脊髓灰質炎病毒的組織培养研究

M. И. 列維 著

赫守义 卢孝曾 譯

李河民 徐志一 胡宗汉 审校

人民卫生出版社

布鲁氏菌病病者的组織病理研究

[illegible]

[illegible]

內 容 提 要

本书綜述了脊髓灰質炎病毒的組織培养研究。重点介紹各种技术方法，从組織培养的准备工作直到比較复杂的最新技术的应用，都写得很系統、詳細，此外，在設备方面还介紹了一些簡便易行的办法。书中引証了大量文献，也介紹了作者自己的經驗。

本书可供专門进行脊髓灰質炎病毒研究的技术人員参考，亦可作为各研究所、卫生防疫站或医院檢驗室里的实际工作人員及初学病毒組織培养者的工作手册。

М. И. ДЕВИ
КУЛЬТУРА ТКАНИ
В ИЗУЧЕНИИ ПОЛИОМИЕЛИТА
Г. Ставрополь–1957

脊髓灰質炎病毒的組織培养研究

开本：787×1092/32　印張：5　插頁：5　字数：112千字

赫守义　卢孝曾　譯

人民卫生出版社出版
（北京書刊出版業营業許可證出字第〇四六號）
·北京崇文區鐵子胡同三十六號·

人民卫生出版社印刷厂印刷

新华书店科技发行所发行·各地新华书店經售

統一书号：14048·2472
定　价：0.80元

1961年5月第1版一第1次印刷
（北京版）印数：1—2,000

序　言

医学病毒学近年来才从微生物学中分出来，發展成为一門專門科学，它在不多的几十年間进展得很快。

病毒学的理論成果与实踐成就，在許多方面都是取决于探討及运用新的研究方法。在初期（从上世紀末叶到本世紀20年代）病毒学主要的研究方法是在易感动物体內进行实驗。在30年代运用了病毒鷄胎傳代的方法以后，病毒学的發展大大地向前推进了。但是，这兩种方法虽是經典的，不久就在很大程度上显得不够用了，因为有許多病毒，無論在实驗动物体內或鷄胚中都不能繁殖，当时，这許多病毒就沒有得到研究。

因此，創立組織培养方法来研究病毒，这是医学病毒学發展的新阶段，它大大地扩大了研究各种不同病毒的可能性。这种研究方法的發現，不仅使許多新的病毒的發現成为可能，而且还使这样一些重要問題得以解决，如迅速幷早期診断病毒性疾病以及获得新型（組織）的疫苗等。

目前組織培养已是病毒学的主要研究方法。因此任何一个病毒学实驗室都应采用此法。

提請讀者注意，М. И. Леви 氏編写的"脊髓灰質炎病毒的組織培养研究"，是一本有关該問題的研究报告的系統綜述，这些研究报告系分散在不經常易于得到的各种專門杂誌內。

此書对許多科学研究所及衞生防疫站病毒学实驗室的科学工作者或实际工作者無疑都是有益的。

苏联医学科学院通訊院士

В. М. Жданов，

序言
一、研究脊髓灰質炎病毒的历史 ……1
二、关于組織培养的概述 ……6
三、血漿 ……8
四、組織及其处理 ……10
五、天然培养基 ……13
1.鹽溶液(14) 2.血清及其代用品(18) 3.胚胎提出液(20)
4.抗菌素(22)
六、人工綜合培养液 ……22
1. 199号溶液(22) 2.MS 綜合培养基(32)
3. Eagle 氏人工綜合培养基(35)
七、气体环境 ……39
八、器皿的处理 ……40
九、現代組織培养方法 ……42
1.殘生組織培养方法(44) 2.血漿悬滴液体培养法(46) 3.轉管培养法(49) 4.胰蛋白酶消化培养法(57);(一)Dulbecco 氏法(60)(二)变色培养基法(68) 5.HeLa 細胞培养(73)
十、脊髓灰質炎病毒的細胞致病作用 ……82
十一、在組織培养中滴定脊髓灰質炎病毒的方法 ……93
十二、在組織培养中以免疫血清与脊髓灰質炎病毒进行的中和試驗 ……95
十三、用組織培养分离脊髓灰質炎病毒株 ……108
十四、用組織培养的抗原做补体結合試驗 ……116
十五、組織培养疫苗 ……122
1.福尔馬林灭活疫苗(123) 2.活毒疫苗(142)
十六、結語 ……149
附录 ……154
常用培养液表 ……154

