MS 高职高专医药卫生类实训指导系列规划教材

GAOZHIGAOZHUAN YIYAOWEISHENGLEI SHIXUNZHIDAO XILIEGUIHUA JIAOCAI

病原生物与免疫学实训指导

BINGYUANSHENGWU YUMIANYIXUE SHIXUNZHIDAO

主编 盘箐

中南大学出版社
www.csupress.com.cn

病原生物与免疫学实训指导

主　编　盘　箐
副主编　李贝晶　张琼宇
编　者　(按姓氏笔划排列)
李贝晶　罗四维　张琼宇　唐小标
唐鹏程　盘利莉　盘　箐

中南大学出版社
www.csupress.com.cn

图书在版编目(CIP) 数据

病原生物与免疫学实训指导/盘箐主编. —长沙: 中南大学出版社，2013. 8

ISBN 978-7-5487-0891-9

Ⅰ. 病... Ⅱ. 盘... Ⅲ. ①病原微生物－高等学校－教学参考资料②免疫学－高等学校－教学参考资料 Ⅳ. ①R37②R392

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013) 第 108932 号

病原生物与免疫学实训指导

盘 箐 主编

□**责任编辑** 李 娴
□**责任印制** 文桂武
□**出版发行** 中南大学出版社
社址: 长沙市麓山南路 邮编: 410083
发行科电话: 0731-88876770 传真: 0731-88710482
□**印 装** 湖南省地图出版社印刷厂

□**开 本** 787×1092 1/16 □**印张** 7 □**字数** 170 千字
□**版 次** 2013 年 8 月第 1 版 □2013 年 8 月第 1 次印刷
□**书 号** ISBN 978-7-5487-0891-9
□**定 价** 28. 00 元

图书出现印装问题，请与经销商调换

前　言

根据国务院学位委员会的指示，将原医学微生物学与人体寄生虫学学科合并为病原生物学学科。国内多所医学院校先后都做了相应的调整，成立与组建病原生物学教研室，并将两门课合并，开设病原生物学课。按教育部的意见，新一轮教学改革注重拓宽学生的知识面，最终要落实到培养适应新世纪需要的创建型、协作型、复合型人才。因此，我们联合了其他兄弟院校编写了病原生物学教材，为配合病原生物学教材的使用，我们特地编写了这本《病原生物与免疫学实训指导》，供高职院校医学生学习病原生物学实验课之用。本教材由医学微生物学实验、人体寄生虫学实验及医学免疫学实验三部分组成，希望通过实验课教学使学生了解和掌握病原生物学的基本实验技能操作和基本研究方法，同时也能获取相应的感性知识。本书旨在培养学生的思维能力和独立操作能力，在进行设计性实验课教学时，学生也能利用本实训指导作为工具，顺利地进行实验操作。为此目的，本书的每项实验目的及实际意义都有所阐述，对实验结果的观察与分析，也予以了必要的辅导。限于教学时数和条件，某些内容将以示教、电视或电影教学方式教学，这部分尤其需要加强复习，以弥补未能亲自操作之不足。有关实验课的改革设想，仍须不断地接受实践考验，发扬成绩克服缺点，以不断地充实和提高。

本实训指导由盘箐主编，全体教研室教师参加编写，我们认为本实训指导符合教学实际。但由于时间的紧迫，仍难免有不当之处，欢迎予以批评指正。

盘　箐

2013 年 7 月

目 录

第一章 绪论 …… (1)

第二章 医学微生物学实验 …… (3)

实验一 油镜的正确使用及细菌基本形态与特殊结构的观察 …… (3)
实验二 常用的细菌染色技术 …… (7)
实验三 细菌的人工培养 …… (12)
实验四 细菌的分布与消毒灭菌 …… (20)
实验五 细菌的药物敏感试验 …… (25)
实验六 真菌的基本形态及结构观察 …… (28)
实验七 病毒及其他病原微生物 …… (31)

第三章 医学免疫学实验 …… (34)

实验八 抗原抗体检测 …… (34)
实验九 免疫标记技术 …… (48)
实验十 超敏反应——家兔的过敏性实验 …… (50)

第四章 人体寄生虫学实验 …… (52)

实验十一 线虫 …… (52)
实验十二 吸虫 …… (61)
实验十三 绦虫和原虫 …… (71)
实验十四 医学节肢动物 …… (81)

