

# 乙型脑炎病毒核酸(RNA)的研究

## II. 若干影响感染性病毒核酸的提取及其感染滴度的因素\*

柳元元 柳華晨 許兆祥 詹美雲 陈立德

(中国医学科学院病毒学系)

在前一篇文章里<sup>[1]</sup>, 我們曾报告了从受染小白鼠脑成功地提取了有感染性的病毒核酸(RNA)。在那些实验中 RNA 的感染滴度不很稳定, 变动范围頗大, 相当于原病毒滴度千分之一到十万分之一之間。这与国外一些作者的报告大致相似<sup>[2-7]</sup>。

Wecker 氏<sup>[2]</sup>报告用热的石炭酸处理病毒后所提取的 RNA 滴度較高。Koch 氏<sup>[3]</sup>等认为病毒悬液的酸碱度对提取的 RNA 感染滴度也有影响。

Alexander 氏<sup>[4]</sup>等曾报告用高渗氯化鈉-磷酸緩冲液稀释脊髓灰白質炎病毒 RNA 可以提高它对猴肾单层細胞培养的感染效价。此外, Koch 等<sup>[3]</sup>还报告了病毒核酸在磷苯二酸盐緩冲液中能表现出較高的感染效价, 同时也认为高渗 NaCl 可影响病毒核酸的滴度。

为了提高脑炎病毒 RNA 的提取量与感染滴度, 我們进行了下列实验, 以便对本病毒 RNA 的进一步研究提供有利条件。

### 一、材料和方法

#### (一) 材料

实验所用的病毒均采用流行性乙型脑炎京卫研<sub>1</sub>株(經鼠脑传至 28—32 代)。将病毒經脑腔接种于三周龄健康小白鼠, 发病后, 按无菌操作常规剖出鼠脑, 并按 1:10 (重量/体积)加入 M/200 磷酸緩冲盐水 pH 8.6 (加或不加枸橼酸鈉), 在高速組織捣碎器內制成 10% 鼠脑匀浆, 低速离心后吸出上清部分, 即为 10% 鼠脑病毒悬液。

#### (二) 病毒 RNA 的提取

基本上按照 Gierer-Schramm 二氏法<sup>[5]</sup>, 但石炭酸浓度除特別注明者外, 第一次均加等容积 90% 石炭酸震蕩 8 分钟, 第二次均加等容积 75% 石炭酸震蕩 5 分钟。此方法詳見前篇报告<sup>[1]</sup>。

#### (三) 病毒 RNA 感染力的滴定

病毒与其 RNA 溶液均按 10 倍連續稀释法稀释(稀释液成分随实验要求的不同而异)。病毒一般用 10% 脱脂牛奶稀释, 仅有数次采用了肉湯。每一稀释度均用体重 8—12 克正常小白鼠 5 只經脑腔接种, 每只 0.03 毫升。核酸提取过程从未超过三小时以上。操作时的温度除注明者外均在冰盘中进行。稀释与接种間隔均未超过 15 分钟。小白鼠接种后观察 14 天, 按 Reed-Muench 二氏法計算 LD<sub>50</sub> 滴度。

#### (四) 核酸酶(RNase)处理

\* 本文 1962 年 3 月 15 日收到。

采用純結晶品 (Bucks), 取每毫升含 200 微克的酶溶液(无菌蒸餾水制备) 0.025 毫升加到 0.475 毫升未稀释的病毒 RNA 溶液中搖勻, 5—15 分鐘后, 以上法稀释接种小白鼠。

(五) 病毒 RNA 溶液紫外光光密度測定

詳見前篇报告<sup>[1]</sup>。

二、实 驗 結 果

(一) 受染鼠脑收获時間与感染性 RNA 滴度的关系

用新鮮的鼠脑病毒經脑腔接种 30 只正常小白鼠(每只接种  $10^6$ — $10^7$ LD<sub>50</sub> 的病毒量), 于接种后 48、72 与 96 小时各杀死 10 只, 制成 10% 鼠脑悬液。以石炭酸处理法提取病毒 RNA, 将所提得的病毒 RNA 进行小鼠脑腔滴定。观察 RNA 的感染力。結果見表 1, 接种 48 小时后病毒的 LD<sub>50</sub> 滴度为 6.5 对数。从此时收获的鼠脑悬液未能提得有感染性的 RNA。至 72、96 小时病毒滴度升高到 8.0 对数以上, 其 RNA 感染滴度亦相应升高, 分別达到了 2.45 与 2.46 对数。

