

病毒学

实用实验技术

主编 傅继华

山东科学技术出版社
www.lkj.com.cn

病毒学 实用实验技术

主编 傅继华

山东科学技术出版社

病毒学实用实验技术

主编 傅继华

出版者: 山东科学技术出版社

地址: 济南市玉函路 16 号

邮编: 250002 电话: (0531)2065109

网址: www.lkj.com.cn

电子邮件: sdkj@jnn-public.sd.cninfo.net

发行者: 山东科学技术出版社

地址: 济南市玉函路 16 号

邮编: 250002 电话: (0531)2020432

印刷者: 济南申汇印务有限责任公司

地址: 济南市王官庄 12 号

邮编: 250022 电话: (0531)7966822

开本: 787mm × 1092mm 1/32

印张: 11.625

字数: 244 千

版次: 2001 年 9 月第 1 版第 2 次印刷

印数: 3001—6000

ISBN 7-5331-2781-1

R·862

定价: 16.00 元

图书在版编目(CIP)数据

病毒学实用实验技术/傅继华 主编. — 济南: 山东科学技术出版社, 2001

ISBN 7-5331-2781-1

I. 病... II. 傅... III. 病毒学-实验方法
IV. Q939.4-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2000)第84968号

主 编	傅继华				
副 主 编	张 静	李 文	尹爱红	黄 涛	
	王少军	王 玫	王晓云	赵明远	
	康殿民				
编委会主任	曹怀杰	武秀兰			
编 委	(按姓氏笔画为序)				
	王 玫	王少军	王志强	王昕宇	
	王宇路	王晓云	王德全	尹爱红	
	李 文	刘学真	刘传新	刘淑贞	
	张 静	张遵宝	严 敏	苏胜利	
	赵明远	黄 涛	傅继华	康殿民	
主 审	黄宝童	张延学	谢慰杖		

序

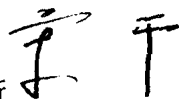
病毒性疾病占急性传染病 2/3 以上,严重威胁着人类的生命和健康,而认识和控制病毒性疾病,首先靠病毒学实验技术。采用敏感的实验动物/细胞培养分离病毒是第一步,进一步再用生物学、免疫学、理化、生化和电镜等技术进行鉴定和定性,而近年分子生物学及基因工程技术的发展,使病毒学研究从生物学、免疫学和细胞水平进入到分子与核酸水平,使我们了解了病毒的分子结构、功能、病毒变异、进化,并应用基因工程方法对病毒加工改造,使研究更加有效的防治用药物和疫苗成为可能。随着病毒学的飞速发展,新的、高致病性的病毒(肝炎病毒、艾滋病病毒、出血热病毒、埃博拉病毒……)不断出现,给病毒病的防治和研究提出了更多、更加艰巨的任务。与此同时,随着高新技术的飞速发展,新的病毒学实验技术也不断增多,这也使我们对病毒病防治、研究工作有了更多的手段。

由傅继华主任主编,一批战斗在病毒性疾病防治研究第一线的年轻病毒学工作者参加编写的《病毒学实用实验技术》一书,比较全面、系统地介绍了病毒学

诊断和研究实用的、新发展的实验技术,包括病毒学基本技术如细胞培养、动物实验、病毒的分离鉴定、血清学方法、理化和生化技术、组织学和组织化学方法,还包括新发展的电镜技术、单克隆抗体技术以及最新发展的主要的分子生物学技术。参加本书编写的年轻科技人员,在本书中凝聚了他们多年的实践经验和对其中一些技术的改进;同时由于作者年轻,容易接受新鲜事物、善于学习吸取新理论、新技术,使本书融汇了国际上的新技术,更加适合当前病毒病诊断及其防治研究的需要。我认为这是一本值得向预防医学和病毒学有关科技人员推荐的好书,也是大学生、研究生的参考用书。

时代在前进,科技在发展,病毒学实验技术也日新月异,不断有新的突破和创新。我们期待着有更多的年轻人加入到病毒病防治和研究的队伍中来,为有效地控制病毒病和人类的保健事业作出积极贡献。

