

生物学与生命科学系列实验教材

微生物学与 免疫学实验

EXPERIMENTS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

主 编 范立梅
副主编 张 薇

 ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

高等院校医学与生命科学系列实验教材

微生物学与 免疫学实验

EXPERIMENTS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

主 编 范立梅
副主编 张 薇



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

微生物学与免疫学实验 / 范立梅主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2012. 8

ISBN 978-7-308-10043-4

I. ①微… II. ①范… III. ①医学微生物学—实验②医学—免疫学—实验 IV. ①R37-33②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 110704 号

微生物学与免疫学实验

范立梅 主编

责任编辑 季峥 (really @zju. edu. cn)

封面设计 林智广告

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 杭州日报报业集团盛元印务有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 10.5

字 数 270 千

版 印 次 2012 年 8 月第 1 版 2012 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-10043-4

定 价 25.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571)88925591

前 言

微生物学与免疫学是生命科学、临床医学、药学、医学检验、护理学等专业的重要的基础课,是一门实践性和应用性很强的学科。随着高等教育教学改革的不深入,实验教学的理念正在发生着深刻的变化,从以往的依附于理论教学的传统模式,转变为注重对学生实践能力、创新能力和综合素质的培养,使实验教学成为培养创新型、应用型人才的一个重要环节。

一本良好的实验教材是提高实验教学质量的必要条件之一。我们在多年从事微生物学与免疫学实验教学工作的基础上,对实验内容进行了调整和优化,编写了这本《微生物学与免疫学实验》教材。本教材保留了必需的基础性和验证性实验,增加了综合性和设计性实验,以提高学生发现问题、分析问题和解决问题的能力。

本教材分为微生物学实验和免疫学实验两大部分,每部分包括基础性实验和综合性实验,全书共有 59 个实验。每个实验基本包括实验目的、实验原理、实验器材和试剂、实验操作、实验结果、注意事项和思考题七部分。

本书中的“微生物学实验”部分由范立梅编写,“免疫学实验”部分由张薇编写。

在本书的编写过程中得到了浙江大学城市学院基础医学实验中心以及其他各方的大力支持和帮助,在此一并表示衷心的感谢。

微生物学与免疫学实验技术的发展日新月异,由于编者水平有限,书中难免会有疏漏之处,真诚期望同行专家们提出宝贵的意见和建议。

编者

2012 年 4 月

目录 Contents

微生物学与免疫学实验室规则	1
第一部分 微生物学实验	2
第一章 微生物学基础性实验	2
实验 1 环境中微生物的检测	2
实验 2 显微镜的使用	4
实验 3 细菌制片及简单染色法	7
实验 4 革兰氏染色法	9
实验 5 细菌的鞭毛染色及细菌运动性的观察	11
实验 6 细菌的芽孢和荚膜染色	13
实验 7 微生物细胞大小的测定	15
实验 8 微生物显微镜直接计数法	18
实验 9 放线菌的形态观察	20
实验 10 酵母菌的形态观察及死活细胞的鉴别	22
实验 11 霉菌的形态观察	24
实验 12 培养基的制备	26
实验 13 消毒与灭菌技术	29
实验 14 微生物的分离纯化	33
实验 15 大分子物质的水解试验	39
实验 16 糖发酵试验	40
实验 17 IMViC 试验和硫化氢试验	42
实验 18 菌种保藏	46
第二章 微生物学综合性实验	51
实验 19 细菌生长曲线的测定	51
实验 20 酒药中糖化菌的分离和甜酒酿的制作	52
实验 21 抗生素抗菌谱的测定	54
实验 22 噬菌体的培养及效价测定	57

