



面向21世纪精品课程教材

高等院校基础医学实验教学示范中心建设成果

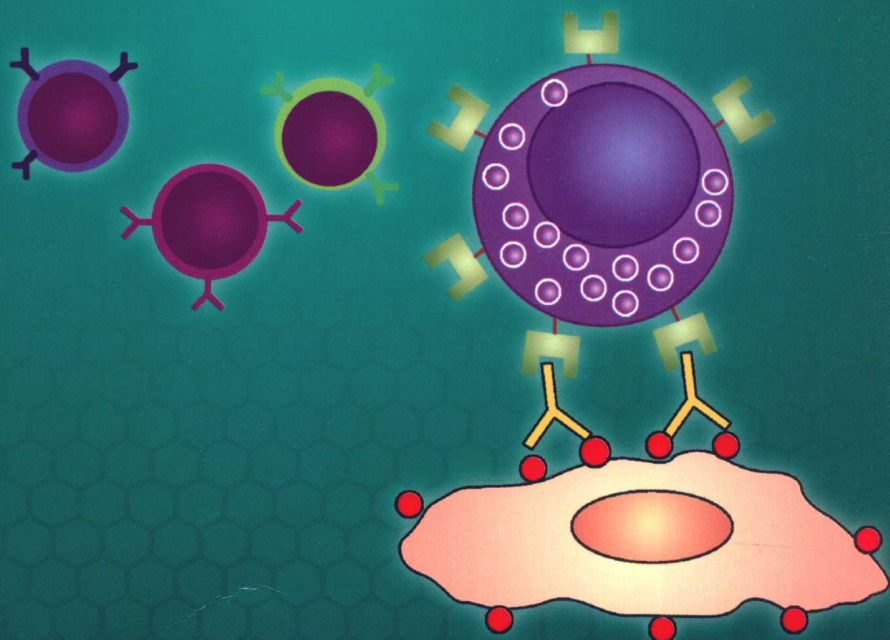
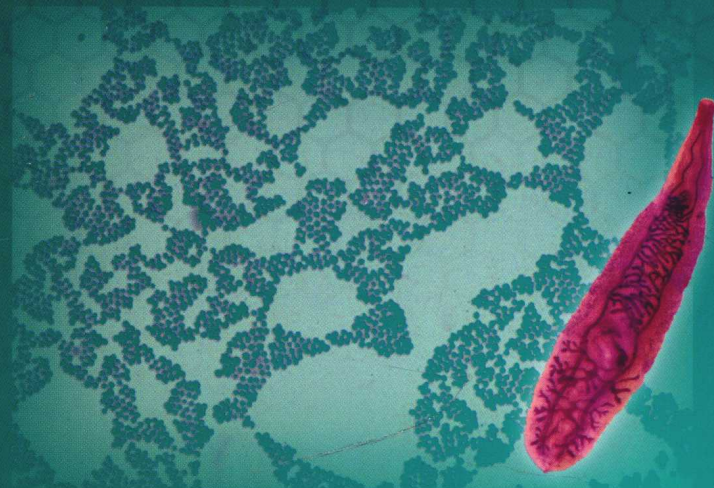
全国高等医药教育规划教材

感染与免疫学实验教程

LABORATORY TEXTBOOK OF INFECTION AND IMMUNITY

主 编 李立伟

副主编 鲍建芳



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

感染与免疫学实验教程

主 编 李立伟

副主编 鲍建芳

编 者 (按姓氏笔画排序)

丁伟勇 王青青 王晓健 王继璇

陈 玮 陈玮琳 陈建忠 沈建根

林旭媛 胡玮琳 钱 景 翁莉霞

彭慧琴

主 审 严 杰



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

感染与免疫学实验教程 / 李立伟主编. —杭州:
浙江大学出版社, 2015. 1

ISBN 978-7-308-14261-8

I. ①感… II. ①李… III. ①病原微生物—实验—医学院校—教材 ②免疫学—实验—医学院校—教材
IV. ①R37-33 ②R392-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 303640 号

感染与免疫学实验教程

李立伟 主编

丛书策划 阮海潮(ruanhc@zju.edu.cn)

责任编辑 阮海潮

封面设计 杭州林智广告有限公司

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 杭州中大图文设计有限公司

印 刷 浙江云广印业有限公司

开 本 787mm×1092mm 1/16

印 张 19

彩 插 4

字 数 481 千

版 印 次 2015 年 1 月第 1 版 2015 年 1 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-14261-8

