



生命科学实验指南系列

Live Cell Imaging: A Laboratory Manual

Second Edition

活细胞成像

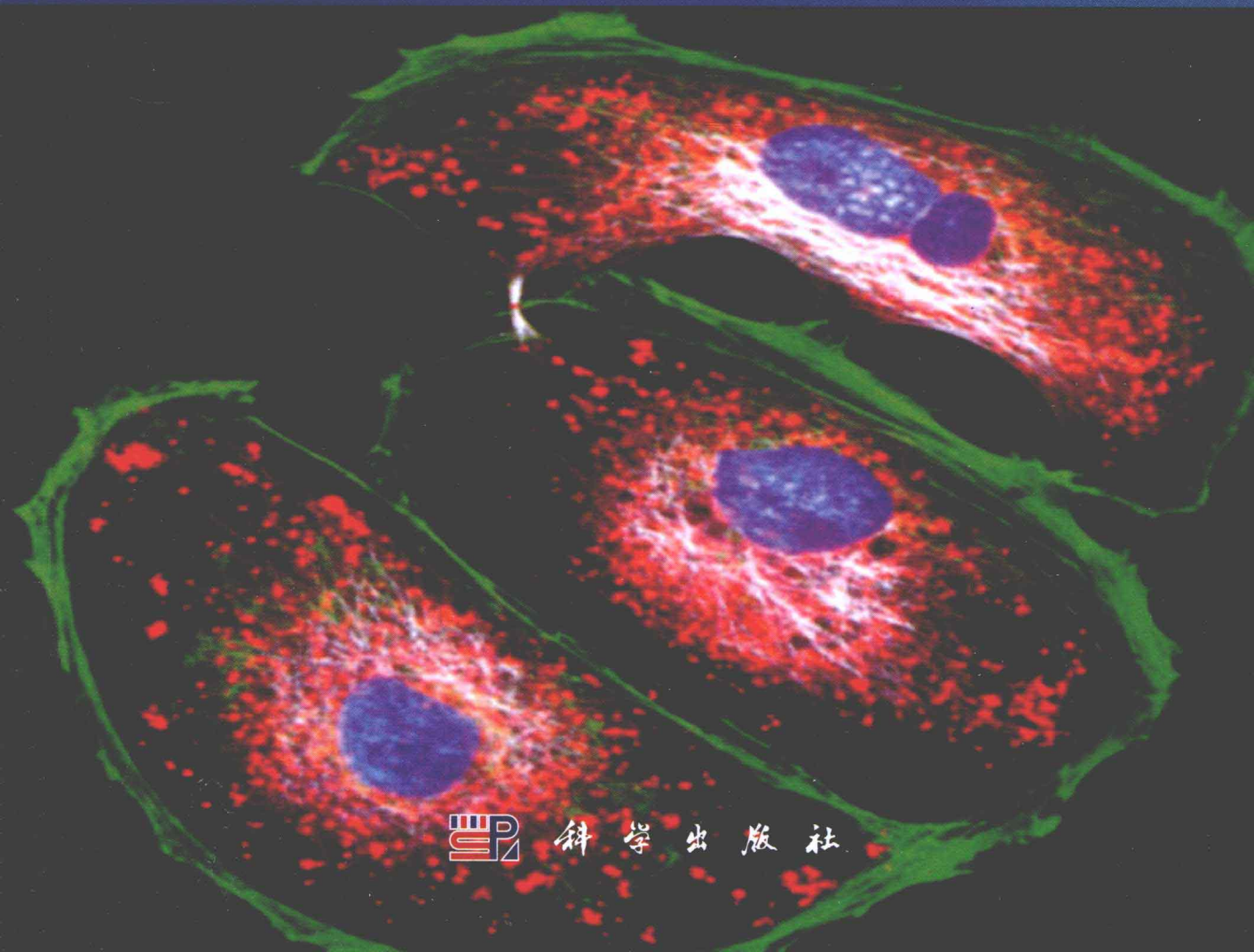
(第二版)

