

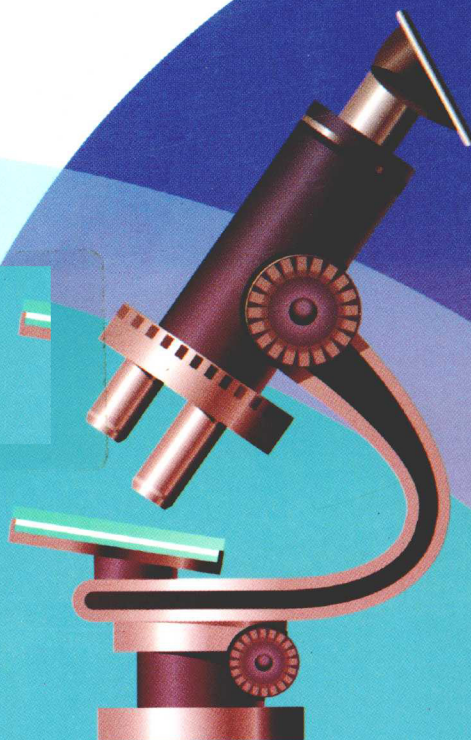
供高等医药院校各类专业使用

XINBIAN
BINGYUAN SHENGWUXUE
SHIYAN JIAOCHENG

新编

病原生物学 实验教程

主编 李婉宜 王雅静



四川大学出版社

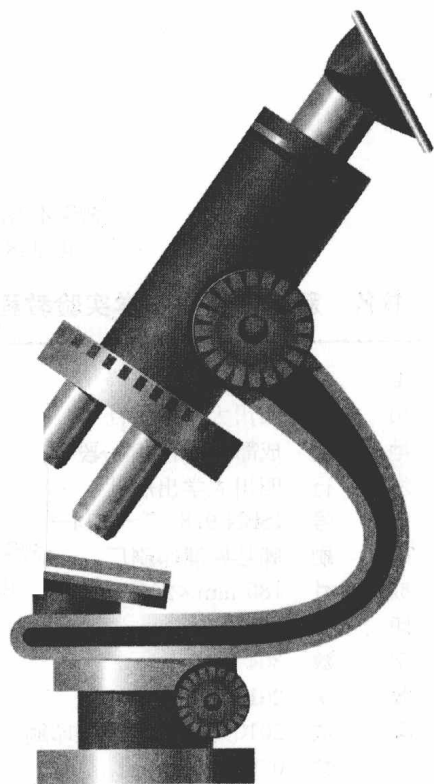
供高等医药院校各类专业使用

新编

XINBIAN

BINGYUAN SHENGWUXUE
SHIYAN JIAOCHENG

病原生物学 实验教程



四川大学华西医学教育与发展中心CMB基金资助



四川大学出版社

责任编辑:朱辅华
特约编辑:李晓静
责任校对:许 奕
封面设计:墨创文化
责任印制:李 平

图书在版编目(CIP)数据

新编病原生物学实验教程 / 李婉宜, 王雅静主编.
—成都: 四川大学出版社, 2010. 8
ISBN 978-7-5614-4954-7

I. ①新… II. ①李…②王… III. ①病原微生物—
实验—医学院校—教材 IV. ①R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 154086 号

书名 新编病原生物学实验教程

主 编	李婉宜 王雅静
出 版	四川大学出版社
地 址	成都市一环路南一段 24 号 (610065)
发 行	四川大学出版社
书 号	ISBN 978-7-5614-4954-7
印 刷	郫县犀浦印刷厂
成品尺寸	185 mm×260 mm
印 张	12.75
字 数	304 千字
版 次	2010 年 8 月第 1 版
印 次	2010 年 8 月第 1 次印刷
印 数	0 001~3 000 册
定 价	22.00 元

◆ 读者邮购本书,请与本社发行科
联系。电 话:85408408/85401670/
85408023 邮政编码:610065

◆ 本社图书如有印装质量问题,请
寄回出版社调换。

◆ 网址: www.scupress.com.cn

版权所有◆侵权必究



随着现代生命科学的飞速发展和各种新型实验技术的不断涌现,高校对医学实验教学提出了更高的要求。改变传统的实验教学模式,在实践中加强对学生创新能力的培养,是目前医学实验教学改革的首要任务。为了适应国家的学科调整和病原生物学的发展,使实验教学独立为不依赖于理论教学的体系,培养学生的创新意识和创新能力,我们在查阅国内外相关资料、参考兄弟院校的实验教程、总结多年实验课教学经验的基础上,结合本学科特点,编写了这本《新编病原生物学实验教程》。

