

如何使用 GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪 对活细胞检测进行成像



使用 GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪进行活细胞成像的介绍

活细胞成像使研究人员能够实时监测动态的细胞过程，为蛋白质功能、相互作用以及对刺激的反应提供有价值的见解。通过生物发光报告基因对活细胞过程进行成像是强有力的方法之一。GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪能够利用 NanoLuc[®] 萤光素酶实现生物发光显微镜成像。NanoLuc[®] 萤光素酶是一种小分子（19.1 kDa）、高度稳定的酶，经过优化可用作发光报告基因。NanoLuc[®] 萤光素酶产生的高强度、辉光型发光比传统萤光素酶高出约 100 倍，非常适合用于灵敏的活细胞检测。NanoLuc[®] 萤光素酶化学体系（如 HiBiT、NanoBiT、NanoBRET）广泛应用于生物医学研究领域，包括：

- **靶向蛋白降解 (Targeted Protein Degradation, TPD) / 蛋白质稳定性：**监测特定蛋白质的降解以评估蛋白质周转与功能；测量不同条件下蛋白质的稳定性。
- **靶标占据 (Target Engagement)：**评估潜在药物化合物与其蛋白质靶标之间的相互作用。
- **蛋白质 - 蛋白质相互作用：**测量多个蛋白质之间的动态相互作用。
- **细胞信号传导：**实时监测细胞过程和信号通路。

通过将发光、荧光和明场成像集成于单一系统，GloMax[®] Galaxy 系统为基于 NanoLuc[®] 的细胞报告基因检测提供了一个全面的成像平台。

本指南概述了使用 GloMax[®] Galaxy 系统设置活细胞成像实验的最佳实践，包括底物选择、环境条件和数据采集方面的注意事项。

1. 检测设置注意事项

选择合适的培养板和容器可提高成像的一致性。考虑以下因素：

- 黑壁、光学级成像板（例如 SensiPlate、玻璃底）可减少背景发光和自发荧光。
- 8 孔玻璃底微腔室（ibidi）可为活细胞成像提供充足空间。我们还推荐 ibidi Treat，其质量与玻璃相当，但能更好地促进细胞贴附。其他具有改良表面的腔室可在 ibidi 官网找到。
- 低黏附强度细胞（如 HEK293）可能存在实验难度。提前用明胶、胶原蛋白（或其他细胞外基质成分）或聚-L-赖氨酸预包被孔板可改善细胞贴附。
- 避免孔内液体过满，否则可能导致载物台污染或信号扩散。

细胞培养与生理条件

生长培养基至关重要，以下是一些建议，以最大化发光信号：

- 从完全血清培养基开始，如果出现自发光现象，将血清限制在 2%。
- 培养基中的酚红可能导致发光信号变化。如果图像中发光信号暗淡或较低，建议避免使用含酚红的生长培养基。
- 若未使用环境控制舱（environmental chamber），推荐使用缓冲培养基（如 Opti-MEM）或 CO₂ 非依赖型培养基。

DNA 转染 /mRNA 递送

- 避免反向转染，因为这可能导致细胞黏附不良。
- 将细胞以 1×10^5 个细胞/mL 的密度铺板，培养 24 小时，第二天进行转染 /mRNA 递送。
- 更多信息请参阅我们的《转染指南》。

维持最佳环境条件以防止细胞应激：

- 使用 Stagetop 培养箱来调节温度（37°C）、CO₂（5%）和湿度。
- 如果使用 CO₂ 非依赖型培养基，缓冲条件（如 Opti-MEM）可减少 pH 波动。

更详细的检测设置请联系 Promega 索取中文版操作说明书，联系邮箱：marketing@promega.com.cn。

2. 底物与试剂选择

Nano-Glo® 底物专为抑制背景信号而设计，可提升检测灵敏度。以下多种 NanoLuc®/NanoBiT® 萤光素酶检测系统兼容 GloMax® Galaxy 系统的生物发光成像，各检测系统提供不同的信号持续时间：

