

易于使用

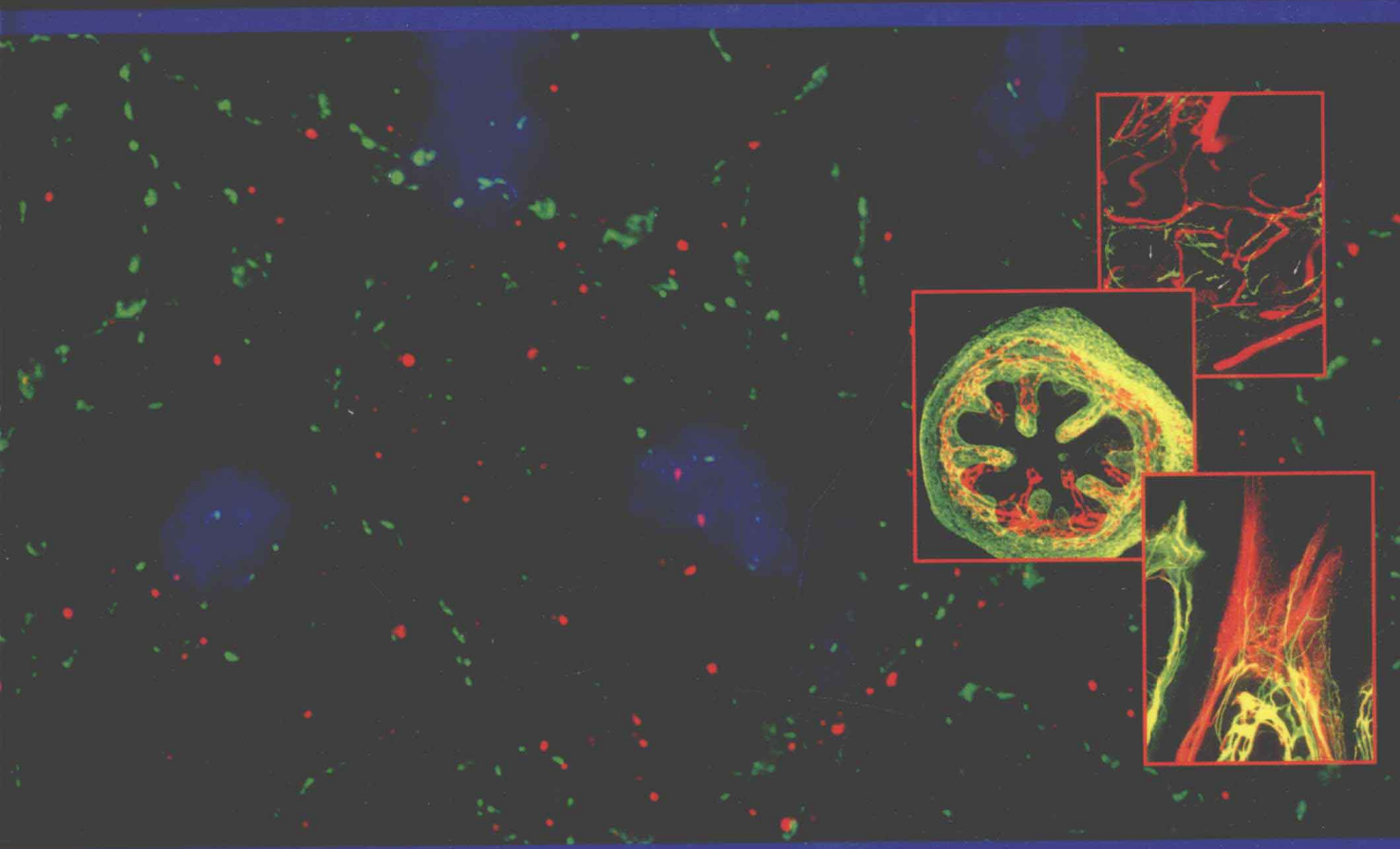
值得信赖

专业权威

共聚焦显微镜技术

Techniques in Confocal Microscopy

P. Michael Conn



实验室解决方案

Techniques in Confocal Microscopy

共聚焦显微镜技术

Edited by

P. Michael Conn

科学出版社

北 京

图字：01-2011-1547 号

This is an annotated version of

Techniques in Confocal Microscopy

Edited by P. Michael Conn.