附录一 常用培养基的制备和用途 …… (90)
附录二 常用染色液和试剂的配制 …… (93)
附录三 药敏试验结果解释标准 …… (96)
附录四 微生物绘图报告 …… (98)
附录五 寄生虫绘图报告 …… (101)
附录六 医学蠕虫比较表 …… (104)

此为试读,需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com

第一章　绪　论

一、实验目的与要求

(1) 通过实验验证理解并巩固理论知识，学习和掌握有关的实验操作技术，为以后的医学专业课学习打好基础。

(2) 实验课前做好预习，明确本次实验课的内容及其原理、方法及注意事项。

(3) 进入实验室要树立“有菌观点”，建立“无菌概念”，严格掌握无菌操作技术。

(4) 在实验过程中逐渐培养独立思考问题、分析问题和解决问题的能力；实验过程仔细认真，注意分工与协作，培养团队精神，提倡同学之间互帮互学。操作实验要按操作步骤进行，学会正确操作手法、准确记录实验结果。示教实验要注意观察，并记录好相关内容。实验完毕应自行分析实验结果，得出可能的结论，并总结实验中的体会和经验。除课堂做好实验记录及绘图外，还应按规定完成系统实验报告。

二、实验室规则及实验室意外处理方法

1. 微生物学实验室规则

由于病原微生物学实验是以病原微生物为研究对象，在实验过程中任何疏忽大意都有可能引起实验人员的自身感染或实验室和周围环境的污染。因此，实验中应严格遵守实验规则，建立无菌观念，严格无菌操作，防止实验过程中出现意外情况，并确保实验结果的准确。

(1) 试验前须预习实验内容，了解实验目的、方法和注意事项，做到心中有数，避免发生错误，提高实验效率。

(2) 进入实验室必须穿工作服，必要时还须戴口罩、帽子和手套，并做好实验前的各项准备工作。

(3) 除必要的书籍文具外，其他个人物品一律不得带入实验室，带入实验室的物品应远离操作区，放在指定的区域。

(4) 实验室内不准大声喧哗、嬉戏，应保持实验室的安静、整洁和有序。不准在实验室内吸烟、进食及与学习无关的其他活动。

(5) 未经老师许可，不得擅自搬动实验器材及示教物品，不准随意摆弄和旋转实验仪器上的开关及旋扭等。

(6) 实验中注意节约试剂，爱护仪器，注意用电安全及节约水电。避免有菌材料的污

染，如万一有菌液外溅、有菌材料污染桌面或衣物、割破手指等意外情况，应及时报告老师进行处理，切勿自作主张不按规定处理，防止自身感染及交叉污染。

(7) 实验中使用完毕的器材和试剂，必须放回规定的位置。废弃物必须按规定进行处理或归放于指定的容器内，不能随便乱丢乱放。需送温箱培养的物品，应标记清楚后送到指定地点。

(8) 实验完毕后应将桌面整理清洁，将实验器材放回原处，值日同学要搞好实验室的清洁卫生，保持室内整齐，并用浸有消毒液的抹布将操作台擦拭干净，离开实验室前要关好门窗、水、电，并将手洗干净。

(9) 未经许可，不得将实验室内任何物品带出实验室。

2. 实验室意外的紧急处理方法

(1) 发生皮肤破损或刺伤：首先用肥皂和水冲洗伤口，尽量挤出损伤处的血液，并用70%乙醇或其他皮肤消毒剂进行消毒，立即进行医疗处理。

(2) 化学药品腐蚀伤：若为强酸，用大量清水冲洗后再以5%碳酸氢钠溶液中和；若为强碱，用大量清水冲洗后再以5%醋酸或5%硼酸溶液中和；若受伤处是眼部，经上述方法处理后，再滴入橄榄油或液体石蜡1～2滴。

(3) 烧伤：局部涂凡士林、5%鞣酸或2%苦味酸软膏。

(4) 菌液误入口中：立即将菌液吐入消毒容器中，再用1∶1000高锰酸钾溶液或3%过氧化氢溶液漱口，根据菌种服用适当抗生素预防感染。

(5) 菌液污染环境：将适量2%～3%甲酚(来苏儿液)或0.1%苯扎溴铵(新洁尔灭)溶液浸泡污染面半小时后除去，如手上有菌污染，也可浸泡于上述消毒液中3～5分钟，之后用肥皂和清水洗净。

(盘　箐)

