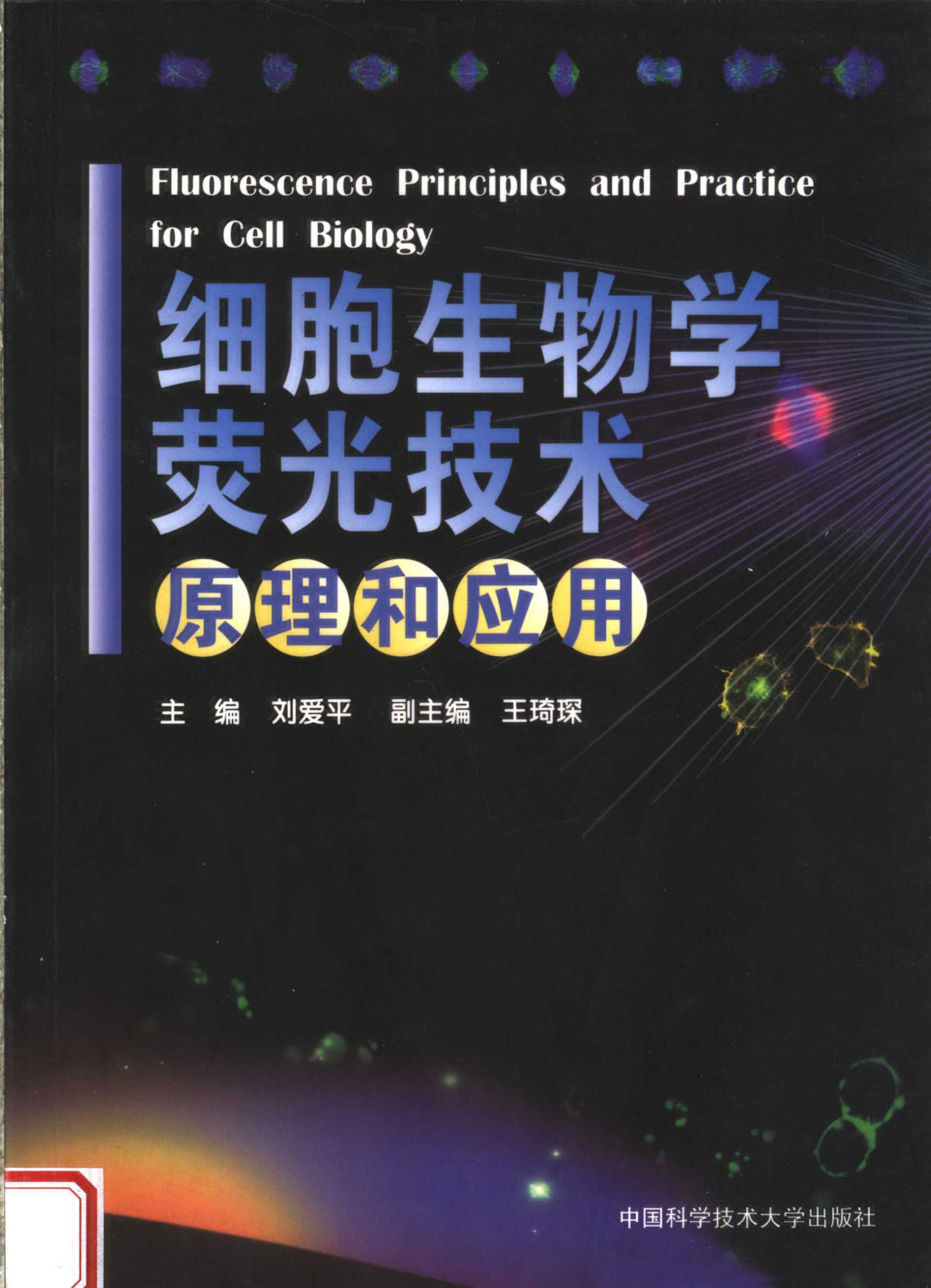




Fluorescence Principles and Practice
for Cell Biology

细胞生物学 荧光技术

原理和应用

主 编 刘爱平 副主编 王琦琛

中国科学技术大学出版社

Fluorescence Principles
for Cell Biology

细胞生物学 荧光技术 原理和应用

主 编 刘爱平

副 主 编 王琦琛

参编人员 郭 振 姚 展 郑晓东

张文锐 王黎丽 程联胜

陈俏俏 易启毅 赵 萍

何海辉

中国科学技术大学出版社

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. —合肥:中国科学技术大学出版社,2007.2

ISBN 978-7-312-02044-5

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(2007)第 012125 号

出版 中国科学技术大学出版社

安徽省合肥市金寨路 96 号,230026

网址:<http://press.ustc.edu.cn>

印刷 合肥现代印务有限公司

发行 中国科学技术大学出版社

经销 全国新华书店

开本 710 mm×960 mm 1/16

印张 20.75

插页 9

字数 466 千

版次 2007 年 2 月第 1 版

印次 2007 年 2 月第 1 次印刷

印数 1~3 000 册

定价 35.00 元

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;第三部分介绍了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。其中第一章、第二章、第三章、第五章、第十二章第一节、第十三章、第十四章的第二、第三节及第十七章由刘爱平编写;第六章、第十五章、第十九章及第二十一章由王琦琛编写;第四章、第十四章的第一节及第十六章由张文锐编写;第七章由姚展编写;第八章由郑晓东编写;第九章由郭振编写;第十章由易启毅编写;第十一章由程联胜和陈俏俏编写;第十二章的第二节由赵萍编写;第十八章由王黎丽编写;第二十章由何海辉编写。

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

2006.06

目 录

前 言	(I)
第一部分 基本知识	(1)
第一章 光的基本知识	(3)
一、光的本质	(3)
