

# 第1章

## 禽流感病毒

### 1.1 简介

禽流感病毒 (*Avian influenza virus*) 属于甲型流感病毒, 按照致病性的不同分成高致病性、低致病性和非致病性禽流感病毒 3 类, 目前 H5N1、H5N6、H5N8、H7N2、H7N3、H7N7、H9N2、H7N9、H6N1、H10N7、H10N8、H3N8 亚型能够直接感染人类。禽流感病毒的形态呈球形或者丝状, 直径为 80 ~ 120 nm, 自外而内分为 3 个部分, 依次是包膜、基质蛋白和核心。基因组由 8 个节段组成。禽流感病毒不耐热, 56℃、30 min 能使病毒灭活。高致病性禽流感病毒主要经呼吸道传播, 通过密切接触感染的禽类及其分泌物、排泄物, 受病毒污染的水等, 以及直接接触病毒毒株被感染。

### 1.2 病毒分离培养

H7N9 亚型和 H10N8 亚型禽流感病毒、高致病性禽流感病毒 H5N1、H5N6、H7N7、H7N4 等要求在生物安全三级实验室 (biosafety level laboratory-3, BSL-3) 进行病毒分离。低致病性 H9N2 亚型病毒在生物安全二级实验室 (biosafety level laboratory-2, BSL-2) 进行病毒分离。病毒分离必须遵守生物安全实验室的有关规定, 并严格执行标准操作规程和废弃物管理规定。

#### 1.2.1 器材与试剂

##### 1. 器材

生物安全柜、4℃冰箱、37℃鸡胚培养箱、-80℃超低温冰箱。

## 2. 耗材

9 ~ 11 日龄无特定病原体鸡胚、照卵灯、75% 乙醇、一次性注射器、开孔器、无菌镊子、15 mL 无菌离心管、10 mL 移液管。

### 1.2.2 操作流程

- (1) 用照卵灯检测鸡胚，标记出鸡胚的气室与尿囊腔的界限以及胚胎的位置。
- (2) 将鸡胚的气室朝上放置在蛋盘上，标记每个鸡胚，通常每个样本接种 3 个鸡胚。
- (3) 用 75% 乙醇消毒鸡胚表面，在气室端打孔器开孔，开约 6 mm × 6 mm 裂口。
- (4) 用一次性 1 mL 注射器吸取 200 μL 经多种抗生素处理过的临床标本接种至鸡胚尿囊腔。
- (5) 37℃ 培养箱培养，每天检查鸡胚生长情况。不同亚型的禽流感病毒培养时间不同（高致病性 H5N1 和 H5N6 禽流感病毒的培养时间不超过 40 h；H7N9 禽流感病毒培养时间 72 h；H9N2 禽流感病毒培养时间 48 h）。
- (6) 收获鸡胚尿囊液。
- (7) 鸡胚在收获前应置 4℃ 环境过夜或至少放置 4 h。标记 15 mL 无菌管与相应的鸡胚编号一致。用 75% 乙醇消毒鸡胚顶部。用无菌镊子撕破鸡胚气室蛋壳，用 10 mL 吸管吸取鸡胚尿囊液置于相应的收集管中。
- (8) 将鸡胚尿囊液 3 000 r/min 离心 5 min，进行红细胞凝集试验。如果第一代红细胞凝集试验结果为阴性，应再进行鸡胚盲传 2 次。
- (9) 测定分离后禽流感病毒的 HA 滴度，冻存于 -80℃ 低温冰箱。

## 1.3 分子鉴定

### 1.3.1 核酸提取

实际工作中常应用商业试剂盒提取，本章列举一病毒试剂盒核酸提取步骤，具体操作可参见各自所用试剂盒说明书。

- (1) 从试剂盒中取出 RLT 液，用 1.5 mL 离心管分装，每管 500 μL。
- (2) 在生物安全柜内将待检样本取 100 μL 加入 RLT 液管中，充分混匀。RPE 缓冲液使用前加 44 mL 无水乙醇。每管加入 5 μL β-巯基乙醇，混匀后加入 600 μL 70% 乙醇，充分混匀。从试剂盒中取出带滤柱的 2 mL 收集管，取混合液 600 μL 加入滤柱中，12 000 r/min 离心 15 s，弃收集管中的离心液。
- (3) 将滤柱放回收集管上，将剩余的混合液全部加入滤柱中，12 000 r/min 离心 15 s，弃离心液。
- (4) 滤柱中加入 700 μL RW1 洗涤液，12 000 r/min 离心 15 s。
- (5) 将离心后的滤柱移到一洁净 2 mL 收集管上，于滤柱中加入 500 μL RPE 洗涤液，12 000 r/min 离心 15 s。
- (6) 弃收集管中的离心液，再向滤柱中加入 500 μL RPE 洗涤液，13 000 r/min 离心 1 min。

(7) 弃收集管中的离心液, 13 000 r/min 离心 1 min。

(8) 将滤柱移至一干净 1.5 mL 离心管上, 向滤柱中加入 30 ~ 50  $\mu\text{L}$  的无 RNA 酶水, 室温静置 1 ~ 3 min。12 000 r/min 离心 1 min, 收集离心液即为提取的病毒 RNA, 立即做实验或  $-80^{\circ}\text{C}$  以下保存。

