

Sinh khả dụng của luciferin trên chuột trong quá trình tạo ảnh trong cơ thể

Luciferin bioavailability in mice during in-vivo imaging

Arnaud Pillon¹, Philippe Gauthier², Mathieu Seimandi¹, André Pèlerin², Françoise Vignon¹, Patrick Balaguer¹, Jean-Claude Nicolas¹, Wolfgang Schäfer³ and Manfred Hennecke³

Tóm tắt

Abstract

Gen chỉ thị được sử dụng phổ biến để giám sát mức độ biểu hiện gen trong những thí nghiệm tiến hành trong và ngoài cơ thể. Công nghệ này cho phép quan sát không can thiệp biểu hiện gen mà không phải xâm phạm tới con vật. Mô hình phát quang sinh học dựa trên biểu hiện gen luciferase đã trở thành những công cụ hữu ích dùng trong đánh giá hiệu suất điều trị ung thư và vai trò của các thụ thể mà các tế bào ung thư dùng để tấn công và nhân lên trong cơ thể.

Reporter genes are widely used for monitoring gene expression in in vitro and in vivo assays. This technology enables non-invasive visualization of gene expression in intact animals. Bioluminescent models based on luciferase gene expression have become useful tools for evaluating cancer treatment efficiencies and the role of receptors in invasion and proliferation.

Ánh sáng phát ra từ phản ứng oxy hóa quang sinh học luciferin trong điều kiện phản ứng có ATP, magiê và oxy có thể dễ dàng phát hiện và định lượng nhờ bộ máy ảnh cảm biến lạnh (CCD) tích hợp trong hệ tạo ảnh NightOWL LB 981 NC 100 chế tạo theo Công nghệ BERTHOLD.

The light resulting from the bioluminescent oxidation of luciferin in the presence of ATP, magnesium and oxygen can be easily detected and quantified with a cooled chargecoupled device (CCD) camera, like the NightOWL LB 981 NC 100 system from BERTHOLD TECHNOLOGIES.

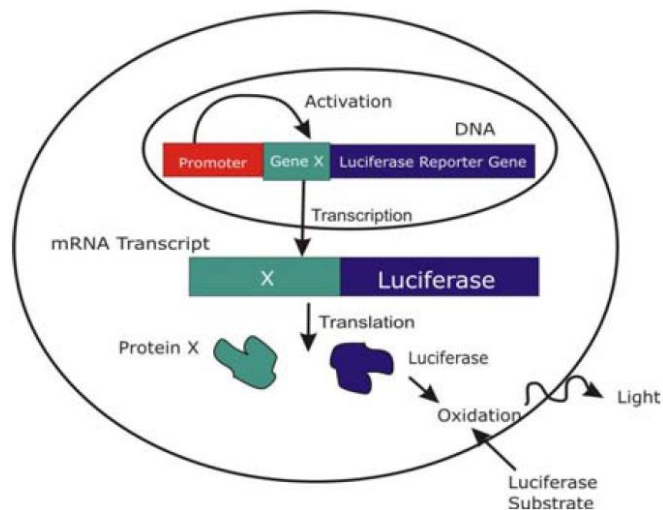
¹ISERM Unité 540, UM I, Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire de Cancers, 34090 Montpellier, France

²ISERM EMI 0227 – CRLC Val d'Aurelle – Paul Lamarque, 34298 Montpellier, France

³BERTHOLD TECHNOLOGIES GmbH & Co. KG, 75323 Bad Wildbad, Germany

Những ưu điểm của thí nghiệm luciferase phải kể đến như độ nhạy cao, đa phần các dòng tế bào đều không có enzym luciferase hoạt động, khoảng hoạt động rộng, mau lẹ và chi phí thấp. Gen chỉ thị phổ biến và linh hoạt nhất là luciferase có nguồn gốc từ đom đóm Bắc Mỹ *Photinus pyralis* với phản ứng sáng có hiệu suất lượng tử cao nhất. Enzym này ở trạng thái hoạt động mà không cần biến đổi protein hậu dịch mã. Ở nồng độ thích hợp tạo ảnh phát quang sinh học, D-luciferin là một chất không độc hại hay không gây ra đáp ứng miễn dịch vậy nên thao tác khảo sát hình ảnh có thể được tiến hành lần lượt trên một con vật duy nhất. Sau khi được tiêm vào chuột, D-luciferin đi qua màng tế bào và đâm xuyên qua hàng rào máu não chưa bị tác động cũng như hàng rào nhau thai. Việc này cho phép protein chỉ thị được ghi ảnh lại ở bất kỳ vị trí giải phẫu nào. Kỹ thuật này không gây phương hại cho con vật nên nhiều nghiên cứu ghi ảnh tuần tự có thể được tiến hành chỉ với một con vật duy nhất.

