

动物微生物学及免疫学 实验

主讲教师：熊焰 蒋文灿



实验一 油镜的使用、细菌的抹片、染色及细菌的形态观察



1 试验目的

(1) 正确掌握油镜的使用和保护方法

(2) 掌握细菌抹片的制备方法和几种常用染色技术

(3) 认识细菌的基本形态和构造

(4) 加深对细菌革兰氏染色原理的认识



2 实验原理

(1) 油镜放大原理：因香柏油与玻璃折光指数近似，可减少光线折射的损失，而进入油镜头的光线增多，视野亮度增大，使物像变得更清晰。

(2) 革兰氏染色原理：不同类型的细菌细胞壁粘肽含量不同，酒精具有收缩粘肽和溶解染料的双重作用，而使进入菌体内的染料被洗脱或存留在菌体内。

3 实验材料

(1) 实验仪器

普通光学显微镜、擦镜纸、玻片、酒精灯、接种环、香柏油

(2) 实验试剂

草酸铵结晶紫、革兰氏碘液、95%酒精、品红、二甲苯

(3) 实验对象

细菌培养物：大肠杆菌、沙门氏菌



4 方法与步骤

(1) 玻片准备

选用经95%酒精浸泡无油垢的载玻片，用纱布擦净，通过火焰几次，滴上无菌水后能均匀展开备用。



● (2) 涂片

固体培养物：先在玻片上加一滴蒸馏水，在挑取少量菌落与水滴均匀混合，涂成大小适中的薄膜。

液体培养物：现把培养物摇匀，再经火焰灭菌后的接种环挑少量培养液，均匀涂布在玻片上。

血液：在玻片一端，滴上血液一滴，另取一玻片，先放在血滴前方，然后稍向后拉，并左右移动，是血液与推篇粘成一线，再以适当的角度，均匀地用力，由一端向另一端推动。

织脏器材料：先用镊子夹住局部通过火焰轻轻的烧一下，用无菌剪刀剪取一小块，以其切面在玻片上轻抹或压印成一薄层。

检查多个样品需要制成抹片时，只要染色相同，可将玻片划成若干个小方格，固定编号顺序，镜检。在记录本上注明标本来源则可。

(3) 干燥固定

玻片应让其自然干燥。急用时可在火焰近处烘干，不可直接在火中烤。将已干燥的抹片，使抹片面向上缓慢的通过火焰**3-4**次（像钟摆一样）进行固定。脏器及血液抹片可用甲醇固定**3-5min**。

