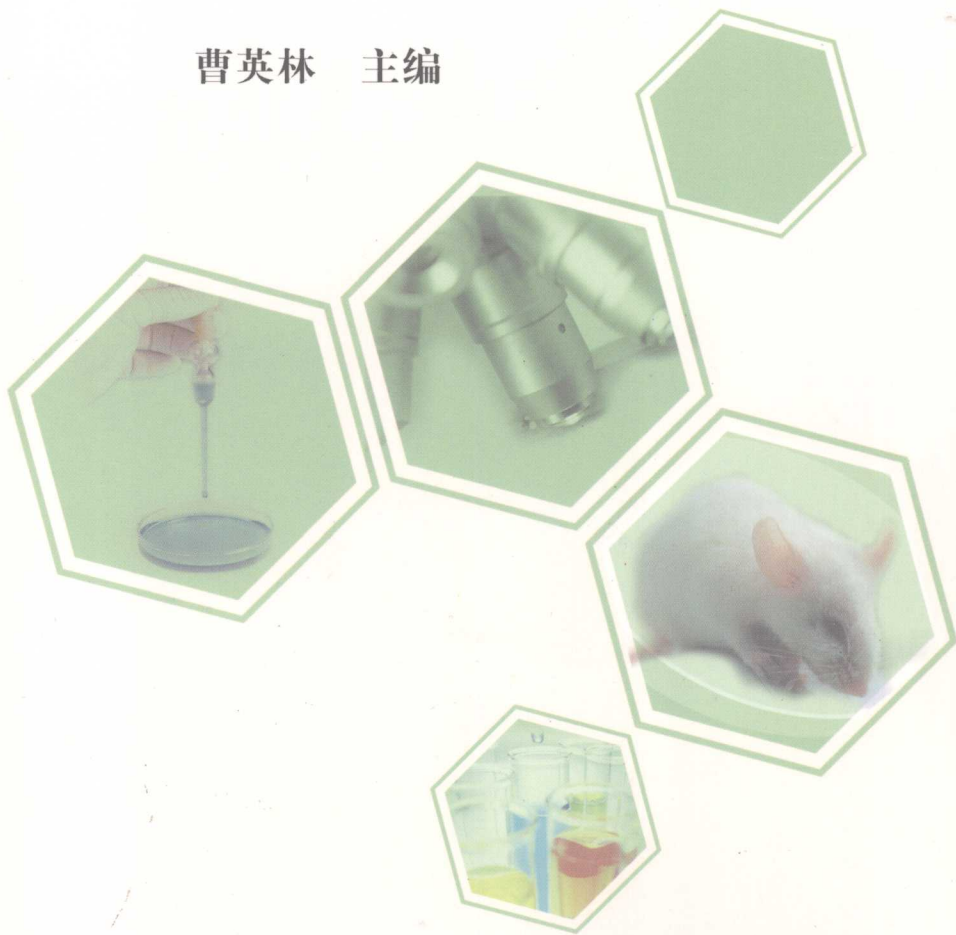



技能型紧缺人才培养培训配套实验教材

免疫学与微生物学 实验指导

曹英林 主编



 科学出版社
www.sciencep.com

技能型紧缺人才培养培训配套实验教材

免疫学与微生物学 实验指导

主 编 曹英林
编 者 曹英林 常翠鸣 郭 春
宋 静 阎世坤

科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书为技能型紧缺人才培养培训配套实验教材之一。全书分为免疫学实验与微生物学实验两部分,共18个实验。全书实验内容选择适当,层次安排合理,作图简捷精巧,文字简明通顺,针对高专高职的教学需求增加了技能型实验内容,有些进展性实验技术也作了适当的介绍。本书的特点是结合实验内容设计了案例、案例提示和链接等内容,构思新颖,图文并茂,内容丰富,使理论联系实际、基础结合临床,适合于技能型、专业型和复合型学生的教学实际,提高了学生的学习兴趣和理解能力,是一本好用、实用的实验教科书。

