

利用细胞阻抗和活细胞成像技术实时检测和表征病毒中和抗体

作者

Nancy Li, Yama Abassi,
Xiaobo Wang 和
Brandon J. Lamarche
安捷伦科技有限公司

前言

通过与病毒表面的特定蛋白质^[1]、碳水化合物^[2]和/或脂质^[3]结合，抗体利用空间位阻避免病毒与同源宿主细胞受体发生相互作用，从而防止感染。虽然可以通过许多生物物理分析研究抗体-抗原相互作用，但已有证据充分表明抗体与纯化抗原的结合能力并不总是与其在宿主细胞膜的复杂环境中的“中和”病毒（即阻断感染）能力一致。因此，监测宿主细胞在真正病毒感染时的功能分析是鉴定和表征病毒中和抗体的金标准。这些分析中最主要的是空斑减少中和试验 (PRNT)，用于评估纯化的病毒与抗体（或血清）预孵育后感染宿主细胞时产生的空斑数量的变化。虽然几十年来 PRNT 一直是金标准，但运行和量化 PRNT 需要大量手动操作时间，在许多研究中无法适用，尤其是需要更高通量的研究。作为 PRNT 的高效替代品，本研究使用 Agilent xCELLigence RTCA eSight 仪器的实时监测阻抗和活细胞成像来筛选中和抗体并量化抗体的中和效力。将病毒 + 抗体混合物添加到宿主细胞中后，便不再需要进行手动操作。连续采集数据，根据所用感染复数，可在短短 1 小时内检测到中和活性。由于灵敏度极高，阻抗读数可提供有关中和机制的信息，进而有可能区分阻止病毒细胞摄取的抗体以及在病毒已经进入细胞内部后非典型抑制病毒的抗体。这种 eSight 检测具有总体灵活性，适用于在各种情况下进行中和抗体的研究，包括但不限于疫苗开发、恢复期血浆检测和抗体工程。

eSight 检测原理

eSight 是目前世界上唯一一款同时使用细胞阻抗和活细胞成像分析细胞健康状况与行为的仪器。eSight 的专用耗材 96 孔 E-plate 的所有孔的底部都嵌有微金电极生物传感器阵列 (图 1)，实时阻抗检测跟踪细胞数量、细胞大小、细胞-基底粘附强度和细胞-细胞相互作用 (即屏障功能) 的变化。由于在典型的病毒病变效应 (CPE) 期间以上各项指标都会发生变化，因此阻抗可在病毒感染的整个连续过程中以高灵敏度提供宿主细胞健康状况的结果读数。通过阻抗信号的动力学和数量级变化，很容易检测到抗体介导的 CPE 抑制。显微镜观察窗位于微金电极生物传感器之间，使 eSight 能够同时采集活细胞图像，使用明场以及红色、绿色和蓝色荧光通道追踪 CPE，以及抗体对 CPE 的缓解 (图 1)。因此 eSight 可以对相同的细胞群从两个正交的角度实时监测抗体的中和活性，通过一次简单的检测提供了初步结果和确证性结果。

材料与amp;方法

用含有 10% 热灭活 FBS (康宁，部件号 35016CV) 的 DMEM 培养基 (ATCC; 部件号 30-2002) 在 37 °C/5% CO₂ 条件下进行细胞培养和检测。使用 Agilent eLenti Red (部件号 8711011) 转导 HEK293A 细胞 (Life Technologies, 部件号 R70507)，感染复数为 1，获得稳定表达核定位红色荧光蛋白 (RFP) 的 HEK293A-Red 细胞系。

感染后第 2 天至第 11 天，向生长培养基中加入 1 µg/mL 嘌呤霉素，以筛选转导子。腺病毒-GFP (Vector Biolabs; 部件号 1060) 属于腺病毒 5 型，编码细胞质 eGFP。编码 eGFP 在 CMV 启动子后表达。此病毒还删除了 E1 和 E3 区域，使其不具有复制能力。由于 HEK293A 细胞系将腺病毒 E1 和 E3 区域稳定地整合到其基因组中，因此支持此处使用的突变腺病毒复制。本研究使用的抗体和蛋白质如表 1 所示。使用了 Agilent E-Plate VIEW 微孔板 (部件号 00300601030)。

通常在 RTCA 检测前，将 50 µL 培养基加入 E-Plate 孔中，然后记录背景阻抗信号。随后用含有 10k 或 40k 宿主细胞的 50 µL 培养基在孔中接种。在室温下使细胞下沉 30 分钟后，将板转移到 eSight 仪器中，过夜监测细胞粘附和增殖。细胞接种 20 小时后，用 100 µL 含腺病毒-GFP (不同浓度) 的培养基处理每个孔，将部分培养基在 25 °C 下用中和抗体预孵育 45 分钟 (详细信息见“结果”部分)。数据采集工作持续至 120 小时。对于图 2 和图 3 所示的初始病毒 CPE 检测，使用 HEK293A 细胞，生长培养基含有稀释 500 倍的 Agilent eLive Red 染料 (部件号 8711040) 和 100 µM 维拉帕米 (外排泵抑制剂)。对于所有后续检测，使用 HEK293A-Red 细胞，不使用染料或维拉帕米。

对于所有检测，每 15 分钟测量一次阻抗，每小时采集一次图像。对每个孔，分

别采集四个通道的图像 (明场、红色和绿色)。暴露时间如下: 明场 (通过 eSight 软件自动优化)、红色 (300 ms)、绿色 (300 ms)。

结果与amp;讨论

使用阻抗监测病毒 CPEs

在进行病毒中和检测之前，重要的是要熟悉所使用的病毒和宿主间的完全 CPE。为此，将 HEK293A 细胞以 10k/孔的密度接种在 E-Plate 中，20 小时后感染连续稀释 5 倍的腺病毒-GFP。使用未感染的对照作为参考，图 2A 中的黑色阻抗曲线显示细胞接种后的前 5 小时内快速增加，表示发生细胞粘附。接下来是一个较慢的增殖阶段，持续至约 55 小时，之后趋于平稳，表明细胞已经完全汇合并覆盖了金生物传感器的整个表面积。需要注意的是，在 20 h 时从 eSight 中取出培养板并将 100 µL 无病毒培养基加到这些复孔中时，处于增殖阶段的曲线呈现瞬时的下降。

在非常低的病毒浓度下，其阻抗曲线与阴性对照的阻抗曲线基本相同。将病毒浓度提高到 1.1×10^3 pfu/mL 后，可以观察到轻微的 CPE，阻抗曲线在约 100 小时开始低于阴性对照 (图 2A; 蓝绿色曲线)。根据 eSight 采集的照片确定在 20 h 时间点添加病毒时存在的红色宿主细胞的实际数量，计算出 1.1×10^3 pfu/mL 样品的感染复数 (MOI) 为 0.0082。虽然该 MOI 产生的 CPE 正好处于该病毒+宿主细胞组合的

