

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.15.005

qPCR array 检测分析 C57BL/6 小鼠胚胎后肢发育基因表达谱 *

杨 柳 王茂春 肖君华[△] 周宇荀 李 凯 曲妍佳

(东华大学生物研究所 上海 201600)

摘要 目的:胚胎发育过程中因肢体发育异常造成的出生缺陷比率不低,其相关基因表达模式尚不明确。本实验通过建立实时定量 PCR 芯片 (Real-time quantitative polymerase chain reaction array, qPCR array) 检测方案,研究 C57BL/6 品系小鼠后肢发育相关基因的表达谱。**方法:**以同源异形盒基因家族(Hox)、Wnt5a、配对同源结构域基因(Pitx1)、成纤维生长因子(Fgf8)、音猬因子(Shh)等小鼠肢体发育相关的重要基因制作基因检测表达谱,以 C57BL/6 品系怀孕雌鼠为材料,取胚胎肢芽发育的四个关键时期(E10.5, E11.5, E12.5, E13.5)的胎鼠后肢,利用 qPCR array 方案检测表达谱中基因的相对表达水平差异。**结果:**通过已建立的 qPCR array 检测了 C57BL/6 品系小鼠胚胎后肢发育时期 Hox 家族、Wnt5a、Pitx1、Fgf8、Shh 等基因的表达差异。以 E10.5 为对照,检测出在后肢发育时期基因呈三种表达模式,即 Hoxb6、Hoxb8、Hoxc8、Hoxc9、Hoxc10、Hoxd9 和 Shh 基因的表达水平呈上调;Hoxa11、Hoxa13、Hoxc12、Hoxc13、Hoxd13 等基因表达出现下调;Hoxc9、Hoxc10、Hoxc11、Hoxd9、Hoxd12、Fgf8 和 Pitx1 等基因的相对表达量呈先上调后下调的曲线表达模式,且有少部分基因在小鼠后肢发育时期表达水平无明显变化。**结论:**Hox 家族、Wnt5a、Pitx1、Fgf8、Shh 等基因在小鼠后肢发育时期表达,并且表达模式存在明显差异。

关键词:实时定量 PCR 芯片;后肢发育;Hox 基因

中图分类号:R-33;Q813.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)15-2824-05

Detecting and Analyzing Hindlimb Developmental Gene Expression Profiles of C57BL/6 Mouse during Embryonic times by qPCR Array*

YANG Liu, WANG Mao-chun, XIAO Jun-hua[△], ZHOU Yu-xun, LI Kai, QU Yan-jia

(Institute of Biology, Donghua University, Shanghai, 201600, China)

ABSTRACT Objective: The rates of birth defects caused by abnormal limb development are not low in the process of embryo development, however, the expression patterns of the related genes are not clear. In this study, we established a real-time quantitative polymerase chain reaction array method to study the expression of genes related to hind limb development in C57BL/6 mouse strains. **Methods:** Hox, Wnt5a, Pitx1, Fgf8 and Shh were used to make the expression profiles of the genes related to hind limb development in mice. The hind limbs of the fetal C57BL/6 mice were taken from the four critical stages (E10.5, E11.5, E12.5, E13.5) of embryonic limb buds development. We detected relative genetic expression levels by the qPCR array. **Results:** The expression levels of Hox, Wnt5a, Pitx1, Fgf8 and Shh were detected during the development of the C57BL/6 mouse strains hind limbs by the qPCR array. Using E10.5 as a control, we detected that the genes presented the three expression patterns during the development of the hind limbs. The expression levels of Hoxb6, Hoxb8, Hoxc8, Hoxc9, Hoxc10, Hoxd9 and Shh genes were up-regulated. And the expression levels of Hoxa11, Hoxa13, Hoxc12, Hoxc13 and Hoxd13 genes were down-regulated. The relative expression levels of Hoxc9, Hoxc10, Hoxc11, Hoxd9, Hoxd12, Fgf8 and Pitx1 genes were up-regulated and then down-regulated. And there were no significant changes in the expression levels of a small number of genes. **Conclusions:** Hox, Wnt5a, Pitx1, Fgf8 and Shh genes were expressed in the development of mice hind limbs, and their expression patterns were significantly different.

