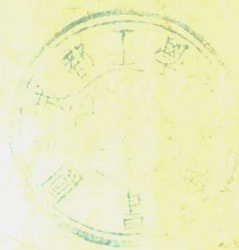


127074

基本館藏

酶的組織化学法

汪堃仁 著



68
102

科学出版社

酶的組織化學法

汪堃仁 著

科學出版社

1957年9月

內 容 提 要

本書簡扼地闡述組織化學的原理，它的基本概念，應用它來顯示各種酶的方法。並重點介紹了磷酸酶在身體內各器官中分佈的位置，通過磷酸酶的功能說明組織化學工作的意義。因此本文不但是組織化學有關酶方面的基本知識介紹，同時也結合目前國內外的研究工作加以深入綜合。可供我國目前對這方面研究作參考。

酶 的 組 織 化 學 法

汪 堃 仁 著

*

科學出版社出版（北京朝陽門大街117號）

北京市書刊出版業營業許可證出字第061號

上海大眾文化印刷廠印刷 新華書店總經售

*

1957年9月第一版 書號：0880 印張：1 3/4

1957年9月第一次印刷 開本：850×1163 1/32

（滬）0001—1,646 字數：41,000

定價：(10) 0.36 元

目 录

第一章 前言	(1)
一. 組織化学的定义	1
二. 組織化学上存在的困难問題	2
三. 研究組織化学的方法	2
四. 研究組織化学应注意的問題	5
第二章 組織化学显示酶的方法介紹	(7)
一. 氧化酶	7
(一)过氧化酶	7
(二)多巴氧化酶	8
(三)胺氧化酶	9
(四)細胞色素氧化酶	10
(五)琥珀酸去氫酶	11
二. 水解酶	12
(一)尿素酶	12
(二)硷性磷酸酶	13
(三)酸性磷酸酶	17
(四)其他磷酸酶类	19
(五)脂肪酶	25
(六)醛縮酶	27
第三章 磷酸酶在身体各器官中存在的部位	(29)
一. 正常組織中硷性磷酸酶存在的部位	29
二. 酸性磷酸酶存在的部位	32
第四章 磷酸酶的功能	(35)
一. 磷酸酶与鈣化作用的关系	35
(一)正常的鈣化作用	35

(二)不正常的钙化作用·····	36
(三)糖元及其第二种机制的作用·····	38
(四)激素与維生素的影响·····	39
二. 磷酸酶对于运输机制的关系·····	40
(一)腎內細尿管中的磷酸酶·····	40
(二)腸粘膜內的磷酸酶·····	42
三. 磷酸酶与生長及分化的关系·····	44
(一)正常情形·····	44
(二)腫瘤·····	45
(三)磷酸酶与核酸的关系·····	46
(四)酸性磷酸酶与生殖的关系·····	47
总結·····	(48)
参考文献·····	(50)

第一章 前 言

一. 組織化学的定义

一般講来，組織化学研究的对象是生物体組織內化学成分的性质、分布及其变化；就其狭义方面而言，这门科学仅是利用显微镜研究各种化学成分在不同組織形态中的位置的分布及其变化。純粹組織的、以及組織成分的化学研究，則并不包括在此範圍中。組織化学 (histochemistry) 及細胞化学 (cytochemistry) 都是从事細胞及細胞內各部分中的化学重要成分的研究，这种新的研究方向已扩充旧有的生物化学上的範圍来研究器官、血液及排泄物，同时也不仅仅就限于利用構造上的描述来增进形态方面的知識，而是应用它的化学特性及其功能和在細胞內与細胞外的形态上所发生的重要关系加以研究。因此組織化学与一般生物化学是不同的，后者系研究細胞与細胞間化学物質的性质，組織化学則要研究这些物質在細胞內或細胞間的存在位置。例如分析骨骼肌內的无机鹽时，一般生物化学是測定这些物質的性质与分量，組織化学則是測定在肌纖維中組織四周空隙內，以及在結締組織細胞中于一定的時間內及某一特殊部分，每种无机鹽的存在情形。再如当研究核酸 (nucleic acid) 时，組織化学的工作为測定在各种不同的活动情形下各种不同細胞內染色体小核、核漿以及細胞質內含有多少的核酸，而生物化学仅是研究組織內核酸的性质与分量。所以組織化学注意的方向是在已知的組織空隙中、細胞中寻求其化学物質在形态上的分布，更进而研究在核与細胞質構造中所存在的問題。

