

技术与方法

活性染料在显微技术上的应用*

史少頤 李永生

(北京农业大学解剖学教研室)

随着近代化学工业的发展,应用到显微技术上来的染料日益增多,因此染色方法也随之多样化。在实际工作中,从事于显微镜下研究工作的人,对于染色方法的要求,不外乎希望通过染色显示出来的組織細胞結構愈多愈好,愈清楚愈好,染料和染色过程中所需要的原料容易购得,染色手續簡便,节省時間,易于掌握,以及染色后,色調鮮明醒目等等。但是要求某一种染色方法同时具备以上諸点,确乎难得。因此,多将各种染色方法和染料結合使用,取长补短,以期满足要求。

在組織学方面,多年以来,分化結締組織,特别是胶原纖維,应用最广的方法就是 Mallory 氏方法(1900)。Mallory 氏的原始方法是用 0.1% 酸性品紅(acid fuchsin) 染細胞核,經過磷鉬酸定色之后,用苯胺兰(aniline blue) 橘黃 G (orange G) 混合液复染胞质、胶原纖維及其他。

由于上述方法倘有若干缺点,迄今已有很多修改法,其中最主要同时也是最著名的一种就是 Heidenhain 氏“azan”法(1915)。他用偶氮洋紅 GX 或偶氮洋紅 G (azocarmine GX, azocarmine G) 代替了酸性品紅,染色程序也有相应的改变,染色結果与 Mallory 氏原始法相似,但是染色更加鮮明,同时克服了酸性品紅褪色的缺点,因使胞核着色經久不褪,得到更加广泛地应用。这种方法需要化学藥品种类較多,染色時間长(3—9 小时),手續較繁,不适于染制大量切片,因此对于实验室設備較差和初学者都有一定困难。

另外一种常用于分化結締組織的染色方法是 Julian 氏(1872)提出的苦味酸靛洋紅法(picroindigocarmine),是分化結締組織的最初染色方法之一。这种方法經過 Ramon y Cajal 氏(1896)修改后,应用更加广泛。这种方法是用碱性品紅(basicfuchsin)、洋紅(carmine)或沙黃(safranin)染胞核,苦味酸靛洋紅复染胞质和結締組織。結果胞核呈紅色,結締組織呈藍綠色,肌組織黃綠色,色泽柔嫩,結構清晰美丽。

作者在总路綫的光輝照耀下,本着敢想敢干的精

神,应用我国 1958 年大跃进中染料工业中的新产品——活性染料到显微技术中来,經過試驗,得到一定成果。我們应用的活性染料还只限于一种紅色染料——活性艳紅 7B。目的是探究用活性艳紅 7B 来代替上述染色方法中染胞核的染料——酸性品紅、偶氮洋紅 GX 或 G、碱性品紅、洋紅、沙黃等的可能性。

反复試驗結果,我們制定了两套活性染料染色程序,現在介紹于后。由于作者应用的時間只有一年半,試用的材料还不够广泛,所以还有一定的局限性,愿意提供显微技术工作者参考,并望提出指正。

(一) 活性艳紅 7B-苦味酸-苯胺蓝法:

1. 固定:用 10% 福尔馬林、Bouin、Zenker-Formol、Carnoy、Susa 等固定液皆可得到好的效果。
2. 石蜡切片。
3. 脫蜡后,經各度酒精下降到蒸餾水。
4. 在鉀明矾活性艳紅 7B 染色液中染色,最低 3 分钟。時間稍长(如在染液中过夜),則須要分色時間延長。染色后,組織呈一片鮮紅。

染液配制方法:

活性艳紅 7B	1 克
鉀明矾	2 克
蒸餾水	100 毫升

混合后,煮沸过滤使用。

5. 蒸餾水冲洗后,入苦味酸飽和水溶液中分色,在显微镜下随时检查,到胞质和結締組織纖維呈淡紅即可。分色時間长短視染色時間而定。
6. 入苦味酸-苯胺蓝染色液中染胞质和結締組織纖維,3—5 分钟。時間长短要看对蓝色的要求而定。这一染液对活性艳紅仍有分色作用,宜注意,不可使胞核着色变浅。

苦味酸-苯胺蓝染液配制方法:

* 这篇論文摘要曾于 1959 年在上海召开的全国胚胎学术會議宣讀过。

水溶性苯胺蓝 0.1 克

苦味酸饱和水溶液 100 毫升

7. 水冲洗, 經 50%、70%、95% 酒精分色与脫水, 再經 100% 酒精、100% 酒精二甲苯(1:1)、二甲苯、中性树脂封藏。

(二) 活性艳紅 7B-苦味酸-靛洋紅法:

- 1、2、3、4、5 步骤同上法。

6. 入苦味酸-靛洋紅染色液中染胞質和結締組織纖維等。为了能使纖維着色深, 在这一染液中時間要长些, 相应地在活性艳紅染液中時間要延长, 在苦味酸飽和水溶液中時間可縮短, 即可得到滿意的效果。

染液配制方法:

靛洋紅 0.3 克

苦味酸飽和水溶液 100 毫升

7. 用 0.5% 醋酸水冲洗。

8. 經 95% 酒精分色脫水, 再經 100% 酒精、100% 酒精二甲苯(1:1)、二甲苯、中性树脂封藏。

上述两种染色方法染制出的切片分別与 Mallory 氏法、Heidenhain 氏和 Azan 法、Ramon y Cajal 氏靛洋紅法結果相似。

我們应用的材料有心、脾、肝、肺、腎、小脑、脊神經节、淋巴結、唾液腺、胰、皮肤、气管、乳腺、視网膜、卵巢、精巢等都得到比較滿意的結果。

应用上述方法染制 Bouin 固定的 72 小时 鸡胚切片、Bouin 固定在 70% 酒精中保存达 六年之久的 12 毫米猪胚切片也得到滿意的效果。染制 蛙胚 (Smith 氏液固定, 神經板时期和 3 毫米蛙胚) 則染色程序略有变更。也在此簡单介紹于下:

1. 神經板时期蛙胚切片, 先入苦味酸飽和水溶液中染卵黃顆粒, 水洗后, 入鉀明矾活性艳紅 7B 染液中 5 秒鐘, 水洗, 入苦味酸-苯胺蓝染液中数秒鐘, 染出細胞界限, 經 95% 酒精迅速分色与脫水, 透明后, 中性树

脂封藏。

2. 3 毫米蛙胚切片, 在鉀明矾活性艳紅 7B 染液中染 3 分钟, 入苦味酸飽和水溶液中分色, 直到全部卵黃顆粒呈黄色为止 (約需 2 小时)。入苦味酸-靛洋紅染液数分钟, 0.5% 醋酸水洗, 脫水、透明, 中性树脂封藏。

經過染色后, 胞核呈紫紅色, 胞質黃綠色, 卵黃顆粒呈黄色, 正在消耗中的卵黃呈不同色調的灰綠色。

上述两种染色方法有以下优点:

1. 不要求特殊的固定液, 上面列举的六种常用的固定剂結果都好。
2. 手續簡便, 节省時間, 易于掌握和操作。
3. 染出后色彩鮮明夺目。
4. 不易褪色, 我們曾將染好后的切片放在日光下曝晒近月余, 溫度达 40°C, 活性艳紅 7B 着色仅褪去 20% 左右。

总结上述, 我們认为活性染料——活性艳紅 “7B” 可以用作胞核染料。其染色原理尚不清楚, 有待进一步探討。根据这次实验結果, 推測其他活性染料也可能应用于显微技术。国产染料易得, 而且价廉物美 (每公斤活性艳紅 7B 价值仅 10 元左右), 希望显微技术工作者广泛試用, 不久将来可望不再依靠国外进口生物染料。通过大家的努力, 还望在显微技术上有所創造, 超过国际上传统的技术水平。

在这次研究过程中, 承教研組主任张鶴宇教授, 业师崔之兰教授的鼓舞与指导, 謹向他們致謝。

参 考 文 献

- [1] 孟瑞朝: 1955. 組織病理标本制作法。人民卫生出版社。
- [2] Lillie, R. D.: 1954. Histopathologic technic and practical histochemistry. New York, Blakiston Co., Inc.
- [3] Ромейс, Б.: 1953. Микроскопическая Техника. Москва, Изд. Иностранной Литературы.