RWD 瑞沃德



活体成像技术白皮书

肿瘤研究 · 药物开发 · 外泌体追踪 · 免疫系统研究

目录

第 1 章　小动物活体成像技术背景 3

1.1 常见的小动物活体成像模态 3

1.2 技术发展现状与研究热点 5

1.3 实验常见痛点与挑战 6

第 2 章 活体成像技术在肿瘤研究中的应用 9

2.1 常用的肿瘤构建模型 9

2.2 肿瘤模型可视化构建流程 12

2.3 肿瘤成像数据分析以及定量方法 18

2.4 典型案例 19

第 3 章 活体成像技术在药物开发研究中的应用 22

3.1 荧光类药物递送系统的构建 22

3.2 荧光染料的修饰 24

3.3 荧光探针成像数据分析以及定量方法 41

3.4 典型案例 42

第 4 章 活体成像技术在外泌体追踪与靶向研究中的应用 43

4.1 常用的外泌体示踪模型 43

4.2 外泌体示踪系统的构建与标记策略 43

4.3 外泌体分离、纯化与给药设计 46

4.4 成像数据分析与定量方法 47

4.5 外泌体靶向机制与工程策略 48
4.6 常见方法学陷阱与标准化建议 49
4.7 典型案例 50
第 5 章 活体成像技术在免疫系统研究中的应用 53
5.1 技术原理与常用的标记策略 53
5.2 基本实验步骤 53
5.3 典型案例 63
第 6 章 成像系统选择建议 66
6.1 硬件性能 66
6.2 光学设计 68
6.3 光谱拆分 73
6.4 数据校正 74
6.5 高通量设计 76
6.6 完善的服务体系 77
参考文献 78
附录 & 下载资源 80
小动物活体成像常用探针、底物与核素指南 80
瑞沃德“从活细胞到活体洞察”全流程解决方案 87

第 1 章　小动物活体成像技术背景

1.1 常见的小动物活体成像模态

活体成像技术（*In Vivo Imaging*）通过非侵入或微创方式，在动物存活状态下获取其生理、病理及分子水平的动态信息。相较于传统离体实验，活体成像能够减少个体差异、提高实验可重复性，并实现长期纵向观察。小动物（如小鼠、大鼠）因其基因可编辑性强、成本较低，成为生物医学研究的主要模型。同时成像技术的灵敏度、分辨率和定量分析能力不断提升有力地推动了精准医学和转化医学的发展。随着光学成像、核医学成像、磁共振成像及多模态融合技术的发展，该技术在肿瘤学、神经科学、免疫治疗和药物研发等方面发挥了关键作用。目前，动物活体成像技术主要分为以下五大类：光学成像、核素成像、核磁共振成像、计算机断层摄影成像和超声成像。

1.1.1 可见光成像

目前体内可见光成像主要分为生物发光(Bioluminescence Imaging, BLI)和荧光成像(Fluorescence Imaging, FLI)。生物发光主要成像原理是将荧光素酶基因整合到细胞染色体 DNA 上，使其表达荧光素酶。当提供外源性底物荧光素时，细胞会产生发光现象，且光强度与标记细胞数量呈线性关系。在哺乳动物中，荧光素酶基因常被用于标记细胞。由于生物发光无组织自发荧光的干扰，因此通常应用于动物模型的构建。然而不同的荧光素酶发光波长并不相同，常用的萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase)发光波长在 550nm-570nm 左右，这使得其更容易穿透组织。而荧光成像则是利用荧光基团，如绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein，GFP）、红色荧光蛋白（DsRed）等对纳米材料或者细胞进行标记，通过激发荧光基团达到高能量状态，随后释放发射光来进行成像。目前随着荧光染料以及荧光蛋白的开发，多重标记已经普遍应用于活体成像。同时由于动物组织会有自发荧光信号，因此荧光染料的选择十分重要，同时对于仪器算法的要求也在进一步的提升。

1.1.2 核素成像

核素成像（Radionuclide Imaging）是一种基于放射性示踪剂的分子影像技术，通过检测放射性核素衰变释放的γ射线或正电子，实现对生物体内生理、生化过程的非侵入性可视化。该技术具有高灵敏度、功能成像优势和定量分析能力，广泛应用于临床诊断和基础研究。目前，主要核素成像技术包括单光子发射计算机断层显像（SPECT）以及正电子发射断层显像（PET）。PET 成像采用正电子核素（如 ^{18}F、^{11}C 等）标记的示踪剂，利用核素衰变过程中发射出的正电子与周围电子湮灭产生一对方向相反的 γ 光子，探测器实时探测这对

光子以确定示踪剂位置，进而重建断层图像。而代谢活跃的组织和器官对 ^{18}F -FDG PET 的摄取会增加，通常在肿瘤诊断中，^{18}F -FDG PET 可通过检测肿瘤细胞高代谢特性来定位肿瘤。而 SPECT 成像利用放射性核素（如 ^{99m}Tc、^{131}I 等）发射的单光子，通过探测器围绕人体旋转采集信息，经计算机处理重建出断层图像。可用于心肌灌注显像、骨骼显像等，例如在心肌缺血诊断中，能清晰显示心肌血流灌注情况。核素成像常与 CT 等结构成像技术融合，形成 PET/CT、SPECT/CT 等一体化成像设备。这种融合能将核素成像提供的功能代谢信息与 CT 提供的精细解剖结构信息相结合，提高诊断的准确性和定位的精确性。

1.1.3 核磁共振成像

核磁共振成像（Magnetic Resonance Imaging，MRI）是一种基于核磁共振（NMR）原理的无创医学成像技术，利用强磁场和射频脉冲激发人体组织中的氢原子（^{1}H），通过检测其弛豫信号重建高分辨率解剖图像。MRI 具有无电离辐射、优异的软组织对比度、多参数成像等优势，广泛应用于临床诊断和科研。MRI 通过调节脉冲序列参数（如重复时间 TR、回波时间 TE），可生成反映不同组织特性的图像，实现“一检多能”，为疾病定性诊断提供多维证据。例如，在脊髓病变诊断中，T1WI 显示脊髓受压程度，T2WI 识别水肿或出血，增强 T1WI 判断是否存在肿瘤强化，三者结合可有效区分椎间盘突出与脊髓胶质瘤。同时 MRI 无需改变患者体位即可进行横断、矢状、冠状及任意斜位成像，能全方位显示病变与周围结构的空间关系，尤其适用于复杂解剖部位的评估。但 MRI 的灵敏度相对 PET/SPECT 较低，因此 MRI 通过与其他成像技术互补可以形成完整诊断体系。

1.1.4 计算机断层摄影成像

计算机断层摄影成像（Computed Tomography，CT）是一种基于 X 射线技术，通过计算机处理多层面投影数据以生成人体内部三维结构图像的医学成像技术。CT 的本质是利用 X 射线的穿透性和不同组织的衰减差异，通过计算机算法将多角度投影数据转化为断层图像。具体而言：X 射线是一种高能电磁波，穿透人体时，会因组织的密度、原子序数和厚度不同而发生不同程度的衰减（吸收或散射）。而小动物 CT 成像（Micro-CT）是临床 CT 技术的微型化版本，专为小鼠、大鼠等实验动物设计。其相对于临床 CT 的空间分辨率可达微米级（1-50 μm）。小动物（尤其是啮齿类）是骨骼发育、退行性疾病（如骨质疏松）、遗传性骨病等研究的经典模型，CT 凭借对骨结构的高敏感性，成为该领域的核心成像工具。对于类风湿关节炎、骨关节炎等模型小鼠，CT 可动态观察关节间隙狭窄、软骨下骨硬化、骨质增生等病理变化。例如，通过对胶原诱导性关节炎（CIA）模型大鼠的膝关节进行纵向 CT 扫描，可量化关节周围骨侵蚀的程度，评估抗炎药物的疗效。同时 Micro-CT 在心血管疾病成像方面有着独特优势，动脉粥样硬化斑块中的钙化灶是 CT 的高敏感靶点(钙化组织衰减系数高)。在 ApoE

基因敲除小鼠（经典动脉粥样硬化模型）中，CT 可检测主动脉根部、颈动脉的钙化斑块，量化钙化体积和密度，评估降脂药物或基因干预对斑块进展的影响。

1.1.5 超声成像

超声成像是一种基于超声波物理特性的无创医学成像技术，通过向人体或生物体发射高频声波（超声波），接收其反射、散射或透射信号，经计算机处理后生成实时的解剖结构或功能图像。超声成像的核心是利用超声波在不同组织中的传播特性差异（如声速、衰减系数、反射系数）实现成像。

根据成像模式和功能，超声成像可分为多种类型，各有侧重。例如：B 型超声是最基础的成像模式，以灰度显示组织的二维解剖结构，亮度反映反射信号强度。而多普勒超声通常用于检测血流速度和方向，可以直观显示血管分布和血流状态。尽管超声应用广泛，但仍存在不足。组织穿透深度有限以及受气体和骨骼干扰，使得超声需结合 CT 或 MRI 进行综合成像。

1.2 技术发展现状与研究热点

在“小动物成像”的概念出现之前，实验动物只能通过临床仪器进行成像。然而，临床前研究大多使用啮齿动物模型（小鼠或大鼠），在许多情况下，这些模型太小，无法通过临床成像设备准确成像。因此小动物活体成像技术的发展方向聚焦于更高分辨率、更深穿透深度、多模态整合及智能化分析，同时注重降低动物损伤和提升临床转化潜力。近年来，单一的成像模式由于技术原理的局限性，往往存在难以克服的缺点，这些缺点可能导致信息获取不全面、应用场景受限等问题。这些缺点推动了多模态成像技术的发展 —— 通过整合不同模态的优势（如 PET 的功能代谢信息 + CT 的解剖定位、MRI 的软组织对比度 + 光声的分子特异性），实现更全面、精准的研究数据。小动物活体光学成像（In Vivo Optical Imaging）主要包括生物发光成像（BLI） 和 荧光成像（FLI），因其高灵敏度、实时动态监测、低成本等优势，广泛应用于肿瘤学、免疫学、神经科学、药物开发等领域。其核心优势在于以下几个方向：

(1) 高灵敏度，可检测微量生物信号

BLI（生物发光成像）：可检测 <100 个细胞（如肿瘤微转移灶），适用于低丰度目标（如循环肿瘤细胞、细菌感染）。

FLI（荧光成像）：近红外（NIR）探针可穿透数毫米组织，提高深层信号检测能力（如肿瘤血管成像）。

实时动态监测，减少实验动物数量

纵向追踪：同一动物多次成像，减少个体差异（如肿瘤生长、免疫治疗响应）。
药物代谢研究：实时观察药物分布（如纳米递药系统靶向性评估）。

(2) 操作简便，成本较低

相比 PET/MRI，光学成像设备成本低，无需放射性同位素或强磁场。
适合 高通量药物筛选（如抗肿瘤药物疗效评估）。

(3) 分子水平特异性高

基因报告系统（如荧光素酶耦合特定启动子）可监测基因表达（如 p53 激活）。
功能探针（如钙离子、ROS 传感器）实现活细胞动态观测。

(4) 多模态成像兼容性强

可与 CT/MRI/PET 联用，结合 解剖+功能信息（如 BLI 定位肿瘤，MRI 提供结构背景）。

1.3 实验常见痛点与挑战

1.3.1.1 信号太弱，难以检测

这是最常见的问题，预期的强信号在图像上几乎看不到，与背景无异，导致实验失败。

可能原因：

(1)细胞/探针用量不足：注射的荧光细胞数量太少或探针浓度过低。
(2)表达水平低：报告基因（如 Luciferase）或荧光蛋白（如 GFP，RFP）在目标细胞中表达效率不高。
(3)穿透深度限制：可见光（400-700 nm）在生物组织内散射和吸收严重，尤其是蓝绿光，几乎无法从深层组织传出。
(4)探针/底物代谢快：例如，萤光素酶底物——萤光素（Luciferin）在体内代谢速度快，注射时机不对会导致信号峰值错过。
(5) 仪器灵敏度不够：相机或光学系统无法有效捕捉微弱的光子信号。

1.3.1.2 背景噪声高，信噪比差

图像背景“很脏”，非特异性信号掩盖了目标信号，难以区分和量化。

可能原因：

(1)非特异性结合：尤其是荧光成像中，探针会非特异地聚集在肝、脾等网状内皮系统，或与血清蛋白结合，造成高背景。
(2)自发荧光：实验动物饲喂的饲料（特别是富含叶绿素的素食饲料）、肠道内容物、皮毛以及一些药物代谢产物在特定激发光下会产生强烈的自发荧光，其光谱可能与目标信号重叠。
(3) 外界光污染：暗室不够暗，或仪器门未关紧，导致漏光。

1.3.1.3 信号不稳定，重复性差

同一组内不同个体的信号强度差异巨大，或同一动物在不同时间点测得的信号波动无常，无法进行统计学分析或纵向比较。

可能原因：
(1)探针/底物注射操作不一致：注射体积、速度、部位（腹腔 vs. 尾静脉）的差异会极大影响生物分布和信号动力学。
(2)动物个体差异：小鼠的代谢状态、体重、年龄、荷尔蒙水平等会影响探针的代谢和分布。
(3) 麻醉深度不一致：麻醉会影响动物的体温和血液循环，从而影响 Luciferin 的分布和酶促反应速率，导致生物发光信号波动。

1.3.2 操作与技术相关问题

1.3.2.1 动物准备繁琐，易引入误差

痛点描述：脱毛不彻底导致荧光背景；麻醉过量或不足；操作时间长导致动物体温下降（影响信号）。
具体体现：商用脱毛膏效果差或刺激皮肤；异氟烷麻醉系统不稳定；手动注射重复性低。

1.3.2.2 图像配准与定位困难

痛点描述：尤其是在没有 X 光二维投影功能的系统中，无法精确判断信号来源的具体解剖位置（例如，是来自肠道、子宫还是肿瘤）。
可能原因：小鼠腹部信号可能来自肠道、肝脏、肾脏或肿瘤，缺乏解剖学参照难以区分。

1.3.2.3 数据分析与量化主观性强

痛点描述：如何划定感兴趣区（ROI）？如何设定背景阈值？不同的人分析同一张图片可能得到完全不同的量化结果。

可能原因：缺乏标准化分析流程。信号边缘模糊时，ROI 的划定大小会显著影响总光通量的计算结果。

1.3.3 生物学与技术局限性

1.3.3.1 “看到信号”不等于“看到细胞”

痛点描述：误将炎症、坏死或探针的非特异性滞留解释为肿瘤细胞信号。
可能原因：成像技术本身提供的是生物化学信号，而非细胞形态学信息。肿瘤周围的炎症区域同样会有大量巨噬细胞吞噬探针或表达报告基因，造成假阳性。

1.3.3.2 无法进行绝对定量

痛点描述：很难准确说出“这个肿瘤里到底有多少个细胞”。信号强度受太多因素影响（深度、血供、缺氧状态、pH 值等），只能进行相对比较（如治疗组 vs 对照组）。

第 2 章 活体成像技术在肿瘤研究中的应用

2.1 常用的肿瘤构建模型

2.1.1 自发性肿瘤模型

自发性动物肿瘤模型（Spontaneous Animal Tumor Models）是指未经人为基因干预或致癌剂处理，在动物自然生命周期中自发形成的肿瘤模型。目前自发性动物肿瘤模型主要有乳腺癌模型、肝脏肿瘤模型以及淋巴肉瘤模型。

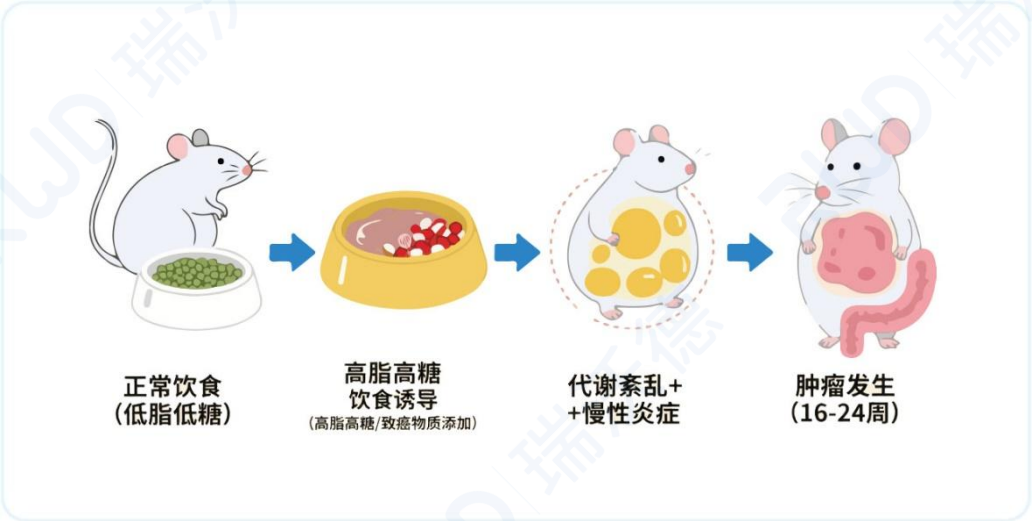


图 1 自发性动物肿瘤模型构建示意图

2.1.1.1 自发性乳腺癌小鼠模型

多采用近交系小鼠，目前研究报道的有 C3H 系、A 系、CBA/J 系等，其中 C3H 小鼠自发性乳腺癌发病率相对较高。

C3H/HeJ 小鼠：雌性小鼠在 6-12 月龄 时乳腺肿瘤自发率 >85%。将 C3H/HeJ 雌鼠饲养至 6-12 月龄，观察乳腺肿瘤自发形成。肿瘤类型主要为腺癌，与人类乳腺癌相似。肿瘤发生与小鼠乳腺肿瘤病毒（MMTV） 感染相关。

C3H/HeJ 小鼠的自发性乳腺癌多为激素依赖性（与雌激素、孕激素相关），可模拟人类激素受体阳性（HR+）乳腺癌，因此常用于解析激素（如雌激素）通过调控细胞增殖、分化参与肿瘤发生的分子机制，或研究内分泌紊乱（如绝经后激素水平波动）与乳腺癌风险的关联。同时此类自发性乳腺癌常发生肺、淋巴结等部位的转移，可用于追踪肿瘤细胞从原发灶脱离、进入循环、定植远处器官的完整过程，解析转移相关分子（如整合素、趋化因子）的作用，

或筛选抑制转移的靶点。同时可用于分析肿瘤浸润免疫细胞（如 T 细胞、巨噬细胞、NK 细胞）的表型及功能变化（如“免疫抑制性微环境”的形成），探索免疫逃逸机制；评估免疫检查点抑制剂（如 PD-1/PD-L1 抗体）对自发性肿瘤的疗效及机制。但由于 C3H/HeJ 小鼠因 Tlr4 基因突变对脂多糖（LPS）不敏感，可能影响其免疫反应（如炎症相关通路），因此在研究“炎症 - 肿瘤”关联或免疫治疗时需考虑这一特性，避免结果偏差。

2.1.1.2 自发性肝脏肿瘤小鼠模型

小鼠自发性肝脏肿瘤通常发生于肝细胞，一般肝脏肿瘤发生发展是从肝细胞损伤导致炎症的产生开始的。而持续的炎症刺激则会导致细胞外基质（ECM）过度沉积，形成纤维化支架。最后肿瘤细胞获得侵袭和转移能力，表现为血管侵犯、卫星结节形成及远处转移（如肺转移）。据研究报道显示以下品系的小鼠常用于自发性肝脏肿瘤的构建。

表 1 常用于自发性肝脏肿瘤构建的小鼠品系

品系	肿瘤发生率	出现时间	主要病理类型
C3H/HeJ	80-90%	12-18 月	肝细胞癌
B6C3F1	30-50%	18-24 月	腺瘤/癌
PTEN+/-	60%	6-9 月	混合型肝癌

饲养条件需提供自由进食灭菌饲料（AIN-93G 配方）。此外，还可以采用化学诱导以及饮食诱导的方式进行造模。

化学法诱导通常包括二乙基亚硝胺（DEN）诱导以及黄曲霉素（AFB1）诱导等。二乙基亚硝胺（DEN）诱导法可以选取体重 250g 左右的封闭群大白鼠或特定品系小鼠，雌雄不拘，按性别分笼饲养，提供普通食物与水。采用 0.25% DEN 水溶液灌胃，剂量为 10mg/kg，每周一次；其余 5 天，将 0.025% DEN 水溶液放入水瓶中，任其自由饮用。持续约 4 个月，可诱发肝癌。或者单用 0.005% DEN 掺入饮水中让小鼠自由饮用，8 个月可诱发肝癌。及黄曲霉素（AFB1）诱导法需要将 AFB1 按每日 0.001 - 0.015ppm 的剂量混入小鼠饲料中，持续 6 个月，肝癌诱发率可达 80%。而饮食诱导法主要以高胆固醇饮食诱导为主。选用高脂 / 高胆固醇饲料（如含 43.7% 脂肪、36.6% 碳水化合物、19.7% 蛋白质、0.203% 胆固醇）。对 8 周龄雄性 C57BL/6 野生型同窝出生幼鼠，用高胆固醇饲料喂养 14 个月。研究表明，喂养该饲料的小鼠在第 10 个月时血清 AFP 水平升高，第 14 个月时出现肝肿瘤，肝脏切片组织学检查为肝细胞癌。

2.1.2 移植性肿瘤模型

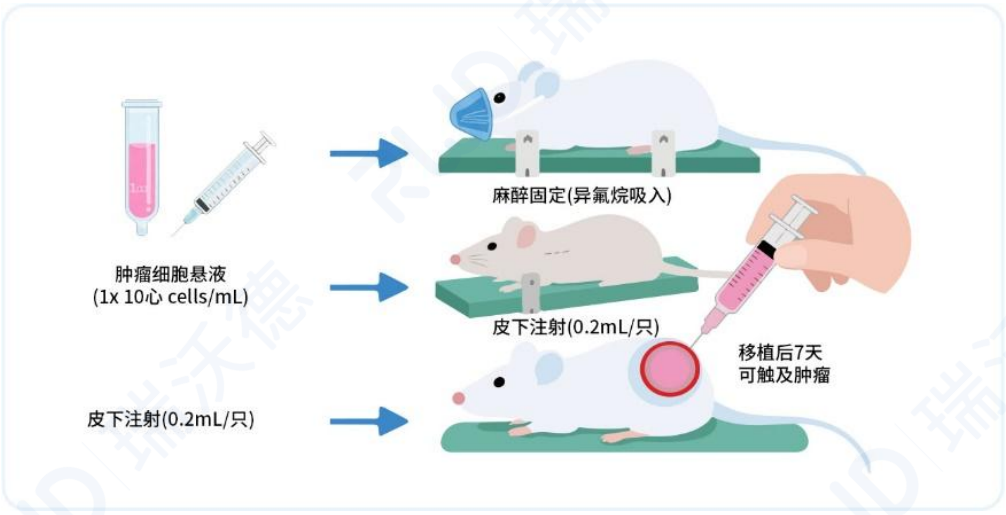


图 2 移植性动物肿瘤模型构建示意图

移植性肿瘤模型是将肿瘤细胞、组织或器官移植到实验动物体内，使其生长形成肿瘤的模型。这种模型因构建周期短、可重复性高、能较好地模拟肿瘤的生长和转移过程等特点，在肿瘤研究中被广泛应用，尤其在药物筛选、疗效评估、肿瘤转移机制研究等方面发挥着重要作用。根据移植的肿瘤来源和受体动物的免疫状态，移植性肿瘤模型可分为以下几类：

2.1.2.1 同种移植模型

将同种动物的肿瘤组织或细胞移植到同品系的动物体内构建而成。由于供体和受体的遗传背景相同，免疫系统通常不会对移植的肿瘤产生强烈的排斥反应，肿瘤较易生长。

优点：模型稳定性好，肿瘤生长特性相对一致，可重复性高，能较好地模拟肿瘤在同种生物体内的生长情况。

应用场景：常用于评估抗肿瘤药物的疗效、研究肿瘤的生长规律和侵袭转移机制等。例如，将小鼠肝癌细胞 H22 移植到同品系小鼠腹腔或皮下，可构建同种移植性肝癌模型，用于肝癌药物的筛选。

2.1.2.2 异种移植模型

将人类肿瘤组织或细胞移植到免疫缺陷动物体内构建而成。由于人类肿瘤细胞与动物细胞存在种属差异，正常动物的免疫系统会对其产生排斥，因此需要使用免疫缺陷动物作为受体，如裸鼠（无胸腺，T 细胞功能缺陷）、SCID 鼠（T、B 细胞功能缺陷）等。

优点：能直接反映人类肿瘤的生物学特性，如肿瘤的形态、生长速度、对药物的敏感性等，为临床前研究提供更接近人类肿瘤的模型。

应用场景：广泛应用于人类肿瘤的发病机制研究、新药研发和个体化治疗方案的评估等。例如，将人肺癌细胞 A549 接种到裸鼠皮下，可构建人肺癌异种移植模型，用于测试新的肺癌治疗药物。

2.1.2.3 原位移植模型

将肿瘤细胞或组织移植到受体动物相应的原发器官或组织中。例如，将肝癌细胞移植到小鼠肝脏，将乳腺癌细胞移植到小鼠乳腺脂肪垫等。

优点：肿瘤生长的微环境与原发肿瘤更相似，能更好地模拟肿瘤的侵袭、转移等生物学行为，是研究肿瘤器官特异性转移和局部治疗效果的理想模型。

应用场景：常用于研究肿瘤在特定器官中的生长机制、评估手术、放疗等局部治疗手段的疗效等。

常用的移植性肿瘤模型方法主要为细胞悬液接种法和组织块移植法。

（1）细胞悬液接种法

肿瘤细胞准备：选取对数生长期的肿瘤细胞，用胰酶消化后离心收集，用生理盐水或无血清培养基调整细胞浓度至合适水平（通常为 1×10^6 - 1×10^7个 /ml）。

