

第三部分 病毒学实验方法

病毒是微生物中体积最小的一种,绝大部分在普通光学显微镜下不能看到,需用电子显微镜才可查见。由于病毒具有严格的寄生性,必须在易感的活组织(细胞)中才能增殖,故通常将其接种于动物(小鼠、家兔及猴等)、鸡胚胎或组织(细胞)中使之增殖,但并非所有标本均需依次接种于动物、鸡胚胎或组织培养中进行病毒的分离鉴定,而是根据具体情况而定。有些病毒在寄生的细胞内增殖后可导致细胞病变,或可在受感染的细胞内形成形态学上特异的斑块,称为包涵体,此可用普通光学显微镜检视。

病毒性疾病常用的血清学检查法为血凝抑制试验、补体结合试验及中和试验。近年来,随着科学技术的进展,在原有血清学检查技术的基础上,又建立了具有特异性强且敏感性又较高的新的血清学检测法,如荧光抗体检测技术,酶联免疫检测技术—EILSA 及固相放射免疫技术等,在实际工作中,可随检查目的的不同而选不同的方法。

实验十五 病毒感染后的形态学观察

一、电子显微镜技术

病毒体积微小,不仅肉眼看不见,即使是分辨率最好的光学显微镜也只能看到个别的大病毒。20世纪30年代初电子显微镜的发明,扩大了人们的视野。在电子显微镜下,不仅能观察到各种病毒的外观,且可看清其结构。为了观察病毒与细胞的关系。一般将接种病毒的组织(细胞)培养固定,包埋后进行超薄切片,染色后进行观察;为观察病毒形态与结构,可用磷钨酸负染法。

(一)磷钨酸负染法

磷钨酸负染法是利用重金属盐类溶液处理生物标本,使它在电镜下呈现出良好的反差。经此种染色处理的生物标本。在电镜下与正染色相反,观察到的不是亮环境下的黑色物象而是暗背景(重金属染液)下的亮象(物体)。

【材料】

- (一)病毒悬液。
- (二)染液:磷钨酸盐(钠、钾)
- (三)铜网

【方法】

(一)用吸管吸取少量病毒悬液,直接滴在铜网上,一般每份标本3-4个铜网。待3-5min后吸去悬液或用小片滤纸吸干。然后用另一吸管吸染液滴于铜网上,待2-3min吸去多余染液,待自然干燥后即可进行电镜观察。

(二)电镜观察:

1. 形态: 电镜下病毒有球形, 杆形和蝌蚪形等。粘病毒呈杆状或多形态, 腺病毒和小 RNA 病毒属球形, 噬菌体呈蝌蚪形。应用电镜技术也可准确的测量病毒体的大小。一般无胞膜病毒大小比较一致; 有胞膜病毒则变动较大, 对这类病毒的大小测定, 应求其平均值。病毒大小使用的单位为毫微米即纳米(nm), 可按公式计算:

$$\text{病毒体大小(nm)} = \frac{\text{病毒体直径(nm)}}{\text{放大倍数}} \times 10^6$$

2. 结构: 一般而言, 大部分球形病毒属立方体对称, 大部分杆形病毒属螺旋对称。如腺病毒和小 RNA 病毒呈 20 面对称; 流感病毒则呈螺旋对称。电镜还可观察病毒有无胞膜及亚单位结构。

(二)病毒感染组织的超薄切片(略)

二、病毒包涵体的观察

在某些病毒感染的细胞内, 经染色后, 常可在其细胞浆或核内的局部见到一些嗜酸性或嗜碱性的染色改变, 称为包涵体。病毒感染形成的包涵体, 因在组织细胞内定位不同及其本身的嗜染色性不同而具有诊断价值(如狂犬病病毒包涵体位于脑神经细胞浆内, 腺病毒包涵体位于感染的细胞核内, 而巨细胞病毒包涵体则可在胞浆和核内发现)。

【材料】

- (一)巨细胞病毒
- (二)传代人胚肺纤维母细胞培养小瓶
- (三)苏木精-伊红染色液
- (四)Borin 固定液

【方法】

(一)将巨细胞病毒接种于有盖玻片的传代人胚肺纤维母细胞培养小瓶中, 37 °C 孵育, 待其出现 80-100% 细胞病变后, 取出盖玻片, 在生理盐水中漂洗 2 次。

(二)用 Borin 固定液将上述漂洗后的盖玻片固定 20-30min。再用生理盐水冲洗 2 次。

(三)苏木精-伊红染色。

(四)用光学显微镜在低倍镜或高倍镜观察: 在巨细胞病毒感染的人胚肺纤维母细胞核内有嗜酸性包涵体(有时亦可嗜碱性), 包涵体周围可有与核膜明显区分的不着色的一轮晕。一个核内大多有 1 个包涵体, 但亦有 2-3 个的。胞浆内可有境界不明的较小嗜碱性包涵体。但诊断意义不大。

实验十六 病毒组织培养及病毒对细胞致病作用的观察

病毒与细菌不同，它必须依赖宿主细胞才能增殖。50年代开始广泛应用组织（细胞）培养法分离鉴定病毒。常用的方法是单层细胞培养法及组织块法。二者皆能在显微镜下直接观察正常细胞的形态，在未接种病毒前，细胞通常一般分为梭形（成纤维样）及多角形（上皮样）二类。

