

普通高等医学院校实验教材

医学微生物学与免疫学 实验指导

YIXUE WEISHENGWUXUE YU MIANYIXUE SHIYAN ZHIDAO

党冬梅 刘晓斌 刘永仙 主编



中国科学技术出版社
CHINA SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS



第 1 版 2009 年 12 月第 1 次印刷

医学微生物学与免疫学

实验指导

主编 王 颖 副主编 王 颖 王 颖



人民卫生出版社
地址：北京市丰台区新街口

普通高等医学院校实验教材

医学微生物学与免疫学实验指导

党冬梅 刘晓斌 刘永仙 主编

中国科学技术出版社
CHINA SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS
· 北 京 ·
BEIJING

图书在版编目(CIP)数据

医学微生物学与免疫学实验指导/党冬梅,刘晓斌,刘永仙主编. —北京:
中国科学技术出版社,2010.8

普通高等医学院校实验教材

ISBN 978 - 7 - 5046 - 5679 - 7

I. ①医… II. ①党… ②刘… ③刘… III. ①医药学:微生物学 - 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 VI. ①R37 - 33 ②R392 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 143039 号

本社图书贴有防伪标志,未贴为盗版。

内 容 提 要

本书分为医学微生物学和免疫学两部分。详述了微生物学与免疫学知识的更新,新的检验技术方法,为满足医学专业需求,内容从简单到复杂,从基本到综合,有基础验证性实验,还有综合设计性实验。本书注重实验方法的说明,并提供必要的图表,便于学生对实验的理解和操作。

中国科学技术出版社出版

北京市海淀区中关村南大街 16 号 邮政编码:100081

策划编辑	林 培 孙卫华	责任校对	林 华
责任编辑	孙卫华	责任印制	安利平

发行部电话:010 - 62173865 编辑部电话:010 - 84123361 - 6029

<http://www.kjpbooks.com.cn>

科学普及出版社发行部发行

北京蓝空印刷厂印刷

*

开本:787 毫米×1092 毫米 1/16 印张:6.875 字数:167 千字

2010 年 8 月第 1 版 2010 年 8 月第 1 次印刷 定价:13.60 元

ISBN 978 - 7 - 5046 - 5679 - 7/R · 1472

(凡购买本社的图书,如有缺页、倒页、
脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

为适应我国高等医学教育改革和发展的需要，培养新世纪的实用型医学人才，提高学生的动手、合作能力，在院校有关部门的组织支持下，经过参编作者的共同努力，编写了这本《医学微生物学和免疫学实验指导》，使学生在有限的时间内熟练掌握基础理论知识和基本技能。希望能借此提高学生的实验课质量，为今后的临床工作打下扎实的基础。

本实验课程为专业必修课，在选择实验内容和编写过程中，我们努力做到与教材配套。为满足教学需要，培养学生理论联系实际，独立思考、操作的能力，在借鉴国内外医学院校相关实验教材的同时，结合微生物学与免疫学长期教学的实践经验，进行了多项教学改革的尝试。随着微生物学与免疫学知识的不断更新，新的检验技术方法及设备不断出现，在细菌学、病毒学及血清学检验方面正趋向于微量化、快速化、系列化、半自动化甚至于自动化。本实验教材医学微生物学内容包括：基础验证性实验和综合设计性实验两部分。为满足医学专业需求，内容从简单到复杂，从基本到综合，在顺序上打破了传统的实验编排，在内容上尝试让学生设计综合鉴定性实验。本书注重实验方法的说明，并提供必要的图表，便于学生对实验的理解和操作。还附录有常用染液和培养基的配置用途、医学微生物英汉基本词汇，便于学生学习和查阅。

本书供临床、护理、影像、麻醉等医学专业使用，由于各专业要求的重点不同，因此，编排实验内容时考虑了教材的兼容性和实用性。

衷心感谢参编单位领导和同事对本教材编写的支持和帮助。由于编者水平有限，书中难免存在疏漏和不足，恳请读者指正，我们将在今后的修订中不断加以补充和完善。

编 者
2009年12月

《医学微生物学与免疫学实验指导》编委会

主 编 党冬梅 刘晓斌 刘永仙

编 委 (按姓氏笔画排序)

