

借

21世纪高等医药院校教材

免疫学与病原生物学

实验教程

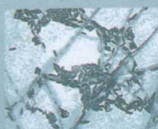
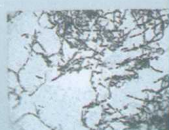
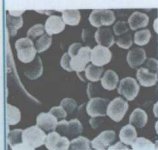
主 编 马兴铭

副主编 何玉林 包根书 赵 晋



MIANYIXUE YU BINGYUANSHENGWUXUE SHIYANJIAOCHENG

MIANYIXUE YU BINGYUANSHENGWUXUE SHIYANJIAOCHENG



兰州大学出版社
LANZHOU UNIVERSITY PRESS

21世纪高等医药院校教材

免疫学与病原生物学

实验教程

MIANYIXUE YU BINGYUANSHEGWUXUE SHIYANJIACHENG

主 编 马兴铭

副主编 何玉林 包根书 赵 晋

编 者

马兴铭(兰州大学)

尹少甫(兰州大学)

王竞秋(兰州大学)

包根书(兰州大学)

何玉林(兰州大学)

吴玉凤(兰州大学)

张李峰(兰州大学)

梁亚玲(兰州大学)

雒艳萍(兰州大学)

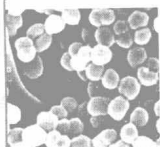
赵 晋(西北民族大学)

董开忠(西北民族大学) 顾克东(西北民族大学)

潘润存(平凉医学高等专科学校)

王小莲(张掖医学高等专科学校)

何国光(张掖医学高等专科学校)



兰州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

免疫学和病原生物学实验教程/马兴铭主编. 兰州:
兰州大学出版社, 2005. 8
ISBN 7-311-02649-0

I. 免... II. 马... III. ①医药学: 免疫学—实验—医学院校—教材 ②病原微生物—实验—医学院校—教材 IV. ①R392-33 ②R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 097395 号

免疫学与病原生物学实验教程

主编 马兴铭

副主编 何玉林 包根书 赵晋

兰州大学出版社出版发行

兰州市天水南路 222 号 电话: 8912613 邮编: 730000

E-mail: press@onbook.com.cn

<http://www.onbook.com.cn>

兰州大学出版社激光照排中心照排

兰州德辉印刷有限责任公司印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 7.5

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月第 1 次印刷

彩插: 4 字数: 154 千字 印数: 1~2000 册

ISBN7-311-02649-0/R·119 定价: 12.00 元

本书如存在漏印、缺页、倒页、脱页等印装质量问题, 请与兰州大学出版社市场营销中心联系调换。

联系电话: (0931)8914298

前 言

《医学免疫学与病原生物学》是一门医学基础课,为了提高学生的操作技能,让学生在有限的时间内学到现代《免疫学与病原生物学》的实验方法和技术,通过实验课的学习进一步认识和巩固课堂所学的知识,同时加强对学生的实验创新能力及分析问题、解决问题能力的培养,在我校(兰州大学)编写的《免疫学与微生物学实验指导》基础上,编写了这本《免疫学与病原生物学实验教程》。

本教程注意将理论性、实用性和系统性相结合,删去了部分内容,适当增加了比较成熟的新实验和新技术。

本教程主要供高等医学院校口腔专业、护理专业、法医专业、影像专业、医学心理专业等本专科学生及全科医学学生使用。

本教程由兰州大学、西北民族大学、平凉医学高等专科学校、张掖医学高等专科学校从事教学的一线中青年教师编写而成。

本教程约20万字,以基础实验为主,适当增加综合设计性实验,有利于培养学生的科学研究和创新思维能力。

部分图片来自互联网,在此向原作者表示感谢。

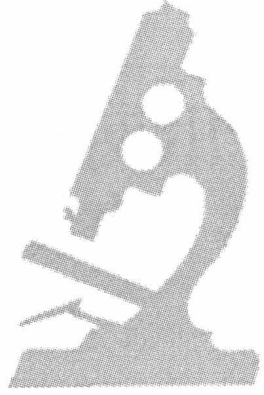
本教程是全体同仁共同努力的结晶,由于水平有限,时间仓促,难免有错误之处,真诚希望读者提出意见和建议,以便我们进一步改进和完善。

