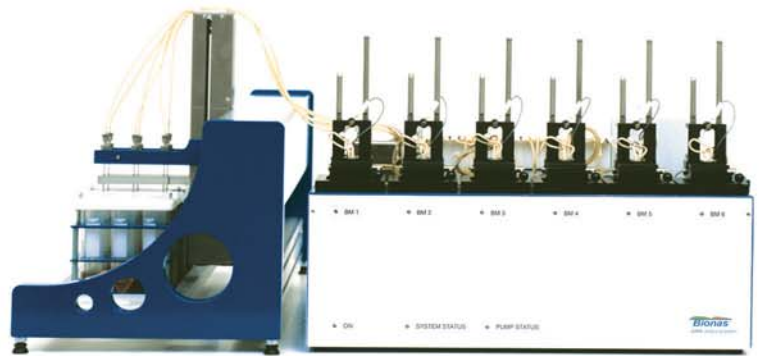
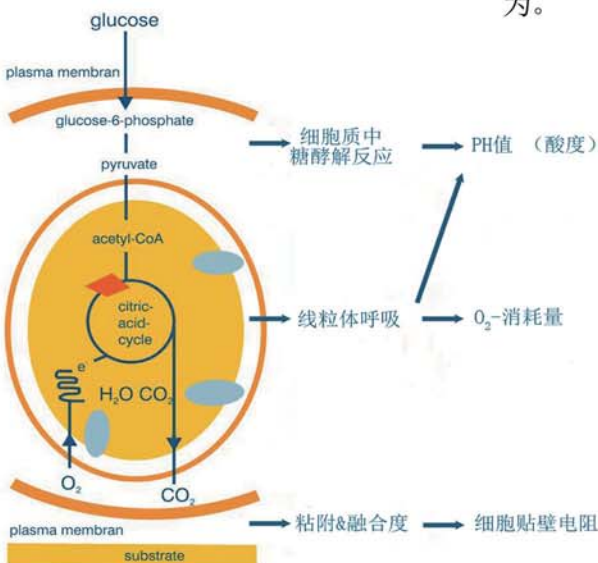


Bionas-细胞代谢监测仪

细胞代谢主要是指细胞从环境中摄取营养物质，消化吸收后排放出降解物或杂质。大多数碳水化合物，例如葡萄糖，都是细胞的营养物质。在有氧条件下，葡萄糖被细胞摄取后在胞浆内转变成丙酮酸，然后进入三羧酸循环代谢，最终变成二氧化碳并产生能量；在缺氧条件下，葡萄糖在细胞内代谢为乳酸以提供能量。总体而言，细胞代谢增强时，葡萄糖的消耗增加，酸性的代谢产物也相应增加；反之亦然。另外，外界环境因素对贴壁细胞的作用经常影响到细胞的粘附和融合度，而细胞的粘附状态是与细胞骨架的组织性和膜的完整性相关的，同样也反映细胞的生理状态和代谢行为。如果受到环境因素干扰，细胞则会改变其粘附方式，可能变圆或完全脱离基底。

如果细胞没有释放酸性代谢产物及无氧气消耗，或者贴壁细胞变圆甚至脱离基底，这些反应均表示细胞代谢活动不旺盛或正在死亡，因此，我们监测这些参数就能很好的了解细胞内的生理状态和代谢行为。



Bionas® 2500 analyzing system
Patent-protected (EP1173541B1, DE10346451B4)

系统主要特点:

- ★ 6个传感器芯片并联平行工作
- ★ 非侵入式、无标记监测
- ★ pH值、氧气消耗率、贴壁电阻
- ★ 实时、连续、在线监控
- ★ 优质的CMOS芯片技术
- ★ 无干扰性代谢产物的积聚
- ★ 全自动的液体加样控制
- ★ 独特的灌注系统可以应用到:
 - 观察细胞的再生或者恢复效应
 - 培养各种细胞、组织

