



全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材  
供临床医学、基础医学、护理学、医学检验等专业使用

丛书主编 秦晓群

# 病原生物学实验

BINGYUAN SHENGWUXUE SHIYAN

主编◎张红军 吾拉木·马木提 刘水平



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>



全国高等医药院校国家级实验教学示范中心

供临床医学、基础医学、护理学、医学检验

丛书主编 秦晓群

# 病原生物学实验

BINGYUAN SHENGWUXUE SHIYAN

主 编 张红军 吾拉木·马木提 刘水平

副主编 孙玉萍 姬云丽

编 者 (以姓氏笔画为序)

|         |             |
|---------|-------------|
| 马秀敏     | (新疆医科大学)    |
| 王 飞     | (同济大学医学院)   |
| 王莉莉     | (中南大学湘雅医学院) |
| 石学魁     | (牡丹江医学院)    |
| 刘 君     | (新疆医科大学)    |
| 刘水平     | (中南大学湘雅医学院) |
| 孙玉萍     | (新疆医科大学)    |
| 吾拉木·马木提 | (新疆医科大学)    |
| 沈 利     | (同济大学医学院)   |
| 宋宝辉     | (牡丹江医学院)    |
| 张红军     | (牡丹江医学院)    |
| 张晓莉     | (牡丹江医学院)    |
| 周晓茵     | (牡丹江医学院)    |
| 姬云丽     | (牡丹江医学院)    |
| 鞠宝玲     | (牡丹江医学院)    |



华中科技大学出版社

<http://www.hustp.com>

中国·武汉

## 内 容 简 介

本书为全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材。

本书在结构上力求实验内容的完整性和系统性,全书内容共分医学微生物学实验技术、人体寄生虫学实验和分子微生物学实验技术等三篇十七章。本书可供高等医药院校临床医学、基础医学、护理学、药学等专业5年制或长学年制学生参考使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

病原生物学实验/张红军 吾拉木·马木提 刘水平 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2013.1  
ISBN 978-7-5609-8503-9

I. 病… II. ①张… ②吾… ③刘… III. 病原微生物-实验-医学院校-教材 IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 276177 号

### 病原生物学实验

张红军 吾拉木·马木提 刘水平 主编

策划编辑:陈 鹏

责任编辑:陈 鹏

封面设计:陈 静

责任校对:祝 菲

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:华中科技大学印刷厂

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:14.5 插页:6

字 数:355千字

版 次:2013年1月第1版第1次印刷

定 价:38.00元



本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换  
全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务  
版权所有 侵权必究



# 全国高等医药院校国家级实验教学示范中心 “十二五”规划教材编委会

主任委员 秦晓群

委 员 (按姓氏笔画排序)

|     |             |     |           |
|-----|-------------|-----|-----------|
| 于 军 | 第四军医大学      | 张晓莉 | 牡丹江医学院    |
| 马志健 | 海南医学院       | 陈昌杰 | 蚌埠医学院     |
| 马晓松 | 深圳大学医学院     | 陈增保 | 新疆医科大学    |
| 王 军 | 首都医科大学      | 罗自强 | 中南大学湘雅医学院 |
| 王迎伟 | 南京医科大学      | 金宏波 | 哈尔滨医科大学   |
| 王晓梅 | 深圳大学医学院     | 周代锋 | 海南医学院     |
| 孙玉萍 | 新疆医科大学      | 秦晓群 | 中南大学湘雅医学院 |
| 吴雄文 | 华中科技大学同济医学院 | 高殿帅 | 徐州医学院     |
| 吴宜艳 | 牡丹江医学院      | 高国全 | 中山大学中山医学院 |
| 宋高臣 | 牡丹江医学院      | 康 毅 | 天津医科大学    |
| 张 晓 | 成都医学院       |     |           |