### 1.3.2 序列测定

流感病毒二代测序以高通量为主要特点, 无须使用特异性引物, 同时也解决了一代测序无法完成的混合标本的测序问题。目前应用于微生物领域的深度测序平台有很多, 测序原理各有不同。

#### 1. 试剂及耗材

实时荧光定量 PCR 试剂盒、PCR 纯化试剂盒、核酸定量分析试剂盒及相关耗材、离心管、PCR 板、封板膜、吸头。

#### 2. 设备

BSL-2 生物安全柜、涡旋混合器、普通离心机、水平板式离心机, 10  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$  量程移液器、PCR 仪、电泳装置、真空抽滤装置 (可选, 用于扩增产物纯化)、核酸定量检测荧光计、深度测序仪。

#### 3. 注意事项

- (1) 核酸提取、反应液配制及产物检测应在独立的房间中进行。
- (2) 不同的房间配备相应的专用耗材和设备, 不可交叉使用。
- (3) 实验操作期间, 如怀疑有污染, 应立即更换手套。
- (4) 实验过程中, 尽量保持所有试剂放置在低温装置中, 如预冷的冰盒或金属浴。
- (5) 操作台的表面、吸头和离心机应保持洁净, 使用去除核酸的试剂擦拭台面, 以降低核酸污染的风险。

#### 4. 流感病毒全基因组扩增

1) A 型流感反应体系及引物序列见表 1-1-1。

表1-1-1 A型流感反应体系及引物序列

| 组 分                                     | 体 积                     |
|---|-------------------------|
| DEPC 水                                  | 14 $\mu\text{L}$        |
| 2 $\times$ Reaction 缓冲液                 | 25 $\mu\text{L}$        |
| 10 $\mu\text{mol/L}$ Mni-12/Inf1 (引物 A) | 0.4 $\mu\text{L}$       |
| 10 $\mu\text{mol/L}$ Mni-12/Inf3 (引物 B) | 0.6 $\mu\text{L}$       |
| 10 $\mu\text{mol/L}$ Mni-13/Inf1 (引物 C) | 1 $\mu\text{L}$         |
| RT/HiFi enzyme mix                      | 1 $\mu\text{L}$         |
| RNA                                     | 8 $\mu\text{L}$         |
| 总计                                      | 50 $\mu\text{L}$        |
| 组 分                                     | 序 列                     |
| Mni-12/Inf1 (引物 A)                      | 5'-GGGGGGAGCAAAGCAGG-3' |

续表

| 组 分                | 序 列                          |
|--------------------|------------------------------|
| Mni-12/Inf3 (引物 B) | 5'-GGGGGGAGCGAAAGCAGG-3'     |
| Mni-13/Inf1 (引物 C) | 5'-CGGGTTATTAGTAGAAACAAGG-3' |

注：引物浓度 10 μmol/L。

2) A 型流感病毒全基因组扩增反应条件见表 1-1-2。

表1-1-2 A型流感病毒全基因组扩增反应条件

| 温 度 | 时 间    | 循 环 数 |
|-----|--------|-------|
| 45℃ | 60 min | —     |
| 94℃ | 2 min  |       |
| 94℃ | 30 s   | 5     |
| 44℃ | 30 s   |       |
| 68℃ | 30 s   |       |
| 94℃ | 30 s   | 31    |
| 57℃ | 30 s   |       |
| 68℃ | 3 min  |       |
| 68℃ | 7 min  |       |
| 4℃  | 保存     | —     |

3) 扩增产物检测。

将 PCR 扩增产物进行电泳检测，确保扩增出流感病毒的 8 个基因片段，方可进行后续建库操作。

(1) 扩增产物纯化。

详细步骤见试剂盒说明书。

(2) 扩增产物定量。

详细步骤见试剂盒说明书。

### 5. 文库构建与测序

不同的二代测序平台具有不同的测序原理和不同的文库构建方法，具体参见试剂盒说明书。定量分析文库后上机测序。

## 1.4 实时荧光定量 PCR

### 1.4.1 生物安全要求

疑似高致病禽流感病例标本的裂解需在 BSL-2 级实验室操作，采取 BSL-3 级防护；核酸提取及加

RNA 模板可在 BSL-2 级实验室生物安全柜内操作。

### 1.4.2 试剂和耗材

实时荧光定量 PCR 试剂盒、正反向引物 (40  $\mu\text{mol/L}$ )、双标记探针 (10  $\mu\text{mol/L}$ )、分子级无菌无核酶水、核酸阳性对照 RNA、1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 管、10  $\mu\text{L}$  带滤芯吸头、20  $\mu\text{L}$  带滤芯吸头、100  $\mu\text{L}$  带滤芯吸头、1 000  $\mu\text{L}$  带滤芯吸头。

### 1.4.3 操作流程

(1) 操作台的表面、吸头和离心机应保持洁净, 可用 0.5% 含氯消毒剂或其他清洁剂, 如可以用含 DNA 酶的核酸污染去除剂擦拭台面, 以减少核酸污染的风险。配制反应液期间, 尽量保持所有试剂放置在低温装置中, 如预冷的冰盒。

(2) 反应体系配制: 按照如下组分配制反应体系 (表 1-1-3), 引物序列详见表 1-1-5。

表1-1-3 PCR反应体系

| 组 分                    | 体 积                |
|------------------------|--------------------|
| 2 × RT-PCR 缓冲液         | 12.5 $\mu\text{L}$ |
| 25 × RT-PCR Enzyme Mix | 1 $\mu\text{L}$    |
| 上游引物                   | 0.5 $\mu\text{L}$  |
| 下游引物                   | 0.5 $\mu\text{L}$  |
| 探针                     | 0.5 $\mu\text{L}$  |
| 无 RNA 酶水               | 5 $\mu\text{L}$    |
| 总计                     | 19 $\mu\text{L}$   |

