

XINMEI
ZUZH
HUAXUE

新酶组织化学

〔日〕 武内忠男 主 编
小川和朗
朱逢春 主译

人 民 卫 生 出 版 社

新 酶 组 织 化 学

〔日〕 武内忠男 主编
小川和朗

朱逢春 主译

邓侠进 孙廷魁
朱逢春 张万盛
杨康成 张耀铮
孟宪昌 崔肇春

译

人 民 卫 生 出 版 社

新 酵 素 組 織 化 学

武内忠男 編集

小川和朗

朝 倉 書 店 1980

新 酶 组 织 化 学

朱逢春 主译

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 27 $\frac{1}{2}$ 印张 4插页 636千字
1983年 11月第1版 1983年 11月第1版第1次印刷
印数：00,001—6,300

统一书号：14048·4378 定价：4.25元

[科技新书目 48—84]

前 言

约在十年前，编者曾出版《酶组织化学》一书。虽然当时该书内容极为新颖，但本学科的发展颇为迅速，故我们早就期待进行再版。然而，我们想与其改版，不如从新的角度，多收集些新资料，多吸收些改进的方法，因此我们决定出版新书，并把本书命名为《新酶组织化学》而出版问世。所以，《新酶组织化学》应属于《酶组织化学》的续篇，读者若能将这两部书对比阅读，定将感到更大的兴趣。

本书把如何特异地证明各种酶的性质，组织内分布及细胞内定位作为重点，详细论述酶的证明法的理论与方法、技术、并论及酶在组织细胞内出现的意义，力图对医学生物学基础研究有所帮助。此外，本书还论述了酶组织化学在医学方面的应用，并考虑了有助于临床医学，特别是诊断和治疗。

酶组织化学最近有惊人的进展，各位执笔者对此都有引用并有所评价。因此，本书对新研究工作者也定大有帮助。

关于酶组织化学的专著，过去只有 Burstone 的《酶组织化学》一书（1962）。此外，酶的组织化学仅在一般组织化学书中列为一个项目。自 Burstone 去世后，该专著不能再版，能够再版的只有我们那一本书了。在酶组织化学的知名学者 Gomori、Burstone 以及 Seligman 均已去世的今天，日本的酶组织化学学者必须有对该学科的进展作出巨大贡献的气魄。在这个意义上，本书必须内容崭新，并能满足学界的要求，故特邀请有关方面权威学者参加执笔。由于执笔者各有所长，所写的内容也都各有特点，这样反而会引起读者的兴趣。

本书不仅对医学生物学界的广大研究者和初学者有用，而且对医师、临床检验技师以及医学生物学的研究生院学生等也均有用。如果能够得到读者的批评指正，同时又能对更多的人有所帮助，编者将喜出望外。

编 者 一九八〇年四月
(朱逢春译)

译者的话

酶组织化学既是一门新兴的学科，又是一项重要的研究手段，所以近年来它已成为异常活跃的一个研究领域。利用酶组织化学方法研究细胞的形态和功能，无需对酶进行提取、分离，就能获得组织内有关代谢的大量信息。对分子生物学或生物化学的研究来说，酶组织化学既可先行指路，又可作为佐证；在认识病理过程的代谢基础及疾病诊断上它也起着特殊重要作用。由武内忠男等主编的《新酶组织化学》收罗了大量近年来在酶组织化学技术方面的新进展，反映了酶组织化学的世界现状。考虑到国内尚无这方面的专著，我们特把此书摘译出来，以飨读者，并期对四化建设有所裨益。

本书的选译是根据译者自己的认识去保留一些常见而较为重要的酶。对选中的酶又以原理、操作及结果判断等为必译内容；对历史的叙述及冗长的讨论则予以删去。但为保持原书概貌，对删去的内容仍保留其标题及参考文献，以便读者查阅。为了减少篇幅及缩短出版周期，译者根据选译内容的要求删去了原书的照片，如有必要读者可根据文献索引去参阅原始图片。由于本书是摘译，部分内容已被删去，因而原书末的索引就失去检索意义。加之，该书目录较为详细，故将书末索引删略。

