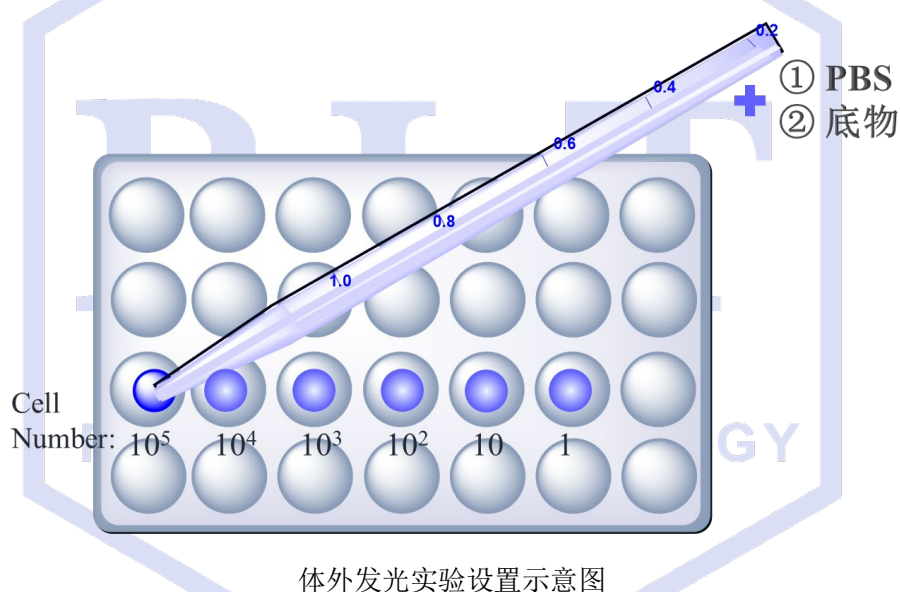


分别表达三种酶的 B16F10 细胞体内外发光测试

1. 实验设置：

- 酶类型：B16F10-FLuc；B16F10-AkaLuc；B16F10-NanoLuc；
- 细胞母液：100 万个/mL；
- 细胞浓度梯度： 1×10^5 个/mL、 1×10^4 个/mL、 1×10^3 个/mL、 1×10^2 个/mL、 1×10 个/mL
- 底物类型：D-荧光素钾盐；Akalmine 盐酸盐；Furimazine；
- 底物母液摩尔浓度：D-荧光素钾盐 (100 mM)；Akalmine 盐酸盐 (10 mM)；Furimazine (1 mM)



2. 体外实验测试

2.1 实验步骤：

- 1、将细胞母液稀释得到不同浓度的细胞稀释液： 1×10^5 个/mL、 1×10^4 个/mL、 1×10^3 个/mL、 1×10^2 个/mL、 1×10 个/mL，然后分别取 100 μ L 加入到细胞孔板中，得到每孔细胞数量为 1×10^4 个、 1×10^3 个、100 个、10 个、1 个；
- 2、然后加入底物和 PBS 混匀；（本实验 FLuc、AkaLuc 和 NanoLuc 体系均不需要加入 ATP），每组孔板物质的添加量如下表：



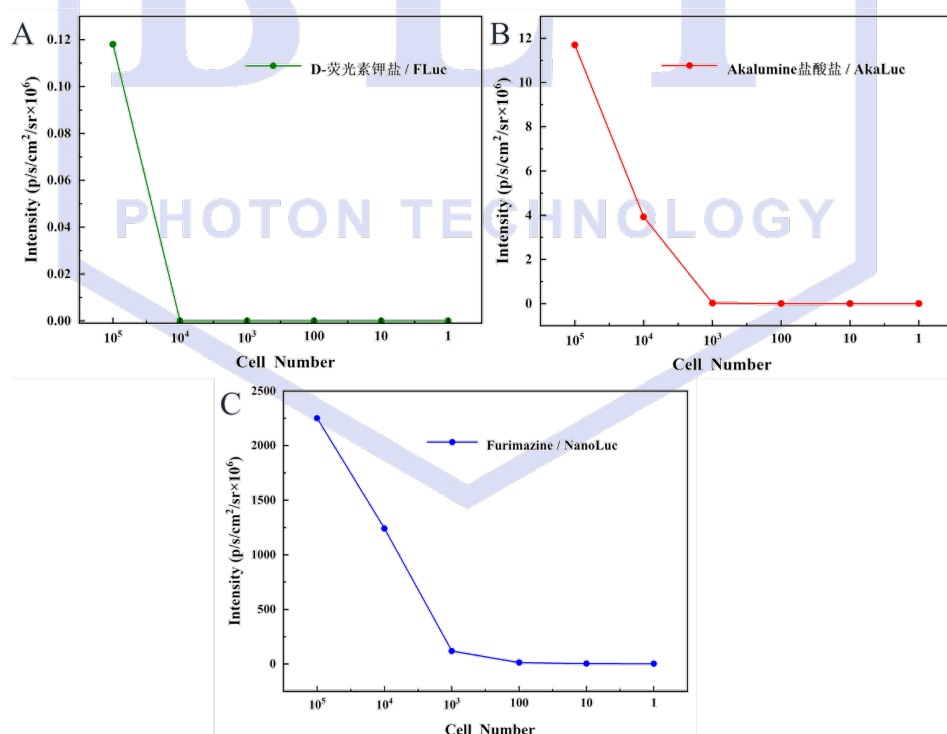
细胞数量	10^5	10^4	10^3	100	10	1
细胞体积	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L
底物	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
PBS	98 μ L	98 μ L	98 μ L	98 μ L	98 μ L	98 μ L

