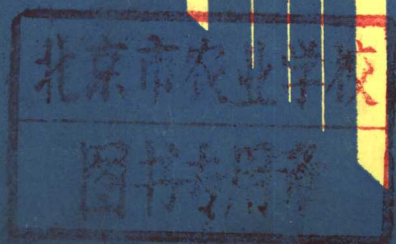
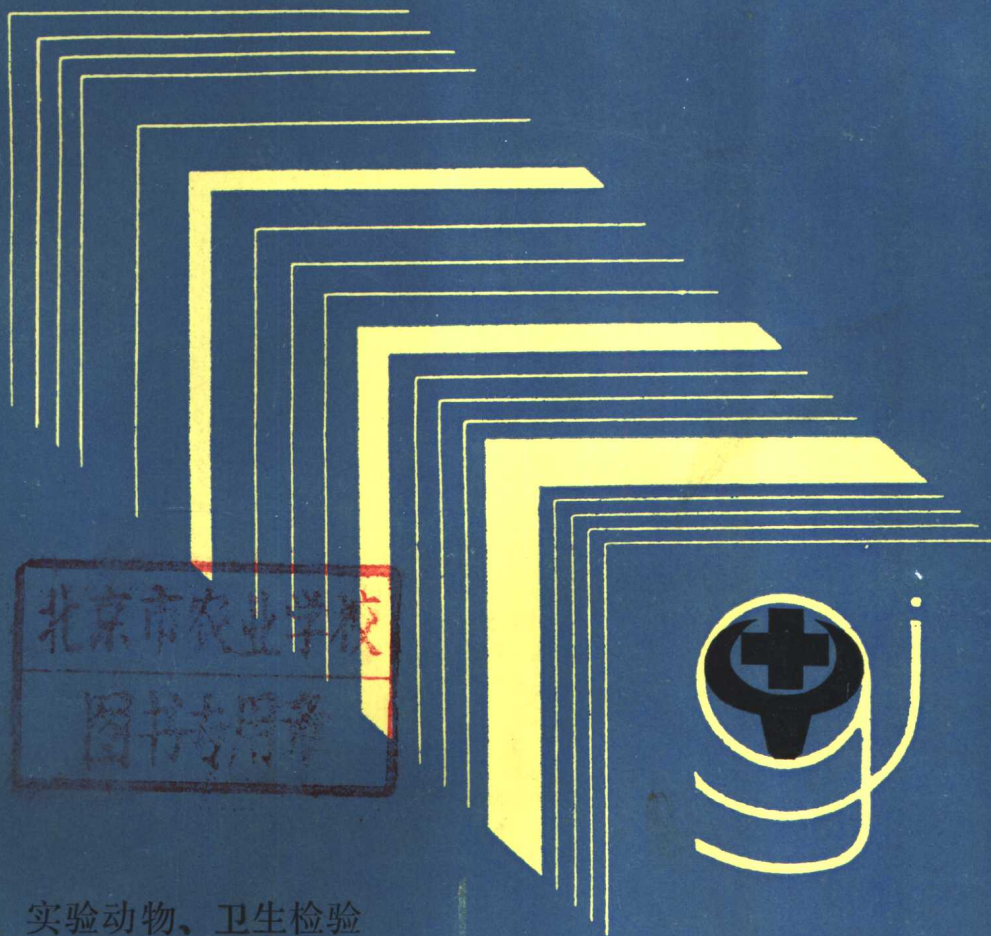


全国高等农业院校教学参考书



兽医、实验动物、卫生检验
及药学等专业用

兽医微生物学 及免疫学技术

曹澍泽 等主编

北京农业大学出版社



全国高等农业院校教学参考书
全国高等农业院校教材指导委员会审定

兽医微生物学及免疫学技术

曹澍泽 等主编

兽医、实验动物、卫生检验
及药学等专业用

北京农业大学出版社

(京)第164号

全国高等农业院校教学参考书

兽医微生物学及免疫学技术

曹澍泽 主编

责任编辑 雷克敬

北京农业大学出版社出版

(北京市海淀区圆明园西路二号)

北京昌平华生印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米 16开本 26.5印张 660千字

1992年5月第1版 1992年5月第1次印刷

印数: 1—2000

ISBN 7-81002-270-9/S·271

定价: 6.85元

前 言

兽医微生物学及免疫学技术一书是全国农业院校统编的配套教学参考书，是在兽医微生物学及免疫学理论上，开设的一门技术操作课程。全书共分细菌学技术、病毒学技术、免疫学技术。它包括了兽医微生物及免疫学的一般基本操作技术，并有常见病原微生物的检验，具有微生物学检验手册的性质，是兽医专业、实验动物专业、兽医卫生检验专业和药学专业的基本教材，并可供研究生、临床兽医微生物工作者参考。

