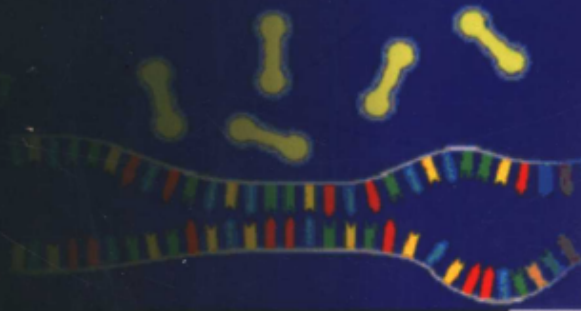


SARS GUAN ZHUANG BING DU
FEN ZI SHENG WU XUE

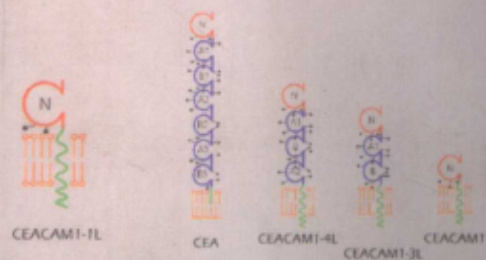
SARS

SARS GUAN ZHUANG BING DU FEN ZI SHENG WU XUE

冠状病毒分子生物学



主编 杨光 谭家驹



African green monkey
CEA family
CEACAM subgroup

Human CEA family, CEACAM subgroup

Legend: N-glycosylation sites, 4 x 20 amino acids, GPI anchor in lipid bilayer

中国医药科技出版社

SARS冠状病毒分子生物学

SARS GUAN ZHUANG BING DU
FEN ZI SHENG WU XUE

责任编辑 于海平
封面设计 王 军

ISBN 7-5067-3254-8



9 787506 732543 >

ISBN 7-5067-3254-8

定价: 32.00元

SARS 冠状病毒分子生物学

主 编	杨 光	谭家驹		
副主编	崔金环	汤丽霞	陈 姝	龚道元
编 者	司建华	梁彩虹	曾劲伟	苏锡康
	张晓林	刘爱平	甘春葆	

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书着重从病毒分子生物学的角度,全面阐述了 SARS 冠状病毒的鉴定过程、分子生物学特征、实验室诊断、分子生物治疗、疫苗的研究进展以及与之相关的生物信息技术、实验室生物安全等,突出分子生物学技术在 SARS 相关研究中的应用。本书适用于广大临床医务人员、卫生防疫人员、从事相关研究的科研工作者以及医学高等院校的学生参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

SARS 冠状病毒分子生物学/杨光,谭家驹主编. —北京:中国医药科技出版社, 2005.9

ISBN 7-5067-3254-8

I.S... II.①杨... ②谭... III.重症呼吸综合征-日冕形病毒-分子生物学 IV.R373.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 106650 号

美术编辑 陈君杞

责任校对 张学军

版式设计 程 明

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100088

电话 010-62244206

网址 www.mpsky.com.cn

规格 787×1092mm^{1/16}

印张 10 1/4

字数 228 千字

版次 2006 年 1 月第 1 版

印次 2006 年 1 月第 1 次印刷

印刷 世界知识印刷厂

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 7-5067-3254-8/R·2704

定价 32.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

序

2002 年底，一种原因不明的肺炎突袭广东省，迅速蔓延至我国多个省市以及世界 30 几个国家和地区，它容易引起呼吸衰竭，严重者可以导致死亡，对人民生命健康造成严重的威胁，对社会的正常交往和经济造成严重的影响。世界卫生组织（WHO）将其命名为严重急性呼吸综合征（severe acute respiratory syndrome, SARS）。

2003 年 4 月加拿大与美国科学家从 SARS 患者体中分离出一种新型冠状病毒，随后这种冠状病毒被证实就是引起 SARS 的病原体，并被命名为 SARS 冠状病毒。对病原体的认识，是防治感染性疾病的重要基础。从近代医学病原学研究发展史来看，甲、乙型肝炎病毒从人们对疾病的认识到病原体的发现及其核酸序列的克隆用了近 30 年的时间，从人们对非甲非乙型肝炎的认识到了丙、戊等肝炎病原体基因组序列的克隆用了近 20 年的时间。人们对新型病原体的检出能力随着分子生物学手段的进步在快速地提高。SARS 从疾病的出现到病原体发现仅用了半年左右的时间，而且 SARS 基因序列的确定为临床上进行病原学诊断奠定了基础。可见，现代分子生物学技术和生物信息技术在 SARS 病原学研究，乃至临床诊断中，发挥了极其重要的作用。

