



服务热线
400 600 1063



艾森生物（杭州）有限公司

地址：浙江省杭州市西湖区西园五路2号3幢

电话：0571-2890 1211

传真：0571-2890 7820

邮箱：xcelligence@aceabio.com.cn

网址：www.aceabio.com.cn



ACEA Biosciences Inc.

Address: 6779 Mesa Ridge Rd.#100, San Diego, CA 92121

Telephone: (858) 724-0928

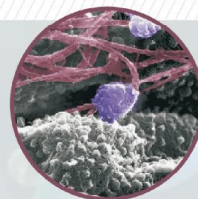
Toll-free: (866) 308-2232

Facsimile: (858) 724-0927

Website: www.aceabio.com

RTCA技术应用专辑(三)

病毒 细菌毒素 中和抗体及疫苗的检测与评估
Application Notes No.3



艾森生物
ACEA BIO



目 录

RTCA实时动态检测微生物感染	01
RTCA实时动态检测病毒Cytopathic Effect效应	11
RTCA实时定量检测病毒侵染效力及评估中和抗体效价	16
RTCA实时动态检测黄病毒CPE及定量评估野生样本中和抗体	23
RTCA实时动态检测人工合成、感染动物排泄物及外周血提取 物中艰难梭状芽胞杆菌毒素	30

前言

微生物和病毒通过感染宿主细胞改变宿主细胞的生理功能,进而导致了疾病的发生。对病原体感染细胞的分析除了作为一个重要的感染诊断结果,还可以为我们提供关于微生物-宿主和病毒-宿主之间相互作用功能性评估的重要信息。早在20世纪50年代,就有研究者应用红细胞(RBCs)进行血凝试验来检测血凝素抗原耐受病毒[1]。近来,这种检测方法也被应用于细菌的检测[2]。这种检验方法的原理是:多数病毒和细菌都具有外壳或表面蛋白,这些外壳或表面蛋白可凝集人或动物红细胞并结合到N-乙酰神经氨酸上。这种凝集分子由于附着了多个红细胞从而形成了一种晶格结构,通过对这些晶格结构检测可实现对病毒和细菌的检测。

长期以来,微生物和病毒感染是通过哺乳动物细胞培养来实现检测的。病毒感染宿主细胞是一个复杂过程,病毒对组织培养细胞感染后产生的细胞变性,包括改变形状、脱离底物、裂解、膜融合、改变膜的通透性、形成包涵体和细胞凋亡等,我们将其统称为细胞病变效应(CPE)。利用此种病变效应可进行病毒诊断和定量。例如,人类鼻病毒感染HoLe细胞导致细胞形状的变化,在相差显微镜下可观察到细胞变圆并且折光性增强[3]。一些被感染的细胞从细胞培养瓶中脱落下来并漂浮在培养基中,所以我们可通过比色法来检测细胞的存活率。此外,空斑形成试验也是一种对病毒感染力精确定量的有效方法,该方法是通过病毒诱导的细胞溶解作用在培养平板上所形成斑块的观察和染色后的计数来实现的。

除了病毒检测,细胞分析也被用于检测细菌-宿主细胞间相互作用和细菌毒素的作用。细菌首先在宿主细胞中大量繁殖,感染宿主细胞。细菌病原体可表达多种分子或结构以促进其黏附到宿主细胞上[4]。这种黏附依赖于宿主细胞表面受体或是那些在细菌-宿主间起到桥梁作用的可溶性蛋白。此外,黏附着的细菌还常常会引起细胞应答调控,对这方面的研究也

衍生出一个新的领域:细胞微生物学[5]。因此,通过细胞微生物学分析细菌对宿主细胞粘附和侵袭在研究细菌发病机制中是非常重要的[6-8]。另外,一种常见的人类性传播感染(STI)的沙眼衣原体细菌被发现只生活在宿主细胞内。衣原体对宿主细胞的感染形成包涵体,可以通过显微镜观察进行检测,因此细胞培养成为诊断生殖道衣原体感染的金标准分析方法[9,10]。

以细胞为基础的检测,已成为研究细菌致病机制实验室的常规检测方法。致病性细菌感染后会产生细菌毒素,这些毒素通过细胞表面受体介导的内吞途径来实现对细胞的侵袭,仅需极少量即具有非常强的侵蚀能力。这些毒素中如艰难梭菌毒素、肉毒杆菌毒素和白喉毒素等对宿主细胞的感染都是致命的。总而言之,细菌-宿主间的相互作用是一个多步骤过程,最终感染宿主细胞而引起宿主死亡。感染的机制因细菌菌株和被感染宿主细胞的不同而异。基于细胞分析的细菌感染实验,可用不同的实验设计针对感染过程中的各个步骤进行检测,因而具有很大的优势。对于临床诊断性来说,要求检测方法具有极高的灵敏性和特异性。而Vero细胞表面具有大量的毒素特异性受体,毒素与细胞表面的特异受体间具有高度的结合亲和力,从而使这些细胞对细菌毒素变得极为敏感。因此,基于细胞的分析适于用作细菌毒素的敏感性和功能性检测。

迄今为止,虽然已经开发了多种基于细胞分析的微生物感染诊断方法,但却几乎没有一个平台的技术是专门用于此目的的,而且,大多数分析方法都是以光学技术为基础的检测方法,这些方法需要使用染料(如荧光或比色染料)进行不同的染色过程。而且很多检测结果是定性的而无法定量。随着如PCR、酶免疫测定(EIAs)和测序等这些更简便和快捷的定量分子检测技术在临床诊断中的应用和发展,最大挑战是如何在感染性疾病的诊断中,能够优化传统的细胞分析技术,提高诊断的敏感性和准确性。因此,我们迫切需要一种定量的、多功能的、快速的、且易于使用

的细胞分析系统。在本文中，我们将介绍一种新型的实时无标记动态细胞分析技术（RTCA 技术）及其在微生物和病毒感染中的应用，包括细菌毒素检测、细菌与宿主细胞间相互作用检测、病毒介导的 CPE 定量分析、中和抗体检测、寄生虫感染活动的评估和免疫系统功能检测。

实时无标记动态细胞分析技术(RTCA)简介

基于实时无标记动态细胞分析技术，ACEA Biosciences 开发了 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪，该仪器共由三部分组成：分析仪、检测台和 E-Plate 检测板（图 1）。E-Plate 检测板底部经特殊工艺整合了微电极阵列，用以构建实时、动态、定量跟踪细胞形态变化和增殖过程的细胞阻抗检测传感系统（图 1）。当贴壁生长在微电极表面的细胞引起电极阻抗的改变时，我们可通过对电极阻抗值的实时检测获得与细胞生理功能相关的生物学信息。RTCA 技术具有无需标记、实时动态检测、实验步骤简单、实验结果客观、重复性好及应用领域广泛等特点。



图 1. RTCA 实时无标记细胞功能分析仪。(A) 分析仪 (B) 检测台；(C) E-Plate 检测板及微电极阻抗传感器阵列。

RTCA 技术在细菌性感染的宿主细胞应答分析中的应用

RTCA 技术可以检测宿主细胞由于细菌毒素的释放或细胞间相互接触而导致的细菌感染所引起的细胞形态、粘附力和细胞数量的细微变化。用 RTCA 技术对毒素效果和细菌-宿主细胞间相互作用进行检测时，我们先将细胞暴露于艰难梭菌毒素或肉毒杆菌毒素，或者用脑膜炎奈瑟氏菌感染细胞，并通过 RTCA 技术对细胞应答过程进行实时动态检测。现就 RTCA 技术在艰难梭菌毒素检测中的应用为例进行介绍。

艰难梭状芽孢杆菌被认为是住院治疗和 / 或接受抗生素治疗的患者发生感染性腹泻的首要原因 [11,12]。最近出现的高毒力菌株 BI-NAP1-027 与发病率和死亡率的增加有关 [13,14]。我们通过实验室检测艰难梭菌特异性毒素 B 来进行疾病诊断，以便及时治疗和进行隔离程序以防止院内感染的传播。艰难梭状芽孢杆菌广为接受的诊断标准是 cytotoxigenic culture 方法，这种方法通过从粪便中培养艰难梭菌菌株并对隔离培养的细胞进行细胞毒性的测定 [15]。虽然 Cytotoxigenic 分析法是艰难梭菌毒素检测的“金标准”，但因其耗费人力、实验主观并且耗时间的原因而没有在临床上得到广泛的应用 [11,15]。最近，一些酶免疫测定（EIAs）和以 PCR 为基础的毒素基因检测方法已被用于临床实验室 [16,17]。这些方法虽然取得了一定进展，但因检测灵敏度低（酶免疫测定）以及毒素基因的 PCR 检测与疾病发生的功能相关性等问题仍然存在着争议。最近的报道表明应用 RTCA 技术对艰难梭状芽孢杆菌毒素进行定量检测取得了很大的进展 [18,19]。He 等描述了一个应用 RTCA 实时无标记动态细胞功能分析仪所建立的一种以细胞为基础的检测艰难梭菌毒素 A 和毒素 B 的超灵敏的免疫细胞毒素分析方法。该试验利用高表达 Fcγ 受体的 CHO 细胞系，添加特殊抗体 A1H3，毒素-抗体复合物被细胞表面上的 Fcγ 受体捕获触发胞吞过程，可提高检测灵敏度。艰难梭菌毒素的细胞毒性由 RTCA 实时无标记动态细胞功能分析仪进行实时监测，该方法对艰难梭状芽孢杆菌毒素检测的灵敏度可达 1pg/ml。虽然在上述报告中使用的是重组的艰难梭菌毒素，但其特性与天然的毒素类似 [20]。是否可在实际临床患者样本中保持检测灵敏度仍需要进一步的测试。最近，有报道表明，在艰难梭菌毒素检测技术的研究中，应用 RTCA 技术能够实现对艰难梭菌毒素的定量检测。该作者利用评估艰难梭菌毒素常用的细胞系 - 人成纤维细胞系 HS27 [18]，艰难梭菌毒素引起了 HS27 细胞的细胞毒作用，从而导致了细胞阻抗显示出剂量和时间依赖性的下降（图 2）。该方法对艰难梭菌毒素 B 的分析灵敏度可达 0.2 ng/ml [18]。

为了定量临床患者样品中所含的毒素浓度，首先检测已知浓度毒素的细胞响应，建立标准曲线，并绘制标准化细胞指数（NCI）值下降 50% 所需时间与毒素浓度的拟合曲线（图 2）。使用该拟合曲线，可通过患者样本引起细胞指数（NCI）减少 50% 所需要的时间来计算出该样本所含毒素含量。经临床验证，通过检测收集的 300 个艰难梭状芽孢杆菌感染（CDI）疑似病人粪便标本，其中样品 F14（图 3）被检出为艰难梭菌毒素感染阳性。该样品可导致 NCI 值的时间依赖性下降，而加入艰难梭菌毒素特异性抗体可中和毒素作用，阻止 CI 值下降。艰难梭菌毒素检测的阴性样本（样品 I4 中，图 3）显示，无论是否使用中和抗体处理，样本都不会导致 CI 值的下降。应用 RTCA 技术所检测到的 CI 值的下降与显微镜呈像所显示的细胞毒作用结果是完全一致的（图 3）。该检测结果同时与 EIAs 和 PCR 等传统分析方法做了对比，见图 3 中表格。

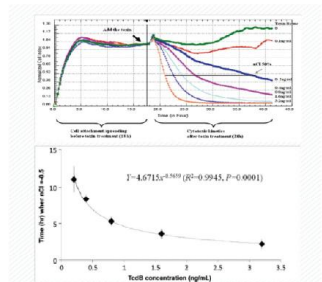


图 2. 应用 RTCA 实时无标记动态细胞功能分析仪定量检测艰难梭菌毒素。HS27 细胞以 5000 个 / 孔接种于 E-Plate 检测板中，应用 RTCA 技术对细胞的收缩和伸展进行实时检测，检测 18 小时后，用不同浓度的艰难梭菌毒素（TcdB）处理细胞并对细胞毒作用进行 24 小时的实时检测。纵轴表示 NCI 值下降 50% 所需的时间，将加入检测毒素时的时间设定为 t=0。横轴为艰难梭菌毒素（TcdB）的浓度。以 CI 值下降 50% 时所需的时间 (y 轴) 和 TcdB 作用浓度 (x 轴) 绘制曲线，该非线性回归数据得到了以下方程：y=4.6715x^{-0.7107} (R²=0.9945, p=0.0001)

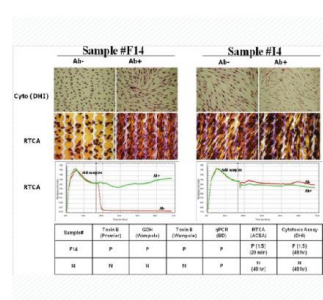


图 3. 应用 RTCA 技术对感染病人粪便样品（#F14）和未感染病人粪便样品（I4）进行艰难梭菌毒素作用的检测，并与传统检测方法（EIAs、qPCR、细胞毒分析 DHI 法）进行对比。在感染病人样品可观察到细胞毒作用，而未感染病人样品中未见细胞毒作用。加入特异性中和抗体可中和该毒性作用。应用 RTCA 技术获得了艰难梭菌毒素的细胞毒作用实时动力学曲线。对于感染病人的样品，可看到无中和抗体时 CI 值有一个明显的下降过程，而加入中和抗体后 CI 值不下降。这两个典型的样品检测结果汇总在表格中，值得注意的是，qPCR 检测方法获得了一个假阳性结果（对于 I4 未感染样品）。P=positive, N=negative, 1:5= 样品稀释倍数。符号中的时间为给出实验结果所需的时间。