一、原代人胚肾单层细胞制备

原代细胞为直接采自动物或人组织如人胚肾、人羊膜、猴肾等。人胚肾为实验室常用的组织。

【材料】

4-6个月龄新鲜的人工流产胎儿(水囊引产或早产儿)。

Hanks氏液、0.25%胰酶、营养液(含10%小牛血清，0.5%水解乳蛋白Hanks液)、三抗(青霉素、链霉素、卡那霉素)。

5.6%碳酸氢钠溶液

无菌培养小瓶、三角烧瓶、吸管、眼科小剪刀及小镊子、橡皮塞。

【方法】

整个操作过程要求严格无菌。

(一)取胚肾：流产胎儿取俯卧位，用3%碘酒消毒背部及臀皮肤，剪开脊柱两侧皮下组织，自肋缘下剪开骶嵴肌，钝性分离拉开切口，用止血钳或镊子夹取肾脏。分离肾周组织，取出肾脏放入无菌平皿中。

(二)剪取皮质：将肾包膜剥去，用眼科剪刀从肾表面剪取皮质，除去髓质。将皮质置培养小瓶内，剪成1-3 mm³小块，用Hanks氏液洗数次，直至液体清晰为止。

(三)消化：将组织小块移入三角烧瓶内，加0.25%胰酶10 ml，同时加入0.1 ml三抗溶液，将pH调至8.0左右置4℃冰箱消化18 h左右。取出后用Hanks氏液轻轻洗3次，以除去剩余的胰酶溶液。

(四)分散细胞：加入营养液10 ml，用刻度吸管吹打，直至组织块细小至不可见，全部成为分散细胞为止。

(五)细胞计数：吸0.1 ml细胞悬液，加入0.9 ml Hanks氏液，混匀后吸出少量悬液滴入血球计数板，在低倍镜下计数，并按下列公式计算每ml细胞数。

$$\frac{4 \text{ 大格细胞数}}{4} \times 10,000 \times 10 = \text{每 ml 细胞数}$$

(六)细胞分装及培养：将已计数的细胞悬液，用营养液稀释至每毫升含40-50万细胞。将此细胞悬液分装入培养小瓶，每瓶1 ml，用塞紧瓶盖，充分摇匀后37℃温箱静置培养，以后每日观察细胞生长情况。一般于次日即可见细胞贴于瓶壁，3-7天长成单层后可供使用。

二、Hela 细胞的培养法

肿瘤组织经过多次传代后可建立传代细胞系，这种细胞能无限期传代。Hela 细胞来自子宫颈癌组织，对多种肠道病毒及腺病毒均敏感，故可用于这类病毒的分离。

【材料】

传代 Hela 细胞系培养瓶，0.25%胰蛋白酶
营养液、5.6%碳酸氢钠
无菌培养小瓶，三抗(青霉素、链霉素、卡那霉素)、吸管

【方法】

- (一)除去传代 Hela 细胞培养瓶中的营养液。
- (二)加入 5 ml 0.25%胰蛋白酶溶液 37℃ 孵育 1~2 min
- (三)翻转细胞瓶，使细胞生长面在上，胰蛋白酶溶液在下，继续孵育 5-10 min。
- (四)除去胰蛋白酶溶液，加入原量的含 10%小牛血清的营养液，用 10 ml 吸管吹打分散细胞。
- (五)用营养液按原量作 3 倍稀释，然后用 1ml 吸管分装培养小瓶，使每小瓶含 1ml 细胞悬液，并置 37℃ 培养。

单层细胞的生长：

培养 24 h 后，Hela 细胞贴于玻璃管壁。表现为单个或 2-3 个细胞聚集成的小岛。随后细胞开始分裂繁殖，一般 3-7 天长成单层。Hela 细胞的形态为多形的上皮样细胞。

三、病毒对细胞致病作用的观察

【材料】

Hela 细胞培养小瓶
脊髓灰质炎病毒毒种，腺病毒毒种
细胞维持液(含 2.5%小牛血清 Eagle 营养液，其中含有青霉素、链霉素、卡那霉素各 100 ug/ml pH 调至 7.4-7.6)，1 ml 吸管。

【方法】

(一)接种病毒

1. 选择生长良好的 Hela 细胞培养小瓶，分试验组(接种病毒)和正常细胞对照组(不接种病毒)。
2. 试验组：倾去营养液，每瓶加入维持液 0.9 ml，然后接种已稀释的脊髓灰质炎病毒液或腺病毒液 0.1 ml。
3. 正常细胞对照组：倾去营养液后，每瓶加维持液 1 ml。
4. 置 37℃ 培养，接种 24 h 后，逐日观察结果。
5. 接种病毒附注意事项：
 - (1)接种病毒时需要两个人配合，严格无菌操作。

(2)接种病毒时应将吸有毒种的吸管伸入到培养小瓶内，然后轻轻地吸吹毒种，切不可将毒种污染环境。

(3)吸毒种的吸管应及时放入消毒缸内。

(二)病毒感染细胞的指标：

1. pH 变化：

正常细胞代谢时能分解糖类产酸，使维持液中酚红指示剂由红色变黄色。但某些病毒增殖后影响正常细胞代谢，降低了细胞分解代谢产酸的作用，因此维持液 pH 值下降慢于正常细胞。这种差别是病毒在细胞中增殖的一个指标。