定 价 48.00 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联系方式: 0571-88925591; <http://zjdxbs.tmall.com>

前 言

多年的教学实践表明,在医学教育中实验教学和理论教学处于同等重要的地位。实验教学是培养医学生的重要环节,也是培养学生分析问题、解决问题的能力,创新精神和综合素质的重要途径。在传统的教学模式下,实验教学完全依附于理论教学,实验教学的功能多为验证理论和加深学生对理论的理解,实验内容陈旧、教学方法落后,学生兴趣不高,因而学生普遍缺乏体验性和深入的研究性学习方式,大大降低了实验教学的效果。

本教材以培养学生综合能力为出发点和落脚点,打破了现行的课程框架,改变了传统的“以学科为中心”的教学模式,将医学微生物学、人体寄生虫学和医学免疫学有机整合,并结合当前先进的实验技术,对实验内容进行了深层次的整合和优化,使实验教学和理论教学既有机结合又相对独立,兼顾了学生基础知识的学习和创新能力的培养。

本教材分为病原生物学基础实验、免疫学基础实验、综合性实验和创新性实验等四篇。病原生物学和免疫学基础实验开设了一些经典的验证性实验,以巩固理论知识和培养学生的实际动手能力;综合性实验以应用型实验和病例分析为主要形式,有机融合了各相关学科的知识 and 实验技术,以培养学生自主学习能力、发现问题和解决问题的能力;创新性实验由教师提出问题,在教师引导下由学生自主设计和完成实验,以培养学生的科研能力、创新能力和团队合作精神。

本教材内容丰富实用、层次清晰、原理简明、适用面广,能充分调动学生的主观能动性,增强学生的独立创新能力和团队合作精神,以培养基础扎实、善于综合、兼顾创新的高素质的医学人才为最终目标。

本教材是在浙江大学医学院病原生物学系和免疫学系各位前辈和同仁的帮助下完成的,在此对各位老师表示真诚地感谢。陆源教授对本书进行了认真的审核,并提出许多宝贵的建议,在此一并表示衷心的感谢!

