

酶组织细胞化学技术

〔日〕小川和郎 中根一徳 主 编 钟宝声 主 译

上海医科大学出版社

酶组织细胞化学技术

〔日〕 小川和朗 中根一穗 主编

钟慈声 主译

上海医科大学出版社

责任编辑：杨俊华

2650/601

酶组织细胞化学技术

【日】小川和朗 中根一穗 主编

钟慈声 主译

上海医科大学出版社出版发行

(上海医学院路138号)

新华书店上海发行所经销

周行联营印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 11.5 字数 290000

1989年5月第1版 1989年5月第1次印刷

印数 1—3,000

ISBN 7-5627-0005-2/R·5

定价 8.00 元

寄语《酶组织细胞化学技术》中译本问世

自然科学的进步是方法论的进步。自然科学似乎是按着感知、认知的方式在进步。然而，一旦回顾人们获得知识的过程，我们立刻便能理解自然科学的进步实质上是方法论的进步。换言之，依靠新技术、新方法的开发和建立，以前无法得到的知识现在得到了，以前无法解决的课题现在解决了，甚至还将发展起来新的学科领域。

本书是《组织细胞化学技术》丛书中的第一部，介绍光学显微镜下和电子显微镜下多种酶的活性检测法和免疫细胞化学检测法的最新技术。

我从中国上海医科大学钟慈声教授处得知本书将被译成中文出版，感到由衷的高兴。近闻中国将成立组织细胞化学学会，本书中译本适当此刻出版，实是适逢良机。再者，我作为上海医科大学的客座教授，本书能由上海医科大学主译和出版，真是奇巧因缘。本书如能得到对组织细胞化学技术这门学科感兴趣的广大中国科学工作者的喜爱，如能对中国光学显微镜水平和电子显微镜水平组织细胞化学的发展有所帮助，我将感到莫大的荣幸。

小川和朗

京都大学医学部教授

日本学术会解剖学研究联络委员会干事

日本组织细胞化学会理事长

国际组织细胞化学会联合会 (IFSHC) 主席

日本电子显微镜学会顾问

国际电子显微镜学会联合会 (IFSEM) 委员

钟慈声译

1987. 12

译 者 的 话

国际组织细胞化学会联合会主席、日本京都大学教授小川和朗,是中国电镜界的好朋友,是国际知名的细胞化学专家。今年初收到他刚刚出版的专著“酵素組織細胞化学の技術”,我浏览全书后,感到这本书既系统又重点突出地介绍了多种酶的细胞化学基本理论和方法,反映了近年来世界上组织细胞化学理论和技术的最新发展,正是我国生物医学界同行们迫切需要的优良读物,当即产生把它翻译成中文供同行们阅读的念头。经过译者们和编辑们将近一年的共同努力,这本书的中文译本终于问世了。希望它的出版能对我国组织细胞化学工作的发展起促进作用。由于我们水平有限,书中错误难免,望读者指正。

主译

钟慈声

上海医科大学教授

1987. 12

前 言

1984年,在组织细胞化学的发展历史上是值得纪念的一年。因为,这一年的8月5日至11日,在国际组织细胞化学联合会的帮助下,在芬兰的赫尔辛基召开了第七届国际组织细胞化学会议(会议主席是赫尔辛基大学医学部的 Olavi Eränkö 教授);日本组织细胞化学会迎来了创建25周年,10月29日至31日,在学会的诞生地京都举行了纪念学术演讲会(大会主席是京都府立医科大学的佐野 豊校长)。这两个会议都取得了圆满成功。在纪念学会成立25周年的大会上,除了专题演讲介绍国内外组织细胞化学新成果以外,还举办了“神经发生过程中的组织细胞化学”的主题讨论会(会议主持者是京都府立医科大学的藤田哲也教授)。这些活动对日本组织细胞化学的发展起了有益的作用。继在加拿大温哥华召开第一届日美组织细胞化学会议之后,又决定1986年6月在旧金山及其周围地区召开第二届会议,会议将由第27届日本组织细胞化学会主席、东海大学医学部的中根一穗教授和第37届美国组织化学会主席、加利福尼亚大学 Lawrence Livermore 研究所的 Robert E. Smith 博士主持。

组织细胞化学是将组织、细胞乃至细胞水平以下的结构与其机能,特别是与化学、生物化学机能之间的动态关系在原位上直接进行观察和理解的学问。它的创始可以追溯到 F.V. Raspail (1925, 1930), 历史已相当长远。但这门学问至今仍然在不断发展、创新。日本组织细胞化学会每年7月组织一次有关组织细胞化学技术的讲习会,致力于先进技术的普及。这次,应朝仓书店编辑部的要求,编写了这套组织细胞化学最新技术丛书。朝仓书店已出版了大量有价值的关于组织细胞化学的书籍,如《新组织化学》、《新酶组织化学》、《病态酶组织化学》等等。编写这套丛书的宗旨与以上各书不同。本书重点介绍组织细胞化学技术的实际应用,力图具体、简明、易懂地记述各项技术操作方法的技巧、要点和注意事项。即使初学者也能参照本书进行实验操作。这是一本实用性很强的指导用书。本书的作者都是参加实际工作的比较年青的研究人员。

