



普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会主任委员 文格波
编写委员会总主编 姜志胜

病原生物学实验

(医学微生物学分册)

第2版

主编 赵飞骏 李忠玉



科学出版社

普通高等教育“十三五”规划教材
全国高等院校医学实验教学规划教材

编审委员会主任委员 文格波
编写委员会总主编 姜志胜

病原生物学实验

(医学微生物学分册)

第2版

主 编 赵飞骏 李忠玉

副主编 朱翠明 陈利玉 曾焱华

编 委 (按姓氏笔画排序)

朱翠明(南华大学医学院)

刘 文(南华大学医学院)

刘卓然(南华大学附属第二医院)

李忠玉(南华大学医学院)

陈列松(南华大学医学院)

肖勇健(南华大学附属第二医院)

赵 铁(南华大学医学院)

赵兰华(南华大学医学院)

游晓星(南华大学湖南省分子靶标

新药研究协同创新中心)

伍 宁(南华大学医学院)

刘安元(南华大学医学院)

李水红(南华大学医学院)

张 艳(南华大学医学院)

陈利玉(中南大学湘雅医学院)

周 洲(南华大学医学院)

赵飞骏(南华大学医学院)

曾焱华(南华大学医学院)

蔡恒玲(南华大学特殊病原体防

控湖南省重点实验室)

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是全国高等院校医学实验教学规划教材之一,遵循系列教材编写总体要求,尝试将实验教学相对独立成不依赖于理论教学体系的实验教学改革新模式,使学生掌握医学微生物学的基本实验操作技术的同时,更注重培养学生独立操作、独立观察和思考、独立分析问题和解决实际问题的能力。全书分为4篇共80个实验,包括细菌学、病毒学、其他微生物和医学微生物学设计性实验。为方便教学,每一实验基本上都按实验目的、实验原理、实验器材、实验方法、实验结果、注意事项与思考题7个部分来编写,各实验所用染液、培养基与溶液等的配制均列在附录内,供读者查阅和参考。

本书适用于高等医药院校医学各专业本科生、专科生及研究生使用,也可作为医院检验科、疾病预防控制中心、卫生学校和科研单位工作人员的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学实验(医学微生物学分册)/赵飞骏,李忠玉主编. —2版.
—北京:科学出版社,2017.1

普通高等教育“十三五”规划教材·全国高等院校医学实验教学规划教材
ISBN 978-7-03-050985-7

I. 病… II. ①赵… ②李… III. ①病原微生物-实验-高等学校-教材
②医学微生物学-实验-高等学校-教材 IV. ①R37-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第296368号

责任编辑:李国红 周 园/责任校对:李 影

责任印制:肖 兴/封面设计:陈 敬

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>

安泰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010年7月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2017年1月第 二 版 印张:14 插页:2

2017年1月第十次印刷 字数:319 000

定价:42.00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 编审委员会

主任委员 文格波

副主任委员 姜志胜 吴移谋 廖端芳

委员 (按姓氏笔画排序)

王 韵	王宗保	牛亦农	龙双涟
田 英	刘贻尧	刘艳平	宇 丽
严 杰	李 和	肖建华	肖献忠
何庆南	余 平	宋 健	张新华
陈 熙	罗学港	周国民	贺修胜
秦晓群	龚永生	傅松滨	管又飞

编写委员会

总 主 编 姜志胜

副总主编 田 英 陈 熙 贺修胜

编 委 (按姓氏笔画排序)

万 炜	王汉群	尹 凯	甘润良
龙石银	乔新惠	向宇燕	刘 俊
刘录山	李严兵	李国庆	李忠玉
李美香	杨秋林	张 艳	易 岚
易光辉	屈丽华	赵飞骏	胡四海
桂庆军	凌 晖	唐志晗	梁 瑜
彭翠英	谭健苗		

秘 书 梁 瑜 唐志晗

序 一

近年来,教育部、卫生计生委等多部委紧密部署实施本科教学工程、专业综合改革试点、实践育人和卓越医生教育培养计划,把强化实践教学环节作为重要内容和重点要求,进一步凸显了医学实践性很强的属性,对切实加强医学实验教学提出了更高要求,指引着我国医学实验教学进入全面深化改革阶段。

高校牢固树立以学生为本、目标导向和持续改进的教育理念,积极创新和完善更加有利于培养学生实践能力和创新能力的实验教学体系,建设高素质实验教学队伍和高水平实验教学平台,以促进和保证实验教学水平全面提高。为此,南华大学医学院协同国内多所高校对第一版“全国高等院校医学实验教学规划教材”进行了修订和拓展。第二版教材涵盖了解剖学、显微形态学、医学免疫学、病原生物学、机能学、临床基本技能学、生物化学、分子生物学、医学细胞生物学、医学遗传学的实验教学内容,全书贯彻了先进的教育理念和教学指导思想,把握了各学科的总体框架和发展趋势,坚持了理论与实验结合、基础与临床结合、经典与现代结合、教学与科研结合,注重对学生探索精神、科学思维、实践能力、创新能力的全面培养,不失为一套高质量的精品教材。