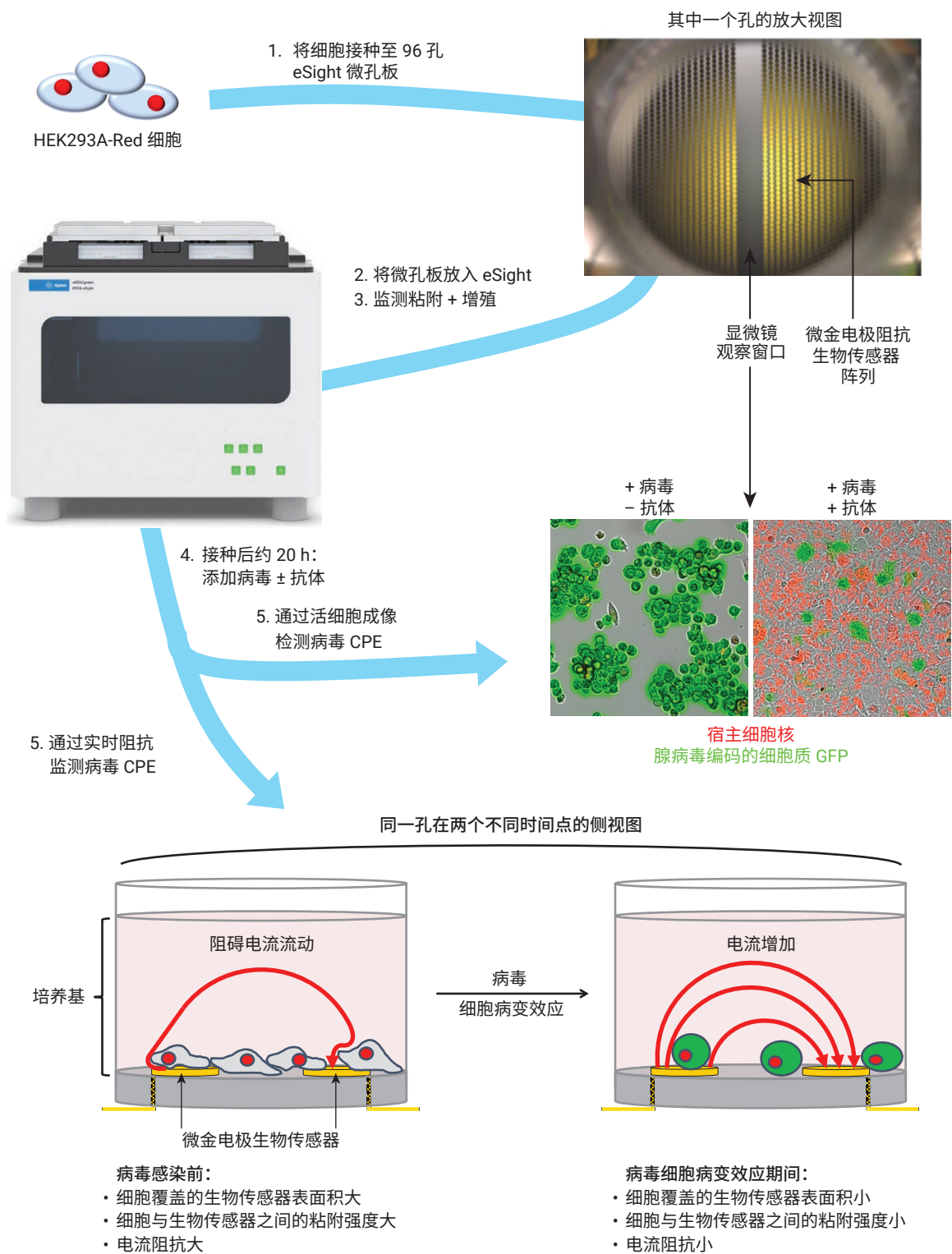
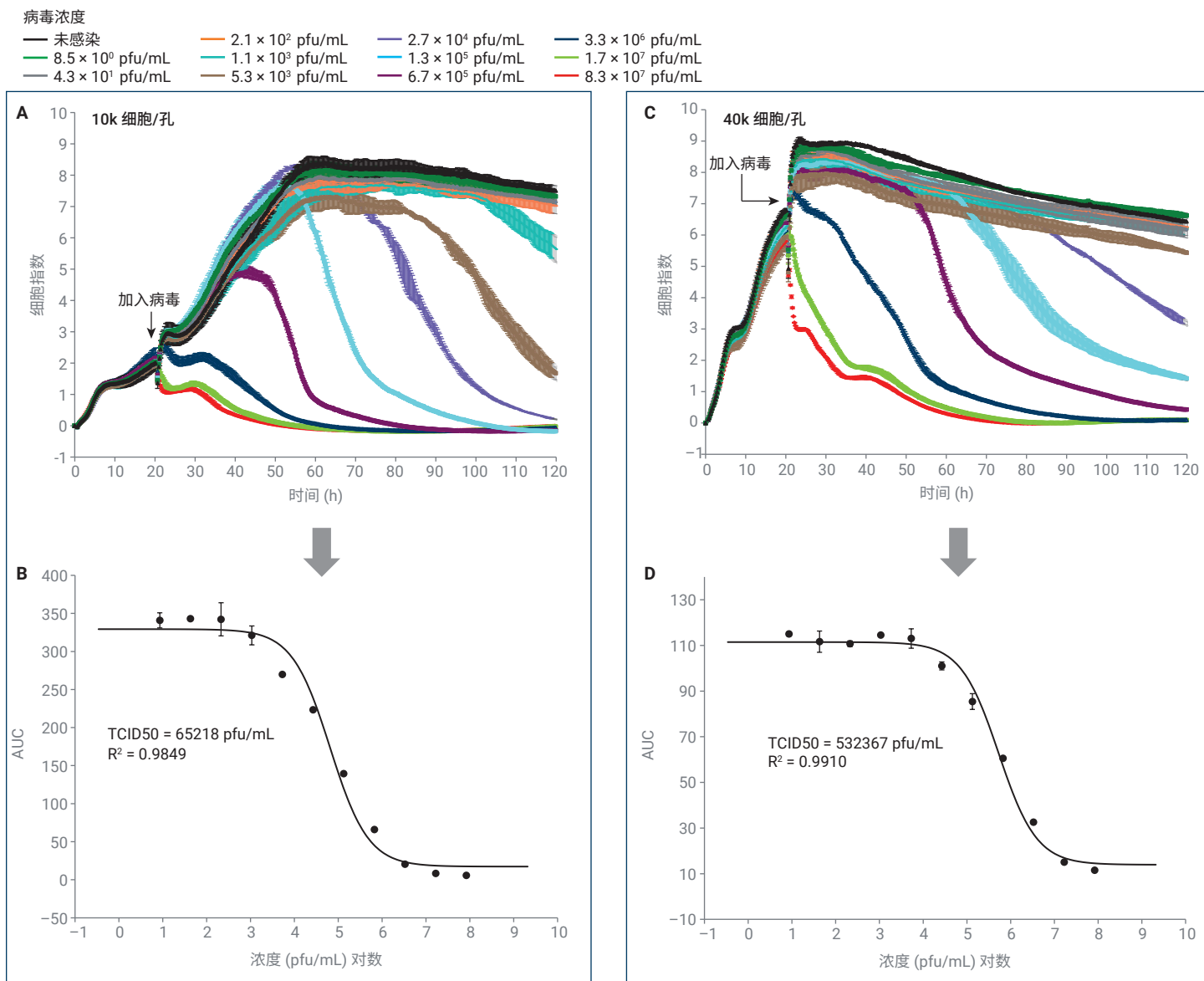


图 1. 用于实时鉴定和表征病毒中和抗体的 eSight 工作流程。详见文字说明



E

所有后续检测使用的所选条件			
细胞接种密度	病毒浓度 (pfu/mL)	病毒浓度 (TCID50)	病毒浓度 (MOI*)
10k 细胞/孔	1.3×10^5	2	1
	8.3×10^7	1280	641
40k 细胞/孔	1.3×10^5	0.25	0.4
	8.3×10^7	156	222

*根据已知的病毒浓度和添加病毒时存在的实际细胞数（由 eSight 计数）计算得出 MOI

图 2. 基于阻抗监测和定量腺病毒-GFP 诱导的细胞病变效应。(A) 使用不同病毒浓度感染 10k 细胞/孔密度接种的 HEK293A 细胞时，阻抗随时间的变化。误差线 = 两个重复孔的标准偏差；由于时间分辨率高，误差线紧密地挤在一起，因此所示阻抗曲线的粗细反映了重现性。(C-D) 类似于图“A”和“B”，但细胞接种密度为 40k 细胞/孔。(E) 选择用于中和抗体检测的四种感染条件汇总，如下所示。病毒浓度，单位 TCID50 = (病毒浓度，单位 pfu/mL)/(图“B”或图“D”中的 TCID50 值)。病毒浓度，单位 MOI = (病毒浓度，单位 pfu/mL) × (0.1 mL)/(感染时实际存在的细胞数‡)。‡ 该数字并非感染前 20 小时接种的细胞数量，而是基于添加病毒前直接从 eSight 获取的细胞计数

阻抗可检测到的极限，但需要重点知道，简单地将实验持续时间延长到 120 小时以上就可使 CPE 更充分地表现出来，从而能检测到更低浓度的病毒（数据未显示）。只要孔中感染了一个活性病毒颗粒，就可以通过阻抗检测到 CPE。

通过 5x 的梯度稀释的阻抗曲线可以清楚地看到病毒量与阻抗信号降低速率的强相关性。在病毒浓度为 1.3×10^5 pfu/mL (图 2A; 浅蓝色曲线) 时，阻抗信号在 120 小时时间点前一直下降到零，表明这些重复孔中的整个细胞群已被杀死。请注意，在三种最高浓度的病毒中，阻抗曲线（红色、石灰绿色和深蓝色）呈双相形，在最初几个小时内极快下降，然后略有“恢复”，之后更平缓地下降。下文的“结果”部分将详细讨论这些双相曲线的物理相关性。

将图 2A 中阻抗的曲线下面积相对于病毒浓度作图，以此评估腺病毒-GFP 的宿主细胞杀伤效果。图 2B 中相应的剂量-响应曲线为典型的 S 型曲线，具有出色的拟合性。该曲线的拐点在此处定义为“TCID₅₀”（达到 50% 杀伤反应所需的组织培养感染剂量）。结果表明，对于此处使用的条件，需要 65218 pfu/mL 的腺病毒-GFP 浓度才能在 120 小时的时间点杀死孔中 50% 的细胞。

当使用相同的腺病毒稀释系列感染接种了四倍细胞（40k/孔）的孔时，阻抗的总体趋势大致相似（图 2C）。一个重要的区别是，对于给定的病毒浓度，10k 细胞/孔的 CPE 比 40k 细胞/孔的 CPE 更强。在比较低病毒浓度的阻抗曲线（图 2A 和 2C）时，以及在比较针对每个细胞接种密度计算的 TCID₅₀ 值时，这一点尤为明显：10k 和 40k 细胞/孔分别为 65218 与 532367 pfu/mL (图 2B 和 2D)。腺病毒-GFP 在 10k 细胞/孔下比在 40k 细胞/孔下杀伤效果更高，至少部分是因为 MOI：对于固定的病毒稀释，10k 细胞/孔条件下的 MOI 高于 40k 细胞/孔条件下的 MOI。两种不同细胞接种密度下呈现了不同的杀伤效果，也可能反映了宿主细胞在感染早期阶段的复制状态。当细胞以 10k/孔的密度接种时，细胞有能力继续增殖到约 55 小时的时间点。反之，当细胞以 40k/孔的密度接种时，细胞仅可增殖到约 25 小时的时间点（比较图 2A 和 2C 中黑色阻抗曲线平台的时间）。由于腺病毒对活跃分裂细胞的杀伤效果更高^[4]，因此在 10k 细胞/孔条件下引发强 CPE 所需的病毒应少于 40k 细胞/孔。

