·生物医药前沿·

应用流式细胞术检测仙台病毒载体感染滴度

付志浩,王军志
(中国食品药品检定研究院,国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室,北京 102629)

[摘要] **目的**:建立一种快速、简便和稳健的用于检测仙台病毒载体感染滴度的方法。**方法**:以传播缺陷型仙台病毒载体为研究对象,流式细胞术为检测方法,建立以泊松分布为基础的数学模型做曲线拟合,以函数中的一项参数做感染滴度的结果判定。**结果**:成功建立了流式细胞术检测仙台病毒载体感染滴度的新方法。与传统的免疫荧光法比较,检测结果无显著性差异,且新方法具有更好的重现性,感染滴度为$(2.13\pm0.05)\times10^{9}$ IU·mL^{-1},相对标准偏差(RSD)为2.34%。**结论**:病毒载体类基因治疗产品的感染滴度是该类制品的一项重要质控指标。传统的测定方法,如噬斑法、组织半数感染量($TCID_{50}$)法和免疫荧光法,实验周期长、重现性差,而且结果判定受主观因素影响。本研究建立了一种适合传播缺陷型仙台病毒载体感染滴度测定的新方法,也可为其他类型病毒载体感染滴度的测定方法研究提供参考。

[关键词] 流式细胞术;仙台病毒载体;感染滴度;泊松分布
[中图分类号] R373 [文献标志码] A [文章编号] 1003-3734(2021)20-1850-05

Infection titer detection of Sendai virus vector by flow cytometry

FU Zhi-hao, WANG Jun-zhi
(*Division of Monoclonal Antibodies, National Institutes for Food and Drug Control; Key Laboratory of National Health Commission of the PRC for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing* 102629, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To establish a rapid, convenient and robust method for detecting the infection titer of Sendai virus (Sev) vectors. **Methods**: With transmission-defective Sendai virus vector as the research target and flow cytometry as the detection method, a mathematic model based on Poisson's distribution was established, and the infection titer was determined by one parameter of the mathematic model after curve-fitting. **Results**: An innovative method for detecting the infection titer of Sendai virus vector was successfully established. There were no significant differences between the results obtained from the flow cytometry method and traditional immunofluorescence method, and the flow cytometry method displayed good reproducibility [infection titer is $(2.13\pm0.05)\times10^{9}$ IU·mL^{-1}, RSD is 2.34%]. **Conclusion**: The infection titer detection is an important quality control item of viral vector gene therapy products and the traditional methods such as plaque method, $TCID_{50}$ method and immunofluorescence method have the disadvantages of long experiment cycle, bad reproducibility and poor objectivity. This study is of significance to be a representative quality control reference for infection titer detecting of other viral vectors.

[**Key words**] flow cytometry; sendai virus vector; infection titer; Poisson's distribution

基因治疗是当今生物医药领域研究的热点,对于某些重大疾病已显示出广阔的应用前景[1]。现有的基因治疗临床实验方案中,以病毒为载体的基因治疗方案仍占据主导地位[2-3]。仙台病毒为副粘病毒科的Ⅰ型副流感病毒,是非分节段的单股负链RNA病毒,已被开发为基因治疗载体。该病毒胞质

[作者简介] 付志浩,男,副研究员,主要从事生物技术药质量控制研究。E-mail:fuzhihao@nifdc.org.cn。
[通讯作者] 王军志,男,研究员,主要从事生物制品质量评价研究。E-mail:wangjz@nifdc.org.cn。

复制,无 DNA 相,无整合风险,安全性更高[4]。该病毒表面的细胞融合蛋白(F 蛋白),在病毒感染细胞过程中介导包膜融合,释放病毒核心成分(核糖核蛋白复合物)进入细胞,在病毒传播过程中起重要作用[5]。应用反向遗传学技术对仙台病毒进行改造,以目的基因替换 *F* 基因,其表面 F 蛋白由包装细胞反式提供(F 蛋白基因型阴性,表型阳性),从而构建成传播缺陷型仙台病毒。其感染细胞后可在胞质中复制,但形成的子一代病毒表面 F 蛋白缺失,失去感染能力[6]。