Copyright © 2010 ELSEVIER INC.

ISBN: 978-0-12-384658-7

All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

AUTHORIZED EDITION FOR SALE IN P. R. CHINA ONLY

本版本只限于在中华人民共和国境内销售

图书在版编目(CIP)数据

共聚焦显微镜技术 = Techniques in Confocal Microscopy: 英文/ (美) 康恩 (Conn, P. M.) 主编. —北京: 科学出版社, 2012

(实验室解决方案)

ISBN 978-7-03-033055-0

I. ①共… II. ①康… III. ①共聚焦激光扫描显微镜-英文 IV. ①TH742.64

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 264074 号

责任编辑: 李小汀/责任印制: 钱玉芬/封面设计: 耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年1月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2012年1月第一次印刷 印张: 34 1/4

字数: 812 000

定价: 138.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

导 读 一

激光扫描共聚焦显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscopy, 简称 Confocal) 技术诞生于二十世纪八十年代中末期, 相对而言是一门较新的技术, 自问世二十几年来一直处于蓬勃发展阶段并活跃在生命科学研究舞台。Confocal 已经从单光子滤片型 Confocal 不断发展为光谱型 Confocal (包括发射光谱型和激发光谱型)、双光子激光扫描显微镜、双光子荧光寿命成像显微镜, 以及能够进行单分子检测的荧光相关光谱型 Confocal。Confocal 功能强大, 在生命科学中应用广泛, 在这二十几年中, Confocal 对推动生命科学研究进程发挥了巨大作用。

Confocal 对多重荧光标记的固定或活的细胞及生物组织样品可进行高清晰度、高分辨率图像采集及无损伤连续光学切片——显微“CT”, 并能实现真正的三维重组; 因此, Confocal 可用于细胞膜/核受体、蛋白激酶和细胞骨架等多种分子精细三维分布的研究、共定位研究或亚细胞器定位研究及核转录因子转位研究等。Confocal 还可实时检测活细胞生理功能的变化, 如可以实时检测活细胞内 Ca^{2+} 、pH、ROS、线粒体膜电位和细胞膜电位等生理功能的变化。而多色荧光蛋白 CFP、GFP、YFP 和 RFP 的出现, 又使 Confocal 在后基因组时代即蛋白质功能研究方面发挥了巨大作用, 如可以实时检测细胞吞噬、蛋白分泌、受体-配体内化和蛋白质相互作用等。Confocal 的应用涉及细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、细胞衰老、干细胞、胚胎发育、神经生物、药学及药理学等多种学科, 几乎覆盖了生命科学的各个领域, 已成为生命科学研究的重要常规手段。蛋白质功能研究是当前生命科学研究的热点, Confocal 在蛋白质功能研究中的优势, 更巩固了 Confocal 在生命科学研究中不可替代的地位。

本书主编 P. Michael Conn 在序言中提到“从 OVID (现已过时) 数据库 (包含 MEDLINE, Current Contents 及其他来源) 中检索关键词“共聚焦显微镜”, 1985 年~1989 年的五年间, 共列出了 76 篇参考文献。与此相比, 1995 年~1998 年的四年间列出了将近 3600 篇参考文献。目前, 仅仅是 PubMed 就能检索出 41 000 多篇参考文献! 这些数据无疑证明了共聚焦显微镜迅速增长的关注度、发展前景和价值。”。我在写本书导读的时候又特意在 PubMed 上以关键词“Confocal Microscopy”进行搜索, 截止目前所发表文章为 49 455 篇, 这确实是个很惊人的数字。而以关键词“Electronic Microscopy” (电子显微镜) 在 PubMed 数据库上进行搜索, 截至目前所发表的相关文章为 5 444 篇, 而电镜比共聚焦显微镜的问世要早二十多年, 从以上这些数字不难看出共聚焦显微镜技术在生命科学研究中所发挥的重要作用。

Confocal 引进我国已经近二十年, 从最初的几台已经发展到近千台, 而且目前 Confocal 还在以每年近百台的速度增长。Confocal 数量的快速增长一是说明我国经济的日渐强大, 国家有财力购置 Confocal; 二是说明生命科学研究已经紧随国际研究的热点, Confocal 数量的增长也从另一个角度说明我国研究人员对 Confocal 的兴趣在快速升温。本书许多章节的作者都是该领域知名的科学家, 在对 Confocal 需求如此之大的当今, 科学出版社引进《共聚焦显微镜技术》这本书可以说是雪中送炭, 对我国在 Confocal 一线工作的人们以及利用这一技术进行科学研究的广大科研工作者和研究生无