应用 RTCA 技术对 300 个临床样品的检测，其灵敏度为 87.6%，特异性为 99.6%，阳性预测值（PPV）为 96.5%，阴性预测值为 98.5%（表 1）。除此之外，RTCA 技术可实现对样品毒性蛋白浓度的定量检测。在进行灭滴灵或万古霉素治疗之前收集的 RTCA 检测为阳性感染的样本中，可观察到毒性蛋白浓度与临床 CDI 严重程度的相关性（R²=0.732, p=0.0004）。这说明（图 4），通过 RTCA 技术的检测显示出该感染病人样品的毒性水平与治疗功效和临床症状有很好的相关性。该研究首次表明 RTCA 技术是一种灵敏度高、检测方便的艰难梭菌临床检测工具，适于检测临床 CDI 严重程度以及监测治疗效果和治疗进程。

No. of coin-positive specimens	CTH severity	Stool viral concentrations (ng/ml)					
		Mean	Co-median	Median	Minimum	Maximum	SD
9	None	0.27	0.17	0.19	0.03	0.89	0.40
1	Mild	1.52	1.52	1.52	1.52	1.52	NA
1	Mild to moderate	35.89	11.51	10.11	2.21	111.25	5.6
2	Moderate	5.05	15.68	15.68	15.68	15.68	0
2	Moderate to severe	20.15	22.52	25.08	4.58	111.25	9.6
1	Severe	111.53	111.53	111.53	111.53	111.53	NA

表 1. 感染样品中艰难梭菌毒素浓度与疾病严重程度的相关性。a 对样品毒素浓度的计算是根据将样品加入细胞中引起细胞 CI 值下降 50% 时所需的时间，运用计算公式 $y=4.6715x^{0.0009}$ (图 2) 所得。细胞响应动力学曲线是通过 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪对加入感染样品后进行实时检测 48 小时获得。

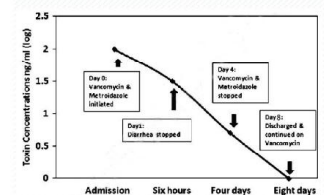


图 4. 应用 RTCA 技术对艰难梭菌感染病人治疗过程中进行艰难梭菌毒素的定量检测。收集治疗开始前 (0 天) 的艰难梭菌感染病人的样品，之后分别在治疗过程的 6 小时、4 天和 8 天取样。通过 RTCA 技术对艰难梭菌毒素进行实时定量检测，y 轴代表毒素浓度，x 轴代表样品收集时间。

RTCA 技术在病毒介导的细胞病变效应 (CPE) 和中和抗体检测中的应用

致细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 指病毒在宿主细胞内大量增殖，导致细胞病变甚至死亡的现象。病毒感染后的细胞在显微镜下可观察到细胞变圆、脱落、聚集等现象，以及形成包涵体的小颗粒等变化。常用检测方法为在单层培养的细胞中，加入病毒样品并进行形态学变化的观察。在最近的研究中，RTCA 技术也可用于病毒介导的 CPE 和特异性病毒中和抗体的定量检测 [13,21,22]。其中包括对西尼罗河病毒、圣路易脑炎、流感病毒、手足口病毒以及特

异性中和抗体的检测。以下我们以西尼罗河病毒和圣路易脑炎为例进行介绍。

西尼罗河病毒 (WNV) 和路易斯脑炎病毒 (SLEV) 与日本脑炎病毒同属于黄病毒科的黄病毒属。这两种病毒都在雀形目禽类体内存在并不断增殖循环，间歇性传播给马科动物和人类从而诱发各种症状和疾病并在宿主体内死亡 [23,24]。由这两种病毒引起的人类疾病在临床上极易与流感病毒混淆。发病通常出现在病毒血症峰值后，从而导致临床诊断困难并需要通过血清学实验进行确认 [25,26]。这两种病毒在各种蚊子、禽类和哺乳动物的细胞中生长良好，病毒浓度检测的通常方法为用空斑形成实验，使用单层培养的非洲绿猴肾细胞或 Vero 细胞进行定量计数。此检测方法不仅耗时，并且难以进行实时测量。应用 RTCA 技术来实现感染剂量从 10^1 至 10^6 PFU 的西尼罗河病毒和路易斯脑炎病毒对 Vero 细胞 CPE 的检测。病毒介导的 CPE 动力学参数表明 CIT_{50} ，即 CI 值下降 50% 所需的时间与病毒的感染剂量成反比。与路易斯脑炎感染相比，西尼罗河病毒感染导致的细胞病变效应的时间更短而且更快，这与病毒溶解细胞的活力是一致的 (图 5)。用数学模型拟合基于阻抗的 CPE 动力学曲线，表明西尼罗河病毒的复制速度是路易斯脑炎病毒的 3 倍左右 [21]。我们还可应用 RTCA 技术来定量检测西尼罗河病毒和路易斯脑炎病毒的特异性中和抗体对细胞的保护作用。若加入特异性抗血清，西尼罗河病毒或路易斯脑炎病毒诱导的 CPE 产生延迟，并且 CIT_{50} 的延迟与采用噬菌斑减少中和试验 (PRNT) 测量的中和抗体的滴度具有很好的相关性 (图 6)。RTCA 技术也被用来检测感染禽类的血清样本并呈现了与 PRNT 非常好的相关性。在这项研究中，作者还使用了病毒 CPE 延迟时间 (CIT_{50}) 绘制标准的抗体剂量曲线，用这种方法，无需进行血清滴定，即可确定未知滴度的血清中所含中和抗体的滴度 [21]。实验结果表明，RTCA 技术可高通量实时动态检测病毒对细胞的毒性作用及定量分析中和抗体的中和作用。

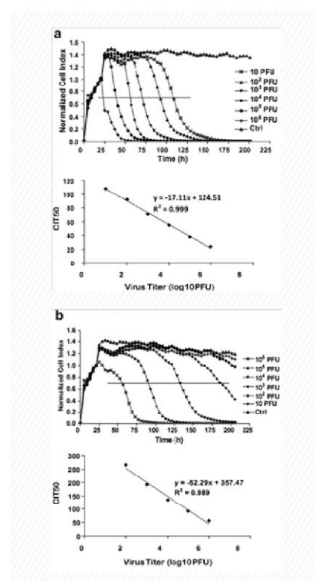


图 5. 应用 RTCA 实时无标记动态细胞功能分析仪对 WNV(a) 和 SLEV (b) 介导的 Vero 细胞 CPE 检测。向预先培养的 Vero 细胞中加入不同剂量的病毒，以未加入病毒的细胞为对照 (Ctrl) 孔，获得病毒剂量与时间依赖的细胞动力学曲线。实验设置两个复孔，水平线代表最大 CI 值 50% 的位置。水平线与细胞响应曲线交点对应的时间为 CIT_{50} 值。 CIT_{50} 值与感染剂量的 $\log_{10}$ PFU 呈反比。 R^2 值显示方程有良好的回归线性。

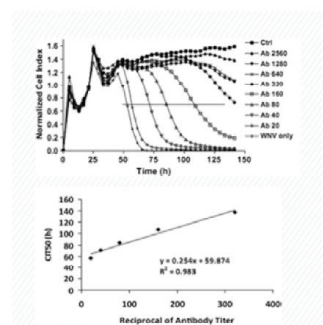


图 6. 应用 RTCA 实时无标记动态细胞功能分析仪实现对 WNV 特异性中和抗体滴度的检测。用 10^6 PFU 的病毒诱导 Vero 细胞 CPE，之后分别加入不同浓度的 WNV 特异性中和抗体。Ctrl 为未感染对照。图中水平线为 CI 值下降 50% 的位置。 CIT_{50} 值和 WNV PRNT 抗体滴度在 1:20 和 1:320 之间呈显著的线性回归。抗体值是 PRNT 实验滴度的倒数。

RTCA 技术对寄生虫运动和卵孵化过程检测的应用

在发展中国家约有 10 亿人受到过寄生虫的感染，导致每年成千上万人的死亡。虽然可使用抗寄生虫药物进行治疗，但寄生虫存在的耐药性问题影响了牲畜的健康，也对人类产生了迫在眉睫的威胁。目前，现有的药物疗效评估方法是通过使用低通量的光学显微镜观察寄生虫的运动来实现的，此方法存在着耗费人力、主观和通量低等缺陷，严重影响了新药开发和耐药性的监测。近日，一组澳大利亚研究人员利用 RTCA 技术开发了一种新型的全自动化、无标记及高通量的方法，可简单客观评估抗寄生虫药物的作用 (图 7)。该技术克服了目前驱虫药物开发和耐药性检测的低通量瓶颈。广泛使用 RTCA 技术筛选新药或检测耐药性将在人类与动物和植物寄生虫以及其他病原体的斗争中起到十分重要的作用。

应用RTCA技术,检测寄生虫引起的E-Plate培养板底部的电阻阻变化,可实时无标记评估所有寄生生物物种的运动和发育过程[27]。由于RTCA技术对寄生生物蠕动的检测具有有很高的精确度,因此它被广泛应用于寄生生物物种和发育阶段的检测。虽然这种技术现仅用于本文中提到的物种(表2),但可以肯定的是,通过对实验方案优化完全可实现应用RTCA技术对在E-Plate培养板底部贴壁的任何物种的任何运动发育阶段的检测。物种研发中,研究不同发育阶段

的寄生虫对药物敏感性的差异是非常重要的一个方面, RTCA技术检测寄生虫的最大优势是可以用于直接评价药物对各个发育阶段寄生虫的作用。例如, PQZ对曼氏血吸虫成虫阶段的疗效明显大于幼虫, 所以外药物的检测就需要特别关注被检测血吸虫的发育阶段。再比如, H线虫也存在幼虫和成虫阶段药物感染性的差异, 这会给药物的筛选及对耐药性的检测带来很大的难题。应用RTCA来检测成虫的活力就可以克服这样的难题。

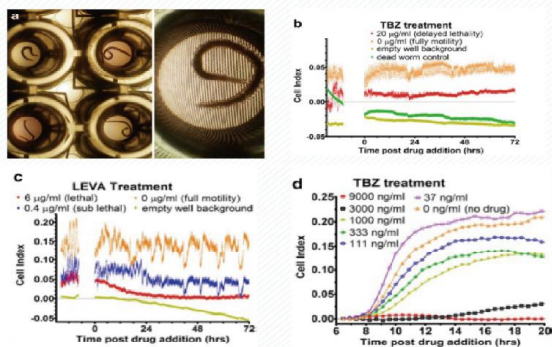


图7 应用 RTCA 技术对不同发育阶段的活寄生虫和死寄生虫的检测。(a)犬钩虫成虫的显微图片,上面两孔为雌性成虫,下面两孔为雄性成虫,旁边为三倍放大图。(b)应用 RTCA 技术对单独的雌性犬钩虫成虫在加入噻苯咪唑时的检测结果。(c)应用 RTCA 技术对 H 虫体在不同浓度度左咪唑作用下的检测。(d)应用 RTCA 技术对 H 虫体线虫卵化过程中加入不同浓度的噻苯咪唑的检测(动力学曲线为重复制均值)。药物剂量的增加导致虫卵孵化率和相应的 CI 值的降低。

Parameter	Drug	IC ₅₀ (μg/ml)	95%CI (μg/ml)	Time to stable IC ₅₀	Proportion (n) (%) TC
Female Ascomycetes	TRG	13.4	8-23.3	6	Unifolios
Sexualized ascomycetes	TRG	18.8	10-32.1	48	Various depending on methodology (1.600-2000 μg/ml) (Gomez et al., 2004)
Basal TRG	TRG	17.4	10.5-26.6	4	2.500 μg/ml (2004) (Gomez et al., 2004)
Ascomycetes TRG	TRG	31.6	24.9-39.9	24 ^a	1.000 μg/ml (2004) (Gomez et al., 2004)
TRG sensitive strains	TRG	28	23.9-33.0		(Kilic et al., Andrew Korte (2010))
TRG sensitive strains	TRG	1.70	1.485-1.96	4 ^a	24.000 μg/ml (2006) (Kilic et al., Andrew Korte (2010))
TRG sensitive strains	TRG	401	39-440		2.000 μg/ml (2006) (Kilic et al., Andrew Korte (2010))
TRG sensitive strains	TRG	700	52-916	12	4.000 μg/ml (2006) (Kilic et al., Andrew Korte (2010))

表 2. 药物的 IC50 值与应用 RTCA 技术对寄生虫发育过程中检测结果的总结。(a) 成功检测了雄性钩虫, 但由于钩虫数量少而无法计算 IC50 值。(b) IVM 耐药株在稳定 24 小时后并没有出现 IC50 的显著性差异, 但是在 12 小时出现了显著性差异。(c) 敏感株在所有时间点都出现了显著性差异 ($p<0.01$)

RTCA技术在细胞免疫功能评估中的应用：T细胞表面受体的检测

抗原特异性 T 细胞在免疫功能上的重要性已被广泛认识 [28,29]。细胞受体的数量和比例不但用于监测病情,而且还经常被用于评估病状的状态和进展 [30,31]。基于细胞的分析方法提供了一个确定功能 T 细胞的工具。流式细胞术是一个标准的临床认可的用于定量测定抗原特异性 T 细胞的方法。然而该方法仍然需要裂解 / 固定、增加通透性以及进行标记等步骤。使用 RTCA 实时无标记动态细胞监测系统也可进行 T 细胞表面受体活化的检测。我们证实通过用 E-Plate 检测板细胞培养孔中包被抗 CD3 或抗 CD28 抗体,使其激活 T 细胞受体复合物,从而导致细胞粘附,在 RTCA 实时无标记动态细胞功能分析上表现为细胞指数 (C 值) 的增加 (图 8)。共刺激因子 (如 CD28 刺激二信号因子) 级联,使细胞通过释放白介素 2 而进入增殖阶段。CD28 协同刺激 T 细胞受体复合物后,与单独抗 CD3 或抗 CD28 抗体相比,细胞指数增加更高 (图 8)。需要注意的是,峰值响应并不一定是发生在相同的时间,我们也可通过实时动态监测很容易进行区分和定量。

