

細菌的簡單染色和革蘭氏染色

(一) 實驗目的：

學習細菌的簡單染色法和革蘭氏染色法。

(二) 實驗原理：

用於生物染色的染料主要有鹼性染料、酸性染料和中性染料三大類。鹼性染料的離子帶正電荷，能和帶負電荷的物質結合。因細菌蛋白質等電點較低，當它生長於中性、鹼性或弱酸性的溶液中時常帶負電荷，所以通常採用鹼性染料（如美藍、結晶紫、鹼性複紅或孔雀綠等）使其著色。酸性染料的離子帶負電荷，能與帶正電荷的物質結合。當細菌分解糖類產酸使培養基 pH 下降時，細菌所帶正電荷增加，因此易被伊紅、酸性複紅或剛果紅等酸性染料著色。中性染料是前兩者的結合物又稱複合染料，如伊紅美藍、伊紅天青等。

簡單染色法是只用一種染料使細菌著色以顯示其形態，簡單染色不能辨別細菌細胞的構造。革蘭氏染色法是 1884 年由丹麥病理學家 C.Gram 所創立的。革蘭氏染色法可將所有的細菌區分為革蘭氏陽性菌 (G^+) 和革蘭氏陰性菌 (G^-) 兩大類，是細菌學上最常用的鑒別染色法。該染色法所以能將細菌分為 G^+ 菌和 G^- 菌，是由這兩類菌的細胞壁結構和成分的不同所決定的。 G^- 菌的細胞壁中含有較多易被乙醇溶解的類脂質，而且肽聚糖層較薄、交聯度低，故用乙醇或丙酮脫色時溶解了類脂質，增加了細胞壁的通透性，使初染的結晶紫和碘的複合物易於滲出，結果細菌就被脫色，再經蕃紅複染後就成紅色。 G^+ 菌細胞壁中肽聚糖層厚且交聯度高，類脂質含量少，經脫色劑處理後反而使肽聚糖層的孔徑縮小，通透性降低，因此細菌仍保留初染時的顏色。

(三) 實驗器材：

- 1、市售養樂多和優酪乳。
- 2、染色液和試劑：結晶紫、碘液、95%酒精、蕃紅、二甲苯、油鏡油。
- 3、器材：廢液缸、洗瓶、載玻片、酒精燈、擦鏡紙、顯微鏡。

(四) 實驗方法：

1、簡單染色：

- (1) 塗片：取乾淨載玻片一塊，將細菌製成薄塗面，注意取菌不要太多。
- (2) 晾乾：讓塗片自然晾乾或者在酒精燈火焰上方溫火烘乾。
- (3) 固定：手執玻片一端，讓菌膜朝上，通過火焰 2-3 次固定（以不燙手為宜）。
- (4) 染色：將固定過的塗片加結晶紫染色 1-2min。
- (5) 水洗：用水洗去塗片上的染色液。
- (6) 乾燥：將洗過的塗片放在空氣中晾乾或用吸水紙吸乾。
- (7) 鏡檢：先低倍觀察，再高倍觀察，並找出適當的視野後，將高倍鏡轉出，在塗片上加油鏡油一滴，將油鏡頭浸入油滴中仔細調焦觀察細菌的形態。

2、革蘭氏染色：

- (1) 塗片：塗片方法與簡單染色塗片相同。
- (2) 晾乾：與簡單染色法相同。
- (3) 固定，與簡單染色法相同。
- (4) 結晶紫色染色：將玻片加適量（以蓋滿細菌塗面）的結晶紫染色液染色 1 分鐘。
- (5) 水洗：傾去染色液，用水小心地沖洗。
- (6) 媒染：滴加碘液，媒染 1min。
- (7) 水洗：用水洗去碘液。
- (8) 脫色：將玻片傾斜，連續滴加 95%乙醇脫色 20—25s 至流出液無色，立即水洗。
- (9) 複染：滴加蕃紅複染 5min。
- (10) 水洗：用水洗去塗片上的蕃紅染色液。
- (11) 晾乾：將染好的塗片放空氣中晾乾或者用吸水紙吸乾。
- (12) 鏡檢：鏡檢時先用低倍，再用高倍，最後用油鏡觀察，並判斷菌體的革蘭氏染色反應性。
- (13) 實驗完畢後的處理：
 - ◎將浸過油的鏡頭按下述方法擦拭乾淨。
 - a.先用擦鏡紙將油鏡頭上的油擦去。
 - b.用擦鏡紙沾少許二甲苯將鏡頭擦 2—3 次。
 - c.再用乾淨的擦鏡紙將鏡頭擦 2—3 次。注意擦鏡頭時向一個方向擦拭。
 - ◎看後的染色玻片用廢紙將油鏡油擦乾淨。

(五) 注意事項：

1. 革蘭氏染色成敗的關鍵是酒精脫色。如脫色過度，革蘭氏陽性菌也可被脫色而染成陰性菌；如脫色時間過短，革蘭氏陰性菌也會被染成革蘭氏陽性菌。脫色時間的長短還受塗片厚薄及乙醇用量多少等因素的影響，難以嚴格規定。
2. 染色過程中勿使染色液乾涸。用水沖洗後，應吸去玻片上的殘水，以免染色液被稀釋而影響染色效果。
3. 選用幼齡的細菌。 G^+ 菌培養 12h-16h，*E.coli* 培養 24h。若菌齡太老，由於菌體死亡或自溶常使革蘭氏陽性菌轉呈陰性反應。

江德老師教學資料