由于实验教学改革尚处于探索阶段,加之编者水平有限,教材中难免存在不足甚至错误之处,恳请同行专家提出宝贵意见。

李立伟

目 录

第一篇 病原生物学基础实验

实验一 显微镜的原理与使用方法 / 1

一、普通光学显微镜原理和使用方法 / 1

二、暗视野显微镜原理和使用方法 / 2

实验二 细菌材料标本的制备 / 4

一、细菌活菌不染色标本的制备 / 4

二、细菌材料玻片标本的制备 / 4

实验三 微生物常用染色方法 / 6

一、单染色法 / 6

二、革兰染色法 / 6

三、抗酸染色法 / 7

四、阿培脱染色法 / 8

五、荚膜染色法 / 9

六、芽孢染色法 / 10

七、鞭毛染色法 / 11

八、Fontana 镀银染色法 / 11

九、墨汁染色法 / 12

实验四 细菌的人工培养 / 13

一、常用基础培养基的制备 / 13

二、细菌人工培养的接种方法 / 14

三、细菌常用生化反应 / 19

实验五 细菌在自然环境中的分布、消毒和灭菌 / 22

一、细菌在自然环境中的分布 / 22

二、细菌的消毒和灭菌 / 22

实验六 生物因素对细菌的影响及细菌的变异 / 25

一、抗生素的抗菌试验(纸片法) / 25

二、细菌鞭毛的变异 / 26

三、细菌接合试验 / 27

四、噬菌体的噬菌作用(平板法) / 27

实验七 细菌免疫学试验 / 28

一、细菌免疫学鉴定试验 / 28

二、细菌免疫学诊断试验 / 29

实验八 细菌的分子生物学诊断 / 32

一、聚合酶链式反应 / 32

二、核酸杂交技术 / 33

实验九 细菌毒素检测 / 36

一、内毒素测定(鲎试验) / 36

二、外毒素毒性作用及抗毒素中和作用 / 36

实验十 病原性球菌 / 39

一、常见病原性球菌的菌体形态、排列及染色性 / 39

二、葡萄球菌、链球菌和肺炎链球菌的培养特性 / 40

三、葡萄球菌的血浆凝固酶试验 / 40

四、脓汁标本病原性球菌的分离鉴定 / 41

实验十一 肠道杆菌和棒状杆菌 / 43

一、肠道杆菌的形态及染色性 / 43

二、粪便中肠道杆菌的分离与鉴定 / 43

三、棒状杆菌 / 45

实验十二 芽孢菌和分枝杆菌 / 46

一、需氧芽孢杆菌 / 46

二、厌氧芽孢梭菌 / 46

三、分枝杆菌 / 49

实验十三 真菌和其他微生物 / 50

一、螺旋体 / 50

二、立克次体 / 50

三、支原体 / 51

四、衣原体 / 51

五、真菌 / 52

实验十四 病毒形态和分离培养 / 54

一、病毒形态的观察方法 / 54

二、病毒分离培养与鉴定 / 54

实验十五 病毒血凝和血凝抑制试验 / 59

一、病毒血凝试验 / 59

二、病毒血凝抑制试验 / 59

实验十六 病毒的分子生物学检测 / 61

一、聚合酶链式反应 / 61

二、免疫印迹法 / 62

实验十七 病毒的形态特点 / 64

一、狂犬病毒包涵体(内基小体) / 64

二、麻疹病毒包涵体 / 64

三、脊髓灰质炎病毒对细胞的致病作用 / 65

实验十八 寄生虫常用标本的制备 / 66

一、血液标本的制备 / 66

- 二、粪便标本的制备 / 67
- 三、排泄物和分泌物标本的制备 / 72
- 四、穿刺标本的制备 / 74
- 五、其他器官组织标本制备 / 75
- 六、虫体标本的制备 / 76
- 实验十九 寄生虫常用染色方法 / 77
 - 一、姬氏染色法 / 77
 - 二、瑞氏染色法 / 78
 - 三、铁-苏木素染色法 / 78
 - 四、碘液染色法 / 79
 - 五、金胺-酚染色法 / 80
 - 六、改良抗酸染色法 / 81
 - 七、金胺-酚-改良抗酸染色法 / 81
 - 八、卡红染色法 / 82
 - 九、墨汁染色法 / 83
- 实验二十 医学原虫 / 84
 - 一、叶足虫 / 84
 - 二、鞭毛虫 / 86
 - 三、孢子虫 / 87
- 实验二十一 医学吸虫 / 90
 - 一、华支睾吸虫 / 90
 - 二、卫氏并殖吸虫 / 90
 - 三、布氏姜片吸虫 / 91
 - 四、日本血吸虫 / 92
- 实验二十二 医学绦虫 / 93
 - 一、链状带绦虫和肥胖带绦虫 / 93
 - 二、细粒棘球绦虫 / 94
 - 三、曼氏迭宫绦虫 / 94
- 实验二十三 医学线虫 / 96
 - 一、似蚓蛔线虫 / 96
 - 二、蠕形住肠线虫 / 97
 - 三、毛首鞭形线虫 / 98
 - 四、十二指肠钩口线虫和美洲板口线虫 / 98
 - 五、马来布鲁线虫和班氏吴策线虫 / 100
 - 六、旋毛形线虫 / 101
- 实验二十四 医学节肢动物 / 102
 - 一、昆虫纲 / 102
 - 二、蛛形纲 / 104