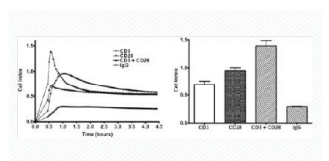


图 8. 应用 RTCA 技术对 T 细胞激活及粘附的检测, 将 E-Plate 检测板分别用抗体 CD3、CD28 和对照 IgG 4℃ 包被过夜。经 PBS 洗涤后, 加入培养基并在 RTCA 实时无标记动态细胞功能检测仪上检测背景阻抗值。Jurkat 细胞以 250,000 个/孔的密度接种到 E-Plate 96 检测板。对 T 细胞激活和粘附进行实时检测, 每 3 分钟检测一次, 共检测 4 小时。细胞指数 (CI 值) 的峰值按图所示。

讨论及展望

细胞分析检测并不是一个新的实验室方法,利用细胞和组织样品进行临床检测是检验医学中的一种常用的经典方法,在新兴技术层出不穷的今天,将基于细胞的检测与新兴科学技术相结合,开发了更简便、更灵敏的新的检测和诊断技术。正如本文所介绍的,通过对基于微电子传感器的细胞分析技术的开发,我们实现了对细胞进程的真实动态监测。值得注意的是,获得细胞与微生物和病毒感染后的动力学响应曲线可进行定量检测和功能评估,与传统的基于细胞的检测方法相比有着明显的优势。虽然 RTCA 技术的临床应用及相关技术评价有待进一步复杂,但该技术于在微生物和病毒感染症诊断以及复杂疾病诊疗等领域的应用具有极高的价值。本文介绍了应用 RTCA 技术来实现评估对病原体的检测和免疫系统检测,因此,基于 RTCA 技术的检测方法可能较广泛地应用于微生物和病毒感染以及免疫功能评估的临床诊断中。此外,基于 RTCA 技术的细胞检测将随着高度多元化的检测系统以及多个实验学科领域,这不仅包括微生物学,还包括血液学、组织学、细胞学、组织病理医学以及最近出现的细胞治疗等。细胞研究和细胞分析技术的发展已显著转向基于细胞的临床诊断和技术中。

参考文献

- Donald HB, Isaacs A (1954) Counts of influenza virus particles. *J Gen Microbiol* 10:457-464
- Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Zhang Z, Fang W (2007) The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* 115:307-312
- Leland DS, Ginocchio CC (2007) Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 20:49-78
- Kline KA, Falker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B (2009) Bacterial adhesions in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5:580-592
- Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R (1996) Cellular microbiology emerging. *Science* 271:315-316
- Eisinghorst EA (1994) Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol* 236:405-420
- Pizarro-Cerda J, Lecuit M, Cossart P (2002) In: Sansonetti P, Zychlinsky A (eds) Molecular cellular microbiology. Academic, London. p 161
- Srivastava A, Isberg RR (2002) In: Sansonetti P, Zychlinsky A (eds) Molecular cellular microbiology. Academic, London. p 179
- Ridgway GL, Oriel JD, Mumtaz G, Mellars B (1986) Comparison of methods for detecting *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Pathol* 39:232-233
- Belland R, Ojcius DM, Byrne GI (2004) Chlamydia. *Nat Rev Microbiol* 2:530-531
- Bartlett JG (2006) Update in infectious diseases. *Ann Intern Med* 144:49-56
- Kelly CP, LaMont JT (2008) *Clostridium difficile*—more difficult than ever. *N Engl J Med* 359:1932-1940
- Lu HZ, Xu X (2011) Label-free real-time cell based assay system for evaluating H1N1 vaccination success. *Asia Pacific Biotech News* 14:15-17
- McDonald LC, Killgore GE, Thompson A et al (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 353:2433-2441
- Chang TW, Lauermann M, Bartlett JG (1979) Cytotoxicity assay in antibiotic-associated colitis. *J Infect Dis* 140:765-770
- Planche T, Aghaizu A, Holliman R et al (2008) Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 8:777-784
- Peterson LR, Manson RU, Paule SM et al (2007) Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 45:1152-1160
- Ryder AB, Huang Y, Li H et al (2010) Assessment of *Clostridium difficile* infections by quantitative detection of *tcdB* toxin by use of a real-time cell analysis system. *J Clin Microbiol* 48:4129-4134
- He X, Wang J, Steele J et al (2009) An ultrasensitive rapid immunocytotoxicity assay for detecting *Clostridium difficile* toxins. *J Microbiol Methods* 78:97-100
- Yang G, Zhou B, Wang J et al (2008) Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A and B in *Bacillus megaterium*. *BMC Microbiol* 8:192
- Fang Y, Ye P, Wang X, Xu X, Reisen W (2011) Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *J Virol Methods* 173:251-258
- Sun F, Zhang Y, Tian D et al (2011) Responses after one dose of a monovalent influenza A (H1N1) 2009 inactivated vaccine in Chinese population—a practical observation. *Vaccine* 29:6527-6531
- Kramer LD, Styer LM, Ebel GD (2008) A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annu Rev Entomol* 53:61-81
- Reisen WK, Chiles RE, Martinez VM, Fang Y, Green EN (2003) Experimental infection of California birds with western equine encephalomyelitis and St Louis encephalitis viruses. *J Med Entomol* 40:968-982
- Oceguera LF 3rd, Patiris PJ, Chiles RE, Busch MP, Tobler LH, Hanson CV (2007) Flavivirus serology by Western blot analysis. *Am J Trop Med Hyg* 77:159-163
- Patiris PJ, Oceguera LF 3, Peck GW, Chiles RE, Reisen WK, Hanson CV (2008) Serologic diagnosis of West Nile and St. Louis encephalitis virus infections in domestic chickens. *Am J Trop Med Hyg* 78:434-441
- Smout MJ, Kotze AC, McCarthy JS, Loukas A (2010) A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e885
- Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667
- Wange RL, Samelson LE (1996) Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 5:197-205
- Messele T, Roos MT, Hamann D et al (2000) Nonradioactive techniques for measurement of in vitro T-cell proliferation: alternatives to the [(3)H]thymidine incorporation assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:687-692
- Sieg SF, Harding CV, Lederman MM (2001) HIV-1 infection impairs cell cycle progression of CD4(+) T cells without affecting early activation responses. *J Clin Invest* 108:757-764
- Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K et al (1998) Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188:2205-2213

病毒Cytopathic Effect 效应 RTCA实时动态检测

前言

病毒引起的细胞病变作用 Cytopathic Effect (CPE) 是评价病毒的感染力及致病效应的通用方法。细胞杀伤性病毒接种到正常培养的细胞中, 经过一定时间后, 在显微镜下就可以观察到细胞的变化, 包括细胞变圆、坏死、从瓶壁脱落等现象, 即细胞病变作用。目前研究病毒的最常用方法是空斑实验 [1]。在这个实验中, 使用对拟研究病毒敏感的细胞株, 对病毒感染的细胞染色 (如结晶紫) 后呈现的肉眼可见的空斑, 并进行数量及大小的测定, 用以评价病毒的感染能力。空斑实验的结果是来自于终点法检测, 因此无法获取病毒复制及其引起的细胞病变的完整信息。另外, 某些病毒如减毒突变株可能会在细胞内成功复制, 但由于其作用微弱, 在单层细胞上产生的空斑难以识别, 因此空斑实验无法研究此类病毒诱导的细胞 CPE 效应。空斑实验的另一缺陷是实验过程中人工操作步骤过多, 增加了操作人员感染病毒的风险。

艾森生物开发的实时无标记细胞功能分析仪 (RTCA, Real Time Cellular Analysis) 利用微电极生物传感器对细胞进行实时无标记动态监控, 检测过程对细胞没有任何损伤[2]。该系统基于阻抗的检测原理, 将微电极传感器整合于E-Plate细胞培养板底部, 接种后的细胞将贴附于检测板底部, 并进行黏附、生长及增殖, 细胞这些状态的变化引起电阻抗的变化都能被RTCA实时无标记细胞功能分析仪的微电极传感器识别。细胞杀伤性病毒接种到正常培养的细胞中, 病毒作用细胞后会在宿主细胞内大量增殖并导致细胞出现变圆、脱落、聚集甚至死亡等现象, 细胞这些状况的改变都能很清晰地被RTCA实时无标记细胞功能分析仪实时动态地记录下来。

RTCA实时无标记细胞功能分析仪可用于检测细胞增殖、细胞黏附及细胞活性等。因此, RTCA实时无标记细胞功能分析仪的应用领域非常广泛, 涉及新药研发、毒理学、肿瘤学、医学微生物学及病毒学等。同时该方法还可应用于细胞增殖及毒性检测[2]、

细胞黏附和伸展[3]、细胞质控[4]、酪氨酸激酶受体反应[5]、肥大细胞活化[6]及G蛋白偶联受体 (GPCR) 激活[7]等实验中。

此应用案例讲述了通过RTCA实时无标记细胞功能分析仪研究病毒介导的CPE效应的实验方法。此方法克服了传统终点法的限制, 无需标记, 步骤简单, 且实时记录病毒CPE效应, 成为研究病毒CPE效应的一种简便有效的方法。

材料方法

细胞

本实验中用到的敲除 I 型干扰素基因的非洲绿猴肾衍生细胞系 (Vero E6) 购自ATCC, 人胚胎肾细胞 (HEK 293) 购自Microbix Biosystems。实验中用到的细胞均用含有10%的小牛血清, 2mM的谷氨酰胺及1%青霉素/链霉素的DMEM培养基培养于5%的CO₂, 37°C培养箱中。

病毒

印第安纳血清型痘疹性口炎病毒 (VSV) 滴加入 Vero E6 及HEK 293细胞培养于5%的CO₂, 37°C培养箱中。

细胞增殖检测

本实验使用RTCA实时无标记细胞功能分析仪对细胞进行实时检测。首先在E-Plate板中加入50μl培养基测量基线CI值, 再加入100μl细胞悬液, 分别为50,000, 25,000, 12,500, 6,250, 3,125, 1,562, 781个/mL, 细胞室温放置30min后放入RTCA实时无标记细胞功能分析仪实时动态检测细胞黏附伸展及增殖状况。

病毒CPE效应分析

细胞以 25,000 及 12,500 个 / 孔的密度接种于 E-Plate 板中。Vero E6 细胞接种 20.5h 后, 加入 10μl 培养基稀释的 VSV 病毒, 使病毒终浓度为 800,000 PFU (高 MOI) 及 80,000 PFU (低 MOI)。对照组则加入 10μl 培养基。HEK 293 细胞则在 68.5h 后加入病毒处

理。加入病毒后将E-Plate板放回RTCA实时无标记细胞功能分析仪，每隔15min检测一次CI值变化，总共190h。

结果与讨论

动态细胞增殖检测

本实验使用 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪检测细胞增殖过程，并由此确定添加病毒的最佳时间点，从结果中可以发现 Vero E6 细胞的最佳感染时期为细胞接种后 20.5h，HEK 293 则在细胞接种后 68.5h (图 1A,B)，在这个时间点接种密度为 50,000 个 / 孔的细胞处于平台期初期，接种密度为 12,500 个 / 孔的细胞处于对数生长期。选择这两个时间点可分别观察病毒对增殖平台期和对数生长期细胞的不同影响。

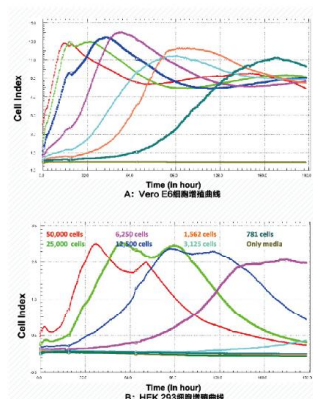


图 1. 动力学监测细胞增殖情况，细胞接种于 E-Plate6 孔板后置于 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪实时动态监测细胞增殖状况，并确定加入病毒的时间（细胞生长对数期或平台期）。RTCA 实时无标记细胞功能分析仪每 30min 检测一次 (A) Vero E6 细胞及 (B) HEK 293 细胞黏附伸展及增殖状况。不同颜色的曲线代表不同的细胞接种密度。

VSV对Vero E6细胞的CPE效应

通过 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪实时动态检测细胞状况，发现 Vero E6 细胞无论在增殖平台期还是在在对数生长期用高低两个滴度的病毒处理细胞都能产生 CPE 效应。当 Vero E6 在对数生长期感染病毒，病毒的 CPE 效应与病毒接种的滴度呈明显的相关性 (图 2)。VSV 病毒以较低的滴度 (80,000 PFU) 感染细胞，在感染前期的 15h Vero E6 细胞的生长状况 (图 2A，蓝色曲线) 与对照组类似 (图 2A，绿色曲线)，但之后 VSV 病毒开始复制并诱导了细胞的死亡，表现为 CI 值下降，24h 后 CI 值下降到 50% (CI_{50})，并持续下降，最后降为 0，细胞全部死亡。若 VSV 病毒以较高的滴度 (800,000 PFU) 感染细胞，CI 值在感染后 4h 就有所下降，在感染后 11h 下降到 CI_{50} 。

VSV 病毒在 Vero E6 细胞生长平台期感染与细胞生长对数期感染的结果类似 (图 2B)：VSV 病毒以

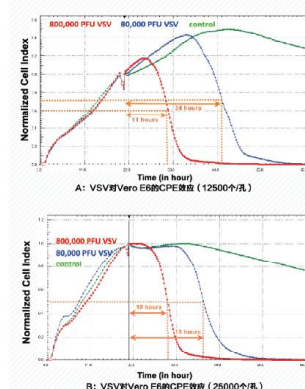


图 2. 实时监控 VSV 病毒感染后 Vero E6 细胞的生长状况。(A) 对数生长期细胞标准化 CI 值；(B) 平台期细胞标准化 CI 值。RTCA 实时无标记细胞功能分析仪每 15min 检测一次 VSV 病毒对 Vero E6 细胞黏附伸展及增殖的影响。

