

· 基础医学实验教程 ·

基础医学

常规实验准备与操作技术

BASIC MEDICAL

LABORATORY TECHNIQUES

王迎伟 主编



科学出版社

基础医学实验教程

基础医学常规实验准备与操作技术

王迎伟 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书主要介绍基础医学的基本实验方法(包括实验准备方法)。本书编写由浅入深、循序渐进,可使学生能够独立且系统地实施从前期实验准备到具体实验操作这一完整的实验流程。

本书可作为医学、生物学、预防、药学、护理学、口腔学、医学影像学等相关专业本科生(五年制和七年制)和专科生的实验教材,也可供硕士研究生及相关学科医药工作者和研究人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

基础医学常规实验准备与操作技术/王迎伟主编.

—北京:科学出版社,2013.7

ISBN 978-7-03-037746-3

I. ①基… II. ①王… III. ①基础医学—实验
IV. ①R3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 121652 号

责任编辑:潘志坚 闵捷 / 封面设计:殷靓
责任印制:刘学

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>

南京展望文化发展有限公司排版

上海欧阳印刷厂有限公司印刷

科学出版社出版 各地新华书店经销

*

2013年7月第 一 版 开本:889×1194 1/16

2013年7月第一次印刷 印张:9¼

字数:264 000

定价:23.00 元

《基础医学常规实验准备与操作技术》 编辑委员会

主 编 王迎伟

副主编 朱学江 郭 军

编 委 (按姓氏笔画排序)

任子健 刘晓燕 吴晓燕 吴辉文

张 戎 周 红 赵婷婷 袁艺标

郭 静 曹 雪 董晓宇

序

医学是一门既要动脑又要动手的实践科学。在医学教育中实践教学具有举足轻重的地位。在高度提倡创新实验和研究型学习的今天,如何加强学生的“基础理论、基本知识和基本技能”的训练,打下扎实的实验基础,并培养学生的创新思维,拓展学生解决问题的综合能力等显得极为重要。为此,笔者组织了南京医科大学基础医学院“实验课程群”国家级教学团队和基础医学国家级实验教学示范中心部分教授和一线教学骨干编写了本书,旨在使本(专)科生及硕士研究生更好地掌握基础医学相关实验的准备方法和常规操作技术,并为今后顺利开展相关的创新实验和(或)科研课题奠定基础。

南京医科大学基础医学院的国家级基础医学实验教学中心于2006年获批,由形态学实验室、机能学实验室和人体解剖学实验室组建而成。目前,该中心拥有三门国家级精品课程,分别是医学形态实验学、医学机能实验学和人体结构学;实验课程群教学团队于2009年获国家级教学团队称号。此外,中心人员组织开展的本科生研究型学习成果《构建基础医学实践教学平台,培养创新型医学人才》获得江苏省(2009年)高等教育教学成果一等奖。

本书主要介绍基础医学的基本实验方法,从实验准备工作开始,由浅入深、循序渐进地编写,其目的是让学生掌握基础医学的大部分实验准备方法和常用的实验技术。

本书围绕基础医学的常规实验进行了系统性地编写,符合医学实验的规律,可作为一本具备操作性的实用教材。但由于编写时间仓促、精力和水平有限,难免有不足之处,恳请各位读者给予批评和指正,以便今后改正和完善。

王迎伟

2013年4月

前 言

一名医学生在学好医学基础理论知识的同时,又能掌握实验技能是高等医学院校培养医学生的重要环节。因此,为了加强学生的“三基”训练,笔者组织南京医科大学基础医学院的部分教授和教学骨干编写了本书。其内容包括:常规实验辅助材料的准备,玻璃器皿与器械的清洁处理与使用,试剂配制的常用仪器、器皿与方法,实验动物技术,无菌操作技术,微生物的常规培养技术,细胞与组织培养,组织标本的制作与染色,多克隆抗体的制备与应用,动物生物信号采集的方法。

本书的特点是:从学生进行实验的准备工作开始由浅入深、循序渐进地编写,并配以实验器材和部分仪器的照片,以期让学生尽快掌握基础医学相关实验的准备方法和常规操作技术。本书是一本综合了基础医学大多常规实验准备和操作技术的实用教材。

