

全国高等医学院校

医学微生物学与 免疫学实验教程

张子康
何光泽 主编

四川科学技术出版社

已录

全国高等医学院校

医学微生物学与 免疫学实验教程

张子康 何光泽 主 编

四川科学技术出版社

1989年·成都

责任编辑: 史兰英
封面设计: 李 勤
技术设计: 俞宜民
责任校对: 李迎军 钱丹凝

全国高等医学院校
医学微生物学与免疫学实验教程
张子康 何光泽 主编

四川科学技术出版社出版
(成都盐道街三号)
四川省新华书店经销
攀枝花新华印刷厂印刷

ISBN7-5264-1404-8/R·186(课)

1989年7月第一版 开本 787×1092毫米 1/16
1989年7月第一次印刷 字数498千
印数: 1—109201册 印张 18 插页1
定价: 5.80元

53000

主编 张子康 何光泽

编委 (以姓氏笔划为序)

王信隆 王 韧 许 晏

张子康 何光泽 赵进昌

凌天翼

ZIV10/30 54

编写说明

随着医学微生物学与免疫学的发展,新实验新技术,有如雨后春笋,破土而出。为适应学科的发展,满足教学的需要,培养学生理论联系实际,利于学生独立思考、独立操作和提高实验课教学质量,我们在查阅国内外有关资料,广泛征求意见,参考一些兄弟院校的实验教材,总结并吸收近年来实验课教学改革经验的基础上,结合本学科实践性极强的特点,编写了这本《医学微生物学与免疫学实验教程》。

本教程根据学科特点,分为医学微生物学和免疫学两部分,共95个实验,每个实验之前,结合相关理论,编写一段概述或原理,使学生既知其然,也知其所以然。实验中尽量做到所列实验器材切实可行,方法明了具体,结果清楚准确。实验之后列有思考题,便于学生复习思考。书末加有附录,便于查阅。

本教程注意到理论性、实用性和系统性相结合,大胆地删去个别不开展的或重复的内容,适当增加了一些比较成熟的新实验和新技术,并力求实验的改进和更新。

本教程主要供高等医学院校医学、卫生、口腔、儿科和法医等专业本科生使用,同时可作为本学科的研究生、进修生、青年教师、师资班学员及实验技术人员的参考用书,可在使用中,根据不同需要予以取舍。

本教程由华西医科大学主编,参加编写的单位有贵阳医学院、兰州医学院、新疆医学院、西安医科大学和重庆医科大学。本书由陈仁溥、房益兰、董熙昌教授,唐俊杰、张先麟、高巽坤、周鸣生、牟家琬、张传彬、蔡美英、张廷华、张荫芝副教授等分别担任审阅。

本教程是集体智慧的结晶,它浸透了同仁们辛勤劳动的汗水,凝集了师长、同事们热情指导和帮助。还得到华西医科大学有关领导,编者所在单位以及四川科学技术出版社的大力支持,在此一并衷心感谢。

本教程是我们奉献给读者的一片绿叶,如果能为读者事业的红花添姿增色,那将使我们倍感欣慰。当然,绿叶不仅依赖土壤根茎的赐予,还需要阳光雨露的滋润。限于我们的水平和经验,本教程虽经我们反复审阅,多次修改,仍嫌不足,必有疏漏,切盼读者不吝惠教。