愿“全国高等院校医学实验教学规划教材”的出版为推动我国医学实验教学的深化改革和持续发展发挥重要作用。

教育部高等学校基础医学类专业教学指导委员会主任委员

中国高等教育学会基础医学教育分会理事长

2015年12月



序 二

随着本科教学工程、专业综合改革试点、实践育人和卓越医生教育培养计划的实施,高等医学院校迎来了进一步加强医学实验教学、提高医学实验教学质量的大好时机,必须积极更新医学实验教学理念,创新实验教学体系、教学模式和教学方法,整合实验教学内容,应用实验教学新技术新手段,促进医学人才知识、技能和素质全面协调发展。

“全国高等院校医学实验教学规划教材”编审委员会和编写委员会与时俱进,积极推进实验教学改革的深化,组织相关学科专业的专家教授,在第一版的基础上,吸收了南华大学等多个高校近年来在医学实验教学方面的改革新成果,强调对学生基本理论、基础知识、基本技能以及创新能力的培养,打破现行课程框架,构建以综合能力培养为目标的新型医学实验教学体系,修订并拓展了这套实验教学规划教材。第二版教材共十四本,包括:《系统解剖学实验》《局部解剖学实验》《显微形态学实验(组织与胚胎学分册)》《显微形态学实验(病理学分册)》《病原生物学实验(医学微生物学分册)》《病原生物学实验(人体寄生虫学分册)》《医学免疫学实验》《机能实验学》《临床基本技能学(诊断技能分册)》《临床基本技能学(外科基本技能分册)》《生物化学实验与技术》《分子生物学实验》《医学细胞生物学实验》《医学遗传学实验》。

本套规划教材的编写,借鉴国内外同类实验教材的编写模式,内容上依据医学实验体系进行重组和有机融合,按照医学实验教学的逻辑和规律进行编写,并注重知识的更新,反映学科的前沿动态,体现教材的思想性、科学性、启发性、先进性和实用性。

本套规划教材适用对象以本科临床医学专业为主,兼顾麻醉学、口腔医学、医学影像、护理学、预防医学、医学检验、卫生检验、药学、药物制剂、生物科学、生物技术等专业实验教学需求,各层次各专业学生可按照其专业培养特点和要求,选用相应的实验项目进行教学与学习。

本套规划教材的编写出版,得到了科学出版社和南华大学以及有关兄弟院校的大力支持,凝聚了各位主编和全体编写、编审人员的心血和智慧,在此,一并表示衷心感谢。

由于医学实验教学模式尚存差异,加上我们的水平有限,本套规划教材难免存在缺点和不当之处,敬请读者批评指正。

总主编

2015年12月



前 言

医学微生物学是医学生必修的主干课程之一，也是一门实践性与应用性很强的学科。实验教学是医学微生物学教学过程中的重要环节，对于验证医学微生物学理论知识、加深对医学微生物学知识的理解和掌握、获得医学微生物学实验基本技能和研究方法，以及提高分析问题及解决问题的能力等方面都有着非常重要的作用，同时它也为继续深入开展生物化学、分子生物学、基因工程等实验课程奠定了坚实的基础。

全书分为4篇共80个实验。在实验内容的选择上，既保留了医学微生物学实验特有的基本实验方法和基本操作技术，以及为验证医学微生物学理论、加深学生感性认识的经典验证性实验，又增加了综合性及设计性实验，同时引进本学科较为成熟的新技术和新方法，满足素质教育和创新教育的基本要求。在编排体例上，为便于教学，本书前面部分介绍了微生物实验须知、显微镜结构和使用方法，每篇每一实验基本上都按实验目的、实验原理、实验器材、实验方法、实验结果、注意事项与思考题7个部分编写，各实验所用染液、培养基与溶液等的配制均列在附录内。

本书适用于高等医药院校医学各专业本科生、专科生及研究生使用，也可作为医院检验科、疾病预防控制中心、卫生学校和科研单位工作人员的参考用书。

本教材在总编委会的尽心指导与科学规划下顺利进行，是各位编者辛勤工作的结晶，凝聚了编者多年实验教学的宝贵经验，同时编写过程中得到了多方支持和帮助，尤其是特殊病原体防控湖南省重点实验室和湖南省分子靶标新药研究协同创新中心的全力支持，在此一并致以衷心感谢。限于我们的水平和经验，书中难免有缺点与不足之处，恳请读者多提宝贵意见。

