

北京大学医学实验系列教材

医学免疫学与 病原生物学实验教程

主 编 王月丹

副主编 李 彤 吴 伟



北京大学医学出版社

北京大学医学实验系列教材

医学免疫学与病原生物学实验教程

主 编 王月丹
副主编 李 彤 吴 伟
编 委 (按姓氏笔画排序)

王月丹	王承志	邓路遥	李 彤
李 杰	李 爽	刘树林	闫 玲
朱蕴兰	吴 伟	陈慧红	周 琦
张秀春	孟佳子	贺 琼	贾默雅
徐 兰	曹 杰	彭宜红	程眉菽

北京大学医学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学免疫学与病原生物学实验教程/王月丹主编. —北京: 北京
大学医学出版社, 2008. 5

(北京大学医学实验系列教材)

ISBN 978-7-81116-556-2

I. 医… II. 王… 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. R473. 71

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 040143 号

医学免疫学与病原微生物学实验教程

主 编: 王月丹

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京东方圣雅印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 朱文玉 周传敬 韩忠刚 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 15.25 字数: 379 千字

版 次: 2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 次印刷 印数: 1-3000 册

书 号: ISBN 978-7-81116-556-2

定 价: 26.00 元

版权所有 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

北京大学医学实验系列教材编委会

主任委员 李学军

副主任委员 管又飞 官恩聪

秘书长 张燕

委员 (按姓氏笔画排序)

卫兰	王宪	王月丹	白云	李彤	刘永寿
吴丹	吴伟	吴立玲	肖军军	宋德懋	张涛
张卫光	范少光	祝世功	钟延丰	贾弘祺	贾竹青
徐海	倪菊华	梁静	谭焕然		

序

现代医学是一门实验科学。医学院校在培养学生时一般都很重视实验教学，北京大学医学部也是如此。但在我的印象中，以前都是各学科单独设立实验课程，彼此多有重复。从内容上看，有相当部分只是理论课上某些结论的印证，学生们往往对着实验指导一步一步往下操作，实验结束、报告写完，脑子里并没有留下多少印象。近些年来，北京大学医学部基础医学院围绕培养创新人才的目标，在教学内容、教学方法、课程模式、考核体系等方面进行了新的探索和实践，其中也包括实验教学的改革。他们在1998年创建了生物医学实验教学中心，十年来对12门基础医学课程的实验教学进行了重组、整合和改革，打破了“单一课程”、“单一实验室”的原有模式，形成了以机能、形态、生物化学与分子生物学、病原与免疫、细胞生物与遗传五个模块和基础性实验、综合性实验、研究性实验三个层次所构成的基础医学实验教学体系，并且在实验内容方面注重培养学生科学思维，激发学生创新活力，提高学生解决实际问题的能力。我认为北京大学医学部在基础医学实验课程教学方面进行的改革是扎实的，是成功的。《北京大学医学实验系列教材》是他们十年改革成果的总结，值得各医学院校参考。我也衷心希望我国从事医学教育的同道们再接再厉，在实践中不断摸索新的经验，思想再解放一些，改革的步伐再迈得大一些，为建立具有中国特色的先进医学教育体系做出新的贡献。

是为序。

韩启德

二零零八年四月二十九日

前 言

本教材是北京大学医学实验系列教材之一，主要包括医学微生物学、医学寄生虫学和医学免疫学的教学实验内容，是帮助医学生验证病原学与免疫学基本理论、理解病原微生物致病机制和掌握免疫学与病原学检验与诊断方法的基本原理和基本操作的指导用书。

本实验教材设计的实验包括三个层次，通过基本实验培养学生掌握病原学与免疫学基本操作技术（如显微观察技术、无菌操作技术、分离培养技术、免疫荧光技术、免疫酶标记和免疫细胞功能检测等）；通过综合实验使学生认识如何将病原学与免疫学的基本操作和分析技术应用用于医学实践（如病原微生物的分离鉴定和细胞因子的检测等）；通过高级实验使学生了解本学科在技术上和认识上最新的发展动态，培养学生的创新意识和参与科学研究的能力（如病原体特异性T细胞识别的抗原表位分析与鉴定等）。在实验中，通过标本观察、实验操作、分析实验结果及计算机多媒体辅助教学等手段对学生进行基本理论、基本操作、基本诊断方法以及建立基本科研思路的训练。