- **Nano-Glo® 活细胞检测系统：**信号最亮，但衰减最快。适用于终点成像。
- **Nano-Glo® Vivazine® 底物：**中等稳定性，适合 3 小时以内的时间进程成像。
- **Nano-Glo® Endurazine™ 底物：**发光非常稳定，但信号强度较低，适用于超过 3 小时的长期动力学成像。
- **NanoBRET® Nano-Glo® 底物：**专为活细胞 NanoBRET® 应用优化。

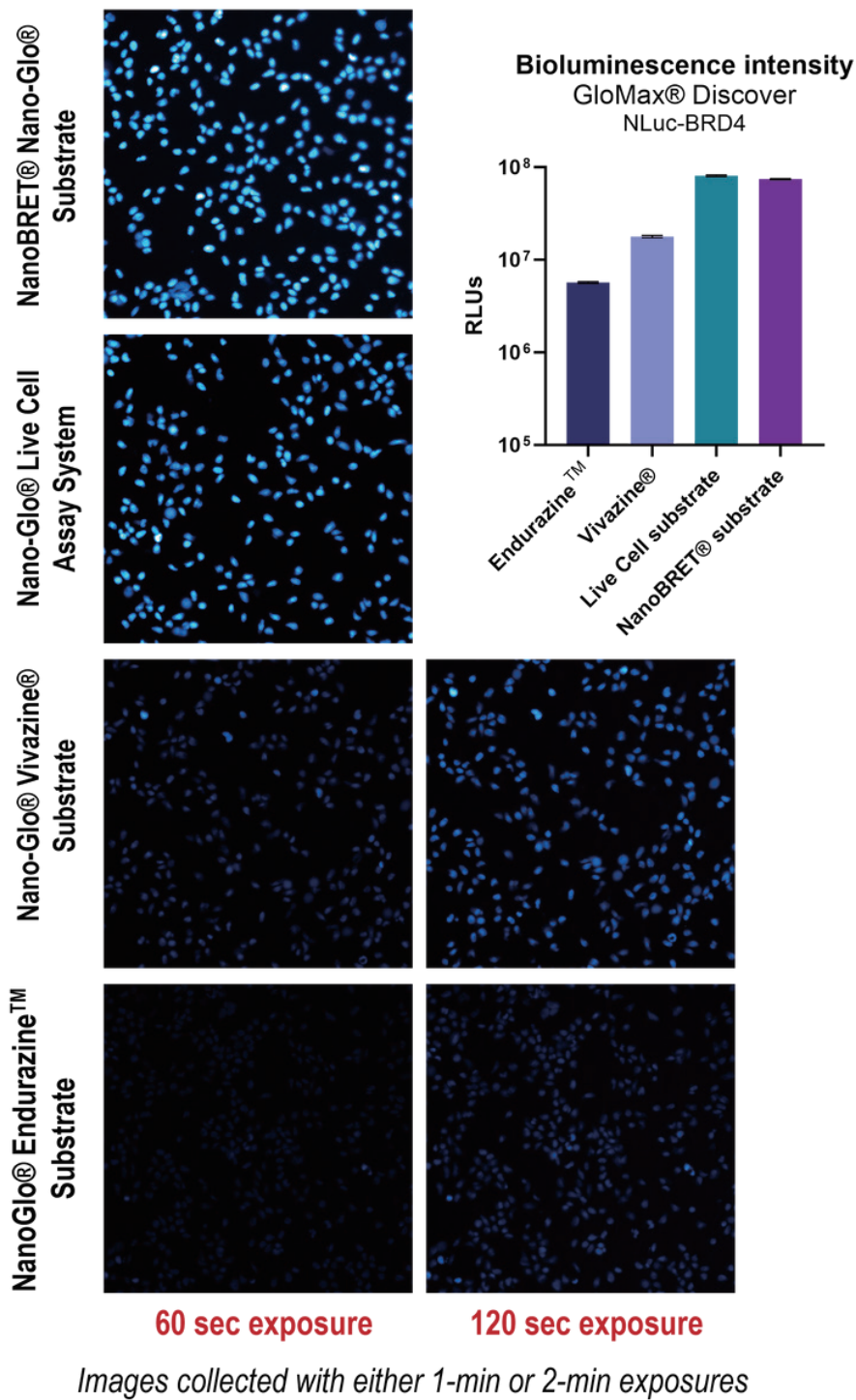


图 1: NanoLuc® 萤光素酶底物在 GloMax® Discover 多功能微孔板读数仪与 GloMax® Galaxy 细胞成像仪上的比较。细胞以 2×10^5 个细胞 / mL 的密度接种于 Opti-MEM 培养基中，其中 8 孔预包装 ibidi 腔室（用于 GloMax® Galaxy 成像）每孔加入 200 μ L，96 孔板（用于 GloMax® Discover 微孔板发光读数）每孔加入 100 μ L。两种板型（8 孔 ibidi 板与 96 孔板）的最终底物浓度相同。

图 1 采用 NanoLuc®-BRD4 (NLuc-BRD4) 细胞，展示这些底物在 GloMax® Discover 多功能微孔板读数仪上产生不同的相对发光单位 (RLU)。