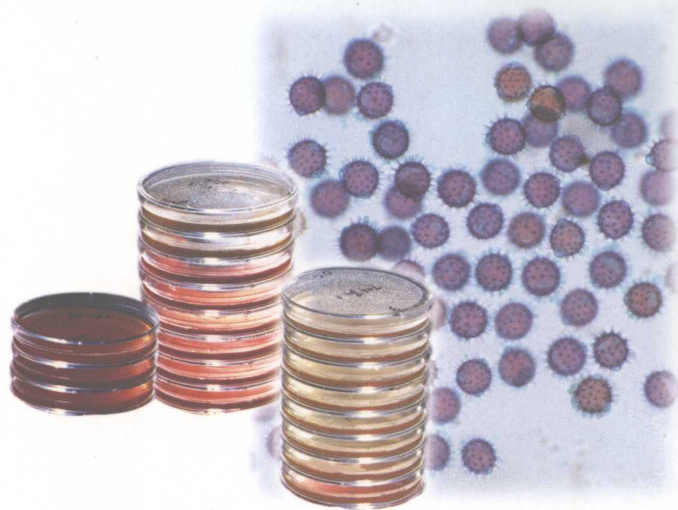




全国高等农林院校“十一五”规划教材

# 兽医生物制品学 实验指导

姜平 主编



SHOUYI SHENGGWUZHIPINXUE  
SHIYAN ZHIDAO

 中国农业出版社

全国高等农林院校“十一五”规划教材

# 兽医生物制品学实验指导

姜 平 主编

中国农业出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

兽医生物制品学实验指导/姜平主编. —北京: 中国农业出版社, 2008. 2

全国高等农林院校“十一五”规划教材

ISBN 978-7-109-12019-8

I. 兽… II. 姜… III. 兽医学—生物制品—实验—高等学校—教学参考资料 IV. S859.79—33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 009674 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

责任编辑 武旭峰

---

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行  
2008 年 2 月第 1 版 2008 年 2 月北京第 1 次印刷

---

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 6.25

字数: 105 千字

定价: 10.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编 姜 平

编 者 (按姓氏笔画顺序)

王君伟 (东北农业大学)

李 郁 (安徽农业大学)

罗满林 (华南农业大学)

胡永浩 (甘肃农业大学)

姜 平 (南京农业大学)

程安春 (四川农业大学)

审 稿 张振兴 (南京农业大学)

# 前 言

《兽医生物制品学》第一、二版出版以来，受到全国农业高等院校广泛欢迎。但是，一直没有配套的实验指导教材出版。为了适应新世纪本学科人才实践能力培养的需要，我们编写、出版了这本《兽医生物制品学实验指导》。

由于兽医生物制品学课程涉及的范围广，与兽医微生物学、兽医免疫学、兽医传染病学等课程的交叉内容多，兽医生物制品制造和检验周期长，以及生物制品制造设备和条件要求高，而兽医生物制品学课堂实验时间短、实验室教学条件有限，所以本书根据实际教学情况精心选择了25个实验。其中，部分实验又包含了多个连续的实验。全体编者结合各自实践教学经验，精心组织编写，力求教材的系统性、科学性、实用性和可操作性，既重视实际操作方法，也兼顾基本技能的训练。各院校可根据各自具体情况，选择安排相关实验，部分实验可以安排成若干阶段进行。

本书的编写分工为：王君伟，实验一、十一、二十二；罗满林，实验二、三、十六、二十；李郁，实验五、七、九、十；胡永浩，实验十五、十八、十九；程安春，实验二十一、二十三；姜平，其余各实验，并对各实验的格式和内容做了必要的调整、修改和补充。