[美] R.D. 戈德曼

[英] J.R. 斯瓦罗 编著

[美] D.L. 斯佩克特

方玉达 等译



科学出版社



生物医学成像国际系列

Live Cell Imaging: A Laboratory Manual
Second Edition

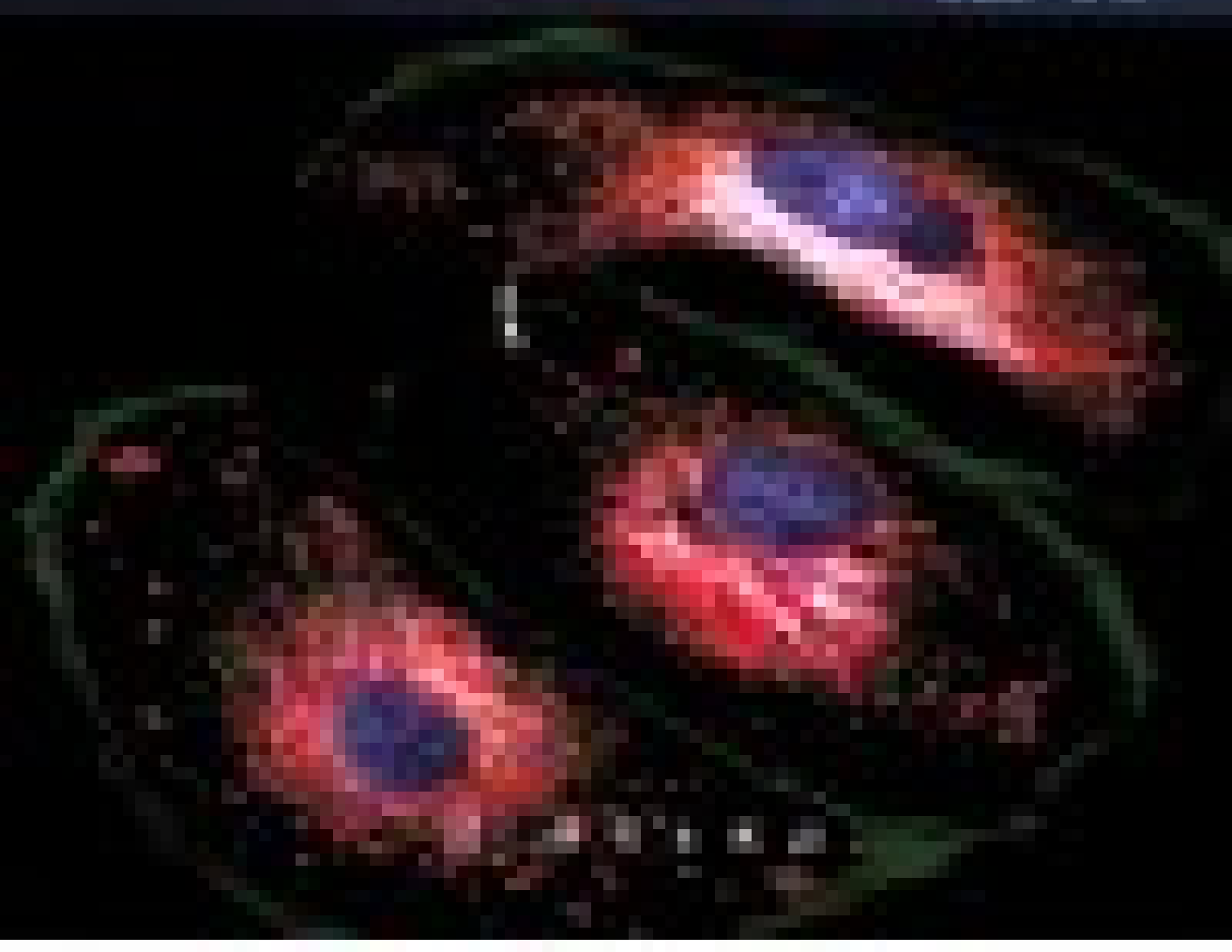
活细胞成像

【第二版】

作者：[美] 詹姆斯·M·拉姆森
译者：王 颖 等

ISBN 7-309-05888-9

定价：48.00元



科学出版社

生命科学实验指南系列

活细胞成像

(第二版)

Live Cell Imaging
A Laboratory Manual
Second Edition

〔美〕 R. D. 戈德曼
〔英〕 J. R. 斯瓦罗 编著
〔美〕 D. L. 斯佩克特

科学出版社

北京

图字：01-2011-3186号

内 容 简 介

本书包括活细胞成像的基础理论、最新发展和实验指南。系统介绍了荧光蛋白的各种光谱变体，表达载体构建，活细胞成像用 CCD 相机的类型及工作原理，常用显微镜系统（如宽视场、共聚焦和转盘式共聚焦），以及新一代超分辨率显微镜系统，图像处理方法和软件，各种定量成像等分析分子动力学的方法。作为实验指南，本书以各种不同细胞和生物体为对象给出了具体的成像实例，包括染色质、蛋白质和 RNA 的标记定位，蛋白质与蛋白质相互作用检测，金属离子和 pH 的生物传感器，脂类物质的标记等。

本书既可以作为活细胞成像领域的入门读物，又可以作为人类、动物、植物、昆虫和微生物等专业科研人员的理论基础读物和具体实验操作指南。

Originally published in English as *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual, Second Edition* by Robert D. Goldman, Jason R. Swedlow, David L. Spector. 2010 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

2012 Science Press. Printed in China.

Authorized Simplified Chinese translation of the English Edition 2010 Cold Spring Harbor Laboratory Press. This translation is published and sold by permission of Cold Spring Harbor Laboratory Press, the owner of all rights to publish and sell the same.

图书在版编目 (CIP) 数据

活细胞成像/ (美) 戈德曼 (Goldman, R. D.) 等编著; 方玉达等译.
—2 版. —北京: 科学出版社, 2012
(生命科学实验指南系列)
书名原文: Live Cell Imaging A Laboratory Manual
ISBN 978-7-03-034119-8

I. ①活… II. ①戈… ②方… III. ①细胞学—实验 IV. ①Q2-33

·中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 078349 号

责任编辑: 夏 梁 贺密青/ 责任校对: 林青梅
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>

天时彩色印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 5 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2012 年 5 月第一次印刷 印张: 47 1/2

字数: 1 123 000

定价: 240.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

我们希望把这本书献给
Anna Goldman、Melpi Platani、Jan and Lena Swedlow 和
Mona Spector，因为她们在这本书的准备过程中
持续地支持、忠心和理解。

