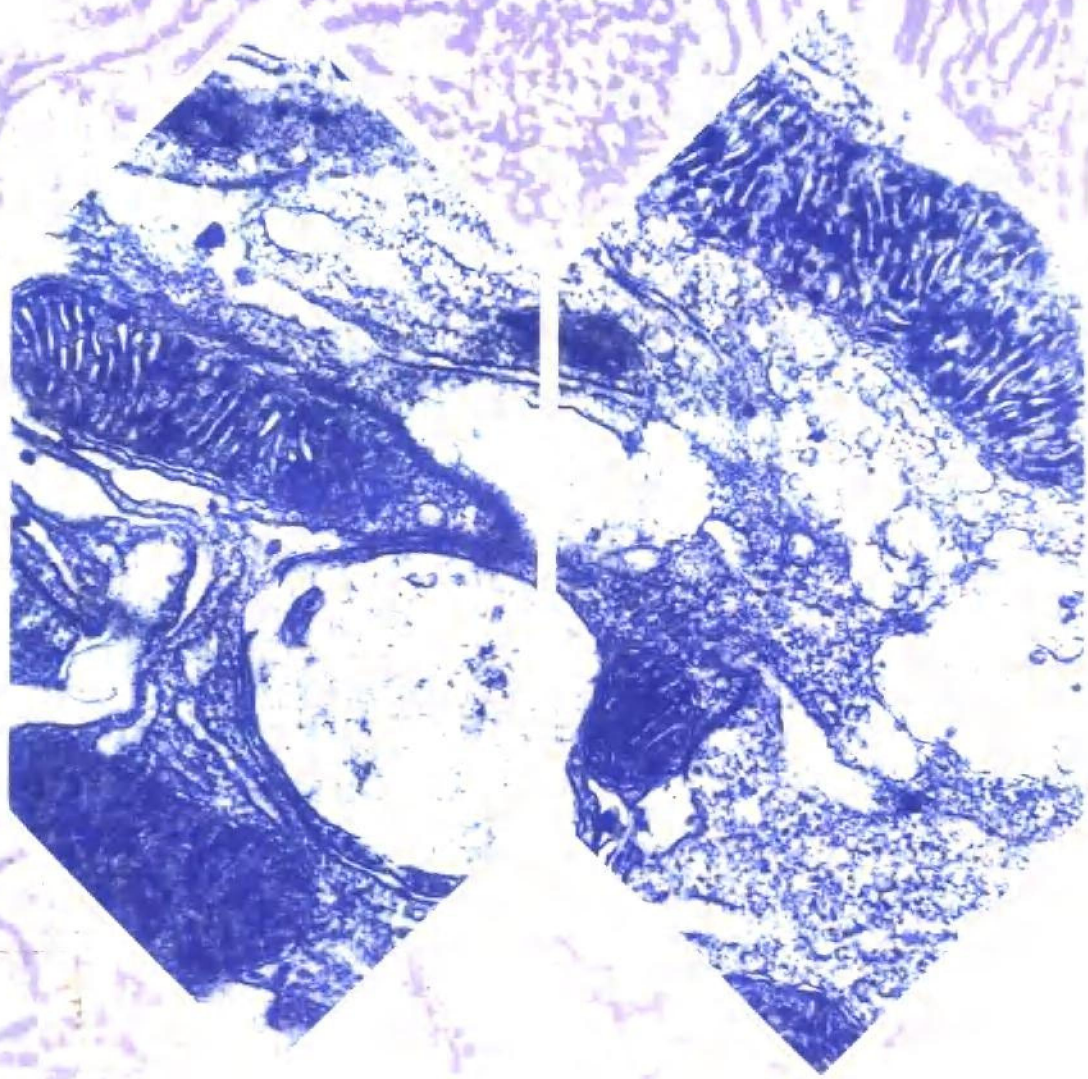
实用酶组织化学

主编：贲长恩　李叔庚



湖南科学技术出版社

Y4.126.12

实用酶组织化学

主　　编　贲长恩　李叔庚
编著人员　（按姓氏笔画为序）
王　彦　教授　沈阳中国医科大学
朴英杰　教授　广州第一军医大学
李叔庚　教授　湖南医科大学
贲长恩　教授　北京中医药大学
张　颖　教授　北京中医药大学

湖南科学技术出版社

A0281946

实用酶组织化学

主　　编：贲长恩　李叔庚

责任编辑：黄一九

出版发行：湖南科学技术出版社

社　　址：长沙市展览馆路3号

印　　刷：湖南省新华印刷二厂

厂　　址：邵阳市双坡岭

邮　　编：422001

（印装质量问题请直接与本厂联系）

经　　销：湖南省新华书店

出版日期：1996年4月第1版第1次

开　　本：787×1092毫米　1/16

印　　张：19

字　　数：458,000

印　　数：1—800

征订期号：地科184—40

ISBN 7—5357—1811—6/R·350

定　　价：20.00元

序　言

酶是生物体内化学反应的催化剂，在试管内可以将它提纯，并测定它的特异性、以及激活或抑制其活性的条件。但是，若要在保存细胞结构的同时显示它定位和机能的特点，则必须运用组织化学的技术方法。这种结合导致30年代末出现了碱性磷酸酶的显示方法，给酶组织化学开辟了广大的研究领域。继之，利用四唑盐的二甲臜反应显示氧化酶和脱氢酶，以及偶氮偶联法的应用，进一步给酶组织化学开拓了广阔的研究道路。随着电镜技术的发展，酶组织化学又进入了超微结构的领域。酶组织化学对细胞生物学的发展做出了很重要的贡献，如溶酶体的发现，阐明了细胞支架、高尔基体和线粒体的机能等等。免疫组织化学的兴起使酶在细胞中的定位、定性和定量的研究提高了精确度。原位杂交技术的应用，展开了对酶的基因表达和它的合成的研究，使之进入了分子生物学水平。酶组织化学已在生命科学研究中展示出无限的光明前景。这本书的出版为各有关专业的研究人员提供了很应手的工具。谨借此向著者祝贺，并作此序言。