在本书编写过程中，得到了国内兽医学界很多专家和学者的热情支持和鼓励。南京农业大学张振兴教授审阅了全部书稿，对本书

的编写大纲和内容提出了很多宝贵的意见；南京农业大学周斌老师承担了本书部分内容的打印和校对工作，谨此一并致谢。

限于编者的水平和经验，本书的不足之处，敬请同行和师生指正，以便以后修订。

编者

2007年12月

# 目 录

## 前言

实验一	细菌种子繁殖和规模化培养 .....	1
实验二	鸡胚孵化和新城疫病毒增殖 .....	4
实验三	细胞培养 .....	8
实验四	免疫佐剂的制备 .....	11
实验五	生物制品的无菌检验、纯粹检验和活菌计数 .....	13
实验六	病毒半数致死量和感染量测定 .....	16
实验七	生物制品的支原体检验 .....	20
实验八	生物制品的外源病毒检验 .....	23
实验九	冻干制品的物理性状检验及真空度和剩余水分的 测定 .....	26
实验十	灭活疫苗的物理性状检验及甲醛和硫柳汞含量的 测定 .....	28
实验十一	鸡大肠杆菌灭活疫苗的制备和检验 .....	32
实验十二	鸡新城疫灭活疫苗的制备和检验 .....	35
实验十三	兔病毒性出血症组织灭活疫苗的制备和检验 .....	38
实验十四	禽多杀性巴氏杆菌活疫苗的制备和检验 .....	40
实验十五	Ⅱ号炭疽芽胞疫苗的制备和检验 .....	42
实验十六	鸡新城疫活疫苗的制备和检验 .....	46
实验十七	猪伪狂犬病基因缺失活疫苗的检验 .....	49
实验十八	布鲁菌病平板凝集抗原的制备和检验 .....	53
实验十九	鸡白痢鸡伤寒平板凝集试验抗原和阴阳性血清的 制备及检验 .....	57
实验二十	鸡新城疫病毒 HA 抗原的制备 .....	62
实验二十一	鸡传染性法氏囊病 AGP 抗原的制备和检验 .....	64

实验二十二	马传染性贫血病 AGP 抗原的制备.....	67
实验二十三	鸡传染性法氏囊病卵黄抗体的制备和检验.....	70
实验二十四	猪瘟抗血清的制备和检验.....	73
实验二十五	兽医生物制品企业参观学习.....	75
附录	常用试剂的配制.....	77
主要参考文献	.....	91



## 实验一 细菌种子繁殖和规模化培养

细菌种子繁殖与规模化培养是细菌疫苗生产的两个重要环节。生产用种子的繁殖必须经过一级种子制备和二级种子繁殖过程。细菌疫苗生产要求细菌培养规模大、发酵速度快、生产效率高。发酵罐设备密闭，可以自动控制，传热、传质性能良好，不易染菌，因此在微生物规模化培养方面发挥着重要作用。

### 【目的要求】

- (1) 掌握细菌种子繁殖的基本过程和方法。
- (2) 了解细菌规模化培养的基本原理和基本操作方法。

### 【材料与试剂】

#### 1. 材料

- (1) 菌种：禽大肠杆菌疫苗菌种 EC24、EC30、EC45 或 EC50 株。
- (2) 主要器材：高压灭菌柜、培养箱、冰箱、摇床、低倍和高倍显微镜、普通试管、载玻片、三角瓶、平皿、细菌接种棒和细菌发酵罐等。

2. 试剂 马丁肉汤、麦康凯培养基平板、蛋白胨、氯化钠、0.1%花生油和革兰氏染色液（草酸铵结晶紫、碘液、95%酒精、番红染液）等。

### 【实验内容】

- (1) 生产用种子的繁殖。
- (2) 细菌规模化培养（演示）。

### 【操作步骤】

#### （一）生产用种子的繁殖

1. 一级种子繁殖 将冻干菌种接种于马丁肉汤三角瓶，置 36~37℃ 振荡培养 20h，然后划线接种于麦康凯培养基平板（图 1），36~37℃ 培养 24h。经下列检查合格，作为一级种子。在 2~8℃ 保存，使用期不超过 14d。也可 2 周继代一次，继代不超过 5 代。

(1) 菌落特征：接种麦康凯培养基平板上，35~36℃ 培养 24h，肉眼观察呈粉红色或砖红色，菌落隆起，表面光滑。低倍显微镜下 45° 折光观察，边缘整齐，呈鲜艳的金光。

(2) 纯粹检查：用低倍镜选取光滑圆整单个菌落若干个，混合接种于普通琼脂斜面若干支，36~37℃ 培养 20h，观察菌落大小，应均匀一致。

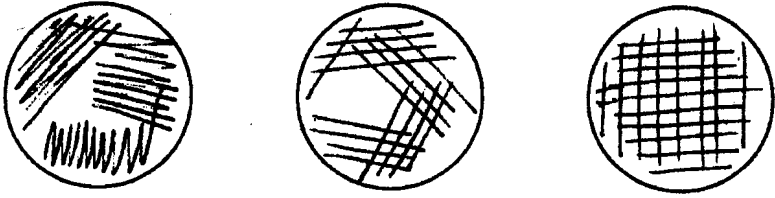


图1 琼脂平板上细菌划线培养方法

(3) 形态观察：选取菌落若干个，涂布于载玻片，烘干后用革兰氏染色液染色。

染色方法：①加草酸铵结晶紫一滴，静置约1min，轻轻水洗。②滴加碘液冲去残水，并覆盖约1min，水洗。③将载玻片上面的水甩净，并衬以白背景，加95%酒精，滴洗，至流出酒精刚刚不出现紫色时为止，静置20~30s，立即用水冲净酒精。④用番红染液复染1~2min，水洗，自然干燥。最后，置高倍显微镜下，用油镜观察，细菌形态应为革兰氏染色阴性的小杆菌，大小均匀一致。

