

## Разработка полусинтетического комбикорма для лабораторных животных (мыши, крысы) и возможность применения в технологии оптической визуализации in vivo

Чалов Сергей Евгеньевич, кхн

“ИнВивоТехнология”, Москва

[chalov@invivotech.ru](mailto:chalov@invivotech.ru), <http://www.invivotech.ru>, +7 (495) 922-25-64



VIEWWORKS

# Оптическая визуализация in vivo (детекция оптического сигнала в тканях животного)

## Детекция флуоресцентного сигнала

## Детекция биолюминесцентного сигнала

Схема возникновения флуоресценции

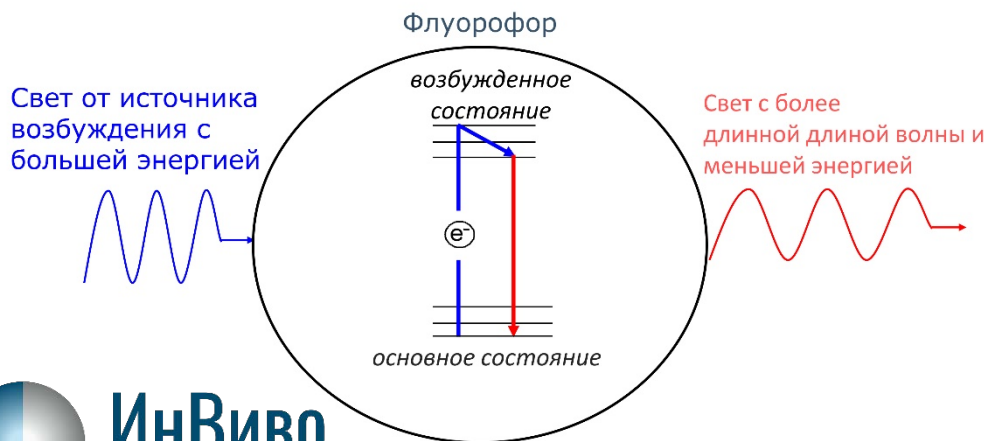
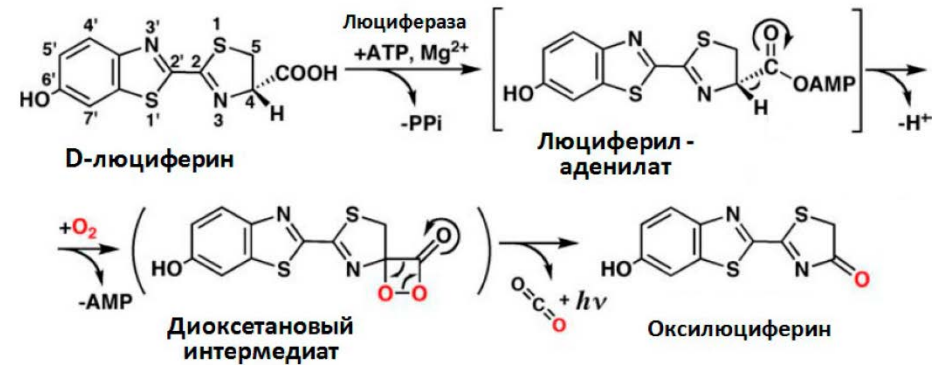