Key words: qPCR array; Hindlimb development; Hox genes

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q813.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)15-2824-05

前言

人类因肢体发育异常造成的新生儿出生缺陷比率不低,美国疾病控制中心(CDC)调查数据显示每年的发病率约有

0.02%-0.04%^[1]。哺乳动物的肢体发育涉及细胞增殖、分化、迁徙和凋亡,Hox、Shh (Sonic hedgehog)、Fgf (fibroblast growth factor)和 WNT 信号通路在其中发挥重要作用。在早期肢芽发育的时期,Shh 在肢芽的后间质的极化活动区(ZPA)表达,控制未

* 基金项目:上海市科学技术委员会重点项目(12140900404;14140900502)

作者简介:杨柳(1992-),硕士研究生,研究方向:小鼠遗传学,电话:021-67792389, E-mail: 421973071@qq.com

[△] 通讯作者:肖君华(1968-),博士生导师,教授,研究方向:小鼠遗传学, E-mail: xiaojunhua@dhu.edu.cn

(收稿日期:2017-11-31 接受日期:2017-12-25)

来肢体 A-P 轴的分化, Fgf8 于顶外胚层嵴(AER)产生, 调控着近 - 远端肢体轴向的生长^[2]。Pitx1 基因在小鼠后肢有很强的表达优势, Daniel P. Szeto 等人将小鼠的 Pitx1 基因敲除, 发现敲除小鼠的胫骨和腓骨出现严重畸变^[3]。WNT 家族中, 只有 Wnt5a 表达于四肢细胞凝集区, 影响肢体 A-P 轴的分化^[4,5]。Hox 基因是生物体中一类专门调控生物形体的基因^[6], 目前已鉴定的哺乳类动物 Hox 基因共有 39 个, 是控制胚胎发育和细胞分化的调节基因^[7]。

目前, 研究基因表达差异的检测技术有 Northern 杂交、RT-PCR 技术、mRNA 差异显示技术、cDNA 代表性差异分析、实时 PCR、表达谱芯片、RNA 测序和 qPCR array 技术等^[8]。前 5 种方法精确度高, 但只能针对少量基因的表达进行分析。表达谱芯片和 RNA 测序产生大量的冗余基因数据会干扰结果分析, 从而导致结果不准确^[9]。qPCR array 则是一项精确度高、检测数据量适中、操作简便的技术手段, 可作为研究一组特定基因表达的理想工具^[9]。

本文利用 qPCR array 技术, 以四个胚胎时期(E10.5, E11.5, E12.5, E13.5)的 C57BL/6 小鼠为材料, 取不同发育时期的胎鼠后肢, 建立后肢发育基因表达谱。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验试剂 Trizol (美国 Invitrogen)、DNase I、反转录试剂 (美国 Fermentas)、SYBR real-time PCR Premixture 试剂盒 (上海惠凌生物技术有限公司)、PCR 引物由苏州泓迅生物科技有限公司设计合成。

1.2 实验动物的组织收集

实验动物选用 C57BL/6 品系小鼠, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 12 周龄, 雌鼠 18~20 g, 雄鼠 20~30 g。按雌雄 1:1 合笼繁殖, 观察到阴栓第一天记作孕期 0.5 天(E0.5)。

怀孕雌鼠分别于 E10.5、E11.5、E12.5 和 E13.5 天颈脱臼处死, 解剖雌鼠, 截取胎鼠后肢, 存于 -80℃ 备用。

1.3 RNA 抽提和 cDNA 反转录

用 Trizol 法提取胎鼠后肢的总 RNA, 详细步骤按说明书进行。使用 Nanodrop 2000c 鉴定 RNA 的质量和浓度。RNA 经 DNase I 处理后, 使用美国 Fermentas 反转录试剂盒逆转录合成 cDNA, 操作按照说明书进行, 合成后置于 -80℃ 备用。

1.4 基因的选定与引物设计

根据参考文献^[10-12]和 MGI 小鼠基因组信息数据库(<http://www.informatics.jax.org/>)挑选了 Wnt5a、Fgf8、Shh、Pitx1 和 Hox 家族等 43 个基因作为检测基因, 以 γ -actin 和 Gapdh 为看家基因设计引物序列信息来自 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

