

文章编号:1674-2869(2010)01-0057-04

流式细胞术快速检测杆状病毒滴度

徐 鹏,张佑红^{*},杨 益,彭继明,陈 龙,靖志强,危 威,马 静,秦 琴

(武汉工程大学化工与制药学院,湖北 武汉 430074)

摘 要:为了快速而准确的测定杆状病毒的滴度,采用流式细胞术对经 SYBR Green I 染色后的杆状病毒直接计数。考察固定、破膜和染色等因素对检测结果的影响,并验证改进后的方法的重复性和线性性。杆状病毒最佳染色条件:质量分数为 0.1% 的多聚甲醛固定病毒 30 min 后,加入一定量的 SYBR Green I 在 80 ℃ 下孵育 10 min。测量结果 CV 值为 2.4%(n=8), R^2 为 0.999 8。整个测量过程由原来终点稀释法的 7~10 d 缩短到 1 h。

关键词:流式细胞术;杆状病毒;SYBR Green I

中图分类号:Q331

文献标识码:A

doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2010.01.018

0 引 言

杆状病毒表达载体系统(Baculovirus expression vector system, BEVS)由于其表达的高效性、安全性等诸多优点,在重组蛋白生产、疫苗的研制以及生物杀虫剂等方面具有很高的应用前景^[1]。为了提高重组蛋白或病毒的产量,必须准确测定杆状病毒与细胞的浓度比,即感染复数(multiplicity of infection, MOI)^[2-4]。目前病毒滴度的测定方法主要是蚀斑法和终点稀释法(EPDA)^[4-6],两种方法都是利用病毒去感染细胞而间接得到病毒的滴度,测量过程繁琐,耗时长,且不同实验者之间测得的结果相差较大。

随着近年来流式细胞术(FCM)的不断发展,其检测范围不再局限于细胞,它已广泛应用于生物医学的各个领域。Marie 和 Brussaard^[6-7]等采用流式细胞仪通过特异性核酸荧光染料 SYBR Green I 染色成功地检测并计数海洋病毒。在此基础上,Shen^[8]首次利用流式细胞术计数杆状病毒,但染色效果不好。本实验针对染色过程中的主要影响因素进行优化,验证了改进后方法的重复性和线性性,并对流式细胞术与终点稀释法的计数结果进行比较。

1 实验部分

1.1 病毒

野生型的首蓓银纹夜蛾核型多角体病毒

(wide type AcNPV)由武汉大学友好提供。

1.2 试剂及仪器

SYBR Green I(10 000×)和黄绿荧光微球(1μm)均购于 Molecular Probes 公司;多聚甲醛购于生工生物工程有限公司;Triton X-100 购于 Amresco 公司;FACSCalibur 流式细胞仪,BD 公司生产。

1.3 样品制备

病毒样品制备的主要步骤可分为固定、破膜和染色。待测病毒经磷酸盐缓冲液(PBS, pH=8.0)稀释后,加入一定量的多聚甲醛 4 ℃ 下固定 30 min,再放入-80 ℃超低温冰箱 15 min,然后置于室温水浴中 5 min,加入一定量的 Triton X-100 室温放置 5 min,最后加入 SYBR Green I 进行染色,具体的影响因素及水平如表 1 所示。在上机检测之前,加入已知浓度的黄绿荧光微球作为内参。

表 1 病毒染色过程的影响因素及水平

Table 1 Factors and levels of the baculovirus dyeing procedure

因素	水平
多聚甲醛质量分数/%	0.00, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40
冻融处理	不冻融, 一次, 两次
Triton X-100 质量分数/%	0.00, 0.05, 0.10, 0.20
孵育温度/℃	25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90
孵育时间/min	0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60

1.4 流式细胞仪分析

采用 BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪检测病毒样品。前向散射光(FSC-H)、侧向散射光

收稿日期:2009-10-22

基金项目:国家自然科学基金(20876120)资助项目

作者简介:徐鹏(1985-),男,四川内江人,硕士研究生,研究方向:细胞生物学。

指导老师:张佑红,男,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:细胞生物学、分子生物学,*通信联系人

(SSC-H) 和绿色荧光 (FL1-H) 均以对数模式获取, 以 FL1-H 设定阈值, 减少背景干扰. CellQuest 软件分析数据, 在 SSC-II 和 FL1-II 的双参数散点图上确定病毒和微球的位置 (图 1).

