

组织化学手册

东啸梅 周文郁 彭俊云 朱蓬第 王乃英 编

组织化学手册

陈啸梅 周文郁
彭俊云 朱蓬第 王乃英 编

人民卫生出版社

组织化学手册

陈啸梅 等编

人民卫生出版社出版

(北京市崇文区天坛西里10号)

人民卫生出版社印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 13 $\frac{1}{8}$ 印张 4插页 285千字

1982年12月第1版第1次印刷

印数：1—9,600

统一书号：14048·4243 定价：1.40元

前 言

组织化学，尤其是酶的组织化学技术，在研究单一细胞或细胞器的组成及代谢状态，在对人体生理与疾病的研究过程中，日益起着重要的作用。近年来我国广大生物学、组织学、胚胎学、病理学及药理学工作者，为提高诊治水平，越来越迫切需要掌握组织化学技术。但在大量组织化学方法中，作出合适的选择，则需要一定的理论基础和实践经验，当开展这项工作时，往往存在一定的困难。为此，我们在总结本实验室有关技术资料的基础上，编写了这本手册。希望它能成为初学者的入门指导，生物学和医学科研工作者有用的参考书。

本书共十四章，介绍有蛋白质、核酸、糖类、脂类、水解酶、氧化酶、脱氢酶、转移酶、单胺类荧光组化、定量组织化学及免疫组织化学等内容。手册在提供技术方法的同时，亦简要介绍反应（显色）原理、定位及其功能意义等，以帮助初学者选择实验指标和分析实验结果。本书以光学组织化学技术为主，辅以电镜组织（细胞）化学方法，可在不同水平显示同一物质。手册介绍的定量及免疫组化方法，使组化技术由定性、定位达到定量水平。

此外，编入手册中的方法绝大多数是经本实验室多年使用、改进后的常规技术，还介绍一些特异性更强的新方法。部分技术方法之后有附注，指出成败的关键、可能出现的问题、克服的办法，并推荐类似方法，以供借鉴。为方便读者，我们尽可能采用国产试剂和设备。附录中列入非组化染

液的配方、明胶包埋方法、试剂厂牌与规格、物质相对含量(M')的电子计算机计算程序等,供读者核查有关技术方法的系统资料。

在编著本书之际,缅怀我们的老师——张作干教授,在他的培养和筹建下,奠定了本实验室的组织化学基础。还应诚挚感谢薛社普教授,经他的指导和支持才使本书的编写工作得以顺利进行。对本实验室的同志谨致谢意,特别是韩雪梅、吴东、居俐、岳素琴等同志,他们在一些方法的建立中,曾付出辛勤的劳动。由于我们水平有限,错误在所难免,敬请批评指正。

编 者

1982. 1. 7.

目 录

第一章 概论	陈啸梅、周文郁	1
一、组织化学方法的种类		1
二、组织化学技术的基本要求		2
三、组织化学的进展		2
主要参考文献		3
第二章 组织化学技术	陈啸梅、王乃英	5
第一节 固定		5
一、固定的目的		5
二、固定的方法和固定液的选择		5
(一) 多糖		6
(二) 脂类		6
(三) 核蛋白及核酸		7
(四) 酶		7
第二节 切片的制备		10
一、冰冻切片		10
(一) 冰冻切片机切片		10
(二) 半导体致冷切片		11
(三) 恒冷箱切片		11
二、冰冻干燥		14
三、冰冻替代法		16
附：固定液及制片方法		17
一、固定液		17
(一) 磷酸缓冲中性甲醛 (10%)		17
(二) Baker氏甲醛钙液		17

(三) Gendre 氏液·····	18
(四) Carnoy 氏液·····	18
(五) Lillie 氏 A. A. F. 液·····	18
(六) 粘多糖和粘液物质固定液·····	18
(七) 显示 SH 基固定液·····	19
(八) 甲醛-蔗糖-氨水液(示胆碱酯酶 ChE)·····	19
(九) 酸性缓冲丙酮·····	19
(十) 蒸气固定·····	19
(十一) 4% 甲醛液·····	19
(十二) 4% 多聚甲醛/0.1M 磷酸缓冲液·····	20
(十三) 4% 多聚甲醛/0.1M 二甲肿酸缓冲液·····	20
(十四) 2.5% 戊二醛/0.1M 磷酸缓冲液或 0.1M 二甲 肿酸缓冲液·····	20
(十五) 4% 多聚甲醛 + 2.5% 戊二醛/0.2M 二甲肿酸 缓冲液·····	20
(十六) 四氧化锇的配制方法·····	20
二、制片方法·····	23
(一) 冰冻替代技术·····	23
(二) 切片替代技术(Patten 及 Nown, 1958; Chang 及 Hori, 1961) ·····	24
(三) 切片替代技术 (Chang 及 Yokayama, 1970)·····	26
主要参考文献·····	26
第三章 蛋白质 ····· 陈啸梅 ·····	28
第一节 蛋白质的分类·····	28
一、简单蛋白质·····	28
二、结合蛋白质·····	28
第二节 个别氨基酸的鉴别·····	28
一、二硝基氟苯法·····	30
二、米伦氏反应·····	30