Схема возникновения биолюминесценции



Механизм реакции окисления люциферина, катализируемой люциферазой светлячка



# Системы оптической визуализации in vivo Vieworks Co., Ltd (Республика Корея)

Детекция биолюминесцентного и флуоресцентного сигнала

Детекция флуоресцентного сигнала



VISQUE™ InVivo ART100, ART400



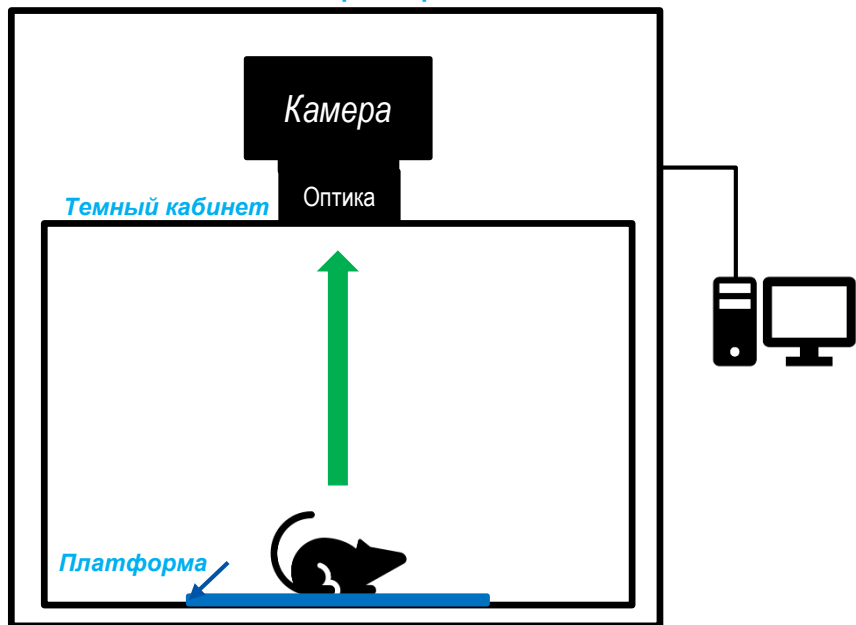
VISQUE™ InVivo Smart-LF



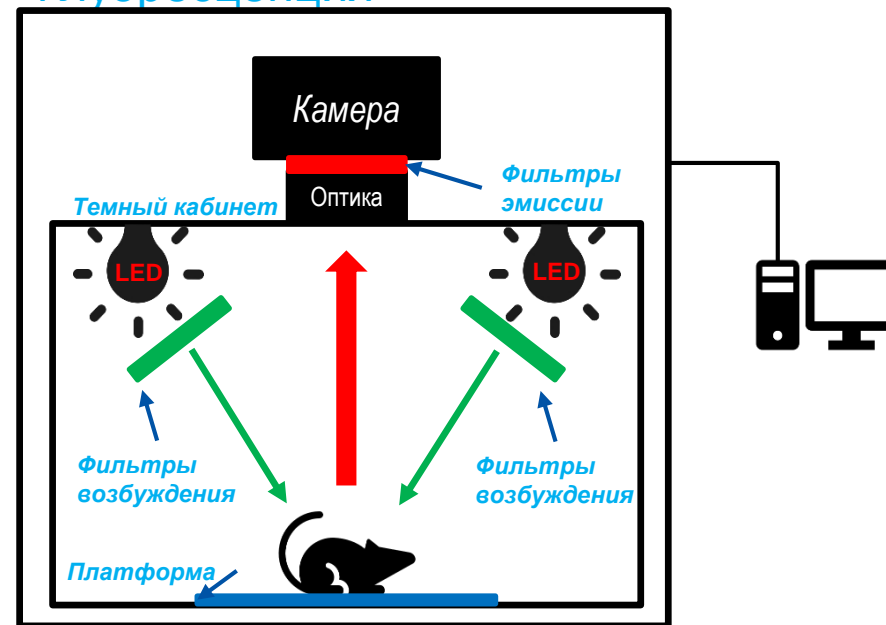
VISQUE™ InVivo Smart

# Детекция оптического сигнала in vivo

## Биолюминесценция



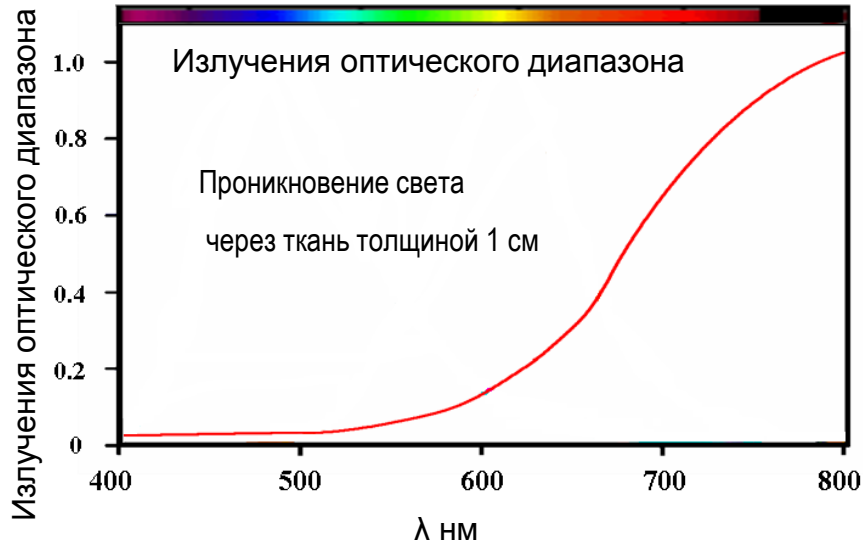
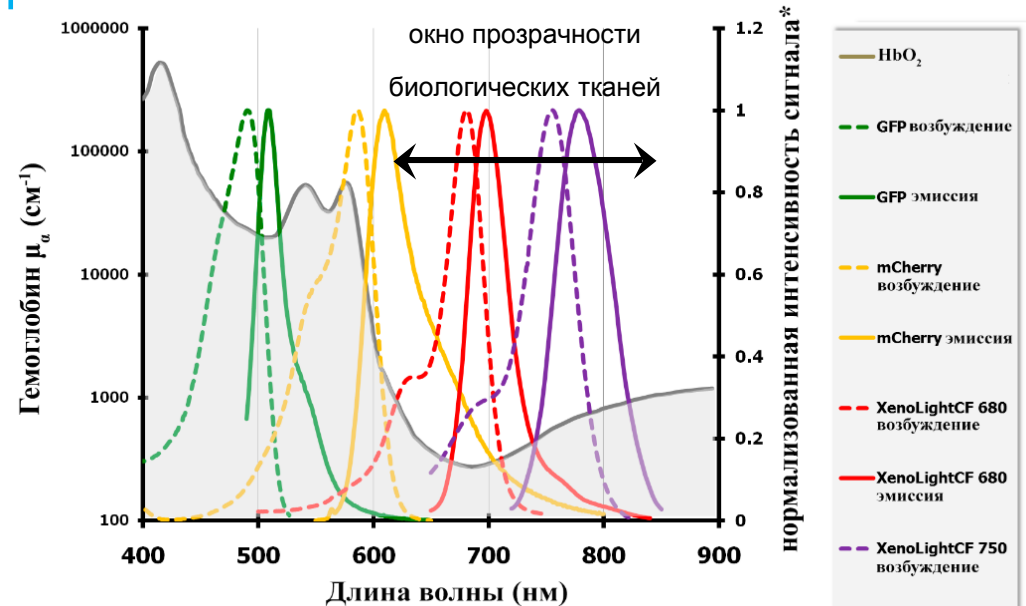
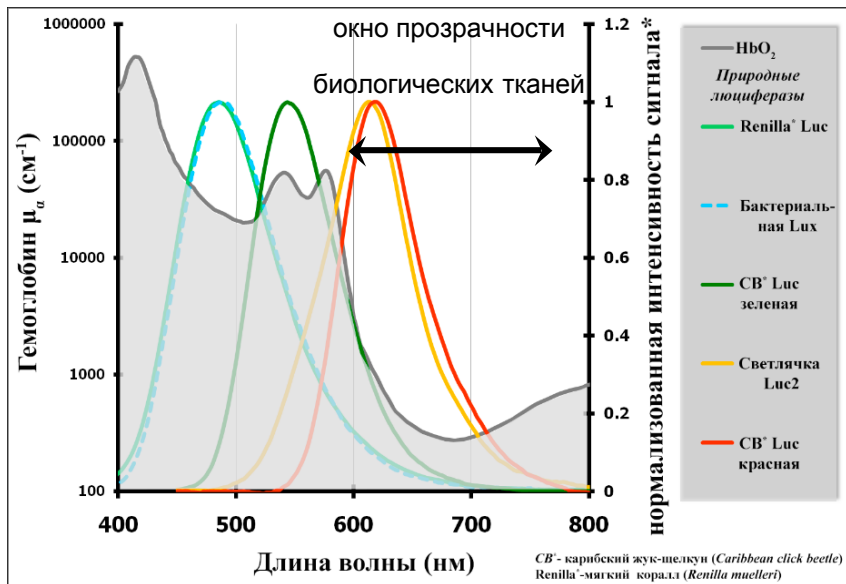
## Флуоресценция



