

# 兽医生物制品制备技术

王宪文 王新卫 主编



中国农业科学技术出版社

# 兽医生物制品制备技术

王宪文 王新卫 主编

中国农业科学技术出版社

### 图书在版编目 ( CIP ) 数据

兽医生物制品制备技术/王宪文,王新卫主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2007. 8

ISBN 978 - 7 - 80233 - 322 - 2

I. 兽… II. ①王…②王… III. 兽医学 - 生物制品 - 制备  
IV. S859. 79

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 082824 号

责任编辑 张孝安  
责任校对 贾晓红  
封面设计 孙宝林

出版发行 中国农业科学技术出版社  
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081  
电 话 (010) 68919704 (发行部) (010) 68919708 (编辑室)  
(010) 68919703 (读者服务部)  
传 真 (010) 68975144  
网 址 <http://www.castp.cn>  
经 销 者 新华书店北京发行所  
印 刷 者 北京华正印刷有限公司  
开 本 787 mm × 1092 mm 1/16  
印 张 17  
字 数 380 千字  
版 次 2007 年 8 月第 1 版 2007 年 8 月第 1 次印刷  
定 价 32.00 元

◆版权所有·侵权必究◆

## 《兽医生物制品制备技术》编写人员

- 主 编** 王宪文 王新卫
- 副主编** 詹爱军 贾少强 陈红英
- 编 者** 杜 爱 (广州市吉康动物营养保健有限公司)
- 薛邦玉 (河南省信阳市畜牧局)
- 张梓英 (信阳农业高等专科学校)
- 杨大光 (河南科技学院)
- 詹爱军 (深圳出入境检验检疫局)
- 贾少强 (河南省上蔡县畜牧局)
- 陈红英 (河南农业大学)
- 张建武 (中国农业科学院上海兽医研究所)
- 刘兴友 (河南科技学院)
- 王三虎 (河南科技学院)
- 赵 朴 (河南科技学院)
- 胡建和 (河南科技学院)
- 王新卫 (河南农业大学)
- 王宪文 (河南科技学院)

## 前 言

兽医生物制品学是一门具有悠久历史，并与现代生物技术密切结合的学科，在动物疫病的诊断、治疗和预防方面的作用越来越重要，引起养殖业及相关行业相关人员的高度重视。目前开设本课程的高等院校数量越来越多，而系统介绍兽医生物制品制备技术的书籍相对较少，远不能满足高等院校实验教学、兽医生物制品厂工作人员和广大养殖户的实际需要。为此，我们决定编写一本关于兽医生物制品制备技术方面的书籍，以使从事养殖业人员都能够了解生物制品的制造过程以及相关知识，经过一年多的努力，完成了本书的编写工作。

本书主要包括畜禽常用生物制品制备技术、新型生物制品制备的原理和方法及兽医生物制品制备相关技术三部分内容。其中，第一篇畜禽常用生物制品制备技术包括细菌培养基及细菌技术、病毒增殖技术、常用佐剂疫苗的制备、抗体制品的制备和诊断制品的制备五方面内容，介绍了牛肉胰酶消化液的制备、牛肉浸液的制备、培养基的制备、细菌的接种与培养、细菌计数技术、猪链球菌蜂胶疫苗的制备、油佐剂疫苗的制备、高免蛋黄的制备、免疫血清的制备，病毒性自家组织苗的制备、病毒鸡胚培养、鸡新城疫弱毒疫苗的制备、病毒的血凝及血凝抑制试验、鸡新城疫诊断抗原的制备、鸡胚原代细胞培养、细胞的传代培养、细胞的冻存与复苏、病毒接种及细胞病变观察（CPE）等技术；第二篇新型生物制品制备的原理和方法包括新型抗体技术、新型诊断技术和新型疫苗技术等内容，讲述了多种新型生物制品制备的理论和制备技术，制备时所需条件较高，主要供教学和科研单位的教师、研究人员以及大学生等作为参考之用；第三篇兽医生物制品制备相关知识包括与兽医生物制品有关设备、技术和参考资料，是前两篇内容的必要补充。