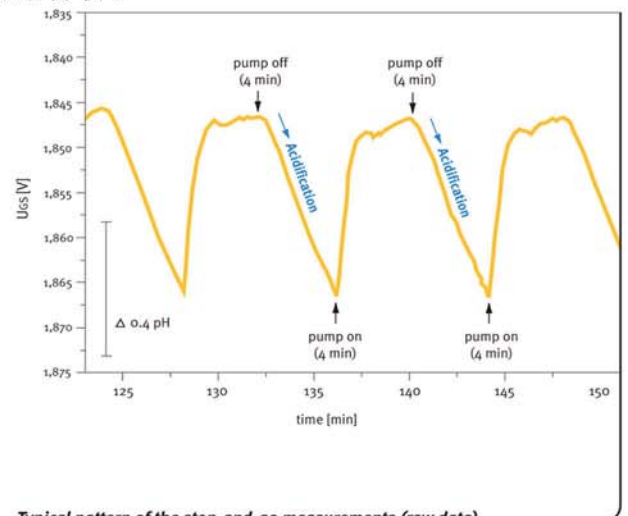
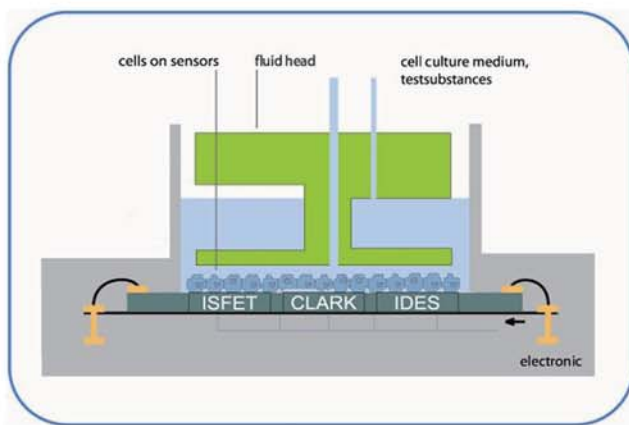
德国Bionas公司的Bionas®-1500/2500细胞代谢监测仪使用非标记非侵入式测量技术，实时在线记录多个细胞生理学参数，包括pH值的变化率，氧气的消耗率和细胞贴壁电阻。在细胞代谢路径研究、线粒体呼吸功能测定和细胞形态学检测等生物医药领域有着广泛的应用，包括：细胞学基础研究、细胞代谢生理学研究、细胞培养条件的优化、细胞毒性检测、抗癌药物检测、临床前药物研发等等。



细胞代谢监测仪

系统的运行模式：

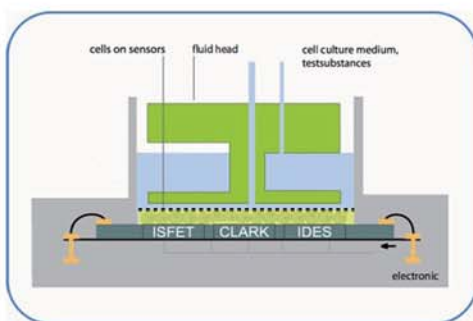
Bionas®-1500/2500的代谢测量芯片SC1000安装于生物模块之内，每个Bionas®-2500分析系统含有6个生物模块，可以平行地操控6个芯片。生物模块在一个可调的控温孵箱中（标准温度为37°C）。自动加样器控制6个支架，每个支架带有6个储液器，每个支架的储液池针对一个生物模块，通过移动自动加样器从一个支架到另一个，可以实现相应的液体加入或者移除相应的生物模块。这个过程是可以自己设置的，所以每个储液池可以使用多次。Bionas系统提供的专业性分析控制软件控制整个实验并且在电脑显示屏上实时在线显示具体的数据，所以实验者可以随时观察实验进程并及时做出记录和分析。



Typical pattern of the stop-and-go measurements (raw data).

如果需要测量产酸率和呼吸作用，灌注系统是必需的。如图，可以看到细胞生长于芯片表面，标准版液体压头距离芯片表面的距离有200 μm （也有50 μm 的替换版），这样流体压头和芯片表面的空间大约为6 μl 。液体从外界经管道流到芯片中间后扩散至表面。在灌注的阶段（go-phase），传感器测量的是注入的新鲜培养基中的pH值和氧气浓度，这个数值会达到一个稳定期。随后灌注停止，随着细胞生理活动消耗氧气并且产生酸性代谢产物，芯片会测量到pH值的变化和氧气的消耗。经过几分钟后（通常是1-4分钟），再次灌注新的培养基，各个测量参数又会重新回到新鲜培养基的标准参数。

不同来源的各种细胞系都在Bionas®-1500/2500成功的测试过，从常用的细胞系CHO, V79, 到原代肝细胞和干细胞。这点对于实验结果很重要，说明我们的分析系统不局限于某些相关的细胞模型。



