

植物酶细胞化学的电子显微镜研究方法

简 令 成

(中国科学院植物研究所细胞室)

酶在有机体生命活动中的重要意义是众所周知的。迄今, 已知酶的总数接近 1000 种, 其中约有 100 种可以在光学显微镜水平上, 通过组织化学的定位方法得到证实。自从电子显微镜术用于细胞化学研究后, 使酶的定位研究进入到一个精确的新阶段。近些年来, 这方面的工作正活跃地广泛开展。现在, 已有近 40 种酶, 可以采用电子显微镜术进行细胞化学的亚显微结构定位^[1,2,3,4]。本文是对植物酶的细胞化学方法作一些简要的介绍。

酶细胞化学的基本原理

酶的细胞化学是关于专一性酶在完整细胞内固有部位的定位。一般是借助于在酶活性的位置上, 形成一种不溶性的电子稠密的反应产物, 从而可在电子显微镜下直接观察到它的定位。迄今所建立的显示方法可分为以下几类:

(一) 铅沉淀法

此法成功地应用于磷酸酶的定位。Nai-

doo 和 Pratt(1951)在 Gomori (1946) 组织化学方法的基础上提出铅沉淀法, Wachstein 和 Meisel(1957)^[5]在磷酸酶的组织化学研究中, 证实了此法的优越性, 于是该技术立即为 Novikoff 和他的同事们 (1958)^[6]应用于电子显微镜水平上的细胞化学研究。

铅沉淀的基本原理是, 反应液中含有适合的底物(如磷酸酯)及捕获剂硝酸铅, 底物在酶活性的位置上被酶水解, 释放出无机磷酸盐, 它立即与捕获剂铅离子结合, 形成磷酸铅沉淀物。在电子显微镜下, 通过磷酸铅沉淀物的强反差, 显示出定位的图相。

需要注意的是, 初始反应产物是可溶性的, 因此, 必须在释放后, 立即与捕获剂(如 Pb^{2+})化合生成沉淀物, 否则, 就会发生扩散, 造成假定位。最终产物的不溶性与反应液的 pH 值有关, 沉淀物还可能在脱水、包埋过程中发生溶解。因此, 在材料的培育反应阶段以及脱水和包埋等一系列过程中, 均需注意创造

McCully (1964) *Protoplasma* 59:368—373.

[10] Spurr, A. R. (1969) *J. Ultrastr. Res.* 26: 31—43.

[11] Sato, T. and M. Shamoto (1973) 48: 223—227.

[12] Warmke, H. E. and S. -L. J. Lee (1976) *Stain Technology* 51:179—185.

[13] Leduce, E. H., Bernhard, W. (1967) *J. Ultrastr. Res.* 19:196—200.

图版说明

图 1—3 乙二醇甲基丙烯酸酯薄切片

1. 水稻成熟籽粒, 近维管处。P = 有色细胞(Pigment Strand Cells); A = 糊粉细胞(aleurone cells)。苏丹黑染色 $\times 1,000$ 。2. 水稻分蘖节内的木质运输细胞(T. transfer cells), X = 管状分子。PAS—甲苯胺蓝-O 染色 $\times 400$ 。3. 水稻分蘖节内的维管束横切面。S = 韧皮部; X = 管状分子。在维管束周围, 有许多含淀粉粒的细胞。PAS—甲苯胺蓝-O 染色 $\times 400$ 。

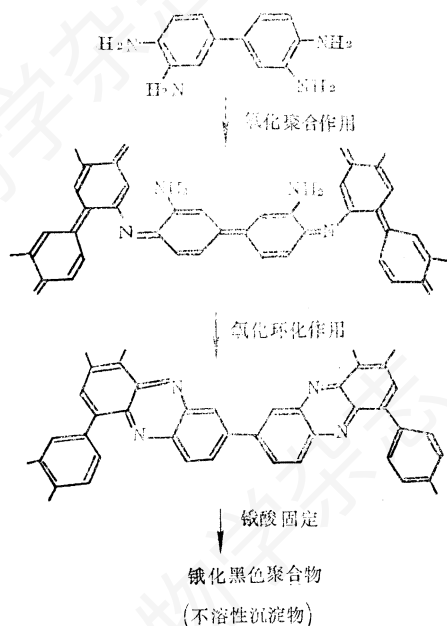
图 4—6 Spurr 氏环氧树脂薄切片

4. 芹菜茎段外植体内的分生细胞。甲苯胺蓝-O 染色 $\times 250$ 。5. 芹菜胚状体。甲苯胺蓝-O 染色 $\times 400$ 。6. 芹菜离体细胞。碱性品红-亚甲蓝染色 $\times 400$ 。