林钧材教授对本书的翻译工作给予极大的鼓励，他在百忙中对大量稿件进行了审阅，并提了许多宝贵的意见。在此笔者谨向林教授致以诚挚的感谢。本书在翻译中充分发挥了集体的力量与智慧，主要用分译互校的方式进行工作，最后再由笔者仔细审订。在翻译工作中，崔肇春、杨康成除完成分工的任务之外，又对其它不少章节的译文认真地进行内容订正及文字修饰；张耀铮也对其他译者主动给予很多帮助。他们的努力，对本书的出版起了很大的促进作用。

由于译者水平所限，缺点错误在所难免，诚挚地欢迎读者批评指正。

朱逢春

1982年6月

目 录

第 1 章 序论	1
第 2 章 光镜的酶组织化学	6
2.1 酶组织化学的基本理论	6
一、一般的基本理论	6
二、酶组织化学证明法的基本理论	8
2.2 酶组织化学的基本操作	21
酶材料(组织)的处理	21
一、固定	21
二、冰冻切片和冰冻法	22
三、冰冻干燥法	23
四、冰冻溶解法	24
五、固定-冰冻操作法	25
第 3 章 电镜的酶细胞化学	29
3.1 基本操作	31
一、切片的制作	31
二、固定	32
三、浸渍或反应	32
3.2 酶活性的检查	32
一、氧化还原酶	32
二、转移酶	40
三、水解酶	42
四、裂解酶(裂合酶)	51
五、异构酶	52
六、连接酶	52
第 4 章 氧化还原酶	57
一、四唑盐	57
二、电子传递系统和四唑	58
三、脱氢酶的标准证明法	59
四、白细胞的四唑试验(NBT Test)	60
4.1 非依赖脱氢辅酶性脱氢酶	62
4.1.1 琥珀酸脱氢酶	62
4.1.2 二氢乳清酸脱氢酶	64
4.1.3 氨基酸脱氢酶	64
4.1.4 L-古洛糖酸内酯氧化酶	65
4.1.5 胆碱脱氢酶	66
4.2 NAD 依赖性脱氢酶	68
4.2.1 (乙)醇脱氢酶	68

次级醇脱氢酶	69
4.2.2 α -磷酸甘油脱氢酶	69
4.2.3 D-木酮糖脱氢酶	69
4.2.4 山梨醇脱氢酶	69
4.2.5 尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶	70
4.2.6 乳酸脱氢酶	70
混合薄膜培养法	71
4.2.7 β -羟基丁酸脱氢酶	73
4.2.8 苹果酸脱氢酶	73
4.2.9 甜菜醛脱氢酶	74
4.2.10 3-磷酸甘油醛脱氢酶	74
4.2.11 谷氨酸脱氢酶	75
4.2.12 二氢硫辛酸脱氢酶	75
4.2.13 前列腺素脱氢酶	76
4.3 NADP 依赖性脱氢酶	79
4.3.1 异柠檬酸脱氢酶	79
4.3.2 L-己糖酸脱氢酶	80
4.3.3 木糖醇脱氢酶	81
4.3.4 戊糖磷酸途径的氧化还原酶的检测	81
4.4 与类固醇代谢有关的氧化还原酶	86
一、类固醇 3 β -醇脱氢酶	87
二、类固醇 3 β -醇脱氢酶和异构酶	87
三、电子显微镜组织化学	88
四、3 α -羟基类固醇脱氢酶	89
五、11 α -及11 β -羟基类固醇脱氢酶	89
六、17 β -羟基类固醇脱氢酶	90
七、20 α -羟基类固醇脱氢酶	90
八、20 β -羟基类固醇脱氢酶	91
九、各种羟基类固醇脱氢酶	91
4.5 丙酮酸氧化酶	95
4.6 L-古洛糖酸内酯氧化酶	97
4.7 尿酸氧化酶	98
4.8 黄嘌呤氧化酶	99
4.9 葡萄糖氧化酶	101
4.10 单胺氧化酶	102
4.11 酪氨酸羟化酶和多巴胺 β -羟化酶	107
一、酪氨酸羟化酶 (TH)	107
二、多巴胺- β -羟化酶 (DBH)	107
三、免疫组织细胞化学的原理	107
四、酪氨酸羟化酶及多巴胺 β -羟化酶的免疫荧光法所见	108
4.12 细胞色素氧化酶	112
4.13 过氧化氢酶	118

