

病毒学实验诊断技术

资料专辑



江西省科学技术情报研究所

病毒学实验诊断技术

戴华生 编译

江西省科学技术情报研究所

前 言

为适应我国社会主义现代化建设,发展医药卫生事业与防治病毒性疾病(人类与动物)的需要,我们组织了戴华生同志等编译了这本《病毒学实验诊断技术》资料专辑,以供有关病毒学工作者、卫生防疫人员、临床医师、兽医人员及教学、科研人员参考。

资料内容是以国内外目前先进实验技术为基础,参考David Freifelder的Applications to Biochemistry and Molecular Biology, Robert J. Kuchler的Biochemical Methods in cell culture and virology, Edwin H. Lennette等的Diagnostic procedures For viral and Rickettsial infections, Frank Fenner 的 Medical Virology, 东升的新ウイルス学, 小酒井望的微生物检查, 松井千秋のウイルス图监等几本关于病毒学理论和实验技术的较近版本以及最近世界卫生组织讲学组推荐的酶标记免疫技术资料文献编译而成。

本资料专辑共分三十九章。前十一章为各种基本方法,包括病毒的基本特性与传染免疫、病毒实验常用技术,如光学显微镜检查、电子显微镜技术、组织培养技术、分子生物学实验技术、免疫化学技术、细胞免疫实验、酶标记免疫技术、免疫荧光技术、鸡胚培养法、动物实验法等;后二十八章收载主要病毒的诊断方法,如腺病毒属、疱疹病毒属、痘病毒属、肠道病毒属、鼻病毒属、虫媒病毒属、正粘病毒属、副粘病毒属、日冕形病毒属、呼肠孤病毒属、弹状病毒属、嵌沙样病毒属、其它病毒属等,诊断程序比较简明实用。综合了一九七九年以

前病毒学实验技术的基本成就和发展趋势。

本资料在编译工作中，承湖北病毒研究所所长向近敏教授、江西中医学院潘达鑫系主任、省科学院吴国琛同志等审核，江西医学院易煌副教授、施中贤讲师，卫生部生物制品检定所王太江教授、省兽医防检站李承开主任，省医学科学研究所王宝山等同志提供资料，摘译、审校，以及有关单位领导同志的热情支持与鼓励，在此深表感谢。

由于我们水平有限，在编译工作上可能还存在不少缺点和错误，敬希同志们批评指正。

江西省科学技术情报研究所

一九七九年十月

目 录

第一章 病毒的基本特性与传染免疫	(1)
一、病毒的大小和形态.....	(2)
二、病毒的结构与化学组成.....	(3)
三、病毒的寄生性与繁殖过程.....	(4)
四、病毒的遗传与变异.....	(5)
五、病毒的传染与免疫.....	(5)
六、病毒的抵抗力.....	(10)
七、病毒的分类.....	(12)
第二章 病毒学实验诊断常用技术	(17)
一、概述.....	(17)
二、实验室注意事项.....	(17)
三、常用洗涤、消毒和处理方法.....	(18)
四、光学显微镜技术.....	(20)
五、滤器及其使用.....	(22)
六、标本收集、运送和保存.....	(26)
七、病毒分离.....	(30)
八、病毒鉴定.....	(31)
九、病毒的滴定及其应用.....	(36)
十、血清学诊断.....	(42)
十一、病毒快速诊断.....	(47)
第三章 电子显微镜技术	(50)
一、电子显微镜.....	(50)
二、电子显微镜技术在病毒学中的应用.....	(55)

(一) 标本支持膜与超薄切片·····	(55)
(二) 负染色技术·····	(62)
(三) 投影技术(真空喷镀)·····	(63)
(四) 复型法·····	(64)
(五) 背散射扫描·····	(65)
(六) 免疫电显技术·····	(65)
(七) 酶标记免疫电镜·····	(72)
(八) 放射自显影技术·····	(74)
(九) 冰冻蚀刻技术·····	(75)
(十) 核酸分子的观察·····	(75)
第四章 组织培养技术·····	(77)
一、病毒学诊断中使用细胞培养的种类·····	(78)
二、在细胞培养中测定病毒的繁殖·····	(80)
三、体外细胞培养物的制备·····	(83)
(一) 培养液·····	(83)
(二) 新鲜组织的处理与贮存·····	(90)
(三) 细胞分散技术·····	(91)
(四) 细胞计数·····	(97)
(五) 各种细胞培养物的制备·····	(97)
1. 人源细胞·····	(97)
2. 猴源细胞·····	(117)
3. 啮齿类源细胞·····	(120)
4. 鸡胚细胞·····	(122)
四、用细胞培养物分离病毒·····	(124)
(一) 接种标本之处理·····	(124)
(二) 病毒培养物的孵育·····	(125)
(三) 在组织培养中病毒作用的识别·····	(132)
五、在单层细胞上滴定病毒的TCD ₅₀ 终点·····	(133)