(3) 将上述反应液混匀, 分装到 0.2 mL PCR 小管中, 每管 20  $\mu\text{L}$ , 分别做好标记。将上述分装好的 PCR 小管分别加入模板 (在核酸提取区)。首先加入阴性对照管 (5  $\mu\text{L}$  无菌水), 其次分别加标本 RNA (每管 5  $\mu\text{L}$ ), 最后加入阳性对照 RNA (每管 5  $\mu\text{L}$ )。

(4) 实时荧光定量 PCR 反应条件。将上述加好模板的反应管混匀, 瞬时离心后放入 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 反应 (仪器操作参照相应的 SOP), 不同 PCR 仪反应条件不同, 举例见表 1-1-4。

表1-1-4 PCR反应程序

| 温 度                   | 时 间    | 循 环 数 |
|-----------------------|--------|-------|
| 45 $^{\circ}\text{C}$ | 10 min | 1     |
| 95 $^{\circ}\text{C}$ | 10 min | 1     |
| 95 $^{\circ}\text{C}$ | 15 s   | 40    |
| 60 $^{\circ}\text{C}$ | 45 s   |       |

注: 60 $^{\circ}\text{C}$ 收集荧光信号。

(5) 结果判读: 阴性对照反应得到的荧光曲线不应超过阈值线, 应无  $C_t$  值或  $C_t$  值为零。如果阴性对照产生假阳性, 则说明有污染产生, 此次检测结果无效, 需严格按照操作程序重复实验。阳性对照的

检测结果应为阳性，且  $Ct$  值在 20 ~ 30。如果阳性对照检测结果未达到要求，则需严格按照操作程序重复试验。当所有对照成立，检测标本在 35 个循环内出现荧光信号，则标本阳性；若  $Ct$  值在 35 ~ 40，应重复确认，如  $Ct$  值还在 40 内可判断为阳性；若  $Ct$  值超过 40，则视该样本为阴性。所有的临床标本核糖核蛋白（ribonucleoprotein, RNP）检测结果都必须为阳性，且  $Ct$  值在 35 以内才可证明样品的质量是可接受的。

表1-1-5 H5N1、H5N6、H7N9、H10N8、H9引物和探针序列

| 型 别   | 引物和探针名称 | 碱 基 组 成                                       |
|-------|---------|---|
| FluA  | 上游序列    | 5'-GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C-3'           |
|       | 下游序列    | 5'-GGG CAT TYT GGA CAA AKC GTC TAC G-3'       |
|       | 探针      | 5'-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG -3'        |
| H5    | 上游序列    | 5'-TGG AAA GYG TRA GAA AYG GRA CRT-3'         |
|       | 下游序列    | 5'-YRC TAR GGA ACY CGC CAC TG-3'              |
|       | 探针      | 5'-TAY CCB CAS TAT TCA GAR GAA GC-3'          |
| N1    | 上游序列    | 5'-TAY AAC TCA AGG TTT GAG TCT GTY GCT TG-3'  |
|       | 下游序列    | 5'-ATG TTR TTC CTC CAA CTC TTG ATR GTG TC-3'  |
|       | 探针      | 5'-TCA GCR AGT GCY TGC CAT GAT GGC A-3'       |
| N6    | 上游序列    | 5'-ATC AGA GGG AGA CCC AAA GA-3'              |
|       | 下游序列    | 5'-ATT TCW GCA CCA TCA TGC C-3'               |
|       | 探针      | 5'-CCC AAT CGC TCC YTG GAT CCA-3'             |
| H7    | 上游序列    | 5'-AGA AAT GAA ATG GCT CCT GTC AA-3'          |
|       | 下游序列    | 5'-GGT TTT TTC TTG TAT TTT TAT ATG ACT TAG-3' |
|       | 探针      | 5'-AGA TAA TGC TGC ATT CCC GCA GAT G-3'       |
| N9    | 上游序列    | 5'-TAG CAA TGA CAC ACA CTA GTC AAT-3'         |
|       | 下游序列    | 5'-ATT ACC TGG ATA AGG GTC ATT ACA CT-3'      |
|       | 探针      | 5'-AGA CAA TCC CCG ACC GAA TGA CCC-3'         |
| H9    | 上游序列    | 5'-CAA GCT GGA ATC TGA RGG AAC TTA CA-3'      |
|       | 下游序列    | 5'-GCA TCT GCA AGA TCC ATT GGA CAT-3'         |
|       | 探针      | 5'-CCC AGA ACA RGA AGG CAG CAA ACC CCA TTG-3' |
| H10   | 上游序列    | 5'-GCAGAAGAAGATGGRAAAGGR-3'                   |
|       | 下游序列    | 5'-GCTTCCTCTCTGTACTGTGWATG-3'                 |
|       | 探针      | 5'-TGCATGGAGAGCATMAGAAACAACACCT-3'            |
| N8    | 上游序列    | 5'-AGCTCCATTGTGATGTGTGG-3'                    |
|       | 下游序列    | 5'-AGGAAGAATAGCTCCATCGTG-3'                   |
|       | 探针      | 5'-ACYATGAGATTGCCGACTGGTCA-3'                 |
| RNasP | 上游序列    | 5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'               |
|       | 下游序列    | 5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'              |
|       | 探针      | 5'-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-3'          |

