

广州中医药大学特色教材

总主编◎王省良

医学免疫学与 病原生物学实训教材

主编◎邝枣园



科学出版社

广州中医药大学

特色教材

总主编 王省良

医学免疫学与病原生物学 实训教材

主 编 邝枣园

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本教材内容分为五部分,分别为医学免疫学、医学微生物学、医学寄生虫学、综合性实验和自主设计实验及范例。从简单到复杂,基本到综合,有基础验证性实验,还有综合设计性实验。每个实验分别包括实验目的、实验原理、实验材料、实验方法、结果观察、注意事项和思考题7个部分,编写时注重实验方法的说明,并提供必要的图表,便于学生对实验的理解和操作,力求将基本理论与操作技术有机结合。探索了在教师的正确引导下,学生自主设计实验,锻炼其综合实践能力。另在本书最后还附有常用培养基配制、常用染色液配制和常用试剂配制,以供学生参考和查阅。

本书适用于中医、中西医结合、针灸推拿、中药学、中药资源、药物制剂、药学等专业的医学免疫学和病原生物学的实验教学。

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学与病原生物学实训教材/邝枣园主编.—北京:科学出版社,2015.6

广州中医药大学特色教材

ISBN 978-7-03-045063-0

I. 医… II. 邝… III. ①医学-免疫学-中医学院-教材 ②病原微生物-中医学院-教材 IV. ①R392 ②R37

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第131796号

责任编辑:郭海燕 曹丽英 / 责任校对:桂伟利
责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2015年6月第一次印刷 印张:10 1/2

字数:246 000

定价:29.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《医学免疫学与病原生物学实训教材》

编 委 会

主 编 邝枣园

编 委 (以下按姓氏笔画排序)

王宏敏 邝枣园 孙继贤 李 岩

李建婷 沈 耿 张 韧 黄雅丽

丛书编写说明

国家规划教材和行业规划教材是专业人才培养的基石，体现了全国专业和课程建设的整体水平，具有先进性和权威性。我校历来积极参与各类规划教材的建设和编写工作，取得了一定的成绩。各类规划教材在我校专业人才培养过程中，发挥了不可替代的作用。

“十二五”以来，为了适应学校发展及教育思想、教学理念、人才培养模式的转变，我校广大教师以极大的热情开展教育教学改革，为提高人才培养质量勇于探索，不懈努力。近年来，我校课程改革实施的依托和课程改革成果的外化——广州中医药大学自编教材（讲义），在学校各专业年级试用，深受学生喜爱。为此，学校应势而为，在广泛使用的自编教材和讲义中，遴选了一批特色教材培育和建设对象。遴选的原则首先要求编写目的明确、针对性强、知识体系完整，充分反映本学科的知识点和方法论，符合学习者的认知规律，充分体现我校办学指导思想和特色。特色教材要贯穿以下几个原则：①融合岭南中医药历史和成就，体现鲜明区域特色；②融合学科研究最新成果，体现学科水平；③融合长期以来课程建设和改革成果，体现课程历史和地位；④融合教育思想和教学方法改革成果，体现教学研究水平。

2013年下半年经教师申报、学校教学指导委员会专家遴选并审定，2014年6月与科学出版社签订了第一批特色教材出版合同，共六本（套）：《中药学》（吴庆光主编），《临床针灸学》（许能贵、符文彬主编），《临床医技学》（赵萍主编），《中西医结合PBL教材（学生版）》（黄燕、王小云主编），《医学免疫学与病原生物学实训教材》（邝枣园主编），《伤寒论图表导学（中英文对照）》（罗广波主编）。

在编者的辛勤努力下，经历了编写、试用和修订等过程，今日终得付梓。在探索和求新的过程中，不免有偏激，甚或错漏之处，言者一并海纳，虚心听取，积极改正。

广州中医药大学教学指导委员会

2015年6月20日

前 言

实验教学是《医学免疫学与病原生物学》的重要组成部分，是培养学生实践能力和创新能力的重要环节。我们从 2002 年起，围绕该实验教学进行了不少探索和改革，尤其是在自主设计性实验中探索了教师如何正确引导学生做到真正意义上的自主设计实验，而且实验又切实可行，同时锻炼学生的综合实践能力。经过多年来的实践，形成了较好的系列做法，本次写入教材，希望对同行能够有所启发。