第二章　医学微生物学实验

实验一·油镜的正确使用及细菌基本形态与特殊结构的观察

【目的与要求】

(1) 熟悉微生物实验室规则并自觉遵守。

(2) 掌握光学显微镜油镜的正确使用和维护。

(3) 掌握细菌的基本形态及特殊结构。

(4) 学会将细菌培养物或含菌标本材料制备的染色标本片，置显微镜油镜头下，观察细菌的形状、大小、结构、排列及染色特性等，了解这些特征帮助临床鉴别各种细菌。

【实验原理】

微生物体积微小，且无色半透明，因此，对于微生物形态学的研究必须借助显微镜，才能比较清楚地进行观察，以普通光学显微镜(简称显微镜)最为常用，必须熟练掌握显微镜的使用，尤其是油镜镜头的使用与保护。

由于细菌个体小，必须使用90×或100×的物镜，以保证足够的放大倍数，同时保证足够的亮度，必须滴加香柏油(因香柏油与玻璃的折光率相近似)，由聚光器出来的光线通过玻璃和镜油，不发生折射，直接进入镜筒，增加进入镜头的光线，视野光亮度增强，物像清晰。

【实验材料与器械】

各种球菌、杆菌、弧菌、荚膜、鞭毛、芽胞的示教片；光学显微镜、载玻片、擦镜纸、香柏油、脱油剂(二甲苯)等。

【实验内容与步骤】

一、细菌基本形态和特殊构造的观察

(一) 细菌的基本形态(各种球菌、杆菌、弧菌等)(图2-1)

(1) 球菌：葡萄球菌革兰染色标本片——菌体正圆形，染成蓝紫色，呈现葡萄串状排列。

(2) 杆菌：大肠埃希菌革兰染色标本片——菌体短杆状，染成红色，呈分散排列。革兰阴性(G^-)杆菌。

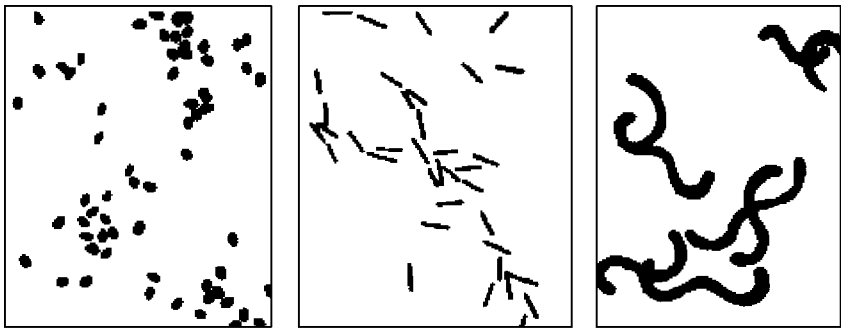

图 2－1　细菌的基本形态示意图

(3) 弧菌：霍乱弧菌革兰染色标本片——菌体弧形，染成红色，呈分散排列。G^-弧菌。

观察要点：注意细菌的染色性、相对大小、形状及排列方式。

(二) 特殊结构的细菌观察(荚膜、芽胞、鞭毛)(图 2－2、2－3、2－4)

