

病原生物学与免疫 学综合实验

江汉大学医学与生命科学学院

病原生物学教研室

医学免疫学教研室

病原生物学与免疫学

综合实验

主编 宋文剑
编者 林莉 许楚娟 黄丽霞 孔争 胡松
程喻力 刘腊珍 张慧 张泽华 刘锴

2005 年 12 月

病原生物学与免疫学综合实验指导

Synthetic experiment of pathogenic biology and immunology

前言

病原生物学是研究病原生物的形态、结构、生命活动规律以及与机体相互作用关系的一门学科，主要包括医学微生物学和人体寄生虫学。医学微生物学主要研究病原微生物与人类疾病的关系问题，包括研究病原微生物的生命特征或生物学特性，致病性与致病机理、感染与免疫、特异性诊断和防治等问题；人体寄生虫学是研究人体寄生虫的形态结构、生活史、致病机制、实验诊断、流行规律与防治措施的一门科学；免疫学是研究机体免疫系统的组成、结构与功能、免疫应答的发生机制以及免疫学在疾病诊断与防治中应用的一门科学。以往，上述三门课分别设有实验课，按本科教学大纲共需实验学时 52-78 学时，其中实验内容有少量重复现象。

本实验教材建立在上述三门学科理论及实验技术的基础上，以培养学生科学地创造性思维为出发点，强化基本技能训练的同时，加强了学科知识的横向联系，并为学生设计性、探索性实验提供了思路 and 空间。在编写过程中，力求条理清晰，简明实用，以病原生物感染的检查为主线，从常见的感染部位出发，将医学微生物学、医学寄生虫学及医学免疫学实验优化整合，剔除陈旧重复内容，融入学科技术发展新知识，并有机地将各学科知识贯穿于综合性实验之中，使之成为以上三门学科实验指导及重要辅助教材。

全书包括两大部分，15 个综合性实验项目，建议学时为 48-54 实验学时（不包括设计性实验所占用的课外时间），适用于本科临床医学专业和检验专业的学生使用。

(宋文剑)

目录

实验室基本操作方法及注意事项.....	3
实验一 病原生物的基本形态结构观察法及细菌的培养鉴定.....	6
实验二 病原生物的基本形态结构观察及理化因素对它们的影响.....	11
实验三 肠道病原的检查 I 及抗原的制备.....	15
实验四 肠道病原的检查 II	23
实验五 组织内病原 I	31
实验六 组织内病原 II 及血液内病原.....	35
实验七 动物细胞免疫功能检测.....	41
实验八 其他病原生物形态学检查.....	44
实验九 医学节肢动物标本观察.....	46
实验十 血吸虫病的诊断.....	51
实验十一 质粒 DNA 的小量制备.....	57
实验十二 核酸的琼脂糖凝胶电泳及限制型内切酶消化.....	62
实验十三 试管凝集反应（肥达反应）	66
实验十四 抗原抗体特异性的检测.....	69
实验十五 设计性实验.....	72
参考文献	
附图 1 四种疟原虫形态	
附图 2 四种疟原虫形态鉴别要点	

第一部分

实验室基本操作方法及注意事项

The Rules of Pathogenic Biology and Immunology Lab

一. 实验要求

1. 实验前必须掌握与实验相关的医学微生物学、医学寄生虫学及医学免疫学基础理论。做好预习，明确实验目的与实验内容。

2. 对于设计性实验，在老师的指导下，注意发挥自身潜能，勤于思考，灵活掌握所学知识。

3. 在实验过程中做到三严：严肃、严格、严谨。如实记录实验结果，按规定完成实验报告。对于失败实验结果要分析原因，必要时重复实验。

4. 严格遵守实验室规则。

二. 实验室规则

1. 进实验室穿工作服，离开时脱下，反折。

2. 除必需教材、文具外，其他物品禁止带入实验室。

3. 按规定位置就坐。保持实验室安静，不得随意走动、进出。

4. 实验室内禁止饮食、吸烟。谨防经口感染病原。

5. 实验操作应严格按实验指导和教师的要求进行。

6. 实验过程中若不慎将传染性标本污染桌面、手及其他物品时，应立即报告老师紧急处理，不得擅自处理。常见处理如下：

(1) 皮肤破伤：先除尽异物，用无菌生理盐水洗净后，涂以 2%红汞或 2%碘酒，必要时进行包扎。

(2) 灼伤：涂以凡士林油，5%鞣酸或 2%苦味酸。

(3) 化学药品腐蚀伤：若为强酸，先用大量清水冲洗，再以 5%碳酸氢钠或氢氧化铵溶液洗涤中和之；强碱腐蚀伤，则先以大量清水冲洗后，再用 5%醋酸或 5%硼酸溶液洗涤中和之。若受伤部位是眼部，经过上述步骤处理后，最后滴入橄榄油或液体石蜡 1、2 滴，滋润之。

(4) 吸入病菌菌液：应立即吐入盛有消毒液的容器内消毒，并用 1: 1000 高锰酸钾漱口；根据菌类不同，必要时需服药预防。

(5) 细菌污染衣物：应立即脱下，放入 3%来苏尔或 3%氯胺液内浸泡半小时，或仔细包好经高压蒸汽消毒后清洗。

(6) 菌液污染桌面：倾倒适量 2-3%来苏尔或 0.5% 84 消毒液于污染处，浸泡半小时后抹去。若手上沾有活菌，应浸泡于上述消毒液 10-20 分钟后，再以肥皂水冲刷之。

7. 看示教时，未经允许，不得移动显微镜推进尺。

8. 爱护实验室器材及设备，认真填写实验设备使用纪录。不慎发生损坏时，应立即报告老师，照章赔偿。

9. 实验结束后, 凡使用过的实验器材必须放在指定地点, 如吸过菌液的吸管, 毛细吸管要投入含有 2-3%来苏尔或 0.1%新洁尔灭的玻璃筒中, 或置“待消毒”处, 不得放在桌上, 亦不可冲洗于水槽内。用过的玻片也应放于含有消毒液的容器内。需要培养的实验材料集中后放入温箱中培养。

10. 实验完毕, 应及时清理实验室(包括桌面, 地面, 试验用具等), 值日生打扫室内卫生, 管好门窗、水电。离开实验室前, 将双手在消毒液内浸泡 3-5 分钟, 再用清水洗净, 方可离室。

三. 显微镜的使用

(一) 普通光学显微镜的基本结构

光学显微镜的基本结构包括光学和机械两个部分。光学部分主要有目镜、物镜、镜筒、内置光源(或反光镜)、光阑等; 机械部分包括镜座、镜臂、调节螺栓、载物台、夹持器、转换器、粗调焦手轮及细调焦手轮等。(见图 1-1)



图 1-1 光学显微镜的基本结构示意图

(二) 显微镜(油镜的使用)

显微镜的物镜一般有低倍镜、高倍镜及油镜。病原生物学实验中最常用者为油镜。

1. 油镜的原理 使用油镜时需在玻片上滴加香柏油。由于从标本玻片上透过的光线, 因介质密度不同, 部分光线发生折射散失, 使射入物镜光线减少(高倍镜孔径较大, 影响不显著), 因油镜的孔径较小, 进入的光线则不够, 致使物象显现不清。当在油镜与标本片之间加香柏油后, 香柏油折射率($n=1.515$)和玻璃的折射率($n=1.52$), 因此可增加进入透镜的光线, 使视野亮度加强。

2. 在油镜头上常有下列几种标记: ①放大倍数是 $90\times$ 或 $100\times$; 若镜筒的长度不变, 显微镜的放大倍数=目镜倍数乘以物镜的倍数。②镜头下缘有一白色线圈或黑色线圈; ③刻有“油”或外文“HI”、“Oil”、“Oil”等字样。④油镜头的长度大于低倍镜和高倍镜。

3. 使用方法

① 对光 转动转换器, 将低倍镜镜头(4 倍、10 倍)转至载物台中央透光孔位置, 打开透光光阑, 对光, 直至目镜中出现光线最明亮、最均匀的视场为止。显微镜的光源可分为内置光源和外置照明。内置光源: 接通电源, 按下底座的开关, 电源打开即可。外置光源: 将光圈放到最大位置, 在用眼睛观察目镜的同时, 转动反光镜使其朝向光源(自然光或灯光),

使视野中的光线最明、均匀。如靠近光源，可用平面反光镜，如距光源较远，可用凹面反光镜。根据所观察的标本，升降集光器和缩放光圈，以获最佳光度。一般染色标本用油镜检查时，光度宜强，可将光圈开足，集光器上升至与载物台相平；检查未染色标本用低倍镜或高倍镜观察时，应适当缩小光圈，下降集光器，使光度减弱。

② 装片 将标本片放置在工作台的夹持器中，用夹持起移动标本片至工作台开口中心（透光孔处）。

③ 调节焦距 通过旋转粗调焦手轮，将载物台升到最高限定位置（制片不能触到物镜），此时已准备好调焦。使用 4 倍或 10 倍物镜，在目视目镜的同时，旋转粗调手轮，使工作台缓慢下降，在目视目镜中观察到的清晰的图像时，再调节光阑聚光镜孔，选择与物镜相匹配的孔，调节微调焦手轮，使视野中的图像最清晰。用低倍镜找出标本的范围，然后提高镜筒，在标本的待检部位加一小滴香柏油，慢慢将油镜头浸于油中，但勿接触玻片。然后，自目镜处一面观察，一面微转动粗调节器，使镜筒徐徐上升，待看到模糊物象时，改用细调节器调至物象清晰。如果是滴片标本，先滴一滴标本在玻片上，轻轻盖上盖玻片。加盖玻片时，先将盖玻片的一边与在玻片上的水滴边缘接触，然后自一侧轻轻放下，先在低倍镜下观察，然后在高倍镜下观察，通过改变光圈的大小或转动细调焦手轮。

④ 还镜 观察完毕把镜头和载玻片上的油用 3%乙醚擦净。将低倍镜转成八字型，降下聚光器，转动粗调节器，使镜台下移，以免接物镜与集光器相碰受损。罩上镜套，放回原处。

（宋文剑）

第二部分 实验项目

实验一 病原生物的基本形态结构观察法及细菌的培养鉴定

EXPERIMENT ONE

Basic Morphological Examination of Pathogenic Biology and the Cultivation and the Identification of Bacteria

【实验目的、要求】

掌握细菌涂片标本的制作、革兰氏染色法及口腔菌群的检测；熟悉细菌基础培养基的制备；高压蒸汽灭菌器的使用方法及注意事项；了解微生物的分布及其与人类的关系。

【实验内容】

- 1、齿垢涂片的革兰氏染色法。
- 2、细菌基础培养基的制备。
- 3、高压蒸汽灭菌器的使用。

【实验学时】 3 学时

一、革兰氏染色法

【原理及方法】

微生物的细胞小且透明，在普通光学显微镜下不易识别，必须对它们进行染色，使经染色后的菌体与背景形成明显的色差，从而能更清楚地观察到其形态和结构。因此，微生物染色技术是观察微生物形态结构的重要手段。（注：任何一项技术都不是完美无缺的。染色后的微生物标本是死的，在染色过程中微生物的形态与结构均会发生一些变化，不能完全代表其生活细胞的真实情况，染色观察时必须注意。）

细菌的等电点较低，pH 值大约在 2—5 之间，故在中性、碱性或弱酸性溶液中，菌体蛋白质电离后带阴电荷；而碱性染料电离时染料离子带阳电。因此，带阴电的细菌常和带阳电的碱性染料进行结合。所以，在细菌学上常用碱性染料进行染色。

影响染色的其它因素，还有菌体细胞的构造和其外膜的通透性，如细胞膜的通透性、膜孔的大小和细胞结构完整与否，在染色上都起一定作用。此外，培养基的组成、菌龄、染色液中的电介质含量和 pH、温度、药物的作用等，也都能影响细菌的染色。

微生物染色方法一般分为单染色法和复染色法两种。前者用一种染料使微生物染色，但不能鉴别微生物。复染色法是用两种或两种以上染料，有协助鉴别微生物的作用。故亦称鉴别染色法。常用的复染色法有革兰氏染色法和抗酸性染色法，此外还有鉴别细胞各部分结构的（如芽胞、鞭毛、细胞核等）特殊染色法。微生物检验中常用的是单染色法和革兰氏染色法。

革兰氏染色反应是细菌分类和鉴定的重要性状。它是 1884 年由丹麦医师 Gram 创立的。革兰氏染色法（Gram stain）不仅能观察到细菌的形态，而且还可将所有细菌区分为两大类：染色反应呈蓝紫色的称为革兰氏阳性细菌，用 G⁺表示；染色反应呈红色（复染颜色）的称为革兰氏阴性细菌，用 G⁻表示。细菌对革兰氏染色的不同反应，是由于它们细胞壁的成分和结构不同而造成的。革兰氏阳性细菌的细胞壁主要是由肽聚糖形成的网状结构组成的，在染色过程中，当用乙醇处理时，由于脱水而引起网状结构中的孔径变小，通透性降低，使结

晶紫-碘复合物被保留在细胞内而不易脱色，因此，呈现蓝紫色；革兰氏阴性细菌的细胞壁中肽聚糖含量低，而脂类物质含量高，当用乙醇处理时，脂类物质溶解，细胞壁的通透性增加，使结晶紫-碘复合物易被乙醇抽出而脱色，然后又被染上了复染液（复红）的颜色，因此呈现红色。

革兰氏染色需用四种不同的溶液：碱性染料（basic dye）初染液；媒染剂（mordant）；脱色剂（decolorising agent）和复染液（counterstain）。用于革兰氏染色的初染液一般是碱性染料初染液结晶紫（crystal violet）。媒染剂的作用是增加染料和细胞之间的亲和性或附着力，即以某种方式帮助染料固定在细胞上，使不易脱落，碘（iodine）是常用的媒染剂。脱色剂是将被染色的细胞进行脱色，不同类型的细胞脱色反应不同，有的能被脱色，有的则不能，脱色剂常用 95% 的酒精（ethanol）。复染液也是一种碱性染料，其颜色不同于初染液，复染的目的是使被脱色的细胞染上不同于初染液的颜色，而未被脱色的细胞仍然保持初染的颜色，而且将细胞区分成 G+ 和 G- 两大类群，常用的复染液为稀释的石炭酸复红液。

【试剂与器材】

1. 器材：牙签、显微镜、载玻片、酒精灯、染色缸等

2. 染色液：革兰氏染色液一套（结晶紫染色液、碘液、95%乙醇、稀释石炭酸复红液）
染色的基本程序如下：

制片→干燥→固定→初染→媒染→脱色→复染→镜检。

（一）细菌标本片的制作

1. 涂片

在干净的载玻片上滴 1 滴蒸馏水，用牙签挑取牙垢少许，置载玻片的水滴中，与水混合做成悬液并涂成直径约 1 厘米的薄层。

2. 干燥

涂片最好在室温下使其自然干燥，有时为了使之干得更快些，可将标本面向上，手持载玻片一端的两侧，小心地在酒精灯上高处微微加热，使水分蒸发，但切勿紧靠火焰或加热时间过长，以防标本烤枯而变形。

3. 固定

标本干燥后即进行固定，固定的目的有三个：

- 1）杀死微生物，固定细胞结构。
- 2）保证菌体能更牢的粘附在载玻片上，防止标本被水冲洗掉。
- 3）改变染料对细胞的通透性，因为死的原生质比活的原生质易于染色。

固定常常利用高温，手执载玻片的一端（涂有标本的远端），标本向上，在酒精灯火焰外层尽快的来回通过 3—4 次，共约 2—3 秒钟，并不时以载玻片背面加热触及皮肤，不觉过烫为宜（不超过 60℃），放置待冷后，进行染色。

（二）染色

- （1）初染 加结晶紫 1 滴，约 1 分钟，水洗。
- （2）媒染 滴加碘液冲去残水，并覆盖约 1 分钟，水洗。
- （3）脱色 将载玻片上的水甩净，并衬以白背景，用 95%酒精滴洗至流出酒精无色或稍呈淡紫色时为止，约 20—30 秒钟，立即用水冲净酒精。
- （4）复染 用稀释石炭酸复红液染 30 秒后，水洗。
- （5）镜检 用吸水纸干燥后，置油镜观察。

【结果判断】

革兰氏阴性菌呈红色，革兰氏阳性菌呈紫色。以分散开的细菌的革兰氏染色反应为准，过于密集的细菌，常常呈假阳性。

【注意事项】

1. 革兰氏染色成败的关键是脱色时间，如脱色过度，革兰氏阳性菌也可被脱色而被误认为是革兰氏阴性菌；如脱色时间过短，革兰氏阴性菌也会被误认为是革兰氏阳性菌。因此必须严格把握脱色时间。
2. 若选用培养细菌染色，选用 18—24 小时菌龄的细菌为宜，若细菌太老，由于菌体死亡或自溶常使革兰氏阳性菌转呈阴性反应。

二、细菌基础培养基的制备

【实验原理及应用】

培养基是人工合成的一种混合营养料，用于分离培养细菌。常用的有基础培养基、营养培养基、鉴别培养基、选择培养基等。

【试剂与器材】

1. 牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、蒸馏水、琼脂、1M NaOH 及 1/10M NaOH，0.02% 酚红指示剂
2. pH 试纸，三角烧瓶，量筒，天平、吸管。

【操作方法】

（一）液体培养基的制备

1. 称取牛肉膏 3g，蛋白胨 10g，氯化钠 5g 加入 1000ml 蒸馏水中，加热溶化。
2. 待冷至 40—50℃ 时，测定并矫正酸碱度为 pH7.6。通常未矫正前的肉膏汤均呈酸性，故常用 1/10M NaOH 溶液进行矫正。
3. 酸碱度调整后，煮沸 3—5 分钟，补足因蒸发失去的水量，待冷却后用滤纸使之过滤澄清。并重新测定酸碱度一次，若变动较大，应再进行矫正。
4. 按应用时的需要量分装于适当的试管或烧瓶内，塞上硅胶塞并用牛皮纸包扎，置高压蒸汽灭菌器内，经 103.4kpa、121.3℃、20 分钟灭菌。
5. 灭菌后取出培养基，待冷至 40℃ 以下时，放入 37℃ 温箱 24 小时做无菌试验，如无菌生长，即可备用。

（二）固体培养基的制备

1、普通琼脂培养基

于 pH 7.6—7.8 的肉膏汤中加入 2%—3% 琼脂，加热溶化（必要时用脱脂棉过滤后再补足水分）适量分装于适当的试管或三角烧瓶中，塞上硅胶塞并用牛皮纸包扎，置高压灭菌器内 103.4kpa、121.3℃、20 分钟灭菌。

（1）琼脂斜面：分装于试管中的琼脂培养基，由高压灭菌器内取出后，趁热将试管斜置冷凝后即成琼脂斜面（或称普通斜面）。

（2）琼脂平板：分装于烧瓶中的琼脂培养基，由灭菌器内取出后，待冷却至 50—60℃ 时，以无菌操作倾入无菌平皿内（直径 9cm 的平皿，约需 13—15ml 琼脂培养基），冷凝后即成琼脂平板（或称普通平板）。

2、血液琼脂培养基

有些细菌营养要求较高，在普通琼脂培养基生长不良，可用血液琼脂培养基进行培养。将已灭菌的琼脂培养基于 50℃ 时，以无菌操作加入无菌的 5%—10% 脱纤维羊血（或兔血），摇匀后分装于无菌试管，斜置冷凝后即成血液琼脂斜面；分装于无菌平皿，摇匀后冷凝即成血液琼脂平板（简称血平板）。

将以上固体培养基（平板应底朝上）放入 37℃ 温箱 24 小时培养，如无菌生长，放凉后即可保存冰箱备用。平板可用于细菌分离培养，斜面可用于增菌和保存菌种等。

3、半固体培养基

于 pH7.6 的肉膏汤种加入 0.3%—0.5% 琼脂，加热溶化，脱脂棉过滤后补足水分，适量分装于试管内，经 103.4kpa、121.3℃、20 分钟高压灭菌，取出直立，待琼脂凝固后，即成为半固体培养基，37℃ 温箱培养 24 小时无菌生长，即可应用。常用于观察细菌动力和保存菌种。

三、高压蒸汽灭菌器的使用

【实验原理及应用】

高压蒸气灭菌是将待灭菌的物品放在一个密闭的加压灭菌锅内，通过加热，使灭菌锅隔套间的水沸腾而产生蒸气。待水蒸气急剧地将锅内的冷空气从排气阀中驱尽，然后关闭排气阀，继续加热，此时由于蒸气不能溢出，而增加了灭菌锅内的压力，从而使沸点增高，得到高于 100℃ 的温度。导致菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌的目的。

在同一温度下，湿热的杀菌效力比干热大。其原因有三：一是湿热中细菌菌体吸收水分，蛋白质较易凝固，因蛋白质含水量增加，所需凝固温度降低，二是湿热的穿透力比干热大，三是湿热的蒸气有潜热存在。1g 水在 100℃ 时，由气态变为液态时可放出 2.26kJ(千焦)的热量。这种潜热，能迅速提高被灭菌物体的温度，从而增加灭菌效力。

在使用高压蒸气灭菌锅灭菌时，灭菌锅内冷空气的排出是否完全极为重要，因为空气的膨胀压大于水蒸气的膨胀压，所以，当水蒸气中含有空气时，在同一压力下，含空气蒸气的温度低于饱和蒸气的温度。

表 2-1 灭菌锅留有不同分量空气时，压力与温度的关系

压力数			全部空气 排出时的 温度/℃	2/3 空气 排出时的 温度/℃	1/2 空气 排出时的 温度/℃	1/3 空气 排出时的 温度/℃	空气全不 排出时的 温度/℃
Mpa	Kg/cm ²	Ib/in ²					
0.03	0.35	5	108.8	100	94	90	72
0.07	0.70	10	115.6	109	105	100	90
0.10	1.05	15	121.3	115	112	109	100
0.14	1.40	20	126.2	121	118	115	109
0.17	1.75	25	130.0	126	124	121	115
0.21	2.10	30	134.6	130	128	126	121

现在法定压力单位已不用磅和 kg/cm² 表示，而是用 Pa 或 bar 表示，其换算关系为：1kg/cm²=98066.5Pa；1Ib/in²=6894.76Pa。

一般培养基用 103.4kpa、121.3℃、20 分钟可达到彻底灭菌的目的。灭菌的温度及维持的时间随灭菌物品的性质和容量等具体情况而有所改变。例如含糖培养基用 0.06Mpa (8lb/in² 或 0.59kg/cm²) 112.6℃灭菌, 然后以无菌操作手续加入灭菌的糖溶液。又如盛于试管内的培养基以 0.1Mpa, 121.5℃灭菌 20min 即可, 而盛于大瓶内的培养基最好以 0.1Mpa, 122℃灭菌 30min。

【操作方法】

实验中常用的非自控高压蒸气灭菌锅有卧式和手提式二种, 其结构和工作原理相同, 有关自控高压蒸气灭菌锅 (autoclave) 的使用可参照厂家说明书。

【思考题】

1. 观察细菌形态学的细菌涂片, 为何必须制作得薄而均匀?
2. 不经复染这一步, 能否区别革兰氏阳性菌和阴性菌?
3. 涂片后为什么要进行固定? 固定时应注意什么?
4. 应为革兰氏阳性的细菌, 若染成了阴性, 可能有哪些原因?
5. 培养基的制备过程可概括为那几个步骤?
6. 为什么使用高压蒸气灭菌锅灭菌时, 必须先将锅内冷空气排出?