悬浮细胞的监测：

Bionas®-1500/2500技术也可以用于监测悬浮细胞pH值的变化和氧气的消耗，将悬浮细胞培养于琼脂糖（黄色区域）之中然后覆盖一层滤膜（黑色虚线）用于阻止灌注过程中液体冲洗细胞。

稳定性保证：所有的传感器芯片的生产均在CMOS技术的标准下进行，所以不存在芯片-芯片之间或者批次-批次之间的差异，所有的变化均是由于生物学的效应引起的。



细胞代谢监测仪

芯片的组成:

Bionas-1500/2500系统的核心就是SC1000传感器芯片，每个芯片含有多个不同类型的传感器元件，分别测量不同的生理学参数，具体包括：

★5个ISFETs（离子敏感场效应晶体管）：

测量细胞外环境的pH值变化即产酸率，酸性代谢产物越多，表明细胞代谢活动越旺盛；

★5个OS（改进型clark型电极）：

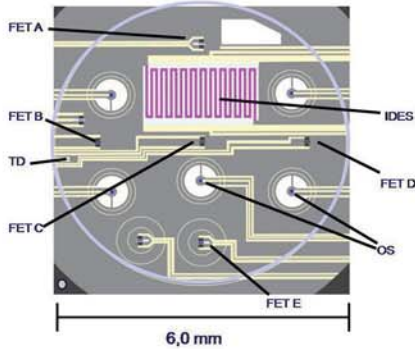
测量氧气浓度即呼吸作用，ATP产生的过程需要消耗氧气，氧气消耗量是细胞能量代谢的一个主要的生理学指标；

★1个IDES（交叉的电极结构）：

测量细胞的贴壁电阻即粘附和融合度，粘附作用使得彼此独立的细胞间形成紧密连接从而维持高度有序的组织分化并且实现细胞间的信号传递。完整的细胞膜是绝缘的，所以可通过测量电流获得传感器信号进而得到贴壁电阻值。

芯片的处理:

细胞直接生长在芯片表面，芯片表面可进行预包装（包括纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白），并不影响参数的测量。



➤ Interdigitated Electrode Structures: IDES

LS 174T (human colon adenocarcinoma)

- ★ 细胞可以在传感器表面培养
- ★ 传感器芯片作为培养孔
- ★ 细胞培养室内操作
- ★ 可对芯片表面进行包被
- ★ 芯片只需简单预处理即可使用
- ★ 可以应用到不同的细胞系
- ★ 自动化控制加样液体

贴壁电阻测量原理：细胞贴壁电阻测量芯片的IDES电极是由两个交叉的结构组成，细胞直接生长于芯片表面（如上图）。在10kHz标准的测量频率下，细胞膜是不导电的，所以细胞间的距离越接近、接触面越大，芯片测量出的细胞贴壁电阻就越大。影响细胞贴壁电阻的因素有：

1. 细胞膜与电极之间的距离；
2. 电极表面被细胞膜覆盖的面积；
3. 细胞膜的绝缘性；
4. 细胞与细胞的接触；
5. 细胞的形状（形态学）；
6. 溶液的导电性（在细胞培养过程中几乎无变化）；

除了溶液的导电性之外，影响因素均是由细胞膜决定的，所以Bionas系统能够非常方便测量完整细胞膜的“状态”，Bionas®-9600就是使用IDES交叉电极，专门用于实时在线测量细胞的贴壁电阻值的高通量测量仪。

