

组织化学

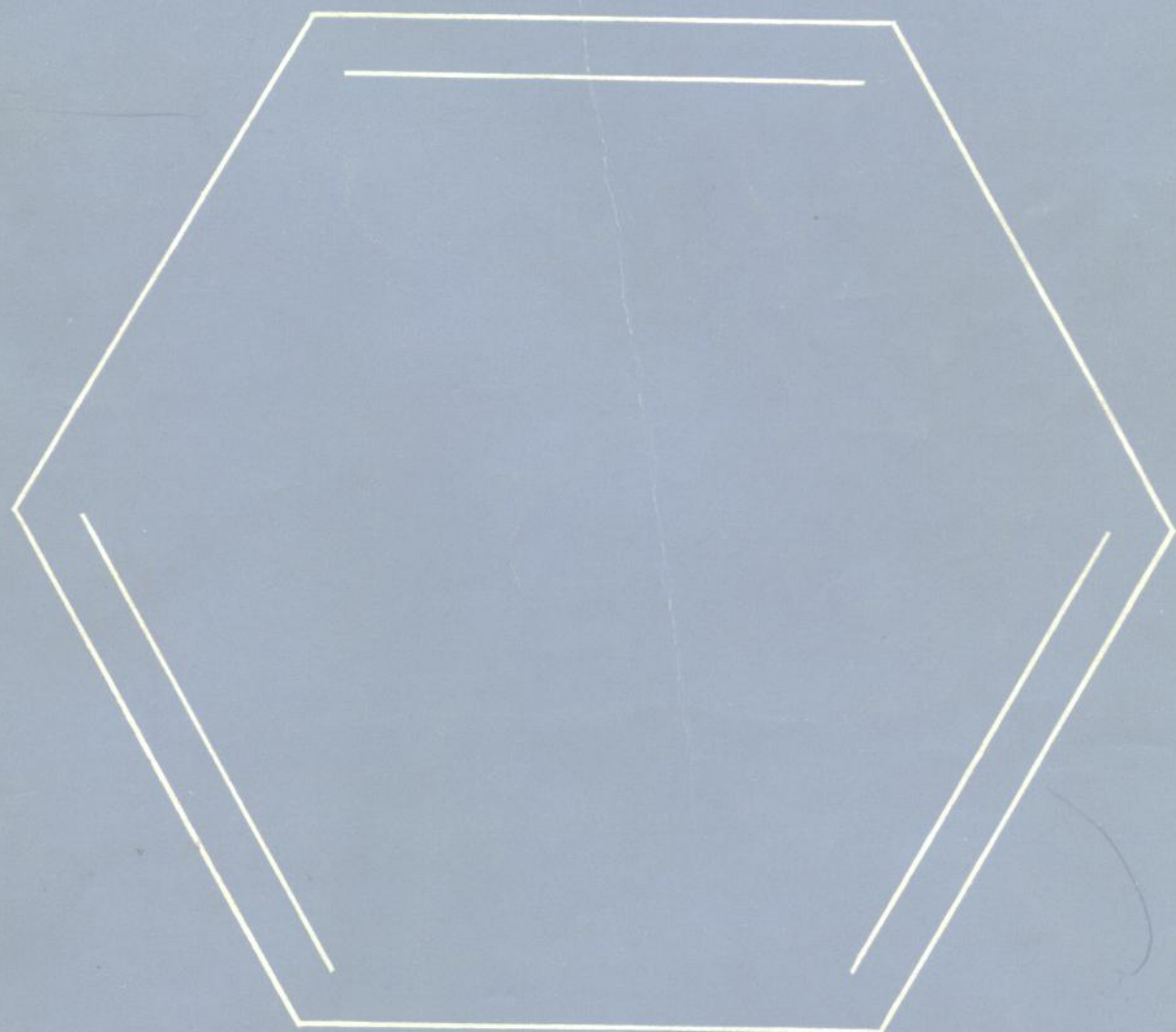
理论和实用

卷一：制备与光学技术

(英) A.G.E. 皮尔斯

马 仲 魁

著
译



人民卫生出版社

组 织 化 学

理论和实用

卷一 制备与光学技术

〔英〕 A. G. E. 皮尔斯 著

马 仲 魁 译

人 民 卫 生 出 版 社

HISTOCHEMISTRY
Theoretical and Applied

Volume 1
Preparative and Optical Technology

A. G. Everson Pearse
4th ed.
Churchill Livingstone
Edinburgh London and New York
1980

2V56/37 06

组 织 化 学

理论和实用

卷一 制备与光学技术

〔英〕 A. G. E. 皮尔斯 著

马 仲 魁 译

人民卫生出版社出版
(北京市崇文区天坛西里10号)

北京顺义寺上印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米16开本 25 $\frac{1}{2}$ 印张 8插页 596千字

1985年3月第1版 1985年3月第1版第1次印刷

印数：00,001—5,500

统一书号：14048·4684 定价：4.35元

〔科技新书目 84 — 80〕

引 言

写本书第四版，乃势之所趋，无庸解释；将本书分为三卷，则需略加说明。

自从我写第一版第一章以来，已历三十载；很明显，组织化学和细胞化学已发展到必须用新的准则来厘定二者的共同技术。

例如，把电镜技术作为单独的一项来处理，已不适宜；而应把它作为光镜组织化学技术应用的延伸，即使现在用的还不太多。

在本书改版之际，我决定重新设计本书的内容与形式，借更改格式之时，将电镜组织化学置于全书的适当位置。第一卷题为《制备技术和光学技术》；第二、第三卷分别题为《分析技术》和《酶技术》。

我不得不倚仗朋友们和同事们的赞助，因为现在更甚于以前，个人独自总括有关的全部技术是不可能的。

组织化学和细胞化学技术将继续广泛应用于整个生物学领域。“好酒不用招”。披阅第一章便可知悉，《科学援引索引 (Science Citation Index)》提供的统计说明，在 1961 到 1972 年间，有关于非期刊项目，生物学中 22% 以上的援引是关于组织化学教科书的。虽然像在第三版第一卷那样，我告诫自己：“称誉本书不是第一次，而是末一次”。但我深信本书，而且希望随后两卷，定会加深组织化学的理论，并为其进一步扩展提供手段和激励。

Hertfordshire, 1980

A. G. E. 皮尔斯
(马仲魁译 杨 进校)

目 录

1. 历史简介·····	1
2. 冷切片法和超薄冷切片法·····	14
3. 生物组织的冷冻干燥法·····	36
4. 组织和切片的冷冻替代法·····	74
5. 固定的化学和应用·····	88
6. 免疫细胞化学·····	148
7. 底物膜技术·····	242
8. 用作组织化学试剂的酶·····	259
9. 放射自显影术及应用·····	291
10. 荧光显微镜术·····	330
11. 定量组织化学·····	359
总附录·····	395
索引(译者略)·····	402

