

## 中文说明书

# Nano-Glo<sup>®</sup> Fluorofurimazine In Vivo Substrate

适用产品目录号：  
N4100、N4110



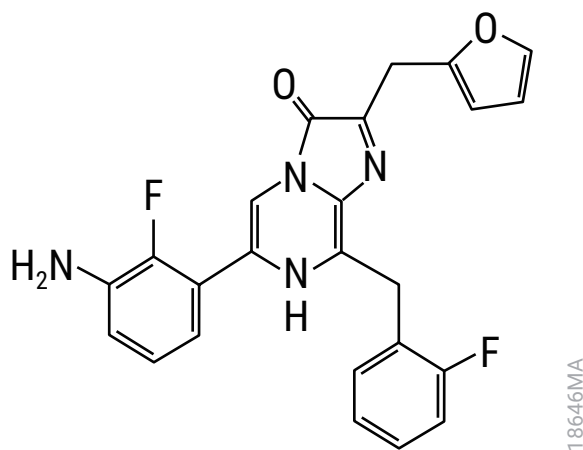
# Nano-Glo<sup>®</sup> Fluorofurimazine In Vivo Substrate

所有技术文献的英文原版均可在 [www.promega.com/protocols](http://www.promega.com/protocols) 获得。请访问该网址以确定您使用的说明书是否为最新版本。如果您在使用该试剂盒时有任何问题，请与 Promega 北京技术服务部联系。  
电子邮箱：[chinatechserv@promega.com](mailto:chinatechserv@promega.com)

1. 描述 .....	2
2. 产品组分和储存条件 .....	2
3. 操作步骤 .....	3
3. A. 概述 .....	3
3. B. 复溶 Nano-Glo <sup>®</sup> Fluorofurimazine In Vivo Substrate .....	3
3. C. 注射 Nano-Glo <sup>®</sup> Fluorofurimazine In Vivo Substrate .....	3
3. D. 体内成像 .....	3
4. 代表数据 .....	4
5. 附录 .....	6
5. A. 腹腔注射后自发光 .....	6
5. B. Fluorofurimazine 和 Furimazine 的发射光谱 .....	8
5. C. 常见问题 .....	8
6. 疑难解答 .....	9
7. 参考文献 .....	9
8. 相关产品 .....	10

## 1. 描述

Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate<sup>(a,b)</sup> 是一种优化的制剂，设计用于 NanoLuc® 萤光素酶、NanoLuc® 融合蛋白或重组 NanoBiT® 萤光素酶在动物模型内实现生物发光成像。该制剂含有 fluorofurimazine (FFz) 和泊洛沙姆-407 (P-407)。FFz 是一种水溶解度更高的 furimazine 衍生物。该制剂提高了底物在体内的生物利用度，使发光信号明显比含有 furimazine 的制剂更亮 (1,2)。FFz 的结构如图 1 所示。使用 NanoLuc® 萤光素酶时，最大发射波长为 459nm，与 furimazine 相似 (见图 5)。



**图 1. Fluorofurimazine 的化学结构。** Fluorofurimazine 是 NanoLuc® 萤光素酶和 NanoBiT® 萤光素酶的底物。NanoBiT® 萤光素酶是大 BiT (LgBiT) 肽与小 BiT (SmBiT) 肽或高 BiT (HiBiT) 肽互补结合形成的。分子量 =432.43g/mol。

## 2. 产品组分和储存条件

产品	规格	目录号
Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate	1 vial	N4100
	5 vials	N4110

**储存条件：**将冻干底物保存在 -65°C 温度以下，避光。我们建议每次体内成像实验时，复溶一瓶新的制剂。

### 3. 操作步骤

#### 3.A 概述

研发 Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate 的目的是提高 NanoLuc® 萤光素酶、NanoLuc® 融合蛋白或 NanoBiT® 萤光素酶在动物模型内的生物发光成像。该制剂含有 furimazine 衍生物 fluorofurimazine，水溶解度更高（见图 1），能提高底物在体内的生物利用度。该制剂通过在冻干制剂中加入亲水性非离子表面活性剂泊洛沙姆-407 (P-407)，进一步提高了生物利用度。

