

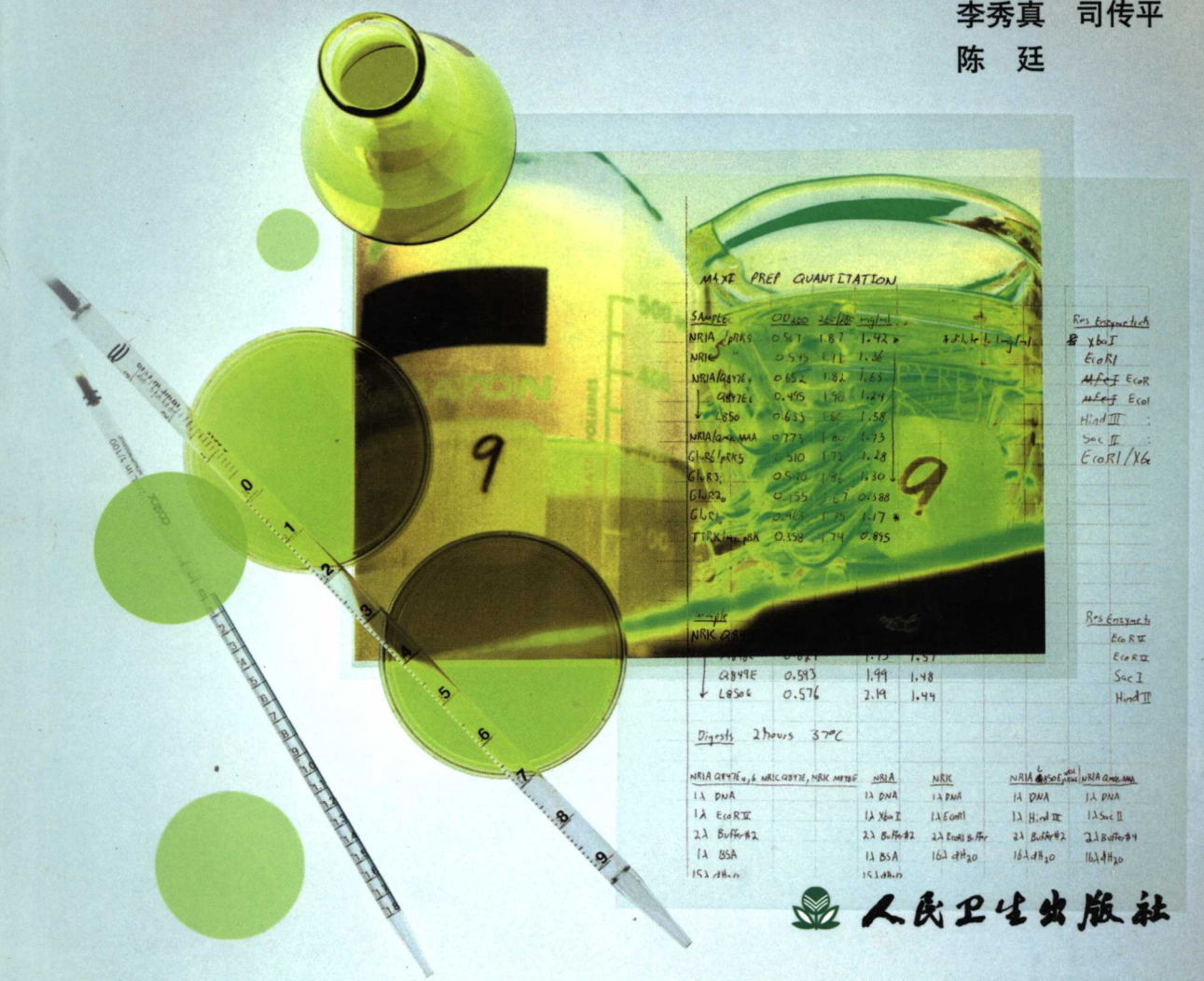
医学高等专科学校教材

医学微生物与免疫学

实验指导

供临床、护理、预防、检验、口腔医学类专业用

主编 山长武 台凡银
 副主编 吕厚东 罗新华
 李秀真 司传平
 陈廷



MAXI PREP QUANTITATION

SAMPLE	OD ₆₀₀	CFU/ml	Res Enzymes	
NRIA/pKRS	0.547	1.87	1.92	Res Enzymes XbaI
NRIE	0.545	1.11	1.36	EcoRI
NRIA/pG7E	0.652	1.82	1.63	MFEI EcoR
G87E	0.495	1.70	1.24	MFEI EcoI
L850	0.633	1.66	1.58	HindIII
NRIA/pGEMMA	0.773	1.60	1.73	Sac II
G186/pKRS	0.510	1.75	1.28	EcoRI/Xba
G183	0.540	1.36	1.30	
G1820	0.155	0.67	0.588	
G181	0.465	1.75	1.17	
TIRK/pKRS	0.338	1.74	0.875	

sample	NRIE	NRIE	NRIE	Res Enzymes
G87E	0.671	1.75	1.57	EcoRIE
G849E	0.583	1.99	1.48	EcoRIE
L850	0.576	2.19	1.44	Sac I
				HindII

