

培養於鴨胚中流行性感冒病毒的性質

高 尚 蔭

(武漢大學生物系病毒實驗室)

自從1935年Stanley氏^[1]首先從患嵌紋病的煙草中分離得煙草嵌紋病毒後，學者對於各種病毒的分離及其性質的研究有很多的貢獻，其中最基本的問題是分離出來的蛋白質分子究竟是否就是病毒分子。換句話說，病毒活動力是否就是分離出來的蛋白質分子的特性抑或是附着在蛋白質分子上的另一種物質的表現，這問題到現在可以說是已經解決了。學者們公認為分離出來的蛋白質分子就是病毒分子，至少沒有人能提出相反的證據出來。最明顯的例子是煙草嵌紋病毒，不論從那一種寄主植物中分離出來的病毒份子，^[2]在物理，化學與生物的性質上是完全相同的(Stanley 1939; Loring and Stanley 1930; ^[2]Gaw and Stanley 1947)。但事實上動物病毒方面的情形並不如此。乃脫氏Knight 1946, 1946a^[4])研究在雞胚中及小白鼠肺中培養的流行性感冒病毒，雖然其物理和化學的性質基本上相同而免疫性質有很明顯的差別。兩者具有相同的病毒抗原結構，但是從雞胚尿囊液中分離出來的病毒另有一與正常雞胚尿囊液有關的抗原結構，而從小白鼠肺中分離出來的病毒也另有一與正常小白鼠肺體素有關係的抗原結構。假使我們不否認從兩種不同來源分離出來的顆粒是流行性感冒病毒(事實上以感染試驗等已經證明兩者都是流行性感冒病毒)，乃脫氏的研究結果就表示病毒的組成可以因寄主的不同而有差別。這問題在理論上來考慮是很有意思的。現在雖然尚不能證明病毒有代謝作用，但事實上病毒在寄主體中生長及繁殖，顆粒的組成原料就非取之於寄主不可，這樣病毒的組成多多少少要受到寄主的影響。作者自1947年起，曾將流行性感冒病毒培養於鴨胚中，將病毒分離出來，研究它的物理，化學及免疫的性質，對病毒與寄主間的關係作進一步的了解(Gaw 1949,^[6] 1951,^[7] 1951a,^[8] 1952^[9])。本文將所得結果作一綜合性的報告。

將流行性感冒病毒培養於鴨胚中(Gaw 1949)^[6]——1941年浦納脫氏(Burnet

1941)^[10]以流行性感胃病毒培養於雞胚尿囊液中成功後，很多病毒證明能在此液中生長及繁殖。作者按照浦氏的方法與技術，將 PR₃ 株流行性感胃病毒培養於鴨胚尿囊液中。先以受精鴨蛋在 39°C 常溫箱中孵化 10—11 日，此時鴨胚已發育至相當程度，將病毒注射入尿囊中，感染後的鴨胚繼續在 36°C 中孵化 48 小時，然後採取含有病毒的尿囊液。普通每鴨胚可取得 8—10 毫升的尿囊液。經兩度差異離心術後得精煉的病毒。以雞紅血球凝集反應及沉澱反應檢定從尿囊液分離出來的蛋白質確是流行性感胃病毒。這實驗證明流行性感胃病毒能培養於鴨胚尿囊液中。

物理性質 (Gaw 1951)

病毒分子的大小：病毒的大小以電子顯微鏡測定是 106 毫微米 (milli-micron) (所用的電子顯微鏡是 EMC 式)。這數字和過去泰勒氏等 (Taylor, etc. 1943)^[11] 所獲得的 77.6 毫微米相差很大而接近勞弗和史丹來氏 (Lauffer and Stanley 1944)^[12] 測定的 119 毫微米。至於兩者的差別，經勞弗與史丹來二氏的研究，認為是所用不同電子顯微鏡的放大因素的差別所致 (本實驗所用的電子顯微鏡就是勞弗和史丹來二氏所用的一架)。現在學者公認流行性感胃病毒的大小是 101 毫微米 (直徑) (Beard 1949)^[13] 所以與本實驗所得的數字是符合的。

等電點 (Isoelectric Point)：病毒的等電點以勞司洛浦和孔納智二氏 (Northrop and Kunitz 1927)^[14] 的微量電泳動器測定。精煉的病毒溶解於 0.1M 磷酸鹽緩衝劑中，濃度是每毫升 5 毫克。根據米勒，勞弗與史丹來諸氏 (Miller, Lauffer and Stanley 1943)^[15] 的方法測定的。測定的等電點在 pH 5.3。作者也曾依照奧司脫氏 (Oster 1946)^[16] 的利用光的吸收測定病毒的等電點。這方法的基本原理在測定病毒的凝固最高點。根據這法測定的等電點在 pH 5.16。