《组织细胞化学の技術》全书分六册,各成体系。各分册的内容及撰写人如下:

酶(包括同功酶): 斎藤多久马, 森 昌彦, 安田健次郎, 渡辺慶一;

激素与神经递质(包括相关酶): 鬼头昭三, 永津郁子, 藤田尚男, 矢内原昇;

核酸与糖(包括相关酶): 小田琢三, 平野 宽, 藤田哲也, 山田和顺;

脂质与类固醇: 川生 明, 岸野泰雄, 土山秀夫, 森井外吉;

无机物与色素: 栗井通泰, 挟间幸忠, 三岛 豊, 水平敏知;

细胞膜(包括相关酶): 名倉 宏, 藤本豊士, 马屋原宏, 村田长芳。

这套《组织细胞化学技术》丛书发行于这个值得纪念的时期,意义是深远的。它如能受爱好组织细胞化学的人们喜欢,将是作者们的最大荣幸。

小川和朗

中根一穗

1985年1月

执笔者(按执笔顺序)

小川和朗	京都大学医学部教授
酒井真弘	京都大学医学部第二解剖学教室
堀浩	北海道大学理学部教授
荒木正介	自治医科大学第一解剖学教室
牧田登之	山口大学农学部教授
绵引利充	关西医科大学讲师
千田耕辅	北田大学卫生学部讲师
山下修二	慶応义塾大学医学部讲师
森昌彦	朝日大学齿学部教授
小林一光	朝日大学齿学部讲师
山科正平	北里大学医学部教授
高野邦雄	长崎大学齿学部教授
平井圭一	金沢医科大学教授
横田贞记	山梨医科大学助教授
水谷昭	爱知县心身障害者ユロニー発達障害研究所所长
铃木裕	慶応义塾大学医学部病理学教室
永田哲士	信州大学医学部教授
山本厚太	京都大学医学部第二解剖学教室
野泽志明	慶応义塾大学医学部讲师
太田博明	东京电力病院产妇人科副科长
长谷川英章	东海大学医学部共利研细胞生物学教室
马屋原宏	武田药品工业(株)中央研究所
野田亨	京都大学医学部第二解剖学教室
金村秦辅	关西医科大学教授
斎藤多久马	自治医科大学教授
上野聪树	京都大学医学部讲师
小川和重	京都大学医学部第二解剖学教室
猪俣贤一郎	东邦大学医学部教授
藤本和	京都大学医学部讲师
久米川正和	城西齿科大学教授
田隈泰信	东日本学園大学齿学部讲师
菅井尚则	福島县立医科大学助教授

3. 山梨醇脱氢酶(Sorbitol dehydrogenase).....	29
a. 组织化学的研究法	29
b. 免疫组织化学的方法	32
4. 乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase) (LDH).....	35
a. 酶组织化学(大鼠肝脏).....	35
b. 免疫组织化学.....	38
5. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(Glucose-6-phosphate dehydrogenase) (G-6-PDH)	
.....	41
6. β -羟基丁酸脱氢酶(β -Hydroxybutyrate dehydrogenase)	
.....	43
7. 苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase).....	44
8. 异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate dehydrogenase).....	45
9. 尿酸氧化酶(Urate oxidase)	45
10. 葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase)	47
11. D-氨基酸氧化酶(D-Aminoacid oxidase)	48
12. 烟酰胺腺嘌呤二核苷氧化酶(NAD(P)H oxidase)	49
13. 细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase).....	52
14. 过氧化物酶(Peroxidase).....	57
15. 过氧化氢酶(Catalase)	62
a. 酶的组织化学法(DAB法).....	62
b. 免疫组织化学法.....	65
IV 转移酶(Transferase)	67
1. 氨甲酰转移酶(Carbamoyl transferase).....	67
1-1 鸟氨酸氨甲酰转移酶(OCT)	
.....	67
2. 谷-草转氨酶(Glutamic oxaloacetic transaminase, GOT)	
.....	68
a. 金属盐法.....	68
b. 偶氮色素法.....	69
V 水解酶(Hydrolase)	71
1. 酯酶(Esterase)	71
1-1 酯酶(羧酸酯水解酶, Carboxylic ester hydrolase)	71
1-2 光镜的证明方法	71
a. 偶氮色素法.....	71
b. 吲哚酚(Indoxyl)法	77
c. 用抑制剂及激活剂对非特异性酯酶的鉴别	79
d. 胆碱酯酶和乙酰胆碱酯酶.....	81