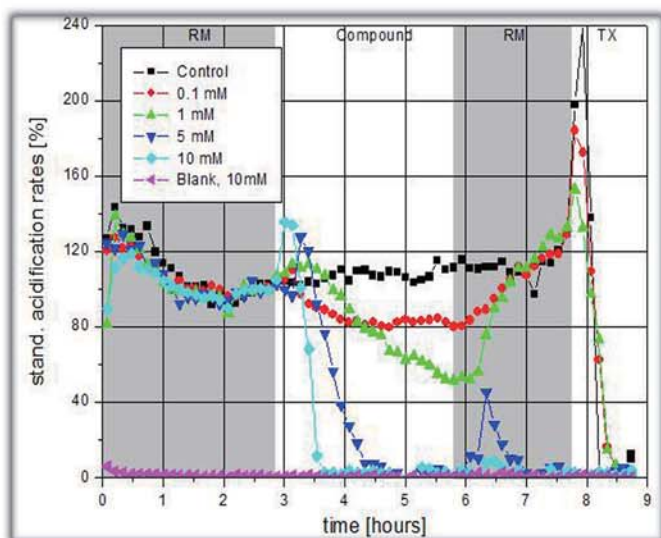
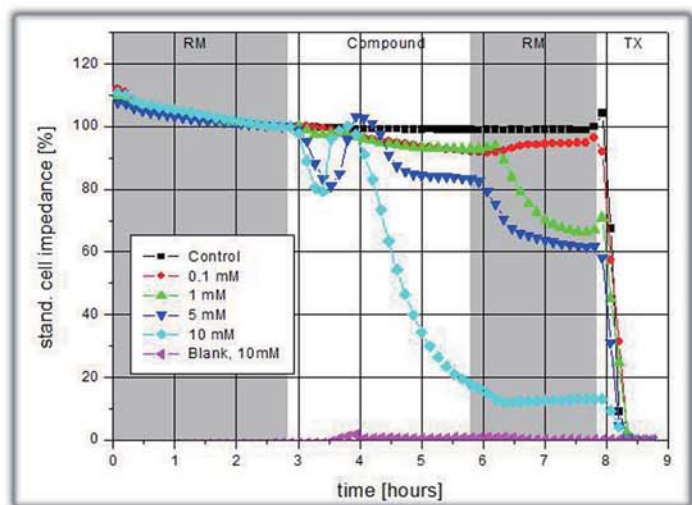
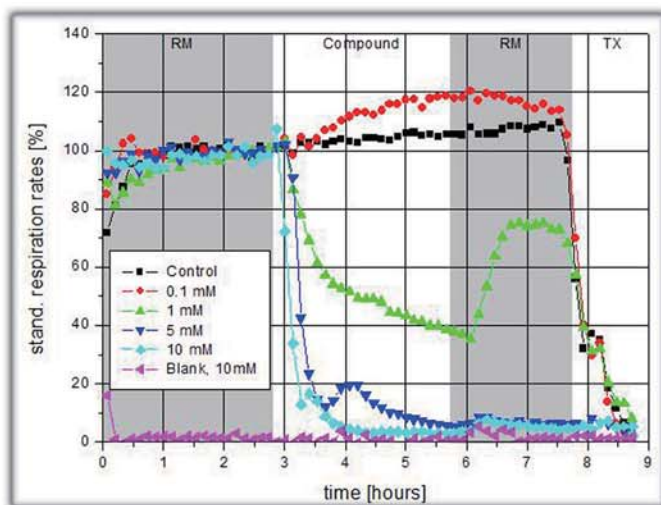


细胞代谢监测仪

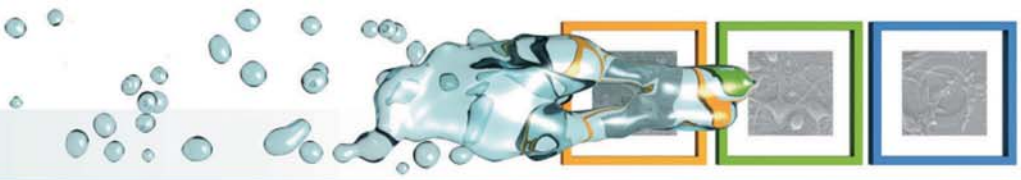
应用领域:

- ★ **毒理作用:** 替代动物实验评估药物或者毒物的毒理学, 揭示底物的有效性、细胞毒性及再生性
- ★ **干细胞研究:** 研究细胞行为和表型改变, 推测干细胞的分化程度和方向, 监控干细胞的稳定性
- ★ **肿瘤学研究:** 肿瘤细胞或组织对药物或环境因素的的化学敏感性和抗药性, 对不同刺激的反应
- ★ **药物靶点的筛选:** 细胞对于抗癌或代谢类或免疫类药物的反应, 对药物进行归类分级
- ★ **细胞凋亡和增殖:** 细胞培养环境的标准化和最优化, 及培养基各个成分对细胞的影响
- ★ **细胞培养条件的优化:** 细胞培养环境的标准化和最优化, 及培养基各个成分对细胞的影响
- ★ **原代细胞质量的鉴定:** 原代组织制备出细胞的质量控制, 测量细胞的生理学指标是否正常
- ★ **再生医学和组织缺氧:** 细胞对不同刺激条件如缺氧条件的反应及再生能力

