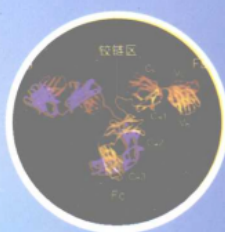


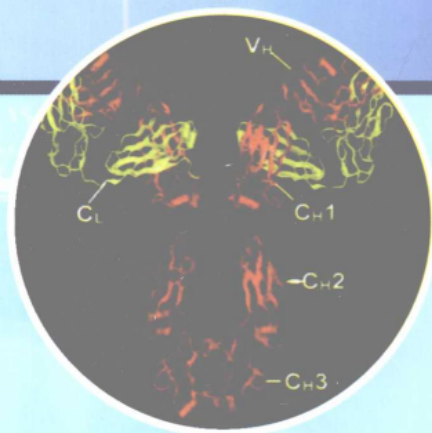
医学免疫学与微生物学 常用实验方法

Yixue Mianyixue Yu Weishengwuxue

Changyong Shiyan Fangfa



主编 ● 李付广



郑州大学出版社

医学免疫学与微生物学 常用实验方法

Yixue Mianyixue Yu Weishengwuxue
Changyong Shiyan Fangfa

主编 ○ 李付广

 郑州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学与微生物学常用实验方法/李付广主编. —郑州:
郑州大学出版社, 2008. 3

ISBN 978 - 7 - 81106 - 792 - 7

I. 医… II. 李… III. ①医药学: 免疫学 - 实验方法
②医药学: 微生物学 - 实验方法 IV. R3 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 016251 号

郑州大学出版社出版发行

郑州市大学路 40 号

出版人: 邓世平

全国新华书店经销

河南龙华印务有限公司印制

开本: 787 mm × 1 092 mm

印张: 13.75

字数: 337 千字

版次: 2008 年 3 月第 1 版

邮政编码: 450052

发行部电话: 0371 - 66966070

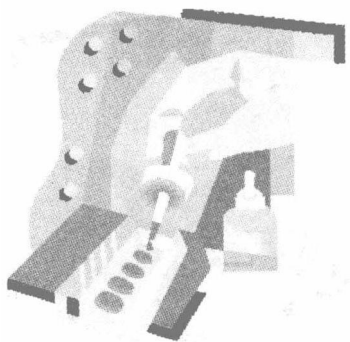
1/16

印次: 2008 年 3 月第 1 次印刷

书号: ISBN 978 - 7 - 81106 - 792 - 7

定价: 20.00 元

本书如有印装质量问题, 请向本社调换



作者名单

ZUOZHEMINGDAN

主 编 李付广

副主编 (以姓氏笔画为序)

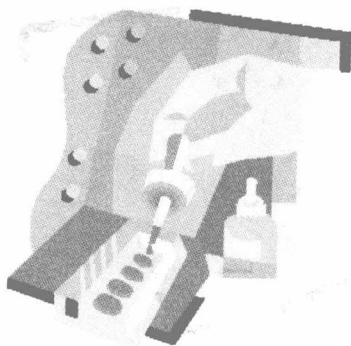
付 庆 杨 璇 潘卫东

编 委 (以姓氏笔画为序)

付 庆 朱 沙 李倩如

杨 璇 轩小燕 唐 悦

黄玉敏 潘卫东

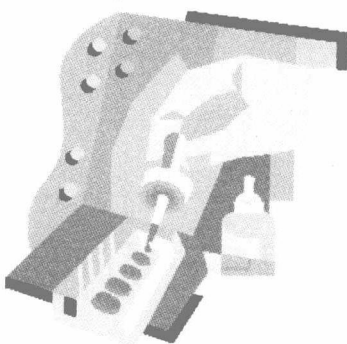


内 容 提 要

NEIRONG TIYIAO

全书分上、下两篇,共 18 章,不仅介绍了医学免疫学与微生物学的一些经典实验方法,也对近年来该领域使用的新技术、新方法如免疫标记技术、核酸杂交与分析技术、流式细胞仪的应用等作了阐述。

本书可供临床医师、卫生防疫和检验人员以及从事医学免疫学和微生物学的教师和科研人员参考,也可作为教材供医学院校本、专科学生使用。



前言

QIANYAN

医学免疫学与微生物学是医学领域的重要基础学科,人体的免疫状况以及微生物与人类许多疾病的发生、发展和预后有密切关系。免疫学与微生物学实验技术不仅是免疫学和微生物学发展的重要基石,也对相关学科的发展起着重要作用。虽然目前各种新的实验方法、技术层出不穷,各种临床检验也由以前的手工操作向着快速、敏感以及全自动化发展,但各种技术的基本原理不变,各种新技术也要以基本技术为依托,这就要求我们在掌握这些先进仪器及技术的同时,还要掌握一些基本的实验技术和原理,才有可能改进和完善新技术。