李肇特

1994年2月5日

前　言

酶组织化学是利用组织化学的分析方法证明组织、细胞和超微结构中酶的存在，进而研究其定位分布、定性与定量和可能催化的生物化学反应的一门学科。对这门学科的深入研究，有力地促进着医学生物学中许多相关学科的向前发展。组织化学和细胞化学是酶组织化学的基础，利用相关技术，可以把维持组织、细胞形态与执行生命机能的化学物质存在和变化的方式转变成可观察的形式，从而阐明组织、细胞结构内的化学反应、功能及其生物学意义。显然，酶组织化学的首要任务是弄清酶在组织、细胞中存在的部位，做到这一点，才有可能准确地对酶定性、定位和定量，也才有可能对组织细胞功能做出重要阐释，并应用于医学生物学等有关学科。

现代科学技术的飞速发展，特别是化学、物理学的进展，为酶组织化学的研究提供了各种有效的手段，推动着这个学科日新月异的发展。在国外，有关组织化学和细胞化学技术的专著，早有出版，并有专业杂志近20余种。另外，在有关期刊、书籍中还刊登了不少组织化学方面的论文。而在国内，虽然酶组织化学的研究在不断发展，并取得可喜成果，但仅出版了几本与本专业有关的译著，由国内学者编著的酶组织化学书籍甚为罕见，这与我国酶组织化学的发展和研究水平极不相称，更不能跟上酶组织化学迅速发展的世界先进水平。为了使酶组织化学这一快速发展领域内的研究成果迅速、广泛地应用到医学、生物学等相关学科的科研实践中去，推动这些学科及酶组织化学本身的进一步发展，我们编写了这本比较全面、系统的《实用酶组织化学》，供生物学科、医药院校的教师、研究生和从事生命科学研究、实验的人员参考。

本书共分七章，即绪论、酶组织化学的基本理论、酶组织化学的基本技术、水解酶、转移酶、裂解酶和氧化还原酶等。本书主要介绍了光镜酶组织化学，并辅以免疫酶组织化学和电镜细胞化学，反映了80年代末——90年代初国内外最新研究成果。为了增强本书的实用性，书中按目前国际酶组织化学分类，对六大酶类中共70余种酶的反应原理，不同实验方法的试剂配置、操作步骤、结果观察、对照分析，以及该酶的生物学意义，作了全面、系统的描述。书后“附录”中编译了267种常用组织化学试剂的中、英文对照目录，还列出了每种试剂的化学结构式、分子量和主要作用。

在本书的编写过程中，我们得到了著名组织化学专家、北京医科大学李肇特教授的亲切指导，并为本书作序。在此谨向李肇特教授致以衷心谢意。

由于编者水平有限，书中难免疏漏，不妥之处，恳请广大读者批评指正。

贲长恩　李叔庚

1994年10月

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

目　录

第一章　绪论 …… (1)
第一节　概述 …… (1)
第二节　酶组织化学简史 …… (2)
第三节　酶的名称及分类 …… (6)
一、酶的命名 …… (6)
二、酶的分类 …… (6)
第二章　酶组织化学的基本理论 …… (11)
第一节　一般的基础理论 …… (11)
一、酶的定位 …… (12)
二、酶的反应 …… (16)
第二节　酶组织化学证明的原理 …… (17)
一、光镜酶组织化学证明法 …… (17)
二、电镜酶细胞化学证明法 …… (24)
三、酶反应特征 …… (42)
四、酶组织化学的基本条件 …… (48)
五、影响酶活性的基本条件 …… (50)
六、人工产物 …… (56)
七、对照实验 …… (58)
第三章　酶组织化学的基本技术 …… (61)
第一节　取材 …… (61)
一、取材的原则和要求 …… (61)
二、取材的样品规格 …… (61)
第二节　组织样品的固定 …… (62)
一、主要固定剂和常用固定液 …… (62)
二、固定方法 …… (67)
三、固定液的选择 …… (69)
四、固定后的处理——漂洗 …… (70)
第三节　切片制备 …… (71)
一、冰冻切片机切片 …… (71)
二、半导体致冷切片机切片 …… (71)
三、恒冷箱切片机切片 …… (72)
四、显示酶组织化学的石蜡切片法 …… (73)
五、显示电镜酶组织化学的切片法 …… (73)
第四节　孵育反应 …… (74)
一、配制孵育液的要求 …… (74)

二、孵育的温度和时间 …… (75)
三、孵育的方法 …… (75)
四、孵育时的对照切片 …… (76)
五、影响孵育的因素 …… (76)
六、孵育后的切片处理 …… (77)
七、切片的封固及封固剂 …… (78)
八、酶反应产物异常 …… (78)
第五节　溶液的配制与计算 …… (79)
一、溶液浓度的表示方法 …… (79)
二、化学试剂的规格 …… (79)
三、克分子(M)和当量(N)溶液计算 …… (81)
第四章　水解酶 …… (84)
第一节　磷酸酶 …… (84)
一、碱性磷酸酶 …… (85)
二、酸性磷酸酶 …… (91)
三、5-核苷酸酶 …… (97)
四、葡萄糖-6-磷酸酶 …… (99)
五、三磷酸腺苷酶 …… (101)
六、核苷二磷酸酶 …… (107)
第二节　羧酸酯水解酶 …… (108)
一、非特异性酯酶 …… (112)
二、脂酶 …… (119)
三、乙酰胆碱酯酶和胆碱酯酶 …… (121)
四、磷酯酶 …… (123)
第三节　焦磷酸酶 …… (126)
一、硫胺素焦磷酸酶 …… (126)
二、硫胺素单磷酸酶 …… (127)
三、硫胺素三磷酸酶 …… (128)
四、无机焦磷酸酶 …… (129)
第四节　糖苷酶 …… (131)
一、酸性-α-葡萄糖苷酶 …… (132)
二、β-葡萄糖苷酶 …… (133)
三、α-半乳糖苷酶 …… (134)
四、酸性-β-半乳糖苷酶 …… (134)
五、α-甘露糖苷酶 …… (135)
六、β-N-乙酰-D-氨基葡萄糖苷酶 …… (136)
七、β-葡萄糖苷酸酶 …… (137)
第五节　肽酶 …… (138)
一、氨基肽酶 M …… (139)
二、二肽(氨基)肽酶Ⅳ …… (140)
三、二肽(氨基)肽酶Ⅱ …… (141)
第五章　转移酶 …… (146)
第一节　乙酰基转移酶 …… (146)
胆碱乙酰基转移酶 …… (146)