1.5 qPCR array 引物固化

将引物依顺序加入 96 孔 PCR 板中, 放入烘箱中 65℃, 30 min, 设置基因阴性对照组和样本阴性对照组。qPCR array 反应体系: 10 μ L 定量 PCR mix, 2 μ L cDNA, 4.6 μ L H₂O, 反应条件: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 15 s, 62℃ 32 s, 72℃ 40 s, 40 个循环采用 $\Delta\Delta$ Ct 法进行相对表达量。

1.6 统计学分析

qPCR array 每组实验均重复 3 次, 用 Excel 2010 软件处理数据, 所有数据采用 mean $\pm$ SD 表示, 用 t 检验法比较两个样本均值间差异是否显著, P<0.05 为差异显著, P<0.01 为差异非常显著。

2 结果

2.1 qPCR array 检测基因

检测基因是根据小鼠肢体发育相关的参考文献而选定, 包括了 Hox 家族的所有基因, 肢体发育的重要基因 Shh、Fgf、Pitx1、Wnt 信号通路的 Wnt5a^[13-15]。小鼠肢体发育初期的肢芽主要由顶外胚层嵴(AER), 渐进带(PZ), 和极性活化区(ZPA)三部分组成。AER 区是肢体生长的主要信号中心, 表达一些 Fgf 家族成员基因, 如 Fgf4 和 Fgf8。PZ 区为 AER 内侧有着旺盛分裂能力的间质细胞区域, 主要由 Hoxa 基因簇和 Hoxd 基因簇调控^[16]。ZPA 区存在于肢芽的后侧, Shh 和 Bmp 等基因在其中起到表达调控作用^[17]。qPCR array 检测的基因参与了胚胎发育时期多数重要的信号通路, 对胚胎发育、细胞分化以及四肢生长等起着关键的调控作用, 这些基因所参与信号通路如下表 1 所示。

表 1 检测基因参与的信号通路

Table 1 Signaling pathways involved in detected genes	
Gene	Pathway
Shh	Hedgehog signaling pathway
Fgf8	Fgf signaling pathway
Pitx1	Gonadotropin releasing hormone receptor pathway Angiogenesis
Wnt5a	Cadherin signaling pathway Wnt signaling pathway

2.2 qPCR array 评估

为了检验 qPCR array 的扩增效率、重复性、特异性, 对 qPCR array 进行了评估实验。如图 1 所示: 将 cDNA 模板连续以 4 倍稀释 5 个浓度梯度, 挑选 5 个实验基因(Hoxa10, Hoxa13, Hoxd10, Hoxd13, β -actin)进行检测, 以 cDNA 浓度的 log 值为 Y 轴, 以 Ct 值为 X 轴绘制标准曲线, 如图所示两者呈线性关系, 说明方案扩增效率高(图 1A); 所有基因的 Ct 值标准差均小于 0.4, 证明方案的重复性好(图 1B); 图 1C 为 qPCR array 溶解曲线图, 曲线的峰单一, 且不是引物二聚体; 图 1D 是 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图, 条带清晰且单一, 说明了方案的特异性强。

2.3 肢体发育的四个胚胎时期

已知小鼠的肢体发育的四个胚胎时期分别是 E10.5、E11.5、E12.5、E13.5。E10.5 天, 体节出现, 肢芽形成^[18](图 2A); E11.5 天, 肢芽明显且独立对称的分布在身体两侧。长宽比范围从 3.5 到 5.9, 没有软骨密集^[19](图 2B); E12.5 天肢芽进一步发育可分辨出手掌部分^[18](图 2C); E13.5 天, 手掌部分继续分化, 在 Bmp2 表达下调的作用下指间细胞消失, 手指出现^[20](图 2D)。

