

文章编号: 1674-7054(2013)01-099-06

激光扫描共聚焦显微镜在生物科学研究中的应用

杨子贤, 王洪星, 易小平

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室 海南 海口, 571101)

摘 要: 介绍了激光扫描共聚焦显微镜的工作原理和特点, 在此基础上, 综述了激光扫描共聚焦显微镜在生物科学研究中的应用和应用技巧。

关键词: 激光扫描共聚焦显微镜; 荧光探针; 生物科学

中图分类号: R 318.6

文献标志码: A

激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)是目前应用最广泛和光学图像分辨率最高的分子细胞生物学分析仪器,它是在荧光显微镜成像基础上加装了激光扫描装置,利用计算机进行图像处理,使用紫外光或可见光区激发荧光探针,得到细胞或组织内部微细结构的荧光图像,在亚细胞水平上观察pH值、钙离子、膜电位等生理信息及细胞形态的变化,是分子细胞生物学研究领域中的新工具。目前,激光扫描共聚焦显微技术已应用于细胞形态定位、立体结构重组、动态变化过程等研究,并提供定量荧光测定、定量图像分析等实用研究手段,在形态学、生理学、免疫学、遗传学等分子细胞生物学领域得到广泛应用^[1-3]。它不仅能观察固定的细胞、组织切片,还可以对活细胞的结构、分子、离子进行实时动态观察和检测,是研究分子细胞生物学、遗传学、免疫学以及病理学的良好实验手段和分析工具^[4]。

1 LSCM的原理和特点

对于一个在传统显微镜下观察的生物样品来说,其结构往往是非常复杂的,而且又互相重叠,给观察带来很大困难。特别是在荧光显微镜观察中,由于荧光标记物质和自发荧光结构重叠,使其紧密地结合在一起,而传统的落射荧光显微镜物镜,不但收集来自焦平面的光线,而且还收集焦平面上下的散射光线,结果大大降低了图像的分辨率和对比度^[5]。

共聚焦成像仅检测反射自焦平面的光线部分,从而解决上述问题。光源通过一个针孔使在焦平面上形成一个小而精细的光点,从焦平面上发射出的光线通过物镜收集,绝大部分物镜焦平面上面或下面点发射的荧光不能会聚到小孔,只有位于焦平面的荧光以及一小部分离焦荧光能够通过小孔,而焦平面外的光束会聚于针孔板前或后,被阻挡不能通过针孔进入探测器。探测到的图像就是来自焦平面的图像,所以最终的图像质量大大提高^[6-7]。共聚焦显微镜的光分辨率以及Z轴上的光切厚度,不但取决于光的波长,而且也决定于物镜的数值孔径和针孔的直径,其中针孔孔径的大小与分辨率成反比。通过精细平面光切,形成生物样品不同平面的精细图像,同时将1个连续的光切图像Z轴重叠就可形成1个三维图像。另外,在同一平面上进行连续扫描,就可分析细胞结构、内含体和标记等的动力学变化。现在最先进的激光共聚焦显微镜已经能够同时扫描多重标记的荧光标记,并加以精确的区分,同时也可以观察随时间的变化荧光标记,由于各种生物学因素的影响,这些荧光标记发生了波长改变,从而能研究到组织和细胞内分子间的相互作用关系。

激光扫描共聚焦显微镜主要由光学显微镜部分、激光发射器、扫描装置、光检测器、计算机系统(包括

收稿日期: 2012-11-23

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903049-02)

作者简介: 杨子贤(1978-),男,湖北应城人,中国热带农业科学院热带生物技术研究所助理研究员,硕士。

通信作者: 易小平, E-mail: yi-000001@yahoo.com.cn

数据采集、处理、转换、应用软件) 和图像输出设备 6 个部分组成(见图 1)。根据研究需要,可以选择不同的激光器: ArUV(351.364 nm)、HeCd(442 nm)、Ar(457 488 514 nm)、ArKr(488 568 647 nm)、Kr(568 nm)、HeNe(543 nm) 和 HeNe(633 nm) 等,它具有多个荧光通道,可同时对样品进行多种标记,也可以采取点照明、逐点扫描的方式逐点成像,成像后可以实时观测、进行数字化图像处理和定量分析多重染色样品。

