

“十二五”国家重点图书出版规划项目

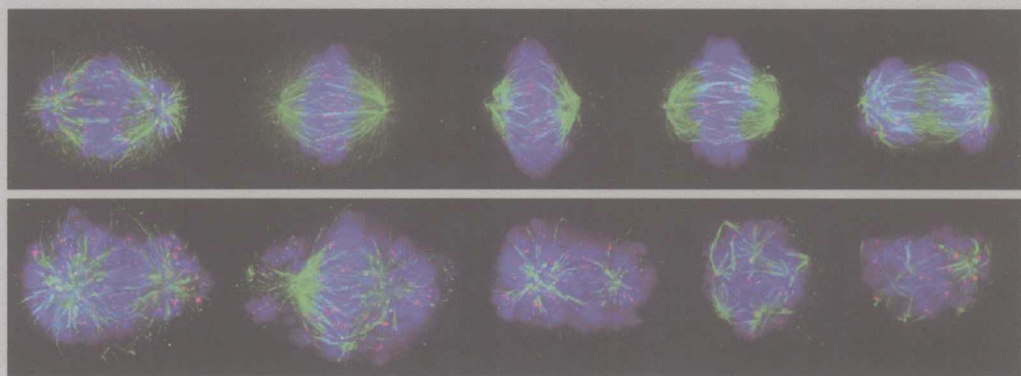
中国科学技术大学 *精品* 教材

细胞生物学 荧光技术原理和应用

第2版

◎ 主 编 刘爱平

副主编 郭 振 王琦琛



中国科学技术大学出版社

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

普通高等教育生物类专业系列教材

细胞生物学 荧光技术原理和应用

第二版

编 者 潘 毅 彭国军

副编者 陈 强 李 强



科学出版社 北京

“十二五”国家重点图书出版规划项目

中国科学技术大学 **精品** 教材

细胞生物学 荧光技术原理和应用

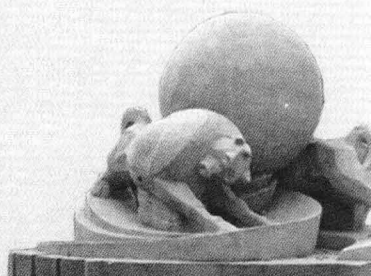
Fluorescence Principles and Practice for Cell Biology

第2版

主 编 刘爱平

副主编 郭 振 王琦琛

中国科学技术大学出版社



内 容 简 介

本书共分三部分:第一部分介绍荧光的基本知识、发展史、荧光探针、活体荧光材料——绿色荧光蛋白(GFP)及最新型荧光材料——量子点;第二部分介绍荧光技术在生命科学中的应用及荧光生物样品的制备方法,其中着重介绍了荧光技术在细胞凋亡研究中的应用、流式细胞术在细胞生物学中的应用、荧光在细胞骨架研究中的应用、荧光原位杂交、荧光在 HER2/ErbB-2/p185 研究中的应用;第三部分介绍中国科学技术大学生命科学学院现已拥有的生物荧光显微镜、激光扫描共聚焦显微镜、细胞遗传工作站、活细胞荧光工作站、流式细胞仪、荧光定量 PCR 仪等荧光检测仪器的基本原理、操作步骤及注意事项。

本书适合作为综合性大学中生命科学、医学、药学、农林学等专业的高年级本科生、研究生教学用书,也可作为对细胞生物学荧光技术感兴趣的相关科研人员的教学和参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学荧光技术原理和应用/刘爱平主编.—2版.—合肥:中国科学技术大学出版社,2012.1

(中国科学技术大学精品教材)

“十二五”国家重点图书出版规划项目

ISBN 978-7-312-02902-8

I. 细… II. 刘… III. 荧光分析—应用—细胞生物学—研究 IV. Q2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 153725 号

中国科学技术大学出版社出版发行

安徽省合肥市金寨路 96 号,230026

<http://press.ustc.edu.cn>

安徽省瑞隆印务有限公司印刷

全国新华书店经销

开本:710 mm×960 mm 1/16 印张:26.25 插页:12 字数:532 千

2007 年 2 月第 1 版 2012 年 1 月第 2 版 2012 年 1 月第 2 次印刷

定价:49.00 元



编审委员会

主 任 侯建国

副主任 窦贤康 陈初升
张淑林 朱长飞

委 员 (按姓氏笔画排序)