Поток фотонов при прохождении  
через живую ткань рассеивается,  
на поверхности животного образуется световое пятно

VIEWWORKS

# Спектры и распространение света в живой ткани



Диапазоны фильтров	Свет	Возбуждение / Излучение	Флуоресцентные красители
GFP	Blue	Ex: 390 – 490 нм Em: 500 – 550 нм	GFP / EGFP / Alexa488 / FITC / QD 525
PE	Green	Ex: 530 – 570 нм Em: 575 – 640 нм	RFP / DsRed / PE / Alexa 568 / TRITC / QD 585 / QD 605 / QD 625
Cy5.5	Red	Ex: 620 – 650 нм Em: 690 – 740 нм	Cy5.5 / PKE680 / Alexa 680 / Alexa 700 / QD 705
	HyperRed	Ex: 630 – 680 нм Em: 690 – 740 нм	
ICG	NIR	Ex: 740 – 790 нм Em: 810 – 860 нм	ICG / QD800

# Katushka2S, TurboFP650, NirFP для флуоресцентного метода визуализации in vivo

Флуоресцентные белки: Визуализация клеток внутри целых организмов

Таблица основных свойств флуоресцентных белков для визуализации клеток внутри целых организмов

БЕЛОК	Katushka2S	TurboFP650	NirFP
Цвет флуоресценции	дальне-красный	ближне-инфракрасный	ближне-инфракрасный
Максимум возбуждения (нм)	588	592	605
Максимум эмиссии (нм)	633	650	670
Квантовый выход	0.44	0.24	0.06
К экст. ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	67 000	65 000	70 000
Яркость*	29.5	15.6	4.2
Яркость, % от EGFP	89	47	13
pKa	5.4	5.7	4.5
Структура	димер	димер	димер
Токсичность для клеток	нет	нет	нет
Агрегация	нет	нет	нет
Скорость созревания при 37°C	очень быстрая	очень быстрая	быстрая**
Молекулярный вес (kDa)	26	26	26

\* Яркость - произведение коэффициента молярной экстинкции и квантового выхода флуоресценции, деленое на 1000.

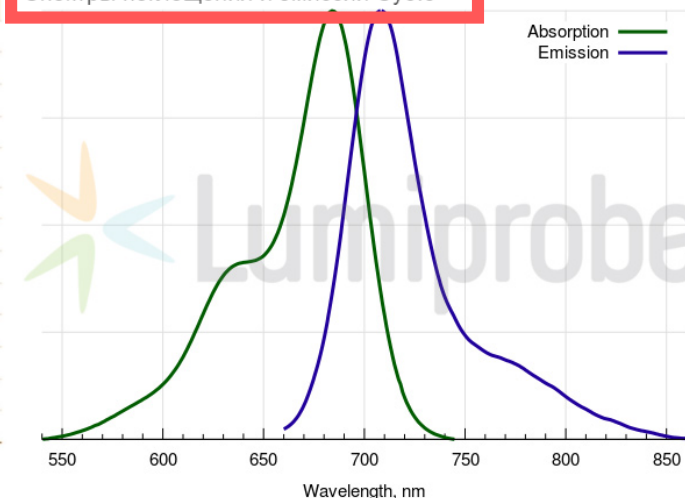
К экст. - коэффициент молярной экстинкции

\*\* Несмотря на то, что NirFP характеризуется быстрым созреванием в *E. coli*, из-за низкой яркости, требуется до 48 часов для его детекции после трансфекции вектора в клетки млекопитающих.