中国预防医学科学院病毒学研究所



于北京

前 言

病毒是一类非细胞形态的微生物,基本结构仅由核酸与蛋白质组成,颗粒微小,光镜不可见,且只能在活细胞中增殖。因此病毒实际上是一种分子水平的寄生物。正是这些远远不同于细菌、真菌等微生物的特点,病毒学的实验室技术比起其他微生物的要复杂和困难得多,尽管如此,自 1892 年第一次发现烟草花叶病毒以来,随着科学技术的发展,人们已经掌握和积累了丰富的病毒实验技术。从细胞培养到电镜观察,从免疫荧光到酶联免疫,无不大大推进了病毒学的发展。尤其是人类认识和了解了大量对人和动物致病的病毒,使人类能更好地控制和预防病毒性疾病。近年来,由于基因工程和分子生物学技术的发展及其在病毒学研究中的应用,人们对病毒的掌握利用和对病毒性疾病的预防控制更是如虎添翼,使人类能够最终攻克病毒学研究中的一个个堡垒,为自己开拓更健康、美好的生活前景。

《病毒学实用实验技术》这本书就是编者在前人实验研究的基础上,结合自己在实践中的经验积累,参照国际病毒学研究技术的最新进展编著而成的。

内容有实验室安全,有病毒分离、培养、浓缩,动物接种,生化分析,形态观察。还有病毒作为抗原的血清等免疫学及组织化学技术,最先进的研究病毒核酸与遗传的基因提取、翻译、克隆、杂交等的基因工程和分子生物学技术。本书基本概括了病毒学研究中所有实用的实验技术,可作为科研工作者的参考工具。由于这些生物学技术具有广泛的通用性和很好的实用性,该书不但适用于具有一定理论基础的病毒学研究者,还可以作为医学、生物学工作者的参考用书,对于医学及生物专业大学生也是一本很好的实验技术教材。

该书的编著者由常年从事病毒病预防控制及实验室研究的人员组成,他们不仅在病毒学实验技术方面积累了丰富的实验经验。而且在编写过程中还得到了老一辈专家学者的指导。由于编著者水平所限,书中难免出现纰漏,望广大读者不吝指正。

编 者

目 录

第一章	实验室安全	1
第二章	细胞培养	27
第三章	病毒的分离和鉴定	45
第四章	动物模型	74
第五章	实验动物的接种	85
第六章	病毒的浓缩	88
第七章	蛋白质分析	94
第八章	超速离心	102
第九章	层析分析	117
第十章	电泳	126
第十一章	电子显微镜	132
第十二章	血清学	143
第十三章	免疫荧光技术	162
第十四章	免疫过氧化物酶技术	169
第十五章	酶联免疫吸附试验	175
第十六章	单克隆抗体抗原位点的识别	180
第十七章	组织学和组织化学	187
第十八章	电镜的免疫化学染色	209
第十九章	新陈代谢法与化学法放射性同位素标记	220
第二十章	免疫沉淀鉴定病毒蛋白	257
第二十一章	免疫蛋白印迹法鉴定病毒蛋白	263
第二十二章	肽图	268
第二十三章	DNA 分子的琼脂糖凝胶电泳	275

第二十四章	病毒核酸的提取·····	286
第二十五章	体外翻译·····	297
第二十六章	病毒 DNA 的基因克隆 ·····	302
第二十七章	互补 DNA 的合成 ·····	320
第二十八章	核酸分子在电镜下的形态·····	330
第二十九章	分子杂交·····	339
第三十章	聚合酶链式反应·····	354

第一章

实验室安全

一、引言

实验室安全一个重要原则,是对任何病理标本,包括血液、血浆、细胞培养物、病毒、化学和放射性制剂都必须非常小心操作。

导致人类疾病的病毒名单一天一天拉长,并且一些对人类明显无害的病毒在某些实验室条件下由于人为地提高了浓度也会成为致命的。另外,一些实验用化学物质具有高毒性或致癌性,应严格按照化学药品安全规程操作。最终,由于滥用放射性碘或磷(^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P)的结果引起放射性生物累积,

可引起人类的健康问题。我们建议读者适当的回顾这个问题的相关文献,对实验室中所有用品的潜在危害保持清醒认识。

有些要求看似过分或简单,但经验表明,有些致命性事故常常是因为没有遵守安全操作造成的。

我们已有的知识表明,科学的实验方法和必要的实验仪器可预防实验室感染,因此应明智地利用它们来安全地处理含有传染性病原和有毒污染物。

(一)一般安全规则

1. 实验室禁止吸烟、喝水、吃东西,放置食品和个人物品。

2. 操作生物学(人或动物)和化学制品的全体人员必须穿戴并扎紧工作服(大褂、制服、长袍)。不能在非实验区(咖啡厅、餐馆、会议室或实验楼以外的地方)穿着工作服。如果需要去另外实验楼,应穿干净的工作服。工作服应每周洗一次或根据需要经常洗。

