

混合感染的多种亚型禽流感病毒的纯化与鉴定

仇保丰, 刘武杰, 胡顺林, 唐应华, 彭大新, 刘秀梵*

(扬州大学兽医学院, 农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

摘要:【目的】研究混合感染的多种亚型禽流感病毒的纯化和鉴定方法。【方法】用鸡胚终点稀释法和鸡胚终点稀释法结合特异性血清中和法分别对 2-3 种已知亚型禽流感病毒的混合感染样品进行纯化, 并对纯化结果用 RT-PCR 和血凝抑制试验进行鉴定。用建立的方法对 214 份禽流感病毒阳性样品进行了纯化和鉴定。【结果】用鸡胚终点稀释法对样品稀释、传代 6-7 次可使病毒达到纯化, 但用鸡胚终点稀释法结合特异性血清中和法对样品稀释、传代 4-5 次即可达到病毒纯化。用 RT-PCR 和血凝抑制试验两种方法同时鉴定病毒的纯化效果, 可明显提高准确性。用本方法从 214 份样品中纯化出涵盖 13 种亚型的禽流感病毒 233 株。【结论】鸡胚终点稀释法及其结合特异性血清中和法均能对禽流感病毒进行纯化, 但是鸡胚终点稀释法结合特异性血清中和法更具有针对性, 也更有效。另外, 对纯化结果的鉴定需采取多种手段。

关键词: 禽流感病毒; 混合感染; 纯化; 鉴定

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 01-0107-06

近年来, 人们对探讨禽流感病毒 (Avian Influenza Viruses, AIVs) 的遗传变异机制、进化流行趋势和疫苗开发利用等工作给予了空前的重视^[1-2]。而获取大量纯化的 AIVs 流行株是开展这些工作的前提和基础, 也是保证工作质量的重要手段。我们课题小组对近年来华东地区家鸭中 AIVs 的亚型分布情况进行了研究^[3], 工作中发现, 多种亚型 AIVs 共同感染同一只家鸭的现象非常普遍且有上升趋势。Sharp 等对 863 份采自野鸭等水禽泄殖腔的样品进行了研究, 结果发现 83% 的样品带有 2 种或 2 种以上亚型的 AIVs^[4]。因此, 如何简单、有效的对混合感染或交叉污染的 AIVs 进行分离和纯化, 将是许多禽流感研究人员必须面对的问题。空斑 (蚀斑) 分离法^[5-6] 是一条有效的途径, 但由于其具有实验条件要求高、操作繁琐以及处理大批量样品能力不足等局限性, 因此在 AIVs 纯化工作中的应

用受到制约。鸡胚终点稀释法^[5] 由于操作简单, 对实验条件要求不高且能够平行处理大量样品而被广泛应用^[7-8]。但由于多种亚型的 AIVs 在同一鸡胚中的增殖速度和竞争生长能力存在差异, 往往只有某种具有竞争优势的毒株 (如 H5N1 强毒) 能够被纯化出来, 其他亚型的 AIVs 被掩盖或丢失, 纯化的实际结果可能与初衷不符^[4]; 另外, 因为评价 AIVs 纯化效果的经验不足或手段不够科学, 常使得纯化工作不彻底或者虽然获得了理想的结果但重复稀释、传代次数过多, 对人力、物力造成巨大浪费。因此, 寻求更加完善的 AIVs 纯化和鉴定方法非常有必要。姜北宇等为了除去 H9 亚型禽流感种毒中混有的新城疫病毒, 采用鸡胚终点稀释结合新城疫 (ND) 抗血清中和法对种毒进行纯化, 取得了良好的效果^[9]。Sharp 等为了观察混合感染样品中 AIVs 的亚型种类, 用特异性抗血清对样品中优势亚型的

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD06A01, 2006BAD06A16)

* 通信作者。Tel: +86-514-87991416; Fax: +86-514-87972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

作者简介: 仇保丰 (1978-), 男, 安徽长丰人, 博士研究生, 主要从事禽流感病毒分子流行病学研究。E-mail: baofengqiu2008@yahoo.cn