病毒载体类基因治疗产品的感染滴度是该类制品一项重要的质控指标,对于质量评价和临床剂量指导具有重要意义[7]。对于传播缺陷型仙台病毒载体,噬斑法和 $TCID_{50}$ 法不适用于检测其感染滴度[8]。目前检测仙台病毒载体感染滴度所采用的方法为免疫荧光法,该方法操作比较复杂,客观性差。因此,有必要建立一种更加科学的检测方法。流式细胞术是一种常用的细胞分析技术,本研究针对药品检验中遇到的实际问题,通过建立适合于模拟仙台病毒载体感染细胞的数学模型,建立了可靠、准确、简便的应用流式细胞术检测仙台病毒载体感染滴度的质控方法。

材料与方法

1 样品

传播缺陷型仙台病毒载体(Sev/dF),该病毒载体 *F* 基因缺失,其包膜上的 F 蛋白由经过改造的恒河猴肾细胞(LLC-MK2)提供。使用 LLC-MK2 细胞检测 Sev/dF 的感染滴度,Sev/dF 感染 LLC-MK2 后,形成的子一代病毒缺失 F 蛋白,失去感染其他细胞的能力。

2 试剂

胎牛血清(FBS,批号:2068801CP)、MEM 培养基(批号:2120696)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液(Trypsin-EDTA,批号:2120449)和磷酸盐缓冲液(PBS,批号:2120824)均购自 Gibco 公司;兔抗仙台病毒多抗(MBL 公司,批号:13062019);异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔二抗(Abcam 公司,批号:GR267728-28);Triton X-100(Fluka 公司,批号:1397288);牛血清白蛋白(BSA,北京友康公司,批号:R07150801)。

3 仪器

FACS Canto 流式细胞仪(美国 BD 公司);数据分析软件为 Curve Expert 1.3。

4 方法

4.1 免疫荧光法[9]

取对数生长期的 LLC-MK2 细胞,用含 10% FBS 的 MEM 完全培养基制备细胞悬液,按 2 mL 含有 2.5×10^5 个细胞的浓度接种于六孔板,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 72 h,感染病毒前弃去培养上清并以 PBS 洗 1 次后备用;将 SeV/dF 在 37 ℃水浴中快速融化,低温下以 1% BSA-PBS 进行适当稀释,以 100 μL·孔$^{-1}$加入 1 块六孔板中并摇匀,37 ℃、5% CO_2 条件下培养 1 h,其间每隔 15 min 摇匀 1 次;孵育结束后,吸弃培养液并以 PBS 洗 1 次,加入 2 mL 的 MEM,37 ℃、5% 的 CO_2 培养箱培养 72 h;培养结束后,吸去 MEM,加入 PBS 洗 1 次,以预冷的甲醇固定细胞,在六孔板底划线以便镜下计数;加入 0.5 mL 兔抗仙台病毒多抗并在 37 ℃孵育 1 h,用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗液洗 3 次后,加入 0.5 mL FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗并在 37 ℃孵育 1 h,洗板 3 次后每孔加入 1 mL PBS;将六孔板置于荧光显微镜下计数每孔中的荧光阳性细胞,将 6 个孔中的阳性细胞数取平均值,结合稀释倍数计算感染滴度。

4.2 流式细胞法

4.2.1 数学模型的建立[9] 本数学模型的建立是基于泊松分布,泊松分布主要用于描述单位时间(空间)中稀有事件的发生数,所谓随机变量 x 服从泊松分布,是指 x 取值范围为 0,1,…;其相应取值概率为:

$$P=\mu^x\times e^{-\mu}/x! \qquad \text{公式(1)}$$

泊松分布适合于模拟病毒感染单细胞层面,由于病毒的体积相对于细胞极小,一定量的病毒感染单细胞层面时,可看作一定区域内某种微生物的计数分布。而且该仙台病毒为传播缺陷型,子一代病毒不会感染其他细胞,在某一感染复数(multiplicity of infection,MOI,病毒与细胞总的数量比,相当于 1 个细胞的区域范围内平均有 MOI 个病毒)情况下,1 个细胞被 k 个病毒感染的概率为:

$$P(X=k)=MOI^k\times e^{-MOI}/k! \qquad \text{公式(2)}$$

每个细胞被感染的概率 P(cell infected)即细胞至少被 1 个病毒感染的概率为:

$$P(\text{cell infected})=P(k\geqslant1)=1-P(k=0)=1-e^{-MOI} \qquad \text{公式(3)}$$