## 1.5 抗体检测

### 1.5.1 微量中和实验

低致病性的 H9N2 病毒在 BSL-2 实验室进行操作；H7N9、H5N1、H5N6、H10N8、H7N4 和 H7N7 在 BSL-3 实验室进行操作。

#### 1. 试剂耗材

(1) 病毒：一般采用接种鸡胚尿囊腔后收获的流感/人禽流感病例病毒分离液或流感/人禽流感代表株病毒液，分装后在  $-80^{\circ}\text{C}$  中保存，并且注意避免反复冻融。进行中和试验之前，需先进行病毒滴度 ( $TCID_{50}$ ) 的滴定。

(2) 血清样品：包括待检血清、阳性及阴性血清对照。如果待检血清有可能需要多次检测，则需将待检血清进行小量分装， $-20^{\circ}\text{C}$  保存即可，避免多次反复冻融。人血清试验前需  $56^{\circ}\text{C}$  灭活 30 min，动物血清需经受体破坏酶 (receptor destroying enzyme, RDE) 处理。

(3) MDCK 细胞和细胞培养液试剂。

MDCK 细胞：低代数的 MDCK 细胞 (传代次数为 25 ~ 30 代)。

细胞培养液：DMEM 培养液、 $100\times$  青链霉素母液 (10 000 U/mL 青霉素 G, 10 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸链霉素)、2 mmol/L 谷氨酰胺、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、HEPES 缓冲液、EDTA- 胰酶。FBS 使用前需  $56^{\circ}\text{C}$  灭活 30 min, 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器过滤除菌后  $4^{\circ}\text{C}$  保存。

(4) 病毒稀释液成分见表 1-1-6。

表1-1-6 病毒稀释液成分

| 组 分  | 体 积     |
|--|---------|
| DMEM 培养液   | 500 mL  |
| 7.5% 牛血清白蛋白 (BSA)  | 77 mL   |
| $100\times$ 青链霉素母液 (10 000 U/mL 青霉素 G; 10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素) | 6 mL    |
| Hepes 缓冲液 (1 mol/L)  | 12.5 mL |

(5) 其他：TPCK- 胰酶 (使用浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，磷酸盐缓冲液 (PBS)，RDE，固定液 80% 丙酮。

(6) ELISA 实验材料。

一抗：小鼠抗甲型流感病毒核蛋白单克隆抗体用封闭液 1:4 000 稀释用。

二抗：辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠 IgG, 用封闭液 1: 2 000 稀释用。  
洗涤液: 0.05% ~ 0.1% Tween-20 的 PBS 溶液 (配制方法: 0.5 ~ 1 mL Tween-20 溶于 1 000 mL PBS 中)。

封闭液: PBS, 1% BSA, 0.1% Tween-20。

显色底物和底物溶液：邻苯二胺 (o-phenylenediamine, OPD)，底物溶液为 pH 5.0 磷酸盐 - 枸橼酸缓冲液 (0.05 mol/L)。将 1 片 OPD (10 mg) 溶解于 20 mL 枸橼酸缓冲液 (含 0.015% 双氧水)；枸橼酸缓冲液、1 个胶囊加入 100 mL 蒸馏水，即配即用。

终止反应液：1 mol/L 硫酸 (28 mL 浓硫酸 + 1 L 蒸馏水)。

## 2. 微量中和实验操作流程

(1) 病毒  $TCID_{50}$  滴定: 取冻存病毒尿囊液, 用病毒稀释液进行 1:100 稀释。第一列 4 个孔每孔加入 146  $\mu\text{L}$  1:100 稀释过的病毒液, 其他各列每孔加入 100  $\mu\text{L}$  病毒培养液。然后用多道加样器从第一孔吸 46  $\mu\text{L}$  至第二孔, 半对数稀释, 使稀释度为  $10^{-2}$ 、 $10^{-2.5}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-3.5}$ 、 $\dots$ 、 $10^{-7}$ 。每孔含有 100  $\mu\text{L}$  病毒液。流感病毒一般在胰酶存在的条件下才能感染 MDCK 细胞, 因此病毒稀释液中需加入终浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 TPCK-胰酶。某些毒性很高的禽流感病毒在无胰酶存在条件下也可感染 MDCK 细胞。将培养板放置在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  条件下 1 h。

(2) MDCK 细胞的制备: 选择细胞密度在 70% ~ 90% 的 MDCK 细胞 (对数生长期)。实验前 2 天, 按照 1:10 的比例传细胞。弃生长液, 在细胞瓶内加入 5 mL EDTA-胰酶, 轻轻漂洗细胞层后弃掉。加入 4 ~ 5 mL EDTA-胰酶使之覆盖在单层细胞上, 置  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内进行消化 (10 min 左右), 加入 5 ~ 10 mL 细胞生长液, 混匀后将细胞液放置离心管内。用 PBS 清洗细胞 2 遍 (1 000 r/min, 10 min)。用病毒稀释液重悬细胞, 并计数。用病毒稀释液配置含  $1.5 \times 10^5$  个细胞 /mL 的细胞液。在培养板每孔内加入 100  $\mu\text{L}$  细胞液, 置  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内 18 ~ 22 h。