第二节　氨基转移酶 …… (150)
天门冬氨酸氨基转移酶 …… (150)
第三节　谷氨酰基转移酶 …… (152)
γ-谷氨酰基转移酶 …… (152)
第四节　氨甲酰基转移酶 …… (154)
鸟氨酸氨甲酰基转移酶 …… (154)
第五节　糖基转移酶 …… (155)
糖原磷酸化酶 …… (155)
第六章　裂解酶 …… (158)
第一节　醛缩酶 …… (158)
第二节　苹果酸合成酶 …… (160)
第三节　枸橼酸合成酶 …… (161)
第四节　碳酸酐酶 …… (162)
第七章　氧化还原酶 …… (166)
第一节　氧化酶 …… (166)
一、细胞色素氧化酶 …… (166)
二、过氧化物酶 …… (170)
三、过氧化氢酶 …… (173)
四、多巴胺-β-羟化酶 …… (176)
五、单胺氧化酶 …… (180)
六、葡萄糖氧化酶 …… (185)
七、黄嘌呤氧化酶 …… (187)
八、尿酸氧化酶 …… (190)
九、氨基酸氧化酶 …… (192)
十、NAD(P)H 酶 …… (195)
第二节　脱氢酶 …… (198)
一、辅酶非依赖性脱氢酶 …… (201)
（一）琥珀酸脱氢酶 …… (201)
（二）二氢乳清酸脱氢酶 …… (206)
（三）胆碱脱氢酶 …… (207)
二、辅酶依赖性脱氢酶 …… (208)
（一）β 羟基丁酸脱氢酶 …… (209)
（二）尿苷二磷酸葡萄糖脱氢酶 …… (211)
（三）乙醇脱氢酶 …… (212)
（四）山梨醇脱氢酶 …… (214)
（五）葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 …… (217)
（六）异柠檬酸脱氢酶 …… (218)
（七）苹果酸脱氢酶 …… (219)
（八）乳酸脱氢酶 …… (221)
（九）谷氨酸脱氢酶 …… (224)
附录一、常用组化试剂中英对照及简介 …… (229)
附录二、主要的缓冲液 …… (284)

第一章 绪 论

第一节 概 述

组织化学与细胞化学(Histochemistry and Cytochemistry)是运用物理的和化学的技术与方法研究分析组织和细胞结构的化学成分，并确定这些化学成分在组织、细胞结构内的定位、定性和定量，从而找出其变化规律的科学。组织化学与细胞化学是介乎组织学、细胞学和生物化学之间的边缘科学。它既基于并溯源于这些学科，又别于这些学科。组织化学与组织学不同：组织学的着眼点是组织与细胞的形态结构，组织学技术是尽可能地保持组织和细胞的微细结构，许多组织学染色方法是一种“经验”的方法；而组织化学的着眼点是组织与细胞结构的化学组成，组织化学技术的基础，不是依靠“经验”，而是运用已知的化学反应，即是一个严格的化学反应过程。组织化学与生物化学也有区别：虽然两者都着眼于组织与细胞的化学成分的分析及其含量的测定，但生物化学技术中常将组织、细胞破坏，制成匀浆，然后进行化学成分的分析测定，故其定位性较差；而组织化学技术则要求尽可能地在原位显示各种化学成分。生物化学反应是在试管内进行的，而组织化学意在使其化学反应在细胞这个“天然”的试管中进行。

简单地说，凡是用显微镜观察细胞在原位显示化学物质，便称为显微镜组织化学或细胞化学。但一般所谓组织化学是指组织化学染色法，是显微镜组织化学的一种，即狭义的组织化学。若用电镜观察细胞原位化学成分反应部位时，则称为电镜组织化学或电镜细胞化学；如用免疫技术方法观察其化学成分时，则称为免疫组织化学或免疫电镜细胞化学。它们都是利用各种化学和物理的方法，使细胞内各种物质和细胞间质能在原位形成可见的最终有色产物。

酶组织化学是用组织化学方法证明组织、细胞、超微结构中酶的存在，它是能够促进医学生物学中许多学科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结构的化学反应、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(有色的最终产物)，以探索其在生理，甚至病理状态下具有重要意义的一门科学。

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。那么，要解决酶的定性、定位和定量问题，其实验方法与技术是至关重要的。如能准确地对酶进行定性、定位和定量，就可能在阐明组织细胞功能上做出重要贡献，这样才有可能把它应用于医学生物学各门学科中去。

当然，研究酶组织化学，必须充分注意酶的特性(enzyme characteristic)。我们知道，在

生物体内进行着许多复杂而有规律的反应，如生物氧化、还原、合成和分解等过程。这些化学反应能够在体温 37℃和适宜的 pH 环境中快速而有规律地进行，这是因为体内含有催化新陈代谢中各种反应的酶。可以说，在生物机体内几乎没有一种生物化学反应不是由酶催化而完成的。目前发现的酶，已超过 2000 余种。新陈代谢就是酶催化的多种多样的同化与异化反应的复杂体系。总之，没有酶的催化就没有新陈代谢，也就会丧失生命的重要特征，即没有生命。