这种研究的发展，則有賴于仪器和方法上的改善。从事这种

研究的有两个方向:一个方向为形态方面的方法,它是应用染色的反应来研究的;用这种方法,可以定性地把化学物質或酶的位置寻找出来;其他一个方向为定量的方法,此种方法并不能將化学物質以及酶的精細位置找出,但是能借以测定其含量。很明显的,如果我们能建立一种方法,既能定量,同时又能测出这些生物重要的成分在形态上的位置时,那就是最理想的方法,不过,現在还没有适合于这个方法。

二. 組織化学上存在的困难問題

虽然这些年来从事組織化学的研究已經很多,但是和我們想要追求的结果,还是相差很远,这些困难的問題是值得注意的。

(一)在組織內所要寻求的化学成分,它的濃度常常是超出了我們所用的測定方法的限度,因此难以測定。

(二)有許多物質在細胞中是相互联結在一起,形成一种复杂物質,很难单独研究之。

(三)組織內所具有的瀰散作用、溶解度、变性現象以及在不活动情形时都是研究的困难因素。

(四)在一种复杂的混合物質中,我們企图觀察到某一种化学物質时;因为沒有一定的法則可以应用,所以对試驗的准确性及方法的限度性,难以确定或批判。

由于技术上种种的困难,所以組織化学的工作,現在大部分工作仍然还是限于描写的、定性的以及区分的阶段中。

三. 研究組織化学的方法

关于研究化学物質在形态方面的問題,可以用下列两种方法来研究:

(一)应用适当的化学及物理方法直接觀察組織內这些化学物質的位置。

● (二)应用統計方法比較組織切片的化学分析的結果与其組織切片的形态結果,就是在顯微鏡下觀察的結果来进行比較研究之。如 Linderstrom-Langholter 的方法 (1939)。他在这方面的工作很多。例如他們利用此法証實了胃粘膜內主細胞系分泌胃蛋白酶元的細胞,他們的方法是將粘膜的切片与蛋白質底質一起保溫,并給以鹽酸,同时又用隣近的切片做組織学上的觀察,結果証明只有在主細胞最多的地方其消化蛋白質最快。同时他們也直接証明胃內鹽酸系壁細胞所分泌的,他的方法是將新鮮胃粘膜的冰切片,它系由粘膜表面平行向內层切,在連續切片中,一片用組織学染色,其次一片用礮滴定之,如是交替来做,証明最大酸度是在粘膜壁細胞最多的地方,沒有壁細胞的地方,也沒有鹽酸。

本文仅就第一种直接觀察化学物質的方法,加以討論。在操作上要使研究的化学物質在形态位置上得到正确的結果,則必須具备下列两个条件:第一,所显示出来的化学物質,必須还要保存在那生活組織中原有的地位,避免那些由于制片时所引起的彌散作用,以及滲透作用而发生的移位現象 (displacement)。第二,所有用来測定化学物質之物理的及化学的方法必須要能应用到組織切片方法上,而且所得的結果必須清晰及穩定。关于第一点,例如当显示脂肪及蛋白質类似的物質时,因为这些物質均不溶解,同时彌散的也慢,所以困难較少。但是如果研究那些易于溶解的,和具有彌散性的物質时,就需要設法避免发生移位作用。这个問題最好解决的方法,就是用冰冻真空去水法 (freezing-drying method) 来將某些物質很快的在原来位置上固定,以后在真空負压內用物理方法抽出組織內的水分,以便組織的滲蜡 (embedding),制成切片。这个方法系 Altmann 氏 (1890) 所发明,后由 Gersh (1932) 改善之,并且將它应用到切片学上。

冰冻真空去水法的主要步驟介紹如下:

(1) 將一小块新鮮的活組織放入液体空气中,或放入經液体

空气冷冻的异戊烷 (isopentane) 溶液中固定。在这种液体的低温情形下 (大約为 -195°C)，組織立即冻结，同时組織中所有的液体部分均变为固态。

(2) 經冰冻固定后的組織放在低溫度 (-31° 至 -21°C) 的真空中，慢慢抽取其水分。应用这个方法，在整个操作步驟中，組織內沒有液体的存在，因此由于瀰散作用而引起的移位現象，就不会发生。在低温真空中將經過冰冻固定的組織去水，以制备切片是需要一套特殊的仪器的。Gersh (1932) 設計的仪器是非常复杂，一般試驗室添設頗感困难。关于制备冰冻固定真空去水切片法的仪器，汪堃仁 (1949a) 曾設計了一种簡單的仪器，在時間上和物質上都比較經濟些。詳細內容，可参考原文。在这方面的設計的簡單方法是很多的。

