

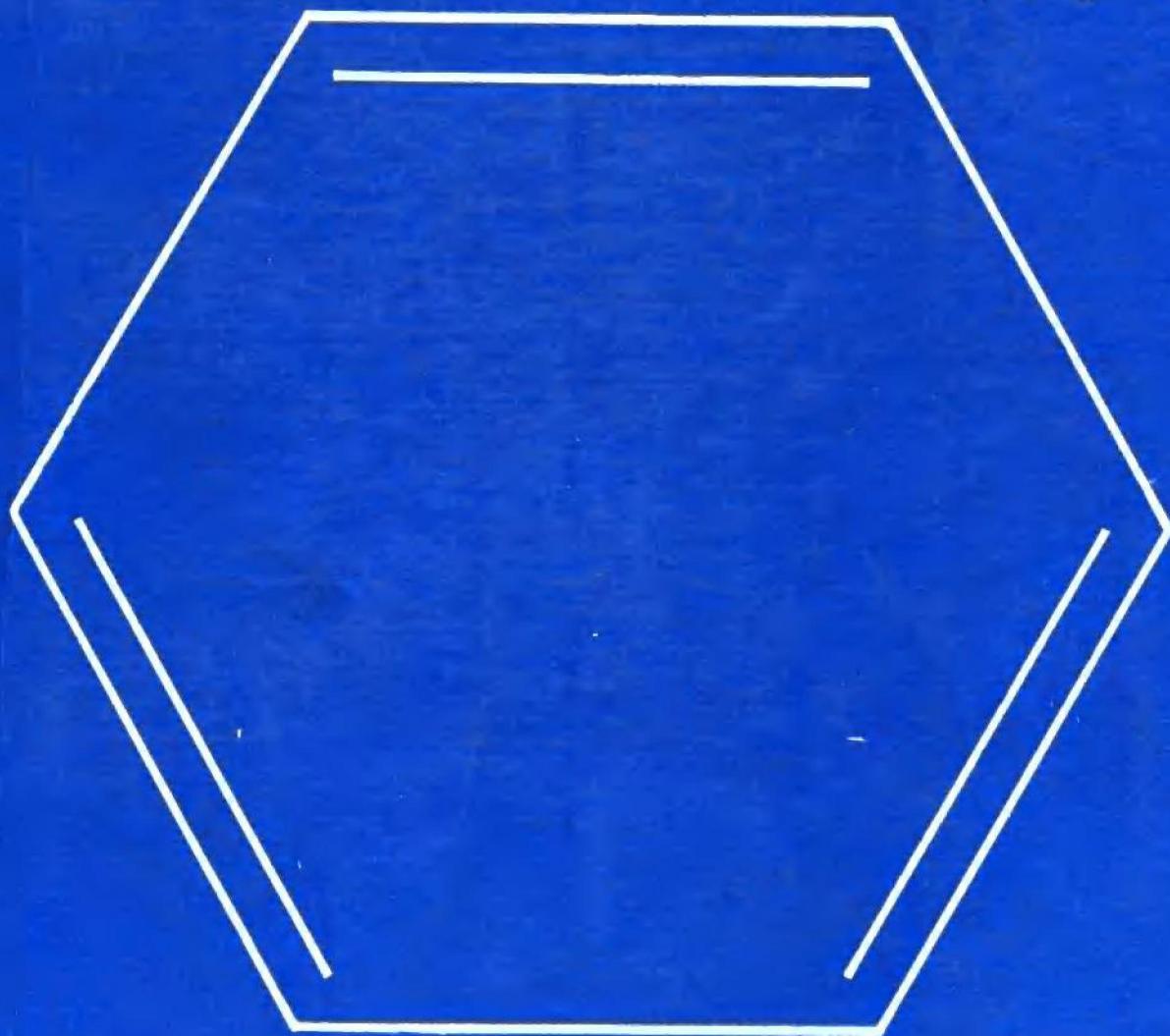
# 组织化学

理论和实用

卷二：分析技术

[英] A. G. E. 皮尔斯 著

马仲魁 主译



中国医药科技出版社

1  
R329.2  
PES

# 组织化学 理论和实用

## 卷二：分析技术

〔英〕A. G. E. 皮尔斯 著

马仲魁 主译

中国医药科技出版社

Histochemistry  
Theoretical and applied  
Volume 2  
Analytical technology  
A. G. Everson pearse  
4th ed.  
Churchill Limited  
Edinburgh London and New York  
1985

## 组 织 化 学

理论和实用

卷二：分析技术

〔英〕A.G.E. 皮尔斯 著

马 仲 魁 主译

★

中国医药科技出版社 出版  
(北京西直门外北礼士路甲38号)  
天津宝坻县第二印刷厂 印刷  
新华书店北京发行所 发行

★

开本787×1092mm<sup>1</sup>/16 印张 40.5 插页7  
字数 974 千字 印数 1—2000  
1990年12月第1版 1990年12月第1次印刷  
ISBN 7-5067-0145-6/R • 0145

---

定价：25.00元

## 译 校 者

主 译 马仲魁

译 者 马仲魁 天津医学院组织胚胎教研室

章燕程 天津医学院组织胚胎教研室

陈雪娴 天津医学院组织胚胎教研室

刘 皓 天津医学院组织胚胎教研室

徐大群 天津市计划生育研究所

杨树森 天津医学院寄生虫教研室

朱静和 天津医学院寄生虫教研室

校 者 虞光明 天津医学院化学教研室

马仲魁 天津医学院组织胚胎教研室

朱铭清 天津医学院组织胚胎教研室

(译校者按译文章节先后为序)

