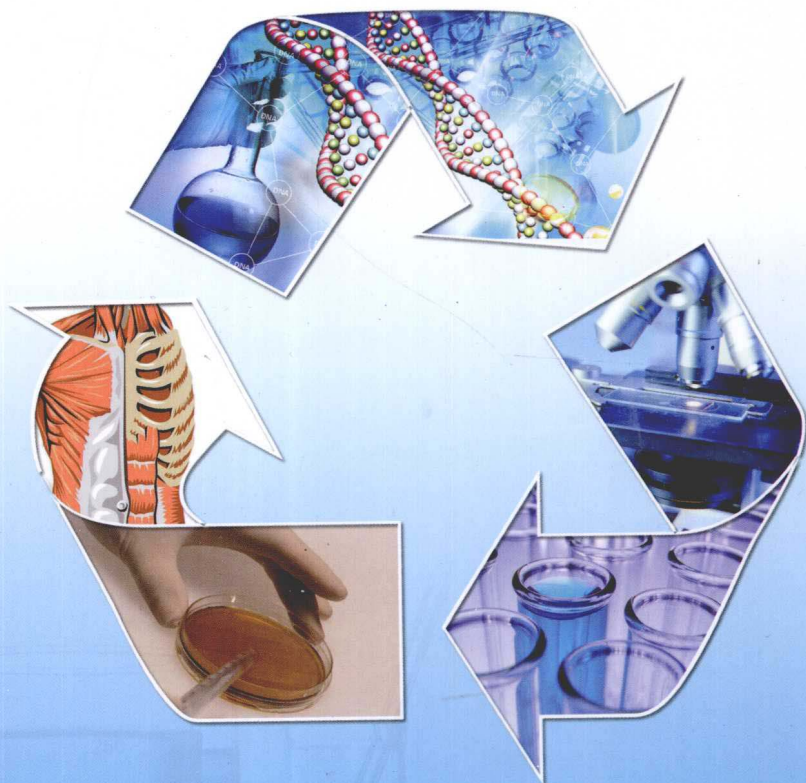


全国高等院校医学实验教学规划教材

医学免疫学与病原生物学实验

主编 刘伯阳



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学免疫学与病原生物学实验

主 编 刘伯阳
副主编 姚淑娟 官 杰
编 委 (按姓氏笔画排序)
王亚贤 李建蓉 吕丽艳
刘伯阳 吴艳敏 官 杰
张 威 姚淑娟 钱丽丽

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

本教材为促进医学教育的发展,适应教学改革的需要而编写。本教材包括4篇,共分12章,分别为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验。基本实验操作及常用仪器使用,使学生对免疫学和病原生物学实验有一个整体的了解;通过经典验证性实验对各项实验技术和方法进行全面系统的学习;综合性实验培养学生综合运用自己掌握的知识解决实际问题;创新性实验启发学生的创新性思维,养成独立思考,善于观察、全面分析和自主学习的习惯。本教材全面系统,详略得当,帮助学生建立一个全面的实验知识体系。

本书适合医药院校本科生使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学与病原生物学实验 / 刘伯阳主编. —北京:科学出版社,2011
(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-028934-6

I. 医… II. 刘… III. ①医药学:免疫学-实验-医学院校-教材 ②病原微生物-实验-医学院校-教材 IV. ①R392-33 ②R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第175214号

责任编辑:胡治国 周万灏 李国红 / 责任校对:刘亚琦

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>

骏志印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2011年1月第一次印刷 印张:16

印数:1—4 000 字数:431 000

定价:29.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《全国高等院校医学实验教学规划教材》

编委会

主 编 李 涛 张淑丽
副主编 刘伯阳 刘 婷 朱坤杰 郑立红 高 音 常东胜
潘洪明

编 者 (按姓氏笔画为序)

于英君	万永刚	马 勇	王 玉	王玉春	王玉阁
王立平	王贤雅	王晓东	王海君	王 斌	仇 惠
邓凤春	邓志会	卢长柱	田 华	冯 丽	吕丽艳
吕艳新	朱坤杰	朱金玲	刘 丹	刘文庆	刘伯阳
刘 富	刘 婷	刘楠楠	许 凤	纪 亮	孙石柱
孙东升	孙 革	孙 贺	孙翠云	杨旭芳	李公启
李志勇	李建蓉	李 涛	李鹏辉	肖 宇	吴艳敏
何 军	邹朝霞	沈 雷	宋 娟	张立平	张春庆
张 威	张淑丽	张淑玲	张 鹏	陈志伟	陈 萍
林 宇	林 岩	岳丽玲	金 莉	金海峰	周 波
郑立红	官 杰	赵丽晶	赵 堃	侯魁元	逢丽红
姚立杰	姚淑娟	柴 英	钱丽丽	徐 晋	高 音
高恒宇	高 涵	郭琳娜	梅庆步	常东胜	高 洁
潘洪明	薛茂强	薛俭雷			

