

卫生部规划教材

全国医学高等专科学校规划教材配套教材

供临床医学专业用

病原生物学和免疫学 实验指导

主 编 陈兴保

副主编 台凡银

陈晓宁



人民卫生出版社

全国医学高等专科学校规划

33
2

套
教
材

全国医学高等专科学校规划教材配套教材

供临床医学专业用

病原生物学和免疫学 实验指导

主 编 陈兴保

副主编 台凡银 陈晓宁

编 者 (以姓氏笔画为序)

台凡银 (山东菏泽医学专科学校)

辛 岗 (汕头大学医学院)

刘 勇 (蚌埠医学院)

邵世和 (江苏大学医学院)

李 薇 (北华大学医学院)

杨勇麟 (安徽医学专科学校)

邢文鸾 (温州医学院)

俞丽琴 (九江学院医学院)

陈兴保 (蚌埠医学院)

袁红瑛 (河南科技大学医学院)

陈兴智 (蚌埠医学院)

崔 克 (大同医学专科学校)

陈晓宁 (承德医学院)

彭 飞 (湖南师范大学医学院)

张玉妥 (北方学院医学院)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学和免疫学实验指导/陈兴保主编. —北京:
人民卫生出版社, 2005. 6

ISBN 7-117-06871-X

I. 病… II. 陈… III. ①病原微生物—实验—医学
院校—教学参考资料②医药学:免疫学—实验—医学
院校—教学参考资料 IV. ①R37-33②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 049805 号

病原生物学和免疫学实验指导

主 编: 陈兴保

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078)北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

邮购电话: 010-67605754

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 11 插页: 2

字 数: 245 千字

版 次: 2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-06871-X/R·6872

定 价: 17.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

为促进医学教育的发展,适应教学改革的需要,卫生部教材办决定在临床医学专科教材《病原生物学和免疫学》出版的基础上,编写一本与此教材相适应的配套实验教材,即《病原生物学和免疫学实验指导》。

为了编好本实验教材,我们前后两次在相关的专业会议上召开了部分院校教师座谈会,会上就本书的编写原则、指导思想、内容的编排模式,甚至涉及某一个实验单元的写法都提出了很好的建议。与此同时,我们还参照了部分写得比较完整的实验指导教材,如尹学念主编的《免疫学和免疫学检验实验指导》、倪语星主编的《微生物学和微生物学检验实验指导》、夏佩莹和黄海升主编的《医学微生物学实验教程》、殷国荣和叶彬主编的《医学寄生虫学实验指导》,以及汪学龙和孙新主编的《人体寄生虫学实验教程》等。这些实验教材各有特色、互为补充,为本教材的编写提供了良好的条件。在此谨对这些书的主编、作者和同仁们表示深切的感谢。

本实验教材的内容和顺序基本上按理论教材编排,除绪论外,全书共分三个部分,即医学免疫学、医学微生物学和人体寄生虫学,其中医学免疫学实验 13 个,医学微生物学实验 22 个,人体寄生虫学实验 8 个。为方便学生的学习,在本教材的编写中力求基本理论与基本技术操作的有机结合,并将技术操作分别写入相关的实验中,以便于学生通过实验操作,更进一步领会和理解教材的基本理论。另外,在相关的实验后还附加了常用试剂的配制等内容,可作为学生今后临床实践和科研工作的参考。为便于学生通过实验过程及结果分析,获得更深层次的知识,培养严谨的科学态度,本书中每个实验后均附有相应的思考题。

在教学改革中,很多院校在实验内容上作了较大的调整,造成各院校的实验课程安排不尽相同,甚至相差很大,在使用本教材的过程中,可根据本校的教学实际,选定、裁减或合并实验内容,并根据内容调整实验次数。但也正因为如此,我们在内容的选择方面考虑得比较宽,因而本教材既可作为临床医学专科的实验指导用书,也可作为临床检验人员、临床实习、进修人员、卫生防疫人员的专业参考书。

在本教材的编写中,各位作者本着对学生负责的态度,认真、仔细地编写每一节实验内容,付出了辛勤的劳动。但由于水平有限,缺点和错误在所难免,恳请广大师生和读者提出宝贵意见。