杨光、谭家驹等编写的《SARS 冠状病毒分子生物学》一书，从病毒分子生物学的角度，较全面概述了 SARS 冠状病毒分子生物学特征，临床诊断中的应用，分子生物治疗和疫苗研究的进展和未来的发展方向。这一书的出版，展现出现代分子生物学技术在感染性疾病临床防治中的重要价值，无疑是从事 SARS 研究和临床防治工作者有价值的参考书。同时它也为其他呼吸系统感染性疾病（如禽流感）提供借鉴。

我殷切期盼这一书的正式出版。

钟南山

前 言

2002年11月下旬,在我国广东部分地区相继出现病因不明的肺炎病例,疫情由开始的散发逐步演变为暴发流行,在短短的半年内波及全球三十多个国家。至2003年6月24日,疫情基本得到控制时,全球累计报告SARS病例8458例,死亡807例。这种被我国专家最初称为传染性非典型性肺炎(atypical pneumonia, AP),俗称“非典”、后被世界卫生组织命名为“严重急性呼吸道综合征”(severe acute respiratory syndrome, SARS)的新发传染病,一时成为人类进入21世纪后遇到的来自公共卫生领域最严重的挑战。

作为收治第一例SARS患者的医院,广东省佛山市第一人民医院在广大医务工作者的共同努力下,创造了无一例非典患者死亡、无一例医务人员感染、无一例院内交叉感染的“三无”佳绩,实现了工厂无停工、学校无停课、服务无停业的“三无”效果,为佛山的社会、政治、经济三稳定做出了贡献。作为收治第一例SARS患者所在医院的医务工作者,与国内众多同行一样,我们不仅经受了SARS这种前所未有的传染病灾难的考验,也深深体会到有义务将全球在SARS战役中积累的经验 and 取得的科研成果作一整理。

从疫情暴发到成功分离鉴定出引起SARS的病原体——SARS冠状病毒,并破译其基因组序列,所用时间仅仅为两个多月,而在20多年前,研究人员在寻找艾滋病的病原体HIV病毒时用了两年多时间,随后又花费几年时间才获得其核苷酸序列。从来也没有哪一个新发传染病在如此短的时间里取得如此举世瞩目的成绩,这无疑归功于现代分子生物学等先进技术的应用,以及全球生物信息的共享与协作等。于是我们便有了《SARS冠状病毒分子生物学》一书的构想。目前有关SARS的书籍均侧重于SARS的临床特点与临床治疗,而本书主要从分子生物学的角度,阐述SARS冠状病毒的分子生物学特征,并对分子生物学技术在SARS临床诊断、治疗以及预防中的应用等方面作了较系统全面的总结、概括与展望。我们衷心地期望该书出版后能对进行SARS研究与防治的科研工作者、临床医务工作者以及广大读者有所帮助,并对其他新发传染病的研究提供借鉴,成为有价值的工具书、参考书。

《SARS冠状病毒分子生物学》一书,是由数名佛山市第一人民医院的医务工作者以及佛山科学技术学院医学院的教师在参阅了国内外发表的大量SARS相关文献,并结合在该领域的工作积累,历时一年完成。由于目前SARS研究还在逐步的深入并不断取得进展,发表的文献也与日俱增,加之编写时间仓促以及水平与经验的局限,不足之处在所难免,期盼同行专家与广大读者不吝指正。

在本书的编写过程中得到了广州医学院附属第一医院呼吸疾病研究所所长、SARS研究专家、中国工程院院士钟南山先生的积极支持与指导,在此向他表示由衷的感谢!

编 者

2005年9月

作者简介



杨光(1960~) 留法医学博士, 佛山市第一人民医院临床医学研究所所长, 内科副主任医师, 中山大学、广东医学院硕士研究生导师, 中华医学会佛山学会理事, 中华医学会佛山肝脏病学会主任委员, 中国医学工程杂志编委。从事医疗工作 20 余年, 在肝胃肠病的诊断

治疗方面有着丰富的临床经验。曾经留学法国3年, 在美国进行合作研究3个月, 加拿大做高级访问学者半年, 有扎实的基础理论知识和熟练的科研技能。2003年12月被中国共青团广东省委、广东省人事厅和科技厅等单位联合评选为第二届“广东省杰出留学青年回国创业之星”, 在抗击SARS的战役中成绩显著、贡献突出, 被中共广东省委和广东省人民政府特记二等功。为市科技攻关计划项目“冠状病毒科(属)间交叉保护性抗体研究与SARS防治策略”课题的申请人。