通过对本书的学习可使读者了解并掌握兽医生物制品制备方面的技术和操作，进而培养动手实践、观察分析和解决问题的能力，从而掌握动物性疫苗、诊断制剂和高效价抗体制备的基本知识，解决生产中的实际问题，降低生产成本，提高养殖场的生产效益，同时响应党的“三农”政策，切实可行地为养殖业服务。

在本书的编写过程中，河南科技学院与河南农业大学预防兽医教研组的

各位老师给予了大力支持；河南农业大学王泽霖教授、华南农业大学毕英佐教授、中国兽医药品监察所于康震研究员给予了指导并提出了宝贵的建议，在此深表感谢。

由于编著者水平有限，书中的遗漏和缺点在所难免，恳请有关专家和广大读者批评指正。

编者

2007年5月

# 目 录

## 第一篇 畜禽常用生物制品制备技术

<b>第一章 培养基及细菌培养技术</b> .....	(3)
第一节 牛肉胰酶消化液的制备 .....	(3)
第二节 牛肉浸液的制备 .....	(4)
第三节 培养基的制备 .....	(4)
第四节 马丁氏培养基的制备 .....	(7)
第五节 细菌的接种和培养 .....	(8)
第六节 平板菌落计数法 .....	(10)
<b>第二章 病毒增殖技术</b> .....	(13)
第一节 鸡新城疫弱毒疫苗的制备 .....	(13)
第二节 病毒的血凝及血凝抑制试验 .....	(15)
第三节 鸡胚原代细胞培养 .....	(17)
第四节 细胞的传代培养 .....	(19)
第五节 细胞的冻存与复苏 .....	(20)
第六节 病毒接种及细胞病变观察(CPE) .....	(22)
<b>第三章 常用佐剂疫苗的制备</b> .....	(24)
第一节 蜂胶疫苗的制备(以猪链球菌蜂胶苗为例) .....	(24)
第二节 油佐剂疫苗的制备 .....	(25)
第三节 氢氧化铝凝胶苗的制备(以病毒性自家组织灭活铝胶苗为例) .....	(26)
<b>第四章 抗体制品的制备</b> .....	(28)
第一节 鸡传染性法氏囊高免卵黄抗体的制备 .....	(28)
第二节 免疫血清的制备 .....	(29)
第三节 免疫球蛋白提取技术 .....	(35)
<b>第五章 诊断抗原的制备</b> .....	(37)
第一节 凝集反应抗原的制备 .....	(37)
第二节 沉淀反应抗原的制备 .....	(39)
第三节 鼻疽补体结合反应抗原的制备 .....	(41)
第四节 变态反应抗原的制备 .....	(42)
第五节 鸡新城疫诊断抗原的制备 .....	(43)

## 第二篇 新型生物制品制备的原理和方法

第一章 新型抗体技术 .....	(47)
第一节 单抗的制备 .....	(47)
第二节 酶标抗体制备技术 .....	(56)
第三节 荧光标记抗体的制备 .....	(62)
第二章 新型诊断技术 .....	(71)
第一节 多聚酶链式反应(PCR) .....	(71)
第二节 核酸探针技术 .....	(87)
第三节 生物芯片技术 .....	(100)
第三章 新型疫苗技术——动物基因工程疫苗研究 .....	(111)