上述数据证明阻抗可以轻松用于连续和定量监测病毒 CPE，并为阻抗信号的动力学和数量级随细胞密度和病毒浓度的变化提供了参考框架。虽然不同病毒 + 宿主细胞系统的具体情况会有所不同，但对于不同的病毒家族均具有此处观察到的一般趋势。

使用该实验检测/表征中和抗体，仅需要将抗体与病毒混合物加到宿主细胞前进行预孵育。在病毒能够诱导 CPE 的条件下，有效的中和抗体将减轻病毒诱导的阻抗信号下降。中和的程度以及可检测到中和的起始时间，将根据不同的实验条件有所差异。为证明这种基于阻抗的方法在较宽条件范围下的有效性，下列章节中进行的中和实验在 10k 和 40k 细胞/孔下以及低 (1.3×10^5 pfu/mL) 和高 (8.3×10^7 pfu/mL) 病毒浓度下进行。图 2E 汇总了四种条件，同时显示了病毒浓度相关 MOI 和 TCID₅₀（有关如何计算这些浓度的说明，请参阅图 2 的图例）。

通过成像证实阻抗

重要的是，eSight 采集的活细胞图像证实阻抗信号准确反映了宿主细胞在整个 CPE 过程中的连续物理状态变化（图 3A 和 3B）。虽然明场成像本身就足以跟踪 CPE 的进展，但纳入的红色通道（宿主细胞核）和绿色通道（病毒编码的 GFP）

都可以改善美观性、增加信息丰富度。例如，图 3C 显示了通过阻抗观察到的宿主细胞死亡与病毒 GFP 表达之间的负相关性。与预期一致，这些数据表明病毒基因表达先于宿主细胞的死亡级联表型。值得注意的是，即使在 120 小时的时间点仍然存在细胞，阻抗信号也已降至 0

（图 3A 和 3B）。由于细胞阻抗是由金生物传感器和宿主细胞的双层磷脂之间的密切相互作用引起，因此该数据表明，在晚期时间点仍然存在的细胞完全脱离了孔底。

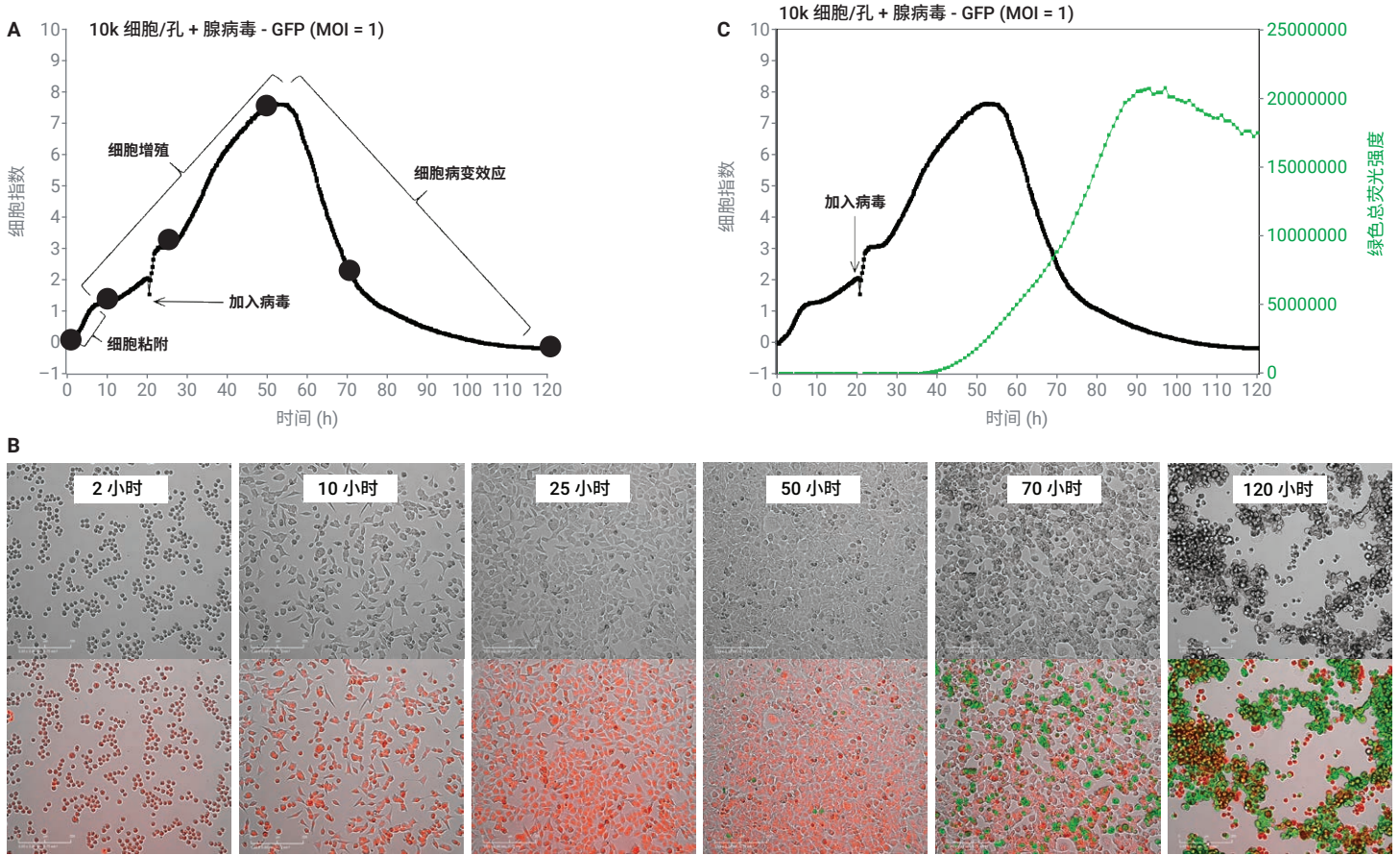


图 3. 结合 eSight 的阻抗和基于图像的读数，实时监测腺病毒-GFP 细胞病变效应。(A) 在 MOI = 1 的情况下，感染腺病毒-GFP 的 10k 细胞/孔的单阻抗曲线。显示了曲线的不同阶段以及作为其基础的细胞现象。黑点对应于图 B 中所显示的时间点。(B) 图 A 阻抗曲线中关键时间点的照片。上图为仅明场，下图包括红色通道（宿主细胞核）和绿色通道（病毒编码的 GFP）。比例尺 = 200 μ m。(C) 并列展示基于阻抗的细胞杀伤检测（黑色曲线）与基于图像的病毒 GFP 表达检测（绿色曲线）

如果更倾向于用荧光观察靶细胞，最直接的方法就是简单地将 Agilent eLive Red 染料添加到生长培养基中。这种染料在扩散穿过细胞膜并与 dsDNA 结合前可保持非荧光。虽然对大多数细胞类型有用，但这种染料标记部分细胞（包括 HEK293A）的效率较低（图 4；左图）。为了解决这个问题，可以将药物维拉帕米添加至生长培养基中，阻断主动从细胞分泌染料分子的外排泵。虽然方法有效（图 4；中间图），但验证加入的维拉帕米不会干扰期望研究的生物学始终很重要。在这种情况下，发现添加的维拉帕米使 HEK293A 细胞对腺病毒介导的杀伤更敏感（数据未显示）。这与最近对溶瘤腺病毒的研究结果一致^[5]，同时考虑到维拉帕米可抑制有机阴离子转运体 2^[6]（一种腺病毒上调蛋白质），此发现并未超出预期^[7]。在这类研究中，CPE 仅用于检测抗体是否具有中和活性，因此杀伤效果的系统性降低不会影响实验目的。然而 HEK293A 细胞设计为表达核定位的红色荧光蛋白（图 4；右图），作为使用维拉帕米更保守的替代方案。这些细胞用于所有后续实验，以下简称此细胞为 HEK293A-Red。

检测中和活性：阳性和阴性对照

使用抗体克隆 27F11 作为阴性对照。虽然这种抗体与腺病毒六邻体蛋白结合，但会特异性地识别仅暴露于衣壳内部的表位（图 5A）。因此，抗体 27F11 应不能减轻腺病毒-GFP 诱导的细胞病变效应。与预期一致，在 25 °C 下用 27F11 (3 µg/mL) 预孵育腺病毒-GFP 45 分钟，对于所有四种细胞密度和病毒浓度组合，