较高的滴度 (800,000 PFU) 感染细胞，10h 后 CI 值下降到 CI_{50} (图 2B，红色曲线)，VSV 病毒以低滴度 (80,000 PFU) 感染细胞，19h 后 CI 值下降到 CI_{50} (图 2B，蓝色曲线)，最后 CI 值也下降为 0，细胞尽数死亡。

VSV对HEK 293的CPE效应

根据 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪检测到的细胞增殖曲线，选择 HEK 293 细胞接种后 68.5h 滴加入病毒 (图 3A,B)。感染 VSV 病毒后 HEK 293 细胞与 Vero E6 细胞的反应不一致。HEK 293 在细胞对数生长期对病毒的作用非常敏感：高滴度的 VSV 病毒作用细胞后细胞 CI 值下降到 CI_{50} 只要 6h。(图 3A，红色曲线)；低滴度病毒组细胞 CI 值下降到 CI_{50} 也只要 12h (图 3A，蓝色曲线)。然而，VSV 病毒在细胞生长的平台期感染细胞的结果却完全不同 (图 3B)。

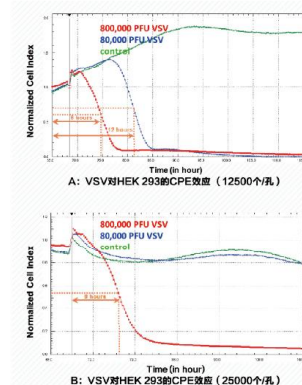


图 3. 实时监控 VSV 病毒感染 HEK 293 细胞的生长状况。(A) 对数生长期细胞标准化 CI 值；(B) 平台期细胞标准化 CI 值。RTCA 实时无标记细胞功能分析仪每 15min 检测一次 VSV 病毒对 HEK 293 细胞黏附伸展及增殖的影响。

高滴度病毒在细胞增长平台期感染细胞 CI 值变化的趋势和细胞对数生长期感染细胞的结果一致 (图 3B，红色曲线)；而低滴度病毒接种于平台期细胞时，细胞 CI 值变化趋势却与对照组相似，说明低滴度病毒对平台期 HEK 293 没有产生 CPE 效应 (图 3B，蓝色和绿色曲线)。

Vero E6 与 HEK 293 唯一的不同之处在于 HEK 293 能产生 I 型干扰素，Vero E6 敲除了 I 型干扰素基因 [8]。I 型干扰素基因可以上调抗病毒活性蛋白如 MxA 及 OAS/RNaseL 蛋白的表达，这就导致了两种细胞对 VSV 病毒的不同响应。HEK 293 细胞有完整的干扰素系统，当病毒感染时，HEK 293 细胞能产生干扰素并激活 JAK/STAT 信号通路，并引起抗病毒活性蛋白表达量增加，细胞的抗病毒能力随之增强。因此，推测本实验中干扰素系统的作用是 HEK 293 细胞对低滴度病毒 (PFU 80,000) 产生抗性的关键因素。细胞对 VSV 病毒的不同响应有助于研究细胞的抗病毒作用机制。

综上所述，与常规终点法相比，RTCA 实时无标记细胞功能分析仪可以实时动态监控病毒与宿主细胞相互作用，且无需标记，为科学研究带来了极大的便利。

参考文献

- Knipe, D. M. and Howley, P. M., Eds. (2007). *Fields Virology*, 5th edition. *Lipincott Williams & Wilkins*: 37-39.
- Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B, and Zheng W (2004). Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev Technol* 2,363-372.
- Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, and Abassi Y (2005). Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *J Biomol Screen* 10,795-805.

4. Kirstein SL, Atienza JM, Xi B, Zhu J, Yu N, Wang X, Xu X, and Abassi YA (2006). Live cell quality control and utility of real-time cell electronic sensing for assay development. *Assay Drug Dev Technol* 4, 545-553.
5. Atienza JM, Yu N, Wang X, Xu X, and Abassi Y (2006). Label-free and real-time cell-based kinase assay for screening selective and potent receptor tyrosine kinase inhibitors using microelectronic sensor array. *J Biomol Screen* 11,634-643.
6. Abassi YA, Jackson JA, Zhu J, O'Connell J, Wang X, and Xu X (2004). Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelec-tronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods* 292,195-205.
7. Yu N, Atienza JM, Bernard J, Blanc S, Zhu J, Wang X, Xu X, and Abassi YA (2006). Real-time monitor-ing of morphological changes in living cells by elec-tronic cell sensor arrays: An approach to study G protein-coupled receptors. *Anal. Chem.* 78,35-43.
8. Emeny, J. M. and M. J. Morgan (1979). Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol* 43(1):247-252.

**RTCA实时定量检测病毒
感染效力及评估中和抗体效价**

前言

病毒是一类比较原始的、有生命特征的、能够自我复制和细胞内寄生的非细胞生物，它们几乎能感染所有的细胞型生物并产生病害。据初步统计，人类的60~70%的传染病系病毒感染所引起，如常见的感冒、麻疹、各种脑炎、及流行性出血热、艾滋病（AIDS）、癌症等。因此，病毒性传染病是严重危害我国人民健康的主要病种之一。从2003年的SARS（严重急性呼吸综合征）、禽流感，到2009年甲型H1N1流感的全球爆发，病毒感染事件的频繁出现给病毒学检测及诊断治疗提出了更高的要求。然而，传统的检测手段存在着许多局限性和缺陷，难以满足当前基础研究和临床研究工作者的需求。本文引入了一种新型的基于电阻抗原理的RTCA（Real Time Cellular Analysis）实时无标记检测技术，能实时提供细胞应对外界刺激动态反应信息，例如：药物处理、生长因子刺激、细胞毒性分析以及病毒诱导的细胞学病变等，检测技术灵敏、高效、重复性高。本研究中，以H1N1病毒为例，着重介绍RTCA技术在病毒学检测中的应用。

2009年全球爆发的甲型H1N1流感（A/H1N1 Influenza）是由新型猪源性甲型H1N1流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病，通过呼吸道等途径直接或间接接触在人群中传播。甲型H1N1流感的临床主要表现为流感样症状，多数患者病情温和，少数病例因伴有其他疾病而表现出病情加重，例如出现肺炎、呼吸衰竭、多器官功能损伤等并发症，严重者甚至死亡。由于此次疫情是由一个新型H1N1病毒亚型引起的，人群没有天然免疫力，导致疫情全球范围快速传播。WHO于2009年6月将大流行警戒级别提高至6级，宣布了甲型H1N1流感的世界大流行[1]。

大规模的免疫接种是控制流感大流行的最有效的方法，随着甲型H1N1流感病毒在全球造成的影响，开发甲型流感病毒疫苗及相应临床试验研究在医学界引起了重视。准确评估疫苗研制及临床试验结果，开发安全有效的疫苗，成为确保人群保护系统建立的关键因素，因此，迫切需要一种安全方便的检测方法。

高通量中和滴定试验常用于血清学诊断及抗体效价的量化分析。传统的流感病毒中和抗体检测方法包括血凝试验、免疫学试验及各种细胞病变效应（CPE）鉴定试验如显微镜、比色和荧光检测等[2-5]，然而，这些检测方法具有低通量、病毒接触率高及检测周期长等局限性，在人群接种H1N1流感疫苗评估中难以被采纳。

艾森生物自主研发的基于细胞水平的RTCA实时无标记细胞功能分析仪实现了活细胞功能的无标记、实时动态检测。该系统基于阻抗技术，在E-Plate电极板底部整合有微金电极，通过阻抗测量可定量评估细胞生理状态如细胞数量、存活率及细胞形态变化等。本文中，我们应用RTCA技术实时监测MDCK细胞中H1N1病毒引起的细胞病变效应，并进行定量分析。同时，用该方法评估了21个接种H1N1流感疫苗的健康个体在接种前和接种后的中和抗体效力，并与传统凝血试验得到的数据进行对比。

材料方法

细胞

MDCK细胞系（ATCC, Manassas, VA, USA）培养在含10%FBS，100 U/ml的青霉素和100 mg/ml链霉素（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）的DMEM完全培养基中，置于37°C，5% CO₂培养箱中。病毒检测时，使用维持液为含抗生素和TPCK-胰蛋白酶（Sigma, St. Louis, MO, USA）的无血清DMEM培养基。

病毒株

本研究中，使用的病毒株为：A/Shanghai/37T/2009（H1N1）（简称SH37T）（GenBank Accession No. GQ263489-GQ263496），A/Shanghai/143T/2009（H1N1）（简称SH143T）（GenBank Accession No. GQ340061-GQ340064，GQ411905-GQ411907及GQ411909），SH37T和SH143T病毒株分别在2009年5月下旬和6月上旬，于中国上海公共卫生临床中心（SHAPHC）入院的30岁和24岁男性体内分离获得。

这两位患者均为输入型病例，分别来自澳大利亚和法国。病毒接种于MDCK单层细胞中，置于35°C，5% CO₂培养箱培养。

血清学检测

2009流感A（H1N1）疫苗（灭活裂解病毒颗粒）由上海生物制品研究所生产，其中所使用的WHO推荐的疫苗病毒A/California/07/2009 NYMC X-179A，由美国疾病控制和预防中心提供。从21个接种流感疫苗的健康成人人体内收集接种前和接种后的血清，疫苗接种前血清为S0样本，疫苗接种第7天和第21天血清分别为S1和S2样本，样本储存于-80°C，使用前56°C水浴灭活30min。

实时PCR检测

用高纯度病毒核酸提取试剂盒（Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, USA）提取病毒核酸，严格按照说明书操作。使用2009年甲型H1N1流感病毒核酸诊断试剂盒（KHB，上海，中国）及实时PCR仪（Mastercycler ep realplex 2.2, Eppendorf, Hamburg, Germany）扩增纯化病毒核酸。

细胞增殖检测

RTCA细胞功能分析仪包含4个组成部分：检测台、分析仪、E-Plates检测板及数据处理软件。检测台放置在细胞培养箱内，全程自动检测检测板孔内细胞状态，所测得阻抗值以细胞指数（CI）的形式输出。CI值反映细胞细胞生长、伸展、形态变化、死亡和贴壁程度等一系列生理状态。

细胞增殖检测：将50μl培养基加入到检测板孔内，测取基线值，然后，每孔加入100μl一系列梯度稀释的细胞悬液，细胞浓度从4×10⁴~2.5×10³，依次2倍稀释。室温孵育30min后放于检测台上，每隔15min检测一次，实时监测细胞增殖过程。

为确定最佳的TPCK-胰蛋白酶浓度，我们检测了细胞在含TPCK-胰蛋白酶的无血清培养基（SFM）中的增殖情况。当细胞生长至单层细胞时，将检测板从检测台上移出，用无血清培养基洗涤两次，

后向每孔加入150μl含10~0.31 mg/ml梯度浓度TPCK-胰蛋白酶的无血清培养基，将检测板重新放回检测台，RTCA实时监测细胞状态。

实时检测病毒引起的细胞病变

检测板每孔加入1.0×10⁴ MDCK细胞。将SH37T和SH143T两株病毒株先通过实时定量PCR调整至相同载量（5.50×10⁶ /ml），再用含2.5 μg/ml TPCK-胰蛋白酶的无血清培养基依次10倍稀释（10⁻¹~10⁻⁶）。当细胞指数CI显示细胞达到稳定生长期时，用无血清培养基洗涤细胞，加入梯度浓度的病毒稀释液感染细胞，将只加培养基的孔作为阴性对照，RTCA实时监测病毒感染情况，每隔15min检测一次，持续检测190h。同时，用WST-1法测定H1N1病毒引起的细胞病变情况作为平行对照试验，与RTCA法所得结果进行对比。50%细胞感染所需要的病毒含量（TCID₅₀）作为评价病毒感染效力的指标。

RTCA实时检测中和抗体试验（实时NT试验）

H1N1病毒和待测血清都用含2.5 μg/ml TPCK-胰蛋白酶的无血清培养基进行稀释。待检测血清，从最高浓度1:10开始2倍稀释，然后混合等体积的含100 TCID₅₀单位H1N1病毒的培养基，混匀后将此血清/病毒混合液置于35°C，5% CO₂培养箱内孵育60min，后将E-Plate检测板孔内的培养基更换成150μl该血清/病毒混合液，设三个复孔。仅含病毒而无待测试血清的孔，及仅含无血清培养基培养的MDCK细胞的孔分别作为对照组。RTCA实时动态检测H1N1病毒引起的细胞学病变，持续检测72h。100 TCID₅₀单位H1N1病毒全部被中和时所需血清浓度的倒数定义为中和抗体滴度。

血凝抑制试验（HI）

HI试验按标准步骤操作[6]：测试血清先用受体破坏酶处理（RDE）（Sigma, St. Louis, MO, USA），灭活非特异性抑制剂。将血清从最高浓度1:10开始2倍稀释加入细胞，再加入4个血凝单位的流感病毒液，及1.5%豚鼠红细胞悬液。

数据分析

数据分析采用 SPSS v17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 及 GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) 软件。

结果

MDCK细胞数及胰蛋白酶优化

为确定合适的 MDCK 细胞接种数量, 向 E-Plate 检测板接种不同数量的细胞, RTCA 动态检测细胞增殖情况 (图 1A)。根据细胞增殖曲线, 在 1×10^4 孔的接种密度下, 细胞达到最大细胞指数 (CI) 之前处于持续增殖状态, 到达单层细胞平台期的时间为 16h~24h, 该时间段最适合病毒感染处理, 因此确定 1×10^4 孔为最佳接种数量。由于流感病毒对 MDCK 细胞的感染需要胰蛋白酶辅助, 因此, 需要优化 TPCK-胰蛋白酶的工作浓度。不同剂量 TPCK-胰蛋白酶作用下病毒对 MDCK 细胞的感染情况如图 1B 所示, 最佳的胰蛋白酶浓度为 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 此浓度对 MDCK 细胞增殖的影响最小。

