

微生物实验技术

白毓谦 方善康 高 东 施安辉

山东大学出版社

内 容 简 介

本书概括了微生物实验的全部技术。全书既有微生物实验的基本技术,如显微技术,各种染色、灭菌与除菌、各种培养基的制备、各类微生物的分离、接种、培养、保种等基本操作技术,微生物生理、生化、遗传、育种、噬菌体的研究方法。同时也介绍了近代微生物实验的新技术,如显微操纵单细胞分离、细胞融合、GC含量测定、免疫电泳、固相化酶与固相化细胞、液氮超低压冻结保藏菌种等。本书附有部分操作示意图和必要的插图一百余幅,并备有附录。

本书可做综合性大学生物系、微生物系的教科书,师范、农林、轻工、医药等大专院校师生以及从事基础、工业、农业、医药微生物科技人员的参考书。

微生物实验技术

白毓谦 方善康 高 东 施安辉 编著

山东大学出版社出版

山东省新华书店发行 山东寿光县印刷厂印刷

开本850×1168 1/32 16 印张 字数:404千字

1987年5月第一版 1987年5月第一次印刷

印数1—1,750册

ISBN 7—5 607—0005—5 / Q · 1

统一书号: 13338 · 19 定价: 2.80元

前 言

微生物实验技术是指研究各类微生物的形态、结构和生命活动的一般方法，以及应用于生产实践的具体操作技术。毋庸置疑，掌握了微生物的实验方法和研究技术，必将促进微生物的基础理论的深入研究和微生物在工业、农业和医药卫生方面的应用研究。所以说微生物实验技术对于从事微生物教学、科学研究和生产实践的工作者是非常需要的。

本书根据作者多年教学和实践经验，除了介绍微生物实验的基本技术，如显微技术包括各种显微镜的原理和使用方法、显微摄影技术，各种染色包括细胞核染色技术，灭菌与除菌方法，各种培养基的制备技术，各类微生物的分离、接种与培养方法，微生物工业发酵的基本技术，微生物生理生化、遗传、育种的研究方法，微生物菌种保藏和噬菌体研究的基本操作技术等。同时也着重介绍了近代微生物实验的新技术，如显微操纵单细胞分离，细胞融合，基因定位，GC含量测定，数值分类法，免疫电泳，固相化细胞和固相酶技术，以及液氮超低温冻结保藏微生物菌种等。为了便于实验和操作，部分操作绘有示意图，并备有附录。

本书在整个编写过程中，得到山东大学校系各级领导的关怀和支持，王祖农教授也提出宝贵的修改意见。吴玉洲和史速建两位同志代为绘图，在此一并致谢。

本书可做综合性大学生物系、微生物系、师范院校、农林院校、医药院校微生物专业等的教科书和有关中等专业学校师生及从事基础、工业、农业微生物科学研究的研究人员和工程技术人员参考，同时也是有关微生物发酵生产工厂和环保、卫生防疫部门等有关人员适用的技术指导。

由于当前微生物实验技术的飞速发展，加之我们的思想和业务水平有限，因此本书难免会出现不妥和错误之处，诚恳希望读者批评、指正。

作者

1986年12月于山东大学

目 录

第一章 显微技术	(1)
第一节 普通光学显微镜.....	(1)
第二节 暗视野显微镜.....	(8)
第三节 相差显微镜.....	(11)
第四节 荧光显微镜.....	(16)
第五节 电子显微镜.....	(18)
第六节 显微摄影技术.....	(23)
第二章 染色技术	(29)
第一节 染色的基本原理及染料种类与选择.....	(29)
第二节 制片与染色.....	(33)
第三节 活体染色法.....	(36)
第四节 单染色法.....	(38)
第五节 负染色法.....	(39)
第六节 复染色法.....	(40)
第七节 特殊染色法.....	(45)
第八节 微生物细胞内贮藏物质的染色.....	(53)
第九节 霉菌菌丝的染色.....	(55)
第三章 灭菌与除菌	(57)
第一节 灭菌、消毒和除菌的概念.....	(57)
第二节 高温灭菌.....	(57)
第三节 化学药剂的消毒与灭菌.....	(71)
第四节 过滤除菌.....	(81)
第五节 其他灭菌方法.....	(91)
第四章 培养基制备技术	(96)
第一节 器皿的准备.....	(96)

