

荧光探针技术

YINGGUANG TANZHEN JISHU

主编/黄晓峰 张远强 张英起



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

荧光探针技术

YINGGUANG TANZHEN JISHU

黄晓峰 张远强 张英起 主 编



人民军医出版社

People's Military Medical Press

北 京

图书在版编目(CIP)数据

荧光探针技术/黄晓峰,张远强,张英起主编. —北京:人民军医出版社,2004.5
ISBN 7-80194-133-0

I. 荧… II. ①黄…②张…③张… III. 荧光-探针 IV. TH776

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 091164 号

策划编辑:姚 磊 加工编辑:钱黎晓 责任审读:李 晨
版式设计:赫英华 封面设计:吴朝洪 责任监印:李润云
出 版 人:齐学进
出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店
通信地址:北京市复兴路 22 号甲 3 号 邮编:100842
电话:(010)66882586(发行部)、51927290(总编室)
传真:(010)68222916(发行部)、66882583(办公室)
网址:www.pmmp.com.cn

印刷:北京天宇星印刷厂 装订:京兰装订有限公司
开本:787mm×1092mm 1/16
印张:28.25 字数:873 千字
版次:2004 年 5 月第 1 版 印次:2004 年 5 月第 1 次印刷
印数:0001~3000
定价:78.00 元

版权所有 侵权必究
购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换
电话:(010)66882585、51927252

内 容 提 要

本书共分 24 章,对目前所见的荧光探针,分别以研究领域为主题进行了全面论述,对于有多种用途的荧光探针,则在不同章节进行侧重叙述。每章之中,按探针最相近的性质或应用分节论述。全书不仅进行了理论知识的论述,更突出了实用的特色,科技人员可根据书中提供的具体方法进行操作、独立完成实验。本书可供医学、生物学、材料科学等各领域的科技人员参考,并可作为研究生教材。

(说明:作者可提供本书的更详尽的图、表、彩图、各种探针的分子式、分子量、CAS 编号/名称、结构式等内容,需要者请与作者直接联系订购。联系方式:张远强,(710032)西安市第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室,电话 029—83374508,电子信箱 zhangyq@fmmu.edu.cn)

责任编辑 姚 磊 钱黎晓

主 编 简 介

黄晓峰 副教授,硕士研究生导师。1986年毕业于安徽蚌埠医学院医疗系,1991年第四军医大学组织胚胎学专业研究生毕业,1997年第四军医大学病理学专业博士研究生毕业。主要从事肿瘤病理学及其超微结构病理诊断。从1997年开始从事激光扫描共聚焦显微镜、荧光标记物在生命科学中的应用和研究等工作。熟练掌握荧光探针原理及其标记技术,以第一作者发表科研论文60余篇,参加编写专著5部。相应论文分别发表于《中华医学杂志》、《科学通报》、*Chin Sci Bulletin*, *Chin Sci J*, *World J Gastroenterology*, *American J Acupuncture*,《华人消化杂志》等核心期刊和源期刊。其中两篇被国际著名的《科学引文索引》(SCI)收录,其余被国外著名检索刊物《化学文摘》(CA)等收录,并被国内外学者引用30余次。“组织蛋白酶D和嗜铬颗粒素在人原发性肝细胞癌的表达意义”研究被收入1999年《中国肿瘤临床年鉴》,并在中国科协首届学术年会作报告。多项科研成果获奖。

张远强 教授,1974年毕业于第四军医大学军医系,1984年病理专业研究生毕业。博士研究生指导教师。现任组织学与胚胎学教研室主任,中国解剖学会组织学与胚胎学专业委员会副主任委员,中国解剖学科普专业委员会副主任委员,中国生理学会消化、内分泌、生殖、代谢专业委员会委员,全军解剖与组织胚胎学专业委员会副主任委员,陕西省解剖学会副理事长,美国生殖研究学会委员、《解剖学报》、《中国组织化学与细胞化学杂志》、《中华男科学》、《细胞与分子免疫学杂志》、《第四军医大学学报》、《军医大学学报》(英文版)编委。四度赴香港大学解剖学系和动物学系进修学习,并获Crouch Foundation奖学金。在香港大学学习期间对运动神经元疾病模型小鼠中枢神经系统神经肽的分布和发育生物学进行了系统研究,在国外发表论文数篇。近10年来,通过免疫组织化学和原位杂交技术对胰腺内生物活性物质及其受体的合成、分布、物质共存进行系统研究,该成果获国家科技进步三等奖。另在心血管系统调节肽、免疫器官肽能神经支配及与免疫细胞相互关系的研究中有一些新的发现,获得全军科技进步二等奖一项,三等奖五项。现正致力于生殖生物学的研究,以探讨新的生物活性物质对生殖细胞发育分化的影响,已取得重要结果,该研究受到国家自然科学基金、全军医药卫生“九五”、“十五”科研基金及国家计生委基金资助。20世纪80年代以来发表科学论文100余篇,被SCI收录18篇。主编及参编专著10部,其中两部在国外出版。

张英起 教授,博士研究生指导教师,1962年8月出生,1983年7月第四军医大学本科毕业,1991年7月获第四军医大学医学博士学位。现任第四军医大学生物技术中心主任、教授、博士研究生导师;中国医学生物技术协会理事;中国生物化学与分子生物学学会工业生化委员会委员;全军生物技术专业委员会委员;陕西省生物化学学会副理事长兼秘书长。长期从事生物化学与分子生物学、生物技术的教学与科研工作。发表学术论文50余篇。