2009H1N1病毒介导的细胞CPE

MDCK 细胞到达对数生长期时, 向其中分别加入 5.50×10^4 拷贝 $/\text{ml}$ 的 SH37T 和 SH143T 病毒株, RTCA 实时动态监测病毒介导的 CPE, 同时显微镜下观察细胞 CPE 状态 (图 2A)。随着 H1N1 病毒的大量复制, 导致细胞逐渐死亡, RTCA 检测显示细胞指数 (CI) 下降 (图 2B), 而对照组未感染细胞呈正常增殖状态。平行进行的 WST-1 试验进一步证实了细胞指数 (CI) 变化可反映 H1N1 病毒介导的 CPE (如图 2C)。在 WST-1 实验中, 细胞感染病毒后, 活细胞量减少, 引起吸光值明显下降, 该结果与 RTCA 检测获得的结果是完全相同的。上述试验表明 RTCA 可实时动态和准确地检测 H1N1 病毒感染引起的 CPE。当测试感染病毒数量下降一个梯度时, CPE 起始时间延迟约 8 小时, 说明病毒负荷量与 CPE 之间有直接的相关性。

另外, 在病毒载量相同的情况下, 病毒株不同, 所引起的细胞 CPE 起始时间及细胞完全死亡时间也不同。例如, 在病毒载量为 10^4 稀释浓度时, 毒株 SH37T 感染引起的细胞全部死亡发生在 37 h, 而毒株 SH143T 感染引起的细胞全部死亡发生在 48 h (图 2D)。使用比色法 TCID₅₀ 检测, 结果显示每 TCID₅₀ 单位 SH37T 病毒载量小于 SH143T (表 1)。这与 RTCA 获得的结果一致。上述结果表明, RTCA 检测不仅可以量化 H1N1 病毒引起的 CPE, 也可检测不同菌株的感染效力。

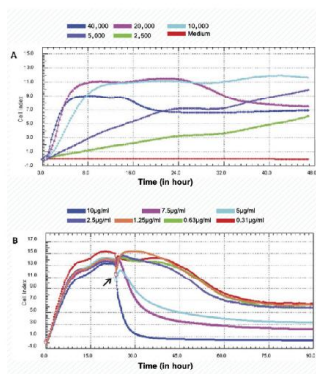


图 1. RTCA 动态检测 MDCK 细胞增殖。MDCK 细胞接种于 E-Plate 检测板上, RTCA 实时动态检测细胞增殖状态, 以确定合适的细胞接种数量、合适的 TPCK-蛋白酶浓度及合适的病毒接种时间等。(A) MDCK 细胞在正常培养条件下的增殖情况;(B) 在不同浓度 TPCK-蛋白酶的 SFM 培养基条件下的增殖情况, 箭头指示为接种病毒时间点。

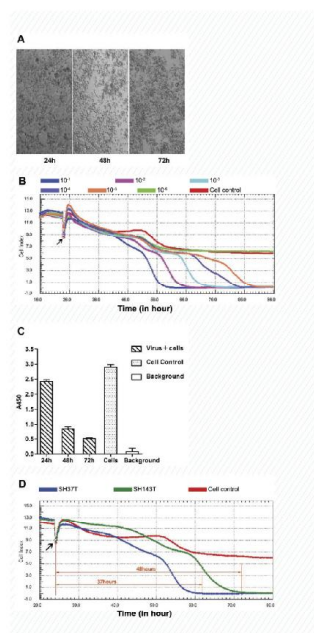


图 2. RTCA 实时动态检测 H1N1 病毒引起的细胞 CPE。(A) 显微镜下检测 MDCK 细胞被 SH37T 病毒株 ($1:10$ 稀释) 感染 24h、48 h、72h 后的反应情况。(B) RTCA 实时动态检测 SH37T 病毒株感染 MDCK 细胞引起的效应。箭头指示在该时间点加入不同稀释梯度的病毒。(C) 比色法检测 SH37T 病毒株 ($1:10$ 稀释) 感染 MDCK 细胞引起的细胞 CPE, A450 波长处测量病毒感染 24h、48h、72h 后的 OD 值。(D) 比较两类病毒株 SH37T 和 SH143T 在相同载量下的感染情况。红色标注线代表两类病毒株感染细胞引起的细胞指数 CI 降到 0 时所需要的时间。

Table 1. TCID₅₀, viral load, and the ratio viral load per TCID₅₀ of two H1N1 strains.

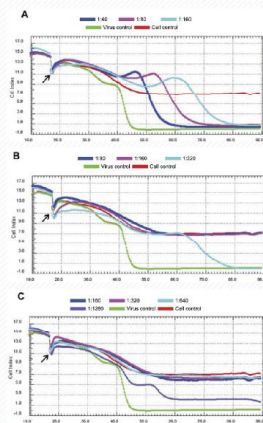
Strain	Viral load	TCID ₅₀	Viral load/TCID ₅₀
A/Shanghai/377/2009 (H1N1)	1.26×10^7	$10^{4.1}$	4.97×10^2
A/Shanghai/1457/2009 (H1N1)	5.50×10^7	$10^{5.2}$	6.88×10^2

doi:10.1371/journal.pone.0031965.t001

表 1. 两类病毒株的 TCID₅₀, 病毒载量及每 TCID₅₀ 单位的病毒载量。

RTCA实时监测病毒中和滴度试验

由于 RTCA 实时检测技术不仅能够对甲型 H1N1 流感病毒引起的 CPE 进行准确的量化, 也能定量分析血清中和抗体对 CPE 效应的阻断或延迟作用。本试验中, 我们利用 RTCA 技术对 21 个血清样本的免疫效价进行了检测。首先, 将 MDCK 细胞接种于 E-Plate 检测板上, 加入经 SH37T 病毒预处理的血清, 血清稀释浓度分别选择为 S0 1:40, S1 1:80, S2 1:160, 每组设三个复孔, 若血清浓度高于此浓度, 病毒复制会被完全抑制。每



组加入 100 TCID₅₀ 单位的病毒载量，RTCA 实时监测 H1N1 病毒诱导的 CPE，结果见图 3。经 S0 血清处理的细胞指数很快下降为 0，其作用曲线接近病毒对照组，表明 S0 血清稀释浓度高于 20 倍以上无法抑制病毒复制。而对于 S1 和 S2，直至血清浓度分别稀释到 320 倍和 1280 倍时才观察到细胞死亡，细胞增殖曲线接近细胞阴性对照组（图 3B,C）。结果显示 S1 和 S2 中和抗体滴度分别为 160 和 640。

RTCA系统实时NT试验及HI试验比较

本试验中，对21对H1N1疫苗接种前和接种后的血清样本进行检测，RTCA系统和试验（NT）和传统检测方法试验（HI）同时进行。接种前后的几何平均滴度（GMT）作为NT和HI的评估标准。对抗体滴度显著升高（≥4倍）的血清样本数作了统计，如表 2。NT试验测得在接种后7天血清样本GMT升高了4倍，接种后21天平均升高了13倍，而HI试验测得在接种后第7天GMT升高了4倍，接种后21天平均升高了9倍。接种前后血清中抗体水平升高情况如图4。通过NT和HI检测，接种后的21个血清样本均呈现抗体滴度明显升高的趋势。两种检测方法获得的接种前和接种后抗体滴度结果比较，数据都呈现明显统计学差异（ $p<0.05$ ，威氏符号秩次检验）（图4A,B）。实时NT检测及HI检测抗体滴度结果具有良好的相关性（Spearman相关系数， $r=0.78$ ， $p<0.01$ ；图4C）。另外，在接种后21天抗体对疫苗的免疫应答达到最大反应时计算抗体滴度值（图4D）。NT试验和HI试验两种检测方法测得的抗体应答结果无明显差异（ $p>0.05$ ）。因此，RTCA实时动态NT试验结果与传统的HI试验结果是一致的，说明利用RTCA技术可以准确地定量检测抗体滴度。

Group	Day 0	Day 7	Day 21	Number of samples with ≥4-fold increase
S0	10	10	10	0
S1	10	40	160	10
S2	10	40	640	10

表 2. 接种前后的几何平均滴度（GMT），滴度范围及 21 对血清样本中抗体滴度显著升高的数量。

讨论

本文中，我们利用RTCA技术检测了H1N1病毒诱导的MDCK细胞病变。该技术不仅可用于区分同种H1N1病毒株不同感染浓度下引起的动力学反应，还可区分不同H1N1病毒株感染引起的不同程度的细胞效应。SH37T及SH143T两个毒株，分别来源于2009年

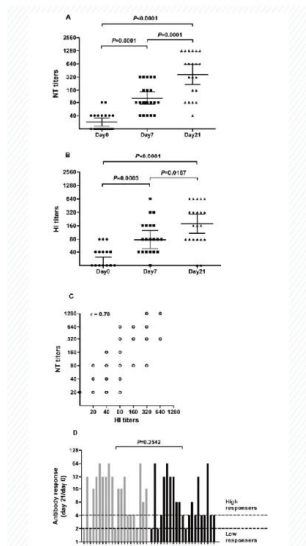


图 4. 实时 NT 试验及 HI 试验检测 21 对接种前后血清样本抗体滴度。(A, B) 通过实时 NT 试验 (A) 及 HI 试验 (B) 证实，接种前后，抗体滴度具有明显的统计学差异（ $p<0.01$ ）。(C) NT 试验结果及 HI 试验结果具有一致性（Spearman 相关系数， $r=0.78$ ， $p<0.01$ ）。(D) 接种后 21 天相对于基线（0 天）的抗体滴度。NT 试验和 HI 试验无明显差异（ $p>0.05$ ）。低反应：不高于 2 倍基线；高反应：高于 4 倍基线。

5月感染过H1N1病毒的两个病人体内。虽然这两株病毒株表现的临床数据基本相似，但SH143T感染细胞引起的CPE起效时间及感染细胞完全死亡时间均比SH37T延迟了10h。SH37T病毒株比SH143T呈现出更高的感染性。因此，RTCA检测技术可以评估H1N1病毒在MDCK细胞中复制能力及感染效力，同时，根据表型变化，可以预测某些病毒基因及蛋白的功能。Ying Fang[7]等研究人员利用RTCA技术获得的数据，建立了相应的数学模型用于模拟不同病毒菌株感染细胞引起的细胞指数CI变化，通过该数学模型，可预测特定病毒复制的倍增时间，引起宿主细胞死亡所需最低病毒数量，及被感染细胞平均死亡时间。另外，RTCA检测技术也可用于区分同一病毒的不同菌株。综上所述，RTCA技术可为评估病毒的感染效力提供可行的体外检测模型，有助于进一步阐释在病毒学检测中基因变异与毒性变异之间的关系。

RTCA技术不仅可用于定量检测病毒诱导的CPE，同时我们也将该技术应用于人血清中H1N1特定抗体的中和抗体滴度评估试验。由于目前HI试验仍然是最传统的研究流行病学、免疫学及测量流感疫苗功效和中和抗体效价的方法，我们将两种试验方法同时应用于H1N1病毒中和抗体效价检测，并对检测结果进行了对比。结果显示，两种检测方法获得的数据具有良好的一致性，接种3周后的测试血清样本中中和抗体明显增加。与HI方法比较，RTCA方法检测灵敏度更高，该检测技术为血清学诊断、免疫学研究及流感疫苗效价评估提供了良好的检测平台。

流行性感冒被认为是导致全球疾病和死亡的重要原因，2009年甲型H1N1流感及其他季节性高致病性禽流感对人类健康造成了极大的危害。全球监控及年度疫苗接种是预防和控制流感的关键，RTCA检测技术避免了传统病毒学检测及中和抗体检测中费时、费力等缺陷，能够实现实时、无标记、高通量、自动化检测，操作简便易行，大大降低了病毒接触风险，可作为流感病毒学检测的最基本的工具。

参考文献

1. Zarocostas J (2009) World Health Organization declares A (H1N1) influenza pandemic. *J Biol* 338: b2425
2. Rowe T, Abernathy RA, Hu-Primmer J, Thompson WW, Lu X, et al. (1999) Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 37: 937–943.
3. Smee DF, Morrison AC, Barnard DL, Sidwell RW (2002) Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *J Virol Methods* 106: 71–79.
4. Lehtoranta L, Villberg A, Santanen R, Ziegler T (2009) A novel, colorimetric neutralization assay for measuring antibodies to influenza viruses. *J Virol Methods* 159: 271–276.
5. Stephenson I, Das RG, Wood JM, Katz JM (2007) Comparison of neutralizing antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: an international collaborative study. *Vaccine* 25: 4056–4063.
6. Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ (1982) Concepts and Procedures for Laboratory based Influenza Surveillance.
7. Fang Y, Ye P, Wang X, Xu X, Reison W (2011) Real-time monitoring of flavivirus induced cytopathogenesis using cell electric impedance technology. *J Virol Methods* 173: 251–258.

