

21世纪医药院校实验规划教材

(供护理、临床、预防、中医、口腔、检验、影像等专业使用)

# 病原生物与免疫学实验指导

BINGYUAN SHENGWU YU MIANYIXUE SHIYAN ZHIDAO

主编 李晓红



第四军医大学出版社

教育部高等学校生物医学基础课程教学指导委员会  
——病原生物学、免疫学、寄生虫学、微生物学、细胞生物学、组织胚胎学、生物化学与分子生物学——

# 病原生物学与免疫学实验指导

Pathogen Biology and Immunology Laboratory Manual

主编 李树刚

北京协和医学院出版社

21 世纪医药院校实验规划教材

(供护理、临床、预防、中医、口腔、检验、影像等专业使用)

# 病原生物与免疫学 实验指导

主 编 李晓红

编 者 (按姓氏笔画排序)

王利荣 李晓红 姚志宏

袁 力 晏继红 蔚振江

第四军医大学出版社·西安

## 图书在版编目(CIP)数据

病原生物与免疫学实验指导/李晓红主编. —西安:第四军医大学出版社,2010.1  
ISBN 978-7-81086-746-7

I. 病… II. 李… III. 病原微生物-高等学校:技术学校-教学参考资料;  
医药学:免疫学-高等学校:技术学校-教学参考资料 IV. R37;R392

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 012064 号

## 病原生物与免疫学实验指导

主 编 李晓红  
责任编辑 马元怡  
出版发行 第四军医大学出版社  
地 址 西安市长乐西路 17 号(邮编:710032)  
电 话 029-84776765  
传 真 029-84776764  
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>  
印 刷 西安力顺彩印有限责任公司  
版 次 2010 年 1 月第 1 版 2010 年 1 月第 1 次印刷  
开 本 787×1092 1/16  
印 张 6.25 彩 0.25  
字 数 150 千字  
书 号 ISBN 978-7-81086-746-7/R·649  
定 价 15.00 元

(版权所有 盗版必究)

## 21 世纪医药院校实验规划教材建设指导委员会

顾 问 邢铁申 吴伯英

主 任 委 员 马晓飞

副主任委员 王文玉 吴 昌 郭晓华

委 员 (按姓氏笔画排序)

马晓飞 孙 慧 吴 昌

陈天虎 郭晓华

# 前 言

《病原生物与免疫学》是医学教育中重要的基础学科和主干课程。我们依据全国医学高等专科学校规划教材《病原生物与免疫学》和教学大纲的要求,结合当前医学技术发展状况以及多年来的教学实践,组织编写了《病原生物与免疫学实验指导》一书。

全书分三篇,共计 11 次实验。按免疫学、病原微生物学和人体寄生虫学的顺序编写,每次实验包括:实验目标、实验原理及材料、实验步骤、实验报告及思考题等。书后有附录,涵盖实验室常用器材的处理与消毒灭菌,常用染色液、消毒液和清洁液的配制方法等。

编写中力求“贴近学生、贴近社会、贴近岗位”。本书特色在于把实验报告部分按作业本的形式编写,留有空白供学生填写,在规范学生书写实验报告的同时,也便于教师批改;内容详实,层次清晰,实用性强,适用于高职高专医学类各专业,也可作为中等卫生职业学校的实验参考用书。各院校在使用中,可根据本校实际进行取舍。

本书由汉中职业技术学院和商洛职业技术学院部分教师合作编写。我们期望能为老师和同学们提供一部新颖、实用的实验指导用书,但由于编者水平有限,不足之处恳请专家同行和广大师生给予批评指正。

编者

2009 年 11 月

# 目 录

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| 病原生物与免疫学实验目的及要求 ..... | ( 1 ) |
| 病原生物与免疫学实验室规则 .....   | ( 2 ) |