陈兴保

2005 年 5 月

目 录

绪论	1
一、病原生物学和免疫学实验目的与要求	1
二、实验室规则	1
三、实验室意外的紧急处理	2
四、显微镜的使用和维护	2
五、显微测微尺与血球计数板的使用	5
第一部分 医学免疫学	9
实验一 抗原与免疫血清的制备	9
一、常用抗原的制备	9
二、常用免疫血清的制备	10
实验二 凝集反应	12
一、直接凝集试验	12
二、间接凝集试验	14
三、间接凝集抑制试验	16
四、协同凝集试验	17
实验三 沉淀反应	18
一、单向琼脂扩散试验	18
二、双向琼脂扩散试验	19
三、火箭电泳试验	20
四、对流免疫电泳	21
实验四 补体测定技术	22
一、补体溶血试验	22
二、补体结合试验	22
实验五 酶免疫标记技术	24
一、免疫组织化学技术	24
二、酶联免疫吸附试验	24
实验六 免疫荧光技术（直接法）	26
实验七 放射免疫分析法	27
实验八 外周血中淋巴细胞的分离纯化	28
一、沉降法	28
二、密度梯度离心分离法	29
实验九 免疫细胞数量检测（T 淋巴细胞 E 花环试验）	29

实验十 免疫细胞功能检测	31
一、T 淋巴细胞转化试验	31
二、抗体生成细胞检测法（溶血空斑试验）	34
三、NK 细胞活性测定（ ⁵¹ Cr 测定法）	35
四、植物血凝素（PHA）皮肤试验	36
实验十一 CTLL 细胞株法测定 IL-2	37
实验十二 超敏反应性疾病及检测	37
一、动物 I 型超敏反应	37
二、自身免疫性溶血性贫血的检测——抗球蛋白试验	38
三、循环免疫复合物的检测	39
四、自身免疫性疾病-抗核抗体的测定	40
五、小鼠 DNFB 试验	41
实验十三 生物制品示教	41
一、预防接种制品	41
二、治疗制品	42
三、诊断用品	42

第二部分 医学微生物学

第一单元 细菌与真菌学	43
实验一 细菌形态结构观察	43
实验二 细菌涂片标本的制备及革兰染色法	44
一、细菌涂片标本的制备	45
二、革兰染色法	45
实验三 基础培养基的制备	46
实验四 细菌的接种方法及生长现象观察	48
一、细菌的接种技术	48
二、细菌生长现象观察	50
实验五 细菌的生化反应	51
一、糖发酵试验	51
二、甲基红试验	52
三、吲哚试验	52
四、硫化氢试验	53
实验六 微生物的分布	55
实验七 消毒与灭菌	56
一、物理因素对细菌的影响	56
二、化学因素对细菌的影响	58
三、生物因素对细菌的影响	59
实验八 细菌的变异	61
一、细菌的鞭毛变异	61

二、细菌的 L 型变异	62
三、R 质粒接合传递试验	63
实验九 细菌的致病性	64
一、实验动物感染方法	65
二、感染动物尸体解剖与病原学检查	65
三、细菌内毒素的检测及致病作用	66
四、细菌外毒素的毒性作用和抗毒素的中和作用	67
实验十 机体的抗感染免疫	67
一、溶菌酶溶菌试验	68
二、中性粒细胞吞噬作用试验	68
三、巨噬细胞吞噬作用试验	68
实验十一 病原性球菌	69
一、常见病原性球菌的形态学和培养特性观察	69
二、血浆凝固酶试验	70
三、透明质酸酶试验	71
四、抗“O”试验	72
五、常见病原性球菌检验的一般程序	74
实验十二 肠道杆菌	74
一、肠道杆菌培养特性观察	74
二、肠道杆菌生化反应观察	75
三、荧光菌球试验	75
四、肥达试验	76
五、粪便中肠道杆菌的一般检验程序	77
实验十三 弧菌与弯曲菌	78
一、弧菌与弯曲菌形态结构和动力观察	79
二、幽门螺杆菌快速诊断试验——尿素酶试验	79
三、霍乱弧菌分离鉴定程序	79
实验十四 厌氧性细菌	80
一、厌氧芽胞梭菌形态和培养特性观察	80
二、产气荚膜梭菌“汹涌发酵”现象观察	80
三、厌氧培养法	81
实验十五 分枝杆菌与放线菌	82
一、分枝杆菌、放线菌的形态和培养特性观察	82
二、抗酸染色法	82
三、放线菌硫磺样颗粒的检查	83
实验十六 动物源性细菌	84
一、动物源性细菌的形态及菌落特征观察	84
二、炭疽芽胞杆菌串珠试验	85
三、布鲁菌玻片凝集试验	85