RTCA实时动态检测黄病毒CPE
及定量评估野生样本黄病毒中和抗体

前言

西尼罗河病毒(WNV)与圣路易斯脑炎病毒(SLEV)具有相似的抗原,属黄病毒科(Family Flaviviridae)、黄病毒属(Genus Flavivirus)、日本乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus)血清群。WNV和SLEV都是虫媒病毒,带病毒的鸟类是主要的传染源和储存宿主,亲鸟类蚊虫是主要的传播媒介,以尖音库蚊(Culex pipiens)为主。病毒通过鸟-蚊-鸟、人、马等动物传播,通常由蚊子叮咬传播给其它动物和人。当人被携带病毒的蚊子叮咬后,病毒随血液进入人脑造成危害。病毒的分离培养鉴定,是病毒学研究的基础,常用的分离方法有乳鼠脑内接种分离和白纹伊蚊C6/36细胞、BHK细胞、Vero细胞等培养分离等两种。病毒分离法的优点是可靠,缺点是操作烦琐,部分标本中病毒量少或活性低,产生细胞病变慢,常需盲传2-3代,且无法确定病毒型别。若作病毒型别鉴定,试验周期更长。

人类感染WNV或SLEV病毒会表现出多种不同的临床症状,如发热、头痛、咽痛、肌肉酸胀等,与感冒病毒引起的症状类似,也有极少部分人感染病毒后出现急性神经系统疾病,从而可能导致死亡。目前WNV广泛分布于非洲、欧洲、澳洲、亚洲、中东、北美、加勒比海和中美洲及南美洲的部分地区。我们的邻国也相继出现该病毒的报道(如印度、俄罗斯、巴基斯坦、哈萨克斯坦、塔吉克斯坦),病毒传入的危险性很大。因此,我们应该提高警惕,加强病毒的监测,熟悉病毒的诊断方法并应用于实际。

目前医院对病毒性脑炎的诊断主要还是依靠临床诊断,对虫媒病毒的检测以病毒分离培养、酶联免疫法和血清中和试验为主。病毒分离后研究者检测病毒抗原通常采用间接免疫荧光试验和免疫组化或Western blot,并检测血清或脑脊液的IgM含量,这些方法得到的检测结果并不足以确诊[1,2],最终还需进行血清中和试验,如空斑中和试验(PRNT),血清特异性中和抗体滴度>4倍才能得到确诊。该方法的

缺点是相对费时费力,而且通常需要使用活病毒,并在生物安全三级实验室进行操作,这些缺点使该检测方法不适用于在普通实验室开展检测,也不能达到快速检测的要求。另外对于大规模的爆发的禽流感使用ELISA分析,实验费用将相当高昂[3,4]。

艾森生物开发的实时无标记细胞功能分析仪(RTCA, Real Time Cellular Analysis)利用微电极生物传感器对细胞进行实时无标记动态监控,检测过程对细胞没有任何损伤。该系统基于阻抗的检测原理,将微电极传感器整合于E-Plate细胞培养板底部,接种后的细胞将贴附于检测板底部黏附、生长及增殖,细胞状态改变引起电阻抗的变化被RTCA实时无标记细胞功能分析仪的微电极传感器识别。细胞杀伤性病毒接种到细胞中,病毒作用细胞后会在宿主细胞内大量增殖并导致细胞出现变圆、脱落、聚集甚至死亡的现象,细胞这些状况的改变都能被RTCA实时无标记细胞功能分析仪实时动态地记录下来。本研究使用RTCA实时无标记细胞功能分析仪定量检测WNV及SLEV病毒的细胞病变效应(CPE),并检测中和抗体对病毒CPE的抑制作用,试验步骤简单,结果准确。

材料方法

细胞

本试验中用到的非洲绿猴肾衍生细胞系(Vero)购自ATCC。细胞用含有10%的小牛血清,2mM的谷氨酸及1%青霉素/链霉素的DMEM培养基培养于5%的CO₂,37°C培养箱中。

病毒

WNV病毒株从Bronx动物园的火烈鸟分离获得(编号:35211 AAF 9/23/69)。SLEV病毒株来源于Bakersfield的斑疹库蚊。病毒使用之前在Vero细胞中传代两次[5,6]。试验前准备病毒稀释液,从10⁶ PFU 10倍依次稀释至10¹ PFU,病毒滴度以噬斑形成单位(PFU)表示,中和抗体滴度通过噬斑减少中和试验(PRNT)测得。

Real-time RT-PCR

本试验中使用的病毒用含有15%FBS的PBS稀释，使用ABI 6100核酸提取仪（Applied Biosystems, Foster City, CA）按说明操作抽提病毒RNA，并使用ABI Prism 7900荧光定量PCR对试验中用到的WNV及SLEV病毒RNA片段扩增，具体试验过程按说明书操作。

病毒CPE检测

本试验使用 RTCA 细胞功能分析仪实时检测细胞评价病毒 CPE。Vero 细胞用培养基配制密度为 5×10^4 cells/ml 的细胞悬液。将 WNV 和 SLEV 病毒用 PBS 依次 10 倍稀释，配制成为病毒滴度为 10^1 至 10^6 PFU 的病毒悬浮液待用。当病毒感染细胞时，将 50 μ l 已稀释的 WNV 或者 SLEV 病毒悬液分别与 50 μ l Vero 细胞悬液（ 5×10^4 cells/ml）混合，置于 5% 的 CO_2 ，37° C 培养箱中孵育 30 min，等量细胞悬液加入 PBS 作为对照组。孵育 30 min 后将细胞 / 病毒混悬液转移入已检测基线的 E-Plate 板中，并使用 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪检测细胞状态，实时动态地记录细胞的变化。细胞培养 24 h 后，将 E-Plate 板中培养基换成 200 μ l 无血清 DMEM 培养基，重新放回 RTCA 检测台，每隔 1 h 检测一次，实时记录细胞 CI 值变化，持续检测 10 d。

病毒中和抗体检测

将 5×10^4 cells/well Vero 细胞接种于 E-Plate 中，并在 RTCA 细胞功能分析仪上检测过夜，获得单层 Vero 细胞。第二天，取来自美洲朱雀（*Carpodacus mexicanus*）的抗血清，并用标准蚀斑减少中和试验（PRNT₅₀）[7] 确定抗血清所含抗体滴度。抗血清用 DMEM 进行 2 倍梯度稀释，再将 100 μ l 的梯度稀释的各滴度血清分别与 $10^{5.5}$ PFU 单位的 WNV 或者 SLEV 病毒相混合，置于普通培养板中在 5% 的 CO_2 ，37° C 培养箱中孵育 30 min，其后将 E-Plate 板中培养基去除，换成 100 μ l 已孵育的抗体 / 病毒混合液。

本试验还从自然界收集了 40 例感染病毒的禽类，并检测其血清中和抗体浓度。首先将本血清用生理盐水 1:20 稀释，然后与滴度为 $10^{5.5}$ PFU 的 WNV 及 SLEV 病毒等体积混合（血清最终稀释度为 1:40），将血清抗体 / 病毒混合液在 5% 的 CO_2 ，37° C 下孵育 30 min。将 E-Plate 板中过夜培养的 Vero 细胞培养基换成 100 μ l 预培养 30 min 的血清 / 病毒混合液（方法同上）。首先建立标准中和滴度曲线，将已知滴度的 WNV 中和抗体血清以 1:20 的滴度开始用无血清 DMEM 培养基 2 倍梯度稀释，再加入 E-Plate 孔中，持续观察 10 d，即可获得标准中和曲线。最后，将各个未知滴度的血清样本获得的中和曲线与标准中和曲线进行对比，计算未知样本的中和滴度。

试验结果

RTCA实时动态监控WNV及SLEV病毒CPE

试验结果表明 WNV 及 SLEV 病毒均有较强的 CPE 效果。从梯度稀释的病毒作用细胞结果可以看出 10^6 PFU WNV 病毒（最高浓度）作用的 Vero 细胞在 20 h 开始出现病毒 CPE，RTCA 细胞功能分析仪中 CI 值在 20 h 后显著下降，且在 24 h 下降到 50%（ $CIT_{50}=24$ h，24 h 后 CI 值降低 50%，图 1A），其它浓度接种的 WNV 病毒感染细胞后 35-42 h 相继出现病毒 CPE。本试验还同时分析了 SLEV 病毒引起的时间剂量依赖性 CPE 效应并作出相应标准曲线，SLEV 病毒对 Vero 细胞的作用相对比较缓慢，相邻数量级 PFU 的 CIT_{50} 约增加 52.3 h（图 1B）。

以病毒接种量 $\log_{10}$ PFU 为横坐标，相应的浓度的 CIT_{50} 为纵坐标进行回归分析得到拟合曲线（图 1），曲线线性相关良好（ $R^2=0.999$ ），可作为标准曲线应用于后期试验中，分析回归曲线发现 WNV/SLEV 病毒接种的 PFU 值每减少一个数量级其 CIT_{50} 增加 17.1 h/52.3h。由此推测：利用病毒作用细胞的标准曲线还可测定未知 WNV 病毒浓度。RTCA 细胞功能分析仪实时动态监控未知浓度 WNV 病毒 CPE，分析其到达

CIT_{50} 的时间并与标准曲线比较便可以估算未知 WNV 病毒感染细胞的浓度。

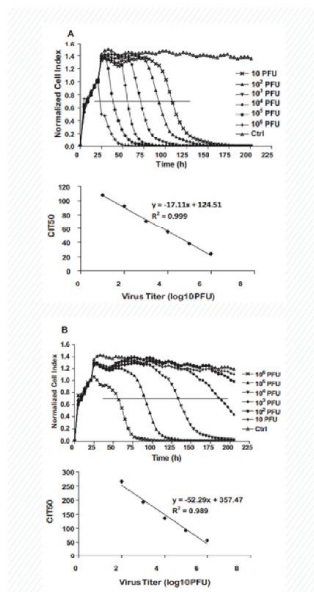


图 1. RTCA 细胞功能分析仪实时动态监控 (A) WNV 及 (B) SLEV 病毒诱导的 Vero 细胞 CPE。图为接种不同 PFU 病毒诱导标准化细胞指数的动态变化。水平直线表示细胞指数下降 50%，水平线与细胞指数曲线交点对应的横坐标值对应 CIT_{50} 。图中每条曲线的数据来自于两个平行的试验孔。

虽然 WNV 与 SLEV 病毒属于同一血清型属，但接种到 Vero 细胞中发现 SLEV 病毒生长比较缓慢，且生成的空斑直径小于 WNV 病毒 [8,9]。本试验中 WNV 与 SLEV 病毒以相同的感染复数（MOI=0.01）

感染 Vero 细胞，检测两种病毒的复制动力学过程，可见 WNV 和 SLEV 的病毒增殖平台期分别在细胞接种后的 48 h 和 84 h（图 2A,B）。该结果与使用 RTCA 技术获得的 CPE 曲线的结果是一致的。病毒以 10^6 PFU 接种时 SLEV 病毒作用的 CIT_{50} 的时间比 WNV 病毒晚 55 h（图 2A）。表明 RTCA 技术可用于定量检测病毒诱导的 CPE 从而为准确评估病毒感染效力提供了一个有价值的新型体外检测平台。

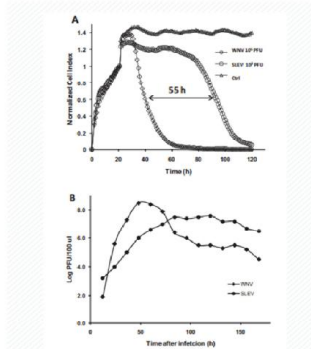


图 2. (A) 相同滴度 WNV 与 SLEV 病毒感染 Vero 细胞的不同 CI 曲线。图中箭头表示相同滴度 WNV 与 SLEV 病毒感染 Vero 细胞 CIT_{50} 的时间差。图中每条曲线的数据来自于两个平行的试验孔；(B) WNV 与 SLEV 病毒生长曲线。WNV 与 SLEV 病毒以 0.01 MOI 感染 Vero 细胞，每隔一定的时间吸取部分悬液用传统的空斑试验检测病毒滴度，病毒浓度以 $\log_{10}$ PFU/100 μ l 表示。

RTCA实时动态监控中和抗体对WNV及SLEV病毒的作用

在一定的细胞接种密度下，病毒诱导的 CPE 引起细胞 CI 曲线下降，其 CI 下降的延迟时间与病毒量相关，病毒量越低，CI 下降延迟时间越长，因此，若使用特异性抗体中和病毒作用，则中和抗体可阻止细胞毒性反应或者可延迟细胞曲线下降。本部分试验主

要目的是检测中和抗体对病毒 CPE 的中和效果。试验中将 Vero 细胞接种于 E-Plate 上培养过夜，预先通过 PRNT₅₀ 计算中和抗体滴度，中和抗体倍比稀释并与 10⁶ PFU WNV 或 SLEV 病毒混合培养 30 min，之后将 Vero 细胞中的培养基换成中和抗体/病毒混悬液，RTCA 细胞功能分析仪实时动态监测细胞变化的全过程。RTCA 细胞功能分析仪实时检测的结果显示（图 3），中和抗体浓度在 1:640 以上能有效地抑制 WNV 及 SLEV 病毒的细胞致病作用，中和抗体滴度在 1:40 - 1:320 之间细胞 CIT₅₀ 时间与加入的抗体滴度线性关系良好（R²=0.983，图 3）。

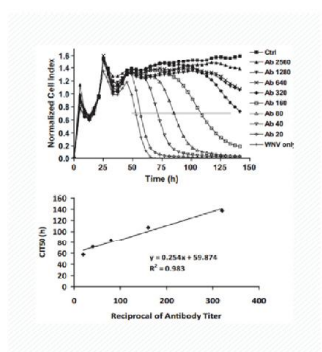


图 3. RTCA 细胞功能分析仪实时定量检测 WNV 中和抗体作用。Vero 细胞加入不同浓度的中和抗体及 10⁶ PFU WNV 病毒。水平线表示 CI 值下降 50%，与曲线交点对应的横坐标为 CIT₅₀。中和抗体滴度在 1:20 及 1:320 时与 CIT₅₀ 线性相关良好。

本试验还分析了来源于美洲宋雀的 WNV 及 SLEV 病毒中和抗体的特异性。分析结果发现 1:80 滴度的 WNV 中和抗体推迟了 WNV 病毒 CIT₅₀，但 SLEV 中和抗体对 WNV 病毒作用 CIT₅₀ 没有影响；同样，滴度为 1:80 SLEV 中和抗体推迟了 SLEV 病毒作用 CIT₅₀，而 WNV 中和抗体对 SLEV 病毒作用 CIT₅₀ 没有影响，这表明 WNV 及 SLEV 病毒中和抗体均具有较好的特异性（图 4）。

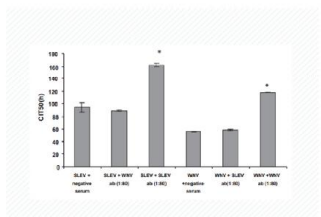


图 4. RTCA 细胞功能分析仪实时动态检测 WNV 及 SLEV 病毒中和抗体特异性。Y 轴表示 Vero 细胞不同处理组 CIT₅₀ 值。标准偏差在图中已做出标识。试验组与对照组进行 t-test 差异性分析，p<0.01 表示显著性差异，图中以 * 表示。