(1) 荚膜：肺炎双球菌荚膜染色片——视野背景为红色，其中可见到染色呈深红色，矛头状菌体，纵向成双排列，菌体周围有未染上颜色的空白区，即荚膜。

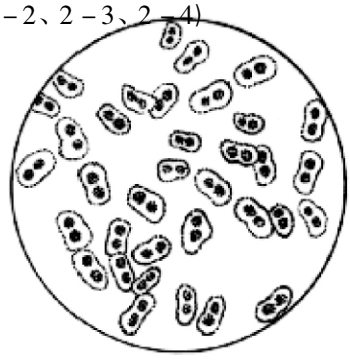

图 2－2　荚膜

(2) 鞭毛：伤寒沙门菌鞭毛染色片——菌体较粗大、杆状，染成蓝灰色，单个或成堆存在，周围可见到波浪状弯曲、较长、呈沙门灰色的鞭毛。

(3) 芽胞：破伤风梭菌芽胞染色片——菌体为细长杆状，顶端有染成红色、并大于菌体的球状物即芽胞，呈“鼓槌状”，其他散乱分布的红色球体，为菌体脱落的成熟芽胞。

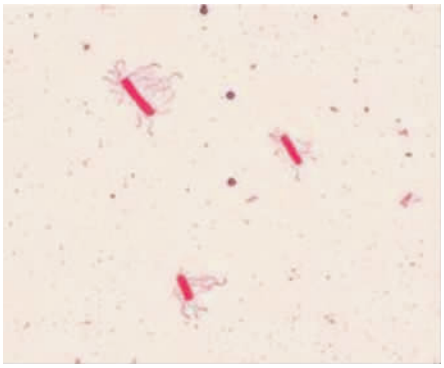

图 2－3　周鞭毛

图 2－4　芽胞

观察要点：注意这些特殊结构的细菌大小、形状及其在菌体中的位置，均有助于细菌的鉴定。

（三）其他病原菌观察

观察链球菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、大肠埃希菌、破伤风杆菌、伤寒沙门菌。

观察要点：注意这些细菌的染色性、相对大小、形状及排列方式。

二、光学显微镜油镜的使用

（一）光学显微镜的构造

光学显微镜是观察细菌形态最常用的一种仪器，其构造分为机械部分和光学部分。机械部分包括：镜座、镜臂、载物台、镜筒、镜头转换器、调焦装置等；光学部分包括：接物镜、接目镜、反光镜、聚光器、光圈等（图 2－5）。

显微镜的接物镜有低倍镜、高倍镜、油镜三种，放大倍数依次增高，其识别方法为：

（1）低倍镜：镜头标志为 10×或 10/0.25，镜头最短，其上常刻有黄色环圈。

（2）高倍镜：镜头标志为 40×或 40/0.65，镜头较长，其上常刻有蓝色环圈。

（3）油镜：镜头标志为 100×或 100/1.30，镜头最长，其上常刻有白色环圈，或“oil”字样。

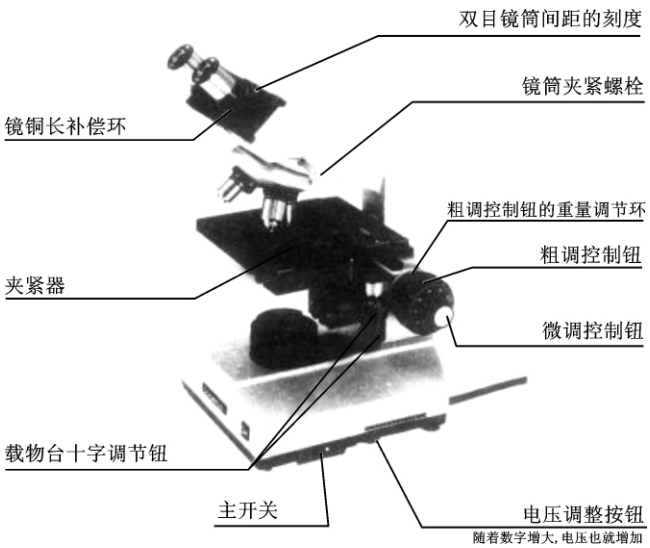

图 2－5　光学显微镜的构造

（二）油镜的使用原理

油镜的放大倍数高，其透镜孔最小，这样进入的光线就少，物体不易看清楚。同时自标本片透过的光线，因玻片和空气的折光率不同（玻璃 $n=1.52$，空气 $n=1.0$），部分光线经载玻片进入空气后发生折射，不能进入透镜，致使射入光线较少，物像更不清晰。因此，

使用油镜观察时，需要更多地增加进入镜头的光线。在油镜和载玻片之间滴加和玻璃折光率相近的香柏油($n = 1.515$) ，则使进入油镜的光线增多，视野光亮度增强，物像清晰(图 2 －6) 。

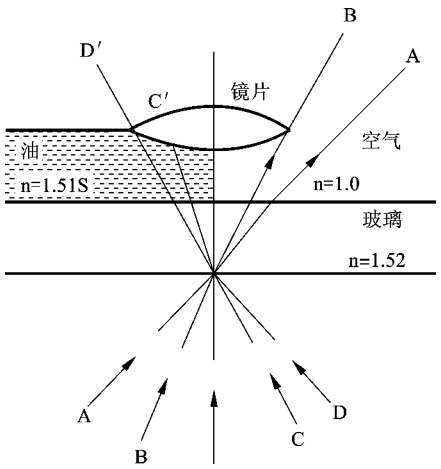

图 2 －6　显微镜油镜的使用原理

(三) 使用方法

(1) 采光: 使用显微镜时必须端坐，将显微镜放在胸前适当位置。将低倍镜转到中央并对准下面的聚光器，打开光圈，转动反光镜，使光线集中于聚光器(以灯光为光源时，使用凹面反光镜，以自然光为光源时用平面反光镜) 。根据所观察的标本，通过升降聚光器和缩放光圈以获得最佳光度。当用低倍镜或高倍镜观察时，应适当缩小光圈，下降聚光器; 当用油镜观察时，光线宜强，应把光圈完全打开，并将聚光器上升到最高位置。