基于鲎变形细胞裂解物 (LAL) 方法，检测每批次 Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate 的内毒素水平，为  $\leq 0.1$  EU/mg。

#### 3.B 复溶 Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate

每个小瓶中都含有冻干 fluorofurimazine 底物 (4.6  $\mu$ moles) 和 P-407 的混合物。加入 525  $\mu$ l 无菌磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或无菌杜氏磷酸盐缓冲液 (DPBS)，手动轻柔旋转，使冻干固体被溶解。切勿涡旋。复溶后的溶液呈橙色。底物溶液可在室温下保存 8 小时，fluorofurimazine 浓度下降  $< 15\%$ ；或在 4°C 下保存 8 小时，fluorofurimazine 浓度下降  $< 5\%$ 。我们建议每次体内成像实验时，复溶一瓶新的制剂。

如果需要，该冻干材料可以在不超过 1.5ml 无菌 PBS 或 DPBS 中重悬，以在每次注射时提供较低剂量的 fluorofurimazine 底物。这将为具有足够亮度的实验系统节省底物。

#### 3.C 注射 Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate

请遵守标准操作规程来进行您的动物模型注射。请完全遵守贵机构有关善待动物的指导原则。

使用者应该根据动物模型和灵敏度要求，确定每次注射的最佳剂量。为优化小鼠静脉注射 (i.v.) 和腹腔注射 (i.p.)，每 24 小时周期 fluorofurimazine 底物的建议起始剂量为 0.44  $\mu$ moles。注射后，在多个时间点检测生物发光信号，生成动力学曲线（见图 3），使用生成的动力学曲线确定后续检测的最佳时间点。

对于小鼠腹腔注射，每 24 小时周期 fluorofurimazine 的最大建议剂量为 1.5  $\mu$ moles（该数据未公布）。当超过建议剂量，或多次频繁注射时，监测毒性是否增加。

对于小鼠静脉注射，当每 24 小时周期剂量超过 0.44  $\mu$ moles，或多次频繁注射时，监测毒性是否增加。

#### 3.D 体内成像

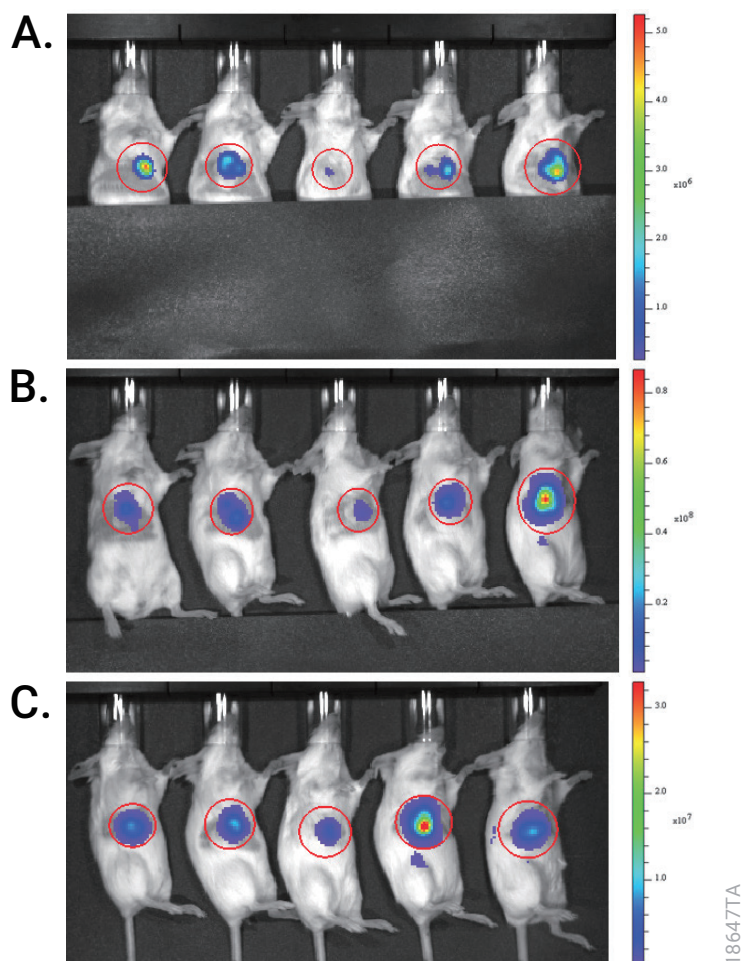
遵守确定的操作步骤进行小鼠成像，完全遵守贵机构有关善待动物的要求。如果自发发光信号对成像来说是个问题，请遮盖注射部位。