2.4 qPCR array 结果

利用 qPCR array 技术检测小鼠胚胎时期(E10.5、E11.5、E12.5、E13.5)后肢的 45 个基因表达情况, 以胚胎 10.5 天的基

因表达量为对照,对比其他 3 天基因的相对表达量水平;以 β -actin 为内参,显示其他基因的相对表达水平。利用 HemI 制图软件做出如下图 3 所示的基因表达水平热图,包括了全部基因的表达水平热图、Hox 家族基因表达水平热图和其余 4 个后

肢发育相关基因表达水平热图,图 3 显示了在胚胎后肢发育时期,检测基因表达水平的变化模式,即:表达水平上调、表达水平下调和表达水平曲线变化模式。也有少部分基因的表达水平在这四个胚胎时期的后肢中无明显差异。

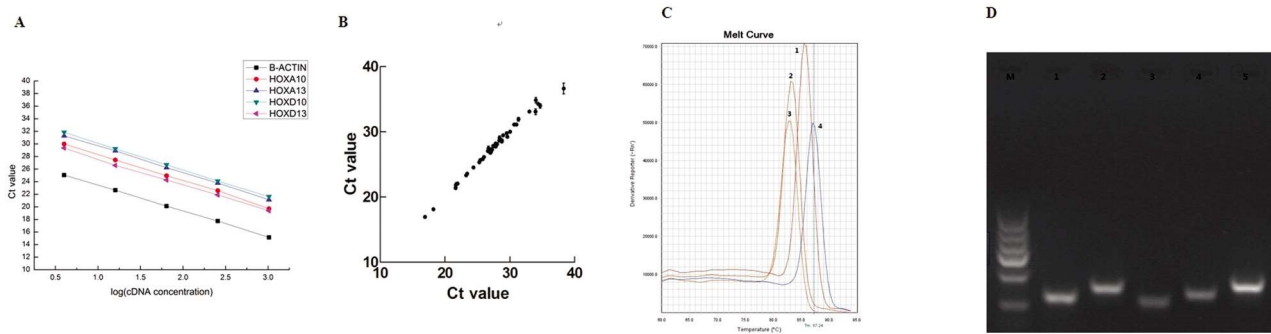


图 1 qPCR array 评估

Fig.1 Evaluation of the qPCR array

Note: Fig.A: The amplification efficiencies of Hoxa10, Hoxa13, Hoxd10, Hoxd13, and β -actin. The X axis is the log value of cDNA concentration. The Y axis is the Ct value of each gene. Fig.B: Average threshold cycle value (46 genes). Fig.C: 1, 2, 3, 4 represent the dissolution curves of Hoxa10, Hoxa13, Hoxd10, and Hoxd13, respectively. Fig.D: 1, 2, 3, 4, 5, respectively, represent the agarose gel electrophoresis bands of β -actin, Hoxa10, Hoxa13, Hoxd10, and Hoxd13. M: 100bp DNA Ladder Marker

