

**国家级实验教学示范中心**  
**全国高等院校医学实验教学规划教材**

# **病原生物学与医学免疫学实验**

## **——基础篇**

总主编 郑葵阳  
主 编 汤仁仙

非  
外  
借



科学出版社

国家级实验教学示范中心  
全国高等院校医学实验教学规划教材

# 病原生物学与医学免疫学实验

## ——基础篇

总主编 郑葵阳

主 编 汤仁仙

副主编 何静妹 韦艳霞

编 委 (按姓氏笔画排序)

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 于倩  | 王维维 | 韦艳霞 | 尤红娟 | 孔凡运 |
| 付琳琳 | 刘相叶 | 汤仁仙 | 肖淑宁 | 何静妹 |
| 张鹏  | 陈静  | 周晓燕 | 周峰  | 郑葵阳 |
| 寇艳波 | 潘伟  | 潘智华 |     |     |

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

本书是高等医学院校医学实验系列教材之一。内容包括病原生物学与医学免疫学基础性实验及常用实验器材及试剂配制,共分四个部分。第一部分为医学微生物学实验,介绍了一些传统微生物学的经典方法及无菌操作,涉及细菌学、病毒学、真菌学及其他微生物;第二部分为医学寄生虫学实验,主要涵盖原虫、吸虫、绦虫、线虫及节肢动物中各虫期的标本观察和检查;第三部分为医学免疫学实验,免疫学实验技术日新月异,本册仅涵盖免疫学基本性经典实验;第四部分为常用实验器材和试剂配制,以及常用寄生虫检测方法。

本书适用于临床医学、预防医学、口腔医学、麻醉学、临床药学等专业使用。也可供从事临床检验、卫生防疫的实验技术人员使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

病原生物学与医学免疫学实验. 基础篇 / 汤仁仙主编. —北京: 科学出版社, 2018.1  
国家级实验教学示范中心·全国高等院校医学实验教学规划教材  
ISBN 978-7-03-056013-1

I. ①病… II. ①汤… III. ①病原微生物—实验—高等学校—教材  
②医药学—免疫学—实验—高等学校—教材 IV. ①R37-33 ②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 315140 号

责任编辑: 张天佐 胡治国 / 责任校对: 郭瑞芝  
责任印制: 赵 博 / 封面设计: 张秀艳

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>

三河市书文印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2018 年 1 月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2018 年 1 月第一次印刷 印张: 10 1/4

字数: 195 000

定价: 35.00 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

总 主 编 郑葵阳

副总主编 蔡红星 侯筱宇 孙 红 汤仁仙 刘 莹

委 员 (按姓氏笔画排序)

王阿明 乔伟丽 刘志安 刘 慧

李 冲 宋远见 张咏梅 徐 明

郭 栋 蔡绍京 魏建峰

# 丛 书 前 言

知识爆炸、信息化时代已经到来。现代医学教育演变改革，历经百年，已发展到以岗位胜任力为导向的医学教育新时代。今天，如何适应新时代知识传授的新特点、能力培养的新要求，以及当代大学生学习模式的悄然转变，已经成为当代医学教育的核心问题之一。徐州医科大学自 2004 年开展以 CBL 为载体的教育教学改革、2012 年开展以医学生岗位胜任力为导向的内涵式质量提升工程，以学生为中心的自主式学习正在全面、有序展开。

