

- 国家级特色专业建设项目
- 国家级实验教学示范中心建设成果
- 高等院校临床医学专业实践类教材系列

病原生物学与 免疫学实验教程

Experiments of Pathogenic
Biology and Immunology

主 编◎吕 刚 夏乾峰 常彩红



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

医学微生物学、免疫学、寄生虫学教材系列

教育部高等学校医学类专业教学指导委员会推荐教材

病原生物学与 免疫学实验教程

Experimental Procedures of Pathogenic
Biology and Immunology

主 编 王 颖 副 编 王 颖 王 颖

科学出版社

国家级特色专业建设项目
国家级实验教学示范中心建设成果
高等院校临床医学专业实践类教材系列

病原生物学与免疫学实验教程

Experiments for Pathogenic Biology and Immunology

主 编 吕 刚 夏乾峰 常彩红

副主编 伍丽娴 裴 华 王永霞

编 者 (以姓氏笔画为序)

王永霞 王 英 吕 刚

伍丽娴 李丽花 吴 琳

陈锦龙 夏乾峰 常彩红

裴 华



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

病原生物学与免疫学实验教程 / 吕刚, 夏乾峰, 常彩虹主编.
—杭州: 浙江大学出版社, 2013. 4

ISBN 978-7-308-11061-7

I. ①病… II. ①吕… ②夏… ③常… III. ①病原微生物—
实验—医学院校—教材 ②免疫学—实验—医学院校—教材
IV. ①R37-33 ②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 014398 号

病原生物学与免疫学实验教程

吕 刚 夏乾峰 常彩虹 主编

责任编辑 杜玲玲

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州中大图文设计有限公司

印 刷 富阳市育才印刷有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 12.25

字 数 298 千

版 印 次 2013 年 4 月第 1 版 2013 年 4 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-11061-7

定 价 25.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571)88925591

高等院校临床医学专业实践类教材系列

编写说明

海南医学院组织编写的这套临床医学专业五年制本科实践类教材是一套以岗位胜任力为导向,以实践能力培养为核心,以技能操作训练为要素、统一规范并符合现代医学发展需要的系列教材。这套教材包括《临床技能学》、《临床见习指南》(分为外科学、内科学、妇产科学、儿科学四个分册)、《系统解剖学实验教程》、《形态学实验教程》、《生物化学与分子生物学实验教程》、《病原生物学与免疫学实验教程》、《预防医学实验教程》、《英汉对照妇产科实践指南》,共 11 部。本套教材的编写力求体现实用、可操作性等特点。在编写中结合临床医学专业教育特色,体现了早临床、多临床、反复临床的教改思想,在尽可能不增加学生负担的前提下,注重实践操作技能的培养。我们希望通过本套教材的编写及使用,不断探索临床医学实践教学的新思路,为进一步推进医药卫生人才培养模式变革做出新的贡献。

本套教材适用于五年制临床医学专业的医学生,同时也是低年资住院医师作为提高工作能力的参考书。

限于编写人员的知识水平和教学经验,本套教材一定存在许多错误,敬请各位教师、学生在使用过程中,将发现的问题及时反馈给我们,以便再版时更正和完善。

高等院校临床医学专业实践类教材建设委员会主任

陈志斌

2013 年 3 月

高等院校临床医学专业实践类教材

建设委员会

主任委员 陈志斌

副主任委员 谢协驹 林英姿

委 员 (以姓氏笔画为序)

