

酶联免疫斑点检测技术的临床应用

张小飘 综述, 聂明 审校

(湖北省襄樊市第一人民医院检验科 441000)

关键词: 酶联免疫斑点技术; 细胞因子类; 细胞免疫; 标准化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.17.041

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)17-1756-03

酶联免疫斑点(enzyme-linked immunosorbent spot, ELISPOT)检测技术结合了细胞培养技术与酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)技术的长处,能够分析经特异抗原活化后分泌细胞因子[如干扰素- γ (interferon-gamma, IFN- γ)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)等]的单个效应细胞的频数,具有敏感、特异、易于重复的优点^[1],是检测抗原反应性效应细胞的最可靠实验方法之一^[2],目前已成为抗原特异性 T 细胞免疫学研究的主流技术。本文就 ELISPOT 技术作如下综述。

1 ELISPOT 技术的基本原理

ELISPOT 培养板以二氟化树脂(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜等为基质,包被上特异性单克隆抗体,在培养板孔内加入细胞培养基、待检测的细胞及抗原刺激物进行培养。在特异性抗原或非特异性有丝分裂原的刺激下, T 细胞分泌各种细胞因子,细胞因子被膜上的单克隆抗体捕获。被捕获的细胞因子可以与生物素标记的第二抗体结合,然后用酶标亲和素与生物素进行化学酶联显色,在膜的局部形成一个圆形斑点^[3]。

2 ELISPOT 技术的优点

ELISPOT 技术得到广泛应用,首先是由于其在检测抗原特异性细胞低频数时的高敏感性,比以流式细胞术为基础的技术(四聚体和细胞内细胞因子染色)的敏感性要高 1~2 个数量级;其次,ELISPOT 技术可以利用冻存的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)样本来进行免疫监测分析而不丧失细胞的重要活性^[4],同时计算机辅助图像分析系统的使用也使大规模研究成为可能。

3 ELISPOT 技术的分析方法

由于 IFN- γ 分泌量较多,且与 T 细胞的细胞毒功能密切相关,使 IFN- γ 的 ELISPOT 技术分析得到了广泛应用^[5]。但是,单独检测 IFN- γ 不足以充分反映 T 细胞的免疫功能,同时检测多种细胞因子的需求使双色 ELISPOT、荧光 ELISPOT 及 Granzyme B ELISPOT 等分析方法相继出现^[6-8]。但这些方法还需进一步完善,虽然早已有双色 ELISPOT 技术应用的报道,但一些原因却限制了其广泛使用。(1)当 ELISPOT 板包被时,2 种捕获抗体竞争结合到膜表面,抗体的疏水性决定它们结合到膜上的亲活力,如果 1 种抗体具有更强的亲水性,它将丧失竞争力;(2)底物产生的 2 种颜色必须各自独立形成,不能相互干扰,且都不能处于优势地位,这样产生 2 种细胞因子的细胞才能被检测出来;(3)图像分析系统也必须建立起来,并通过验证能准确客观地测量每个斑点的颜色和形态;(4)细胞因子的产量还受反馈机制调节。因此,需要明确哪些细胞因子结合可以在双色 ELISPOT 技术中进行检测。Quast 等^[9]发现

白介素 2(interleukin-2, IL-2)可导致 IFN- γ 和 IL-5 斑点的丢失。荧光 ELISPOT 技术检测时由于荧光素直接偶联在抗体或亲和素上,缺乏酶催化底物的放大作用,灵敏度无法与化学显色的 ELISPOT 技术方法比较。此外硝酸纤维素膜和 PVDF 膜有自发荧光现象,导致背景升高,信噪比下降^[10]。

4 ELISPOT 技术的标准化与验证

由于超高的灵敏度,ELISPOT 结果易受到诸多因素影响,所以,需要进行 ELISPOT 技术的标准化与验证^[11]。

4.1 ELISPOT 技术的标准化

4.1.1 ELISPOT 板 Schielen 等^[12]首先将 PVDF 膜应用到 ELISPOT 技术,后来随着 ELISPOT-免疫沉淀反应(immunoprecipitation, IP)及高通量筛选(high-throughput screening, HTS)等板材的应用,质量得到进一步的提高。塑料 ELISA 板蛋白结合能力有限,所以不建议使用。建议在一项研究中使用同一种板材,最好为同一批次,同时需要检查生产厂家的质量控制程序,批次性能以及是否达到生物分子筛查协会(society for biomolecular sciences, SBS)制定的标准。