《医学免疫学与病原生物学实训教材》分为五部分，分别是医学免疫学、医学微生物学、医学寄生虫学、综合性实验和自主设计实验及范例。内容从简单到复杂，从基本到综合，有基础验证性实验，还有综合设计性实验。每个实验分别包括实验目的、实验原理、实验材料、实验方法、结果观察、注意事项和思考题 7 个部分，编写时注重实验方法的说明，并提供必要的图表，便于学生对实验的理解和操作。为方便学生的学习，在本教材的编写中力求将基本理论与基本操作技术有机地结合，以便于学生通过实验操作，进一步理解和领会教材的基本理论。在自主设计性实验中探索了在教师的正确引导下，学生自主设计实验，以锻炼其综合实践能力。另外，在本书最后还附有常用培养基配制、常用染色液配制和常用试剂配制，以供学生参考和查阅。

本书适用于中医、中西医结合、针灸推拿、中药学、中药资源、药物制剂、药学等专业的医学免疫学和病原生物学的实验教学。

本教材定位于本科生实验教材，以五年制、七年制为主，适合用于中医、中西医结合、针灸推拿、中药学、中药资源、药物制剂、药学等专业的医学免疫学和病原生物学的实验教学。

本教材的编写得到了广州中医药大学微生物学与寄生虫学教研室、西医基础公共实验室各位老师的积极支持，在此表示衷心感谢！

限于我们的水平、经验有限，本教材难免有不妥之处，殷切期望同行的批评指正。

广州中医药大学微生物学与寄生虫学教研室

2014 年 9 月 25 日

目 录

丛书编写说明

前言

实验须知	(1)
实验室生物安全	(2)

医学免疫学

实验一 吞噬作用及溶菌酶实验	(5)
实验二 凝集反应	(7)
实验三 血清中免疫球蛋白测定	(13)
实验四 补体溶血反应	(15)
实验五 E玫瑰花环试验	(17)
实验六 超敏反应	(20)
实验七 沉淀反应	(22)
实验八 溶血空斑试验	(24)
实验九 淋巴细胞分离法	(26)
实验十 细胞免疫测定法——淋巴细胞转化试验	(28)
实验十一 酶联免疫吸附试验	(30)
实验十二 放射免疫测定法	(32)
实验十三 免疫荧光技术	(35)

医学微生物学

实验一 细菌形态与结构观察	(39)
一、油镜的使用	(39)
二、细菌的基本形态与特殊结构的观察	(40)
三、细菌运动的观察——悬滴标本检查法	(41)
四、细菌革兰染色法	(42)
实验二 细菌的人工培养	(45)
一、常用细菌培养基的制备	(45)
二、细菌的接种和培养方法	(47)
三、细菌的计数	(49)

实验三 细菌的代谢产物	(51)
一、细菌的糖发酵试验	(51)
二、吲哚试验	(52)
三、甲基红试验	(52)
四、V-P 试验	(53)
五、柠檬酸盐利用试验	(54)
六、硫化氢产生试验	(54)
七、细菌菌落的色素及溶血现象	(55)
实验四 细菌的分布及外界因素对细菌的影响	(56)
一、细菌在自然界及人体的分布	(56)
二、细菌对热的抵抗力	(57)
三、紫外线对细菌的作用	(57)
四、高压蒸汽灭菌	(58)
五、干热灭菌法	(59)
六、滤器除菌	(60)
七、抗生素及中草药的抗菌作用	(61)
实验五 细菌的变异性实验	(63)
一、细菌的形态变异	(63)
二、细菌的菌落变异	(63)
三、细菌的鞭毛变异	(64)
四、细菌 L 型变异	(64)
实验六 细菌的致病性	(66)
一、内毒素测定与鲎实验	(66)
二、透明质酸酶试验	(68)
实验七 病原性球菌	(69)
一、葡萄球菌、链球菌、肺炎链球菌及脑膜炎奈瑟菌的形态和染色特征	(69)
二、葡萄球菌、链球菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌及淋病奈瑟菌的菌落特征	(70)
三、血浆凝固酶试验	(71)
四、抗肺炎链球菌溶血素“O”抗体的测定(乳胶法)	(72)
实验八 肠道杆菌	(74)
一、大肠杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌的染色和形态	(74)
二、大肠杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌在 SS 琼脂平板上的特征	(74)
三、大肠杆菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌在双糖含铁培养基中的现象	(75)
四、肥达反应	(76)
实验九 弧菌、螺杆菌属	(80)
一、观察霍乱弧菌的形态及染色法	(80)
二、霍乱弧菌的快速诊断方法	(80)
三、试管凝集试验鉴定霍乱弧菌	(81)
四、幽门螺杆菌的形态及菌落特点	(82)

