

AAV-CaMKIIa-GCaMP6f-P2A-nls-dTomato

产品说明书

货号：GC050401442

血清型：AAV2/9、AAV-PHP.eB

滴度： $\geq 1 \times 10^{13}$ vg/mL

规格：5uL 500.00 20uL 1500.00 50uL 2500.00;100uL 4500.00

1. 背景

1.1 CaMKIIα 启动子介绍

在神经科学领域，精准靶向特定类型的神经元是研究复杂神经环路的基本前提。CaMKIIα启动子正是实现这一目标的核心工具之一，主要应用于兴奋性神经元中特异性表达。

CaMKIIα启动子来源于编码钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 IIα亚基的基因(基因 ID: 12322, 启动子长度约 1.3kb)。CaMKIIα是一种受细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度调控的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，在突触可塑性、学习记忆等过程中发挥关键作用。在前脑区域，CaMKIIα亚基特异性表达于兴奋性（谷氨酸能）主神经元中，因此其启动子序列被分离出来，用作驱动外源基因在同类神经元中的表达。

CaMKIIα启动子被视为前脑谷氨酸能神经元的特异性启动子，尤其是在大脑皮层和海马体等区域。在不同脑区，CaMKIIα启动子的表现存在差异。例如，在杏仁中央核（CEA）区域，被标记的主要是兴奋性神经元；而在相邻的杏仁基底外侧核（BLA），标记特异性则有所不同。这种区域差异提示，使用该启动子时需要充分考虑目标脑区的特性。

1.2 GCaMP6f 荧光介绍

GCaMP6f 是基因编码钙离子指示剂（GECI）GCaMP6 家族中的“快速反应”蛋白。（其余两个为 GCaMP6s，GCaMP6m），被广泛用于将神经电活动转化为可视的荧光信号，能以较高的时间分辨率报告单个动作电位，是研究快速神经环路动态的关键工具之一。

表 1 GCaMP6 各变体的关键性能指标比较

| 指示剂                    | GCaMP6s         | GCaMP6m        | GCaMP6f       |
|------------------------|-----------------|----------------|---------------|
| 单动作电位ΔF/F <sub>0</sub> | 13.3 ± 0.5      | 中等水平           | 10.8 ± 0.7    |
| 衰减半衰期 t <sub>1/2</sub> | 慢 (~100-150 ms) | 中 (~75-100 ms) | 快 (~50-75 ms) |
| 基线亮度（相对 6m）            | 1.45 ± 0.57     | 1.00 ± 0.28    | 1.11 ± 0.20   |
| 衰减时间常数τ（s）             | 8.4 ± 5.0       | 6.3 ± 2.9      | 2.7 ± 2.0     |
| 单 AP 检测率               | 99 ± 0.2%       | 略低于 6s         | 略低于 6s        |

GCaMP6f 是一个经过工程改造的融合蛋白，由三部分组成：第一部分为 M13 肽段，为钙调蛋白的互作蛋白；第二部分为 cpGFP，作为信号的发光基团；第三部分为钙离子的探针“感应器”。当神经元放电导致细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度升高时，Ca<sup>2+</sup>与钙调蛋白结合，引发 M13 肽段与钙调蛋白的相互作用，进而诱导 cpGFP 的构象变化，使其荧光强度显著增加。而当 Ca<sup>2+</sup>浓度回落，荧光强度也随之恢复，直接反映了神经元的活跃程度。

在 GCaMP6 基础上的系统性优化。通过定向进化筛选，jGCaMP7 在多个性能维度实现了同步提升，同时衍生出四个变体：jGCaMP7s（高灵敏度）、jGCaMP7f（快速）、jGCaMP7b（高基线亮度，适合树突棘成像）和 jGCaMP7c（特性介于 b 和 f 之间）。以及最新一代 jGCaMP8 指示剂，jGCaMP8 指示剂得关键创新在于钙调蛋白结合肽的替换