由于编写时间仓促,加上笔者编写经验有限,错误之处在所难免,恳请读者指正。

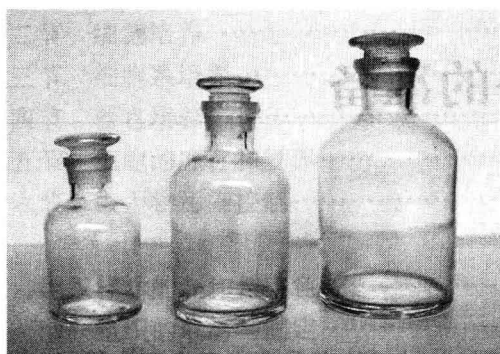
《基础医学常规实验准备与操作技术》编辑委员会

2013年4月

目 录

序	
前言	
第一章 常规实验辅助材料的准备	1
第一节 实验基本材料	1
第二节 微生物学相关实验的辅助材料	9
第三节 常用机能学相关实验的辅助材料	15
第四节 形态学相关实验材料	18
第二章 器皿与器械的清洁处理与使用	21
第一节 玻璃器皿的清洁与处理	21
第二节 常用手术器械的介绍	22
第三节 手术器械的清洗	28
第三章 试剂配制的常用仪器、器皿与方法	30
仪器的使用	30
第四章 实验动物技术	43
第一节 实验动物简介	43
第二节 实验动物的麻醉方法	57
第三节 实验动物的给药途径	61
第四节 生物样本的采集	66
第五节 实验动物的处死方法	73
第五章 无菌操作技术	75
第一节 常用的无菌消毒设备	75
第二节 实验室的无菌环境	81
第六章 微生物的常规培养技术	83
第一节 培养基的制备	83
第二节 细菌的分离与培养	86
第三节 常见细菌的染色与鉴定	88
第七章 细胞与组织培养	93
第一节 细胞培养的常用试剂	93

第二节	细胞培养	98
第三节	细胞系培养	103
第四节	器官培养	106
第五节	细胞的冻存和复苏	108
第六节	微生物污染控制	111
第八章	组织标本的制作与染色	114
第一节	组织的取材与固定	114
第二节	组织的包埋与切片	116
第三节	组织切片的常规染色	119
第九章	多克隆抗体的制备与应用	121
第一节	多克隆抗体的制备	121
第二节	多克隆抗体的应用	129
第十章	动物生物信号的采集方法	136
	参考文献	140



无色细口瓶



棕色细口瓶

图 1-3 细口瓶

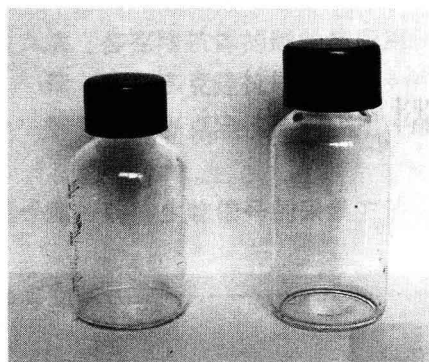


图 1-4 血清瓶

(二) 不同容量的试剂瓶

一般来说,根据实验需要,要准备各种不同容量规格的试剂瓶来盛装试剂,例如 50 ml、100 ml、250 ml、500 ml、1 000 ml 和 2 000 ml 等。

(三) 血清瓶

血清瓶由硼硅酸盐玻璃制作,可高压灭菌或干热灭菌,可选用胶塞盖或带胶垫铝盖。有 100 ml、250 ml、500 ml 和 1 000 ml 等规格,装培养液用(图 1-4)。

二 称量纸和药匙

(一) 称量纸

称量纸可用于各种样品的称重,其特点是透明和光滑,能够用来定量转移。操作时,需要根据实际称取样品的量来选择合适大小的称量纸,例如 75 mm×75 mm、90 mm×90 mm、100 mm×100 mm、120 mm×120 mm 和 150 mm×150 mm 等(图 1-5)。



图 1-5 称量纸

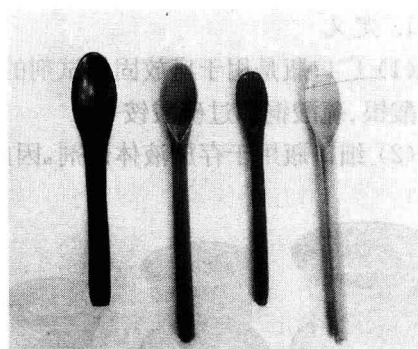


图 1-6 药匙

(二) 药匙

1. 定义 药匙用于取用粉末状或小颗粒状的固体试剂(图 1-6)。按质地可分为玻璃药匙、塑料药匙、牛角药匙和不锈钢药匙等。

2. 使用注意事项

(1) 根据试剂用量不同,药匙应选用大小合适的。

(2) 不能用药匙取用热药品,也不要接触酸、碱溶液。

(3) 取用药品后,应及时用纸把药匙擦干净。

(4) 药匙最好专匙专用,用玻璃棒制作的小玻璃勺子可长期存放于盛有固体试剂的小广口瓶中,无需每次洗涤。

三 移液器枪头与枪头盒

(一) 移液器枪头

移液器枪头又称移液器吸头、移液器吸嘴,简称“枪头”(图 1-7)。不同规格的移液器要准备不同规格的枪头,按最大量程分为 5 000 μl 白色、1 000 μl 蓝色、200 μl 黄色和 20 μl 白色四种。目前市场销售的有灭菌和未灭菌两种枪头。其中灭菌的枪头可以直接使用。未灭菌的枪头需要处理后使用,例如 DEPC 水浸泡、高压蒸汽灭菌等,主要目的是去除残留在枪头上的 DNA 酶、RNA 酶、DNA、热源质和 ATP 等。

