

Alexa Fluor 荧光标记在细胞学和分子生物学研究中的应用^{*}

王洪苏 关桂静 刘金香^{**}

(西南大学柑桔研究所 中国农业科学院柑桔研究所 重庆 400712)

摘要 Alexa Fluor 染料为罗丹明或香豆素的衍生物,是一种含有活性基团的有机荧光染料,具有激发光谱窄、发射光谱宽、量子产率高、光稳定性好,以及受温度、pH 影响小等优点。近年来, Alexa Fluor 染料作为荧光探针在细胞学和分子生物学研究领域取得了广泛应用,但对 Alexa Fluor 染料进行系统阐述的文章很少。因此,在综述 Alexa Fluor 染料的基本特征和优缺点的基础上,阐述其在细胞学和分子生物学研究中的应用,并对其应用和发展方向进行展望。

关键词 荧光标记 Alexa Fluor 细胞学 分子生物学

中图分类号 Q819

20 世纪 40 年代,Coons 等^[1-2]采用荧光素标记抗体检测可溶性肺炎球菌多糖抗原,首次创建了荧光抗体检测技术。随后,荧光分析方法广泛应用于高效液相色谱、蛋白质分析、核酸分析和流动细胞计数等领域^[3-5]。目前,用于荧光分析的荧光染料主要是荧光素类^[6]、罗丹明类^[7]、Alexa 系列^[8]、Cy 系列^[4,9]等有机荧光染料。随着 Alexa Fluor 染料在医学研究中的广泛应用^[10-13],引起了生物科学研究者的关注,逐渐成为细胞学和分子生物学研究中常用的有机荧光染料。

1 Alexa Fluor 染料概述

Alexa Fluor 染料是罗丹明或香豆素等染料的衍生物,利用磺酸或磺酸盐代替罗丹明或香豆素等染料中的氢原子合成。主要应用于生物研究中对组织、细胞和生物分子的标记和定位。Alexa Fluor 染料包含一系列染料,其激发光和发射光光谱覆盖大部分可见光和部分红外线光谱区域,对绝大多数荧光显微镜都适用。荧光染料命名是由染料名称与其最佳激光扫描光谱纳米数值构成的^[14]。根据不同的最佳激光扫描光谱, Alexa Fluor 系列染料可分为几种不同的类型,其发射光谱、激发光谱、常用的激发光和与其光谱范围相似的有

机荧光染料如表 1^[14]所述。其中最常用的是绿色荧光探针 Alexa Fluor 488。与绝大部分常用的绿色荧光探针相比, Alexa Fluor 488 更加明亮,不容易荧光猝灭,背景更低。

按照荧光染料探针分子与生物分子的结合方式,荧光探针可分为嵌入式荧光探针和含有活性基团的荧光探针。作为荧光探针, Alexa Fluor 染料的磺酸酯($R-SO_2O-$)活性基团与生物分子中的伯胺相结合形成琥珀酰亚胺酯稳定结构,从而实现了对蛋白质、核酸等生物分子的 Alexa Fluor 荧光标记。

1.1 蛋白质 Alexa Fluor 标记

蛋白质由氨基酸残基组成,其 Alexa Fluor 标记利用了高效和简单的琥珀酰酯(NHS)化学反应,选择性地将 Alexa Fluor 染料与邻近蛋白质的氨基基团($-NH_2$,包括赖氨酸侧链和氨基端)相连接,共价结合形成一个稳定的琥珀酰亚胺酯结构。多肽的 Alexa Fluor 标记与蛋白质的标记相同;而环肽没有末端氨基,只能通过磺酸基团与赖氨酸(Lys)侧链氨基相结合,完成其 Alexa Fluor 标记。

Alexa Fluor 染料没有选择性,必须与生物活性载体连接,利用生物活性物质间的选择性,才能达到选择性识别靶标蛋白的目的。Alexa Fluor 染料通过与抗体、多肽等某些生物活性载体共价结合形成稳定的琥珀酰亚