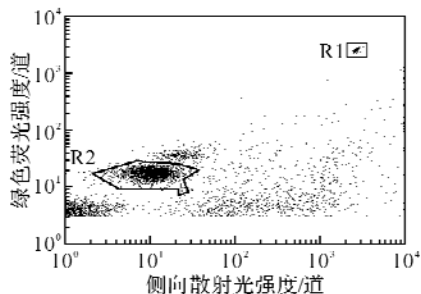


图 1 SSC-H vs. FL1-H 双参数散点图

Fig. 1 Dot plots of side scatter vs. green fluorescence

“门”R1 内为加入的微球, “门”R2 内为待测的病毒. 根据 $R1/R2$ 可以推算出样品病毒的滴度 (1).

$$\frac{\text{样品中微球的数量}}{\text{样品中病毒的数量}} = \frac{R1}{R2} \quad (1)$$

将得到的样品病毒滴度乘以稀释倍数便是原病毒样本中的病毒滴度.

1.5 重复性和线性检测

线性性: PBS 缓冲液稀释杆状病毒 1000 倍, 取稀释后不同体积 (5~640 μL) 的病毒测定其滴度, 做 3 个重复, 计算相关系数 R^2 . 重复性: 对同一个病毒样本计数 8 次, 计算变异系数 CV.

1.6 流式细胞术与终点稀释法的计数结果比较

为了比较改进后的流式测量方法与传统的病毒测定方法的准确性, 采用终点稀释法^[4]对同一病毒样本进行检测, 具体如下: a. 将处于对数生长期的 Sf9 细胞接种于 96 孔板中 (100 μL /孔), 27 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 24 h. b. 以新鲜培养基连续 10 倍稀释杆状病毒 (10^{-4} ~ 10^{-10}). c. 96 孔板上去清, 于每孔加入不同稀释度的病毒 100 μL , 每稀释度重复 12 孔, 对照孔加入 100 μL 的新鲜培养基代替病毒液, 27 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5~7 d. d. 按 Spearman-Kärber 法^[9] 计算病毒样本的 TCID_{50} 值. 重复测量 5 次, 计算变异系数 CV.

2 结果与讨论

2.1 固定的影响

图 2 显示了不同质量分数的多聚甲醛固定对杆状病毒计数的影响. 采用多聚甲醛固定能够维持病毒的原有形态, 提高病毒的计数, 但当其质量分数大于 0.1% 后病毒的计数随之减少. 这主要是由于甲醛与 DNA 的相互作用, 削

弱了染料 SYBR Green I 与 DNA 的结合. 病毒颗粒的荧光强度也会随着多聚甲醛质量分数的增加而降低.

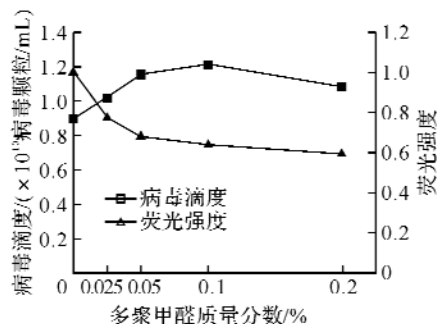


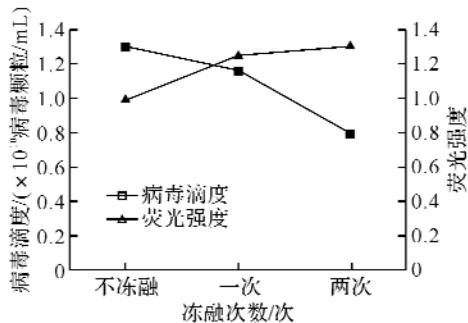
图 2 多聚甲醛固定的影响

Fig. 2 Effects of paraformaldehyde concentrations on baculovirus counts

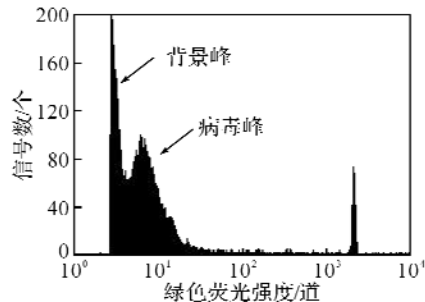
注: 规定未经固定处理的样本荧光强度为 1.