王富有 田红英 刘晓斌 刘永仙 张欠欠

杨建军 林 敏 贺智英 党冬梅 符兆英

樊 霞

目 录

实验目的与要求	1
实验室规则	2

微生物学部分

基础验证性实验	3
实验一 细菌基本形态的观察	3
实验二 细菌特殊结构的染色和观察	8
实验三 细菌培养	12
实验四 细菌的分布与计数	20
实验五 消毒灭菌	23
实验六 质粒 DNA 的提取	31
实验七 抗链球菌溶血素“O”试验	37
实验八 厌氧性细菌	38
实验九 分枝杆菌属	40
实验十 螺旋体	43
实验十一 其他细菌	46
实验十二 病原性真菌的检测	47
实验十三 病毒的分离培养	49
实验十四 病毒血凝试验	51
综合设计性实验	54
实验十五 细菌的生化反应	54
实验十六 病原性球菌感染检查与鉴定	58
实验十七 肠道杆菌的检测	64

免疫学部分

实验一 凝集反应.....	70
实验二 沉淀反应.....	75
实验三 细胞分离技术及 E 花环形成试验	80
实验四 超敏反应试验.....	81
实验五 免疫标记技术.....	83
实验六 吞噬功能的检测.....	90
实验七 白细胞介素 -2 生物学活性测定	92
实验八 抗血清的制备.....	94
附 录.....	98
医学微生物学基本词汇英汉对照.....	98

实验目的与要求

医学微生物学与免疫学实验课是医学课程的重要组成部分，是学生重要的基础课和技能训练课，也是学生今后临床学习和工作的基础。学习实验课的主要目的有以下几点。

1. 使学生巩固和加强课堂所学的基础理论知识和基本技能，掌握有关的实验操作技术，为以后的医学专业课学习打下坚实的基础。

2. 培养学生观察、思考、分析和解决问题的能力，培养学生参与实验的主动性、动手能力及独立工作的能力。熏陶学生严谨的科学态度及严密的工作方法。

3. 通过实验，使学生对理论内容加以验证，提高学生学习兴趣的同时也使系统地了解微生物学实验的原理、方法、结果及用途。

4. 培养学生的团结协作、互帮互让、取长补短，共同完成实验的美德。

为了达到以上目的，提出下列要求。

1. 实验课前做好预习，明确本次实验课的目的、内容、原理、方法及注意事项。

2. 实验中要仔细认真，注意分工与协作，操作实验要按操作步骤进行。学会正确操作手法、准确记录实验结果。示教实验要注意观察，并记录好相关内容。

3. 详细讨论实验结果，提倡同学之间互帮互学，并紧密联系理论课内容。要注意不论实验结果与理论符合与否，都有讨论的价值，并分析其原因，有可能的话还应重复实验。

4. 独立认真完成实验报告，书写要字迹清楚，绘图应根据实际标本绘制。

5. 严格遵守实验室规则，在微生物学实验课上，要树立“无菌观念”，严格掌握和不断完善无菌操作技术。

实验室规则

医学微生物学与免疫学实验研究对象大都有传染性，为防止感染必须严格遵守实验室规则。

1. 进入实验室须穿工作服、戴工作帽。除必要的书、文具外，其他个人物品一律不得带入实验室。

2. 实验室禁止饮食、吸烟、打电话及与学习无关的活动，室内应保持清洁、安静，实验时要认真严肃，不得大声喧哗和随处走动。

3. 未经老师允许，实验室内任何物品不得擅自搬动和带出室外，否则后果自负。

4. 实验必须按计划进行，严格遵守操作规则认真操作。爱护实验室内的仪器，使用显微镜及其他贵重仪器时要严格按照要求操作。

5. 爱护室内一切设施，注意节约实验消耗材料及药品，节约用水及安全用电。

6. 实验中若打翻菌液、带菌材料污染桌面、地板、书籍、衣物或割破手指，应及时报告老师进行处理，切勿自作主张不按规定处理。

7. 实验过程中用过的带菌材料如玻片、试管或培养物，应放到指定的地方统一处理，不得放在桌上或冲洗于水槽内；易燃物品不准接近火源，一旦起火应立即用沾水的抹布覆盖扑火。