4.14 过氧化物酶·····	125
4.15 氧化还原酶的电子显微镜的细胞化学·····	132
一、亚铁氰化铜法·····	132
二、四唑盐法·····	135
第5章 转移酶 ·····	139
5.1 氨甲酰基转移酶·····	139
5.1.1 鸟氨酸氨甲酰基转移酶 (OCT)·····	140
5.1.2 天门冬氨酸氨甲酰基转移酶 (ACT)·····	142
5.2 酰基转移酶·····	143
5.3 谷氨酰基转移酶·····	147
5.3.1 γ -谷氨酰基转肽酶·····	147
5.4 糖基转移酶·····	150
5.4.1 糖原磷酸化酶·····	150
5.4.2 分枝糖基转移酶(分枝酶)·····	156
5.4.3 UDP 葡萄糖-糖原葡萄糖基转移酶(糖原合成酶)·····	158
5.4.4 糖原磷酸化酶及分枝糖基转移酶的电镜组织化学·····	161
5.5 氨基转移酶·····	168
5.5.1 天门冬氨酸氨基转移酶·····	168
5.5.2 鸟氨酸氨基转移酶·····	170
5.5.3 γ -氨基丁酸氨基转移酶·····	171
5.6 核苷酸转移酶·····	172
5.6.1 尿嘧啶核苷酰基转移酶·····	172
第6章 核酸水解酶(用薄膜底物法检出) ·····	175
6.1 方法·····	175
一、明胶底物薄膜的制作法·····	175
二、组织的冰冻切片·····	176
三、组织切片与明胶底物薄膜的反应·····	176
四、底物薄膜和组织切片的染色·····	176
五、酶活性的分布及酶活性的判断·····	177
6.2 实验操作上的注意事项·····	177
一、明胶的选择·····	177
二、染料的选择·····	177
三、底物的选择·····	177
四、对照实验·····	177
6.3 实验结果·····	178
第7章 水解酶 ·····	180
7.1 酯酶·····	180
一、酯酶的定义和分类·····	180
二、酯酶的鉴别·····	182
7.1.1 非特异性酯酶·····	184
7.1.2 脂酶·····	193

7.1.3 磷脂酶	197
一、磷脂酶A〔磷脂酰(基)(水解)酶〕	198
二、磷脂酶B〔溶血卵磷脂酰(基)(水解)酶〕	199
7.1.4 乙酰胆碱酯酶和胆碱酯酶	204
7.2 磷酸酶	210
磷酸酶的分类	210
7.2.1 硷性磷酸酶	212
一、硷性磷酸酶的性质	212
二、硷性磷酸酶的生物学意义	213
三、硷性磷酸酶活性的组织化学检查法	213
四、硷性磷酸酶活性的组织内分布	217
7.2.2 对硝基酚磷酸酯酶	222
一、非特异性硷性磷酸酶	223
二、(特异性硷性)对硝基酚磷酸酯酶	223
三、K ⁺ 依赖性对硝基酚磷酸酶	224
四、非特异性酸性磷酸酶	226
五、酸性对硝基酚磷酸酶	226
六、其他	226
7.2.3 酸性磷酸酶	228
一、溶酶体性酸性磷酸酶	228
(一) 溶酶体性酸性磷酸酶的性质	228
(二) 溶酶体性酸性磷酸酶的生理学意义	228
(三) 溶酶体性酸性磷酸酶活性的组织化学检查法	228
(四) 酸性磷酸酶(溶酶体性)活性的定位	231
二、非溶酶体性酸性磷酸酶	231
(一) 酸性对硝基酚磷酸酶	232
(二) 酸性磷酸酐硷磷酸酶	232
(三) 把 β -甘油磷酸作为底物的非溶酶体性酸性磷酸酶	232
7.2.4 5'-核苷酸酶	236
7.2.5 葡萄糖6-磷酸酶	240
7.2.6 葡萄糖1-磷酸酶	242
7.2.7 磷酸二酯酶	243
7.2.8 3',5'-环核苷酸磷酸二酯酶	244
7.3 焦磷酸酶(三磷酸酶与多磷酸酶)	246
7.3.1 无机焦磷酸酶	246
7.3.2 硫酸素单磷酸酶	250
7.3.3 硫酸素焦磷酸酶	250
7.3.4 硫酸素三磷酸酶	255
7.3.5 核苷二磷酸酶	255
7.3.6 核苷三磷酸酶	259
7.3.7 腺苷三磷酸酶	259
7.3.8 多聚磷酸酶	266