表 1 小白鼠受染不同時間后提取 RNA 的感染力与原病毒感染力之間的差別

48 小 时			72 小 时			96 小 时		
鼠脑病毒	RNA*	RNA+酶*	鼠脑病毒	RNA*	RNA+酶*	鼠脑病毒	RNA*	RNA+酶*
LD <sub>50</sub>			LD <sub>50</sub>			LD <sub>50</sub>		
6.50	≤0.5	≤0.5	7.75	2.46	≤0.5	7.50	2.78	≤0.5
—	—	—	8.63	2.43	≤0.5	8.50	2.50	≤0.5
平均 6.50	≤0.5	≤0.5	8.19	2.45	≤0.5	8.00	2.64	≤0.5

\* 稀释液为 0.14M NaCl 0.02M 磷酸緩冲液, 下同。 注: LD<sub>50</sub>: 均代表对数/0.03 毫升, 下同。

(二) 冻化鼠脑病毒悬液对其 RNA 感染滴度的影响

用新鮮受染鼠脑制备 10% 悬液置于 -20℃ 冰箱內冰冻过夜。次日取出, 将容器放在冷的流水中解冻至完全溶化, 然后提取 RNA。用未經冻化的材料作对照, 結果見表 2。如表所示, 病毒悬液事先經過冻化处理的, 所提得的 RNA 滴度均比未經冻化的有显著提高。

表 2 冻化鼠脑病毒悬液对提取 RNA 感染力的影响

	鼠 脑 病 毒* (LD <sub>50</sub> )	RNA* (LD <sub>50</sub> )	RNA+酶* (LD <sub>50</sub> )
冻 化	5.83	2.59	≤0.5
	5.50	8.38	≤0.5
	5.38	2.54	≤0.5
未 冻 化	6.83	1.17	≤0.6
	5.50	1.08	≤0.5
	5.50	1.88	≤0.5

(三) 石炭酸浓度对感染性 RNA 滴度的影响

用 M/200 磷酸緩冲液 pH8.0 将重蒸餾过的石炭酸稀释成 93%、90% 与 75% 三种浓度, 分 5 組进行处理。第 1 組用 75% 处理二次, 第 2 組先用 90% 处理一次再用 75% 处理一次; 第 3 組用 90% 处理二次; 第四組用 93% 处理二次, 第五組用 100% 处理一次。以上

每組在第一次处理均用 8 分钟, 第二次均用 5 分钟。結果见表 3, 第 3 組与第 4 組結果如表所示, RNA 的 LD<sub>50</sub> 滴度較高, 第 2 組滴度虽然略低, 但可提得較大容积的 RNA 溶液。

表 3 不同濃度石炭酸与所提 RNA 感染力的关系

石 炭 酸 浓 度 (处 理 2 次)				石 炭 酸 浓 度 (处 理 1 次)
75%~75%	90%~75%	90%~90%	93%~93%	100%
鼠脑病毒 RNA* LD <sub>50</sub>	鼠脑病毒 RNA* LD <sub>50</sub>	鼠脑病毒 RNA* LD <sub>50</sub>	鼠脑病毒 RNA* LD <sub>50</sub>	鼠脑病毒 RNA* LD <sub>50</sub>
9.50 1.38	8.63 1.17	7.68 2.88	9.50 4.10	9.50 1.88
8.13 0.6	8.50 ≤0.5	4.50 2.68	8.31 3.00	8.50 1.60
7.31 1.38	7.50 3.22	— 3.17	7.84 3.22	8.30 1.38
6.75 2.24	7.00 2.68	— 2.5	7.68 1.83	8.13 0.83
5.88 0.6	5.50 3.38	— —	7.50 1.62	7.84 0
9.50 3.0	4.63 2.50	— —	— —	7.50 0
平均 7.85 1.54	6.96 2.23	6.09 2.81	8.16 2.75	8.29 1.08

“~”区别第 1 次与第 2 次处理。

(四) 提取过程中离心沉淀时的温度对 RNA 感染力的影响

比較了用室温离心机(15±2℃)与用低温离心机(−15±2℃)沉淀后所提 RNA 的滴度(其他步驟均在冰盘中进行), 結果见表 4。看来用室温离心机沉淀与用低温离心机沉淀对 RNA 滴度影响不大。

