

面向21世纪高等医药院校精品课程教材
高等医学院校实验实训系列教材

JICHU YIXUE SHIYAN XILIE JIAOCHENG

基础医学实验系列教程

——形态学分册

《基础医学实验系列教程》编审委员会 组编

本册主编 吴仲敏 郑景璋

本册副主编 陈永峰 王东红 王晓明

基础医学实验系列教程

——形态学分册

——机能实验学分册

——医学免疫学与病原生物学分册

——生物化学与生物技术分册

《基础医学实验系列教程》编审委员会 组编

面向21世纪高等医药院校精品课程教材
基础医学实验系列教程
——形态学分册

面向21世纪高等医药院校精品课程教材
基础医学实验系列教程
——机能实验学分册

面向21世纪高等医药院校精品课程教材
基础医学实验系列教程
——医学免疫学与病原生物学分册

面向21世纪高等医药院校精品课程教材
基础医学实验系列教程
——生物化学与生物技术分册

面向 21 世纪高等医药院校精品课程教材
高等医学院校实验实训系列教材

基础医学实验系列教程

—— 医学免疫学与病原生物学分册

《基础医学实验系列教程》编审委员会 组编

本册主编 包兆胜

本册副主编 周智东

编者 (以姓氏笔画为序)

包兆胜 周智东 林平 张建兴



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

基础医学实验系列教程/《基础医学实验系列教程》编审委员会组编. —杭州: 浙江大学出版社, 2009.7

(高等医学院校实验实训系列教材)

面向 21 世纪高等医药院校精品课程教材

ISBN 978-7-308-06999-1

I.基… II.基… III.基础医学—实验—医学院校—教材
IV .R3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 152116 号

基础医学实验系列教程

《基础医学实验系列教程》编审委员会 组编

本册主编 包兆胜

丛书策划 阮海潮(ruanhc@163.com)

责任编辑 阮海潮 严少洁

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 杭州浙大同济教育彩印有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 41.75

字 数 1069 千

版 印 次 2009 年 7 月第 1 版 2009 年 7 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-06999-1

定 价 74.00 元(共四册)

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

高等医学院校实验实训系列教材

《基础医学实验系列教程》

编审委员会

主 任

周 军 张增安

副主任

梁 勇 赵传昌 陈万平

委 员

吴仲敏 郑景璋 王红梅

包兆胜 郑云郎 黄 芳

史 平 杨通河 陈佳玉

编写说明

实验教学是高等学校实验室的基本任务,是训练学生掌握实验技能的一个重要实践性教学环节,是对学生进行最佳智能结构培养的必修课。为适应当今世界科技迅猛发展对传统实验教学提出的严峻挑战,适应 21 世纪高校医学实验教学改革,培养 21 世纪的实用型人才,提高学生的动手能力和实验教学质量,需要我们及时把新知识、新技术纳入到高等医学教育的教学内容之中。为此,我们坚持“加强基础、培养素质、发展个性、突出创新”的实验教学改革方针和“以学生为主体、以就业为导向、以职业实践为主线、以项目课程为引导”的实验教学改革理念,兼顾知识传授和能力培养、素质提高,使学生全面、协调发展,彻底改变传统的实验教学模式。按照学院人才培养模式,围绕学院实验教学学分制,结合实验课程体系、实验教学内容、教学方法、考核模式等诸方面改革的要求,注重素质教育和创新性与实践性的培养,为学生知识、能力、素质协调发展创造条件。为此,学院牵头组织相关医学院校共同编写了这套《高等医学院校实验实训系列教材》。

本系列教材在编写过程中,以着重培养学生动手能力和分析解决问题的能力为基础,把握实验教学改革思路,突出特色,确定了“四个三”的编写原则。首先要有思维新、知识新、结构新等“三个创新”。其次,把握好实验课程的系统性与创新性的关系,传统实验内容删减与实验知识完整性的关系,实验教学课程的独立开设与相关课程理论教学的协同关系等“三个关系”。再次,体现实践经验与经典技术的结合,技术创新与素质培养的结合,实验项目与科研工作的结合等“三个结合”。最后,实验内容要包括“三个层次”,即基础性实验、综合设计性实验、研究创新性实验,分别占 60%、30%、10% 左右。对所选择的实验内容进行系统的优化组合,具有代表性、先进性、实用性和特色性。