全书的内容分三篇十四章。细菌学技术部分有：第一章细菌形态；第二章分离培养；第三章培养特性与生化特性；第四章其它技术；第五章重要的细菌、真菌等的分离鉴定。病毒学技术部分有：第六章病毒的分离培养；第七章病毒的鉴定；第八章常见病毒的分离与鉴定。免疫学技术部分有：第九章抗原抗体的制备；第十章凝聚性抗原抗体反应；第十一章免疫标记抗体技术；第十二章有补体参与的反应；第十三章中和反应；第十四章细胞免疫检测技术等。此外，在本书之后还有一些有关的附录。

在我们编写本书的过程中，注意到内容的系统性、科学性和先进性，努力做到反映国内外的最新科学成果，力求使本书能适应我国的四个现代化的发展需要。

由于我们编写时间仓促，专业知识水平不高，缺点和问题一定不少，诚恳地希望读者们提出宝贵意见，以便再版时修订。

编 者

1991年

目 录

第一篇 细菌学技术	1
第一章 形态学检查	1
第一节 标本制备	1
一 不染色标本的制备	1
二 负染色标本的制备	2
三 染色标本的制备	2
第二节 染色法与染料的配制	3
一 染料	3
二 染料酒精饱和溶液的配制	3
三 染色法与染料的配制	3
(一) 简单染色法 3; (二) 革兰氏 (Gram) 染色法 3; (三) 3% KOH 法 4; (四) 萼纳 (Ziehl-Neelsen) 氏抗酸性细菌染色法 5; (五) 结核荧光染色法 (Herrmann 改良法) 5; (六) 瑞氏 (Wright) 染色法 5; (七) 姬姆萨 (Giemsa) 氏染色法 5; (八) 细菌芽胞染色法 6; (九) 细菌鞭毛染色法 6; (十) 细菌荚膜染色法 7; (十一) 乳酸酚棉蓝染色法 8; (十二) 方吞那 (Fontana) 染色法 8; (十三) 钩体镀银染色法 (改良镀银法) 8; (十四) 钩体媒染色法 9; (十五) 螺旋体负染色法 9; (十六) 马夏维洛 (Macchiavello) 染色法 9; (十七) 科兹洛夫斯基染色法 9; (十八) 牛乳的纽曼氏 (Newman) 染色法 9	
第三节 细菌的形态观察	9
一 细菌的形状、排列、染色性	9
二 细菌大小的测量	10
三 细菌的细胞结构	11
第四节 其它微生物形态	13
一 真菌	13
二 放线菌	14
三 螺旋体	14
四 霉形体	15
五 立克次氏体	16
六 衣原体	16
七 病毒	16
第二章 微生物的分离培养	17
第一节 注意事项及获得纯培养的原则	17
一 注意事项	17
二 获得纯培养的原则	18
三 正确分离方法的选用	19
第二节 细菌的分离培养法	19
一 通用的分离培养法	19
(一) 平板划线分离培养法 19; (二) 稀释平板分离培养法 20	
二 厌氧菌的分离培养法 21; (一) 高层琼脂培养法 21; (二) 平板划线法 21; (三) 稀释平板分	

离培养法 21; (四) 厌氧环境的创造 21; (五) 厌氧菌的培养 23	
第三节 细菌的纯培养与移植接种	23
一 纯培养菌的挑选法	23
二 纯培养菌的移植接种法	23
第四节 其它微生物的分离技术	24
一 病原真菌的分离	24
二 枝原体的分离培养	25
三 螺旋体的培养	26
四 放线菌的分离方法	27
五 衣原体与立克次氏体的分离方法	27
第三章 纯培养菌的培养特性与生化特性检查法	29
第一节 细菌培养特性检查法	29
一 生长条件的检查	29
二 生长表现的检查	31
第二节 细菌的生化特性检查	34
一 糖类代谢试验	34
(一) 糖发酵试验 34; (二) 葡萄糖代谢型测定或O/F试验 34; (三) 甲基红(MR)试验 35;	
(四) V-P试验 35; (五) 淀粉水解试验 36; (六) β 半乳糖苷酶试验(ONPG试验) 36;	
(七) 甘油品红试验 36; (八) 七叶苷水解试验 37	
二 氨基酸蛋白质代谢试验	37
(一) 吲哚试验(靛基质试验) 38; (二) 硫化氢试验 38; (三) 尿素酶试验 38; (四) 明胶	
液化试验 38; (五) 苯丙氨酸脱氨酶试验 39; (六) 氨基酸脱羧酶试验 39; (七) 精氨酸双水解	
酶试验 39	
三 碳源与氮源利用试验	40
(一) 枸橼酸盐利用试验 40; (二) 马尿酸钠水解试验 40; (三) 有机酸盐利用试验 40; (四)	
丙二酸钠利用试验 41; (五) 葡萄糖铵利用试验 41; (六) 醋酸钠利用试验 41	
四 酶类试验和其它	42
(一) 氧化酶试验 42; (二) 细胞色素氧化酶试验 42; (三) 触酶试验 42; (四) 过氧化物酶	
试验 43; (五) 硝酸盐还原试验 43; (六) 凝固酶试验 44; (七) 卵磷脂酶试验 44; (八) 磷	
酸酶试验 45; (九) DNA 酶试验 45; (十) 胆汁溶菌试验 45; (十一) 石蕊牛乳试验 46;	
(十二) 美蓝还原试验 46; (十三) 凝固血清液化试验 46; (十四) 氰化钾试验 47; (十五) 染料	
抑菌试验 47; (十六) CAMP七叶苷试验 47	
第四章 其它技术	49
第一节 细菌对抗菌素的敏感试验	49
一 纸片扩散法(琼脂扩散法)	49
二 稀释法	53
三 联合药敏试验	54
第二节 细菌的计数法	54
一 平板计数法	54
二 比浊法	56
第三节 大肠菌群数的检查	57
一 概念	57
二 检查方法	57

