

活体成像操作手册

For research use only!

本品仅供科研使用，严禁用于治疗！

版本号：v2.2

目录

1. 技术简介	1
2. 实验原理	1
3. 实验流程	2
3.1 材料与准备	2
3.2 制作动物模型	3
3.3 活体成像	3
3.4 数据处理	4
3.5 影响因素	4
4. 案例分析	4
5. 常见问题解答（FAQ）	5
6. 客户文章(部分)	7
7. 相关产品	7

1. 技术简介

可见光活体成像技术，主要采用生物发光(Bioluminescence)和荧光(Fluorescence)这两种技术，广泛地应用于医学及生物学研究领域。

使用生物发光技术进行活体成像研究，如用荧光素酶(Luciferase)基因标记细胞或者 DNA，是一种活体生物的光生化反应，特异性强，无自发荧光，灵敏度高，在体内可以检测到几百个细胞，检测深度在 3-4cm，可以精确定量。然后通过高度灵敏的 CCD 设备形成图像，直接监控活体生物体内的细胞活动和基因行为，研究人员借此可以观测肿瘤的生长及转移、感染性疾病发展过程、特定基因的表达等生物学过程。

使用荧光技术进行活体成像研究，如用荧光蛋白(如 GFP, RFP 等)对细胞或者 DNA 进行标记，只需用相当简单的设备进行观察及捕获成像照片，并且不需要完全黑暗的环境。GFP 荧光相对不受外部环境的影响，因为发色团受蛋白质的三维结构保护。标记有 GFP 绿色荧光蛋白的细胞已用于追踪活啮齿动物的转移和血管生成，GFP 绿色荧光蛋白表达细菌已用于研究小鼠中空间迁移和感染过程的行为。

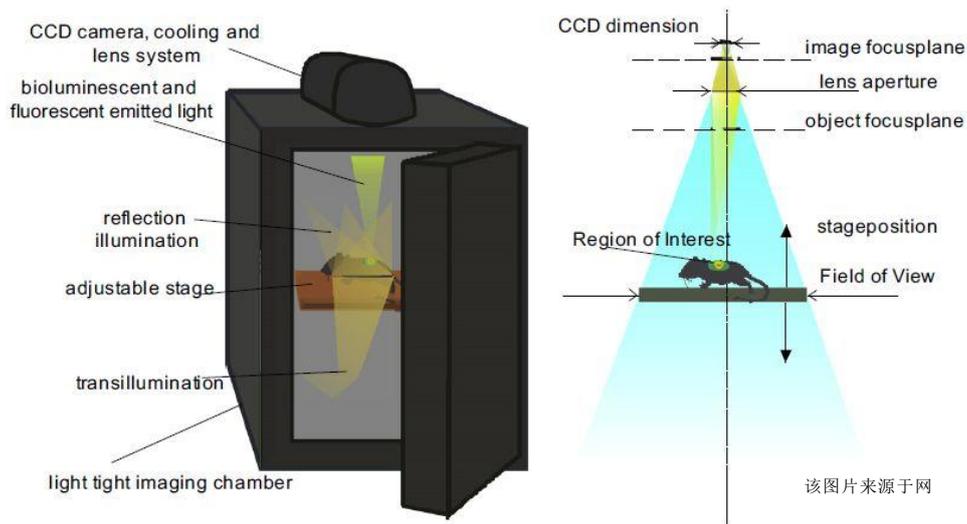


图 1 活体成像技术

2. 实验原理

生物发光 是将 Fluc 基因整合到细胞染色体 DNA 上以表达荧光素酶，当外源（腹腔或静脉注射）给予其底物荧光素(luciferin)，即可在几分钟内产生发光现象。这种酶在 ATP 及氧气的存在条件下，催化荧光素的氧化反应才可以发光，因此只有在活细胞内才会产生发光现象，并且光的强度与标记细胞的数目线性相关。然后在体外利用敏感的 CCD 设备形成图像。此外，荧光素酶基因可以被插入多种基因的启动子，成为某种基因的报告基因，通过监测报告基因从而实现目标基因的监测。