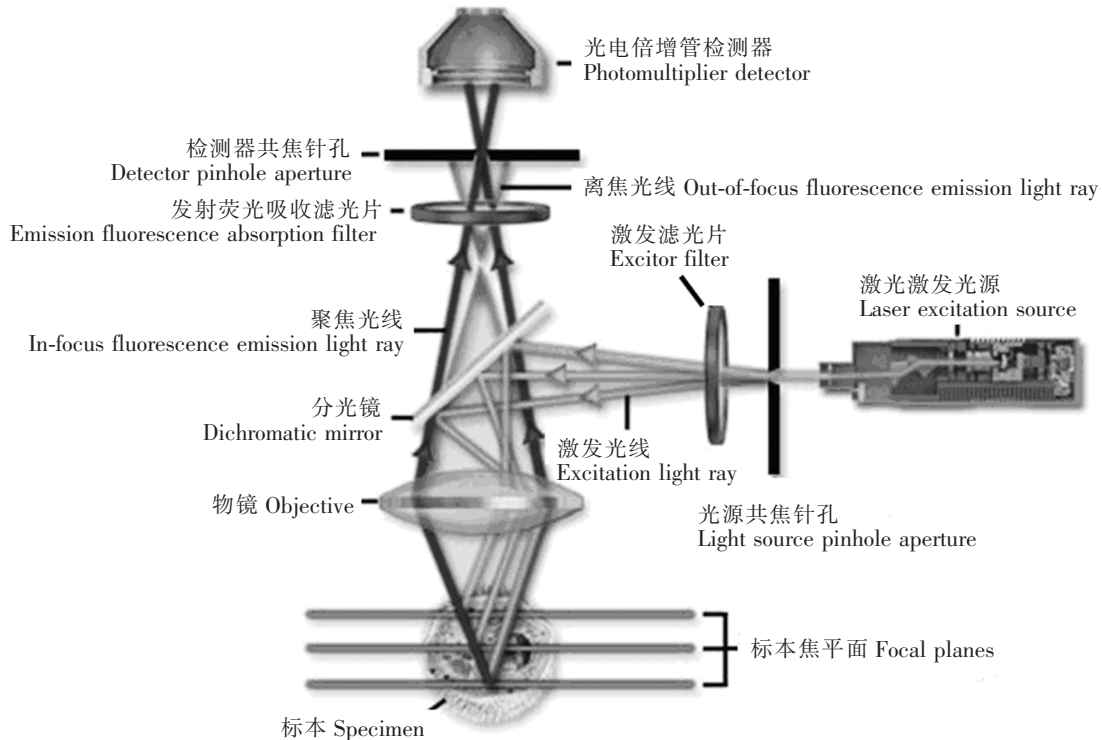


图 1 激光共聚焦显微镜的光学结构和原理

Fig. 1 The optical structure and theory in a laser scanning confocal microscope

2 LSCM 的应用

激光扫描共聚焦显微镜的功能,主要分为图像处理功能和细胞生物学功能,由于激光扫描共聚焦显微镜的功能具有多种优越性和实用性,因此,在细胞生物学、植物学以及细胞研究领域中都得到了广泛的应用。

2.1 图层处理功能

2.1.1 组织光学切片 激光扫描共聚焦成像,是利用照明点与探测点共轭的特性,有效地抑制同一焦点平面上非测量点的杂散荧光以及来自样品中非焦平面的荧光,从而获得普通光学显微镜无法达到的分辨率。这种分辨率具有深度识别率和纵向分辨率,它以 1 个微动步进马达控制载物台的升降,可以逐层获得高反差、高分辨率、高灵敏度的二维光学横断面图像,从而对活的或固定的细胞及组织进行无损伤的系列“光学切片”(Optical sectioning),得到各个层面的信息。这种功能也被称为“细胞 CT”或“显微 CT”^[8]。李林光等^[9]采用组织光学切片的方法对二倍体富士苹果及其四倍体芽变品种的胚胎发育特征进行了观察,胚囊经取样固定后,梯度复水,用 $w=4\%$ 的蔗糖曙红溶液染色 12~48 h,水洗 3 次后再经脱水、透明化处理,最后用水杨酸甲酯封片观察,发现二倍体富士苹果及其四倍体芽变品种天星的胚囊均为蓼型,二者均存在异常胚囊现象,天星的异常胚囊现象包括极核位置异常、极核数目异常、卵器结构异常、胚囊内有多个发育滞后的细胞等,而在富士中仅发现少数胚囊结构不完整的现象。