实验十七 其他细菌	86
一、白喉棒状杆菌、流感嗜血杆菌、百日咳鲍特菌的形态观察	86
二、白喉棒状杆菌的培养方法及毒力试验	86
实验十八 支原体、衣原体、立克次体、螺旋体	88
一、支原体形态与菌落观察及培养	88
二、衣原体包涵体观察	89
三、立克次体形态观察及外斐反应	89
四、螺旋体形态观察	89
实验十九 病原性真菌	91
一、真菌基本形态观察	91
二、真菌菌落特征观察	91
三、浅部真菌病临床标本检查法	92
第二单元 病毒学	94
实验二十 病毒的形态与培养	94
一、病毒的形态观察	94
二、病毒的培养方法	94
实验二十一 流行性感冒病毒的检测	98
一、流行性感冒患者标本的采集与处理	98
二、流行性感冒病毒的分离与鉴定程序	98
三、流行性感冒病毒的初步鉴定	99
实验二十二 乙型肝炎病毒的检测	101
一、乙型肝炎病毒抗原抗体的检测——ELISA	101
二、乙型肝炎病毒 DNA 的检测 (PCR 法)	102
第三部分 人体寄生虫学	105
第一单元 医学蠕虫	105
实验一 线虫和棘头虫	105
一、似蚓蛔线虫 (蛔虫)	105
二、蠕形住肠线虫 (蛲虫)	107
三、毛首鞭形线虫 (鞭虫)	109
四、十二指肠钩口线虫及美洲板口线虫 (十二指肠钩虫及美洲钩虫)	110
五、班氏吴策线虫和马来布鲁线虫 (班氏丝虫和马来丝虫)	113
六、旋形毛线虫 (旋毛虫)	116
七、粪类圆线虫	117
八、结膜吸吮线虫	118
九、猪巨吻棘头虫	118
实验二 吸虫	119
一、华支睾吸虫 (肝吸虫)	119
二、布氏姜片吸虫 (姜片虫)	120

三、卫氏并殖吸虫（肺吸虫）.....	122
四、日本血吸虫	123
实验三 绦虫	128
一、链状带绦虫（猪带绦虫）.....	128
二、肥胖带绦虫（牛带绦虫）.....	130
三、细粒棘球绦虫（包生绦虫）.....	131
四、微小膜壳绦虫（短膜壳绦虫）.....	132
五、曼氏迭宫绦虫（孟氏裂头绦虫）.....	133
第二单元 医学原虫	135
实验四 阿米巴	135
一、溶组织内阿米巴	135
二、结肠内阿米巴	137
实验五 鞭毛虫	138
一、杜氏利什曼原虫（黑热病原虫）.....	138
二、阴道毛滴虫	139
三、蓝氏贾第鞭毛虫	141
实验六 孢子虫和纤毛虫	142
一、疟原虫	142
二、刚地弓形虫	143
三、微小隐孢子虫	145
四、肺孢子虫	146
五、结肠小袋纤毛虫	146
第三单元 医学节肢动物	148
实验七 昆虫纲	148
一、蚊	148
二、蝇	150
三、蚤	151
四、白蛉	152
五、虱	153
六、臭虫	154
七、蜚蠊（蟑螂）.....	155
实验八 蛛形纲	156
一、蜱	156
二、螨	158
附录一 微生物学实验室常用仪器的使用.....	162
附录二 动物实验技术	165
附录三 玻璃器皿的准备	167

绪 论

一、病原生物学和免疫学实验目的与要求

实验室是供学生进行实验的重要场所。在实验室内，学生通过实验观察和技术操作，使学生进一步理解、巩固和掌握理论课内容，掌握病原生物的检验、鉴定等基本技术及其免疫学检验技术，为今后的临床实践及科研工作打下坚实的基础。

为达到上述实验目的，要求学生做到以下几点：

1. 实验前应做好预习，明确每次实验的目的、内容、理论依据，尽量避免或减少错误发生。
2. 认真听取指导老师的课前讲解、示教，观摩实验课中形象、多媒体等电化教材。
3. 在实验中要按实验指导认真操作，独立思考，仔细观察并做好记录。有关基本技能的训练，要按照操作程序反复练习，以达到一定的熟练程度。
4. 在病原生物学的实验中，尤其是在微生物学的实验过程中，学生应建立无菌概念，掌握无菌操作技术。
5. 实验报告要强调科学性，实事求是地记录、绘制。如实验结果与理论不符，应认真分析和探讨其原因，培养自己的分析能力和解决问题的能力，不断提高实验质量。