酶是由活细胞产生，并能在体内、外起催化作用的一类特异性蛋白质(即酶蛋白)，又称生物催化剂。在酶学中常将被酶催化的物质称为底物或基质(substrate)。由酶催化的化学反应称为酶促反应(enzymetic reaction)。酶加速化学反应的能力，称为酶活性或活力(enzyme activity or vitality)。酶失去催化能力，称为酶失活或酶抑制(enzyme deactivation or inhibition)。

酶是催化剂，它既具有催化剂的共性，又具有与一般催化剂不同的特征。

1. 酶与一般催化剂的共同点　①极少量的酶即可促进大量底物的化学变化，且在反应前后，其质和量均发生改变；②只能催化热力学允许进行的化学反应；③只能缩短可逆反应达到平衡所需时间，不能改变反应的平衡点；④可降低反应的活化能。

2. 酶与一般催化剂的不同点　①一般催化剂是小分子物质，而酶却是大分子物质，因而它具有大分子的各种性质；②酶是生物体自身合成的蛋白质，因而酶的功能，除决定于它的分子结构外，还与酶的生物合成量和代谢情况有关。它不同于一般催化剂需要高温、高压、强酸、强碱等激烈的外界条件，而只需要类似生物体体温的温度和适宜的酸碱度即可；③一般催化剂对反应物的特异性比较差，而酶对反应物与化学反应都有特异性，因而酶作用的反应物，称之为底物，从酶的特异性可以推测出酶的种类是极其复杂多种多样的，这种特异性是一般催化剂所不具备的；④酶具有高度催化效能，它能在常温及适宜的酸碱度的条件下，使反应速度几乎等于零的化学反应进行迅速反应。它的催化效能比一般催化剂约高出 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍；⑤在生物体内许多酶形成体系，其催化功能受各种因素，如激素的调节和控制，而一般催化剂均缺乏这种性质。

第二节　酶组织化学简史

酶组织化学是自然科学的一部分，随着相关学科的发展而逐渐发展，现已成为一门独立的学科。然而它的形成历史却仅有 50 年拟或稍长一点的时间。

酶组织化学的历史大致可分为四个阶段：第一阶段，是 1939 年以前，即酶组织化学发展的早期阶段；第二阶段，是 1940 年到 1950 年，即酶组织化学技术方法形成，并取得快速进展的时期；第三阶段，是 50 年代以后，由于电镜技术的发展和广泛应用，逐渐阐明了细胞超微结构，亦即酶与细胞器的定位的关系时期，在此阶段中，与酶的提纯化学的发展相平行；第四阶段，是指 60 年代以后，逐渐出现了免疫组织化学这样崭新的领域，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。可以说目前正是酶组织化学向更新的高度发展的阶段。

第一阶段：1939 年以前酶组织化学是集中于研究组织细胞的氧化还原，此时尚未出现证

明酶组织化学技术方法。人们最早熟悉的是Nadi反应。它是在萘酚和二乙基-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。这个反应最初由Ehrlich(1885)发现，他把该试剂注入机体内，观察到组织被染成蓝色。有人将此法应用于新鲜组织和固定的组织细胞。认为蓝染是基于不稳定性氧化和稳定性氧化酶作用的结果(Gierke，1911；Graeff，1936)。以后Keilin(1938)证明不稳定性氧化酶的反应是由细胞色素氧化酶催化的真正的酶反应，而所谓稳定性氧化酶的反应(M—Nadi反应)，它不是酶的作用，而是基于Nadi试剂，特别是α-萘酚所致。

还有一个与酶反应有关的例子是愈创树脂(guaiacum)反应。它是一种过氧化物酶的反应，用组织化学方法，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。在此反应中，过氧化物酶和过氧化氢酶的作用可以共存，一般认为是由于过氧化物酶作用的结果。多巴氧化酶也有同样的问题，虽然称它为“氧化酶反应”或者是“过氧化物反应”，但尚未能真正证明是哪种酶作用。

1939年是酶组织化学发展中划时代的一年，是酶组织化学真正开始的一年。Gomori(1939)提出磷酸酶硫化钴反应，高松(1939)提出磷酸酶银反应。关于酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的酶组织化学证明的论文都是在这一年发表的。

但是自然科学中任何新的发明或创造都不是在某时期突然出现的，而是在前人科研工作的基础上发展起来的。在Gomori和高松之前，Robison学派(1923～1930)对磷酸酶的酶组织化学约花费了十年时间进行研究，从固定液的选择到底物试剂的挑选都作了大量工作。在此基础上，Gomori和高松把磷酸酶的组织化学的检测向前推进了一大步，确立了方法学，提高了可重复性，建立起证明酶的这种想法是十分有意义的。此后，Gomori开展了酸性磷酸酶、脂酶、酯酶；高松开展了磷酰胺酶、腺苷三磷酸酶等酶组织化学的证明。

第二阶段：1940～1950年，此期是酶组织化学发展的黄金时代。正是从Gomori和高松提出的磷酸酶方法开始，在方法学上，即所谓“金属盐法”或“金属沉着法”(metal precipitation method)的确立，采用这种方法对许多水解酶开展了酶组织化学的证明。相继，Meten Junge和Green(1944)又创立了“偶联偶氮色素法”(coupling azodye method)。这种方法则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酶组织化学增添许多色彩，但该法多适用于水解酶类，虽有代替金属盐法的趋势，但仍不能脱离金属盐法。而在电镜细胞化学方面，金属盐法又有了新的发展。