2.1.2 三图像重建 激光扫描共聚焦显微镜通过薄层光学切片功能,可获得真正意义上的三维数据,经过计算机图像处理及三维重建软件,沿 X、Y 和 Z 轴或其他任意角度来观察标本的外形及剖面,得到三维的立体结构,从而能十分灵活、立体直观地进行形态观察,并揭示亚细胞结构的空间关系。在此基础上的

光谱扫描,也叫XY-λ扫描,是用来扫描XY平面图像在整个发射波段内的荧光强度变化。通过该扫描方法,可以查看标本荧光光谱,可以确定最佳荧光谱段,也可以拆分发射峰值极为接近的染料或从较强背景荧光中提取染料荧光,这对热带植物的细胞学研究显得尤为重要,可用来消除热带植物的自发荧光,大大提高荧光探针定位的准确性,避免了其他荧光的干扰。WANG Dongmei等^[10]采用荧光分子探针与LSCM技术相结合,观察了大蒜鳞片细胞间期核中是否存在F肌动蛋白,结果表明:细胞核经荧光免疫染色后呈黄绿色,含有肌动蛋白,在经过TRITC-phalloidin标记后,细胞核发出明亮的红色荧光,利用激光扫描共聚焦显微镜对处理好的样本作光学切片及三维结构重组成像,发现细胞核中有1个三维网络结构,所以,F肌动蛋白存在于大蒜的细胞核中,并以F肌动蛋白纤束形成三维网络结构。YE Xiulin等^[11]应用免疫荧光标记技术及LSCM技术观察了鹤顶兰胚囊发育过程中微管分布的变化,结果表明:鹤顶兰的胚囊发育为单孢子蓇葖型,当孢原细胞初形成时,细胞内的微管呈网状分布;之后,孢原细胞体积增大发育为大孢子母细胞,大孢子母细胞延长,进入减数分裂I;微管由分裂前的网状分布变为辐射状排列,二分体的2个细胞内的微管分布一样,呈辐射状;四分体的近珠孔端的3个大孢子解体,细胞内的微管消失;靠合点端的功能大孢子内有许多微管呈网状分布,当功能大孢子进入第1次有丝分裂时,细胞内的微管由网状变为辐射状,从核膜伸展至周质;再经2次有丝分裂形成八核胚囊,在核分裂之前微管一般是呈网状分布并紧密包围着核。

2.1.3 细胞物理生物化学测定 激光扫描共聚焦显微镜可进行低荧光探测、活细胞定量分析和重复极佳的荧光定量分析,从而能对单细胞或细胞群的溶酶体、线粒体、内质网、细胞骨架、结构性蛋白质、DNA、RNA、酶和受体分子等细胞特异结构的含量、组份及分布进行定性、定量、定时及定位测定;同时可测定分子扩散、膜电位、氧化-还原状态和配体结合等生化反应变化程度。另外,还可以对细胞的面积、平均荧光强度、积分荧光强度、细胞周长、形状因子及细胞内颗粒数等参数进行自动测定^[12]。

