

# 利用蝕斑选种由乙型脑炎病毒(京卫研<sub>1</sub>株) 中获得毒力不同的毒株

許兆祥 陈伯权 柳元元

(中国医学科学院病毒学研究所, 北京)

利用蝕斑技术可由同一病毒株中分离得不同生物学性质的純系病毒<sup>[1-5]</sup>。在脑炎病毒方面如西方馬脑炎、委內瑞拉脑炎等病毒都曾以蝕斑选种法获得对小白鼠具有不同毒力的病毒株<sup>[6-8]</sup>。

作者曾报导,对小白鼠皮下致死力不同的乙型脑炎病毒,其蝕斑形成特征有一定的差异,但也有某些共同点<sup>[9]</sup>,由此我們曾推論对小白鼠皮下致死力高的乙型脑炎病毒京卫研<sub>1</sub>株可能是由对小白鼠皮下致死力不同的病毒顆粒所組成的。为了証明上述推論是否正确,本文对该毒株进行了蝕斑选种,并对所选出的病毒顆粒进行了某些生物学性质的比較研究。

## 材 料 与 方 法

**1. 病毒** 京卫研<sub>1</sub>株(即 A<sub>2</sub> 株):其历史详见文献<sup>[10]</sup>,是一株对小白鼠有高度皮下致死力,其皮下感染 LD<sub>50</sub> 滴度比脑內感染滴度仅低 1 个对数左右,该毒株曾經在小白鼠脑內传了 33—37 代。

中山株:该株病毒在本实验室经小白鼠脑內传了 77—79 代,是 1 株对小白鼠皮下致死力較低的毒株,其皮下感染 LD<sub>50</sub> 滴度比脑內感染滴度低达 5—6 个对数左右<sup>[10]</sup>。

**2. 病毒毒力滴定** 小白鼠脑內及皮下 LD<sub>50</sub> 滴定: 用 10 倍稀释法将病毒悬液制成不同的稀释度,以本院繁殖的三周龄小白鼠(体重 7—9 克)进行脑內及皮下滴定,滴定时脑內每稀释度注射 4 只小白鼠,皮下注射 5 只,脑內組动物观察 2 星期,皮下組观察 3 星期,按 Reed 和 Muench 法<sup>[11]</sup>计算,LD<sub>50</sub> 滴度。

**3. 中和試驗** 采用稀释病毒固定血清法进行小白鼠脑內中和試驗,具体方法详见文献<sup>[12]</sup>。

**4. 病毒血球凝集試驗** 详见文献<sup>[13]</sup>。

**5. 蝕斑技术** 详见前一报告<sup>[14]</sup>。

**6. 蝕斑选种技术** 将毛细吸管在酒精灯上烧成近似 90° 的弯头,用此吸管插入所要挑选的空斑所在区域的琼脂层中,吸出其内容物,移入 0.9 毫升的 Hanks 溶液中作为接种材料。

## 实 驗 結 果

### 1. 由京卫研<sub>1</sub>株中获得对小白鼠皮下致死力不同的毒株

将京卫研<sub>1</sub>株病毒稀释成每毫升含 10—100PFU(蝕斑形成单位)的悬液,进行蝕斑試驗。在病毒培养第 6 天时,对直径大小不同的蝕斑按前述蝕斑选种法进行选种,将选出的蝕斑接种于鸡胚单层細胞进行蝕斑試驗,同样在培养到第 6 天时再挑出与原接种的直径

相同的蝕斑,如此經蝕斑純化一次后将蝕斑懸液接種小白鼠腦內以提高滴度,經小白鼠腦內傳 2 代后,進行小白鼠腦內和皮下 LD<sub>50</sub> 滴定。實驗結果如表 1 所示。由表 1 中可看

表 1 利用蝕斑選種由京衛研<sub>1</sub>株中獲得對小白鼠皮下致死力不同的毒株

蝕 斑 号	鼠 腦 滴 度 (log LD <sub>50</sub> /0.03 毫升)	皮 下 滴 度 (log LD <sub>50</sub> /0.03 毫升)	腦內與皮下滴度的差距 (log)
1	7.66	5.82	1.84
2	8.17	6.50	1.69
3	7.50	5.00	2.50
4	8.00	5.00	3.00
5	8.33	5.00	3.33
6	8.50	4.75	3.76
7	7.67	3.72	3.95
8	8.23	4.25	3.98
9	8.33	4.00	4.33
10	7.50	<1.50	>6.00

注: 空斑第 1, 8, 10 号在下面的試驗中分別簡稱為 P、M、L 株。

出, 利用空斑選種法可以從京衛研<sub>1</sub>株分離到對小白鼠皮下致死力高低不同的毒株, 根據對小白鼠皮下致死力的不同, 毒株可分 3 類, 第 1 類, 皮下致死力較高, 共 3 株, 其皮下滴