三 乳糖胆盐发酵培养基	58
四 检索表	58
第四节 细菌毒素的检查	62
一 大肠杆菌肠毒素的检查	62
二 葡萄球菌肠毒素的检查	64
三 肉毒梭菌毒素的检查	64
四 魏氏梭菌毒素的检查	66
第五节 菌种保存	69
一 继代保存法	69
二 液体石蜡覆盖保存法	70
三 冷冻保存法	71
四 冷冻干燥保存法	71
第五章 常见病原细菌的分离与鉴定	75
第一节 概述	75
一 病料采取、保存与运送	75
二 确认为传染病	76
三 常见传染病检验时所用的病料	78
四 临床诊断病料的一般检验程序	82
五 细菌属的初步鉴定	85
第二节 大肠埃希氏菌	87
第三节 沙门氏菌属	95
第四节 耶尔森氏菌属	103
第五节 巴氏杆菌属	108
第六节 嗜血杆菌属	112
第七节 鼻疽假单胞菌	115
第八节 铜绿色假单胞菌	118
第九节 布氏杆菌属	121
第十节 支气管败血波氏杆菌	126
第十一节 葡萄球菌属	129
第十二节 链球菌属	131
第十三节 炭疽杆菌	136
第十四节 梭菌属	139
第十五节 猪丹毒杆菌	146
第十六节 棒状杆菌	148
第十七节 分枝杆菌	150
第十八节 钩端螺旋体	159
第十九节 密螺旋体	163
第二十节 气单胞菌属	165
第二十一节 放线杆菌与放线菌	168
第二十二节 枝原体	170
第二十三节 曲霉菌	177
第二十四节 皮肤癣菌	181

第二篇 病毒学技术	189
第六章 病毒的分离培养	189
第一节 病料的采集与送检	189
一 病料的采集	189
二 病毒标本的运送和保存	190
三 病料的处理	191
第二节 动物试验	191
一 实验动物的分类和选择	192
二 实验动物的捕捉与保定	194
三 实验动物的接种法	196
四 实验动物的采血法	197
五 实验动物的观察、解剖与病料采取	199
第三节 鸡胚培养	199
一 鸡胚培养实验用器械	200
二 鸡胚的实验室孵育	201
三 鸡胚的接种剖视和收获	201
第四节 细胞培养	205
一 器材处理	205
二 人工营养液与平衡盐溶液	206
三 原代细胞培养	209
四 传代细胞培养	212
五 细胞培养物病毒接种的方法与收获	214
六 细胞的保存与运送	216
七 细胞冻存与复苏的操作法	217
第七章 病毒的鉴定	218
第一节 病毒的提纯	218
一 物理提纯法	218
二 化学提纯法	219
三 生物提纯法	220
第二节 病毒的蚀斑技术与克隆	221
一 培养瓶蚀斑技术	221
二 微量细胞培养板蚀斑技术	221
三 培养基与溶液的配制	221
四 病毒的克隆	222
第三节 病毒感染力的测定	223
第四节 病毒的理化特性	224
一 病毒核酸类型的鉴定	224
二 病毒颗粒大小的测定	225
三 对脂溶剂的敏感性	226
四 对酸的敏感性	227
五 耐热性试验	227
六 浮密度值	227
第五节 电子显微镜术	228