表 4 离心沉淀时的温度对 RNA 感染力的影响

	鼠 脑 病 毒 LD <sub>50</sub>	RNA LD <sub>50</sub>	RNA+酶 LD <sub>50</sub>
在室温离心 机 中 离 心 +15 ± 2℃	7.46	4.83	≤0.5
	7.68	3.68	≤0.5
	8.38	5.38	≤0.5
在低温离心 机 中 离 心 −15 ± 2℃	7.50	4.38	≤0.5
	7.54	4.18	≤0.63
	6.17	3.48	≤0.5

(五) 震蕩方法对 RNA 感染力的影响

在用石炭酸处理时, 我們采用了三种震蕩方法: 一种是手搖法(見前篇报告<sup>[1]</sup>); 另一种为电动攪拌法——把鼠脑悬液加等容积石炭酸放入 4000÷8000 轉/分的鋁制电动高速組織捣碎器中, 第 1 次攪拌 1 分钟, 第 2 次半分钟; 第三种方法为低頻率震蕩法——用特殊的低頻率发生器(图 1), 处理鼠脑病毒——石炭酸混合液, 第 1 次 8 分钟, 第 2 次 5 分钟。三种方法的結果列于表 5。根据用分光光度計在波长为 260 毫微米处測定的光密度算出三种方法所提 RNA 的浓度(微克/毫升), 如表 5 所示, 低頻率震蕩法所提取的 RNA 溶液浓度高于手搖法(平均高 1.38 微克/毫升), 而电动攪拌法提取的 RNA 浓度波动范围很大。此外, 用小白鼠脑腔滴定 LD<sub>50</sub> 滴度, 結果低頻震蕩法比手搖法平均高 1 个对数以上, 差別是相当显著的。用电动攪拌法提取的 RNA 滴度一般都很低。

(六) 不同浓度的氯化鈉緩冲液及其他稀釋液对 RNA 感染滴度的影响

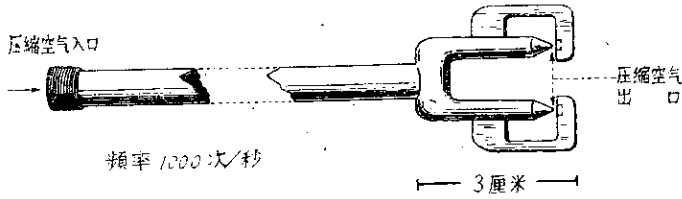


图1 低 頻 率 震 荡 器

我們曾应用 10% 脱脂牛奶生理盐水、0.02M 磷酸缓冲液(pH 7.2)、含有不同浓度的 NaCl 和不含 NaCl 的磷酸缓冲液(pH 7.2),以及蒸馏水等作滴定用稀释液。滴定結果見表 6 与表 7。

从表 6 可見,在 10%脱脂牛奶生理盐水中鼠脑病毒有較高的效价,而 RNA 的感染力則較低,甚至被灭活。在用 0.02M 磷酸缓冲液(pH 7.8)稀释时,則鼠脑病毒滴度降低,而其 RNA 滴度有所提高。但在此稀释剂中, RNA 滴度与原病毒滴度之差尚很悬殊。这种差别可能是由于在这种稀释液中 RNA 的感染力不能充分表現出来。为了寻找能較高地表現出脑炎病毒 RNA 感染力的稀释液,我們采用了不同浓度的 NaCl 磷酸缓冲液(即 0.5M NaCl~0.02M 磷酸盐、0.14M NaCl~0.02M 磷酸盐、不含 NaCl 的 0.02M 磷酸缓冲液和蒸馏水四种稀释液, pH 均为 7.2),进行 RNA 感染力滴定。其結果見表 7。如表所示,用 0.5M 氯化鈉磷酸缓冲液稀释时 RNA LD<sub>50</sub> 滴度已达到原病毒滴度的千分之一左右,能較好的表現 RNA 感染力。用 0.14M NaCl 等渗溶液稀释时, RNA 的滴度最低。用 0.02M 磷酸缓冲液或蒸馏水滴定时, RNA 滴度都比 0.14M NaCl 稀释者高。

