

经验交流

赖夫生鞭毛染色法的改进*

郭坚华¹ 周明华² 朱 艳¹ 许高娟¹ 葛云英¹(南京农业大学植保学院 南京 210095)¹ (江苏省张家港出入境检验检疫局 张家港 215000)²

摘要: 赖夫生染色法是细菌鞭毛染色的一种常用方法。最近发现了延长赖夫生染剂使用寿命及改进染色效果的方法,并在此基础上进一步论证了乙醇在染色过程中所起的作用。

关键词: 赖夫生染色法, 鞭毛, 乙醇

中图分类号: S432.4⁺2 **文献标识码:** D **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0100-04

IMPROVEMENT OF THE LEIFSON FLAGELLUM STAINING METHOD

GUO Jian-Hua¹ ZHOU Ming-Hua² ZHU Yan¹ XU Gao-Juan¹ GE Yun-Ying¹(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)¹(Jiangsu Zhangjiagang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhangjiagang 215000)²

Abstract: The Leifson staining method is a common method of the flagellum staining of bacteria. The new means of prolonging the deadline of the staining solution and improving the staining effect is being found and the role of alcohol during the process of staining is being explained.

Key words: The Leifson staining method, Flagellum, Alcohol

鞭毛是细菌的运动器官,它的数目和着生部位在菌体形态特征鉴定上是必不可少的指标之一^[1]。但由于细菌的鞭毛直径很小(仅 $0.02\mu\text{m} \sim 0.03\mu\text{m}$),要在普通光学显微镜下观察到鞭毛,必须采用特殊的染色方法。目前已报道的鞭毛染色法有赖夫生染色法、西萨-基尔染色法、银盐染色法、柯达卡溶液染色法^[3]及负染法^[4]。一般常用的是前两种方法,其中以赖夫生染色法最为简便易行,且染剂保存时间最长。近来本室在运用赖夫生染色法时有了一些新的发现,这对于赖夫生染色法染剂使用寿命的延长及染色效果的改进都有积极意义。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

萎蔫短小杆菌落葵致病变种 (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *basellae*)、辣椒疮痂病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)、菊欧文氏菌菊致病变种 (*Erwinia chrysanthemi* pv. *chrysanthemi*),均为本实验室保存菌株。

1.2 载玻片的准备

用新的或没有磨损的载玻片先在浓铬酸洗液中浸 24h,清水洗净后用蒸馏水冲洗,再浸泡在 95% 的乙醇溶液中以备用。检验玻片是否清洁的标准是:在玻片上加一滴蒸

* 国家自然科学基金资助项目 (NO. 39570476)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39570476)

收稿日期: 2000-10-13, 修回日期: 2001-4-13

馏水后能够很快且均匀地扩散开来为佳。

1.3 染液的配制

配方：单宁酸 1.0g，氯化钠 0.5g，碱性品红 0.4g。

取以上混合物（共 1.9g），溶解在 33mL 的 95% 酒精中，加蒸馏水定容至 100mL，pH 值为 5.0。

1.4 制片及染色

1.4.1 菌悬液的制备：取生长 24h 的斜面，用吸管缓慢加入灭菌水至接近试管口，将试管直立静置于试管架上 15min 以上，以使有鞭毛的细菌游动并悬浮在水面上，而无鞭毛的菌体仍然沉于管底。

制片前应先作运动力的检查（压滴法或旋滴法），确认细菌的运动性后再进行鞭毛染色^[5]。

1.4.2 菌体的固定：从 95% 乙醇溶液中取出载玻片，将玻片通过酒精灯的火焰几次，至玻片上的酒精烧净，然后放在多层吸水纸上冷却。用蜡笔在通过火焰的热玻片上画 4 个小格。玻片冷却后在每小格中加一薄层灭菌的蒸馏水，然后用接种环从试管菌悬液上端取一环轻置于水膜中，稍停留片刻以使菌体及鞭毛舒展，此时一般看不到混浊或只有很微弱的混浊现象。

1.4.3 染色及观察：制好的玻片在空气中晾干后，在每方格中加一滴染剂，7min 左右可见小方格中出现细小沉淀^[3]，用清水轻轻冲去染剂，在空气中晾干，油镜镜检。

1.4.4 用新配置的染剂进行染色：染色步骤同 1.4.3。

1.4.5 染剂放置半年后的加工及使用：将密封放置 4℃ 冰箱中半年后的染剂等量分装在 4 个磨口试剂瓶中（每瓶 15mL），一份作为对照，另 3 份分别滴加 15μL（试验组 1）、25μL（试验组 2）、35μL 无水乙醇（试验组 3），摇匀后分别进行染色。染色时间均为 7min，此时室温为 20℃。