收稿日期: 2009-06-08; 修回日期: 2009-07-19

AIVs 进行中和并接种鸡胚,成功的使样品中被掩盖的 AIVs 显现出来^[4]。但是,用鸡胚终点稀释法及其结合抗血清中和法对混合感染的 AIVs 进行纯化和科学的鉴定,目前国内外尚未见详细的资料。本研究对这一方法进行了探讨,旨在为广大禽流感研究人员纯化和鉴定混合感染或交叉污染的 AIVs 提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒:高致病性毒株 A/Duck/Eastern China/318/02 (H5N1), 低致病性毒株 A/Duck/Eastern China/66/03 (H9N2) 和 A/Duck/Eastern China/453/02 (H10N3), 分别简称为: H5N1、H9N2 和 H10N3, 这 3 株 AIVs 由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室分离、纯化, 鉴定。SPF 种蛋购自山东省家禽研究所。

1.1.2 主要试剂和仪器:抗 H1-H15 阳性血清由中国农科院哈尔滨兽医研究所研制, 江苏省畜牧兽医总站馈赠。H5、H9 和 H10 亚型 AIVs 多克隆抗血清均为本室自制。TRIzol 购自 Invitrogen 公司, AMV 反转录酶购自 Promega 公司, RNA 酶抑制剂 (40 U/ μ L)、dNTPs (0.01 mol/L each)、rTaq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 均购自 TaKaRa 公司。PTC-200 PCR 仪和 3000Xi 型电泳仪购自 Bio-Rad 公司, UV-2000 紫外分析仪购自天能科技上海有限公司。

1.2 多种亚型 AIVs 混合感染样品的人工制备及鉴定

按照参考文献^[5-6]的方法分别对 3 株病毒的鸡胚半数感染量 (50% egg infectious dose, EID₅₀) 进行测定: 将病毒用 PBS 作 10 倍连续稀释, 接种 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 每胚 0.2 mL, 收集接种后 24-120 h 死亡及 120 h 后未死鸡胚, 统计感染阳性胚, 用 Reed-Muench 法计算 EID₅₀。用未接种病毒的 10 日龄鸡胚尿囊液将 3 株病毒滴度分别调至 10⁶ EID₅₀。第 1 组分别取 H9N2, H5N1 和 H10N3 尿囊液 0.3 mL、0.2 mL 和 0.1 mL 均匀混合; 第 2 组取 H9N2 和 H10N3 各 0.2 mL 均匀混合, 两组尿囊液分别用 PBS 作 10 倍连续稀释, 取 10⁻³、10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 三个稀释度分别接种 9 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 每个稀释度接种 5 个胚, 每胚 0.2 mL, 分别收集接种后 24-120 h 死亡鸡胚及 120 h 未死鸡胚尿囊液 (如果所有鸡胚 24 h 内均死亡则选取几枚收取尿囊液, 下同)。选择最低稀释度的尿囊液按文献^[6]的方法用抗 H1-

H15 阳性血清进行血凝抑制试验 (Hemagglutination Inhibition tests, HI), 同时按文献^[10]的方法用 RT-PCR 对尿囊液中 AIVs 的 NA 亚型进行检测, 鉴定人工制备的多种亚型 AIVs 混合感染样品的结果如何。

1.3 鸡胚终点稀释法纯化样品中的 AIVs

将两组制备的多种亚型 AIVs 混合感染尿囊液分别挑取一份, 用添加抗生素的 PBS (含青霉素 10000 U/mL, 链霉素 10 mg/mL, 庆大霉素 250 μ g/mL, 制霉菌素 5000 U/mL) 10 倍连续稀释, 稀释度的选择标准是接种最高稀释度样品的鸡胚有部分或全部无病毒感染, 而接种低稀释度的胚则会发生感染。本研究选取 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 和 10⁻⁹ 四个稀释度分别接种 9 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔, 每个稀释度接种 5 个胚, 每胚 0.1 mL, 置孵化器 35.5℃ 孵育。分别收集接种后 24-120 h 死亡和 120 h 未死鸡胚尿囊液, 挑选 1 枚最高稀释度的含毒尿囊液按相同方法连续稀释、传代, 每代尿囊液分别保存并用 HI 试验检测纯化效果, 对 HI 试验证明已经纯化了了的病毒尿囊液继续稀释传代 1 次, 然后用 HI 试验和 RT-PCR 分别检测病毒的 HA 和 NA 亚型, 同时检测纯化效果。