各种适宜的条件,防止反应产物的扩散,以保证达到真实的正确定位。

(二) 3,3-二氨基联苯胺(DAB)显示法

此法成功地用于过氧化物酶的定位研究。它为 Granham 和 Karnovsky(1966)^[7] 提出。其基本原理是, DAB 作为反应底物被酶氧化后,形成一种不溶性的嗜铁聚合物,组织经铁酸固定后,便在酶活性的位置上产生一种钼化的电子稠密的不溶性沉淀物,在电子显微镜下很容易得到鉴别。DAB 在氧化及固定过程中的变化如图示:



DAB 溶液见光迅速地变黑,因此,反应液必须新配,并在使用过程中避免光照。

(三) 四唑盐(tetrazolium salt)显示法

此法用于脱氢酶的定位。在酶反应液中,四唑盐被用作人工电子受体,它被还原后产生一种不溶性的红色甲臅(formazane),具有嗜铁性,组织经铁酸固定后,获得铁的染色——电子反差,因而可在电子显微镜下识别。

该方法的重要改进之一,是采用疏脂四唑作受体^[10],它在酶反应后形成的嗜铁甲臅是不溶的,渗透性也较好,因而获得比较广泛的

使用。

(四) 氰铁酸盐—铜(氰亚铁酸铜)沉淀法

由于四唑盐作为电子受体存在许多问题,所以 Ogawa 等^[11]提出用氰铁酸盐作电子受体。在反应液中,除氰铁酸盐外,还包含电子供体(酶的生理底物)和铜离子(捕获剂)。在酶的催化作用下,氰铁酸盐被还原成氰亚铁酸盐。该还原产物又立即与捕获剂铜离子结合,形成氰亚铁酸铜沉淀物。氰亚铁酸铜具有高度的不溶性,它在脱水、包埋过程中都十分稳定,并表现出高度的电子不透明性,甚至在染色的情况下,也能明显地鉴别。氰铁酸盐又易于被许多带有自由 SH 基的底物所还原,并且是无毒的,因此,它被广泛地使用。其主要缺点,是渗入组织细胞中的速度比较慢;同时必须在反应液中加入一种螯合剂(如酒石酸盐),以阻止铜离子与反应液中其他成分形成沉淀物。

(五) 偶氮染料法

它是光学显微镜水平上酶的组织化学中普遍采用的方法,有很强的染色性^[3]。但在电子显微镜下却不能产生高的电子密度,得不到必需的反差,因而受到限制。

从以上方法可以明显地看出,酶细胞化学的根本原理和特征,是形成一种不溶性的、具有高电子密度的反应产物。它的形成有两种情况:(a)酶反应后的产物就是不溶性的,如过氧化物酶对 DAB 的氧化及脱氢酶对四唑盐的还原;(b)酶的初始反应产物是可溶的,必须立即进行一次捕获反应才形成不溶性产物,如磷酸酶的铅沉淀法和氧化还原酶的氰铁酸盐还原法。

基本要求与关键性步骤

酶细胞化学的基本要求,是在实际操作过程中尽可能使酶的活性不受或少受影响;使酶和酶的反应产物不发生扩散性位移;而且要尽可能良好地保持细胞的精细结构。然而这些往

往是不易兼得的。关键性的步骤是材料的固定和培育反应。

(一) 材料的固定

“固定”,在酶细胞化学中的主要作用是:

(a) 保持细胞的精细结构;(b) 破除细胞膜的半透性障碍,增加试剂的渗透性;(c) 把酶固定在原来的位置上,防止其扩散。所以,在培育反应之前,需要进行材料的初固定。然而在实际工作中,要同时达到以上要求是困难的,往往是结构保存得越好,酶的活性越低。因此,在酶细胞化学工作中,不能采用适宜于形态学工作的一般的固定技术。为了达到固定的效果,需要注意以下几种因素:

(1) 固定剂的种类 不同种类的固定剂对细胞形态学和酶的活性有不同的效果,酒精和丙酮可以相当良好地保存某些酶的活性,但它不能保持细胞形态学,所以不能用于酶的定位。钼酸、高锰酸钾及醛类一戊二醛、甲醛与丙烯醛,能产生相当良好的细胞形态学效应,但对酶的活性有损害。钼酸和高锰酸钾会氧化蛋白质,使酶的活性全部丧失,因此也不能用于初固定。甲醛对酶的失活作用比戊二醛和丙烯醛的小。玉米根细胞的氧化酶,用戊二醛固定后,酶活性全部被破坏;但是,在甲醛固定后,尚保持足够的酶活性^[12]。甲醛固定对核甙二磷酸酶和芥子素酶的活性也无多大损害,但戊二醛则严重损害这两种酶的活性。用戊二醛和甲醛固定三磷酸腺甙酶和过氧化物酶,均能保持相当高的活性^[4]。

(2) 固定剂的浓度与固定时间 在形态学工作中,戊二醛一般采用2—5%,甲醛为4—10%。在酶的细胞化学工作中,为保持酶的活性,应该采用较低的浓度,但浓度太低,则结构保持不好,酶也不能得到充分的固定而发生扩散。

材料的固定时间一般为30—90分钟。有些酶,如磷酸葡萄糖酶和过氧化物酶,在固定过程中很容易被钝化,因此只能采用很短的固定时间。琥珀酸脱氢酶对固定剂十分敏感,所

以一般不进行初固定。

(3) 固定剂的杂质对酶活性的影响 甲醛中常含有甲醇,它对酶具有很强的抑制作用,所以最好在使用前,用碱水解多聚甲醛来生产新鲜甲醛。方法是,在65℃ 100毫升蒸馏水中溶解40克多聚甲醛,然后滴入40%NaOH,直到溶液变成透明为止。

戊二醛也含有不少杂质,如聚合物,戊二酸,乙醇和磷酸盐等。Anderson(1967)^[13]用蒸馏法和活性炭抽提法纯化戊二醛进行固定效果的对比试验,结果表明,未经纯化的戊二醛强烈抑制酶活性,而经过蒸馏纯化的戊二醛对酶活性的保存显著提高。

(二) 培育反应

培育反应是酶细胞化学操作过程中的中心环节,必须注意以下一些方面:

(1) 反应液的配制 在选择一种合适的配方后,通常不宜对反应液的组成作很大的改动。因为个别成分的变动,会破坏溶液的平衡状态,引起沉淀,并扰乱反应进程与效果。例如,ATPase的反应液中,Pb²⁺离子与ATP能形成一种相当稳定的螯合物,比例关系为1:1;过量的游离铅离子会抑制ATPase的活性,并促进ATP的非酶水解(自然水解)。如果Pb²⁺对ATP的比率超过2,则ATP的自然水解很强烈,同时,酶的活性受到严重抑制,若Pb²⁺:ATP在1以下,虽对酶的活性有利,但因游离铅离子的浓度过低,不能立即全部扑获酶解释放出来的无机磷酸盐,以致发生磷酸盐的扩散,造成假定位。在Wachstein和Meisel(1957)^[5]最初提出的反应液中,Pb²⁺浓度是3.6mM,ATP是0.83mM,Pb²⁺:ATP的比值大于4。经Jacobsen和Jorgensen(1969)^[14]等人的修改,使游离铅离子(Pb²⁺)浓度在1mM左右,这样,ATP的自然水解不严重,并能充分地捕获酶的反应产物。因此,对于合适的优良配方不要轻易变动。当然,为了适合某些特殊组织的需要,反应液的全部成分都是可以调节的。