1-3	电镜的证明法	82
a.	非特异性酯酶	82
b.	乙酰胆碱酯酶、胆碱酯酶 (Acetylcholinesterase, Cholinesterase)	82
2.	磷脂酶(phospholipase)	84
2-1	磷脂酶A (Phospholipase A)	85
2-2	磷脂酶B (Phospholipase B)	86
3.	碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALPase)	88
3-1	活性检测法	88
a.	金属盐法	89
b.	偶氮色素法	91
3-2	同工酶(isoenzyme)	93
3-3	免疫学方法	101
4.	对硝基苯酚磷酸酶 (NPP酶 P-Nitrophenyl phosphatase)	103
4-1	NPP酶的种类	103
4-2	哇巴因敏感, K^+ 依赖性 P-NPP 酶(K^+ -NPP 酶, Ouabain-sensitive, K^+ -dependent P-nitrophenyl phosphatase)	104
4-3	酸性对硝基苯酚磷酸酶 (酸性 NPP酶)	107
4-4	H^+ - K^+ -ATP酶	108
5.	辅酶A 磷酸酶 (CoA phosphatase)	109
6.	酸性磷酸酶 (Acid phosphatase)	110
6-1	活性检测法	110
a.	金属盐法 (Gomori 法)	111
b.	偶氮色素法	114
6-2	免疫学方法	115
7.	葡萄糖-6-磷酸酶 (Glucose-6-phosphatase)	118
8.	果糖-1,6-二磷酸酶 (Fructose-1,6-diphosphatase)	123
a.	果糖-1,6-二磷酸酶的检测法 (磷酸捕捉法)	124
b.	果糖-1,6-二磷酸酶 (三步法)	125
9.	3', 5'-环核苷酸磷酸二酯酶 (Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase) ...	126
	[内源性5'-核苷酸酶应用法]	128
10.	5'-核苷酸酶 (5'-Nucleotidase)	132
11.	硫胺素单磷酸酶 (Thiamine monophosphatase) (TMP酶)	136
12.	硫胺素焦磷酸酶 (Thiamine pyrophosphatase TPP酶)	137
13.	硫胺素三磷酸酶 (Thiamine triphosphatase 简称TTP酶)	138
14.	腺苷三磷酸酶 (Adenosine triphosphatase 简称ATP酶)	140
14-1	Mg^{2+} -腺苷三磷酸酶 (Mg^{2+} -ATP酶)	140
14-2	Na^+ - K^+ -腺苷三磷酸酶 (Na^+ - K^+ -ATP酶)	142
14-3	Ca^{2+} ATP酶 (Ca^{2+} -adenosine Triphosphatase)	144
15.	硫酸酯酶 (Sulfatase)	147

16. 腺苷酸环化酶和鸟苷酸环化酶 (Adenylate cyclase和 Guanylate cyclase)	150
17. 氨基肽酶(Aminopeptidase)	153
17-1 氨基肽酶M (Aminopeptidase M)	154
17-2 二肽(氨基)肽酶IV [Dipeptidyl (amino)peptidase IV]	156
17-3 二肽(氨基)肽酶I [Dipeptidyl(amino) peptidase I]	156
18. 胰蛋白酶及其它	157
18-1 胰蛋白酶(Trypsinenzyme), 类胰蛋白酶 (Trypsin-like enzyme)	157
18-2 肠肽酶(Enteropeptidase)	158
18-3 胰蛋白酶原 (Trypsinogen)	158
19. 脂蛋白酶(Esteroprotease)	164
a. 酶谱	164
b. 酶组织化学	166
VI 裂解酶 (Lyase)	167
1. 醛缩酶(Aldolase)	167
2. 柠檬酸合成酶 (Citrate synthase)	168
3. 碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase)	169
VII 混合-功能氧化酶(Mixed-function oxidase)	173
跋	174

I 近年来酶组织化学研究技术的发展动向

酶组织化学,是利用酶化学反应的产物,能在光学显微镜和电子显微镜下被识别,借以从形态学角度判定酶在组织细胞内存在的部位,其基础是组织化学。这门学科是研究酶这类物质在组织细胞内的存在及其动态,以阐明组织细胞的结构和功能及其所含这类物质的生物学意义。

研究组织细胞内特定酶分布的酶组织化学方法,大致有两种:一是利用酶的活性反应的方法;二是利用抗原抗体反应(免疫反应)证实酶蛋白存在部位的方法。酶组织化学一般是前者,后者被归类于免疫组织化学。近年来,免疫组织化学的进展很快,从前难以证实的一些酶,现在利用免疫组织化学方法相继得到了证实。还有一些酶,已有可能从检测其活性和证实其酶蛋白存在部位这两个方面进行研究。本书内容以检测活性的方法为主。但是,有几种酶,如山梨醇脱氢酶、乳酸脱氢酶、D-氨基酸氧化酶、过氧化氢酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、胰蛋白酶原等,除了叙述其检测活性的方法以外,还介绍了免疫组织化学方法。这个事实说明现在已经到了应当考虑扩大酶组织化学概念的时候了。酶组织化学发展至今已有50年或者说更长的历史了。关于其发展过程中的一些重大事件,已有综述发表(高松,1967;武内,1980)。在此,我想从酶组织化学近年来的发展动向出发,首先简要介绍免疫组织化学的概况,然后介绍酶活性检测方法方向的最新发现、技术的改良和新确立的检测法,最后谈谈酶组织化学在新领域中的应用。