收稿日期:2015-04-29 修回日期:2015-06-17

^{*} 重庆自然科学基金资助项目(CSTC2012JJA80036)

^{**} 通讯作者,电子邮箱:ljinxiang@126.com

表 1 Alexa 系列染料
Table1 A series of Alexa dye

Fluorescent dyes	Molecular mass	Extinction coefficient [L/(cm·mol)]	Abs(nm)	Em(nm)	Usual excitation	Equivalent dyes
Alexa Fluor 350	410	19 000	346	442	UV excitation	AMCA, AMCA-X
Alexa Fluor 405	1 028	34 000	402	421	Blue laser excitation	Pacific blue dye, Cascade blue dye
Alexa Fluor 430	702	16 000	434	540	Blue laser excitation	Lucifer yellow
Alexa Fluor 488	825(643)	71 000	495	519	488 nm argon and Kr/Ar laser line	Fluorescein, Cy2
Alexa Fluor 532	721	81 000	531	554	Frequency-doubled Nd-YAG laser	Rhodamine 6G
Alexa Fluor 546	~1 260	104 000	556	573	Hg lamp, red filter set	Cy3, TMR
Alexa Fluor 555	~1 250	150 000	555	565	Hg lamp & 543nm green HeNe	Cy3
Alexa Fluor 568	792	91 300	579	604	568nm Kr/Ar laser line	Lissamine rhodamine B
Alexa Fluor 594	820	73 000	591	618	647nm Kr/Ar laser line	Texas red
Alexa Fluor 647	~1 300	23 900	650	665	647nm Kr/Ar laser line	Cy5
Alexa Fluor 660	~1 100	132 000	650	690	647nm or 633nm laser lines	Cy5
Alexa Fluor 680	~1 150	184 000	679	702	Xenon-are or far-red diode laser	Cy5.5
Alexa Fluor 700	~1 400	192 000	696	719	Xenon-are or far-red diode laser	Cy5.5
Alexa Fluor 750	~1 300	240 000	752	779	Xenon-are or dye pumped lasers	Cy7

胺酯结构后,再利用这些生物活性载体与靶标蛋白的相互作用(抗体与抗原的免疫结合等),完成蛋白质的 Alexa Fluor 标记。

1.2 核酸分子 Alexa Fluor 标记

核酸是由磷酸、戊糖和碱基组成的生物大分子,根据戊糖的不同分为脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。DNA 碱基中的氨基($-\text{NH}_2$)在 DNA 双螺旋结构内部形成稳定的氢键,因此 Alexa Fluor 染料不能直接对保持完整结构的 DNA 进行标记。Alexa Fluor 对核酸的标记常常通过氨基标记尿苷三磷酸(uridine triphosphates, UTP)、脱氧尿苷三磷酸(deoxyuridine triphosphates, dUTP)和脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphates, OBEA-dCTP)进行,插入的氨基成为联系核苷酸和 Alexa Fluor 染料的桥梁。对 DNA 的 Alexa Fluor 标记可以通过以下步骤完成:①在酶的作用下,通过 DNA 合成将 $-\text{NH}_2$ 标记的 dUTP 插入到 DNA 中,使 DNA 表面带上 $-\text{NH}_2$;②Alexa Fluor 染料中的 C=O 双键与标记 dUTP 的 $-\text{NH}_2$ 相互结合形成稳定的琥珀酰亚胺酯结构。

对核酸的标记也可以先将 Alexa Fluor 染料与带 $-\text{NH}_2$ 的 UTP、dUTP、OBEA-dCTP 反应形成稳定的琥珀酰亚胺酯结构后,再在酶作用下使带有 Alexa Fluor 染

料的核苷酸参与核酸合成。该方法广泛应用于染色体和 mRNA 荧光原位杂交(fluorescent *in situ* hybridization, FISH)、原位 PCR 和原位 RT-PCR,以及在阵列和微阵列基础上进行基因表达研究及突变检测等研究。