0370492/87.4.11/4.35元

1. 历史简介

定义和附言

如果 George Gomori 1952 年出版的经典著作未用《显微镜组织化学》一名,本书第一版及以后各版的书名就应是“显微镜组织化学”。这一名称是由比较老的名子和比较老的学科即微量化学或称“显微镜观察的化学”沿袭来的。随后微量化学成为生物化学的一个分支,是关于最小样的化学分析,并延续到现代,成为超微量化学。这三者之所以能在历史简介一节中阐明,应归功于法国植物学家 Francois-Vincent Raspail,是他最先(1826)把化学技术与显微镜结合起来。

组织化学这个混合学科,即组织学同分析化学或生物化学之间的边缘领域(Gomori, 1952),可进一步定义为:在细胞和组织中,以化学或物理试验法,对某些特殊物质、反应基团和酶促活性进行识别、定位和定量。因此,它更属于一门技术而不是一门学科,正如作者多次写过和始终相信的,组织化学在其它学科中的应用性如何,是它成败的关键。

情况常不是那样明朗,在上述定义之前还有许多不同的定义,无疑今后还会有许多定义。目前,我们最好对这些层出不穷的定义作一通览,借以部分熟悉它们之间的纷争,经过这些争论之后,剩下的即是组织化学一词,至少在显微镜学家手中是如此。

根据 Gérard 为 Lison 所著《动物组织化学(Histochie Animale)》第一版(1936)所写的序言,组织化学是近代的一个创造,体现了人们想借助于适当的化学反应,以认识活细胞的各种产物。在此之前,Voss(1933, 1952)曾提出过定位组织化学(histotopochemistry)一词,虽然此词曾经是而且现在仍然是一个颇好的术语,但却遭到造词笨拙和词音不悦的非议。故一直未能通用。组织化学和细胞化学的区别,一度曾为细胞化学家所乐道,认为其间的区分是一门为技术学另一门为专门科学(见 Danielli, 1953),但这种议论现已不存在。纵然 Gomori(1952)认为,细胞化学一词,应用于细胞内化学组成的一般研究,但现在细胞化学已作为一个首要部分包括在组织化学之内。这一点与 Vialli(1966)的意见一致,即一个术语仅是另一术语的延伸。

早年对组织化学技术的批评,无论是总体的或是个别的,都是有道理的。Needham(1950)在他的巨著《生物化学与形态发生(Biochemistry and Morphogenesis)》中认为,“组织化学必须经历漫长的道路,才能达到直接化学方法的准确性”。Danielli(1953)认为,细胞化学是“生物学的一个几乎尚未开发的分支”,这个领域需要一支研究队伍,而且应有“生物学、化学和物理学的高深知识”。值得庆幸的是,在既往和现在,那种劝阻个别科学家应用组织化学的意图,都失败了。

即便是现代组织化学,虽曾为基础科学家的工作服务,但仍需经过相当长的历程,才能得到他们的正当承认。现在,组织化学家可以从《科学援引索引(现代目录)》提供的 1961~1972 年间的统计中得到鼓舞。在此期间,在生物化学和生物医学整个领域中,有 29 种著作引用 200 次以上,这 29 种中,有 5 种是组织化学的,这 5 种总合在一起,

至少占引用总数(13543)的22.269%。这些统计表明,组织化学这门学科所包括的技术是有用的,且已被生物科学中所有的学者采用。他们的工作成果以至应用技术本身,可分为优、中、劣三类,而组织化学应对后两类负一定责任,因在它的常规方法中确实缺乏应有的特异性和准确的定位能力。常受到其它学者恰当批评的,可能正是组织化学家们的至关重要的才能,而这种才能仍需要某些磨练。

组织化学的展望

Gomori (1952) 在《显微镜组织化学 (Microscopic Histochemistry)》一书的序言里曾说:“有充分的迹象表明,正如本世纪初生物化学的情况一样,组织化学现在正发展为一门独立的学科,具有其特有的理论、方法和专门的课题”。该书出版后已有二十多年,现我们可以自问,上述结论是否已被事实证实。

Danielli (1953) 在他评论性的专著《细胞化学 (Cytochemistry)》中,同前面各章的责难相反,在末一章开始就写了这样的话:“在细胞学的许多领域中,细胞化学大概是成长最快的,而且在以往十年中是最活跃的。未来的十年或二十年定将充实这个领域,许多方法的改进以及许多新方法的创立”。我们可再试问,这个预言是否已经实现。首先可以回溯到更早的年代,有些学者已经认识到,形态学本身是一门有局限性的学科,纵然电子显微镜提供了很高的分辨力。

其中最早的是 Georghe Marinesco (1863~1938),他是神经组织化学的一位先驱者,这个领域在已往的十年中,已从较含混的状况上升到最重要的地位。Marinesco (1920) 曾说,要想完善地理解生命现象,不久必将借助于物理化学的语言来替代描述性的和印象性的语言,而此类语言目前在神经-生物病理学以及正常组织学和病理学中仍占有优势。在本节之末还应提到 Raspail (1845) 在他的年鉴手册 (Manuel-annuaire de La santé) 中写道:“显微镜——此处他无疑指的是显微镜组织化学——将会揭示疾病的原因,并以科学观察的明确语言替代传说的含义不清的语言”。

组织化学的前景,是个发达的、日益成功的、应用的前景。如同对核酸的分布和变化课题的贡献一样,Brachet (1940a、b, 1942, 1944, 1946) 借助于组织化学,成为最终导致建立遗传密码研究的直接先驱。我们对组织化学的发现和被其他学科所收纳,应感到满意,这些学科的技术,如分子生物学的技术,将会把它们带入发现的新天地。

组织化学历史概述

这里所述的组织化学历史概观,曾在一篇组织化学现代方法评论 (Pearse, 1951) 中有过简短的叙述。该文的意图是对于生物科学中这门最年幼的、同时也是最古老的科学的沿革,提供一个真实的概貌。作为简介,下面列出一个历史简表,它虽很不完全,但可提供一个梗概,把随后的互无联系的个别文献连贯起来。

1800~1829 与组织标本中形态学的研究同时,有些零星的化学研究。组织化学尚未成为一门独立的学科。

1830~1855 这是组织化学作为一门学科兴起的年代。起初它主要是在植物学方面,几十年间,组织化学的运用实际上是掌握在植物学家们手中。此期出版了几种有关的著作: Raspail 的 Essai de Chimie Microscopique Appliquée a la Physi-

ologie, 1830; 还有他的 *Nouveau Système de Chimie Organique*, 1833; 再就是 Lehmann 的 *Lehrbuch der phisiologischen Chemie*, 1842; 以及 Raspail 的 *New System of Organic Chemistry*, 1834 (译本)。

1856~1871 动物方面的组织化学同植物的相反, 此期主要为生物化学, 且其大多数方法对组织都有破坏性。开始出现了更多的有关组织化学的教科书, 其中有些是早年著作的译本, 如: Lehmann 的 *Physiological Chemistry*, 1951 (译本); Robin 和 Verdeil 的 *Traité de Chimie Anatomique*, 1853; Schlossberger 的 *Chemie der Gewebe des gesammten Thierreichs*, 1856; Sachs 的 *Handbuch der Experimental Physiologie der Pflanzen*, 1865; 以及 Frey 的 *Handbuch der Histologie und Histochemie des Menschen*, 1867。