马志健 刘云儒 吕 刚 孙早喜

李天发 李 群 杨 堃 陈 路

金 松 郝新宝 钟南田 凌 奕

常彩红 黄东爱 蒙 晶

秘 书 长 何琪懿

秘 书 廖宇航 冯 明

本套教材目录

- | | | | | |
|-------------------|----|-----|-----|-----|
| 1. 临床技能学 | 主编 | 陈 路 | 郝新宝 | 孙早喜 |
| 2. 临床见习指南——内科学分册 | 主编 | 李天发 | | |
| 3. 临床见习指南——外科学分册 | 主编 | 杨 堃 | | |
| 4. 临床见习指南——妇产科学分册 | 主编 | 金 松 | | |
| 5. 临床见习指南——儿科学分册 | 主编 | 蒙 晶 | | |
| 6. 系统解剖学实验教程 | 主编 | 马志健 | | |
| 7. 形态学实验教程 | 主编 | 李 群 | 钟南田 | |
| 8. 生物化学与分子生物学实验教程 | 主编 | 黄东爱 | | |
| 9. 病原生物学与免疫学实验教程 | 主编 | 吕 刚 | 夏乾峰 | 常彩红 |
| 10. 预防医学实验教程 | 主编 | 刘云儒 | | |
| 11. 英汉对照妇产科实践指南 | 主编 | 凌 奕 | 金 松 | |

前 言

病原生物学和免疫学是临床医学专业重要的基础课程,是临床医学专业本科生的必修课。《病原生物学与免疫学实验教程》的编写结合临床医学专业实验教学改革的实际,依据新的培养目标,将医学微生物学实验、人体寄生虫学实验与医学免疫学实验的传统实验内容进行优化整合,是帮助医学生验证病原生物学与免疫学基本理论,理解病原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。

本教材适用于医药卫生院校临床医学专业本科实验教学,也可供青年教师考研和从事科研工作时参考。

尽管所有作者在进行材料收集及整理编写的过程中都很尽心努力,但限于我们的水平和经验,书中疏漏甚至错误之处在所难免,恳请广大师生和读者多提宝贵意见。

编 者

2013年1月

目 录

第一篇 微生物学实验

实验 1	显微镜的使用	3
实验 2	自然界环境中细菌的检查	6
实验 3	消毒、灭菌、除菌	8
实验 4	细菌的基本形态及结构观察	11
实验 5	细菌生长现象的观察	14
实验 6	培养基的制备和应用	16
实验 7	细菌的致病性	20
实验 8	抗菌药物敏感实验	22
实验 9	球菌的分离培养及微生物学鉴定	24
实验 10	肠杆菌科细菌的分离培养及微生物学鉴定	30
实验 11	呼吸道感染细菌的分离培养及微生物学鉴定	37
实验 12	病毒的形态与结构观察	41
实验 13	呼吸道感染的病毒学检验	43
实验 14	乙型肝炎病毒抗原抗体的检测	51
实验 15	真菌的形态与结构观察	53
实验 16	真菌的培养	55
实验 17	其他微生物的形态学观察	58

第二篇 寄生虫学实验

第一章	实验总则	65
第二章	线 虫	69
实验 1	似蚓蛔线虫(蛔虫)	69
实验 2	毛首鞭形线虫(鞭虫)	71
实验 3	钩 虫	72
实验 4	蛲 虫	75
实验 5	丝 虫	77
实验 6	旋毛形线虫(旋毛虫)	79
第三章	吸 虫	80
实验 7	华支睾吸虫(肝吸虫)	80

实验 8 布氏姜片吸虫(姜片虫)	82
实验 9 并殖吸虫(肺吸虫)	84
实验 10 日本血吸虫	86
第四章 绦 虫	88
实验 11 带绦虫	88
实验 12 棘球绦虫	90
实验 13 膜壳绦虫	92
实验 14 曼氏迭宫绦虫	94
第五章 原 虫	96
实验 15 叶足虫	96
实验 16 鞭毛虫	98
实验 17 孢子虫	101
实验 18 纤毛虫(结肠小袋纤毛虫)	106
第六章 医学节肢动物	107
实验 19 昆 虫	107
实验 20 蝉 螭	112
第七章 寄生虫诊断特有的免疫学技术	115

第三篇 医学免疫学实验技术

第八章 免疫学基本原理	123
实验 1 免疫血清的制备	123
第九章 抗原抗体反应	127
实验 2 直接凝集实验	127
实验 3 沉淀反应	129
实验 4 单向免疫扩散实验	132
实验 5 补体参与的反应	134
第十章 免疫标记技术	137
实验 6 酶联免疫吸附实验	138
实验 7 酶免疫印迹技术	146
实验 8 荧光免疫染色技术	149
实验 9 化学发光免疫分析技术	151
实验 10 放射免疫技术测定甲胎蛋白	153