一 负染色技术	229
二 超薄切片法	230
三 免疫电镜法	231
第六节 核酸探针技术	232
第七节 病毒致病特性检查	234
第八章 常见病毒的分离与鉴定	236
第一节 口蹄疫病毒	237
第二节 狂犬病病毒	243
第三节 流行性乙型脑炎病毒	245
第四节 新城疫病毒	249
第五节 传染性腔上囊炎病毒	253
第六节 喉气管炎病毒	255
第七节 禽传染性支气管炎病毒	256
第八节 鸡马立克氏病病毒	257
第九节 鸭瘟病毒	259
第十节 鸭肝炎病毒	261
第十一节 小鹅瘟病毒	262
第十二节 猪瘟病毒	264
第十三节 猪传染性胃肠炎病毒	266
第十四节 猪细小病毒	269
第十五节 轮状病毒	270
第十六节 牛传染性鼻气管炎病毒	273
第十七节 牛腹泻—粘膜病病毒	274
第十八节 犬瘟热病毒	278
第十九节 犬细小病毒	279
第二十节 猫泛白细胞减少病毒	280
第二十一节 兔出血症病毒	282
第三篇 免疫学技术	285
第九章 抗原抗体的制备	285
第一节 抗原的制备	285
一 细菌抗原的制备	285
二 病毒抗原的制备	287
三 免疫用抗原的制备	287
第二节 抗体的制备	287
一 抗血清的制备	287
二 免疫球蛋白的分离与提纯	289
三 抗抗体(第二抗体)的制备	295
四 单克隆抗体的制备	296
第三节 佐剂	298
一 佐剂及其作用	298
二 佐剂的种类	299
第十章 凝聚性抗原抗体反应	301
第一节 凝集反应	301

一 直接凝集反应	301
二 间接凝集反应	303
三 协同凝集反应	307
第二节 沉淀反应	308
一 环状沉淀反应	308
二 双向单扩散(辐射扩散)	309
三 双向双扩散试验(Ouchterlong法)	310
四 免疫电泳	311
五 对流免疫电泳	313
六 火箭免疫电泳	314
七 聚丙烯酰胺凝胶电泳	314
八 转移电泳	320
第十一章 免疫标记抗体技术	322
第一节 免疫荧光抗体技术	322
一 基本原理	322
二 荧光抗体的制备	322
三 荧光抗体染色方法	328
四 荧光显微镜观察	331
第二节 免疫酶标记技术	332
一 免疫酶标记技术的原理	332
二 免疫酶标记抗体的制备	332
三 免疫酶染色技术	337
四 酶联免疫吸附测定(ELISA)	339
五 斑点—酶联免疫吸附测定(Dot—ELISA)	343
第三节 放射免疫分析	344
一 放射性同位素的选择	344
二 放射性同位素的体内标记法	344
三 放射性同位素的体外标记法	345
四 液相放射免疫分析	347
五 固相放射免疫分析	349
六 免疫沉淀试验	350
七 放射火箭电泳自显影定量测定法	351
第四节 免疫电镜技术	352
一 免疫复合物电镜技术	352
二 免疫标记电镜技术	353
第五节 其它标记技术	356
第十二章 有补体参与的反应	359
第一节 补体结合反应	359
一 原理	359
二 材料与方法	359
三 准备实验	360
四 正式试验	363
五 标准比色管	364

六 记录符号	365
附一、病毒的补体结合反应(测抗体)	365
附二、病毒的补体结合反应(测抗原)	368
第二节 溶血与溶菌试验	368
一 被动溶血试验	368
二 溶菌试验	369
第三节 单向辐射溶血试验	369
一 材料	369
二 方法	369
第十三章 中和试验	371
第一节 病毒滴度(毒价)的测定	371
一 Reed—Muech氏法	371
二 Karber法	373
第二节 终点法中和试验	374
一 固定病毒稀释血清法	374
二 固定血清稀释病毒法	375
第三节 空斑减少试验	375
第十四章 细胞免疫检测技术	377
第一节 玫瑰花环试验	377
一 E玫瑰花环试验	377
二 EA玫瑰花环试验	378
三 EAC玫瑰花环试验	379
第二节 酸性 α -醋酸萘酯酶测定	380
一 原理	380
二 材料	380
三 试验方法	381
四 结果判断	381
第三节 淋巴细胞转化试验	381
一 PHA淋转试验形态学检查法	381
二 PHA淋转试验 $^3\text{HTdR}$ 掺入法	383
附录:	386
一 仪器设备	386
显微镜 二氧化碳培养箱 恒温培养箱 干热灭菌箱 血清凝固器 水浴箱 电冰箱 真空抽气机	
高压蒸气灭菌器 细菌滤器 离心机	
二 微生物学实验用玻璃器皿的准备	399
(一)细菌用玻璃器皿的准备 399 (二)组织培养用玻璃器皿准备 401 (三)橡胶制品的准备 402	
三 培养基的制造	403
(一)制造人工培养基的要求 402 (二)制造培养基的步骤与方法 402 (三)基础培养基 404	
四 指示剂配制	405
五 常用缓冲液的配制	406
六 常用元素的原子量	410
七 常量、微量、超微量度量衡单位	410