7.4 磷酸胺酶	267
7.5 硫酸酯酶	267
7.6 腺苷酸环化酶和鸟苷酸环化酶	273
7.7 外糖苷酶以及其他酶	281
7.7.1 α -葡糖苷酶	281
7.7.2 β -葡糖苷酶	282
7.7.3 β -半乳糖苷酶	283
7.7.4 β -N-乙酰氨基葡糖苷酶	283
7.7.5 β -葡糖苷酸酶	284
7.7.6 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡糖淀粉酶	285
7.8 肽酶	287
蛋白酶, 蛋白水解酶	287
7.8.1 氨基肽酶	288
7.8.2 氨基酰 β -萘酰胺裂解酶	295
7.8.3 脂萘酰胺水解酶(酰基转移酶 I、II)	295
7.8.4 类胰蛋白酶(胰蛋白酶样酶)	295
7.9 谷氨酰胺酶	297
7.10 尿素酶	299
第8章 裂合酶类	300
8.1 醛缩酶	300
8.2 苹果酸合成酶	302
8.3 柠檬酸合成酶	303
8.4 碳酸酐酶	303
第9章 异构酶	309
9.1 尿嘧啶核苷二磷酸葡萄糖醛酸表异构酶	309
9.2 羟脯氨酸-2-表异构酶	310
9.3 尿嘧啶核苷二磷酸半乳糖-4-表异构酶	310
9.4 磷酸葡萄糖异构酶	310
第10章 酶消化法	311
10.1 一般事项	311
一、酶消化法的原理	311
二、底物薄膜法原理	311
三、关于以酶消化为原理的方法的探讨	312
10.2 检测方法	313
一、有关糖类的检测法	313
二、有关脂质的检测法	315
三、有关蛋白质的检测法	317
四、有关蛋白酶的底物薄膜法	318
五、有关淀粉酶的底物薄膜法	320
六、有关透明质酸酶的底物薄膜法	320
第11章 放射自显影术	323

11•1 放射自显影术的创立及其发展	323
11•2 放射自显影术的理论	323
一、放射自显影术的原理	323
二、用于放射自显影的放射物质和 β 粒子的性质	323
三、放射自显影术的照相作用机制和分辨力	323
11•3 放射自显影的技术	324
一、光学显微镜放射自显影的技术(浸渍法)	324
二、电子显微镜放射自显影的技术(玻璃切片法)	324
11•4 放射自显影术的应用	325
一、放射自显影术在两方面的应用	325
二、放射自显影术在其它方面的应用	326
11•5 放射自显影术的优缺点	328
一、所谓四维的医学·生物学	328
二、放射自显影术的前景	328
第12章 酶的免疫组织化学	331
12•1 荧光抗体法	331
一、用荧光抗体法证明酶定位的基本问题	331
二、荧光染色操作技术	333
三、用荧光染色法确定酶的定位	337
12•2 酶抗体法	343
一、用于标记的酶	344
二、用酶标记抗体的方法	345
三、标记抗体的精制法	353
四、关于酶抗体法中使用的抗体	359
五、组织标本的处理	365
12•3 铁蛋白标记法	377
一、铁蛋白标记法的建立与由来	377
二、铁蛋白研究的现状	377
三、铁蛋白结合物的制备	378
四、阳离子化的铁蛋白(cationized ferritin, CF)	382
五、铁蛋白结合物的应用	382
六、阳离子化铁蛋白的应用	389
12•4 金属标记抗体法	393
一、使用金属标记法的理由	393
二、金属标记法中的注意事项	393
三、标记金属所必需具备的条件	394
四、使用的标记物	394
五、标记用的金属或其化合物的种类	395
六、标记的方法	395
七、氯汞二茂络铁(CMF)标记法	396
八、羧醛二茂络铁(FCA)标记法	398
九、铋标记法	399