与 GloMax® Discover 微孔板读数仪类似，使用这些底物在 GloMax® Galaxy 细胞成像仪上进行成像时也会产生不同的发光输出。在 GloMax® Galaxy 系统上曝光 60 秒后捕获的生物发光信号，与在 Discover 微孔板读数仪上捕获的生物发光强度相关，其中 NanoBRET® Nano-Glo® 底物和 Nano-Glo® 活细胞检测系统产生的信号最亮。而添加 Nano-Glo® Endurazine™ 和 Nano-Glo® Vivazine® 底物后产生的信号需要更长的曝光时间才能形成可见信号，但其信号随时间推移更为稳定。这种信号强度与持续时间之间的权衡是在选择使用哪种底物时需要考虑的重要因素。（更多关于曝光时间的指导，请参见第 4 节“仪器优化”）。

底物选择的一般指导原则：

- **对于终点法检测实验：** 如果不需要动力学成像，优先考虑信号强度，选用 Nano-Glo® 活细胞检测系统以获得最大亮度。
- **对于实时动力学成像：** 优先考虑稳定性，使用 Nano-Glo® Vivazine® 或 Endurazine™ 来追踪数小时内蛋白质的动态变化。

图 2 展示了 Endurazine™ 与 Vivazine® 在动力学信号上的差异。Vivazine® 信号最初更亮，但在 2 小时内明显变暗。Endurazine™ 最初略暗，但在数小时内保持非常稳定。通过在 GloMax® Discover 微孔板读数仪上捕获的 RLU 对比，可以看出不同的信号强度和衰减速率。