3、发光成像：三种体系在 AniViewPhoenix 成像设备中生物发光设置相同参数，分别成像；

4、数据处理：圈出发光信号面积取值导出；绘制三种体系在细胞浓度梯度下的信号曲线图；比较在信号接近情况下不同体系所需的细胞数量和底物浓度。

2.2 实验结果分析：

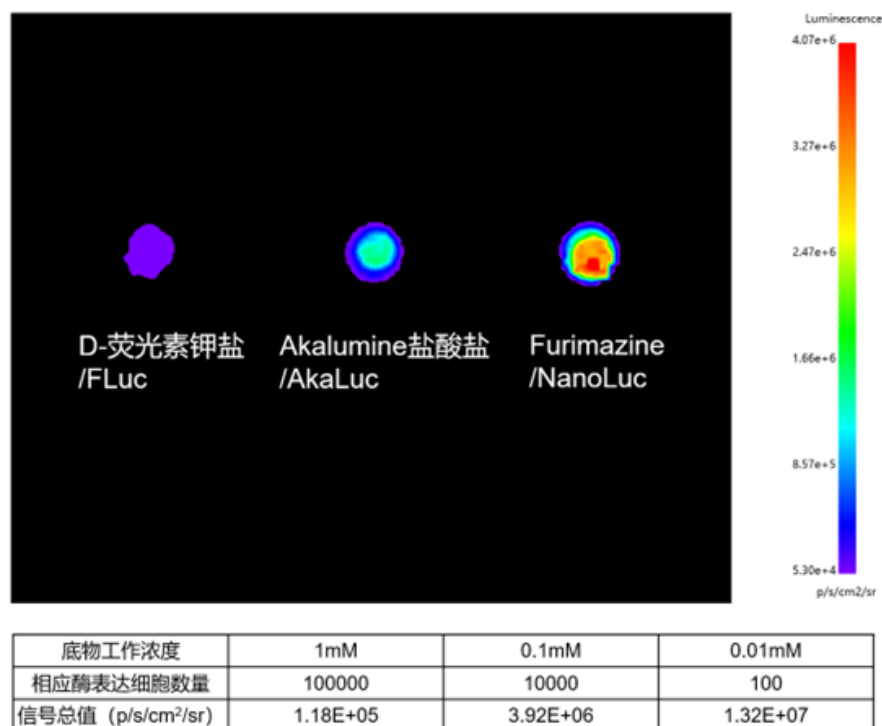
● 细胞浓度梯度信号曲线比较：



(A) 细胞浓度梯度下的 D-荧光素钾盐/FLuc 体系生物发光；(B) 细胞浓度梯度下的 Akalumine 盐酸盐/AkaLuc 体系生物发光；(C) 细胞浓度梯度下的 Furimazine/NanoLuc 体系生物发光；

D-荧光素钾盐/FLuc 体系只有在细胞数量 10^5 个才检测到较低的信号， 10^4 个以下细胞都不能检测出信号。Akalumine 盐酸盐/AkaLuc 体系在细胞数量 10^5 个能检测到较高的信号，在细胞数量 1000 个以下就不能检测到信号了，并且随着细胞数量的下降，信号下降的幅度也很大。而 Furimazine/NanoLuc 体系在细胞数量 10^5 个的条件下检测到很高的信号，而最低细胞数量去到一个的时候也能检测到十的六次方的信号强度，并且随着细胞数量的减少，信号下降的速率较慢。

● 信号接近情况下不同体系所需的细胞数量和底物浓度比较：



D-荧光素钾盐/FLuc 体系的底物工作浓度为 1 mM，细胞数量在 10^5 的条件下的信号总值与 Akalumine 盐酸盐/AkaLuc 体系的工作浓度为 0.1 mM，细胞数量为一千个时以及 Furimazine-NanoLuc 体系的工作浓度为 0.01 mM，细胞数量为一百的时候的信号总值是接近的，说明 Furimazine/NanoLuc 体系不管在底物使用量以及细胞数量上相比前面两个体系都是更低然后能呈现出相同或者更好的信号，底物使用量的减少能够降低使用的成本，细胞数量的减少使检测更加的灵敏。