此为试读,需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com

一、研究脊髓灰質炎病毒的历史

不久以前，人們是利用易感动物有規律地發病的方法，来进行病毒性疾病病原学的研究的。但在許多不能找到易感动物的情况下，这些疾病的病原学就不能闡明。

用动物試驗来研究动物所患的或人兽皆患的疾病的病原体，是極有成效的。某些实驗动物与病毒的自然感染宿主在分类学方面是接近的，因此，在实驗动物体內發生类似的症狀，就不足为奇。

例如，对于淋巴球脉絡叢腦膜炎来說，鼷鼠是此傳染病的自然保存宿主；由此可以理解，淋巴球脉絡叢腦膜炎病毒也可在小白鼠体內获得良好的繁殖条件。当然，就是采用了易感动物，重要的是还要选擇最好的感染方法，这种方法要使感染动物死亡或發病，以便于計算試驗結果。可以指出这样的一条一般規律——在实驗动物身上引起动物所患的或人兽皆患的疾病要比引起人类的疾病容易得多。虽然如此，我們还是知道有这样一些人类疾病，它們可以使动物發病（如流感）；然而有些病毒性的人类疾病却完全不能使实驗动物發病，或則仅能使分类关系与人很接近的猿猴發病。砂眼、麻疹、脊髓灰質炎、流行性肝炎等皆屬于此类疾病。脊髓灰質炎的研究在病毒学历史上曾起到很大作用，所以对此問題应該詳加叙述。

脊髓灰質炎很早就被人發現了。公元前1300年，孟菲斯地方月神（Аспарт）庙內的埃及壁画上，繪有东罗馬僧侶的画像，他脚像一只"馬蹄"——这就是脊髓灰質炎后遺症的特征。一般都提到希波格拉底，在他的叙述中有和脊髓灰質炎相似

的疾病。1840年 Heine 氏曾系統描述脊髓灰質炎的临床症狀。1891年 Medin 氏曾描述过 1887 年斯德哥尔摩城所發生的脊髓灰質炎爆發。有时就用这两位作者的名字將脊髓灰質炎称为 Heine-Medin 氏病。大家知道，1883 年在俄国的文献中有 Кожевников 氏对脊髓灰質炎的記述。近 10 年来世界各国脊髓灰質炎的發病率一直在增加，苏联也是同样。在美国过去几年，每十万人口的脊髓灰質炎發病率曾达到52—60例，而在許多欧洲国家則达 35—40 例。苏联 1955 年每十万人口的發病率不超过 3.6 例。脊髓灰質炎的病原学在很長时期一直是不清楚的。1908年 12 月 18日 Landsteiner、Popper 二氏，在維也納將患脊髓灰質炎致死的小孩的脊髓悬液感染猴子，使之發生脊髓灰質炎。猴子發热，并伴有弛緩性的四肢癱瘓。其后几年，这种發現在許多国家被証实，这样，脊髓灰質炎就成为实驗研究的对象了。当然由于用猴子来进行脊髓灰質炎的病原学、發病机制及流行病学的广泛研究，曾付出很大的代价。因此，許多研究者自然就試圖在其他动物机体內繁殖病毒。1939年 Armstrong 氏成功地將 Lansing 株脊髓灰質炎病毒，移植于实驗小动物的体內（棉鼠、小白鼠）。其后几年，証明只有某几株能适应于小白鼠，它們都屬于一个免疫型，以后被称为 Lansing 型。最近几年有人利用脊髓感染法而使其他免疫型的病毒株适应于小白鼠（108、109、110）。美国專門机構——美国小兒麻痺症基金会——在研究脊髓灰質炎方面起了重要的作用，此基金会在研究脊髓灰質炎的工作上每年平均約花去三千万美元(36、23)。

由于用猴子及小白鼠对脊髓灰質炎的各个方面进行了大力研究，人們發現了这一傳染病的一些最重要的規律性；我將談到其中对目前工作直接有关的部份。

不同株的脊髓灰質炎病毒有不同的抗原性，証明这点曾具有重大的意义(50,135,51)。

美国小兒麻痺症基金会在1948年建立了一个專門委員会，由美国各个实驗室的权威的病毒学家所組成。他們用統一的方法証明，脊髓灰質炎病毒有三型——第Ⅰ型(Brunhild)，第Ⅱ型(Lansing)及第Ⅲ型(Leon)。

