

《病毒学检验》实验讲义

实验一 细胞的传代培养与病毒接种

一、实验目的

- 1、熟悉单层细胞培养技术的操作步骤。会判断培养液的酸碱度，识别细胞的生长情况。
- 2、掌握单层细胞培养上接种病毒的方法。

二、实验原理

细胞株长成单层后可用酶消化下来形成单个细胞，分装后在一定条件下培养又繁殖形成单层，从而不断扩大细胞培养物供试验用。病毒接种细胞，感染细胞后，在细胞内增殖，大多数能引起细胞病变，无需染色即可直接在普通光学显微镜下观察。有的细胞不产生病变，但能改变培养液的 pH 值，或出现红细胞吸附及血凝现象（如流感病毒和副流感病毒），有时还可用免疫荧光技术检查细胞中的病毒和细胞变化。

三、仪器与试剂

病毒（肠道病毒悬液）、细胞培养液（RPMI-1640，10%小牛血清）、细胞生长液（RPMI-1640，含 10%小牛血清及 100u/ml 双抗）、Hanks 液、2.5g/L 胰酶、0.1g/L 中性红、无菌蒸馏水

培养瓶、各种无菌吸管、滴管、无菌小试管、试管架、水浴箱、CO₂ 培养箱、倒置显微镜等。

四、实验方法

1. 细胞培养器材处理 细胞培养所用器材处理得好坏是决定细胞培养成败的首要问题，故必须认真，切不可有丝毫疏忽。

(1) 玻璃器材处理法

1) 未使用过的玻璃器材 先用自来水冲洗干净，再以热碱水(1g/L~5g/L)煮沸 15min 后，用自来水冲洗干净，置清洁液中泡 1d~2d，取出后经自来水冲洗 10 次，再用去离子水冲洗 3 次，晾干后包装，160℃ 2h 干热灭菌。

2) 已使用过的玻璃器材 如未污染，则按上述方法处理；如污染者，则需用 1%HCl 浸泡 24h 或煮沸 20min~30min 后，再按上述方法处理。

(2) 橡皮塞处理法 未污染的塞子用自来水冲洗干净(污染塞子先用自来水煮沸消毒)，再用去离子水浸泡数天，换新鲜去离子水煮沸 5min，晾干后包装，最后以 103.43kPa 高压灭菌 20min~30min。

2. 选生长良好的 HeLa 细胞一瓶，轻轻摇动使细胞表面的碎片等浮起，连同生长液一起倒入废液瓶内，再用 Hanks 液洗涤一次。

3. 从无细胞面一侧加入适量(能覆盖细胞面)的 2.5g/L 的胰酶溶液，翻转培养瓶，使消化

液浸没细胞 1min 左右，再翻转培养瓶使细胞层向上，让残存胰酶继续作用 5min~10min，至肉眼能看到细胞面出现布纹状网孔为止。

4. 倒掉胰酶，沿细胞面加入原培养液 2 倍量不含小牛血清的培养液洗下细胞，并用吸管用力吹打被消化的细胞，使其脱壁、分散，成为均匀的细胞悬液，补加 10% 的小牛血清，按 1 传 2 分装培养瓶。

5. 将培养瓶平放于 37℃，5%CO₂ 培养箱内培养，于分装后 30min 细胞便可贴壁，于 48h 可换生长液 1 次，一般 3d~4d 可形成单层细胞。

6. 细胞病变效应(CPE)的观察

(1) 接种病毒 取已生长成单层细胞培养瓶 2 只，弃去瓶中液体，一瓶作为对照(不加病毒液)，另一瓶滴加肠道病毒悬液 1 滴，然后在两瓶中均按原量加入培养液(含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 液)，盖紧，37℃ 培养 1~2 天。

(2) 观察结果 于培养后 18h、24h、36h、96h 在显微镜下观察细胞病变效应(CPE)，对照瓶无细胞病变，试验瓶中病毒可引起细胞圆缩、堆聚及脱落现象。

五、结果意义

在显微镜下观察到试验瓶中单层细胞病变效应为有病毒生长。

六、注意事项

1. 培养液量不要太多，应有足够的空间以保证细胞对氧的需要。
2. 若用普通孵箱培养，必须盖紧盖子或塞紧橡皮塞，或贴紧胶纸，以防培养基碱化，如用 CO₂ 培养箱培养则不要盖紧瓶盖，并将 CO₂ 浓度控制在 5%。
3. 一般 2d 换一次液，细胞长成单层要及时进行细胞传代。
4. 传代是保持细胞在体外良好生长和建成永久性细胞系的关键，应在对数期进行细胞传代；对贴壁细胞，酶消化一定要充分；传代培养时要严格无菌操作并防止细胞之间交叉污染。