2 Alexa Fluor 染料的优点

对于荧光探针,好的光稳定性是灵敏度高、特异性强的基础。相较于传统有机荧光染料, Alexa Fluor 系列染料具有以下优势。①发射光谱窄。相较于传统有机荧光染料, Alexa Fluor 染料具有较窄的发射光谱,从而降低不同检测的交叉水平。②荧光强度高,光稳定性好。Panchuk-Voloshina 等^[15] 对 Alexa Fluor、AMCA、Lucifer Yellow、荧光素、罗丹明 6G、四甲基罗丹明和 Cy3 等染料标记羊抗鼠抗血清、链霉亲和素(streptavidin)、麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)和伴刀豆球蛋白(concanavalin)等生物分子的荧光信号强度进行对比分析发现,尽管这些染料具有与 Alexa Fluor 染料类似的发射和激发光谱,但在各染料的吸收和发射光谱范围内 Alexa Fluor 染料量子产率更高、荧光强度更强、光稳定性更好。③受温度和 pH 的影响较小。Wirth 等^[16] 为研究古细菌细胞壁生长模式,对嗜热古细菌

Prococcus furiosus、*Pyrobaculum aerophilum*、*Pyrobaculum islandicum* 和 *Pyrobaculum organotrophum* 进行 Alexa Fluor 标记,发现在 100℃ 高温下 Alexa Fluor 染料仍可保持稳定 12h 以上,可用于原位分析研究。Panchuk-Voloshina 等^[15]对 Alexa Fluor 染料的发射光谱、吸收光谱和荧光信号强度进行研究,证明 Alexa Fluor 染料对 pH 变化不敏感,可在 pH 为 4 ~ 10 时保持稳定结构和强荧光。④具有良好的水溶性。无需有机试剂 Alexa Fluor 染料即可结合蛋白质,且储存不易产生沉淀。在简单缓冲溶液中 Alexa Fluor 染料表现出很少的衰落。⑤可通过标记,对不同对象进行区分。Alexa Fluor 系列染料具有不同的颜色,可根据实验需要,用不同 Alexa Fluor 染料标记不同的对象,从而实现区分。Malic 等^[13]利用 Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 488 和 Hoechst 核酸染料将白色念珠菌(*Candida albicans*)、人类重组口腔上皮角细胞(reconstituted human oral epithelium, RHE)和 RHE 细胞核分别标记成红色、绿色和蓝色,研究白色念珠菌对人类口腔上皮的侵染特性,并对是否存在与侵染类型相关的固有株系差异进行分析。⑥价格实惠,使用方便。随着 Alexa Fluor 染料在医学和农业领域的广泛应用使其商业生产得到了基本普及,价格实惠;其标记产品的生产降低了实验的复杂程度。因此, Alexa Fluor 染料是一种很好的荧光探针,可以应用于活细胞研究和固定的标准样品分析。

3 Alexa Fluor 染料在细胞学和分子生物学研究中的应用

Alexa Fluor 作为一种有机荧光染料,常常作为荧光探针,对生物分子、组织和细胞等进行标记,其激发光和发射光谱覆盖大部分可见光和部分红外线光谱区域,对于绝大多数荧光显微镜都适用。

3.1 Alexa Fluor 染料在分子标记研究中的应用

3.1.1 用于生物功能蛋白标记研究 蛋白质是生命的承载者,具有运输、调节、催化、免疫和作为生物体的结构物质等功能。目前,生物蛋白的功能研究主要通过蛋白质相互作用、蛋白质亚细胞定位、RNA 干扰改变蛋白质表达和蛋白质生物信息学等方面进行^[17]。Alexa Fluor 染料是一种很好的用于蛋白质亚细胞定位研究的生物材料。Yamamoto 和 Kiss^[18]为研究植物肌动蛋白细胞骨架与花序茎和下胚轴向地性生长的相关性,结合激光共聚焦显微镜,应用 Alexa Fluor 488 标记的毒伞素(phalloidin, F-肌动蛋白高亲和探针)对模式