本教材定位于本科实验教学,立足于多数高校的实验条件,以满足本校针对五年制医学类本科生所开设的《病原生物学实验Ⅱ》和针对七年制及八年制临床医学学生、基础医学生所开设的《病原生物学实验Ⅰ》的教学要求为主,并兼顾针对药学专业开设的《病原生物学实验Ⅲ》、针对口腔医学专业开设的《病原生物学实验Ⅳ》和《病原生物学实验Ⅴ》的教学要求。按照各专业培养的特点和要求,满足学生通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合选修实验课程。

本教材依据学科特点,分为微生物学和寄生虫学两篇,共105个实验。在每节实验之前,结合相关理论,编写了一段概述或原理,使学生在实验过程中能既知其然,也知其所以然。在实验的编写中,尽量做到所列实验材料方便易得、方法切实可行,以及对实验结果的叙述准确、清楚。此外,我们在大多数实验之后,列出了相应的思考题,以便于学生结合理论知

识复习并思考。

本教材的理论性、实用性和系统性均较强,并结合我校教学改革和科研实际,列入了一些比较成熟的新实验和新技术,突出了其综合性和创新性的特色。实验项目分为以下3个部分:①基本实验方法,介绍病原生物学实验的基本操作技术,包括常用仪器的使用、培养基的配制等;②验证性实验,以验证病原生物学理论、加深学生感性认识的经典实验为主;③综合创新性实验,为综合病原生物学知识并结合科研而设计的一些实践性实验。本教材主要供高校医学类本科及专科生使用,也可作为本学科的研究生、进修生、青年教师和实验技术人员的参考用书。

本教材由四川大学华西基础医学与法医学院微生物学教研室、寄生虫学教研室和形态学实验室共同编写。它是集体智慧的结晶,渗透着各位编者辛勤劳动的汗水,包含着师长和同事们的热情帮助。它的出版还得到了四川大学出版社、四川大学华西医学教育与发展中心 CMB 基金的大力支持,在此表示衷心的感谢。

本教材的编写目的是使学生掌握病原生物学实验的基本方法和操作技术,强化无菌操作的观念及实验室的生物安全观念,加深学生对病原生物学基本理论的理解和认识,启迪学生的科学思维和创新意识,培养学生独立分析问题和解决实际问题的能力。如果本书的出版和使用能促进实验教学改革探索,能对读者的学业和事业有所帮助,我们将倍感欣慰。限于我们的水平与经验,本教材虽经反复审阅和修改,但难免存在疏漏之处,殷切盼望读者不吝赐教。

李婉宜 王雅静

2010年6月

目 录

绪 论	(1)
-----	-------

第一篇 微生物学实验

第一章 常用仪器的使用及试剂的配制	(9)
第一节 常规实验器材的准备	(9)
第二节 常用仪器的使用	(10)
第三节 常用试剂的配制	(17)
第二章 医学微生物学基本实验技术	(28)
第一节 显微技术	(28)
实验 1 普通光学显微镜的使用及保护	(29)
第二节 微生物形态观察技术	(30)
实验 2 活菌运动的观察	(31)
实验 3 浅部真菌的形态观察	(32)
实验 4 细菌的革兰染色法	(33)
实验 5 细菌的抗酸染色法	(35)
实验 6 负染色法	(36)
实验 7 镀银染色法	(37)
实验 8 真菌染色片的制作方法	(38)
第三节 微生物培养技术	(39)
实验 9 基础培养基的制备	(39)
实验 10 细菌接种法和生长现象观察	(41)
实验 11 细菌培养方法	(44)
实验 12 细菌计数方法	(46)
实验 13 支原体培养及生长现象观察	(48)
实验 14 螺旋体培养及生长现象观察	(49)
实验 15 真菌培养方法	(51)
实验 16 病毒培养方法	(54)
第四节 微生物菌种的保藏	(58)
实验 17 菌种的保藏方法	(58)