译者序

生命科学最终要揭示活体生物内所有细胞的动态和功能。近年来，荧光蛋白及其各种光谱变体的开发和荧光显微镜及其相关技术的发展为研究活细胞结构、动态和功能开启了一扇大门。本书不仅是一本活细胞成像的实验指南，而且系统地介绍了与活细胞成像有关的基础知识和理论以及最新发展。内容包括荧光蛋白的各种光谱变体，表达载体构建及其注意事项，活细胞成像所用的 CCD 相机的类型及工作原理，常用显微镜系统（如宽视场、共聚焦和转盘式共聚焦）及新一代超分辨显微镜系统，图像处理方法和软件，各种定量成像等分析分子动力学的方法。同时，以各种不同细胞和生物体为对象给出了具体的成像实例，包括染色质、蛋白质和 RNA 的标记定位，蛋白质与蛋白质互作检测，金属离子和 pH 的生物传感器，脂类物质的标记等。另外，每章还列出了相关参考文献、网站和软件。有的章节间内容有交叉，读者在阅读时可以针对某一具体内容交叉参考。虽然本书涉及许多不同细胞和生物体的不同成像方法，但是这些方法不是独立的，它们可以相互借鉴、相互参考。

本书可以作为活细胞成像的入门读物，也可以作为一线科研人员的理论基础读物和具体实验步骤指南。同时，本书还可以作为活细胞成像课程的教科书。由于本书内容很广，教师在教学时应根据学生对象不同有目的地作部分删减。

我有幸参加了本书英文版的撰写工作，一直梦想将此书翻译成中文，介绍给更广大的读者。感谢科学出版社生物分社王静社长的支持；感谢来自中国科学院上海生命科学研究院、美国冷泉港实验室、北京东胜创新生物科技有限公司、奥林巴斯（中国）有限公司、上海锋致光电科技有限公司的所有参译者；感谢我的家人王静、方凯琳和方凯西在本书繁忙紧迫的翻译和校对工作中提供的理解和支持使得梦想成真！

方玉达

中国科学院上海生命科学研究院

植物生理生态研究所植物分子遗传国家重点实验室 (yfang@sippe.ac.cn)

前 言

这本书里许多令人惊叹的活细胞图像和分子动态特性分析可以追溯到 20 世纪 70 年代技术上的发展。在这期间，配置了有效分色滤光系统的荧光显微镜被推上市场。这些显微镜代替传统的暗场透射光镜使得细胞生物学家能充分利用非直接免疫荧光技术。细胞首次可以在 15~30s 曝光时间内被记录到 35mm 胶片上，而广泛使用的暗场系统则需要几分钟的曝光时间。另外，荧光使得高数值孔径的油镜可以同时作为聚光镜和物镜来使用。伴随着显微镜技术的发展，抗体的生产和应用使得双标记甚至三标记间接免疫荧光得到广泛应用，因此研究者可以仔细地研究同一个亚细胞结构域内不同组分之间的相互关联。接着，荧光原位杂交（FISH）的发展使特异 mRNA 和单个基因在染色体上的定位成为可能。最近，随着共聚焦、去卷积、多光子、OMX 和 SPIM 显微镜的推出以及图像收集系统的不断进步，使图像分辨率得到改善，细胞内的三维结构逐一被细化，图像收集的速度得到大幅度提高，达到毫秒级范围。

用高分辨免疫荧光技术产生的图像揭示了细胞结构的高度复杂性，从而对许多主要细胞结构有了更深入的了解，这些结构包括不同的细胞骨架系统、细胞核和核内各种亚结构以及有膜的细胞器。然而，细胞经固定和染色产生的图像是静态的，是这些结构组成和特性的一个简单快照。这个重大的缺陷促使细胞生物学家和显微镜学家利用荧光成像的灵敏度去发展新技术以便研究活细胞中特定种类的分子或者多组分复合体。首先，制备比较纯的蛋白质（如细胞骨架系统中的微管蛋白、波形蛋白或肌动蛋白）。其次，将这些蛋白质直接与荧光素（如 X-罗丹明）偶联，这些经标记的蛋白质通常被注射到细胞中，随时间推移这些蛋白质逐步整合到含有与它们同源的內源蛋白的细胞结构中。这种方法开辟了许多激动人心的时程观察，并在活细胞中初步进行了荧光漂白后恢复（FRAP）和荧光共振能量转移（FRET）实验以监测活细胞中特定蛋白质的动态特征。然而，这种方法特别费力费时，而且只限于那些能被生物化学提纯、标记及注射入细胞后功能正常的蛋白质。最后，显微镜视野内样品的光漂白限制了可被收集的可时间分辨的图像的数目。

在 20 世纪 90 年代，研究者惊讶地发现遗传编码的绿色荧光蛋白（GFP）可以在细胞和生物体中表达，这在细胞生物学领域引起了一场革命。例如，本书从头到尾所描述的，使用 GFP 及其光谱变体进行标记的融合蛋白有许多优点，最主要的优点是借助于它能多收集可时间分辨的图像，这让研究者可以在长时间内观察标记分子的动态特性，并从活细胞中提取出定量生物学信息。

本书第二版共 37 章，描述了活细胞成像的特异方法，全部由世界著名的权威专家撰写。每章附有精彩的图像，并且在许多情况下还在相关网站（<http://www.cshprotocols.org/livecellimaging>）配有影像，这些影像清楚地表明综合运用显微成像技术新进展所带来的巨大好处。这些新进展也使研究者能以无可比拟的方式去探究亚细胞动态和功