苏联研究者 Чумаков 氏，Ворошилова 氏曾分离出 АБ株，此株与上述三型病毒均有区别，他們把它列为第Ⅳ型。

Чумаков 氏与 Ворошилова 氏在訪問美国时，曾將第Ⅳ型脊髓灰質炎病毒贈給美国的研究者，他們在初步試驗中确信第Ⅳ型病毒的抗原性与前三型有所区别。同时，Гард 氏(瑞典)發現，Ворошилова 贈他的第Ⅳ型病毒能使乳鼠致病，而免疫学方面和 Koxsackie A-1 型病毒相似。Sabin 氏發現第Ⅳ型病毒株可使猴子致病，并且其所引起的組織学的变化和其他各型脊髓灰質炎病毒株也沒有什么不同。在考慮了 Гард 氏的观察以后，Sabin 氏提出这样的推断：第Ⅳ型病毒株实际上是 Koxsackie 病毒和第Ⅰ、Ⅱ或Ⅲ型脊髓灰質炎病毒株的混合物。

由于病原体有显明的嗜神經性，脊髓灰質炎病毒引起脊髓和大腦(灰質)各个区域的損害，表現为癱瘓型的疾病。脊髓灰質炎病毒可随病人鼻咽粘液及粪便排出体外(31)，后者在傳播病毒方面的流行病学意义最大。但是，少数研究者，其中包括苏联卓越的流行病学家 Громашевский 氏(7)，却認为脊髓灰質炎病毒的主要傳播途徑是呼吸道。除了明显的癱瘓型脊髓灰質炎以外，已証明，还有頓挫性的非癱瘓型及無症狀型的脊髓灰質炎(31,52,25)。这些可以用1955年世界衛生組織所出版的"脊髓灰質炎"选集內的圖表来說明(圖1)。

某些种类的猴子——类人猿(黑猩猩)及狐猿(Macaca

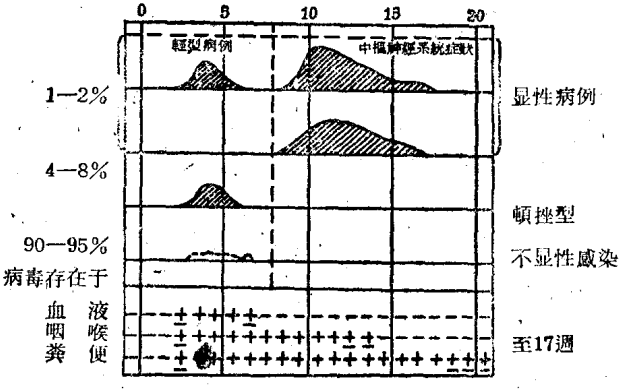

圖 1

cynomotgus)——在經口感染病毒后,表現出典型的症狀;这在很大程度上和人的情况相似。某些研究者發現病毒在人体內的繁殖有不同的阶段——腸道、血液及中樞神經系統,而病原体在血管內的繁殖阶段具有特殊的致病意义(52,90,55,91,53,32)。

患过显型或不显型脊髓灰質炎患者的血液中都有型特異性抗体增加,在实驗感染动物身上所引起的免疫是型特異性的,根据一些材料来看在人身上也如此。由于此病之不显性感染傳播甚广,所以極大多数成年人的血清中均含有此病毒的中和抗体。这些資料为以丙种球蛋白作脊髓灰質炎的特異性血清預防奠定了基础(55)。

人們曾用感染的猴腦組織制备疫苗,以各种化学劑剂(福尔馬林、蓖麻酸鈉及其他)使疫苗中的病毒灭活。此疫苗曾在人体試用过,但它不是沒有危險的(55)。

不能不指出，由于利用实验动物感染，首先是感染猴子，来研究脊髓灰質炎，已使病毒学获得巨大成就。但由于猴子的价值昂貴，人們就难于对脊髓灰質炎进行广泛的研究；因此，以往这方面的試驗只能在供应条件良好的实驗室中进行。

应該指出，病毒学曾度过一段方法学上的特别困难的时期，这点甚至到如今还能体会到。为了研究在人的病理学上具有重大意义的一些人类傳染病，病毒学上已知的一些方法显得不够用了；需要探求使病毒得以繁殖的条件。另外，在日程上出現了至今仍屬重要的任务——探求發現和鑑定病毒的方法。只有掌握可靠的、發現培养中的病毒的方法，才有可能深入地研究培养病毒的問題。因此，可以理解，由于这些問題的解决，病毒学确实得到了巨大的成就。

