

实验三 无菌技术

蔡奇英

南昌大学生物学基础实验中心

一、消毒与灭菌

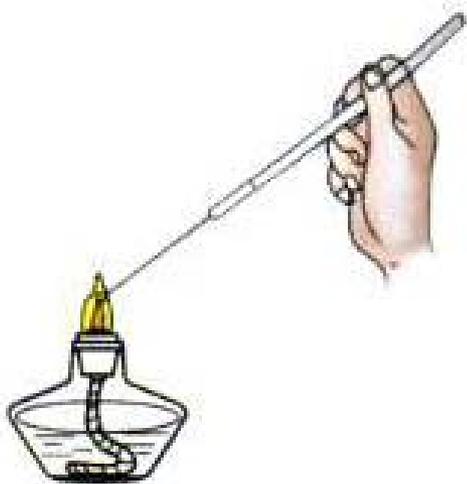
- **消毒**是指消灭病原菌和有害微生物的营养体而言；
- **灭菌**是指杀灭一切微生物的营养体，芽孢和孢子。
- 消毒与灭菌的方法很多，一般采用物理和化学方法，如加热、过滤、照射和使用化学药品等方法。

1 加热法

➤ 1.1 干热灭菌

➤ 火焰烧灼灭菌：接种环、涂布棒等。

➤ 热空气灭菌：用电烤箱



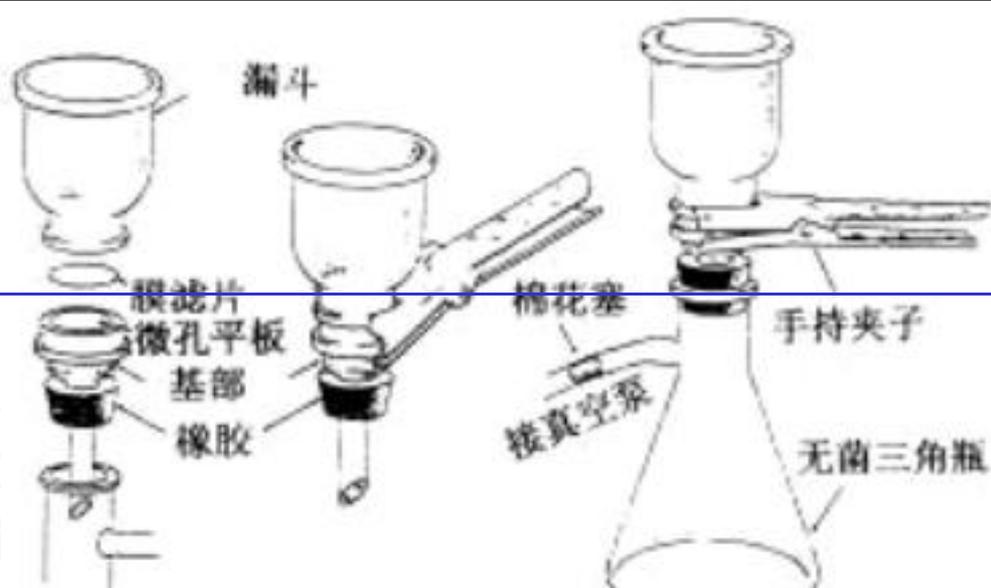
➤ 1.2 湿热灭菌

- A **高压蒸气灭菌** 0.1MPa; 121℃; 15-30min, 用于培养基、工作服、橡皮物品、玻璃器皿。
- B **常压蒸气灭菌** 100℃ 30min 3d, 用于不宜用高压蒸气灭菌的培养基如明胶培养基、牛乳培养基、含糖培养基等。
- C **煮沸消毒法** 沸水10-15min, 用于注射器和解剖器械消毒, 但人用的均采用高压灭菌或干热灭菌。
- D **超高温杀菌** 135-150℃ 2-8s, 既能高效杀菌, 也能保持食品品质与营养价值。

2 过滤除菌

➤ 许多材料如血清、抗生素方法，均会热损，因此是采用过滤的方法将空气

➤ 广用微



反也



b

3 辐射灭菌

➤ 紫外线波长在200-300nm，具有杀菌作用，其中以265-266nm

杀菌
臭气
杀菌

➤ 60
工作

➤ 的

➤ 注

的射
下



4 其他物理灭菌技术

超声波杀菌技术：超声波是频率大于10kHz的声波，与传声媒介相互作用蕴藏着巨大的能量，当遇到物料时就对其产生快速交替的压缩和膨胀作用，可在极短时间内杀死和破坏微生物。

高压电场脉冲杀菌技术：高压电场脉冲能破坏细菌的细胞膜，改变其通透性，从而杀死细胞。

5 化学药品灭菌

➤ 化学药品消毒灭菌法是应用能抑制或杀死微生物的化学制剂进行消毒灭菌的方法。能致死的化学药剂为**杀菌剂**，如重金属离子；只阻抑细菌的化学药剂为**抑菌剂**，如磺胺类及大多数抗生素。