本书可供高专高职护理、助产、临床医学、检验、药学、药剂、医学影像技术、卫生保健、社区医学、中医等专业使用。

图书在版编目(CIP)数据

免疫学与微生物学实验指导 / 曹英林主编. —北京:科学出版社,2009
技能型紧缺人才培养培训配套实验教材
ISBN 978-7-03-024003-3

I. 免… II. 曹… III. ①医药学:免疫学-实验-医学院校-教学参考资料
②医药学:微生物学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. R3-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2009)第017567号

责任编辑:邱波 吴茵杰 / 责任校对:陈丽珠

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

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>

丽源印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2009年2月第一版 开本:787×1092 1/16

2009年2月第一次印刷 印张:6 1/4

印数:1—7 000 字数:122 000

定价:15.00元

如有印装质量问题,我社负责调换

技能型紧缺人才培养培训配套实验教材
编委会

主 编 常翠鸣
副主编 陈连璧 朱摩西 吴崇媛 徐荣达
毕玉顺 刘 凯 刘玉娥 周玉琴
张孟业 赵兴国 王绪洲 李瑞峰
曹英林 卢雪峰

编 者 (按姓氏汉语拼音排序)

毕玉顺	曹英林	常翠鸣	陈连璧
董海霞	郭 春	江 虹	孔 峰
李 莉	李景新	李瑞峰	李秀敏
林晓燕	刘 凯	刘 萍	刘克敬
刘玉娥	卢雪峰	宋 静	王 敏
王 茜	王菊英	王婷婷	王绪洲
王姿颖	魏树珍	魏欣冰	吴晓娟
武玉玲	夏西燕	邢子英	阎世坤
袁中瑞	原银萍	张孟业	赵兴国
甄军晖	周玉琴	庄学伟	

前 言

高等职业教育是我国高等教育的重要组成部分,为社会和经济建设培养了大量高素质的技术性专门人才,在加快社会主义现代化建设进程中起到不可替代的作用。高职教育课程体系具有很强的实用性,高度重视实践性教学环节,实验课教学在教学计划中占有较大比重。目前国内出版了许多高等职业院校基础医学理论教学用书,缺少与理论教学配套的实验教材,实验教材的建设滞后于高职教育的发展步伐。为此,我们组织了部分具有丰富教学经验的教授担任主编,为目前所使用的由科学出版社出版的高专、高职基础医学教科书撰写了相配套的实验指导,分别为《生理学、药理学及心理学实验指导》、《生物化学与医用化学实验指导》、《病理学与病理生理学实验指导》、《解剖学与组织胚胎学实验指导》、《免疫学与微生物学实验指导》和《诊断学实验指导》。

在本套教材编写中,作者遵循教育部“高职教育基础课程教学要体现以应用为目的,以必须、够用为度,以讲清概念、强化应用为教学重点”的基本要求,和“以应用为主旨、以能力为本位”的指导原则。编写内容努力体现教材的思想性、科学性、先进性、适用性和启发性,并具有如下特点:①力求文字简明,深入浅出,通俗易懂,以增加可读性,便于学生自主学习。②紧紧围绕教学目标,突出培养应用能力的教学定位。实验项目的选择首先保证实验教材的系统性和实用性。同时,兼顾不同医学专业实验教学的实际需要,考虑到不同地区和不同实验室条件的差异,实验内容给不同专业和学校的选用留有余地,以增加适用性和灵活性。③提供了适量的案例、提示和链接,使实验内容联系有关专业知识和临床实践,以增强学生的学习兴趣 and 主动性,拓宽学生的知识面,启迪学生的科学思维和创新能力。④注意介绍与实验内容有关的新知识、新技术和新方法,充分利用实验室的先进设备,使得实验教学更具实用性和先进性。

本套实验教材适用于高专、高职护理、助产、临床医学、检验、药学、药剂、医学影像技术、卫生保健、社区医学、中医等专业。

本套实验教材的编写和出版得到了全体编委会成员和科学出版社的大力支持,在此表示衷心感谢。由于教材的编写时间紧,作者水平所限,不足之处在所难免。我们诚挚地希望广大师生和读者给予批评指正。