WNV 病毒中和抗体滴度检测

由于 CIT₅₀ 与中和抗体滴度线性相关（图 3），因此推测，若将未知滴度抗血清 CI 曲线与已知滴度抗体标准 CI 曲线相比对，便可通过一次试验获得大量未知浓度抗血清的中和滴度信息。为验证这一想法，本试验使用 RTCA 细胞功能分析仪检测了 40 例野生禽类血清样本中的 WNV 病毒中和抗体滴度，这 40 例血清样本经 ELISA 及 PRNT₅₀ 试验验证，WNV 病毒中和抗体均为阳性。将这 40 例抗血清加入 E-Plate 板中进行检测，每孔加入 1 种抗血清。图 5 是未知滴度抗血清样本与已知滴度（1:20 - 1:320）中和抗体样本对 10⁶ PFU WNV 病毒 CPE 作用中和的 CI 曲线。中和抗体滴度在 1:640 以上能完全中和由 10⁶ PFU

WNV 病毒诱导的 CPE，且 CI 曲线与对照组类似（数据未显示）。40 例未知浓度的样本反应曲线各不相同，其中样本 7 中和效果较好（滴度≥1:640），能将 10⁶ PFU WNV 病毒诱导的 CPE 完全中和，然而 1, 3, 4, 9, 19, 22, 23 及 35 号样本中和抗体检测结果呈现阴性，根据已知滴度中和抗体样本推测这些样本中和抗体滴度小于 1:20，其余样本 CI 曲线介于此区间之间（图 5A），也就是说中和抗体浓度介于 1:20 与 1:640 之间。为了评估这些样本的 PRNT₅₀ 滴度，用已知滴度样本的 CIT₅₀ 值建立标准回归曲线（图 5B），基于此标准回归曲线即可计算出任意未知滴度样本中和抗体的滴度。对计算结果进行了统计分析，发现按标准曲线计算得到的滴度相比传统 PRNT₅₀ 计算获得的结果略低（表 1）。传统的 PRNT₅₀ 计算结果与 RTCA 细胞功能分析仪得到的结果有良好的相关性（p<0.01）（R²=0.67，图 5C）。本试验是首次对未知样本无需梯度稀释，仅需一个浓度即可计算 WNV 病毒中和抗体滴度，此方法简便有效，重复性好，在研究和抗体领域应用前景广阔。

Sample #	ELISA	PRNT ₅₀	RTCA	Sample #	ELISA	PRNT ₅₀	RTCA
1	2.2	160	1:160	21	2.1	160	1:160
2	2.1	160	1:160	22	2.1	160	1:160
3	2.1	160	1:160	23	2.1	160	1:160
4	2.1	160	1:160	24	2.1	160	1:160
5	2.1	160	1:160	25	2.1	160	1:160
6	2.1	160	1:160	26	2.1	160	1:160
7	2.1	160	1:160	27	2.1	160	1:160
8	2.1	160	1:160	28	2.1	160	1:160
9	2.1	160	1:160	29	2.1	160	1:160
10	2.1	160	1:160	30	2.1	160	1:160
11	2.1	160	1:160	31	2.1	160	1:160
12	2.1	160	1:160	32	2.1	160	1:160
13	2.1	160	1:160	33	2.1	160	1:160
14	2.1	160	1:160	34	2.1	160	1:160
15	2.1	160	1:160	35	2.1	160	1:160
16	2.1	160	1:160	36	2.1	160	1:160
17	2.1	160	1:160	37	2.1	160	1:160
18	2.1	160	1:160	38	2.1	160	1:160
19	2.1	160	1:160	39	2.1	160	1:160
20	2.1	160	1:160	40	2.1	160	1:160

注：ELISA ratio>2 表示结果为阳性

表 1 三种方法检测 40 例野生禽类血清样本 WNV 病毒中和抗体滴度结果比较（ELISA，空斑试验及 RTCA）。

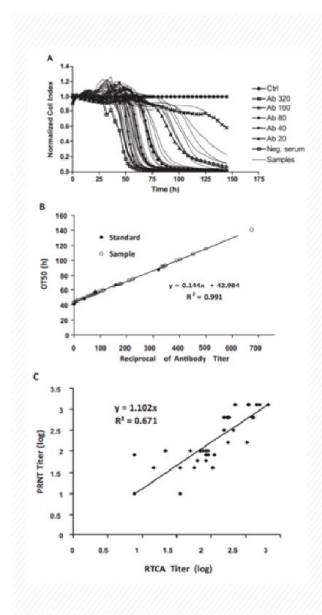


图 5. RTCA 实时动态检测 40 例野生禽类血清样本中和抗体滴度。（A）Vero 细胞用已知滴度并序列表稀释的中和抗体或未知滴度 1:40 稀释的 40 例血清样本及 10⁶ PFU WNV 病毒处理；（B）Vero 细胞用中和抗体及 10⁶ PFU WNV 病毒处理得到的 CIT₅₀ 与中和抗体浓度进行回归分析获得的标准曲线；（C）传统方法 PRNT 测得的病毒滴度与 RTCA 测得的滴度比较。本部分结果每条曲线的数据来源为单个试验孔。

讨论

本文介绍了使用基于微电子阻抗技术的 RTCA 细胞功能分析仪研究病毒及中和抗体的方法。WNA 及 SLEV 病毒感染 Vero 细胞后，病毒在细胞内的复制会诱导细胞聚集、颗粒增多、圆缩、漂浮、破碎、融合、脱落、细胞单层完全破坏等表现，这些变化过程能被 RTCA 细胞功能分析仪实时动态地记录下来。本试验结果表明 WNA 及 SLEV 病毒的作用效果具有较强的剂量依赖效应，且重复性好。虽然 WNA 及 SLEV 病毒同属于黄病毒科，但其引起的细胞响应并不一致，每种病毒作用细胞都有各自对应的 CPE 曲线，这种细胞动力学曲线是传统方法无法获得的。细胞对每种病毒的不同响应可能与病毒的感染能力密切相关，由此也可以区分不同的病毒株系，深入研究病毒感染力对探索其遗传进化意义重大。

检测中和抗体滴度的传统方法是 PRNT 终点检测法，此方法选择最小滴度的中和抗体能中和 75-100 PFU 病毒作用效果的 80% 以上作为检测的终点。传统的 PRNT 法耗费大量的人力物力且不适合做高通量的筛选。本研究提供的方法简单易行，重复性好，检测时未知样本时无需做繁琐的梯度稀释，试验中对 40 例野生禽类血清中和抗体的检测得到了理想的结果，虽然试验样本量大，但步骤减少，操作简单，大大降低了人力物力的消耗，且试验结果精确。

综上所述，基于微电子阻抗技术的 RTCA 细胞功能分析仪在 WNV 及 SLEV 病毒诱导 Vero 细胞 CPE 研究上得到了成功的应用。与传统方法对比，RTCA 细胞功能分析仪实现了对病毒 CPE 及病毒中和抗体的实时定量检测。RTCA 研究病毒及中和抗体的作用只步骤简单，这就减少了实验室工作人员与病毒的接触机会，降低了感染病毒的风险。此方法简单易行，能进行高通量的操作，使用 RTCA 细胞功能分析仪在高通量抗病毒药物筛选，病毒感染诊断及病毒学相关的研究领域应用前景广阔。

参考文献

1. Oecguera III, L.F., Patiris, P.J., Chiles, R.E., Busch, M.P., Tobler, L.H., Hanson, C.V., 2007. Flavivirus serology by Western blot analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 159-163.
2. Patiris, P.J., Oecguera III, L.F., Peck, G.W., Chiles, R.E., Reisen, W.K., Hanson, C.V., 2008. Serologic diagnosis of West Nile and St. Louis encephalitis virus infections in domestic chickens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 434-441.
3. Kwan, J.L., Kluh, S., Madon, M.B., Reisen, W.K., 2010. West Nile virus emergence and persistence in Los Angeles, California, 2003-2008. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 400-412.
4. Reisen, W.K., Carroll, B.D., Takahashi, R., Fang, Y., Garcia, S., Martinez, V.M., Quiring, R., 2009. Repeated West Nile virus epidemic transmission in Kern county, California, 2004-2007. *J. Med. Entomol.* 46, 139-157.
5. Reisen, W.K., Fang, Y., Martinez, V.M., 2005. Avian host and mosquito (Diptera: uli-cidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J. Med. Entomol.* 42, 367-375.
6. Goddard, L.B., Roth, A.E., Reisen, W.K., Scott, T.W., 2002. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1385-1391.
7. Fang, Y., Reisen, W.K., 2008. Previous infection with West Nile or St. Louis encephalitis viruses provides cross protection during reinfection in house finches. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 480-485.
8. Hayes, C.G., 1989. West Nile fever. In: Monath, T.P. (Ed.), *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 59-88.
9. Monath, T.P., 1980. St. Louis Encephalitis. *Am. Publ. Hlth. Assoc.*, Washington, DC.

RTCA 实时动态检测人工合成、感染动物排泄物及外周血提取物中艰难梭状芽胞杆菌毒素

前言

艰难梭状芽胞杆菌 (*Clostridium difficile*) 简称艰难梭菌, 是梭菌属专性厌氧菌的一种, 因其对氧气十分敏感、很难分离故得名, 是抗生素相关的结肠炎直接致病菌, 天然存在于 65% 以上的儿童和 3% 的成人中, 为胃肠道正常菌群中的一部分。但某些用于治疗疾病的抗生素会干扰肠道内的菌群平衡, 胃肠道中对抗生素敏感的细菌被抑制, 而艰难梭菌能够在这种条件下存活且大量繁殖, 同时产生大量毒素—毒素 A (TcdA) 和毒素 B (TcdB)。毒素损伤结肠粘膜, 导致严重的结肠炎症、持续腹泻、坏死组织、纤维蛋白及众多白细胞形成伪膜, 覆盖在肠内面的炎症部位, 形成伪膜性肠炎。艰难梭菌正日益被认为是医院性腹泻的病原菌, 该菌引起的腹泻既可单独发生, 也可在有限范围内暴发流行。美国每年因艰难梭菌感染导致死亡的病例约 15000 ~ 20000 人, 2005 年到 2006 年间, 艰难梭菌病感染的病例数增长了 70%, 到 2006 年达 55620 例。

艰难梭菌感染的实验诊断方法包括艰难梭菌的厌氧培养、细胞毒性实验、菌体及毒素抗原检测、毒素基因扩增检测等, 其中毒素检测和基于细胞的毒素中和实验是目前实验室检测艰难梭菌的金标准。采用细胞毒性实验检测厌氧培养的纯菌落被公认为最灵敏和特异的功能性实验室检测方法 [1]。但是, 艰难梭菌的厌氧培养难度较高, 且培养阳性不能确定其是否产生毒素。应用 MRC-5 细胞培养观察分离菌落的细胞病变效应, 特异性较好, 只是条件设备要求高, 至少需要 24h [2]。检测谷氨酸脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH) 抗原的酶联免疫法可以快速确定粪便标本中艰难梭菌的存在, 但不能确定是产生毒素的菌株。实时 PCR 技术检测需要精密的设备和经过专门训练的人员 [3], 且该检测方法的问题是 10 ~ 30% 没有疾病的医院病人能够被检测出产生毒素的菌株和非产生毒素的菌株, 假阳性率较高。因此急需一种简单快捷的方法检测出艰难梭菌致病性相关

的痢疾 (*C. difficile-associated diarrhea*, CDAD) [4]。广泛使用的基于单克隆抗体 (MAbs) 区分毒素 A (TcdA) 和/或毒素 B (TcdB) 的酶免疫测定方法迅速而且操作简单, 但是敏感性不够高 [5]。TcdB 的检测方法, 因其具有高敏感性和高特异性一度被认为是检测艰难梭菌的“金标准” [6]。但其主要检测 TcdB 的存在, 而 TcdA 引起的细胞病变则检测不到, TcdB 的检测方法被取消主要原因还有其技术上的复杂性和检测所需要的时间较长 (24~72h) [6]。由于近些年来艰难梭菌致病性相关的病例急剧增加, 迫切需要一种简单快捷、高敏感性和特异性检测艰难梭菌的方法。

由艾森研发的 RTCA (Real Time Cellular Analysis) 实时无标记细胞分析仪, 基于微电子阻抗技术检测贴附于 E-Plate 检测板中细胞的活力, 细胞的贴壁能力及相互作用都会导致阻抗发生变化, 同时阻抗的变化与贴壁细胞的数量、大小、形状都有直接关系。因此由艰难梭菌产生的毒素诱导的细胞病变可在 E-Plate 检测板上进行动态的定量监测, 且无需对靶细胞进行额外的标记。

本文详细介绍了基于实时无标记细胞分析仪检测艰难梭菌毒素的毒性作用的方法。A1H3 是抗 TcdA 的单克隆抗体, 能够大大增加 TcdA 对稳定表达 FcγRII 细胞系的杀伤作用 [7]。A1H3 结合实时无标记细胞分析仪实现了一种实时、超敏感性检测艰难梭菌毒素生物学毒性的方法。该方法操作简单、灵敏度高, 可对 0.1 ~ 1 pg/ml 浓度的 TcdA 进行检测, 且整个检测过程只需 3h 左右。

材料方法

细胞

mRG1-1 细胞, 一种稳定表达鼠源 FcγRII-α 的 GD 细胞系 [8] 由 Dr. Daniel Conrad (Virginia Commonwealth University) 惠赠。高纯度重组的 TcdA 和 TcdB 生物学活性接近天然毒素 [9]。抗 TcdA 的单克隆抗体 A1H3 由实验室 (South China University of Technology) 制备。