The advantages of a luciferase assay are the high sensitivity, the absence of luciferase activity inside most of the cell types, the wide dynamic range, rapidity and low costs. The most versatile and common reporter gene is the luciferase of the North American firefly Photinus pyralis with the highest quantum efficiency of the light reaction. The protein requires no posttranslational modification for enzyme activity. At the concentrations used for bioluminescence imaging, D-luciferin is non-toxic and non-immunogenic, and so serial imaging examinations can be performed with the same mouse. D-luciferin crosses cell membranes and penetrates the intact blood-brain barrier in addition to placental barriers after injection in mice, allowing this reporter protein to be imaged in any anatomic site. As the technique does not harm the animals, multiple sequential imaging studies in the same animal are possible.



Hình 1. Nguyên lý hoạt động của Thí nghiệm Gen Chỉ thị. Vùng khởi động kích hoạt quá trình phiên mã của gen X và chỉ thị kế bên trong nhân tế bào. Sau khi được dịch mã, enzym luciferase sẽ xúc tác phản ứng biến Luciferin (cơ chất của Luciferase) và ATP thành oxyluciferin và ánh sáng.

Figure 1. Principle of Reporter Gene Assays. The promoter activates the transcription of gene X and the close luciferase reporter in the cell nucleus. After translation the luciferase enzyme will catalyse the reaction of Luciferin (luciferase substrate) and ATP to oxyluciferin and light.

Thao tác tiến hành thí nghiệm

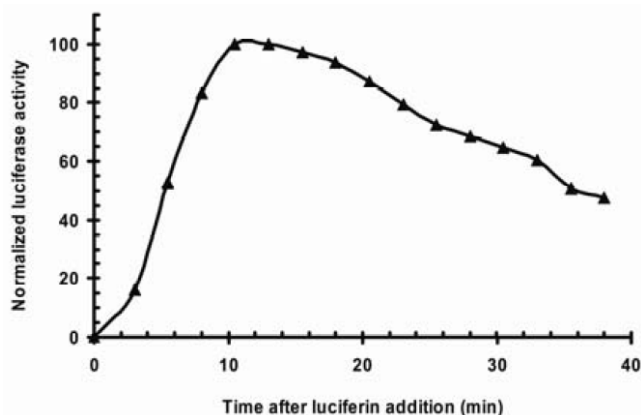
Experimental Procedure

Biểu hiện của luciferase thường được phân tích sau khi tiêm luciferin dưới bụng. Nồng độ D-luciferin sử dụng trong kỹ thuật tạo hình ảnh trong cơ thể thường rơi vào ngưỡng từ 120 mg/kg cho tới 225 mg/kg khối lượng cơ thể chuột. Do độ phát quang sinh học đo trong cơ thể thường biến thiên theo thời gian sau tiêm và liều lượng luciferin, vậy nên hai đại lượng này thường được duy trì không đổi trong thí nghiệm ghi ảnh tuần tự trên một con vật duy nhất (Burgos và cộng sự). Chỉ khi ở trong các điều kiện không đổi thì việc so sánh các kết quả định lượng mới có ý nghĩa.

Usually luciferase expression is analyzed after intraperitoneal luciferin injection. Concentrations of D-Luciferin used for in vivo imaging are between 120 mg/kg up to 225 mg/kg bodyweight in mice. Since the magnitude of bioluminescence measured in vivo varies with time after luciferin injection, as well as with dose, time after injection and dose of D-luciferin have to be kept constant in the sequential imaging experiences with the same animals (Burgos et al.). Only under constant conditions comparison of the quantitative results are possible.

Để xác định hoạt động tối ưu của luciferase, thí nghiệm thời gian phát hiện và thời gian diễn ra phản ứng được tiến hành. Ảnh được ghi lại tuần tự kể từ sau khi tiêm luciferin (125 mg/ kg khối lượng cơ thể) cứ khoảng 2 phút một lần. Tín hiệu phát quang sinh học cực đại được ghi nhận 10 phút sau khi tiêm và duy trì ổn định trong vòng 10 phút tiếp theo.