➤ 以下列举一些实验室常用杀菌剂：

➤ 乙醇、异丙醇： 70-75% 皮肤及器械消毒

➤ 食醋： 3-5ml/m³ 熏蒸消毒空气，防流感病毒

➤ 来苏尔： 2-5% 空气、皮肤消毒

➤ 福尔马林： 10%溶液 2-6ml/m³ 熏蒸消毒

➤ 升汞： 0.1% 植物组织表面消毒

➤ 次氯酸钠： 3 -10% 植物组织表面消毒

二、复合处理（以植物组织表面消毒为例）

- 在建立植物组织培养的初代培养体系时，带菌材料的表面消毒往往需要进行复合处理：
 - 1 洗衣粉或其他去污剂漂洗；
 - 2 流水冲洗；
 - 3 酒精消毒；
 - 4 升汞或次氯酸钠消毒；
 - 5 无菌水冲洗；
 - 6 接种前用无菌滤纸吸净组织表面水份。

三、无菌操作

➤ 1 超净工作台及常备器皿



水平送风

➤ **常用器皿：**

➤ **酒精灯、酒精槽、酒精棉瓶、接种器械（解剖刀、弯头解剖剪、枪形镊子、接种针或环）**

➤ 2 无菌操作的一般过程（以水稻种子接种为例）

➤ 教师做如下准备工作：

➤ 种子筛选；

➤ 漂洗；

➤ 以下在超净工作台上完成。

➤ 70-75%酒精 20-30s；（酒精如何配？）

➤ 0.1%升汞 3min；

➤ 无菌水冲洗 5-6次；备用。

以下学生操作：

- 洗手液洗手；晾干；
- 镊子蘸工业酒精，于酒精灯上灼烧7-8s，烧尽镊子上的酒精，充分冷却；
- 取一支试管于左手，在没打开锡铂纸前，将试管口先在灯焰上过一遍3-5s；用右手小心揭开锡铂纸，注意不要使锡铂纸盖变形，以免盖不回去；再将试管口置灯焰上灼烧，除去试管口内壁水份；
- 打开广口瓶盖，用镊子夹取一粒种子；接入试管，种脐向下将种子轻压到培养基表面上，试管竖起后不致脱落即可，不要压入培养基过深，以免供氧不足。
- 放下镊子，将锡铂纸盖盖回试管口，用拇指和食指将盖子捏紧，用皮筋扎住盖子；
- 用记号笔在盖子上做好标记，方便看结果。

以下学生操作：

- 重复以上操作，再接一至两个颗种子；
- 接种完成后，同组试管仍捆扎在一起，标记组号和培养基类型；
- 放入7楼培养间培养；
- 约2到3天后，即可观察到是否有污染；如果没有污染，约7到10天后，即可观察到是否启动生长。

➤ **作业：**

➤ **1、消毒与灭菌有哪些常用方法？**

➤ **2、你认为无菌操作过程中要注意哪些细节？**

实验四 显微镜的使用方法和生物绘图

一 实验目的：

- 1.学会显微镜的使用；
- 2.掌握徒手切片与临时装片的制作方法；
- 3.掌握生物绘图的方法。

二 实验材料：

部分新鲜材料(洋葱、匍灯藓)。

三、内容：

(一) 显微镜的使用

1. 光学显微镜结构

A. 镜臂、镜座、载物台

B. 粗准焦螺旋、细准焦螺旋

C. 光源、光圈、聚光镜、通光孔、（切片或装片）、接物镜、物镜转换器、镜筒、接目镜。

光源：采光/电光

接物镜有 $4\times$ 、 $10\times$ 、 $40\times$ 、 $100\times$

接目镜一般为 $10\times$ 、 $20\times$









2、光学显微镜使用方法

拿：右手持镜臂，左手托镜座，（反之亦可）停于胸。

放：将显微镜放在桌上，偏向身体左侧，离桌边约3—5cm，右侧放记录本或报告纸。

检：电源接线是否插稳；灯光强度调节旋扭是否置于最小（暗）处；接物镜是否旋至低倍镜**档位**（一般10倍档）。

通：通电（按下电源开关，本实验中应向自身方向的一边按下），顺时针旋转光源调节旋扭，将光线对准70—80%强度。

通光，在目镜中观察是否有光亮（通光孔是否打开）

调：装入一张玻片，调节载物台前后左右移动，使目标物对准通光孔最中央位置；调节粗准焦螺旋使载物台上下移动，从而达到调焦目的。一般使用10倍物镜时，镜头前端距离玻片约7—8mm（这时可先目测一下就行）。