六、病毒蚀斑技术.....	(134)
七、组织培养系统中的中和试验.....	(141)
八、组织培养制备血清学抗原.....	(153)
九、细胞培养物的保存、贮藏及运输.....	(160)
十、细胞培养物中的支原体污染.....	(163)
(一) 细胞培养物中支原体的检查.....	(164)
1. 培养基.....	(164)
2. 分离培养.....	(165)
3. 检查支原体集落.....	(166)
4. 支原体的移种.....	(167)
(二) 防止支原体污染细胞培养物.....	(167)
(三) 从细胞培养物中清除支原体.....	(167)
十一、组织培养设备和试剂.....	(169)
(一) 玻璃器皿.....	(169)
(二) 塑料培养瓶.....	(171)
(三) 橡皮类.....	(171)
(四) 杂项.....	(171)
十二、附录.....	(173)
(一) 培养液和试剂.....	(173)
1. 抗菌素和抗霉素溶液.....	(173)
2. 平衡盐溶液及缓冲盐溶液.....	(174)
(1) Earle 平衡盐溶液.....	(174)
(2) Hanks 平衡盐溶液.....	(174)
(3) 磷酸盐缓冲液.....	(175)
(4) PH7.5 磷酸盐缓冲液.....	(175)
(5) 无钙、镁离子的磷酸盐缓冲液.....	(176)
(6) Puck 盐水.....	(176)
3. 缓冲溶液—碳酸氢钠.....	(176)

4. 细胞分散剂.....	(177)
5. 50% 鸡胚浸液.....	(177)
6. 指示剂及染色液.....	(177)
7. 营养培养液.....	(178)
(1) Eagles最低必要成分培养液 (MEM)	(178)
(2) 水解乳白蛋白—酵母浸液培 养液.....	(182)
(3) Leibvitz-15号培养液(L-15) ...	(182)
(4) 199 培养液	(184)
(5) RPMI1640 培养液.....	(191)
8. 营养液.....	(194)
(1) 20% 葡萄糖.....	(194)
(2) 5% 水解乳白蛋白生理盐水	(194)
9. 血清.....	(194)
(二) 培养液的除菌过滤.....	(194)
第五章 分子生物学实验技术.....	(196)
第一节 病毒的提纯.....	(196)
一、病毒提纯一般原则.....	(196)
二、物理提纯法.....	(197)
三、化学提纯法.....	(201)
四、血清学提纯法.....	(204)
五、电泳提纯法.....	(204)
六、液体两相分配系统法.....	(204)
第二节 病毒的大小及其分子量的测定.....	(205)
一、超速离心沉淀法.....	(205)
二、微孔薄膜过滤法.....	(208)
第三节 细胞成分的分离提纯.....	(211)

一、收集细胞·····	(211)
二、细胞粉碎方法·····	(212)
三、细胞成分分离·····	(212)
四、离心分离法·····	(212)
五、细胞成分提取法·····	(212)
六、线粒体、溶酶体、微粒体的精制·····	(214)
七、无菌染色体的分离·····	(217)
八、细胞核和染色质的制备·····	(217)
九、病毒感染所致染色体畸变与体外培养 制备染色体标本·····	(219)
第四节 病毒核酸亚单位的分离与测定·····	(224)
一、病毒 DNA 的分离和测定·····	(224)
二、病毒 RNA 的分离和测定·····	(227)
第五节 病毒蛋白质亚单位的分离和测定·····	(232)
一、病毒蛋白质亚单位的分离·····	(232)
二、病毒蛋白质的测定·····	(233)
第六节 核酸分子杂交·····	(234)
一、概述·····	(234)
二、意义·····	(235)
三、核酸的分离提取·····	(237)
四、核酸分子杂交方法·····	(241)
第七节 RNA-DNA 分子杂交法对病毒诊断 的应用·····	(243)
一、基本原理·····	(244)
二、材料·····	(245)
三、原位杂交方法·····	(246)
四、结果·····	(247)
第八节 病毒的遗传变异·····	(248)