To determine the optimal luciferase activity detection time, time course experiments were performed. Serial pictures were taken at different time intervals following luciferin injection (125 mg/kg bodyweight) roughly every 2 min. (Fig. 2). Maximal bioluminescent signal was obtained about 10 min after injection and remained stable during 10 more minutes.

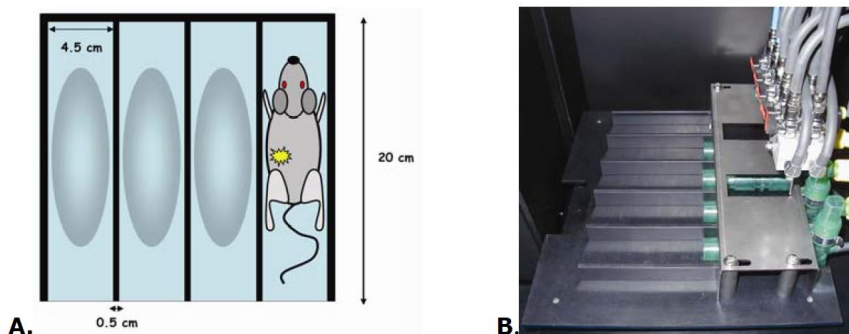


Hình 2. Ánh sáng phát ra từ tế bào LSCL+N đã được xử lý với luciferin được ghi nhận trong cơ thể theo tham chiếu thời gian. Dữ liệu thu được sau khi cấy dưới da chuột trại lông cái Thụy Sĩ dòng tế bào LSCL+N. Chuột được gây mê để tiêm luciferin dưới màng bụng. Sau 2 phút tạo ảnh bằng máy ảnh CCD, dữ liệu được truy xuất bằng phần mềm WinLight (CÔNG NGHỆ BERTHOLD). Đường cong biểu diễn đơn vị ánh sáng đã được chuẩn hóa tại mỗi thời điểm ghi kết quả bằng việc coi giá trị cực đại là 100.

Figure 2. Time course of *in vivo* light emission from luciferin-treated LSCL+N cells. Data were obtained after subcutaneous implantation of LSCL+N cells in female Swiss nude mice. Mice were anesthetized and luciferin was ip injected. After 2 min imaging with CCD camera, data were extracted using WinLight software (BERTHOLD TECHNOLOGIES). The curve represents the normalized light units at each point measured by taking maximum value as 100.

Để tiến hành những nghiên cứu sâu hơn đòi hỏi thí nghiệm thực hiện trên nhiều con chuột cùng lúc, hệ NightOWL LB 981 NC 100 (Công nghệ BERTHOLD) được tích hợp với hệ thống gây mê từ TEM (Bordeaux) cho phép ghi ảnh chuột kết hợp cùng với thiết bị cố định kiểm soát thân nhiệt con vật được bố trí bên trong thiết bị (Hình 3).

To perform further studies with several mice simultaneously, NightOWL LB 981 NC 100 system (BERTHOLD TECHNOLOGIES) was coupled with an anaesthesia system from TEM (Bordeaux) that allow mice imaging in combination with a temperature controlled mice holder in the inner of the instrument (Fig.3).

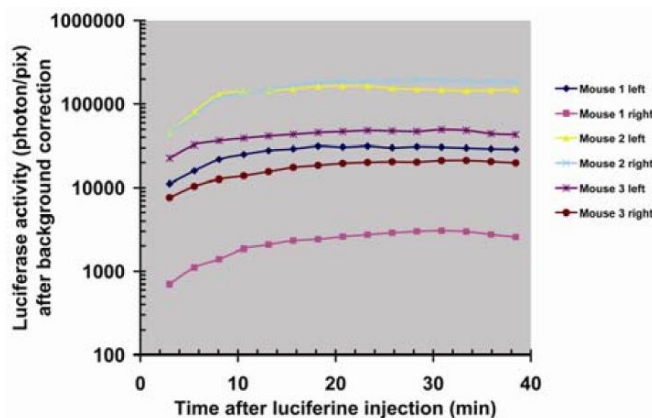


Hình 3. Thiết bị cố định chuột NightOWL NC 100. Bản thảo thiết bị cố định chuột được minh họa bởi INSERM U 540, Montpellier, Pháp (A) và sản phẩm cuối cùng được hoàn thiện bởi các kỹ sư của BERTHOLD TECHNOLOGIES.