## 编辑说明

由〔英〕A.G.E.皮尔斯著，天津医学院马仲魁教授主译的《组织化学——理论与实用》一书，共分三卷。卷一：制备与光学技术，已于1985年由人民卫生出版社出版；卷二：分析技术，由中国医药科技出版社出版。

在本书出版过程中，承蒙天津医学院院长吴咸中教授鼎力支持，同时得到责任编辑于素芝副编审大力支持，谨此致谢。

译者

1990年12月

## 序 言

一个人的能力是有限度的，除了少数卓越者外，鲜能使自己早年出版的文学和科学书刊得以保持其量与质，尤其是后者。随着这一卷，作为一个单一著者，任务已经完成，第三卷亦即末一卷，是由一些有才智的酶组织化学家所写的，并且是由Dr. Peter Stoward FRSE和我本人共同主持编写的。

组织化学继续在扩展，其技术在各门学科中的应用与日俱增。在非医生物科学中扩展余地尚广；至于医学科学中，我特别高兴看到：病理学中由于组织化学特别是免疫组织化学技术的应用，在组织发生中产生了革命性的成果。

我对组织化学作为应用技术的信心，从未动摇过。对于这种信心肯定现在较之37年前更加增强，那时它占据我职业生活的大部，我衷心地希望这一卷以及随之而来的多著者卷，将鼓励、支持各涉及到的学科中更大更好的努力。

A.G.E.皮尔斯 著

马仲魁 主译

## 目 录

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| 12. 蛋白质·肽和氨基酸·····        | ( 1 )   |
| 13. 简单和糖基化蛋白质的应用组织化学····· | ( 106 ) |
| 14. 核酸和核蛋白·····           | ( 181 ) |
| 15. 第一部 碳水化合物和粘物质·····    | ( 252 ) |
| 第二部 亲和细胞化学·····           | ( 341 ) |
| 16. 脂类、脂蛋白和蛋白脂类·····      | ( 375 ) |
| 17. 醛和酮·····              | ( 447 ) |
| 18. 色素和色素前体·····          | ( 473 ) |
| 19. 生物胺·····              | ( 528 ) |
| 20. 无机成分和异物·····          | ( 574 ) |

## 12. 蛋白质、肽和氨基酸

### 引 言

组织标本中，蛋白质到处都有。尽管如此，组织学家们有时欲在一个特定处所或在一个特定细胞器中证实蛋白质的存在。在这种情况下，他们有可能还要鉴定其主要氨基酸的性质，这种工作在过去已得到了一些重要成果。但蛋白质组织化学的经典分析技术已在相当程度上让位于免疫细胞化学方法（第6章）、亲合细胞化学（第15章）和放射自显影法（第9章）。

上述学科中的第一项和第二项给特定蛋白质和肽提供了精确辨认和定位，而第三项则将范围扩展到个别氨基酸。

蛋白质由 $\alpha$ -氨基酸组成，后者之间由于失水结合而形成聚酰胺。如此，它们应属于生物聚合物大类，后者的其余两个主要成员为核酸和多糖。氨基酸残基间的酰胺键名为肽键，所以由氨基酸链组成的分子名为多肽。及到一定大小（氨基酸残基数），一般认为分子量约为3000（50个残基）时，多肽则称为蛋白质。

虽然已知道有100个以上的天然氨基酸，但出现在多数蛋白质中的只有20个，其中有两个：羟基脯氨酸和羟基赖氨酸则只限于在胶原（蛋白）中（第13章）。

### 蛋白质的分类

蛋白质首先分为：①单纯蛋白质，按照生物化学定义是经水解后，产物主要是 $\alpha$ -氨基酸及其衍生物；②结合蛋白质，经水解后，产物除上述物质外，还有很多非蛋白质物质。

单纯蛋白质一般又分为纤维蛋白质和球状蛋白质两大类。第一类包括胶原、网硬蛋白、角蛋白、肌球蛋白、弹性蛋白、血纤维蛋白原和血纤维蛋白；而第二类则含有清蛋白、球蛋白、珠蛋白和组蛋白。按定义而论，纤维蛋白是强结构物质，不溶于水和稀的盐溶液，而球蛋白则溶于水系，并易扩散。近年来这种区别逐渐模糊，举例来说，肌球蛋白和血纤维蛋白原本是纤维蛋白，可是全溶于水。许多球蛋白，原先认为是单纯的，近来知道含有碳水化合物，按理则应属于结合蛋白，表43示结合蛋白，但不完全。



表43 结合蛋白质

| 类 别           | 辅 基                      |
|---------------|--------------------------|
| 核蛋白           | DNA, RNA                 |
| 糖蛋白           |                          |
| $\gamma$ -球蛋白 | 己糖胺, 己糖, 唾液酸             |
| 血清类粘蛋白        | 己糖, N-半乳糖胺               |
| 脂蛋白           | 磷脂、胆固醇、中性脂类              |
| 磷蛋白           |                          |
| 酪蛋白           | 磷酸酯(丝氨酸酯)                |
| 血蛋白           |                          |
| 血红蛋白          | 铁原卟啉                     |
| 细胞色素C         | 铁原卟啉                     |
| 黄蛋白           |                          |
| 琥珀酸脱氢酶        | 黄素核苷酸                    |
| 金属蛋白质         |                          |
| 铁蛋白           | $\text{Fe}(\text{OH})_3$ |
| 酪氨酸酶          | Cu                       |
| 醇脱氢酶          | Zn                       |