在此时期，利用偶氮色素四唑盐法(tetrazolium salts method)对证明组织细胞内的氧化还原反应起到了相当大的促进作用，由它而演变成许多脱氢酶的酶组织化学证明法。Seligman(1951)等在这方面作出了突出的贡献。

本阶段证明酶组织化学理论的还有武内等(1954～1958)，当时他们从利用酶的分解作用方面转向酶的合成作用，即向合成法(synthetic method)方向发展，从葡萄糖-1-磷酸合成与正常糖原不同的多糖体，此多糖体与碘反应而着色，他们将此法与PAS反应法和利用分解作用的磷酸钴捕捉法进行了比较，并进行了改良，成功地创立了磷酸化酶的组织化学证明法。这种合成法可用于不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。

此期出版了许多有关组织化学书籍，其中有Glick (1949)[1]、Gomori (1952)[2]、Danielli (1953)[3]、Lison (1953)[4]、Bourne (1953)[5]、Lillie (1954)[6]、Baker (1958)[7]、Casselmen (1959)[8]等有关组织化学及细胞化学或酶组织化学技术方法以及理论方面的著作，对推动组织化学的发展，并广泛应用于医学生物各学科均起到了极为重要的作用。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

第三阶段：即50年代以后。在此期间，随着电镜的广泛应用，和超薄切片技术的成熟，人们可观察到组织细胞的超微结构。最初由Scheldon等人(1956)把超薄切片法和电镜技术应用于酶组织化学技术上，以观察酸性磷酸酶。接着Brander等(1956)用以观察碱性磷酸酶，用金属盐法证明酶的存在，称此为电镜酶组织化学(electron microscope enzyme histochemistry(或称电镜细胞化学(electron microscope cytochemistry)。电镜细胞化学开始崭露头角。Seligman(1967～1970)[9]等人相继提出了锇黑化法(osmification method)又明确证明了多种酶的定位。此后几十年中，电镜细胞化学得到飞速发展，这是因为电镜细胞化学可获得更精确的定位，可观察到细胞器、膜系统及大分子物质等，从而将亚微、超微结构与机能直接结合起来。故深受医学生物学各学科的重视，并广泛采用之。在此期间也同样出版了许多专著。如McManus 和 Mowry(1960)[10]、Davenport(1960)[11]、Pearse(1953～1972)[12]、Jensen(1962)[13]、Burstone (1962)[14]、Bark 和 Anderson (1963)[15]、Anderson (1967)[16]、Lillie(1954)[17]等相继出版专著。还有Thompson(1966)[18]编写的《selected Histochemical and Histopathological method》一书几乎是一本专业的百科全书。在此期间Pearse (1985)、Bancroff (1967、1976)、Culling (1974)、Ganter 和 Jolles (1969) 以及Lison、Glick 和 Rosenbanm的专著相继再版。

在此期间，电镜细胞化学定位的新技术方法仍在迅速发展，如Geyer (1973)[19]所汇集的一本优秀专著《Ultra-Histochemistry》、Hayat (1973)[20]主编的《Electron microscopy of enzyme》。之后还有Lojda 和 Luppa (1977)、Barka 和 Anderson (1963)、Lillie (1969) 等相继出版了有关组织化学书籍。日本组织化学家武内忠男和小川和朗 (1980)[21]出版《新酵素组织化学》，90年代再版，平野宽等 (1987)[22]编著《实验组织化学》、小川和朗等 (1984)[23]编著《组织细胞化学の技术》、小川和朗等 (1989)[24]出版了《组织化学の技术一细胞膜》、水平敏知编著《受容体の组织细胞化学的アプローチ》[25]、Horobin(1982)[26]出版的《Histochemistry》等新著作。此外，还有日本组织细胞化学会每年出版一册《组织细胞化学》。[27]这些书籍，均收集了近年来在酶组织化学技术方面大量的新技术、新进展，包括电镜细胞化学、酶免疫组织化学、放射自显影技术以及同工酶等内容。可以说，这些书的内容丰富、广泛，反映了酶组织化学的现状。

第四阶段：是指免疫组织化学发展阶段。免疫组织化学(immunohistochemistry)的进展为酶组织化学的证明更加专一化和酶的定位提供了重要手段，开辟了崭新的途径。

研究组织细胞内特定酶的分布的酶组织化学方法，大致可分为两种：一是利用酶的活性反应方法；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。酶组织化学一般是属于前者；后者被归类于免疫组织化学。近年来，免疫组织化学得到飞速发展，并广泛应用于各学科。以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的存在部位这两个方面进行验证研究。

免疫组织化学的发展历史已有几十年了。早在1933年Heidelber等人把偶氮联苯胺结合到卵蛋白上，使之成有颜色的抗原开始，到本世纪40年代建立免疫荧光抗体法以来，免疫组织化学技术取得了长足的进展。到60年代末70年代初期Nakane等(1968)、Avrameas等(1969)、Sternberger等(1970)把酶的样品提纯法和免疫组织化学的进展结合起来，为把以酶作为抗原，以辣根过氧化物酶作为指标的酶标抗体法(enzyme-labeld antibody method)应用于酶组织化学开辟了道路。现在免疫组织化学已发展成电镜免疫组织化学(electron microscope immunohistochemistry)。

总之，免疫组织化学是利用特异性抗原抗体反应，观察和研究组织细胞内的特定抗原或抗体的定位、定性和定量技术。为了显示和观察到组织和细胞内的抗原抗体反应，需要预先将某种标记物结合到抗体上，借标记物的荧光或酶的呈色反应、放射自显影或高电子密度，在光镜或电镜下进行观察。即用已知的标记抗体来示踪，以检测未知的抗原。

酶组织化学的最新技术有冷冻复型法（freeze—replica method）和超高压电镜（high voltage electron microscope，HVEM）等，均已开始应用。

