°C 1 小时,一份放室温 $1\frac{1}{2}$ 小时,一份放冰室内 (8°C) 2 小时后,观察结果。在血凝滴度方面, 37°C 者较在室温及冰室内者略低;在凝集现象方面,放在冰室内者最鲜明,放在室温者次之, 37°C 者则较模糊,所以放在冰室内反应较好。

2. 酸碱度

同一血凝素,分别用 pH 5.7—7.5 的磷酸盐缓冲盐水稀释,在同样条件下,进行血凝试验。结果见表 5,各酸碱度中以 pH 6.3—6.5 血凝滴度最高,而在 pH 6.9 以上时,则几乎不凝集。

表 5 酸碱度与血凝反应的关系

pH	5.7	5.9	6.1	6.3	6.5	6.7	6.9	7.1	7.3	7.5
滴度	1:160	1:320	1:640	1:5120	1:1280	1:80	<1:80	—	—	—

(四) 流乙脑炎病毒各菌株所制血凝素滴度的比较

将本系保存之某些株流乙脑炎病毒,通过鼠脑 3 代后,感染乳鼠,鼠发病后,取脑,比较它们的高速沉淀上清液及苯处理后的干燥血凝素的血凝滴度。结果如表 6。

表 6 各菌株血凝滴度之比较

菌 株	代 数	血 凝 滴 度			
		pH 6.5		pH 8.4	
		高速上清液	干燥血凝素	高速上清液	干燥血凝素
中 山	>100	1:20480	1:1280	1:81920	1:20480
京 衛 研	71	1:5120	0	1:10240	1:160
协 6	13	1:5120	1:160	1:10240	1:320
协 10	15	1:1280	0	1:1280	0
协 12	8	凝集不规则	0	凝集不规则	1:40
协 17	5	1:320	0	1:320	0
协 18	5	1:320	0	1:1280	1:40
协 2	8	0	0	1:160	0
协 3	8	0	0	1:80	0
协 4	9	0	0	1:160	0

討 論

从感染鼠脑悬液经沉淀后的上清液,经苯处理及减压蒸发后,可获得保存比较稳定的、凝集现象规则的干燥血凝素。在我们的实验中,如表 1 所列,第 3 批及第 20 批血凝素的鼠脑悬液 (Sabin 氏血凝素) 或没有血凝滴度,或虽有血凝现象,而不规则。但经苯

处理干燥后，它們都出現了很規則的血凝現象，故可証明以前著者所謂鼠腦內含有非特异性抑制物的推論^[4,5,6,10,11,12]。我們認為当这种抑制物与血凝素同时存在时，血凝素的作用，全部或一部被抑制了，因此不能出現血凝現象，或凝集不規則。經苯处理后，可以除去这种大部或全部抑制物，因而血凝現象又复出現，或使血凝規則化了。动物血清中的非特异性血凝抑制物，已証明是类脂体^[4,10,13,14,15]，但鼠腦中的血凝抑制物，是何种物質，尚未見到报告。根据我們的实验，脂溶剂（苯、石油醚等），能除去此种抑制物質，可能也是脂类物質。脂溶剂中，氯仿不能用以处理血凝素，可能系氯仿对血凝素有破坏作用^[16]。

苯的作用是除去抑制物，也可从下面另一个实验証明。感染鼠腦懸液的血凝作用，經冰冻溶化一次后，即失去了血凝性能，但經苯处理之干燥血凝素稀釋液，反复冰冻 5 次，仍有較高的血凝滴度。这种現象的解釋，可能由于鼠腦懸液中存在的抑制物，經冰冻溶化后，使之大量放出發生抑制作用，或使血凝素大量吸附于其上^[17]，因此使血凝反应由陽性变为陰性。但經苯处理后，这种抑制物已被除去，且經减压蒸發至干后，除去了有血凝抑制作用的苯，故再冰冻溶化，亦不能完全失去血凝性能。

干燥血凝素对各种动物血球的凝集試驗中，我們發現它对綿羊血球，亦有高度作用，这个事实如能廣泛的証实，为实际应用腦炎病毒血凝試驗中，会帶來更大的方便。

此外 Sabin 氏等^[5]謂流乙腦炎病毒株，只新分离或通过鼠腦代数較少者，可獲得血凝素，通过鼠腦 100 代以上者則不能。我們的实验与以上不同，因为通过了鼠腦至少在 100 代以上的中山株，滴度最高，而只通过 8 代的协 3 株最低。故 Sabin 氏的論据，不一定正确。这可能是由于流乙腦炎病毒株產生血凝滴度很不一致之故，因而許多实验室，用同样方法进行血凝試驗，不能得到同样結果。