(3)  $TCID_{50}$  计算: 根据 Reed 和 Muench 方法对病毒滴度进行计算, 计算出病毒的  $TCID_{50}/100 \mu\text{L}$ , 可按表 1-1-7 Reed and Muench 方法计算  $TCID_{50}$  滴度的病毒稀释度配比情况。

表1-1-7 Reed and Muench方法计算 $TCID_{50}$ 滴度的病毒稀释度配比情况

| 稀释度         | 阳性数目 (1) | 阴性数目 (2) | 阳性数 (3) | 阴性数 (4) | 比率 (5) | 阳性数百分比 (6) |
|-------------|----------|----------|---------|---------|--------|------------|
| $10^{-4}$   | 4        | 0        | 11      | 0       | 11/11  | 100        |
| $10^{-4.5}$ | 4        | 0        | 7       | 0       | 7/7    | 100        |
| $10^{-5}$   | 3        | 1        | 3       | 1       | 3/4    | 75         |
| $10^{-5.5}$ | 0        | 4        | 0       | 5       | 0/5    | 0          |

注 1: 计算各病毒稀释度阳性孔数目 (1) 和阴性孔数目 (2)

注 2: 计算阳性和阴性孔的累积数

阳性孔累积数由下向上累积 (3) 阴性孔累积由上向下累积 (4)

注 3: 计算阳性孔的百分比: 比率 (5) = (3) / [(3) + (4)]

(6) = (5)  $\times$  100%

注 4: 计算距离比

距离比 = (大于 50% 的阳性百分比 - 50) / (大于 50% 的阳性比 - 小于 50% 的阳性百分比)

= (75 - 50) / (75 - 0) = 0.3

$TCID_{50}$  的对数 = 大于 50% 的阳性百分比的最高稀释对数 + 距离比例  $\times$  稀释系数的对数

= 5 + 0.3  $\times$  0.5 = 5.15

$TCID_{50} = 10^{-5.15} / 100 \mu\text{L}$

100  $TCID_{50} / 100 \mu\text{L} = 10^{-3.15}$

100  $TCID_{50} / 50 \mu\text{L} = 10^{-3.15} / 2 = 10^{-3.15} + 0.3 = 10^{-2.8} = 1 : 1\ 631$

注 5: 稀释系数的对数

1:10 稀释为 1; 半对数稀释为 0.5; 倍比稀释为 0.3; 1:5 稀释为 0.7

(4) 待检血清的稀释: 检测一种病毒的中和抗体需要 10  $\mu\text{L}$  血清, 每份血清需进行至少一次重复测定。人血清需  $56^{\circ}\text{C}$  灭活 30 min。在 96 孔板每孔中加入 50  $\mu\text{L}$  病毒稀释液。加完后弃吸头至废液缸中。再补加 40  $\mu\text{L}$  病毒稀释液于 96 孔板第一排中 (A1 ~ A10), 使之成为 90  $\mu\text{L}$  每孔。用微量加样器吸取 10  $\mu\text{L}$  阳性

对照血清、阴性对照血清、待检血清,加入 96 孔板的第一排 (A1 ~ A10)。从 96 孔板的第一排 (A ~ H) 吸取 50  $\mu\text{L}$  液体到第二排,用排枪上下吹吸 5 次混合均匀后再吸 50  $\mu\text{L}$  液体至第三排,如此重复操作直至第八排,随后将液体混合均匀后,弃掉 50  $\mu\text{L}$  液体,使待检血清作系列倍比稀释 (A ~ H),稀释度依次为 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160, 1 : 320 ; 1 : 640, 1 : 1 280。

(5) 病毒的准备: 稀释病毒至 100  $TCID_{50}/50 \mu\text{L}$ 。根据病毒特性选择是否在稀释液中加入 TPCK- 胰酶 (终浓度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。吸取 50  $\mu\text{L}$  病毒液,除细胞阴性对照外,其余每孔中均加入 50  $\mu\text{L}$  病毒液。用微量加样器吸取 50  $\mu\text{L}$  病毒稀释液,加入细胞阴性对照孔中。选择 A11 列孔作病毒滴度核实 (病毒回滴)。在选择作为病毒液滴度核实的那一列的第一孔中加入 100  $TCID_{50}$  的病毒液 50  $\mu\text{L}$ ,使得病毒起始浓度为 50  $TCID_{50}$ 。将微量加样器的量程调节到 50  $\mu\text{L}$ ,吸取 50  $\mu\text{L}$  病毒,依次进行 2 倍稀释 (A: 50  $TCID_{50}$ ; B: 25  $TCID_{50}$ ; C: 12.5  $TCID_{50}$ ; D: 6.3  $TCID_{50}$ ; E: 3.2  $TCID_{50}$ ; F: 1.6  $TCID_{50}$ ; G: 0.8  $TCID_{50}$ ; H: 0.4  $TCID_{50}$ ),每稀释一孔需更换新的吸头。补加 50  $\mu\text{L}$  病毒稀释液至 A11 列,温和混匀病毒 - 血清混合物,放 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱作用 1 h。

(6) 加入 MDCK 细胞: 将 MDCK 细胞液缓慢倒入加样槽中,将排枪 (多道微量加样器) 的加样量程调节到 100  $\mu\text{L}$ ,插上并固定好吸头后,吸取 100  $\mu\text{L}$ ,在每孔中均加入 100  $\mu\text{L}$  MDCK 细胞液 ( $1.5 \times 10^4$  细胞 / 孔)。37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  培养箱孵育 18 ~ 22 h。