Digests 2 hours 37°C

NRIA pG7E, G87E, NRIE pG7E, NRIE pKRS	NRIA	NRIE	NRIA pGEMMA	NRIA pGEMMA
1A DNA	1A DNA	1A DNA	1A DNA	1A DNA
1A EcoRIE	1A XbaI	1A EcoRI	1A HindIII	1A Sac II
2A Buffer #2	2A Buffer #2	2A EcoRI Buffer	2A Buffer #2	2A Buffer #1
1A BSA	1A BSA	1A dH ₂ O	1A dH ₂ O	1A dH ₂ O
15.1 dH ₂ O	15.1 dH ₂ O			

人民卫生出版社

医学高等专科学校教材
供临床、护理、预防、检验、口腔医学类专业用

医学微生物与免疫学 实验指导

主 编 山长武 台凡银
副主编 吕厚东 罗新华 李秀真
司传平 陈 廷

编 者 (按姓氏笔画排列)

山长武 (济宁医学院)	张业霞 (菏泽医学专科学校)
王宗军 (菏泽医学专科学校)	李秀真 (济宁医学院)
台凡银 (菏泽医学专科学校)	李 睿 (菏泽医学专科学校)
司传平 (济宁医学院)	陈 廷 (济宁医学院)
吕厚东 (济宁医学院)	罗新华 (南阳医学专科学校)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

医学微生物与免疫学实验指导/山长武等主编.

—北京: 人民卫生出版社, 2006. 6

ISBN 7-117-07548-1

I. 医… II. 山… III. ①医药学: 微生物学-实验-医学院校-教学参考资料②医药学: 免疫学-实验-医学院校-教学参考资料 IV. R3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 034849 号

医学微生物与免疫学实验指导

主 编: 山长武 台凡银

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 67616688)

地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

邮购电话: 010-67605754

印 刷: 北京市燕鑫印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 11.25

字 数: 261 千字

版 次: 2006 年 6 月第 1 版 2006 年 6 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-07548-1/R·7549

定 价: 19.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

高等专科学校临床医学专业 实验教材编写说明

医学是一门实践性较强的学科,不仅要求学生具有扎实的理论基础,同时要求学生具有较强的动手能力和严谨的科学态度。因此,加强实验教学,改革实验教学内容、体系和方法,培养能适应社会发展需要的高素质医学人才,已成为高等医学院校面临的重大课题。为此,我们组织部分院校编写了这套与全国医学高等专科学校规划教材相配套的临床医学专业实验教材。该套教材的编写,旨在进一步加强实验教学,规范实验教学内容,提高教学质量,为学生知识、能力、素质协调发展创造条件。

高等专科学校临床医学专业 实验教材目录

- | | | |
|------------------|----|---------|
| 1. 人体解剖学实验指导 | 主编 | 程田志 |
| 2. 药理学实验指导 | 主编 | 刘善庭 徐持华 |
| 3. 医学微生物与免疫学实验指导 | 主编 | 山长武 台凡银 |
| 4. 生物化学实验指导 | 主编 | 罗德生 |
| 5. 组织学与胚胎学实验指导 | 主编 | 崔运河 齐云飞 |
| 6. 生理学实验指导 | 主编 | 张艳霞 |
| 7. 病理学实验指导 | 主编 | 周琪 崔文 |
| 8. 医学技能学实验指导 | 主编 | 伊廷夫 赵惟呈 |

[前 言]

实验教学是体现三基（基础理论、基本知识、基本技能）中基本技能的主要手段，它是加深和验证基础理论和基本知识的唯一途径，是提高教学质量的重要环节。根据临床医学专科医学微生物学、医学免疫学教学要求及培养目标，在总结多年实验教学的基础上，并参考兄弟院校的成熟经验，我们编写了《医学微生物与免疫学实验指导》一书。

《医学微生物与免疫学实验指导》涵盖了专科和本科医学微生物学与免疫学教材中所要求的实验内容，部分内容并有所创新。本书以其实用性、科学性、先进性为原则，它不但能满足各层次学生实验要求，还增设了有关分子生物学实验内容及“各种临床标本的微生物学检查”，更提高了它的实用价值。每项实验都分别介绍“实验目的”、“实验用品”、“实验原理及实验方法”。对于操作复杂、难度较高的实验项目，还专门增设了“注意事项”。