本系列教材对每个实验的编写力求实用、简明、条理清晰,突出实验原理、实验方法的说明,并提供必要的图表,便于学生理解实验原理,方便教师指导实验操作。实验之后的思考题有助于学生理解、掌握实验原理和操作步骤,以期提高分析问题、解决问题的能力。

由于时间仓促,加之编写经验不足,本系列教材一定存在不尽如人意之处,敬请广大师生在使用过程中及时提出宝贵意见,以便再版时修订,使其更加完善。

周 军
2009 年 7 月

前 言

随着高等教育改革的不断深入,能力培养已引起高等学校的普遍关注。我们在学院领导的组织、支持下,经过教研室全体教师的共同努力,编写了这本医学免疫学与病原生物学实验教程,希望能借此提高学生的实验课教学质量,有助于学生对基本理论、基本知识和基本技能的掌握。

在选择实验内容和确定编写指导思想时,力求适应学科的发展,满足教学的需要,培养学生理论联系实际和独立思考、独立操作的能力。在借鉴其他医学院校相关实验教材的同时,结合我校的实际情况,注重素质教育和学生创新能力的培养,为学生知识、能力、素质协调发展创造条件。

本书突出实验原理、实验方法的阐述,每个实验力求实用、条理清晰,并提供必要的图表,便于学生对实验原理的理解和方便教师指导实验操作。实验之后的思考题便于学生复习和巩固,理解和掌握实验原理,以期提高学生分析问题、解决问题的能力。

本实验指导分三部分,第一部分医学免疫学实验,由周智东编写,第二部分为医学微生物学实验,由包兆胜编写,第三部分人体寄生虫学实验,由包兆胜编写。林平、张建兴老师参加了部分书稿的编写和整理工作。

由于编者水平有限,加上编写时间紧迫,书中难免存在缺点和不足,恳请广大师生给予指正,我们将在今后的教学工作中不断加以补充和完善。

包兆胜
2009年7月

实验注意事项

一、实验目的要求

医学免疫学与病原生物学实验课的目的是巩固对课堂讲授的基本理论的理解,学习和掌握免疫学与病原生物学实验的基本操作技术,为今后的临床工作和科研工作打下基础。为上好免疫学与病原生物学实验课,要求同学们做到如下各点:

1. 课前务必做好充分预习,明确实验目的、原理、方法及操作中的注意事项,做到心中有数。
2. 在实验进程中,严格按照实验指导书所列步骤和要求进行操作,坚持实验的严肃性、严格性、严密性。
3. 真实记录实验结果,对错误的结果要认真分析,找出原因,得出结论。实验完成后,写出实验报告,并及时交给老师批改。
4. 严格遵守实验室规则,防止各种事故发生。

二、实验室规则

免疫学与病原生物学实验材料,有些是病原微生物,在实验中稍一不慎和防护上的不善,便有发生人身感染的可能,所以要求同学们严格遵守下列各点:

1. 尽量不带个人生活、学习用品入实验室,必要的用具带入后,应放在远离操作的位置。
2. 进入实验室前穿上工作衣,离室时脱下并反叠带走。在实验室内应保持安静、有秩序,不得高声谈笑、随便走动,不得随意拆卸仪器、搬弄标本。
3. 实验室内严禁吸烟、进食、饮水,严禁用嘴吸移液及润湿标签,尽量不要用手触摸头面部及身体其他暴露部位。
4. 如遇不慎而打破菌种管或使有菌材料污染皮肤、衣物、桌面等情况,应立即报告指导教师,切勿隐瞒或自行处理。

5. 被污染过且需要回收的吸管、滴管、试管、玻片等物用完后应立即投入已准备的消毒液中,不得放在桌面上或水槽内。

6. 爱护公物,节约试剂材料,不得将实验室任何物品私自带走。如遇仪器、用品损坏,应报告指导教师,并按规定予以赔偿。

7. 实验完毕,整理桌面,值日生打扫室内卫生,最后离开的同学应注意关好水电、门窗,洗手后离室。

(包兆胜)