Спектральные характеристики белков для оптической визуализации флуоресцентного сигнала in vivo (<https://evrogen.ru>)

Флуоресцентные красители с флуоресценцией в дальней красной - ближней ИК-области

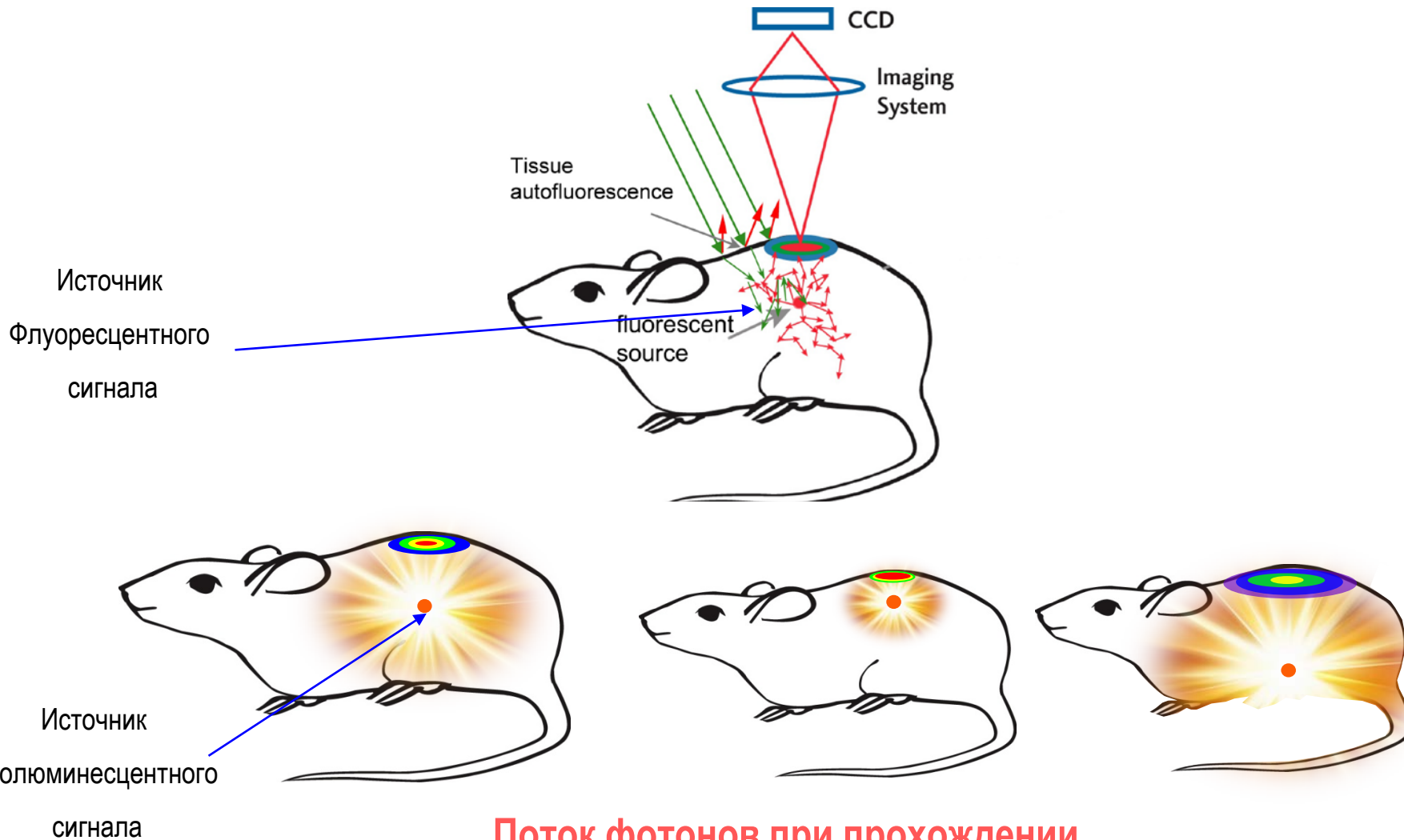
Спектры поглощения и эмиссии Cy5.5



Спектральные характеристики красителя (<https://ru.lumiprobe.com>)