本书中各实验相对独立，在教学过程中可根据各学校学时分配、专业层次而选择相应实验内容。本书亦可作为从事相关专业的教师、科技工作者和临床检验人员的参考用书。在参编人员所在院校领导的支持、关注和出版社的大力支持帮助下，本书得以出版，在此表示衷心的感谢。

由于时间仓促，各校实验条件不同，专业有别、层次不一，特别是我们的编写能力有限，考虑不周，错误在所难免，恳请同道及使用者提出宝贵意见。

山长武

2006年4月

[目 录]

第一章	实验的目的要求及实验室规则	1
第二章	医学微生物学基础	2
	实验一 显微镜油镜的使用	2
	实验二 细菌的形态结构观察	3
	实验三 细菌不染色标本观察法	4
	实验四 细菌涂片标本的制备及常用染色方法	4
	实验五 显微测微尺与血球计数板的使用	10
	实验六 常用培养基的制备	12
	实验七 细菌的培养及生长现象	22
	实验八 细菌的代谢产物检查	26
	实验九 自然界与人体的细菌检查	29
	实验十 消毒灭菌法	30
	实验十一 细菌的药物敏感性试验	33
	实验十二 噬菌体分离鉴定与特异性溶菌试验	34
	实验十三 细菌的变异性试验	36
	实验十四 细菌的致病性试验	39
第三章	细菌各论	42
	第一节 病原性球菌	42
	实验一 葡萄球菌属	42
	实验二 链球菌属	45
	实验三 奈瑟菌属	50
	第二节 肠道杆菌	53
	实验一 大肠埃希菌属	53
	实验二 沙门菌属	55
	实验三 志贺菌属	58
	实验四 霍乱弧菌	59
	实验五 幽门螺杆菌	62
	实验六 弯曲菌属	64
	第三节 厌氧菌	65
	厌氧芽胞梭菌	65
	第四节 呼吸道感染细菌	67
	实验一 结核分枝杆菌的分离鉴定	67

实验二 白喉杆菌的分离与鉴定	69
第五节 动物源性细菌	72
实验一 炭疽芽胞杆菌	72
实验二 布鲁菌属	74
第六节 真菌及其他微生物	75
实验一 立克次体形态观察	75
实验二 梅毒螺旋体形态观察	75
实验三 口腔螺旋体镀银染色法	75
实验四 PCR 技术	75
实验五 真菌的检测	76
第四章 病毒	78
第一节 病毒的形态观察	78
第二节 病毒培养法	78
实验一 鸡胚培养法	78
实验二 组织培养法	79
实验三 动物接种法	79
第三节 病毒的检测技术	81
实验一 间接免疫荧光试验	81
实验二 间接酶联免疫吸附试验	82
实验三 病毒血凝及血凝抑制试验	83
实验四 乙型肝炎病毒表面抗原反向间接血凝检查法	85
实验五 反向被动血凝抑制试验	86
实验六 Southern 印迹试验	87
实验七 免疫印迹法	89
第五章 各种临床标本的微生物学检查	93
实验一 血液标本中常见病原微生物的分离鉴定	93
实验二 粪便标本中常见病原微生物的分离鉴定	96
实验三 尿液标本中常见病原微生物的分离鉴定	100
实验四 生殖道标本中常见病原微生物的分离鉴定	103
实验五 痰液及呼吸道标本中常见病原微生物的分离鉴定	106
实验六 脓汁标本中常见病原微生物的分离鉴定	109
实验七 脑脊液标本中常见病原微生物的分离鉴定	111
实验八 穿刺液标本中常见病原微生物的分离鉴定	113
第六章 医学免疫学实验	115
实验一 免疫器官	115
实验二 抗原与免疫血清的制备	115
实验三 凝集反应	123
实验四 沉淀反应	126
实验五 常用免疫标记技术	130

实验六	补体的测定技术·····	137
实验七	免疫细胞检测技术·····	141
实验八	细胞因子的检测·····	153
实验九	HLA 分型技术 ·····	156
实验十	红细胞免疫功能的检测·····	158
实验十一	超敏反应性疾病及检测·····	162
实验十二	机体天然防御因素·····	167
实验十三	生物制品·····	169

第一章 实验的目的及要求 实验室规则

一、实验的目的要求

医学微生物学实验和免疫学实验是医学微生物学和免疫学教学过程中的重要环节之一，是理论与实验研究的技术基础。

通过实验，加深、巩固对理论内容的理解与记忆；学习、掌握有关医学微生物学的基本操作技术，树立无菌观念；更重要的是通过实验培养学生实事求是的科学的态度和独立分析问题与解决问题的能力。为对有关疾病的诊断与防治，对医学微生物学与免疫学的科学研究工作所必要的实验方法及技术打下一定的基础。特别是通过实验，使学生熟练地掌握普通光学显微镜、涂片染色、分离接种与血清稀释方法等基本操作技术。

