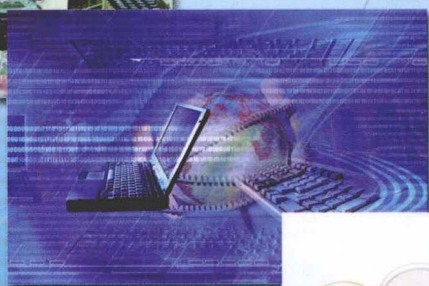


全国高等院校医学实验教学规划教材

病原生物学与 医学免疫学实验

主编 杨锦荣 李淑红



科学出版社

www.sciencep.com

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

主 编 杨锦荣 李淑红

副主编 米 娜 陈军剑

编 委 (按姓氏笔画排序)

冯胜军(广东医学院)

黄霞云(广东医学院)

刘永茂(吉林大学)

王 欣(广东医学院)

徐珠锦(广东医学院)

张俊爱(广东医学院)

郭 震(广东医学院)

林华胜(广东医学院)

宋 杰(广东医学院)

文秋嘉(广东医学院)

许琴英(广东医学院)

张 薇(广东医学院)

科学出版社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本教材全书分为常用仪器使用、基本实验、综合性实验和创新性实验四篇,附录有常用培养基、指示剂、缓冲液的制备和文后彩图。本教材突出综合性实验及创新性实验,独立成编,利用病原生物学实验室自有的标本制作了大量插图,由于文中有大量插图,使用者更加容易学习和掌握病原体的形态结构;本教材内容完整,层次清晰,便于学生提前预习,更加适合创新人才的培养。

本书适合我国高等医学院校5年制、长学制学生使用,也可供研究生参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

病原生物学与医学免疫学实验 / 杨锦荣,李淑红主编. —北京:科学出版社,2011

(全国高等院校医学实验教学规划教材)

ISBN 978-7-03-029670-2

I. 病… II. ①杨… ②李… III. ①病原微生物-实验-医学院校-教材 ②医学:免疫学-实验-医学院校-教材 IV. ①R37-33 ②R392-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第236067号

责任编辑:周万灏 李国红 / 责任校对:朱光兰

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄超

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

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>

新华印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2011年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2011年1月第一次印刷 印张:8 3/4 插页:4

印数:1—5 000 字数:195 000

定价:22.00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》 编写指导委员会

主任	丁元林				
副主任	施建明				
委员	刘仿	唐湘涓	吴斌	李果明	黄培春
	苏汝好	唐焕文	贾振斌	庄海旗	
总策划	刘仿				
秘书	徐美奕	林华胜	余海波		

总 序

随着 21 世纪经济与社会的不断发展,科学技术既向纵深发展、不断分化,又互相渗透、不断融合;同时,新兴学科与边缘学科的兴起、新技术的应用、信息量的剧增,对医学的发展产生了重大而深远的影响,这些必将促进医学教育的全面改革。实验教学作为高等教育的重要组成部分,是学生实践能力和创新能力培养的重要途径,其重要性已受到越来越广泛的关注。

目前,传统实验教学模式仍占主导地位,存在不少弊端和不足:以学科为基础构建的课程体系,忽略了生命科学的整体性、系统性;学科体系繁多,相互孤立,学科间联系不够;实验室分散,功能单一,设备重复购置,资源浪费,效率低下,调配困难;实验教学内容陈旧,手段落后,方式老化,实验内容以验证理论为主,缺少现代医学实验内容;医学生学习的积极性、主动性不强。这些明显滞后于现代医学的发展,影响教学质量,不利于大学生创新意识和实践能力的培养,难以培养出高素质、创新型的医学人才。如何改革传统的实验教学模式,培养具有创新精神、知识面广、动手能力强的新型医学人才,已成为当务之急。教育部、卫生部《关于加强医学教育工作,提高医学教育质量的若干意见》(教高〔2009〕4号)明确提出“高等学校要积极创新医学实践教学体系,加强实践能力培养平台的建设。积极推进实验内容和实验模式的改革,提高学生分析问题和解决问题的能力”,进一步明确了医学实验教学的重要性和改革的必要性。根据教育部精神,要对传统医学实验教学模式进行改革,最大限度地整合有限资源,优化重组教学实验室,依托相关学科优势,与学科建设相结合,构建开放共享的实验教学中心,力求突出和贯彻执行教育部提出的“三基”、“五性”和注重实用性的要求,以培养学生的探索精神、科学思维、实践能力和创新能力。构建新型的医学实验教学体系,要求我们从根本上改变实验教学依附于理论教学的理念,理论教学与实验教学要统筹协调,既有机结合又相对独立,建立起以能力培养为主线,分层次、多模块、相互衔接的实验教学体系。

