

60℃水滴上,也能保持最大部分的¹⁴C蔗糖,认为无须干法即可制备高分辨的自显影象^[8]。我们用以取代脱水的丙酮液中,没有查出可测知的放射性。从自显影片银粒集中分布在输导组织看,证明这个方法,至少在显微水平上是有效可行的。

包埋剂GMA在40—60℃高温聚合时,速度快、收缩强烈,易产生气泡和造成材料收缩损伤(图版图4,5)导致实验失败。采用浸透前包埋剂预聚合,聚合前于冰箱4℃继续浸透12小时以上,低温(12℃)紫外光照射聚合,可以消除气泡和收缩损伤。

为解决溶性物质放射自显影技术的困难,与其他方法相比较,本文所用方法的优点:
1. 方法简便,不需超低温冰箱,用广口冰瓶内加干冰即可替代。2. 克服了标本与干乳胶不能紧密接触曝光的困难。3. 克服标本切片易脱落的问题。

摘 要

本文采用以简易的广口冰瓶内加干冰作冷冻剂,以替代超低温(-80℃)冰箱。用以冷冻无水丙酮作取代液,对植物材料进行冷冻取代脱水,固定。经无水GMA预聚合后浸透、包埋、低温紫外线照射聚合,半薄切片、制片和涂敷核型乳胶,曝光后显、定影等操作。为

经验交流

用过氧化氢酶电镜细胞化学技术显示 人肝细胞的过氧化物酶小体

陆珍凤 郑晓刚 周晓军
(南京军区总医院超微病理科)

人肝细胞的过氧化物酶小体(Peroxisome)的电镜细胞化学技术研究,国内尚未见报道。本实验参照有关文献^[1,2],采用人肝组织进行细胞化学反应。结果表明,过氧化氢酶细胞化

植物体中溶性物质(包括引进外源溶性物质)放射自显影定位、定向研究、提供技术方法。

图 版 说 明

用0.137 μCi/ml ¹⁴C₂ 光合标记人参叶柄组织,冷冻取代,GMA、环氧树脂Epon 812包埋,切片厚1—2 μ,曝光56天人参叶柄维管束光合产物自显影片,放大380倍。

1. GMA包埋,人参叶柄维管束细胞内箭头所示自显影银粒。
2. Epon 812包埋,人参叶柄维管束细胞内箭头所示自显影银粒。
3. 未经标记的对照人参叶柄维管束细胞内无自显影银粒。
4. GMA包埋60℃热聚合出现气泡。
5. GMA包埋热聚合出现根组织损伤。

参 考 文 献

- [1] 肖永璐、高金方,1987,植物生理通讯,4:66—68。
- [2] 冯春生等,1987,核农学报,2:105—111。
- [3] 顾庆超等,1979,《化学用表》,8:54。
- [4] 朱丽霞等,1983,《生物学中电子显微技术》,26—33。
- [5] 徐是雄,1981,《植物材料的薄切片超薄切片技术》,p. 39。
- [6] Peel A. J., 1974, Transport of Nutrients in plants pp. 27—34. Butterworth Ltd. London.
- [7] 水平敏知,1978,オートラシノ“オク”ラフン医歯栄出版社,187—189。
- [8] Fisher and Housley, 1972, Plant Physiol., 49:166—171。

学反应的效果与戊二醛、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、过氧化氢(H₂O₂)、温度及时间5个因素有关。

材 料 和 方 法

一、试剂

1. 固定液: 1.5%戊二醛(0.1 mol/L, 二甲胍酸钠缓冲液, pH 7.4)。

2. DAB: 预先溶解成 4 mg/ml, 于 -20℃ 冰冻保存。3. Teorell-Stenhagen 缓冲液: 5 mol/L 磷酸 10 ml, 硼酸 3.524 g, 柠檬酸 7.04 g, 氢氧化钠 13.8 g 配成 1 升溶液。4. 1% H₂O₂。