生物发光本质为化学荧光，荧光素被荧光素酶氧化的过程中可以释放波长广泛的可见光光子，其波长范围为 460-630nm（平均波长为 560nm）。在哺乳动物体内，血红蛋白是吸收

可见光的主要成分，能吸收蓝绿光波段中的大部分可见光；水和脂质主要吸收红外线，但其均对波长为 590-800nm 的红光近红外线吸收能力较差，因此波长超过 600nm 的红光虽然有部分散射消耗但大部分可以穿透哺乳动物组织而被高灵敏 CCD 检测到。



图 2 荧光素发光反应原理

荧光发光 是通过激发光激发荧光基团到达高能量状态，而后产生发射光。考虑到不同荧光物质的发射光谱 EX (excitation spectrum) 和激发光谱 EM (emission spectrum) 的不同，要选择对应的激发和发射滤片。

比较区别：

	优点	缺点
生物发光	特异性强，灵敏度高，且无自发荧光； 能够进行精确定量；	信号较弱，检测时间较长； 需要高度灵敏的仪器设备； 需要底物；
荧光成像	信号强度大，可直接观察成像； 有多种蛋白和染料可用；	存在非特异性荧光； 检测深度受到局限； 需要不同波长激发光，难精确体内定量；

活体成像技术主要有以下几个方面应用：

1. 标记细胞，如疾病及药物研究、干细胞研究、细胞凋亡研究；
2. 标记 DNA 及 RNA，特别是基因治疗方面的应用；
3. 标记基因，如转基因动物模型研究，基因表达和药物代谢研究；
4. 标记细菌，如研究蛋白质相互作用、代谢等。利用活体生物荧光成像技术可以检测到，并能连续观察其对机体的侵染过程以及抗病毒药物和抗生素对其病理过程的影响。

3. 实验流程

3.1 材料与准备

(1) 荧光素溶液配置

称取 1g 荧光素钾盐或钠盐溶解于 66.6 ml 无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 DPBS 中，配成 15 mg/mL 的荧光素溶液；充分溶解并混匀后使用 0.2 μm 滤膜过滤（可吹入惰性气体，如氮气，以防止氧化），于 -80°C 避光条件保存，一年内有效。

(2) 麻醉剂：0.7% 戊巴比妥钠溶液或异氟烷气体

- (3) 注射器和针头
- (4) CCD 成像设备

3.2 制作动物模型

通过分子生物学克隆技术与单克隆细胞技术，将萤火虫荧光素酶的基因稳定整合到预期观察的细胞的染色体，筛选出能稳定表达荧光素酶的细胞株。

通过尾静脉注射、皮下移植或原位移植等方法接种荧光素酶标记的细胞或组织于小鼠体内。该生物发光标记与荧光标记相比，前者更适用于深部脏器和体内转移的观察，因为当标记荧光波长较短时，则穿透效率不高，局限于观察皮下瘤和解剖后脏器的直接成像。

3.3 活体成像

- (1) 提前一天对实验动物进行禁食处理，减少荧光干扰；
- (2) 第二天，根据动物体重按照 $10 \mu\text{L/g}$ 剂量腹腔注射 0.7% 戊巴比妥钠溶液或使用活体成像仪器自带的气体麻醉系统进行异氟烷气体麻醉代替；
- (3) 5 min 左右后，动物彻底进入昏迷状态，食指轻轻按压动物胸口，测试心跳保证动物是成活状态，将昏迷动物放到活体成像仪器的暗室中；
- (4) 腹腔注射 使用 25 G 的针头，1 mL 注射器，按照动物体重每 kg 注射 150 mg 荧光素底物，进针 5 mm，斜向上 30 度角。那么，20 g 重的小鼠需要注射 $200 \mu\text{L}$ 15 mg/mL 荧光素溶液；

