

# 影响流行性乙型脑炎病毒蚀斑的 若干因素的研究\*\*\*

張漢荊 王逸民 鄭云凱

(中国医学科学院病毒系, 北京)

流行性乙型脑炎病毒(以下简称乙型脑炎病毒)和其他B组中的虫媒病毒一样,大多数不能使鸡胚细胞引起有规律的明显的病变,但可采用Dulbecco氏法<sup>[1,2]</sup>在该细胞层上形成蚀斑<sup>[3-5]</sup>。目前对此种病毒蚀斑的研究尚少,在实验条件上还不十分稳定,结果也不一致<sup>[6,7]</sup>。为了更好地利用蚀斑方法进行乙型脑炎病毒的研究,特进行了以下的实验。

## 一、材料和方法

(一) 病毒株 实验中采用乙型脑炎病毒京卫研<sub>1</sub>株<sup>[8]</sup>,系经3周龄小白鼠脑内传20—40代者。

(二) 鸡胚单层细胞制备 取10—11日龄莱亨鸡鸡胚,去头、肢、内脏后,剪成约1毫米大小组织块,用Hanks液洗4—5次以去除血球及碎细胞。洗净的组织块加0.25%胰酶,每胚4毫升,置37℃水浴孵育10分钟后再不断振荡10分钟,吸出上层细胞悬液,用等量Hanks液稀释后暂存于冰浴中。留下组织块加胰酶重复消化(如第1次),再次吸出细胞悬液后,将剩余的組織加适量Hanks液用吸管轻轻吹打,如此,残留的组织块则分散成均匀的细胞悬液,与第1次消化后收集的细胞悬液混合通过8层细孔纱布过滤,以每分钟1000转沉淀10分钟,倒去上清液,沉淀的细胞用含有5%小牛血清、0.5%乳蛋白水解物Hanks液作生长液,用NaHCO<sub>3</sub>调节pH至8.2—8.4(每100毫升生长液加5.6%NaHCO<sub>3</sub>1.5—2.0毫升)。细胞悬液浓度为每毫升 $4 \times 10^6$ ,接种量为每扁瓶(底面积约 $3 \times 7$ 平方厘米)5毫升,12×100毫米试管(底面积约 $1 \times 6$ 平方厘米)1.5—2毫升。静置37℃培养(扁瓶应平放,试管则呈5°角倾斜)。48小时后即形成致密、均匀的细胞层,倒去生长液后用Hanks液洗1次。

(三) 病毒感染单层细胞 将受染后发病典型的小白鼠鼠脑取出,加Hanks液(pH 8.5),制成10%悬液,以每分钟3,000转沉淀20分钟,将上清液作10倍递增稀释,选适当稀释度的病毒液感染细胞。接种量:扁瓶为0.5毫升,试管为0.2毫升。在37℃下接触吸附60分钟,倒去剩余液体后,即复盖琼脂培养基。

## (四) 琼脂培养基的配制及复盖

- |   |            |
|---|------------|
| (1) Earle 甲液(10倍浓缩,无NaHCO <sub>3</sub> 及酚红) | 10毫升       |
| 乙液(20倍浓缩)                                   | 5毫升        |
| (2) 乳蛋白水解物                                  | 0.5克       |
| (3) 琼脂(纯净质优的琼脂可不經丙酮处理)                      | 1.5克       |
|   | (或2.0克)*** |

\* 本文曾在北京市微生物学会1962年学术年会病毒组报告。

\*\* 在蚀斑法建立与研究工作中蒙宋干、丘福禧、曾毅、任贵方、吴安然、郭辉玉等大夫的关怀和鼓励,柳元元先生和王植伦大夫对本稿提出宝贵意见,特此致谢。

本文1962年12月14日收到。

\*\*\* 扁瓶用1.5克,试管2.0克。

- (4) 三蒸水85 毫升
- 經 8 磅高压灭菌 20 分钟后,待凉至 50℃ 左右依次加入:
- (5) 中性紅 (用三蒸水配成 1:1,000, 八磅高压灭菌后备用)4 毫升
- (6) 正常小牛血清5 毫升
- (7) 抗菌素(青霉素每毫升 10,000 单位;鏈霉素每毫升 10,000 毫微克)1 毫升
- (8)  $\text{NaHCO}_3$  (用三蒸水配成 7.5%, 玻璃滤器除菌过滤)3 毫升

