

乙型脑炎病毒核酸(RNA)的研究

I. 从受染小白鼠脑组织提出有感染性的病毒核酸*

柳元元 詹美云 许兆祥 柳华晨 关学勤

(中国医学科学院病毒系)

自从1956年 Gierer 和 Schramm 二氏^[1] 报告用饱和石炭酸溶液分离得具有感染性的烟草花叶病毒的核酸(RNA)以后, 许多作者用类似的方法分离得 Mengo 脑炎^[2]、假性脑脊髓炎^[3]、脊髓灰白质炎^[4]、脑心肌膜炎^[5]、东方和西方马脑脊髓炎^[6]、壁蝨脑炎^[7]、流感^[8]、M. M.^[9]、鼠脑脊髓炎^[10]、口蹄疫^[11]等病毒的核酸, 并证明这些核酸均具有感染性。

除了植物和动物病毒核酸以外, 若干作者曾分离得对大肠杆菌有感染性的嗜菌体脱氧戊糖核酸(DNA)^[12]; 某些作者曾指出若干肿瘤组织核酸有致肿瘤的能力^[13,14], 最近 Lacour 等氏^[15] 报告分离得人及小白鼠肿瘤的戊糖核酸, 并证明这些核酸亦具有使实验动物发生肿瘤的性质。

流行性乙型脑炎在我国是一种流行比较广泛的疾病, 颜氏(1940)^[16]、黄氏(1949)^[17] 曾从脑炎患者分离得数株流行性乙型脑炎病毒, 经鉴定证明其抗原性与日本乙型脑炎(*Neurophilus japonicus*)相同, 王、黄氏等^[18,19] 并对分离得的毒株进行了一系列生物学性质的研究, 但对该病毒的生化本质问题研究的很少。

为了进行有关乙型脑炎病毒的生物化学本质问题的研究, 我们首先进行本病毒核酸的分离提取, 现将初步结果报告如下。

一、材料和方法

(一) 材料

1. 病毒株: 流行性乙型脑炎京卫研₁株, 在小白鼠脑内传至25—31代, 对小白鼠脑内的LD₅₀滴度平均在7.0—8.0(对数/0.03ml)之间。

2. 试剂:

石炭酸: C. P. 级, 经重蒸馏一次后使用。

乙醚: A. R. 级。

核糖核酸酶结晶: C. P. 级。

缓冲液和稀释液:

(1) 含有1/200M 枸橼酸钠及1/100M 磷酸钠盐的缓冲生理盐水(pH 8.6±0.1)。

(2) 含有1/200M 枸橼酸钠及1/200M 磷酸钠盐的缓冲生理盐水(pH 7.8±0.1)。

(3) 含10%脱脂牛奶的生理盐水。

* 本文1961年10月18日收到。

(二) 实验方法

1. 病毒材料的制备:

以乙型脑炎京卫研₁ 毒株通过脑腔感染三周龄的正常小白鼠, 待动物发病后, 取出其脑组织, 立即放于 -20℃ 低温冰箱中保存备用, 自保存至应用, 一般不超过三天。

将低温保存的受染鼠脑加入上述 pH8.6 的缓冲盐水, 以组织捣碎器(速率为 4000 转/分)捣碎制成 10% 病毒组织悬液, 在低温 (0—-10℃) 下以 3000 转/分沉淀 20 分钟。吸取上清液, 取出一小部分进行病毒的感染力滴定和无菌试验, 余作提取病毒 RNA 的材料。

2. 乙型脑炎京卫研₁ 株病毒核酸的提取:

将 10% 的病毒悬液装入带玻璃珠的三角瓶内, 加入等量的 90% 石炭酸(用上述 pH8.6 缓冲盐水稀释), 用力振荡 8 分钟, 然后在低温下以 3000 转/分沉淀 20 分钟。吸取水层, 放入带玻璃珠的三角瓶内, 加入等量的 75% 石炭酸, 用力振荡 5 分钟, 再以 3000 转/分低温沉淀 20 分钟。分离水层, 而后加入等量乙醚, 振荡冲洗。振荡后放置片刻, 混合液即分为两层, 吸出下面的澄清液再以等量的乙醚冲洗。如此共洗涤 4—5 次, 每次振荡冲洗 1—2 分钟, 在第五次洗完后, 吸出下层澄清液, 以 1000 转/分沉淀 3 分钟。小心吸出澄清液部分。该澄清液内尚含小量乙醚, 故用纯氮气(气泡通过溶液)去除乙醚, 直至无乙醚气味为止。此溶液即为病毒核酸(RNA)溶液, 其浓度相当于原鼠脑病毒悬液——即为 10% 的制剂。最后, 滴定病毒 RNA 的 LD₅₀ 滴度以及鉴定制剂的纯度等。