二、方法^[1]: 手术时取肝组织 0.5—1 mm³ 大小, 1.5%戊二醛固定 15—30 分钟。用振动切片机切成 60 μm 厚的组织片, 缓冲液中洗涤 3—5 次, 在下述孵育液, 25℃ 避光条件下浸泡 60 分钟。

4 mg/ml DAB	2.5 ml
Teorell-Stenhagen 缓冲液	2.5 ml

(用 1 N NaOH 或 1 N 盐酸调 pH 为 10.0, 加蒸馏水使总量至 10 ml)

1% H ₂ O ₂	0.2 ml
----------------------------------	--------

孵育结束后, 倒去溶液, 用 2% 钨酸后固定 1 小时, 脱水包埋。对照实验的标本在除去 DAB 的孵育液中孵育, 其他操作相同。

结 果 与 讨 论

一、过氧化物酶小体的形态及特征

电镜下, 过氧化物酶小体圆形或椭圆形, 直径约 0.4 μm—0.6 μm, 单层膜包围。过氧化物酶细胞化学反应的产物特异性地定位于过氧化物酶小体上(见图)。

生化研究的结果表明, 过氧化物酶是肝细胞过氧化物酶小体中最丰富的蛋白质, 占整个过氧化物酶小体蛋白质总量的 16%^[1]。并且, 肝细胞中绝大部分过氧化物酶集中在过氧化物酶小体上。因此, 过氧化物酶是过氧化物酶小体这一细胞器的标志酶。

二、影响过氧化物酶细胞化学反应的因素

1. 固定液 过氧化物酶对戊二醛较敏感。不同浓度的戊二醛, 其反应效果有较大的差异。LeHir^[3] 采用 4 种不同浓度的戊二醛(1%、3%、6%、12%) 固定, 在同等条件下分别检测酶反应产物的吸收值(波长为 460 nm), 发现低浓度的戊二醛固定时, 其吸收值高; 相

反, 吸收值较低。本实验选择 1.5% 戊二醛固定, 结果酶活性保存良好。

2. DAB DAB 与过氧化氢酶之间存在着复杂的相互关系, 它主要作为供氢体在氧化还原反应中起作用。DAB 的作用受固定、孵育的影响。高浓度的 DAB 可以产生明显的反应物沉着, 但是过高的浓度会使反应液呈棕色, 增加背景染色。LeHir^[3] 用三种浓度的 DAB (1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml) 显色, 结果发现 4 mg/ml 浓度的 DAB 其吸收值最高。我们采用此浓度的 DAB, 得到较理想的效果。由于 DAB 有致癌作用^[4], 故操作时应戴手套, 尽量避免与皮肤直接接触, 用后及时彻底冲洗。此外, DAB 应在黑暗处保存, 因为光线能使 DAB 自动氧化, 且 DAB 要完全溶解, 否则未溶解的颗粒沉积于标本上影响观察。

3. 时间 固定和孵育时间的延长与酶失活的程度成正相关。LeHir^[3] 将组织固定 30 分钟、6 小时、24 小时以及孵育 30 分钟、60 分钟, 分别测定其吸收值, 发现固定时间为 30 分钟及孵育 60 分钟, 这两种情况时, 吸收值较高。本实验的固定时间为 30 分钟(4℃); 孵育时间为 60 分钟(25℃)。

4. 温度 (1) 组织固定温度: 新鲜组织离体后立即置于戊二醛中, 并且应保持低温状态, 目的是为了保证酶的活性及组织结构不受损失。LeHir^[3] 选用 5℃、15℃、25℃、35℃ 四种固定温度, 测得 5℃ 的吸收值最高(0.5), 35℃ 最低(0.1)。我们采用常规的电镜标本固定温度(4℃), 结果较好。(3) 孵育温度: 与孵育液的 pH 值有关, 温度应根据孵育介质的 pH 值而调节。当 pH 8.5 时, 温度应选 45℃, 当 pH 为 10.0 时, 温度为 25℃。LeHir^[3] 认为这两种情况均能得到较深的反应产物。我们的结果显示后者的效果理想。