第三章 微生物学常用经典实验	(61)
第一节 微生物形态及结构的观察	(61)
实验 18 细菌的基本形态及特殊结构观察	(61)
实验 19 沙眼衣原体包涵体的观察	(63)
实验 20 常见真菌形态及结构观察	(64)
第二节 细菌鉴别常用的生化反应	(65)
实验 21 糖发酵试验	(66)
实验 22 甲基红试验	(66)
实验 23 V - P 试验	(67)
实验 24 枸橼酸盐利用试验	(68)
实验 25 靛基质试验	(69)
实验 26 硫化氢生成试验	(69)
实验 27 尿素分解试验	(70)
实验 28 色素生成试验	(71)
第三节 细菌分布的检查	(71)
实验 29 自然界中细菌的检查	(72)
实验 30 皮肤正常菌群的检查	(73)
实验 31 口腔及咽喉部菌群的检测	(74)
实验 32 肠道正常菌群的定性和定量检测	(76)
第四节 外界因素对细菌的影响	(77)
实验 33 热力灭菌试验	(78)
实验 34 紫外线灭菌试验	(79)
实验 35 常用化学消毒剂的抑菌试验	(80)
实验 36 噬菌体的噬菌现象	(81)
实验 37 细菌素的测定试验	(83)
第五节 细菌的变异现象	(84)
实验 38 细菌 L 型变异的诱导及观察	(84)
实验 39 细菌菌落变异的诱导及观察	(85)
实验 40 细菌鞭毛变异的诱导及观察	(86)
实验 41 细菌耐药性变异的观察	(87)
第六节 细菌的毒力相关试验	(88)
实验 42 细菌的黏附试验	(88)
实验 43 荚膜致病作用的观察	(89)
实验 44 细菌致病性酶的检测	(90)
实验 45 细菌内毒素的检测	(92)
实验 46 细菌外毒素的检测	(94)
第七节 微生物常用的免疫学检测试验	(96)
实验 47 玻片凝聚试验	(96)
实验 48 肥达试验	(97)

实验 49 外斐试验	(99)
实验 50 钩端螺旋体的血清学试验	(101)
实验 51 ELISA 法检测肺炎支原体	(103)
实验 52 病毒的血清学试验	(104)
第八节 微生物常用的分子生物学试验技术	(107)
实验 53 细菌质粒 DNA 的提取	(107)
实验 54 聚合酶链式反应	(109)
实验 55 斑点杂交	(110)
第九节 微生物试验在药学中的应用	(112)
实验 56 抗菌药物最低抑菌浓度和最低杀菌浓度的测定	(112)
实验 57 琼脂扩散法药物敏感试验	(114)
实验 58 抗生素效价测定	(116)
实验 59 注射用药的无菌检查	(118)
实验 60 口服药品中细菌总数的测定	(120)
第四章 微生物学综合创新性实验	(123)
第一节 食品的卫生细菌学检测	(123)
实验 61 水的卫生细菌学检验	(123)
实验 62 冷饮的卫生细菌学检测	(126)
实验 63 罐头的卫生细菌学检测	(127)
第二节 临床常见感染性疾病的微生物学检测	(129)
实验 64 化脓性感染的微生物学检测	(130)
实验 65 消化道感染的微生物学检测	(131)
实验 66 食物中毒的微生物学检测	(133)
实验 67 泌尿系统感染的微生物学检测	(135)
实验 68 厌氧菌感染的微生物学检测	(137)
实验 69 乙型肝炎病毒感染的微生物学检测	(138)
实验 70 人类免疫缺陷病毒感染的微生物学检测	(140)
实验 71 皮肤癣菌感染的微生物学检测	(142)

第二篇 寄生虫学实验

第一章 寄生虫学基本实验方法	(147)
第一节 寄生虫标本的采集与保存	(147)
第二节 寄生虫标本的类别和观察方法	(149)
第三节 粪便直接涂片法	(150)
第四节 血涂片检查法	(151)
第二章 寄生虫学常用经典实验	(153)
第一节 线 虫	(153)
实验 72 似蚓蛔线虫	(153)

