

Part III. 实验操作说明

TECHNICAL NOTE

Pre-clinical *in vivo* imaging

Kinetic Analysis of
Bioluminescent Sources

生物荧光动力学分析

生物荧光动力学分析

为了获取最精确的生物发光信号，需要更进一步了解基础动力学行为包括被检测光信号的产生和获取。注射后，生物发光底物先分布于全身，后逐渐与靶细胞内的荧光素酶反应。以萤火虫荧光素酶为例，在有 **ATP, Mg²⁺**和氧气存在的条件下，**D**-荧光素经催化氧化产生发光现象。产生的体内光信号被我们检测并精确定量。**D**-荧光素在体内的分布受多种因素的影响，其中包括注射方式，机体代谢以及靶组织的位置等。

常用的注射方式包括腹膜内注射，皮下注射和静脉注射，目前，前两种方式应用较广泛。将一定量的底物溶液注射到小动物腹膜内是目前最常用的底物注射方法。采用该方法注射，有时会将底物注射到某些组织内而不在腹腔内，这种情况尤其在患有严重疾病以及瘦弱的小鼠身上发生。这常常会导致得到混乱的数据，如在靶细胞未发光或其它小鼠或同一只小鼠不同时间相对比光信号极弱。在这种情况下，对注射底物失误的挽回方法是等待 2-3 小时荧光素被完全代谢后再次注射。正是由于此原因，许多人采用后颈部皮下注射，掌握正确的注射方法后能够显著降低注射失败率。更多有关皮下注射与腹膜内注射底物的对比内容，见 *Inoue et. al., 2009, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 36:771-779*。尾静脉注射底物，光信号峰在一到两分钟内出现，并且成像平台期非常短，失误率更高，因此不建议采用该注射方法。

当建立一种新的动物模型时，代谢问题往往被忽视，但代谢能够显著影响底物在体内的分布。通常情况问题是由于动物应变和处理动物的过程而导致。简单来说，动物的不同应变行为可能会产生不同的代谢速率从而产生不同的代谢动力学曲线。此外，如何处理动物是主要的影响因素。您在麻醉前还是麻醉后注射底物？如果在注射底物后麻醉小鼠，能够保证麻醉时间保持一致吗？在成像之前是否将小动物持续放于加温板上或者放在IVIS成像台上保温？从本质上讲，对于每一次成像，这些问题的答案保持一致就可以了。至于建议，我们倾向于在麻醉前注

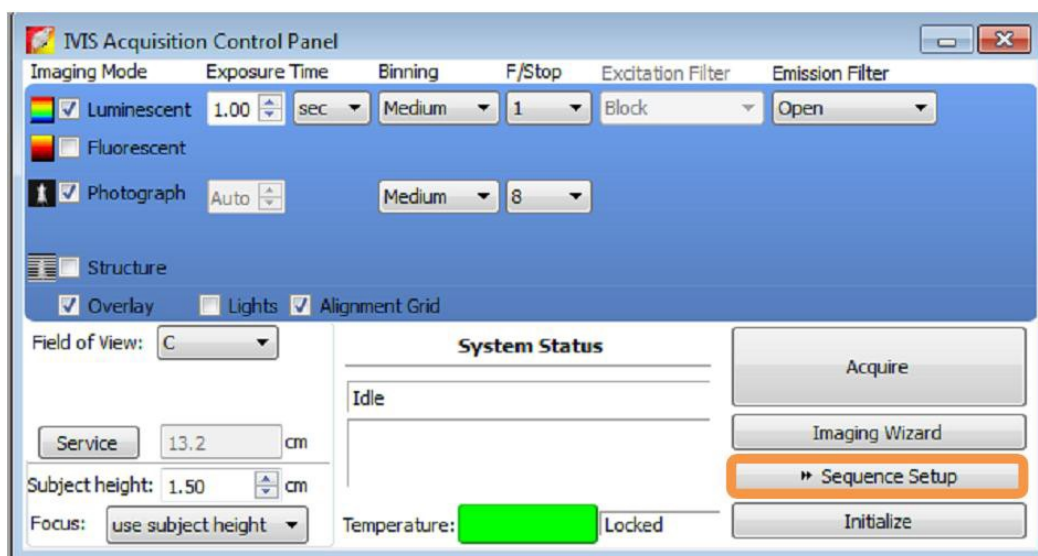
射底物，并且建议在麻醉小动物后保持小鼠的体温。麻醉状态会降低小动物的代谢，因此有可能威胁到实验动物的健康状态而改变实验结果。

D-荧光素被认为可以穿过细胞膜和血脑屏障，但注射位点不同穿过细胞膜和血脑屏障所需的时间会有所不同。当然，为了确保光强峰值的出现，透过时间越长需要底物在体内分布的时间越长。文献 *Burgos et. al. 2003 BioTechniques 34:1184-1188* 很好的比较了原位侧位肿瘤与脑肿瘤。结果显示，一旦底物到达靶组织，荧光素酶的量会影响到检测限并可以使底物浓度曲线改变。对于每个实验室新得到的细胞系，通常出现一个新的代谢动力学曲线。

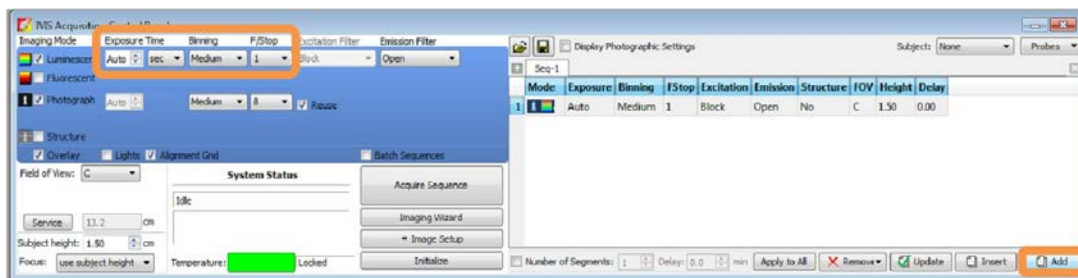
采用如下操作得到所需代谢曲线：

所需试剂耗材—无菌过滤的 D-荧光素磷酸缓冲液溶液，25G 注射针头，1mL 注射器，计时器。
注意—代谢曲线的建立不需要大量的实验动物，通常 3-5 只即可满足。

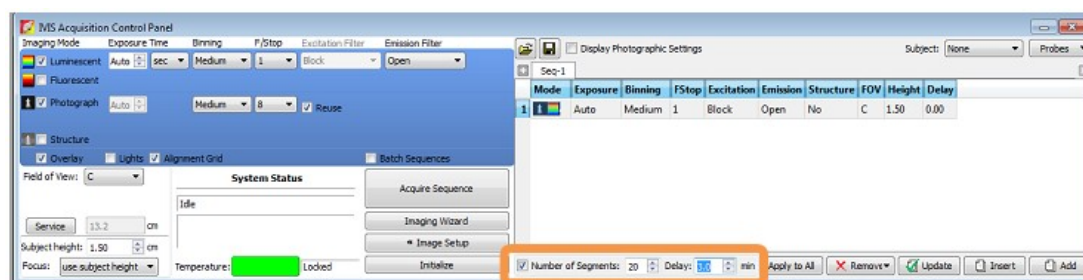
1. 在开始所有操作之前，最好将软件设置好，用来准备获取一系列代谢动力学数据。打开并初始化 Living Image 软件。
2. 在 IVIS 系统获取图像的控制面板上选择 **Sequence Setup**。



3. 选择设置合适的灵敏度。**Autoexposure** 能够给出合适的曝光时间防止曝光过度，同时建议使用默认设置 **Medium binning** 和 **F/Stop1** 为最初的图像获取参数。在图像获取过程中曝光时间会根据所需的 count 值进行调节。

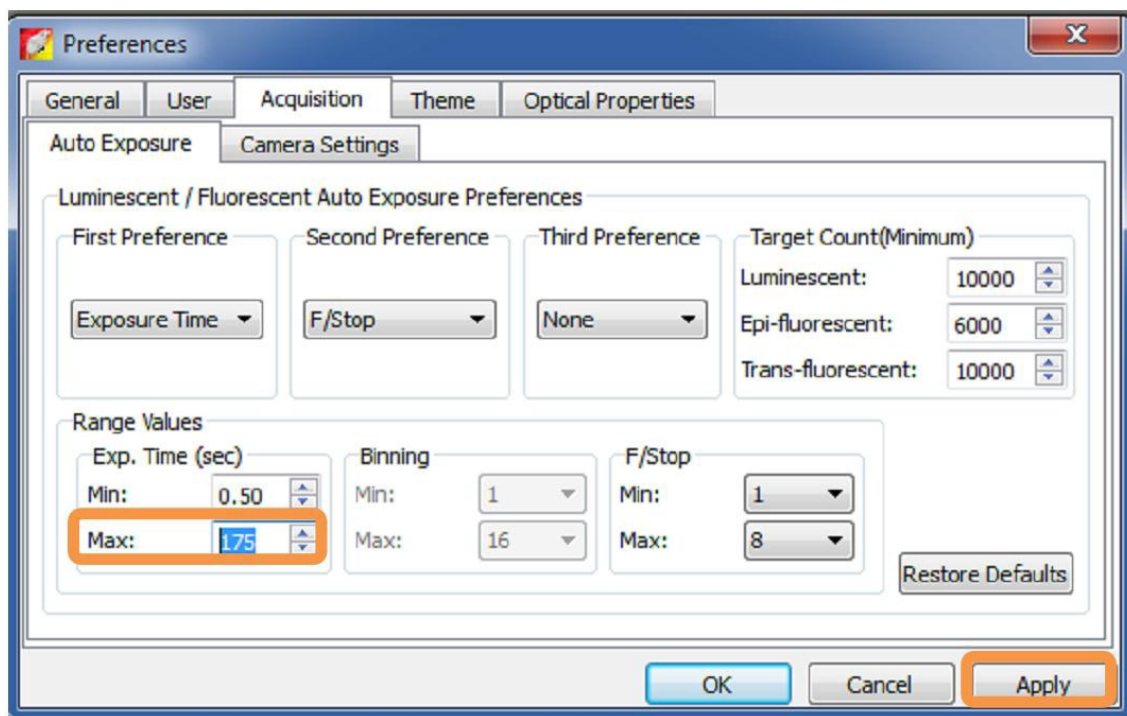


4. 调节得到满意的参数后，点击 Sequence Editor 窗口下方的 **Add** 键，设置好参数的图像会被添加到图像序列中。
5. 我们需要确保图像会根据设定的拍摄次数而重复获取，并在每次获取之间根据需要设定特定的时间间隔。曲线绘制建议 1 个小时内每 2-5 分钟绘制一个点。对于较弱的光信号，我们可以延长曝光时间，而对较强光信号，则适当减少曝光时间。例如，如果我们测量一小时，每三分钟获取一张图像，那么我们需要点击 Sequence Editor 窗口左下角 **Number of Segments** 的勾选框，输入间隔时间为 3 分钟，Segments 为 20。这意味着我们将会获取 20 张图片，每张图片间隔时间为 3 分钟，相当于总获取数据时间为 60 分钟。当点击 **Acquire Sequence** 后开始获取第一张图片。
6. 值得注意的一点是，自动曝光时间可能会覆盖捕捉图片设置的时间间隔。我们希望软件可以自动