#### 4. 代表数据

小鼠 4T1 细胞原位植入雌性 BALB/c 小鼠乳腺脂肪垫是乳腺癌研究的同基因模型系统 (3)。原发肿瘤在 2-4 周内出现，原发肿瘤和肺转移瘤均可通过生物发光可见 (3,4)。

建立了同时稳定表达 NanoLuc<sup>®</sup> 萤光素酶和萤火虫萤光素酶的 4T1 细胞系。当使用 Nano-Glo<sup>®</sup> Dual Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (目录号: N1620) 进行体外检测时, NanoLuc<sup>®</sup> 信号比萤火虫信号约高 70 倍, 结果与这些报告基因的已知相对亮度一致。

将 4T1/Nluc-P2A-Fluc 细胞系原位植入雌性 BALB/c 小鼠的 #3 乳腺脂肪垫后, 肿瘤生长 22 天, 然后分箱成肿瘤大小相似的队列。小鼠腹腔注射或静脉注射 Nano-Glo<sup>®</sup> Fluorofurimazine In Vivo Substrate, 以检测 NanoLuc<sup>®</sup> 发光信号 (见图 2)。同样, 小鼠腹腔注射 Vivo-Glo<sup>®</sup> Luciferin, In Vivo Grade, 以检测萤火虫发光信号 (见图 2)。在所有情况下, 检测发光信号 75 分钟, 每 5 分钟检测一次, 以比较不同试验条件下的相对于时间的信号强度 (见图 2 和图 3)。



**图 2. BALB/c 小鼠 4T1 原发肿瘤的生物发光成像。**将 1 万个同时表达 NanoLuc<sup>®</sup> 萤光素酶和萤火虫萤光素酶的 4T1 细胞原位植入 BALB/c 雌性小鼠乳腺 #3 脂肪垫。允许原发肿瘤生长 22 天，然后根据肿瘤大小分箱成三个肿瘤队列。分箱后第二天，注射底物后，检测生物发光信号 75 分钟，每 5 分钟检测一次。剔除原发肿瘤附近的被毛。**图 A.** 队列 #1 (n=5) 在对侧腹腔注射 0.44 $\mu$ moles Nano-Glo<sup>®</sup> Fluorofurimazine In Vivo Substrate (50 $\mu$ l 总容积含 0.19mg) 后 20 分钟成像。色表范围为  $2.63 \times 10^5$ – $5.26 \times 10^6$  光子 / 秒 /  $\text{cm}^2$  / 球面度 (sr)。使用一块黑色非荧光塑料布遮住腹腔注射部位的自发光信号。**图 B.** 队列 #2 (n=5) 静脉注射 0.44 $\mu$ moles Nano-Glo<sup>®</sup> Fluorofurimazine In Vivo Substrate (50 $\mu$ l 总容积含 0.19mg) 后 10 分钟成像。使用一块黑色非荧光塑料布遮住尾部的自发光信号。色表范围为  $6.08 \times 10^5$ – $8.67 \times 10^7$  光子 / 秒 /  $\text{cm}^2$  / sr。**图 C.** 队列 #3 (n=5) 在对侧腹腔注射 9.4 $\mu$ moles Vivo-Glo<sup>®</sup> Luciferin, In Vivo Grade (100 $\mu$ l 体积含 3mg) 后 20 分钟成像。色表范围为  $2.93 \times 10^5$ – $3.29 \times 10^7$  光子 / 秒 /  $\text{cm}^2$  / sr。分箱前，三个队列的原发肿瘤大小相似，平均肿瘤体积为  $135 \pm 50 \text{mm}^3$ 。使用 IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (Perkin Elmer) 获得成像。IVIS 设置：发射滤光器，打开；视场角 (FOV)， $22.4 \times 22.4 \text{cm}$ ；f 光圈，1；分箱，M(8)；图 A、图 B 和图 C 自动曝光时间分别为 15、1 和 3 秒。生物发光成像在威斯康星大学的小动物成像和放射治疗机构 (威斯康星州麦迪逊市) 完成。使用 Living Image 软件 (版本 4.7.4) 进行成像分析。在每个成像中指示计算总光子通量 (见图 3) 所需的区域。