实验 73	毛首鞭形线虫	(155)
实验 74	十二指肠钩口线虫与美洲板口线虫	(155)
实验 75	蠕形住肠线虫	(158)
实验 76	班氏吴策线虫与马来布鲁线虫	(159)
实验 77	旋毛形线虫	(161)
第二节	吸 虫	(162)
实验 78	华支睾吸虫	(162)
实验 79	卫氏并殖吸虫与斯氏狸殖吸虫	(164)
实验 80	布氏姜片吸虫	(165)
实验 81	肝片形吸虫	(166)
实验 82	日本裂体吸虫	(167)
第三节	绦 虫	(170)
实验 83	链状带绦虫与肥胖带绦虫	(170)
实验 84	微小膜壳绦虫	(172)
实验 85	细粒棘球绦虫	(172)
实验 86	曼氏迭宫绦虫	(173)
第四节	原 虫	(174)
实验 87	溶组织内阿米巴与结肠内阿米巴	(174)
实验 88	蓝氏贾第鞭毛虫	(176)
实验 89	阴道毛滴虫	(176)
实验 90	杜氏利什曼原虫	(177)
实验 91	间日疟原虫与恶性疟原虫	(178)
实验 92	刚地弓形虫	(180)
第五节	节肢动物	(180)
实验 93	蚊	(180)
实验 94	蝇	(182)
实验 95	白 蛉	(183)
实验 96	蚤	(184)
实验 97	虱	(185)
实验 98	蜱	(186)
实验 99	恙 螨	(187)
实验 100	疥 螨	(187)
实验 101	蠕形螨	(188)
第三章	寄生虫学综合创新性实验	(189)
实验 102	肝吸虫成虫的染色	(189)
实验 103	蚊的采集及解剖	(190)
实验 104	寄生虫实验动物保种	(191)
实验 105	杜氏利什曼原虫及阴道毛滴虫的体外培养	(192)

绪 论

病原生物学是专门研究与人体健康有关的病原体的形态结构、生命活动规律，及其与人体和外环境相互关系的一门科学，它是随我国学科调整而将医学微生物学和医学寄生虫学合并而成的新学科。病原生物对人类健康危害极大，据世界卫生组织（WHO）统计，全世界每年有 1 700 多万人死于各类感染性疾病，其中危害最大的是获得性免疫缺陷综合征（AIDS，艾滋病），每天新增感染人数约 14 000 人。全球的似蚓蛔线虫、钩虫和毛首鞭形线虫的感染率分别为 24%、24% 和 17%，22 亿人生活在疟疾流行区。因此，我们必须高度重视对病原生物的研究，争取对其所致的疾病能够准确诊断，并使该类疾病得到有效控制或消灭。

病原生物学实验技术就是研究和发展对病原生物的检测技术，它包括了病原学检查、免疫学检查和分子生物学检查三个方面。病原生物学实验技术是医药类学生“基本技能”的重要体现，也是推动病原生物学学科发展的重要动力，所以在学习本课程时必须勤于动手，掌握实验的基本原理和实验方法，为将来的学习和工作奠定坚实基础。

一、病原生物学实验技术的发展简史

医学的发展往往都与医学实验技术的突破有关，病原生物学的发展也是如此。病原生物学实验技术中常用的器材是显微镜，如果没有荷兰人列文虎克（Antony van Leeuwenhoek）制备的第一部显微镜，就没有当今各类显微镜的存在；如果没有科赫（Robert Koch）发明的固体培养基，就无法把细菌分离出来；如果没有组织或细胞培养技术，就不可能对病毒进行深入研究。由此可见，病原生物学的发展与实验技术的发展有着密切的关系，所以在学习病原生物学理论知识时必须重视病原生物学实验的学习。

纵观我国医学教育的历程，《病原生物学实验》课程开设的时间并不长，但有关病原生物学实验技术却与《医学微生物学》和《人体寄生虫学》相伴而行，有着悠久的发展历史。为了方便学习理解和掌握，我们把病原生物学实验技术，主要是微生物学实验技术的发展简史分为以下两个时期。

1. 微生物学实验时期

微生物学实验时期指人们在经验时期之后，开始进行微生物学的有关实验时期。首先观察到微生物的人是荷兰的列文虎克（图绪-1），他于 1676 年用自制的一台可以放大 266 倍的原始显微镜，在牙垢、雨水、井水等标本中观察到许多运动着的微小生物，并记载了它们球状、杆状、螺旋状的各种形态，为微生物的存在提供了客观依据。



图绪-1 列文虎克



图绪-2 巴斯德

19 世纪 60 年代，法国科学家巴斯德（Louis Pasteur，图绪-2）在解决葡萄酒变质原因的实验中，通过著名的“曲颈瓶实验”，首先证明有机物质的发酵和腐败是由微生物引起的，而酒味变酸是污染了其他杂菌所致，从而推翻了当时占统治地位的“自然发生学说”。他还开展了微生物的形态学和生理学研究，肯定了微生物在自然界中所起的作用，为微生物学学科的发展作出了不可磨灭的贡献。同时，他为了克服酒类变酸的问题，将发酵的基质预先经 62°C 处理 30 min，然后再加入酵母，成功解决了酒味变酸的问题，因而建立了“巴氏消毒法”，也为后来的李斯特（Joseph Lister）创用苯酚（石炭酸）喷洒手术室和煮沸处理手术用具等消毒措施奠定了基础。