所谓免疫组织化学,是利用在组织细胞内进行的特异、灵敏、稳定的抗原抗体反应,从检测特异抗原物质和抗体存在部位的科学。要利用免疫组织化学染色法(简称免

疫染色法)检测组织细胞内物质,必须具备两个基本条件:第一,作为检测对象的物质要有抗原性,能制作出与之对应的特异、高效价的抗体;第二,在免疫反应发生之前,目标物质要保持抗原性,同时还要保持在组织细胞内的稳定状态。要检测抗原,就要用与之对应的抗体进行免疫反应;要检测抗体,就要用与之对应的抗原进行免疫反应。但是,仅仅作这样的处理,还不能作常规的形态观察,也就是说,无法在细胞内识别抗原抗体反应的产物。因此,有必要用可视标记物标出抗原或抗体,被标识的抗原或抗体分别叫做标识抗原或标识抗体。采用这种方法的免疫染色法叫做标识抗体法或标识抗原法。常采用的标识抗体法有直接法、间接法、补体结合法以及多重染色法等。直接法是标识要检出的抗原的抗体(第1抗体),然后进行反应的方法。其特异性好,但检出敏感度不如间接法,标识抗体的使用范围局限。间接法是未标识的第1抗体进行反应,接着标识以第1抗体为抗原所制作的抗体(第2抗体),进行重叠反应,间接地证明抗原。这种方法的缺点是容易出现非特异性反应,但敏感度较高,标识抗体的用途也广,因此被广泛采用。补体结合法是将间接法中的标识第2抗体作为标识抗补体抗体使用,这一点与间接法不同。多重染色法则是在同一标本上检出多种抗原物质的方法,可以用反复进行的重复标记的直接法或酶标记(后述)的重复进行的间接法。此外,还有后标识抗体的免疫染色法。这种方法,先采用未标识的抗体进行反应,反应结束以后,通过免疫化学反应或其它化学反应,用适当的标记物质来标识已与组织细胞内抗原发生结合的抗体。常用的有 PAP 法(peroxidase-antiperoxidase method),

蛋白A法、抗生物素蛋白-生物素法(avidin-biotin method)等。PAP法(Sternberger等, 1970)是利用标识物质辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase HRP)的抗原性, 制作相应的抗体, 使形成可溶性HRP-抗HRP的免疫复合体, 通过使第2抗体同与抗原结合的第1抗体相结合, 来达到可视的目的。其中, 第1抗体与抗HRP抗体必须来自同种动物。蛋白A法(Biberfeld, 1975)是利用蛋白A(从黄色葡萄球菌细胞壁获得的糖蛋白)与免疫球蛋白(IgG, IgM)Fc部分特异结合的性质, 用标识后的蛋白A进行反应, 使与抗原结合的抗体被标记, 以达到间接地标识抗体的方法。抗生物素蛋白-生物素法(Heggeness和Ach, 1977), 是利用生物素(维生素H)同卵蛋白中抗生物素蛋白之间的强大结合力, 使标识的抗生物素蛋白同已经与抗体结合的生物素特异地结合, 间接地标识抗体的方法。为了进一步提高敏感度, 有人考虑让未标识的抗生物素蛋白同HRP标识的生物素相结合, 组成复合物(Avidin-biotin peroxidase complex, ABC), 再让此复合物和与在抗原上结合的经生物素标记的抗体发生反应。这种方法被称作ABC法(Hsu等, 1981)。

如上所述, 在免疫染色法中, 所谓标识法和后标识法都需要标识抗体或抗原, 而标识物质必须具备以下条件: 1)量微且能容易在光镜或电镜下被识别; 2)机体内无同一或类似物质; 3)物理或化学性质稳定, 可以与抗体或抗原结合, 其结合物稳定。目前所用的标识物质有: 荧光色素、放射性同位素、重金属、微粒子、酶等。荧光色素中, 有代表性的物质是异硫氰酸盐荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)和四甲基苾丹明异硫氰酸盐(Tetramethylrhodamine isothiocyanate, RITC)用这些物质作标记的免疫染色法称作荧光抗体法(Fluorescent antibody method)。发生反应的部位在荧光显微镜