接种操作：使用注射器将细胞悬液接种到受体动物的特定部位，如皮下、腹腔、静脉或器官内。皮下接种时，一般选择背部或腋下；腹腔接种可形成腹水瘤；静脉接种常用于研究肿瘤的转移；器官内接种则用于构建原位移植模型。

（2）组织块移植法

肿瘤组织准备：选取新鲜的肿瘤组织（可以是动物自身的肿瘤或人类肿瘤标本），在无菌条件下切成大小均匀的组织块（通常为 1 - $2mm^3$）。

接种操作：在受体动物的接种部位做一小切口，将组织块植入，然后缝合切口。对于原位移植，需将组织块精准植入相应的器官内。

2.2 肿瘤模型可视化构建流程

2.2.1 荧光素酶报告基因系统的构建

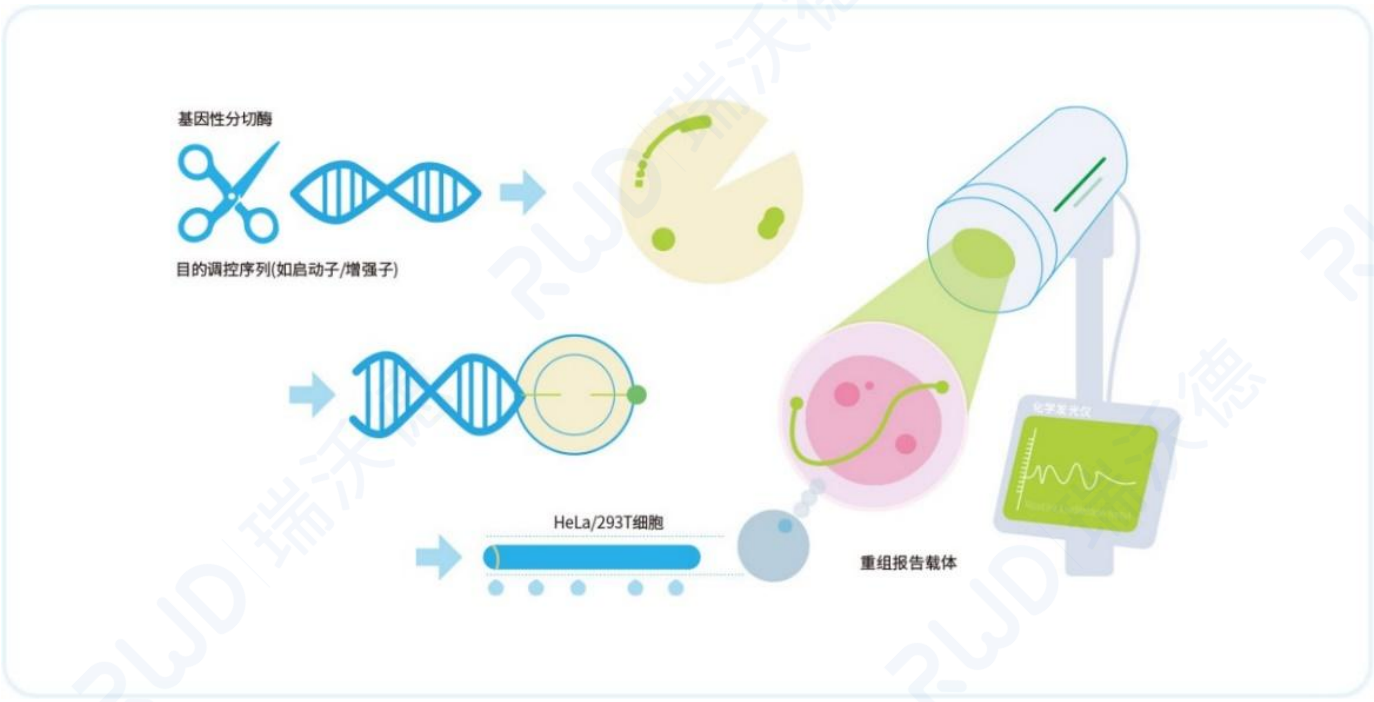


图 3 移植性动物肿瘤模型构建示意图

2.2.1.1 系统组成

报告基因载体:包含荧光素酶基因(如 Luc2 优化版萤火虫荧光素酶)和多克隆位点(MCS),用于插入待研究的启动子/增强子序列。常用载体:pGL3-Basic(无启动子)、pGL4 系列(背景更低,灵敏度更高)。

内参载体:用于归一化转染效率差异,通常使用另一种荧光素酶(如 Renilla Luciferase,载体如 pRL-TK 或 pGL4.74)。也可用其他内参(如β-半乳糖苷酶、荧光蛋白)。

底物:萤火虫荧光素酶:D-荧光素(需 ATP、O_2、Mg^{2+})。海肾荧光素酶:腔肠素(Coelenterazine)。

2.2.1.2 构建步骤

(1) 目标序列克隆

启动子/增强子片段获取 通过 PCR 从基因组 DNA 中扩增或化学合成目标序列(通常 500-2000 bp)。

载体选择:将片段插入报告载体的多克隆位点(如 pGL3-Basic 的 HindIII/XhoI 位点)。

验证：测序确认插入方向和序列正确性。

（2）报告载体优化

去除隐藏调控元件：确保载体骨架不含干扰目标启动子的转录因子结合位点。

添加多聚腺苷酸信号（polyA）：增强 mRNA 稳定性（如 SV40 polyA）。

（3）共转染系统设计

实验组：报告载体（如 pGL3-Promoter） + 内参载体（如 pRL-TK）。

对照组：空载体（pGL3-Basic）作为阴性对照；阳性对照（如 pGL3-Control 带 SV40 启动子）。

（4）细胞转染

适用细胞系：HEK293（高转染效率）、HepG2 或其他相关细胞。

转染方法：脂质体（如 Lipofectamine 3000）、电穿孔或病毒转导。

转染比例：报告载体与内参载体通常按 10:1~50:1（如 1 μg pGL3 : 0.1 μg pRL-TK）。

（5）荧光素酶活性检测

裂解细胞：转染 24-48 小时后，用裂解液裂解细胞。

双荧光素酶检测（以 Promega Dual-Luciferase 系统为例）：

加入萤火虫荧光素酶底物，检测 Firefly Luciferase 活性（信号持续约 10 秒）。

加入试剂淬灭 Firefly 并激活 Renilla Luciferase，检测内参活性。

（6）数据分析

计算相对活性：Firefly RLU / Renilla RLU，归一化转染效率。

统计学处理：t 检验或 ANOVA 比较实验组与对照组的差异。

2.2.2 荧光蛋白报告基因系统的构建（以表达绿色荧光蛋白 GFP 为例）

2.2.2.1 GFP 报告基因系统的构建

构建的核心目标是将 GFP 基因与“目标序列”（调控元件或目的基因）通过载体连接，形成可表达的重组系统。具体步骤如下：

（1）系统设计：明确构建目的

根据研究需求确定系统类型，常见包括：

1）启动子 / 增强子活性报告系统：将 GFP 基因置于目标启动子 / 增强子下游，通过 GFP 荧光强度反映调控元件的活性（如检测某基因启动子在缺氧条件下的激活）。

2）基因表达追踪系统：将 GFP 与目的基因融合（如目标基因-GFP），通过荧光定位目的蛋白的表达时空模式或亚细胞定位（如追踪细胞骨架蛋白的动态分布）。

3）信号通路报告系统：将 GFP 基因与通路下游特异性启动子（如 NF-κB 响应元件）连接，通过荧光反映通路激活状态（如炎症通路是否被激活）。

（2）载体骨架选择

需选择合适的质粒载体作为骨架，关键要素包括：

1）复制起点：确保载体在宿主细胞中稳定复制（如哺乳动物细胞用 pCDNA 系列，原核用 pET 系列）。

2）筛选标记：用于筛选成功导入载体的细胞（如抗生素抗性基因 neo、amp，或荧光标记 mCherry）。

3）启动子：若为启动子报告系统，需去除载体自带启动子，仅保留多克隆位点（MCS）供插入目标启动子；若为融合蛋白系统，需保留强启动子（如 CMV、EF1α）驱动融合基因表达。

4）多克隆位点（MCS）：需包含与目标片段匹配的酶切位点，且不破坏 GFP 的开放阅读框（ORF）。

（3）关键片段制备

需通过 PCR 扩增或基因合成获取以下核心片段：

1）目标序列：若为启动子报告系统，需克隆目标启动子 / 增强子序列（长度通常 500-2000 bp，需包含核心调控区域）；若为融合蛋白系统，需克隆目的基因全长（确保无终止密码子，避免 GFP 无法表达）。

2）GFP 基因：常用优化后的变体（如 EGFP，荧光更强；mGFP，稳定性更高），需确保其 ORF 完整，且与目标序列的阅读框一致（融合蛋白系统中尤为重要）。

（4）重组载体构建

通过分子克隆技术将目标序列与 GFP 基因连接到载体骨架中，常用方法包括：

酶切连接法：

a. 用相同限制酶（如 EcoR Ⅰ、Xho Ⅰ）分别酶切载体骨架、目标序列和 GFP 基因（若为融合系统，目标基因与 GFP 需通过 linker 连接，避免空间位阻）；

b. 用 T4 DNA 连接酶将酶切后的片段连接，形成重组载体。

同源重组法：

通过设计引物引入同源臂，利用重组酶（如 In-Fusion、Gibson 组装）直接连接片段与载体，无需酶切，效率更高，尤其适用于复杂片段拼接。

（5）载体初步验证

重组载体构建后需验证正确性，避免后续实验误差：

酶切鉴定：用构建时的限制酶切割重组载体，通过琼脂糖凝胶电泳检测片段大小是否与预期一致（如启动子 - GFP 载体酶切后应出现“载体骨架 + 启动子 + GFP”的片段）。

测序验证：对插入片段（目标序列 + GFP）进行 Sanger 测序，确认序列无突变、方向正确（尤其启动子需确保 5’→3’方向驱动 GFP 表达）。

2.2.2.2 GFP 报告基因系统的验证

构建完成后，需通过多维度实验验证系统的有效性，包括表达验证、功能验证和特异性验证。

（1）表达验证：确认 GFP 正确表达

核心是检测 GFP 在转录、翻译水平的表达，排除载体构建错误或表达障碍。

荧光显微镜观察： 将重组载体转染 / 转化至目标宿主（如哺乳动物细胞、细菌、植物细胞），培养后通过荧光显微镜（激发波长 488 nm，发射波长 507 nm）观察绿色荧光。若有荧光，说明 GFP 成功表达；无荧光需排查载体阅读框、启动子活性或转染效率问题。

流式细胞术定量： 对转染后的细胞进行流式分析，统计荧光阳性细胞比例（反映转染效率）和平均荧光强度（反映表达量），量化 GFP 表达水平。

Western blot 检测： 提取细胞总蛋白，用 GFP 特异性抗体检测，通过条带大小（如 EGFP 约 27 kDa）确认 GFP 蛋白正确合成，排除截短或错误翻译。

RT-PCR/qPCR 验证： 提取总 RNA，反转录后用 GFP 特异性引物扩增，检测 mRNA 水平，确认表达障碍是否来自转录阶段（如启动子失效）。

（2）功能验证：验证系统的生物学意义

根据系统设计目的，验证其是否能反映目标生物学过程：

启动子 / 增强子活性验证： 在不同条件下（如不同细胞类型、激素处理、药物刺激）检测荧光强度变化。例如，若研究缺氧响应启动子（如 HIF-1α 靶启动子），需比较常氧和缺氧条件下的荧光强度，确认缺氧后荧光增强（反映启动子激活）。

融合蛋白定位验证：通过共聚焦显微镜观察 GFP 荧光的亚细胞定位，与已知标记物（如细胞核用 DAPI、线粒体用 MitoTracker）共定位，确认融合蛋白是否在预期位置表达（如“目的基因 - GFP”是否定位于细胞膜）。

信号通路激活验证： 用通路特异性刺激剂处理细胞（如用 LPS 激活 NF-κB 通路），检测 GFP 荧光强度是否随通路激活而增强，并用 qPCR 检测下游内源基因表达，验证报告系统与内源通路的一致性。

（3）特异性验证：排除干扰因素

通过对照实验确保荧光信号的特异性：

阴性对照：

转染空载体（无 GFP）的细胞，排除细胞自发荧光或载体骨架干扰；

转染“目标序列 - 突变 GFP”载体（如 GFP 无荧光突变体），排除非特异性信号。

阳性对照： 转染已知高效表达的 GFP 载体（如 pEGFP-N1），确保实验体系（转染、检测）有效。

稳定性验证：

长期培养（如传代 10 次以上）或在动物模型中（如转基因小鼠）检测 GFP 表达是否稳定，排除基因沉默或载体丢失。

2.2.2.3 常见问题与优化策略

无荧光或荧光弱：

载体问题：测序确认阅读框正确、启动子方向无误；更换强启动子（如 CMV）或添加增强子（如 SV40 增强子）。

表达问题：优化转染效率（如调整脂质体比例）；使用 GFP 变体（如 mNeonGreen，荧光强度是 EGFP 的 3 倍）。

非特异性荧光：

减少激发光强度或延长曝光时间，或使用红色荧光蛋白（如 mCherry）作为内参，排除背景干扰。

融合蛋白功能异常：

调整 linker 序列（如柔性 linker GGGGS），避免 GFP 与目的蛋白相互干扰；或采用“GFP - 目的基因”与“目的基因 - GFP”两种方向构建，选择功能正常的系统。

2.3 肿瘤成像数据分析以及定量方法

荧光素酶动力学曲线（以萤火虫荧光素酶为例）

由于萤火虫荧光素酶在体内的生物分布迅速且其动力学特征具有组织依赖性，研究人员在开展正式实验前，通常需要通过建立动物模型的荧光素酶动力学曲线，来确定荧光素酶底物注射后成像采集的最佳时间点。

2.3.1 实验准备

2.3.1.1 动物模型选择

需使用稳定表达荧光素酶的转基因动物或经荧光素酶报告基因载体转染 / 接种的模型动物（如荷瘤小鼠，肿瘤细胞表达荧光素酶）。确保模型的荧光素酶表达稳定且具有生物学相关性（如特定组织 / 器官靶向表达）。

2.3.1.2 试剂与仪器

底物：D-荧光素钠盐（需用无菌 PBS 或生理盐水溶解，浓度通常为 15~150 mg/mL，现配现用）；

仪器：活体成像系统（RWD MOIS HT 系列）和气体麻醉装置（如异氟烷）；

2.3.2 实验步骤

2.3.2.1 动物预处理

称重，根据体重计算 D-荧光素钠盐注射剂量（常用剂量：小鼠 100 μL / 只，浓度 15 mg/mL，即 150 mg/kg；大鼠按比例调整）。

2.3.2.2 注射与成像时间点设计

注射方式：根据模型特点选择，常用腹腔注射（吸收较慢，信号持续久）或尾静脉注射（吸收快，信号峰值早）；

时间点设置：覆盖从注射后数秒到数小时的区间，兼顾信号上升、稳定和衰减阶段。

例如：

静脉注射：0.5、1、2、5、10、15、20、30、45、60 分钟；

腹腔注射：5、10、15、20、30、45、60 分钟。

（建议前期密集采样，后期延长间隔，捕捉关键转折点）。

2.3.2.3 活体成像操作

将动物置于麻醉装置中，用异氟烷（2~3% 诱导，1~2% 维持）麻醉后，转移至成像暗箱的加热平台（37°C）；

按预设时间点，通过腹腔或尾静脉注射 D-荧光素钠盐溶液（注射速度均匀，避免漏液）；

每个时间点采集荧光图像：设置曝光时间（通常 1~60 秒，根据信号强度调整）、激发 / 发射滤光片（荧光素酶常用 560 nm 发射滤光片），记录荧光信号强度（以 $p/s/cm^2/sr$ 表示）。

2.3.2.4 数据采集与标准化

每次成像时，在相同区域（如肿瘤部位、特定器官）绘制感兴趣区域（ROI），定量该区域的荧光强度；记录每只动物的体重、注射剂量、麻醉状态等，减少个体差异影响；至少重复 3 只动物，取平均值以提高可靠性。萤火虫荧光素酶动力学曲线的趋势大致如下：

（1）快速上升期（启动阶段）

反应初始阶段，随着酶与底物结合，发光强度迅速上升至峰值。此阶段反应速率受底物浓度、酶浓度及反应启动效率影响，峰值高度反映初始反应活性。

（2）线性衰减期（稳态阶段）

峰值后，发光强度随时间缓慢线性下降。此阶段酶与底物处于动态平衡，反应速率相对稳定，是定量分析的关键区间（通常取此阶段的斜率计算酶活性）。

（3）平台衰减期（底物耗尽阶段）

当底物逐渐耗尽，反应速率急剧下降，发光强度趋近于背景值，曲线进入平缓衰减期。

2.4 典型案例

2.4.1 原位脑胶质瘤模型的可视化

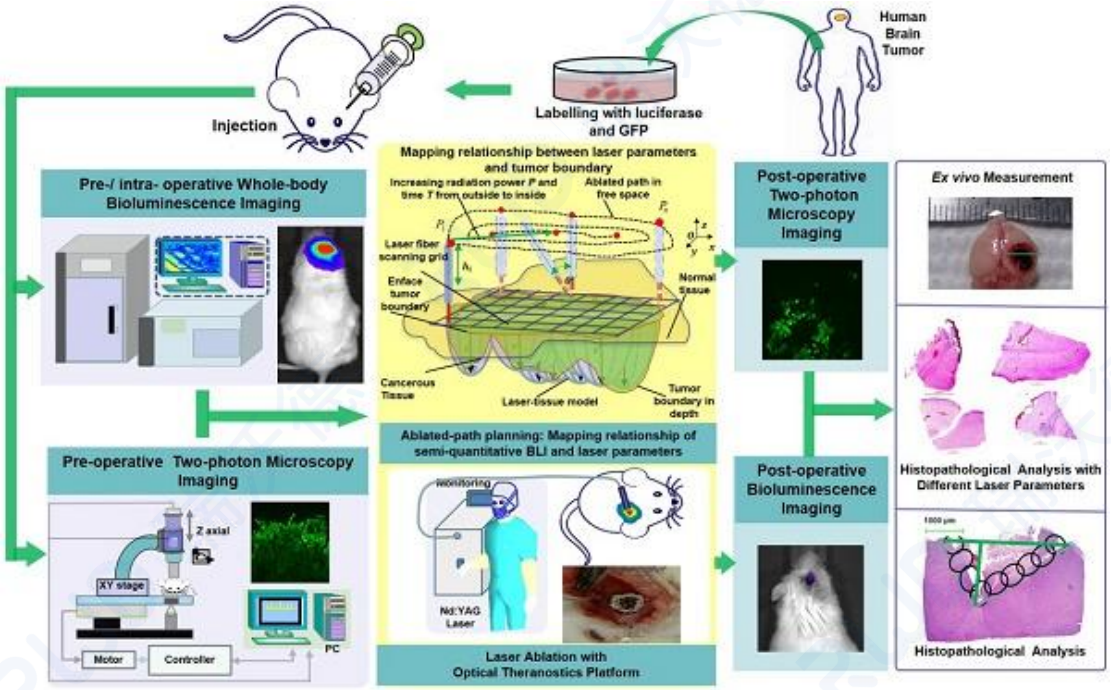


图 4 原位脑胶质瘤的术中切除示意图

该文章通过对表达荧光素酶报告基因的 GBM 细胞进行成像，系统可以清晰地显示出肿瘤的范围和大小。目前 GBM 复发的主要原因是无法在术中完全切除浸润性肿瘤细胞，但是在 BLI 引导下，激光消融的精度达到亚毫米级，肿瘤的切除率（Ablation Rate）超过了 99%。平台成功清晰地勾勒出 GBM 的边缘，为精准切除提供了可能。该研究建立了 BLI 信号强度（肿瘤负荷）与激光消融参数之间的映射关系，实现了定量化、个性化的手术路径规划，确保激光能覆盖所有肿瘤区域。该研究成功证明，整合 BLI 和 TPM 的多模态光学成像平台，能够极其精确地引导激光消融治疗，实现对 GBM 的精准、微创且高效的治疗。其为精准神经外科提供新范式——将多种实时成像技术整合到一个治疗平台中，使外科医生能够“看到”不可见的肿瘤边界并进行精准切除[1]。

2.4.2 骨转移乳腺癌模型的构建及治疗

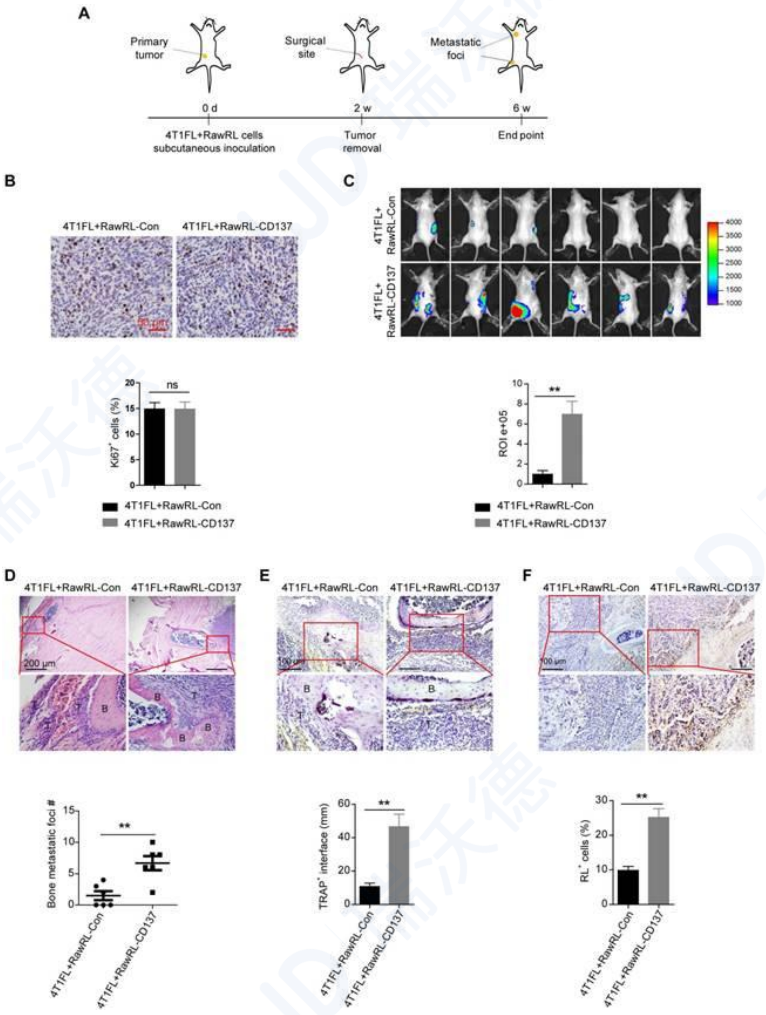


图 5 纳米粒子对骨转移乳腺癌的治疗效果

骨是乳腺癌最常见的转移部位之一，CD137 （4-1BB）是肿瘤坏死因子（TNF）受体超家族成员之一，主要表达于活化的白细胞中。已有研究证实了 CD137-CD137L 双向信号通路在 rankl 介导的破骨细胞发生中的作用。然而，CD137 在乳腺癌骨转移中的作用有待进一步研究。通过建立自发性骨转移小鼠模型，通过生物发光成像、免疫组织化学和组织学检测 CD137 在体内骨转移中的功能。在前期的研究中发现 CD137 通过上调 fr1 的表达促进单核/巨噬细胞向肿瘤微环境的迁移。同时也促进单核/巨噬细胞向破骨细胞的分化，为乳腺癌细胞在骨内定植生长提供了良好的微环境。在此基础上，合成了一种新型的包裹抗 CD137 阻断抗体（NP-αCD137 Ab-F4/80）的靶向 F4 /80 纳米脂质体。该纳米颗粒在体内对 4T1 乳腺癌细胞骨转移和肺转移均有较高的抑制作用。此外，它增加了 Fra1 抑制剂对肿瘤转移的治疗效果[2]。

注意事项：通常在构建原位转移瘤的过程中，转移灶发生初期由于肿瘤细胞相对较少，难以被发现，因此为保证模型的成功构建，建议选取灵敏度较高的活体成像仪器进行成像。

第 3 章 活体成像技术在药物开发研究中的应用

3.1 荧光类药物递送系统的构建

荧光类药物递送系统是一类整合了荧光成像功能与药物递送能力的智能纳米平台，通过将荧光标记物（或荧光响应元件）与药物载体结合，实现药物递送过程的实时可视化追踪、靶向部位的精准定位及治疗效果的动态监测，是“诊疗一体化”理念在药剂学领域的典型应用。其核心优势在于突破传统药物递送“黑箱式”给药的局限，通过荧光信号直观反馈药物的体内分布、释放动力学及病灶靶向效率，为优化递药系统设计、提高治疗精准性提供关键依据。