能的谜团。结果是，细胞生物学家现在正用以前梦想不到的方式进行活细胞实验和分析。

在这本第二版的《活细胞成像》中，有 21 章得到了更新，新增加了 16 章，内容涉及活细胞成像的最新技术和方法。第二版特有的内容是关于显微镜的几个重要进展，包括采用 OMX 的结构照明显微镜、采用 SPIM 的光片式显微镜以及动物和植物的单细胞成像方法。另外，还描述了新的分析方法，如活的哺乳动物细胞的高通量/高容量筛选以及活细胞数据的计算机分析。本书分两篇。上篇是“活细胞成像的检测和方法”，为活细胞成像技术方面的内容。通过此篇，读者学习荧光蛋白变体、如何在细胞中最好地表达荧光蛋白以及利用荧光融合蛋白的不同成像方式。下篇是“活细胞和生物体的成像”，为成像的特异例子。这些例子用荧光蛋白和各种不同成像途径以单分子的培养物、组织和动物中的单细胞来研究亚细胞结构和动态。每一章的写作方式不仅对从未在自己的研究中接触过活细胞成像的门外汉，而且对显微镜专业人员都非常有用。另外，这本书还提供了非常好的参考文献，使学生可以学习利用活细胞成像方法从细胞和生物体中提取重要的功能信息，这些信息是用其他传统的生物化学、分子生物学和遗传学方法所无法获得的。

我们感谢全世界范围的本书所有作者和他们的研究组，是他们使本书成真。我们感谢冷泉港实验室出版社的优秀员工，是他们把我们的梦想变成现实。我们尤其感谢出版者 John Inglis 同意安排第二版这个项目。感谢项目经理 Kaaren Janssen 协调各方面的努力并使这本书提前出版。我们感谢项目开发编辑 Catriona Simpson、Maria Smit 和 Michael Zierler，优秀的项目协调人 Mary Cozza，市场和销售主管 Jan Argentiner，生产经理 Denise Weiss，生产编辑 Kathleen Bubbeo 和桌面经理 Susan Schaefer。

ROBERT D. GOLDMAN
JASON R. SWEDLOW
DAVID L. SPECTOR

各章附加的影像

影像可以从 www.cshprotocols.org/livecellimaging 网站免费获取。

第 1 章 荧光蛋白的跟踪与检测

影像 1.1. 表达了人 α -微管蛋白与 EGFP 融合蛋白的非洲绿猴肾上皮细胞 (CV-1 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45-NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.2. 表达了人 α -微管蛋白-EGFP 和人组蛋白 H2B-mCherry 融合蛋白的猪肾表皮细胞 (LLC-PK1 细胞株) 用尼康 C1si 激光扫描共聚焦显微镜得到的图像。

影像 1.3. 表达了人 β -肌动蛋白与 EGFP 融合蛋白的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.4. 表达了人 β -肌动蛋白与 EGFP 融合蛋白的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.5. 表达了微管蛋白 EB3 与 EGFP 融合蛋白的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.6. 表达了人 α -微管蛋白与 EGFP 融合蛋白的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.7. 表达了人轻链网格蛋白与 EGFP 融合蛋白的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.8. 表达了人 β -肌动蛋白与 mCherry 融合蛋白以及 mKusabira Orange 与人线粒体融合物的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 用尼康扫场显微镜得到的图像。

影像 1.9. 表达了微管蛋白 EB3 与 mKusabira Orange 融合蛋白的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.10. 表达了 mKusabira Orange 与线粒体靶向信号肽融合的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.11. 表达了微管蛋白 EB3 与 Ypet 融合蛋白的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.12. 表达了过氧化物酶靶向序列与 EGFP 融合蛋白的人宫颈癌表皮细胞 (HeLa 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.13. 表达了过氧化物酶靶向序列与 EYFP 融合蛋白的人宫颈癌表皮细胞 (HeLa 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.14. 表达了微管蛋白 EB3-mEmerald 和人组蛋白 H2B-mCherry 融合蛋白的猪肾表皮细胞 (LLC - PK1 细胞株) 在尼康 C1si 激光扫描共聚焦显微镜下得到的图像。

影像 1.15. 表达了高尔基体靶向序列- GFP 和线粒体靶向序列- SdRed 融合蛋白的狐狸肺表皮细胞 (Folu 细胞株) 在尼康 C1si 激光扫描共聚焦显微镜下得到的图像。

影像 1.16. 表达了内质网靶向肽- mEmerald 融合蛋白的人骨肉瘤表皮细胞 (U2OS 细胞株) 在尼康 C1si 激光扫描共聚焦显微镜下得到的图像。

影像 1.17. 表达了人 β -肌动蛋白与 EGFP 融合蛋白的负鼠肾表皮细胞 (OK 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.18. 表达了内涵体靶向信号- EGFP 融合蛋白的负鼠肾表皮细胞 (OK 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.19. 表达了高尔基体靶向信号- EGFP 融合蛋白的负鼠肾表皮细胞 (OK 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.20. 表达了 LAMP1 (靶向溶酶体) - EYFP 融合蛋白的负鼠肾表皮细胞 (OK 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.21. 表达了 β -肌动蛋白与 EYFP 融合蛋白的负鼠肾表皮细胞 (OK 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