(4) 染色（以革兰氏碘液为例）

玻片固定后，滴加染色液，以覆盖过抹面为度。

滴加草酸铵结晶紫，染1-2min，水洗 →

革兰氏碘液媒染2-3min，水洗 →

95%酒精脱色，约30s-1min → 品红复染10-30s，水洗。

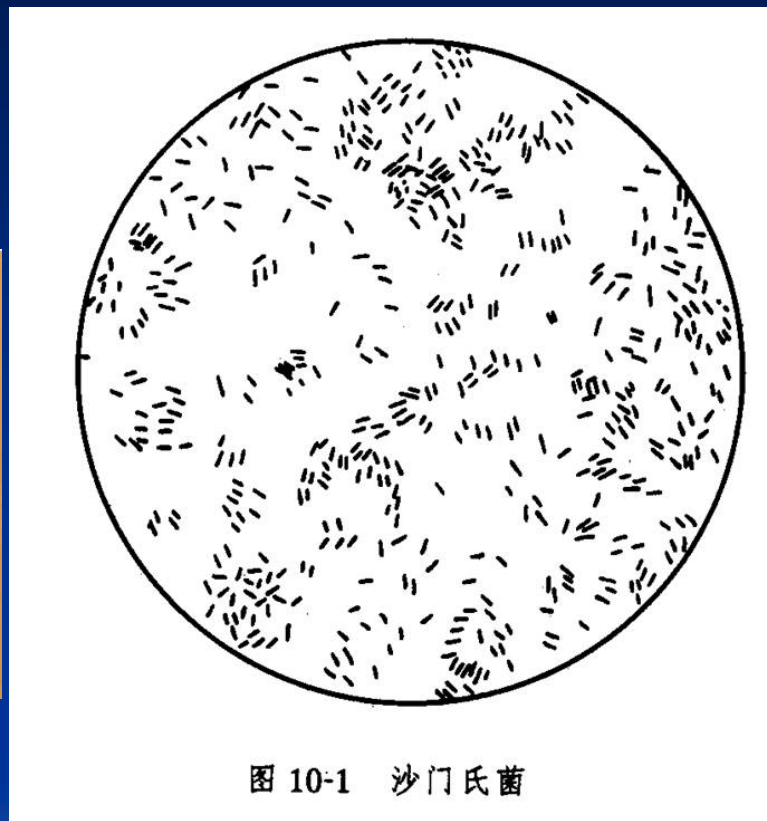
(5) 干燥

标本冲洗干净后，用吸水纸吸干或在室温中晾干。

(6) 观察

滴加适量香柏油于抹片上，选用油镜观察。

上述染色技术的过程是：抹片 → 固定 → 染色 → 水洗 → 媒染 → 水洗 → 脱色 → 水洗 → 复染 → 水洗 → 干燥 → 镜检



- 5.实验报告撰写内容
- 实验题目
- 实验原理及目的
- 材料
- 方法
- 结果
- 分析与讨论



实验二 细菌在自然界的 分布



1 实验目的

(1)掌握水、土壤、空气等细菌学的检查方法。

(2)了解细菌在自然界中的分布。



2 实验材料

(1) 实验仪器

平皿、灭菌移液管、灭菌试管、洗耳球、三角瓶、取样器、酒精灯、接种环、恒温培养箱

(2) 实验对象

土样、水样



3 实验方法

(一) 水中细菌总数的测定

1 自来水

(1) 采取自来水样时，须先开水龙头放水几分钟，然后再放入无菌容器中。

(2) 以无菌操作方法用灭菌移液管吸取1ml充分混合的水样，注入普通平板中，用接种环涂抹使其均匀，每个水样做三个重复。

(3) 待水样干后，翻转平皿，置37℃恒温箱中培养24h后取出计算菌落数。三个平皿中的的平均菌落数，即为水样1ml中的细菌总数。

2 河水及其他水源

(1) 将灭菌采样瓶潜入水源10-15cm深处，掀开瓶塞，待水盛满后在水中盖上瓶塞，取出以备检查。由于河水及其他水源水中含菌数多，检查时必须稀释成 10^{-2} 。

(2) 用灭菌移液管吸取 10^{-2} 的水样1ml，注入盛有9ml灭菌水的试管中混匀，使成 10^{-3} 稀释，按同法依次稀释成 10^{-4} 和 10^{-5} 倍等备用。吸取不同浓度的稀释液时都必须更换移液管。

(3) 用灭菌移液管吸取 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 稀释的水样各1ml、注入普通平板中，用接种环涂抹使其均匀，每个水样做三个重复。

(4) 待水样干后，翻转平皿，置 37°C 恒温箱中培养24h后取出计算菌落数。三个平皿中的的平均菌落数，即为水样1ml中的细菌总数。

(二) 土壤中细菌总数的测定

1 取样

取离地面10cm深处的土壤。每个检地取5点，5个点的土样不得少于1Kg。将采来的土样置灭菌的容器内，尽快检查。

2 制备悬浮液

土样充分混合后，取10g土样，至于灭菌三角瓶内，加灭菌蒸馏水至100ml，充分摇匀。然后静置2min，取其上清液。

3 稀释

吸取上清液，用无菌蒸馏水稀释成**10-4**、**10-5**、**10-6**、**10-7**等不同的稀释度。

4 培养与计数

用无菌移液管分别吸取**1ml**不同稀释度的混悬液各**1ml**，接种于普通琼脂平皿中，其方法与水中细菌总数测定方法相同。接种后置**37℃**恒温箱中培养**24h**后取出计算菌落数。计算方法也与水中细菌总数测定法相同，但以**1g**图样中的菌落数报告之。



菌落计数

- 5.实验报告撰写内容
- 实验题目
- 实验原理及目的
- 材料
- 方法
- 结果
- 分析与讨论



实验三 ε 花环形成试验



1 实验目的

检测T淋巴细胞活性，间接反应
机体的细胞免疫水平



2 实验原理

T淋巴细胞是一个具有多功能的细胞群，其表面有SRBC受体，可与SRBC结合形成花环样细胞团即E花环。此实验既能计数T细胞，又能反映T淋巴细胞的活性，从而可以判断机体的细胞免疫水平。其中在4℃反应2h以上形成的花环，代表T淋巴细胞的总数，称为Et花环；而淋巴细胞与SRBC混合后，不经4℃作用立即反应生产的花环，代表对SRBC亲合力高的一个T细胞亚群，称为活性E花环即Ea花环。