第二篇 免疫学基础实验

- 实验一 凝集反应 / 106

- 一、直接凝集反应 / 106
- 二、间接凝集反应 / 107
- 实验二 沉淀反应 / 110
 - 一、琼脂扩散试验 / 110
 - 二、免疫电泳试验 / 113
 - 三、环状沉淀试验 / 118
- 实验三 补体参与的免疫反应 / 120
 - 一、溶血反应 / 120
 - 二、补体结合试验 / 121
 - 三、血清总补体含量的测定(CH_{50} 测定) / 124
 - 四、溶血空斑试验 / 126
 - 五、补体介导的细胞毒试验 / 127
- 实验四 免疫标记技术 / 129
 - 一、酶免疫技术 / 129
 - 二、荧光免疫技术 / 135
 - 三、金免疫技术 / 139
 - 四、放射免疫技术 / 142
- 实验五 免疫印迹 / 144
 - 一、蛋白质的电泳分离 / 144
 - 二、将蛋白质从凝胶中转印至膜上 / 148
 - 三、免疫检测 / 150
- 实验六 免疫细胞的分离与纯化 / 153
 - 一、外周血液中白细胞的分离 / 153
 - 二、外周血液中单个核细胞的分离——密度梯度离心法 / 154
 - 三、淋巴组织中淋巴细胞的分离 / 156
 - 四、淋巴细胞的分离纯化 / 157
 - 五、人外周血树突状细胞的分离与培养 / 165
- 实验七 细胞免疫功能测定 / 166
 - 一、E玫瑰花环试验 / 166
 - 二、淋巴细胞转化试验 / 167
 - 三、NK细胞活性的检测 / 169
 - 四、LAK细胞的制备及其细胞毒活性检测 / 173
 - 五、肿瘤浸润淋巴细胞的制备 / 173
 - 六、CTL细胞毒活性检测 / 176
 - 七、抗体介导的淋巴细胞毒试验 / 177
 - 八、混合淋巴细胞培养试验 / 178
 - 九、白细胞移动抑制试验 / 180
- 实验八 流式细胞测定技术 / 181
- 实验九 细胞因子及其受体的检测 / 183

- 一、细胞因子的生物活性检测法 / 183
- 二、细胞因子及其受体的免疫学检测法 / 193
- 三、细胞因子的分子生物学检测法 / 202
- 实验十 化学发光免疫分析 / 211
- 实验十一 HLA 分型技术 / 213
 - 一、微量淋巴细胞毒试验 / 213
 - 二、DNA 分型技术 / 214
- 实验十二 超敏反应 / 217
 - 一、豚鼠过敏试验 / 217
 - 二、血清中总 IgE 水平测定(酶联免疫吸附试验,ELISA) / 218
 - 三、血清中特异性 IgE 抗体的测定(酶联免疫吸附试验,ELISA) / 219
 - 四、肥大细胞脱颗粒试验 / 220
 - 五、循环免疫复合物(IC)的检测 / 221
 - 六、迟发型超敏反应(皮肤试验) / 223
- 实验十三 多克隆抗体的制备及纯化 / 225
 - 一、伤寒杆菌(颗粒性抗原)抗血清的制备 / 225
 - 二、溶血素(颗粒性抗原)的制备 / 227
 - 三、抗人 IgG(可溶性抗原)免疫血清的制备 / 227
- 实验十四 单克隆抗体的制备 / 229
 - 一、小鼠骨髓瘤细胞的准备 / 229
 - 二、免疫 B 淋巴细胞的准备 / 231
 - 三、细胞融合 / 232
 - 四、融合细胞的接种与选择性培养 / 233
 - 五、杂交瘤细胞的检测 / 234
 - 六、阳性杂交瘤细胞的克隆化培养 / 236
 - 七、杂交瘤细胞的扩增与冻存 / 236
 - 八、单克隆抗体性质的鉴定 / 237
 - 九、单克隆抗体的生产 / 239
 - 十、单克隆抗体的提纯 / 240
- 实验十五 抗体的纯化 / 242
 - 一、中性盐沉淀法粗提抗体 / 242
 - 二、离子交换层析法纯化抗体 / 243
- 实验十六 非特异性免疫实验 / 246
 - 一、吞噬细胞的吞噬作用 / 246
 - 二、正常体液杀菌作用的测定 / 248