2. 二级种子繁殖 取一级种子，接种于马丁肉汤三角瓶中，36~37℃振荡培养20~24h，经纯粹检验合格后，作为二级种子。根据需要，取二级种子液等量混合，按培养基总量的1%~2%接种于含1%~2%蛋白胨的普通肉汤中，在36~37℃通气培养16~20h，作为发酵培养的种子液。培养过程中根据需要加入适量消泡剂（0.1%花生油）。经纯粹检验合格后，也可以作为二级种子。

## (二) 大肠杆菌规模化培养

1. 细菌规模化培养的基本流程 包括：试管菌种→三角瓶液体培养→大三角瓶培养→小体积发酵罐培养→大体积发酵罐培养（图2）。

2. 空罐灭菌 发酵罐在装入培养基之前要进行空罐灭菌，包括与罐体相连的管道与阀门等。灭菌温度一般采用121℃灭菌40min。

3. 实罐灭菌 细菌发酵培养前要将培养基移入发酵罐内，其装量为罐体全容积的70%~75%，之后要进行灭菌，一般情况下，温度为116℃灭菌40~60min。

4. 移种 待发酵罐内培养基温度冷却至37℃时即可进行移种。一般采用压差移种，即在种子罐压力大于发酵罐压力的条件下，将种子液转移到发酵罐内。一般按培养基总量的1%~2%移种。

5. 发酵培养 移种后进行发酵培养，在36~37℃通气培养16~20h即可。培养过程中根据需要加入适量消泡剂（0.1%花生油）。

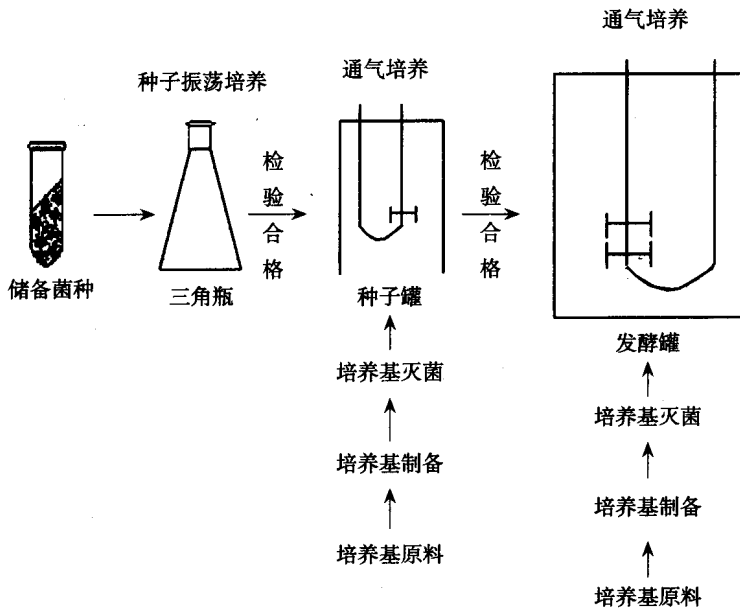


图2 细菌规模化培养过程基本示意图

6. 纯粹检验和活菌计数 细菌发酵培养完成后，取样用普通琼脂做纯检，并接种普通琼脂平板做活菌计数。

**【思考题】**

- (1) 生产用细菌种子繁殖的基本程序是什么？为什么对一级种子和二级种子需要进行纯粹检验？
- (2) 简述大肠杆菌规模化培养的基本流程和关键操作步骤。

## 实验二 鸡胚孵化和新城疫病毒增殖

鸡胚具有价廉易得、实验操作简便以及对多种病毒（尤其是禽类）和立克次体等易感的优点，在兽医生物制品的生产中占有重要地位。本实验以新城疫病毒为材料，利用鸡胚，由尿囊腔和绒毛尿囊膜途径分别接种病毒，通过鸡胚孵化、照蛋观察，直至收获病毒，进一步学习掌握鸡胚病毒增殖方法，并为病毒疫苗制备提供半成品。