4.1.2 包被规程 使用 PVDF 膜板,预湿时每孔加入 70%乙醇 15 μ L 以降低膜的疏水性。但乙醇必须被充分洗掉,残留乙醇能干扰斑点形成。成对抗体的选择根据实验要求而定,需要考虑抗体敏感性因素。不同商品试剂盒检测相同细胞因子的敏感性可相差 10 倍,所以需要进行标准化,其中的一个重要参数是包被抗体的总量,一般认为每孔约 0.5~1.0 μ g 包被抗体可以得到理想的斑点。

4.1.3 细胞准备 (1)细胞分离:因为红细胞溶血和血小板分泌的抑制因子能影响 T 细胞功能,所以,必需进行 PBMC 的分离。(2)冻存、贮藏和运输:冻存在细胞处理过程中最为关键。细胞的冻存有多种方法,自动控制降温器可以提供逐步智能降温,这在细胞最佳冻存及其标准化程序中是必需的;经济实用的方法是使用装有异丙醇的冻存盒。血液样本处理,分离及冻存的最好时间范围应该在 8 h 内或在采集当天完成,样本放置时间过长或在不合适的温度下过久,会影响 PBMC 的功能,甚至可造成 IFN- γ 斑点形成细胞减少 5 倍以上。运输 PBMC 的最佳方式是专用的冷冻液氮装置,液氮缓慢挥发使气态氮充满运输容器,使样本可在接近 -140 $^{\circ}$ C 的恒定温度下保持 10~18 d。不断变化的温度会对细胞功能造成致命影响,不推荐用干冰运输盒运送标本。(3)细胞复苏:细胞复苏时应用 DNA 酶能提高细胞的产量并降低细胞团块形成^[13],ELISPOT 技术分析前最好将 PBMC 放置过夜,使有凋亡倾向的细胞死亡,这样在分析前就可以估计出活力细胞的确切计数^[14]。

4.1.4 刺激抗原 重组蛋白可以用来检测 CD4⁺ T 细胞介导

的反应,对 CD8⁺ T 细胞介导的反应有限。对重组蛋白的反应依赖于抗原呈递细胞 (antigen-presenting cell, APC), APC 细胞在冻存后数量减少,同时重组蛋白在不同贮藏温度下会出现溶解性和稳定性的问题。活的重组病毒载体或病毒感染细胞株也有相似的优缺点。重叠多肽池能用来鉴定 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞识别的最佳表位。肽段越短,重叠越多,鉴别组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC)-I 表位时越精确,而不需要考虑到可能的 MHC-II 类反应,因为 MHC-II 表位的氨基酸序列长度相对较长。所以检测 MHC-I 表位 (CD8⁺ T 细胞反应)、MHC-II 表位 (CD4⁺ T 细胞反应) 时在考虑合成肽价格的同时需要找到一个理想的平衡点。另外使用多肽时需要注意多肽的纯度,以降低非特异细胞因子的产生。

4.1.5 细胞计数 ELISPOT 技术在细胞数量上需要很高的准确性,同时最小化死细胞数量也很重要,死细胞可影响分析的正确性。常用台盼蓝排斥试验和对丝裂原的反应来判断复苏后 PBMC 的质量。但 Smith 等^[15] 试验表明检测细胞的凋亡在判断细胞活力方面更有效,当凋亡小于 18% 时可以得到理想结果。目前已有自动化设备用来进行细胞计数以及细胞活力检测。

4.1.6 洗涤及斑点形成 洗涤程序可以采用手工,也可以使用自动洗板机。大批量洗涤时,手工需要很长时间,从而造成孵育时间不一致。另外,手工洗涤时,如果缓冲液过少或压力过低就不能完全移除细胞和试剂,从而造成膜上的假相斑点增多以及孔的周边染料聚集。因此,建议使用自动洗板机,它至少可以使用 2 种不同的洗涤缓冲液,且能调整清洗探针的高度和缓冲液的流量。斑点的形成与 ELISA 相似,正确的成对抗体及其浓度必须通过实验验证后加以选择,最佳的抗体量需要参考生产厂家的要求。对于亲和素酶复合物也必须给予重视,不同批次间的酶变异性要小,以保证实验的可比性。底物的选择能够影响斑点的检测数量,针对同一种酶的不同底物以及不同厂家生产的同一底物可能在敏感性上不同,从而造成斑点计数产生相当大的差别^[16]。