实验形式分教师示教和学生操作两种。前者主要验证理论，后者可从不同角度进行基本技术训练和反复练习，掌握基本技能。

为了提高实验课效果，保证实验课质量，要求学生做到：

1. 实验前必须做好预习，以了解实验的内容、目的、理论依据、操作方法及注意事项，避免或减少错误的发生。
2. 实验过程中坚持严肃性、严格性与严密性，对操作的实验要在全面理解的基础上，按步骤依次进行操作，并进行积极地思考；对示教内容要仔细观察并与有关理论密切联系。
3. 如实记录、分析结果，得出结论。如结果与理论不符，应分析、探讨其原因以培养训练自己的思维能力，最后写出实验报告。

二、实验室规则

1. 进入实验室要穿工作服，除必需的书藉、文具外，其他一切物品不得带入实验室。
2. 实验室要保持安静，不得高声喧哗和过多的走动，严禁在实验室内抽烟、吃东西。
3. 实验操作严格按实验指导和老师的讲授进行，以期获得正确的结果。
4. 用过的带菌材料、器材（吸管、试管、玻片等）应放入指定的消毒缸内。
5. 如有传染性材料污染桌面、地面、书藉和衣物时，应立即报告老师，以便及时处理。
6. 爱护国家财产，节约实验用品，损坏器材应主动报告登记。
7. 实验完毕，应清洁整理桌面，打扫卫生，用消毒液和肥皂洗手，关闭水管、电源、门窗后方可离开实验室。

第二章 医学微生物学基础

实验一 显微镜油镜的使用

【实验目的】

1. 熟悉光学显微镜的结构
2. 掌握油镜的使用原理及使用方法

【实验用品】

1. 器材：普通光学显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸
2. 标本：细菌革兰染色玻片标本、大肠杆菌 24h 培养液

【实验原理】 细菌个体微小，肉眼不能看见，必须借助于普通光学显微镜将其放大 1000 倍左右才能看清。光学显微镜利用透镜的放大原理，故放大倍数与透镜的大小有关。油镜的透镜小，镜孔也小，观察时由于聚光器聚集的光源要通过载玻片、空气才能进入物镜中，玻璃与空气的折光率不同，产生折射，进入物镜的光线减少，致使观察视野暗淡，物象不清。如在油镜与玻片中间加入和玻璃折光率（ $n=1.52$ ）相仿的香柏油（ $n=1.515$ ）则可减少折射，增加视野光线亮度，提高分辨率，如图 2-1。

【使用方法】

1. 油镜辨认

- (1) 镜头孔径最小。
- (2) 油镜头下缘一般刻有一圈红线或黑线，并有 100x (90x、95x) 等标志。

2. 具体应用

(1) 双手托持显微镜，轻放于自己面前的试验台上，镜座距实验台边缘约 5 厘米。显微镜应直立于桌上，勿使镜臂倾斜，避免油滴外溢，影响观察。

(2) 先用低倍镜对光，光源多采用间接日光或灯光，用低倍镜对光时，应适当缩小光圈使光线减弱。使用油镜时，使聚光器与载物台相平，将反光镜对准光源（自然光线用平面镜，人工光源用凹面镜），将光圈完全打开以增大射入光线的强度。

(3) 加镜油：在标本片的预检部位加一滴香柏油（勿使油棒与标本片接触），再将标本片置于载物台上，用弹簧架固定。

(4) 将预检部位移置于物镜下，先用低倍镜找到适宜视野，再换用油镜。眼睛从镜

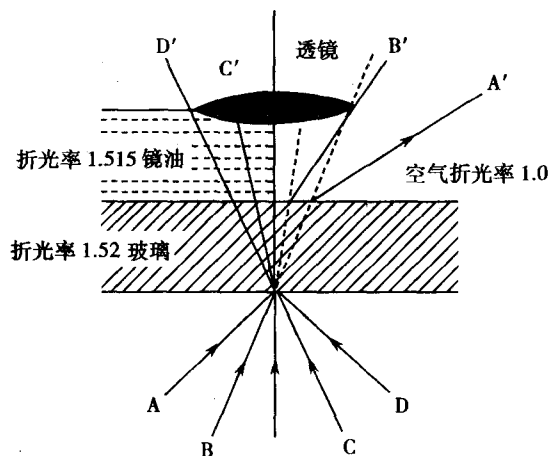


图 2-1 油镜加香柏油的原理

筒侧面注视油镜头，小心转动粗调节器，使镜头缓慢下降并浸入油中至几乎与玻片接触为止，切勿相撞，以免压坏镜片。

(5) 从目镜观察，慢慢转动粗调节器，使镜头缓缓上升。当见到模糊物象时，立即停止，再用细调节器上下调节，直到物象清晰为止。

(6) 镜检完毕，转动粗调节器使油镜上升，用擦镜纸轻轻顺一个方向擦去油渍，再用擦镜纸蘸少许二甲苯擦拭，立即用擦镜纸擦干。

(7) 取下标本片、下降聚光器、竖起反光镜、转动旋转盘，将物镜摆成低倍镜向前，高倍镜与油镜头各向两侧的位置。擦掉载物台上的油渍，下降镜筒，双手托持显微镜，放入镜箱中。