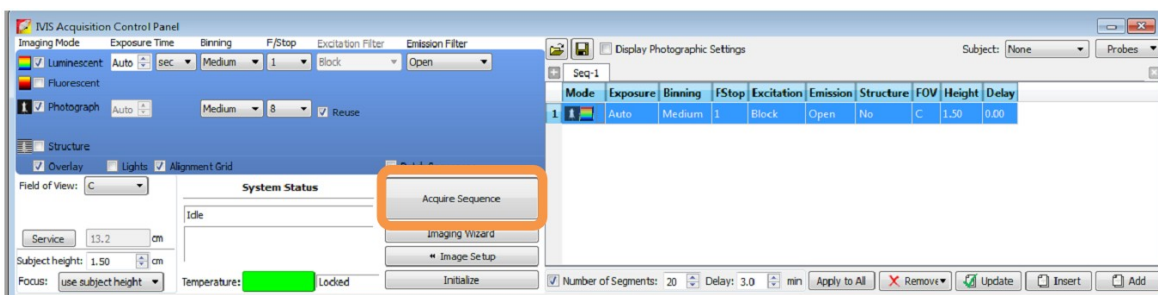


调节为灵敏度最高的最适合曝光时间，同时也要避免曝光时间覆盖时间间隔。系统默认最长曝光时间为 1min，在这种情况下我们设置时间间隔尽量小于这个时间值。然而在获取最初几张图片时，可能需要超过 1min 的曝光时间才能够得到我们需要的 count 值。那么我们建议将曝光时间设置缩短 5s，这 5s 留给图像读取和电机发动。设置方法为

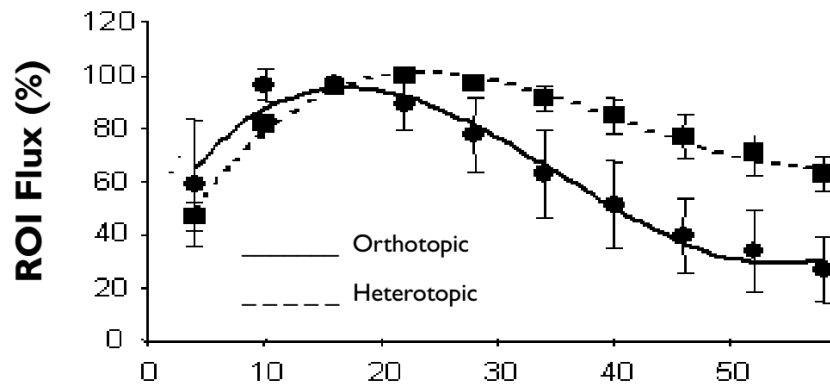
Edit>Preferences>Acquisition>Autoexposure，改变相应的最大曝光时间（显示为秒）。在这个例子中，我们的最大曝光时间设置为 175 秒。



7. 设置完毕后点击 **Apply**。
8. 软件此时已准备好进行图像的获取，同时实验人员可以开始给实验动物注射底物。
9. 将 D-荧光素以 150mg/kg 的剂量注射到动物体内。例如，体重为 10g 的小鼠则注射浓度为 15mg/mL 的底物溶液 100 μ L。
10. 采用 I.P.或 S.C.的注射方式将底物注射到小动物预定位置。
11. 等待 3 分钟后，将实验动物放到麻醉盒中进行麻醉。
12. 实验动物一旦**被麻醉**，将其转移到 IVIS 成像箱中 37℃的成像台上，并将动物头部对准麻醉面罩，保持其麻醉状态和体温。
13. 注射底物后 5min 点击 **Acquire Sequence** 开始第一张图像的获取。



14. 软件进行图像获取的时间大约为 1 小时。用 2%的异氟烷气体可以持续麻醉健康小鼠长达一个多小时而不会造成其它影响。
15. 数据将会以信号总流量与时间的关系或者最强信号百分比与时间的关系被绘制出来。



上图为 *Burgos et. al. 2003 BioTechniques 34:1184-118*. 中一个比较好的例子。典型的底物代谢曲线首先会有一个快速上升期，随后出现一个稳定的平台期，后期信号会逐渐减少。根据不同的底物注射方法，平台期的持续时间不同，通常为 10-20 分钟。为了得到最优的定量结果通常会选用曲线的平台期进行图像获取。曲线中的其它点往往会使得到的数据不准确，可造成错误的解释和较大的误差。

Luciferin and In vivo Imaging

荧光素与活体成像

荧光素与活体成像

在进行生物发光检测中荧光素是必不可少的，您的研究结果的质量很大程度上取决于荧光素的质量。这也是为什么 PerkinElmer 可以领先活体生物成像领域，因为我们正以实惠的价格提供高品质的萤光素。

荧光素是在各种不同的可生物发光微生物细胞中发现的一种化学物质。当荧光素在荧光素酶和 ATP 的催化氧化作用下可以产生蓝绿色的荧光。由于该反应需要 ATP 的存在，这可以让研究者确定是否有能量或生命的存在。由于萤火虫荧光素具有特异的发射光谱。是一个非常好的体内生物荧光成像的荧光报告物质。

荧光素可用于多种领域。它可以被用于多种体外检测，荧光素产生的光可以被光度计或闪烁计数器检测。

荧光素也可以应用于 PerkinElmer IVIS®成像系统，用于生物体内光生成的监测。由于荧光素可以穿过细胞膜进入细胞内，因此可用于检测细胞内荧光素酶的活性。

在选择荧光素底物时，有许多注意事项，如底

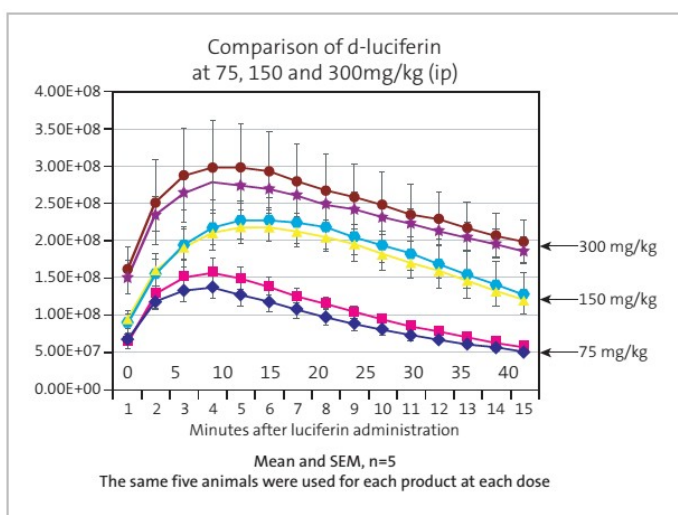
物的剂量和毒性。其中重要的是需要知道哪种荧光素在您的实验体系中是最优的。您可能要问：

- ◆ 你们的荧光素有没有被PerkinElmer 的科研人员验证？
- ◆ 你们的荧光素底物是否只专用于 PerkinElmer 工程师校准的 IVIS®成像系统？
- ◆ 你们的底物荧光素有没有在相关科研出版物中被报道？

荧光素的毒性

荧光素是一种由苯丙噻唑和噻唑羧酸基因组

成的低分子量有机化合物。荧光素被发现于萤火虫和其它荧光生



物，这些生物中在有 ATP 存在的条件下，荧光素在荧光素酶的作用下发荧光。由于荧光素分子较小，使得它具有低抗原性并几乎无免疫应答性。荧光素能够通过血脑屏障，胎盘屏障和血液

测试屏障，毒性低。

常见的问题

如何使用荧光素？

小鼠经过lux 细菌荧光素酶转染后不需要底物荧光素即可发光。在肿瘤模型和转基因模型中，荧光素采用腹腔内给药（伴随麻醉）。

如何确定荧光素在体内的分布？

荧光素分布快，易于分布于动物全身。

如果进行荧光素底物重复给药，实验动物会有何不良反应？

荧光素不会引起动物毒性（没有明显的毒性或免疫反应）。

成像前是否需要给实验动物注射底物？

细菌中，整个底物操纵子稳定存在于染色体上。因此 PerkinElmer 的生物发光细菌模型不需要注射底物。而肿瘤模型和转基因模型成像则需要注射 PerkinElmer 的底物。

荧光素参考书目

Visualizing gene expression in living mammals

using a bioluminescent reporter. Contag C.H., Spilman S.D., Contag P.R., Oshiro M., Eames B., Dennery P., Stevenson D.K. and Benaron D.A. Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, CA 94305, USA.

Photochemistry and Photobiology, October 1997, Vol. 66, pp. 523-531.

Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin. Day J.C., Tisi L.C. and Bailey M.J. Centre for Ecology and Hydrology (CEH)-Oxford, Mansfield Road, Oxford OX1 3SR, UK.jcda@ceh.ac.uk

Luminescence, January-February 2004, Vol. 19, pp. 8-20.

Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin.

Gomi K. and Kajiyama N. Research and Development Division, Kikkoman Corporation, Noda-shi, Chiba 278-0037, Japan.

JBiol Chem, September 28 2001, Vol. 276, pp. 36508-36513.

Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. Hardy J., Edinger M., Bachmann M.H., Negrin R.S., Fathman C.G. and Contag C.H. Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA. *Exp Hematol*, December 2001, Vol. 29, pp. 1353-1360

Cell uptake and tissue distribution of radioiodine labelled D-luciferin: implications for luciferase based gene imaging. Lee K.H., Byun S.S., Paik J.Y., Lee S.Y., Song S.H., Choe Y.S. and Kim B.T. Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea. *Nucl Med Commun.*, September 2003, Vol. 24, pp. 1003-1009.

In utero delivery of adeno-associated viral vectors: intraperitoneal gene transfer produces long-term expression. Lipshutz G.S., Gruber C.A., Cao Y., Hardy J., Contag C.H. and Gaensler K.M. Department of Surgery, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA. *Molecular Therapy*, March 2001, Vol. 3, pp. 284-292.

Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. Rehemtulla A., Stegman L.D., Cardozo S.J., Gupta S., Hall D.E., Contag C.H. and Ross B.D. The Center for Molecular Imaging and the Department of Radiation Oncology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109, USA. *Neoplasia*, November-December 2000, Vol. 2, pp. 491-495

Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in

living animals. Sweeney T.J., Mailander V., Tucker A.A., Olomu A.B., Zhang W., Cao Y., Negrin R.S. and Contag C.H. Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA. *Proc Natl Acad Sci USA*, October 1999, Vol. 96, pp. 12044-12049.

TECHNICAL NOTE

Pre-clinical *in vivo* imaging

Preparation of Luciferin for in vitro and in vivo Bioluminescent Assays

体内外生物发光试验
荧光素试剂的制备

体内外生物发光试验荧光素试剂的制备

- 材料**
- 体外**
- D-萤火虫荧光素，钾盐，1.0克/瓶(Xenogen 目录# xr - 1001)
 - 无菌水
 - 完全培养基

- 步骤**
1. 用无菌水制备 200X 荧光素原液 (30mg/ml)，轻轻颠倒摇动至荧光素完全溶解。混匀后立即使用或分装后-20℃冻存。
*提示：可以用 33.3 mL 蒸馏水溶解 1.0 g D-荧光素钠盐，配制成 100 mM 的储存液 (200×，浓度 30mg/ml)。也可以按试验需要量进行配置。
 2. 将 D-Luciferin 溶解于预热好的组织培养基中制备成浓度为 150 μg/ml 的工作液。用组织培养基 1 : 200 稀释储存液，配置工作液(终浓度 150μg/mL)。
 3. 去除培养细胞的培养基。
 4. 图像分析前，向细胞培养板中添加 1× 荧光素工作液，然后进行图像分析。
—注射器滤膜过滤除菌，0.2 μ m
*提示：成像前在 37℃ 下对细胞进行短时间孵育可增强信号。

- 材料**
- 体内**
- D-荧光素，钾盐，1.0克/瓶(Xenogen 目录# xr - 1001)
 - 无菌 PBS，w/o Mg²⁺、Ca²⁺
 - 注射器滤膜过滤除菌，0.2 μ m Procedure

- 步骤**
1. 用无菌 PBS 配制 D-荧光素钾盐工作液 (15mg/mL)，0.2 um 滤膜过滤除菌。
 2. 按 10 uL/g 剂量，给予 150mg/kg 荧光素工作液。(例如，10g 的小鼠注射 100 μl 工作液，被给予 1.5mg 荧光素。)
 3. 腹腔注射荧光素 10-15 min 后进行成像分*。
* 需要对每个动物模型做荧光素动力学研究以确定峰值信号获取时间。

腹腔内注射方法

最优注射点:

实验动物腹部的左下四分之一处。

针头型号:

21G 或更小（通常用 25G 针头注射荧光素溶液）

注射量:

注射剂量按每 10g 体重小鼠注射 100ul 荧光素（15mg/ml 储存）

注意：小鼠可以耐受 1ml 无刺激的腹腔注射剂

动物的摆放位置:

手动操作，腹部朝上，将动物的颅（头部）末端朝下。**轻轻的晃动小鼠 2-3 分钟，使肠道中未消化食物向下移动在下腹四分之一部位形成一个空腔。**注射点用 75% 的乙醇消毒。

注射:

注射针头插入腹腔时与腹腔的倾斜角应在 15-20° 之间。针头只穿过腹壁（大约 4-5mm）。为了安全，插入针头后应当将注射向后轻微的回抽以确保腹腔内脏（含腔组织如膀胱或结肠）被刺破。如果有物质被吸出，应拔出并处理注射器。决不能让胃肠道内物质或尿注射进入腹腔，它们所含的细菌或化学物质会引发腹膜炎。针尖应该进入动物腹腔的左下腹四分之一部位。缓慢将荧光素注入腹腔内腔，然后拔出注射器并安全丢弃。

技巧:

为了确保精确的深度和阻止荧光素更深的扩散，一块导管材料固定于针头可以确保针尖进入腹腔 4-5mm。可在一个位点注入一半量的 D-荧光素底物，并在对侧一个位点再注入另一半。然而，如果注射位点比较合适，就不必要分两次注射了。

小鼠尾静脉注射方法

在小鼠尾静脉注射前，使用戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉小鼠：先将戊巴比妥钠粉末溶于PBS，配成1%戊巴比妥钠溶液。麻醉剂量为0.08-0.1 ml戊巴比妥钠溶液/10g小鼠体重。

在进行尾静脉注射时，使用含75%酒精的酒精棉球反复擦拭小鼠尾部，可以使尾静脉血管膨胀。尾静脉注射使用带4号针头的1 ml量程的真空包装注射器即可。进针前清空注射器内空气，针头的斜截面向上，轻刺入小鼠尾部后针尖轻轻上挑，延血管平推一点点，此时用预留的手指轻推推液杆，如果针头进入静脉，则推杆的手感是无阻力的，非常流畅。如果推动的时候有阻力，或是发现进针处有泛白现象，则说明悬液没有进入静脉，而是进入了皮下，此时应立即停止推杆，重新进针。顺利进针后的注射速度（推注速度）一般控制在0.05-0.10 ml/秒，一次注入量控制在为0.05-0.15 ml/10g体重，过快或过多地注射会导致小鼠死亡。尾静脉注射应该从距小鼠尾端约1/3处开始，如果不成功，再一点点延尾静脉向尾根进针，不可一开始就在尾根进针，否则不成功，则再从尾端注射也无法成功。

备注：

- 若使用小鼠固定器，也可在不麻醉的情况下进行尾静脉注射。
- 为提高注射成功率，注射前也可使用加热灯照射小鼠尾部使尾静脉膨胀。

细胞培养技术基础

细胞复苏

1. 将细胞冻存管在手掌或是37℃的水浴锅中进行解冻和融化。
2. 细胞融化后，将细胞转入15 ml的离心管中。
3. 向管中加入5 ml细胞培养基。
4. 4℃下，1,000 rpm转速离心5分钟。
5. 吸弃细胞培养基，重新加入5 ml细胞培养基进行细胞重悬。
6. 将细胞悬液转移至T25细胞培养瓶中，37℃，5% CO₂，100%的湿度下静置培养。

细胞培养

1. 当细胞达到约75%的汇合度时，用PBS将细胞清洗三遍。
2. 向T25细胞培养瓶中加入1 ml的0.25%胰蛋白酶溶液将细胞从瓶壁上消化下来。
3. 使用显微镜检查细胞确保其全部从瓶壁上消化下来。
4. 加入5 ml细胞培养基，通过移液器反复吹打进行细胞重悬。
5. 向新的T25或T75细胞培养瓶中加入0.5-1 ml的上述细胞悬液。
6. 向细胞培养瓶中加入适当体积的细胞培养基。
7. 将细胞培养瓶置于细胞培养箱中静置培养。

备注:

1. 每个细胞系都有其独特的细胞培养基组分。
2. 对于不同种类的细胞培养瓶/皿，使用不同体积的胰蛋白酶（例如：T75细胞培养瓶中加入2 ml，T150细胞培养瓶中加入5 ml）。
3. 悬浮细胞不需要使用胰蛋白酶进行消化。
4. 每种细胞系生长速率不尽相同，细胞饲养条件需依据经验而定。

贴壁细胞的稳定转染

借助Qiagen公司的SuperFect转染试剂（产品货号 # 301305），使用pGL3荧光素酶报告基因载体（Promega公司，产品货号 # E1741）和pCI-neo哺乳动物表达载体，可以对肿瘤细胞系进行转染。

1. 向一个60 mm的细胞培养皿中植入50,000个肿瘤细胞，加入5 ml适当的细胞培养基。
2. 将细胞培养皿置于合适的细胞培养环境中。
3. 使用不含血清、蛋白或抗生素的细胞培养基对4.5 μg (4.5 μl) 的pGL3荧光素酶报告基因载体和0.5 μg (0.5 μl) 的pCI-neo哺乳动物表达载体进行稀释，稀释后的总体积为150 μl ；混合后离心数秒将管盖内的液滴离心下来。
4. 向上述DNA溶液中加入20 μl 的Superfect转染试剂，通过移液器吸吹5次或振荡器振荡10秒进行混合。
5. 上述样品室温下静置10分钟以形成转染混合物。
6. 在上述样品静置过程中，轻轻地吸弃细胞培养皿中的细胞培养基，使用4 ml PBS洗一遍细胞。
7. 向转染混合物中加入1 ml含血清和抗生素的细胞培养基，使用移液器吸吹2次进行混合，之后立即将上述混合液加入60 mm的细胞培养皿中。
8. 将细胞培养皿置于合适的细胞培养环境中3小时。
9. 轻轻地吸弃细胞培养皿中的混合液体，使用4 ml PBS清洗细胞，洗3~4次。
10. 加入新鲜的细胞培养基（含血清和抗生素），静置培养48小时。
11. 按1:10的比例进行细胞传代，使用适当的选择培养基进行细胞筛选；筛选过程中细胞培养皿置于正常的细胞培养环境，直至筛选出需要的细胞克隆。

提示：

- 1) 使用筛选抗生素新霉素（neomycin）对目标细胞做一次半数致死浓度（LC50）测试实验，以免在转染后筛选过程中细胞被全部杀死。
- 2) 使用一个新霉素质粒对目标细胞进行共转染，以便可以进行后续的筛选。
- 3) 选择细胞克隆的方法：向细胞培养液中加入荧光素，选择发光最强的细胞克隆，至少选择20个细胞克隆。
- 4) 从上述细胞克隆中，使用96孔细胞培养板，稀释分离获得单细胞克隆。

- 5) 让细胞在细胞培养箱中培养一段时间，观察它们是否稳定转染（通过荧光素生物发光进行检测），比较细胞的生长速率（表型比较）。
- 6) 体外检测发光最强的细胞在动物活体内发光不一定最强。
- 7) 建议做一系列活体表型测试，以验证这些细胞的确被稳定转染并且它们在行为表型上仍接近其亲本细胞系（有时使用荧光素酶基因转染后的肿瘤细胞会变得更具有侵略性）。例如：通过皮下注射细胞的方法，在老鼠身体两侧分别注射转染后的肿瘤细胞和其亲本细胞，然后进行比较研究。

（以上整个细胞体外转染过程耗时约3个月，但具体时间与细胞的生长速度相关）。

细胞生物发光效率检测方案

细胞准备和梯度稀释:

1. 使用完全细胞培养基配置2X荧光素溶液（300 $\mu\text{g/ml}$ ）。
2. 快速融化200X的荧光素母液，使用完全细胞培养基按照1:100的比例进行稀释（配成2X 荧光素溶液）。
3. 备注：上述2X荧光素溶液在每次实验前需要新鲜配制。
4. 将饲养在T75细胞培养瓶中的细胞用胰酶消化下来，用10 ml完全细胞培养基进行重悬。
5. 细胞计数，调整细胞浓度至100,000 细胞/ml（10,000 细胞/100 μl ）。
6. 使用完全细胞培养基按1:2的比例进行一系列梯度稀释：
 - 使用多通道移液器向96孔细胞培养板中#2-12孔中分别加入100 μl 完全细胞培养基（平行加两排）。
 - 从#1管中吸取200 μl 的细胞悬浮液加入#1孔中（平行加到两排#1孔中）。
 - 使用多通道移液器从#1孔吸100 μl 细胞液至孔#2中并混合均匀，按上述1:2比例的稀释方法从#2孔吸100 μl 细胞液至#3孔中；同样方法进行梯度稀释至#10孔， #10孔稀释并且混合后吸弃100 μl 细胞液。
7. 从#1管中吸取100 μl 的细胞悬浮液平行加入到两排#12孔中（细胞对照）。
8. 在成像前，向#1-10孔（经过梯度稀释的细胞）和#11孔（细胞培养基对照）中分别加入100 μl 的2X荧光素溶液。

成像检测:

盖上96孔细胞培养板的透明盖子，将培养板置于小动物活体成像系统中，调节样品载物台至B档位，使得整个细胞培养板都位于成像视野内。

在加入荧光素溶液2-3分钟后对96孔细胞培养板进行生物发光成像，成像曝光时间1-2分钟，bin值设为中等。

组织细胞培养建议

1. 细胞融化复苏后，需要一开始就去掉细胞培养液中的DMSO。方法如下：使用5 ml新鲜细胞培养基稀释刚融化的细胞液，混合后离心去除细胞培养基，之后使用5 ml新鲜细胞培养基进行细胞重悬，重悬后的细胞液移至T25细胞培养瓶中静置培养，第二天更换新鲜的细胞培养基。
2. 细胞获得后建议立即进行扩大培养和冻存。
3. 抗生素选择：不建议使用博莱霉素，因为该抗体会抑制细胞生长（除了B16F10细胞系，该细胞系建议一直在200-300 $\mu\text{g/ml}$ 的博莱霉素筛选压下进行饲养）。细胞在无博莱霉素的培养条件下

可以稳定表达荧光素酶至少2个月。为防止培养过程中的基因漂移，建议细胞不要培养超过10周，之后可复苏冻存的细胞进行重新培养。对于植入动物体内的细胞，建议不要超过15代。

4. 对于日常的细胞饲养，细胞系需每周传代2次，方法如下：
 - i. 靠近生物安全柜拆开新的无菌细胞培养瓶包装，取出一定数量的培养瓶放进生物安全柜中。通过倒置显微镜观察培养在细胞培养瓶（瓶盖旋紧）中细胞的形态和汇合度（瓶中贴壁细胞占培养瓶中培养面积的百分比）。对于任何细胞状态的异常需进行记录并立即通知导师。细胞汇合度达到70-90%即可进行传代，例如对于MDA-MB-435JP细胞系，培养3天即可按1:5比例进行传代或培养4天按1:10比例进行传代。具体的传代比例与每种细胞系的生长状态相关，且传代比例也不是一成不变的。细胞在传代前都需要检查其汇合度。将含待传代细胞的细胞培养瓶移至生物安全柜中。生物安全柜中每次一般都只能操作一种细胞系。如果有大量细胞系需要传代，生物安全柜内也是可以同时放入不同细胞系的，但此时一定要小心操作以防细胞系间发生交叉污染。下面所述的操作过程除非有特别说明都是在生物安全柜中进行的。
 - ii. 在新的细胞培养瓶上标上细胞系名称，传代时间，传代比例和代数（在目前细胞代数上加1）。使用移液器向新的细胞培养瓶中加入细胞培养基（T25细胞培养瓶中加10 ml细胞培养基，T75细胞培养瓶中加25 ml细胞培养基，T225细胞培养瓶中加50 ml细胞培养基）并旋紧瓶盖。（以上细胞培养基体积为经验值，具体加入的细胞培养基体积数可能随不同细胞系而变）
 - iii. 使用移液器从培养瓶中吸出细胞培养基，弃于灭菌的废液收集瓶中（烧杯或瓶子）。如果使用烧杯收集废液，建议在烧杯上覆盖无菌纱布以防止液滴溅起。可以使用同一根移液管吸出培养相同细胞系的多个培养瓶内的培养基。将细胞培养基倾倒出去，或是通过连接在收集瓶上的无菌巴氏吸管吸出细胞培养基的方法在进行大批量细胞扩增时是可以接受的，但一般不建议采用。将细胞培养基从培养瓶中倾倒出时需谨防液滴流到培养瓶颈的外壁上。
 - iv. 使用无血清的细胞培养基或PBS对贴壁细胞进行清洗，去除可能抑制胰蛋白酶消化作用的残余血清蛋白（T25细胞培养瓶中加7 ml，T75细胞培养瓶加10 ml，T-162/T-225细胞培养瓶中加15 ml）。之后使用无菌移液管吸弃培养基（或PBS）。
 - v. 向含贴壁细胞的细胞培养瓶中加入胰蛋白酶-EDTA溶液（0.25% 胰蛋白酶*，1 mM EDTA Na4），旋紧瓶盖。轻轻晃动培养瓶让溶液分散浸没过细胞培养区域。有些情况下可以使用0.05%的胰蛋白酶并且延长消化时间，但一般不推荐。
 - vi. 经过一段时间的细胞消化（需要特别注意的是：使用胰蛋白酶进行细胞消化的时间依目标细胞不同而有所差异），检查细胞状态并确保全部细胞都从瓶壁上消化下来。当细胞形态变圆并从瓶壁上脱离时（当细胞开始漂浮在瓶中时，可以拍动培养瓶使细胞从瓶壁上完全脱离），将细胞培养瓶转移至生物安全柜中，打开培养瓶，加入适当体积的完全细胞培养基（T25细胞培养瓶加5 ml，T75细胞培养瓶加10 ml，T-162/T-225细胞培养瓶加20 ml）。使用移液器反复吹打细胞悬液（移液器用—快速II档）以打散细胞聚团（推荐使用10 ml的移液管；避免移液管中吸入空气或在细胞培养瓶中吹出大量气泡）。将一定体积的细胞悬液用移液管吸

至新的预先加好新鲜细胞培养基的培养瓶中（例如：传代比例为1:5，总细胞悬液体积为10 ml时，向每个新细胞培养瓶中加入2 ml相同体积的细胞悬液）。

- vii. 细胞冻存：使用含5 %的DMSO的胎牛血清进行细胞冻存。

测定荧光素动力学曲线

研究者需要测定实验模型中荧光素注射后的最佳成像时间，因为荧光素在体内的生物分布和代谢过程是迅速的，但其动力学可能因不同组织而异。

测定实验模型中荧光素酶动力学曲线的方法如下：

1. 按下述方法通过腹腔注射荧光素酶底物。我们建议在动物清醒时进行荧光素注射，如果在底物注射前确实需要进行动物麻醉也是可以的，但可能会稍微延长其动力学过程（到达荧光素酶生物发光最强的时间点）。
2. 等待3分钟，然后使用气体麻醉或注射麻醉的方式进行动物麻醉。
3. 将麻醉后的动物放入成像仓中，在荧光素注射后约5分钟时刻拍摄第一张图片。
4. 继续每隔2分钟拍一张图片（创建一个成像序列），一直拍摄约60分钟，从而得到一条针对该实验模型的荧光素分布动力学曲线；使用2%异氟烷对健康动物进行气体麻醉后，动物可以安全地在小动物活体成像系统中连续成像60分钟。
5. 一旦获得了上述荧光素动力学曲线，就可以在之后研究过程中选取最佳成像时间点进行成像。一般情况下，大多数实验模型的最佳成像时间点位于荧光素腹腔注射后10-20分钟。

活体生物发光实验中荧光素的准备

试剂和耗材:

萤火虫荧光素酶底物D-Luciferin, 钾盐, 1.0 g/管, (PerkinElmer, 产品货号 #: 122796)

DPBS, 不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+}

针头式过滤器, 0.2 μm

准备方法:

1. 用DPBS配制新鲜的荧光素母液, 浓度为15 mg/ml, 使用0.2 μm 针头式过滤器进行过滤除菌。
2. 荧光素溶液注射剂量为10 $\mu l/g$ 动物体重, 对应着每千克小鼠体重注射150 mg的荧光素 (例如: 对于10 g体重的小鼠, 注射100 μl 荧光素溶液, 对应于1.5 mg的荧光素)。
3. 在成像前10-15分钟进行荧光素腹腔注射。

备注: 对每个动物模型都需要预先测定其相应的荧光素动力学曲线, 从而确定其最佳成像时间点。

荧光素腹腔注射

建议注射部位：动物左下腹区域

注射器规格：21号或更小型号（通常用25号进行荧光素注射）

注射剂量：150 毫克荧光素/千克动物体重, 通常注射150 μ l 荧光素溶液（溶液浓度15 mg/ml）

备注：动物可以耐受腹腔注射1 ml无刺激性的溶液。

注射时动物固定姿势：用手固定动物，背卧（腹部朝上），动物头部后仰。

注射过程：针头在刺进腹腔时应稍微倾斜一定角度并保持针头斜面朝上。针头略微刺进腹腔壁（约4-5毫米）。针的尖端应刚好略穿透动物左下腹区域的腹腔壁。

荧光素静脉注射

荧光素的静脉注射可以通过尾静脉或者眼眶静脉。

1. 注射剂量依旧是150 mg/kg，静脉注射时，注射溶液的体积不能超过动物血容量的10%（如小鼠不超过200 μ l）。
2. 静脉注射时其相对剂量较大（相比之下，腹腔注射时吸收缓慢），注射后5分钟左右生物发光信号可达到峰值，信号在30分钟时消失，且生物发光的信号强度比腹腔注射时的信号强度高数倍。
3. 建议：配制荧光素溶液浓度为15 mg/ml，注射剂量为150 mg/kg（对应于10 ml/kg）。

