

Q-336
0638

生物学染色剂

H.J.科恩

科学出版社

生物学染色剂

H. J. 科恩 著

王 文 译

科学出版社

1966

H. J. CONN

BIOLOGICAL STAINS

(Revised with the assistance of E. H. Stotz and M. A. Darrow)

(A Handbook on the Nature and Uses of the
Dyes Employed in the Biological Laboratory)

Biotech Publications, Geneva, N. Y., U. S. A. 6th Edition, 1953

本书的内容,着重地介绍了生物学染色剂的化学性质及其用途,其目的为使生物学家合理地使用染色剂;此外,还介绍了某些常用染色剂的检定方法。本书第一版是在1925年出版的,颇受到广大读者的欢迎,到了1953年已出至第六版了,此中译本是根据第六版翻译的,而且第六版还有原著者H. J. 科恩教授的同事E. H. 斯托茨和M. A. 达罗二人参加增订工作,因此比以前的版本更臻完善了。

本书可供生物学家、医学家、农学家、微生物学家、以及病理学家进行生物学染色时参考之用。

生物学染色剂

[美] H. J. 科恩 著

王 文 译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

北京市书刊出版业营业登记证出字第061号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1958年6月第一版 开本:850×1168 1/32

1966年4月第六次印刷 印张:10 3/16

印数:3,001—8,800 字数:248,000

统一书号:13031·675

本社书号:1177·13—6

定价:[科七] 1.70 元

第一版序言

在六十及七十年代，当微生物学家开始使用染色剂时，由于需用量太少，自然不必要有一个特殊的供应中心。因此，他们就不得不用紡織物染料，而这些染料在当时是很粗制的，在組成上也不一致。但是，经过若干年以后，生物学染色剂需用量有了增加，于是在德国便首先成立了以 Dr. G. Grübler 公司为名的生物学染色剂經售商。这个公司不是像人們所設想的那样，它并不自制染料；但是在另一方面不应否認，它的創立者对于科学作出了杰出的貢獻，使微生物学家能够得到恒定而可靠的染料。据悉，Grübler 医师是用显微鏡檢查染色剂的；根据他的經驗如果認為某批染料合用，他就大批購入、分装并且用他自己的名义包装以供若干年内出售。然而，这只是用經驗法作为标化依据的，所以这个公司对于批号不同的一些染料还無法求得組成上的一致。事实証明眞实情形正是这样。

为了使标化方法符合近代科学知識，在美国最近組成一項合作机构專門从事这一工作。这件事是在大战之后在缺少染色剂的情况下开始的，其目的为在不能获得外来貨源时求得可靠的国内貨源的供应。自此以后，它的業務范围扩大了；在目前外来貨源又可供应时，这一工作的目的，是对染色剂，無論是国貨或是外貨进行科学檢驗。实际上，直到現在还只是就国貨样品作了常規工作。这并不是因为对外貨有任何偏見，而是由于有实际上的困难。

这项工作是通过一个称为生物学染色剂标化委员会的組織进行的。这个委员会成立于1922年，原先隶属于国家研究評議會，但現已脫离成为单独組織。实际上，它是一个有下列各学会代表参

加的混合委员会：美国化学会，美国细菌学家学会，美国动物学家学会，美国植物学会，美国病理学家及细菌学家联合会及美国解剖学家联合会。它拥有60位由生物学家和上述各学会会员组成的委员，这些委员按照他们各自的特长，协助染色剂的检查和试验。它还取得了化学家、染料制造厂和染色剂商的合作，从而就能保证即时供应生物学家的需要。它的事务是由五个委员（目前是由细菌学、植物学、染料化学、病理学及动物学会会员为代表的）组成的执行委员会主持的，而本书的编写亦为该委员会任务之一。然而，本书著者只用了委员会主席一个人的名义，这是为了明确责任，同时又可使编排资料索引工作简化一些。实际上，其它委员也曾给予了极大的帮助，所以应该认为是本书的共同著者。因此，委员会主席于此向他们表示感谢。没有他们的合作，这项工作几乎是不可能完成的。

