

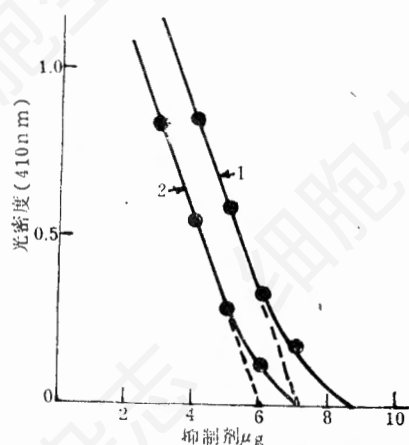


图4 不同剂量大豆胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶抑制试验

1. 胰蛋白酶量为 12 微克
2. 胰蛋白酶量为 10 微克

长与横座标相交点, 为全抑制胰蛋白酶所需的抑制剂的量。从图中看出 10 微克和 12 微克胰蛋白酶分别被 6 微克和 7 微克左右的大豆胰蛋白酶抑制剂完全抑制。因而在正式实验中用 10 微克大豆胰蛋白酶抑制剂已足以抑制剩余的游离胰蛋白酶。在每次正式实验时, 除备有胰蛋白酶活力曲线外, 再备一只完全抑制胰蛋白酶的作参考对照(此时胰蛋白酶和抑制剂与正式实验的剂量相同), 以防由于大豆胰蛋白酶抑制剂的不足而造成实验结果的假阳性。

血清中甲₂巨球蛋白对胰蛋白酶抑制活力测定, 每个实验室所用的胰蛋白酶、大豆胰蛋白酶抑制剂等药品来源不同, 它们各自的酶活

力和抑制能力也不同, 因而在进行正式实验之前, 进行胰蛋白酶对血清中 α_2M 的饱和试验, 胰蛋白酶活力测定试验和大豆胰蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶抑制试验是完全必需的。本实验方法灵敏, 所需的血清量较少, 可用手指采血法取血清, 为实验室和临床检验提供测试方法。

摘要

甲₂巨球蛋白(简称 α_2M) 是存在于人和动物血清中一种广谱蛋白酶抑制剂。实验利用 α_2M 对蛋白酶的特殊抑制原理: α_2M 通过包陷蛋白酶去抑制蛋白酶对天然蛋白质的水解作用, 但不破坏蛋白酶活化中心, 因而仍保留对小分子合成底物的水解, 释放显色基团, 在分光光度计上比色, 达到测定目的。本实验用人大鼠正常混合血清作样品, 对实验方法和测定系统中选择样品和试剂量作较详细介绍。方法灵敏, 血清量少。为实验室和临床检验提供测试方法。

参考文献

- [1] Lorand, L., 1981, *Method in Enzymology*, 80: 737.
- [2] Alleson, A. C., 1976, *Structure of Function of Plasma Protein* 2: 207-217.
- [3] Harpel, P. C. et al., 1973, *J. Clin. Invest.*, 52: 2175-2184.
- [4] Schidlow, D. A. et al., 1980, *Amer. Rev. Respira. Dis.*, 121: 31-37.
- [5] Ganrot, P. O. et al., 1966, *Clin. Chim. Acta*, 14: 493-501.

超微结构研究中的铀-铅-铜染色方法

汤雪明 朱建国
(上海第二医科大学)

在透射电镜下观察常规染色的超薄切片时, 由于切片一般不超过 0.1 微米, 只能获得细胞结构的二维信息。如果采用特殊的染色方

法, 选择性地对某些细胞结构染色, 在电镜下观察较厚的切片, 就可能通过立体对照相获得细胞三维结构的信息^[1]。铀-铅-铜染色技术就

是其中一种特殊染色方法,能选择性地染色线粒体、内质网和高尔基体^[2]。我们曾用这一方法观察一些细胞中高尔基体的三维结构以及内质网与高尔基体的关系^[3],现就实验方法作一简单介绍。

材 料 和 方 法

实验动物为成年雄性大鼠,用血管灌注方法固定肝、肾、十二指肠和睾丸等组织,然后进行铀-铅-铜染色,具体步骤如下:

1. 用2%戊二醛固定液(pH 7.4)灌注固定大鼠的各种组织,然后取下组织、切成1立方毫米组织块,再在同样固定液中浸泡固定1小时;

2. 用0.1 mol/L二甲酸钠缓冲液(pH 7.4)充分漂洗组织块,并置于冰箱(4℃)过夜;

3. 将组织块放入5%醋酸铀水溶液(pH 3.5),在40℃温箱中浸染1小时;

4. 组织块经蒸馏水漂洗后,放入新鲜配制的铅-铜双重枸橼酸盐水溶液,在40℃温箱中浸染1小时;铅-铜双重枸橼酸盐水溶液配方如下:

33%硝酸铅溶液(1 mol/L) 2毫升

10%硫酸铜溶液 0.5毫升

4.6%枸橼酸钠溶液 19毫升

4%氢氧化钠溶液(1 mol/L) 4毫升

在最后加入4%氢氧化钠溶液时,不断振荡,得到透明的蓝色溶液。

5. 组织块经蒸馏水漂洗后,放入1%锇酸固定液,在4℃下过夜(12小时);

6. 组织块经逐级酒精脱水、环氧丙烷过渡后,用环氧树脂Epon 812包埋;

7. 将包埋块用超薄切片机切成0.25—0.5微米的半薄切片、在75—100 kV透射电镜下观察,或切成0.5—2微米的半薄切片、在200 kV透射电镜下观察、利用旋转样品台使切片相对于水平面倾斜,从+7°和-7°两个角度对同一结构拍摄两张照片,即立体对照相。印成照片后在双目立体镜下观察细胞结构的空间关系,有经验者可直接用肉眼观察。

结 果 和 讨 论

细胞经铀-铅-铜方法染色后,线粒体、内质网和高尔基体都呈不同程度的染色,具有较高的电子密度,而细胞的其它部分一般均不染

色,从而使这些细胞器在细胞内的分布非常突出(图1)。在我们观察的肝、肾、十二指肠和睾丸等组织中,各种细胞的线粒体都染色很深,呈圆形、长圆形、环形等多种形态;内质网的染色程度随不同细胞而异,在精子细胞和Sertoli细胞中,内质网的染色与线粒体一样深,呈网状分布,但在肝细胞和肾曲小管上皮细胞中内质网染色较浅;各种细胞的高尔基体都呈中等程度的染色,从生成面到成熟面各层膜囊都被染色,GERL的染色程度与高尔基体其他膜囊相似。在精子细胞中,高尔基体周围的伴随内质网电子密度高于高尔基体膜囊,两者关系相当清楚(图2)。

利用铀-铅-铜方法能选择性地染色线粒体、内质网和高尔基体的特点,可以开展两个方面的超微结构观察。首先,利用旋转样品台在透射电镜下拍摄立体对照片,在双目立体镜下观察细胞器的三维结构和空间分布。我们曾用这一方法观察精子细胞中高尔基体和内质网的三维结构以及这两种细胞器之间的空间关系;其次,可在透射电镜下直接观察半薄切片中线粒体、内质网和高尔基体的结构和分布,还可通过图象分析仪对这些细胞器进行形态定量分析。

铀-铅-铜染色的结果与很多因素有关,如戊二醛固定液的浓度和pH、醋酸铀染色液的浓度和pH以及铅-铜双重枸橼酸盐溶液的浓度等,其中醋酸铀溶液的pH影响较大。Thiery等人的实验表明,组织先用5%醋酸铀(pH 3.5)染色,然后用铅-铜双重枸橼酸盐染色,最后用锇酸后固定,结果对线粒体、内质网和高尔基体的染色最理想。如果用低于或高于pH 3.5的醋酸铀染色,结果会使细胞膜染色加深而上述细胞器的染色减弱。关于铀-铅-铜染色的详细机制还不很清楚,一般认为,染色液中的铀(阳离子)与细胞器中大分子的阴离子基团以静电结合可能是特殊染色的基础,而铅和铜则进一步结合在铀染色的部位,形成铀-铅-铜复合物,提高了结构的反差,最后锇酸后