1.4 鸡胚终点稀释结合特异性抗血清中和法纯化样品中的 AIVs

将 1.2 制备的两组混合感染尿囊液按 1.3 的方法分别连续稀释后, 第 1 组: 取 10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 和 10⁻⁹ 四个稀释度的尿囊液各 0.2 mL, 分别加入 H5 和 H9 亚型 AIVs 多抗血清各 0.1 mL; 第 2 组: 同样取上述四个稀释度的尿囊液各 0.2 mL, 分别加入 H10 亚型 AIVs 多抗血清和无 AIVs 抗体的 SPF 鸡血清各 0.1 mL。分别将两组样品混合均匀, 置 35℃ 水浴锅作用 1 h, 然后接种 9 日龄 SPF 鸡胚, 每胚 0.2 mL (实际尿囊液量相当于相同稀释度的 0.1 mL), 按 1.3 的方法稀释、传代, 同时用 HI 试验逐代检测 AIVs 纯化效果, 当发现相应尿囊液中待中和病毒的血凝抑制价 (HI 滴度) 高于 4 时, 继续按上述方法添加相应抗血清予以中和, 直至 HI 试验证明病毒已经纯化了, 再稀释传代 1 次, 然后再用 HI 试验和 RT-PCR 检测病毒纯化效果。

1.5 纯化和鉴定方法的实际应用

为了分析华东地区家鸭中 AIVs 的亚型分布情况^[3], 用本研究建立的鸡胚终点稀释法或鸡胚终点稀释与血清中和相结合的方法, 对近年来分离自家鸭的 24 份禽流感病毒 HI 试验阳性样品 (泄殖腔棉拭液接种鸡胚收取的尿囊液) 进行了纯化。对获

得的 AIVs 用 RT-PCR 和 HI 试验鉴定病毒的纯化效果。

2 结果

2.1 多种亚型 AIVs 混合感染样品的人工制备及鉴定

第 1 组:接种 H5N1、H9N2 和 H10N3 3 种亚型 AIVs 的鸡胚,在 10^{-3} 稀释度有 2 枚鸡胚在 24-120 h 死亡,分别收集尿囊液, 10^{-3} 稀释度另有 3 枚鸡胚在接种后 12 h 内死亡,弃去。第 2 组:接种 H9N2 和 H10N3 两个亚型 AIVs 的鸡胚,在 10^{-3} 稀释度有 3 枚在 24~120 h 死亡,2 枚在 120 h 未死,

将未死鸡胚置 4℃ 冰箱 10 h 冻死,5 枚鸡胚分别收集、保存尿囊液。经血凝试验检测发现,两组鸡胚尿囊液均有血凝性。从两组中各挑 1 枚鸡胚的尿囊液进行 HI 试验,结果发现($HI > 4 \log_2$ 才进行统计,以下同):第 1 组尿囊液的血凝性能被抗 H5、H9 和 H10 的特异性血清部分抑制,第 2 组尿囊液的血凝性能被抗 H9、H10 的特异性血清抑制(见表 1 和 2 的 E0 代)。用 NA 亚型 RT-PCR 鉴定法分别检测这 2 枚鸡胚尿囊液内病毒的 NA 亚型,结果发现:第 1 组为 N1、N2 和 N3(图 1-A);第 2 组为 N2 和 N3(图 1-B)。由此可以看出,两份多种亚型 AIVs 混合感染样品的人工制备获得了成功。