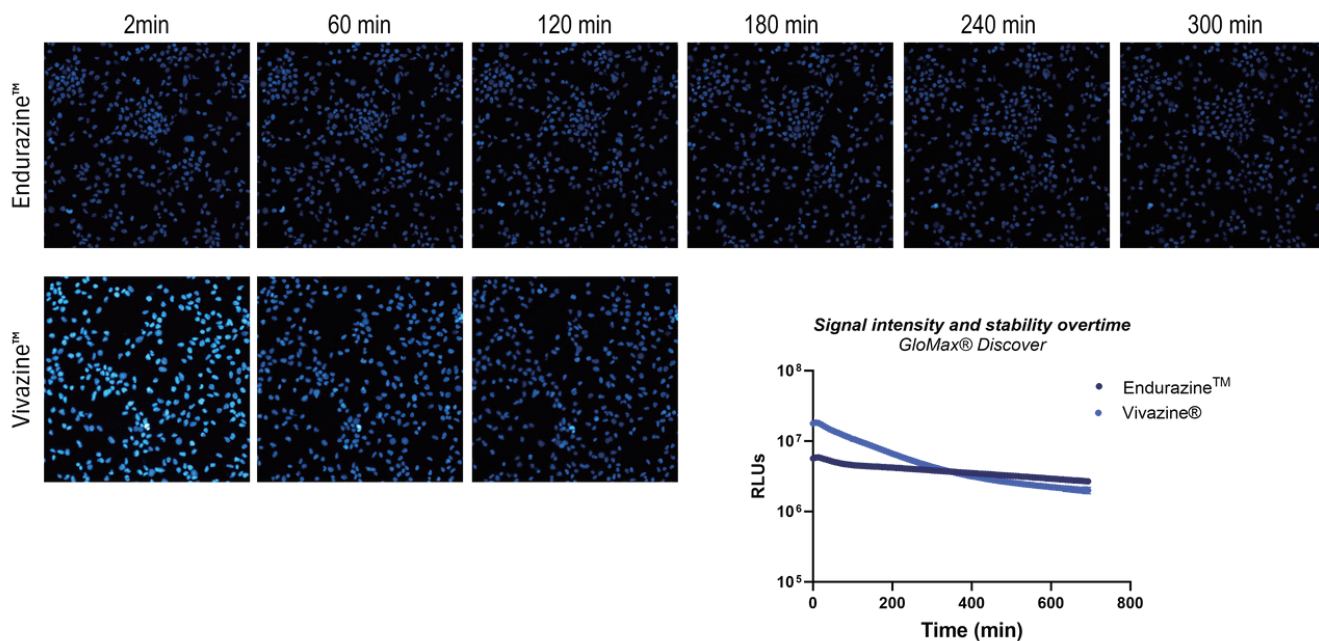


图 2：表达 NLuc-BRD4 的基因编辑 HEK293 细胞的成像动力学。 上排）使用 Endurazine™ 在 5 小时内生成的时间点图像。下排）使用 Vivazine® 在 2 小时内生成的时间点图像。图表）在 GloMax® Discover 微孔板读数仪上捕获的 Endurazine™ 和 Vivazine® 产生的相对发光单位 (RLUs)。所示图像是在 GloMax® Galaxy 细胞成像仪上捕获，并通过 Fiji 软件进行本底暗场扣除与伪彩色处理。细胞以 2×10^5 个细胞 / mL 的密度接种于 Opti-MEM 培养基中，其中 8 孔预包装 ibidi 腔室（用于 GloMax® Galaxy 成像）每孔加入 200 μ L，96 孔板（用于 GloMax® Discover 微孔板读数仪读数）每孔加入 100 μ L。8 孔 ibidi 板和 96 孔板的最终底物浓度相同。动力学成像在使用 Stagetop 培养箱及控制器的条件下进行采集。

优化底物稀释、时机与浓度

底物浓度会影响信号强度和背景噪声。信号随时间的衰减要求在引入底物时把握恰当的时机。根据实验需求相应调整底物浓度和添加时间，以找到最佳参数至关重要。以下我们列举了一些示例稀释方案和药物处理方式。根据模型及其他实验条件，可能需要进行相应调整。

示例终点实验稀释方案（8 孔微腔室；每孔细胞铺板体积为 200 μ L）：

	Nano-Glo [®] Live Cell Substrate	NanoBRET [®] Nano-Glo [®] Substrate
底物储备液稀释比例	在 Nano-Glo LCS 稀释缓冲液或 Opti-MEM 中 20 倍稀释	在 Opti-MEM 中 62.5 倍稀释
底物加入培养基中的量	50 μ L/ 孔，轻轻混匀	66 μ L/ 孔，轻轻混匀
药物处理	在 Opti-MEM 中制备 4X 药物溶液 每孔添加 82.5 μ L	在 Opti-MEM 中制备 4X 药物溶液 每孔添加 88 μ L