赵飞骏 李忠玉

2016年12月

目 录

绪论 微生物实验须知

第一篇 细 菌 学

第一章 细菌形态与结构的观察	15
实验一 细菌不染色标本的观察	15
实验二 细菌染色标本的观察	16
实验三 细菌基本形态与特殊结构的观察	27
第二章 细菌的分离培养技术	29
实验一 常用培养基的制备	29
实验二 细菌的接种技术	32
实验三 细菌的培养方法	35
实验四 细菌生长现象的观察	37
实验五 细菌的计数方法	38
第三章 细菌代谢产物的检测及鉴定	43
实验一 细菌毒素的检测	43
实验二 细菌生化反应鉴定	46
第四章 细菌感染的血清学试验	51
实验一 玻片凝集试验	51
实验二 肥达试验	52
实验三 抗链球菌溶血素 O 试验	53
实验四 荚膜肿胀试验	55
第五章 细菌的分布	56
实验一 自然界中细菌的检查	56
实验二 人体正常菌群的检查	58
第六章 理化及生物因素对细菌的影响	60
实验一 热力灭菌法	60
实验二 紫外线杀菌法	61
实验三 滤过除菌法	62
实验四 常用化学消毒剂的杀菌试验	63
实验五 噬菌体的分离鉴定及溶菌实验	64

实验六 抗菌药物敏感性试验	66
实验七 细菌对抗生素的联合敏感实验	71
第七章 细菌的遗传与变异	73
实验一 细菌变异现象的观察	73
实验二 细菌质粒的提取与转化	76
实验三 细菌 R 质粒的接合传递	78
实验四 细菌质粒的提取、酶切与连接实验	79
实验五 细菌 DNA 的提取及 DNA 琼脂凝胶电泳	80
实验六 细菌核酸分子杂交	83
实验七 PCR-ELISA 技术检测结核分枝杆菌	84
第八章 细菌致病作用的测定	87
实验一 血浆凝固酶试验	87
实验二 透明质酸酶试验	88
实验三 链激酶试验	88
实验四 荚膜的致病作用	89
实验五 志贺菌侵袭力测定（Sereny 试验）	90
实验六 内毒素的致病作用	91
实验七 外毒素的致病作用	91
第九章 常见病原菌的分离与鉴定	93
实验一 病原性球菌的分离与鉴定	93
实验二 粪便标本中致病性肠道杆菌的分离与鉴定	95
实验三 胃黏膜组织中幽门螺杆菌的分离与鉴定	98
实验四 厌氧芽胞梭菌的分离与鉴定	100
实验五 呼吸道感染细菌的分离与鉴定	104
实验六 需氧芽胞杆菌的分离与鉴定	109
实验七 细菌 L 型的分离与鉴定	111

第二篇 病毒学

第十章 病毒形态结构的观察	114
实验一 磷钨酸负染法	114
实验二 病毒包涵体的观察	115
第十一章 病毒的分离培养技术	117
第十二章 病毒数量与感染性的测定	123
实验一 空斑形成试验	123
实验二 TCID ₅₀ 测定	124

第十三章 病毒感染的血清学试验	126
实验一 血凝试验与血凝抑制试验	126
实验二 中和试验	128
实验三 病毒补体结合试验	130
第十四章 病毒感染的快速诊断	133
实验一 免疫电泳法检测粪便标本中轮状病毒颗粒	133
实验二 ELISA 法检测乙肝病毒抗原、抗体	134
实验三 ELISA 法检测 HIV 抗体筛选试验	137
实验四 蛋白印迹法检测 HIV 抗体确证试验	139
实验五 间接免疫荧光法检测单纯疱疹病毒抗原	142
实验六 病毒的分子生物学检查	143

第三篇 其他微生物

第十五章 支原体	151
实验一 肺炎支原体分离培养及菌落、形态观察	151
实验二 解脲脲原体分离培养	152
第十六章 立克次体	153
实验一 立克次体形态、结构的观察	153
实验二 外斐反应	153
第十七章 衣原体	155
实验一 衣原体分离培养技术	155
实验二 沙眼衣原体包涵体的观察	156
实验三 实时荧光定量 PCR 检测沙眼衣原体	157
第十八章 螺旋体	160
实验一 螺旋体的形态观察	160
实验二 钩端螺旋体的动力观察	161
实验三 钩端螺旋体的分离培养	162
实验四 致病性螺旋体的血清学试验	163
第十九章 真菌	169
实验一 真菌形态、结构的观察	169
实验二 真菌分离培养技术	170
实验三 临床标本中常见真菌的检查	172