疑是一个福音，使他们有了一本有价值可供参考的 Confocal 实用手册。

这本书第一部分着重介绍激光共聚焦显微镜技术，除了比较深入地介绍 Confocal 的光学原理之外，这一部分重点介绍了 Confocal 技术应用中的难点和应该考虑而往往又被人们忽略的问题，而这些问题常常严重影响 Confocal 的检测结果，如：激光诱导的荧光信号的增强、DMSO 水含量对荧光染料负载的影响等。第一部分详细介绍了各种荧光染料的负载，更可贵的是还有对各种荧光染料负载的比较，包括负载浓度、温度和荧光染料的光稳定性等，如对细胞内 Ca^{2+} 负载的各种荧光染料进行了详细的比较，这些珍贵的一手资料可使读者在 Confocal 样品制备中少走许多弯路。我们特别把这一部分推荐给在 Confocal 一线工作的人们和研究生，相信他们读后一定收获颇丰。主题为功能研究的第二部分和主题为绿色荧光蛋白的第三部分则各自给出了十个具体应用研究实例，所选择的应用实例不仅从各个层面和角度尽显了 Confocal 的强大功能，这些应用实例也是当今生命科学的研究热点，且应用点覆盖比较全面，每个读者根据自己的研究方向都能找到可供参考的章节并能使读者从中得到启发。特别值得一提的是本书还对多光子激光扫描显微镜技术和应用也有比较系统的介绍，多光子激光扫描显微镜是相对比较新且比较前沿的技术，它的应用开发也处于相对初级阶段，因此更具参考价值。

本书更适合具有生物医学背景知识的读者阅读，而这一部分读者群对第一部分中关于 Confocal 光学原理的理解会有些难度，但这些内容对在 Confocal 一线的工作者尤其重要，深入了解 Confocal 的原理是高水平使用 Confocal 和开发其应用的基础。本书由于每一个章节都由不同的作者编写，所以整体性略显不足，例如关于 Confocal 原理就有多处章节提到，还有某些其他内容也略显重复。荧光寿命成像技术和单分子检测荧光相关光谱技术是本领域的前沿技术，它们与蛋白质组学研究密切相关，是蛋白质功能研究的重要手段之一，因此，这两项技术也必将得到广泛应用。而本书只在第十五章提到荧光寿命测量，对单分子检测荧光相关光谱技术则未提及。但这些都不妨碍本书成为一本 Confocal 领域难得的有价值的参考书。

目前，Confocal 在我国应用的整体水平与发达国家相比还有些滞后，并且还没有一本类似的书籍可供广大的研究者们参考，这本书在我国的出版对提高 Confocal 应用水平将具有重要作用。

何其华

2011. 11. 30

导 读 二

1957 年 Marvin Minsky 提出了共聚焦显微镜技术的基本原理, 1970 年牛津大学和阿姆斯特丹大学同时向科学界推出了一种新型的扫描共聚焦显微镜, 1987 年 White 和 Amos 在 Nature 杂志上发表了《共聚焦显微镜时代的到来》一文, 之后, 共聚焦显微镜技术在生命科学研究中开始得到越来越广泛的应用。利用共聚焦显微镜技术, 除了可以在亚细胞水平观察细胞或组织的结构, 还可以观察 Ca^{2+} 、pH、膜电位等生理信号的发生及变化, 并能追踪蛋白或分子的动态变化及定位, 将形态学研究和功能学研究有机地结合起来。因此, 共聚焦显微镜技术被广泛应用于荧光定量测量、共聚焦图像分析、三维图像重建、活细胞动力学参数监测和胞间通讯等诸方面研究, 成为形态学、分子细胞生物学、神经学、药理学、遗传学等领域中新一代强有力的研究工具, 被誉为当今世界上最先进的分子细胞生物学分析仪器。随着生命科学领域研究的不断深入, 共聚焦显微镜新技术的开发层出不穷。在共聚焦显微镜之后, 又出现了双光子显微镜、多光子显微镜、激光捕获显微切割系统, 进一步拓展了显微镜技术在生命科学领域的应用范围和深度。

