

# 森林脑炎病毒感染性核糖核酸制备 及蛋白水解酶对其感染性的影响

張兴义 鄒蓮芝 王庭志 朱旣明

(长春生物制品研究所, 长春)

近年来已由各种病毒或其感染組織中提取出具有感染性的核酸, 能够感染宿主細胞<sup>[1]</sup>。現在用各种方法制备的病毒核糖核酸(RNA)都含有一些杂质, 特别是少量蛋白质<sup>[2]</sup>。这些蛋白质是否是感染性 RNA 的必要組成部分, 是否与 RNA 的遗传作用有关, 尚无定論<sup>[3]</sup>。认为材料中所含少量蛋白质或肽对 RNA 的感染性有重要作用的作者曾經指出几种病毒 RNA 都能为胰蛋白酶所灭活<sup>[4-6]</sup>。为此, 我們对几种蛋白水解酶对森林脑炎病毒感染性核酸的作用进行了研究, 現將結果报告如下。

## 实验材料与amp;方法

森林脑炎病毒为“森张”株, 經鼠脑传代者。

**核酸提取法** (1)冷石炭酸提取, 按 Colter 等<sup>[7]</sup>的过程操作; (2)热石炭酸提取, 按 Wecker 法<sup>[8]</sup>进行; (3)改进的石炭酸提取法, 在冷石炭酸提取法的基础上稍加改进。鼠脑加緩冲盐水及石炭酸后在锥形瓶中用玻璃球打碎或在乳鉢中加海砂磨碎提取, 醚洗后立即将 RNA 水溶液 1 容积加 98% 乙醇 2 容积, 沉淀 RNA 并离心分离之, 用 67% 乙醇洗一次, 溶解于以 pH 7.4 的 0.007M 磷酸盐緩冲之 0.14M 氯化鈉溶液中, 恢复沉淀前之体积, 保存于 -35℃ 冰箱中。以后实验皆用此法制备之核酸。

**感染性核糖核酸活力測定** 取上述 RNA 作为原倍液, 以 pH 7.4 的磷酸盐緩冲盐水作連續 10 倍稀释, 每个稀释度接种 5 只小鼠, 每只脑腔內接种 0.04 毫升, 观察 14 天, 按 Reed 和 Muench 法計算 LD<sub>50</sub>。作酶灭活試驗时一般仅用原倍反应液接种 5 只小鼠, 計其死亡只数, 未作定量滴定。

胃蛋白酶为美国 Armour Pepsin, 活力 1:3,000, 用 0.1N 盐酸配成 100 微克/毫升, 立即使用, 反应液的最終 pH 为 4.0 左右。木瓜酶为 E. Merck 厂出品, 活力为 1:350, 用水配制成 100 微克/毫升, 每 100 毫升中含有 0.1M 半胱氨酸 2 毫升。胰蛋白酶使用了三种: 一种为 Difco Trypsin, 活力 1:250; 一种为 E. Merck Trypsin, 活力用苏联药典法檢定为 1:15; 另一种为上海中国科学院生物化学研究所贈与者, 用苏联药典法檢定活力为 1:10; 三种胰蛋白酶皆用水配制成 100 微克/毫升。大豆胰酶抑制素 (Ti) 为卫生部生物制品研究所制备之溶液, 用水稀释 (1:10) 使用, 經測定每毫升能抑制 Difco 胰蛋白酶 (1:250) 1 毫克以上。核糖核酸酶 (RNase) 为按 McDonald 法<sup>[9]</sup>由牛胰脏制备之結晶酶, 配制成 200 微克/毫升使用。將此酶溶液稀释 1:100 及 1:1,000 后測定, 計算出 1 克酶在 37℃ 60 分钟能由 RNA 释出可溶磷 10.5 克。石炭酸为經二次蒸餾的市售品, 用时配制成 80% 溶液。其他試剂皆为化学純或分析純級。