影像 1.22. 表达了高尔基体靶向信号- EYFP 融合蛋白的负鼠肾表皮细胞 (OK 细胞株) 用尼康扫场显微镜在 1.45NA 全内反射荧光显微镜 (TIRFM) 物镜下得到的图像。

第 11 章 数字扫描激光光片荧光显微镜

影像 11.1. DSLM 的工作原理示意图。影像展示了标准 DSLM 成像模式下主要的样品照射流程和荧光检测流程。激光束从边缘开始照射样片, 沿着样片中的单线激发荧光。两个激光扫描仪在水平和垂直方向上移动激发激光线。通过快速扫描的样品的整个平面, 与照射轴呈一定角度的荧光被检测到, 光学切面图就被记录下来。上边左图可以看到一个被放大的样品照射分数, 样品包被在琼脂糖筒中, 放在样品室里。

第 20 章 线虫的活细胞成像

影像 20.1. 注射了 *lmn-1* dsRNA 的停止胚胎。表达组蛋白 H2B-GFP 的雌雄同体

线虫 (AZ212 系, 由 J. Austin 博士提供, 见 Praitis et al. 2001) 中, *lmn-1* 基因的表达被下调。插入了双链 *lmn-1* RNA 的 F1 的雌雄同体线虫后代被固定在胚胎盐溶液琼脂垫上, 用润滑脂真空密封, 用带有荧光照明的 Zeiss Axioplan 2 显微镜观察。每 30s 间隔用 AxioCam CCD, AxioVision 成像分析包收集时程数据。影像说明大多数细胞核有无组织的染色质。有一个细胞核在有丝分裂时显示典型的后期桥。

影像 20.2. 在发育的胚胎中, DIC (蓝) 和 *eff1*-启动子::GFP (绿色) 同时成像揭示了细胞融合的时间。共聚焦显微镜按图 2 设置 (Rabin and Podbilewiz 2000)。在表皮细胞的前体中观察到报告基因的初始表达。在胚胎伸长 (形态发育) 阶段, 在背部和腹部皮下组织, 细胞质中出现 GFP 信号, 反映了表皮细胞之间的融合。

影像 20.3. 在胚胎形态发育阶段的上皮细胞中表达 *AJM-1*::GFP。每隔 5min 收集共聚焦图像, 投射生成的动画显示形态发育阶段的表皮细胞形态和细胞融合的变化。

影像 20.4. 表达 *egl-17/FGF* 启动子::GFP (Burdine et al. 1998) 的双门环的 z 系列图像。在 L4 时期, 排泄门由一摞七个圈或者环组成 (Sharmakishore et al. 1999)。只有两个门合胞体细胞表达成纤维细胞生长因子 (FGF/*egl-17*)。VulD 环在顶端 (背部) 包括两个细胞核, 而 vulC 环包括 4 个细胞核, vulD 上有两个额外的环, 它们和另外三个腹环在这个时期不表达报告基因。

影像 20.5. 影像 20.4 中表达成纤维生长因子 (*egl-17*) 的两个门环的 z 系列图像的投射和旋转。使用 Bio-Rad 公司的 LaserSharp 软件可以得到门环的动画。中心 (洞) 允许卵排出, 在交配时精子由相反方向进入。

影像 20.6. 表达 GFP::Ce-lamin 野生型蛋白的细胞核的 FRAP 实验。使用奥林巴斯公司配备了 IX81 倒置显微镜和 60×/1.4 油镜的 FV-1000 共聚焦显微镜拍摄影像。对蠕虫表达的 GFP::Ce-lamin 野生型蛋白在特定的细胞核区域使用 488nm 激光 100% 强度进行光漂白, 成像时使用 488nm 激光作为激发光和 505~525nm 发射滤光片。在光漂白前每 30s 拍摄 5 帧, 光漂白后每 30s 拍摄 10 帧, 每 2.5min 拍摄 30 帧。

影像 20.7. 表达 GFP::Ce-lamin 的细胞核的 FRAP 实验, 该 Ce-lamin 包含 R64P 点突变。使用奥林巴斯公司配备了 IX81 倒置显微镜和 60×/1.4 油镜的 FV-1000 共聚焦显微镜拍摄影像。对蠕虫表达的 R64P GFP::Ce-lamin 蛋白在特定的细胞核区域使用 405nm 激光进行光漂白, 成像时使用 488nm 的激光作为激发光和 505~525nm 发射滤光片。在光漂白前每 1.107s 拍摄 15 帧, 光漂白时每 1.107s 拍摄 2 帧, 光漂白后每 1.107s 拍摄 200 帧。

第 21 章 植物活细胞成像

影像 21.1. 拟南芥表皮细胞细胞核中着丝粒组织的立体视图。

影像 21.2. 有丝分裂期间着丝粒动态的观察。着丝粒被 HTR12-GFP 标记呈绿色。

第 22 章 果蝇活细胞成像技术的拓展

影像 22.1. 注射入第 4 期合胞体胚盘果蝇胚胎 (14~15 个循环)。使用微分干涉相衬和宽视场荧光显微镜, 在 $20\times$ NA 0.75 物镜下成像。

