

BINGYUAN SHENGWU YU MIANYIXUE
SHIYAN ZHIDAO

病原生物与免疫学 实验指导

主编 王 健

 北京理工大学出版社
BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

病原生物与免疫学 实验指导

主编 王健

 **北京理工大学出版社**
BEIJING INSTITUTE OF TECHNOLOGY PRESS

图书在版编目 (CIP) 数据

病原生物与免疫学实验指导 / 王健主编. — 北京: 北京理工大学出版社, 2015.3

ISBN 978-7-5682-0336-4

I. ①病… II. ①王… III. ①病原微生物-实验-教材 ②医药学-免疫学-实验-教材
IV. ①R37-33 ②R392-33

中国版本图书馆CIP数据核字 (2015) 第051021号

出版发行 / 北京理工大学出版社有限责任公司

社 址 / 北京市海淀区中关村南大街5号

邮 编 / 100081

电 话 / (010) 68914775 (总编室)

82562903 (教材售后服务热线)

68948351 (其他图书服务热线)

网 址 / <http://www.bitpress.com.cn>

经 销 / 全国各地新华书店

印 刷 / 北京通县华龙印刷厂

开 本 / 787毫米×1092毫米 1/16

印 张 / 6

字 数 / 132千字

版 次 / 2015年3月第1版 2015年3月第1次印刷

定 价 / 18.00元

责任编辑 / 洪晓英

文案编辑 / 李玉昌

责任校对 / 周瑞红

责任印制 / 边心超

前 言

病原生物与免疫学是临床医学和预防医学的专业基础课，是每位医学院校学生的必修课程。学生在学习系统理论知识的基础上，掌握一些验证性实验和基本技术操作，可为今后从事临床实践和科学研究奠定基础，同时亦可培养独立工作及分析和解决问题的能力。

全书分为实验室规则、微生物学实验、寄生虫学实验和免疫标记技术四部分。共 33 个实验项目，其中微生物学实验包括显微镜，细菌的形态及观察，细菌标本的染色检查和不染色检查，细菌的分布、消毒和灭菌，细菌的培养、接种和生长，细菌的致病性，病原性球菌，肠道杆菌，结核分枝杆菌，真菌的形态与结构的观察，真菌的培养；寄生虫学实验包括溶组织内阿米巴和阴道毛滴虫，疟原虫、弓形虫，吸虫，似蚓蛔线虫和毛首鞭形线虫，带绦虫，蚊、蝇、虱和蚤，蜱和螨，蛲虫；免疫标记技术包括凝集反应与沉淀反应，补体的溶细胞作用，酶联免疫吸附试验，酶免疫印迹技术，化学发光免疫分析技术，放射免疫法测定甲胎蛋白，聚蔗糖—泛影葡胺密度梯度离心法分离外周血单个核细胞、间接免疫吸附法 T 细胞亚群的分离，流式细胞术分离 T 细胞亚群，中性粒细胞吞噬功能检测，巨噬细胞吞噬功能测定，NK 细胞功能测定，MTT 法检测白细胞介素-2 (IL-2) 和环境水中病原菌的 PCR 测定。附录部分包括检验程序和常见微生物形态图，供学生学习参考。

限于编写人员的知识水平和教学经验，本书难免存在一定错误，敬请各位老师、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。

编 者

目 录

第一篇 实验室规则	1
第二篇 微生物学实验	2
实验一 显微镜	2
实验二 细菌的形态及观察	5
实验三 细菌标本的染色检查和不染色检查	7
实验四 细菌的分布、消毒和灭菌	10
实验五 细菌的培养、接种和生长	14
实验六 细菌的致病性	18
实验七 病原性球菌	20
实验八 肠道杆菌	22
实验九 结核分枝杆菌	25
实验十 真菌的形态与结构的观察	27
实验十一 真菌的培养	29
第三篇 寄生虫学实验	31
实验十二 溶组织内阿米巴和阴道毛滴虫	31
实验十三 疟原虫、弓形虫	33
实验十四 吸虫	36
实验十五 似蚓蛔线虫和毛首鞭形线虫	39
实验十六 带绦虫	41
实验十七 蚊、蝇、虱和蚤	44
实验十八 蜱和螨	47
实验十九 蛲虫	49