作者

1989年1月

医学微生物学与免疫学 实验的目的和要求

医学微生物学与免疫学实验课，是微生物学与免疫学课程的重要组成部分，学习本实验课的目的在于：

一、在系统学习医学微生物学与免疫学理论知识的基础上，使学生加深理解，并验证和巩固其理论知识，学习和掌握本课程的基本操作技术。

二、培养学生观察、思考和分析问题的能力；独立学习和独立工作的能力以及严格的科学作风，严肃的科学态度和严密的工作方法。

三、为临床疾病（尤其是传染病）的预防、诊断和治疗打下良好的基础。

四、让学生了解一些微生物学与免疫学的科学研究方法和基本技术。

五、培养学生树立相互帮助和团结协作精神。

为了达到上述目的，提高实验课效果，特提出下列要求：

一、严格遵守实验室规则，树立“有菌观点”，掌握无菌操作技术。

二、实验前做好预习，明确实验目的、要求、原理、主要方法步骤和注意事项，并做好必要的准备工作。

三、实验时要仔细认真，对较复杂的实验应分工协作，对所做过的实验要达到掌握的程度。

四、客观地、忠实地记录实验结果，联系理论分析结果。若实验结果与理论不符合时，要加以分析讨论，找出原因，必要时还应重复实验。

五、防止发生各种事故。

医学微生物学与免疫学实验室规则

医学微生物学与免疫学的实验对象，大都是病原微生物，有传染的危险。因此，进入实验室必须严格遵守以下规则：

- 一、进入实验室必须先穿好隔离服，必要时还要戴上口罩。
- 二、除必要的书籍、笔记本和文具外，其他个人物品，一律不得带入实验室。
- 三、在实验室内，禁止饮食、吸烟、用嘴湿润标签、大声喧哗或嬉戏。
- 四、未经老师许可，不得擅自搬动示教、器材或其他室内设施。
- 五、按照实验要求，积极地计划安排要进行的实验，仔细认真地进行实验操作，严格遵守无菌操作规程，争取又快又准确地完成实验。
- 六、实验用过的器材，必须放在指定地点或按要求处理，不能随便乱丢乱放。
- 七、实验中万一发生有菌材料污染桌面或衣服、菌液打翻、割破手指或菌液吸入口中等情况，应立即报告老师及时处理，切勿隐瞒或自作主张不按规定处理。
- 八、要爱护实验室内的仪器，使用显微镜及其他贵重仪器，要按要求操作。对消耗材料、药品、试剂及水、电、气等，都要力求节约。
- 九、实验完毕，应将实验器材放回原处，需培养的菌要放入孵箱内。清理桌面，搞好室内清洁，保持室内的整齐。离开实验室前，关好门、窗、水、电、煤气，脱下隔离服，并将手洗净。
- 十、未经许可，不得将实验室内任何物品，特别是菌种带出室外。

目 录

医学微生物学与免疫学实验的目的和要求

医学微生物学与免疫学实验室规则

医学微生物学部分

实验一	显微镜油镜的使用和保护	1
实验二	活菌运动的观察	2
实验三	细菌的基本形态和特殊结构观察	3
实验四	细菌的简单染色法	4
实验五	细菌的革兰氏染色法	5
实验六	细菌的荚膜染色法	6
实验七	鞭毛染色法	6
实验八	芽胞染色法	7
实验九	基础培养基的制备	8
实验十	细菌的接种法及生长情况的观察	10
实验十一	细菌碱基组成的测定	13
实验十二	细菌代谢产物的检查	15
实验十三	气相色谱分析厌氧菌的终末代谢产物	19
实验十四	自然界中细菌的检查	22
实验十五	正常人体的细菌检查	24
实验十六	物理因素对细菌的影响	25
实验十七	化学因素对细菌的影响	27
实验十八	生物因素对细菌的影响	30
实验十九	紫外线对细菌的诱变	35
实验二十	细菌的形态结构变异	36
实验二十一	细菌的生理变异	37
实验二十二	R质粒接合传递试验	39
实验二十三	青霉素酶的测定	39
实验二十四	细菌转化试验	40

实验二十五	细菌转导试验.....	41
实验二十六	细菌质粒DNA的提取.....	43
实验二十七	细菌的粘附试验.....	46
实验二十八	细菌致病性酶类与毒素的检查.....	47
实验二十九	细菌热原质的检测.....	51
实验三十	葡萄球菌.....	52
实验三十一	链球菌.....	56
实验三十二	变形链球菌.....	59
实验三十三	肺炎球菌.....	60
实验三十四	脑膜炎球菌.....	63
实验三十五	淋球菌.....	65
实验三十六	临床标本化脓球菌的分离鉴定.....	65
实验三十七	大肠杆菌.....	67
实验三十八	沙门氏菌属.....	68
实验三十九	志贺氏菌属.....	71
实验四十	粪便标本中致病性肠道杆菌的分离鉴定.....	72
实验四十一	霍乱弧菌.....	74
实验四十二	副溶血性弧菌(嗜盐弧菌).....	76
实验四十三	百日咳杆菌.....	78
实验四十四	鼠疫杆菌.....	79
实验四十五	布氏杆菌.....	80
实验四十六	炭疽杆菌.....	83
实验四十七	破伤风杆菌.....	85
实验四十八	产气荚膜杆菌.....	86
实验四十九	肉毒杆菌.....	87
实验五十	临床标本厌氧菌的分离鉴定.....	88
实验五十一	弯曲菌.....	93
实验五十二	白喉杆菌.....	96
实验五十三	结核杆菌.....	100
实验五十四	军团菌.....	104
实验五十五	水的卫生细菌学检验.....	107
实验五十六	冷饮的卫生细菌学检验.....	114
实验五十七	罐头的卫生细菌学检验.....	117
实验五十八	食物中毒的微生物学检验.....	119
实验五十九	病毒的培养方法.....	124
实验六十	病毒的血清学试验.....	130
实验六十一	乙型肝炎病毒的微生物学检查.....	135
实验六十二	病毒蛋白多肽成分的检测.....	140