医学是实践性很强的生命科学，基础医学的学习是大学生步入医学的起始阶段，基础医学实验训练对医学生职业素质的养成和后续的专业学习，都有着很大影响。因此，加强基础医学教学实验中心建设，提高实验教学质量，培养大学生实践创新能力具有重要意义。以培养适应国家及区域医药卫生事业发展和经济建设需要的高素质、高水平卓越医学人才为根本任务，从“育人为本、德育为先、能力为重、全面发展”的教育理念出发，树立“以学生为主体、以能力培养为核心”的实验教学观，徐州医科大学基础医学国家级实验教学示范中心对基础医学实验课程进行了优化设计，组织编写了一套新颖的实验教材。本套教材以案例作为引导，构建“理论实践相结合、基础临床相互渗透、教学科研相互促进”的实验教学体系；构建模块化、层次化、多元化满足学生自主学习的实验教学新模式。本套实验教材按照医学生物学实验课程群、正常人体形态学实验课程群、疾病基础实验课程群、医学机能学实验课程群和病原生物学与免疫学实验等五大课程群循序编排。在实验项目层次上，精简基础性实验和内容重复过多的实验，增加综合设计性实验和研究创新性实验比例，使学生通过实验课程学习，系统掌握从“分子”、“细胞”、“组织”、“器官”到“系统”；从形态到功能；从正常到异常；从疾病诊断到防治等一套完整的基础医学实验的知识与技能，为后续的学习和工作打下坚实的基础。

本套实验教材是徐州医科大学基础医学国家级实验教学示范中心全体老师辛勤劳动的结晶，是我校多年来教学改革成果体现。衷心感谢科学出版社对编写工作的热情鼓励和悉心指导。诚然，由于编者的学识、水平和能力的限制，难免存在诸多不足和遗憾，恳请广大专家、教师和学生提出宝贵意见与批评，为推动我国医学教育的发展共同努力。

郑葵阳

2017 年 12 月

# 前 言

本实验教材是一套创新性教材，分“基础篇”和“综合篇”2个分册，从理念到编排进行了一些新的尝试。按照本套教材的整体设计思想，体现“以学生为主体、以能力培养为核心”的实验教学理念，强化基础、注重实践、培养能力、鼓励创新、提高素质。

“基础篇”分册以培养学生岗位胜任力为基点，本实验教材以夯实必要的基础性实验技能为目标，并为综合性、创新性实验打牢基础，着力训练学生的基本技术、基本知识、基本能力。

本册将原来独立设置的医学微生物学、人体寄生虫学和医学免疫学实验进行了优化、整合，精选学科经典、重要的基本内容，删除淘汰的陈旧部分。

在编排上，实验开篇不是先交待实验目的而是首先提出“问题与思考”，提出的问题密切围绕本次实验需要但又不拘泥于实验本身，引导学生自主学习；对实验目的不再按传统的“掌握、认识、了解”设置，而是从“学习”角度提出目标；作业形式灵活多样，既有对实验结果的分析、讨论，也有对形态学内容传统的手绘记录和利用数码互动显微镜拍摄观察内容，体现现代教育技术的应用。

“综合篇”分册以培养学生发现问题、解决问题为基点，着力训练学生的综合素质与能力，培养学生整体观与整合意识。在遵循学科自身规律的基础上，由浅入深，由简单到综合，设置了综合性、设计性实验，体现学科内、学科间纵向连贯、横向渗透、交叉融合。本分册对设计性实验进行深化，提出动物模型制备方案，大胆引入案例式学习，按照“早临床、多临床、反复临床”和岗位胜任力要求，结合学生学业阶段学习能力，适当联系基础医学相关知识与实际临床案例，鼓励学生围绕案例设计实验，自主提出实验方案，促进医学基础学科与临床医学知识整合，基础课与专业课知识相互渗透交融，是为本实验教材的又一创新亮点。

“基础篇”与“综合篇”两个分册既相对独立、更相互衔接，是一个有机整体，方便教学中结合不同专业、拓展训练等实际情况使用。本实验教材适用于临床医学、预防医学、检验医学、全科医学、口腔医学、影像医学、麻醉学、护理学等专业使用。编写工作得到了郑葵阳教授从理念到撰写的悉心指导，得到了科学出版社的鼓励与帮助，在此一并表示感谢。全体编写人员均为一线教学教师，富有教学经验，富有改革热情，希望奉献一本具有时代特点的创新性教材，但由于水平、学识有限，难免有不妥之处，恳请专家、学生批评指正。