以教学内容和课程体系改革为核心、培养高素质、创新型人才为目标,科学整合实验教学内容,打破既往学科框架,按新构建的科学体系,编写适合创新性实验教学体系的配套实验教材已显非常迫切。在科学出版社的大力支持下,《全国高等院校医学实验教学规划教材》编委会以广东医学院为主体,协同重庆医科大学、中山大学等全国 33 所高等医药院校相关专业的 167 名专家、教授共同编写了这套实验教学系列教材。全系列教材共 26 本,分别是《医学物理学实验》、《医用基础化学实验》、《医用有机化学实验》、《系统解剖学实验》、《医学机能学实验教程》、《病原生物学与医学免疫学实验》、《生物化学与分子生物学实

验指导》、《病理学实习指南》、《计算机应用基础上机与学习指导》、《预防医学实习指导》、《卫生统计学实习指导》、《流行病学实习指导》、《临床营养学实习指导》、《营养与食品卫生学实习指导》、《毒理学基础实习指导》、《环境卫生与职业卫生学实习指导》、《健康评估实验指导》、《护理学基础实验指导》、《内科护理学实验指导》、《外科护理学实验指导》、《妇产科护理学实验指导》、《儿科护理学实验指导》、《药理学实验教程》、《药学实验指导》、《临床免疫学检验实验》、《核医学实验教程》。

本系列实验教学规划教材是按照教育部国家级实验教学示范中心的要求组织策划,根据专业培养要求,结合专家们多年实验教学经验,并在调研当前高校医药实验室建设的实际情况基础上编写而成,充分体现了各学科优势和专业特色,突出创新性。同时借鉴国外同类实验教材的编写模式,力求做到体系创新、理念创新。全套教材贯彻了先进的教育理念和教学指导思想,把握了各学科的总体框架和发展趋势,坚持了理论与实验结合、基础与临床结合、经典与现代结合、教学与科研结合,注重对学生探索精神、科学思维、实践能力的培养,我们深信这套教材必将成为精品。

本系列实验规划教材编写对象以本科、专科临床医学专业为主,兼顾预防、基础、口腔、麻醉、影像、药学、中药学、检验、护理、法医、心理、生物医学工程、卫生管理、医学信息等专业需求,涵盖全部医学生的医学实验教学。各层次学生可按照本专业培养特点和要求,通过对不同板块的必选实验项目和自选实验项目相结合修选实验课程学分。

由于医学实验教学模式尚存在地区和校际间的差异,加上我们的认识深度和编写水平有限,本系列教材在编写过程中难免存在偏颇之处,敬请广大医学教育专家谅解,欢迎同行们提出宝贵意见。

《全国高等院校医学实验教学规划教材》编写指导委员会

2010年6月

前 言

病原生物学与医学免疫学是基础医学领域的一门重要的基础学科,包括医学微生物学、医学寄生虫学和医学免疫学。其实验教学占有十分重要的地位。它可为学生们提供感性认识和理论印证,使其掌握正确的实验操作方法与基本技能,培养学生独立思考问题、独立开展工作的能力,以及严谨的科学作风和实事求是的科学态度。

本教材以教学大纲为依据,以广东医学院长期开设的实验课教学内容为基础,参照目前国内医药院校的教学现状,结合多年来教学实践中的经验,我们组织一线教师编写了这本实验教材。全书共分为常用仪器使用、基本实验、综合性实验和创新性实验四篇。在全书的附录部分详细介绍了各种常用培养基、指示剂、缓冲液的制备。

本教材突出了综合性实验及创新性实验,独立成编;由于本教材文中配有大量插图,使用者更加容易学习和掌握病原体的形态结构;本教材内容完整,层次清晰,便于学生们提前预习,更加适合创新人才的培养。本教材适合我国高等医药院校5年制、长学制的学生使用,也可供研究生及相关科研人员参考使用。