須边加边搖,并且維持琼脂培养基温度在 40℃ 左右,用移液管将培养基沿扁瓶或試管无細胞一側的内壁加入 5 毫升(扁瓶)或 1.5 毫升(試管),以橡皮塞塞紧后平放,使琼脂平鋪于細胞面上,待冷凝后翻轉細胞瓶或細胞管,置 37℃ 避光培养。蝕斑在病毒感染細胞后 2—3 天开始出現,4 天增多,5 天已趋稳定。观察期限为 7 天,期满后测量蝕斑大小,并按蝕斑数計算每毫升蝕斑形成单位(以下簡称为 PFU)的对数值<sup>[4]</sup>。

(五) 小白鼠脑內病毒滴定 以 Hanks 液 (pH8.5) 稀釋鼠脑病毒,用正常 3 周龄小白鼠进行脑內滴定,每只接种 0.03 毫升,观察 14 天,按 Reed 和 Muench 氏法計算病毒  $\text{LD}_{50}$  滴度。

二、实 驗 結 果

(一) 不同因素对蝕斑形成的影响

1. 病毒悬液的 pH: 用  $\text{NaHCO}_3$  調节 Hanks 液使成不同 pH (如表 1 所列), 观察到用 pH 7.0 的 Hanks 液稀釋的病毒感染細胞时,蝕斑数显著减少, pH 为 8.0、9.0、及 10.0 时,蝕斑数有显著的增加。若以 pH 9.0 所形成的蝕斑数为 100%, 則 pH 7.0 者仅为 3.9%。同时在小鼠脑內所滴定的  $\text{LD}_{50}$  病毒滴度, pH 7.0 者較 pH 8.0、10.0 者亦約低 1 个对数左右。

表 1 感染雞胚細胞时乙型脑炎病毒(京卫研1株)懸液不同 pH 对蝕斑数的影响

病 毒 悬 液 中			平均蝕斑数**	百 分 比 (%)	log PFU/毫升	log $\text{LD}_{50}$ /毫升
pH*	$\text{NaHCO}_3$ (克/毫升)	細胞在37℃ 吸附60分钟 后的 pH*				
7.0	0	6.5	2.5	3.9	7.10	8.02
8.0	0.000098	7.5	48.0	74.4	8.38	9.27
9.0	0.000196	8.5	64.5	100.0	8.51	—***
10.0	0.000392	9.0	57.0	88.3	8.46	9.12

\* 用石蕊試紙測定。  
\*\* 每稀釋度 2 管蝕斑平均数。  
\*\*\* 未做。

2. 温度: 細胞以同一稀釋度的病毒悬液接种后分別放置 4℃、29℃ 及 37℃ 各 60 分钟。由表 2 的結果可看到病毒感染細胞时的温度在 37℃ 者形成的蝕斑数最多, 在 4℃、29℃ 者依次为 37℃ 的 26.9%、65%。

3. 吸附时间: 細胞吸附病毒的时间与蝕斑形成数有明显的关系。在 37℃ 吸附 30 分钟所产生的蝕斑数仅为吸附 60 分钟的 45.2%, 若吸附时间延长至 60 分钟、120 分钟及 180 分钟, 則后三者的蝕斑数均相近似(表 3)。

