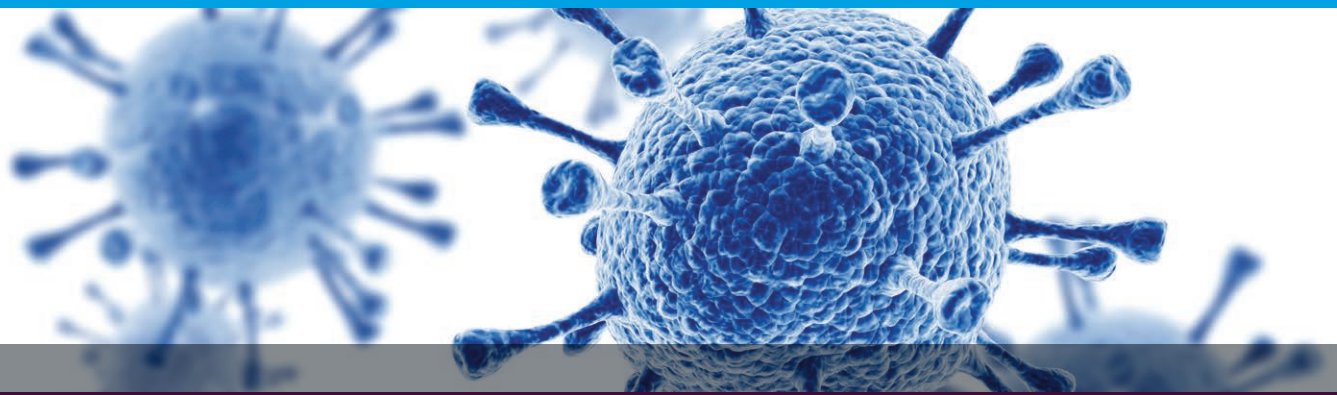


# 疫苗与病毒学应用

Agilent xCELLigence RTCA 手册



# 目录

<b>概述</b>	<b>3</b>
细胞病变效应在病毒学研究中的重要性	3
传统 CPE 检测的不足之处	3
解决方案：Agilent xCELLigence 实时 CPE 检测	4
E-Plate	4
实时阻抗曲线说明	5
xCELLigence 仪器	5
<b>应用</b>	<b>8</b>
病毒滴度测定	8
中和抗体的检测和定量	11
抗病毒药物研究	14
杀病毒剂检测	17
溶瘤病毒	19
表征病毒质量/适应性	22

# 概述

## 细胞病变效应在病毒学研究中的重要性

感染病毒后，宿主细胞通常会显示出显微镜下可见的变化，这些变化统称为细胞病变效应 (CPE)。CPEs 可能包括细胞皱缩或增大、退化/裂解、细胞融合以及包涵体形成。并非所有病毒都在其宿主细胞中引起 CPE，但如果引起 CPE，则可作为各种研究应用的有用工具，包括从确定病毒滴度到检测并定量中和抗体的所有方面。

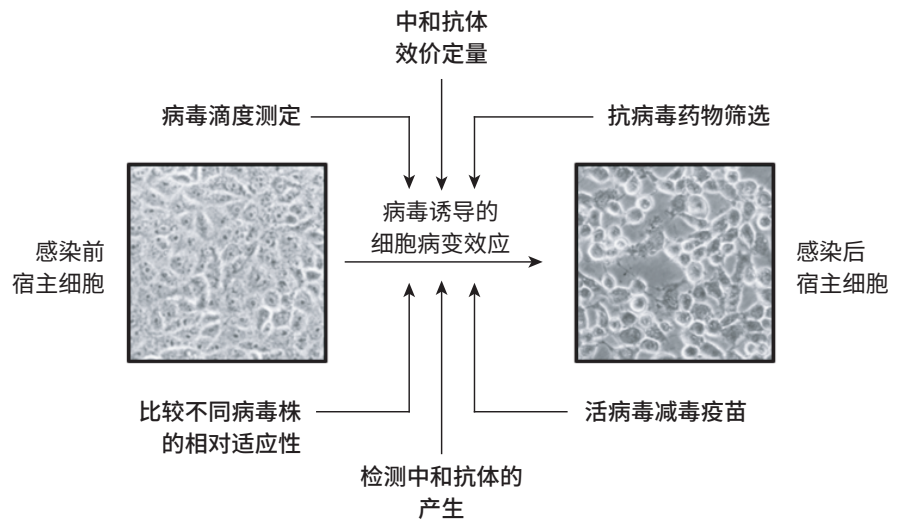


图 1. 诱导细胞病变效应的因素

## 传统 CPE 检测的不足之处

在典型的 CPE 检测中，用病毒感染单层细胞，然后在随后数天（或数周）内进行监测以追踪形态变化。这些变化出现在与感染部位相对应的不同病灶上。几十年来，首选的检测方法一直是空斑实验，即在感染后不久，用半固体物质（如琼脂糖）覆盖单层细胞。随着被感染细胞裂解，琼脂糖阻止子代病毒颗粒通过培养基自由扩散并感染孔中更远位置处的细胞。由于病毒仅能在琼脂糖层下方横向扩散，因此仅能感染相邻细胞。随着这种感染、裂解和相邻细胞感染的循环持续进行，形成了称为空斑的无细胞区域，该区域可以通过肉眼或显微镜进行计数。空斑实验有多种不同形式（例如，使用或不使用染色细胞），但是所有这些都需要耗费大量人力。要确定是否为合格空斑非常困难。这使得实现高水平的准确性和重复性极具挑战。最后，很难从空斑实验的终点数据中获得动力学信息。比较两种不同病毒株/分离株的相对适应性时，动力学信息可能非常有用。

使用经基因改造表达荧光蛋白的病毒，可以更轻松地鉴定单层宿主细胞内的感染部位。但是在许多情况下（例如减毒活疫苗开发），不允许采取这类对病毒基因组进行修饰的方法。此外，也可以使用抗病毒蛋白抗体结合荧光显微镜来鉴别感染的细胞，但需要大量的手动操作时间，而且试剂可能较为昂贵。上述两种基于荧光的检测方法还存在另一个问题，就是它们无法提供整个病毒生命周期的评估/定量信息。例如，病毒株能够感染细胞并表达荧光蛋白，但是在下游步骤（如衣壳装配或宿主细胞裂解）中仍显示出缺陷。在此情况下，通过荧光追踪病毒蛋白的存在不适用于评估病毒的适应性/质量。

## 解决方案：Agilent xCELLigence 实时 CPE 检测

作为传统 CPE 检测的一种更高效、更高通量的替代方法，许多行业和学术机构实验室现在都采用 Agilent xCELLigence 实时细胞分析 (RTCA) 仪器来开展许多病毒学应用。

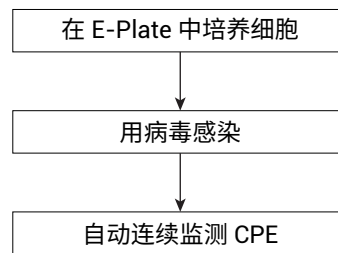


图 2. Agilent xCELLigence 仪器示意图。xCELLigence 仪器具有不同规格可供选择（16 孔、48 孔、96 孔和 576 孔）。所示仪器包含六个板位，每个板位中可搭载一个 96 孔电子微孔板。放置孔板的仪器部分放置于标准培养箱中，而分析仪和工作站（笔记本电脑）则放置于培养箱外。可以同时且相互独立地监测所有六个孔板，最大程度提高通量和灵活性

xCELLigence 分析仪采用专利微孔板 (Agilent E-Plate), 每个孔底部集成了微金电极生物传感器。当浸没在导电溶液 (例如标准培养基) 中时, 在这些生物传感器上施加微弱电压便会在它们之间形成微电流 (图 3B)。微金电极生物传感器上的贴壁细胞会阻碍电流, 并且阻抗大小取决于细胞数量、细胞大小、细胞-基底粘附强度以及细胞间黏附情况 (屏障功能)。微金电极生物传感器的表面或电压本身都不会对细胞活力或行为造成影响。