4.1.7 ELISPOT 板判读 使用显微镜计数斑点的方法费时、费力,结果依赖个人经验,产生偏差和较大变异的问题不可避免。使用自动读板机可明显降低计数时的变异性^[17]。Currier 等^[18] 使用自动读板机时通过 23 个 8~11 肽组成的肽池 [鸡胚成纤维细胞 (chicken embryo fibroblast, CEF) 肽池] 来确定斑点的参数设置标准,它们可以被 CD8⁺ T 细胞识别并被 I 类人类白细胞抗原 (human leukocyte antigen, HLA)-A 和 HLA-B 等位基因呈递,形成的斑点代表记忆性 CD8⁺ T 细胞反应。Janetzki 等^[19] 实验表明使用 CEF 肽池的控制方法时预设读板参数能获得变异性更小的结果。

4.2 ELISPOT 技术的验证 ELISPOT 技术的验证必须在开始临床试验前进行,验证时应首先确定分析中可能出现问题的变量 (如:孵育时间、试剂纯度及试剂浓度等),并随后在国际协调会议 (international conference on harmonisation, ICH) 文件 ICH-Q2A 和 ICH-Q2B 的指导下对整个操作规程进行验证。针对一个标准作业程序 (standard operation procedure, SOP) 的验证过程应该包括:准确性、精确性、特异性、检出限界、定量限界、线性及检测范围。

5 ELISPOT 技术的应用展望

ELISPOT 技术目前得到了广泛的应用,其涉及范围包括: AIDS、癌症、自身免疫性疾病、过敏性疾病以及移植方面的研究;感染性疾病的免疫监测;疫苗的研发与检测;免疫显性表位的鉴定等^[20-25]。ELISPOT 技术在医学研究方面所受的限制不在于技术本身,而在于人们的想象力与创新思维,客观地说,在一切免疫学研究的前沿领域,ELISPOT 技术都是最有力的研究工具之一。

参考文献:

- [1] Cox JH, Ferrari G, Janetzki S. Measurement of cytokine release at the single cell level using the ELISPOT assay [J]. *Methods*, 2006, 38(4): 274-282.
- [2] Zhang W, Caspell R, Karulin AY, et al. ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring—even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators [J]. *J Immunotoxicol*, 2009, 6(4): 227-234.
- [3] Kalyuzhny AE. Chemistry and biology of the ELISPOT assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2005(302): 15-31.
- [4] Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, et al. CD4⁺ and CD8⁺ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays [J]. *J Immunol Methods*, 2003, 278(1/2): 79-93.
- [5] Matijevic M, Urban RG. Use of interferon-gamma ELISPOT in monitoring immune responses in humans [J]. *Methods Mol Biol*, 2005(302): 237-252.
- [6] Shafer-Weaver K, Rosenberg S, Strobl S, et al. Application of the granzyme B ELISPOT assay for monitoring cancer vaccine trials [J]. *J Immunother*, 2006, 29(3): 328-335.
- [7] Okamoto Y, Nishida M. Dual-color ELISPOT assay for analyzing cytokine balance [J]. *Methods Mol Biol*, 2005(302): 263-272.
- [8] Boulet S, Ndongala ML, Peretz Y, et al. A dual color ELISPOT method for the simultaneous detection of IL-2 and IFN-gamma HIV-specific immune responses [J]. *J Immunol Methods*, 2007, 320(1/2): 18-29.
- [9] Quast S, Zhang W, Shive C, et al. IL-2 absorption affects IFN-gamma and IL-5, but not IL-4 producing memory T cells in double color cytokine ELISPOT assays [J]. *Cell Immunol*, 2005(237): 28-36.
- [10] Gazagne A, Malkusch W, Vingert B, et al. Fluorospot assay: methodological analysis [J]. *Methods Mol Biol*, 2005(302): 289-296.
- [11] Janetzki S, Cox JH, Oden N, et al. Standardization and validation issues of the ELISPOT assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2005(302): 51-86.
- [12] Schielen P, van Rodijnen W, Tekstra J, et al. Quantification of natural antibody producing B cells in rats by an improved ELISPOT technique using the polyvinylidene

difluoride membrane as the solid support[J]. *J Immunol Methods*, 1995, 188(1): 33-41.