总 序

随着生命科学及其实验技术的飞速发展,我国高等医学教育对医学实验教学提出了更高的要求,大量先进医学实验进入实验教学课程体系将成为必然趋势,要全面推进现代医学实验教学的发展,必须加大对实验项目、实验条件、实验教学体系的改革力度,这对培养适应 21 世纪医药卫生事业发展的高素质医学人才具有重要意义。建立以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的实验教学体系,与理论教学既联系又相对独立,实现基础与前沿、经典与现代的有机结合是我们编写本系列教材的初衷。依照此要求编写的医学基础课实验系列教材,其基本理念是面向学生未来,立足创新能力教育,体现科学本质,突出科学探索,反映当代科学成果。设计思路突出“整合”和“探究”两大特点。力图从实际应用性出发构建具有自身特点的实验教学内容,进而通过实验结果的分析与思辨,期望在医学基础课实验教学体系和方法上有所继承与突破。

本系列实验教材由长期工作在教学和科研一线的教师编写而成,他们来自齐齐哈尔医学院、大连医科大学、天津医科大学、哈尔滨医科大学、牡丹江医学院、绍兴文理学院医学院、厦门大学医学院、陕西中医学院、中央民族大学、吉林医药学院、佳木斯大学、黑龙江中医药大学、华中科技大学同济医学院、北华大学等,力求做到体系创新、理念创新及编写精美。

本系列实验教材将实验内容分为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验,并将实验报告融入到实验教材中。系列教材共七本,包括《人体解剖学实验》、《医学微形态学实验》、《医学机能实验学》、《医学细胞生物学与遗传学实验》、《医学免疫学与病原生物学实验》、《医学物理学实验》和《医学化学实验》。

本系列教材读者对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、口腔、影像、检验、护理、药学、精神医学等专业需求,涵盖医学生基础医学全部的实验教学内容。

由于水平和时间的限制,缺点和错误在所难免,恳请读者和同行专家提出宝贵意见。

李 涛 张淑丽

2010 年 8 月 19 日

前 言

实验教学是医学教育的重要内容,是培养创新型人才的重要环节,提高实验教学的质量有助于提高整体医学教育水平。实验教学完全依附于理论教学的传统模式不利于创新人才的培养,本书改变传统的以学科为单位的教学方法,将关系紧密的医学免疫学、医学微生物学和人体寄生虫学有机整合,重点培养学生的实践能力和创新精神,养成独立思考、善于观察、全面分析和自主学习的习惯。

许多人把实验教学简单化,认为实验教学只是为了验证理论和加深对理论的理解,从而降低了实验教学水平。实验教学是医学学生掌握实践能力和增强科研意识,学会探索和研究必不可少的课程,对今后的工作将产生深远的影响。我们在积累多年实验教学经验的基础上,结合当今先进的实验技术,对实验教学内容进行系统分类、整合,形成基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验、创新性实验四篇,内容实用,层次清晰,原理简明,使学生基础扎实,善于综合,兼顾创新。同时配有实验报告,方便学生使用,是广大医学院校五年制、七年制学生的理想教材。

本教材大胆创新,深度发掘,围绕培养跨世纪医学学生的目标,转变旧的传统观念,打破现行课程框架,建立以能力培养为主线,分层次、多模块、互相衔接的实验教学体系。同时,本教材按照国家建设实验教学示范中心的理念,打破现行课程框架,使实验教学与理论教学既有机的结合又相对独立,最大限度的拓宽学生的视野,构建一个由相关学科有机融合的实验平台。

我们希望本书的出版能够对实验教学改革有所促进,但由于水平有限,教材中难免有疏漏之处,殷切期望同行专家提出宝贵意见。

刘伯阳

2010年5月

目 录

第一篇 基本实验操作及常用仪器使用

第一章 医学免疫学基本操作及仪器使用	(1)
实验一 常用医学免疫学基本技术	(1)
实验二 常用医学免疫学设备简介	(4)
实验三 常用医学免疫学试剂的配制	(6)
第二章 医学微生物基本操作及仪器使用	(8)
实验一 微生物形态结构观察方法	(8)
实验二 病原微生物的分离培养技术	(12)
实验三 常用微生物仪器设备使用	(18)
实验四 微生物菌、毒种的保存	(24)
实验五 常用微生物试剂的配制	(25)
第三章 人体寄生虫学基本操作及仪器使用	(27)
实验一 常用寄生虫标本形态结构观察方法	(27)
实验二 常用寄生虫仪器设备使用	(28)
实验三 常用寄生虫试剂的配制	(28)