2.1.4 荧光的定量、定位分析 激光扫描共聚焦显微镜可对单标记或双标记细胞及组织标本的共聚焦荧光进行定量分析,并显示荧光沿Z轴的强度变化;同时可自动将荧光图像与相差图像重叠以显示荧光在形态结构上的精确定位,也可测量标本深层的荧光分布,适用于高灵敏度的快速荧光测定,准确地监测抗原表达、荧光原位杂交斑点及细胞结合和杀伤的形态学特性,并作定量分析。激光光束在振镜的控制下,可作XY的平面扫描,以获取更清晰的单层面、多通道的细节结构,由于排除了非焦平面的荧光干扰,因此,可应用于热带植物细胞中多种荧光定位即共定位研究等^[13-14]。生化成分精确定位观察,对于要检测的成分不仅可以定位到细胞水平,还可以定位到亚细胞水平和分子水平。朱洪亮^[15]等运用LSCM对多胚水稻不同类型品系胚囊形成过程中的微管骨架进行了比较分析,发现2份材料多胚品系AP IV和单胚品种IR36大孢子发生所经历的阶段具有一致性,每个阶段微管骨架各具特点:孢原细胞微管为随机状排列,大孢子母细胞在进入减数分裂前微管呈现极性分布,而在细线期微管呈独特的“旋状”排列,终变期出现明显的微管组织中心,二分体和四分体核周围主要为辐射状微管,功能大孢子内存在少量随机状微管。LI Yan等^[16]以川百合为材料,利用免疫荧光定位结合激光共聚焦显微镜,对花粉及花粉管中类红膜分布进行了观察,进而用免疫金标方法在电子显微镜下证明,类红膜主要存在于花粉及花粉管内基体附近的囊泡膜上。

2.1.5 Ca^{2+} , pH及其他细胞内离子的实时定量测定 利用Flu-3, Indo-1, Fura-Red等多种荧光探针,激光扫描共聚焦显微镜能完成活细胞生理信号的动态监测,可对单个细胞内各种离子(Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} , Mg^{2+} 和pH)的比例及动态变化作毫秒级实时定量分析;可以定量探测胞质中 Ca^{2+} 对启动因子、化学因子、生长因子及各种激素等刺激反应;使用荧光探针Flu-3和SNARF可同时测定 Ca^{2+} 和pH值。DONG Fa-cai等^[17]以拟南芥叶片下表皮为材料,分别用表皮生物分析法和LSCM技术研究茉莉酸甲酯(JA-Me)在气孔关闭过程中胞质 Ca^{2+} 浓度的变化及其与气孔关闭的关系,发现在一定浓度范围内, Ca^{2+} 能促进拟南芥叶片的气孔关闭,而且加入胞质 Ca^{2+} 通道的阻断剂和螯合剂EGTA,能明显地降低JA-Me对气孔关闭的促进作用,因此,胞质 Ca^{2+} 可能是JA-Me促进气孔关闭的重要信号转导因子。

2.2 细胞生物学功能

2.2.1 荧光光漂白恢复(FRAP)技术 激光扫描共聚焦显微镜能借助高强度脉冲式激光照射细胞的某一区域,造成该区域荧光分子的光淬灭,其周围的非淬灭荧光分子将以一定速率向受照区域扩散,扩散速率可直接进行监测,由此揭示细胞结构和各种变化的机制,用于研究细胞骨架构成、核膜结构和大分子组

装等^[18]。CHUONG S D X 等^[19]用免疫荧光技术和 LSCM 观察藜科植物的 C4 光合系统的各种细胞器的分布,发现肌动蛋白纤维和微管形成具有高度组织结构的网络,这些网络结构与叶绿体的分布有关,其中,微管对叶绿体和其他一些细胞器的极性定位有重要作用。藜科植物通过在单个细胞中划分 2 个不同的区域,将拥有 2 种形态的叶绿体以及其他一些细胞器、光合作用酶分配到细胞的不同区域,从而达到典型 C4 植物花环结构的效果,从而提高了植物的光合作用速率。

2.2.2 胞间通讯的研究 激光扫描共聚焦显微镜通过测量细胞缝隙连接介导的分子转移,观察相邻细胞之间的胞间通讯,用于研究肿瘤启动子、生长因子以及细胞内 Ca^{2+} 、pH 和 cAMP 对缝隙连接和胞间通讯的影响。

2.2.3 细胞膜流动性测定 LSCM 可通过专用计算机软件,对细胞膜流动性进行定量和定性分析,在研究膜的磷脂酸组成分析、药物效应和作用位点、温度反应测定及物种比较等方面有重要作用^[20]。