全书分两篇,共 18 章 70 个常用实验。上篇为医学免疫学实验方法,下篇为医学微生物学实验方法。书中不仅介绍了免疫学与微生物学的一些经典实验方法,也对近年来该领域使用的新技术、新方法加以阐述,如免疫标记技术、核酸杂交与分析技术、流式细胞仪应用等。

本书理论联系实际,图文并茂,通俗易懂,具有科学性与较强的实用性,可供临床医师、卫生防疫和检验人员以及从事医学免疫学和微生物学的教师和科研人员参考,也可供医学院校本、专科学生使用。

在本书编写过程中参考了本教研室前辈撰写的专著、教材等,也承蒙各位老师的关心和指导,在此表示感谢。

各种因素所限,书中难免存在不足,恳请广大读者批评、指正。

郑州大学免疫学和微生物学教研室

李付广

2007 年 12 月

目 录

上篇 医学免疫学实验方法

第一章 免疫器官的获取与观察	3
第二章 非特异性免疫功能检测	4
实验一 吞噬细胞的吞噬实验	4
一、中性粒细胞的吞噬作用	4
二、巨噬细胞的吞噬作用	5
实验二 血清补体的测定	7
实验三 细胞因子的检测	8
一、生物检测法	8
二、免疫学检测法	9
三、分子生物学检测法	10
第三章 体液免疫功能检测	11
实验一 凝集反应	11
一、直接凝集反应	11
二、间接凝集反应	12
三、金黄色葡萄球菌 A 蛋白协同凝集试验	14
实验二 免疫扩散与免疫电泳技术	15
一、免疫扩散试验	16
二、免疫电泳技术	18
实验三 免疫标记技术	22
一、免疫酶技术	22
二、免疫荧光技术	25
三、放射性核素标记技术	27
四、免疫胶体金标记技术	27
五、生物素-亲和素免疫测定法	29
实验四 单克隆抗体的制备及应用	31
一、杂交瘤技术的原理及流程	31
二、McAb 的应用	32

第四章 流式细胞仪的基本原理及其在免疫学中的应用	34
一、流式细胞仪的基本工作原理	34
二、流式细胞仪使用样品的准备	36
三、免疫荧光探针(染料)	37
四、流式细胞仪资料显示基本形式	39
五、流式细胞术免疫学检测的影响因素和质量控制	40
第五章 细胞免疫功能检测	41
实验一 免疫细胞的分离	41
一、外周血单个核细胞的分离	41
二、淋巴细胞的分离纯化	42
三、T细胞和B细胞的分离	43
四、T细胞亚群的分离	43
五、不同细胞分离方法的综合评价	44
实验二 E玫瑰花环形成试验	44
实验三 T淋巴细胞亚群检测	45
一、间接免疫荧光法	45
二、免疫酶化学法	46
三、免疫荧光法	46
四、流式细胞仪检测	46
实验四 淋巴细胞功能检测	46
一、T细胞功能检测	46
二、T细胞亚群功能检测	48
三、B细胞功能检测	49
实验五 混合淋巴细胞反应	49
实验六 NK细胞活性检测	50
一、乳酸脱氢酶释放试验	50
二、同位素释放法	51
三、荧光分析法	52

下篇 医学微生物学实验方法

第六章 细菌形态学检查	55
实验一 显微镜的使用与保护	55
一、显微镜的结构	55
二、显微镜的使用方法及注意事项	56
三、显微镜的维护	58
实验二 细菌基本形态及特殊结构观察	58
实验三 细菌不染色标本检查	59

一、悬滴法·····	59
二、压滴法·····	59
三、暗视野显微镜检查法·····	60
实验四 细菌染色·····	61
一、细菌标本片制作·····	62
二、单染色法·····	62
三、革兰染色法·····	62
四、抗酸染色法·····	63
五、荚膜染色法·····	64
六、鞭毛染色法·····	65
七、芽胞染色法·····	66
第七章 细菌培养 ·····	68
实验一 培养基的制作·····	68
一、肉汤培养基·····	68
二、肉汤琼脂固体培养基·····	69
三、肉汤琼脂半固体培养基·····	69
实验二 细菌的基本培养法及生长现象观察·····	69
一、分离培养法·····	69
二、纯种细菌接种法·····	72
实验三 细菌的生化反应·····	73
一、糖发酵试验·····	74
二、V-P 试验·····	74
三、甲基红试验·····	74
四、枸橼酸盐利用试验·····	75
五、靛基质(吲哚)试验·····	75
六、尿素分解试验·····	75
七、硫化氢试验·····	76
八、触酶(过氧化氢酶)试验·····	76
九、氧化酶试验·····	76
第八章 外界因素对细菌的影响 ·····	81
实验一 物理因素对细菌的影响·····	81
一、温度和湿度对细菌的影响·····	81
二、紫外线对细菌的影响·····	85
三、滤菌器过滤除菌·····	86
四、无菌室及无菌工作台的原理及其使用·····	86
实验二 化学因素对细菌的影响·····	88
一、常用化学消毒剂的杀菌试验·····	88
二、化学消毒剂的效力测定·····	89
实验三 生物因素对细菌的影响·····	90