十、金标记抗体法·····	400
十一、组织的处理·····	405
第 13 章 同工酶 ·····	405
一、发现的经过及定义·····	405
二、同工酶的生理学意义·····	407
三、同工酶的研究对于生物学各领域的贡献·····	408
四、同工酶的组织化学检查·····	410
五、同工酶的分离法·····	410
六、同工酶研究二例·····	414
附录 主要的缓冲溶液表·····	420

第1章 序 论

酶组织化学是用组织化学的方法证明酶的存在,它是能促进医学生物学中许多自然科学向前发展的一门学科。它的基础是组织化学,目的在于阐明组织细胞的结构、功能及其生物学意义。换言之,就是把维持组织细胞形态和执行功能的化学物质及其存在方式变成可观察的形式,以探索其在生理甚至病理状态下的意义的一门学科。

因此,酶组织化学首先要弄清的是酶在组织细胞中存在的部位,也就是说,为了解决酶的定位,方法学是头等重要的。如能准确对酶进行定位,并在阐明功能上作出重要贡献,才有可能把它应用于医学生物学上。

酶组织化学^[1~4]是自然科学的一部分,随着其它自然科学的进展而逐渐发展,目前,已成为一门学科。然而它的形成却经历了50年或更长的时间。

酶组织化学的历史大致可分为三期。第一期,是1939年以前,即酶组织化学的早期。第二期,1940~1960年,即酶组织化学的想法形成,并取得快速进展的时期。第三期,是指由于电子显微镜的发展,逐渐阐明细胞结构亦即酶与细胞器的关系的时期。在这个时期,与酶的提纯化学的发展相平行,逐渐出现了酶免疫组织化学这样新的领域,使以往在方法学上难于证明的酶,逐渐弄清了其在细胞内的定位。可以说目前正在向酶组织化学的第四期过渡。

第一期:考察1939年以前的酶组织化学,可以发现它主要集中于研究组织细胞的氧化还原现象,此时尚未出现“酶组织化学的证明”这种想法。我们最早熟悉的是Nadi反应。这是当 α -萘酚和二乙基-对-苯二胺的混合液受到氧化时产生蓝色色素靛酚的一种反应。这反应最初由Ehrlich (1885)^[5]发现,他把该液注入机体内,观察到组织染成蓝色。有人将此法应用于新鲜组织和固定的组织细胞,认为蓝染是由于不稳定性氧化酶和稳定性氧化酶作用的结果(Gierke, 1911; Graeff, 1916)^[6]。以后Keilin (1925~1938)证明不稳定性氧化酶的反应是由细胞色素氧化酶引起的真的酶反应,而所谓稳定性氧化酶的反应(M-nadi反应)不是酶的作用,而是由于Nadi试剂特别是 α -萘酚所致。

还有一个与酶有关的愈创木脂(guaiac)反应。这是一种过氧化物酶的反应,用组织化学的方法使用联苯胺,在过氧化氢共存的情况下,通过氧化反应而生成蓝色。在这种反应中,过氧化物酶和过氧化氢酶的作用可以共存,据认为是由于氢过氧化物酶(Theorell, 1951)^[8]作用的结果(高松, 1967)^[9]。多巴-氧化酶也有同样的问题,虽然称它为“氧化酶反应”或者“过氧化物酶反应”,但尚未能真正证明出是哪种酶的作用,关于论证这种反应为非特异性的论文不胜枚举。

1939年是酶组织化学划时代的一年,是酶组织化学真正开始的一年。高松^[10]和Gomori^[11]关于硷性磷酸酶的酶组织化学证明(histochemical demonstration)的论文是在这一年发表的。但是在自然科学中任何新的发明或创造并不是在该时期突然出现的。