# 总序

preface

为了进一步推动高等学校加快实验教学改革,加强实验室建设,培养大学生的实践能力和创新精神,提高教育质量,更好地满足我国经济社会发展和创新型国家建设的需要,教育部于2005年5月启动了高等学校实验教学示范中心建设和评审工作。同时,要求各实验教学示范中心认真总结教学经验,凝练优质实验教学资源,加强实验教学研究,不断开拓创新,探索实验教学改革新思路,引领实验教学改革方向,为全国高等学校实验教学提供示范。在此质量工程实施过程中,一批优秀的国家级医学实验教学示范中心应运而生。

在医学基础课教学中,实验教学占有极其重要的位置,它在培养学生实际动手能力、综合分析问题和解决问题的能力以及科研创新能力等方面发挥着独特的作用。实验教材是实验教学的基础,也是实验教学的载体。但目前各高等学校的实验教材建设明显滞后,主要存在以下几个问题:①实验教材建设落后于理论教材,作为高等学校三大建设之一的教材建设多年来一直受到高度重视,但这里的教材建设一般是指理论教材的建设,而实验教材在大多数高等学校一直不受重视,实验教材大多是自编的实验指导,不能满足实验教学的需要;②实验教材没有形成自己的体系,许多实验教材只注重了与理论知识体系配套,而忽视了自身的系统性、科学性和完整性,成为理论教材的附属品,没有形成自己独立的教材体系,表现为实验课大多是为了配合理论课教学,偏重于验证理论,缺乏综合性与设计性的教学内容;③实验教材缺乏创新,表现为验证性实验偏多,缺乏设计性、综合性实验课题,验证性实验可以对学生强化课堂所学的理论知识起到积极作用,但不能充分激发学生的创造性思维,不能较好地培养学生分析问题、解决问题的能力,不利于学生综合素质、创新意识和创新能力的培养;④实验教材管理混乱,由于历史原因,高等学校实验教材在管理上较为混乱,缺少实验教材建设规划,也没有教材使用的统一要求,教材使用相对无序,既有本校教师编写的自印讲义、实验指导书,也有从校外选用的实验教材,从而助长了实验教学的随意性。

为了顺应高等医学教育实验教学改革的新形势和新要求,在认真、细致调研的基础上,在国家级实验教学示范中心医学组的专家们和部分示范院校领导的指导下,华中科技大学出版社组织了全国27所重点医药院校的近200位老师编写了这套全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材。本套教材由12个国家级实验教学示范中心的教学团队引领,有副教授及以上职称的老师占85%,教龄在20年以上的老师占



70%。教材编写过程中,全体主编和参编人员进行了充分的研讨和细致的分工,各主编单位高度重视并大力支持教材的编写工作,编辑和主审专家严谨和忘我的工作,确保了本套教材的编写质量。

本套教材充分反映了各国家级实验教学示范中心的实验教学改革和研究的成果,教材编写体系和编写内容均有所创新,在编写过程中重点突出以下特点。

(1) 教材课程的设置为三个模式,即传统型课程模式、整合型课程模式、创新型课程模式。

(2) 教材内容体现“三个层次”,即基本训练(基础知识、基本技能训练)、综合型实验、研究型/创新型实验(以问题为导向的实验)。

(3) 既体现基础性,又具有先进性;既体现学科内涵和实验内容的更新,又有反映新技术、新方法、新设备的现代实验技术和手段。

(4) 强调学生的自主性,加强创新能力培养。

本套教材得到了教育部国家级实验示范中心医学组和各院校的大力支持与高度关注,我们衷心希望这套教材能为高等医药院校实验教学体系改革作出应有的贡献,并能为其他院校的实验教学提供有益的借鉴和参考。我们也相信这套教材在使用过程中,通过教学实践的检验和实际问题的解决,能不断得到改进、完善和提高。

**全国高等医药院校国家级实验教学示范中心“十二五”规划教材  
编写委员会**

# 前言

foreword

病原生物学是基础医学中的重要学科,其实践性强,在临床医学的诊断和研究方面占有重要地位。

病原感染致病的诊断主要依靠实验技术的支持,因此在病原生物学的教学环节中,实验教学具有与理论教学同等重要的作用,实验教学工作不仅要培养学生的操作技能,还应该注重学生分析问题、解决问题及创新能力的培养。为适应我国高等教育改革和发展的需要,本着全面贯彻落实科学发展观、培养符合时代要求的医学人才的宗旨,我们四所院校在教学一线具有丰富经验的教师,针对病原生物学本科教学的需求,对病原生物学的实验技术进行了甄选,编写了本实验教材。