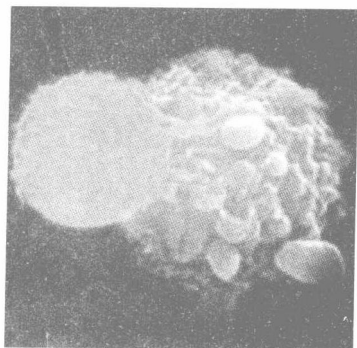
一、药物敏感试验	91
二、细菌素的测定	92
三、噬菌体的噬菌作用	93
第九章 细菌的变异	96
实验一 L型细菌的检查	96
实验二 Ames 试验	96
实验三 细菌质粒的提取和细菌转化试验	97
一、细菌质粒 DNA 的提取	97
二、细菌转化试验	98
第十章 细菌毒力测定	99
实验一 细菌内毒素测定——鲎试验	99
实验二 外毒素对机体的毒性作用及抗毒素的中和作用	99
实验三 大肠杆菌肠毒素试验	100
一、LT 测定法	100
二、ST 测定法	100
实验四 细菌侵袭力测定	101
一、荚膜的致病作用	101
二、血浆凝固酶试验	102
三、链激酶试验	102
四、透明质酸酶试验	103
第十一章 细菌在正常人体与环境中的分布	104
实验一 细菌在人体分布的检测	104
一、人体皮肤表层细菌的检查	104
二、皮肤上细菌总数测定	104
三、人体咽喉腔中细菌的检查	105
四、牙垢中细菌的检查	105
五、肠道正常菌群的检测	105
实验二 环境中细菌分布的检测	106
一、空气中细菌的检查	106
二、土壤中细菌的检查	107
三、地表水中细菌的检查	108
四、物体表面细菌的检查	109
第十二章 病原性球菌的微生物学检查	110
实验一 临床标本化脓性球菌的分离与鉴定	110
实验二 葡萄球菌的微生物学检查	111
一、形态与培养特性	111
二、血浆凝固酶试验	111

三、耐热核酸酶试验	111
四、葡萄球菌肠毒素测定	112
五、耐药性菌株的耐药试验	112
实验三 链球菌的微生物学检查	113
一、形态与培养特性	114
二、抗链球菌溶血素“O”试验	114
实验四 肺炎球菌的微生物学检查	115
一、胆汁溶菌试验	115
二、Optochin 敏感试验	116
实验五 脑膜炎奈瑟菌的微生物学检查	116
一、形态与培养特性	116
二、脑脊液直接涂片检查	117
三、动物毒性试验	117
实验六 淋病奈瑟菌的微生物学检查	117
一、淋病患者分泌物的微生物学检查	117
二、淋病奈瑟菌的分离培养	118
第十三章 肠道杆菌的分离与鉴定	119
实验一 粪便标本中致病性肠道杆菌的分离与鉴定	119
实验二 肥达反应	122
实验三 痢疾志贺菌荧光菌球检查法	123
实验四 耶尔森菌属的微生物学检查	123
第十四章 其他细菌的微生物学检测	127
实验一 霍乱弧菌的检测	127
一、形态与培养特性	127
二、荧光菌球试验	129
三、制动试验	129
四、霍乱弧菌生化反应	129
实验二 副溶血性弧菌(嗜盐弧菌)的检测	129
一、嗜盐性试验	130
二、毒力试验	130
实验三 气单胞菌属的检测	130
一、形态与培养特性	131
二、初步鉴定	131
三、最后鉴定	131
实验四 嗜血杆菌属及包特菌属的检测	132
一、流感杆菌生物学特性	132
二、百日咳杆菌生物学特性	132
实验五 布氏菌属的检测	133
一、形态与培养特性	133