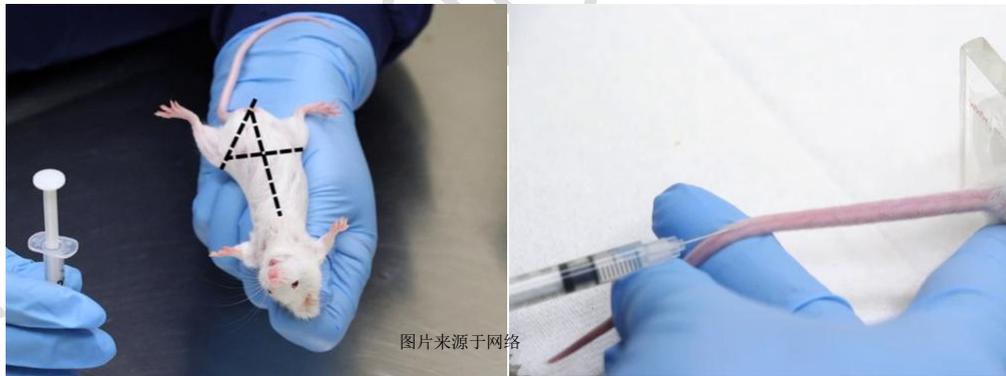


图 3 (A) 腹腔注射 (B) 静脉注射

- (5) 静脉注射 通常指小鼠的尾部或者眼眶静脉注射，注射前将动物置于加热灯下约 5 min，或者将尾巴浸泡于温水中以扩张血管。操作时将小鼠固定于鼠筒或者烧杯中，使用 1 mL 注射器 26 G 针头，或者使用胰岛素注射器 28 G 针头，确保注射器中无气泡后，乙醇消毒尾部，缓慢注射。

注：注射液体的最大体积不可超过血容量的 10%，如 20 g 小鼠其血容量约为 2 mL，因此最大注射量不超过 200 μL 体积。

- (6) 向体内注射后约 15-20 min（待光信号达到最强稳定平台期），进行成像分析。

- (7) 小鼠经过常规麻醉（气麻、针麻皆可）后放入成像暗箱平台，软件控制平台的升降到一个合适的视野，自动开启照明灯（明场）拍摄第一次背景图。下一步，自动关闭照明灯，在没有外界光源的条件下（暗场）拍摄由小鼠体内发出的特异光子。明场与暗场的背景图叠加后可以直观的显示动物体内特异光子的部位和强度，完成成像操作。
- (8) 将成像完成后的动物依次放回到饲养笼中，2 小时后进行动物健康状态观察，或根据实验要求处死动物进行数据收集。