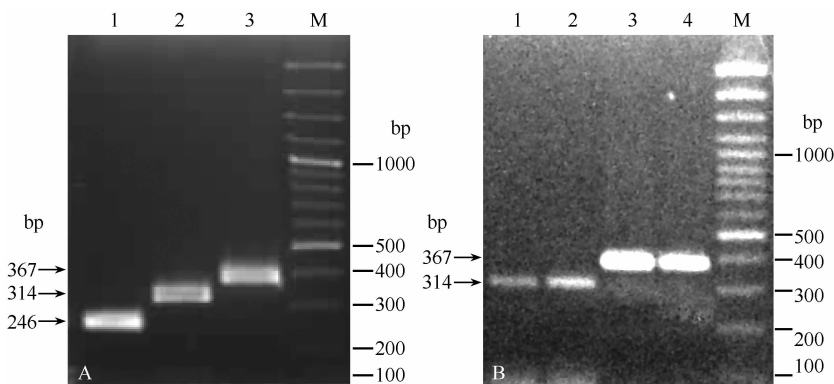


图 1 RT-PCR 分析第 1 组(A)和第 2 组(B)尿囊液中病毒的 NA 亚型

Fig. 1 RT-PCR analysis on viral NA-subtypes of allantoic fluid in group 1(A) and group 2(B). A: 1-3. Amplicons with primers specific to N1-N3 subtypes; B: 1-2. Amplicons with primers specific to N2 subtype; 3-4. Amplicons with primers specific to N3 subtype; M: 100 bp DNA ladder Maker.

2.2 鸡胚终点稀释法对样品的纯化及其鉴定

用鸡胚终点稀释法对两组含有多种亚型 AIVs 的尿囊液样品分别进行连续的稀释、传代。HI 试验

表 1 HI 试验检测鸡胚终点稀释法对 AIVs 的纯化情况

Table 1 HI tests on AIVs purified by chicken embryo end-point dilution method

Generation	HI titer of group 1 (\log_2)			HI titer of group 2 (\log_2)	
	H 5	H 9	H10	H 9	H10
E 0	6	7	5	7	6
E 1	6	6	5	6	6
E 2	7	6	6	7	6
E 3	7	5	5	6	5
E 4	7	5	4	7	5
E 5	6	4	4	7	4
E 6	7	4	—	7	—
E 7	8	—	—	8	—
E 8	9	—	—	—	—

“—” indicates the HI titer below 4 is ignored.

结果显示(表 1),第 1 组样品在第 7 代(E7) H5N1 亚型 AIVs 被纯化出来,继续传代 1 次,再用 HI 试验和 RT-PCR 检测病毒纯化效果,结果显示样品达到了纯化,只含有 H5N1 亚型的 AIVs(表 1 和图 2-A)。同时,第 2 组样品中, H9N2 亚型 AIVs 在第 6 代被纯化出来,继续传代 1 次并进行鉴定,证明样品中只存在单一的 H9N2 亚型的 AIVs(表 1 和图 2-B)。

2.3 鸡胚终点稀释结合血清中和法对样品的纯化及其鉴定

按 1.4 方法对两组尿囊液样品分别进行纯化,并用 HI 试验检测纯化效果,结果显示(表 2),第 1 组样品 H10N3 亚型 AIVs 在第 5 代(E5)被纯化出来,第 2 组样品中, H9N2 亚型 AIVs 在第 4 代(E4)被纯化出来,继续传代 1 次并进行鉴定,证明样品已经被纯化(表 2 和图 3)。

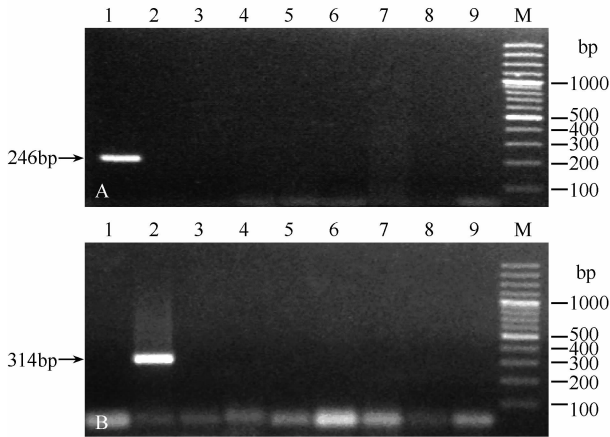


图2 RT-PCR分析第1组(A)和第2组(B)尿囊液的纯化效果

Fig. 2 The RT-PCR analysis on the purification of allantoic fluid in group 1 (A) and group 2 (B). A: 1-9. Amplicons with primers specific to N1-N9 subtypes; B: 1-9. Amplicons with primers specific to N1-N9 subtypes; M: 100 bp DNA ladder Maker.