在病毒学测定的背景下, 经历细胞病变效应连续过程 (表现出细胞变圆并最终脱落或裂解) 的感染细胞对电流的阻碍作用越来越小 (图 3B)。xCELLigence 分析仪能够检测出显微镜无法检测到的细微变化, 例如细胞-表面粘附强度降低。通过连续检测这些变化, xCELLigence 分析仪可以以前所未有地详细追踪病毒 CPEs, 并可用于多种应用的定量动力学。

### A 工作流程



### B

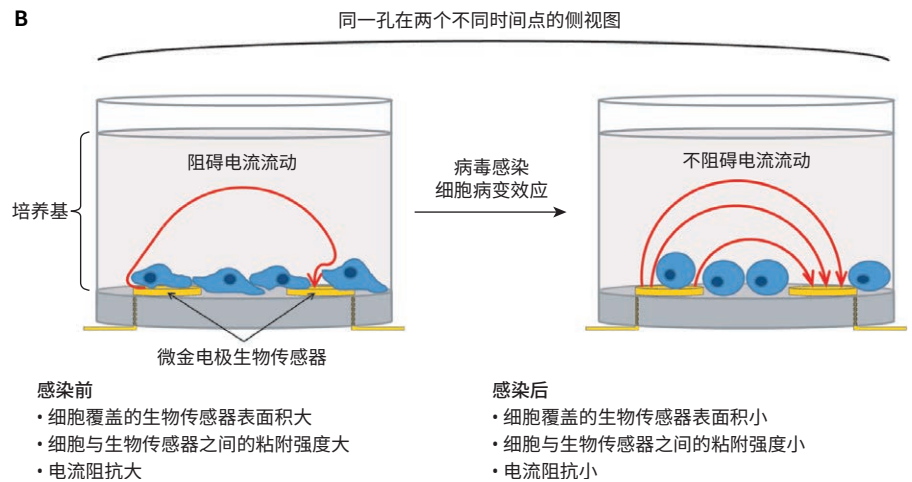


图 3. 使用 Agilent xCELLigence 仪器实时监测病毒 CPE。(A) 用于监测病毒 CPE 的简单工作流程。细胞被感染后, 不再涉及手动操作, 仪器将自动连续采集数据。(B) 微金电极生物传感器实时监测病毒诱导的细胞数量、大小、细胞-基底粘附强度和细胞间黏附强度的变化

## E-Plate

与图 3 中的简化示例不同的是，Agilent E-Plate 中的微金电极生物传感器以交错阵列形式排列，覆盖每个孔底部约 75% 的面积。这使得可以对成千上万的细胞进行整体分析，为检测细胞活力和行为的实时变化提供了出色的灵敏度。

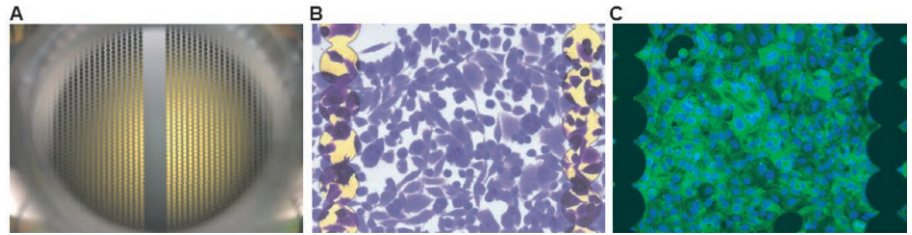


图 4. Agilent E-Plate 上的阻抗生物传感器。(A) E-Plate 上单个孔的照片。尽管可以在微金电极生物传感器表面上看到细胞，但孔中间的非电极区域有助于显微成像。(B) 荧光显微镜下观察到的放大后的微金电极生物传感器和结晶紫染色的人体细胞。(C) 免疫荧光显微镜下观察到的微金电极生物传感器轮廓

## 实时阻抗曲线说明

使用细胞指数 (Cell Index, CI) 这一无单位参数来表示贴壁细胞引起的电流阻抗，其中：

$$CI = \frac{(\text{时间点 } n \text{ 时的阻抗}) - (\text{无细胞时的阻抗})}{(\text{阻抗常数})}$$

图 5 提供了在设置和运行病毒 CPE 检测的整个过程中实时阻抗曲线的通用示例。将细胞加入孔后的最初几个小时，细胞粘附和伸展使阻抗迅速增加。如果细胞在最初的粘附阶段后生长至亚汇合 (subconfluent)，将开始增殖并导致 CI 逐渐稳定地增加。当细胞增殖至汇合后，由于生物传感器的整个表面积已达到饱和，CI 值将趋于平稳。随后，用诱导 CPE 的病毒感染细胞会导致 CI 稳定下降。CI 下降到零反映靶细胞完全裂解或脱落。通过显微镜可以很容易确认阻抗信号与生物传感器上细胞状态之间的这种相关性。

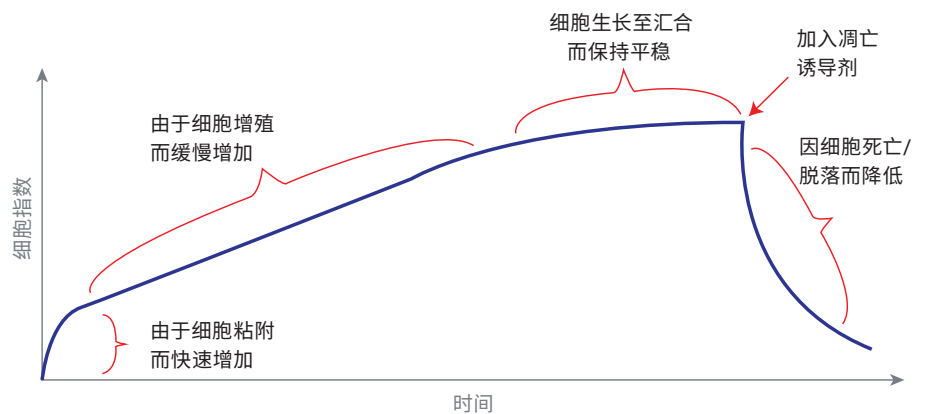



图 5. 用于病毒 CPE 检测的通用实时阻抗曲线。阻抗曲线的各个阶段和细胞行为都通过文字进行了说明

## xCELLigence 仪器

如前两页所述，九款不同的 xCELLigence 仪器均采用非侵入性电阻抗监测来追踪细胞活力和行为。下表展示了最适合疫苗开发和一般病毒学研究的四款 xCELLigence 仪器。除了不同的孔板规格/通量外，某些型号的仪器还具备特殊功能，比如能够监测细胞侵袭和迁移。



	双重用途 (DP)	单板位 (SP)	多板位 (MP)	高通量 (HT)	eSight
规格	3 × 16 孔	1 × 96 孔	6 × 96 孔	1 × 384 孔	3 × 96 孔用于阻抗监测， 5 × 96 孔用于成像
最大通量	48 孔	96 孔	576 孔	最多 4 × 384 孔 (总计 1536 孔)	288 孔用于阻抗监测， 最多 480 孔用于成像