第三篇 综合性实验

- 实验一 人体正常菌群的检测 / 250
 - 一、人体手指皮肤正常菌群的检测 / 250

二、人体咽喉部正常菌群的检测 / 250

实验二 饮用水中大肠菌群的测定 / 252

实验三 黄鳝体内棘颚口线虫感染的调查 / 254

实验四 人体蠕形螨感染的调查 / 255

实验五 TORCH 感染的检测 / 256

实验六 病原性球菌感染的病例分析 / 258

实验七 肠道杆菌感染的病例分析 / 260

实验八 病毒和其他微生物感染的病例分析 / 262

实验九 线虫和吸虫感染的病例分析 / 263

实验十 医学绦虫和原虫感染的病例分析 / 265

第四篇 创新性实验

实验一 医学微生物学科研课题设计与论文撰写 / 267

一、医学微生物学研究的的目的、意义和主要特征 / 267

二、医学微生物学研究的基本程序 / 267

实验二 腹泻样品微生物(病原体)的检测 / 274

一、导 言 / 274

二、背景设计 / 276

三、实验目的 / 276

四、实验要求 / 276

五、进度安排 / 276

六、实验报告 / 276

实验三 细菌耐药性的检测 / 277

一、导 言 / 277

二、背景设计 / 279

三、实验目的 / 280

四、实验要求 / 280

五、进度安排 / 280

六、实验报告 / 280

附 录

附录 I 常用试剂的配制 / 281

附录 II 动物实验技术 / 285

附录 III 常用免疫学检查正常值 / 288

附录 IV 工作中应常注意的要点 / 289

附录 V 危险品的防护 / 290

参考文献 / 294

第一篇 病原生物学基础实验

实验一 显微镜的原理与使用方法

一、普通光学显微镜原理和使用方法

目的 熟练掌握普通光学显微镜的使用和保护,以便能娴熟使用油镜观察细菌标本。

原理 细菌个体微小,肉眼无法看到,必须使用油镜,将其放大 1000 倍左右才能看到。如光线直接从标本玻片经空气层进入油镜头时,由于介质密度不同而发生折射现象,因此进入物镜中的光线很少,结果视野暗淡,物像不清晰。如在标本玻片上加上折光率与玻片($n=1.52$)相近的香柏油($n=1.515$),就可避免光线的分散,加强视野的亮度,获得清晰的物像。油镜原理如图 1-1-1 所示。

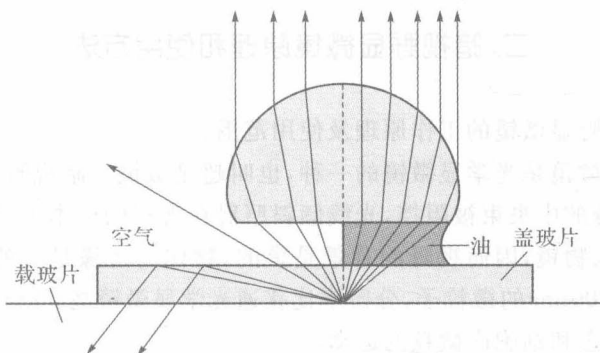


图 1-1-1 油镜原理示意图

材料 附有油镜头的普通光学显微镜一架、染色标本装片、香柏油、擦镜纸、二甲苯、消毒缸。

方法

1. 油镜使用方法

(1) 油镜的识别

油镜头上标记有“90×”或“100×”字样,镜头前端有白色圆圈,刻有“HI”或“Oil”等标记。油镜镜筒较其他物镜长,透镜孔径较其他物镜小。

(2) 油镜的使用

- ①用油镜观察标本时应将显微镜直立,勿将镜臂弯曲,以免镜油流散。
- ②若以天然光线为光源,使用平面反光镜;如以灯光为光源,使用凹面反光镜。
- ③将聚光器升到最高位置,再将光圈完全打开,增大射入光线的强度。
- ④将标本固定在载物台上,标本面上加镜油一小滴,用标本移动器夹紧标本。
- ⑤先用低倍镜寻找物像,把物像移到视野中心,将视野调至最亮,然后换用油镜。
- ⑥用眼从侧方看着物镜,缓慢转动粗调节器,使物镜镜头浸入油滴内,并几乎与玻片接触为止,但切勿使两者相碰,以防止损伤镜头或压碎玻片;然后从目镜观察,轻轻转动粗调节器,看到物像时,再调换细调节器,使物像清晰;若未能看到物像,再重复上述操作。
- ⑦油镜头使用后应立即用擦镜纸擦净镜头上的油,如油已干,可在擦镜纸上滴少许二甲苯擦拭,并随即用干的擦镜纸擦去二甲苯,以防镜头脱落。

2. 油镜的保护

- (1)显微镜是贵重精密仪器,使用时要精心爱护,不得随意拆散和碰撞。
- (2)取送显微镜时,应右手持镜臂,左手托镜座,平端于胸前,然后轻放于台面上或柜箱内。
- (3)防止与强酸、强碱、乙醚、氯仿、酒精等化学药品接触。
- (4)擦镜头时,用擦镜纸擦,切忌使用粗糙的纸片或布片擦拭。擦镜时应顺其直径方向擦,不要转圈擦。
- (5)显微镜使用完毕,将物镜转开呈“八”字,使其不正对聚光器,以免物镜与聚光器相碰撞。将聚光器下降,罩上镜套或盖布,对号归位。