8. 实验结束时要清理台面，将实验材料整理好放回原处。每次离开实验室前用消毒水清洗双手，自来水冲洗。值日生应彻底打扫室内卫生，离开前要检查水、电、门窗等开关是否关好。

9. 离开实验室时脱下工作服反折叠带走。

微生物学部分

基础验证性实验

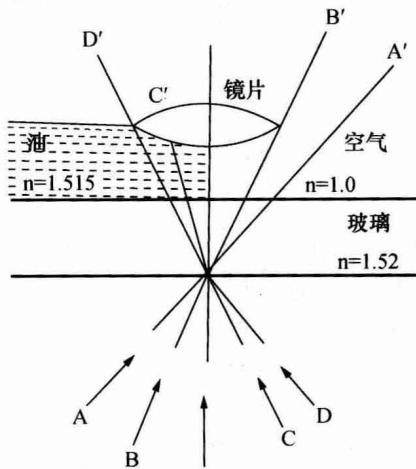
实验一 细菌基本形态的观察

由于细菌个体微小，需借助显微镜，才能够看清细菌的形状、大小、结构、排列及染色特性等。因此，同学们首先要熟练掌握油镜的使用及保护。

一、显微镜油镜头的使用及保护

【原理】

显微技术是微生物检验技术中最常用的技术之一。油镜的透镜很小，光线通过玻片与油镜头之间的空气时，因介质密度不同，发生折射或全反射，使射入透镜的光线减少，物象显现不清。若在油镜与载玻片之间加入和玻璃折射率相近的香柏油和液体石蜡，避免光线散射，使进入透镜的光线增多，视野亮度增强，观察物象更加清楚。(图1-1-1)。



1. 光线C、D、C'、D'通过载玻片经香柏油折射，使进入物镜中的光线量较多。
2. 光线A、B、A'、B'通过载玻片经空气折射，使进入物镜中的光线量减少。

图1-1-1 油镜的使用原理

【方法】

1. 物镜

物镜的放大率可由其外形辨认，镜头长度越大，镜片直径越小，放大倍数越大；反之，放大倍数越小。油镜头长度大于低、高倍镜，镜头下缘一般刻有一圈黑线、白线或蓝线，并刻有100×或oil等字样。(图1-1-2)。

2. 显微镜油镜的使用

使用显微镜油镜时，必须将显微镜端正直立桌上，不得将镜臂弯曲，以免使载物台倾斜，松柏油流溢，影响观察，污染台面。

3. 调试

打开电源，先采用低倍镜，上下移动集光器和光圈，使视野达到清晰光亮。将标本片固定于载物台上，镜头对准标本面，先用低倍镜找出标本的位置，转动粗螺旋使镜筒上升，在标本的待检部位滴加一滴香柏油，改换油镜头观察。

4. 调焦距

(1) 转动粗螺旋使载物台徐徐上升，同时眼睛从右侧观察镜筒下降程度，至油镜头浸入油中。小心操作，以免压碎标本片或损坏镜头。

(2) 用双眼观察目镜，反方向缓慢地转动粗螺旋，下降载物台，待看到模糊物像时，换用细螺旋，转动至物像完全清晰为止。

(3) 观察时只用细螺旋调节，需改换视野时，右手操纵推进器，左手转动细螺旋，做到配合自如。并养成左眼观察，右眼绘图的习惯。

(4) 实验完毕，先提高镜筒，并将油镜头扭向一侧，再取下标本片。油镜头使用后须用擦镜纸滴加适量酒精和乙醚混合液(7:3)将镜头上的油擦洗干净。不用时将物镜转成“八”字形，载物台降至低点，下降集光器，关上光圈，套上保护罩，双手平托放回原处。