下会发出鲜艳的荧光, 反差很好, 对微小物质的检出也很有效。但其不足之处, 是染色标本不能保存, 在观察过程中荧光会衰减, 目前还很难用于电镜水平的观察。用放射性同位素作标识物, 采用放射自显影术, 则能从光镜和电镜两个水平来观察目标物质存在的部位(Pressman, 1951)。重金属标识物有汞(Pepe, 1961)、铀(Sternberger等, 1963)、钨(Sternberger等, 1966)、铁(Franz, 1968)、铋(Yasuda, 1979)等。微粒子有铁蛋白(Singer, 1959)、胶体金(Faulk等, 1971)等。这些物质本身都具有一定的电子密度, 所以能在电镜下被识别。特别是用铁蛋白作免疫染色法(铁蛋白标识抗体法), 可供定量研究, 对阐明细胞表面的抗原结构非常有效。其缺点是分子大, 不容易浸透到细胞内。不过对近年来发展的冷冻超薄切片免疫电镜法来说, 铁蛋白是一种不可缺少的标识物质。胶体金电子密度比铁蛋白大, 成像鲜明, 也可用于定量研究。以胶体金为标识物的最大优点, 是其大小可在直径2~150nm之间任意改变, 而且与抗体的结合不是化学反应, 可以很好地保持抗体的活性。此外, 蛋白A-金法(Roth, 1982a)也可用于光镜水平的观察(Roth, 1982b)。胶体金由于应用范围广, 其利用率近年急速增加。用酶作标识物质的免疫染色法叫做酶抗体法, 所使用的几种酶几乎都是氧化还原酶, 如HRP。免疫染色以后要从组织化学角度检测反应部位的HRP, 须要0.005%过氧化氢3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine, DAB)溶液。DAB在H₂O₂存在下由于HRP的作用而氧化, 产生暗褐色的不溶物质, 可在光镜下识别。如用钼酸反应, 则变成高电子密度的钼黑, 也可用于电镜水平的观察。

用作免疫染色的组织细胞的处理方法, 应根据抗原种类、标识法、观察方法等不同而不同。目标物抗原性的强弱和耐保存性方面都有很大的差异, 所以选择最适当的处理

法是重要的。特别要考虑固定液的选择、有机溶液的使用、加热的影响等。就固定液而言,对蛋白质性抗原一般用2~4%的多聚甲醛(Paraformaldehyde, PFA)使其固定在维持抗原性的状态。但有时也用95%的乙醇及100%的丙酮固定。电镜标本经常采用的固定液戊二醛和锇酸,明显损害抗原性,还会引起非特异性反应,因此适用范围很狭窄。于是出现了过碘酸赖氨酸-多聚甲醛(Periodate, Lysine-paraformaldehyde, P LP)固定液(Melean等, 1970)和Zamboni固定液(Zamboni 和 DeMartion, 1967)。

用于免疫染色的抗体被精制成抗血清、 γ -球蛋白甚至免疫球蛋白。一般来说,间接法的第1抗体用抗血清本身,标识抗体采用标识的、从抗血清中提取 γ -球蛋白或免疫球蛋白。抗体重要性是特异性高、与抗原的结合力强。用抗血清作免疫染色时,它必须有足够高度的效价。若是为了得到足够强的染色,而采用高浓度低效价的抗血清,这样做会引起球蛋白与组织细胞的非特异性结合,从而得不到可信赖的高质量染色像。一般情况下最好用磷酸缓冲生理盐水将原血清稀释成1,000倍以上的抗血清来使用。特殊抗体有片段抗体和单克隆抗体。所谓片段抗体,就是用胃蛋白酶或番木瓜酶等蛋白分解酶和还原剂,将免疫球蛋白分解成为与抗原有结合性的片段F(ab)', Fab', Fab等,以缩小抗体分子,提高其细胞渗透力。同时通过除去Fc部分就能减少非特异性吸附。单克隆抗体是一种特异性极高的抗体,它仅能够识别利用细胞融合法制成的抗原结构(Köhler 和 Milstein, 1975),故不会有通常抗体(多克隆抗体)可能发生的交叉反应(Cross reaction)。因此,为了识别具有复杂抗原结构的巨大分子抗原或细胞膜抗原时,需要鉴别力高的抗体时,这种单克隆抗体极其有用。

免疫染色一般是使组织乃至细胞内的不

溶抗原与其相对应的抗体相作用,引起抗原抗体反应。影响这种反应的重要因素是反应时间、温度、组织内的抗原量以及抗体浓度等。正确组合这些条件,可以得到良好的染色结果。做到这些,往往要通过反复试验,依靠经验,而不是依靠理论。一般说来,进行光镜水平的免疫染色为了获得适当的组织内抗原同抗体的反应,要在室温下放置30分钟至1小时;如果缩短反应时间或检出微量抗原时,则要在37℃下进行反应;在低温(4℃)下,反应要进行16~24小时。进行电镜水平的免疫染色,为了使抗体充分反应,反应时间比光镜水平所需的还要长。然而,反应时间越长,发生非特异性反应的可能性也越大,因此反应时间最好控制在最低限。

免疫染色所得到的结果与一般检出酶活性的酶组织化学染色一样,必须证明其特异性。也就是说,它与采用提纯的抗原在试管内进行的抗原抗体反应不同,当抗体作用于组成非常复杂的组织细胞时,不可忽视抗体与相应抗原以外的物质通过抗原抗体反应以外的机制发生非特异性结合的可能性。证明这种特异性有两种方法,即阴性对照法(negative control)和阳性对照法(positive control)。所谓阴性对照法,就是在免疫染色前,降低抗体活性或中和抗原性,确认染色性消失或明显减弱。其中又有为了中和抗体而添加过剩抗原的吸收试验(Absorption test),和用未标识抗体同组织细胞抗原发生反应,确认同一标识抗体已不会发生反应的阻断试验(blocking test)。总之,这些都是免疫染色在阳性的情况下证明其特异性的方法。与此相反,阳性对照法,是用以证实在反应阴性的情况下,染色方法是否适当,也就是在标本内不存在抗原物质的情况下证明反应确为阴性的方法。这要事先准备确有抗原存在的标本,通过同一反应成为阳性而得到证明。