我們也观察到,稀释液中 NaCl 含量越高, RNA LD<sub>50</sub> 滴度也越高,但过高的 NaCl 含量对实验动物有強烈的刺激作用。例如将 1M NaCl 溶液注入鼠脑后,小白鼠于三分鐘內发生強直性惊厥、紫紺而死亡。因而含 0.5M 以上的 NaCl 稀释液在本实验中未应用。

### (七) 驅除乙醚时所用气体对 RNA 感染滴度的影响

我們曾用过三种气体驅除殘留在 RNA 溶液中的乙醚。一种是純氮气,一种是大理石加稀盐酸于气体发生器中所产生的二氧化碳,最后一种是压缩空气。三种气体結果的比較,列在表 8。似乎用二氧化碳或空气驅醚,其 RNA 滴度均不亚于純氮气。虽然不除乙醚与驅除乙醚后的結果也相差不大,但后者存在一定的缺陷,因为少量乙醚注入鼠脑可引起个别小白鼠死亡,影响滴定結果的計算。

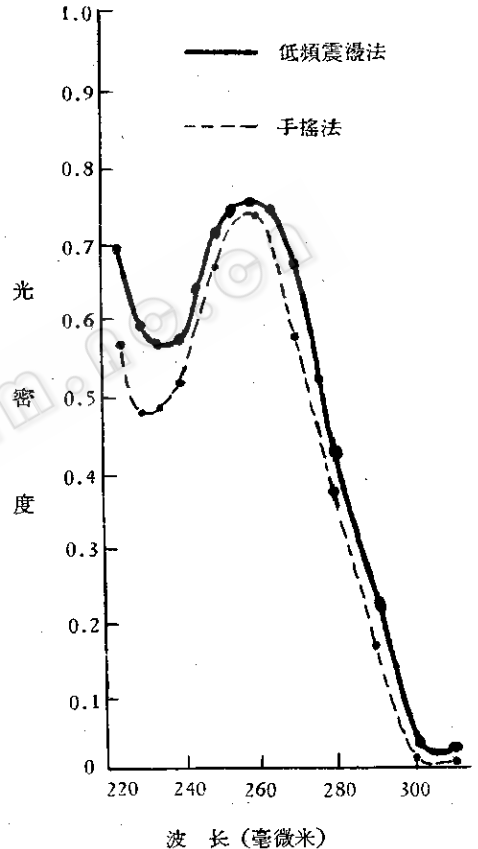


图2 低頻震盪法与手搖法提取病毒 RNA 光密度曲綫比較

表 5 震荡方法对提取 RNA 感染力的影响

鼠脑病毒 LD <sub>50</sub>	低频率震荡法			手 摇 法			电 动 搅 拌 法			
	RNA* LD <sub>50</sub>	RNA*+酶 LD <sub>50</sub>	RNA 浓度 微克/毫升	RNA* LD <sub>50</sub>	RNA*+酶 LD <sub>50</sub>	RNA 浓度 微克/毫升	RNA* LD <sub>50</sub>	RNA*+酶 LD <sub>50</sub>	RNA 浓度 微克/毫升	
7.50	3.80	≤0.5	31.6	3.22	≤0.5	33.9	—	—	—	
8.00	3.36	≤0.5	25.4	1.62	≤0.5	23.9	—	—	—	
7.38	3.24	≤0.5	—	≤0.5	≤0.5	—	—	—	—	
7.75	3.15	≤0.5	21.5	3.0	≤0.5	19.1	—	—	—	
7.00	3.20	≤0.5	—	—	—	—	2.93	≤0.5	51.1	
6.17	3.55	≤0.5	30.2	—	—	—	≤0.5	≤0.5	26.3	
7.00	2.44	≤0.5	29.8	—	—	—	2.11	≤0.5	23.5	
7.46	4.31	≤0.5	23.7	—	—	—	0.60	≤0.5	15.4	
8.83	2.31	≤0.5	—	—	—	—	0.63	≤0.5	23.5	
平均	7.39	3.29	≤0.5	27.0	2.08	≤0.5	25.7	≤1.35	≤0.5	27.6