影像 22.2. 在 11 期果蝇卵巢前部, 通过追踪标记了 MS2/MCP-绿色荧光蛋白的 *bcd* 信使 RNA, *Bicoid* 基因 mRNA 转运的动态过程。在 DV-Core 宽视场去卷积显微镜下以 3 帧/s 的速度收集影像, 以 15 帧/s 的速度放映。

影像 22.3. 深入到晚期 (排卵后 12~18h) 组蛋白 H2A-GFP 标记的果蝇胚胎的多光子和共聚焦成像。使用 $20\times$ 0.75 多浸物镜。共聚焦用的 GFP 激发光波长为 475nm, 多光子激发波长为 870nm。收集 520nm 以上的发射光。

第 23 章 乳腺癌鼠模型肿瘤基质相互作用在转盘式共聚焦显微镜下的动态和长时间活体成像

影像 23.1. 骨髓细胞渗出和渗透晚期癌病变组织。已经渗透入癌细胞组织块 (蓝色) 的两个骨髓细胞 (绿色, 用白方块标出) 大部分已固定不动, 而第三个细胞是从血管神经渗透侵入肿瘤, 显示在画面的右侧 (沿着点 A~J)。在 MMTV-PyMT、ACTB-EGFP、*c-fms*-EGFP 小鼠中, 蓝色和绿色分别显示的是 ECFP 和 EGFP 通道。影像最初是被标记的, 后面没有被标记。大刻度线是 $20\mu\text{m}$, ECFP 的曝光时间是 33ms, 而 EGFP 的曝光时间是 67ms。播放时间是 $600\times$ 真实时间, 代表 50min 长的图片序列, 每帧之间相隔 42s。

影像 23.2. 正常乳腺的伤口表面的骨髓细胞迁移响应。*c-fms*-EGFP 鼠的乳腺间质成脂骨髓细胞 (绿色) 被观察到迁移。绿色标记的是 EGFP 通道。比例尺, $20\mu\text{m}$ 。EGFP 的曝光时间为 133ms。播放时间是 $50\times$ 真实时间。代表 8min 长的图片序列, 每帧相隔 5s。

第 26 章 小鼠正常组织和疾病组织活体成像研究

影像 26.1. 肿瘤血流量。MCalV 小鼠乳腺癌生长在 C3H 小鼠的背部皮肤上。肿瘤微循环用常规活体显微镜配备绿色滤光片透射照明来观察, 绿色滤光片可以增强红细胞的对比度。这些血管中的红细胞速率使用时间相关测速或者其他技术进行离线测量。更多细节请看正文。图像横跨 $330\mu\text{m}$ 。

影像 26.2. 肿瘤血管中白细胞与内皮细胞的相互作用。MCalV 小鼠乳腺癌生长在 C3H 小鼠的背部皮肤上。灌流炎症胞嘧啶 ($\text{INF}\alpha$) 诱导了白细胞黏附。静脉注射罗丹明 6G 突出了白细胞, 使用荧光活体显微镜观察, S-VHS 磁盘记录。用形态分析对白细胞与内皮细胞的相互作用进行量化。更多细节请看正文。图像横跨 $330\mu\text{m}$ 。

影像 26.3. 脂肪组织中的新生血管。图像使用双光子 LSM 采集, 并通过静脉注射四甲基罗丹明标记葡聚糖 ($\text{MW } 2\times 10^6$)。影像的垂直深度为从表面开始的 $300\mu\text{m}$ (看到活体脂肪组织的血管) 直至底部 (看到典型的皮下组织存在的血管), 图像横跨

1mm。(从 Fukumura 的文章中转载)。

影像 26.4. 组织工程产生的血管的三维展示。人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 和 10T1/2 细胞 (间质祖细胞) 放在纤维连接蛋白和胶原蛋白 I 构成的三维培养室, 植入 SCID 小鼠颅窗。绿色荧光蛋白表达 HUVEC (绿色) 和灌注过的血管 (红色, 通过四甲基罗丹明连接的葡聚糖增强对比度) 用多光子 LSM 来收集。在第 28 天, 小室中各层都出现了血液扩散。小室厚度为 $165\mu\text{m}$, 图像横跨 $270\mu\text{m}$ 。(经 Koike 允许转载自 Nature Publishing Group, Koike et al. 2004)

第 29 章 活细胞中基因表达的成像

影像 29.1. 基因表达的实时分析。用活细胞显微镜和各种荧光融合蛋白, 我们所发展的一个细胞系能观察一个稳定整合的遗传位点以及它的 mRNA 和蛋白质产物。这个位点能诱导开始转录。影像左版显示该遗传位点染色质的荧光信号及蛋白质产物, 右版显示当遗传位点打开后 mRNA 的合成。当遗传位点的转录不活化时, 染色质是浓缩的 (左版紧密的蓝色点), 细胞质中看不到蛋白产物。同时, mRNA 结合蛋白弥散在细胞核中 (左版), 因为几乎没有底物可以结合。影像开始, 左版中染色质随时间推移解浓缩, 而且这个遗传位点编码的蛋白质分布在细胞质过氧化物酶体 (细胞质中蓝色点) 中, 该蛋白带有过氧化物酶体定位信号。在影像右版, 随着染色质解浓缩, mRNA 结合蛋白集中在遗传位点 (转录位置) 处。因为 mRNA 正在合成, 荧光蛋白标记的 mRNA 结合蛋白有了结合点, 在核质中呈现颗粒状。颗粒状结构代表信使核糖核蛋白 (mRNP) 颗粒, 它们从遗传位点处向各个方向扩散, 止于细胞质, 在细胞质中 mRNA 被翻译成蛋白质并定位到过氧化物酶体中去。(经 Elsevier 公司允许, 转载自 Janicki et al. 2004)。

