

磷酸酶的三种铈法光镜定位比较

袁笃南 徐根兴 赵振金 余有训 陈陵 董文度

(南京海军医学专科学校细胞生物研究室)

目前磷酸酶在电镜水平的铈法定位已较普遍,因为铈法明显优于铅法。铈法非特异性反应极少,背景干净,无基质效应和移位现象,无人工假象形成;铈法中形成的磷酸铈反应产物稳定,重复性好;铈法反应颗粒细而均匀,不掩盖超微结构细节;铈对酶没有抑制作用,并可增加生物膜的反差^[1]。但铈法在光镜水平无法直接显示反应产物。对此,国外曾有报道^[6-10],他们将过氧化物酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的铈反应产物转换成能在光镜下观察到的有色反应产物。我们参考这些方法,根据不同酶和国内实际情况作了一些改进,对兔肾和肝脏的AKP(碱性磷酸酶)、AcP(酸性磷酸酶)、5'-Nase(5'-核苷酸酶)和TPPase(焦磷酸硫酸胺酶)等四种磷酸酶进行了3种铈法(Ce-DAB法、Ce-Pb法和Ce-Pb-AgS法)光镜定位比较。

材料和方法

家兔麻醉后用2%多聚甲醛-0.5%戊二醛固定液(0.1 mol/L二甲腈酸缓冲液pH 7.4配成)灌注固定10分钟,迅速取出肾和肝脏,切成小块,用同种固定液再固定30分钟。用上述缓冲液充分漂洗,30%蔗糖处理,液氮速冻,恒冷箱冰冻切片,再用铈作捕捉剂,分别进行AKP、AcP、5'-Nase和TPPase反应。

AKP反应采用Ce-DAB法、Ce-Pb法和Ce-Pb-AgS法进行。Ce-DAB法按照Goor和Angermüller等方法^[6,20],在反应介质和一些具体步骤上作了一些修改,其步骤为:(1)反应介质含2%巴比妥钠5 ml,0.1 mol/L β-甘油磷酸钠5 ml,0.14 mol/L无水氯化钙10 ml,1% MgSO₄·7 H₂O 0.5 ml,蒸馏水2.5 ml,调pH 9.4。(2)在上述反应介质中37℃作用30-60分钟。用0.07 mol/L CaCl₂(pH 9.2)室温略洗。(3)在含

3 mmol/L CeCl₃和9 mmol/L柠檬酸钠的0.3 mol/L glycine-NaOH缓冲液(pH 9.5)中37℃作用30分钟。(4)用0.05 mol/L glycine-NaOH缓冲液(pH 8.5)洗5分钟。(5)含1%过氧化氢的0.05 mol/L glycine-NaOH缓冲液(pH 8.5)室温处理30分钟。(6)用0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)洗5分钟。(7)含0.05%二氨基联苯胺(DAB)的0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)60℃处理30分钟,水洗后常规封片。

AKP的Ce-Pb法基本按Halhuber等^[8]的方法进行。但我们用的AKP反应介质中含0.1 mol/L Tris-maleate缓冲液(pH 8.0),β-甘油磷酸钠30.6 mg作底物,CeCl₃ 74.5 mg,蔗糖5 g。反应步骤为:(1)在去底物的反应介质中37℃预孵育30分钟,再在含底物的上述反应介质中37℃孵育60分钟,0.05 mol/L二甲腈酸缓冲液(pH 7.4)短时间漂洗。(2)用0.5%醋酸铅液室温处理15分钟,漂洗后用2%硫化铵显色。

AKP的Ce-Pb-AgS法根据Halhuber等^[9]的方法作了银显影的改进。步骤为:(1)先进行Ce-Pb法步骤。(2)用硝酸银显影液室温显影10-15分钟。硝酸银显影液配方为:A液,2%明胶30 ml。B液,柠檬酸1.3 g,柠檬酸钠1.2 g,加三蒸水5 ml。C液,对苯二酚0.8 g,加三蒸水15 ml。D液,硝酸银20 mg,加三蒸水1.0 ml。上述四液临用前配制并混合使用。

5'-Nase、AcP和TPPase分别参照Robinson^[2]、Hoefsmit^[3]和Kobayashi^[4]等进行铈法反应。然后分别进行Ce-DAB、Ce-Pb和Ce-Pb-AgS法,把铈反应产物转换成光镜下可见的有色复合物。这三种酶的Ce-DAB法按照AKP的Ce-DAB法中(4)-(7)步骤进行。AcP的Ce-Pb法则在铈反应后,用0.05 mol/L二甲腈酸缓冲液短时间漂洗,再用碱性柠檬酸铅液^[5]室温下处理10分钟,充分水洗,2%硫化铵显色。AcP的Ce-Pb-AgS法经Ce-Pb法处理后,按上述AKP