2.2.4 光活化技术 LSCM 具有光活化测定功能,可以控制探针分解的瞬间光波长和照射时间,从而掌握多种生物活性产物及其他化合物发挥作用的时间和空间,以此研究可形成化合物的许多重要活性物质(如神经递质、细胞内第二信使 cAMP、核苷酸、 Ca^{2+} 及某些荧光素等)在细胞增殖、分化等生物代谢过程中的作用^[21]。

通过上述介绍,共聚焦显微镜强大的功能可见一斑,与其他的生物学技术(如免疫组化技术、原位杂交技术等)相配合,它的检测范围可进一步扩大。利用共聚焦显微镜几乎都能定性、定量地检测细胞内的任何一种生化成分。

3 LSCM 的应用技巧

3.1 样品制备

3.1.1 切片 实验标本要求单层,并能很好地贴附在样品池中。组织标本无论是石蜡切片还是冰冻切片,均为越薄越好。常用的贴附剂有:多聚赖氨酸、伴刀豆球蛋白、蛋清、琼脂明胶 cell-Tak 和 vectabond 等。

3.1.2 培养细胞 选用购置仪器时所带的薄底培养瓶进行培养效果更佳。

3.1.3 激光共聚焦观察样品处理注意事项 需尽量保持生物材料的天然状态,避免膨胀、变形和失真,因此,须将生物材料做固定处理;制片必须薄而透明,才能在显微镜下成像,除将材料切成薄片或通过轻压或其他手段使之分散外,还需采用其他方法使它透明和染色,以便更好地观察到结构的细节。需长期保存的制片,还应进行脱水和封固。显微制片法一般包括切片法、整体封片法、涂片法和压片法 4 类^[22]。

3.2 荧光探针的选择 激光扫描共聚焦显微镜对标本的成像模式非常依赖于荧光探针所发出的荧光,不同的实验要求不同的分子探针,选择合适的荧光探针是有效地进行实验并获取理想实验结果的保障。荧光探针的选择主要从以下几个方面考虑:1) 现有仪器采用的激光器。如热带生物技术研究所在购进的 LSCM(FV-1000)采用氩离子激光器,激发波长为 351 ~ 364 nm,488 nm 或 514 nm,可激发多种荧光探针。2) 荧光探针的光稳定性和光漂白性。在进行荧光定量和动态荧光监测时,要求荧光探针有较好的光稳定性,甚至越高越好,也可通过减少激光扫描次数或降低激光强度的方法,来减轻光漂白的程度。但在进行膜流动性或细胞间通讯检测时则需要荧光探针既有一定的光稳定性又要有一定的光漂白性^[23-24]。3) 荧光的定性或定量。仅做荧光定性或仅是观察荧光动态变化时,选择单波长激发探针,无需制作工作曲线。做定量测量时,最好选用双波长激发比率探针,利于制定工作曲线^[25-26]。4) 荧光探针的特异性和毒性。尽量选用毒性小、特异性高的探针,如绿色荧光蛋白(GFP)是从北大西洋水母(*Aequorea victoria*)中发现的三肽衍生物,随后的研究表明,编码 GFP 蛋白的基因可以在其他生物中表达,如植物、哺乳动物等,并且没有任何细胞毒性。事实上,通过 DNA 重组技术,荧光蛋白可以和任何其他生物的细胞蛋白融合,产生具有荧光信号的融合蛋白,而且不需要任何其他的激发因子^[27-28]。5) 荧光探针适用的 pH。大多数情况下,细胞的 pH 在生理条件下,但当 pH 不在此范围时,考虑适用该环境 pH 的荧光探针是有必要的,同时,应注意染液自身的 pH 值会影响带电荷的荧光探针与胞内组份之间的结合,因此,在染液的配备时需加以考虑。不同的荧光探针在不同标本的效果常有差异,除综合考虑以上因素以外,有条件者应进行染料的筛选,以找出最适的荧光探针。此外,许多荧光探针是疏水性的,很难或不能进入细胞,需使用其乙酰羟甲基酯(acetoxymethyl, AM)形式,也就是荧光探针与 AM 结合后变成不带电荷的亲脂性化合物易于通过质膜进入细胞,在细胞内荧光探针上的 AM 被非特异性酯酶水解,去掉 AM 后的荧光探针不仅可与细胞