应该提到的是在此之前,Robison学派^[12~14]在磷酸酶的组织化学证明上花费了大

约十年的努力。Robison (1923 年)^[12] 最初将骨端软骨和肾脏组织放入 1ml 的己糖(单)磷酸盐溶液中,在 37℃ 下保温 22 小时,结果证明在磷酸酶所在部位,由于该酶的作用,磷酸钙有所增加,接着 Robison 和 Soames (1924)^[13] 把骨端软骨的薄片在己糖-单-磷酸钙和甘油磷酸钙溶液 (pH 8.4~9.4) 中,37℃ 下保温一定时间,使磷酸酶所在部位发生酶促的人工钙盐沉着,经福尔马林固定、脱水、包埋制成切片后,浸渍于 1% 硝酸银液进行日光还原,通过所谓 Kossa 反应,成功的证明了银反应。为了证明这是由于酶的作用,反复进行了许多对照实验。随后,Robison, Macleod 和 Rosenheim (1930)^[14] 把将制成的薄组织切片置入有机磷酸酯和各种盐类溶液中,在 37℃ 的温箱内浸渍 16 小时,然后福尔马林固定,水洗,进行 Kossa 反应,而证实为酶促反应。这时进行丙酮脱水、香柏油包埋,通过透明标本进行观察。在这个实验中,在磷酸酶的存在部位,一个是显示了酶的定位,另一个是磷酸钙的过饱和引起的假酶反应,因此磷酸钙的沉着有两种机制。这是一个很有趣味的报道,它提示了目前存在有特异性和非特异性两种反应。Robison 和 Rosenheim (1934)^[15] 用石蜡包埋切片,制作对照标本,证实这种组织化学的反应是由于磷酸酶的作用,他们使用 α -和 β -甘油磷酸、己糖磷酸、果糖单磷酸、海藻糖单磷酸等的盐类做为酶的底物来证明酶反应的。遗憾的是,因为 Robison 是一个生化学者,而不是一个形态学者,他把工作重点放在骨端软骨的化骨现象并扩展到肾和其它一部分组织,但是未能取得更进一步的进展。然而他们的这种磷酸酶证明法却很快地被应用到牙科领域的化骨或钙化现象上,日本有镰田 (1932)^[16] 和三村 (1938)^[17] 的改良法,成为酶组织化学的萌芽。另一方面 Sen (1930)^[18] 报告了一种脲酶水解尿素成氨和碳酸、使碳酸与钴相结合,进而生成硫化钴的反应方法。但他使用的是植物而不是动物组织。

就这样从 1923 年到 1938 年,已开始孕育着酶组织化学证明的想法,开创了属于酶的金属盐法的银反应和硫化钴反应。高松的磷酸酶银反应 (1939) 和 Gomori 的磷酸酶硫化钴反应 (1939) 的论文由于未引用 Robison 学派和 Sen 的报告,就好象突然出现了似的 (武内, 1944)^[19]。高松、Gomori 把磷酸酶的组织化学的检查向前推进了一步,确立了方法学,提高了可重复性,建立了证明酶的这种想法,这是很有意义的。果然,从此以后,高松开展了磷酸胺酶、ATP 酶, Gomori 开展了酸性磷酸酶、脂酶、酯酶等的组织化学的证明。

第二期:第二期的黄金时代正是从高松, Gomori 提出的磷酸酶方法开始的。在方法学上,即所谓“金属盐法”或“金属沉着法”(metal precipitation method),用这种方法,许多水解酶能进行组织化学的证明。但也有一定的限度, Menten Junge 和 Green (1944)^[20] 创立了所谓偶氮色素法 (coupling azo dye method), 这种方法是利用人工合成底物,通过色素沉着来确定酶的定位。人工底物和显色剂的发明虽然使组织化学增色不少,但此法多应用于水解酶类,虽有代替金属盐法的趋势,但是仍不能脱离金属盐法,而且在电镜酶组织化学方面,金属沉着法又有了进展。偶氮色素法虽具有一定的优点,但未得到进一步的发展。

但是,利用同样的偶氮色素四唑盐法 (tetrazolium salts method),对证明组织细胞的氧化还原反应却起到了促进作用,演变成为许多脱氢酶的组织化学证明法。Seligman^[21] 等在这方面有突出的贡献。但是,用这种理论粗略地证明有关酶时,发现仍有许