表2 HI 试验检测 AIVs 的纯化情况

Table 2 HI tests on the purification of AIVs

Generation	HI titer of group 1 (log ₂)			HI titer of group 2 (log ₂)	
	H 5	H 9	H10	H 9	H10
E 0	6	7	5	7	6
E 1	5	5	6	7	4
E 2	4	5	6	8	5
E 3	4	4	7	8	4
E 4	—	4	8	8	—
E 5	—	—	7	8	—
E 6	—	—	8		

"—" indicates the HI titer below 4 is ignored.

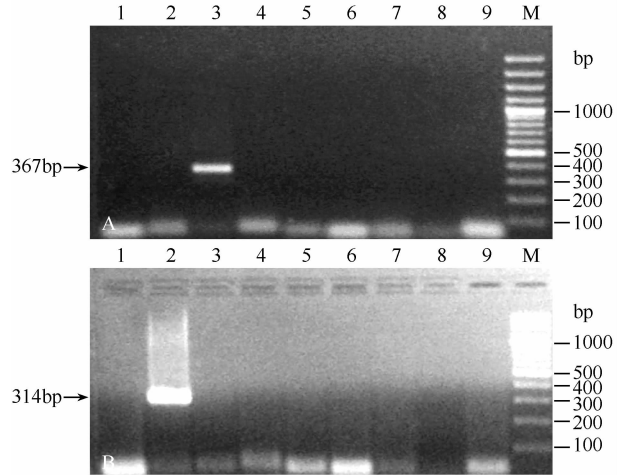


图3 RT-PCR分析第1组(A)和第2组(B)尿囊液的纯化效果

Fig. 3 The RT-PCR analysis on the purification of allantoic fluid in group 1 (A) and group 2 (B). A: 1-9. Amplicons with primers specific to N1-N9 subtypes; B: 1-9. Amplicons with primers specific to N1-N9 subtypes; M: 100 bp DNA ladder Maker.

2.4 纯化和鉴定方法的实际应用

在对 214 份样品纯化的过程中发现,60% 以上的样品为 2 种或 2 种以上亚型 AIVs 混合感染样品,或 AIVs 与新城疫病毒(NDV)混合感染样品。运用本研究建立的鸡胚终点稀释法或其与血清中和法相结合,从 214 份样品纯化出 H1N1、H3N8、H4N6、H6N2、H6N8 和 H11N2 等 13 种亚型的 AIVs 计 233 株(表 3),NDV 9 株。其中用鸡胚终点稀释结合血清中和法分离获得的 H6N8 亚型 AIVs 为国内首次

表3 本研究纯化获得的 AIVs 亚型及数量

Table 3 Subtypes and numbers of AIVs purified in this study

Subtype											Total		
H1N1	H3N1	H3N2	H3N8	H4N6	H5N1	H5N2	H6N2	H6N8	H8N4	H9N2			
5	37	75	9	8	28	3	2	1	1	23	28	13	233

报道,分离的 H4N6、H6N2、H11N2 等亚型 AIVs 国内目前也很少有分离的报道。233 株 AIVs 经 HI 试验和 RT-PCR 鉴定均已达到纯化。目前,本研究纯化获得的绝大部分 AIVs 已经另文发表^[3]。

3 讨论

日益增多的不同亚型 AIVs 混合感染同一宿主的问题迫使人们去寻求一条简单、有效的 AIVs 纯化方法。鸡胚终点稀释法最早是人们在研究 A 型流感病毒的 O-D 相变异时创立的,目前已经被广泛用于病毒纯化和变异株选育等工作^[5]。用这种方法对 AIVs 进行纯化也有人曾加以尝试^[7],但其具体

操作方法尚缺乏相关的资料,其纯化效果也未见报道,极不利于借鉴和使用。本研究对鸡胚终点稀释法及其结合特异性血清中和法纯化 AIVs 的工作进行了系统、全面的研究,并对病毒纯化结果的鉴定也进行了探讨,可供广大的流感及其他病毒研究工作者参考和借鉴。

为了集中精力对鸡胚终点稀释法本身进行探讨,同时为了检测该纯化方法的有效性,本研究选择用 3 株已知 AIVs 人工制备的混合感染样品进行了研究,从而避免了因纯化方法本身可能存在的缺陷造成的未知样品中某些亚型 AIVs 被掩盖或丢失。而研究人员浑然不知并得出错误结论的情况发生。