常翠鸣

2008年3月于济南

目 录

第一部分 免疫学实验

实验一	吞噬细胞的吞噬作用	(3)
实验二	补体溶血试验	(6)
实验三	抗原抗体反应——凝集试验	(8)
实验四	抗原抗体反应——沉淀反应	(10)
实验五	抗体标记技术——酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HBsAg	(13)
实验六	细胞免疫	(16)
实验七	淋巴因子 IL-2 的检测	(20)
实验八	超敏反应——过敏性休克	(23)
实验九	常用生物制品介绍(示教)	(25)

第二部分 微生物学实验

实验一	细菌的形态与结构观察	(31)
实验二	细菌的培养	(39)
实验三	细菌的耐药性与药物敏感性试验	(44)
实验四	病原性球菌的微生物学检测	(48)
实验五	肠道杆菌的微生物学检测	(54)
实验六	破伤风外毒素的毒性作用和抗毒素的中和作用	(60)
实验七	病毒培养的基本技术(示教)	(62)
实验八	支原体、衣原体、立克次体、螺旋体的形态观察	(69)
实验九	真菌、放线菌的形态观察(示教)	(73)
附录 1	染色液及染色法	(76)
附录 2	试剂及溶液	(79)
附录 3	常用培养基制备	(81)
附录 4	常用的细胞培养溶液	(90)
主要参考文献		(91)

第一部分

免疫学实验

实验一 吞噬细胞的吞噬作用

案例

吞噬细胞吞噬而不杀伤细菌导致慢性肉芽肿

患儿,男,3岁,因双下肢淋巴结炎、伴有皮肤溃疡和肺炎急诊入院。患儿母亲述患者自幼经常感染。

查体:患儿体质弱,神志清,精神烦躁。听诊呼吸有啰音,肝脾肿大,左下肢胫外侧皮肤严重溃疡,面积约 $4\text{cm} \times 6\text{cm}$,胸窝淋巴结肿大、触痛,右下肢胫内侧也有溃疡面,面积约 $3\text{cm} \times 2\text{cm}$,胸窝淋巴结略肿大、有触痛。取样作细菌培养、病原学诊断、染色体遗传学分析。临床诊断为表皮葡萄球菌感染,慢性肉芽肿,伴肺炎。

实验室检查报告:细菌培养为表皮葡萄球菌感染。NBT(硝基四氮唑蓝还原试验)为1.8%(正常小于10%)。2h杀菌曲线无明显作用。染色体检测分析报告为X连锁隐性。

问题:

慢性肉芽肿病的发病机制是什么?

【实验目的】

1. 了解吞噬细胞的吞噬功能。
2. 观察吞噬细胞的形态特征。

【实验材料】

1. 3.8% 枸橼酸钠溶液、葡萄球菌菌液(浓度为 $5 \times 10^2/\text{ml}$)。
2. 采血针、干棉球、酒精棉球。
3. 玻片、吸管、康氏管、试管架、 37°C 恒温箱。
4. 瑞特(Wright)染色液、pH6.8缓冲液。
5. 香柏油、二甲苯、擦镜纸。

【实验方法】

1. 将抗凝剂3.8%枸橼酸钠溶液滴加于康氏管内1滴。
2. 消毒后采集末梢血4滴(约0.5ml),沿管壁滴入康氏管中。

3. 加细菌悬液 3 滴,混匀。取少量血液轻推一张血片,自然干燥作为阴性对照。
4. 将上述试管放入 37℃ 温箱中 30min,每 10min 振摇一次。
5. 取出试管后做一张推片,待自然干燥,作为实验片。
6. 将对照片、实验片一起作瑞特染色。
7. 瑞特染色 瑞特染色液盖满玻片 1min 后,用 2 倍的 pH6.8 缓冲液充分混匀,约 10min 后水洗,用吸水纸吸干后镜检。用油镜观察吞噬情况,绘图。

【实验结果】

寻找吞噬细胞(图 1-1-1),吞噬细胞的形态:细胞核可分为 2 或 3 叶,为深蓝色,细胞浆为淡蓝色;吞噬细菌后(图 1-1-2),在细胞浆中可见深紫色的细小颗粒。

