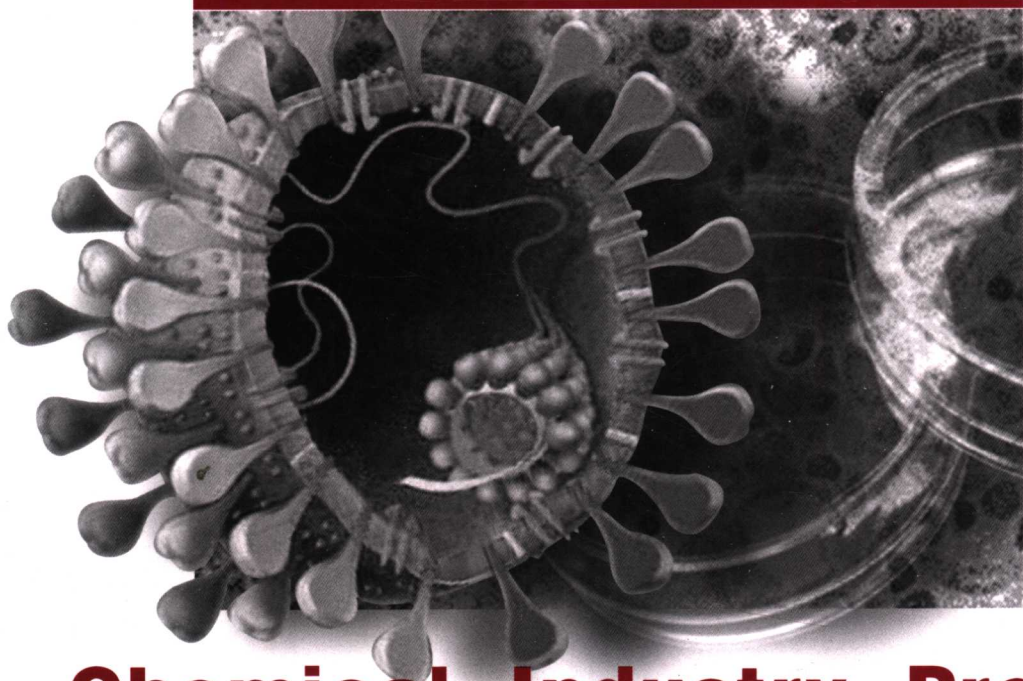


生物实验室系列

医学微生物学 实验技术

管远志 王艾琳 李坚 主编 章静波 主审



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

医学微生物学实验技术

管远志 王艾琳 李 坚 主编
章静波 主审



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

医学微生物学实验技术/管远志, 王艾琳, 李坚主编.
北京: 化学工业出版社, 2005. 8
(生物实验室系列)
ISBN 7-5025-7605-3

I. 医… II. ①管…②王…③李… III. 医药学:
微生物学-实验 IV. R37-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 101859 号

生物实验室系列

医学微生物学实验技术

管远志 王艾琳 李 坚 主编

章静波 主审

责任编辑: 郎红旗 傅四周 梁静丽

责任校对: 陈 静

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010) 64982530

(010) 64918013

购书传真: (010) 64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 31 字数 808 千字

2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7605-3

定 价: 69.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

生物实验室系列图书

陆续出版的书目如下

- 发酵工程实验技术 (2004 年 3 月)
- 生物化学实验技术 (2005 年 5 月重印)
- 拟南芥实验手册 [影印] (2004 年 5 月)
- 现代生物科学仪器分析入门 (2005 年 6 月重印)
- 转基因动物技术手册 [译] (2004 年 9 月)
- RNAi——基因沉默指南 [译] (2004 年 10 月)
- PCR 最新技术原理、方法及应用 (2005 年 1 月)
- 生物安全柜应用指南 (2005 年 3 月)
- 分子生物学实验参考手册 [译] (2005 年 6 月)
- DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 (2005 年 6 月)
- 流式细胞术原理与科研应用简明手册 [译] (2005 年 7 月)
- 医学微生物学实验技术 (2005 年 11 月)
- PCR 技术实验指南 (第二版) [译]
- 基因表达分析手册 [译]
- 蛋白质与蛋白质组学实验指南 [译]
- 蛋白质纯化实验指南——用于蛋白质组学研究 [译]
- 分子生物学与蛋白质化学实验方法 [译]
- 小鼠胚胎实验操作手册 [译]

《医学微生物学实验技术》编写人员

主 编 管远志 王艾琳 李 坚

副 主 编 乔建国 边 疆 李明成

参编人员 (按姓名汉语拼音排序)