CK89/07

作者简介



谭家驹(1953~) 佛山市第一人民医院院长, 国务院特殊津贴专家, 主任医师, 第十届全国人大代表, 中山大学、广东医学院硕士研究生导师, 中山大学医药卫生管理EMBA客座教授, 广东省医学会理事, 广东省医学会胸心血管外科学会常务委员, 广东省微量元素科学

研究会副理事长, 广东省抗癌协会肺癌专业委员会委员, 美国内镜医生协会会员, 佛山市医学会名誉会长, 佛山市医学会外科学会主任委员, 中华胸心血管外科杂志编委, 中国现代医学杂志、中国内镜杂志、中国医学工程杂志常务编委。从事医疗工作近30年, 在食道癌、肺癌以及先天性、后天性心脏疾患的诊断及手术治疗方面有着丰富的临床经验。先后获广东省科技进步二等奖1项、三等奖1项, 佛山市科技进步一等奖2项、二等奖4项、三等奖5项。承担国家863、973项目子课题各1项, 主持省、市科技攻关计划项目8项, 获专利9项。主编(副主编)《微创外科手术与麻醉》、《医院的法律风险》、《实用微创外科手册》、《农肥、污水与食管癌》等专著。为市科技攻关计划项目“冠状病毒科(属)间交叉保护性抗体研究与SARS防治策略”课题的负责人。

目 录

第一章 病毒分子生物学研究方法	(1)
第一节 病毒分类方法	(1)
第二节 病毒的感染与繁殖	(3)
第三节 病毒的分离与鉴定	(4)
第四节 病毒基因组学研究方法	(10)
第五节 病毒蛋白组学研究方法	(10)
第二章 SARS 冠状病毒概述	(12)
第一节 SARS 的暴发及流行	(12)
第二节 SARS 冠状病毒的确定	(15)
第三节 SARS 冠状病毒的感染特性	(18)
第三章 SARS 冠状病毒分子生物学	(21)
第一节 SARS 冠状病毒的生物学特性	(21)
第二节 SARS 冠状病毒基因组	(27)
第三节 SARS 冠状病毒蛋白质	(30)
第四节 SARS 冠状病毒复制过程	(36)
第五节 SARS 冠状病毒的变异	(40)
第四章 分子生物学与 SARS 诊断	(48)
第一节 SARS 冠状病毒核酸检测	(48)
第二节 SARS 冠状病毒蛋白检测	(58)
第三节 SARS 冠状病毒生物芯片检测	(66)
第五章 分子生物学技术与 SARS 治疗	(75)
第一节 反义技术抗 SARS 冠状病毒的研究	(77)
第二节 核酶技术抗 SARS 冠状病毒的研究	(81)
第三节 RNA 干扰技术抗 SARS 冠状病毒的研究	(85)
第六章 分子生物学技术与 SARS 预防	(96)
第一节 SARS 冠状病毒疫苗的研究	(96)
第二节 抗毒抗体的研究	(98)
第七章 生物信息技术与 SARS 冠状病毒研究	(101)
第一节 生物信息技术研究概况	(101)
第二节 SARS 冠状病毒基因序列分析	(102)
第三节 SARS 冠状病毒蛋白质序列分析	(103)
第八章 实验室生物安全与 SARS 研究	(106)
第一节 实验室生物污染的原因及种类	(106)
第二节 实验室的生物安全防护	(107)
第三节 SARS 实验室的生物安全防护	(118)

附录 1	BJ01 全基因组序列	(122)
附录 2	SARS 冠状病毒在分类位置和收录株数	(144)
附录 3	SARS 冠状病毒研究国际协作网络成员及地址	(147)
附录 4	应用于 SARS 冠状病毒序列分析的软件及其网址	(150)
附录 5	卫生部临床检验中心公布的《SARS 病例实验室检测标本采集技术指南》 (试行)	(152)
附录 6	卫生部临床检验中心公布的《SARS 临床标本的采集和处理》	(153)
汉英对照索引		(155)