# Детекция оптического сигнала in vivo

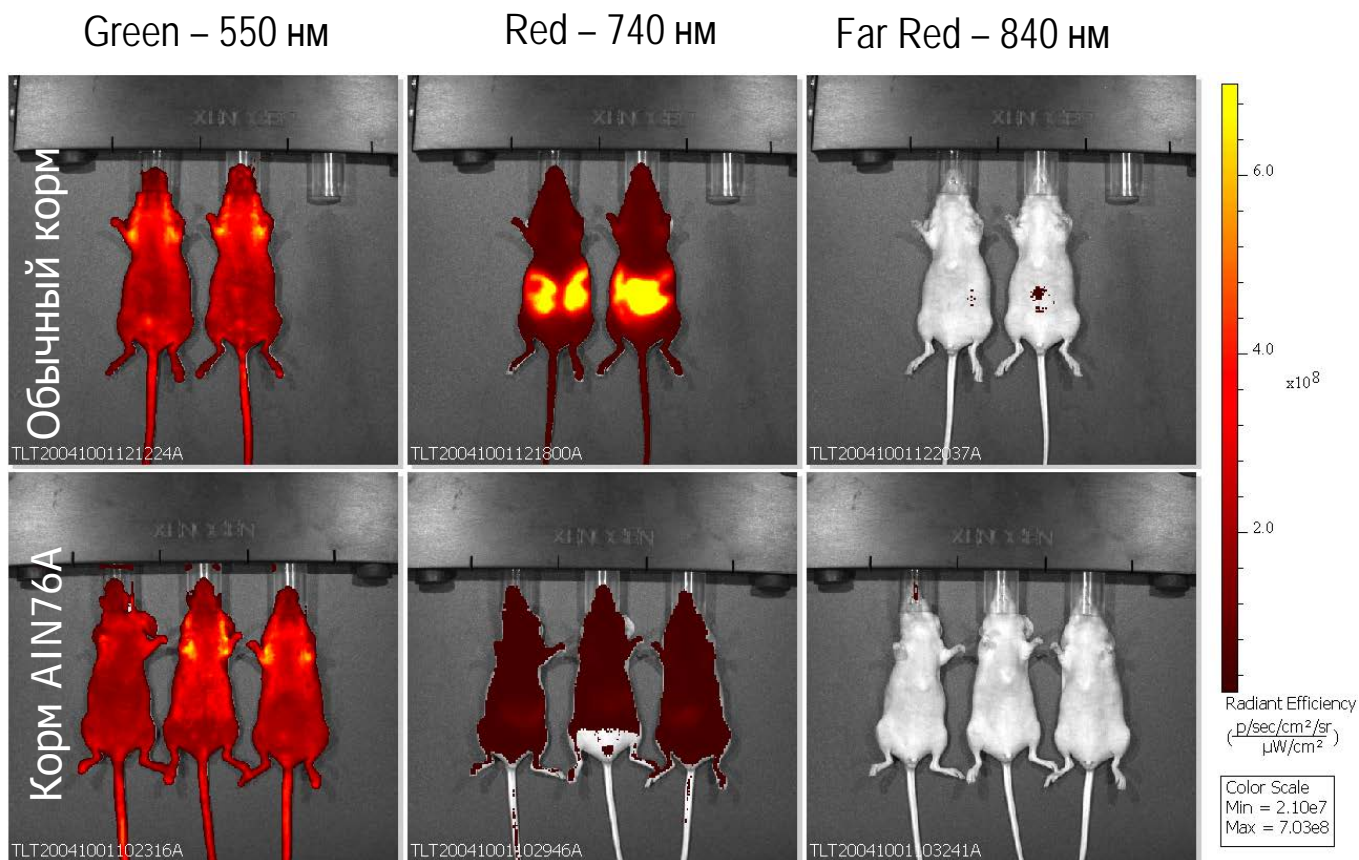


**Поток фотонов при прохождении через живую ткань рассеивается, на поверхности животного образуется световое пятно**

**VIEWWORKS**

# Создание специализированных кормов для уменьшения аутофлуоресцентного сигнала in vivo

- Корм с хлорофиллсодержащими ингредиентами на основе люцерны



- Корм AIN76A на основе оптически неактивных ингредиентов Research Diets Inc. (США)

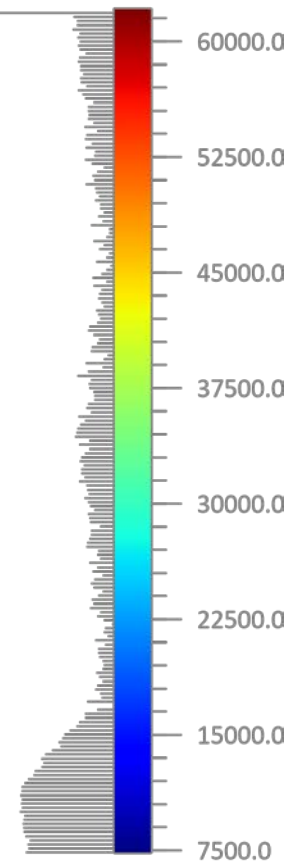
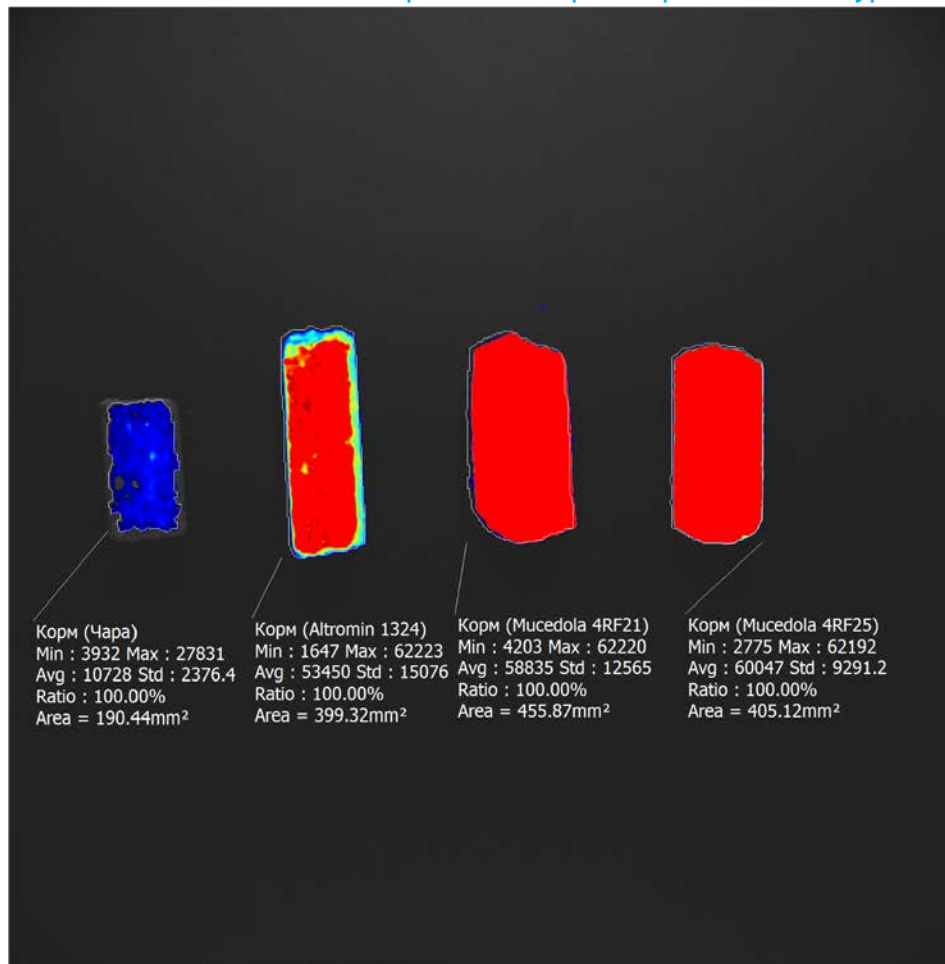


