

细菌的简单染色法和革兰氏染色法 及形态观察

南昌大学生物技术系
主讲人:孔召玉

一、实验目的

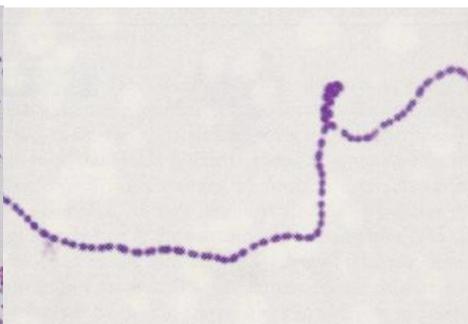
1. 学习微生物（涂片）制片，染色原理和染色的基本操作技术
2. 掌握微生物的一般（简单）染色法和革兰氏染色法
3. 巩固显微镜（油镜）的使用方法和无菌操作技术

二、染色原理：

微生物细胞个体微小且含有大量水分，对光线的吸收和反射与水溶液的差别不大，**机体是无色透明**的，与周围背景没有明显的反差，在普通光学显微镜下不易识别，必须对它们进行**染色**，使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**。



金黄色葡萄球菌



链球菌



大肠杆菌



弧菌

- 微生物细胞是由蛋白质、核酸等两性电解质及其他化合物组成。所以，微生物细胞表现出两性电解质的性质。两性电解质兼有碱性基和酸性基，在酸性溶液中离解出碱性基呈碱性带正电。在碱性溶液中离解出酸性基呈酸性带负电。
- 经测定，细菌等电点pH在2-5之间，故在中性、碱性或偏酸性溶液中，细菌的等电点均低于上述溶液的pH值，所以细菌带负电荷，容易与带正电荷的碱性染料结合，故用碱性染料染色的较多。微生物体内各结构与染料结合力不同，故用不同的染料来分别染微生物的各结构以便观察。

用于染色的染料是一类苯环上带有**发色基团**和**助色基团**的有机化合物。

- ◆ 发色基团：赋予染料颜色特征；
- ◆ 助色基团：使染料形成盐。

常用的微生物细胞染料都是盐，分为**碱性染料**和**酸性染料**。

- ◆ 碱性染料：美蓝（亚甲蓝）、结晶紫、碱性复红、沙黄、孔雀绿等。
- ◆ 酸性染料：酸性复红、伊红、刚果红等。



- 通常采用**碱性染料**进行简单染色，原因在于微生物细胞在碱性、中性及弱酸性溶液中通常带负电荷，而染料电离后染色部分带正电荷，很容易与细胞结合使其着色；
- 当细胞处于酸性条件下（如细菌分解糖类产酸）所带正电荷增加时，可采用**酸性染料**染色。

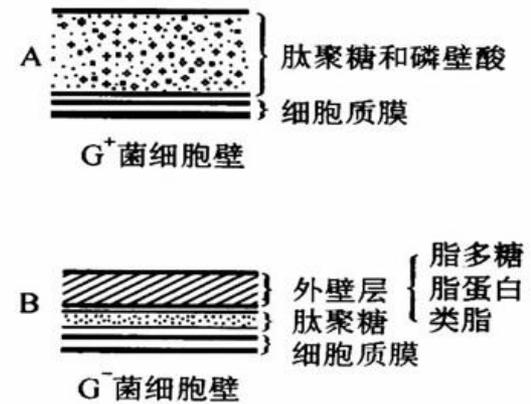
革兰氏染色原理

革兰氏染色法是细菌学中最广泛使用的一种鉴别染色法。系由丹麦病理学家Gram于1884年所创立。

染色法是将细菌标本用结晶紫染色，再加媒染剂碘液（增加染料和细菌细胞的亲和力），使它和结晶紫在菌体细胞中形成分子量较大的紫碘复合物，而后用酒精进行脱色。最后用复染剂沙黄或复红染色。假使细菌细胞不被脱色而保留初染紫颜色者，称为革兰氏阳性菌（G⁺），若被脱色，而染上复染剂的红颜色者，称为革兰氏阴性菌（G⁻）。