一、变异剂与诱异变异.....	(248)
二、温度敏感性变异株的分离和鉴定.....	(251)
第六章 病毒免疫化学技术.....	(256)
第一节 免疫球蛋白的分离和提纯.....	(256)
一、概述.....	(256)
二、IgG 的提取.....	(256)
三、分泌IgA 的提取.....	(260)
四、IgM 的提取.....	(261)
五、IgE 的提取.....	(262)
六、连续提取免疫球蛋白法.....	(264)
第二节 凝胶过滤与离子交换层析法.....	(265)
一、凝胶过滤.....	(265)
二、离子交换层析法.....	(269)
第三节 亲和层析纯化法.....	(272)
第四节 盘状电泳.....	(276)
第五节 醋酸纤维膜电泳.....	(284)
第六节 免疫球蛋白的鉴定.....	(287)
第七章 细胞免疫实验.....	(291)
第一节 白细胞的吞噬功能测定.....	(291)
第二节 淋巴细胞有关的实验方法.....	(293)
第三节 淋巴素实验法.....	(299)
第八章 免疫荧光技术.....	(305)
一、荧光显微镜.....	(305)
二、免疫荧光技术程序.....	(307)
三、免疫荧光试剂制备.....	(308)
1. 荧光素.....	(310)
2. 免疫球蛋白的提取.....	(310)
3. 荧光素标记抗体方法.....	(310)

4. 去除非特异性荧光染色的方法	(312)
四、荧光抗体染色法	(314)
五、荧光显微镜检查	(337)
六、荧光分带技术	(337)
第九章 酶标记免疫技术	(342)
一、概述	(342)
二、原理与分类	(343)
(一) 不均一酶标记免疫试验	(344)
(二) 均一酶标记免疫试验	(348)
三、器材与试剂	(349)
(一) 固相载体	(349)
(二) 抗原	(351)
(三) 抗体	(351)
(四) 抗原结合片段(Fab)的制备	(352)
(五) 血清(样品)	(352)
(六) 洗涤液	(352)
(七) 酶	(353)
(八) 酶结合物制备	(354)
(九) 底物	(362)
(十) 间接法测定抗体所需的器材与试剂	(364)
四、酶标记免疫试验方法	(366)
(一) 均一酶标记免疫试验	(366)
(二) 不均一酶标记免疫试验	(366)
(三) 预备试验	(368)
1. 酶结合物最适浓度测定	(368)
2. 抗原最适浓度测定	(368)
3. 底物最适时间测定	(369)
(四) 正式试验	(370)

1. 间接法检测抗体·····	(370)
2. 双抗体夹心法检测抗原·····	(371)
3. 酶标记抗原竞争法检测抗原·····	(373)
4. 竞争性酶标记免疫试验检测抗原·····	(373)
5. 特定抗原基质球(DASS)法·····	(374)
6. 酶标记免疫组织抗原定位法·····	(379)
7. 无标记抗体酶(NLAbE)法·····	(381)
8. 可溶性酶—抗酶复合物(PAP)法·····	(381)
9. 四步抗体法·····	(383)
10. 组织固定法·····	(383)
11. 免疫球蛋白桥免疫显色法·····	(387)
12. 可溶性酶—抗酶显色法·····	(388)
五、在病毒学中的应用·····	(389)
第十章 鸡胚培养法 ·····	(390)
一、具材·····	(390)
二、鸡卵的选择与孵育·····	(390)
三、接种与收获·····	(391)
(一) 绒毛尿囊膜接种法·····	(393)
(二) 尿囊腔接种法·····	(393)
(三) 卵黄囊接种法·····	(394)
(四) 羊膜腔接种法·····	(395)
第十一章 动物实验法 ·····	(396)
一、动物接种法·····	(396)
(一) 皮内接种·····	(396)
(二) 皮下接种·····	(396)
(三) 腹腔接种·····	(396)
(四) 脑内接种·····	(397)
(五) 静脉接种·····	(397)

(六) 鼻腔接种.....	(398)
二、动物采血法.....	(398)
(一) 心脏采血.....	(398)
(二) 羊颈外静脉采血.....	(399)
(三) 颈动脉放血.....	(399)
三、动物解剖法.....	(399)
腺病毒属	(400)
第十二章 腺病毒	(403)
一、概述.....	(403)
二、诊断程序.....	(404)
三、标本采取与处理.....	(404)
四、免疫荧光快速诊断.....	(404)
五、病毒分离.....	(405)
六、病毒鉴定.....	(405)
七、血清学诊断.....	(411)
八、诊断要点.....	(411)
疱疹病毒属	(411)
第十三章 单纯疱疹病毒	(413)
一、概述.....	(413)
二、诊断程序.....	(413)
三、标本采取与处理.....	(414)
四、免疫荧光快速诊断.....	(414)
五、酶标记免疫试验.....	(415)
六、病毒分离.....	(416)
七、病毒鉴定.....	(417)
八、血清学诊断.....	(419)
九、诊断要点.....	(420)
第十四章 水痘——带状疱疹病毒	(421)