【附录】

革兰氏染色液的配制

(1) 结晶紫(crystal violet)液: 结晶紫乙醇饱和液(结晶紫 2g 溶于 20mL 95%乙醇中) 20mL, 1%草酸铵水溶液 80mL 将两液混匀置 24h 后过滤即成。此液不易保存, 如有沉淀出现, 需重新配制。

(2) 卢戈(Lugol)氏碘液: 碘 1g, 碘化钾 2g, 蒸馏水 300mL。先将碘化钾溶于少量蒸馏水中, 然后加入碘使之完全溶解, 再加蒸馏水至 300mL 即成。配成后贮于棕色瓶内备用, 如变为浅黄色即不能使用。

(3) 95%乙醇: 用于脱色, 脱色后可选用以下(4)或(5)的其中一项复染即可。

(4) 稀释石炭酸复红溶液: 碱性复红乙醇饱和液(碱性复红 1g, 95%乙醇 10mL, 5%石炭酸 90mL 混合溶解即成碱性复红乙醇饱和液), 取石炭酸复红饱和液 10mL 加蒸馏水 90mL 即成。

(黄丽霞)

实验二 病原生物的基本形态结构观察及理化因素对它们的影响

EXPERIMENT TWO

Basic Morphological Examination of Pathogenic Biology and the Influences of Physical and Chemical Agents

【实验目的、要求】

学习病原生物的基本形态结构特点及理化因素对它们的影响。掌握细菌的基本形态、细菌的特殊结构、原虫及虫卵基本形态；熟悉紫外线、抗生素、溶菌酶对细菌的影响；了解各种理化因素对病原生物的不同影响。

【实验内容】

- 1、细菌的结构观察(球菌、杆菌、弧菌、鞭毛、芽胞、荚膜)
- 2、原虫及虫卵的基本结构观察(示教利什曼原虫、弓形虫、肺吸虫卵)：
- 3、药敏实验、紫外线杀菌实验、溶菌酶杀菌实验。

【实验学时】3 学时

【试剂与器材】

普通光学显微镜、香柏油、擦镜液、擦镜纸；葡萄球菌、变形杆菌、霍乱弧菌、芽胞(破伤风梭菌)、荚膜(肺炎链球菌)、鞭毛(变形杆菌)、刚地弓形虫滋养体、肺吸虫卵等标本片。

【原理及方法】

一. 细菌的结构观察

细菌从形态上分，主要有球菌(coccus)、杆菌(bacillus)、螺形菌(spiral bacterium)三种。另外，细菌的特殊结构有：芽胞、荚膜、鞭毛、菌毛，芽胞(Endospore, spore)——增强细菌对不良环境的抗性；荚膜(Capsule)——抗吞噬、抗损伤、抗干燥；鞭毛(Flagella)——运动器官，单生、双生、丛生、周生。而菌毛(Pili)在电镜下才可以见到。

二. 原虫及蠕虫卵的基本结构观察(示教)

原虫(protozoa)是单细胞真核生物，原虫的整个机体仅由一个细胞构成，大小3-200 μm 不等。原虫的外形多样，其结构由胞膜、胞质和胞核组成。原虫的各种生理功能由细胞器来完成。

医学蠕虫主要包括线虫(nematode)、吸虫(trematode)及绦虫(cestode)。其虫卵外形、颜色、卵内容物、壳厚薄及有无卵盖因虫种而异。虫卵大小28 μm ×20 μm —140×85 μm 不等。均需显微镜观察。

附：1. 刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*) 弓形虫发育过程中，有滋养体、包囊、裂殖体、配子体和卵囊等5种不同形态的时期。其中滋养体、包囊和卵囊对人体致病及传播有重要作用。

①滋养体 常称速殖子。虫体呈香蕉形或新月形，一端较尖，细胞质被染成蓝色，胞核呈紫红色，位于虫体中央。速殖子寄生于中间宿主的有核细胞内或游离与腹腔渗出液、脑脊液或血液中。当数个至十个速殖子群落被宿主细胞膜包绕，形成假包囊，因无真正



图 2-1 弓形虫各期形态

囊壁故称假包囊。

②包囊 呈圆形或椭圆形，直径为 $5 \sim 100 \mu\text{m}$ ，具有一层富有弹性的坚韧囊壁，内含数个至数百个缓殖子，缓殖子形态与速殖子相似，但个体较小，核稍偏后。在一定条件下包囊可破裂，释出缓殖子进入新的细胞。包囊长期在组织内存存，多见与疾病的慢性期或称隐性感染期。

③卵囊 为圆形或椭圆形，大小为 $10 \sim 12 \mu\text{m}$ ，具有两层光滑透明的囊壁。成熟卵囊含有 2 个孢子囊，每个孢子囊内含有 4 个新月形孢子。

2. 卫氏并殖吸虫吸虫 (*Paragonimus westmani*) 卵



金黄色，椭圆形，大小不一， $80 \sim 118 \times 48 \sim 60 \mu\text{m}$ (卫氏) 或 $71 \times 48 \mu\text{m}$ (斯氏)。卵壳厚薄不一，多不对称。卵盖大，常倾斜，多位于最宽一端。卵内含一个卵细胞，及 $5 \sim 12$ 个卵黄细胞。(图 2-2)

图 2-2 卫氏并殖吸虫吸虫卵

三. 杀菌实验

【实验原理及应用】

各种理化因素对细菌等病原生物有着广泛的影响。紫外线可破坏 DNA，常用于空气消毒；抗生素因为不同的作用机理而抑制细菌的生长或杀灭细菌，测定细菌对抗生素的敏感度的实验称为药物敏感实验，可供临床治疗选用药物时参考；溶菌酶是广泛存在于正常体液、各种分泌液(唾液、汗液乳、汁肠道、及呼吸道分泌液)和嗜中性粒细胞内的一种小分子碱性蛋白质。它能水解细菌胞壁中的粘肽成分，使细菌溶解(主要是对革兰氏阳性细菌)。溶菌酶是构成机体天然免疫力的一种重要体液因素。

【试剂与器材】

药物敏感实验 (纸片法)

1. 菌种：金黄色葡萄球菌 (staphylococcus)，痢疾杆菌 (dysentery bactdrium) 6-8 小时液体培养基培养保存。
2. 培养基：琼脂平板。
3. 含抗生素 (青霉素、庆大霉素、氯霉素) 的干燥滤纸药片，镊子，酒精灯。

紫外线杀菌实验

- 1 菌种：葡萄球菌琼脂斜面培养物。
2. 培养基：琼脂平板。
3. 紫外灯，有孔纸板等。

溶菌酶杀菌实验

1. 黄色微球菌 (M.Lysodeikticus) 菌液：浓度为 100 毫克细菌/毫升。
2. 1% 磷酸盐缓冲盐水琼脂，pH6.4。
3. 标准溶菌酶 (10 微克/毫升)。待测唾液。
4. 无菌平皿、毛细吸管、琼脂板打孔器等。

【操作方法】

(一) 药物敏感实验 (纸片法)

1. 用无菌棉签粘取 6-8 小时金黄色葡萄球菌或痢疾杆菌培养液，分别密集涂布于琼脂平板表面 (注意棉拭不可过湿，沾上菌液后可于试管内壁轻轻压一下) 涂布要均匀，致密。待稍干。

2. 用无菌镊子将含有各种抗生素的药物纸片按一定间隔在平板的不同地域，并分别做好标记。

3. 37℃温箱培养 18-24 小时后，观察抑菌圈的有无及大小，分别测量各种抗生素纸片抑菌圈的直径大小以毫米来表示。判断其敏感及耐药性。(图 2-3)

(二) 紫外线杀菌实验

- 1、取琼脂平板一个，将葡萄球菌密集划线接种在平板表面上。
- 2、打开培养皿盖，将有孔纸板盖在平板上，平板放在紫外线灯上，直接照射 30 分钟。



图 2-3 药敏实验（纸片法）

3、盖好皿盖，置 37℃温箱内培养 24 小时后，观察细菌生长情况。

(三) 溶菌酶杀菌实验

1. 将 1%磷酸盐缓冲盐水琼脂加热溶化，待冷至 50℃左右时，按每 100 毫升琼脂内加入黄色微球菌菌液 1 毫升（使每毫升琼脂内含标准试验菌 1 毫克），充分混和均匀，倾注入无菌平皿内，每个平皿 20 毫升，琼脂厚度约 4 毫米。
2. 待琼脂凝固后，用打孔器在琼脂板上打孔。孔径 5 毫米，孔距为 15~20 毫米。
3. 用毛细管吸取唾液标本（新鲜收集，盛于洁净容器内，取下层清液）加入琼脂孔内，以注满为度。同时取标准溶菌酶加于另一孔内，作为阳性对照。
4. 将琼脂平皿放置室温内过夜（或 24~28℃温箱内 18~24 小时取出），观察琼脂孔四周的透明溶菌圈，并测量其直径。溶菌圈的大小与溶菌酶含量成正比。

【结果判断】

1. 以所得溶菌圈直径对照标准曲线，即可算出溶菌酶的含量（ug/ml）
2. 药物敏感试验纸片法判断标准：

抗菌药物		抑菌圈直径（毫米）			最低抑菌浓度（微克/毫升）	
		纸片含药量	耐药	中度敏感	敏感	
青霉素	葡萄球菌	10 单位	≤20	21-28	≥29	≥0.2
	其它细菌	10 单位	≤11	12-21	≥22	≤0.1
氯霉素		30 微克	≤12	13-17	≥18	≥25
庆大霉素		10 微克	≤12	13-14	≥15	≥8

【思考题】

1. 仔细观察细菌的结构后，将其用红蓝铅笔画下来。（染色性，形态，排列）
2. 仔细观察原虫及虫卵的基本结构后，将其用红蓝铅笔画下来并标明特征。
3. 记录紫外线杀菌作用试验结果并简述其作用特点及用途？
4. 记录药敏实验的结果（注明敏感程度）：

抗菌素	青霉素	氯霉素	庆大霉素
抑菌圈（mm）			
菌种			
金黄色葡萄球菌			
痢疾杆菌			

【附录】

1. 抗菌谱: 各种抗生素都有一定的抗菌范围称抗菌谱。
2. 最低抑菌浓度: 最高稀释度的抗菌药物仍能抑制细菌生长者, 即该药物的最低抑菌浓度; 单位是微克/毫升, 或者单位/毫升 (比如青霉素)。
3. 溶菌酶杀菌实验中试剂配制

磷酸盐缓冲盐水 (pH6.4) 的配制

- (1) M/15 磷酸二氢钾溶液 (KH_2PO_4): 称取无水磷酸二氢钾 9.08 克溶解于 1000 毫升蒸馏水中。
- (2) M/15 磷酸二氢钠溶液 (Na_2HPO_4): 称取无水磷酸二氢钠 9.46 克溶解于 1000 毫升蒸馏水中。
- (3) 取 (1) 液 73 毫升和 (2) 液 27 毫升混合, 加入 0.5 克氯化钠溶解后即成。

标准菌液的制备

- (1) 新鲜菌液的制备: 先将黄色微球菌在琼脂斜面上传代一次, 再接种于大管肉汤琼脂斜面, 37°C 培养 24 小时, 收集菌苔, 称重, 用 pH6.4 磷酸缓冲盐水配成 100 毫克/毫升的菌液, 置 70°C 水浴中加热 1 小时杀菌, 保存于 4 冰箱内备用。
- (2) 干菌粉的制备: 将黄色微球菌的 48 小时琼脂斜面培养物用无菌蒸馏水洗下菌苔, 经无菌纱布 (2~3) 过滤; 取滤液以 3000/分 1015 分钟离心沉淀, 弃上清; 再用无菌蒸馏水充分混匀, 离心沉淀, 去上清, 如此重复洗涤共 3 次。将洗涤过的菌体悬浮于丙酮内, 离心沉淀, 去上清, 再换用丙酮, 共脱水 3 次。然后将细菌置无菌平皿内摊开, 放 37°C 温箱内干燥 2~3 小时, 即成干菌粉, 贮放干燥器内, 可于室温中保存较长时间。使用时, 称取一定量的干菌粉, 置于无菌烧杯内, 加少量磷酸盐缓冲液, 用玻璃棒调匀成糊状, 然后再稀释至每毫升内含 100 毫克细菌。

(林莉、孔争)

实验三 肠道病原的检查 I 及动物免疫血清的制备 I（抗原的制备）

EXPERIMENT THREE

Examination Of Enterobacteria I And The Preparation Of Immune Serum Of Animal I (Preparation Of Antigen)

【实验目的、要求】

学习肠道病原的形态及检查方法；细菌抗原的制备方法。掌握肠道杆菌的分离培养；肠道病原的形态；大便直接涂片法、饱和盐水漂浮法检查虫卵。熟悉肠道杆菌的鉴定程序。了解肠道病原的分类；细菌抗原的制备方法；EMB、SS 培养基的原理。

【实验内容】

- 1、肠道病原的基本结构观察（肠道杆菌、霍乱弧菌、溶组织内阿米巴包囊、大滋养体、兰氏贾第鞭毛虫）。
- 2、肠道细菌在 EMB、SS 上的分离培养（大肠杆菌等）。
- 3、肠道杆菌的生化反应。
- 4、细菌抗原的制备方法。

【实验学时】 4 学时

【试剂与器材】

普通光学显微镜、香柏油、擦镜液、擦镜纸、EMB 琼脂平板、SS 琼脂平板、接种环、大肠杆菌培养物、痢疾杆菌培养物、溶组织内阿米巴及蓝氏贾第鞭毛虫标本片等。

【原理与方法】

一. 肠道病原的基本结构观察

1. 肠道杆菌共同形态学特点：中等大小革兰阴性杆菌。无芽胞，多数有鞭毛，少数有荚膜或包膜，大多有菌毛。

2. 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)：呈革兰染色阴性，弧形或逗点状。呈鱼群状排列，一端有鞭毛，有普通菌毛，性菌毛，无芽胞，荚膜。

3. 溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 属原虫的叶足虫纲，蓝氏贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*) 属原虫的鞭毛虫纲，两者的生活史均有传播期的包囊及增殖期的滋养体两个时期，但它们的形态及生活史截然不同。

(1) 溶组织内阿米巴大滋养体（铁苏木素染色）

在光学镜下生理盐水涂片中，滋养体大小为 $10\sim60\mu\text{m}$ ，借伪足运动，运动活泼，形态变化大，以二分裂增殖。滋养体胞质内常含有摄入的红细胞。滋养体经固定和铁苏木素染色后，在高倍

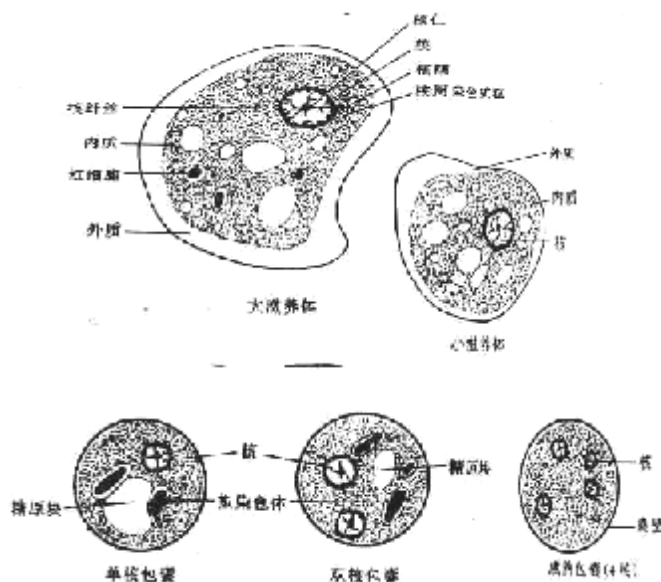


图 2-4 溶组织内阿米巴各期形态

镜下可见胞质分两层，外质透明，内质呈颗粒状，含空泡。将其移至视野中心，更换油镜，观察：

①外质透明无色，常显示有伪足。

②内质为兰黑色颗粒状，食物泡内含有完整或半消化的圆形黑染的红细胞（此点为大滋养体的主要特征）。

③核一个，圆形，核膜薄，染成黑色，核膜内缘有一层排列整齐的染色质粒。核中央有一个小点状的核仁。

(2) 溶组织内阿米巴包囊（铁苏木素染色标本）

寻找方法同前，油镜下观察，注意细胞核往往不在同一水平面上，包囊圆形，囊壁光滑，胞质内有一特殊的营养储存结构，即拟染色体，其数目和形状具有虫种鉴别的意义。未成熟包囊内有单核或双核及糖原泡、拟染色体。成熟包囊内有四核，糖原泡和拟染色体均消失。包囊直径为 $5 \sim 20 \mu\text{m}$ 。（图 2-4）

(3) 蓝氏贾第鞭毛虫

滋养体：倒梨形，左右对称。

$9.5 \sim 22 \times 5 \sim 15 \mu\text{m}$ ，背面隆起，腹面内陷呈吸盘状。虫体内有一对轴柱有前向后伸延，两个细胞核位于虫体前部中线两侧。虫体两侧可见前、后、腹、尾四对鞭毛。

包囊：长圆形， $10 \sim 14 \times 7.5 \sim 9 \mu\text{m}$ ，囊壁厚且不着色，与虫体间有明显的间隙。未成熟包囊内含2个细胞核，成熟包囊内有四个细胞核。胞质内可见鞭毛和轴柱组成的丝状物。（图 2-5）

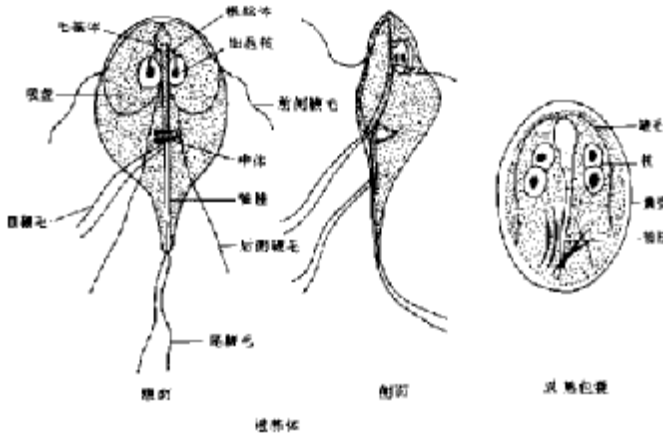
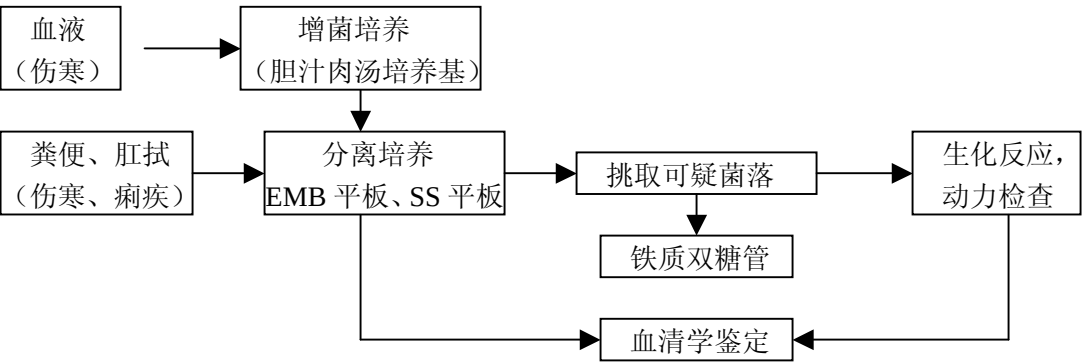


图 2-5 兰氏贾第鞭毛虫各期形态

二. 肠道细菌的分离

肠道病原菌的分离鉴定原则及流程：



肠道细菌在 EMB \SS 上的分离培养：

【实验原理及应用】

肠道细菌种属很多,分布广泛,其中大多数是人类肠道正常菌群的主要成员,一部分是条

件致病菌,少数为致病菌。

伊红美蓝琼脂平板 (EMB): 为弱选择培养基, 供分离肠道致病菌用。伊红与美蓝在培养基中起指示剂作用, 分解乳糖的细菌 (如大肠埃希菌), 菌落呈紫黑色或紫红色, 具有金属光泽; 不分解乳糖的细菌, 菌落为无色。

SS 琼脂平板: 用于分离志贺菌和沙门氏菌的强选择培养基, 它对大肠埃希菌有较强的抑制作用, 而对肠道病原菌则无明显抑制作用。大肠埃希菌分解乳糖产酸, 通过中性红指示剂呈红色菌落; 志贺菌和沙门氏菌不分解乳糖而分解蛋白质产生碱性物质, 故呈透明微黄色菌落。产生硫化氢的细菌菌落中心呈黑色。

【操作方法】

将大肠杆菌、痢疾杆菌以划线法分别接种 EMB 琼脂平板和 SS 琼脂平板, 37℃培养过夜。

【结果判断】

	EMB 琼脂平板	SS 琼脂平板
大肠杆菌	紫黑色或紫红色, 具有金属光泽的菌落	红色菌落
痢疾杆菌	无色菌落	透明微黄色菌落

【注意事项】

制好的培养基宜当日使用, 或保存于冰箱内于 48h 内使用。可以购用 SS 琼脂的干燥培养基。

三. 肠道杆菌的生化反应

【实验原理及应用】

糖发酵试验: 因不同种细菌具有不同的糖酶, 对糖的分解能力不同, 对同一种糖有的能分解, 有的则不能分解; 对糖分解后有的只能产生酸, 有的则能产酸、产气。如发酵管变红色 (含酸性复红指示剂) 证明分解糖后产酸, 如倒置小玻管中有气泡出现, 则证明产生气体。

靛基质试验: 能合成色氨酸酶的细菌, 分解蛋白胨水中的色氨酸生成靛基质, 该物质本身无色, 加入对位二甲基氨基苯甲醛时, 生成玫瑰靛基质呈红色。无色氨酸酶的细菌, 呈阴性反应。

硫化氢试验: 能分解含硫氨基酸, 生成硫化氢, 与铅盐 (醋酸铅) 或铁盐 (硫酸亚铁) 反应生成黑褐色硫化铅 (或硫化铁) 沉淀物。沉淀物愈多, 表示生成的硫化氢愈多。

实验器材及试剂

【试剂与器材】

糖发酵试验: 大肠杆菌、伤寒杆菌、福氏痢疾杆菌斜面培养物、葡萄糖、甘露醇及乳糖发酵管

靛基质试验: 大肠杆菌、伤寒杆菌、福氏痢疾杆菌斜面培养物、蛋白胨水培养基、柯氏 (吲哚) 试剂 (对二甲基苯甲醛)

硫化氢试验: 大肠杆菌、伤寒杆菌、福氏痢疾杆菌斜面培养物、醋酸铅培养基

【操作方法】

糖发酵试验: 用接种环将大肠杆菌、伤寒杆菌分别各接种于葡萄糖及乳糖发酵管中 (方法同前)。37℃孵育 18~24 小时, 取出观察结果。

靛基质试验：将两种细菌各接种于 1 支蛋白胨水中。37℃ 24~48 小时孵育后，每管各加数滴柯氏试剂，振荡后呈红色者为阳性。

硫化氢试验：沿管壁周围将两种细菌分别接种于醋酸铅培养基中。37℃ 孵育 24 小时，观察结果，培养基周围呈黑褐色为阳性，证明产生硫化氢。

【结果判断】

观察伤寒杆菌、福氏痢疾杆菌、大肠杆菌的主要生化动力反应特性及动力。

表 2-1 伤寒杆菌、福氏痢疾杆菌、大肠杆菌的鉴别要点。

菌名	葡萄糖	甘露醇	乳糖	靛基质	硫化氢	动力
福氏痢疾杆菌	+	+	-	-/+	-	-
伤寒杆菌	+	+	-	-	+	+
大肠杆菌	⊕	⊕	⊕	+	-	+

注：- 表示阴性

+ 表示产酸

⊕ 表示产酸产气

四. 免疫血清的制备

【实验原理及应用】

用抗原刺激机体可以使机体产生抗体，抗原与抗体是一对概念。抗原的纯度和活性，影响着其免疫动物后获得的抗体的特异性和滴度。根据抗体产生的一般规律，抗原的性质不同选择不同的途径免疫动物，经初次、再次免疫过程，使得动物血清中产生足量的特异性抗体，继而分离血清并纯化免疫球蛋白，得到免疫血清或抗体。