4. 中性紅浓度: 在琼脂培养基內加入中性紅, 采取了两种不同的方式。一是于复盖前

表 2 乙型脑炎病毒(京卫研1株)感染鸡胚细胞时不同温度对蚀斑数的影响

病毒感染细胞时的温度*	平均蚀斑数**	百分比(%)
4℃	8.7	26.9
29℃	21.0	65.0
37℃	32.3	100.0

\* 吸附 60 分钟。

\*\* 三管蚀斑平均数。

表 3 乙型脑炎病毒(京卫研1株)感染鸡胚细胞时不同吸附时间对蚀斑数的影响

吸附时间*(分)	平均蚀斑数**	百分比(%)
30	14.6	45.2
60	32.3	100.0
120	31.7	98.1
180	32.3	100.0

\* 在 37℃ 吸附。

\*\* 3 管蚀斑平均数。

将中性红溶液(浓度见表 4)加至融化的琼脂培养基内;二是于第 1 次复盖琼脂(无中性红)后 48 小时复盖含有中性红的琼脂,使其最后浓度为 1:20,000。从试验中看到蚀斑形成数的增减以及斑的大小与中性红的浓度呈反比(结果见表 4、图 1),中性红在 48 小时后加入者,对蚀斑的数量及大小的抑制作用均比早加入者影响为轻。

表 4 中性红浓度对乙型脑炎病毒(京卫研1株)蚀斑数及大小的影响

实验号	琼脂培养基中的中性红浓度	中性红颜色	平均蚀斑数**	百分比(%)	蚀斑大小(毫米)
I	1:28,000	浅红	21	87.5	2.0—4.5
	1:14,000	暗红	13	54.2	1.0—1.5
	暂时不加*	无色	24	100.0	2.0—4.5
II	1:56,000	淡红	86.5***	88.3	2.0—4.5
	1:28,000	浅红	80.5	82.1	2.0—4.5
	1:14,000	暗红	45.0	45.9	1.0—1.5
	暂时不加*	无色	98.0	100.0	2.0—4.5

\* 第 1 次复盖琼脂培养基(无中性红)后 48 小时,复盖第二次琼脂培养基,并加入中性红,浓度为 1:20,000。

\*\* 实验 I: 每稀释度 1 瓶蚀斑数。

实验 II: 每稀释度 2 瓶蚀斑平均数。

\*\*\* 染色太淡,蚀斑不太清楚,较难正确计数。

5.  $\text{NaHCO}_3$  的含量: 琼脂培养基中  $\text{NaHCO}_3$  的含量对鸡胚细胞的维持、蚀斑大小有显著的影响(表 5、图 2 甲)。当琼脂培养基中无  $\text{NaHCO}_3$  (培养基 pH 为 7.0) 或在每毫升琼脂培养基中加 0.004 克  $\text{NaHCO}_3$  (pH 10.0) 时,细胞维持时间都不能超过 24 小时。 $\text{NaHCO}_3$  量在每毫升为 0.0007 至 0.0028 克之间 (pH 7.5—9.0) 均能形成蚀斑,但各组蚀斑大小比例不一, $\text{NaHCO}_3$  含量少的(0.0007 克/毫升),小斑(小于 2.2 毫米者)居多数; $\text{NaHCO}_3$  含量较多时(0.0014 克/毫升至 0.0028 克/毫升),所形成的蚀斑,其大、小斑数的比例相近。

6. 琼脂培养基成分: 表 6 中指出琼脂培养基内缺乳蛋白水解物者,即使含有小牛血清(4.5%)、脱脂牛奶(9%)或鸡胚浸汁(4.5%)均未见有蚀斑形成,细胞维持时间也未能超过 24 小时(表 6 实验 I)。凡在琼脂培养基内加乳蛋白水解物而又补充适量正常小牛血清、脱脂牛奶或鸡胚浸汁者,则形成的蚀斑数多,细胞维持时间可延长 2 天左右(表 6,