前言

在生物医学和生命科学的研究中,光学探针起重要作用。在许多领域光学探针已经取代放射性同位素标记技术成为标准的研究工具,在检测速度和易用性方面都具有无可比拟的优点。随着激光扫描共聚焦显微镜在国内的引进和广泛应用,以及流式细胞仪和荧光显微镜在国内的普及,对各种荧光标记物的需求和了解日益迫切。而目前国内系统介绍荧光探针及其应用的书籍很少。本书从基本理论开始,系统论述了目前可获得的各种荧光标记物及其应用范围,并附有详细的参考文献,十分方便查阅。本书不仅提供了研究细胞骨架、细胞内各种重要细胞器的探针,而且对目前热门研究领域的活性氧、一氧化氮(包括一氧化氮合成酶)各种离子和离子通道、信号转导、受体研究、细胞凋亡、核酸和基因组学以及蛋白组学应用的探针都进行了详细介绍。对分子信标以及荧光原位杂交的应用和进展也进行了论述。还详细讨论了探针检测使用的超敏检测技术、荧光探针负载和校准技术。本书共分 24 章,分别以研究领域为主题进行论述,对于有多种用途的荧光探针,则在不同章节进行侧重叙述。每章之中,按探针最相近的性质或应用分节论述。本书不仅进行了理论知识的论述,更突出了实用的特色,使科技人员可根据书中提供的具体方法进行操作、独立完成实验。

作者可提供各章节更详尽的图、表和文中图片的彩图、各种探针的分子式、分子量、CAS 编号/名称、结构式等内容、与荧光探针染色标记密切相关的组织学和细胞生物学常用技术。联系方式:张远强,(710032)西安市第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室,电话 029—83374508,电子信箱 zhangyq@fmmu.edu.cn。

图片除注明者外,其余引自分子探针公司网上资料,在此深表感谢。

由于荧光探针发展迅速,每年都有大量新的探针和检测方法出现,限于作者学术水平,书中缺点、错误在所难免,希望广大读者批评指正,以利再版时修正。

编 者

目 录

第 1 章 荧光探针发展简史	(1)
第一节 荧光染色和荧光探针	(1)
第二节 染料的合成及荧光染料的早期应用	(2)
第三节 荧光探针在活细胞中的应用和发展	(3)
第四节 体内荧光探针	(3)
第 2 章 荧光技术概述	(4)
第一节 荧光产生过程	(4)
第二节 荧光光谱	(4)
第三节 荧光检测	(5)
第四节 荧光团的荧光输出量	(6)
第五节 荧光的环境敏感性	(7)
第 3 章 荧光探针的性质及滤光片的选择	(9)
第一节 荧光探针的性质	(9)
第二节 滤光片的选择	(11)
第三节 荧光抗衰减剂的选择	(11)
第 4 章 荧光探针及其染色技术	(13)
第一节 荧光探针负载(染色)原则及注意事项	(13)
第二节 常用的染色方法	(15)
第三节 常用荧光探针的染色方法	(16)
第四节 荧光探针的校准	(17)
第 5 章 测定细胞活性的荧光探针	(19)
第一节 细胞活性和细胞毒性检测	(19)
第二节 活细胞探针	(21)
第三节 死细胞探针	(23)
第 6 章 膜荧光探针	(25)
第一节 膜脂和膜探针	(25)
第二节 膜流动性测定	(26)
第三节 荧光基团标记的磷脂	(26)
第四节 阴离子膜探针	(31)
第五节 阳离子膜探针	(36)
第六节 其他非极性和双亲性膜探针	(41)
第 7 章 细胞器荧光探针	(45)
第一节 线粒体探针	(45)
第二节 溶酶体、酵母菌液泡和其他酸性细胞器的探针	(53)

第三节	内质网和高尔基复合体探针	(59)
第 8 章	Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 和其他金属离子荧光探针	(64)
第一节	Ca^{2+} 测定	(64)
第二节	紫外光激发的荧光 Ca^{2+} 探针	(66)
第三节	可见光激发的荧光 Ca^{2+} 探针	(69)
第四节	荧光 Ca^{2+} 探针交联物	(76)
第五节	水母素(Aequorin): 一种生物性发光 Ca^{2+} 探针	(78)
第六节	荧光 Mg^{2+} 探针	(80)
第七节	Zn^{2+} 和其他金属离子荧光探针	(81)
第八节	螯合剂、校准缓冲液、离子载体、细胞负载试剂	(86)
第 9 章	Na^{+} 、 K^{+} 、 Cl^{-} 和其他离子探针	(93)
第一节	荧光 Na^{+} 和 K^{+} 探针	(93)
第二节	Cl^{-} 、磷酸根、亚硝酸根和其他阴离子检测	(96)
第 10 章	pH 荧光探针	(103)
第一节	pH 探针概述	(103)
第二节	近中性 pH 应用的探针	(104)
第三节	酸性 pH 使用的探针	(108)
第四节	pH 探针交联物	(110)
第 11 章	酶底物	(114)
第一节	酶底物及其参考标准	(114)
第二节	糖苷酶检测	(119)
第三节	代谢磷酸酯(盐)和多磷酸酯(盐)酶的检测	(129)
第四节	肽酶和蛋白酶检测	(135)
第五节	氧化酶底物,包括 Amplex Red 试剂盒	(143)
第六节	其他酶底物	(147)
第 12 章	活性氧和一氧化氮探针	(152)
第一节	活性氧和一氧化氮	(152)
第二节	活性氧的产生和检测	(155)
第三节	一氧化氮研究探针	(163)
第 13 章	信号转导探针	(167)
第一节	信号转导概述	(167)
第二节	钙调节研究试剂	(167)
第三节	蛋白激酶、蛋白磷酸酶和核苷酸结合蛋白探针	(169)
第四节	脂类代谢和信号转导的探针	(177)
第 14 章	入胞作用、受体和离子通道探针	(186)
第一节	追踪受体结合、入胞作用和出胞作用的探针	(186)
第二节	神经递质受体探针	(202)
第三节	离子通道和载体探针	(206)
第四节	二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)试剂光转化的荧光探针	(209)
第 15 章	荧光原位杂交技术的原理及应用	(211)