实验十 白喉杆菌、分枝杆菌	(83)
一、白喉杆菌的形态和染色特点	(83)
二、分枝杆菌的形态和染色特点	(84)
三、结核患者痰液抗酸染色检查法	(84)
实验十一 厌氧性细菌、需氧芽孢杆菌	(86)
一、厌氧性细菌的形态、染色性	(86)
二、破伤风杆菌的生长特点	(86)
三、破伤风抗毒素中和试验	(87)
四、需氧芽孢杆菌的形态特征	(88)
实验十二 其他病原微生物	(90)
一、螺旋体的形态、染色及检测	(90)
二、支原体的形态学观察	(92)
三、立克次体的形态学观察	(92)
四、衣原体的形态学观察	(93)
实验十三 真菌	(94)
一、真菌的小培养及形态观察	(94)
二、真菌菌落形态	(94)
三、墨汁染色检查法	(95)
实验十四 病毒	(96)
一、病毒的分离培养技术	(96)
二、乙型肝炎病毒抗原和抗体检测	(97)
三、病毒的分离与鉴定	(100)
四、狂犬病病毒的包涵体	(103)
实验十五 注射药物的微生物学检查	(105)
一、一般注射剂的无菌检查	(105)
二、特殊注射剂的无菌检查	(106)
实验十六 口服药及外用药物的微生物学检查	(107)
一、细菌总数测定	(107)
二、霉菌总数测定	(107)
三、病原菌检验	(108)

医学寄生虫学

实验一 线虫	(117)
实验二 吸虫	(121)
实验三 绦虫	(124)
实验四 原虫	(126)

综合性实验

肠道菌群的微生物学检查	(131)
-------------------	-------

自主设计实验及范例

一、实施原则	(137)
二、课题选择	(138)
三、实验方法	(138)

附录

一、常用培养基配制	(141)
二、常用染色液配制	(148)
三、常用试剂配制	(151)

实验须知

【医学免疫学与病原生物学实验目的】

- (1) 帮助学生理论知识理解和运用。
- (2) 学习和掌握医学免疫学与病原生物学实验基本操作技术。
- (3) 培养和提高学生科学实验的能力，即观察记录实验结果、理论联系实际、综合分析实验现象、互相协作的科研团队精神。

【医学免疫学与病原生物学实验要求】

- (1) 课前充分预习，明确实验目的、原理、操作方法及注意事项，降低实验的失误率。
- (2) 实验中，认真按照实验步骤和要求操作，坚持实验的严肃性、严谨性，仔细观察并客观记录实验结果。分组实验，每位组员都要积极参与、密切配合。
- (3) 实验结束后，根据实验原理、相关知识对实验结果进行总结和分析，如果实验实际结果与理论预期不相符，要分析原因，总结经验，以逐步提高科学思维和操作能力。
- (4) 严格遵守实验室生物安全制度，以防各种事故发生。

实验室生物安全

医学免疫学与病原生物学实验中会接触到病原性生物，为了保护操作者人身安全及实验室财产安全、防止环境污染，要求操作者遵守以下规则。

(1) 每次进入实验室必须穿实验服，按规定就座。实验指导、记录本和文具等必需品应放在实验台抽屉里，非实验必需品，不准带进实验室。

(2) 遵守课堂纪律，不得高声谈笑及乱动物品。禁止在实验室内饮食、抽烟。

(3) 树立牢固的无菌概念，实验严格遵守无菌操作。

(4) 实验用过的所有染菌器材，不能随意摆放和丢弃，实验结束后放入含有消毒液的消毒缸中。接种环使用完，灼烧灭菌后放回原处。

(5) 实验过程中如果发生意外，应立即报告老师，及时做以下处理。

1) 皮肤破损：先除尽异物，用蒸馏水或生理盐水冲洗后，涂以2%碘酒。

2) 灼伤：涂以凡士林油、5%鞣酸。

3) 菌液进入口腔：立即吐出，用大量清水漱口，必要时服用抗生素进行预防，并密切观察身体反应，如有不适，立即就医。

4) 菌液泼洒溢流至桌面：抹布浸蘸2%~3%来苏或5%苯酚溶液，盖在污染处0.5h后，才可抹去清洗。如手上沾有菌液，浸泡于上述消毒液10~20min后，再以肥皂、清水洗净。