艾金霞 北华大学医学院
边 疆 吉林省疾病预防控制中心
陈 曦 北华大学医学院
陈佳玉 吉林大学白求恩医学院
崔连东 吉林大学白求恩医学院
杜培革 北华大学医学院
顾 蓓 中国医学科学院基础医学研究所
顾世海 北华大学医学院
管远志 中国医学科学院基础医学研究所
李桂荣 北华大学医学院
李 坚 北华大学医学院
李明成 北华大学医学院
李咏梅 北华大学医学院
刘玉琴 中国医学科学院基础医学研究所
吕 刚 北华大学医学院
母润红 北华大学医学院
乔建国 吉林市疾病预防控制中心
任 军 中国疾病预防控制中心病毒所
孙丽媛 北华大学医学院
孙 敏 北华大学医学院
孙晓红 北华大学医学院
王艾琳 北华大学医学院
王立霞 北华大学医学院
王 琰 北华大学医学院
王 媛 浙江省中医学院附属医院
吴爱武 广州医学院
吴 决 北华大学医学院
曾常茜 大连大学医学院
张成义 北华大学医学院
张逢春 北华大学医学院
张 宏 中国医学科学院基础医学研究所
张晶波 军事医学科学院微生物流行病研究所
张维瑜 北华大学医学院
赵云冬 吉林职工科技大学
主 审 章静波 中国医学科学院基础医学研究所

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生命实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

前 言

由于生态环境的不断衍变、恶化,人类大规模地使用各种抗生素、抗菌药物以及广泛应用损伤性的医疗技术,人类正面临着前所未有的生物学挑战。其主要表现是新型病原微生物不断出现,耐药性细菌尤其是多重耐药性细菌日益增多,流行病谱更加复杂。近年来,全球恐怖活动中使用的各类生物制剂也对人类健康和社会安全构成了前所未有的威胁。因此,对致病性微生物进行准确、快速的分离、鉴定成为人类应对此类危机的首要条件。

为满足微生物学实验技术须更加完善的要求,我们组织有多年实际工作经验的人员编写了本书。本书立足于现实需要,以致病性微生物的分离、鉴定为中心内容,涉及面广泛,分微生物学基本实验技术(第一章至第十三章)、与微生物相关的实验技术(第十四章至第二十二章)、各种环境中微生物的检测(第二十三章至第二十五章)与生物战剂(第二十六章)等四篇,具体内容包括细菌、病毒、衣原体、支原体和真菌的基本检测方法;微生物数量、毒力的检测;菌种、毒株的保存;抗菌药物对微生物的作用;微生物实验室质量控制;实验动物和动物实验技术;细胞培养技术;与微生物相关的免疫学、分子生物学和生物化学实验技术;各种临床标本、生活环境中、医院感染中和新发现微生物的检测;生物战剂及其检测。附录列出了包括培养基在内的常用试剂配方等实用内容。

书中综合了微生物学、免疫学、分子生物学、生物化学、遗传学等实验技术,旨在解决当前存在的现实的微生物学问题。本书力争体现“全、新、准”的理念。“全”——全面介绍各种微生物的实验技术;“新”——反映现代科技发展水平,体现医学微生物学实验中采用的新技术、新手段;“准”——内容准确,可操作性强。

本书对从事医学微生物领域工作的医务人员(临床检验、治疗医师)、科研人员,以及医学院校大学生(尤其是从事实验研究的研究生)是一部有价值的参考书。对从事基础微生物学研究、食品和环境检测的科研、实验人员亦有借鉴意义。希望本书对相关研究人员、科学工作者有一定的启发,为他们扫清所面临的微生物学技术方面的障碍提供支持;对相关领域的大学生、研究生有所帮助,激励他们将传统课程中所学的知识综合起来,开拓思路,在科学研究的道路上发展创新。

由于编者水平有限,书中若出现不妥之处,敬请读者批评指正。

管远志
2005年6月

内 容 提 要

这是一本以医学微生物学为核心、兼论基础微生物学及其他相关微生物实验技术的指南。比较系统地阐述了微生物学的基本实验技术，与微生物相关的实验技术，各种环境下微生物的检测，生物战剂及其检测等。附录列出了常用试剂配方。