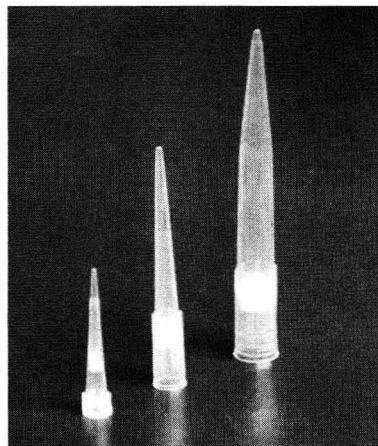


图 1-7 枪头

(二) 枪头盒

为了灭菌和使用方便,枪头一般都装在枪头盒内(图 1-8),不同规格的枪头要准备相应规格的枪头盒。

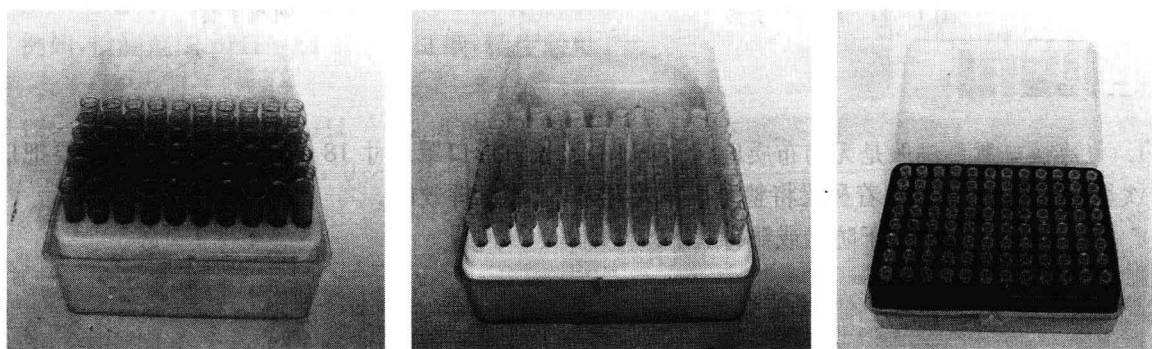


图 1-8 枪头盒

四 手套与口罩

(一) 手套

1. 一次性薄膜手套 采用聚乙烯 LDPE、HDPE、LLDPE 吹膜压制而成(图 1-9)。其产品特点:经济实惠,手套表面经凹凸加工,可防粘连,可左右手混用,具有防水、防油污、防细菌、耐酸耐碱的功能。

2. 一次性乳胶手套 采用天然乳胶材料制成,净化处理,具有极好的拉伸力和防静电功能(图 1-10)。“微糙面”提供良好的灵巧性和牢固的抓握力,并具有耐酸碱和抗菌防臭的良好性能。