【注意事项】

1. 显微镜是贵重精密仪器，使用时要精心爱护，不得随意拆装和碰撞。
2. 取送显微镜时应轻拿轻放，双手托持，一手握镜柱，一手托镜座，防止因震动受损。
3. 显微镜的调节器是精密而脆弱的部分，只能做有限的旋转，当旋转感到有阻力则表明已达极限，绝不能再继续向此方向旋转，必须立即向反方向旋转退回。
4. 油镜用完后一定要擦拭，以防油干而影响其使用寿命。
5. 使用油镜时，一定要等标本干后才能加香柏油，滴镜油时避免形成气泡。
6. 显微镜应放置在背阴干燥处，以防止透镜生霉。

实验二 细菌的形态结构观察

【实验目的】

1. 熟悉细菌的基本形态
2. 了解细菌的特殊结构，明确特殊结构在医疗实践中的意义

【实验用品】 革兰染色标本片：

1. 球菌：葡萄球菌、链球菌、淋球菌、脑膜炎双球菌
2. 杆菌：大肠杆菌
3. 弧菌：霍乱弧菌

特殊结构标本片：

1. 鞭毛：变形杆菌、伤寒杆菌、霍乱弧菌
2. 荚膜：肺炎链球菌、产气荚膜杆菌
3. 芽胞：破伤风杆菌、炭疽杆菌

其他材料：香柏油、二甲苯、擦镜纸

【实验方法】

1. 用油镜观察上述革兰染色标本片，认识细菌的三种基本形态。观察时要注意细菌的形态、大小、排列及染色性。

2. 观察细菌的特殊结构标本片

肺炎链球菌与产气荚膜杆菌的荚膜（荚膜染色法），注意观察菌体及荚膜的染色、形态特点。伤寒杆菌与霍乱弧菌鞭毛（鞭毛染色法），注意观察菌体与鞭毛的染色、形态特点，鞭毛的数目、长短、位置。

破伤风杆菌及炭疽杆菌芽胞（芽胞染色法），注意观察菌体、芽胞的形态与染色及芽胞在菌体中的位置。

实验三 细菌不染色标本观察法

【实验目的】

1. 了解细菌不染色标本的观察方法。
2. 观察活细菌的形态及运动情况。

【实验原理】 有鞭毛的细菌在液体培养基中从一处游到另一处，而无鞭毛的细菌无动力，受到分子的冲击，只发生分子颤动，以此可观察了解细菌的运动能力。

【实验用品】

1. 菌种：变形杆菌及葡萄球菌 8~12h 肉汤培养物
2. 器具：盖玻片、载玻片、凹玻片
3. 试剂：凡士林

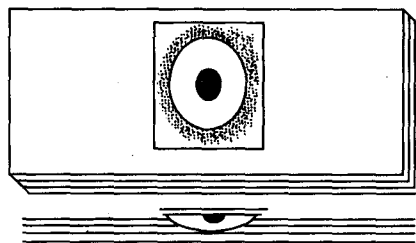
【实验方法】

1. 悬滴法：

(1) 取盖玻片一张，用取菌环取变形杆菌肉汤培养物一滴置于盖玻片中央，盖玻片四角涂少许凡士林。

(2) 使凹玻片反转，使凹窝对准盖玻片中央，粘住盖片后反转，使标本成悬滴（图 2-2）。

(3) 先用低倍镜找到悬滴边缘后，再换用高倍镜观察（因凹玻片较厚而油镜焦距很短，故一般不用油镜观察）。



上：正面 下：侧面

图 2-2 悬滴法

2. 压滴法：

(1) 用接种环取变形杆菌、葡萄球菌菌液 2~3 环，置于载玻片中央。

(2) 用镊子夹住盖玻片，覆盖在菌液上，放置时，先使盖玻片一端轻触菌液，缓缓放下，以免产生气泡。

(3) 先用低倍镜找好位置，再换高倍镜观察。

【实验结果】 无论是悬滴法还是压滴法，均可见到有鞭毛的细菌（变形杆菌）发生位移现象，而没有鞭毛的细菌（葡萄球菌）不发生位置变化。

实验四 细菌涂片标本的制备及常用染色方法

一、涂片标本的制备

【实验目的】

- (1) 正确掌握细菌涂片标本的制备。
- (2) 熟悉涂片固定的目的和注意事项。

【实验材料】

- (1) 细菌培养物或临床标本。

(2) 器具：玻片、取菌环、生理盐水等。

【实验方法】

(1) 涂片：取洁净的载玻片一张，于玻片两端各加一滴生理盐水。取菌环灭菌后，取葡萄球菌斜面培养物少许与盐水混匀，涂成均匀薄膜。同法将大肠杆菌涂于玻片的另一端盐水中制成涂片。如用液体材料（液体培养物、痰、尿液、脓汁等）可直接涂片，不必加生理盐水（图 2-3）。