第四篇 医学微生物学设计性实验

附录	181
彩图	

绪论 微生物实验须知

一、医学微生物学实验目的

医学微生物学是一门实验性很强的学科，实验教学是医学微生物学教学的一个重要环节。开设此课程实验课的主要目的为：

- (1) 加深学生对理论知识的理解和验证。
- (2) 掌握医学微生物学基本的实验操作技能。熟悉常用的微生物学实验检查方法。
- (3) 培养学生从事科学实验的能力，即观察并记录实验结果、整理分析实验资料、综合书写实验报告等的能力。
- (4) 培养学生严谨求实的科研态度、独立分析和解决问题的能力以及相互帮助和团结协作的精神。

二、医学微生物学实验要求

为达到医学微生物学实验教学目的，对学生提出以下要求：

- (1) 实验课前应认真预习，明确实验目的、了解实验原理、主要操作步骤及操作中注意事项。
- (2) 实验课时应认真听取指导老师的讲解、示教，观摩学习实验课中的影像、多媒体等电化教学资料。在实验过程中，要小心仔细，严格按规程进行操作；要注意分工协作、密切配合；注意科学合理的分配和运用时间。
- (3) 实验过程中若发现问题，要独立思考、分析原因，必要时可寻求指导老师帮助。
- (4) 在整个微生物实验过程中，应遵守实验室生物安全制度，建立“有菌”观念，培养“无菌操作”习惯。
- (5) 真实记录实验结果，按要求、按时写出并递交实验报告（根据需要可用彩笔绘图）。如实验结果与理论预期不符，应分析和探讨原因。

三、医学微生物学实验室规则

医学微生物学实验室大多涉及第三类或第四类病原微生物，任何疏忽或者不规范操作均可能导致较为严重的后果。为了防止学生在实验过程中自身感染或造成实验室污染，根据中华人民共和国国务院令（第 424 号）《病原微生物安全管理条例》，参照《实验室生物安全通用要求》，并结合学生实验的实际情况，实验室制定如下实验规则：

- (1) 学生进入实验室应穿实验服（隔离衣），离开时脱下并将其反折叠好。
- (2) 与实验无关的物品不得带入实验室。带入的实验指导、书籍和文具等应放在指定的非操作区，以免被污染。
- (3) 在实验室工作区域不得高声谈笑，关闭手机或将其置于静音状态。应保持实验室

内的安静、整洁、有序。

(4) 实验室内禁止进食、饮水、嚼口香糖、吸烟、化妆、处理隐形眼镜、用嘴含铅笔、用口吸移液管或将实验室材料置于口内等，尽量不要用手抚摸头面部或身体其他暴露部分。

(5) 实验过程中发生差错或意外事故时，禁止隐瞒或自作主张不按规定处理，应立即报告老师，按“实验室意外事件的紧急处理”规则进行正确的处理。

(6) 用过的带菌材料、器材（吸管、试管、玻片等）应放入污染区指定的消毒缸内。

(7) 节约使用实验材料。爱护仪器设备，严格按操作规则使用。如不慎损坏了仪器设备或实验材料等应主动报告指导老师。

(8) 在实验课结束前清点、整理好实验物品，将各物归放指定地点，若有缺失，应立即报告指导教师；需培养的材料应做好标记，放入培养箱；并将桌面整理清洁；做好显微镜等仪器设备使用登记。

(9) 实验完毕后，以肥皂洗手，必要时用消毒液泡手后方可离开实验室。值日生打扫室内卫生，关好水电、煤气、门窗，洗手后离室。

四、实验室生物学安全（实验室意外事件的紧急处理）

医学微生物学实验教学的实验室多为Ⅱ或Ⅰ级生物安全实验室（BSL-2 或 BSL-1），其安全设备和设施适合于操作第三类或第四类病原微生物。

为保障学生和指导老师的安全以及实验室生物安全，学生必须严格遵守操作程序，一旦有意外事故发生，应立即停止实验，及时通知指导老师，并根据 WHO《实验室生物安全手册》第三版、GB19489-2008 实验室生物安全通用要求以及 GB19781-2005 ISO15190 医学实验室安全要求，对实验室意外事件，应采取如下应急措施处理：