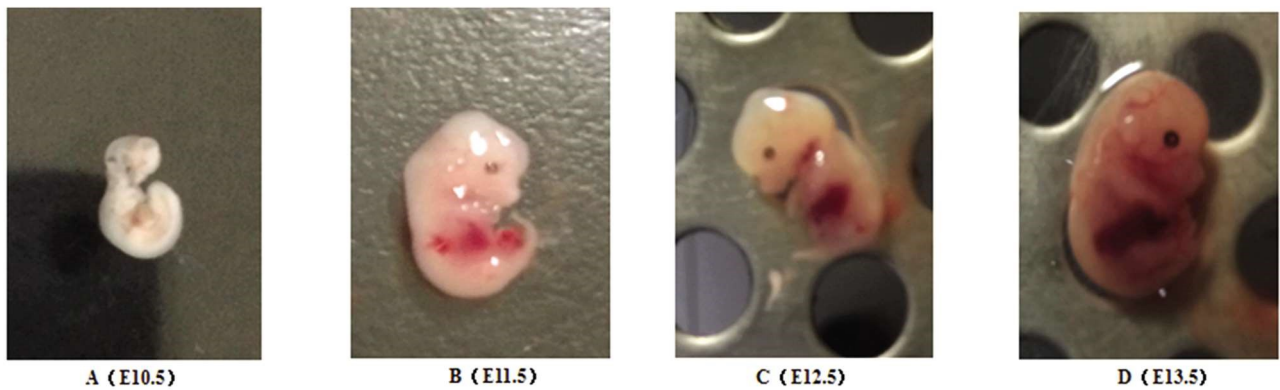


图 2 四个胚胎时期小鼠解剖图

Fig.2 Anatomy of mice at four embryos

1)相对表达水平上调和下调:以胚胎 10.5 天为对照,检测到在胚胎后肢发育时,45 个基因中,Hoxb6、Hoxb8、Hoxc8、Hoxc9、Hoxc10、Hoxd9 和 Shh 基因的表达水平呈上调的表达模式,如图 4;而 Hoxa11、Hoxa13、Hoxc12、Hoxc13、Hoxd13 等基因呈下调的表达模式,如图 5。

2)相对表达水平呈曲线变化模式:实验检测到 45 个基因中,某些基因在胚胎后肢发育时期的相对表达水平是呈曲线变化的模式,即图 6 所示的基因相对表达量先上调,后下调,包括 Hoxc9、Hoxc10、Hoxc11、Hoxd9、Hoxd12、Fgf8 和 Pitx1 等基因。它们在胚胎肢体发育初中期(E11.5 或 E12.5)其相对表达量上调,在胚胎肢体发育的末期(E13.5)其相对表达量又降了下去,甚至例如 Hoxc11 和 Hoxd12 等基因在末期,其相对表达量低于胚胎 10.5 天。

3 讨论

本研究通过引物固化的方式建立了扩增效率高、重复性好、特异性强、稳定可靠的 qPCR array 方案,不仅避免了 RNA

测序产生冗余基因数据,导致结果不准确的干扰^[21],而且弥补了传统 qPCR 实验重复加样过程中操作繁琐、容易污染的缺陷。但同样它也具有一定的局限性,相比于表达谱芯片和 RNA 测序,它受载体所限制,只能以 96 孔板或 384 孔板为载体来检测基因表达量的变化,可检测的基因数量有限,仅适用于普通实验室的科研操作。

Hox 基因家族作为在进化世上一类高度保守的基因,主控了脊椎动物的生长发育和细胞分化,在中枢神经系统、中轴骨、胃肠道、尿殖管、外生殖器和肢体发育中均具有重要的作用^[22]。本研究了小鼠后肢发育过程中 Hox 基因的表达模式。从结果中可以看出随着肢芽的发育生长(E10.5 至 E13.5),大部分 Hox 基因的相对表达水平在不同胚胎时期存在明显差异,出现上调、下调和曲线变化三种不同的表达模式。Hoxb6、Hoxb8、Hoxc8、Hoxc9、Hoxc10、Hoxd9 和 Shh 基因相对表达量的上调,表明 Hox 家族中控制肢体发育的基因主要分布在后部,且上调组中缺少了 Hoxa 基因簇,下调组出现了 Hoxa11 和 Hoxa13 对应了先前对 Hox 基因的报道,Hoxa11 和 Hoxa13 调控前肢

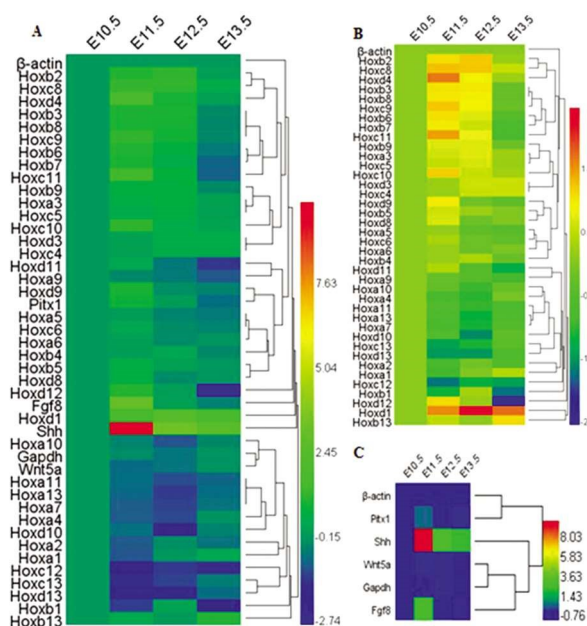


图3 基因表达水平热图

Fig.3 Heat map diagrams of the gene expression

Note: A) Heat map diagrams of all genes expression; B) Heat map diagrams of Hox genes expression; C) Heat map diagrams of Wnt5a, Pitx1, Fgf8, and Shh expression.