## 蛋白质的组成

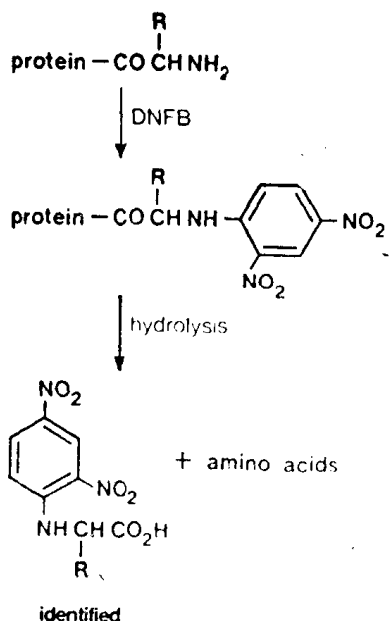
### 蛋白质构象 I

一个蛋白质分子的三维形状取决于其一级、二级、三级和有时四级结构。一级结构指的是多肽链主链上以共价键联系的氨基酸残基的序列。二级结构指的是链的排列,是螺旋样的或是无规则团、或者如一个折叠片。三级结构表征链是如何弯曲或折叠的、特别是象在紧密的球状蛋白质。若把一个蛋白质的二级结构和三级结构归在一起而统指时则构象一词更为常用,四级结构则指的是有一个多肽链以上的蛋白质其多肽链排置的情况。多数较大的蛋白质,无论其为纤维状或球状,常含两个或更多的多肽链,链间多不以共价键相连接,这样的蛋白质称为低聚物。其中最熟知的大约是血红蛋白。它含有四个多肽链,两个相同的 $\alpha$ -链,两个相同的 $\beta$ -链,每一个链约由140个氨基酸组成。

第二次世界大战时及以后,建立了许多分析蛋白质的新技术并得到了广泛的应用。结果是对许多蛋白质无论是纤维状或球状,我们知道的更多了,但把这些新知识应用于蛋白质组织化学则做的较少。由于它们的复杂性,蛋白质对于各种试剂易招致不希望的反应,并且亦可以对预计的和希望的作用有所阻碍,这在固定一章内(第5章,卷一,88页)有些曾被述及,但更多的还有待测定。我们将把现时的一些零碎的知识写入本章和下一章(第13章)。

战后若干年来出现的主要技术是色谱法、各种形式的电泳法和凝胶过滤。测定一个肽的氨基酸组成,常先水解(如在6N-HCl内于105°C反应24小时),继之,在纸上或在离

子交换树脂柱上以二维色谱法判定其各个氨基酸。这样得到的有关氨基酸组成的情报是有价值的，但对于结构的全部知识是不够的。紧跟着我们需要知道肽链上氨基酸的精确顺序，测定氨基酸顺序的方法是用所谓端基分析来进行的。两个方法合用可以得到足够的情报以决定小肽的结构，但对于较大的肽或蛋白质来说则另外需要一个称为部分水解的方法。



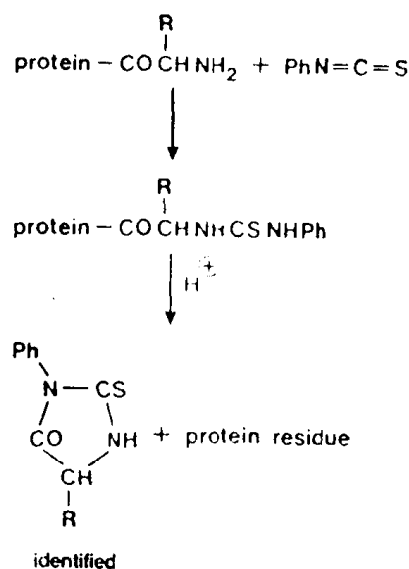
**端基分析** 一个组成已知的肽，测定其序列是用显示终端氨基酸残基的反应。例如：一个组为ABC的三肽有两个终端残基，有游离 $\alpha$ -氨基的一个称为N-端，而有游离羧基的另一个则为C-端，而中间残基则以其两个功能基结合于二者。如此，我们可以分别判定两个终端氨基酸或是由分子的一端顺序分析，其两个残基以决定其整个序列。实际工作中，除去并判定C-端残基的方法不如测定N-端的方法满意。

为了鉴定胰岛素的N-端氨基酸，Sanger (1945)建立了二硝基氟苯(DNFB)法。这一反应需要一种不保护的亲核试剂，其进行情况如下：它对于 $\alpha$ -氨基无特殊性，但于pH8.5和 $\alpha$ -氨基的反应远较与 $\epsilon$ -氨基的反应为速，说明前者的pK较低。这种二硝基苯代的肽接着被酸水解，黄色的二硝基苯代的氨基酸易于分离，以纸色谱法鉴定。由于Sanger反应以后紧跟着完全水解，它只能鉴定肽的N-端残基。其优点是仅用一个微摩尔以下的肽，并且当用 $^{14}\text{C}$ -标记的DNFB时，再伴以纸色谱法放射自显影分析，肽的量可减少到0.001微摩尔(Kopple, 1966)。