表 6 用不同溶液稀释病毒与其 RNA 进行滴定的比较

鼠脑病毒与其 RNA 均用同种稀释液				鼠脑病毒与其 RNA 各用一种稀释液	
10%脱脂牛奶生理盐水		M/200 磷酸缓冲盐水, pH7.8		10%脱脂牛奶生理盐水	M/200 磷酸缓冲盐水 pH7.8
鼠 脑 病 毒 LD <sub>50</sub>	RNA LD <sub>50</sub>	鼠 脑 病 毒 LD <sub>50</sub>	RNA LD <sub>50</sub>	鼠 脑 病 毒 LD <sub>50</sub>	RNA LD <sub>50</sub>
9.00	1.88	8.38	3.38	8.63	2.43
8.63	1.17	8.00	1.62	8.50	1.63
8.50	1.60	7.38	≤0.5	8.50	2.50
8.50	≤0.5	7.00	2.68	8.50	4.38
8.31	≤0.5	6.75	2.24	8.31	3.00
8.00	≤0.5	5.50	1.88	7.31	5.38
7.48	≤0.5	≤4.50	2.68	7.87	3.24
7.17	≤0.5	≤4.50	3.43	7.68	2.88
7.14	1.35	4.78	1.59	7.75	2.46
7.50	≤0.5	≤4.5	2.52	6.00	2.33
平均	8.02	≤6.13	≤2.20	8.00	3.03

表 7 稀释液内氯化钠浓度对 RNA 感染力的影响

稀 释 液	鼠 脑 病 毒 LD <sub>50</sub>	R N A LD <sub>50</sub>			
	10%脱脂牛奶生理盐水	0.5M NaCl 0.02M 磷酸缓冲液	0.14M NaCl 0.02M 磷酸缓冲液	0.02M 磷酸缓冲液	蒸 馏 水
	7.54	4.18	0	2.75	2.50
	6.17	3.18	2.63	3.75	3.55
	7.68	3.68	1.68	2.68	3.68
	7.46	4.83	1.87	3.75	4.31
	8.83	5.38	0.63	2.39	2.31
平 均	7.54	4.25	1.46	3.06	3.27
平均差	RNA 与原病毒 滴度之差	3.29	6.08	4.48	4.27

表 8 用不同氣體驅除余髓的比較

	R N A			LD <sub>50</sub>
氮 气	4.38△	2.59*	1.62*	—
二氧化碳	—	2.73*	—	—
空 气	4.38△	—	—	2.23*
未通气体	—	—	2.24*	2.01*

△ 稀释液 0.5M 氯化鈉磷酸緩冲液, pH7.2。

### 三、討 論

本實驗結果說明,收获受染鼠脑時間与所提 RNA 滴度有一定关系。用  $10^6-10^7$ LD<sub>50</sub> 的大量病毒感染小白鼠后,于 48 小时后收获受染鼠脑,未能提取出有感染性的 RNA,可能是由于病毒的絕對量較少或由于病毒顆粒尚未完全成熟之故。在受染 72 小时后的病毒滴度及 RNA 滴度与受染 96 小时虽无明显差别,但在受染 96 小时后小白鼠全部发病,症状典型,瀕于死亡,其 RNA 滴度亦較穩定。看来,此时是收获受染鼠脑提取 RNA 的最适时机。Salzman 氏<sup>[6]</sup>报告牛痘病毒、Sanders 氏<sup>[7]</sup>报告脑心肌炎病毒和 Brown 等氏<sup>[8]</sup>报告口蹄疫病毒的感染性 RNA 均形成于完整的病毒顆粒可被測知之前。而 Darnell 等<sup>[9]</sup>报告脊髓灰白質炎病毒的感染性 RNA 的形成不能比完整的病毒顆粒的出現更早。从我們的实验結果看来,在病毒繁殖过程中,成熟的病毒顆粒与感染性 RNA 量之間有一定的比例,在感染 48 小时后,当病毒的 LD<sub>50</sub> 滴度已經达到相当高的水平时 (LD<sub>50</sub>=6.5),尚不易測知病毒感染性核酸的存在。但是,这些材料在数量上还不多,要肯定脑炎病毒感染性核酸及成熟病毒顆粒形成時間的关系,还須进一步研究。

