

参 考 文 献

- [1] Harary. I. et al., 1960, *Science*, 131:1674-1675.
- [2] 中医研究院西苑医院基础研究室等, 1981, 中华心血管病杂志, 9(3):216-218.

- [3] Mc Manus. J. F. A., 1984, *Stain Technology*, 23:99-107.
- [4] 芮菊生等, 组织切片技术, 312页, 1980, 人民教育出版社.
- [5] Polinger. I. S., 1973, *Exptl. Cell. Res.*, 76: 243-252.

用电镜细胞化学方法显示胶原纤维中的-SH基*

陈 力 应芸书

(中国科学院生物物理所)

皮肤、胃肠道、肺和心血管等的结缔组织中含有一种特殊类型的胶原, 称Ⅲ型胶原, 其化学组成中有胱氨酸和半胱氨酸。本实验参照Swift^[1-4]的显示-SH基的电镜细胞化学方法, 进一步证实了这一事实。

材 料 和 方 法

取小白鼠肺、食道、皮肤和小肠, 用磷酸缓冲液(pH 7.4)配制的5%戊二醛和1%O₃O₄进行双固定, 用系列乙醇脱水, 并作电镜常规包埋、超薄切片。然后用六亚甲四胺银法(简称S-M法), 对上述四种材料的切片进行染色。具体步骤如下:

一: 实验组

1. 用新配制的S-M溶液浸染切片网, 在45℃、避光条件下染色2小时, 然后用蒸馏水彻底洗涤。S-M溶液配方: 5%硝酸银0.118 ml; 3%六亚甲四胺加到2.5 ml; 硼酸硼砂缓冲液(pH 9.0)0.5 ml; 重蒸水2.5 ml; 依次加入玻璃器皿, 最终pH 9.2。硼酸硼砂缓冲液配方: 1.44%硼酸1 ml, 加1.9%硼砂10 ml。

2. 用10%硫代硫酸钠水溶液在室温下浸泡经过S-M染色的切片, 40分钟后用蒸馏水洗。

3. 用饱和醋酸双氧铀染, 蒸馏水洗后, 切片自然干燥, 用JEM-7透射电镜观察。

二、两组对照

1. 空白对照: 切片只用铀染。

2. 两种抑制对照:

(1) 用1%醋酸配的2%丙酮, 在室温下浸泡切片网1.5小时, 以抑制醛基(-CHO), 然后用蒸馏水洗。

(2) 先用20% n-丙醇配的0.3 M苯甲醇, 在室温下浸切片网40分钟, 以还原二硫键(-S-S-), 然后依次用20% n-丙醇和蒸馏水洗。再用1.86%碘乙酸盐溶液在室温下浸泡切片网40分钟, 以烷化巯基(-SH), 最后用蒸馏水洗。碘乙酸盐溶液配方: 取0.93 g碘乙酸盐; 0.617 g硼酸; 20 ml蒸馏水, 用2 N KOH调pH 8.0; 用蒸馏水加到25 ml, 再加25 ml n-丙醇。

将两种抑制对照组的切片与实验组在同样的条件下, 同时进行S-M染色, 再用10%硫代硫酸钠水溶液洗, 最后用铀染。

实 验 结 果

实验组小白鼠的肺、食道、皮肤和小肠四种材料的切片经S-M染色之后, 在胶原纤维上都见到了黑色的银沉淀颗粒(图1)。

而在对照组中, 抑制-CHO基后, 再经S-M染色, 在胶原纤维上仍显示强烈的阳性反应。若先还原-S-S-键, 后烷化-SH基, 再经S-M染色, 胶原纤维上的黑色银沉淀颗粒显著减少。而只用铀染的空白对照片, 在胶原纤维上没有黑色的银沉淀颗粒(图2)。

讨 论

Epstein, E. H. (1974)^[5]用生化方法证明了Ⅲ型胶原分子中, 链与链之间由-S-S-键交联。Byers, P. H. 等(1975)^[6]通过免疫学等方法证明, 胶原合成时前 α 链的聚合中, C端的附加肽