实验动物

实验所用无菌小猪养在隔离的无菌环境中。出生 2~5 天口服接种 $1 \times 10^8 \sim 10^9$ 的艰难梭菌 (NAP1/027 菌株) 芽孢 (n=12)。接种前 0 天和接种后每一天取其粪便标本冻存于 -20° C 用于进一步研究。研究时取其粪便标本置于冰上融化, 用 PBS (1:10, wt/vol) 稀释, 离心收集上清, 用 0.45 μm 的滤膜过滤待用。

结果和讨论

动态检测艰难梭菌毒素对 mRG1-1 细胞的影响

RTCA 实时无标记细胞功能分析仪通过检测艰难梭菌对 mRG1-1 细胞的毒性作用, 检测结果用细胞指数 (Cell Index, CI) 表示。细胞指数为 E-plate 检测板底部微电极的阻抗变化, 反映细胞数目改变、细胞和微电极粘附力、细胞在电极上的伸展程度等 [10]。艰难梭菌毒素破坏细胞的粘附力, 引起细胞变圆, 坏死和脱落, 降低细胞指数。在 E-plate16 检测板中每孔接种 2×10^4 个 mRG1-1 细胞, 置于 RTCA 细胞功能分析仪的检测台上, 培养过夜后, 分别在 E-Plate 检测板中加入单独病毒 / 生物样本、饱和 A1H3 和病毒 / 生物样本的混合物、或者抗体 - 病毒和 A1H3 混合液。兔抗 TcdA 的血清或者羊抗 TcdA 和 TcdB (TechLab Inc.) 的血清抗体用于中和毒素的毒性作用, PBS 作为阴性对照, RTCA 细胞功能分析仪实时动态记录细胞的响应。

细胞增殖检测

RTCA 实时无标记细胞分析仪检测艰难梭菌毒素毒性作用的结果如图 1 所示, A1H3 可增强 mRG1-1 细胞对 TcdA 的敏感性。加入 1000 ng/ml 的 TcdA, 10 ng/ml 的 TcdB, 以及 1 ng/ml 的 TcdA 和 A1H3 同时作用时都引起细胞指数的快速下降 (图 1A, 红)。0.1 pg/ml 的 TcdA 和 A1H3 同时作用细胞 20h 后也可使细胞指数降至 0; 与之相比, 10 ng/ml TcdA 单独作用细胞时, 只引起细胞指数的部分降低。若加入特异性兔抗 TcdA 血清, TcdA/A1H3 对 mRG1-1 细胞的毒性作用能够完全被兔抗 TcdA 血清中和, 说明细胞指数

的降低是由病毒 TcdA 特异性引起的 (图 1A)。不加入 A1H3 时, 发现 TcdB 病毒对 mRG1-1 细胞的毒性作用较 TcdA 单独使用强的多 (图 1)。由曲线可见, 10 ng/ml 或者 1 ng/ml 的 TcdB 即可迅速降低细胞指数, 即便是浓度极低的 TcdB (100 pg/ml) 也会引起细胞指数的缓慢降低 (图 1A)。另外, 结果还显示, A1H3 与 TcdB 无相互作用, 且 A1H3 不会增强 TcdB 的生物学毒性作用 (数据未显示)。

基于组织培养检测艰难梭菌毒素毒性作用的方法时程较长 [6]。为了克服这一缺点, 本实验采用的是复苏冻存的 mRG1-1 细胞和毒素混匀后一起加入 E-plate 检测板中, 结果如图 1B 所示, 对照组 (PBS) 的细胞指数随着时间延长逐渐增加, 表示细胞正常贴壁和生长, 而用 0.1 ~ 1 ng/ml 或者更高浓度的 TcdA 和 TcdB 处理的细胞, 由于毒素作用引起细胞与 E-plate 检测板底部的粘附力降低, 细胞指数始终很低。A1H3 大大增强了细胞对毒素的敏感性, 与 TcdA 同时使用, 在 4h 内即可检测到 1 pg/ml 的毒素的毒性作用 (图 1B)。羊抗 TcdA 和 TcdB 血清能够中和毒素的毒性作用, 表现为细胞指数的增加 (图 1B)。

实时动态检测生物样品中艰难梭菌毒素的毒性作用

为了验证 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪能否用于检测生物样品中艰难梭菌毒素的毒性作用, 实验使用感染了艰难梭菌的小猪的粪便提取物, 作用于接种在 E-plate 检测板中的 mRG1-1 细胞。图 2A 为小猪粪便毒素作用的结果。当用感染 3 天小猪的粪便提取物 100 倍稀释后处理细胞时, 细胞指数极低, 即说明粪便样品中存在毒素; 而用同一只小猪感染前的粪便相同倍数稀释后处理细胞, 其中没有毒素, 因此对细胞指数的增长没有明显的影响 (图 2A)。若同时加入 A1H3 可在 2 ~ 3h 内迅速检测到稀释 1000 倍粪便样品中的毒性作用 (图 2A)。抗 TcdA 和 TcdB 的血清能够完全中和粪便样品中毒素的毒性作用。这表明细胞指数的降低是由艰难梭菌毒素引起的 (图 2A)。可见 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪可以很好的应用

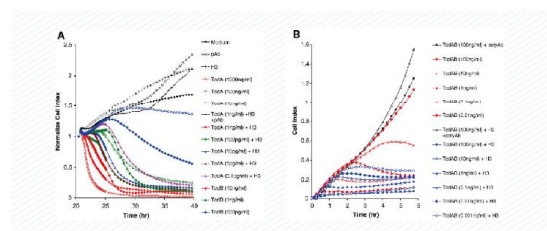


图 1. RTCA 实时无标记细胞功能分析仪动态检测艰难梭菌毒素对 mRG1-1 细胞的影响。(A) mRG1-1 细胞接种于 E-plate 16 中，培养过夜后在 A1H3 (H3) 存在或不存在的情况下，加入指定剂量的毒素。对照组包括 PBS 阴性对照、兔抗血清中和对照及 A1H3 对照。可见 A1H3 增强了 mRG1-1 细胞对 TcdA 的敏感性。加入 1000 ng/ml 的 TcdA，10 ng/ml 的 TcdB，或者 A1H3 和 1 ng/ml 的 TcdA 同时使用都会引起细胞指数的快速下降(红)。A1H3 和 0.1 pg/ml 的 TcdA 同时作用细胞时，20h 后引起细胞指数降至 0 左右，而只有 10 ng/ml TcdA 存在时只引起细胞指数的部分降低。10ng/ml 或者 1ng/ml 的 TcdB 也能够迅速降低细胞指数，而浓度较低的 TcdB (100 pg/ml) 只引起细胞指数的缓慢降低。(B) 在 A1H3 存在或者不存在的情况下，刚复苏的 mRG1-1 细胞和毒素一起加入 E-plate 检测板中，对照组 (PBS) 的细胞指数随着时间延长逐渐增加，而用 0.1~1 ng/ml 或者更高浓度的 TcdA 和 TcdB 处理的细胞，细胞指数一直很低，表明毒素引起细胞与 E-plate 检测板底部的粘附力降低。在血清中和实验中，兔抗 TcdA 的血清 (pAb) 或者羊抗 TcdA 的血清 (polyAb) 与毒素和 A1H3 一起混匀后加入细胞。每 15min 检测一次细胞指数的动态变化。

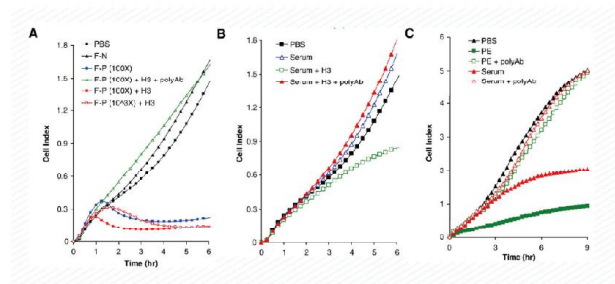


图 2. RTCA 实时无标记细胞功能分析仪动态检测生物样品中艰难梭菌毒素的毒性作用。(A) A1H3 存在或不存在的情况下，用 100 或者 1000 倍稀释感染前 (F-N) 或者感染后 (F-P) 无菌小猪的粪便提取物 (n=12) 与细胞一起混匀后接种于 E-plate 检测板，置于细胞功能分析仪上检测。(B 和 C) 严重感染小猪的血清和 / 或胸腹渗出物 (n=5) 用 PBS 稀释后与刚复苏的 mRG1-1 细胞混匀后，在 A1H3 存在或不存在的情况下检测 mRG1-1 细胞的生长状态。在血清中和实验中，半抗 TcdA 和 TcdB 的血清 (polyAb)、样品及 mRG1-1 细胞混匀后接种于 E-plate 检测板中，RTCA 实时无标记细胞功能分析仪动态检测细胞指数的变化。

在检测高倍稀释的粪便样品中毒素的毒性作用，反应速度快且敏感性高。

致命性的艰难梭菌相关的痢疾往往伴随着全身性的并发症[11]，可能的原因是毒素随着身体的循环系统遍布全身[12]。因此我们用 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪检测严重感染艰难梭菌实验小猪外周血血清中毒素的毒性作用。由于血清中毒素含量极低，与 PBS 对照组相比，血清中少量的毒素并不影响细胞的粘附力 (图 2B)，血清单独作用的细胞曲线与 PBS 对照组相似。而 A1H3 可增强艰难梭菌毒素的毒性作用，因此当同时加入 A1H3 和血清时，即使血清中毒素含量较低，也可产生细胞毒性作用，从而抑制细胞指数的增长 (图 2B)，且这种抑制作用能够被抗艰难梭菌毒素的抗体中和 (图 2B)，这表明细胞指数的降低是由艰难梭菌毒素特异性引起的。同样方法也可检测严重感染的小猪胸腹渗出物中毒素的细胞毒性作用，此毒性作用引起细胞指数的降低也可被特异性抗体中和 (图 2C)。若在显微镜下进行观察，当 A1H3 和毒素样本同时作用时，可引起培养过夜的 mRG1-1 细胞变圆 (数据未显示)，抗毒素的血清则能够阻断细胞的这些病变 (数据未显示)，该结果与使用 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪测得的结果是一致的。这些结果说明，对于严重感染的小猪，少量艰难梭菌毒素可进入外周循环系统，这也可以说明为何艰难梭菌引起的菌痢会伴发全身症状。严重感染的人类患者同样也可出现全身性并发症，但外周循环系统中是否存在有毒素还需要大量的实验来证实，RTCA 实时无标记细胞功能分析仪可作为一种简单方便且敏感性高的检测方法来进行临床检测。

综上所述，本文详细介绍了一种新型的基于微电极阻抗的实时无标记细胞功能分析仪检测艰难梭菌毒素的毒性作用的方法。与传统的 TcdB 检测方法相比，这种新型的方法能够很敏感的检测到 TcdA 的毒性作用。文中使用的 A1H3，一种抗 TcdA 的单克隆抗体大大增加了稳定表达 FcγRI 的 mRG1-1 细胞对 TcdA 的敏

感性[7]。另外，直接复苏冻存细胞和单克隆抗体的使用可以缩短检测所需要的时间 (2~4h)。且直接使用冻存的细胞，可以降低对实验操作人员细胞培养技能的要求。当使用特殊的 pH-缓冲培养液后，实验无需在 CO₂ 培养箱中进行，降低了对实验条件的要求。检测过程操作简单，只需混合待测样品、细胞和试剂后置于 E-plate 检测板中，即可自动获取实验结果。可见 RTCA 实时无标记细胞功能分析仪是一款快速、操作简单、高敏感性和高特异性的应用于检测艰难梭菌的仪器。

参考文献

1. Reller ME, Lema CA, Perl TM, et al. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two- step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic Clostridium difficile. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(11):3601- 3605.
2. Planche T, Aghaizu A, Holliman R, et al. Diagnosis of Clostridium difficile infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 2008, 8(12):777- 784.
3. Peterson, L.R., Manson, R.U., Paule, S.M., Hacek, D.M., Robicsek, A., Thomson Jr., R.B., et al., 2007. Detection of toxigenic Clostridium difficile in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of C. difficile-associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis*, 45, 1152-1160.
4. Kelly, C.P., LaMont, J.T., 2008. Clostridium difficile—more difficult than ever. *N. Engl. J. Med*, 359, 1932-1940.
5. Planche, T., Aghaizu, A., Holliman, R., Riley, P., Poloniecki, J., Breathnach, A., et al., 2008. Diagnosis of Clostridium difficile infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet. Infect. Dis*, 8, 777-784.
6. Chang, T.W., Lauermann, M., Bartlett, J.G., 1979. Cytotoxicity assay in antibiotic associated colitis. *J. Infect. Dis*, 140, 765- 770.

7. He, X., Sun, X., Wang, J., Wang, X., Zhang, Q., Tzipori, S., et al., 2009. Antibody-enhanced, Fc(gamma)R-mediated endocytosis of Clostridium difficile toxin A. *Infect. Immun.*
8. Cho, S., Conrad, D.H., 1997. A newmultivalent B cell activationmodel—anti-IgD bound to Fc gamma RI: properties and comparison with CD40L-mediated activation. *Int.Immunol.* 9, 239–248.
9. Yang, G., Zhou, B., Wang, J., He, X., Sun, X., Nie, W., et al., 2008. Expression of recombinant Clostridium difficile toxin A and B in Bacillus megaterium. *B.M.C Microbiol.* 8, 192.
10. Abassi, Y.A., Jackson, J.A., Zhu, J., O'Connell, J., Wang, X., Xu, X., 2004. Label-free, realtime monitoring of IgE-mediatedmast cell activation onmicroelectronic cell sensor arrays. *J. Immunol. Methods* 292, 195–205.
11. Siemann, M., Koch-Dorfler, M., Rabenhorst, G., 2000. Clostridium difficile-associated diseases. The clinical courses of 18 fatal cases. *Intensive Care Med.* 26, 416–421.
12. Hamm, E.E., Voth, D.E., Ballard, J.D., 2006. Identification of Clostridium difficile toxin B cardiotoxicity using a zebrafish embryo model of intoxication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14176–14181.