表 5 琼脂培养基中不同量的  $\text{NaHCO}_3$  对乙型脑炎病毒(京卫研<sub>1</sub>株)蚀斑数及大小的影响

实验批号	琼脂培养基中					蚀斑数	蚀斑大小(毫米)		小斑:大斑
	$\text{NaHCO}_3$ (克/毫升)	pH*	中性红颜色 变化	细胞 着色	细胞在 37℃ 维持 10 天后 pH*		<2.2	>2.2	
I	0	7.0	红	无	7.0 <sup>-</sup>	0	0	0	0:0
	0.0007	7.5	红微黄→红	红	7.0 <sup>+</sup>	41	33	8	4.1:1
	0.0014	8.0	红 黄→红	红	7.5	29	14	15	0.9:1
	0.0020	8.5	黄 红→红	红	8.0	41	21	20	1.1:1
	0.0028	9.0	橙 → 红	红	8.5	33	18	15	1.2:1
	0.0040	10.0	橙黄	无	10.0 <sup>-</sup>	0	0	0	0:0
II	0	7.0	红	无	7.0	0	0	0	0:0
	0.0007	7.5	红微黄→红	红	7.5 <sup>-</sup>	15	12	3	4:1
	0.0020	8.5	黄 红→红	红	8.0	21	9	12	0.8:1
	0.0040	10.0	橙黄	无	10.0 <sup>-</sup>	0	0	0	0:0

\* 用石蕊试纸测定。

实验 I、II)。仅含乳蛋白水解物者亦能形成较多的蚀斑(表 6 实验 I、II、III),但若将乳蛋白水解物量增加 1 倍(0.9%),则未见蚀斑有明显的增加,细胞维持时间亦未见延长。

表 6 琼脂培养基中不同成分对乙型脑炎病毒(京卫研<sub>1</sub>株)蚀斑数的影响

实验批号	每 100 毫升琼脂培养基中有				平均蚀斑数*	百分比 (%)	细胞在 37℃ 维持天数**
	乳蛋白水解物 (克)	小牛血清 (毫升)	脱脂牛奶 (毫升)	鸡胚浸汁 (毫升)			
I	0.45	0	0	0	23.0	100.0	7—10
	0.45	4.5	0	0	25.3	110.0	10—12
	0.45	0	9.0	0	24.3	105.6	8—10
	0	4.5	0	0	0	0	1
	0	0	9.0	0	0	0	1
	0	0	0	4.5	0	0	1
II	0.45	0	0	0	67.0	100.0	10
	0.45	0	9.0	0	68.3	102.0	10—12
	0.45	0	0	9.0	66.0	98.5	10—12
III	0.45	0	0	0	27.3	100.0	10—12
	0.90	0	0	0	24.3	89.0	10—12

\* 3 管蚀斑平均数。

\*\* 以中性红着色的细胞至退色时,计算维持天数。

(二) 扁瓶与试管蚀斑法滴定乙型脑炎病毒的比较

在以上实验条件的基础上比较了扁瓶与试管蚀斑法滴定乙型脑炎病毒 PFU 对数值。表 7 的结果表明两者的数值是相接近的。若以  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  的病毒稀释液同时分别接种扁瓶或试管时,两者所形成的平均蚀斑数与稀释度均呈现一致的比例(表 7 实验 III),计算每毫升病毒悬液的 PFU 对数值也甚为接近。

表 7 比较扁瓶与试管蚀斑法滴定乙型脑炎病毒(京卫研<sub>1</sub>株) PFU 对数值

实验批号	容器类别	病毒稀释度	病毒悬液接种量 (毫升)	平均蚀斑数*	log PFU/毫升
I	扁瓶 试管	$10^{-5}$	0.5	21.5	6.63
		$10^{-5}$	0.2	14.3	6.85
II	扁瓶 试管	$10^{-6}$	0.5	16.0	7.51
		$10^{-6}$	0.2	12.0	7.60
III	扁瓶	$10^{-6}$	0.5	51.0	8.01
		$10^{-7}$	0.5	4.5	7.95
		$10^{-6}$	0.5	50.0	8.00
		$10^{-7}$	0.5	5.5	8.04
	试管	$10^{-6}$	0.2	19.7	7.99
		$10^{-7}$	0.2	2.0	8.00
		$10^{-6}$	0.2	24.0	8.08
		$10^{-7}$	0.2	2.0	8.00