免疫血清时机体受到抗原物质刺激后的血清，含有特异性免疫球蛋白。根据用途的不同，可直接应用免疫血清与病原的诊断或感染性疾病的紧急预防和治疗；也可通过进一步纯化血清中的免疫球蛋白，用做多种免疫相关或不相关疾病的诊断和治疗制剂。免疫血清又称为抗血清或抗体，而从抗血清中纯化的免疫球蛋白则只称为抗体。在传统的免疫学方法中，尤其是作细菌的血清学鉴定时，抗血清即能满足要求，无需纯化，因为纯化过程将造成免疫球蛋白的丢失。但在现代免疫学方法中，由于免疫标记和反应精确度的需要，必须纯化抗血清的有效成分，即获得免疫球蛋白甚至是免疫球蛋白的某一类别或亚类。

抗体的制备大致包括三个阶段，即抗原的制备与纯化、动物免疫和血清分离纯化与鉴定。抗原是制备抗体的先决条件，要制备高质量的抗体，必须首先获得特异性高的抗原性物质。抗体制备的方案视抗原性质不同而异。免疫所用的抗原可用病毒、细菌或者其他蛋白质抗原，如果使用半抗原如小分子激素等，必须与大分子载体连接，抗原的用量视抗原种类及动物而异，一次注射小鼠可以少至几个微克，兔、羊甚至更大的动物每次注射的量就相应增加，从几百 μg / 次至几百 mg / 次。本实验制备抗伤寒沙门菌 O 抗原及抗体。

【试剂与器材】

1. 体重 2~3kg 的健康雄家兔、伤寒杆菌斜面菌种；
2. 琼脂斜面培养基、0.5%石炭酸(用 0.85%生理盐水配制)、75%酒精棉球、碘酒棉球、消毒干棉球；
3. 麦氏细菌比浊标准管、无菌吸管、无菌注射器(5ml、20ml)、注射针头(5 号，B19)、无菌试管、装有玻璃珠的无菌血清瓶、解剖用具(解剖台、兔头夹、止血钳、解剖刀、眼科剪刀、镊子、动脉夹等)、双面刀片、丝线、玻璃管、胶管、离心机及无菌离心管、普通冰箱、超净工作台、水浴箱。

【操作方法】

(一). 细菌抗原的制备:

1. 菌种选择: 伤寒杆菌标准菌株
2. 增殖: 将伤寒杆菌标准菌株于普通琼脂斜面上。置 37℃ 培养 24 小时。
3. 收获: 上述斜面培养物经检查为纯培养, 即可作为浓菌液。

菌体 (O) 抗原的制备: 于每支斜面培养物中加入 0.5% 石炭酸生理盐水 2—4ml, 同样将菌苔洗下, 将浓菌液移至另一无菌空试管内。置 60℃ 水浴以破坏细菌的鞭毛, 用滤纸过滤 (大量制备时) 或移入离心管 4000rpm/min 离心 10—20 min (少量时)。将滤过的菌液接种少量于琼脂平板进行无菌试验 (37℃, 24 小时), 确定无菌后用生理盐水调整浓度至少 10^9 个/ml, 此为细菌 O 抗原, 置 4℃ 保存备用。

4. 测定菌液浓度: 用麦 (McFarland) 氏比浊管测定其浓度, 即吸取菌液 1ml 放至与比浊管大小相同的无菌试管中, 加入生理盐水稀释至标准浓度 (一般以每毫升含菌 9—12 亿个为标准, 然后按比例用生理盐水将其余菌液稀释成标准浓度, 即可作为凝集实验用的抗原 (表 2-2)。

表 2-2 麦氏比浊管的制备

管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1%BaCl ₂	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
1%H ₂ SO ₄	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
相当细菌数/毫升	3 亿	6 亿	9 亿	12 亿	15 亿	18 亿	21 亿	24 亿	27 亿	30 亿

(二). 注射伤寒杆菌抗原免疫动物

1. 实验原理及应用

1) 用于免疫的动物

作免疫用的动物有哺乳类和禽类, 主要为羊、马、家兔、猴、猪、豚鼠、鸡等, 实验室常用者为家兔、山羊和豚鼠等。动物种类的选择主要根据抗原的生物学特性和所要获得抗血清数量, 如一般制备抗 r-免疫球蛋白抗血清, 多用家兔和山羊, 因动物反应良好, 而且能够提供足够数量的血清, 用于免疫的动物应适龄, 健壮, 无感染性疾患, 最好为雄性, 此外还需十分注意动物的饲养, 以消除动物的个体差异以及在免疫过程中死亡的影响。若用兔, 最好用纯种新西兰兔, 一组三只, 兔的体重以 2~3kg 为宜。

2) 免疫途径

免疫途径有多种多样, 如静脉内、腹腔内、肌肉内、皮内、皮下、淋巴结内注射等, 一般常用皮下或背部多点皮内注射, 每点注射 0.1ml 左右。途径的选择决定于抗原的生物学特性和理化特性, 如激素、酶、毒素等生物学活性抗原, 一般不宜采用静脉注射。

3) 佐剂

由于不同个体对同一抗原的反应性不同, 而且不同抗原产生免疫反应的能力也有强有弱, 因此常常在注射抗原的同时, 加入能增强抗原的抗原性物质, 以刺激机体产生较强的免疫反应, 这种物质称为免疫佐剂。佐剂除了延长抗原在体内的存留时间, 增加抗原刺激作用外, 更主要的是, 它能刺激网状内皮系统, 使参与免疫反应的免疫活性细胞增多, 促进 T 细胞与 B 细胞的相互作用, 从而增强机体对抗原的细胞免疫和抗体的产生。

2. 操作方法

1) 免疫方法:

选择 2~3kg 健康雄兔，从耳缘静脉采血 1ml，分离出血清。该血清与准备免疫用的抗原进行凝集反应，以检查有无天然凝集素。如没有或只有极微量时，该动物便可用来免疫。最常用的免疫途径是耳缘静脉注射。将家兔放在家兔固定箱内，一手轻轻拿起耳朵，用碘酒棉花球在耳外侧边缘静脉处消毒，然后用酒精棉花球涂擦，并用手指轻轻弹几下静脉血管，使其扩张。消毒细菌悬液瓶塞后，用无菌注射器及 5 号针头吸取抗原，沿着静脉平行方向刺入静脉血管，并慢慢注入抗原，注射完毕，用干棉花球按压住注射处，然后拨出针头，并压迫血管注射处片刻，以防止血液向外溢出。注射时发现注射处隆起，不易推进时，表明针尖不在血管中，应拨出针头，重找位置再注射。有时针尖口被堵塞，菌液推不进去，应及时更换针头。注射途径、剂量和日程安排等视抗原和动物不同而有所不同。伤寒杆菌 O 抗原免疫家兔的抗原注射剂量和日程安排如表 2-3。

表 2-3 伤寒杆菌 O 抗原免疫家兔的抗原注射剂量和日程安排

免疫日期(天)	免疫途径	抗原	免疫剂量(ml)
1	多点皮内	伤寒沙门 O 抗原	1.0
6	静脉	伤寒沙门 O 抗原	0.5
11	静脉	伤寒沙门 O 抗原	0.5
16	静脉	伤寒沙门 O 抗原	1.0
19	静脉	伤寒沙门 O 抗原	2.0

2) 试血: 通常于最后一次注射后 7~11d, 从兔耳缘静脉抽取 2mL 血, 分离析出血清, 用试管凝集反应测定抗血清效价。效价合格即可大量采血, 如效价不高, 可继续注射抗原免疫, 提高效价。

3) 采血: 采血分为心脏采血和颈动脉放血。

心脏采血: 使免疫家兔仰卧于台上, 四肢固定。用左手探明心脏搏动最明显处, 用碘酒棉花球与酒精棉花球消毒后, 右手握消毒过的 20mL 注射器和 B19 号针头, 在上述部位的肋骨间隙与胸部呈 45° 角刺入心脏, 微微抽取针筒, 此时可发现血液涌入注射器中便可徐徐抽取血液。2.5kg 家兔一次可取血 20~30mL。取血完毕后, 用消毒棉花球按压进针处迅速拔出针头, 进针处用棉花球继续压住。并马上将所采的血液注入无菌大试管内, 斜放, 待血液凝固后, 置于 37℃ 恒温箱中 30min, 使血清充分析出, 然后放入 4~6℃ 冰箱中。

颈动脉采血: 将免疫家兔固定于兔台上, 用少量乙醚麻醉, 剪去颈部的毛, 然后用碘酒棉花球和酒精棉花球消毒。沿正中线将颈部皮肤切开到锁骨间, 拨开肌膜, 暴露出气管, 在气管深侧处找到搏动的颈动脉。小心地将颈动脉和迷走神经剥离开 4~5cm。用镊子拉出颈动脉, 用丝线扎紧血管的离心端, 在血管的向心端用止血钳夹住。然后用眼科剪在丝线与止血钳之间的血管上剪一个 V 型小切口, 将弯咀眼科镊自切口插入, 使其张开, 同时将一小玻管插入, 用丝线扎紧, 以防玻管脱漏。玻管另一端接入一条胶管, 胶管通入大试管(或大离心管)内, 然后将止血钳慢慢松开, 使血液流入试管, 直至动物死亡, 无血液流出为止。

4) 抗血清分离与保存: 取凝固血液于 4000r/min, 离心 20min, 获得抗血清(即凝集素)。加入石炭酸或硫柳汞使其浓度分别达到 0.5% 或 0.01%。测定抗血清的效价后, 封好瓶口, 贴好标签, 注明抗血清名称、效价及日期, 置冰箱保存备用。

【结果判断】

于家兔耳静脉取血 1~2ml, 分离血清。用环状沉淀试验测定抗体效价达 1: 5000 以上(稀

释抗原),或用琼脂双向扩散试验测定抗体效价达 1:16 以上(稀释抗体),即可从心脏或颈动脉放血,分离血清,进行抗体的纯化及检测,包括抗血清效价、特异性及亲和力的鉴定。抗原免疫动物后获得的抗血清,效价还可用凝集等试验判断;其特异性则可通过双扩、免疫电泳或交叉凝集试验进行考察。各试验结果的观察和判断参见相关实验。此外,抗血清的外观应该为澄清、力求无溶血、无血液有型成分残留和无细菌等微生物污染。

【注意事项】

- 1、在细菌型抗原的制备过程中,应严格无菌操作,保证其纯度和避免对实验者的感染。
- 2、由于每个动物对免疫反应不同,产生的抗体效价有高有低,所以在制备抗血清时至少免疫两只家兔。如须保留该免疫动物,则采取心脏直接取血,取血后应从静脉注射等体积的 50%葡萄糖溶液,经过 2-3 个月的饲养,方可再次免疫。若不保留动物须一次取大量血时,则采用颈动脉放血法。

【思考题】

1. 记录免疫家兔的操作过程及免疫过程中兔的反应。
2. 实验操作过程的体会。

【附录】

1. 动物的选择 免疫血清的制备多选用家兔为免疫对象,若系大量制备或二抗种属特异性的需要,也可选用羊或马。应用的动物必须健康,且以雄性为佳。为了避免个体差异,每种抗原最好免疫 3 只以上的动物。

2. 获得的免疫血清需要进行特异性检测、亲和力测定和效价滴定。针对颗粒性抗原的免疫血清效价,可通过凝集或溶细胞试验(如溶血素效价滴定)检测。可溶性抗原相应抗体的效价和纯度多选用环状沉淀、琼脂扩散和免疫电泳的方法检测。酶免疫测定、放射免疫分析及平衡透析等方法,可用于抗体的特异性和亲和力测定。抗血清鉴定的方法相见相关试验部分。

3. 抗血清纯化

更加精细的免疫试验需要从抗血清中提取免疫球蛋白,此过程称抗血清的纯化。其步骤为:

- (1) 50% 饱和硫酸铵盐以沉淀血清球蛋白
- (2) 应用透析或分子筛法除盐
- (3) 除盐后的球蛋白过阴离子交换柱(DEAE-纤维素),根据不同类别免疫球蛋白的等电点,选用不同 pH 和离子强度的缓冲液分别洗脱之
- (4) 高渗或风干法浓缩免疫球蛋白,若使用冷冻干燥器则可获得干燥制品。

4. 佐剂的准备和使用 佐剂可以帮助抗原在注射部位缓慢释放,以增加免疫刺激的效果。佐剂应用于可溶性抗原的免疫,颗粒性抗原的免疫无需佐剂。佐剂于抗原混合研磨时,应充分乳化,否则难以达到预期的免疫效果。在使用佐剂-抗原时,若难以吸入注射器,则可将连同装有佐剂的容器置热水上加热,并选用较粗的针头。注射完毕后,剩余佐剂-抗原置 4℃ 保存。通常使用弗氏佐剂。弗氏佐剂有完全和不完全佐剂之分。

佐剂的制备

佐剂可以帮助抗原在注射部位缓慢释放,以增加免疫刺激的效果,通常使用弗氏佐剂。弗氏佐剂有完全和不完全佐剂之分。

(1) 弗氏不完全佐剂的制备:

称取 10g 优质羊毛脂置研钵中, 逐滴加入液体石蜡油 40ml, 混匀后分装于青霉素瓶中,, 高压蒸气灭菌后 4 摄氏度保存。

(2) 完全佐剂加有灭活的分枝杆菌(如卡介苗)或棒状杆菌。Kang 弗氏佐剂可从试剂公司购买, 也可用羊毛脂和石蜡油按 1: 2-4 混合自行制备。佐剂与抗原按 1: 1 的比例混合乳化为均匀的乳液, 放置后不会发生油水分离。

5、免疫程序并非固定不变, 一般而言, 不与佐剂一同免疫的抗原, 免疫间隔时间较短, 可每隔 2-3 天免疫一次。由于佐剂有缓释作用, 与佐剂一起免疫的抗原可以隔 1-2 周。无论有无佐剂, 最后一次免疫一周后采取血清。加强免疫的剂量一般为首次剂量的 1/5-2/5。如需制备高度特异性的抗血清, 可选用低剂量抗原短程免疫; 若欲得到高效价的抗血清, 则宜采用大剂量的抗原长程免疫。由于免疫期限及间隔时间较长, 要注意脱敏, 尤其在静静脉免疫时。脱敏的原则时少量多次注射抗原, 例如, 在静脉注入抗原前, 先将抗原少量注入腹腔, 1 小时后再作缓慢静脉注射。

6. 伊红美蓝琼脂(EMB)

成分

蛋白胨 10g, 乳糖 10g, 磷酸氢二钾 2g, 琼脂 17g, 2%伊红 Y 溶液 20mL, 0.65%美蓝溶液 10mL, 蒸馏水 1000mL, pH7.1

制法

将蛋白胨、磷酸盐和琼脂溶解于蒸馏水中, 校正 PH, 分装于烧瓶内, 121℃ 高压灭菌 15min 备用。临用时加入乳糖并加热溶化琼脂, 冷至 50~55℃, 加入伊红和美蓝溶液, 摇匀, 倾注平板。

7. SS 琼脂

基础培养基

牛肉膏 5g, 蛋白胨 5g, 三号胆盐 3.5g, 琼脂 17g, 蒸馏水 1000mL

再将两液混合, 121℃ 高压灭菌 15min, 保存备用。

完全培养基

基础培养基 100mL, 乳糖 10g, 柠檬酸钠 8.5g, 硫代硫酸钠 8.5g, 10%柠檬酸铁溶液 10mL, 1%中性红溶液 2.5mL, 0.1%煌绿溶液 0.33mL

加热溶化基础培养基, 按比例加入上述染料以外之各成分, 充分混合均匀, 校正至 pH7.0, 加入中性红和煌绿溶液, 倾注平板。

(黄丽霞、孔争)

实验四 肠道病原的检查 II

EXPERIMENT FOUR

Examination Of Enterobacteria II

【实验目的、要求】

学习肠道病原的检查。掌握鉴定肠道杆菌的生化反应原理及方法。熟悉虫卵的形态；了解以上各虫成虫、（或）中间宿主的形态；钉螺、尾蚴的形态及经皮感染动物的方法。了解伤寒杆菌抗原免疫动物的方法。

【实验内容】

- 1、镜下观察蛔虫卵、钩虫卵、鞭虫卵、蛲虫卵、姜片虫卵、肺吸虫卵、肝吸虫卵、带绦虫卵、曼氏叠宫绦虫卵以及肉眼观察各虫成虫、（或）中间宿主的形态；
- 2、大便直接涂片法、饱和盐水漂浮法检查虫卵
- 3、钉螺、尾蚴的形态及经皮感染动物的方法（附）。

【试剂与器材】

载玻片、盖玻片、眼科镊、竹签、生理盐水、浮聚瓶（高 3.5cm，直径约 2cm 的圆形直筒瓶）、载玻片、竹签、饱和盐水、体重 2.5kg、4~5 月龄的健康雄性家兔、佐剂、伤寒抗原、无菌注射器、平皿、刻度吸管、毛细吸管、研钵等。

【实验学时】 4 学时

【原理及方法】

一、几种虫卵以及其成虫的形态

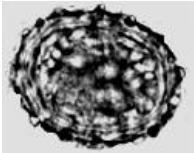
1. 似蚓蛔线虫（蛔虫）(*Ascaris lumbricoides*)

似蚓蛔线虫属线虫纲，寄生于人体小肠。

（1）蛔虫卵（镜下观察）：分为受精卵和未受精卵两种（表 2-4）。

表 2-4 蛔虫受精卵与未受精卵的区别

受精蛔虫卵	未受精蛔虫卵
1) 宽椭圆形， $45\sim 75\times 35\sim 50\mu$	长椭圆形， $88\sim 94\times 39\sim 44\mu$
2) 卵壳厚，自外向内分三层：受精膜、壳质层、蛔甑层。卵壳表面常附着一层凹凸不平的蛋白质膜	卵壳与蛋白质膜均较薄，无蛔甑层及受精膜
3) 内含一个卵细胞，细胞两端与卵壳间有新月形空隙	内含大小不等的屈光颗粒



（2）蛔虫成虫大体标本（肉眼观察）

蛔虫为人体肠道寄生线虫中体形最大者。虫体长圆柱形，形似蚯蚓，活体略带淡黄或微

黄色，固定标本灰白色。体表光滑有细横纹，体两侧有明显的侧线。雄虫长 15~35cm，雌虫 20~35cm，雄虫尾端向腹面弯曲。蛔虫唇瓣围绕口孔呈品字形。



图 2-6 雌、雄蛔虫成虫



图 2-7 蛔虫唇瓣

2. 十二指肠钩口线虫 (*Ancylostoma duodenale*) 和美洲板口线虫 (*Necator americanus*)
十二指肠钩虫及美洲钩虫属线虫纲，寄生于人体小肠。

自学标本

(1) 两种钩虫成虫 (镜下或肉眼观察)

两种钩虫成虫细长，约 1cm 左右，略透明，活体吸血量多时呈血红色，死后呈乳白色。虫体前端均向背面仰曲，都有一发达的角质口囊。雄虫尾部膨大，由角质延伸形成膜质交合伞。两种钩虫依其大小、体态、口囊、交合伞外形及其背腹肋的不同可以加以鉴别 (表 2-5)。

(2) 钩虫卵 (镜下观察)

两种钩虫卵相似，不易区别，统称钩虫卵。呈椭圆圆形，大小为 56~76×36~100μm。壳薄而无色透明，内含 2~8 个卵细胞，以四个为多见，卵细胞与卵壳之间有明显间隙。胞内可见桑葚期。



图 2-8 钩虫卵

表 2-5 寄生人体两种钩虫成虫的鉴别

鉴别要点	十二指肠钩虫	美洲钩虫
大小(mm)	♀: 10~13×0.6	9~11×0.4
体形	♂: 8~11×0.4~0.5	7~9×0.3
	前端与后端均向背面弯曲，体呈“C”形	前端向背面仰曲，后端向腹面弯曲，体呈“J”形
口囊	腹侧前缘有两对钩齿	腹侧前缘有一对板齿
交合伞	撑开时略呈圆形	撑开时略呈扁圆形
背辐射	远端分两支，每支两分三小支	基部先分两支，每支远端再分两小支
交合刺	两刺呈长鬚状，末端分开	一刺末端呈钩状，常包套于另一刺的凹槽内
阴门	位于体中部略后	位于体中部略前
尾刺	有	无

示教标本

1) 两种钩虫的口囊及交合伞（镜下观察）

2) 成虫寄生肠腔标本（肉眼观察）

观察钩虫寄生肠腔的方式，联系其形态特征，了解致病机理。

3 毛首鞭形线虫(鞭虫)(*Trichuris trichiura*)

鞭虫属线虫纲，主要寄生于人体回盲部。

自学标本

鞭虫卵（镜下观察）

纺锤形,大小 $50\sim 54\times 22\sim 23\text{ }\mu\text{m}$,壳厚,黄褐色,两端各具一透明塞状突起,卵内含一椭圆形未分裂的卵细胞（图 2—8）。



2—8 鞭虫卵

示教标本

(1) 鞭虫成虫大体标本（肉眼观察）

形似马鞭,前端细长,约占体长 $3/5$,后端粗大,占体长 $2/5$,雄虫长 $3\sim 5\text{cm}$,尾端向腹面呈环状卷曲（图 2—9）。

(2) 鞭虫寄生肠壁标本



图 2—9 鞭虫雌雄成虫

4 蠕形住肠线虫(蛲虫)(*Enterobius Vermicularis*)

自学标本

蛲虫卵（镜下观察）

长椭圆形，两侧不对称，呈 D 字形，壳较厚透明，内含一蝌蚪状幼虫（图 2—10）。



图 2—10 蛲虫卵

示教标本

蛲虫成虫染色标本（镜下观察）

细小白色。虫体前端角皮膨大形成头翼，咽管末端膨大呈球形，称咽管球。雌虫长 $8\sim 13\text{mm}$,雄虫长 $2\sim 5\text{mm}$, 后端向腹面卷曲。



图 2—11 蛲虫雌雄成虫

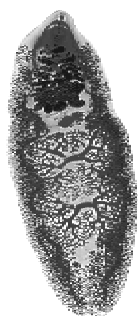


图 2—12 姜片虫成虫

5.布氏姜片吸虫(*Fasciolopsis buski*)

又称姜片虫，属吸虫纲，寄生于人或猪小肠。

自学标本

(1) 布氏姜片吸虫成虫染色标本（肉眼观察）

1) 长椭圆形，背腹扁平且肥厚，固定后形似姜片，平均大小为 $20\sim 75\times 8\sim 20\text{mm}$ 。

2) 腹吸盘相当发达，呈漏斗状，大小略为口吸盘的 $4\sim 5$ 倍，两盘距离较近。两肠支呈波浪状向后延伸，末端为盲端。

3) 卵巢成佛手状分支, 位于子宫与睾丸之间。卵膜外包以梅氏腺, 无受精囊, 有劳氏管。卵黄腺发达, 分布于腹吸盘后的两侧。

4) 睾丸分支较细, 前后排列, 占据虫体后端大半部分。

(2) 布氏姜片吸虫卵(镜下观察)

为人体蠕虫卵中最大的虫卵, 大小为 $130 \sim 140 \times 80 \sim 85 \mu\text{m}$ 。淡黄色, 椭圆形。卵壳薄而均匀, 卵盖不明显, 卵内含 1 个卵细胞和 $20 \sim 40$ 个卵黄细胞(图 2-13)。



图 2-13 姜片虫卵

6. 华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*)

又称肝吸虫, 属吸虫纲。成虫寄生于终末宿主肝脏胆管。

自学标本:

(1) 华支睾吸虫成虫染色标本(图 2-14)



图 2-14 肝吸虫成虫

虫体扁平, 前尖后圆, 形似葵瓜子, 平均大小 $10 \sim 25 \times 3 \sim 5 \text{mm}$ 。口吸盘位于虫体前端, 腹吸盘位于虫体前 $1/5$ 处, 腹吸盘略小于口吸盘。消化道包括口、咽、食道和肠支, 两肠支沿虫体两侧呈直线延伸至末端成盲管。管状排泄囊位于虫体后部中央, 开口于虫体末端。卵巢边缘分叶, 位于虫体后 $1/3$ 交界处。其前有卵膜、梅氏腺, 后有受精囊、劳氏管。子宫为单管状, 充满虫卵。自卵膜盘曲向前开口于腹吸盘前的雌性生殖孔。卵黄腺呈棕黄色, 颗粒状, 分布在虫体两侧, 自腹吸盘至受精囊水平区。一对分支状的睾丸占虫体后 $1/3$ 部分, 各发出一输出管, 在虫体中部汇合为输精管, 继而向前膨大形成储精囊,