第二篇 经典验证性实验

第四章 医学免疫学经典验证性实验	(31)
实验一 非特异免疫细胞形态观察及功能检测	(31)
实验二 特异免疫细胞分离、亚群及功能检测	(37)
实验三 凝集反应	(49)
实验四 沉淀反应	(55)
实验五 免疫电泳技术	(61)
实验六 血清补体活性测定及相关实验	(66)
实验七 免疫标记技术	(68)
实验八 超敏反应	(75)
第五章 医学微生物经典验证性实验	(80)
实验一 消毒与灭菌实验	(80)
实验二 细菌的变异实验	(82)
实验三 细菌耐药性检测	(87)
实验四 球菌的检测	(90)
实验五 杆菌的检测	(97)
实验六 棒状杆菌的检测	(102)
实验七 分枝杆菌的检测	(105)
实验八 厌氧菌的检测	(108)
实验九 弧菌、弯曲菌和螺杆菌的检测	(115)

实验十 其他微生物的检测	(118)
实验十一 真菌与放线菌的检测	(119)
实验十二 病毒的培养	(122)
实验十三 病毒的检测	(128)
第六章 人体寄生虫学经典验证性实验	(132)
实验一 线虫	(132)
实验二 吸虫	(136)
实验三 绦虫	(140)
实验四 医学原虫	(145)
实验五 医学节肢动物	(153)
实验六 常用寄生虫检测技术	(157)

第三篇 综合性实验

第七章 医学免疫学综合性实验	(165)
实验一 多克隆及单克隆抗体制备	(165)
实验二 细胞因子的检测	(171)
实验三 流式细胞仪检测技术	(174)
第八章 医学微生物学综合性实验	(176)
实验一 人体正常菌群检测	(176)
实验二 常见临床标本检测	(178)
实验三 环境卫生学检测	(183)
实验四 病毒的快速检测	(186)
实验五 细菌 L 型检测	(188)
第九章 人体寄生虫学综合性实验	(190)
实验一 实验动物人工感染蛔虫及诊断	(190)
实验二 实验动物人工感染吸虫及诊断(以血吸虫为例)	(191)

第四篇 创新性实验

第十章 医学免疫学创新性实验	(193)
实验一 怎样进行 HLA 配型	(193)
实验二 怎样早期发现肿瘤	(194)
实验三 怎样检测自身免疫性疾病	(196)
实验四 怎样检测血液中药物浓度	(198)
第十一章 医学微生物学创新性实验	(200)
实验一 乙肝病毒感染的临床讨论	(200)
实验二 噬菌体突变率检测	(201)
实验三 分子微生物学实验	(203)
实验四 TORCH 感染的检测	(205)
第十二章 人体寄生虫学创新性实验	(207)
实验一 蛙体内裂头蚴感染的调查	(207)
实验二 淡水鱼中肝吸虫囊蚴感染的调查	(207)
实验三 大学生蠕形螨感染的调查	(208)
医学免疫学与病原生物学实验报告	(209)

第一篇 基本实验操作及常用 仪器使用

第一章 医学免疫学基本操作及仪器使用

实验一 常用医学免疫学基本技术

一、人血液标本的采集

【实验目的】 掌握静脉采血的方法,了解皮肤采血法。

【实验原理】 采集的血液标本主要分为全血、血浆及血清等。

1. 全血 保留血液的全部成分,由血细胞和血浆组成。抗凝全血主要用于免疫细胞的分离、血细胞检查等。

2. 血浆 抗凝全血离心除去血细胞后的成分,用于血浆生理性和病理性化学成分测定。

3. 血清 血液离体自然凝固后析出的液体部分,除纤维蛋白原等凝血因子在凝血时被消耗外,其他成分与血浆基本相同,更适用于大多数临床免疫学检验。

【实验器材】 真空采血管(普通血清管、枸橼酸钠或肝素抗凝管)、一次性双向采血针(常用7号)、持针器、止血带、三棱针、碘酊、消毒干棉签。

【实验方法】 血液标本的采集分为静脉采血法、皮肤毛细血管采血法和动脉采血法。动脉采血法由于其风险性较高,在临床上一般很少使用。真空负压静脉采集血标本是近年来采用的一种新静脉采血法,此法简便易行。

1. 静脉采血法 静脉采血时通常采用肘部静脉作为采血部位,如果肘部静脉不明显,还可用手背静脉或内踝静脉。婴幼儿由于肘部静脉较细和配合性差,可从股静脉采血或颈外静脉采血,但要准备充分,注意其风险性。以真空负压静脉采血法为例作介绍。

选择合适的静脉,在穿刺点上方约6cm处系止血带,消毒,嘱被采血者握拳使静脉充盈。把一次性双向采血针安在持针器上,手持持针器,进行静脉穿刺,一次性双向采血针一端刺入血管。穿刺成功后,将真空采血管沿持针器后端稍用力推入,使双向采血针另一端针头刺破真空采血管的管盖,进入真空采血管,血液顺着压力差流入真空采血管内。待血液停止流动后,固定针头不动,取下该真空采血管,将其余备好的真空采血管依次推入、取出,最后拔出穿刺针,用干棉签按压针眼处片刻,整理用物。