第一章 病毒分子生物学研究方法

人们对病毒的认识起初是相对于细菌而言的。19 世纪, 由于法国科学家巴斯德 (Pasteur, 1822 ~ 1895) 在微生物方面的卓越成绩, 细菌致病说盛极一时。俄国的伊万诺夫斯基 (Ivanowsky) 和荷兰的贝叶林克 (Beijerinck) 分别于 1892 年和 1898 年通过烟草的花叶病传播试验发现了一种比细菌还小, 能够通过滤菌器的“有传染性的活的流质”, 由贝叶林克将其命名为病毒 (virus)。现在已知病毒是一种仅含有 RNA 或 DNA 其中一种核酸作为其遗传信息载体, 需要借助宿主细胞才能进行基因复制与蛋白表达, 从而完成完整病毒颗粒的复制和装配的微生物。病毒的体积极小, 一般长短仅在十几至几百纳米之间, 只有靠电子显微镜才能进行形态学研究。病毒培养对条件的要求也十分苛刻, 目前只能在活体组织和细胞中进行。一些类似 SARS 冠状病毒一样可导致严重疾患的烈性传染病病毒, 在进行培养研究时还需要有很高的生物安全环境, 以防止实验研究人员被感染。分子生物学方法可通过对病毒基因的序列分析、重组表达、蛋白结构和功能测定等手段, 安全高效地对病毒进行更加深入细致的研究, 并已成为病毒学研究的重要手段。下面对目前常用的病毒研究方法进行简单地介绍。

第一节 病毒分类方法

病毒的分类是在人们对病毒的认识不断深化的过程中逐渐完善的。起初, 人们根据病毒的宿主不同将病毒分为脊椎动物病毒、无脊椎动物病毒、植物病毒、真菌病毒和细菌病毒 (噬菌体) 等。20 世纪 40 ~ 50 年代, 人们又根据病毒对宿主器官的特殊“嗜性”, 将病毒分为嗜神经病毒、嗜内脏病毒、嗜肠道病毒、嗜呼吸道病毒等。50 ~ 60 年代, 随着对有关病毒性质认识的增多, 人们开始发现仅仅按病毒的寄生宿主或嗜性进行分类, 既不能全面反映自然病毒群落的特点, 更不能反映病毒间的亲缘关系。1971 年成立的国际病毒分类学委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), 按照当时了解的有关病毒的理化性质制定了分类方案, 并采用林奈命名系统, 将病毒按照目、科、属、种进行分类。目前病毒的林奈命名系统综合了病毒感染的宿主范围、病毒形态、血清免疫学特征和病毒核酸分子的序列等多种因素。到目前为止, 病毒的分类中仅有一个“目”得到国际病毒分类委员会认可, 即由弹状病毒科、丝病毒科和副粘病毒科组成的“单负目”。

在根据病毒感染的宿主范围、病毒形态和血清免疫学特征进行分类的基础上, 现代分子生物学进一步通过病毒核酸分子的序列分析划分病毒的归属, 从基因层面了解病毒间的同源性, 从而可以从本质上反映各种病毒之间亲缘关系的远近。随着分子生物学技术的进步, 以及人们对病毒基因组结构和序列了解的增多, 以病毒基因为基础的分类方法日益受到重视。目前, 根据病毒核酸的类型, 可将病毒在总体上区分为 DNA 病毒和 RNA 病毒两大类。RNA 病毒占有病毒种类的 80% 以上, 其中包括很多形态学和生物学特性截然不同的病毒。RNA 病毒根据 RNA 存在的形式又可分为正链 RNA 病毒、负链 RNA 病毒和双链 RNA 病毒 3 种。

在利用核酸序列分析进行病毒分类时, 由于病毒中的各种基因的演变速率并不相同, 加之机体在对抗病毒的过程中促使不同的病毒产生的趋同进化, 使病毒全基因组序列的相似度并不能成为最好反映病毒进化关系的指标。病毒聚合酶基因是一般病毒都具有的基因, 在各种病毒中执行着相似的功能, 承受机体带来的选择压力也相似, 同时进化速度相对缓慢, 能够记录较长的进化历史, 所以能较好地反映病毒的进化关系, 在病毒的分类中占有十分重要的地位。

SARS 冠状病毒是一种 RNA 病毒。RNA 病毒根据聚合酶序列在科以上可分为几个“超级进化群”(super group), 例如负链 RNA 病毒样超级进化群, 其中包括的病毒科属有正粘病毒、副粘病毒、沙粘病毒、弹状病毒和布尼亚病毒; 小 RNA 病毒样超级进化群, 其中包括的病毒科属有小 RNA 病毒、环状病毒、线虫传多面体病毒、豇豆花叶病毒、欧防风黄点病毒和马铃薯 Y 病毒、黄病毒样超级进化群, 其中包括的病毒科属有黄病毒、丙型肝炎病毒和瘟病毒; 冠状病毒样超级进化群, 其中包括的病毒科属有冠状病毒、土拉病毒和动脉炎病毒; 双链 RNA 病毒样超级进化群, 其中包括的病毒科属有双 RNA 病毒、隐病毒、Crysto 分病毒、呼肠(孤)病毒和全病毒。

