

医学病毒实验 诊断技术

主编 杨春生 陈梦芝



5

天津科学技术出版社

94
R446.5
7
7

医学病毒实验诊断技术

主 编 杨春生 陈梦芝

X476311



3 0147 0383 3

天津科学技术出版社



003951

津新登字(90)003号

责任编辑:马 洪

医学病毒实验诊断技术

主编 杨春生 陈梦芝

*

天津科学技术出版社出版、发行

天津市张自忠路189号 邮编 300020

天津市武清县振兴印刷厂印刷

*

开本 787×1092 毫米 1/32 印张 11.25 字数 234 000

1993年10月第1版

1993年10月第1次印刷

印数:1—4 000

ISBN 7-5308-1454-0/R·401 定价:7.60元

副主编	孙秀荣	宋乃国	高仕卿	
审 阅	赵长春	张永忠		
编 者	杨春生	陈梦芝	高仕卿	李金平
	孙秀荣	崔亚军	郝玉芹	吴 坚
	宋乃国	闻和田	王冰	

前 言

近十几年来,我国病毒病的诊断技术有了长足的发展,新的技术方法不断地出现和广泛地应用,一些原来认为较实用的敏感和特异的方法已被一些新的、更先进的方法所取代,因此,不断地结合实际对一些新的理论和技术进行总结和介绍,无疑是非常必要的。根据目前这方面的专业书籍较少的情况,作者结合多年从事病毒病实验室诊断的经验,参阅了国内外大量的有关文献,编写了《医学病毒实验诊断技术》一书,其目的是对有关医学病毒病的诊断技术做一较系统、较全面的介绍,为各级医院、卫生防疫站从事病毒检验工作的技术人员,各医学院校检验专业的师生,临床科研人员提供一本具有较高实用价值的参考书。

值此书面世之际,我们向给予我们大力支持的天津科学技术出版社表示感谢;向对本书提供部分资料 and 进行修改及审阅的河北医学院附属二院赵长春教授、解放军北京军区总医院张永忠教授深表谢意。

由于我们的水平和经验有限,书中难免有疏漏或错误之处,切望热心的同道给予批评指正。

编 者

1993年9月

目 录

第一篇 现代病毒学检验新技术

第一章 多聚酶链反应技术	(1)
第一节 PCR 技术的基本原理和操作规程	(1)
第二节 基因扩增的反应主要成分和作用	(2)
第三节 PCR 技术在病毒检验中的应用	(9)
第二章 化学发光免疫分析技术	(9)
第一节 化学发光免疫分析的基本原理	(10)
第二节 化学发光免疫分析的方法	(11)
第三节 抗原或抗体的标记	(12)
第四节 化学发光试验的仪器及基本装置	(14)
第五节 影响化学发光免疫分析的因素	(15)
第三章 免疫胶体金技术	(16)
第一节 免疫胶体金技术的基本原理	(17)
第二节 胶体金的制备	(17)
第三节 金标记技术	(19)
第四节 免疫金银技术的临床应用	(22)

第二篇 常见病毒快速诊断技术

第一章 免疫荧光技术	(24)
第一节 荧光素标记技术	(24)

第二节	免疫荧光技术的原理和方法	(33)
第三节	免疫荧光技术的应用	(38)
第二章	酶联免疫吸附试验技术	(40)
第一节	酶标记技术	(41)
第二节	酶联免疫吸附试验技术	(47)
第三章	放射免疫分析技术	(54)
第一节	同位素标记技术	(54)
第二节	放射免疫分析技术	(60)
第四章	电镜诊断技术	(65)
第一节	免疫电镜技术的原理及方法	(66)
第二节	负染技术的原理及方法	(69)
第三节	病毒形态的识别和鉴定	(71)
第五章	单扩溶血试验	(75)
第六章	凝集试验技术	(80)
第一节	间接血凝试验的准备及致敏方法	(82)
第二节	SPA 协同凝集试验	(92)

第三篇 常见医学病毒诊断技术方法

第一章	肝炎病毒感染	(95)
第一节	甲型肝炎病毒(HAV)	(96)
一、	甲型肝炎病毒抗原(HAAg)的检测	(99)
二、	甲型肝炎病毒抗体(HAAb)的检测	(106)
第二节	乙型肝炎病毒(HBV)	(112)
一、	乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的检测	(115)
二、	乙型肝炎病毒表面抗体(抗-HBs)的测定(快速法)	(121)