时间进程成像示例方案（8 孔微腔室；每孔细胞铺板体积为 200 μ L）：

	无药物处理	药物处理
Vivazine [®] 或 Endurazine [™] 储备液的稀释	在 Opti - MEM 中 50 倍稀释	在 Opti - MEM 中 25 倍稀释
向培养基中添加底物	每孔 200 μ L，轻轻混匀	每孔 66 μ L，轻轻混匀
预孵育（37°C / 5% CO ₂ ）	使用 Vivazine [®] 时为 1 - 1.5 小时 使用 Endurazine [™] 时为 2 - 3 小时	
药物处理	不适用	在 Opti - MEM 中制备 4 倍药物溶液 每孔添加 88 μ L

添加体积需至少达到原体积的 20%（即 5X 溶液），以便在不扰动细胞的情况下实现充分混匀。必要时可预先移除部分培养基以确保所有需要添加的成分都能加入孔中。当对多个孔进行成像时（例如，比较对照组与处理组），仅向首个待成像的孔中添加底物。在完成一个孔的图像采集后，再向下一待成像的孔中添加底物，依此类推。这样可避免在对其他样本进行成像时，另一些样品孔发光信号的衰减。

在某些低表达模型中，将底物浓度从微孔板读数仪检测所推荐的浓度增加 2 倍，可在不明显增加背景信号的情况下，获得更强的成像信号。我们不建议使用更高浓度，以避免沉淀和毒性。下图 3 展示了在 GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪上，相对于基于微孔板的检测稀释比例，使用 1 倍和 2 倍底物浓度进行成像的示例。

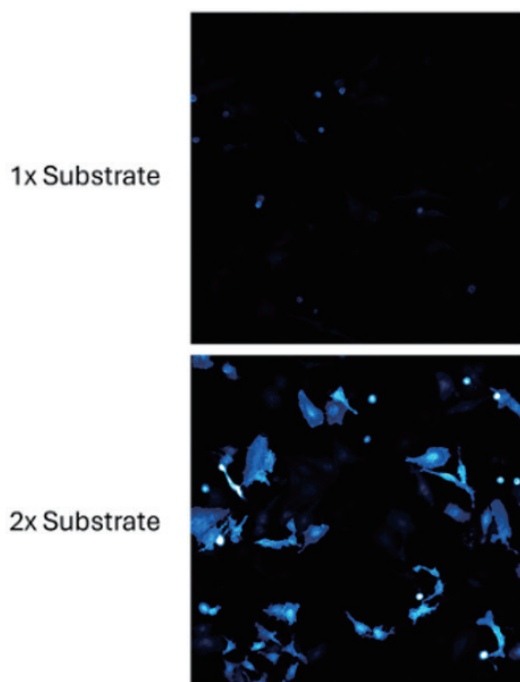


图 3：底物浓度会影响信号的产生。我们不建议使用超过 2 倍的浓度，以防止沉淀和毒性。

4. 仪器优化

为确保成像准确性最大化，请务必对以下 GloMax[®] Galaxy 软件设置 / 参数进行优化。信号饱和可能导致过度曝光。以下是推荐的曝光时间：

曝光时间建议

- **生物发光：**曝光 1-5 分钟通常可获得适当的图像；最大曝光时间可达 60 分钟，但部分分辨率会有所损失。
- **荧光：**可调至 120 秒及以上。在低表达情况下，可能需要更长的曝光时间。
- **明场：**短时间曝光（10–200 微秒）可防止饱和。

像素合并（Binning）

- 像素合并选项包括：无合并、2×2 合并或 4×4 合并。选择 2×2 或 4×4 合并会将每个 2×2 或 4×4 像素方块区域的信号进行合并，从而降低分辨率但提高灵敏度。
- 2×2 或 4×4 合并可提高低表达目标的灵敏度，有助于聚焦调整，并在采集未合并图像前快速优化曝光设置。
- 像素合并仅影响实时预览（Live View）。实际保存的图像将为全分辨率图像。
- 像素合并的曝光时间范围会影响生成的图像。有关像素合并工作原理的示例，请参阅我们的[技术手册（第 3.4.2 节）](#)。