用红蓝铅笔描绘未吞噬细菌的吞噬细胞及吞噬细菌的吞噬细胞。

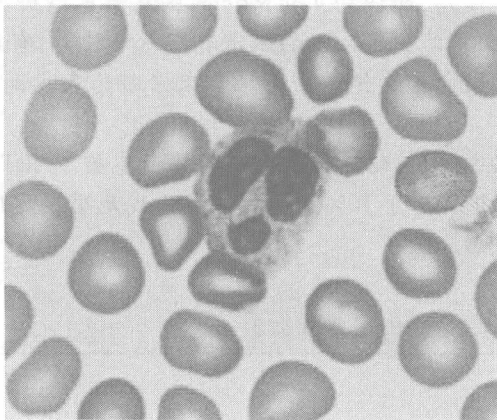


图 1-1-1 未吞噬细菌的吞噬细胞

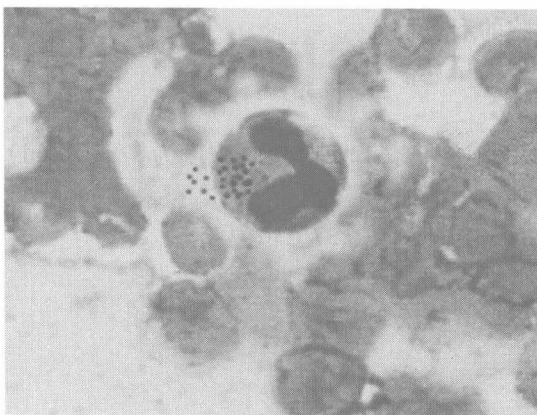


图 1-1-2 吞噬细菌的吞噬细胞

【参考值】

小吞噬细胞吞噬率： $< 10\%$ （硝基四氮唑蓝还原试验）；大吞噬细胞吞噬率： $60\% \sim 65\%$ （吞噬细胞吞噬试验）。

提示

慢性肉芽肿病是一种吞噬细胞疾病，以严重的巨噬细胞杀菌能力缺陷为特点。该病是编码细胞色素的 β 链基因突变，不能有效地组成NADPH氧化酶。而NADPH氧化酶的缺少不能使超氧化物酶充分地生成和杀菌，表现为吞噬功能正常、杀伤功能缺陷，不能有效杀死病原微生物，导致反复的、通常为非致病菌的细菌感染，难以痊愈，呈慢性肉芽肿。这是一种因基因突变使人体NADPH氧化酶缺乏所导致的慢性肉芽肿病。

【注意事项】

1. 先消毒手指然后采血。采血时用手捏紧被采血手指，针要扎深、动作要快，以保证采集到足够的吞噬细胞。
2. 制备细菌悬液时，要注意细菌菌液的浓度；实验时严格按照实验操作规程操作。
3. 染色过程要注意时间与温度。
4. 所用器材要洁净。

【思考题】

1. 吞噬细胞在特异性免疫应答中发挥哪些作用？
2. 简述吞噬细胞吞噬杀菌的基本过程。
3. 吞噬细胞的吞噬率正常是多少？

（常翠鸣 曹英林）

实验二 补体溶血试验

案例

表兄妹的婚姻——补体 C3 成分缺陷

患者,女,12岁,因发热、咳脓痰、呼吸困难入院。患者母亲述患者生后至此次入院前曾经历多次严重化脓性细菌感染:曾患过7次肺炎、2次败血症、1次细菌性脑膜炎、2次中耳炎等。

查体: T 38.7℃, P 102次/分, R 29次/分, BP 96/60mmHg;发育正常,神志清、精神可。听诊心律齐,两肺有湿啰音。胸透示两肺纹理增粗,其他无异常发现。

实验室检查:①白细胞分类计数:中性粒细胞 $8.4 \times 10^9/L$,嗜碱粒细胞 $0.76 \times 10^9/L$,嗜酸粒细胞 $0.64 \times 10^9/L$,淋巴细胞 $3.7 \times 10^9/L$,单核细胞 $1.02 \times 10^9/L$ 。②血清中未检测出补体 C3,其余补体成分 C1、C4 及 C1 抑制剂的测定均在正常范围内。

问题:

1. 你对该患者的初步诊断是什么? 诊断依据是什么?
2. 你对该病的发病机制是如何理解的?