沉澱常數 (Sedimentation constant)：沉澱數字是以裝製有司凡生與費路僕脫光學設備的鮑威與畢克爾式超速度離心器測定的 (Bauer-piskels type ultra-centrifuge with Svensson-Philpot optical system)。所用材料是精煉病毒溶解於 0.1 M 磷酸鹽緩衝劑中 (氫游子濃度是 pH 7.0，病毒濃度是每毫升 5 毫克)。沉澱常數根據下列公式計算：

$$S = \frac{2(x_2 - x_1)}{(x_2 + x_1)\omega^2(t_2 - t_1)} \quad (1)$$

x_2 和 x_1 是在時間 t_2 和 t_1 時旋轉中心到沉澱界線的距離， ω 是角度速率。從 (1) 所得的沉澱常數隨測定時溫度，沉澱時溶劑 (包括無機鹽類) 的密度與滯性而改變，所以如果將在各種不同情形下所得的結果比較，需要一系列的標準情形，

普通以水在 20°C 計算,所以公式 (1) 應該改成。

$$S^{\circ}_{20} = St \cdot \frac{n^{\circ}t}{n^{\circ}_{20}} \cdot \frac{nt}{n^{\circ}t} \cdot \frac{1 - V_{20} P^{\circ}_{20}}{1 - V_t Pt} \quad (2)$$

S°_{20} = 在標準情形下(水在 20°C 的沉澱常數, St = 從(1)所得的常數, $n^{\circ}t/n^{\circ}_{20}$ = 水的滯性在溫度 t 時和在 20°C 時的比率, $nt/n^{\circ}t$ = 所用緩衝劑在測定時的溫度 t° 時的滯性和水在同溫度時的滯性的比率, V_t = 蛋白質在溫度 $t^{\circ}C$ 時的局部比容, V_{20} = 蛋白質在 20°C 時局部比容, P°_{20} = 水在 20°C 時的密度, Pt = 溶劑在 $t^{\circ}C$ 時的密度。沉澱常數的單位是司華德單位 (Svedberg unit), 以 S 符號代表它, 表示沉澱率 10^{-13} 克離心場單位。

根據上述計算,流行性感胃病毒的沉澱常數是 718S。現在學者公認的數字是 742 S (Beard 1949)^[13]

粘滯性: 病毒的滯性以奧史脫華氏粘滯性測定器測定。在低濃度情形下(病毒濃度 0.1—0.5 克/100 毫升), 病毒溶液的滯性和濃度成正比例。

化學性質 (Gaw 1951a)

本實驗共分析了十種氨基酸,其中五種,阿金氨酸,膠氨酸,離氨酸,酥氨酸和色氨酸,包括在內是有特別用意的(在下面詳細討論)。各種氨基酸的分析方法如下: 阿金氨酸,膠氨酸,白氨酸,琥珀氨酸,纈草氨酸依照司德克等 (Stokes, etc., 1945)^[17] 的微生物學分析法; 酥氨酸以邦哈德微量法 (Bernhart, 1938)^[18]; 色氨酸採取夏與麥克法倫的醯基甲酸方法 (Shaw and Mcfarlane, 1938)^[19]; 離氨酸以苦味酸法 (Chibnall, 1942);^[20] 組織氨酸以鮑林反應比色法 (Jorpes, 1932)^[21]; 苯初氨酸以撲洛克改良法 (Knight and Stanley, 1941)^[22]。除病毒外,也將正常鴨胚尿囊液蛋白質經精煉後進行分析。分析的結果見下表 1:

表 1

氨基酸	培養於鴨胚中的 流行性感胃病毒 PR ₈ 株 %	正常鴨胚尿囊液 蛋白質 %	乃脫氏 (Knight) 分析結果培養 於鴨胚中的流行性感胃病毒株		正常鴨胚尿 囊液蛋白質 %
			PR ₈ 株 %	Lee 株 %	
阿金氨酸	4.8	3.8	5.0	4.0	3.9
膠氨酸	7.5	5.2	7.7	6.2	6.1
離氨酸	2.6	2.8	3.6	4.7	2.5
酥氨酸	3.9	2.4	3.1	2.1	2.2
色氨酸	1.2	1.4	1.1	0.7	0.7
組織氨酸	1.5	0.9	1.4	1.5	0.8
初氨酸	3.5	3.5	3.7	3.4	3.6
白氨酸	4.8	4.5	5.3	5.5	4.3
纈草氨酸	3.1	4.0	3.4	3.2	3.2
琥珀氨酸	7.3	6.8	7.4	7.3	6.2