最后，將本文所报告的干燥血凝素的制法及血凝試驗的具体步骤，簡述如后：

用中山株流乙腦炎病毒感染乳鼠或成鼠（乳鼠所得的滴度較高），發病后取腦，用 pH 8.4 的磷酸鹽緩冲鹽水做成 10% 的懸液。置于 4°C 冰箱一夜（16 小时左右），經高速沉淀（5000—10,000 轉/分）1 小时，吸取上清液，放于冰箱內 24 小时，然后加入 4 倍量之苯，再放在 4°C 冰箱內共 3 天，間或用手搖动（一天 3—4 次）。取出后低速沉淀 10 分鐘，沉淀管內之內容物分三層：上層为苯，中間为乳酪样物質，下層为鼠腦懸液。小心吸出下層液体，再高速沉淀一次，分裝于干燥管內，每管 0.5 毫升。不用冷冻，在真空抽气机上抽干（約 3 小时左右），封口、保存于冰箱內备用。

進行血凝試驗时，用 pH 8.4 的磷酸鹽緩冲鹽水稀釋血凝素，然后用 pH 6.3—6.5 的同样緩冲液，按倍比稀釋，每管加入 0.25% 的雛雞或成鷄（綿羊）血球懸液，混合后放冰

室(4—6°C) 2 小时, 观察结果(不需在冷的条件下操作)。

有一点必须指出, 如此制成的血凝素仍有感染性, 故进行血凝试验或血凝抑制试验, 血凝素应当作活病毒论; 至于何时感染性消失或用何法使感染性消失而血凝性仍然保存的问题, 仍待继续研究。

結 論

本文报告用苯处理及减压蒸发制备流乙脑炎病毒干燥血凝素的方法及其性质的研究, 用此法制得的干燥血凝素比较稳定, 且凝集现象规则, 不但能凝集鸡血球, 而且初步证明能凝集绵羊血球。

用以制备此种干燥血凝素的菌株, 以中山株获得的血凝滴度最高, 其他被试验过的菌株, 血凝滴度很低或完全没有滴度(但感染鼠脑悬液(pH 8.4)都获得了或多或少的滴度)。

参 考 文 献

- [1] 朱锡华: 中华医学杂志 6:444, 1954.
- [2] 朱锡华: 微生物学报 3 (1):63, 1955.
- [3] Casals, J. & Brown, L. V. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 83: 170, 1953.
- [4] Sabin, A. B. and Buescher, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 74: 222, 1950.
- [5] Sabin, A. B. *Federation Proc.* 10: 573, 1951.
- [6] Casals, J. *J. Immunol.* 70: 272.
- [7] Kolmer, J. A. & Boerner, F. *Approved Lab. Technic*, 4th ed. 331-332, 1945.
- [8] 作者未发表资料.
- [9] Salk, G. E. *J. Immunol.* 49: 87, 1944.
- [10] Chanock, R. M. and Sabin, A. B. *J. Immunol.* 70: 302-316, 1953.
- [11] Olitsky, P. K. and Yager, R. H. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 71: 719, 1949.
- [12] Fastier, L. B. *J. Immunol.* 66: 87, 1951.
- [13] Casals, J. *J. Exp. Med.* 99 (5): 429, 1954.
- [14] MacDonald, F. *Brit. J. Exp. Path.* 33: 537, 1952.
- [15] Casals, J. and Olitsky, P. K. *Science* 106: 267, 1947.
- [16] Chanock R. M. and Sabin, A. B. *J. Immunol.* 70: 286, 1953.
- [17] Шубладзе А. К. *Журнал Микробиологии, Эпидемиологии и Иммунологии* 10: 62, 1954.

HEMAGGLUTINATION REACTION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS I. PREPARATION AND PROPERTIES OF DRIED HEMAGGLUTININ

CHOU PEI-AN

Department of Bacteriology, Chinese Union Medical College, Peking

By the treatment with benzene and evacuation the hemagglutinin contained in the infected mouse brains was preserved in a dry form. It was found to be more stable, and to agglutinate the red blood cells more intensively and more markedly than that prepared by other methods previously described. Besides, this agglutinin was active not only for the red blood cells of the chicken, but also for those of a few sheep tested.

Different strains of Japanese B encephalitis virus were found to produce dried hemagglutinins of markedly different activity. The Nakayama strain was found to be most active, despite the fact that it has been passed in mice for very many generations.

The pH of the solvent was found to enhance the hemagglutination reaction. It is to be emphasized that the dry hemagglutinin so produced is still virulent for white mice and hence care must be exercised in handling this material.