同时,为了最大限度的还原自然采集样品中 AIVs 混合感染的实际情况,一方面,我们选用了毒力不同的 1 株 H5N1 强毒和 2 株弱毒(H9N2 和 H10N3)制备了两组 AIVs 混合感染样品进行研究,分别考虑了强毒与弱毒混合感染及弱毒间混合感染这两种最常见的混合感染情形;另一方面,本研究对病毒粒子的最初添加量也进行了调整,这在反映自然采集样品实际情况的同时,也便于对毒株间竞争增殖能力进行比较。此外,由于 HI 试验和 NI 试验(Neuraminidase inhibition tests)具有交叉反应性强,灵敏性低等缺点^[10,12],本研究选用 HI 试验和 RT-PCR 技术相结合的方法分别对 AIVs 的 HA 和 NA 亚型进行鉴定,有效的提高了鉴定结果的准确性。运用这两种手段分别对 E0 代尿囊液进行检测,结果发现,多亚型 AIVs 混合感染样品的人工制备取得了成功(见表 1、2 和图 1)。

单纯使用鸡胚终点稀释法对多种亚型 AIVs 混合感染的样品进行纯化,往往是毒力较强的毒株更容易被纯化出来,即便最初它的病毒粒子并非占有数量上的优势。本研究中第一组 H5N1 亚型 AIV 的最初的病毒粒子数量介于两弱毒之间,但最终还是 H5N1 被纯化出来(见表 1 和图 2 - A),这与我们在 AIVs 长期的分离、纯化工作中更容易从混合感染的样品中分离出强毒是一致的。鸡胚稀释法虽然能够对混合感染的 AIVs 进行纯化,但是往往对混合感染样品特别是弱毒间混合感染样品的纯化结果无法预见,容易造成有价值的 AIVs 被丢失或纯化获得的毒株与期望结果不符。本研究中我们对 H9N2 和 H10N3 两株弱毒混合感染样品进行纯化时,H9N2 亚型的毒株被纯化出来(见表 1 和图 2 - B),H10N3 亚型的病毒被丢失。

为了增强 AIVs 纯化工作的针对性和目的性,本研究对鸡胚终点稀释结合特异性血清中和法纯化 AIVs 混合感染样品进行了探索。结果显示,可以使混合感染样品中任一期望获得的毒株被成功纯化。因此,同时设立针对不同亚型毒株的纯化组,可以使混合感染样品中的不同毒株逐一被纯化出来,特别是分离、纯化生长竞争能力弱、难以用终点稀释法分离出来的稀有亚型 AIVs 时,这种分离方法的优越性更能得以充分体现。同时,中和 AIVs 用的血清即使不是很难获取的单特异性抗血清,而使用多抗血清也可取得良好效果,在目前国内实验室条件和水平参差不齐的现实状况下,这具有重要的意义。此外,本方法还具有使鸡胚传代的次数大为缩

短,大大节约人力和物力等优点。运用本方法对 214 份禽流感病毒阳性样品(60% 以上为混合感染样品)进行纯化,共获得涵盖 13 种亚型的 AIVs 计 233 株(见表 3),NDV 9 株,这都充分展现了本方法的良好实用性。因此,对其进行推广和应用,必将对我国 AIVs 的研究起到积极的推动作用。

参考文献

- [1] Smith GJD, Fan XH, Wang J, et al. Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *PNAS*, 2006, 103 (45): 16936-16941.
- [2] Takada A, Kuboki N, Okazaki K, et al. Avirulent avian influenza virus as a vaccine strain against a potential human pandemic. *Journal of virology*, 1999, 73 (10): 8303-8307.
- [3] 仇保丰, 刘武杰, 彭大新, 等. 近年来华东地区家鸭中禽流感病毒的亚型分布. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(10): 1290-1294.
- [4] Sharp GB, Kawaoka Y, Jones DJ, et al. Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. *Journal of Virology*, 1997, 71(8): 6128-6135.
- [5] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 1985.
- [6] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术. 北京: 中国三峡出版社, 1997.
- [7] 薛峰, 顾敏, 彭宜, 等. H4 亚型家养水禽流感病毒分离株的表面膜蛋白基因的序列测定和遗传进化分析. *畜牧兽医学报 (Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica)*, 2006, 37(12): 1334-1339.
- [8] Hatchette TF, Walker D, Johnson C, et al. Influenza A viruses in feral Canadian ducks: extensive reassortment in nature. *Journal of General Virology*, 2004, 85: 2327-2337.
- [9] 姜北宇, 赵继勋, 张国中, 等. 禽流感 H9 亚型病毒 WD 株毒种的纯化研究. *中国兽药杂志 (Chinese Journal of Veterinary Drug)*, 2006, 40(8): 1-4.
- [10] Qiu B, Liu W, Peng D, et al. A reverse transcription-PCR for subtyping of the neuraminidase of avian influenza viruses. *Journal of Virological Methods*, 2009, 155: 193-198.
- [11] Ciappi S, Azzi A, Stein CA, et al. Isolation of influenza A (H3N2) virus with "O" → "D" phase variation. *Research in Virology*, 1997, 148(6): 427-431.
- [12] Hoffmann E, Stech J, Guan Y, et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 2001, 146: 2275-2289.

