

常見病毒病實驗技術



常见病毒病实验技术

中国医学科学院流行病学防治研究所 编

科学出版社

1978

内 容 简 介

《常见病毒病实验技术》一书首先综述了病毒的一般性质及分类，后分三部分。第一部分为病毒学常用技术，包括生物学研究方法，理化研究方法，免疫球蛋白的分离提纯、细胞免疫、干扰素、电子显微镜等技术。第二部分为各论。第三部分为附录，包括病毒学工作人员日常所需的实验室常规资料。本书可作为广大防疫基层单位、临床化验单位及病毒学工作者参考的工具书，也可供微生物学、传染病学、流行病学、兽医病毒学工作者在教学、研究及防治工作上参考。

常见病毒病实验技术

中国医学科学院流行病学防治研究所 编

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

西安新华印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1978年9月第一版 开本：787×1092 1/16

1978年9月第一次印刷 印张：26 3/4 插页：1

印数：0001—25,380 字数：606,000

统一书号：15031·789

本社书号：1134·13—9

定 价：3.30 元

前 言

在常见病多发病中,病毒性疾病占重要位置。在党的领导下,我国防治病毒性疾病工作取得很大成绩。天花已经消灭,脊髓灰白质炎、麻疹、乙型脑炎等疾病的防治取得了显著效果。但是,还有一些病毒性疾病,仍在继续危害人民健康,影响抓革命促生产。控制和消灭这些疾病,是摆在我们面前的一项光荣而艰巨的任务。

几年来,全国范围的群防群治运动,极大地推动了病毒性疾病防治工作的迅速发展,创造了新鲜经验,为病毒性疾病的防治研究积累了丰富资料,同时,也提出了普及实验技术、交流防治经验的迫切需要。为了和广大卫生科技人员、基层卫生工作者共同努力搞好这项工作,作为抛砖引玉,我们集体编写了这本《常见病毒病实验技术》。

遵照毛主席关于“自力更生”和“洋为中用”的教导,在本书中,我们推荐了在国内实践中认为可行的方法;引进了切合我国需要的若干国外技术;为使实验技术能在实践中不断发展、创新,介绍了诊断技术的基本原理,概述了常见病毒病的防治。当前,肿瘤的病毒病因学说已经引起人们的较大注意,为了共同探讨这个问题,本书也写进了一些有关知识和实验技术。

我们希望本书在普及病毒性疾病防治实验技术方面能起到一点交流和促进作用。由于我们政治和业务水平所限,定有不妥,甚至谬误之处,恳请批评指正。

中国医学科学院流行病学防治研究所

一九七六年十一月

目 录

绪论 病毒的一般性质及分类	1
一、病毒的一般生物学性质	1
二、病毒的形态与结构	1
三、病毒的化学本质	2
四、病毒对理化因子的稳定性	2
五、病毒的繁殖	3
六、病毒的感染	4
七、病毒的基因、遗传和变异	5
八、机体对病毒感染的反应	6
九、病毒的分类	6
十、病毒的化学治疗	9

第一部分 病毒学常用技术

第1章 常用实验器材的准备	10
一、玻璃器材的洗刷消毒	10
二、有机玻璃制品的消毒洗刷	11
三、滤器的清洁消毒	12
四、橡皮塞和橡皮管的清洁消毒	12
第2章 动物实验法	13
一、绪言	13
二、动物实验室及其器材装备	14
三、危险病毒动物实验室工作制度	14
四、实验动物的病毒性感染	14
五、实验动物的选择	16
六、动物接种法	18
七、动物采血法	21
八、感染动物的观察	23
九、感染动物的病理解剖检查	23
十、感染动物尸体及有关材料的处理	24
第3章 鸡胚培养法	25
一、概况	25
二、器材准备	25
三、鸡胚的管理	27
四、鸡胚的解剖与生理	28