所谓的Edman降解(Edman, 1950、1956)，它是一个端基分析，借助于它能把要鉴定的N-端残基除去，而不伤分子的其余部分。如此它可以一步步地反复应用，但实际上能用于一个肽的Edman循环数常是有限的。若要定一个肽的序列，常是使它和异硫氰酸苯酯相反应，形成N-苯氨基硫代甲酰基肽，后者以酸处理，先环化为噻唑酮(Thiazolone)，终端肽键折断，然后重排为更稳定的海硫因(Thiohydantoin)，如下式所示。

海硫因溶于有机溶剂，并可以以这样的形式和缩短的肽链分离，用纸色谱法鉴定。残余的肽再次和异硫氰酸苯酯相反应，重复整个过程。若用 $^{35}\text{S}$ -异硫氰酸苯酯(Jacobs和Niall, 1975)则检出释放出来的乙内酰苯硫脲的灵敏度大为增加。

使肽逐步降解，还是选用Edman反应。而全部氨基酸分析，仍习惯于用Spackman等

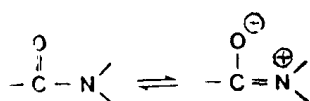


的 [Spackman et al, (1958)] 方法,它是用阳离子交换柱,柠檬酸钠缓冲液,以水合茚三酮显示。

**蛋白质裂解** 较大的肽的氨基酸序列常是在分子断裂为碎片后再行取得。这有时仍然用温和的酸水解 (12N-HCl, 48小时, 25°C), 但常用的则是分解蛋白的酶。后者如胰蛋白酶, 它专门作用于赖氨酸的羧基和精氨酸间的肽键, 如胰凝乳蛋白酶 (它专门作用于芳香氨基酸羧基的肽键), 如亮氨酸氨基肽酶 (它能水解一般氨基酸的 N-端肽键, 惟脯氨酸除外), 如羧基肽酶, 它作用于 C-端肽键。现在提供了一些酶, 其中有的专门在谷氨酸处发挥裂解作用 (Houmard and Drapeau, 1972; Ryden et al, 1974), 有的在精氨酸处 (Steinman et al, 1974), 有的在赖氨酸 N-端处 (Wingard et al, 1974) 和赖氨酸的 C-端处 (Patthy和Smith, 1975)。Walton et al (1972) 从密蕈 (*Armillaria mellea*) 中分离出来的一种蛋白酶亦可以专门裂解赖氨酸残基氨基一侧的肽键, 并曾被 Gregory (1975 a, b) 和 Gregory 同 Preston (1977) 用来判定人尿抑胃激素的一级结构, 尿抑胃激素是一个肽, 它含有两个赖氨酸残基。

## 蛋白质构象 II

蛋白质内两个主要的键是肽键 (如前所述) 和二硫键。对于肽键的构象而言, 肽键是一个重要决定因素, 经过相当长一段时间, Corey



和 Pauling (1953) 才从 X 线结晶学数据中将其几何学找出。他们指出: 肽键的各个原子主要位于平面反式构型中, 它相当坚牢, 并难以旋转。其中原因是: 肽键具有一些双键的特征, 指出如下:

主链结构的坚牢性是相对的, 因为单键允许绕肽键轴旋转。肽的 RCH 基团的单键所处的角为 110°, 围绕各个单键旋转一定的角度使其成为完全挠性的链。

非共价键 肽链各部分间以及肽链和溶剂或反应混合物间的非共价键作用, 对于决定一个三维结构具有重要作用。最重要的三种力是: ①静电相互作用; ②疏水 (非极性) 键; ③氢键。

静电力当然包括氢键, 因为有 90% 的导致形成氢键的吸引力属于静电力。其它重要的静电力是由于侧链基团间的相互作用。它们易受某些化学反应所引起的变化的影响, 这些化学反应常用于分析细胞化学并将在本章内述及。

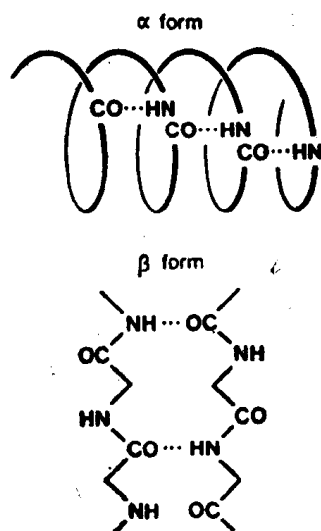
有四个氨基酸具有疏水性侧链 (亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸), 它们不受因组化用试剂所引起的变化的影响。另两个氨基酸 (色氨酸、酪氨酸) 要受化学试剂的影响, 亦是疏水的, 但它们位于蛋白质内部, 因此受到保护而不受侵袭。当在两个残基间有疏水键形成时, 残基周围有序排列的水分子有些就被释出。单个疏水键的强度并不很大 (按自由能说, 每一摩尔不到 2 千卡), 但在一个蛋白质中, 有 30% 的氨基酸具有非极性侧链, 其聚集稳定性将是可观的。此外, 由于从肽主链排除水分, 疏水键对于链的折叠起一定的作用。

氢键、A...H...B 是两个密切相关的电负性原子与中间的质子之间的吸引力。氢和一电负性原子间形成共价键后, 其氢端带有部分阳电, 其附近若有另一电负性原子, 它便能与这一原子的未共用电子对间产生静电吸引。若质子恰好位于 N、O 或 F 间的连线上时,