1872~1898 在这个阶段, 组织化学分成两部分, 一部分脱离了组织学而并入生理学; 另一部分仍为生物化学。这时期出版的论著有: Miescher 著 *Ein Beitrag zur Histochemie*, 1874; Frey 著 *Histology and Histochemistry of Man*, 1874 (译本); Lehmann 著 *Traité de Chimie Physiologique*, 1883 (译本); Bunge 著 *Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie*, 1887; 及 Sachs 著 *Lectures on the Physiology of Plants*, 1887。

1899~1929 在这个时期, 苯胺染料在组织学中已广泛应用, 苯胺染料是 1862 年 Bencke 首先记述。二十世纪前二十五年中, 描述组织病理学迅速扩展, 组织学家们对新的染料和染色技术很感兴趣, 而对组织结构化学的兴趣较小。尽管有许多新的染色反应已具有诊断意义, 但并无人企图了解它们的物理及化学原理。形态学的研究压倒了组织化学的研究。Mann (1902) 曾很轻率的说, 哺乳类显微解剖学的研究在 1900 年“已几近于结束”。这个时期有三部记述显微化学和显微生理学的著作: Mann 的 *Physiological Histology*, 1902; Ehrlich 的 *Encyclopädie der Mikroskopischen Technik*, 1903; 及 Macallum 的 *Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie*, 1908; 这些都是经典著作。Prenant (1910) 在一篇有价值的文章中, 评述了组织化学的一般状况, Molisch 著 *Mikrochemie der Pflanzen*, 1913; 中记述了不少组织化学和细胞化学的内容。在这个时期末出版的阐述组织化学发展的其它著作有: Parat 著 *Review of Recent Developments in Histochemistry*, 1927; Patzelt 著 *Animale Histochemie*, 1928; Klein 著 *Praktikum der Histochemie*, 1929; 和 Hertwig 著 *Histochemische Methoden*, 1929。

1930~1944 这是组织化学复兴及其部分归入组织学领域的阶段。这个时期最重要的著作是 Lison 的 *Histochemie Animale* (1936), 作者在书中阐述了不使组织破坏的新组织化学。此书对组织化学的发展和运用所发生的影响, 是无法估量的。直到 1953 和 1960 年此书第二版和第三版出版之前, 它一直是基础科学各领域中组织化学家们公认的权威著作。其次较重要的优秀著作有: Chamont 和 Mason 所著 *Handbook of Chemical Microscopy*, 1930; Romies 著 *Histochemische Methoden*, 1932; Policard 和 Okkels 著 *Die Mikroveraschung als histochemische Hilfsmethode*, 1932; 和 Linderstrom-Lang 著 *Problems in Histochemi-*

stry, 1936。

1945~1958 这个时期的第一部著作是 Glick 的 *Techniques of Histo- and Cytochemistry*, 1949。此书简要说明了与组织学家们有关的组织化学理论和方法。书中并从生理学、物理学和组织学的角度评述了组织化学的全貌, 其中也有许多专门的技术方面的知识。其后不久, 出版了四部大部或全部是属于组织化学的著作。按出版的顺序, 这些书为: Gomori 的 *Microscopic Histochemistry*, 1952; Danielli 的 *Cytochemistry*, 1953; 我著的本书第一版, 1953; 以及 Lison 的 *Histochemie et Cytochimie Animales*, 1953。Bourne 的 *Functional Histology*, 1953, 这本书虽不是一部组织化学论著, 但其大部分内容是以组织化学技术的应用为基础的。Lillie 的改用新书名 *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 1954 出的第二版, 它虽只有部分内容涉及到组织化学, 但也是一本重要的组织化学著作。Vialli 在他的著作 *Introduzione alla Ricerca in Istochimica* (1955) 中对现代组织化学作了鼓励的和批评的评论, 讨论了组织化学许多方面的优点和缺点。Mellor 的 *Analytical Cytology* (1955), 是许多学者参考的有关各型显微镜及其应用的一本著作, 还有 Eränkő 的 *Quantitative Methods in Histology and Microscopic Histochemistry*, 1955; 都对组织化学的发展前景提供了依据。这两部著作特别着重于组织化学的定量方面, 组织化学未来的发展同这个方面的发展密切相关。在 1958 年出版了许多单卷的甚为全面的丛书, 即 *Handbuch der Histochemie* 的第一卷, 此书论述了组织化学的一般方法及其应用。在 1950 年以前, 还没有专属于组织化学的杂志或期刊, 但在此时已有七种。如果把主要或大部登载组织化学和细胞化学论文的刊物也计算在内, 则为数更多。此期间的组织化学和细胞化学的主要杂志, 按发刊年代为: *Experimental Cell Research* (1950), *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (1953), *Acta Histochemica* (1954), *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* (1955), *Annales d'Histochemie* (1956), *Histochemie* (1958)。

1959~1965 在此期间, 又增加了相当数量的组织化学的新书和新版。Casselman 在 1959 年写了一本名为 *Histochemical Technique* 的有用的小书。次年又出版了三本新书。这些书是 McManus 和 Mowry 的 *Staining Methods, Histologic and Histochemical*, Mellor 的 *Analytical Cytology* 第二版, 以及我著的本书第二版。1962 年出版了 Burstone 的 *Enzyme Histochemistry and its Application to the Study of Neoplasms*, 还有 Jensen 的 *Botanical Histochemistry, Principles and Practice*, 次年出版了 Barka 和 Anderson 的 *Histochemistry, Theory, Practice and Bibliography*。 *Handbuch der Histochemie* 的另几卷和卷的分册零散出版, 而且无一定的次序, 其中有: 卷 II *Polysaccharide* (1962 和 1964), 卷 III *Nucleoproteide* (1959), 卷 V *Lipide* (1964), 卷 VII *Enzyme* (1960, 1962, 1963, 1964)。1964 年出版了另外两本德文的专著, 第一本是由两位匈牙利学者 Kiszely 和 Pósalaky 写的名为 *Mikrotechnische und Histochemische untersuchungsmethoden*。此书的主旨是用作实验室手册。同此目的第二本是 Spannhof 著 *Einführung in die Praxis der Histoche-*

mie. 1965 年出版了 Lillie 的大为扩充的第三版名著, 这本书是名符其实的知识宝库, 许多内容在别处是找不到的。这个时期同前一时期相比, 新期刊较少。日本组织化学协会于 1960 年开始用英文发表会议录年刊。于 1962 年, *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 改名为 *Journal of Cell Biology*, 编辑方针不变, 优先刊载电镜术和电镜细胞化学。波兰组织化学学会创建于 1961 年, 1963 年创办了期刊 *Folia Histochemica et Cytochemica* 的第一卷。此刊主要但非全部以英文发表。皇家显微镜学会扩充了其期刊, 开辟了组织化学和细胞化学专项 (1964) 及电子显微镜学专项 (1965), 以接收更多的有关这些领域的文章。为了纪念 1964 年在法兰克福举行的国际组织化学学会第二次会议, 出版了由 Sandritter 主编的 *Hundert Jahre Histochemie in Deutschland* 的小书。随后不久出版了由 Sandritter 和 Kasten 主编的此书的英译本, 对组织化学的历史颇有贡献。