## 第三篇 兽医生物制品制备相关知识

第一章 常用仪器的使用 .....	(123)
第二章 离心机和离心技术 .....	(129)
第三章 培养基的主要原材料——蛋白胨的生产 .....	(145)
第四章 培养基的主要原材料——浸出液、琼脂 .....	(152)
第一节 浸出物 .....	(152)
第二节 琼脂(琼胶) .....	(156)
第五章 兽用生物制品生产用培养基 .....	(160)
第一节 需氧菌菌苗培养基 .....	(160)
第二节 厌氧菌菌苗培养基 .....	(170)
第三节 诊断用品培养基 .....	(173)
第六章 菌种的保存 .....	(176)
第七章 凝集反应 .....	(179)
第八章 细菌药敏试验——扩散法 .....	(190)
第九章 鸡胚培养 .....	(195)
第十章 血凝与血凝抑制试验所用试剂的配制 .....	(201)
第十一章 细胞培养技术 .....	(202)
参考文献 .....	(210)
本书中常用的缩写词表 .....	(212)
附录一 中华人民共和国动物防疫法 .....	(215)
附录二 中华人民共和国国务院令 病原微生物实验室生物安全管理条例 .....	(222)
附录三 中华人民共和国农业部令 兽药生产质量管理规范 .....	(235)
附录四 中华人民共和国农业部令 新兽药研制管理办法 .....	(255)
附录五 兽药产品批准文号管理办法 .....	(260)



## **第一篇**

# **畜禽常用生物制品制备技术**



# 第一章 培养基及细菌培养技术

要制备细菌性生物制品，需要符合标准的菌种、合适的培养基和培养环境以及规范的细菌操作技术，并以得到大量的细菌为基础，进而制备成细菌疫苗或诊断抗原。本章主要讲述细菌培养基及其制备和细菌培养技术方面的内容，掌握这些操作技术，我们可以用合乎质量要求的菌种接种培养基，培养和收获大量细菌培养物，以制备我们所需的生物制品。

## 第一节 牛肉胰酶消化液的制备

蛋白胨 (Peptone) 是由蛋白质经酸、碱、酶水解而获得的水溶性混合物。蛋白质经水解后，可产生一系列的衍生物酶、胨、肽、氨基酸等。它是微生物培养基最主要的基础成分，在培养基中的主要作用是微生物生长提供氮源。蛋白胨在培养基中除了为微生物提供氮源外，由于它同时具有氨基和羧基，是两性化合物，所以它还具有缓冲作用。

### 1. 原理

动物蛋白经蛋白酶水解后，成为蛋白胨，可为微生物生长提供氮源。用作各种培养基的基础液，供给微生物生长。

### 2. 试剂与器材

(1) 试剂：牛肉 1 500g、碳酸钠水溶液 (0.8%) 2 500ml、蒸馏水 2 000ml、胰酶提取液 50ml、浓盐酸 40ml。

(2) 器材：恒温箱、绞肉机、高压锅、烧杯、三角瓶。

### 3. 制备方法

胰酶提取液的制备：取除去脂肪并绞碎的猪胰脏 500g，加 95% 乙醇 500ml 和水 1 500ml，混合装入带塞的玻璃瓶中，每日振摇 3 次，3d 后，液体用纱布过滤，加入盐酸 0.05%，摇匀，置冰箱保存备用。

将 1 500g 除去脂肪、筋腱并绞碎的牛肉与 2 000ml 水混合，加热至 80℃ 时，加入  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液搅匀，待冷却至 45℃ 时，加入胰酶提取液和氯仿，置 37℃ 恒温箱消化 6h，并不断搅拌。

消化完毕，慢慢加入浓盐酸，边加边搅拌，然后加热煮沸 1h，补足蒸发的水量，搅匀后过滤，滤液用 NaOH 调节 pH 值为 8.0，分装于玻璃瓶中，121℃ 高压灭菌 30min，置冰箱保存备用。