### 【目的要求】

- (1) 掌握鸡胚孵化的基本条件和鸡胚孵化的基本方法。
- (2) 掌握鸡胚尿囊腔途径接种病毒及其收获方法。
- (3) 掌握鸡胚绒毛尿囊膜途径接种病毒及其收获方法。

### 【材料与试剂】

#### 1. 材料

- (1) 毒株：新城疫病毒 I 系疫苗毒株。
- (2) 实验动物：新鲜种蛋和 9~10 日龄鸡胚。
- (3) 主要器材：孵卵器（或恒温箱）、蛋盘、检卵灯、蜡笔（或油性笔）、小量注射器（0.5ml）、剪刀、镊子、滴管、其他器皿等。

2. 试剂 生理盐水、双抗（10 000IU/ml 青链霉素）、5%新洁尔灭消毒液、5%碘酒棉和 75%酒精棉等。

### 【实验内容】

- (1) 鸡胚孵化与存活鸡胚的识别。
- (2) 鸡胚尿囊腔途径接种病毒与病毒收获。
- (3) 鸡胚绒毛尿囊膜途径接种病毒与病毒收获。

### 【操作步骤】

#### 1. 鸡胚孵化与存活鸡胚的识别

(1) 孵化器的使用：可以选择使用孵化箱或恒温箱，演示使用方法（清洁、消毒、温度、湿度、蛋架使用和翻蛋方法等）。

(2) 鸡蛋预处理：取健康种鸡所产新鲜蛋，用温水（15~40℃）清洗，除去蛋壳污物，并用 1%新洁尔灭溶液逐个擦洗（不得浸泡）。洗蛋时注意剔除破蛋、沙壳蛋和畸形蛋。

(3) 孵化：将清洁的鸡蛋，气室朝上放入蛋架，置 38~39℃，相对湿度为 40%~70% 的孵化箱内孵化 9~11d，应保持空气的流通。孵育 3d 后，每天 180°翻蛋 1~2 次。无孵化箱时可用普通恒温箱代替，但要在其下部放一盛水盘，以保持 40%~70% 的相对湿度。

(4) 检查（照蛋）：孵育后的第 4~6 日，用检卵灯照视鸡胚发育情况，此时有活力的鸡胚可见有清晰的血管小网，并显有鸡胚的暗影，较大的鸡胚还可见到绒毛尿囊膜上的血管及活动的胚体。如只见模糊的卵黄黑影，不见有鸡胚形迹的为未受精的卵，而胚体不能主动性运动，则为死亡的卵，均应弃去。

(5) 胚体的定位（画蛋）：孵育 9~11d 时，将待接种的卵取出，在检卵灯上照视，用油性笔画出气室范围及胚位，按鸡胚接种途径要求，在鸡胚接种部位做好标记。

## 2. 鸡胚尿囊腔途径接种与病毒收获

(1) 病毒处理：接种前用灭菌的生理盐水将毒种做 1:100 稀释。加入 1% 双抗（100IU/ml 青链霉素），37℃ 条件下感作 30min 后备用。

### (2) 接种：

方法一：在胚体对侧距气室底边下方无血管部位和距气室底边上方 0.5~1cm 处的蛋壳，划出钻孔标记，分别用碘酒棉和酒精棉消毒，用钻孔器在接种部位标记处的蛋壳上刺一小孔（图 3A），以短斜面针头由孔口刺入，注入 0.1~0.2ml 接种物，用融化的石蜡将蛋壳上的接种小孔处封口，然后继续孵育。

方法二：在气室接近胚体处（蛋直径最大处、无血管的部位）划出标记（图 3B），分别用碘酒棉和酒精棉消毒鸡胚接种部位，用钻孔器在接种部位钻一小孔，由小孔穿刺 0.5~1cm 深，注入 0.1~0.2ml 接种物，以石蜡封口后继续孵育。