3.4 数据处理

小动物活体成像图像处理软件除了提供含有光子强度标尺的成像图片外，还能计算分析发光面积、总光子数、光子强度的相关参数供实验者参考。

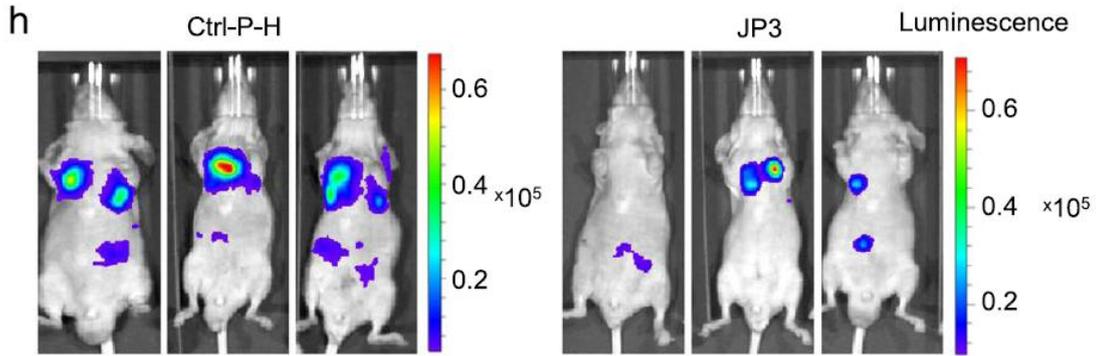
3.5 影响因素

- (1) 曝光时间：原则上，如预实验时拍摄出图片非特异性杂点多，需降低曝光时间；反之，如信号过弱可适当延长曝光时间。但曝光时间的延长，不仅增加了目的信号，对于背景噪音也存在一个放大效应。同一批实验应保持一致的曝光时间，同时还应保持标本相对位置和形态的一致，从而减少实验误差。
- (2) 背景荧光：进行荧光成像时，实验者可选择背景荧光低不容易反光的黑纸放在动物标本身下，减少金属载物台的反射干扰。动物体内很多物质在受到激发光激发后，会发出荧光，产生的非特异性荧光会影响到检测灵敏度。背景荧光主要是来源于皮毛和血液的自发荧光，皮毛中的黑色素是皮毛中主要的自发荧光源，其发光光线波长峰值在 500-520 nm 左右，在利用绿色荧光作为成像对象时，影响最为严重，产生的非特异性荧光会影响到检测灵敏度和特异性。动物尿液或其他杂质如没有及时清除，成像中也会出现非特异性信号。
- (3) 阈值：由于各厂商的图像分析软件不同，实验数据分析方法也有区别。活体成像系统使用时，实验者考虑到非特异性杂信号，以及成像图片美观等方面，可能会调节信号的阈值，因此在分析信号光子数或信号面积时，应考虑阈值的改变对实验结果的影响。正确选择 ROI 区域，可提高分析实验数据的准确性。

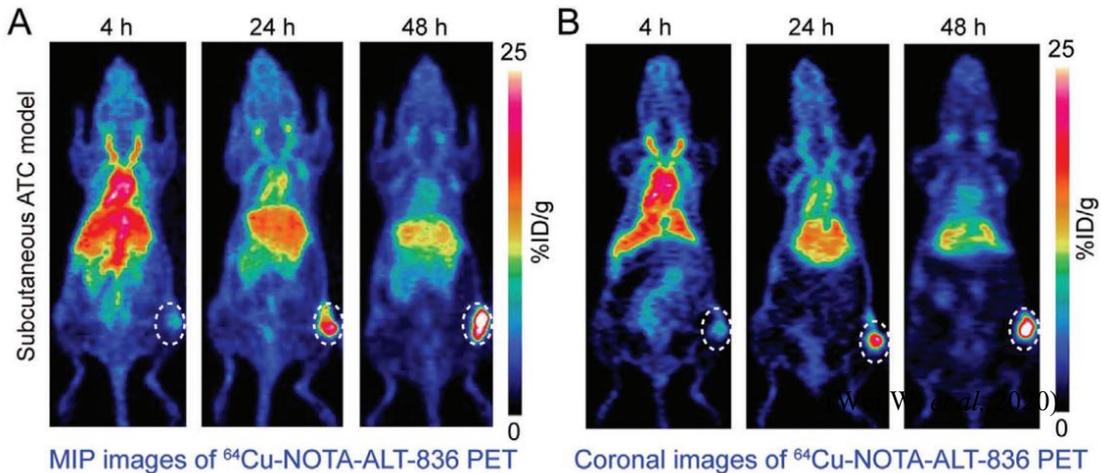
4. 案例分析

案例 1: 在 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 杂志中发表的题目为: JP3, an antiangiogenic peptide, inhibits growth and metastasis of gastric cancer through TRIM25/SP1/M- MP2 axis 研究中使用了吉满生物科技（Genomeditech）提供的 Luciferase 荧光素酶报告基因慢病毒，成功证实了抗癌多肽 JP3 能够抑制胃癌细胞在小鼠体内的转移。