## 第一篇 免疫学

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| 实验一 免疫细胞观察 .....                 | ( 3 )  |
| 一、实验目的 .....                     | ( 3 )  |
| 二、实验内容 .....                     | ( 3 )  |
| (一)吞噬细胞的吞噬现象观察 .....             | ( 3 )  |
| (二)血细胞涂片观察 .....                 | ( 3 )  |
| (三)淋巴细胞 E 受体检测(E 花环试验) .....     | ( 3 )  |
| (四)淋巴细胞转化试验(形态学检测法) .....        | ( 5 )  |
| 三、实验报告 .....                     | ( 6 )  |
| 四、思考题 .....                      | ( 7 )  |
| 实验二 抗原 - 抗体反应及其应用 .....          | ( 9 )  |
| 一、实验目的 .....                     | ( 9 )  |
| 二、实验内容 .....                     | ( 9 )  |
| (一)补体溶血试验 .....                  | ( 9 )  |
| (二)直接凝集反应(玻片法) .....             | ( 10 ) |
| (三)单向琼脂扩散试验 .....                | ( 11 ) |
| (四)双向琼脂扩散试验 .....                | ( 12 ) |
| (五)对流免疫电泳 .....                  | ( 13 ) |
| (六)双抗体夹心法检测 HBsAg(ELISA 法) ..... | ( 14 ) |

|                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| (七)斑点金免疫层析试验(孕免试纸试验) .....     | (15)        |
| 三、实验报告 .....                   | (16)        |
| 四、思考题 .....                    | (18)        |
| <b>实验三 超敏反应及常用生物制品介绍 .....</b> | <b>(19)</b> |
| 一、实验目的 .....                   | (19)        |
| 二、实验内容 .....                   | (19)        |
| (一)豚鼠过敏反应 .....                | (19)        |
| (二)结核菌素试验 .....                | (20)        |
| (三)常用生物制品介绍 .....              | (21)        |
| 三、实验报告 .....                   | (21)        |
| 四、思考题 .....                    | (22)        |

## 第二篇 病原微生物学

|                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| <b>实验四 细菌的形态检查 .....</b>       | <b>(24)</b> |
| 一、实验目的 .....                   | (24)        |
| 二、实验材料 .....                   | (24)        |
| 三、实验内容 .....                   | (24)        |
| (一)细菌基本形态和特殊结构的观察 .....        | (24)        |
| (二)细菌不染色标本检查法 .....            | (25)        |
| (三)革兰染色法 .....                 | (25)        |
| 四、实验报告 .....                   | (26)        |
| 五、思考题 .....                    | (28)        |
| <b>实验五 细菌的培养和生长现象的观察 .....</b> | <b>(29)</b> |
| 一、实验目的 .....                   | (29)        |
| 二、实验材料 .....                   | (29)        |
| 三、实验内容 .....                   | (29)        |
| (一)细菌的接种方法 .....               | (29)        |
| (二)细菌生长现象的观察 .....             | (31)        |

|                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| 四、实验报告·····                      | (31)        |
| 五、思考题·····                       | (32)        |
| <b>实验六 细菌的分布与消毒灭菌</b> ·····      | <b>(33)</b> |
| 一、实验目的·····                      | (33)        |
| 二、实验材料·····                      | (33)        |
| 三、实验内容·····                      | (33)        |
| (一)细菌的分布 ·····                   | (33)        |
| (二)常用的消毒灭菌方法 ·····               | (34)        |
| (三)常用的消毒灭菌器和滤器 ·····             | (34)        |
| (四)药物敏感试验 ·····                  | (35)        |
| 四、实验报告·····                      | (35)        |
| 五、思考题·····                       | (37)        |
| <b>实验七 常见病原微生物形态与培养物观察</b> ····· | <b>(38)</b> |
| 一、实验目的·····                      | (38)        |
| 二、实验材料·····                      | (38)        |
| 三、实验内容·····                      | (38)        |
| (一)化脓性球菌 ·····                   | (38)        |
| (二)消化道感染细菌 ·····                 | (39)        |
| (三)呼吸道感染细菌 ·····                 | (39)        |
| (四)厌氧菌 ·····                     | (40)        |
| (五)其他病原微生物 ·····                 | (40)        |
| 四、实验报告·····                      | (41)        |
| 五、思考题·····                       | (42)        |
| <b>实验八 常见病原微生物生化反应</b> ·····     | <b>(44)</b> |
| 一、实验目的·····                      | (44)        |
| 二、实验内容·····                      | (44)        |
| (一)血浆凝固酶试验 ·····                 | (44)        |
| (二)肠道杆菌生化反应 ·····                | (44)        |

