

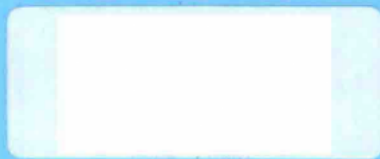
· 四川大学精品立项教材 ·

口腔微生物学实验指导

K OUQIANG WEISHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

主编 李雨庆
主审 肖丽英

四川大学出版社

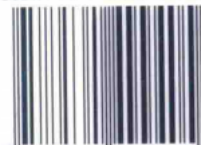


口腔微生物学实验指导

K OUQIANG WEISHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO



ISBN 978-7-5614-9940-5



9 787561 499405 >

定价: 20.00元

· 四川大学精品立项教材 ·

口腔微生物学实验指导

K OUQIANG WEISHENGWUXUE SHIYAN ZHIDAO

主 编 李雨庆
副 主 编 李明云 郭 强
主 审 肖丽英

编写人员 (以姓氏笔画为序) :

王 艳	王素苹	冯 云	朱 砾
任 彪	刘诗雨	刘程程	李雨庆
李明云	李 燕	何金枝	邱 伟
张辰紫	张朝良	陆峻君	陈 娇
周 媛	郑 欣	郭 强	高 远
徐 欣	黄睿洁	章可可	彭 显
董佳佳	程兴群	程 磊	



四川大学出版社

前 言

口腔微生物学是现代口腔医学中的一门重要基础学科。近年来,随着分子生物学、微生物生态学和系统生物学等学科的迅猛发展,口腔微生物学已由以分离培养为主的传统微生物学学科转变成为一门多学科交叉、从多角度开展研究的现代口腔微生物学学科。口腔微生物学实验课程是沟通口腔基础医学与口腔临床相关学科的桥梁,通过本课程的学习,将为今后从事口腔医学相关领域的医疗、教学和研究工作奠定基础。学生在本课程的实践过程中不仅能够验证在课堂上学习到的口腔微生物学基本理论知识,掌握基本的和常用的口腔微生物学实验技术,还能够锻炼动手、动脑、自主设计微生物学实验的能力。然而,目前国内的同类实验指导教材主要集中于普通微生物学、病原生物学或医学微生物学与免疫学领域,尚缺少专门的用于口腔微生物学实验的教学指导用书。

本实验指导教材的内容可分为微生物实验室安全概述、口腔微生物学技术、生物化学技术和分子生物学技术等四大部分。其中,微生物实验室安全部分包括微生物实验室生物安全、危险化学品安全、危险废弃物处置、用电安全及消防事故处理等内容;微生物学部分包括常用的微生物染色技术、显微镜技术、口腔微生物标本的采集、口腔致病菌的分离鉴定、菌种的保存和复苏、微生物代谢产物检测、微生物的药物敏感实验以及常用口腔微生物培养基的配制等内容;生物化学技术部分主要包括口腔微生物的快速生化鉴定,唾液中钙、磷浓度的测定等内容;分子生物学技术部分包括生物大分子的提取、口腔微生物的分子生物学鉴定技术和电泳技术等内容。

在本教材的编写过程中,得到了多位老师和同学的帮助和支持,在此我们对各位老师 and 同学的付出表示诚挚的感谢。虽然我们竭尽全力,但是本书在内容和编排上难免还存在不足之处,敬请读者能够给予指正。