实验二 鸡胚的培养与病毒接种

一、实验目的

- 1、掌握鸡胚发育情况的判断、绒毛膜尿囊腔的接种方法以及接种物的收获。
- 2、通过此实验，进一步规范无菌操作技术。

二、实验原理

鸡胚培养法为常用的病毒培养方法之一，操作简单，来源容易，对粘病毒、痘病毒、脑炎病毒等都很敏感。鸡胚培养的接种方法，常用的有尿囊腔、绒毛尿囊膜、卵黄囊、羊膜腔接种法四种。尿囊腔接种法广泛应用于流感病毒的适应和传代培养，这些病毒被注射到尿囊腔后，可在内皮细胞中复制，复制的病毒被释放到尿囊液中，因此，在尿囊液中含有大量的病毒。

三、实验材料

1. 病毒液 减毒流行性感胃病毒悬液。
2. 鸡胚 来亨鸡受精卵。
3. 其他 1ml 注射器及针头、无菌生理盐水、卵架、检卵灯、碘酒和酒精棉球、无菌镊子、无菌手术刀、剪刀、平皿、齿锯、透明胶带等。

四、实验方法

1. 鸡胚准备 选择健康来亨鸡的受精卵，表面光滑干净，最好是白色蛋皮。在培养前应保存于 10℃ 左右，保存期不超过产后 10 天。培养时放入 38℃~39℃ 孵卵器内培养，相对湿度 40%~70%。培养 3 天后，鸡卵每日作 180° 翻动 2 次，以免粘壳。第 4 天，用检卵灯检查鸡胚发育情况，未受精卵只见模糊的卵黄黑影，不见鸡胚形迹，应予淘汰；受精卵可见到清晰的血管和胚动，且蛋白一边和胚胎一边界限分明，蛋白一边较亮，胚胎一边暗红色。随后每天观察一次，若出现胚动吊滞或胚影固定于卵壳，或血管昏暗模糊，或胚胎一边变黑或变苍白，说明鸡胚将要死去或已死亡，需随时淘汰。生长良好的鸡胚一直培养到适当的胚龄。

2. 鸡胚结构

- (1) 羊膜腔 位于胚胎的外面，其中有羊水，具有保护鸡胚不受创伤及粘连的影响。
- (2) 尿囊腔 为鸡胚的肾脏，大量排泄物集中在尿囊腔，培养第二天，尿囊腔分布于整个蛋的大部，一般 6 天时尿囊液 1ml，11 天为 6ml，13 天达 10ml。
- (3) 绒毛尿囊膜 位于蛋壳膜内，在发育过程中，尿囊腔扩大与绒毛膜重叠，形成绒毛尿囊膜，此处有极丰富的血管，是胚胎与外界交换气体的场所。
- (4) 卵黄囊 胚胎发育过程中养料的来源。

3. 尿囊腔接种

(1) 取 9~12 日龄鸡胚，划出气室端，在胚胎面与气室交界的边缘上约 1mm 处或在胚胎的对侧处，避开血管作一标记，作为注射点，用碘酒和酒精消毒后用无菌刀尖在记号处钻一小孔。

(2) 用无菌注射器吸取流行性感胃病毒悬液，针头垂直或与卵壳成 30° 交角，由小孔处刺入 0.5ml~1ml，注入病毒液 0.1ml~0.2ml(见图 2-10-1)

图 2-10-1

图 2-10-1 尿囊腔接种法

(3) 用透明胶带封闭注射孔，放卵架上置 33℃~37℃ 培养箱内培养，每日检卵一次，培养 48h~72h，期间如在 24h 内死亡者为非特异性死亡，弃之。

(4) 收获前先将鸡胚放 4℃ 冰箱 6h 或过夜，使血管收缩，血液凝固，避免解剖时出血。

若鸡胚已死，则不需冰冻。待收获的鸡胚先用碘酒和酒精消毒气室端卵壳，用无菌镊子沿气室边缘将蛋壳揭去，撕去卵膜，可见毛尿囊膜。在无大血管处用无菌小镊子稍提起此膜，以无菌毛细吸管刺破此膜并吸取尿囊液，收集于无菌试管内。一般可吸得 4ml~5ml。作无菌试验后将尿囊液保存于低温冰箱中备用。也可直接将尿囊液作血凝试验和血凝抑制试验。

五、结果意义

可通过观察鸡胚是否死亡来判断有些病毒是否生长，但更多情况下需通过血凝试验、血细胞吸附或免疫荧光等技术显示鸡胚尿囊液中有无病毒存在。

六、注意事项

1. 最好选用SPF鸡群所产鸡蛋，如果没有可用健康鸡群所产的受精蛋，白色薄壳的鸡蛋比红壳鸡蛋更容易观察胚胎的生长情况。
2. 受精卵入孵后要注意翻蛋。
3. 检卵时注意避免照蛋时间过长引起鸡胚温度下降过大。
4. 接种鸡胚时尽可能避开血管丰富区域。
5. 对收获尿囊液要进行杂菌实验。
6. 温箱底盘中要加入足够量的蒸馏水以保持一定的湿度。