第二节	培养基的基本组成成分及其作用·····	(99)
第三节	培养基的设计原则和方法·····	(105)
第四节	培养基的种类·····	(110)
第五节	培养基的制备方法·····	(115)
第五章	微生物的分离、接种和培养·····	(130)
第一节	无菌操作·····	(130)
第二节	接种与分离·····	(136)
第三节	显微操纵单孢(细胞)分离技术·····	(144)
第四节	培养方法·····	(153)
第五节	微生物的选种方法·····	(161)
第六章	微生物生理生化的研究方法·····	(166)
第一节	微生物细胞的收集和处理方法·····	(166)
第二节	微生物呼吸的测定——华勃(Warburg)氏技术 ·····	(175)
第三节	微生物分析法·····	(189)
第四节	微生物发酵生产过程及其控制·····	(194)
第五节	固相酶及固相化细胞技术·····	(221)
第六节	免疫电泳·····	(235)
第七节	GC含量的测定·····	(253)
第八节	数值分类法·····	(255)
第七章	噬菌体的基本操作技术·····	(259)
第一节	基本概念及测定·····	(259)
第二节	噬菌体的分离和纯化·····	(262)
第三节	噬菌体浓缩液的制备·····	(263)
第四节	溶原株的性质及鉴定·····	(264)
第五节	抗噬菌体菌株的选育和保藏·····	(266)
第八章	细菌遗传学实验技术·····	(268)
第一节	细菌接合与基因定位·····	(268)

第二节	转导·····	(286)
第三节	转化·····	(297)
第四节	基因互补测验·····	(307)
第五节	基因精细结构的分析·····	(310)
第六节	质粒的检测、分离和鉴定·····	(316)
第九章	菌种选育技术·····	(327)
第一节	突变型的筛选·····	(327)
第二节	诱变育种·····	(357)
第三节	微生物代谢控制育种·····	(363)
第四节	杂交育种·····	(370)
第五节	微生物细胞融合技术·····	(385)
第十章	微生物菌种的保藏方法·····	(400)
第一节	微生物菌种保藏的基本理论及技术·····	(400)
第二节	微生物菌种的保藏方法·····	(400)
第三节	噬菌体的保藏方法·····	(426)
第四节	微小藻类和原生动物的保藏法·····	(430)
第五节	菌种保藏机构及菌种的索取与交流·····	(433)
附 录	·····	(444)
一、	电子显微镜的制片方法·····	(444)
二、	常用显影液的配方·····	(445)
三、	菲尼酮D—72显影液的配方·····	(446)
四、	SB—1停显液配方·····	(446)
五、	常用定影液配方·····	(447)
六、	玻璃仪器的清洁方法·····	(448)
七、	溶液及染色液的配制·····	(449)
八、	几种培养基的制备方法·····	(457)
九、	微生物遗传学实验用培养基的制备·····	(468)
十、	计算反应瓶常数时所需的各种常数·····	(482)

十一、反应瓶的洗涤方法·····	(482)
十二、测压计的洗涤方法·····	(482)
十三、水银清洁法·····	(482)
十四、常用缓冲液的配制·····	(483)
十五、常用元素原子量表·····	(489)
十六、指示剂的配制·····	(489)
十七、洗液的配制和使用·····	(490)
十八、常用酸和碱的浓度·····	(491)
十九、溶液pH值与温度关系对照表·····	(492)
二十、比重和糖度换算表·····	(493)
二十一、饱和水汽压力与温度的关系·····	(494)
二十二、压力换算表·····	(494)
二十三、恒定湿度液·····	(495)
二十四、冷却混合物·····	(496)
二十五、琼脂的制造和检查方法·····	(496)
二十六、实验室意外事故的处理·····	(497)