1.5 染剂保存条件对染色效果的影响

本室将室温条件下在棕色试剂瓶内密闭保存半年的赖夫生染剂取出进行了类似的试验。每 15mL 染剂中所加无水乙醇量分别为：15μL，20μL，35μL，50μL，100μL，500μL，1mL，2mL，3mL，4mL，5mL，进行染色效果的观察。

2 结果与分析

2.1 用新配置的染剂进行染色

各菌的鞭毛数目及着生位置分别为：*C. f. pv. basellae*：单生亚极，*X. c. pv. vesicatoria*：单生极鞭，*E. c. pv. chrysanthemi*：6~8 根周鞭。

新配制的染剂，染色效果好，菌体结构清晰，着色均匀，载玻片上染剂沉积物少，鞭毛细长，脱落少（照片 1）。

2.2 用放置半年及加以改造的赖夫生染液染色

对照：染色效果差，菌体结构不明显，不易着色或着色不均匀，玻片上染剂沉积物多（易误认为菌体），鞭毛不易着色，断脱严重。显微镜视野中 *C. f. pv. basellae*、*X. c. pv. vesicatoria* 大多数菌体没有鞭毛，即使有也比较粗短。*E. c. pv. chrysanthemi* 菌几乎都仅观察到 1~4 根鞭毛（照片 5）。

试验组 1：较对照效果稍好，玻片上沉积物减少。3 种供试菌在视野中观察到鞭毛

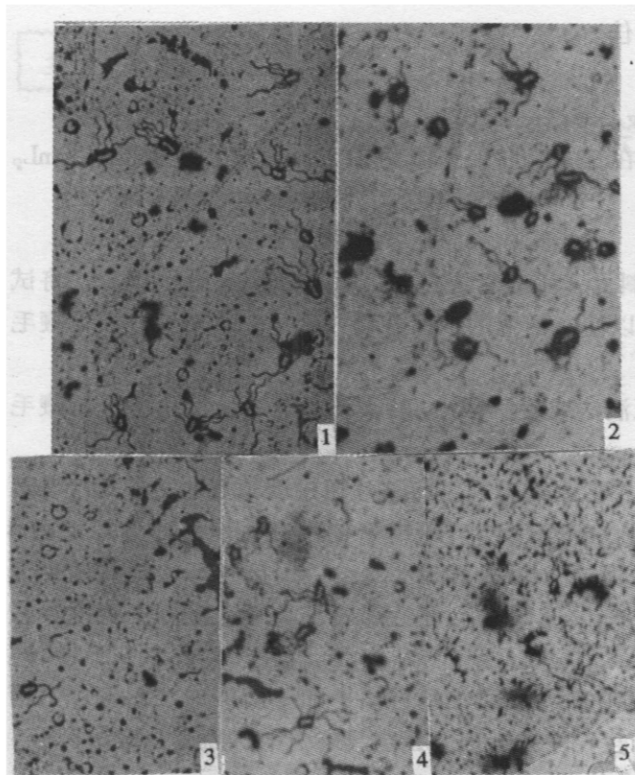


图1 不同乙醇浓度赖夫生染剂的染色效果
1 新配制的染剂, 2 加 15 μ L, 3 加 35 μ L, 4 加 25 μ L, 5 放置半年的染剂(对照)

的菌体比例比对照大, 但比新配染剂效果差。 *E. c. pv. chrysanthemi* 的鞭毛仅观察到 1~6 根不等 (照片 2)。试验组 2: 结果与 2.1 中新配染剂染色结果相同, 只是鞭毛着色稍浅 (照片 4)。试验组 3: 部分菌体中空 (仅剩细胞壁), 其中 *E. c. pv. chrysanthemi* 的鞭毛发生少量断脱 (照片 3)。

由上述结果可见, 在 15mL 放置半年的染液中加入 25 μ L 乙醇后, 染色效果可恢复至接近新配制的染液染色的效果, 但鞭毛着色稍浅。可见虽然长时间的放置会影响赖夫生染液的染色效果, 但这种影响主要是由于乙醇的挥发所致, 用时添加适量的无水乙醇即可。推测乙醇在其中的作用, 可能有两个方面。一是助溶, 使染剂溶解充分、着色效果好; 另一方面, 乙醇过多又会使菌体细胞壁和细胞膜通透性增

强、细胞质物质散失从而不易识别; 此外, 鞭毛着色过重使其易于断脱。

2.3 赖夫生染剂的保存

保存于室温条件下的赖夫生染剂在所试各乙醇浓度中均不能恢复其正常染色效果。仔细观察试剂瓶及其瓶壁, 发现有沉淀现象, 且不能通过加入乙醇而重新溶解。说明其中发生了不可逆的化学变化。可见赖夫生染剂的保存, 除了要有较好的密封性之外, 温度亦为很关键的因素。