二、实验室规则

病原生物包括微生物和寄生虫两个部分。根据这种特有的实验对象，尤其是对其中的病原微生物，任何疏忽都会导致严重的后果。不仅自身有可能招致感染，且有可能导致环境污染，并将病原生物传给他人。因此必须严格贯彻“无菌概念”，必须遵守病原生物学实验室规则：

1. 进入实验室前必须穿好白大衣，离开实验室脱下反折，白大衣应经常清洗消毒。
2. 书包、衣物等物品勿带入实验室。必要的文具、实验用具、笔记等物带入后，应放在指定位置。
3. 在实验室不做与实验无关的事情。不能高声呼叫、谈笑、喧哗或随意走动，禁止随地吐痰，并严禁饮食、吸烟，保证实验室的良好秩序。
4. 注意安全、保护环境。使用危险品或具有感染性的病原体时，应严格按照操作规程进行。严禁随意丢弃具有感染性的病原体、感染性材料、培养物、污染物、动物尸体及排泄物。正确使用各种消毒容器。
5. 必须小心地避免有菌材料的溅出，若不慎污染了工作台、手、眼、衣物和地面等处，应立即报告老师，以便及时作出适当处理。
6. 注意节约，爱护设备和仪器，如不慎损坏了实验仪器或实验标本，应及时报告指导老师，按照学校规定处理。

7. 每次实验后均应用肥皂洗手,必要时用消毒液泡手,如实验中使用了致病性较强的微生物,则需用消毒液擦洗工作台面,并用紫外线灯照射。

8. 实验完毕后,清理台面、检查标本、器材,并按原位放好或送还标本室;将需培养的标本及时放入培养箱。值日生应做好实验室清洁,关好门、窗、水、电后方可离开。

三、实验室意外的紧急处理

在实验的过程中,要严防事故的发生,如发生意外伤害事故,应及时报告,并采取一些紧急处理办法。

1. 皮肤伤害 先除去异物,用蒸馏水或生理盐水洗净后,涂2%红汞或2%碘酒。

2. 烧伤 局部涂凡士林、5%鞣酸或2%苦味酸。

3. 化学药品腐蚀伤

(1) 强酸:先用大量清水冲洗,再用5%碳酸氢钠溶液洗涤中和。

(2) 强碱:先用大量清水清洗,再用5%醋酸或5%硼酸溶液中和。若受伤部位是眼部,经上述步骤处理后,再用橄榄油或液体石蜡1~2滴滴眼。

4. 菌液误入口中 立即将菌液吐入消毒容器内,并用1:10 000高锰酸钾溶液或3%双氧水漱口,并根据菌种不同,服用抗菌药物预防感染。

5. 菌液污染桌面 将适量的2%~3%来苏水或0.1%新洁尔灭倒入污染处,浸泡30min抹去。若手上沾有活菌,亦应浸泡上述消毒液3分钟后,然后用肥皂和清水洗净。

6. 火警 如发生火警时须沉着、冷静处理,切勿慌张,应立即关闭电闸或煤气阀门。如酒精、乙醚、汽油等有机溶液起火,切忌用水扑救,可用沙土等物扑灭。

四、显微镜的使用和维护

在病原生物形态的检查中,如蠕虫虫卵、原虫和细菌等,必须借助光学显微镜和电子显微镜才能观察到,但最常用的是普通光学显微镜(以下称显微镜),因此,掌握显微镜的使用和维护是进行病原生物学实验研究的基本技能。

(一) 显微镜的构造

显微镜的构造分机械和光学二大部分(图1)。

1. 机械系统 用于支持镜体和调焦。

(1) 镜筒:上端装接目镜,下端与物镜转换器相连。

(2) 物镜转换器:又称旋转盘,是安装在镜筒下方的一圆盘结构,可以按顺时针或逆时针方向旋转,其上均分布有3~4个圆孔,用以装载不同放大倍数的物镜。

(3) 镜臂:是支持镜筒和镜台的弯曲状结构,是取用显微镜时的握持部位。

(4) 镜台:也称载物台,是放置被检测标本片的平台,镜台上有标本移动器(推进尺),可使标本片前后左右移动。镜台的中央有圆形的通光孔,来自下方的光线经此孔照射到标本上。