在此 MOI 下,细胞被感染的阳性百分数为:

$$\text{Positive}/\%=100\times(1-e^{-MOI}) \qquad \text{公式(4)}$$

假设样品中实际的病毒感染滴度为 m，实验前由于 m 未知，假定其滴度为 n，此处引入一个参数 B，且 $m = B \times n$。根据假定值 n 将样品做成不同稀释度，结合细胞计数得到不同的 MOI_n，由于 $m = B \times n$，则 $MOI = B \times MOI_n$（MOI 为对应于 m 的实际值，MOI_n 为根据假定值 n 得到的表观值），将其代入上式，同时被感染的细胞中可能有一定比例由于状态不好，不能表达大量病毒蛋白，染色时有一定比例为假阴性，需引入一个参数 A 来反映染色效率，即：

$$Positive/\% = 100 \times A \times (1 - e^{-B \times MOI_n}) \quad \text{公式(5)}$$

此即为所建立的数学模型，通过曲线拟合得到 B 值，即可通过 $m = B \times n$ 计算样品的感染滴度。

4.2.2 实验方法的建立[9-10] 取对数生长期的 LLC-MK2 细胞，用含 10% FBS 的 MEM 完全培养基制备细胞悬液，按 2 mL 含有 2.5×10^5 个细胞的浓度接种于六孔板，37 ℃、5% CO_2 条件下培养 72 h，感染病毒前弃去培养上清并以 PBS 洗 1 遍后备用；病毒上样前首先选择 2 个孔，将细胞消化后记数，取平均值得到每孔细胞总数。结合细胞总数，假定值 n，病毒上样体积为 100 μL，将样品用 1% BSA-PBS 做不同稀释度，得到不同的 MOI_n；病毒上样，每个 MOI_n 对应 1 个细胞孔，上样体积为 100 μL，同时设一阴性孔（1% BSA-PBS，100 μL），37 ℃、5% CO_2 条件下培养 1 h，其间每隔 15 min 摇匀 1 次；孵育结束后，吸弃培养液并用 PBS 洗 1 次，加入 2 mL 的 MEM，37 ℃、5% 的 CO_2 培养箱培养 72 h；培养结束后，以 0.25% Trypsin 消化细胞后转入流式检测管，离心后先以 750 μL PBS 重悬细胞，置振荡器上缓慢加入 250 μL 16% 多聚甲醛，4 ℃孵育 30 min，离心后弃上清；以 1 mL 0.1% Triton X-100-PBS 重悬细胞，37 ℃孵育 15 min，离心后弃上清；以 1 mL 5% FBS-PBS 重悬细胞，室温孵育 30 min，离心后弃上清；每管加入 0.5 mL 兔抗仙台病毒多抗，4 ℃孵育 60 min，离心后以 1% BSA-PBS 洗 1 次；每管加入 0.5 mL FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗，4 ℃孵育 60 min，离心后以 1% BSA-PBS 洗 1 次；每管加入 0.5 mL PBS，混匀后流式上机检测。以阴性管设置阴性区和阳性区的分界线，然后记录各管的阳性细胞百分数（即各 MOI_n 对应的阳性细胞百分数）；以 MOI_n 为横坐标，阳性百分数为纵坐标，根据所建立的数学模型，使用 Curve Expert 1.3 做曲线拟合，得到 B 值，则实际感染滴度为 $m = B \times n$。

结　果

1　免疫荧光法检测结果

该实验共进行 3 次，以其中 1 次为例详细阐述。将样品稀释 2×10^6 倍，每孔上样 100 μL，荧光显微镜下每个阳性细胞代表 1 个有感染能力的病毒（见图 1）。经过计数，6 个孔中的阳性细胞数分别为 133，76，101，99，114，94，平均值为 103，则供试品感染滴度为 $103 \times 10 \times 2 \times 10^6$ IU·mL^{-1}，即 2.06×10^9 IU·mL^{-1}。