二、光的性质	(3)
三、光的吸收	(5)
第二章 荧光的基本知识	(6)
第一节 荧光的发光原理	(6)
一、荧光	(6)
二、荧光的发光原理	(7)
三、荧光色素及其大分子结构	(8)
第二节 荧光色素的性质	(9)
一、激发光波长和发射光波长	(9)
二、激发光谱和发射光谱	(10)
三、荧光强度	(12)
四、荧光寿命	(12)
五、荧光稳定性	(13)
六、荧光色素分子间的相互作用	(13)
七、荧光色素分子对环境的敏感性	(14)
八、荧光色素的分类	(14)
第三节 组织细胞的自发荧光与继发荧光	(15)
一、组织细胞的自发荧光	(15)
二、组织细胞的继发荧光	(17)
第四节 荧光的淬灭及抗淬灭	(18)
一、荧光的淬灭	(18)
二、荧光的抗淬灭	(19)
三、其他抗荧光淬灭方法	(22)
第五节 荧光光谱交叉干扰及消除	(22)
第三章 荧光染料(色素)的早期应用和发展史	(26)
一、染料的早期应用和发展	(26)

二、荧光染料(色素)的早期应用和发展	(27)
三、荧光染料(探针)在活细胞中的早期应用和发展	(28)
四、荧光染料(探针)在植物研究中的早期应用和发展	(29)
第四章 常用的荧光染料(探针)	(32)
第一节 细胞器荧光探针	(32)
一、线粒体荧光探针	(32)
二、溶酶体荧光探针	(34)
三、内质网荧光探针	(34)
四、高尔基复合体荧光探针	(36)
第二节 细胞骨架荧光探针	(37)
一、F-肌动蛋白荧光探针	(37)
二、G-肌动蛋白荧光探针	(39)
三、微管蛋白荧光探针	(39)
四、微管选择性的紫杉醇探针	(40)
第三节 研究钙调节及活性的荧光探针	(41)
一、钙调蛋白荧光探针	(41)
二、蛋白激酶C的荧光探针	(41)
三、钙离子的荧光探针	(42)
第四节 核酸荧光探针	(44)
一、透性核酸荧光探针	(44)
二、非细胞透性核酸荧光探针	(48)
第五节 其他荧光探针	(52)
一、D1和D5多巴胺受体荧光探针	(52)
二、表皮生长因子受体(EGF)荧光探针	(52)
三、甘氨酸受体荧光探针	(53)
四、组织胺受体探针	(53)
第五章 活体荧光材料——绿色荧光蛋白(GFP)及其衍生物	(57)
一、发现绿色荧光蛋白	(57)
二、绿色荧光蛋白的结构	(57)
三、绿色荧光蛋白的特性及优点	(59)
四、荧光蛋白的新进展	(61)
第六章 最新型荧光材料——量子点	(64)
一、量子点的定义及物理特性	(64)
二、量子点具有优良的光学特性	(66)
三、量子点的优点	(66)
四、量子点技术在生物领域中的应用	(66)