所用的试剂应该是高质量的,最好是保证试剂至少是分析纯。因为试剂中含有的杂质(如重金属)会抑制酶的活性。在配制过程中也应防止其他杂物的污染,并防止溶液吸收 CO_2 而引起沉淀。若已形成沉淀,则应在使用前过滤。大多数反应液应在使用前配制,不宜贮存。

(2) 反应液的 pH 值 酶的反应需要在一定的 pH 下进行,不同的酶有各自的适宜 pH 值,例如,酸性磷酸酶的适宜 pH 是 5.0—6.5,碱性磷酸酶是 7.6—9.9,三磷酸腺苷酶是 7.0—7.2,在实际工作中,不仅应根据酶活性所要求的 pH 值,而且还需要考虑 pH 对其他因素,特别是对反应产物溶解性的影响,例如黄瓜子叶苹果酸盐合成酶活性的适宜 pH 值是 8.3;然而, pH 在 8 以上,该酶的反应产物是溶解的。因此,不用 8.3,而是采用 6.9^[8]。

许多水解酶在水解过程中释放出酸,为了保证恒定的适宜 PH 值,反应液必须选用具有一定缓冲能力的缓冲液。一般不能使用磷酸缓冲液,因为许多金属离子(如 Ca^{2+} , Pb^{2+} 等)会使它形成沉淀。

(3) 反应温度与时间 材料一般在 37℃ 下进行。植物细胞的酶反应温度,一般采用 30℃ 左右。在较低温度下进行培育反应,可以获得更好的定位效果。温度对酶活性的影响是复杂的,但可通过实验确定某一种酶的最适温度。

培育的适宜时间,是根据酶的各个活性位置上都产生能够良好鉴别的沉淀为标志。这种适宜时间在不同酶、不同组织、甚至在不同细胞之间都有差别。培育时间过长,会增加扩散的假像,沉淀的定位细节也会变得模糊不清。但若培育时间过短,酶活性弱的地方则得不到表现。为了获得满意的结果,需要进行培育时间试验,以选出适宜的时间。

(4) 反应液的渗透 酶细胞化学的主要问题之一,是反应试剂不能很好地渗入组织细胞内,在许多情况下,常常只有组织块的外围细

胞发生反应。Hall 与 Sexton 在玉米根的酸性磷酸酶的定位中观察到,在培育 4 分钟后,反应液渗入组织块表面以下 60 微米,2 小时后进到 90 微米,4 小时仅达 100 微米^[4]。因此,必须精心地切取材料,使组织片尽可能的小,最好是 100—200 微米,不宜超过 300 微米。此外,一些作者采取以下的克服办法:

(a) 预培育,即在正式反应前,将材料放入没有底物的反应液中,在 4℃ 下预培育 30—60 分钟;(b) 在反应液中加入 5—10% 二甲亚砜(DMSO),以增大渗透性;(c) 在反应过程中适当地摇动反应液。

(5) 对照 为了鉴别定位的真伪,需要同时进行对照反应。一般采用以下几种对照:(a) 反应液中不加底物;(b) 反应液中加入酶的专一性抑制剂;(c) 将组织块放在固定剂中加热以钝化酶活性。

一些酶定位的具体方法

目前,可以在电子显微镜下进行细胞化学定位的酶近 40 种,主要包括水解酶,氧化还原酶和转移酶。本文只重点介绍一些有代表性的酶。

(一) 酸性磷酸酶(acid phosphatase)

酸性磷酸酶的细胞化学定位,基本上采用 Gomori 的光学显微镜下的组织化学技术,稍作修改。主要问题是试剂渗入慢,所以必须采用很薄的组织片。此种方法的基本操作程序如下:

(1) 制备材料 切取小于 0.3 毫米的组织片。

(2) 初固定 用 50mM 二甲胂酸钠(Na-cacodylate)缓冲液(pH7.2)配制的 2.5% 戊二醛和 4% 甲醛混合固定液(或 3% 戊二醛固定液),在 4℃ 或室温下固定 1.5—2 小时。

(3) 洗涤 用 pH7.2 的二甲胂酸钠洗两次,再用 50mM Tris-顺丁烯二酸缓冲液(pH5.2)洗 2 次,共历时 3 小时以上,彻底除去固定剂。

(4) 培育反应

配制反应液:

贮存液

用 量 最终浓度
(毫升) (mM)

0.2M Tris-顺丁烯二酸 10 40

缓冲液, pH 5.2

0.1M β -甘油磷酸钠 4 8

0.02M 硝酸铅 6 2.4

重蒸水 30

材料在以上反应液中, 于 22℃ 下培育 2 小时。

对照反应: (a) 反应液中不加 β -甘油磷酸钠。(b) 反应液中加入 0.01M 氯化钠。

(5) 洗涤 用二甲胂酸钠缓冲液(pH7.2)洗 2—3 次, 历时 1 小时。

(6) 固定 用二甲胂酸钠缓冲液(pH7.2)配制的 2% 锇酸固定液, 在 0℃—4℃ 下固定 2 小时或过夜。

(7) 脱水、包埋 洗涤后, 按常规脱水、包埋、超薄切片和电镜观察。

(二) 三磷酸腺苷酶(ATPase)

由于 ATPase 对于有机体生命活动的能量供应具有重要作用, 它与许多生理过程有密切关系。因此, 对于 ATPase 活性的细胞化学研究已做了大量的工作^[15,16]。其活性普遍而稳定地分布于质膜上, 也广泛地分布于细胞核、线粒体、高尔基体、质体、内质网和液泡中。定位方法的程序如下:

(1) 材料的初固定 用二甲胂酸钠缓冲液(pH7.2)配制的 4% 甲醛和 2.5% 戊二醛固定剂, 在室温或 0℃—4℃ 下固定 1—2 小时。

(2) 洗涤 固定后, 先用 pH7.2 的二甲胂酸钠缓冲液洗 2 次, 然后再用 Tris—顺丁烯二酸缓冲液(pH7.2)洗 2—3 次, 共历时 2.5—3 小时。

(3) 培育反应 反应液的组成如下:

50mM Tris-顺丁烯二酸缓冲液 (pH 7.2)

中含:

ATP (钠盐) 2 mM

 $MgSO_4$ [或 $Mg(NO_3)_2$] 2 mM $Pb(NO_3)_2$ 3—3.6m M

材料在此反应液中, 于 37℃ 或室温下培育 30 分钟至 2.5 小时。

对照反应: (a) 反应液中不加 ATP。(b) 反应液中加入 0.01M NaF。

(4) 洗涤 培育后, 用二甲胂酸钠缓冲液(pH7.2)洗 2—3 次, 历时 1 小时左右。

(5) 第二次固定 用 pH7.2 的二甲胂酸钠缓冲液配制的 2% 锇酸于 0℃—4℃ 下固定过夜。

(6) 洗涤 用蒸馏水洗涤 3—4 次, 历时 3 小时。

(7) 脱水、包埋 用各级酒精(或丙酮)脱水, 环氧树脂包埋。

(三) 腺苷环化酶(adenylate cyclase)

此酶活性主要分布于质膜上, 它催化环化 AMP(cAMP) 的形成, 反应式是:



Howell 和 Whitfield(1972)^[17]用一种专一性底物亚胺二磷酸腺苷[adenylyl-imido-diphosphate(AMP—PNP)], 首次成功地在动物细胞内对腺苷环化酶进行了定位。Al-Azzawi 和 Hall(1976)^[18]按 Howell 和 Whitfield 方法对玉米和豌豆根尖细胞内腺苷环化酶的定位也获得良好的结果。实验方法的程序如下:

(1) 材料的固定 用二甲胂酸钠缓冲液(pH7.4)配制的 1% 戊二醛, 在室温下固定 1 小时(或在 0℃—4℃ 下固定 2 小时)。

(2) 洗涤 先后用冷却的二甲胂酸钠缓冲液(pH7.4)和 Tris—顺丁烯二酸缓冲液(pH 7.4)洗涤, 至少 6 小时。

(3) 培育反应 反应液的组成: 80mM Tris—顺丁烯二酸缓冲液(pH7.4)中含 AMP—PNP 0.5mM, $MgSO_4$ 2mM, $Pb(NO_3)_2$ 4mM, 葡萄糖 8%。材料在此反应液中, 在 30℃ 下培育 30—60 分钟。

