

全国高等院校医学实验教学规划教材

医学免疫学 与病原生物学实验

吴学敏 张佩 主编



科学出版社

全国高等院校医学实验指导书编写组编

医学免疫学 与病原生物学实验

医学免疫学实验分册

人民卫生出版社

全国高等院校医学实验教学计划教材

医学免疫学 与病原生物学实验

主 编 吴学敏 张 佩

副主编 卢 颖 金旭鹏 单 颖 佟 伟

崔洪雨

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 岚(沈阳医学院)

王 琴(辽宁医学院)

王光川(辽宁医学院)

卢 颖(辽宁医学院)

李淑华(辽宁医学院)

吴 因(辽宁医学院)

吴学敏(辽宁医学院)

佟 伟(辽宁医学院)

沈雁飞(辽宁医学院)

张 佩(辽宁医学院)

张轶博(辽宁医学院)

金旭鹏(辽宁医学院)

单 颖(辽宁医学院)

官 杰(齐齐哈尔医学院)

赵玉玲(赤峰学院医学院)

柳明杰(辽宁医学院)

董 颖(辽宁医学院)

程 峰(辽宁医学院)

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本教材是在结合本校教学工作实际,借鉴兄弟院校的成熟经验基础上编写而成。全书共四篇 13 章,第一篇为常用仪器使用、试剂配制及基本实验操作,主要介绍实验室常规仪器设备的使用与维护、常用试剂的配制、常用动物实验技术及免疫学、微生物学、寄生虫学基本实验方法;第二篇为经典验证性实验,目的是训练学生的基本技能,并巩固基本知识、验证基本理论;第三篇的综合性实验,是在有一定的实验基础上为解决临床某些具体问题而开设的,目的是提高学生对本学科内的知识和技术进行综合运用与分析的能力;第四篇的创新性实验旨在培养学生的创新思维能力和基本科研能力。

在编写形式方面,每项实验都包括实验目的、实验原理、实验材料、实验方法及注意事项,并在每个实验后附有少量的思考题。

本书可供高等医学院校临床、口腔、影像、麻醉、护理、预防及药学等专业学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

医学免疫学与病原生物学实验 / 吴学敏,张佩主编. —北京:科学出版社,2011.6

(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-031573-1

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

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 113488 号

责任编辑:周万灏 / 责任校对:包志虹

责任印制:刘士平 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

天利彩色印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年6月第一版 开本:787×1092 1/16

2011年6月第一次印刷 印张:13

印数:1—5 000 字数:304 000

定价:39.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《全国高等院校医学实验教学规划教材》 总编委会

主任 刘学政
副主任 曲巍 孙洞箫 肖建英 罗俊生 梁宇恒
贾云宏
委员 (按姓氏笔画排序)
万义增 王冰 王万旗 王云飞 王亚平
王爱梅 艾浩 朱艳 刘丹 刘卫党
严宁生 李红 李尘远 李华侃 李德华
肖马 吴学敏 谷京城 闵连秋 张佩
张辉 张春阳 张祥林 张筠莉 张蕴莉
金英 郝春艳 高志安 郭敏 陶贵周
谢志明 穆殿超
总策划 曲巍
秘书 崔洪雨

总 序

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

本系列实验教材由长期工作在教学和科研一线的教师编写而成,将实验内容分为基本实验操作及常用仪器使用、经典验证性实验、综合性实验和创新性实验,并将实验报告融入到实验教材中。系列教材共九本,包括《大学计算机基础实践教程》、《医学大体形态学实验》、《医学显微形态学实验》、《医学机能实验学》、《生物化学与分子生物学实验》、《医学免疫学与病原生物学实验》、《医用物理学实验》、《医用化学实验》和《临床技能学》。

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

由于水平和时间的限制,缺点和错误在所难免,恳请读者和同行专家提出宝贵意见。

《全国高等院校医学实验教学规划教材》

总编委会

2011.1

前 言

《医学免疫学与病原生物学实验》涵盖了医学免疫学、医学微生物学及人体寄生虫学的实验内容。实验教学是体现三基(基本理论、基本知识、基本技能)中基本技能的主要手段,它是加深和验证基本理论和基本知识的途径,是学好相关课程的重要环节。通过实践,使学生掌握基本的实验诊断技术,为今后的学习及医疗科研工作打下良好基础。