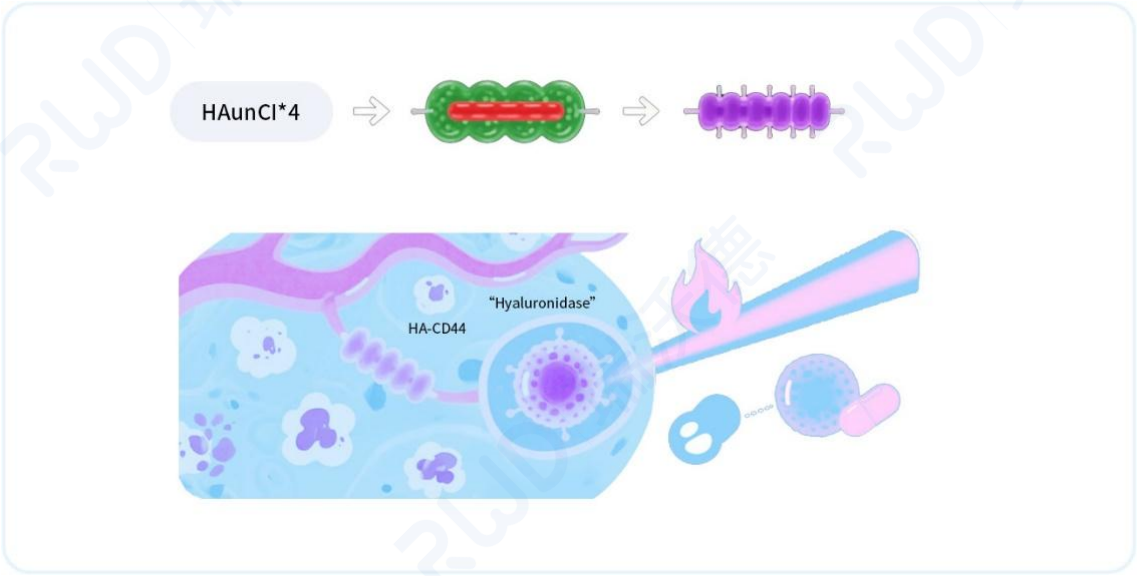


图 6 荧光类药物递送系统构建示意图

3.1.1 系统的核心组成

荧光类药物递送系统通常由 3 个关键部分构成，各组分协同实现“递送 - 成像 - 治疗”功能。

3.1.1.1 药物载体（核心骨架）

承担药物负载与递送功能，需具备良好的生物相容性、靶向性及药物控释能力，常见类型包括：

聚合物纳米粒：如聚乙二醇（PEG）修饰的聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物（PLGA）、壳聚糖等，可通过疏水相互作用或共价键负载疏水药物，且易于修饰荧光基团。

脂质体：由脂质双分子层构成的囊泡结构，可包裹水溶性药物（内部水相）或脂溶性药物（双分子层），表面可修饰荧光染料（如 Cy5.5）和靶向配体（如 RGD 肽）。

无机纳米载体：如介孔二氧化硅纳米粒（MSNs）、量子点（QDs）、金纳米簇等，兼具高载药量和荧光特性（部分自身可发光，无需额外标记）。

仿生载体：如细胞膜包裹的纳米粒（“纳米伪装”），可降低免疫清除，同时通过膜表面荧光标记实现追踪。

3.1.1.2 荧光标记 / 响应元件（成像单元）

负责提供荧光信号，实现药物递送的可视化，其选择需满足：荧光稳定性高、生物毒性低、发射波长适合活体成像（通常为近红外区，700~1000 nm，穿透深度深、组织吸收少）。常见类型包括：

有机荧光染料：如 Cy3、Cy5.5、ICG（吲哚菁绿）等，毒性较低，易于与载体偶联，但存在光漂白快（长期追踪受限）的问题。

量子点（QDs）：如 CdSe/ZnS 量子点，荧光量子产率高、稳定性强、发射波长可调（通过尺寸调控），但含重金属（如 Cd^{2+}）可能存在长期毒性，需表面修饰（如 PEG）降低毒性。

荧光蛋白：如 GFP、mCherry 等，可通过基因工程与载体蛋白融合表达，生物相容性极佳，但荧光强度较弱，多用于细胞水平追踪（体内成像穿透性不足）。

刺激响应型荧光探针：如 pH 敏感型荧光分子（在酸性肿瘤微环境中荧光增强）、酶响应型探针（药物释放时荧光恢复），可同时指示药物释放状态（“释放 - 成像”联动）。

3.1.1.3 靶向单元（可选，增强精准性）

通过修饰靶向配体（如抗体、肽段、适配体），提高系统对病灶组织（如肿瘤、炎症部位）的特异性识别，减少脱靶效应。例如：

肿瘤靶向：RGD 肽（识别肿瘤细胞整合素 αvβ3）、叶酸（靶向叶酸受体高表达肿瘤）；

炎症靶向：甘露糖（识别巨噬细胞表面甘露糖受体）。

3.1.2 工作原理与典型过程

荧光类药物递送系统的核心是通过荧光信号与药物递送行为的“关联映射”，实现从给药到疗效的全程追踪，典型过程如下：

系统构建：将药物（如化疗药、基因药物）包载或偶联到载体中，同时通过共价结合、物理吸附或内嵌方式引入荧光标记物，必要时修饰靶向配体。

给药与体内转运：通过静脉、局部注射等方式给药后，系统在体内循环，靶向单元识别病灶细胞表面受体并富集（被动靶向依赖 EPR 效应，主动靶向依赖配体 - 受体结合）。

荧光成像追踪：通过活体成像系统（RWD MOIS HT 系列）激发荧光标记物，实时监测：

药物在体内的分布（如是否富集于肿瘤，而非正常器官）；

到达靶部位的时间（优化给药间隔）；

荧光强度变化（间接反映药物浓度，如信号增强提示富集，信号衰减可能伴随药物释放）。

药物释放与治疗：在病灶微环境（如低 pH、高还原环境、特定酶）刺激下，载体解体释放药物，发挥治疗作用；部分系统可通过荧光信号变化直接指示释放（如刺激后荧光“点亮”或“淬灭”）。

疗效反馈：通过荧光信号持续监测病灶大小变化（如肿瘤缩小伴随荧光区域减小），评估治疗效果并及时调整方案。

3.2 荧光染料的修饰

3.2.1 化学结构修饰

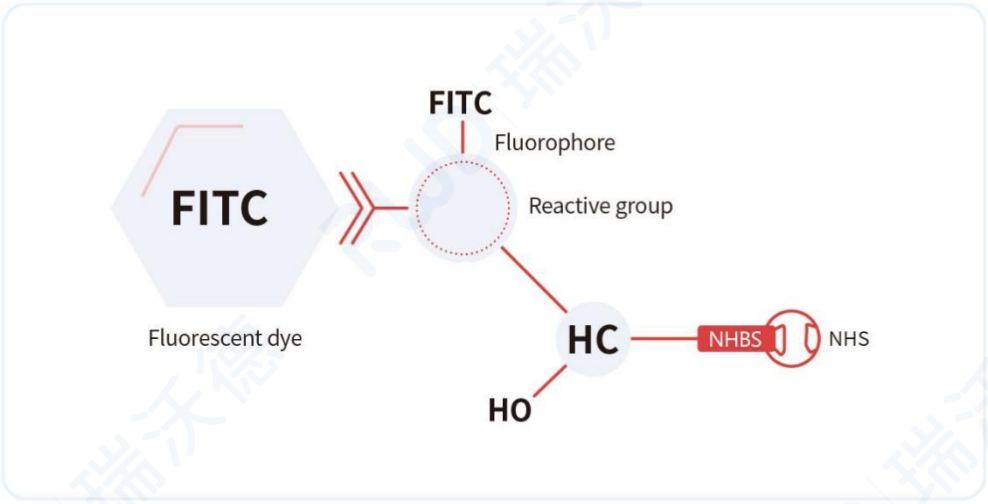


图 7 荧光类染料构建示意图

3.2.1.1 引入/改变发色团：

扩展共轭体系（如增加苯环、多烯链）以红移发射波长。

示例：花菁染料（Cy5）的延伸

（1）活化起始原料：将吲哚衍生物与碘乙烷在乙腈中回流，生成季铵盐中间体。

（2）缩合反应：在碱性条件下（如三乙胺），季铵盐与戊二烯醛缩合，延长共轭链。

（3）纯化：通过硅胶柱层析分离产物（洗脱剂：二氯甲烷/甲醇）。

效果：共轭链从 Cy3（3 个碳）扩展到 Cy5（5 个碳），发射波长从~550 nm 红移至~650 nm。

引入推拉电子基团（如-NH_2、-NO_2）调节荧光量子产率。

3.2.1.2 修饰荧光团核心：

如罗丹明中的氧原子替换为硅（Si-罗丹明），增强光稳定性。

（1）构建氧杂蒽骨架：2-溴苯甲酸与间苯二酚在熔融 $ZnCl_2$中缩合，生成氧罗丹明前体。

（2）氧原子替换为硅：前体与 $SiCl_4$在高温下反应，硅原子取代氧桥，形成 SiR 核心。

（3）氨基修饰：硅核心与胺类（如 N,N-二乙胺）缩合，生成最终染料。

效果：Si-O 键替换为 Si-C 键，显著降低光漂白速率。

氟化（如 BODIPY 氟化）提高亮度和光稳定性。

（1）BODIPY 核心合成：吡咯与醛类在 $BF_3·Et_2O$ 催化下缩合，生成 BODIPY 母核。

（2）亲电氟化：用 Selectfluor®（氟化试剂）在α位（2,6 位）引入氟原子。

（3）纯化：通过制备型 HPLC 分离氟化产物。

效果：氟原子抑制分子振动，减少非辐射衰减，量子产率提升至>90%。

3.2.2 官能团衍生化

3.2.2.1 活化羧基（-COOH）：与氨基（-NH_2）通过 EDC/NHS 缩合形成酰胺键，用于生物偶联（如抗体标记）。

（1）试剂准备

EDC 溶液：溶于水或无水有机溶剂（如 DMF、DMSO），现配现用（易水解）。

NHS 溶液：溶于水或 DMF/DMSO。

反应缓冲液：推荐使用 pH 4.5-7.0 的 MES 缓冲液（避免 Tris 或含氨基的缓冲液干扰反应）。

含羧基分子（如蛋白质、多肽或小分子）。

含氨基分子（如抗体、多肽或氨基修饰的荧光标记物）。

（2）羧基活化（EDC/NHS 步骤）

溶解底物：将含羧基的分子溶解于缓冲液（如 0.1 M MES，pH 6.0）中，浓度建议 0.1-10 mg/mL。

加入 NHS：按羧基摩尔量的 1.2-2 倍加入 NHS（如 10 mM 终浓度）。

加入 EDC：按羧基摩尔量的 1-5 倍加入 EDC（如 5-20 mM 终浓度），冰浴或室温反应 15-30 分钟。

注意：EDC 不稳定，需快速操作，避免长时间暴露在潮湿环境中。

（3）偶联反应（与氨基结合）

加入含氨基分子：将氨基化分子（如抗体）直接加入活化后的混合物中，氨基需过量（通常 2-10 倍于活化羧基量）。

反应条件：室温或 4°C 反应 2-4 小时（或过夜，4°C 更稳定）。

pH 调节：若需要，可调节 pH 至 7.0-8.5 以促进酰胺键形成（但避免 pH >8.5 以防水解）。

（4）终止反应与纯化

终止反应：加入终止剂（如β-巯基乙醇或甘氨酸）淬灭未反应的 EDC/NHS。

纯化：

透析：用 PBS 或目标缓冲液透析去除小分子副产物。

凝胶过滤层析（如 PD-10 柱）：分离偶联产物与未反应分子。

超滤离心：适用于蛋白质偶联物。

3.2.2.2 巯基（-SH）修饰：与马来酰亚胺或碘乙酰胺反应，用于特异性标记蛋白质的巯基。

马来酰亚胺（Maleimide）：与巯基发生迈克尔加成反应，形成稳定的硫醚键。反应速度快，选择性较高，是最常用的巯基标记方法。

碘乙酰胺（Iodoacetamide）：与巯基发生烷基化反应，形成稳定的硫醚键。它也与其他亲核基团（如氨基、组氨酸的咪唑基）反应，但在控制得当的条件下，对巯基有较好的选择性。

（1）实验前重要准备

缓冲液选择：使用无硫醇的缓冲液：绝对不能含有β-巯基乙醇（BME）、二硫苏糖醇（DTT）等还原剂，否则会消耗标记试剂。

pH 值至关重要：最佳 pH 范围为 7.0 - 7.5。pH < 6.5 时，反应速率慢；pH > 8.0 时，马来酰亚胺可能与氨基反应，选择性降低。

避免含胺缓冲液：Tris、甘氨酸等伯胺会与试剂竞争反应，应使用磷酸盐缓冲液（PBS） 或 HEPES 缓冲液。

去除金属离子：可使用 EDTA（1-5 mM）整合金属离子，防止巯基被氧化。

蛋白质预处理（还原暴露巯基）：如果目标巯基已形成二硫键，需要先将其还原。在缓冲液中加入过量的还原剂（如 DTT，5-10 mM）。在 37°C 下孵育 30 分钟。

关键步骤：去除多余的还原剂！ 使用脱盐柱（如 PD-10）、透析或凝胶过滤色谱，将蛋白质转移至无还原剂的反应缓冲液中。这是实验成败的关键。

（2）试剂配制：

将马来酰亚胺或碘乙酰胺粉末用无水 DMSO（二甲基亚砜）新鲜配制为高浓度储备液（如 100 mM）。避免使用水，因为它们在水溶液中不稳定。计算好摩尔倍数，确保标记试剂大大过量于蛋白质中的巯基。

具体操作步骤

方案 A：使用马来酰亚胺（Maleimide）进行标记

a. 准备反应体系：将已还原并换好缓冲液的蛋白质样品置于合适的离心管中。蛋白质浓度建议在 1-5 mg/mL 之间。

b. 加入标记试剂：根据计算，向蛋白质溶液中缓慢加入马来酰亚胺-DMSO 储备液。摩尔比：通常使用 10:1 到 20:1 （标记试剂 ： 总巯基）的过量。对于复杂情况，可高达 50:1。涡旋或轻柔吹打混匀，避免产生气泡。

c. 孵育反应：在避光条件下（因为某些标记物和马来酰亚胺本身可能光敏），于 室温（25°C）或 4°C 下孵育。反应时间：通常 1-2 小时。时间过长可能增加非特异性标记。

d. 终止反应与纯化：加入过量的、不含巯基的淬灭剂来终止反应。最常用的是 β-巯基乙醇（BME）或 半胱氨酸。加入的淬灭剂应远多于剩余的标记试剂（例如，终浓度 10-20 mM）。在室温下孵育 5-10 分钟，以淬灭所有未反应的马来酰亚胺。使用脱盐柱或透析去除多余的标记试剂、淬灭剂和副产物，并将蛋白质转换到所需的储存缓冲液中。

方案 B：使用碘乙酰胺（Iodoacetamide）进行标记

a．加入标记试剂：加入碘乙酰胺-DMSO 储备液。摩尔比：通常使用 5:1 到 10:1 （标记试剂 ： 总巯基）的过量。为避免烷基化其他基团，不应过度过量。

b．孵育反应：在避光条件下，于室温或 4°C 下孵育。反应时间：通常 30 分钟 - 1 小时，在黑暗中反应。

c．终止反应与纯化：反应完成后，可直接进行纯化（透析或脱盐）以终止反应，因为碘乙酰胺水解较慢。也可以加入过量的β-巯基乙醇或 DTT（终浓度 5-10 mM）来淬灭。

3.2.2.3 点击化学：引入炔烃或叠氮基团，通过 CuAAC（铜催化）或 SPAAC（应变促进）实现高效偶联。

CuAAC (Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition)

反应物： 叠氮化物（N_3）+ 末端炔烃（HC≡C-）

特点： 需要铜催化剂（Cu(I)），反应速率极快，但铜催化剂可能对生物分子有毒性或导致蛋白变性。

SPAAC (Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition)

反应物： 叠氮化物（N_3）+ 环辛炔（例如：DBCO，BCN）

特点： 无需金属催化剂，利用环辛炔的环张力驱动反应。反应速度比 CuAAC 慢，但生物相容性极佳，非常适合活细胞标记和易失活蛋白。

（1）引入叠氮基团（-N_3）

常用方法： 使用 NHS-Ester 试剂 与蛋白质表面的赖氨酸（Lysine）氨基反应。

试剂示例：

NHS-PEG_4-Azide（常用，PEG spacer 提高了灵活性和水溶性）

反应条件：

缓冲液： PBS 或 HEPES（pH 7.2-8.5），避免含氨基的缓冲液（如 Tris、甘氨酸）。

温度： 室温或 4°C

时间： 1-2 小时

摩尔比： 试剂 ： 蛋白质 = 3:1 至 20:1（需优化，避免过度标记导致蛋白沉淀或失活）。

（2）引入炔烃基团（-C≡CH）

同样使用 NHS-Ester 试剂：

试剂示例：

NHS-PEG_4-Alkyne（最常见）

DBCO-NHS（可直接用于后续的 SPAAC，跳过铜催化步骤）

反应条件： 与引入叠氮基团的条件完全相同。

（3）引入非天然糖（用于特异性标记糖蛋白）

这是一种更特异的方法，用于标记细胞表面的糖蛋白。

方法： 在细胞培养基中加入 Ac_4ManNAz（用于生成叠氮化唾液酸）或 Ac_4GalNAz（用于生成叠氮化半乳糖）。

原理： 细胞将这些叠氮修饰的糖类似物代谢并整合到细胞表面糖蛋白中，从而在细胞表面特异地引入叠氮基团。

纯化： 在步骤一之后，必须使用脱盐柱（如 PD-10）、透析或超滤离心管去除未反应的修饰剂和副产物，将蛋白质换到点击反应缓冲液中。

方案 A：CuAAC（铜催化）反应步骤

优点： 反应速率极快（分钟级）。

缺点： 铜毒性和氧化损伤风险。

a. 准备反应缓冲液： 使用脱气的 PBS 或 TBS。可加入少量水溶性配体以减少铜毒性并加速反应，例如：

THPTA（常用且高效）

BTTAA（更高效，兼容生物素标记）

TBTA（经典，但水溶性差）

b. 配制反应母液（按顺序加入）：

修饰好的含 Azide 或 Alkyne 的蛋白质（终浓度 ~10-100 μM）

带有互补基团的分子（如 Alkyne-Dye 或 Azide-Dye）（1.2-2 equiv.）

配体（THPTA，BTTAA 等）（5-10 equiv. relative to Cu）

最后加入： $CuSO_4$（1-5 equiv.）和 新鲜配制的抗坏血酸钠（Sodium Ascorbate）（5-10 equiv. relative to Cu），抗坏血酸钠用于将 Cu(II)原位还原为具有催化活性的 Cu(I)。

c. 孵育反应：

在室温下，避光涡旋或翻转混合。

反应时间： 30 分钟 - 2 小时（反应非常迅速）。

d. 终止与纯化：

加入 EDTA（终浓度~5 mM）螯合铜离子，终止反应。

通过脱盐柱、透析或 SDSPAGE 纯化，彻底去除铜离子、配体和未反应的标记分子。

方案 B：SPAAC（应变促进）反应步骤

优点： 生物相容性极佳，无需金属催化剂，可直接在细胞培养基或活体中进行。

缺点： 反应速率较慢（小时级），环辛炔试剂较昂贵。

a. 准备反应体系：

将已引入 Azide 基团的蛋白质（或细胞）与 DBCO-（或 BCN-）标记的分子（如 DBCO-Dye）混合。

缓冲液： PBS、HEPES 或完全细胞培养基均可。

摩尔比： DBCO 试剂 ： Azide = 1.5:1 至 5:1（需优化）。

b. 孵育反应：

在 37°C（用于细胞）或 室温（用于纯蛋白）下避光孵育。

反应时间： 1 - 4 小时（纯蛋白）；30 分钟 - 2 小时（细胞表面标记）。

c. 纯化：

反应完成后，直接通过脱盐柱、透析或离心纯化蛋白质。

如果是标记细胞，用 PBS 洗涤细胞 2-3 次即可去除未反应的 DBCO 试剂。

3.2.3 亲水性/溶解性调节

3.2.3.1 聚乙二醇化（PEG 修饰）：减少非特异性吸附，延长体内循环时间。

聚乙二醇（PEG）是一种亲水、生物相容性好的高分子聚合物。将其共价连接到药物分子（主要是蛋白质、多肽、核酸、纳米粒）上，就像给药物穿上一件“隐形斗篷”。

（1）延长循环时间：PEG 链通过空间位阻效应，屏蔽了药物分子的表面，使其不易被肾脏快速过滤清除，也不易被免疫细胞（如巨噬细胞）识别和吞噬，从而大大延长了在血液中的半衰期。

（2）减少非特异性吸附：PEG 的高度亲水性和动态运动能力使其能结合大量水分子，在药物表面形成一个“水合层”。这层水屏障能有效减少蛋白质、细胞或其他生物成分与药物表面的非特异性相互作用，从而降低免疫原性、毒性和聚集。

步骤一：蛋白质预处理

目的： 确保蛋白质处于最佳反应状态。

a. 纯化与置换缓冲液：

使用 HPLC、FPLC 或透析等方法将蛋白质纯化至高纯度。

关键：将蛋白质置换到不含伯胺（如 Tris、甘氨酸）和不含硫醇（如 β-巯基乙醇、DTT、GSH）的反应缓冲液中。常用缓冲液为 磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.2-7.5） 或 硼酸盐缓冲液（pH 8.0-8.5）。

为什么？伯胺和硫醇会与大多数 PEG 化试剂反应，消耗试剂并导致非特异性修饰。

b. 浓度测定：

使用 Bradford、BCA 或紫外吸收等方法精确测定蛋白质浓度，以便计算与 PEG 试剂的摩尔比。

c. （可选）还原处理：

如果目标修饰位点是半胱氨酸（Cys）的巯基（-SH），且该巯基已形成二硫键，则需要先用过量 DTT/TCEP 还原，然后通过脱盐柱快速去除还原剂，防止其干扰后续反应。

步骤二：PEG 化反应（核心步骤）

目的： 在控制条件下，将 PEG 共价连接到蛋白质的特定位点上。

a. 选择 PEG 试剂

PEG 分子量：常用 5kDa，10kDa，20kDa，40kDa。分子量越大，屏蔽效果越好，但可能对蛋白活性影响越大。

PEG 类型：线性 PEG 最常用；分枝 PEG（Y 型 PEG） 通常能提供更好的屏蔽效果和更低的免疫原性。

反应官能团（根据蛋白位点选择）：

表 2 常用的 PEG 试剂类型

目标基团	PEG 试剂类型	反应条件	特点
赖氨酸 ε-氨基	NHS-PEG（最常用）	pH 7.5-8.5，4°C - 室温	非特异性修饰，可能得到多种产物混合物。
半胱氨酸巯基	Mal-PEG（马来酰亚胺 PEG）	pH 6.5-7.5，避光	位点特异性高，副反应少，产物均一性好。
N 端氨基	醛基 PEG	pH 5.5-6.5，需 $NaBH_3CN$ 还原	具有一定位点特异性，反应条件较苛刻。

b. 进行反应

摩尔比优化（最关键！）：PEG 试剂 ： 蛋白质 = 3:1 到 20:1（需通过预实验优化)。比例过低，修饰效率低；比例过高，可能导致过度修饰、蛋白失活或沉淀，且增加纯化难度。

操作： a．将蛋白质溶液置于冰浴中。 b．称取适量 PEG 试剂，缓慢分批加入蛋白质溶液中，同时温和搅拌或涡旋，避免局部浓度过高导致蛋白沉淀。 c．反应体系在避光条件下（尤其对于 Mal-PEG），于 4℃ 或室温下反应 1-4 小时。

监测：可在反应过程中定时取样，用 SDS-PAGE 分析修饰进程。

步骤三：纯化与分离

目的： 分离目标 PEG 化产物（ mono-PEGylated，di-PEGylated 等），去除未反应的蛋白质、游离 PEG、副产物和盐离子。

a．离子交换色谱（IEX）：

原理： PEG 化后蛋白质表面电荷发生改变，与未修饰蛋白的洗脱条件不同。

效果： 能有效分离不同修饰度的产物（如未修饰、单修饰、双修饰）。

b．尺寸排阻色谱（SEC/GFC）：

原理： PEG 化蛋白的流体动力学体积显著大于未修饰蛋白，因此先被洗脱下来。

效果： 是去除游离 PEG 最有效的方法，同时也能分离不同修饰度的蛋白聚集体。

c．超滤离心：

原理： 选择合适分子量截留（MWCO）的超滤管，可浓缩蛋白并去除小分子杂质和盐。

注意： 游离 PEG 分子量可能与被修饰蛋白接近，难以单独用此方法完全去除，常与其他方法联用。

3.2.3.2 两亲性分子引入：如磷脂修饰，用于细胞膜标记或纳米颗粒封装。

应用：磷脂修饰蛋白质/抗体（用于细胞膜标记）

原理：将疏水性的磷脂（如 DSPE-PEG）通过其 PEG 末端的活性基团（-COOH，$-NH_2$，-Mal 等）与亲水性的大分子（如抗体、蛋白质）偶联，得到的两亲性偶联物可以自发插入细胞膜的脂质双分子层中，从而实现对细胞膜的标记。

具体步骤（以 DSPE-PEG-COOH 与氨基化抗体的 EDC/NHS 偶联为例）：

(1) 试剂准备：

磷脂储备液：将 DSPE-PEG-COOH 溶解于氯仿或氯仿/甲醇混合液中（例如 1-10 mg/mL），分装后于-20℃ 保存，避免水分和光照。

抗体溶液：将待标记的抗体（含-NH_2）溶于 pH 7.0-7.4 的 PBS 或 HEPES 缓冲液中，浓度建议为 1-5 mg/mL。确保缓冲液中不含游离氨基（如 Tris、甘氨酸、叠氮钠），否则会干扰反应。