Purification and identification of avian influenza viruses causing mixed multi-infection

Baofeng Qiu, Wujie Liu, Shunlin Hu, Yinghua Tang, Daxin Peng, Xiufan Liu*

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: [Objective] To purify and identify avian influenza viruses causing multi-subtype mixed infection. [Methods] By using chicken embryo end-point dilution or combining with specific antiserum neutralizing tests, the mix-infection samples of 2 or 3 subtyping avian influenza viruses were purified, and the results of purification were identified by RT-PCR and hemagglutination inhibition tests. These methods were used to purify and identify 214 positive samples of avian influenza viruses. [Results] The method of chicken embryo end-point dilution was able to purify the viruses from samples by dilution and subculturing six or seven passages. However, combining this method with the specific antiserum neutralizing tests, the samples could be purified after four or five passages. The accuracy of identification could be obviously enhanced by using RT-PCR and hemagglutination inhibition tests simultaneously. Based on these methods, 233 of avian influenza viruses, which constituted 13 subtypes, were purified from 214 samples. [Conclusion] Both chicken embryo end-point dilution method and its combination with specific antiserum neutralizing tests could be used to purify avian influenza viruses of mix-infection, however, the latter may be more focused and valid. In addition, the results of purification should also be evaluated by multiple means.

Keywords: Avian influenza virus; mixed infection; purification; identification

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Key Program for Technology Research and Development of China Plan Grant(2006BAD06A01, 2006BAD06A16)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87991416; Fax: +86-514-87972591; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

Received: 8 June 2009/ Revised: 19 July 2009



高等教育出版社新书推介

微生物学(彩色版)

主编:沈萍,陈向东

978-7-04-022268-5 ¥96.00 2009年8月出版

内容简介:本书是普通高等教育“十—五”国家级规划教材,是全彩色出版的《微生物学》。本书由武汉大学、北京大学、复旦大学、南开大学和山东大学的多位微生物学专家共同完成。全书分15章,内容包括微生物的纯培养和显微技术,微生物细胞的结构与功能,微生物的营养、代谢、生长繁殖及其控制,病毒的分离、鉴定、特性、感染及其控制,微生物的基因组、遗传规律与特性,微生物基因表达的调控及基因工程,微生物的生态、进化、系统发育、分类鉴定及物种的多样性,微生物的感染与免疫以及微生物生物技术与产品等。全书字数95万。

该版教材除了继续保持第2版的编写宗旨、编写风格和特色外,在综合国内外教材特点的基础上,还对其编排形式作了较大的改变:在每章的开头选用了一幅彩图作为开篇图;在每章正文开始前有一段用英语撰写的“ChapterOutline”;每章除了后面有小结、复习题和思考题外,每节后还插有帮助学生理解、消化的习题;对本书的参考书目和两个附录(微生物名称索引和微生物学名词索引)也根据全书内容的改动和修订进行了相应的变动,特别注意了对近年出版物(2008年)的引用。

本书适合理、工、农、林、医各类以及师范院校等高等院校生命科学领域本科生、研究生学习使用,也可供其他生物科技人员参考

欢迎各界人士邮购高等教育出版社各类图书

购书热线:010-58581100/1101 咨询电话:400-810-0598

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://www.landfac.com/> <http://journals.im.ac.cn/>