**酶滅活核酸試驗** 上法提取之 RNA 1 毫升, 加酶溶液 0.1 毫升, 混勻后, 放 37℃ 恆溫箱中 20 分

鐘,取 0.04 毫升接种小鼠。分別用未加酶的 RNA 及純酶溶液同样处理作为对照。加抑制物試驗时,將 0.1 毫升酶与 0.1 毫升抑制物混合(或酶与抑制物預先在 37°C 温育 20 分钟)后加病毒核酸 1 毫升,混勻后放 37°C 恒温箱中作用 20 分钟,接种小鼠。

蛋白質用双縮脲法及 Lowry 之酚試剂法<sup>[10]</sup>測定,并于酸水解后作紙层析分析其中氨基酸。RNA 用甲基胍苯二酚法測定。

核糖核酸酶活力測定,取按 Chanstrenne 法<sup>[11]</sup>制备之高分子 RNA-A 1% 溶液 2 毫升,加 pH 6.0 的 0.1 M 醋酸鈉緩冲液 1 毫升,放 37°C 水浴中待温度平衡后加同温度之 RNase 2 毫升,維持 60 分钟,加 7.5 毫升盐酸-乙醇溶液(或 5 毫升醋酸鈉)沉淀,室温放 30 分钟,离心取上清液測酸可溶磷。

## 試驗結果

(一) RNA 制备与稳定性 用 Colter 冷石炭酸提取法及 Wecker 热石炭酸提取法制备之 RNA, 滴度 (LD<sub>50</sub>) 的对数在 2.00—3.00 左右, 二者之間沒有明显差别。用此 RNA 感染小白鼠, 发生典型的森林脑炎症状死亡, 此时脑中病毒滴度 (LD<sub>50</sub>) 的对数为 8.40, 新产生的病毒与原病毒性状相同, 仍能为森林脑炎免疫血清所中和。

病毒与 RNA 有三点不同: (1) 病毒用 RNase 处理滴度仅稍有下降, 而 RNA 則完全丧失感染力; (2) 用乙醇可以将病毒灭活, 而对 RNA 沒有影响; (3) 正常血清能使 RNA 灭活, 但不能中和病毒, 免疫血清能同时中和病毒与 RNA。(表 1)

表 1 从感染森林脑炎病毒的鼠脑組織用冷及热的石炭酸提取的核酸的性状\*

样 品	原滴度的对数	用各种试剂处理后之滴度对数				
		RNase	乙 醇	37°C 5 小时	免疫血清中和	正常血清
冷提取 RNA	2.87	0+	3.17	≥1.17	2.20	<1.00
热提取 RNA	3.32	0+	3.46	—	<1.00	<1.00
原病毒(对照)	7.17	5.83	0++	6.38	4.0	6.86
稀释病毒(对照)	3.00	2.66	0++	—	?	3.68

\* 表内数字均为 LD<sub>50</sub> 的对数 (0.04 毫升); 病毒滴度均以 10% 鼠脑悬液为基础計算, 核酸以由該悬液按文中所述方法提出的材料为基础計算的。

+ 为原倍液接种后无一只死亡者;

++ 为原倍液接种后一部分发病死亡, 但未达到 50% 者;

? 为稀释倍数过高, 刚有部分小鼠死亡, 不能正确測定 LD<sub>50</sub> 者;

— 表示未作, 以后表中均同。

历来文献报告皆用 10% 鼠脑病毒悬液作为对照, 10% 鼠脑悬液中森林脑炎病毒滴度的对数为 7.00—8.00 左右, 而提得之 RNA 感染力只有 3.00, 相差万倍以上, 难于比較。为考察微量病毒能否表现类似 RNA 的性质, 我們將高浓度病毒悬液用健康鼠脑 RNA 溶液稀释成滴度对数为 3.00, 再进行各种处理亦获得与高滴度病毒相同而与 RNA 不同的結果。可以认为我們制备的 RNA 确有感染能力, 此感染力非由痕迹量病毒混入所致。

我們將 Gierer 及 Schramm 酚提取法<sup>[12]</sup>中之通氮气泡步骤去掉, 增加乙醇沉淀一步, 获得之 RNA 滴度对数都在 4.00 以上, 用此法提取之 RNA 其性状与用原法制备者相同, 能被 RNase 灭活, 而不受乙醇影响。