(7) 细胞固定: 将排枪 (多道微量加样器) 的加样量程调节到 200  $\mu\text{L}$ ,吸尽微量培养板中的液体。弃枪头至含消毒液的废液缸中。将 PBS 缓慢倒入加样槽中,将排枪 (多道微量加样器) 的加样量程调节到 200  $\mu\text{L}$ ,吸取 200  $\mu\text{L}$  PBS 至 96 孔板各孔,洗细胞 3 次。弃吸头至含消毒液的废液缸中。弃去 PBS (不要让细胞干燥),将固定液 (4 $^{\circ}\text{C}$  预冷) 缓慢倒入加样槽中,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  固定液。于室温固定细胞 10 min。弃去固定液,让 96 孔板室温干燥。

(8) 洗板: 将 PBS 倒入加样槽中,将排枪 (多道微量加样器) 的加样量程调节到 200  $\mu\text{L}$ ,吸取 200  $\mu\text{L}$  PBS 至 96 孔板各孔,洗涤微量培养板 3 次,每次作用 3 min,弃掉 PBS 后,将残留液体用吸水纸尽量拍干,以去除残余的丙酮。

(9) 加入一抗: 按照 1 : 4 000 (或最佳稀释度) 的比例用封闭液稀释一抗 (抗禽流感病毒核蛋白及 NP 单克隆抗体),每孔加入 100  $\mu\text{L}$ ,室温孵育 1 h。

(10) 洗板: 将洗液倒入加样槽中,将多道微量加样器的加样量程调节到 200  $\mu\text{L}$ ,吸取 200  $\mu\text{L}$  洗涤液至 96 孔板各孔,洗涤 4 次,每次作用 3 min,弃掉洗涤液后,将残留液体用吸水纸上尽量吸干,以去除未结合的一抗。

(11) 加入二抗: 按照 1 : 2 000 (或是最佳稀释度) 的比例用封闭液稀释 HRP 标记的羊抗鼠免疫球蛋白 (immunoglobulin, IgG),每孔加入 100  $\mu\text{L}$  稀释后的二抗,室温孵育 1 h。

(12) 洗板: 将洗涤液倒入加样槽中,将排枪 (多道微量加样器) 的加样量程调节到 200  $\mu\text{L}$ ,吸取 200  $\mu\text{L}$  洗涤液至 96 孔板各孔,洗涤 6 次,每次作用 3 min,弃掉洗涤液后,将残留液体用吸水纸尽量拍干,以去除未结合的二抗。

(13) 显色和读数: 每孔加入 OPD 底物 100  $\mu\text{L}$ ,室温放 3 min 左右显色,直至细胞阳性对照孔变成橙黄色,而细胞阴性对照孔尚未变色时,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  终止液终止反应。用酶标仪 ( $OD = 492 \text{ nm}$ ) 读取每孔的  $OD$  值。

(14) 结果判定:  $X$  (细胞半数感染域值) = (细胞阳性对照平均  $OD$  值 - 细胞阴性对照平均  $OD$  值) / 2 + 细胞阴性对照平均  $OD$  值,每孔  $OD$  值低于  $X$  值时,判定为中和试验反应阳性,中和反应阳性的血清最高

稀释度为血清的中和抗体滴度。在特殊情况下可用目测法判定结果,即加入底物后,肉眼下出现橙黄色反应的为阳性,无色为阴性。待检系列稀释血清中无色孔的最高稀释度即为血清的中和抗体滴度。H7N9 禽流感病毒抗体滴度  $\geq 20$  判为阳性; H5N6 和 H9N2 禽流感病毒抗体滴度  $\geq 80$  判为阳性。阴性血清对照孔的 *OD* 值应该与阳性细胞对照的 *OD* 值无明显差别。病毒回滴 5 ~ 7 孔呈阳性反应,显示病毒量正常,若超过 7 孔阳性,则为病毒量过量;若少于 5 孔阳性,则为病毒量不足。阴性细胞对照孔 *OD* 值一般小于 0.2,阳性细胞对照孔的 *OD* 值一般在 1 左右。每次测定过程中,阳性血清对照的中和抗体滴度应该在 2 倍之内波动。

## 1.5.2 红细胞凝集抑制实验

### 1. 生物安全要求

低致病性的 H9N2 病毒在 BSL-2 实验室进行操作; H7N9、H5N1、H5N6、H10N8, H7N4、H7N7 在 BSL-3 实验室进行操作。应当遵守生物安全实验室的有关生物安全的规定。

### 2. 试剂和耗材

1% 火鸡、马红细胞悬液, PBS 缓冲液, 96 孔 V 底血凝板, 流感病毒抗原和血清。

### 3. 实验流程

(1) 血清的处理: 按照 1 : 5 比例加入 RDE, 37℃, 过夜。次日 56℃ 灭活 30 min。

(2) 测定病毒抗原的滴度: 在 V 底血凝板将病毒抗原依次进行 1 : 2、1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32、1 : 64、1 : 128、1 : 256、1 : 512、1 : 1 024 系列稀释, 稀释后每孔中的病毒抗原体积为 50  $\mu\text{L}$ , 然后加入 50  $\mu\text{L}$  的 1% 红细胞悬液, 室温 30 min, 观察红细胞凝集现象并记录结果。红细胞凝集滴度的判定以出现完全凝集的最高稀释度为终点, 其稀释度的倒数即为病毒的红细胞凝集滴度。