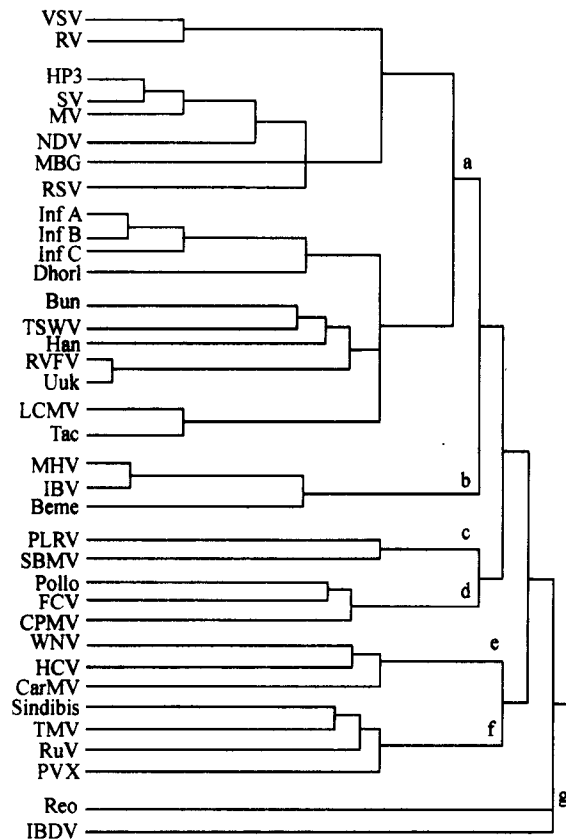


图 1-1 病毒有根进化树

图中所示为基于 RNA 依赖的 RNA 聚合酶序列建立的 RNA 病毒有根进化树。a—负链超级进化群; b—冠状病毒样超级进化群; c—南方菜豆花叶病毒样超家族; d—微小 RNA 病毒样超级进化群; e—黄病毒/香石竹斑驳病毒样超级进化群; f—甲病毒样超级进化群; g—双链超级进化群

病毒的分类还可根据从不同病毒核酸序列相似性中反映出来的同源性，按照亲缘关系的远近绘制成树状图，即以进化树的方式来表示。进化树的表现方式分为有根树和无根树两种，有根树除了可以表明病毒间的亲缘关系外，还可表明进化的方向和过程，见图 1-1；无根树则只能表明病毒间的亲缘关系，无法表明进化的方向和过程，主要是在缺乏有关进化关系佐证、难以确定参比对象的进化时间时使用，见图 1-2。有根进化树沿分支方向的线段长短一般可用来表示病毒间变异的大小，而与分支垂直的线段一般只是为了间隔开足够的距离。在无根进化树上一般所有的线段长短都表示进化距离的大小。