(1) 实验过程中，切勿使乙醇、乙醚等易燃易爆药品接近火焰。若遇火险，应先关掉火源，再用湿布掩盖灭火，必要时使用灭火器。切忌用水灭火。

(2) 若菌液或感染性液体（血液、尿液标本或培养物）污染衣物，应尽快脱掉已污染的衣物，将其放入黄色垃圾袋内以待高压灭菌，然后洗手并更换实验服。

(3) 若手上沾有菌液或感染性液体，应将手浸泡于来苏尔、新洁尔灭或 84 消毒液中消毒 10min，再用肥皂和自来水反复洗净；若菌液等溢到其他部位皮肤，需用 75% 的酒精或碘液进行皮肤消毒，再用水冲洗。若刺伤、切割伤或擦伤等导致皮肤破损，应用清水和肥皂水清洗伤口，尽量挤出伤口处的血液，再用 75% 的酒精或络合碘擦洗伤口，必要时找医生进行医学处理。

(4) 若菌液感染性液体溅入眼睛，则立即用清水冲洗眼睛，再用生理盐水冲洗（注意动作轻柔，勿损伤眼睛）。

(5) 若菌液流洒至桌面或其他地方，需将 3% 来苏尔液或 5% 石碳酸溶液覆盖 30min 后擦去，如为芽胞杆菌，需适当延长消毒时间。

(6) 误入菌液若不慎将菌液吸入口中，应立即将口中菌液吐到消毒容器内，用 1 : 1000 高锰酸钾溶液或 3% 双氧水漱口，并根据菌种，使用有效的抗菌药物预防感染。

(7) 离心时，若带有感染性物质的离心管发生破裂，应关闭电源，让离心机停止工作。戴上手套，用镊子清理离心管碎片，然后将破碎的离心管及离心桶、转轴和转子放在无腐

蚀性的、对相关微生物有杀灭作用的消毒剂内浸泡。离心机内腔则需用适当浓度的同种消毒剂擦拭。

(8) 药品腐蚀：强酸腐蚀伤口需先用大量清水冲洗，再用 5%碳酸氢钠溶液中和；而强碱腐蚀伤时，用清水冲洗后，再用 5%醋酸或 5%硼酸溶液中和。若伤至眼睛，经上述处理后，再滴入 1~2 滴液体石蜡。

五、显微镜的结构和使用方法

显微镜是一种能将人眼不能分辨的微小物体放大成便于肉眼观察的仪器，分为光学显微镜和电子显微镜。光学显微镜包括明视野显微镜、暗视野显微镜、荧光显微镜、相差显微镜等。目前，我们通常使用的是明视野显微镜，能将物体放大 1500~2000 倍（最大的分辨率为 $0.2\mu\text{m}$ ）。其他显微镜结构与其基本相同，是在明视野显微镜的基础上进一步发展而来的。因此，明视野显微镜简称显微镜。

(一) 普通光学显微镜

【显微镜的构造】

显微镜的构造分为机械部分、光学部分及电气部分（图绪 1）。

1. 机械装置部分

(1) 镜座：显微镜下面呈马蹄形或圆形的基座部分，支持整台显微镜的平稳。

(2) 镜臂：显微镜后方倾斜或弓形弯曲的部分，是移动显微镜时用手握持的部位。

(3) 镜筒：安装在镜臂前端的筒状结构，上连目镜，下连物镜转换器，形成目镜与物镜间的暗室。显微镜的国际标准镜筒长为 160 mm。

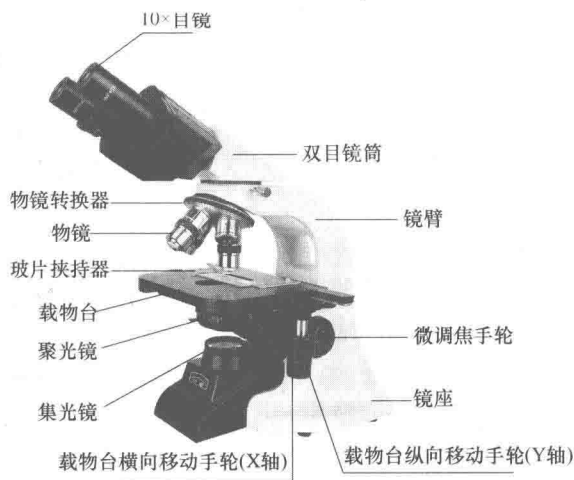
(4) 物镜转换器：镜筒下端可自由旋转的圆盘，用于安装物镜。观察时通过转动转换器来调换不同倍数的物镜。

(5) 载物台：镜筒下方用于放置载玻片的平台，中央有一圆形的通光孔。台上装有弹簧夹和推动器，以固定和移动标本，使镜检部位恰好位于视野中心。有些推动器上还附有刻度，可直接计算标本移动的距离并确定标本的位置。