通过射精管开口于腹吸盘前的雄性生殖孔。

(2) 华支睾吸虫卵(图 2-15)

为人体蠕虫卵中最小的虫卵, 平均大小为 $29 \times 17 \mu\text{m}$ 。黄褐色,



图 2-15 肝吸虫卵

形似芝麻, 前端较窄, 后端钝圆。卵壳厚, 卵盖和肩峰明显, 底端有一小疣, 内含一成熟毛蚴。

(3) 华支睾吸虫囊蚴的检查方法

取约米粒大小的鲤科淡水鱼肉, 置于两张载玻片之间压平, 在低倍镜下观察。囊蚴平均大小为 $138 \times 115 \mu\text{m}$, 椭圆形, 外以囊壁包绕, 内有口、腹吸盘以及肠管、排泄囊等结构。

示教标本:

(1) 华支睾吸虫成虫染色和未染色标本。

(2) 华支睾吸虫成虫寄生于肝胆管的病理标本

(3) 华支睾吸虫第一、二中间宿主: 纹沼螺、赤豆螺、长角函螺及鲤科鱼类、淡水虾。

7. 猪带绦虫 (*Taenia solium*)

自学标本

(1) 猪带绦虫头节(染色标本)(表 2-6)

球形, 有四个吸盘, 顶端具有顶突, 围绕顶突周围排列有两圈小钩。

(2) 猪带绦虫成节（染色标本）（表 2—6）

睾丸 150~200 个，散在。卵巢除分左右两叶外，在子宫与阴道之间有一卵巢分叶，共分三叶。

(3) 猪带绦虫孕节（墨汁灌注法）（表 2—6）

节片长>宽，子宫分枝不整齐，每侧分枝 7~13 枝。

(4) 虫卵

猪带绦虫与牛带绦虫虫卵仅在卵壳上有两个丝状突起，猪带绦虫卵没有。但两种虫卵排出时，卵壳多已破裂，难以鉴别，统称带绦虫卵。

卵为球形或近似球形，直径为 31~43um，胚膜较厚，棕黄色，上有放射状条纹，胚膜内含一个六钩蚴。



图 2—16 带绦虫卵

示教标本

(1) 猪带绦虫成虫大体标本（图 2—17）

虫体扁长约 2~4m，乳白色，逐节增宽，生殖孔呈左右不规则之交互排列。

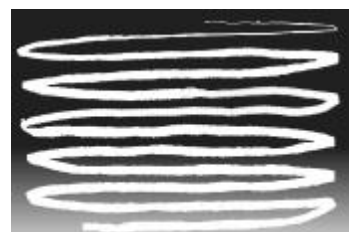


图 2—17 猪带绦虫成虫

(2) 囊尾蚴瓶装标本

卵圆形，黄豆大小，呈白色半透明状物，囊内充满囊液，囊壁内面的头节米粒大小，外形似成虫头节。

(3) 囊尾蚴寄生猪肉大体标本（米猪肉）

猪肉（横纹肌）切面上可见呈水泡样隆起之囊尾蚴。



图 2—18 猪囊尾蚴（左：头节内陷；右：头节外伸）

8. 肥胖带吻绦虫（*Taenia saginata*）

自学标本

(1) 牛带绦虫头节（染色标本）

呈四方形，四周四个吸盘（表 2—6）

(2) 牛带绦虫成节（染色标本）

节片近似方形，每节片内具有雌雄生殖器官各一套，滤泡状睾丸 300~400 个，散在。卵巢分左右两叶，位于节片下方中间两侧（表 2—6）。

(3) 牛带绦虫孕节（墨汁灌注标本）

节片长>宽，子宫分支整齐，每侧分支 15~30 支（表 2—6）。

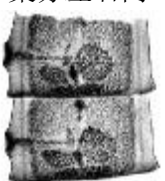
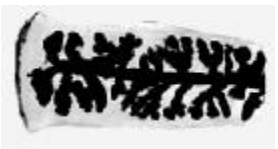
(4) 牛囊尾蚴（染色和未染色标本）

卵圆形，黄豆大小，内翻头节米粒大小，外形与成虫头节相似（压片标本可见头节向外翻出）。

示教标本

1. 牛带绦虫成虫大体标本
2. 牛带绦虫的头节、孕节
3. 牛囊尾蚴

表 2-6 两种绦虫鉴别要点

	猪带绦虫	牛带绦虫
体长	2~4m	4~8m
节片	700~1000 节，节片较薄，略透明	1000~2000 节，节片较肥厚，不透明
头节	球形，四个吸盘，具顶突及两圈小钩	近似方形，四个吸盘，无顶突及小钩
		
成节	卵巢分左右两叶及中央小叶	卵巢仅分左右两叶
		
孕节	子宫分枝整齐，每侧 7~13 枝	子宫分枝整齐，每侧 15~30 枝
		
囊尾蚴	球形，头节具有小钩	方形，头节无小钩

9. 曼氏迭宫绦虫 (*Spirometra mamsoni*)

示教标本

1、曼氏迭宫绦虫成虫大体标本

曼氏迭宫绦虫隶属假叶目，成虫长约 60~100cm, 头节细小呈指状，背腹面各有一条纵行的吸槽，链体上的节片宽>长。

2、曼氏迭宫绦虫成节（孕节）染色标本

成节与孕节无形态区别，每节约具有发育成熟的雌雄性生殖器官各一套。睾丸小泡形，约 320~540 个，散布于节片侧背面。卵巢分两叶，位于节片腹面后部中央。子宫位于节片

中部，似发髯样卷曲。雄性生殖孔、雌性生殖孔、子宫孔从前向后顺序排列。

3、裂头蚴

长约 100-300mm,宽约 0.7mm，体前端稍大，具有与成虫相似的头节，虫体不分节，但具有横纹。

4、虫卵

似椭圆形，一端稍钝，另一端相对尖细，浅灰色，大小约 $52\sim 76\times 31\sim 44\mu\text{m}$ ，卵壳较薄，卵盖位于尖细端，卵内含一个卵细胞和 12~20 个卵黄细胞。

二. 大便直接涂片法、饱和盐水漂浮法检查虫卵

大便直接涂片法是粪便检查诊断寄生虫病中最基本、最常用的方法。用以检查蠕虫卵、原虫的包囊和滋养体。方法简便，连续作3次涂片，可以提高检出率。饱和盐水浮聚法是利用比重较大的液体，使蠕虫卵上浮，集中于液体表面。此法用以检查钩虫卵效果最好，也可用以检查线虫卵和微小膜壳绦虫卵。但不适于检查吸虫卵和原虫包囊。

（一）大便直接涂片法

1. 蠕虫卵的检查 滴一滴生理盐水于洁净的载玻片上，用竹签挑取绿豆大小的粪便块，在生理盐水中涂抹均匀；涂片的厚度以透过玻片隐约可辨认书上的字迹为宜。

2. 原虫检查：

(1)活滋养体检查 涂片应较薄，方法同查蠕虫卵。气温愈接近体温，滋养体的活动愈明显。必要时保温。

(2)包囊的碘液染色检查 直接涂片方法同上，以一滴碘液代替生理盐水。粪便涂抹方法同上。

（二）饱和盐水漂浮法

用竹签取黄豆大小的粪便置于浮聚瓶中，加入少量饱和盐水调匀，再慢慢加入饱和盐水至液面略高于瓶口，以不溢出为止。此时在瓶口覆盖一载玻片，静置15min后，将载玻片提起并迅速翻转，镜检。

【附录】

钉螺、尾蚴的形态及经皮感染动物的方法（示教）

1. 钉螺及尾蚴的形态：钉螺为小型螺类，圆锥形，似螺丝钉，长 10mm 左右，有 6~8 个螺层，表面有纵肋或光滑无肋。尾蚴：采自阳性钉螺，10% 甲醛固定，卡红染色、封片标本。高倍镜观察。叉尾型尾蚴，可见口、腹吸盘，腹吸盘后有一团生殖原基。体部有头腺和穿刺腺。

2. 尾蚴经皮感染动物的方法

- (1) 用 5%戊巴比妥钠溶液经腹腔麻醉小鼠
- (2) 小鼠腹部备皮，暴露皮肤
- (3) 解剖显微镜下计数 30~40 条活尾蚴置于盛有蒸馏水的盖玻片上
- (4) 将盛有尾蚴的盖玻片贴于小鼠腹部皮肤约 20 分钟，再接去盖玻片。
- (5) 感染 45 天后，解剖小鼠观察肝脏虫卵肉芽肿及门静脉内成虫寄生情况。

【思考题】

1. 蛔虫卵、钩虫卵、鞭虫卵、蛲虫卵、姜片虫卵、肺吸虫卵、肝吸虫卵、带绦虫卵、曼氏叠宫绦虫卵的形态特点是什么？各自的感染阶段是哪一虫期？
2. 以上各虫哪些属于土源性蠕虫？哪些属于生物源性蠕虫？如果是生物源性蠕虫其中间宿主是什么？
- 2、大便直接涂片法、饱和盐水漂浮法检查虫卵原理和操作方法。
- 3、注射伤寒杆菌抗原免疫动物；

（程喻力）

实验五 组织内病原 I

EXPERIMENT FIVE

Pathogen Of Enter tissue I

【实验目的、要求】

学习组织内病原的分类及检查方法。掌握常见组织内病原的形态；掌握肌肉压片法检查旋毛虫幼虫囊包；熟悉病原性球菌血浆凝固酶检测（玻片法）；抗 O 实验（间接凝集实验）；了解组织内病原的分类。

【实验内容】

- 1、沙眼衣原体包涵体、内基氏小体、结核杆菌、破伤风杆菌、产气荚膜杆菌、旋毛虫形态。
- 2、血浆凝固酶检测（玻片法）
- 3、抗 O 实验（间接凝集实验）
- 4、肌肉压片法检查旋毛虫幼虫囊包

【试剂与器材】

普通光学显微镜；标本片（沙眼衣原体包涵体、内基氏小体、结核杆菌、破伤风杆菌、产气荚膜杆菌、旋毛虫）；金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、人血浆；患者血清、抗链球菌溶血素“O”试剂盒；无菌拭子、血平板、接种环、香柏油、擦镜纸、擦镜液

【实验学时】 3 学时

【原理及方法】

一、形态学观察

1. 沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*): 沙眼衣原体具有特殊的染色性状，不同的发育阶段其染色有所不同。成熟的原体以 Giemsa 染色为紫色，与蓝色的宿主细胞浆呈鲜明无比。始体以 Giemsa 染色呈蓝色。沙眼衣原体对革兰氏染色虽然一般反应为阴性，但变化不恒定。沙眼包涵体在上皮细胞浆内，很致密，如以 Giemsa 染色，则呈深紫色，由密集的颗粒组成。其基质内含有糖原，以 Lugol 液染色呈棕褐色斑块。（图 2—19）

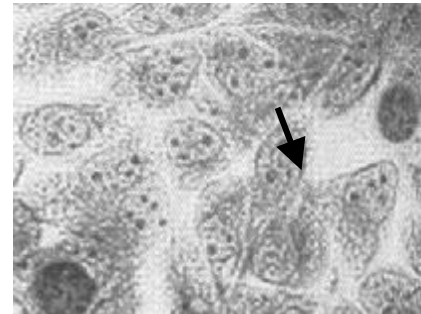
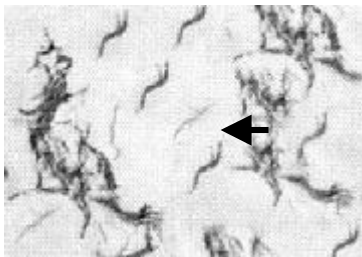


图 2—19 沙眼衣原体

2. 内基氏小体: 狂犬病毒感染后形成的，是胞浆内嗜酸性染色的包涵体[又名“内基氏小体”(Negri body)，在脑神经细胞内]（图 2—20）。



图 2—20 内基氏小体



3. 结核杆菌 (*Mycobacterium Tuberculosis*): 结核杆菌细长略弯曲，端极钝圆，大小约 $1\sim4\times0.4\mu\text{m}$ ，呈单个或分枝状排列，无荚膜、无鞭毛、无芽胞。在陈旧的病灶和培养物中，形态常不典型，可呈颗粒状，串球状，短棒状，长丝形等。

图 2-21 结核杆菌

取决于胞壁内所含分枝菌酸残基和胞壁固有层的完整性有关（图 2-21）。



图 2-22 破伤风杆菌

4.破伤风杆菌 (*Clostridium tetani*): 破伤风梭菌菌体细长, 长 $4\sim 8\mu\text{m}$, 宽 $0.3\sim 0.5\mu\text{m}$, 周身鞭毛, 芽胞呈圆形, 位于菌体顶端, 直径比菌体宽大, 似鼓槌状, 是本菌形态上的特征 (图 2-22)。

5. 旋毛虫 (*Trichuris spiralis*) 囊包: 为黄豆大小 (10mm x 5mm) 的乳白色半透明囊泡, 囊壁薄, 囊内充满囊液, 及一小米粒大的白点, 为向内翻卷收缩的头节 (图 2-23)。



图 2-23 旋毛虫幼虫囊包

6. 细粒棘球绦虫 (*Echinococcus granulosus*): 成虫全长 2-7mm, 共分四节: 头节、幼节、成节和孕节 (图 2-24)。

细粒棘球蚴（图 2—25）：幼虫即棘球蚴，俗称包虫，为圆形囊状体，随寄生时间长短、寄生部位和宿主不同，直径可由不足 1cm 至数十厘米。棘球蚴为单房性囊，由囊壁和囊内含物（生发囊、原头蚴、囊液等）组成。有的还有子囊和孙囊。囊壁外有宿主的纤维组织包绕。

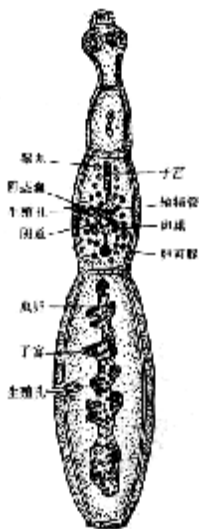


图 2-24 细粒棘球绦虫

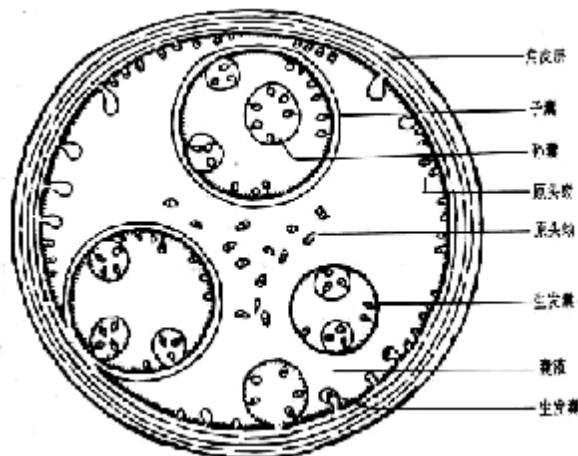


图 2-25 细粒棘球蚴

金黄色葡萄球菌(SA)是一种临床常见的机会致病菌,常引起化脓性感染,也是医院感染的重要病原菌之一。准确鉴定SA具有重要的临床意义。血浆凝固酶(Coagulase)是能使含有枸橼酸钠或肝素抗凝剂的人或兔血浆发生凝固的酶类物质,致病菌株多能产生,常作为鉴别葡萄球菌有无致病性的重要标志。

34

作用类似凝血酶原物质，可被人或兔血浆中的协同因子(Cofactor)激活变成凝血酶样物质后，使液态的纤维蛋白原变成固态的纤维蛋白，从而使血浆凝固。另一种凝固酶结合于菌体表面并不释放，称为结合凝固酶(Bound coagulase)或凝聚因子(Chumping factor)，在该菌株的表面起纤维蛋白原的特异受体作用，细菌混悬于人或兔血浆中时，纤维蛋白原与菌体受体交联而使细菌凝聚。游离凝固酶采用试管法检测，结合凝固酶则以玻片法测试。凝固酶耐热，粗制品 100℃30 分钟或高压灭菌后仍保持部分活性，但易被蛋白分解酶破坏。

操作方法：取一滴生理盐水于洁净的玻片上，同时用接种环挑取待检菌一环于生理盐水中，制成浓菌悬液，观察有无自凝现象。然后加一环人血浆混合，10s 内观察结果。

结果判断：出现明显凝块为阳性，否则为阴性。

三、抗“O”实验（间接凝集实验）

溶血性链球菌在代谢过程中产生溶血毒素“O”，该毒素可刺激机体免疫系统产生相对应的抗溶血毒素“O”抗体。乙型溶血性链球菌产生溶血毒素“O”，是一种含-SH 基的蛋白质，能溶解红细胞，不耐热，怕氧，如与空气接触稍久，即失去溶血能力，借还原剂的作用，将氧除去，可重新恢复溶血能力。“O”溶血毒素具有很强的抗原性。人受溶血性链球菌感染后 2~3 周就能产生抗链球菌溶血素“O” (Anti-streptolysin“O”，ASO)抗体。此种抗体能中和溶血素“O”，直至病愈后数月甚至年余才消失。因此凡查见病人血清内溶血素“O”的抗体效价显著增高者，可认为最近受过或反复受过溶血性链球菌的感染，如患风湿及急性肾小球肾炎等。

操作方法：将被测血清与含 250U/ml 的溶血素“O”混合后再加入抗链球菌溶血素“O”胶乳试剂，观察结果。

结果判断：由白色凝集物的样本其抗链球菌溶血素“O”效价>250U/ml。

四、肌肉压片法检查旋毛虫幼虫囊包及旋毛虫转种

当人或动物食入含有活囊包幼虫的肉类后，在胃液及肠液的作用下，幼虫自囊包逸出，在肠腔内发育为雌雄成虫，雌、雄交配后，雄虫死亡，雌虫侵入肠黏膜内产出新生幼虫。产于黏膜内的新生幼虫侵入局部淋巴管或小静脉，随淋巴和血循环到达宿主各组织器官，但只有到达横纹肌的幼虫才能继续发育。由于幼虫对肌细胞的刺激，导致炎症细胞浸润、纤维结缔组织增生，约在感染一个月左右，在幼虫周围形成纤维性囊壁，并不断增厚，形成囊包。因此，检测人或动物的横纹肌内有无旋毛虫幼虫囊包即可诊断是否感染旋毛虫。

操作方法：（1）将感染旋毛虫的小白鼠（或大白鼠）处死，剥皮，取其肌肉；也可取含有幼虫的猪肉，剪成米粒大小，取一小块米粒大小肌肉，置于两张载玻片之间，压片检查。

（2）旋毛虫感染小鼠：以含有 100~200 个幼虫囊包量的肌肉，经口喂健康小白鼠，喂前应饥饿小鼠 24 小时；或将含有幼虫囊包的肌肉剪碎，置于含有消化液的三角瓶内，一般每 1g 肌肉加入 60ml 的消化液，置 37~40℃温箱中，经 10~18 小时（此间经常摇动烧瓶或搅拌），去掉上层液，然后以水洗沉淀法或离心沉淀法收集幼虫。以生理盐水洗涤 2~3 次，用 1ml 的注射器和 8 号针头吸取 100~200 条幼虫，经腹腔注射或喂饲健康小白鼠（或大白鼠）。

（3）感染第 5 周后，在鼠肌中（以膈肌、腿部肌多见）可找到幼虫囊包。幼虫在动物体内可生存 3 个月到半年左右。

【思考题】

1. 组织内的病原微生物感染的共同特点。

2. 旋毛虫感染的过程。
3. 抗"O"试验的原理及其在临床检验中的意义。

【附录】

试管法凝固酶试验：用生理盐水将人血浆 4 倍稀释，取 0.5ml，然后挑取 3~5 个菌落于稀释血浆中，制成浓悬液，置 37℃ 水浴，30min 读取第一次结果，以凝固为阳性，若未凝固则每隔 0.5h 观察一次结果，3~4h 后仍为阴性继续观察，到 24h 不凝为阴性。同时以 ATCC25923 标准菌株做阳性对照。

（胡松）

实验六 组织内病原Ⅱ及血液内病原

EXPERIMENT SIX

The Pathogen Of Enter tissue Ⅱ And The Pathogen Of blood

【实验目的、要求】

学习组织内病原和血液内病原的检查法。掌握病原性球菌的三种不同的溶血现象；掌握囊虫、包虫、丝虫、疟原虫、利什曼原虫标本片观察。熟悉血片的制作；熟悉咽拭培养及其结果的观察。了解血液内病原的分类。

【实验内容】

- 1、溶血现象（示教）、咽拭培养检查
- 2、囊虫、包虫、丝虫、疟原虫、利什曼原虫标本片观察
- 3、血片的制作

【实验学时】 3 学时

【试剂与器材】

无菌拭子、血平板、接种环、甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌；普通光学显微镜；香柏油、擦镜液、擦镜纸、各组织及血液内病原大体及玻片标本等；载玻片、取血针、75%酒精消毒棉球；姬氏或瑞氏染色液、铁苏木素染色液、标本片等。

【实验原理及应用】

一、溶血现象（示教）、咽拭培养检查

观察咽部的细菌分布，观察不同的溶血现象的发生，对细菌的致病力进一步了解。

1、溶血现象（示教）

将甲型溶血性链球菌、乙型溶血性链球菌分别接种于血平板上，置 37 度培养箱 18-24 小时，观察溶血环

1) 甲型溶血性链球菌 (α -Hemolytic streptococcus)

菌落周围有 1—2mm 宽的草绿色溶血环，称为甲型溶血或 α 溶血(条件致病菌)

2) 乙型溶血性链球菌 (β -Hemolytic streptococcus)

菌落周围形成一个 2—4mm 宽界限分明、完全透明的无色溶血环，称乙型溶血或 β 溶血(致病菌)

2. 咽拭培养（血平板）

观察咽部的细菌分布，观察其溶血现象的发生，对细菌的分类、致病力进行鉴定。

操作方法：无菌拭子在咽部擦拭后，在血平板上进行划线，在 37 度下培养 18-24 小时后观察结果。

结果判断：观察其溶血现象的发生，并将咽拭培养结果进行革兰氏染色（详见第一章）后鉴别细菌。

注意事项：无菌拭子在咽部擦拭时，注意无菌操作。

二、囊虫、丝虫、疟原虫、利什曼原虫标本片观察

绦虫的幼虫期统称为中绦期，其名称和形态因种而异。猪囊尾蚴是猪带绦虫的幼虫，可

寄生于人体、猪体横纹肌（图2—26）、脑等许多部位，所致的囊虫病比成虫寄生在小肠引起的猪带绦虫病要严重得多。

丝虫属于线虫。在我国流行的丝虫只有班氏吴策线虫（*Wuchereria bancrofti*）和马来布鲁线虫（*Brugia malayi*）两种，寄生于人体淋巴系统。两种丝虫雌虫子宫发达，直接排出幼虫即微丝蚴。两种微丝蚴的形态特征是诊断和鉴别虫种的主要依据。

疟原虫（malaria parasite）属于原虫的孢子虫纲。寄生在人体的疟原虫共有四种，其中间日疟原虫流行最广泛。

杜氏利什曼原虫（*Leishmania donovani*）属原虫的鞭毛虫纲。生活史包括无鞭毛体及前鞭毛体两个时期，以无鞭毛体寄生于人体的单核巨噬细胞内，主要引起内脏利什曼病（黑热病）。白蛉是利什曼原虫的传播媒介。