目 录

第一篇 医学免疫学实验

- 实验一 特异性抗体(抗血清)的制备 / 3
- 实验二 凝集反应 / 5
- 实验三 沉淀反应 / 13
- 实验四 酶免疫标记技术 / 17
- 实验五 免疫细胞分离技术 / 20
- 实验六 免疫细胞功能检测(E 花环形成试验) / 24
- 实验七 混合淋巴细胞培养 / 26
- 实验八 NK 细胞活性的检测(LDH 法) / 28
- 实验九 细胞因子检测(白细胞介素 2 的诱生与活性测定) / 30
- 实验十 鼠过敏反应的观察 / 32
- 实验十一 外周血来源树突状细胞的分离与培养 / 33

第二篇 医学微生物学实验

- 实验一 显微镜油镜的使用及保养 / 37
- 实验二 细菌的基本形态与特殊结构观察 / 40
- 实验三 革兰染色法 / 42
- 实验四 细菌的人工培养法 / 45
- 实验五 细菌在自然界及人体的分布 / 49
- 实验六 物理、化学消毒灭菌法 / 51
- 实验七 抗生素的抗菌作用(抗生素敏感试验) / 53
- 实验八 细菌的生化反应检测法 / 55
- 实验九 质粒 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳 / 59
- 实验十 耐药质粒 DNA 转化实验 / 62
- 实验十一 病原性球菌 / 64
- 实验十二 病原性球菌(葡萄球菌)感染检查与鉴定 / 68
- 实验十三 肠道杆菌 / 74
- 实验十四 粪便标本中肠道杆菌的分离鉴定 / 76
- 实验十五 厌氧性细菌 / 78
- 实验十六 分枝杆菌 / 80
- 实验十七 乙型肝炎病毒的抗原和抗体检测 / 81

第三篇 人体寄生虫学实验

第一章 医学蠕虫	89
实验一 线虫 / 89	
实验二 吸虫 / 96	
实验三 绦虫 / 100	
第二章 医学原虫	102
实验四 叶足虫 / 102	
实验五 鞭毛虫 / 104	
实验六 孢子虫 / 107	
参考文献	109

第一篇 医学免疫学实验

实验一 特异性抗体(抗血清)的制备

【目的】

1. 掌握抗血清制备的原理、基本方法,掌握抗血清的采集及效价的测定。
2. 了解免疫佐剂的作用及免疫原的制备。

【原理】

抗原可刺激机体内相应的 B 细胞活化、增殖分化为浆细胞,由浆细胞产生和分泌特异性抗体。天然大分子抗原表面常带有多种不同的抗原决定基,一般来说每种抗原决定基可刺激机体产生一种特异性抗体,因此,由某一种抗原刺激机体诱生的抗体实际上是针对该抗原分子表面多种不同抗原决定基的抗体混合物(即多克隆抗体)。抗血清效价的高低取决于抗原的理化性质与机体因素,此外尚与抗原进入机体的剂量、途径、次数、两次免疫的间隔时间、免疫佐剂的选择等有密切的关系。

【材料与仪器】

成年普通家兔、伤寒杆菌“O901”、人全血清、福氏完全佐剂、无菌生理盐水、碘酒、酒精棉球、消毒棉签。

剪刀、镊子、小试管、吸管、恒温培养箱、水浴箱、1mL 注射器、动物固定架、无菌三角烧瓶、手术刀、手术剪、止血钳、离心机、冰箱。

【方法与步骤】

(一) 伤寒杆菌“O”抗血清的制备

1. 伤寒杆菌“O”抗原的制备

(1) 细菌增殖 将伤寒杆菌“O901”标准菌株接种于普通琼脂平板培养基上,置 37℃ 恒温培养箱培养 24h,挑取光滑型菌落接种琼脂斜面培养基进行增菌培养。

(2) 伤寒杆菌“O”抗原的制备 用无菌生理盐水洗下增菌培养后的菌苔,置 100℃ 水浴 2h 杀菌及破坏“H”抗原,检验无菌生长后,用无菌生理盐水将其稀释成 10 亿/mL 的伤寒杆菌“O”抗原悬液。