(6) 调焦手轮：装在镜臂上的两种螺旋，通过转动使载物台上下移动，调节成像系统的焦距。大的称为粗调焦手轮，每转动一圈，载物台升高或降低 20mm，用于在低倍镜观察时调节物像；小的为微调焦手轮，刻度为 $2\mu\text{m}/\text{格}$ ，转动一圈可使载物台升高或降低 0.2mm，用于高倍镜观察时调节物像。

2. 光学系统部分

(1) 目镜：位于镜筒上方，由两组透镜构成。作用是把物镜放大的实像再放大一次，



图绪 1 普通光学显微镜

并将物像映入观察者的眼中。在目镜上方刻有放大倍数，如 $10\times$ 、 $20\times$ 等。在目镜内两个透镜间的光栏上可装一根剪短的毛发作为指针，用以指示要观察的目标。

（2）物镜：位于镜筒下端物镜转换器的孔道内，通常每台显微镜备有一套不同倍数的物镜镜头，并刻有放大倍数。包括：①低倍物镜：用于搜索观察对象及观察标本全貌，如 $4\times$ 、 $10\times$ ；②高倍物镜：用于观察标本某部分或较细微的结构，如 $40\times$ ；③油镜：用于观察微生物更细微的结构，如 $100\times$ 。

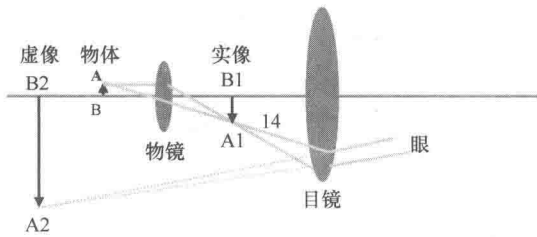
（3）聚光镜：位于载物台下方的聚光器支架上。光通过聚光镜将像聚焦于标本的正确位置（光路中心）。拨动聚光镜升降手柄，可将聚光镜上下移动。

（4）集光镜：具有光线聚集作用，把灯泡向四周发散的光线聚集起来。

3. 电气部分 输入电压（AC 100~240V）、灯泡（3W LED 灯或 12V 20W 卤素灯）、保险丝和电源线。

【显微镜的成像原理】

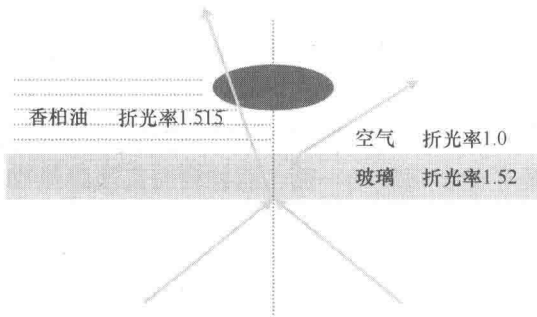
外界光源的光线经反光镜反射到聚光器后，会聚在镜检标本上，标本反射或折射出来的光线经物镜作用后，在目镜的焦平面上形成一放大的实像，该实像经目镜再次放大后成一虚像。故观察到的是经两次放大后的倒立虚像。即：光线→反光镜→聚光器→镜检标本→物镜（第一次放大成倒立实像）→镜筒→目镜（再次放大成虚像）→眼（图绪 2）。



图绪 2 显微镜的成像原理

显微镜对样品的放大倍数是物镜放大倍数和目镜放大倍数的乘积。如物镜是 $40\times$ ，目镜是 $10\times$ ，其物像的放大倍数是 $40\times 10=400$ 倍。

使用油镜时需滴加香柏油是因为当光线从玻片经空气进入镜头时，由于介质密度不同会发生折射现象而散失，进入物镜中的光线减少。使用高倍或低倍镜时，透镜的孔径比较大，影响不显著；但油镜透镜孔径很小，射入镜内的光线很少，视野暗，物像模糊不清。香柏油的折光率（ $n=1.515$ ）与玻片（ $n=1.52$ ）相近，可减少光线因折射而散失掉，使进入油镜的光线增多，视野亮度加强，物像从而变得清晰（图绪 3）。



图绪 3 油镜原理示意图

【使用方法】

1. 从显微镜柜内取出显微镜，右手握镜臂，左手托镜座，平稳地取出，放置在实验台桌面上，置于操作者左前方，距实验台边缘约 10cm，镜臂朝自己，镜筒朝前。实验台右侧放绘图用具。