在本教材的编写过程中，不仅有北京大学生物医学实验教学中心病原与免疫综合实验室教师的参与，同时也得到了北京大学基础医学院免疫学系和病原生物学系广大教师与研究生的支持。其中，病原生物学系刘树林教授、吴伟副教授、彭宜红副教授、李彤副教授和免疫学系王月丹博士等一批相关专业的专家担任本书的编委，这不仅保证了本教材中的实验能满足医学本专科学生掌握免疫学与病原学基本实验技能和原理的需要，而且也使本教材介绍的实验（尤其是高级实验部分）更能与时俱进，具有一定的先进性，更有利于培养学生的创新意识与创新能力。

本教材可供基础医学、临床医学、口腔医学、预防医学、医学检验、护理学、药学及卫生事业管理等专业的医学生实验课使用，针对不同专业的学生可根据实际情况对实验内容进行适当调整与删减。由于本教材在编写形式和实验内容方面进行了新的尝试，经验不足，而且时间仓促，难免存在各种各样的错误与不足，希望各位使用本教材的老师与同学批评指正。

编 者

2008年4月5日

目 录

总 论

- 一、实习课的基本要求.....(1)
- 二、实验室规则.....(1)
- 三、实验室生物安全简介.....(1)
- 四、医学寄生虫学实验中光学显微镜的使用.....(4)

基本实验

- 实验一 细菌形态学观察基本技术.....(9)
- 实验二 细菌分离培养相关技术及应用.....(16)
- 实验三 微生物的控制.....(24)
- 实验四 细菌代谢产物检查.....(31)
- 实验五 细菌变异现象的观察.....(35)
- 实验六 螺旋体实验.....(38)
- 实验七 真菌形态学观察.....(41)
- 实验八 病毒学基本技术.....(44)
- 实验九 免疫器官的观察.....(50)
- 实验十 免疫沉淀反应试验.....(52)
- 实验十一 免疫凝集反应试验.....(56)
- 实验十二 酶联免疫吸附试验.....(59)
- 实验十三 补体功能检测试验.....(61)
- 实验十四 免疫细胞功能检测试验.....(65)
- 实验十五 线虫.....(74)
- 实验十六 吸虫.....(80)
- 实验十七 绦虫.....(86)
- 实验十八 医学原虫.....(92)
- 实验十九 医学节肢动物.....(101)

综合实验

- 实验一 病原性球菌的分离鉴定.....(113)
- 实验二 肠道杆菌的分离鉴定.....(120)
- 实验三 流行性感冒病毒的分离鉴定.....(128)
- 实验四 白细胞介素 2 活性测定.....(132)

实验五	超敏反应试验	(134)
实验六	消化道寄生虫的检查	(140)
实验七	血液、排泄物、分泌物与组织器官中的寄生虫检查	(146)
实验八	感染血吸虫家兔的病理解剖和实验室诊断	(152)

高级实验

实验一	脉冲场电泳技术在细菌基因组物理图构建中的应用	(159)
实验二	沙眼衣原体临床标本的分离培养与鉴定	(171)
实验三	病毒样品感染滴度的测定	(173)
实验四	乙型肝炎病毒基因分型实验	(177)
实验五	多克隆抗体的制备	(182)
实验六	单克隆抗体的制备	(187)
实验七	特异性 T 细胞识别的抗原表位分析与鉴定	(191)
实验八	卡氏肺孢子虫感染动物模型的建立及 PCR 检测	(203)
附录 I	常用培养基制备	(205)
附录 II	微生物染色法	(213)
附录 III	常用指示剂、试剂、溶液和缓冲液	(218)
附录 IV	实验动物的管理、接种、采血及解剖法	(224)
附录 V	实验仪器介绍	(227)
参考文献		(230)

英文索引

.....	一
.....	二
.....	三
.....	四

总论

一、实习课的基本要求

病原生物学实验室是分离、培养、鉴定和保藏病原微生物之处，为避免感染和污染的发生，在实验中必须注意树立无菌观念，掌握无菌操作技术。为使同学们通过实习课加深和巩固基础理论知识，学习并掌握病原生物学的基本实验操作技能，并保证自身和他人的安全，特制定以下规则，希望同学们严格遵守。