二、暗视野显微镜原理和使用方法

目的 了解暗视野显微镜的工作原理及使用范围。

原理 暗视野显微镜是光学显微镜的一种,也叫超显微镜。暗视野显微镜的聚光镜中央有挡光片,使照明光源的中央束被阻挡,光线倾斜照射在观察的标本上,标本遇光发生反射或散射,散射的光线进入物镜,因而视野的背景是黑的,物体的边缘是亮的(图 1-1-2)。利用这种显微镜能见到 4~200nm 的微粒子,分辨率比普通光学显微镜高 50 倍。暗视野显微镜主要用于观察活细胞的形态和细胞内微粒的运动。

材料 钩端螺旋体液体培养基 7~10d 培养物;载玻片、盖玻片、液体石蜡、滴管等。

方法

1. 安装暗视野聚光器。
2. 选用强光源,一般用显微镜灯照明,以防止直射光线进入物镜。
3. 制备玻片标本 在载玻片上滴一滴钩端螺旋体培养物,盖上盖玻片。
4. 载玻片放在载物台上,水平移动聚光器,使聚光器的光轴与显微镜的光轴严格位于一直线上。
5. 在聚光器和玻片之间加一滴液体石蜡,轻轻抬高聚光器,使其上的液体石蜡与载玻片接触,但勿产生气泡。
6. 选用与聚光器相应的物镜,调节焦距,按普通显微镜的方法操作。

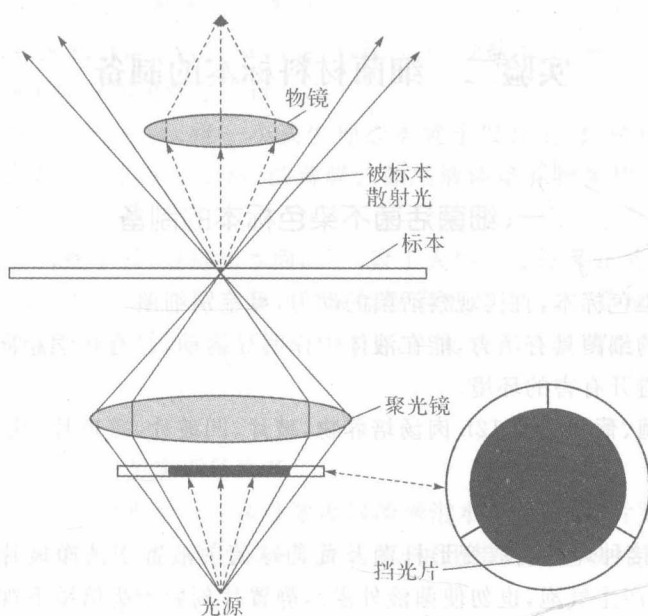


图 1-1-2 暗视野显微镜原理示意图

(李立伟)

实验二 细菌材料标本的制备

一、细菌活菌不染色标本的制备

目的 采用不染色标本,直接观察活菌的动力,可鉴别细菌。

原理 有鞭毛的细菌具有活力,能在液体中作明显运动,并有化学趋向性,常朝着有营养物质的方向移动而避开有害的环境。

材料 变形杆菌、葡萄球菌 12h 肉汤培养物,玻片、凹玻片、盖玻片、凡士林、接种环、酒精灯、火柴、消毒缸。

方法

1. 压滴法 用接种环分别取变形杆菌及葡萄球菌菌液置于洁净玻片中央,在菌液上轻覆以盖玻片(注意勿产生气泡,也勿使菌液外溢),静置片刻后于高倍镜下观察。

2. 悬滴法 在凹玻片的凹窝四周涂少许凡士林,用接种环分别取变形杆菌及葡萄球菌菌液置于洁净盖玻片中央,将凹玻片的凹窝对准玻片的菌液处,反扣覆在盖玻片上,微压使两者贴紧后迅速反转,使菌液悬滴于盖玻片下(图 1-2-1)。先以低倍镜找到悬滴的边缘后,再换以高倍镜观察。