本书的主旨是把委员会组成以后所积累的资料合理地表达出来。它不是一篇染料化学或是镜检技术的论述，虽则其中包含有这两方面的资料。为了力求把它写成为一本能为生物学家接受的形式书，所以作了有关生物学染色剂的染料化学原理介绍，并且就生物学染色剂的适用性加以讨论，所引述的数据一部分是委员会保有的，一部分是由文献得来的。著者深悉，在主题讨论上是不完全的，特别是关于染料的生物学使用那一方面。染色剂的主要使用法已尽力列写了出来，有一些古老方法只是为了历史意义提了一提；著者认为其中必然有很多遗漏的地方，因此希望读者赐予指正。

著 者

第六版序言

本书的一般目的已在第一版序言中作了说明。随后编写的各版次，在内容方面逐有增多，叙述也较详，但其目的及适用范围未曾有所改变。

和以前各版次相较，这一次出书经历了一段较长的时间（七年）。推其原，这并非是由于缺乏这方面的新材料，而是因为难于把这些材料用最好的方式表达出来。在本版中所增补的新染料数不如以前为多，但组织化学试剂则有不少的添加。组织化学试剂本身虽非染料，惟如用于组织，则可与所欲检出的化合物发生显色作用。

组织化学这一门学科的重要性已日益显见，目前并有专书出售。因此，本书只就有关文献加以介绍，而未尝试图详细叙述此主题。例如，某些染料及染料样试剂的组织化学用法均为本版新增添的内容。

本版的另一个主要变更是在染色剂鉴别法方面占了较多的比重。所有以前各版次已经提到过分光光度计的测量及其在染料鉴别中的应用；然而除了叙述各个染色剂的最大吸收点（有时尚未获得完全证实）外，这些资料大部分被省略了。目前，由于生物学染色剂委员会已积累有较丰富的实验数据，因而为本书的增订，提供了条件。例如，书内印出的二十多幅曲线图都是委员会的试验室在二十多年期间对同一染料收集得的无数批样品作成的比较结果。这些曲线代表着各有关染色剂的标准样品。借此曲线不但可以作出染色剂的鉴别，而且有助于使用者明悉染料的光学特性以及合理使用。

色層分析用于染料的鑒別还是一个比較新穎的方法。本書对此未作詳細討論。其重要性固不待言，但是由于使用方法尚未經充分标化，自然不能用作常規檢查。本書曾就这方面的文献稍加介紹，以期今后能有更多的研究成果，使这一方法成为更为有用的一种工具。

在編排上，本版也略有更动。書的前部有一章染色的理論；此外，又加入一章包括杂类染料、顏料及組織化学試剂的叙述。

著 者

目 录

第一版序言	i
第六版序言	iii
第一章 染色剂的使用和标定	1
(一) 什么是染色剂	1
(二) 染色剂發展史	1
(三) 染色剂的应用	3
(四) 染色剂的近代标定	6
第二章 染料的一般性質及其分类	9
(一) 苯	9
(二) 分子結構和顏色的关系	11
(三) 酸性染料和鹼性染料	13
(四) 發色团	15
(五) 無色化合物	17
(六) 染料的分类	19
(七) 染料的命名和索引	22
(八) 染料的溶解度	23
(九) 杂质对于染色强度的影响	24
(十) 檢定方法	25
(十一) 組織化学試剂	26
第三章 染色的理論	27
第四章 染料的分光光度測定及色層分析	36
第五章 硝基及偶氮染料	46
(一) 亚硝基染料(醌肟类)	46
(二) 硝基染料	47
(三) 偶氮染料	49