方兆本	史济怀	古继宝	伍小平
刘 斌	刘万东	朱长飞	孙立广
汤书昆	向守平	李曙光	苏 淳
陆夕云	杨金龙	张淑林	陈发来
陈华平	陈初升	陈国良	陈晓非
周学海	胡化凯	胡友秋	俞书勤
侯建国	施蕴渝	郭光灿	郭庆祥
奚宏生	钱逸泰	陈善宝	盛六四
龚兴龙	程福臻	蒋 强	窦贤康
褚家如	滕脉坤	霍剑青	

总 序

2008年,为庆祝中国科学技术大学建校五十周年,反映建校以来的办学理念 and 特色,集中展示教材建设的成果,学校决定组织编写出版代表中国科学技术大学教学水平的精品教材系列。在各方的共同努力下,共组织选题281种,经过多轮、严格的评审,最后确定50种入选精品教材系列。

五十周年校庆精品教材系列于2008年9月纪念建校五十周年之际陆续出版,共出书50种,在学生、教师、校友以及高校同行中引起了很好的反响,并整体进入国家新闻出版总署的“十一五”国家重点图书出版规划。为继续鼓励教师积极开展教学研究与教学建设,结合自己的教学与科研积累编写高水平的教材,学校决定,将精品教材出版作为常规工作,以《中国科学技术大学精品教材》系列的形式长期出版,并设立专项基金给予支持。国家新闻出版总署也将该精品教材系列继续列入“十二五”国家重点图书出版规划。

1958年学校成立之时,教员大部分来自中国科学院的各个研究所。作为各个研究所的科研人员,他们到学校后保持了教学的同时又作研究的传统。同时,根据“全院办校,所系结合”的原则,科学院各个研究所在科研第一线工作的杰出科学家也参与学校的教学,为本科生授课,将最新的科研成果融入到教学中。虽然现在外界环境和内在条件都发生了很大变化,但学校以教学为主、教学与科研相结合的方针没有变。正因为坚持了科学与技术相结合、理论与实践相结合、教学与科研相结合的方针,并形成了优良的传统,才培养出了一批又一批高质量的人才。

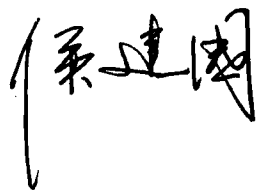
学校非常重视基础课和专业基础课教学的传统,也是她特别成功的原因之一。当今社会,科技发展突飞猛进、科技成果日新月异,没有扎实的基础知识,很难在科学技术研究中作出重大贡献。建校之初,华罗庚、吴有训、严济慈等老一辈科学家、教育家就身体力行,亲自为本科生讲授基础课。他们以渊博的学识、精湛的讲课艺术、高尚的师德,带出一批又一批杰出的年轻教员,培养

了一届又一届优秀学生。入选精品教材系列的绝大部分是基础课或专业基础课的教材,其作者大多直接或间接受到过这些老一辈科学家、教育家的教诲和影响,因此在教材中也贯穿着这些先辈的教育教学理念与科学探索精神。

改革开放之初,学校最先选派青年骨干教师赴西方国家交流、学习,他们在带回先进科学技术的同时,也把西方先进的教育理念、教学方法、教学内容等带回到中国科学技术大学,并以极大的热情进行教学实践,使“科学与技术相结合、理论与实践相结合、教学与科研相结合”的方针得到进一步深化,取得了非常好的效果,培养的学生得到全社会的认可。这些教学改革影响深远,直到今天仍然受到学生的欢迎,并辐射到其他高校。在入选的精品教材中,这种理念与尝试也都有充分的体现。

中国科学技术大学自建校以来就形成的又一传统是根据学生的特点,用创新的精神编写教材。进入我校学习的都是基础扎实、学业优秀、求知欲强、勇于探索和追求的学生,针对他们的具体情况编写教材,才能更加有利于培养他们的创新精神。教师们坚持教学与科研的结合,根据自己的科研体会,借鉴目前国外相关专业有关课程的经验,注意理论与实际应用的结合,基础知识与最新发展的结合,课堂教学与课外实践的结合,精心组织材料、认真编写教材,使学生在掌握扎实的理论基础的同时,了解最新的研究方法,掌握实际应用的技术。