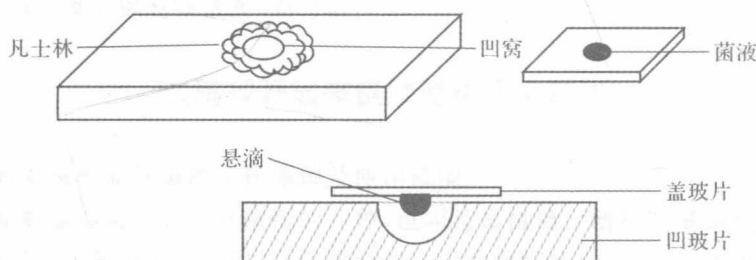


图 1-2-1 悬滴标本的制备

结果 变形杆菌有明显的定向运动,葡萄球菌作布朗氏分子运动。

注意事项

1. 镜检时需适当降低聚光器或缩小光圈,视野不宜过亮。
2. 需仔细辨认鞭毛的运动与布朗氏分子运动的区别,前者是有方向的位移,而后者则是细菌受环境中液体分子的冲击而呈现在原位附近的颤动。无鞭毛的细菌虽无动力,但同样能作布朗氏分子运动。

二、细菌材料玻片标本的制备

目的 细菌材料需要涂布固定于玻片上,经染色后才能观察其形态、结构和染色反应。

原理 细菌以胶体原浆蛋白为主,涂布在玻片上经火焰温热后可固定于玻片,再经染色

液作用后可被染上颜色,且不易被水流冲洗掉。

材料 葡萄球菌、大肠杆菌 18~24h 培养物,玻片、生理盐水、接种环、酒精灯、消毒缸。

方法 按涂片→干燥→固定顺序进行。

1. **涂片** 取洁净载玻片一张,将一小滴生理盐水置于玻片上,接种环灭菌后取菌少许,与生理盐水混匀并涂成面积不超过 1cm^2 的薄膜。如用液体培养物涂片,可直接取培养物涂于玻片上。

2. **干燥** 将涂片自然干燥,或将标本面向上,置于火焰上方较远处烘干。

3. **固定** 其目的有二:一是杀死细菌并使菌体黏附于玻片上;二是增加其对染料的亲和力。常用加热固定法,手执玻片的一端,标本面向上,在火焰外层较快地连续通过三次,每次 2~3s。

注意事项

1. 玻片要洁净无油,否则菌液不易涂开。
2. 取菌量宜少,与生理盐水混合后菌液浓度以淡米泔水样为宜,涂片要匀而薄。
3. 干燥时不应距火焰太近,以避免细菌样品烤焦,可用指尖触碰玻片背面,以手指感觉较烫但能忍受为宜。

(丁伟勇)

实验三 微生物常用染色方法

细菌染色是微生物学实验中的一项基本技术。在适宜条件下,各种细菌保持其原有形态和染色反应,可作为菌种鉴别的基本条件。细菌为无色半透明胶体,在普通光学显微镜下不易识别,必须对它们进行染色。经染色后的菌体与背景形成明显的色差,从而能更清楚地观察到其形态和结构。

一、单染色法

目的 利用单一染料对细菌进行染色,此法操作简便,适用于菌体一般形状和细菌排列的观察。

原理 因细菌蛋白质等电点较低,当它生长于中性、碱性或弱酸性溶液时常带负电荷,而碱性染料在电离时,其分子的染色部分带正电荷,因此碱性染料容易与细菌结合使细菌着色。经染色后的细菌与背景形成鲜明的对比,在显微镜下更易于识别。常用作简单染色的碱性染料有美蓝、结晶紫、碱性复红等。当细菌分解糖类产酸使培养基 pH 下降时,细菌所带正电荷增加,此时可用伊红、酸性复红或刚果红等酸性染料着色。

材料 按前述方法制备的细菌玻片标本、结晶紫染液。

方法

1. 染色 将玻片平放于玻片搁架上,滴加染液 1~2 滴于涂片上(染液刚好覆盖涂片薄膜为宜),染色约 1min。
2. 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,不要用水流直接冲洗涂面。水流不宜过急、过大,以免涂片薄膜脱落。
3. 干燥 甩去玻片上的水珠自然干燥或用吸水纸吸干,待标本充分干燥后加油,用油镜观察。

二、革兰染色法

目的 革兰染色法是最常用的细菌鉴别染色法,根据染色结果将细菌分成两大类,即革兰阳性菌(G^+)和革兰阴性菌(G^-),此方法可为细菌鉴别、分析细菌的结构特点、致病性和选用抗菌药物提供依据。