【实验目的】

1. 了解补体的特性与功能。
2. 观察补体的溶血作用。

【实验材料】

1. 抗原 2% 绵羊红细胞(SRBC)。
2. 抗体 溶血素(2U)。
3. 补体 新鲜豚鼠血清(含 2U 补体)。
4. 生理盐水。
5. 试管、离心器等。

【实验方法】

1. 取 4 支小试管,按表 1-2-1 加入各组分。

表 1-2-1 补体溶血试验 (单位:ml)

成分管号	2% SRBC	羊溶血素(2U)	补体(2U)	生理盐水	结果
1(实验管)	0.5	0.5	0.5	0.5	溶血
2(溶血素对照)	0.5	0.5	—	1.0	不溶
3(补体对照)	0.5	—	0.5	1.0	不溶
4(NS对照)	0.5	—	—	1.5	不溶

2. 将上述各试管放 37 °C 水浴箱中,30 min 观察结果。

【实验结果】

1. 实验管(第 1 管) 实验管内溶液正常时应呈现红色、透明,为溶血;若溶液呈混浊则为不溶血。

2. 对照管(第 2、3、4 管) 均应不溶血。因第 2 管缺乏补体,第 3 管缺乏溶血素抗体,第 4 管缺乏溶血素、补体,它们都不能形成溶解红细胞的分子。设计这些对照管的目的是验证各溶液是否符合实验要求,以确保实验材料的可靠性和试验结果的可信度。

【注意事项】

- 豚鼠补体血清要新鲜,否则补体活性会下降。
- 所用羊溶血素、补体、绵羊红细胞均要预先滴定活性单位、效价及其相应浓度。
- 避免操作过程中非实验用水进入试管内,以防红细胞破裂溶解,影响实验结果。

【思考题】

- 不同种属的抗原-抗体(IgM、IgG 类抗体)复合物是否也能激活补体的传统途径呢?为什么?
- 补体归属于固有免疫体系,它是否也参与适应性免疫呢?

提示

1. 初步诊断 C3 完全缺乏后果严重,可致吞噬细胞的吞噬、杀菌和溶菌作用明显减弱,容易导致化脓性细菌感染,甚至是致死性的化脓性感染。本病例属 C3 缺陷导致的细菌感染伴发肺炎。诊断依据:结合临床表现、查体与实验室检查。

2. 发病机制 本病例经随访调查发现,患者父母是表兄妹婚姻,造成女儿补体 C3 缺陷症,导致反复的细菌感染。编码补体 C3 的基因是常染色体隐性遗传,位于第 19 对染色体。该患者父母血清中 C3 水平只相当于正常人的一半,是一对表兄妹,属于杂合子型,婚后生下的女儿属于纯合子型,导致补体 C3 完全缺乏。

(常翠鸣 曹英林)

笔记栏

实验三 抗原抗体反应

——凝集试验

案例

输血反应

患者,男,25岁。因车祸“腹部外伤、失血性休克”急诊入院。查血型:A型。手术中输入A型全血2000ml,术后2h再次输入A型全血400ml,输血后患者突然胸闷、呼吸困难、心跳加快、烦躁不安、发绀、血压下降,经抢救无效死亡。询问病史:既往无输血史和过敏史。经诊断死亡原因为输血反应所致。进一步检查,原来在第二次输血时由于值班护士疏忽大意,错把B型血当成A型血输入。

问题:

1. 输血反应属于哪一型超敏反应?
2. 简述输血反应发生机制。
3. 从本病例中应吸取哪些教训?