2. 灯泡照明：打开电源开关，灯泡就会发亮。旋转亮度旋钮来调节视场的明亮度。顺时针旋转亮度增强，反之亮度减弱。

3. 瞳距调节：通过目镜观察时，调节双目镜筒转座直到左右视场完全吻合。

4. 放置标本玻片：下调载物台，将待检标本玻片放于其上（有盖玻片的一面朝上），以弹簧夹固定。移动推进器，使观察范围移至通光孔的中心。

5. 低倍镜观察：用 10×物镜聚焦。旋转转换器，将 10×物镜移至光路（当旋转到位时，物镜转换器会自动定位，咔嗒一声），旋转粗调焦手轮，将载物台升至最高点。通过目镜进行观察，慢慢旋转粗调焦手轮，降低载物台，当标本像出现时停止旋转。旋转微调焦手轮，进行精确聚焦。并利用推进器把需观察的部分移至视野中央。不要同时沿相反方向旋转左右调焦手轮。当载物台已达到移动的极限位置，请不要继续旋转粗调焦手轮，这些操作都会导致调焦部件的损坏。

6. 聚光镜垂直位置调节：利用聚光镜升降手柄将其调至上端极限处，然后稍微往下降低一点，如果在视场背景中发现散射图像，可将聚光镜上下微微调节，使其现象消失。

7. 高倍镜观察：转动转换器，选择高倍镜的镜头，用微调焦手轮调节焦距，到物像清晰为止。进一步把要观察的部位移至视野中央。

8. 油镜观察：标有“oil”字体的物镜为浸油物镜。使用油镜时，需在物镜和盖玻片之间加专供显微镜的浸油。

(1) 在玻片镜检部位加香柏油 1~2 滴，消除气泡。

(2) 转动转换器，将油镜置于镜筒下方。

(3) 从目镜观察，缓慢以微调焦手轮微调，直至物像清晰。未能看到物像或镜头离开油滴时，可从侧面观察，小心调节油镜浸入油滴，镜头几乎与标本接触为止，再重复上述操作。

(4) 观察标本时应两眼同时张开，左眼观察，右眼用于绘图并记录结果。

(5) 镜检完毕，转动粗调焦手轮使载物台下降到底，再将亮度调节旋钮移到最小亮度处，最后关闭电源开关。将镜头旋离玻片，取下标本，先用擦镜纸将镜头上的油擦净，再用擦镜纸蘸少许二甲苯擦去残留油渍，最后以干净的擦镜纸擦去二甲苯。

9. 还原显微镜：旋转转换器，将物镜头扭成“八字形”位置与聚光器相对。下降聚光器。罩上镜罩，将显微镜对号归位。

【显微镜的应用】

显微镜能将微小物体或物体的微细部分高倍放大，便于肉眼观察。因此，广泛应用于工农业生产和科学研究中，尤其在生物学和医学中经常使用。

【注意事项】

1. 显微镜是贵重精密仪器，使用时要精心爱护，不得随意拆散和碰撞。

2. 放置显微镜的实验室应清洁而干燥，实验台台面水平，稳固无震动，应防止显微镜与腐蚀性的试剂接触。

3. 使用显微镜时，一般顺序为经低倍镜、高倍镜到油镜，当高倍镜观察到标本后，基

本上油镜也可以观察得到。也可以不经过低倍镜和高倍镜,直接以油镜观察。由于油镜的工作距离很小(一般在 0.2 mm 以内),因此在使用油镜时,调焦速度要慢,注意从侧面观察镜头与标本距离,避免压碎玻片,损坏物镜头。

4. 使用油镜头时,切忌将镜油污染到其他非油镜头上。
5. 用擦镜纸擦拭油镜头时,应顺其直径朝一个方向擦,不要转圈擦。
6. 为防止触电或火灾,在安装显微镜、更换灯泡和插拔电源之前,必须关闭电源开关。

【思考题】

1. 为什么使用油镜时要等玻片干后才能加香柏油?
2. 油镜的标志是什么?使用时应注意些什么?
3. 如果视野太亮或太暗,可以通过哪些方法来解决?

(二) 暗视场显微镜

【暗视场显微镜原理】

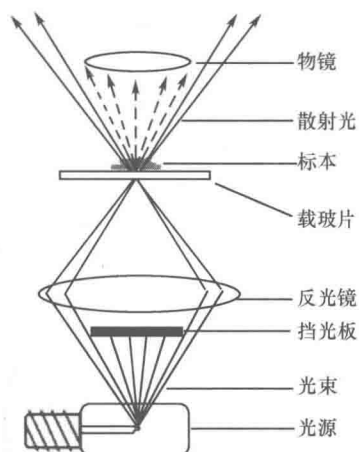
暗视场显微镜是根据丁达尔现象即以胶体粒子的反射和散射现象为基础设计的显微镜,丁达尔现象是指光通过烟、雾、悬浮液或乳状液等浑浊媒质时,这些浑浊媒质所呈光的强烈散射现象。如灰尘细粒,若在明视野用强光通过的方法观察,有些粒子遇光后发生散射现象,但因光线太强和发生绕射现象等而看不出来,如果用光线斜照它们,并衬上暗的背景,则因粒子与光线发生散射的结果,尘粒成为可见。