#### 4. 代表数据 (续)

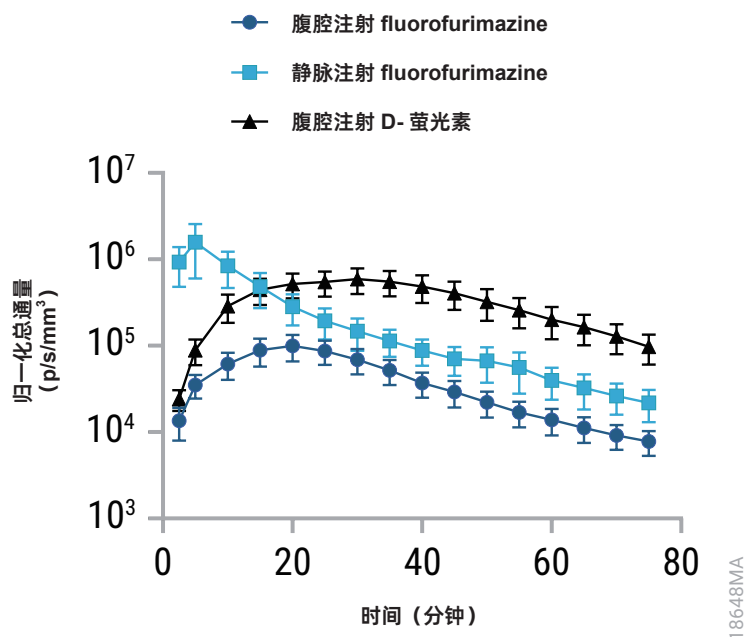
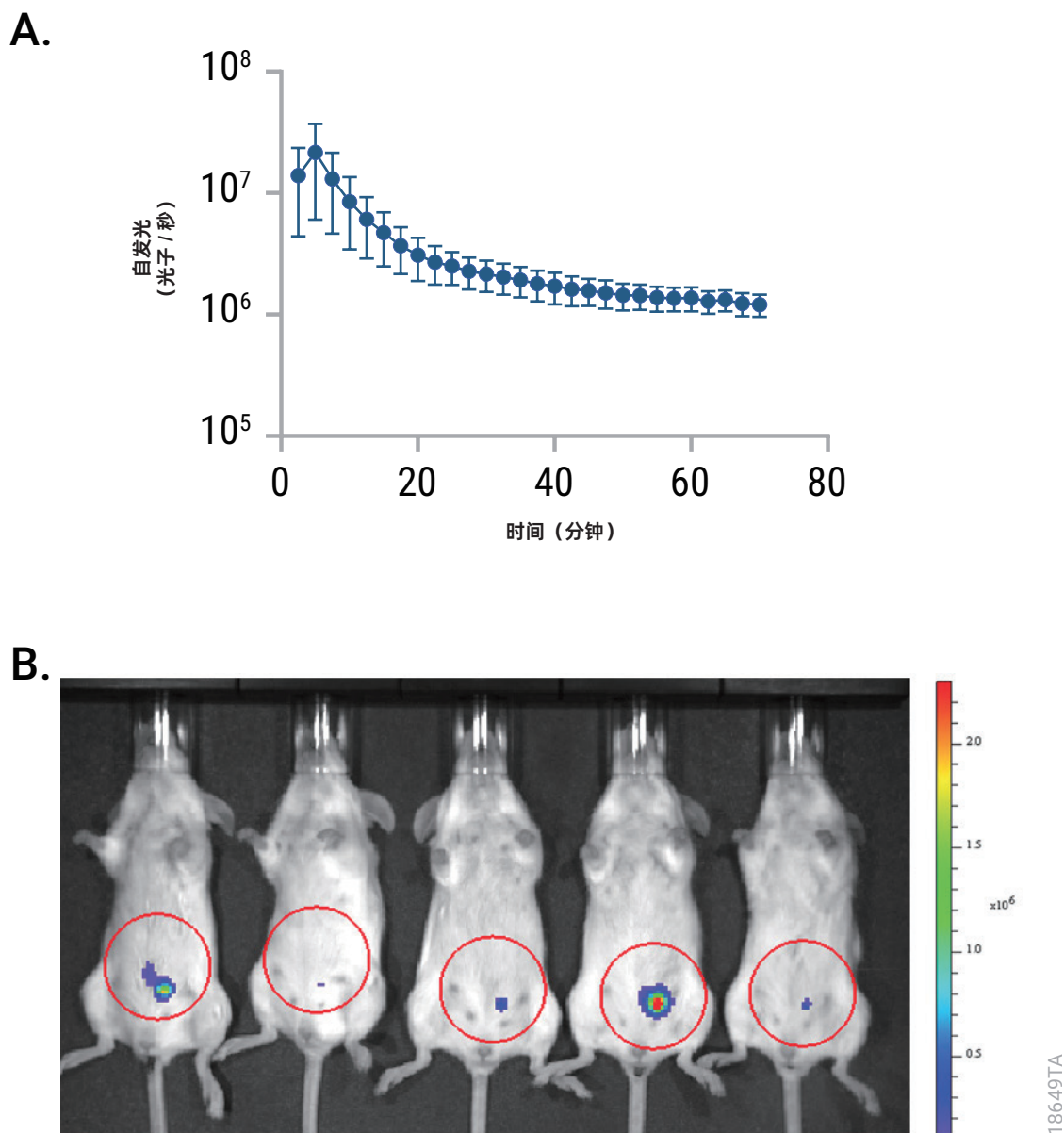