第一节	荧光原位杂交原理	(211)
第二节	荧光原位杂交的发展	(212)
第三节	荧光原位杂交的优点	(213)
第四节	荧光原位杂交的应用	(214)
第五节	荧光原位杂交的荧光探针	(231)
第六节	荧光原位杂交的特殊需要	(231)
第七节	荧光原位杂交展望	(234)
第 16 章	细胞形态和流体测量的荧光示踪剂	(237)
第一节	示踪剂的选择	(237)
第二节	进行长时间细胞标记的膜通透性反应性示踪剂	(238)
第三节	极性示踪剂	(241)
第四节	荧光亲脂性的示踪剂	(248)
第五节	荧光和生物素化的葡聚糖	(252)
第六节	进行示踪的 FluoSpheres 和 TransFluoSpheres 微球	(257)
第七节	蛋白质交联物	(261)
第 17 章	超敏检测技术	(264)
第一节	检测方法概述	(264)
第二节	酪胺酰胺信号放大(TSA)技术	(267)
第三节	酶标记荧光(ELF)信号放大技术	(271)
第四节	藻胆蛋白	(276)
第五节	荧光微球	(285)
第 18 章	笼锁化合物探针	(290)
第一节	笼锁基团及其光解作用	(290)
第二节	不同用途的笼锁探针	(292)
第三节	笼锁化合物探针的实验方法	(296)
第 19 章	细胞骨架蛋白荧光探针	(298)
第一节	细胞骨架的概念、结构和作用	(298)
第二节	细胞骨架荧光探针	(304)
第三节	微管蛋白和其他细胞骨架蛋白探针	(309)
第 20 章	细胞凋亡的荧光检测方法	(314)
第一节	用核酸染料进行凋亡研究	(314)
第二节	用 ChromaTide 核苷酸检测 DNA 链断裂	(316)
第三节	使用 Annexin V 交联物进行凋亡分析	(317)
第四节	基于蛋白酶活性的凋亡分析方法	(319)
第五节	使用线粒体染料进行凋亡分析	(321)
第六节	使用自由基探针进行凋亡分析	(321)
第七节	使用离子探针进行凋亡分析	(322)
第八节	使用酯酶底物进行凋亡分析	(322)
第九节	测定 ATP:ADP 比率的凋亡分析方法	(323)
第十节	针对细胞凋亡不同阶段的检测方法	(323)

第 21 章 核酸检测和基因组学技术使用的荧光探针	(326)
第一节 核酸染料	(326)
第二节 寡核苷酸和核酸的标记	(339)
第三节 溶液中核酸的检测和定量	(348)
第四节 在电泳凝胶和毛细管进行核酸检测和定量	(353)
第五节 核酸杂交的检测	(358)
第六节 细胞核和染色体复染剂和 Nissl 染料	(372)
第七节 DNA 结构、DNA 结合和 DNA 损伤分析	(376)
第 22 章 蛋白质检测和蛋白组学技术应用的荧光探针	(381)
第一节 蛋白质检测概述	(381)
第二节 溶液中蛋白质的定量和选择性纯化	(381)
第三节 在凝胶中、印迹上和毛细管电泳中检测总蛋白的氨基酸组成	(386)
第四节 在凝胶中和印迹上特殊蛋白质检测的多元蛋白组学	(394)
第五节 进行肽分析、序列分析和合成的试剂	(403)
第六节 荧光探针在蛋白质研究中的应用	(404)
第 23 章 激光扫描共聚焦显微镜荧光探针的选择和应用	(409)
第一节 概述	(409)
第二节 激光扫描共聚焦显微镜常用的荧光探针	(409)
第三节 激光扫描共聚焦显微镜中荧光探针的使用	(412)
第 24 章 钙荧光探针负载、校准及其应用	(418)
第一节 概述	(418)
第二节 荧光钙探针负载和校准方法	(418)
第三节 荧光钙探针高时间空间分辨率成像	(428)
主要参考文献	(431)

乙醇中的荧光量子产率为 0.97, 荧光黄在水中的荧光量子产率为 0.65。而许多吸光物质的荧光量子产率很低, 不能产生荧光。因为这些物质吸收了发光的能量后, 再把这部分能量释放出来时, 大多用于同类分子或其他分子碰撞时的消耗, 以热能的形式释放, 因此无荧光发射。