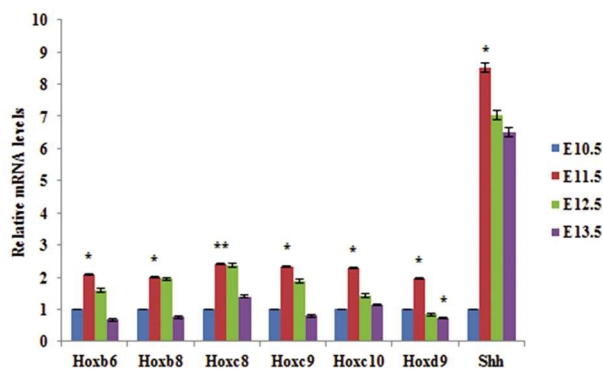


图4 表达水平上调的基因的相对表达量

Fig.4 Up-regulation of the relative expression of the genes

Note: E10.5 was used as the control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

的胫骨、腓骨和指部的发育^[7]。Hoxc9、Hoxc10、Hoxd9和Hoxd12呈现先上调后下降的相对表达模式,说明在肢芽发育初期Hox9至Hox12基因先被激活用于调控作用。随着股骨、胫骨和腓骨的发育完成,Hox9至Hox12的基因调控作用减弱,相对表达量下降,Hox13开始被激活,指导腕关节、指和趾部的生长发育^[2]。从下降组中Hoxd13的相对表达就可以看出,其在肢芽发育初期未被激活,表达量下调,到E13.5脚掌发育时表达量开始上升。Fgf8的表达量变化说明在E10.5天AER区的Fgf4诱导Fgf8分泌,Fgf8又激活Shh,被激活的Shh与Hox基因协同作用,调控指/趾的发育^[10]。

哺乳动物的肢体发育是个错综复杂的过程,直到现在我们尚未了解其全部的调控机制。本实验对Hox基因三种表达模式的研究为肢体发育研究工作开辟了新思路,也为后人的研究工作提供了小型数据库。除此之外,实验检测的另5个对于肢体发育起重要调控作用的基因,它们与Hox基因有着密切联系,其与Hox基因的表达调控网络尚未被完全发掘,仍有待

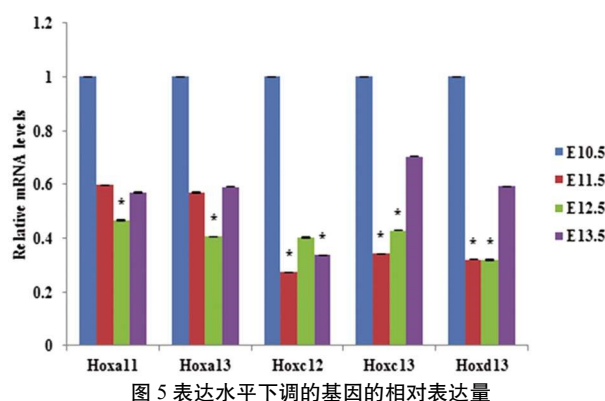


图5 表达水平下调的基因的相对表达量

Fig.5 Down-regulation of the relative expression of the genes

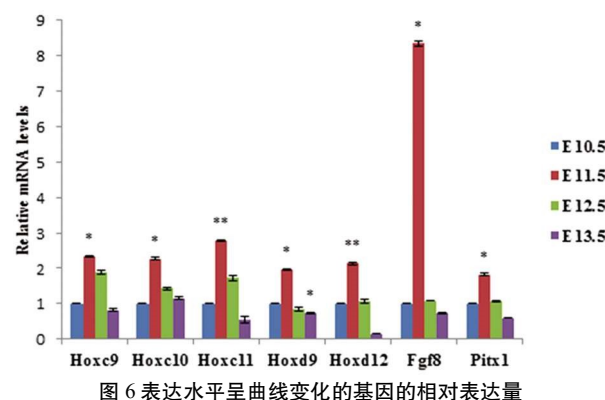
Note: E10.5 was used as the control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图6 表达水平呈曲线变化的基因的相对表达量