多问题有待解决。

因此,需要有第三种证明理论。武内等(1954~58)^[22,13]不得不从当时利用酶的分解作用方面转向利用酶的合成作用的方面一即向合成法(synthetic method)的方面发展。早已有 Yin 和 Sun (1947)^[24]在植物方面利用磷酸化酶的合成作用试验出了合成大豆淀粉的方法,但此法缺乏特异性。Cobb (1949)^[25]和 Goldberg 等 (1952)^[26]分别在动物软骨和肝组织等进行实验,仍未能真正地证明出磷酸化酶,而误认了假的酶反应。武内等放弃了磷酸化酶的分解作用,转向它的合成作用,从葡萄糖-1-磷酸合成为与正常糖原不同的多糖体,此多糖体与碘反应而着色,并发现其反应的色调与正常糖原不同,同时,他们将此法与 PAS 反应法和利用分解作用的磷酸铅捕捉法进行了比较并进行了改良,成功地创立了磷酸化酶的组织化学证明法。这种合成法(synthetic principle,武内)可用于同系统的若干合成酶以及相关的转移酶的组织化学的证明。但这也有一定限度,因而不断要求提出新的理论。Doust 等 (1955~1961)^[27]的底物薄膜法(substrate film method)是将切片贴附于底物的薄膜上,浸渍保温,在酶的作用下,使底物分解部位形成阴影,但定位不佳,未能得到更大发展,然而此法能证明其它方法不能证明的几种酶(如淀粉酶、DNA 酶, RNA 酶等)的大致部位。

第三期:此时需要有新的证明理论。恰好这时自然科学界出现了电子显微镜,用超薄切片,可以观察到组织细胞的结构。最初是 Scheldon 等人(1955)把这种方法应用于酶组织化学上,以观察酸性磷酸酶。接着 Brandes 等(1956)用以观察硷性磷酸酶,用金属沉着法在酶的所在部位,使金属颗粒沉着,从而明确了酶在溶酶体和膜的定位。用金属沉着法能够证明的酶类在电子显微镜酶组织化学(electron microscope enzyme histochemistry)上开始崭露头角(武内,1965)^[30]。目前电镜酶组织化学的研究仍在继续进行。1965年,武内在第六次日本组织细胞化学大会上做了题为“关于组织化学和电子显微镜酶反应的特异性”的报告,今天的情况与当时电镜酶反应相比已经有了显著的进步^[31~33]。但在理论上没有很大的发展, Seligman^[34,35]等人提出的钨黑化法(osmification method)虽然明确了几种酶的定位,但尚不够完善。

第四期:免疫组织化学的进展为酶组织化学的证明开辟了新的途径。为了在荧光显微镜下能够对酶进行观察, Coons 等人提出了荧光抗体法,虽然在某些方面有所应用,但没有什么发展。与此相关,酶样品的提纯法和免疫组织化学的进展,为把以酶作为抗原,以辣根过氧化物酶为指标的酶标抗体法(enzyme-labeled antibody technique, Nakane 等1968; Avrameas 等, 1969; Sternberger 等, 1970)应用于酶组织化学上开辟了道路。如果所探讨的酶的化学纯化取得成功,这种方法即能被广泛使用,目前此法正在迅速发展之中。用这种方法陆续地开始了新的酶组织化学的证明,在相当一段时间内,这种工作将会继续进行。所幸的是虽然这种方法尚有一定困难,但还能够应用于电镜酶组织化学上,将会给这一方面增加新的知识。

如上所述,酶组织细胞化学是近 40 年来迅速发展的一门学科,它在医学生物学方面虽然起了很大作用,但仍有待于向更新的领域发展。从这个意义上讲,本书介绍有关酶组织化学的现状,将为学习组织细胞化学的人,以及为医学家、生物学家的研究工作提供有力的武器。此外不仅对初学者、也希望对许多研究者和医师能有所裨益。

(武内忠男 编,朱逢春 译)