3. 建议对所有标本(如血液、组织、粪便)的操作都应戴外科手套。

4. 禁止用嘴吹吸吸管,应该用橡皮吸头或其他吸液装置。橡皮吸头应经常更换或消毒。

5. 所有人体和动物标本的操作都应在安全罩内进行,标本应放在可塑性、有吸收的台面上,实验完后消毒。任何含有毒物质的操作都应在通风柜内进行。

6. 工作台每次用完和一天工作结束后,都应用适当的消毒剂消毒(如用不低于 800mg/L 游离氯的溶液或 2% Wescodyme 或 Proviodine 的溶液)。

7. 所有物品再利用或处理以前,必须消毒。被污染物品

在运出实验室之前,必须装入防漏袋或容器密封。

8. 每次操作后和离开实验室之前,必须用肥皂洗手。

9. 为减少气溶胶的形成和扩散,所有操作必须小心进行。

10. 必须防止实验记录本和工作簿的污染。

11. 没有实验人员陪同,来访客不得进入实验室。

(二)工作中事故的处理

1. 用水冲洗伤口,并向实验室负责人或上级领导报告。

2. 实验材料溅入眼内时,用水或盐溶液清洗眼睛 10~15min,并向实验室负责人和上级领导报告。

3. 所有其他事故如:烧伤、腐蚀、针头扎伤等均应向实验室负责人或上级领导报告。

二、两种控制方法

对实验室环境和个人防护的最基本控制称为微生物学方法,实验人员尽可能地进行疫苗免疫和提供相应的实验设施。第二种控制或对实验室外部环境的保护,则是靠熟练的操作技术和恰当的装置。

有利于控制措施三个因素:微生物实验方法、生物安全设施和合理的装置。

(一)微生物实验方法

最重要的控制因素是微生物学中建立起来的完善的无菌技术。每个实验室都必须制订一个微生物学操作手册,明确潜在的危险因素,规定用于传染性病原和化学物质的操作过程和技术,从而将感染和中毒的危险降到最小。

良好的个人卫生在一个细致有效的保护计划中是关键的

一步。经常洗手和绝不使有害物质进入口和眼中,既简单实用,又对很多感染的侵袭构成有效的屏障。操作中戴口罩既减少了感染的危险,又降低了样品的污染。

所有液体不管是否有传染性必须用移液管或相应的移液装置操作。实验室中吸烟除了显而易见的危害外,还可使感染和中毒的危险性增高,应严格禁止。

工作中所有事故必须报告实验室主任,并作记录。

实验室工作台用后和每天工作完后必须消毒。800mg/L 的次氯酸钠和 2% 的 Wescodyme 对大多数微生物有效,应注意的是任何一种消毒剂其作用必须达到规定时间。2% 苯酚以前用于表面消毒,由于其有毒性,现在已不提倡使用,因其易被皮肤和呼吸及消化系统粘膜吸收。

工作服通常是传染性材料与我们衣服之间惟一的屏障,在所有微生物及化学制品的操作中,都必须穿戴工作服并系紧,但在实验室外则禁止穿着,在开会、喝咖啡、吃饭时应脱下。实验室发生包括气溶胶在内的事实时,必须更换工作服。

被污染的材料应进行消毒或安全处理。被证明有效的抗污染方法是加热和利用卤素制剂,最常用的是氯和碘,使用浓度为 100mg/L 或更高。加热消毒一般在 121℃/103kPa,进行 30min,但要进行更彻底的消毒则须 1h。

(二) 生物安全装置

生物安全装置包括层流罩(生物安全柜)及限制微生物的各种密闭容器,层流罩用于限制传染性气溶胶,有三种类型的生物安全柜,两种(I型,II型)前开门,过滤循环空气保护个人和环境。第三种(III型)完全密闭,提供最高程度的微生物控制。对少量有毒物质的操作,只需用化学罩把风抽到外面