Enders 氏及其同事(40,31)在1949—1950年报告脊髓灰質炎病毒可以在人胚組織培养中培养，这个發現在科学上引起了根本的变化。他們發現，病毒不仅可以在含腦細胞的組織培养中生長，而且在非神經細胞組織中——皮膚、肌肉或腸道，亦可以培养。此外脊髓灰質炎病毒在組織培养上引起所謂"細胞致病"作用。当培养病毒时，不同組織的細胞呈現退化現象。病原体的这种性質就被用来發現病毒或測定抗体。

在这項發現以后数年內，人們發表了許多用人或猴的离体組織来培养病毒的卓越的研究工作。在討論所有这些研究时，不能不得出下列結論：这些工作是研究脊髓灰質炎方面突出的轉折点，其意义远远超出此病的范圍之外，它对某些其他人类傳染病的研究工作也产生了决定性的影响(33)。近几年来，組織培养方法發生了根本性的变化，現代化的方法不仅用于研究所內的病毒学实驗室，而且还用于临床檢驗室中。

例如莫斯科市衛生防疫站人員用組織培养方法分离出成百株脊髓灰質炎病毒。捷克斯洛伐克衛生防疫机構的实际工作同志們也获得了同样的成就。

在苏联文献中已有各种有关脊髓灰質炎的手册，最好的有 Чумаков、Присман 及Зацепин 等氏所写的"脊髓灰質炎"(1953)一書。

本書則試圖綜合其后在用組織培养来研究脊髓灰質炎病毒方面所發表的，相当大量的文献資料；我們特别重視影响培养成敗的各种方法的特点。此書中并沒有包括所有的有关文献，但直到1956年以前所發表的重要研究工作都可在本書中找到。

虽然本書主要是叙述文献資料，但某些細节問題及插圖材料則取自哈尔科夫 Мечников 疫苗血清研究所病毒科。

二、关于組織培养的概述

組織培养方法的發現是和美国胚胎学家 Harrison 氏的名字分不开的(29,40)，他曾提出悬滴法(1907年)。这方法后来被 Максимов 氏进一步發展和改进了。Carrel 氏及其同事在組織培养方面作了重大的貢献，他們將組織培养在特殊的容器中，被称为 Carrel 氏瓶。

还在20年代的时候，Carrel 氏首先用組織培养法培养了病毒——Rous 氏肉瘤的病原体。以后差不多所有已知的病毒都曾用組織培养研究过。Carrel 氏的方法是將組織培养在血漿凝固后所形成的固体塊上。这一方法曾被 John 及 Lewis 氏(40)所改良，他們提出使用轉管的方法；在試管內壁塗佈凝固血漿及組織塊。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

1928年 Maitland 及 Maitland 氏以及后来1930年李氏及 Rivers 氏所提出的殘生組織培养法，实际上就是把組織塊直接放在培养液里。

最近几年来出現了一些新的組織培养方法，至少在病毒学的实际应用方面，这些方法取代了老的方法。無血漿的組織培养方法在目前具有重要的意义，在这些方法中細胞利用玻璃作为黏附的固体。特别要提出的是 Dulbecco 氏單層細胞組織培养法。关于这种方法，我們在下面还要詳細的談到。

由 Scherer、Syverton 及 Gey 等氏所获得的人上皮腫瘤細胞—HeLa 細胞，在研究脊髓灰質炎方面起了莫大的作用。最近有人發表，正常胚胎細胞在液体培养中繁殖的試驗已告成功。

在研究組織培养所必需的营养物質方面也获得了相当大的成就。Parker 氏及其同事(134)提出了 199 綜合培养基，这在組織培养的人工綜合培养液問題上引起了極大的兴趣。

在俄罗斯有一些关于組織培养的手冊。然而，这些都相当陈旧了 (12, 29, 26, 39, 40, 22)。Н. Г. Хлопина 氏所著的"組織培养"，对病毒学者来說有極大的意义，再版这本書是会有好处的。Фадеев 氏 (27) 在学位論文中詳細地叙述了在 Carrel 氏瓶中进行組織培养的技术。