文 献

1. Gomori, G.: *Microscopic Histochemistry, Principle and Practise*. Chicago Univ. Press, Chicago, Illinois (1952)
2. Burstone, M. S.: *Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms*, Academic Press, New York and London (1962)
3. Pearse, A. G. E.: *Histochemistry, Theoretical and Applied*, Churchill London (1960), 3rd ed., Vol. 1 (1968)
4. 武内忠男・清水信夫・小川和朗 (編): *酵素組織化学*, 朝倉書店, 東京 (1967)
5. Ehrlich, P.: *Das Sauerstoff Bedürfniss des Organismus*, Hirschwald, Berlin (1885)
6. Graeff, S.: In "Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden", ed. by E. Abderhalden, Vol. IV, Part 1, pp. 93, Urban & Schwarzenberg, Berlin (1936)
7. Keilin, D.: *Proc. Roy. Soc.* B98, 312 (1925); *Ibid.*, B106, 418 (1930); Keilin, D. and Hartree, E. F.: *Ibid.*, B125, 171 (1938)
8. Theorell, H.: In "The Enzymes", ed. by Sumner and Somers, Vol. II, Part 1, pp. 397, Academic Press, New York (1951)
9. 高松英雄: *酵素組織化学*, 武内忠男・清水信夫・小川和朗編, pp. 1, 朝倉書店, 東京 (1967)
10. Takamatsu, H.: *Acta Path. Jap.*, 29, 492 (1939)
11. Gomori, G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 42, 23 (1939)
12. Robison, R.: *Biochem. J.*, 17, 286 (1923)
13. Robison, R. and Soames, K. M.: *Biochem. J.*, 18, 740 (1924)
14. Robison, R., Mucleod, M. and Rosenheim, A. H.: *Biochem. J.*, 24, 1927 (1930)
15. Robison, R. and Rosenheim, A. H.: *Biochem. J.*, 28, 684 (1934)
16. 鎌田幸一: *福岡医科大学雑誌*, 25, 207 (1932)
17. 三村 二: *日本薬物学雑誌*, 25, 123 (1938)
18. Sen, P. B.: *Indian J. Med. Research*, 18, 79 (1930)
19. 武内忠男: *満洲医学雑誌*, 41, 565 (1944)
20. Menten, M. L., Junge, J. and Green, M. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57, 82 (1944)
21. Seligman, A. M. and Rutenberg, A. M.: *Science*, 113, 317 (1951)
22. 武内忠男・栗秋秀雄: *東京医事新誌*, 71, 519 (1954), 武内忠男他: *東京医事新誌*, 72, 139, 同誌, 72, 191, 同誌, 72, 301, 同誌, 72, 355 (1955), 同誌, 73, 137, 同誌, 73, 201, 同誌, 73, 279, 同誌, 73, 282, 同誌, 73, 709 (1956)
23. Takeuchi, T. and Kuriaki, H.: *J. Histochem. Cytochem.*, 3, 153 (1955); Takeuchi, T. et al.: *Ibid.* 3, 385 (1956); Takeuchi, T.: *Ibid.*, 4, 84 (1956); *Ibid.*, 6, 208 (1958)
24. Yin, H. C. and Sun, C. N.: *Science*, 105, 650 (1947)
25. Cobb, J. D.: *Am. Arch. Pathol.*, 55, 496 (1953)
26. Goldberg, B., Wade, O. B. and Jones, H. W.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 13, 543 (1952)
27. Doust, R.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 15, 1447 (1955); *Exp. Cell. Res.*, 12, 203 (1957); *Ibid. Suppl.*, 7, 40, (1959); Doust, R., et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 8, 131 (1960), *Exp. Cell. Res.*, 24, 559 (1961)
28. Scheldon, H., Zetterqvist, H. and Brandes, D.: *Exp. Cell Res.*, 9, 592 (1955)

29. Brandes, D., Zetterqvist, H. and Scheldon, H.: *Nature*, 177, 382 (1956)
30. 武内忠男: 熊本医会誌, 41, 1 (1967)
31. Hayat, M. A.: *Electron Microscopy of Enzymes. Principles and Methods*, Reinhold, New York, Cincinnati, Toronto, London and Melbourne (1973)
32. Geyer, G.: *Ultrahistochemie; Histochemische Arbeitsvorschriften für die Elektronenmikroskopie*, Fischer Verlag, Jena (1973)
33. 小川和朗・武内忠男・森 富 (編): 新組織化学, 朝倉書店, 東京 (1975)
34. Seligman, A. M., Ueno, H., Morizono, Y., Wasserkrug, H., Katzoff, L. and Hanker, J. S.: *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 1 (1967)
35. Seligman, A. M., Wasserkrug, H. L. and Plapinger, R. E.: *Histochemie*, 23, 63 (1970)
36. Nakane, P. K. and Pearce, G. B.: *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 929 (1966)
37. Avrameas, S. and Ternynck, T.: *Immunochimistry*, 6, 53 (1969)
38. Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Jr. Cuculis, J. J. and Meyer, H. G.: *J. Histochem. Cytochem.*, 18, 315 (1970)