由于编者水平有限,教材中的错误和不妥之处在所难免,恳请广大读者批评、指正。

编 者

2010年10月

目 录

第一篇 常用仪器使用

第一章 实验室规则	(1)
第二章 常用仪器的使用和维护	(2)

第二篇 基本实验

第三章 医学微生物学基本实验	(5)
实验一 细菌的形态与结构观察	(5)
实验二 细菌的培养及生长现象观察	(8)
实验三 外界因素对细菌的影响	(12)
实验四 常见病原性细菌的分离鉴定方法	(15)
实验五 厌氧芽孢梭菌属与需氧芽孢杆菌	(23)
实验六 白喉杆菌与结核杆菌	(27)
实验七 衣原体、支原体、立克次体、螺旋体、放线菌的形态观察	(30)
实验八 真菌培养及形态结构观察	(32)
实验九 病毒的形态	(33)
实验十 病毒的分离培养	(34)
实验十一 病毒血凝和病毒血凝抑制试验	(36)
第四章 医学寄生虫学基本实验	(38)
实验一 线虫	(38)
实验二 吸虫	(44)
实验三 绦虫	(51)
实验四 叶足虫	(57)
实验五 鞭毛虫	(61)
实验六 孢子虫	(64)
实验七 医学节肢动物	(68)
第五章 医学免疫学基本实验	(76)
实验一 凝集反应	(78)
实验二 沉淀反应	(82)
实验三 免疫细胞功能的检测	(89)
实验四 豚鼠过敏试验	(94)
实验五 免疫标记技术	(95)

第三篇 综合性实验

第六章 综合性实验项目	(98)
-------------------	------

实验一	自然环境及人体中微生物的检测	(98)
实验二	临床血液标本的检测	(99)
实验三	临床粪便标本的检测	(101)
实验四	结核菌素试验	(102)
实验五	乙肝两对半的检测	(103)
实验六	流感病毒的检测	(105)
实验七	粪便中虫卵的检测	(106)
实验八	日本血吸虫特有的血清学检测	(107)
实验九	固有性免疫功能的检测	(108)
实验十	淋巴细胞的分离与 T 细胞的亚群鉴定	(112)

第四篇 创新性实验

第七章	创新性实验项目	(116)
实验一	中药的抗菌能力检测	(116)
实验二	细菌的接合试验	(117)
实验三	华支睾吸虫病流行性调查	(118)
实验四	蔬菜中虫卵的检查	(118)
实验五	口腔病原体的自查	(119)
实验六	胡桃楸提取物对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响	(119)
参考资料	(121)

附 录

附录一	常用细菌培养基的制备	(122)
附录二	常用试剂的配制	(127)
彩图		

第一篇 常用仪器使用

第一章 实验室规则

1. 进入实验室要穿白大衣,必要时要戴帽子和口罩,实验指导、书籍和文具带入后,应放在实验台下的抽屉里,饮水和食物等一律不得带入实验室。
2. 保持实验室安静,关闭手机铃声。严禁在实验室内吸烟或饮食。
3. 留长发的同学要将头发扎好,不得披散。
4. 用过的吸管、滴管、试管、玻片等带菌器材,应放在指定的地方或含消毒液的容器内。酒精灯不可互相点燃,以防发生意外。
5. 如不慎发生传染性材料污染台面、器物等意外,要立即报告老师,进行妥善处理。
6. 实验材料和动物等应按规定处理,不得将实验室的动物、物品带出室外。
7. 不可擅自搬动实验器材或室内设施。爱护公物,节约使用实验材料,看镜下示教时,未经许可,不要移动显微镜推进器,改变镜下视野。
8. 爱护显微镜、标本、药品及其他器材,不得乱拧室内仪器控制按钮。不慎发生损坏时应立即报告老师,照价赔偿。
9. 实验完毕,整理实验材料;检查门、窗、水、电、火。认真做好清洁,桌面、地面打扫干净,凳椅排列整齐。