三、乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)的检测	(126)
四、乙型肝炎病毒 e 抗体(抗-HBe)的检测	(129)
五、乙型肝炎病毒核心抗原(HBcAg) 的检测	(132)
六、乙型肝炎病毒核心抗体(抗-HBc) 的检测(快速法)	(135)
七、乙型肝炎病毒核心抗体 IgM(抗-HBc · IgM)的检测	(138)
八、酶联免疫吸附试验检测抗-HBc · IgA	(142)
九、酶联免疫吸附试验检测抗-HBc · IgE	(143)
十、放射免疫分析检测乙型肝炎病毒 DNA 多聚酶(DNA-P)	(144)
十一、乙型肝炎病毒多聚白蛋白受体(PHSA-R)的检测	(147)
十二、乙型肝炎病毒基因前 S ₂ 蛋白(Pre-S ₂)的检测	(150)
十三、乙型肝炎病毒前 S ₂ 基因蛋白抗体(Pre-S ₂ Ab)的检测	(153)
十四、聚合酶链反应(PCR)检测 HBV-DNA	(155)
十五、乙型肝炎病毒 DNA 的检测	(158)
第三节 丙型肝炎病毒(HCV)	(161)
一、酶联免疫吸附试验检测丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)	(163)
二、聚合酶链反应(PCR)检测丙型肝炎病毒 RNA(HCV RNA)	(165)
第四节 丁型肝炎病毒(HDV)	(168)
一、丁型肝炎病毒抗原(HDAg)的检测 酶联免疫吸附试验检测 HDAg	(171)
二、丁型肝炎病毒抗体(抗-HDV)的检测	

酶联免疫吸附试验检测抗-HDV	(172)
第五节 戊型肝炎病毒(HEV)	(174)
一、戊型肝炎病毒的特征及一般特性	(175)
二、戊型肝炎病毒抗体(HEAb)的检测	(176)
酶联免疫吸附试验检测 HEAb	(176)
第二章 EB 病毒	(179)
第一节 间接免疫荧光试验检测 EB 病毒 VCA-IgM 抗体	(181)
第二节 酶免疫染色法检测 EB 病毒 EA 抗体	(183)
第三节 酶免疫染色法检测 EB 病毒 VCA 抗体	(184)
第四节 酶联免疫吸附试验检测 EB 病毒 VCA 抗体	(186)
第三章 巨细胞病毒(CMV)	(190)
第一节 酶联免疫吸附试验检测人巨细胞病毒 (HCMV)IgM 抗体	(191)
第二节 间接免疫荧光试验检测 CMV-IgM 抗体	(193)
第三节 酶免疫染色法检测 CMV 抗体	(194)
第四章 流行性出血热病毒(EHFV)	(197)
第一节 流行性出血热病毒抗原的检测	(198)
一、间接血凝试验检测流行性出血热病毒抗原	(198)
二、酶联免疫吸附试验检测流行性出血热病毒抗原	(201)
第二节 流行性出血热病毒抗体的检测	(203)
一、反向间接血凝抑制试验检测流行性出血热病毒抗体	

.....	(203)
二、免疫荧光试验检测流行性出血热病毒抗体	(205)
三、免疫酶染色法检测流行性出血热病毒抗体	(206)
四、酶联免疫吸附试验检测流行性出血热病毒 IgM 抗体	(208)
五、酶标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)染色法 检测流行性出血热病毒抗体	(210)
第五章 轮状病毒	(213)
第一节 胶乳凝集试验检测粪便中轮状病毒抗原	(215)
第二节 SPA 协同凝集试验检测轮状病毒抗原	(216)
第三节 酶联免疫吸附试验检测轮状病毒抗原	(218)
第四节 固相放射免疫分析检测轮状病毒抗原	(220)
第五节 快速 免疫电镜技术检测轮状病毒抗原	(223)
第六节 对流电泳法检测轮状病毒抗原	(225)
第七节 间接免疫荧光试验检测血清中轮状病毒 抗体	(226)
第六章 呼吸道合胞病毒	(228)
第一节 免疫荧光试验检测呼吸道合胞病毒抗体	(230)
第二节 酶联免疫吸附试验检测呼吸道合胞病毒 抗体	(231)