(2) 干燥：涂片最好在室温下自然干燥，必要时可将涂片膜面向上，小心间断地略烘，以助水分蒸发，但切勿紧靠火焰，以免涂膜烤枯，染色后难以检测。

(3) 固定：涂片干燥后，手持玻片一端（涂膜面向上）在酒精灯上快速地来回通过火焰三次，约 2~3s，注意温度不可太高，以玻片涂膜的反面触及皮肤时觉烫而尚能忍受为度。固定的目的—是杀死细菌；二是使菌体与玻片粘附牢固，在染色时不致被染液和水冲掉；三是使菌体蛋白变性易着色。

【注意事项】 无论何种染色，在标本的制备时，涂片不可过厚，一定要涂成薄膜。

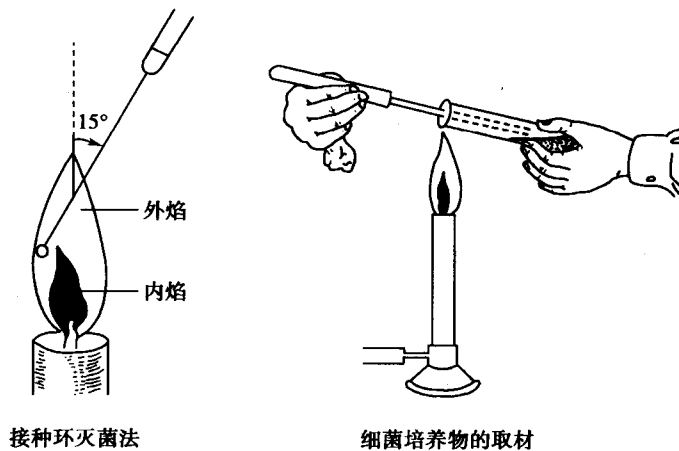


图 2-3 细菌涂片的制作

二、常用染色法

(一) 革兰染色法

革兰染色法 (Gram stain) 是丹麦细菌学家革兰 (Christain Gram) 于 1884 年发明的，至今已逾百年，但仍在广泛使用，是细菌学中最为经典的染色法。此法可将细菌染成两大类：革兰阳性菌和革兰阴性菌，这对于鉴别细菌、研究细菌的致病性、选择敏感的抗生素均有一定的意义。

【实验目的】

1. 掌握革兰染色的方法。
2. 熟悉革兰染色的意义。

【实验原理】 革兰染色法的原理目前尚不完全清楚，主要有三种学说：

1. 等电点学说：革兰阳性菌等电点 ($pH2\sim3$) 比革兰阴性菌 ($pH4\sim5$) 低，一般染色时染液的酸碱度在 $pH7.0$ 左右，电离后阳性菌所带负电荷比阴性菌多，因此与带

正电荷的结晶紫染料结合牢固，不易脱色。

2. 通透性学说：革兰阳性菌细胞壁结构比较致密，肽聚糖层厚，脂质含量少，乙醇不易透入，反而可使细胞壁脱水而形成一道屏障，阻止染料向细胞外渗。革兰阴性菌细胞壁疏松，肽聚糖层很薄，而外膜、脂蛋白、脂多糖均含大量脂质，易被乙醇溶解，使细胞壁通透性增加，细胞内的结晶紫-碘复合物容易被乙醇溶解而脱出。

3. 化学学说：革兰阳性菌细胞内含有某些特殊化学成分，一般认为是核糖核酸镁盐与多糖的复合物，它和染料与媒染剂复合物相互结合，使已着色的细菌不易脱色。

【实验材料】

1. 菌种：葡萄球菌、大肠杆菌琼脂斜面培养物
2. 染液：结晶紫、碘液、95%酒精、稀释复红
3. 其他：载玻片、生理盐水、酒精灯、取菌环、镜油等

【实验方法】

1. 初染：在已固定的细菌涂片上滴加结晶紫染液 2~3 滴，染 1min，用水冲洗。
2. 媒染：滴加媒染剂碘液数滴，1min 后用水冲洗。
3. 脱色：滴加 95%酒精脱色，轻轻摇动玻片几秒钟，使均匀脱色，直至无紫色脱落为止（约 30s），并立即用水冲洗。
4. 复染：滴加稀释复红复染约 30s 后用水冲洗。
5. 镜检：标本染色后，凉干或吸水纸吸干，油镜观察。
6. 结果：染成紫色的为革兰阳性菌，染成红色的为革兰阴性菌。