以上就近年来发展迅速的免疫组织化

学,谈了其概念、反应方法以及反应中应予以考虑的问题。还没有涉及反应的实际操作和其它详细内容。这些请参考本书的各论以及书末所介绍的优秀著作(浜岛和京极,1975;Johnson等1978;Sternberger,1979;渡边等,1985)。

从检出酶活性这一较狭小意义上来说,近年来发明或改良过的酶组织化学技术中,要首推制作未冷冻切片所用的国产装置“微切片机(Microslicer)”(Mayahara等,1981)。用酶组织化学方法证明酶在细胞内的存在所进行的一系列操作中,无论是光镜水平抑或电镜水平,除了酶孵育反应阶段(通常在固定和脱水之间进行)以外,与常规形态观察的一系列操作(取样-固定-脱水-包埋-切片制作-染色-镜检)几无改变。两者最大的差异,是用于酶组织化学观察的标本必须在酶反应之前进行切片。如果直接将组织块用于酶反应,则会由于孵育液在细胞内的浸透不均而导致酶活性呈现部位差异,即引起了非特异性反应。为了防止这一点,标本必须进行微切片。一般可用Cryostat制作的冷冻切片进行光镜水平的观察。可是,以观察细胞器水平上酶活性部位为目的的电镜观察,用冷冻切片,会造成细胞细微结构的变化,故需用 $40\mu\text{m}$ 以下的未冷冻切片。用过去已有的未冷冻切片装置(振动切片机,Vibratome)制作未冷冻切片,效果不十分满意。为了弥补它的不足,发明了微切片机。用这种切片机制作未冷冻切片,速度快,而且容易获得厚度均匀、面积较大的切片。此外,从保持酶活性这一问题出发,一向不为人们注意的缓冲液也受到了重视。其中最重要的是配制固定液时用的缓冲液。例如,要是把经常使用的二甲胂酸缓冲液换成PIPES缓冲液,那么以前只有在肝细胞毛细胆管质膜上见到的碱性磷酸酶活性,现在在肝细胞四周的质膜上也能见到了(Yamamoto和Ogawa,1983)。这一事例说明,对常用的一些技术、方法要

重新估量、重新评价。近年来确立了检测法的或重新被研究的酶中,有以 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶为代表的各种ATP酶。所谓ATP酶,是一种使高能磷酸化合物ATP加水分解成ADP和磷酸,同时释放能量的酶,在肌内收缩和膜主动运输等多方面有重要功能。ATP酶活性的组织化学检测法,主要有捕捉铅离子的Wachstein-Meisel法和这种方法的改良法。可是,以ATP为底物的Wachstein-Meisel类型的铅法,不能检测生理学上有重要意义的哇巴因(Ouabain)敏感的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶的活性,也不能检测Nolinium bromide敏感的 $\text{H}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶的活性。因此有人提出用对硝基苯酚磷酸(*P*-Nitrophenylphosphate, *P*-NPP)代替ATP作底物,加入二甲亚砜(Dimethylsulfoxide, DMSO)作激活剂,来检测 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶或 $\text{H}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶系统包含的对 K^+ 依赖的对硝基苯酚磷酸酶(K^+-NPP 酶)的活性(Mayahara和Ogawa,1980;藤本等,1984)。关于这些酶的性状、生理意义、检测法以及活性存在部位,请参照原著或本书的各论。这两种酶活性的反应产物都能从质膜的胞质侧观察到,显示了这种检测法的可信性。因为这与 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶或 $\text{H}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶在反应过程中,无机磷酸向胞质方向释放是一致的。还有由 Ca^{2+} 激活的 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ 酶的研究方法,在过去一直采用的柠檬酸铅的基础上,详细研究了固定条件、孵育液中 Ca^{2+} 浓度以及抑制剂,结果使得对 Ca^{2+} 有不同敏感性的几种 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ 酶的活性检测变成了现实。一般来说, Ca^{2+} 浓度为 $0.1\sim 1.6\text{mM}$ 时可以检测质膜等膜系的ATP酶, $1\sim 5\text{mM}$ 时可检测肌球蛋白(肌丝)ATP酶, 10mM 时可检测线粒体ATP酶活性。除此以外,在缝隙联结、高尔基体、肌浆网等处检测 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活性也是可能的。但除了质膜 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ 酶以外,用戊二醛固定,酶活性便受到明显抑制,故最好使用甲醛固定(Ando等,