应用举例-1: 药物Diclofenac的毒理试验

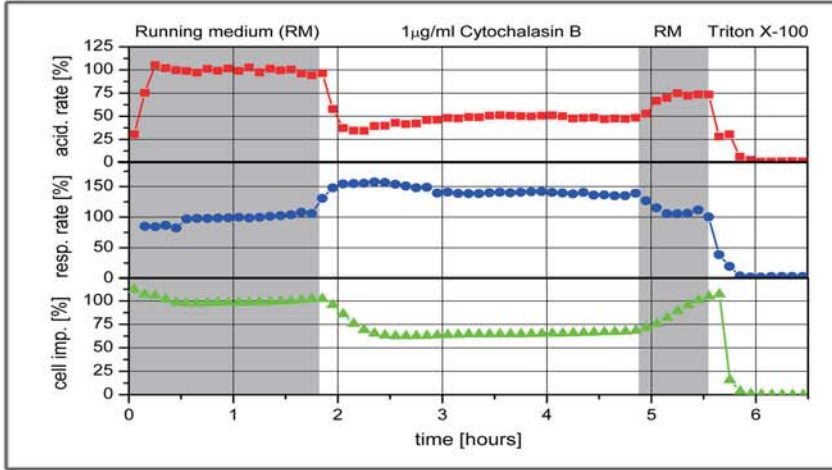


上图通过监测三个平行参数—产酸率、呼吸作用、细胞贴壁电阻, 揭示出Diclofenac对细胞的毒性效应是与浓度相关的。需要注意的是, 这三个参数相应的信号图并不完全相同。1、细胞阻抗显示为波动变化, 2、产酸率在最高的Diclofenac浓度初始加入时出现了最高值, 3、呼吸作用在最近浓度时显示出持续的增强。一般的细胞代谢监测仪器通采用的终点测定, 即在每一段孵育期结束测量数据, 最后根据这些分散独立的数值点拟合出IC50数据。Bionas®-1500/2500系统同样也可以做到终点测定, 而且可以做整个孵化阶段包括随后的再生阶段实时测定出数据然后拟合出IC50, 这样的数据更加全面真实, 而且能反映出更多的信息。



细胞代谢监测仪

应用举例-2：代谢途径的研究

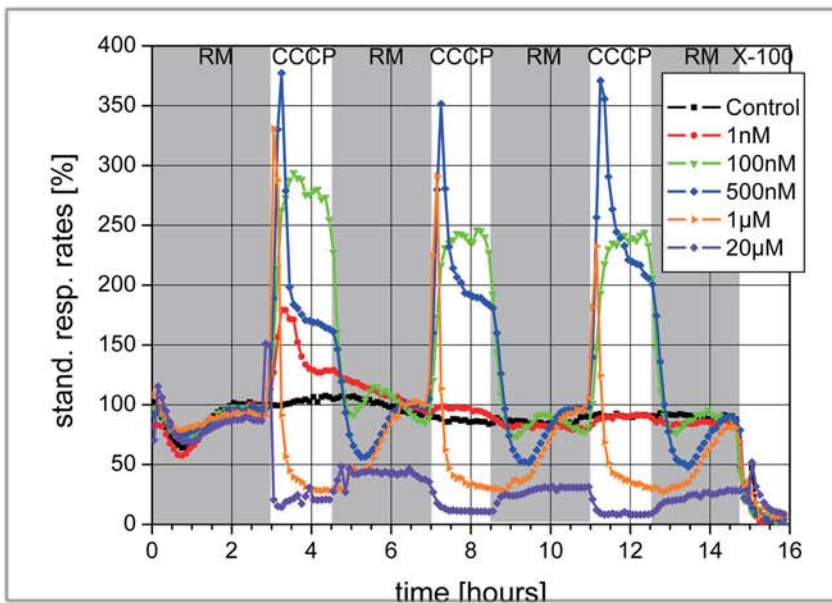


细胞代谢途径的抑制作用：

将细胞养在芯片上完全贴壁后放在CO₂ 孵箱中培养24-48小时至细胞达到80%融合度，然后进行测量。图中可以看到一个芯片/生物模块同时测量的3个参数，从上至下为：产酸率、呼吸作用、细胞贴壁电阻。第一个灰色区域显示的是适应期：细胞适应新的环境，包括新的培养基、低血清、灌注、高氧气浓度。