植物拟南芥下胚轴和花序茎内皮细胞中的肌动蛋白进行了荧光定位分析,证明肌动蛋白微丝与植物花序茎和下胚轴的向地生长无关。Lord 等^[19]将水蓼属植物 *Aponogeton madagascariensis* 组织固定后,应用 Alexa Fluor 488 标记的毒伞素和碘化丙锭将植物细胞中的肌动蛋白和细胞核分别标记成绿色和红色,定位分析植物细胞程序化死亡(plant programmed cell death, PCD)过程中植物肌动蛋白微丝密度和宽度的变化情况,从而对 PCD 过程中线粒体、肌动蛋白和半胱天冬酶类似酶的作用及相互关系进行了研究。

3.1.2 用于生物核酸分子标记 同蛋白质一样,核酸也是生命的最基本物质之一。染色体和 mRNA 的荧光原位杂交、原位 PCR 和原位 RT-PCR 等常用于核酸研究的方法都需要荧光染料的参与。Alexa Fluor 染料由于其自身的量子产率高、光稳定性强等优点,而被广泛应用。Alexa Fluor 染料对核酸分子的标记主要是通过对其核苷酸的标记进行的。Kuwayama 等^[20]利用 8 种 Alexa Fluor 染料标记不同的引物,对致泻性大肠杆菌(*Escherichia coli*)进行多重 PCR 检测,基于产物的大小和颜色,不进行电泳即可对检测结果进行判断。

除了对 DNA 和 RNA 进行标记之外, Alexa Fluor 染料也可对寡聚核苷酸进行标记,并应用于科学研究。Lu 等^[21]结合电子显微镜和共聚焦显微镜,利用 Alexa Fluor 488 标记寡聚核苷酸证明了在 dsDNA 和 ssDNA 同时存在时,黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)外壳蛋白(capsid protein, CP)可与寡聚核苷酸重组,形成一个稳定的病毒类似粒子。

3.1.3 用于生物糖类的标记 糖类是自然界中广泛分布的一类重要的有机化合物,在生命活动过程中起着重要作用,是一切生命体维持生命活动所需能量的主要来源。Goh 等^[22]利用 Alexa Fluor 488 标记的大豆凝集素对胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)进行定位,并结合共聚焦激光扫描显微镜和电子扫描显微镜对 EPS 在牛奶中的位置和分布进行研究。

3.1.4 用于生物素标记 生物素又称为维生素 H,是水溶性维生素,是合成维生素 C 的必要物质,是脂肪和蛋白质正常代谢不可或缺的物质,是维持人体自然生长、发育和正常机能健康的必要营养素。Martin 等^[23]利用 Alexa Fluor 594 标记生物素,建立了一种分析转基因植物生物素及其结合蛋白的荧光共振分析法,该方法不通过抗生素蛋白就可以分析对照植物中的生物素,且其检测时间相对于 ELISA 和 Western blot 可节约

20 倍左右。

3.2 Alexa Fluor 用于生物细胞标记研究

细胞是生物体的基本结构和功能单位。对细胞的生物学进行研究可从显微镜技术、细胞培养与细胞杂交、细胞成分的分布、细胞成分的示踪和细胞 DNA 的重组等方面进行^[24], 细胞成分示踪可以通过同位素标记和荧光染料标记等方法进行。

3.2.1 用于植物细胞标记 Kodama 和 Fujishima^[25] 利用与 Alexa Fluor 488 共价结合的麦芽凝集素、GS-II、刀豆 A 对绿藻 (*Chlorella*) 细胞壁进行标记, 研究在氢氧化钠和这些凝集素作用下绿藻的稳定性及绿藻对草履虫的侵染性, 发现绿藻对草履虫的侵染性与其细胞壁上的糖类残基和细胞壁中不溶于碱的成分无关, 而与绿藻在细胞膜上定植的能力有关。

基于油菜素内酯 (brassinosteroid, BR) 与油菜素内固醇不敏感 1 型 (brassinosteroid insensitive 1, BRI1) 特异性结合的特点, Irani 等^[26-27] 利用 Alexa Fluor 647 标记槲寄生酮形成的具有生物活性的油菜素内酯类似物 (Alexa Fluor 647-castasterone, AFCS), 对拟南芥植物活细胞中的 BRI1-AFCS 进行了可视化研究。