结合教学工作实际,并参考兄弟院校的成熟经验,我们编写了适合于临床、口腔、影像、麻醉、护理、预防及药学等各专业使用的实验指导。全书共四篇 13 章,第一篇为常用仪器使用、试剂配制及基本实验操作,主要介绍实验室常规仪器设备的使用与维护、常用试剂的配制、常用动物实验技术及免疫学、微生物学、寄生虫学基本实验方法;第二篇为经典验证性实验,目的是训练学生的基本技能,并巩固基本知识、验证基本理论;第三篇的综合性实验,是在有一定的实验基础上为解决临床某些具体问题而开设的,目的是提高学生对学科内的知识和技术进行综合运用与分析的能力;第四篇的创新性实验旨在培养学生的创新思维能力和基本科研能力。

本书以其实用性、科学性、先进性为原则,尽可能满足各层次学生实验要求。每项实验都由实验目的、实验原理、实验材料、实验方法及注意事项构成,并附有一定量的思考题。

本书中各实验相对独立,在教学中各不同专业可根据各自教学大纲的要求、学时分配、实验条件及专业的特点选择相应实验内容。

编写本书是我们多年教学改革的愿望和尝试,但由于我们的编写能力有限,书中难免有不妥和疏漏之处,恳请同行及使用者多提宝贵意见。

编 者
2011 年 3 月

目 录

总序	
前言	
实验室安全守则	(1)
第一篇 常用仪器使用、试剂配制及基本实验操作	
第一章 常用仪器设备的使用	(2)
第二章 常用试剂配制	(13)
第三章 实验动物及动物实验技术	(27)
第一节 实验动物品系和选择	(27)
第二节 动物实验基本技术	(28)
第四章 基本实验方法	(35)
第一节 微生物形态结构观察法	(35)
第二节 微生物分离培养技术	(39)
第三节 病原微生物菌种、毒种保藏技术	(48)
第四节 寄生虫病原学实验诊断技术	(49)
第二篇 经典验证性实验	
第五章 医学免疫学基本实验	(57)
第一节 体液免疫相关的基本实验	(57)
第二节 细胞免疫相关的基本实验	(70)
第三节 免疫标记技术	(76)
第六章 医学微生物学基本实验	(82)
第一节 微生物形态结构观察	(82)
第二节 微生物分离培养鉴定	(88)
第三节 细菌的药物敏感性试验	(115)
第四节 消毒灭菌	(116)
第五节 细菌变异试验	(121)
第七章 人体寄生虫学基本实验	(126)
第一节 医学蠕虫	(126)
第二节 医学原虫	(148)
第三节 医学节肢动物	(157)
第三篇 综合性实验	
第八章 医学免疫学综合性实验	(165)
第九章 医学微生物学综合实验	(173)
第十章 人体寄生虫学综合实验	(184)
第四篇 创新性实验	
第十一章 医学免疫学创新性实验	(191)
第十二章 医学微生物学创新性实验	(195)
第十三章 人体寄生虫学创新性实验	(197)
参考文献	(200)

实验室安全守则

医学免疫学与病原生物学实验包括医学免疫学、医学微生物学和人体寄生虫学三个专业的基本技术和实验方法。实验中所用标本大多含有病原生物,有些病原生物传染性强。因此,实验中要严格遵守无菌操作技术规范,避免发生自身感染和环境污染。为此,全体师生必须遵守下列实验室安全守则。

(1) 进入实验室,穿上实验室专用的白大衣;非必需的物品不要带入室内。

(2) 严禁饮食、咬笔杆、触摸隐性眼睛、随便走动及大声喧哗等;无特殊情况不得中途离开实验室。

(3) 爱护共物,节约使用实验材料;严禁在白大衣、吸水滤纸、桌面、抽屉和墙壁上乱写乱画;未经教师允许不得擅自将实验室内物品带出。

(4) 实验中若发生任何意外污染(如传染性材料污染了桌面和物品,划破皮肤,吸入菌液或实验器材打破等),应立即报告指导教师,进行相应处理。

(5) 用过的有菌器材等应放到指定的消毒容器内,不得随意放在桌上或水池中。

(6) 易燃品切勿接近火;丢失或损坏器材及标本时要立即报告并予赔偿。

(7) 实验结束后,显微镜镜头上的香柏油和其他部件上无意溅落的香柏油要擦拭干净;洗刷试管及用过的器材;及时清理实验区,物归原处,摆放整齐。

(8) 关闭水、电及煤气;然后脱下白大衣,洗手消毒后方可离开实验室;值日同学打扫卫生,关好门窗,经老师允许后方可洗手消毒,离开实验室。

第一篇 常用仪器使用、 试剂配制及基本实验操作

第一章 常用仪器设备的使用

一、显微镜

(一) 显微镜的种类

显微镜是一种精密的光学仪器,是由一个或几个透镜组合构成,可用于放大微小物体使人用肉眼可以观察。显微镜以显微原理进行分类,可分为光学显微镜与电子显微镜;按可移动性进行分类,可分为台式显微镜与便携式显微镜。其中光学显微镜还可细分为普通光学显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜、相差显微镜、激光共聚焦扫描显微镜、偏光显微镜、微分干涉差显微镜、倒置显微镜等。下面介绍几种比较常用的显微镜:

1. 普通光学显微镜 用日光或灯光为光源,在最佳条件下分辨率可达 $0.25\mu\text{m}$,在油浸镜放大 1000 倍时,能将 $0.25\mu\text{m}$ 的微粒放大到 0.25mm 的肉眼可观察范围(肉眼可见最小形态为 0.2mm)。由于一般病原生物都大于 $0.25\mu\text{m}$,故利用普通光学显微镜都可进行观察。

2. 暗视野显微镜 暗视野显微镜是光学显微镜的一种,也叫超显微镜。暗视野显微镜的聚光镜中央有挡光片,使照明光线不直接进入物镜,只允许被标本反射和衍射的光线进入物镜,因而视野的背景是黑的,物体的边缘是亮的。利用这种显微镜能见到小至 $4\sim 200\text{nm}$ 的微粒子,分辨率可比普通显微镜高 50 倍。

3. 荧光显微镜 荧光显微镜是以紫外线为光源,现多采用 200W 的超高压汞灯作为光源照射,由于光源波长短,故分辨率高于普通显微镜。用荧光染料或荧光抗体染色细菌或病毒等微生物后,经紫外线照射可发荧光,利用荧光显微镜可进行定性和定量分析。

4. 相差显微镜 相差显微镜可利用光的衍射和干涉现象将透过标本的光线光程差或相位差转换成肉眼可分辨的振幅差,从而提高了密度不同物质图像的明暗区别。活细胞和未染色的生物标本,因其各部细微结构的折射率和厚度不同,光波通过时,波长和振幅并不变化,仅相位变化(振幅差),这种振幅差人眼无法观察。而相差显微镜通过改变这种相位差,利用光的衍射和干涉现象,把相位差变为振幅差来观察活细胞和未染色的标本。

5. 电子显微镜 电子显微镜是根据电子光学原理,用电子束和电子透镜代替光束和光学透镜,使物质的细微结构在非常高的放大倍数下成像的仪器。电子显微镜的放大倍数可达到数十万倍,能分辨 1nm 的物体。电子显微镜除了最早发明的透射电子显微镜外,还有其他多种类型,如扫描电镜、分析电镜、超高压电镜等。

(二) 普通光学显微镜的构造

1. 机械装置

(1) 镜座和镜臂:镜座位于显微镜底部,呈马蹄形,它支持全镜。镜臂有固定式和活动式两种,活动式的镜臂可改变角度。镜臂支持镜筒。

(2) 镜筒:是由金属制成的圆筒,上接目镜,下接转换器。镜筒有单筒和双筒两种,单筒又可分为直立式和后倾式两种。而双筒则都是倾斜式的,倾斜式镜筒倾斜 45° 。双筒中的一个目镜有屈光度调节装置,以备在两眼视力不同的情况下调节使用。

(3) 转换器:为两个金属碟所合成的一个转盘,其上装3~4个物镜,可使每个物镜通过镜筒与目镜构成一个放大系统。

(4) 载物台:又称镜台,为方形或圆形的盘,用以载放被检物体,中心有一个通光孔。载物台上有的装有两个金属压夹称标本夹,用以固定标本;有的装有标本推动器,将标本固定后,能前后左右推动。有的推动器上有刻度,能确定标本位置,便于找到变换的视野。

(5) 调焦装置:调节物镜和标本间距离的机件,有粗动螺旋即粗调节器和微动螺旋即细调节器,利用它们使镜筒或镜台上下移动,当物体在物镜和目镜焦点上时,得到清晰图像。

2. 光学装置

(1) 物镜:物镜安装在镜筒下端的转换器上,因接近被观察的物体,故又称接物镜。其作用是将物体作第一次放大,是决定成像质量和分辨能力的重要部件。物镜上通常标有数值孔径、放大倍数、镜筒长度、焦距等主要参数。如:NA 0.30;10 \times ;160/0.17;16mm。其中“NA 0.30”表示数值孔径(numerical aperture,简称为NA);“10 \times ”表示放大倍数;“160/0.17”分别表示镜筒长度和所需盖玻片厚度(mm);16mm表示焦距。