(4) 洗涤 用二甲胂酸钠缓冲液洗涤3次, 历时45分钟。

(5) 第二次固定 用二甲胂酸钠缓冲液(pH7.4)配制的1%(或2%)铬酸固定液, 于0—4℃下固定2小时。

(6) 洗涤 用蒸馏水洗涤数次, 历时1—1.5小时。

(7) 脱水、包埋 按常规法脱水、包埋、超薄切片。

(四) 过氧化物酶(Peroxidase)

Graham 和 Karnovsky(1966)^[7]首次用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)成功地对动物细胞的过氧化物酶进行了细胞化学研究。植物材料可采用 Hall 和 Sexon(1972)^[19]稍经修改的方法。

(1) 材料的初固定 用50mM二甲胂酸钠缓冲液(pH7.0)配制的3%戊二醛, 于0℃下固定1小时。

(2) 洗涤 用Tris—HCl缓冲液(pH7.0)洗涤4次, 历时3小时。

(3) 切片 将材料进一步切小, 切片厚度不超过100微米。

(4) 培育反应 反应液含缓冲的DAB溶液(即50毫克DAB溶于50毫升50mM Tris—HCl缓冲液中pH7.0)8毫升, 0.1% H₂O₂ 2毫升。切片在此反应液中, 于23℃下培育15分钟。

(5) 洗涤 用二甲胂酸钠缓冲液(pH7.0)彻底洗涤。

(6) 第二次固定 用pH7.0的二甲胂酸钠缓冲液配制的2%铬酸, 于0—4℃下第二次固定2小时或过夜。

(7) 脱水、包埋 按常规脱水、包埋。

(五) 过氧化氢酶(catalase)

过氧化氢酶是微体中的一种特征性酶。它使过氧化氢还原成水, 并放出氧。植物细胞过氧化氢酶的亚显微结构定位是 Frederick 和 Newcomb (1969)^[20]按 Novikoff—Goldfischer 方法^[21]首次在烟草叶片细胞的研究中获

得成功, 其实验程序如下:

(1) 材料的初固定 用50mM磷酸钾缓冲液(pH6.8)配制的3%戊二醛, 在室温下固定1.5—2小时。

(2) 洗涤 用磷酸钾缓冲液(pH6.8)洗涤3次, 为时20—30分钟。

(3) 培育反应 反应液含50mM甘氨酸—NaOH缓冲液(pH10.0)5毫升, DAB 10毫克, 3% H₂O₂ 0.1毫升, 使用前配制, 在放入材料前, 将pH调节到9。将材料移入以上反应液中, 于37℃下培育50—60分钟。

对照反应: (a) 标准反应液中不加 H₂O₂。(b) 在含0.02M 3-氨基-1,2,4-三唑(3-amino-1,2,4-triazole)的甘氨酸—NaOH缓冲液中预培育20—30分钟, 随后在含0.02M 3-氨基-1,2,4-三唑的标准反应液中进行培育。(c) 在含0.01M KCN的甘氨酸—NaOH缓冲液中预培育20—30分钟, 随即在含0.01M (或0.001M) KCN的标准反应液中进行培育。

(4) 洗涤 培育后, 用50mM磷酸钾缓冲液(pH6.8)漂洗几次, 历时20—30分钟。

(5) 第二次固定 用50mM磷酸钾缓冲液(pH6.8)配制的2%铬酸固定液, 第二次固定2小时。

(6) 洗涤 用磷酸钾缓冲液(pH6.8)漂洗数次, 历时20—30分钟。

(7) 脱水、包埋 用各级丙酮脱水, Araldite—Epon 包埋。

(六) 琥珀酸脱氢酶(Succinic dehydrogenase)

由于此酶对固定剂很敏感, 所以材料一般不进行初固定, 即用新鲜材料进行培育反应。方法如下(根据 Ekes 1970^[22]):

(1) 反应液的配制 0.5M酒石酸钾钠(溶于磷酸盐缓冲液, pH7.6)3毫升, 0.3M CuSO₄ 0.35毫升, 1M琥珀酸钠0.7毫升, 0.05M氰铁酸钾0.15毫升, 0.1M磷酸盐缓冲液(pH7.6)0.8毫升。