\* 扁瓶每稀释度 2 瓶; 试管则为 3 管。

### 三、讨 论

通过本实验的研究结果初步地了解到影响乙型脑炎病毒蚀斑的若干因素。首先, 在感染细胞的一些有关条件方面, 如病毒稀释液的 pH, 感染细胞时的温度以及吸附病毒的时间都与蚀斑形成数量的多少有关。在比较病毒稀释液不同 pH 的试验中, 观察到在 pH 7.0 时的蚀斑数较 pH 8.0、9.0 及 10.0 时为少。小白鼠脑内滴定的结果亦表明低 pH 者的 LD<sub>50</sub> 滴度较低, 这主要是由于乙型脑炎病毒在低 pH 的条件下不稳定的缘故<sup>[9]</sup>。

病毒一般在低温下较稳定, 然而蚀斑数形成的多少在 4°—37°C 的范围内恰与温度的高低成反比关系, 这可能与细胞在 37°C 时代谢较好、病毒活动性较高, 有利于细胞病毒相互作用和促进病毒吸附有关, 因此蚀斑数亦较多。至于病毒吸附的时间, 一般来说, 时间长的蚀斑形成数多, 实验结果表明乙型脑炎病毒(京卫研<sub>1</sub>株)的吸附时间至少要 60 分钟。

中性红(注意质量)的浓度、琼脂培养基内 NaHCO<sub>3</sub> 的含量以及琼脂中的成分等与病毒的蚀斑形成及其特点有着密切的关系。高浓度的中性红对蚀斑形成的数量和大小都有明显的抑制作用, 这在鸡瘟病毒<sup>[10]</sup>、西方马脑炎病毒和小儿麻痹病毒方面<sup>[11]</sup>已有类似的报告。关于蚀斑抑制的机制, 诸家论说不一, Pledger 氏<sup>[12]</sup>指出中性红对口蹄疫病毒无灭活作用, 但可抑制蚀斑形成。在本试验中见到中性红在 1:14,000 时细胞染色很深, 细胞面积在着色后 2—3 天有明显的收缩现象, 蚀斑出现略迟, 数量少, 形态也小(图 1), 细胞于染色后第 8 天左右褪色(较用 1:28,000 中性红染色的细胞约早 5 天)。这种现象可能由于中性红影响细胞代谢及病毒繁殖的结果。当中性红的浓度低于 1:28,000, 如 1:56,000 者, 细胞着色太浅, 蚀斑观察不明显, 故选用 1:28,000 为宜。

在试验中我们注意到琼脂培养基内 NaHCO<sub>3</sub> 的浓度对蚀斑形成的形态有显著的影响。在 NaHCO<sub>3</sub> 含量少的琼脂培养基中小蚀斑较多, 蚀斑边缘不整齐, 界线不清楚(图 2 甲<sub>2</sub>), 镜下可见蚀斑区有残留的着色细胞, 除部分细胞变圆外, 梭形纤维母细胞依然交織成网状(图 2 乙<sub>2</sub>); 含 NaHCO<sub>3</sub> 较多的琼脂培养基中大蚀斑所占的比例较 NaHCO<sub>3</sub> 量少

的为大, 蝕斑边缘界綫較清楚 (图 2 甲<sub>3</sub>), 蝕斑区殘留的着色完整細胞少見, 細胞变圓, 細胞間間隙加大 (图 2 乙<sub>3</sub>)。NaHCO<sub>3</sub> 对蝕斑大小影响的原因可能是琼脂培养基适宜的 pH 能使細胞維持良好的代謝环境, 病毒能較好的繁殖。反之, pH 过高或过低的琼脂培养基, 細胞不能較好維持, 因而也无蝕斑形成 (图 2 甲<sub>1,4</sub>)。在乙型脑炎病毒不同毒株蝕斑特征的研究中<sup>[13]</sup>, 观察到在含 NaHCO<sub>3</sub> 量較高的琼脂培养基中形成大蝕斑的毒株, 当在含量較低的培养基中所形成的蝕斑虽小, 但仍然是明显的; 在 NaHCO<sub>3</sub> 含量較高的琼脂培养基中形成小蝕斑的毒株, 則在含量較低的培养基中形成的蝕斑更小, 且边缘模糊, 甚至有不显现蝕斑者。可見在稳定蝕斑技术、研究不同毒株的蝕斑特征、病毒株的生物学性状及变异性方面琼脂內 NaHCO<sub>3</sub> 的含量是一个值得注意的問題。