(2) 目镜:装于镜筒上端,由两块透镜组成。目镜把物镜成的像再次放大,不增加分辨率,上面一般标有7 \times 、10 \times 、15 \times 等放大倍数,可根据需要选用。一般可按与物镜放大倍数的乘积为物镜数值孔径的500~700倍为准,最大也不能超过1000倍。目镜的放大倍数过大,反而影响观察效果。

(3) 聚光器:光源射出的光线通过聚光器汇聚成光锥照射标本,增强照明度和造成适宜的光锥角度,提高物镜的分辨力。聚光器由聚光镜和虹彩光圈组成,聚光镜由透镜组成,其数值孔径可大于1,当使用大于1的聚光镜时,需在聚光镜和载玻片之间加香柏油,否则只能达到1.0。虹彩光圈由薄金属片组成,中心形成圆孔,推动把手可随意调整透进光的强弱。调节聚光镜的高度和虹彩光圈的大小,可得到适当的光照和清晰的图像。

(4) 光源:较新式的显微镜光源通常安装在镜座内,通过按钮开关控制;老式的显微镜大多是采用附着在镜臂上的反光镜,反光镜是一个两面镜子,一面是平面,另一面是凹面。使用低倍和高倍镜观察时,用平面反光镜;使用油镜或光线弱时可用凹面反光镜。

(5) 滤光片:可见光是由各种颜色的光组成的,不同颜色的光线波长不同。如只需某一波长的光线时,就要用滤光片。选用适当的滤光片,可以提高分辨力,增加影像的反差和清晰度。滤光片有紫、青、蓝、绿、黄、橙、红等各种颜色的,分别透过不同波长的可见光,可根据标本本身的颜色,在聚光器下加相应的滤光片。

(三) 普通光学显微镜使用方法

1. 低倍镜的使用方法

(1) 取镜和放置:取下绸布和外罩,右手紧握镜臂,左手托住镜座,将显微镜放在自己左

前方的实验台上,镜座后端距桌边 1~2 寸为宜,便于坐着操作。

(2) 对光:用拇指和中指移动旋转器,使低倍镜对准镜台的通光孔。打开光圈,上升集光器,并将反光镜转向光源,以左眼在目镜上观察,同时调节反光镜方向,直到视野内的光线均匀明亮为止。

(3) 放置玻片标本:取一玻片标本放在镜台上,一定使有盖玻片的一面朝上,切不可放反,用推片器弹簧夹夹住,然后旋转推片器螺旋,将所要观察的部位调到通光孔的正中。

(4) 调节焦距:以左手按逆时针方向转动粗调节器,使镜台缓慢上升至物镜距标本片约 5mm 处,应注意在上升镜台时,切勿在目镜上观察,一定要从右侧看着镜台上升,以免上升过多,造成镜头或标本片的损坏。然后,两眼同时睁开,用左眼在目镜上观察,左手顺时针方向缓慢转动粗调节器,使镜台缓慢下降,直到视野中出现清晰的物像为止。

如果物像不在视野中心,可调节推片器将其调到中心,注意移动玻片的方向与视野物像移动的方向是相反的。如果视野内亮度不合适,可通过升降集光器的位置或开闭光圈大小来调节,如果在调节焦距时,镜台下降已超过工作距离($>5.40\text{mm}$)而未见到物像,说明此次操作失败,则应重新操作,切不可心急而盲目地上升镜台。

2. 高倍镜的使用方法

(1) 选好目标:一定要先在低倍镜下把需进一步观察的部位调到中心,同时把物像调节到最清晰的程度,才能进行高倍镜的观察。

(2) 转动转换器,调换上高倍镜头,转换高倍镜时转动速度要慢,并从侧面进行观察,防止高倍镜头碰撞玻片,如高倍镜头碰到玻片,说明低倍镜的焦距没有调好,应重新操作。

(3) 调节焦距:转换好高倍镜后,用左眼在目镜上观察,此时一般能见到一个不太清楚的物像,可将细调节器的螺旋逆时针移动约 0.5~1 圈,即可获得清晰的物像。

如果视野的亮度不合适,可用集光器和光圈加以调节,如果需要更换玻片标本时,必须顺时针转动粗调节器使镜台下降,方可取下玻片标本。

3. 油镜的使用方法

(1) 使用油镜前,须先经低、高倍镜观察,后将需进一步放大部分移到视野中心。

(2) 将集光器上升到最高位置,光圈开到最大。

(3) 转动转换器,使高倍镜头离开通光孔,在需要观察部位的玻片上滴加一滴香柏油,然后慢慢转动油镜,在转换油镜时,从侧面水平注视镜头与玻片的距离,使镜头浸入油中而又不以压破载玻片为宜。