即可。

个人防护生物安全装备还包括其他因素,如:手套、工作服、工作围裙、外科隔离服、鞋套、口罩、护目镜、防漏袋。

(三) 实验室规则

每一个国家,都是由医学研究权威机构制订实验室规则(如美国的疾病控制中心,加拿大医学研究委员会)。他们制定可执行的实验室规则,包括防微生物污染及微生物操作的设备,根据微生物固有的危险性,通常将防止微生物污染的控制分为四级。

三、实验室生物安全水平的标准

下面将美国疾病控制与预防中心(CDC)和美国国立卫生研究院(NIH)共同编写的四级生物安全水平的级别介绍如下:

(一) 一级生物安全水平(BSL-1)

一级生物安全水平适用于包括已知不引起健康成人疾病的,对实验室工作人员和环境可能有微弱危害的,有明确特征的微生物的研究。在建筑上,实验室不需要与一般的通道隔离。在进行标准微生物操作时,一般在开放式工作台上进行。不需要特殊的防护设备或设施。实验室工作人员在实验室操作程序上需要特殊培训,并由在微生物相关科学上有全面实践的专家监督。

以下标准和特殊的操作、安全设备和设施,适用于属于1级生物安全水平的微生物。

1. 标准微生物操作:

(1)当正在进行微生物培养和标本处理时,由实验室主任

决定限制或禁止进入实验室的人员。

(2)实验室工作人员处理感染性的材料和动物后以及离开实验室之前,要脱去手套并洗手。

(3)在可能暴露于感染性材料的工作区内,不许吃、喝、抽烟、处理隐形镜片和使用化妆品。在实验室里带隐形眼镜的工作人员也应带护目镜或面罩。食物应储藏在工作区外的柜子里,或储藏在仅为这一目的专用冰箱里。

(4)禁止用口吸移液管,要用机械加样器。

(5)为减少溅出物或气溶胶的产生,所有程序要小心谨慎操作。

(6)每天以及在任何感染性材料溅出后,工作台面至少消毒1次。

(7)所有培养物、菌种管和其他日常废弃物在抛弃之前,用适当的消毒方法消毒,例如高压灭菌。从实验室里拿出废弃物时,要放在一个耐用的、密闭的废物容器里。从实验室转移消毒材料之前,依照当地的规定包装。

(8)有效地控制昆虫和啮齿动物。

2. 安全设备(一级屏障):

(1)操作1级生物安全水平的微生物,一般不需要特殊防护器材和设备,如生物安全柜等。

(2)要求在实验室穿工作外衣、长服或制服,防止便服被污染和弄脏。

(3)如果手部皮肤有破损或皮疹,应该带手套。

(4)在操作可能有微生物溅出或其他有害材料飞溅到面部的操作,应该戴保护眼罩。

3. 实验室设施(二级屏障):

(1)每个实验室要有洗手池。

(2)实验室的设计要便于打扫。实验室不应该铺地毯,因为感染性材料一旦溅出后很难消毒。

(3)工作台面应不渗水,耐酸、耐碱、耐有机溶剂以及中等度耐热。

(4)实验室物品要固定存放位置,工作台、操作柜和设备之间要留有一定空间便于清扫。

(5)实验室如果有开着的窗户,要安装纱窗,防蚊、蝇等飞入。

(二)二级生物安全水平(BSL-2)

二级生物安全水平类似一级生物安全水平,适用于从事可能有中度危害的微生物研究的工作人员和环境。它的区别在于:①实验室工作人员在处理病原体方面要经过特殊的培训并由有经验的专家指导;②工作时限制人员进入;③对有污染的锐器采取高度防护措施;④可以产生感染性气溶胶或溅出物的操作要在生物安全柜或其他物理防护设备中进行。

以下标准、特殊的操作、安全设备和设施适用于属于二级生物安全水平的微生物。

1. 标准微生物操作:

(1)在进行实验时,由实验室主任决定限制和禁止进入实验室的人员。

(2)实验室工作人员在处理有感染性的材料和动物后,离开实验室之前,要脱去手套并洗手。

(3)工作区内,不许吃、喝、抽烟、处理隐形镜片和使用化妆品。在实验室里戴隐形眼镜的工作人员,也应带护目镜或面罩。食物应储藏在工作区外的柜子里或储藏在仅为这一目