图 6. 在培养箱内直接进行活细胞分析。Agilent xCELLigence 仪器放置于标准培养箱或低氧室中，兼容全部生物学相关温度、大气成分和湿度范围

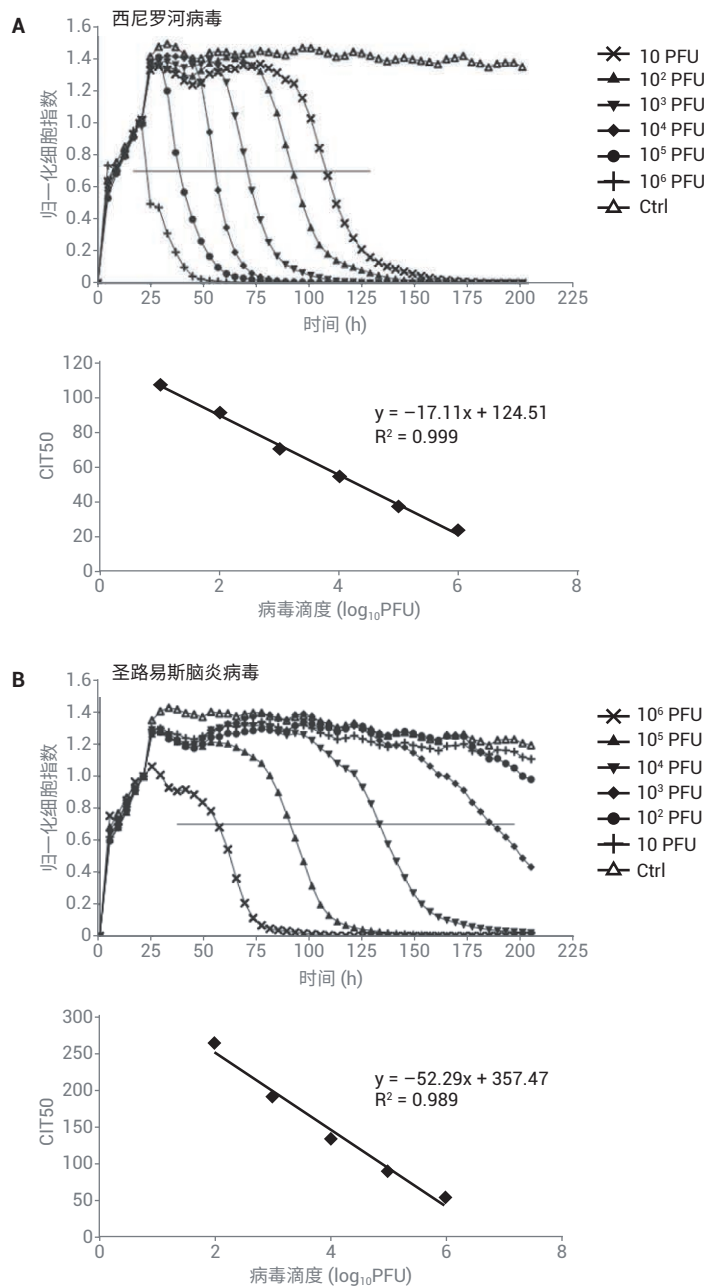
# 应用

## 病毒滴度测定

由于用于病毒滴度定量分析的传统 CPE/空斑实验费时费力，Reisen 和同事对 xCELLigence RTCA 测定西尼罗河病毒 (WNV) 和圣路易斯脑炎病毒 (SLEV) 滴度的效率进行了评估<sup>[1]</sup>。将 Vero 细胞悬液与已知浓度的 WNV 或 SLEV 的系列稀释液在 37 °C 下孵育 30 分钟。随后立即将细胞/病毒悬液加入 E-Plate 孔中，然后在 xCELLigence 分析仪上监测阻抗。与未感染的对照细胞生长至汇合并维持稳定 CI 相比，感染病毒的细胞的 CI 随时间降低至零，表明细胞已完全裂解（图 7A 和 7B 上图）。与已知的 WNV 和 SLEV 具有细胞溶解活性一致，xCELLigence 分析仪显示 WNV 更早表现出 CPE 并具有更快的 CPE 进展速度。

对于 WNV 和 SLEV，发生细胞病变效应的时间与已知的病毒滴度相关。这一点可以通过绘制 CIT50（CI 降低 50% 所需时间）与病毒滴度的关系图来呈现（图 7A 和 7B 下图）。使用此类标准曲线可以测定未知浓度样品中的病毒滴度。除表征用于研究或疫苗的病毒原液外，实验室还可以采用该方法对暴露前、暴露期间和暴露后特定病毒的载量进行定量分析。





**图 7.** 使用 Agilent xCELLigence RTCA 测定病毒滴度。(A) 上图：实时监测 Vero 细胞中 WNV 诱导的细胞病变效应。显示接种了阴性对照 (Ctrl) 或不同数量空斑形成单位 (PFUs) WNV 的 E-Plate 孔的归一化细胞指数。每条曲线均为两个独立平行孔的平均值。水平线表示 CI 下降至其初始值 (加入病毒前) 50% 的点。达到这一点所需的时间称为 CITT50。下图：绘制 CITT50 与病毒滴度的关系图，得到标准曲线，可用于测定不同类型样品中的病毒浓度。(B) 实时监测 Vero 细胞中 SLEV 诱导的细胞病变效应。实验详细信息和数据处理与 (A) 部分相似

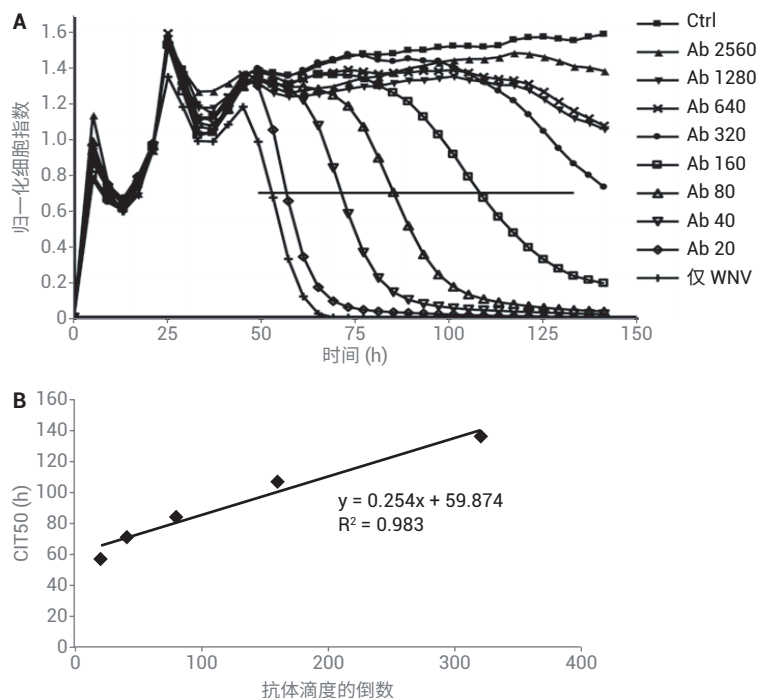
转载自: *Journal of Virological Methods*, volume 173(2), Fang, Y. et al., "Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology," pages 251–8. 版权所有 2011, 经 Elsevier 授权。

参考文献 — 使用 xCELLigence  
测定病毒滴度

1. Fang, Y. *et al.* Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology. *J. Virol. Methods* **2011** May, 173(2), 251–8
2. Witkowski, P. T. *et al.* Cellular Impedance Measurement as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralization Testing and Evaluation of Antiviral Substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010** Oct 8, 401(1), 37–41
3. Charretier, C. *et al.* Robust Real-Time Cell Analysis Method for Determining Viral Infectious Titers During Development of a Viral Vaccine Production Process. *J. Virol. Methods* **2017** Nov 14, 252, 57–64