第四篇 免疫标记技术 51

 实验二十 凝集反应与沉淀反应 51

 实验二十一 补体的溶细胞作用 54

 实验二十二 酶联免疫吸附试验 56

 实验二十三 酶免疫印迹技术 59

 实验二十四 化学发光免疫分析技术 62

 实验二十五 放射免疫法测定甲胎蛋白 64

 实验二十六 聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 66

 实验二十七 间接免疫吸附法 T 细胞亚群的分离 68

 实验二十八 流式细胞术分离 T 细胞亚群 70

 实验二十九 中性粒细胞吞噬功能检测 72

 实验三十 巨噬细胞吞噬功能测定 74

 实验三十一 NK 细胞功能测定 77

 实验三十二 MTT 法检测白细胞介素-2 (IL-2) 81

 实验三十三 环境水中病原菌的 PCR 测定 84

附录一 检验程序 87

附录二 常见微生物形态图 90

第一篇 实验室规则

进入实验室需要遵守一些规则，这是因为病原生物学与免疫学实验的对象多为病原微生物，存在一定的危险性。如果发生意外，操作者不仅可能自身感染，还有可能污染环境，甚至将病原生物传染给其他人。

- (1) 开始实验前要认真阅读当次实验内容。
- (2) 进入实验室必须穿着实验服，按规定就座，保持肃静。
- (3) 上实验课时，禁止吸烟和进食，严格执行实验室安全制度。
- (4) 实验时听从教师指导。不擅自移动示教标本，如有不清楚时，请教师调整，以免影响其他同学观察。
- (5) 牢固树立无菌概念，严格遵守无菌操作规则。若发生菌液污染、损坏物品等事故，立即报告教师并及时处理。
- (6) 实验用过的染菌器材如吸管、试管、玻片等应及时放在含消毒液的容器内，不得放在桌上或在水槽里冲洗。
- (7) 作业应在规定时间内完成，实验报告要求简明扼要，字迹清楚。
- (8) 实验完毕，应有清洁值日生整理器材物品，打扫卫生，关好门窗和水、电、煤气的开关及照明设备。

第二篇 微生物学实验

实验一 显微镜

观察细菌标本时，最常用的工具是显微镜。学习使用显微镜油镜是免疫学实验中所必需的基本技术。

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。
3. 掌握显微镜油镜的使用。

实验器材及试剂

光学显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、细菌革兰染色标本。

实验内容

一、基本结构

普通光学显微镜的构造主要分为机械系统和光学系统。

1. 机械系统

- (1) 镜座：用以支撑镜体，是显微镜的底座。
- (2) 镜柱：在镜座上连接镜座和镜臂的部分。
- (3) 镜臂：连接镜柱和镜筒，是取放显微镜时手握部位。
- (4) 镜筒：连在镜臂的前上方，装有目镜和物镜转换器。
- (5) 物镜转换器：位于镜筒下端的旋转盘，盘上有多个物镜孔，可自由转动。

(6) 载物台：是放置标本的地方，在镜筒下方，中央有一通光孔。载物台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：是指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。大螺旋即粗调节器，移动时可使载物台作较大幅度的升降。小螺旋即细调节器，移动时可使镜台缓慢地升降，一般在高倍镜下使用，可得到清晰物像。

2. 光学系统

(1) 目镜：位于镜筒上端，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。镜中装有一根指针指示图像。

(2) 物镜：位于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。为了区别高倍镜和油镜，常在高倍镜和油镜上加有一圈不同颜色的线。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：位于镜台下方，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，其可以将光线集中到所要观察的标本上。

显微镜如图 1-1 所示。

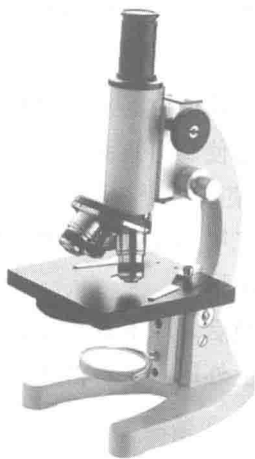


图 1-1 显微镜

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。提高介质折射率可以增加数值口径，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。

三、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，放在座前桌面上稍微偏左的位置，镜座应距桌沿 6~7cm。

(2) 对光：放置好后，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，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：先用低倍镜观察，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，此时见到的物像并不清晰，可将细调节器的螺旋逆时针移动，缓慢转动，直到物像清晰为止。如果视野内的亮度不合适，可通过升降集光器的位置或开闭光圈的大小来调节。