RNA 在室温 (25°—30°C) 放置后活力迅速下降, 活力下降原因一般认为是被組織中 RNase 分解。据 Singer 等<sup>[13]</sup>的报告, 在提取 RNA 时加入皂土 (bentonite) 可吸附除去

RNase 而增加 RNA 的稳定性。在我們試驗中看到用高浓度皂土提取之 RNA, 室温保存 11 天活力沒有下降, 但有部分小鼠在感染后三天开始死亡。低浓度皂土与不加皂土者无显著区别, 这样制备的 RNA 室温放置 5 天, 滴度下降不多, 且放置 11 天后, 仍保留一部分活力。(表 2) Sokol<sup>[14]</sup> 用 Gierer 及 Schramm 法<sup>[12]</sup> 制备之 RNA 在 4°C 保存 3—72 小时即丧失活力, 与我們所获得的結果有显著不同。

表 2 加皂土与不加皂土提取的感染性核糖核酸在室温 (25—30°C) 保存之稳定性

試 驗 材 料	試 驗	保存后滴度 (LD <sub>50</sub> 之对数)		
		当 天	5 天	11 天
加高浓度皂土提取*	I	4.22	3.68	4.37
加低浓度皂土提取†	I	3.83	3.32	2.50
	II	4.50	≥4.50	2.50
提取后加皂土保护者††	i	4.32	3.00	≤1.83
	II	4.22	3.33	3.12
未加皂土者	I	4.32	≤1.50	2.50
	II	4.17	3.50	2.60

\* 以皂土悬液代替磷酸盐缓冲盐水, 皂土量为 0.023 克/鼠脑。

† 加一半磷酸盐缓冲盐水, 一半皂土悬液, 皂土量为 0.0115 克/鼠脑;

†† 提取获得之 RNA 溶液 10 毫升 (相当 10 个鼠脑) 加皂土悬液 1 毫升 (0.0115 克)。

(二) 蛋白质含量分析 10 毫升核酸溶液 (RNA 0.24 毫克/毫升) 用 5% 三氯醋酸沉淀, 再溶于 1 毫升水中, 用酚试剂显色, 有微弱蓝色, 但仍不足以正确测定。取 1.3 毫克 RNA 用 6N 盐酸在封管中 108°C 水解 30 小时, 作双向纸上层析, 检出少量亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酸、精氨酸及赖氨酸, 未进行定量测定。

(三) 蛋白水解酶对 RNA 活力的影响 胃蛋白酶、木瓜酶、胰蛋白酶皆有高度破坏蛋白质的能力, 而其切断肽链之位置不同, 作用最适 pH 亦异。现用三种蛋白水解酶与 RNA

表 3 各种蛋白水解酶灭活感染性核糖核酸的能力

反 应 液 组 成	小 鼠 死 亡 数*		
	I	II	III
RNA	5/5	5/5	5/5
RNA + 胃蛋白酶†	—	5/5	4/5
RNA + 木瓜酶†	5/5	5/5	—
RNA + Difco 胰蛋白酶†	0/5	1/5	—
RNA + E. Merck 胰蛋白酶†	0/5	2/5	0/5
RNA + 上海胰蛋白酶†	0/5	1/5	0/5
RNA + RNase††	0/5	0/4	—
胃蛋白酶†(对照)	0/5	—	—
木瓜酶†(对照)	0/5	—	—
上海胰蛋白酶†(对照)	0/5	—	—

\* 表中分母为接种小鼠数, 分子为死亡数, 以后表中均同。

† 蛋白酶最终浓度为 10 微克/毫升;