微生物学实验时期的另一位杰出代表人物是德国的学者科赫（Robert Koch，图绪-3）。他首先创用了琼脂固体培养基，通过将培养基倾注成平板，便可以把患者排泄物或其他标本中的细菌分离出单个菌落，获得了纯培养的各种细菌。他分离到的第一种细菌就是炭疽芽胞杆菌，并带动了一大批学者，在 19 世纪最后 20 年里分离出了许多对人具有致病性的重要病原菌，如结核分枝杆菌、白喉棒状杆菌、霍乱弧菌、破伤风梭菌、脑膜炎奈瑟菌等。他针对感染性疾病中病原体的确定，提出了著名的科赫法则（Koch's postulates），至今仍具有指导意义。



图绪-3 科赫

当然，在这个时期还有发现患烟草花叶病的烟叶除菌滤汁可使正常烟叶出现花斑的俄国学者伊凡诺夫斯基（Ivanovski），发现感染细菌的病毒——噬菌体的英国学者特沃特（Twort），发现青霉素的英国细菌学家弗莱明（Alexander Fleming）等。他们都是善于在实验中发现问题和解决问题的科学工作者，也都为医学微生物学的发展作出了巨大贡献。

2. 现代微生物学时期

由于生物化学、免疫学和分子生物学等学科的迅速发展,用于病原生物实验的技术也得到了快速的发展,反过来又推动了病原生物学的发展。这主要表现在以下几个方面。一是运用这些新技术,发现了很多新现的病原体。例如,自1973年以来,已经发现了30多种病原微生物,包括军团菌、幽门螺杆菌、伯氏疏螺旋体等细菌,以及人类免疫缺陷病毒(HIV)、西尼罗病毒、SARS冠状病毒等。二是病原微生物的基因组研究取得了长足进步,目前已经完成对150多种细菌DNA的测序工作,其中我国完成了6种细菌DNA的测序工作,现正逐步进入后基因组学时代。这将对了解微生物的致病机制、研发新型抗感染药物和疫苗具有重大意义。三是对微生物感染的检测手段有了快速发展,分子检测技术已经得到广泛应用,包括DNA的(G+C)摩尔百分含量、DNA杂交、16S rRNA寡核苷酸序列分析、聚合酶链式反应(PCR)、定量PCR、限制性片段长度多态性(RFLP)分析等,大大提高了实验诊断水平。四是疫苗研制在经历了灭活或减毒全菌疫苗、亚单位疫苗之后,进入了全新的DNA疫苗(亦称核酸疫苗)研究,而且通过基因重组技术研制的多价重组疫苗正逐步显示出其强大的生命力,对感染性疾病的预防起到了巨大作用。

虽然病原生物学领域已经取得骄人的成绩,但病原生物引起的多种感染性疾病仍严重威胁着人类健康,而且微生物将永远伴随人类的存在而存在。所以,要达到控制和消灭危害人类健康的感染性疾病的宏伟目标,任重而道远。

二、病原生物学实验室的特殊性与规则

病原生物学实验室是完成病原生物学实验教学的地方,由于多数病原生物具有传染性,所以病原生物学实验室是一个具有特殊性的学习场所。多数病原生物的个体微小,肉眼不能直接观察到,但它却客观存在于我们周围。因此,进入病原生物学实验室必须严格遵守以下规则。

- (1) 进入实验室必须先穿好隔离服,必要时还须戴上口罩或手套。
- (2) 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。
- (3) 在实验室内,禁止吃东西、吸烟,以及大声喧哗或嬉戏。
- (4) 未经老师许可,不得擅自搬动实验器材和实验室内的其他设施,以及已经调试好的示教片。
- (5) 按照实验室要求,积极地计划、安排要进行的实验,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内容。
- (6) 实验用过的被污染或有菌器材,必须放在指定地点或按要求处理,不能随便乱丢乱放。
- (7) 如果在实验中发生有菌材料或传染性标本污染桌面或衣服、打翻菌液、割破手指等情况,应立即报告老师并及时处理,切勿隐瞒或自作主张处理。
- (8) 要爱护实验室内的仪器,在使用显微镜及其他贵重仪器时,请严格按照规程操作。对实验用的消耗材料、药品、试剂,以及水、电、气等,都要求厉行节约。
- (9) 实验完毕,应将实验器材放回原处,需培养的物品要放入培养箱内。清理好桌面,做好室内清洁,保持室内整齐。关好门、窗、水、电和燃气,脱下隔离服,并认真洗手,然后离开实验室。