图 3. 腹腔注射和静脉注射 Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate 和 Vivo-Glo® Luciferin, In Vivo Grade 的动力学曲线。对于图 2 的实验，绘制指定的时间点每个队列的归一化总通量（光子 / 秒 / mm<sup>3</sup>）的平均值曲线。误差以平均值的标准误差（SEM）表示。在图 2 中指示计算总光子通量所需的区域。

## 5. 附录

### 5.A 腹腔注射后自发光

与 furimazine 一样，fluorofurimazine 也会发生不依赖酶的氧化，同时在激发态发射，产生自发光。自发光信号的强度是可变的（图 4），信号强度随注射后时间的变化而变化（图 4）。使用物理方法遮住注射部位（例如，用黑色非荧光塑料布）或选择替代注射途径，以减少或消除干扰性自发光。

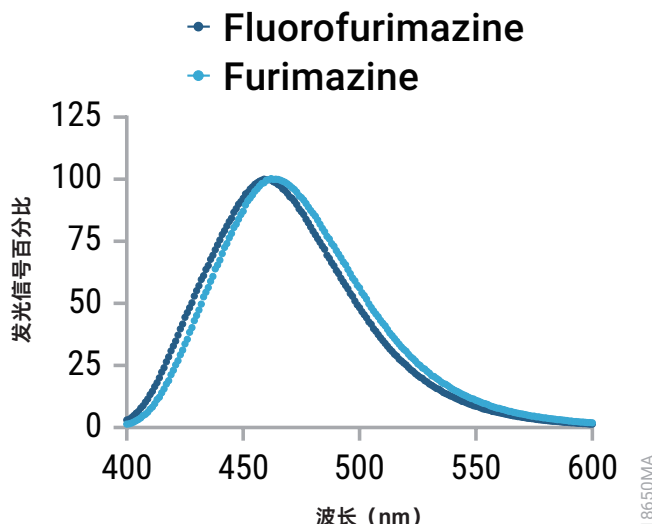


**图 4. 腹腔注射 Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate 后自发光。**未剔除被毛的雌性 BALB/c (n=5) 腹腔注射 0.44 $\mu$ moles Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate。注射后, 使用 IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (Perkin Elmer) 检测发光信号 70 分钟, 每 2.5 分钟检测一次。**图 A.** 注射后各时间点平均总光子通量曲线 (光子/秒)。误差以平均值的标准误差 (SEM) 表示。**图 B.** 腹腔注射后 20 分钟采用 20 秒曝光进行小鼠成像。色表范围为  $1.2 \times 10^5$ – $2.3 \times 10^6$  光子/秒/cm<sup>2</sup>/球面度 (sr)。指示每只小鼠计算总光子通量所需的区域。IVIS 设置: 发射滤光器, 打开; 视场角, 22.4 $\times$ 22.4cm; f 光圈, 1; 分箱, M(8); 自动曝光时间为 3-60 秒。生物发光成像在威斯康星大学的小动物成像和放射治疗机构 (威斯康星州麦迪逊市) 完成。使用 Living Image 软件 (版本 4.7.4) 进行成像分析。



## 5.B Fluorofurimazine 和 Furimazine 的发射光谱

NanoLuc<sup>®</sup> 介导的 fluorofurimazine 和 furimazine 转化产生相似的发射光谱（图 5）。两种底物都发蓝光，由于血红蛋白的吸收和光散射，将在更深的组织深度发生信号衰减。