第七章 麻疹病毒	(234)
第一节 酶联免疫吸附试验检测麻疹病毒 IgG 抗体	(236)
第二节 酶联免疫吸附试验检测麻疹病毒特异性 IgM 抗体	(238)
第三节 酶免疫染色法检测麻疹病毒 IgM 类抗体	(239)
第八章 风疹病毒	(242)
第一节 酶联免疫吸附试验检测风疹病毒 IgG 抗体	(244)
第二节 酶联免疫吸附试验检测风疹病毒 IgM 抗体	(246)
第九章 单纯疱疹病毒(HSV)	(248)
第一节 酶联免疫吸附试验检测单纯疱疹病毒抗体	(250)
第二节 酶染色法检测单纯疱疹病毒抗体	(252)
第三节 酶联免疫吸附试验检测单纯疱疹病毒抗原	(254)
第十章 流行性乙型脑炎病毒	(256)
第一节 酶联免疫吸附试验检测血清中乙脑病毒 IgM 抗体	(258)
第二节 血球凝集抑制试验检测乙脑病毒抗体	(259)
第十一章 艾滋病毒(HIV)	(261)
第一节 间接免疫荧光(IFP)试验检测 HIV-1 型抗体	(263)

第二节	免疫酶染色法检测 HIV-1 型抗体	(265)
第三节	明胶凝集试验检测 HIV-1 型抗体	(266)
第四节	酶联免疫吸附试验检测 HIV-1 型抗体	(267)
第五节	蛋白印迹快速试验检测 HIV-1 型抗体	(270)
第六节	蛋白印迹确证试验检测 HIV 抗体	(272)
第七节	2-2 基因工程 HIVgp41、p24 蛋白印迹 法检测 HIV 抗体	(274)
第八节	多聚酶链反应(PCR)技术检测 HIV-1 型抗 体	(277)

第四篇 淋巴细胞杂交瘤技术

第五篇 病毒实验室注意事项及常用试剂配制

第一章 病毒实验室注意事项及常用器材的處理和消

毒	(333)
---------	-------

第一节 病毒实验室注意事项	(333)
---------------------	-------

第二节 常用实验器材的准备及处理	(334)
------------------------	-------

第二章 常用试剂的配制

第一节 常用缓冲液的配制	(337)
--------------------	-------

第二节 其它常用试剂的配制	(343)
---------------------	-------

第一篇 现代病毒学检验新技术

第一章 多聚酶链反应技术

多聚酶链反应(PolymerasechainReaclion,简称 PCR),又称为无细胞分子克隆法,是 1983 年由 Mullis 首先发现的:1986 年 Erlich 分离并纯化了适用于 PCR 的 Taq 热稳定性多聚酶,1988 年 SaiKi 开始使用耐热多聚酶 Taq 进行 PCR 扩增,从此 PCR 进入实用阶段,由于具有快速,敏感,操作简单,能在普通实验室完成优点,很快地在世界各国应用开来,我国于 1988 年由上海复旦大学开始进行耐热多聚酶的研究,随后研制出 PCR 用的 FD 多聚酶以来,已经应用到生命科学、分子生物学、遗传工程、各种病毒性疾病的病原体诊断、细菌和真菌病原体的鉴定、肿瘤疾病的诊断等。相信在不远的将来,PCR 技术应用的会越来越广泛,迅速地应用到全国各大中型医院实验室,为医学研究和疾病的诊断做出新的贡献。

第一节 PCR 技术的基本原理和操作流程

PCR 是一种能够迅速特异地在体外扩增任何所希望的目的基因(其中包括 DNA 或 DNA 段片)的方法。其反应原理是:利用 DNA 聚合酶具有以单链 DNA 为模版,寡聚核苷为引物,沿 5,→3, 方向掺入单核苷酸的特性,在体外适宜条件

下,扩增 DNA 片段,最初进行的 PCR 反应中所用的是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片断,由于它不耐受高温,因此在反应过程中需要不断添加新鲜的聚合酶,以使反应系统中始终保持有活性酶。近年来,PCR 反应取自嗜热性细菌 (*Thermus aquaticus*) 分离出来的耐热 DNA 聚合酶 (Taq DNA polymerase)。该酶可耐受 95℃,所以只要在反应系统中一次加入足量的酶和核苷酸,即可满足整个反应过程的需要,从而极大地便利了操作。