## 中和抗体的检测和定量

xCELLigence 实时追踪病毒诱导的 CPEs 的功能可用于检测和定量分析中和抗体。实验原理类似于标准空斑减少中和试验，但是 xCELLigence 仪器的自动数据采集功能可以极大减少所需的手动操作时间，消除数据分析的主观性。图 8 中显示的两个示例证实了此方法在研究应用中的有效性。



**图 8.** 使用 Agilent xCELLigence RTCA 定量分析 WNV 中和抗体滴度。(A) 用不同稀释度的中和抗体稀释液对 WNV 病毒进行预孵育，然后用  $10^6$  PFU 的 WNV 感染 Vero 细胞。Ctrl = 未感染病毒的 Vero 细胞；仅 WNV = 感染未经抗体预处理的病毒的 Vero 细胞。水平线表示细胞指数下降至其初始值（加入病毒前）50% 的点。达到这一点所需的时间称为 CIT50。(B) 绘制 CIT50 与抗体滴度倒数的关系图，得到标准曲线，可用于评估野生禽类血清中的抗体浓度

转载自: *Journal of Virological Methods*, volume 173(2), Fang, Y. et al., "Real-Time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology," pages 251–8. 版权所有 2011, 经 Elsevier 授权。

当 Vero 细胞在 E-Plate 孔中生长至汇合后，Fang 和同事用  $10^6$  空斑形成单位 (PFU) 的 WNV 感染每个孔的细胞，这些病毒已经与已知浓度的中和抗体连续稀释液预孵育<sup>[1]</sup>。如图 8A 所示，中和抗体延迟了 WNV 诱导的 CPE 的发生，并且与抗体浓度直接相关。通过绘制 CIT50 (CI 降低 50% 所需时间) 与抗体滴度倒数的关系图，获得标准曲线 (图 8B)。这可用于定量分析禽类样本中存在的中和抗体含量。使用这种基于 xCELLigence 的标准曲线确定野外感染禽类中的抗体浓度，获得的数值与通过传统空斑减少中和试验得到的数值高度相关<sup>[1]</sup>。

与 WNV 方法类似，xCELLigence 已用于定量分析人血清中存在的甲型 H1N1 流感病毒的中和抗体含量（图 9）。分别使用或不使用受试者血清对纯化的 H1N1 病毒进行预处理，然后用 H1N1 病毒感染 E-Plate 孔中生长至汇合的细胞。这些血清样本在疫苗接种前和疫苗接种后 7 或 21 天采集，用于追踪 H1N1 特异性中和反应随时间的变化。正如预期，H1N1 中和抗体活性的稳健性在疫苗接种后的前 21 天逐渐增加，这可以通过细胞病变效应延迟发生或完全阻断加以证明。

xCELLigence 凭借简单、自动化的工作流程以及客观的定量读数，在检测和定量中和抗体方面明显优于传统检测方法。此方法能够轻松监测疫苗接种的有效性，并阐明病毒抗性出现的动力学。

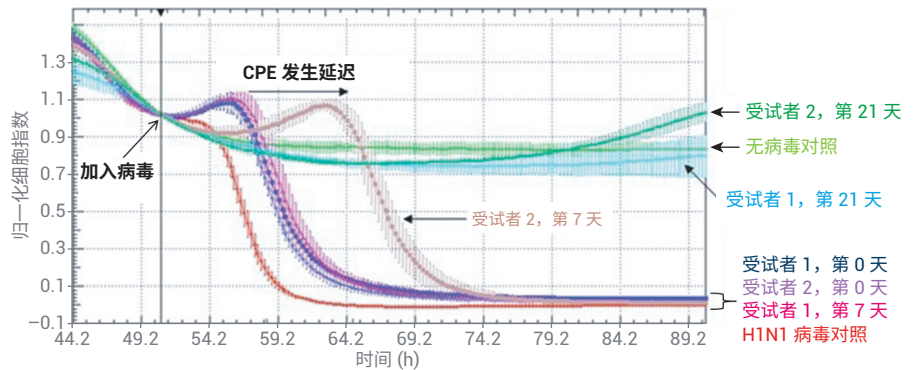


图 9. 使用 Agilent xCELLigence 测定接种 H1N1 疫苗的受试者的中和抗体活性。在接种疫苗前（第 0 天）以及接种疫苗后第 7 天和第 21 天，采集两名受试者的血清样本。将这些血清样本与纯化的 H1N1 病毒孵育，然后将病毒/血清混合物加入在 Agilent E-Plate 中生长的细胞中。对于两名受试者，第 0 天的血清（紫色和蓝色曲线）没有提供任何保护作用，病毒对细胞的杀伤动力学类似于阳性对照（红色曲线）。对于受试者 2，第 7 天的血清显示可以明显延迟 H1N1 诱导的 CPE 的发生（棕色曲线），表明存在 H1N1 病毒的特异性中和抗体。相反，受试者 1 第 7 天的血清并未显示出预防作用（粉色曲线），表明尚不具有 H1N1 中和抗体活性。然而，两名受试者接种疫苗后第 21 天的血清均显示出强大的 H1N1 中和抗体活性，使病毒完全无法诱导细胞病变效应（深绿色和浅绿色曲线）。此测定法能够定量评估特定疫苗的效力以及病毒抗性出现的动力学

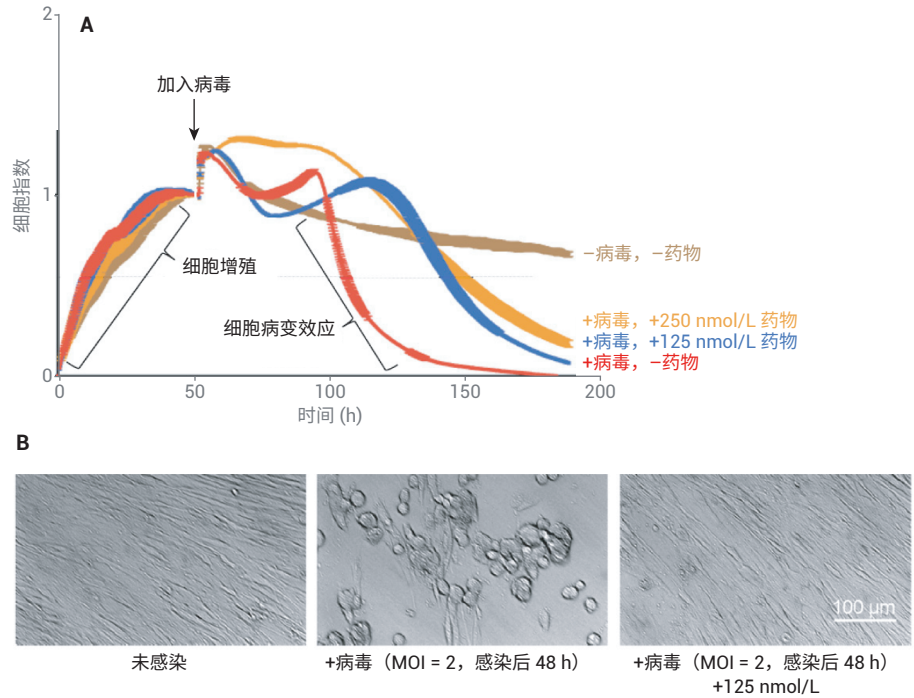
图片摘自：Asia Pacific Biotech News, volume 14(10), Lu, H. et al. "Label-free Real-time Cell Based Assay System for Evaluating H1N1 Vaccination Success," pages 31–32. 版权所有 2010，经 Asia Pacific Biotech News 授权。