(一) 课前预习，明确实验目的、原理、内容、操作步骤及注意事项，并做好必要准备工作。

(二) 课上认真听讲并仔细观察示教内容；对自己操作的实验要严格按实验步骤进行操作，注意分工协作，合理分配和利用时间；有问题随时提问解决。

(三) 客观真实地记录结果，及时完成实验报告。

(四) 确实遵守实验室规则，避免各种事故发生。

二、实验室规则

(一) 实验前穿好白大衣，除实习讲义外，其他个人物品不要放在实验台上。实验室内严禁吸烟、饮食及大声喧哗。

(二) 实验中严格按无菌操作技术要求操作。当出现污染时，应立即报告老师以便及时处理。

(三) 沾有微生物的用品，如吸管和玻片等，用后应立即放入装有消毒液的专用容器内。

(四) 爱护示教标本、仪器和室内设施。注意易燃物品的使用，防止火灾发生。

(五) 节约水电、燃气、酒精、试剂及一切实验材料。损坏公物和实验器材，需视情节进行批评及赔偿。

(六) 实验完毕后，将标本和材料按原样摆好送还老师，要消毒处理的物品，应送到指定地点。须将显微镜按要求维护好，登记并对号放入柜中。

(七) 每次实验课后，按小组值日。值日要求如下：实验物品还原，台面、地面和白板面干净，凳子放齐，检查水、电、门、窗、培养箱温度、水浴锅等，该关闭的关闭，该保温的保温。

(八) 离开实验室前，脱去白大衣并反折叠好，用肥皂洗手后再离开。

三、实验室生物安全简介

医学病原生物学实验室是分离、培养、鉴定和保藏病原微生物之处，确保操作人员和环境安全至关重要。

(一) 病原微生物分类

2004年11月12日国务院发布了424号令，开始实施《病原微生物实验室生物安全管理条例》。根据《条例》病原微生物分为4类。第一类病原微生物，是指能够引起人类或动

物非常严重疾病的微生物，以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物，例如马尔堡病毒和天花病毒。第二类病原微生物，是指能够引起人类或者动物严重疾病，比较容易直接或间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物，如 SARS 冠状病毒、HIV I 型和 II 型、炭疽芽孢杆菌和结核分枝杆菌。第三类病原微生物，是指能够引起人类或者动物疾病，但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病，并且具备有效治疗和预防措施的微生物，如 HBV、登革病毒、破伤风梭菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌。第四类病原微生物，是指在通常情况下不会引起人类或者动物疾病的微生物，如小鼠白血病病毒。其中，第一类和第二类称为高致病性病原微生物。医学微生物学教学实验中使用的微生物主要为第三类和第四类病原微生物。

(二) 生物安全实验室分类

生物安全实验室 (Biosafety Laboratory)，简称“BSL 实验室”，在结构上由一级防护屏障 (安全设备) 和二级防护屏障 (设施) 这两部分硬件构成，实验室生物安全防护的安全设备和设施的不同组合，构成了四级生物安全防护水平，一级最低，四级最高。其中，BSL-1 和 BSL-2 实验室被称为基础实验室，BSL-3 被称为生物安全防护实验室，BSL-4 被称为高度生物防护实验室。医学微生物学教学实验通常要求在 BSL-1 和 BSL-2 实验室开展。

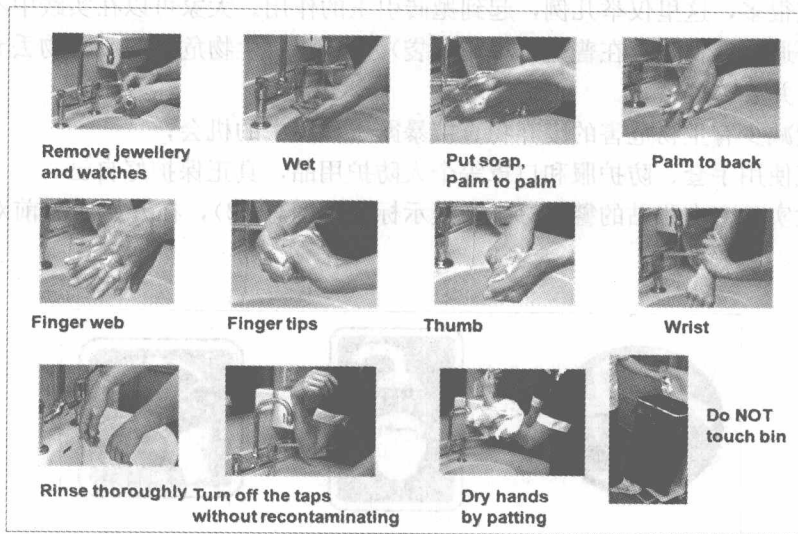
(三) 实验室生物安全操作规程的要点

在医学微生物学教学实验中，虽然所用微生物一般危害较轻，但学生应该注意树立预防为主的观点。实验室生物安全操作规程的要点是：①把所有的微生物培养物当成有潜在危害的生物对待；②把所有的操作当成有潜在危险的操作对待。之所以有必要把所有的微生物培养物当成有潜在危害的生物对待，原因有三。首先，已知对人无害的微生物有可能经变异而对人产生危害；其次，某种微生物在自然情况下其总量和单位体积 (或单位重量) 样品中的量 (即浓度) 较之实验室纯培养物要低很多，不能据其在量小、浓度低时对人体无害就推断其在量大、浓度高时对人体就一定无害；最后，要考虑人群中存在个体免疫力的差异，某种微生物可能对大多数个体无害，但对少数个体可能就能致病。