3.2.2 用于动物细胞标记 Fan 等^[28] 基于 Alexa Fluor 488 仅限于被注射的神经细胞, 而神经生物素可以通过间隙连接进入其他神经细胞中, 将 Alexa Fluor 488 染料与带有链霉亲和素-Cy3 的神经生物素共同注入水蛭的运动神经元, 对水蛭运动神经元进行研究, 发现水蛭运动神经元可以通过染料耦合到约 25 个神经元, 其中近一半是中间神经元; 这种染料耦合与生理上确定的电位连接相关, 但在运动神经元间整流连接处是单向不可逆的; 并且在兴奋和抑制的运动神经元间存在异常的电位连接。

3.2.3 用于真菌细胞标记 Figueroa-López 等^[29] 利用 Alexa Fluor 488 标记的麦胚凝集素可与真菌细胞壁中几丁质特异性结合的特点, 对玉米镰刀菌 (*Fusarium verticillioides*) 菌丝进行绿色荧光标记, 通过人工培养基上绿色荧光信号的强度和密度对真菌的生物量进行估计, 从而分析细菌对玉米镰刀菌生长情况的影响, 筛选出了对玉米镰刀菌具有拮抗作用的细菌菌系; 同时建立了一种用于筛选抗镰菌的细菌抗菌剂的高通量荧光实验方法。

3.2.4 用于细菌细胞标记 Alexa Fluor 染料对细菌细胞标记后不会影响细菌孢子的萌发、生长动力及热抵抗能力。因此, Stojkovic 等^[30] 利用胺反应性的 Alexa

Fluor 488 琥珀酰亚胺酯与炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*) 孢子形成 Alexa-蛋白质复合物, 从而借助 Alexa Fluor 488 的绿色荧光对炭疽杆菌与巨噬细胞在炭疽杆菌感染时的相互作用进行了可视化研究。

3.3 用于病毒标记

Alexa Fluor 染料不仅可以用于生物细胞标记, 也可用于病毒、类病毒和朊病毒等非细胞生物的标记。病毒的 Alexa Fluor 标记主要是通过 Alexa Fluor 染料与病毒粒子外壳蛋白的氨基结合形成稳定的琥珀酸亚胺结构完成, 有直接标记和间接标记两种方式。

3.3.1 Alexa Fluor 直接标记 病毒粒子的 Alexa Fluor 直接标记是由 Alexa Fluor 染料与病毒粒子外壳蛋白的氨基直接结合成稳定的结构, 而使病毒带上 Alexa Fluor 染料。Kamiya 等^[31] 用 Alexa Fluor 488 标记苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) 的出芽型病毒 (budded virus, BV), 对 BV 与巨型单层囊泡 (giant unilamellar vesicle, GU) 的融合进行分析发现在 pH 为 5~6 时促进融合, 且融合效率受膜性质的影响。

3.3.2 Alexa Fluor 间接标记 病毒的间接标记除了利用 Alexa Fluor 染料与病毒粒子外壳蛋白氨基的结合外, 还与蛋白质同其他物质的相互作用有关, 如抗体与抗原的免疫反应。Chen 等^[32] 利用 Alexa Fluor 488 标记的羊抗兔抗体标记莴苣侵染性黄化病毒 (*Lettuce infectious yellows virus*, LIYV) 的抗体, 从而对粉虱中 LIYV 病毒粒子进行免疫荧光定位分析, 证明了 LIYV 病毒可以通过粉虱进行传播, 并且其病毒粒子被保留在粉虱的前肠和食囊中。

3.4 用于生物物理机制研究

Kinoshita 等^[33] 利用 Alexa Fluor 532 与细胞色素 c-末端半胱氨酸的共价结合对细胞色素 c (Cyt c) 进行标记, 从而实现不用对蛋白质进行固定而对 Cyt c 单分子折叠过程进行研究。发现 Cyt c 在自然状态、未折叠状态和中间态三种状态下展现出不同强度的荧光信号, 从而建立了研究蛋白质折叠动力学及其他生物物理过程的方法。