五、鸡胚培养技术	28
六、病毒的检查	32
第4章 血清学方法	33
一、绪言	33
二、中和试验	34
(一) 原理	34
(二) 材料与方法	34
1. 固定病毒-稀释血清法(用能致组织培养细胞病变的病毒为例)	34
2. 固定血清用量-稀释病毒法(以致动物死亡的病毒为例)	35
(三) 判定结果的依据	37
(四) 影响中和试验的一些因素	37
(五) 用途及选择	38
三、补体结合试验	39
(一) 原理	39
(二) 材料制备	39
1. 病毒抗原	39
2. 免疫血清	39
3. 补体	40
4. 1% 羊红细胞	40
5. 溶血素	40
(三) 滴定	40
1. 溶血素滴定	40
2. 补体的滴定	41
3. 抗原的滴定	41
(四) 补体结合试验正式试验步骤	43
(五) 影响补体结合试验的因素	44
(六) 用途及选择	45
四、红细胞凝集及凝集抑制试验	45
(一) 原理	45
(二) 材料与方法	46
(三) 红细胞凝集抑制试验	47
(四) 影响血凝及血凝抑制试验的因素	48
(五) 用途及选择	50
五、免疫荧光试验	51
(一) 原理	51
(二) 材料	51
(三) 操作步骤	53
1. 抗血清的制备	53
2. 抗体的提纯	53
3. 荧光素抗体球蛋白标记法	53
4. 去除未结合的游离荧光素的方法	54
5. 非特异性染色反应的去除法	54

6. 避免目的外的荧光血清染色和自家荧光的方法	55
(四) 免疫荧光的染色方法	55
1. 直接法	55
2. 间接法	55
(五) 免疫荧光技术在病毒学方面的应用	56
(六) 影响试验的一些因素	57
六、琼脂扩散试验	58
(一) 原理	58
(二) 材料及操作步骤	58
(三) 用途	58
(四) 影响试验的因素	59
七、间接红细胞凝集试验	59
(一) 原理	59
(二) 材料和方法	59
(三) 试验步骤	60
(四) 结果的判定	61
(五) 影响试验的因素	61
(六) 用途	62
八、微量血清学方法	62
(一) 器具制备	62
(二) 使用方法	63
(三) 试验	63
第5章 病毒的组织培养法	66
一、病毒的组织培养发展史	66
二、组织培养原理	66
(一) 组织来源	67
(二) 单细胞的制备	67
(三) 细胞培养的基本条件	68
(四) 细胞培养液	70
(五) 单层细胞的生长	70
三、组织培养技术	71
(一) 小组织块培养技术	71
(二) 人胚肾或猴肾细胞的培养及维持方法	72
(三) 人胚肺细胞的培养及维持法	73
(四) 人羊膜细胞的培养及维持法	73
(五) 地鼠肾细胞的培养法	74
(六) 传代细胞的培养法	74
(七) 人双倍体细胞的培养法	75
(八) 同管两种细胞培养法	75
(九) 器官培养法	75
(十) 胶原层方法	76
(十一) 组织和细胞的保存方法	76

(十二) 空斑技术	77
四、组织内在污染及枝原体污染	78
(一) 猴类病毒	78
(二) 禽类病毒	79
(三) 人组织的内在病毒污染	79
(四) 枝原体的污染	79
(五) 内在病毒及枝原体污染的控制及去除	80
五、组织培养技术在病毒工作中的应用	80
(一) 病毒的分离和鉴定	81
(二) 病毒的滴定	81
(三) 血清中和抗体的测定	82
(四) 疫苗及抗原的制备	82
(五) 病毒繁殖条件的研究	82
第6章 物理学和化学研究技术	83
一、病毒的提纯	83
(一) 物理学纯化方法	83
(二) 化学纯化方法	96
二、病毒的大小及其分子量的测定	96
(一) 超速离心沉淀法	97
(二) 微孔薄膜过滤法	98
三、病毒核酸和病毒蛋白质亚单位的分离和纯化方法	100
(一) 病毒核酸的分离和抽提	100
(二) 病毒蛋白质亚单位的分离	102
(三) 病毒核酸和蛋白质亚单位的分析和分提	104
四、核酸分子杂交	111
(一) 意义	111
(二) 核酸的制备	112
(三) 核酸分子杂交技术	115
第7章 免疫球蛋白的分离和提纯	118
一、概述	118
二、IgG 的分离和提纯	118
(一) 盐析法分离提纯 IgG	119
(二) 离子交换层析法分离和提纯 IgG	120
三、IgM 的分离和提纯	122
(一) 离子交换层析法提纯 IgM	122
(二) 凝胶过滤法: 即 19S 和 7S 免疫球蛋白的分离方法	123
四、分泌 IgA 的分离和提纯	123
(一) 淀粉凝胶平板制备电泳法	123
(二) 凝胶过滤和离子交换层析法	126
五、IgE 的分离和提纯	127
六、免疫球蛋白的鉴定	128