(4) 观察目镜,并慢慢转动细调节器至物像清晰为止。如果不出现物像或者目标不理想要重找,在加油区之外重找时应按:低倍到高倍到油镜程序;在加油区内重找应按:低倍到油镜程序,不得经高倍镜,以免油沾污镜头。

(5) 油镜使用完毕,先用擦镜纸沾少许二甲苯将镜头上和标本上的香柏油擦去,然后再用干擦镜纸擦干净。

4. 显微镜使用注意事项

(1) 持镜时须右手握臂、左手托座,不可单手提取,以免零件脱落或碰撞其他地方。

(2) 轻拿轻放,不可把显微镜放置在实验台边缘,以免将其碰翻落地。

(3) 保持显微镜的清洁,光学和照明部分只能用擦镜纸擦拭,切忌口吹手抹或用布擦,机械部分用布擦拭。

(4) 水滴、酒精或其他药品切勿接触镜头和镜台,如果沾污应立即擦净。

- (5) 放置玻片标本时要对准通光孔中央,且不能反放玻片,防止压坏玻片或碰坏物镜。
- (6) 要养成两眼同时睁开的习惯,以一眼观察视野,另一眼用以绘图。
- (7) 使用完毕后,取下标本片,转动旋转器使镜头离开通光孔,下降镜台,平放反光镜,下降集光器,关闭光圈,推片器回位,盖上绸布和外罩,最后填写使用登记表。

二、高压蒸汽灭菌器

(一) 高压蒸汽灭菌器的工作原理

高压蒸汽灭菌器是由一个具有两层壁的能耐高压的锅炉构成,蒸汽进入消毒室内,积聚产生压力。蒸汽压力增高,温度随之增高。在压力 104.0~137.3kPa 时,温度可达 121~126℃,维持 30 分钟,即能杀死包括具有顽强抵抗力的细菌芽胞在内的一切微生物,达到灭菌目的。此法常用于一般培养基、手术器械及敷料等耐湿和耐高温物品的灭菌。

(二) 高压蒸汽灭菌器的使用方法

- (1) 将需要灭菌的物品放入消毒室内,紧闭器门。
- (2) 先使蒸汽进入夹套,在达到所需的控制压力后,将冷凝水泄出器前面的冷凝阀旋开少许,再将总阀开放,使蒸汽进入消毒室。
- (3) 冷凝阀的开放是使冷凝水和空气从消毒室内排出,以确保消毒室所需的温度。
- (4) 此时可看到夹套的蒸汽压力下降,消毒室的蒸汽压力上升。
- (5) 在消毒室温度表达达到预选温度时,开始计算灭菌时间。
- (6) 灭菌时间终了后,让消毒室内的蒸汽自然冷却或予以排气。
- (7) 在消毒室压力表下降到“0”位 1~2 分钟后,将门打开。
- (8) 再等 10~15 分钟后取出已灭菌的物品。
- (9) 由于余热的作用和蒸发,包裹即能干燥。物品灭菌后,一般可保留 2 周。

(三) 高压蒸汽灭菌器的使用注意事项

- (1) 需要灭菌的各种包裹不应过大、过紧,一般应小于 55cm×33cm×22cm。
- (2) 放入灭菌器内的包裹,不要排得太密,以免妨碍蒸汽透入,影响灭菌效果。
- (3) 包内和包外各贴一条灭菌指示带(长约 6~8cm),如压力达到 15 分钟时,指示纸带上即出现黑色条纹,表示已达灭菌的要求。
- (4) 易燃和易爆炸物品如碘仿、苯类等,禁用高压蒸汽灭菌法;锐利器械如刀、剪不宜用此法灭菌,以免变钝。
- (5) 瓶装液体灭菌时,要用玻璃纸和纱布包扎瓶口,如用橡皮塞的,应插入针头排气。
- (6) 已灭菌的物品应做记号,以便识别,并需与未灭菌的物品分开放置,以免弄错。
- (7) 专人负责,每次灭菌前,检查安全阀性能是否良好,以防锅内压力过高,发生爆炸。