入选的这些精品教材,既是教学一线教师长期教学积累的成果,也是学校教学传统的体现,反映了中国科学技术大学的教学理念、教学特色和教学改革成果。希望该精品教材系列的出版,能对我们继续探索科教紧密结合培养拔尖创新人才,进一步提高教育教学质量有所帮助,为高等教育事业作出我们的贡献。



中国科学技术大学校长
中国科学院院士
第三世界科学院院士

第 2 版前言

在本书第 1 版与读者见面刚刚一年时,发现并发展了绿色荧光蛋白(GFP)的日本科学家下村修、美国科学家马丁·沙尔菲和美国华裔科学家钱永健 3 人共同获得了 2008 年度诺贝尔化学奖,我们编写组的每一位成员都备感鼓舞,为我们的编写工作具有如此的前瞻性而感到兴奋。

本书 2007 年被评为“安徽省高等学校‘十一五’省级规划教材”,2010 年又荣获中国科学技术大学研究生教学二等奖,这充分肯定了本书在生命科学专业的研究生教学、科研中起到的重要作用。

现代科学技术的发展日新月异,虽然本书第 1 版出版才 3 年多,但细胞生物学荧光技术又有了新的拓展,荧光检测仪器也有了相应的更新。仅中国科学技术大学生命科学学院新购置的大型仪器就有 Revolution 转盘共聚焦显微镜(安道尔公司)、LSM 710 激光扫描共聚焦显微镜(蔡司公司)和 ELYRA. P1 超高分辨率荧光显微镜(蔡司公司)。为了紧跟当前生命科学研究的需要,此次修订我们一方面对原有内容作了部分修改,另一方面又增加了新的章节。例如在第一部分基本知识中,增补了下村修、马丁·沙尔菲及钱永健 3 位科学家发现并发展了绿色荧光蛋白(GFP)的过程及他们共同获得 2008 年度诺贝尔化学奖的内容;增加了新的第 6 章“荧光蛋白的两大类新的衍生物——光诱导蛋白和双分子荧光互补技术”。在第二部分荧光色素(探针)在细胞生物学中的应用中,对原第 8 章、第 9 章、第 10 章、第 12 章(第 2 版中的第 9 章、第 10 章、第 11 章、第 13 章)都作了部分修改,并增添了我们在科研中取得的新成果。在第三部分常用荧光检测仪器中,增加了“光学显微镜的最新演变——无目镜倒置显微镜诞生”的新内容;增加了第 16 章超高分辨率荧光显微镜;同时对原第 16 章、第 18 章进行了补充修改,并在激光扫描共聚焦显微镜 LSM 510

META 的基础之上增加了 LSM 710 的内容。

在本书的修订过程中,得到了生命科学学院领导的大力支持,得到了沈显生老师的许多帮助,在此向他们表示衷心的感谢!此外,特别感谢袁源博士对本书修订提出了宝贵建议。由于时间紧迫,我们的编写工作还有很多不足之处,敬请读者批评指正。

刘爱平 郭 振 王琦琛
2011 年 5 月

前 言

随着生命科学研究的快速发展,生物荧光技术在细胞免疫学、微生物学、分子生物学、分子遗传学、神经分子生物学、病理学、肿瘤学、临床检验学、医学、植物学等方面的应用越来越广泛;制备各种荧光生物样品的方法越来越多;用于荧光检测的仪器种类不断增加,而且也越来越先进。荧光技术已经成为生命科学研究的重要手段之一。因此,了解荧光的基本知识,熟悉荧光技术在生命科学研究中的应用,掌握常用的荧光生物样品的制备方法,了解荧光检测仪器的基本原理和操作步骤,是生命科学研究者必备的知识 and 技能。我们编写本书的目的,是为了给对细胞生物学荧光技术感兴趣的老师、研究生和本科生提供基本知识、相关的实验方法和技术参考。