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| 三、实验报告·····                   | (46) |
| 四、思考题·····                    | (47) |
| <b>实验九 常见病原微生物血清学试验</b> ····· | (48) |
| 一、实验目的·····                   | (48) |
| 二、实验内容·····                   | (48) |
| (一)抗链球菌溶血素 O 试验(乳胶凝集法) ·····  | (48) |
| (二)肥达试验 ·····                 | (49) |
| (三)白喉棒状杆菌毒力试验 ·····           | (50) |
| (四)破伤风外毒素与抗毒素中和试验 ·····       | (51) |
| (五)外斐试验 ·····                 | (51) |
| (六)流感病毒血凝抑制试验 ·····           | (52) |
| 三、实验报告·····                   | (53) |
| 四、思考题·····                    | (54) |

## 第三篇 人体寄生虫学

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| <b>实验十 医学蠕虫</b> ·····         | (55) |
| 一、实验目的·····                   | (55) |
| 二、实验材料·····                   | (55) |
| 三、实验内容·····                   | (55) |
| (一)虫体标本观察 ·····               | (55) |
| (二)宿主标本观察 ·····               | (57) |
| (三)病理标本观察 ·····               | (57) |
| (四)镜下虫卵观察 ·····               | (58) |
| (五)虫卵检查法 ·····                | (59) |
| 四、实验报告·····                   | (60) |
| 五、病例分析·····                   | (63) |
| <b>实验十一 医学原虫和医学节肢动物</b> ····· | (65) |
| 一、实验目的·····                   | (65) |

|                 |        |
|-----------------|--------|
| 二、实验材料·····     | ( 65 ) |
| 三、实验内容·····     | ( 65 ) |
| (一)医学原虫 ·····   | ( 65 ) |
| (二)医学节肢动物 ····· | ( 66 ) |
| 四、实验报告·····     | ( 68 ) |
| 五、病例分析·····     | ( 69 ) |

## 附 录

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| 附录一 光学显微镜的使用和维护 ·····     | ( 71 ) |
| 附录二 常用染色液和消毒液的配制法 ·····   | ( 73 ) |
| 附录三 细菌染色法 ·····           | ( 76 ) |
| 附录四 常用细菌培养基的制备法 ·····     | ( 79 ) |
| 附录五 实验室常用器材的处理与消毒灭菌 ····· | ( 82 ) |
| 附录六 临床常见病原体标本的采集 ·····    | ( 84 ) |
| 参考文献 ·····                | ( 87 ) |

# 病原生物与免疫学实验目的及要求

## 一、实验目的

1. 培养学生严肃的科学态度和严谨的工作方法。培养学生独立操作、独立观察思考、独立分析问题和解决问题的能力。
2. 验证有关理论，使学生加深对基本知识的理解，并在系统学习理论知识的基础上，学习并掌握病原生物学与免疫学的基本操作技术。
3. 帮助学生建立无菌观念，掌握无菌操作技术。为疾病的诊断、预防和治疗打下坚实的基础。

## 二、实验要求

1. 实验前作好预习，明确实验的目的、内容、原理、主要操作步骤和注意事项。
2. 严格遵守实验室规则，认真按要求操作，预防实验事故发生。
3. 仔细观察实验过程，如实记录实验结果，联系理论认真分析得出结论。如结果与预期不符，应分析讨论，找出原因，提出自己的见解，必要时重复实验。实验完成后，及时完成实验报告交老师批阅。