第十章 免疫细胞分离与检测技术	155
实验 11 聚蔗糖—泛影葡胺密度梯度离心法分离外周血单个核细胞	158
实验 12 间接免疫吸附法 T 细胞亚群的分离	160
实验 13 流式细胞术分离 T 细胞亚群	162
实验 14 中性粒细胞吞噬功能检测	164
实验 15 巨噬细胞吞噬功能测定	166
实验 16 NK 细胞功能测定	169
第十二章 细胞因子的检测	173
实验 17 MTT 法检测白介素-2(IL-2)	173
实验 18 双抗夹心法检测肿瘤坏死因子(TNF)	176
第十三章 免疫自动化分析技术	178
实验 19 流式细胞仪	178
实验 20 酶联免疫自动化分析技术	182
主要参考资料	184

第一篇 微生物学实验

实验 1 显微镜的使用

【实验目的】

1. 掌握光学显微镜的结构和原理。
2. 掌握光学显微镜使用方法。

【实验原理】

一、显微镜的基本结构

普通光学显微镜的构造主要分为两部分：机械部分和光学部分。

1. 机械系统

- (1)镜座：是显微镜的底座，用以支持和稳定整个镜体。
- (2)镜柱：是镜座上面直立的部分，用以连接镜座和镜臂。
- (3)镜臂：一端连于镜柱，一端连于镜筒，是取放显微镜时手握部位。
- (4)镜筒：连在镜臂的前上方，镜筒上端装有目镜，下端装有物镜转换器。
- (5)物镜转换器：位于镜筒下端的旋转盘，可自由转动，盘上有多个物镜孔。
- (6)载物台：在镜筒下方，用以放置标本，中央有一通光孔；装有玻片标本推进器，推进器左侧有弹簧夹，用以夹持玻片标本，镜台下有推进器调节轮，可调节标本位置。
- (7)调焦装置：是装在镜柱上的大小两种螺旋，可调节物镜和标本之间的焦距。大螺旋称粗调节器，移动时可使载物台作较大幅度的升降，通常在使用低倍镜时，先用粗调节器迅速找到物像。小螺旋称细调节器，移动时可使镜台缓慢地升降，可作精密调焦，一般在高倍镜下使用，可得到清晰物像。

2. 光学系统

- (1)目镜：装在镜筒的上端，其上刻有“ $5\times$ ”、“ $10\times$ ”或“ $15\times$ ”符号以表示其放大倍数，一般装的是“ $10\times$ ”的目镜。为便于指示图像，镜中装有一根黑丝作为指针。
- (2)物镜：装在镜筒下端的旋转器上，一般有 3~4 个物镜，其中最短的刻有“ $10\times$ ”符号的为低倍镜，较长的刻有“ $40\times$ ”符号的为高倍镜，最长的刻有“ $100\times$ ”符号的为油镜，此外，在高倍镜和油镜上还常加有一圈不同颜色的线，以示区别。在物镜上，还有镜口率(N. A.)的标志，它表示该镜头分辨率的大小，其数字越大，表示分辨率越高。
- (3)照明装置：装在镜台下方，包括光源和集光器。光源一般采用普通灯光，强度可以自由调节。集光器位于镜台下方的集光器架上，由聚光镜和光圈组成，其作用是把光线集中到所要观察的标本上。

二、显微镜的放大成像原理

显微镜的分辨率是由所用光波长和物镜数值口径决定，缩短使用的光波波长或增加

数值口径可以提高分辨率。减小光波长来提高光学显微镜分辨率是有限的,提高物镜数值口径是提高分辨率的理想措施。增加数值口径,一般通过提高介质折射率,以空气为介质的折射率为1,而香柏油的折射率为1.51,与载玻片1.52的折射率相近,这样光线可以不发生折射而直接通过载玻片、香柏油进入物镜,从而提高分辨率。显微镜总的放大倍数是目镜和物镜放大倍数的乘积,而物镜的放大倍数越高,分辨率越高。