**图 5. 体外归一化的 Fluorofurimazine 和 Furimazine 发射光谱。** 纯化后的 NanoLuc<sup>®</sup>-HaloTag<sup>®</sup> 融合蛋白用 TBS+0.01% BSA 稀释到最终浓度为 12nM。Fluorofurimazine 或 Furimazine 用 TBS+0.01% BSA 稀释到最终浓度为 40μM。等量的酶和底物在白色 96 孔板中混合，然后立即对发射波长进行扫描（Infinite<sup>®</sup> M1000 PRO 多功能酶标仪，Tecan）。酶和底物的最终浓度分别为 6nM 和 20μM。Fluorofurimazine 的最大发射波长为 459nm。Furimazine 的最大发射波长为 462nm。

## 5.C 常见问题

**问题：**我完成实验后，有剩余的复溶材料未用完。是否可以储存起来以后使用？

**回答：**我们建议每次体内成像实验时，复溶一瓶新的 Nano-Glo<sup>®</sup> Fluorofurimazine In Vivo Substrate 使用。如果您选择将复溶后的材料储存起来，我们建议仅在 4℃ 下短期存放，在此条件下，fluorofurimazine 浓度在 8 小时内可下降 <5%。复溶的材料如果在较低温度下长期存放或经过冻融循环，我们不能保证您的体内成像应用具有可接受的性能。

**问题：**萤火虫萤光素酶和 NanoLuc<sup>®</sup> 萤光素酶能在体内进行多重检测吗？

**回答：**是的。必须确定每个实验系统的最佳给药方案。例如，连续几天分别进行各自的底物给药（1）。

**问题：**是否可以使用 Nano-Glo® Fluorofurimazine In Vivo Substrate 实现 NanoLuc®、NanoLuc® 融合蛋白或 NanoBIT® 萤光素酶在更深的组织深度成像？

**回答：**是的。虽然血红蛋白吸收和光散射会导致信号衰减（第 5.B 节），但 NanoLuc® 萤光素酶可用于深部组织成像（2）。可能需要注射更高剂量的 FFz。或者，可以使用基于 NanoLuc® 的构建体，依赖共振能量转移和红移发射（1,5）发出发光信号。

## 6. 疑难解答

如果您遇到的问题在此没有列出，请联系普洛麦格（北京）生物技术有限公司或当地经销商。联系信息见：[www.promega.com](http://www.promega.com) 电子邮箱：[chinatechserv@promega.com](mailto:chinatechserv@promega.com)