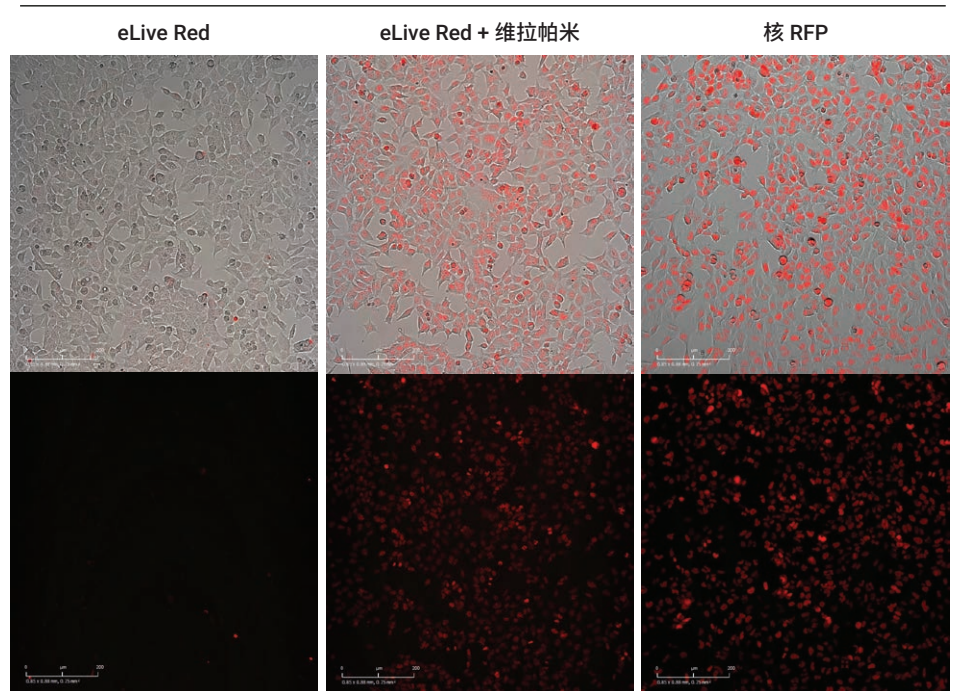


图 4. 用 eLive Red、eLive Red + 维拉帕米或通过稳定表达核 RFP（通过慢病毒转导）标记 HEK293A 细胞

检测到的宿主细胞杀伤程度或速率几乎无影响（图 5B 至 5E）。

腺病毒主要通过其纤维蛋白与宿主细胞膜中柯萨奇腺病毒受体 (CAR) 的相互作用接触宿主细胞（图 6A）。作为中和活性的阳性对照，在 25 °C 下用腺病毒-GFP 预孵育 30 µg/mL 的 CAR 可溶性结构域 45 分钟，然后将混合物加入宿主细胞。当使用 40k 细胞/孔以及 MOI = 222 的高病毒浓度时，可溶性 CAR 对病毒杀伤效果的影响最小（图 6B）。与此形成鲜明对比的是，当使用 40k 细胞/孔以及 MOI = 0.4 的低病毒浓度时，可溶性 CAR 完全阻断腺病

毒-GFP 杀死宿主细胞的能力（图 6C）。这突出了使用适当实验条件的重要性，即病毒的数量足以诱导可观测到的 CPE，但又不能高到完全覆盖中和抗体的中和作用。类似地，当处理 10k 细胞/孔时，可溶性 CAR 在病毒浓度高 (MOI = 641) 时显示出极小的中和活性，但在病毒浓度低 (MOI = 1) 时显示出强大的中和活性（图 6D 和 6E）。最后请注意，可溶性 CAR 在 40k 细胞/孔条件下比 10k 细胞/孔条件下的中和效果更高。这再次证明，虽然中和活性可检测，但中和的幅度/动力学也会根据实验的确切条件而变化。

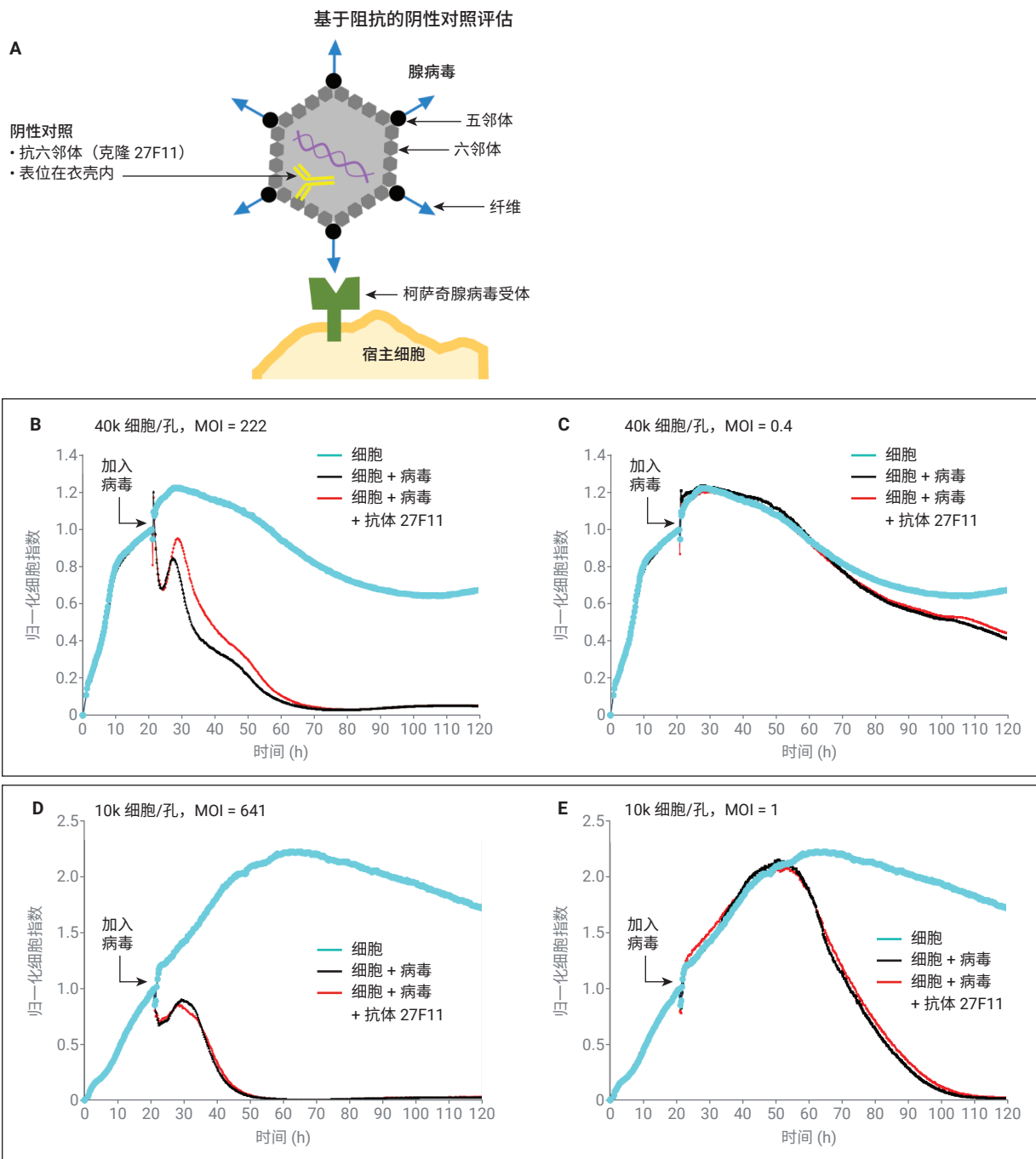


图 5. 基于阻抗的阴性对照评估。(A) 示意图显示关键腺病毒蛋白，宿主细胞膜中的腺病毒受体以及阴性对照抗体（黄色；与仅暴露于腺病毒衣壳内部的表位结合）的结合位点。(B,C) 在使用或不使用抗体 27F11 的预孵育后，在 MOI = 222 或 0.4 时感染 40k 细胞/孔的阻抗响应。(D,E) 在使用或不使用抗体 27F11 的预孵育后，在 MOI = 641 或 1 时感染 10k 细胞/孔的阻抗响应。所用抗体 27F11 浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。请参阅图 2 的图例，了解如何确定确切的 MOI