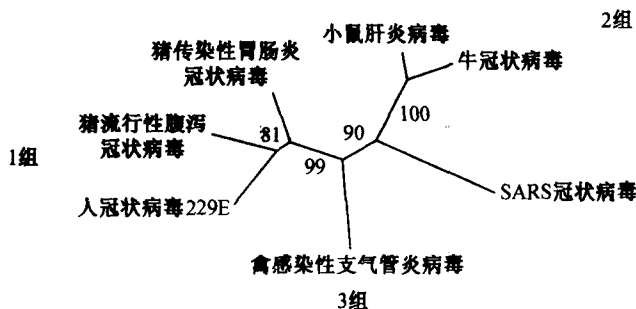


图 1-2 病毒无根进化树

图中所示为根据冠状病毒的多聚酶基因的同源性所建立的无根进化树。分枝的长度代表遗传的距离，从该进化树中可以看出 SARS 在进化上是一个特殊的病毒

第二节 病毒的感染与繁殖

在病毒感染宿主细胞的过程中，第一个关键的步骤就是病毒与被感染细胞的结合，病毒通过与被感染细胞的结合进入到细胞内进行复制和繁殖。病毒与宿主细胞的结合是具有特异性的，是通过与宿主细胞表面的特异性成分发生相互作用来实现的，人们把宿主细胞表面的这种特异性成分称为病毒受体。因此，不存在某一种病毒的特异性受体的细胞，就不会被该种病毒感染，也就是说，这类细胞会对该种病毒有自然的抵抗性。病毒的感染依赖于存在于宿主细胞表面的病毒受体来感染宿主细胞的这一特性，在临床上可表现为感染部位的特异性，例如脊髓灰质炎病毒可以感染人体鼻咽部、消化道和脊髓前角细胞，因为只有这些部位的细胞表面才具有脊髓灰质炎病毒的特异性受体，其他组织细胞则因为缺乏这种病毒受体而不被感染；也可表现为感染宿主的特异性，例如轮状病毒一般在物种上只感染哺乳动物，在年龄上只感染婴幼儿，在种族上其易感性亦有明显的差异，这些都与病毒受体在宿主细胞上的表达情况有关。但是，病毒与受体的这种配比关系并不是一成不变的，在一定的条件下是可以发生改变的。例如脊髓灰质炎病毒在人体内不会感染肾组织细胞，而在实验室用人肾上皮细胞来分离脊髓灰质炎病毒时，却可表现出高度的敏感性。这说明不是病毒上的配体就是宿主细胞上的病毒受体发生了演变，出现了新的相互配比。同样，通过演变也可能使原本敏感的宿主细胞变得不再敏感。

感染动物细胞的病毒的表面分子结构与被感染细胞的表面分子结构之间的相互作用力包

括氢键、离子引力和范德华力 (Van der waal's forces), 相互作用的分子在三维结构上应是像锁与钥匙一样相互匹配。在病毒与被感染细胞相互作用的早期, 可能只涉及一对分子的相互作用, 病毒与细胞之间的结合并不紧密。当病毒上的多个位点与细胞的多个受体相互作用时, 就开始发生不可逆的结合。

通过利用特定的敏感酶或单克隆抗体对病毒宿主细胞上的病毒受体进行破坏或封闭, 可使宿主细胞对原本敏感的病毒不再敏感, 这也可以证明病毒受体的存在。病毒受体是病毒宿主细胞所固有的, 正常情况下具有一定的生理功能。如 B 淋巴细胞上的 EB 病毒受体是补体 C3d/C3dg 片段的受体; 狂犬病病毒可利用细胞的乙酰胆碱受体进入; 痘苗病毒可能通过上皮生长因子受体进入宿主细胞; 艾滋病病毒主要利用 T 淋巴细胞上的 CD4 抗原作为受体; SARS 病毒的受体被认为是存在于肺泡上皮细胞上的血管紧张素转化酶 2 (angiotension converting enzyme, ACE2)。但是, 目前人们对大多数细胞上存在的病毒受体的生理功能并不了解。另外, 从分子水平揭示病毒受体的本质, 详细了解病毒与宿主细胞之间的相互作用机制, 对抗病毒药物和疫苗的研制都至关重要。

虽然各种病毒都是通过细胞表面的受体进入宿主细胞的, 但是病毒的种类很多, 不同结构类型的病毒进入宿主细胞的方式也有所区别。根据病毒的结构类型, 可将动物病毒分为无包膜病毒、有包膜病毒和复杂大颗粒病毒 3 种。

无包膜病毒在进入宿主细胞时, 先通过病毒表面的特种分子结构与病毒受体结合产生黏附作用。此时病毒与宿主细胞的结合往往为可逆性的, 也称可逆性接触, 病毒与宿主细胞的结合并不牢固, 可因某些原因而重新分离。当病毒颗粒转移进宿主细胞膜时才产生不可逆性结合。但是, 无包膜病毒的核衣壳并不进入宿主细胞的胞浆, 而是在宿主细胞的膜内发生水解, 释放出核酸。由于无包膜病毒的核酸可以单独地进入胞浆, 因此这类病毒的提纯核酸也有一定的感染性。大多数无包膜 DNA 病毒的核酸还需要通过核膜进入核内的复制部位。

有包膜病毒在与宿主细胞一接触就可与多个受体产生相互作用, 发生不可逆性结合。然后, 病毒的包膜可与宿主细胞膜融合, 而将病毒的核酸连同核壳一起释放入细胞浆。对于这类病毒, 病毒的核壳往往是病毒复制所必需的, 因为核壳中含有病毒复制所需的一些酶, 例如转录酶或逆转录酶。

复杂大颗粒病毒, 如痘病毒、疱疹病毒和呼肠孤病毒等, 主要通过受体介导的宿主细胞吞噬作用进入细胞, 在胞浆内形成囊泡。囊泡经由胞浆内的溶酶体释放出的酶的消化释放出核酸, 与病毒核壳相连的转录酶也可能在水解中被激活。

当病毒进入细胞后, 从病毒颗粒中释放出来的核酸可利用被感染细胞的各种细胞器进行病毒的复制。

第三节 病毒的分离与鉴定

病毒的分离培养和鉴定是病毒学研究的基本工作, 但其过程却十分复杂。它涉及如何能够采集到含有足够病毒数量的标本, 如何选择适合接种的组织细胞或敏感动物, 以及如何对所获得的病毒进行鉴定等。