1966~1976 作为一门科学或技术学, 组织化学在本世纪最后二十几年中, 在继续发展, 其前进步伐并不迟缓。出版了一些大的和一些较小的著作。第一本即这几年来最大的一本 (1966), 是 Thompson 编的 *Selected Histochemical and Histo-pathological Methods*。它几乎是一本百科全书, 包括了最有用的并广博的参考文献, 同 Bancroft (1967) 更有选择的著作 *An Introduction to Histochemical Technique* 适成对照。Bancroft 的书在 1976 年又出了第二版, 表明此书是有成就的。Culling 的 *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques* 的第三版出版于 1974 年。

其次出版的是这个期间最巨大的书, 即 Ganter 和 Jolles (1969) 的两卷 *Histochemie normale et pathologique*。这本法文著作由病理学家和化学家的卓越合作而成。由 Gauthier-Villars 出版, 估计是用来代替告缺的 Lison 著作的第四版。此书同这个领域的大多数其它著作相比, 包含了更丰富的化学或生物化学数据。由 Glick 和 Rosenbaum 主编的许多作者参与的 *Techniques of Biochemical and Biophysical Morphology* 于 1972、1975、和 1977 相继出版了三卷。可惜的是, 这一极为有用的丛书只出到第三卷。

这十年来, 正如所料, 出现了许多电镜定位新技术。这些技术由 Geyer (1973) 汇集到一本优秀而适时的专著 *Ultra-histochemie* 中, 由 Jena 的 Gustav Fischer Verlag 出版。四卷集的 *Electron Microscopy of Enzymes* 的专著, 由 Hayat 主编, 许多作者参与著写。此时 (1973, 1974) 由 Von Nostrand Reinhold 出版。Lojda 的 (Lojda, Gossrau and Scheibler) 德文著作 *Enzyme-histochemische Methoden* 第一版也是专论酶的。此书充分显示了 Lojda 对这个领域的精通, 他在两位合作者的有效协助下, 使此书成为光学显微镜酶组织化学的权威著作。1977 年出版了 Lippa 的两卷平装本著作, 书名为 *Grundlagen der Histochemie*。此书论述本学科的理论和应用, 对熟悉德文的人来说, 花费不多, 就能达到熟悉技术的目的。

这个时期又出现了两个新版本, 即 Barka 和 Anderson 的 *Histochemistry, Theory, Practice and Bibliography* 第二版 (1963)* 和 Lillie 的 (Lillie 和

* 原书如此, 显然错误——译者注

Fullmer) 第四版 (1976), 后一书全经重新修订, 以适合当今需要。在这十年之末, 由 Graumann 和 Neumann 主编的 Handbook of Histochemistry 已出版了第八卷的第四册。此书靠后的几卷中, 主要是论述组织化学在哺乳类特定部位及其疾病中的应用。

这十年同前十年相比, 新期刊颇少, 也并不奇怪。因有很多改组, 有的停刊, 亦有少数增加。日本组织化学和细胞化学协会的机关杂志 Acta Histochemica et Cytochemica 第一卷以英文于 1968 年出版, 并在 1970 年开始出版了专著丛书, 总名为 Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 大多由一位作者编写。此丛书主要用英文印行, 由 Gustav Fischer Verlag 出版。它刊载一些不适合于其它刊物的较长的组织化学技术或应用的专题文章, 它没有成见也不加删减, 以满足实际需要。1968 年首次出版的 Histochemical Journal, 经出版者 Chapman and Hall 同意, 于 1973 年与 Royal Microscopical Society 联合。联合时同意改变 Journal of Microscopy 的编辑方针, 至今仍是登载一部分应用组织化学文章。刊名于 1974 年由 Histochemie 改为 Histochemistry, 确认此刊是一种主要的英文杂志, 其开本和内容不变。

组织化学历史、续篇

在题为 Contributions to the History of Microchemistry 的几篇文章中, Harms (1931~1932) 详细介绍了法国药学家、植物学家兼显微镜学家 François-Vincent Raspail (1794~1878) 在组织化学方面的工作, 文中的结论是: 应该认为 Raspail 是微量化学的创始人, 这也得到其他有权威的评论者的支持。Baker (1943, 1945) 在 Quekett Microscopical Club 的一本专论和他的细胞学技术第一版中有进一步的看法。他也认为 Raspail 是组织化学的真正创始人, 他拥有这一称号是无可争辩的。Weiner (1959) 在一本专著中, 叙述了 Raspail 的生平与工作, 并集中介绍他广泛开展的慈善事业。继此之后, 同一作者出了 Raspail, Scientist and Reformer 一书 (1968); 其中有由他的重孙女 Simone Raspail 写的一章, 十分详尽地叙述了他作为青年研究者, 早年 (1822~1830) 做的全部组织化学工作。和前几版一样, 本书的首页印有 Raspail 青年时代的肖像, 后来他抛弃了组织化学却从事神学论争和政治。

最先对显微组织化学 (microscopic tissue chemistry) 提出明确评价的, 无疑是出自 Raspail (1825a 和 b, 1829)。这位学者提出他的四个原理 (Harms 曾全部引述, 1931; Baker 也部分引述, 1943) 后, 就专心研究禾本科植物的花和果的受精过程。他为这项研究所用的最重要的反应就是碘淀粉反应。这是 Colin 和 de Claubry 于 1814 年及 Stromeyer (1815) 首先提出的, Caventou 于 1826 年曾用于淀粉的显微研究中。但还不能肯定 Raspail 还是 Caventou 谁先在组织化学中使用了碘溶液, 不过这一点并不重要, 因为 Caventou 后来未再作过组织化学研究。与此相反, Raspail 却发现并应用了许多其它组织化学反应。1982 年他用蛋白黄色反应显示蛋白质和盐酸 (糠醛) 反应显示碳水化合物, 后一反应即众所周知的 Liebermann (1887) 反应, 在动物组织化学中现已不用。他用硫酸在植物组织中显示蛋白质的存

在, 其实他所用的就是显示色氨酸的醛法, 此法在他以后经过许多学者修改, 成为目前仍用于组织化学的 Voisenet-Farth 反应。据 Reichl (1889) 所述, Mikosch 曾用苯甲醛。硫酸和硫酸铁的混合物, 以此种苯亚甲基缩合反应来显示植物组织中的蛋白质。

现在一般都把烧灰显微法的发明归功于 Raspail (据 Baker 所述为 1829 年)。他曾首先用指示剂染料测定原生质的 pH 值, 用的是从地中海甘遂中提取的石蕊作为指示剂。这个染料平时为蓝色, 在酸性溶液内变为粉红色。