观：双眼靠近目镜，小心调节粗准焦螺旋，1—2mm范围内。如果看到视野中有模糊影像时，放慢调节速度，直到图像最清楚（注意：使用低倍物镜时，只能用粗准焦螺旋）

高：如果要研究更细致的结构，可紧接以上操作，将物镜转换器旋转到40倍档，旋停到位后，一般均有模糊图像，这时只能用细准焦螺旋将图像调至最清晰（注意：细准焦螺旋一般只能正反两方向来回调节360度以内，切勿连续旋转数周）。

绘：

复：观察结束后，注意复位，先将物镜转换到低倍镜，再取下玻片；将光线调节到最小（暗），再按下开关，关闭电源。用完后，将电源线绕在镜座以上位。加盖显微镜罩。归还显微镜。

(二) 生物绘图法

生物实验图不同于一般美术图，也不同于机械制图。生物绘图要求将标本的外形和内部结构准确的记录下来，然后详加说明，要求简单、形象、自然，比例适当，线条清晰。

1. 布图（“胸有成竹”）

一张报告纸，第一行中央位置为报告题目；

根据所绘图多少和图的大小来确定一张报告纸绘制多少图。一般一张纸绘1—2幅图。布图的位置为报告纸的中央偏左，右侧留有注示空位。

每幅图绘完后，在图（包括注示算在一起）的下方中央位置，注明所绘图名称。（…细胞、图、…轮廓图、…示意图）

2. 绘图

采用**点、线法绘图**。轮廓用线条描绘，明暗程度、物质含量多少等则用细点的疏密表示之，图纸应选择能够用橡皮擦的上好白纸，绘图时先用中软（HB）笔绘出轮廓，然后用较硬（2H）的铅笔绘出全图。

线：平滑，无明显突出“起毛”；粗细一致；连续。

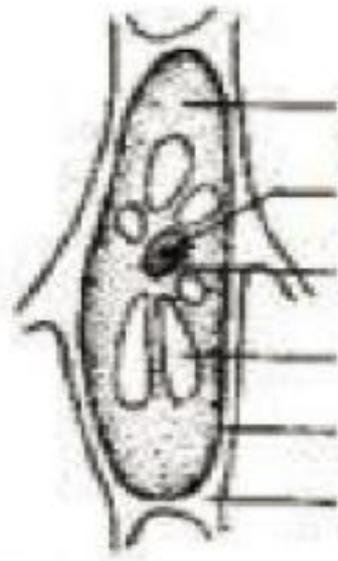
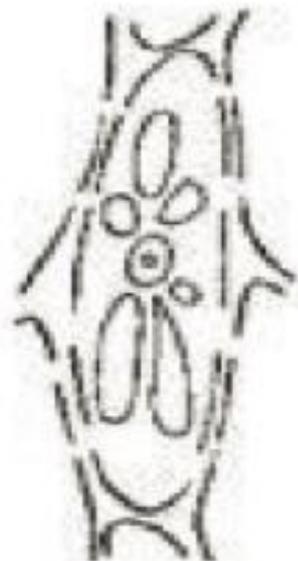
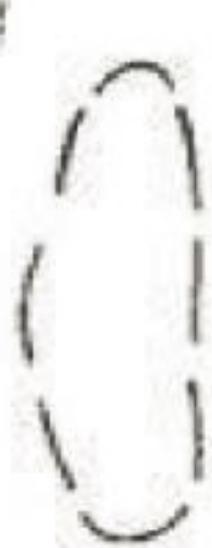
点：笔竖直，向下打圆点，不能有“翘尾”。

3. 注示

图中各部分应注字说明，图与字之间用尺作水平细线连系之，图的标题填在图的下方。

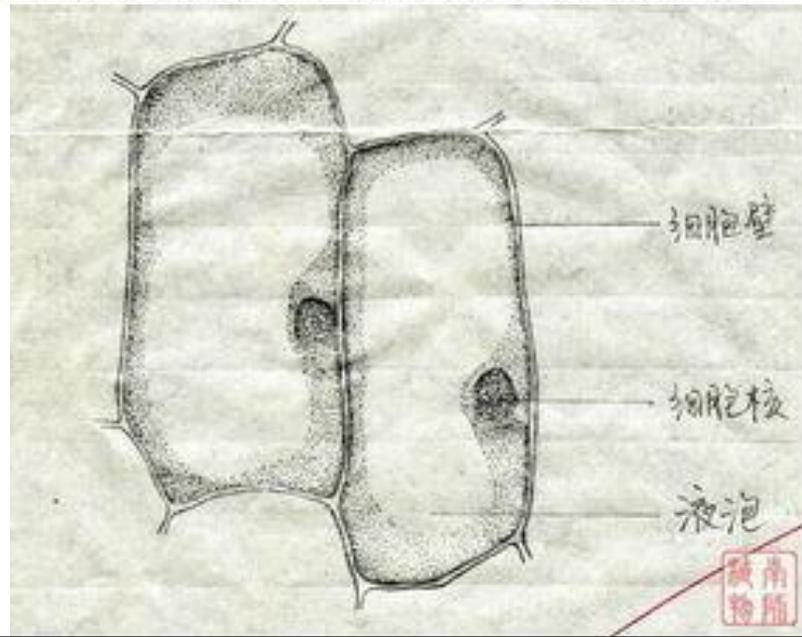
注意：各注示的平行线间距尽量均匀相近。注示细线为**右对称形式**，注示的文字排列为**左对称形式**。