有机化合物分子中具有 π 电子共轭结构者, 其荧光效率随着 π 电子共轭程度的增加而增大, 所发生的荧光光谱也将向长波长方向移动。任何有利于提高 π 电子共轭程度的结构改变, 都能提高荧光效率, 或使荧光波长长移。荧光物质的分子结构, 具有刚性结构和平面结构的 π - π 共轭体系。分子不会以 C-C 单键自由旋转(刚性), π - π 共轭体系必须是共平面的, 否则无法形成大的共轭体系。在共轭体系中处于激发态的 π 电子有宽广的离域(π 电子的活动度)范围, 其在激发态时具有一定的稳定性, 能够维持 10~8s, 为使能量向荧光转化提供必要的时间。非荧光染料虽然也有 π - π 共轭体系, 但不具备刚性

结构和共平面的 π - π 共轭体系, 因此不发光。

四、荧光探针

在生物染色剂中, 有一类可被紫外线或蓝紫光(短波长光)激发而发射荧光的染料, 称为荧光染料(荧光色素), 现在应用的一些染料也可被长波长光线激发, 这些荧光色素常统称为荧光探针。常用的荧光染料大多数属于吖啶类, 如吖啶橙、吖啶黄、罗丹明、荧光黄钠等, 还有金胺-O、樱草素等。按其化学反应性可将荧光染料分为三类。①碱性荧光染料: 含碱性助色团, 在酸性溶液中电离, 荧光色离子为阳离子。吖啶类染料如吖啶黄能与 DNA 和 RNA 结合而染色。主要是嵌入 DNA 的双螺旋结构。溴化乙啶也是通过嵌入 DNA 而染色, 在紫外线照射下发红色荧光。②酸性荧光染料: 含有酸性助色团, 在碱性溶液中电离, 荧光色离子为阴离子。③中性荧光染料: 由酸性荧光染料和碱性荧光染料混合而成的一种复合染料。

第二节 染料的合成及荧光染料的早期应用

染料最早是应用在丝、麻、棉等纺织品的印染上, 我国古代自黄帝时代到周朝初期(公元前1122~前225年)已相当发达。此时人类在染色剂和染色方面已经积累了一些知识。在 1714 年, Leeuwenhoek 首先应用天然染色剂研究肌肉组织, 用番红花九浸染切片, 得到了较好的结果。当时人们使用的全是从动植物和矿物中提炼的天然染料如靛青、朱砂、胭脂红等。1856 年, William Perkin 首先合成了一种煤焦油染料—苯胺紫(mauve, aniline purple)。从此开始了人工合成染料的时代。此后, 一些化学家采用 Perkin 的方法, 以氟化苯胺作原料, 相继合成了其他很多染料。1859 年合成了蔷薇苯胺(品红), 也称为复红。随后又合成了副品红、甲紫或龙胆紫、结晶紫、甲基绿、孔雀绿、亮绿、藏红 O、亚甲蓝、倍花青和各种偶氮染料(如碱性棕)。随后, 这些染料逐渐商品化并应用于组织标本、血液标本、细菌标本的染色, 新的染色方法随之建立。

这个时期生产的具有荧光性的染料, 包括氧杂蒽和吖啶(氧杂蒽的衍生物)。派若宁 Y、罗丹明 B、荧光黄、曙红 Y、赤藓红等, 都是很有名的吖啶类染料。一些早期的吖啶类染料, 有碱性染革黄棕、吖啶黄、吖啶橙、吖啶黄素等。有些染料, 如金胺 O、亮磺黄素、中性红和副品红等, 来源于其他试剂。

尽管 20 世纪初就有很多荧光探针可供使用, 但

人们真正用过的却很少。组织学家、细胞学家和细菌学家喜欢染色能力很强的红色、蓝色和绿色染料, 而这些染料在溶液中大多没有荧光或荧光很弱。只有派若宁 Y 和曙红 Y 等红色染料是例外。吖啶类染料通常把细胞染成黄色, 因而不大常用。碱性品红(含有副品红和品红碱的混合物)在 1863 年被 Waldeyer 引进组织学研究以后, 就成为—种重要的细胞核染料, 它对于细菌学, 特别是对于用以证明结核杆菌这类耐酸微生物体的 Ziehl-Neelsen 法的发展起过重要影响。甲紫是 Weigert 和 Ehrlich 分别在 1881 年和 1882 年引入微生物技术中的, 它在 1884 年就成了 Gram 染色液的主要成分。

直到荧光显微镜研制 20 多年后的 1930 年代初期, 吖啶类和其他荧光探针才用于固定细胞和组织的荧光显微术。Krause 的《显微技术大全》收录了其他很多染料, 但对吖啶类染料却未提及。这部在其他方面都很有参考价值的著作中, 关于荧光显微镜的章节, 也只提到了其在观测组织切片自身荧光中的应用。当时的显微镜学家还没有认识到荧光探针能提高染色组织的观察灵敏度和清晰度。

虽然荧光探针通常被用于固定组织和细胞的染色, 但在其他方面也得到应用。人们知道, 在水溶液中, 荧光黄会产生很强的黄绿色荧光, 即使用水稀释到 16×10^{-6} 倍, 其钠盐仍可产生浅绿色的荧光。