受染鼠脑組織經過冻化处理后进行 RNA 的提取,其感染滴度比較高。这可能是由于冻化作用使細胞破碎和部分病毒顆粒裂解,其病毒 RNA 释放更加充分的緣故。

在用 100% 石炭酸提取病毒 RNA 时,由于石炭酸需加热到 40℃ 左右,使溶化,因而 RNA 滴度降低了。但用 75% 石炭酸处理两次,感染滴度亦較低。用 93% 或 90% 石炭酸处理两次,或以 90% 与 75% 石炭酸各处理一次,結果 RNA 滴度都比較高。但用 90% 与 75% 各处理一次,比前两者有更多的优点: (1) 所提的 RNA 总容积較前者多几倍, (2) 經過 90% 石炭酸处理一次后, RNA 上清液中含有相当高浓度的石炭酸,再以 75% 石炭酸处理时,在水溶液层中石炭酸的浓度仍然是过饱和的,因此不影响 RNA 的提取。所以我們认为用后一方法提取乙型脑炎病毒核酸(RNA)比較合适。

在提取病毒 RNA 过程中应用低温离心沉淀 ( $-15 \pm 2^\circ\text{C}$ ) 或室温离心沉淀 ( $+15 \pm 2^\circ\text{C}$ ),而其他操作过程均在冰盘中进行,結果对 RNA 滴度无明显影响。說明此病毒 RNA 在通常温度下有短時間的穩定性,这就使我們可能在一般設備条件下提取本病毒的感染性 RNA,对研究工作带来了不少方便。

我們观察到在用石炭酸提取的过程中使用不同的震蕩方法对 RNA 的感染滴度有一定的影响。采用低頻震蕩法是比較滿意的一种震蕩方法,因其震蕩力量均匀,可以控制震蕩強度,操作也很簡便。用該法震蕩所提的 RNA 滴度較通常的手搖法高而穩定。可能这种震蕩易使病毒顆粒从組織碎片中釋出,也可能使病毒 RNA 更易于从蛋白外套中解

脫出来。用电动搅拌法所提的 RNA 滴度不高,这可能是由于过高的轉速造成温度的急剧升高,以致使 RNA 遭到灭活。

在用不同稀释液测定 RNA 感染滴度时,观察到用含 0.5M NaCl、不含 NaCl 的 0.02M 磷酸缓冲液或蒸馏水稀释 RNA,稀释时均能使 RNA 滴度有較高的表现,而用 0.14M NaCl(即等渗)溶液稀释时,对 RNA 滴度的表现能力最差。我們推测,可能由于高浓度的鈉盐和含盐浓度很低,甚至于沒有含盐的蒸馏水,对动物細胞均有短时间的刺激作用,使細胞膜的通透性增加或破坏了細胞膜的正常生理功能,致使 RNA 分子容易吸附与穿过胞膜进入胞內。因此,在胞內繁殖的子代病毒数量也必然增加,提高了对細胞的感染性,表现了較高的滴度。Koch 等认为接种脊髓灰白质炎病毒 RNA 时,鈉盐浓度是影响病毒 RNA 对猴腎細胞感染力的主要因素。Elemm 氏<sup>[10]</sup>也报告了高浓度的 NaCl 或蔗糖溶液对 Mengo 病毒 RNA 的感染力有显著的影响。他們发现用含有 0.6 或 0.67M NaCl 溶液作稀释液时 RNA 的滴度最高,而 1M 以上的 NaCl 溶液对組織細胞产生破坏作用。这和我們的結果基本相符。Sprunt<sup>[11]</sup>等氏认为高浓度的 NaCl 对 RNA 酶有抑制作用,保护了 RNA 的感染力。但用这一观点无法解释我們发现的另一现象——用不含鈉盐的 0.02M 磷酸缓冲盐水或蒸馏水稀释 RNA 时其滴度也比 0.14M NaCl 者高。因此,用高浓度 NaCl 溶液提高 RNA 滴度的作用机制,除了可能由于抑制 RNA 酶的活性外,渗透压的作用(过高或过低)也可能有重要意义。此外,是否还可能有其他因素影响 RNA 滴度,目前还了解得很少,这些問題尚待进一步探討。

根据国外文献介紹,都是用氮气驅醚的,一般认为氮气是惰性气体,通过 RNA 溶液时可保护 RNA 某些活性基团免遭氧化灭活作用。我們用二氧化碳或空气驅除乙醚,結果証明不亚于純氮气,可作为純氮气的代用品。短時間通过空气不致影响对 RNA 感染力。由此可見,假如在空气通过的时间內, RNA 曾遭受了某种程度的氧化作用,那么,可以认为被作用的基团与感染力无密切的关系。