二、实验结果

(一) 病毒 RNA 感染力的测定

将从受染鼠脑组织所提取的病毒 RNA 溶液(其浓度为 10⁻⁴)用上述 pH7.8 的缓冲盐水按 10 倍稀释到 10⁻⁹, 然后分别接种于三周龄的正常小白鼠脑腔内。每稀释度接种 5 只小白鼠, 每只 0.03ml。用 10% 脱脂奶生理盐水稀释病毒悬液, 取 10⁻⁵—10⁻⁹ 五个稀释度, 分别接种于三周龄的正常小白鼠脑腔内(每组 5 只, 每只 0.03ml) 作为对照。观察动物两周, 然后按 Reed 和 Muench 方法计算其 LD₅₀ 滴度, 以比较所提取的病毒 RNA 和原病毒悬液对小白鼠的感染力。实验结果见表 1。

表 1 乙型脑炎病毒和其 RNA 对小白鼠感染力的比较

实 验	LD ₅₀ 滴度(对数/0.03ml)		鼠脑病毒滴度与病毒 RNA 滴度之差(LD ₅₀ 对数)
	鼠 脑 病 毒	RNA	
1	6.80	2.23	4.57
2	7.00	2.68	4.32
3	6.00	2.33	3.67
4	8.38	3.38	5.00
5	7.83	2.31	5.52
6	7.75	2.41	5.29
7	7.50	2.78	4.72

由表 1 可以看出, 从受染鼠脑组织所提取出的病毒 RNA 对小白鼠的 LD₅₀ 滴度变动于 2.0—3.5 之间, 其病毒 LD₅₀ 滴度则在 6.0—8.5 之间, 所提取的病毒核酸的 LD₅₀ 滴度为原病毒滴度的 0.1%—0.001%。用不稀释的(即相当于 10% 的鼠脑组织悬液)病毒核

酸感染小白鼠时,其潜伏期約为 6—9 天。这与稀释到 10^{-6} 左右的病毒悬液引起小白鼠发病的潜伏期相似。

病毒 RNA 感染小白鼠所引起的症状和病毒感染者相同。

利用乙醇将所提得的核酸沉淀后,获得具有感染性的病毒 RNA 結晶。用磷酸盐緩冲溶液溶解此結晶后,进行毒力滴定,观察到其 LD_{50} 滴度和沉淀前无明显差别。

(二) 核酸純度的物理学和化学鉴定

为了証明实验中所提取的核酸是否含有蛋白質,是否为純淨的核酸,該核酸是戊糖核酸或脫氧戊糖核酸,我們采用了几种物理学和化学方法加以鉴定,其結果如下:

1. 戊糖核酸酶 (RNase) 对病毒核酸的作用: 在 0.475ml 不稀释的病毒核酸溶液內加入 0.025ml 戊糖核酸酶溶液 (使該酶的最后浓度为 $10\mu\text{g/ml}$), 混合后, 将混合液放置冰

表 2 戊糖核酸酶对病毒 RNA 感染力的影响

实 驗	鼠 脑 病 毒		病 毒 RNA	
	RNase 处理前	RNase 处理后	RNase 处理前	RNase 处理后
1	5.50	5.50	3.38	—
2	7.00	8.38	2.68	—
3	8.38	7.31	3.38	—

注: 1. 表內数字为 LD_{50} 滴度(对数/0.03ml)。 2. “—”表示接种的小白鼠均不死亡。

浴中 10 分钟,然后按上述方法进行稀释和滴定。用同种浓度的戊糖核酸酶处理病毒悬液,在冰浴中放置 10 分钟后进行滴定,以作为对照。結果见表 2。

从表 2 可以看出,提取液的感染力迅速被核糖核酸酶破坏,而核酸酶对病毒的毒力則基本上无影响。

2. 蛋白質的顏色反应: 我們应用双縮尿反应定性測定所提取的 RNA 中的蛋白質。結果在被試驗的核酸溶液中未能观察到任何顏色变化。証明在所提取的 RNA 中即使存在蛋白質,也是很微量的。