(3) 完全去水以后的組織，可以在真空条件下中滲蜡，因为在固定去水过程中未用任何化学药品 (如酒精等) 来抽去組織中的水分，所以組織內就沒有产生瀰散作用的机会。

(4) 这样制备的組織蜡块可以切成薄片，然后放入化学剂中进行研究。例如測定氮、磷及碳酸鹽時可用含銀离子的溶液，如欲測定鉀時可以用亞硝酸鈷鈉溶液；在形成沉淀物的部位即可認為有这种离子的存在，然后可做再进一步的分析。例如碳酸銀及磷酸銀可以与氯化銀分开，因前者可溶于稀醋酸中。又如亞硝酸鈷鉀即可用其顏色和其結晶的形狀以区别之。但無論如何，由这种方法所制备的切片还必須經过去蜡的步驟以及各种的溶液，然后才能到达可以用来观察反应的目的。因此，由于瀰散作用所发生的移位現象，仍不能完全消除，可是已减低許多的可能性了。因此冰冻真空去水法仍然是一种比較好的方法。

經過这样固定去水的方法所制备的組織切片，就可利用染色的方法来寻求組織內的化学物質，以及这些化学物質在細胞內与組織構造內的活动情形。許多形态学者早已建立了并且也曾試用

了一些化学鑑定的反应到組織切片方法上；不幸的是大多数的染色方法，价值很小，原因是这些方法中忽視了它們的化学特异性 (specificity)，或者由于这些化学反应不能作用到真正的原位上 (localization)。因此一般化学物質在組織化学方面的研究就必须注意下列这些問題：

四．研究組織化学应注意的問題

(1) 制备切片时，不使那些想要观察的化学成分的位置有重大的改变。

(2) 需要一种特别适合于这种組織成分的試剂。

(3) 在試剂和化学成分二者之間的反应必須要相当迅速，以避免化学成分或其反应产物間的瀰散作用。

(4) 在組織中所产生的反应物質必須是容易观察得出的。(帶有顏色的)

現在組織化学中有些方法可以用来显示出細胞或組織中酶的位置，关于显示酶在組織的分布情形則更要注意下列几項：

(5) 当一种試剂加到具有緩冲剂的底質 (buffered substrate) 內时，它只可以与在反应过程中由于酶和底質作用所生的一种产物发生作用，而不能与底質或緩冲物发生反应。

(6) 必須选择一种对于酶本身无影响的試剂。

(7) 假如与試剂发生反应的酶作用后的产物是一种在組織內原来就有的物質，这时候必須要將活动部位与那些原来就存在的物質的部位加以区分；或是增加由酶活动所产生的那些可以辨别出的化学物質的分量，或者最好是应用一种不伤害酶的方法將这种早已存在的化学物質提出。

(8) 必須同时做一种对照实验，在这种实验中，或者是切片不經過底質溶液，或者是加入一些有效的而又可以溶解的，并且对于酶具有抑制作用的物質；例如氟化物加到底質中，可以抑制某些酶

的活动,但是所加入的物質要对于底質、緩冲物及試剂和酶的产物又均不发生作用。

因为只有很少数的方法符合以上的条件,所以多数已发表的工作,不但价值很小,而实际上反倒是錯誤的。其中最困难就是怎样在原来的部位中找到这些化学成分,因为許多物質常常是具有强的瀰散作用,如无机游子等。所幸酶本身的瀰散作用較低,所以酶在細胞中的位置可以找得比較可靠些。如果一般的固定液不完全毁坏酶的活动时,亦可以用来帮忙保持其原来的位置。当然最好的方法还是利用冰冻真空去水法来研究酶在組織中的位置,以减少瀰散作用。关于这点 Gersh 曾用 Zenker-Formol 固定的組織与冰冻真空去水法的組織来研究,比較鈍口鰈 (amblystoma) 肝細胞內的动物淀粉,在两种不同方法制备的切片中表現动物淀粉分布不同。用 Zenker-Formol 化学剂固定的組織,細胞中的动物淀粉发生瀰散作用,且分布不均;而在冰冻真空去水法中的組織,細胞內的动物淀粉則分布一致。Mancini氏(1948)亦曾利用組織化学方法以研究各种組織內的动物淀粉,用化学固定法及冰冻真空去水法切片以作比較,結果認為用后一方法所显出的动物淀粉比前一法为多,同时分布也比較規則。無論是在鸡的軟骨細胞中,或肝、阴道及皮肤的上皮細胞中,或子宮內皮、脂肪組織、胎盤、腎臟以及其他产生动物淀粉的器官中,动物淀粉的分布均为一致。作者(汪堃仁,1949B)曾在狗及貓的各种組織中,用普通化学剂(80%酒精)固定与应用作者(1949A)所設計的簡單仪器做冰冻真空去水法制成的切片以研究硷性磷酸酶,用这两种方法所制的同一組織切片放在同一載玻片上,然后置于 Gomori 氏(1941)的底質溶液中保溫(37°C) pH 值为 9.3。由这种比較研究的結果发现在冰冻真空去水法制备的切片中找到一些的硷性磷酸酶而在化学固定的切片中則未見到,这点說明經過化学固定后的組織可以將其中酶的活动减低。