本书共分三部分:第一部分介绍荧光的基本知识、发展史、荧光探针、活体荧光材料——绿色荧光蛋白(GFP)及最新型荧光材料——量子点;第二部分介绍荧光技术在生命科学中的应用及荧光生物样品的制备方法,其中荧光技术在细胞凋亡研究中的应用、流式细胞术在细胞生物学中的应用、荧光在细胞骨架研究中的应用、荧光原位杂交、荧光在 HER2/ErbB2/p185 研究中的应用及绿色荧光蛋白(GFP)在动植物细胞和分子生物学中的应用是中国科学技术大学生命科学学院(以下简称“我院”)多位教授科研项目中正在研究的内容;第三部分介绍我院现已拥有的生物荧光显微镜、激光共聚焦显微镜、细胞遗传工作站、活细胞荧光工作站、流式细胞仪、荧光定量 PCR 仪等荧光检测仪器的基本原理、操作步骤及注意事项。本书彩页中的大部分照片是使用我院拥有的上述各种荧光检测仪器获得的。

本书的编者为我院多年从事仪器管理的中青年教师和从事相关课题研究的硕士、博士研究生。其中第 1 章、第 2 章、第 3 章、第 5 章、第 12 章第 1 节、第 13 章、第 14 章的第 2 节、第 3 节及第 17 章由刘爱平编写;第 6 章、第 15 章、第

19 章及第 21 章由王琦琛编写;第 4 章、第 14 章的第 1 节及第 16 章由张文锐编写;第 7 章由姚展编写;第 8 章由郑晓东编写;第 9 章由郭振编写;第 10 章由易启毅编写;第 11 章由程联胜和陈俏俏编写;第 12 章的第 2 节由赵萍编写;第 18 章由王黎丽编写;第 20 章由何海辉编写。

在本书的编写过程中,得到了院领导的大力支持和本院“长江学者”姚雪彪、向成斌教授,“百人计划”吴缅、史庆华、田志刚教授和刘兢、魏海明教授以及许多老师和研究生的关心和帮助,在此向他们表示衷心的感谢!同时,校教务处和研究生院也给予了许多帮助,在此表示感谢。

由于荧光技术的发展相当迅速,加之编写时间仓促,水平有限,书中难免有不妥之处,恳请读者指正。

刘爱平 王琦琛
2006 年 6 月

目 次

总序	(i)
第 2 版前言	(iii)
前言	(v)

第一部分 基本知识

1 光的基本知识	(3)
1.1 光的本质	(3)
1.2 光的性质	(4)
1.3 光的吸收	(5)
2 荧光的基本知识	(6)
2.1 荧光的发光原理	(6)
2.2 荧光色素的性质	(9)
2.3 组织细胞的自发荧光与继发荧光	(15)
2.4 荧光的淬灭及抗淬灭	(19)
2.5 荧光光谱交叉干扰及消除	(24)
3 荧光染料(色素)的早期应用和发展史	(27)
3.1 染料的早期应用和发展	(27)
3.2 荧光染料(色素)的早期应用和发展	(28)
3.3 荧光染料(探针)在活细胞中的早期应用和发展	(29)
3.4 荧光染料(探针)在植物研究中的早期应用和发展	(31)
4 常用的荧光染料(探针)	(34)
4.1 细胞器荧光探针	(34)
4.2 细胞骨架荧光探针	(40)

4.3	研究钙调节及活性的荧光探针	(44)
4.4	核酸荧光探针	(47)
4.5	其他荧光探针	(57)
5	活体荧光材料——绿色荧光蛋白(GFP)及其衍生物	(62)
5.1	绿色荧光蛋白的发现	(62)
5.2	绿色荧光蛋白的结构	(65)
5.3	绿色荧光蛋白的特性及优点	(66)
5.4	荧光蛋白的新进展	(68)
6	荧光蛋白的两大类新的衍生物——光诱导蛋白和双分子荧光互补技术 ...	(72)
6.1	光诱导蛋白	(72)
6.2	双分子荧光互补技术	(79)
7	最新型荧光材料——量子点	(89)
7.1	量子点的定义及物理特性	(89)
7.2	量子点具有优良的光学特性	(91)
7.3	量子点的优点	(91)
7.4	量子点技术在生物领域中的应用	(92)
7.5	量子点技术的安全性	(95)
7.6	量子点技术的发展前景	(96)