(5) 油镜的使用方法：在一般微生物学实验中最常使用的是普通光学显微镜的油镜。油镜镜头透镜很小，进入镜筒的光线很少，使用时为了增加亮度，必须在标本玻片与镜头之间滴加香柏油。

经低、高倍镜观察后，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。

(6) 在显微镜油镜下观察到细菌形态。

(7) 实验结束后：使用完显微镜后，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，最后将其放回显微镜柜内。

注意事项



1. 持镜时不可单手提取，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，机械部分用布擦拭。
4. 显微镜应放置在透风干燥、灰尘少、不受阳光直接曝晒的地方。不使用时，用有机玻璃或塑料布防尘罩罩起来。
5. 显微镜不要与挥发性药品及酸、碱类药物接触，以免受腐蚀。

实验二 细菌的形态及观察

细菌的基本形态有三种，分别是球状、杆状和螺旋状，采用适当染色法在油镜下即可观察到。某些细菌还有一些特殊结构，经特殊染色法染色后在油镜下可以观察到荚膜、芽胞和鞭毛。

实验目的

观察并识别细菌的基本形态和特殊结构。

实验器材及试剂

普通光学显微镜、擦镜纸、二甲苯、液体石蜡、生理盐水、接种环、酒精灯、革兰染色液。

细菌基本形态（染色标本片）：球菌（葡萄球菌、链球菌、脑膜炎奈瑟菌）、杆菌（大肠埃希菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌等肠道杆菌和炭疽芽孢杆菌）和弧菌（霍乱弧菌）。

细菌特殊结构（染色标本片）：荚膜（肺炎链球菌和产气荚膜梭菌）、芽孢（破伤风梭菌）和鞭毛（伤寒沙门菌和铜绿假单胞菌）。

实验内容

一、细菌基本形态染色标本片的观察

使用油镜观察细菌的基本形态，比较不同细菌的形态、大小、排列和染色等特点。遵循从低倍到高倍的原则逐渐调换物镜头，直到观察到细菌后，顺时针把物镜头转到八字状，在盖玻片上滴一滴液体石蜡，旋转时对准油镜头，调节微调进行观察。