第一章 显微技术

第一节 普通光学显微镜

普通光学显微镜是一种最常用的明视野显微镜。普通光学显微镜的结构分光学系统和机械装置两大部分。

一、结构与性能

普通光学显微镜有两组镜头，即接物镜和接目镜，简称为物镜和目镜。物镜的作用是将标本放大，在目镜的焦平面上形成实像，再经过目镜的放大而形成能见的虚像，如图 1—1 所示。

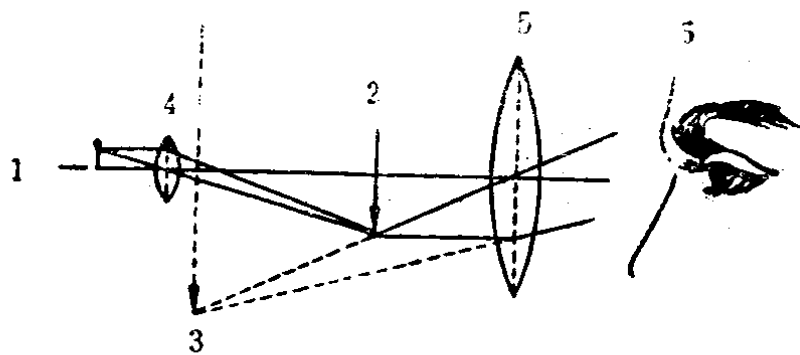


图 1—1 显微镜成像原理图

1. 标本 2. 放大实像 3. 放大虚像 4. 物镜 5. 目镜 6. 人眼的视线

此外，普通光学显微镜的光学系统还有聚光镜、反光镜、光源等。

1. 物镜

(1) 分辨率

当两个小的物体移近到一定的限度，眼睛就不能分辨出这

是两个单独的物体。例如，一个视力正常的人，从相距256厘米处观察物体，其分辨的最小距离是0.1毫米。透镜的放大能力也不是无限的，也受分辨率的限制。镜头的分辨率是能够分辨出两点的最小距离。光学显微镜的分辨率，决定于所用光波的长短和物镜的数值口径 (Numerical aperture, 简称 NA)，其公式如下：

$$\text{分辨率} = \frac{\text{光波长度}}{\text{数值口径}}$$

由此可见，光波越短，显微镜的分辨率则越高。例如，数值口径是1.00的物镜，如用黄色滤片（通过波长是579纤米），每2.54厘米可以分辨出88000根线条，如用紫滤色片（通过波长是436纤米），则可以分辨出115000根线条。可见光的光波幅度是比较窄的（400—700纤米），所以，利用减小光波长度来提高光学显微镜的分辨率是有限的。利用紫外线作光源，虽然可以提高分辨率，但是只适用于显微摄影，不能直接观察。因此，提高分辨率的最理想的措施还是增加数值口径。

（2）数值口径

数值口径是用来表示聚光镜发出的锥形光柱，照射在被观察标本上、被物镜所能聚集的量，通常以下式表示：

$$\text{数值口径} = n \cdot \sin(\mu/2)$$

式中：

n ——为物体和物镜之间介质的折射率；

μ ——是进入物镜锥形光柱的角度，也称为开角。

虽然，加大物镜透镜的直径和缩短它的焦距，可以加大 μ 角，提高数值口径和分辨率。但是，透镜直径的加大和焦距的缩短，都有一定的限度。放大倍数很高的物镜，数值口径很大，但焦距很短，使用很不方便。由此可见，物镜的放大倍数越大，它的数值口径也越大。油浸镜（ $\times 90$ ）的数值口径是

0.85—1.40，高倍镜（×45）的值是0.65—0.95，低倍镜（×10）的值是0.25—0.30。数值口径的值一般都是分别刻在物镜上。应该指出，物镜上刻的数值口径的值，是在其它条件都适宜的情况下所能达到的最高值，而实际使用时往往都低于所标志的值。