口腔疾病研究国家重点实验室

编 者

2016 年 5 月

目 录

第一章 微生物实验室安全概述	(1)
第一节 微生物实验室生物安全	(1)
第二节 实验室危险化学品安全	(2)
第三节 实验室危险废弃物处置	(3)
第四节 实验室用电安全及消防事故处理	(4)
第二章 口腔微生物的分离技术	(6)
实验一 暗视野显微镜的使用	(6)
实验二 刚果红负性染色技术	(8)
实验三 真菌涂片技术	(10)
实验四 口腔菌斑、唾液及黏膜标本的采集和运送	(12)
实验五 口腔标本的分散、稀释与培养	(14)
实验六 唾液中钙浓度的测定 (试剂盒法)	(16)
实验七 唾液中磷浓度的测定 (磷钼酸法)	(18)
第三章 口腔微生物的鉴定技术	(20)
实验八 常见口腔细菌的革兰染色及油镜的使用	(20)
实验九 口腔细菌生物膜的培养及结晶紫染色	(23)
实验十 芽胞染色技术	(25)
实验十一 荚膜染色技术	(27)
实验十二 鞭毛染色技术	(29)
实验十三 扫描隧道电子显微镜技术	(31)
实验十四 透射电子显微镜技术	(33)
实验十五 原子力显微镜技术	(35)
实验十六 激光扫描共聚焦显微镜技术	(37)
实验十七 高效液相层析法测定代谢酸产物	(40)
实验十八 口腔细菌胞外多糖含量的测定 (蒽酮法)	(42)
实验十九 细菌基因组 DNA 提取及凝胶电泳检测	(44)
实验二十 细菌总 RNA 提取及凝胶电泳检测	(47)
实验二十一 细菌蛋白质提取及凝胶电泳检测	(50)
实验二十二 细菌 DNA 的 GC 含量测定	(53)

实验二十三	DNA-DNA 分子杂交技术	(55)
实验二十四	限制性核酸内切酶分析技术	(57)
实验二十五	PCR 技术	(59)
实验二十六	16S rRNA 序列分析技术	(61)
实验二十七	变性梯度凝胶电泳	(64)
实验二十八	反应板微量快速生化实验	(69)
实验二十九	全自动微生物鉴定仪	(72)
第四章	口腔微生物药物敏感实验	(76)
实验三十	液体稀释法	(76)
实验三十一	琼脂稀释法	(78)
实验三十二	纸片扩散法	(80)
附录一	口腔微生物培养常用培养基的配制	(82)
附录二	口腔微生物的保存	(102)
附录三	口腔微生物宏基因组研究临床标本收集标准及处理流程	(106)

第一章 微生物实验室安全概述

第一节 微生物实验室生物安全

一、安全制度

(1) 进入实验室前必须进行微生物实验基本操作规程及安全培训,熟悉实验室各项规章制度,树立牢固的无菌操作观念。

(2) 进入实验室必须穿工作服,进入无菌室应换洁净的无菌衣、帽、鞋,戴好口罩,洗净双手,并用 0.1%新洁尔灭溶液或 75%乙醇擦拭干净。

(3) 进入实验室的所有人员要爱护室内公共卫生,无菌室(培养室)必须保持洁净,实验室内禁止饮食、吸烟,谨防经口感染病原体。

(4) 微生物实验中坚持无菌操作,既要防止临床标本及纯培养物被污染,还要防止临床标本或纯培养中的病原微生物感染人体或污染环境。

(5) 实验完毕,即时清理现场和实验用具,对染菌、带毒物品进行灭菌消毒处理。用过的吸管、滴管、试管、玻片等带菌器材,应放在指定的地方或含消毒液的容器内,不得放在桌面上或水池内,亦不得将带菌液体倒入水槽。

(6) 工作完毕,双手用肥皂水清洗干净,必要时可用新洁尔灭、0.2%过氧乙酸泡手,然后用水冲洗。工作服应经常清洗,保持整洁,必要时行高压消毒处理。

(7) 未经许可,不得将实验用品带走,不得擅自外借、转让或从实验室带走菌种。不得私自将非实验室人员带入实验室。

二、紧急情况处置

实验过程中若不慎将传染性标本污染桌面、手及其他物品,应立即报告老师紧急处理,不得擅自处理。若发生严重的病原性微生物源污染突发事件,必须在第一时间隔离、封锁事故现场,或进行消毒,严防交叉传染,并立即通知防疫站和上级卫生、环保主管部门进行专门处置;受污染侵害的人员应立即送医疗救护部门进行急救治疗。

常见生物安全紧急情况处理方式如下:

(1) 吸入病菌菌液:应立即吐出,用 1:1000 高锰酸钾溶液漱口,菌液加入消毒液消毒;根据菌类不同,必要时需服药预防。

(2) 细菌污染衣物:应立即脱下,放入 3%来苏尔或 3%氯胺液内浸泡半小时,或

将受污染衣物仔细包好,经高压蒸汽消毒后清洗。

(3) 菌液污染桌面:如发生菌液、病原体溅出容器外,应立即倾倒适量 2%~3% 来苏尔或 0.5%84 消毒液于污染处,浸泡半小时后抹去。

(4) 若手上沾有活菌,应浸泡于上述消毒液 10~20 分钟后,再以肥皂水洗净。

第二节 实验室危险化学品安全

一、安全制度

(1) 建立健全危险化学品安全管理制度。对危险化学品做到专室专柜储存,并指定专人妥善保管;建立危险化学品管理台账制度,对危险化学品的购置、领取、使用、储存、销毁进行登记备案,要有可靠的安全防范措施;严格控制领用量,一般以一次使用为限,每次领用不得超过限量。