为什么革兰阳性菌和革兰氏阴性菌被染料染成两种不同的颜色呢？

- } 主要是因为它们的**细胞壁**组成和结构不同。
- } 革兰氏阳性细菌细胞壁中**肽聚糖的含量高且交联度高**，脂类含量少，经酒精或丙酮脱色时，肽聚糖层的孔径变小，通透性变低，因此细胞仍保留初染时的紫颜色。
- } 革兰氏阴性菌的细胞壁中含有较多的脂类物质，而肽聚糖含量较少，交联度又低，故用脱色剂脱色时，溶解了脂类物质，增加了细胞壁的通透性，使初染后的结晶紫和碘的复合物容易逸出，结果这些细菌细胞被脱色，经复染后，就呈现红色。



A. 革兰氏阳性菌的细胞壁 B. 革兰氏阴性菌的细胞壁

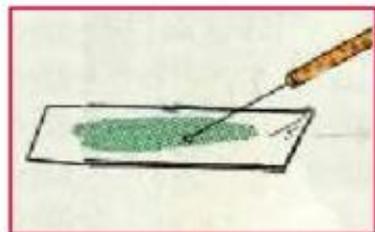
染色方法

· (一)简单染色法

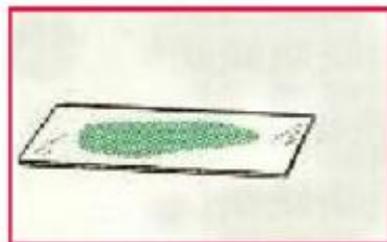
- 简单染色法又叫作普通染色法，只用一种染料使细菌染上颜色，如果仅为了在显微镜下**看清细菌的形态**，用简单染色即可。

染色过程：

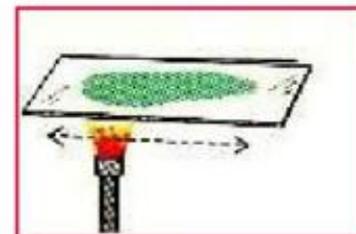
涂片



干燥

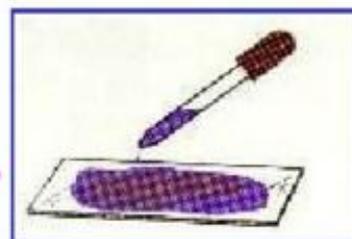


固定



镜检

水洗、吸干



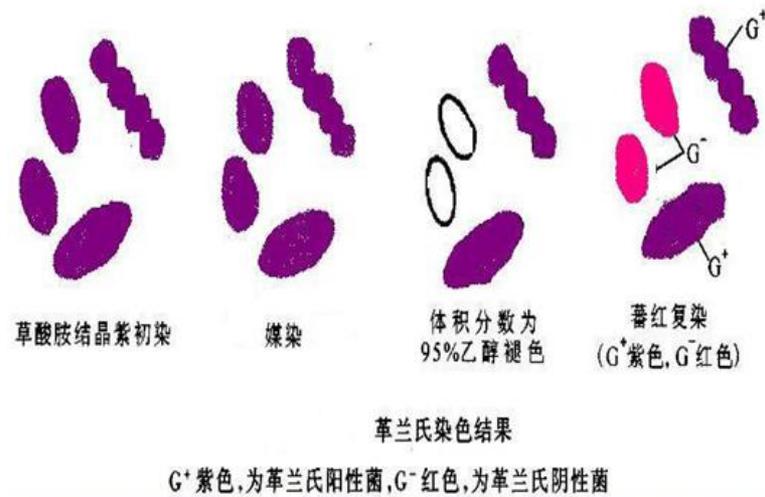
染色

(二)复染色法

用两种或多种染料染细菌，目的是为了鉴别不同性质的细菌，所以又叫鉴别染色法。主要的复染色法有**革兰氏染色法**和**抗酸性染色法**。

革兰氏染色法：不仅能观察到细菌的形态，而且还可将所有细菌区分为两大类：

1. 染色反应呈蓝紫色的称为**革兰氏阳性细菌**，用 G^+ 表示；
2. 染色反应呈红色（复染颜色）的称为**革兰氏阴性细菌**，用 G^- 表示。



三. 主要仪器设备及耗材

- 1. 显微镜、香柏油、二甲苯、擦镜纸、吸水纸、接种环、载玻片、酒精灯等。
- 2. 石炭酸复红染液、草酸铵结晶紫染液、碘液、95%乙醇、番红（沙黄）染液
- 3. 菌种：**金黄色葡萄球菌、变形杆菌**