### 4. 注意事项

(1) 制备时，消化温度要掌握好。

(2) 加热煮沸后，一定要补足蒸发的水量。

#### 5. 思考

蛋白酶消化时，消化液中加入氯仿的作用是什么？

## 第二节 牛肉浸液的制备

浸出物是由一定量的蒸馏水作为浸出剂，将组织中可溶性成分溶入水内，该水溶液称之为浸出液，简称浸液。再将该浸出液在不影响其有效成分的温度下，浓缩成膏状，称之为浸膏，或干燥成粉末状，称之为浸出粉。主要为微生物生长繁殖提供可溶性含氮物质、核酸降解物、维生素及无机盐类等，以补充蛋白胨营养成分的不足部分。

#### 1. 目的

牛肉浸液为最常用的培养基基础液，广泛用于配制营养肉汤、营养琼脂、半固体等培养基。

#### 2. 试剂与器材

(1) 材料：牛肉 500g、蒸馏水 1 000ml。

(2) 器材：绞肉机、烧杯、三角瓶、纱布、高压锅。

#### 3. 制备过程

(1) 将切除脂肪、筋腱、肌膜的牛肉，用绞肉机绞碎，按上述比例放入适宜的容器内，搅拌均匀，置 4℃ 冰箱浸泡 20 ~ 24h。

(2) 自冰箱取出，逐渐加热升温，最后煮沸 1h，并不断搅拌，加蒸馏水补足蒸发量，用纱布过滤，滤液分装于玻璃瓶内，121℃ 高压灭菌 30min，待冷却后，置冰箱保存备用。

#### 4. 注意事项

冷冻的牛肉比新鲜的牛肉制备浸液，细菌培养效果好。其原因可能是由于冷冻的牛肉有一定程度的自溶作用，增加了某些浸出成分所致。

用马肉制成的浸液比牛肉浸液含有较多的糖原，其增菌效果比后者好，但是它使细菌形状变粗糙。用小牛肉制备的浸液，尤其适用于培养厌氧菌和生产毒素用的培养基。

#### 5. 思考

牛肉浸膏与牛肉浸粉有什么区别？

## 第三节 培养基的制备

培养基是用人工方法将多种物质按照各类微生物生长的需要而合成的一种混合营养物质，用于细菌的分离、培养、鉴别、研究和保存。常用的培养基有基础培养基、增菌培养基、选择培养基、鉴别培养基和厌氧培养基。

### 1. 通用制备过程

不同的培养基制备的方法不同，一般有如下步骤：

- (1) 根据不同的种类和用途，选择适宜的培养基。
- (2) 按培养基配方称好各种原料，培养基内用的试剂、药品必须达到化学纯或分析纯，各种成分的计算和称量必须精确。
- (3) 培养基的配制记录，包括培养基的名称、pH 值、配制时间和配制人姓名等。
- (4) 将各种成分按规定混合、溶解，调整 pH 值到适宜的范围内。
- (5) 将培养基高压灭菌，不同培养基的灭菌温度和时间不同，通常为 121℃ 高压灭菌 15~20min。待温度降低后，在超净台内进行无菌分装。
- (6) 培养基中的某些成分，如血清、腹水、糖类、尿素、氨基酸、酶等在高温下易分解、变性，故应先用蒸馏水溶解后，再用灭菌滤菌器滤过，并按规定的温度和量加入培养基中。
- (7) 无菌检查，取制备好的培养基数管，置 37℃ 恒温箱内 24h，培养基应无细菌生长。
- (8) 培养基的储存，新配制的培养基一般应在 4℃ 冰箱保存备用。

### 2. 试剂与材料

- (1) 器皿：量筒、烧杯、漏斗、三角烧瓶、试管、刻度吸管、pH 值试纸、纱布、脱脂棉、天平、电炉、试管塞、包装纸、扎绳、洗耳球等。
- (2) 试剂：牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、磷酸氢二钾、琼脂条或粉、0.1mol/L 和 1mol/L 的氢氧化钠、0.1mol/L 和 1mol/L 的盐酸溶液、蒸馏水、脱纤维羊血液或家兔血液。