(5) 调焦器:也称调焦螺旋,是用于调节物镜与被检物体之间的焦距,一般设有粗调螺旋和细调螺旋,前者作概略调焦,后者作精密调焦。

(7) 镜座：位于最底部，是整台显微镜的基座，用于支撑和稳定镜体。有的显微镜在镜座内装有光源。

(1) 目镜：也称接目镜，安装在镜筒的上端。每个目镜一般由两个透镜组成。其上刻有放大倍数，如 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 。镜中常装有一条黑色细丝作为指针，以便指示物像供人观察。

(2) 接物镜：也称物镜。每个物镜由数片凸透镜组合而成，其下端接近被检标本。接物镜一般有低倍镜、高倍镜和油镜三种。它们安装在物镜转换器上，各有一些标志，如低倍镜： 10×0.25 （10/0.25），10 表示放大倍数，0.25 表示数值孔（口）径（NA）；高倍镜 40×0.65 （40/0.65）；油镜： 100×1.25 （100/1.25）。

(3) **聚光器**：位于载物台通光孔的下方，由聚光镜和光圈组成，其主要功能将光线集中到要观察的标本上。聚光器由 2~3 个透镜组合而成，其作用相当于一个凸透镜，可将光线汇集成束。在聚光器的左下方，有一调节螺旋，可使其上升或下降，升高可使光线增强，反之光线变弱。光圈也称彩虹光阑或孔径光阑，位于聚光器的下端，是控制进入聚光镜光束大小的可变光阑。它由十几张金属薄片组合排列而成，其外侧有一小柄，可使光圈的孔径开大或缩小，以调节光线的强弱。有的显微镜在光圈下方装有滤光片环，可放置不同颜色的滤光片。

(4) 反光镜：位于聚光镜的下方，有平、凹两面，可以自由转动方向，使光源射出的光线反射到聚光器。

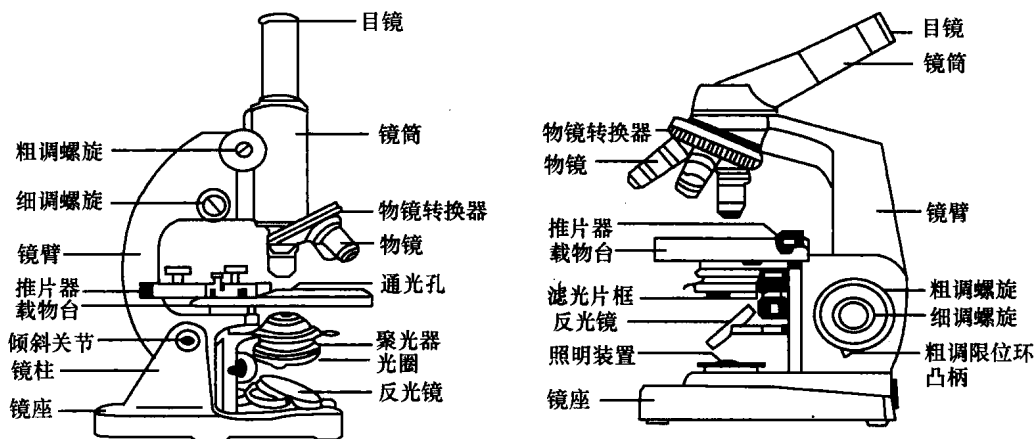


图1 普通光学显微镜结构示意图

(二) 显微镜的使用

1. 低倍镜的使用

(1) 准备：打开实验台上的工作灯，转动粗调螺旋。将载物台略下降（或镜筒略升高），使物镜和载物台距离稍拉开。再旋转物镜转换器，将低倍镜对准载物台中央的通光孔，当镜头完全到位时，可听到轻微的“咔哒”声。

(2) 调光：打开光圈，上升聚光器，双眼向目镜内观察，同时调节反光镜的角度，

使视野内的光线均匀、亮度适中。

(3) 放片：把所需要观察的标本片放到载物台上，并用移动器上的弹簧夹固定好，然后把观察的标本部位移到通光孔的正中央。

(4) 调焦：从显微镜侧面注视低倍镜，同时用粗调螺旋使载物台缓慢上升（或镜筒下降），直到低倍镜镜头距玻片标本约 5mm 时，再从目镜里观察视野，同时用左手慢慢转粗调螺旋，使载物台缓缓下降（或镜筒缓缓上升），直至视野中出现物像为止。如物像不清晰，可转动细调螺旋，直至视野中的物像清晰为止。