第二章 組織化学显示酶的方法介紹

一. 氧化酶(Oxidative enzyme)

关于氧化酶染色方法的报告很多, 这些报告的原理是建立在酶活动时的产物所发生的有颜色的化合物上, 但是值得注意的是这种带有颜色的化合物常常是溶解在形成它的媒介物中, 这种扩散作用也会改变了这些酶的正常位置。

(一) 过氧化酶(Peroxidase) Armitages (1939) 及 Mcjunkin (1922) 二氏关于过氧化酶的方法是根据組織中的酶作用到下列的底質时, 由藍色变为棕色的結果以显示之。底質溶液內包含有联苯胺 (benzidine) 及过氧化氢溶于 30—40% 的美藍溶液內。Mcjunkin 氏方法曾应用它以研究人的組織, Armitage 氏曾应用它以观察血及骨髓涂片中的过氧化酶。

1. Mcjunkin 氏显示过氧化酶的組織切片方法:

(1) 將經過福美林固定的組織一小块, 約一厘米厚, 置于70% 的丙酮(acetone)中, 一小时后再放到純丙酮中30分鐘, 苯(benzol)內20分鐘, 再放到熔化的蜡中20分鐘。

(2) 將組織切成薄片 (3.5—5.0 微米), 然后置于涂过蛋清(albumin) 的載玻片上, 在室溫中过夜。

(3) 切片放在苯 (benzol) 中20秒以去蜡, 然后經過丙酮10秒。

(4) 切片放在水中数秒鐘, 吸干过多的水分, 然后放入联苯胺溶液中5分鐘, 再放到水中5分鐘。

联苯胺溶剂配制法 溶解100毫克的联苯胺于25毫升之80% 的甲醇(methanol)中, 再加两滴3% 的过氧化氢。存在黑暗处, 用

时加一二倍水。

(5) 切片再經過 Harris 氏苏木紫 (hematoxylin) 染色 2 分鐘, 在水中洗 1 分鐘, 然后在 0.1% 的曙紅 (eosin) 中染 20 秒鐘。

(6) 切片在 95% 酒精中去水, 放在純酒精中 5 秒鐘。

(7) 切片在甲苯 (xylol) 中透明, 用树香 (balsam) 封固之。

(8) 同时同样制备对照切片, 一切手續如上, 只是不要經過联苯胺溶液。

2. Armitage 氏显示血或骨髓涂片的过氧化酶方法:

(1) 血或骨髓涂片固定于酒精, 福美林溶液中 (10% 的福美林溶于 96% 的酒精中)。

(2) 用联苯胺試剂盖于涂片上, 如涂片是新鮮的 2 分鐘即可, 如果是陈旧的涂片則需 20 分鐘。

联苯胺試剂 溶解 750 毫克的联苯胺于 500 毫升的 40% 酒精中, 然后加 0.7 的 3% 过氧化氢, 用时搖动, 如在黑暗中保存, 試剂可以經月不坏。

(3) 涂片在 40% 酒精中冲洗, 直至黃色顆粒可以在白球中显出时为止。

(4) 涂片在純酒精中去水, 在 37°C 溫箱內使之干燥。

(5) 用稀的 Giemsa 氏染料或稀的 Leishman 氏染料复染之, 30 分鐘即可, 繼以水洗, 然后再干燥之。

結果: 有黃色顆粒处为有过氧化酶阳性反应的結果。

(二)多巴氧化酶(Dopa oxidase) Bloch 氏的关于多巴氧化酶的方法被 Laidlaw (1932) 及其同事在組織化学方法上采用了。这个方法系用加有磷酸緩冲剂 (pH 7.4) 的多巴溶液做为底質, 經酶的作用可將多巴 (3,4-dihydroxyphenylalanine) 变为黑色素 (melanin), 因此切片显出黑色。