微生物学与免疫学实验

实验 23	蛋白酶产生菌的分离纯化和蛋白酶活性的测定	58
实验 24	微生物的诱变育种	60
实验 25	水中大肠菌群的检测	63
实验 26	乳酸发酵与乳酸菌饮料的制作	67
实验 27	常见病原性球菌的分离与鉴定	69
实验 28	粪便标本中致病性肠道杆菌的分离与鉴定	72
实验 29	临床标本中常见真菌的检查	75
第二部分	免疫学实验	78
第一章	免疫学基础性实验	78
实验 1	免疫系统器官和细胞形态学观察	78
实验 2	小鼠血脑屏障观察	82
实验 3	中性粒细胞吞噬杀菌功能的测定——小吞噬现象	83
实验 4	硝基四氮唑蓝还原试验	85
实验 5	巨噬细胞吞噬功能的测定——大吞噬现象	86
实验 6	NK 细胞杀伤功能的测定	88
实验 7	溶菌酶的溶菌作用	90
实验 8	补体的溶血反应	91
实验 9	血清总补体活性的测定	92
实验 10	直接凝集反应	95
实验 11	间接凝集抑制试验	98
实验 12	对流免疫电泳试验	99
实验 13	B 淋巴细胞溶血空斑形成试验	101
实验 14	人外周血单个核细胞的分离	103
实验 15	E 花环形成试验	105
实验 16	豚鼠速发型过敏反应	107
实验 17	豚鼠结核菌素试验	108
第二章	免疫学综合性实验	110
实验 18	T 淋巴细胞增殖试验	110
实验 19	白细胞介素-2 的生物学活性的测定	114
实验 20	酶联免疫吸附试验	116
实验 21	酶联免疫斑点试验	119
实验 22	免疫荧光技术	121
实验 23	斑点金免疫渗滤试验	122
实验 24	免疫组化技术	124
实验 25	免疫印迹技术	125

实验 26	流式细胞仪对人 T 淋巴细胞亚群的分析	129
实验 27	人外周单核细胞来源树突状细胞的制备	130
实验 28	细胞凋亡的检测	132
实验 29	多克隆抗体的制备	136
实验 30	单克隆抗体的制备	137
附 录		142
附录一	微生物学实验常用试剂及培养基配制方法	142
附录二	免疫学实验常用试剂及配制方法	150

微生物学与免疫学实验室规则

“微生物学与免疫学”是一门实践性很强的学科,有一套独特的实验操作技术。开设“微生物学与免疫学实验”课的目的是培养学生掌握微生物学与免疫学的基本实验操作技能,加深对课堂讲授的相关基础理论的理解,提高观察问题、分析问题和解决问题的能力,养成实事求是、严肃认真的科学态度以及勤俭节约、爱护公物的良好作风。

实验中应严格遵守“微生物学与免疫学实验室规则”,树立无菌观念,严格执行无菌操作,防止实验过程中出现意外情况,并确保实验结果的准确。为了保证微生物学与免疫学实验教学的正常进行,特制定以下实验室规则:

1. 每次实验课前必须对实验内容进行充分预习,了解实验目的、原理和方法,做到心中有数,思路清楚,以提高实验质量。
2. 进入实验室必须穿实验服,必要时还需戴口罩、帽子和手套,并做好实验前的各项准备工作。
3. 实验室内应保持整洁,不得高声谈话和随便走动,保持室内安静,禁止在实验室内饮食。
4. 认真及时做好实验记录,对于当场不能得到实验结果、需要培养后再来观察的实验,需按时观察实验现象和结果,并做好记录。
5. 实验时应做到胆大心细,严格遵守无菌操作规程。实验中万一发生菌液打翻、有菌材料污染桌面或衣物、割破手指等意外情况,应立即报告指导教师,及时处理,切勿自作主张不按规定处理。废纸、棉花、培养物等废弃物应投入污物箱,不得任意乱丢。
6. 使用显微镜等贵重仪器时,要细心操作,爱护仪器。显微镜使用完毕后,要按规定步骤进行清洗。
7. 须送恒温生化培养箱培养的物品,应做好标记(标明组号、姓名、日期、培养时间等),放于教师指定的地点进行培养。
8. 实验结果应以实事求是的科学态度进行记录,作图应符合规范,实验数据以表格的形式记录,力求简单准确,并及时、规范地完成实验报告。
9. 实验完毕后,必须整理好桌面,将实验器材放回原处。值日同学要搞好实验室的卫生,离开实验室前应将手洗净,注意关闭门窗、水、电、煤气等。
10. 实验室中的菌种和物品等材料,未经教师许可,不得擅自携带出实验室。