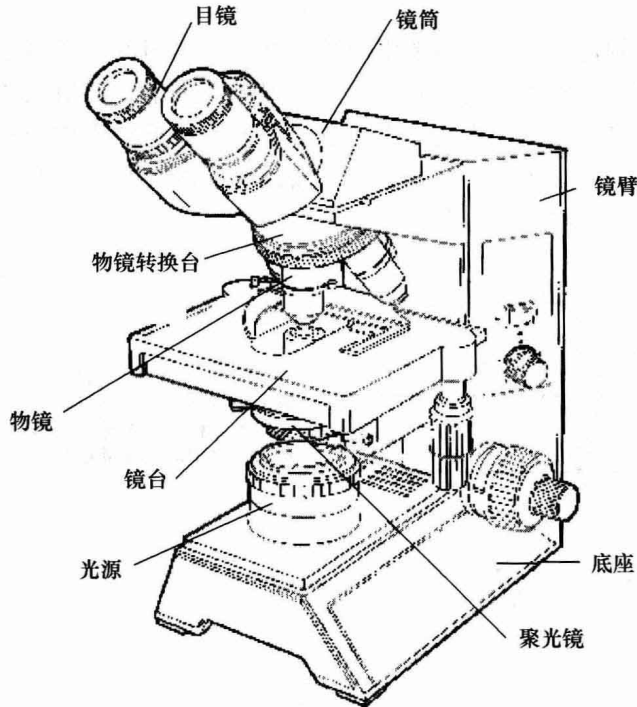


图 1-1-2 普通光学显微镜结构图

【油镜头的保护】

1. 显微镜是精密仪器，使用时要注意爱护，切勿随意拆卸和碰撞。
2. 强酸、强碱、氯仿、酒精、乙醚等都能去漆或损坏机件，均需注意不使其接触显微镜。
3. 细调节器是显微镜最精细、最脆弱的机械部分，每旋转一周使镜筒上升或下降 0.1mm，只能往返回转，即向一个方向转动数周，遇阻力时，应反方向转动。
4. 显微镜不用时放入镜柜，避免直射日光，置于干燥处，以防受潮。

【注意事项】

1. 显微镜使用时，如发现问题或配件短缺应及时向老师报告并进行登记，以便检修。
2. 观察不染色标本时，需下降集光器并适当地缩小光圈，使光度减弱；观察染色标本时，光度宜强，应将显微镜亮度开关调至最亮，光圈完全打开，并上升集光器至与载物台相平。
3. 使用直筒显微镜观察标本时，必须两眼同时睁开，训练使用左眼观察，右眼绘图。如用油镜头观察，勿将镜身歪斜，避免镜油流出片面。
4. 使用完毕，务必擦去镜头油。

二、细菌基本形态观察（示教）**1. 球形**

葡萄球菌 G^+ ——菌体正圆形，染成蓝紫色，呈现葡萄串状排列。 G^+ 球菌。

2. 杆形

大肠杆菌 G^- ——菌体短杆状，染成红色，呈不规则分散排列。 G^- 杆菌。

3. 螺形

霍乱弧菌 G^- ——菌体弧形，染成红色，呈不规则分散排列。 G^- 弧菌。

三、革兰染色法（操作）

细菌革兰染色有助于鉴别细菌。

【原理】

细菌的等电点较低，约在 $pH2 \sim 5$ 之间，故在中性、碱性或弱碱性溶液中，菌体蛋白质电离后带负电荷，易与带正电荷的碱性染料如龙胆紫及碱性复红等结合，使细菌被染成紫色或红色。革兰染色是细菌学中使用最广泛的一种染色方法，借此染色法，可将所有细菌区分为两大类。