介质的折射率（ n ）是影响数值口径的另一个因素，各种介质的折射率如下表：

表 1—1 各种介质的折射率

介 质	折 射 率（25℃）
空 气	1 . 0 0
水	1 . 3 3
石 蜡 油	1 . 4 6
香 柏 油	1 . 5 1
香 脂	1 . 5 3

空气的折射率是1， μ 角度即使大到 180° （实际上是是不可能的，因为这时物镜的镜头已经碰到观察的标本）， $\sin \frac{\mu}{2}$ 的值仍然是1。因此，以空气作介质的物镜，数值口径是不可能大于1的。由于空气和玻璃的折射率的差异（玻璃的折射率是1.50左右），一部分光被失掉，不能完全进入物镜，实际上就降低了数值口径和相应的分辨率。为了提高数值口径和分辨率，就必须用与玻璃相近的折射率较高的介质，如用香柏油等作介质的油浸镜，在其他条件的配合下，数值口径可以达到1.4，分辨率可以达到0.2微米。

（3）放大倍数、焦距和工作距离

标本的放大主要是由物镜完成的。目镜的作用只不过是

物镜放大的实像，进一步放大形成能见的虚像。物镜的放大倍数越大，它的焦距越短。另一个参数是，物镜的工作距离。工作距离是标本在焦点上时，物镜的透镜与玻片之间的距离。物镜的焦距小，工作距离也小。放大倍数、焦距和工作距离之间的关系见表 1—2。

表 1—2 放大倍数、焦距和工作距离三者
之间的关系（举例）

放 大 倍 数	焦 距（毫米）	工作距离（毫米）
× 10	16	8.3
× 43	4	0.72
× 97	1.6	0.14

油浸镜的工作距离很短，只有0.14毫米，如果载玻片上再加薄的盖玻片，则工作距离更短，所以在使用油浸镜时，一定要注意防止物镜中透镜的损坏。

2．目镜

目镜起着放大的作用，不能提高分辨率。目镜的放大倍数一般为 5—10倍，显微镜的标准目镜倍数是10倍，小于10倍的多不用，仅是在看较大视野时才选用。

显微镜总的放大倍数是目镜和物镜放大倍数的乘积，但从提高分辨率的实际效果来看，还是选用放大倍数较高的物镜为好。例如，用20倍的目镜和20倍的物镜，与用10倍的目镜和40倍的物镜，其放大倍数都是400倍，但由于分辨率不同实际效果还是后者为好。另外，根据实际工作经验发现，有效的放大倍数大致是数值口径的1000倍。

3．聚光镜和虹彩光圈

物镜下的聚光镜对提高物镜的分辨率是很重要的。简易显

显微镜没有聚光镜，它是利用凹面反光镜所形成一定角度的锥形光柱照射标本和物镜，一般只能形成 64° 左右的锥形光柱。因此，即使物镜上所标志的数值口径较大，但最大数值口径的值也不能超过0.6（数值口径 $=1 \times \sin 32^\circ = 0.6$ ）。为了充分利用物镜的数值口径，就必须加大锥形光柱的角度，这就是聚光镜的作用。