实验六十三	病毒的快速诊断	142
实验六十四	沙眼—包涵体结膜炎衣原体的培养和包涵体的观察	146
实验六十五	立克次体	147
实验六十六	支原体	148
实验六十七	螺旋体	149
实验六十八	放线菌	156
实验六十九	真菌	157

免 疫 学 部 分

实验七十	血脑屏障作用	162
实验七十一	吞噬细胞的吞噬作用	162
实验七十二	溶菌酶的溶菌作用	165
实验七十三	血清总补体测定法	167
实验七十四	淋巴细胞分离技术	169
实验七十五	免疫血清的制备	173
实验七十六	溶血空斑试验	177
实验七十七	单克隆抗体的制备	180
实验七十八	凝集反应	183
实验七十九	沉淀试验	190
实验八十	补体结合试验	199
实验八十一	微量淋巴细胞毒试验	202
实验八十二	荧光素标记抗体技术	203
实验八十三	酶联免疫吸附技术——ELISA	206
实验八十四	放射免疫测定法—— ^{125}I 标记技术	208
实验八十五	淋巴细胞转化试验	210
实验八十六	E玫瑰花环试验	213
实验八十七	白细胞移动抑制试验	215
实验八十八	单克隆抗体检测T淋巴细胞亚群试验	216
实验八十九	抗体介导的淋巴细胞毒试验	218
实验九十	人外周血中NK细胞活性的检测	220
实验九十一	豚鼠过敏试验	221
实验九十二	肥大细胞脱颗粒试验	222
实验九十三	循环免疫复合物的检测	223
实验九十四	红细胞免疫粘附试验	225
实验九十五	细胞免疫的皮肤试验	227

附录:

一、常用指示剂、试剂、溶液和缓冲液	230
二、常用酸碱的比重、百分浓度和当量浓度的关系	235

三、染色法.....	237
四、常用培养基.....	244
五、常用热力灭菌器与滤菌器.....	262
六、溶液和器物的除菌灭菌.....	264
七、菌种的保藏法.....	267
八、动物实验技术.....	269
九、电子显微镜技术.....	272
十、Brown氏标准比浊管测菌液浓度.....	277

医学微生物学部分

实验一 显微镜油镜的使用和保护

细菌个体微小，肉眼不能看到，必须借助普通显微镜之油镜，将其放大1000倍左右，才能看清。因此，必须熟练掌握显微镜的使用和保护，尤其是油镜的使用和保护。

【原理】

光线从标本玻片经空气进入镜头时，由于介质密度不同而发生折射现象，因此进入物镜中的光线很少，结果视野很暗，物象不清晰。如在玻片上加上折光率和玻片($n=1.52$)相近的香柏油($n=1.515$),就可避免光线的分散，加强视野的亮度，获得清晰的物象(图1)。

【材料与方法】

1. 油镜的识别 普通光学显微镜的构造，见图2。观察微生物标本最常用的油镜，油镜头上都有标记；标有 $90\times$ 或 $100\times$ ；镜头前端有黑、白或红色的圆圈；刻有“HI”或“Oil”等，其孔径也较其他物镜小。

1. 油镜的使用

(1) 显微镜平稳地安放在实验台上，勿将镜臂倾斜，以免香柏油流散。

(2) 以天然光线为光源时，使用平面反光镜。以灯光为光源时，使用凹面反光镜。

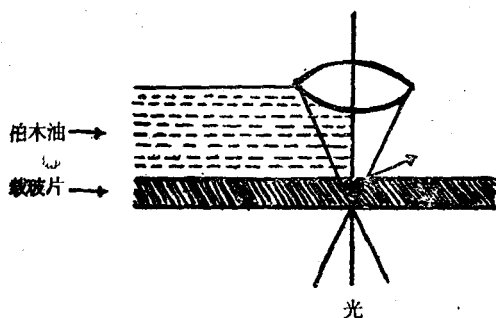


图1 油镜原理示意图

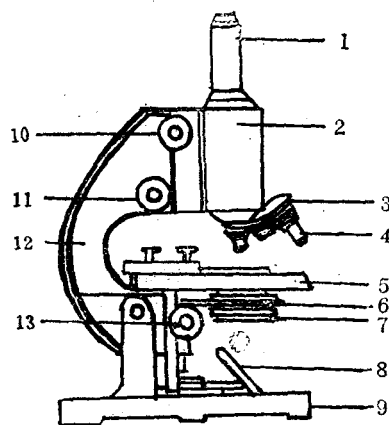


图2 显微镜的构造

1.目镜 2.镜筒 3.镜头转换器 4.接物镜 5.载物台
6.光圈 7.聚光器 8.反光镜 9.镜座 10.粗调节器
11.细调节器 12.镜臂 13.聚光器调节器