本实验教材在结构上力求实验内容的完整性和系统性,全书内容共分医学微生物学实验技术、人体寄生虫学实验和分子微生物学实验技术等三篇十七章。本实验教材力求简明实用,使其适合各专业层次的教学实践的需要,同时也能为医学本科生、研究生提供一些基本的科研实验方法。

由于编写时间仓促、水平有限,书中难免会有疏漏和错误,真诚希望广大师生提出宝贵意见,以便再版时修正。

编者

# 目录

contents

## 第一篇 医学微生物学实验技术

|                      |     |
|----------------------|-----|
| 第一章 细菌形态学检查法         | /3  |
| 实验一 不染色标本的检查         | /3  |
| 实验二 革兰氏染色法           | /4  |
| 实验三 抗酸染色法            | /6  |
| 实验四 荚膜染色法            | /7  |
| 实验五 鞭毛染色法            | /8  |
| 实验六 芽胞染色法            | /9  |
| 第二章 细菌的培养            | /10 |
| 实验一 培养基的制备           | /10 |
| 实验二 细菌的培养方法及生长状态的观察  | /18 |
| 实验三 细菌的生化反应检查法       | /23 |
| 实验四 内毒素的检测           | /26 |
| 实验五 细菌致病性的检测实验       | /27 |
| 第三章 理化及生物因素对细菌的影响    | /30 |
| 实验一 常用消毒灭菌法          | /30 |
| 实验二 噬菌体特异性溶菌试验       | /34 |
| 实验三 细菌的药物敏感性试验       | /35 |
| 实验四 细菌的变异性试验         | /40 |
| 第四章 化脓性球菌的病原学检测      | /44 |
| 实验一 化脓性球菌的接种及其生长状态观察 | /46 |
| 实验二 化脓性球菌的生化反应       | /47 |
| 实验三 化脓性球菌的血清学试验      | /50 |





|     |                         |      |
|-----|-------------------------|------|
| 实验四 | 化脓性球菌的动物实验              | /51  |
| ◇   | <b>第五章 肠道感染细菌的病原学检测</b> | /53  |
| 实验一 | 常用培养基的制备                | /54  |
| 实验二 | 肠道杆菌的生长状态观察             | /59  |
| 实验三 | 肠道杆菌的血清学试验              | /60  |
| 实验四 | 生化试验和微量-编码测定法           | /62  |
| 实验五 | 肥达试验                    | /66  |
| 实验六 | 霍乱弧菌的检查                 | /68  |
| ◇   | <b>第六章 幽门螺杆菌实验检测</b>    | /71  |
| 实验一 | 幽门螺杆菌的形态及染色观察           | /71  |
| 实验二 | 幽门螺杆菌的生化鉴定              | /72  |
| ◇   | <b>第七章 厌氧性细菌检查</b>      | /73  |
| 实验一 | 厌氧培养法                   | /73  |
| 实验二 | 厌氧性芽胞杆菌形态及生长状态的观察       | /75  |
| ◇   | <b>第八章 呼吸道感染细菌检测</b>    | /77  |
| 实验一 | 结核分枝杆菌检测                | /77  |
| 实验二 | 白喉棒状杆菌的检查               | /79  |
| ◇   | <b>第九章 其他微生物的检查</b>     | /83  |
| 实验一 | 支原体、衣原体、立克次体的检查         | /83  |
| 实验二 | 螺旋体的检查                  | /93  |
| ◇   | <b>第十章 病毒学实验</b>        | /100 |
| 实验一 | 病毒的形态学检查法               | /100 |
| 实验二 | 病毒培养法                   | /105 |
| 实验三 | 病毒数量与感染性的测定             | /112 |
| 实验四 | 流感病毒的分离与鉴定              | /114 |
| 实验五 | 乙型肝炎病毒的血清学检测法           | /119 |
| 实验六 | 小儿腹泻病原体——A 组轮状病毒感染的检测   | /124 |
| 实验七 | TORCH 感染的检测             | /127 |
| ◇   | <b>第十一章 真菌和放线菌的检查</b>   | /133 |
| 实验  | 病原性真菌和放线菌的检查            | /133 |