### 3. 常用培养基的配制

- (1) 营养肉汤培养基的制作：

①按以下剂量称取各种试剂（先称取盐类，再称蛋白胨及牛肉膏），置于铝锅或搪瓷缸中。

牛肉浸粉	3g
蛋白胨	5g
蒸馏水	1 000ml

②将上述成分混合加热溶解后，以 0.1mol/L 氢氧化钠溶液调整酸碱度至 pH 值为 7.2~7.4。为避免过碱，应缓慢加入 NaOH 溶液，边加边搅拌，并不时地用 pH 试纸测定。

③将配好的肉汤培养基用滤纸或纱布过滤。

④将过滤好的肉汤置高压蒸汽锅内，121℃ 高压灭菌 15min，取出后 4℃ 冰箱保存备用。

用途：在此肉汤中不需要特殊营养的细菌均能生长。加入血液、血清、糖等即成特殊用培养基。

(2) 营养琼脂培养基的制备:

营养肉汤	1 000ml
琼脂	15g

琼脂是由海藻中提取的一种多糖类物质,对病原性细菌无营养作用,但在水中加热可融化,冷却后可凝固。起固体支持物作用,在液体培养基中加入琼脂 1.5% ~ 2%,即成固体培养基,如加入 0.3% ~ 0.5% 则成半固体培养基。

①将称好的琼脂粉加到营养肉汤内,搅拌均匀,将 pH 值调至 7.2 ~ 7.4 (方法同前)。

②高压蒸汽灭菌后(方法同上),将培养液趁热倒入试管内,并使之有一定坡度,凝固后即成普通琼脂斜面,也可直立,凝固后即成高层琼脂。

③待培养液温度降低至 45 ~ 50℃ 时,此时琼脂瓶紧握手中觉得烫手,但仍能握持时,即为倾倒入皿的合适温度。将培养液倒入灭菌培养皿中厚度为 3 ~ 5mm,将皿盖盖上,并将培养皿于桌面上轻轻回转,使培养基平铺于皿底,即成普通琼脂平板,待冷却后包好,置 4℃ 冰箱保存。

④培养基中的特殊成分,如血清、糖类、尿素、氨基酸等在高温下易于分解、变性,故应过滤除菌,再按规定的量加入到培养基中。

另外,实验室制备少量琼脂培养基时,可直接称取营养琼脂,溶解于蒸馏水中,或称取:

酵母粉	5g
蛋白胨	10g
氯化钠	10g
蒸馏水	1 000ml
琼脂	15g

混匀,高压灭菌后,再按上述③、④步进行。

(3) 鲜血琼脂培养基制备:

①无菌血液是用无菌操作方法采自健康动物,通常是绵羊或家兔的血液,加到盛有 5% 灭菌枸橼酸钠或 3% 灭菌肝素的 100ml 三角瓶内,或加到盛有玻璃小珠的灭菌三角瓶内,然后摇动三角瓶 10min 左右,形成的纤维蛋白块会沉淀在玻璃珠上,把含有血细胞和血清的上清液倒入无菌容器即得到脱纤血,置 4℃ 冰箱中待用。

②将灭菌的营养琼脂培养基加热融化,待冷至 50℃ 左右,以无菌操作按 10% 加入无菌的脱纤绵羊或家兔鲜血 5% 于培养基中,立即摇荡,以便血液与培养基充分混匀;迅速以无菌操作倒入无菌平皿中,使成血液琼脂平板。分装灭菌试管立即摆成倾斜状或倾注于灭菌平皿(如果琼脂温度过高,鲜血加入后则成紫褐色,某些不耐热的营养物质和血细胞被损坏;温度过低,则鲜血加入琼脂易凝固,混合不均匀。注意,混合时不要产生气泡)。待凝固后,置 37℃ 培养 24h,无菌检验合格方可应用。

