

# ELISPOT 的技术优势及其在动物免疫研究中的潜力

郭晓蕾, 师志海, 曹宗喜, 陈朝喜, 潘全会\* (1. 滨州职业学院, 山东滨州 256603; 2. 华南农业大学, 广东广州 510642)

**摘要** 介绍了酶联免疫斑点技术(ELISPOT), 比较了该技术与其它免疫检测技术相比的优势, 展望了ELISPOT在动物免疫研究中的应用前景。

**关键词** ELISPOT; 免疫检测技术; 动物免疫

**中图分类号** Q81 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)25-07862-02

酶联免疫斑点技术(Enzyme-linked Immunospot Assay, ELISPOT)是20世纪80年代中期Czerkisky等以ELISA技术基本原理和方法为基础, 建立起来的一种既可以在体外进行单细胞水平的特异性抗体分泌细胞检测, 又可以对细胞因子(Cytokine, CK)分泌量进行定量检测的一种简便、快捷的免疫学检测方法, 尤其在检测单个细胞分泌可溶性CK时更有意义<sup>[1-2]</sup>。

## 1 ELISPOT 简介

**1.1 ELISPOT 检测原理** 在细胞受到刺激后局部产生CK, 该CK被特异性的单克隆抗体捕获。洗去分泌细胞后, 被捕获的CK与生物素(Biotin)标记的二抗结合<sup>[3]</sup>, 然后再与碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)或辣根过氧化物酶(Horse radish peroxidase, HRP)标记的链亲和素结合。经底物, 如BCIP/NBT孵育后, 在PVDF孔板出现有色的斑点即表明细胞产生了CK。通过显微镜或ELISPOT酶联斑点分析系统<sup>[4]</sup>对斑点进行分析即可获得结果。

**1.2 ELISPOT 技术原理** ELISPOT的技术原理与ELISA基本相似, 即通过生物酶高催化效率放大反应效果, 进而达到很高的敏感度, 便于检测微量的抗原或抗体。其实验设计是在96微孔培养板的底部披覆PVDF薄膜, 包被经特殊挑选的、无毒性(不含Sodium azide、内毒素Endotoxin)的单克隆抗体。然后洗脱未结合的单克隆抗体, 封闭。随后将经适当分离处理后的细胞(如外周血单核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC))分配到微孔上, 用适当的抗原刺激, 并将96孔板放置于温箱中过夜培养一段时间。一般情况下, 记忆型T细胞在受抗原刺激后数小时开始分泌CK, 此时局部(紧靠分泌细胞的周围)分泌出的CK会被PVDF薄膜上包被的特异性抗体捕获。洗去微孔中的细胞和未结合的组分之后, 被捕获的CK进一步使用生物素标记的特异性检测抗体来标志。然后将未结合的酶洗除, 再以AKP或HRP标记的链亲和素与之作用, 并加入底物(如BCIP/NBT)使其呈色, 有反应作用的细胞会留下大小染色的斑点。斑点多少可以在ELISPOT读数系统上进行自动化计数或在立体显微镜上进行人工计数。当然也可以在96微孔培养板上包被特异性捕获抗体来检测特异的CK分泌细胞<sup>[5]</sup>。

**1.3 ELISPOT 基本操作步骤** ELISPOT的检测原理和技术原理与双夹心法ELISA较为相似, 具体操作步骤如下<sup>[6]</sup>。

(1) 将适量捕获性抗体预先包被于96孔ELISPOT板上,

用胶带封板并在4℃冰箱中孵育过夜。取出后将板用PBS洗6次, 再用含10%胎牛血清(Fetal calf serum, FCS, 体积比)的培养基封闭(降低非特异性反应), 室温下至少孵育1h。如果使用试剂盒已包被的96孔板, 该步操作可以省略。

(2) 将阴性对照和细胞样品, 如经纯化的CD8<sup>+</sup>T细胞, 用含10%FCS的培养基稀释至 $5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5$ 个/孔(高的可达 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/孔, 尤其是分泌细胞), 分装于ELISPOT板孔中, 然后加入特异的刺激物, 如多肽、基因表达产物或提取的抗原等。阴性对照孔中只加入培养基(尽量采用无血清的培养基, 以避免血清的某些成分所引起的非特异反应, 及血清批次不同所造成的试验误差), 阳性对照孔加入植物血凝素(PHA, 2 μg/ml)或阳性多肽, 放置于含有5%CO<sub>2</sub>、37℃的生化培养箱中培养24~48h。

(3) 用含0.01% Tween-20(体积比)的PBS洗96孔板6次, 以洗去分泌细胞, 再加入生物素标记的抗CK的特异性检测抗体, 孵育3h。再用PBS Tween-20洗液洗6次以除去没有结合的二抗, 加入AKP或HRP标记的链亲和素, 室温孵育3h。

(4) 用PBS Tween-20对96孔板再洗5次, 加入底物室温下显色, 待出现紫色(AKP和底物的产物)或红色(HRP和底物的产物)斑点时, 说明检测的细胞产生了CK。此时可用计算机辅助成像分析系统或显微镜计算斑点数, 并用斑点形成单位记录结果。每一个有色斑点即代表一个特异性分泌CK的细胞。若预先包被抗原, 则可用于分泌细胞的测定, 此时的每一个斑点就代表一个分泌特异抗体或CK的细胞。

## 2 ELISPOT 与其他免疫检测技术的比较

用于动物免疫应答的检测技术很多, 但均存在一些难以克服的缺陷, 如在精确定量检测的同时又需进行单细胞水平检测等, 相比之下ELISPOT则显示出巨大的技术优势和应用潜力。