活化试剂：新鲜配制 EDC 和 NHS（或 Sulfo-NHS）水溶液。

(2) 磷脂活化（关键步骤）：

取一定量的 DSPE-PEG-COOH 储备液于玻璃试管中，用温和的氮气流或真空离心干燥仪彻底吹干有机溶剂，在管底形成一层透明的脂质薄膜。

加入适量的 PBS（pH 7.4）或 MES 缓冲液（pH 6.0），并剧烈涡旋或超声（建议使用探针超声仪，冰浴操作），使其在水相中形成胶束。

向胶束溶液中加入摩尔过量（通常为 DSPE-PEG-COOH 的 2-5 倍）的 EDC 和 NHS。

在室温下轻微摇荡或涡旋反应 15-30 分钟，活化磷脂末端的羧基，形成活化的 NHS 酯。

(3) 偶联反应：

将活化后的磷脂胶束溶液缓慢滴加到抗体溶液中。磷脂与抗体的摩尔比需要优化（通常从 10：1 到 50：1 开始尝试）。

在 4°C 或室温下温和搅拌反应 2-4 小时。避免剧烈搅拌产生气泡，导致蛋白质变性。

(4) 纯化与表征：

目的：去除未反应的磷脂胶束、游离的试剂和副产物。

方法：

透析： against PBS（4°C，24-48 小时，多次更换缓冲液），适用于小规模。

凝胶过滤层析（Size Exclusion Chromatography，SEC）：使用 Superose 6 或 Sephacryl S-300 等柱子进行分离，这是最有效的方法，可以完美分离偶联物（大分子）与磷脂胶束（聚集数很大，洗脱体积早）和小分子副产物。

超滤离心：使用 100 kDa 或 300 kDa 截留分子量的超滤管，离心多次并添加缓冲液洗涤。

表征：

SDS-PAGE：比较修饰前后抗体的分子量变化，可能会出现条带的上移或拖尾。

荧光标记：如果修饰的是荧光磷脂，可直接通过荧光检测 SEC 洗脱组分来确定偶联成功。

功能验证：通过细胞孵育实验，用显微镜观察细胞膜标记效果。

3.2.4 靶向性修饰

3.2.4.1 小分子配体：如叶酸修饰靶向肿瘤细胞，生物素用于亲和素系统。

这两种修饰通常都是将小分子配体通过其衍生物（通常带有羧基或氨基）与蛋白质、抗体、核酸或纳米颗粒表面的官能团（氨基或羧基）通过化学偶联（如 EDC/NHS）相连。

叶酸(Folic Acid):靶向许多肿瘤细胞表面高度过表达的叶酸受体(Folate Receptor)。常用于药物靶向递送、肿瘤成像探针制备。

生物素(Biotin):与亲和素(Avidin) 或链霉亲和素(Streptavidin) 具有极高亲和力(Kd ~ 10^{-15} M)。用于构建强大的检测、纯化、捕获系统(如 ELISA、荧光检测、蛋白纯化)。

由于叶酸和生物素的偶联化学非常相似,以下将以最常见的“羧基修饰的配体与含氨基的蛋白质偶联”为例,提供通用步骤,并分别说明其特殊之处。

通用实验步骤(以叶酸-NHS 酯或生物素-NHS 酯修饰抗体为例)

(1) 试剂与材料准备

a. 含氨基的大分子:待标记的蛋白质、抗体、纳米颗粒(溶于 PBS,pH 7.4,浓度≥1 mg/mL)。确保缓冲液不含氨基(如 Tris、甘氨酸、叠氮钠)。

b. 配体衍生物:

对于叶酸:Folate-PEG-NHS 或 Folic Acid-NHS Ester。PEG 链可增加灵活性,减少空间位阻。

对于生物素:Biotin-PEG-NHS 或 Biotin-NHS Ester(如磺基-NHS-LC-生物素,水溶性更好)。

c. 反应缓冲液:无水 DMSO(用于溶解配体-NHS 酯),PBS(pH 7.4)或 硼酸盐缓冲液(pH 8.5)。稍高的 pH(7.4-8.5)有利于 NHS 酯与氨基的反应。

d. 纯化设备:透析袋(截留分子量 MWCO 10-14 kDa)、脱盐柱(如 PD-10)、或超滤离心管(MWCO 50-100 kDa)。

(2) 操作步骤

a. 配制配体溶液:

将 Folate-NHS 或 Biotin-NHS 酯粉末在无水 DMSO 中配制成高浓度储备液(如 10-50 mM)。现用现配,避免水解。

b. 确定反应摩尔比:

起始点建议:

生物素化:通常使用 Biotin-NHS : 蛋白质 = 5:1 到 20:1 (mol/mol) 的比例。对于检测应用,每个蛋白质分子连接 3-5 个生物素是常见目标。

叶酸修饰:比例可能更高,通常为 10:1 到 40:1 (mol/mol),以确保足够的靶向配体密度。

计算所需的配体-NHS 酯体积。

c．进行偶联反应：

将蛋白质溶液置于冰上。

缓慢地、逐滴地将计算好体积的配体-NHS 酯/DMSO 溶液加入蛋白质溶液中，同时持续轻柔涡旋或搅拌，以确保混合均匀，防止 DMSO 局部浓度过高导致蛋白质沉淀。

反应体系中的 DMSO 最终浓度应≤10%。

将反应混合物在室温（22-25°C）下避光孵育 2 小时，或在 4°C 下孵育过夜（更温和，减少蛋白质聚集）。

d．终止反应：

加入过量甘氨酸或 Tris 缓冲液（pH 8.0）至终浓度 50-100 mM，室温孵育 10 分钟。甘氨酸的游离氨基会淬灭未反应的 NHS 酯。

e．纯化：

目的：去除未反应的配体、DMSO、淬灭剂等小分子。

方法：

透析： PBS（4°C，24-48 小时，更换缓冲液 3-4 次)。经济，但耗时。

脱盐柱/凝胶过滤层析（首选）：使用 PD-10 柱或类似产品，按照说明书操作。快速（15-20 分钟）、高效，是最常用的方法。

超滤离心：使用合适截留分子量的超滤管，离心数次并添加 PBS 洗涤。

f．产物鉴定与储存：

浓度测定：使用 BCA 或 Bradford 法测定纯化后产物的浓度。

修饰度分析：

生物素化程度：使用 HABA/Avidin 试剂盒进行定量测定，或通过 SDS-PAGE 后 Western Blot 用链霉亲和素-HRP 孵育显色。

叶酸修饰程度：可通过 UV-Vis 光谱分析。叶酸在 280nm 和 360nm 左右有特征吸收峰，通过与原始蛋白质的吸光度对比可估算连接数。

储存：分装后于 4°C 或-20°C 避光保存。

3.2.5 环境响应性修饰

酶底物链接：荧光团与淬灭基团通过酶切序列连接，实现激活式成像（如 caspase-3 探针）。这类探针的核心是将荧光团（Fluorophore）和淬灭基团（Quencher）通过一段酶特异性的底物肽链（Substrate Peptide）共价连接。

以下是以 Caspase-3 为例，设计并合成此类探针的详细步骤、原理和关键考量。

3.2.5.1 核心设计原理

“淬灭”状态（Off-State）：当荧光团和淬灭基团在空间上非常接近时，会发生荧光共振能量转移（FRET）或基态复合物淬灭。能量从荧光团转移到淬灭基团并以热量等形式散失，导致无法检测到荧光。

“激活”状态（On-State）：当连接两者的肽链被特异性酶（如 Caspase-3）切割后，荧光团和淬灭基团在物理上分离。FRET 过程被中断，荧光团的荧光得以恢复，从而产生可检测的荧光信号。

关键组件选择：

（1）荧光团（Fluorophore）：如 FAM，Cy3，Cy5，TAMRA 等。需考虑其激发/发射波长是否与成像设备匹配。

（2）淬灭基团（Quencher）：选择与荧光团发射光谱有最大重叠的淬灭基团，以实现高效淬灭。

FAM 的常用淬灭基团：BHQ-1，Dabcyl。

Cy3 的常用淬灭基团：BHQ-2。

Cy5 的常用淬灭基团：BHQ-3，QSY21。

（3）酶切序列（Enzyme-Specific Sequence）：

Caspase-3：DEVD（氨基酸序列：Asp-Glu-Val-Asp）

MMP-2/9：GPLGVRG

凝血酶：LVPRGS

通常在序列的 C 端进行化学修饰以便与淬灭基团连接，N 端与荧光团连接。

3.2.5.2 具体实验步骤（以固相合成法为例）

此类探针的合成通常使用 Fmoc 固相肽合成(SPPS)技术，在专业的肽合成仪上完成。以下是概念性步骤：

（1）树脂预处理与第一个氨基酸连接

将含有第一个氨基酸（通常是淬灭基团一侧的氨基酸，如 Asp(D)）的 Wang 树脂或 Rink Amide 树脂装入合成柱中，用 DMF 洗涤溶胀。

用哌啶/DMF 溶液脱除 Fmoc 保护基，暴露氨基。

（2）肽链逐步延长

循环步骤：a．耦合：将下一个 Fmoc 保护的氨基酸(如 Val(V))、活化剂(如 HBTU/HOBt)和碱（如 DIPEA）在 DMF 中混合，通入反应柱与树脂上的游离氨基反应。 b．洗涤：用 DMF 洗涤树脂，去除多余试剂。 c．脱保护：用哌啶/DMF 溶液脱去刚连接上的氨基酸的 Fmoc 保护基，暴露氨基，为下一个循环做准备。

重复此循环，按照淬灭基团 - D - E - V - D - 荧光团的顺序逐一合成肽链。顺序至关重要。

（3）连接荧光团

在肽链的 N 端（即最后一个氨基酸的 Fmoc 脱除后），与 NHS 酯修饰的荧光团（如 FAM-NHS）在碱性条件下反应，将荧光团连接到肽链上。

（4）连接淬灭基团

如果淬灭基团（如 BHQ-COOH）是羧酸形式，需要在肽链的 C 端（树脂端）脱除保护后，使用与步骤 3 类似的偶联方法（EDC/HOBt）将其连接到树脂上的第一个氨基酸上。

（5）切割与脱保护

合成完成后，使用切割 cocktail（如 TFA:TIS:Water = 95:2.5:2.5）将完整的探针分子从树脂上切割下来，并同时移除所有侧链保护基团。

反应后，用冷乙醚沉淀并离心收集粗产品。

（6）纯化与鉴定

纯化：使用制备型高效液相色谱（HPLC） 进行纯化，通常采用 C18 反相柱，乙腈/水（含 0.1% TFA）梯度洗脱。

鉴定：使用分析型 HPLC 和质谱（MS） 验证纯化后产物的纯度和分子量。

（7）探针验证（必做步骤）

光谱验证：

取适量纯化后的探针溶于 PBS 中，测量其荧光光谱。应观察到极低的荧光信号，证明淬灭效率高。

向溶液中加入活性重组 Caspase-3 酶，在 37°C 下孵育 1-2 小时。

再次测量荧光光谱。应观察到显著的荧光增强（几十至上百倍）。

特异性验证：用失活的酶或其它无关蛋白酶孵育探针，应无荧光激活现象。

3.2.5.3 替代方案：购买商业探针并自行验证

对于大多数生物学实验室，自行合成探针不现实。更常见的流程是：

（1）选购商业探针：从知名供应商（如 AAT Bioquest, Thermo Fisher, MedChemExpress）购买如 FAM-DEVD-BHQ1 或 Cy5-DEVD-QSY21 等探针。

（2）验证性能：

淬灭效率：测量探针本身的荧光强度（F_min）。

完全激活对照：用过量酶孵育至荧光不再增长，测量最大荧光强度（F_max）。

淬灭效率（%）= [1 - (F_min / F_max)] * 100%。优良探针的淬灭效率应 >95%。

（3）细胞/动物实验：

细胞成像：将探针导入细胞（如通过显微注射、转染试剂或电穿孔），通过共聚焦显微镜观察凋亡过程中 caspase-3 激活引发的荧光信号。

体内成像：对于近红外探针（如 Cy5-DEVD-BHQ3），可通过静脉注射给荷瘤小鼠，利用活体荧光成像系统观察肿瘤部位的凋亡激活信号。

3.2.5.4 关键注意事项与优化

连接子（Linker）：在荧光团/淬灭基团与肽链之间加入适当的 linker（如氨基己酸，Ahx），可以减少空间位阻，提高酶切效率。

溶解度：整个分子可能是疏水的，必要时在序列中引入带电荷的氨基酸（如 Lys， Arg，Glu）以改善水溶性。

酶学动力学：优化孵育时间、温度和酶浓度，以确保探针被有效切割。

细胞毒性：确保探针本身对细胞没有显著毒性，以免影响正常的生物学过程。

对照实验：始终设置不加酶的阴性对照和加入广谱 caspase 抑制剂（如 Z-VAD-FMK）的对照组，以证明信号的特异性。

3.2.6 金属离子螯合

引入螯合基团（如 DOTA、NOTA、EDTA）用于金属离子传感或多模态成像（如 MRI/荧光）是常用的分子探针设计策略。这类修饰通常旨在实现两个目标之一：

金属离子传感：螯合基团与特定金属离子（如 Zn^{2+}，Cu^{2+}，Ca^{2+}）结合后，引起连接的荧光团信号发生变化（增强或淬灭）。

诊断成像：螯合基团用于螯合放射性金属（如^{68}Ga， ^{64}Cu 用于 PET）或顺磁性金属（如 Gd^{3+}用于 MRI），同时连接的荧光团用于光学成像，实现双模态（如 PET/荧光或 MRI/荧光）成像。

以下将以最经典的 DOTA 为例，详细介绍其修饰和应用的具体步骤。

3.2.6.1 核心设计原理

DOTA（1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸）：是一种大环多齿配体，对三价金属离子（如 Gd^{3+}，Ga^{3+}，Lu^{3+}，In^{3+}） 具有极高的亲和力和稳定性。

修饰策略：

DOTA 分子上有四个羧基，可通过其中一个羧基进行化学修饰，生成 DOTA-NHS 酯或 DOTA-马来酰亚胺等活性衍生物，从而与生物分子上的氨基或巯基反应。

最终构建的探针结构通常为：靶向分子/荧光团 - Linker - DOTA。

工作流程：先进行化学偶联，再进行金属螯合，最后纯化。螯合步骤通常在高温下进行以保证高效率。

3.2.6.2 具体实验步骤（以 DOTA-NHS 酯修饰氨基化抗体，用于后续 Gd^{3+}螯合及 MRI 成像为例）

阶段一：DOTA 修饰抗体（化学偶联）

（1）试剂准备：

DOTA 衍生物：DOTA-NHS ester（商业可得，如 Macrocyclics，Bulumina 公司产品）。非常重要： 使用前将其溶解于无水 DMSO 中，配制成 10-50 mM 的储备液，现用现配。

待修饰分子：纯化的抗体（IgG），溶解于无氨基的缓冲液中（如 0.1 M HEPES，pH 8.5；或 0.1 M MES，pH 6.0）。浓度建议 > 1 mg/mL。避免使用 Tris、甘氨酸等含氨基的缓冲液。

纯化设备：PD-10 脱盐柱（GE Healthcare）或超滤离心管（MWCO 50kDa）。

（2）偶联反应：

将抗体溶液置于冰上。

计算 DOTA-NHS 酯的用量。摩尔比（DOTA:Ab）需要优化，通常从 10:1 到 50:1 开始尝试，以避免过度修饰导致抗体聚集或失活。

缓慢地、逐滴地将 DOTA-NHS 酯/DMSO 溶液加入到抗体溶液中，同时持续轻柔涡旋。

将反应混合物在室温（~25°C）下避光反应 2 小时，或 4°C 下反应过夜（更温和）。

（3）纯化：

使用 PD-10 脱盐柱，用 PBS（pH 7.4）作为洗脱液，按照说明书操作，收集蛋白峰。

此步骤旨在去除未反应的 DOTA-NHS 酯、水解产物和 DMSO。

收集纯化后的 DOTA-Ab conjugate，测定浓度（BCA 法），分装后于 4°C 或-20°C 保存。

阶段二：金属离子螯合（以 Gd^{3+}为例）

（1）试剂准备：

金属盐：$GdCl_3$ 溶液（溶于弱酸性水溶液，如 50 mM HCl，防止水解沉淀）。

缓冲液：0.1-0.5 M 醋酸铵缓冲液（pH 5.5-6.0）。此 pH 范围是 Gd^{3+}与 DOTA 螯合的最佳条件。

螯合竞争剂（可选）：Citric acid（柠檬酸），用于捕获未成功螯合的游离 Gd^{3+}。

（2）螯合反应：

将纯化后的 DOTA-Ab conjugate 用醋酸铵缓冲液 (pH 5.5) 稀释或换液 (通过超滤离心)。

加入摩尔过量 10-20 倍的 $GdCl_3$溶液。

在 37-50°C 下孵育 1-2 小时（高温有助于克服螯合能垒，提高产率）。偶尔涡旋混合。

（3）纯化与验证：

目的：去除游离的、未螯合的 Gd^{3+}，这一点对于体内应用至关重要，因为游离 Gd^{3+}有毒性。

方法：

透析： against PBS（含 1-5 mM EDTA，然后换为不含 EDTA 的 PBS 进行充分透析）。EDTA 能强力络合去除游离 Gd^{3+}。

PD-10 脱盐柱：使用 PBS 作为流动相，快速有效。

超滤离心：使用 MWCO 50kDa 的超滤管，用 PBS 反复洗涤离心多次。

验证螯合效率：

电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）：金标准方法。分别测定纯化后 conjugate 中的 Gd 元素含量和 蛋白质 含量（通过测 S 元素或氮元素），即可精确计算出每个抗体分子上螯合的 Gd^{3+}数量。

放射性模拟：使用放射性同位素（如^{153}Gd，^{111}In）进行螯合，然后用尺寸排阻色谱（SEC）连接放射性检测器，通过分析色谱峰来定量螯合率和稳定性。

阶段三：功能验证（以 MRI/荧光双模态探针为例）

（1）MRI 弛豫率测定：

将不同浓度的 Gd-DOTA-Ab conjugate 置于 MRI 扫描仪或核磁弛豫计中。

测量其 T_1弛豫时间。

绘制 $1/T_1$（s^{-1}）对 Gd 浓度（mM）的曲线，斜率即为弛豫率（r_1），是衡量其 MRI 对比增强效能的关键指标。

（2）荧光特性验证：

如果抗体本身带有荧光标记或 DOTA 与荧光团共修饰，需测量螯合前后探针的荧光光谱，确保荧光特性未受螯合过程影响。

（3）体外/体内成像：

体外靶向验证：与表达靶抗原的细胞共孵育，通过共聚焦显微镜观察荧光是否富集在细胞膜上（证明靶向性和荧光功能）。

体内 MRI 成像：将探针注射入动物模型，在 MRI 设备上扫描，观察肿瘤或其他靶组织的 T_1加权信号是否增强。

离体荧光成像：处死动物后，取出器官，用小动物活体成像系统观察荧光分布，与 MRI 结果进行相关性分析。

3.3 荧光探针成像数据分析以及定量方法

从每个 ROI 中，软件通常会提供以下关键数据：

（1）总荧光效率（Total Efficiency）或 总通量（Total Flux）[photons/s]：ROI 内所有像素点的信号总和。这是最常用、最可靠的指标，因为它反映了信号的总量，对 ROI 大小不太敏感。

（2）平均辐射效率（Average Radiance）[p/s/cm²/sr]：ROI 内所有像素点的平均值。表示信号的“浓度”或“亮度”。当 ROI 大小不一致时，此值可能产生偏差。

（3）最大辐射效率（Maximum Radiance）：ROI 内最亮像素点的值。可用于评估信号强度的峰值。

（4）ROI 面积（Area）[cm²或 pixels]：记录 ROI 的大小，用于辅助判断。

3.3.1 药代动力学分析

如果进行了长时间、多时间点的动态成像，可以绘制时间-信号曲线，并计算类似药代动力学的参数：

峰值时间（Tmax）：信号达到峰值的时间。

峰值强度（Imax）：信号的峰值（通常用 TBR 表示）。

曲线下面积（AUC）：从时间零点到某个时间点的信号强度-时间曲线下的面积，反映了探针在靶区的总暴露量。

注意事项：靶背景比（Target-to-Background Ratio，TBR），这是活体荧光成像中最重要、最有意义的定量指标。 它消除了动物自身荧光、探针非特异性富集和仪器噪声的影响。

公式：TBR = （靶区 ROI 的平均辐射效率）/ （背景 ROI 的平均辐射效率）

TBR > 2 通常被认为具有明显的特异性信号。TBR 越高，说明探针的特异性越好，信噪比越高。

进行组间比较时，TBR 比绝对荧光值更具说服力。

3.3.2 离体验证与相关性分析

活体成像的终极验证是将成像数据与“金标准”离体数据关联。

在成像结束后，立即处死动物，取出靶组织和主要器官（心、肝、脾、肺、肾）。

用小动物成像系统对离体器官进行成像，计算每个器官的总荧光效率。

进一步地，可以 homogenize（匀浆）组织，用荧光分光光度计测量精确的荧光绝对值。

最后，将离体测得的荧光值与活体成像测得的 TBR 或总通量进行相关性分析（如计算 Pearson 相关系数），强有力的正相关关系可以极大增强活体数据可信度。

3.4 典型案例

Mn_3O_4 nanozymes-Cy3 的离体分布

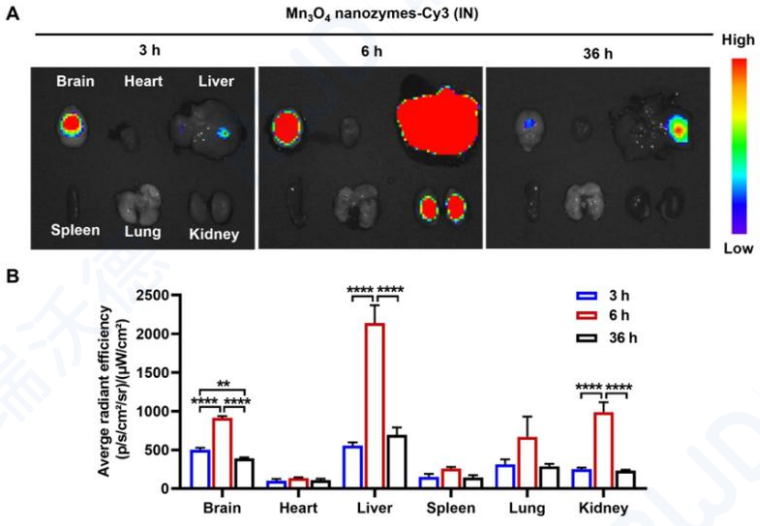


图 8 纳米药物离体分布结果

该研究通过多时间点的长期活体成像监测，系统性地追踪并分析了 Mn_3O_4 nanozymes-Cy3 探针在小鼠模型体内的时间-空间分布动态与代谢规律。具体而言，在静脉注射探针后的多个预设时间点（3 h、6 h、36 h），利用小动物活体荧光成像系统获取了 Cy3 荧光信号在主要脏器层面的二维分布图像。

通过对图像进行半定量分析，研究者绘制了探针在不同器官（包括肝脏、肾脏、脾脏、肺部、心脏以及脑部）中的荧光强度-时间曲线。结果显示，探针注射后早期（3h）即可在脑区观察到显著的信号富集，证明 Mn_3O_4 nanozymes-Cy3 可以在脑部富集；随后在肝脏以及肾脏中也可见明显荧光增强，提示探针可能经过肝肾清除排出体外。相比之下，在心、肺、脾等脏器中的信号强度始终维持在较低水平，说明探针在这些组织中的非特异性滞留较少。值得注意的是，随着时间延长至 36 小时，肝、肾区域的荧光信号呈现缓慢下降的趋势，表明探针可随时间逐渐被机体代谢清除，显示出良好的生物可清除性，这对于其未来的生物医学应用安全性是一个积极的指标。此外，通过对离体主要脏器进行荧光成像及定量分析，进一步验证并补充了活体成像结果，精确揭示了探针在不同组织中的实际蓄积量，为全面评价该纳米酶探针的体内药代动力学行为与生物分布特征提供了关键数据支撑[3]。

第 4 章 活体成像技术在外泌体追踪与靶向研究中的应用

4.1 常用的外泌体示踪模型

外泌体（Exosomes，或小细胞外囊泡 sEVs，直径约 30–150 nm）是由细胞主动分泌的脂质双层囊泡，作为细胞间交流的天然信使，其内部富含蛋白质、核酸（miRNA、mRNA）和脂质。它们如同微型的“信件”，在机体内精确传递信息，在肿瘤发生发展、免疫调节、组织再生及神经退行性疾病等过程中扮演着关键角色。

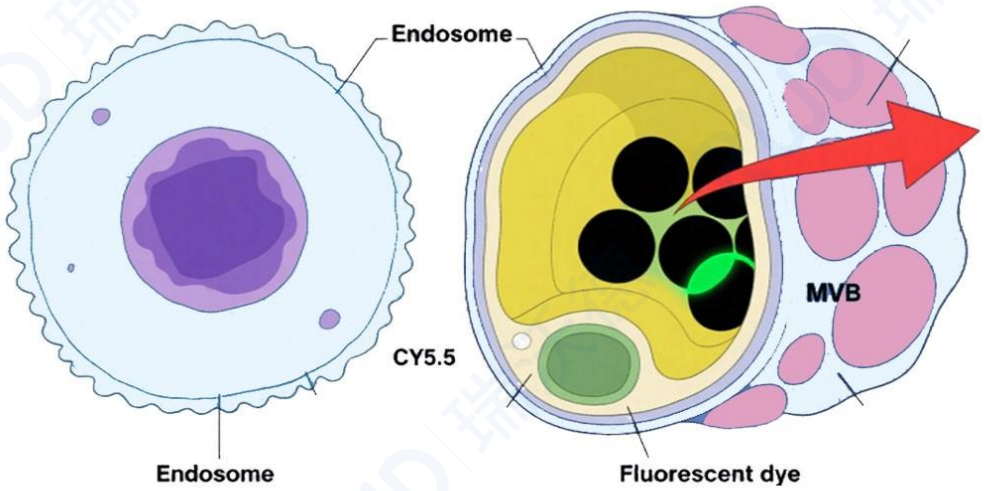


图 9 外泌体示踪模型示意图

传统研究手段，如透射电镜（TEM）、纳米颗粒跟踪分析（NTA）及生化检测，虽然能提供外泌体的静态形态学与分子学信息，但无法回答一个核心问题：当这些“信使”进入活体后，它们分布到何处、如何被清除、以及是否能够选择性归巢于特定病灶。