第一部分 微生物学实验

第一章 微生物学基础性实验

实验1 环境中微生物的检测

【实验目的】

1. 通过实验证实环境及人体表面广泛存在微生物。
2. 初步体会无菌操作的重要性。
3. 观察不同类群微生物的菌落特征。

【实验原理】

在我们周围的环境中及人体表面都存在着不同种类和数量的微生物,但我们的肉眼却看不见它们。微生物学实验应该严格按照无菌操作在纯培养下进行。所谓无菌操作,即必须保证在操作过程中无其他任何杂菌进入培养系统中。如操作不慎引起染菌,则实验结果就不可靠,甚至失败。因此,如果我们在实验过程中忽视了无菌操作,这些环境中的微生物就会污染培养物,从而造成染菌,使实验失败。

如何用实验证实我们周围的环境中及人体表面广泛存在着不同种类和数量的微生物呢?

培养基中含有微生物生长所需要的营养成分,将不同来源的微生物样品接种于灭过菌的培养基平板上,在适宜的温度下进行培养。经过一定时间的培养后,微生物能在固体培养基上生长繁殖,并形成一个个肉眼可见的微生物群落,称为菌落。每一种微生物所形成的菌落都有各自的特点,这些特点包括:菌落的大小,颜色,表面干燥或湿润、隆起或扁平、粗糙或光滑,边缘是否整齐,菌落的透明度,以及质地疏松或紧密等。因此通过平板培养法可以检查环境中及人体表面的微生物的种类和数量。

通过实验使学生树立“微生物无处不在”的概念,在微生物学实验及生产实践中牢固树立“无菌概念”。掌握一整套过硬的微生物学无菌操作技术,是每一位微生物学实验初学者必须具备的基本实验技能。

【实验器材和试剂】

1. 器材

无菌棉拭子、酒精灯、接种环、75%的酒精棉球、记号笔等。

2. 仪器

恒温培养箱。

3. 培养基

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基。

【实验操作】

1. 环境中及人体表面微生物的检查

(1) 空气中微生物的检查

开启牛肉膏蛋白胨琼脂培养基平板的血盖,置于空气中 30min 后,盖上血盖。将培养皿倒置于 37℃ 培养箱中,培养 24h。观察并记录培养基表面的菌落的种类和数量。

(2) 手上微生物的检查

先在培养皿底做好记号,将培养皿分为左右两半。用未经洗手的手指在无菌培养基平板的左半侧做涂布接种操作;然后用肥皂洗手,再用 75% 的酒精棉球擦手指,在培养基平板的右半边做涂布接种。将培养皿倒置于 37℃ 培养箱中,培养 24h。观察并记录平板左右两边的菌落的种类和数量。

(3) 头发、口腔中微生物的检查

用无菌棉拭子分别刮擦头发、口腔,分别涂布接种于无菌培养基平板的左右两边。将培养皿倒置于 37℃ 培养箱中,培养 24h。观察并记录平板左右两边的菌落的种类和数量。

(4) 桌面及其他物品表面微生物的检查

用无菌棉拭子分别刮擦实验桌面以及其他物体表面(如手机、钱币等表面),分别涂布接种于无菌培养基平板的左右两边。将培养皿倒置于 37℃ 培养箱中,培养 24h。观察并记录平板中菌落的种类和数量。

2. 染色、镜检

取上述培养基平板表面生长的若干典型菌落,制作微生物标本片,染色后在显微镜下观察微生物的显微形态。

【实验结果】

将各样品的培养结果记录下来,完成表 1-1,包括菌落数目、菌落特征的描写(大小、颜色、形态、干湿、表面、透明度、边缘等),并与其他同学所做的结果进行比较。

表 1-1 环境中微生物检测结果记录表

	空气	手指(洗手前)	手指(洗手后)	头发	口腔	桌面	其他
菌落数量							
菌落特征							
结论							

(菌落数量可用“+”、“-”表示。“++++”表示多;“-”表示无)