汤仁仙

2017年12月

# 目 录

|                                    |     |
|------------------------------------|-----|
| 第一章 医学微生物学实验 .....                 | 1   |
| 第一节 细菌学实验 .....                    | 1   |
| 第二节 病毒学实验 .....                    | 23  |
| 第三节 真菌学实验 .....                    | 31  |
| 第四节 其他微生物实验 .....                  | 37  |
| 第二章 医学寄生虫学实验 .....                 | 45  |
| 第一节 原虫 .....                       | 45  |
| 第二节 吸虫 .....                       | 59  |
| 第三节 绦虫 .....                       | 68  |
| 第四节 线虫 .....                       | 74  |
| 第五节 节肢动物 .....                     | 85  |
| 第三章 医学免疫学实验 .....                  | 94  |
| 第一节 抗原抗体反应概述 .....                 | 94  |
| 第二节 沉淀反应 .....                     | 96  |
| 第三节 凝集反应 .....                     | 104 |
| 第四节 补体参与的实验 .....                  | 112 |
| 第五节 免疫标记技术 .....                   | 118 |
| 第四章 实验室常用实验器材、试剂配制及寄生虫常用检查方法 ..... | 129 |
| 第一节 常用实验器材 .....                   | 129 |
| 第二节 常用试剂配制 .....                   | 139 |
| 第三节 寄生虫常用检查方法 .....                | 151 |



本书数字资源

# 第一章 医学微生物学实验

## 第一节 细菌学实验

细菌是一类体形微小、结构简单的原核细胞型微生物，可通过形态学检查，结合人工培养、生化实验、动物实验、免疫学实验等多种手段，进行细菌综合性鉴定，为临床感染性疾病的诊断与防治提供依据。

### 实验一 细菌形态学检查

#### 问题·思考

1. 细菌的基本形态和特殊结构有哪些？如何进行观察与识别？
2. 常用于细菌染色的方法有哪些？
3. 革兰染色与抗酸染色的不同点有哪些？
4. 影响革兰染色结果的因素有哪些？

#### 一、细菌的基本形态与特殊结构

##### 【目的】

学会镜下观察细菌的基本形态和特殊结构。

##### 【原理】

细菌有相对恒定的形态与结构，经过革兰染色或特殊染色后，借助光学显微镜观察与识别。

##### 【材料】

葡萄球菌、大肠埃希菌、霍乱弧菌革兰染色示教片；肺炎链球菌荚膜染色示教片、变形杆菌鞭毛染色示教片、破伤风梭菌芽胞染色示教片。

##### 【方法】

油镜下观察示教片。

##### 【结果】

#### 1. 细菌的基本形态

(1) 球菌：葡萄球菌，革兰阳性球菌，镜下菌体呈球形，直径约  $1\mu\text{m}$ ，紫色，葡萄状排列。

(2) 杆菌：大肠埃希菌，革兰阴性杆菌，镜下菌体呈细杆状，大小为  $(0.4\sim 0.7)\mu\text{m}\times(1\sim 3)\mu\text{m}$ ，红色，散在排列。

(3) 螺形菌：霍乱弧菌，革兰阴性菌，镜下菌体呈弧形或逗点状，只有一个弯曲，大小为  $(0.5\sim 0.8)\mu\text{m}\times(1.5\sim 3)\mu\text{m}$ ，红色，散在排列。

## 2. 细菌的特殊结构

(1) 荚膜：肺炎链球菌菌体周围淡染区或空白区即为荚膜所在处。

(2) 鞭毛：变形杆菌菌体周围有波状丝状物。

(3) 芽胞：破伤风梭菌芽胞呈正圆形，直径大于菌体，位于菌体顶端，带芽胞的破伤风梭菌呈鼓槌状。

### 【注意事项】

1. 观察细菌的基本形态应注意大小、形态、排列方式及染色性。

2. 观察细菌的特殊结构要注意染色方法。

3. 观察示教片时，请勿随意改变镜下视野，以防影响结果观察。

## 二、不染色标本检查

### 【目的】

1. 学会操作悬滴法。

2. 领会不染色标本检查的临床意义。

### 【原理】

鞭毛是细菌的运动器官，有鞭毛的细菌，能在液体中主动、自由、迅速游动，因此，光镜下可直接观察液体标本中细菌的动力及运动状况。

### 【材料】

变形杆菌、葡萄球菌 6~12h 肉汤培养物，培养箱、普通光学显微镜，接种环、酒精灯、火柴、载玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林、小镊子等。