第一篇 细菌学技术

第一章 形态学检查

细菌形态学检查是细菌检验的重要内容之一。它是细菌分类和鉴定的基础，并为进一步鉴定提供参考依据，不但可以迅速了解标本中有无细菌，并可根据形态、结构和染色反应对其有一个初步的了解，为及时选用有效的抗生素有一定的参考价值。

第一节 标本制备

一、不染色标本的制备

细菌不经染色直接镜检，仅可观察生活状态下细菌的形态及其运动情况。细菌未染色时无色透明，在显微镜下观察主要靠细菌的折光率与周围环境的不同。但二者之间差别甚小，所以不能清楚见到特征性结构。一般主要用于检查细菌的动力及运动状况。常用的方法有悬滴片与湿片。检查细菌动力时，须注意真正运动和分子运动，前者是由鞭毛引起的有方向性的位置移动，而后者则只在原位颤动，是由于水分子撞击细菌而引起的布朗氏运动，无鞭毛的细菌亦有此种分子运动。

（一）湿片（又称压片） 取清洁载玻片一张，以接种铂圈（又称白金耳、铂耳、接种环、接种棒）取蒸馏水或清水一滴，放在玻片上（如为液体材料可以不用加水）。将培养管夹持在左手拇指、食指和中指之间，用拇指压着试管底部，使培养物向上，以便于观察。用右手拇指、食指和中指握取接种棒，在酒精灯火焰上灭菌。先直立灭菌铂丝部分，将铂丝部分烧红，再横着灭菌金属棒部分。待接种铂圈灭菌后，立即在酒精灯火焰的周围，以右手的小拇指和无名指夹取左手中的试管棉塞，并在火焰上将管口灭菌，用接种铂圈挑取培养物少许后，立即将试管口放于火焰上灭菌，然后塞好棉塞，将试管放入试管架内。把材料适量混合在水滴内，取盖片一张，小心的盖在水滴上。为了不使其产生气泡，可先将盖片的一端放在水滴内，然后逐渐将盖片全部放平。镜检时注意光线不宜太强。

（二）悬滴标本片 取有凹的清洁玻片一张，于凹的四周涂以少许凡士林，另外置馏水一小滴于一张盖玻片中央，以灭菌好的接种圈取待检材料少许，混合于水滴中，不要涂开，材料宜少，不宜过浓，若为液体材料，则不必事先加水，把液体培养物直接置于盖玻片上即可。将凹玻片翻盖于盖玻片上，使载玻片之凹窝正罩在水滴之上。盖玻片的对角线与载玻片的四边垂直，略加压力，使载玻片与盖玻片贴紧，然后将载玻片翻过来，即可进行检查。检查时将标本置于载物台上，转上低倍接物镜，先找到悬滴边缘，然后将悬滴置于视野中央，

再换上高倍接物镜，将高倍接物镜向下旋转，使其几乎与盖玻片接触，然后检查者观看目镜，同时以手握显微镜的调节螺旋，慢慢向上旋转，直至看见细菌时为止。检查时光线要暗一些效果更好，必要时可用油镜检查。利用暗视野装置或相差镜检查不染色的活微生物，常可获得满意结果。

二、负染色标本的制备

负染色法系将标本的背景染色，而细菌或荚膜等目的物不着色。常用的染料有墨汁，酸性染料刚果红，苯胺黑等，因酸性染料带阴电，故细菌不着色，只能使背景着色。

(一) 负染色法 于玻片上加一滴苯胺黑染液，用灭菌的接种铂圈取培养物少许，混于苯胺黑染料中，并立即将其涂开，使其成为均匀的一层薄膜，自然干燥后，用油镜检查，可在黑色的背景中，看到不着色的细菌。

(二) 节思明氏荚膜染色法 取9毫升含有0.5%石炭酸的生理盐水，加入1毫升无菌血清（各种动物的血清均可）混合成为涂片稀释液。取此液一接种环置于载玻片上，又以灭菌接种环取细菌少许，均匀混合其中，涂成薄层，任其自然干燥，在火焰上微微加热固定，然后置甲醇中处理，并立即取出，在火焰上烧去甲醇。以革兰氏染色液中的草酸铵结晶紫染色液染色半分钟，干后镜检。背景淡紫色，菌体深紫色，荚膜无色。

三、染色标本的制备

细菌标本经过染色后，由于细菌与环境间在颜色上形成鲜明对比，不仅可以看清楚，而且还可以看到一些微细构造，并能根据细菌对不同染料的染色反应及着色深浅对其加以分类鉴定。因此应用较广。染色标本的制作过程包括涂布、干燥、固定和染色几个步骤。

