

活体生物发光成像技术及其在病毒感染研究中的应用

柴凡¹, 周耘裔², 肖庚富^{1,2*}

¹中国科学院武汉病毒研究所, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430071

²武汉大学生命科学学院, 病毒学国家重点实验室, 武汉 430072

摘要:生物发光是动物活体光学成像技术之一, 因其反应灵敏、操作简单、数据精确, 而被广泛地应用于生命科学研究多个领域, 观测活体动物体内病毒复制、肿瘤生长等生命过程。生物发光技术采用荧光素酶基因标记细胞或病毒, 与外源注射的底物荧光素发生反应, 在冷 CCD 成像系统下显像并进行数据记录、分析。本文简要介绍活体生物发光成像这一新技术的原理, 综述了其在发现病毒新的复制位点、研究干扰素及药物对病毒的抑制作用、展示病毒潜伏感染与再激活的历程等方面的应用, 并结合自己工作对该技术及其发展前景进行评述。

关键词: 生物发光, 活体成像, 荧光素酶, 病毒感染, 应用

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0431-07

动物活体成像技术主要分为可见光成像 (optical imaging)、核素成像 (PET/SPECT)、核磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI)、计算机断层摄影 (computed tomography, CT) 成像和超声 (ultrasound) 成像 5 大类。生物发光成像 (Bioluminescence imaging, BLI) 与荧光 (fluorescence) 成像一起, 统称为活体动物内可见光成像技术, 两者的主要区别在于生物发光是用荧光素酶 (luciferase) 基因标记细胞或病毒, 而后者是用荧光报告基因 (GFP)、荧光染料或荧光量子点 (quantum dots) 来进行标记。用荧光素酶标记的细胞或病毒在适宜的条件下, 能稳定地表达荧光素酶, 当有 ATP 及氧气存在时, 再外源 (腹腔或静脉注射) 给予底物荧光素 (luciferin), 荧光素酶便能催化荧光素的氧化反应从而发光。可用高灵敏度的冷 CCD (-90℃) 镜头来精确观测并记录这些生物发光信

号。通过这个系统, 可以研究活体动物体内肿瘤的生长及转移、病毒侵染及感染性疾病发展过程、特定基因的表达与基因治疗等生物学过程^[1], 该技术被广泛地应用于生命科学、医学研究和药物研发等多个领域。本文简要介绍活体生物发光成像技术的原理及其在病毒感染研究中的应用。

1 活体生物发光成像技术

荧光素酶是生物体内催化荧光素或脂肪醛 (firefly aldehyde) 氧化发光的一类酶的总称, 来自于自然界能够发光的生物。根据来源生物种类的不同, 可将荧光素酶分为细菌荧光素酶 (bacterial luciferase, BL) 和萤火虫荧光素酶 (firefly luciferase, FL)。萤火虫荧光素酶可以从很多有机体中分离得到 (表 1), 目前, 以北美萤火虫 (North America

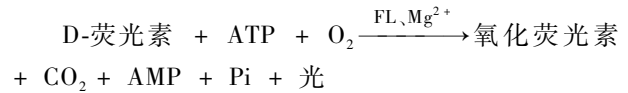
基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展规划之“纳米研究”项目 (2011CB933600)

* 通信作者。Tel: +86-27-87198685; E-mail: xiaogf@wh.iov.cn

作者简介: 柴凡 (1988 -), 男, 湖北黄冈人, 博士研究生, 从事病毒感染与基因治疗方面的研究。E-mail: shaka@126.com

收稿日期: 2010-09-25; **修回日期:** 2010-12-03

firefly) 来源的荧光素酶 (550aa) 应用的最为广泛。在外源注射 D-荧光素 (D-luciferin) 后, 因动物组织或活细胞内通常含有反应所需的 Mg^{2+} 、ATP、 O_2 , 荧光素酶能催化 D-荧光素氧化脱羧, 产生激活态的氧化荧光素, 并放出光子, 产生 550 - 580nm 的荧光。有资料显示, 25℃ 产生 578nm 的荧光, 而活体动物的体温一般在 37℃, 可产生光谱红移现象, 使最大发射峰增长到 612nm^[2]。由于红光和红外光具有较好的穿透能力, 特别适于对动物组织进行检测。其化学反应式如下:



从海肾 (Renilla) 和海洋桡足类 (Gaussia) 分离到的荧光素酶作用于底物腔肠素后产生 480nm 的蓝光, 催化反应无需 ATP 的参与, 且分子小 (311aa 或 185aa), 可以更好地插入到病毒基因组中, 也能用于表达基因融合蛋白^[3]。但其发出的蓝光穿透力较弱, 且底物腔肠素容易自氧化, 因此, 这两种荧光素酶的应用受到一定程度的限制^[4]。

表 1 活体生物发光成像中使用的荧光素酶^[4]

Table 1 Luciferase enzymes for BLI

Organism	Luciferase	Length	Peak emission at 37℃/nm	Substrate	ATP dependence	Secretion signal
<i>Photinus pyralis</i>	FLUC	550aa	612	D-luciferin	Yes	-
<i>Renilla reniformis</i>	RLUC	311aa	480	Coelenterazine	-	-
<i>Gaussia princeps</i>	GLUC	185aa	480	Coelenterazine	-	Yes

上述每个催化反应只能释放 1 个光子, 无法用肉眼直接观察到, 故常用美国精诺真公司 (Xenogen Corp.) 生产的 IVIS 小动物成像系统和高灵敏度的冷 CCD (cool-CCD) 镜头来精确观测并记录这些发光信号。暗电流是 CCD 的噪音, 当温度降到 -90℃ 时, 暗电流可以降低到忽略不计的程度, 从而极大地降低了背景噪音信号, 并且量子效率也得到很好的表现。

病毒基因组本身就很小, 将荧光素酶基因整合到病毒基因组中且不影响病毒的感染性较为困难。但选择合适的启动子和插入位点, 病毒也能够持续表达荧光素酶^[5-6]。值得一提的是, 该系统提供的荧光量子数据取决于解剖部位 (anatomic site) 而不是荧光素酶的浓度, 因为不同器官和不同深度的成像对生物发光有不同程度的减弱作用。对特定解剖部位而言, 实验者可以得出结论说病毒复制的增加使生物发光更强, 并有可能做出生物发光强度-病毒滴度的标准曲线。但从不同部位发射出的相同强度的生物发光却不能说明这些部位拥有相同数量的病毒^[7]。

2 活体生物发光成像技术在病毒感染研究中的应用

无损和持续是活体生物发光成像技术突出的两大优点, 该技术的应用带来了许多病毒学研究上的新发现。

2.1 发现病毒新的复制位点

Milho^[8] 等发现小鼠鼻内感染鼠 IV 型疱疹病毒 (murine herpesvirus-4, MuHV-4) 后, 荧光素酶在鼻子、肺脏和淋巴组织中持续表达 7 - 10 天, 尤其是在子宫淋巴结表面持续稳定的表达长达 30 日之久。该研究首次发现 MuHV-4 能够感染宿主的鼻子, 并且鼻子是鼻腔感染病毒时唯一表达荧光素酶的非淋巴组织。Raaben 等^[9] 构建了能表达荧光素酶的重组鼠肝炎冠状病毒 (MHV), 他们发现经腹膜接种后, 可观察到病毒复制主要发生在肝脏中, 偶尔也在肠道中复制。令人感兴趣的是居然在小鼠的尾巴和爪子中也能观察到病毒的复制, 这是利用 BLI 观察 MHV 复制的新发现。Hwang 等^[10] 构建了能被病毒 M3 启动子启动表达荧光素酶的鼠 γ 疱疹病毒 68 (MHV-68), 即重组病毒 M3FL。对 M3FL 感染的实时监测发现了唾液腺等 MHV-68 新的复制位点。

2.2 研究病毒进入宿主的方式

Harmache 等^[11] 构建了重组的鱼传染性造血组织坏死病毒 (IHN), 发现感染 IHN 后 3 周, 病毒一直存在于鱼鳍之中, 在随后的动态观察中, 证实了鱼鳍基部是 IHN 感染鲑鱼的主要入侵门户。Cook 等^[12] 发现辛德毕斯病毒 (Sindbis virus, SV) 进入神经系统主要是通过逆向轴突运输进行的, 包括神经元刺激支配的复制起始等系列行为。