Fig.6 The relative expression of genes that vary in curves

Note: E10.5 was used as the control, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

下一步的研究。

参考文献(References)

- [1] MA Canfield, MA Honein, N Yuskiv, et al. National estimates and race/ethnic-specific variation of selected birth defects in the United States, 1999-2001 [J]. Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology, 2006, 76: 747-756
- [2] Alan R. Rodrigues, Nayuta Yakushiji-Kaminatsui, Yuji Atsuta, et al. Integration of Shh and Fgf signaling in controlling Hox gene expression in cultured limb cells[J]. PNAS, 2017, 114(12): 3139-3144
- [3] Daniel P Szeto, Concepcion Rodriguez-Esteban, Aimee K. Ryan, et al. Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development [J]. Genes & Development, 1999, 13: 484-494
- [4] 刘厚琴,王毅.WNT信号通路研究进展[J].社区医学杂志, 2015, 13(5): 15-18
Liu Hou-qin, Wang Yi. Advances in WNT signaling pathway[J]. Journal of Community Medicine, 2015, 13(5): 15-18
- [5] Wang Yi-ping, Li Yi-ping, Christie Paulson, et al. Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease [J]. NIH Public Access, 2014, 19: 379-407
- [6] 刘凤松,胡钦亮,杜世新.Hox基因在马蹄内翻足病因中的研究进展[J].天津医药, 2015, 43(6): 702-704
Liu Feng-song, Hu Qin-liang, Du Shi-xin. Current research of role of Hox genes in pathogenesis of equinus deformity [J]. Tianjin Med J, 2015, 43(6): 702-704

- [7] 金淑清, 浦予飞, 袁莹. Hox 基因的研究进展 [J]. 癌症进展, 2011, 9(2): 154-158
Jin Shu-qing, Pu Shu-feng, Qiu Ying. The study advances of HOX gene[J]. Oncology Progress, 2011, 9(2): 154-158
- [8] 朱长保, 徐福意, 晁天柱, 等. qPCR array 检测高糖对胆固醇合成基因表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(33): 6420-6424
Zhu Chang-bao, Xu Fu-yi, Chao Tian-zhu, et al. Effect of High Glucose on the Expression of Cholesterol Biosynthesis Gene by qPCR Array[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(33): 6420-6424
- [9] Jensen KK, Previs SF, Zhu L, et al. Demonstration of diet-induced decoupling of fatty acid and cholesterol synthesis by combining gene expression array and $2H_2O$ quantification[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 302(2): 209-217
- [10] Eugeniu Nacu, Elena Gromberg, Catarina R. Oliveira, et al. FGF8 and SHH substitute for anterior-posterior tissue interactions to induce limb regeneration[J]. Nature, 2016, 533: 407-422
- [11] Candace Rapchak, Neeraj Patel, John Hudson, et al. Conservation of Pitx1 expression during amphibian limb morphogenesis[J]. Biochemistry and Cell Biology, 2015, 93(4): 396-404
- [12] Marco Osterwalder, Dario Speziale, Malak Shoukry, et al. HAND2 Targets Define a Network of Transcriptional Regulators that Compartmentalize the Early Limb Bud Mesenchyme [J]. Developmental Cell, 2014, 31(3): 345-357
- [13] Kyriel M. Pineault, Deneen M. Wellik. Hox Genes and Limb Musculoskeletal Development [J]. Current Osteoporosis Reports, 2014, 12(4): 420-427
- [14] Yo-ichi Yamamoto-Shiraishi, Atsushi Kuroiwa. Wnt and BMP signaling cooperate with Hox in the control of Six2 expression in limb tendon precursor[J]. Developmental Biology, 2013, 377(2): 363-374
- [15] Masaru Tamura, Masaki Hosoya, Motoi Fujita, et al. Overdosage of Hand2 causes limb and heart defects in the human chromosomal disorder partial trisomy distal 4q [J]. Human Molecular Genetics, 2013, 22(12): 2471-2481
- [16] Malte Spielmann, Naseebullah Kakar, Naeimeh Tayebi, et al. Exome sequencing and CRISPR/Cas genome editing identify mutations of ZAK as a cause of limb defects in humans and mice [J]. Genome Research, 2016, 26(2): 183-191
- [17] V. Duboc, MP Logan. Regulation of limb bud initiation and limb-type morphology[J]. Developmental dynamics, 2011, 240(5): 1017-1027
- [18] 杨媛媛. 小鼠胚胎发育形态观察及 CRB3 在胚胎和成体中的表达 [D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2011
Yang Yuan-yuan. Morphological observation on mouse embryo development and expression of CRB3 in mouse embryo and adult body [D]. Shanxi: Northwest A&F University, 2011
- [19] N Wanek, K Muneoka, G Holler-Dinsmore, et al. A Staging System for Mouse Limb Development[J]. The Journal of Experimental Zoology, 1989, 249: 41-49
- [20] Rulang Jiang, Yu Lan, Harry D. Chapman, et al. Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice [J]. Genes & Development, 1998, 12: 1046-1057
- [21] Franck Rapaport, Raya Khanin, Yupu Liang, et al. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data[J]. Genome Biology, 2013, 14: 3158-3170
- [22] Guillaume Andrey, Denis Duboule. SnapShot: Hox Gene Regulation [J]. Cell, 2014, 156: 856