(2) 实验室内所有危险化学品应摆放整齐,容器表面应标明每个药品的危害性质和风险性,定期进行安全检查,定期盘存余量,保证标签清晰。

(3) 危险化学品在存放时应在近地面处储存,以减小掉下的危险,可燃或易燃试剂及强腐蚀性试剂存放时应选择专用的危险化学品安全储存柜分开存放,严禁将氧化剂与易燃(可燃)试剂存放在一起。易燃易爆液体试剂在分装时应有明确标记,工作储备量应控制在最低限度。

(5) 所有挥发性危险化学品的操作都必须在化学通风橱中进行。在使用腐蚀性物品场所的工作人员,应该穿戴围裙、手套和其他个人防护装备,做好个人防护,避免污染环境,保证个人实验安全。

(6) 易燃、可燃性液体如需要在冰箱内存放,该冰箱的设计必须符合避免产生蒸汽燃烧的要求。实验室所有的冰箱门都应标明可否用于存放易燃、可燃性液体。

二、紧急情况处置

1. 化学品强腐蚀灼伤、烧伤

(1) 酸烧伤:先以大量清水冲洗局部,再以 3%~5% 碳酸氢钠或氢氧化铵溶液洗涤中和,然后用清水冲洗,涂擦烫伤油膏,送医院救治。

(2) 碱烧伤:先以大量清水冲洗局部,再以 5% 醋酸或 1%~2% 硼酸溶液洗涤中和,然后用清水冲洗,涂擦烫伤油膏,送医院救治。

(3) 溴烧伤:用大量清水冲洗局部后,用酒精擦洗至无溴液,然后涂擦鱼肝油软膏,送医院救治。

(4) 眼部烧伤:一旦腐蚀性药品或灼热溶剂及药物溅入眼睛,应立即用大量清水冲洗局部,并及时送医院诊治。

2. 化学品（气体、液体、固体）引发的中毒

应将中毒者从中毒现场转移至通风清洁处，采用催吐等急救方法帮助中毒者清除体内毒物，拨打“120”急救电话，等待医务人员治疗。也可通过排风、用水稀释等手段减轻或消除环境中有毒物质的浓度，保护好现场。

3. 化学危险气体泄漏及爆炸

应立即将人员撤离现场至安全地带，切断事故现场电源，关闭阀门，并转移危险物品，同时拨打“119”火警电话，根据情况采取适当补救措施。

第三节 实验室危险废弃物处置

一、实验室废弃物处置的基本要求

(1) 严格实验室废弃物处理程序，对实验室内所用的生物性或化学性材料的废弃和安全处置应有明确的书面程序，从而将操纵、收集、运输、处理及处置废弃物的危险减至最低，将其对环境的危害作用降至最低。

(2) 危险废弃物在进行最终处置之前，应放置在指定的堆放场所，置于适当密封且防漏的容器中，对已装满的容器应定期统一处置。严禁将腐蚀物或有毒有害物质倒进水槽及排水管道。

(3) 实验室应指定专人在培训后使用适当的个人防护装备和设备处理实验室有害生物或化学废弃物。

二、生物废弃物处置

(1) 所有不再需要的生物样本、培养物和其他生物性材料应弃置于专门设计的、专用的、带有标记的、用于处置危险废弃物的容器内。生物废弃物容器的盛装量不能超过其设计容量。