一、概述	(421)
二、诊断方法	(421)
(一) 标本采取与处理	(421)
(二) 显微镜检查	(422)
(三) 免疫荧光快速诊断	(423)
(四) 酶标记免疫试验	(423)
(五) 病毒分离	(424)
(六) 病毒鉴定	(424)
(七) 血清学诊断	(424)
三、诊断要点	(425)
第十五章 巨细胞病毒	(427)
一、概述	(427)
二、诊断方法	(428)
(一) 标本采取与处理	(428)
(二) 临床标本直接观察	(428)
(三) 病毒分离	(429)
(四) 病毒鉴定	(430)
(五) 酶标记免疫试验	(433)
三、血清学诊断	(434)
四、诊断要点	(436)
第十六章 EB 病毒	(438)
一、概述	(438)
二、诊断方法	(438)
(一) 病毒分离	(438)
(二) EBV 感染引起的细胞转化	(439)
(三) EBV 持续感染细胞株的建立	(440)
(四) EBV 基因组在细胞内的存在形式	(441)
(五) EBV 的定量法	(442)

(六) 免疫荧光试验.....	(443)
(七) 酶标记免疫试验.....	(444)
(八) 嗜异性凝集试验.....	(445)
(九) 血清学诊断.....	(446)
三、诊断要点.....	(447)
痘病毒属	(448)
第十七章 天花病毒与痘苗病毒	(450)
一、概述.....	(450)
二、诊断程序.....	(450)
三、标本采取与运送.....	(451)
四、显微镜检查.....	(452)
五、病毒分离与鉴定.....	(453)
(一) 鸡胚绒毛尿囊膜接种.....	(453)
(二) 组织培养分离法.....	(454)
(三) 动物接种分离法.....	(454)
六、血清学诊断.....	(454)
(一) 补体结合试验.....	(454)
(二) 血凝抑制试验.....	(454)
(三) 絮状沉淀试验.....	(456)
(四) 酶标记免疫试验.....	(457)
七、诊断要点.....	(458)
肠道病毒属	(458)
第十八章 脊髓灰质炎病毒	(462)
一、概述.....	(462)
二、标本采取与处理.....	(462)
三、免疫荧光快速诊断.....	(463)
四、酶标记免疫试验.....	(464)
五、病毒分离.....	(465)

六、病毒鉴定·····	(466)
七、诊断要点·····	(473)
第十九章 柯赛基病毒 ·····	(474)
一、概述·····	(474)
二、病毒分离·····	(474)
三、病毒鉴定·····	(476)
四、血清学诊断·····	(476)
五、诊断要点·····	(477)
第二十章 艾可病毒 ·····	(479)
一、概述·····	(479)
二、病毒分离·····	(479)
三、病毒鉴定·····	(479)
四、诊断要点·····	(481)
鼻病毒属 ·····	(482)
第二十一章 鼻病毒 ·····	(482)
一、概述·····	(482)
二、标本采取与处理·····	(482)
三、病毒分离·····	(482)
四、病毒鉴定·····	(484)
(一) 中和试验·····	(484)
(二) 补体结合试验·····	(485)
(三) 生物学特性测定·····	(486)
(四) 酶标记免疫试验·····	(488)
五、诊断要点·····	(488)
第二十二章 口蹄疫病毒 ·····	(490)
一、概述·····	(490)
二、病毒分离与鉴定·····	(490)
三、血清学诊断·····	(491)

虫媒病毒属.....	(492)
第二十三章 流行性乙型脑炎病毒	(495)
一、概述.....	(495)
二、诊断程序.....	(496)
三、标本采取与处理.....	(496)
四、免疫荧光快速诊断.....	(498)
五、酶标记免疫试验.....	(499)
六、病毒分离.....	(499)
七、病毒鉴定.....	(501)
八、血清学诊断.....	(501)
九、诊断要点.....	(515)
第二十四章 森林脑炎病毒	(516)
一、概述.....	(516)
二、病毒分离与鉴定.....	(516)
三、血清学诊断.....	(517)
四、诊断要点.....	(517)
第二十五章 流行性出血热病毒	(518)
一、概述.....	(518)
二、病毒分离与鉴定.....	(519)
三、血清学诊断.....	(520)
正粘病毒属	(521)
第二十六章 流行性感冒病毒	(522)
一、概述.....	(522)
二、流感病毒的结构、抗原成分与功能.....	(522)
三、流感病毒的命名.....	(524)
四、诊断程序.....	(526)
五、标本采取与处理.....	(526)
六、免疫荧光快速诊断.....	(527)