全书强调内容的系统性、先进性与实用性。在题材的遴选上，以致病性微生物的分离、鉴定为中心内容，既包括常规实验方法，又扩展至与微生物相关的交叉学科（如细胞培养技术、临床免疫分析技术、动物实验技术、电泳技术等），同时注意撷取微生物学科中发展较快和现实急需的内容，如包括芯片技术在内的分子生物学技术，SARS病毒、禽流感病毒等新发现微生物的检测，以及生物战剂的检测等。在阐述方式上，对基础理论部分不作过多的铺垫，而是着墨于实验技术的操作及其应用实例，尤其对应用集中的领域，如临床标本、医院感染、对环境和食品的检测等，专章予以介绍，突出重点，强调技术方法的可操作性。对于从事相关研究的人员不失为一本良好的实验指南型工具书。

从事微生物学的教学、科研和应用技术研究的人士，特别是临床检验、微生物疾病防治和食品安全监测领域的工作者，将会发现本书是他们开展相关工作的参考性与指导性书籍。

目 录

第一篇 微生物学基本实验技术

第一章 微生物学实验室设备及实验器材	2
第一节 细菌学实验室建设.....	2
一、细菌学实验室设置基本条件.....	2
二、基本设备和器具.....	2
三、几种仪器的管理和使用.....	2
第二节 病毒学实验室的建设.....	3
一、病毒学实验室的设置要求.....	3
二、几种仪器的保护与使用.....	4
第三节 常用实验器材的准备.....	5
一、清洁法.....	5
二、消毒与灭菌法.....	7
【附 1-1】清洗液的配制.....	9
参考文献.....	10
第二章 细菌的形态学检查方法	11
第一节 细菌大小的测定方法.....	11
一、基本原理.....	11
二、器材.....	11
三、试验方法.....	11
第二节 细菌形态的检查方法.....	12
一、检查工具——普通光学显微镜的使用及保护.....	12
二、暗视野显微镜检查法.....	14
三、细菌不染色标本检查法.....	15
四、细菌染色标本检查法.....	15
第三节 细菌特殊结构的检查方法.....	18
一、荚膜染色法.....	18
二、鞭毛染色法.....	19
三、芽孢染色法.....	20
参考文献.....	21
第三章 细菌的培养技术	22
第一节 培养基的种类和应用.....	22
一、培养基的种类.....	22
二、培养基的应用.....	22
第二节 培养基的制备.....	23
一、调配.....	23
二、溶化.....	23
三、校正 pH 值.....	23

四、澄清过滤	23
五、分装	24
六、灭菌	24
七、检定	24
八、保存	24
第三节 细菌培养分类及应用	24
一、分批培养	24
二、连续培养	24
三、应用	25
第四节 细菌的培养	25
一、细菌的接种方法	25
二、细菌的培养方法	27
三、细菌 L 型的分离培养	28
【附 3-1】Diene 染色法与 857 培养基的制备	30
参考文献	31
第四章 细菌的生化鉴定	32
第一节 糖(醇)类代谢试验	32
一、氧化-发酵试验 (OF 试验)	32
二、甲基红试验 (MR 试验)	32
三、V-P (Voges-Proskauer) 试验	33
四、 β -半乳糖苷酶试验	33
五、七叶苷水解试验	34
六、淀粉水解试验	34
七、甘油复红试验	34
八、石蕊牛乳试验	35
第二节 氨基酸和蛋白质代谢试验	35
一、靛基质(吲哚)试验	35
二、硫化氢试验	35
三、尿素酶试验	36
四、明胶液化试验	36
五、苯丙氨酸脱氨酶试验	36
六、氨基酸脱羧酶试验	37
七、精氨酸双水解酶试验	37
八、肉渣消化试验	37
第三节 有机酸盐和胺盐利用试验	38
一、枸橼酸盐利用试验	38
二、丙二酸盐利用试验	38
三、马尿酸钠水解试验——三氯化铁法	38
四、马尿酸钠水解试验——茆三酮法	39
五、乙酸盐利用试验	39
六、惟一碳源试验	39
七、惟一氮源试验	40
八、生长因子试验	40