(四) 减少实验室感染实用指南

1. 学会洗手

实验室中规范的洗手流程参见图总-1。洗手时间为 20~30s，即将“祝你生日快乐”歌唱 1~1.5 遍。



图总-1 规范的洗手流程图

2. 学会安全使用注射器和利器

- (1) 必须用时（如取血和注射）才使用；
- (2) 只使用一次；
- (3) 使用后不得将针头帽重新套上或折弯针头；
- (4) 使用者即丢弃者原则：使用者不要将用过的注射器或利器交给别人丢弃；
- (5) 使用后丢弃在专用的防穿透的容器内；
- (6) 最后的处理要按国家、地方或单位的规定。

3. 学会危害评估

对实验材料和实验活动的危险性评估主要考虑的因素见表总-1。

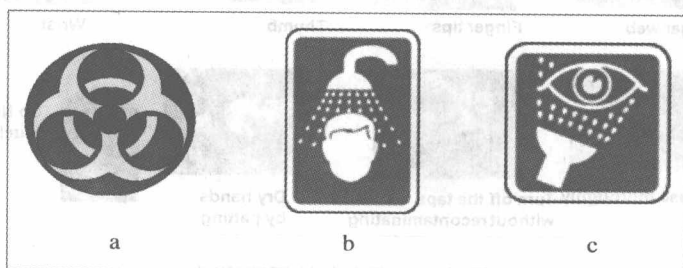
表总-1 潜在危险性大的实验材料和实验活动

潜在危险性大的实验材料	潜在危险性大的实验活动
1. 致病性强	1. 产生气溶胶的操作（如离心、组织研磨、混合培养液、真空抽滤、打开装有冻干物的安瓿管、收集微生物培养物、使用匀浆器、摇床和超声处理器、热的接种环放在菌液或菌苔上、在玻璃片上做触酶试验、液体从吸管滴落到工作台上、从吸管中将最后一滴液体吹出、用移液管反复吹吸混合液体、磨口瓶子打开瓶塞时、快速地脱实验服）
2. 经呼吸道传播	2. 使用针头和利器的操作
3. 稳定性强，去除污染难	3. 操作纯培养物或浓缩的培养液
4. 感染剂量 LD ₅₀ 低	4. 操作大体积样品（如 10 L）
5. 单位体积内感染性微生物量大	
6. 样品总体积大	
7. 对其致病性了解不详的变异株、我国没有的菌毒株、转基因生物	
8. 没有有效疫苗预防的	
9. 没有有效治疗方法的	
10. 本实验室人员从未操作过的	

4. 掌握减少污染和降低感染风险的实用措施

实用措施很多，这里仅举几例，起到抛砖引玉的作用。大家可以在实践中不断总结。

- (1) 将普通废弃物丢弃在普通垃圾箱（袋）内；将有生物危害的废弃物丢弃在专用垃圾箱（袋）内，并妥善处理；
- (2) 尽量减少有生物危害的废弃物直接暴露于环境中的机会；
- (3) 规范使用手套、防护服和口罩等个人防护用品，真正保护好自己；
- (4) 注意实验室中张贴的警示标志及提示标志（图总-2），在开始实验前对工作环境有清楚的认识。



图总-2 实验室中警示标志及提示标志举例。a. 生物危害警告标志；
b. 紧急淋浴标志；c. 洗眼器标志。

5. 掌握污染事故处理的实用原则

- (1) 做好个人防护；
- (2) 立刻处理；
- (3) 不扩大污染；
- (4) 视情况隔离观察；
- (5) 根据条件进行适当预防治疗；
- (6) 向实验室负责人汇报；
- (7) 有事故及处理记录。

(五) 有关实验室生物安全规章制度的详细内容可参见“中国生物安全信息网”(<http://www.biosafety.com.cn/Html/Article/Index.html>)。

四、医学寄生虫学实验中光学显微镜的使用

寄生虫标本大多为完整的虫体，在使用显微镜观察标本时，要经常旋转粗、细调节器，依次观察标本各层的结构和关系，以获得整体结构的概念。

光线的调节：将寄生虫学标本置于载物台上，将光栅完全打开，提升聚光器，调节反光镜至最大亮度。

根据观察标本的厚薄与颜色，通过光栅和聚光器把光线调至适宜强度，用低倍镜（ $\times 10$ 物镜）粗调至能看清物像后，再用细调调至最清晰。通常高倍、油镜和比较厚的标本需要较强的光；低倍、无色标本光线宜弱。