# Детекция сигнала флуоресценции кормов

Состав натурального корма

Пищевая ценность	Ингредиент в составе корма
Углеводы, белок, пищевые волокна	Пшеница
Белок, жиры углеводы	Отруби пшеничные
Белок, жиры углеводы, пищевые волокна	Шрот подс.
	Шрот соевый Кукуруза
Белок, жиры углеводы	Дрожжи кормовые
Жиры	Масло подс.
	Комбинация жиров и масел
Витамины, аминокислоты	Витаминно-минеральная смесь
Минералы	Мука известняковая
Белок, жиры	Мука мясная
	Мука рыбная

Спектральные характеристики натурального корма



Linear Mapping  
Measurement: Intensity

Параметры: Увеличение 1x, Фокус 120 step, Iris F2.8, Выдержка 00:01:000 мсек, Бининг 2x2, -20C<sup>0</sup>

**VIEWWORKS**

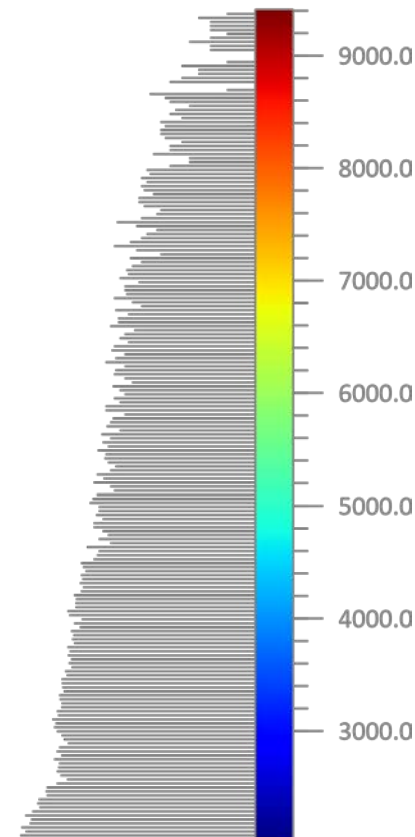
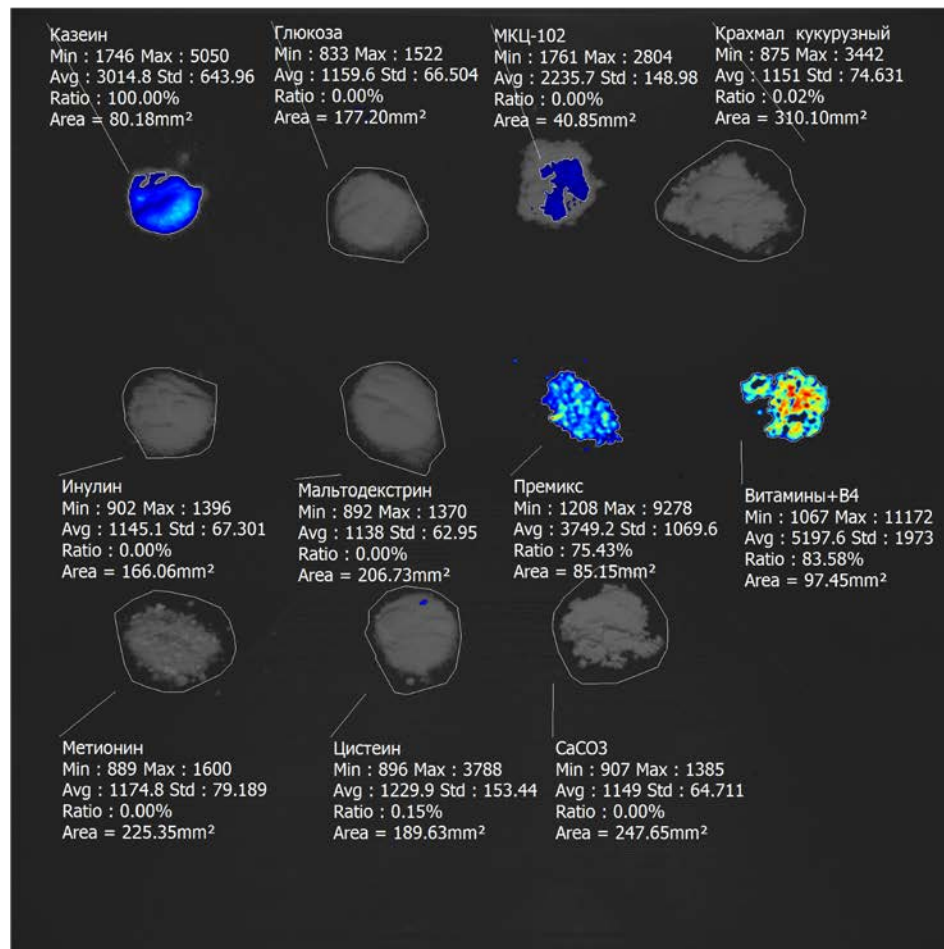
Диапазон	Свет	Возбуждение (нм)	Излучение (нм)
Cy5.5	Red	620 – 650	690 – 740
	HyperRed	630 – 680	