【材料】**1. 菌种**

葡萄球菌、大肠杆菌 18 ~ 24h 普通琼脂斜面培养物。

2. 染色液

革兰染色液。

3. 其他

生理盐水，载物玻片，接种环等。

【方法】**1. 制片**

(1) 灭菌。接种环以 15° 角置于酒精灯的外焰中烧灼灭菌（图 1-1-3），直至金属丝烧红，然后将金属柄部也回旋通过火焰烧灼灭菌，重复 3 次。

(2) 涂片

1) 取清洁无油污载物玻片一张，已灭菌接种环蘸取生理盐水 1 ~ 2 环置于玻片中央。

2) 用右手小指和手掌小鱼肌侧拨下左手所持菌种的试管盖，并立即火焰烧灼试管口灭菌。

3) 再用已灭菌冷却接种环伸入试管中，蘸取少许葡萄球菌或大肠杆菌菌苔，混于生理盐水中，轻轻涂成均匀薄膜。

4) 再次灭菌试管口，盖好试管，放回原处。

5) 然后将接种环用火焰烧灼灭菌。为防止细菌溅散污染环境, 接种环灭菌前, 须先将接种环靠近火焰或放内焰中烤干, 然后再在外焰中烧红灭菌, 杀死残留的细菌。若菌种为脓液、痰液等液体标本, 注意取菌液时 (图 1-1-4) 勿使沾有菌液的接种环触及试管壁及试管口。

(3) 干燥。最好在室温自然干燥, 如需加速干燥, 也可将涂面向上, 远离火焰上方微微加温干燥 (离火焰 20cm 处, 切勿加热过度, 以防将标本烧枯)。

(4) 固定。标本干燥后, 用加热固定法固定。常玻片有菌膜的面向上, 在火焰的最热部分通过酒精灯火焰三次 (约 2~3s), 固定的目的是杀死细菌使之固定于玻片上, 并使细菌蛋白变性, 以改变菌体对染料的通透性。

2. 染色 (革兰氏染色)

(1) 初染。于涂抹面上滴加结晶紫染液 1~2 滴, 覆盖涂面, 室温染色 1min。用细流水冲洗剩留染液, 甩去片上积水。



图 1-1-3 接种环灭菌

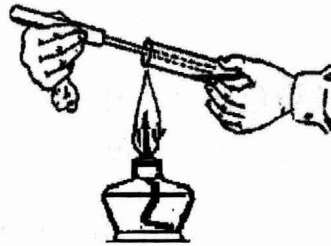


图 1-1-4 试管中取菌

(2) 媒染。滴加卢戈碘液, 室温作用一分钟, 细流水冲洗, 甩去积水。

(3) 脱色。将载玻片浸于 95% 酒精缸中, 上下提取, 边提边看, 直至涂面流下的液体无色为止 (约 30s)。细流水冲洗, 甩去积水。

(4) 复染。加稀释石炭酸复红染液 1~2 滴, 染色 30s, 细流水冲洗, 吸水纸吸干玻片水分。

3. 制片和染色操作过程 (图 1-1-5)

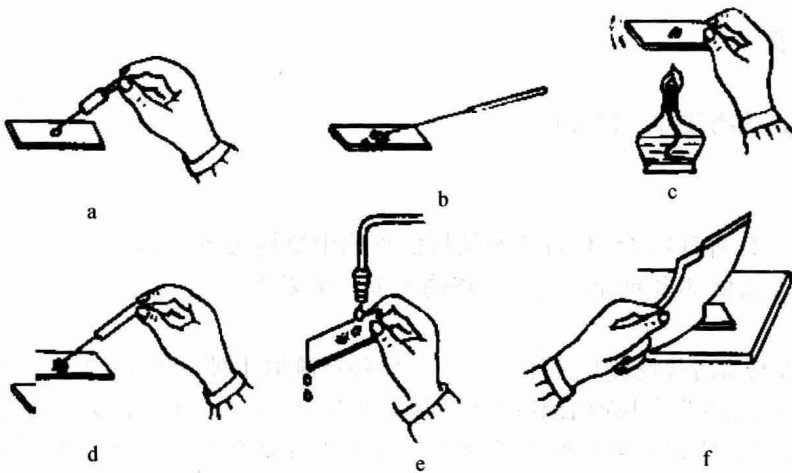


图 1-1-5 制片和染色程序

【结果】

待染色片干后，于油镜下，调强光视野观察，呈紫色的为革兰阳性菌，呈红色的为革兰阴性菌。葡萄球菌染成紫色，为革兰阳性，以 G^+ 表示；大肠杆菌染成红色，为革兰阴性，以 G^- 表示。