(上接第 2840 页)

- [13] 于传飞, 王文波, 李萌, 等. 人源化抗 VEGF 单克隆抗体制品的大小异质性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014, 9(13): 718-722
Yu Chuan-fei, Wang Wen-bo, Li Meng, et al. Size heterogeneity analysis of monoclonal antibody products [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2014, 9(13): 718-722
- [14] 王文波, 王兰, 于传飞, 等. 重组抗埃博拉病毒单克隆抗体质量控制方法的建立[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(1): 46-51
Wang Wen-bo, Wang Lan, Yu Chuan-fei, et al. Development of Quality Control Methods of Recombinant Anti-EBOV Antibodies[J]. Chin Pharm J, 2016, 51(1): 46-51
- [15] Rabah Gahoual, Michael Biacchi, Johana Chicher, et al. Monoclonal antibodies biosimilarity assessment using transient isotachopheresis capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry [J]. MAbs, 2014, 6(6): 1464-1473
- [16] Sliwkowski MX, Mellman I. Antibody therapeutics in Cancer[J]. Science, 2013, 341(6151): 1192-1198
- [17] Gao K, Wang J. The biopharmaceutical industry in China: history and future Perspectives[J]. Front Med, 2012, 6(2): 101-111
- [18] 王文波, 王兰, 王馨, 等. 抗 CD20 人鼠嵌合单抗 N 糖的毛细管电泳分析[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(20): 2312-2316
Wang Wen-bo, Wang Lan, Wang Xin, et al. Analysis of N-linked glycan profile of human/murine chimeric antiCD20 antibodies by capillary electrophoresis [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2015, 24(20): 2312-2316
- [19] 郭玮, 王兰, 王文波, 等. 尼妥珠单抗毛细管区带电泳鉴别方法的建立与验证[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(20): 2366-2381
Guo Wei, Wang Lan, Wang Wen-bo, et al. Establishment and validation of nimotuzumab identification method with capillary zone electrophoresis [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23(20): 2366-2381
- [20] 白玉, 王海学, 谢松梅, 等. 生物类似药药学研究的挑战[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(6): 477-479
Bai Yu, Wang Hai-xue, Xie Song-hai, et al. Challenges of Pharmaceutical Evaluation of Biosimilars [J]. Chin Pharm J, 2015, 50(6): 477-479
- [21] 聂静苑, 刘煜. 人源单克隆抗体药物质量控制与分析[J]. 中国生物制药杂志, 2012, 33(2): 2010-2017
Nie Jing-yuan, Liu Li. Quality control and analysis of monoclonal antibody [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2012, 33(2): 2010-2017