(一) 免疫球蛋白的纯度鉴定	128
(二) 免疫球蛋白的生物学性质鉴定	129
(三) 超离心分析法	130
第 8 章 细胞免疫实验技术	132
一、免疫反应的性质	132
二、细胞免疫的作用方式	133
(一) 免疫淋巴细胞的直接作用	133
(二) 免疫淋巴细胞的间接作用	133
三、细胞免疫体外测定法	133
(一) 移动抑制试验	133
(二) 淋巴母细胞转化试验	136
第 9 章 干扰素	139
一、绪言	139
二、干扰素的特性	139
三、干扰素诱生剂	140
四、干扰素的产生机制和抗病毒作用原理	143
五、人干扰素的制备	144
六、干扰素的测定方法	148
七、干扰素的提纯浓缩	152
八、干扰素在医学上的应用	154
第 10 章 电子显微镜技术在病毒学上的应用	159
一、电子显微镜	159
二、病毒研究中常用的电镜技术方法	160
(一) 超薄切片技术	160
(二) 病毒悬滴的阴性反差染色	163
(三) 真空喷镀(或真空投影)方法	164
(四) 免疫电镜技术	164
第 11 章 病毒的分离与鉴定	166
一、病毒的分离	166
(一) 标本的采集和运送	166
(二) 标本的处理	167
(三) 标本的接种	167
二、病毒的鉴定	170
(一) 初步鉴定	171
(二) 最后鉴定	174

第二部分 各 论

呼吸道病毒感染绪论

一、引起呼吸道感染的病毒类型	176
二、关于呼吸道病毒感染的流行病学	176

三、临床表现与病毒类型的关系	177
四、呼吸道病毒的理化性质	178
五、关于呼吸道病毒的血清学性质及抗原性	178
六、呼吸道感染有关病毒的生物学性质	180
七、实验室常用动物和细胞对分离呼吸道病毒的敏感性	180
八、呼吸道病毒的分离和鉴定程序	183
第 12 章 流行性感冒	185
一、序言	185
(一) 简介和历史	185
(二) 临床表现	185
(三) 病理	185
二、流感病毒的生物理化性状	186
(一) 一般特性	186
(二) 流感病毒的结构、抗原成分和功能	186
(三) 流感病毒的抗原变异	187
(四) 流感病毒的命名	188
(五) 动物感染范围	189
(六) 动物流感病毒	190
(七) 流感病毒在组织培养细胞中的生长能力	190
三、标本的收集和准备	190
(一) 病毒分离标本的采集	190
(二) 血清标本的采集	191
四、实验诊断	191
(一) 目的和原则	191
(二) 临床材料的直接检查	191
(三) 病毒分离	192
(四) 分离物的鉴定	193
(五) 免疫血清的制备	197
(六) 血清学诊断	197
(七) 血清非特异性抑制素去除方法	199
(八) 流感病毒神经氨酸酶和神经氨酸酶抑制试验	200
附: 霍乱滤液(受体破坏酶)的制造和效力测定的方法	203
第 13 章 副流感病毒感染	206
一、概述	206
二、流行病学	206
三、临床表现	206
四、病毒的性质	207
五、病毒的分离和鉴定	208
(一) 病毒的分离	208
(二) 病毒的鉴定	209
(三) 免疫血清制备	209

六、血清学诊断	210
(一) 抗原制备	210
(二) 血清学方法	211
第 14 章 呼吸道合胞病毒感染	213
一、概述	213
二、流行病学	213
三、临床表现	213
四、病理	214
五、病毒的性质	214
六、病毒的分离和鉴定	215
(一) 病毒的分离	215
(二) 病毒的鉴定	216
(三) 免疫血清制备	216
七、血清学诊断	216
(一) 抗原制备	216
(二) 血清学方法	216
第 15 章 鼻病毒感染	218
一、概述	218
二、临床表现	218
三、病毒的性质	218
四、病毒的分离和鉴定	220
(一) 提高鼻病毒分离阳性率的要点	220
(二) 病毒的分离	220
1. 标本收集及处理	220
2. 组织培养	220
(1) 人胎肾细胞培养	220
(2) 人胎肺双倍体细胞培养、传代、核学检查及保存	221
3. 标本接种及培养条件	222
4. 结果判断	222
(1) 病变特点	222
(2) 干扰试验	222
(三) 病毒的鉴定及定型	222
1. 病毒的初步鉴定	222
2. 鼻病毒的定型	223
(四) 免疫血清的制备	224
五、血清学诊断	224
第 16 章 日冕病毒感染	226
一、历史	226
二、临床表现	226
三、病毒的性质	227
四、病毒的分离和鉴定	228