冷冻复型法：是指在亚微形态学领域内一种独特的观察方法。近年来，已开始将冷冻复型法应用于研究生物膜内的化学成分（如胆固醇等）、膜酶和各种膜受体的存在等方面。有人尝试用放射自显影术配合使用，已取得较好的效果。要用冷冻复型法观察酶的活性，可直接观察进行酶反应标本的冷冻复型图像，特别是冷冻蚀刻像。目前，用冷冻复型法只是对酶活性部位存在于细胞膜外表面的乙酰胆碱酯酶进行研究。此外，如反应产物存在于膜的外表面，其颗粒较粗大时，还可用扫描电镜观察。

超高压电镜的应用：在医学生物学领域中应用的优点之一，是可用于1～5μm厚的树脂包埋切片，将样品倾斜±5～10度时拍照，可获得一对立体图像。这样就能如实地掌握细胞的三维立体图像。但要想观察特定的细胞器的立体图像及其区别，则必须通过细胞化学反应，对目标细胞器进行特异性染色，就能容易地获得复杂的立体结构图像。譬如用Gomori法在HVEM下观察组织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、高尔基复合体等特定的细胞器处，使得反差增强，获得理想的三维立体结构图像。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（细胞内液泡）、过氧化物酶（肌细胞横小管）、过氧化氢酶（微体）等。这样在HVEM水平上采用酶组织化学方法，可获得关于细胞器的立体结构及其动态变化的极其重要的新的理论知识。

国内开展组织化学与细胞化学的研究起步较晚，始于50年代，当时有组织化学家李肇特、张作干、汪堃仁教授等人，积极从事组织化学方面的科研和教学工作，并培养了一大批组织化学的专门研究人才。几十年来我国学者采用组织化学与细胞化学技术方法已广泛应用于各学科领域，无论在研究内容、技术方法及其应用范围以及研究人员的培养等方面均取得了很大的发展，翻译和编写有关组织化学书籍多部：如陈啸梅主编的《组织化学手册》[28]、刘斌编著的《电子显微镜组织化学技术》[29]，翻译书籍有马仲魁等译皮尔斯《组织化学》[30]、《组织化学—理论和应用卷一》[31]、《组织化学—理论和实用卷二》[32]、钟慈声主译小川和朗的《酶组织细胞化学技术》[33]、朴英杰主译小川和朗的《组织细胞化学技术—细胞膜》[34]等书籍多部。

在中国解剖学会领导下，于1988年3月在广州第一军医大学召开了中国解剖学会“组织化学与细胞化学学组”成立大会，并决定筹划《中国组织化学与细胞化学杂志》，这标志着中国组织化学与细胞化学的科学研究进入了一个崭新的阶段。

我国组织细胞化学专家艾民康教授曾参加过第6、7届IFSHC大会。第8届IFSHC大会于1988年7月在美国华盛顿召开，我国派组织化学与细胞化学学组组长艾民康教授，学组秘书长朴英杰教授出席了大会。在本次大会上经IFSHC大会正式批准中国组织化学与细胞化学学组加入该国际联盟，会上艾民康教授被选为联盟理事，从此我国已成为IFSHC的成员和理事国。第9届IFSHC大会于1992年8月在荷兰Maastucht召开，我国派苏慧慈、蔡文琴等教

授参加了本次大会，苏慧慈教授被选为IFSHC理事会理事。

此外，相继于1989年12月在广州、1991年8月在西安、1993年9月在沈阳召开了第1、2、3届中日组织化学与细胞化学学术研讨会，会议展现了中、日两国组织化学与细胞化学领域内的最新研究成果和进展。

组织化学与细胞化学的理论和技术，在我国医学生物学领域的应用逐渐推广，它在基础和临床各学科的研究中深受重视。鉴如此况，中国解剖学会于1987年决定创办《中国组织化学与细胞化学》杂志，1992年经国家有关部门批准《中国组织化学与细胞化学杂志(Chinese Journal of Histochemistry and cytochemistry)》[35]（季刊）正式出版发行。

综上所述，酶组织化学是近50年来迅速发展的一门学科。它具有将形态学、生物化学和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其重要作用。今后定将得到进一步的发展。

第三节　酶的名称及分类

一、酶的命名

自1878年Kuhne将酶称为enzyme以来，一直延用至今，所发现的酶都是按习惯命名。最初仅知道几种酶，其命名常常是不能反映酶所具有的功能。如延用至今的胰蛋白酶、血管紧张肽原酶以及木瓜蛋白酶等都是仅仅表明其来源。而现在的命名大多数是以天然底物为词根，加上后缀-ase构成。如水解精氨酸的酶，称为精氨酸酶，但它没有说明此酶是如何作用于精氨酸的。现有许多酶，其名称衍生于所作用的底物和对底物的作用，如天门冬氨酸氨基转移酶、琥珀酸脱氢酶及谷氨酸脱羧酶。显而易见，酶的系统命名法可防止由俗名引起的混乱。关于酶的详细命名法请查阅Dixon和Webb(1964)[36,37]《酶学》一书。

酶的命名原则如下：

1. 酶对底物的特异性　绝大多数酶系以底物来命名，如催化脂肪水解的酶，称为脂肪酶；催化核酸降解的酶，称为核酸酶。

2. 根据催化反应性质　这是因为酶对催化反应具有特异性，如能催化功能基团的转移反应，称为转移酶；催化底物水解反应，称为水解酶。

3. 根据底物与催化反应性质　如乙醇脱氢酶，是催化乙醇脱氢的酶。

4. 根据酶的来源　除上述命名原则外，有些酶是根据酶的来源命名的，如胃蛋白酶、胰蛋白酶；还有些酶是根据酶的特性命名的，如酸性磷酸酶及碱性磷酸酶。

习惯命名没有国际系统命名法的严格要求，所以有时出现命名混淆不清的现象，如一酶数名，或数酶一名。但是习惯命名法比较简单，应用方便，故目前仍广泛应用。

二、酶的分类

为了使酶的命名统一系统化，国际生物化学会（International Union of Biochemistry）中

的酶学会(Enzyme Commission,EC)乃于1961年提出酶的分类及命名原则,复经国际化学会(International Union of Applied Chemistry)同意[38]，遂规定如下：