则形成最强的氢键，但氢键象疏水键一样，单独一个的引力是弱的。但在任一蛋白质内它们是那样多，总合起来对于决定蛋白质的构象具有重大作用。

## 二 级 结 构

在1951年Pauling和Corey为蛋白质拟议了一些二级结构。在他们的模式中，每一个C=O基团以氢键连于一个N-H基团，当所有酰胺、酰胺间的氢键若在链内，则预期结构将是一个螺旋。若键是在链间，则出现片状结构。于是二级构象便有 $\alpha$ -螺旋型和 $\beta$ -折叠片型。



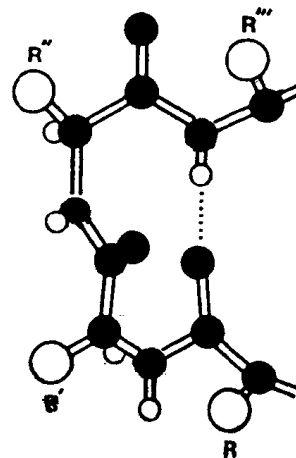
在 $\alpha$ -螺旋中，其主链呈盘绕状，圈与圈的间距为45nm，每一残基可沿轴进展15nm，（每圈3.6个氨基酸残基）。在 $\beta$ -折叠片中，平行或反平行的肽链以氢键相连，象图114所示。在许多纤维蛋白中、 $\alpha$ -螺旋拧在一起，形成超螺旋，恰如一根绳之成于几股那样。涉及到一些纤维蛋白质的有序区，例如 $\alpha$ -角蛋白（将详尽讨论于第13章）， $\alpha$ -螺旋是很重要的。 $\alpha$ -螺旋允许它的侧链作相当大的运动，并由于多数蛋白质有高比例的烃基侧链（高于50%），在水环境中。一个直的螺旋没有三级折叠是不可能的。

尽管从1960年以来，提议了一些预言蛋白质结构的方法，而 $\beta$ -折叠片区比较被忽略，它和蛋白质的无规线团部分一起包括于非螺旋区，有鉴于此，Chou和Fasman（1974 a,b）建立了一套预言法则，它能使蛋白质的 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠片和无规线团区域直接定位，不需借助于计算机分析。把常见的20个氨基酸分为 $\alpha$ -螺旋形成者， $\alpha$ -螺旋破坏者， $\beta$ -折叠片形成者， $\beta$ -折叠片破坏者。强螺旋形成者谷氨酰胺、丙氨酸和亮氨酸，强折叠片形成者为甲硫氨酸、缬氨酸和异亮氨酸。这些观察后为Fasman et al（1976）所证实并发展。他们的法则被Geisows（1978）用来定位一些激素原（甲状旁腺素原、胰高血糖素原、胃泌素原、胰岛素原）的 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -结构。

二级结构的第三个重要决定因素是 $\beta$ -弯曲（图115）。

可以看出，所示的I型弯曲成于任何三个L-氨基酸残基，残基R和R'连以氢键。

现在认为是折叠肽链的主要机制的 $\beta$ -弯曲首先被Lewis et al（1971）所述。他们根据他们的假想，认为：一个肽链折叠成为最稳定的构象不是任意而来，它必有个特殊的折叠过程。于是提出： $\beta$ -弯曲指导着反平行 $\beta$ -结构的形成。他们对三个已知结构的蛋白质（溶菌酶、核糖核酸酶S、 $\alpha$ -胰凝乳蛋白酶）所作计算表明： $\beta$ -弯曲可以



● C atoms      ● N atoms  
● O atoms      ○ H atoms

Fig. 115 The  $\beta$ -bend.

满足作为指导区所要求的条件，因为他们据此可以预测在上述二个蛋白质中弯曲的位置，其可靠性达到80%。

Geisow (1978) 曾就其激素原系列确定 $\beta$ -弯曲的位置，所用的方法是计算四肽形成反转 (reverse turn) 的累积几率，象Chou et al (1975) 所提议的那样。当用此方法预定重叠的反转的延伸区时，由于激素原肽链中丝氨酸、甘氨酸和脯氨酸的频频出现，选择了最有可能形成 $\beta$ -弯曲的四肽。Geisow 能够指出：易受蛋白分解酶侵袭的成对序列，若位于无结构区或在一 $\alpha$ -螺旋边界时才被折裂，蛋白分解酶是指导激素原转复为激素的。被侵袭处所常是位于链中反转的邻近。这种观察支持了这样的想法，即激素原蛋白质的选择性裂解，大约不是由于有许多特殊蛋白酶的存在，而是由于正常情况下易于裂解的序列处于不易触及的地方所致。

### 三 级 结 构

我们对于三级结构的多数情报，来自对球蛋白结构的结晶学测定，对于这一问题最突出的研究乃是Kendrew和其同工作者 (1940, 1961) 对于 (抹香鲸) 肌红蛋白和Perutz et al (1960) 对于血红蛋白分子的研究，对这些Perutz (1964) 描述的很清楚。

Kendrew et al, (1960, 1961) 指出：肌红蛋白为一含有 153 个残基的单肽链，曲曲为实体形。对该蛋白质的单晶及其含汞衍生物的X线衍射图的分析，在分辨力为15nm时，得到一个三维电子密度图。几乎所有的极性侧链是在分子的外部，与形成结晶质量的40%的水分子相接触。分子内部含有非极性疏水侧链，其间的间距以其范德瓦尔斯 (Van der Waals) 半径为准。已发现有几段 $\alpha$ -螺旋，包入153个残基的75%。肌红蛋白所显示的衍射图，和所有的球蛋白的一样，所不同的仅是 $\alpha$ -螺旋的含量不一样，还有不是所有的非极性残基无例外的均位于分子内部。