4 展 望

近年来, 一些以量子点 (quantum, QDs) 为代表的、新型的荧光探针在各方面的研究中也有应用^[34-38]。相较于传统有机染料, 无机半导体纳米材料——QDs 具有量子产率高、光寿命长、不易受光漂白的影响、可在

同一波长下同时对多种生物分子进行分析等优点^[39-42]。迄今为止,大多数合成 QDs 的方法都需加入有毒性的化学试剂^[43-44],使合成的 QDs 对生物造成细胞毒性。Wang 等^[45]利用 Alexa Fluor 染料与 SiO₂ 纳米材料合成的 Alexa Fluor-SiO₂ 量子点,其光信号强、光漂白弱、有机功能成分损失少;与 SiO₂ 合成的量子点相比,其量子产率更高。因此,随着科学的进步,量子点细胞毒性的克服,Alexa Fluor 系列染料与无机半导体纳米材料的结合是未来荧光染料的发展方向。

Alexa Fluor 系列染料广泛应用于单分子检测、荧光标记、细胞生物学、生物物理过程等生物科学研究的各个方面。Alexa Fluor 染料相较于传统有机染料不仅具有量子产率高、光寿命长、不易受光漂白的影响等优点,而且特异性高、不易受温度和 pH 等因素的影响。鉴于这些优点,Alexa Fluor 系列染料在细胞学和分子生物学研究中的作用在未来将会得到更多体现。

参考文献

- [1] Coons A H, Kaplan M H. Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 1950, 91(1): 1-13.
- [2] Coons A H, Snyder J C, Cheever F S, et al. Localization of antigen in tissue cells; IV. antigens of rickettsial and mumps virus. *Journal of Experimental Medicine*, 1949, 91(1): 31-38.
- [3] Levsky J M, Singer R H. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, 2003, 116(14): 2833-2838.
- [4] Huang B, Wu H K, Bhaya D, et al. Counting low-copy number proteins in a single cell. *Science*, 2007, 315(5): 81-84.
- [5] Eremin S A, Gallacher G, Lotey H, et al. Single-reagent polarization fluorimmunoassay of methamphetamine in urine. *Clin Chem*, 1987, 33(10): 1903-1906.
- [6] Weiner H L, Ault K A, Fields B N. Interaction of reovirus with cell-surface receptors. 1. Murine and human lymphocytes have a receptor for the hemagglutinin of reovirus Type-3. *Journal of Immunology*, 1980, 124(5): 2143-2148.
- [7] Urano Y, Sakabe M, Kosaka N, et al. Rapid Cancer detection by topically spraying a g-glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Science Translational Medicine*, 2011, 3(110): 1-10.
- [8] Kecskes M, Kumar T S, Yoo L, et al. Novel Alexa Fluor-488 labeled antagonist of the A(2A) adenosine receptor: application to a fluorescence polarization-based receptor binding assay. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 80(4): 506-511.
- [9] Bates M, Huang B, Dempsey G T, et al. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 2007, 317(21): 1749-1753.
- [10] Hofmann W A, Stojiljkovic L, Fuchsova B, et al. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nature Cell Biology*, 2004, 6(11): 1094-1101.
- [11] Gao Y, Islam M S, Tian J, et al. Inactivation of ATP citrate lyase by Cucurbitacin B: A bioactive compound from cucumber, inhibits prostate cancer growth. *Cancer Letters*, 2014, 349(1): 15-25.
- [12] Morris G P, Uy G L, Donermeyer D, et al. Dual receptor T cells mediate pathologic alloreactivity in patients with acute graft-versus-host disease. *Science Translational Medicine*, 2013, 5(188): 1-9.
- [13] Malic S, Hill K E, Ralphs J R, et al. Characterization of *Candida albicans* infection of an *in vitro* oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. *Oral Microbiology Immunology*, 2007, 22: 188-194.
- [14] Hibbs A R. *Confocal Microscopy for Biologists*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004: 201-238.
- [15] Panchuk-Voloshina N, Haugland R P, Bishop-Stewart J, et al. Alexa Dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1999, 47(9): 1179-1188.
- [16] Wirth R, Bellack A, Bertl M, et al. The mode of cell wall growth in selected archaea is similar to the general mode of cell wall growth in bacteria as revealed by fluorescent dye analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1556-1562.
- [17] 蒋英芝, 贺连华, 刘建军. 蛋白质功能研究方法及技术. *生物技术通报*, 2009, 9: 38-44.
- [18] Jiang Y Z, He L H, Liu J J. The methods and technologies for protein function study. *Biotechnology Bulletin*, 2009, 9: 38-44.
- [19] Yamamoto K, Kiss J Z. Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2002, 128(2): 669-681.
- [20] Lord C E N, Dauphinee A N, Watts R L, et al. Unveiling interactions among mitochondria, caspase-like proteases, and the actin cytoskeleton during plant programmed cell death (PCD). *PLoS One*, 2013, 8(3): 1-11.
- [21] Kuwayama M, Shigemoto N, Oohara S, et al. Simultaneous detection of virulence factors from a colony in diarrheagenic *Escherichia coli* by a multiplex PCR assay with Alexa Fluor-labeled primers. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(1): 119-120.
- [22] Lu X Y, Thompson J R, Perry K L. Encapsulation of DNA, a