†† RNase 最终浓度为 20 微克/毫升。

作用后,再将反应液接种于小鼠脑腔内,观察 RNA 的活力,结果如表 3。

在我们的试验条件下,胃蛋白酶和木瓜酶处理的 RNA 没有失去活力,而不同来源的三种胰蛋白酶皆能破坏 RNA,使其灭活。

胰蛋白酶为由猪胰提取制备者,常含有少量 RNase。大豆胰蛋白酶抑制素能抑制胰蛋白酶分解蛋白的能力而不能抑制 RNase 分解 RNA。为了观察灭活 RNA 的作用能否为大豆抑制素所抑制,我们用 0.1 毫升大豆抑制素(经实验证明能抑制 100 微克 Difco 胰蛋白酶 1:250)抑制 0.1 毫升(10 微克) E. Merck 胰蛋白酶(1:15)或上海胰蛋白酶(1:10),发现被抑制的酶仍能灭活病毒 RNA。此外,为了防止在试管中已被抑制之胰蛋白酶进入机体后再被解离而发挥蛋白水解酶的作用,我们将作用后的样品又用石炭酸重复提

表 4 大豆胰蛋白酶抑制素对胰蛋白酶灭活感  
染性核糖核酸的影响

反应液组成	小鼠死亡数	
	反应液未处理接种	反应液经石炭酸再提取后接种
RNA	5/5	5/5
RNA + T	0/5	1/5
RNA + T + Ti	0/5	1/5
RNA + RNase	0/5	0/5
RNA + RNase + Ti	1/5	0/5
RNA + Ti	5/5	—
Ti	0/5	—

注:本表中“T”代表胰蛋白酶;“Ti”代表大豆胰蛋白酶抑制素。

对 RNase 尚无满意的抑制剂,常被采用者有聚乙烯醇硫酸酯、肝素、聚谷氨酸、皂土等,以皂土的抑制效果为稍佳。但据我们试验的结果,皂土除能抑制 RNase 活力外,亦能抑制胰蛋白酶水解蛋白的能力。

病毒核酸 2 毫升加 1.15% 皂土 2 毫升,胰蛋白酶 0.2 毫升或 RNase 0.2 毫升,37°C 作用 20 分钟后用 80% 石炭酸除去蛋白质,水层用乙醚提取除去石炭酸以 2 容积酒精沉淀之,沉淀溶解于 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水成 2 毫升,接种于小白鼠脑腔内,观察感染性,结果如表 5 所示。皂土抑制了 RNase 水解 RNA 的能力,同样也抑制了胰蛋白酶灭活病毒核酸的能力。

(四)不同浓度的酶对 RNA 的灭活作用 取滴度对数为 3.38 的 RNA 一批,测得的 RNA 含量为 0.25 毫克/毫升,用双缩脲法没有检出蛋白质,分别加入不同浓度的 RNase 及上海胰蛋白酶,37°C 作用 20 分钟接种小鼠,结果见表 6。

一般用石炭酸法制备 RNA 皆提取三次,为使蛋白质含量更为降低,用石炭酸提取 5 次得滴度对数为 4.17 的 RNA 一批, RNA 含量为 0.38 毫克/毫升,用双缩脲及 Lowry 酚试剂法皆未检出蛋白质。此批 RNA 用不同浓度的上海胰蛋白酶和 Difco 胰蛋白酶处理 20 分钟,再给小鼠接种,结果如表 7。于本表中同时列出另一批滴度对数为 3.75 的 RNA 以 E. Merck 及 Difco 酶处理 60 分钟的结果。

取一次,除去酶及抑制素,再接种于小鼠脑腔内,亦获得同样结果。(表 4)

表 5 皂土对核糖核酸酶及胰蛋白酶灭活感  
染性核糖核酸的影响

反应液组成	小鼠死亡数
RNA	5/5
RNA + 皂土 + RNase*	5/5
RNA + 皂土 + 胰蛋白酶*	5/5
RNA + RNase	1/5
RNA + 胰蛋白酶	0/5

\* 恢复原量后,又作 1:10 稀释接种。

表 6 不同浓度的核糖核酸酶和胰蛋白酶对感染性核糖核酸的灭活作用

胰蛋白酶最终浓度 (微克/毫升)	小鼠死亡数	RNase 最终浓度 (微克/毫升)	小鼠死亡数
10	3/5 <sup>+</sup>	0.002	0/5
1	5/5	0.0002	5/5
0.1	5/5	0.00002	5/5