——从传统的 RS20 或 M13 肽段更换为来自内皮型一氧化氮合酶的 20 个氨基酸残基肽段，使 jGCaMP8 的响应速度达到毫秒级别，可与化学合成染料相媲美。jGCaMP8 同样提供三个主要变体：jGCaMP8s（高灵敏度）、jGCaMP8m（中速/平衡）、jGCaMP8f（快速型）。

表 2 GCaMP6、jGCaMP7、jGCaMP8 比较

| 对比参数         | GCaMP6           | jGCaMP7             | jGCaMP8    |
|--------------|------------------|---------------------|------------|
| 代表变体         | 6s, 6m, 6f       | 7s, 7f, 7b, 7c      | 8s, 8m, 8f |
| 核心技术特征       | CaM-M13 肽设计      | 定向进化优化              | eNOS 结合肽替换 |
| 灵敏度（单 AP 响应） | 高（6s 最高）         | 更高（7s 比 6s 提升~90%）  | 高（8s 优化）   |
| 响应速度         | 快（6f 上升 50-75ms） | 中（7f 慢于 6f）         | 最快（毫秒级）    |
| 基线亮度         | 中等               | 最高（7s 为 6m 的 2.6 倍） | 高          |
| 高频发放追踪       | 受限（>50Hz 困难）     | 优秀（7b 检出率提升 73%）    | 潜力巨大       |
| 数据积累         | 最丰富              | 有限                  | 有限         |
| 技术成熟度        | 极高               | 高                   | 中等（部分待验证）  |

1.3 NLS-dTomato 荧光介绍

dTomato 是一种红色的荧光蛋白，由来源于珊瑚（Discosoma sp.）的红色荧光蛋白 DsRed 改造而来。激发峰 554nm，发射峰 581nm，发出明亮的橙红色荧光，这个光谱特性让它可以轻松地与 GCaMP6f 的绿色荧光区分开，实现多通道同时成像，互不干扰，NLS 是一段由带正电荷的氨基酸组成的短肽序列，能引导 dTomato 穿过核膜，进入细胞核，而 GCaMP6f 位于细胞质，共同完成细胞清晰成像和检测，做比率校正（GCaMP6f 绿色 ÷ dTomato 红色），消除病毒表达量差异、成像光照波动带来的误差。

二、病毒注射方式

2.1 脑立体定位注射

- （1）、实验动物称重，使用麻醉剂（异氟烷、氯胺酮、赛拉嗪混合液等）或者小动物麻醉机进行麻醉。将大鼠或小鼠头部固定于脑立体定位仪上，保证左右耳杆位于同一水平，将左右耳杆通过外耳道插入动物实验耳内，动物眼部涂抹青霉素眼药膏。
- （2）、颅骨暴露与定位：剃除头部毛发并用无色消毒液对头皮进行消毒清理，沿头皮中线切开，去除结缔组织，暴露颅骨。
- （3）、病毒注射位置定位：根据大鼠脑立体定位图谱第六版《The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Sixth Edition》或小鼠脑立体定位图谱第四版《The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates》，确定目标注射脑区的位置，并确定注射点的三维坐标（AP: 前凶后，ML: 中线旁开，DV: 颅骨表面下深度），确定注射针位置。

(4)、颅骨钻孔：移开注射针，使用牙科钻在定位点钻开颅骨，钻孔时需小心，避免损伤脑组织。

(5)、病毒注射：用微量注射器吸取 AAV 病毒液，固定在定位仪上，根据设好的坐标进行注射，注射病毒速率介于 0.1-0.15  $\mu\text{L}/\text{min}$ ，注射完成后，必须将注射针在注射位点原位停留 10-15 分钟。这个步骤至关重要，能让病毒充分扩散并有效防止病毒沿针道回流，停留结束后，以极其缓慢的速度拔出注射针。

