

狂犬病毒灭活前后形态结构的研究

赵林 李爱华 孙富林

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

狂犬病是严重危害人畜的一种传染病,公元前 3000 年,前摩西法典 Tierkel^[1]就谈到犬咬伤人引起人死亡。公元前 500 年德漠克利特和公元前 322 年阿里多德认识到狂犬病是犬和其它动物的一种传染病。Johnson^[2]引证了 1271 年西欧发生狼狂犬病,以及 1803—1925 年在同一地区狐中发生 7 次动物间的大流行。

1919 年 Semple 指出了用化学药物灭活狂犬病毒而不破坏其抗原性,此后灭活病毒苗广泛应用于人体,至今已 70 多年。但是,灭活前后狂犬病毒的形态结构,是否能如其抗原性一样不受影响,至今国内外尚未见有报道。作者研究了狂犬病毒用化学药物灭活前后的形态,结构的变化,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 病毒种及其制备

狂犬病毒 aG 株由中国普通病毒保藏中心赠。锯开毒种安培瓶,用 0.05ml Eagle 反复吹打稀释,接种于体重 11—13g 健康小鼠脑内活化。如此传代 3 次增殖。选接毒后 4—5 天有典型狂犬病症状,鼠毛倒竖、毛疏松、鼠体颤抖多叫的病鼠,乙醚处死,无菌条件下取脑,鼠脑加 2% 小牛血清,无菌研磨制成悬液,再加 50 倍 Eagle 细胞培养液稀释,经 $1000 \times g$ 20 分钟离心沉淀,取上清液分装于小瓶内置 $-20^{\circ}C$ 待用。

1.2 BHK₂₁细胞株

BHK₂₁细胞株购自武汉生物制品研究所。

1.3 病毒提纯缓冲液

NaCl-tris(pH7.8); NTE 0.13mol/L NaCl, 0.001mol/L EDTA 和 0.05mol/L Chloriue (pH7.8)。

1.4 细胞培养和病毒增殖

BHK₂₁细胞按 Kaplan, M. M. 等人^[3]方法培养,在 Eagle 营养液中,细胞生长良好并均匀铺满培养瓶时,除去培养液,每瓶加入含有 50 μ g DEAE dextron/ml 种毒 2ml, 35 $^{\circ}C$ 吸附 1 小时。在无菌条件下,用温热含有 10% 加热灭活小牛血清生长液,二倍量洗去未吸附的病毒液。再加 5% 小牛血清维持液 32—33 $^{\circ}C$ 培养 48 小时以上,光学显微镜高倍观察,细胞没有特殊变化,70% 细胞脱落,病毒滴度 LD₅₀ 为 log₄ 以上,即可收获病毒液。经 $1000 \times g$ 20 分钟除去细胞碎片。将病毒液一分为二分装小瓶,一份加入 1/4000 的福尔马林 37 $^{\circ}C$ 48 小时灭活(即制备狂犬疫苗的方法)。另一份不灭活置 4 $^{\circ}C$ 待用。

1.5 病毒粗提纯

将灭活和未灭活的病毒悬液,分别置于离心管内 $49000 \times g$ 离心 60 分钟,弃去上清液,沉淀加入 0.5—0.7ml 的 NTE 缓冲液,经乳化器充分研磨,再经 $1000 \times g$ 离心 20 分钟,弃沉淀,留上清液制铜网。

1.6 电子显微镜观察

分别取病毒悬液一小滴,滴于洁净的玻璃板上,将喷涂碳粉的富尔膜电子显微镜特制铜网反扣于病

毒悬滴上,约 5 分钟。用尖镊子将铜网夹起,再置于同病毒悬液法所滴的 2% pH6.4 磷钨酸负染液上 5 分钟,夹起铜网置滤纸上晾干,在 JEM-100C 电子显微镜下观察。

2 结果和讨论

电子显微镜观察未灭活的病毒粒子,形态呈弹状,结构蛋白缜密,病毒粒子表面光滑,且明显有一层外膜,核心清晰可见(图版 I-1)。甲醛灭活后的狂犬病毒,病毒粒子蛋白全部呈疏松状,外膜消失,呈絮状结构,病毒核心也不能见到。病毒粒子明显膨大 3 倍以上(图版 I-2)。灭活与未灭活的病毒粒子,除形态结构大小有明显的不同外,其物理化学性质有何差异,正在进一步研究中。

参 考 文 献

- [1] Tierkel E S. Historical review of rabies in Asia. In: Nagano Y *et al* ed. Rabies. Tokyo: University of Tokyo Press, 1971. 3-9.
- [2] Johnson H N. Rabies. In: Rivers T M ed. Viral and Rickettsial Infections of Man. Philadelphia: Lippincott, 1952. 267-299.
- [3] Kaplan M M, Wiktor T J, Maes R F *et al*. *J Virol*, 1967,1:145-151.

STUDIES ON MORPHOLOGICAL SUPERSTRUCTURE OF INACTIVATED RABIES VIRUS AND UNINACTIVATED RABIES VIRUS

Zhao Lin Li Aihua Sun Fulin

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Abstract Rabies is widely epidemic in human and animals. It is very dangerous disease at present. In 1919, semple has shown that antigenicity was not destroyed by chemicals. After that inactivated rabies vaccine was widely used in human being up to more than seventy years. But the afferration of morphological superstructure between inactivation and uninactivated, we have not see any report on the world.

Key words Rabies virus, Tissue culture

图 版 说 明

1. 狂犬病毒的形态结构(81000×); 2. 灭活狂犬病毒的形态结构(81000×)。