(2) 培育反应 将材料放入以上反应液

中,在室温下培育20—30分钟。

对照反应:(a)反应液中加入140mM丙二酸钠。(b)在培育前,先用5mM氯汞基苯甲酸盐(p-chloromercuribenzoate,溶于0.1M磷酸盐缓冲液中)处理材料。

(3)洗涤 用0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.6)洗涤15分钟。

(4)固定 用0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.2)配制的5%戊二醛在0—4℃下固定2—2.5小时。

(5)洗涤 用磷酸盐缓冲液(pH7.2)洗涤。

(6)第二次固定 用Millonig缓冲液(pH7.4)配制的1%锇酸,在0—4℃下第二次固定1—1.5小时。

(7)脱水、包埋 按常规脱水与包埋。

(七) 细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase)

细胞色素氧化酶是线粒体内氧化磷酸化的末端氧化酶,它使还原的细胞色素恢复到氧化状态,并在最后催化 O_2 还原成 H_2O 。Seligman等(1968)^[23]将DAB用于细胞色素氧化酶的细胞化学研究。细胞色素c是天然的氧化剂,它能氧化DAB,还原态细胞色素c在细胞色素氧化酶的催化下,又恢复到氧化状态。如以上所述,氧化后的DAB经锇酸固定后,会形成一种不溶性的锇化聚合物,因此可在电子显微镜下得到定位的图像。

Opik(1975)^[24]用此法对水稻胚芽鞘线粒体的细胞色素氧化酶活性的定位获得十分良好的结果。其实验程序是:

(1)材料的初固定 用磷酸盐缓冲液(pH 7.2)配制的3%戊二醛在室温下固定1小时。

(2)洗涤 用pH7.2磷酸盐缓冲液洗涤4次,历时30分钟。

(3)培育反应 反应液的组成是,50mM磷酸盐缓冲液中含有DAB 2.5毫克/毫升,蔗糖0.1M, pH6.2。将材料放入此反应液中,在27℃下培育1—2小时。同时以反应液中

不加DAB的平行反应作对照。

(4)洗涤 培育后,用pH7.2磷酸盐缓冲液洗涤4—5次,历时1小时。

(5)第二次固定 用磷酸盐缓冲液(pH 7.2)配制的2%锇酸进行第二次固定。

(6)脱水、包埋 按常规脱水与包埋。

(八) 酯酶(lipase)

Gomori(1945)首次用组织化学方法证实酯酶的存在。Nagata和Murata(1972)和Nagata(1974)成功地进行了亚显微结构的定位^[4]。以Tween 80作底物,该底物被酯酶水解时产生一种不溶性的钙皂,然后用 $Pb(NO_3)_2$ 溶液处理,形成铅皂。

(1)反应液的配方

5%Tween 60 或 80	1 毫升
0.2M Tris-顺丁烯二酸缓冲液(pH 7.2)	2.5 毫升
10%CaCl ₂	1 毫升
2.5%牛磺胆酸钠	2.5 毫升
蒸馏水	13 毫升

(2)培育 冰冻切片在以上反应液中,于37℃培育1—18小时。

(3)洗涤 用2%EDTA—二甲胍酸钠缓冲液(pH7.2)短暂的洗涤,以除去 Ca^{2+} 。

(4)处理 在0.15% $Pb(NO_3)_2$ 溶液中处理10分钟。

(5)洗涤 用pH7.2二甲胍酸钠缓冲液洗涤3次,历时一小时。

(6)固定 用二甲胍酸钠缓冲液(pH7.2)配制的2%锇酸进行固定。

(7)脱水、包埋 用蒸馏水洗涤、丙酮迅速脱水、环氧树脂包埋。

参 考 文 献

- [1] Hayat, M. A. ed., Electron Microscopy of Enzymes, Vol.1 (1973); Vol.2 (1974); Vol.3 (1974); Vol.4 (1975); Vol.5 (1977). Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- [2] Lewis, P. R. & D. P. Knight 1977:

- Staining methods for sectioned material, pp. 137—287, North-Holland publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
- [3] Pearse, A. G. E.: *Histochemistry: theoretical & applied*, 3rd edn., Vol. 1 (1968); Vol. 2 (1972). Churchill London.
- [4] Sexton, R. & J. L. Hall 1978: *Enzyme Cytochemistry*. In: "Electron Microscopy and Cytochemistry of plant Cells". (J. L. Hall ed).
- [5] Wachstein, M. & E. Meisel 1957: *Amer. J. Clin. Path.*, 27:13—23.
- [6] Essner, E. & A. B. Novikoff et al., 1958: *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 711—716.
- [7] Granham, R. C. & M. J. Karnovsky 1966: *J. Histochem. Cytochem.*, 14:291—302.
- [8] Trelease, R. N. et al., 1974: *J. Cell Biol.*, 60:483—495.
- [9] Seligman, A. M. et al., 1967: *J. Histochem. Cytochem.*, 15:1—13.
- [10] Kalina, M. et al., 1972: *J. Histochem. Cytochem.*, 20:685—695.
- [11] Ogawa, K. et al., 1968: *J. Histochem. Cytochem.*, 16:49—57.
- [12] Nir, I. & A. M. Seligman 1972: *J. Histochem. Cytochem.*, 19:611—620.
- [13] Anderson, P. J. 1967: *J. Histochem. Cytochem.*, 15:652—661.
- [14] Jacobsen, N. O. & P. L. Jorgensen 1969: *J. Histochem. Cytochem.*, 17: 443—449.
- [15] 简令成等, 1980: *实验生物学报*, 13: (2) 135—146.
- [16] Nakagaki, I. et al., 1978: *J. Histochem. Cytochem.*, 26:835—845.
- [17] Howell, S. L. & M. Whitfield 1972: *J. Histochem. Cytochem.*, 20:873—878.
- [18] AL-AZZawi, M. J. & J. L. Hall 1976: *Plant Sci. Lett.*, 6:285—289.
- [19] Hall, J. L. & R. Sexton 1972: *Planta* 108:103—120.
- [20] Frederick, S. E. & E. H. Newcomb 1969: *J. Cell Biol.*, 43:343—353.
- [21] Novikoff, A. B. & Goldfischer, S. 1968: *J. Histochem. Cytochem.*, 16:507.
- [22] Ekes, M. 1970: *Planta* 94:37—46.
- [23] Seligman, A. N. et al., 1968: *J. Cell Biol.*, 38:1—14.
- [24] Opik, H. 1975: *J. Cell Sci.*, 17:43—55.



植物细胞生物学讲习班在兰州举办

中国植物学会细胞专业组于1980年7月22日至8月5日在兰州兰州大学举办植物细胞生物学讲习班, 邀请有关专业的教员和科研人员共12名为教员, 并邀请美国密执安大学细胞遗传学教授戴维廉及香港大学植物系徐是雄博士讲课。主要讲课内容有: 植物细胞的溶酶体、液泡及微体系统, 生物膜和线粒体的结构和功能, 植物细胞的遗传修饰, 细胞间的联络和物质运输, 叶绿体的结构和功能, 间期核的结构与功能, 有丝分裂与减数分裂。内膜系统与微梁系统, 基因表达, 植物细胞对低温、干旱和盐碱的适应性变化, 扫描电镜及其在植物学上的应用, 植物原生质体培养及细胞分化……等方面。学员来自全国各大专院校的教员及科研系统有关专业的科技工作者共195名。讲习班主要目的: ① 提高教育科研人员的植物细胞学水平。② 为高等院校开课创造条件。③ 为教育及科研在细胞学方面交流情况创造条件。除讲课外还组织各种形式的座谈会, 互相交流教学经验, 并请郑国锷、郝水教授介绍开讲细胞生物学课程的经验体会。学员主要都是中年骨干教师, 为开好细胞生物学课程作好准备, 教师们学习情绪高涨, 课前课后纷纷交流经验, 认真讨论各专业的内容, 互相学习, 为提高目前细胞生物学水平而努力。

植生所细胞生理室 王 熊

80.8.15.