(6) 注意水、电、酒精灯的安全使用。易燃物品（二甲苯、乙醇等）勿靠近酒精灯；酒精灯不可互相直接点燃；如遇火险，先关掉电源，再以湿布和沙土覆盖灭火。

(7) 实验完毕，按要求清理桌面，物品放回原处，打扫卫生，需培养的物品放至培养箱。

(8) 离开实验室前，脱下实验服，反向折叠放入塑料袋中，双手浸泡于消毒液5~10min，再用肥皂、清水洗净后，方可离开实验室。未经许可，不得将实验室任何物品（尤其是菌种）带出实验室。

医学免疫学

实验一 吞噬作用及溶菌酶实验

【实验目的】

熟悉白细胞的吞噬作用 (phagocytosis) 及溶菌酶实验的原理和方法。
通过本实验理解机体的非特异性免疫机制。

【实验原理】

机体内具有吞噬功能的细胞大致分为两大类,即小吞噬细胞和大吞噬细胞。小吞噬细胞一般是指血液中的中性粒细胞、嗜酸粒细胞;大吞噬细胞则是指存在于组织中的巨噬细胞和血液中的大单核细胞。它们能吞噬侵入体内的异物(如微生物)并将其水解,是机体天然防御功能的重要组成部分。本实验通过体外或动物体内的细胞吞噬及溶菌酶实验,以证实机体的非特异性免疫机制。

【实验材料】

1. 器材

显微镜、载玻片、厚凹玻片、接种环、采血针、滴管、湿盒、恒温培养箱、注射器、针头、打孔器、平皿、酒精灯、火柴。

2. 试剂

3.8%柠檬酸钠、2%碘酒、75%乙醇、瑞氏染液(Wright's stain, 亚甲蓝-伊红)、蒸馏水、6%可溶性淀粉、1%鸡红细胞悬液、溶壁微球菌(100mg/ml)、1/15mol/L磷酸盐缓冲液(pH6.4)、琼脂、标准溶菌酶(100 μ g/ml)、新鲜鸡蛋清(1:10)、生理盐水、香柏油。

3. 菌种

金黄色葡萄球菌 18~24h 培养液。

4. 动物

小白鼠。

【实验方法】

1. 中性粒细胞的吞噬作用(小吞噬)

- 1) 取金黄色葡萄球菌菌液 1~2ml, 注射于小白鼠腹腔内。
- 2) 经 5h 后将动物解剖, 用棉拭子取其腹腔液涂成薄片。
- 3) 自然干燥后瑞氏染色(2~3min)、镜检。

瑞氏染色法: 干燥后的涂片上滴加瑞氏染液 2~3min; 再加约等量的新鲜蒸馏水, 均匀吹 5min; 水洗、待干、镜检。注意事项: 瑞氏染色主要应用于血涂片及大小吞噬细胞涂片染色; 染色时应注意不要让染液干涸于涂片上, 否则片上将有许多染渣, 影响结果观察。

2. 大吞噬实验

- 1) 实验前 3 天, 于小白鼠腹腔内注射 6%可溶性淀粉肉汤 1ml。
- 2) 实验当天, 于每只小白鼠腹腔内注射 1%鸡红细胞悬液 1ml, 并轻揉腹部。
- 3) 注射后 30min, 用注射器吸取腹腔液少许, 置于洁净载玻片上, 推成涂片、晾干。

用瑞氏染液染色。

4) 油镜观察小白鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞现象(鸡红细胞为有核红细胞),并计算吞噬细胞的百分率。

3. 溶菌酶测定

1) 将含1%琼脂的磷酸盐缓冲液(1/15mol/L)100ml加热熔化,待冷至50~60℃时加入溶壁微球菌菌液1ml(每毫升琼脂内含标准微球菌1mg)混合均匀,注入无菌平皿,每个平皿15ml。一共准备4个平皿。

2) 琼脂凝固后,用打孔器在琼脂板上打4个孔,孔径5mm,孔距相等。

3) 用1ml注射器吸取唾液(由实验者收集自己的唾液于洁净平皿中,取下层清液使用),加入琼脂孔内,以注满为度。同时以标准溶菌酶、鸡蛋清作为阳性对照,生理盐水作为阴性对照,分别做好标记。

4) 将平皿置于实验台上于室温中过夜,第二天观察琼脂孔周围的溶菌环。根据溶菌环直径的大小比较唾液及两个阳性对照的实验结果,分析试剂中溶菌酶的含量。

【结果观察】

1) 观察中性粒细胞吞噬金黄色葡萄球菌的小吞噬现象。

2) 观察小白鼠巨噬细胞吞噬鸡红细胞现象(鸡红细胞为有核红细胞),并计算吞噬细胞的百分率。

3) 观察溶菌酶实验中溶菌环的大小。

【注意事项】

1) 小吞噬实验注射金黄色葡萄球菌菌液时切勿刺伤内脏;大吞噬实验时使小白鼠处于直立姿势有利于腹腔渗出液的抽取。

2) 溶菌酶实验中应注意无菌操作,否则杂菌生长会影响溶菌环的观察。

【思考题】

1) 在吞噬细胞中发现细菌时,如何区别吞噬的细菌和黏附在吞噬细胞表面的细菌?

