

• 另類方法練習顯微鏡對焦之操作

阿原發現，我們實驗室的顯微鏡相對不易操作（李老師也認同），與其批評硬體，不如趁機提升自己的技能。各位畢業後可能到實驗室簡陋的單位上班，台語有一句話：「鈍刀駛利手」，意思是刀子雖鈍，但是底子好、內力夠，功夫一樣強。下面這招是阿原 2010 年測試實驗室硬體時想到的，現在跟大家分享。

1. 取一個玻片，使用奇異筆在一面畫下一條垂直線，使用另一色的奇異筆在玻片的反面畫下水平線。例如使用紅色在正面畫線垂直線，藍色在背面畫水平線。（也可以試著畫斜線，但是對焦時可能會猶豫一下。）
2. 練習對焦，從低倍物鏡開始，因為心中已經預定目標，所以對焦會更快。首先會看到灰塵，若移動玻片，但是影像不動，那就是焦距在光源的透鏡，在玻片下方。再來會看到藍色線，這時候就知道焦距來到玻片背面，再來就看到紅色線，這才是接近我們的焦點。
3. 使用簡易型簡單染色法：在同一玻片，在紅色線位置加上一小滴水，使用燒紅 loop 取菌落，懸浮在水滴上，加上染料，放上蓋玻片，吸去多餘的液體，進行觀察。

到此，大家對於操作的技巧就更有感覺了。

提醒：若換到 40x 物鏡，但是紅線影像不清楚，可以調整光圈，大約比最小光圈大一些些。

• Spore staining (孢子染色)

原理：

十九世紀是微生物的黃金時期，這段時間發展了不少細菌的染色方法，但是細菌所產生的內孢子 (endospores)，卻因為化學試劑不易穿透其細胞壁，因此不容易在光學顯微鏡下看到內孢子。後來陸續發展出可以染內孢子的技術，其中一種使用 malachite green 的方法，又稱作 Schaeffer - Fulton stain，是在 1930 年代兩位細菌學家發展出來的方法。

其實 malachite green 常出現在新聞報導中，就是「孔雀綠」，常被水產養殖業者用來抗真菌、抗寄生蟲，但是會造成人類肝臟病變，以及致癌等，因此被禁用。而 malachite green 在微生物實驗室中，卻是孢子染色的關鍵試劑。

1. 每組有一個培養皿（標示：6/2 B.）是上週作 Gram stain 的材料，經過一周，經驗上會產生 endospores。
2. 請製作 smear：加一小滴水在玻片上，使用 loop（燒紅冷卻後）取部份的 colony 在水滴中抹開。建議製作三個玻片，一個玻片兩個樣本。這次不會用到乙醇沖洗，所以可以標示在撥片正面。
3. 其中一塊玻片進行簡單染色，例如使用 crystal violet 或是 methylene blue，使用油鏡觀察。
4. 另外兩塊玻片進行 spore staining:
 1. 我們有兩台水浴鍋，在加入 malachite green（孔雀綠）之後，在水浴槽內使用蒸氣加熱 5 分鐘，之間需補充染料以免乾掉 [微生物教科書會建議，在玻片樣品上方蓋上紙巾後才加染料，但是阿原試作的結果效果比沒有使用紙巾的來的略差] 我們會請兩位同學在水浴鍋旁協助，若染料乾了，加染料。使用水浴鍋除了小心高溫，也要注意水位不得低於加熱圈。
 2. 等玻片完全冷卻，用水溫和的沖去染料（約 30 秒或更久）
 3. 其中一片使用 safranin（番紅）染 1~2 min（另外一片不使用 safranin 染色，以

便對照)，用水沖去染料，壓乾後使用顯微鏡以及油鏡進行觀察。使用 safranin 將會把菌體染成紅色，更容易觀察到綠色的孢子 [與簡單染色比較，將會發現疑似球菌的東西原來是孢子]{觀察重點，找出被菌體包在菌體裡面以及單獨存在} 三片玻片，水滴 → 懸浮菌體 → 風乾 → 過火，如下方說明進行

只用簡單染色

只用孔雀綠，染色後沖洗

孔雀綠染色、清洗後，
使用 safranin 染色、清洗

**各組需要照相的，請找阿原使用電子目鏡。

• 練習接菌，為下週量測菌體大小準備

下週將要進行菌體大小測量，今天先練習接菌，下週就可以使用。

1. 每組桌上有培養皿 Bacillus (上週操作過的)、E. coli、LL 共三種。
2. 接種說明

	適用微生物特性	今日用的培養基	今日接入之菌種
1 通氣蓋試管			
2 螺紋試管-大			
3 螺紋試管-小			

3. 接種方式：燒 loop → 冷卻後取菌落 → 使用小指開蓋 (小技巧，請見阿原示範) 試管口過火 → 接入菌種 → 試管口再過火 → 放回蓋子，完成

上週 Gram stain 之額外練習

★請參考課本 p68, Fig 3.12

1	2
E+LL	E+LL

3	4
E+LL	E+LL

1. 如上圖，取細菌 E + LL 製作 4 個樣本。E. Coli 形狀是 _____，LL 形狀是 _____
2. 將這 4 個樣本如下表之方式進行染色，這樣可比對不同步驟的結果

	1	2	3	4
Crystal violet	Yes	Yes	Yes	Yes
Iodine	Yes	Yes	Yes	-
Ethanol	Yes	Yes	-	-
Safranin	Yes	-	-	-