三、电热恒温培养箱

(一) 电热恒温培养箱的工作原理

电热恒温培养箱是利用电加热方式,通过控温仪控制,达到工作室温度均匀恒定,可为受试培养物提供理想稳定的温度环境。电热恒温培养箱外壳一般由钢板制成,工作室用碳钢板或镜面不锈钢板折制而成,工作室与外壳之间填充保温棉。工作室内部放有试验用品搁板,用来放置各种试验物品,工作室顶部装有离心式风扇叶轮和环形电热管。冷空气

经电热管加热后使工作室温度上升,通过离心风机的作用,保证工作室内部温度均匀,箱门上设有可供观察用的视镜。电热恒温培养的前面板上装有温度控制仪表、电源开关及加热开关等,利于观察及操作。电热恒温培养箱适于细菌培养、发酵及恒温试验用。

(二) 电热恒温培养箱的使用方法

- (1) 接通电源,将仪器电源开关拨到“I”位,电源指示灯亮,控温仪示培养箱内当时温度。
- (2) 温度设定:所需温度与设定温度相同时不需设定;反之,则需重新设定。
 - 1) 按控温仪的功能键“SET”进入温度设定状态,此时“SV”设定闪现。
 - 2) 按移位键,并配合加键“△”或减键“▽”设定培养温度至所需温度。
 - 3) 按功能键“SET”确认设定,温度设定相符合。

(三) 电热恒温培养箱的使用注意事项

- (1) 箱内不应放入过热或过冷之物,取放物品时,应随手关闭箱门,以维持恒温。
- (2) 培养箱内最底层温度较高,培养物不宜与之直接接触。箱内培养物不宜放置过挤,以保证培养物受温均匀。各层金属孔架上放置物品不宜过重,以免将金属孔架压弯滑脱。
- (3) 定期消毒内箱,可每月一次。方法为断电后,先用3%来苏溶液涂布消毒,再用清水抹布擦净。

四、生物安全柜

(一) 生物安全柜工作原理

生物安全柜是为操作原代培养物、细菌病毒毒株以及诊断性标本等具有感染性的实验材料时,用来保护操作者本人、实验室环境以及实验材料,使其避免暴露于上述操作过程中可能产生的感染性气溶胶和溅出物而设计的。生物安全柜可提供样品和工作人员的双重保护,是一种负压过滤排风柜。在一级生物安全柜内操作时,排出的气体先经过废气通道到达高效空气过滤器(High-efficiency particulate air, HEPA),再排除到环境中,进而防止微生物气溶胶扩散造成污染。二级和三级生物安全柜,进入空气也需经过 HEPA 过滤器。

(二) 生物安全柜使用方法

- (1) 操作前应将本次操作所需的全部物品移入安全柜,避免双臂频繁穿过气幕破坏气流;并且在移入前用70%乙醇溶液擦拭表面消毒,以去除污染。
- (2) 打开风机5~10分钟,待柜内空气净化并气流稳定后再进行实验操作。将双臂缓缓伸入安全柜内,至少静止1分钟,使柜内气流稳定后再进行操作。
- (3) 安全柜内不放与本次实验无关的物品。柜内物品摆放应做到清洁区、半污染区与污染区基本分开,操作过程中物品取用方便,且三区之间无交叉。物品应尽量靠后放置,但不得挡住气道口,以免干扰气流正常流动。
- (4) 操作时应按照从清洁区到污染区进行,以避免交叉污染。为防止可能溅出的液滴,可在台面上铺一用消毒剂浸泡过的毛巾或纱布,但不能覆盖住安全柜格栅。
- (5) 柜内操作期间,严禁使用酒精灯等明火,以避免产生的热量产生气流,干扰柜内气流稳定;且明火可能损坏 HEPA 滤器。
- (6) 工作时尽量减少背后人员走动以及快速开关房门,以防止安全柜内气流不稳定。
- (7) 在实验操作时,不可打开玻璃视窗,应保证操作者脸部在工作窗口之上。在柜内操作时动作应轻柔、舒缓,防止影响柜内气流。