小动物活体成像技术的应用，突破性地解决了这一难题。通过将外泌体标记荧光或生物发光探针，可以将其体内行为转化为可视化、可量化的光学信号，使研究人员能够在活体水平上实时追踪外泌体从注射到分布、归巢与清除的全过程。这为深入理解外泌体的生物学功能、评估其作为药物载体的递送效率，以及推动外泌体在诊断和治疗领域的转化应用，提供了强有力的工具。

4.2 外泌体示踪系统的构建与标记策略

要实现外泌体的活体成像，核心在于构建一个稳定、特异且高亮度的示踪系统。这主要依赖于两种核心策略：**遗传/内源标记**和**体外标记**。这两种方法各有其优缺点，且必须配合严格的实验对照以确保数据的准确性。

4.2.1 遗传/内源标记：实现长期、稳定的内源性追踪

实现原理：该方法通过基因工程手段，在供体细胞的基因组中稳定引入一个报告基因，该基因编码的报告蛋白（如荧光蛋白或荧光素酶）与外泌体膜蛋白（如 CD63、CD9）融合表达。当细胞分泌外泌体时，这些外泌体自然携带了荧光或生物发光标签。这一策略从生物学源头赋予了外泌体成像能力，被认为是最可靠、最特异的示踪方法。

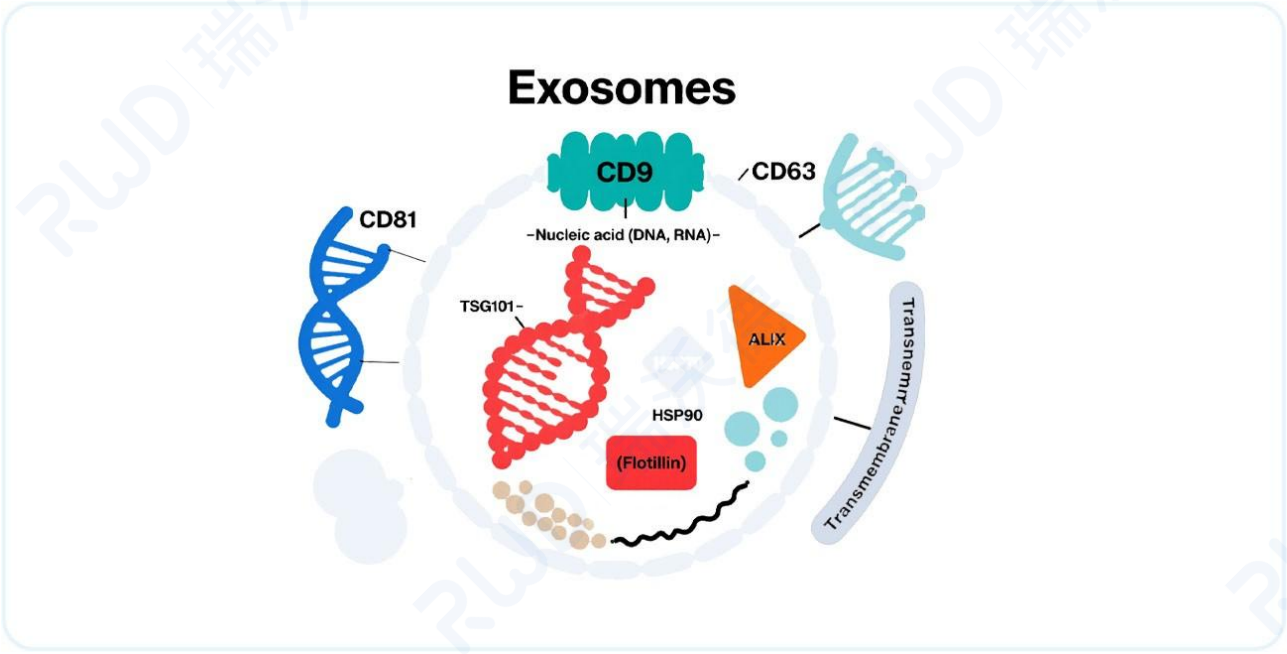


图 10 外泌体体内成像示踪模型示意图

优点与应用场景：

高特异性与稳定性：由于标记分子是外泌体膜的组成部分，它不会从外泌体上脱落或转移到其他细胞，从根本上避免了体外标记的假阳性风险。这对于研究外泌体在体内缓慢累积或长期作用（如在肿瘤转移前微环境中的作用）至关重要。

低背景信号：生物发光（Luciferase）系统在没有底物的情况下不发光，且活体组织本身的自发光背景极低，使得这类标记策略具有极高的信噪比和灵敏度。这使得研究人员能够有效检测体内微量、低丰度的外泌体，甚至是在难以到达的深层组织，如大脑或心脏。例如，有研究通过构建心肌细胞特异性表达 NanoLuc-CD63 的小鼠模型，成功追踪了心源性外泌体在体内的分布，揭示了其在心脏疾病中的作用。

常用探针与实践要点：

荧光蛋白（如 EGFP、mCherry）：适用于体外细胞共聚焦成像，以验证外泌体的细胞内化与亚细胞定位。但由于组织穿透性差，不适合体内深层成像。

荧光素酶（如 Firefly Luc2、NanoLuc）：亮度高，背景低，是体内追踪的首选。NanoLuc 尤其以其超高亮度和稳定性著称，能够有效克服生物发光在深部组织中的光子衰减问题。

实践建议：构建融合表达载体时，应选择合适的连接子（linker）以避免影响蛋白构象。此外，在进行体内实验前，必须通过 **Western Blot** 确认融合蛋白成功表达，并用 **NTA**（纳米颗粒跟踪分析）验证外泌体的粒径和数量，确保标记未显著改变外泌体的物理特性。

4.2.2 体外标记：灵活、快速，但需严谨对照

实现原理：该方法在体外对外泌体进行标记，随后将其纯化并回输至动物体内。该策略因其操作简便、无需基因改造而广受欢迎，尤其适用于研究临床样本或特定来源的外泌体。

常用方法：

脂溶性膜染料（如 **DiR、DiI、PKH26**）：利用染料的疏水性将其插入外泌体膜中。该方法操作简便，信号强烈，适用于快速筛选外泌体的体内大致分布。

化学偶联（如 NHS-ester）：将荧光染料（如 Cy5.5、IRDye）通过共价键连接到外泌体表面的赖氨酸（Lysine）残基上。这种方法比脂溶性染料更具特异性，降低了染料脱落的风险。

点击化学：通过在体外预先将外泌体标记上叠氮（$-N_3$）或炔烃（$-C\equiv CH$）基团，然后通过高效、高特异性的点击反应（如 **SPAAC**）与带有互补基团的荧光染料偶联。这种方法无需基因改造，同时又兼具高特异性，为外泌体示踪提供了新的选择。

优点与核心风险：

灵活性高：可用于任何来源的外泌体，无需复杂的基因改造。

核心风险：脂溶性染料存在**假阳性**的巨大风险。染料可能从外泌体脱落，形成**聚集体**或与血浆中的**脂蛋白**结合，并被肝脾等器官快速清除，导致研究人员错误地认为外泌体靶向了这些器官。

必须的对照与验证：

为了规避假阳性，必须执行以下严格对照：

i.“染料空白”对照（Dye-only Control）：用相同剂量的染料处理不含外泌体的缓冲液，并进行相同的纯化流程。将此“染料空白”注射到小鼠体内，如果活体成像出现信号，则表明信号可能来自染料聚集体。

ii. **密度梯度验证**：将标记后的外泌体样品进行蔗糖或碘克沙醇密度梯度离心，检测荧光信号是否与外泌体的密度峰（1.10–1.21 g/mL）重合。

iii. **功能性验证**：化学偶联法需在标记前后评估外泌体的**内化效率**和**生物功能**，以确保标记过程未对其生物学活性造成影响。

4.3 外泌体分离、纯化与给药设计

4.3.1 分离与质量控制：确保外泌体的纯度

外泌体的分离与纯化是后续示踪实验成功的基石。若样品纯度低，混入其他细胞外囊泡（如微囊泡）或游离蛋白，将严重干扰示踪结果。

分离方法：

差速超速离心（Differential Ultracentrifugation）：基于粒径和密度的差异，通过多次高速离心分离外泌体。该方法操作相对简单，但纯度较低，可能混有其他蛋白或囊泡。

密度梯度离心（Density Gradient Ultracentrifugation）：将样品置于蔗糖或碘克沙醇等梯度介质上，通过离心使外泌体沉降到其特异性密度（1.10–1.21 g/mL）的层级，从而获得高纯度的外泌体，是目前公认的**金标准**。

尺寸排阻色谱（Size Exclusion Chromatography，SEC）：通过特殊凝胶柱，根据外泌体的粒径进行分离，可有效去除游离蛋白。

免疫亲和捕获：利用特异性抗体（如 CD63、CD9）对外泌体进行捕获，可实现高纯度分离，但可能存在偏向性。

质量控制：为确保实验可重复，每批外泌体样品都必须进行严格的质量控制。根据**外泌体研究领域标准化指南（MISEV）**的要求，必须记录以下关键数据：

粒径与浓度：使用纳米颗粒跟踪分析（NTA）或基于电阻的纳米孔技术（TRPS）测量外泌体的粒径分布和颗粒浓度。

蛋白含量：通过 BCA 或其他蛋白定量方法测定总蛋白量。

标志物分析：通过 Western blot 验证外泌体特异性标志物（如 CD63、TSG101）的表达，并检测非外泌体污染标志物（如内质网蛋白 Calnexin）。

电镜观察：使用透射电镜（TEM）确认外泌体的典型杯状或球状形态。

4.3.2 给药途径与剂量设计：影响体内命运的关键因素

外泌体的体内分布与清除速率受给药途径的巨大影响。选择合适的给药方式，是实现精准示踪和靶向递送的前提。

给药途径：

尾静脉注射（Intravenous，IV）：最常用的给药方式，可使外泌体迅速进入全身循环。然而，大部分外泌体会被肝脏和脾脏等富含巨噬细胞的网状内皮系统（RES）迅速清除。研究显示，静脉注射后外泌体在循环中的半衰期通常仅为几分钟到几小时[4]。

腹腔注射（Intraperitoneal，IP）：外泌体通过淋巴系统和门静脉系统被吸收，进入全身循环的速度较慢，可减少 RES 的快速清除，并对腹腔内器官产生局部作用。

局部注射（Local Injection）：如肿瘤内注射（Intratumoral，IT）或关节腔内注射，适用于评估局部治疗效果，可避免全身分布带来的清除问题，并最大化外泌体在靶部位的积累。

剂量设计：为确保不同研究间的结果可比，建议以**粒子数量（particles / dose）或总蛋白质量（μg EV protein / dose）来报告剂量。在报告中同时提供两者信息，并注明颗粒数/蛋白比（particle:protein ratio）**，能够为读者提供更全面的信息。

4.4 成像数据分析与定量方法

活体成像技术提供了丰富的数据，但如何准确地处理和定量这些数据，直接决定了研究结论的可靠性。

4.4.1 成像 Modalities：优缺点对比

生物发光成像（Bioluminescence Imaging，BLI）：

优点：背景信号极低，信噪比高，灵敏度极佳，适合追踪低丰度外泌体。

缺点：发光信号会因组织深度的衰减，且依赖于底物（如 D-luciferin）在体内的分布和渗透，因此非绝对定量。

近红外荧光成像（Near-Infrared Fluorescence Imaging，NIRF）：

优点：近红外光（700-900 nm）穿透力强，受组织自发荧光和光散射影响小，适合深部器官成像。

缺点：荧光信号会因组织衰减和散射，且体外标记的染料（如 DiR）可能存在假阳性风险。

PET/SPECT：

优点：提供**绝对定量数据**（%ID/g），信号不受组织深度限制，是评估生物分布的“金标准”。

缺点：设备昂贵，需使用放射性同位素，操作门槛高。

4.4.2 定量指标与数据处理

为确保结果的标准化和可比性，建议采用以下指标：

总通量（Total Flux）：单位 photons/s，反映 ROI（感兴趣区域）内的总光子输出，是生物发光成像最可靠的定量指标。

平均辐射（Radiance）：单位 $p/s/cm^2/sr$，反映信号的“浓度”，便于不同实验组间比较。

靶背景比（TBR）：TBR = 靶区信号/背景区信号，消除了仪器差异和非特异性背景信号的影响，是衡量探针特异性最关键的指标。

标准化流程与统计：

采集原始图像：使用统一的曝光时间、激发/发射滤光片设置。

ROI 定义：在图像上，以标准解剖学标记或肿瘤边界为参照，绘制 ROI。

背景扣除：从 ROI 信号中减去非注射部位或染料空白组的信号，以获得净信号。

信号归一化：将数据按注射剂量、动物体重或总粒子数进行归一化，以消除个体差异。

动力学曲线：绘制 ROI 信号随时间变化的曲线，可计算外泌体在体内的半衰期（t1/2）和曲线下面积（AUC），反映其药代动力学行为。

统计建议：为获得稳健的统计结果，建议每组生物学重复不低于 5 只小鼠。使用均值±标准误（SEM）或标准差（SD）报告结果，并注明统计检验方法（如 t-test 或 ANOVA）。

4.5 外泌体靶向机制与工程策略

活体成像的终极价值在于验证外泌体的靶向递送。理解其天然归巢机制并对其进行工程化改造，是实现精准治疗的关键。

4.5.1 天然靶向性：整合素介导的器官嗜向

如前文所述，Hoshino 等人[5]的开创性研究证实了肿瘤来源外泌体表面整合素在介导器官嗜向性中的关键作用。他们的工作不仅解释了肿瘤转移的生物学机制，也为“天然”靶向性药物载体的设计提供了分子靶点。例如，可以利用具有特定整合素谱的外泌体，天然地将药物递送到肺部或肝脏。

4.5.2 表面工程化策略：实现增强靶向

为了增强外泌体的靶向性，研究人员可以对其进行表面工程化改造。活体成像技术是验证这些改造策略有效性的核心工具。

基因编码靶向肽/抗体展示：通过基因工程，将靶向配体（如 **RVG 肽**，可靶向神经元；**RGD 肽**，可靶向肿瘤血管）融合到外泌体膜蛋白（如 Lamp2b、CD63）上。随后，通过活体成像可以追踪这些工程化外泌体是否能高效积累在预期的靶点（如脑部肿瘤）。

化学偶联/PEG 化：利用化学方法将靶向配体或聚乙二醇（PEG）共价偶联到外泌体表面。PEG 化能够延长外泌体在体内的循环半衰期，减少 RES 的清除。活体成像可以直观地对比修饰前后外泌体在肝脾部位的信号差异，从而量化 PEG 化对半衰期的影响。

功能性递送的验证：单一的活体成像信号并不足以证明功能性递送。在验证“增强靶向”时，必须同时展示：1）**物理分布差异**（成像数据）；2）**功能性递送证据**（如靶器官内目标基因表达的改变，可通过 qPCR 或 Western blot 验证）；3）**严格的对照组**（如空载体、非修饰外泌体）。

4.6 常见方法学陷阱与标准化建议

在活体成像外泌体研究中，存在一些常见的方法学陷阱，若不加以规避，可能导致错误的结论。

4.6.1 常见陷阱（及避免措施）

染料假阳性：脂溶性染料（如 PKH、DiR）易形成胶束或与血浆蛋白结合，被肝脾等 RES 迅速清除。这会产生类似外泌体分布的假阳性信号。

避免措施：**必须**进行**染料空白对照**和**密度梯度验证**，以排除游离染料的影响。

标记覆盖率误导：遗传标记可能只标记外泌体总群中的一个亚群。

避免措施：需结合 NTA 和 Western blot 确认标记覆盖比例，并与体外标记法进行交叉验证。

底物分布影响 BLI 读数：生物发光成像依赖底物（如 D-luciferin 或 furimazine）在体内的分布。底物在血脑屏障、肝脏代谢等环节的可及性差异，可能导致不同组织信号强弱与外泌体实际分布不符。

避免措施：在设计实验时应评估底物的药代动力学特征，必要时通过多次补充底物或采用改良型底物来提高信号稳定性。

4.6.2 数据解读偏差

外泌体信号积累 ≠ 功能性递送。活体成像观测到的光学信号可能来自外泌体膜碎片或染料转移，而非完整外泌体进入靶细胞。**避免措施**：必须结合组织学验证（免疫荧光共定位、RNA 原位杂交）和功能学 readout（基因表达变化、信号通路激活等）共同佐证。

4.6.3 实验间差异与重复性

不同实验室在分离方法、标记方式和剂量设计上的差异，使得结果缺乏可比性。 **避免措施**：遵循 **MISEV2018 指南**，在报告中提供粒子数、蛋白含量及 particle:protein ratio；公开原始图像和 ROI 文件，提升数据透明度。

4.7 典型案例

肿瘤转移与微环境

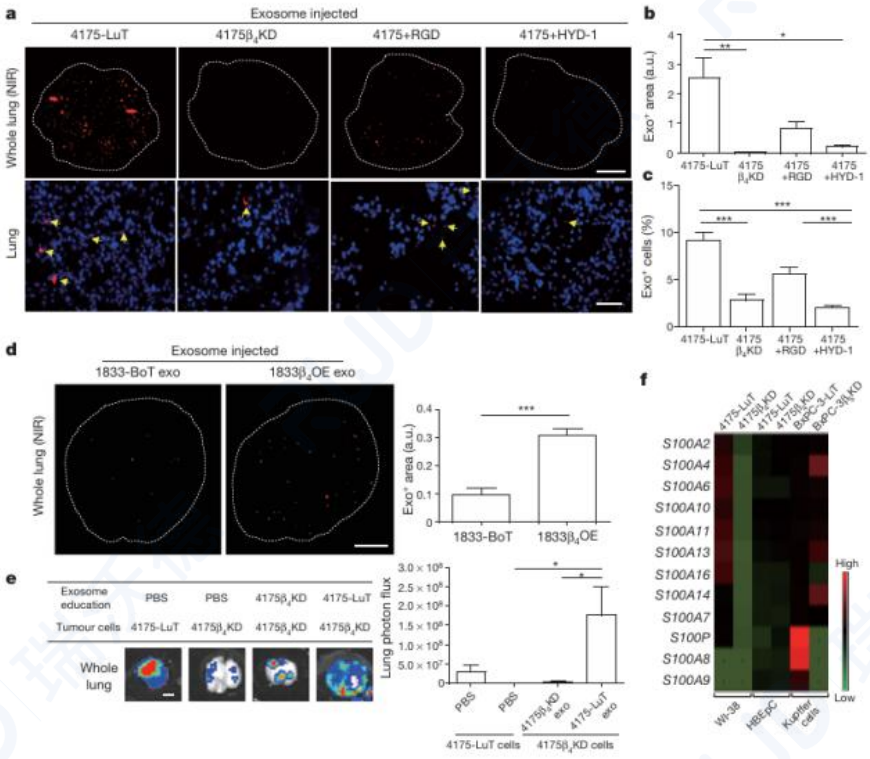


图 11 外泌体定向转移研究

自从斯蒂芬·佩吉特 1889 年提出转移性器官倾向假说以来，转移性器官倾向一直是癌症最大的谜团之一。在这里我们证明小鼠和人类嗜肺、嗜肝和嗜脑肿瘤细胞的外泌体优先与常驻细胞融合即肺成纤维细胞和上皮细胞、肝库普弗细胞和脑内皮细胞。我们证明了肿瘤来源

的外泌体被器官特异性细胞吸收，形成转移前生态位。用嗜肺外泌体治疗模型重新定向了嗜骨肿瘤细胞的转移。外泌体蛋白质组学揭示了不同的整合素表达模式，成像研究首次在动态水平证实了“外泌体先行，肿瘤细胞后至”的转移前生态学理论[5]。

免疫治疗

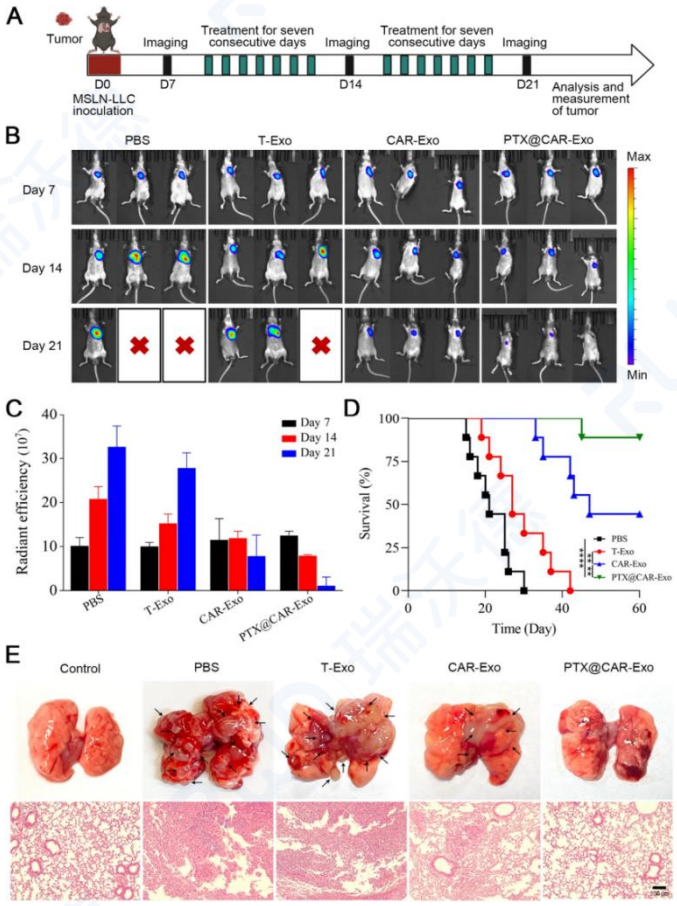


图 12 外泌体与免疫治疗相结合

CAR-T 细胞外泌体携带功能性 TCR/CD3，可在肿瘤局部聚集并发挥效应，同时避免细胞因子风暴。活体成像验证了其在肿瘤组织的定位与滞留。紫杉醇（PTX）等化疗药物已被广泛应用于临床，但因其非特异性循环导致的全身毒性常引起肝肾功能等多器官损伤。因此，有必要开发新策略以增强 PTX 的靶向抗肿瘤效果以及降低全身毒性。CAR-Exos 是一种十分有效的方式：首先，其直径仅 30-150 纳米且具有疏水性，能轻易穿越肿瘤物理屏障将 PTX 递送至肿瘤细胞内部；其次，工程化 CAR 能识别肿瘤相关抗原，避免 PTX 对正常组织的细胞毒性作用；最后，靶向递送特性可提高 PTX 的生物利用度。因此，CAR-Exos 有望成为生物相容性纳米平台，最大限度降低实体瘤治疗中的系统毒性[6]。

药物递送

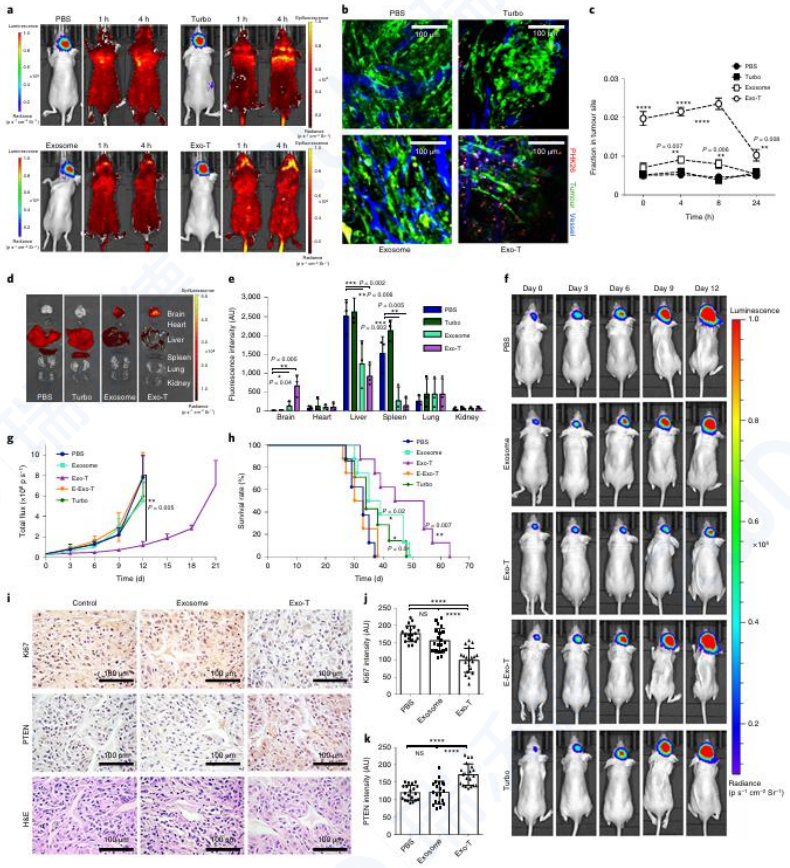


图 13 外泌体与药物递送系统结合有效抑制肿瘤生长

外泌体因具有有利的药代动力学和免疫学特性，且能穿透合成药物递送载体无法通过生理屏障的特点，作为核酸载体备受关注。该研究报道了一种细胞纳米穿孔法，可大规模生产含有治疗性 mRNA 及靶向肽的外泌体。通过质粒 DNA 转染多种源细胞，并采用局部瞬时电刺激促进细胞释放携带转录 mRNA 及靶向肽的外泌体。与整体电穿孔及其他外泌体生产策略相比，细胞纳米穿孔法产生的外泌体数量增加 50 倍以上，外泌体 mRNA 转录本数量提升超 1000 倍——即使对于基础外泌体分泌水平较低的细胞同样有效。在 PTEN 缺陷型神经胶质瘤原位小鼠模型中，含 mRNA 的外泌体成功恢复了肿瘤抑制功能，显著增强肿瘤生长抑制效果并延长生存期。细胞纳米穿孔技术有望使外泌体成为通用型核酸载体，应用于需要转录操纵的治疗领域[7]。