## 第二篇 人体寄生虫学实验

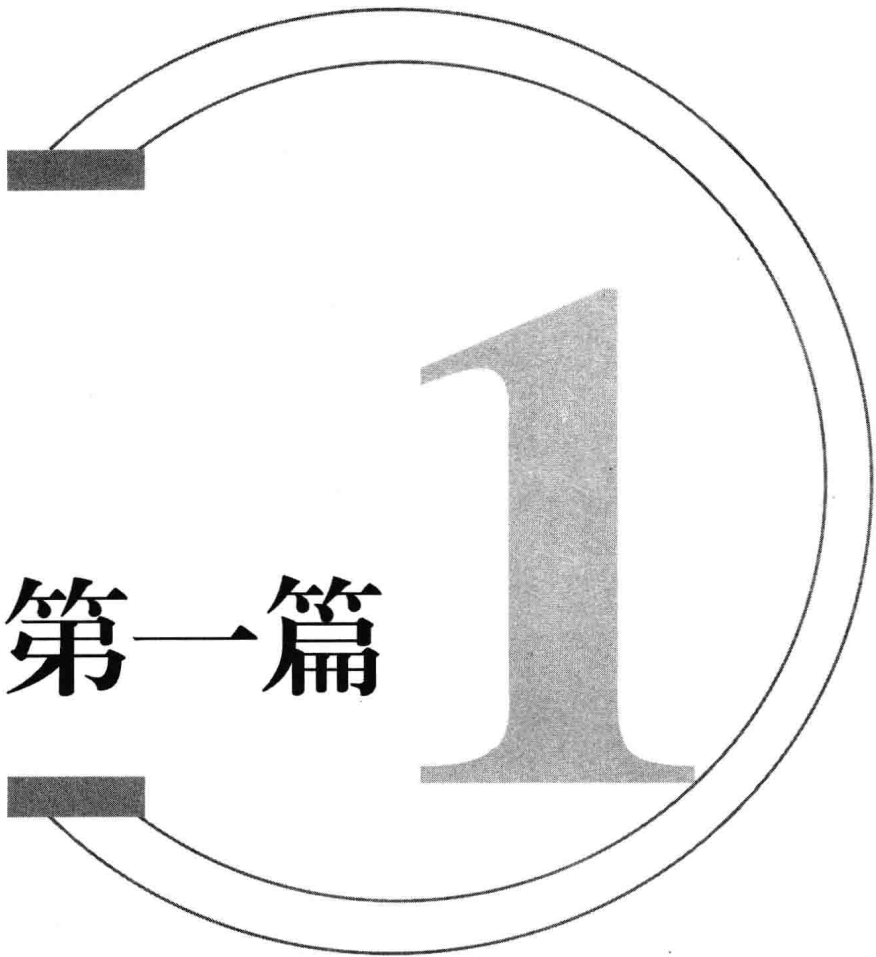
|                     |      |
|---------------------|------|
| ◇ 第十二章 线虫           | /149 |
| 实验一 似蚓蛔线虫           | /149 |
| 实验二 十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫 | /152 |
| 实验三 蠕形住肠线虫          | /155 |
| 实验四 毛首鞭形线虫          | /157 |
| 实验五 马来布鲁线虫和班氏吴策线虫   | /158 |
| 实验六 旋毛形线虫           | /160 |
| ◇ 第十三章 吸虫实验         | /161 |
| 实验一 华支睾吸虫           | /161 |
| 实验二 卫氏并殖吸虫(肺吸虫)     | /163 |
| 实验三 布氏姜片吸虫(姜片虫)     | /165 |
| 实验四 日本裂体吸虫(日本血吸虫)   | /167 |
| ◇ 第十四章 绦虫实验         | /174 |
| 实验一 带绦虫             | /174 |
| 实验二 棘球绦虫            | /177 |
| 实验三 微小膜壳绦虫(短膜壳绦虫)   | /179 |
| 实验四 曼氏迭宫绦虫          | /180 |
| ◇ 第十五章 医学原虫         | /183 |
| 实验一 溶组织内阿米巴         | /183 |
| 实验二 结肠内阿米巴          | /184 |
| 实验三 阴道毛滴虫           | /185 |
| 实验四 蓝氏贾第鞭毛虫         | /186 |
| 实验五 杜氏利什曼原虫         | /187 |
| 实验六 疟原虫             | /188 |
| 实验七 其他医学原虫          | /189 |
| ◇ 第十六章 昆虫实验         | /193 |
| 实验一 蚊               | /193 |
| 实验二 白蛉              | /196 |
| 实验三 蝇               | /198 |
| 实验四 蚤               | /201 |