三、硫氢基与二硫键的显示·····	30
四、精氨酸·····	32
第三节 组蛋白·····	33
一、碱性固绿法·····	33
二、铵银法·····	34
三、肝素-爱尔蓝 (HAB) 法·····	34
附：蛋白质的显示方法·····	34
一、二硝基氟苯 (DNFB) 法·····	34
二、米伦反应示酪氨酸·····	36
三、铁氰化铁法示 SH 基·····	37
四、碱性四唑盐示 SH 基及 S-S 键·····	38
五、汞橙 (RSR) 法示 SH 基·····	38
六、组化坂口反应示精氨酸·····	40
七、坂口反应示精氨酸·····	40
八、碱性固绿法·····	42
九、肝素-爱尔蓝 (HAB) 染色法·····	43
主要参考文献·····	45
第四章 核酸 ·····陈啸梅、朱蓬第	47
第一节 Schiff 试剂·····	47
第二节 Feulgen 反应示 DNA·····	48
第三节 核酸与碱性染料·····	50
一、甲基绿-焦宁法·····	50
二、甲苯胺蓝-钼酸盐法·····	51
附：核酸的显示方法·····	52
一、Feulgen 反应·····	52
二、三氯醋酸-Feulgen-固绿·····	54
三、甲基绿-焦宁及 RNase 法示 RNA·····	55
四、甲基绿-焦宁技术·····	57
五、甲苯胺蓝法示核糖蛋白·····	58

六、提取方法	59
(一) 提取DNA	59
(二) 提取RNA	60
主要参考文献	61
第五章 糖类	陈啸梅 64
第一节 分类	64
一、多糖	64
二、粘液物质	64
三、糖蛋白	65
四、粘液脂类	65
第二节 保存方法	66
第三节 糖原	66
一、过碘酸-Schiff (PAS)反应原理	67
二、酶消化法	69
第四节 酸性粘液物质及异色性染色	69
一、阳离子基团	70
(一) 阳离子染料	70
(二) 金属阳离子	71
二、荧光抗体法	71
三、同位素标记	71
附：糖类的显示方法	72
一、PAS 反应	72
二、三茂铁甲基羧基酰肼显示糖原	74
三、爱尔蓝示酸性粘液物质 (CEC 法)	76
四、爱尔蓝示中性及酸性粘液物质	77
五、渗析铁法示酸性粘液物质	78
六、甲苯胺蓝法	79
七、甲酸-结晶紫法示类淀粉	80
主要参考文献	81

第六章 脂类	陈啸梅	83
第一节 固定		83
第二节 脂类的显示方法		84
一、物理方法显示脂类		85
二、化学方法显示脂类		86
三、选择性提取		89
四、脂类电镜组化		89
五、组织中的脂色素		90
附：脂类的显示方法		91
一、溴-苏丹黑法示脂类		92
二、油红O示中性脂肪		93
三、酸性氧化苏木精示磷脂		94
四、氢氧化钠-酸性氧化苏木精法示神经磷脂		96
五、硫酸尼罗蓝示酸性及中性脂类		96
六、丙酮-硫酸尼罗蓝法示磷脂		97
七、铜-红氨酸法示游离脂肪酸		98
八、Schultz 反应示胆固醇		99
九、过氯酸-萘醌(PAN)法示胆固醇		100
十、酶的方法示胆固醇及胆固醇酯		100
十一、胞浆反应示缩醛磷脂		102
十二、尼罗蓝示黑色素及脂褐素		102
主要参考文献		103
第七章 酶	陈啸梅	105
第一节 酶的保存及影响酶活性的因素		105
第二节 酶的组化方法		107
一、沉淀反应		107
(一) 金属阳离子沉淀反应		107
(二) 偶联偶氮沉淀反应		108
二、电子传递的方法		110

第三节 组化示酶的保温技术	111
一、盖片染色缸法	111
二、滴加作用液法	111
三、漂浮保温法	111
四、环、框技术	111
五、半透膜技术	112
第四节 酶的超微细胞化学	112
第五节 同功酶	115
主要参考文献	115
第八章 水解酶	陈啸梅 117
第一节 磷酸酶类	117
一、碱性磷酸酶	117
二、酸性磷酸酶	121
三、5'-核苷酸酶	123
四、葡萄糖-6-磷酸酶	124
五、腺苷三磷酸酶	125
六、腺苷酸环化酶	127
七、核苷二磷酸酶	128
八、硫胺素焦磷酸酶	128
第二节 羧酯水解酶	129
一、非特异性酯酶	130
二、胆碱酯酶	131
(一) 乙酰胆碱酯酶	131
(二) 胆碱酯酶	132
第三节 亮氨酸氨基肽酶	133
第四节 β -葡糖苷酸酶	134
一、铁羟基喹啉法	135
二、偶联偶氮法	135
附：水解酶的显示方法	136