很多微小生物体或解剖结构是通过显微镜观察认识的。因此要逐步训练用左眼观察，右眼看图纸。将观察结果准确地描绘出来。



细胞质
核仁
细胞核
液泡
细胞膜
细胞壁

植物细胞的显微图的绘制过程



(三) 植物细胞结构制片观察

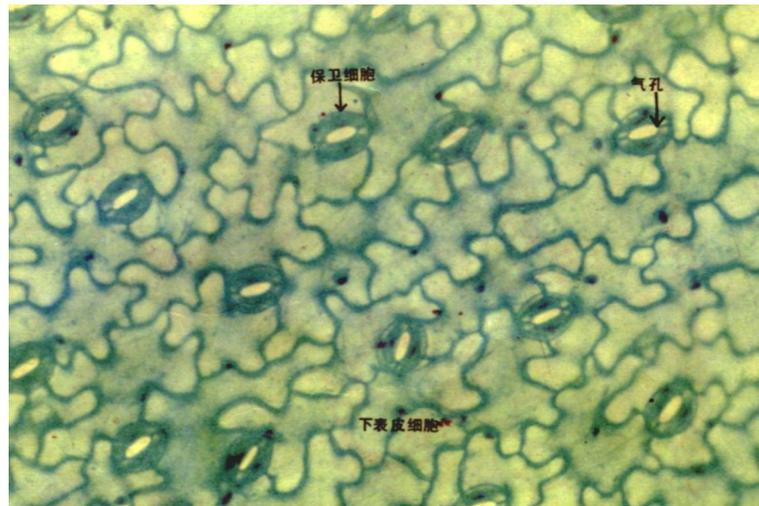
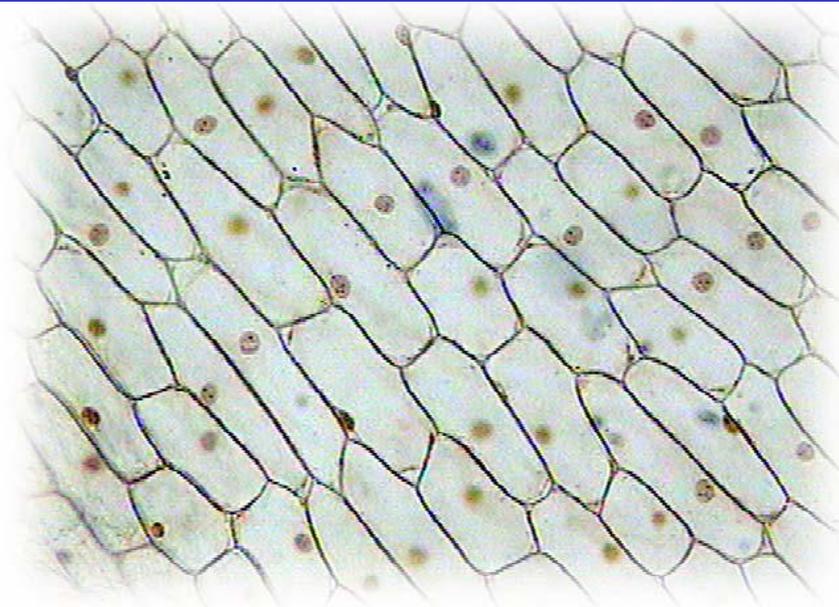
1) 洋葱鳞片叶表皮制片程序:

** 在干净的载玻片中间滴上一滴水。

** 用镊子撕取洋葱鳞片叶内表皮一小块 (2mm^2) 放在水滴中使其舒展开。

** 盖上盖玻片, 吸去多余的水, 显微镜下观察。

2) 同以上操作, 撕取韭菜叶下表皮制作水装片。



作业：

1. 绘出洋葱鳞片表皮细胞的构造，并注明各部分的名称。 1-2细胞
注示：细胞壁、细胞质、液泡、细胞核。
2. 绘制畲灯藓叶片细胞图。 20-30细胞，注示：叶细胞、叶缘细胞、齿细胞。