|     |      |      |
|-----|------|------|
| 实验五 | 虱及臭虫 | /202 |
| 实验六 | 蜱    | /204 |
| 实验七 | 螨    | /205 |

### 第三篇 分子微生物学实验技术

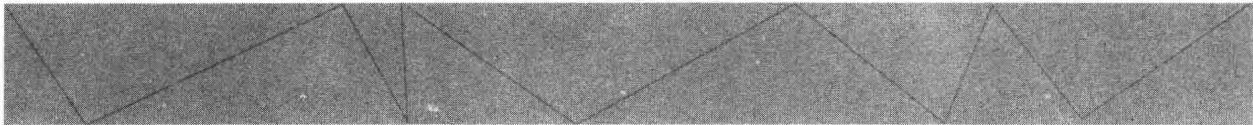
|   |                       |      |
|---|-----------------------|------|
| ◇ | <b>第十七章 基因诊断及应用技术</b> | /209 |
|   | 实验一 基因组 DNA 的提取       | /209 |
|   | 实验二 细菌质粒 DNA 的提取      | /211 |
|   | 实验三 耐药质粒 DNA 转化实验     | /213 |
|   | 实验四 PCR 方法检测病原微生物     | /214 |
|   | 实验五 核酸杂交法检测病原微生物      | /216 |
| ◇ | <b>参考文献</b>           | /220 |
| ◇ | <b>彩图</b>             | /221 |



# 第一篇

## 医学微生物学实验技术

---





# 第一章

## 细菌形态学检查法

### 实验一 不染色标本的检查

#### 实验目的

了解细菌动力的显微镜检查法,观察有鞭毛菌与无鞭毛菌运动的特点。

#### 实验原理

鞭毛是细菌的运动器官,观察细菌有无动力(即有无鞭毛)可鉴别细菌。检查生活状态下细菌的生长与运动常通过细菌的不染色标本来进行观察,常用悬滴法和压滴法。有鞭毛的细菌运动呈真正运动,称为固有运动,其特点是细菌从一个地方游到另一个地方,可以改变位置。无鞭毛的细菌无真正运动的能力,在液体环境中呈布朗运动,只在原位进行颤动。

#### 实验材料

1. 菌种 枯草杆菌、金黄色葡萄球菌 8~12 h 肉汤培养物、牙垢。
2. 其他 凹玻片、载玻片、盖玻片、生理盐水、凡士林等。

#### 实验方法

##### (一) 悬滴法

- (1) 取 1 张凹玻片,于凹窝周围涂少许凡士林(图 1-1-1)。
- (2) 用接种环蘸取枯草杆菌或金黄色葡萄球菌 8~12 h 肉汤培养物,置于盖玻片中央。
- (3) 反转凹玻片,使凹窝对准盖玻片中央,盖于其上,轻压后,迅速翻转凹玻片面向上。
- (4) 先用低倍镜找到悬滴的边缘,再换高倍镜或油镜观察。由于菌体是透明的,镜检时可适当缩小光圈或降低集光器以增大反差便于观察。镜检时要仔细辨别是细菌的运动