参考文献 — 使用 xCELLigence  
检测和定量中和抗体

1. Fang, Y. *et al.* Real-time Monitoring of Flavivirus Induced Cytopathogenesis Using Cell Electric Impedance Technology. *J. Virol. Methods* **2011** May, *173*(2), 251–8
2. Label-free Real-time Cell Based Assay System for Evaluating H1N1 Vaccination Success. *Asia Pacific Biotech News* **2010**, *14*(10), 31–32
3. Teng, Z. *et al.* Real-Time Cell Analysis—a New Method for Dynamic, Quantitative Measurement of Infectious Viruses and Antiserum Neutralizing Activity. *J. Virol. Methods* **2013** Nov, *193*(2), 364–70
4. Kashima, K. *et al.* Inhibition of Metastasis of Rhabdomyosarcoma by a Novel Neutralizing Antibody to CXCR4 Chemokine Receptor-4. *Cancer Sci.* **2014** Oct, *105*(10), 1343–50
5. Tian, D. *et al.* Novel, Real-Time Cell Analysis for Measuring Viral Cytopathogenesis and the Efficacy of Neutralizing Antibodies to the 2009 Influenza A (H1N1) Virus. *PLoS One* **2012**, *7*(2), e31965

## 抗病毒药物研究

xCELLigence 是鉴别和表征能够抑制病毒生命周期任何方面的药物的出色工具，因为实时阻抗监测对病毒诱导的细胞病变效应高度灵敏。在第一个例子中，Urs Greber 和同事的目标是找到一种药物，可以减轻腺病毒对已感染该病毒的受试者的影响。他们的筛选实验包括使 HeLa 细胞生长至汇合，然后在存在不同候选药物的情况下用人腺病毒进行感染。其中最有效的是夫拉平度 (Flavopiridol)，一种能抑制细胞周期依赖性激酶 Cdk9 的半合成黄酮类化合物。如图 10A 所示，在没有药物的情况下，腺病毒感染会诱导稳定的 CPE，阻抗信号降至零（红色曲线）。但是，夫拉平度能够以剂量依赖性方式明显延迟 CPE 发生（蓝色和橙色曲线）。通过显微镜分析（图 10B）可以证实上述基于阻抗的结果。

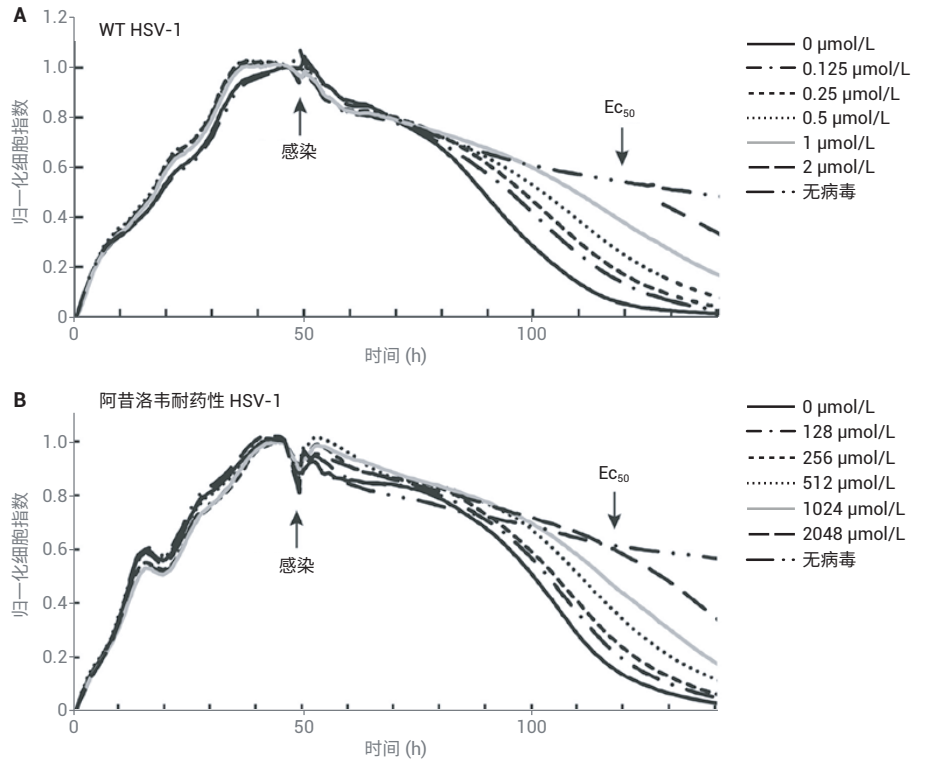


**图 10.** 监测夫拉平度的抗病毒活性。(A) HeLa 细胞在 Agilent E-Plate 中生长至汇合点。细胞接种约 50 小时后，在存在不同浓度夫拉平度的情况下，用 C5 人腺病毒株感染细胞。(B) 夫拉平度可以针对腺病毒提供广泛的保护能力。此处，用 D37 人腺病毒株感染 WI38 肺成纤维细胞，四个小时后，加入或不加入夫拉平度。感染 48 小时后，可以清楚地看到该药物阻止了细胞病变效应的发生

图片经授权摘自：ACS *Infectious Diseases*, volume 3(6), Prasad, V. et al. "Cell Cycle-Dependent Kinase Cdk9 Is a Postexposure Drug Target Against Human Adenoviruses," pages 398–405. 版权所有 2017, American Chemical Society.

在第二个例子中，Guy Boivin 和同事分析了野生型 (WT) 和突变型单纯疱疹病毒 1 (HSV-1) 对抗病毒药物阿昔洛韦的敏感性。Vero 细胞在 E-Plate 中生长至汇合后，将其用病毒感染 90 分钟，然后加入不同浓度的药物。WT 和突变型病毒诱导的 CPE 均可被阿昔洛韦阻断，但与 WT 病毒株相比，阻断突变型病毒株所需的药物浓度明显更高（图 11）。

通过绘制给定时间点的 CI 值与药物浓度的关系图，得到剂量反应曲线（此处未展示），突变型病毒和 WT 病毒的 EC<sub>50</sub> 值分别为 100 μmol/L 和 0.8 μmol/L。上述结果符合此特殊突变型病毒株的特点，即它的 DNA 聚合酶发生了突变，而这正是阿昔洛韦的靶点。



**图 11.** 比较野生型和突变型 HSV-1 对阿昔洛韦的敏感性。Vero 细胞在 Agilent E-Plate 中生长至汇合。细胞接种 48 小时后，将细胞用 WT 或突变型 HSV-1 感染 90 分钟。然后加入不同浓度的阿昔洛韦，每隔 30 分钟监测一次阻抗，持续 100 小时。可以注意到，突变型病毒株需要更高药物浓度来防止细胞病变效应

数据引自: *Journal of Clinical Microbiology*, volume 54(8), Piret, J. et al. "Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus." 版权所有 2016, 经 American Society for Microbiology 授权。