静脉注射时一般使用1 ml量程、26号针头的注射器。

口腔内注射时使用1 ml量程、20号针头的注射器。

1. 注射前需排出注射器内的气泡。
2. 通过来回推拉注射器推杆和轻弹注射器的方法排出注射器内的气泡。

备注： 在不同实验动物组之间进行注射时，需要更换注射器和针头，以免发生交叉污染。

注射过程

1. 使用加热灯照射动物尾部约5分钟让其尾部静脉扩张。不要太靠近加热灯以免烫伤（烧伤）动物，动物置于加热灯下时，实验人员不能离开。
2. 将动物置于固定器内，使用酒精棉球清洁动物尾部，通过缓慢推针的方式向静脉内注射适当剂量的荧光素，注射时间约为5秒，（不能注射太快）以免急性毒性作用。

用于动物注射的细胞准备

为保证细胞有充足的活性，请按以下方法进行操作。

1. 在室温下融化冻存管内的细胞（也可通过手掌摩擦的方法融化冻存管内的细胞）。
2. 快速将融化后细胞转移至15 ml离心管内，每支15 ml离心管对应一个细胞冻存管内的细胞。
3. 贴着管壁缓缓加入预热的5 ml细胞培养基，轻弹管壁让细胞均匀混合。
4. 4°C下1,000 rpm转速离心5分钟，吸弃细胞培养基。
5. 贴着管壁缓缓加入预热的2 ml细胞培养基进行细胞重悬，轻弹管壁让细胞均匀混合，再加入8 ml预热的细胞培养基。
6. 预留部分细胞用于细胞计数，细胞计数可在细胞静置孵育过程中进行。
7. 将离心管置于37°C的CO₂细胞培养箱中，管盖不要旋紧，静置孵育细胞15分钟。
8. 4°C下1,000 rpm转速离心5分钟，吸弃细胞培养基。
9. 使用10 ml DPBS清洗细胞两次（注意贴着管壁缓缓加入DPBS，轻弹管壁让细胞均匀混合；记住先加入2 ml DPBS并混合细胞，之后再加入8 ml DPBS）。
10. 4°C下1,000 rpm转速离心5分钟，吸弃DPBS。
11. 加入适当体积的DPBS进行细胞重悬，细胞重悬后建议浓度为：皮下注射 1-2 x 10⁶ 细胞/100 μl；心脏注射 3 x 10⁶ 细胞/100 μl；静脉注射 2 x 10⁶ 细胞/100 μl。细胞重悬后离心管置于冰上以待用（备注：细胞混合液在注射前需为室温）。
12. 通过皮下/心脏/静脉注射的方式注射100 μl的细胞混合液进入小鼠体内。

动物体内注射肿瘤细胞的方法

1. 肿瘤细胞在一定的细胞浓度下，可以进行动物体内注射，注射方式包括皮下注射（20-100 μ l），腹腔注射（200-750 μ l），静脉注射（50-100 μ l），心脏内注射（50-100 μ l）或器官原位注射（20-50 μ l）。

建议：使用25号5/8I针头进行成年小鼠皮下和腹腔注射，使用26号1/2I针头进行静脉注射，26-27号1/2I针头进行心脏内注射，30号1/2I针头进行一些器官原位注射。

2. 动物体内注射细胞前，使用DPBS进行细胞稀释和混合。用不带针头（避免针头吸入时损伤细胞）的注射器将细胞吸入注射器内，之后将针头装上，轻弹注射器壁让细胞保持悬浮状态。

备注：

1. 不要多次通过针头吸取细胞，以免造成细胞损伤或细胞数量的损失。
2. 确保注射前注射器内的细胞处于悬浮状态。
3. 建议一支注射器不要用于注射3只以上的小鼠。
4. 细胞注射入动物体内时，让细胞集中于一个较小体积内有助于对细胞信号进行定位并增强体内的初始信号。

动物皮下注射肿瘤细胞的方法

肿瘤细胞的准备:

使用胰蛋白酶将饲养在T175细胞培养瓶中的细胞（细胞培养在含10%胎牛血清的细胞培养基中）消化下来，使用DPBS进行细胞重悬，重悬后的细胞浓度为 1×10^5 - 1×10^6 细胞 / 50 -100 μ l。

注射方法

1. 第0天，使用25 x 5/8I号针头向 nu/nu小鼠腹腔注射萤火虫荧光素（150 mg/kg）。
2. 7-8分钟后，小鼠通过气体麻醉（3%异氟烷）或使用25 x 5/8I号针头肌肉注射氯胺酮（120 mg/kg） / 甲苯噻嗪（6mg/kg）进行麻醉。
3. 在小鼠背部靠近后腿部位皮下注射50 μ l细胞悬液，注射细胞量为 1×10^5 - 1×10^6 。
4. 使用镊子轻轻捏起小鼠皮肤，皮下插入针头（25 x 5/8I号针头）。松开镊子，轻轻地注入细胞，注意不要刺穿针头对侧的皮肤。
5. 将小鼠置于垫有黑色纸板的IVIS[®]小动物活体成像系统中，背部朝上进行成像。

成像检测

1. 小鼠每周成像2次，连续成像2-3周。
2. 记录第0天时细胞注射部位的信号，肿瘤（50-100 mm³）在第7-10天时可以通过卡尺检测到。
3. 实验结束后，将小鼠安乐死，取出组织进行离体成像分析和组化分析。

重要提示:

细胞注射、成像的顺序和时间:

在该模型中，荧光素在注射后10-15分钟时生物发光达到峰值。

1. 荧光素通过腹腔注射（20 g小鼠注射200 μ l）。

2. 在第0天时，荧光素注射7-8分钟后，动物进行麻醉（1-2分钟），之后细胞注射入小鼠体内并进行成像（2-3分钟）。
3. 在之后的时间，动物在荧光素注射10分钟后进行麻醉（1-2分钟），之后进行成像。

成像时间和参数设置

1. 第0天时，使用IVIS®小动物活体成像系统，成像曝光时间约1-2分钟，设置bin值为10，成像载物台为B档位。随着肿瘤增长和生物发光信号增强，成像曝光时间可以缩短至数秒钟以免图像饱和。
2. 图像获取时，建议使用-counts单位，这样可以调节相机设置以优化信号。信号强度应高于背景噪声（>100 counts）且低于饱和值（65535 counts）。
3. 在使用ROI进行信号定量和不同图像间信号比较时，建议使用-photons单位。在该单位模式下，定量和图像展示时都会自动考虑不同曝光时间，binning值，光圈大小和成像视野因素的影响。

小鼠的种类和来源：

1. 5-7周的小鼠购自Charles River公司 (www.criver.com)；实验时小鼠为6-8周龄。
2. 实验指定小鼠为 Nu/nu (CrI: NU/NU-nuBR)。

C57BL/6白化小鼠尾静脉注射肿瘤细胞的方法

实验方案

A. 肿瘤细胞准备:

使用胰蛋白酶将饲养在T175细胞培养瓶中的细胞（细胞培养在含10%胎牛血清的细胞培养基中）消化下来，使用DPBS进行细胞重悬，重悬后的细胞浓度为 $1-5 \times 10^5$ 细胞 / 100 μ l。

注射方法

1. 第0天，使用25 x 5/8l号针头向雄性C57BL/6白化小鼠（Jackson Laboratory公司购买）腹腔注射萤火虫荧光素（150 mg/kg）。
2. 使用加热灯对小鼠尾部进行加热使尾静脉扩张（加热4-5分钟）。
3. 将小鼠放入小鼠固定器内，使用26 x 1/2l号针头通过尾静脉将 $1-5 \times 10^5$ 细胞注入小鼠体内。
4. 小鼠通过气体麻醉（3%异氟烷）或使用25 x 5/8l号针头肌肉注射氯胺酮（120 mg/kg）/ 甲苯噻嗪（6mg/kg）进行麻醉。
5. 将小鼠置于垫有黑色纸板的IVIS[®]小动物活体成像系统中，背部朝上进行成像。

成像检测

1. 小鼠每周成像2次，持续成像2-3周。
2. 注射 5×10^5 细胞后，第0天在小鼠肺部即可检测到生物发光信号。肿瘤转移位点的信号将在一周后开始被检测到。
3. 实验结束后，将小鼠安乐死，取出组织进行离体成像分析和组化分析。

重要提示:

细胞注射、成像的顺序和时间:

在该模型中，荧光素在注射后10-15分钟时生物发光达到峰值。

1. 荧光素通过腹腔注射（20 g小鼠注射200 μ l）。
2. 在第0天时，荧光素注射7-8分钟后，动物进行麻醉（1-2分钟），之后细胞注射入小鼠体内并进行成像（2-3分钟）。
3. 在之后的时间，动物在荧光素注射10分钟后进行麻醉（1-2分钟），之后进行成像。

成像时间和参数设置

1. 第0天时，使用IVIS®小动物活体成像系统，成像曝光时间约1-2分钟，设置bin值为10，成像载物台为B档位。随着肿瘤转移过程的发展和生物发光信号增强，成像曝光时间可以缩短至数秒钟以免图像饱和。
2. 图像获取时，建议使用-counts单位，这样可以调节相机设置以优化信号。信号强度应高于背景噪声（>100 counts）且低于饱和值（65535 counts）。
3. 在使用ROI进行信号定量和不同图像间信号比较时，建议使用-photons单位。在该单位模式下，定量和图片展示时都会自动考虑不同曝光时间，binning值，光圈大小和成像视野因素的影响。

小鼠的种类和来源:

1. 5-7周的雄性小鼠购自Jackson Labs 公司(www.jax.org)；实验时小鼠为6-8周龄。
2. 实验指定小鼠为C57BL/6白化小鼠(C57BL/6J-Tyrc-2J/+)

生物发光信号和肿瘤转移位点:

1. 如果尾静脉注射成功了，在第0天即可检测到肺部的生物发光信号；如果尾静脉注射失败了，生物发光信号将会局限于小鼠尾部区域。
2. 肿瘤转移的生物发光信号除了位于肺部（占80-90%）外，信号有时还会出现在肝脏，肾脏，脂肪组织及其它组织中（占15-30%）。

小动物麻醉方法

异氟烷气体麻醉

试剂和耗材:

V-1 台式麻醉机 (VetEquip公司, 产品货号 #1806)

动物麻醉面罩 (Xenogen公司)

异氟烷, Abbott Laboratories公司, 250ml (Burns Vet供应)

活性炭过滤器, Omnicon公司 (Burns Vet供应)

操作流程:

1. 称量活性炭过滤器的种类, 超过一定重量需更换。
2. 向蒸发器中灌注异氟烷, 灌注时蒸发器的旋钮应处于-OFF位置。
3. 打开氧气瓶, 确保氧压为55 psi。
4. 调节氧气流量为1 升/分钟。
5. 将动物放入诱导盒中, 盖上盒盖。
6. 打开诱导盒管线上的阀门, 确保通向成像仪器的管线上阀门是关着的。
7. 将蒸发器上旋钮旋至3%, 动物将在1-2分钟内被麻倒。
8. 当晃动诱导盒而动物无反应时, 调节蒸发器上旋钮至1.5-2%。
9. 打开连接成像仪器的管线上的阀门。
10. 打开诱导盒, 迅速取出动物放入成像仓内, 将动物鼻子置于麻醉面罩中。
11. 关闭诱导盒管线上的阀门。
12. 使用IVIS®小动物活体成像系统开始进行成像或是进行细胞注射, 停止气体麻醉后动物恢复正常的时间短于1分钟。

成像/细胞注射结束后:

13. 关闭蒸发器。
14. 关闭氧气瓶。
15. 按住氧气冲气按钮直到氧气流量计读数为0从而排出蒸发器中全部残余麻醉气体。
16. 对诱导盒和麻醉面罩进行清洁和消毒。

氯胺酮/甲苯噻嗪混合制剂麻醉

试剂和耗材:

盐酸氯胺酮 (Ketaset) (Fort Dodge Animal Health公司)

甲苯噻嗪 (X-Ject SA) (Phoenix Scientific, Inc.公司)

操作流程:

1. 将氯胺酮 (100 mg/ml) 和甲苯噻嗪 (20 mg/ml)按4:1比例配成混合制剂。
2. 肌肉注射剂量为氯胺酮 (120 mg/kg) 和甲苯噻嗪 (6 mg/kg)。
3. 每20 g小鼠体重注射0.03 ml (每10 g小鼠体重注射15 μ l)。
4. 2-3分钟小鼠被麻倒, 可以被持续麻醉20-30分钟; 如有需要, 每10 g小鼠体重可补注射7 μ l, 但也会有麻醉剂过量的风险。
5. 单个麻醉剂注射剂量的小鼠恢复时间约为60-90分钟; 补注射麻醉剂后小鼠的恢复时间可长达2小时。

使用小动物活体成像系统获取活体成像数据

获取一张图像或一个图像序列：

1. 打开 Living Image 软件。
2. 初始化小动物活体成像系统，等待CCD降温至工作温度（温度颜色条将变成绿色）。
3. 将麻醉后的小鼠放入成像仓中，关好成像仓门。
4. 点击—Acquire—按钮以获取一张图像或一个图像序列。

使用IVIS Lumina, IVIS Spectrum, IVIS 100 系列或 200 系列获取图像：

生物发光成像：

1. 选择生物发光成像模式。
2. 确认激发滤光片和发射滤光片分别被设置为—Block—和—Open—。
3. 设置binning值和F/Stop（光圈）值：使用默认的binning值和F/Stop值或依据生物发光/荧光成像的具体实验情况设置新的binning值和F/Stop值。
4. 设置曝光时间：使用默认的曝光时间或依据生物发光/荧光成像的具体实验情况设置新的曝光时间。
5. 设置FOV：调节成像视野（FOV），从FOV下拉条中选择适合的值。
6. 备注：在成像前可以先拍一张明场照片（去掉—luminescent—或—fluorescent—的勾选框，在—Photographic—和—Auto—勾选框内打勾，点击—Acquire—进行拍照），用于观察动物在成像仓内的状态。
7. 点击Acquire：在图像获取时，—Acquire—按钮变成—Stop—按钮，若要取消图像获取过程，点击—Stop—按钮。

荧光成像：

1. 选择荧光成像模式。
2. 对于IVIS Spectrum：若希望使用底部激发成像，请选择透射成像模式；若使用顶部激发成像，不要选择透射成像模式。
3. 滤光片锁定（Filter Lock）模式下，从激发滤光片下拉条中选择激发滤光片，软件会自动选择适当的发射滤光片。
4. 确认荧光光源的位置被设置为High。
5. 设置binning值和F/Stop（光圈）值：使用默认的binning值和F/Stop值或依据生物发光/荧光成像的具体实验情况设置新的binning值和F/Stop值。
6. 设置曝光时间：使用默认的曝光时间或依据生物发光/荧光成像的具体实验情况设置新的曝光时间。
7. 设置FOV：调节成像视野（FOV），从FOV下拉条中选择适合的值。
8. 备注：在成像前可以先拍一张明场照片（去掉-luminescent||或-fluorescent||的勾选框，在-Photographic||和-Auto||勾选框内打勾，点击-Acquire||进行拍照），用于观察动物在成像仓内的状态。
9. 点击Acquire：在图像获取时，-Acquire||按钮变成-Stop||按钮，若要取消图像获取过程，点击-Stop||按钮。

使用ROI进行数据分析

1. 打开待分析的图像。
备注：图像需要是激活状态时才能显示出ROI工具栏，对于一个激活状态的图像序列，工具栏内将不显示ROI选项。
2. 在ROI工具栏中，从拉条中选择—Measurement ROI。
3. 如果图像属于一个图像序列且需要将ROI应用于该序列中其它图像时，选择—Apply to Sequence选项。
4. 确定ROI形状，点击圆形，方形或网格按钮。在对应的下拉条中选择需要在图像中添加的ROI数目或网格形ROI的格数。
5. 随后选定了形状、数目的ROI将被添加到图像中。
备注：网格形ROI在进行微孔板成像定量时非常有用。
6. 调节ROI的位置：
 - a. 将鼠标指针放在ROI内，当指针变成十字交叉形时，点住鼠标。
 - b. 拖动ROI至目标区域。
7. 调节ROI的尺寸：
 - a. 将鼠标指针放在ROI内，当指针变成十字交叉形时，点住鼠标。
 - b. 将鼠标指针放在ROI边线上，当指针变成十字交叉形时拖动边线修改ROI尺寸。
8. ROI区域画好后，点击—measure按钮，之后会弹出一个测量表格窗口，表格含有全部光子通量数据。
9. 为将定量数据储存为excel格式，可将数据从上述测量表格中复制并粘贴在Microsoft Excel文件中。

IVIS®小动物活体成像系统像机的清洁和灭菌

我们已经在IVIS®成像系统的内部零件上测试了以下化学试剂：

1. Johnson & Johnson Medical公司生产的Cidexplus (3.4%戊二醛)
2. 70%甲醇 / 30%去离子水溶液
3. 70%乙醇 / 30%去离子水溶液
4. Sporidicin公司生产的胶醛消毒剂 (1.56%苯酚)
5. Pharmacal Research Labs公司制造的Clidox-S (二氧化氯溶液)

以上化学试剂不会损坏内部零件，因此需要的话可以作为清洁剂使用。

注意目前没有关于上述化学试剂的清洁和灭菌作用的声明。请参考制造商的参考资料来获取相关化学试剂适用性的信息。

建议使用光学级无线头的抹布，如Scott Pure、Kaydry EX-L进行清洁，从而减少擦拭过程中的颗粒物。

使用清洁剂浸湿抹布，之后通过温和圆周运动的方式轻轻擦拭成像仪器的内表面。不要将清洁剂直接泼在或喷在仪器内表面上，之后再无菌去离子水浸湿的抹布擦拭仪器内表面。不要让仪器避免有残留积水。仪器在使用前需确保避免干燥，不要使用含荧光成分的清洁剂。

要特别注意不要弄脏相机镜头和滤光片，清洁时尽量避开镜头和滤光片区域。

不要使用上面未提及的化学清洁剂，尤其不要使用强碱/漂白作用或酸性化学试剂，这些试剂可能损坏成像设备并影响其正常使用。

对于免疫缺陷动物的成像，可以考虑配备一台单独的小动物活体成像仪器，以免动物间的交叉污染。

PerkinElmer 小鼠剃毛器使用说明

剃毛器套装:

PerkinElmer 小鼠剃毛器套装盒内包括两只小鼠剃毛器：方头剃毛器（图 A）、圆头剃毛器（图 B）。每只小鼠剃毛器使用一节 5 号干电池，每节电池可供其连续工作约 2 小时。小鼠剃毛器套装盒内的小瓶润滑油用于对剃毛器刀头进行润滑和清洁。

剃毛过程:

1. 麻醉小鼠，将其置于实验台上
2. 先使用方头剃毛器逆着小鼠毛发的方向进行推动，推动时可轻轻贴着小鼠皮肤但不要用力按压在皮肤上，方头剃毛器可以剃除小鼠身上绝大部分毛发，但由于刀头构造的缘故，局部可能会残留约 1 mm 长的短毛
3. 使用圆头剃毛器对剩余短毛进行适当处理

使用效果:

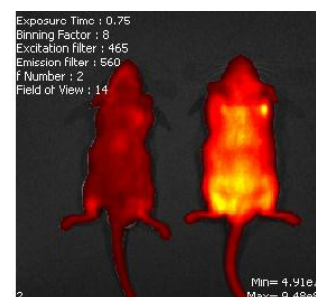
小鼠毛发在短波长激发光下的背景荧光较强，图 C 为两只同龄 ICR 雄性小鼠（白色毛发），左侧小鼠使用了 PerkinElmer 小鼠剃毛器进行剃毛处理，右侧小鼠未剃毛。使用 465 nm 滤光片同时进行反射成像，可以看出使用 PerkinElmer 小鼠剃毛器处理后能显著降低背景荧光。



A



B



C

注意事项:

1. 小鼠剃毛前，实验台上预先铺一张一次性实验桌布，能便于小鼠毛发的清理
2. 小鼠毛发在干燥疏松状态时较易剃除，因此剃毛时请保持小鼠身体干燥
3. 小鼠剃毛器长期不使用时建议将干电池取出

XGI-8 气体麻醉系统

1. 准备程序

在开始麻醉程序之前，做一些准备程序可以帮助实验顺利进行：

- 1) 请把不用的出气口用特制的黑色橡胶塞塞住。
- 2) 把锥形通气口的位置对准。
- 3) 在麻醉程序开始前对照图片确保出气支管位置正确。
- 4) 确认气体循环管没有打结阻塞和松动。
- 5) 确认蒸发器内有足够的 ISOFLURANE，如果需要注入请参看下一节。

2. 蒸发器注入步骤

- 1) 确保氧气供应被切断，可以在源头或减压阀处关掉它。
- 2) 确保蒸发器开关处于关的位置。
- 3) 打开两个前面板的阀门开关释放 XGI-8 的氧气，可以看到阀门处于打开位置，流量计指示氧气已放完后，关闭这两个阀门开关。
- 4) 反时针旋转卸掉蒸发器的螺丝帽。确认试剂是 ISOFLURANE，缓慢的倒进灌入口，透过玻璃指示窗随时观察 ISOFLURANE 的水平线，注意不要超过最大允许线。
- 5) 注意：如果蒸发器在灌注前是干的，水平线在开始会轻微下落因为内部的棉芯会吸收一部分试剂。
- 6) 当 ISOFLURANE 达到玻璃指示窗上的最大标线时，表明蒸发器已灌注满。此时应停止，不要过分灌注。顺时针旋紧螺丝帽。为防止泄漏，请仔细检查螺丝帽已旋紧。