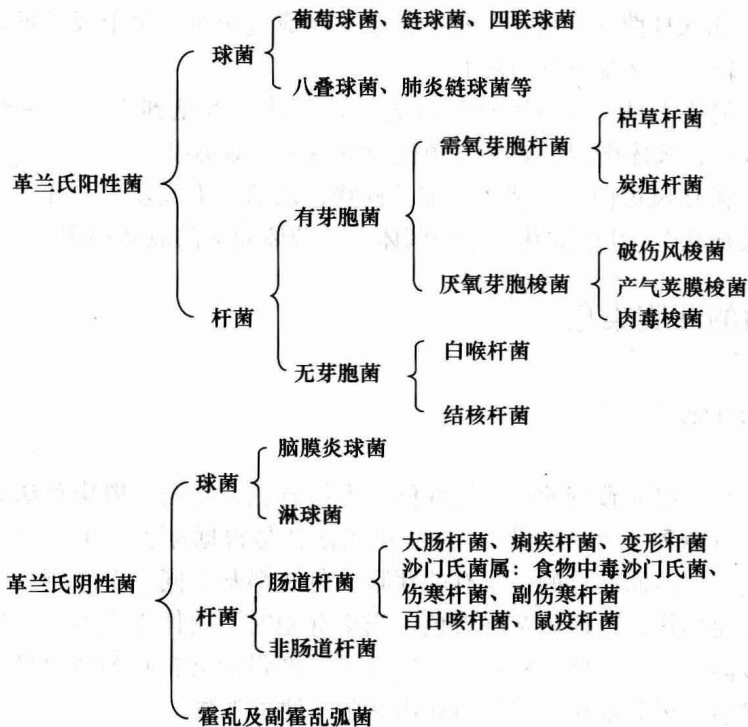
【注意事项】

1. 脱色是革兰染色中的关键步骤，脱色过度，可使 G^+ 菌被误染为 G^- 菌；脱色不够，则 G^- 菌可被误染为 G^+ 菌。脱色时间的长短还与涂片厚薄有关，一般以涂片薄而均匀为好。

2. G^+ 菌与 G^- 菌的染色反应，还受多种因素如菌龄、染色时间、pH 等的影响，只有严格正规操作，才能得到正确结果。

【附注】

1. 与医学有关的常见细菌的革兰染色性



2. 革兰 (Gram) 染色液的配制

1) 结晶紫染液

- ① 结晶紫酒精饱和液：取 14g 结晶紫溶于 100mL 95% 的酒精内。
- ② 1% 草酸铵水溶液：草酸铵 0.8g 溶于 80mL 蒸馏水中。
- ③ 将已配好之①液 20mL 和②液 80mL 混合即成，置瓶中备用。

2) 芦戈 (Lugol) 氏碘液

- ① 碘 1g；碘化钾 2g；蒸馏水 300mL
- ② 先将碘化钾 2g 溶于 100mL 蒸馏水中，再加碘 1g，用力摇匀待溶解后加蒸馏水至 300mL 即成。供革兰染色媒染用。

3) 95% 酒精

- 4) 石炭酸复红稀释液。1 份碱性复红饱和液 (碱性复红 3.2g 溶于 95% 酒精 100mL

中。即为碱性复红饱和溶液)加9份5%石炭酸水溶液,先配成石炭酸复红染液(抗酸染色用),取1份石炭酸复红染液加9份蒸馏水即为稀释复红染液。上述各种染液配成后,均需用滤纸过滤后使用,染液应贮存于棕色瓶内。

【思考题】

1. 细菌的基本形态有哪几种?怎样进行细菌染色标本显微镜检查?应注意什么事项?
2. 革兰染色的原理?有何实际意义?