3 实验材料

(1) 实验仪器

水平式离心机、显微镜、恒温水浴、冰箱、血细胞计数板、无菌注射器、吸管、玻片、毛细滴管、细菌滤器、0.22 μm 滤纸等



● (2) 实验试剂及配制

肝素抗凝剂：将一定的肝素（0.015%）加入Hanks液中，分装试管，每管0.5ml，抗凝2ml血液。

pH7.4含10%小牛血清(FCS)和5.0g/L水解乳蛋白的Hanks液：90mlHanks液中加入10ml小牛血清和0.5g水解乳蛋白，用NaHCO₃调PH至7.4。最好用0.22~0.30um的滤膜进行过滤。

0.8%戊二醛溶液：市售的戊二醛多为25%，用时以0.43%的NaCl 30.25ml加入25%的戊二醛即可。

新鲜采集的SRBC（用肝素抗凝血获得）4℃保存，可使用2周。

Hanks液（不含Ca²⁺和Mg²⁺）

2%台酚蓝溶液、Wright-Giemsa液。

4 实验方法

(1) 配制淋巴细胞悬液

- a. 取肝素抗凝血2ml，加Hanks液2ml混匀。
- b. 用毛细滴管将稀释血液沿管壁加入已盛有2ml淋巴细胞分离液的离心管中，保持界面清晰。
2000r/m，离心20min。
- c. 用毛细滴管伸至单个核细胞层(白色狭带)，沿管壁吸出全部单核细胞, 移入另一离心管中。

d.加入37℃预热的Hanks(约为悬液量的五倍),洗涤2次。第一次3000/m 7-10min; 二次3000r/m 7-10min 。

e.洗涤后加入Hanks(含有血清和水解乳蛋白)稀释至2ml,注入血细胞计数板计数,计四大格白细胞与淋巴细胞数。（此步可大致对细胞数进行估算即可）

f.用Hanks（含有血清和水解乳蛋白）液稀

(2) 1%SRBC (绵羊红细胞) 的配制 (注意检查红细胞是否溶血!!)

a. 用Hanks液将新鲜采集的绵羊血液洗涤三次, 前两次2500r/m, 离心10min, 最后一次2000r/m, 离心10min。

b. 加2倍体积的FCS, 混匀, 置37℃水浴作用30min, 2000r/m离心10min, 吸取上清液4℃冰箱保存备用。

c. 用时加入Hanks液稀释至1%。

注: 1%SRBC为 10^7 个细胞/ml

(3) Ea花环试验

- a. 1%SRBC稀释成0.1%。
- b. 取0.1mlSRBC与0.1ml淋巴细胞悬液(10^5 - 2×10^5)混合并作用30min, 500r/m离心5min。离心后加入0.8%的戊二醛固定20-30min。
- c. 染色, 涂片。
- d. 油镜观察, 计数200个淋巴细胞。

(4) Et花环试验

- a.取0.1ml淋巴细胞悬液，加入0.1ml1%SRBC，置37℃水浴，作用5min。
- b.500r/m离心5min。
- c.4℃作用2h或过夜。
- d.取出试管吸出上清部分。轻转试管使沉淀细胞重悬，加入0.8%的戊二醛2滴固定20-30min。
- e.染色，涂片。
- f.油镜观察，计数200个淋巴细胞。

(5) 结果观察

a.湿片观察：把Wright-Giemsa染色液加入沉淀细胞中进行染色，涂片，油镜观察。

b.干片观察：沉淀细胞涂片，自然干燥，放入盛有Wright-Giemsa染色液的色缸中，染色10min左右，放入盛有清洁自来水的平皿中漂洗一下。干燥，用树脂胶封片。高倍镜或油镜观察。

5 结果处理

在显微镜下，淋巴细胞呈蓝紫色或淡兰色，SRBC为无色的。一个淋巴细胞凡吸附3个或3个以上SRBC，即为E花环形成细胞（E rosette forming cell，ERFC）。计数200个淋巴细胞，求出ERFC%。