【实验目的】

1. 熟悉直接凝集试验的原理与方法。
2. 了解间接凝集试验的原理与方法。

【实验材料】

1. 直接凝集试验 红细胞抗A、抗B标准血清,凹玻片,采血针,消毒棉球,牙签。
2. 间接凝集试验 黑色反应板,被测血清标本1号、2号,抗链球菌溶血素“O”抗原试剂。

【实验方法】

1. 直接凝集试验(玻片法)
 - (1) 取清洁凹玻片一张,分左、右两区,分别加入抗A、抗B血清一滴。
 - (2) 消毒环指后采血1~2滴,加至含0.2ml无菌生理盐水中,混匀。
 - (3) 以滴管分别滴入抗A、抗B血清中,再用牙签一端与抗A血清混匀,另一

端与抗 B 血清混匀。静置 2~3min 后,观察结果。

(4) 红细胞凝集成块者为阳性,无凝集者为阴性。

链 接 间接凝集试验——ASO 试验

间接凝集试验,是将可溶性抗原或抗体吸附或偶联于免疫无关的颗粒上,使其成为致敏的载体,再与相应的抗体或抗原作用,在适当电解质参与下,出现特异性凝集现象。

抗链球菌溶血素“O”(ASO)试验(简称抗链“O”试验),是用来检测溶血性链球菌感染后机体血清中是否对链球菌菌体“O”抗原产生了抗“O”抗体的测定,通常 ASO 效价大于 200 为阳性,即有诊断价值。

2. 间接凝集试验(抗链球菌溶血素“O”试验)

(1) 抗链球菌溶血素“O”抗原试剂在使用前预置达到室温,再轻轻摇匀。

(2) 在黑色反应板的反应格中,滴加被测血清标本 1 滴。

(3) 同时再分别加阴性、阳性对照血清各 1 滴于黑色反应板上。

(4) 分别在血清标本 1 号、2 号中滴加抗链“O”抗原试剂 1 滴,轻轻摇动混匀,反应 2min,观察结果。

【实验结果】

1. 直接凝集试验(血型鉴定) 与抗 A 血清凝集者为 A 型血,与抗 B 血清凝集者为 B 型血;与抗 A、抗 B 血清均凝集者为 AB 型血;与抗 A、抗 B 血清均不凝集者为 O 型血。

2. 间接凝集试验 阴性对照血清凝集(胶乳颗粒凝集且液体澄清),阴性对照血清不凝集(胶乳颗粒不凝集仍保持均匀胶乳状态);被测血清标本 1 号凝集为阳性,被测血清标本 2 号不凝集为阴性血清。

【注意事项】

1. 红细胞的浓度要适当,过浓与过稀均影响实验结果。

2. 抗链“O”试验结果的观察,要注意时间与温度对实验的影响情况。

【思考题】

1. 直接凝集试验与间接凝集试验中抗原有何区别?

2. 简述凝集试验的原理及类型。

3. 为什么检查患者血清抗体时,常需要采集双份血清标本?若抗体效价不升高,应考虑何种可能性?

(常翠鸣 曹英林)

实验四 抗原抗体反应

——沉淀反应

【实验目的】

1. 了解沉淀反应的类型。
2. 熟悉 IgG 单向琼脂扩散试验的原理、方法与应用。
3. 熟悉双向琼脂扩散试验的原理、方法与应用。

【实验材料】

1. 琼脂板 单向琼脂扩散试验, 2.4% 琼脂板; 双向琼脂扩散试验, 1.5% 琼脂板。
2. 缓冲液 pH 8.2 0.05mol/L 巴比妥钠-盐酸缓冲液。
3. 标本 IgG(或正常人血清)。
4. 试剂 羊抗人 IgG 血清。
5. 其他 湿盒、载玻片(25mm × 75mm)、微量加样器、打孔器。

【实验方法】

1. 单向琼脂扩散试验

(1) 标准血清稀释: 用生理盐水将参考血清作 200mg/L、400mg/L、600mg/L、800mg/L、1000mg/L 稀释。

(2) 待测血清稀释: 按说明书要求稀释。

(3) 制板: 单向琼脂扩散板(商品供应)。

(4) 加样: 将已稀释的待测血清与标准血清依次加至琼脂板小孔内, 每孔 10 μ l。

(5) 温育: 将已加完样品的琼脂板放入湿盒中, 扣好上盖, 置 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 12 ~ 24h。