几乎与 Raspail 这些发现的同时, 还有另外几位植物学家发表了真正组织化学反应的论文。其中应提到 Mohl (1831) 对碘反应的研究和 Schleiden (1838) 对碘-硫酸反应的研究。但是, 除植物学上的研究外, 组织化学的发展是很慢的, 甚至从最广泛的意义来说, 到 1860 年以前, 能称为组织化学的研究是很少的。在一些发表最早的方法中, 应该提到铁的显示法, 其中有些方法引自 Vogel (1845, 1847) 的工作, 他用氨的黄色硫化物把组织中的铁变为黑色硫化亚铁。但 Lillie (1972) 认为, 铁鞣酸反应至少可追溯到 1807, Link 当时曾用这一反应显示橡树叶和枝条的液体循环。1867 年 Perls 介绍了他显示铁的普鲁士蓝法, 此法至今还在使用。继 Perls 之后, Quinke 在 1868 年应用了 Vogel 的硫化物法, 他的方法一直保留到目前而未更改。1844 年 Millon 叙述了他的蛋白质反应, 1853 年 Hoffmann 指出, 这个反应实际上是一个测定酪氨酸的方法, 虽然 Payen (1843) 已用硝酸亚汞显示植物组织中的含氮物质, 但是 Millon 反应在 1888 年 (由 Leitgeb 用过) 以前未用于组织化学中。叶绿体中淀粉的定位, 最先载于 Sachs 著的植物生理学专著中。

色素组织化学, 实际起始于 Virchow (1847) 对组织中血红蛋白分解产物的广泛研究。他是对出血区出现的黄色晶体色素首先使用 haematoidin (胆红素) 这一名词的人。顺便提到, 由于 Virchow 是细胞病理学 (1858) 的奠基人, 故通常以为细胞来自细胞 (Omnis cellula e cellula) 这一名言是他提出的, 其实, 1825 年 Raspail 即曾用这句话作为他论述淀粉粒发育一文中的引语, 此文发表在当年的 Annales des Sciences Naturelles 上。Neumann (1888) 提出含铁血黄素 (haemosiderin) 一词, 意指细胞内的一种不同于 Virchow 的 haematoidin 的含铁的色素。Von Recklinghausen (1889) 首次描述了血褐素 (haemofuscin), 而 Langhans 采用了黑色素 (melanin) 一词, 虽然 Virchow (1859) 早已叙述过中枢神经系细胞中的一种黑色素。其后 Berdez 和 Nencki (1886) 研究了肿瘤中黑色素的特点。

1850 年 Claude Bernard 完成了一项有名的实验, 但在 1859 年以前并未发表。他给狗注射乳酸铁和亚铁氰化钾, 看到有酸存在时普鲁士蓝产物不仅分布在胃腺中, 而且在胃粘膜表面亦有。这种活体试验方法确属于生理学范围, 但这个实例也应属于组织化学。也在 1850 年, Schulze 首先发表了他的显示纤维素的氯锌碘法。现时仍在使用的这个方法是 Farnrohr (1850) 记述的。

使用酶消化组织的方法, 最初是 1861 年 Beale 报导的, 他用胃液从神经纤维中除掉不需要的组织。这个方法其实是显微解剖学方法, 但到十九世纪末已发展为一种公认的酶分析技术 (Kossel 和 Methews, 1898)。

证明组织中酶的存在是从 Klebs (1868) 和 Struve (1872) 的工作开始的,二人都指出愈创木酯同胶原作用时能生成蓝色,这是说明组织中有过氧化物酶存在的最早的记录,现已知此酶存在于白细胞的颗粒中。Brandenburg (1900) 首先证明白细胞颗粒中的过氧化物酶反应。细胞色素氧化酶是 Ehrlich (1885) 首先发现的,不过当时不叫这个名子。他在活体内进行了纳迪反应 (Nadi reaction) (卷三),把 α -萘酚 (α -naphthol) 和对苯二胺 (p-phenylenediamine) 注入动物体内,在有“纳迪氧化酶”存在的部位观察靛酚蓝 (indophenol blue) 的生成。

除了上述一些方法外,在 1856~1898 年期间,还提出了若干其它组织化学方法。1868 年 Heidenhain 指出,动质 (ergastoplasm) 分布于分泌腺细胞底部的一种强嗜硷性物质中含有一种可被醋酸沉淀的物质。现知这种物质就是核糖核酸。1870 年他发现肾上腺髓质的某些细胞用铬酸处理时呈现棕色,这种反应现称嗜铬反应 (chromaffin reaction)。按照 Lison 的意见,这个反应的发现应属于 Henle (1865)。在此期间,利用酶消化组织的有: Miescher (1871a) 用胃蛋白酶从细胞质中分离核; Stirling (1875) 用胃液的消化作用分离弹性纤维。从现在的知识看,这两项工作并不属于组织化学方法,但是它们足以说明,当时的许多组织化学的研究具有破坏性。这正是促使 Lison 把新的非破坏性的组织化学同旧组织化学分开的理由。

1873 年 Miescher 利用核染色质对甲绿的选择性亲和力,分离出核染色质;在 1878~1879 年, Ehrlich 观察到热凝固作用可增进血红蛋白对硝基染料的亲和力。在探讨变性对于染料或组织化学试剂同组织蛋白中特殊基团结合的影响方面, Ehrlich 的工作,得到现代的响应。James (1920) 在致编者的一封信题为“核组织化学一百年 (A centenary of nuclear chemistry)”的信中,就 Miescher 对组织化学的贡献提供了更多的资料, Miescher 曾为他最早的提取工作选择材料,以及 Miescher 关于脓细胞的化学的报导拖延到 1871 年才由 Hoppe-Seyler 发表。当 1872 年他在 Basel 成为生理学教授时,他的兴趣从脓转到莱茵河鲑鱼精子上,以此作为他的酸性“核素(nuclein)”和与它结合的硷性蛋白“精蛋白(protamin)”的来源。Greenstein (1943) 引述 Miescher 写给组织学家 Wilhem His 的一封信,信中有这样一些话:“我比任何人都更清楚地知道,我的工作仅是未来组织化学的初步研究”。无疑 Miescher 应该同 Raspail 并列一起,受到崇敬,作为组织化学的一位真正奠基人,尽管他谩骂过“染色工人协会”。关于 Miescher 事业的许多详情可见 Mirsky 的名为“The Discovery of DNA”的详细历史论述。他叙述了 His 如何劝告 Miescher 从事组织化学工作,因 His 在他的组织学研究中“始终认为,组织发生的最终课题将会在化学基础上获得解决”。

同一时期 (1856~1898), 继 Bencke (1862) 把苯胺染料用于组织学领域之后,苯胺染料普遍用于组织学中。这是组织学实践中的一次革命,但也给组织化学的发展带来了障碍。因为各种染料的使用,大多是从组织学的意义上竭力记述染色和结构的关系,而未曾致力于探讨染料的性质同组织成分的化学性质的相互关系。尽管如此,仍有几位学者为了发现各种染料如何同组织结合,进行了相当多的研究。染色的物理学理论是 Witt (1890~1891) 提出的,特别得到了 Fischer (1899) 的有力支持,后者根据吸附现象解释了所有的染色作用。Miescher、Ehrlich 以及 Knecht (1888) 都