编者
2005.6

目 录

第一篇 微生物学实验	(1)
实验一 显微镜的使用与细菌的形态观察.....	(3)
实验二 革兰氏染色法.....	(7)
实验三 细菌的接种与培养技术.....	(9)
实验四 细菌分布的检查.....	(12)
实验五 外界因素对细菌的影响.....	(14)
实验六 化脓性球菌.....	(18)
实验七 肠道菌.....	(22)
实验八 其它病原性细菌.....	(25)
实验九 抗酸染色.....	(27)
实验十 其它微生物形态.....	(29)
第二篇 免疫学实验	(31)
实验一 免疫系统组织和细胞形态学.....	(33)
实验二 吞噬细胞功能检测.....	(38)
实验三 花环法测定红细胞 CD35 分子.....	(41)
实验四 外周血单个核细胞的分离.....	(43)
实验五 花环法 T 细胞 CD2 分子的检测.....	(46)
实验六 T 细胞体外增殖实验.....	(50)
实验七 沉淀反应.....	(53)
实验八 凝集反应.....	(59)
实验九 酶联免疫吸附试验.....	(64)
实验十 胶体金标记技术.....	(68)
实验十一 荧光抗体法.....	(73)
实验十二 I 型过敏试验.....	(75)

第三篇 寄生虫学实验	(77)
实验一 线虫(I)	(79)
实验二 线虫(II)	(81)
实验三 绦虫	(84)
实验四 吸虫	(87)
实验五 叶足虫	(90)
实验六 孢子虫	(93)
实验七 医学节肢动物	(96)
附录一 常用试剂配方	(100)
附录二 实验报告要求	(112)
附录三 免疫学与病原生物学实验室规则	(113)
参考文献	(114)



第一
篇

微生物学实验





实验一 显微镜的使用 与细菌的形态观察

【预习提要】

1. 细菌属于原核型细胞的一种单胞生物,形体微小,结构简单。肉眼的最小分辨率为0.2mm,观察细菌要用光学显微镜放大几百倍到上千倍才能看到。细菌按其外形主要有三类,即球菌、杆菌、螺形菌。细菌形态可受各种理化因素的影响,一般说来,在生长条件适宜时培养8~18小时的细菌形态较为典型,各种细菌的大小、形态、排列差异较大。

2. 细菌的结构对细菌的生存、致病性和免疫性等均有一定作用。细菌的结构包括基本结构和特殊结构。基本结构包括:细胞壁、细胞膜、细胞浆及核质;细菌的特殊结构包括:荚膜、鞭毛、菌毛和芽胞。光学显微镜下可观察到的是:荚膜、鞭毛和芽胞。

3. 荚膜是许多细菌胞壁外围绕的一层较厚的粘性胶冻样物质,细菌一般在机体内和营养丰富的培养基中才能形成;鞭毛是某些细菌菌体上具有的细长而弯曲的丝状物,长度常超过菌体若干倍,不同细菌的鞭毛数目、位置和排列不同;芽胞是细菌在一定条件下,菌体内形成的一个折光性很强的不易着色小体,并非细菌的繁殖体,而是处于代谢相对静止的休眠体态,以维持细菌生存的持久性,芽胞在菌体内的位置、大小随菌种而不同。