原理 革兰阳性菌细胞壁主要成分是数十层的肽聚糖,且肽聚糖分子内有交联桥而呈三维网状结构,类脂质含量少,革兰染色过程中用酒精脱色时,可使肽聚糖层的孔径变小,细胞壁通透性降低,结晶紫与碘染料复合物不易渗出,菌细胞仍保留结晶紫的颜色。革兰阴性菌细胞壁仅有数层肽聚糖,无交联桥而呈平面片层结构,因外膜含较多类脂质,革兰染色过程中用酒精脱色时,类脂质被溶解,细胞壁通透性增高,使结晶紫与碘染料复合物易于渗出,结果使菌细胞脱色,再经石炭酸复红稀释液复染后呈红色。

材料 按前述方法制备的细菌玻片标本,革兰染色液一套。

方法

1. 初染 滴加结晶紫染液数滴覆盖于细菌玻片标本的菌膜上,室温染色约 1min,用细水流轻轻冲洗数秒,甩干。
2. 媒染 滴加卢戈氏碘液数滴覆盖于菌膜上,室温染色 1min,按上法水洗、甩干。
3. 脱色 滴加 95%酒精于菌膜上,轻轻旋转或晃动玻片,直至不再有紫色染料溶出为止,约 0.5min(可视菌膜厚薄适当增减时间),按上法水洗、甩干。
4. 复染 滴加稀释石炭酸复红染液覆盖于菌膜上,室温染色约 0.5~1min,按上法水洗、甩干。
5. 用吸水纸轻轻吸干玻片,室温中充分干燥后滴加香柏油于染色后的菌膜上,用油镜观察。

结果 革兰阳性菌染成蓝紫色(图 1-3-1),革兰阴性菌染成红色(图 1-3-2)。

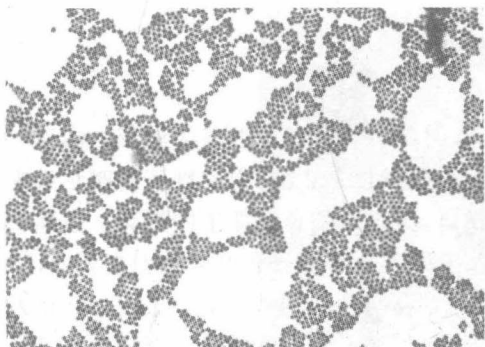


图 1-3-1 金黄色葡萄球菌革兰染色

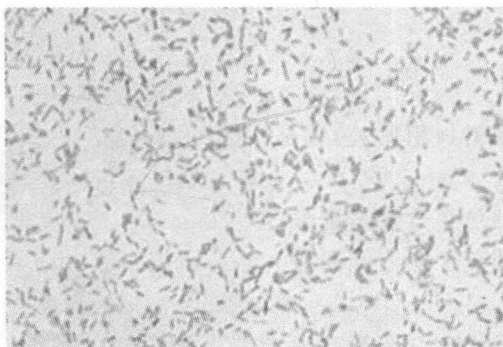


图 1-3-2 大肠杆菌革兰染色

注意事项

1. 滴加各种革兰染色液体时均以菌膜完全被覆盖为准。
2. 掌握好染色时间,尤其是酒精脱色时间不宜过长或过短。
3. 染色过程中不可使革兰染色液体干涸。
4. 选用 18~24h 新鲜细菌培养物制备标本,否则影响染色效果。
5. 细菌染色标本片观察后仍应放入规定的容器内以便消毒处理。

三、抗酸染色法

目的 抗酸染色法是一种显示抗酸杆菌的特殊染色方法,对于结核病诊断和评价治疗效果有重要意义。

原理 分枝杆菌属细菌的细胞壁有大量分枝菌酸包绕在肽聚糖表面,影响染料的穿入,因而革兰染色不易着色。但结核分枝杆菌经 5%石炭酸复红加温染色后,能抵抗 3%盐酸酒精脱色作用而仍呈红色,为抗酸阳性细菌,其他细菌易被 3%盐酸酒精脱色而呈蓝色,为抗酸阴性细菌。

材料 卡介苗及葡萄球菌混合液、抗酸染色液、3%盐酸酒精、载玻片、染色架、酒精灯等。