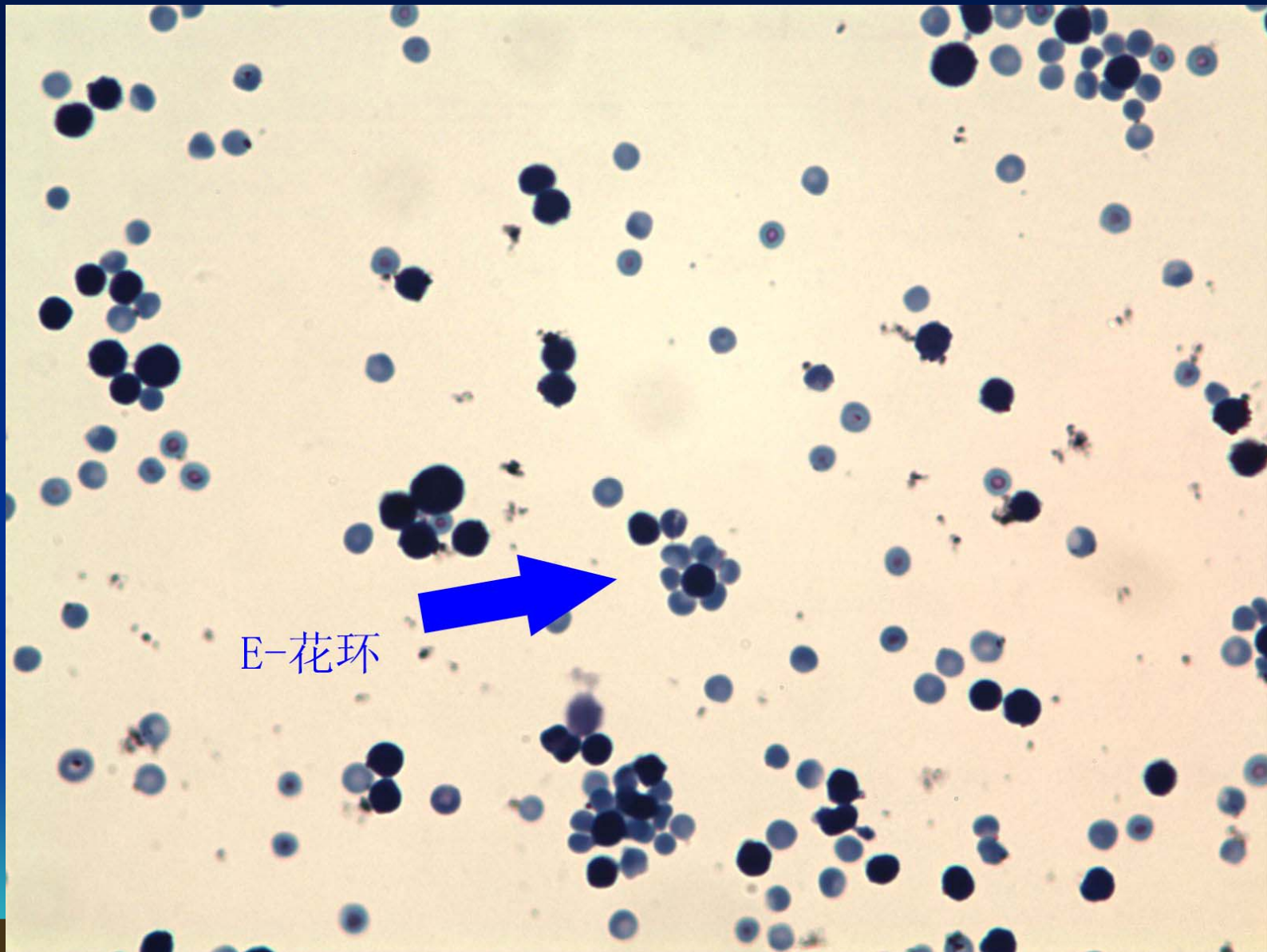
参考值：人Et-RFC $64.4 \pm 6.7\%$ Ea-

RFC $23.6 \pm 3.5\%$



6 注意事项

- (1) 戊二醛必须在临用前新鲜配制，**0.43%NaCl** 配制比**Hanks**好，因为**Hanks**液配制的固定剂呈高渗溶液，可使红细胞皱缩
- (2) 由于花环结合不牢固，震荡太剧烈，容易破坏；震荡不够，没有充分混悬，影响计数。故戊二醛固定前应充分混匀，否则戊二醛加入后更加难以计数。
- (3) **SRBC**和淋巴细胞的比值：**Et**花环试验 **100~200: 1**为好，**Ea**花环试验 **10~20: 1**为好。



E-花环

- 5.实验报告撰写内容
- 实验题目
- 实验原理及目的
- 材料
- 方法
- 结果
- 分析与讨论