1. Laidlaw 氏 (1932) 方法:

(1) 准备新鮮組織的冰凍切片 (組織在 5% 福美林溶液中硬

化 2—3 小时即可应用)。

(2) 切片在蒸餾水中冲洗数秒鐘，然后立即換含有緩冲剂的多巴溶液中。此溶液 pH 为 7.4。内含 2 毫克二氫磷酸鉀 (9 克 KH_2PO_4 /升) 及 6 毫升一氫磷酸鈉 (11 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /升)，放到 25 毫升的多巴溶液中，然后過濾。在 30—37°C 中放置 2 小时，此溶液即变成紅色，3—4 小时后变成紅棕色。当切片如变成紅棕色时即需取出，以免染色过度，必要时常常要在显微鏡下观察，以决定正合适的染色濃度。

(3) 切片在蒸餾水中冲洗，去水，用酒精溶解的焦油紫 (cre-syl-violet) 或 methyl green-pyronine 复染之。

(4) 切片經透明后用树膠封固之。

(5) 同样制备对照切片，与上法不同点是对照切片当經(2)步驟时用下列緩冲液(对照試剂)以代替含緩冲剂的多巴氏溶液。

对照試驗所用之緩冲液为用 25 毫升的蒸餾水代替上列(2)項內的含緩冲剂的多巴液中的多巴溶液即可，所含磷酸鹽的量則相同。

結果：切片中黑色处代表多巴氧化酶的位置。

(三) 胺氧化酶 (Amine oxidase) 胺氧化酶系由 Oster 及 Schlossman (1942) 二氏在組織切片中所显示者。他們利用酶氧化了酰胺 (tyramine) 的結果而形成醛 (aldehyde) 的事实，再用 fuschsin-sulfurous acid, Feulgen 試剂与这种醛发生作用可以产生藍色，以便在显微鏡下观察而寻求这种酶的位置。致于在組織中原有的醛可以在加酰胺底質前，用重硫酸鈉液以抑制之，使不致与由酶所产生的醛相混。

1. Oster 及 Schlossman 氏(1942)的“胺氧化酶”方法：

(1) 將新鮮組織的冰凍切片置于 2% 重硫酸鈉溶液中 24 小时，放在 37°C 溫度中。用水洗后取出，用 fuschsin-sulfurous acid 試剂試驗之，結果必需呈无色以表示組織內原有的游离醛均被消

除。

(2) 在下列底質溶液中保溫 (37°C) 24 小时, 同时对照切片也要經過对照溶液。

底質溶液配制法 置 0.5% 鹽酸酞胺 (tyramine HCl) 于 M/15 磷酸緩冲液中校准至 pH 7.2。

对照溶液配制法 在上列底質溶液(磷酸緩冲液)中不加鹽酸酞胺。

(3) 將切片置于 fuchsin-sulfurous acid 試剂中染色。

(4) 在显微鏡下观察切片直至有藍色形成为止。

結果: 酶活动区呈藍色。

(四)細胞色素氧化酶 (Cytochrome oxidase) Lison (1936) 开始在組織化学工作中試驗細胞色素氧化酶, 这种酶曾被認為是 nadi 氧化酶, 或酞基酚氧化酶 (indophenol oxidase), 直至 1935 年 Keilin 及 Hartree (1935) 方用細胞色素氧化酶这个名詞, 使之更明确些。因为这种酶接触的效果, 可以使还原性的細胞色素起氧化作用。組織內有了細胞色素 C 的存在, 則細胞色素氧化酶就可以氧化对氨基二甲苯胺 (p-aminodimethylaniline) 及 α -萘醇 (α -naphthol) 使之变为酞基酚; 或者是使对苯烯二胺 (p-phenylene-diamine) 变为二亞胺 (diimine)。所产生帶有顏色的化合物的部位即指明这是酶在組織中存在的地点。