第四节 呼吸酶类试验	41
一、过氧化氢酶试验	41
二、氧化酶试验	41
三、硝酸盐还原试验	41
四、氯化三苯四氮唑试验	42
第五节 毒性酶类试验	43
一、血浆凝固酶试验	43
二、磷酸酶试验	43
三、链激酶试验	43
四、卵磷脂酶	44
五、DNA 酶试验	44
第六节 其他试验	44
一、胆盐溶菌试验	44
二、CAMP 试验	45
三、杆菌肽抑菌试验	45
四、Optochin 敏感试验	45
五、新生霉素抑菌试验	46
六、呋喃唑酮抑菌试验	46
七、O/129 抑菌试验	46
参考文献	47
第五章 病毒的观察、培养鉴定及检测方法	48
第一节 电子显微镜观察病毒法	48
一、电子显微镜	48
二、电镜负染观察病毒方法	48
三、免疫电镜观察病毒形态	49
第二节 病毒的分离培养与鉴定	49
一、鸡胚培养技术	50
二、组织培养技术	52
三、动物接种	56
第三节 血清学检查法	58
一、中和试验	58
二、血凝及血凝抑制试验	61
三、补体结合试验	62
四、凝胶免疫扩散试验	62
参考文献	63
第六章 真菌的常规检查法	64
第一节 真菌的一般检验法	64
一、不染色标本直接检验法	64
二、染色标本检查法	65
第二节 产毒真菌的检验	65
【附 6-1】常见霉菌特征	67
第三节 真菌的培养方法	68
一、斜面培养	68

二、玻片培养	68
三、平板培养法	69
第四节 酵母菌的检查与鉴定	69
一、酵母菌直接镜检计数法	69
二、酵母菌的鉴定	69
三、白假丝酵母菌的鉴定	69
四、隐球菌的鉴定	70
参考文献	70
第七章 支原体的检测	71
第一节 概述	71
一、分离培养技术	71
二、支原体分型试验	71
三、支原体污染细胞培养的检测方法	73
第二节 细胞培养中支原体污染的检测	74
一、培养法检测支原体	74
二、荧光染色法 (DNA 染色法) 检测支原体	74
三、PCR 法检测支原体	76
四、支原体的扫描电镜检测	77
参考文献	79
第八章 衣原体的检测	80
一、衣原体特异性抗原和抗体检测	80
二、特异性核酸检测	81
参考文献	81
第九章 微生物数量的测定	82
第一节 显微镜直接计数法	82
一、材料	83
二、方法	83
第二节 平板培养计数法	84
一、材料	84
二、方法	84
第三节 最大可能数计数法	85
一、材料	86
二、方法	86
第四节 光电比浊计数法	86
一、材料	86
二、方法	87
第五节 滤膜法	87
一、材料	87
二、方法	87
第六节 病毒计数	88
一、材料	88
二、方法	88
三、影响蚀斑形成的因素	88

参考文献	89
第十章 微生物毒力的测定	90
第一节 内毒素的测定——鲎试验	90
一、材料	90
二、方法	90
三、结果	90
第二节 外毒素的毒性检测	90
一、材料	91
二、方法	91
三、结果	91
第三节 病毒毒力测定	91
一、材料	92
二、方法	92
三、注意事项	93
第四节 细菌毒力的检测	93
一、材料	93
二、方法	93
参考文献	94
第十一章 菌株、毒株的保存方法	95
第一节 菌株的保存与管理	95
一、菌种的保存	95
二、菌种保管	95
三、常用的保存菌种的方法	96
第二节 毒株的保存	99
参考文献	100
第十二章 药物敏感试验	101
第一节 细菌的耐药机制	101
一、细菌耐药性的概念	101
二、细菌耐药性的产生机制	101
第二节 需氧菌和兼性厌氧菌的体外抗菌药物敏感性试验	105
一、体外药敏试验的抗菌药物选择	105
二、抑菌试验	108
三、联合药物敏感试验和杀菌试验	119
四、检测细菌耐药性的其他方法	121
第三节 厌氧菌的体外抗菌药物敏感试验	130
一、稀释法	130
二、E 试验	132
第四节 酵母样真菌的体外抗菌药物敏感试验	132
一、常量（试管）肉汤稀释法	132
二、微量肉汤稀释法	133
第五节 结核分枝杆菌的体外抗菌药物敏感试验	133
一、临床实验室进行结核分枝杆菌体外抗菌药物敏感试验的指征	133
二、体外药敏试验抗分枝杆菌的药物选择	133