认为染色是一个化学过程。Mann (1902) 就这些问题也提出过有意义的见解, 他说, 染色的目的首先是为了判断形态, 其次是“要从微量化学上认识我们从常量化学上已知的那些物质的存在和分布”。“我们不能只满足于使用酸性或硷性染料并推测组织的硷性或酸性, 或应用具有氧化或还原性的染色基团, 我们必须尽力发现那些染色反应, 它们不只证明如铁或磷等某些元素的存在, 而且还能证明如碳水化合物、核素和精蛋白等有机物的存在”。这些话至少表明, Mann 已经意识到了这些问题, 但是大多数组织学家却很少从实际上加以解决。

有些使用苯胺染料反应其实就是组织化学反应, 但是这些反应的意义常未能得到解释或者是被误解了。大多数反应的意义现在仍未完全了解。Puchtler 等 (1975) 回顾了从 1862~1935 年有关硷性品红和醛-雪夫反应 (aldehyde-schiff reaction) 的历史。他们较详细地叙述了 Hoffmann (1862) 对副品红 (pararosaniline) 合成和化学的研究, 以及他难以对他的染料定出确切化学结构的情况。亦叙述了包括 Schiff 本人 (1865a 和 b) 的学说在内的硷性品红与醛结合的各种学说, 连同他对于以他名为名的试剂的组成的看法 (1866, 1867a 和 b)。

Cornil (1875) 首先记述了甲基紫同淀粉状蛋白的异染性 (metachromatic staining)。Heschl (1875) 和 Jürgens (1875) 几乎同时研究了异染性的一般问题, Ehrlich 用含 8% 醋酸的天竺牡丹 (dahlia) 饱和酒精溶液显示肥大细胞的反应, 同现代的噻嗪染料 (thiazine dye) 方法基本相似, 也可以认为是一个组织化学反应。其它机理不明的一些反应有 Weigert (1884) 和 Marchi (1892) 的髓鞘染色法及 Gram (1884) 的苯胺紫 (anilin-violet) 法。Mathews (1898) 的清蛋白和豚 (albumose) 的实验研究, 以及 Saint-Hilaire (1898) 进行的核组蛋白 (nucleohistone) 的重要研究, 都有力的支持了化学染色理论。Saint-Hilaire 在创立检查组织中尿酸的方法时, 注意到核有时也被染色。他认为核的反应是由于有组蛋白存在的缘故。Saint-Hilaire 还指出, 组织中被醋酸沉淀的核组蛋白可用稀盐酸溶液离解, 使组蛋白留在原位。此法的几种改良法目前应用很广。

这个时期的后半期, 对于原生质的性质作了很多研究, 其中尤其是 Stöhr (1882), 他根据凝结过程的研究结果, 认为在胃壁细胞中有某种蛋白存在。Flemming (1882), Kossel (1882, 1886), Altmann (1886, 1889), Schwarz (1887) 和 Mann (1890) 等也进行过这方面的研究。Flemming (1876) 已经说明有一种粘合质把组成疏松结缔组织束的原纤维结合在一起。他认为这种物质是粘蛋白性质的。Altmann (在 1889) 创立了冷冻干燥的固定方法, 后经 Gersh 及其继承者的改进, 已成现代组织化学的一种重要的固定方法。其它学者们继续研究了染色过程, 其中特别有价值的是 Griesbach (1886) 的工作, 他推测染料与组织形成的复合物应有不同于游离基的性质; Unna (1887) 也曾试图证明这一点; 还有 Lilienfeld (1893) 对粘蛋白染色的研究工作。Hoyer (1890) 显示了噻嗪染料 (thiazine dye) 在唾液腺粘液细胞中的异染性, 在他之后, 粘蛋白的异染法就十分普遍了, 在 Hoyer 发表他的论文以前, 粘蛋白多是用因其具有强嗜硷性而采取的染色法染色的。List (1885) 最先用俾斯麦棕 (Bismarck brown) 染粘蛋白, Hardy 和 Westbrook (1895) 则用俾斯麦棕的酒精溶液染水溶性粘蛋白和粘多糖。同年, Heine (1895) 对染色质的性质进行了一些

重要的观察,他发现染色质的一些片段可被米伦试剂 (Millon's reagent) 深染,并用甲基绿 (methyl green) 和玉红 S (rubin S) 的混合液试图区分核蛋白和核酸,但未能成功。1895 年,Macallum 证实,经硫酸处理后,核就能用常用的显示组织中铁的方法染色。从此以后,关于铁是否确实存在于核内或是由它处吸收而来的问题,曾有过长期的争论。

十九世纪末应用的酶分析法,在 Mall (1891) 的研究中已有记述。他研究了胶原蛋白在各种溶液中的膨胀作用及粗制胃蛋白酶和胰蛋白酶对胶原蛋白的作用。那时,现代的酶分析作用概念还未建立。1896 年 Daddi 首次用苏丹 III (Sudan III) 做离体的脂肪染色,使动物食入染色的脂肪后,借出现的红色证明组织中的脂肪。1901 年 Michaelis 提出用苏丹 IV (Sudan IV) 作脂肪染色。这位学者指出,用苏丹染料染脂肪纯属物理作用,是由于这种惰性的染料溶于脂肪的结果。

在显示组织中无机盐的方法里,应该提到 Molish (1893) 的方法,他利用把组织中的铁变为红色的硫氰酸铁的方法来染色;还有 Lilienfeld 和 Monti (1892) 提出的显示磷酸盐的钼酸氨法。这个方法经 Pollacci (1900) 修改,其后在二十世纪又进一步由其它学者加以修改。de Michele (1891) 显示汞的方法,是用 H_2S 把汞变为硫化汞,这是显示组织中金属盐的若干类似方法的先驱。1901 年 von Kossa 记述了显示组织中钙的方法 (其实此法显示的是磷酸根), 现仍在使用;甚至在此以前由 Schujeninoff (1897) 叙述的更特异的“石膏 (gypsum) 法”,也保留至今。

以上关于组织化学历史的简短介绍,也许未能给读者一个这门科学是如何不断发展的真实感觉。这至少有一部分原因是确实缺乏这样的连续性。虽然如此,Raspail 奠定的组织化学和他所阐述的一些原理,从 1820 年到本世纪一直没有大的间断,从而得以继续下来。十九世纪末,大多数组织学家注意收集由于新染色技术的发展所带来的丰富成果,很少有人顾及组织化学的工作。因此,这门科学几乎处于停滞不前的状态,仅仅由于少数人的工作才得以残存,直到二十世纪三十年代才复兴起来。由于 Lison 的著作 *Histochimie Animale* 的问世,使组织化学建立在现代的基础上,成为组织学的一个独立分支。从那时起,组织化学的发展和进步很快,在二十世纪的后半期,可以设想,大多数使用光镜和电镜的形态学家都愿意在他们所从事的工作中,“微量化学地来识别”组织中的某些物质。

马仲魁译 虞光明 杨 进校

参 考 文 献

- Altmann, R. (1886) 'Studien über die Zelle.' Leipzig.
Altmann, R. (1889) *Arch. Anat. Physiol. Lpz. Physiol. Abt.*, p. 524.
Baker, J. R. (1943) *J. Quekett micr. Cl.*, 4 ser., 1, 256.
Baker, J. R. (1945) 'Cytological Technique.' 2nd Ed., Methuen, London.
Barka, T. and Anderson, P. J. (1963) 'Histochemistry. Theory, Practice and Bibliography.' Hoeber, New York.
Beale, L. S. (1861) *Arch. Med. Lond.*, 2, 179.
Bencke, A. (1862) *Korrespbl. Ver. Gemeinsch. Arbeiten*, 59, 980.
Berdez, I. and Nencki, M. (1886) *Arch. exp. Path. Pharm.*, 20, 346.
Bernard, C. (1859) 'Leçons sur les Propriétés Physiologiques et les Altérations Pathologiques des Liquides de l'Organisme.' Vol. 2. Paris.