(一) 培养物染色标本片的制备

1. 涂抹 按照“湿片”的取材料方法，用接种铂圈取水一滴放于清洁无脂载玻片上，再取培养物少许混合于水滴中，使其呈极轻微之乳浊色为度，多余材料置火焰上灭菌，若为液体材料可不事先加水，用铂圈将载玻片上的液体涂抹成均匀的薄膜。注意用固体培养物制标本片时，取材料不宜过多，否则涂片上的细菌量很多，互相重叠，不利于染色和观察。

2. 干燥 一般是置空气中自然干燥，必要时可微加温。在制涂片时不宜加水过多，用铂圈取水为宜。

3. 固定 固定的目的是将涂片中的细菌凝固在玻片上，以免在染色过程中被冲掉，可将绝大多数细菌杀死免于扩散，同时也便于细菌着色。一般固定的方法是将被涂有材料的一面向上，以玻片背面在火焰上缓缓来回通过三次。也可用甲醇、酒精等化学药品固定（方法参阅染色法中有关部分）。

4. 染色 将染色液滴于涂片上，经一定时间后，用水冲去染色液，将玻片直立干燥或用吸水纸吸干，镜检。根据不同的目的，可选择不同染色方法。

(二) 血液染色片（血片）的制备

取玻片一张，靠近一端放一滴血液，以左手的大拇指和食指固定住玻片的两端，然后另取一张边缘平整光滑的玻片，作为推移片，将推移片的一端接触血滴前方，使它与带有血液的玻片呈45°夹角，待血液布满推移片的边缘时，以均匀的速度向另一端移动，使血片制得均匀的薄薄一层，不能使血球重叠，否则不利于观察，制好的血片应立即自然干燥，血片的固

定，依染色法不同而异。一般常用革兰氏染色法，瑞氏染色法和姬姆萨氏染色等等。

（三）组织染色片的制备

取病料组织一小块，将其切面放于玻片表面轻轻接触几次，不宜过厚，任其自然干燥，即成组织触片（或称印片）。触片的固定可根据不同染色法而进行。一般多用革兰氏染色、瑞氏染色、姬姆萨氏染色等等。

第二节 染色法与染料配制

一、染料

染料一般可分成三类

一类 碱性染料常以氯化物的形式存在，电离后带阳电，易与带阴电的被染物结合而使其着色。由于细菌的等电点较低，约在 pH2—5 之间，故在中性或碱性以及弱酸性溶液中细菌都带阴电。带阴电的细菌和带阳电的碱性染料易于结合，所以在细菌学检验中多用碱性染料，如结晶紫，美蓝，碱性复红等。

二类 酸性染料通常制成钠盐，有时用其钾盐，钙盐或铵盐，电离后带阴电，能和带阳电的被染物结合。通常酸性染料用来染细胞质，而细菌染色少用。如伊红，刚果红，酸性复红等。

三类 单纯染料，这类染料的化学亲和力低，它的染色能力视其能否溶于被染物而定。它们大多数为偶氮化合物，不溶于水，可溶于脂肪溶剂中，如苏丹类染料，常用于脂肪组织的染色。

二、染料酒精饱和溶液的配制

先将染料配成可长期保存的酒精饱和溶液，用时再进行稀释配制。现将常用染料在水和 95% 酒精中溶解度列于表 1—1

三、染色法与染料的配制

（一）简单染色法 是用单纯的一种染液进行染色者称之。常用的有美蓝染液、结晶紫或稀释的石炭酸复红等染液。

吕氏美蓝染色法

美蓝酒精饱和液 30 毫升及 1:10000 氢氧化钾水溶液 100 毫升，混合后即成。如欲获得多色性美蓝液，可将配好的美蓝液，倾入大瓶中，松松的加以棉塞，每天振荡 5 分钟，时常以蒸馏水补足失去的水分，经过长时间的保存，即可获得多色性。

染色时取已经固定好的涂片，加染色液数滴，经过 3—5 分钟后，以水冲洗，待干燥后镜检。菌体着蓝色。多色性美蓝液可染细菌荚膜，使其呈浅红色。

（二）革兰氏（Gram）染色法

革兰氏染色法是最常用的鉴别染色法之一，此法可将细菌分为两大类：不被酒精脱色保留紫色者为革兰氏阳性菌，被酒精脱色复染成红色者为革兰氏阴性菌。

1. 染色液配制

表1—1 常用染料的溶解度

名 称	100ml 水中的饱和度	100ml 95%酒精的饱和度
结 晶 紫	1.68g	13.87g
龙 胆 紫	2.5—4.0g	10.0g
碱性复红(含量20%)	1.13g	3.2g
美 蓝(氯化物)	3.35g	1.48g
沙 黄(蕃红花红)	5.45g	3.41g
苦 味 酸	1.18g	8.92g
刚 果 红		0.19g
硫 堇	0.25g	0.25g
中 性 红	5.64g	2.54g
孔 雀 绿	7.6g	7.52g
甲 基 蓝	2.93g	15.21g
黄 色 伊 红	44.2g	2.18g
苏 丹 Ⅲ		0.15g
派 若 宁 C	8.96g	0.60g
派若宁B(氯化物)	0.07g	1.08g
伊红B(钠盐)	39.11g	0.75g