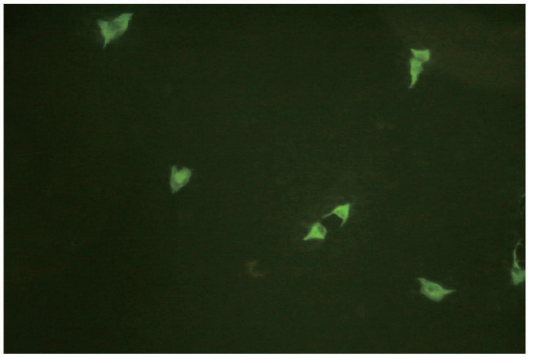
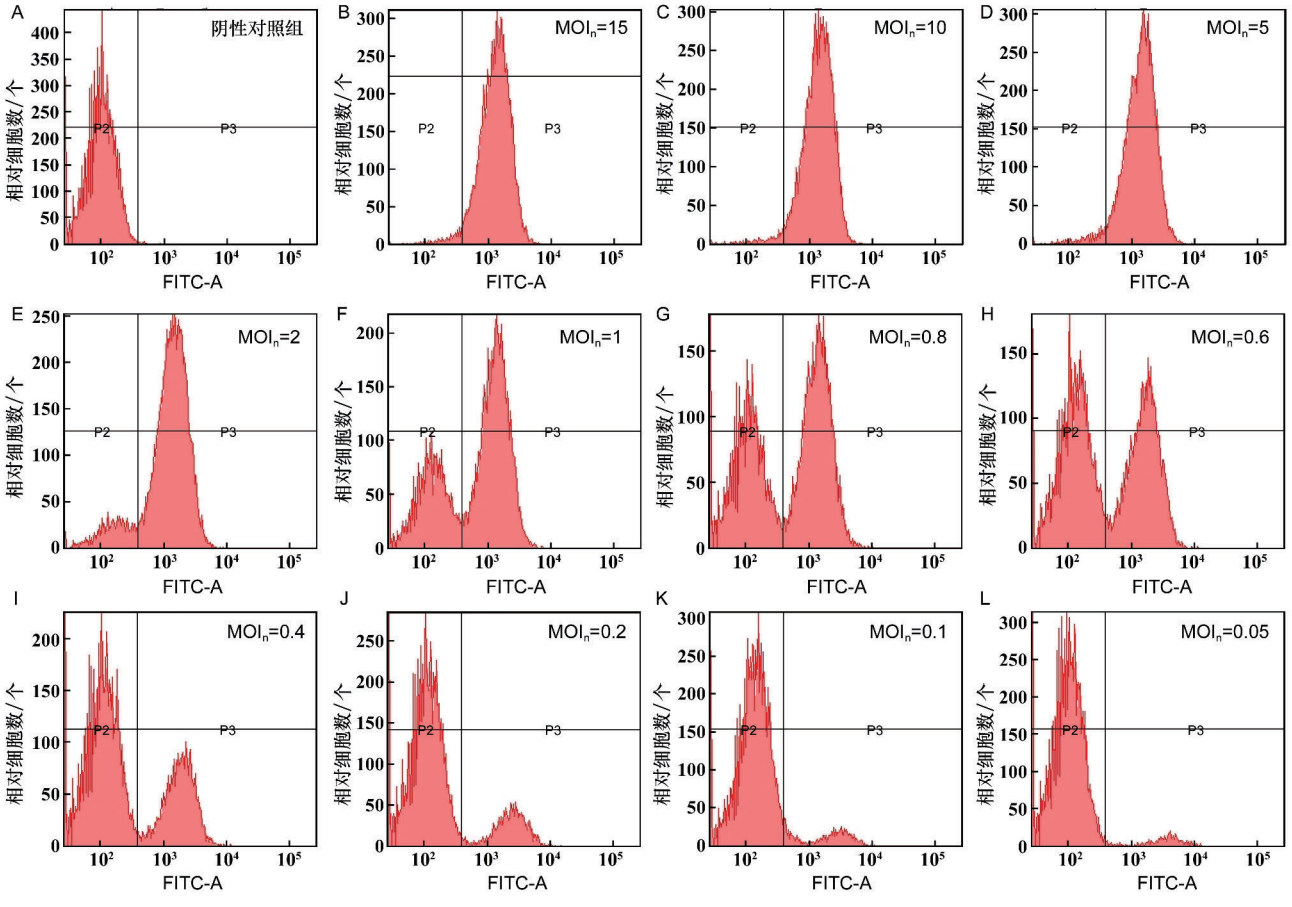