(3) 把集光器升到最高位置,把光圈完全打开,增大射入光线的强度。

(4) 将标本固定在载物台上,先用低倍镜调至视野最亮,并找到标本之适当位置,然后换用油镜。

(5) 先在玻片上滴香柏油1滴。用眼从侧方看着物镜,缓慢转动粗调节器,使物镜头浸于油滴内,并几乎与玻片接触为止,但切勿使两者相碰,防止损伤镜头或玻片。然后从目镜观察,仔细转动粗调节器,看到模糊物象时,再调动细调节器,使物象清晰。未能看到物象时,可重复上述操作。

(6) 油镜头使用后应立即用拭镜纸擦净镜头上的油。如油已干,可在拭镜纸上滴少许二甲苯擦拭,并随即用干的拭镜纸擦去二甲苯,以防镜片脱落。

(3) 显微镜的保护。

(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) 取送显微镜时,应右手持镜臂,左手托镜座,平端于胸前。

(3) 防止与强酸、强碱、乙醚、氯仿、酒精等化学药品接触。

(4) 擦镜头时,应顺其直径方向擦,不要转圈擦。

(5) 不用时,将接物镜转开呈八字,使其不正对聚光器。聚光器下降,罩上镜套,对号归位。

思考题:

1. 怎样调节才能使显微镜的视野最亮?

2. 使用油镜应注意哪些问题?

许晏编 张先麟审

实验二 活菌运动的观察

【原理】

许多杆菌与弧菌有鞭毛,球菌一般无鞭毛。有鞭毛的细菌具有动力,能作明显运动,且往往有化学趋化性,常朝着有营养物质的方向移动,而避开有害的环境。直接观察细菌动力是鉴别细菌的方法之一,常采用不染色标本的压滴法或悬滴法。

【材料】

1. 变形杆菌、葡萄球菌肉汤12小时培养物。

2. 玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林、接种环、酒精灯等。

【方法】

1. 压滴法 用接种环分别取变形杆菌及葡萄球菌菌液置于洁净的玻片中央,在菌液上轻覆以盖玻片(注意勿产生气泡,也勿使菌液外逸),静置片刻后于高倍镜下观察。

2. 悬滴法 在凹玻片的凹窝四周涂少许凡士林,用接种环分别取变形杆菌及葡萄球菌菌液置于洁净的盖玻片中央,将凹玻片的凹窝对准盖玻片的菌液处,反扣覆在盖玻片上,微压使二者贴紧后迅速反转,使菌液悬滴于盖玻片下(如图3),静置片刻后于高倍镜下观察。

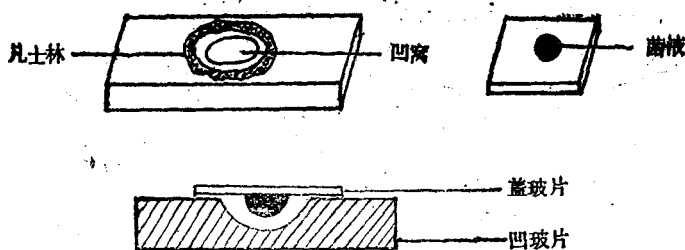


图3 悬滴标本的制备

【结果】

变形杆菌有明显的定向运动。

【注意事项】

1. 镜检时需适当降低集光器或缩小光圈，视野不宜过亮。
2. 需仔细辨认鞭毛的运动与布朗氏分子运动的区别，前者是有方向的位移，而后者则是细菌受环境中液体分子的冲击呈现在原位附近的颤动。无鞭毛的细菌虽无动力，但同样有布朗氏分子运动。