✓一、钙-钴法示碱性磷酸酶	136
二、偶联偶氮（同时偶联）法示碱性磷酸酶	137
三、柠檬酸铅法示碱性磷酸酶（EM）	139
四、硫化铅法示酸性磷酸酶（Gomori, 1950）	141
五、硫化铅法示酸性磷酸酶（Chang, 1980）	143
六、偶联偶氮法示酸性磷酸酶	145
七、钼桥连技术示酸性磷酸酶（EM）	147
✓八、铅法示 5'-核苷酸酶	149
九、硫化铅法示葡萄糖-6-磷酸酶	151
十、硫化铅法示葡萄糖-6-磷酸酶	153
✓十一、钙激活的腺苷三磷酸酶	154
✓十二、镁激活的腺苷三磷酸酶	155
十三、钠、钾激活的腺苷三磷酸酶	157
十四、钠-钾腺苷三磷酸酶（EM）	158
十五、线粒体腺苷三磷酸酶（EM）	161
十六、铅法示腺苷酸环化酶	162
十七、铅法示核苷二磷酸酶	164
十八、铅法示硫胺素焦磷酸酶	165
十九、膜技术示总非特异性酯酶	167
二十、同时偶联法示非特异性酯酶	168
二十一、酸性酯酶显示法	170
二十二、亚铁氰化铜法示乙酰胆碱酯酶	172
二十三、铜-铅-硫胆碱技术示乙酰胆碱酯酶及胆碱酯酶 （EM）	175
二十四、氨基肽酶	176
二十五、同时偶联法示 β -葡糖苷酸酶	177
主要参考文献	179
第九章 氧化酶与过氧化物酶	陈啸梅 183
第一节 细胞色素氧化酶	183

第二节	DOPA 氧化酶·····	184
第三节	DOPA 胺- β -羟化酶 (DBH) ·····	185
第四节	单胺氧化酶 (MAO) ·····	185
第五节	过氧化物酶 ·····	187
附:	氧化酶与过氧化物酶的显示方法 ·····	188
一、	细胞色素氧化酶·····	188
二、	二氨基联苯胺法示细胞色素氧化酶 (Seligman 等, 1968) ·····	189
三、	二氨基联苯胺法示细胞色素氧化酶 (Novikoff 及 Gol- dfischer, 1969) ·····	191
四、	DOPA 氧化酶·····	192
五、	四唑盐法示单胺氧化酶·····	193
六、	亚铁氰化铜法示单胺氧化酶·····	194
七、	嗜饿四唑盐法示单胺氧化酶 (EM)·····	195
八、	二氨基联苯胺法示过氧化物酶·····	197
九、	二氨基联苯胺法示过氧化物小体·····	198
十、	髓性过氧化物酶的显示·····	199
十一、	辣根过氧化物酶示踪法·····	200
	主要参考文献·····	202

第十章 脱氢酶及四唑还原酶····· 陈啸梅···204

第一节	四唑盐 ·····	204
第二节	脱氢酶的一般组化·····	207
第三节	不需辅酶的脱氢酶·····	209
一、	琥珀酸脱氢酶·····	209
二、	甘油-3-磷酸脱氢酶 ·····	210
第四节	四唑还原酶 ·····	211
第五节	需辅酶的脱氢酶 ·····	212
一、	尿核苷二磷酸葡萄糖脱氢酶·····	212

二、羟基甾体脱氢酶·····	212
三、甘油-3-磷酸脱氢酶·····	214
四、谷氨酸脱氢酶·····	215
五、异柠檬酸脱氢酶·····	216
六、乳酸脱氢酶·····	216
七、葡糖-6-磷酸脱氢酶和6-磷酸葡糖酸脱氢酶·····	218
八、苹果酸脱氢酶·····	219
九、苹果酸脱氢酶·····	220
附：脱氢酶及四唑还原酶的显示方法·····	220
一、结合酶的标准方法·····	220
二、可溶性酶的标准方法·····	223
三、琥珀酸脱氢酶·····	224
四、亚铁氰化铜法示琥珀酸脱氢酶 (EM)·····	226
五、BSPT 示琥珀酸脱氢酶 (EM)·····	227
六、尿核苷二磷酸葡糖脱氢酶·····	229
七、3 β -羟基甾体脱氢酶·····	230
八、谷氨酸脱氢酶·····	231
九、乳酸脱氢酶显示法·····	233
十、明胶凝胶作用液示乳酸脱氢酶·····	235
十一、钼桥连技术示乳酸脱氢酶 (EM)·····	236
十二、嗜钼四唑盐示乳酸脱氢酶(EM)·····	240
十三、PVA 法示乳酸脱氢酶同功酶·····	242
十四、葡糖-6-磷酸脱氢酶·····	244
十五、苹果酸脱氢酶·····	245
主要参考文献·····	247
第十一章 转移酶 ·····陈啸梅··	250
第一节 胆碱乙酰化酶·····	250
第二节 肉毒碱乙酰化酶·····	251
第三节 γ -谷氨酰转肽酶·····	252