(8) 安全柜应定期进行检测与保养,以保证其正常工作。工作中一旦发现安全柜工作异常,应立即停止工作;采取相应处理措施,并通知相关人员。

(9) 工作完全后关闭玻璃窗,保持风机继续运转 10~15 分钟,打开紫外灯 30 分钟。

(10) 安全柜应定期进行清洁消毒,柜内台面污染物可在工作完成且紫外灯消毒后用 2% 的 84 消毒液擦拭。柜体外表面则应每天用 1% 的 84 消毒液擦拭。

(11) 柜内使用的物品应在消毒后再取出,以防止将病原微生物带出而污染环境。

五、超净工作台

(一) 超净工作台工作原理

超净台又叫无菌工作台,是在接种罩的基础上设计出来的无菌工作台。目前多采用垂直层流的气流形式,通过变速离心机将负压箱内经过预过滤器过滤的空气压入静压箱,在经高效过滤器进行二级过滤,从出风面吹出洁净风流,以一定的和均匀的断面风速通过工作区时,将尘埃颗粒和微生物颗粒带走,从而形成无尘无菌的工作环境。

(二) 超净工作台使用方法

- (1) 打开无菌工作台及净化室的紫外灯,消毒 30 分钟以上。
- (2) 进入净化室前先关闭紫外灯,打开超净台风机,等待 30 分钟以上,以排尽臭氧。
- (3) 穿好隔离衣,戴好口罩、帽子。
- (4) 风淋 2 分钟。
- (5) 0.1% 过氧乙酸溶液泡手,擦干。
- (6) 点燃酒精灯;超净台内避免放入过多物品;吸管、试管、培养瓶等均事先灭菌。
- (7) 打开各类瓶盖前先过火,以固定灰尘;镊子使用前应经火焰烧灼。
- (8) 水平式风机的超净台,应使瓶口斜置,应尽量避免瓶口敞开直立进行实验操作。
- (9) 漏在培养瓶上或台上的液体,立即用酒精棉球擦净。
- (10) 操作完毕后恢复工作台面。

六、厌氧培养箱

(一) 厌氧培养箱工作原理

厌氧培养箱是通过催化除氧系统和自动连续循环换气系统保持箱内的厌氧状态,是一种在无氧环境条件下进行细菌培养及操作的专用装置。厌氧培养箱由手套操作箱和传递箱两个部分组成,操作箱内还附有小型恒温培养箱,它能提供严格的厌氧状态、恒定的温度培养条件和具有一个系统化、科学化的工作区域。在厌氧培养箱内,可以培养最难生长的厌氧生物,又能避免以往厌氧生物在大气中操作时接触氧而死亡的危险性。

(二) 厌氧培养箱使用方法

1. 操作室厌氧环境形成

- (1) 按使用要求放置好必要的附件和器具。
- (2) 通电源开照明灯,开温控仪,调节所需温度。
- (3) 操作室内放入 1000g 钯粒(封闭)和 500g 干燥剂,并放入美兰指示纸。
- (4) 关紧取样室内外门,并抽真空校验。
- (5) 操作室内第一次置换(氮气置换)
 - 1) 把乳胶手套套在观察板法兰圈上并扎紧。

2) 接通氮气进气路,打开氮气控制阀 1,使手套鼓起,关闭阀门 1,然后扎紧袋口。

(6) 操作室第二次置换(氮气置换)重复第一次充氮过程,取样室先抽真空,并注意随时用脚踏开关开闭排气。重复上述过程进行第三次氮气置换。

(7) 操作室第四次置换(混合气体置换,混合气体配比为 N_2 85%、 H_2 10%、 CO_2 5%)

1) 调换气路打开混合气阀 3 进气,充气时取样室先抽真空,随时开闭排气。

2) 关掉混合气体阀 3,打开阀 5,使混合气体经过流量计,调整流量计,流量为每分钟 10ml 左右。

3) 混合气体重复 2~3 次转换,经过上述过程,基本形成厌氧环境。

(8) 操作室内打开钯粒除氧剂,接通除氧催化剂电源进行催化除氧,一小时后打开美兰指示纸观察其变色情况,不变色为操作室内达到厌氧环境。

(9) 开紫外线灭菌灯,室内进行灭菌处理,灭菌时间按具体实验自定。

2. 菌种的置入和培养

(1) 检查取样室内门并关紧。

(2) 打开取样室外门,将菌种放入取样室后即关上外门。

(3) 取样室充氮置换三次过程:打开真空泵,先抽真空度 500ml 汞柱(66kPa)以上,然后人工打开氮气阀 2 进气,使指针回复零位,关掉阀 2。第二次重复操作一次。第三次操作时,使真空度 500ml 汞柱(66kPa)以上,然后打开阀 4 进混合气,使指针回复零位,关掉阀 4。取样室充氮置换三次过程结束。