3 结果与讨论

3.1 玻片清洁度对染色效果的影响

赖夫生染色法与其他多种鞭毛染色法一样, 玻片的清洁是得到理想效果的首要前提。新旧玻片均可, 但表面不能有磨损。玻片在浓铬酸洗液中浸泡 24h 后取出, 先放在水龙头下冲洗, 再放入装有蒸馏水的烧杯中涤荡几次, 玻片表面不能留有洗液, 洗净后放入 95% 乙醇溶液中浸泡备用。

此外, 将玻片取出在酒精灯上灼烧时要将需使用的一面背对火焰置于酒精灯的外焰。酒精灯的外焰一定要蓝色透明, 黄色或者产生黑烟的火焰会污染玻片^[2]。操作过程中注意不要用手触碰玻片。

3.2 染剂中乙醇浓度的影响

从结果 2.2 中不难看出, 染剂中乙醇含量是决定染色效果的关键。染剂使用一段时间后, 乙醇挥发掉一部分, 染色效果即变差, 细菌及其鞭毛均不能着色或着色后鞭毛

断脱多, 菌体的细胞壁不清晰。

在赖夫生染色法中, 新配制染料中酒精浓度为 31.4%, 当酒精挥发至浓度为 20% 25% 时, 染料所形成的一层胶质凝结物便在鞭毛上沉积, 使鞭毛变粗并染成红色^[2]。据此, 我们推测储存不好的染料酒精挥发后, 一方面染料不能充分溶解易沉淀; 另一方面因染料经储存后需延长染色时间, 但同时酒精挥发较短时间即可达到 20% ~ 25% 浓度, 这样胶质凝结物在玻片上停留时间过长致使不能完全冲洗干净, 同时鞭毛着色过重亦易断。所以, 染料不用时必须塞上塞子以防乙醇挥发。若密闭条件不好, 可通过补加微量无水乙醇恢复染色效果。补加的量可通过试验确定, 可能对于不同细菌、不同菌龄、不同储存时间及不同室温而言, 情况都不相同。

试验 1.4.5 中染料内乙醇含量由少至多, 染色效果呈一曲线状, 即由差→好→差。说明乙醇含量过少或过多对鞭毛染色效果都有不良影响。

3.3 培养基、菌龄及操作因素对染色效果的影响

细菌必须在合适的培养基上生长。培养基的成分对鞭毛生长有很大影响, pH 值过低对鞭毛有毒害作用, 糖分含量应在保证细菌生长的前提条件下尽可能低, 可向培养基中加入有助于鞭毛生长的磷酸盐^[2]。

菌龄要适当。决定染色效果的首先是菌体本身, 生长不良或菌龄过老都会使鞭毛数目严重减少。

制片固定菌体时, 载玻片不需要一端倾斜, 因为倾斜后蒸馏水流下的过程中很容易使鞭毛断脱并使所有鞭毛朝向同一方向从而不易计数。在操作过程中, 如滴加染料、冲洗等均要轻柔适度, 以减少鞭毛断脱率。

接种环取的菌液要适量, 以使鞭毛尽可能舒展开来, 尤其是具周生鞭毛的细菌。

一般染料染色时间在 5 ~ 15min 之间。用新配制的染料, 在环境温度较高、通风条件好的情况下需要的染色时间短; 用储存一段时间后的染料, 在环境温度较低、通风条件差的情况下所需时间长^[2]。

制片时最好使用专用于玻璃制品的蜡笔画小方格, 一方面可防染料平铺开来不易着色; 另一方面使用蜡笔后可在同一张玻片上同时做几个试验, 既节省时间又能充分利用玻片空间。

3.4 染料配制及保存条件对染色效果的影响

因染料中乙醇容易挥发, 所以配制时间应尽量缩短。有时新手配制的染料, 即使是刚配好的, 仍不能得到好的染色效果。其中主要原因就是因为染料配制时间过长, 敞口操作使乙醇挥发过多的缘故。染料配好后, 需放在洗净晾干的棕色磨口试剂瓶中, 塞上塞子。暂不使用的染料要避光密闭保存于冰箱中。

另外, 染料的保存不仅是乙醇挥发的原因, 较高的温度亦易使其失效。若将染料配好分装后置于更低的温度如 -20℃ 条件下保存, 几个月或几年后取出将会是怎样的染色效果? 对于经常需要进行鞭毛染色的实验室, 这是一个值得探索的问题。

参考文献

- [1] Fahy P C, Persley E J. Plant Bacterial Diseases, A Diagnostic Guide, 1983, 18 ~ 20.
- [2] Leifson E. Atlas of Bacterial Flagellation. London: Academic Press 1960, 1 ~ 6.
- [3] 方中达. 植病研究方法 (第三版). 北京: 中国农业出版社, 1998, 197 ~ 200.
- [4] 王全德, 李进芬. 微生物学通报, 1987, 14 (2): 89 ~ 91.
- [5] 刘德容, 李晓红. 微生物学通报, 1998, 25 (2): 119 ~ 120.