第四节	磷酸化酶	253
附:	转移酶的显示方法	254
一、	胆碱乙酰化酶	254
二、	亚铁氰化钾法示肉毒碱乙酰化酶	255
三、	镉法示肉毒碱乙酰化酶	258
四、	γ -谷氨酰转肽酶	259
五、	γ -谷氨酰转肽酶(EM)	260
六、	磷酸化酶	262
第十二章	生物胺荧光组织化学技术	彭俊云 266
第一节	甲醛、乙醛酸诱发生物单胺荧光化学	
	反应原理	267
一、	甲醛诱发生物单胺荧光化学反应	267
二、	乙醛酸诱发生物单胺荧光化学反应	269
第二节	生物单胺递质荧光的鉴别	271
一、	生物单胺递质荧光团之间的区别	272
	(一) 滤光片区别法	272
	(二) 荧光显微分光光度计区别法	272
二、	醛类诱发生物单胺递质荧光团的荧光与组织内自	
	发荧光的区别	272
	(一) 氢硼化物反应区别法	272
	(二) 紫外光照射区别法	272
	(三) 水淬灭荧光区别法	273
	(四) 空白对照区别法	273
第三节	邻苯二醛显示组织胺荧光法	273
第四节	荧光显微镜观察和照相	274
一、	荧光显微镜观察	274
二、	照相	276
附:	生物胺荧光显示法	277
一、	甲醛诱发生物单胺递质荧光法	277

(一) 冰冻干燥、甲醛蒸气诱发荧光石蜡切片法显示 生物单胺递质	277
(二) 薄膜组织铺片甲醛诱发荧光法显示生物单胺递 质	280
二、乙醛酸诱发生物单胺递质荧光法	281
(一) 恒冷箱切片机切片乙醛酸诱发荧光法显示生物单 胺递质	281
(二) 薄膜组织铺片乙醛酸诱发荧光法显示生物单胺 递质	282
三、铝-甲醛显示生物单胺递质荧光组织化学技术	284
(一) 铝-甲醛冰冻干燥石蜡切片法显示生物单胺递 质	284
(二) 铝-甲醛恒冷箱切片机切片法显示生物单胺递 质	288
四、氢硼化钠特殊试验	289
五、邻苯二醛显示组织胺荧光法	290
六、恒冷箱切片机切片的 CA 与多巴胺 β -羟化酶的连 续显示法	292
七、去甲肾上腺素和乙酰胆碱酯酶的同时显示法	294
八、乙醛酸诱发儿茶酚胺荧光和乙酰胆碱酯酶连续显 示法	295
主要参考文献	297
第十三章 免疫组织化学方法	周文郁 299
第一节 荧光抗体法	299
一、荧光抗体法的原理	300
二、荧光染色液的制备	302
(一) 免疫球蛋白 (IgG) 的调制	302
(二) 荧光素及其标记原理	304
(三) 标记荧光素的具体步骤 (以 FITC 为例)	306

(四) 非特异染色的去除	307
(五) 荧光抗体液的检定	309
三、染色标本的准备	310
四、染色	312
(一) 荧光染色的注意事项	312
(二) 染色方法与步骤	313
(三) 对照染色	315
五、荧光显微镜观察及其在组化定位中的应用	316
第二节 酶标抗体法	316
一、酶标抗体液的制备	317
(一) 免疫球蛋白 (IgG) 的调制	317
(二) 标记用的酶及其纯化方法	318
(三) 标记与精制的方法	320
(四) 酶标抗体液的检定	322
二、组织材料的处理	323
(一) 固定	323
(二) 切片标本	325
三、染色	325
(一) 光学显微镜标本的染色	325
(二) 电镜标本的染色	328
(三) 对照染色法	329
四、镜检时注意事项	329
主要参考文献	330

第十四章 定量组织化学技术——显微分光光度测

量法 周文郁 ··· 331

一、原理	331
二、显微分光光度测量法的特殊性	333
三、几种常用的显微分光光度测量法简介	334
(一) 固定光束测定法	334