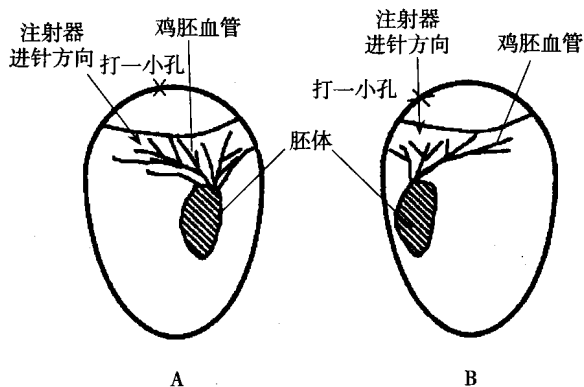


图 3 鸡胚尿囊腔接种法示意图

(3) 照蛋：每日照蛋 1~2 次。弃去 24h 内死亡的鸡胚，取 36~72h 后死亡的鸡胚，使鸡蛋气室向上，置 2~8℃ 冷却 4h 以上或过夜。

(4) 收获：气室端向上置于卵架上，消毒后用无菌镊子或剪刀揭去气室端蛋壳，注意勿使其碎片落于壳膜上，以无菌眼科镊子掀开壳膜，用无菌的吸管穿破绒毛尿囊膜，吸取尿囊液（5~10ml/胚），贮于无菌小瓶内，经无菌检查后保存于低温处备用。

### 3. 鸡胚绒毛尿囊膜途径接种与病毒收获

(1) 病毒处理：接种前用灭菌的生理盐水将毒种做 1:100 稀释，再加入 1% 双抗（100IU/ml 青链霉素），37℃ 条件下感作 30min 后备用。

(2) 气室标记与人工气室制造：选择 10 日龄鸡胚，照检后划出气室和胚位，用 5% 碘酒和 75% 酒精分别消毒，于气室部位的卵壳上钻一小孔，穿透壳膜，再于鸡胚面避开血管小心钻一小孔，勿穿透绒毛尿囊膜，然后用橡皮吸球紧贴气室孔轻轻一吸，在照蛋灯下便看到鸡胚面小孔处的绒毛膜下陷造成人工气室（图 4）。

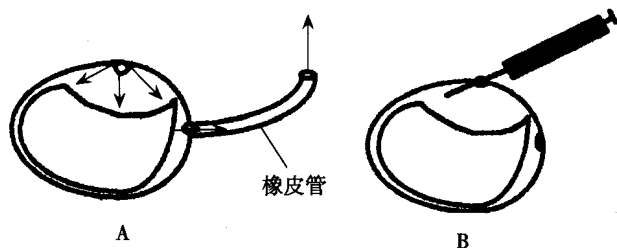


图 4 鸡胚绒毛尿囊膜接种方法示意图

A. 打孔、吸气、造气室 B. 进针位置

(3) 接种：用 6~7 号细针头慢慢插入人工气室孔，注入病毒液，0.1~0.2ml/胚，用石蜡封孔，轻摇鸡蛋使注入物均匀散布于绒毛尿囊膜上，继续孵育。

(4) 照蛋：每日照蛋 2 次，弃去 24h 内死胚，及时取出 24~72h 死亡胚，置 2~8℃ 冷却 4h 以上或过夜。

(5) 收获：气室端向上置于卵架上，消毒后用无菌镊子或剪刀揭去气室端蛋壳，注意勿使其碎片落于壳膜上。以无菌眼科镊子掀开壳膜，用无菌的吸管穿破绒毛尿囊膜，吸取尿囊液，贮于无菌小瓶内，用灭菌镊子轻轻夹起绒毛尿囊膜，并沿气室周围将绒毛尿囊膜全部剪下，取病变明显部位，经研磨制成病毒悬液，-20℃ 保存备用。

**【思考题】**

- (1) 鸡胚孵化与鸡胚病毒接种技术有哪些关键因素和步骤?
- (2) 鸡胚接种增殖病毒,通常将接毒后 24h 内死亡胚弃之不用,收获病毒液前需要将鸡胚(死亡和存活胚)放置在 2~8℃ 冷却 4h 以上或过夜,为什么?

## 实验三 细胞培养

细胞培养技术是很多生物制品研究制造的基础。目前,很多兽医生物制品采用原代细胞培养法和传代细胞培养法大量生产。本实验以鸡胚成纤维细胞作为原代细胞、Vero 细胞作为传代细胞为例,通过细胞培养实践操作,进一步认识和体会影响细胞培养的主要因素,并掌握原代细胞和传代细胞的培养方法。