# 病原生物与免疫学实验室规则

病原生物与免疫学实验的对象大多是病原微生物和寄生虫，在实验中稍有不慎，便有发生感染的危险，因此要求学生进入实验室必须严格遵守以下规则：

1. 尽量不带个人生活、学习用品进入实验室，必需的实验讲义、笔记本、文具等应放在指定的位置。
2. 进入实验室必须穿工作服，必要时还需戴口罩、帽子，离室时脱下反叠带走。工作服要经常清洗消毒。
3. 在实验室内应保持安静，遵守秩序，不得高声喧哗，随便走动或拆卸仪器、搬弄标本。以免影响他人实验和安全。
4. 实验室内严禁吸烟、进食、饮水、用嘴润湿铅笔或标签，尽量不要用手触摸头面部及身体其他暴露部位，以免发生感染。
5. 实验过程中，接种环和接种针使用前后必须进行烧灼灭菌。必须避免任何有菌材料的溅出，如不慎打破菌种管致有菌材料污染皮肤、衣物、桌面等情况，应立即报告指导教师以便及时处理，切勿隐瞒或自行处理。
6. 实验室内任何物品不得携出室外，使用过的实验物品，如培养物、带菌材料、实验动物及器皿等需按要求处理，不得随便乱扔或用水冲洗。
7. 爱护实验室内的仪器，使用显微镜和其他贵重仪器要按要求操作。显微镜油镜使用后应立即用拭镜纸擦净镜头上的油。
8. 实验过程中应注意节约实验材料，损坏实验器材应报告指导教师并进行登记，按规定予以赔偿。
9. 实验完毕，应整理实验物品，清理实验台面，打扫实验室卫生。离室前需用消毒液洗手，再用清水冲洗。关好水、电、门、窗后方可离开实验室。

# 第一篇 免疫学

## 实验一 免疫细胞观察

### 一、实验目的

1. 学会在显微镜下观察吞噬细胞的吞噬现象，加深对吞噬细胞的认识。
2. 学会观察 E 花环试验、淋巴细胞转化试验结果，熟悉免疫活性细胞的特征与功能。

### 二、实验内容

#### (一) 吞噬细胞的吞噬现象观察

吞噬细胞依据形态大小分为大吞噬细胞和小吞噬细胞两类：单核 - 巨噬细胞及中性粒细胞。它们经过趋化、吞入和杀菌等几个步骤，能吞噬和消化衰老、死亡细胞以及病原体等异物，是机体非特异性免疫的重要组成部分。

1. 中性粒细胞吞噬淋病奈瑟菌标本片 油镜观察，中性粒细胞内有吞噬的革兰阴性双球菌。

2. 巨噬细胞吞噬鸡红细胞标本片 镜下可见巨噬细胞细胞核着色较深，多呈马蹄形；细胞质着色较浅。由于被吞噬的鸡红细胞被消化程度不同，形态有差异，应注意观察。未被消化的鸡红细胞核呈椭圆形，着色较深；细胞质呈淡橘黄色，边缘整齐；被完全消化的鸡红细胞，隐约可见到椭圆形空泡中的细胞核。

#### (二) 血细胞涂片观察（彩图 1）

镜下可见红细胞、嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、血小板。

#### (三) 淋巴细胞 E 受体检测（E 花环试验）

##### 【实验原理】

人外周血 T 细胞表面有绵羊红细胞受体（又称 E 受体），与绵羊红细胞在一定条

件作用下可形成玫瑰花状的细胞团，称为 E 花环。

## 【实验材料】

1. 小牛血清、0.5g 水解乳蛋白、抗凝剂、Hank's 液、Wright-emsa 染液、0.8% 戊二醛溶液等。
2. 绵羊红细胞（新鲜采集用玻璃珠去纤维抗凝）。
3. 肝素抗凝人全血 2ml。
4. 显微镜、恒温水浴箱、水平离心机、冰箱、血细胞计数板、毛细吸管、试管、玻片等。