五、量子点技术的安全性	(69)
六、量子点技术的发展前景	(70)
第二部分 荧光色素(探针)在细胞生物学中的应用	(71)
第七章 荧光技术在细胞凋亡研究中的应用	(73)
第一节 细胞凋亡及其基本通路	(74)
一、细胞凋亡	(74)
二、细胞凋亡的基本转导通路	(75)
第二节 荧光显微镜对细胞凋亡的形态学观察	(78)
一、通过光学显微镜对凋亡细胞的形态学的观察	(78)
二、通过电子显微镜对凋亡细胞的形态学的观察	(78)
三、通过荧光显微镜对凋亡细胞的形态学的观察	(79)
四、通过某些特定分子在细胞凋亡时定位的变化对其进行荧光标记	(80)
第三节 凋亡调控分子的荧光标记在细胞凋亡研究中的应用	(80)
一、荧光显微镜在对 Survivin 及其剪接体参与的细胞凋亡研究中的 应用	(81)
二、荧光显微镜在促凋亡蛋白 RIP3 核质穿梭性鉴定中的应用	(85)
第四节 其他荧光技术在细胞凋亡研究中的应用	(87)
一、Caspase 活性的荧光检测	(87)
二、蛋白表达调控元件活性的荧光检测	(89)
第八章 流式细胞术在细胞生物学中的应用	(94)
第一节 检测细胞的特征	(94)
一、表型的分析	(94)
二、胞内蛋白的检测	(96)
第二节 检测细胞的增殖和凋亡状态	(101)
一、用 PI 染色法分析细胞的增殖和凋亡	(101)
二、检测细胞凋亡 PI 和 Annexin-V	(103)
第三节 定量检测可溶性蛋白质(CBA 技术)	(105)
第四节 纯化特定的细胞	(109)
一、原理	(109)
二、方法	(109)
三、预期结果	(109)
四、注意事项	(110)
第九章 荧光在细胞骨架研究中的应用	(111)
第一节 荧光技术在微丝骨架研究中的应用	(112)
一、概述	(112)

二、胃壁细胞酸分泌过程中的微丝骨架蛋白研究	(113)
三、材料与方法	(120)
第二节 荧光技术在微管骨架研究中的应用	(121)
一、概述	(121)
二、有丝分裂过程中微管形态与功能的研究	(123)
三、观察 Hela 细胞中微管和 ACA 蛋白的定位	(131)
第十章 荧光原位杂交	(132)
第一节 荧光原位杂交的基本原理与基本过程	(132)
一、荧光原位杂交的基本原理	(132)
二、荧光原位杂交的基本实验过程	(132)
三、FISH 技术新进展	(143)
第二节 荧光原位杂交的应用	(145)
一、基因定位	(145)
二、染色体物理图谱构建	(146)
三、染色体结构分析	(147)
四、染色体数目测定	(148)
五、研究染色体进化/比较基因组学	(148)
六、转基因的细胞学鉴定	(149)
七、基因表达分析和临床病毒学检测	(149)
第十一章 荧光在 HER2/ErbB2/p185 研究中的应用	(150)
第一节 用免疫荧光细胞化学的方法鉴定抗体与 p185 的结合特异性 ..	(151)
一、材料与方法	(151)
二、结果	(152)
第二节 EGFP 在 ErbB2 胞内区核定位信号研究中的应用	(152)
一、材料	(153)
二、方法	(154)
三、结果	(157)
第十二章 绿色荧光蛋白(GFP)在细胞分子生物学中的应用	(162)
第一节 绿色荧光蛋白(GFP)在动物细胞分子生物学中的应用	(162)
一、探测细胞的流程	(162)
二、确定细胞器的定位	(163)
三、研究细胞骨架	(163)
四、作为基因表达和细胞谱系的标记	(163)
五、研究蛋白质之间的相互作用和构象变化	(164)
六、研究细胞内信号传导	(164)
七、亚细胞动力学研究	(164)