【实验器材】

普通光学显微镜、细菌革兰染色标本、香柏油、二甲苯、擦镜纸。

【实验方法】

1. 取镜和放置:从显微镜柜中取出显微镜,右手紧握镜臂,左手托住镜座,放在座前桌面上稍偏左的位置,镜座应距桌沿6~7cm,便于坐着操作。

2. 对光:打开光源开关,转动旋转器,使低倍镜对准镜台的通光孔,打开光圈,上升集光器,在目镜上观察,调节光源强度至视野内的光线均匀明亮。

3. 放置玻片标本:取一玻片标本放在镜台上,一定使有标本一面朝上,切不可放反,用推片器弹簧夹夹住,然后旋转推片器螺旋,使玻片中被观察的部分位于通光孔的正中央。

4. 低倍镜和高倍镜使用:先用低倍镜观察,先转动粗动调焦手轮,使载物台上升至物镜距标本片约5mm处。并转动粗动调焦手轮,使载物台慢慢下降,直到视野中出现清晰的物像为止。如果物像不在视野中心,可调节推片器将其调到中心。转动转换器,调换为高倍镜头,用左眼在目镜上观察,此时一般能见到一个不太清楚的物像,可将细调节器的螺旋逆时针移动,缓慢转动,直到获得清晰的物像。如果视野内的亮度不合适,可通过升降集光器的位置或关闭光圈的大小来调节。

5. 油镜的使用方法:在使用油镜之前,先经低、高倍镜观察,然后将需进一步放大的部分移到视野的中心。将集光器上升到最高位置,光圈开到最大。转动转换器,使高倍镜头离开通光孔,在需观察部位的玻片上滴加一滴香柏油,然后慢慢转动油镜,使镜头浸入油中,慢慢转动细调节器至物像清晰为止。油镜使用完毕,先用擦镜纸沾少许二甲苯将镜头上的香柏油擦去,再用干擦镜纸擦干净。

【实验结果】

在显微镜油镜下观察到细菌形态。

【注意事项】

1. 持镜时必须是右手握臂、左手托座的姿势,不可单手提取,以免零件脱落或碰撞到其他地方。

2. 轻拿轻放,不可把显微镜放置在实验台的边缘,以免碰翻落地。

3. 保持显微镜的清洁,镜头必须用专用擦镜纸擦拭,切忌口吹、手抹或用布擦;机械部分用布擦拭。

4. 使用完毕后,取下标本片,转动旋转器使镜头离开通光孔,下降载物台和集光器,关闭光圈,盖上外罩,放回显微镜柜内。

【思考题】

1. 为什么用油镜要等标本完全干后才能滴加香柏油？
2. 如果显微镜视野光线太强或者太弱,应该怎么调节？

(夏乾峰)

实验2 自然界环境中细菌的检查

【实验目的】

1. 了解细菌在空气、水、物体表面及正常人体表上细菌分布情况。
2. 树立无菌观念。

一、空气中的细菌

【实验材料】

琼脂平板培养基。

【实验方法】

1. 取5个琼脂平板培养基,在平皿底部标记检查材料的名称、日期、检查者组别、代号,分别置于室内同一平面5个不同的点(室内四个角及中间)。
2. 将平板培养基的皿盖打开,使培养基面向上暴露在空气中10min后盖好,置37℃恒温箱中培养18~24h。

【实验结果】

记录结果并加分析:

1. 观察菌落的种类和数量。
2. 100cm²琼脂培养基面积上,5min所降落的细菌数,相当于10L空气中所含的细菌数,计算公式如下:

$$\text{细菌数(CFU)/m}^3 = N \times \frac{100}{A} \times \frac{5}{T} \times \frac{1000}{10} = \frac{50000N}{AT}$$

式中: T—平皿暴露于空气中的时间(min)。

N—培养后,平皿上的菌落总数。

A—平皿的面积(cm²)。

二、水中细菌数检测

【实验材料】

1. 普通琼脂培养基,融化并保温50~55℃。
2. 无菌平皿及1ml吸管。
3. 待检水样:自来水、1:1000污水。