2.3 比较同种病毒不同株的毒力, 预测病毒的致死性

Osorio^[13] 构建了 2 株能表达荧光素酶的重组猴痘病毒 (Monkeypox Viruses, MPXV), 对感染病毒后的 SCID 小鼠进行生物发光成像观察, 发现重组 MPXV-USA/Luc⁺ 在组织中发射的荧光较之 MPXV-Congo/Luc⁺ 要少, 表明 MPXV-Congo/Luc⁺ 病毒的复制更加强且烈且在机体组织中传播更广。还发现 MPXV-USA/Luc⁺ 较之 MPXV-Congo/Luc⁺ 在组织中的扩散要大约晚 2 天。Cook^[12] 构建了能表达荧光素酶的强毒和弱毒的重组辛德毕斯病毒, 利用 Xenogen IVIS 监测病毒的复制位点和区域。这个系统能够分辨出强毒株或弱毒株病毒以及易感小鼠或抗性小鼠。

Zaitseva^[14] 构建了重组的 WR 牛痘病毒 (Vaccinia Virus), 发现在 3 天后对脾脏和 5 天后对肝脏处进行荧光测量可对致死性提供比较牢固精准的预测。对不同器官和不同时间点的生物荧光进行多重逻辑回归分析可以对此模型的预测准确性进行进一步的校核。

2.4 研究干扰素对病毒复制的限制作用、药物对病毒病的治疗作用

Luker^[15] 等用荧光素酶标记单纯疱疹病毒 (HSV-1), 对重组病毒在小鼠体内的感染和扩散过程进行非损伤性检测。他们研究了 HSV-1 感染不同类型干扰素 (IFN) 受体敲除的小鼠后病毒复制特性和趋向性的改变, 发现在足部或眼部感染后, 在 IFN2 I / II 型受体均缺陷的小鼠体内 HSV-1 可以扩

散进入大多数实质器官, 常常导致致死性感染; 而在 IFN2 I 受体缺陷的小鼠体内重组病毒的扩散范围则小得多, 病毒复制数量也少得多; 在 IFN2 II 受体缺陷以及野生型小鼠体内则只在感染局部发生短暂且自限性的扩散。该研究证明了 I、II 型 IFN 受体在限制 HSV-1 全身扩散过程中的效应。Raaben^[9] 等发现鼠肝炎冠状病毒 (MHV) 的传播不仅与病毒的刺突蛋白 S 有关, 也与所选取的小鼠种类有关。在缺乏 I 型干扰素的小鼠体内观察到了 MHV 的广泛散布, 在注射 I 型干扰素后, 病毒在体内的扩散得到了一定程度的抑制。

Luker^[16] 等构建了能够表达荧光素酶的重组 KOS 株 HSV-1。病毒经过小鼠的爪子感染后, 能在腹腔、脑部和眼部检测到萤火虫荧光素酶的表达。当向感染小鼠注射抗 HSV-1 药物伐昔洛韦时, 可以看到明显的剂量依赖性减少的萤火虫荧光素酶活力变化。

2.5 观察病毒的潜伏感染及其再激活

Hwang^[10] 观察到鼠 γ 疱疹病毒 68 的重组病毒 M3FL 从潜伏感染到再激活的全过程 (图 1)。研究发现腹膜接种 M3FL 后 12 天即可观察到病毒的复制, 接种后 24 天宿主免疫系统即开始清除病毒, 随之进入潜伏感染状态。潜伏感染病毒能够被蛋白酶抑制剂万珂 (Velcade) 或免疫抑制剂环孢菌素 A (cyclosporine A) 所诱导激活。在感染后 89 天注射 50 mg/kg 的环孢菌素 A, 第 92-95 天又重新观察到了病毒的复制现象。此发现证实了鼠 γ 疱疹病毒在体内的复制、潜伏和再激活是病毒-宿主免疫系统