(2) 所有弃置的实验室生物样本、培养物和被污染的废弃物在从实验室取走之前，应使其达到生物学安全标准。

(3) 生物学安全可通过采用高压消毒处理或其他被承认的技术达到。

三、化学废弃物处置

(1) 所有废弃化学物品都应按危险废弃物处理，除非能够确定它们的性质。清洁溢出有害物质的所用材料，包括吸附物和中和物，都被认为是有害废弃物。

(2) 处置前，化学废弃物应放置在密闭、有盖的容器中暂时储存。

(3) 化学废弃物的包装上应有标签，标签上应注明物品日期、来源、成分、物理性质（气体、液体等）、体积、危险性（易燃、易爆、毒性或腐蚀性）等信息。

四、其他废弃物处置

利器（包括针头、小刀、金属和玻璃等）应直接弃置于耐扎容器内。

第四节 实验室用电安全及消防事故处理

一、实验室用电安全的基本要求

(1) 用电安全的基本要素：电气绝缘良好、保证安全距离，线路和插座容量与设备功率相适宜，不使用三无产品。

(2) 定期进行安全用电检查并建立档案记录，特别留意电插座的接地和极性、电缆的完整性，对电线老化等隐患要及时排除。

(3) 实验室内设备及线路的使用必须严格按照安全用电规程和设备的要求，不许乱接、乱拉电线，墙上电源未经允许，不得拆装、改线。在实验室同时使用多种设备时，其总用电量和分线用电量均应小于设计容量。连接在接线板上的用电总负荷不能超过接线板的最大容量。

(4) 不得使用闸刀开关、木质配电板和花线，应使用空气开关并配备必要的漏电保护器，仪器设备须接地良好。

(5) 接线板不能直接放在地面上，不能多个接线板串联。电源插座需固定，不使用损坏的电源插座。空调应有专门的插座。

(6) 配电箱、开关、变压器等各种电气设备附近不得堆放易燃、易爆、潮湿和其他影响操作的物件。

二、实验室用电防火的注意事项

(1) 实验前先检查用电设备，再接通电源；实验结束后，先关闭仪器设备，再关闭电源。

(2) 电炉、烘箱等用电设备在使用中，使用人员不得离开。工作人员离开实验室或遇突然断电，应关闭电源，尤其要关闭加热电器的电源开关。

(3) 不得将供电线任意放在通道上，以免因绝缘破损造成短路。

(4) 建立安全值日制度，实验室的电源总闸每天离开时要关闭。

(5) 应定期对重点防火部位、易燃易爆化学品使用情况进行检查，及时消除隐患，并定期进行火灾及相关紧急事件处置的培训和演练。

(6) 实验室内禁止吸烟，不得使用明火取暖，禁止使用电热水壶、热得快。电脑、空调、饮水机不得在无人情况下开机过夜。

(7) 安全使用酒精灯，不可互相点燃，以防发生意外。不能在酒精灯燃烧状态下添加酒精。酒精灯中的酒精量不能超过总容量的 2/3。

(8) 禁止用冰箱储存易燃液体。如果确实需要，应存放在专门的防爆冰箱内，冰箱应远离火源。

三、实验室消防事故处理的紧急措施

(1) 防止火势蔓延, 首先切断电源, 熄灭所有加热设备。快速移走附近的可燃物, 关闭通风装置, 减少空气流通。

(2) 立即扑灭火焰, 设法隔断空气, 使温度下降到可燃物的着火点以下。如果可能, 立即使用便携式灭火器灭火。

(3) 按照上级消防部门的规定配备、摆放灭火器, 并根据要求对灭火器进行定期检查维修。Ⅰ类灭火器适用于固体可燃物(如纸、木材、塑料)引起的火灾, 该类灭火器多数为消防水栓; Ⅱ类灭火器适用于汽油和有机溶剂引起的火灾或电气设备及精密仪器着火的情况, 该类灭火器的成分多数为二氧化碳或化学干粉, 如碳酸氢钠; Ⅲ类灭火器适用于不能用水灭火的着火物, 应用沙土隔绝空气灭火, 保持着火物的干燥。

(4) 如果不能及时控制火情, 应将房间里的所有人员撤离, 把所有通向火场的门关紧, 并用湿毛巾或床单堵住门缝, 以阻止火势蔓延。

四、实验室消防事故处理的注意事项

(1) 用水灭火注意事项: 能与水发生猛烈作用的物质失火时, 不能用水灭火, 如金属钠、电石、浓硫酸、五氧化二磷、过氧化物等, 对于小面积范围的燃烧可用防火沙覆盖; 比水轻、不溶于水的易燃与可燃液体, 如石油、烃类化合物和苯类等芳香族化合物失火燃烧时, 禁止用水扑灭; 溶于水或稍溶于水的易燃物与可燃液体, 如醇类、酯类、酮类等失火时, 如数量不多可用雾状水、化学泡沫、皂化泡沫等扑灭; 不溶于水、密度大于水的易燃与可燃液体如二硫化碳等引起的火灾, 可用水扑灭, 因为水能浮在液面上将空气隔绝。