### 【方法】

#### 1. 悬滴法

(1) 取洁净凹玻片 1 张，在凹窝四周涂凡士林少许。

(2) 用灭菌的接种环取 1 环变形杆菌或葡萄球菌菌液置于盖玻片中央。

(3) 将凹玻片倒合于盖玻片上，使凹窝中央正对菌液。

(4) 迅速翻转凹玻片，用小镊子轻压盖玻片，使之与凹窝边缘黏紧封闭，以防水分蒸发

(图 1-1-1)。

(5) 先用低倍镜找到悬滴，再换高倍镜观察细菌的运动。

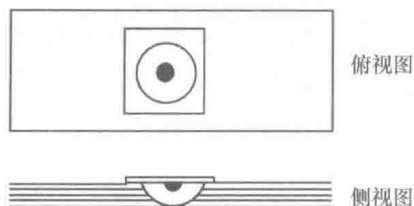


图 1-1-1 悬滴法示意图

#### 2. 压滴法

(1) 用灭菌后的接种环取葡萄球菌或变形杆菌菌液 2~3 环，置于洁净载玻片中央。

(2) 用小镊子夹一张盖玻片，先使盖玻片一边接触菌液，然后缓缓放下，覆盖于菌液上，避免菌液中产生气泡。

(3) 先用低倍镜找到观察部位, 再换高倍镜观察细菌的运动。

### 【结果】

变形杆菌有鞭毛, 运动活泼, 可向不同方向迅速运动, 位移明显。葡萄球菌无鞭毛, 不能运动, 但受水分子的撞击时呈分子运动(布朗运动), 即在一定范围内做往复颤动, 位移不大。

### 【注意事项】

1. 接种环灭菌时, 须先靠近火焰预热或放内焰中烤干, 然后再在外焰中灼红灭菌。

2. 取菌的接种环切勿过热, 否则易将菌烫死。

3. 制作悬滴时四周要黏紧封闭; 制作压滴时要避免产生气泡。

4. 使用显微镜观察时应下降聚光器、缩小光圈, 以减少光亮。

5. 观察结束后, 应将带菌玻片放入消毒缸中消毒。

## 三、染色标本检查

### 【目的】

1. 学会制作细菌涂片。

2. 学会革兰染色法与抗酸染色法。

3. 领会革兰染色及抗酸染色的临床意义。

### (一) 单染法

采用一种染料染色的方法, 如用亚甲蓝或稀释石炭酸复红等, 使不同细菌均染成同一种颜色。故此法只能显示细菌的形态及大小, 对细菌鉴别价值不大。

### (二) 复染法

采用两种或以上染料染色的方法, 此法除可显示细菌形态和大小外, 还能进行细菌种类的鉴别, 故称为鉴别染色法。

细菌学实验中常用的复染法有革兰染色法(Gram stain)和抗酸染色法。

#### ● 革兰染色法

### 【原理】

革兰染色的原理尚未明确, 主要有以下三种学说。

1. **等电点学说** 革兰阳性菌的等电点低( $pI=2\sim3$ ), 革兰阴性菌等电点较高( $pI=4\sim5$ ), 在相同 pH(碱性)条件下, 革兰阳性菌所带负电荷比革兰阴性菌多, 与带正电荷的结晶紫染料结合较牢固且不易脱色。

2. **通透性学说** 革兰阳性菌细胞壁结构致密, 肽聚糖层厚, 脂质含量少, 乙醇不易透入; 而革兰阴性菌细胞壁结构较疏松, 肽聚糖层少, 脂质含量多, 乙醇易渗入。