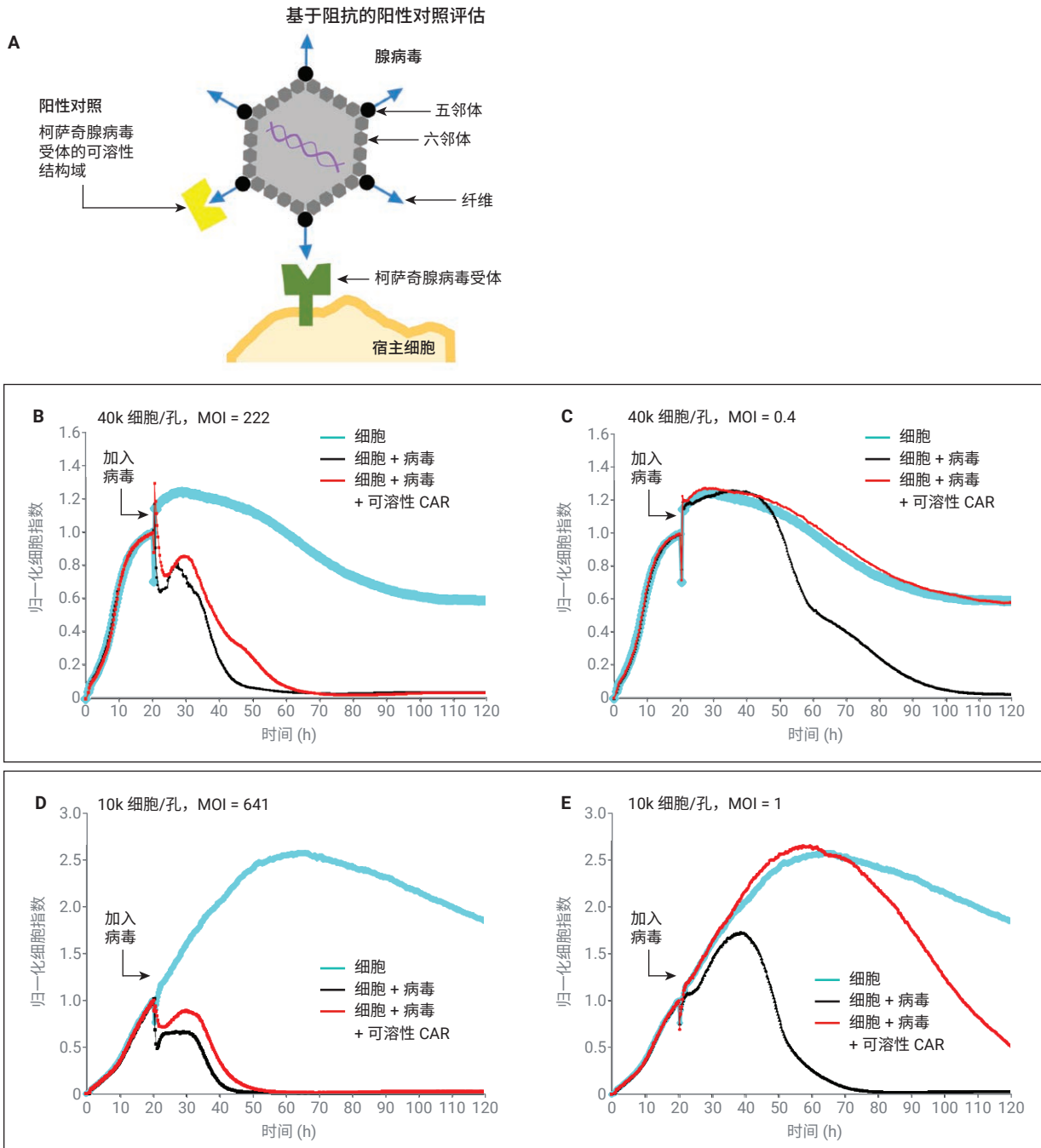


图 6. 基于阻抗的阳性对照评估。(A) 示意图显示了关键的腺病毒蛋白，宿主细胞膜中的腺病毒受体，以及 CAR 受体（黄色）的可溶性结构域与腺病毒纤维蛋白的结合。(B,C) 在使用或不使用可溶性 CAR 的预孵育后，在 MOI = 222 或 0.4 时感染 40k 细胞/孔的阻抗响应。(D,E) 在使用或不使用可溶性 CAR 的预孵育后，在 MOI = 641 或 1 时感染 10k 细胞/孔的阻抗响应。所用 CAR 可溶性结构域浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。请参阅图 2 的图例，了解如何确定确切的 MOI

作为上述阻抗结果的佐证，图 7 显示了未感染细胞以及感染腺病毒-GFP 细胞的图像。感染腺病毒-GFP 的细胞又分为是否与 CAR 的可溶性结构域预先孵育。未经处理的病毒会引起显著的 CPE，其中 100% 的细胞对病毒编码的 GFP 呈阳性，而用 CAR 预处理的病毒无法引发 CPE，只有一小部分细胞呈 GFP 阳性。

筛选中和抗体

接下来筛选了七种抗体，评估其减轻腺病毒-GFP 的 CPE 的能力。其中包括抗完整腺病毒 5 型衣壳的多克隆抗体、对腺病毒六邻体和纤维蛋白具有特异性的单克隆抗体，以及抗 CAR 的单克隆抗体。检测形式与上述相似，在 25 °C 下进行 45 分钟的预孵育步骤，抗体浓度

为 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。抗体 ab6982 例外，该抗体使用时稀释 25 倍（制造商未提供此多克隆抗体的实际浓度）。当在 10k 和 40k 细胞/孔中使用低病毒浓度时，如果抗体在 120 小时的时间点抑制 CPE > 50%，则认为是一种有效的中和剂。^{*}使用这个标准，筛选出两种抗体为有效中和抗体（表 1）。

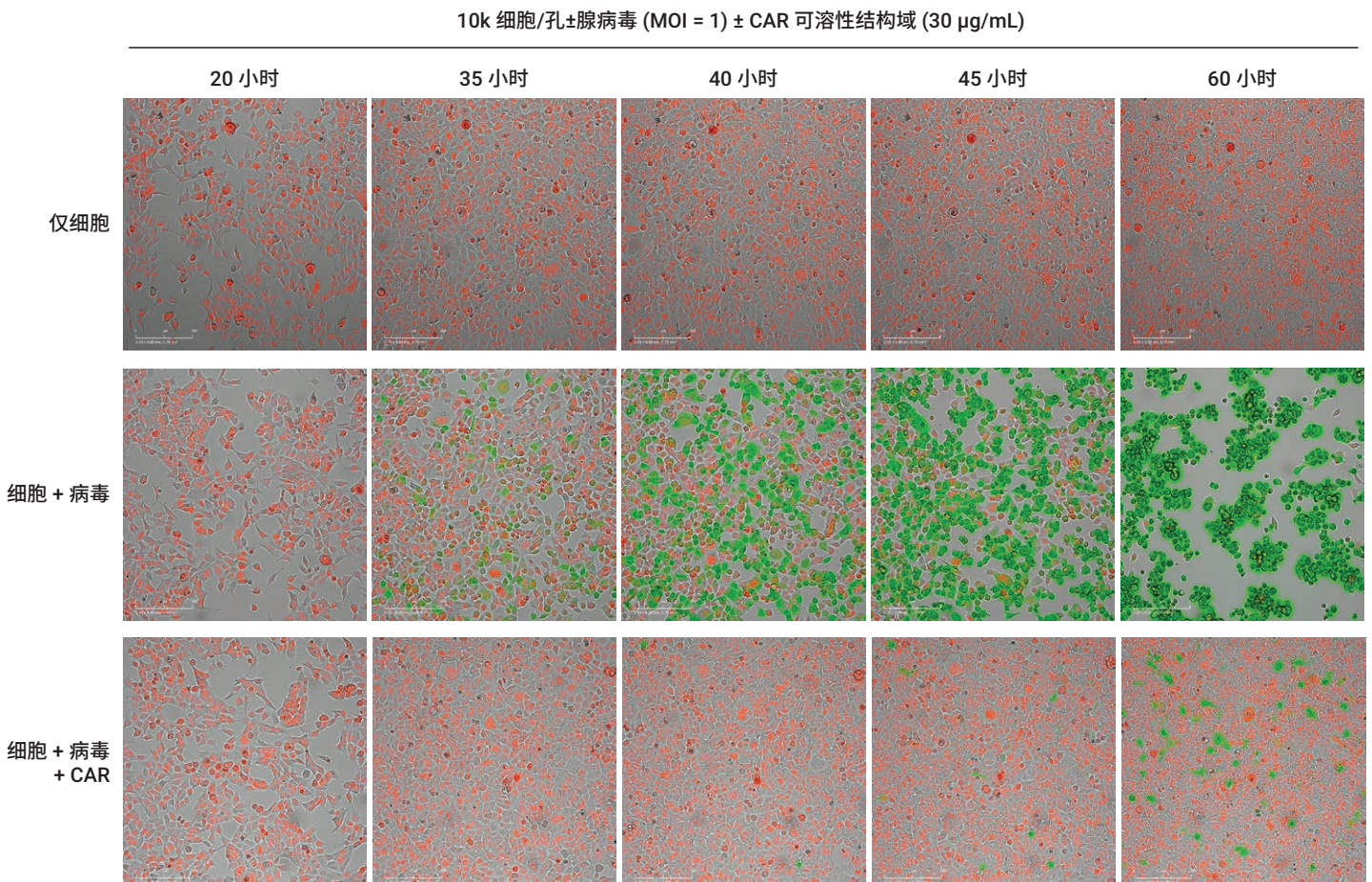


图 7. 基于图像监测 CAR (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 可溶性结构域中和 HEK293A-Red 细胞 (10k/孔) 感染的腺病毒-GFP (MOI = 1) 的效力。详见文字说明。比例尺 = 200 μm