每个酶都赋予一个学名和一个编号。编号共有四个阿拉伯数字，数字间由“.”相隔开。能表明酶促反应的底物、产物、辅酶和性质。按酶促反应的性质，酶学会共将酶分为六大类，由第一个阿拉伯数字代表，即分别由编号1. 2. 3. 4. 5. 6. 表示（表1—1）。

表1—1　　国际生物化学会酶学会对酶的分类与酶的编号

EC编号	酶　名	
1	氧化还原酶	(oxidoreductases)
2	转移酶	(transferases)
3	水解酶	(hydrolases)
4	裂解酶	(lyases)
5	异构酶	(isomerases)
6	连接酶或合成酶	(ligases 或 synthetases)

某一大类中又可根据底物的被催化基团或键的特点分为若干个亚类，每个亚类可按顺序编成：1. 2. 3. 4. 5. 6. ……等。每一亚类还可以再按顺序分为若干亚亚类，并给予编号。在亚亚类中可以有若干种酶。酶的编号中，首先应用EC规定进行编号，写出大类、亚类、亚亚类及酶的特定编号，如EC. 1. 1. 1. 37是指苹果酸脱氢酶，即表示该酶属于第一大类，第一亚类，第一亚亚类，其酶的特定编号为37。

其编号解释如图（图1—1）：

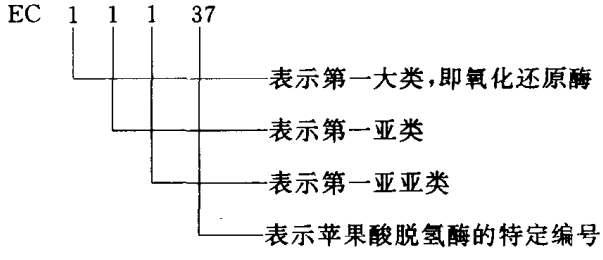


图1—1　酶分类编号示意图

为了进一步说明酶的系统分类法，现将六大类及其亚类简述如下：

1. 氧化还原酶　是催化氧化还原反应的酶。包括脱氢酶、氧化酶、过氧化物酶和加单氧酶。如苹果酸脱氢酶、黄嘌呤氧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶与羟化酶或混合功能氧化酶。氧化还原酶可根据底物中发生氧化的基团的性质，再分若干亚类。

如乳酸脱氢酶(Lactic acid dehydrogenase)可催化下述反应：

$$\text{L-乳酸}+NAD^+ \rightleftharpoons \text{丙酮酸}+NADH+H^+$$

式中L-乳酸给出电子，NAD^+接受电子。向右反应，L-乳酸是底物，丙酮酸是产物，NAD^+是脱氢辅酶。向左反应，乳酸变成产物，丙酮酸变成底物，NADH是给氢辅酶。

2. 转移酶　即催化功能基团转移的酶。此大类可根据底物中被转移的基团性质分为8个亚类。其中第6亚类为转移含氮基基团的酶，如天门冬氨酸转移酶。例如：己糖激酶(hexokinase)的学名是ATP：D-己糖6-磷酸转移酶(ATP：D-hexose 6-phosphotransferase)，催化如下反应：

$$\text{ATP}+\text{D-己糖} \rightleftharpoons \text{ADP}+\text{D-己糖-6-磷酸}$$

式中ATP给出磷酸，D-己糖接受磷酸，己糖6碳上的羟基发生转移。

3. 水解酶　即催化水解反应的酶，称为水解酶。而水解酶又可根据其与水解反应有关的键的类型进一步分为亚酶类，如酯酶、糖酶和肽酶。而每一亚酶至少还可再细分两次，每一次归类对酶所催化的底物都有更严格的要求。

根据被水解键的类型，可将其分为 11 个亚类，其中第一亚类是作用于脂类的酶，如胆碱酯酶；第三亚类是作用于醚键的酶；如 s-腺苷同型半胱氨酸酶。磷酸酶为 3. 1. 3；碱性磷酸酶为 3. 1. 3. 1.。可见后面的每个数字都使酶的分类更加明确。例如腺苷三磷酸酶 (adensoine triphosphatase)的学名是 ATP 磷酸水解酶(ATP phosphohydrolase)。其催化如下式反应：

$$ATP+H_2O \rightleftharpoons ADP+\text{正磷酸}$$

式中底物 ATP 发生水解。

4. 裂解酶　又称裂合酶。它可使底物移去基团，如 H_2O、CO_2，并出现双键。此类酶的亚类比较多，一般表示分裂的基团，如其中第 1 亚类为裂解 C—C 基团的酶，如草酰乙酸脱羧酶；第 2 亚类是裂解 C—O 基团的酶，如脱羧酶等。

例如，果糖二磷酸醛缩酶(fructose diphosphate aldolase)的学名是 D-果糖 1、6-二磷酸 D-甘油醛 3-磷酸裂合酶(D-fructose 1、6-diphosphate D-glyceraldehyde 3-phosphate-lyase)。其催化下述反应：

$$\text{果糖 1、6-二磷酸} \rightleftharpoons \text{D-甘油醛-3-磷酸}+\text{二羟丙酮磷酸}$$

式中的底物果糖 1、6-二磷酸脱去二羟丙酮酸，变成产物 D-甘油醛-3-磷酸，或逆向由底物 D-甘油醛-3-磷酸经加成反应变成产物果糖 1、6-二磷酸。

5. 异构酶　催化同分异构体的互相转变，根据异构的类型，可区分多种亚类。其中第 1 亚类是消旋酶与表异构酶，如丙氨酸消旋酶；第 3 亚类为分子内氧化还原酶，如磷酸葡糖异构酶。

