

荚膜染色实验方案

由于荚膜与染料间的亲和力弱，不易着色，通常采用负染色法染荚膜，即设法使菌体和背景着色而荚膜不着色，从而使荚膜在菌体周围呈一透明圈。由于荚膜的含水量在90%以上，故染色时一般不加热固定，以免荚膜皱缩变形。

实验步骤

1. 取刚果红染液与鸡蛋清按4:1(v/v)混合，接种环挑取血平板上鲍曼不动杆菌与上述液体充分，按推制血片的方法制成推片，自然干燥；
2. 滴加脱色液脱色1 min，流水冲洗；
3. 滴加结晶紫染液染色1 min，流水冲洗，自然干燥后镜检；显微镜下可见鲍曼不动杆菌四周荚膜不被染液着色，鲍曼不动杆菌菌体染成紫色，整个背景呈现桔红色。

配方

刚果红染液：刚果红(Congo red)0.8g充分溶解于20 ml蒸馏水中，室温下保存备用。

脱色液：于通风橱中将5 ml浓盐酸加入95 ml蒸馏水中，室温下保存备用。

结晶紫染液：先将2.5 g结晶紫研细后加入25 ml 95%乙醇(v/v)中，充分溶解配成A液。将1 g草酸铵充分溶于100 ml蒸馏水中，配成B液。将A液与B液充分混匀并静置24 h后采用中速滤纸过滤即成结晶紫染液，置于室温中保存。

1.负染色法：

- (1) 制片：取洁净的载玻片一块，加蒸馏水一滴，取少量菌体放入水滴中混匀并涂布。
- (2) 干燥：将涂片放在空气中晾干或用电吹风冷风吹干。
- (3) 染色：在涂面上加复红染色液染色2—3min。
- (4) 水洗：用水洗去复红染液。
- (5) 干燥：将染色片放空气中晾干或用电吹风冷风吹干。
- (6) 涂黑素：在染色涂面左边加一小滴黑素，用一边缘光滑的载玻片轻轻接触黑素，使黑素沿玻片边缘散开，然后向右一拖，使黑素在染色涂面上成为一薄层，并迅速风干。
- (7) 镜检：先低倍镜，再高倍镜观察。结果：背影灰色，菌体红色，荚膜无色透明。

2.湿墨水法

- (1) 制菌液：加1滴墨水于洁净的载玻片上，挑少量菌体与其充分混合均匀。
- (2) 加盖玻片 放一清洁盖玻片于混合液上，然后在盖玻片上放一张滤纸，向下轻压，吸去多余的菌液。

(3) 镜检：先用低倍镜、再用高倍镜观察。

结果：背景灰色，菌体较暗，在其周围呈现一明亮的透明圈即为荚膜。

3.干墨水法

(1) 制菌液：加1滴6%葡萄糖液于洁净载玻片一端，挑少量胶质芽孢杆菌与其充分混合，再加1环墨水，充分混匀。

(2) 制片：左手执玻片，右手另拿一边缘光滑的载玻片，将载玻片的一边与菌液接触，使菌液沿玻片接触处散开，然后以30度角，迅速而均匀地将菌液拉向玻片的一端，使菌液铺成一薄膜。

(3) 干燥：空气中自然干燥。

(4) 固定：用甲醇浸没涂片，固定1 min，立即倾去甲醇。

(5) 干燥：在酒精灯上方，用文火干燥。

(6) 染色：用甲基紫染1—2min。

(7) 水洗：用自来水轻洗，自然干燥。

(8) 镜检：先用低倍镜再高倍镜观察。结果：背景灰色，菌体紫色，荚膜呈一清晰透明圈。

4.Tyler法

(1) 涂片：按常规法涂片，可多挑些菌体与水充分混合，并将粘稠的菌液尽量涂开，但涂布的面积不宜过大。

(2) 干燥：在空气中自然干燥。

(3) 染色：用Tyler染色液染5—7min。

(4) 脱色：用20%CuSO₄水溶液洗去结晶紫，脱色要适度（冲洗2遍）。用吸水纸吸干，并立即加1—2滴香柏油于涂片处，以防止CuSO₄结晶的形成。

(5) 镜检：先用低倍镜再用高倍镜观察。观察完毕后注意用二甲苯擦去镜头上的香柏油。结果：背景蓝紫色，菌体紫色，荚膜无色或浅紫色。

注意事项

- 1.加盖玻片时不可有气泡，否则会影响观察。
- 2.应用干墨水法时，涂片要放在火焰较高处并用文火干燥，不可使玻片发热。
- 3.在采用Tyler法染色时，标本经染色后不可用水洗，必须用20%CuSO₄冲洗