1. 囊虫：猪囊尾蚴俗称囊虫。为黄豆大小的乳白色半透明的囊泡，囊壁薄，囊内充满囊液，及一米粒大小的白点，为向内翻卷收缩的头节（图 2—27）。

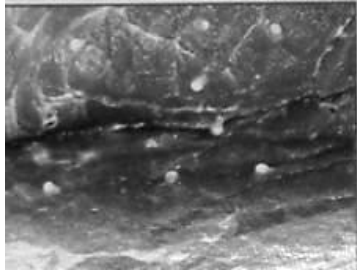


图 2—26 寄生于猪肉内之囊尾蚴

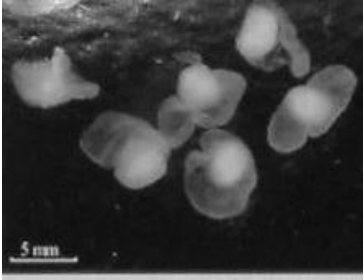


图 2—27 猪囊尾蚴

2. 丝虫：丝虫虫体细长形如丝线而得名。班氏丝虫与马来丝虫形态与结构基本相似。

① 成虫：虫体乳白色，体表光滑，雌虫大于雄虫。虫体头端略膨大，近似圆形，顶部有口，外周有两圈乳突。雄虫尾端向腹面呈螺旋状卷曲，常为2圈。雌虫尾端钝圆，微向腹面弯曲，生殖器官为双管型，子宫膨大近卵巢段含大量虫卵，随子宫的延伸，虫卵逐渐发育成，在近阴门处，子宫内卵壳伸长成鞘膜，包于幼虫外，即为微丝蚴。

② 微丝蚴：成虫产出的幼虫叫微丝蚴，虫体细长，无色透明，体外被有鞘膜。头端钝圆，尾端尖细，活时作蛇形运动。经染色的虫体弯曲，体内有许多圆形或椭圆形的细胞核，称体核。头端无体核区，称头间隙。虫体尾端的细胞核称为尾核。微丝蚴的尾端有无尾核、头间隙长宽比例、体核密度与分布情况等是鉴别不同种微丝蚴的要点（表2—7）。

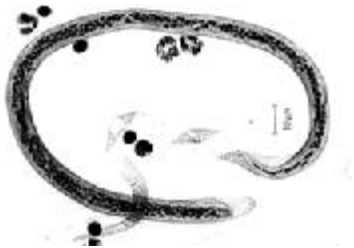


图 2—29 马来微丝蚴



图 2—28 班氏微丝蚴

表 2—7 班氏与马来微丝蚴形态鉴别

	班氏微丝蚴	马来微丝蚴
长×宽 (μm)	244~296×5.3~7.0	177~230×5~6
体态	柔和, 弯曲较大	硬直, 大弯上有小弯
头间隙 (长: 宽)	较短 (1: 1 或 1: 2)	较长 (2: 1)
体核	圆形或椭圆形, 各核分开, 排列整齐, 清晰可数	椭圆形, 大小不等, 排列紧密, 常互相重叠, 不易分清
尾核	无	有 2 个, 前后排列, 尾核处角皮略膨大

3. 杜氏利什曼原虫

①杜氏利什曼原虫前鞭毛体 (细滴型)

虫体呈梭形, 染成淡紫色, 中部有一圆形的细胞核, 前端有动基体, 从其前方的基体长出一根鞭毛, 游离于虫体外。虫体大小为 $14.3\sim 20\times 1.5\sim 1.8\mu\text{m}$ (图 2—30)

②杜氏利什曼原虫无鞭毛体 (利杜小体)

无鞭毛体寄生于巨噬细胞内, 每一个巨噬细胞内可寄生20~100个利杜体, 由于寄生虫的数量过多, 细胞可以破裂, 常见到游离于细胞外的无鞭毛体 (与血小板区别, 血小板被染成淡紫色红色, 无明显结构)。无鞭毛体体积甚小, 为椭圆形小体, 平均 $4.4\times 2.8\mu\text{m}$ 用瑞氏染色, 原虫细胞质呈淡蓝或深蓝色, 内有一个较大的圆形核, 呈红色或淡紫色。动基体细小, 杆状, 着色较深 (图 2—31)。

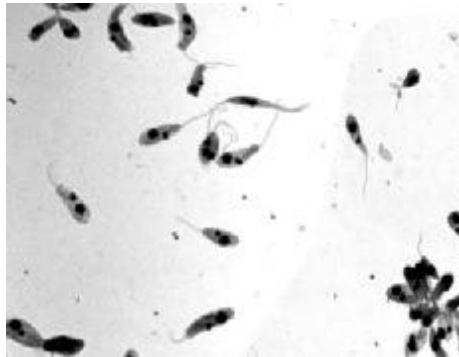


图 2—30 杜氏利什曼原虫前鞭毛体

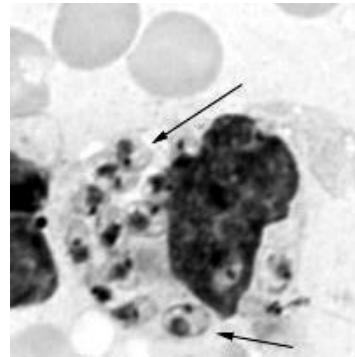


图 2—31 杜氏利什曼原虫无鞭毛体

4. 疟原虫: 疟原虫在红细胞内发育各期形态特征是确诊疟疾和鉴别出虫种的重要依据。

疟原虫的基本结构为核、胞质和胞膜, 此外, 胞质内还含有被疟原虫消化分解的血红蛋白的终产物——疟色素。薄血膜经姬氏或瑞氏染色后, 疟原虫的核呈紫红色或红色, 胞质为蓝色, 疟色素不着色, 呈棕黄色或棕褐色。4种人体疟原虫发育各期的虫体基本构造相似, 但形态有所不同; 此外, 被寄生的红细胞的形态也有不同变化。这些特征均要熟识与鉴别。

表 2—8 四种疟原虫在红细胞内发育各期的形态特征

	间日疟原虫	恶性疟原虫	三日疟原虫	卵形疟原虫
环状体	胞质淡蓝色，环较大，约为红细胞的 $1/3$ ；核 1 个，偶有 2 个红细胞内通常只寄生 1 个原虫。	环纤细，约为红细胞直径的 $1/5$ ；核 $1 \sim 2$ 个；红细胞内常有 2 个以上原虫寄生，虫体常位于红细胞边缘。	胞质深蓝色，环较粗壮，约为红细胞直径的 $1/3$ ；核 1 个；红细胞很少含有 2 个原虫	似三日疟原虫
大滋养体	核 1 个；胞质增多，形状不规则有伪足伸出；疟色素棕黄色，细小杆状，分散在胞质内	一般不出现在外周血液，开始集中在内脏毛细血管。体小，圆形胞质深蓝色；疟色素黑褐色，集中	体小，圆形或带状，空泡小或无亦可呈大环状；核 1 个；疟色素深褐色、粗大、颗粒状，常分布于虫体边缘	虫体不规则呈圆形，空泡不显著；核一个，较大；疟色素似日疟原虫。但较少而粗大
未成熟裂殖体	核开始分裂；胞质随着核的分裂渐呈圆形，空泡消失；疟色素开始集中	外周血不易见到虫体仍似大滋养体，但核分裂成多个；疟色素集中	体小，圆形，空泡消失；核 2 个以上；疟色素集中较迟	体小，圆形成卵圆形；空泡消失；核开始分裂；疟色素较少
成熟裂殖体	虫体充满红细胞裂殖子 $12 \sim 24$ 个排列不规则；疟色素集中	外周血不易见到裂殖子 $8 \sim 16$ 个，排列不规则；疟色素集中	小于正常红细胞裂殖子 $6 \sim 12$ 个，常为 8 个排成一环；疟色素常集中在中央	虫体小于正常红细胞；裂殖子 $4 \sim 12$ 个，常为 8 个；疟色素集中在中央或一侧
雌配子体	虫体圆形或卵形占满胀大的红细胞，胞质蓝色；核小致密，深红色，偏向一侧；	新月形，两端较尖，胞质蓝色；核致密，深红色位于中央；疟色素黑褐色，分布	小于正常红细胞圆形；胞质深蓝色；核 1 个，较小致密，深红色偏于一侧；疟色	虫体小于正常红细胞；疟色素分布似间日疟原虫

	疟色素分散	核周围	素多而分散	
雄配子体	虫体圆形，胞质蓝而略带红色；核大，疏松，淡红色，位于中央；疟色素分散	腊肠形，两端钝圆，胞质蓝而略带红色；核疏松淡红色，位于中央；疟色素分布核周	小于正常红细胞圆形；胞质浅蓝色；核1个，较大疏松，淡红色位于中央；疟色素分散	似三日疟原虫；疟色素分布似间日疟原虫
被寄生的红细胞变化	除环状体外，其余各期均胀大，色淡；并常见较多鲜红色、细小的薛氏体小点	正常或略小，可有数颗粗大紫色的茂氏点	正常或略小；偶见少量、淡紫色微细的齐氏小点	略胀大，色淡，部分长形，边缘呈锯齿状；薛氏小点较粗大，环状体期即可出现

二. 血片制作

疟疾和丝虫病人在其周围血中都可发现相应病原。故血液检查是诊断疟疾、丝虫病的基本方法。

【实验步骤及方法】

1. 检查疟原虫

①. 取血与涂片 用

75%酒精棉球消毒耳垂，待干后用左手拇指与食指捏着耳垂下方，并使耳垂下侧方皮肤绷紧，右手持取血针、刺破皮肤，挤出血滴。薄、厚血膜可涂制在同一张玻片上。间日疟原虫宜在发作后数小时采血；恶性疟在发作初期采血可见大量环状体，一周后可见配子体。

薄血膜制片：在载玻片1/3与2/3交界处蘸血1小滴，以一端缘光滑的载玻片为推片，将推片的一端置于血滴前，待血液沿推片端缘扩散后，自右向左推成薄血膜。

厚血膜制片：于载玻片的另一端（右）1/3处蘸血1小滴（约1ml），以推片的一角，将血滴自内向外作螺旋形摊开，使之成为0.8-1cm，厚薄均匀的血膜。

②. 固定与染色 血片必须充分凉干，否则染色时容易脱落。固定时用小棒蘸甲醇或无水

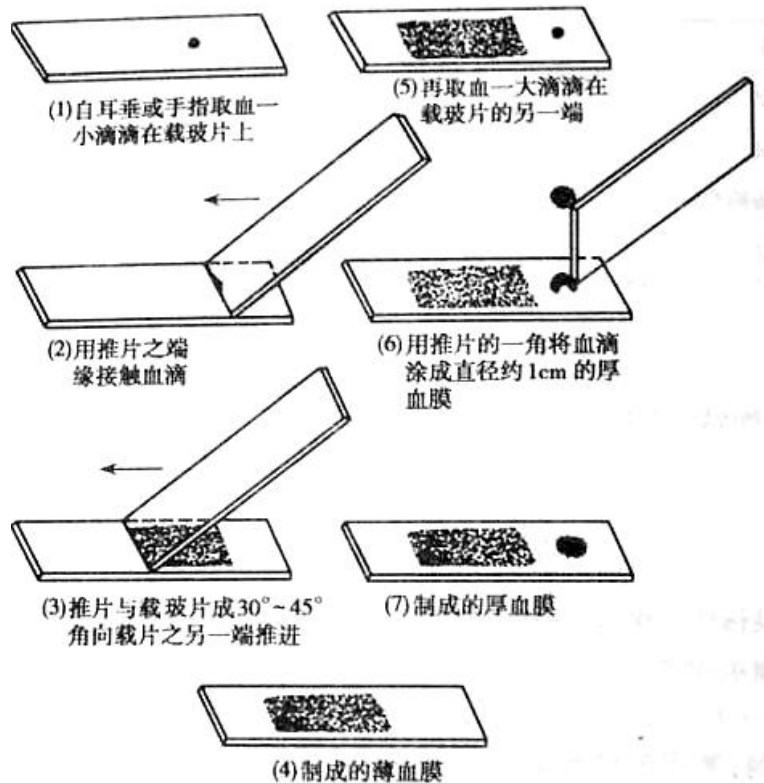


图 2-32 厚、薄血膜制作示意图

酒精在薄血膜上轻轻抹过。如薄、厚血膜在同一片上，切勿将固定液带到厚血膜上，因厚血膜固定之前必须溶血。可用滴管滴水于厚血膜上，待血膜呈灰白色时，将水倒去，凉干。

常用的染色法有姬氏染色法和瑞氏染色法：

姬氏染色法：将稀释的姬氏染液滴于已固定的薄、厚血膜上，染色半小时（室温），再用缓冲液冲洗。血片凉干后镜检。

快速姬氏染色法：姬氏染液1ml，加缓冲液5ml，如前法染色5分钟后用缓冲液冲洗，凉干后镜检。

瑞氏染色法：此法操作简便，适用于临床诊断，但甲醇蒸发甚快，掌握不当易在血片上发生染液沉淀，并较易退色，保存时间不长。多用于临时性检验。

2. 检查微丝蚴

①新鲜血片检查 晚间9时到次晨2时取1滴滴于载玻片上，加盖片，在低倍镜下观察，发现蛇形游动的幼虫后，仍需做染色检查，以确定虫种。

②厚血膜检查 厚血膜的制作、溶血、固定与姬氏液染色同疟原虫。但需取血3滴，也可用苏木素染色法染色。

【思考题】

1. 如何根据细菌的溶血现象鉴别三种不同的病原性球菌？
2. 班氏微丝蚴和马来微丝蚴有何区别？
3. 四种疟原虫红内期的形态有何特征？

（孔争）

实验七 动物细胞免疫功能检测

EXPERIMENT SEVEN

Assay Of The cell Immune Function Of animal

【实验目的、要求】

学习细胞免疫功能检测。掌握 E 花环实验；熟悉免疫功能的构成；检测机体细胞免疫功能的方法概述；了解免疫动物制备多克隆和单克隆抗体的原理及方法。

【实验内容】

E 花环实验

【实验学时】 3 学时

【原理及应用】

一、E 花环实验

正常人外周血中 T 细胞在体外能直接和绵羊红细胞 (SRBC) 结合形成玫瑰花样细胞团。凡能与 SRBC 形成 E 花环的淋巴细胞称为 E 花环形成细胞 (ERFC)。E 花环实验的原理是人的 T 细胞表面具有能与 SRBC 膜上的糖蛋白相结合的受体，称为 E 受体。因此，SRBC 能黏附于 T 细胞的表面，形成花环。T 细胞中有部分细胞与 SRBC 有高度的亲和力，与较低比例的 SRBC 混合，经低速离心沉淀后能迅速形成 E 花环。此种 T 细胞是 T 淋巴细胞一种功能活跃的亚群，能更敏感地反映机体的细胞免疫水平，故又称活性 E 花环。常用的 E 花环试验方法有总 E 花环实验及活性 E 花环实验。前者是测定外周血中总 T 细胞百分数，后者是测定功能活跃的 T 细胞百分数。E 花环实验可了解细胞免疫功能状态，判断疾病的预后，考核药物疗效等。

【试剂与器材】

淋巴细胞分离液 [聚蔗糖-泛影葡胺 (Ficoll-Hypaque, 比重 1.077 ± 0.001)] , 1%SRBC、灭活小牛血清；肝素抗凝血；Hank's 液；1%美兰液。

【操作方法】

1. 淋巴细胞分离 (葡聚糖-泛影葡胺分离法)

外周血中的各种血细胞其体积、形态和比重有所不同，红细胞和多形核白细胞比重较大，为 1.092 左右，而淋巴细胞和单核细胞比重为 1.075—1.092，由于其比重不同，离心时其沉降速度亦不同。利用一种比重介于 1.075—1.092 之间而近于等渗的溶液 (分层液) 作密度梯度离心，使一定比重的细胞按相应密度梯度分布，可将各种血细胞分离开，选择并吸出淋巴细胞层，即可完成淋巴细胞分离。

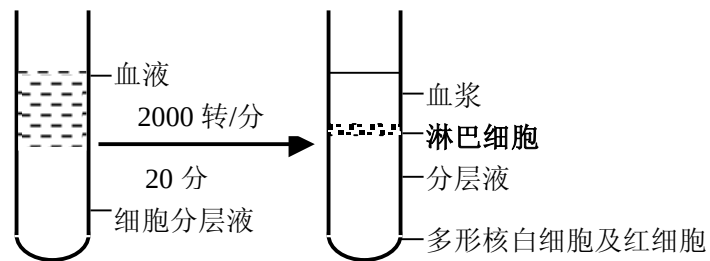
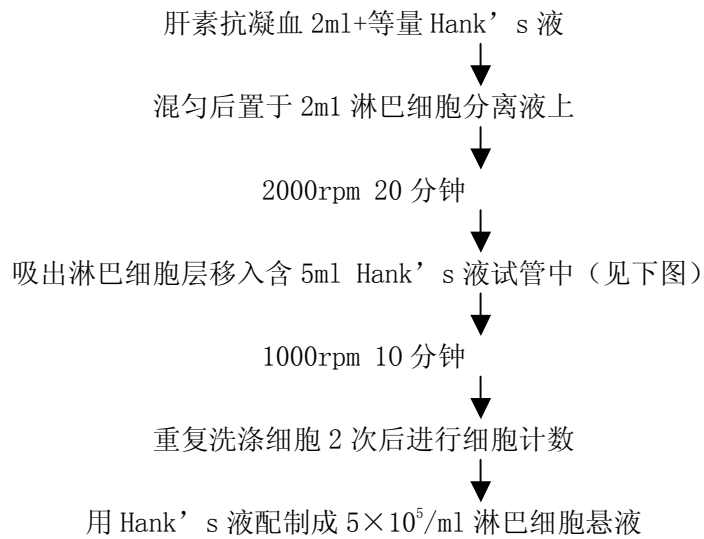
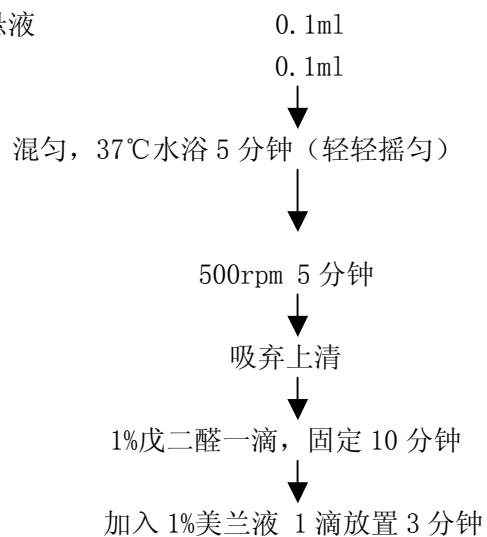


图 2—33 淋巴细胞分离示意图

2. E 花结形成试验

取 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 淋巴细胞悬液
1%SRBC





加盖玻片镜检观察 E⁺细胞

【结果判断】

E⁺细胞判断:能结合 3 个以上 SRBC 者为 E⁺细胞。

正常值: 总 E 花环形成率 60—70%, 活性 E 花环形成率 15—35%

用途: E 花环试验可用于检测外周血 T 细胞数量, 间接反应机体细胞免疫功能。

【注意事项】

肝素抗凝血沿着试管壁慢慢加至分层液面上, 勿使血液混入分层液内, 应保持两种液体界面清晰。离心后, 管内容物分为三层, 上层为血浆 (内含血小板), 中间层为分层液, 底层为红细胞和多形核白细胞。在上、中层液体界面处可见到乳白色混浊的淋巴细胞层, 用吸管仔细吸取淋巴细胞层。

【思考题】

1. 细胞免疫功能检测常用有哪几种方法?
2. E 花环实验的试验原理, 结果判定及用途?
3. 人类 T 细胞的主要表面标志有哪些, 你了解多少它们的检测方法和临床意义?
4. 免疫学检测技术的分类。
5. 将实验结果绘图。

【附录】

成熟的人 T 细胞表面表达绵羊红细胞 (SRBC) 受体, 能与 SRBC 结合形成 E 花环, 而 B 细胞则不能。经聚蔗糖—泛影葡胺分层液密度梯度离心, E 花环形成细胞因密度增大而沉积于管底, 用低渗法裂解花环中的 SRBC, 即可获得纯化的 T 细胞。B 细胞则可直接取自分层液的界面。E 花环实验优点: 方法简便易行; 可大量分离 T 细胞; 所获细胞的纯度较高 (95%~99%); 可同时获得 B 细胞。缺点: E 花环形成后可能启动 T 细胞内信号传递, 使 T 细胞活化。

(许楚娟)

实验八 其他病原形态学检查

EXPERIMENT EIGHT

The Morphological Examination of Other Pathogen

【实验目的、要求】

学习阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、齿龈内阿米巴 (*Entamoeba gingivalis*)、白喉杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) 及其他病原的形态学检查。掌握其形态学特点, 了解其形态学分类。

【实验内容】

1. 阴道毛滴虫、齿龈内阿米巴、白喉杆菌的形态学观察
2. 其他微生物 (钩端螺旋体、梅毒螺旋体、白色念珠菌、新型隐球菌、黑色曲霉菌等) 形态学观察

【实验学时】 2 学时

【实验器材】

普通光学显微镜; 擦镜纸、香柏油、擦镜液;

标本片: 钩端螺旋体、梅毒螺旋体、白色念珠菌、新型隐球菌、黑色曲霉菌、衣原体包涵体、阴道毛滴虫、齿龈内阿米巴、白喉杆菌。

【原理及方法】

一. 阴道毛滴虫、齿龈内阿米巴、白喉杆菌形态学观察

1. 镜下观察阴道毛滴虫

阴道毛滴虫属原虫的鞭毛虫纲。寄生于男性、女性泌尿生殖道。生活史简单, 只有滋养体期。为感染阶段与致病阶段。

活体呈无色透明状, 有折光性, 体态多变, 活动力强。固定染色后则程椭圆形或梨形, 体长可达 $30\mu\text{m}$, 宽为 $10\sim 15\mu\text{m}$ 。虫体前端有4根前鞭毛和1根后鞭毛。体外侧前1/2处有一波动膜, 其外缘与向后延伸的后鞭毛相连。虫体借助鞭毛的摆动前进, 以波动膜的波动作旋转式运动。1个椭圆形的泡状细胞核位于虫体前端1/3处, 核上缘有5颗排列成环状的基体, 5根鞭毛即由此发出。1根纤细透明的轴柱由前向后纵贯虫体并于后端伸出体外 (图 2-39)。



图 2-39 阴道毛滴虫

2. 齿龈内阿米巴的检查

齿龈内阿米巴为寄生于人及哺乳动物口腔中的一种共生性原虫, 常在患病的齿龈和扁桃体隐窝中发现, 生活史仅有滋养体阶段, 通过飞沫、滋养体污染的食物或接吻传播。

为人及许多哺乳动物类如犬、猫等口腔共栖型阿米巴, 见于齿龈及齿垢内。滋养体大小 $10\sim 20\mu\text{m}$, 伪足内外质分明, 运动活泼, 食物泡内常含有口腔上皮细胞、细菌和白细胞, 偶见红细胞。口腔卫生不良者感染率较高。本虫常于牙龈炎、牙周炎并存, 检出率可达50%以上, 但二者因果关系不明。一般认为牙龈内阿米巴无致病性。

检查方法: 用消毒牙周探针取出龈袋或牙周袋内的龈下菌斑放在滴有生理盐水的载玻片上做成均匀涂片, 覆以盖片, 用高倍镜观察滋养体的检出情况。

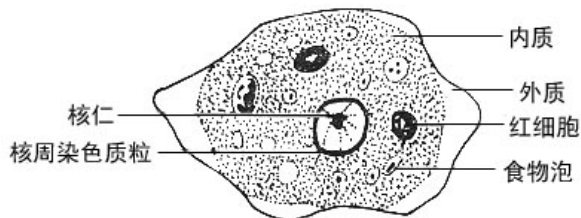


图 2-40 齿龈内阿米巴

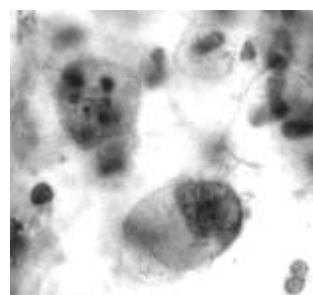


图 2-41 齿龈内阿米巴铁苏木素染色

3. 白喉杆菌

俗称白喉杆菌，是白喉的病原体，白喉是一种急性呼吸道传染病，患者在咽喉部位出现灰白色的假膜。该菌能产生强烈的外毒素，进入血液引起强烈的中毒症状。

G⁺，菌体细长微弯，一端或两端膨大呈棒状，用美兰短时间染色，菌体着色不均，有较深的染色颗粒。用 Neisser 或 Albert 等染色法染色，这些颗粒与菌体着色颜色不同，称为异染颗粒。本次示教片使用的是 Albert 染色法处理后的标本。