(3) 配制红细胞凝集抑制试验的 4 个红细胞凝集单位的抗原: 用病毒红细胞凝集滴度除以 8, 得到的商即为 4 个红细胞凝集单位的稀释度。例如, 某病毒的 HA 滴度为 64, 除以 8 等于 8。按 1 : 8 (1 mL 病毒液加 7 mL PBS) 稀释该病毒即可得到 4 个凝集单位 /25  $\mu\text{L}$  的抗原病毒量。为了保证红细胞凝集抑制试验中抗原用量一致并且准确无误, 新配制的 4 个凝集单位抗原须复核滴定: 取 50  $\mu\text{L}$  稀释好的抗原, 用等量 PBS 做倍比稀释 (同病毒滴定) 后加入 50  $\mu\text{L}$  红细胞悬液, 至室温孵育 30 ~ 60 min 后观察凝集结果。如只有前 3 孔出现凝集, 表明每 50  $\mu\text{L}$  病毒含有 8 个凝集单位 (即 25  $\mu\text{L}$  中含有 4 个红细胞凝集), 该病毒稀释准确, 可以用于红细胞凝集抑制试验。如第 4 孔也出现凝集, 说明每 50  $\mu\text{L}$  病毒含有 16 个凝集单位, 该抗原必须等量稀释。如只有前 2 孔凝集, 表明每 50  $\mu\text{L}$  病毒仅含有 4 个凝集单位, 病毒量需要加倍。此外, 4 个凝集单位抗原必须每次用前新配制。

### 4. 抗体测定

(1) V 底血凝板 (图 1-1-1) 每孔加入 25  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液, 在 A 行各孔加入处理过的血清 25  $\mu\text{L}$ 。

(2) 从 A 行各孔分别吸取 25  $\mu\text{L}$  血清, 由 A 行至 H 行进行 2 倍稀释血清, 弃去 H 行最后 25  $\mu\text{L}$ 。

(3) 每孔加入 25  $\mu\text{L}$  新配制的 4 个凝集单位的抗原。

(4) 轻弹击血凝板, 室温孵育 20 min, 使抗原与抗体充分混合。

(5) 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  红细胞悬液, 混匀。室温孵育 30 min (火鸡红细胞室温孵育 30 min, 马红细胞孵育 60 min)。

当特定的抗体与相应病毒抗原结合后，可以抑制病毒引起的红细胞凝集现象。红细胞凝集抑制效价是指抑制红细胞凝集出现时血清的最高稀释度的倒数。如 1 : 80 稀释的血清孔不出现凝集（完全抑制），1 : 160 稀释的血清孔出现凝集（无红细胞凝集抑制），则该血清对测定病毒的红细胞凝集抑制效价为 80。

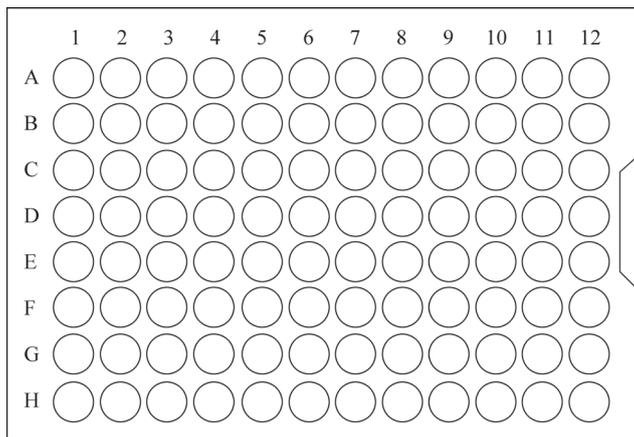


图 1-1-1 V 底血凝板

### 1.5.3 空斑减少测定抗体滴度

#### 1. 生物安全要求

参见《人间传染的病原微生物名录》相关试验操作都应在相应生物安全级别的实验室中进行，必须遵守生物安全规定，严格执行标准操作规程和废弃物管理规定，做好个人防护。

#### 2. 材料及耗材

血清：人血清 56℃ 30 min 灭活，动物血清经 RDE 处理。细胞：MDCK 或者 MDCK-SIAT1。VGM：500 mL DMEM+5 mL Pen/Strep。覆盖液：5 ml Avicell（100 mL 水中加入 2.4 g avicell）与 5 ml 2XDMEM 混合后加入 TPCK 胰酶（终浓度为 2 μg/mL）。固定液 4% 多聚甲醛（Paraformaldehyded）。穿孔液：0.2% Triton X-100（v/v），每 100mLPBS 中加入 200 μL Triton X-100。ELISA 稀释液：0.1% Tween-80，10%（v/v）马血清 PBS。洗液：0.05% Tween-80，每 100 mL PBS 中加入 50 μl Tween-80。一抗：小鼠抗 A 型流感病毒单抗。二抗：HRP 标记羊抗小鼠 IgG（H+L）。显色液。96 孔平底细胞板。PBSA。