例如，丙糖磷酸异构酶(triosephosphate isomerase)的学名为 D-甘油醛-3-磷酸酮醇异构酶(D-glyceraldehyde-3-phosphate Ketol-isomerase)。其催化下述反应：

$$\text{D-甘油醛-3-磷酸} \rightleftharpoons \text{二羟丙酮磷酸}$$

6. 合成酶(又称连接酶)　系指能将两种物质合成为一种物质，并必须与 ATP 分解相偶联的酶。根据反应后新生成的键为 C=O 键、C=S 键、C=N 键、C—C 键及磷酸酯键等 5 种类型，还可将此类酶分为 5 个亚类。

在催化双分子合成单分子的反应时，其消耗的能量通常来自 ATP 分子。如异亮氨酰-tRNA 合成酶(isoleucyl-tRNA synthetase)的学名是 L-异亮氨酸 $tRNA^{He}$合成酶。其催化反应如下式：

$$ATP+\text{L-异亮氨酸}+tRNA^{He} \rightleftharpoons AMP+PP_i+\text{L-异亮氨酰-}tRNA^{He}$$

式中 L-异亮氨酸与一个特殊的 tRNA 受体(RNA^{He})成键，同时 ATP 分裂为 AMP 及焦磷酸，并释放能量。

严格地说，一种酶只能有一个命名(包括俗名与学名)和一个编号。但是我们要知道，基于该种酶所催化的反应来命名和分类与酶的来源无关。从各种不同物质分离出来的，但是催化同一化学反应的酶，它们分子中的氨基酸顺序可能大不相同，它们催化的机理也可能不一样。例如，从人胎盘和从马胎盘分离出来的雌二醇脱氢酶虽然同样催化雌二醇脱氢为雌酮或雌酮加氢为雌二醇的反应。但是经过酶动力学的研究，发现二者的活性中心结构并不完全相同。这些相异的地方是无法用命名和分类法加以区别的。

目前在六大酶系中，可应用酶组织化学与细胞化学方法显示出来的，并可进行定性、定

位和定量的酶却是较少的，不过百余种。因此酶组织化学的发展具有极大的潜力。

（贲长恩）

参 考 文 献

1. Glick, D.: Techniques of Histo and Cytochemistry, Interscience, New York, 1949
2. Gomori, G.: Microscopic Histochemistry: Principles and practice, University of Chicago Press, 1952
3. Danielli, J. F.: Cytochemistry, Wiley & Sons, New York; Chapman and Hail, London, 1953
4. Lison, L.: Histochimie et Cytochimie animales 2d ed., Ganthier Villars, Paris, 1953
5. Bourne, G. H.: An introduction to functional Histology, Churchill, London, 1953
6. Lillie, R. D.: Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, 2d ed., Blakiston Philadelphia, New York, 1954
7. Baker, J. R.: Principles of Biological Hicrotechnique, Methuen, London and Wiley, New York, 1958
8. Casselmen, W. G. B.: Histochemical technique, Methuen, London, 1959
9. Seligman, A, et al.: Nondroplet ultrastructural demenstration of cytochiome oxidase actirity with a polymerizing osmiophilic reagent, diamino Bennidine (DAB). J. Cell Biol. 38: 1～14, 1968
10. McManus, J. F. A., and Mowry, R. W.: Staining Methods, Histological and Histochemical, Hoeber-Harper, New York, 1960
11. Davenport, H. A.: Histological and Histochemical Technics, Saunders, Philadelphia, 1960
12. Pearse, A. G. E.: Histochemistry Thoretical and Applied, Little, Brown, Boston, 1953; 2d ed, 1960, 3d. ed 1968～1972
13. Jensen, W. A.: Botanical Histochemistry, Principles and Practice, Freeman, San Francisco, 1962
14. Burstone, M. S.: Enzyme Histochemistry and Its Application in the Study of Neoplasms, Academie Press, New York and London, 1962
15. Barka, T. and Anderson, P. J.: Histochemistry: Theory, Practice and Bibliography, Hoeber-Harper, New York, 1963
16. Anderson, C. A.: An introduction to the electron probe micra omalyner and its application to Biochemistry, in D. Glick (ed), Methods of Biochemical analysis, Interscience, New York, 1967
17. Lillie, R. D.: Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, Blakiston, Philadelphia, New York, 1954
18. Thompson, S. W.: Selected Histochemical and Histopathalogical Method, Charles C. Thomas, Springfield, Ⅱ, 1966
19. Geyer, G.: Ultrahistochemie: Histochemische Arbeitrorschirften für die Elektronenmikroskopie, Fischer Verlag, Jena, 1973
20. Haya t, M. A.: Electron Microscopy of Enzyme, Principles and Methods, Reinhold, New York, Gincinnati, Toronto, London and Melbourne, 1973
21. 武内忠男、小川和朗等：新酵素组织化学，朝仑书店，日本，1980
22. 平野宽等：实验组织化学，丸善株式会社，日本，1987
23. 小川和朗等：组织细胞化学の技术，学际企画，日本，1984
24. 小川和朗和中根一穗等：组织化学の技术—细胞膜，朝仑书店，日本，1989，
25. 水平敏知：受容体の组织细胞化学アプローチ，临床检查 Mook，日本，1983
26. Horobin, R. W.: Histochemistry, Gustav Fischer, Butterworths, 1982
27. 日本组织细胞化学会：组织细胞化学，学际企画，日本，每年一册。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com