【注意事项】

以上各项取样操作均应在酒精灯旁以无菌操作进行,以保证实验结果中的微生物来自于所取的样品,而不是从其他地方污染进去的。

【思考题】

1. 比较各种来源的样品的实验结果,哪一种样品在培养基表面生长的菌落数量与种类最多?
2. 比较洗手前后的手指涂布的培养基平板,其菌落数量有无区别?说明什么?
3. 通过本实验,你对环境中“微生物无处不在”这一概念有什么体会?谈谈在微生物学实验中强调无菌操作的重要性。

实验2 显微镜的使用

【实验目的】

1. 熟悉普通光学显微镜的构造及其使用方法。
2. 学习并掌握油镜的原理及其使用方法。

【实验原理】

1. 普通光学显微镜的构造

普通光学显微镜由机械部分和光学部分组成(图1-1)。机械部分包括镜座、镜臂、镜筒、载物台、物镜转换器、粗调螺旋、细调螺旋、标本夹等。光学部分包括目镜、物镜、反光镜、光圈(虹彩)、聚光镜(集光器)等。

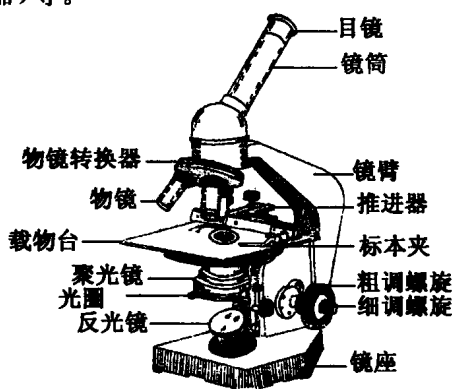


图1-1 光学显微镜

光学显微镜的物镜通常有低倍物镜(16mm, 10×)、高倍物镜(4mm, 40×)和油镜(1.8mm, 100×)三种。油镜是三者中放大倍数最大的。

2. 油镜的工作原理

油镜与其他物镜的不同之处是,载玻片与物镜之间不是隔一层空气,而是隔一层油,称为油浸系(图1-2)。如果载玻片与物镜之间的介质为空气,则称为干燥系(图1-2)。干燥系中,光线通过玻片后,受到折射,会发生散射现象,使得进入物镜的光线减少,这样视野的照明度就减低了。但当物镜与玻片之间存在油浸系时,情况就不同了。通常选用香柏油作为介质,因香柏油的折射率 $n=1.515$,与玻璃的折射率 $n=1.52$ 基本相近。因此,当光线通过载玻片后,可直接通过香柏油进入物镜而不发生折射,这样增加了视野的进光量,能使物像更加清晰。

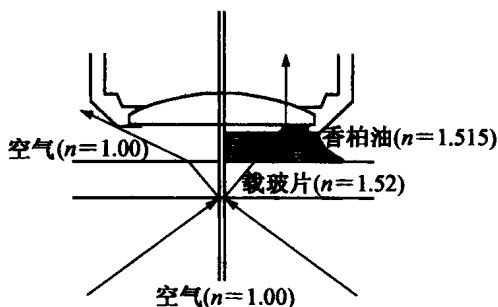


图1-2 显微镜的干燥系和油浸系

利用油镜不但能增加照明度,更主要的是能增加数值孔径,因为显微镜的放大效能与其数值孔径相关。所谓数值孔径,即光线投射到物镜上的最大角度 α (称镜口角) 的一半的正弦(图 1-3) 乘上玻片与物镜间介质的折射率,可用下列公式表示:

$$N \cdot A = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

式中: $N \cdot A$ 表示数值孔径; n 是介质折射率; α 表示最大入射角,即镜口角。

数值孔径的大小是衡量一台显微镜分辨力大小的依据。分辨力是指显微镜能辨别的两点间的最小距离。

$$\text{能辨别的两点间的最小距离} = \frac{\lambda}{2N \cdot A}$$

式中: λ 表示光波波长。

由公式可知,若 n 值和 α 角越大,则 $N \cdot A$ 越大,则显微镜的分辨力越大。

一些物质的折射率为: $n_{\text{水}} = 1.33$; $n_{\text{玻璃}} = 1.52$; $n_{\text{空气}} = 1.0$; $n_{\text{香柏油}} = 1.515$ 。