生物发光成像结果如下，与对照组相比，JP3 肽处理组小鼠胃癌转移的荧光强度明显降低。



案例 2: 在 European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 杂志中发表的题目为: Development and characterization of CD54-targeted immunoPET imaging in solid tumors 研究中使用了吉满生物科技 (Genomeditech) 提供的 pGMLV-CMV-Lu 活体成像慢病毒, 成功构建了甲状腺癌(ATC)动物模型, ^{64}Cu -NOTA-ALT-836 在皮下 ATC 模型中的免疫 pet 成像如下图, 在注射示踪剂 48 小时后, 最大强度投影(MIP, 图 A)和冠状位(图 B)免疫 pet 图像显示了 THJ-16T 肿瘤清晰轮廓。



5. 常见问题解答 (FAQ)

(1) 荧光素钠盐和荧光素钾盐有什么区别?

答: 目前的研究发现二者在使用效果上无明显差异, 均溶于水, 但荧光素钠盐溶解度 (100mg/mL) 要高于荧光素钾盐 (60mg/mL)。在体内实验研究中, 研究者更倾向于选择荧光素钾盐。

(2) 为什么溶解荧光素钠盐或者钾盐的时候需用不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 离子的 PBS, 有无别的盐溶液可用来溶解荧光素?

答：PBS 中的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 抑制某些蛋白酶的活性。此外 Mg^{2+} 是催化荧光氧化的重要因素， Ca^{2+} 是和腔肠素氧化有关的离子，因此建议使用 DPBS, 其他的盐溶液也可用来溶解荧光素，但要避免溶液中的阳离子对实验造成影响。

(3) 描述荧光素酶的发光特性？

答：荧光素腹腔注射老鼠后约 1 min 后，能够表达荧光素酶的细胞开始发光，10 min 后强度达到稳定的最高点，在最高点持续约 20-30 min 后开始衰减，约 3 h 后荧光素排除，发光全部消失，最好的检测时间是在注射后 15-35 min 内。其动力学曲线如下图：

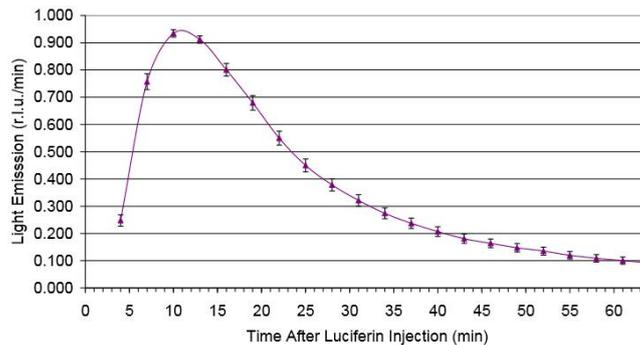


图 4 荧光素酶动力学曲线

(4) 怎么将荧光素注入小鼠体内，注射方法之间的区别是什么？

答：荧光素可通过腹腔注射或尾部静脉注射注入小鼠体内。约 1 min 可扩散到小鼠全身。大部分情况下使用荧光素浓度为 150 mg/kg。对于 20 g 的小鼠约使用 3 mg 的荧光素即可。对于腹腔注射来讲，扩散较慢，开始发光较慢，持续发光时间较长。对于荧光素的尾部静脉注射，扩散快，开始发光快，但发光持续时间较短。

(5) 荧光素底物可以透过血脑屏障吗？

答：底物荧光素，约 280 道尔顿，其脂溶性非常好,很容易透过血脑屏障。注射一次荧光素能保持小鼠体内荧光素酶标记的细胞发光 30-45 min。每次荧光素酶催化反应只产生一个光子，这是肉眼无法观察到的。

(6) 荧光素酶的表达稳定性如何？

答：通过慢病毒稳定筛选等过程，荧光素酶基因是能够插到细胞染色体内的。当细胞进行分裂、转移、分化时，荧光素酶也得到持续稳定的表达，荧光素酶的半衰期约为 3 h，故只有活细胞才能持续表达荧光素酶。