1. 单偶氮染料	51
2. 双偶氮及多偶氮染料	64
第六章 酰亚胺染料	79
(一) 吡啶类	79
(二) 吡酚类	80
(三) 噻嗪类	81
(四) 噻嗪类	92
(五) 噻类	99
1. 氨基噻类或优咯啉类	100
2. 碱性藏花红类	102
3. 吡啶类	108
第七章 苯甲烷染料	110
(一) 二苯甲烷衍生物	112
(二) 三苯甲烷衍生物	113
1. 二氨基三苯甲烷类	113
2. 三氨基三苯甲烷类(品红碱类)	117
3. 羟基三苯甲烷类(玫红酸类)	137
(三) 二苯基萘基甲烷衍生物	139
第八章 吡啶染料	142
(一) 派罗宁类	142
(二) 蕊香红类	145
(三) 荧光酚酞衍生物(曙红类)	147
(四) 酚酞及磺酞类	159
(五) 吡啶染料	168
第九章 天然染料	172
(一) 靛蓝类	173
(二) 虫红产物	174
(三) 地衣素及石蕊	177
(四) 巴西木素及苏木素	179
第十章 杂类染料、颜料及组织化学试剂	184
(一) 蒽醌染料	184

(二) 噻唑染料	188
(三) 噻啉染料	190
(四) 重氮盐及四重氮盐类	191
(五) 四唑盐类	193
(六) 矿物颜料	195
第十一章 中性染色剂	197
(一) 三酸染色剂	199
(二) 噻嗪曙红盐	200
(三) 其他复合染色剂	206
附录一 生物学染色剂检查法	207
附录二 资料及配方	257
附录三 各种染色剂的用途	268
参考文献	300
染料译名及索引	313

第一章 染色剂的使用和标定

(一) 什么是染色剂

“什么是染色剂以及它们和染料怎样区别?”这是人们常常提出来的一个问题。回答很简单,染色剂就是染料,仅仅不过是供作特殊目的使用而已。染料制造者通常把染料分为二类,一类供一般使用,一类供生物学用。在他们看来,生物学染料应自成一类,因为在制造这类染料时,要特别加以注意,制成以后还须经过严格的标定,才能保证合乎应用。但是,对于生物学家来说,“生物学用品”之中包括好几种产品,并非全部都是染色剂;有些是药用染料,有些是抑菌剂,还有一些是指示剂,这些自然不是真正的染色剂,但是也被染料制造者列为同类。严格说来,生物学染色剂是指一些可供显微镜检查(镜检)用的染料,使实物在染色以后,清晰可见。这类染料也可作纺织物染色用,只是生物学中所用的染料,通常要求特殊的规格。药用染料和指示剂,在化学上和染色剂极为相似,所以本书也一并略加叙述。

(二) 染色剂发展史

如今人们知道,镜检人员一定要用染色剂的,但是很难想像,有很多重要的工作是在开始使用染色剂以前,就用显微镜检查法做出来了。当然,在那个时候有那样成就是很困难的,需要苦心钻研,需要有耐心和目力;如果我们试读一些古老的出版物,将会使人们怀疑在那上面所描述的细微结构,是不是真地能被看出。

由于染色剂的使用,使鏡檢技术起了革命。在最早(約在 1850 年),用的还是一些天然染料,如胭脂紅和靛藍;到后来,自从苯胺染料首次(1856 年)出現于市場以后,进展得便很快了。

关于早先使用染色剂的記載,据 Gierke (1884) 引述,开始于 Hill (1770),往后是 Ehrenberg (1838), Göppert 及 Cohn (1849)。直到 1858 年, Gerlach 在他所写的一篇文章里,他提出了組織学中使用染色法(用胭脂紅)的重要性。因此,当时人們,特别是在德国,都把 Gerlach 推崇为“染色之父”。然而,根据近代人的考証 (Lewis, 1942),远在 1714 年, Leeuwenhoek 在致英国皇家学会的一封信(1719 年出版)中,就曾經提到过用藏紅花 (saffron) 作肌纖維切片染色进行了鏡檢;他用这种染料,可使肌纖維中的微粒易于見出。