1981)。近年来还确立了核苷酸环化酶(Nucleotidyl cyclase)中的腺苷酸环化酶(Adenylate cyclase, ACL酶)和鸟苷酸环化酶(Guanylate cyclase, GCL酶)活性检测法的可信性。ACL酶和GCL酶是分别以ATP和GTP为底物的酶,它们在激素等各种动因的作用下,在靶细胞内生成环化AMP和环化GMP作为第二信使。关于这两种酶的检测法早就有很多报道。但还存在许多问题,如底物特异性、固定及用作捕捉剂的金属离子对酶活性的抑制等。通过使用腺嘌呤基亚胺二磷酸(Adenylyl imidodiphosphate, AMP-PNP)或鸟嘌呤基亚胺二磷酸(Guanylyl imidodiphosphate, GMP-PNP)(这两种底物都是末端磷酸与—NH—基结合的与ATP或GTP相类似的化合物,但它们不会被ATP酶或GTP酶非特异地分解)代替ATP和GTP作底物,在固定液和孵育液中添加DMSO,解决了以往的问题,确立了ACL酶和GCL酶的组织化学检测法(Fujimoto等,1981)。这两种酶活性可以在肝细胞窦状隙侧的质膜、心肌细胞的质膜和肌质网、肾上腺髓质细胞的质膜以及各种细胞的缝隙连结处被观察到。一般说来,GCL酶活性比ACL酶活性弱,但在视网膜视杆细胞外节的圆盘膜上可以检测强活性的GCL酶。显示这种ACL酶和GCL酶活性检测法可信性的实例就是使用激活剂能观察到它们被激活的效果。如用ACTH处理的肾上腺皮质和髓质细胞的质膜上以及用肾上腺素处理的心肌细胞质膜上,酶活性明显增强。以上两类酶主要是通过改变底物,使活性检测获得了成功。也有一些酶是通过改换孵育液中的捕捉剂金属离子的种类而得到了稳定的检出结果。例如在检测5'-核苷酸酶(5'-Nucleotidase, 5'-Nase)活性时,将孵育液中的 Pb^{2+} 换成 Ce^{2+} ,由此获得了稳定的孵育液,结果得到了均匀的、富有连续性的反应产物,而且非特异性反应也有减少(Robinson和Karnovsky, 1938; 小川和小

川, 1985的综述)。这也就是说,用铈法检测5'-Nase活性,能提高检测敏感度和重复性,从而可比较正确地断定活性部位。希望这种方法也能用于其它酶活性的检测。

下面介绍酶组织化学在最新技术如冷冻复型法(Freeze- replica method)和超高压电子显微镜(High voltage electron microscope, HVEM)中应用的实例。冷冻复型法是亚微形态学领域内独特的观察方法。由于应用复型膜作形态研究的历史较短,要把复型图像与生化机能直接联系起来还有困难。虽然如此,近年来已开始将冷冻复型法应用于研究生物膜内化学成分(胆固醇等)、膜酶和各种膜受体的存在,更有人尝试同放射自显影术配合使用(小川等, 1982)。要用冷冻复型法观察酶活性,可以直接观察进行酶反应的标本的冷冻复型像,特别是冷冻蚀刻像。目前,用冷冻复型法只对活性部位存在于细胞膜外表面的乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, Ach E)进行了研究(Fujimoto和Ogawa, 1980)。此外,如反应产物存在于膜的外界面并且其颗粒较粗大时可用扫描电镜观察。希望这种方法今后能被广泛运用。超高压电镜在医学生物学领域中应用的优点之一是可用 $1\sim 5\mu m$ 厚的树脂包埋切片,将样品各倾斜 $\pm 5\sim 10^\circ$ 时拍照,可以得到一对立体像(Stereo-pair),这样就能如实地掌握细胞体的三维立体像。但仅仅用一般的电子染色方法时往往得不到良好的反差,而且在以特定的细胞器立体像为观察目标时,常常很难与其它细胞器相区别。因此,通过细胞化学反应对目标细胞器进行特异性染色,就能较容易地获得其复杂的立体结构。譬如,用Gomori法在HVEM下观察组织厚切片中酸性磷酸酶活性,高电子密度的反应产物磷酸铅出现在溶酶体、高尔基体等特定的细胞器处,使得反差增强。这样就能获得理想的图像,了解这些细胞器复杂的三维立体结构。此外,对细胞器进行立体观察可采用的细胞

化学反应有, Ca^{2+} -ATP 酶(观察细胞膜特化部位, 即细胞间的镶嵌连接和缝隙连接等处的立体结构)、葡萄糖-6-磷酸酶(内质网)、ACL 酶和 GCL 酶(缝隙连接)、中性磷酸酶(细胞内液胞)、过氧化物酶(肌细胞的横小管)、过氧化氢酶(过氧化物酶小体)(小川等, 1982)。这样, 在 HVEM 水平上采用酶组织细胞化学方法, 可获得关于细胞器立体结构及其动态的极其重要的新知识。

酶组织化学是近50年来迅速发展起来的学科, 它具有将形态学、生化学或生理学联系起来的独特特点, 在医学生物学领域内日益发挥重要作用。上述一些新检测法的确立及其在新领域内的应用等等, 今后定将得到更进一步的发展。通过这种发展, 我们可望动态地理解组织细胞内结构同机能之间的关系。