(6)、缝合与消毒：缝合伤口，可在术后几天内给予适当的镇痛或抗生素，防止动物感染。

## 2.2 RO (Retro-orbital venous sinus, RO) 注射

眶后静脉窦 (Retro-orbital venous sinus, RO) 注射是一种将 AAV 病毒通过眼部内侧眼角后方的静脉窦快速递送至小鼠循环系统的方法，操作简便、每只动物耗时短 (通常 <3 分钟)、可重复性好等优势，适用于需要系统性递送 AAV 载体以实现全身或特定器官 (如中枢神经系统、视网膜等) 转导的实验研究，常用于成年小鼠和新生小鼠 AAV 病毒注射方式。

(1)、实验动物称重，使用麻醉剂 (异氟烷、氯胺酮、赛拉嗪混合液等) 或者小动物麻醉机进行麻醉。确认麻醉深度：轻轻夹捏后肢趾部，应无缩爪反射。

(2) 动物体位固定，操作者用非惯用手持鼠：将麻醉小鼠背靠操作者手掌，拇指和食指轻轻握住小鼠头部两侧。将拇指轻柔放置于小鼠气管侧面并施以温和压力，使小鼠眼球微微向外凸出，以充分暴露内侧眼角。确保小鼠处于稳定姿态但不受过度压迫。

(3) 进针，将针尖置于小鼠内侧眼角 (靠近鼻梁侧的眼角) 位置，将注射器针头斜面朝下 (bevel down)，以 30-45° 角向眼球后方插入，成年小鼠进针深度约 3-5 mm，针尖应进入眶后静脉窦，确认位置：针尖进入静脉窦后，通常会有血液从注射部位渗出，这是确认进入血管的标志。

(4) 病毒悬液缓慢匀速推入，总注射时间控制在 10-20 秒左右。成年小鼠单次注射体积通常为 50-200  $\mu\text{L}$ ，一般不超过 200  $\mu\text{L}$ 。注射过程中持续观察注射部位，不应出现明显皮下隆起或大量出血，若有则提示针尖位置不当。

(5) 退针与止血，注射完毕后，等待 5 秒再缓慢抽出针头，保持斜面朝外以避免划伤眼角膜。立即用无菌纱布轻压注射部位 5-10 秒，直至出血停止。

## 2.3 尾静脉注射

尾静脉注射 (Lateral Tail-Vein Injection) 是 AAV 病毒系统性递送最常用的途径之一，通过将病毒载体直接注入小鼠尾部的侧静脉，使其随血液循环分布至全身各器官。这种方法尤其适用于靶向肝脏、心肌、骨骼肌等组织，也应用于能穿越血脑屏障的工程化 AAV 血清型的全身递送。

(1) 小鼠固定：提取小鼠尾巴，将其放置于鼠笼盖或手臂上，进行适当安抚，减少应激，将小鼠装入固定器 (可使用商用小鼠固定器或自制的 50 mL 离心管改造)，使头部处于固定器内部，尾巴从后端开口露出。确保固定器大小合适-小鼠在固定器内应能自由呼吸但不能转身，尾部自然伸直。

(2) 酒精擦拭，用 70% 乙醇棉球反复擦拭鼠尾，可同时起到消毒和轻度扩张血管的作用，擦至尾部皮肤略微发白，

紧靠尾骨两侧可见两根红色静脉

（3）定位与固定，将擦干的鼠尾置于操作台上，使一侧静脉朝上。用拇指和食指捏住鼠尾的远端（靠近尾尖），轻轻绷直尾巴。识别尾静脉：小鼠尾部有四条主要血管，腹侧一条为动脉，背侧一条为静脉，两侧各有一条静脉。两侧的静脉因位置固定、容易暴露，是尾静脉注射的首选部位。从尾部的远端（靠近尾尖）开始首次注射，若失败可向近端（靠近身体）移动，避免在同一位置反复穿刺。

（4）进针：针头斜面朝上，以几乎与尾巴平行（小于  $30^{\circ}$ ）的角度，沿静脉走行方向平稳刺入皮肤。进针深度约 2-3 mm，应感觉到针尖进入静脉腔的"突破感"。注射前可轻轻回抽针栓，如有血液回流入针头，确认已位于血管内。若未回血或推注阻力明显，说明未进入静脉，应退针重新定位。