第 30 章 在哺乳动物培养细胞中研究有丝分裂

影像 30.1. 表达 GFP-微管蛋白的猪肾细胞的有丝分裂。这里显示的是从前期到细胞质分裂的全过程。

第 31 章 中间纤维蛋白在活细胞内的成像

影像 31.1. 表达标记有 GFP 的波形蛋白并扩展良好的 BHK-21 细胞。注意许多纤维蛋白表现出变长和缩短的表型, 而且这些波形蛋白具有运动的特性 (见 Yoon et al. 1998)。相差显微图片用来显示细胞的轮廓或是正在观察的细胞区域。

影像 31.2. 正在分散的 BHK-21 细胞表现出波形蛋白颗粒的运动特性, 一些颗粒发生了明显的融合, 并且短的细丝开始形成并发生扭曲。这些细胞转染了标记有 GFP 的波形蛋白, 经胰蛋白酶处理, 重新铺板, 然后按 Prahlad 等 (1998) 的方法观察。

影像 31.3. 一个 PC-12 细胞在加入神经生长因子后短时间内, 在新生成的圆锥体区域表达标记有 GFP 的外周蛋白。注意外周蛋白颗粒和短的纤维状结构 (绿色) 在圆锥体的许多区域运动。用相差显微镜观察生长锥 (详细请见 Helfand et al. 2003)。

影像 31.4. 转染了标记有 GFP 的角蛋白 14 的一个 PtK2 细胞的一个区域。注意张

力原纤维表现出了弯曲的运动并且在某些情况下表现出了扩增的波形（详细请见 Yoon et al. 2001）。

第 32 章 表达和分析绿色荧光蛋白标记的微管蛋白和微管相关蛋白的方法

影像 32.1. 一个表达 GFP 微管蛋白的 LLCPK1 细胞的周边区域可以观测到微管的动态不稳定性。单个微管蛋白可以看到生长，缩短和暂停。以 2s 时间间隔成像；影像以 20 倍实际速度播放。

影像 32.2. 一个表达 GFP - EB1 的 LLCPK1 细胞看到的 MT 生长，GFP - EB1 (Piehl et al. 2004) 标记微管生长的正端。中心细胞包括两个中心体，GFP - EB1 荧光点就从这里出现；正在生长的单个微管蛋白接近细胞边缘时被追踪。以 2s 时间间隔成像；影像以 15 倍实际速度播放。

影像 32.3. 为了研究 CLIP - 170 (Perez et al. 1999) 正端的追踪行为，观测了表达 GFP - CLIP - 170 的一个 COS - 7 细胞中微管的生长情况。特别注意到 CLIP - 170 细胞中荧光分布不均匀（荧光散斑）。分析这些散斑随时间推移的分布（波动曲线分析）得知它们是不动的，且 CLIP - 170 + TIP 行为不是马达介导的 (Perez et al. 1999; Folker et al. 2005)。以 0.5s 的曝光时间和 1s 的时间间隔成像；影像以每秒 30 帧的速度播放。微管的生长速度比影像 32.1 和影像 32.2 要慢，因为这个数据是在较低温度 (28°C) 下收集的。

第 34 章 机械应力下的活细胞成像

影像 34.1. 去卷积光学切片的时程影像显示 GFP (绿色) 标记的波形蛋白丝在 90s 间隔内的运动，该图像叠加了在开始没有液体流动和有液体流动期间静止的图片 (红色)。红色和绿色表示中间纤维分离运动；黄色代表最初零位移的对比。流动方向从左到右；剪应力 12dyn/cm²；标尺，2μm。经过时间，ms；ss。(经过 Helmke 许可转载)

影像 34.2. 去卷积光学切片的时程影像展示了靠近顶端细胞表面的 GFP (绿色) 标记的波形蛋白的运动，相应的区域显示在图 4B~D 中。中间纤维在 90s 时间 (绿色) 间隔的运动，叠加了显示在有和没有液体流动的情况下的静止图片 (红色)。红色和绿色表示中间纤维分离运动；黄色代表绿色的分离，红色代表中间纤维的运动；黄色代表最初零位移的对比。流动方向从左到右；剪应力 12dyn/cm²；标尺，2μm。经过时间，ms；ss (经过 Helmke 许可转载)。

第 35 章 基于全内反射荧光显微镜的单分子成像

影像 35.1. 标记了 TMR (绿色) 的单个动力蛋白分子沿着 Cy5 (红色) 标记的轴丝微管运动的全内反射显微镜成像结果。60×真实时间。

第 36 章 基于全内反射荧光显微技术的细胞成像

影像 36.1. GFP - tubulib 标记的微管导向 CAR 成纤维细胞皮层，通常沿着相似的

路径。图像是倒置的，当微管接近下皮层细胞时强度更高。在 0.2Hz 下收集的数据 (Krylyshkina et al. 2003)。

影像 36.2. YFP-tubulin 标记的微管导向 PtK2 上皮细胞皮层。在 0.2Hz 下收集的数据 (Toomre, 未发表)。

影像 36.3. YFP 标记的肌动蛋白展示了逆行流动和点状消失 (就像 PtK2 细胞中的包被网格蛋白经历的内吞作用)。在 0.2Hz 下收集的数据 (Toomre, 未发表)。