观察标本时，要仔细观察每一个视野。为了减少遗漏，可按一定方向，如自上而下、自左而右推进。如有可疑物像，可放大倍数观察。

将待观察部位移至视野中央，转高倍镜（ $\times 40$ 物镜）。若高倍与低倍焦点不一致，则须先摸索好高倍和低倍的位置和焦距的关系，并熟悉二者相应的关系，以便自如转换高、低

倍镜。

用油镜（ $\times 100$ 物镜）时，先进行高倍观察，将待观察部位移至视野中央，在载玻片上加一滴显微镜油，转换至油镜，然后用细调上下旋转至清晰后观察。注意不要将高倍镜浸入显微镜油。

显微镜使用完毕，按要求清洁后，将亮度调至最小，关闭电源，将显微镜罩上防尘罩。

基本实验

实验一 细菌形态学观察基本技术

(Bacterial Morphology Observation: Basic Techniques)

实验 1.1 显微镜油镜头的使用 (Use of oil immersion lens)

【实验目的】

微生物的显微观察是微生物学的基本实验技术之一。光学显微镜油镜头则是观察细菌的重要工具。通过本实验了解光学显微镜油镜头工作原理和使用范围,掌握使用油镜头的技术。

【实验原理】

细菌很小,一般最大不超过几微米(μm)。而人肉眼分辨力约为 0.25 毫米(mm)。因此,需把细菌放大 1000 倍左右才能看到。在微生物学实验室常用普通光学显微镜(light microscope)的油镜头观察细菌的形态,它可将物体放大 800~1000 倍。

正常人眼能看清相距 0.25mm 的两个物点,不会误看为一个点。这个 0.25mm 的数值,即正常人眼的分辨距离。假如两个物点之间的距离小于这个数值,人眼就分辨不出,会误看为一个点。所以分辨距离就是所能分辨开的两个物点之间的最小距离。分辨力与分辨距离呈反比,其大小由分辨距离的数值来表示。显微镜的分辨力由物镜的分辨力决定,以 D 表示,D 值越小表示分辨力越高。

$$D = 0.61\lambda/NA; NA = n \cdot \sin\alpha/2$$

公式中 λ 为入射光波长,NA 为物镜数值孔径;n 为物镜与标本之间介质的折光率, α 为光线进入物镜的最大夹角(最大镜口角)。由于 λ 与 α 一般不会改变,因此 n 对显微镜分辨力影响很大。

当光线由标本(玻片)经空气进入物镜头时,由于空气的折光率($n=1.0$)与玻片折光率($n=1.52$)不同,便发生散射现象,降低了显微镜的分辨力。油镜与其他物镜的不同是标本片与物镜之间不是隔一层空气,而是隔一层镜油。因镜油的折光率为 1.52,与玻璃的折光率相近。当光线通过载玻片后,可直接通过镜油进入物镜而不发生折射,因此减少了光的散射,提高了显微镜的分辨力,使物像明亮清晰可见(图 1-1-1a)。

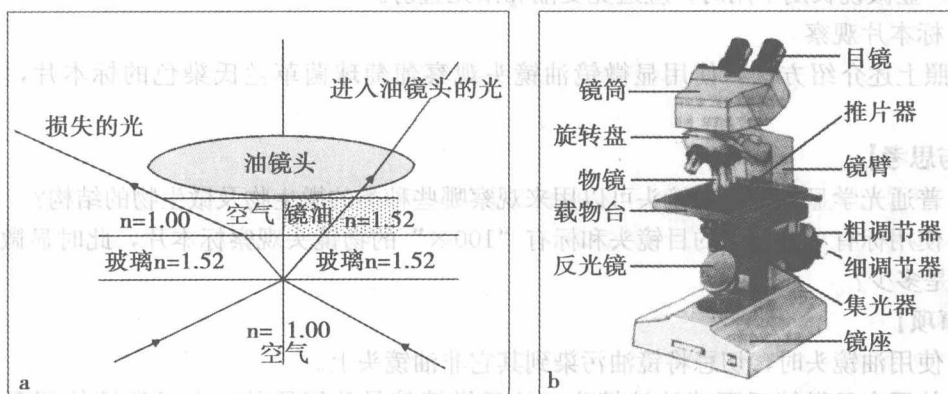


图 1-1-1 光学显微镜。a. 油镜头提高分辨力的原理; b. 构造。