(4) 半成品培养基的制备:半成品培养基成分无须自己配制,有现成的商品出售。

只要按瓶签上的说明及所需量和要求直接溶解、分装、灭菌制成平板或斜面即可。半成品培养基，根据培养基所含成分的特性不同，有的可高压灭菌，有的则不宜高压灭菌，如SS琼脂、沙门氏菌、志贺菌选择培养基不可高压灭菌或过久加热，麦康凯琼脂、三糖铁琼脂均可进行高压灭菌。

#### 4. 注意事项

(1) 配制培养基所用化学药品尽量为分析纯，称量要准；配制用水应为蒸馏水或三蒸水。

(2) 所用器材应清洁，一般用玻璃，搪瓷或不锈钢容器；不宜用铜、铝或铁的容器，以免金属离子进入培养基而影响细菌生长。即制备培养基的材料和盛培养基的容器应没有抑制细菌生长的物质。

(3) 所用培养基必须含有细菌生长所需要的营养物质。

(4) 培养基的酸碱度应符合细菌生长的要求。多数细菌生长适宜 pH 值范围是弱碱性 (pH 值为 7.2 ~ 7.6)。

(5) 培养基加热次数不宜过多，时间不宜过长，否则营养成分被破坏。

(6) 培养基分装不得超过容器的 2/3，以免灭菌时从容器中溢出。

(7) 根据培养基成分，采用适当的灭菌温度、时间和方法。但必须彻底灭菌，不得含有任何活细菌。

(8) 制备好的培养基应作无菌检验，常于 37℃ 温箱培育 24h，应无细菌生长，必要时用已知菌鉴定其质量。

(9) 去水培养基应保存于阴暗干燥处，使培养基始终呈干粉状态。制备好的培养基通常应存放于 4℃ 冰箱中，或少量制备一次使用。

(10) 所制培养基应该是透明的，以便观察细菌的生长性状和其他代谢活动所产生的变化。

#### 5. 思考

试述营养肉汤和营养琼脂培养基的主要用途。

## 第四节 马丁氏培养基的制备

### 1. 目的要求

通过对分离真菌的马丁氏 (Martin) 培养基配制、掌握选择培养基的配制方法。

### 2. 基本原理

马丁氏培养基是一种用来分离真菌的选择性培养基。此培养基是由葡萄糖、蛋白胨、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、孟加拉红和链霉素等组成。其中葡萄糖主要作为碳源，蛋白胨主要作为氮源， $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  作为无机盐，为微生物提供钾、磷、镁离子。这种培养基的特点是，培养基中加入的孟加拉红和链霉素能有效的抑制细菌和放线菌的生长，而对真菌无抑制作用，因而真菌在这种培养基上可以得到优势生长，从而

达到分离真菌的目的。

马丁氏培养基配方如下：

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g
蛋白胨	5g
葡萄糖	10g
琼脂	15 ~ 20g
水	1 000ml
pH 值	自然

此培养液 1 000ml 加 1% 孟加拉红水溶液 3.3 ml。

临用时以无菌操作在 100ml 培养基中加入 1% 的链霉素 0.3ml，使其终浓度为  $30\mu\text{g/ml}$ 。

### 3. 器材

(1) 溶液或试剂： $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、蛋白胨、葡萄糖、琼脂、孟加拉红（1% 的水溶液）、链霉素（1% 水溶液）。

(2) 仪器和器皿：试管、三角烧瓶、烧杯、量筒、玻棒、培养基分装器、天平、药匙、高压锅等。

### 4. 操作步骤

(1) 称量和溶化：按培养基配方，准确称取各成分，并将各成分依次加入少于所需要的水量中。将各成分完全溶化后，补足水分到所需体积。再将孟加拉红配成 1% 的溶液；在 1 000ml 培养基中加入 1% 的孟加拉红溶液 3.3ml 混匀后，加入琼脂加热溶化。