- protein and a fluorophore into virus-like particles by the capsid protein of *Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology*, 2012, 93(Pt5): 1120-1126.
- [22] Goh K K T, Haisman R D, Singh H. Examination of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* using confocal laser scanning and scanning electron microscopy techniques. *Journal of Food Science*, 2005, 70(4): 224-229.
- [23] Martin H, Murray C, Christeller J, et al. A fluorescence polarization assay to quantify biotin and biotin-binding proteins in whole plant extracts using Alexa-Fluor 594 biocytin. *Analytical Biochemistry*, 2008, 381(1): 107-112.
- [24] 范维珂. 细胞分子生物学研究方法概论. 中国病理生理杂志, 1987, 3(2): 116-118.
Fan W K. The research method of cell molecular biology. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 1987, 3(2): 116-118.
- [25] Kodama Y, Fujishima M. Infectivity of *Chlorella* species for the ciliate *Paramecium bursaria* is not based on sugar residues of their cell wall components, but on their ability to localize beneath the host cell membrane after escaping from the host digestive vacuole in the early infection process. *Protoplasma*, 2007, 231(1-2): 55-63.
- [26] Irani N G, Di Rubbo S, Russinova E. *In Vivo* Imaging of Brassinosteroid Endocytosis in *Arabidopsis*. In: Otegui M S. *Plant Endosomes*. New York: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, 2014: 107-117.
- [27] Irani N G, Di Rubbo S, Mylle E, et al. Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(6): 583-589.
- [28] Fan R J, Marin-Burgin A, French K A, et al. A dye mixture (Neurobiotin and Alexa 488) reveals extensive dye-coupling among neurons in leeches; physiology confirms the connections. *Journal of Comparative Physiology A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 2005, 191(12): 1157-1171.
- [29] Figueroa-López A M, Cordero-Ramirez J D, Quiroz-Figueroa F R, et al. A high-throughput screening assay to identify bacterial antagonists against *Fusarium verticillioides*. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(Suppl 1): S125-133.
- [30] Stojkovic B, Torres E M, Prouty A M, et al. High-throughput, single-cell analysis of macrophage interactions with fluorescently labeled *Bacillus anthracis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(16): 5201-5210.
- [31] Kamiya K, Kobayashi J, Yoshimura T, et al. Confocal microscopic observation of fusion between baculovirus budded virus envelopes and single giant unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1798(9): 1625-1631.
- [32] Chen A Y, Walker G P, Ng J C, et al. A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(40): 16777-16782.
- [33] Kinoshita M, Kamagata K, Maeda A, et al. Development of a technique for the investigation of folding dynamics of single proteins for extended time periods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(25): 10453-10458.
- [34] Feder D, Gomes S A, de Thomaz A A, et al. *In vitro* and *in vivo* documentation of quantum dots labeled *Trypanosoma cruzi-Rhodnius prolixus* interaction using confocal microscopy. *Parasitology Research*, 2009, 106(1): 85-93.
- [35] Huang A, Qiu Z, Jin M, et al. High-throughput detection of food-borne pathogenic bacteria using oligonucleotide microarray with quantum dots as fluorescent labels. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 185: 27-32.
- [36] Ng J C. A Quantum dot-immunofluorescent labeling method to investigate the interactions between a *Crinivirus* and its whitefly vector. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4(77): 1-10.
- [37] Vasudevanpillai B, Damodaran M, Kenichi N, et al. Quantum dot-insect neuropeptide conjugates for fluorescence. *Langmuir*, 2007, 23(20): 10254-10261.
- [38] Rispaal N, De Matteis L, Santos R, et al. Quantum dot and superparamagnetic nanoparticle interaction with pathogenic fungi: internalization and toxicity profile. *American Chemical Society Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(12): 9100-9110.
- [39] Pinaud F, Michalet X, Bentolila L A, et al. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 1679-1687.
- [40] Mi C, Wang Y, Zhang J, et al. Biosynthesis and characterization of CdS quantum dots in genetically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2011, 153(3-4): 125-132.
- [41] Bao Y, Li J, Wang Y, et al. Preparation of water soluble CdSe and CdSe/CdS quantum dots and their uses in imaging of cell and blood capillary. *Optical Materials*, 2012, 34(9): 1588-1592.
- [42] 王萍, 毛红菊. 纳米材料在生物医学检测中的应用. 中国生物工程杂志, 2011, 31(9): 88-95.
Wang P, Mao H J. The application of nanomaterials in biomedical detection. *China Biotechnology*, 2011, 31(9): 88-95.
- [43] Akbarzadeh A, Zare D, Farhangi A, et al. Synthesis and characterization of gold nanoparticles by tryptophane. *American Journal of Applied Science*, 2009, 6(4): 691-695.
- [44] Chen G, Yi B, Zeng G, et al. Facile green extracellular biosynthesis of CdS quantum dots by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 2014, 117: 199-205.
- [45] Wang W, Nallathamby P D, Foster C M, et al. Volume labeling