但用X线结晶学测定结构是费时的，因而想用能量计算来预言三级结构，即找出自由能最小的构象。这种方法自然是限于较小的蛋白质，象胰蛋白酶抑制物 (58个残基) 和肌浆蛋白 (108个残基) (Levitt和Warshel, 1975; Kuntz et al, 1976)。

另外的，是Ptitsyn和Rashin (1975) 用于肌红蛋白的方法，形成 $\alpha$ -螺旋的残基是得自己发表的观察，然后把每一 $\alpha$ -螺旋再用圆柱模型表示，继之用手探索试图把 $\alpha$ -螺旋拥挤在一起，使埋入的侧链其疏水自由能减到最低，借此以推断其正确折叠。

$\beta$ -片的定量分析结果，被Sternqerg和Thorton (1977, 1978) 用来预言结构而不需计算能量，从分析得到的一个经验性折叠参数能指出那一摺排列是好的，那一摺排列是用来做最后稳定，及折叠的动力学。这种方法的长处，是它能用于上述的较大的不能用别的方法分析的蛋白质。

### 分析组织化学和蛋白质结构

用分析蛋白质组织化学方法，(这占本章大部)，在结构水平提供不了任何情报。情报的流向恰恰相反，即从结构知识阐明组织化学分析。许多孤立的组织化学观察，例如关于在一个特定蛋白质组分中其主要的特定氨基酸，可以以上述方法显示的一级、二级、三级结构来解释。对解释用物理学方法得到的结果来说，有关结构的知识尤为重要，许多早期的光镜观察和测量，现在得到了证实和解释。

分析蛋白质组织化学的大多数方法，（特殊端基方法），严格说来，对于蛋白质精确定位无关，因为它们全是限于光镜。虽然如此，有一些反应则预示可推广到超微结构，例如有银还原的反应。它们产生电子暗的反应产物，但其组化特性大多数还有待阐明。随同银沉降机理知识的增加，几年后反应的有用幅度必将大为扩展。定位SH和SS基团的许多方法同样能产生或使其产生电子暗产物。

## 鉴定蛋白质的方法

### 一般方法

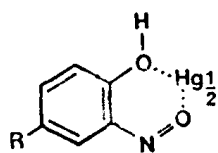
用于动物和植物组织鉴定蛋白质的最古老显色反应，总起来说是有严重破坏性的。因此曾力求找出这些原始方法的无害变法。现在虽已不用但其机理在历史上尚有重要性的古典反应有：①显示酪氨酸的米伦反应；②显示酪氨酸、色氨酸和组氨酸的Pauly的重氮盐反应；③显示芳香化合物的黄蛋白反应；④显示精氨酸的坂口氏反应；⑤显示巯基的硝普盐试验。所有这些反应仅能测定任一特定蛋白质的部分组成氨基酸，但一个阳性反应仍然被视为有蛋白质存在，因动物组织标本中无游离氨基酸存在。所有这些反应，惟末一个除外，均能用于已固定的切片，但只有两个适合于蛋白质的鉴定，它们是米伦及重氮盐反应。

#### 米伦反应

这一反应（Millon, 1849）是由于蛋白质分子中有羟苯基的存在所致。任何酚的化合物，只要在羟基的邻位上没有被取代，都有这个反应；但这样的化合物不会在组织内游离存在，唯一已知的含羟苯基的氨基酸是酪氨酸。

原始的米伦氏试剂的制法是，使汞溶解于硝酸，然后把制得的溶液用水稀释，在这样的一个混合物中有许多化学物质生成，但是这个反应的机制当初却无说明。继Hoffman（1853）之后，Meyer（1864）用酪氨酸， $\text{HgCl}_2$ 和亚硝酸盐一起作用产生了阳性反应，它记述了米伦氏反应的主要特点。Nasse（1901）曾指出任何酚先和汞离子再和亚硝酸根离子接触后，都能出现红色。

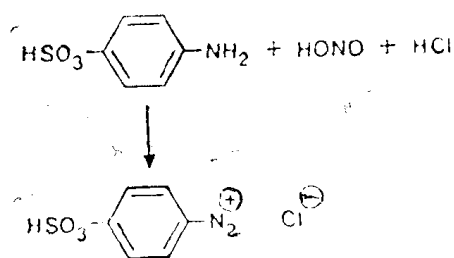
在组织化学上，Bensley和Gersh（1933）两氏提出冷时使用这个试剂的变法，并用来显示冻干切片上的线粒体。这个试剂如果用之于石蜡切片，必须适当加热，而且当最深的颜色刚一出现，就得马上用稀硝酸把温试剂洗掉。这个方法见于附录12。米伦反应在组织化学上的其一些变法还有Serra氏法（1944）和Baker氏法（1956）。Baker氏法可特别推荐作为常规方法，因为著者认为它是既简单又可靠且较上述方法得到的颜色为深。详情



见附录12。根据Gibbs（1927）反应分两步进行，第一步，酚羟基邻位的H被NO取代，产生一种亚硝基酚；第二步，由于螯合作用， $\text{Hg}^{2+}$ 离子被并入包括着亚硝基氮原子的新环里，这个新化合物的颜色是红的。