# Детекция сигнала флуоресценции ингредиентов

## Состав полусинтетического корма

## Спектральные характеристики ингредиентов полусинтетического корма

Пищевая ценность	Ингредиент в составе корма
Белок	Казеин
Белок	Кукурузный крахмал
Углеводы	Глюкоза моногидрат
Углеводы	Мальтодекстрин
Пищевые волокна (растворимые)	Инулин
Пищевые волокна (нерастворимые)	Целлюлоза микрокристаллическая
Жиры	Кукурузное масло
Витамины	Метионин-DL
Минералы	Минеральная смесь
Витамины	Витаминная смесь
Витамины	Холин битартрат
Минералы	CaCO <sub>3</sub>



Linear Mapping  
Measurement: Intensity

Параметры: Увеличение 1x, Фокус 120 step, Iris F2.8, Выдержка 00:01:000 мсек, Бининг 2x2, -20C<sup>0</sup>

**VIEWWORKS**

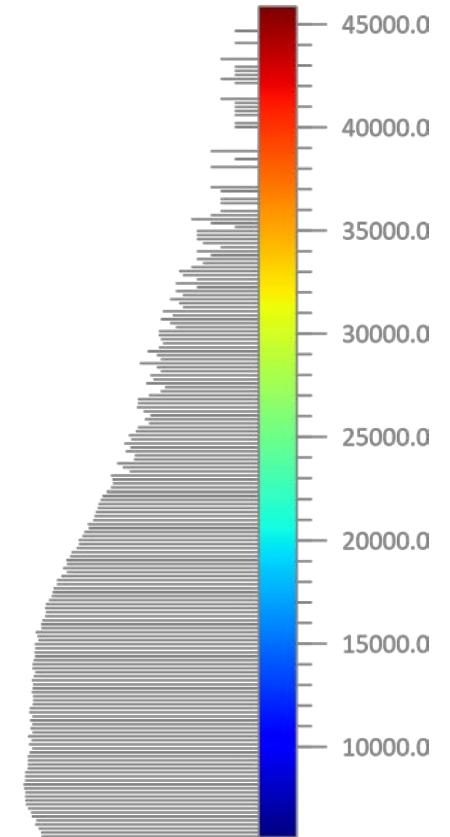
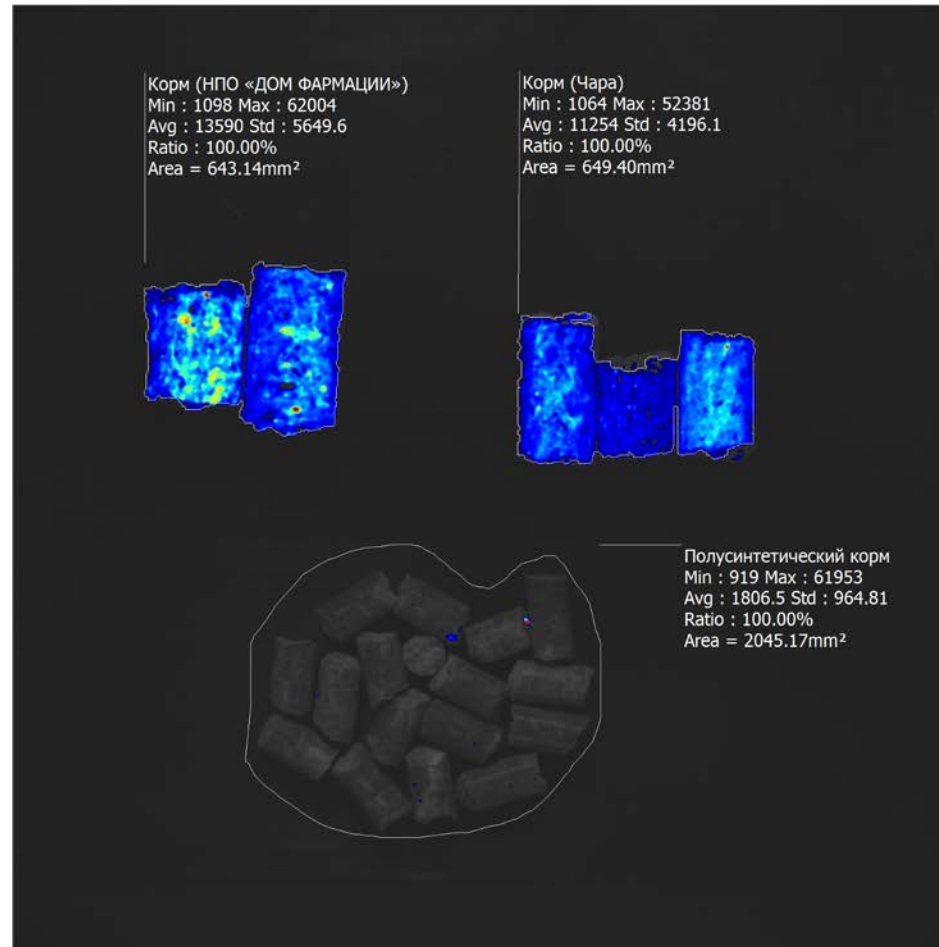
Диапазон	Свет	Возбуждение (нм)	Излучение (нм)
Cy5.5	Red	620 – 650	690 – 740
	HyperRed	630 – 680	