这个問題，在 Шубладзе 及 Гайдавомич 氏(39)的手冊中以及 Зильбер 氏(13)所著的書中，也曾談到，但不如上述著作詳尽。

Carrel 氏將組織培养分成四个組成部份：1)凝固血漿，2)組織塊，3)培养基，4)上面的气体部份。有时候將組織培养分成液体及固体部份。

三、血 · 浆

現在大家都認識到，血漿並不是供生長的細胞作营养用的，它的主要作用是供組織塊作凝固的附着处。

在組織塊周圍漸漸地長出新細胞，同时还有成纖維細胞或其他組織成份游走移动。以前不久还認为：若無凝固血漿作为固体基础，則組織根本不可能生長。然而，現在的資料却証明，細胞可以在液体培养中直接生長在玻璃上。一般常用鷄胚提出物来凝固鷄血漿，作为固体部份。其他种类的血漿（如人、兎或其他动物）用得極少。人們曾注意到，被抽取血漿的动物越年輕，細胞的生長就越旺盛(12)。

用塗石蜡的沉淀管制备血漿。为此，先在干淨的沉淀管中加入約0.5毫升融化的石蜡，並用棉塞塞好，直立放置，进行高压灭菌。然后將此帶有石蜡的热沉淀管包在毛巾中，几乎按水平位来慢慢地旋轉，使之冷却，液体石蜡不要与塞子接触。这样石蜡即可均匀地塗佈并凝固在沉淀管的內壁上。

为防止鷄血凝固，可使用1:500的肝素。肝素溶液的配制法如下：称取定量粉末狀的肝素，用所需量的生理鹽水稀釋，並按1毫升量分裝在安瓿內，然后进行高压灭菌。在每个裝有5—6毫升的塗有石蜡的試管中按1毫升血加一滴肝素之比，加入5—6滴肝素。

取鷄血漿之方法如下：將5—10毫升的帶長針头的注射器（最好是路耳氏注射器），在蒸餾水中煮沸，然后用無菌生理鹽水洗滌。由助手將公鷄或母鷄之背部固定。將它的左胸部龙骨旁边的羽毛拔淨，擦以酒精。术者之手也应擦酒精。然后測定心跳位置，將針头从肋間隙插入此处。心臟收縮的这种特

殊冲动很容易被拿着注射器的手所察覚。当注射器中采滿5毫升血时，將針头取下，靠近火焰注入石蜡試管中。此时助手先將拿去塞子的試管靠近火焰，当注入血液后，仍靠近火焰塞上塞子，並將此試管垂直放在双掌中迅速轉动。一般每只鷄可抽30—40毫升血液，事后最好在其皮下注入30—40毫升生理鹽水。裝血液的石蜡試管放在冰箱中过夜，然后进行离心沉淀，將血漿完全分离出来。此血漿分注于另一些無菌試管內，放入冰箱內保存。許多研究者不用心臟采血的方法，而直接切开頸靜脉采血。血漿也可用冷冻眞空干燥法保存于安瓿中。干燥血漿用蒸餾水稀釋。有些研究者利用穿孔玻璃紙，纖維素或琼脂来代替血漿。在組織培养过程中，組織塊周圍会發生血漿溶解的現象，細胞生長得愈旺盛，这种現象發生得愈早。Ledinko、Rishdan、Melinck(118)及 Robbins(153)、Enders、Weller 等氏誤認为这是血清的作用。血漿的溶解是由于組織迅速生長的結果。某些研究者認为在营养液中加入一定量的牛白蛋白或大豆胰蛋白酶抑制素（在培养基中終濃度达0.05毫克%时即具預防作用(142)）就能防止血漿溶解。使用后者是不适当的，因为在这些地方显著地破坏了生長区的結構，同时也影响了細胞成份之間的联系。在那些已經發生血漿溶解的試管中可采取所謂“填补”的措施；即在老的血漿凝固物上或仅在有溶解之处加入新的血漿和鷄胚提取液。在“填补”之前应將液体吸出。应当强調指出，所有这些組織培养操作都应在严格的無菌条件下进行。

四、組織及其处理

可采用各种不同的組織来培养脊髓灰質炎病毒，但是在所有情况下都是采用人、猴以及对脊髓灰質炎有自然感受性的生物的組織。往往都是用猴的腎臟、精子及睾丸組織，用腎組織培养此病毒时可获最高滴度。Salk 氏（169）曾在各种不同組織的轉管培养中滴定病毒。