所以,首先使用染料作显微鏡檢查的人,究竟是誰,目前很难說;只知道当时的确使用过一些天然染料,如靛藍、茜草、藏紅花和商陆 (*Phytolacca*)。

在这些先鋒工作者之后,染色法的發展就快了,特别是 Waldeyer (1863 年) 倡用苏木素并經 Böhmer (1865) 更成功地应用之后, Beneke (1862) 倡用苯胺染料以及 Böttcher (1869) 倡用酒精析色 (differentiation) 之后,更为迅速。差不多每年都有一些新的、極為重要的染色技术被推荐出来。有时是用原先人們不知道的染料来显示某种特殊結構;有时是把几种染料做成复合染料以供某些特殊目的使用;还有时是用老的方法借近代仪器和技术来检查从前人們所不能看到的細微結構。

近年以来,在显微鏡設計方面,也發生了一种根本性的变化;这种变化虽然和染色無关,例如电子束、X 射綫、位相差、反射光学等新的应用,但是可以断言:如果組織化学随之有了相应的發展,終必使染色剂的需要逐步消除。

(三) 染色剂的应用

此处仅就染色剂的应用作一个简短的综述；至于更详细的说明，见本书各有关章节。此外，Mann (1902)、Ehrlich (1910)、Krause (1926—27)、Lee (1950)、及 McClung (1951) 等氏著作，亦可供参考。

1. 动物组织学 虽然染色剂最早是应用在植物学方面，但近代组织学方法是从动物学材料发展起来的。因此，染色剂首先是在动物组织学中获得广泛的使用，较在植物学中有更多的染色方法，并且使用更多种的染料(如下所述，这对细胞学方法来说，便不是这样)。

第一类是普通组织染色剂。这是由一种、两种有时甚或三种染料组成的染色剂，目的是要通过普通动物组织切片的染色，把细胞核和细胞质以及各种类型的组织区分开来。在这一类染色剂之中，以苏木素为最著名，或者单独使用，或者和一种对比染色剂(counterstain)，例如曙红-Y 或刚果红或碱性藏花红(safranin)联合使用。苏木素和曙红联合使用是最常用的一个方法，所以有时简称为苏曙染色剂。此外，普通组织染色剂还包括若干种由碱性染色剂如结晶紫、亚甲蓝或是一种天青(azure)和对比染色用的酸性染料如曙红所做成的染色剂；前一染料用作核染色，后一染料用作细胞质染色。

第二类是结缔组织染色剂。这是普通染色剂的一种特殊应用，因为有些能使结缔组织和弹性硬胚易于显色的染色剂，也是很好的普通染色剂。这样分类虽然较粗略，但在实用上很方便。例如 Mallory 氏所倡用的三联染色(需用苯胺蓝，橙黄-G 及酸性品红)便是有名的结缔组织染色法。这一染色法的特点是在最后加用染色液之前，先用磷钨酸作媒染。若干年来，Mallory 氏染色法已经有了好多种的改良，有些方法甚至把苯胺蓝也完全省去。除此以

外,还有一些是杂类的二联、三联甚或四联染色剂;用 Mallory 氏磷钨酸苏木素法染色时,由于染料具有强烈的多色性,所以無需使用对比染色剂,就可正确地区別結締組織。

在动物組織学中所用的第三类重要方法是神經組織染色。这一类方法很多,并且都是专用的。实际上其中有許多不是染色法,而是有賴于銀盐的浸渗作用 (impregnation), 即当銀盐浸渗了神經組織以后乃成为显見的金屬銀,由于銀剂法不需使用染料,所以本書将不加以叙述。