(一) 病毒的分离	228
1. 标本的收集和处理	228
2. 人胎气管培养	228
3. 人胎肺双倍体细胞和人胎肠成纤维细胞培养	229
(二) 病毒的鉴定	229
(三) 免疫血清制备	229
五、血清学诊断	229
(一) 抗原制备	229
(二) 血清学方法	230
第 17 章 腺病毒感染	231
一、引言	231
(一) 历史	231
(二) 流行病学	231
(三) 临床症状及病理	232
二、病原	233
(一) 形态	233
(二) 病毒的性质	233
1. 对理化因子的稳定性	233
2. 腺病毒血凝性质及分类	233
3. 可溶性抗原	234
4. 对鸡胚及实验动物不致病	234
5. 腺病毒的致癌性	234
6. 在组织培养上的繁殖情况	235
7. 腺病毒伴随病毒	235
三、病毒的分离	236
(一) 标本的采集和处理	236
(二) 标本的接种	236
四、病毒的鉴定	236
(一) 免疫血清的制备	236
(二) 新分离病毒的鉴定	237
五、血清学诊断	237
(一) 补体结合试验采用塑料板微量法	237
(二) 中和试验	237
(三) 血凝及血凝抑制试验	238
(四) 其他操作	239
由副粘液病毒引起的急性全身性感染	240
第 18 章 麻疹	241
一、概述	241
二、流行病学	241
三、临床表现	242
四、病理及发病机制	242

五、病原	243
(一) 形态	243
(二) 化学组成及抗原	243
(三) 对理化因子的稳定性	244
(四) 生物学特性	244
六、实验诊断	245
(一) 标本的采集及病毒分离、鉴定	245
(二) 血清学试验	246
七、预防	247
(一) 减毒活疫苗	247
(二) 灭活疫苗	248
(三) 被动免疫预防	248
第 19 章 风疹	249
一、概述	249
二、流行病学	249
三、临床表现	249
四、病毒的性质	250
五、病毒的分离和鉴定	253
(一) 病毒的分离	253
(二) 病毒的血清学鉴定	253
六、血清学诊断	254
(一) 补体结合试验	254
1. 抗原制备	254
2. 补体结合试验步骤	254
(二) 血凝抑制试验	255
1. 血凝素制备	255
2. 红血球悬液制备	255
3. 血清处理	255
(1) 肝素-氯化锰处理法	255
(2) 白陶土处理法	255
4. 血凝素及血清稀释液	255
5. 血凝抑制试验步骤	256
6. 用不同免疫球蛋白血凝抑制试验诊断近期感染	256
(三) 中和试验	256
七、预防	256
第 20 章 流行性腮腺炎	258
一、简史	258
二、流行病学	258
三、临床表现	258
四、发病机理	259
五、病原学	259

六、实验诊断	261
(一) 病毒的分离和鉴定	261
(二) 血清学试验	263
七、预防	264
虫媒病毒绪论	265
第 21 章 流行性乙型脑炎	268
一、概述	268
二、临床症状	268
三、病理	268
四、流行病学	269
五、病原	270
六、病毒的分离和鉴定	271
七、血清学诊断	273
(一) 补体结合试验	273
(二) 血凝抑制试验	275
(三) 中和试验	275
八、防治措施	276
第 22 章 森林脑炎	278
一、临床症状	278
二、病理变化	278
三、流行病学	278
四、病原学	279
五、病毒的分离鉴定	280
六、诊断	280
七、治疗和预防	281
肠道病毒感染	282
第 23 章 肠道病毒感染	282
一、引言	282
二、流行病学	282
三、临床表现	283
四、病原学	285
五、实验诊断	286
(一) 分离与鉴定	286
1. 标本的收集和处理	287
2. 免疫血清的制备	287
3. 病毒分离	288
4. 病毒的鉴定	289
(1) 鉴定程序	289
(2) 中和试验	290