致密、匀厚的鸡胚纖維母細胞层是形成良好蝕斑的基本条件。本实验中采用的琼脂培养基配制方法較簡便, 形成蝕斑的結果亦是稳定的。甚至当培养基中仅含 0.45% 乳蛋白水解物时对蝕斑形成的影响不大 (图 3<sub>1</sub>)。这可避免血清中特异性或非特异性抑制物对蝕斑形成的影响。培养基中琼脂浓度在 0.9—1.8% 之間、琼脂厚度約为 3 毫米左右, 未見对形成的蝕斑数及大小有明显影响, 故可用試管蝕斑法<sup>[14]</sup> (1.8% 琼脂) (图 4) 代替扁瓶法 (1.2% 琼脂) 进行病毒分离、滴定、蝕斑中和試驗及蝕斑抑制試驗等方面的研究<sup>[15]</sup>。

#### 四、总 結

影响流行性乙型脑炎病毒 (京卫研<sub>1</sub>株) 蝕斑的因素很多。实验証明感染細胞时的病毒悬液的酸碱度在 pH 8—9、于 37°C 吸附至少 60 分鐘的条件下才能形成較多的蝕斑。采用最适宜的中性紅浓度为 1:28,000, 此浓度对蝕斑的形成和大小影响較輕, 且染色清楚。琼脂培养基中不同量的 NaHCO<sub>3</sub> 对蝕斑大小有明显的影响, 当每毫升琼脂培养基含 0.002 克时形成的蝕斑边缘清楚、形态較大, 蝕斑区細胞变圓, 細胞間間隙加大; 若每毫升含 NaHCO<sub>3</sub> 为 0.0007 克时, 則形成的蝕斑边缘模糊、形态較小, 蝕斑区仍有着色的完整細胞散在。培养基中无 NaHCO<sub>3</sub> 或每毫升含量高达 0.004 克时, 細胞維持時間短, 也无蝕斑形成。当琼脂培养基中仅有 0.45% 乳蛋白水解物时也能形成蝕斑。

关于研究蝕斑法的基本条件: 如鸡胚单层細胞制备、琼脂培养基的处方, 配制以及利用試管代替扁瓶进行蝕斑試驗等方法本文均作了簡要的介绍。

#### 参 考 文 献

- [1] Dulbecco, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **38**:747, 1952.
- [2] Dulbecco, R. & Vogt, R.: *Jour. Exp. Med.*, **99**:167, 1954.
- [3] Porterfield, J. S.: *Nature*, **183**:1069, 1959.
- [4] 郭輝玉: 微生物学报, **8**:109, 1960.
- [5] Inoue, Y., Kanda, Iwasaki, T. & Kato, H.: *Jour. of Immunol.*, **87**:337, 1961.
- [6] Henderson, J. R. & Taylor, R. M.: *Jour. of Immunol.*, **84**:590, 1960.
- [7] Henderson, J. R.: *Yale Jour. Biol. Med.*, **33**:350, 1961.
- [8] 黃禎祥、王逸民: 中华医学杂志, **37**:280, 1951.
- [9] 柳元元、张汉荆、张吉祥、关学勤: 微生物学报, **7**:149, 1959.
- [10] Waterson, A. P.: *Nature*, **183**:628, 1959.
- [11] Darnell, J. E., Lockart, R. Z. & Sawyer, T. K.: *Virology*, **6**:567, 1958.
- [12] Pledger, R. A.: *Virology*, **10**:50, 1960.
- [13] 流行性乙型脑炎病毒不同毒株的蝕斑特征的研究 (未发表)。
- [14] Henderson, J. R. & Taylor, R. M.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **101**:257, 1959.
- [15] 测定流行性乙型脑炎病毒中和抗体的几种方法学比較研究 (未发表)。