与普通光学显微镜不同之处是暗视场显微镜使用一种特殊的暗视场聚光器,此聚光器中央有一个黑色挡光板,光线不能直接进入镜筒,导致来自反光镜的中央光线不能直接上升进入物镜,而只能从挡光板周边缝隙折射到载玻片的标本上。经反射作用而出聚光器,形成一个圆锥样的光柱。调节聚光器之高低,可使此圆锥的顶点(即焦点)恰在载物玻片的表面,此时如玻片上空无一物,或为完全透明之物体,则光线直穿而过,不能进入接物镜中,因此视野背景是黑暗的;如玻片上有可以折光的物体(如细菌或其他颗粒)存在,则由聚光器而来的光线遇此物体,形成一个弥散反射,其中有一部分光线即经物体反射或衍射的散射光进入镜头,到达观察者的眼睛,此时所见者即为闪光的物体颗粒,衬托在黑色背景中,状如夏夜晴空中的点点繁星,异常清晰。如光线斜射到螺旋体,由于菌体与周围物体折光率不同而引起光散射发出亮光,反射到接物镜(图绪 4)。

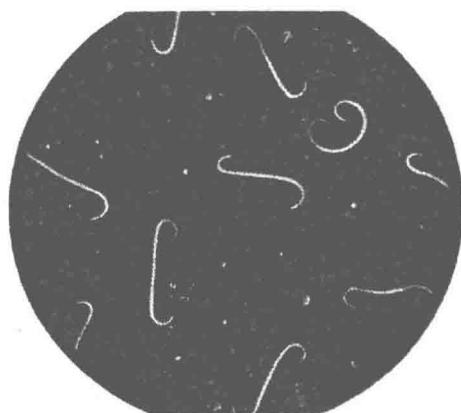
因用暗视野法可以在黑暗的视野中看到光亮的菌体,故在观察生活细菌及细菌运动时常采用此法。用这种方法可以分辨小到 $0.04\mu\text{m}$ 的超微粒子。而明视场显微镜最多能分辨 $0.2\mu\text{m}$, 小于 $0.2\mu\text{m}$ 的物体,则不能分辨。暗视场显微镜仅能看到菌体轮廓,而看不到内部结构(图绪 5),故常用于确定螺旋体、病毒的存在;观察未染色体液标本中的细菌、霉菌等;观察细菌鞭毛的运动。在暗视野中,由于有些活细胞其外表比死细胞明亮,所以暗视野也被用来区分死、活细胞,此技术现已被用于各种酵母细胞的死、活鉴别。

【构造及组成】

普通光学显微镜、暗视场聚光器、显微镜灯。



图绪 4 暗视野显微镜光路原理示意图



图绪 5 暗视场显微镜下钩端螺旋体的形态

【使用方法】

1. 把暗视野聚光器装在显微镜的聚光器支架上。
2. 选用强的光源，但又要防止直射光线进入物镜，所以一般用显微镜灯照明。
3. 在聚光器和标本片之间要加一滴香柏油，目的是不使照明光线于聚光镜上面进行全反射，达不到被检物体，而得不到暗视野照明。
4. 升降集光器，将集光镜的焦点对准被检物体，即以圆锥光束的顶点照射被检物。如果聚光器能水平移动并附有中心调节装置，则应首先进行中心调节，使聚光器的光轴与显微镜的光轴严格位于一直线上。

5. 选用与聚光器相应的物镜，调节焦距，找到所需观察的物像。

【注意事项】

1. 进行暗视野观察时，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 ($NA=1.2\sim1.4$)，焦点较浅，因此，过厚被检物体无法调在聚光镜焦点处，一般载玻片厚度为 1.0 mm 左右，盖玻片厚度宜在 0.16 mm 以下，同时载玻片、盖玻片应很清洁，无油脂及划痕，否则都会严重地干扰最终成像。

(三) 荧光显微镜

荧光显微镜是利用一定波长的激发光对样品进行激发，使之产生一定波长的荧光，从而用于对样品结构或其组分进行定性、定位、定量观察检测。某些物质经波长较短的光照射后，分子被激活，吸收能量后呈激发态。其能量部分转化为热能或用于光化学反应外，相当一部分则以波长较长的光能形式辐射出来，这种波长长于激发光的可见光称为荧光。荧光显微镜是利用一定波长的光激发标本发射荧光，通过物镜和目镜系统放大以观察标本的荧光图像。其外形见图绪 6。