问题	原因和参考建议
腹腔注射部位的自发光遮住了发光信号	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 尝试不同的注射途径（例如静脉注射）。</li> <li>• 使用对侧腹腔注射。</li> <li>• 减少底物注射量。</li> <li>• 在成像过程中遮盖腹腔注射部位（例如，用一块黑色非荧光塑料布）。</li> </ul>
信号微弱或无法检测。	<p>组织深度和底物的可用性等因素将影响信号强度。如果使用腹腔注射，增加递送的底物量至最大建议剂量 1.5<math>\mu</math>moles。或者，换为静脉注射 <math>\geq 0.44\mu</math>moles fluorofurimazine。如果尝试检测深部组织的发光信号，则换用依赖共振能量转移和红移发射、基于 NanoLuc® 的构建体，以缓解信号衰减（5）。</p>

## 7. 参考文献

1. Su, Y. *et al.* (2020) Novel NanoLuc substrates enable bright two-population bioluminescence imaging in animals. *Nat. Methods* **17**, 852–60.
2. Gasper, N. *et al.* (2021) Evaluation of NanoLuc substrates for bioluminescence imaging of transferred cells in mice. *J. Photochem. Photobiol. B.* **216**, 112118.
3. Pulaski, B.A. and Ostrand-Rosenberg, S. (2001) Mouse 4T1 breast tumor model. In: *Current Protocols in Immunology* Chapter 20, Unit 20.2.
4. Paschall, A.V. and Liu, K. (2016) An orthotopic mouse model of spontaneous breast cancer metastasis. *J. Vis. Exp.* **114**, 54040.
5. Chu, J. *et al.* (2016) A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging in vivo. *Nat. Biotechnol.* **34**, 760–7.

## 8. 相关产品

产品	规格	目录号
VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade	50mg	P1041
	250mg	P1042
	1g	P1043

<sup>(a)</sup>BY USE OF THIS PRODUCT, RESEARCHER AGREES TO BE BOUND BY THE TERMS OF THIS LIMITED USE LABEL LICENSE. If researcher is not willing to accept the terms of this label license, and the product is unused, Promega will accept return of the unused product and provide researcher with a full refund.

Researchers may use this product for research use only, limited to animal imaging experiments or experiments performed to prepare for such animal imaging experiments; no commercial use is allowed. "Commercial use" means any and all uses of this product by a party in exchange for consideration, including, but not limited to (1) use in further product manufacture; and (2) resale of the product, whether or not such product is resold for use in research. Researchers shall have no right to modify or otherwise create variations of the product. No other use or transfer of this product is authorized without the prior express written consent of Promega. Notwithstanding the foregoing, researcher may use this product in provision of services, information or data to third parties in exchange for consideration, provided that researcher does not transfer the product.

**For uses of Nano-Glo®-branded reagents intended for energy transfer (such as bioluminescence resonance energy transfer) to acceptors other than a genetically encoded autofluorescent protein, researchers must:**

- (a) use NanoBRET™-branded energy acceptors (e.g., BRET-optimized HaloTag® ligands) for all determinations of energy transfer activity by this product; or
- (b) contact Promega to obtain a license for use of the product for energy transfer assays to energy acceptors not manufactured by Promega.

With respect to any uses outside this label license, including any diagnostic, therapeutic, prophylactic or commercial uses, please contact Promega for supply and licensing information. PROMEGA MAKES NO REPRESENTATIONS OR WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING FOR MERCHANT-ABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, WITH REGARD TO THE PRODUCT. The terms of this label license shall be governed under the laws of the State of Wisconsin, USA.

<sup>(b)</sup>U.S. Pat. No. 11,691,976 and other patents pending.

© 2023 Promega Corporation. All Rights Reserved.

HaloTag, Nano-Glo, NanoBiT and NanoLuc are registered trademarks of Promega Corporation. VivoGlo is a trademark of Promega Corporation.

Infinite is a registered trademark of Tecan Group Ltd.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.