【注意事项】 革兰染色时，关键的环节是脱色，脱色不够，革兰阴性菌可染成阳性菌，脱色过度，革兰阳性菌可呈现阴性菌，恰当的脱色须通过实践掌握。

(二) 抗酸染色法

分枝杆菌属中的细菌（结核杆菌、麻风杆菌）含脂质多，一般染色法不易着色，须用抗酸染色法。抗酸染色法能将细菌分为两大类，即抗酸性细菌和非抗酸性细菌。但抗酸性细菌种类较少，大多数细菌均为非抗酸性细菌，故一般仅在怀疑抗酸性细菌时采用，抗酸染色法（acid-fast stain）不作为常规检查。

【实验目的】

1. 掌握抗酸染色的原理
2. 熟悉抗酸染色的过程

【实验材料】

1. 标本：疑似肺结核病人的晨痰。
2. 染液：石炭酸复红、3%盐酸酒精、美兰染液等。
3. 其他：载玻片、香柏油、二甲苯等。

【实验方法】

1. 涂片：用牙签沾取痰液或干酪坏死痰块，涂在玻片上。
2. 干燥、固定：同革兰染色。
3. 初染：滴加石炭酸复红染液于涂膜上，在火焰高处徐徐加热直至有蒸气出现（切不可煮沸），维持 5min。待载玻片冷却后，水洗。
4. 脱色：加入 3%盐酸酒精脱色，轻轻晃动玻片，直至无红色染液流下为止，一般

需 1~2min, 然后水洗。

5. 复染: 用碱性美兰液复染 1min 水洗, 干后油镜检查。

6. 结果: 油镜观察, 结核杆菌等抗酸性细菌染成红色, 非抗酸性细菌 (非结核菌) 及标本中其他细胞等均染成蓝色。

三、特殊染色法

(一) 鞭毛染色法

【实验原理】 细菌的鞭毛细长, 直径约 10~20nm, 光学显微镜不能直接观察到。但如用特殊染色, 使媒染剂大量沉积在鞭毛上, 使其变粗, 则在光学显微镜下也可看到。碱性复红 (或结晶紫) 作为主要染料, 而单宁酸为媒染剂。

【实验材料】

1. 变形杆菌 6~8h 的琼脂培养物。
2. 鞭毛染色液。
3. 蒸馏水。
4. 其他: 载玻片、取菌环等。

【实验方法】

1. 鞭毛菌的培养及标本片制备: 先将鞭毛菌 (变形杆菌、伤寒杆菌) 每日在肉汤培养基中移种一次, 共 7 次。取琼脂斜面培养基一支, 加入无菌生理盐水 2ml, 用取菌环取上述菌液至琼脂斜面边缘再由该处向上划线接种。37℃ 培养 6~16h。以取菌环取交界处菌液一环, 轻轻放在盛有 3~4ml 蒸馏水的平皿表面, 待细菌自由扩散在液体表面, 静置 4~5min, 用取菌环由上述液面轻轻挑取一环菌液, 放在洁净无油脂玻片上, 切勿研磨, 置室温自然干燥, 或 37℃ 温箱内烘干 (切勿火焰固定)。

2. 染色镜检: 在干燥标本片上滴加染液 1~2 滴, 使覆盖于薄膜, 作用 1~2min 后, 轻轻水冲, 干后镜检。

3. 染色结果: 菌体染成红色或深紫色, 鞭毛淡红色或淡紫色。

【注意事项】 鞭毛染色时, 单宁酸及钾明矾必须加温溶解, 否则染色不佳。以新配的染液为好, 但新配染液, 染色时间不能过长, 否则会出现许多黑点。

(二) 芽胞染色法

【实验原理】 芽胞具有高度的折光性, 外膜致密, 渗透性低, 故普通染色法不易使其着色, 若加温使其渗透性增强, 可以吸收碱性染料而着色, 着色后一般不易被脱色。

【实验材料】

1. 菌种: 破伤风杆菌 48~72h 培养物。
2. 染料: 石炭酸复红、碱性美兰、95% 酒精。

【实验方法】

1. 涂片: 取芽胞菌培养物涂片, 自然干燥, 火焰固定。
2. 染色: 滴加石炭酸复红染液于涂片上, 并用弱火加热, 使冒蒸气, 持续约 5min, 冷后水洗。再用 95% 酒精脱色 2min, 水洗。碱性美兰复染 1min, 水洗。
3. 结果: 油镜观察, 菌体为蓝色, 芽胞为红色。