2. 高倍镜的使用

- (1) 依照上述操作步骤，先用低倍镜找到物像。
- (2) 将观察物移至视野中央，同时转动细调螺旋，使被观察的物像清晰。
- (3) 眼睛从侧面注意物镜，转动物镜转换器，使高倍镜镜头对准通光孔。
- (4) 眼睛向目镜内观察，同时微微转动细调螺旋，直至视野内的物像清晰。

有时，在低倍镜准焦情况下，直接换高倍时会发生高倍镜与标本片碰撞，有时标本转不过来，此时应将载物台下降或使镜筒升高，直接用高倍镜调焦。方法是从侧面注视物镜，调节粗调螺旋，使高倍镜头下降至与标本片最短距离，再观察目镜视野，慢慢调节细调螺旋，使镜头缓缓上升，直至物像清晰为止。

3. 油镜的使用

(1) 用低倍镜或高倍镜找到所需观察的标本物像，并将要进一步放大的部位移至视野中央。

(2) 转动物镜转换器，移开低倍镜或高倍镜，在标本片的中央滴 1 滴香柏油，眼睛从侧面注视镜头，轻轻转换油镜，使镜面浸在油滴中。在一般情况下，转过油镜即可看到物像，如不清楚，用细调螺旋调节至物像清晰。

(3) 油镜观察完毕后取下标本片，并下降载物台约 10mm，把物镜转到一边，立即用擦镜纸拭去镜头上的油，若油已干，可用擦镜纸蘸少许二甲苯擦净，并用另一张擦镜纸拭去二甲苯，以防二甲苯使镜头脱胶落下。

(4) 封加盖片的标本片擦拭方法同擦油镜头。无盖片的标本片，可用拉纸法擦油，即用一小块擦镜纸覆盖在标本片油滴上，再滴 1 滴二甲苯，平拉擦镜纸，反复几次即可擦净，也可直接在二甲苯中把标本片上的油洗去。

使用油镜时加香柏油的原理：油镜的放大倍数高而透镜较小；从标本片透过的光线，因玻片和空气的折射率不同，部分光线经折射后不能进入油镜，使视野亮度不够，且物像不清晰；在油镜和标本片之间滴加的香柏油，其折射率（ $n=1.515$ ）和玻片的折射率（ $n=1.520$ ）相仿，使进入油镜头的光线增加，使物像清晰（图 2）。

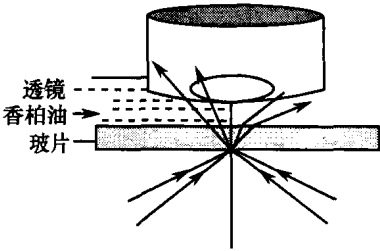


图 2 油镜原理示意图

(三) 显微镜使用的注意事项和维护

- 1. 使用显微镜时应小心爱护，不得随意拆卸。
- 2. 取显微镜时应一手紧握镜臂，一手托住镜座，切忌一手斜提，前后摆动，以避免零部件滑落。

3. 显微镜应置于离实验台边缘约 6cm 处，以免显微镜翻到落地。课间离开座位时，应将倾斜关节复原，镜头转离通光孔位置。

4. 要熟悉粗、细调螺旋转动方向，并能配合使用，调节焦距时，眼睛必须注视物镜头，以免压坏标本和损坏镜头。

5. 观察带有液体的临时标本要加盖片，应将显微镜充分放平，以免液体污染镜头和显微镜。

6. 显微镜不得与强酸、强碱、乙醚、氯仿和酒精等化学药品接触，如不慎污染时，应立即擦干净。

7. 要经常保持显微镜的清洁，显微镜的光学部分只能用擦镜纸轻轻擦拭，不可用纱布、手帕、普通纸张或手指擦拭，以避免磨损镜面。

8. 显微镜使用完毕，将三个接物镜转成“八”字形，将聚光器下降，放入显微镜箱内。切不可把显微镜放在直射光线下曝晒。

五、显微测微尺与血球计数板的使用

对微生物或细胞进行形态观察时，往往需测量它们的大小或统计它们的数目。这就要用到显微测微尺和血球计数板。

(一) 显微测微尺的使用

1. 原理 目镜测微尺(图 3A)是一块可放在目镜内的隔板上的圆形小玻片。在它的中央刻有精确的刻度，有等分 50 小格或 100 小格两种，每 5 小格之间有一长线隔开。因为目镜和物镜的放大倍数有所不同，目镜测微尺每小格所代表的实际长度就不一样。所以，目镜测微尺不能直接用来测量微小标本的大小，使用前要用镜台测微尺校正，以测算出在一定的目镜和物镜下该目镜测微尺每小格的相对值，然后才能用来测量微生物的大小。