【实验目的要求】

1. 了解普通光学显微镜的原理,学会使用普通光学显微镜(包括低倍镜、高倍镜及油镜三种),掌握普通光学显微镜在使用中的注意事项。

2. 掌握细菌(葡萄球菌、链球菌、脑膜炎双球菌、大肠杆菌、炭疽杆菌、白喉杆菌、霍乱弧菌、幽门螺杆菌)的基本结构特征(形态、大小、排列和染色性),并能够进行区别。

3. 掌握细菌特殊结构(荚膜、鞭毛、芽胞)的特征及医学意义。



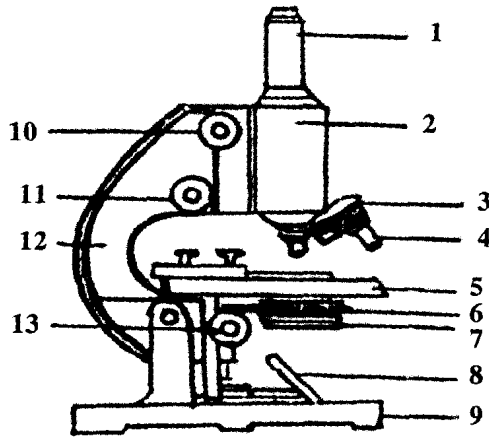
一、显微镜的使用及维护

光学显微镜是实验过程中经常使用的仪器,在生物学、组织胚胎学中均已操作过,现在再将使用显微镜的方法及注意点,简述如下。

1. 显微镜有固定编号,取用、放置显微镜时,须双手持取,用前必须检查,如发现显微镜使用不灵或损坏,立即报告教师,不要自己处理,实验过程中,对目镜和物镜不得任意调换。

2. 显微镜种类不同,结构有异,有的是镜筒升降,有的是载物台升降,使用时应首先熟悉所用显微镜的结构与性能,否则,在调焦时,会因方向弄错而损坏物镜和标本。

3. 要认清低倍镜、高倍镜和油镜头(如下图)的标志,否则,会因选错而影响观察,甚至发生损坏镜头或标本的事故。



显微镜的构造

1. 目镜 2. 镜筒 3. 镜头转换器 4. 接物镜 5. 载物台 6. 光圈
7. 聚光器 8. 反光器 9. 镜座 10. 粗调节器 11. 细调节器 12. 镜臂 13. 聚光器调节器

4. 使用显微镜时,不宜使载物台倾斜,否则,在使用油镜观察或进行粪便涂片检查时,会因镜油或粪便液体流淌,影响检查结果或造成污染。

5. 对好光后,将标本置于载物台,用低倍镜观察,用粗调节器调节至能看出物像,再用细调节器使物像更加清晰。如换高倍镜观察时,可将待观察部分移至视野的中央,再转换高倍镜,注意不能将物镜压在盖玻片上,以免压坏标本,甚至损坏镜头。镜检时,用左眼观察,同时右眼张开,养成双眼并用的习惯。

6. 观察时为避免遗漏,必须按一定方向循序前进,按顺序寻找标本。

7. 光线调节要适当,使用高倍镜时,光源减弱,使视野清晰;使用油镜时,使光线增强。

8. 显微镜油镜的使用方法:



(1)检查微生物形态时常用油镜,油镜常见的标志是:a. 镜孔直径最小;b. 镜头最长;c. 有放大倍数 $90\times$ 或 $95\times$ 或 $100\times$ 的标记;d. 镜头有一圈黑线和/或一圈白线。显微镜的放大倍数 = 目镜倍数 \times 物镜倍数。例如目镜倍数为 $10\times$, 物镜倍数为 $100\times$, 则放大倍数为 1000 倍。

(2)使用油镜时必须将显微镜直立于桌上,切勿将镜臂和载物台倾斜,以免镜油流出,影响观察。

(3)先用低倍镜对光:显微镜不能采用直接阳光作光源,因其光线过强,反而不易看清,且反射热,有损光学装置。应采取间接日光为光源,使用平面反光镜;如采用灯光为光源,宜用凹面反光镜。转动反光镜,使光线集中于集光器。

(4)根据所观察的标本,升降集光器和缩放光圈,以获得最佳光度。一般染色标本用油镜检查时,光度直强,可将光圈开足,集光器上升至与载物台相平;检查未染色标本用低倍镜或高倍镜观察时,应适当缩小光圈,下降集光器,使光度减弱。