影像 36.4. 在同一图像平面的 EPI 荧光 (红色) 和 TIRFM (绿色) 反映了 YFP-水泡型口炎病毒糖蛋白 (VSVG) 标记的囊泡发生胞吐。注意, 红色小泡排出高尔基体, 运输到周边, 形态发生变化 (变得更绿), 融合时产生明亮的绿光。在 1Hz 下收集的数据 (Toomre et al. 2000)。

影像 36.5. TIRFM 影像显示两个子细胞融合时由 VSVG-YFP 囊泡运输到 BSC-1 细胞的胞质沟。在约 22Hz 下收集的数据 (Goss and Toomre, 2008)。

影像 36.6. COS 细胞中 GFP 标记的网格蛋白轻链表达揭示了很多小点, 相当于网格蛋白小窝, 当小窝开始内吞, 信号就消失了。在 0.25Hz 下收集的数据 (Zoncu et al. 2007)。

第 37 章 活细胞中单个 RNA 分子的观测与定量分析

影像 37.1. 在人类细胞 (U2OS) 表达一个在其信使 RNA 3'-UTR 含有 24 个 MS2 结合位点的基因, 这个细胞同时被 CFP-LacI、YFP-MS2 质粒转染。基因被诱导转录 30min (Tet-On 和强力霉素) (Shav-Tal et al. 2003)。影像呈现的是细胞核, 其中基因 (DNA) 被标记为红色 (被 CFP-LacI 结合) 而转录的信使 RNA 被标记为绿色 (YFP-MS2)。RNA 在转录位点以及作为信使核糖核蛋白体 (mRNP) 在和核质内的运动被观测。

影像 37.2. 一个人类细胞 (U2OS) 中表达一个在其信使 RNA 3'-UTR 含有 24 个 MS2 结合位点的基因, 这个细胞同时被 CFP-LacI、YFP-MS2 质粒转染。基因被诱导转录 30min (Tet-On 和强力霉素) (Shav-Tal et al. 2003)。影像展现的是细胞核以及 YFP-MS2 标记的信使核糖核蛋白体。细胞核中心的一个转录位点以及 mRNP 的释放被检测到。

目 录

译者序

前言

各章附加的影像

上篇 活细胞成像的检测和方法

第 1 章	荧光蛋白的跟踪与检测	3
第 2 章	荧光蛋白融合的构建和表达	35
第 3 章	用线性聚丙烯酸阻抗细胞与基底黏附的微图案化处理技术	43
第 4 章	CCD 相机在活细胞荧光成像中的应用	51
第 5 章	荧光干扰技术研究活细胞中蛋白质的运动性和分子动态: FRAP、 Photoactivation、Photoconversion 和 FLIP	65
第 6 章	细胞中蛋白质状态成像	93
第 7 章	用于高分辨率活细胞成像的多功能多色彩全内反射荧光及转盘式共聚焦 显微成像系统	120
第 8 章	共聚焦显微镜、去卷积和结构照明方法	141
第 9 章	生物成像和微观机械性质测量中的原子力显微镜	184
第 10 章	OMX, 一个多模式多通道宽场成像的新平台	204
第 11 章	数字扫描激光光片荧光显微镜	215
第 12 章	活体细胞荧光相关光谱初步	228
第 13 章	动态移动细胞和粒点的跟踪及定量分析	238
第 14 章	测量细胞材料特性的成像技术	255
第 15 章	细胞动态的计算图像分析——粒点追踪的案例分析	270
第 16 章	显微成像中的软件工具、数据结构及控制界面	282
第 17 章	以哺乳动物活细胞为例介绍高通量显微镜	295

下篇 活细胞和生物体的成像

第 18 章	哺乳动物细胞的活体成像	315
第 19 章	酵母活细胞成像	329
第 20 章	线虫的活细胞成像	347

第 21 章	植物活细胞成像	366
第 22 章	果蝇活细胞成像技术的拓展	384
第 23 章	乳腺癌鼠模型肿瘤基质相互作用在转盘式共聚焦显微镜下的动态和长时间活体成像	416
第 24 章	活体肿瘤的高分辨多光子成像	439
第 25 章	四半胱氨酸标签与双砷染料标记的活细胞光学显微镜与电子显微镜的关联成像	460
第 26 章	小鼠正常组织和疾病组织活体成像研究	473
第 27 章	活细胞中脂类的成像	525
第 28 章	染色体被乳糖操纵基因标记的哺乳动物细胞系的发展	543
第 29 章	活细胞中基因表达的成像	567
第 30 章	在哺乳动物培养细胞中研究有丝分裂	573
第 31 章	中间纤维蛋白在活细胞内的成像	586
第 32 章	表达和分析绿色荧光蛋白标记的微管蛋白和微管相关蛋白的方法	609
第 33 章	膜系统和膜运输的活细胞成像	629
第 34 章	机械应力下的活细胞成像	646
第 35 章	基于全内反射荧光显微镜的单分子成像	661
第 36 章	基于全内反射荧光显微技术的细胞成像	678
第 37 章	活细胞中单个 RNA 分子的观测与定量分析	700
附录	注意事项	718
索引	727