除上述三类方法以外,对于其它組織或体液也有特殊的染料。例如脂肪染色須用特殊的油性染料,如四号苏丹紅(Sudan IV)。血液有它专用的染色法,其中多数要用复合染色剂,例如用曙紅或是一种相类的染料使与亚甲藍类染料混合物作用而制成的一种染色剂;这种复合染料也可供骨髓染色用。骨染色多数須用茜素紅-S (alizarin red S), 这一染料对于曾經用碱处理过的小骨标本尤为适宜。

2. 組織化学 以上所說的染色法,有許多可以用來說明組織的化学性質。有些染色学說設想了化学亲和力来解釋鑒別染色;但是这些学說都沒有进入深入的探討,主要是因为染料通常是应用在固定了的組織,而后者的化学性質和自然状态存在的不尽相同。

自从快速冷冻法有了發展以后,組織化学家就不再使用化学固定法了,因而被檢材料更能代表自然状态。加之,近年以来由于一方面在酶的研究工作以及另一方面在各个核酸鑒別上的成就,也逐漸使得这些学者有了标准来評定那些染色剂或試剂对于某种細胞化学組成有特殊性。其中特別重要的一个例子是在用某些氧化剂以后,用錫夫氏 (Schiff) 試剂 (品紅亚硫酸) 来鑒別粘多糖类 (mucopolysaccharides)。

3. 植物組織学 植物組織学染色大致可分为普通組織染色剂

和木組織染色剂二类。最常用的染料有苏木素和鹼性藏花紅；前者可供普通組織染色用，也可供木組織染色用；后者是一种很好的核染色剂，以綠色或藍色染料作对比染色时，結果最为优良。

有些特殊組織，例如組織中霉菌染色以及柱头中花粉管染色等，須用由特殊染料組成的染色剂。所使用的染料很多，如硫堇 (thionin)，橙黃-G，馬提渥黃 (martius yellow)，孔雀綠，酸性品紅，甲基綠，胭脂紅，鹼性品紅及树脂酚藍 (lacmoid)。但是如前所述，用于植物組織学中的染色方法为数較在动物学中者为少。

4. 植物細胞学 以上所說的，只是指普通組織学而言，但在細胞学中就不然了。最早的細胞学工作是用植物材料来做的，这或許是因为用植物更容易看得到快速分裂的細胞(分生組織)。因此，植物細胞学中所用的染色方法發展得很快。其中最著名的要算：苏木素法的改良法，Flemming 氏三联染色剂 (結晶紫、鹼性藏花紅及橙黃-G)，以及作为新鮮花粉囊标本染色用的醋酸胭脂紅法。此外，还有很多种由結晶紫或由鹼性藏花紅和某些对比染色剂組成的特殊染色剂，也可使用。

有許多染料無論在动物或是在植物显微技术中都用得上，但是有一些染料只能用在这两类中的一类。例如，胭脂紅和鹼性藏花紅最宜用作植物染色，而亚甲藍在植物学中虽然極少使用，但在动物学中却非常重要。

5. 微生物学 用于微生物方面的染料，为数不多；一般細菌学者只要有亚甲藍、結晶紫和品紅即可滿足需要。实际上，这些細菌学染料是所有生物学染料中用量最多的三种。

細菌細胞学是微生物学中的一个比較新的学科。就正如組織化学一样，在这方面的發展是由于固定法的改良所导致的。往常慣用的細菌染色須先使細菌在玻片上干燥固定，这样做能使細胞变形，并且使其內部結構不易显見。这种粗糙的固定法，今日已被其它不易使細胞变形的的方法所代替，因而細菌細胞学才逐漸有了

新的内容。

細菌染色法(細胞学除外)可分为二类;用于干塗片的細菌染色剂和用于組織中的細菌染色剂。前者通常比較簡單;其中最复杂的是革兰氏染色法。这个方法須用結晶紫和一种对比染色剂,因为有些細菌种类能染上紫色染料,有些能染上对比染色剂,借此可以把各类細菌区分开来。組織中細菌所用的染色法基本上就是組織学方法;其目的并不在于鑒別各种組織,而是用来区别存在于組織中的細菌。