2. 细胞病变：

细胞受病毒感染后，由于病毒的增殖，使细胞形态学上产生病理性改变，不同病毒引起细胞病变的特征有所不同，依次可识别病毒，举例如下：

(1)脊髓灰质炎病毒：细胞变圆、缩小，细胞之间可有拉丝，折光性强，病变细胞分散较均匀，不成堆聚集，视野较干净。

(2)腺病毒：细胞肿大变圆，常见的 3、7、11 型可有折光性很强的粗大颗粒，细胞聚集成葡萄状，细胞层间可见明显撕裂现象。

(3)疱疹病毒：细胞肿大变圆，边缘较薄有时有拉丝现象，并可有比一般病变细胞大数倍的大圆形细胞及多核巨细胞。病变细胞之细胞膜，细胞浆，细胞核层次较清楚，可见分成三层的靶形病变细胞。

细胞病变的程度用“+”表示：

0：表示无细胞病变。

+表示 25%的细胞病变。

++表示 25-50%的细胞病变。

+++表示 50-75%的细胞病变。

++++表示 75-100%的细胞病变。

实验十七 病毒的半数组织感染量 (TCID₅₀) 和蚀斑分析

病毒感染机体以后, 或进行复制大量增殖, 或被宿主免疫系统识别最终被清除, 或者以某种方式形成潜伏性感染。病毒感染以后对宿主造成怎样的影响, 与病毒在机体中的复制水平密切相关。因此采取合适的临床样本, 进行病毒分离或定量分析, 对临床鉴定诊断和确定病程进展具有重要的参考意义。目前定量病毒滴度的方法有很多种, 例如利用病毒感染后细胞形态和特性发生改变的方法有病毒半数组织感染量 (TCID₅₀) 分析、病毒蚀斑分析 (Plaque assay)、病毒诱导细胞转化分析等, 以及其它如利用病毒对红细胞凝集能力、PCR 技术对病毒核酸、免疫印迹对病毒抗原进行定量分析等。本实验主要介绍两种常见的病毒定量技术, 病毒 TCID₅₀ 的测定和病毒蚀斑形成分析。

一、病毒 TCID₅₀ 的测定

病毒感染和增殖以后, 如何确定病毒滴度的变化? 如果病毒感染导致细胞呈现在显微镜下肉眼可辨的细胞病变效应 (CPE), 或者利用其它实验仪器和设备可以定量测定细胞被病毒感染后的明显变化。则可以通过测定病毒半数组织感染量 (TCID₅₀) 的方法进行确定。本实验以肠道病毒 EV71 为例, 对测定的原理和操作过程予以说明。

【原理】病毒感染细胞后常导致细胞出现病变 (CPE)。含病毒样品经一系列稀释之后, 比如将待测病毒样品连续按 10 倍稀释。然后取等量体积的病毒液分别感染敏感单层细胞, 观察病毒感染 3-4d 后, 出现 CPE 的细胞孔的数量和比例。通过观察或测定每一个稀释度诱导细胞病变的能力。然后经统计分析, 可以确定病毒 TCID₅₀。

【材料】RD 细胞 (横纹肌肉瘤细胞)、DMEM+10% FBS 的完全培养基、不含胎牛血清的 DMEM 培养基、96 孔细胞培养板、移液器、细胞培养箱等。

【方法和步骤】

1. 单层细胞的准备:

- 1) 将测定用的 96 孔板四周所有孔 (共 36 孔) 加入无菌三蒸水各 100ul。
- 2) 用胰酶消化细胞, 显微镜下用细胞计数器对细胞进行计数, 然后用 DMEM 完全培养基稀释细胞悬液, 将细胞密度调整为 2×10^5 细胞/ml。在 96 孔板中央区域的孔中, 加入 100ul/孔稀释好的细胞悬液。
- 3) 静置后放入培养箱中, 37℃ 和 5% CO₂ 培养过夜 (24 h), 形成 80-90% 汇合的细胞单层。

2. 病毒样品的稀释和感染细胞:

- 1) 将待测病毒样品以无血清 DMEM 培养基连续按 10 倍稀释, 依据原病毒液可能的滴度连续稀释 7-8 个稀释度;
- 2) 弃单层细胞培养上清液, 加入病毒稀释液, 每个病毒稀释度至少加入 5-10 孔细胞

中；

3) 将加有病毒的细胞重新置于 CO₂ 细胞培养箱培养，让病毒感染 1-2h，期间每隔 30 分钟轻柔混合病毒稀释液，使病毒充分接触并感染细胞；

4) 病毒感染细胞后，用移液器吸弃病毒稀释液。重新加入 DMEM+10%FBS 的完全培养基 100ul/孔，然后放入细胞培养箱中培养 3 天。

3. 细胞病变的观察：

细胞经病毒长时间感染以后，是否产生 CPE,需要利用显微镜对细胞状态进行观察，利用未被病毒感染的细胞为对照，观察不同稀释度病毒是否导致出现 CPE（图 17-1），以及出现 CPE 的细胞孔的数量，出现 CPE 的以“+”标记，反之标记为“-”。并计算出现 CPE 的细胞孔数量占这个稀释度感染细胞孔的百分比。