- [13] Smith JG, Liu X, Kaufhold RM, et al. Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001(8): 871-879.
- [14] Meiklejohn DA, Karlsson RK, Karlsson AC, et al. ELISPOT cell rescue[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 288(1/2): 135-147.
- [15] Smith JG, Joseph HR, Green T, et al. Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14(5): 527-537.
- [16] Kalyuzhny AE. ELISPOT assay on membrane microplates [J]. *Methods Mol Biol*, 2009(536): 355-365.
- [17] Hawkins N, Self S, Wakefield J. The automated counting of spots for the ELISpot assay[J]. *J Immunol Methods*, 2006, 316(1/2): 52-58.
- [18] Currier JR, Kuta EG, Turk E, et al. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays[J]. *J Immunol Methods*, 2002, 260(1/2): 157-172.
- [19] Janetzki S, Schaed S, Blachere NE, et al. Evaluation of Elispot assays: influence of method and operator on variability of results[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 291(1/

2): 175-178.

- [20] Shacklett BL, Critchfield JW, Lemongello D. Quantifying HIV-1-specific CD8 (+) T-cell responses using ELISPOT and cytokine flow cytometry[J]. *Methods Mol Biol*, 2009(485): 359-374.
- [21] Hesselting AC, Gie RP, Mandalakas AM. The predictive value of the ELISpot-based interferon-gamma-release assay for tuberculosis disease[J]. *Ann Intern Med*, 2009, 150(6): 428-429.
- [22] Cristaudo A, Bordignon V, Palamara F, et al. Progesterone sensitive Interferon-gamma producing cells detected by ELISpot assay in autoimmune progesterone dermatitis[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2007, 32(4): 439-441.
- [23] Kim SH, Oh EJ, Kim MJ, et al. Pretransplant donor-specific interferon-gamma ELISPOT assay predicts acute rejection episodes in renal transplant recipients[J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(10): 3057-3060.
- [24] 赵文利, 孔祥英, 何念海. 支气管哮喘缓解期患儿 T 辅助细胞功能状态评估[J]. *重庆医学*, 2004, 33(8): 1211-1213.
- [25] Bordignon V, Sinagra JL, Trento E, et al. Antigen specific cytokine response in pediatric patients with atopic dermatitis[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2005, 16(2): 113-120.

(收稿日期: 2010-11-26 修回日期: 2011-03-09)

(上接第 1696 页)

- [7] Meltzer HY, Bobo WV, Nuamah IF, et al. Efficacy and tolerability of oral paliperidone extended-release tablets in the treatment of acute schizophrenia: pooled data from three 6-week, placebo-controlled studies[J]. *J Clin Psychiatry*, 2008, 69(5): 817-829.
- [8] Davidson M, Emsley R, Kramer M, et al. Efficacy, safety and early response of paliperidone extended-release tablets (paliperidone ER): results of a 6-week, randomized, placebo-controlled study[J]. *Schizophr Res*, 2007, 93(1/3): 117-130.
- [9] Nussbaum AM, Stroup TS. Paliperidone for treatment of schizophrenia[J]. *Schizophr Bull*, 2008, 34(3): 419-422.
- [10] Janicak PG, Winans EA. Paliperidone ER: a review of the clinical trial data[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2007, 3(6): 869-897.
- [11] Canuso CM, Dirks B, Carothers J, et al. Randomized,

double-blind, placebo-controlled study of paliperidone extended-release and quetiapine in inpatients with recently exacerbated schizophrenia [J]. *Am J Psychiatry*, 2009, 166(6): 691-701.

- [12] 周婧. 新型抗精神病药物——帕利哌酮缓释片[J]. *医药导报*, 2010, 29(10): 1284-1286.
- [13] Karlsson P, Dencker E, Nyberg S, et al. Pharmacokinetics and dopamine D2 and serotonin 5-HT2A receptor occupancy of paliperidone in healthy subjects[J]. *Eur Neuro-psychopharmacol*, 2005, 15 Suppl 3: S386.
- [14] 卫生部合理用药专家委员会组织编写. 中国医师药师临床用药指南[M]. 重庆: 重庆出版社, 2009: 1241.
- [15] 沈渔邨. 精神病学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 680.

(收稿日期: 2011-03-30 修回日期: 2011-03-09)