聚光镜是由两个或几个透镜组成，它可以使光线从正面和斜面照射标本后进入物镜，形成一个大角度的锥形光柱。使用合理设计的大角度聚光镜，可以使物镜的分辨率增加一倍。

聚光镜有一定的焦距和工作距离。聚光镜的使用位置一般是接近镜台，但其高度可以上下自由调节。图像的清晰度和光的强度都受聚光镜位置的影响。

聚光镜下是虹彩光圈，主要作用是调节聚光镜的数值口径。聚光镜的数值口径要和所用物镜的数值口径相配合，最好是等于或稍大于物镜的数值口径，使进入物镜光柱的角度大到能够正好均匀照满物镜前面的透镜。虹彩光圈过小，就会减小锥形光柱的角度，因而降低了物镜数值口径的利用率，减少了分辨能力；虹彩光圈过大，锥形光柱的角度也过大，光线将在物镜和镜筒内发生反射，影响其清晰度。由此可见，使用油浸镜时必须用聚光镜。高倍镜用聚光镜的效果也较好。对于低倍镜，特别是放大倍数很低的物镜（如3.5倍的物镜）一般不用聚光镜。使用显微镜时，有人往往习惯用虹彩光圈来调节光的强弱，但不能超过一定的限度，否则会降低显微镜的分辨率，甚至在视野中形成假像。如果将虹彩光圈适当关小一些，可以增加焦深和物像的对比度，即明暗差。

4. 反光镜

反光镜是一个双面镜，一面是平面，另一面是凹面，起着接收外来光线并将光线送到聚光镜或直接送到物镜中的作用。

由于聚光镜需要有平行的光线，所以一般在自然光线下都用平面镜。没有聚光镜的显微镜，用灯作光源时，常用凹面镜。反光镜可以向任何方向转动，使聚光镜得到均匀的照明。

5. 光源

自然光线和灯光都可做为光源，以灯光较好，因光色和强度都容易控制。一般的显微镜可用普通的灯光，质量高的显微镜要用显微镜灯，才能充分发挥其性能。有些需要很强照明，如暗视野照明、摄影等，常常使用卤素灯作为光源。

二、普通显微镜的使用方法

1. 低倍镜观察

先将低倍物镜的位置固定好，然后放置标本片，转动反光镜，调好光线，将物镜提高，向下调至看到标本，再用细调对准焦距进行观察。除少数显微镜外，聚光镜的位置都要放在最高点。如果视野中出现外界物体的图像，可以将聚光镜稍微下降，图像就可以消失。聚光镜下的虹彩光圈应调到适当的大小，以控制射入光线的量，增加明暗差。

2. 高倍镜观察

显微镜的设计一般是共焦点的。低倍镜对准焦点后，转换到高倍镜基本上也对准焦点，只要稍微转动微调即可。有些简易的显微镜不是共焦点，或者是由于物镜的更换而达不到共焦点，就要采取将高倍物镜下移，再向上调准焦点的方法。虹彩光圈要放大，使之能形成足够的光锥角度。稍微上下移动聚光镜，观察图像是否清晰。

3. 油浸镜观察

油浸镜的工作距离很小，所以要防止载玻片和物镜上的透镜损坏。使用时，一般是经低倍、高倍到油浸镜。当高倍物镜对准标本后，再加油浸镜观察。载玻片标本也可以不经过低倍和

高倍物镜，直接用油浸镜观察。显微镜有自动止降装置的，载玻片上加油以后，将油浸镜下移到油滴中，到停止下降为止，然后用微调向上调准焦点。没有自动止降装置的，对准焦点的方法是从显微镜的侧面观察，将油浸镜下移到与载玻片稍微接触为止，然后用微调向上提升调准焦点。

使用油浸镜时，镜台要保持水平，防止油流动。油浸镜所用的油要洁净，聚光镜要提高到最高点，并放大聚光镜下的虹彩光圈，否则会降低数值口径而影响分辨率。无论是油浸镜或高倍镜观察，都宜用可调节的显微镜灯作光源。

三、普通显微镜的保养

显微镜是精密贵重的仪器，必须很好地保养。显微镜用完后要放回原来的镜箱或镜柜中，同时要注意下列事项：

- (1) 观察完后，移去观察的载玻片标本。
- (2) 用过油浸镜的，应先用擦镜纸将镜头上的油擦去，再用擦镜纸蘸着二甲苯擦拭2—3次，最后再用擦镜纸将二甲苯擦去。
- (3) 转动物镜转换器，放在低倍镜的位置。
- (4) 将镜身下降到最低位置，调节好镜台上标本移动器的位置，罩上防尘套。