表征中和抗体的效力

通过将腺病毒-GFP 与 4.9 至 10000 ng/mL 的不同浓度抗体预孵育的重复测定来评估需要筛选的其中一种抗体-抗六邻体单克隆抗体 9C12 的中和效力。尽管在所有四种细胞密度和病毒浓度组合下进行了实验，但图 8A 仅关注 10k 细胞/孔+ MOI = 1 条件。使用此条件，未感染的细胞在约 50 小时达到完全汇合后，到 120 小时阻抗信号逐渐下降（黑色粗数据曲线）。这表明未受感染的细胞在后期变得不健康。重要的是，病毒的存在会导致阻抗信号（粗的灰色数据曲线）更快下降。在 4.9 ng/mL 浓度下使用抗体 9C12 进行预孵育，对宿主细胞杀伤率的影响最小（细的紫色数据曲线）。然而，9C12 浓度范围为 9.8–10000 ng/mL 时，导致病毒的杀伤能力逐渐降低（图 8A）。将 120 小时时间点处的阻抗信号值相对于抗体浓度作图，得到图 8B 中的剂量响应曲线，表明抗体 9C12 的 IC₅₀ 为 67 ng/mL。

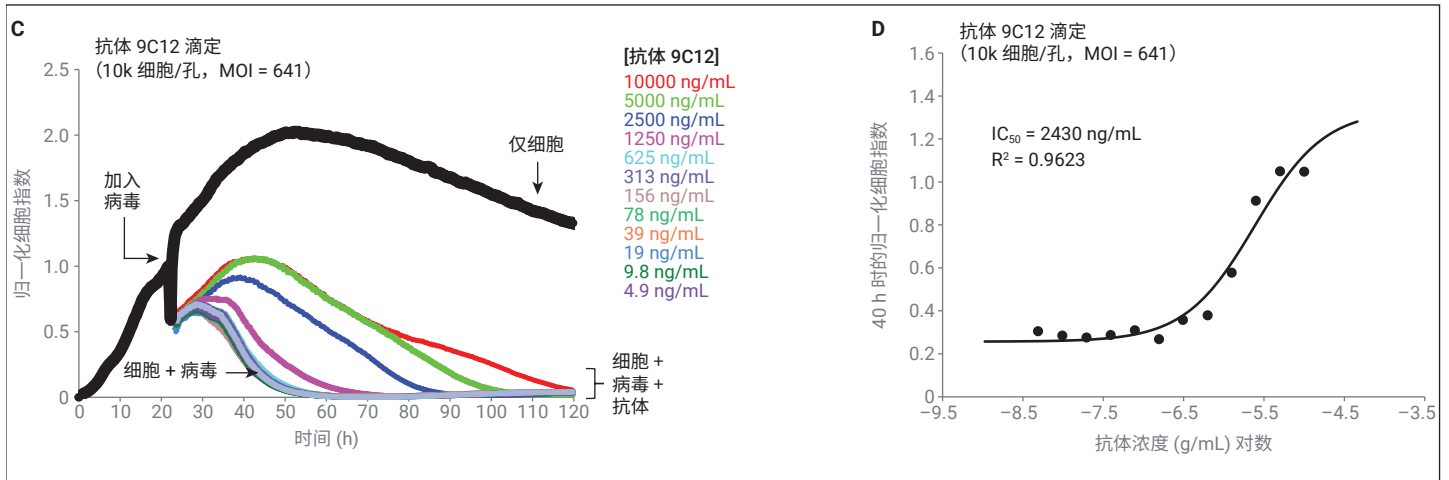
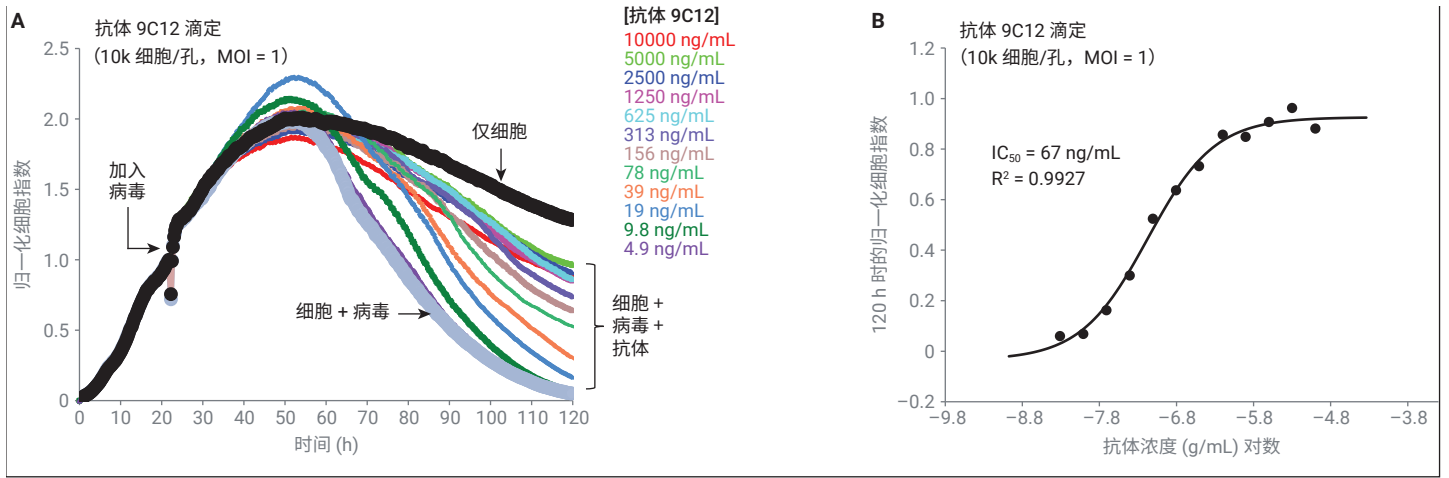
表 1. 中和抗体筛选结果汇总

抗体所对应的靶蛋白	抗体克隆	中和活性
腺病毒 5 完整衣壳	ab6982 (abcam)	有
腺病毒六邻体	TC31-9C12.C9 (U. Iowa Hybridoma Bank)	有
腺病毒六邻体	TC31-27F11.C2 (U. Iowa Hybridoma Bank)	无
腺病毒六邻体	8C4 (abcam)	无
腺病毒六邻体	1E11 (abcam)	无
腺病毒纤维	4D2 (abcam)	无
腺病毒纤维	3F13 (abcam)	无
腺病毒纤维	ab168893 (abcam) 这不是抗体，而是柯萨奇腺病毒受体的可溶性结构域。	有
柯萨奇腺病毒受体	EPR23305-44 (abcam)	无

使用相同的细胞接种密度（10 k/孔）重复抗体 9C12 滴定，病毒浓度从 MOI = 1 增加到 MOI = 641，此时杀伤动力学急剧升高（图 8C），并且不再适用基于 120 小时时间点的阻抗值产生剂量响应曲线。相反，在这些条件下，通过分析 40 小时时间点的阻抗值获得最佳拟合，从而得到 2430 ng/mL 的 IC₅₀ 值（图 8D）。随着病毒浓度的增加，在较高的（40 k/孔）细胞接种密度下也观察到 IC₅₀ 的增加（图 8E），并预计：在实验中使用的病毒越多，实现中和需要的抗体越多。有趣的是，与 40k 细胞/孔相比，10k 细胞/孔条件下需要更多的抗体来中和病毒，这再次突出了结果的条件依赖性，强调了在尝试比较不同抗体的效果时进行标准化的必要性。

最后，值得注意的是，抗体具有直接与细胞相互作用的潜力，无论是否与病毒发生相互作用。因此需要始终加入细胞 + 抗体对照（即在没有病毒的情况下）。发现在整个浓度范围内，用抗体 9C12 处理 HEK293A-Red 细胞对细胞阻抗信号的影响最小（数据未显示）。这有助于确证图 8 中观察到中和的合理性，表明其不仅仅是抗体直接与宿主细胞相互作用的伪影。

* 其他人无需使用此定义。用户可调整认定为有效中和剂的标准



E 在四种不同感染条件下中和腺病毒-GFP 的抗体 9C12 的 IC_{50}

	高病毒浓度	低病毒浓度
40k 细胞/孔	1150 ng/mL	24 ng/mL
10k 细胞/孔	2430 ng/mL	67 ng/mL

图 8. 基于阻抗定量中和效力。(A) 以 4.9–10000 ng/mL 的单克隆抗体 9C12 浓度预孵育 HEK293A-Red 细胞 (10k/孔) 后, 腺病毒-GFP (MOI = 1) 感染该细胞的情况。(B) 剂量-响应曲线基于 120 小时时间点处的阻抗曲线值随抗体浓度的变化。(C,D) 与图 A 和 B 相似, 但病毒浓度更高, MOI = 641。(E) 在所有四种细胞密度和病毒浓度组合下检测的抗体 9C12 IC_{50} 值汇总

快速检测中和

对于标准的空斑减少中和试验 (PRNT), 需要等待约 3 至 12 天才能准确评估空斑。关键是需要留出充足的时间, 使病毒从最初感染的细胞向外扩散到邻近的细胞, 其形成一个可通过光学手段检测到的强大空斑。但若使用阻抗, 即使是在感染的早期阶段也可检测到。当 10k 细胞/孔在 MOI = 1 下感染腺病毒-GFP 时, 只需 15 小时即可得到明显的细胞病变效应 (图 9A)。抗衣壳抗体 ab6982 是筛选库中的第二个待筛选抗体, 在病毒添加后 15 小时的时间点中和活性也将可检出 (即图 9A 中红色和黑色阻抗曲线开始彼此分离的位置)。重要的是, 可检测到中和的起始时间点与所用病毒的浓度高度相关。将病毒浓度从 MOI = 1 增加到