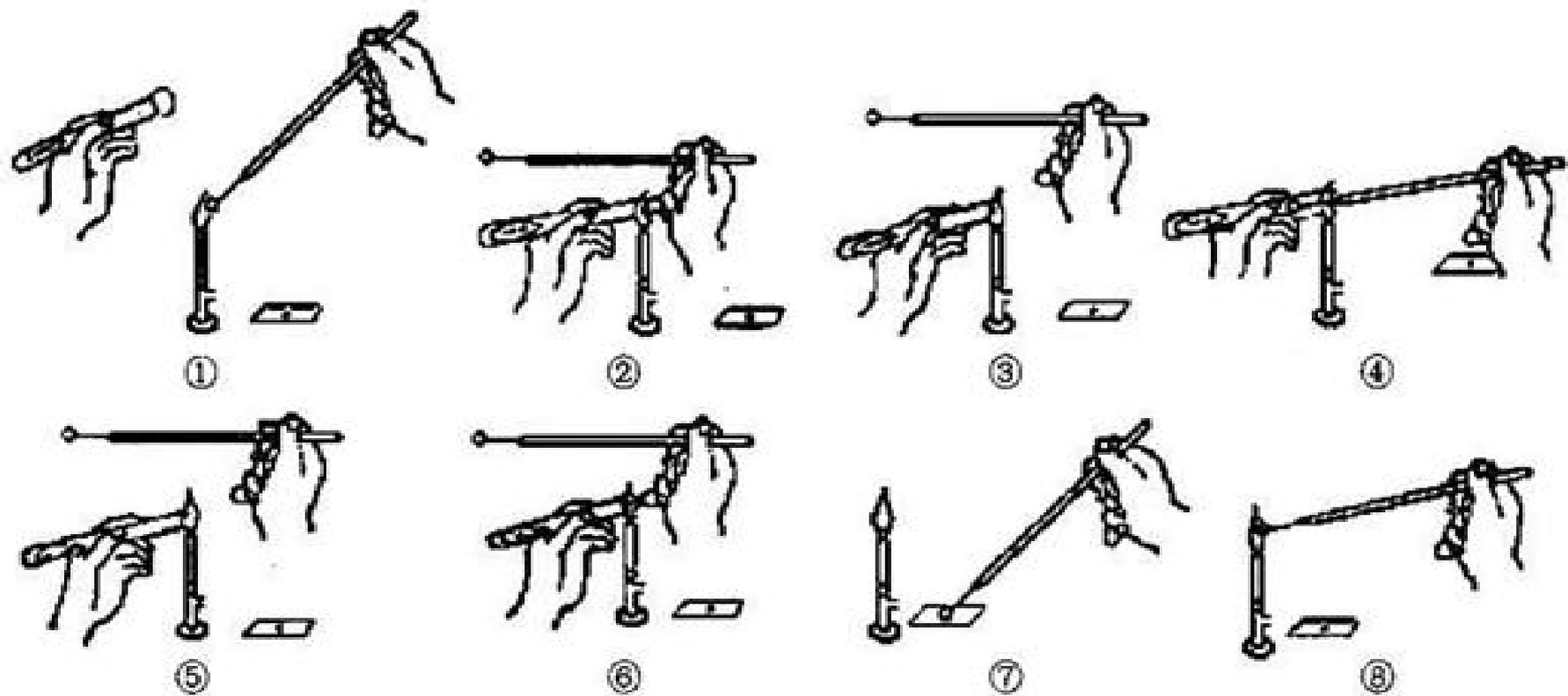
四、细菌的染色步骤

（一）简单染色步骤

涂片→干燥→固定→染色→水洗→干燥→镜检。

1. 涂片

取干净的载玻片于实验台上，在载玻片的中央滴一滴无菌蒸馏水，将接种环在火焰上烧红，待冷却后从斜面挑取少量菌种（金黄色葡萄球菌或变形杆菌）与玻片上的水滴混匀后，在载玻片上涂布成一均匀的薄层，涂布面不宜过大。



无菌操作及做涂片的过程

2. 干燥

涂片最好在室温下使其自然干燥，有时为了使之干得更快些，可将标本面向上，手持载玻片一端的两侧，小心地在酒精灯上高处微微加热，使水分蒸发，但切勿紧靠火焰或加热时间过长，以防标本烤枯而变形。