2. 免疫方法 选择体重 2~3kg 的健康成年家兔,用已制备好的伤寒杆菌“O”抗原按表 1-1-1 的程序及剂量免疫家兔。

表 1-1-1 伤寒杆菌“O901”抗原免疫程序

免疫日期(天)	免疫途径	免疫原	免疫剂量(mL)
1	多点皮内	O901	1.0
6	静脉	O901	0.5
11	静脉	O901	0.5

续 表

免疫日期(天)	免疫途径	免疫原	免疫剂量(mL)
16	静脉	O901	1.0
19	静脉	O901	2.0

从耳静脉抽血 1mL,分离血清,测定抗体效价,若抗体效价在 1:2000 以上即可采血。若抗体效价在 1:2000 以下,需追加一针,隔 4 天后再行试血,试血后效价达 1:2000 以上即可采血;若效价仍在 1:2000 以下,该家兔即可弃去。

3. 抗血清的采集与保存 末次免疫后 5~7 天,对家兔采用心脏采血。

心脏采血法:将家兔仰面固定于动物固定架上,剪去左胸部兔毛,以碘酒和酒精依次消毒,在第 3 和第 4 肋骨间心搏最强烈的部位将注射器针头刺入心脏抽血,将采集的血液置于无菌试管中。

收集的血液凝固后,2000r/min 离心 10min,无菌吸取血清,加入防腐剂(最终浓度 0.01% 硫柳汞或 0.02% 叠氮钠),分装小瓶密封,-20℃冰箱保存备用。

(二) 抗人全血清的制备

1. 免疫原-福氏完全佐剂的制备 取混合人全血清,用生理盐水作 1:4 稀释,用研磨法将稀释血清与福氏完全佐剂按 1:1 的体积比混合,制成油包水状态。

2. 免疫动物 选择体重 2~3kg 的健康成年家兔,按表 1-1-2 的程序及剂量免疫家兔。

表 1-1-2 抗人全血清制备免疫程序

免疫日期(天)	免疫途径	免疫原	免疫剂量(mL)
1	双后足掌	免疫原-福氏完全佐剂	1.0(0.5/只×2)
14	腹股沟淋巴结	免疫原-福氏完全佐剂	1.0(0.5/侧×2)
21	耳静脉	人全血清(1:2 稀释)	1.0

3. 试血 末次注射后一周采血。耳静脉抽血 1mL,分离血清,测定抗体效价,若环状沉淀抗体效价在 1:5000,双向琼脂扩散试验效价在 1:16 以上即可放血收集血清。

4. 抗血清采集 方法同上。

【注意事项】

1. 用于免疫的动物接受抗原刺激后产生抗体应答的个体差异较大,因此,免疫时每种抗原应选用 2 只以上动物。

2. 抗原的剂量及免疫方法视动物、抗原种类及是否使用佐剂而异。

【思考题】

1. 抗血清有何用途?
2. 如何获得高效价的抗血清?

实验二 凝集反应

颗粒性抗原(如细菌、红细胞或带有抗原的颗粒载体)与特异性抗体结合形成肉眼可见的凝集团块,称为凝集反应(agglutination)。凝集反应分为直接凝集和间接凝集两大类。