4. 其他微生物形态学观察

(1) 钩端螺旋体 (*Leptospira*): G⁻，螺旋细密、规则、形式细小珍珠排列的细链，一端或两端呈钩状，普通染色不易着色，Fontana 镀银染色呈棕褐色。

(2) 梅毒螺旋体 (*Treponema Pallidum*): G⁻，梅毒螺旋体有细胞壁和细胞膜，细胞壁外尚有包膜。有 8—14 个致密而规则的小螺旋。两端尖直，普通染色不易着色，Fontana 镀银染色呈棕褐色。

(3) 白色念珠菌 (*Monilia albicans*): 真菌，菌体圆形或卵圆形，念珠状，可以被染成 G⁺ 出芽繁殖，可见菌丝 (图 2-42)。

(4) 新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*): 圆形的酵母型菌，外有荚膜，折光性强，不易为一般染色法染色，印度墨汁负染色法可见。

(5) 黑色曲霉菌 (*Aspergillus niger*): 小分生孢子成黑色，小颗粒状，连接与生殖菌丝上。

(6) 衣原体包涵体：包涵体是衣原体感染细胞中独特的形态学变化，位于核内，嗜酸性红色，在姬姆萨染色下呈紫红色。



图 2-42 白色念珠菌患者痰液
直接涂片革兰氏染色

【思考题】 阴道毛滴虫、齿龈内阿米巴、白喉杆菌、钩端螺旋体、梅毒螺旋体、白色念珠菌、新型隐球菌、黑色曲霉菌的形态学的形态学特征是什么？

(孔争)

实验九 医学节肢动物标本观察

EXPERIMENT NINE

The Observation of Medical Arthropod Specimens

【实验目的、要求】

学习医学节肢动物标本的形态学特点。掌握常见蚊种及蝇种的形态特征。熟悉疥螨、蠕形螨的形态特征，了解其他医学节肢动物的形态特点。

【实验内容】 镜下观察医学节肢动物标本。

【实验学时】 2 学时

【实验器材及试剂】

普通光学显微镜；擦镜液、擦镜纸；各主要医学节肢动物大体及玻片标本等。

【实验原理及应用】

医学节肢动物分属5个纲，其中以昆虫纲和蛛形纲与人类关系密切。昆虫纲虫体分头、胸、腹三部，有触角1对，足3对，有翅或无翅；蛛形纲虫体分头胸部和腹部或头胸腹合为躯体，无触角，成虫4对足，无翅。

一. 昆虫纲

1. 蚊

蚊属于双翅目、蚊科，是一类最重要的医学昆虫。在我国传播疾病的蚊种主要属于按蚊属、库蚊属和伊蚊属。

表 2-11 三属蚊发育各期形态鉴别				
虫期	鉴别项目	按蚊	库蚊	伊蚊

卵	形态、颜色	舟状、有浮囊深灰色	长圆锥状黄褐色	橄榄状，黑色
	在水中状况	单个，浮于水面	集成筏块，浮于水面	单个沉于水底
幼虫	呼吸管	无，有一对呼吸孔	细长，有多对管毛	较短粗，管毛1对
	在水中姿态	浮于水面下，体与水面平行	体倒垂与水面成角度	同库蚊
蛹	呼吸管	短粗、似漏斗状管口宽，有裂隙	细长、管口小，无裂隙	一般较短，管口无裂隙
	体色 停落姿态	灰褐色 体与喙成一直线 与停落面成一角度	黄棕色 体与喙成一角度 与停落面平行	黑色有白斑 同库蚊
成蚊	触须	雌雄触须与喙等长	雌蚊触须短于喙之半，雄蚊则比喙长	雌蚊同库蚊 雄蚊触须与喙等长
	翅	多有黑白斑	多无黑白斑	无黑白斑

2. 蝇

①舍蝇 长5~8 mm，灰黑色，胸背有4条黑色纵纹，翅第4纵脉末端向上急弯成折

角。腹部橙黄色，并具有黑色纵条。

②丝光绿蝇 长5~10 mm, 呈现绿色金属光泽, 颊部银白色中胸背板上的鬃毛发达, 腋瓣上无毛。

③大头金蝇 长8~11 mm, 肥大, 体呈蓝绿色金属光泽, 颊橙黄色, 一对深红复眼尤其明显, 头比胸宽, 腋瓣有毛。

④尾黑麻蝇 体长6~12 mm, 暗灰色, 胸背有三条黑色纵纹, 腹背具黑、白相间的可变色的棋盘状斑。

⑤舍蝇幼虫后气门 有一对呈“D”状气门环, 每一环内3条蛇状气门裂和一圆孔状钮孔(气门钮)



图 2-43 四属蝇的形态

3. 白蛉

中华白蛉成虫体小, 长约3.0~3.5 mm, 全身多毛(腹部第2~6节背面具竖立毛)。两翅狭长, 停歇时与躯体以45°角向背面竖起。驼背, 有一对黑而大的眼睛(图2-44)。



图 2-44 中华白蛉

4 虱、蜚蠊、蚤、臭虫 (附)

①.人虱 背腹扁平, 体窄长, 灰白色, 雌虫体长2.5~4.2 mm, 雄虫稍小。头部略呈菱形, 触角分5节约与头等长, 向两侧伸出。眼明显, 位于触角后方。口器为刺吸式, 不用时缩入头内。

②.耻阴虱 灰白色, 体形宽短似蟹。雌虱长为1.5~2.0 mm 雄蚤稍小。

③.蜚蠊 蜚蠊为自由生活, 但在传播疾病上是重要媒介之一。常见的蜚蠊长10~30 mm, 体色浓淡及大小依种属而异, 但都具油亮光泽, 俗名蟑螂。体形椭圆, 背腹扁平、尖小, 几乎全被前胸背板覆盖, 口器为咀嚼式, 向后伸至第一对足之间。

④.印鼠客蚤

⑤.温带臭虫 扁平, 红棕色, 雌5×3 mm, 雄虫<雌虫, 遍体有粗短毛。喙分三节, 不吸血时弯入头

⑥.热带臭虫 与温带臭虫极相似, 主要区别是前胸的形状, 温带臭虫前胸缘深凹, 背前中央圆凸, 两侧平坦, 展开较宽。热带臭虫前胸前缘凹入较浅, 背面中央至两侧均圆凸, 两侧展开不大。

二. 蛛形纲

蛛形纲中蝎亚纲、蜘蛛亚纲和蜱螨亚纲有医学意义。蜱螨亚纲是医学节肢动物中重要的



类群。蜱属于蜱螨亚纲的寄螨目、蜱种科。有的成虫在躯体背面有壳质化较强的盾板，通称为硬蜱；背面无钝板者，通称为软蜱，属软蜱科。我国已记录的硬蜱科约100种，软蜱科10种。

1. 人疥螨成虫

外型卵圆，背面隆起有波状横纹、刚毛和皮刺，足4对，第一、二对足与第三、四对足之间距离较远。除雌螨后二对足和雄螨第三对足末端为长毛外，其余各足末端均具梗节和吸垫，形状呈网球拍状（图2-46）。

2-45 皮内隧道中的雌疥螨及卵

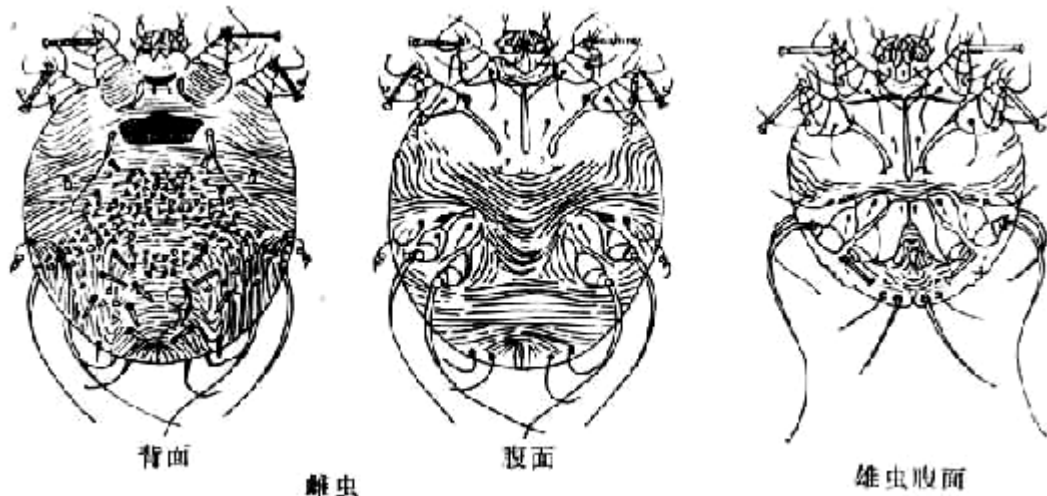


图 2-46 疥螨成虫

2. 蠕形螨

为一类永久性寄生螨。体细长呈蠕虫状，故名之。成虫长0.1~0.4 mm，雌>雄。胴体呈梯形，须肢3节，螯肢短针状。躯体前部为足体，后部为末体。足体约占虫体1/3，四对足。雄虫阴茎位第二对足间；雌虫裂缝状生殖孔位于第四对足之间腹面（图2-47）。

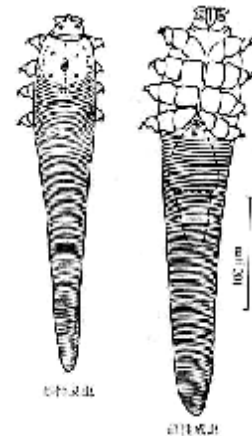


图 2-47 蠕形螨雌雄成虫

3. 全沟硬蜱（附）

①胴体（假头）长方形，由螯肢（一对）、腭基、口下板、须肢（一对）组成。

②躯体：背面有硬的盾板一块（此即硬蜱区别于软蜱之结构基本点！）根据盾板大小以别雌雄（雌蜱盾板小），注意其盾板上无限、无珐琅片样花纹，体后缘无缘垛。腹面有四对足，第一对足是跗节背面有杯状哈氏器（Haller's organ）可感觉；基节有长刺一根。生殖孔直线状，位于三、四对足基节间。肛沟呈倒“U”型，位肛门前方。

4. 亚东璃眼蜱（附）

硬蜱之一，盾板红褐色，有眼、有缘垛，第二节须肢明显伸长。腿各关节处有明显淡色环，雄虫颈沟呈明显深沟状气门板呈烟斗状。

5. 乳突钝缘蜱（附）

软蜱之一，无盾椭圆型，向前变窄，背面观不见假头。体缘圆钝无缝线，有较宽的缘褶。体表粗糙呈颗粒状。

6. 地理纤恙螨幼虫（附）

体小，平均 0.2 ~ 0.5 mm，椭圆型。足三对，每足分 7 节，依次为基节、转节、基股节、端股节、膝节、胫节、跗节。躯体背面前端有盾板一块，其上有羽毛 5 根，丝状感器 2 根。背毛 28 根，横列六行，公式 2 - 8 - 6 - 4 - 2，为分类的重要依据。

【思考题】

1. 伊蚊、库蚊、按蚊各有什么主要形态特征？各自的主要孳生地类型是什么？
2. 舍蝇、麻蝇、金蝇、绿蝇的主要形态特征是什么？各自的主要孳生地类型是什么？
(孔争)

实验十 血吸虫病的诊断

EXPERIMENT TEN

The Diagnosis Of Schistosomiasis

【实验目的、要求】

学习血吸虫病的诊断方法。掌握日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 成虫的寄生部位及虫卵的形态结构; 熟悉日本血吸虫虫卵自然沉淀法及毛蚴孵化法技术; 了解日本血吸虫毛蚴及成虫的形态特征; 了解解剖血吸虫病动物模型及采集感染动物血清的基本要领; 了解间接血凝实验及 ELISA 诊断血吸虫病的方法。

【实验内容】

1. 感染血吸虫病兔耳静脉采血, 分离血清。(示教)
2. 解剖病兔观察成虫寄生部位, 收集成虫(示教)。摘取带有虫卵结节的病肝镜下观察。
3. 血吸虫虫卵、毛蚴、成虫的形态。
4. 虫卵自然沉淀法及毛蚴孵化法。
5. 间接血凝试验
6. 酶联免疫吸附试验 (示教)

【实验学时】 6 学时

一、感染血吸虫病兔耳静脉采血, 分离血清

【实验原理及应用】

血吸虫在人体内的发育 血吸虫病的感染主要是由于人或保虫宿主接触疫水后, 水中血吸虫尾蚴经皮肤感染。尾蚴侵入皮肤后脱去尾部, 发育为童虫。童虫侵入小静脉及淋巴管, 随血流或淋巴液到右心、肺, 穿过肺泡壁毛细血管到左心并至全身。部分童虫到达肠系膜动脉, 然后经肠系膜静脉移行至肝内门静脉系统, 在此暂时停留, 并继续发育。当童虫性器官初步分化时, 遇到异性童虫即开始合抱, 并移行到门脉-肠系膜静脉寄居, 逐渐发育成熟并交配产卵。自尾蚴侵入宿主至成虫成熟并开始产卵约需 24 天, 产出的虫卵在组织内发育成熟约需 11 天左右。虫卵可随宿主大便排出体外。血吸虫在宿主体内的三个不同阶段(童虫、成虫、虫卵)的分泌物、排泄物均可作为抗原物质, 引起宿主一系列的体液免疫和细胞免疫。因此通过血吸虫病可以通过粪便检查及血清学试验进行诊断。

【试剂与器材】

兔解剖台、手术刀、止血钳、剪刀、镊子、眼科弯镊子、注射器、

【操作方法】

家兔耳静脉为主要采血部位。采血时将家兔腹面向上捆绑固定于兔台上, 不宜用力硬压, 以防影响呼吸而导致家兔挣扎。采血时用拧干的热水纱布敷在兔耳上, 或用 75% 的酒精擦拭, 使小血管充分扩张后以 7 号针头刺入, 而后迅速拔出, 然后斜执兔耳, 用注射器吸取血液, 置试管中, 离心分离血清。有的家兔用针穿刺后, 血管发生收缩反应, 但稍等待后又变扩张, 血液涌出。

【注意事项】

勿将兔耳烫伤, 更不能盲目穿刺, 造成血肿, 甚至造成大片兔耳溃烂。

二、解剖病兔观察成虫寄生部位, 收集成虫。摘取带有虫卵结节的病肝镜下观察。

【试剂与器材】

兔解剖台、手术刀、止血钳、剪刀、镊子、眼科弯镊子、注射器、脸盆、水桶、烧杯、

量杯、培养皿、橡皮管、圆带子、广线、尼龙纱、铜筛、图钉、乙醚或 2.5%戊巴比妥钠，生理盐水等。

【操作方法】

(1) 感染血吸虫 45-50 天的病兔，如上。用乙醚麻醉和注入 2.5%戊巴比妥钠 6 毫升进行麻醉，抽取心脏血液。

(2) 经耳静脉注入空气，待动脉心脏还未完全停止跳动时，用剪刀迅速沿腹部正中线剪去被毛和皮肤，再用湿纱布擦干净，然后剖开腹腔和胸腔，剪除横膈肌，折断左右两边肋骨，用图钉将两边皮肤固定在解剖台上，使其形成一定的角度，将盛水容器接放下面。

(3) 用两把止血钳夹住食管、气管及组织，两钳之间的距离约 2 厘米，然后从中间剪断食管、气管和组织，将背大动脉（胸主动脉）暴露。用小镊子分离背大动脉的根部，串线、并在动脉上剪破一个小口，再轻轻插入接连在自来水管龙头上的橡皮管的针头，然后将线扎紧。

(4) 用线将肝脏门静脉上断扎紧，以防成虫随水流入肝脏。然后将门静脉刺破一小口，再打开水龙头进行灌洗，用手轻轻地翻动脏器，使虫体能顺利地随水流从门静脉破口处流出。

(5) 将收集到的虫体移置到盛有生理盐水的培养皿内，反复洗涤 2-3 次，再用蒸馏水洗涤 2 次，吸干水分，冰冻干燥或放 56℃温箱烘干。

(6) 肝脏处理：将肝脏取下，去掉胆囊和组织，用清水洗净，剪碎机捣成匀浆后过滤分离虫卵。镜下观察。

三、日本血吸虫虫卵、毛蚴、成虫的形态观察

【器材】 生物显微镜，血吸虫成虫大体标本，血吸虫虫卵及毛蚴玻片标本

1. 日本血吸虫成虫

雌雄异体。雄虫乳白色，长 12~20mm，雌虫虫体扁平，前端有发达的口吸盘和腹吸盘，腹吸盘以下，虫体向两侧延展，并略向腹面卷曲，形成抱雌沟（gynecophoral canal），故外观呈圆筒状。雌虫前细后粗，形似线虫，体长 20~25mm，腹吸盘大于口吸盘，由于肠管充满消化或半消化的血液，故雌虫呈黑褐色，常居留于抱雌沟内，与雄虫合抱。雌虫发育成熟必需有雄虫的存在和合抱，促进雌虫生长发育的物质可能是来自雄虫的一种性信息素（pheromone），通过合抱，从雄虫体壁传递给雌虫，另外雄虫和雌虫的营养性联系也是促使他们发育的主要因素之一。一般认为，单性雌虫不能发育至性成熟；而单性雄虫虽然能产生活动的精子，可发育成熟，但所需时间较长，体形也较小。

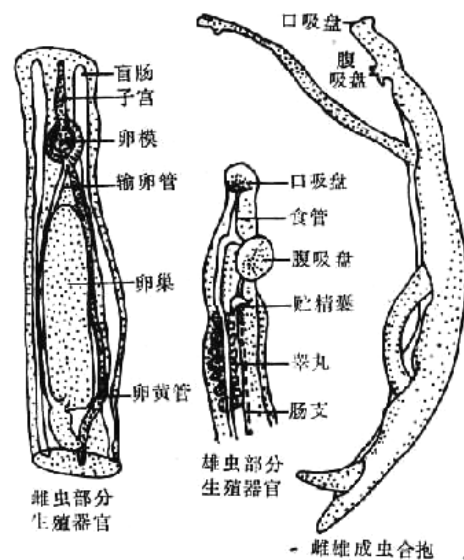


图 2-34 日本血吸虫生殖系统、成虫雌雄合抱

2. 日本血吸虫毛蚴

呈梨形或长椭圆形，左右对称，平均大小为 99×35μm，周身被有纤毛，是其活动器官。钻器位于体前端呈嘴状突起，或称顶突；体内前部



中央有一个顶腺，为一袋状构造；两个侧腺或称头腺位于顶腺稍后的两侧，呈长梨形，它们均开口于钻器或顶突（图 2—35）。

3. 日本血吸虫卵

图 2—35 日本血吸虫毛蚴

成熟虫卵大小平均 $89 \times 67 \mu\text{m}$ ，椭圆形，淡黄色，卵壳厚薄均匀，无卵盖，卵壳一侧有一小刺，表面常附有宿主组织残留物，卵壳下面有薄的胚膜。成熟虫卵内含有一毛蚴，毛蚴与卵壳之间常有大小不等圆形或长圆形油滴状的头腺分泌物（图 2—36）。电镜观察，卵壳表面呈网状纤维基质及细颗粒状微棘；卵壳切面可见囊样微管道，贯通卵内外，毛蚴分泌的可溶性抗原可经卵壳的囊状微管道释出卵外。在粪便内，大多数虫卵含有毛蚴即为成熟卵，而未成熟和萎缩性虫卵占少数。



图 2—36 日本血吸虫卵

4. 日本血吸虫尾蚴

血吸虫尾蚴属叉尾型，由体部及尾部组成，尾部又分尾干和尾叉。体长 $100 \sim 150 \mu\text{m}$ ，尾干长 $140 \sim 160 \mu\text{m}$ ，尾叉长 $50 \sim 70 \mu\text{m}$ （图 2—37）。全身体表被有小棘并具有许多单根纤毛的乳突状感觉器。体部前端为特化的头器（head organ），在头器中央有一个大的单细胞腺体，称为头腺。口位于体前端正腹面，腹吸盘位于体部后 $1/3$ 处，由发达的肌肉构成，具有较强的吸附能力。在尾蚴体内中后部有 5 对单细胞钻腺（penetration gland），左右对称排列，其中 2 对位于腹吸盘前，称前钻腺，为嗜酸性，内含粗颗粒；3 对位于腹吸盘后，称后钻腺，为嗜碱性，内含细颗粒。前后 5 对钻腺分别由 5 对腺管向体前端分左右两束伸入头器，并开口于顶端。



图 2—37 日本血吸虫尾蚴

四、虫卵自然沉淀法及毛蚴孵化法

【实验原理及应用】

粪便中的血吸虫卵为成熟虫卵，内含毛蚴，比重大于水，在清水中可以自然下沉。进入水中的成熟血吸虫卵，在 $25-30^\circ\text{C}$ 、pH 中性的清水中可孵化出毛蚴。毛蚴具有向光性、向清性、浮于水面下直线运动的特性。用三角烧瓶作为孵化瓶，可利用瓶颈处水面积小的特点，使集中于此游动毛蚴更易于被检出。

【试剂与器材】 三角量筒、三角烧瓶、清水、金属筛（40~60 孔）、竹签

【操作方法】

1. 虫卵自然沉淀法

取粪便 $20 \sim 30\text{g}$ （或含虫卵结节的肝脏组织匀浆）、加水成混悬液，经金属筛（40~60 孔）或 2、3 层湿纱布过滤，再加清水冲洗残渣；过滤粪液在容器中静置 25 分钟，倒去上液，重新加满清水，以后每隔 20 分钟换水一次（3~4 次），直至上液清晰为止。最后倒去上液，取沉渣作涂片镜检。 见图示。

2.毛蚴孵化法

取粪便约 30g，先经重力沉淀法浓集处理，将粪便沉渣倒入三角烧瓶内，加清水（城市中需用去氯水）至瓶口，在 20~30℃ 的条件下经 4~6 小时后肉眼或放大镜观察结果。如有毛蚴孵出，可见水面下有白色点状物作直线来往游动（毛蚴）。必要时也可用吸管将毛蚴吸出镜检。如无毛蚴，每隔 4~6 小时（24 小时内）观察一次。气温高时，毛蚴可在短时间内孵出，因此在夏季要用 1.2% 氯化钠或冰水冲洗粪便，最后一次才改用室温清水。