(4) 如选定真空度较低就需要增加置换的次数。

(5) 取样室外门开启、关紧,再抽低真空度 100ml 汞柱(13kPa)检验。

(6) 厌氧培养箱需要长期连续使用的条件

1) 每天在操作室内打开美兰指示纸观察,如不正常就必须重新换气。

2) 要长期连续输入微量的混合气体,使补进的氮气能和微量的氧结合通过催化吸收,保证室内厌氧状态,补入混合气流量选定为每分钟 10ml 左右。

3) 连续培养运行一天,更换一次除氧剂和干燥剂。

4) 操作室内温度可任意选择和控制在。

(7) 混合气瓶、氮气瓶输出压力调整:调节减压阀,使输出压力 0.1 MPa 左右。

(三) 厌氧培养箱使用注意事项

(1) 仪器尽可能地安装于空气清静、温度变化较小的地方。

(2) 开机前应全面了解各组成配套仪器、仪表的使用说明,掌握正确的使用方法。

(3) 培养物必须是在操作室内达到绝对厌氧环境后放入。

(4) 如发生故障(停气等原因)操作室内仍可保持 10 小时厌氧状态(超过 10 小时则根据需把培养物取出另作处理)。

(5) 经常注意气路有无漏气现象。

(6) 调换气瓶时,注意要扎紧气管,避免流入含氧气体。

七、菌落计数器

(一) 菌落计数器工作原理

手动菌落计数器专为细菌和真菌菌落快速准确计数而设计。由计数器、探笔、计数池等部分组成,计数器内部由一块刻有 144 个面积为 1cm^2 的正方形小格的玻璃计数板和放大镜组

成。此机器操作简单,只需将培养皿放置在压力感应垫上、用尖式触笔按顺序点压即可。通过点压传导转化成数字形式显示在 LCD 屏幕上,并音响证实计数,尖式触笔能避免漏计或重复计数。

全平板菌落总数 CFU = 每平方米平均菌落数 × 平板面积

1ml 标本中活菌数 = 全平板 CFU × 标本稀释倍数

(二) 菌落计数器使用方法

- (1) 将电源插头插入 220 伏电源插座内。
- (2) 将计数笔插头插入仪器上的插孔内。
- (3) 将电源开关拨向“开”,计数池内灯亮,同时数字显示应为“000”,表示允许进行计数。如数字不为“000”,应按复零键。
- (4) 将待检的培养皿(皿底朝上),放入计数池内。
- (5) 用计数笔在培养皿底面对所有的菌落逐个点数。每数一个应听到“嘟”声才说明有效,否则应重点。此时,点到的菌落被标上颜色,显示数字自动累加。
- (6) 用放大镜仔细检查,确认点数无遗漏,计数即完毕。
- (7) 显示的数字即为该培养皿内的菌落数。
- (8) 记录数字后取出培养皿。按复“0”键,显示恢复“000”,为另一培养皿的计数做好准备。

(三) 菌落计数器使用注意事项

- (1) 仪器应放置在平整牢固的实验台上使用。
- (2) 点数菌落时,计数笔不要过于倾斜,轻轻点下至有弹跳感,听到“嘟”声即可,如点按过重,易损坏计数笔。
- (3) 仪器应防潮、防剧烈震动、防直接日光暴晒、防酸碱侵蚀,用后应加防尘罩。
- (4) 注意防止细菌污染计数池。
- (5) 如仪器发生不计数的问题,可按检验键。若发现故障,请不要随意拆卸,应请有经验的技术人员检修。

八、微量移液器

(一) 微量移液器工作原理

微量移液器的应用原理主要是依靠活塞通过弹簧的伸缩运动来实现吸液和放液。在活塞推动下,排出部分空气,利用大气压吸入液体,再由活塞推动空气排出液体。使用移液器时,配合弹簧的伸缩性特点来操作,可以很好地控制移液的速度和力度。

(二) 微量移液器使用方法

1. 标准操作 适用的液体:水、缓冲液、稀释的盐溶液和酸碱溶液。

- (1) 根据所需取液量选择相应移液器及吸液嘴。
- (2) 旋转移液器按钮设定移液量。
- (3) 将移液器按钮压至第一点位置垂直进入液面几毫米吸取液体;转移液体至目的容器,轻压按钮至第一点位置,一秒钟后,继续将按钮压至第二点位置将吸液嘴中液体全部放干。
- (4) 弃去吸液嘴,将移液器放回移液器支架。

2. 黏稠或易挥发液体的移取 在移取黏稠或易挥发的液体时,很容易导致体积误差较大。为了提高移液准确性,建议采取以下方法:

- (1) 移液前先用液体预湿吸头内部,即反复吸打液体几次使吸头预湿,吸液或排出液体