PCR 过程由高温变性,低温退火,适温延伸等几个反应步骤组成一个周期,循环进行,使目的 DNA 得以迅速扩增。这一过程首先是使得扩增的 DNA 于高温下解链成为单链以作模版;然后降温,让人工合成的两个寡聚核苷酸引物在低温条件下分别与目的片断两侧的两条单链模版互补结合;DNA 聚合酶在 72℃ 将单核苷酸从引物 3' 端开始掺入,沿模版 5'→3' 方向延伸,合成 DNA 新股(见图 1-1)。每 1 周期所产生的 DNA 均能作为下一轮反应的模版,所以 PCR 反应产物的增加呈指数形式,经 25~30 次循环后,产物扩增倍数一般可达 $10^{5\sim7}$ 。

第二节 基因扩增的反应主要成分和作用

(一) Taq DNA 多聚酶的浓度

在 PCR 100μl 反应体系中 Taq DNA 多聚酶用量为 1~2.5 单位之间(Lawyer)。然而,由于 DNA 的不同和引物不同,以及其它条件的差别,则多聚酶的使同量亦有差别。

多聚酶的试验用量在 0.5~5 单位之间,根据电泳的结果决定酶的最佳用量,若用酶的浓度偏高,非特异性的产物堆积;

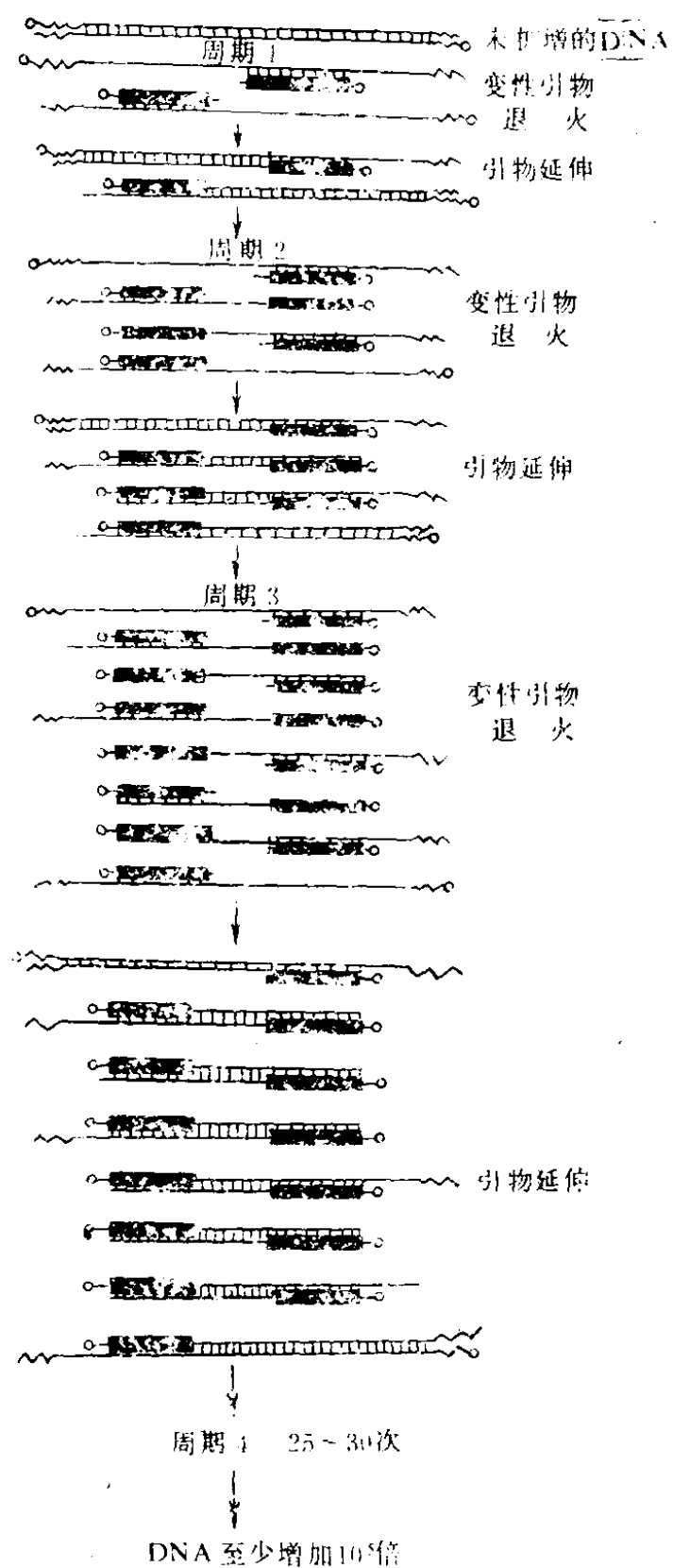


图 1-1 PCR 反应原理

若用酶的浓度偏低,则合成产物的量少。由于生产厂家所使用的配方、制造条件以及活性不同,不同厂商供应的 Taq DNA 多聚酶的性能有所不同。

(二)三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)

dNTP 包括:(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)用 NaOH 中性(pH7.0)贮存,其浓度用分光光度计测定。最初的贮存液可稀释到 10mmol/L 分装后存放在-20℃冰箱中,使用 dNTP 工作储存液为 1mmol/L 在 PCR 循环加温试验中,dNTP 的稳定性方面,在 50 次的循环中有 50%是稳定的。dNTP 使用浓度在 20~200 μ mol/L 之间。这四种 dNTP 必须以当量浓度配合以减少错配误配,在 PCR 反应中,使用较低的 dNTP 浓度,比以前使用 Klenow 酶时所使用 1.5mmol/L 的浓度,在特异性和精确性方面都有提高,使用低 dNTP 浓度,减少在非靶位置启动和延伸时核苷酸错误掺入,决定最低 dNTP 浓度是根据靶序列的长度和组成。例如:在 100 μ l 的反应体系中,四种 dNTP 的浓度使用 20mmol/L,基本满足合成 2.6 μ g DNA 或 10 μ mol 的 400 bp 序列。使用低 dNTP 浓度(每种 dNTP 浓度为 2 μ mol/L),能够高灵敏($1/10^7$)扩增 ras 基因点突变的等位基因。