【实验器材和试剂】

1. 器材

双层瓶(内装香柏油和二甲苯)、擦镜纸等。

2. 仪器

光学显微镜。

3. 材料

细菌标本片。

【实验操作】

1. 操作前准备

显微镜是精密光学仪器,使用时应特别小心。从镜箱中取出时,一手握住镜臂,一手托住镜座,置于实验台上。使用前首先要熟悉显微镜的结构和性能,检查各部分零件是否完备、镜身有无尘土、镜头是否清洁。做好必要的清洁和调整工作。

2. 调节光源

(1) 将低倍镜旋到镜筒下方,旋转粗调螺旋,使镜头和载物台之间的距离为 5mm 左右。

(2) 上升聚光镜,使之与载物台表面相距 1mm 左右。

(3) 调节光圈以调整光线强弱,直至视野内得到最均匀、最适宜的照明为止。

一般染色标本用油镜检查时,光度宜强,可将光圈开大,聚光镜上升到最高,反光镜调至最强;未染色标本用油镜检查时,应适当缩小光圈,下降聚光镜,调节反光镜,使光度减弱,否则会因光线过强而不利于观察。

3. 标本的显微镜观察

(1) 低倍镜观察

一般情况下,初学者进行显微镜观察时,应遵循先用低倍镜($10\times$)观察,再用高倍镜($40\times$)观察,最后用油镜($100\times$)观察的程序。因为低倍镜视野大,易于发现目标及确定标

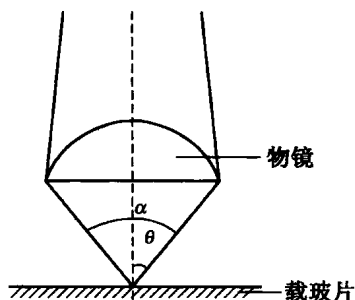


图 1-3 物镜的光线入射角

本位置。

先将标本片置于载物台上(注意标本面朝上),并使标本部位处于物镜的正下方,转动粗调螺旋,使物镜接近标本。再慢慢旋转粗调螺旋,使镜筒缓慢上升,调至视野内出现物像时,改用细调螺旋,上下微微转动。仔细调节焦距和照明,直至视野内获得清晰的物像,确定需进一步观察的部位。移动推动器,将所要观察的部位置于视野中心,准备换高倍镜观察。

使用粗调螺旋聚焦物像时,应先从显微镜侧面观察标本片,小心调节,先使物镜与标本片接近,再用目镜观察,小心调节物镜离开标本片,以防压碎镜头及标本片。

(2) 高倍镜观察

将高倍镜($40\times$)转至镜筒下方,调节光圈和聚光镜,使光线亮度适中,再仔细反复转动细调螺旋,调节焦距,直至获得清晰物像。移动推动器,选择最满意的镜检部位,将染色标本移至视野中央,待用油镜观察。

(3) 油镜观察

用粗调螺旋提起镜筒,移开高倍镜,改用油镜观察。在标本片的镜检部位加一滴香柏油;上升载物台,从侧面注视,使油镜浸入油中,直到几乎与标本片接触时为止(注意:切勿压到标本片,以免压碎玻片,甚至损坏油镜镜头);慢慢转动粗调螺旋,当视野中有模糊的标本物像时,改用细调螺旋,并移动标本直至标本物像清晰为止。