图 1　荧光显微镜下被病毒感染的阳性细胞

针对同一样品连续测定 3 次，结果分别为 2.06×10^9 IU·mL^{-1}，2.40×10^9 IU·mL^{-1}，1.86×10^9 IU·mL^{-1}［$(2.11 \pm 0.27) \times 10^9$ IU·mL^{-1}，变异系数（CV）= 12.8%）］。

2　新建立的流式细胞法检测结果

该实验共进行 3 次，以其中 1 次为例详细阐述。细胞记数为 1.0×10^6 细胞·孔$^{-1}$，假定感染滴度为 2.0×10^9 IU·mL^{-1}（假定值 n，该值理论上可根据预估值任意设定，为了稀释方便，可取细胞的整数倍），根据上样体积 100 μL，做不同稀释度，使 MOI_n 依次为 15，10，5，2，1，0.8，0.6，0.4，0.2，0.1，0.05，同时设 1 阴性孔，共 12 个孔。流式上机检测时，在通用模板上做 2 个图，第 1 个为前向散射光（FSC）与侧向散射光（SSC）的散点图，调整 FSC，SSC 电压，使细胞群位于合适位置，做门 P_1，圈住目标细胞群。第 2 张图为 FITC 荧光值的直方图，使第 2 张图显示 P_1 门内细胞群，同时设左侧阴性门 P_2 和右侧阳性门 P_3。首先上样阴性对照检测，调整电压，使阴性细胞峰位于阴性门 P_2 内（接近 100%），然后检测各 MOI_n 对应管，得到流式荧光直方图（见图 2），记录阳性门 P_3 内阳性百分数（见表 1）。



A：阴性对照；B ~ L：各 MOI_n 对应的流式测定图

图 2　各 MOI_n 对应的流式测定图

表 1　各 MOI_n 下对应的细胞感染阳性率

MOI_n	15	10	5	2	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	0.05
阳性率/%	97.2	97.3	96.4	88.1	66.6	56.4	47.6	32	16.9	9.4	4.6

使用所建立的数学模型，用 Curve Expert 1.3 做曲线拟合（见图 3）。

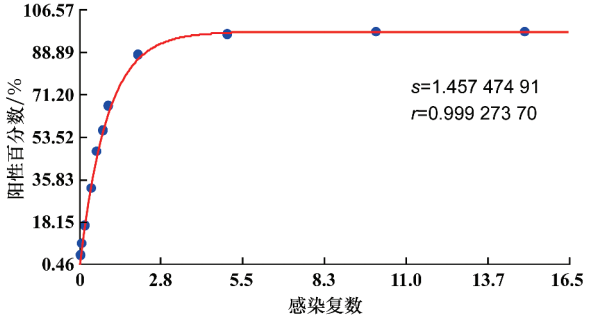


图 3　根据所建数学模型对测定结果进行曲线拟合

通过曲线可以反映感染细胞的特点，病毒较少时，与细胞感染率呈近似线性关系，随着病毒增多，细胞感染率逐渐达到接近 100% 的平台，说明所选择的泊松分布适合病毒感染细胞的特点。本次实验中，所得拟合曲线 $R^2 > 0.99$，拟合参数 A = 0.98，B = 1.09。根据 $m = B \times n$，感染滴度为 2.18×10^9 IU·mL^{-1}。

3 次的测定结果分别为 2.18×10^9 IU·mL^{-1}，2.10×10^9 IU·mL^{-1}，2.10×10^9 IU·mL^{-1}（$2.13 \pm 0.05 \times 10^9$ IU·mL^{-1}，CV = 2.34%），与免疫荧光法的测定结果无统计学差异。

讨　论

本研究建立了一种适合传播缺陷型仙台病毒载体感染滴度测定的新方法，与传统的免疫荧光法相比，具有操作简便、结果客观和精密度高等优点，从以下几点进行分析：① 免疫荧光法将样品稀释 2×10^6