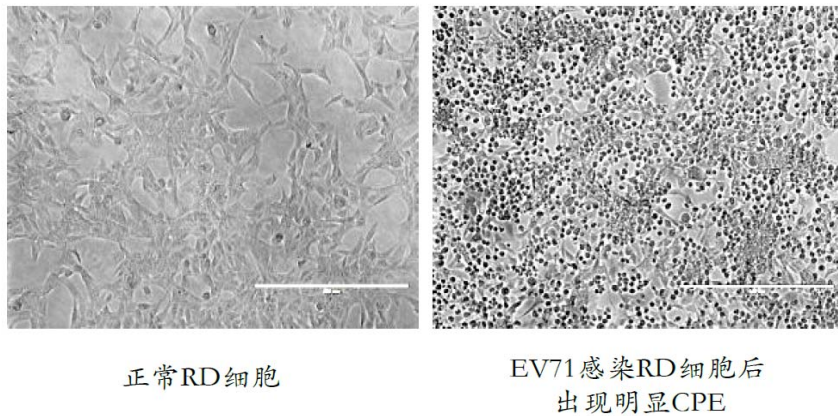


图 17-1 显微镜观察细胞形态变化，确定细胞被病毒感染后是否出现细胞病变（CPE）

【附录】细胞 CPE 百分比的定量和统计可选方法：细胞 CPE 的变化也可以利用其它方法反应出来，如加入 MTT(3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-di phenyltetrazolium bromide, 噻唑蓝) 试剂，然后通过测定细胞代谢 MTT 的能力，利用比色仪器测定细胞吸收光密度（OD_{570nm} 值）变化，来确定细胞病变的程度。MTT 是人工合成的化合物，可以被细胞线粒体酶分解形成深蓝色物质甲瓚（Formazan），细胞病变或死亡后，MTT 不能被转化，表现为 OD 值无明显增加，因此通过比色能客观反映细胞病变的程度。细胞病变后加入 10ul MTT 溶液 (5.0 mg/ml 溶于 PBS 缓冲液)，继续培养 2-4h，用 DMSO 溶解细胞中的甲瓚，10-30min 后测定 OD_{570nm} 值。则细胞 CPE%可以利用算式： $[1-(\text{病毒感染细胞 OD}_{570\text{nm}}/\text{正常 OD}_{570\text{nm}})] \times 100\%$ 进行计算。相对来说，通过仪器测定获得的结果，由于避免了肉眼观察 CPE 的主观性，获得的结果更为客观。

4. 病毒 TCID₅₀ 的统计和计算：

根据病毒感染细胞出现 CPE 的细胞孔数量，计算病毒在某一个稀释度的 CPE%。如图 17-2 举例，稀释 10^6 倍时导致 CPE 为 3 孔，计 60% CPE；稀释 10^7 倍时导致 CPE 为 1 孔，计 20% CPE，然后根据不同稀释度累计诱导 CPE 百分比（CPE%）的量进行统计，计算病毒 TCID₅₀。

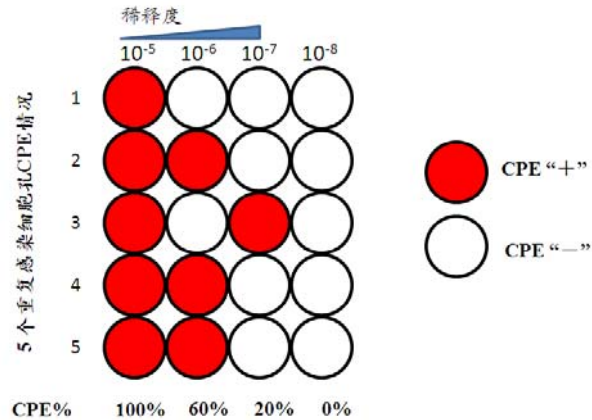


图 17-2 病毒诱导细胞 CPE 的计算和统计

病毒不同稀释度诱导细胞 CPE%的累计统计和计算病毒 TCID₅₀，可以按照下列方法进行计算：

1. 介于导致细胞 50% CPE 的两个病毒稀释度之间的均衡距离（Proportionate distance, PD）PD 值的计算： $PD = (CPE\%_{\text{大于} 50\% CPE \text{的稀释度}} - 50\%) / (CPE\%_{\text{大于} 50\% CPE \text{的稀释度}} - CPE\%_{\text{小于} 50\% CPE \text{的稀释度}})$ 。如上图, $PD = (60\% - 50\%) / (60\% - 20\%) = 0.25$;

2. 计算导致细胞 50% CPE 的滴定终点（50% end point）值：该值为 CPE% 大于 50% 的最大稀释度的对数值（对数的底数取决于梯度稀释时连续稀释倍数，如图 17-2 以 10 为倍数连续稀释，则底数为 10），如上图滴定终点值为 $\log(10^{-6}) = -6$;

