

# 小动物活体成像固定装置与实验设计

吴航军<sup>1</sup>, 韩琴<sup>1</sup>, 戎叶<sup>2</sup>, 肖桂凤<sup>1</sup>, 林赵肖楠<sup>1</sup>

(1. 浙江大学医学院, 浙江 杭州 310058;

2. 杭州师范大学基础医学院, 浙江 杭州 311121)

**摘要:** 为解决双光子活体显微成像实验中样本固定的问题, 研制了一套适用于多种不同模式的小动物固定装置, 能根据动物的大小进行灵活调整适配, 可对小动物不同感兴趣区域(如脑部、腹部、四肢等)进行固定, 确保成像过程中焦面的稳定, 并可以对成像的位置进行定位, 保证长时间、多时间节点的稳定成像。该装置简单易加工、成本低, 能广泛适用, 为活体成像提供了一种多功能的活体小动物固定方法, 能帮助研究人员完成大部分麻醉状态下小动物活体实验。

**关键词:** 活体成像; 双光子成像; 小动物; 固定装置

中图分类号: N33 文献标识码: A

## Fixation devices for intravital imaging of small animals

WU Hangjun<sup>1</sup>, HAN Qin<sup>1</sup>, RONG Ye<sup>1</sup>, XIAO Guifeng<sup>1</sup>, LIN Zhaoxianan<sup>1</sup>

(1. Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China;

2. Hangzhou Normal University School of Basic Medical Sciences, Hangzhou 311121, China)

**Abstract:** To solve the problem of sample fixation in two photon intravital imaging, a set of small animal fixation devices suitable for a variety of different modes is developed. This device is suitable for fixing different region of interests (such as brain, abdomen, limbs, etc.) during intravital imaging, it can ensure the stability of the imaging, and can locate the imaging position for long time and multiple nodes imaging. The device is low cost, easy production and broadly suitable, which provides a multifunctional immobilization method for small animals intravital imaging, that will help researchers to complete most intravital experiments on small animals under anesthesia.

**Key words:** intravital imaging; two photon imaging; small animals; fixation device

在生命科学和医学研究中, 活体实验是对体外实验的重要补充和验证, 在活体研究中,

使用双光子显微镜对动物活体组织进行动态观察是一种重要的研究手段。双光子激光扫描显微镜于 1990 年被开发<sup>[1]</sup>，结合了激光共聚焦显微镜和双光子激发技术的优势，利用长波长激发，比共聚焦的短波长的组织穿透能力强，且只有在焦平面上的荧光分子才能被激发，从而减少了光漂白、降低了细胞的光毒性和自发荧光信号。所以双光子显微镜比普通荧光显微镜更适合用来长时间观察厚样本、活细胞或活体样本<sup>[2-4]</sup>。此外，双光子显微镜还可以检测二次谐波信号，无需外源标记，可用于胶原纤维结构、肿瘤、电生理等领域的研究<sup>[5-7]</sup>。利用双光子显微镜，可以实现对样本的多色、长时间、多时间点的观察。双光子显微成像技术已成为研究活体动物生物过程的首选方法<sup>[1]</sup>，为细胞生物学、免疫学、肿瘤生物学、神经生物学和药理学等领域提供定量和动态的研究手段<sup>[8, 9]</sup>。

常规双光子成像方法是通过提取局部组织，放置在相应培养液中进行观察，或者利用小动物固定装置对局部进行固定后，在双光子显微镜下观察。由于受到动物的呼吸、心跳、蠕动等各种生理过程引起的干扰，以及部分组织结构柔软等特点的影响<sup>[4]</sup>，样本的固定是双光子显微成像的一大挑战。此外，双光子显微镜一般选用水镜进行成像，需要在镜头和样本之间添加水作为介质，活体成像过程中，常会因为稳定性不足导致漏水及长时间蒸发导致介质水缺失而无法聚焦成像。脑部成像得益于颅骨比较坚硬，并且距离心脏和肺部较远，因而受呼吸心跳的影响小，相对比较容易实施，通常在固定后用颅骨减薄（通常 30-50  $\mu\text{m}$ ）或者穿颅术来实现成像<sup>[10, 11]</sup>。常见的商品化动物固定装置主要针对脑部成像，难以适应大部分组织，观察范围有限，也难以实现对同一个位置的长时间、多时间点的动态观察，因此，一些特殊部位的固定，如腹部器官（肾、脾、肝和肠）、位于胸腔内/靠近胸腔（心脏、肺）的器官等，需要研究者根据具体实验自制固定装置<sup>[12-22]</sup>。

针对现有固定方法中的缺陷，本文的主要目的在于提供一种简单易行、低成本的小动物长时间活体成像固定装置及实验方案，解决麻醉状态下小动物成像的固定问题。

## 1 小动物长时间活体成像固定装置设计和搭建

自制的小动物长时间活体成像固定装置是基于日常双光子活体成像中小动物固定的多样性设计搭建的。双光子成像过程中，需要对活体样本进行固定，保持样本稳定，才能得到焦平面稳定的动态图像，以便于后续进行图像分析。为实现以上目的，在实践基础上，改进并设计了全新的小动物固定装置，该装置设计方案见图 1，主要包括：固定于显微镜平台或防震台上的固定装置底座、用于维持小动物体温的温控加热垫、高度及位置可调的成像平台