2. 皮肤采血法 皮肤采血法主要用于需血量微小的检查项目。所获得的末梢血不单纯是毛细血管血,实际是微动脉、微静脉和毛细血管的混合血,并依采血时挤压的力度不同含有少量细胞间质和细胞内液。

轻轻按摩患者的采血部位(左手无名指指尖内侧),使局部组织自然充血,用碘酒、乙醇消毒皮肤。干燥后,紧捏采血部位两侧,右手持一次性消毒采血针迅速刺入,深度以2~3mm为宜,稍加挤压血液自动流出。第一滴血液因混入组织液相对较多,多弃去不用。用微量吸管吸取血

液至要求的刻度(化学、免疫学检验用尼龙毛细管吸取),然后用无菌干棉球压住穿刺点以止血。皮肤采血多选择左手无名指指尖内侧或耳垂作为采血部位。

【注意事项】

(1) 血标本采集应规范操作。采血前患者应保持平静,一般应在清晨时间取血。

(2) 皮肤采血应避免有炎症、化脓、冻伤等皮肤损害部位采血。皮肤出汗应先用干棉球擦干,以免稀释血液。采血时,不要用力挤压皮肤,血液应自然流出。

二、动物血液标本的采集及动物处死方法

【实验目的】 掌握免疫学实验中常用动物的血液采集方法,了解常用实验动物的处死方法。

【实验器材】

1. 实验动物 小鼠、大鼠。

2. 器材 大鼠固定板、剪刀、手术刀、注射器、玻璃毛细管、血色素吸管、止血带。

3. 试剂 1%肝素生理盐水溶液、饱和草酸钾溶液、3.8%的枸橼酸钠生理盐水溶液。

【实验方法】

1. 大鼠与小鼠的采血方法

(1) 鼠尾采血:当所需血量很少时采用本法。固定动物并露出鼠尾,将尾部浸入45~50℃温水中数分钟,使尾静脉充血,擦干,再用乙醇溶液棉球消毒。剪掉尾尖(0.2~0.3cm),拭去第一滴血。然后用血色素吸管定量吸取尾血。采血完毕用干棉球压迫止血。也可不剪尾,用7~8号注射针头连上注射器直接刺破尾静脉采血。

(2) 眼眶静脉丛采血:当需用中等量的血液,而又避免动物死亡时采用本法。左手拇指及食指紧紧握住大鼠或小鼠颈部,压迫颈部两侧使眶后静脉丛充血,但用力要恰当,防止动物窒息死亡。右手持玻璃毛细管从右眼或左眼内眦部以45°角刺入,刺入深度小鼠2~3mm,大鼠4~5mm。若遇阻力稍后退调整角度后再刺入,如穿刺适当,血液能自然流入毛细管内。得到所需的血量后,即除去加于颈部的压力,拔出玻璃毛细管,用干棉球压迫止血。

(3) 断头采血:当需用较大的血液,而又不需继续保存动物生命时采用本法。左手握住动物,右手持剪刀,快速剪掉头颈部,倒立动物让血液滴入容器。需注意防止断毛落入容器中。

2. 大鼠和小鼠的处死方法

(1) 脊椎脱臼法:右手抓住鼠尾用力向后拉,同时左手拇指与食指用力向下按住鼠头。将脊髓与脑髓拉断,鼠便立刻死亡,这是对小鼠最常用的处死方法。

(2) 断头法:用剪刀在鼠颈部将鼠头剪掉,迅速将鼠身倒置放血,由于剪断脑脊髓和大量失血,会很快死亡。但易引起肺淤血,因此,重点观察肺部病变的实验,不宜采用此法。

(3) 击打法:右手抓住鼠尾,提起,用力摔击其头部,鼠痉挛后立即死亡;或小木锤用力击打鼠头部也可致死。

(4) 急性失血法:可采用鼠眼眶动脉和静脉急性大量失血方法使鼠立即死亡。左手拇指和食指尽量将鼠头部皮肤捏紧,使鼠眼球突出。右手持弯头小镊,在鼠右侧眼球根部将眼球摘去,并将鼠倒置,头向下,此时血液很快从眼眶内流出。

【注意事项】

(1) 实验动物一次采血量过多或采血过于频繁,都可影响动物健康,造成贫血甚至死亡。

(2) 采血方法的选择,主要取决于实验的目的和所需血量的多少,所需血量较少时可刺破组

织取毛细血管的血,当需血量较多时可做静脉采血,若需反复多次静脉采血时,应自远心端开始。

(3) 若需抗凝全血,在注射器或试管内需预先加入抗凝剂,常用的抗凝剂有草酸钾溶液、肝素生理盐水溶液和枸橼酸钠溶液。

【思考题】

- (1) 皮肤采血法为什么多选择左手无名指?
- (2) 使用真空采血管有哪些优点和用途?
- (3) 常用的大鼠与小鼠的采血方法有哪些?