#### 3. 病毒滴定

（1）准备细胞：根据实验需要，可以选择实验开始前 2 ~ 3 天，准备细胞，每毫升含有细胞的数量参照表 1-1-8 进行选择。

（2）洗板：用 VGM 液体洗细胞，每孔 200 μL，洗 3 次。弃去 VGM，每孔加入 50 μL VGM。

（3）病毒稀释：在无菌的 1.5 mL 离心管中加入 900 μL VGM 和 100 μL 病毒，充分混匀后依次进行 10 倍稀释，稀释度为  $10^{-6}$  ~  $10^{-1}$ 。

（4）将稀释后的病毒从最高稀释度（ $10^{-6}$ ）开始，依次加入细胞板中，每个稀释度做 6 个复孔。

（5）病毒感染细胞：已加入病毒的细胞板放置于 37℃ 条件 2 ~ 3 h。

（6）准备覆盖液，将感染细胞的病毒液全部弃去，每孔加入 200 μL 的覆盖液，37℃ 孵育过夜，加入覆盖液的板子不要随意挪动以免影响感染病毒的复制。

表1-1-8 细胞准备方案表

|               |     |                 |                 |
|---------------|-----|-----------------|-----------------|
| MDCK 细胞       | 2 天 | 1 : 5 (1+4)     | 1 : 10 (1+9)    |
|               |     |                 |                 |
| MDCK-SIAT1 细胞 | 3 天 | 1 : 10 (1+9)    | 1 : 20 (1+19)   |
|               |     |                 |                 |
| MDCK 细胞       | 2 天 | $2 \times 10^5$ | $1 \times 10^5$ |
|               |     |                 |                 |
| MDCK-SIAT1 细胞 | 3 天 | $1 \times 10^5$ | $5 \times 10^4$ |
|               |     |                 |                 |

(7) 吸取覆盖液，加入预冷的 4% 多聚甲醛，每孔加入 200  $\mu\text{L}$ ，4 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min。

(8) 吸取 4% 多聚甲醛，每孔加入 100  $\mu\text{L}$  PBS A 洗板，洗 2 次。多聚甲醛固定之后的细胞板中加入 PBS，可以放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存或者继续后续的实验。

(9) 加入渗透液，每孔加入 200  $\mu\text{L}$ ，室温放置 30 min。

(10) 洗板：每孔加入 100  $\mu\text{L}$  PBS A。

(11) 弃去 PBS，每孔加入 50  $\mu\text{L}$  一抗，室温放置 1 h (或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜)。

(12) 洗板：每孔加入 400  $\mu\text{L}$  洗液，洗 3 次。

(13) 弃去洗液，每孔加入 50  $\mu\text{L}$  二抗，室温放置 1 h。

(14) 洗板：每孔加入 400  $\mu\text{L}$  洗液，洗 3 次。

(15) 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  显色液，室温孵育直至蓝色斑点清晰可见。

(16) 终止显色：每孔加入 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ ，洗板 2 次。

(17) 弃去  $\text{H}_2\text{O}$ ，室温干燥后，避光保存。

(18) 确定病毒的最适稀释度：病毒感染后产生斑点数所占比例 20% ~ 85% 的稀释度，确定为最适稀释度。如图 1-1-2 所示。

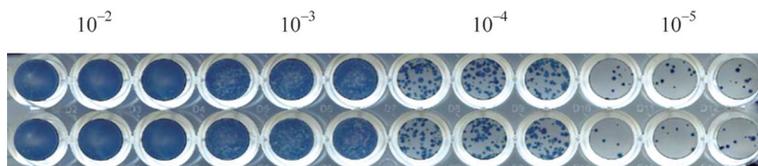


图 1-1-2 细胞病变情况

#### 4. 中和试验

(1) 准备细胞：按照病毒滴定中细胞准备进行。

每孔加入 50  $\mu\text{L}$  of VGM。11 列和 12 列分别是病毒对照和细胞对照。1 ~ 10 列的第一孔加入 50  $\mu\text{L}$  血清 (1 : 20 RDE 处理后)，每份血清均要做复孔，如图 1-1-3 所示。

(2) 血清的稀释：每份血清从 A-H 依次进行 2 倍稀释，稀释至 H 孔，弃去 50  $\mu\text{L}$  第 12 列加入 50  $\mu\text{L}$  病毒稀释液。除了细胞对照孔，其余各孔加入 50  $\mu\text{L}$  病毒 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 ~ 3 h。弃去感染时加入的病毒液。

(3) 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  的覆盖液，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜，加入覆盖液的板子不许随意挪动以免影响感染病毒的复制。

(4) 按照病毒滴定的步骤 (1) ~ 步骤 (17) 进行操作。

(5) 确定血清的中和滴度：以病毒对照孔作为参照孔，加入血清的孔出现 50% 或者 80% 空斑减少时的血清稀释度作为血清的中和滴度。

|   | 稀释度   | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10    | 11   | 12              |
|---|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|-----------------|
| A | 40    | 血清 1 | 血清 2 | 血清 3 | 血清 4 | 血清 5 | 血清 6 | 血清 7 | 血清 8 | 血清 9 | 血清 10 | 只有病毒 | VGM<br>细胞<br>质控 |
| B | 80    |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |      |                 |
| C | 160   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |      |                 |
| D | 320   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |      |                 |
| E | 640   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |      |                 |
| F | 1 280 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |      |                 |
| G | 2 560 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |      |                 |
| H | 5 120 |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |      |                 |

图 1-1-3 血清稀释及样本布局情况图

(薄洪 编写, 韩俊、董婕、冯霞、魏强 审校)