3. **化学学说** 革兰阳性菌细胞内含有大量核糖核酸镁盐, 可与结晶紫和

碘牢固地结合成大分子复合物，不易被乙醇脱色；而革兰阴性菌细胞内含少量的核糖核酸镁盐，吸附染料量少，形成的复合物分子也较小，故易被乙醇脱色。

### 【材料】

葡萄球菌、大肠埃希菌 18h 斜面培养物，结晶紫染液、卢戈碘液、95%乙醇、稀释石炭酸复红染液，载玻片、生理盐水、接种环、显微镜等。

### 【方法】

#### 1. 制作细菌涂片

- (1) 接种环灭菌后取 1~2 环生理盐水放于载玻片上。
- (2) 接种环灭菌后取少许菌种于载玻片生理盐水中均匀涂布，直径不超过 1cm。
- (3) 将涂有细菌的载玻片在酒精灯火焰上方干燥或自然干燥，并将有菌部位快速通过火焰，来回 3 次，固定。

#### 2. 染色

- (1) 初染：结晶紫染液盖满涂片，染色 1min，用细水流冲洗，弃去积水。
- (2) 媒染：加卢戈碘液作用 1min，用细水流冲洗，弃去积水。
- (3) 脱色：将玻片反复蘸取酒精缸中酒精 30s，用细水流冲洗，弃去积水。或滴加 95%乙醇数滴，摇动玻片数秒钟，使其均匀脱色，然后斜持玻片，再滴加乙醇，直至流下的乙醇无色为止（约 30s），用细水流冲洗，弃去积水。
- (4) 复染：加稀释石炭酸复红染 30s，用细水流冲洗，弃去积水。

3. 观察 待标本片自然干燥或用吸水纸吸干后，在涂片区域滴加镜油，置油镜下观察。

### 【结果】

葡萄球菌呈紫色，为革兰阳性菌，球形、葡萄状排列；大肠埃希菌呈红色，为革兰阴性菌，杆状、散在排列。

### 【注意事项】

1. 制片时，涂菌太厚或太薄，固定时菌体过分受热及脱色时间长短，都会影响染色结果。
2. 所有染液均应防止蒸发而使其浓度改变，特别是卢戈碘液，其久存或受光作用后易失去媒染作用；涂片积水过多会改变染液浓度，影响染色效果，脱色乙醇以 95%为宜，浓度降低会增强其脱色能力。
3. 细菌的菌龄不同，革兰染色结果也有差异，一般以 18~24h 的培养物染色效果最好，菌龄过长会影响细菌染色性。

### ● 抗酸染色法

#### 【原理】

结核分枝杆菌等抗酸菌细胞壁的蜡脂包膜不易着色，但经加热和延长染色时

间着色后,不易被盐酸乙醇脱色,故可借此染色法鉴别抗酸菌与非抗酸菌。

### 【材料】

卡介苗稀释标本或肺结核可疑患者痰液标本,石炭酸复红染液、3%盐酸乙醇、亚甲蓝染液,载玻片、染色夹子、显微镜等。

### 【方法】

1. 制作细菌涂片 取上述标本约 0.01ml,制成 20mm×25mm 大小的均匀薄涂片。自然干燥或火焰上方干燥后,火焰固定。

### 2. 抗酸染色

(1) 初染:将已固定的菌涂片置于染色架上或用染色夹子夹住,滴加石炭酸复红染液,并在弱火上方加热,见染液冒蒸气时移开火焰片刻,再加热,反复持续 3~5min,用细水流冲洗,弃去积水。