实验二 细菌特殊结构的染色和观察

一、特殊结构

(1) 鞭毛。伤寒杆菌——菌体较粗大杆状,染成蓝灰色,单个或成堆存在,周围可见到波浪状弯曲、较长、呈蓝灰色的鞭毛。

(2) 荚膜。肺炎双球菌——视野背景为红色,其中可见到染色呈深红色,矛头状菌体,纵向成双排列,菌体周围有未染上颜色的空白区,即荚膜。

(3) 芽胞。破伤风梭菌——菌体为细长杆状,顶端有染成蓝色、并大于菌体的球状物即芽胞,呈“鼓槌状”,其他散乱分布的菌体,为菌体脱落的成熟芽胞。

二、细菌的芽胞染色

【目的】

掌握细菌的芽胞染色法。

【原理】

细菌的芽胞具有厚而致密的壁,透性低,不易着色,若用一般染色法只能使菌体着色而芽胞不着色(芽胞呈无色透明状)。芽胞染色法就是根据芽胞既难以染色而一旦染上色后又难以脱色这一特点而设计的。所有的芽胞染色法都基于同一个原则:除了用着色力强的染料外,还需要加热,以促进芽胞着色。当染芽胞时,菌体也会着色,然后水洗,芽胞染上的颜色难以渗出,而菌体会脱色。然后用对比度强的染料对菌体复染,使菌体和芽胞呈现出不同的颜色,因而能更明显地衬托出芽胞,便于观察。

【材料】

- (1) 材料。培养的枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)。
- (2) 染色液和试剂。5%孔雀绿水溶液、0.5%蕃红水溶液。
- (3) 器材。小试管、接种环、擦镜纸、镊子、显微镜等。

【方法】Schaeffer与Fulton氏染色法

1. 涂片

按常规方法将待检细菌制成一薄的涂片。

2. 晾干固定

待涂片晾干后在酒精灯火焰上通过2~3次。

3. 染色

- (1) 加染色液。加5%孔雀绿水溶液于涂片处(染料以铺满涂片为度),然后用酒精

灯火焰加热玻片至染液冒蒸汽时开始计算时间，约维持 5min。加热过程中要随时添加染色液，切勿让标本干涸。（加热时温度不能太高）。

(2) 水洗。待玻片冷却后，用水轻轻地冲洗，直至流出的水中无染色液为止。

(3) 复染。用蕃红液染色 5min。

4. 水洗、晾干或吸干

5. 镜检

先低倍，再高倍，最后在油镜下观察芽胞和菌体的形态。

【结果】

芽胞呈绿色，菌体为红色。

三、细菌的荚膜染色

【目的】

了解细菌的荚膜染色法

【原理】由于荚膜与染料间的亲和力弱，不易着色，通常采用负染色法染荚膜，即设法使菌体和背景着色而荚膜不着色，从而使荚膜在菌体周围呈一透明圈。由于荚膜的含水量在 90% 以上，故染色时一般不加热固定，以免荚膜皱缩变形。

【材料】

(1) 菌种。肺炎球菌

(2) 染色液和试剂。结晶紫、20% CuSO_4 水溶液、香柏油、二甲苯。

(3) 器材。载玻片、玻片搁架，擦镜纸、显微镜等。

【方法】

1. 制片

提前数日于小白鼠腹腔注射肺炎链球菌 0.2mL，小鼠死亡后解剖，取腹腔液印片。印片自然干燥，无需加热固定。

2. 染色

(1) 滴加结晶紫染液，于火焰上加温染色，使冒蒸汽，勿水洗。

(2) 以 20% CuSO_4 溶液冲洗染液，勿水洗，干后镜检。

【结果】菌体呈现紫色，荚膜呈淡紫色。

四、细菌的鞭毛染色

【目的】

了解细菌的鞭毛染色法

【原理】

细菌的鞭毛极细，直径一般为 10~20nm，只有用电子显微镜才能观察到。但是，如采用特殊的染色法，则在普通光学显微镜下也能看到。鞭毛染色方法很多，但其基本原理相同，即在染色前先用媒染剂处理，让它沉积在鞭毛上，使鞭毛直径加粗，然后再进行染色。常用的媒染剂由丹宁酸和氯化高铁或钾明矾等配制而成。

【材料】

(1) 菌种。假单细胞菌斜面菌种。