实验室常用仪器种类很多,下面仅就显微镜、恒温箱和水浴箱等的使用和维护简要加以介绍。

一、显微镜的使用与维护

(一) 显微镜的使用

1. 取出显微镜(图 1-2-1),放在实验台上,保持载物台水平状态。

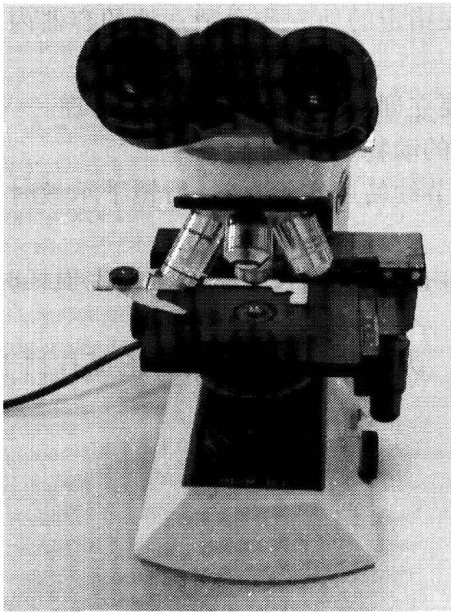


图 1-2-1 显微镜

2. 调整两目镜间距。

3. 将灯源亮度调节开关电压调节器调节至“0”刻度处,接通电源,打开显微镜电源开关,慢慢调节灯源亮度调节开关和集光器,使光线达到最佳亮度。

4. 要使光线强弱适宜,低倍镜需要弱光,高倍镜及油镜则需强光,可通过集光器位置的高低、灯源亮度调节及光圈大小调节。

5. 检查标本时,最初尽量用低倍镜,当找到物体后,再更换高倍镜。由于高倍镜或油镜视野面积比低倍镜小,因此在由低倍镜换高倍镜或油镜之前,必须把观察部位移到视野正中央,然后再转换。寄生虫标本常用系统查找法检查,微生物标本可直接用油镜检查。

6. 立体观的概念 观察的寄生虫均为整体标本,是立体的,有一定的厚度。在螺旋上下调节时,只能看到标本的某一层平面。往上调节时,上层清晰;往下调节时,下层清晰。随着上下调节,应依次联系到各层间

的不同位置和所示的不同结构,对虫体有个立体概念。

7. 油镜的使用

(1) 用低倍或高倍镜找到所观察的物体,将其移至视野中心,调节光源亮度调节开关至最佳亮度,转换油镜头,在镜头对准标本片上加一小滴镜油后,即在显微镜侧面注视镜头,慢慢小心转动粗螺旋,使油镜头浸入油滴中,注意切勿与标本接触,以免压损标本。

(2) 接目镜边看边慢慢转动粗调节器,使载物台缓缓下移(此时只能向下,不能再向上移动,以免压碎玻片标本和损坏镜头),注意视野中出现物像时,改用细调节器反方向略加调节,至物像清楚为止。若发现油镜末端已离开油面,但尚未观察到视野内物像时,则仍按以上步骤,将油镜头浸入油滴中,重新观察。

(3) 观察完毕应把镜头和载玻片上的镜油擦干净。方法是使载物台下移,把油镜头转向外侧,先用擦镜纸将镜头上的镜油擦拭,换用擦镜纸蘸取少许镜头清洁剂擦拭镜头,并立即用另一干净擦镜纸拭去镜头上的清洁剂,以免镜片脱胶损坏。标本上的镜油,则先用擦

镜纸敷在载玻片上将镜油吸去,换另一擦镜纸敷在载玻片上,在其上滴 1 滴二甲苯,小心拖拉擦镜纸将镜油擦去,直至无油迹。

8. 显微镜用毕,需将低倍镜移至中央,或将接物镜转成“八”字形,集光器向下移,然后转动粗调节,使镜台下移,以免接物镜与集光器相碰受损。灯源亮度调至“0”刻度处,先关闭显微镜开关,后切断插座电源。最后将显微镜放入镜柜中。

(二) 显微镜的维护

1. 显微镜是贵重的精密仪器,使用时要小心爱护,禁止随意拆卸。
2. 显微镜保存时,不得放置在潮湿地方,更不得与挥发性药品如酒精或酸类溶液放在一起,防止损坏金属部分。
3. 显微镜不能放在强阳光下暴晒,因为金属吸热,而镜头片均为数层粘连,易于溶裂。
4. 镜头必须注意保持清洁,不得用手摸,以免视野模糊。镜头沾污油滴或污物,如系水溶性则用擦镜纸蘸清水擦之,油性的则用擦镜纸蘸二甲苯擦后再以擦镜纸擦之。
5. 镜头只能擦外侧镜片,不得擦里面,更不得用口吹,也不能随便把目镜取下,以免尘土落入。
6. 变换接物镜时要转动回转板的螺旋部分,不要直接扳动镜头。