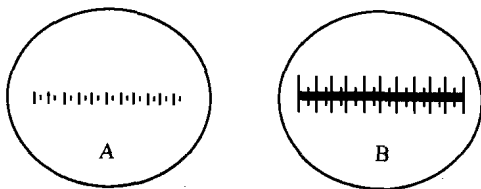


图 3 显微测微尺

A. 目镜测微尺 B. 镜台测微尺中央部分

镜台测微尺(图 3B)是中央部分刻有精确等分线的载玻片。一般每个小格的长度是 0.01mm，是专用于校正目镜测微尺的每格长度的。

2. 使用方法 目镜测微尺的标定

(1) 放置镜台测微尺：将镜台测微尺置于显微镜的载物台上，使刻度面朝上。

(2) 放置目镜测微尺：取出目镜，旋开透镜，将目镜测微尺放在目镜的隔板上并使刻度向下，然后旋目镜透镜，将目镜放回镜筒内。

(3) 校正目镜测微尺：先用低倍镜看清镜台测微尺，转动目镜，使目镜测微尺的刻度平行于镜台测微尺的刻度，移动镜台测微尺使两种测微尺在某一区间内的两对刻度线完全重合，然后计数出两对重合线间各自所占的格数(图 4)。根据计数的结果通过以下公式算出目镜测微尺每格所代表的实际长度。

$$\text{目镜测微尺每小格长度}(\mu\text{m}) = \frac{\text{两对重合线间镜台测微尺格数} \times 10}{\text{两对重合线间目镜测微尺格数}}$$

在高倍镜和油镜下目镜测微尺每小格所代表的长度可用同法校正。

(4) 微生物或细胞大小的测定：移去镜台测微尺，换上微生物或细胞染色玻片标本，调节焦距使物像清晰，转动染色标本或目镜测微尺，测出微生物或细胞的长度和宽度所占的格数，将此结果乘以每小格所代表的长度，即可求出单个标本的大小。一般而言，为准确起见可以采用多次测量求平均值的办法确定微生物或细胞的大小。对于细菌来说多用对数生长期的菌体来进行测定。

(5) 复原：取出目镜测微尺，复原显微镜，将所用的两种测微尺擦干净放回盒内保存。

(二) 血球计数板的使用

在显微镜下计数微生物或细胞的数量，常用血球计数板。此法直观快速。

1. 原理 血球计数板，通常是一块特制的载玻片，其上表面中央部分由四条槽分成三个平台。中间平台又被一短槽一分为二，每边各有一个方格网。每个方格网有九个大小相等的大方格，中间的一个大方格即计数室，就是计数微生物或细胞的部位，如图 5 所示。