固定再使铍加入到铀-铅-铜复合物上,也进一步增强了电子染色作用。

摘 要

本文介绍了超微结构研究中的铀-铅-铜技术。铀-铅-铜方法能选择性地染色细胞内的线粒体、内质网和高尔基体,细胞的其他部分一般不染色,从而使这些细胞器在细胞内的分布非常突出。利用这一特点,可在透射电镜下观

察半薄切片,研究线粒体、内质网和高尔基体的三维结构以及细胞器之间的相互关系。

参 考 文 献

- [1] Rambourg, A. et al., 1974, *Am. J. Anat.*, 140: 27-46.
- [2] Thiery, G. et al., 1976, *J. Microscopie Biol. Cell* 26: 103-106.
- [3] 汤雪明等, 1984, 电子显微学报, 3 (3): 151 (摘要)。

植物材料光学和电镜蛋白 A-金胶体结合体标记技术

徐 是 雄

(香港大学植物系)

这里介绍一种可在光学显微镜薄切片和电子显微镜超薄切片上标记的技术^[1,2]。我们初步应用这一技术来做燕麦球蛋白的定位, 结果是成功的(图版图1, 2)。现将操作方法简述如下:

一、样品制备

1. 把切成2—3微米³的新鲜材料, 用磷酸缓冲液(pH 7.1)配制的3—4%甲醛(加2.5%蔗糖), 在室温固定2小时;

2. 用磷酸缓冲液清洗两次, 每次30分;

3. 用20%, 40%, 60%, 80%, 90%, 100%酒精脱水(每一步15分), 在100%时多换一次;

4. 把材料直接放入C. R. White塑料包埋剂(由London Resin Co. Ltd. 供应)内, 在室温渗透1小时后再换一次新鲜的塑料溶液, 在4℃渗透2天(其间可再换一次)。

5. 包埋时把材料放在胶囊内, 置60℃1天。包埋剂硬化后即可制作薄切片和超薄切片。

二、光学显微镜标记技术^[3]

(A) 显影液的配制

1. 保护胶液——把1千克阿拉伯胶溶在2升蒸馏水内, 经常把溶液摇动。5天后, 用纱布过滤, 放4℃备用。

2. 柠檬酸缓冲液——柠檬酸25.5克, 柠檬酸钠23.5克, 蒸馏水100毫升。

3. 还原剂——氢醌0.55克, 蒸馏水15毫升(用

前配制)。

4. 银溶液——醋酸银0.1克, 蒸馏水15毫升(避尘, 用前配制)。

5. 显影液——将配制好的上述溶液按60、10、15和15毫升的比例混合。

(B) 标记技术

1. 先将塑料薄切片(1—2μm)沾在环片上;

2. 用卵清蛋白BSA溶液浸泡5分钟(卵清蛋白溶液的配制: 用PBS缓冲液配制成0.5%卵清蛋白溶液。PBS缓冲液的配方: 在1升水中加入氯化钠8克, 氯化钾0.2克, 磷酸二氢钾0.2克, 磷酸氢二钠1.14克);

3. 倾去溶液(但不要用水清洗)滴上一大滴专一的抗体血清(上覆一盖片), 浸泡30分钟(抗体的浓度要根据抗体的效价来决定。我们所用的燕麦球蛋白抗体血清, 要稀释25倍);

4. 在PBS缓冲液中清洗2次, 每次15分;

5. 放一大滴蛋白A-金胶体溶液在切片上, 停留1小时(买来的蛋白A-金胶体溶液, 需要用PBS缓冲液稀释25倍左右方可应用);

6. 在PBS缓冲液中清洗2次, 每次15分;

7. 将玻片置放在0.5%明胶溶液内, 使沾上一薄层, 室温风干;

8. 第二天, 将玻片放入显影液内(26℃)20—60分钟。这一步操作需把盛装显影液的玻璃器皿用黑色