为了在生命科学领域中更好地运用共聚焦显微镜技术, 一本内容全面、实用性强的参考书是科研工作者们十分期待的。因此, 《共聚焦显微镜技术》(Techniques in Confocal Microscopy) 在我国以导读版的形式出版, 是一件令人十分高兴的事。无论是相关研究的实验技术人员, 还是科研人员; 无论是初学者, 还是已有一定基础的工作者; 无论是基础医学研究人员, 还是临床医学研究人员, 都能从这本书中找到自己想要了解的相关知识与技术。

本书的主编 P. Michael Conn 是美国奥勒冈国家灵长类动物研究中心 (ONPRC) 的生殖科学和神经科学的资深科学家, 是生理学、药理学和细胞生物学教授, 是 *Endocrinology*, *Molecular and Cellular Neurosciences*, *Methods in Neuroscience*, and *Recent Progress in Hormone Research* 总编、*Endocrine*, *Contemporary Endocrinology* 和 *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 主编及 *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* 的编辑, 在科研学术类书籍的编辑方面经验丰富。本书涵盖了激光扫描共聚焦显微镜的理论基础和应用。为保证新颖性, 每一章节都由活跃在科研第一线的该领域专家撰写, 他们结合自己的科研工作深入浅出地介绍了该领域共聚焦显微镜的技术方法和最新进展。同时编者在每章的第一节编排了“修订”, 并在每章结束前给出了详尽的“参考文献”, 以便于读者快速了解本章内容的最新发展, 如果对某些研究方向或研究内容感兴趣, 也可以检索到相关原始文献。

本书内容分为四部分, 第一部分主要介绍共聚焦显微镜的构造和操作、共聚焦显微镜技术的基本理论、样品的常规制备技术, 以及共聚焦显微镜在细胞学研究中的基本应用, 并且对激光扫描共聚焦显微术与电子显微术的结合进行了有益的探讨。这部分内容对实验技术人员, 尤其是初学者而言, 更有针对性, 能帮助他们尽快了解并使用这类设备。第二部分主要介绍了共聚焦显微镜的一些独特功能及其在生命科学领域研究中的具体应用。第九章和第十章介绍了共聚焦显微镜技术中的体积测量和定量测量; 第十二

章、第十五章阐述了多光子显微镜技术并与共聚焦显微镜技术进行对比。这几章内容不仅对共聚焦显微镜做了详细介绍，同时对具体实验也给予指导。这部分的其他章节分别介绍了共聚焦显微镜在受体—配体内化作用、雄性激素受体的转运、激肽释放酶与激肽受体、活体人皮肤的功能代谢成像、活体人眼角膜、哺乳动物中枢神经系统神经元的活体成像、病毒感染鉴别和膜转运等研究领域中的应用，从实验准备、实验步骤到实验结果的分析等方面都进行了细致的描述。第三部分主要介绍了绿色荧光蛋白在生物学中的应用。绿色荧光蛋白与共聚焦显微镜的发展关系密切，在 2008 年的诺贝尔化学奖上，绿色荧光蛋白成了主角。2008 年的诺贝尔化学奖授予了美籍日裔科学家下村修、美国科学家马丁·沙尔菲和美籍华裔科学家钱永健三人，以表彰他们发现并发展了绿色荧光蛋白质技术。第三部分详细介绍了绿色荧光蛋白的应用，例如绿色荧光蛋白用于检测蛋白质释放，测量蛋白质的降解，研究细胞核受体、G 蛋白偶联受体的信号传导和转运、神经元中的离子通道和第二信使以及肌醇 1, 4, 5—三磷酸腺苷受体的表达，还有 Ca^{2+} 、pH、电位等生理信号的检测以及膜通透性的检测，除了阐述实验操作中的关键性步骤外，还根据具体应用指出了使用中的注意事项、局限性及发展前景。第四部分主要介绍了激光捕获显微切割技术在基因组学和蛋白质组学、活体中的应用，以及采用激光捕获显微切割从石蜡切片中获取细胞核，并对其进行荧光原位杂交的技术。激光捕获显微切割技术是在不破坏组织结构，保存要捕获的细胞和其周围组织形态完整的前提下，直接从冰冻或石蜡包埋组织切片中获取目标细胞的一项技术。它成功地解决了组织中细胞异质性问题，从而可以进行纯细胞的蛋白质组学研究，是目前较为理想的细胞提取工具。而且这项技术在活体研究中也具有极大的应用价值。此外，本书还介绍了一些实验技巧，使得其实用性更强。