内的靶结构或靶分子结合且不易透出质膜,从而能有效地发挥作用。另外,从海洋生物分离出的其他荧光蛋白也拓展了荧光蛋白在红外光谱区域的应用^[29]。如DsRed荧光蛋白及其衍生物,可以在575~650 nm的区域进行分析,这是从海葵(*Discosoma Striata*)中分离的蛋白^[30]。荧光蛋白HcRed是从紫海葵中得到的1种蛋白,可以在更长的波谱中激发。

随着荧光探针设计和共聚焦分析技术的日益进步,一些在热带植物研究中的疑难问题,如发射光干扰、激发光强度等问题,将得到进一步解决,这将为收集和分析更复杂的荧光图像数据提供更大的帮助。

4 LSCM 的使用与选择

1) 根据标本选择的荧光探针用激发波长这种参数选择激光器类型。

2) 根据荧光探针的发射波长选择相应的滤片,但K 滤镜无滤片扫描则不需要这一步,最好根据现有的仪器配制选择荧光探针。

3) 根据实验目的选择合适的软件。一般仪器的软件分静息状态图像分析软件、动态测量软件和特殊软件。

4) 按软件要求设置有关参数,进行观察和分析。

5 结 语

激光扫描共聚焦显微镜是20世纪80年代发展起来的高科技医学图像分析仪器,与传统的荧光显微镜相比,分辨率有了进一步提高,最重要的是清晰度大为提高。激光扫描共聚焦显微镜的发明,是对电子显微镜的一个补充,在生物学尤其是细胞生物学领域有着广阔的应用前景。LSCM在不损伤细胞的前提下,对活组织、活细胞进行观察和测量,这不仅省去了繁琐的样品前期处理过程(如脱水、脱蜡、染色等),而且观察过的样品还可以继续用于其他的研究。这种功能对于细胞培养、转基因研究尤为重要,可以说是LSCM最大的优势。当然,LSCM也存在一些不足,比如激光管有使用寿命的限制;检测过程中需要使用荧光染料,增加了检测成本;激光存在荧光漂白作用及细胞毒性,应在使用过程中加以关注。随着生命科学研究的深入,生物医学研究已进入后基因组时代,基因组学的研究从结构基因组学过渡到功能基因组学,对功能蛋白质组学的研究也不断深入,与其他生物技术相结合,LSCM必将在大分子结构与功能等新兴研究方向上得到广泛的应用。

参考文献:

- [1] REN Hong, LIU Yongsheng, SUN Jingsan. Observation of rice embryo sac development with confocal laser scanning microscopy [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1998, 40(9): 786–789.
- [2] WANG Dongmei, WANG Xuechen, ZHANG Weicheng. Revealing the F-actin networks in interphase nuclei of garlic clove cells by confocal fluorescence microscopy [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(11): 1167–1171.
- [3] LAMPRECHT A, SCHFER U F, LEHR C M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000(49): 1–3.
- [4] CLAXTON N S, FELLERS T J, DAVIDSON M W. Laser Scanning Confocal Microscopy [EB/OL]. Tokyo: Olympus, 2006 [2012-11-23]. <http://www.olympusconfocal.com/theory/LSCMIntro.pdf>.
- [5] 张莹, 谷巍, 陈建伟. 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)在植物细胞学中的应用[J]. *南京中医药大学学报*, 2011, 27(2): 195–197.
- [6] 张向阳, 赵磊. 激光扫描共聚焦显微镜的基本功能及在医学各领域中的应用[J]. *邯郸医学高等专科学校学报*, 2002, 15(3): 369–372.
- [7] 霍霞, 吕建勋, 杨仁东, 等. 激光共聚焦显微镜与光学显微镜之比较[J]. *激光生物学报*, 2001, 10(1): 76–78.
- [8] 王琰, 王燕, 龚坚, 等. 激光共聚焦显微镜的应用技术[J]. *现代仪器*, 2009, 15(4): 50–52.
- [9] LI Linguang, WANG Ying, WANG Yuxia, et al. Pollen characteristic and embryonic development of tenses apple [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(4): 662–666.
- [10] WANG Dongmei, WANG Xuechen, ZHANG Weicheng. Revealing the F-actin networks in interphase nuclei of garlic clove cells by confocal fluorescence microscopy [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(11): 1167–1171.
- [11] YE Xiulin, XU Shixiong. Confocal microscopic observations on microtubular cytoskeleton changes during megasporogenesis and megasporogenesis in *Phaius tankervilleae* BL [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1996, 38(9): 677–685.