- Bourne, G. H. (1953) 'An Introduction to Functional Histology.' Churchill, London.
- Brandenburg, K. (1900) *Munch. med. Wschr.*, 47, 183.
- Brachet, J. (1940a) *C. R. Soc. Biol., Paris*, 133, 88-90.
- Brachet, J. (1940b) *C. R. Soc. Biol., Paris*, 133, 90-91.
- Brachet, J. (1942) *Arch. Biol.*, 53, 207-209.
- Brachet, J. (1944) 'Embryologie chimique.' Desoer, Liège.
- Brachet, J. (1946) *Experientia*, 2, 142-144.
- Bunge, G. (1887) 'Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie.' F. C. W. Vogel, Leipzig.
- Burstone, M. S. (1962). 'Enzyme Histochemistry and its Application in the Study of Neoplasms.' Academic Press, New York.
- Casselmann, W. G. B. (1959) 'Histochemical Technique.' Methuen, London.
- Caventou, J. B. (1826) *Ann. Chim. Phys.*, 31, 337.
- Chamot, E. M. and Mason, C. W. (1930) 'Handbook of Chemical Microscopy.' New York.
- Colin, J. J. and de Claubry, H. G. (1814) *Ann. Chim.*, 90, 87.
- Cornil, V. (1875) *C. R. Acad. Sci., Paris*, 80, 1288.
- Culling, C. F. A. (1974) 'Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques.' 3rd Ed., Butterworths, London.
- Daddi, L. (1896) *Arch. ital. Biol.*, 26, 143.
- Danielli, J. F. (1953) 'Cytochemistry.' Wiley & Sons, New York; Chapman and Hall, London.
- Ehrlich, P. (1878-79) *Verh. physiol. Ges. Berlin*, 20.
- Ehrlich, P. (1885) 'Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus.' Berlin.
- Ehrlich, P. (1903) 'Encyclopadie der Mikroskopischen Technik.' Urban and Schwarzenberg, Berlin and Wien.
- Eränkö, O. (1955) 'Quantitative Methods in Histology and Microscopic Histochemistry.' Karger, Basel and New York.
- Fischer, A. (1899) 'Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas.' Leipzig.
- Flemming, W. (1876) *Arch. mikr. Anat.*, 12, 434.
- Flemming, W. (1882) 'Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung.' Leipzig.
- Frey, H. (1867) 'Handbuch der Histologie und Histochemie des Menschen.' Leipzig.
- Frey, H. (1874) 'Histology and Histochemistry of Man.' Trans. Baker, A. F. J. London.
- Fürnrohr, R. (1850) *Flora*, 8, 641.
- Glick, D. (1949) 'Techniques of Histo- and Cyto-chemistry.' Interscience, New York.
- Gomori, G. (1952) 'Microscopic Histochemistry.' Chicago University Press.
- Gram, C. (1884) *Fortschr. med.*, 2, 185.
- Graumann, W. and Neumann, K. (Eds.) (1958) 'Handbuch der Histochemie', Vol. I, Allgemeine methodik. G. Fischer, Stuttgart.
- Greenstein, J. P. (1943) *Sci. Monthly*, 57, 523.
- Griesbach, H. (1886) *Z. wiss. Mikr.*, 3, 358.
- Hardy, W. B. and Wesbrook, F. F. (1895) *J. Physiol.*, 18, 490.
- Harms, H. (1931) *Apotheker-Zeitung.*, No. 90, p. 1454.
- Harms, H. (1932) *Ibid.*, Nos. 83, p. 1274; 84, p. 1293; 85, p. 1307; and 86, p. 1324.
- Heidenhain, R. (1868) *Stud. physiol. Inst., Breslau*, 4, 88.
- Heidenhain, R. (1870) *Arch. mikr. Anat.*, 6, 368.
- Heine, L. (1895-96) *Hoppe-Seyl. Z.*, 21, 494.
- Hertwig, G. (1929) 'Histochemische Methoden.' In von Möllendorff's 'Handbuch der mikroskopische Anatomie des Menschen.' Berlin.
- Heschl, A. (1875) *Wiener med. Woch.*, 25, 714.
- Hoffmann, R. (1853) *Ann. Chem. Pharm.*, 87, 123.
- Hoyer, H. (1890) *Arch. mikr. Anat.*, 36, 310.
- James, J. (1970) *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 217.
- Jensen, W. A. (1962) 'Botanical Histochemistry, Principles and Practice.' W. H. Freeman, San Francisco.
- Jurgens, R. (1875) *Virchows Arch.*, 65, 189.
- Kiszely, G. and Pósalaky, Z. (1964) 'Mikrotechnische und Histochemische Untersuchungsmethoden.' Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Klebs, E. (1868) *Z. med. Wiss.*, 6, 417.
- Klein, G. (1929) 'Praktikum der Histochemie.' Berlin.
- Knecht, E. (1888) *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 21, 1556.
- Kossa, J. von (1901) *Beitr. path. Anat.*, 29, 163.
- Kossel, A. (1882) *Hoppe-Seyl. Z.*, 7, 7.
- Kossel, A. (1886) *Ibid.*, 10, 248.
- Kossel, A. and Mathews, A. (1898) *Ibid.*, 25, 190.
- Langhans, Th. (1870) *Virchows Arch.*, 49, 117.
- Lehmann, C. G. (1842) 'Lehrbuch der physiologischen Chemie.' Leipzig.
- Lehmann, C. G. (1851) 'Physiological Chemistry.' Trans. Day, G. E. London.
- Lehmann, C. G. (1883) 'Traité de Chimie Physiologique.' Paris.
- Leitgeb, H. (1888) *Mitt. bot. Inst., Graz*, p. 113.
- Liebermann, L. (1887) *Zbl. med. Wiss.*, 25, 321.
- Lilienfeld, L. (1893) *Arch. Anat. Physiol., Lpz. Physiol. Abt.*, p. 554.
- Lilienfeld, L. and Monti, A. (1892) *Z. wiss. Mikr.*, 9, 332.
- Lillie, R. D. (1954) 'Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.' 2nd Ed. Blakiston Co., New York (3rd Ed. 1965).