二、水浴箱的使用与维护

1. 水浴箱(图 1-2-2)使用前应加入与需用温度相近的温水,并放入一个温度计。
2. 通电后红色指示灯亮,表示电热管(发热器)已发热,观察温度达到所需温度时,调节控制器旋钮到指示灯忽亮忽暗之点,此后箱内即能自动保持水温恒定。
3. 保持箱内外整洁,箱内温水应定期更换。
4. 温度控制器一经调好固定后,不得任意转动。

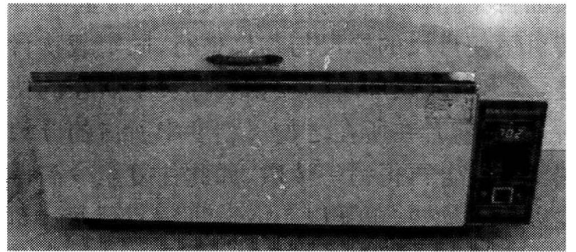


图 1-2-2 水浴箱

5. 防止酸碱等腐蚀性药物进入箱内,以免损坏箱壁,如被病原菌污染则应立即消毒处理。

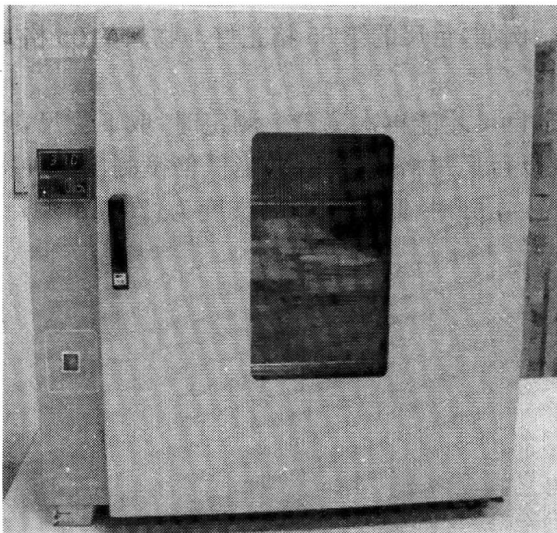


图 1-2-3 培养箱

三、温箱的使用和维护

1. 培养箱(图 1-2-3)为便于热空气对流,温箱内的培养物不宜过挤,无论放入或取出培养物,应随手关门以免温度波动。
2. 通电后红色指示灯亮,表示电热管(发热器)已发热,观察温度计达到所需温度时,调于控制器旋钮到指示灯忽亮忽暗之点,此后即能自动保持箱内温度恒定。
3. 为防止电热式温箱内环境过于干燥,

可在箱内放一盛水容器,维持一定湿度。

4. 保持温箱内外整洁。

四、显微镜测微尺的使用

寄生虫虫体的体积大小往往具有鉴别意义,其测定一般用显微镜测微尺(图 1-2-4)。该尺由目镜测微尺(目尺)和物镜测微尺(物尺)组成。

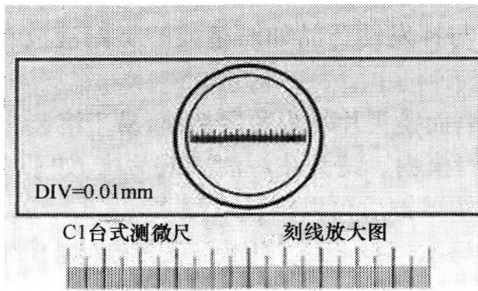


图 1-2-4 测微尺结构示意图

目尺分为线性目尺和网状目尺。线性目尺为一直径 2cm 的圆形玻片,其上有 0~50 或 100 的刻度。网状目尺上有数个正方格的网状刻度,可用来测量物体的体积。

物尺是一块中央镶有刻度标尺的载玻片,其标尺全长 1mm,分为 10 个大格,每个大格又分成 10 个小格,共 100 个小格,每小格 0.01mm。物尺是显微长度测量的标准,它并不被用来直接测量,而是用它来校正目尺,故其质量对所测微体影响极大。