2.2 破膜处理

破膜的主要原理是利用骤冷骤热或破膜剂的溶脂作用增强病毒颗粒的通透性, 以便于染料的进入. 从图 3(a) 可知, 病毒样本经过冻融处理后, 荧光强度逐渐增强, 但病毒计数却随之而减少, 这可能是由于冻融导致一部分病毒的 DNA 与染料不能有效地结合. 图 3(b) 是 Triton X-100 终质量分数为 0.2% 的直方图, 与图 1 相比较可知: 经破膜剂处理后, 病毒的荧光信号分散, 背景噪音增强, 导致两峰交叠, 不利于病毒的准确计数.



(a) 冻融处理的影响



(b) 破膜剂处理的影响

图 3 破膜处理对病毒计数的影响

Fig. 3 Effects of permeabilization on baculovirus counts

注: 规定未经冻融处理的样本荧光强度为 1.

2.3 染色温度和时间的影响

孵育过程对病毒计数的影响显著(图 4). 孵育温度的提高,一方面可以使病毒外壳失活,增强其通透性,另一方可以增强染料的活性,增加计数结果(图 4a),但温度过高对染色结果也不利. 孵育时间不足,将导致染色不充分,病毒峰与背景峰交叠,不能准确计数,当孵育时间大于 10 min 后,计数结果保持稳定(图 4b).

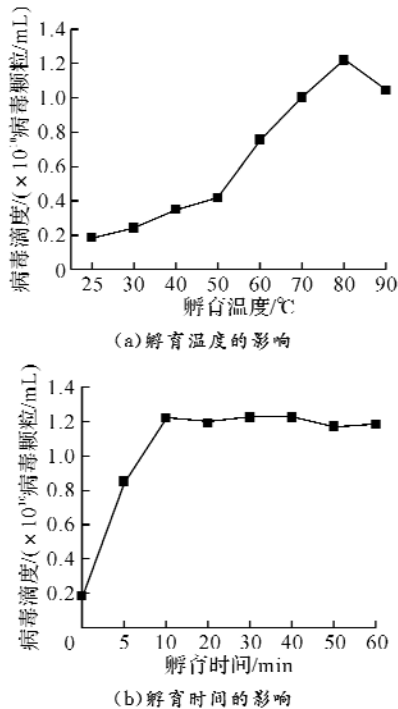


图 4 孵育温度和时间对病毒计数的影响
Fig. 4 Effects of incubation process on baculovirus counts

2.4 重复性和线性性检测

对于重复性,8 次实验结果的平均值为 1.22×10^{10} 病毒颗粒/mL,最大值为 1.43×10^{10} 病毒颗粒/mL,最小值为 1.01×10^{10} 病毒颗粒/mL,CV 值为 2.4%,这表明该方法的重复性较好. 对于线性性,从图 5 可知,病毒滴度在 $10^6 \sim 10^7$ 病毒颗粒/mL 范围内,线性性较好($R^2=0.9998$).

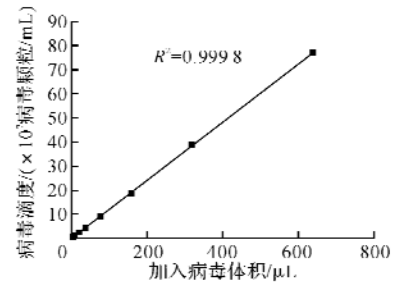


图 5 不同加入体积的病毒计数
Fig. 5 Virus counts of different volume of viral solution

注:固定前所有样本均加入 PBS 缓冲液稀释至 960 μ L 终体积.

2.5 流式细胞术与终点稀释法的计数结果比较

分别采取流式细胞术和终点稀释法测定同一批病毒的滴度,测量结果如表 2 所示. 从表 2 可知,流式细胞术的重复性($CV=2.4\%$)明显优于终点稀释法($CV=25.7\%$). 表中流式细胞术的测量结果是终点稀释法的 13.7 倍,这是因为流式细胞术是直接计数病毒,而终点稀释法测量的是感染单位. 一个感染单位对应多个病毒颗粒,所以流式测量结果大于终点稀释法.