（6）注射：确认针头在血管内后，匀速缓慢推注病毒溶液。大鼠的推荐推注速度约为 20  $\mu\text{L}/\text{秒}$ ；小鼠应根据注射体积适当调整，总量 100-200  $\mu\text{L}$  通常控制在 10-20 秒内完成。推注时感觉不到明显阻力，部分品系小鼠可见注射点近端静脉瞬间变白（液体替代血液）。

（7）退针与止血，推注完成后，等待 5 秒再缓慢抽出针头，使液体充分弥散。立即用无菌纱布或棉球按压注射点 1 分钟，直至出血完全停止。

参考文献:

- Keaveney MK, Rahsepar B, Tseng HA, et al. CaMKII $\alpha$ -Positive Interneurons Identified via a microRNA-Based Viral Gene Targeting Strategy. *J Neurosci*. 2020;40(50):9576-9588. doi:10.1523/JNEUROSCI.2570-19.2020
- Umpierre AD, Bystrom LL, Ying Y, Liu YU, Worrell G, Wu LJ. Microglial calcium signaling is attuned to neuronal activity in awake mice. *Elife*. 2020;9:e56502. Published 2020 Jul 27. doi:10.7554/eLife.56502
- Sun F, Zhou J, Dai B, et al. Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity in vivo. *Nat Methods*. 2020;17(11):1156-1166. doi:10.1038/s41592-020-00981-9
- Dana H, Mohar B, Sun Y, et al. Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife*. 2016;5:e12727. Published 2016 Mar 24. doi:10.7554/eLife.12727
- Dana H, Sun Y, Mohar B, et al. High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nat Methods*. 2019;16(7):649-657. doi:10.1038/s41592-019-0435-6
- Liang Z, Ma Y, Watson GDR, Zhang N. Simultaneous GCaMP6-based fiber photometry and fMRI in rats. *J Neurosci Methods*. 2017;289:31-38. doi:10.1016/j.jneumeth.2017.07.002
- Ouzounov DG, Wang T, Wu C, Xu C. GCaMP6  $\Delta F/F$  dependence on the excitation wavelength in 3-photon and 2-photon microscopy of mouse brain activity. *Biomed Opt Express*. 2019;10(7):3343-3352. Published 2019 Jun 14. doi:10.1364/BOE.10.003343
- Dana H, Chen TW, Hu A, et al. Thy1-GCaMP6 transgenic mice for neuronal population imaging in vivo. *PLoS One*. 2014;9(9):e108697. Published 2014 Sep 24. doi:10.1371/journal.pone.0108697
- Ding J, Luo AF, Hu L, Wang D, Shao F. Structural basis of the ultrasensitive calcium indicator GCaMP6. *Sci China Life Sci*. 2014;57(3):269-274. doi:10.1007/s11427-013-4599-5
- Steinmetz NA, Buetfering C, Lecoq J, et al. Aberrant Cortical Activity in Multiple GCaMP6-Expressing Transgenic Mouse Lines. *eNeuro*. 2017;4(5):ENEURO.0207-17.2017. Published 2017 Sep 6. doi:10.1523/ENEURO.0207-17.2017
- Chen YC, Bullock B, Ogbey DI, et al. In vitro modeling of human dorsal root ganglion neurons for GCaMP6-based calcium imaging of sensory responses to HSV-1 infection. *J Virol Methods*. 2026;339:115264. doi:10.1016/j.jviromet.2025.115264
- Hussain S, Sedlacek M, Cui R, et al. Spontaneous calcium transients in hair cell stereocilia. *Sci Rep*. 2025;15(1):33660. Published 2025 Sep 29. doi:10.1038/s41598-025-17976-1
- Mallmann RT, Gonzalez Mantuano MC, Polomski K, Knerr J, Klugbauer N. Small molecule agonist TPC2-A1-N increases intracellular Ca<sup>2+</sup> independent of two-pore channels. *J Biol Chem*. 2025;301(9):110576. doi:10.1016/j.jbc.2025.110576