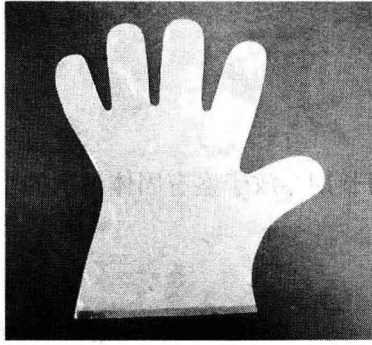


图 1-9 一次性薄膜手套

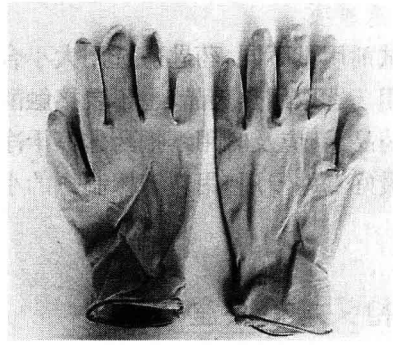


图 1-10 一次性乳胶手套

3. 厚乳胶手套 又称耐酸碱手套,主要用于接触强酸强碱等腐蚀性液体时的防护,清洗后可反复使用(图 1-11)。

4. 帆布手套 主要用于抓取实验动物,例如家兔、大鼠等,防止被动物抓伤或咬伤(图 1-12)。

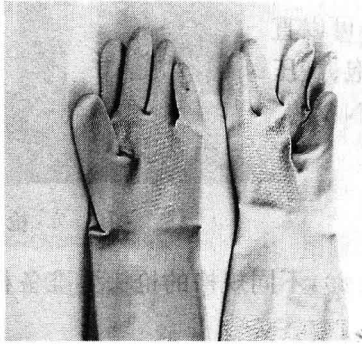


图 1-11 厚乳胶手套

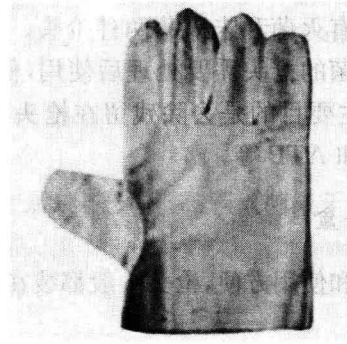


图 1-12 帆布手套

(二) 口罩

1. 一次性口罩 一般是无纺布质地(图 1-13)。长方形口罩尺寸 18 cm×9 cm。使用者要把口罩上的铁丝按在鼻梁上,再顺着鼻梁将整个口罩摊开来,才能发挥效能。

2. 纱布口罩 主要用于防尘或防毒(图 1-14)。

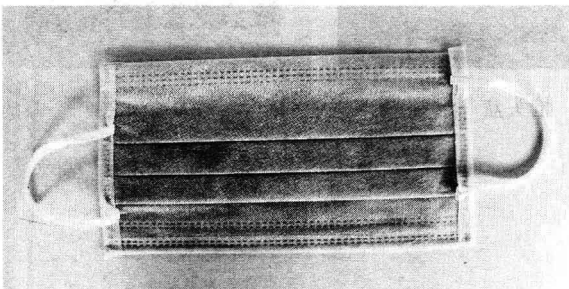


图 1-13 一次性口罩

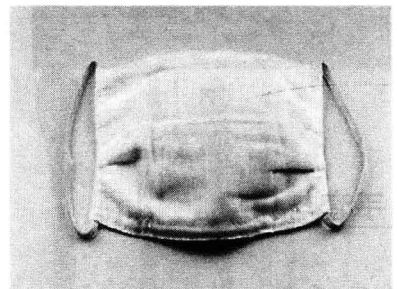


图 1-14 纱布口罩

五 标签纸与记号笔

(一) 标签纸

标签纸主要用于标记试剂瓶,根据试剂瓶规格选择不同大小的标签纸(图 1-15)。

(二) 记号笔

记号笔主要用于标记 EP 管、试管和离心管等,要选用油性记号笔,常用的颜色有红色、黑色和蓝色(图 1-16)。

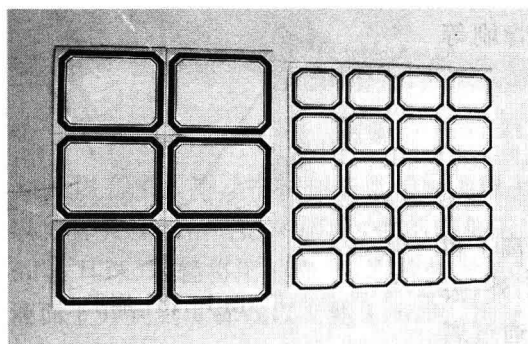


图 1-15 标签纸



图 1-16 记号笔

六 pH 试纸

pH 试纸是一种检验溶液酸碱度的变色试纸(图 1-17)。从它的颜色变化评价溶液的酸碱性,十分方便。按测量精度可分 0.2 级、0.1 级、0.01 级或更高精度。例如,检测范围 pH1~14 的 pH 试纸,精度较低,比色卡分格为 1—2—3—4—5—6—7—8—9—10—11—12—13—14;检测范围 pH1.0~2.8 的 pH 试纸,精度较高,比色卡分格是 1.0—1.3—1.6—1.8—2.0—2.2—2.5—2.8。

(一) 使用方法

1. 检验溶液的酸碱度 取一条或一小块试纸放在表面皿或玻璃片上,用洁净的玻璃棒蘸取待测液,点滴于试纸的中部,观察变化稳定后的颜色,与标准比色卡对比,判断溶液的性质。

2. 检验气体的酸碱度 先用蒸馏水把试纸润湿,粘在玻璃棒的一端,再送到盛有待测气体的容器口附近,观察颜色的变化,判断气体的性质(试纸不能触及器壁)。

(二) 注意事项

- (1) 试纸不可直接伸入溶液。
- (2) 试纸不可接触试管口、瓶口、导管口等。
- (3) 测定溶液的 pH 时,试纸不可事先用蒸馏水润湿,因为润湿试纸相当于稀释被检验的溶液,这