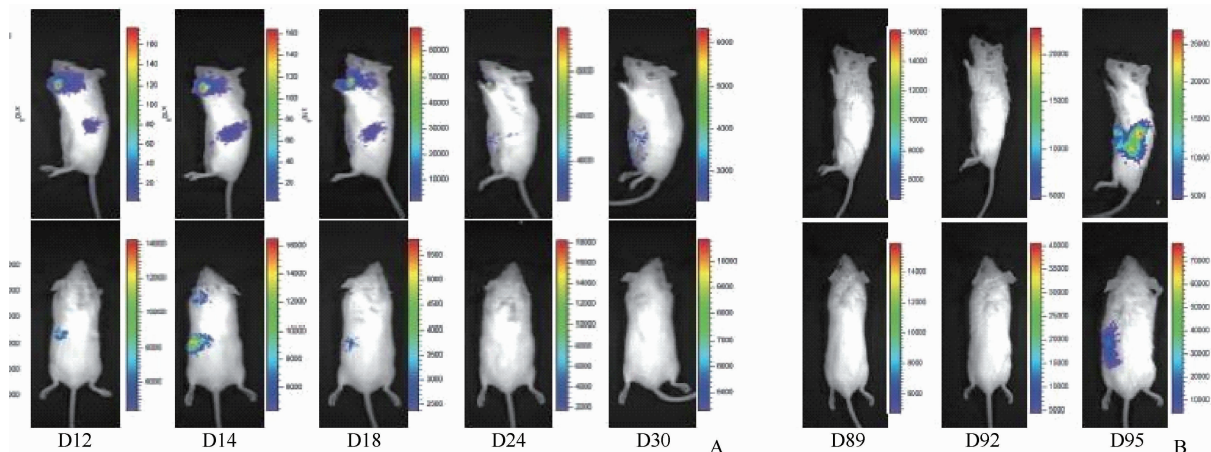


图 1 口服感染病毒的复制、潜伏 (A) 和 50 mg/kg 环孢菌素 A 处理后的再激活 (B)^[10]

Fig. 1 Clearance of orally infection (A) and after the treatment of 50 mg/kg cyclosporine A^[10].

的动态相互作用所控制的。

2.6 转基因报告小鼠的应用

转基因报告小鼠可用于直接观测宿主对于病毒侵染作出的反应,从宿主的角度为病毒侵染研究提供了新的思路。

HSV reporter mice; Luker^[17]实现了荧光素酶基因在单纯疱疹病毒胸苷激酶(thymidine kinase, TK)基因启动子调控下表达,成功地构建了TK-firefly luciferase 报告小鼠。实验中,利用3种不同株系的单纯疱疹病毒(KOS, 17, McKrae)分别构建三组TK-firefly luciferase 小鼠,研究发现小鼠在未受病毒感染时在爪子、耳周等部位发出轻微的荧光信号,病毒感染后发光的面积扩大且强度增强10倍以上,并且荧光强弱与病毒毒性强弱和病毒滴度呈正相关。另外,ICP6(编码单纯疱疹病毒1型的核糖核酸还

原酶)也成功用于构建该类报告小鼠^[18]。

Gal/upstream activation sequence (Gal/UAS) reporter mice; Pichler A^[19]设计的Gal4-VP16(酵母转录因子Gal4和HSV-1 VP16的融合蛋白)可与小鼠的UAS结合,然后启动下游荧光素酶基因的表达。Ochiai^[20]在荧光素酶基因的上下游各插入5拷贝的G5(Gal4识别序列),使得荧光素酶长期大量表达。值得一提的是,Gal4-VP16(227aa)比Fluc(550aa)小得多,因此将其插入RNA病毒的可行性提高,并且Gal4/UAS小鼠可以检测到任何插入Gal4的病毒在其体内的复制。

目前,Jackson Laboratory等已推出JAX[®] Mice系列40余种转荧光素酶基因报告小鼠,下表(表2)仅列出可应用在病毒感染研究中的代表性转基因小鼠。

表2 可应用在病毒感染引发的炎症反应等研究中的荧光素酶报告小鼠

Table 2 Representative luciferase reporter mice used in the research of inflammation stimulated by viral infection

Source	Strain	Application
Taconic	BALB/C-Tg(NFκB-luc)-Xen	Immunomodulation of NFκB, IκBα, Epx, IL2, TNFα, NFAT and other factors involved in inflammation response to viral infection and treatment of relative diseases ^[21,22,23]
	BALB/C-Tg(IκBα-luc)-Xen	
	IFVB/N-Tg(Epx-luc)-Xen	
	CD1-Tg(IL2-luc)-Xen	
	BALB/C-TNFα-luc-Xen	
Jackson Laboratory	CD1-Tg(Gadd45β-luc)-Xen	
	(NFκB/Fos-luc)26Rinc/J	
	B10. Cg-H2k Tg(IL2/NFAT-luc)83Rinc/J	