MOI = 641 后, 仅 1 小时内即出现明显 CPE (图 9B)。虽然这种阻抗的快速下降与病毒诱导的细胞收缩有关, 并且发生在病毒 GFP 表达前数小时 (数据未显示), 但仍需更多研究来表征这种机制。由于在包括包膜和非包膜病毒在内的多种病毒家族中均观察到这种现象, 因此使用高病毒浓度似乎可以作为通用方法, 进一步减少通过阻抗识别中和活性所需的时间。

确定不同的作用机制

关于中和抗体发挥作用的最常见观点可能是, 中和抗体与病毒颗粒的表面结合, 在空间上阻断病毒与其同源受体相互作用的能力, 阻止病毒被摄取到细胞中。抗体 ab6982 似乎通过以上机制发挥作用: 高浓度 (MOI = 641) 未经处理的腺病毒-GFP

会导致阻抗立即下降, 而 ab6982 则阻止了这种下降 (图 10A) 和病毒 GFP 的下游表达 (未显示)。相比之下, 还鉴定了具有替代中和机制的抗体。例如, 已证明抗体 9C12 与腺病毒六邻体蛋白结合, 并通过内吞途径一直附着在病毒颗粒上。当病毒颗粒从内体逸出时, 细胞质抗体受体 TRIM21 识别抗体 9C12 的恒定区, 导致病毒颗粒被蛋白酶体降解^[8-10]。在阻抗信号中体现了这种非典型的作用机制: 9C12 无法阻断与病毒摄取相关的初始阻抗快速下降, 但大大降低了后续细胞杀伤的动力学 (图 10B)。这种区分不同抑制机制的能力源自 eSight 读数的连续性, 传统的病毒中和实验无法实现这一点。

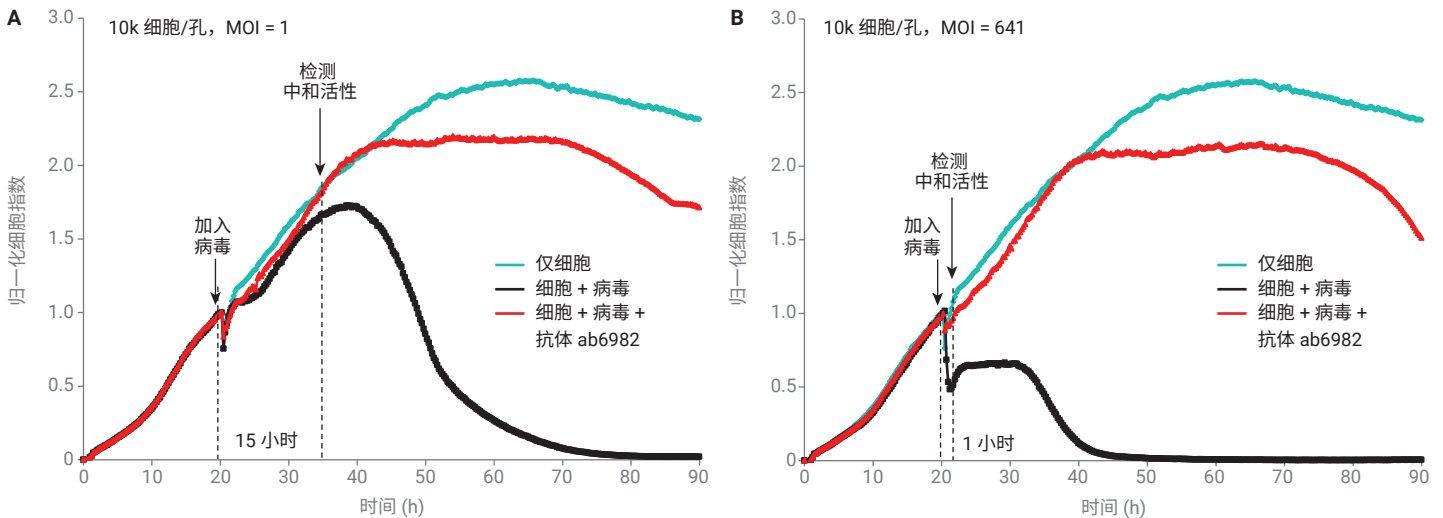


图 9. 通过阻抗检测病毒中和活性所需的时间取决于病毒 MOI。(A) 感染条件为 10k 细胞/孔、MOI = 1 时, 需要约 15 小时才能检测到抗体 ab6982 的中和活性。(B) 感染条件为 10k 细胞/孔、MOI = 641 时, 需要约 1 小时即可检测到抗体 ab6982 的中和活性。在病毒 + 抗体预孵育步骤中, 所用 ab6982 稀释倍数为 25 倍

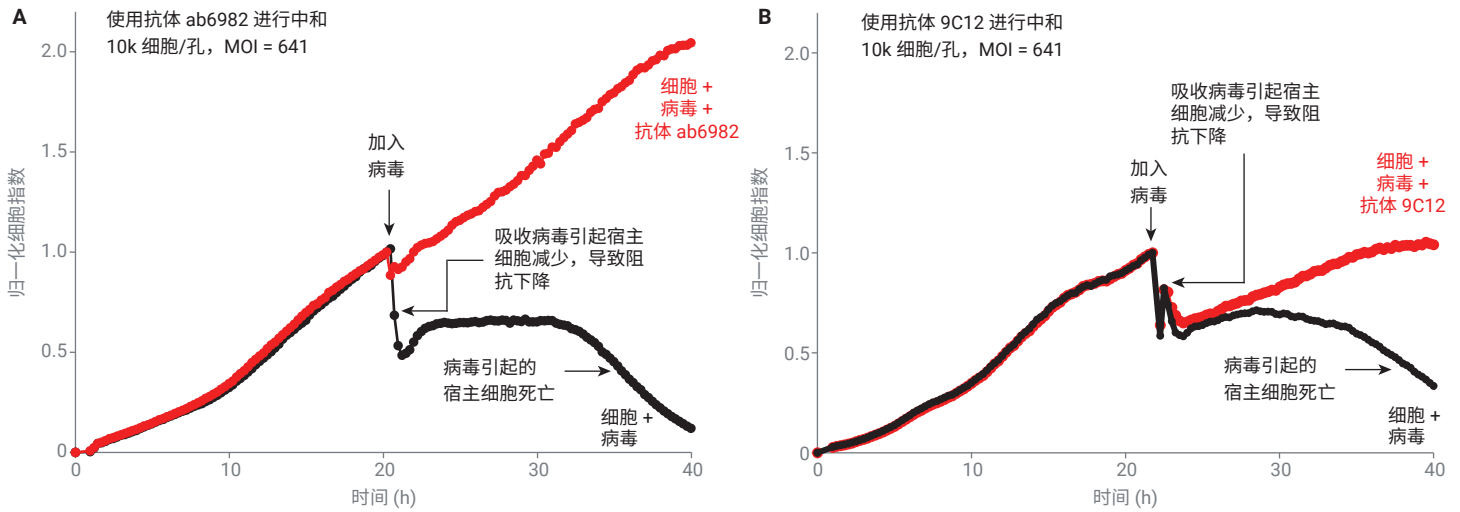


图 10. 识别抗体介导病毒中和的不同机制。(A) 多克隆抗体 ab6982 阻碍病毒介导的阻抗快速下降以及后续较慢的细胞杀伤阶段。总之，这些数据与 9C12 阻断细胞摄取病毒的数据一致。(B) 单克隆抗体 9C12 未能阻断病毒介导的阻抗快速下降，但随后抑制了宿主细胞的杀伤。总之，这与 9C12 通过腺病毒内吞途径，然后引起细胞质中病毒颗粒的蛋白酶降解的能力一致

结论

本文数据清楚表明 eSight 能够筛选抗体的病毒中和活性，并随后量化配对的效力。使用本应用简报中展示的实验方案，已成功对各种病毒应用阻抗，包括包膜和非包膜病毒，以及影响宿主细胞裂解或融合的病毒。该检测方法的显著特征是简便，所需手动操作时间极少。在典型检测形式中，接种宿主细胞，之后使其粘附和增殖过夜，然后加入病毒 + 抗体溶液。无需额外的手动操作或处理步骤。但重要的是，该方案中的检测方法高度适应各种变化 — 包括在悬浮液中感染细胞，然后将细胞 + 病毒混合物转移到 E-Plate 中。通过使用粘附抗体首先将细胞捕获到孔底，阻抗也可用于研究非自然粘附的宿主细胞类型中 CPE 的中和抗体缓解。

此处数据的呈现方式反映了典型 eSight 用户的方法：阻抗作为初步/定量读数，图像用于定性确认。不过也有可能实现基于图像的定量。图 11 显示了抗体 9C12 对 10k 细胞/孔 + MOI = 1 检测条件影响的三种不同类型的基于图像的分析。在图 A 中，很明显对于这种特殊情况无法使用明场汇合百分比分析：CPE 不够严重，不足以转化为汇合的实质性变化（因为许多死亡/脱色细胞仍停留在孔底；见图 11A 插入的照片）。对比图 8A，通过阻抗很容易检测到抗体 9C12 在相同检测条件下的影响。这种差异突出了阻抗的灵敏度 — 它是复合读数的结果，反映了细胞数量、大小、附着强度和屏障功能的变化。在图 11B 中，跟踪随时间变化的红色细胞核数量有效地阐明了 9C12 的中和活性。其原因是，即使许多死细胞在孔