細菌染色的一个重要应用是对疾病的診斷,結核和白喉就是最明显的例子。

(四) 染色剂的近代标定

早先生物学家所用的染色剂,都是紡織工業用的染料;但是由于品質不一,甚至以同一牌号出售的商品也不常能保証合乎使用。为了改进这种情况,在1880年,德国萊比錫Grübler医师受Weigert教授的囑托專門从事苯胺染料,尤其是鏡檢用染料的檢查,并且还成立了一个以Grübler为名的公司經營各种染色剂的銷售。不是如一般人相信的那样,这个公司并不制造染料,据推測它只是靠着显微鏡的檢查,如果經驗証明这批染料合用,于是它就大量地买进、分装、再貼上自己公司的名称,以供若干年内出售給生物学家使用。毫無疑問,这个公司以及后来和它發生关系的一个公司*不仅在国际上享有極大的声誉,并且在科学上作出了一定的貢

* Grübler在起初成立的只是一个試驗室(Physiol.-Chemisches Laboratorium, Dr. Georg Grübler),經營染料及其它生理化学用品,后来改成一个公司(Dr. G. Grübler & Co.)專門从事染料經營。直到1896年,Grübler退出了这个公司,在另处成立了一个試驗室并繼續供应一些染料給Dr. G. Grübler & Co.在1897年Grübler又把新成立的那个試驗室(Dr. G. Grübler's mikroskopisch-chemisch-bakteriologisches Laboratorium)出售給Hollborn医师。从此这个試驗室遂改称为Dr. K. Hollborn & Söhne。此后若干年内,这两个公司繼續在業務上發生关系,一直到1921年,才各自銷售自己的商品。

献——虽然它们所用的标定方法或许是以经验为依据的，还不完全能保证不同批号的同一制品在成分上做到绝对一致，但是较之往日已大有改进，它们在生物学染色剂标准化问题上做了头一次杰出的努力。

由于染色剂在微生物学中的应用，使染料成为一种重要的战略物资，这在第一次大战期间即已得到了证明。在此以前，世界各地所有的染料差不多都是来自德国，因为当时其它国家出产的生物学染色剂，威信不高，甚至到了目前，不少的人们还持有这种偏见。造成威信不高的原因，一方面是由于制造方法不划一，一方面是由于生物学染色剂的规格难于订立。在许多情况下，对于某些染料的化学还没有完全明了，即或是了解了，并且证明是纯品，但在实际应用中不一定合乎使用，因为有些染色剂需要含有一些杂质，那怕这些杂质为量极为微少，在性质上也还未能确定。

基于这些原因，美国在1922年成立了生物学染色剂标定委员会（即现今所称的生物学染色剂委员会）。委员会的任务有二：一、通过生物学家和化学家的合作，收集有关染料性质和染料在显微技术应用方面的资料；二、检定各制造厂商的染色剂出品。

目前所用的标定方法，大致分为二类：一类是化学法和光学法；一类是实际效果试验。在评定结果时，尤应对效果试验给予较多的考虑，因为有些批号的染色剂虽在染料含量上较少或在光学特性上略有区别，但经实际试用证明合乎使用，此时则应以试用结果为凭批准出品。

经委员会检定过的某批制品，应由委员会发给“检定合格号”，并须在染色剂名称之后，附以“委员会验证”字样。凡是有验证标

所以，在1921—45期间，德国染色剂都出自这两个公司。它们之间究竟有什么关系，外间不明；它们都各自宣称自己的出品是唯一真正的 Grüber 染色剂。实际上，这两个公司都不自己制造染料，它们所用的配法和检查方法，可能都是 Grüber 传授的。在第二次大战以后，E. Merck 及 Bayer 两个公司取代了它们的市場。