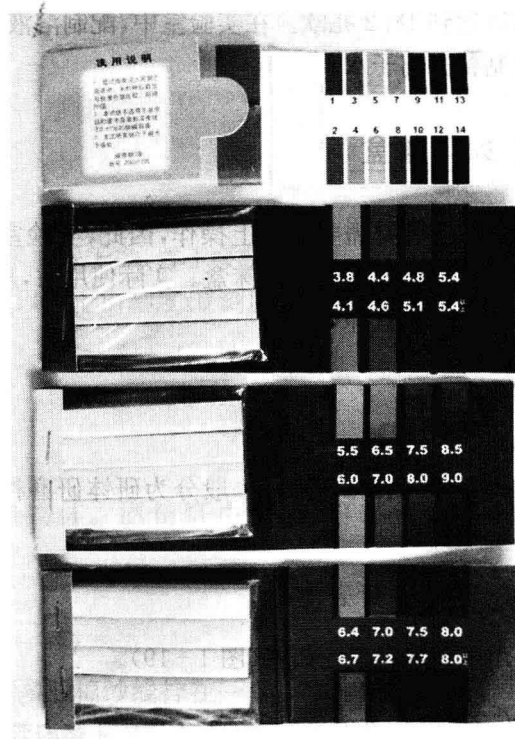


图 1-17 pH 试纸

会导致测量不准确。正确的方法是用蘸有待测溶液的玻璃棒点滴在试纸的中部,待试纸变色稳定后,再与标准比色卡比较来确定溶液的 pH。

(4) 取出试纸后,应将盛放试纸的容器盖严,以免被实验室的一些气体污染。

七 刷子

根据不同实验需要,准备试剂瓶刷、试管刷、烧杯刷、玻璃烧杯刷、三角瓶刷、量瓶刷、滴定管刷和吸管刷等(图 1-18)。

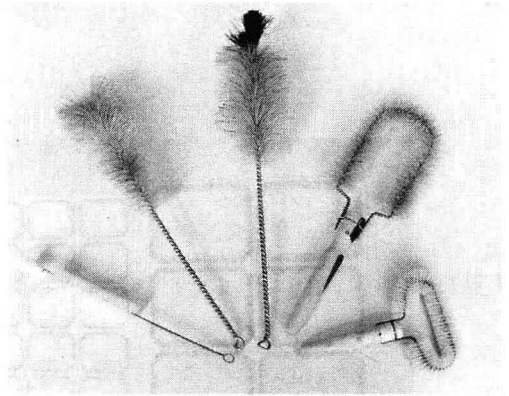


图 1-18 刷子

八 去离子水

去离子水是指去除了钠、钙、铁、铜等元素的阳离子和氯、溴等元素的阴离子后的水。除了 H_3O^+ 和 OH^- 外,去离子水中不含有其他任何离子成分。去离子水可通过离子交换分离等过程生产。将水通过阳离子交换树脂(常用的为苯乙烯型强酸性阳离子交换树脂),使水中的阳离子被树脂吸收,树脂上的阳离子 H^+ 被置换到水中,并和水中的阴离子组成相应的无机酸。含这种无机酸的水再通过阴离子交换树脂(常用的为苯乙烯型强碱性阴离子交换树脂),将 OH^- 置换到水中,和水中的 H^+ 结合成水,此即去离子水。由于去离子水中的离子数可以被人为地控制,从而使它的电阻率、溶解度、腐蚀性、病毒细菌等物理、化学及病理等指标均得到良好的控制。去离子水的最高电阻率可以达到 18.2 兆欧。在实验室中,配制溶液时最好使用去离子水。现在大多数实验室都安装纯水机用来制备去离子水。