Figure 3. NightOWL NC 100 mice holder. Schematic view (A) of the mice holder was made by INSERM U 540, Montpellier, France and the realization of the final product was achieved by BERTHOLD TECHNOLOGIES engineers (B).

Hệ thống gây mê này cho phép chúng tôi tiến hành đo động năng của phân bố luciferin trên 1 tới 4 con chuột cùng một lúc. Để làm được điều này, chúng tôi sử dụng chế độ chuyển đổi tuần tự của phần mềm WinLight để ghi nhận sự xuất hiện của tín hiệu phát quang sinh học như Hình 4 cho thấy.

This anesthesia system allowed us to perform kinetic of luciferine distribution within 1 to 4 mice simultaneously. For this purpose, we used the sequence acquisition mode of WinLight software to follow the apparition of the bioluminescent signal as shown in Figure 4.

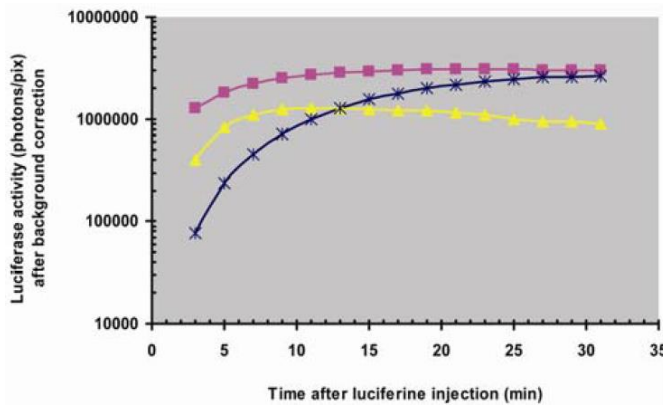


Hình 4. Ánh sáng phát ra từ chuột được xử lý luciferin theo tham chiếu thời gian. Dữ liệu thu được sau khi cấy dưới da chuột trụ lông cái Thụy Sĩ dòng tế bào phát quang sinh học. Chuột được gây mê để tiêm luciferin dưới da. Cứ mỗi 2 phút chuột được ghi ảnh bằng chế độ chuyển đổi và dữ liệu được truy xuất bằng phần mềm WinLight (CÔNG NGHỆ BERTHOLD).

Figure 4. Time course of in vivo light emission from luciferin-treated mice. Data were obtained after subcutaneous implantation of bioluminescent cells in female Swiss nude mice (two implantations per mice: left flank and right flank). Mice were anesthetized and luciferin was subcutaneously injected. Mice were imaged using acquisition mode within a 2 min period and data were extracted using WinLight software (BERTHOLD TECHNOLOGIES).

Ở đa phần thời điểm, động năng của enzym tương đương nhau nhưng chúng tôi nhận thấy một số biến đổi, phần lớn là do sự phân bố luciferin khác nhau phụ thuộc vào vị trí tiêm (dưới màng bụng hoặc dưới da). Hình 5 cho thấy ba dạng động năng khác nhau mà chúng tôi ghi nhận được.

Most of the time kinetic was similar but we have noted some variation mostly due to luciferin distribution that depends on injection (either intraperitoneal or subcutaneous injection). Figure 5 showed three different kinetic often obtained.

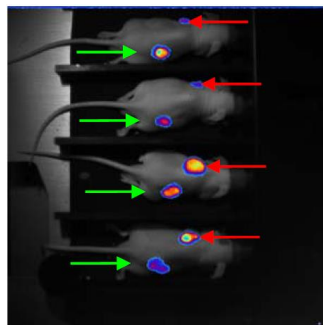


Hình 5. Ba đường biểu diễn ánh sáng phát ra từ chuột bị xử lý luciferin theo tham chiếu thời gian. Dữ liệu thu được sau khi cấy dưới da chuột trụ lông dòng tế bào phát quang sinh học. Chuột được gây mê để tiêm luciferin dưới da. Cứ mỗi 2 phút chuột được ghi ảnh bằng chế độ chuyên đổi và dữ liệu được truy xuất bằng phần mềm WinLight (CÔNG NGHỆ BERTHOLD).