(1) 结晶紫染液 先配制结晶紫酒精饱和溶液及草酸铵溶液(草酸铵0.8克, 蒸馏水80毫升)分置于不同容器内。用蒸馏水将结晶紫液稀释5倍, 然后与等量草酸铵溶液混合。

(2) 革兰氏碘溶液 取碘1.0克, 碘化钾2.0克及蒸馏水300毫升, 先将碘化钾用少量水溶解后, 再加入磨碎的碘片, 然后徐徐加水, 充分混合, 待碘片完全溶解后, 再加蒸馏水至足量。

(3) 复染液 有的用沙黄液(沙黄酒精饱和溶液10毫升加蒸馏水90毫升); 也有用稀释石炭酸复红。

2. 染色法 取经火焰固定的标本片, 加结晶紫液于涂片上, 染色1分钟, 轻轻用水冲去染液, 并倾尽玻片上的积水, 加革兰氏碘溶液于片上, 作用1分钟, 又用水冲洗, 并倾尽玻片上积水后, 滴加适量95%乙醇于涂片上, 进行脱色, (注意涂片不再有颜色退下即行停止, 脱色时间一般不能超过半分钟, 最长的也不要超过1分钟, 脱色是革兰氏染色法中关键的一步, 必须谨慎为之); 水洗后, 以复染液染1分钟; 水洗, 干后镜检。细菌经此法染色后, 呈紫色者, 称为革兰氏阳性细菌; 呈红色者称为革兰氏阴性细菌。

在染色的各步骤中, 注意不要直接把染料倾去, 应用水把染料浮起再冲去, 以免染料颗粒附着在玻片上。

(三) 3% KOH法

试剂 3% KOH溶液

方法 1. 在玻片上滴二滴3%的KOH溶液。

2. 用灭菌铂耳挑取待检菌落或斜面培养物少许, 与KOH液混匀。

3. 缓慢地将铂耳拖出混合液, 观察其粘稠性。

结果 如果混合液在50—60秒内明显地变为粘液样或胶样者, 该菌就是革兰氏阴性。

3%KOH溶液能使薄壁的革兰氏阴性菌释放出DNA而长链DNA表现出这种粘稠性，革兰氏阳性菌不会很快出现这种现象。这种判断革兰氏染色性的方法，很容易被初学者掌握。

(四) 萠纳 (Ziehl—Neelsen) 氏抗酸性细菌染色法

1. 染色液配制 碱性复红 (染料含量90%) 0.3克加入95%乙醇10毫升中，然后与5%石炭酸100毫升混和即成；3%盐酸酒精是取3毫升浓盐酸加97毫升酒精混合即成。

2. 染色法 将用前滤过之石炭酸复红 (量可多一些) 加在火焰固定的涂片上，置玻片于火焰上，加热至产生蒸气 (不要沸腾)，约经5分钟 (如在加热过程中，染料蒸干了，可补加一些染料，但应避免染料蒸干，以免影响染色质量)，待玻片稍冷后，用水冲洗，然后将玻片置于含3%盐酸酒精中脱色，直至无红色再褪下为止 (脱色时间约1—2分钟，在脱色过程中，应不时从酒精中取出玻片观察，如果不再褪色，即使时间未到1—2分钟，也应停止)；再用水冲洗，最后用吕氏美蓝液染色1分钟。抗酸性细菌 (如结核杆菌) 经此法染色后，着红色；非抗酸性细菌及组织细胞呈蓝色。

(五) 结核分枝杆菌荧光染色法 (Herrmann改良法)

染液配制 1. 0.1%金胺5%酚溶液

2. 0.1%过锰酸钾液

3. 碱性美蓝液

4. 3%盐酸酒精

染色法 1. 按常法涂片，干燥后火焰固定。

2. 加金胺染色液，加温使冒蒸气，染色5分钟后，水洗。

3. 盐酸酒精褪色15—20秒钟，水洗。

4. 以过锰酸钾液处调5秒钟，水洗。

5. 美蓝染色30秒，水洗，干后在荧光镜下镜检。结核杆菌在黑色背景发出明亮的黄绿色荧光。而其它无荧光。

(六) 瑞氏 (Wright) 染色法

1. 染色液配制 瑞氏染料粉末的制备，取纯粹美蓝 (染料含量90%) 0.9—1.0克溶于0.5%碳酸钠水溶液100毫升，置流通蒸气灭菌器中，于100°C下加热1小时，待冷后过滤。然后于滤液中缓缓加入1:500黄色伊红 (染料含量85%) 500毫升，同时不断搅拌产生微小的黑色沉淀为止。过滤，取出沉淀，放入60°C的定温箱中烘干即成。也可用市售的瑞氏染料粉。