国内也有一些有关激光扫描共聚焦显微镜技术方面的书籍，内容各有偏重，但由于出版时间均较早，而共聚焦显微镜技术和多光子显微镜技术在近几年发展较快，所以这些书籍的内容对于相关科研人员和实验技术人员来说就显得有些不够用了。本书的出版补充了多光子显微镜方面的知识，并介绍了在多种科研中的应用。这本书的价值留待读者们阅读后自己评价！

杨勇骥

前 言

本书详细阐述了迅速发展的共聚焦显微镜和其他重要的显微镜技术。从 OVID (现已过时) 数据库 (包含 MEDLINE, Current Contents 及其他来源) 中检索关键词“共聚焦显微镜”, 1985 年~1989 年的五年间, 共列出了 76 篇参考文献。与此相比, 1995 年~1998 年的四年间列出了将近 3600 篇参考文献。目前, 仅仅是 PubMed 就能检索出 41 000 多篇参考文献! 这些数据无疑证明了共聚焦显微镜迅速增长的关注度、发展前景和价值。

本书归纳了共聚焦显微镜横跨生命科学领域不同学科的各种应用, 并给出了技术方法包括原始刊物中未曾发表过的共聚焦显微镜使用捷径和技巧。书中详细描述了这些技术方法并与其他相关方法进行了比较, 本书主编鼓励各章节的作者这样做, 因为主编坚信这种比较对读者是有价值的, 可以帮助读者改进现有的操作步骤以应用于新的研究。此外, 本书在讲述方法的过程中, 尽可能强调了其在常规情况下的适用性及潜在的局限性。尽管由于种种原因, 某些领域未涉及到, 但本书全面、详细地概括了本领域中现有的方法, 并展望了其迅速发展的前景。

特别感谢作者们对各章节的快速修订, 感谢学术出版社全体员工为使本书保持高水准的出版质量与及时出版所做的努力。

P. Michael Conn

(何其华 杨勇骥 译)

CONTRIBUTORS

Numbers in parentheses indicate the pages on which the authors' contributions begin.

- George F. Babcock** (163), Department of Surgery and Cell Biology, University of Cincinnati College of Medicine; Shriners Hospitals for Children, Cincinnati Burns Institute, Cincinnati, Ohio, USA
- George Banting** (335), Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk Bristol, United Kingdom
- Larry S. Barak** (391), Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA
- K. K. Bence** (421), Department of Molecular Pharmacology, Physiology, and Biotechnology, Brown University Providence, Rhode Island, USA
- Miguel Berrios** (47), Department of Pharmacological Sciences, School of Medicine, Stony Brook University Medical Center; University Microscopy Imaging Center, State University of New York, Stony Brook, New York, USA
- Kanti D. Bhoola** (221), Lung Institute of Western Australia, University of Western Australia, Nedlands, Perth Western Australia, Australia
- Ghassan Bkaily** (105), Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada
- L. A. C. Blair** (421), Department of Molecular Pharmacology, Physiology, and Biotechnology, Brown University Providence, Rhode Island, USA
- Matthias Böhnke** (283), Arlington, Virginia, USA
- Alberico Borghetti** (175), Department of Experimental Medicine, Via Volturno 39, Parma, Italy
- Dieter Brocksch** (479), Humangenetik für Biologen, Universität Frankfurt, Frankfurt/Main, Germany
- Christof Buehler** (261), Arlington, Virginia, USA
- Marc G. Caron** (391), Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA
- Wayne E. Cascio** (443), Department of Cell Biology and Anatomy, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA
- Kam Tai Chan** (21), Department of Electronic Engineering, Center for Advanced Research in Photonics, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, Hong Kong
- Robert Chervenak** (409), Department of Microbiology and Immunology, LSU Health Sciences Center-Shreveport, Shreveport, Louisiana, USA
- David E. Colflesh** (47), University Microscopy Imaging Center, State University of New York, Stony Brook, New York, USA