Ehrlich 用它来显示眼内液体的流动。1906 年,荧光素在美国成为第一个用于地下水示踪的荧光探针。

第三节 荧光探针在活细胞中的应用和发展

1885 年, Ehrlich 用亚甲蓝作为第一个重要的活体染料,并阐明了它对神经组织的亲和性。吖啶染料是治疗锥虫病的有效药物。Ehrlich 用吖啶黄素对付老鼠体内的这种原生动物,并取得显著效果。这种染料也因其能影响锥虫而被称为“锥黄素”。显微镜学家用明视野显微镜观察了这类染料和微生物体的结合。Provazek 把各种荧光探针和药物(如萤光黄,曙红,中性红,奎宁等)加到纤毛虫的培养液中,并用荧光显微镜观察了细胞的染色荧光。这种实验方法的基本目的是把各种类型的物质(不管是染料还是无色药物)引入细胞,假定它们服从一定的分布规律并在一定的条件下富集在细胞的特定成分中,那么它们在荧光显微镜的暗视野中就可以突出显示细胞的部分结构。1914 年,荧光探针引入荧光显微术中,标志着实验细胞学向前迈了一大步。Provazek 首次描述了活体荧光探针。以前,曾有人用活体染料,包括荧光探针,实验原生动物,但只限于用明视野显微镜观察。1932 年

匈牙利药物学家把几种不同的荧光探针注入预先感染了锥虫的啮齿动物体内,创立了活体荧光探针技术。荧光显微镜下的血涂片观察表明,染料和核酸及带血锥虫的基本部分有特异结合。20 世纪 30 年代由于对化学疗法特别感兴趣,人们作了各种努力,试图确定染料在什么位置和动物及人体内的疟原虫结合。人们在荧光显微镜下发现,在所实验的各种荧光探针中,米帕林(奎时因,quinacrine,即阿的平)在注射后的 10 min 内能被循环淋巴液选择吸收。把吖啶黄素加到成纤维细胞培养液中,在显微镜下可看到,实验浓度下它能阻止细胞的分裂。Reynolds(1985)曾用荧光吖啶碳花青染料标记脂蛋白,在体外研究动脉粥样硬化形成过程中脂蛋白的代谢。通过这些研究,人们明白某些氨基吖啶能优先与细胞核成分结合。对这种结合机制的研究,导致了染料对核酸的亲合力的发现。这种强相互作用已为体外及低 pH 区固定细胞中的纯化核酸所阐明。

第四节 体内荧光探针

在 Ehrlich 阐明荧光黄能示踪眼内液体的流动之后, Thiel 将裂隙灯显微镜加以改进,以观察眼内染料的荧光。荧光显微镜用的光源是经聚光镜会聚的透射光,对大多数不透明的活器官标本无法观察。1929 年, Ellinger 和 Hirt 对荧光显微镜作了重大改进,在这种荧光显微镜中,光源的垂直入射光直接通过侧边的透光管,经物镜会聚于样品上,发射的荧光沿透光管返回到观察者眼中。别的基本部件还有相应的滤光片和一个浸在水中的物镜。这台被称作“体内活体显微镜”的仪器,可以认为是第一台落射荧光显微镜。他们用这种显微镜观察了动物体内注入荧光探针后的肾脏的微循环。荧光黄和吖啶黄素的稀溶液被用于研究尿液形成的生理学。其他很多科学家对体内活体荧光显微镜产生了兴趣,并实验了各种荧光探针,如亮碱性染革黄棕 G、吉耳曼宁 S、樱草灵黄、rheonin A、噻唑黄、硫黄素(thiofla-

vine)等。1930 年,人们用这种荧光新技术观察了活体皮肤、肝脏、肾脏、结膜和肾上腺。为满足生物学研究的需要,活体荧光探针必须在等渗、无毒和无淬灭剂条件下使用。近年来,由于现代落射荧光显微镜、显微荧光扫描仪、高灵敏摄像机、数据实时采集器等现代化仪器和方法的应用,微循环的体内活体显微术又重新受到欢迎。有人在将低密度脂蛋白(LDL)进行酰化,然后与一种荧光探针二十八烷基吖啶碳花青结合,当肝窦内皮细胞摄取这种 LDL 后,便可用荧光显微镜进行鉴定。研究人员将荧光标记的 LDL 经门静脉注入大鼠体内。1 周后处死大鼠,取出肝脏标本进行常规组织学检查,并用大鼠内皮细胞单克隆抗体进行免疫组织化学染色。结果发现:在正常肝实质组织中,肝窦内皮细胞出现荧光,而大血管内皮未出现荧光染色,说明仅肝窦内皮细胞能摄取乙酰化的 LDL。

第2章 荧光技术概述

荧光探针使研究人员可以高度敏感性和选择性地检测复杂生物分子包括活细胞中的特定成分。本章

概述了荧光技术的基础内容。

第一节 荧光产生过程

某些称为荧光团或荧光染料的分子(通常为芳烃杂环聚合物, polyaromatic hydrocarbons or heterocycles)荧光的产生经过三个步骤。即激发、激发态寿命和荧光发射。荧光探针是设计用来进行生物标本特定区域内定位或对特定刺激反应的荧光团。荧光探针和其他荧光团荧光产生过程如下, 见图 2-1。