表 2 利用蝕斑選種獲得的不同毒株的毒力穩定性試驗

毒 株	鼠 腦 盲 傳 代 數	腦 內 滴 度 (log LD <sub>50</sub> /0.03 毫升)	皮 下 滴 度 (log LD <sub>50</sub> /0.03 毫升)	腦內與皮下滴度的差距 (log)
M 株	1	8.23	4.25	3.98
	5	7.66	4.15	3.51
	10	7.66	4.72	3.94
P 株	1	7.66	5.82	1.84
	5	7.50	6.17	1.33
	10	7.77	5.80	1.97
L 株	1	7.50	<1.50	>6.00
	5	7.17	<0.50	>6.67
	10	8.17	<0.75	>7.42

表 3 利用蝕斑選種獲得的各毒株與原株免疫血清的中和試驗

實驗次數	毒 株	A <sub>2</sub> 株免疫血清號	對 照 組 (log LD <sub>50</sub> /0.03 毫升)	試 驗 組 (log LD <sub>50</sub> /0.03 毫升)	中 和 指 數 (log)
1	A <sub>2</sub> 41 代	1 号	7.22	4.17	3.05
	M 株	1 号	7.50	3.80	3.70
2	A <sub>2</sub> 33 代	1 号	8.67	5.00	3.67
	M 株	1 号	8.00	4.67	3.33
	P 株	1 号	8.33	4.50	3.83
3	A <sub>2</sub> 37 代	2 号	7.00	4.50	2.50
	L 株	2 号	6.67	4.50	2.17

度僅比腦內低 1 個對數左右, 與原毒株相似; 第 2 類, 皮下致死力較低, 共有 2 株, 皮下與腦內滴度的差距達 4.33—6 個對數; 其他 5 株屬第 3 類, 其差距為 2.33—3.98 個對數, 其

皮下致死力介于二者之間。

2. 毒力的稳定性試驗

为了了解上面所分离到的毒株的皮下和脑內感染力是否稳定,将其中的 M、L 及 P 株病毒在鼠脑連續传代, 每 5 代进行小白鼠脑內和皮下 LD<sub>50</sub> 滴定以观察其毒力变化。实验結果列在表 2, 証明此 3 株病毒經鼠脑传到 10 代时,其对小白鼠脑內和皮下 LD<sub>50</sub> 滴度的差距与第一代相似, 說明該 3 株病毒对小白鼠皮下致死力高低不同的性質是比較稳定的。

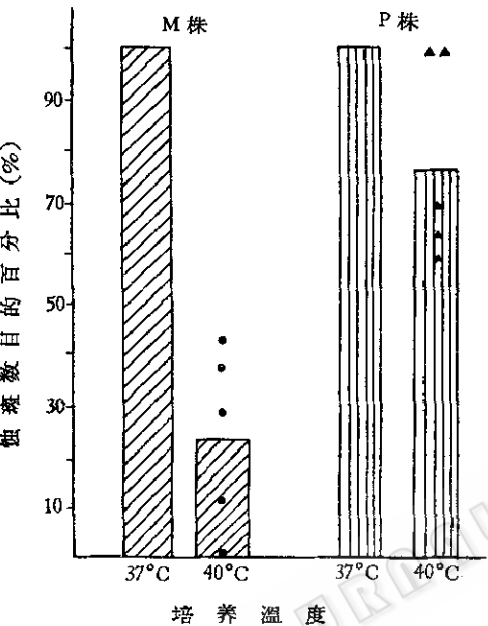


图 1 不同温度培养病毒对蚀斑形成能力的影响。

3. 毒株的鉴定

用流行性乙型脑炎病毒京卫研<sub>1</sub>株豚鼠免疫血清对 M、L、P 株及京卫研<sub>1</sub>株进行中和試驗, 以确証这些毒株为乙型脑炎病毒。表 3 的結果表明 M、L、P 三株病毒都能被京卫研<sub>1</sub>株免疫血清所中和。

4. 一些生物学性状的比較

(1) 在不同温度培养下的蚀斑形成能力:  
将 M 株与 P 株病毒稀释成每毫升含 10—100 PFU 的悬液进行蚀斑試驗。同一株病毒的培养瓶分成 2 組, 每組 4—6 个, 分別在 37°C 和 40°C 培养。培养到第 6 天, 以 37°C 培养所形成的蚀斑数目为 100%, 同时观察在 40°C 培养同样天数时的蚀斑数目以計算降低的百分数。实验共进行了 5 次, 結果如图 1 所示。此二株