乃脫氏曾分析流行性感胃病毒的全部氨酸，發現 PR₁ 株與 Lee 株的阿金氨酸，膠氨酸，離氨酸，酥氨酸及色氨酸有很顯著的差別，其他所含的氨酸就完全相同，因此本實驗的分析包括了這五種氨酸。結果阿金氨酸，膠氨酸，色氨酸，組織氨酸，苯初氨酸，纈草氨酸，琥珀氨酸與乃脫氏的結果大致相同，但離氨酸，酥氨酸白氨酸却和乃脫氏的結果有差別。白氨酸的差別不大只約 0.5%，或因所用分析方法的不同所致。至於離氨酸與酥氨酸的差別是重要的。這似乎表示流行性感胃病毒的氨酸成分可以因寄主的不同而有差別。這點也許可以解釋培養於不同寄主中流行性感胃病毒在免疫性質上的差別。特別值得我們注意的，離氨酸與酥氨酸不只在培養於鴨胚中的與培養於雞胚中的有差別，他們也就是區別 Lee 株與 PR₁ 株五種氨酸中的兩種，這好像說明這兩種氨酸是在寄主中組成病毒顆粒的關鍵氨酸。

根據本實驗的結果，流行性感胃病毒的情況和煙草嵌紋病毒是不同的。上面已經提及煙草嵌紋病毒不論從那一種寄主植物中分離出來的分子在物理，化學與生物的性質上完全相同，換句話說，病毒分子的性質不因寄主的不同而有差別。至於這兩種病毒情況不同的基本原因，現在還不了解，雖然皮亞德氏 (Beard, 1949) [13] 曾指出“動物病毒遠較植物病毒複雜，而在很多方面變易更大”。照現在新的觀點來說，病毒既在寄主中生長及繁殖，並進行代謝作用，則寄主的不同當然會影響到病毒的性質。

還有一點值得我們注意的，正常鴨胚尿囊液蛋白質的氨酸成分有四種與流行性感胃病毒相同。(離氨酸，色氨酸，苯初氨酸，與白氨酸)。乃脫氏分析正常雞胚尿囊液蛋白質與流行性感胃病毒的結果，大致與本實驗相同。

上文曾提及乃脫氏研究培養於雞胚中及小白鼠肺中流行性感胃病毒的免疫性質是有差別的。本實驗以培養於鴨胚中的流行性感胃病毒作沉澱反應試驗來進一步的觀察。實驗結果如表 2：

表 2

		抗 原								
		從鴨胚中分離出來的流行感冒病毒 毫克(氮)			從雞胚中分離出來的流行感冒病毒 毫克(氮)			正常鴨胚尿囊液 蛋白質 毫克(氮)		
		0.02	0.04	0.06	0.02	0.04	0.06	0.02	0.04	0.06
抗血清	從鴨胚中分離出來的流行性感胃病毒	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	++
	從雞胚中分離出來的流行性感胃病毒	+++	+++	+++	++++	++++	++++	-	-	-
	正常鴨胚尿囊液蛋白質	++	++	++	-	-	-	++++	++++	++++

*“++++”“+++”“++”“+”表示正反應的程度，“-”表示負反應。

上述的沉澱反應試驗雖然是定性觀察，但是完全支持乃脫氏的結果 (Knight 1946)^[4]。從鴨胚尿囊液中分離出來的流行性感胃病毒和抗正常鴨胚尿囊液蛋白質血清產生交叉反應。正常鴨胚尿囊液蛋白質也和從鴨胚尿囊液中分離出來的流行性感胃病毒產生反應，但是和從雞胚尿囊液中分離出來的病毒沒有反應。這說明在鴨胚中培養的病毒具有正常鴨胚尿囊液蛋白質的特殊抗原，因此我們對於流行性感胃病毒的觀念與乃脫氏相同，就是該病毒包括兩種抗原結構，一種是流行性感胃病毒所共有，不論其寄主是什麼，另一種是病毒個別寄主所特有。至於兩者在病毒顆粒中怎樣的關係，現在還無法了解，但是值得我們注意的，從不同寄主中分離出來的病毒在免疫性質上的差別也同樣的在氨基酸成分上有差別 (Knight 1947, Gaw 1951a^[8])。這是否是偶然的符合或有相關的聯系尚待將來實驗研究來解釋。