的 Ce-Pb-AgS 法进行处理。5'-Nase 和 TPPase 的 Ce-Pb 法和 Ce-Pb-AgS 法与 AKP 相同。所有酶的底物采用去物对照, 结果均为阴性。

结果与讨论

AKP、5'-Nase、AcP 和 TPPase 等 4 种磷酸酶在铈反应后, 经 Ce-DAB 法、Ce-Pb 法和 Ce-Pb-AgS 法处理, 把铈反应产物转换成光镜下可以观察到的有色反应产物, 从而在光镜下显示了 4 种磷酸酶的活性定位。AKP 和 5'-Nase 活性主要定位于肾小管的刷状缘(图版图 1, 2)和肝的毛细胆管中(图版图 3, 5); AcP 活性主要定位于肾小管细胞质的溶酶体中和肝细胞的溶酶体中(图版图 4); TPPase 活性主要定位于肾小管细胞质中(图版图 6)和肝细胞质中。

兔肾和肝脏的 AKP、5'-Nase、AcP 和 TPPase 等 4 种磷酸酶在光镜下用 Ce-DAB 法均显示了强的阳性反应(图版图 1-3, 表 1); Ce-Pb-AgS 法的反应次之(图版图 4, 表 1); Ce-Pb 法的反应则较弱(图版图 5-6, 表 1)。

表 1 4 种磷酸酶的 3 种铈法光镜定位比较

	AKP 和 AcP	5'-Nase 和 TPPase
Ce-DAB 法	++++ 定位清晰 有血细胞背景染色	+++ 定位清晰 有血细胞背景染色
Ce-Pb 法	+++ 定位少清晰 背景较干净	++ 定位少清晰 背景较干净
Ce-Pb-AgS 法	+++ 定位清晰 银显影操作麻烦	++ 定位清晰 银显影操作麻烦

++++, +++, ++, + 表示酶阳性反应的相对强弱。

Ce-DAB 法的原理是通过把磷酸铈反应产物转变成过氢氧化铈(Ce-[OH]₂OH), 过氢氧化铈能引起 DAB 聚合而显色。在 AKP 的反介质中, 由于 pH 值较高(9.4), 用铈作为第一捕捉剂易形成铈沉淀, 同时因为 AKP 是一个含锌酶, 在此环境中锌易被释出, 导致酶活性

的消失。所以不宜用铈作第一捕捉剂, 而用钙作为第一捕捉剂, 可防止这些问题^[6]。磷酸钙在 CeCl₃ 液中孵育很易转换成磷酸铈, 然后用含 1% 过氧化氢的 glycine-NaOH 缓冲液室温处理 30 分钟; 转换成过氢氧化铈, 再用 DAB 显色。

Ce-Pb 法是将铈的捕捉反应产物磷酸铈, 用铅盐转换成磷酸铅, 再用硫化铵加以显色^[7]。根据不同的酶而选择不同的铅盐。AKP、5'-Nase、TPPase 均用 0.5% 醋酸铅液 37℃ 处理 15 分钟, 而 AcP 则用碱性柠檬酸铅液(pH 12) 37℃ 处理 10 分钟。因为用醋酸铅 AcP 反应很弱, 而用碱性柠檬酸铅则反应较强^[7], 这与反应液的 pH 值有关。

用 Ce-Pb 法, 4 种磷酸酶的活性在光镜下显示也比较清楚, 但较 Ce-DAB 法和 Ce-Pb-AgS 法稍弱些。其中 AKP 更弱一些(图版图 5), 图为 AKP 在 pH 8.0 的条件下, 与底物反应是较弱的^[8]。

Ce-Pb-AgS 法是在 Ce-Pb 法的基础上再用硝酸银显影液进行放大反应。反应产物由磷酸铈转变为磷酸铅, 再与硫化铵作用生成硫化铅。硫化铅能催化银离子还原成银原子, 被还原的银原子则围绕酶反应产物硫化铅的表面并与其牢固结合, 形成“银壳”, 从而增强了反应^[9]。在我们的实验中, 我们用明胶配制的银显影液取代原法中阿拉伯胶配制的银显影液。配制方便, 较容易操作, 其反应效果也比文献中报道的要好。用 Ce-Pb-AgS 法的酶反应明显较 Ce-Pb 法强一些。