(2) 脱色:用 3%盐酸乙醇脱色 1min,直至涂片无红色染液脱下为止,用细水流冲洗,弃去积水。

(3) 复染:用亚甲蓝染液复染 1min,用细水流冲洗,弃去积水。滤纸印干。

3. 观察 待标本片自然干燥或用吸水纸吸干后,在涂片区域上滴加镜油,置油镜下检查。

### 【结果】

镜下可见结核分枝杆菌,在淡蓝色背景下染成红色细长或略带弯曲、有分枝生长趋向的杆菌,此为抗酸染色阳性菌。非抗酸性细菌和细胞杂质染成蓝色。

### 【注意事项】

1. 制作涂片时,接种环从试管底部取菌为好。

2. 滴加石炭酸复红染液后,在弱火上方加热时,勿煮沸或烘干,随时补充染液以防干涸。

3. 水洗时,防载玻片爆裂。

4. 用滤纸印干载玻片时,印干滤纸只能使用一次,以防假阳性结果。

## (三) 特殊染色

### ● 芽胞染色

### 【原理】

芽胞壁厚、透性低,着色、脱色均较困难。因此,用着色力强的染色剂(如石炭酸复红)在加热条件下进行染色时,染料不仅可以进入菌体,而且也可以进入芽胞,进入菌体的染料可经水洗脱色,而进入芽胞的染料则难以透出,再用复染液(如亚甲蓝染液)染色后,芽胞仍然保留初染剂的颜色,而菌体被染成复染剂的颜色,即菌体和芽胞分别染成蓝色和红色易于区分。

### 【材料】

类炭疽杆菌或破伤风梭菌陈旧培养物制成的菌悬液,石炭酸复红染液、95%

乙醇、碱性亚甲蓝染液等。

### 【方法】

1. 制作菌涂片 取菌悬液制成涂片，干燥后，快速通过酒精灯火焰 3 次，固定。

### 2. 染色

(1) 滴加石炭酸复红染液数滴，微火加热染 5min，冷却后水洗。

(2) 滴加 95%乙醇脱色 2min，水洗。

(3) 滴加碱性亚甲蓝染液复染 30s，水洗、吸干后油镜观察。

### 【结果】

芽胞呈红色，菌体呈蓝色。

### 【注意事项】

1. 染色用破伤风梭菌最好来源于陈旧血平板培养物。

2. 微火加热，使染液冒蒸气（切勿煮沸），加热过程中要随时补充染液，勿让标本干涸。

## ● 鞭毛染色

### 【原理】

细菌的鞭毛极细，直径为 12~30nm，需用电子显微镜观察。但采用特殊染色法时，使鞭毛水肿变粗，经染色后，在普通光学显微镜下也能看到它。

### 【材料】

变形杆菌斜面培养物，肉汤培养基、琼脂斜面培养基，无菌生理盐水、双蒸馏水、空平皿，鞭毛染色液、亚甲蓝复染剂，载玻片、接种环、酒精灯等。

### 【方法】

#### 1. 菌种处理

(1) 先将变形杆菌（有鞭毛菌）每日在肉汤培养基中转种一次，共 7 次。

(2) 取无菌琼脂斜面培养基，先吸出培养基内的凝结水，换以无菌生理盐水 2ml，再接种一环菌液于琼脂斜面与液体交界部，再自该部位向上划线接种，37℃孵育 7~16h。

(3) 灭菌的接种从交界处取一环菌液，轻轻放在盛有 3~4ml 双蒸馏水的平皿水面，使菌自由分散，浮在液体表面，静置 4~5min。

2. 制片 接种环从上述液面轻轻挑取一环菌液，放在高度洁净无油脂的载玻片一端，切勿研磨或振动，斜立载玻片，使此菌液沿载玻片向下流，自然流成一薄菌膜。或放入 37℃孵箱内让其自然干燥，不能以火焰固定。

#### 3. 染色

(1) 加鞭毛染色液染 10~15min（染色时间长短随室温高低而异，如冬季可置温箱内染色），水洗。

(2) 再加亚甲蓝复染剂染 10min, 水洗, 待干, 油镜观察。

### 【结果】

菌体染成蓝色, 鞭毛呈红色。

### 【注意事项】

(1) 此法一般可无须用复染剂, 如染色恰当, 则细菌菌体与鞭毛皆染成红色。

(2) 鞭毛染色时, 所用载玻片必须十分洁净毫无油脂。可将玻片先置于重铬酸钾硫酸清洁液中过夜, 取出后以清水冲洗干净, 再斜插于架上, 自然晾干备用。

(3) 鞭毛染色液, 甲液由饱和硫酸铝钾液(饱和明矾液) 2ml、5%石炭酸 5ml 与 20%鞣酸 2ml 混合成; 乙液是碱性复红酒精饱和液。使用前甲液 9 份与乙液 1 份混合后过夜, 次日过滤, 一般滤后放置第三天使用最佳。