- Kimberly A. Conlon** (47), Department of Pharmacological Sciences, School of Medicine, Stony Brook University Medical Center, State University of New York, Stony Brook, New York, USA
- Guy Cox** (27), Electron Microscope Unit, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia
- Stephen R. Cronin** (363), Department of Biology, UCSD, La Jolla, California, USA
- Douglas J. Demetrick** (489), The Departments of Pathology and Laboratory Medicine; Oncology; Biochemistry and Molecular Biology; Medical Genetics; The University of Calgary, and Calgary Laboratory Services
- Lisa M. DiFrancesco** (489), The Departments of Pathology and Laboratory Medicine; The University of Calgary, and Calgary Laboratory Services
- Tommy Duong** (355), Department of Cell Biology, CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, California, USA
- Ralf Engelmann** (307), Medical Faculty, Institute of Medical Psychology, Otto-von-Guericke University of Magdeburg, Magdeburg, Germany, email: Bernhard.Sabel@med.ovgu.de; Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena), Product Management BioSciences, Laser Scanning Microscopy
- Stephen S. G. Ferguson** (391), Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA
- Carlos D. Figueroa** (221), Institute of Anatomy, Histology and Pathology, Faculty of Medicine, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile
- Teiichi Furuichi** (433), Department of Molecular Neurobiology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan
- Rita Gatti** (175), Department of Experimental Medicine, Via Volturno 39, Parma, Italy
- Gian Carlo Gazzola** (175), Department of Experimental Medicine, Via Volturno 39, Parma, Italy
- Virginie Georget** (205), INSERM U439, Pathologie Moléculaire des Récepteurs Nucleaires, Rue de Navacelles Montpellier, France
- Hans-Hermann Gerdes** (345), Institute for Neurobiology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany
- Enrico Gratton** (261), Arlington, Virginia, USA
- Gordon L. Hager** (379), Head, Hormone Action and Oncogenesis Section, Laboratory Chief, Bethesda, Maryland, USA
- Randolph Y. Hampton** (363), Department of Biology, UCSD, La Jolla, California, USA
- Hisashi Hashimoto** (79), Department of Anatomy, The Jikei University School of Medicine, Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo, Japan
- Hao He** (21), Department of Electronic Engineering, Center for Advanced Research in Photonics, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, Hong Kong
- Petra Henrich-Noack** (307), Medical Faculty, Institute of Medical Psychology, Otto-von-Guericke University of Magdeburg, Magdeburg, Germany, email: Bernhard.Sabel@med.ovgu.de
- Ho Pui Ho** (21), Department of Electronic Engineering, Center for Advanced Research in Photonics, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, Hong Kong

- David N. Howell** (317), Department of Pathology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA
- Chiao-Chian Huang** (355), Department of Cell Biology, CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, California, USA
- Hiroshi Ishikawa** (79), Laboratory of Regenerative Medical Science, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Tokyo, Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan
- Danielle Jacques** (105), Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada
- Manabu Kagayama** (73), Department of Anatomy, Tohoku University School of Dentistry, Sendai, Japan
- Steven R. Kain** (355), Department of Cell Biology, CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, California, USA
- Ki Hean Kim** (261), Arlington, Virginia, USA
- Susan M. Knobel** (189), Department of Molecular Physiology and Biophysics, Vanderbilt University Medical School, Nashville, Tennessee, USA
- Siu Kai Kong** (21), Department of Biochemistry, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, Hong Kong
- Christoph Kaether** (345), Institute for Neurobiology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany
- Sabine Kupzig** (335), Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk Bristol, United Kingdom
- Moriaki Kusakabe** (79), Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan
- Georgia Lahr** (479), Humangenetik für Biologen, Universität Frankfurt, Frankfurt/Main, Germany
- Stephane A. Laporte** (391), Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA
- San San Lee** (335), Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University of Bristol, University Walk Bristol, United Kingdom
- John J. Lemasters** (443), Department of Cell Biology and Anatomy, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA
- Xianqiang Li** (355), Department of Cell Biology, CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, California, USA
- Lonnie Lybarger** (409), Department of Microbiology and Immunology, LSU Health Sciences Center-Shreveport, Shreveport, Louisiana, USA
- Carlos B. Mantilla** (143), Departments of Anesthesiology, and Physiology & Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
- J. Marshall** (421), Department of Molecular Pharmacology, Physiology, and Biotechnology, Brown University Providence, Rhode Island, USA
- Barry R. Masters** (261, 283), Arlington, Virginia, USA
- Julie M. Matheson** (433), Department of Molecular Neurobiology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan

- Anette Mayer** (479), Humangenetik für Biologen, Universität Frankfurt, Frankfurt/Main, Germany
- Takayuki Michikawa** (433), Department of Molecular Neurobiology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan
- Katsuhiko Mikoshiba** (433), Department of Molecular Neurobiology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan
- Sara E. Miller** (317), Department of Pathology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA
- Atsushi Miyawaki** (433), Department of Molecular Neurobiology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan
- Sabita K. Murthy** (489), Consultant Geneticist and Head of Molecular Cytogenetics Unit, Genetics Center, Al Wasl Hospital, Dubai, UAE
- Akira Muto** (433), Department of Molecular Neurobiology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan
- Jean-Claude Nicolas** (205), INSERM U439, Pathologie Moleculaire des Recepteurs Nucleaires, Rue de Navacelles Montpellier, France
- Hisayuki Ohata** (443), Department of Cell Biology and Anatomy, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA
- Guido Orlandini** (175), Department of Experimental Medicine, Via Volturno 39, Parma, Italy
- David W. Piston** (189), Department of Molecular Physiology and Biophysics, Vanderbilt University Medical School, Nashville, Tennessee, USA
- Y. S. Prakash** (143), Departments of Anesthesiology, and Physiology & Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
- Sylvia Prilloff** (307), Medical Faculty, Institute of Medical Psychology, Otto-von-Guericke University of Magdeburg, Magdeburg, Germany, email: Bernhard.Sabel@med.ovgu.de
- Ting Qian** (443), Department of Cell Biology and Anatomy, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA
- Chad T. Robinson** (163), Department of Surgery and Cell Biology, University of Cincinnati College of Medicine; Shriners Hospitals for Children, Cincinnati Burns Institute, Cincinnati, Ohio, USA
- Nicoletta Ronda** (175), Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences Via Gramsci 14, University of Parma, Parma, Italy
- Bernhard A. Sabel** (307), Medical Faculty, Institute of Medical Psychology, Otto-von-Guericke University of Magdeburg, Magdeburg, Germany, email: Bernhard.Sabel@med.ovgu.de
- Yasuyuki Sasano** (73), Department of Anatomy, Tohoku University School of Dentistry, Sendai, Japan
- Lee G. Sayers** (433), Department of Molecular Neurobiology, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan
- Karin Schütze** (479), Humangenetik für Biologen, Universität Frankfurt, Frankfurt/Main, Germany

- Gary C. Sieck** (143), Departments of Anesthesiology, and Physiology & Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA
- Celia J. Snyman** (221), Department of Biochemistry, Genetics and Microbiology, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, South Africa
- Peter T. C. So** (261), Arlington, Virginia, USA
- Monika Stich** (479), Humangenetik für Biologen, Universität Frankfurt, Frankfurt/Main, Germany
- Charles Sultan** (205), INSERM U439, Pathologie Moléculaire des Récepteurs Nucleaires, Rue de Navacelles Montpellier, France
- Xuejun Sun** (123), Department of Oncology, Cross Cancer Institute, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
- Béatrice Terouanne** (205), INSERM U439, Pathologie Moléculaire des Récepteurs Nucleaires, Rue de Navacelles Montpellier, France
- Donna R. Trollinger** (443), Department of Cell Biology and Anatomy, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, USA
- Robert H. Webb** (3), Wellman Laboratories of Photomedicine, Bartlett 703, Boston, Massachusetts, USA
- James L. Wittliff** (463), Hormone Receptor Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Brown Cancer Center, University of Louisville, Louisville, Kentucky, USA
- Rose Chik Ying Ong** (21), Department of Biochemistry, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, NT, Hong Kong
- Jie Zhang** (391), Howard Hughes Medical Institute, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina, USA
- Xiaoning Zhao** (355), Department of Cell Biology, CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, California, USA

PREFACE

This volume deals with the rapidly evolving topic of confocal microscopy and other important microscopic techniques. The (now outdated) OVID database (which included MEDLINE, Current Contents, and other sources) listed 76 references using keywords, "confocal microscopy" for the 5-year period 1985–1989. In contrast, for the 4-year period 1995–1998, nearly 3600 references are listed. Presently, PubMed lists over 41,000 references! This is certainly a testament to the growing value and interest in this topic.