第 5 章 活体成像技术在免疫系统研究中的应用

小动物活体光学成像系统在免疫系统中的应用主要包括免疫疾病监测、免疫细胞动态追踪及免疫机制研究三大方向，以下分实验步骤和典型案例详细说明：

5.1 技术原理与常用的标记策略

生物发光（BLI）

将荧光素酶基因（Fluc、Rluc、Nluc 等）通过转基因或病毒载体导入目标免疫细胞；底物（D-荧光素、腔肠素）注射后产生光子，信噪比较高。

荧光成像（FLI）

采用 GFP、mCherry、Cy7、量子点或近红外染料标记细胞/抗体；需考虑组织自发荧光与血红蛋白吸收，通常选择 650–900 nm 波段。

多模态融合

BLI/FLI + X-ray/CT 可叠加解剖结构；BLI/FLI + 高频超声可同步评估血流与免疫细胞迁移 。

5.2 基本实验步骤

5.2.1 免疫疾病监测（以炎性疾病为例）

免疫疾病监测可以分为以下三个步骤：

探针设计与注射

使用功能性探针（如 ROS 响应型探针 HA-AuNPs）标记疾病特征分子。例如：尾静脉注射 HA-AuNPs 探针（表面结合荧光染料标记的透明质酸），探针在 ROS 作用下被剪切后发光 。

疾病模型构建

建立动物模型（如小鼠关节炎模型），通过化学诱导或基因修饰模拟疾病状态。

活体成像与数据采集

注射探针后，在不同时间点（如 0h、24h、48h）利用小动物活体光学成像系统采集生物发光或荧光信号，定量分析疾病进展 。

以炎症疾病为例：白念珠菌是一种主要的致病真菌，它通过多种代谢适应来逃避免疫细胞并引起全身性疾病。在这里，我们描述了一种测量这些适应之一（在缺氧微环境中生存的能力）的方案。在成功建立小鼠皮下感染模型后，通过白念珠菌产生缺氧。缺氧情况通过

HypoxiSense 680 荧光染料进行测量。这种染料可以对缺氧区域进行可视化，帮助研究人员了解组织的氧气供应情况。最后，对得到的活体成像荧光数据进行定量分析。

实验流程：

（1）真菌生长和鼠类准备（第 1-3 天）

1）用接种环将白念珠菌冷冻菌种接种到 50 毫升管中的 10 毫升 SC 培养基中，然后以 180 rpm 的速度在 30°C 下振荡培养 20 小时。

2）取前一天制备的白念珠菌培养物 10 微升，加入到 50 毫升管中的 10 毫升新鲜 SC 培养基中。对新混合物进行相同时间的培养。

3）在第 3 天，在细胞计数器中计数细胞，并在 10 毫升 SC 培养基中制备新鲜亚培养物，起始细胞数为 5 x 10^7 细胞/毫升，培养 3 小时。在室温下以 3,000 x g 离心 10 分钟，然后用 1 毫升 1x PBS 重新悬浮真菌，并用细胞计数器计数真菌细胞数。

4）将真菌浓度调整为 5 x 10^8 细胞/ml，如需立即使用则置于冰上保存。计算示例：从 8 x 10^8 细胞/ml 的储备悬液制备 1 ml 浓度为 5 x 10^8 细胞/ml 的酵母悬液，需加入 625 µl 储备悬液至 375 µl PBS 中。

5）所有小鼠（B6(Cg)-Tyrc-2J）均在 C. albicans 皮下感染前 24 小时腹腔注射 100 µl HypoxiSense 680 染料（每只小鼠注射 HypoxiSense 染料 2 nmol/100 µl）。

（2）皮下感染（第 4 天）

1）将小鼠放入麻醉箱中，并在气体麻醉系统中将异氟烷气体浓度调节至 2.5%。将小鼠从麻醉箱中取出，并将其鼻子轻轻放入异氟烷输送锥内。

2）在小鼠麻醉后，使用剃毛器剃掉背部腹侧的毛发（图 1）。

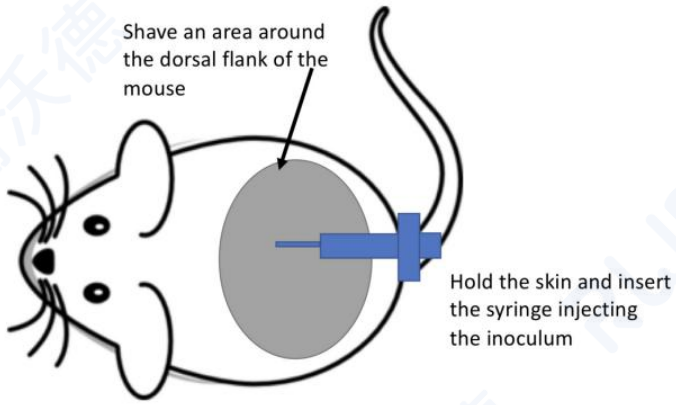


图 14 皮下感染的操作示意图

3）用镊子拉起小鼠皮肤。将注射器插入被拉起的皮肤中，用制备好的 100 µl 白念珠菌接种物感染小鼠（5 x 10^7 细胞）。动物皮下会可见一个小液泡，持续几分钟。

4）用 100 µl 1x PBS 以类似方式治疗并注射对照组动物。

5）将动物放置在加热灯下，直到完全清醒。

（3）活体成像（第 4-7 天）

1）使用 2.5%异氟烷的气流在麻醉箱中对小鼠进行麻醉，并将其转移到活体成像的成像室中，使每只动物的鼻子位于输送异氟烷的锥形面罩内。

2）选择适合染料发射和激发波长的滤光片设置（675 ex/720 em）。

3）在初始感染后第 4 天对两组动物进行时间零图像采集（图 2）。曝光时间为 0.5 秒，捕捉由 HypoxiSense 染料活性产生的体内生物荧光，作为缺氧的标志。

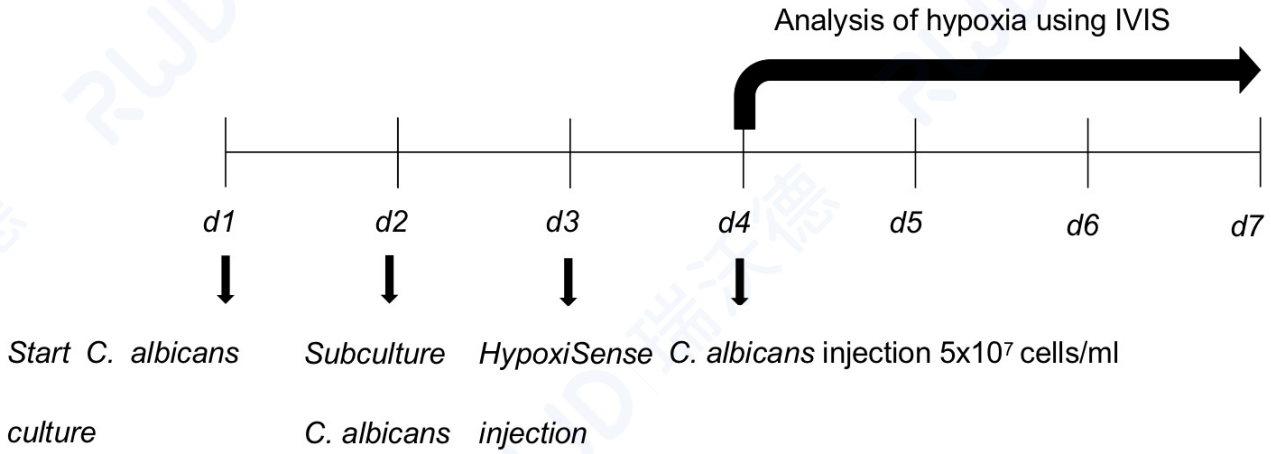


图 15 实验流程示意图

数据分析：

（1）在对应脓肿存在的区域，绘制感兴趣区域（ROI），覆盖高上皮荧光的区域。在暗区放置背景 ROI 以定义背景。

（2）将每个动物的荧光值减去背景荧光值。

（3）使用数据作图，y 轴为荧光值，x 轴为组别。使用 two-tailed Mann-Whitney U-test 进行感染组和对照组之间的统计学显著性检验。

5.2.2 免疫细胞动态追踪

先天免疫细胞包括白细胞，例如自然杀伤（NK）细胞、树突状细胞（DC)、细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL)、调节性 T 淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和

嗜碱性粒细胞等。其中，NK 细胞和 T 细胞作为先天免疫系统中的细胞毒性淋巴细胞，能够通过多种免疫受体特异性识别癌细胞，可作为多种癌症治疗中极具前景且有效的免疫治疗药物。迄今为止，NK 细胞和 T 细胞已在临床前研究和临床实践中广泛应用于治疗不同类型的癌症，例如急性髓系白血病、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、肝细胞癌和脑胶质母细胞瘤。免疫治疗的疗效直接取决于移植的 NK 细胞和 T 细胞在体内的存活率和数量。因此，在体内追踪和监测这些免疫细胞的活力对于评估免疫治疗期间的治疗效果具有重要意义。

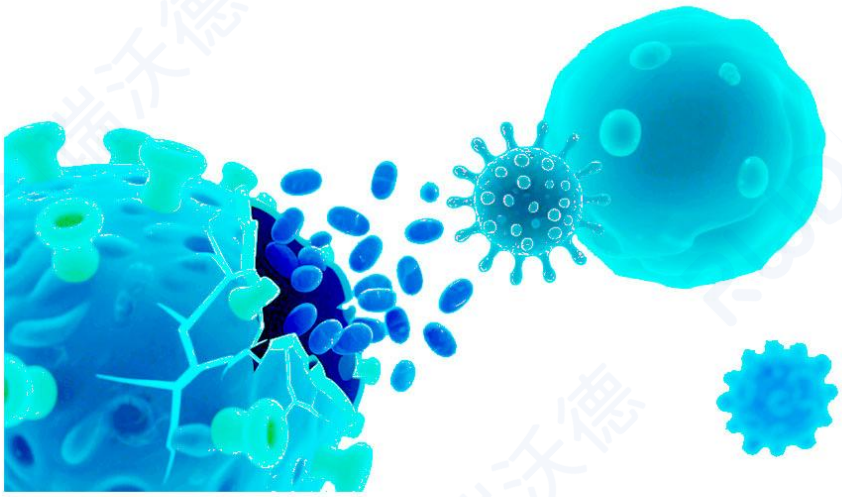


图 16 免疫细胞动态追踪示意图

5.2.2.1 免疫细胞动态追踪步骤

（1）细胞标记

基因标记：用慢病毒载体将荧光素酶基因（如 Fluc）转染 T 细胞，或从转基因发光小鼠（如 Luc+小鼠）提取免疫细胞 。

染料标记：体外用近红外荧光染料（如 DiD）直接标记单核细胞或 T 细胞 。

（2）细胞移植与模型构建 将标记细胞转移至受体动物（如肿瘤模型小鼠），通过尾静脉或局部注射。

（3）实时成像与迁移分析 每隔一段时间成像，记录细胞在淋巴结、脾脏或肿瘤部位的分布，分析迁移路径与功能状态（增殖、激活） 。

（4）功能验证 结合组织学分析（如流式细胞术、冷冻切片）验证成像结果 。

5.2.2.2 典型案例步骤解析

以 NK 细胞的上转换纳米包装颗粒（UCNPs）为例：

（1）UCNPs 的合成与表面修饰（水溶性改造）

合成核心 UCNPs（$NaYF_4:Yb^{3+}/Tm^{3+}$）

1）脱水处理：将稀土盐、油酸和 1-辛烯混合，加热至 150°C。

2）注入氟源与碱源：迅速注入 NaOH 和 NH_4F 溶液，50°C 保温 30 分钟。

3）高温晶化：升温至 290°C，氩气保护下反应 2 小时。

4）纯化：冷却后加乙醇离心沉淀，重复 3 次，最终分散于环己烷中。

（2）细胞培养与标记（电穿孔）

1）细胞准备：收集 1×10^7个 NK-92 细胞，重悬于 100 μL 培养基中。

2）加入 UCNPs：与羧基-PEG-UCNPs 混合（终浓度约 50 μg/mL）。

3）电穿孔：使用设定程序（如 OPT2）进行电击。

4）恢复培养：37°C 孵育 20 分钟→稀释至 2 mL 培养基→继续孵育 1~2 小时。

5）洗涤：PBS 洗 3 次，去除游离 UCNPs 与死细胞。

（3）细胞功能验证实验

1）细胞活性检测

方法：台盼蓝染色。

结果：计算细胞存活率。

2）细胞因子分泌（IFN-γ、TNF-α）

ELISA 法：

收集电穿孔后 24 小时上清液。

使用人 IFN-γ/TNF-α ELISA 试剂盒（R&D Systems）检测。

对比标记组与未处理组差异

3）细胞毒性功能（对 K562 靶细胞）

Calcein-AM 释放法：

靶细胞（K562）预标记 Calcein-AM。

按效靶比（E:T = 5:1 或 1:1）共培养 4 小时。

测荧光强度，计算裂解率。

对比标记组与对照组的杀伤能力。

（4）成像与分布实验

1）体内灵敏度测试（皮下注射）

细胞梯度：1.25×10^4 ~ 1×10^6个细胞/50 μL PBS

注射部位：小鼠腹部皮下

成像时间：0 天与 1 天

结果：将信号强度与细胞数进行线性分析，计算 R^2值。

2）体内分布追踪（尾静脉注射）

剂量：2×10^7个细胞/200 μL PBS

时间窗：0.5、1、3、6、24 小时

成像方式：全身荧光成像 + 离体器官成像（肺、肝、脾）

组织验证：冷冻切片→荧光共定位

5.2.3 免疫机制研究（转基因动物模型）

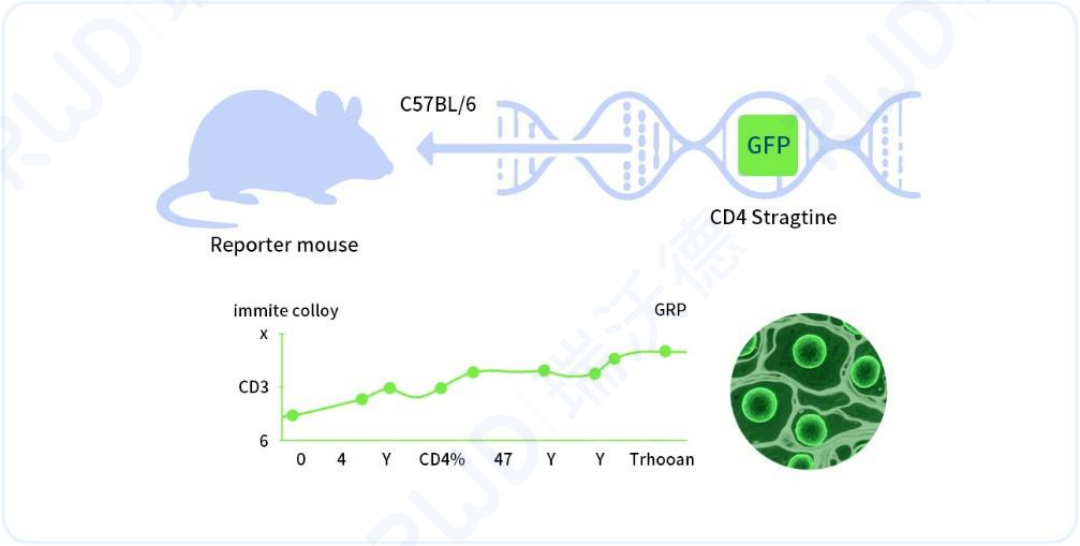


图 17 转基因动物模型构建示意图

免疫机制研究主要流程如下：

（1）构建转基因动物 利用炎症相关基因启动子（如 NF-κB、iNOS）驱动荧光素酶表达，构建转基因小鼠（如 Tg(NFκB-RE-luc)） 。

（2）诱导免疫反应 注射免疫刺激剂（如 LPS 诱导炎症）或病原体（如病毒感染）。

（3）基因表达监测 活体成像观测荧光素酶信号，反映目的基因的时空表达动态 。

（4）机制干预 给予基因敲除或药物处理，对比信号变化探究分子机制（如咖啡抑制 NF-κB 表达） 。

免疫机制研究常用转基因动物模型分类与特点：

（1） 过表达模型

IL34 转基因小鼠：人源 IL34 基因在 C57BL/6J 小鼠中过表达，用于研究巨噬细胞分化和脾脏免疫调节。模型显示脾脏白髓增生，免疫细胞活性增强。

HLA-G 转基因小鼠：慢病毒载体介导人 HLA-G 基因在 FVB/N 小鼠中表达，用于移植免疫研究。通过显微注射胚胎实现基因整合。

TNFRSF6B 转基因狼疮模型：人 β-肌动蛋白启动子驱动 TNFRSF6B 表达，导致雌性小鼠出现淋巴结病、抗核抗体和肾小球肾炎，模拟系统性红斑狼疮（SLE）。

（2）基因敲除/敲入模型

FcγRIIB 敲除 SLE 模型（B6;129S-Fcgr2btm1Ttk/J）：B 细胞受体缺失导致免疫复合物清除障碍，引发肾炎和自身抗体升高。

CD45E613R 敲入模型：CD45 基因谷氨酸 613 突变为精氨酸，引起 T/B 细胞异常活化、淋巴增生和自身免疫性肾炎。

B 细胞特异性 Ewsr1 敲除模型：利用 Cre/loxP 系统（Mb1-Cre 驱动），在 B 细胞中敲除 Ewsr1 基因，增强体液免疫和抗体产生，适用于单抗筛选。

（3）人源化免疫系统模型

改良 BLT 模型：

步骤：NSG 小鼠植入人胸腺组织，注射肝源性 $CD34^+$细胞，并通过 AAV8 载体递送细胞因子（IL-3/IL-7/GM-CSF）。

优势：长期稳定重建多系免疫细胞（30 周），支持 HLA 限制性 T 细胞发育，用于肿瘤免疫治疗研究。

（4）诱导表达模型

Cre/loxP 调控 HBsAg 模型：HBsAg 基因在 Cre 重组酶激活后表达，避免免疫耐受。通过显微注射或尾静脉液压裸质粒实现，用于乙肝免疫损伤研究。

下表总结了主要免疫相关转基因动物模型的特点：

表 3 主要免疫相关转基因动物模型的特点

模型类型	代表模型	免疫表型	适用研究
过表达	IL34 转基因小鼠	脾白髓增生，巨噬细胞分化增强	先天免疫调控机制
基因敲除	FcγRIIB^{-}/$^{-}$	自身抗体升高，肾小球肾炎	SLE 病因学
人源化	改良 BLT 模型	多系免疫细胞重建，HLA 限制性 T 细胞	肿瘤免疫疗法
诱导表达	Cre/loxP-HBsAg	急性肝炎，抗 HBsAg 抗体产生	乙肝免疫病理

5.2.4 免疫缺陷小鼠模型

免疫缺陷模型是指一种或多种免疫系统组成成分缺陷的动物模型，随着基因编辑技术的不断发展，越来越多的免疫缺陷小鼠品系被研发出来，在免疫学，传染病学，肿瘤学，干细胞生物学等研究领域中发挥着越来越重要的作用。

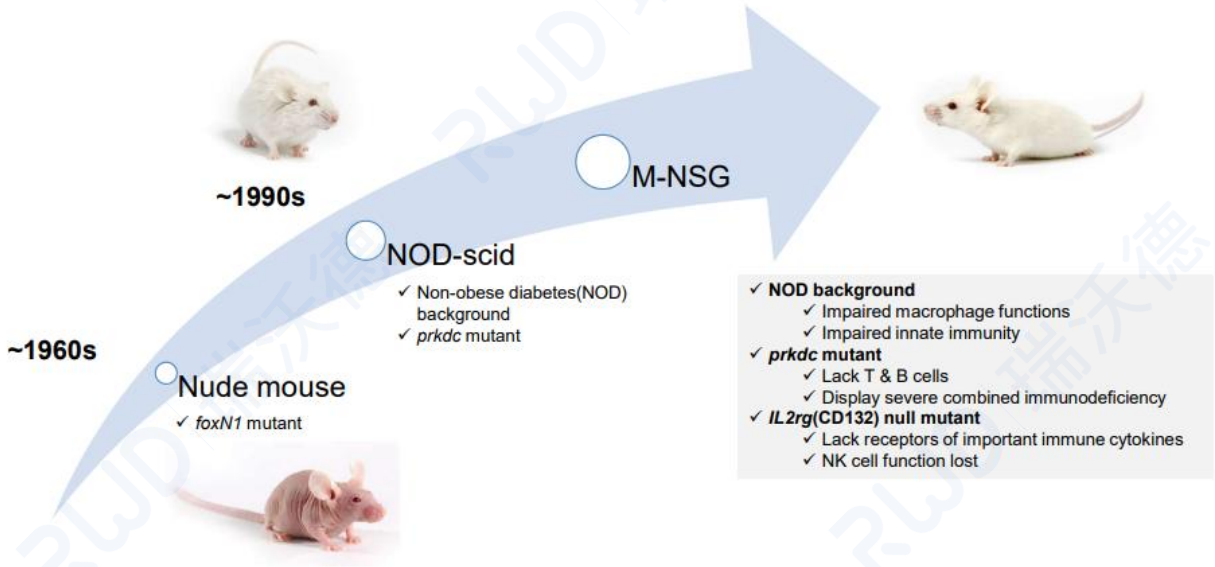


图 18 转基因动物模型发展历程

以下是常用的免疫缺陷模型小鼠分类及其核心特征，按免疫缺陷程度从低到高排列，结合应用领域和最新进展综合整理：

5.2.4.1 基础免疫缺陷模型

（1）Nude 小鼠（裸鼠）

遗传背景：*Foxn1* 基因纯和突变。

缺陷特征：无毛、无胸腺，T 细胞完全缺失，B 细胞和 NK 细胞功能正常。

应用：裸鼠是快速生长的肿瘤细胞系是理想的宿主，广泛用于实体瘤移植（CDX 模型）、免疫学及感染性疾病研究。

局限：NK 细胞活性保留可能导致移植物排斥，寿命较短（易患肝炎）。

（2）SCID 小鼠

遗传背景：*Prkdc* 基因纯和突变（DNA 修复酶缺陷）。

缺陷特征：T、B 细胞联合缺失，但 NK 细胞、巨噬细胞正常；约 20%小鼠出现“渗漏”（免疫功能部分恢复）。

应用：适合同种和异种肿瘤移植，可用于血液瘤 PDX 模型、免疫重建研究。

5.2.4.2 中度免疫缺陷模型

（1）NOD-SCID 小鼠

遗传背景：NOD 糖尿病品系与 SCID 杂交，携带 NOD 先天免疫缺陷（补体活性低、巨噬细胞功能弱）。

缺陷特征：T/B 细胞缺失，NK 细胞活性显著降低（较 SCID 更彻底），无糖尿病表型，没有溶血补体活性，骨髓发育缺陷。

应用：造血干细胞移植、部分肿瘤模型；但易发淋巴瘤（寿命≤8 个月），不适合长期的移植实验。

5.2.4.3 重度免疫缺陷模型（三重基因缺陷）

在 NOD-scid 基础上同时敲除 *IL2rg* 基因（细胞因子受体γ链）进一步消除 NK 细胞功能，显著提升人源细胞移植效率：

（1）B-NSG/B-NDG 小鼠

遗传背景：NOD-SCID + IL2rg 敲除。

缺陷特征：T/B/NK 细胞完全缺失，巨噬细胞吞噬作用弱，无渗漏现象。

应用：寿命长达 1.5 年，支持微量细胞成瘤，适用 HSC、PBMC、PDX 移植。人源化免疫系统重建、CAR-T 药效评价。

（2）C-NKG 小鼠

遗传背景：NOD-SCID + IL2rg 敲除（与 B-NSG 类似）。

特征：淋巴瘤发生率极低，支持新生鼠 HSC 移植（T 细胞重建效率更高）。

应用：HIV 感染模型、实体瘤原位移植（如胰腺癌、肺癌）。

（3）NCG 小鼠

遗传背景：NOD + Prkdc/IL2rg 双敲除。

应用：生存期>89 周，广泛用于 PDX 药效测试（如肺癌靶向药厄洛替尼评价）。

（4）BRGSF 小鼠

遗传背景：Rag2/IL2rg/Sirpα/Flk2 四基因修饰。

特征：补体系统完整，巨噬细胞吞噬抑制，适用补体依赖性疗法研究（如抗体药物）。

应用：HIV 细胞免疫治疗、人源 PBMC 短期实验。

表 4 免疫缺陷小鼠主要品系对比表

品系	免疫缺陷特征	应用领域	优势与局限
Nude	T 细胞缺失，B/NK 正常	实体瘤移植、免疫学	成本低；NK 活性限制移植物存活
SCID	T/B 细胞缺失，NK 正常	血液瘤 PDX 模型	易发生免疫"渗漏"
NOD-SCID	T/B 缺失+NK 活性降低	干细胞移植、短期肿瘤研究	寿命短（≤8 个月），易发淋巴瘤
B-NSG	T/B/NK 完全缺失	人源化模型、微量细胞成瘤	寿命长（1.5 年），无渗漏
C-NKG	T/B/NK 缺失+低淋巴瘤风险	HIV 模型、原位肿瘤	新生鼠移植 T 细胞重建效率高
BRGSF	T/B/NK 缺失+补体完整	补体依赖性疗法、PBMC 研究	适用抗体药物评价