(2) 低倍镜调焦: 将欲观察的标本置载物台上，用弹簧夹和推进器固定，将待检部位移至视野正中央，上升载物台至不能升高为止。用左眼观察接目镜，缓慢调节粗调节器，使载物台下降，待看到模糊的图像时，再调节细调节器，直至看到清晰的图像为止。

(3) 油镜的使用: 低倍镜找到物像并调至清晰之后，转开物镜头，在玻片的标本上滴加 1 滴香柏油，将油镜头转换至中央，缓慢调节粗调节器，使镜头浸入油中，当油镜头几乎接触玻片时停止转动(从侧面观察) ，边观察接目镜边轻轻转动粗调节器(此时只能上升镜头，不能下降，防止压坏玻片及损坏物镜) ，待看到模糊物像时改调细调节器，直至找到清晰物像。

镜检时应将标本按一定方向呈“弓”形移动，直至整个标本观察完毕，以防漏检。观察时应将两只眼睛同时睁开，左眼观察，右眼用于绘图或记录。标本观察完毕后，先将物镜头移开，再转动粗调节器使载物台下降，取下载玻片，立即用擦镜纸将镜头上的香柏油擦净。

(四) 油镜的保护

(1) 显微镜是贵重精密仪器，使用时要精心保护，不得随意拆散和碰撞。

(2) 取送显微镜时，右手持镜臂，左手托镜座，平端于胸前，然后轻放于桌面上或柜箱内。

(3) 油镜用毕，载物台下降，取出标本片，用擦镜纸将油镜上的油擦净(用擦镜纸蘸二甲苯擦试，再用擦镜纸擦去二甲苯) ，擦镜时应顺其直径方向擦，不要转圈擦。

(4) 不用时，将镜头转离聚光器，油镜头朝前呈“八”字形，降下聚光器，对号放入镜箱。标本片按规定擦去镜油，放入标本盒，如该标本片不再使用，则投入消毒缸内。

(5) 防止与强酸、强碱、乙醚、氯仿、乙醇等化学药品接触。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

【注意事项】

(1) 显微镜搬运时应右手紧握镜臂，左手稳托镜座，平端在胸前，轻拿轻放。

(2) 显微镜放到实验台上时，先放镜座的一端，再将镜座全部放稳，切不可使镜座全面同时与台面接触，这样震动过大，透镜和微调节器的装置易损坏。

(3) 避免强酸、强碱、氯仿、乙醚、乙醇等化学药品与显微镜接触，避免日光直射，显微镜须经常保持清洁，勿使油污和灰尘附着。

(4) 接目镜和接物镜不要随便卸下，必须抽取接目镜时，须将镜筒上口用布遮盖，避免灰尘落入镜筒内。更换接物镜时，卸下后应倒置在清洁的台面上，并随即装入木箱的置放接物镜的管内。

(5) 细调节器是显微镜最精细而脆弱的部分，不要向一个方向连续转动数周，应轻微地来回旋转。

(6) 镜头必须保持清洁，油镜使用完后应立即用擦镜纸拭去香柏油。若油镜镜头上的油迹未擦干净，应先将 1∶1 醇醚混合液或二甲苯滴在擦镜纸上擦拭镜头，再用干净擦镜纸将镜头上残留的醇醚混合液或二甲苯擦净。

(7) 显微镜擦净后，取下标本片，下降聚光器，再将物镜转成“品”字形，送至显微镜室，放入镜箱内。

【思考题】

(1) 使用油镜应注意哪些问题？观察细菌形态时应注意些什么？

(2) 细菌有哪些特殊结构？这些结构有什么医学意义？

(3) 绘图记录细菌的基本形态及镜下特殊结构的观察(图绘入附录四)。

(盘　箐)

实验二·常用的细菌染色技术

【目的与要求】

(1) 学习微生物的涂片、染色的基本技术，掌握细菌的常见染色方法。

(2) 了解革兰染色及抗酸染色的原理及其在细菌分类鉴定中的重要性。

(3) 巩固显微镜(油镜)的使用方法和无菌操作技术。

【实验原理】

染色法是利用染料对细菌进行染色的一种方法。此法操作简便，适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。常用碱性染料进行简单染色，这是因为，在中性、碱性或弱酸性溶液