倍,采用单点上样,无法避免高倍稀释带来的累计误差,而流式测定采用多个稀释度,采用曲线拟合,弥补了这种不足[12]。② 免疫荧光法肉眼观测记数,客观性差,不同操作者之间变异较大,而流式测定借助仪器分析,结果更客观。且免疫荧光法需要在荧光显微镜下对六孔板全视野进行肉眼观测计数,操作繁琐,而流式测定借助仪器,操作简便。③ 如果被感染的细胞有一定比例由于状态不好,无法支持病毒大量复制,或由于染色原因造成一定比例假阴性,采用免疫荧光法无法避免这种误差,会造成结果偏离。而流式测定的数学模型中引入参数 A,可将此误差校正,而结果判定由 B 决定,避免了对结果的影响。④ 病毒感染细胞后到染色之前需培养 3 d,在此过程中一小部分细胞(包括感染细胞和非感染细胞)会分裂,免疫荧光法镜下观察常见 2 个荧光细胞连在一起的现象,很难区别是 1 个阳性细胞分裂为 2 个还是 2 个单独的阳性细胞(实际操作中若 2 个细胞间隔大于 1 个细胞直径则判定为 2 个,否则判定为 1 个),给结果判定带来误差,而流式测定是记数阳性比(细胞分裂前后,阳性比不会改变),避免了细胞分裂带来的误差[13]。

综上,本项研究以传播缺陷型仙台病毒为研究对象,通过建立以泊松分布为基础的数学模型,研究建立了流式细胞术检测感染滴度的质控方法,结果表明该方法操作简便、客观性强、精密度高。该研究不仅适用于传播缺陷型病毒载体,对于其他类型病毒载体类基因治疗药物感染滴度的测定也有参考意义。如针对复制缺陷型病毒载体(可采用辅助细胞作为检测用细胞)或复制型病毒(如溶瘤病毒),如可进行方法优化阻断子一代病毒感染其他细胞,则该数学模型仍可适用。由于病毒载体类基因治疗研究方案不断出现,各种质控方法在不断建立和完善,该方法的建立对于此类产品的质量控制具有积极意义[14](**致谢**:感谢李永红研究员、高凯研究员和饶春明研究员对该研究提供的指导和帮助)。

[参 考 文 献]

[1] ANGUELA XM, HIGH KA. Entering the modern era of gene therapy[J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 273 - 288.

[2] BULCHA JT, WANG Y, MA H, *et al*. Viral vector platforms within the gene therapy landscape[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 53.

[3] WANG D, TAI PWL, GAO G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 358 - 378.

[4] BITZER M, ARMEANU S, LAUER UM, *et al*. Sendai virus vectors as an emerging negative-strand RNA viral vector system [J]. *J Gene Med*, 2003, 5(7): 543 - 553.

[5] NAGAI Y. Virus activation by host proteinases. A pivotal role in the spread of infection, tissue tropism and pathogenicity[J]. *Microbiol Immunol*, 1995, 39(1): 1 - 9.

[6] MURAKAMI Y, IKEDA Y, YONEMITSU Y, *et al*. Newly-developed Sendai virus vector for retinal gene transfer: reduction of innate immune response via deletion of all envelope-related genes [J]. *J Gene Med*, 2008, 10(2): 165 - 176.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020 年版. 三部. 北京:中国医药科技出版社,2020:55.

[8] ITO H. Plaque assay of Sendai virus in monolayers of a clonal line of porcine kidney cells[J]. *J Clin Microbiol*, 1976, 3(2): 91 - 95.

[9] GUERET V, NEGRETE-VIRGEN JA, LYDDIATT A, *et al*. Rapid titration of adenoviral infectivity by flow cytometry in batch culture of infected HEK293 cells[J]. *Cytotechnology*, 2002, 38 (1 - 3): 87 - 97.

[10] WEAVER LS, KADAN MJ. Evaluation of adenoviral vectors by flow cytometry[J]. *Methods*, 2000, 21(3): 297 - 312.

[11] HITT DC, BOOTH JL, DANDAPANI V, *et al*. A flow cytometric protocol for titering recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescent protein[J]. *Mol Biotechnol*, 2000, 14(3): 197 - 203.

[12] 王银环,钱凌,董芳华,等. 流式细胞术和平板计数法用于地衣芽孢杆菌活菌制剂检测的比较研究[J]. 中国现代应用药学,2018,35(3):352 - 356.

[13] 高恩惠,陈探,马璟,等. 药效动力学研究中流式细胞术方法学验证概述[J]. 中国医药工业杂志,2020,51(7):815 - 822.

[14] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 北京: 科学出版社, 2018.

编辑:蒋欣欣/接受日期:2021 - 09 - 22