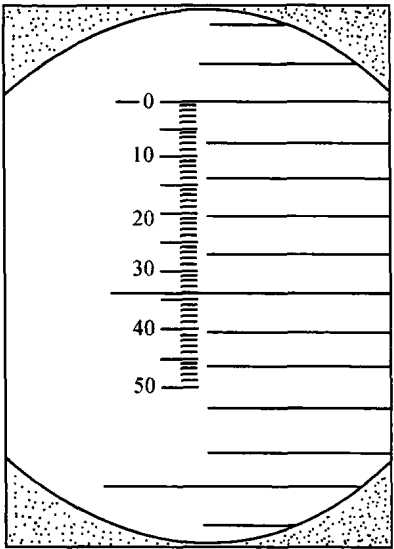


图 4 目镜测微尺与镜台测微尺校正时的情况

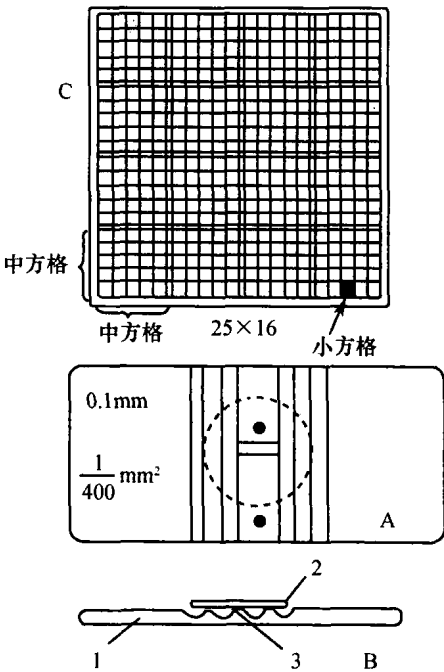
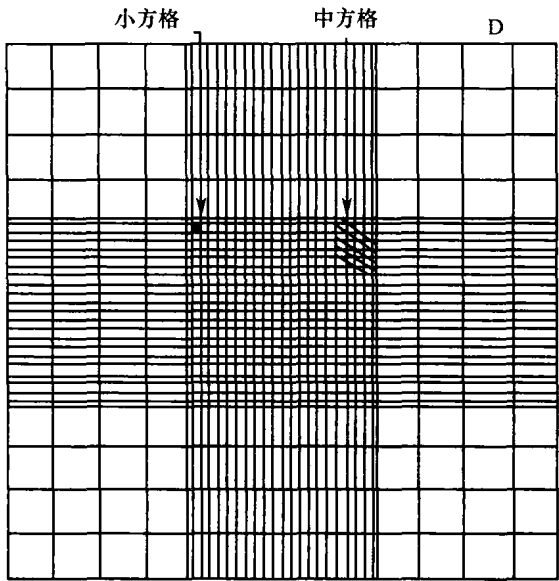


图 5 血球计数板的构造

A. 正面图 B. 纵切面图 (1. 血球计数板, 2. 盖玻片, 3. 计数室)
C. 计数室 D. 放大后的方格网 (方格网的中央为计数室)

由于计数室容积一定，只要将稀释后的待测标本的均匀悬液放在计数室中并在显微镜下计数就可算出单位体积内的微生物的总数目。

计数室刻度一般有两种规格，即大方格分成 25 个中方格，而中方格又分成 16 个小方格的一种（图 5D）；和大方格分成 16 个中方格，而中方格又分成 25 个小方格的一种（图 5C）。但两种规格的计数板均有 400 个（ 16×25 或 25×16 ）小方格。

由于大方格边长为 1mm，载玻片与盖玻片间距为 0.1mm，所以计数室容积为： $1 \times 1 \times 0.1 = 0.1 \text{mm}^3$ 。

计数时，通常数五个中方格，即四个角与中央的中方格中的待测标本数，然后算出每个中方格平均值，再乘以 16 或 25，就得出一个大方格的总微生物数，然后换算出 1 毫升的总微生物数，公式如下：

$$1\text{ml 悬液中的微生物总数} = \frac{A}{5} \times n \times B \times 1000 = 2000ABn \text{ (个)}$$

其中，A 为五个中方格中的微生物总数，B 为稀释倍数，n 为每大方格中的中方格数。

2. 使用方法

(1) 稀释：将浓的标本悬液进行适当稀释。

(2) 镜检：加样前，先要检查计数室内有无污物，若有则需清洗后烘干再使用。

(3) 加样：在血球计数板上盖上清洁干燥的盖玻片，用无菌的细口滴管将稀释的微生物悬液从盖玻片边缘滴一小滴（不宜过多）。这样通过毛细渗透作用液体可沿缝隙进入计数室，注意要使计数室中不产生气泡并且充盈稀释液。

(4) 计数：将血球计数板置于显微镜的载物台上静置 5min 左右，先用低倍镜找到计数室，然后将计数室移到视野中央，换上高倍物镜，微调后使计数室的小方格和悬液中的微生物清晰可见，分别计数任意 5 个中方格内的微生物数（最好选 4 个角和中央的中方格）。为准确可靠，位于格线上的微生物一般只数上线和右线上的或下线和左线上的。而且要计数两个计数室求平均值。若稀释液过浓或过稀需重新处理悬液再进行计数。

(5) 清洗：用完后，一般用水冲洗血球计数板，切勿用硬物洗刷，以免磨损计数室。洗完后要烘干或晾干，镜检，若有残留微生物或污物需重复洗涤直至干净。

（陈兴保 台凡银）