通过本实验研究已有可能使乙型脑炎病毒 RNA 的  $LD_{50}$  滴度較旧法提高 2 个对数,使 RNA 滴度与原鼠脑病毒滴度之間的差別由十万分之一縮小到千分之一左右,稳定在  $10^{-4}$ — $10^{-4.5}$  范围內。可以根据实验結果确定一套比較适宜于本病毒感染性 RNA 的提取和滴定的常规方法。

#### 四、摘 要

本文研究了若干影响乙型脑炎病毒 RNA 的提取及其感染滴度的因素。初步証明收获受染鼠脑的时间与所提 RNA 的感染滴度有一定关系。在受染动物症状典型时提取 RNA 的滴度較高。在用石炭酸提取 RNA 时,鼠脑病毒悬液用 90% 与 75% 石炭酸各处理一次,所提得的 RNA 溶液容积較大。其感染滴度与用較高浓度的石炭酸(90%)处理二次者无明显差异。

文中指出用低频率发生器震蕩法处理鼠脑病毒——石炭酸混合液提取 RNA 时其滴度比一般手搖震蕩法为高。

作者不仅观察到用高浓度 NaCl (0.5M) 磷酸缓冲液稀释 RNA 时,其  $LD_{50}$  滴度比等渗 (0.14M NaCl) 磷酸缓冲液稀释者为高,而且証明了用不含 NaCl 的磷酸缓冲液或蒸餾

水稀释 RNA 时,其滴度也比用等渗磷酸缓冲液稀释者为高,作者在本文中对稀释液中钠盐的浓度及渗透压对病毒 RNA 感染滴度的影响机制进行了讨论。

根据实验研究结果,作者认为,在实验室中控制上述对病毒 RNA 及滴定的有利条件,可以提高乙型脑炎病毒 RNA 感染滴度。

### 参 考 文 献

- [1] 柳元元、詹美云、许兆祥、柳华晨、关学勤: 微生物学报, 8 (3): 231—235, 1962.
- [2] Wecker, E., and Schafer, W., *Zeit. naturforsch.* 126: 415—17, 1957.
- [3] Koch, G., Koenig, S., and alexander, H. E., *Virology* 10: 329—43, 1960.
- [4] Alexander, H. E., Koch, G., Mountain, I. M., and Van Damme, O., *J. Exp. Med.*, 108: 493—506, 1958.
- [5] Gierer, A., and Schramm, G., *Zeit. Naturforsch.* 116: 138—42, 1956.
- [6] Salzman, N. P., *Virology* 10: 150, 1960.
- [7] Sanders, F. K., *Nature* 185: 802, 1960.
- [8] Brown, F., and Stewert, D., *Virology* 7: 408, 1959.
- [9] Darnell, J. E. Jr., Levintion, L., Thoren, M. M., and Hooper, J. L., *Virology* 13: 271, 1960.
- [10] Elemm, K. O. A., and Colter, J. S. *Virology* 2: 434, 1956.
- [11] Sprunt, K., Koenig, S., & Alexander, H. E. *Virology* 13: 135, 1961.

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

### II. SOME FACTORS INFLUENCING THE YIELD AND THE INFECTIVITY TITRE OF THE VIRAL RNA

LIU YÜAN-YÜAN, LIU HUA-CHEN,

SHÜ CHAO-SHIANG, CHAN MEI-YÜN, AND CHEN LI-TE

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

The experiment showed that the infectious viral RNA was isolated from the infected mouse brains only at the time when the virus titre in the brain had reached a relatively high level, no infectious RNA could be detected during the first 24 hours after infection. The relationship between the rate of synthesis of infectious viral RNA and the formation of intact virus particles was discussed.

Highest RNA titres were obtained with twice 90% or twice 93% cold phenol extractions. However, extraction with a 90% phenol first followed by a 75% phenol treatment gave good yields.

When a low frequency vibrator was applied during the course of phenol extraction, the infectivity titres of RNA were increased (about ten times higher than the controls). Besides this, it was also showed that when a hyper- or hypotonic salt solution was used to dilute the RNA solution instead of using the isotonic buffer saline, higher infectivity titres were also obtained.

The possible action of the hyper- and hypotonic salt solutions on cell membrane as a factor influencing the infectivity titre of the viral RNA was discussed.