(6) 实验结果观察(图 1-4-1)。

2. 双向琼脂扩散试验

(1) 制板: 融化琼脂, 吸取 4ml 浇注于水平放置的清洁载玻片上。

(2) 打孔: 待凝固后, 用孔径为 3mm 打孔器垂直打孔, 孔间距 4 ~ 6mm, 孔型呈梅花形。用针头挑去孔内琼脂。

(3) 加样: 中央孔加入抗体, 周围孔加入不同的待测抗原标本, 每孔约 20 μ l。

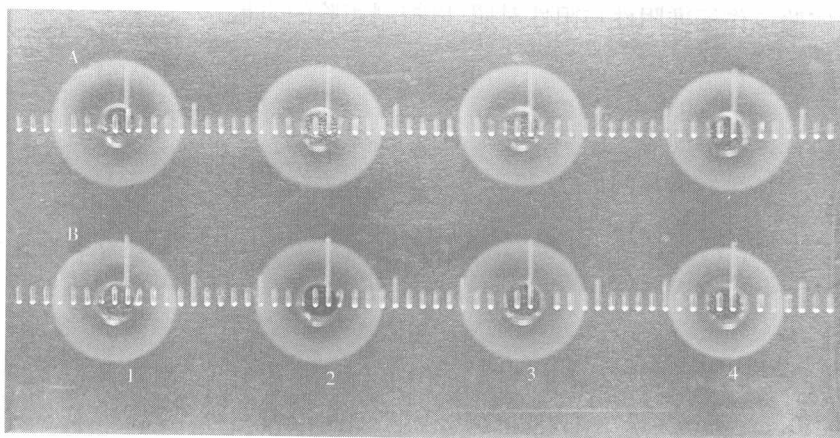


图 1-4-1 单向琼脂扩散试验

同时设好阴性、阳性对照(图 1-4-2)。

(4) 将加好样的琼脂放入湿盒内,加盖后,置 37℃ 孵育 12~24h,观察结果(图 1-4-3)。

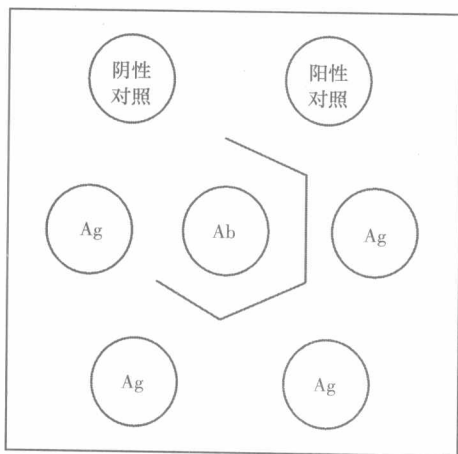


图 1-4-2 双向琼脂扩散试验示意图

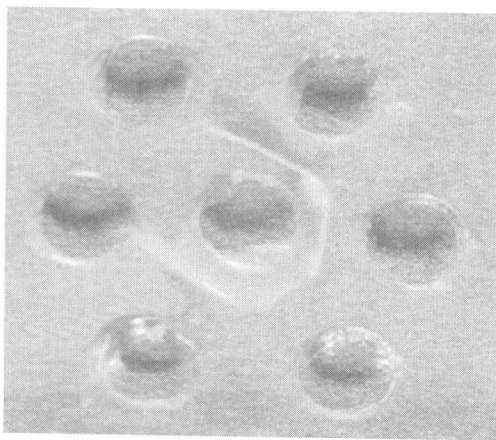


图 1-4-3 双向琼脂扩散试验

【实验结果】

通常,沉淀圈或沉淀线出现的为阳性反应,说明有相对应的抗原或抗体。

【注意事项】

1. 要注意琼脂的质量、浓度,孔径的大小与间距,这些对实验结果都有一定影响。
2. 浇板时,琼脂温度一般在 60℃ 左右。切避免凝胶产生气泡。
3. 加样量要准确,且勿溢出孔外。