(5)将标本置载物台上,用弹簧或标本推进器固定,移待检部位于物镜下。

(6)先用低倍镜找出标本的范围,然后提高镜筒,在标本的待检部位加一滴镜油,量勿过多,更勿将油涂开。用油镜对准油滴,眼睛从侧面看着油镜,将粗调节器缓缓移动,使玻片和物镜逐渐靠近,直至物镜浸没在油内。然后眼睛转移至目镜处,一面观察,一面转动粗调节器,待看到模糊物像时,再改用细调节器转动到物像清晰为止。如果物镜已离开油面,应按上述过程重复操作。

9. 显微镜用毕后,用擦镜纸擦拭油镜头,不可用粗布硬纸擦拭;向下调节聚光镜,反光镜直放,物镜头成八字形摆放;套好镜罩,按指定的地方放好。

10. 显微镜的保护要点:

(1)显微镜是精密仪器,注意爱护,取送搬移时,要一手握紧镜臂,一手托住镜座,轻拿轻放,以免碰撞,严格按规程操作。

(2)物镜和目镜只能用擦镜纸擦,不能用手、手绢、纸擦,每次使用完油镜,立即用擦镜纸将油镜上的油擦干净,如油已干或镜头模糊不清,可用擦镜纸蘸少许二甲苯擦,并用另一张擦镜纸擦净残留的二甲苯。

(3)不能用错物镜,切片观察时不能放反,使用高倍镜时应先用低倍镜观察后再转换高倍镜观察。

(4)细调节器是显微镜最精细而脆弱的部分,只能做轻微的来回转动。各部位应保持清洁,避免日光直接照射和强酸、强碱等化学物质的接触,以免损坏。

(5)显微镜不用时,必须将物镜转成“品”字形,降下聚光器,罩上防尘套,置于干燥处,以防受潮。

(6)如有损坏玻片、仪器等现象必须及时报告老师。



二、细菌形态结构观察

【实验内容】

1. 细菌的基本形态观察

球菌:葡萄球菌、链球菌、脑膜炎双球菌

杆菌:大肠杆菌、炭疽杆菌、白喉杆菌(异染颗粒)

螺菌:霍乱弧菌、幽门螺杆菌

2. 细菌的特殊结构观察

荚膜:肺炎球菌(荚膜染色)

鞭毛:变形杆菌(鞭毛染色)

芽胞:破伤风杆菌(芽胞染色)

【注意事项】

1. 观察细菌的基本形态时注意细菌的形态、大小、排列和染色性。
2. 观察荚膜时,注意观察菌体与荚膜的形态染色。
3. 观察鞭毛时,注意观察菌体与鞭毛颜色及鞭毛在菌体上的位置、数量。
4. 观察芽胞时,注意观察芽胞的形状、大小、颜色及位置。

【实验报告要求】

1. 细菌的基本形态绘图(标明细菌名称、形态、排列和染色性)。
2. 细菌的特殊结构绘图(标明细菌名称、特殊结构名称、染色方法)。



实验二 革兰氏染色法

【预习提要】

在细菌形态学检查时,由于细菌体积细小,种类繁多,且为无色半透明体,需要经过合适的染色后,才能较清楚地观察。常用的染色方法有:

单染色:碱性美兰染色,主要观察细菌基本形态;

复染色:革兰氏染色法、抗酸染色法、特殊结构染色方法等。

复染色可以观察细菌形态结构,用于鉴别细菌。

【实验目的要求】

1. 了解革兰氏染色法的原理及意义。
2. 学会革兰氏染色法的基本过程,并且通过光学显微镜观察细菌的形态结构,能够进行细菌的鉴别。

【原理及意义】

革兰氏染色法是 1884 年由丹麦病理学家 Christain Gram 创立的,而后一些学者在此基础上作了某些改进。革兰氏染色原理尚未完全明了,可能与细菌等电点、细胞壁的结构等因素有关,是细菌学中最重要鉴别染色法。