中停留了 120 个小时，也会在死亡时失去细胞核的红色荧光（见图 11A 插入的照片）。最后，监测病毒编码的 GFP 的总荧光强度 (TII*) 是量化 9C12 中和活性非常有效的方法（图 11C）。重要的是，将红色细胞核的曲线下面积和绿色 TII 曲线下面积绘制为抗体 9C12 浓度的函数时，会得到出色的剂量响应曲线（图 11D），与使用阻抗确定的值相比，IC₅₀ 值仅相差 2-3 倍（分别为 19、30 和 67 ng/mL）（图 11D）。

考虑到这是一种基于细胞的检测，不同读数之间的相关性非常好，至少有部分原因是由于从相同的细胞群中获取了阻抗和成像数据。虽然认为使用正交方法生成初步

* 总荧光强度为从孔底采集的所有绿光的总和。因此反映了绿色细胞的数量以及每个绿色细胞中绿色信号的强度

结果和确证性结果为最佳方案，但由于所需的时间和成本，实际很少用正交方法。而借助 eSight，通过一次简单检测就可以同时提供初步和确证性结果。

虽然使用 eSight 监测病毒编码的荧光团是研究病毒中和抗体非常有效的方法（图 11C），但这种方法只适用于经过适

当设计的一小部分病毒。使用荧光标记的宿主细胞是一种有用且通常更容易获得的替代方法。第三种选择是外源荧光染料，此方法并非对所有宿主细胞类型都有用，应注意确保染料不会造成功能上的破坏（图 4 和相关讨论）。

当使用低浓度的腺病毒-GFP 时，病毒 GFP 的表达先于任何病毒诱导的阻抗变化（图 3C）。相比之下，中高浓度的病毒在病毒 GFP 表达之前约 5 小时（图 2A、2C 和 9B）导致阻抗立即下降（数据未显示）。如果非常需要快速得到结果，并且

HEK293A-Red (10k/孔) + 腺病毒-GFP (MOI = 1) 的 3 种基于图像的分析

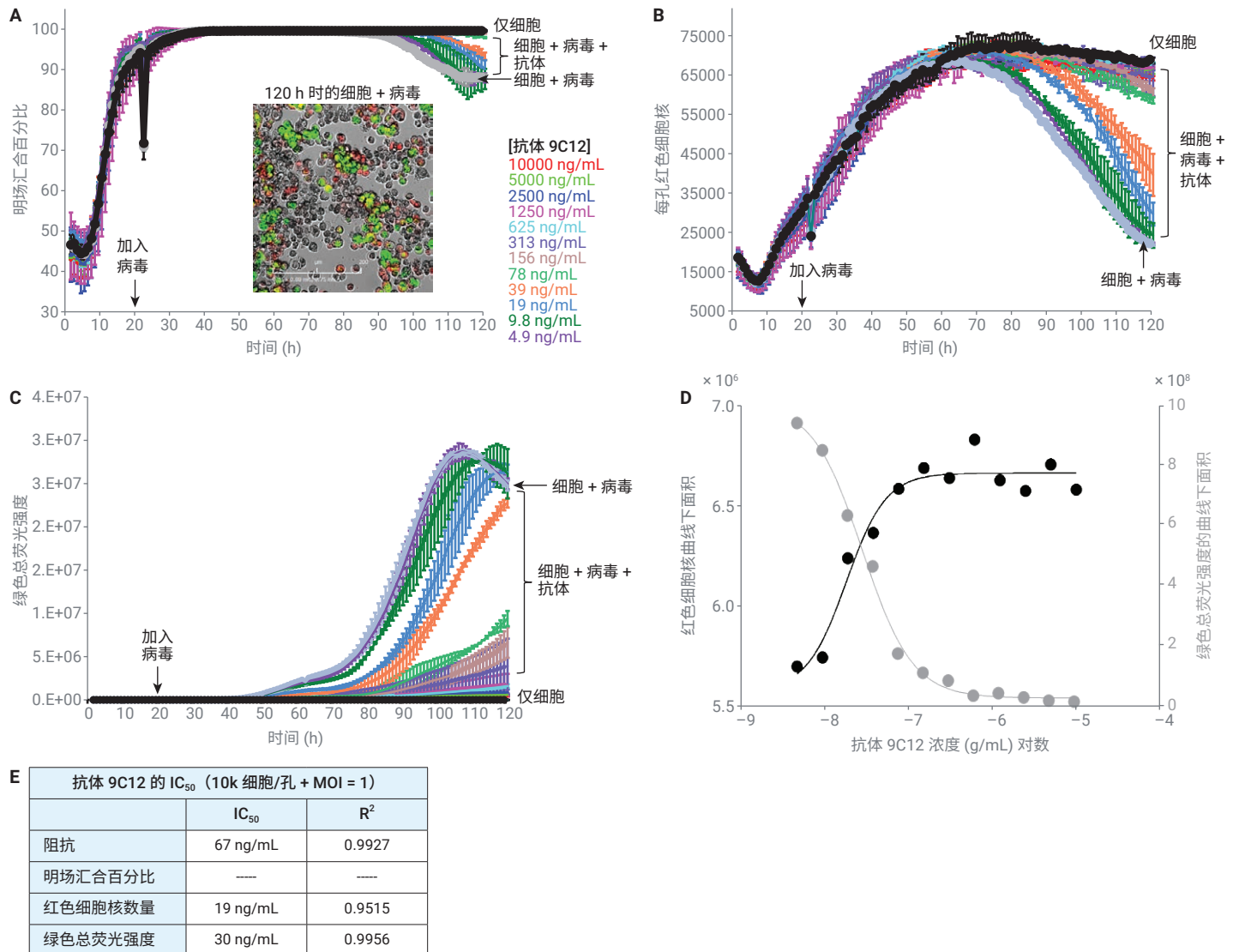


图 11. 基于图像定量分析在 10k 细胞/孔 + MOI = 1 检测条件下抗体 9C12 的中和效价。(A) 明场汇合百分比随时间的变化。插入的照片为在存在抗体的情况下感染病毒的细胞（120 小时时间点）。比例尺 = 200 μm 。(B) 红色细胞核数量随时间的变化。(C) 绿色总荧光强度随时间的变化。(D) 基于图 B 的红色细胞核曲线下面积或图 C 的绿色总荧光强度曲线的剂量-响应曲线。(E) 在 10k 细胞/孔 + MOI = 1 检测条件下，使用阻抗与基于图像的分析确定抗体 9C12 IC_{50} 值，并进行比较

如果可以获得高浓度病毒，阻抗可实现真正的功能检测，以出众的速度识别中和活性。此外，使用传统方法无法获得阻抗提供的关于抗体中和机制的信息（图 10）。

无论是使用实时阻抗、活细胞成像还是两者兼而有之，本概述介绍的 eSight 检测都为传统的病毒中和抗体检测提供了更简单、更快速、信息更丰富的替代方案。除基础研究和开发外，全球在恢复期血浆/治疗性抗体检测和疫苗开发等领域也采用了该检测方法。

参考文献

1. Forthal, D. N. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr.* **2014**, 2(4), 1
2. Pejchal, R. et al. A Potent and Broad Neutralizing Antibody Recognizes And Penetrates the HIV Glycan Shield. *Science* **2011**, 334(6059), 1097
3. Chen, J. et al. Mechanism of HIV-1 Neutralization by Antibodies Targeting a Membrane-Proximal Region of gp41. *J. Virol.* **2014**, 88(2), 1249
4. Vaillancourt, M. T. et al. Inefficient Killing of Quiescent Human Epithelial Cells by Replicating Adenoviruses: Potential Implications for Their Use as Oncolytic Agents. *Cancer Gene Ther.* **2005**, 12(8), 691
5. Gros, A. et al. Verapamil Enhances the Antitumoral Efficacy of Oncolytic Adenoviruses. *Mol. Ther.* **2010**, 18(5), 903
6. Zolk, O. et al. Structural Determinants of Inhibitor Interaction with the Human Organic Cation Transporter OCT2 (SLC22A2). *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2009**, 379(4), 337
7. Miakotina, O. L. et al. Adenovirus Stimulates Choline Efflux by Increasing Expression of Organic Cation Transporter-2. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2005**, 288(1), L93
8. Varghese, R. et al. Postentry Neutralization of Adenovirus Type 5 by an Antihexon Antibody. *J. Virol.* **2004**, 78, 12320
9. Smith, J. G. et al. Neutralizing Antibody Blocks Adenovirus Infection by Arresting Microtubule-Dependent Cytoplasmic Transport. *J. Virol.* **2008**, 82, 6492
10. Bottermann, M. et al. TRIM21 Mediates Antibody Inhibition of Adenovirus-Based Gene Delivery and Vaccination. *PNAS* **2018**, 115, 10440

查找当地的安捷伦客户中心：

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

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44321.027025463

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，2021
2021年5月19日，中国出版
5994-3258ZHCN