with Alexa Fluor dyes and surface functionalization of highly sensitive fluorescent silica (SiO_2) nanoparticles. *Nanoscale*,

2013, 5(21): 10369-10375.

Application of Alexa Fluor in Cytology and Molecular Biology

WANG Hong-su GUAN Gui-jing LIU Jin-xiang

(Citrus Research Institute, SouthWest University, Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract Alexa Fluor is a derivative of rhodamine or coumarin. As an organic fluorescent dye, Alexa Fluor has some obvious advantages such as narrow excitation spectrum, wide emission spectrum, high quantum yield, good light stability and less temperature and pH impact. Recently, though Alexa Fluor dye gets a wide range of applications in the field of cytology and molecular biology research, there are few articles about Fluor Alexa dyes. elaborate Alexa Fluor's application and make prospects for its development in cytology and molecular biology science based on the characteristics are elaborated.

Key words Fluorescently labeled Alexa Fluor Cytology Molecular biology

广 告 索 引

北京中原领先科技有限公司(封面),伯乐生命医学产品(上海)有限公司(封面拉页),默克化工技术(上海)有限公司(封二),赛多利斯科学仪器(北京)有限公司(前彩1),仕必纯贸易(上海)有限公司(前彩2),上海森松制药设备工程有限公司(前彩3),镇江东方生物工程设备技术有限责任公司(前彩4-5),伯乐生命医学产品(上海)有限公司(前彩6-7),梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司(前彩8),中国生物工程学会第六次全国会员代表大会暨第九届学术年会(前彩9),通用电气医疗系统贸易发展(上海)有限公司(目次对页),赛默飞世尔科技(中国)有限公司(封三),慕尼黑上海分析生化展(封底)