(10) 未经许可，不得将实验室内任何物品，特别是菌种和标本等带出实验室，以免造成污染或感染。

三、病原生物学实验室的生物安全

我国卫生部根据病原微生物的传染性、感染后对个体或者群体的危害程度，将病原微生物分为以下四类。第一类病原微生物是指能够引起人类或者动物非常严重感染和疾病的微生物，以及我国尚未发现或者已经宣布消灭又复活的微生物。第二类病原微生物是指能够引起人类或者动物严重感染和疾病，比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物。第三类病原微生物是指能够引起人类或者动物感染和疾病，但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后引起的疾病不严重，并且具备有效治疗和预防措施的微生物。第四类病原微生物是指在正常情况下不会引起人类或者动物感染和疾病的微生物。第一类和第二类病原微生物统称为“高致病性病原微生物”，而病原生物学实验课多数只涉及第四类病原微生物，只在少数情况下会涉及第三类病原微生物。

根据病原微生物的分类，我国政府于 2004 年 11 月通过国务院第 424 号令颁发了《病原微生物实验室生物安全管理条例》，使从事病原生物学教学和科研的机构有了明确的依据和具体的管理规章制度，确保了实验室生物安全。根据生物安全水平（biosafety level, BSL），病原生物学实验室分为四级，相应为 BSL-1~BSL-4。表绪-1 简要介绍了各级实验室的要求、要点及适用范围。

表绪-1 生物安全实验室分级与适用范围

实验室级别	实验室主要条件	适合的病原微生物
BSL-1	没有特殊要求	主要适合第四类病原微生物
BSL-2	Ⅱ级生物安全柜和应急喷淋等	主要适合第三类病原微生物
BSL-3	建筑要自成隔离区，应有压力梯度并控制气流方向，Ⅱ级或Ⅲ级生物安全柜	高致病性病原微生物，主要是第二类病原微生物
BSL-4	建筑应远离城市，有Ⅲ级生物安全柜，穿正压防护服	高致病性病原微生物，主要是第一类病原微生物

四、病原生物学实验的目的和要求

1. 学习目的

病原生物学实验课是《医学微生物学》和《医学寄生虫学》课程的重要组成部分，是理论知识和实验技术相结合的具体体现。所以，学习本课程的目的主要体现在以下五个方面。

(1) 在系统学习《医学微生物学》和《医学寄生虫学》理论知识的基础上开展病原生物实验课，一方面使学生加深对理论知识的理解，验证和巩固其理论知识；另一方面也使学生学习和掌握病原生物学的基本操作技术。

(2) 通过课程中的实验操作，培养学生独立工作和独立学习的能力；通过观察实验结

果,培养学生观察、思考和分析问题的能力;并使学生逐步建立严格的科学学风、严肃的科学态度和严密的工作方法。

(3) 通过本课程的学习,让学生为临床感染性疾病的诊断、预防和治疗奠定良好的实验基础。

(4) 通过本课程的学习,让学生了解和熟悉有关病原生物学的科学研究思路、研究方法和基本实验技术。

(5) 通过学生合作完成实验操作内容,从而培养学生互相帮助和团结协作的团队精神。

2. 学习要求

为了圆满达到本课程的学习目的,提高病原生物学实验课的教学质量和教学效果,特提出以下要求。

(1) 严格遵守实验室规则,牢固树立有菌观点,掌握无菌操作技术。

(2) 实验前做好预习,明确各实验的目的和要求,了解实验的原理、方法和注意事项,明确将要进行的实验内容,并做好必要的准备工作。

(3) 实验操作时要仔细认真,对较复杂的实验应分工协作共同完成。客观和准确地记录实验结果,联系理论知识分析实验结果。若所得到的实验结果与预期结果不符合时,要加以分析、讨论并找出原因,必要时还应做重复实验。

(4) 按照授课教师要求,认真完成实验报告和绘图作业,对所做过的实验要求达到掌握的程度。

(5) 严格遵守操作规程,杜绝各种实验事故的发生。

总之,只要大家严格遵守病原生物学实验室的规则,就能够保证每位学生在病原生物学实验课程学习中的生物安全;明确病原生物学实验的学习目的和要求,自觉并认真完成学习任务 and 实验操作内容,就会在本课程学习中得到收获,并掌握感染性疾病诊、防、治的基本实验技术,为将来开展保护人类健康的医疗卫生工作奠定坚实基础。

(李明远 编写)

第一篇

微生物学实验