八、研究细胞凋亡	(165)
九、检测细菌	(165)
十、转基因动物	(165)
第二节 绿色荧光蛋白(GFP)在植物细胞和分子生物学中的应用	(166)
一、植物细胞骨架研究	(166)
二、细胞器动力学和内膜运输	(167)
三、大分子运输和病毒在植物体内的运动	(168)
四、植物与微生物之间的相互作用	(169)
五、会发荧光的植物“哨兵”	(169)
六、GFP 在植物分子生物学研究中的应用	(169)
第十三章 免疫荧光细胞化学技术	(172)
第一节 免疫学基础知识	(172)
一、抗原、抗体的概念及抗原和抗体的关系	(173)
二、抗原的性质及种类	(173)
三、抗体的性质和种类	(175)
四、抗原与抗体的反应	(176)
第二节 免疫荧光细胞化学的原理	(176)
一、直接法	(177)
二、间接法	(177)
三、双重免疫荧光标记法	(178)
四、对照试验	(178)
第三节 荧光抗体的制备	(179)
一、FITC 标记抗体的方法	(179)
二、荧光抗体的保存	(181)
第四节 免疫荧光组织化学细胞和组织标本的制备	(181)
一、组织标本的取材	(181)
二、细胞和组织的固定	(182)
三、组织切片	(185)
四、玻片处理和涂胶	(187)
第五节 免疫荧光细胞化学染色方法	(188)
一、标本制作	(188)
二、荧光抗体染色方法	(188)
第六节 非特异性染色的消除方法	(191)
一、非特异性染色的主要因素	(191)
二、除非特异性染色的方法	(191)

第三部分 常用荧光检测仪器	(195)
第十四章 生物荧光显微镜	(197)
第一节 普通生物光学显微镜	(197)
一、显微镜的构造	(198)
二、显微镜的成像原理	(200)
三、显微镜的性能	(201)
四、显微镜的操作及注意事项	(203)
五、相差显微镜	(204)
六、微分干涉差显微镜	(205)
七、暗视野显微镜	(206)
第二节 生物荧光显微镜	(206)
一、荧光显微镜的分类及主要组成部分	(208)
二、荧光显微镜落射式照明原理	(210)
三、荧光显微镜的基本操作及注意事项	(211)
第三节 细胞遗传工作站	(213)
一、细胞遗传工作站的组成	(213)
二、细胞遗传工作站的应用	(214)
三、细胞遗传工作站的工作原理	(214)
四、基本操作	(214)
第十五章 激光扫描共聚焦显微镜	(222)
第一节 基本原理	(223)
第二节 主要部件	(224)
一、激光器	(225)
二、扫描器	(226)
三、荧光显微镜	(227)
四、计算机	(227)
第三节 操作步骤及注意事项	(228)
一、样品制备	(228)
二、基本观察步骤及仪器操作	(229)
三、获取 3D 图像	(230)
四、获取时间序列图像	(230)
第四节 主要用途	(231)
一、细胞物理和生物化学测定	(231)
二、激光扫描共聚焦图像分析及三维重组分析生物结构	(231)
三、动态荧光测定	(231)
四、荧光光漂白恢复——活细胞的动力学参数	(232)

五、胞间通讯研究	(232)
六、检测荧光共振能量转移	(232)
七、细胞膜流动性测定	(232)
八、笼锁-解笼锁测定	(233)
九、粘附细胞分选	(233)
十、细胞激光显微外科及光陷阱技术	(233)
十一、生物芯片(biochip)	(233)
第五节 LSM 510 META	(234)
一、LSM 510 META 的扫描模件	(234)
二、LSM 510 META 的优点	(234)
三、LSM 510 META 的操作过程	(236)
第六节 其他用途	(236)
一、FRAP/FLIP	(236)
二、FRET	(237)
第七节 应用于激光共聚焦的新技术	(239)
一、TIRFM	(239)
二、多扫描模块系统	(241)
三、弧光灯光源的圆盘扫描系统	(241)
第八节 双光子(多光子)激光扫描显微镜	(242)
一、单光子激光扫描共聚焦显微镜的局限	(242)
二、双光子(多光子)激光理论基础	(242)
三、双光子(多光子)激光成像原理	(243)
四、双光子共聚焦显微镜的优点	(243)
第九节 注意事项及维护保养	(244)
第十六章 活细胞显微成像技术	(245)
第一节 活细胞荧光工作站	(245)
一、荧光激发和显微成像系统	(246)
二、图像信号采集系统	(249)
三、环境控制系统	(249)
四、光损伤控制系统	(250)
五、计算机控制和信号处理系统	(250)
第二节 其他活细胞显微成像技术	(251)
一、全内反射显微镜技术	(251)
二、荧光相关光谱技术	(253)
三、荧光共振能量转移技术	(253)
第十七章 活体体内荧光成像技术	(255)