3 评述和展望

荧光成像技术需要用激发光激发荧光报告蛋白或荧光染料,但生物体内很多物质在激发光的激发下都会发光。当被标记的靶点深藏于组织内部时,需要较高能量的激发光,会产生很强的非特异性荧光,从而导致较低的信噪比。另外,GFP荧光蛋白发射波长较短,不易有效穿透活体组织从而清晰成像。因而,为了检测到更加明显的信号,实验过程中,往往还是需要不同时间点将动物宰杀,取出待检测的器官、组织或细胞进行分析,未能做到无损和连续^[24-25]。包括近红外荧光量子点在内的系列量子点的出现解决了光量子产率低、易淬灭、不稳定的问题,被广泛应用于病毒等生物分子的标记和示踪^[26]。本实验室罗侃^[27]成功地利用量子点标记朊病毒(prion)蛋白并对其跨越神经细胞胞膜、胞内运输的动态过程进行了实时观测。但体内荧光成像往

往需要检测 10^6 个以上的细胞,量子点作为无机纳米材料无法随病毒复制而大量扩增的特点,限制了量子点标记病毒在动物体内示踪中的广泛应用。

相对荧光成像技术而言,活体生物发光成像更有优势,它利用酶和外源底物D-荧光素的作用而发光,特异性极强。因动物本身没有自发光,使得生物发光具有较低的背景、较高的信噪比,检测灵敏度大大提高。整合入病毒基因组的荧光素酶基因可以随病毒复制而大量扩增,同时,D-荧光素自身无毒且可随循环系统运输至各组织并穿越血脑屏障,这样,酶促荧光素的氧化反应发光使动物体内各组织包括脑部成像成为可能^[28-29]。此外,荧光成像技术中,激发光需要穿过组织到达靶点,路径较长且光束覆盖面有限,信号水平取决于激发光的强度、发光细胞的数量、靶点的深度等一系列因素,使得荧光强度很难定量。与之相反,生物发光信号则可以精确定位,因为荧光酶在细胞中是稳定表达的,单位细胞的发光数量稳定,即使标记细胞在动物体内有复杂的定位,

也可以从动物体表的信号水平直接得出发光细胞的相对数量^[30]。

除了在病毒感染研究中的应用外,生物发光成像技术也已经被应用于细菌、真菌等微生物感染研究^[31-33]多个领域,提升了感染与免疫研究的层次和水平。但该技术仍有一些需要改进的细节。首先,每个荧光素酶催化的反应只产生1个光子,为提高检测灵敏度,必须进一步改进冷 CCD 等检测系统来捕捉更加微弱的发光信号。其次,有待利用蛋白质工程技术对荧光素酶进行改造,使其酶促反应发射光波长向近红外乃至红外方向进一步增加,以提高组织穿透力。这方面已经开始了具有开拓意义的尝试^[34,35],但未能取得显著突破。再者,生物发光成像需要先对病毒、小鼠等生物进行基因嵌入改造。转基因小鼠技术极为复杂,购置也较昂贵。有些基因组较小的病毒,比如3.2kb的乙型肝炎病毒无法承载长达1.65kb的荧光素酶基因,是否有可能进一步截短荧光素酶基因并保持酶活,也值得探索。最后,成像前需要外源注射底物D-荧光素,其质量、注射时机和剂量均会对实验数据产生影响,亟需确立国际公认的标准化操作程序(SOP)。相信随着上述问题的逐步解决,活体生物发光成像技术必将在微生物感染与免疫研究和药物研发中得到更加广泛的应用,并取得丰硕的成果。