一、直接凝集反应

颗粒性抗原在电解质参与下直接与相应抗体结合出现凝集反应,叫做直接凝集反应。在操作上有玻片凝集和试管凝集两类。

(一) 玻片凝集试验

【目的】

掌握玻片凝集反应的基本原理与操作方法。

【原理】

用已知抗体(诊断血清)与待测抗原在玻片上直接反应,为定性实验方法,常用于 ABO 血型的鉴定和细菌菌种的鉴定和分型(略)。

ABO 血型鉴定:红细胞表面的 A 和(或)B 抗原与相应的抗体结合后使红细胞凝集,借此判断待测的 ABO 血型。

【材料与仪器】

1. 抗 A 血清、抗 B 血清。
2. 采血计、小试管(内装 1mL 生理盐水)、玻片、牙签、一次性针头、酒精棉球等。

【方法与步骤】

1. 红细胞悬液的制备 皮肤消毒后用针刺手指尖或耳垂,采 1~2 滴血入装有 1mL 生理盐水的小试管中,混匀,即成 2%~5% 红细胞悬液。

2. 取洁净玻片一块,分为 2 格,分别标记 A、B 字样。将抗 A 血清、抗 B 血清各 1 滴加入 A、B 处。

3. 取等体积的待测红细胞悬液(也可用全血)分别滴加入 A、B 处,用牙签的两头分别将红细胞悬液(或全血)与血清调匀,同时不断摇动玻片并观察红细胞凝集现象。

【结果】

红细胞凝集成块,周围液体澄清者为阳性(+);红细胞仍呈悬液,无凝集者为阴性(-)(见图 1-2-1)。根据凝集情况,判断 ABO 血型(见表 1-2-1)。

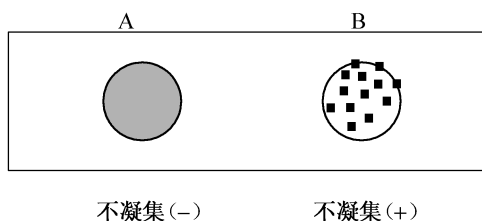


图 1-2-1 红细胞凝集现象

表 1-2-1 ABO 血型的鉴定

抗 A 血清	抗 B 血清	血 型
+	-	A
-	+	B
+	+	AB
-	-	O

【注意事项】

1. 待测血样与抗血清混合调匀后,不要再用牙签搅动,以免影响大凝集块形成。
2. 试验在温度低于 10℃时可出现冷凝集,造成假阳性。
3. 对含较多自身冷凝集素的受检者,需用 37℃生理盐水洗涤受检者的红细胞 2~3 次,再鉴定血型,防止误定为 AB 型。

(二) 试管凝集试验**【目的】**

掌握试管凝集试验的基本原理与操作方法。

【原理】

用已知诊断抗原与一系列稀释后的待测血清在试管内混合,观察每管的凝集程度,以检测抗体效价,为半定量试验方法。常用的有肥达试验和外斐试验,输血时也用于交叉配血定性试验。

【材料与仪器】

1. 1:10 稀释的伤寒沙门菌“O901”诊断血清、伤寒沙门菌“O901”诊断菌液、生理盐水。
2. 小试管、试管架、刻度吸管等。

【方法与步骤】

1. 列两排试管,每排 8 支,依次编号,每管内加入生理盐水 0.5mL。
2. 用吸管吸取伤寒沙门菌“O901”诊断血清 0.5mL 加于第一排的第 1 管,用吸管吹吸 3

次,充分混匀后,吸取 0.5mL 加入第 2 管,同法混匀后又吸取 0.5mL 加入第 3 管,依此类推,连续稀释到第 7 管,最后从第 7 管吸出 0.5mL 弃去,第 8 管为生理盐水对照管。

3. 吸取伤寒沙门菌“O901”诊断菌液,于第一排各管内加 0.5mL (按顺序从第 8 管开始往第 1 管加)。

4. 各管摇匀后,置室温(或 37℃)24h 后观察结果。操作步骤见表 1-2-2 所示。

表 1-2-2 试管凝集反应操作步骤

单位: mL

管号	1	2	3	4	5	6	7	8
生理盐水	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
1:10 伤寒血清	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
伤寒菌液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
血清终稀释度	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	—

置室温(或 37℃)24h

结 果

【结果】

凝集程度

++++ 液体清澈,管底形成大片凝集物,表明细菌全部被凝集。

+++ 液体轻度浑浊,管底凝集物较少,表明细菌大部分被凝集。

++ 液体半澄清,管底有较多细小凝集物,表明细菌部分被凝集。

十 液体浑浊,管底凝集物少,表明细菌少部分被凝集。

— 液体浑浊,管底有圆点状细菌的沉积,边缘整齐,表明细菌无凝集。

以产生明显可见凝集现象(++)时血清的最高稀释度作为血清中抗体的效价。

【注意事项】

1. 混匀血清时不能产生气泡,以免影响稀释血清量的吸取。
2. 观察结果时应先看第 8 管(对照管),该管应无凝集现象。
3. 菌液“O”抗原凝集物为致密颗粒状,不易摇起;“H”抗原凝集物为疏松棉絮状,轻摇易浮起。

4. 抗原抗体反应时必须要有适当的比例才能出现肉眼可见的凝集物,若抗原或抗体过多,均不形成肉眼可见的凝集物。在凝集反应中通常稀释血清抗体使其与抗原保持适当比例。

【思考题】

1. 直接凝集反应有哪几种? 各有何用途?
2. 什么是抗体的效价? 为什么效价可以表示血清中抗体的含量?
3. 凝集反应的原理与沉淀反应有何不同?