(2) 电气设备及电线着火时, 首先用干粉灭火器灭火, 电源切断后才能用水扑救。严禁在未切断电源前用水或泡沫灭火剂扑救。

(3) 若敞口的器皿中发生燃烧, 应尽快切断热源, 设法盖住器皿口, 隔绝空气, 使火熄灭。扑灭产生有毒蒸气的火情时, 要特别注意防毒。

(4) 灭火器的维护: 灭火器要定期检查, 并按规定更换药液; 使用前须检查喷嘴是否畅通, 如有阻塞, 应用铁丝疏通后再使用, 以免发生爆炸; 使用后应彻底清洗, 并更换损害的零件; 灭火器一定要固定放在明显的位置, 不得任意移动。

第二章 口腔微生物的分离技术

实验一 暗视野显微镜的使用

一、实验目的

- (1) 了解暗视野显微镜的基本工作原理及用途。
- (2) 学习并掌握使用暗视野显微镜观察微生物样品的基本技术。

二、实验内容

- (1) 掌握暗视野显微镜的使用。
- (2) 暗视野下龈下菌斑的形态观察。

三、实验原理

生活细菌在明视野下观察是透明的，不易看清。暗视野显微镜的原理与来自缝隙的一束强光通过暗室时，可清楚地看到其中细微灰尘的现象是一样的，即给样品的光不直接穿过物镜，而是由样品上反射或折射的光进入物镜，那么，在漆黑的视野中，由于反差增大，样品能够被看得更清楚。应用暗视野法可以在黑暗的视野中看到光亮的菌体，故在观察生活细菌及细菌运动时常采用此法。

暗视野显微镜的构造主要采用一种特殊的聚光器，聚光器的下方中央为圆形黑盘所遮盖，光仅由其周缘进入，汇聚于载玻片上，并斜照物体，物体经斜射照明后发出反射光可进入物镜，这样，就形成了显微镜视野黑暗而其中的物体明亮的现象。在无暗视野显微镜时，只需将明视野显微镜上的聚光器取下，换上暗视野聚光器即可；也可在明视野显微镜聚光器下面的滤光镜支架上放一片星形挡板，构成暗视野，这种方法适用于低倍镜下细菌的观察。

在暗视野中，由于有些活细胞的表面比死细胞明亮，所以暗视野也被用来区分死、活细胞。此技术现已被用于各种酵母菌死、活细胞的鉴别。此外，暗视野显微镜对于观察娇弱的微生物，如梅毒密螺旋体特别有用。

Listgarten 首先将暗视野显微镜应用于牙周炎龈下菌斑细菌的检查。

四、实验材料

龈上菌斑、龈下菌斑、唾液及其他口腔临床标本；暗视野显微镜，载玻片，盖玻片，含1%明胶的生理盐水（0.9%氯化钠溶液）。

五、实验方法

（1）将采集到的标本置于一洁净的载玻片上，加适量的含有1%明胶的生理盐水混匀后加上盖玻片轻轻地挤压以排出多余的液体。

（2）将制好的涂片立即置于暗视野显微镜下检查，计数200个细菌，按照Listgarten分类标准进行分类（螺旋体、可动菌、球菌和其他细菌）。

六、注意事项

（1）在暗视野下观察时，聚光镜与载玻片之间滴加的香柏油要充满，否则照明光线于聚光镜上面进行全面反射，达不到被检物体，从而不能得到暗视野照明。

（2）在进行暗视野观察标本前，一定要进行聚光镜的中心调节和调焦，使焦点与被检物体一致。

（3）由于暗视野聚光镜的数值孔径都较大，焦距短，因此，过厚被检物体无法被调节至聚光镜焦点处。一般载玻片厚1.0 mm左右，盖玻片厚度宜在0.16 mm以下，同时载玻片、盖玻片应保持清洁，无油脂及划痕，否则将严重影响最终的成像质量。