思考题：

除了压滴法与悬滴法外，还有什么方法可鉴别细菌的动力？

王 韧编 陈仁溥审

实验三 细菌的基本形态和特殊结构观察

细菌个体小，种类繁多，但仍具有一定的形态。在适宜的条件下，保持其正常的形态，主要分成球菌、杆菌和螺形菌三种。细菌细胞的基本结构主要由细胞壁、细胞膜、细胞浆和核质组成。有些细菌尚有芽胞、荚膜、鞭毛及菌毛等特殊结构。在细菌形态学检查时，由于细菌微小，且为无色半透明体，故需要用显微镜放大或经合适的染色后，才能较清楚的观察。而各种特殊结构则必须经相应的特殊染色后才可看到。根据细菌的形态、大小、排列方式、特殊结构和染色性，可对其进行鉴别。

【材料与方法】

观察下列染色标本片，注意细菌的形态、大小、排列方式、染色性和特殊结构、并绘图记录。

1. 细菌基本形态的观察

球菌：葡萄球菌。

杆菌：大肠杆菌。

弧菌：霍乱弧菌。

2. 细菌特殊结构的观察

鞭毛：伤寒杆菌鞭毛染色示教片。注意鞭毛和菌体的颜色及鞭毛的位置。

荚膜：肺炎双球菌荚膜染色示教片。注意荚膜与菌体的颜色，荚膜的厚度。

芽胞：破伤风杆菌芽胞染色示教片。注意菌体与芽胞的颜色，芽胞的形态、大小及位置。

思考题：

细菌有哪些特殊结构？这些结构在医疗实践中各有何实际意义？

美国枢编 张先麟审

实验四 细菌的简单染色法

【原理】

染色是细菌形态学检查法的一项基本技术。由于细菌微小而透明，在普通光学显微镜下不易识别，故必须对它们进行染色，以增加反差。

简单染色是用单纯的一种染料进行染色，多数采用美蓝、结晶紫或稀释的石炭酸复红等碱性染料。此法仅能显示细菌的形态，而不能鉴别细菌。

染色前必须将细菌固定，目的是杀死细菌，并使它粘附于玻片上，常用加热法，固定时应尽量使细菌维持原有形态，防止变形。

【材料】

1. 葡萄球菌和大肠杆菌18~24小时液体培养物或斜面培养物。

2. 吕氏美蓝液或石炭酸复红稀释液。

3. 载玻片，酒精灯，接种环，染色架，冲洗用具。

【方法】

按涂片→干燥→固定→染色→镜检顺序进行。

1. 涂片：取洁净载玻片1张，将1小滴生理盐水放于玻片上，接种环灭菌后取菌苔少许，与盐水混匀并涂成面积不超过 1cm^2 的薄膜（如用液体培养物涂片，可直接取培养物涂于玻片上，不加生理盐水），见图4。