3. 计算滴定终点到均衡距离之和 S：如上图： $S = -6 - 0.25 = -6.25$;

4. TCID₅₀ 计算： $\text{Log TCID}_{50} = 10^{6.25}$ ，则 $\text{TCID}_{50} = 1.78 \times 10^6$;

5. 采用原病毒液的体积：比如我们用 10μl/孔病毒液感染细胞；

6. 最后计算 $\text{TCID}_{50}/\text{ml} = (1000\mu\text{l}/10\mu\text{l}) \times 1.78 \times 10^6 = 1.78 \times 10^8$ 。

二、病毒蚀斑分析（Plaque assay）实验

病毒感染和增殖以后，确定病毒滴度的变化，一些病毒除可以用上述病毒半数组织感染量（TCID₅₀）的方法进行确定外（这类病毒感染将导致细胞出现肉眼可见的 CPE 或利用其它方法检测细胞 CPE 变化，如 MTT 法等）。如果有些病毒感染细胞后可导致细胞裂解，则可

以通过测定病毒经连续稀释后，诱导细胞形成蚀斑的数量来进行病毒的定量。蚀斑的形成一方面可以用于病毒定量分析，另外病毒的蚀斑特征还是研究病毒性质重要内容。下面同样以肠道病毒 EV71 为例，来说明病毒蚀斑分析的一般实验流程。

【原理】 病毒蚀斑分析主要适用于那些病毒增殖以后可以导致细胞裂解的病毒定量分析和特征研究。病毒感染敏感单层细胞后，去除未感染游离病毒，然后利用固定覆盖物（如琼脂糖、羧甲基纤维素等）限制感染和进一步增殖的病毒在细胞间随意扩散。由于细胞被病毒感染裂解后形成空斑，所以有的文献中也称病毒空斑分析。一个空斑对应着来源于一个有感染活性的病毒，计为一个蚀斑形成单位（Plaque forming unit, PFU）。病毒裂解细胞后形成的空斑可以用多种染料，如中性红、结晶紫、MTT 等进行着色区别。由于活细胞可以被上述染料着色，而裂解后的死细胞不被着色，因而形成肉眼可见的空斑。实验原理和流程见图 17-3。

【材料】 无菌吸头、移液管，六孔细胞培养板或 6cm 细胞培养皿，用 3dH₂O 配制并灭菌的 1.2% 低熔点琼脂糖、新鲜配制的 0.1% 中性红（中性红储存液配制：0.5g 中性红粉末放入 50ml 的 3dH₂O 中（1.0%），在 37℃ 中温育 30min，让粉末完全溶解，然后用 3M 滤纸过滤，室温避光保存；新鲜工作液配制：用 0.9% NaCl 稀释上述 1.0% 中性红储存液成终浓度 0.1% 的使用液。注意不能用 PBS (PH 7.4) 等偏碱性等渗透溶液溶解中性红，否则颜色会变成黄色，也不要低温长期储存和光照，否则易形成沉淀。）或 0.5% 结晶紫（0.1g 结晶紫溶解在 100ml 福尔马林-PBS 溶液中，用 3M 滤纸过滤，4℃ 储存备用）、或用 PBS 缓冲液配制的 MTT(5mg/ml，0.22um 膜过滤除菌)；DMEM+10%FBS 完全细胞培养液；低血清浓度的 DMEM 培养基（2×DMEM+4.0%FBS 细胞培养液），无血清 DMEM 培养液。

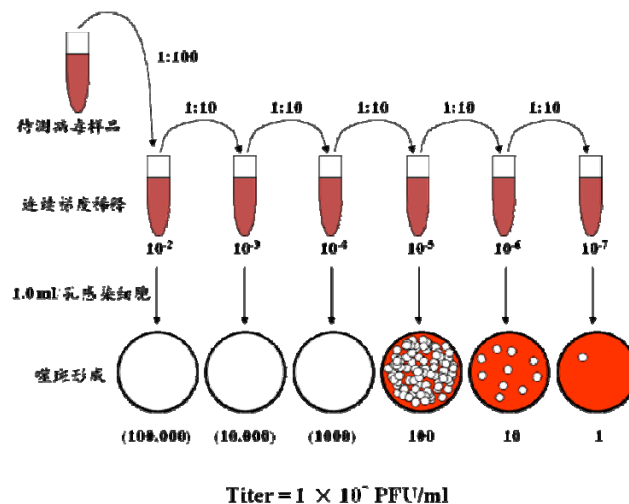


图 17-3 病毒蚀斑分析

【方法和步骤】

1. 单层细胞的准备:

1) 用胰酶消化细胞, 显微镜下用细胞计数器对细胞进行计数, 然后用 DMEM 完全培养基稀释细胞悬液, 将细胞密度调整为 5×10^5 细胞/ml。在 6 孔板中加入 2.0 ml/孔稀释好的细胞悬液。

2) 静置后放入培养箱中, 37°C 和 5% CO_2 培养过夜 (24h), 形成 90-100%汇合的细胞单层。

2. 病毒样品的稀释和感染细胞:

1) 将待测病毒样品以无血清 DMEM 培养基连续按 10 倍稀释, 依据原病毒液可能的滴度连续稀释 7-8 个稀释度;