* 本文蒙徐伟同志指导, 并得到本所电镜室技术上的支持, 深表谢忱。

段中存在-S-S-键。我们用电镜细胞化学方法证明了胶原纤维中含有-SH基。

关于S-M法的特异性问题,是值得探讨的。在这一细胞化学反应中,究竟是-S-S-键起作用,还是-SH基起作用,或是二者都参与了反应,尚存在一些争议^[1-4,7-9]。我们认为,S-M染色中起作用的是-SH基。因为,S-M染液是一种含Ag⁺的碱性溶液,在避光和加温等条件下,具有还原性的-SH基把Ag⁺还原成金属银。切片上有银颗粒沉淀的部位,即是细胞内-SH基存在的部位,而-S-S-键没有这种还原性。但是,由于半胱氨酸中的-SH基很不稳定,极易氧化成胱氨酸中的-S-S-键;而-S-S-键在一定条件下,又会还原成-SH基,所以不能把二者严格分开。

本实验中,用1%醋酸配的2%丙酮抑制-CHO基之后,经S-M染色,在胶原纤维上仍呈现黑色银沉淀颗粒,说明该沉淀颗粒不是由-CHO基的还原作用形成的。先用20%*n*-丙醇配的0.3M苯甲醇还原-S-S-键,再用1.86%碘乙酸盐溶液烷化-SH基,把-SH基掩盖起来,尽可能使所有的-SH基不能参与还原Ag⁺的反

应,再经S-M染色,上述四种材料中的胶原纤维上的黑色银沉淀颗粒显著减少了。切片只用铀染色,胶原纤维上无黑色沉淀颗粒,也进一步证明实验组显示的阳性反应是S-M染色的作用,而不是材料中固有的,包埋过程中带入的,或铅污染造成的。用10%硫代硫酸钠处理切片是为了洗去浮在切片表面的螯合银。

参 考 文 献

- [1] P. R. Lewis., D. P. Knight., (1977) *Staining Methods for Sectioned Material.*, 93-96.
- [2] J. A. Swift., (1966) *Proc. 6th Int. Cong. Electron Microscope.*, 2:63-64.
- [3] J. A. Swift., (1968) *Jl. R. Microsc. Soc.*, 88:449-460.
- [4] J. A. Swift., (1969) *Histochemie.*, 19:88-98.
- [5] E. H. Epstein., (1974) *J. Biol. Chem.*, 249: 3225-3231.
- [6] P. H. Byers et al., (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72:3009-3013.
- [7] peter Böck., (1978) *Anatomy and Embryology.*, 153:157-166.
- [8] J. A. Swift., (1973) *Histochemistry.*, 35: 307-310.
- [9] H. Jessen., (1973) *Histochemie.*, 33:15-29.

圆盘电泳分析几种植物同工酶的重演性与清晰度

彭永康 阎炳宗

(天津师范大学生物系)

近几年来,国内外不少研究者以同工酶为“生化指标”来探讨高等植物中的许多理论和生产实践问题并取得了可喜的进展。许多工作表明^[1],把同工酶作为一项“生化指标”是正确的和合适的。关于同工酶的分析方法虽已有论述^[2],但目前还存在一定的技术问题,如凝胶上同工酶谱型的重演性问题,即同一样品,在同一实验方法下,不同人操作结果是否相同;每次分析间隔一定时期(如间隔一周)和数次分析结果是否相同;在分析条件基本一致的情况下,一次分析中数个重复间是否一致和凝胶上

酶带的清晰度,因为同工酶谱是否清楚往往给实验结果分析造成一定困难,有时甚至可能掩盖真相。几年来,我们对水稻、高粱和玉米的过氧化物酶、酯酶和淀粉酶的同工酶进行了较多次的分析,由于不断注意实验操作问题,如取材(黄化幼苗还是绿苗)、样品提取方法(现制备现用还是一次提取后冰箱内保存供几次分析用),以及电流电压、每管加入等量溴酚蓝和固定染色时间等问题,使上述三种作物的同工酶分析中谱带的重演性不断加强,清晰度也比以前的分析要好得多^[3,4],现将这方面积累