B-NDG(®)小鼠

B-NDG(®)小鼠 (NOD-Prkdcscid IL2rgtm1/ Bcgen) 是基于 NOD-scid 遗传背景的 IL2rg 基因敲除小鼠，缺乏成熟的 T、B 和 NK 细胞，是目前国际公认的免疫缺陷程度高、适合人源细胞或组织移植的工具小鼠。

B-NDG(®)小鼠结合 NOD scid-Il2rg 基因敲除背景特征，具有严重免疫缺陷表型，缺乏成熟 T 细胞、B 细胞和功能性的 NK 细胞，巨噬细胞和树突状细胞功能下降。非常适合进行人造血干细胞（CD34+ HSCs）和外周血单个核细胞（PBMC）的移植，以获得具有人免疫系统的人源化小鼠。

将人 CD34+造血干细胞移植入 B-NDG 小鼠体内重建人类免疫系统，并评估抗人 PD-1 抗体的疗效：

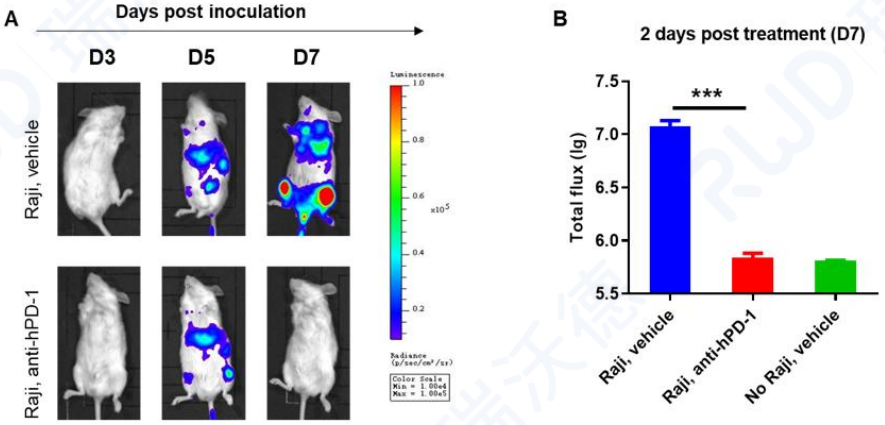


图 19 淋巴瘤移植瘤模型的监测

采用 CD34+造血干细胞重建的 B-NDG 小鼠用于药物疗效评价。将人淋巴瘤细胞系 B-luciferase-GFP Raji 细胞（5E5）通过尾静脉接种到接受人 CD34+造血干细胞重建的成年 B-NDG 小鼠体内。在肿瘤细胞接种后第 5 天，对小鼠进行抗人 PD-1 抗体治疗。在第 7 天观察到抗人 PD-1 抗体对肿瘤细胞生长的显著抑制作用。结果表明，在重建造血干细胞的 B-NDG 小鼠中建立 CDX 肿瘤模型，为体内抗体评价提供了一个强大的临床前模型。数据以均值±标准误表示。

5.3 典型案例

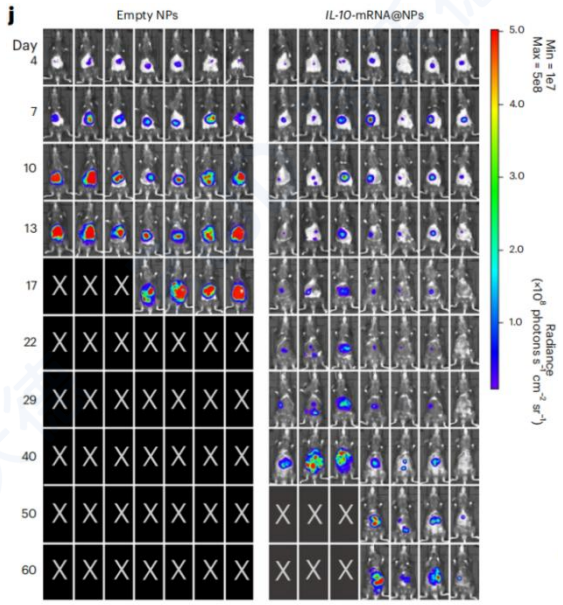


图 20 IL-10-mRNA@NPs 的疗效评估

静脉注射 IL-10 信使 RNA（mRNA）纳米颗粒（IL-10-mRNA@NPs）能够在多种临床前肿瘤模型中诱导强效的免疫监视，同时降低系统性毒性。尤其是，IL-10-mRNA@NPs 可在肿瘤内持续产生 IL-10，促进细胞毒性 T 细胞的大量浸润与增殖，诱导树突状细胞的活化与成熟，并在免疫抑制性的早期原位肝细胞癌肿瘤中增强主要组织相容性复合体 I 类分子的表达。此外，在中晚期原位肝细胞癌小鼠模型中，将 IL-10-mRNA@NPs 与免疫检查点抑制剂联合应用，可使 43%的小鼠实现完全肿瘤清除，并使中位生存期较单用免疫检查点抑制剂组延长 6 倍。更为重要的是，该联合策略可诱导持久的抗肿瘤免疫记忆，对肿瘤复发攻击提供 100%的保护。静脉给药 IL-10-mRNA@NPs 策略有望克服重组 IL-10 在临床试验中面临的挑战，适用于更广泛的免疫抑制性肿瘤治疗[8]。

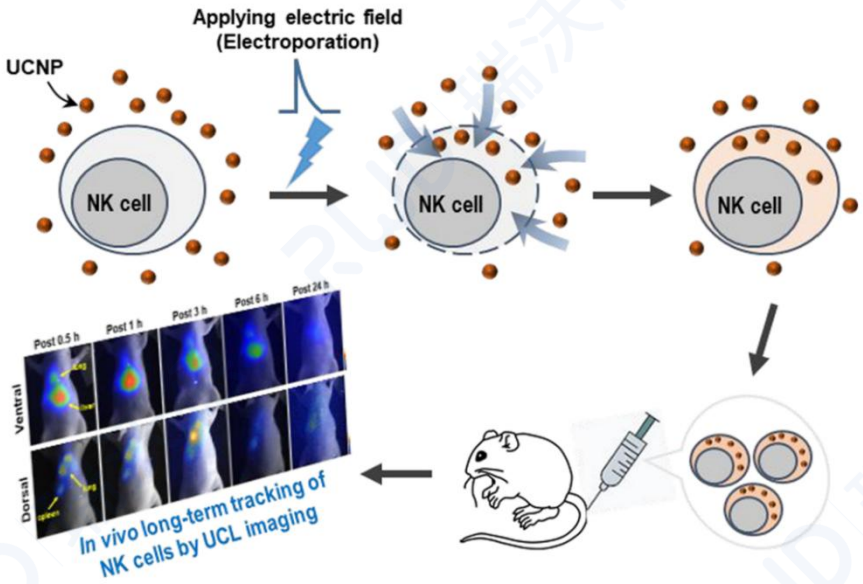


图 21 IL-10-mRNA@NPs 的疗效评估

使用电穿孔（EP）技术对标记有 UCNP 的 NK 细胞进行体内长期追踪。本研究通过电穿孔法将羧基-PEG 修饰的 Tm^{3+}/Yb^{3+}掺杂上转换纳米颗粒（UCNPs）高效、低毒地标记到缺乏吞噬能力的 NK-92 细胞中，实现了对细胞体内分布的高灵敏度、无背景干扰的近红外上转换发光（UCL）成像；结果表明，标记不影响 NK 细胞的存活率和杀伤功能，静脉注射后细胞先聚集于肺部，随后迁移至肝脏和脾脏，为 NK 细胞癌症免疫治疗的体内动态监测提供了可靠工具。

第 6 章 成像系统选择建议

在生物医学研究中，活体光学成像系统作为一种非侵入性工具，能够实时监测实验动物体内复杂的生物学过程，为科学研究提供重要支持。然而，面对市场上众多小动物活体光学成像系统及其繁杂的技术参数——如分辨率、暗电流、F 值、光谱拆分能力等，研究人员往往难以准确把握各参数对实际实验的影响。

究竟哪些核心指标对实验成功具有决定性作用？何种系统设计能够保障数据的可靠性与重复性？本章将从科研工作的实际需求出发，系统梳理关键性能参数与设备选型指南，助力研究者作出科学合理的选择，为实验项目甄选最适宜的成像工具。

6.1 硬件性能

在活体成像实验中，待检测信号往往极其微弱，对成像系统的灵敏度提出了极高要求。若系统自身噪声控制不足，此类低丰度信号极易被背景噪声所淹没，导致有效信息丢失。因此，在选择成像系统时，不应仅关注参数表观数值，更需深入理解其背后的物理机制与实际影响。

6.1.1 CCD 制冷深度与暗电流

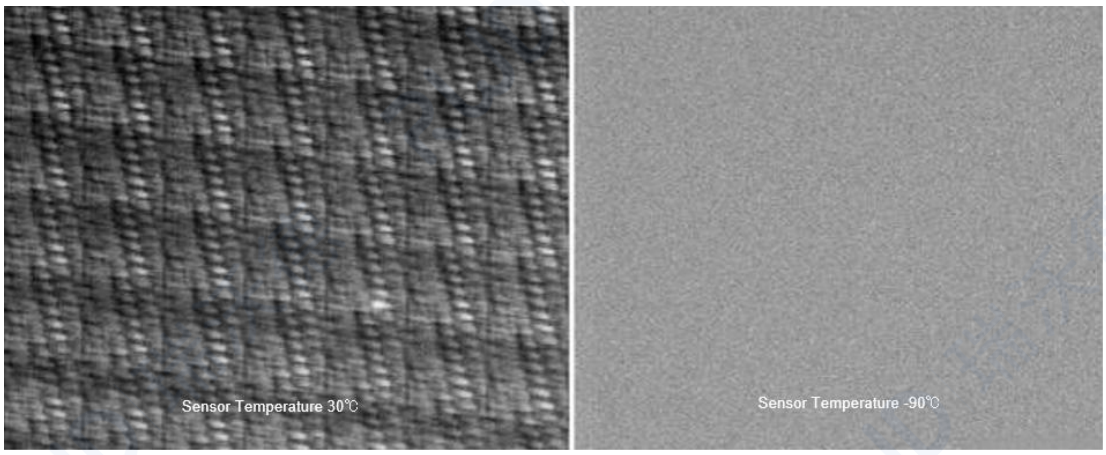


图 22 CCD 相机温度对暗电流的影响

CCD（电荷耦合器件）在工作时，CCD 基底材料会因热激发而产生少量的自由电子，这些电子与光子激发的信号电子混合在一起，形成了一种无法区分的“背景噪声”，这就是所谓的**暗电流（Dark Current）**。深度制冷是降低暗电流最有效的方法，每降低 6-8°C，暗电流就

会减半。因此，一个制冷深度更深的系统，意味着它在长时间曝光下，背景将更纯净，图像质量更高。

6.1.2 读出噪声（Readout Noise）

当 CCD 将接收到的光子信号（电荷）转移出相机并转化为数字信号时，这个读出过程本身会产生一种固有的电子噪声，这就是读出噪声。在低光照、微弱荧光信号的活体成像实验中，读出噪声就成了决定性的因素。一个极低的读出噪声意味着相机可以更有效地检测到微弱信号，使图像更干净，从而获得更高质量的数据。

6.1.3 信噪比（SNR）

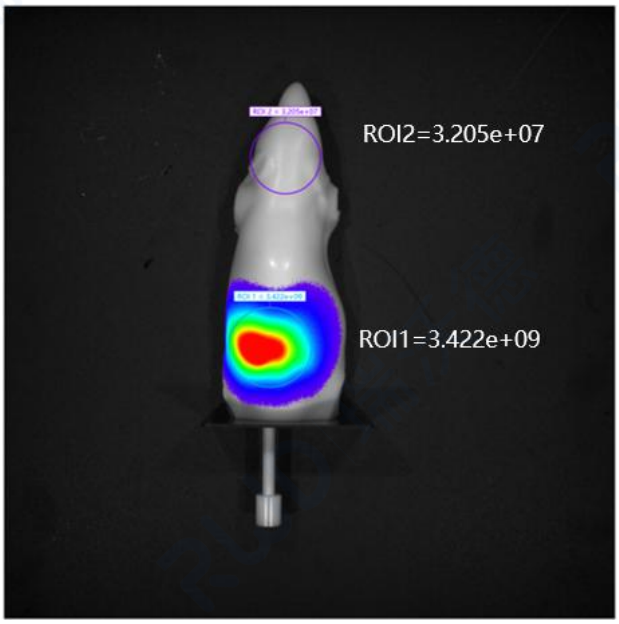


图 23 信噪比对比结果

信噪比是衡量系统性能的最终核心指标。它是一个比值，分子是有效信号，分母是各种噪声（包括暗电流、读出噪声、散发荧光等）。一个优秀的系统，就是通过最小化分母中的噪声项，同时最大化分子中的信号项，从而实现最高的信噪比。

6.1.4 CCD 像素

更高像素 = 更高分辨率：一台相机的总像素数指的是其传感器上感光单元的数量。像素越多，传感器就能将场景分割得越细，捕获的细节就越多。

像素总数很重要，但单个像素的物理尺寸更重要。

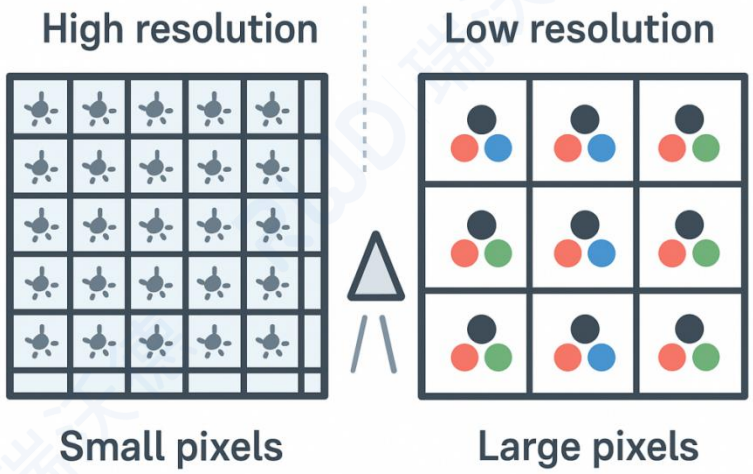


图 24 大像素和小像素的对比示意图

大像素 vs. 小像素：

更大的像素：当传感器总尺寸固定时，像素数量较少意味着每个像素的感光面积更大。优点：能捕获更多的光线，具有更好的信噪比。表现在照片上就是噪点更少、画质更纯净，尤其在弱光环境下（如夜景、室内）表现远胜于高像素小尺寸的传感器。动态范围（同时记录最亮和最暗细节的能力）通常也更好。

更小的像素：在同样大小的传感器上塞进更多的像素，每个像素的感光面积就变小了。缺点：容易产生更多的热噪点和电子噪声，尤其是在高 ISO（感光度）下，画质会下降。

一个生动的比喻：

把 CCD 传感器想象成一个游泳池，像素就是一个个用来接雨水的杯子。

高像素（小像素）：用很多个小杯子（像素）摆满游泳池。杯子多，能记录雨滴落下的位置更精确（分辨率高），但每个杯子接的水（光线）少。

低像素（大像素）:用少量大杯子摆满游泳池。杯子少，记录位置不够精细（分辨率低），但每个杯子能接到更多的水（光线），更容易测量（信噪比好）。

6.2 光学设计

光学设计是成像系统的核心组成部分，其性能直接决定了系统捕获光子的效率。优质的光学组件能够显著提升有效信号的采集能力，从而对成像速度与最终图像的信噪比产生决定性影响。

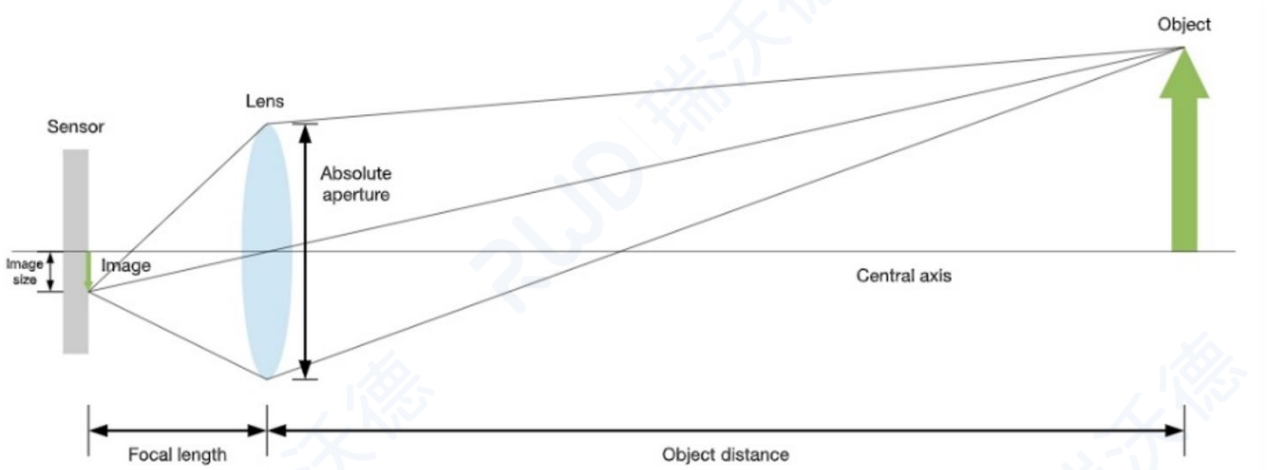


图 25 光学设计示意图

6.2.1 F 值与大光圈镜头

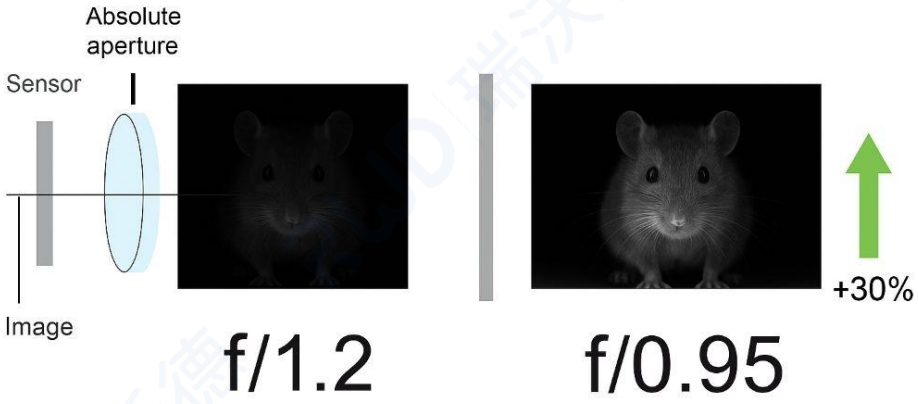


图 26 F 值大小对于成像效果的影响

F 值（F-number）：定义为镜头的 焦距（f） 与 入瞳直径（D） 的比值，即 F = f / D。

物理意义：F 值是一个相对值，它表示镜头通光能力的效率，而不是绝对值。F 值越小，代表光圈开口越大，单位时间内进入相机的光线就越多。

活体成像，特别是荧光成像，永远在与一个敌人作斗争：极低的光子信号。这是因为：

生物体内的荧光信号非常微弱。

生物组织对光有强烈的吸收和散射效应。

为了减少光毒性和光漂白，需要限制激发光强度和曝光时间。

因此，最大限度地收集每一个珍贵的光子至关重要。大光圈镜头（低 F 值）的作用就体现在这里：

显著提高信噪比（Signal-to-Noise Ratio，SNR）

信号（Signal）：大光圈允许更多来自样本的（真实的）荧光光子到达探测器。

噪声（Noise）：相机的读出噪声、暗电流噪声等是固定的，不随进光量变化。

结果：信噪比（SNR） ≈ √（信号）。进光量提升 4 倍，信噪比理论上可提升 2 倍。这意味着图像更干净、背景更暗、目标更清晰，更容易进行定量分析。

大幅缩短曝光时间

进光量增加，意味着可以用更短的时间捕获到足够亮的图像。

带来的好处：

减少运动伪影：活体动物难免有呼吸和微小移动，更短的曝光时间可以“冻结”运动，获得更清晰的图像。

降低光毒性和光漂白：缩短激光或照明灯的照射时间，能更好地保持样品的活性，尤其对于长时间动态观察至关重要。

提升通量：在高通量筛选中，更短的曝光时间意味着更快的成像速度。

允许使用更低剂量的探针或更弱的激发光

如果曝光时间固定，大光圈的高集光能力意味着可以使用更低浓度的荧光探针或更弱强度的激发光来获得相同的图像亮度。

带来的好处：

降低毒性：减少探针和激发光对动物的潜在毒副作用，实验数据更接近生理状态。

延长观测时间：减弱光漂白效应，使得长时间观测成为可能。

6.2.2 激发光源与光谱连续性

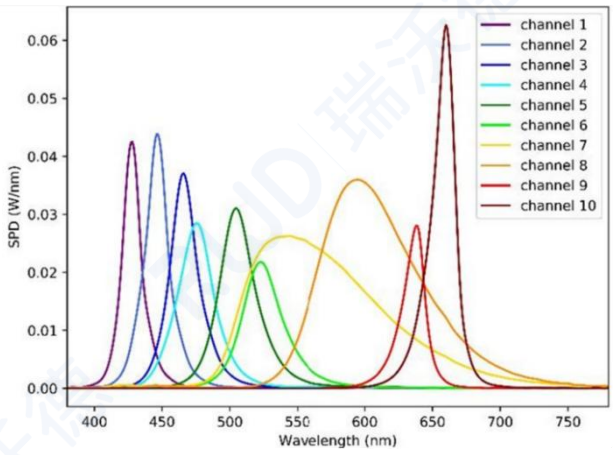


图 27 LED 光源的激发功率

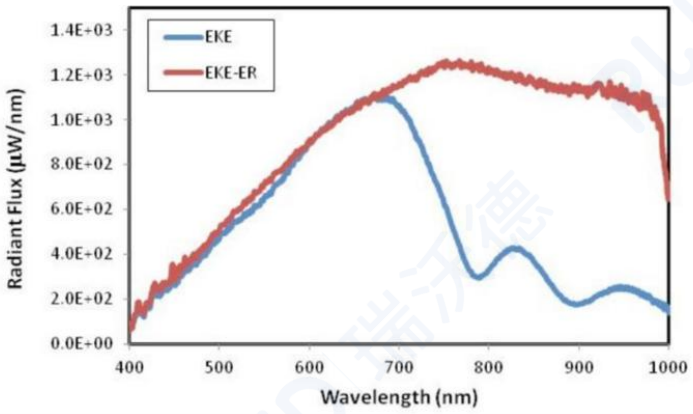


图 28 卤钨灯光源的激发功率

荧光实验依赖激发光。光源的质量直接影响激发效率。**连续光谱光源**能提供覆盖整个可见光和近红外范围的连续光谱，这能更好地支持多波段探针实验，为未来的新型探针应用提供可能性。

活体成像大多数使用**卤素灯**作为光源，主要原因可以归结为以下几个关键点：

活体成像，特别是基于生物发光和荧光的成像，需要一个强大的光源来激发荧光探针（例如 GFP、RFP 或各种染料）。卤素灯（尤其是大功率氙灯）在这方面具有无可比拟的优势：

连续且宽广的光谱

卤素灯/氙灯能产生从紫外（~300 nm）到近红外（~1000 nm 甚至更远）的连续光谱，非常接近于完美的太阳光。

这一点至关重要，因为不同的荧光探针有不同的最佳激发波长（例如，GFP 约在 488nm 被激发，而 RFP 约在 558nm）。一个宽光谱光源可以同时高效地激发多种不同的荧光标记物，只

需通过更换滤光片来选择所需的激发波段即可。一台设备就能满足多种实验需求，灵活性和性价比极高。

极高的亮度（光强）

活体成像的对象是整个活体动物（如小鼠），光线需要穿透皮肤、肌肉、骨骼等组织才能到达深处的目标（如肿瘤、器官），并被探测器捕获。

这个过程中光线会被散射和吸收，损耗极大。因此，需要一个极其明亮的光源，以确保有足够多的光子能到达目标并返回到相机形成有效信号。高功率的氙灯（常为 100W 以上）能提供这种所需的高强度光。