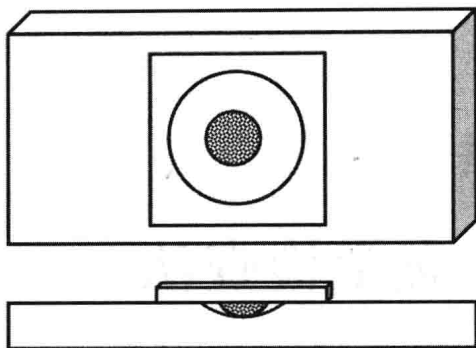


图 1-1-1 悬滴标本示意图

还是分子运动(即布朗运动),细菌的运动在视野下,可见细菌自一处游动至另一处,而布朗运动仅在原处左右摆动。

(5) 观察结果 有鞭毛的枯草杆菌可看到活跃的运动,而无鞭毛的金黄色葡萄球菌作布朗运动。

### (二) 压滴法

(1) 用接种环取菌液 2~3 环,置于载玻片中央。

(2) 用镊子夹好盖玻片,覆盖于菌液上,在放置时,先将盖玻片一端接触菌液,缓缓放下,以不产生气泡为佳。

(3) 先以低倍镜找好位置,再以高倍镜或油镜观察。

(4) 观察结果与悬滴法相同,有鞭毛的枯草杆菌可看到活跃的运动,而无鞭毛的金黄色葡萄球菌作布朗运动。

### (三) 暗视野显微镜检查法

(1) 载玻片上加生理盐水 1 滴,用牙签取牙垢少许于生理盐水中混匀,盖上盖玻片。

(2) 在暗视野集光器的透镜滴加镜油 1 滴,然后将载物台稍向下移。

(3) 将制好的标本片置于载物台上,缓缓上升集光器使镜油与载玻片接触。

(4) 放大光源,进行聚光器光轴调节及调焦。用 10× 物镜找到被检物像,关小聚光器虹彩光圈,在视野中看到视场光阑的轮廓,再缓慢调整聚光进行进一步观察。

(5) 观察结果 在黑暗的视野中,菌体光亮,形状清晰,螺旋体的螺旋及运动方式清晰可见。

## 实验二 革兰氏染色法

### 实验目的

(1) 掌握细菌染色标本的制备、革兰氏染色法及其结果判断。

(2) 熟悉革兰氏染色法的意义。

## 实验原理

细菌染色法是细菌形态学检查的一项基本技术。由于细菌个体微小,基本上无色半透明,直接在显微镜下不易观察,经适当染色增加反差后,才能在显微镜下观察到清晰图像。细菌的染色法分为单染和复染,单染是在染色过程中只需一种染料,复染需2种或2种以上的染料。

革兰(gram)氏染色法是细菌学中最常用的一种复染色法,是1884年由丹麦病理学家 Christain Gram 创立的,目前关于革兰染色的原理存在三种假说。

**1. 通透性学说** 通透性学说是指革兰氏阳性菌细胞壁结构较致密,肽聚糖层厚,脂质含量少,乙醇不易透入,仍保留紫色;革兰氏阴性菌细胞壁结构疏松,肽聚糖层薄,含大量脂质,乙醇易渗入,被脱色后复染成红色。

**2. 等电点学说** 等电点学说是指革兰氏阳性菌等电点(pI为2~3)比革兰氏阴性菌(pI为4~5)低,在相同pH值条件下,革兰氏阳性菌所带负电荷比革兰氏阴性菌多,故与带正电荷的结晶紫染料结合牢固,不易脱色。

**3. 化学学说** 化学学说是指革兰氏阳性菌菌体含大量核糖核酸镁盐,可与碘、结晶紫牢固结合,使已着色的细菌不被乙醇脱色;革兰氏阴性菌菌体含核糖核酸镁盐很少,故易被脱色。

通过革兰氏染色法不仅可以观察细菌的形态和排列方式,还可根据染色结果将细菌分成革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌两大类,有助于细菌的鉴别,同时还为分析细菌的致病性和选用抗菌药物提供了依据。