中，细菌细胞通常带负电荷，而碱性染料在电离时，其分子的染色部分带正电荷(酸性染料电离时，其分子的染色部分带正电荷) ，因此碱性染料的染色部分很容易与细菌结合使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比，在显微镜下更易于识别。常用作简单染色的染料有: 美蓝、结晶紫、碱性复红等。

【实验材料与器械】

大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、卡介苗、草酸铵结晶紫液、卢戈碘液、95% 乙醇、石碳酸复红、3% 盐酸乙醇、碱性美蓝、载玻片、显微镜、乙醇灯、接种环、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸、木夹、玻璃缸、0.9% 氯化钠溶液(生理盐水) 等。

【实验内容与步骤】

一、革兰染色法

革兰染色法是细菌学中广泛使用的一种重要的鉴别染色法。1884 年由丹麦医师 Gram 创立。染色机制是利用两类细菌的细胞壁成分和结构不同。革兰阳性菌(G^+) (Gram-positive) 的细胞壁中肽聚糖的含量多，有 15 ~ 50 层，由聚糖骨架、四肽侧链和五肽交连桥三部分交织而成，成三维立体排列，结构致密，且脂质含量少，经乙醇或丙酮洗脱后，肽聚糖层的孔径变小，通透性降低，因此，细胞仍保留初染时的颜色; 而革兰阴性菌(G^-) (Gram-negative) 的细胞壁中含有较多的脂质，肽聚糖的含量较少，仅 1 ~ 2 层，肽聚糖仅由聚糖骨架和四肽侧链组成，成二维排列，结构疏松。当用乙醇或丙酮脱色时，脂质被溶解，增加了细胞壁的通透性，使初染后的结晶紫和碘的复合物易于渗出，结果细胞被脱色，经复染后，又染上复染液的颜色。根据染色结果将细菌分为两大类。一类经碱性染色剂结晶紫初染，再经碘液媒染(以增加染料与细胞的亲和力) 后，用脱色剂脱色，最后用复染剂复染，而能保留初染剂于细胞中，不受脱色剂的影响，最终被保留初染剂紫色颜色的细菌称为革兰阳性细菌(G^+) 。另一类则因脱色剂的作用而洗出结晶紫，然后被复染剂染色红色的细菌称为革兰阴性细菌(G^-) 。

(一) 操作步骤(图 2 - 7、2 - 8)

1. 涂片

取清洁无油污载物玻片一张，接种环沾取生理盐水 1 ~ 2 环置于玻片正中央，再将接种环火焰灭菌待冷后，从培养物中刮取少量的 12 ~ 24 小时金黄色葡萄球菌或大肠埃希菌菌苔，混于生理盐水中，涂抹区约拇指盖大，轻轻涂抹均匀，切记涂片不宜过厚，以免脱色不完全造成假阳性。