根据Lugg（1937），亚硝基对羟基而言是在邻位，但对螯合并无干扰。多年以前，

著者想对采用一些其它螯合剂以增强这个反应的颜色，但迄未成功。象在冈本反应（第16章）那样，曾用二苯卡巴脲处理，在各种组织成分中能产生深紫色。但封闭反应表明，除了亚硝基酪氨酸以外，有大量汞还同组织中的其它一些反应基团相结合。



### 重氮盐反应

重氮盐化合物是由亚硝酸在低温下作用于芳香族伯胺的盐类而制得的，为此目的，常用的是对氨基苯磺酸。

所生成的化合物在碱性溶液中偶联于酪氨酸、色氨酸的芳香环和组氨酸的咪唑杂环以生成有色产物。蛋白质中的其它氨基酸亦可能

和重氮盐反应，其产物有的可以有色。

利用上述原理，用来鉴定组织切片中蛋白质的方法是Danielli (1947) 的“偶联四氮盐反应”。著者见到：一般所用的重氮盐反应是没有什么用处的，因为偶联重氮盐于酪氨酸、色氨酸和组氨酸其产物的颜色很浅。所以，他使用了一种双重氮盐（经重氮化的联苯胺或邻联茴香胺）代替原来的重氮盐，并且使各种不同的酚或胺同蛋白——重氮化合物的自由重氮基相连起来，在原来位置上形成一种颜色很深的蛋白-双重氮-酚化合物。这个反应在下面和在14章内还要讨论，它可用于各种固定冻切片或石蜡切片，也适用于冻干材料。技术细情见附录12。

### 蛋白黄色反应

这个方法目前还在照原法不变地使用着，切片用浓硝酸处理，然后把酸洗掉。将切片放在氨气烟雾上使之作用，给出阳性结果的是酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。切片中如果有这些氨基酸的存在，可以出现鲜明的橙色。但是这个方法对组织破坏性太大，所以应用有限。

本节一开头列举的其余方法，不是用来证实蛋白质的存在，而是仅用于鉴定对其有特殊性的氨基酸。下面在鉴定个别氨基酸的2节中将会提到。

有些最近引进的方法，曾被用于鉴定蛋白质，其中有汞-溴酚蓝法，氧化单宁-偶氮和-噁嗪法，以及丙烯醛-席夫方法。

### 汞-溴酚蓝方法 (HgBPB)

这个本来不是组织化学上用的染色法，被Durrum (1950) 引进用以显示在滤纸上的蛋白质斑点，后来又被Mazia、Brewer和Alfert (1953) 用为蛋白质的一般染色法。这些著者们声称：用他们的方法染色的标本中，被结合的色素量在较大的范围内和蛋白质的量成正比，符合于比耳-兰伯 (Beer-Lambert) 定律。Bonhag (1955) 用这个方法研究过乳草虫 (*Oncopeltus fasciatus*) 卵巢的化学组成，他对这个方法的一些变法包括在12章的技术详情附录中。Menzies (1961) 曾指出用HgBPB显示肌纹的优越性，但Kanwar (1960) 仍强调这一反应对蛋白质全无特殊性，可是Harris和Mazia (1959) 亦曾用过此法在电镜下显示蛋白质。在用HgBPB染色的标本中，见到颜色从蓝移向红，Ramalingam和Ravindranath (1972) 认为这是异染性，而Chapman (1975) 指出：

其实这是由于色素的二色性的原故。他见到在不同浓度色素的最大吸收(585~590nm)没有变化,只有当浓度增加时,色谱曲线在蓝区较之在红区透射比大为减低,因而见到颜色从蓝变向红。

从他的试验结果,Chapman(1975)认为:用HgBPB所染的组织成分中,任何红色只是意味着一个单位体积内它的色素结合点较多。经他改变过的技术,并无较大的特殊性(见于附录12)。

引申Nayyar和Glick(1954)四溴酚酞磺酸钠(BSP)原法,一些其它色素曾被用于蛋白质测定和微量测定。BSP和多数蛋白质形成复合物,在低pH沉淀,但和一些蛋白象胶原,其反应很小。因此,它被Wallace和Partlow用于测定在胶原底物生长的分散细胞培养物中的蛋白质。另一色素为考马斯煌蓝G-250,Brandford(1976)认为它能提供可靠的灵敏的蛋白质微量测定。但当Pierce和Suelter(1977)对其最大吸收(595nm)做过试验后,认为它对各种不同的蛋白质其灵敏度出入很多。Vesterberg et al,(1977)曾用过这种色素,在三氯醋酸或磺基水杨酸内,染等电聚集凝胶内的蛋白质。

溴氯酚蓝曾被用为成红血细胞的一个“特殊”染色(Kass和Gardner,1979)。甲醇短时固定后,骨髓或外周血涂片染于此色素的1%水溶液,于pH4.0 1分钟。成红血细胞的胞浆为亮黄色,细胞其它组分则为暗绿色,造成两性效果物质迄未认出。