用 Ce-DAB 法、Ce-Pb 法和 Ce-Pb-AgS 法对兔肾和肝脏四种磷酸酶的光镜定位的试验中, 我们认为这 3 种方法均可以在光镜下较好地显示酶的活性, 从而有利于在光镜和电镜下同时进行磷酸酶的铈法定位, 使铈作为捕捉剂更广泛地用于酶组织化学和细胞化学研究之中。

摘 要

我们用 Ce-DAB 法、Ce-Pb 法和 Ce-Pb-

AgS法对兔肾和肝脏的四种磷酸酶进行了光镜定位,并对这三种钡法进行了比较。Ce-DAB法反应较强,Ce-Pb-AgS法次之,Ce-Pb法反应较弱。但用这三种方法在光镜下均可清晰地显示这4种磷酸酶的活性,从而使钡法可同时应用于电镜和光镜下的磷酸酶的活性定位。

图版说明

4种磷酸酶的3种钡法光镜定位的比较

1. 兔肾 AKP Ce-DAB法×132
2. 兔肾 5'-Nase Ce-DAB法×132
3. 兔肝 AKP Ce-DAB法×132
4. 兔肝 AcP Ce-pb-Ags法×264
5. 兔肝 AKP Ce-Pb法×132
6. 兔肾 TPPase Ce-Pb法×132

参考文献

- [1] 汤雪明, 1989, 细胞生物学杂志, 11(1):

39—41.

- [2] Robinson, J.M. and Karnovsky M.J., 1983, *J. Histochem. Cytochem*, 31(10):1190.
- [3] Hoefsmit, E.C.M., et al., 1986, *Histochem*, 84:329.
- [4] Kobayashi, T., et al., 1987, *J. Histochem. Cytochem*, 35(5):601.
- [5] Reynolds, E. S., 1963, *J. Cell Biol*, 17: 208—212.
- [6] Goor, H. V., et al., 1989 *J. Histochem. Cytochem*, 37(3):399—403.
- [7] Zimmermann, N. and Halhuber, K. J., 1985, *Acta histochem*, 76:97—104.
- [8] Halhuber, K. J., et al., 1985, *Acta Histochem*, 77:67—73.
- [9] Halhuber, K. J., et al., 1985, *Acta Histochem*, 77:143—149.
- [10] Augermüller, S., and Fahimi, H. D., 1988, *J. Histochem. Cytochem*, 36(1): 28—28.

植物组织中光合产物的放射自显影定位 ——冷冻取代树脂包埋法

肖永瑚 高金方

王丽霞 毕庶春 国际翔

(吉林省农业科学院原子能利用研究所、公主岭) (中国科学院沈阳应用生态研究所)

关于植物组织中可溶性物质的放射自显影,我们曾用冰冻切片乳胶干装法,取得了¹⁴C标记的光合产物在人参、大豆输导组织中定位的自显影片^[1],但是,该方法具有标本与乳胶不能紧密接触和防止标本脱落的困难。虽然可以克服,但操作的精细程度直接影响实验的成败与质量。应用冷冻取代、树脂包埋和液体乳胶法,可以避免这方面的问题。

材料和方法

一、仪器设备

Jeal-JuM-7型超薄切片机、生物显微镜、照相机、液体二氧化碳、广口冰瓶、GMA、Epon 812包埋剂,核4型乳胶,无水丙酮等试剂。

二、材料及标记处理方法

盆栽3年生人参植株,用含¹⁴C₂ 400 PPM(V/

V),比放射性为0.137 μci/ml的CO₂标记空气(用FGC-2型¹⁴C植物光合测定仪配制^[2]),于室外气温为19.5℃,光强为3万LX条件下,对人参植株一片掌状复叶,曝光两次(间隔一个半小时),每次15分钟。标记后3.5小时取样。分别按标记叶脉、叶柄、茎或侧根取样,迅速切割为小于2mm的小块样本,液氮速冻或直接放入干冰冷冻的无水丙酮中速冻,并继续进行冷冻取代。

三、冷冻取代

化学纯丙酮,经加入无水硫酸钠或分子筛等干燥剂,反复脱水并蒸馏后,密封保存,供做取代液用。

冷冻取代:采用简易的广口冰瓶和干冰法,以代替昂贵的超低温(-80℃)冰箱。取一大型广口冰瓶,将高压钢瓶中液态二氧化碳放入布袋中使成干冰。干冰直接加入冰瓶中至满,或冰瓶中先加一定量酒精,再加入干冰调至-72℃^[3],取带胶塞试管(7×1.8mm),每管迅速装入约20ml无水丙酮作取代液