一、病毒的分离培养

病毒分离的一般程序是：采集标本，加入抗生素杀灭杂菌，接种于易感的培养物，例如实验动物、鸡胚或敏感细胞。取自脑脊液、血液、血浆或血清的标本常为无菌标本，也可直接接种。来自无菌的组织块经培养液洗涤后，要制成 10% ~ 20% 悬液，离心取其上清液接种；咽洗液、粪便、尿、感染组织或昆虫等污染标本在接种前需要先用抗生素处理，杀死杂菌。

（一）病毒的分离

一般首先需要根据病毒感染性疾病的临床症状和体征，初步判断可能有病毒存在的临床标本，通常采集的标本包括患者的血液、脑脊液、鼻咽分泌物、痰液、粪便、尿液、活检组织或尸检组织等。由于病毒的排出量往往在疾病的早期较多，同时合并继发感染的几率较低，所以应尽量在发病的初期采集标本。对采集到的标本应尽快进行分离培养和检测，因为病毒离开活体后在室温下很易死亡。另外，在室温下放置引起的机体组织细胞溶解释放出的消化酶也可使病毒降解。如果受到条件限制，对采集的标本不能立刻进行分离培养，则首先应对采集的体液标本进行 -80°C 或液氮冷藏，组织标本则应放置在 50% 的甘油缓冲液中 -80°C 或液氮冷藏。

在处理怀疑有病毒存在的标本时，除了要注意无菌操作避免外来细菌和病毒的污染以外，常常还要进行除菌处理，特别是含有大量细菌的粪便、呼吸道分泌物和鼻咽拭子等，以消除细菌对病毒分离过程的干扰。除菌方法一般采用抗生素处理，具体使用的抗生素种类、浓度以及作用时间等要视标本的情况而定。利用病毒与细菌大小的差异，通过滤菌器也可达到除菌的效果。

（二）病毒的培养

可用于病毒培养的材料有成体动物、胚胎、器官、组织和细胞。利用动物进行病毒接种培养的优点是，除了可获得研究所需的病毒外，一般还可模拟出疾病的临床症状表现，有利于对疾病进行较为全面的研究。缺点是实验成本高，实验动物个体间存在的疾病易感性差异使各个实验室或各项研究之间的实验条件同化难度较大。利用胚胎、器官、组织或细胞进行病毒接种培养比用成体动物更加经济简便，特别是利用细胞进行病毒接种培养，实验条件易于掌控。随着器官、组织和细胞体外培养技术的日趋完善，利用器官、组织或细胞进行病毒培养也越来越广泛地被采用。

常用的病毒培养实验动物有小白鼠、田鼠、豚鼠、家兔及猴等；常用的接种途径有鼻内、皮内、脑内、皮下、腹腔或静脉。在进行动物试验时，如何选择接种动物和接种部位，主要取决于对病毒嗜性的了解。病毒的嗜性包括病毒对接种动物种属的嗜性和组织器官的嗜性。病毒对动物的种属嗜性主要通过试验探索来了解，目前人们已为许多引起人类疾病的病毒在动物中找到了易感对象，见表 1-1。病毒对器官的嗜性可通过疾病的主要表现部位进行判定，例如临床上以神经系统症状为主的疾病，感染病毒往往具有嗜神经性，可在实验动物的脑内进行接种；临床上以呼吸系统症状为主的疾病，则可在实验动物的鼻腔进行试种；引起皮肤病变的病毒可试着在皮下或皮内接种等。另外，接种方式还可参照自然的感染途径，如通过静脉感染肝炎病毒等。