表 4 利用蚀斑选种由京卫研<sub>1</sub>株中获得的不同毒株的血凝滴度

毒 株	血 凝 滴 度	蚀 斑 滴 度 (log PFU/毫升)	蚀斑滴度/血凝滴度 (log)	蚀斑滴度/血凝滴度 (平均值, log)
M 株	>1/20480	9.36	<5.05	≤5.27
	>1/20480	9.66	<5.35	
	1/5120	9.12	5.42	
P 株	1/80	9.29	7.39	7.17
	1/20	8.51	7.21	
	1/20	8.21	6.91	
L 株	1/120	9.42	7.35	7.70
	1/40	9.66	8.06	
	1/20	8.99	7.69	
A <sub>2</sub> 38 代	1/40	9.29	7.69	7.33
	1/80	8.99	7.09	
	1/20	8.51	7.21	
中 山 株	1/10240	9.81	5.80	5.65
	1/5120	9.21	5.51	

病毒在 40℃ 培養時蝕斑數目降低的百分數有所不同。對小白鼠皮下致死力較低的 M 株, 在 40℃ 培養時其蝕斑降低達 76% 左右, 而對小白鼠皮下致死力較高的 P 株在 40℃ 培養時其蝕斑僅降低 25% 左右。

## (2) 血凝性質的比較:

以 M、P 及 L 株病毒進行血凝試驗, 觀察其血凝素的滴度, 並與京衛研<sub>1</sub> 株 38 代及中山株鼠腦病毒的血凝滴度進行比較。實驗結果(表 4) 表明, 京衛研<sub>1</sub> 株(38 代) 與中山株的血凝素滴度也有明顯不同, 中山株的血凝素滴度較高。由血凝滴度較低的京衛研<sub>1</sub> 株(33—37 代) 中選種獲得的 M 株, 與中山株相似, 都具有較高的血凝滴度, 而 P 及 L 株的血凝素滴度與原株相似, 仍然較低。

## 討 論

本實驗利用蝕斑技術由流行性乙型腦炎病毒京衛研<sub>1</sub> 株中分離到數株對小白鼠皮下致死力高低不同的病毒顆粒, 而且證明經小白鼠腦內連續傳 10 代, 其皮下感染力是比較穩定的。所選出的毒株之間的其他生物學性質如血凝滴度, 在不同溫度下培養的蝕斑形成能力也有所不同, 但其抗原性仍與原株相似。這些資料說明京衛研<sub>1</sub> 株實際上不是由單一性質的病毒顆粒所組成的, 而是由一些抗原性基本上相似但在某些生物學性質上不同的病毒顆粒所組成的羣落。

黃禎祥等<sup>[5]</sup>曾比較了數株由人、豬、蚊子等不同來源的病毒株的毒力, 證明這些毒株之間對小白鼠皮下感染致死力有所不同。大家知道腦炎病毒在自然界是由蚊、蠓等節足動物作為媒介而在不同種類的牲畜、禽类等動物中輾轉傳播繁殖的。根據本實驗結果推論, 由於乙型腦炎病毒在動物中繁殖的過程不盡一樣, 所以在自然界中腦炎病毒株間所含生物學性質(如毒力等) 不同的病毒顆粒在比例上也有所差別。即在一定條件下繁殖循環時病毒羣落中以皮下毒力較高的病毒顆粒為主, 在另一些條件下, 羣落中則以皮下毒力較低的病毒顆粒占優勢。由此推測, 在不同時期內從不同宿主獲得的病毒, 可能借蝕斑技術分離到毒力不同的毒株。這樣, 也可進一步說明本文所提出的自然界確實存在有毒力比例不同的病毒株。黃禎祥<sup>[6]</sup>曾提出腦炎的顯性感染、不顯性感染與病毒毒力的高低有關, 由上述問題的研究結果也有利於進一步闡明腦炎不同臨床表現的機制。

李河民等以數株乙型腦炎病毒通過雞胚組織培養傳代, 發現其毒力有改變且其改變與毒株有關, 有的毒株通過傳代易於改變其毒力, 有的則不易改變<sup>[7]</sup>。本文研究結果說明病毒株本身包含有毒力高低不同的病毒顆粒, 所以不同株之間其不同性質的病毒顆粒所占的比例也可能有不同, 從而影響其毒力改變的速度。

柳元元<sup>[8]</sup>認為在病毒變異的研究工作中, 當使用的毒株在還不能肯定其是否為單一性質的病毒顆粒所組成之前, 如果在研究過程中出現病毒性質的改變, 則除考慮病毒變異的可能性外, 尚需考慮淘汰的可能性。本文實驗結果證明了乙型腦炎病毒京衛研<sub>1</sub> 株實際上不是由單一性質的病毒顆粒所組成的, 因此在研究病毒變異時, 對所用的毒株應先採用由蝕斑選種法進行純化。