如果转动粗调螺旋已使镜头离开油滴又尚未发现标本物像,可能是因为油镜上升太快,以至于未能捕捉到一闪而过的物像。此时,可重新按上述步骤操作,直到找到清晰的物像为止。

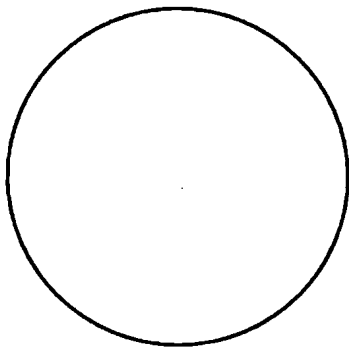
4. 显微镜用毕后的处理

观察完毕,下降载物台,取下标本片。先用擦镜纸擦去镜头上的油,然后用擦镜纸沾少量二甲苯擦去镜头上的残留油迹,最后用擦镜纸擦去残留的二甲苯(应轻轻地向外擦,不要来回擦或转圈擦,以免磨损镜头)。切忌用手或其他纸擦镜头,以免损坏镜头。可用绸布擦净显微镜的金属部件。

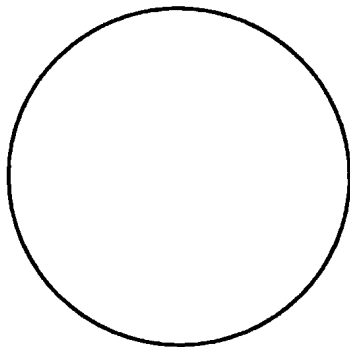
观察结束后,将显微镜各部分还原,反光镜垂直于镜座,将物镜转成八字形,再向下旋。罩上镜套,将显微镜放回镜箱中。

【实验结果】

绘出在油镜下观察到的几种供试菌的形态。



菌 名: _____
放大倍数: _____



菌 名: _____
放大倍数: _____

【注意事项】

1. 要加强对显微镜镜头的保护和保养,特别是油镜镜头的清洗工作。在转动粗调螺旋时不要用力过猛,以免损坏镜头及标本片。
2. 使用显微镜时应根据不同的物镜及标本而调节光线的强弱。

【思考题】

1. 简述油镜的放大原理。一般在载玻片和镜头之间滴加什么油?它起什么作用?
2. 用油镜观察微生物标本时应注意哪些问题?
3. 影响显微镜分辨力的因素有哪些?

实验3 细菌制片及简单染色法

【实验目的】

1. 学习并掌握细菌制片、染色的基本技术。
2. 掌握细菌的简单染色法。
3. 巩固油镜的使用方法,观察细菌的形态特征。
4. 学习无菌操作技术。

【实验原理】

细菌的涂片和染色是微生物学实验的一项基本技术。细菌的细胞小而透明,在普通的光学显微镜下不易识别,必须对它们进行染色。利用单一染料对细菌进行染色,称为简单染色法。经染色后的菌体与背景形成明显的色差,从而能清楚地观察到细菌的形态。此方法操作简便,适用于观察菌体的一般形态和细菌的排列方式,但不能用作微生物的鉴别。

常用碱性染料进行简单染色。碱性染料在电离时,其分子带正电荷。细菌的等电点较低($\text{pH } 2\sim 5$),在中性、碱性或弱酸性溶液中,细菌细胞通常带负电荷,因此带正电荷的碱性染料很容易与带负电荷的细菌细胞结合,从而使细菌着色。经染色后的细菌细胞与背景形成鲜明的对比,在显微镜下更易观察。常用于简单染色的染料有美蓝、结晶紫、碱性复红、番红等。

当细菌分解糖类产酸,培养基 pH 下降时,细菌所带的正电荷增加,此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料进行染色。

染色前必须对细菌进行固定。固定的目的有:杀死细菌并使菌体粘附于玻片上;增加菌体对染料的亲和力。常用的固定方法有加热固定和化学固定两种。固定时应尽量维持细胞原有的形态,防止菌体变形。