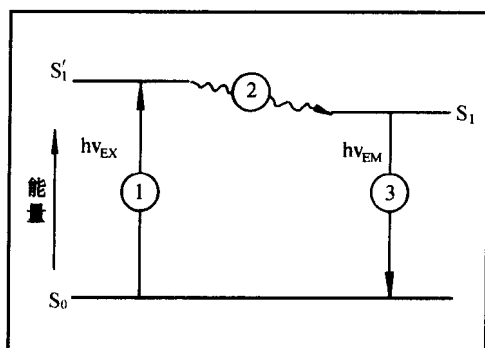


图 2-1 荧光产生 Jablonski 模式图

注: $h\nu_{EX}$ 激发能量; $h\nu_{EM}$ 发射能量

一、激发

光子能量 $h\nu_{EX}$ 由外部光源如白炽灯、激光器

提供, 由荧光团吸收后产生激发性电子单重态 (singlet state, S_1')。这一过程是荧光与化学发光的区别, 化学发光的激发态是由化学反应造成的。

二、激发态寿命

激发态存在的时间有限, 一般为 $(1 \sim 10) \times 10^{-9}$ s。在此期间, 荧光团发生构象变化, 并可能受到分子互相作用的影响。这个过程有两种重要结果。首先, S_1' 的能量部分散失, 产生一种弛豫的单激发态 (relaxed singlet excited state, S_1), 从此处产生荧光发射。随后, 并非所有最初通过吸收作用激发的分子都能通过荧光发射返回基态 (S_0)。其他过程如碰撞引起的淬灭、荧光能量传递 (转移) 和系统间过渡也可使 S_1 减少。荧光量子产率是发射的荧光光子数与吸收光子数的比率。

三、荧光发射

光子能量 $h\nu_{EM}$ 发射后, 返回荧光团基态 S_0 。由于在激发态寿命过程中能量损耗, 光子能量降低, 因此波长比激发态光子 $h\nu_{EX}$ 更长。用 $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$ 表示的能量或波长的不同称为 Stokes 移位。Stokes 移位是荧光技术敏感性的基础, 因为使发射光子可在较低的背景下检测, 可与激发光子清楚分开。

第二节 荧光光谱

完整的荧光过程是循环的。除非荧光团在激发态被不可逆地破坏, 即一种称为光漂白的现象, 否则同样荧光团可被重复激发和检测。对于溶液中的多原子分子, 图 2-1 的 $h\nu_{EX}$ 和 $h\nu_{EM}$ 表示的不连续的电子跃迁, 用等同的光谱代替, 分别称为荧光激发光谱

和荧光发射光谱。在同时检测两个或多个不同荧光团的应用中, 这些光谱的带宽 (bandwidth) 是非常重要的参数。除极少数例外, 单一荧光团在稀溶液中的荧光激发光谱与它的吸收光谱一样。在同样条件下, 荧光发射光谱不依赖于激发波长, 而是依赖于激



发态寿命过程中激发能量的部分损耗。发射强度与在激发波长的荧光激发光谱的振幅成正比(图2-2)。

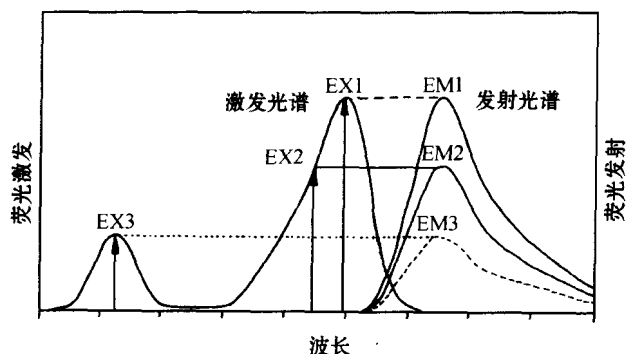


图2-2 荧光发射强度与激发光谱的振幅关系

注:三种不同波长(EX 1, EX 2, EX 3)荧光团的激发不改变发射图形,但产生荧光发射强度(EM 1, EM 2, EM 3)的变化,与激发光谱的振幅对应

第三节 荧光检测

一、荧光仪器

从前面的讨论可以看出,荧光检测系统四种基本要素包括:激发光源;荧光团;将发射光子与激发光子分离的波长滤片;记录发射光子和产生记录输出的检测器,可记录为电信号或摄影图像。不论如何应用,这四种要素的兼容性是进行最优化荧光检测的基础。

荧光仪器主要有四种类型,每种都可提供不同的信息。分光荧光计(spectrofluorometer)和微孔板读数仪(microplate reader)测定大量样品(μl 至 ml)的平均特性。荧光显微镜可分辨出直径 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ 以下目标的二维或三维空间结构。荧光扫描仪(fluorescence scanner)可分辨较大目标如电泳凝胶、印迹和层析图(chromatogram)的二维空间结构。流式细胞仪(flow cytometer)测定流体中每个细胞的荧光,可在大样品中进一步分类识别和定量。如细胞的分选和定量。

每种仪器都可产生不同的测定假象,但可以满足荧光探针的不同需要。例如,在荧光显微镜检查时,光漂白是常见的问题,但在流式细胞测定时并不是主要干扰,因为单个细胞在激发光束的时延(dwelling time)很短。