参考文献 — 使用 xCELLigence  
筛选抗病毒药物

1. Watterson, D. *et al.* A Generic Screening Platform For Inhibitors of Virus Induced Cell Fusion Using Cellular Electrical Impedance. *Sci. Rep.* **2016** Mar 15, 6, 22791
2. Zandi, K. A Real-Time Cell Analyzing Assay for Identification of Novel Antiviral Compounds against Chikungunya Virus. *Methods Mol. Biol.* **2016**, 1426, 255–62
3. Sharma, B. N. *et al.* Antiviral Effects of Artesunate on Polyomavirus BK Replication in Primary Human Kidney Cell. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, 58(1), 279–89
4. Witkowski, P. T. *et al.* Cellular Impedance Measurement as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralization Testing and Evaluation of Antiviral Substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010** Oct 8, 401(1), 37–41
5. Piret, J. *et al.* Novel Method Based on Real-Time Cell Analysis for Drug Susceptibility Testing of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* **2016** Aug, 54(8), 2120–7
6. Cymerys, J. *et al.* Primary Cultures of Murine Neurons for Studying Herpes Simplex Virus 1 Infection and Its Inhibition by Antivirals. *Acta Virol.* **2013**, 57(3), 339–45
7. Prasad, V. *et al.* Cell Cycle-Dependent Kinase Cdk9 Is a Postexposure Drug Target Against Human Adenoviruses. *ACS Infect. Dis.* **2017** Jun 9, 3(6), 398–405



## 杀病毒剂检测

杀病毒剂可通过非特异性灭活固体表面（例如工作台面）或溶液中存在的病毒来防止感染。这与通过特异性抑制关键病毒蛋白来减轻感染的抗病毒药物有所不同。杀病毒剂的使用极为普遍，尤其是在农业、兽医和医院环境中。通常使用病毒诱导的 CPE（一般为空斑实验）来测试现有杀病毒剂对特定病毒的有效性以及鉴别新型杀病毒剂。

E.H.Venter 和同事对 xCELLigence CPE 检测作为一种新方法测试杀病毒剂效力进行了评估。他们指出：“使用当前方案测试杀病毒剂效力存在一个主要问题，即对病毒诱导的细胞病变效应的评分依赖于使用光学显微镜的主观视觉判断。”将市售的化学消毒剂/杀病毒剂与传染性法氏囊病病毒 (IBDV) 孵育 20 分钟。然后对病毒进行连续稀释，并加入在 E-Plate 中生长至汇合的 Vero 细胞中。未经处理的病毒可以诱导细胞病变效应，CPE 发生时间取决于病毒稀释倍数（稀释倍数越高，杀伤作用越晚出现，如图 12A 所示）。但是用杀病毒剂预处理 IBDV 能够极大降低感染性。此时，稀释 10 倍的病毒稀释液能够诱导 CPE，但 100 倍或更高稀释倍数的病毒稀释液对 Vero 细胞没有影响（图 12B）。

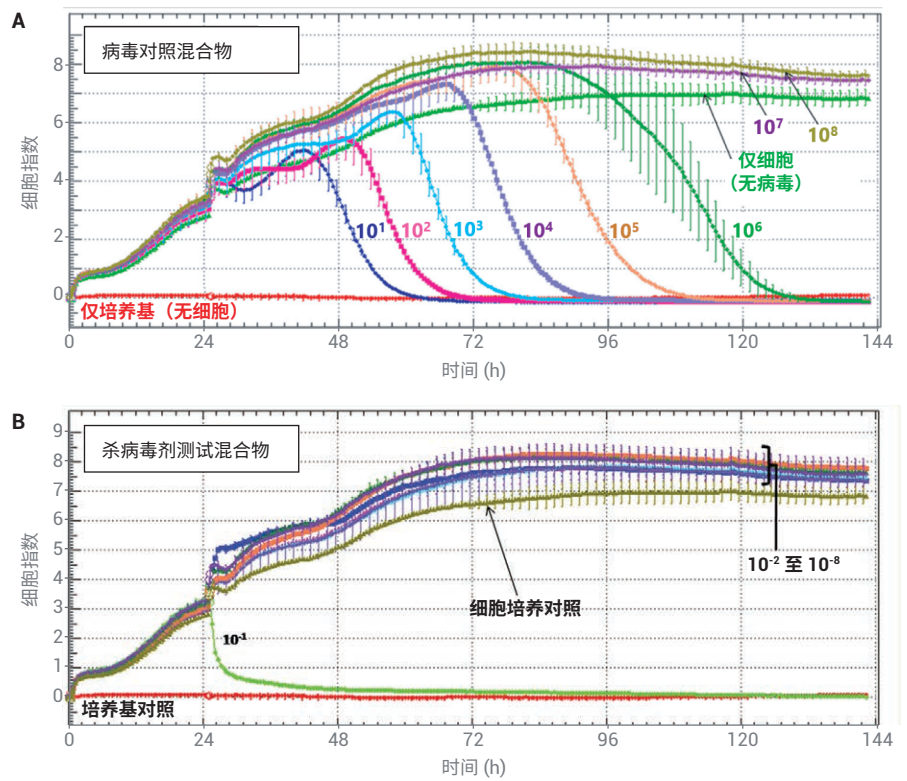


图 12. 使用 xCELLigence 系统检测 (A) 病毒稀释液和 (B) 病毒-杀病毒剂混合物稀释液对 Vero 细胞的细胞病变效应 (D<sub>50</sub> 测定)。每条曲线由三次独立重复测定的 CI 值组成。加入混合物后, 每隔 30 分钟检测一次细胞指数值。CI 值为零表示细胞从细胞培养孔底部完全脱落。误差线表示每个读数/曲线的标准偏差。经杀病毒剂处理后 (B), 仅最高浓度的病毒溶液才能诱导细胞病变效应。病毒浓度以稀释倍数表示 (即 10<sup>1</sup> = 稀释 10 倍, 10<sup>2</sup> = 稀释 100 倍, 依次类推)

转载自: *Journal of Virological Methods*, volume 199, Ebersohn, K. et al. "An Improved Method for Determining Virucidal Efficacy of a Chemical Disinfectant Using an Electrical Impedance Assay," pages 25–28. 版权所有 2014, 经 Elsevier 授权。

**注:** 经杀病毒剂处理的病毒在稀释 10 倍后表现出的快速杀伤作用可能是活性病毒颗粒和残留的杀病毒剂共同作用于靶细胞的结果, 表明高浓度的杀病毒剂对 Vero 细胞也具有毒性。

基于以上数据, 作者得出结论: “尽管使用 xCELLigence 系统的改进版[杀病毒剂]测定法与传统[杀病毒剂]测定法获得的结果相同, 但 xCELLigence 系统可以更精确、更高重复性地测定杀病毒效力和细胞毒性。”

1. Ebersohn, K.; Coetzee, P.; Venter, E. H. An Improved Method for Determining Virucidal Efficacy of a Chemical Disinfectant Using an Electrical Impedance Assay. *J. Virol. Methods.* **2014** Apr, 199, 25–8

## 溶瘤病毒

溶瘤病毒治疗是一种有前景的癌症治疗方法，其使用具有复制能力的病毒，选择性地感染或杀死癌细胞。尽管这种方法可以使用野生型病毒，但已开展了大量研究对病毒进行基因工程改造以实现更高特异性或效力。一个典型示例是改造溶瘤腺病毒以表达分泌形式的双特异性 T 细胞衔接蛋白 (bi-specific T cell engager)，将细胞毒性 T 细胞募集到残留的癌细胞处<sup>[1]</sup>。

xCELLigence 仪器能够连续监测癌细胞杀伤作用，同时具备高灵敏度，是定量评估溶瘤病毒（单独使用或与其他治疗方式联合使用）效力的有效工具。

在图 13 中，使用 xCELLigence 监测嵌合型腺病毒 (Enadenotucirev, EnAd) 对 A549 肺癌细胞的杀伤作用，嵌合型腺病毒通过结合多种癌细胞上均会表达的 CD46 或桥粒芯蛋白而感染癌细胞。在效价分析中，在一定浓度范围内对 EnAd 与野生型腺病毒 Ad11p 和 Ad5 的细胞毒性（杀伤动力学）进行了比较。在最高浓度（红色，500 个病毒颗粒/细胞 [PPC]）下，EnAd 和 Ad11p 均在感染后 36 至 48 小时内完全杀死细胞（CI 降至零）。但是，在较低病毒浓度下 (0.8–20 PPC)，EnAd 的效价远高于 Ad11p，表现为更早出现细胞毒性和更快完成细胞杀伤过程。与 EnAd 和 Ad11p 相比，野生型 Ad5 对癌细胞的杀伤效率要低得多，即使在最高病毒浓度下也需要 5 天才能完全杀死癌细胞。总体而言，这些数据突显了 xCELLigence 测定法定量捕获不同溶瘤病毒效价差异的能力。