#### 氧化单宁-偶氮法(OTA)

此法原述于Dixon(1959、1962),用作蛋白质一般染色。它的机理在于组织蛋白和单宁酸(双食子酸)的反应,以后用高碘酸氧化为1,2-醌。后者与重氮化了的 $\alpha$ -萘茴香胺偶联,产生一个赭红色偶氮色素(偶氮醌)。这个方法详细情节见附录12。在不同的pH,与蛋白质结合的单宁酸量亦很不同。根据Dixon,组织的NH<sub>2</sub>基团是主要结合点。他曾见到在用HNO<sub>2</sub>处理后,染色低减。这一所见和Bowes同Kemten(1949)的相符,但与Lollaz同Kremen(1948)得的结果则不符合。Guslavson(1956)指出:在Lollaz同Kremen的测实情况下,可能只有赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基被封闭。

#### 氧化单宁-噁嗪方法(OTO)

为Dixon所记述的这一方法,乃前者的变法。在本方法中,与组织结合的单宁的氧化产物醌,与6-氨基-5-甲氨基酚反应形成一个蓝色噁嗪色素。原作者未提到:偶氮醌或噁嗪产物的水溶解度或脂溶解度,假定它们是牢固地结合于蛋白质。很有可能其脂溶性适足以说明线粒体之所以被染色。

虽对OTA或OTO无特殊性或化学计量可言,二者全简单易行,作为蛋白质的一个一般染色法可能是有用的。

#### 丙烯醛-席夫方法

这个方法作为蛋白质的一个一般染色是由Van Duijn(1961)引进的。当应用石蜡切片,其对照为席夫阴性,所以在试验标本上,其反应全是由于用丙烯醛(H<sub>2</sub>C=CHCHO)处理所引进的醛基。根据Van Duizn丙烯醛的双键可与SH、脂肪族NH<sub>2</sub>和NH,以及咪唑相反应,剩下一个醛基和席夫试剂相反应。一般认为丙烯醛之所以能固定蛋白质,是因为它有双键(Gustavson),用丙烯醛蒸气固定的冻干组织能给出强席夫反应那是无疑的(卷一,第5章)。但在另一方面、难于理解的是,何以丙烯醛以双键与蛋白质氨基反应却能产生一点以外的固定,如果无有交联的话?形成的产物可能是



$\text{RNHCH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$ 。

Van Duijn见到,乙酰化后丙烯醛席夫反应完全被阻塞,如此可能反应基局限于SH、 $\alpha$ -氨基、 $\epsilon$ -氨基、NH、OH、胍基、咪唑、酚和亚氨基。因为糖和糖元不能反应,所以脂族羟基参与的可能性被除去。在模拟试验中鱼精蛋白并不染色,这就将胍基除掉。其它阻塞试验确定反应基为SH、 $\text{NH}_2$ 和咪唑,在无磷脂的情况下著者认为丙烯醛席夫反应对蛋白质是有专一性的。

方法见于附录12

## 物理学方法区别各类蛋白质

单纯蛋白的鉴定,只要观察到没有为结合蛋白质特有的那些性质就可以达到目的。这些将在讨论结合蛋白质的几章中叙述。为组织学家感兴趣的一些单纯蛋白质结构将在13章讨论。

化学家把单纯蛋白质按着它们的溶解性的不同,分为几类。清蛋白类:特点是可溶于纯水;球蛋白类:不溶于水但可溶于各种盐的溶液;组蛋白类:可溶于水但不溶于稀氨水溶液;还有硬蛋白类:这是不溶于所有中性溶剂但可溶于酸和碱的蛋白质,也是对组织化学家有关的主要一类。胶原、弹性蛋白和角蛋白等硬蛋白是硬蛋白类的主要成员。珠蛋白类和组蛋白类乃是碱性蛋白质,因为它们主要是由组氨酸、精氨酸和赖氨酸等强碱性氨基酸组成的。珠蛋白类和组蛋白类之间的不同,在于珠蛋白类含有大量组氨酸和常量的精氨酸及色氨酸,而组蛋白类则含有大量精氨酸和痕迹量的色氨酸[根据Stedman和Stedman (1947),组蛋白类不含色氨酸]。

各种不同蛋白质的等电点也是一项很重要的数据。在等电时,蛋白质的许多物理性质象溶解度、渗透压、粘度和在水中的溶胀性等都表现得最小。例如,血红蛋白的等电点在pH6.7到6.8之间,血清白蛋白的等电点为pH4.88,而球蛋白类的等电点在pH5到7之间。极端的例子,一个是等电点低于pH1.0的胃蛋白酶,另一个是等电点在pH从12到12.4之间的鱼精蛋白类。鉴定各种类型蛋白质的常用方法如下。

### 简单的溶解性试验

用来划分清蛋白类、球蛋白类、珠蛋白类和组蛋白类的物理性质,大部分都不能借以研究用普通方法固定的组织;但是,在冻干材料上进行溶解性试验,对组织中的蛋白质却可以给出一个近似鉴定。最好是使用不和水接触而贴在载片上的切片(参看卷一、第3章),则能测定出未被固定的蛋白质成分的溶解性。作为溶剂可用水、1%食盐溶液、半饱和及全饱和的硫酸铵溶液、稀氨水溶液和各种缓冲液。利用这种方法,Gersh (1949)鉴定了甲状腺胶体一部分具有甲状腺球蛋白性质,Catchpole (1949)利用类似的方法,鉴定了大鼠脑垂体一部分糖蛋白具有促滤泡激素的性质。经过各种提取手续以后的残余物对米伦反应和其它一些鉴定蛋白质的反应仍呈现阳性结果,这可以说明原本认为只含有一种蛋白质的物质,其实是由溶解性各不相同的几种蛋白质组成。这是一个非常有前途的方