(2) 分装、加塞、包扎、灭菌、无菌检查与第三节相同。

(3) 链霉素的加入：将链霉素配成 1% 的溶液，在 100ml 培养基中加 1% 链霉素液 0.3ml，使每毫升培养基中含链霉素  $30\mu\text{g}$ 。由于链霉素受热容易分解，所以临用时，培养基溶化后待温度降至  $45 \sim 50^\circ\text{C}$  时才能加入。

### 5. 思考

(1) 什么是选择性培养基？它在微生物学工作中有何重要性？

(2) 如果在用马丁氏培养基分离真菌时，发现有细菌生长，你认为原因是什么？你将如何进一步分离纯化得到所需要的真菌？

## 第五节 细菌的接种和培养

在兽医生物制品生产中，往往需要获得一定量的细菌抗原，以制备疫苗、诊断抗原或抗菌血清等。下面即介绍接种和培养细菌的方法和步骤。

### 1. 目的要求

掌握常规的细菌接种和培养方法。



## 2. 所用器材

菌液、灭菌试管、平皿、灭菌 PBS 液或生理盐水、刻度吸管、枪头、枪头盒、超净台、玻璃棒、酒精灯、发酵罐等。

## 3. 操作步骤

### A. 细菌的接种方法

培养细菌时，须将病料或细菌培养物接种于培养基上，常用接种方法有以下几种：

(1) 平板画线接种法：本法为最常用的分离培养细菌的方法，通过平板画线后，可使细菌分散生长，形成单个菌落，有利于从含有多种细菌的样品中挑选和分离出目的菌。分离培养用的平板培养基应表面干燥，用前置 37℃ 培养箱内孵育一段时间，这样表面既干燥有利于分离培养，又使培养基预温，对培养某些较脆弱的细菌有利。常用的平板画线接种法有以下 2 种：

① 分区画线法：此法多用于含菌量较多的样品的分离。其方法是首先将接种环灭菌后，沾取标本均匀地涂布于平板培养基边缘一小部分（第一区），将接种环火焰灭菌，待冷却后只通过第一区画线 3~5 次后，转移至第二区连续画线，依次可共画线 3~5 区，每一区细菌数可逐渐减少，直到分离出单个菌落为止。

② 连续画线法：该法多用于含菌数量较少的标本。其方法是首先用接种环将标本均匀地涂布于平板培养基边缘一小部分，然后由此开始，在培养基表面自左向右呈“之”字形连续画线并逐渐向下移动，直至划到下边缘。

画线接种时，尽可能做到直、密、匀，有效地利用培养基表面达到充分分离的目的。

(2) 斜面接种法：采用该法目的是进行纯培养。其方法是从平板分离培养物上用接种环挑取单个菌落或者是取纯种，移种至斜面培养基上，先从斜面底部自下而上画一条直线，再从底部开始向上画曲线接种，尽可能密而匀，或者直接自下而上画曲线接种。

(3) 倾注培养法：此法适用于乳汁和尿液等液体样品的细菌计数。其方法是取原标本或经适当稀释（一般是  $10^{-1} \sim 10^{-5}$  倍稀释）的样品 1ml，置于装有固体培养基的平皿内，涂布均匀后倒置于 37℃ 培养 18~24h，做菌落计数。

(4) 穿刺接种法：本法多用于双糖、明胶等具有高层的培养基进行接种。方法是用接种针挑取菌落或培养物，由培养基中央直刺到距管底 0.3~0.5cm 处。然后沿穿刺线退出接种针，若为双糖等含高层斜面的培养基则光穿刺高层部分，退出接种针后直接曲线接种斜面部分。

(5) 液体接种法：本法多用于普通肉汤、蛋白胨和水等液体培养基的接种。其方法是接种环沾取菌种，倾斜液体培养基管，先在液面与管壁交界处研磨接种物（以试管直立后液体能淹没接种物为准），然后再在液体中摆动 2~3 次接种环，塞好棉塞后轻轻混合即可。

总之，液体接种培养更适合细菌的大规模培养。固体培养基接种培养常用于细菌的