七、实验报告

报告各种类型细菌所占百分比。

八、思考题

- （1）观察活细胞的个体形态，用显微镜的明视野好还是暗视野好？
- （2）暗视野观察时，对所用的载玻片、盖玻片有何要求？为什么？
- （3）暗视野显微镜的临床意义和应用范围？

实验二 刚果红负性染色技术

一、实验目的

- (1) 掌握牙菌斑标本的采集技术。
- (2) 掌握刚果红负性染色技术的原理、操作步骤、结果观察及意义。
- (3) 熟悉龈上菌斑中常见细菌的形态和 Listgarten 分类标准。

二、实验内容

- (1) 菌斑标本的采集。
- (2) 细菌涂片的制备、染色。
- (3) 染色细菌的观察。

三、实验原理

刚果红 (CR) 能与培养基中的纤维素发生反应形成红色复合物, 但不和纤维二糖、葡萄糖发生这种反应。当纤维素被纤维素酶分解后, 红色的刚果红-纤维素复合物无法形成。培养基中表现为以纤维素分解菌为中心的透明圈, 可以通过是否产生透明圈来筛选纤维素分解菌。

四、实验材料

唾液、牙菌斑生物膜或者其他口腔分泌物; 刚果红, 培养基, 平板等。

五、实验方法

取 1 g 刚果红粉末与 50 ml 蒸馏水配制成 2% 染色液。在玻片一端滴 1 滴刚果红溶液, 取龈上菌斑或其他临床样本与其混合并且推成薄片, 使其自然干燥。将上述刚果红涂片放置于浓盐酸蒸气上 (瓶口) 熏, 当涂片呈现蓝色时, 即可取出在油镜下观察。

六、实验结果

镜下可以见涂片呈现蓝色的背景, 菌细胞不着色呈现光亮的白色, 形态清晰。在涂片上选择涂布均匀的视野计数 200 个菌细胞, 按照 Listgarten 分类标准报告各类细菌的百分比。

七、注意事项

- (1) 染色操作中, 用浓盐酸熏蒸涂片时要小心。
- (2) 该法不能检测细菌的活动性, 但染色涂片可长期保存。

八、实验报告

龈上菌斑涂片刚果红负性染色结果图及 Listgarten 分类。

九、思考题

- (1) 刚果红负性染色技术有何优点？菌斑采集时应注意什么？
- (2) 刚果红负性染色技术的临床意义及应用范围分别是什么？

实验三 真菌涂片技术

一、实验目的

- (1) 掌握常见口腔真菌涂片技术的标本制作及形态观察。
- (2) 掌握口腔真菌涂片技术的原理、操作步骤、结果观察及意义。

二、实验内容

- (1) 常见口腔真菌涂片标本的制作。
- (2) 常见口腔真菌的形态观察。

三、实验原理

用显微镜直接检查标本中有无菌丝及孢子的存在,对皮肤丝状菌的感染可作初步诊断。本法具有简单、迅速、易行的特点。

四、实验材料

- (1) 真菌标本(口腔黏膜的白膜)。
- (2) 试剂:生理盐水。
- (3) 接种环、酒精灯、载玻片、显微镜、香柏油及擦镜纸等。

五、实验方法

- (1) 用经火焰消毒的镊子或钝性小刀,取适量标本置于载玻片上。
- (2) 滴加一滴生理盐水,盖上盖玻片,在酒精灯上稍微加热,待标本溶解,轻轻加压盖玻片使标本透明即可镜检。
- (3) 将制作好的涂片置于显微镜下检查,先用低倍镜检查,然后再用高倍镜证实。

六、实验结果

镜下见假丝酵母菌染色呈革兰阳性,呈大的圆形或者卵圆形,芽生孢子的直径为 $3\sim 6\mu\text{m}$,也可以见到着色不均匀的菌丝及厚膜孢子。

七、注意事项

放置盖玻片时应先倾斜 45° 再慢慢盖上,载玻片和盖玻片之间不能产生气泡。

八、实验报告

对镜下发现的菌丝或孢子或芽生孢子的基本形态结构进行绘图。

九、思考题

- (1) 制备一张好的真菌涂片应注意些什么？
- (2) 镜检阳性可否确定真菌感染的存在？镜检阴性是否一定没有真菌感染？临床上还需不需要做进一步的真菌培养？
- (3) 真菌直接涂片检查的临床意义是什么？