# STUDIES ON SOME FACTORS INFLUENCING THE PLAQUE FORMATION OF JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS

CHANG HAN-KING, WANG YI-MIN AND CHENG YUN-KAI

(Department of Virology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

Japanese B encephalitis virus (Peking-strain) did not exert regular cytopathogenic effect on chick embryo monolayer cells but could produce plaque with Dulbecco's technique. However, studies on the plaque formation of this virus were rather meager and their results were irregular.

Results of our studies indicated that the plaque formation of Japanese B encephalitis was affected by various factors: such as the pH of the virus suspension, the time and temperature for virus adsorption, the concentration of neutral red, the amount of sodium bicarbonate as well as the ingredients of the nutrient agar medium.

The optimal conditions for producing regular plaques are as follows:

1. Chick embryo monolayer cells must be dense and uniform.
2. The pH of the inoculated virus suspension should be between 8 and 9.
3. The adsorption of the virus should be taken place at 37°C for at least 60 minutes.
4. The optimal concentration of neutral red was 1:28,000 and the amount of sodium bicarbonate was about 0.002 gm per ml (pH 8.5).

The concentration of neutral red and that of sodium bicarbonate in the agar medium might affect the size of plaques. When the concentration of neutral red employed was 1:14,000, small plaques were formed, while it was in 1:28,000, uniformly large ones appeared. In these experiments, it was shown that the higher concentration of neutral red (1:14,000) might decrease the number of plaques. Besides, large plaques were regularly produced by using sodium bicarbonate in a concentration of 0.002 gm per ml.

It was also observed that with the use of agar medium consisting of only 0.45% lactalbumin hydrolysate, plaques could still be formed.

## 圖 版 說 明

- 图 1 (1) 中性紅 1:28,000 染色的鸡胚細胞, 白色斑为乙型脑炎病毒蚀斑。  
(2) 用 1:14,000 中性紅染色。  
(复盖琼脂培养基后第 7 天)。
- 图 2 甲 (1) 琼脂培养基中无  $\text{NaHCO}_3$  (pH 7.0)。  
(2) 琼脂培养基中  $\text{NaHCO}_3$  含量为每毫升 0.0007 克 (pH 7.5)。  
(3) 琼脂培养基中  $\text{NaHCO}_3$  含量为每毫升 0.002 克 (pH 8.5)。  
(4) 琼脂培养基中  $\text{NaHCO}_3$  含量为每毫升 0.004 克 (pH 10.0)。  
(复盖琼脂培养基后第 7 天)
- 图 2 乙 (1) pH 8.5 琼脂培养基复盖下的正常鸡胚单层細胞 (1:28,000 中性紅染色, 下同),  $\times 62$ 。  
(2) pH 7.5 琼脂培养基复盖下形成的蚀斑区,  $\times 62$ 。  
(3) pH 8.5 琼脂培养基复盖下形成的蚀斑区,  $\times 62$ 。  
(复盖琼脂培养基后第 7 天)。
- 图 3 (1) 琼脂培养基中有 0.45% 乳蛋白水解物。  
(2) 琼脂培养基中有 0.45% 乳蛋白水解物与 9% 脱脂牛奶。  
(3) 琼脂培养基中有 0.45% 乳蛋白水解物与 9% 鸡胚浸汁。  
(复盖琼脂培养基后第 10 天)。
- 图 4 用試管蚀斑法滴定乙型脑炎病毒 (京卫研 1 株) PFU。  
(复盖琼脂培养基后第 5 天)