5. H₂O₂ H₂O₂ 的浓度随 DAB 的浓度而改变。过高的 H₂O₂ 抑制过氧化物酶的活性。LeHir^[3] 等采用 3 种浓度(0.1%、0.2%、0.3%), 显示低浓度的 H₂O₂ 和高浓度的 DAB

配合使用,显色效果良好。本实验据此选用0.15%的 H_2O_2 和4 mg/ml的DAB。

摘 要

本文采用新鲜的人肝组织标本,进行过氧化氢酶细胞化学反应,以显示肝细胞中的过氧化物酶小体。结果表明,此细胞器圆形或椭圆形直径0.4—0.6 μm 。同时,要获得满意的反应效果,须使用低浓度的戊二醛短时间固定,孵育液由0.15% H_2O_2 和4 mg/ml的DAB配制(pH 10.0),孵育时间为60分钟(25 $^{\circ}C$)。

参 考 文 献

- [1] 钟慈声主译,1989,酶组织化学技术,[日]小川和朗,中根一穗主编,62—65页,上海医科大学出版社。
[2] Lazarow, P. B. et al., 1988, the Liver Biology and Pathobiology, ed. by Arias,

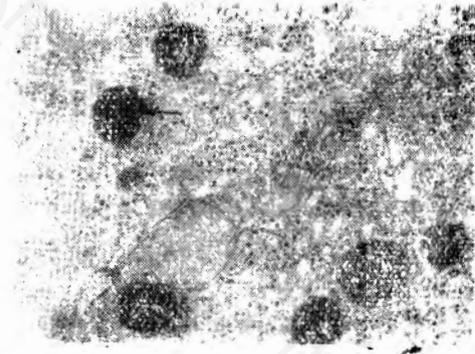


图 箭头表示人肝组织经DAB、 H_2O_2 孵育染色后的过氧化物酶小体。 $\times 22000$

J. M. t e al, pp. 241—254. Raven new York.

[3] LeHir, M. et al., 1979, *Histochemistry*, 64:51—66.

[4] 蔡文琴、王伯恂主编,1988,实用免疫细胞化学,446页,四川科学技术出版社。

《细胞生物学杂志》第13卷总目录

(1991)

专论与综述

- 生物细胞中钙调素分布研究及其意义……………李家旭 孙大业 I:(1)
雌激素受体的结构与功能……………靳嘉瑞 李载平 I:(7)
果蝇前后图式基因调控的层次性(上)……………赵德标 I:(12)
真核细胞重复顺序 DNA 研究的一些进展……………张玉砚 I:(20)
高等植物细胞壁中的伸展蛋白……………何才平 II:(49)
内皮细胞的免疫学功能……………吴金鹭 盛民立 II:(53)
果蝇前后图式基因调控的层次性(下)……………赵德标 II:(57)
B 淋巴细胞表面抗原及其生物学意义……………夏其全 II:(64)
M 期启动调节的普遍机制……………杨新林译 II:(70)
高等植物在发根农杆菌介导下的遗传转化……………何玉科 巩振辉 III:(97)
P 物质免疫调节作用的研究现况……………童 强 葛锡锐 III:(101)
非洲爪蟾 *Xenopus Laevis* 卵母细胞中的 Vgl mRNA ——一种重要的母体 RNA ……张遵义 毛铭廷 III:(105)
动脉粥样硬化中平滑肌细胞增殖的调控……………张 骅 楼定安 IV:(145)
甾体激素的作用机制及其受体的结构和功能……………徐幼海 IV:(148)
细胞粘菌的发育调控……………胡 明 IV:(154)

研究工作

- 小鼠胃粘膜细胞和人胃癌细胞间隙连接的超微结构研究与促癌变剂的影响……………高 燕等 I:(24)
二乙基二硫代氨基甲酸钠对微波辐射损伤肿瘤细胞超微结构的影响……………全 松等 I:(28)
肺动脉内皮细胞的分离、培养和鉴定……………王 琪等 I:(31)
G 显带人体中期染色体亚显微结构的扫描电镜观察……………郑高飞等 I:(34)