對小白鼠皮下致死力低的乙型腦炎病毒中山株在 40℃ 培養下蝕斑形成能力較對小白鼠皮下致死力高的京衛研<sub>1</sub> 株為差<sup>[9]</sup>。本文由京衛研<sub>1</sub> 株中分離得的對小白鼠皮下致死

力高低不同的病毒也同样有这样的现象。

李河民<sup>[20]</sup>曾比较了 10 株乙型脑炎病毒的血凝滴度,发现不同株之间血凝滴度有明显差别。本文发现利用空斑技术从同一株病毒中分离得的不同病毒颗粒其血凝性质也有明显不同。因此,不同株之间血凝滴度的不同,可能也与组成该株的不同血凝性质的病毒颗粒所占的比例不同有关。利用空斑技术挑选血凝素高的毒株、以制备脑炎病毒血凝素,可能为进行血凝试验提供更有利的条件。这对脑炎的诊断具有一定的意义。

## 摘 要

本实验利用空斑技术由对小白鼠皮下致死力较高的流行性乙型脑炎病毒京卫研<sub>1</sub>株分离出 10 株皮下致死力高低不等的毒株。经小白鼠脑内连续盲传 10 代,证明其皮下感染力是比较稳定的,所选出的毒株的其他生物学性质,如血凝性质,在不同温度下培养时的空斑形成能力等,也有所不同,但其抗原性则仍相似。

作者根据本实验的结果,认为京卫研<sub>1</sub>株病毒实际上不是由单一性质的病毒颗粒所组成,而是由一些抗原性相似,但在某些生物性质上不同的病毒颗粒所组成的群落。

此外,本文对自然界存在有不同毒力的脑炎毒株的可能原因进行了讨论。

## 参 考 文 献

- [1] Dulbecco, R. and Vogt, M.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **61**:790, 1955.
- [2] McClain, M. E., Hackett, A. J., Madin, S. H.: *Science*, **127**:1391, 1958.
- [3] Godlieb, S. T. and Leventon, S.: *Brit. J. Exp. Path.*, **41**:507, 1960.
- [4] Ellem, K. A. and Colter, J. S.: *Virology*, **15**:340, 1961.
- [5] Fuerst, C.: *Virology*, **13**:553, 1961.
- [6] Ushijima, R. N., Hill, D. W., Dolana, G. H. and Gebhardt, L. P.: *Virology*, **17**:356, 1962.
- [7] Dunayevich, M., Johnson, H. N. and Burleson, W.: *Virology*, **15**:295, 1961.
- [8] Henry, J., Hearn, H. R., William, F.: *Bact. Proc.*, 23—27:150, 1961.
- [9] 陈伯权、许兆祥、柳元元:微生物学报, **10**(3):333, 1964.
- [10] 黄祯祥、周明先:微生物学报, **6**(1):22, 1958.
- [11] Reed, L. J. and Muench, H.: *Amer. J. Hyg.*, **27**:493, 1938.
- [12] 北京协和医院检验科主编:病毒学诊断手册, 28, 1960.
- [13] 任广宏、张吕先、丘福祥、曹惠霖:中华医学杂志, **47**:441, 1961.
- [14] 陈伯权、许兆祥、柳元元、范瑞莲:微生物学报, **9**(1):53, 1963.
- [15] 黄祯祥、戴莹:微生物学报, **6**(3):294, 1958.
- [16] 黄祯祥:中华医学杂志, **44**:109, 1958.
- [17] 李河民、俞永新、李淑蓉、武佩芬:微生物学报, **8**(3):251, 1962.
- [18] 柳元元:生物科学动态, (3), 1, 1963.
- [19] 许兆祥、周 坚、熊启华、陈伯权:温度对流行性乙型脑炎病毒及其 RNA 的影响 (待发表).
- [20] 李河民、俞永新、敖 坚、陈晓生:生物制品通讯, (1), 27, 1959.

# ISOLATION OF VIRUS STRAINS OF DIFFERENT SUBCUTANEOUS PATHOGENICITY FROM JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS (PEKING STRAIN) BY MEANS OF PLAQUE-SELECTION METHOD

HSÜ CHAO-HSIANG, CHEN BO-CHUAN AND LIU YÜAN-YÜAN

*(Institute of Virillogy, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)*

In this experiment 10 virus strains of different subcutaneous pathogenicity on mice had been isolated from J. B. E. virus by means of plaque-selection method.

The pathogenicity of these selected strains was proved to be stable by subsequent transferring through mouse brain up to 10 passage. Certain differences in biological properties, such as hemagglutination activity and plaque-forming ability on cultivation at different temperature had also been observed between some of the selected strains. However, all of these had similar neutrallizing antigenicity.

Basing on the above results, the authors suggest that the original virus strain (Peking strain) was not composed by homogeneous virus particles but really a mixed population made up of particles of different biological properties.

Propable reason about the formation of different virulent strains found in nature was discussed in the paper.