2) 弃单层细胞培养上清液, 加入病毒稀释液, 每孔细胞中加入病毒稀释液 0.5 ml;

3) 将加有病毒的细胞重新置于 CO_2 细胞培养箱培养, 让病毒感染 1-2h, 期间每隔 30 min 轻柔混合病毒稀释液, 使病毒充分接触并感染细胞;

3. 低熔点琼脂糖覆盖物的准备和覆盖病毒感染细胞

1) 病毒感染后, 用移液器将没有吸附的游离病毒吸出弃去;

2) 在 50ml 离心管中, 轻柔混合 1.2%琼脂糖溶液和 $2 \times \text{DMEM}/\text{F12} + 4\% \text{FBS}$ 培养基以免产生气泡, 然后每孔加入 2ml 低血清 0.6%琼脂糖覆盖物。

注意: 在病毒感染期间, 准备好琼脂糖覆盖物: 下面是一块 6 孔板的用量 (每孔需加入覆盖物 2.0 ml, 可根据使用细胞板的数量按比例适当调整): 7.0 ml 的 $2 \times \text{DMEM} + 4\% \text{FBS}$ 培养基于 50ml 无菌离心管中放置于 37°C 水浴箱中温育, 7.0 ml 灭菌的 1.2%琼脂胶放在 42°C 水浴 (用 $3\text{dH}_2\text{O}$ 配制的 1.2%琼脂糖提前高压灭菌, 放在微波炉里融化, 然后在 42°C 温育, 使用时拿出与 $2 \times \text{DMEM} + 4\% \text{FBS}$ 培养基混合, 制成终浓度为 0.6%的琼脂糖凝胶覆盖物); 注意稍微加快操作, 不要耽误太久, 10-15 min 内完成覆盖的操作, 以免琼脂糖凝固。

3) 将加有覆盖物的细胞培养板放置于室温 10-20 min, 待琼脂糖凝固, 然后把它放回细胞培养箱中, 继续培养 3 天。

4. 蚀斑染色和计数

1) 病毒感染细胞并培养 3 天后, 在每孔中加入 0.5 ml 新鲜配制的 0.1%中性红等渗溶液, 然后立即放回 37°C 培养箱中继续温育 4-6 h。

2) 小心拿出六孔细胞培养板, 轻柔除去琼脂糖覆盖物和染色液, 晾干后计数蚀斑。

【附录】其它染色方法

病毒蚀斑还可使用含 0.5%结晶紫的福尔马林溶液, 或者 MTT 溶液染色, 然后按上述类似方法去除覆盖物和染色液, 计数蚀斑。用 MTT 染色还可以通过挑取蚀斑来分离纯化病毒。

5. 病毒滴度的计算

用 PFU/ml 的方式计算病毒滴度：病毒滴度用 PFU 来表示，因为我们感染病毒用的是 500ul 的稀释病毒溶液，所以 PFU 用以下公式计算：

$$\text{PFU/ml} = \text{蚀斑数} \times \text{蚀斑计数的孔对应的病毒稀释倍数} \times 1000/500$$

例如：如果我们计数蚀斑的孔对应病毒稀释的倍数是 10^5 ，蚀斑的数量是 20，即病毒滴度为： $\text{PFU/ml} = 20 \times 10^5 \times (1000/500) = 4 \times 10^6 \text{ PFU/ml}$ 。

思考题：

1. 如果采用 MTT 法，通过测定病毒感染细胞后 OD 值变化，来确定病毒诱导细胞 CPE 的百分比，最后如何计算病毒样品的 TCID₅₀/ml 值？
2. 有哪些实验因素会影响病毒 TCID₅₀ 和 PFU 的最终测定值？
3. 同样是病毒滴度的定量分析，比如测定同一个 EV71 病毒样品，最后获得的这个病毒样品 TCID₅₀ 和 PFU 值之间有无关系？
4. 按照测定病毒 TCID₅₀ 的操作方法，书写测定一个病毒样品的完整实验报告。

（编写：龙健儿）

实验十八 病毒感染后血清抗体测定

病毒侵入机体后,刺激机体产生免疫反应,并在血液中出现抗体,抗体在机体内可持续存在一定时期。因此,应用已知病毒测定抗体的存在和滴度,就可以协助诊断是否有病毒感染。如果只采取恢复期的血清,即使测到抗体也只说明过去有过该病毒的感染,而不能确定最近的感染系由该病毒所引起。只有在疾病的早期和恢复期采取双份血清检测抗体,且恢复期抗体较早期血清抗体效价升高四倍以上时,再结合临床表现,才有诊断价值。如能检测到血清 IgM 抗体,则毋须双份血清,即可达快速诊断的目的。

一、红血球凝集及血球凝集抑制试验

某些病毒或病毒的血凝素能选择地引起个别种类的哺乳类或禽类的红细胞发生凝集,此即为红细胞凝集现象。这种红细胞凝集现象可被病毒(或其血凝素)悬液中加入特异性免疫血清或病人血清所抑制,即为红细胞凝集抑制试验。在疾病发病早期和恢复期采取双份血清。经检测,恢复期抗体较早期血清抗体效价升高四倍以上时,再结合临床表现,可作诊断依据。