三、抗分枝杆菌药物原液的配制及保存·····	133
四、培养基·····	133
五、结核分枝杆菌体外药敏试验方法·····	133
六、结核分枝杆菌体外药敏试验的质控菌株·····	135
参考文献·····	135
第十三章 微生物实验室质量控制 ·····	137
第一节 常规仪器的质量控制·····	137
一、灭菌器的效果检测·····	137
二、恒温孵育箱、水浴箱及冰箱·····	138
三、厌氧箱及厌氧罐·····	138
四、CO ₂ 培养箱·····	138
五、生物安全罩·····	138
六、细菌培养仪·····	139
七、微生物鉴定仪·····	139
八、其他仪器·····	139
第二节 标准菌株的质量控制·····	139
一、质控标准菌株应具备的条件·····	139
二、质控标准菌株的来源·····	139
三、标准菌株的保存·····	139
第三节 培养基的质量控制·····	140
一、建立制备培养基的记录·····	140
二、培养基的外观检查·····	141
三、无菌试验·····	141
四、培养基的一般质量控制·····	141
五、培养基的性能监测·····	142
第四节 药敏试验的质量控制·····	143
一、扩散法的质量控制·····	143
二、稀释法的质量控制·····	147
三、用标准菌株对厌氧菌药敏试验进行质量控制·····	149
四、结核分枝杆菌药敏试验的质量控制·····	150
第五节 其他项目的质量控制·····	150
一、试剂、染色液及抗血清的质量控制·····	150
二、处理临床标本的质量控制·····	152
参考文献·····	153

第二篇 与微生物相关的实验技术

第十四章 细胞培养技术 ·····	156
第一节 概述·····	156
一、培养细胞的生长类型·····	156
二、培养细胞的生长特点·····	156
三、培养细胞的生长条件·····	157
第二节 常用的细胞培养方法·····	158
一、原代培养·····	158

【附 14-1】培养要点	159
二、传代细胞培养	160
三、二倍体细胞培养	161
四、其他培养（包括大规模培养）方法	161
第三节 培养细胞的生长、增殖及其观察	163
一、培养细胞的生长和增殖	163
二、培养细胞生长和增殖的观察	164
第四节 培养细胞的保存和运输	165
一、组织块保存法	165
二、细胞悬液保存法	165
三、单层细胞保存法	165
四、低温冻结保存和复苏	166
五、细胞运输	166
第五节 培养细胞污染的检测排除	166
一、生物污染的检测	166
二、微生物污染的防治	167
第六节 培养细胞基本设备与器具	168
一、基本设备	168
二、常用器械	169
三、培养器皿	169
第七节 细胞培养液	170
一、生理平衡盐溶液	170
二、天然培养基	170
三、合成培养液	171
四、生长液和维持液	171
五、无血清培养液	172
第八节 细胞培养在病毒研究中的应用	172
一、细胞培养的应用	172
二、判断病毒生长复制的方法	172
三、细胞培养在病毒研究工作中的价值	173
参考文献	173
第十五章 抗体的制备	174
第一节 普通诊断血清的制备	174
一、免疫原的制备	174
二、免疫动物的选择	175
三、免疫方法	175
四、免疫血清的收获	176
五、免疫血清的保存	176
第二节 单克隆抗体技术	176
一、概述	176
二、B 细胞杂交瘤的制备	177
参考文献	179
第十六章 免疫血清学检查方法	180

第一节 凝集试验·····	180
一、直接凝集反应·····	180
二、间接凝集反应·····	181
第二节 沉淀反应·····	183
一、液体内沉淀反应·····	183
二、凝胶内沉淀反应·····	185
第三节 补体结合试验·····	187
第四节 免疫荧光技术·····	189
一、荧光标记物的制备·····	189
二、荧光免疫显微技术·····	191
三、流式荧光免疫技术·····	192
四、时间分辨荧光免疫测定·····	192
五、荧光偏振免疫测定·····	193
第五节 酶免疫技术·····	194
一、酶的选择与试剂的制备·····	194
二、酶联免疫吸附测定·····	198
三、细胞酶联免疫吸附测定·····	199
四、液相酶免疫测定·····	203
五、均相酶免疫测定·····	204
第六节 放射免疫测定技术·····	206
一、放射免疫测定·····	206
二、免疫放射测定·····	211
三、放射受体分析·····	212
第七节 免疫金标记技术·····	213
一、基本原理·····	214
二、胶体金的制备·····	214
三、胶体金标记蛋白的制备·····	215
四、胶体金标记技术在免疫学试验中的应用·····	217
第八节 化学发光标记及发光免疫测定·····	219
一、发光现象·····	219
二、化学发光·····	220
三、生物发光·····	221
四、发光标记物·····	222
五、发光免疫标记技术·····	223
六、发光免疫分析技术·····	226
七、电化学发光免疫分析·····	228
第九节 免疫电镜技术·····	230
一、免疫标记方法·····	230
二、铁蛋白标记免疫电镜技术·····	231
三、酶标记免疫电镜技术·····	232
四、胶体金标记免疫电镜技术·····	232
五、凝集素标记免疫电镜技术·····	232
六、免疫电镜技术的不标记抗体法·····	233