Figure 5. Three different time courses of *in vivo* light emission from luciferin-treated mice. Data were obtained after subcutaneous implantation of bioluminescent cells nude mice. Mice were anesthetized and luciferin was subcutaneously injected. Mice were imaged using acquisition mode within a 2 min period and data were extracted using WinLight software (BERTHOLD TECHNOLOGIES).

Cả ba đường biểu diễn này đều rất khác biệt. Mô hình hay ghi nhận được là đường biểu diễn màu vàng có tín hiệu phát quang sinh học cực đại đạt được 10 phút sau khi tiêm và duy trì ổn định trong suốt 10 phút tiếp theo và giảm dần sau đó. Nhưng đôi khi, tín hiệu được duy trì ổn định trong hơn 30 phút (đường biểu diễn màu tím) hay có thể mất tới hơn 30 phút luciferase mới có thể đạt được mức hoạt động cực đại (đường biểu diễn màu xanh). Thí nghiệm này chỉ ra rằng kiểm soát hoạt động của enzym xuyên suốt thời gian diễn ra phản ứng là rất cần thiết. Để làm được điều này, chế độ chuyển đổi tuần tự được sử dụng để làm giảm sự đa dạng tín hiệu trong những phép đo in vivo. Sinh khả dụng của luciferin trong con vật có thể khác nhau ở các thí nghiệm khác nhau. Để hạn chế vấn đề này, chúng tôi đã sử dụng những tế bào luôn biểu hiện luciferase ổn định làm đối chứng nội. Chuột được ghép mô dưới da ở hai vị trí (phải và trái) như thấy ở Hình 6.

Those three patterns were very different. The yellow curve in which the maximal bioluminescent signal was obtained about 10 min after injection and remained stable during 10 more minutes and when decreased, was the more often obtained. But sometimes, the signal remained stable during more than 30 minutes (red curve) or it took more than 30 minutes to reach the maximum luciferase activity (blue curve). This experiment point out the necessity to perform time courses using the sequence acquisition mode to reduce signal variability of in vivo measurements. The bioavailability of luciferin within the animal could be different from an experiment to another. To avoid this problem, we have used constitutive luciferase expressing cells as an internal standard. Mice were subcutaneously double grafted (right and left flanks) as shown in figure 7.

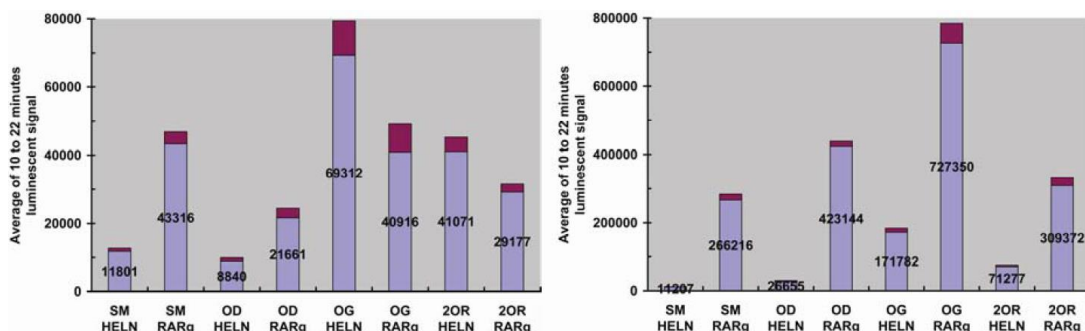


Hình 6. Cấy tế bào cần kích hoạt và tế bào biểu hiện sẵn làm đối chứng nội. Bốn con chuột được ghép dưới da (tế bào biểu hiện ổn định tín hiệu phát quang (tế bào HELN) ở mạn sườn trái (mũi tên đỏ) và tế bào biểu hiện tín hiệu phát quang khi được kích hoạt bằng retinoid (RAR γ) ở mạn sườn phải (mũi tên xanh).

Hình 6. *Implantation of inducible and constitutive cells as an internal standard. Four mice subcutaneously double grafted with cells expressing a constitutive luminescent signal (HELN cells) on their left flank (red arrows) and with cell expressing a retinoid inducible luminescent signal (RAR γ) on their right flank (green arrows).*

Chuột được ghi ảnh bằng chế độ tuần tự trước và sau khi kích hoạt tế bào cần gây kích hoạt bằng phối tử phù hợp (chất chủ vận) 16 tiếng. Phối tử này được cho chuột uống bằng đường miệng. Tín hiệu phát quang trong khoảng thời gian từ 10 đến 22 phút được tính giá trị trung bình cho từng khối u và tổng hợp lại ở Hình 7 và bảng bên dưới.