(一)血凝试验(红细胞凝集试验)(表 18-1)

【材料】

1. 流感病毒鸡胚尿囊液:将流感病毒接种于 9-11 天胚龄的鸡胚尿囊腔内(若初次分离物应接种鸡胚羊膜腔内)。37℃ 孵育 48 h,随时观察胚蛋活动情况。温箱内应保持一定湿度。48 h 后,鸡胚若处于濒死状态时即收取尿囊液,3000 r/min,离心 15 min,上清含血凝素。血凝素在-30℃ 保存,可保持其活性几个月至几年。

2. 红血球:取鸡血加入 2% 枸橼酸盐水,其比例为 4:1,迅速混合,存放于 4℃ 冰箱,时间不超过一周。使用前取红细胞悬液加 5-10 倍体积生理盐水洗涤三次,最后一次以 2000 r/min 的速度沉淀 10 min,洗涤后的红细胞按容积用生理盐水稀释成 0.5% 悬液备用。

【方法】

1. 排列小试管 10 支,编号
2. 按下列表顺次加入各种材料。

表 18-1 血凝试验操作方法

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
鸡胚尿囊液0.1ml										
生理盐水 (ml)	0.9	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5
病毒稀释度	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:2560	阴性对照	
生理盐水	第1管弃去0.5ml混合液, 然后各管加0.25ml生理盐水									
0.5%鸡红血球悬液	各管加0.25ml									
摇匀, 置室温60~90min										
记录各管反应结果										

注: 各管血凝结果以++++、+++、++、+、±、-表示, 自管底观察。

一层红细胞均匀铺于管底者为++++。

基本同上, 但边缘不整齐, 有下垂趋向者为+++。

血球于管底形成一个环状, 四周有小凝集块者为++。

血球于管底形成一个小团, 但边缘不光滑, 四周有小凝块者为+。

血球于管底形成一个小团, 边缘光滑圆润者为-。

结果以++为终点, 亦即一个凝集单位。做血凝抑制试验时, 4个单位的血凝素即为++管向左移二管的稀释。如病毒的血凝稀释度为1/640, 则4个单位为1/160, 将鸡胚尿囊液用160倍稀释即为4个单位。

(二)血凝抑制试验 (表 18-2)

【材料】病人血清、流感病毒 (4个血凝单位)、0.5%鸡红细胞、生理盐水、试管、试管架、1ml吸管。

【方法】

1. 排列 11 支小试管, 编号。
2. 按下表顺次加入各种材料。
3. 摇匀, 置室温 60-90 min, 按血凝结果标准判断观察结果, 即在对照管均正常的情况下, 不出现血凝的最高稀释管的稀释倍数即为血凝抑制抗体的效价。

表 18-2 血凝抑制试验操作方法

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
病人血清 0.1ml									0.25ml 弃去		
生理盐水 (ml)	0.9	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
血清稀释度	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160		1:1280	血清对照	病毒对照	血球对照
4单位病毒悬液	取第1管稀释血清0.25ml加入第9管作血清对照管；第11管加0.25ml生理盐水作血球对照管，其余各管加病毒液0.25ml。										
0.5%鸡红血球悬液	各管加0.25ml										
摇匀，置室温60~90min											
记录各管反应结果											

二、中和试验

病毒中和试验是抗体在试管中的中和反应，通过易感动物，鸡胚培养或组织（细胞）培养反映出来。原来病毒可对动物易感、鸡胚或组织（细胞）培养致一定病变，因经特异性抗体中和而失去致病性。可用于检查病人血清中抗体的增长，也可以用来鉴定未知病毒。常用于流行病学调查，在诊断一般疾病时不常用。试验时将病人血清作一系列递倍稀释后加入定量的已知病毒，作用一定时间后，接种于易感动物、鸡胚或组织（细胞）培养系统中，观察一段时间。如果易感动物不发病死亡、或鸡胚不死、或组织（细胞）培养不出现病变，则表示该病人血清中含有一定量的特异性中和抗体。说明病人曾经历过该病毒的感染。

【材料】脊髓灰质炎病毒 I 型、病人血清、Hela 细胞培养小瓶、细胞维持液：含 5% 小牛血清 Eagle 液。

【方法】

(一) 病毒液制备

1. 接种：将已知 I 型脊髓灰质炎病毒分别接种 Hela 细胞 3-5 瓶，病毒液 1 ml 加维持液 9 ml/瓶。
2. 培养：37 °C 温箱
3. 收获：一般培养 1~3 天，细胞病变达++++时收获细胞培养液。
4. 离心：将收获的病毒液经 2000 r/min 15 min 离心沉淀，去除细胞碎屑，混匀。
5. 分装：将混匀病毒分装成 1 ml 管，同时作无菌试验，证实无菌后冰冻保存。作病毒滴定用。

(二) 病毒滴定：(参见实验十七)

(三) 中和试验步骤：

1. 固定病毒：在中和反应中，通常用病毒滴度为 100 TCID₅₀。一个 TCID₅₀ 是指，如 10^{-4.5} 即一个 TCID₅₀，如 10^{-2.5} 为 100 个 TCID₅₀。例如，病毒滴度为 100 TCID₅₀，具体稀释度为 1:316 (查反对数表)