【实验器材和试剂】**1. 器材**

酒精灯、载玻片、接种环、双层瓶(内装香柏油和二甲苯)、擦镜纸、吸水纸、染色缸等。

2. 仪器

光学显微镜。

3. 菌种

白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*) 24h 牛肉膏蛋白胨琼脂斜面培养物、枯草芽孢杆

微生物学与免疫学实验

菌(*Bacillus subtilis*)16h 牛肉膏蛋白胨琼脂斜面培养物。

4. 试剂

吕氏碱性美蓝染液、石炭酸复红染液、生理盐水。

【实验操作】

细菌制片、染色的一般流程为：

涂片→干燥→固定→染色→水洗→干燥→镜检。

1. 涂片

取洁净的载玻片一块，滴一小滴生理盐水于载玻片中央，用接种环以无菌操作从白色葡萄球菌或枯草芽孢杆菌斜面上挑取少许菌苔于水滴中，混匀并涂成薄膜。注意：滴加生理盐水不要太多，否则不容易干燥；取菌时不宜过多，且要涂均匀，菌膜不宜涂得过厚。

2. 干燥

让涂片在室温下自然干燥为宜，也可以将涂面朝上在酒精灯上方微微加热，使其干燥，但切勿离火焰太近，因温度太高会使菌体形态变形。

3. 固定

将已干燥的涂片的涂面向上，通过酒精灯火焰三次，以杀死细菌并使其固定于玻片上。

4. 染色

滴加吕氏碱性美蓝染液或石炭酸复红染液 1~2 滴于涂片上，以染液刚好覆盖涂片菌膜为宜。染色 1min。

5. 水洗

倾去染液，用自来水从载玻片一端轻轻冲洗，直至从涂片上流下的水无色为止。水洗时，不要让水流直接冲洗涂面，水流不宜过急、过大，以免涂片菌膜脱落。

6. 干燥

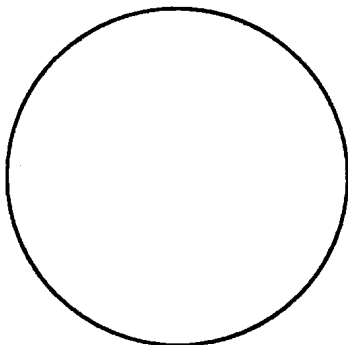
自然干燥或用吸水纸轻轻吸干玻片上的水分，注意不要擦去菌体。

7. 镜检

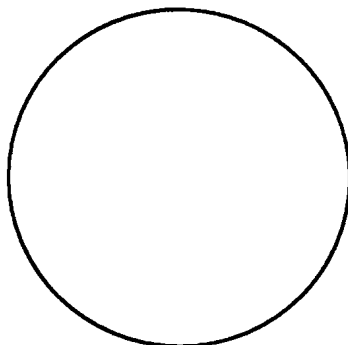
涂片干燥后镜检，用油镜观察细菌标本片，并绘出所观察到的细菌的形态和排列。

【实验结果】

根据观察到的结果，绘出两种细菌的显微形态图。



菌 名：_____
放大倍数：_____



菌 名：_____
放大倍数：_____

【注意事项】

1. 无菌操作取菌时应等接种环稍冷却后再取菌,以免高温使菌体变形。
2. 火焰固定不宜过热。
3. 水洗时,水流不宜过急、过大,不能直接冲洗涂面,以免涂片菌膜脱落。

【思考题】

1. 制备细菌标本时,应该注意哪些环节?
2. 涂片时涂得过厚或过薄会对观察造成什么影响?
3. 为什么要求制片完全干燥后才能用油镜观察?
4. 固定的作用是什么?若热固定时加热温度过高,时间过长,会出现什么后果?

实验4 革兰氏染色法

【实验目的】

1. 掌握革兰氏染色的原理及基本操作方法。
2. 熟练掌握油镜的使用方法。

【实验原理】

革兰氏染色法是1884年由丹麦病理学家 C. Gram 发明的。利用革兰氏染色法可将细菌分为革兰氏阳性(G^+)菌和革兰氏阴性(G^-)菌两大类。该方法是细菌学上最常用的鉴别性染色法。

革兰氏染色法是用结晶紫进行初染,再加碘液媒染,以增加染料与细胞间的亲和力,使碘和结晶紫在细胞膜上形成相对分子质量较大的复合物,然后用脱色剂乙醇进行脱色,最后用复染剂番红进行复染。凡不被乙醇脱色而保留初染剂的颜色细菌,即紫色者,为革兰氏阳性菌;如被乙醇脱色后又染上复染剂的颜色细菌,即红色者,为革兰氏阴性菌。