实验三 双抗原夹心法测定血清中乙肝表面抗体

一、实验目的

- 1、掌握用 ELISA 方法检测病人血清乙型肝炎病毒的感染标志物的原理与方法。
- 2、掌握病毒抗体检测的操作步骤、试验结果的判断以及试验的注意事项。通过实验，加深对实验原理的认识和理解，对实验影响因素的认识。

二、实验原理

将已纯化乙肝表面抗原（HBsAg）包被于微孔酶标板上，与待检血清中的相应抗体结合后，加入酶标抗原（HBsAg-HRP），形成包被乙肝表面抗原-待检乙肝表面抗体-酶标乙肝表面抗原，用洗涤的方法将其与其他物质分开，最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后，底物被酶催化变为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据颜色反应的深浅判定定性或定量分析。由于酶的催化频率很高，故可极大地放大反应效果，从而使测定方法达到很高的敏感度。

三、仪器与试剂

酶标仪、微量加样枪、恒温水浴箱、乙肝表面抗体 ELISA 试剂盒（包括已包被抗原的固相载体、酶标记的抗原、参考标准品和控制血清、酶联物（结合物）及标本的稀释液、洗涤液、酶反应终止液）、待检血清

四、实验方法

1. 加受检标本：取已包被抗原的固相载体，加待检血清，一定温度下，使之与固相抗

原接触反应一段时间，让标本中的抗体与固相载体上的抗原结合，形成固相抗体复合物。洗涤除去其他未结合的物质。

2. 加酶标抗原：使固相免疫复合物上的抗体与酶标抗原结合。彻底洗涤未结合的酶标抗原。此时固相载体上带有的酶量与标本中受检物质的量正相关。

3. 加底物：夹心式复合物中的酶催化底物成为有色产物。

4. 用酶标仪进行测定：根据颜色反应的程度进行该抗原的定性或定量。

5. 用酶标仪以试剂空白孔校零点，当标本吸光度值 / 阴性对照吸光度值（即 P/N）>2.1 可判断为阳性；当标本吸光度值 / 阴性对照吸光度值 <2.1 可判断为阴性。阴性对照 A 值 <0.1 时，按 0.1 计。

五、结果意义

乙肝表面抗体呈阳性状态主要有以下三方面的意义：

1. 单项抗-HBs 阳性：接种乙肝疫苗成功的标志。

2. 与抗-HBc、抗-HBe 同时阳性：机体感染乙肝病毒后发生免疫应答，乙肝病毒被清除，机体获得抵御乙肝病毒再次侵袭的特异性免疫力。

3. 与 HBsAg 同时阳性相关的因素：

(1) 感染了不同的乙肝病毒亚型。

(2) 感染了 S 基因变异的乙肝病毒。

(3) 免疫功能低下，抗-HBs 不能清除 HBsAg。

(4) 正处于抗原-抗体动态平衡阶段。

六、注意事项

1. 载体的选择与处理：载体的吸附效果主要与塑料的类型和表面类型有关。目前应用最广的固相载体是聚苯乙烯微量反应板。聚苯乙烯塑料板有聚苯乙烯硬板(PS)和聚氯乙烯软板(PVC)之分，其中PS板不易变形，容易洗涤操作，阴性背景好，故一般ELISA 试验多选择微孔聚苯乙烯硬板。

2. 待检血清：待检血清中的免疫球蛋白与固相载体易出现非特异的吸附。如待检血清中抗体浓度太高，抗体分子间相互作用形成不稳定的多层吸附，影响ELISA的重复性，若待测血清中免疫球蛋白含量高，则产生非特异性吸附，最后结果的本底显色就深。聚合的免疫球蛋白与固相载体结合的速度比不聚合者快，易造成假阳性结果，加热灭活血清补体或反复冻融血清都易形成聚合的球蛋白，因此，在实验过程中应避免加热灭活血清和对血清反复冻融。待测血清浓度过低也会影响抗原-抗体之间的免疫反应。分离待检血清时最好是室温自然凝固析出后在吸出，如放置在4℃以下凝固，很容易丢失大量的抗体。

3. 洗涤：在整个实验过程中每一步都需要进行洗涤，主要是将没有结合的抗原、抗体、游离的酶结合物以及血清中与反应无关的其他成分等去除，而且充分洗涤可防止聚

合球蛋白对固相载体的非特异性吸附。常用的是含0.05% Tween-20的PBS洗涤液。Tween-20的作用助溶剂可减少表面的非特异性吸附。