2. 稀释血清：先将血清 56℃ 30 min 灭活补体，然后用细胞维持液将血清作不同的稀释度稀释 1:10, 1:40, 1:160, 1:640, 1:2560

3. 加病毒：将含 100 TCID₅₀ 的病毒与各稀释度的血清等量混匀，置 37℃ 水浴作用 2 小时，然后分别吸取每个稀释度的血清与病毒的混合物 0.2 ml 接种于加有 0.8 ml 维持液的细胞培养管中，每个稀释度种 2 管。同时做下列对照：

病毒对照 0.1 ml 病毒+0.9 ml 维持液

血清对照 0.1ml (1:10)血清+0.9 ml 维持液

细胞对照 加 1 ml 维持液

4. 结果判定：接种后每天或隔天观察细胞病变，第 7 天判定最后结果。

一般病毒对照于第 2 天出现+~++病变，3-5 天达++++病变，细胞对照及血清对照为阴性(极少数 1:5 血清对细胞有毒性，但能与特异性病变相区别)。待试血清最高稀释度能抑制 50% 细胞病变出现即为该血清中和抗体的效价(2 管中有 1 管未出现病变者)。

举例：

表 18—3 中和试验结果判断

血清稀释倍数	试验管	病毒对照	细胞对照	血清对照
1:10	○ ○	● ●	○ ○	○ ○
1:40	○ ○			
1:160	● ○			
1:640	● ●			
1:2560	● ●			

注：“○”—无细胞病变； “●”—有明显病变(++以上)。

试验血清中和抗体效价为 1: 160。

实验十九 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)

酶联免疫吸附法，应用酶标记抗-HBs 检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)或酶标记 HBsAg，检测表面抗体(抗-HBs)。

本实验系采用酶标记抗 HBs 检测乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)，即待测乙型肝炎患者的血清标本中是否含 HBsAg。

1. 包被：将纯化的抗-HBs IgG，用包被液(pH9.5, 0.05 mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液)稀释，加至聚苯乙烯塑料小管中，每管 0.1 ml，放入湿盒内 4℃、24-48 h 弃包被液，用洗涤液(pH9.0, 0.02 mol / L Tris-Tween20 缓冲液)洗 3 次，每次 5 min，吸干待用。

2. 加样：每管加待测标本 0.1 ml(每组做 1 号及 2 号标本各 1)，同时加已知阴性、阳性对照各 1 管。置 37℃ 2h，吸干样品，用洗涤液洗 4 次，吸干。

3. 加酶结合的标记抗体：每管加酶标记抗-HBs 0.1ml，置 37℃ 1h。用洗涤液洗 4 次，吸干。

4. 加底物：每管加底物 0.1ml，置 37℃ 0.5 h。

5. 终止反应：每管加终止液 (1 mol/L H₂SO₄) 1 滴终止反应，肉眼观察结果，或用紫外分光光度计读数，作定量检测。

表 19—1 酶免疫一步法检测 HBsAg(TMB-快速法)*试剂盒组成：

1. 微孔反应条	12 孔×4	6. 显色剂 A	1 瓶
2. 酶联试剂	1 瓶	7. 显色剂 B	1 瓶
3. 阳性对照	1 瓶	8. 终止液	1 瓶
4. 阴性对照	1 瓶	9. 封片	数片
5. 洗涤液(使用时 1:25 稀释)			

*药盒由上海实业科华生物技术有限公司提供

操作程序：

1. 每孔加入待测标本 100μl 设阴、阳性对照各 2 孔，每孔加入阴性对照或阳性对照各 2 滴，并设空白对照 1 孔。

2. 每孔加入酶联试剂 1 滴(空白对照孔除外)，充分混匀，封板，置 37℃ 孵育 30 分钟。

3. 手工洗板：弃去孔内液体，洗涤液注满各孔，静置 5 秒钟，甩干，重复五次后拍干。

4. 每孔加显色剂 A 液、B 液各 1 滴，充分混匀，封板，置 37℃ 孵育 15 分钟。

结果判断:

比色法(波长 450 nm): 每孔加入终止液 1 滴, 混匀, 先用空白孔校零, 然后读取各孔 OD450nm 值。

$$\frac{\text{样品 OD 值}}{\text{阴性对照平均 OD 值}} \geq 2.1 \text{ 判断为阳性, 否则为阴性。}$$

【备注】阴性对照 OD 值低于 0.05 作 0.05 计算, 高于 0.05 按实际 OD 值计算。

注意事项:

1. 使用前试剂应摇匀, 并弃去 1-2 滴后垂直滴加。
2. 试剂盒应置 2-8 °C 中保存。
3. 从冷藏环境中取出的试剂盒内部分瓶装试剂及待测标本所需微孔条应置 37 °C 平衡 30 分钟后方可使用。余者应及时封存于冰箱中以备后用。在平衡试剂的同时, 待测标本需置室温平衡 30 min 后再行测试。
4. 待测标本不可用 NaN_3 防腐。
5. 结果判断须在 10 min 内完成。
6. 不同批号的试剂不可混用。
7. 封片不能重复使用。
8. 如需稀释标本, 请用小牛血清稀释。