# Детекция сигнала флуоресценции полусинтетического и натуральных кормов

Полусинтетический корм

Спектральные характеристики кормов (навеска 6,5 гр.)



Linear Mapping  
 Measurement: Intensity

Параметры: Увеличение 1x, Фокус 120 step, Iris F2.8, Выдержка 00:01:000 мсек, Бининг 2x2, -20C<sup>0</sup>

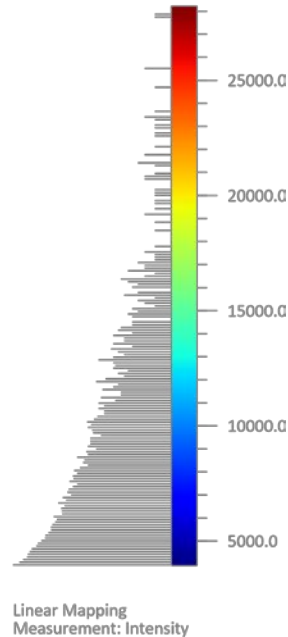
**VIEWWORKS**

Диапазон	Свет	Возбуждение (нм)	Излучение (нм)
Cy5.5	Red	620 – 650	690 – 740
	HyperRed	630 – 680	

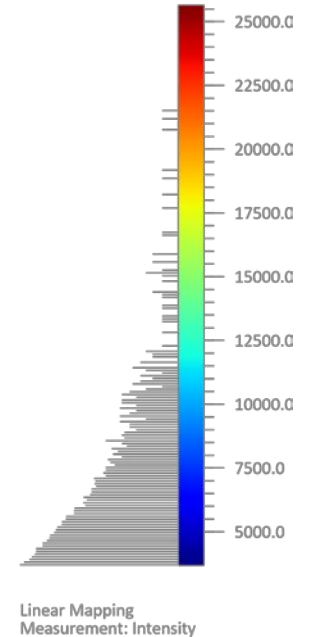


# Детекция сигнала флуоресценции полусинтетического корма после радиационной обработки пучком электронов

Спектральные характеристики  
до облучения (50 гр.)



Спектральные характеристики  
после облучения 40кГр (50 гр.)



Диапазон	Свет	Возбуждение (нм)	Излучение (нм)
Cy5.5	Red	620 – 650	690 – 740
	HyperRed	630 – 680	

Параметры: Увеличение 1x, Фокус 120 step, Iris F2.8, Выдержка 00:01:000 мсек, Бининг 2x2, -20C<sup>0</sup>

**VIEWWORKS**

# Оборудование для исследования полусинтетического корма

Детекция флуоресцентного и  
биолюминесцентного  
сигнала



VISQUE™ InVivo Smart-LF

## Камера

- Камера (КМОП) с сенсором и технологией обратной засветки
- 1824 x 1824 (3.3 мПиксель)
- Охлаждение до , -20 °С
- 94% @ 550 нм
- 220 – 940 нм более 30% квантовой эффективности
- 450 – 675 нм более 85% квантовой эффективности
- Чувствительность) <70 фотонов/ сек/ стерадиан/ см<sup>2</sup>
- Бинниг 1x1; 2x2; 4x4

## Флуоресценция

- Возбуждение: 8 светодиодных ламп (LED)
- Поглощение: 9 узкополосных оптических фильтров

## Оптическая часть

- Автоматический режим по управлению камерой (IRIS), увеличением , фокусным расстоянием
- Кратность увеличения 1x – 3x
- область просмотра 5см - 15см

## Платформа для лабораторных животных

- Размещение 3 мышей
- Подогрев до 36°С
- Адаптер для газовой анестезии

# Спасибо за внимание

**“Ин Виво Технология”** - официальный представитель:

Vieworks Co., Ltd (Республика Корея) - системы оптической визуализации in vivo  
chalov@invivotech.ru , <http://www.invivotech.ru>, +7 (495) 922-25-64