参考文献

- [1] Dothager RS, Flentie K, Moss B, Pan MH, Kesarwala A, Piwnica-Worms D. Advances in bioluminescence imaging of live animal models. *Current opinion in biotechnology*, 2009, 20(1):45-53.
- [2] Zhao H, Doyle TC, Coquoz O, Kalish F, Rice BW, Contag CH. Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo. *Journal of biomedical optics*, 2005, 10(4):41210.
- [3] Venisnik KM, Olafsen T, Gambhir SS, Wu AM. Fusion of Gaussia luciferase to an engineered anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody for in vivo optical imaging. *Molecular imaging and biology*, 2007, 9(5):267-277.
- [4] Luker KE, Luker GD. Applications of bioluminescence imaging to antiviral research and therapy: multiple luciferase enzymes and quantitation. *Antiviral research*, 2008, 78(3):179-187.
- [5] Tarantal AF, Lee CC. Long-term luciferase expression monitored by bioluminescence imaging after adeno-associated virus-mediated fetal gene delivery in rhesus monkeys (Macaca mulatta). *Human gene therapy*. 2010, 21(2):143-148.
- [6] Asokan A, Johnson JS, Li C, Samulski RJ. Bioluminescent virion shells; new tools for quantitation of AAV vector dynamics in cells and live animals. *Gene therapy*. 2008, 15(24):1618-1622.
- [7] Luker KE, Luker GD. Real-time bioluminescence imaging of viral pathogenesis. *Methods in molecular biology*. 2009, 574:125-135.
- [8] Milho R, Smith CM, Marques S, Alenquer M, May JS, Gillet L, Gaspar M, Efstathiou S, Simas JP, Stevenson PG. In vivo imaging of murid herpesvirus-4 infection. *The Journal of general virology*. 2009, 90(Pt 1):21-32.
- [9] Raaben M, Prins HJ, Martens AC, Rottier PJ, de Haan CA. Non-invasive imaging of mouse hepatitis coronavirus infection reveals determinants of viral replication and spread in vivo. *Cellular microbiology*, 2009, 11(5):825-841.
- [10] Hwang S, Wu TT, Tong LM, Kim KS, Martinez-Guzman D, Colantonio AD, Uittenbogaart CH, Sun R. Persistent gammaherpesvirus replication and dynamic interaction with the host in vivo. *Journal of virology*, 2008, 82(24):12498-12509.
- [11] Harmache A, LeBerre M, Droineau S, Giovannini M, Brémont M. Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for Novirhabdovirus. *Journal of virology*, 2006, 80(7):3655-3659.
- [12] Cook SH, Griffin DE. Luciferase imaging of a neurotropic viral infection in intact animals. *Journal of virology*, 2003, 77(9):5333-5338.
- [13] Osorio JE, Iams KP, Meteyer CU, Rocke TE. Comparison of monkeypox viruses pathogenesis in mice by in vivo imaging. *PLoS One*. 2009, 4(8):e6592.
- [14] Zaitseva M, Kapnick SM, Scott J, King LR, Manischewitz J, Sirota L, Kodihalli S, Golding H. Application of bioluminescence imaging to the prediction of lethality in vaccinia virus-infected mice. *Journal of virology*, 2009, 83:10437-10447.
- [15] Luker GD, Prior JL, Song J, Pica CM, Leib DA. Bioluminescence imaging reveals systemic dissemination of herpes simplex virus type 1 in the absence of interferon receptors. *Journal of virology*. 2003, 77(20):11082-11093.
- [16] Luker GD, Bardill JP, Prior JL, Pica CM, Piwnica-