使用方法如:将目镜取下,旋开上方的透镜,把目尺放在镜筒的光阑上,使有刻度的一面朝上,旋回透镜。置物尺于载物台上,刻度朝上,调换物镜至所需倍数,调解焦距使至物尺的刻线最清晰。此时,在视野内可以同时看到物尺和目尺。移动载物台将物尺标尺移至目尺下方以避免后者标尺上的刻度妨碍视线。旋转目镜使目尺的标尺与物尺平行,固定载物台使物尺最左端的刻线与目尺最左端的刻线重叠,读出目尺最后端刻线物尺标尺上所在的位置。如目尺右端线不与物尺上任何刻线重合时,读出前者在所在之物尺刻度中所占的分数。移动物尺再重新使物尺左端刻线与目尺左端刻线重合再得另一读数,如此往复至少需得到 5 个读数后求出其平均数,以目尺的刻度数除以此平均数,再乘以 $10\mu\text{m}$,即得目尺每一刻度所代表的实际长度。公式如下:

$$\text{目尺每格值}(\mu\text{m}) = \frac{\text{物尺格数}}{\text{目尺格数}} \times 10$$

公式中的“10”表示物尺每个小格长 $10\mu\text{m}$ 。例如,目尺的第 35 格正好与物尺的 26 格重合,代入公式:目尺每格值 $(\mu\text{m}) = 7.4\mu\text{m}$

如果更换不同放大率的镜头,必须重新标定目尺才能再次测量。测定时,取下物尺,换上标本片,记录被检标本占目尺的格数,然后乘以目尺每格值。例如,当低倍镜测出某种寄生虫卵的长度为目尺的 5 格,而已知每格等于 $7.4\mu\text{m}$ 时,则该虫卵的长度为: $7.4\mu\text{m} \times 5 = 37\mu\text{m}$ 。

第二篇 基本实验

第三章

医学微生物学基本实验

实验一 细菌的形态与结构观察

微生物学是一门形态学科。各种细菌在一定环境条件下,有相对恒定的形态与结构,了解细菌的形态与结构是鉴别细菌的重要方法之一。细菌涂片的制备、染色及形态观察在微生物学实验过程中是一个重要的基本环节。

【实验目的】

1. 观察常见细菌的基本形态和一些细菌的特殊结构。
2. 掌握革兰染色的原理和操作方法。
3. 熟悉悬滴法并观察细菌的运动能力。

一、观察细菌的基本形态与特殊结构

【实验原理】

细菌的基本形态分为球菌、杆菌和螺形菌。球菌为圆形或椭圆形,直径约 $1\mu\text{m}$,各种球菌的排列方式有不同类型;杆菌为直杆状,各种杆菌的大小和形态有很大差异;螺形菌是菌体有弯曲的细菌,菌体有一个弯曲呈逗号状的为弧菌,有多个弯曲的为螺菌。

细菌的特殊结构包括荚膜、鞭毛、菌毛和芽孢。其中荚膜、鞭毛和芽孢通过特殊的染色方法可在光学显微镜下观察,而菌毛太微小,只能在电子显微镜下观察。荚膜为菌体外的黏液性物质,不易着色,革兰染色后为透明不着色区,荚膜染色为淡紫色;鞭毛为细长丝状结构,需通过鞭毛染色法使鞭毛变粗后才能在显微镜下观察到;芽孢用革兰染色亦不易着色,通常显示为透明圆形或椭圆形结构,如用芽孢染色法则染出的芽孢呈红色,菌体呈蓝色。

【实验器材】

1. 示教玻片 葡萄球菌、链球菌、脑膜炎奈瑟菌、大肠埃希菌、破伤风梭菌、产气荚膜梭菌、霍乱弧菌、变形杆菌(鞭毛染色)、肺炎链球菌(荚膜染色)。
2. 其他 显微镜。