与其他光源的对比（为什么不用 LED？）

要更好地理解为什么是卤素灯，可以看看其他光源的局限性：

LED（Light-Emitting Diodes）

优点：节能、寿命长、体积小、发热量低、可瞬间开关。

缺点：

光谱窄：单个 LED 通常只发出一个很窄波段的光（例如 470nm ±10nm）。要覆盖宽光谱，就需要集成多个不同波长的 LED，这会使系统变得复杂和昂贵。

光强不足：虽然 LED 技术发展很快，但在需要极高光强以穿透厚组织时，特别是对于激发效率较低的探针，大功率氙灯的整体光通量仍然更具优势。

现状：近年来，高功率多波段 LED 光源正在快速发展，并在一些对穿透深度要求不高的应用中开始取代卤素灯，但在高端的深层组织成像中，卤素灯/氙灯仍是主流。

6.2.3 光纤自发荧光控制

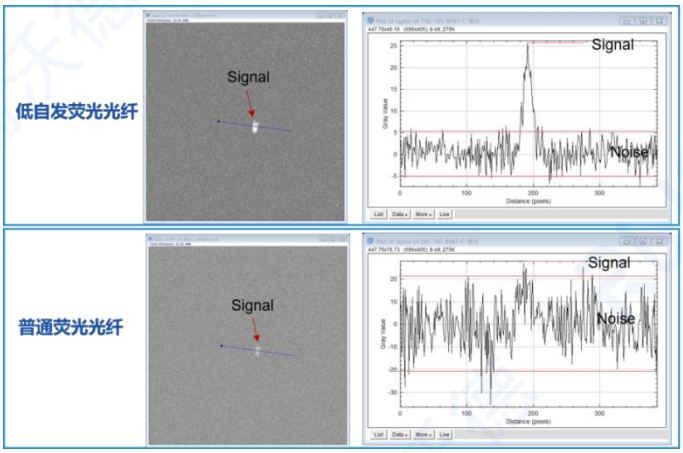


图 29 同一光源下不同荧光光纤的信噪比对比结果

在传输激发光的路上，光纤本身也会发出微弱的荧光，对目标信号造成干扰。采用**超低荧光光纤**能从源头降低这种背景干扰，保证你的荧光信号纯粹无瑕。

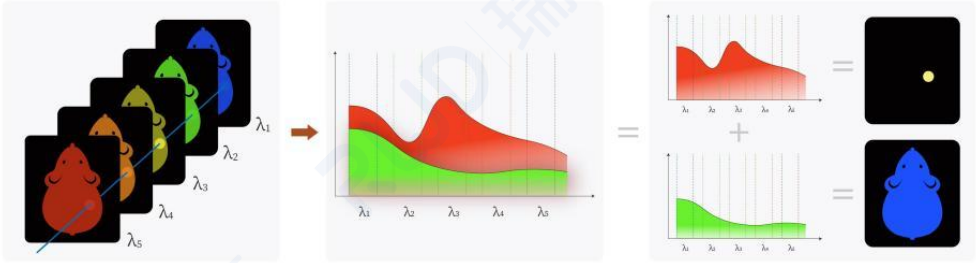
问题所在（普通光纤的缺陷）：普通的光纤在受到激发光（尤其是高能量的紫外或蓝光）照射时，自身会发出微弱的荧光（称为“自体荧光”或“光纤荧光”）。这种荧光会成为背景噪声。

在活体成像中的影响： 小动物体内的荧光信号本身就已经非常微弱，并且经过组织衰减后更是微乎其微。如果用来传输激发光的光纤自身发出的荧光噪声与真实的生物信号强度相当甚至更强，那么真实的信号就会被淹没在噪声中，导致无法检测或数据不准。

超低荧光光纤的解决方案： 这种光纤采用特殊掺杂的石英材料（通常具有极高的纯度和经过优化处理的羟基-OH-含量）和制造工艺，使其在常用的激发波长（如 400-900 nm）下几乎不产生任何自体荧光。

6.3 光谱拆分

现代生物医学研究往往需要同时使用多种探针。但它们的光谱会相互重叠，产生“串色”（Crosstalk）干扰，就像多种颜料混在一起，难以分辨。若不能有效拆分，就难以得到准确的数据。



混合光谱 → 算法分离 → 独立信号

图 30 光谱拆分原理图

光谱拆分的核心是**光谱解卷积（Spectral Unmixing）**。这是一种强大的数学算法，能够将混合光谱中的每个探针的贡献分离出来。一个优秀的算法需要具备准确性、自动化和可追溯性，从而确保多色实验的定量分析可靠性。

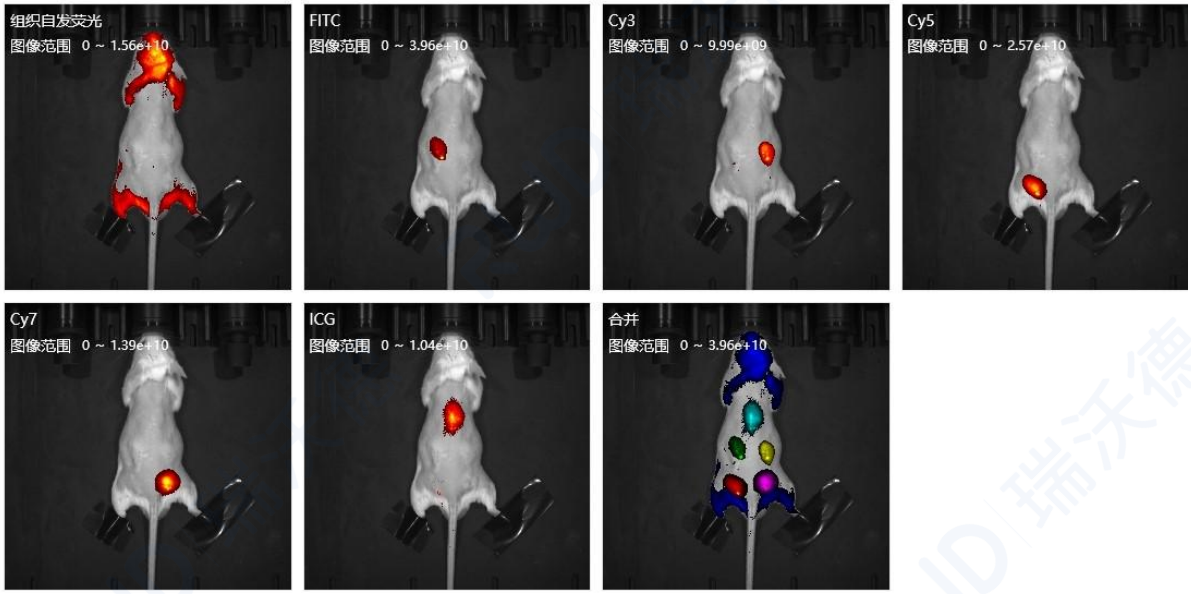


图 31 光谱拆分效果图

6.4 数据校正

在科研实践中，数据的真实性与可靠性是根本要求。高灵敏度成像系统需配备完善的数据校正功能，以有效抑制“假阳性”信号并控制系统误差，确保实验结果的可靠性与可重复性，满足学术发表的高标准要求。

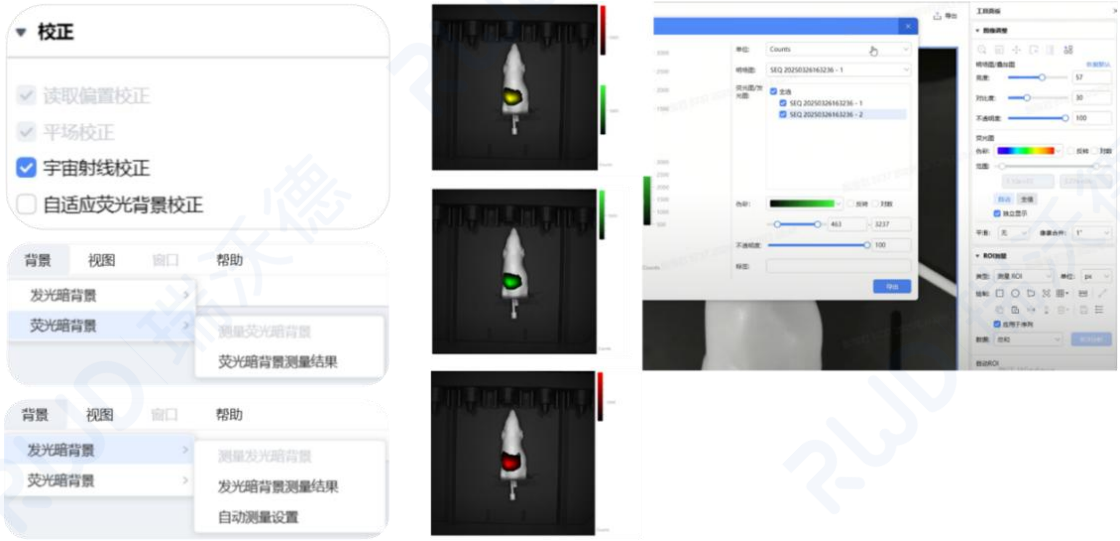


图 32 数据校正功能展示图

深度解析：数据校正在活体成像中不是可选项，而是获得可靠、可重复、可定量科学结论的基石。没有经过严格校正的活体成像数据，其结论往往是可疑的，甚至可能是完全错误的。

活体成像面临的根本挑战是：设备探测到的原始信号（Raw Data）是多种因素的混合体，而非目标生物信号的真实反映。 这些因素包括：

1）非特异性背景：动物自身荧光（皮毛）、仪器噪声等。

2）光子与组织的复杂相互作用：吸收（如血红蛋白对蓝绿光的强烈吸收）和散射，导致信号严重衰减和空间分布扭曲。

3）实验变量的干扰：探针注射剂量、注射效率、动物个体差异（体重、代谢率）等。

4）仪器本身的偏差：光源强度波动、相机像素响应不一致、滤光片效率等。

如果不对这些因素进行校正，直接比较不同时间点、不同动物、不同实验组之间的“原始荧光值”是没有意义的。

数据校正主要分为两大类：**仪器硬件校正**和**生物背景校正**。

6.4.1 仪器硬件校正（确保测量工具本身的准确性）

平场校正（Flat-field Correction）

相机芯片不同像素的灵敏度存在微小差异；镜头边缘可能存在暗角（vignetting），导致图像中心亮、四周暗；光源照明可能不均匀。

重要性：这是进行任何定量分析前必须做的第一步，否则图像不同区域的强度无法直接比较。

暗场校正（Dark-current Correction）

即使没有任何光线进入，相机传感器因热效应也会产生信号，即“暗电流”或“热像素”（Hot Pixels），表现为图像上的固定噪声。这在长曝光时尤其严重。

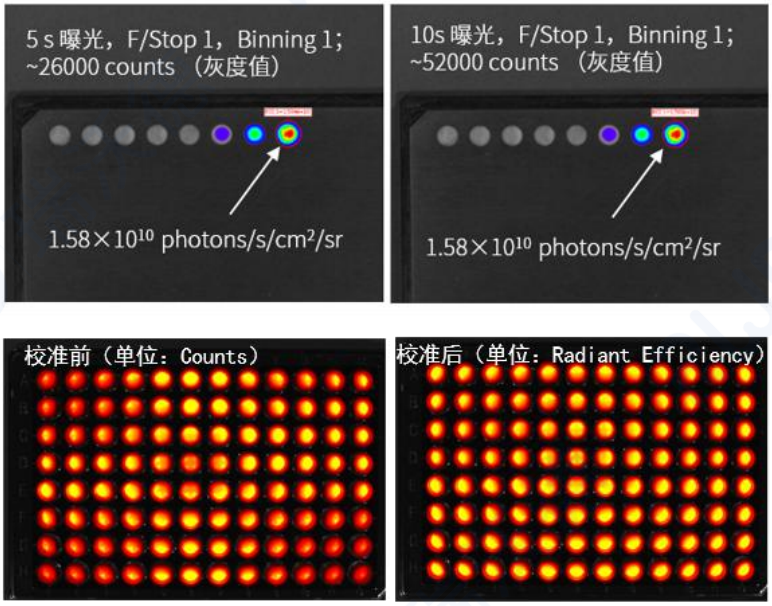
重要性：消除相机本身的热噪声，提高图像的信噪比（SNR），是检测弱信号的关键。

6.4.2 生物背景与定量校正（确保数据反映生物学真相）

背景荧光校正（Background Fluorescence Subtraction）

问题：动物自身组织（如皮肤、毛发、内脏）在激发光照射下会产生非特异性荧光，与探针的特异性信号混合在一起。

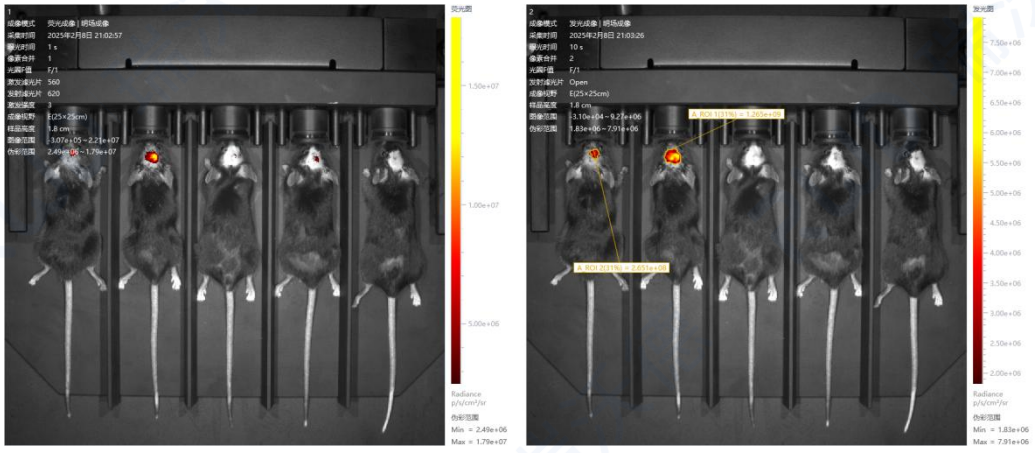
重要性：得到探针的真实净信号。这是计算靶背景比（TBR）的基础。



为保证实验数据可靠且可重复，建议选用内置符合 NIST 标准光源、支持荧光模态激发光均一性校正的小动物活体成像设备，从而实现发光/荧光信号的绝对定量和精准分析。

6.5 高通量设计

现代生物医学研究对实验效率提出了更高要求。一台性能卓越的活体成像系统，应具备高通量能力，以满足大批量样本的快速、连续成像需求，显著提升科研工作效率。



高通量设计体现在多个方面：大成像视野可容纳多只动物，一次采集，大幅节约时间；配备多动物同步麻醉系统，确保操作高效又安全；模块化升级则让设备具有更强的扩展性和更长的使用寿命。

6.6 完善的服务体系

在选择小动物活体成像系统时，大多数科研人会首先关注性能参数（如灵敏度、分辨率）和价格。然而，一个完善的服务体系往往是决定长期科研成败和用户体验舒适度的关键因素，其带来的好处是巨大且深远的。

1）专业且客观的技术咨询

不仅仅是销售产品，而是提供解决方案。优秀的应用专家会根据不同客户的具体研究领域（肿瘤、神经、感染免疫等）、模型（小鼠、大鼠、斑马鱼）、实验需求（生物发光、荧光、X-ray）和预算，推荐最合适的型号和配置，避免您购买“性能过剩”或“性能不足”的设备。

2）深入的售前演示与验证

客户可以直观地看到自己实验样本的成像效果，获得对设备性能的第一手信心，杜绝“参数漂亮，但不实用”的风险。

3）高效可靠的售后响应

提供清晰的本地化支持渠道（电话、邮件、在线客服）、快速的现场响应（如 24-72 小时内上门）和备件供应。

当设备出现故障时，能最小化停机时间。对科研来说，时间就是一切。快速的维修意味着实验进程不被中断，宝贵的动物模型和样品不会因设备宕机而浪费。

参考文献

[1] Fan, Y., Sun, Y., Chang, W., Zhang, X., Tang, J., Zhang, L., & Liao, H. (2018). Bioluminescence imaging and two-photon microscopy guided laser ablation of GBM decreases tumor burden. *Theranostics*, *8*(15), 4072–4085. https://doi.org/10.7150/thno.25357

[2] Jiang, P., Gao, W., Ma, T., Wang, R., Piao, Y., Dong, X., Wang, P., Zhang, X., Liu, Y., Su, W., Xiang, R., Zhang, J., & Li, N. (2019). CD137 promotes bone metastasis of breast cancer by enhancing the migration and osteoclast differentiation of monocytes/macrophages. *Theranostics*, *9*(10),2950–2966.https://doi.org/10.7150/thno.29617

[3] Xie, J., Cao, K., Liu, L., Zhang, L., Yang, Y., Gong, H., & Luo, H. (2025). Mn_3O_4 nanozyme-based anti-inflammatory therapy modulates microglial phenotype by downregulating TLR4/NOX2 expression and further alleviates Alzheimer's disease pathology. *Theranostics*, *15*(15), 7467–7488. https://doi.org/10.7150/thno.112213

[4] Escudé Martinez de Castilla, P., Tong, L., Huang, C., Sofias, A. M., Pastorin, G., Chen, X., Storm, G., Schiffelers, R. M., & Wang, J. W. (2021). Extracellular vesicles as a drug delivery system: A systematic review of preclinical studies. *Advanced drug delivery reviews*, *175*, 113801. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.011

[5] Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T. L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmer, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., Zhang, T., … Lyden, D. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, *527*(7578), 329–335. https://doi.org/10.1038/nature15756

[6] Zheng, W., Zhu, T., Tang, L., Li, Z., Jiang, G., & Huang, X. (2023). Inhalable CAR-T cell-derived exosomes

as paclitaxel carriers for treating lung cancer. *Journal of translational medicine*, *21*(1), 383. https://doi.org/10.1186/s12967-023-04206-3

[7] Yang, Z., Shi, J., Xie, J., Wang, Y., Sun, J., Liu, T., Zhao, Y., Zhao, X., Wang, X., Ma, Y., Malkoc, V., Chiang, C., Deng, W., Chen, Y., Fu, Y., Kwak, K. J., Fan, Y., Kang, C., Yin, C., Rhee, J., … Lee, L. J. (2020). Large-scale generation of functional mRNA-encapsulating exosomes via cellular nanoporation. *Nature biomedical engineering*, *4*(1), 69–83. https://doi.org/10.1038/s41551-019-0485-1

[8] Liu, C., Huang, X., Chen, K. S., Xiong, S., Yaremenko, A. V., Zhen, X., You, X., Rossignoli, F., Tang, Y., Koo, S., Chen, W., Kong, N., Xie, T., Shah, K., & Tao, W. (2025). Systemic reprogramming of tumour immunity via IL-10-mRNA nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 10.1038/s41565-025-01980-7. Advance online publication. https://doi.org/10.1038/s41565-025-01980-7

附录 & 下载资源

小动物活体成像常用探针、底物与核素指南

本指南旨在为客户提供 400–900 nm 波段小动物活体成像（In Vivo Imaging System） 中常用的荧光探针、生物发光底物以及放射性核素的全面信息，并扩展至部分新兴的 NIR-II（1000–1700 nm）探针与多模态探针。

一、常用荧光探针与染料

探针/染料	激发峰 (nm)	发射峰 (nm)	特点与应用
FITC	490	520	最经典绿色荧光染料，常用于抗体/蛋白标记
Cy5	650	670	深部组织成像，组织穿透力较好
Cy7	750	780	近红外窗口，背景低，穿透力强
ICG（吲哚菁绿）	780	810	FDA 批准临床用，安全性高，用于血流、肿瘤成像和淋巴结示踪
Alexa Fluor 系列 (488/594/647/750)	各异	各异	高亮度、高光稳定性，常用于免疫标记
IRDye 800CW	774	789	常用于抗体偶联，临床转化研究应用较多
DiR	748	780	脂溶性，可标记细胞膜/外泌体用于追踪
DiD	644	665	脂质标记，常用于外泌体/细胞示踪
DiI	549	565	神经元/细胞膜染料，常用于示踪
CellTracker 系列	492/577	517/602	细胞长时追踪探针，可随细胞分裂
MitoTracker 系列	490–600	516–650	线粒体特异性染色，活细胞可用
pHrodo 系列	560/640	585/690	pH 依赖信号，研究吞噬/溶酶体功能
ROS 探针（DCFH-DA, DHE）	485	530	检测细胞内 ROS 水平
FRET 探针	双通道	双通道	研究分子间相互作用的动态过程
Activatable 探针 (MMP, Caspase)	各异	各异	被特定酶激活后发光，背景低，信噪比高

二、生物发光常用底物

底物	发光酶系统	发射峰（nm）	特点与应用
D-荧光素（D-Luciferin）	FLuc（萤火虫荧光素酶）	560–620	最常用，ATP 依赖，信号稳定，用于肿瘤负荷/基因表达
AkaLumine-HCl	Akaluc	~650	红移发光，深部组织成像
Coelenterazine（CTZ）	RLuc/GLuc	480–510	ATP 独立，蓝光，信号衰减快，适合动态浅表成像
Cypridina Luciferin	VLuc	~460	蓝光，海洋生物来源，多用于体外实验
Benzothiophene luciferin（BtLuc）	FLuc 变体	600–650	红移，提升深部组织灵敏度
Furimazine	NanoLuc	~460	亮度极高，比传统底物亮数百倍，适合微弱信号检测
h-Coelenterazine	RLuc8/Antares	560–580	改良 CTZ，信噪比更高
DeepBlueC	RLuc	400–460	蓝光，用于 BRET 体系
Vargulin	VLuc	460	海洋来源，ATP 独立，背景低
NanoLuc-BRET（NanoLuc+荧光团）	NanoLuc	460→600–700	通过能量转移实现红移，提高深部成像能力

三、活体放射性核素与切伦科夫成像（CLI）

放射性核素	半衰期	CLI 发射范围 (nm)	特点与应用
^{18}F（FDG 等）	110 min	500–700	最常用 PET 核素，可实现 PET/CLI 双模态
^{64}Cu	12.7 h	500–750	半衰期适中，适合抗体标记
^{131}I	8 d	500–700	治疗核素，β 粒子产生 CLI 信号
^{90}Y	2.7 d	500–750	高能 β 发射，常用于肿瘤治疗探针
^{68}Ga	68 min	500–700	短半衰期，适合小肽探针
^{177}Lu	6.6 d	500–750	治疗核素，也可通过 CLI 监测
^{211}At	7.2 h	500–700	α 发射体，有治疗与成像潜力
^{99m}Tc	6 h	500–700	常用 SPECT 核素，已探索 CLI 应用
^{125}I	60 d	500–650	长期标记，低能 γ 发射，可用于 CLI

四、多模态探针与特殊功能探针

探针类别	代表性探针	激发峰/发射峰（nm）	特点与应用
光声/荧光双模探针	ICG-纳米颗粒，IR780	780/810	荧光+光声，兼具灵敏度与分辨率，适合肿瘤血管成像
磁共振/荧光双模探针	SPIO-ICG	780/810	结合 MRI 高分辨率与 NIRF 高灵敏度
放射性/荧光双模探针	^{64}Cu-ICG	PET（511 keV）/ 810 nm	PET 高灵敏+荧光实时定位，术前/术中结合
pH/氧敏探针	Pt(II)-porphyrins，Ru(II) complexes	400–450/600–700	对缺氧或酸性环境敏感，可反映肿瘤或缺血状态
生物响应性探针	Caspase-3/7 活化探针	~500/600	特定酶激活后发光，低背景，监测细胞凋亡

五、新兴与特殊应用探针

探针/染料	激发峰（nm）	发射峰（nm）	特点与应用
量子点（QDs）	400–600	500–800（可调）	亮度极高，光稳定性好，多色成像；缺点：潜在毒性
近红外二区（NIR-II）探针	808/980	1000–1700	穿透深，信噪比高，适合脑/肝深层成像
遗传编码荧光蛋白（iRFP720，mCherry）	690 / 587	720 / 610	可通过基因工程稳定表达，长期示踪，无需注射
光热/荧光一体化探针（Au 纳米棒，CuS 纳米粒）	750–800	800–850	兼具光热治疗和荧光成像功能
光动力/荧光一体化探针（ICG 高剂量，卟啉类）	630–780	650–810	同时具备光动力治疗与荧光导航能力
ATP 探针（ATeam，FRET 型）	CFP/YFP 对	480/530	基于 FRET，实时监测 ATP 浓度变化
膜电位探针（DiBAC4(3)，RH414）	480–530	520–600	随膜电位变化信号可逆，用于神经活动成像
离子探针（Fluo-4，SBFI）	494 / 340	516 / 505	钙/钠离子特异性探针，常用于神经科学

六、探针制备与应用注意事项

类别	关键注意事项与建议
探针选择	匹配波长（滤光片/光源）、高效偶联、生物相容性
给药方式	IV 最常用；IP 吸收慢；SC 局部成像；PO 主要用于消化道
成像过程	稳定麻醉（Isoflurane）；注射前背景扣除；合理曝光避免饱和
数据分析	ROI 定量；多模态配准；时间点动态分析

瑞沃德“从活细胞到活体洞察”全流程解决方案

瑞沃德旨在为客户提供从活细胞到活体的全流程解决方案，目前我们具有一条始于单细胞纯度、终于机制验证的完整产品证据链。

溯源起点：单细胞悬液制备仪以及磁珠分选系统精准分选，确保研究纯度

一切始于最纯净的“种子”。单细胞悬液制备仪和磁珠分选系统以其温和、高效、高存活率的特性，为您精准分选出目的细胞群（如特定类型的干细胞、CAR-T 细胞、循环肿瘤细胞或转染后细胞）。这份无可挑剔的“纯”度，是您所有后续数据可靠性、可重复性的根本保证。

动态洞察：活体成像实时追踪，揭示细胞命运

将分选后的纯净细胞回输或移植后，我们的活体成像系统便成为您的“时空望远镜”。它可对这些细胞进行无创、动态、定量的长期监测，实时揭示细胞在活体环境中的归巢、增殖、分布、代谢及细胞间相互作用等全过程，将生命动态尽收眼底。

终极验证：精准切片与多组学分析，解密分子机制

解决方案的智能核心，能将活体成像中捕获的“信号热点”精准映射至解剖位置。指导您使用全自动切片机对目标组织进行精确取样，进而通过超高分辨率的免疫荧光、多重免疫组化、空间转录组等分析，在微观层面为活体现象提供最终的“机制性注解”和形态学证据。



扫描二维码即可申请免费试用

深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司

地址：深圳市南山区西丽街道西丽社区打石一路深圳国际创新谷七栋 A 座 1901 房 (A 座 9 层、19 层、20 层，D 座 9 层)

电话：400-966-9516　售前邮箱：rwd@rwdls.com　售后邮箱：service@rwdls.com　官网：www.rwdls.com