2. 干燥

室温自然干燥，也可将涂面向上，远离火焰上方微加温干燥(切勿加热过度，以防将标本烧枯) 。

3. 固定

标本干燥后，通过乙醇灯火焰三次(约2～3秒钟) ，以杀死细菌并使之固定于玻片上。

4. 染色

(1) 初染: 滴加结晶紫(以覆盖菌膜为宜) ，染色 1 分钟。倾去染液并用洗瓶装水轻轻冲洗，甩干。

(2) 媒染: 加卢戈碘液染色 1 分钟，水洗，甩干。

(3) 脱色: 将载玻片略倾斜，滴加95%乙醇脱色(洗至流下的乙醇中无颜色时为止) ，然后水洗，甩干。

(4) 复染: 加复红复染 1 分钟，水洗，用吸水纸吸干或烘干。

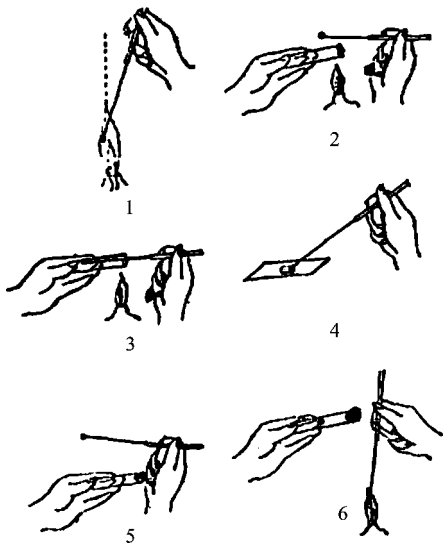

图 2－7　细菌取菌涂片

5. 镜检

干燥后用油镜观察，判断细菌的染色性。

6. 脱油、存放

对油镜镜头用二甲苯脱油，关显微镜开关，拔下插头归还显微镜，登记显微镜使用状况; 对使用后的玻片放到规定位置进行处理。

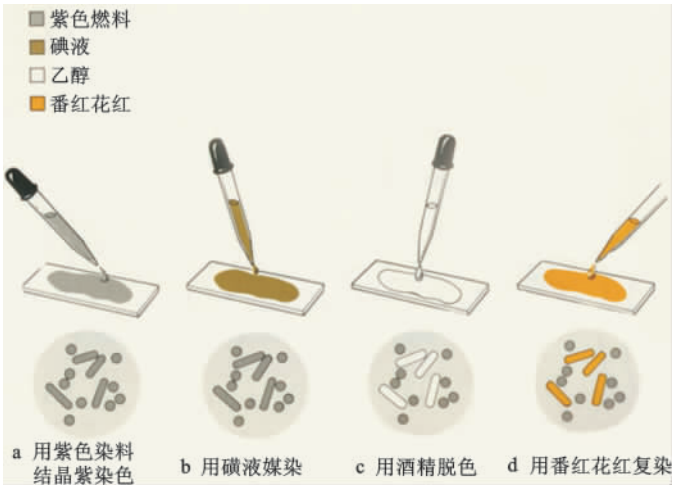

图 2－8　革兰氏染色步骤

(二) 染色结果

记录结果并绘图。菌体染成蓝紫色的是 G^+，染成红色的是 G^+(图 2－9、2－10、2－11) 。

图 2－9　革兰染色结果

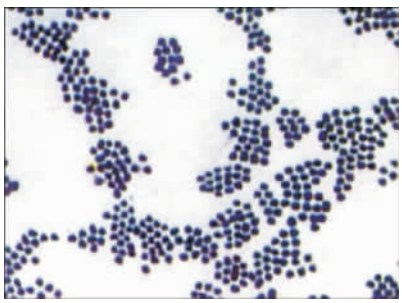

图 2－10　金黄色葡萄球菌

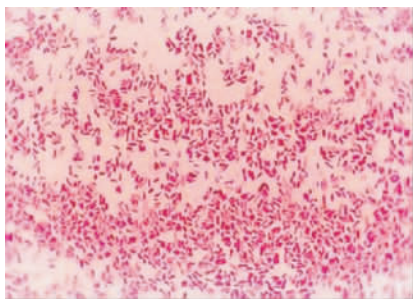

图 2－11　大肠埃希菌

二、抗酸染色法

抗酸染色法是 1882 年由埃利希(F. Ehrlich) 首创并经 F・齐尔(Ziehl) 改进而创造出的细菌染色法。染色机制是因分枝杆菌的细胞壁内含有大量的脂质，主要成分是分枝菌酸，包围在肽聚糖的外面，一般不易着色，要经过加热和延长着色时间来促使其着色。但分枝杆菌中的分枝菌酸与石碳酸复红(红色) 牢固结合形成复合物后，很难被酸性脱色剂(盐酸酒精，无色) 脱色，当再加碱性美蓝(蓝色) 复染后，分枝杆菌仍为红色，故名抗酸染色，该菌称抗酸杆菌，而其他细菌及背景中的物质因无抗酸能力，初染的红色被酸类所脱去，故被复染成蓝色。

(一) 操作步骤

1. 涂片

取清洁无油污载物玻片一张，用棉签沾取少量卡介苗稀释液置于玻片正中央，在载玻

片上涂开，涂抹区约拇指盖大，轻轻涂抹均匀，切记涂片不宜过厚，以免脱色不完全造成假阳性。用过的棉签及玻片应放到规定的空平皿内等待高压灭菌。

2. 干燥

室温自然干燥，也可将涂面向上，远离火焰上方微加温干燥(切勿加热过度，以防将标本烧枯) 。

3. 固定

标本干燥后，通过乙醇灯火焰三次(约 2 ~3 秒钟) ，以杀死细菌并使之固定于玻片上。

4. 染色

(1) 初染涂抹面用滤纸片盖上，然后往滤纸片上滴加石炭酸复红染液，使滤纸片完全被染液浸湿(以覆盖菌膜为宜) ，持玻片在小火上加温片刻然后离开火焰，此时可见到玻片上冒出蒸汽。待蒸汽消失后再加温，如此反复 3 ~4 次，约 5 分钟，加温时随时添加染液勿使纸片干涸，玻片冷却后，用接种环挑去滤纸扔到污物盆内，倾去染液并用流水冲洗玻片，甩干。