### 【目的要求】

- (1) 进一步认识和体会影响细胞培养的主要因素。
- (2) 学习和掌握鸡胚成纤维细胞的培养方法。
- (3) 学习和掌握 Vero 细胞传代培养的方法。

### 【材料与试剂】

#### 1. 材料

(1) 鸡胚与细胞: 9~11 日龄 SPF 鸡胚和 Vero 传代细胞。

(2) 主要器材: 灭菌的细胞瓶、眼科剪、眼科镊、平皿、吸管和离心管等器材。

2. 试剂 Hank's 液、0.25%胰酶消化液、0.025%胰酶-EDTA 消化液、犊牛血清、双抗(10 000IU/ml 青链霉素)、7.5%NaHCO<sub>3</sub> 溶液、DMEM 营养液; 5%新洁尔灭消毒液、5%碘酒棉和 75%酒精棉等。

### 【实验内容】

- (1) 鸡胚成纤维细胞的制备。
- (2) Vero 细胞的传代与培养。

### 【操作步骤】

#### 1. 鸡胚成纤维细胞的制备

(1) 蛋壳消毒: 用照卵灯选取血管清楚、活动正常的鸡胚,置蛋架上,令气室端向上,用碘酒棉和酒精棉消毒蛋壳。

(2) 胚体采集: 用消毒剪剪除气室端蛋壳,用无菌的眼科镊子撕开蛋壳气室膜并小心拨开绒毛尿囊膜,另用一把镊子伸到胚体颈下方,将鸡胚钩起置于平皿中,鸡胚如有出血等异常情况则弃之。

(3) 胚体匀浆: 用剪刀剪去胚头、肢、爪及内脏,移置于另一个平皿中,



用 Hank's 液洗 2~3 次。将胚体置于小烧杯中，用剪刀剪碎胚体至 0.5~1mm 的小块，用约 10ml 的 Hank's 液洗 2~3 次，以除去其中的红细胞。

(4) 胰酶消化：加入 0.25% 的胰蛋白酶溶液 (37℃ 预热)，包紧小烧杯瓶口，37℃ 消化 10min，观察组织被消化程度，至消化成细胞团块、出现细胞团块有粘连现象 (如需长时间消化，可中间换一次消化液，即静置三角瓶 10min，待组织下沉后，吸除 2/3 上清液，余 1/3，再补加新胰蛋白酶液，继续消化)。然后，用 Hank's 液轻洗 3 次，最后一次洗液尽量全部弃去，再加入 5~10ml DMEM 生长液 (DMEM 营养液 + 5% 犊牛血清 + 100IU/ml 青链霉素，用 7.5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液调 pH7.2)，终止消化作用。

(5) 细胞分散和过滤：用吸管反复吹打组织块，直至大部分细胞分散而上层液变混浊。加入 DMEM 生长液，30~40ml/鸡胚，用 2~4 层脱脂纱布过滤，收集滤液。

(6) 细胞计数：用细胞计数器计数，根据计数结果，加入 DMEM 生长液，调整细胞浓度至 50 万~60 万个/ml。

(7) 分装与培养：根据需要分别分装于培养瓶中，分装量为该容量瓶的 1/10 左右。用橡皮塞将瓶口塞紧，置 37℃ 培养，一般在 2~4h 后可贴壁，1~2d 左右可形成单层。分装后 2~4h 不可移动细胞瓶，以免影响细胞的贴壁和生长。

(8) 细胞形态观察：检查时注意培养液的颜色变化，变黄但不混浊表示有细胞的生长，而变红表示细胞未有生长或生长不佳。37℃ 培养 24~48h 后，于倒置显微镜下观察，细胞可以长成单层，细胞透亮，呈纤维状，细胞膜清晰。

## 2. Vero 传代细胞培养

(1) 单层细胞的选择：取 1~2 瓶单层细胞，在显微镜下观察，细胞应生长情况良好，长成 90% 单层。

(2) 换液与消化：倒去细胞培养液，加入 Hank's 液洗 2~3 次，每次加入 2~3ml/瓶，轻轻摇动，尽量弃尽洗液，再加入 0.025% 胰酶-EDTA 消化液，0.5~1ml/瓶，使其与细胞接触，37℃ 作用 2~5min (或室温作用，但所需时间一般稍长)。一旦细胞瓶边缘的细胞单层出现脱落，可以立即在显微镜下观察，细胞呈松散、变圆，表明消化已经完全。

(3) 分散细胞：细胞消化一旦完全，应立即将长有细胞的瓶壁转向上方，轻轻倒去胰酶-EDTA 消化液，并加入细胞生长液 (DMEM 营养液 + 10% 犊牛血清 + 100IU/ml 青链霉素，pH7.2)，2~3ml/瓶，用吸管反复吹打细胞，以分散细胞。

(4) 细胞计数：用细胞计数器计数，根据计数结果，加入细胞生长液