三、血细胞分离技术

(一) 红细胞分离技术

【实验目的】 掌握免疫学实验中红细胞分离方法。

【实验器材】

- (1) 肝素生理盐水溶液等抗凝剂。
- (2) 3%明胶液:取明胶 3g,溶于 0.9%灭菌盐水 100ml 中,114.3℃灭菌 10 分钟,冷却后 4℃冰箱保存。临用时,37℃预热 10 分钟。
- (3) 阿氏液。

【实验方法】

1. **采血抗凝** 采血抗凝即为红细胞。由于红细胞与白细胞的比例相差悬殊,一般白细胞混杂在其中,忽略不计。

2. **细胞处理** 根据红细胞的用途,可做进一步的处理。如计算红细胞,可直接稀释计数。如需做补体结合反应或其他溶红细胞反应,则需将红细胞进行充分的清洗,以除去附着在红细胞膜表面的血浆。一般用等渗的稀释液连续清洗,2000 转/分离心 10 分钟,重复 3~4 次。

3. **储藏** 如需储藏备用,则以阿氏液做抗凝剂采血,混匀后置于 4℃冰箱保存,可保存 2 周,其活性尚可。

(二) 单核细胞分离技术——铁粉吸附法

【实验目的】 掌握铁粉吸附分离单核细胞的方法。

【实验器材】

1. **器材** 铁粉或羰基铁粉:99%的纯度,颗粒小于 60 μm ;强磁铁(马蹄形);一块小棒状磁铁(约 1cm 长);毛细吸管;离心机等。

2. **试剂** 生理盐水、Hank's 液。

【实验方法】

(1) 称取一定量的铁粉,一般为 10g,用 100ml 生理盐水洗涤 4 次,去除任何可溶性有毒物质。在倒去盐水时,用强磁铁吸住铁粉。

(2) 用 50ml 生理盐水混悬铁粉,摇匀后,分装于 10 个瓶中,包扎瓶口,121℃灭菌 20 分钟,拿出后立即轻轻摇匀,防止铁粉结块,储藏备用。

(3) 临用前,倒去瓶中的生理盐水,加入适量的单个核细胞悬液(3~5ml,细胞总数为 8×10^7 个/瓶)。37℃温育 45 分钟,中间不时晃动,使铁粉悬浮起来。

(4) 加入一块小磁铁棒于瓶中,让其吸住铁粉及附着在铁粉上的细胞。

(5) 倒出悬液,此悬液主要是淋巴细胞,离心、收集。

(6) 在铁粉瓶内倒入一定量的 Hank's 液,用力振摇后,以强磁铁吸附,几分钟后,倒出液体。

(7) 2000 转/分离心液体,管底即为单核细胞。

(三) 单核细胞分离技术——玻璃板吸附法

【实验目的】 掌握玻璃板吸附分离单核细胞的方法。

【实验器材】

1. 器材 无菌玻璃平皿、温箱、毛细吸管等。

2. 试剂 Hank's 液。

【操作方法】 将分离的单个核细胞倾于无菌洁净的玻璃平皿内,置于 37℃ 30~40 分钟,用毛细吸管轻轻吸取悬液,即为淋巴细胞。用适量的 Hank's 液冲洗平皿,收获即为单核细胞悬液。

(钱丽丽)

实验二 常用医学免疫学设备简介

一、荧光显微镜的结构与使用

【构造及原理】

1. 荧光显微镜光源 能发射丰富的紫外光和紫蓝光,常用 150~200W 高压汞灯。

2. 滤光片

(1) 激发滤光片装于光源与聚光器之间,可选择性使紫外光及紫蓝光通过,而激发荧光素发出荧光。

(2) 吸收滤光片装于物镜与目镜之间,可吸收紫外光及紫蓝光,仅让荧光通过,以便观察标本和保护眼睛。

【使用方法】

(1) 将荧光显微镜置暗室,开启光源,待光源稳定并达到一定亮度(5~10 分钟)后,对准光轴。

(2) 装好配对的激发滤光片和吸收滤光片后,再进行观察。其余操作同普通显微镜。

【注意事项】

(1) 如用高压汞灯做光源,使用时一经开启不宜中断,断电后需待汞灯冷却后(约 15 分钟)方能再启动。

(2) 观察标本的时间不宜太长,因标本在高压汞灯下照射超过 3 分钟,即有荧光减弱现象。

二、微量可调移液器

【构造及原理】 在免疫学实验中,各种试剂及样品的使用量是很小的,有时甚至只有零点几微升,所以一般的加样器具达不到如此的精度。微量加样是通过微量移液器来实现的。移液器一般有 1000~5000 μ l,100~1000 μ l,10~200 μ l,1~20 μ l,0.1~2 μ l 等多种规格。

【使用方法】 将吸嘴套在移液器上,以右手拇指轻按其按钮使达第一阻力位,将吸嘴插入液面下 2~3mm,放松拇指,被吸液体即进入吸嘴,取出将液体放于另一容器中,轻按按钮使达第二阻力位,停留数秒后即可,退掉吸嘴。