二、荧光信号

荧光强度的定量依赖于与吸光率同样的参数,Beer-Lambert定律定义为摩尔消光系数、光路长度(optical pathlength)和溶质浓度的乘积,并依赖于荧光量子产率和染料、激发光源强度、仪器的采集性能。在稀溶液或悬液中,荧光强度与这些参数成正比。Kubista等(1994)报道当样品吸光率在 1cm 光路长度超过约 0.05 ,则关系变为非线性,测量就会被人工假象扭曲,如自身吸收(self-absorption)和内部滤波效应(inner-filter effect)。因为荧光定量依赖于仪器,因此在不同的时间或使用不同的仪器配置时,必须用荧光参考标准进行校准(Schwartz和Fernandez-Repollet, 1994; Siskin, 1989)。为满足这些需要,可使用荧光显微镜和流式细胞仪校准的高精确度荧光微球参考标准(参考本书相关部分),还有一系列用于荧光分光光度计校准的现成的荧光标准溶液。

分光荧光计相当灵活,可测定激发和发射波长的连续变化。激光扫描显微镜和流式细胞仪则需要单一固定波长激发的探针。在现代仪器中,激发光源通常是氩离子激光器的 488 nm 谱线。如图2-3所示,荧光发射信号(S1)与Rayleigh散射激发光

(EX)很容易通过大的荧光 Stokes 移位(即 A1 和 E1 的间隔)而分开。用一种以上荧光探针标记的生物样品,其信号分离问题更复杂。另外的光学信号,如图 2-3 中的 S2,可能是背景荧光或来自第二种荧光探针的信号。

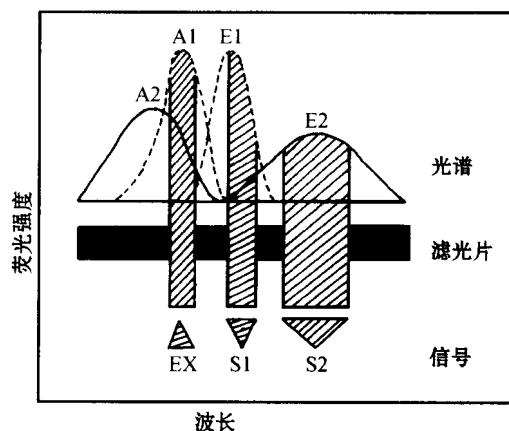


图 2-3 混合荧光团的荧光检测

注:在 A1 和 A2 重叠吸收带的激发(EX)产生两种发射光谱分别为 E1 和 E2 的荧光信号;光学滤片分离定量的发射信号 S1 和 S2

三、背景荧光

荧光检测的敏感性可受到背景信号的严重干扰,可能是来源于样品的固有成分。在酵母菌细胞和植物细胞中,可看到红色的叶绿素荧光。这种荧光定义为自发荧光。另外,某些试剂,尤其是戊二醛固定剂可能是自发荧光的来源,但经氢硼化物处理后,其自发荧光可降低或消除。未结合的或非特异性结合的探针也可产生背景荧光,这种荧光定义为试剂背景。通过选择降低 E2 相对于 E1 的透射的滤片可将自发荧光的检测降至最低,也可通过选择

具有更长吸收和发射波长的荧光探针来降低背景荧光,通过时间分辨发光技术(见第 17 章超敏检测技术)也可消除自发荧光。尽管缩窄荧光检测带宽可增加 E1 和 E2 分辨率,但也影响检测的总体荧光强度。大多数细胞、组织和生物液的自发荧光引起的信号失真,通过使用超出自发荧光范围的长波长激发光(500 nm 以上)激发可消除自发荧光。为避免短波长自发荧光的干扰,常选用 Cy5 的长波长进行激发。而且,在更长波长,致密介质如组织的光散射大大降低,激发光的穿透性更大。

四、多色荧光标记实验

多色标记实验可使用两种或更多的探针同时检测不同的生物化学功能。该技术主要应用包括流式细胞术、DNA 测序、荧光原位杂交、荧光显微镜检查。只有达到多种发射光谱的最大分离(图 2-3 的 E1 和 E2),才能容易进行信号分离和数据分析。因此,窄带宽的荧光团,如 Alexa Fluor 染料和 BODIPY 染料,尤其适合多标记使用(Metzker 等,1996)。多色荧光标记时,染料的最佳结合应在一致的激发波长显示强的光吸收,而发射光谱则出现很好的分离(图 2-3)。但令人遗憾的是,不容易发现具有大的消光系数光吸收和大 Stokes 移位相结合的染料(Haugland,1990)。

五、比率测定

在某些情况下,如钙探针 fura-2、indo-1, pH 探针 BCECF、SNARF、SNAFL,荧光离子探针的游离和离子结合形式,具有不同的发射或激发光谱。使用这种探针时,光学信号(图 2-3 的 S1 和 S2)的比率,可用来监测结合平衡并计算离子浓度。比率测量可消除光漂白、探针负载和留存变化以及设备因素(照明稳定性)引起的数据失真(Silver,1998)。进一步讨论可参考离子探针的负载和细胞内校准部分。

第四节 荧光团的荧光输出量

一、不同染料的比较

目前作为荧光探针使用的荧光团提供的波长范围、Stokes 移位和光谱带宽可满足仪器的需要,并可进行多色荧光标记实验。特定荧光团的荧光输出依赖于吸收和发射光子的功效,以及经受重复激发/发射循环的能力。吸收和发射功效大多数根据吸收的