【实验方法】

显微镜油镜下观察以上细菌示教玻片。

【实验结果】

1. 葡萄球菌镜下呈圆形,革兰染色阳性,葡萄串样或散在排列,无芽孢无荚膜(彩图1)。

2. 链球菌镜下呈圆形或椭圆形,革兰染色阳性,长链或短链状排列,无芽孢无荚膜(彩图 2)。

3. 肺炎链球菌镜下为矛头状近似圆形,革兰染色阳性,两两排列,宽端相对,尖端向外,可见荚膜(彩图 3)。

4. 脑膜炎奈瑟菌镜下近似肾形或豆形,革兰染色阴性,两两排列,形似咖啡豆,无芽孢无荚膜。

5. 大肠埃希菌镜下呈杆状,为中等大小的杆菌,革兰染色阴性,散在排列,无芽孢无荚膜(彩图 6)。

6. 破伤风梭菌镜下为杆状,革兰染色阳性,散在排列,可见芽孢,位于菌体末端,粗于菌体,细菌呈鼓槌状(彩图 7)。

7. 产气荚膜梭菌镜下呈杆状,为革兰染色阳性粗大杆菌,散在排列,可见荚膜(彩图 8)。

8. 霍乱弧菌镜下呈弧形,革兰染色阴性,散在排列,无芽孢无荚膜(彩图 5)。

9. 变形杆菌镜下呈杆状,散在排列,可见细长的鞭毛,鞭毛遍布菌体,菌体和鞭毛均为红色(彩图 12)。

【注意事项】

1. 芽孢有时可脱离菌体,成为一个透明空泡状结构。

2. 有荚膜的细菌菌体有时可从荚膜中脱离出来,剩余的荚膜呈不着色的空白区域。

3. 鞭毛可从菌体上脱落,呈游离的丝状结构。

4. 细菌的形态结构经常受到外界环境的干扰而出现不典型的形态,不同菌龄的细菌其形态也会有差异,观察时应注意鉴别。

【思考题】

观察细菌镜下形态时应注意观察哪些特征?

二、革兰染色法

【实验原理】

革兰染色法是细菌学上最常用的鉴别性染色法,可将所有细菌区分为革兰阳性菌和革兰阴性菌两大类。主要步骤是先用结晶紫进行初染,再加媒染剂碘液,以增加染料和细胞的亲和力,使结晶紫和碘在细胞膜上形成相对分子量较大的复合物,然后再用脱色剂乙醇脱色,最后用苯酚(石炭酸)复红复染。凡细菌不被脱色而保留初染剂的颜色者为革兰阳性菌,如被脱色后又染上复染剂的颜色者则为革兰阴性菌。

革兰染色法的原理主要有三种学说,包括等电点学说、化学学说与生物学说。其中生物学说认为,两种细菌染色的差异是由于这两类菌的细胞壁结构和成分不同所决定的。阴性菌细胞壁的肽聚糖层较薄,主要成分是脂质外膜,容易被乙醇溶解。故乙醇脱色溶解脂质增加了细胞壁的通透性,使结晶紫和碘的复合物易于渗出,结果是细菌脱色,再经苯酚复红复染后就染成了红色。阳性菌肽聚糖层较厚,脂质含量少,经脱色剂处理后反而使肽聚糖层的孔径缩小,通透性降低,因此细菌仍保留初染的颜色。革兰染色可帮助鉴别细菌,了解细菌的致病性和指导临床选用抗菌药物。

【实验器材】

1. 菌种 葡萄球菌、大肠埃希菌。
2. 其他 革兰染色液、生理盐水、载玻片、接种环、酒精灯、吸水纸、显微镜。

【实验方法】

1. 涂片 取洁净载玻片一张,做好标记后置于实验台上。点燃酒精灯,右手以持笔式握持接种环,先将接种环的金属环部分置于火焰中,待金属环烧红并蔓延至金属丝端,再直接烧灼金属丝直至烧红,然后由金属环至金属杆方向快速通过火焰,随后再反方向通过火焰,如此 2~3 次,以杀灭其表面细菌。然后将接种环移开火焰,待其冷却。注意,接种环不能距离火焰过远,一般应在距火焰 10cm 范围之内,灭菌后的接种环不能再碰及他物。

用灭菌的接种环取无菌生理盐水 2 环,分别置于玻片左右两处。然后左手持葡萄球菌斜面培养物试管,右手小指拔取试管上的胶塞,将管口迅速通过火焰数次灭菌;右手仍以持笔式将接种环再次放在火焰上灭菌,待接种环冷却后,挑取适量培养物。烧灼管口,塞好胶塞,将斜面培养物放回原处。然后将挑取的细菌混合于其中一处的盐水中,涂成直径为 1cm 的圆形菌膜。按上法制备大肠埃希菌菌膜。

2. 干燥 涂片最好在室温下自然干燥,或将标本片接种面向上,置于酒精灯火焰约 15cm 高处慢慢烘干,切不可直接放在火焰上烤干。

3. 固定 涂片在酒精灯火焰上快速通过 3~4 次。固定目的在于杀死细菌,并使菌体与玻片黏附牢固,染色时不至于被染液和水冲掉,同时固定可凝固细胞质,改变细菌对染料的通透性。应在完全干燥后才能固定。