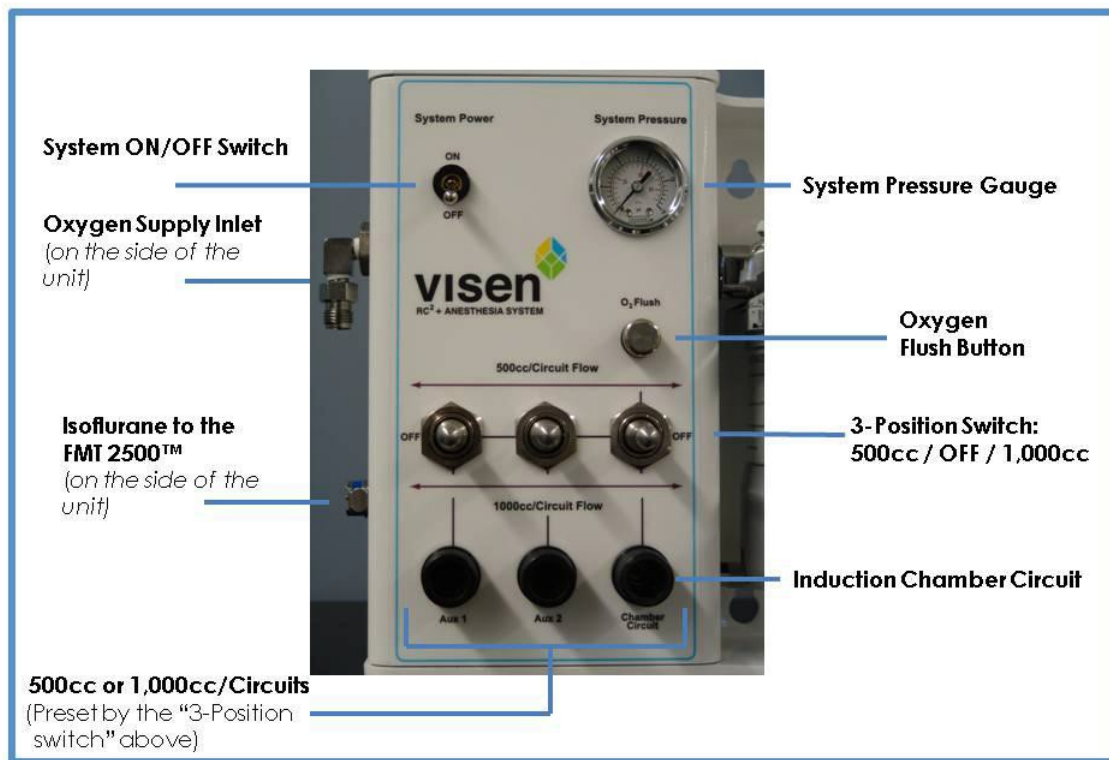
3. 设备操作

- 1) 在开始程序前分别称量两个 ISOFLURANE 活性炭过滤器，在过滤罐上用不可擦除的标记记录这些信息和日期。
- 2) 打开前面板上的排气泵的电子开关，确认流速超过 6 公升每分钟。
- 3) 打开高压氧气罐或其它供应源确保氧气供应。
- 4) 打开 IVIS 系统成像暗箱的气体开关。
- 5) 打开 XGI-8 前面板上的绿色氧气开关。
- 6) 设置蒸发器的百分比，典型值是百分之 2.5，可以根据需要进行调整。
- 7) 把动物放置在感应箱内，关上并锁紧箱子。打开标记着“CHAMBER On/off”的开关（麻醉气体流向感应箱），设置感应箱流量计的流速为 1.5 公升每分钟，进行小鼠预麻醉。
- 8) 关闭“CHAMBER On/off”的开关，把动物从感应箱中拿出来，转移至暗箱内。打开前面板上标记着“IVIS Flow on/off”的开关（麻醉气体流向 IVIS 分支管），使用流量计设置流速，进行小鼠维持麻醉拍照。注意：使用能使动物处于麻醉状态的最低量麻醉即可，最初建议如需麻醉 5 只成年鼠使用 0.25 公升每分钟的流量。
- 9) 关闭“IVIS Flow on/off”的开关，把蒸发器设置到关的位置。
- 10) 打开“CHAMBER On/off”开关，让纯氧流进感应箱 5 分钟。
- 11) 直到感应箱充满氧气后，关掉“CHAMBER On/off”开关。
- 12) 把氧气罐关上，切断氧气供应。
- 13) 打开所有的开关让设备减压。当 IVIS 分支管流量计和感应箱流量计的指示球下降到指示管的底部说明 XGI-8 减压完毕。
- 14) 关上 XGI-8 的氧气开关。
- 15) 当流量计停止不动时关掉所有的开关，关上排气泵。如果需要，准备好以备下次使用。

RC2+ 异氟烷麻醉机使用



操作界面概览



使用前的检查和准备

1. 确认氧气供给有足够量。
2. 确认氧气供给压力为50-60 psi (0.3-0.4 MPa)。
3. 确认蒸发罐里的异氟烷为足够剂量。

使用流程

1. 调节氧气瓶输出压力至50-60 psi (0.3-0.4 MPa)。

注意

当压力超出上述范围时，请勿使用。
压力范围超出会影响麻醉机使用寿命。

2. 确保其它开关处于“OFF”状态，将“System On”调至“ON”状态，“System Pressure”压力指示表应显示为“6 PSI +/- 0.5PSI”。

注意

当压力指示低于5.5 psi或高于6.5 psi时，请将系统开关关闭，超出指定范围时，请勿使用。

3. 将蒸发罐旋转盘调至2.5，代表混合麻醉气体中异氟烷的百分比为2.5%。
4. 将麻醉气体通路开关调至500cc或1000cc，麻醉气体即通入预麻醉盒及成像仪器暗箱，当成像盒插入 仪器暗仓后，仪器内部通路即打开，拔出后，仪器内部通路即断开。
5. 当将已麻醉小鼠由预麻醉盒拿出前，请按住“O2 flush button” 10秒，以清除预麻醉盒中的尾气，之后再打开预麻醉盒拿出小鼠。
6. 打开真空泵，将连接真空泵的调节阀调至5 inHg，以吸收暗箱中的尾气。
7. 使用完成后，将所有开关依次关掉。

异氟烷注入蒸发罐流程

注意：在灌注异氟烷前，请确保“System Pressure”数值为“0”，即整个通路为关闭状态。

1. 将蒸发罐旋转盘调至“0%”，切勿调至“OFF”状态。
2. 将“System On”状态调至“OFF”状态。
3. 将3个通路拨钮均调至1000cc处。
4. 确认“System Pressure”读数为“0” psi。
5. 利用配套注入器将异氟烷注入蒸发罐。
6. 将3个通路拨钮调回“OFF”处。

Rhodamine 荧光光谱分离实验

动物和材料

- 小鼠：6 周龄雄性 Balb/c nu/nu 小鼠三只或 6 周龄雄性 ICR/昆明鼠三只，其中一只为空白对照小鼠，一只为 Rhodamine 染料皮下注射用小鼠，剩下一只小鼠备用，实验前一天完成小鼠剃毛，小鼠禁食一天但不禁水。
- Rhodamine 6G: Sigma 公司, 货号# R4127-5G, 颜色为暗红色粉末状, 分子量 479.01
- 戊巴比妥钠 (Pentobarbital Sodium): Sigma 公司, 货号# P3761, 通过北京三博远志生物技术有限责任公司购买, 白色粉末, 产品纯度 > 99% (高纯级), 分子量 248.26
- PBS
- 双蒸水 (Double distilled water, ddwater)
- 75 %酒精
- 移液器两把 (1000 μ l 和 100 μ l 量程)
- 移液枪头两盒 (1000 μ l 和 100 μ l 量程)
- PerkinElmer 小鼠剃毛器一套 (5 号电池一对)
- 1 ml 一次性无菌注射器: 上海康德莱公司, 配针规格 0.45 \times 16 mm
- 15 ml 离心管、50 ml 离心管、1.5 ml Eppendorf 小管
- 黑色底不透 96 孔板一块, PerkinElmer # 6005270
- 锡纸
- 称量纸
- 实验手套
- 医用纱布或棉球
- 小镊子
- 剪刀
- 白色实验桌布、黑色垃圾袋
- 记号笔、光盘一张

仪器

- IVIS Spectrum 或 IVIS Lumina III
- 电子天平

实验方法和步骤

1. Rhodamine 溶液配制: 使用电子天平称量 0.04 g 的 Rhodamine 粉末, 置于 50 ml 离心管中, 加入 40 ml ddwater, 配制成 1 mg/ml 的 Rhodamine stock solution, 溶液颜色为樱桃红色, 用锡纸将 stock solution 包好并标记上浓度和配制日期等信息, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中存储; 使用 1.5 ml Eppendorf 小管, 经过 ddwater 多次稀释, 将 stock solution 稀释成 0.1 μ g/ml、0.05 μ g/ml、0.04 μ g/ml、