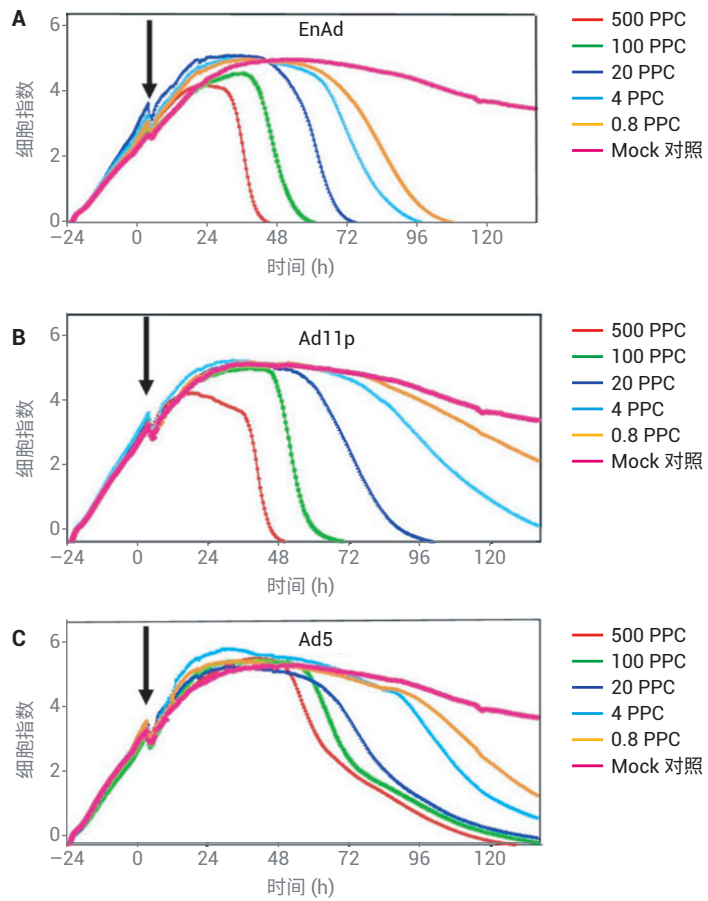


图 13. 不同腺病毒对 A549 肺癌细胞的杀伤作用。黑色箭头表示加入病毒的时间。病毒浓度以 PPC 表示

图片摘自: *Molecular Therapy Oncolytics*, volume 10(4), Dyer, A. et al. "Oncolytic Group B Adenovirus Enadenotucirev Mediates Non-Apoptotic Cell Death with Membrane Disruption and Release of Inflammatory Mediators," pages 18–30. 此工作已根据知识共享署名 4.0 国际许可协议 (Creative Commons Attribution 4.0 International License) 获得许可。

如需查看此许可协议的副本, 请访问 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> 或向知识共享组织 (Creative Commons) 寄送信件, 地址为 PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA。

参考文献 — 使用 xCELLigence  
研究溶瘤病毒

1. Freedman, J. D. *et al.* Oncolytic Adenovirus Expressing Bispecific Antibody Targets T-Cell Cytotoxicity in Cancer Biopsies. *EMBO Mol. Med.* **2017** Aug, 9(8), 1067–1087
2. Fajardo, C. A. *et al.* Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting T-cell Engager Improves Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* **2017** Apr 15, 77(8), 2052–2063
3. Dyer, A. *et al.* Oncolytic Group B Adenovirus Enadenotucirev Mediates Non-Apoptotic Cell Death with Membrane Disruption and Release of Inflammatory Mediators. *Mol. Ther. Oncolytics* **2016** Dec 10, 4, 18–30
4. Ellerhoff, T. P. *et al.* Novel Epi-Virotherapeutic Treatment of Pancreatic Cancer Combining the Oral Histone Deacetylase Inhibitor Resminostat with Oncolytic Measles Vaccine Virus. *Int. J. Oncol.* **2016** Nov, 49(5), 1931–1944
5. Lacroix, J. *et al.* Oncolytic Effects of Parvovirus H-1 in Medulloblastoma are Associated With Repression of Master Regulators of Early Neurogenesis. *Int. J. Cancer.* **2014** Feb 1, 134(3), 703–16
6. El-Andaloussi, N. *et al.* Generation of an Adenovirus-Parvovirus Chimera with Enhanced Oncolytic Potential. *J. Virol.* **2012** Oct, 86(19), 10418–31
7. Fecker, L. F. *et al.* Efficient and Selective Tumor Cell Lysis and Induction of Apoptosis in Melanoma Cells by a Conditional Replication-Competent CD95L Adenovirus. *Exp. Dermatol.* **2010** Aug, 19(8), e56–66

## 表征病毒质量/适应性

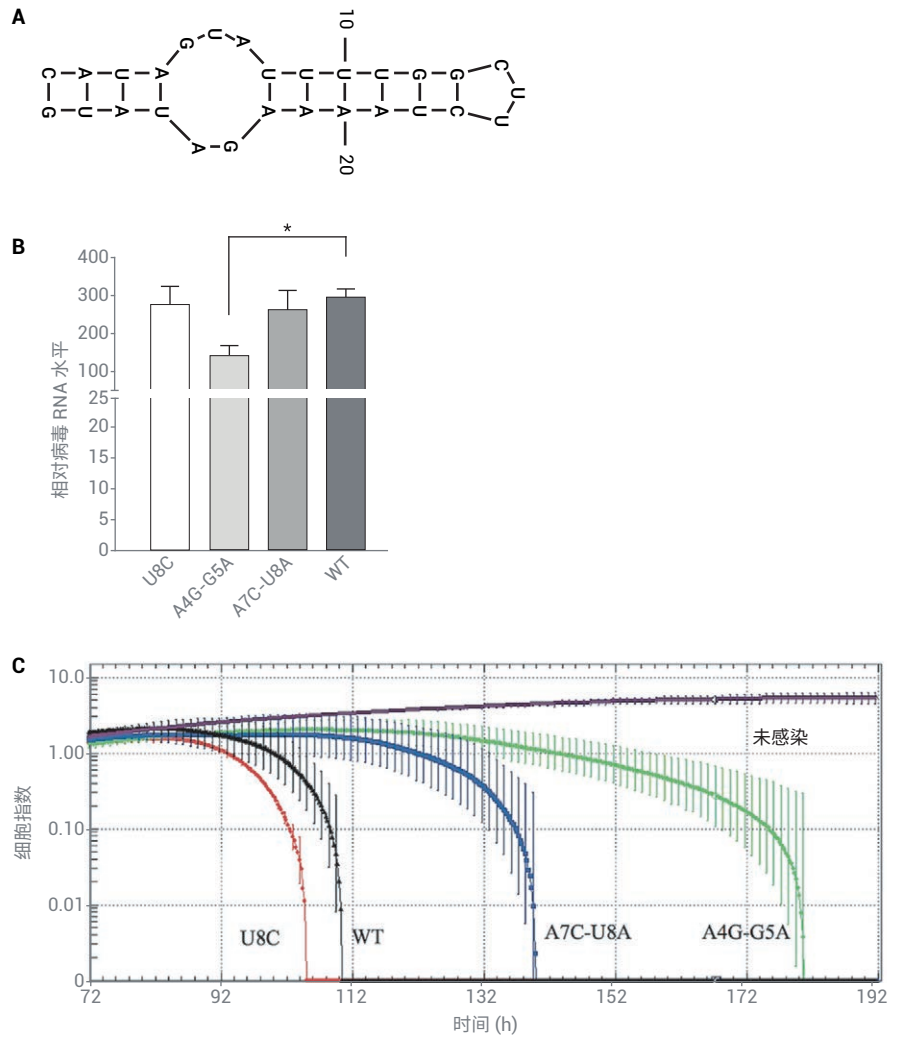
在评估活病毒疫苗的减毒程度、比较两种不同分离株的细胞毒力特性或探索病毒基因的功能时，适应性比较对于疫苗开发和基础病毒学研究不可或缺。尽管“适应性”在不同情况下存在不同定义，但其通常是指病毒完成其整个生命周期的效率——涵盖从细胞表面受体的初始结合到基因组复制、衣壳装配以及子代病毒最终从细胞中释放出来开始新一轮感染的全部过程。基于 xCELLigence 的测定方法非常适合病毒适应性研究，因为其可以在病毒诱导的 CPE 的整个连续过程中检测宿主细胞的变化，并能对这些变化进行实时追踪。