二、染料抑制试验	134
三、凝集试验	135
实验六 棒状杆菌属的检测	136
一、形态与培养特性	136
二、毒力试验	137
实验七 分枝杆菌属的检测	139
一、麻风杆菌的形态与染色	139
二、结核杆菌的形态与培养特性	139
三、结核病患者痰标本的直接检查	139
四、结核杆菌检验程序	140
实验八 需氧芽胞杆菌属的检测	142
一、炭疽杆菌生物学特性	142
二、炭疽杆菌串珠试验	142
三、Ascoli 反应	143
四、枯草杆菌生物学特性	144
实验九 厌氧芽胞杆菌属的检测	144
一、破伤风杆菌和产气荚膜杆菌的形态与培养特性	144
二、破伤风杆菌和产气荚膜杆菌动物试验	145
三、Nagler 反应	145
四、肉毒杆菌的形态	146
实验十 临床标本厌氧菌的分离鉴定	146
一、厌氧菌感染的分离鉴定	146
二、细菌的厌氧培养法	148
实验十一 军团菌的检测	149
一、形态与培养特性	150
二、生化反应	151
三、细菌学检验	151
实验十二 假单胞菌属的检测	152
实验十三 弯曲菌属的检测	153
一、形态与培养特性	153
二、生化反应	153
三、致病弯曲菌检验程序	155
第十五章 衣原体、立克次体、螺旋体、支原体的检测	158
实验一 衣原体的检测	158
一、鸡胚培养法	158
二、荧光抗体染色法	158
三、ELISA 法	159
实验二 立克次体的检测	160
一、形态观察	160

二、外斐反应	160
实验三 螺旋体的检测	161
一、螺旋体的形态观察	161
二、钩端螺旋体的人工培养	162
三、梅毒的血清学试验	163
实验四 支原体的检测	166
一、支原体的分离培养	166
二、肺炎支原体冷凝集试验	167
第十六章 真菌的常规检验	169
实验一 真菌的形态观察	169
一、基本形态	169
二、染色标本制作	171
实验二 真菌的培养	172
一、沙氏琼脂斜面培养法	172
二、真菌小培养法	173
三、真菌菌落观察	174
实验三 真菌毒素的鉴定	175
一、产霉菌株荧光反应测定	175
二、黄曲霉毒素抑菌试验	175
第十七章 病毒学检查	178
实验一 病毒的分离培养	178
一、标本处理	178
二、动物接种法	178
三、鸡胚培养法	182
四、组织培养法	185
实验二 血凝及血凝抑制试验	188
实验三 病毒的血清学反应	189
一、中和试验	189
二、补体结合试验	192
三、酶联免疫吸附试验	194
实验四 病毒抗原的检测	196
一、免疫荧光技术	196
二、免疫酶染色	198
三、免疫酶斑点试验	199
四、免疫印迹试验	199
实验五 病毒核酸检测技术	199
一、核酸杂交	199
二、聚合酶链反应	201
实验六 病毒感染的细胞包涵体检查	203

一、核内包涵体	203
二、核内和浆内包涵体	203
三、胞质内包涵体	203
第十八章 微生物鉴定的自动化技术	204
一、微生物数码鉴定法	204
二、自动化的微生物鉴定和药敏试验分析系统	204
三、使用自动化鉴定仪的局限性	205
常用缩略语	206



上篇

医学免疫学实验方法

第一章 免疫器官的获取与观察

免疫系统是机体执行免疫功能的重要系统。免疫系统由免疫器官和组织、免疫细胞及免疫分子组成。免疫器官是免疫系统的重要组成部分,是免疫细胞产生、分化、成熟的场所,也是免疫应答发生的场所。免疫器官根据功能不同可以分为中枢免疫器官和外周免疫器官两部分。中枢免疫器官包括骨髓和胸腺,外周免疫器官包括淋巴结、脾和黏膜免疫系统等。

【材料】

1. Hank's 液、75% 乙醇。
2. 剪刀、镊子、解剖盘、平皿。
3. 健康小白鼠。

【方法】

1. 采用颈椎脱臼法处死小白鼠。
2. 将小鼠放入 75% 乙醇中浸泡消毒,取出后放在解剖盘中。
3. 左手持镊提起腹中部皮肤,右手用剪刀剪长 5 mm 的小口,从剪口处朝头、尾部两端用力,撕开皮肤,暴露小鼠胸壁和腹壁。
4. 解剖小鼠胸腔,从胸骨下缘剪“一”字形切口,再在肋骨做“八”字形切口,向头端掀开胸骨、肋骨,完全暴露小鼠胸腔,于胸骨后方、心脏前上方取出胸腺。
5. 解剖小鼠腹腔,小心剪开腹部肌肉及腹膜,暴露小鼠腹腔(图 1-1),于腹部左侧取出脾脏。



图 1-1 小白鼠腹腔暴露操作示意图

6. 将胸腺、脾脏置于盛有 Hank's 液的平皿中,进行观察。

【结果】

胸腺为乳白色,分两叶;脾脏为暗红色,长条状。

【注意事项】

掌握胸腺、脾脏所在的正确位置与颜色形状,不要把肺错当成胸腺。

(轩小燕)