## 【实验步骤】

1. 配制 1% 绵羊红细胞悬液 将绵羊红细胞用 Hank's 液洗 3 次，然后用 2000r/min 离心 10min，最后用 Hank's 液配制成 1% 绵羊红细胞悬液。
2. 配制淋巴细胞悬液 抽取受检者静脉血 2ml 加肝素抗凝，先用淋巴细胞分离液分离出淋巴细胞，再用含 10% 小牛血清和 5.0g/L 水解乳蛋白 Hank's 液（pH 值 7.4）配制成  $(1 \sim 2) \times 10^6/\text{ml}$  的淋巴细胞悬液。
3. 取淋巴细胞悬液 0.1ml 加 1% 绵羊红细胞悬液 0.1ml，混匀，放入 37℃ 水浴 5min，低速（500r/min）离心 5min，然后放入 4℃ 冰箱 2h 或过夜。
4. 取出试管，吸去部分上清液，轻轻使沉淀的细胞重悬后，加入 0.8% 戊二醛溶液 1 滴，固定 20~30min。

## 【结果观察】

1. 湿片观察 用尖吸管取 1 滴细胞悬液置于清洁载玻片上，加 1 滴 Wright 染液，盖上盖玻片，于高倍镜下观察计数。
2. 干片观察 将制备好的花环细胞悬液轻轻摇匀后，加入 0.8% 戊二醛溶液 1 滴，摇匀后置 4℃ 冰箱 20min，涂片后自然干燥，苏木精染液浸染 30min，水洗，伊红液浸染 20s，水洗、干燥，高倍镜或油镜观察。
3. 结果分析 淋巴细胞呈蓝色，绵羊红细胞呈红色围绕淋巴细胞形成花环（图 1-1）。凡淋巴细胞表面黏附有 3 个或 3 个以上绵羊红细胞者为花环形成细胞（即

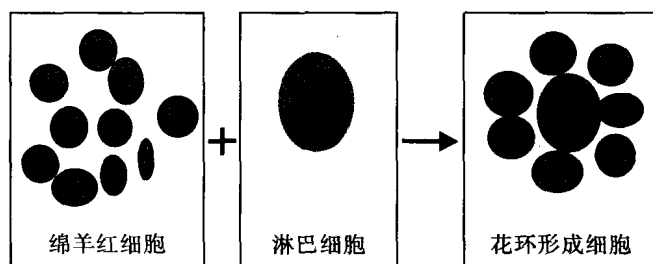


图 1-1 E 花环试验示意图

T淋巴细胞)。一般计数 200 个淋巴细胞, 算出花环形成百分率, 并推测 T 细胞百分率。该试验正常值为 60%~80%。若花环形成率下降, 表明细胞免疫功能降低。

#### (四) 淋巴细胞转化试验 (形态学检测法)

##### 【实验原理】

体外培养的淋巴细胞, 在受植物血凝素 (PHA)、刀豆蛋白 A (ConA) 等非特异性有丝分裂原的刺激时, 可转化为淋巴母细胞, 称为淋巴细胞转化试验。淋巴细胞转化率的高低可反映机体细胞免疫水平, 因此在临床上常作为检测细胞免疫功能的指标之一。

##### 【实验材料】

1. 肝素抗凝人全血。
2. 细胞培养液 常用 RPMI1640 培养液, 有商品出售。
3. 植物血凝素 有商品出售, 用 RPMI1640 培养液稀释成 500~1000 $\mu$ g/ml 备用。
4. Giemsa 染液。
5. 恒温水浴箱、培养管、CO<sub>2</sub> 孵箱、超净台、无菌过滤装置、毛细吸管、高压灭菌器等。