- 0.033 $\mu\text{g/ml}$ 的 working solution, 这些 working solution 请在实验当天配制, 室温避光放置即可。
2. 戊巴比妥钠溶液配制: 使用电子天平称量 0.1 g 的戊巴比妥钠粉末, 置于 15 ml 离心管中, 加入 10 ml 的 PBS, 摇晃离心管使其完全溶解, 即得到 1%的戊巴比妥钠溶液。
 3. 小鼠麻醉方法: 使用 1 ml 注射器, 每只小鼠腹腔注射 0.15~0.18 ml 的 1%戊巴比妥钠溶液, 注射后小鼠会出现短暂兴奋, 5 分钟左右可以麻倒, 持续麻醉时间约 45 分钟; 如果在 45 分钟内小鼠出现明显苏醒迹象而此时仍没有结束实验时, 可以视小鼠体征通过腹腔注射补加一些 1%戊巴比妥钠溶液, 但剂量一般不超过 0.1 ml。
 4. 小鼠剃毛: 如果使用 Blab/c nu/nu 小鼠, 无需剃毛; 如果使用 ICR 或者昆明鼠, 需要在实验前一天完成小鼠剃毛工作; 剃毛过程: 小鼠麻醉后, 先使用较大的方头剃毛器逆着小鼠毛发的方向进行推动, 推动时可以轻轻贴着小鼠皮肤但不要用力按压在皮肤上, 方头剃毛器可以剃除小鼠身上绝大部分毛发, 对于局部小短毛可以使用小的圆头的剃毛器进行处理; 对于本实验, 主要使用方头剃毛器将小鼠胸、腹部的毛发剃干净。
 5. Rhodamine 染料皮下注射: 小鼠剃毛并麻醉后, 仰卧, 用温水浸湿的纱布或棉球搽拭口鼻、爪子以及排尿处; 对于 IVIS Spectrum 实验, 在小鼠的腹部中间较平坦处和胸口处分别注射 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.033 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rhodamine working solution, 对于 IVIS Lumina III 实验, 在小鼠的腹部中间较平坦处和胸口处分别注射 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 和 0.04 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rhodamine working solution; 不同浓度的 Rhodamine working solution 用不同的 1 ml 注射器吸取和注射, 吸取量约为 0.2 ml, 排去针管内的空气以待用, 注射器的针管上用记号笔写好染料浓度信息以免混淆; 对于小鼠实验操作新手, 注射时建议左手持镊子, 轻轻镊起小鼠注射处的表皮, 右手持针, 针头斜面朝上, 顺着镊子表皮提起的方向刺入小鼠表皮, 越表浅越好, 针头贴着表皮进入约 2~3 mm, 推针, 注射剂量均为 0.1 ml, 抽针时一定要慢; 抽针时如果有少量染料渗出, 可用干纱布或棉球轻轻吸去, 避免用力擦拭或按压注射部位; 倘若由于误操作在小鼠身上沾染了较多染料, 建议换一只小鼠。
 6. 成像: 将 IVIS Spectrum / IVIS Lumina III 开机后, 进行初始化; 取黑色底不透 96 孔板, 向其中一孔中加入 350 μl 的 0.05 $\mu\text{g/ml}$ Rhodamine working solution; 将麻醉后的空白对照小鼠置于成像仓 (Image Chamber) 内左侧, 皮下注射染料的小鼠置于中间, 黑色底不透 96 孔板置于右侧; 对于 IVIS Spectrum, 使用 FOV C, 对于 IVIS Lumina III, 使用 FOV D, 调整成像仓中小鼠和板的位置, 保证小鼠和板中染料加样孔置于绿色“田”字成像区内; 在 Imaging Wizard 中选择成像参数, 选择 Fluorescence 下面的 Spectral Unmixing 选项, 对于 Living Image 4.4 软件版本, 直接选择染料 database 中的 Rhodamine 染料即可, 对于 Living Image 4.3 软件版本, 其 database 里无 Rhodamine, 可以选择与其接近的 tdTomato, 调整 filters pair, 激发滤光片用 500、535、570 nm, 发射滤光片用 560、580、600、620、640、660、680 nm, 使用 auto 模式进行成像拍摄; 在 Edit Image Labels 里面对实验信息进行记录, 之后对成像数据进行保存, 必要时可用格式化后的光盘将数据拷贝出来。
 7. 数据分析: 用 Living Image 软件打开原始数据, 在“Corrections / Filtering”中勾选“Adaptive FL Background Subtraction”, 在“Photo Mask Setup”中调整 Threshold 使小鼠体外的紫色区域刚好消失, 一般使用系统默认的 Threshold 即可; 平场校正后, 在“Spectral Unmixing”的方法中选择 Manual, 然后点击“Start Unmixing”; 在 Unmixing 窗口里, 勾去“Overview”, 拖动“Image Cube Viewer”, 一般肉眼可见 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rhodamine 皮下注射区以及 0.05 $\mu\text{g/ml}$ Rhodamine
-

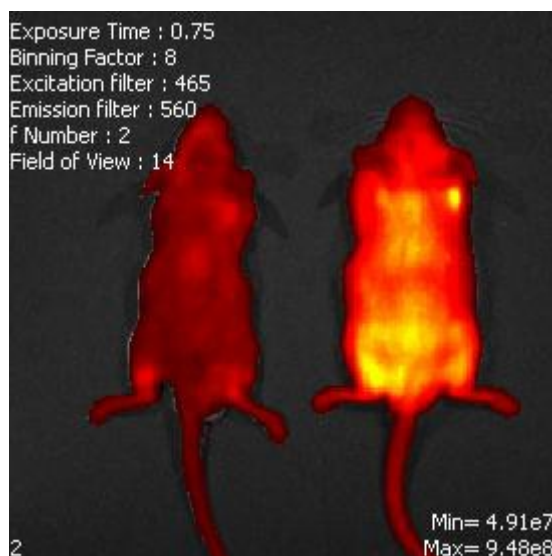
的板中标样孔区域的信号，而 0.033 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rhodamine 皮下注射区域信号肉眼难辨，0.04 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rhodamine 皮下注射区域信号肉眼可能可见但较模糊，建议在左侧对照小鼠的耳部或口鼻处划 TissueAF，在中间小鼠的 0.05 $\mu\text{g/ml}$ Rhodamine 皮下注射区或右侧 0.05 $\mu\text{g/ml}$ Rhodamine 的板中标样孔区域内划取 Rhodamine 信号（一般选择中间小鼠的 0.05 $\mu\text{g/ml}$ Rhodamine 皮下注射区进行光谱分离效果更好，杂信号较少），划线时建议选用“Pick”中的“Thin”，点击“Computer the pure spectrum”，计算出 Rhodamine 的 Pure spectrum 后，点击“Unmix”；调整“Color Scale”的 Min 值“消除”小鼠身上的杂信号，还可以调节“Corrections / Filtering”中的 Binning 至 1，让信号区域看起来更平滑；在“ROI Tools”中选择“Circle”或“Contour”对信号区域进行圈选，使用“Contour”进行 ROI 圈选时，“Auto ROI Parameters”下的 Threshold 可用于对 ROI 大小和区域进行调节；在 Units 为“Radiant Efficiency”的情形下，点击“Measure ROIs”，即可看见全部已圈选 ROIs 的定量结果。

备注

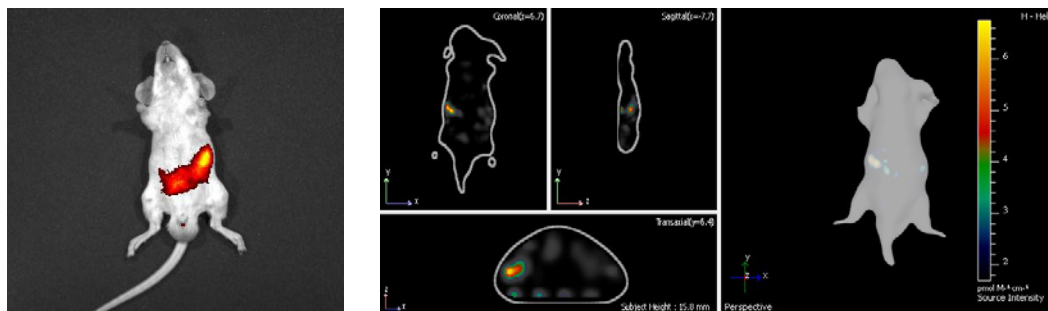
- 正常情况下，IVIS Spectrum 和 IVIS Lumina III 能清晰检测到 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rhodamine 信号，若实验时由于不确定原因（如皮下注射操作不熟练，入针太深），导致 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rhodamine 信号非常微弱，可以考虑使用备用小鼠，皮下注射 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 的 Rhodamine working solution 进行重复实验
- 实验操作台上请铺好白色实验桌布
- 染料/麻醉剂配制、小鼠操作过程中，需要戴实验手套，必要时请穿着实验服或佩戴护目眼镜
- 成像时，请不要戴实验手套操作电脑鼠标
- 实验结束后，用蘸有 75%酒精的棉球擦拭和清理成像仓内黑色成像纸板以及成像仓的门把手
- 实验结束后，脱颈法处死小鼠，小鼠尸体置于黑色垃圾袋内，携带至动物尸体指定处理地点进行抛弃
- 实验中所有用过的注射器，务必将针头套好，弃于专门存放尖锐废弃物的容器内，由专人进行处理

小鼠活体成像实验经验

1. 对于有毛小鼠（如 ICR 鼠、昆明鼠、C57 鼠等），我们强烈建议在成像实验的前一天进行脱毛，从而最大限度地消除毛发的背景荧光和其他干扰。小鼠毛发在短波长激发光下的背景荧光尤为显著，如下图的两只 ICR 小鼠（白毛），左边小鼠已剃毛，右边小鼠未剃毛，在 465 nm 光激发下，可以明显看出毛发的背景荧光。



2. 小鼠剃毛方法主要包括剃毛器、脱毛膏、化学试剂脱毛（如硫化钠），我们比较建议使用小鼠剃毛器进行脱毛，因为脱毛膏含有一些芳香成分可能会带来背景荧光，而且脱毛膏和硫化钠等化学试剂均可能对小鼠皮肤造成灼伤，伤口处有时会伴随着较强的背景荧光。PerkinElmer 小鼠剃毛器套装可以很好地对小鼠进行脱毛，小鼠麻醉后，先使用较大的方头剃毛器逆着小鼠毛发的方向进行推动，推动时可以轻轻贴着小鼠皮肤但不要用力按压在皮肤上，方头剃毛器可以剃除小鼠身上绝大部分毛发，但由于刀头的缘故可能会留着约 1 mm 长的短毛，接着可以使用小的圆头的剃毛器对剩余的短毛进行处理。小鼠剃毛器使用 5 号干电池，套装内的小瓶装油可以用于刀头的润滑。
3. 鼠粮对小鼠成像也会带来一定干扰，常规的鼠粮中含有苜蓿等成分，这些成分在特定波段下会产生背景荧光，如下图左，在 Emission 740 nm 的波段下，小鼠腹腔中有明显的食物荧光信号；下图右是胃肠中食物荧光信号的 3D 透射成像图。



为尽量避免来自食物的荧光，我们建议选用不含苜蓿等成分的鼠粮，或者实验前一天对小鼠进行禁食，但不要禁水。

4. 小鼠在成像前建议先用温水浸湿的纱布擦拭口鼻、爪子以及排尿处，因为这些部位常伴随着不必要的背景荧光。
5. 在荧光光谱分离时，有时信号较弱难以识别。可以使用一个黑色底不透的 96 孔板，板中加入适当浓度的染料/标准样品（染料信号强度与目标信号强度约在同一级别，不能过高以免干扰目标信号），如下图。96 孔板放在实验小鼠右侧，实验小鼠的左侧放一只空白对照小鼠。在光谱分离时，在左侧对照鼠身上划取背景线（常用耳部、口鼻处等），在 96 孔板中的染料样品处画取目标信号，然后进行光谱分离。