4. 染色

(1) 初染:在涂片上滴加结晶紫染液,加量以覆盖菌膜为度,染色 1 分钟。后用细流水冲洗,并轻轻甩去玻片上的积水。

(2) 媒染:加碘液染 1 分钟,后用细流水冲洗,甩去玻片上的积水。

(3) 脱色:此步骤为革兰染色的关键。用 95%乙醇溶液数滴滴于玻片上,轻轻摇晃以脱色。脱色时间长短与涂片的厚薄程度、玻片晃动程度、乙醇用量多少有关,难以严格规定,最多不超过 30 秒。脱色后立即用细流水冲洗,甩去积水。

(4) 复染:最后滴加苯酚复红染液,复染 30 秒后用细流水冲洗,甩去积水,待标本自干或用吸水纸吸干。

5. 显微镜油镜观察。

【实验结果】

葡萄球菌染成紫蓝色,为革兰阳性菌;大肠埃希菌染成红色,为革兰阴性菌(彩图 1、6)。

【注意事项】

1. 烧灼接种环时应使接种环与火焰焰心成 $15^{\circ}\sim 30^{\circ}$ 夹角。
2. 试管胶塞在取菌过程中应夹在右手小指上,不能放在实验台面。
3. 菌种为液体标本时涂片不必加生理盐水溶液。
4. 当要确证一个未知菌的革兰染色时,应同时做一张已知革兰阳性菌和阴性菌的混合涂片,用以对照。
5. 染色观察细菌形态应选用培养 18~24 小时菌龄的细菌为宜。若菌龄太老,则革兰阳性菌常转阴性。

【思考题】

1. 革兰染色法中哪一步最关键,为什么?如何控制这一步?
2. 固定的目的有哪些?为什么要完全干燥后的涂片才能固定?
3. 有哪些情况会使革兰阳性菌转阴性?

三、不染色标本检查法

【实验原理】

一些细菌具有鞭毛,鞭毛是细菌的运动器官。有鞭毛的细菌在生活状态下能活跃运动,这种运动不同于小颗粒性物质在液体介质中的布朗运动。有无动力是鉴别细菌的一种重要指标。观察细菌动力的方法有压滴法、悬滴法、暗视野法等。

【实验器材】

1. 菌种 葡萄球菌、变形杆菌 12 小时肉汤培养物。
2. 其他 凹玻片、盖玻片、凡士林、镊子、显微镜。

【实验方法】

1. 压滴法

- (1) 用接种环取变形杆菌菌液 2~3 环,置于洁净载玻片中央。
- (2) 用镊子将盖玻片轻轻盖在菌液上。为避免产生气泡,放置盖玻片时可先将盖玻片一边接触菌液,缓缓放下。
- (3) 先用低倍镜找到观察部位,再换高倍镜观察细菌的运动情况。
- (4) 同法制备葡萄球菌压片,在高倍镜下观察其运动情况。

2. 悬滴法

- (1) 取一凹玻片,在凹窝四周涂以少许凡士林。
- (2) 用接种环取适量变形杆菌菌液置于洁净的盖玻片中央。
- (3) 将凹玻片的凹面向下,使凹窝对准盖玻片的菌液处,盖于其上。
- (4) 迅速翻转玻片,菌液悬滴于盖玻片下,用镊子轻轻按一下盖玻片,使两者贴紧。
- (5) 先用低倍镜找到悬滴,再换高倍镜观察细菌的运动情况。
- (6) 同法制备葡萄球菌悬滴片,用高倍镜观察其运动情况。

【实验结果】

变形杆菌有鞭毛,运动活跃,可向不同方向迅速运动,位置移动明显。葡萄球菌无鞭毛,不能作真正的运动,但受水分子布朗运动的冲击,在一定范围内作往复颤动,位置移动不大。

【注意事项】

1. 因为是不染色标本,应调暗显微镜光源易于观察。
2. 悬滴法应注意观察悬滴的边缘部位。
3. 细菌的运动除用普通显微镜观察外,还可用暗视野显微镜。

实验二 细菌的培养及生长现象观察

在临床诊断及微生物学实验中,经常需要培养细菌。培养细菌需要满足细菌生长的各