暗帧采集（Dark Frame Capture）

- 在仪器中不放置发光样本的情况下采集一张图像，并将其从样本产生的图像中减去，可以提高低信号对比度。
- 若图像中出现均匀图案，通常表明无漏光——但即使存在漏光，仍可能产生均匀图案；用户应确认平均像素强度不会随曝光时间增加而变化。

图像处理

图像分析与定量可在 Fiji (ImageJ) 软件平台上进行。

[完整快速入门指南请见此处。](#)

5. 示例方案：内源性 GSPT1 的靶向蛋白降解

下文详细列出了使用分子胶降解剂 CC-885 对 HiBiT-GSPT1 进行靶向蛋白降解的动力学成像操作步骤。

1. 使用 0.1% 明胶对 8 孔玻璃底微腔室 (ibidi) 进行预包被, 处理时间为 30 分钟, 随后用 PBS 清洗 1 次。
2. 将稳定表达 LgBiT 的 HiBiT-GSPT1 CRISPR KI HEK293 细胞以每孔 75,000 个细胞的密度、200 μ L 体积铺板于每个微腔室中, 在 37°C、5% CO₂ 条件下孵育过夜。

为确保不同处理孔及其对应样本的试剂添加时机完全一致, 应按顺序执行以下步骤:

1. 次日, 通过将 Vivazine[®] 底物储备液以 1:50 比例用 Opti-MEM 稀释, 制备 2 $\times$ Vivazine[®] 底物。从每个孔中轻轻吸出 100 μ L 培养基, 然后小心加入 100 μ L 制备好的 2 $\times$ 底物。
2. 细胞在 37°C、5% CO₂ 条件下孵育 1 小时以达到平衡。
3. 将微腔室放入配备有已预平衡至 37°C、5% CO₂ 的 Stagetop 培养箱的 GloMax[®] Galaxy 系统中。
4. 在添加 50 μ L 500 nM CC-885 降解剂 (终浓度 100 nM) 或 DMSO 之前, 分别使用 5 分钟曝光时间和 100 μ s 曝光时间 (20% LED 功率) 采集初始基线生物发光图像和明场图像。
5. 处理后立即以 5 分钟 (生物发光) 和 100 μ s (明场, 20% LED 功率) 的曝光时间, 连续采集生物发光和明场图像, 持续 5 小时。
6. 使用 ImageJ 图像处理软件 (Fiji 包) 进行伪彩色渲染和动态范围的线性调整。