(3) 补体结合试验	291
(4) 血凝抑制试验	292
(二) 血清学检查	293
第 24 章 病毒性肝炎	295
一、引言	295
二、病原	296
三、甲、乙型肝炎临床鉴别诊断	297
四、乙型肝炎抗原检测技术	298
(一) 对流免疫电泳	298
(二) 间接血球凝集法	299
(三) 反向间接血凝法	301
(四) 免疫血球粘连实验	302
(五) 双向琼脂扩散法	303
(六) anti-HB _s 免疫血清制备	304
(七) 佛氏 (Freund's) 佐剂配制	304
(八) 纳氏试剂配法	305
(九) 乙型肝炎表面抗原 (HB _s Ag) 的纯化	305
1. 用葡聚糖凝胶 G-200 柱层析法纯化 HB _s Ag	305
2. 用亲和层析法纯化 HB _s Ag	306
(十) 乙型肝炎表面抗体 (Anti-HB _s) 的纯化	307
痘类病毒感染	309
第 25 章 天花和痘苗病毒	309
一、概述	309
二、临床表现	309
三、病毒的性质	310
四、实验室诊断	312
(一) 标本收集	312
(二) 快速诊断	313
(三) 病毒分离和鉴定	313
(四) 血清学诊断	315
疱疹病毒感染	316
第 26 章 单纯疱疹病毒感染	316
一、概述	316
二、临床表现	316
三、病毒的性质	318
四、实验室诊断	321
(一) 病毒分离和鉴定	321
(二) 血清学诊断	322
1. 补体结合试验	322
2. 微量间接血凝试验	323

第 27 章 水痘-带状疱疹	324
一、概述	324
二、临床表现	324
(一) 水痘	324
(二) 带状疱疹	324
三、病理	325
四、病毒的性质	325
五、实验室诊断	326
(一) 病毒分离和鉴定	326
(二) 血清学诊断	327
第 28 章 巨细胞病毒感染	328
一、概述	328
二、临床表现	328
三、病理	329
四、病毒的性质	329
五、实验室诊断	330
(一) 病毒的分离和鉴定	330
(二) 血清学诊断	331
其它病毒感染	332
第 29 章 狂犬病	332
一、流行病学	332
二、病原	332
三、临床表现	333
四、病理和发病机制	333
五、实验诊断	334
六、预防和治疗	335
第 30 章 呼吸道肠道孤儿病毒感染	338
一、概述	338
二、病毒的性质	338
三、病毒的分离和鉴定	339
四、血清学诊断	340
第 31 章 肿瘤病毒	342
一、序言	342
二、肿瘤病毒的分类	342
(一) RNA 肿瘤病毒	342
(二) DNA 肿瘤病毒	343
三、肿瘤病毒的生物学特性	344
四、研究人肿瘤病毒的技术方法	345
五、人类肿瘤病毒	347

第三部分 附录

附录一 组织培养试剂	352
I. 基础试剂	352
1. 抗菌素	352
2. 琼脂 (3% 溶液)	352
3. 10% 葡萄糖母液	352
4. 中性红	353
5. 酚红 1% 溶液	353
6. NaHCO_3 溶液	353
7. 1N NaOH 液	353
8. 5% 小牛血清白蛋白溶液	353
9. Hanks' 溶液	354
10. 有抗菌素的 Hank's 溶液的制备	354
11. Earle's 液	355
12. 2 倍 Earle's 液	355
13. 磷酸缓冲盐溶液	356
14. 无钙镁磷酸缓冲液	356
15. 水解乳蛋白液	356
16. 10 倍 Eagle's 母液及使用液	356
17. 2 倍 Eagle's 液	358
18. 199 综合培养基	358
19. 细胞冷藏培养液	362
20. RPMI 细胞培养基 1640	362
21. 血清	363
22. Tris [(三)羟甲基氨基甲烷]缓冲液	364
23. 台酚蓝	364
24. 胰酶	364
25. 胰酶-乙二胺四乙酸二钠	365
26. 乙二胺四乙酸 0.02% 溶液	365
II. 生长液和维持液	365
1. Hank's 水解乳蛋白小牛血清生长液	365
2. Eagle's 小牛血清生长液	365
3. 199 综合培养基小牛血清生长液	366
4. RPMI 细胞培养基 1640 小牛血清生长液	366
5. Earle's 水解乳蛋白小牛血清维持液	366
6. Earle's 水解乳蛋白无血清低 pH 维持液	366
7. Eagle's 小牛血清维持液	367
8. 无血清的 Eagle's 维持液	367
9. 无血清的 199 维持液	367
10. Eagle's 小牛血清营养性琼脂	367
11. Earle's 液小牛血清营养性琼脂	367