## ● 荚膜染色 (Hiss 法)

### 【原理】

荚膜是某些细菌细胞壁外包绕的一层黏液状或胶质状物质。厚度  $\geq 0.2\mu\text{m}$ , 普通光学显微镜可以看见。由于荚膜与碱性染料的亲和力弱, 不容易着色; 可溶于水, 易在水洗时被除去。所以常采用负染色法染色, 使菌体和背景着色, 荚膜不着色, 从而在菌体周围形成一透明圈。

### 【材料】

产气荚膜梭菌小白鼠动物实验肿胀的器官组织, 结晶紫乙醇饱和液、20%硫酸铜水溶液等。

### 【方法】

1. 制片 取产气荚膜梭菌感染的小白鼠肿胀的脏器组织涂片, 置空气中自然干燥。

### 2. 染色

(1) 滴加结晶紫乙醇饱和液在弱火上略加热, 使染液冒蒸气为止, 勿水洗。

(2) 以 20%硫酸铜水溶液轻洗去涂片上的染液, 勿水洗, 滤纸吸干后油镜观察。

### 【结果】

菌体及背景呈紫色, 菌体周围有一圈淡紫色或无色的荚膜。

### 【注意事项】

(1) 荚膜为可溶性物质, 很薄且易变形, 因此, 激烈的冲洗, 荚膜可丢失或脱离, 故 20%硫酸铜水溶液冲洗时动作要轻柔。

(2) 荚膜富含水分, 制片时应自然干燥, 不可以加热固定, 因为加热会使菌体细胞收缩, 在菌体周围形成一个清晰的环, 易被误认为是荚膜。

## （四）其他染色方法

### ● 异染颗粒染色（Albert 染色）

#### 【原理】

白喉棒状杆菌的异染颗粒主要成分是核糖核酸和多偏磷酸盐，嗜碱性强，对碱性染料的结合能力比菌体大，因此，异染颗粒的染色较菌体深。

#### 【材料】

白喉棒状杆菌吕氏血清斜面培养物，Albert 染色液甲液、乙液等。

#### 【方法】

1. 制片 取白喉棒状杆菌涂片，干燥，经火焰固定，待冷。

#### 2. 染色

（1）滴加甲液染 3~5min，水洗。

（2）加乙液染 1~2min，水洗，吸干，油镜观察。

#### 【结果】

菌体呈浅绿色，异染颗粒呈蓝黑色。

#### 【注意事项】

涂片时取菌不要过多。

### ● 细胞壁染色

#### 【原理】

细菌细胞壁很薄，革兰阳性菌的细胞壁为 20~80nm，革兰阴性菌的细胞壁为 10~15nm。以肽聚糖为主要化学成分，与染料结合能力差，不易着色，在细菌的染色过程中，染料通常通过细胞壁的渗透、扩散等作用而进入细胞，细胞壁本身并未着色。根据细菌细胞在高渗溶液中会产生质壁分离现象，经染色后也可在普通光学显微镜下区分细胞壁和细胞质膜。

#### 【材料】

枯草芽胞杆菌 16~18h 斜面培养物，10%鞣酸水溶液、0.5%龙胆紫水溶液等。

#### 【方法】

1. 制片 取枯草芽胞杆菌涂片，自然干燥或 37℃温箱烘干。

#### 2. 染色

（1）加 10%鞣酸水溶液固定 15min 后，水洗。

（2）加 0.5%龙胆紫水溶液染 3~5min，水洗，吹干，油镜观察。

#### 【结果】

细胞壁呈紫蓝色，细胞质无色。

#### 【注意事项】

固定切勿用火焰。

## ● 金胺“O”荧光染色法

### 【原理】

金胺“O”为荧光染料，在紫外线照射下，能激发出荧光。细菌用荧光染料着色后在荧光显微镜下观察，在黑背景中可见到细菌发出明亮的荧光。由于各种细菌的化学组成和结构的不同，各种荧光染料在菌体各个构成部位中的溶解、吸附、化合情况也不同，因此，发出不同色调和不同亮度的荧光。