三、比浊仪

【构造及原理】 免疫浊度测定是免疫学定量检测的一种常用方法,其基本原理是:抗原抗体在特殊缓冲液中快速形成抗原抗体复合物,使反应液出现浊度。当反应液中保持抗体过量时,形成的复合物随抗原量增加而增加,反应液的浊度也随之增加,与一系列的标准品对照,即可计算出受检物的含量。

【临床应用】 自动散射比浊仪的临床应用包括:免疫球蛋白测定,如 IgG、IgA、IgM、IgD、IgE 的检测;补体单个成分测定,如 C3、C4、B 因子的检测;类风湿因子的测定;C 反应蛋白、载脂蛋白、尿微量蛋白检测;体液(主要血浆)中小分子药物浓度的检测等。

四、全自动酶标仪

【构造及原理】 酶标比色仪(即酶标仪)是 ELISA 定量检测的主要仪器,其原理和分光光度计相似,均利用朗伯-比尔定律,当特定波长的光源通过有色溶液时,其强度会被溶液吸收,再通过“检光仪”测定出溶液的吸光度值,通过计算阴性对照和阳性对照的吸光度值,来判断结果。当光通过被检测物,前后的能量差异即是被检测物吸收掉的能量。在特定波长下,同一种被检测物的浓度与被吸收的能量成定量关系,这是酶标仪定量检测的基础。酶标仪检测单位用 OD 值表示,OD 是 optical density(光密度)的缩写,表示被检测物吸收掉的光密度, $OD = \log(1/trans)$,其中 trans 为检测物的透光值。

酶标仪测定每一种物质都有其特定的波长,在此波长下,此物质能够吸收最多的光能量。如果选择其他的波长段,就会造成检测结果不准确。因此,在测定检测物时,选择特定的波长进行检测,称为测量波长。但是每一种物质对光能量还存在一定的非特异性吸收,为了消除这种非特异性吸收效应,再选取一个参照波长,以消除这个不准确性。在参照波长下,检测物光的吸收最小。检测波长和参照波长的吸光值之差可以消除非特异性吸收。

全自动酶标仪(图 1-2-1)的所有操作都是自动化的和可编程的,如可自动阅读标本条形码、稀释样本、试剂分类、孵化(从室温到 45℃,在两个独立的孵育器里,可持续摇动或不持续摇动)、洗涤、读数等,可帮助使用者同时完成多项数据分析和打印输出。

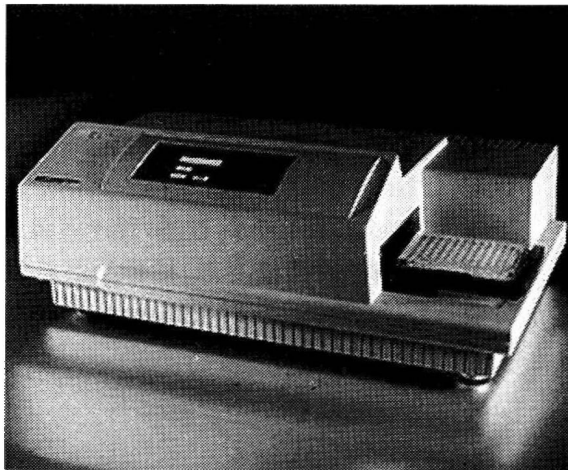


图 1-2-1 全自动酶标仪

【临床应用】 全自动酶标仪广泛地应用在临床检验、生物学研究、农业科学、食品和环境科学中。

实验三 常用医学免疫学试剂的配制

一、常用试剂溶液的配制

1. 阿氏(Alsever)血液保存液

葡萄糖	2.05g
枸橼酸钠·5H ₂ O	0.80g
枸橼酸·H ₂ O	0.55g
NaCl	0.42g

加蒸馏水至 100ml, 溶解后过滤, 分装, 115℃ 灭菌 10 分钟, 4℃ 保存。血液与阿氏液混合比例为 1:1~1:2。

2. Hank's 液

A 液: NaCl	80g
KCl	4g
CaCl ₂	1.4g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2g
双蒸水	450ml
B 液: Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.52g
KH ₂ PO ₄	0.6g
葡萄糖	10g
双蒸水	450ml
C 液: 1% 酚红溶液	16ml

将 B 液缓慢加入 A 液中, 边加边搅匀。然后加入 C 液, 补足双蒸水至 1000ml。此为 10 倍浓缩的 Hank's 母液。加入氯仿 2ml 防腐, 置于 4℃ 备用。

应用液的制备: 母液 1 份加双蒸水 9 份, 混匀, 分装, 115℃ 灭菌 10 分钟。置于室温或 4℃ 保存。临用前用 NaHCO₃ 调 pH 至 7.2~7.4。