(7) 用荧光素进行活体成像与绿色荧光蛋白检测体内发光相比优势何在？

答：荧光素酶的偏红光比绿色荧光蛋白的绿光在体内的穿透性要强近 100 倍。荧光素是靠和荧光素酶的相互作用发光，特异性很强，得到的信噪比较高；荧光蛋白需要激发光来产生反射光，但是在检测的过程中，老鼠的皮毛，皮肤都会产生非特异性荧光，使得信噪比降低。荧光蛋白检测更适合于体外检测，荧光素酶的检测更适合于体内检测。

(8) 如何用荧光素酶基因标记干细胞？

答：可标记组成性表达的基因，做成转基因小鼠，干细胞就被标记了，从该小鼠的骨髓取出造血干细胞，移植到另外一只小鼠的骨髓内，可以用该技术示踪造血干细胞在体内的增殖和分化及迁徙到全身的过程。另外一种方法是用慢病毒标记神经干细胞。

(9) 为何生物发光成像技术能看到体内发出的可见光？

答：两个主要原因使可见光成像技术能够看到体内发出的微弱的可见光：一是高灵敏度的制冷 CCD 镜头，可达到零下-105°C，使体内发出的非常少的光子也能够检测到。二是绝对密封的暗箱装置，可以屏蔽包括宇宙射线在内的所有光线。

6. 客户文章(部分)

(1) Wei W, Liu Q, Jiang D, et al. Tissue Factor-Targeted ImmunoPET Imaging and Radioimmunotherapy of Anaplastic Thyroid Cancer[J]. Advanced Science, 2020: 1903595.

IF = 15.84

(2) Wei W, Jiang D, Lee H J, et al. Development and characterization of CD54-targeted immunoPET imaging in solid tumors[J]. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2020: 1-11.

IF = 7.182

(3) Chen J J, Ren Y L, Shu C J, et al. JP3, an antiangiogenic peptide, inhibits growth and metastasis of gastric cancer through TRIM25/SP1/MMP2 axis[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2020, 39(1): 1-14.

IF = 7.068

(4) Luo T, Gao Y, Zhangyuan G, et al. lncRNA PCBP1-AS1 Aggravates the Progression of Hepatocellular Carcinoma via Regulating PCBP1/PRL-3/AKT Pathway[J]. Cancer Management and Research, 2020, 12: 5395.

IF = 2.886

(5) Zhao R, Bei X, Yang B, et al. Endothelial cells promote metastasis of prostate cancer by enhancing autophagy[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2018, 37(1): 1-12. IF = 7.068

7. 相关产品

货号	名称
GM-040611	D-Luciferin Sodium Salt(D 荧光素钠盐)
GM-040621	D-Luciferin Potassium Salt(D 荧光素钾盐)

GM-2439LV18	CMV-Luc-PGK-Puro Lentivirus
GM-8980LV19	CMV-GFP-Luc-Puro Lentivirus
GM-0220IV15	CMV-mCherry-T2A-Luc-PGK-Blasticidin
GM-10619LV18	CMV-mCherry-Luc-Puro Lentivirus
GM-0220IV01	CMV-RFP-T2A-Luciferase Lentivirus
GM-0220IV02	CMV-GFP-T2A-Luciferase Lentivirus
GM-0220IV03	CMV-Luciferase-RFP-TK Lentivirus
GM-0220IV04	UBC-RFP-T2A-Luciferase Lentivirus
GM-0220IV05	UBC-GFP-T2A-Luciferase Lentivirus
GM-0220IV06	UBC-Luciferase-RFP-TK Lentivirus
GM-0220IV07	MSCV-RFP-T2A-Luciferase Lentivirus
GM-0220IV08	MSCV-GFP-T2A-Luciferase Lentivirus