(2) 脱色滴加 3% 盐酸乙醇脱色，至涂抹均匀部位基本没有红色再脱下为止，然后水洗，甩干。

(3) 复染加碱性美蓝染液 1 分钟，水洗，用吸水纸吸干或烘干。

5. 镜检

干燥后用油镜观察，判断细菌的染色性。

6. 脱油、存放

对油镜镜头用二甲苯脱油，关显微镜开关，拔下插头归还显微镜，登记显微镜使用状况；对使用后的玻片放到规定位置进行处理。

(二) 染色结果

记录结果并绘图。菌体染成红色的是抗酸菌，染成蓝色的是非抗酸菌(图 2 – 12) 。

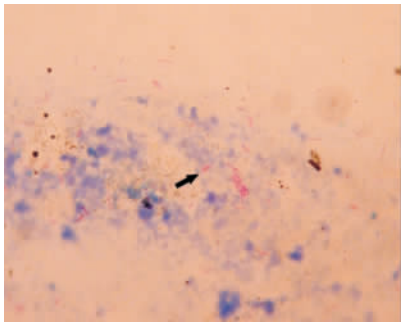

图 2 – 12　抗酸染色结果

【注意事项】

(1) 染色前必须固定细菌。其目的有二：一是杀死细菌并使菌体黏附于玻片上；二是增加其对染料的亲和力。

(2) 染色液必须覆盖所有菌膜。

(3) 火焰固定常常利用高温，手执载玻片的一端(涂有标本的远端) ，标本向上，在乙醇灯火焰外层尽快的来回通过 3 ~4 次，共约 2 ~3 s，时间长了菌膜会烧焦，时间短了固定不好，并不时以载玻片背面加热触及皮肤，不觉过烫为宜(不超过 60℃) ，放置待冷后，进行染色。

(4) 抗酸染色初染时，加热时间应维持 5 分钟，过程中勿使溶液沸腾烧干。制作涂片

时标本涂抹均匀，不要太厚或太薄。严格按照无菌操作程序完成染色过程。

(5) 标本脱色时把握好时间，否则影响染色效果。

(6) 革兰染色基本程序：制片→干燥→固定→初染→媒染→脱色→复染→镜检→脱油。

(7) 抗酸染色基本程序：制片→干燥→固定→初染→脱色→复染→镜检→脱油。

【思考题】

(1) 你认为制备细菌染色标本时，尤其应该注意哪些环节？操作中有哪些因素影响结果的正确性？

(2) 如果你的涂片未经热固定，将会出现什么问题？如果加热温度过高、时间太长，又会怎样呢？

(3) 你认为哪些环节会影响革兰染色结果的正确性？其中最关键的环节是什么？

(4) 进行革兰染色时，为什么特别强调菌龄不能太老，用老龄细菌染色会出现什么问题？染色中，哪一个步骤可以省去而不影响最终结果？在什么情况下可以采用？

(5) 抗酸染色过程中有哪些注意点？

(6) 简述抗酸染色法与革兰染色的区别。

(7) 绘图记录革兰染色及抗酸染色结果图(图绘入附录四)。

(唐鹏程)

实验三·细菌的人工培养

【目的与要求】

(1) 了解培养基的制备方法、种类和用途及细菌人工培养的方法和过程。

(2) 掌握细菌在各种培养基中的生长现象；细菌菌落的概念，熟悉菌落的特点。

【实验原理】

人工制备营养充足的培养基并提供适宜的温度、气体、pH 等培养条件，即能使细菌在体外环境迅速生长繁殖。细菌培养对临床上病原菌的分离鉴定、制备抗生素、制备疫苗等生物制品都是必不可少的。临床的痰、粪、浓汁等标本，常混杂有多种细菌，要从中找出病原菌，就必须通过平板划线接种细菌，使细菌在琼脂平板表面充分的分散开来，一种细菌就能固定在某一点生长，形成单个菌落。根据菌落的特征，可以发现病原菌，达到分离纯种的目的。有了纯种的细菌就可以扩大培养进行鉴定。

【实验材料与器械】

葡萄球菌和大肠埃希菌混合菌液、普通琼脂平板、枯草杆菌、链球菌培养物、肉汤培养

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com