注意: 所用试剂要纯; 试剂要按配方顺序逐个溶解后再依次加入, 以免起化学反应产生沉淀; 高压灭菌不要超过 115℃。

3. 1% 酚红溶液 取 1g 酚红置于乳钵中, 加入少量 1mol/L NaOH 溶液研磨, 将溶解溶液移至 100ml 量瓶中。分批加入 1mol/L NaOH 溶液研磨, 直至酚红溶解, 所得染液都移入量瓶中, NaOH 溶液的用量不能超过 7ml。加双蒸水至 100ml, 过滤, 置于室温或 4℃ 保存。

4. 肝素抗凝剂 取肝素用 Hank's 液(或其他溶剂)稀释至终浓度为 250U/ml, 112℃ 灭菌 15 分钟(或 115℃ 10 分钟)后分装, -20℃ 保存。用时按每毫升血液加 0.1~0.2ml 肝素抗凝, 或按实验要求浓度配制使用。

5. 0.5% 台盼蓝溶液

台盼蓝	1.0g
双蒸水	100ml

将台盼蓝加入双蒸水中充分溶解(配制方法同瑞氏染液), 过滤去沉淀, 置于 4℃ 或室温保存。临用时用 18g/L NaCl 溶液 1:1 稀释后即可应用。

二、常用免疫组织化学技术试剂的配制

1. 缓冲液

(1) 0.01mol/LPBS液(pH7.2)

NaCl	8g
Na ₂ HPO ₄	1.15g
KH ₂ PO ₄	0.2g
加双蒸水至	1000ml

(2) 0.05mol/LTBS液(pH7.4)

Tris(三羟甲基胺基甲烷)	12.1g
NaCl	17.5g
加双蒸水至	1500ml

在搅拌下加浓 HCl 至 pH7.4,再加双蒸水至 2000ml。

2. 显色液

(1) DAB(Diaminobenzidine)显色液

DAB(3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐)	50mg
0.05mol/LTB(或 0.01mol/LPBS)	100ml
30% H ₂ O ₂ 溶液	30~40μl

配制方法:先以少量 0.05mol/LTB液(或 0.01mol/LPBS液)溶解 DAB,充分溶解后加入剩余的 TB 或 PBS,摇匀后(避光)过滤,显色前加入 30% H₂O₂溶液,宁少勿多,便于掌握反应过程。阳性为棕黄色颗粒。

DAB 有致癌作用,操作时应格外小心,避免直接与皮肤接触,用后的器皿应充分冲洗,用后的 DAB 液不应冲入下水道,应集中深埋或清洁液处理后弃之。

(2) AEC(3-氨基-9-乙基卡巴唑)显色液

AEC(3-氨基-9-乙基卡巴唑)	20mg
二甲酰胺(DMF)	2.5ml
0.05mol/L 乙酸缓冲液(pH5.5)	50ml
30% H ₂ O ₂ 溶液	25μl

配制方法:先将 AEC 溶于 DMF 中,再加入乙酸缓冲液充分混匀。临显色前加入 30% H₂O₂溶液。镜下控制显色时间,阳性为深红色颗粒。

(钱丽丽)

第二章 医学微生物基本操作及仪器使用

实验一 微生物形态结构观察方法

一、不染色标本观察

【实验目的】 了解细菌标本不染色检查方法。

【实验原理】 许多细菌标本不经染色直接镜检,可观察生活状态下的细菌形态及其运动情况。有的杆菌、弧菌有鞭毛,有鞭毛的细菌具有动力,常能朝着一定方向移动,用适当的方法可在普通光学显微镜下观察。直接检查细菌动力是鉴别细菌的方法之一。

【实验器材】

1. 菌种 葡萄球菌、变形杆菌肉汤培养物。

2. 仪器 普通光学显微镜。

3. 其他材料 酒精灯、接种环、镊子、载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林、香柏油、擦镜纸等。

【实验方法】 细菌标本不染色检查的方法有悬滴法和压滴法。

1. 悬滴法

(1) 取洁净凹玻片 1 张,在凹窝四周涂上少许凡士林。

(2) 取洁净盖玻片 1 张,用接种环分别取葡萄球菌或变形杆菌液体培养物 2~3 环加在盖玻片中央。

(3) 将凹玻片的凹窝中央对正菌液处合于盖玻片上。

(4) 迅速翻转凹玻片,用小镊子轻压,使盖玻片与凹窝边缘黏紧封闭,以防水分蒸发。

(5) 将凹玻片置显微镜载物台上,调低显微镜的聚光器或缩小光圈,以减少入光亮,使背景较暗而易于观察。

(6) 先在低倍镜下找到悬滴,然后换用高倍镜观察。镜下可见有鞭毛的变形杆菌运动活泼,并可向不同方向迅速运动。无鞭毛的葡萄球菌只在一定范围内作位移不大的颤动,这是细菌受水分子撞击而引起的分子运动,即布朗运动。悬滴标本,如图 2-1-1 所示。