【注意事项】 气温高时，毛蚴可在短时间内孵出，因此在夏季要用 1.2% 氯化钠或冰水冲洗粪便，最后一次才改用室温清水。

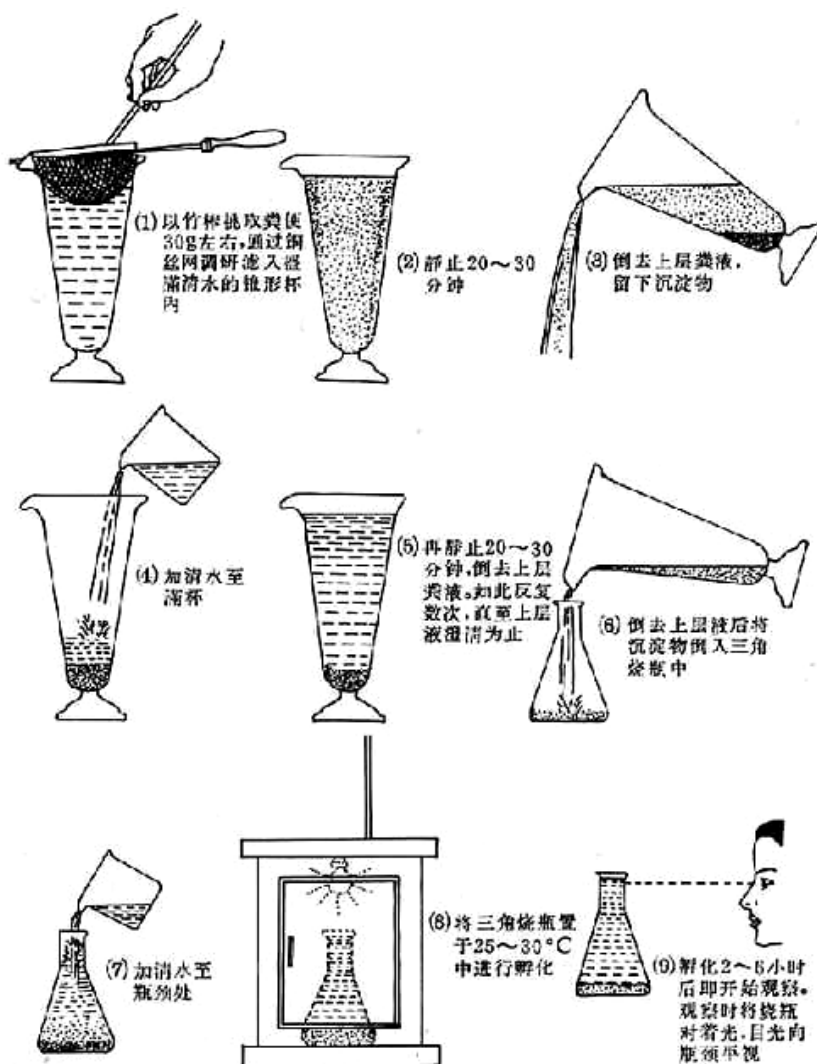


图 2-38 虫卵自然沉淀及毛蚴孵化法示意图

五、间接血凝试验

【实验原理及应用】

间接红细胞凝集试验（Indirect haemagglutination test, IHA）简称间接血凝试验。将可

溶性的抗原(或抗体)吸附于一种与免疫无关的载体颗粒表面,然后再用这种带有抗原性的载体与相应的抗体起反应,在有电解质存在的条件下,抗原抗体结合后产生了凝集反应。这种凝集反应是抗原抗体结合后载体的间接凝集而产生的。因此称间接凝集反应。本试验一般用经鞣酸处理的绵羊红细胞作为载体,因红细胞性能稳定,且有颜色,便于肉眼观察。

【试剂与器材】

间接血凝诊断试剂盒、V型微量血凝板、振荡器、微量加样器、1%氯化钠

【操作方法】 (若用间接血凝诊断试剂盒可省略第一步)

(1) 红细胞鞣化和致敏 ①取醛化红细胞用 0.15mol/L, pH7.2PBS 离心洗涤 2 次,并用 PBS 配成 2.5%悬液;②加等量 1:2000 鞣酸溶液(鞣酸不同批号,质量相差较大必须预试测定适宜浓度)37℃孵育 20 分钟,经常摇动;③离心去上清, PBS 洗 1 次,再用 0.15mol/L, pH6.4PBS 配成 10%悬液;④每份悬液加等量适当稀释的抗原液,置于 37℃水浴箱中 30 分钟(每 5 分钟振动一次),离心去上清, pH7.2PBS 洗 2 次,再用含 1%正常兔血清(NRS)10%蔗糖缓冲液配成 5%细胞悬液。加 1%叠氮钠防腐,存 4℃或减压冻干备用,每批致敏细胞均需用已知阳性和阴性血清滴定灵敏度或特异性。阳性滴度在 1:640 以上,阴性血清不出现反应者可用。

(2) 微量血凝试验 在 V 型微量血凝板上,将被试血清用 1%生理盐水作倍比系列稀释,每孔含稀释血清 0.05ml。每孔加 0.01ml 致敏红细胞悬液,充分振荡摇匀,加盖于室温静置 1~2 小时读取结果。

【结果判断】

根据红细胞在孔底的沉积类型而定。“—”,红细胞沉于孔底,呈圆点形,外周光滑;“±”,红细胞沉于管孔底,周围不光滑或中心有白色小点;“+”,红细胞沉积范围很小,呈较明显的环形圈;“++”,红细胞沉积范围较小,其中可出现淡淡的环形圈;“+++”,红细胞布满孔底呈毛玻璃状;“++++”,红细胞呈片状凝集或边缘卷曲。呈明显阳性反应(+)的最高稀释度为该血清的滴度或效价。

六、酶联免疫吸附试验(示教)

【实验原理及应用】

酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)将抗原或抗体包被到某种固相载体表面,并保持其免疫活性;使抗原或抗体与某种酶连接成酶标抗原或抗体,这种酶标抗原或抗体既保留其免疫活性,又保留酶的活性,在测定时,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体按不同的步骤与固相载体表面的抗原或抗体起反应。用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与其他物质分开,最后结合在固相载体上的酶量与标本中受检物质的量成一定的比例。加入酶反应的底物后,底物被酶催化变为有色产物,产物的量与标本中受检物质的量直接相关,故可根据颜色反应的深浅判定定性或定量分析。

在 ELISA 中,常用的酶是辣根过氧化物酶(HRP),底物是 H_2O_2 ,反应中需供氢参与。供氢体常选用邻苯二胺(OPD),OPD 的氧化产物呈黄棕色。本实验检测待测标本中的日本血吸虫抗体。

【试剂与器材】 日本血吸虫酶联免疫吸附试验试剂盒

【操作方法】

酶联试验的基本操作过程可分为：①固相包被；②温育洗涤；③加样；④酶结合物反应；⑤底物显色；⑥终止反应读取结果等若干步骤。温育和洗涤需贯穿在每二步骤之间，用以去除多余的反应物。以下为临床上最常用的间接法（检测抗体）的操作程序（若采用试剂盒，操作程序参照说明书）：

1) 以包被液(碳酸钠—碳酸氢钠缓冲液 0.05mol/L , pH9.6)稀释抗原(常用 $5\sim 10\mu\text{g/ml}$)，每孔 0.1 (或 0.2) ml 包被反应板， 37°C 湿盒温育 $2\sim 3$ 小时或 4°C 过夜；

2) 弃去包被液，反应板用去离子水或 PBS—Tween 液 (0.005mol/L PBS 含 0.05% Tween-20) 冲洗 3 次，甩干；

3) 用样本稀释液 (0.05mol/L PBS 含 0.05% Tween-20) 稀释样本 (起始浓度 $\geq 100-1$)，用样本稀释液每孔 0.1 (或 0.2) ml，温育 1 小时；

4) 弃去样液，如上冲洗，甩干加稀释结合物 (市售品常稀释至 $100:1$ ，用样本稀释液)，每孔 0.1 (或 0.2) ml，温育 $1\sim 2$ 小时；

5) 如上冲洗甩干后即刻加入新鲜配制的底物系统，每孔 0.1 (或 0.2) ml，置暗盒室温 15 分钟；

6) 终止反应：HRP—OPD 系统每孔加 1mol/L H_2SO_4 $50\mu\text{l}$ ；

7) 用酶标检测仪在 490nm 波段测定吸收值来判断。

【思考题】

1. 日本血吸虫感染阶段是哪一虫期？其形态特征是什么？
2. 日本血吸虫虫卵的形态特征是什么？
3. 日本血吸虫病主要有哪些诊断方法？各方法的原理是什么？

(宋文剑)

实验十一 质粒 DNA 的小量制备

EXPERIMENT ELEVEN

The Miniprep of Plasmid DNA

【实验目的、要求】

掌握小量快速制备质粒的方法；熟悉病毒核酸的构成及复制过程。

【实验内容】

质粒 DNA 的小量制备

【实验学时】 3 学时

【实验原理及应用】

当菌体在 NaOH 和 SDS 溶液中裂解时，蛋白质与 DNA 发生变性，当加入中和液后，质粒 DNA 分子能够迅速复性，呈溶解状态，离心时留在上清中；蛋白质与染色体 DNA 不变性而呈絮状，离心时可沉淀下来。

小量制备的质粒 DNA，经过苯酚、氯仿抽提，RNA 酶消化和乙醇沉淀等简单步骤去除残余蛋白质和 RNA，所得纯化的质粒 DNA 可满足细菌转化、DNA 片段的分离和酶切等要求。

【试剂与器材】

1. 菌种：

大肠杆菌 DH-5 α

2. 培养基：

LB培养基, 含氨苄青霉素100 μ g/ml

3. 试剂：

溶液I: 25mmol/L Tris-HCl(pH 8.0) 10mmol/L EDTA(pH 8.0) 50mmol/L 葡萄糖

溶液II(新鲜配置): 0.2mol/L NaOH 1% SDS

溶液III: 5mol/L 醋酸钾 冰乙酸

4. 器材：

低温高速离心机、台式高速离心机、超净工作台（上海科学仪器厂）、恒温振荡培养摇床、紫外\可见光分光光度计、-80℃低温冰箱、震荡器。

【操作方法】

1. 将培养过夜的培养物 1-2ml 加入 1.5ml EP 管中，6,000rpm/min，离心 5 分钟；
2. 弃上清，倒置 Ep 管，尽量使菌液流尽，再加入 100 μ l 4℃预冷的溶液I，剧烈振荡使菌体分散混匀（可用震荡器）；
3. 加入 200 μ l 新鲜配置的溶液II，快速轻柔的颠倒 EP 管 5 次（请勿振荡），冰浴 3 分钟至溶液变澄清（时间不宜过长）；
4. 加入 150 μ l 4℃预冷的溶液III，上下颠倒 4-6 次，动作轻柔，冰浴 5 分钟；
5. 4℃离心，12,000rpm/min，10 分钟；
6. 取上清至另一新 EP 管中，加入等体积酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）混匀，12,000rpm/min，离心 15 分钟；
7. 取上清至另一新 EP 管，加入等体积氯仿：异戊醇（24：1）混匀，12,000rpm/min，离心 15 分钟；
8. 取上清，加入 2 倍体积无水乙醇和 0.1 倍体积乙酸钠（3mol/L, pH 5.3），-20℃沉淀 10-15 分钟；

9. 4℃离心, 12,000rpm/min, 15 分钟;
10. 弃上清, 用 1ml 预冷的 70%乙醇洗涤沉淀, 室温晾干;
11. 加入 20-30μl 无菌蒸馏水 (含 RNaseA 20μg/ml), 37℃水浴 30 分钟;
12. -20℃储存备用。

【注意事项】

1. 溶液 II 必须要新鲜配制, 最好使用一次, 残余液体弃掉;
2. 每次丢弃上清时, 要特别注意除尽管中所有液体;
3. 酚: 氯仿: 异戊醇抽提之后, 必须将酚完全除去, 残留在 DNA 样品中的酚会抑制酶的活性, 影响酶切的效果。

【思考题】

1. 碱裂解法提取质粒 DNA 中溶液 I、II、III的作用是什么?
2. 如何提高质粒 DNA 的产量?

【附录】

试剂的配制:

50ml LB 培养基 (LB Medium):

1% 蛋白胨, 0.5%酵母浸提物, 1% NaCl, 加双蒸水至 48ml, 调整 pH 值至 7.0, 定容至 50ml, 高压灭菌, 4℃保存。

附 噬菌体 DNA 的提取

The Miniprepation Of DNA Of Phage

【实验目的、要求】

学习病毒核酸的提取。掌握噬菌体 DNA 的提取方法; 熟悉病毒核酸的构成特点; 熟悉病毒的复制过程。

【实验内容】

噬菌体 DNA 的提取

【实验原理及应用】

一、M13 噬菌体 DNA 的提取

M13 和其它的丝状噬菌体载体, 在文库构建和为测序提供 ssDNA 方面十分有用。由于丝状噬菌体并不裂解宿主细胞, 病毒的滴度可达到一个较高的水平。由于细菌细胞完好无损, 可以从培养基中离心掉, 所以从丝状噬菌体中分离 ssDNA 与 λ 噬菌体稍有不同, 即 M13 噬菌体单链 DNA 是从感染细胞分泌至周围培养液中的病毒颗粒中制备的: 首先在高盐存在下, 丝状病毒被聚乙二醇 (PEG) 沉淀浓缩, 去除蛋白质污染, 经洗涤去除盐类等杂质, 可获得产量和纯度皆较好的 ssDNA, 用于测序等后续实验。

【试剂与器材】

1.噬菌体试剂盒(Ph.D.-12 Phage DisplayPeptide Library Kit)购自New England Biolabs公司,其中噬菌体线肽库的多样性为 2.7×10^9 转化体;测序引物为-96g III 5' - HOCCTCA TAG TTA GCG TAA CG 3' ; 受体菌为大肠杆菌ER₂₇₃₈;

2.低温高速离心机、台式高速离心机、超净工作台(上海科学仪器厂)、恒温振荡培养摇床、紫外/可见光分光光度计、-80℃低温冰箱、液氮罐;

【操作方法】

- 1 以 1: 100 倍稀释 ER₂₇₃₈ 过夜培养物,分装成每管 1ml;
- 2 每管加入待测的噬菌体储液 10μl;
- 3 于 37℃剧烈摇动 4.5-5h;
- 4 4℃10,000rpm/rpm 离心 30s;
- 5 将含噬菌体的上清 500μl 转至另一离心管中;
- 6 加 200μl PEG/NaCl, 上下混合, 室温下反应 10min;
- 7 离心 10min, 弃上清;
- 8 再次离心, 小心弃掉残余上清;
- 9 加 100μl 碘化物 buffer 使沉淀悬浮, 再加 250μl 乙醇, 室温下孵育 10min;
- 10 离心 10min, 弃上清, 用 70%乙醇洗沉淀, 真空干燥;
- 11 加 30μl TE buffer (pH 8.0)以溶解沉淀, 此为噬菌体的单链 DNA;
- 12 测定含量和纯度后, -20℃保存备用。

【思考题】

- 1 病毒核酸的构成特点
- 2 病毒的复制过程

噬菌体的扩增:

1. Add 10μl phage stock to the 20 mlER₂₇₃₈ culture (which should be early-log at this point) and incubate at 37°C with vigorous shaking for 4.5 hours.
2. Transfer the culture to a centrifuge tube and spin 10 minutes at 10,000 rpm/min at 4°C. Transfer the supernatant to a fresh tube and re-spin.
3. Pipet the upper 80% of the supernatant to a fresh tube and add 1/6 volume of PEG/NaCl. Allow phage to precipitate at 4°C for at least 60 minutes, preferably overnight.
4. Spin PEG precipitation 15 minutes at 10,000 rpm/min at 4°C. Decant supernatant, re-spin briefly, and remove residual supernatant with a pipette.
5. Suspend the pellet in 1ml TBS. Transfer the suspension to a microcentrifuge tube and spin for 5 minutes at 4°C to pellet residual cells.
6. Transfer the supernatant to a fresh microcentrifuge tube and re-precipitate with 1/6 volume of PEG/NaCl. Incubate on ice for 15-60 minutes.
7. Microcentrifuge for 10 minutes at 4°C. Discard supernatant, re-spin briefly, and remove residual supernatant with a micropipet.
8. Suspend the pellet in 200 μl TBS, 0.02% NaN₃. Microcentrifuge for 1 minute

to pellet any remaining insoluble matter. Transfer the supernatant to a fresh tube. This is the amplified eluate.

噬菌体的保存:

This is the amplified phage stock and can be stored at 4°C for several weeks with little loss of titer. For long-term storage, dilute 1:1 with sterile glycerol and store at -20°C.

ER₂₇₃₈ 宿主菌的储存及培养:

- 1 Host strain supplied as 50% glycerol culture; not competent. Store at 70°C.
- 2 Streak out ER₂₇₃₈ from the included glycerol culture onto a LB-Tet plate.
- 3 Invert and incubate at 37°C overnight.
- 4 Store wrapped with parafilm at 4°C in the dark for a maximum of 1 month.

核酸分离纯化的基本原则:

因为遗传信息全部贮存在核酸的一级结构中,故完整的一级结构是保证核酸结构与功能研究的基础。在进行核酸的分离和纯化时应遵循两个原则:

- ① 保证核酸一级结构的完整性;
- ② 排除其它分子的污染。

核酸的纯度要求:

- ① 核酸样品中不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂和过高浓度的金属离子;
- ② 其它生物大分子如蛋白质、多糖和脂类分子的污染应降低到最低程度;
- ③ 排除其它核酸分子的污染,如提取 DNA 分子时,应去除 RNA,反之亦然。

核酸分离纯化的注意事项:

为保证分离核酸的完整性和纯度,在实验中应注意:

- ① 尽量简化操作步骤,缩短提取过程,以减少各种有害因素对核酸的破坏;
- ② 减少化学物质对核酸的降解,为避免过酸、过碱对核酸链中磷酸二酯键的破坏,操作多在 pH 4~10 条件下进行;
- ③ 防止核酸的生物降解:细胞内或外来的各种核酸酶消化核酸链中的磷酸二酯键,直接破坏核酸的一级结构。其中 DNA 酶需要金属二价阳离子 Mg^{2+} , Ca^{2+} 的激活,因此使用金属离子螯合剂,如 EDTA 或柠檬酸盐等基本上可以抑制 DNA 酶的活性。而 RNA 酶不但分布广泛、极易污染样品,而且耐高温、耐酸碱、不易失活,所以生物降解是 RNA 提取过程中的主要危害因素;

- ④ 减少物理因素对核酸的降解:物理降解因素主要是机械剪切力,其次是高温。

机械剪切力包括强力高速的溶液振荡、搅拌,溶液快速地通过狭长的孔道;细胞突然置于低渗液中;细胞破裂及 DNA 样品的反复冻融等。这些操作细节在实验操作中应加倍注意。机械剪切作用的主要危害对象是大分子量的线性 DNA 分子,如真核细胞的染色体 DNA 等。高温,如长时间煮沸,除水沸腾带来的剪切力外,高温本身对核酸分子中的某些化学键也有破坏作

用。核酸提取过程中常规操作温度为 0~4℃以降低核酸酶的活性从而减少对核酸的生物降解。

核酸分离纯化的主要步骤:

破碎细胞——去除蛋白质、多糖、脂类等生物大分子——沉淀核酸——去除盐类、有机溶剂等杂质——纯化干燥——溶解。

核酸提取方案,应根据具体生物材料和待提取核酸分子的特点而定。对于某特定细胞器中富集的核酸分子,采用先提取细胞器后再提取目的核酸分子的方案,可获得完整性和纯度两方面质量均高的核酸分子。

(张泽华、林莉)

实验十二 核酸的琼脂糖凝胶电泳及限制型内切酶消化

EXPERIMENT TWELVE

Digestion of DNA With Restriction Enzyme and Agarose Gel Electrophoresis of Nucleic Acid

【实验目的、要求】

学习质粒 DNA 的凝胶电泳技术及限制性内切酶消化 DNA 的基本技术. 掌握质粒 DNA 浓度、纯度、分子量的测定。

【实验内容】

1. 质粒 DNA 的琼脂糖凝胶电泳;
2. 质粒 DNA 的限制性内切酶消化。

【实验学时】 3 学时

【原理及应用】

一. 质粒 DNA 琼脂糖凝胶电泳:

以淀粉胶、琼脂或琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等作为支持介质的区带电泳法称为凝胶电泳。其中聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 普遍用于分离蛋白质及较小分子的核酸。琼脂糖凝胶孔径较大, 对一般蛋白质不起分子筛作用, 但适用于分离同工酶及其亚型, 大分子核酸等。

在一定浓度的琼脂糖凝胶介质中, DNA 分子的电泳迁移率与其分子量的常用对数成反比; 分子构型也对迁移率有影响, 如共价闭环 DNA > 直线 DNA > 开环双链 DNA。

观察琼脂凝胶中 DNA 的最简单方法是利用荧光染料溴化乙锭 (EB) 进行染色。该物质含有一个可以嵌入 DNA 的堆积碱基之间的一个平面基团, 这个基团的固定位置及其与碱基的密切接近, 导致染料与 DNA 结合并呈现荧光, 其荧光产率比游离染料溶液有所增加。DNA 吸收 254nm 处的紫外辐射并传递给染料, 而被结合的染料本身则在 302nm 和 366nm 有光吸收。这两种情况下, 被吸收的能量可在可见光谱红橙区的 590nm 处重新发射出来。因此, 当凝胶中含有游离溴化乙锭 (EB) 时即可以检测到少量的 DNA。

二. 质粒 DNA 的限制性内切酶消化:

限制性内切酶可特异地结合于一段被称为限制酶识别序列的 DNA 序列位点上并在此切割双链 DNA。绝大多数限制性内切酶识别长度为 4、5 或 6 个核苷酸且呈二重对称的特定序列, 切割位点相对于二重对称轴的位置因酶而异。1 个单位限制性内切酶是指在最适条件下, 在 50 μ l 体积 1 小时内完全切开 1 μ g λ 噬菌体 DNA 所需的酶量。

【试剂与器材】

- 1、上次实验提取的质粒 DNA 样品;
- 2、限制性内切酶 KpnI;
- 3、试剂:
 - 加样缓冲液 (DNA 凝胶电泳用)
 - 10mg/ml 溴化乙锭溶液
 - 1 $\times$ TBE 电泳缓冲液

琼脂糖

10×限制酶缓冲液（购于供应酶的厂家）

- 4、仪器：核酸电泳仪、紫外成像仪、台式高速离心机、超净工作台、酶联免疫分析仪、恒温水浴箱、恒温培养箱、DNA 分子量 marker、溴化乙锭、GoldViewna-I。

【操作方法】

质粒 DNA 的限制性内切酶消化：

- 1、测定上次提取的质粒 DNA 样品的纯度和浓度；
- 2、根据测定结果决定酶切的反应体积；
- 3、酶切反应体系中各项成分添加的顺序：

质粒 DNA 溶液

10×酶切缓冲液

无菌双蒸水

限制性内切酶（KpnI）（添加前保存在-20℃冰箱内，使用时将其置于冰上进行操作）

- 4、敲击管底使溶液混匀，必要时可在离心机上低速离心数秒钟，使液体全部甩到管底；
- 5、将反应物置于 37℃水浴箱中，2-3 小时；
- 6、取出后至 65℃水浴箱中 15 分钟，灭活；

质粒 DNA 的凝胶电泳：

1. 将电泳槽和梳子冲洗干净，置于水平桌面上，并架好梳子。
2. 配制浓度为 0.8%的琼脂糖凝胶：于 35ml 1×TBE 电泳缓冲液中加入 0.28g 琼脂糖粉，置于微波炉内加热使琼脂糖颗粒全部熔化，待溶液冷却至约 60℃时，加入溴化乙锭，至终浓度为 0.5μg/ml，充分混匀，匀速倒入胶模中。
3. 待凝胶完全凝固后，向电泳槽中倒入配制好的电泳缓冲液，以没过胶面 2 mm 为宜。小心垂直移去梳子，注意不要破坏加样孔。如果样品孔内有气泡，应除去。
4. 取 4μl 反应产物与 1μl 上样缓冲液，混匀后，加入样品孔内。以未经酶切的质粒或/和酶切的空载体（如有）作对照。
5. 接通电源。一般红色代表正极，黑色代表负极。DNA 样品是由负极向正极移动，因此要保证靠近加样孔一端的电极为负极。电压为 1-5V/cm。待指示剂移动到凝胶 2/3 处时，断开电源，终止电泳。
6. 将凝胶放在紫外仪上观察电泳带亮度及其位置。

【结果判断】

根据 DNA 分子量 marker，估计产物的大小。

【注意事项】

1. 溴化乙锭有中等毒性、高度致癌性，操作时一定要戴手套，防止污染；考虑其以上缺点，可考虑用 SYBRgreen、GoldViewna-I代替，但也需注意防止污染，操作时使用一次性手套。
2. 浓缩的限制性内切酶可在使用前以 1×限制酶缓冲液稀释，切勿用水稀释以免酶变性。
3. 购买的限制性内切酶多保存于 50%甘油中，于-20℃是稳定的。进行酶切消化时，将除酶以外的所有反应成分加入后即混匀，再从-20℃冰箱中取出酶，立即放置于冰上。每