九 冰与冰盒

许多实验都需要在冰上操作,因此,实验室最好安装一台制冰机。冰盒多采用泡沫盒。实际使用时,从制冰机中取出碎冰放入冰盒即可。

十 研磨杵

研磨杵,也称研磨棒,一般分为研钵研磨杵和微量离心管研磨杵。

(一) 研钵研磨杵

用于大块组织的研磨(图 1-19)。

(二) 微量离心管研磨杵

用于少量组织的研磨(图 1-20)。

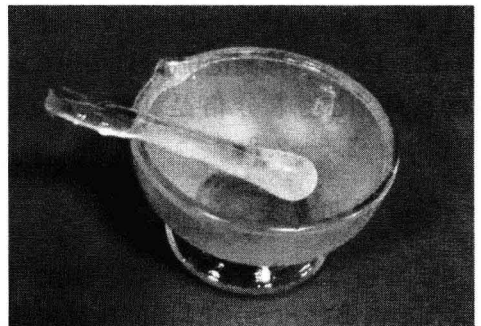


图 1-19 研钵研磨杵

十一 吸量管

吸量管是具有刻度的直形玻璃管(图 1-21),常用的吸量管有

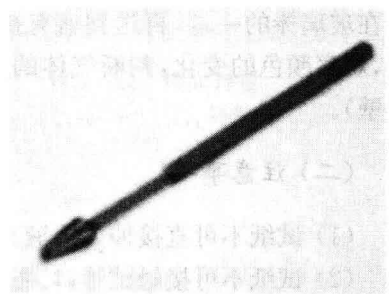


图 1-20 微量离心管研磨杵

1 ml、2 ml、5 ml 和 10 ml 等规格。

(一) 使用方法

(1) 使用时,应先将吸量管洗净,自然沥干,并用待量取的溶液少许荡洗 3 次。

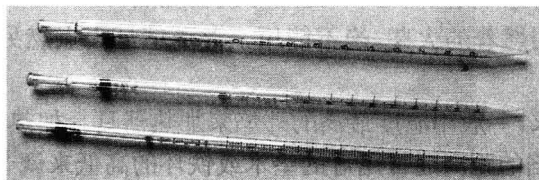


图 1-21 吸量管

(2) 然后以右手拇指及中指捏住管颈标线以上的地方,将吸量管插入溶液液面下约 1 cm,不应伸入太多,以免管尖外壁粘有过多溶液,也不应伸入太少,以免液面下降后吸空。左手拿橡皮吸球(一般用 60 ml 洗耳球)轻轻将溶液吸上,眼睛注意正在上升的液面位置,吸量管应随容器内液面下降而下降,当液面上升到刻度标线以上约 1 cm 时,迅速用右手示指堵住管口,取出吸量管,用滤纸条拭干吸量管下端外壁,并使与地面垂直,稍微松开右手示指,使液面缓缓下降,此时视线应平视标线,直到弯月面与标线相切,立即按紧示指,使液体不再流出,并使出口尖端接触容器外壁,以除去尖端外残留溶液。

(3) 再将吸量管移入准备接受溶液的容器中,使其出口尖端接触器壁,容器微倾斜,吸量管直立,然后放松右手示指,使溶液顺壁流下,待溶液停止流出后,一般等待 15 s 拿出。

(4) 注意此时吸量管尖端仍残留有一滴液体,如果吸量管没有标识“吹”字,则不可吹出残留液体。

(二) 注意事项

(1) 吸量管不应在烘箱中烘干。

(2) 吸量管不能移取太热或太冷的溶液。

(3) 同一实验中应尽可能使用同一支吸量管。

(4) 吸量管在使用完毕后,应立即用自来水及蒸馏水冲洗干净,置于吸量管架上。

(5) 在使用吸量管时,为了减少测量误差,每次都应以最上面刻度(0 刻度)处为起始点,往下放出所需体积的溶液,而不是需要多少体积就吸取多少体积。

十二 酒精灯

酒精灯是以酒精为燃料的加热工具,用于加热物体。酒精灯由灯体、灯芯管和灯帽组成(图 1-22)。

(一) 使用方法

(1) 新购置的酒精灯应首先配置灯芯。灯芯通常用多股棉纱线拧在一起,插进灯芯瓷套管中。灯芯不要太短,一般浸入酒精后还要长 4~5 cm。对于旧灯,特别是长时间未用的灯,在取下灯帽后,应提起灯芯瓷套管,用洗耳球轻轻地向灯内吹一下,以赶走其中聚集的酒精蒸气,再放下套管检查灯芯,若灯芯不齐或烧焦都应用剪刀修整为平头等长。

(2) 新灯或旧灯壶内酒精少于其容积 1/4 时应添加酒精。酒精不能装得太满,以不超过灯壶容积的 2/3 为宜(酒精量太少则灯壶中酒精蒸气过

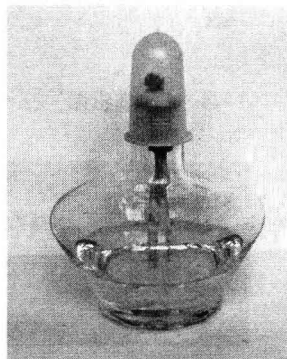


图 1-22 酒精灯

多,易引起爆燃;酒精量太多则受热膨胀,易使酒精溢出,发生事故)。添加酒精时一定要借助小漏斗,以免将酒精洒出。燃着的酒精灯,若需添加酒精,必须熄灭火焰。绝不允许燃着时加酒精,否则很易着火,造成事故。

(3) 新灯加完酒精后须将新灯芯放入酒精中浸泡,而且移动灯芯套管使每段灯芯都浸透,然后调好其长度,才能点燃。因为未浸过酒精的灯芯,一经点燃就会烧焦。

(4) 点燃酒精灯一定要用燃着的火柴,绝不能用一盏酒精灯去点燃另一盏酒精灯。否则易将酒精洒出,引起火灾。

(5) 加热时若无特殊要求,一般用温度最高的外焰来加热器具。加热的器具与灯焰的距离要合适,过高或过低都不正确。与灯焰的距离通常用灯的垫木或铁环的高低来调节。被加热的器具必须放在支撑物(三脚架、铁环等)上或用坩埚钳、试管夹夹持,绝不允许手拿仪器加热。

(6) 加热完毕或要添加酒精需熄灭灯焰时,用灯帽将其盖灭。如果是玻璃灯帽,盖灭后需再重盖一次,放走酒精蒸气,让空气进入,免得冷却后盖内造成负压使盖打不开;如果是塑料灯帽,则不用盖两次,因为塑料灯帽的密封性不好。绝不允许用嘴吹灭。