根據以上的報告，關於在鴨胚中培養流行性感胃病毒的性質，我們的結論是流行性感胃病毒是可能在鴨胚尿囊液中培養的。它的物理性質和在其他寄主中培養的病毒並沒有差別，但是他的化學及免疫性質可以因寄主的不同而有差別。

參 考 文 獻

- [1] Stanley, W. M., *Physiol. Rev.* 1939, **19**, 524.
- [2] Loring, H. S. and Stanley, W. M., *Jour. Biol. Chem.* 1937, **117**, 733.
- [3] Gaw, H. Z., and Stanley, W. M., *Jour. Biol. Chem.* 1947, **167**, 765.
- [4] Knight, C. A., *Jour. Exp. Med.* 1946, **83**, 11.
- [5] Knight, C. A., *Jour. Exp. Med.* 1946a, **83**, 281.
- [6] Gaw, H. Z., (高尙蔭), *Sci. Rec.* 1949, **2**, 318.
- [7] ———, *Sci. Rec.* 1951, **4**, 285.
- [8] ———, *Chinese Jour. Exp. Biol.* 1951a, **3**, 93.
- [9] ———, *Sci. Rec.* 1952, **5**, 167.
- [10] Burnet, F. M., *Austral. Jour. Exp. Biol.* 1941, **19**, 291.
- [11] Taylor, A. R. and co-workers, *Jour. Immunol.* 1943, **47**, 261.
- [12] Lauffer, M. A. and Stanley, W. M., *Jour. Exp. Med.* 1944, **80**, 531.
- [13] Beard, J. W., *Jour. Immunol.* 1949, **57**, 49.
- [14] Northrop, J. H. and Kunitz, M., *Jour. Gen. Physiol.* 1927, **7**, 729.
- [15] Miller, G. L., Lauffer and Stanley, *Jour. Exp. Med.* 1943, **80**, 459.
- [16] Oster, G., *Science*, 1946, **103**, 306.
- [17] Stokes, J. D. and co-workers, *Jour. Biol. Chem.* 1945, **160**, 35.
- [18] Bernhart, L., *Soc. Biochem.* 1938, **8**, 10.
- [19] Shaw, J. L. D. and McFarlane, *Canadian Jour. Rec.* 1938, **16**, 361.
- [20] Chibnall, A. C., *Proc. Roy. Soc. London B*, 1942, **131**, 136.
- [21] Jorpes, E., *Biochem. Jour.* 1932, **26**, 1507.
- [22] Knight, C. A. and Stanley, W. M., *Jour. Biol. Chem.* 1941, **131**, 29.

PROPERTIES OF PURIFIED PR₈ INFLUENZA VIRUS FROM INFECTED DUCK EMBRYO

GAW H. ZANYIN

Virus Laboratory, Wuhan University

The PR₈ influenza virus has been successfully cultivated in the allantoic cavity of duck embryo. The physical, chemical and immunological properties of the purified virus (two cycles of differential centrifugation) were studied.

Physical properties: Size—By electron micrograph, the virus particles were found to have a diameter of 106 m μ . Isoelectric point—The isoelectric point of the virus material as determined by microelectrophoresis cell of Northrup and Kunitz was found to be at pH 5.3 and by Oster's light absorption method at pH 5.16. Sedimentation constant—The sedimentation constant is 718 S (Svedberg unit), sedimentation data being observed by means of a Bauer-Pickle type ultracentrifuge equipped with a Svensson-Philpot optical system. Viscosity—At virus concentration of 0.1 to 0.5 mg. per 100 ml., the specific viscosity is a linear function of virus concentration. Determinations were made by a Ostwald type of viscosimeter.

Chemical properties: By means of chemical and microbiological assay methods, ten amino acids of the virus were analyzed. It was found that seven amino acids were about the same in amount as that of PR₈ influenza virus from infected chick embryo. Three were different; namely, Leucine, Lysine and tryptophan. This seems to indicate that the amino acid content might be affected by nature of the host.

Immunological properties: Antiserum to purified PR₈ influenza virus from duck embryo and to purified protein from normal allantoic fluid of duck embryo were obtained from immunized rabbits and used in precipitation tests using purified PR₈ influenza virus from duck embryo, chick embryo and normal allantoic protien as antigens. The results of the tests indicate that the purified PR₈ influenza virus from duck embryo contains an antigenic structure characteristic of the normal duck allantoic fluid besides a 'virus proper' component common to all PR₈ strain of influenza virus from different hosts.