2) 简述机体非特异性免疫的概念及特点。

附录 试剂配制

1) 6%可溶性淀粉肉汤:取肉汤培养基100ml,加入可溶性淀粉6g,混匀后煮沸灭菌,冷却后置4℃冰箱保存(只能保存1周)。使用时37℃水浴溶解。

2) 1%鸡红细胞悬液:取肝素抗凝鸡血1ml,加生理盐水99ml混合。

3) 瑞氏染液:瑞氏染粉0.1g,甲醇60ml,先将染粉置于研钵内加少量甲醇研磨,然后加入全部甲醇。配好的染液要装瓶塞紧,放置两周后使用。

4) 溶壁微球菌菌液的制备:菌种于使用前先在琼脂斜面上传代1次,然后接种于琼脂斜面培养基中,37℃培养24h后收集菌苔,称重、用pH6.4磷酸盐缓冲液配成100mg/ml菌液。经70℃水浴1h杀菌,置于4℃冰箱中备用。

5) 1/15mol/L磷酸盐缓冲液(沙伦生PBS)(pH6.4):甲液为无水 Na_2HPO_4 9.46g溶于1000ml蒸馏水;乙液为无水 KH_2PO_4 9.078g溶于1000ml蒸馏水。然后取甲液27ml,乙液73ml,加入NaCl 0.5g即可。

实验二 凝集反应

【实验目的】

了解凝集反应的原理、基本类型及用途。

熟悉直接凝集试验（玻片凝集试验、试管凝集试验）、间接凝集试验的实验方法和结果分析。

【实验原理】

细菌和红细胞等颗粒性抗原，当与相应抗体特异结合后，在适量电解质存在的条件下，可逐渐聚集，出现肉眼可见的凝集现象，称为凝集反应。反应中的抗原称为凝集原（agglutigen），抗体称为凝集素（agglutinin）。反应过程可分为两个阶段：①抗原抗体的特异结合；②出现可见的颗粒凝集。

凝集试验既是一个定性的检测方法，即根据凝集现象的出现与否判定结果阳性或阴性；也是一个半定量的检测方法，即将标本作一系列倍比稀释后进行反应，以出现阳性反应的最高稀释度作为滴度。由于凝集反应方法简便，敏感度高，因此在临床检验中被广泛应用。

凝集反应可分为直接凝集（direct agglutination）反应和间接凝集（indirect agglutination）反应两大类。

直接凝集反应是指细菌、红细胞等颗粒性抗原，在适量电解质参与下，直接与相应抗体结合而出现的凝集现象。常用的凝集试验有玻片法和试管法两种。玻片凝集试验（slide-agglutination test）是定性凝集试验。将含有已知抗体的诊断血清与未知细菌或待定型的红细胞滴在玻片上混匀，数分钟后，如出现凝集颗粒，为阳性反应。此法简便快速，主要用于鉴定细菌和血型。

人类 ABO 血型抗原原有 A 和 B 两种。A 型红细胞膜上有 A 抗原，B 型红细胞膜上有 B 抗原，AB 型有 A 和 B 两种抗原，而 O 型则不含有 A 抗原和 B 抗原。据此，如分别将抗 A 和抗 B 血清与待测红细胞混合，则抗 A 和（或）抗 B 血清与红细胞表面上的相应抗原结合而引起红细胞凝集，根据其凝集状况便可判定受试者的血型（表 1）。

表 1 血型鉴定试验结果与判定

凝集反应 血型	诊断血清	
	抗 A	抗 B
A	+	-
B	-	+
AB	+	+
O	-	-

注：“+”表示凝集；“-”表示无凝集

试管凝集试验（tube agglutination test）为半定量试验，在微生物学检验中常用已知细菌作为抗原液与一系列稀释的受检血清混合，保温后观察每管内抗原凝集程度，通常以产生明显凝集现象的最高稀释度作为血清中抗体的效价（titer），亦称为滴度。在试验中，由