- Worms D, Leib DA. Noninvasive bioluminescence imaging of herpes simplex virus type 1 infection and therapy in living mice. *Journal of virology*. 2002, 76 (23):12149-12161.
- [17] Luker KE, Schultz T, Romine J, Leib DA, Luker GD. Transgenic reporter mouse for bioluminescence imaging of herpes simplex virus 1 infection in living mice. *Virology*. 2006, 347, 286-295.
- [18] Olivo PD. Detection of herpes simplex virus by measurement of luciferase activity in an infected-cell lysate. *Journal of virological methods*. 1994, 47(1-2): 117-128.
- [19] Pichler A, Prior JL, Luker GD, Piwnica-Worms D. Generation of a highly inducible Gal4-Fluc universal reporter mouse for in vivo bioluminescence imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008, 105 (41): 15932-15937.
- [20] Ochiai H, Harashima H, Kamiya H. Positive feedback system provides efficient and persistent transgene expression. *Molecular pharmaceutics*. 2010, 7 (4): 1125-1132.
- [21] Carlsen H, Moskaug JØ, Fromm SH, Blomhoff R. In vivo imaging of NF-kappa B activity. *Journal of immunology*. 2002, 168(3):1441-1446.
- [22] Lienenklaus S, Cornitescu M, Zietara N, Łyszkiwicz M, Gekara N, Jabłńska J, Edenhofer F, Rajewsky K, Bruder D, Hafner M, Staeheli P, Weiss S. Novel reporter mouse reveals constitutive and inflammatory expression of IFN-beta in vivo. *Journal of immunology*. 2009, 183(5):3229-3236.
- [23] Liu P, Aitken K, Kong YY, Opavsky MA, Martino T, Dawood F, Wen WH, Kozieradzki I, Bachmaier K, Straus D, Mak TW, Penninger JM. The tyrosine kinase p56lck is essential in coxsackievirus B3-mediated heart disease. *Nature medicine*. 2000, 6(4):429-434.
- [24] Lan SY, Yu T, Xia ZS, Yuan YH, Shi L, Lin Y, Huang KH, Chen QK. Musashi 1 positive cells derived from mouse embryonic stem cells can differentiate into neural and intestinal epithelial-like cells in vivo. *Cell biology international*. 2010,34(12):1171-1180.
- [25] Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, García-Sastre A. Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107(25):11531-11536.
- [26] Rawsthorne H, Phister TG, Jaykus LA. Development of a fluorescent in situ method for visualization of enteric viruses. *Applied and environmental microbiology*. 2009, 75(24):7822-7827.
- [27] Luo K, Li S, Xie M, Wu D, Wang W, Chen R, Huang L, Huang T, Pang D, Xiao G. Real-time visualization of prion transport in single live cells using quantum dots. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010, 394(3):493-497.
- [28] Jang SJ, Kang JH, Kim KI, Lee TS, Lee YJ, Lee KC, Woo KS, Chung WS, Kwon HC, Ryu CJ, Choi TH, Choi CW, Lim SM, Cheon GJ. Application of bioluminescence imaging to therapeutic intervention of herpes simplex virus type I - Thymidine kinase/ganciclovir in glioma. *Cancer letters*. 2010,297(1):84-90.
- [29] Kim TS, Choi HS, Ryu BY, Gang GT, Kim SU, Koo DB, Kim JM, Han JH, Park CK, Her S, Lee DS. Real-time in vivo bioluminescence imaging of lentiviral vector-mediated gene transfer in mouse testis. *Theriogenology*. 2010,73(1):129-138.
- [30] Tseng JC, Hurtado A, Yee H, Levin B, Boivin C, Benet M, Blank SV, Pellicer A, Meruelo D. Using sindbis viral vectors for specific detection and suppression of advanced ovarian cancer in animal models. *Cancer research*. 2004, 64(18): 6684-6692.
- [31] Doyle TC, Nawotka KA, Kawahara CB, Francis KP, Contag PR. Visualizing fungal infections in living mice using bioluminescent pathogenic *Candida albicans* strains transformed with the firefly luciferase gene. *Microbial pathogenesis*. 2006, 40(2):82-90.
- [32] Francis KP, Joh D, Bellinger-Kawahara C, Hawkinson MJ, Purchio TF, Contag PR. Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct. *Infection and immunity*. 2000, 68(6):3594-3600.
- [33] Francis KP, Yu J, Bellinger-Kawahara C, Joh D, Hawkinson MJ, Xiao G, Purchio TF, Caparon MG, Lipsitch M, Contag PR. Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel gram-positive lux transposon. *Infection and immunity*. 2001, 69(5):3350-3358.
- [34] Mezzanotte L, Fazzina R, Micheli E, Tonelli R, Pession A, Branchini B, Roda A. In vivo bioluminescence imaging of murine xenograft cancer models with a red-shifted thermostable luciferase. *Molecular imaging and biology*. 2010, 12(4):406-414.
- [35] Kimura T, Hiraoka K, Kasahara N, Logg CR. Optimization of enzyme-substrate pairing for bioluminescence imaging of gene transfer using Renilla and *Gussia* luciferases. *The journal of gene medicine*.

2010, 12(6):528-537.

Bioluminescence in-vivo imaging technology and its application in the study of viral infection—A review

Fan Chai¹, Yunyi Zhou², Gengfu Xiao^{1,2}¹State Key Laboratory of Virology, Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071, China²State Key Laboratory of Virology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China

Abstract: Bioluminescence imaging is one of the bio-optical imaging techniques which report definite biological event in living animals with genetic modification. With high sensitivity, simple operation and high precision, it is particularly applied in observing vital processes like viral infection and tumor growth *in vivo*. We summarize the principle of bioluminescence imaging, introduce its application in finding virus replication site, study of interferon (IFN) inhibiting-virus effect and real-time visualization of viral latent infection and reactivation, and preview the trend of bioluminescence imaging technological development.

Keywords: bioluminescence, in-vivo imaging, luciferase, viral infection, application

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program) -Nanoscience and Nanotechnology(2011CB933600)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87198685; E-mail: xiaogf@wh.iov.cn

Received: 25 September 2010/ Revised: 3 December 2010

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2011 年 4 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008	月刊	48	1 - 12
2009	月刊	49	1 - 12
2010	月刊	50	1 - 12
2011	月刊	51	1 - 4