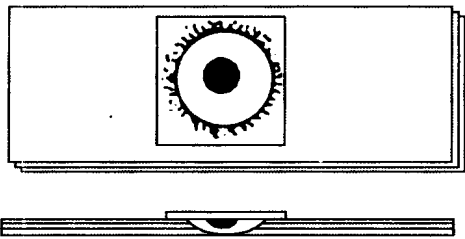


图 2-1-1 悬滴标本

2. 压滴法

(1) 取洁净载玻片 1 张。

(2) 用接种环分别取葡萄球菌或变形杆菌液体培养物 2~3 环加于载玻片中央。

(3) 用小镊子取 1 张盖玻片轻轻覆盖在载玻片的菌液上。放置盖玻片时,应先将盖玻片的一端接触载玻片,然后缓慢放下,以免菌液中产生气泡。

(4) 在低倍镜下对光找到细菌所在部位,然后用高

倍镜观察细菌运动。

【实验结果】 变形杆菌有明显的定向运动,葡萄球菌只有布朗运动。

【注意事项】

(1) 镜检时需适当降低聚光器或缩小光圈,视野不宜过亮。

(2) 需注意区别细菌的真正运动和分子运动,前者是有方向性的位置移动,而后者则只在原地颤动。

二、染色标本的观察

细菌个体微小,呈半透明状。未经染色的细菌,在光学显微镜下只能观察到细菌的大致形态和大小。经过染色后的细菌,不但能清楚地观察到细菌的各种形态,还可对细菌进行初步鉴别。细菌涂片标本的染色方法可分为单染色法和复染色法两种。单染色法是指只用一种染料进行染色的方法,可清楚观察细菌的形态、大小,但对细菌无鉴别价值;复染色法是用两种或两种以上染料进行染色的方法,对细菌有辅助鉴别意义,故亦称鉴别染色法。常用的复染色法有革兰染色法、抗酸染色法等。

(一) 单染色法

【实验目的】

- (1) 学习掌握微生物涂片、染色的基本技术。
- (2) 掌握细菌的单染色方法及无菌操作技术。

【实验原理】 用于细菌涂片标本染色的染料多为苯的衍生物。其带色基团与染料分子中不饱和双键的存在有关,含双键的部位化学性质极不稳定,易吸收光线而显色。细菌的等电点较低,为 pI 2~5。在中性、碱性或弱酸性溶液中,整个菌体带负电荷,易被碱性染料着色。碱性染料是指电离后其显色离子带正电荷的染料,如用于细菌等微生物涂片标本染色的甲紫、亚甲蓝、碱性复红等均属碱性苯胺类染料,对细菌的核蛋白或细胞壁成分有较强的亲和力。

【实验材料】

1. 细菌 葡萄球菌液体培养基或琼脂斜面 18~24 小时培养物,大肠埃希菌液体培养基或琼脂斜面 18~24 小时培养物。
2. 染液 甲紫染液、稀释复红染液或碱性亚甲蓝染液。
3. 其他 酒精灯、接种环、生理盐水、载玻片、香柏油、二甲苯、擦镜纸等。

【实验方法】

1. 细菌涂片的制作

(1) 涂片:取洁净载玻片 1 张,用记号笔将其划分为 2 格,在每 1 小格中央放置 1 接种环生理盐水。左手握菌种管,右手握笔样持接种环,先在酒精灯火焰上烧灼接种环。冷却后,挑取葡萄球菌、大肠埃希菌斜面培养物少许,在生理盐水中磨匀,在第 1 小格中放置葡萄球菌,第 2 小格中放置大肠埃希菌,分别涂成直径约 1cm 大小区域。若为液体培养基,可直接涂布于载玻片上,不必加生理盐水。

(2) 干燥:涂片最好在室温下自然干燥,或将标本片接种面向上,置酒精灯火焰上约 15cm 处慢慢烘干,切不可直接放在火焰上烤干。

(3) 固定:将干燥后的标本片匀速通过酒精灯火焰来回 3 次,这样既可以杀菌,又能将细菌蛋白质固定在载玻片上,以免载玻片上的细菌在染色过程中被水冲洗掉,还可增强细菌的着色性。

2. 染色 滴加甲紫染液、稀释复红染液或碱性亚甲蓝染液的任一种 1~2 滴,使染液盖满细菌涂膜,约 1 分钟后,用细小水流洗去染液,甩掉涂片上的水滴。按上述干燥方法干燥。

3. 镜检 在染片涂膜中央处滴加一滴香柏油,在油浸镜下观察。

【实验结果】 用甲紫染液染色的葡萄球菌、大肠埃希菌呈紫色;用稀释复红染液染色则呈红色;用碱性亚甲蓝染液染色则呈现蓝色。

【注意事项】 取菌量要少,涂片要薄而均匀,流水冲洗载玻片一端,不要直接冲洗涂布标本处。水流轻柔。