<sup>+</sup> 此浓度之上海胰蛋白酶经多次试验, 多数能将 RNA 全部灭活, 有时只有部分灭活或不灭活, 可能与每批 RNA 浓度不同有关。

表 7 不同浓度胰蛋白酶对 5 次提取的感染性核糖核酸的灭活作用

胰蛋白酶最终浓度 (微克/毫升)	小 鼠 死 亡 数			
	滴度对数为 4.17 RNA 处理 20 分钟		滴度对数为 3.75 RNA 处理 60 分钟	
	上 海 酶	Difco 酶	E. Merck 酶	Difco 酶
1000	0/5	—	—	—
100	0/5	—	0/5	0/5
10	5/5	2/5	0/5	0/5
1	5/5	4/5	5/5	1/5
0.1	5/5	5/5	4/5	5/5
0.01	5/5	5/5	5/5	5/5

从表 6 与表 7 结果可见, 于 37°C 作用 20 分钟胰蛋白酶的有效灭活最终浓度为 10—100 微克/毫升, 而 RNase 的有效浓度仅为 0.002 微克/毫升。我们分析了这三批胰蛋白酶水解酵母 RNA 的能力, Difco 胰蛋白酶 1 克 37°C 60 分钟能释出 50 毫克可溶磷, E. Merck 酶能释出 8.5 毫克可溶磷, 上海酶能释出 50 毫克可溶磷。如按纯 RNase 在同样条件下游离可溶磷来计算, 它们可能混有 RNase 的数量分别为 0.5%、0.08% 和 0.05%。

## 讨 论

我们从森林脑炎鼠脑中提取具有感染性的 RNA, 从而证实了 Sokol 等<sup>[14]</sup>报告的结果。

将森林脑炎病毒用健康鼠脑核酸溶液稀释到与感染性 RNA 相同的滴度, 再用 RNase, 乙醇等试剂处理, 结果与 RNA 有明显之差别, 因而可以肯定 RNA 之感染性非由混入极微量病毒所致。

用我们改进的方法制备森林脑炎病毒感染性核酸, 不但操作方便, 而且制品的感染力较原法为高, 原法制备者滴度 (LD<sub>50</sub>) 对数为 2.00—3.00, 改进法制备者为 4.00 左右。这样制备的 RNA 在室温 (25—30°C) 中保存 5 天, 活力没有很大变化。而 Sokol<sup>[14]</sup> 报告用 Gierer 及 Schramm 原法制备之森林脑炎 RNA 在 4°C 很快灭活, 可能用酒精沉淀和皂土处理一样除去了部分的 RNase, 而增加了 RNA 的稳定性。

用石炭酸提取法制备之 RNA 含有少量蛋白质。这些蛋白质和 RNA 的感染力及遗传性的关系尚有不同意见。Cochran 等<sup>[15]</sup> 认为蛋白质在病毒感染过程中具有相当重要的作用, 甚至认为 RNA 具有之感染性是因为有少量蛋白质存在之故。多种病毒的感染性核酸如烟草花叶病毒 RNA<sup>[4]</sup>, 口蹄疫病毒 RNA<sup>[5]</sup>, 黄热病毒 RNA<sup>[6]</sup> 用胰蛋白酶处理均被灭活。关于灭活机制, 意见尚不一致。主张蛋白质在感染中起主要作用的作者更以此

为主要证据之一。如 Franklin<sup>[16]</sup> 认为病毒 RNA 末端有一个氨基基为保持活性所必需, 而 Otaka 等<sup>[17]</sup> 认为酵母 RNA 可能是几个沉淀常数为 4S 的亚单位以肽类联结而成的高分子, 胰蛋白酶的作用就是切断了这些肽键。我们研究了几种蛋白水解酶对森林脑炎 RNA 感染力的影响, 结果在我们的试验条件下胃蛋白酶和木瓜酶未影响 RNA 活力, 而三种不同来源的胰蛋白酶却都有灭活作用。但胰蛋白酶系由猪胰提取, 可能混有少量 RNase。我们估计 Difco 胰蛋白酶由酵母 RNA 释出可溶性磷的能力约相当于其中含 0.5% RNase, E. Merck 胰蛋白酶约相当于 0.08%, 上海酶相当于 0.05%。因此, 灭活作用可能是由于 RNase 的作用。为了证明此点, 进行了以下两项试验:

