病毒的流式检测

Flow Cytometric Analysis of Virus

闵娟，关武祥*

中国科学院武汉病毒研究所，武汉，湖北省

*通讯作者邮箱: guanwx@wh.iov.cn

引用格式：闵娟，关武祥．(2019). 病毒的流式检测．*Bio-101* e1010318. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010318.

How to cite: Min, J. and Guan, W. X. (2019). Flow Cytometric Analysis of Virus. *Bio-101* e1010318. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010318. (in Chinese)

摘要：流式细胞术 (FCM) 可通过分析受感染细胞来间接检测病毒或其抗原，然而该方法存在测量过程繁琐、耗时长、误差大等缺点。伴随 FCM 的不断发展，其检测范围已不再局限于细胞，目前已可利用流式细胞仪直接分析各类形态和基因组大小各异 (直径范围：100~200 nm) 的病毒，如杆状病毒、带状疱疹病毒、HIV-1 病毒等。跟病毒的其他检测方法相比，FCM 法具有重复性好、简便快速、可获取多参数信息等优势。除此之外，FCM 得到的荧光分布结果还可进一步用于病毒蛋白合成及病毒颗粒释放等数据的统计估算和数学建模。本文以含有 GFP 荧光蛋白的 HIV 慢病毒为例，简要介绍一种利用 FCM 对其进行检测的方法。

关键词：流式细胞仪，GFP 荧光蛋白，HIV 慢病毒，检测

材料与试剂

1. 过滤器
2. 慢病毒包装系统 (GeneCopoeia, catalog number: HPK-LvTR-20)
3. 聚苯乙烯绿色荧光微球 (Invitrogen, catalog number: F13839)
4. HEK293 T 细胞 (ATCC)
5. 超纯水 (Milli-Q 水)
6. Opti-MEM 培养基 (Gibco, catalog number: 51985091)
7. 多聚甲醛 (Sigma-Aldrich, catalog number: 16005-1KG-R)
8. 磷酸钙

9. 20%蔗糖溶液
10. p24 ELISA 试剂盒
11. KH_2PO_4
12. Na_2HPO_4
13. NaCl
14. KCl
15. 盐酸
16. 磷酸缓冲液 (1× PBS) (见溶液配方)

仪器设备

1. 超速离心机 (Beckman, model: Optima XPN-100)
2. 流式细胞仪 (BD, model: FACSAria SORP)

软件

1. FlowJo v10.0.8 软件

实验步骤

一、慢病毒的制备

1. 构建 HIV 核心基因片段质粒 (野生型或带有 iGFP 荧光标签), 使用磷酸钙作为转染试剂, 两者混合均匀后, 继续静置 15 min。
2. HEK293 T 细胞种植于直径为 10 cm 的培养皿中, 孵育过夜后换用新鲜培养基, 并将上述混合液加入培养基中, 放回培养箱中继续培养。
3. 在培养 72 h 后, 将培养瓶中的培养基 (病毒液) 收集起来, $1,500 \times g$ 离心 30 min, 弃去细胞碎片。
4. 上清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤头过滤, 在 20%的蔗糖溶液中离心浓缩病毒 ($100,000 \times g$, 2 h)。
5. 用适量超纯水重悬病毒, 得到慢病毒的浓缩液, 经 p24 ELISA 试剂盒确定病毒浓度。病毒经 2%的多聚甲醛固定后直接上机检测。

二、流式细胞术检测慢病毒

流式细胞仪的参数设置：建立双参数 FSC/SSC 散点图和 EGPF/SSC 双参数散点图，根据其信号调节光电倍增管电压，得到合适的流式图。流式细胞仪选用 70 μm 的喷嘴，设前向角 (FSC) 电压值为 10 V，侧向角 (SSC) 为 250 V，荧光通道 PMT 电压调整至合适值，确保经 0.1 μm 滤头过滤后的 PBS 缓冲液上样后，在最低流速度下的颗粒数 < 10 events/s。在双参数 FSC/SSC 或者 EGPF/SSC 散点图中找到病毒最集中的区域设门，圈出所需要分析的病毒，并用 FlowJo v10.0.8 软件进行数据分析。