第二部分 荧光色素(探针)在细胞生物学中的应用

8	荧光技术在细胞凋亡研究中的应用	(99)
8.1	细胞凋亡及其基本通路	(101)
8.2	荧光显微镜对细胞凋亡的形态学观察	(104)
8.3	凋亡调控分子的荧光标记在细胞凋亡研究中的应用	(108)
8.4	其他荧光技术在细胞凋亡研究中的应用	(115)
9	流式细胞术在细胞生物学中的应用	(123)
9.1	检测细胞的特征	(123)
9.2	检测细胞的增殖和凋亡状态	(130)
9.3	定量检测可溶性蛋白质(CBA 技术)	(135)
9.4	纯化特定的细胞	(139)

10 荧光在细胞骨架研究中的应用	(142)
10.1 荧光技术在微丝骨架研究中的应用	(143)
10.2 荧光技术在微管骨架研究中的应用	(153)
11 荧光原位杂交	(166)
11.1 荧光原位杂交的基本原理与基本过程	(166)
11.2 荧光原位杂交的应用	(182)
12 荧光在 HER2/ErbB2/p185 研究中的应用	(188)
12.1 用免疫荧光细胞化学的方法鉴定抗体与 p185 的结合特异性	(189)
12.2 EGFP 在 ErbB2 胞内区核定位信号研究中的应用	(191)
13 绿色荧光蛋白(GFP)在细胞分子生物学中的应用	(201)
13.1 绿色荧光蛋白(GFP)在动物细胞分子生物学中的应用	(202)
13.2 绿色荧光蛋白(GFP)在植物细胞分子生物学中的应用	(206)
13.3 绿色荧光蛋白在医学、新药的开发及其他方面的应用	(211)
14 免疫荧光细胞化学技术	(213)
14.1 免疫学基础知识	(214)
14.2 免疫荧光细胞化学的原理	(218)
14.3 荧光抗体的制备	(221)
14.4 免疫荧光组织化学细胞和组织标本的制备	(223)
14.5 免疫荧光细胞化学染色方法	(231)
14.6 非特异性染色的消除方法	(234)

第三部分 常用荧光检测仪器

15 生物荧光显微镜	(241)
15.1 普通生物光学显微镜	(241)
15.2 生物荧光显微镜	(251)
15.3 细胞遗传工作站	(259)
15.4 光学显微镜的最新演变——无目镜倒置显微镜的诞生	(267)
16 激光扫描共聚焦显微镜	(272)
16.1 基本原理	(273)
16.2 主要部件	(275)
16.3 操作步骤及注意事项	(279)

16.4	主要用途	(282)
16.5	LSM 510 META LSM 710	(286)
16.6	应用于激光共聚焦的新技术	(290)
16.7	双光子(多光子)激光扫描显微镜	(292)
16.8	注意事项及维护保养	(294)
17	超高分辨率显微镜的原理和应用	(295)
17.1	分辨率	(295)
17.2	超高分辨率显微技术简介	(296)
17.3	超高分辨率显微镜的应用	(304)
18	活细胞显微成像技术	(307)
18.1	活细胞荧光工作站	(307)
18.2	其他活细胞显微成像技术	(313)
19	活体体内荧光成像技术	(329)
19.1	基本原理	(329)
19.2	基本组成	(331)
19.3	实验过程	(332)
19.4	系统特性	(333)
19.5	应用	(336)
19.6	发展前景	(338)
20	流式细胞仪	(339)
20.1	概述	(339)
20.2	工作原理与基本构成	(341)
20.3	主要用途	(345)
20.4	检测样品的制备	(348)
20.5	仪器的基本操作步骤	(349)
20.6	重要参数及意义	(352)
20.7	数据处理与分析	(355)
21	荧光定量 PCR 仪	(361)
21.1	概述	(361)
21.2	基本原理	(362)
21.3	仪器简介	(366)

21.4 样品制备及操作步骤	(370)
22 荧光分光光度计	(373)
22.1 基本结构与原理	(373)
22.2 AMINCO-Bowman 扫描荧光分光光度计	(374)
22.3 基本操作	(378)
23 激光扫描成像仪	(380)
23.1 系统硬件组成及功能	(380)
23.2 工作原理及操作步骤	(381)
23.3 仪器参数	(382)
23.4 荧光样品的制备	(382)
附录 免疫细胞化学常用试剂及其配制方法	(384)
F.1 缓冲液	(384)
F.2 固定剂	(389)
F.3 黏附剂	(394)
F.4 封固剂	(395)
F.5 其他辅助试剂	(396)
参考文献	(399)



第①部分

基 本 知 识