该染色法之所以能将细菌分为 G^+ 菌和 G^- 菌,是由这两类菌的细胞壁结构的不同所决定的。 G^- 菌的细胞壁中肽聚糖层较薄、交联度低,且含有较多的类脂质,易被乙醇溶解,故用乙醇脱色时溶解了类脂质,增加了细胞壁的通透性,使结晶紫和碘的复合物易于被洗脱,结果细菌就被脱色,再经番红复染后就被染成红色。而 G^+ 菌细胞壁中肽聚糖层厚且交联度高,类脂质含量少,经脱色剂处理后,会引起肽聚糖层收缩,细胞壁网格孔径变小,通透性降低,因此细菌仍保留初染时的颜色(紫色)。

【实验器材和试剂】**1. 器材**

酒精灯、载玻片、接种环、双层瓶(内装香柏油和二甲苯)、擦镜纸、吸水纸、染色缸等。

2. 仪器

光学显微镜。

3. 菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*)斜面菌种、白色葡萄球菌斜面菌种、枯草芽孢杆菌斜面菌种、未知菌斜面菌种。

4. 试剂

草酸铵结晶紫染液、卢戈氏(Lugol)碘液、95%乙醇、番红复染液、生理盐水。

【实验操作】

革兰氏染色流程(图 1-4)为：

涂片→初染→媒染→脱色→复染→镜检。

1. 涂片

无菌操作涂片(在洁净的载玻片上加一滴生理盐水,以无菌操作法分别涂布白色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、未知菌)→干燥→固定(热固定,固定时通过火焰一两次即可,不可过热,以载玻片不烫手为宜)。

2. 染色

(1) 初染

加草酸铵结晶紫染液(加量以盖满菌膜为宜),染色 1min。倾去染液,用自来水小心地冲洗,至洗出液无紫色为止。

(2) 媒染

加卢戈氏碘液,覆盖菌膜,染 1min 后,同上述方法水洗。

(3) 脱色

用吸水纸吸去残留的水,玻片倾斜,滴加 95%乙醇,脱色 30s,水洗。

(4) 复染

滴加番红复染液,染 1min,水洗。

3. 镜检

干燥后(用吸水纸吸干),用油镜观察。被染成紫色者,即为革兰氏阳性(G^+)菌;被染成红色者,为革兰氏阴性(G^-)菌。

【实验结果】

描述供试菌的染色结果(供试菌的形态、排列、颜色和革兰氏染色结果),完成表 1-2,并作图。

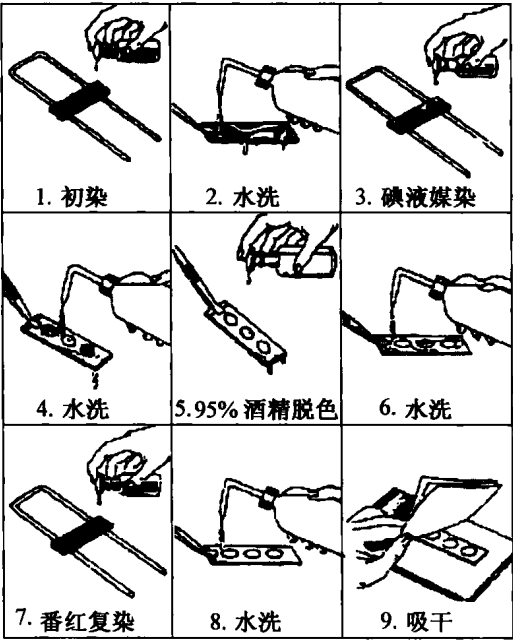


图 1-4 革兰氏染色过程

表 1-2 革兰氏染色结果记录表

菌 名	菌体颜色	细菌形态和排列	染色结果(G^+ 、 G^-)
大肠杆菌			
白色葡萄球菌			
枯草芽孢杆菌			
未知菌			