##### 【实验方法】

1. 采血 用无菌技术抽取静脉血 0.2ml, 注入预先加有 1.8ml RPMI1640 培养液的培养瓶内, 同时加入 PHA 0.1ml, 混匀。
2. 培养 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养 72h, 其间每天旋转摇动一次。
3. 收获 培养结束后取出培养瓶, 吸去大部分上清液, 加入 8.5g/L NH<sub>4</sub>Cl 4ml, 混匀后置 37℃ 水浴箱 10min 后, 2000r/min 离心 10min, 弃去上清, 沉淀物加 5ml 固定液, 混悬沉淀, 室温静置 10min, 离心, 弃上清液, 留 0.2ml 沉淀用以制片。
4. 制片 轻摇混匀后, 用毛细吸管取液置于洁净玻片上, 使其均匀分布于全片。
5. 染色 涂片, 自然干燥后用 Giemsa 染液染 10~15min。水洗, 晾干。
6. 油镜观察并计数 用油镜观察计数涂片头、体、尾三段各一纵列 (以减少细胞分布不均的误差) 的淋巴细胞 200 个, 分别计算转化和未转化细胞数。

##### 【结果观察】

1. 转化的淋巴细胞 应根据淋巴细胞的大小, 形态, 核和胞质的比例, 胞质的染色性, 核结构和核仁的有无等特征进行判别。转化和未转化淋巴细胞的形态特征见表 1-1。

表 1-1 转化和未转化淋巴细胞的形态特征

| 细胞特征      | 母细胞      | 转化的淋巴细胞<br>(过渡型) | 未转化的淋巴细胞 |
|-----------|----------|------------------|----------|
| 细胞直径 (μm) | 12~22    | 12~16            | 6~8      |
| 细胞核与染色质   | 增大、疏松    | 增大、疏松            | 不增大、密集   |
| 核仁        | 清晰 1~4 个 | 有或无              | 无        |
| 有丝分裂      | 有或无      | 无                | 无        |
| 胞浆        | 增多, 多有空泡 | 增多, 可有空泡         | 少, 无空泡   |
| 伪足        | 多有伪足     | 有或无              | 无        |

2. 淋巴细胞转化率的计算

淋巴细胞转化率 (%) =  $\frac{\text{转化的淋巴细胞}}{\text{转化的淋巴细胞} + \text{未转化的淋巴细胞}} \times 100\%$

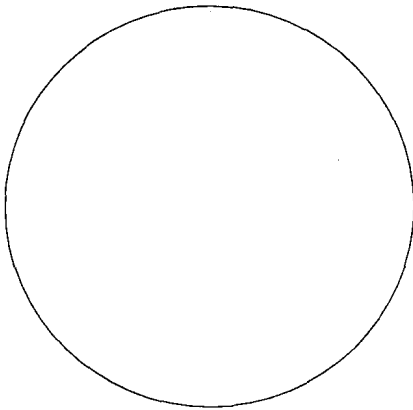
转化率的高低可反映 T 淋巴细胞的功能。正常人的转化率为 70% 左右。

【注意事项】

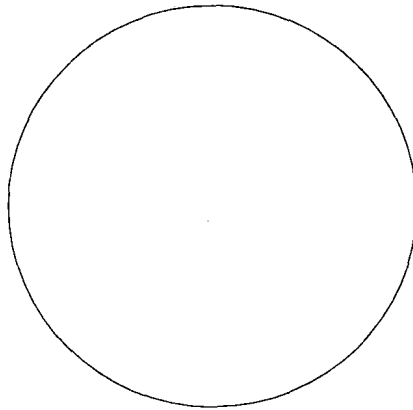
- 1. 培养基的 RPMI1640、小牛血清等成分的预试选定，培养基的 pH，培养瓶的空间和玻璃质量等均可影响淋巴细胞的转化率。
- 2. 严格按无菌操作，避免实验过程污染是淋巴细胞转化试验成功的关键。

三、实验报告

- 1. 绘制镜下所见吞噬细胞的吞噬图像。



吞噬了细菌的中性粒细胞



吞噬了鸡红细胞的巨噬细胞