【实验材料】

1. 菌种:葡萄球菌、大肠杆菌的混合液(37℃下斜面培养 10 小时左右)。
2. 染液:结晶紫染液,95%乙醇,碘液,稀释复红染液,蒸馏水。
3. 器材:载玻片,接种环,酒精灯,火柴,香柏油,擦镜纸,显微镜。

【实验方法】

1. 涂片:取清洁载玻片一张,用玻璃蜡笔在玻片上画一个大小适中闭合的圆圈,将接种环灭菌后,从混合菌液取两接种环的菌膜,在圆内涂成均匀薄膜。接种环灭菌放回架上。
2. 干燥:涂片在室温中自然干燥。
3. 固定:将干燥后的涂片涂菌面朝上通过酒精灯两到三次,通过时稍作停留,注意温



度不可太高,以玻片加温面触及皮肤微感烫而尚能忍受为度。

4. 染色:

(1)初染:在已固定涂片上加结晶紫染液,以全面覆盖涂膜为度,染1分钟后用细流水徐缓冲洗,洗后再将玻片上的积水轻轻甩净。

(2)媒染:滴加媒染剂碘液,约1分钟后用细流水冲洗,并将玻片上的积水轻轻甩净。

(3)脱色:滴加95%酒精数滴,前后轻轻摇动玻片数秒钟,使均匀脱色,然后斜持玻片,使脱掉的染料随酒精流去,再滴加酒精。如此反复2~3次,直到流下的酒精无色或稍呈淡紫色为止(约需30秒钟),立即用细流水冲去酒精,并将玻片上的积水轻轻甩净。

(4)复染:滴加稀释复红染液复染30秒钟后,用细水冲洗,甩去积水,用吸水纸吸干水(一定要吸干水)。

5. 镜检:在涂片上滴香柏油一滴,油镜检查。

6. 结果:革兰氏阳性菌经结晶紫与碘液染色后,不易被酒精脱色,染成紫色;革兰氏阴性菌易被酒精脱色,经稀释复红复染后染成红色。

【实验报告要求】

1. 革兰氏染色的方法与意义。

2. 革兰氏染色结果绘图(同时描述显微镜下所见细菌形态、排列和染色性)。



实验三 细菌的接种与培养技术

【预习提要】

各类细菌对营养物质的要求差别很大,包括水、碳源、氮源、无机盐和生长因子等,人工培养细菌需提供的基本条件为:

1. 充足的营养物质;
2. 适宜的温度;
3. 合适的酸碱度;
4. 必要的气体环境。

根据待检标本的性质和培养目的,选择不同的培养基(基础培养基、营养培养基、鉴别培养基、选择培养基、厌氧培养基等),对于固体培养基、半固体培养基、液体培养基采用不同的接种方法。

实验操作均需严格无菌操作,避免杂菌进入培养基,防止实验菌种污染环境。

【实验目的要求】

1. 了解细菌生长繁殖的基本条件以及培养基的种类和用途。
2. 学会细菌的接种方法及观察细菌的生长现象。

【实验材料】

1. 菌种:金黄色葡萄球菌、变形杆菌及大肠杆菌普通平板培养物。
2. 培养基:普通琼脂平板培养基,普通琼脂斜面培养基,普通琼脂半固体培养基,液体培养基。
3. 器材:接种环,酒精灯,火柴,普通培养箱。

【实验方法】

1. 普通琼脂平板分区划线接种法:通过划线,将混杂的细菌在平板表面逐一分散,经培养后,分散的单个细菌形成菌落。根据菌落形态、特征挑选单个菌落,移种培养后,即得纯种细菌。

(1)烧灼接种环,冷却后取一环菌种。

(2)打开平板盖,左手斜持平板(约45°角),并靠近火焰,以免空气中的杂菌落入平板



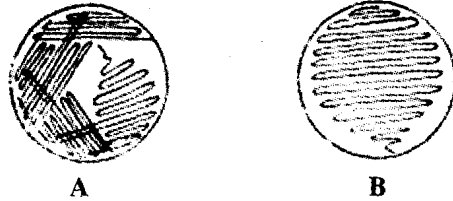
内,右手握持已沾菌种的接种环在琼脂平板一端连续平行划线(约占平板面积的 1/10),为第 1 组线。划线时,接种环与平板成 $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 角,轻轻接触平板,注意不要将接种环嵌入琼脂将其划破。