3. 病毒 RNA 的吸收光譜特性: 将提取得的病毒 RNA 溶液用上述 pH7.8 的磷酸盐緩冲液稀释 10 倍,然后用 Unicam SP 500 型的分光光度計測定該溶液对波长 $220\text{m}\mu$ 到 $300\text{m}\mu$ 的紫外綫的光密度曲綫 (用稀释液作为对照)。获得核酸的特有曲綫,如图 1。

数批病毒 RNA 制品对 $260\text{m}\mu$ 与 $280\text{m}\mu$ 紫外光的吸收性質的比較如表 3。

4. 病毒 RNA 的嘌呤、嘧啶碱的定性分析: 利用乙醇及 2M NaCl 溶液将所提出的病毒 RNA 沉淀純制,用过氯酸水解后进行紙上层析的結果,証明所提出的核酸只含有腺嘌

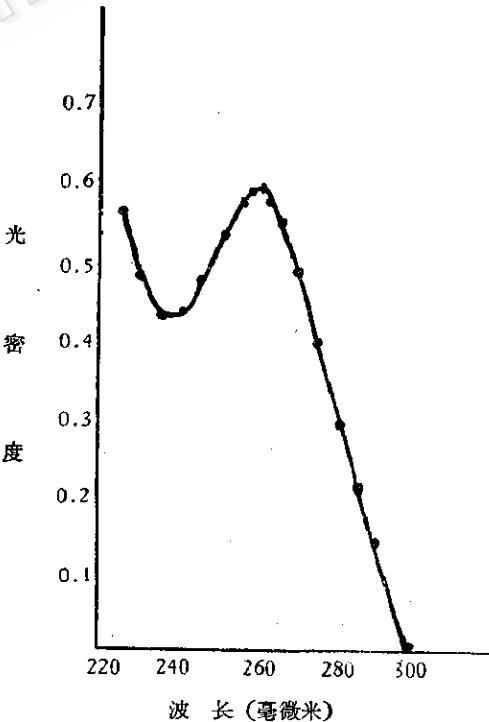


图 1 京卫研 1 病毒 RNA 光密度曲綫

表3 病毒 RNA 溶液对 260mμ 与 280mμ 紫外光吸收性質的比較

实 驗	$D_{260\text{ m}\mu}$	$D_{280\text{ m}\mu}$	$D_{260\text{ m}\mu}/D_{280\text{ m}\mu}$
1	1.250	0.584	2.14
2	1.610	0.763	2.11
3	1.620	0.800	2.03
4	0.594	0.298	1.96
5	0.586	0.263	2.20
酵 母 RNA	0.508	0.230	2.21

法: 1. “D”表示光密度。 2. 表內酵母 RNA 一栏是用純結晶品制成标准液(60r/ml), 測其光密度的結果。 吟、鳥嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶。

三、討 論

根据上述实验結果, 很明显地看出用石炭酸提取法能够从乙型脑炎京卫研₁株受染鼠脑組織內提取出具有感染力的病毒 RNA, 唯其病毒 RNA 的感染力平均为原病毒感染力的几万分之一, 这比其他作者从 Polio 病毒和 TMV 病毒提出的 RNA 感染力低。产生此結果的原因可能是由于用此方法提取本病毒 RNA 不很适宜; 也可能由于进行 RNA 感染力滴定时, 所用稀释剂不能使 RNA 的感染力充分表現出来。此外还可能存在着其他影响因素。故今后在病毒 RNA 提取方法方面以及稀释剂的选择方面应进行改进, 以便提高病毒 RNA 的感染力。实验結果說明經過乙醇处理以后所获得的結晶仍然具有感染性, 至于此結晶的感染力能保存多久, 尙有待于进一步研究。

在实验中所提取出的病毒 RNA 經過 RNase 处理后, 其感染力完全消失, 而用同种方法以 RNase 处理鼠脑病毒, 其感染力基本上不改变。因此, 可以认为在提取的 RNA 制剂中不存在着完整的病毒顆粒。

我們得到的 RNA 制剂的双縮尿試驗呈阴性結果。一般认为在蛋白質含量少于 37μg 时, 双縮尿反应可以为阴性, 因此可以推測在我們所提取出的材料, 其感染力主要是由病毒 RNA 所引起。但在病毒 RNA 制剂中也可能含有极其微量的蛋白質。这些极微量的蛋白質, 如果存在, 其对病毒 RNA 的毒力起着什么作用則有待于进一步研究。不过 Gierer 氏^[1]认为极微量的蛋白質存在对 RNA 的感染力不起作用。