从第一个白色区域到第二个灰色区域显示的是加入待测物质-细胞松弛素B，然后移除的过程，细胞生理代谢活动先受到了抑制，后来又恢复正常的过程。最后一个白色区域显示的是细胞被去污剂Triton X-100杀死的变化过程，所有的生理学参数均降至0。

细胞松弛素B能抑制葡萄糖跨膜转运，并抑制肌动蛋白形成微丝。产酸率的降低是由于细胞质中有效的葡萄糖含量的降低，而细胞贴壁电阻的降低表明细胞紧缩变圆（形态学变化），是由于肌动蛋白形成微丝的过程受到抑制造成的。而呼吸作用的增加是用于弥补由于糖酵解作用（对应产酸率，通过糖酵解作用产生ATP）降低而导致的能量不足。此试验表明细胞松弛素B对细胞的作用是可逆的，所有三个参数均可以恢复。在这个图中，我们可以清楚地观察到细胞松弛素B对细胞行为的影响。



氧化磷酸化的解偶联作用：

本实验结果表明，细胞代谢行为受到CCCP影响是与其浓度相关的。由于CCCP对氧化磷酸化的解偶联作用，细胞可以使用氧气进行呼吸作用，但不能产生ATP/能量。细胞试图通过增加呼吸作用和氧气的消耗来产生ATP。通过三次加入CCCP后再更换新鲜培养基，细胞都出现生理状态回复的结果表明：大多数CCCP浓度下，细胞均可以恢复到正常的状态（100%加CCCP之前的水平）。

最高浓度CCCP-20µM的CCCP移除后，细胞并未恢复到100%正常状态，这是由于不可逆的线粒体损伤。该实验同时还测量产酸率和细胞贴壁电阻(没有显示在图中)。由于我们的系统具有6个平行的生物模块，所以可以同时不同浓度的三个参数的测量，全自动模式下，一天内就能得到所有的数据。



细胞代谢监测仪

客户的评价:

“Wouldn't it be ideal to measure cellular events to different cellular stimuli using a common assay methodology without having to modify the cellular environment by addition of endogenous labels, i.e. using label-free technology, and do it in real time in a living cell?” -----Lisa Minor, 强生医药

In conclusion, considerable interest is now given to label-free technologies because they eliminate concerns related to fluorescence and luminescence interferences, and do not require parameter-specific, exogenously added probes. Advanced adaptations, such as the system developed by Bionas, use silicon chips equipped with parametric sensors, and feature the ability to make dynamic and continuous measurements of three key metabolic parameters (oxygen consumption, extracellular acidification rate, and adhesion properties) for up to several days. -----Andrew L. Niles, Promega公司

The bionas system allows us to extend and optimize target validation studies by bringing the targets back into their physiological context. -----Dr. Eric Ronken, solvay药业公司首席科学家

发表的文章:

- 2006 *Sensors and Actuators* Real-time assessment of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate
- 2006 *Exp. Cell Res* Junctional adhesion molecule-A participates in the formation of apico-basal polarity through...
- 2006 *Annals New York Academy of Sciences* A New Method to Assess Drug Sensitivity on Breast...
- 2007 *Analytical Biochemistry* Online monitoring of BALB3T3 metabolism and adhesion with multiparametric...
- 2007 *Toxicology and Applied Pharmacology* Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic...
- 2008 *J. Med. Chem. Synthesis* Biological Activity and Structure-Activity Relationship for Potent Cytotoxic...
- 2008 *ChemMedChem* Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Metabolic Profiling of Human Cancer Cells Treated with...
- 2008 *The Open Ophthalmology Journal* Prevention of Lens Epithelial Cell Growth In Vitro Using...
- 2009 *Cell Transplantation* A Transformed Cell Population Derived From Cultured Mesenchymal Stem Cells Has...
- 2009 *J Biol Inorg Chem* [N,N'-Bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine]metal complexes with cell death promoting...
- 2009 *Procedia Chemistry* Characterization of eucaryotic cells as the sensitive layer of cell based cytotoxicity sensors
- 2010 *Anticancer Res* Online Monitoring of Cellular Metabolism in the MCF7 Carcinoma Cell Line Treated with...
- 2010 *International Journal of Oncology* SIRT3 SNPs validation in 640 individuals, functional analyses and new...



Compare to other label-free/cell-based systems

USP:

- 3 Parameters
- Regeneration
- Long-time

Bionas®-1500/2500细胞代谢监测仪