查看完整视频并了解更多详情, 请阅读我们关于**靶向蛋白降解的技术文章**。

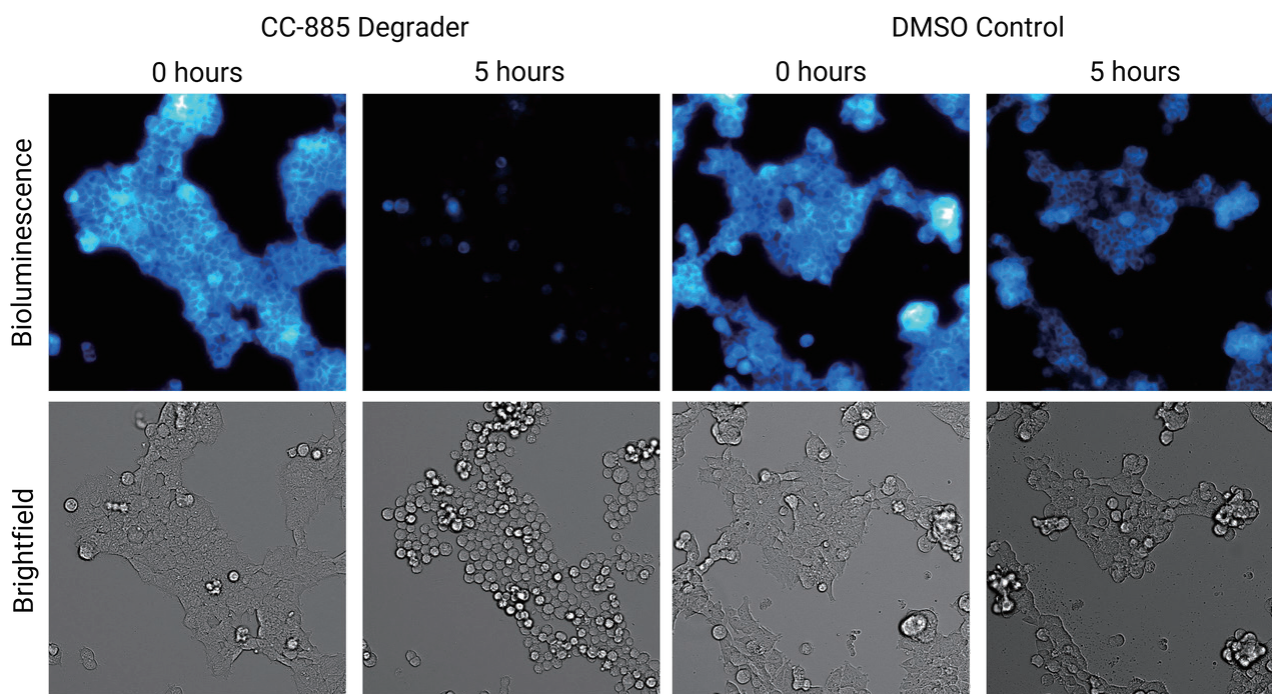


图 4: 使用 CC-885 对 HiBiT 标记的 GSPT1 进行降解成像。表达内源性 HiBiT 标记 GSPT1 并稳定表达 LgBiT 的 HEK293 细胞经 CC-885 降解剂或 DMSO 对照处理后, 在 5 小时内进行周期性成像。

总结与更多资源

本指南概述了在使用 GloMax[®] Galaxy 细胞成像仪进行活细胞成像检测时需重点考虑的若干关键因素与建议。通过优化底物选择、完善成像参数设置并维持适宜的生理条件，研究人员能够获取高质量、可重复的数据，从而实时研究动态的细胞过程。

想进一步了解 GloMax[®] Galaxy 的生物发光成像技术？欢迎查阅以下技术文章，内容包括靶向蛋白降解成像或蛋白质 - 蛋白质相互作用成像等相关主题。

深入了解生物发光成像技术

产品列表

仪器设备

产品	规格	目录号
GloMax [®] Galaxy Bioluminescence Imager System	1 each	GM4005
GloMax [®] Galaxy Bioluminescence Imager Accessories	1 each	GM4000

GloMax[®] Galaxy Bioluminescence Imager System 仅供科研使用（RUO）。

检测试剂

产品	规格	目录号
Nano-Glo® Live Cell Assay System	100 assays	N2011
	1,000 assays	N2012
	10,000 assays	N2013
NanoBRET® Nano-Glo® Standard Detection System	200 assays	N1661
	1000 assays	N1662
	10000 assays	N1663
NanoBRET® Nano-Glo® Kinetic Detection System	200 assays	N2583
	1000 assays	N2584
	10000 assays	N2585
Nano-Glo® Endurazine™ Live Cell Substrate	0.1ml	N2570
	1ml	N2571
	10ml	N2572
Nano-Glo® Vivazine™ Live Cell Substrate	0.1ml	N2580
	1ml	N2581
	10ml	N2582
Nano-Glo® Extended Live Cell Substrate Trial Pack	0.2ml	N2590

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

地址：北京市东城区北三环东路 36 号

环球贸易中心 B 座 907-909

电话：010-58256268

传真：010-58256160

网址：www.promega.com

技术支持电话：400 810 8133

技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

更新时间：2025.09


关注 Promega
生命科学