表 2 终点稀释法与流式细胞术测量结果的比较
Table 2 Comparison of virus quantitation results obtained by FCM analysis and by EPDA

方法	测量次数	测量平均值	CV/%
终点稀释法	5	8.9×10^8 TCID ₅₀ /mL	25.7
流式细胞术	8	1.22×10^{10} 病毒颗粒/mL	2.40

3 结 语

病毒最佳染色条件:4 $^{\circ}$ C 下,0.1%的多聚甲醛固定病毒样本 30 min,然后加入 SYBR (Green I 在 80 $^{\circ}$ C 下避光染色 10 min,经改进后的流式细胞术测定杆状病毒的方法能够快速而准确的测定杆状病毒的滴度.

参考文献:

[1] Thomas A K, Condreay J P, Donald I. J. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(5): 567-575.

[2] Radford K M, Cavegn C, Bertrand M, et al. The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells secreted and non-secreted products [J]. Cytotechnology, 1997, 24: 73-81.

[3] Zhang Y H, Enden G, Merchuk J C. Insect cells-Baculovirus system; Factors affecting growth and low MOI infection[J]. Biochem Eng J, 2005, 27 (1): 8-16.

[4] O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual[M]. New York: Oxford University Press, 1994: 132-134.

[5] Hink W F, Vail P V. A plaque assay for titration of Alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in cabbage looper (TN-368) cell line [J]. J Invertebr Pathol, 1973, 22: 168-174.

[6] Marie D, Brussaard C P D, Thyraug R, et al. Enumeration of marine viruses in culture and

- natural samples by flow cytometry [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(1): 45-52.
- [7] Brussaard C P D. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(3): 1506-1513.
- [8] Shen C F, Meghrouh J, Kamen A. Quantitation of baculovirus particles by flow cytometry [J]. J Virol Methods, 2002, 105(2): 321-330.
- [9] Finey D J. Statistical Method in Biological Assay [M]. 3rd ed. London: Charles Griffin & Co., 1978: 394-401.
- [8] Shen C F, Meghrouh J, Kamen A. Quantitation of

Rapid titration of baculovirus by flow cytometry

XU Peng, YANG Yi, PENG Ji-ming, CHEN Long, JING Zhi-qiang,
WEI Wei, MA Jing, QIN Qin, ZHANG You-hong

(School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: To develop a rapid and accurate method for baculovirus titration, flow cytometry (FCM) was adopted to quantitate baculovirus directly after staining with SYBR Green I. The effects of different treatment steps (fixation, permeabilization, staining, etc.) were examined. The linearity and the reproducibility of the developed method were evaluated. The optimum dyeing conditions were shown: viral samples fixed with 0.1% paraformaldehyde for 30 min at 4 °C, stained with SYBR Green I (1×10^{-4} commercial concentration) for 10 min at 80 °C. The CV value of results is 2.4% ($n=8$), R^2 value of different dilutions is 0.999 8. The entire procedure is shortened to 1 h compared with the 7-10 d of end-point dilution method.

Key words: flow cytometry; baculovirus; SYBR Green I

本文编辑:张 瑞



(上接第 41 页)

Separation of spermine from methamidophos solution by liquid-liquid extraction

WANG Li¹, ZHANG Liang-jun¹, XUE Guang-cai², XIANG Wei-de²

(1. Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China; 2. Hubei Shalongda Ca Ltd, Jingzhou 434001, China)

Abstract: In this paper, the primary separation of the spermine in methamidophos solution was taken by Liquid-Liquid extraction, the partition coefficients and the separation coefficients of methamidophos solution in different extraction solvents were determined in the same conditions, the influencing factors of extraction effect such as phase ratio, temperature and extraction stages on Liquid-Liquid separation were studied, the best extraction solvent and the suitable process conditions were confirmed: the best extraction solvent was component solvent named A ($V_{a1} : V_{a2} = 1 : 1$), phase ratio was 1 : 1, the temperature was 55 °C, after extracting ten times, the total extraction rate of methamidophos solution was greater than or equal 85%, and the amount of the spermine in raffinate phase was reduced to 1.710%.

Key words: methamidophos solution; liquid-liquid extraction; separation

本文编辑:张 瑞