3. 体内实验测试

3.1 实验步骤：

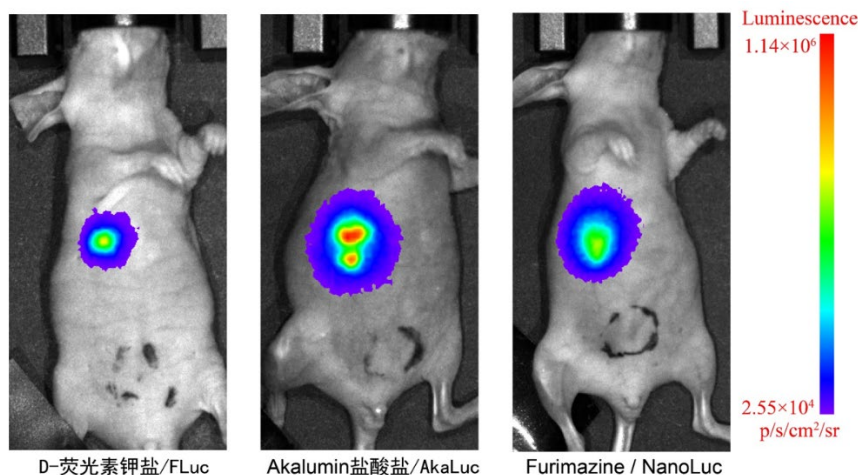
- 1、小鼠皮下注射肿瘤细胞母液（ 10^5 个/mL）100 μ L，里面含有约 10^4 个细胞



- 2、腹腔注射底物 100 μL (D-荧光素钾盐 (100 mM); Akalumine 盐酸盐 (10 mM); Furimazine (1 mM))
- 3、三个体系分别做动力学实验，最后在信号峰值处比较。

3.2 实验结果分析：

● 体内峰值发光检测比较：



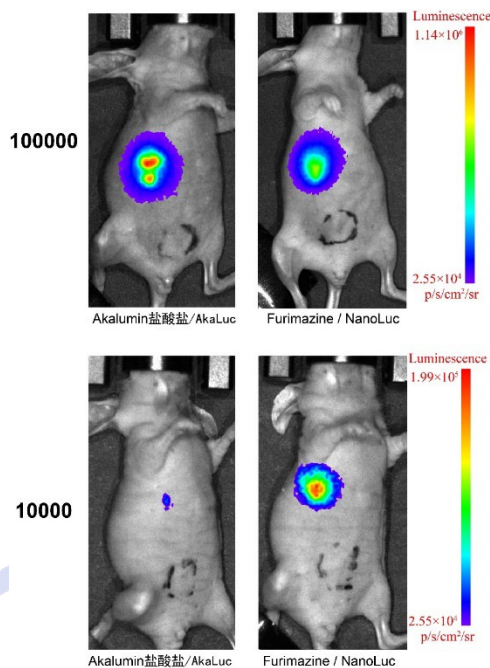
底物工作浓度	100mM	10mM	1mM
相应酶表达细胞数量	五十万	十万	十万
信号总值 (p/s/cm ² /sr)	9.42E+05	3.46E+06	3.30E+06

各体系发光信号峰值比较图

由于 D-荧光素钾盐/FLuc 体系细胞数量在十万个的时候没有检测出信号，所以该体系使用五十万细胞数量的信号检测结果，同样可以看到 D-荧光素钾盐/FLuc 体系需要高浓度以及细胞数量更高时的信号才能与 Akalumine 盐酸盐/AkaLuc 体系、Furimazine-NanoLuc 体系体系接近。而 Furimazine-NanoLuc 体系在细胞数量相同，底物工作浓度是 Akalumine 盐酸盐的 0.1 倍的情况下，信号依旧与 Akalumine 盐酸盐/AkaLuc 体系基本一样，说明 Furimazine-NanoLuc 体系体内成像效果也是最好的。

● 体内发光进一步检测：





底物工作浓度	10mM	1mM
相应酶表达细胞数量	十万	十万
信号总值 (p/s/cm²/sr)	3.46E+06	3.30E+06
信号最大值 (p/s/cm²/sr)	1.14E+06	6.69E+05
相应酶表达细胞数量	一万	一万
信号总值 (p/s/cm²/sr)	1.98E+04	6.62E+05
信号最大值 (p/s/cm²/sr)	5.54E+04	1.19E+05

前面从体外实验的细胞浓度信号曲线可以知道 Akalumine 盐酸盐/AkaLuc 体系的信号随着细胞数量的减少下降得很快，所以进一步对 Akalumine 盐酸盐/AkaLuc 体系和 Furimazine-NanoLuc 体系检测更少细胞数量时的信号情况，果然结果和体外实验一致，在一万个细胞数量的情况下，Akalumine 盐酸盐/AkaLuc 体系已经几乎检测不出信号，而 Furimazine-NanoLuc 体系依旧能检测到较强信号，并且与十万个细胞数量时的信号差距不大，说明 Furimazine-NanoLuc 体系随着细胞数量减少，信号强度变化的要比其他两个体系要小得多，变化幅度较小且稳定，有利于实验的开展。