(三)镁离子浓度

选择合适的镁离子浓度是很重要的,镁离子浓度可影响到引物退火,模版和 PCR 中间产物的链解离温度,产物的特异性,引物二聚体的生成以及酶的活性和精度等。PCR 镁离子浓度在 0.5~2.5mmol/L 之间,超过了 dNTP 浓度。如果溶液中存在 EDTA,或在引物贮备液中有它的螯合物或者 DNA 模版,会干扰镁离子的浓度。

(四)其它反应组成物

1. Tris-HCl 在 PCR 中使用 10~50mmol/L Tris-HCl (pH8.3~8.8, 20℃), Tris-HCl 缓冲液是一种双极化离子缓冲液, pKa 为 8.3, 20℃在典型热循环条件下, 真正 pH 值在 7.8~6.8 之间变化。

2. KCl KCl 浓度在 50mmol/L, 它能促使引物退火。NaCl 的浓度在 50mmol/L, KCl 的浓度大于 50mmol/L 时, 将会抑制 Taq DNA 多聚酶的活性。

3. 二甲基亚砜(DMSO) 在使用 Klenow 大片断(大肠杆菌多聚酶 I)进行 PCR 时 DMSO 是有用的, 当其浓度超过 10% 将会抑制 Taq DNA 多聚酶 50% 的活性。因此, 大多数人并不使用 DMSO。

4. 明胶和牛血清白蛋白或非离子型生物去污剂, 能帮助稳定酶的作用, 虽然大多数操作中即使不加蛋白亦得到良好的结果。一般用量为 100μg/mL。

(五)引物的退火

引物退火温度和所需时间长短取决于反应体系中的基本组成及扩增引物的长度和温度, 实际使用的退火温度要比扩增引物的 T_m 值低 5℃, 因为 Taq DNA 多聚酶的活性温度范围很宽, 引物延伸将在低温下获得, 酶活性温度的范围差别很大, 在 20℃~85℃之间。退火温度在 55℃~72℃之间都会得到较好的结果, 在典型的引物浓度时(如 0.2μmol/L), 退火仅需数秒即可完成。如增加退火温度, 会增强对不正确的退火引物的识别, 同时能降低引物 3' 端不正确核苷酸的错误延伸, 因此, 严格规定退火温度, 特别是前几个循环中, 会增加扩增的特异性, 为了在开始循环中就获得最大的特异性, 应在第一次