1. 球菌染色标本片的观察

观察对象：葡萄球菌、链球菌、脑膜炎奈瑟菌。

葡萄球菌菌体呈球形，革兰阳性，紫色，葡萄串状排列；链球菌菌体也呈球形，革兰阳性，链状排列；脑膜炎奈瑟菌呈球形，革兰阴性，红色，成双排列。

2. 杆菌染色标本片的观察

观察对象：大肠埃希菌、痢疾杆菌、伤寒杆菌等肠道杆菌和炭疽芽孢杆菌。



大肠埃希菌等肠道杆菌菌体成短杆状，革兰阴性，排列不规则；炭疽芽孢杆菌为革兰阳性的粗大杆菌，两端平齐，竹节状排列。

3. 弧菌染色标本片的观察

观察对象：霍乱弧菌。

霍乱弧菌的菌体呈弧形，革兰阴性。

二、细菌特殊结构染色标本片的观察

观察细菌特殊结构，注意细菌特殊结构的形态、大小、位置等特点。

1. 荚膜染色标本片的观察

观察对象：肺炎链球菌和产气荚膜梭菌。

肺炎链球菌呈矛头状，多成双排列，宽端相对，尖端向外，革兰阳性，荚膜无色透明；产气荚膜梭菌为杆状，革兰阳性，荚膜无色透明。

2. 芽孢染色标本片的观察

观察对象：破伤风梭菌。

破伤风梭菌的芽孢为圆形，比菌体大，位于菌体顶端，状如鼓槌。

3. 鞭毛染色标本片的观察

观察对象：伤寒沙门菌和铜绿假单胞菌。

伤寒沙门菌菌体呈短杆状，革兰阴性，周鞭毛密而长；铜绿假单胞菌为革兰阴性，单端1~3根鞭毛。

常见微生物形态图见附录二。

注意事项



1. 使用显微镜油镜进行观察时，必须端坐。镜体保持垂直位，不要使载物台倾斜。
2. 将观察到的结果和附录二中的图进行比较，试绘图，并用文字加以适当的描述。

实验三 细菌标本的染色检查和不染色检查

在接近中性的环境中，带有负电荷的细菌易与带正电荷的碱性染料结合，故常用碱性苯胺染料如美蓝、结晶紫、碱性复红等染色细菌。

细菌标本经染色后，除能清楚看到细菌的形态、大小、排列方式外，还可根据染色反应将细菌进行分类。

某些染色操作可能会引起细菌变形，这时可采用不染色检查。不染色细菌标本检查是指细菌不经染色直接镜检，主要用于观察细菌的动力和运动状况。

实验目的



1. 掌握并熟悉革兰染色的操作方法。
2. 掌握不染色细菌标本的检查方法。

实验器材及试剂



普通光学显微镜、酒精灯、接种环、试管、载玻片、吸管、吸水纸、擦镜纸、火柴、葡萄球菌和大肠埃希菌 18~24h 培养物、95%酒精、卢戈氏、碘液、生理盐水、消毒缸、凹玻片、盖玻片、凡士林、小镊子、牙签、变形杆菌 12h 肉汤培养物、石炭酸复红稀释液。

实验内容



一、染色检查

1. 制备涂片

(1) 涂片：在载玻片上滴加一滴生理盐水。接种环过火灭菌，待冷却后挑取少量细菌与水滴充分混合。接种环再次过火灭菌后插入试管架。

(2) 干燥：可以让涂片在室温下自然干燥，或将涂片置于火焰高处微热烘干，但不得直接将涂片放在火焰上烘烤。

(3) 固定：手执玻片一端，将有菌膜的一面向上，迅速通过酒精灯火焰外焰 3 次（用



手指触涂片反面,以不烫手为宜)。

2. 革兰染色

(1) 初染:滴加结晶紫染液,直到覆盖菌膜为止,染 1min,用缓慢水流冲洗掉多余的染液。

(2) 媒染:滴加卢戈氏碘液,染 1min,再用缓慢水流冲洗掉多余的染液。

(3) 脱色:滴加 95%酒精,轻轻摇动玻片,直至流下的液体无色为止(整个过程需 20~30s),用缓慢水流冲洗掉多余的染液。

(4) 复染:滴加石炭酸复红稀释液染 1min,缓慢水流冲洗掉多余的染液。

用吸水纸吸干玻片表面的水分,待标本充分干燥后进行镜检。

染色后,葡萄球菌菌体为紫色,大肠埃希菌为红色。

二、不染色检查

1. 压滴法

(1) 取两张载玻片,用无菌接种环分别取葡萄球菌及变形菌菌液 2~3 环,置于载玻片中央。

(2) 用小镊子夹取一张盖玻片,先使盖玻片一端接触菌液,然后缓慢放下,覆盖于菌滴之上,避免菌液中产生气泡。

(3) 先用低倍镜找到观察部位,再换用高倍镜观察。镜检时光线不宜太强,可将光圈适当缩小,集光器适当下降。

2. 悬滴法

(1) 取两张洁净凹玻片,在凹窝四周涂抹少许凡士林。

(2) 用接种环分别取一环葡萄球菌或变形杆菌肉汤培养物于盖玻片中央。

(3) 将凹玻片倒合于盖玻片上,使凹窝中央正对菌液,然后迅速翻转凹玻片,用小镊子轻压盖玻片,使之与凹窝边缘粘紧封闭,以防水分蒸发。

(4) 放置悬滴标本片于光学显微镜的载物台上,先用低倍镜找到悬滴,再用高倍镜进行观察。

注意事项



1. 细菌培养物以 18~24h 为宜。

2. 涂片应薄而均匀,生理盐水不宜过多,如生理盐水过多,可用吸水纸吸去再进行涂片。

3. 在染色过程中,严格掌握染色时间,不可使染液干涸,酒精脱色时间不宜过长或

过短。

4. 染色结束后，用吸水纸吸干时不要用力压玻片，也不要擦拭菌膜。
5. 用显微镜观察细菌的不染色标本时应将聚光器下降，光圈缩小，使视野光线变暗。
6. 染色检查和不染色检查结束后，将玻片投放至消毒缸内。