第一, 在胰蛋白酶中加入过量的大豆胰酶抑制素仍不能消除胰蛋白酶灭活 RNA 的作用。为避免酶与抑制素结合物进入鼠脑内解离后释出活性胰蛋白酶, 曾将作用后的混合物又用石炭酸处理使蛋白质变性除去之, 再提取的 RNA 仍然没有活力, 说明在胰蛋白酶被抑制的情况下, RNA 仍然被破坏了。但向 RNA-胰蛋白酶混合液中加入能抑制 RNase 活力的皂土时, 却消除了胰蛋白酶灭活 RNA 的作用。

第二, 我们的试验结果表明, 将 RNase 在反应液中的最终浓度降低到 0.002 微克/毫升, 仍能破坏 RNA。上海酶由酵母 RNA 释出可溶性磷的活力约相当于其中含 0.08% RNase, 为使其活力达到相当于 0.002 微克/毫升 RNase 需要 4 微克/毫升胰蛋白酶, 动物试验的结果表明 10-100 微克上海胰蛋白酶能灭活 RNA 而 1 微克则无作用, 正与预计数值大致符合。

根据上述各种蛋白水解酶的灭活试验, 胰蛋白酶抑制试验以及 RNase 和胰蛋白酶稀释试验结果, 我们认为胰蛋白酶的灭活作用并非由于它的水解蛋白质的活力, 而很可能是由于其中含有少量的 RNase 分解了 RNA。

据文献报告, 石炭酸法制备之 RNA 用各种方法测定的蛋白质含量不会高于 0.4-0.02%, 一般文献报告都是用石炭酸提取 3 次, 我们提取 5 次的 RNA, 用较灵敏的酚试剂法测定没有检出蛋白质, 即或用滤纸色层分析法检查也需要 5 毫升样品才能检出少量氨基酸。从残余蛋白质含量上推算, 每个有活性的核酸分子所含的病毒蛋白质最多只是一个或几个亚单位。病毒蛋白亚单位很容易被胰蛋白酶分解<sup>[16]</sup>。但是据我们多次试验的结果, 当胰蛋白酶的浓度低于 10 微克/毫升时, 即没有灭活作用。

由此似可推论提取的材料中含有的微量蛋白质对 RNA 的感染性和遗传不是绝对必要的。

## 摘 要

1. 我们用改进方法制备森林脑炎病毒感染性 RNA, 操作方便, 活力高, 在室温中保存五天, 活力变化不显著。

2. 用胃蛋白酶、木瓜酶、胰蛋白酶处理感染性 RNA, 所用的胰蛋白酶试剂能将 RNA 灭活, 胃蛋白酶和木瓜酶没有作用。

3. 用大豆胰酶抑制素抑制胰蛋白酶活性, 仍能破坏 RNA, 而用能抑制 RNase 的皂土处理则消除了胰蛋白酶灭活 RNA 的能力。

4. 用不同浓度的 RNase 和胰蛋白酶处理 RNA, 最终浓度为 0.002 微克/毫升的 RNase

即能灭活 RNA, 而胰蛋白酶则至少需要 10 微克。用化学方法测定估计不同来源的胰蛋白酶由酵母 RNA 释出可溶性磷的活力约相当于其中含有 0.05%—0.5% 的 RNase。胰蛋白酶灭活 RNA 的需要量与其中可能含有的 RNase 数量大致符合, 而与蛋白水解活力相差很远。