(三) 荚膜染色法

【实验原理】 荚膜为细菌细胞壁外围的粘液层，对染料的亲和力很低，用一般染色方法不易着色，而一旦着色又难以脱色。通过荚膜染色法，方能清晰辨认出荚膜。

【实验材料】

1. 菌种：肺炎链球菌。
2. 荚膜染色液。

【实验方法】

1. 涂片：取死于感染肺炎链球菌的小白鼠的心脏血或腹腔液涂片，室温中自然干燥、固定。
2. 染色：加 1% 结晶紫，在火焰上略微加热至产生蒸气为止。
3. 用 20% 硫酸铜冲洗涂片上的染料至无色为止。
4. 用滤纸吸干、镜检。
5. 结果：菌体染成紫色，荚膜无色或显淡紫色。

(四) 异染颗粒染色法

【实验目的】

1. 掌握白喉杆菌的形态特点
2. 了解异染颗粒染色的意义

【实验原理】 异染颗粒是白喉杆菌细胞浆中对碱性染料着色较深的结构，也称迂回体。其主要成分是核糖核酸和多磷酸盐。异染颗粒是白喉杆菌的主要形态特征，具有重要的鉴别意义。

【实验材料】

1. 白喉杆菌培养物。
2. 奈瑟法染液、阿伯法染液。

染色方法：

奈瑟（Neisser）法

1. 涂片、干燥、固定。
2. 甲液染色 30Sec。
3. 轻轻水洗。
4. 乙液复染 1min。
5. 水洗、干后油镜检查。

结果：菌体染成黄褐色，异染颗粒染色。

阿伯（Albert）法：

1. 涂片、干燥、固定。
2. 阿伯氏甲液染 3~5min，水洗。
3. 乙液染 1min，水洗。
4. 滤纸吸干，油镜检查。

结果：菌体呈绿色，异染颗粒呈深蓝色。

【注意事项】

1. 水洗要轻，水流不要太急。

2. 奈瑟法中混合之甲液可较长时间保存。

(五) 瑞特 (Wright) 染色法:

【实验材料】

1. 瑞特染液、蒸馏水
2. 器材: 载玻片、取菌环等

【染色方法】

1. 涂片在室温下自然干燥。
2. 加染液染色 1min。
3. 加等量蒸馏水, 轻轻晃动混匀, 继续染 5min 后水洗。用吸水纸吸干后镜检。
4. 结果: 细胞浆染成蓝色, 细胞核染成浅紫色, 红细胞染成浅红色。

四、染色液的配制

(一) 革兰染色液

1. 结晶紫染液: 结晶紫 14g 溶于 100ml 95% 酒精中, 配成结晶紫酒精饱和溶液, 取此饱和溶液 20ml 与 1% 草酸铵溶液 20ml 混合即成。
2. 碘液: 先将碘化钾 2g 溶于 2ml 蒸馏水中, 再加碘片 1g, 轻轻振摇, 使之溶解后加蒸馏水至 300ml。
3. 稀释复红染液: 取碱性复红 10g 溶于 100ml 95% 酒精中, 配成碱性复红饱和液, 取该液 10ml 与 90ml 15% 石炭酸溶液混合, 配成石炭酸复红液。取石炭酸复红液 10ml 加蒸馏水 90ml 混匀, 即成稀释复红液。

(二) 抗酸染色液

1. 石炭酸复红液 (见革兰染液的配制)
2. 3% 盐酸酒精: 取浓盐酸 3ml 与 95% 酒精 97ml 混合。
3. 碱性美兰液: 取美兰 0.3g 溶于 95% 酒精 30ml 中, 再加蒸馏水 100ml 及 10% 氢氧化钾水溶液 0.1ml 即成。

(三) 鞭毛染色液

1. 甲液: 钾明矾饱和液 2ml, 5% 石炭酸复红 5ml, 20% 鞣酸 2ml, 相互混合。
 2. 乙液: 碱性复红酒精饱和液。
- 注: A 使用前将甲液 9 份, 乙液 1 份混合过滤。

B 碱性复红饱和液: 碱性复红 4g 溶于 95% 酒精 100ml 混合。

(四) 芽胞染色液

1. 孔雀绿 10g 溶于 200ml 蒸馏水中。
2. 稀释复红溶液: 见革兰染色液的稀释复红配法。

(五) 荚膜染色液

1. 结晶紫酒精饱和溶液: 结晶紫 14g 溶于 95% 酒精 100ml。
2. 20% 硫酸铜溶液: 硫酸铜 20g 溶于 100ml 蒸馏水中。

(六) 瑞特染色液

1. 瑞特染粉 0.1g
2. 甲 醇 60.0ml