【文献】

- Ando, T., Fujimoto, K., Mayahara, H., Miyajima, H. and Ogawa, K.: *Acta histochem. cytochem.*, **14**, 705, 1981.
- Biberfeld, B., Ghetie, U. and Sjöquist, J.: *J. Immunol. Meth.*, **6**, 249, 1975.
- Faulk, W. P. and Tayler, G. H.: *Immunocytochemistry*, **8**, 1081, 1971.
- Frang, H.: *Histochemie*, **12**, 230, 1968.
- 藤本 和, 小川和重, 小川和朗: 組織細胞化学 1984, 63, 学際企画, 東京, 1984.
- Fujimoto, K., Toibana, M. and Ogawa, K.: *Acta histochem. cytochem.*, **14**, 687, 1981.
- Fujimoto, T. and Ogawa, K.: *Acta histochem. cytochem.*, **13**, 72, 1980.
- 浜島義博, 京極方久: 免疫組織学, 医学書院, 東京, 1975.
- Heggenes, M. H. and Ach, T. F.: *J Cell Biol.*, **73**, 783, 1977.
- Hus, S-H., Raine, L. and Fanger, H.: *J Histochem. Cytochem.*, **29**, 577, 1981.
- Johnson, G.D., Holborow, E. and Dorling, J.: *Handbook of Experimental Immunology* (Weir, D. M., ed.) Vol. 3, Blackwell Scientific Publications, Oxford London, Edinburgh and Melbourne, 1978.
- Köhler, G. and Milstein, C.: *Nature*, **256**, 495, 1975.
- Mayahara, H., Fujimoto, K., Noda, T., Tamura, I. and Ogawa, K.: *Acta histochem. cytochem.*, **14**, 211, 1981.
- Mayahara, H. and Ogawa, K.: *Acta histochem. cytochem.*, **13**, 90, 1980.
- McLean, I. W., Raine, L. and Fanger, H.: *J Histochem. cytochem.*, **18**, 315, 1970.
- 小川和朗, 藤本豊士, 藤本 和: 組織細胞化学 1982, 1, 学際企画, 東京, 1982.
- 小川和重, 小川和朗: 組織細胞化学 1985, 23, 学際企画, 東京, 1985.
- Pepe, F. A.: *J Biophys. Biochem. Cytol.*, **11**, 515, 1961.
- Pressman, D.: *Fed. Proc.* **10**, 568, 1951.
- Robinson, J. M. and Karnovsky, M. J.: *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 1190, 1983.
- Roth, J.: *Histochem.*, **14**, 391, 1982a.
- Roth, J.: *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 691, 1982b.
- Singer, S. J.: *Nature*, **183**, 1523, 1959.
- Sternberger, L. A.: *Immunocytochemistry*, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane and Toronto, 1979.
- Sternberger, L. A. Donat, E. J., Cuculis, J. J. and Petrail, J. P.: *Exp. Mol. Pathol.*, **4**, 112, 1965.
- Sternberger, L. A., Donat, E. J. and Wilson, C. E.: *J. Histochem. Cytochem.*, **11**, 48, 1963.
- Sternberger, L. A., Hardy P. H., Cuculis, J. J. and Meyer, H. G.: *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 315, 1970.
- 高松英雄: 酵素組織化学(武内忠男, 清水信夫, 小川和朗編), p.1, 朝倉書店, 東京, 1967.
- 武内忠男: 新酵素組織化学(武内忠男, 小川和朗編), p.1, 朝倉書店, 東京, 1980.
- 渡辺慶一, 中根一穂編: 改訂版酵素抗体法, 学際企画, 東京, 1985.
- Yamamoto, K. and Ogawa, K.: *Histochemistry*, **77**, 339, 1983.
- Yasuda, K.: *Acta histochem. cytochem.*, **12**, 168, 1979.
- Zamboni, L. and DeMartino, C.: *J Cell Biol.*, **35**, 148A, 1967.

(钟慈声译 陈桂荣审)

II 基本技术

1. 活性检测法

要从酶组织细胞化学角度检测某种酶活性,必须具备三个基本条件:第一,同时保持组织结构和酶的活性;第二,保持反应产物的存在部位,并可用于观察;第三,进行反应产物特异性的研究。为达到这些基本条件所必需的基本步骤有:组织或细胞的固定,制作孵育切片,孵育(酶反应)。光镜观察时,如反应产物无色,则要使之显色,封固;电镜观察时,则有超薄切片的制作及染

色(电子染色)阶段。表 I.1 将其基本步骤,以及纯形态观察所必需的步骤等作了简单的对比介绍。表 I.1 (B) 所介绍的用石蜡以及火棉胶进行的酶组织化学的方法已经很古老了,是 Gomori、高松时代采用的方法。现在这种方法已经不用了。一般常用的是表 I.1 (C) 所介绍的不固定及固定标本冷冻或不冷冻切片的方法。下面详细叙述各步骤所需要注意的问题。

表 I.1 组织细胞化学中酶活性检出的基本步骤