镜头的保护最为重要。镜头要保持清洁，只能用软而没有短绒毛的擦镜纸擦拭。擦镜纸要放在纸盒中，以防沾染灰尘。切勿用手绢或纱布等擦镜头。物镜在必要时可以用溶剂清洗，但要注意防止溶解固定透镜的胶固剂。根据不同的胶固剂，可选用不同的溶剂，如酒精、丙酮和二甲苯等，其中最安全的是二甲苯。方法是用脱脂棉花团蘸取少量的二甲苯，轻擦，并立即用擦镜纸将二甲苯擦去，然后用洗耳球吹去可能残留的短绒。目镜是否清洁可以在显微镜下检视。转动目镜，如果视野

中可以看到污点随着转动，则说明目镜已沾有污物，可用擦镜纸擦拭接目的透镜。如果还不能除去，再擦拭下面的透镜，擦过后用洗耳球将短绒吹去。在擦拭目镜或由于其他原因需要取下目镜时，都要用擦镜纸将镜筒的口盖好，以防灰尘进入镜筒内，落在镜筒下面的物镜上。

第二节 暗视野显微镜

一、暗视野显微镜的特点

暗视野显微镜与明视野显微镜的区别是，其光线照射的方法不同。暗视野显微镜，直射光线完全不能进入物镜，而用斜射光线照射物体，发出的散射光再进入物镜，这样就可暗视野中见到明亮的物像。

应当注意的是，暗视野显微镜的光线照射角度一定要调节好。当视野中没有物体存在时，整个视野是暗的。活的透明的微生物细胞，用暗视野显微镜观察，效果要比一般明视野显微镜好。

二、暗视野显微镜的种类

反射式暗视野聚光镜，归纳起来有以下两种。

1. 抛物面暗视野聚光镜

如图 1—2 所示。将已经压成抛物形的玻璃体，把顶点磨平，使反射来的光线可以继续前进，并汇集于一点。如果抛物面涂有水银，则反光效果更好。在抛物面的底部中央有一片遮光板，把来自反光镜的中部光柱遮掉，只让边缘的筒状光线射入抛物面，然后改换为斜射途径。

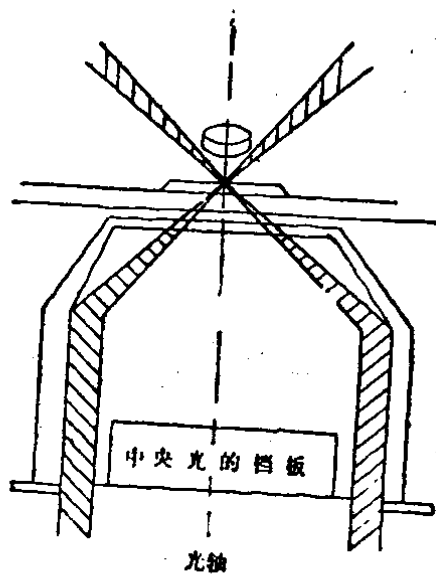


图 1—2 抛物型暗视野聚光镜的剖视

2. 心型暗视野聚光镜

抛物面呈心脏形，并涂有水银，其底部也有遮光板。

三、暗视野显微镜的使用方法

利用暗视野聚光镜进行暗视野观察，其方法归纳如下：

1. 首先将显微镜底盘上的光源圈开至最大，使用明视野聚光镜，镜口率开至1.2以上，用低倍物镜观察，视野应均匀明亮。

2. 换入暗视野聚光镜，提升至距载物台下约0.5厘米处，仔细滴加一大滴香柏油（严防油滴中有气泡）。

3. 把被观察的菌悬液滴一滴于载玻片上，放置盖玻片，制成供检标本。

4. 将做好的标本放在载物台上，仔细上升聚光镜，使油滴与载片下表面接触（切勿产生气泡）。在聚光镜上加入香柏油滴后，马上与载片接触，油滴不可过大，否则会使油滴沿聚光镜上透镜表面外溢。