表 1-1 各种病毒常用的易感动物与接种途径

病毒	实验动物	接种途径
单纯疱疹	家兔	角膜、脑内
	豚鼠	肉趾
痘苗、天花	家兔	角膜、睾丸
	犊牛	皮肤
	恒河猴等	皮肤、角膜、呼吸道
水痘	恒河猴等	脑内、睾丸
	家兔	睾丸、眼前房
鼠痘	小白鼠	皮肤、皮下、肌肉、腹腔、脑内
	豚鼠、地鼠	皮肤
脊髓灰质炎	各种猴	脑内、鼻内、腹腔
	棉鼠	脑内、扁桃腺、腹腔
	小白鼠	脑内、脊椎内
	金黄地鼠	脑内
柯萨基、甲型	初生小白鼠	脑内、肌肉、腹腔、皮下
风疹	乳小白鼠	皮下、腹腔、鼻腔、静脉
	雪貂	皮下、脑内
口蹄疫	幼龄豚鼠	足趾
	乳小白鼠	脑内
狂犬病	家兔	脑内、皮下
	小白鼠、地鼠、大白鼠、犬	脑内
	猫、鸡、猴	脑内
水泡性口膜炎	豚鼠	足趾
	小牛	舌黏膜
流感	雪貂	鼻内
	小白鼠（传代适用、甲、乙型）	鼻内
	猴	鼻内
猪流感	小白鼠	鼻内
	雪貂	鼻内
腮腺炎	恒河猴等	脑内、腹腔、静脉、腮腺
麻疹	恒河猴（部分可用豚鼠、家兔）	皮下、肌肉、静脉、脑内、脑腔
新城疫	鸽、鸭、鸡、鹅、燕、麻雀	脑内、鼻内、神经外
乙型脑炎	小白鼠	脑内、腹腔、皮下
	恒河猴	脑内、鼻内、皮下
春夏型脑炎	小白鼠	脑内、腹腔、静脉、皮下
	绵羊	脑内
	恒河猴	脑内

续表

病毒	实验动物	接种途径
登革热	恒河猴等	脑内
	小白鼠乳幼鼠 (传代适应)	脑内
马脑脊髓炎 (各型)	小白鼠	脑内
	豚鼠	脑内
	家兔	脑内
羊跳跃病	小白鼠	脑内、腹腔、鼻内
	大白鼠	脑内
	地鼠	脑内

胚胎培养主要是采用鸡胚进行, 鸡胚培养是病毒培养的经典方法。用受精卵孵化的活鸡胚培养病毒比用动物更加经济简便。根据病毒的特性可分别接种在鸡胚绒毛尿囊膜、尿囊腔、羊膜腔、卵黄囊、脑内或静脉内。如有病毒增殖, 鸡胚则发生异常变化或羊水、尿囊液出现红细胞凝集现象。鸡胚常用于流感病毒及腮腺炎病毒等的分离培养, 但也有很多病毒在鸡胚中不生长。

利用器官、组织或细胞进行病毒培养, 首先要模拟体内的生理条件, 在体外对从体内取出的器官、组织或细胞进行培养。也就是说, 建立体外培养器官、组织或细胞的方法, 是利用这些器官组织进行病毒培养的前提条件。在利用器官和组织块进行病毒培养时, 由于器官和组织块本身对体外培养的条件要求苛刻, 而且操作烦琐, 所以不如利用细胞进行病毒培养受欢迎。细胞相对于器官和组织来说具有更容易获取、可取自人体以及实验条件的一致性更好等优点。培养细胞的培养液通常为含胎牛血清、葡萄糖、氨基酸、维生素的平衡溶液, pH7.2~7.4。细胞培养适于绝大多数病毒生长, 是现代病毒实验室的常规技术。用于病毒培养的细胞, 根据其来源和增殖特性可分为原代细胞、半传代细胞和传代细胞3种。

原代细胞的获取是通过机械、胰酶或胶原酶等处理新鲜器官或组织, 制成细胞悬液, 与营养液一起置于培养器皿内培养, 可贴壁生长的活细胞即可作为用于病毒培养的原代细胞。由于非肿瘤细胞在生长时存在接触性抑制现象, 当培养的原代细胞相互接触时, 生长繁殖即停止, 从而形成单层贴壁细胞。将病毒接种于单层细胞上, 便可进行原代细胞培养。由于原代培养的细胞经传代后其特性常发生较大的改变, 有的不能继续生长, 有的对病毒不再敏感, 因此应用不够方便。

半传代细胞株是原代细胞经过成功传代后形成的细胞株, 这种细胞一般只能传至50代左右, 而不能无限繁殖, 因此称为半传代细胞株。一般来说, 半传代细胞对病毒的敏感性至少可保持10代。应用时先进行扩增培养, 然后冷冻保存, 分批复苏使用。由于这种细胞仍保持有正常细胞的特性, 如细胞染色体为二倍体, 如果细胞来自人体, 其染色体总数仍为46条等, 因此具有较好的安全性, 常被用于病毒疫苗的生产。现常用的半传代细胞株多为成纤维细胞, 例如MRC-5和WI-38。

传代细胞多来源于肿瘤细胞, 也有经半传代细胞株经体外转化而成的。传代细胞可在体外进行无限传代, 成为传代细胞系。由于这类细胞的染色体和增殖特性均类似于恶性肿瘤细