## 实验材料

- 1. 菌种** 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌的18~24 h肉汤培养物各1支。
- 2. 革兰氏染色液** 结晶紫、碘液、95%乙醇、稀释复红各1瓶。
- 3. 其他** 载玻片、生理盐水、接种环、酒精灯等。

## 实验方法

### (一) 细菌染色标本片的制备

**1. 涂片** 取洁净玻片一张,按无菌操作法用接种环取菌液一环,轻轻涂于玻片中央,涂面直径1 cm左右。

(1) 右手拿接种环的黑色胶柄部分,左手托试管。

(2) 接种环以15°角置于酒精灯的外焰中烧灼灭菌,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。

(3) 用右手小指和手掌小鱼肌侧拨下左手所持混合菌液的试管盖,并立即火焰烧灼试管口灭菌。

(4) 用已灭菌冷却的接种环伸入试管中取出菌液。再次灭菌试管口,盖好试管,放回原处。

(5) 将接种环上菌液轻轻涂于玻片中央,涂面直径1 cm左右,厚度适宜均匀。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。

**2. 干燥** 将涂片置于桌面上,在室温下让其自然干燥;或将涂有细菌的一面朝上,在酒精灯火焰上方慢慢烘干,但切勿紧靠火焰,防止细菌烤焦或玻片碎裂。

**3. 固定** 手持玻片一端,涂有细菌标本的一面朝上,将载玻片在酒精灯火焰外层(最热部分)来回快速通过3次,使涂抹的细菌固定于载玻片上。固定的目的是杀死细菌,使菌体蛋白凝固与玻片黏附较牢;改变对染料的通透性(一般染料难于进入活细胞内)容易着色。

## (二) 染色

**1. 初染** 将玻片置于染色架上,加结晶紫染液2~3滴于标本片上,使染液布满涂片的范围,染1 min后水冲洗,并将标本片上的残余水分甩净。

**2. 媒染** 滴加卢戈碘液2滴,染1 min后水冲洗,并将标本片上的残余水分甩净。

**3. 脱色** 加95%乙醇数滴滴于标本片上,频频摇晃,至无紫色液体脱下为止(约30 s),水冲洗,甩去标本片上的残余水分。

**4. 复染** 滴加稀释复红染液,染1 min后水冲洗,吸水纸吸干,油镜观察。

## 实 验 结 果

革兰氏阳性菌被结晶紫着色后不易被乙醇脱色,故染成紫蓝色;革兰氏阴性菌被结晶紫着色后易被乙醇脱色,故被稀释复红复染成红色。金黄色葡萄球菌被染成紫蓝色,为革兰氏阳性菌;大肠埃希菌被染成红色,为革兰氏阴性菌。

## 附 录

### 革兰氏染色液配制

**1. 结晶紫染液** 称取结晶紫4~8 g,溶于100 mL 95%乙醇中制成饱和液。取20 mL饱和液与80 mL 10 g/L草酸铵溶液混合即成,过滤后备用。

**2. 卢戈碘液** 先将2 g碘化钾溶于10 mL蒸馏水中,再加1 g碘,待碘全部溶解后再加300 mL蒸馏水即成。

**3. 95%乙醇或丙酮乙醇溶液** 95%乙醇70 mL加丙酮30 mL。

**4. 稀释苯酚复红液** 称取4 g碱性复红溶解于100 mL 95%乙醇内,即成碱性复红饱和乙醇溶液,吸取10 mL饱和液和90 mL 50 g/L苯酚溶液混匀即成苯酚复红液。量取10 mL苯酚复红液加90 mL蒸馏水混匀即成。

## 实验三 抗酸染色法

## 实 验 目 的

熟悉抗酸染色法及意义。