(3)接种环烧灼灭菌冷却后,将接种环通过第 1 区 2~3 次并连续划线,为第 2 组线(约占平板面积的 1/5),接种环再次灭菌,冷却后同法划出第 3、4 组线。如图 A。

(4)接种完毕,接种环灭菌后放回试管架,盖上皿盖,于皿底做好标记,将平板倒置(平板底面朝上),置 37°C 培养 24 小时后观察结果。

(5)结果:琼脂平板表面散在分布菌落,有金黄色色素的为金黄色葡萄球菌菌落。

2. 普通琼脂平板连续划线接种法:对于菌量较少底混和菌液或标本,可作连续划线接种,如图 B。



平板划线分离培养法

A. 分区划线接种 B. 连续划线接种

3. 普通琼脂斜面培养基接种法:本法主要用于移种经划线分离培养所获得的单个菌落,以得到纯种细菌,保存菌种即观察细菌特性。

(1)将菌种管、培养基管握于左手食指、中指和拇指之间,菌种管在外侧,培养管位于内侧,斜面均朝上。

(2)以右手食指及拇指松动两管棉塞,接种环烧灼灭菌。

(3)以右手小指与手掌、小指与无名指分别拨取两管棉塞,将管口迅速透过火焰以灭菌。

(4)用已灭菌的接种环挑取少量菌苔,迅速伸入培养管,在斜面表面先从底部上拉一线,然后从底部向上轻轻连续蜿蜒划线直至斜面顶端。管口火焰灭菌,塞好管塞,接种环灭菌后放回试管架。置 37°C ,培养 24 小时。

(5)结果:斜面表面形成灰白色菌苔。

4. 液体培养基接种法:牛肉汤、蛋白胨水、糖发酵管等均为液体培养基。牛肉汤常用于增菌,细菌呈混浊、沉淀、菌膜等生长现象;蛋白胨水和糖发酵管主要用于检测细菌的生化反应。

(1)将菌种管、培养基管握于左手食指、中指和拇指之间,菌种管在外侧,培养管位于内侧,斜面均朝上。

(2)以右手食指及拇指松动两管棉塞,接种环烧灼灭菌。

(3)以右手小指与手掌、小指与无名指分别拨取两管棉塞,将管口迅速透过火焰以灭



菌。

(4)用已灭菌的接种环挑取少量菌苔,迅速伸入肉汤培养基,在接近液面的管壁处轻轻研磨,培养管竖直后研磨点在液面下,试管加塞。肉汤管置 37℃,培养 24 小时,接种环灭菌后放回试管架。

(5)结果:

浑浊生长:菌液呈均匀混浊,管底有少量沉淀。

沉淀生长:管底有沉淀,菌液无明显混浊。

菌膜生长:菌液表面形成膜状物。

5. 普通琼脂半固体培养基接种法:半固体培养基均以穿刺法接种,半固体琼脂培养基用于观察细菌动力或保存菌种。

(1)将菌种管、培养基管握于左手食指、中指和拇指之间,菌种管在外侧,培养管位于内侧,斜面均朝上。

(2)以右手食指及拇指松动两管棉塞,接种环烧灼灭菌。

(3)以右手小指与手掌、小指与无名指分别拔取两管棉塞,将管口迅速透过火焰以灭菌。

(4)用已灭菌的接种针挑取少量菌苔,垂直刺入半固体培养基的中心近达管底处,后沿原路退出,接种针灭菌后放回试管架。试管加塞,置于 37℃,培养 24 小时。

(5)结果:葡萄球菌沿接种线生长,线外培养基仍透明清亮;变形杆菌可见线外的扩散生长,有时整个培养基呈混浊。

【实验报告要求】

普通琼脂平板培养基、普通斜面培养基、半固体培养基、液体培养基的生长现象、用途。