1. Graff 氏显示細胞色素氧化酶的方法:

(1) 在福美林气中固定組織二小时, 或在 10 毫升的福美林与 40 毫升的 96% 酒精混合液中固定之。

(2) 准备冰切片, 置于载玻片上, 然后放到曾涂过一层薄的 nadi 試剂的玻璃盤中, 小心搖动, 使此溶液氧化, 过 1—5 分鐘以后, 用水洗再观察之。

Nadi 試剂配制法 以等容量的 α -萘醇与对氨基二甲苯胺溶液混合, 这种混合液用时配制之, 过濾。

1) α -萘醇溶液 取 1 克的 α -萘醇溶于 100 毫升的蒸餾水中煮沸之, 然后加 25% 氫氧化鉀, 直至 α -萘醇溶解为止。放在暗处, 至少可保存到一个月。

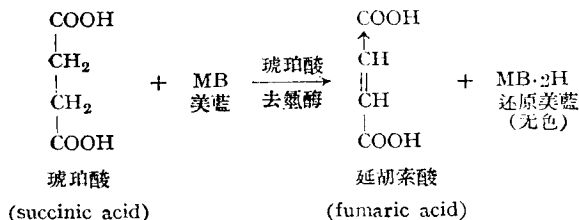
2) 对氨基二甲基苯胺溶液 取 1 克对氨基二甲基苯胺溶于 100 毫升蒸餾水中, 煮沸使之溶解, 存在暗处, 可保存 2—3 週。

(3) 切片在稀的盧戈氏溶液 (Lugol solution) 中, 放置 2—3 分鐘, 使顏色更为稳定。盧戈氏溶液可使藍色顆粒变为棕色。以后切片放在碳酸鉀中恢复其藍色。濃的鉬酸鉍溶液可用来代替盧戈氏溶液。

(4) 用俾斯麦氏棕 (Bismark brown), 番紅花紅 (safranin) 或胭脂紅鋁礬 (alum carmine) 复染之, 染好的切片用甘油或甘油膠以封固之。

結果: 細胞色素氧化酶所在处呈藍色的反应。

(五) 琥珀酸去氫酶 (Succinic dehydrogenase) Semenoff (1935) 发现琥珀酸去氫酶可以在組織切片中显出, 他利用美藍与琥珀酸的混合液中的还原作用以証明之。在酶的活动区域中这种藍色顏料可以退色。于是找出酶的所在地。他将新鮮未曾固定的冰冻切片放在琥珀酸鈉及美藍混合液中染色, 然后切片, 再置于載玻片上, 盖上盖玻片, 周圍密封, 使不致透气。切片中美藍顏色消失处即指明該处有这种酶的存在。煮过后的組織就没有这种反应。其反应化学式如下:



方法:

(1) 准备冰冻切片。

(2) 將切片置于下列底質溶液內 10—15 分鐘, 在盖玻片下須无气泡。盖片四周用蜡封閉。

底質溶液配制法——取 2 毫升的 10% 琥珀酸鈉加到 2 毫升的 0.05% 的美藍溶液中, 然后加 M/15 磷酸緩冲液至 10 毫升。其 pH 为 7.6—8.0。

(3) 在显微镜下观察, 同时与对照切片相比較, 对照底質中无琥珀酸鈉。

結果: 藍色消失处即这种酶的活动地点。

二. 水解酶(Hydrolytic enzyme)

(一) 尿素酶(Urease) Sen (1930) 氏发明一种方法可以在組織切片中找出尿素酶的位置。他用洋刀豆(jack bean)做研究, 当尿素破坏时所形成的碳酸可以沉淀为碳酸鈣, 碳酸鈣又可以变成碳酸銀, 然后还原之使变为金属銀的黑色沉淀物而显出; 或者使碳酸先变成碳酸鈷, 以后再变成硫化鈷的棕色及黑色沉淀而可以在显微镜下观察之。

这种方法以后被 Gomori 氏应用来染磷酸酶, 因磷酸酶作用时要发放磷酸, 然后再設法显出之。所不同的是 Sen 氏先把組織放在底質溶液內产生水解作用, 然后再行浸蜡与切片, 最后用硫化物(sulfide)作用到还没有去蜡的切片上, 以使没有顏色的碳酸鈷变成黑色的硫化鈷。照这种方法制备切片有許多困难; 故 Gomori 氏在制备磷酸酶时先将組織制成切片, 然后将切片放在底質溶液中經水解作用。因为有些酶是可以抵抗切片过程时的去水、封蜡以及去蜡等步骤的, 故照这种方法制备当較妥善。

1. Sen 氏 (1930) 显示尿素酶的方法:

(1) 將洋刀豆組織放于 1% 的硝酸鈷 (溶于 80% 的酒精中) 1 小时。