### 参 考 文 献

- [1] Colter, J. S. and Ellem, K. A. O.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **15**:219, 1961.
- [2] Schuster, H.: in *"The Nucleic Acid"*, Edited by Chargaff and Davidson, Vol. III, pp. 245—301, Acad. Press., N. Y., 1960.
- [3] Commoner, B.: *Biochemistry of Viruses*, Edited by Broda and Frisch-Niggemeyer, IVth Internat. Congr. Biochem., Vienna, pp. 17—30, Pergamon Press., Vienna, 1959.
- [4] Fraenkel-Conrat, H., Singer, B. and Williams, R. C.: *Biochem. Biophys. Acta*, **25**:87, 1957.
- [5] Bachrach, H. L.: *Viol.*, **12**:258, 1960.
- [6] Nielsen, G. und Marquardt, J.: *Arch. für Virusforsch.*, **12**:335, 1962.
- [7] Colter, J. S., Bird, H. H. and Brown, R. A.: *Nature*, **179**:859, 1957.
- [8] Wecker, E.: *Viol.*, **7**:241, 1959.
- [9] McDonald, M. R.: *J. Gen. Physiol.*, **32**:39, 1948.
- [10] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**:265, 1951.
- [11] Chantrenne, H.: *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **55**:5, 1946.
- [12] Gierer, A. and Schramm, G.: *Nature*, **177**:702, 1956.
- [13] Singer, B. and Fraenkel-Conrat, H.: *Viol.*, **14**:59, 1961.
- [14] Sokol, F., Libiková, H. and Zémbla, J.: *Acta Virol.* (Русское издание), **4**:65, 1960.
- [15] Cochran, G. W., Welkie, G. W., Chidaster, J. L., Chandrasekhar, B. K. and Lee, M. H.: *Nature*, **193**:544, 1962.
- [16] Franklin, R. M. and Wecker, E.: *Nature*, **184**:343, 1959.
- [17] Otake, E., Oota, Y. and Osawa, S.: *Nature*, **191**:598, 1961.
- [18] Gish, D. T., Ramachandran, L. K. and Stanley, W. M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**:433, 1958.
- [19] Fraenkel-Conrat, H. and Ramachandran, L. K.: in *"Adv. Protein Chem."* Vol. 14, pp. 175—229, Acad. Press, N. Y., 1959.
- [20] McDonald, M. R.: in *"Methods of Enzymology"* Edited by Colowick and Kaplan, Vol. II, pp. 427—436, Acad. Press., N. Y., 1955.

## PREPARATION OF INFECTIVE RNA FROM SPRING-SUMMER ENCEPHALITIS VIRUS AND THE ACTION OF PROTEIN- SPLITTING ENZYMES ON ITS INFECTIVITY

CHANG SHING-YI CHOU LIEN-TSE WANG TING-TZE CHU CHI-MING

*(Changchun Vaccine and Serum Institute, Changchun)*

By employing Gierer and Schramm's method, modified by additional alcohol precipitation following phenol extraction, RNA of higher infectivity was prepared from mouse brain infected with spring-summer encephalitis virus. The infective RNA preparation may be kept at 25—30°C for at least 5 days without marked loss in infective titre.

The infectivity of virus RNA was unaffected by treatment with pepsin or papain, but was inactivated by three different preparations of trypsin. This inactivating activity was not affected by the presence of soya-bean inhibitor known to inhibit the action of trypsin, but was inhibited by bentonite which was found to inhibit the action of both trypsin and RNase.

During assaying the inactivating activity of different enzyme preparations on virus RNA, RNase from beef pancreas was found to be active up to a concentration of 0.02  $\gamma$ /ml. On the other hand, 10—100  $\gamma$ /ml of the different trypsin preparations were required under the same experimental conditions. The capacity of the trypsin preparation to liberate soluble phosphorus from yeast RNA was estimated to be equivalent to their containing 0.05—0.5% RNase. Thus, the quantities of trypsin preparations required for inactivation of virus RNA roughly correspond to their content of RNase possibly present as contaminant.

From the above evidence, it is suggested that the inactivation of virus RNA by trypsin preparations is probably due to contamination of the latter by RNase. The significance of this finding is discussed.