RNA 制剂对紫外光的吸收光譜具有 RNA 的特性, 这說明所提取的 RNA 制品是相当純淨的。但是应当指出, 在使用粗制的鼠脑病毒作为提取核酸的材料时, 制剂中无疑的杂有鼠脑組織的 RNA。

制剂的化学定性分析証明其中所含嘌呤、嘧啶碱的組成属于 RNA 型, 因此所提取得制剂可以确定是 RNA。关于乙型脑炎 RNA 各碱基的定量化学分析結果将另文报告。

所以, 根据戊糖核酸酶对病毒 RNA 的灭活作用、RNA 制剂对紫外光的吸收光譜特性、核酸成分的化学分析以及双縮尿反应等, 均可証明我們所提取得到的是 RNA, 而且此制品也是比較純淨的。

四、摘 要

用石炭酸处理法可从乙型脑炎病毒感染的鼠脑組織中提出有感染性的病毒 RNA,

其感染滴度在原病毒滴度的 0.1—0.001% 之間, 并且获得具有感染性的病毒 RNA 結晶。

实验証明, 在提取的 RNA 中, 不含病毒顆粒, 制剂的感染性主要是病毒 RNA 的作用。文中对病毒 RNA 制剂的感染滴度較低的原因曾加以討論。

参 考 文 献

- [1] Gierer, A., & Schramm, G., *Zeit. Naturforsch.* **116**: 138—42, 1956.
- [2] Colter, J. S., Bird, H. H., & Brown, R. A., *Nature* **179**: 859—60, 1957.
- [3] Wecker, E., & Schäfer, W., *Zeit. Naturforsch.* **126**: 415—17, 1957.
- [4] Alexander, H. E., Koch, G., Mountain, I. M., & Van Damme, O., *J. Exp. Med.*, **108**: 493—506, 1958.
- [5] Huppert, J., & Sanders, F. K., *Nature* **182**: 515—17, 1958.
- [6] Wecker, E., *Virology* **7**: 241—3, 1959.
- [7] Sokol, F., Libikova, H., & Zemla, J., *Nature*, **184**: 1581, 1959.
- [8] Maassab, H. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**: 877—81, 1959.
- [9] Liebenow, W., & Schmidt, D., *Acta Virologica* **3**: 168—71, 1959.
- [10] Franklin, R. M., Wecker, E., & Henry, C., *Virology* **7**: 220—35, 1959.
- [11] Brown, F., & Stewart, D. L., *Virology* **7**: 408, 1959.
- [12] Fraser, D., Mahler, H. R., Shug, A. L., & Thomas, C. A. Jr., *Proc. N. Y. Acad. Sci.* **43**: 939—47, 1957.
- [13] Hays, E. F., Simmons, N. S., & Beck, W. S., *Nature* **180**: 149—50, 1957.
- [14] Latarjet, R., Rebeyrotte, N., & Moustacchi, E., *Compt. rend. Acad. Sci.* **246**: 853—55, 1958.
- [15] Lacour, F., Lacour, J., Harel, J., & Huppert, J., *J. Natl. Cancer Inst.* **24**: 301—18, 1960.
- [16] Yen, C. H., *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **46**: 609, 1941.
- [17] 黃禎祥、王逸民: 中华医学杂志, **37**: 280, 1951.
- [18] 王逸民、柳元元、黃禎祥: 中华医学杂志, **38**: 1066, 1952.
- [19] 黃禎祥、周明先: 微生物学报, **6**: 32, 1958.

STUDIES ON THE RIBONUCLEIC ACID (RNA) OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

I. ISOLATION OF THE INFECTIOUS VIRAL RNA FROM INFECTED MOUSE BRAINS

LIU YÜAN-YÜAN, CHAN MEI-YÜN, LIU HUA-CHEN,

SHÜ CHAO-SHANG AND KUAN HSUEH-CHIN

(Laboratory of Biochemistry, Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences)

An infectious ribonucleic acid (RNA) was isolated from mouse brains infected with Japanese B encephalitis virus (Peking strain) by means of the cold phenol extraction method. The infectivity of the RNA solution was found to be in the range of 0.001—0.1% of that of the original virus suspension.

According to the results of chemical and physico-chemical determinations as well as that of RNAase treatment, it was proved that the infectious solution contained mainly nucleic acid of the ribose type, and there was no intact virus particle remained in the solution.