- [12] 薛秀花, 张晓嫣, 郑东, 等. 激光共聚焦显微成像技术在植物细胞微丝骨架三维动态观察中的应用[J]. 现代仪器, 2010, 16(5): 50–54.
- [13] 吴立柱, 赵宝存, 齐志广, 等. 小麦糖原合成酶激酶的亚细胞定位及功能鉴定[J]. 中国农业科学, 2006, 39(4): 842–847.
- [14] 王鹏程, 王晨, 米华玲, 等. 拟南芥中一个未知功能蛋白的叶绿体亚细胞定位研究[J]. 植物学通报, 2006, 23(3): 249–254.
- [15] ZHU Hongliang, LIU Xiangdong, LU Yonggen. Changes of microtubule pattern during the megasporogenesis of polyembryonic rice strain APIV [J]. Chinese J Rice Sci, 2002, 16(2): 134–140.
- [16] LI Yan, YAN Longfei, XU Shixiong, et al. A study of membrane skeleton spectrin poretion in pollen and pollen tube [J]. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(6): 643–645.
- [17] DONG Facai, CUI Xianghuan, AN Guoyong, et al. The role of Ca^{2+} signaling in methyl jasmonate-induced stomatal closure in arabidopsis thaliana [J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2002, 28(6): 457–462.
- [18] 韩卓, 陈晓燕, 马道荣, 等. 激光扫描共聚焦显微镜实验技术与应用[J]. 科技信息, 2009(19): 27–28.
- [19] CHUONG S D X, FRANCESCHI V R, EDWARDS G E. The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C4 photosynthesis in chenopodiaceae species [J]. The Plant Cell, 2006, 18(9): 2207–2223.
- [20] 李鹏云, 曾晓荣. 激光扫描共聚焦显微镜技术简介[J]. 泸州医学院学报, 2006, 29(5): 469–471.
- [21] 王春梅, 黄晓峰, 杨家骥, 等. 激光扫描共聚焦显微镜技术[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2004.
- [22] 汪维伟, 王娅兰. 人体显微形态学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [23] HEIM R, PRASHER D C, TSIEN R Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994(91): 12501–12504.
- [24] HEIM R, TSIEN R Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, Longer wavelengths, and fluorescence resonance energy transfer [J]. Curr. Biol, 1996(6): 178–182.
- [25] Sullivan K F, KAY S A. Green Fluorescent Proteins, Methods in Cell Biology Volume 58 [M]. New York: Academic Press, 1999.
- [26] TSIEN R Y. The green fluorescent protein [J]. Ann. Rev. Biochem, 1998(67): 509–544.
- [27] CONN P M. Green Fluorescent Protein, Methods in Enzymology Volume 302 [M]. New York: Academic Press, 1999.
- [28] HICKS B W. Green Fluorescent Protein, Methods in Molecular Biology Volume 183 [M]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2002.
- [29] WACHTER R M, ELSLIGER M A, KALLIO K, et al. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein [J]. Structure, 1998(6): 1267–1277.
- [30] MATZ M V, FRADKOV A F, LABAS Y A, et al. Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species [J]. Nature Biotechnology, 1999(17): 969–973.

Future Prospects of Laser Scanning Confocal Microscope in Bioscience

YANG Zixian, WANG Hongxing, YI Xiaoping

(Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture/ Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China)

Abstract: The principle and features of laser scanning confocal microscope (LSCM) are described, based on which the application of laser scanning confocal microscope (LSCM) in bioscience studies and some application skills is summarized.

Key words: laser scanning confocal microscope; fluorescence probe; bioscience