一、基本原理	(255)
二、基本组成	(256)
三、实验过程	(257)
四、系统特性	(258)
五、应用	(261)
六、发展前景	(263)
第十八章 流式细胞仪	(264)
第一节 概述	(264)
第二节 工作原理与基本构成	(266)
一、工作原理	(266)
二、基本构成	(266)
第三节 主要用途	(270)
一、细胞周期和 DNA 倍体分析	(270)
二、细胞凋亡与坏死的检测	(270)
三、染色体分析	(271)
四、细胞表面标志的检测	(271)
五、淋巴细胞亚群分析	(271)
六、胞内蛋白的检测	(271)
七、细胞的分选	(272)
第四节 检测样品的制备	(272)
一、直接标记细胞表面分子	(272)
二、检测细胞内信号分子	(272)
三、用 PI 单染检测细胞周期	(273)
四、样品制备的注意事项	(273)
第五节 仪器的基本操作步骤	(273)
一、FACS Calibur	(273)
二、FACS Aria	(274)
第六节 重要参数及意义	(275)
一、前向散射光(FSC)	(275)
二、侧向散射光(SSC)	(276)
三、荧光信号	(276)
四、补偿值	(277)
五、使用双色补偿质控样本,微调补偿	(278)
第七节 数据处理与分析	(278)
一、流式的实验数据主要有以下几种形式	(278)
二、数据分析	(280)

第十九章 荧光定量 PCR 仪	(281)
第一节 概述	(281)
第二节 基本原理	(282)
一、荧光定量化学原理	(282)
二、荧光定量 PCR 仪的光学原理	(284)
三、荧光定量原理	(285)
第三节 仪器介绍	(286)
第四节 样品制备及操作步骤	(289)
一、DNA 用量	(289)
二、TaqMan 探针法 PCR	(289)
三、SYBR Green I 荧光染料法 PCR	(290)
四、ABI Prism7000 SDS v1.0 软件操作	(290)
第二十章 荧光分光光度计	(292)
一、基本结构与原理	(292)
二、AMINCO-Bowman 扫描荧光分光光度计	(293)
三、基本操作	(296)
第二十一章 激光扫描成像仪	(298)
一、系统硬件组成及功能	(298)
二、工作原理及操作步骤	(298)
三、仪器参数	(299)
四、荧光样品的制备	(299)
附录 免疫细胞化学常用试剂及其配制方法	(301)
第一节 缓冲液	(301)
一、0.2mol/L (pH 7.4) 磷酸缓冲液 (phosphate buffer, PB)	(301)
二、0.01mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水 (phosphate buffered saline, PBS)	(302)
三、Karasson-Schwlt 磷酸盐缓冲液	(302)
四、0.5mol/L (pH 7.6) Tris-HCl 缓冲液	(303)
五、Tris 缓冲生理盐水 (Tris buffered saline, TBS)	(303)
六、Tris-TBS (PBS)	(303)
七、0.1mol/L (pH 7.4) 二甲胂酸钠缓冲液	(304)
八、几种常用的不同 pH 值缓冲液的配制表	(304)
第二节 固定剂	(306)
一、4% 多聚甲醛-0.1mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.3)	(306)
二、4% 多聚甲醛-磷酸二氢钠/氢氧化钠	(306)

三、Bouin 液及改良 Bouin 液	(307)
四、Zamboni(stefanini)液	(307)
五、PLP 液(periodate-lysine-paraformaldehyde fixative 过碘酸盐 -赖氨酸-多聚甲醛固定液)	(307)
六、Karnovsky 液(pH 7.3)	(308)
七、0.4% 对苯醌(parabenzoquinone)	(308)
八、PFG 液(parabenzoquinone-formaldehyde-gutaraldehyde fixative)	(309)
九、碳二亚酰胺-戊二醛(ECD-G)液	(309)
第三节 粘附剂	(310)
一、铬矾明胶液	(310)
二、甲醛-明胶液	(310)
三、多聚赖氨酸(poly-l-lysine, PLL)	(311)
四、Vectabond 试剂	(311)
第四节 封固剂	(311)
一、甘油-TBS 及甘油-PBS	(311)
二、甘油-明胶(冻)	(312)
三、液体石蜡	(312)
四、DPX	(312)
五、抗荧光淬灭剂	(312)
第五节 其他辅助试剂	(312)
一、蔗糖溶液	(312)
二、Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)	(313)
三、甲醇-H ₂ O ₂ 液	(314)
参考文献	(315)

第①部分

基本知识