结果与分析

常用的病毒载体有腺病毒、逆转录病毒和慢病毒。逆转录病毒载体只能感染分裂期细胞，而且容量有限，腺病毒一般不能整合到染色体上，只能进行瞬时感染。与其他逆转录病毒相比，慢病毒具有可以感染非分裂期细胞、容纳外源性基因片段大、可以长期表达等显著优点。慢病毒不产生任何有效的细胞免疫应答，可作为一种体外基因运输的工具。慢病毒载体介导的转基因表达能持续数月，且无可观察到的病理学现象。因此，慢病毒载体在基因转染中的应用极为广泛，本文以其为例，通过 FCM 分析其荧光标记效率。

在正式检测病毒之前，我们首先利用流式分析仪检测不同尺寸的商品化聚苯乙烯绿色荧光微球，以此验证流式细胞仪对微纳米尺度的颗粒的分析性能 (Vlasak 等, 2016; Bonar 和 Tilton, 2017)。结果如图 1 所示，我们选用的流式细胞仪对 200 nm 以上的微颗粒具备分辨能力。

图 1. 流式细胞仪通过 FSC 和 SSC 分析不同尺寸的荧光微球获得的散点图

慢病毒尺寸在 120 至 150 nm 范围内，因此传统基于 FSC 和 SSC 获取散点的办法并不适用。但是我们发现，当 HIV 慢病毒颗粒带有 GFP 荧光标签后，利用荧光强度代替 FSC 作为阈值筛选条件，可以将病毒区分开来。如图 2 所示，标记有 GFP 的病毒可以出现明显的散点群落，而未标记的野生型并未出现。

图 2. 流式细胞仪 GFP 荧光通道和 SSC 分析野生型和 GFP 标记的 HIV 慢病毒获得的散点图

失败经验

1. 检测病毒样本前还需要使用空白对照，由 TE 溶液和经 0.22 μm 滤器或 30-kDa 超滤管过滤的样本按病毒溶液同样稀释度配制。只有当空白对照的阳性数量及荧光背景很低时才能进行样本检测。
2. 在分析单病毒过程中，需要排除病毒间的粘连，因此在制备病毒液过程中要首先通过分速离心的办法去除细胞碎片，再先后使用 0.45 μm 和 0.22 μm 的滤器过滤掉其他杂质。
3. 实验中，为排除杂质及噪音信号的影响，使用的耗材一定要洁净，缓冲液一定要经 0.04 μm 滤器过滤，仪器的气路和液路尽量分别装上 0.01 μm 的空气过滤器和 0.04 μm 的鞘液过滤器。

溶液配方

1. 磷酸缓冲液 (1 $\times$ PBS)
 - 0.24 g 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)
 - 1.44 g 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)

8 g 氯化钠 (NaCl)

0.2 g 氯化钾 (KCl)

加去离子水约 0.8 L 充分搅拌溶解，然后加入浓盐酸调 pH 至 7.4，最后定容到 1 L

致谢

本文实验方案改编自美国凯斯西储大学 Michał M. Bonar, John C. Tilton 于 2017 年发表在 *Virology* 杂志上的文章 (Bonar 和 Tilton, 2017)。

参考文献

1. Bonar, M. M. and Tilton, J. C. (2017). [High sensitivity detection and sorting of infectious human immunodeficiency virus \(HIV-1\) particles by flow virometry.](#) *Virology* 505: 80-90.
2. Vlasak, J., Hoang V. M., Christanti, S., Peluso, R., Li, F. and Culp T.D. (2016). [Use of flow cytometry for characterization of human cytomegalovirus vaccine particles.](#) *Vaccine* 34(20): 2321-2328.