(7) 酒精灯不用时,应盖上灯帽,以免酒精挥发,因为酒精灯中的酒精,不是纯酒精,所以挥发后会有水在灯芯上,致使酒精灯无法点燃。如长期不用,灯内的酒精应倒出,以免挥发,同时在灯帽与灯颈之间夹小纸条,以防粘连。

十三 其他

实验室还需要准备各种型号规格的试管、量筒、烧杯、锥形瓶、漏斗、容量瓶,还有滴管、滤纸、试管夹和温度计等(图 1-23~图 1-32)。

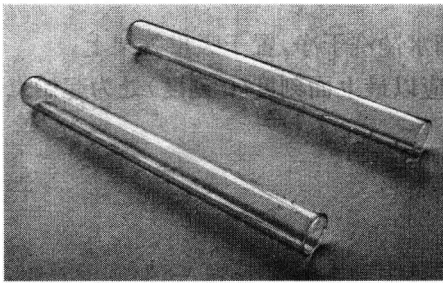


图 1-23 试管

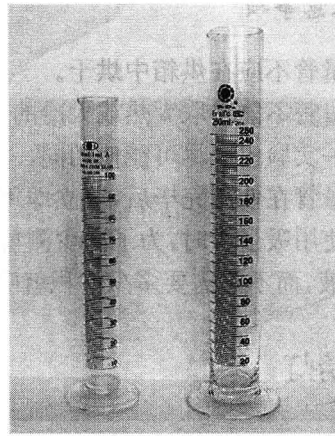


图 1-24 量筒

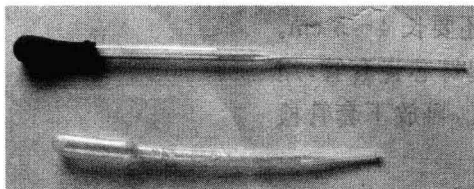


图 1-25 滴管

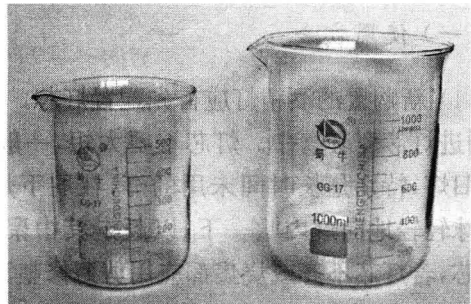


图 1-26 烧杯

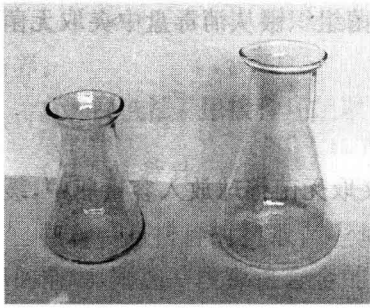


图 1-27 锥形瓶

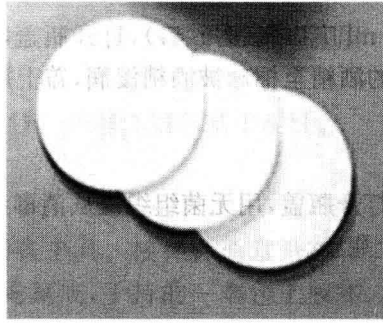


图 1-28 滤纸

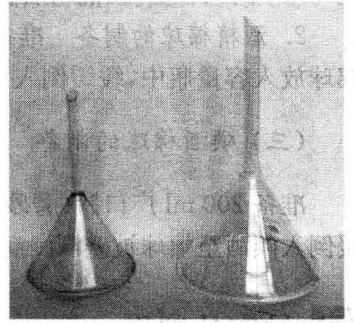


图 1-29 漏斗

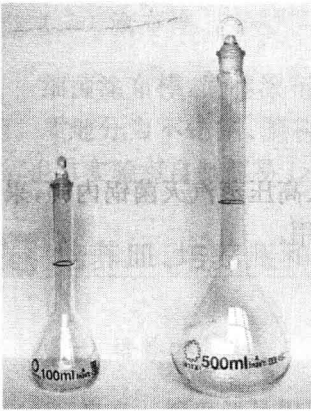


图 1-30 容量瓶

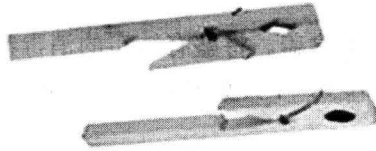


图 1-31 试管夹

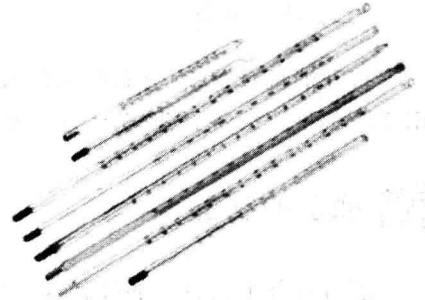


图 1-32 温度计

第二节 微生物学相关实验的辅助材料

一 消毒盘和消毒筒

消毒盘和消毒筒用来放置需要消毒灭菌的实验材料,例如棉球、离心管、EP管等,在实际应用时要根据实验材料的大小来选择消毒盘或是消毒筒(图 1-33)。

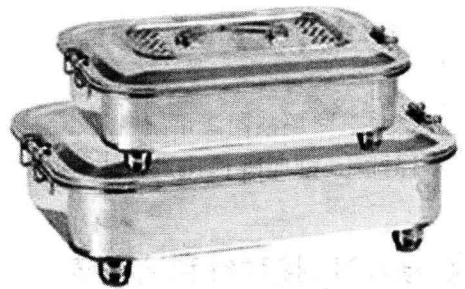


图 1-33 消毒盘

二 棉球的制作

(一) 无菌干棉球的制备

1. 消毒盘与干棉球的准备 打开消毒盘盖,将干棉球放入消毒盘,盖上盒盖。打开消毒盘盖,将组织镊放入消毒盘,盖上盒盖。