不同猴組織培养物的感染滴度（$TCID_{50}$）

組織	組織感染后的天数						
	2	6	10	13	16	22	26
腎	6.0*	5.5	5.0	2.5	3.5	2.5	2.5
睾丸	4.0	3.5	3.0	2.5	3.5	3.5	3.0
肌肉	2.5	3.0	2.5	2.0	2.5	2.0	2.5
肝	2.0	0.1	0	0	0	0	0

* 示 TCID50（能在50% 組織培养中引起細胞致病作用的病毒感染量）之反对数。

現在常采用猴腎組織来滴定並增殖脊髓灰質炎病毒（如生产疫苗）。有时也用睾丸組織来滴定，在这种組織塊上可長出很大的成纖維細胞生長区；适于用以探查細胞致病作用。猴腎及睾丸应以严格無菌手术摘取。

在人的組織中可用人胚及成人的組織来培养脊髓灰質炎病毒。至于胚胎組織，一般常用腎、皮膚、肺，有时还用肌肉、腦、腸以及羊膜細胞。在子宫黏膜及胎盤組織中病毒是不繁殖的（132）。正如 Evans、Chambers、Smith 及 Byatt 等氏（73）

所指出的那样，脊髓灰質炎病毒在狐猿睾丸組織上發育得很好，但在 Macaca Rhesus 猴睾丸組織上却不能發育。在狐猿腸組織培养中病毒能很好地繁殖，在膀胱組織中較差。在心肌組織及横紋肌組織培养中观察不到病毒的繁殖。脊髓灰質炎病毒在小白鼠、豚鼠、家兎、狗、雪貂中的睾丸組織中不能繁殖。在X射綫照射过的小白鼠或注射过皮質素的雪貂的睾丸內接种病毒，都不能改变培养結果。

实驗室中的人胚組織系取自人工流产的胎兒或产妇之胎盤。后者先放在無菌盒中，再由此移入無菌皿內。应在無菌罩（無菌室）內擇取人工刮出的胎兒，將胚胎組織上的血塊以及子宮黏膜碎片除去。

在用成年人的組織时，通常是使用睾丸、皮膚、腎臟、扁桃体。睾丸是在病人患不宜动手术的前列腺癌时所获得，腎臟是因結核病而施行手术或者人死后經过几小时而获得的。皮膚通常是摘除龟头包皮时所获得的。近年来广泛地推广了在人的惡性癌—HeLa 株細胞上培养脊髓灰質炎病毒的方法。

有时当組織並不立即使用时，則將它放在專門的鹽溶液內，保存在冰箱中。

保存組織用的鹽溶液与营养液中的鹽溶液相同，关于这些溶液，下边还要談到。組織塊能够在冷处保存3—4天，但据 Syverton 及 Scherer 氏的資料(192)，組織在冷处保存7天，以后仍具有生長能力。

用剪刀或用剃刀剪碎組織塊。第一种办法是將組織放在含足够濃度的抗菌素鹽溶液中，再用剪刀將組織剪碎成为1—2毫米直徑的組織塊。第二种办法是將組織放在平皿中，該平皿中加上数滴鹽溶液，並用眼科手术刀的末端將粉狀的抗菌素（青霉素及鏈霉素）加入此平皿中。用配安氏鉗从乙醚中

取出半張保險刀片(一張刀片可斜折成兩塊)(圖2),將它放在酒精中。此刀片經灼燒后即可使用。

圖 2 用以切碎組織塊的刀片

用夾好的刀片按不同的方向迅速切碎組織塊。操作时間要依組織塊切碎的程度而定。因为切碎过程是在开着的平皿中进行的,所以我們在这个程序中加了很濃的抗菌素(每毫升1—5千單位)。随后連續用鹽水在离心沉淀管中將它洗滌三次,並除去血液夾杂物及剩余的抗菌素。

用于洗滌組織之溶液介紹如下:

1. 溶液Z_2(Simms及Sanders)

I.	每升含量(克)
NaCl	8.0
KCl	0.2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.147
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.203
II.	
Na_2HPO_4	0.19
NaH_2PO_4	0.021
葡萄糖	1.0

蒸餾水加足到一升。

I 及 II 部分的溶液分开进行高压蒸汽灭菌。

2. 磷酸鹽緩冲溶液(Dulbecco 氏及 Fogt 氏)

(甲)NaCl 8.0 克 (乙) $CaCl_2$ 0.1 克

KCl 0.2 克 蒸餾水加至100毫升。

此为试读,需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com