取0.1克瑞氏染料粉末溶于60毫升纯甲醇中即成，贮于暗处备用。通常于用时过滤。

2. 染色法 用此法染色之涂片，事先不必固定，可直接加染色液于涂片上，借染色液中甲醇作用而固定之。然后，用蒸馏水稀释染色液进行染色。染色时，滴加染色液于涂片上作用1—2分钟，然后加等量蒸馏水或缓冲液 (包括磷酸二氢钾6.63克，无水磷酸氢二钠2.56克及蒸馏水1000毫升，pH6.4) 于片上，使与染色液均匀混合，作用2—3分钟，至生金属光泽为止。用蒸馏水冲洗约30—60秒，待干后检查。血片和组织触片常用此法染色，其中之细菌着深蓝色。

(七) 姬姆萨 (Giemsa) 氏染色法

1. 染色液配制

(1) 姬姆萨氏染料粉末的制备 含有伊红1.5克，天青II 0.4克，纯甘油125毫升及纯甲

醇125毫升。制备时，取甘油和甲醇分别加热至60℃后，再将上述染料溶于甘油内，然后加入甲醇，待过夜后滤过，即可在滤纸上获得多量的龟裂样的晶体，放于温箱或室温下干燥即成。也可用商品化的姬姆萨染料。

(2) 姬姆萨氏染色原液的配制 成分为姬姆萨粉末0.6克，甘油50毫升，甲醇50毫升。配制时，将姬姆萨染料加入甘油内，于55—60℃下加热1.5—2小时后，再加甲醇50毫升，于数天后过滤，即可获得原液。

2. 快染色法 涂片用甲醇固定1—3分钟，待干后，用姬姆萨氏原液1份加蒸馏水20份新制成之混合液染色30—60分钟，再用蒸馏水充分冲洗约半分钟，等自然干燥或吸干后，检查。本法适于血片，组织触片等之染色。

缓慢染色法 对于一般不易着色之微生物如螺旋体最为适用。涂片用甲醇固定3分钟或用无水酒精固定15分钟，然后将玻片放于盛有染色液（配制法同快速法）之染色缸内，或将玻片置于放有二根火柴棍之平皿内，使玻片有病料面向下，放在火柴棍上，加染色液于平皿和玻片之间，然后盖上平皿盖；这样染色液不致干掉，故可着色较长时间，通常让其作用一夜，不会有颗粒沉于玻片。取出玻片，用蒸馏水充分冲洗，待干后检查。姬姆萨氏染色法适用于螺旋体，枝原体，立克次氏体，某些病毒或包涵体等的染色，细菌细胞，血液中的细胞以及组织细胞等用此法染色均可获得良好的结果。

(八) 细菌芽胞染色法

细菌的芽胞结构致密，通透性差，着色较难，用普通染色法染色时，菌体着色而芽胞呈不染色的轮廓。但是芽胞一旦着色后，脱色也比较困难。因此芽胞染色的基本方法是采用着色力强的染色剂如石炭酸复红，孔雀绿等并加热染色，先使菌体和芽胞都着色。再用脱色剂脱去菌体颜色而保留芽胞的颜色，然后再用另一种染液复染菌体，使菌体和芽胞形成不同颜色的鲜明对照。

1. 孔雀绿沙黄染色法

(1) 染色液配制 配制5%孔雀绿水溶液与0.5%沙黄水溶液，染料溶解后，用滤纸过滤，分置于玻瓶中保存。

(2) 染色法 涂片经火焰固定后，将5%孔雀绿水溶液滴加于玻片上，于火焰加热，使生蒸气30—60秒钟。避免染色液蒸发干，可以增加一些染色液的量。然后水洗半分钟，以0.5%沙黄水溶液复染半分钟，水冲洗，吸干镜检。菌体呈红色，芽胞呈绿色。

2. 复红美蓝染色法

(1) 染色液配制 石炭酸复红液见结核分枝杆菌抗酸染色，5%醋酸。

(2) 染色法 滴加石炭酸复红液于已固定好的样品上，加热至生蒸气，约经1分钟；水洗后，以5%醋酸褪色，不超过2秒钟；水洗后，用美蓝液染色1分钟；水洗，干后显微镜检查，芽胞呈红色，菌体呈蓝色。

(九) 细菌鞭毛染色法

1. 银染法

(1) 染液配制

A液 取鞣酸20克，蒸馏水100毫升，在50℃的水浴中混合溶解，备用，另外配制6%的三氯化铁溶液，临用前将两液等量混合。

B液 硝酸银2克，溶于100毫升蒸馏水内。取5—10毫升作为回滴用。其余的硝酸银溶