病毒性出血性败血症病毒 (VHSV) 的负链 RNA 基因组在其 3' 端含有高度保守的核苷酸序列。预计这将会形成发夹结构 (图 14A)。Øystein Evensen 和同事试图了解该序列是否会对鱼类上皮细胞中 VHSV 的复制和转录产生影响。使用一组 VHSV 突变体开展研究，感染两天后使用 qPCR 对总正链 RNA 水平进行定量分析。图 14B 显示，U8C 和 A7C-U8A 突变体对病毒正链 RNA 水平没有明显影响，A4G-G5A 突变体则显著降低了病毒 RNA 水平。随后使用 xCELLigence 对这些不同突变体的相对适应性进行了评估 (图 14C；在 72 小时向细胞中加入病毒)。与 RNA 水平降低相一致的是，A4G-G5A 突变体 (绿色曲线) 比 WT 病毒 (黑色曲线) 需要更长时间才能完成对靶细胞的杀伤。

有趣的是，尽管 A7C-U8A 突变体的 RNA 水平与 WT 相当，但也显示出 CPE 延迟 (蓝色曲线)。此外，尽管 U8C 突变体与 WT 的 RNA 水平相当，但其在杀伤靶细胞方面更有效 (红色曲线)。

此 VHSV 示例表明，使用单一时间点生物标志物 (如 RNA) 定量分析来评估病毒适应性可能会产生误导。这更加证实了追踪病毒生命周期的功能测定的实用性。

使用 xCELLigence 定量评估病毒适应性的另一个示例涉及蓝舌病毒，该病毒可以导致野生和家养反刍动物 (牛、绵羊和山羊) 出现出血性疾病，从而导致巨大的经济损失。蓝舌病毒具有一个排列在 10 个不同线性片段中的 dsRNA 基因组。基于这种基因组结构性质以及该病毒的多个病毒株可以同时感染一个细胞，蓝舌病毒可以随时间推移表现出极大程度的基因重排。一个重要的问题是这种基因组重排如何影响病毒的细胞致病性。



**图 14.** VHSV 基因组 3' 端序列对病毒适应性和 RNA 水平均有影响。(A) 预测的 VHSV 基因组 3' 端二级结构。(B) 感染两小时后总 VHSV 正链 RNA 水平。(C) 使用 Agilent xCELLigence 定量分析 VHSV 突变体的相对适应性

图片摘自: *Virology*, volume 476, Kim, S. H. et al. "Specific Nucleotides at the 3'-Terminal Promoter of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus are Important for Virulence In Vitro and In Vivo," pages 226–32. 版权所有 2015, 经 Elsevier 授权。

Estelle Venter 和同事通过生成病毒变体开展了相关研究，该变体的基因组大部分来自一个病毒株。他们还纳入了来自不同病毒株的片段。随后，研究小组对这些重排病毒株杀伤 Vero 细胞的能力进行了实时监测。如图 15 所示，亲本病毒株 8 杀伤靶细胞的效率比亲本病毒株 6 更高。将病毒株 6 与病毒株 8 的片段结合并未提高其细胞致病性。这种嵌合体的杀伤动力学较慢（淡蓝色迹线）。相反，将病毒株 8 与病毒株 6 的片段结合则产生了具有极强细胞杀伤能力的病毒（紫色迹线）。

通过精确追踪这些不同的病毒表型，研究者得出了关于蓝舌病毒野外行为的重要结论。至关重要的是，如果使用蓝舌病毒减毒活株为动物接种疫苗，其可能在体内与其他病毒株发生重排，并超越减毒表型而达到足够高的病毒血症，从而诱发真正的疾病。

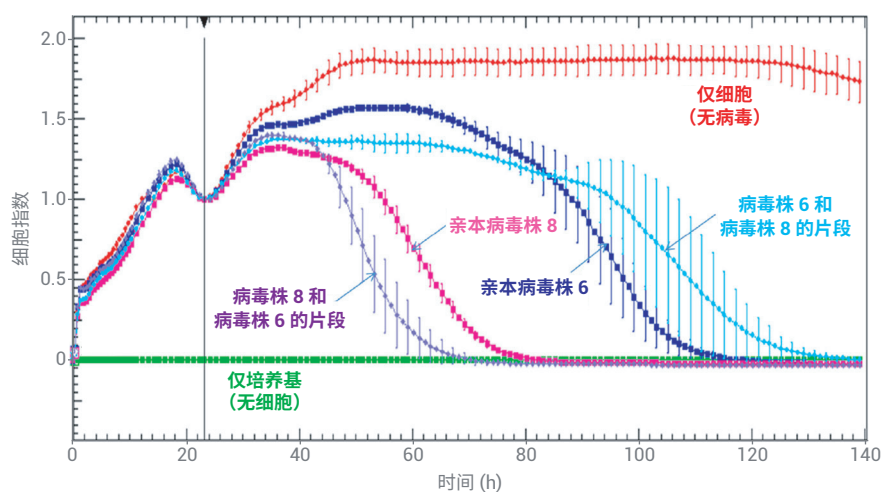


图 15. 蓝舌病毒基因组重排引起的细胞致病性差异。Vero 细胞生长至汇合，然后用亲本病毒株或基因重排病毒株以相同 MOIs 进行感染（23 小时处）

图片摘自: *Veterinary Microbiology*, volume 171 (1-2), Coetzee, P. et al. "Viral Replication Kinetics and In Vitro Cytopathogenicity of Parental and Reassortant Strains of Bluetongue Virus Serotype 1, 6 and 8," pages 53–65. 版权所有 2014, 经 Elsevier 授权。

## 参考文献 — 使用 xCELLigence 研究病毒质量/适应性

1. Sung-Hyun, K. et al. Specific Nucleotides at the 3'-Terminal Promoter of Viral Hemorrhagic Septicemia Virus are Important for Virulence *In Vitro* and *In Vivo*. *Virology* **2015** Feb, 476, 226–32
2. Coetzee, P. et al. Viral Replication Kinetics and *In Vitro* Cytopathogenicity of Parental and Reassortant Strains of Bluetongue Virus Serotype 1, 6 and 8. *Vet. Microbiol.* **2014** Jun 25, 171(1-2), 53–65

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

DE.5845601852

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019  
2019 年 11 月 1 日，中国出版  
5994-1086ZHCN