2. 干燥：将涂片放空气

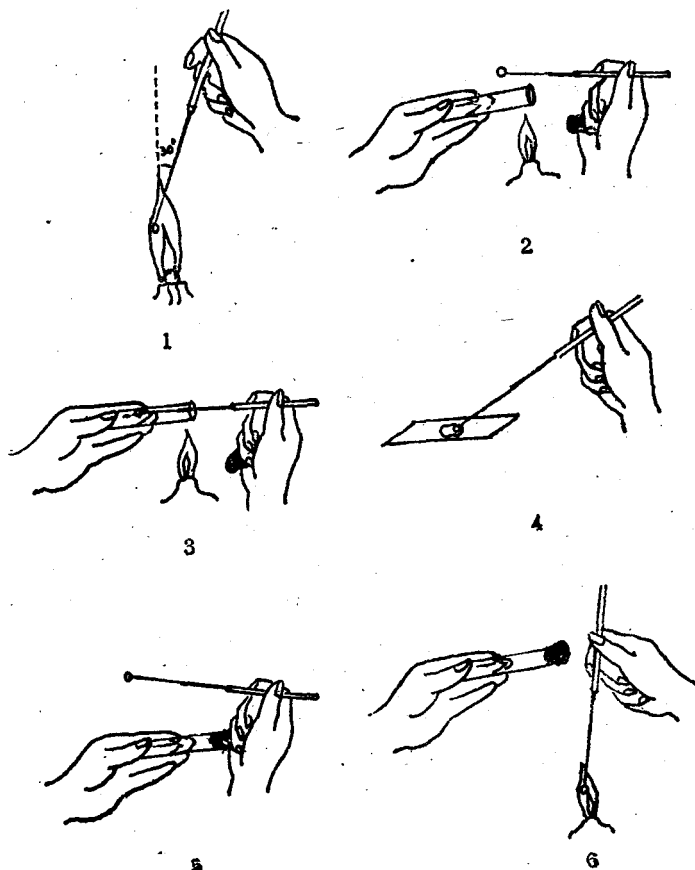


图4 细菌涂片的制备

中自然干燥，或将标本面向上，放在离火焰较远处烘干，避免烤焦。

3. 固定：手持载玻片一端，把涂片在火焰最热部分连续通过3次（约2~3秒）。

4. 染色：置玻片于水平位置，加吕氏美蓝染液（或石炭酸复红稀释液）于涂片部位，染色1~2分钟，用自来水轻轻洗去染液，滤纸或毛边纸吸干，镜检。

【结果】

绘图记录结果，葡萄球菌和大肠杆菌均染成蓝色（或红色）。

【注意事项】

1. 玻片要洁净无油，否则菌液涂不开，不宜选用厚玻片。

2. 取菌量宜少，涂片要匀而薄。

3. 水洗时要以细流水徐缓冲洗，避免直接冲洗涂菌处。

思考题：

涂片后为什么必须进行固定？固定时应注意什么？单染色法的局限性是什么？

姜国枢编 张先麟审

实验五 细菌的革兰氏染色法

【原理】

革兰氏染色法是最常用的细菌鉴别染色法。细菌染色后，不仅可以观察其形态，而且可根据染色结果将细菌分为两大类，即革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。这样有助于对细菌的鉴别，同时还为分析细菌的致病性和选用抗菌药物提供依据。

革兰氏染色的机理，主要是由于两类细菌的细胞壁成分和结构的不同。革兰氏阴性菌细胞壁中含有较多的类脂质，而肽聚糖含量较少。当用酒精脱色时，溶解了类脂质，增加了细胞的通透性，使结晶紫和碘的复合物易于渗出，细胞脱色，经复染后，染上复染液的颜色。而革兰氏阳性菌细胞壁中肽聚糖含量多且交联度大，类脂质含量少，经酒精脱色后，肽聚糖层的孔径变小，通透性降低，细胞仍保留结晶紫的颜色。

【材料】

1. 葡萄球菌和大肠杆菌18~24小时培养后的混合菌液。

2. 革兰氏染色液。

3. 其他材料同单染色法。

【方法】

涂片、干燥、固定后按以下顺序染色。

1. 初染 滴加结晶紫染液数滴，染色1分钟，水冲洗。

2. 媒染 滴加芦戈氏碘液数滴，染1分钟，水冲洗。

3. 脱色 滴加95%酒精，脱色时频频倾动玻片，直到不再溶下染料为止，约半分钟，水冲洗。

4. 复染 加石炭酸复红稀释液染1分钟，水冲洗，用毛边纸或滤纸轻轻吸干，待标本充分干燥后用油镜观察。

【结果】

经革兰氏染色后，显紫色者为革兰氏阳性菌，显红色者为革兰氏阴性菌。

【注意事项】

1. 要掌握好染色的时间，尤其是酒精脱色时间，不易过长或过短。
2. 在染色过程中，不可使染液干涸。
3. 选用适龄培养物，以18~24小时为宜，否则影响染色效果。

思考题：

1. 什么是革兰氏染色法？革兰氏染色法有何实际意义？
2. 要做好革兰氏染色，应注意哪些关键步骤，为什么？

姜国枢编 张先麟审

实验六 细菌的荚膜染色法

【原理】

某些细菌细胞壁外面有一层较厚的粘性物质，称为荚膜。荚膜对染料的亲和力弱，不易着色。通常采用负染色法，使菌体和背景着色而荚膜不着色，因而在菌体周围荚膜呈一透明圈。由于荚膜含水量在90%以上，染色时一般不用热固定，以免荚膜皱缩变形。本试验采用黑斯（Hiss）氏法染色。

【材料】

1. 经小白鼠传代培养的肺炎双球菌。
2. 结晶紫酒精饱和液5ml加蒸馏水95ml，混匀。
3. 20%硫酸铜水溶液。

【方法】

1. 按常规方法涂片，干后不需加热固定。
2. 加结晶紫液，在火焰上略加热，使冒蒸汽为止。
3. 用20%硫酸铜液冲洗，吸干，镜检。

【结果】

荚膜无色或呈淡紫色，菌体及背景呈紫色。

思考题：

荚膜染色为什么要用感染动物腹腔液或脏器来制作？

姜国枢编 张先麟审

实验七 鞭毛染色法

【原理】

细菌鞭毛细长，直径10~20nm，要用电镜才能观察到。如采用特殊染色法，则在