3. **固定**：固定常常利用高温，手持载玻片的一端，标本向上，在酒精灯火焰外层尽快的来回通过2~3次，共约2~3秒钟，并不时以载玻片背面加热触及皮肤，不觉过烫为宜（不超过60℃），放置待冷后，进行染色。

4. **染色**：在涂片薄膜上滴加染色液(石炭酸复红、草酸铵结晶紫或美蓝任选一种)一滴，使染色液覆盖涂片，染色约1min。
5. **水洗**：斜置载玻片，在自来水龙头下用小股水流冲洗，直至洗下的水呈无色为止。
6. **干燥**：用吸水纸吸去涂片边缘的水珠，置于室温下自然干燥。用吸水纸时切勿将菌体擦掉。
7. **镜检**：用显微镜观察，并用铅笔绘出细菌形态图。

(二) 细菌的革兰氏染色步骤

涂片→干燥→固定→**初染**（结晶紫染1-2分钟）→水洗→**媒染**
（碘液染1分钟）→水洗→**脱色**（95%乙醇洗至无色约20-30秒）→水
洗→**复染**（沙黄染 3-5分钟）→水洗→干燥→观察

1. 取金黄色葡萄球菌和变形杆菌(均以无菌操作)分别在同一张载玻片上做涂片、干燥、固定,方法均与简单染色的相同。
2. 用草酸铵结晶紫染色1min后水洗。
3. 加碘液媒染1min后水洗。
4. 斜置载玻片,滴加95%乙醇脱色,至流出的乙醇不现紫色为止,大约需时20~30s,随即水洗。
5. 用沙黄染液复染3-4min,水洗。
6. 用吸水纸吸掉水滴,待标本片干后置显微镜下,用低倍镜观察,发现目的物后用油镜观察,注意细菌细胞的颜色。绘出细菌的形态图并说明革兰氏染色的结果。

} (一) 简单染色步骤

} 涂片→干燥→固定→染色→水洗→干燥→镜检。

} (二) 细菌的革兰氏染色步骤

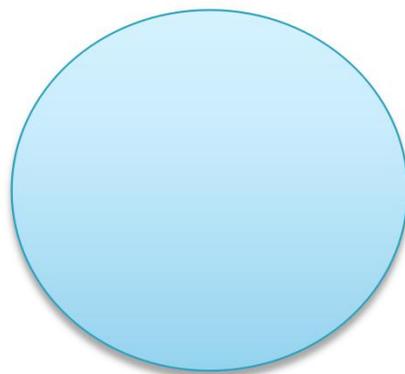
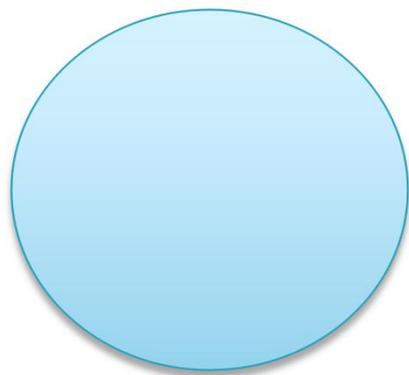
} 涂片→干燥→固定→初染（结晶紫染1-2分钟）→水洗→媒染
（碘液染1分钟）→水洗→脱色（95%乙醇洗至无色约20-30秒）→水
洗→复染（沙黄染 3-5分钟）→水洗→干燥→观察

注意事项

1. 革兰氏染色成败的**关键是脱色时间**，如脱色过度，革兰氏阳性菌也可被脱色而被误认为革兰氏阴性菌；如脱色时间过短，革兰氏阴性菌也会被误认为是革兰氏阳性菌。因此必须 严格把握脱色时间。
- 2 . 选用培养**18-24小时菌龄**的细菌为宜，若细菌太老，由于菌体死亡或自溶常使革兰氏阳性菌转呈阴性反应，故不能选用。

五、实验报告

1. 把实验结果画图记录下来并填写。



菌名 _____
使用染液 _____
菌体颜色 _____
放大倍数 _____

菌名 _____
使用染液 _____
菌体颜色 _____
放大倍数 _____

2. 革兰氏染色（**变形杆菌**与**金黄色葡萄球菌**）；将结果填于上表中。

菌名	菌体形态	菌体颜色	G+或G-
金黄色葡萄球菌			
变形杆菌			

六、思考题

1. 什么是革兰氏染色法？染色过程应注意什么？
2. 试分析革兰氏染色法在细菌分类中的意义。