摩尔消光系数(ϵ)和荧光量子产率(QY)进行量化。在特定的环境条件下,二者都是常数。在单一波长(通常为最大吸收波长) ϵ 值特异的,而 QY 是全荧光光谱图形的总光子发射的量度。每个染料分子荧光强度与 ϵ 和 QY 的乘积成正比。目前常用的重要荧光团中,这些参数的范围如下: ϵ 5 000~200 000 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, QY 0.05~1.0。藻胆蛋白如 R-藻



红蛋白(phycoerythrin),每个蛋白具有多个荧光团,因此比低分子质量荧光团具有更大的消光系数($2 \times 10^6 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

二、光漂白

在高强度照射条件下,激发荧光团的不可逆破坏或光漂白成为限制荧光检测能力的因素。Song等(1996)已经对荧光黄光漂白的几种光化学反应途径进行了详细的描述。某些途径包括邻近染料分子之间的反应,在标记生物标本的反应比在游离染料的稀溶液中的反应更复杂。在所有情况下,光漂白都起源于三重激发态,是从单重态(singlet state) (S_1' ,图2-1)经由称为系统间过渡(intersystem crossing)的激发态过程产生的。

克服光漂白最有效的方法是使检测敏感性最大化,降低激发强度。检测敏感性通过弱光检测设备如CCD摄像机、高数值孔径物镜和与满意的信号分离兼容的最宽的发射带通滤片,可使检测敏感性增强。替换实验中光不稳定性荧光团也有效果。Alexa Fluor 488染料是一种重要的荧光黄替代物,其光稳定性比荧光黄显著提高,而且可与标准荧光黄滤片兼容。抗衰减剂如SlowFade和ProLong产品(见本书第3章第三

节荧光抗衰减剂的选择)也可用来降低光漂白作用,但通常不适合活细胞。一般情况下,要预测这些对策的必要性和有效性很困难,因为光漂白速度与荧光团环境有关(Song等,1995;Benson等,1985)。

三、信号放大

最直接的增强荧光信号的方法是增加可检测荧光团的数量。荧光信号可使用以下方法放大:使用卵白素-生物素或抗体-半抗原二级检测技术;酶标二级检测试剂与荧光底物结合(Chao等,1996;Larison等,1995);使用含有多个荧光团的探针如藻胆蛋白和FluoSpheres荧光微球(参见本书相关章节);其他超敏检测技术(见第17章)。

通过单纯增加探针浓度的方法往往达不到预期的效果,反而常造成探针化学和光学性质的显著改变。重要的是要注意通过大量渗透性方法负载的探针,有效细胞内浓度通常比细胞外孵育的浓度高10倍以上。而且,蛋白质或膜标记的增加最终可导致蛋白质沉淀或膜通透性的极大改变。每个蛋白质用多于4~6个荧光团标记,其特异性降低,结合的亲和力也降低。此外,重度标记后,荧光团的荧光反而会因为自身淬灭而下降。

第五节 荧光的环境敏感性

荧光光谱和量子产率通常比吸收光谱消光系数更依赖于环境。例如,一个荧光黄标记与蛋白质结合可使荧光黄的QY降低约60%,但 ϵ 仅降低约10%。在两个邻近荧光团或荧光团与周围环境其他成分的相互作用可产生环境敏感的荧光。

一、荧光团-荧光团相互作用

荧光淬灭可定义为一种降低荧光量子产率而不改变荧光发射光谱的双分子过程,可能是由于瞬时激发态相互作用引起(碰撞淬灭, collisional quenching)或由无荧光基态荧光团的形成造成。自身淬灭是一个荧光团被另一个荧光团淬灭,因此常在高负载浓度发生或标记密度过高时出现。DQ底物(见本书第11章酶底物部分)是重度标记的高度淬灭的生物高聚物(biopolymer),Jones等(1997)发现DQ底物在酶裂解后荧光强度大大增强。Chen等(1988)进行的羧基荧光黄自身淬灭研究显示,淬灭的机制包括向无荧光二聚体产生的能量传递(转移)。荧光共振能量传递(fluorescence resonance en-

ergy transfer, FRET)是一种高度距离依赖的激发态相互作用,此处一个荧光团的发射与另一个荧光团的激发耦合。某些激发的荧光团相互作用形成激发态二聚体(excimer),使发射光谱特征改变。因为它们都依赖于邻近荧光团的相互作用、自身淬灭、FRET和激发态二聚体形成,因此可被用来监测大量分子装配或破碎的过程,如膜融合、核酸杂交、配体受体结合、多肽水解。

二、其他环境因素

影响荧光性质的其他环境因素很多,最常见的包括三方面:溶剂极性(溶剂包括细胞内部区域、蛋白质、膜和其他生物分子结构);淬灭剂的接近度(proximity)和浓度;水性介质的pH。荧光光谱对溶剂可能有强依赖性。这种特点在使用具有大激发态偶极子力矩(excited-state dipole moment)的荧光团时常可观察到,在极性溶液中可导致荧光光谱移位至更长波长。代表性荧光团包括氨基萘类(aminonaphthalenes),如氟硅酸钠(prodan)、badan和dan-