2. 无菌干棉球的制备 将盛有干棉球和组织镊的消毒盘放入高压蒸汽灭菌锅内胆,采用高压蒸汽灭菌法灭菌(蒸汽压力维持在 15 磅/平方英寸,即 0.1 MPa,维持 30 min),取出后备用。

(二) 酒精棉球的制备

1. 配制 75% 的酒精 准备 1 000 ml 容量瓶,分别量取无水乙醇 750 ml 和灭菌蒸馏水 250 ml(体积

比 3 : 1) 倒入容量瓶, 混匀后备用。

2. 酒精棉球的制备 准备 200 ml 广口瓶(磨砂口), 打开瓶盖, 用无菌组织镊从消毒盘中夹取无菌棉球放入容量瓶中, 缓缓倒入 75% 的酒精至棉球被酒精浸润, 盖上瓶盖。

(三) 碘酒棉球的制备

准备 200 ml 广口瓶(磨砂口), 打开瓶盖, 用无菌组织镊从消毒盘中夹取无菌棉球放入容量瓶中, 缓缓倒入碘酒至棉球被碘酒浸润, 盖上瓶盖。

三 纱布的制作

(一) 裁剪纱布

将纱布裁剪成 5 cm × 20 cm 大小, 将其折成四层 5 cm × 5 cm。

(二) 纱布灭菌

打开消毒盘盖, 将纱布放入消毒盘, 盖上盒盖。将盛有纱布的消毒盘放入高压蒸汽灭菌锅内胆, 采用高压蒸汽灭菌法灭菌(蒸汽压力维持在 15 磅/平方英寸, 30 min), 取出后备用。

四 瓶塞的制备

准备各种不同直径的硅胶塞, 例如 5 mm、10 mm 和 15 mm 等(图 1-34)。

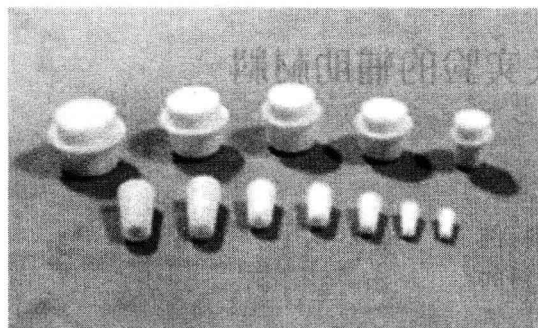


图 1-34 瓶塞

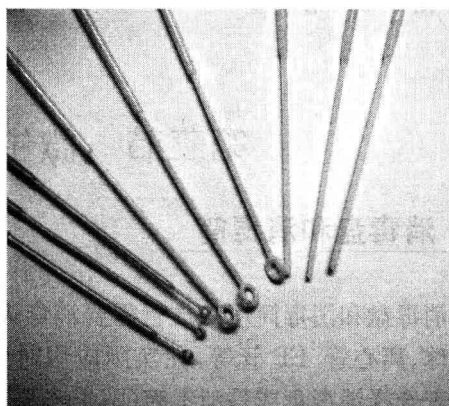


图 1-35 接种环和接种针

五 接种环、接种针和涂布棒

(一) 接种环

1. 定义 接种环是细菌培养时常用的一种接种工具, 广泛应用于微生物检测、细胞生物学和分子生物学等众多学科领域。接种环按材质不同一般可分为一次性塑料接种环和金属接种环(钢、铂金或者镍铬合金)(图 1-35)。

2. 接种环的使用

(1) 划线法: 用接种环蘸取含菌材料, 在固体培养基表面划线。

(2) 点植法: 用接种环在固体培养基表面接触几点。