

细菌染色技术

一、细菌的革兰染色法

革兰染色法(Gram stain)是细菌学上最经典的、使用最广泛的一种染色方法。由丹麦细菌学家革兰(Christian Gram)于 1883 年创立。细菌染色后,不仅可以观察其形态,而且可根据染色结果将细菌分为两大类,即革兰阳性菌(G⁺菌)和革兰阴性菌(G⁻菌)。

1、原理:

(1)G⁺菌细胞壁结构致密(肽聚糖层厚),且脂质含量少,乙醇不易渗入脱色;G⁻菌细胞壁结构疏松(肽聚糖层薄),且脂质含量多,乙醇溶解脂质后易渗入细胞而脱色。

(2)G⁺菌菌体含有大量核糖核酸镁盐,可与碘、结晶紫牢固结合,使已着色的细菌不被乙醇脱色。G⁻菌菌体内核糖核酸镁盐含量小,易被乙醇脱色。

(3)G⁺菌等电点比G⁻菌低,在同一pH条件下阳性菌比阴性菌所带阴电荷要多,故与带正电荷的碱性染料(结晶紫)结合牢固,不易被乙醇脱色。

2、应用

革兰染色法的实际应用意义有三:

(1)按照革兰染色法可把细菌分为G⁺和G⁻两大类;

(2)G⁺菌和G⁻菌的致病性不同,所致疾病各异;

(3)对G⁺和G⁻菌,选择不同抗菌物治疗。

3、材料

(1)葡萄球菌和大肠埃希菌培养 18~24h 后的混合菌液。

(2)兰染色液:结晶紫染液、碘液、95%酒精、稀释复红或沙黄染液。

(3)载玻片、接种环、酒精灯、吸水纸、显微镜等。

4、方法

标本片制备

(1)载玻片准备:取一张清洁载玻片,用蜡笔在其背面画出二个有一定间隔、直径约 1~2cm 的涂抹范围,用数字或符号做好标记。

(2)涂片:将接种环在火焰上烧灼灭菌,冷却后取菌液直接涂布在标记的涂抹范围内。接种环在火焰上烧灼灭菌。

(3)干燥：涂片最好在室温下自然干燥，或将标本面向上，置于离酒精灯火焰约半尺高处缓慢烘干，切不可放在火焰上烧干。

(4)固定：将干燥后的涂片用片夹夹住，使涂抹面向上缓慢通过火焰3次，然后自然冷却。固定即可杀死细菌，并使细菌固着于玻片上，以免染色时脱落；又可使细菌蛋白凝固，而易着色。

革兰染色法：

(1)初染：在固定好并冷却了的涂片上滴加结晶紫染液1~2滴，作用1min后，用细水流从玻片的一端把游离的染液洗去。

(2)媒染：滴加卢戈(Lugol)碘液数滴，作用1min后水洗。碘液是媒染剂，使结晶紫染液与细菌结合更牢固。

(3)脱色：滴加95%酒精数滴，轻轻晃动玻片，使玻片上流下的酒精液无紫色为止(约需0.5~1min)，流水冲洗。

(4)复染：滴加稀释复红(或沙黄)染液数滴，作用1min后流水冲洗。最后用吸水纸印干标本片或自然干燥后，玻片上滴加香柏油，用油镜观察。

5、结果

G⁺菌染成紫色；G⁻菌染成红色。

6、影响因素

(1)操作因素：涂片太厚或太薄，菌体分散不均匀，可影响染色结果。固定时避免菌体过份受热。脱色时间要根据涂片厚薄灵活掌握。

(2)细菌因素：不同时间培养物，革兰染色结果有差异，如葡萄球菌幼龄菌染成紫色。而老龄菌被染成红色。细菌染色时最好用18~24h的细菌培养物。

(3)染液因素：所有染色液应防止水分蒸发而影响浓度，特别是卢戈碘液久存或受光作用后易失去媒染作用。脱色酒精以95%浓度为宜，若瓶密封不良或涂片上积水过多，可使酒精浓度下降而减弱其脱色能力。

二、细菌荚膜染色法(Hiss 法)

1、原理与应用

细菌荚膜是细菌细胞壁外面的一层粘液性物质。其对染料的亲和力弱，不易着色，通常采用负染色法染色，即使菌体和背景着色而荚膜不着色。因此在菌体周围呈一透明圈。由于荚膜含水量在90%以上，染色时一般不用热固定，以防荚膜皱缩变形。荚膜染色法用于有荚膜细菌

如肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、炭疽芽胞杆菌及产气荚膜梭菌的鉴定。

2、材料

(1)荚膜菌液

(2)结晶紫酒精饱和液 5ml，加蒸馏水 95ml 混合液。

(3)200g/L 硫酸铜水溶液。

3、方法

将荚膜菌涂片，在空气中自然干燥，不需加热固定。滴加结晶紫染色液，在火焰上微微加热，使玻片上染液冒蒸汽为止，不要水洗，再用 200g/L 硫酸铜水溶液冲洗染液，切勿用流水冲洗。用吸水纸吸干后油镜观察。