- Lillie, R. D. (1972) *J. Histochem. Cytochem.*, 20, 295.
- Linderström-Lang, K. (1936) *Arch. exp. Zellforsch.*, 19, 231.
- Link, D. H. F. (1807) 'Grundlehren der Anatomie und Physiologie der Pflanzen.' Julius Friedrich Druckwerte, Göttingen, pp. 50-51.
- Lison, L. (1936) 'Histochemie Animale.' Gauthier-Villars, Paris.
- Lison, L. (1953) 'Histochemie et Cytochimie Animales.' Gauthier-Villars, Paris.
- Lison, L. (1960) 'Histochemie et Cytochimie Animales.' Vols. I and II, Gauthier-Villars, Paris.
- List, J. H. (1885) *Z. wiss. Mikr.*, 2, 145.
- Luppa, H. (1977) 'Grundlagen der Histochemie.' 2 Vols. Akademie-Verlag, Berlin.
- Macallum, A. B. (1895) *Quart. J. Micr. Sci.*, 38, 175.
- Macallum, A. B. (1908) *Ergebn. Physiol.*, 7, 552.
- McManus, J. F. A. and Mowry, R. W. (1960) 'Staining Methods, Histologic and Histochemical.' Hoeber, New York.
- Mall, F. (1891) *Abh. sächs. Ges. (Akad.) Math-phys.*, 1/1, 299.
- Mann, G. (1890) *Trans. bot. Soc., Edinb.*, 18, 429.
- Mann, G. (1902) 'Physiological Histology.' London.
- Marchi, V. (1892) *Arch. ital. Biol.*, 17, 191.
- Marinesco, G. (1920) *Ann. Acad. Roum., Ser. 2*, 38 mém. sect. sci. pp. 424-483.
- Mathews, A. (1898) *Amer. J. Physiol.*, 1, 445.
- Mellors, R. C. (1955) 'Analytical Cytology.' McGraw-Hill, New York.
- Mellors, R. C. (1960) 'Analytical Cytology', 2nd Ed. McGraw-Hill, New York.
- Michaelis, L. (1901) *Virchows Arch.*, 164, 263.
- de Michele, S. (1891) *La Riforma Medica*, p. 169.
- Miescher, F. (1871a) 'Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen.' *Med. Chem. Untersuch.*, 4, 441.
- Miescher, F. (1871b) *Hoppe-Seyl. med.-chem. Untersuch.*, p. 441.
- Miescher, F. (1873) *Verh. naturf. Ges., Basel*, 6, 138.
- Miescher, F. (1874) *Verh. naturf. Ges., Basel*, 6, 138.
- Millon, A. N. E. (1844) *C. R. Acad. Sci., Paris*, 18, 1041.
- Mohl, H. (1831) *Flora*, 15, 417.
- Molisch, H. (1893) *Ber. deutsch. bot. Ges.*, 11, 73.
- Molisch, F. (1913) 'Mikrochemie der Pflanzen.' Fischer, Jena.
- Needham, J. (1950) 'Biochemistry and Morphogenesis.' Cambridge University Press, p. 5.
- Neumann, E. (1888) *Virchows Arch.*, 111, 25.
- Parat, M. (1927) *Biol. Rev.*, 2, 285.
- Patzelt, V. (1928) In 'Fortschritte der Mikrochemie.' Eds. Klein, G. and Strebing, R. Vienna.
- Payen, A. (1843) *Mem. Acad. Sci., Paris*, p. 163.
- Pearse, A. G. E. (1951) *J. clin. Path.*, 4, 1.
- Perls, M. (1867) *Virchows Arch.*, 39, 42.
- Policard, A. and Okkels, H. (1932) 'Die Mikroveraschung als histochemische Hilfsmethode.' In Abderhalden's 'Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden.' Berlin.
- Pollacci, G. (1900) *Att. Ist. bot. Univ. Pavia*, 2 ser., 6, 15.
- Prenant, A. (1910) *J. anat. Physiol.*, 46, 343.
- Puchtler, H., Meloan, S. N. and Brewton, B. R. (1975) *Histochemistry*, 41, 185.
- Quinke, H. I. (1868) Referred to in *Arch. exp. Path. Pharmacol., Leipzig*, 37, 183, 1895-96.
- Raspail, F. V. (1825a) *Ann. Sci. nat.*, 6, 224.
- Raspail, F. V. (1825b) *Ibid.*, 6, 384.
- Raspail, F. V. (1829) *Ann. Sci. Observation*, 1, 72.
- Raspail, F. V. (1830) 'Essai de Chimie Microscopique Appliquée à la Physiologie.' Paris.
- Raspail, F. V. (1833) 'Nouveau Système de Chimie Organique.' Paris.
- Raspail, F. V. (1834) 'A New System of Organic Chemistry.' Trans. Henderson, W. London.
- Raspail, F. V. (1845) 'Manuel-annuaire de la santé.' Paris.
- Recklinghausen, F. D. von (1889) 'Tagebuch der 62.' *Versammlung Dtsch. Naturf. Ärzte*, S324, Heidelberg.
- Reichl, C. (1889) *Monatschr. Chem.*, 10, 317.
- Robin, C. and Verdeil, F. (1853) 'Traité de Chimie Anatomique.' J. B. Baillière, Paris.
- Romeis, B. (1932) 'Histochemische Methoden.' In Boehm and Oppel's 'Taschenbuch der mikroskopischen Technik.' Munich.
- Sachs, J. (1865) 'Handbuch der Experimental Physiologie der Pflanzen.' Engelmann, Leipzig.
- Sachs, J. (1887) 'Lectures on the Physiology of Plants.' Clarendon Press, Oxford.
- Saint-Hilaire, C. (1898) *Hoppe-Seyl. Z.*, 26, 102.
- Sandritter, W. (Ed.) (1964) 'Hundert Jahre Histochemie in Deutschland.' F. K. Schattauer, Stuttgart.
- Schiff, H. (1865a) *C. R. Acad. Sci., Paris*, 60, 32.
- Schiff, H. (1865b) *C. R. Acad. Sci., Paris*, 60, 913.
- Schiff, H. (1866) *Liebigs Ann. Chem.*, 140, 92.
- Schiff, H. (1867a) *C. R. Acad. Sci., Paris*, 64, 182.
- Schiff, H. (1867b) *Bull. Soc. Chim.*, 7, 443.
- Schleiden, M. J. (1838) *Ann. phys. Chem.*, 43, 391.
- Schlossberger, J. E. (1856) 'Die Chemie der Gewebe des gesammten Thierreichs.' Leipzig.
- Schujeninoff, S. (1897) *Z. Heilk.*, 18, 79.
- Schwarz, F. (1887) *Beitr. Biol. Pfl.*, 5, 1.
- Spannhof, L. (1964) 'Einführung in die Praxis der Histochemie.' Gustav Fischer, Jena.
- Stirling, W. (1875) *J. Anat. Physiol.*, 10, 185.
- Stöhr, P. (1882) *Arch. mikr. Anat.*, 20, 221.