次取酶时都应更换一个无菌吸头，以免酶被污染。加酶的操作尽可能快，用完后立即将酶放回-20℃冰箱。

4. 尽量减少反应体积，但要确保酶体积不超过反应总体积的 10%，否则酶活性将受到甘油的抑制。

5. 通常延长反应时间可使所需的酶量减少，在切割大量 DNA 时可用。在消化过程中可取少量反应液进行微量凝胶电泳以检测消化进程。

【思考题】

1. 试述不同电压对电泳结果的影响是什么？
2. 影响酶切的因素有哪些？

【附录】

1. 试剂的配制

(1) 6×DNA 上样缓冲液：0.25%溴酚蓝，40% (w/v) 蔗糖水溶液

(2) 0.5×TBE 电泳缓冲液：0.045mol/L Tris-硼酸；0.001mol/L EDTA

先配制 5×贮存液，电泳时稀释 10 倍，为 0.5×使用液。

2. 琼脂糖凝胶浓度与 DNA 分离范围的关系

凝胶浓度要依据 DNA 分子大小来定，见表 2-9。

表 2-9 琼脂糖凝胶浓度与 DNA 分离范围的关系

琼脂糖凝胶浓度(%)	线型 DNA 分子的分离范围(千碱基对, kb)
0.3	5~60
0.6	1~20
0.7	0.8~10
0.9	0.5~7
1.2	0.9~6
1.5	0.2~3
12.0	0.1~2

3. 核酸电泳缓冲液的选用

核酸电泳缓冲液有三种，分别是 Tris—硼酸(TBE)、Tris—乙酸(TAE)和 Tris—磷酸(TPE)。在上述三种缓冲液中：TBE 与 TPE 缓冲液容量高，对 DNA 的分离效果好，但 TPE 液中含磷酸盐的浓度偏高，容易使 DNA 沉淀。TAE 液的缓冲容量低，价格较便宜。本实验选用的是 TBE 缓冲液。缓冲液中的 EDTA 可整合正价阳离子，从而抑制 DNA 酶的活性，防止 PCR 产物被降解。

4. 核酸电泳的指示剂与染色剂

核酸电泳常用的指示剂是溴酚蓝，溴酚蓝在碱性条件下呈蓝紫色。指示剂一般与蔗糖、甘油等组成上样缓冲液（**loading buffer**）。上样缓冲液的作用是：能够增加样品密度，确保 DNA 均匀沉入加样孔内；能够在电泳中形成肉眼可见的蓝紫色指示带，从而帮助预测核酸电泳的速度和位置；能够使样品呈现蓝紫色，使加样操作更方便。核酸电泳，需要染色才能在紫外线下观察到带型。最常用的染色方法是溴化乙锭染色法。溴化乙锭(EB)是一种荧光染料，有剧毒，因此操作时要非常小心。EB 可嵌入 DNA 双链的碱基对之间，在紫外线激发下，能发出红色荧光。

5. 抗体的效价:能出现明显阳性抗原抗体反应的受测血清的最高稀释度，称为该血清的效价。

（张泽华、林莉）

实验十三 试管凝集反应（肥达反应）

EXPERIMENT THIRTEEN

Agglutination Reaction (Widal's Reaction)

【实验目的、要求】

掌握试管凝集反应（肥达反应）；熟悉抗原抗体反应的基本条件和特性。

【实验内容】

试管凝集反应（肥达反应）

【实验学时】1 学时

一、试管凝集反应（肥达氏反应）

【原理及方法】

颗粒性抗原（如细菌、红细胞等）与相应抗体特异性结合，在有电解质存在等一定条件下出现肉眼可见的凝集团块，称为凝集反应。凝集反应又分为直接凝集和间接凝集反应。试管法直接凝集反应为一种定量实验，是用已知抗原检测待检血清中是否又相应的抗体，且可测出相应抗体的量。

肥达氏反应属于凝集反应，是用于诊断伤寒和副伤寒的血清学辅助诊断试验。其原理是用已知的沙门氏菌标准菌株如：伤寒杆菌“H”901、“O”901，和副伤寒杆菌甲(A)、乙(B)、丙(C)作为抗原，来检测病人血清中是否存在相应的抗体，由此作为判断病人是否被感染该菌感染的间接指征。人被沙门氏菌感染发病一周后，血清中抗体含量逐渐升高，当其与相应抗原(诊断菌液)在体外进行试验，出现肉眼可见的絮状(H)凝集或颗粒状(O)凝集。根据抗体含量的多少及增长情况结合临床症状，可帮助诊断伤寒和副伤寒。

【试剂与器材】

- 1、伤寒杆菌免疫血清（1：10 稀释）或病人血清。
- 2、诊断菌液：伤寒杆菌抗原（H 及 O 二种）。
- 3、生理盐水、吸管、试管等。

【操作方法】

- 1、取洁净试管 12 支，分两排排列于试管架上，每排 6 支，依次标明号码。
- 2、于第一排及第二排的 1—6 管内加生理盐水 0.5 毫升。
- 3、再用吸管取 1：10 稀释的伤寒杆菌免疫血清 1 毫升分别加入第一排及第二排的第一管内各 0.5 毫升，充分混合均匀后（吸上吸下三次），吸出 0.5 毫升血清（1：20）移入第二管，然后依次稀释至第五管，最后弃去 0.5 毫升，血清稀释度依次为 1：20、1：40、1：80、1：160 及 1：320。第六管为抗原对照（不加血清）。
- 4、用吸管滴加伤寒杆菌“H”抗原 0.5 毫升于第一排各管中。
- 5、加伤寒杆菌“O”抗原于第二排各管中每管加 0.5 毫升。
- 6、将各管震荡混匀，置 37℃ 温箱中过夜。

表 2-10 试管定量凝集反应加样程序

管号	1	2	3	4	5	6
生理盐水 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	

1: 10 血清 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	—
血清稀释度	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	—
菌液 (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
最后稀释度	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	—

【结果判断】

(1) 观察方法：取出试管后，先勿震动，观察顺序为先观察第 6 管生理盐水对照，试管中应无凝集现象，正确的结果是管底沉淀物呈圆形、边缘整齐，轻轻震荡细菌迅速分散呈均匀浑浊，如出现凝集，则试验有误，应重做。然后自第一管向后观察。若使用的为 O 型伤寒杆菌菌液，出现凝集时，凝集物呈颗粒状，轻摇时不易升起和离散；若使用 H 型伤寒杆菌菌液，凝集物呈棉絮状，轻摇后易升起和离散。

(2) 凝集程度：根据凝集反应的程度，分别用以下符号表示：

+++：管内液体澄清透明，细菌完全被凝集于管底，轻摇后可见大片的凝集块。

++：管内液体轻度浑浊，大部分细菌凝集于管底，摇起后见凝集块较小。

++：管内液体中度浑浊，部分细菌被凝集于管底，凝集仍较明显，呈颗粒状或小片状。

++：管内液体很浑浊，仅有少量细菌被凝集沉于管底。

-：管内液体与对照相同，无凝集现象。

(3) 效价判断：试验中所用抗原与抗体对应时或被检血清中含有相应抗体时，即发生凝集现象，其凝集程度以上述符号表示并做记录。凡在“++”以上的均属于明显凝集，因此通常以“++”为标准判断。即在所有明显凝集的管中，稀释度最高的管为该血清的效价。

例如：管号	1	2	3	4	5	6
最后稀释度	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	—
凝集程度	+++	+++	+++	++	+	-

效价为 1: 320。

【注意事项】

1. 肥达氏反应仅是一种辅助诊断，在判定结果对疾病作出诊断时，需综合考虑以下几点：

(1) 血清效价问题：血清中抗体效价需高于当地正常人平均水平，一般规定“H”凝集效价 > 1: 160，“O”凝集效价 > 1: 80。

(2) 抗体效价应随病程发展而逐渐升高。故应相隔一定时间（数日或一周）重复检查，逐步升高者方为传染后反应。

(3) 若五中诊断菌液中有数种均出现一定的凝集效价（超过当地正常人水平），则选其中效价最高者作为判定依据。

(4) 如出现“O”凝集效价高而“H”凝集不高者可能是发病初期，也可能是其他细菌或其他沙门氏菌传染的交叉反应；若“H”凝集效价高而“O”凝集效价始终不高，可能是回忆反应，或者诊断菌液不合适（菌体表面的鞭毛未能除尽）。

(5) 结合临床表现正确应用实验结果十分重要，如健康无恙的人查处血清中抗体显著升高，不能贸然诊断患沙门氏菌病；反之，病人肠热症症状明显而血清中抗体不显甚至始终阴性者，亦不能轻易否定沙门氏菌病，可采用其他方法如骨髓穿刺术作检查。

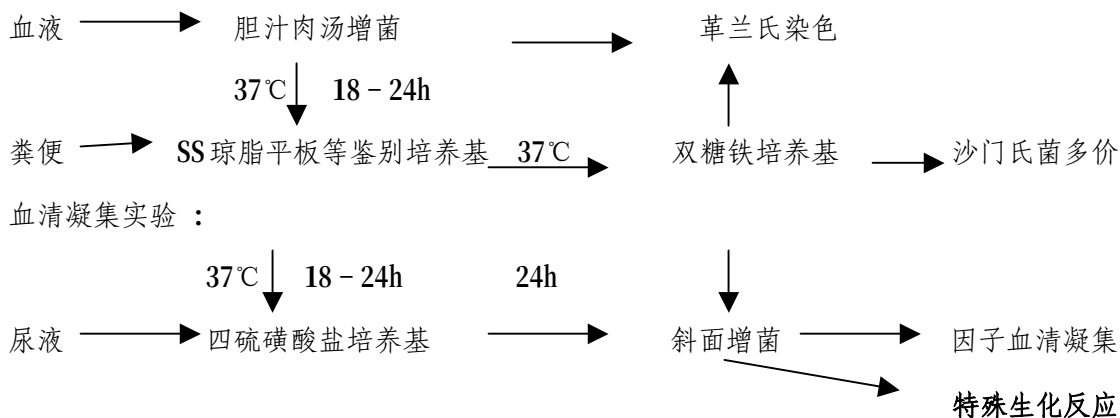
所用试管、移液管等用具均应干净。

2. 在血清对倍稀释过程中，力求准确。一是防止液体溢出管外，二是在连续吸 3 次混匀液体时，第 2 次吸入移液管中的液体高度不能低于第 1 次，最好是每一稀释度换一支洗净的移液管。

3. 试管水浴或静置后，观察前不宜摇动振荡，以免影响实验结果的准确性。

【附录】

沙门氏伤寒杆菌检验程序：



【思考题】

1. 记录本次实验抗血清效价测定结果：

试管	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
最后血清稀释倍数										
凝集强弱										

确定抗血清的效价为_____。

2. 为什么取“++”的抗血清最高稀释倍数作为抗血清的效价？

3. 在试管凝集试验中，有否出现不正常现象？并分析其原因。

（许楚娟 黄丽霞）

实验十四 抗原抗体特异性的检测

EXPERIMENT FOURTEEN

The Detection Of Specificity Of Antigen And Antibody Reaction

【实验目的、要求】

学习抗原抗体特异性的检测。掌握沉淀反应（precipitation）的基本原理和主要实验方法，了解双向琼脂免疫扩散试验中沉淀线形成的原理以及双向琼脂扩散试验的实际应用，了解单向琼脂扩散试验、火箭电泳的原理。

【实验内容】

沉淀反应

【实验学时】 3 学时

【原理及方法】

一、单向定量免疫电泳（又名火箭电泳 rocket electrophoresis）

【实验原理及应用】

当可溶性抗原（如血清、毒素、细菌浸出液等）与相应抗体相遇，两者比例合适并有电解质存在时，可形出现肉眼可见的沉淀物，此种现象称沉淀反应。

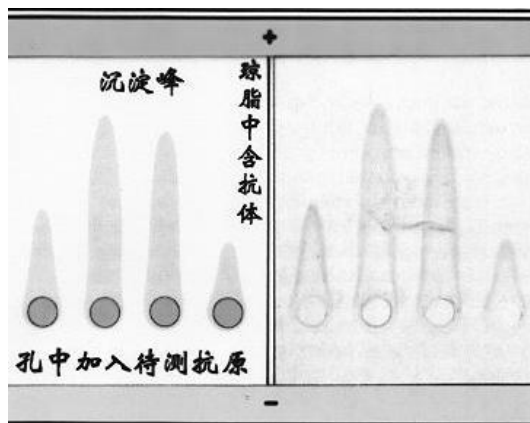
单向定量免疫电泳是将一定量的已知抗体均匀混入琼脂内制成琼脂板，冷凝后，在琼脂板的阴极端打一排小孔，分别加入一定量的待测样品进行电泳。抗原在扩散过程中，与抗体相遇，在二者比例合适部位形成锥形沉淀峰，其形状如火箭，故又名火箭电泳。沉淀峰的高度与抗原的浓度成正比。将沉淀峰与事先用不同浓度的标准抗原制成的标准曲线比较，就可测出样品中抗原的含量。现以甲胎蛋白（alpha-fetoprotein AFP）的检测为例。

【试剂与器材】

- 1、巴比妥缓冲液。
- 2、1%巴比妥琼脂。
- 3、甲胎蛋白诊断血清。
- 4、待检血清。
- 5、已知含量的甲胎蛋白标准溶液。
- 6、电泳仪，载玻片，琼脂板打孔器等。

【操作方法】

- 1、将甲胎蛋白诊断血清用巴比妥缓冲液稀释成 1：100。
- 2、取溶化并冷至 50° C 左右的 1%巴比妥琼脂 2 毫升与 1：100 稀释的甲胎蛋白诊断血清 2 毫升混合，立即浇于洁净载玻片上制成厚薄均匀的含抗体琼脂板。
- 3、琼脂凝固后，用直径 3 毫米的打孔器在琼脂板上近负极端打一排孔。
- 4、用微量加样器分别准确吸取待测血清 10 微升加于孔内。
- 5、将琼脂板放入电泳槽，样品孔靠近负极端，用滤纸与电极槽联结。
- 6、以电流强度为 40 毫安（mA）进行电泳 1—2 小时。
- 7、电泳完毕，关闭电源，取出琼脂板。



- 【结果判断】** 沉淀峰（即火箭峰）的高度与抗原的浓度成正比。
- 【注意事项】** 吸取琼脂浇板时要迅速，以免琼脂凝固；加抗原时不要溢出加样孔。

二、双向免疫扩散（double diffusion）

【实验原理及应用】

在含有电解质的琼脂中，抗原抗体分子互相弥漫扩散，当比例合适时可出现弧形沉淀带，此法可用于检查甲胎蛋白（AFP），乙型肝炎病毒抗原，分析抗原成分，以及鉴定抗体的纯度等。

【试剂与器材】

- 1、1.5%生理盐水琼脂。
- 2、待检血清，肝癌病人阳性血清（或正常人胚组织浸液）。
- 3、甲胎蛋白诊断血清。
- 4、琼脂板打孔器、载玻片等。

【操作方法】

- 1、将 1.5%生理盐水琼脂在水浴中加热溶化。
- 2、取洁净载玻片一张，放水平台上，将已溶化的琼脂 3—4 毫升趁热倾注在玻片上制成厚度均匀的琼脂板。
- 3、待琼脂凝固后，按图 2—49 打孔。
- 4、在中心孔内加入抗 AFP 诊断血清（已知抗体）。
- 5、1，4 孔加入肝癌病人阳性血清（或正常人胚组织浸液）作为对照。
- 6、于 2，3，5，6 各孔分别加入待检血清。
- 7、将琼脂板放入保持一定湿度的密闭容器内置 37° C 温箱中 24 小时后取出，观察结果。

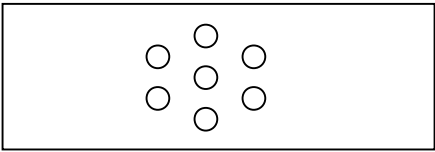


图 2—49 琼脂板打孔

- 【结果判断】** 在 1、4 两孔（加入含甲胎蛋白的已知阳性血清）与中心孔（抗体）之间应出现清晰的乳白色沉淀带。其余各孔待检血清中若含有 AFP，也会与抗体发生沉淀反应，形成乳白色沉淀带且一端应与相邻的 AFP 阳性血清形成的沉淀带相互融合。如果相邻的两条沉淀带互相交叉现象，则表明二者的抗原完全不同。
- 【注意事项】** 加抗原或标准溶液时不要溢出加样孔，以加满为度，不要过多或过少，加样孔不能混有气泡；板浇好后及时加样，如时间过长引起琼脂板的蒸发或变形等。
- 【思考题】** 1、沉淀反应的原理及种类。
- 2、分析并记录火箭电泳实验、双向免疫扩散实验结果及其影响因素。

实验十五 设计性实验

EXPERIMENT FIFTEEN

Creative Experiment

【实验目的、要求】学习科研设计的基本方法和思路。掌握科研课题的设计、执行、结果分析、论文撰写的基本过程。熟悉病原生物学及免疫学相关科研课题的要素。了解医学文

献检索的基本方法。

【实验内容】 （在老师的指导下进行选题、科研设计）

- 1、耐药质粒的提取和鉴定
- 2、吸虫疫区钉螺的调查
- 3、食物源性病原的调查（如对学生食堂各环节的检查）
- 4、幼儿园小儿饶虫病的调查
- 5、医院化验室常见疾病的统计与分析
- 6、利用所学实验技术，学生自检体内病原
- 7、蚊蝇孳生地的调查
- 8、土壤破伤风杆菌的分离、鉴定
- 9、生活区真菌标本的制备、观察
- 10、抗体的制备（持续3周，6-8学时）
- 11、患者免疫功能的检测
- 12、分子杂交
- 13、RT-PCR
- 14、HIV
- 15、工厂职业病的调查
- 16、某一疾病危险因素的调查
- 17、学生选取的其他课题

【实验学时】 3 学时

参考文献及书目

《医学微生物学》 周正任主编 人民卫生出版社 2003 年 12 月第 6 版

普通高等教育“十五”国家级规划教材

《医学微生物学》 谷鸿喜、陈锦英主编 北京大学医学出版社 2003 年 2 月

全国高等医药院校 7 年制规划教材

《医学微生物学》贾文祥主编 人民卫生出版社 2001 年 9 月第 1 版

《医学微生物学精要速览》 科学出版社 1999 年 3 月第 1 版

《现代医学微生物学》闻玉梅主编 上海医科大学出版社 1999 年 10 月

全国高等医药院校教材

《人体寄生虫学》 第六版 李雍龙主编 人民卫生出版社, 2004 年

全国高等医药院校教材

《医学寄生虫学》 卢思奇主编 北京大学医学出版社 2003 年 2 月

《现代感染性疾病与传染病学》 彭文伟主编 科学出版社 2000 年

《临床寄生虫病学》谢醒民主编 天津科学技术出版社 1999 年

《现代感染性疾病与传染病学》 彭文伟主编 科学出版社 2000 年

《临床寄生虫病学》谢醒民主编 天津科学技术出版社 1999 年

全国高等医药院校教材《医学免疫学》 龚非力主编 科学出版社 2003 年

《免疫学原理》(供研究生用) 周光炎主编 上海科学技术出版社 2000 年

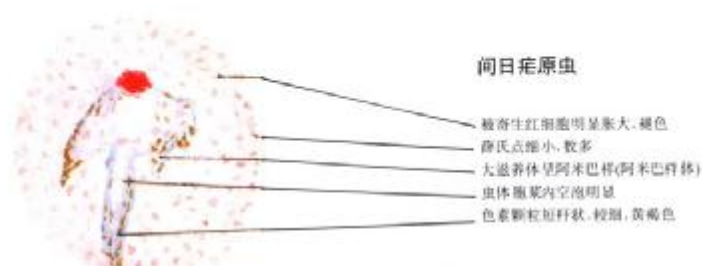
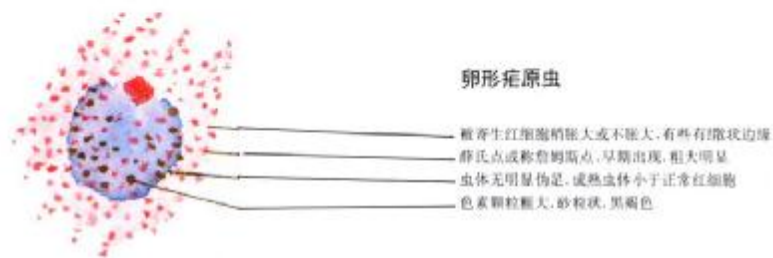
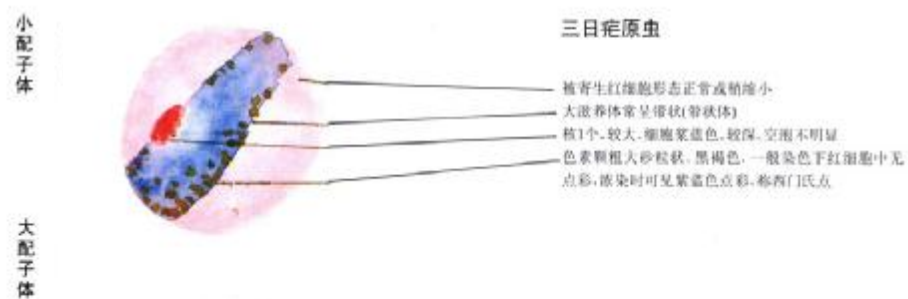
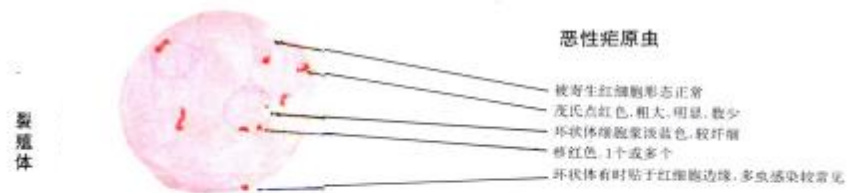
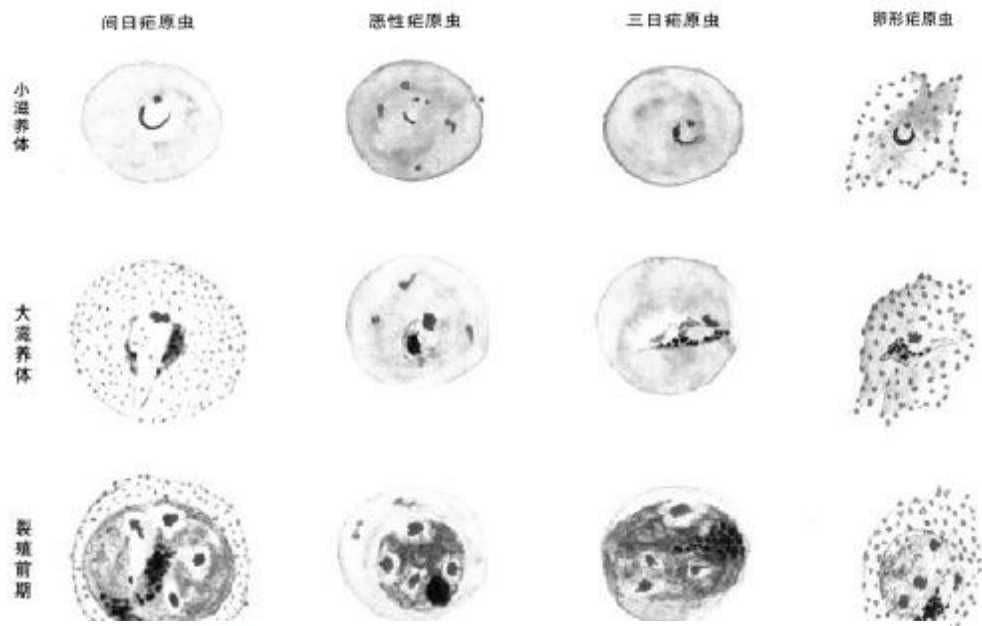
《医学免疫学》(供研究生用) 龚非力主编 科学出版社 2002 年

《临床医学免疫学丛书》裘法祖主编 湖北科学技术出版社 1998 年

《分子免疫学》余传霖主编 复旦大学出版社、上海医科大学出版社 2001

附图 1

四种疟原虫形态



附图 2
疟原虫
鉴别要

四 种
形 态
点