4、结果

细菌菌体呈紫色，荚膜呈淡紫色或无色。

三、细菌鞭毛染色法

1、原理与应用

细菌鞭毛为细菌的运动器官。其形态细长，直径约 10~20nm，需用电子显微镜才能观察到。若用特殊染色使鞭毛增粗并着色，则在普通光学显微镜下也可观察到。鞭毛染色方法很多，但原理基本类似，即在染色前先经媒染剂处理，使鞭毛增粗，然后再进行染色。

2、材料

(1)变形杆菌 6~8h 血琼脂平板培养物。

(2)染色液。

A 液：200g/L 钾明矾液(加温溶解)20ml，50g/L 石炭酸液 50ml，200g/L 鞣酸液(加温溶解)20ml。

B 液：复红酒精饱和液。

取 A 液 9 份和 B 液 1 份混合后立即过滤。滤液放置 6h 后，使用最佳。

(3) 蒸馏水管

3、方法

(1)细菌标本制备：取变形杆菌血琼脂平板培养物，仔细从菌膜伸展最远处挑取菌少许，轻轻放入蒸馏水管中，经数 min 使其自行分散，再 37℃ 25~30min。

(2)涂片：取上述菌液一接种环，轻轻滴于载玻片上，使成薄膜。涂抹时接种环随水滴移动，切勿与玻片相磨，以免鞭毛脱落。

(3)染色：涂片自然干燥(勿用火焰固定)后，加染色液作用 1~2min ，水洗、吸干、镜检。

4、结果

鞭毛呈淡红色，菌体呈红色。

四、细菌芽胞染色法

1、原理与应用

芽胞具有高度的折光性，外膜致密，渗透性低，故普通染色法不易使其着色，芽胞染色法是根据芽胞既难以着色，而一旦着色又难以脱色的特点设计的。所有芽胞染色法都基于同一个原则：采用着色力强的染料，并加热以促进标本着色，然后使菌体脱色，而芽胞上的染料仍保留，经复染后，菌体和芽胞呈现不同的颜色。

2、材料

(1)破伤风梭菌 48~72h 培养物

(2)石炭酸复红液、碱性美兰液、95%酒精

3、方法

(1)将破伤风梭菌培养物涂片，自然干燥，火焰固定，滴加石炭酸复红液，并加温至产生蒸汽(不可煮沸)约 5min，防止染液干涸，随时补充，待载玻片冷却后，水洗。

(2)用 95%酒精脱色 2min，水洗。

(3)滴加美兰染液复染 30sec，水洗，待干，镜检。

4、结果

芽胞呈红色，菌体呈蓝色。

五、抗酸染色法

1、原理与应用

结核分枝杆菌对苯胺染料一般不易着色，若加温或延长染色时间使其着色后，再用 3% 盐酸酒精处理也不易脱色，经此染色后，结核分枝杆菌及其他分枝杆菌呈红色，而非抗酸菌和细胞杂质等呈蓝色。

2、材料

(1)结核病人痰

(2)抗酸染色液

(3)玻片、片夹、滤纸片、竹签、空平皿、污物盆。

3、方法

(1)取洁净的竹签沾取痰中血丝或脓性痰，在清洁无油脂玻片上涂开。涂抹区约拇指盖大。用过的竹签放到空平皿内待高压灭菌。

(2)涂片自然干燥后，用片夹挟住玻片一端，通过火焰固定。

(3)涂抹面用滤纸片盖上，然后往滤纸片上滴加石炭酸复红染液，使滤纸片完全被染液浸湿，持玻片在小火上加热片刻然后离开火焰，此时可见到玻片上冒出蒸气。待蒸气消失后再加热，如此反复3~4次，约5min，加热时随时添加染液勿使纸片干涸。

(4)玻片冷却后，用接种环挑去滤纸扔到污物盆内，流水冲洗玻片。

(5)滴加3%盐酸酒精脱色，至涂抹均匀部位基本没有红色再脱下为止，水洗。

(6)滴加吕氏美蓝染液30sec，水洗。

(7)吸干、镜检。

4、溶液配制

萋-尼(Ziehl-Neelsen)抗酸染色液

(1)石炭酸复红液：硷性复红4g，溶于95%酒精100ml，作成饱和溶液，再取该饱和液10ml与5%石炭酸溶液90ml混匀即成。

(2)3%盐酸酒精液。

浓盐酸3ml加入95%酒精97ml中即成。

(3)吕(Loeffler)氏美蓝染色液

美蓝2g，溶于95%酒精100ml中，作成饱和液。再取该饱和液30ml与0.01%氢氧化钾水溶液100ml混合均匀即可。

六、奈瑟染色法

1、材料

(1)染液甲

第一液：美兰1g，95%酒精30ml，冰醋酸50ml，蒸馏水100ml。

第二液：结晶紫1g，95%酒精10ml，蒸馏水300ml。

以上第一液二份，与第二液一份混合之。

(2)染液乙，黄吡精1或2g，热蒸馏水300ml，待溶解后过滤。

2、染色法

(1)涂片按常规法固定后，滴加奈瑟染液甲液数滴于涂片上，15~30 Sec，水洗。

(2)用奈瑟染液乙液复染 10~30 秒钟。

(3)迅速用水洗，吸干、镜检。

3、结果

菌体呈鲜明黄色、异染颗粒呈深紫兰色。