Mice were imaged using the sequential mode before and after 16 hours induction by a ligand of the inducible cells (retinoid agonist) administered orally. Averages of luminescent signal between 10 and 22 minutes were calculated for each tumor and reported in figure 7 and table below.



	Cells	Basal luminescent values (photon/pix)	Inducted luminescent values (photon/pix)	Induction simple	Induction corrected
Mouse 1 (SM)	Constitutive (HELN)	11801	11207	0.95	6.47
	Inducible (RAR γ)	43316	266216	6.15	
Mouse 2 (OD)	Constitutive (HELN)	8840	26655	3.02	6.48
	Inducible (RAR γ)	21661	423144	19.53	
Mouse 3 (OG)	Constitutive (HELN)	69312	171782	2.48	7.17
	Inducible (RAR γ)	40916	727350	17.78	
Mouse 4 (2OR)	Constitutive (HELN)	41071	71277	1.74	6.11
	Inducible (RAR γ)	29177	309372	10.60	

Hình 7. Giá trị trung bình của tín hiệu phát quang. Bốn con chuột được ghi hình bằng cách sử dụng chế độ tuần tự trước và sau khi kích hoạt tế bào cần gây kích hoạt bằng phối tử (chất chủ vận retinoid) được cho chuột hấp thụ bằng đường uống. Giá trị trung bình của tín hiệu phát quang được tính trong khoảng thời gian từ 10 tới 22 phút. HELN là tế bào luôn biểu hiện luciferase ổn định và RAR γ là tế bào biểu hiện luciferase khi được kích hoạt bởi retinoid. Tác nhân kích hoạt được tính theo và không theo chuẩn hóa bởi tế bào luôn biểu hiện.

Hình 7. Averages of luminescent signal. Four mice were imaged using the sequential mode before and after 16 hours induction by a ligand of the inducible cells (retinoid agonist) administered orally. Averages of luminescent signal between 10 and 22 minutes were calculated. HELN were constitutive luciferase expressing cells and RAR γ were retinoid luciferase inducible cells. Induction factor were calculated with or without constitutive cells correction.

Nếu không chuẩn hóa, mức độ được kích hoạt của tế bào cần kích hoạt bởi retinoid là 6.15, 19.53, 17.78 và 10.60 lần lượt ở bốn con chuột. Kết quả này đưa ra các giá trị rất hỗn tạp và điều này có thể gây ra từ những sai khác trong thao tác tiêm luciferin và sinh khả dụng của hợp chất này cũng như khả năng nhân lên của tế bào. Sử dụng đối chiếu nội làm căn cứ để chuẩn hóa đưa ra các kết quả mức độ được kích hoạt lần lượt là 6.47, 6.48, 7.17 và 6.11. Những giá trị tương đồng này cho phép chúng tôi đưa ra kết luận thực sự về mức độ được kích hoạt của thí nghiệm này: 6.56 ± 0.44 .

Without any correction, fold induction of retinoid inducible cells were 6.15, 19.53, 17.78 and 10.60 for the four mice. Those results were very heterogeneous and could be due to variability of luciferin injection and its bioavailability as well as cell proliferation. Using the internal standard correction, fold induction were 6.47, 6.48, 7.17 and 6.11, respectively. This homogeneity allows us to determine the real fold induction of this experiment: 6.56 ± 0.44 .

Tài liệu tham khảo

Literature

Burgos, J.S., M. Rosol, R.A. Moats, V. Khankaldyyan, D.B. Kohn, M.D. Jr. Nelson, and W.E. Laug. 2003. Time course of bioluminescent signal in orthotopic and heterotopic brain tumors in nude mice. *Biotechniques* 34:1184-8.

Một số kỹ thuật tiến hành trên các chủ thể sinh học đã được cấp bằng sáng chế và có thể phải yêu cầu giấy phép từ bên thứ ba. Người dùng được khuyến cáo rằng họ phải là người chủ động quyết định xem các thao tác tiến hành của mình có xâm phạm tới bất cứ bằng sáng chế hợp lệ nào không.

Some techniques for generating and/or detecting light in biological subjects are patented and may require licences from third parties. Users are advised to independently determine for themselves whether their activities infringe any valid patent.