This volume documents many diverse uses for confocal microscopy in disciplines that broadly span biology. The methods presented include shortcuts and conveniences not included in the initial publications. The techniques are described in a context that allows comparisons to other related methodologies. The authors were encouraged to do this in the belief that such comparisons are valuable to readers who must adapt extant procedures to new systems. Also, so far as possible, methodologies are presented in a manner that stresses their general applicability and reports their potential limitations. Although, for various reasons, some topics are not covered, the volume provides a substantial and current overview of the extant methodology in the field and a view of its rapid development.

Particular thanks to the authors for revising their chapters promptly and to the staff at Academic Press for maintaining high standards of production quality and for timely publication of this work.

P. Michael Conn

目 录

编者	xv
前言	xxi

第一部分 使用注意事项和设备原理

1. 共聚焦显微镜的理论基础

Robert H. Webb

I. 简介	3
II. 光学切片	6
III. 点扩散函数	6
IV. 针孔	11
V. 放大倍数	11
VI. 显微镜的完整结构	12
VII. 共聚焦显微镜的种类	14
VIII. 多光子显微镜	14
IX. 光源	16
X. 非相干光源	16
XI. 光漂白	17
XII. 合轴	17
XIII. 数值孔径	18
XIV. 小结	18
参考文献	18

2. 共聚焦显微镜获取生物信号时的注意事项

Hao He, Rose Chik Ying Ong, Kam Tai Chan, Ho Pui Ho, and Siu Kai Kong

I. 简介	21
II. 激光诱导荧光信号的增强	22
III. DMSO 的含水量和染料负载的效率	23
参考文献	26

3. 大容量存储器和数据处理

Guy Cox

I. 大容量存储器	28
-----------------	----

II. 图像处理	33
附录	45
参考文献	45
4. 共聚焦荧光显微镜的荧光淬灭剂	
Miguel Berrios, Kimberly A. Conlon, and David E. Colflesh	
I. 修订	47
II. 简介	48
III. 样品制备	50
IV. 抗荧光淬灭剂	58
V. 荧光衰减图像的采集	64
附录: 供应商	69
参考文献	70
5. 共聚焦显微镜的封片技术	
Manabu Kagayama and Yasuyuki Sasano	
I. 简介	73
II. 材料与方法	74
III. 结果与讨论	76
参考文献	77
6. 共聚焦显微镜样品的全组织包埋与厚片制备	
Hisashi Hashimoto, Hiroshi Ishikawa, and Moriaki Kusakabe	
I. 修订	79
II. 简介	80
III. 固定	83
IV. 切片	86
V. 预处理	87
VI. 荧光染色	90
VII. 标记荧光明胶的血管模型	90
VIII. 封片	93
IX. 观察	97
附录	99
参考文献	103
7. 利用共聚焦显微镜研究细胞结构和功能	
Ghassan Bkaily and Danielle Jacques	
I. 简介	106
II. 样品制备	107
III. 共聚焦显微镜的参数设置	108

IV. 细胞器的荧光探针	108
V. 体积扫描法和核内钙、钠和 pH 测量	110
VI. 快速扫描成像	110
VII. 细胞共培养	112
VIII. 共聚焦显微镜的荧光探针负载	113
IX. 小结	120
参考文献	122

8. 激光扫描共聚焦显微镜与电子显微镜的结合

Xuejun Sun

I. 修订	124
II. 简介	125
III. 实验步骤	126
IV. 方法一：免疫金荧光法	127
V. 方法二：抗生物素-生物素复合物法	133
VI. 免疫细胞化学法的应用	136
VII. 讨论与小结	137
参考文献	139

第二部分 功能方法

9. 利用共聚焦显微镜进行体积测量

Carlos B. Mantilla, Y. S. Prakash, and Gary C. Sieck

I. 简介	143
II. 共聚焦显微镜光学系统的选择	145
III. 利用共聚焦显微镜进行光学切片	146
IV. 共聚焦体积测量中的误差估计	152
V. 共聚焦显微镜在体积测量中的局限性	154
参考文献	160

10. 利用共聚焦显微镜对吞噬作用进行定量分析

George F. Babcock and Chad T. Robinson

I. 修订	163
II. 利用共聚焦显微镜对吞噬作用进行定量分析	165
III. 调理素和受体	166
IV. 测量吞噬作用的方法	166
V. 选择恰当的吞噬颗粒	167
VI. 细菌的荧光标记	168
VII. 仪器	168