### 【材料】

卡介苗，金胺“O”荧光染液、0.5%盐酸乙醇、0.5%高锰酸钾等。

### 【方法】

1. 制片 卡介苗涂片，固定，自然干燥或 37℃温箱烘干。

#### 2. 染色

(1) 滴加金胺“O”荧光染液，染色 10~15min，水洗。

(2) 用 0.5%盐酸乙醇脱色 3~5min，到无黄色染液脱下为止，水洗。

(3) 加 0.5%高锰酸钾复染 2min，水洗、待干，荧光显微镜观察。

### 【结果】

荧光显微镜高倍镜下可见，在暗视野背景下，抗酸菌呈黄绿色或橙黄色荧光。

### 【注意事项】

荧光染色后涂片应在 24h 内观察。

### 【实验报告】

1. 绘图 细菌的基本形态，标明各菌的大小、形态、排列方式及染色性。
2. 绘图 细菌的特殊结构，标明细菌的特殊结构，并注明染色方法。
3. 记录革兰染色过程，并绘制镜下图。
4. 绘图 抗酸染色镜下图。

## 实验二 细菌的培养

### 问题·思考

1. 培养细菌需要满足哪些条件？当培养条件不合适时，会发生哪些现象？
2. 培养基制备完成后为什么需要灭菌？如果不进行灭菌会有什么后果？
3. 细菌培养常采用哪些方法？这些方法各有什么目的、意义？
4. 菌落的形态是否可以作为判断细菌种属的标准？为什么？

### 一、基础培养基的制备

#### 【目的】

学会固体、液体、半固体基础培养基的制备。

#### 【材料】

去离子水、营养琼脂、琼脂粉、1mol/L 或 0.1mol/L NaOH 溶液、1mol/L HCl 溶液、粗制蛋白胨水、精密 pH 6.4~8.0 试纸、康氏试管、华氏试管、无菌空平皿、天平、三角烧瓶、吸管、乳胶瓶塞、吸耳球、玻棒、接种环、接种针、电炉、试管架、酒精灯、高压蒸汽灭菌器等。

#### 【方法】

##### 1. 固体培养基的制备

(1) 先将 100ml 去离子水加入 500ml 三角烧瓶中，加 9.4g 营养琼脂，玻棒搅拌呈糊状，再加余水定容至 225ml，搅拌均匀。置电炉上加热溶解，煮沸。测定并调节 pH 至 7.4。

(2) 分装 13 支华氏试管，每支加入 2.5ml，塞好瓶塞，包扎。三角烧瓶内剩的培养基，同样塞好瓶塞，包扎，与华氏试管一起高压蒸汽灭菌。

(3) 灭菌后趁热将华氏试管摆成斜面，斜面长度约为试管长度的 2/3，冷却后备用；灭菌后的三角烧瓶内培养基待冷却至 50℃ 左右，以无菌操作倾注直径 9cm 无菌空平皿，每块平皿 10~12ml，水平旋转放置平皿，待培养基凝固后，将平皿翻转，备用。

**2. 液体培养基的制备** 将粗制蛋白胨水 20ml（或按商品液体培养基使用说明称量）放入三角烧瓶中，加温、煮沸，测定并调节 pH 至 7.4，分装 13 支康氏试管，每支加入 1.5ml，塞好瓶塞，包扎，高压蒸汽灭菌，直立冷却，备用。

**3. 半固体培养基的制备** 先将 10ml 粗制蛋白胨水（或按商品半固体培养基使用说明称量）加入三角烧瓶中，加入 0.06g 琼脂粉，用玻棒搅拌至糊状，再加入 10ml 粗制蛋白胨水，搅拌加热、煮沸至琼脂粉溶解，测定并调节 pH 至 7.4，分装 13 支康氏试管，每支加入 1.5ml，塞好瓶塞，包扎，高压蒸汽灭菌，直立冷