实验四 细菌的分布、消毒和灭菌

细菌在自然界广泛存在,通过无菌培养基暴露在空气中和手指皮肤取菌培养可获得肉眼可见的菌落。

高温对细菌有明显的致死作用。热力灭菌主要是利用高温使菌体变性或凝固,酶失去活性而使细菌死亡。

实验目的

了解高压蒸汽灭菌法、紫外线灭菌法、机械除菌。

实验器材及试剂

血平板、镊子、L型玻璃棒、无菌棉拭子、滤菌器、滤菌瓶、高压蒸汽灭菌器、干热灭菌器、紫外线灯、革兰染液、碘酒、乙醇、黑纸片、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌培养物、普通琼脂培养基、无菌镊子、打孔器(直径6mm)、无菌吸管、抗生素纸片、中药药敏纸片(直径约6mm,每片含中药20 μ l)、待测药液(100%黄连、100%大蒜汁、100%板蓝根煎液)、黄连素溶液。

实验内容

一、细菌的分布

1. 空气中细菌的检查

可采用沉降法。取1只普通琼脂平板培养基,任意放置,启盖约15min,再盖上,37 $^{\circ}$ C培养24h,观察有无细菌生长。培养基表面可见多种大小、形态不一的菌落。

2. 皮肤表面细菌检查

可采用涂抹法。先在平板底面用记号笔分成两区,作标记,将未消毒的手指在平板的1/2处表面轻轻涂抹划线,然后用碘酒、乙醇擦拭手指皮肤,用消毒后的手指在平板另一1/2处进行涂抹,操作完毕,置37 $^{\circ}$ C培养24h后,取出观察结果。

3. 咽喉部细菌检查

用无菌棉拭子在咽喉部涂抹后,涂在血平板上,并划线分离,37 $^{\circ}$ C培养24h后观察结

果。注意观察平板上菌落种类以及是否有溶血现象,并可挑取菌落进行革兰染色检查。口腔微生物检查也可用无菌牙签直接挑取少量牙垢,制成涂片,进行革兰染色检查。

观察可见血平板表面有大小和形态不同的菌落,有的菌落周围可见溶血环。牙垢涂片镜检可见革兰阳性菌和革兰阴性菌。

二、药物杀菌、抑菌实验

1. 纸片法

将金黄色葡萄球菌 16~18h 液体培养物用无菌棉签均匀涂布于普通平板表面,稍干,以无菌镊子夹取吸有定量抗生素或每片加 $20\mu\text{l}$ 中药的药敏纸片,平铺于上述已接种细菌的平板表面,一个平板可以放 3~5 块含不同药物(或不同浓度)的药敏纸片,置 37°C 培养,次日观察结果。

凡药敏纸片周围有抑菌圈的说明药物对细菌有抑制作用,抑菌圈越大,则药物对细菌的抑制作用越强。

2. 打孔法

用无菌吸管吸金黄色葡萄球菌 6~8h 肉汤培养液(1:1 000 的稀释液) 0.1ml 接种于普通琼脂平板培养基表面,用无菌的 L 型玻璃棒涂抹均匀;在相隔适当距离处,用无菌打孔器打孔,并用针头挑出孔内琼脂;于每孔内加满待测药液(100%黄连、100%大蒜汁、100%板蓝根煎液),置 37°C 恒温孵育箱内培养 18~24h,观察结果。

若药物有抗菌作用,则依其抗菌力的大小形成不同直径的抑菌环。

3. 试管法

取带试管塞的无菌小试管 10 支,按无菌操作每管加入肉汤培养基 1ml。在第 1 管中加入黄连素溶液(或其他药物) 1ml,混匀后取出 1ml 移到第 2 管,同样混匀后,再取出移入第 3 管,依此类推,将黄连素对倍稀释至第 9 管取出 1ml,弃去。第 10 管不加药物,作为对照。从第 1 管至第 10 管,每管加入大肠埃希菌(或其他细菌)的稀释菌液 0.1ml,混匀,培养 24h 后观察各管细菌生长情况。

以完全抑制细菌生长的药物最高稀释倍数定为该细菌对药物的敏感度,即某药物对该菌完全抑制的最低有效浓度(MIC)。

如果看不清是否有细菌生长,可取试管中培养物 $10\mu\text{l}$ 接种于固体培养基上, 37°C 培养 24h 后观察结果。

三、常用的消毒灭菌方法

1. 热力灭菌法

(1) 高压蒸汽灭菌法。高压蒸汽灭菌器是一种坚固密闭的蒸锅,锅盖上装有压力计、安全阀及排气孔等。锅盖密闭旋紧后由锅底加热,因蒸汽不能外溢,可使锅内压力逐渐增高,从而提高了锅内水的沸点和蒸汽的温度。由于高压蒸汽的温度较高,放出潜热多,热