**2.1 ELISPOT 与 ELISA 相比较** ELISA在以下情况下无法检测到效应分子, 如分泌到上清或被稀释, 或被蛋白水解酶降解, 或被其高亲和力的受体吸收等。同时, ELISA是通过显色反应, 在酶标仪上测定吸光度(OD值)后与标准曲线比较, 得出可溶性蛋白总量, 而不知道效应细胞有多少。ELISPOT也是通过显色反应, 但它是在细胞分泌该种可溶性蛋白的相应位置处显现清晰可辨的斑点, 能够直接在显微镜下人工计数斑点或通过计算机辅助分析系统对斑点进行计数。1个斑点代表1个分泌细胞, 从而能够计算出分泌该蛋白的细胞的频率, 进行效应细胞计数, 得到单个细胞分泌效应细胞的相对量及细胞活化后产生效应分子的变化等。在单细胞水平检测时, ELISPOT比ELISA更灵敏<sup>[7]</sup>, 它能从20万~30万个细胞中检出1个分泌该蛋白的细胞<sup>[8]</sup>。ELISPOT

的捕获抗体是由具有高亲和力、高特异性、低内毒素的单克隆抗体组成,在试验过程中以刺激性抗原激活细胞时不会影响活化细胞分泌 CK。

**2.2 ELISPOT 与流式细胞技术(Flowcytontry, FCM) 相比较** ELISPOT 和 FCM 都是在单细胞水平检测 CK 的产生,不同的是 FCM 是检测细胞产生的所有因子,它既可以检测细胞的表面标志又可以检测胞内因子,是一项多参数的检测技术<sup>[9]</sup>。而 ELISPOT 则是检测分泌到胞外的 CK,多用于抗原多肽库的筛选,可以直接在体外检测抗原特异性 T 细胞的活性,技术更简单,易于掌握<sup>[10]</sup>。

**2.3 ELISPOT 与胞内 CK 染色法(Intra-cellular CK staining ICS) 相比较** ICS 主要用于细胞内累积 CK 的染色和多色参数的 FACS 法,在检测循环淋巴细胞中抗原特异性 T 淋巴细胞时应用较多。

**2.4 ELISPOT 与有限稀释法(Limiting dilution analysis, LDA) 相比较** LDA 能够对特异性细胞毒性 T 细胞(Cytotoxic T cell, CTL) 进行定量。但该方法需要高强度抗原刺激,这会加快效应 CTL(eCTL) 凋亡<sup>[11]</sup>,且不能定量测定 eCTL 细胞数量或测定值偏低。同时,该方法较繁琐,很容易造成 T 细胞数量损失。

**2.5 ELISPOT 与四聚体法(Tetramer) 相比较** Tetramer 具有迅速、直接、灵敏且特异性强的优势。当体内记忆毒性 T 淋巴细胞(memorial CTL, mCTL) 水平低于 1% 时,用该法仍可以直接测到准确的值<sup>[12]</sup>,比 LDA 敏感度高 5~10 倍<sup>[13]</sup>。Tetramer 每次反应只能分析单一的抗原表位,而 MHC-I 类分子结合的各种抗原表位,能否形成 CTL 反应是随着基因背景及时间的变化而变化,因此需要正确地选择抗原表位。研究结果表明,Tetramer 阳性的细胞数是用 ELISPOT 分析能分泌 INF- $\gamma$  细胞数的数倍<sup>[14]</sup>,说明并非所有经过 Tetramer 鉴定的阳性细胞都有确切的功能,其中很多可能是不表现功能的惰性细胞,它们代表了记忆型 CTL 前体细胞<sup>[15]</sup>,Tetramer 分析只增加了分析的灵敏度。

**2.6 ELISPOT 与  $G^{51}$  释放法相比较**  $G^{51}$  释放法在检测 CTL 识别的抗原多样性方面非常有效,且能精确阐明被 CTL 识别的最佳表位。但是该检测方法至多为半定量检测,而且  $G^{51}$  标记的细胞自发释放率较高,不适于较长时间培养;标记时所需的细胞浓度较高,给试验带来诸多不便; $G^{51}$  释放法所测定的是一个细胞群体的特性,而不是单个细胞<sup>[16]</sup>。与  $G^{51}$  释放法相比,ELISPOT 有相当多的优越性,如更高灵敏度,所需细胞量更少,通量更高;没有放射性污染,一致性、准确性更好,更省时、省力等。

因此,ELISPOT 与其他免疫检测技术相比有不少独特的优势: ELISPOT 具有灵敏度高、特异性好的特点。精确检测最低至 1 100 万体外 CK 的分泌频率。该分辨率远远超过使用 ELISA 法和四聚物染色法测量的精度。因为体内产生抗原特异性 T 细胞的频率是非常低,所以这种高灵敏度在细胞分泌检测方面是非常关键的; ELISPOT 可用于确定抗原特异性 T 细胞的功能性亲和力; ELISPOT 分析不影响淋巴细胞的活性。这使得分析之后继续进行淋巴细胞增值,用于更进一步的分析、克隆或者低温储藏成为可能<sup>[17]</sup>; ELISPOT

可用于定义 CD4 或 CD8 细胞的抗原决定簇。ELISPOT 实验灵敏,只需少数细胞,分析就可以在高产量模式下进行。ELISPOT 分析在筛选肽库,绘制免疫因子方面是一个理想的工具; ELISPOT 使大批量细胞分析成为可行。经过训练的数个相关实验室人员组成 1 个小组可以测试成百个样本中几十种抗原的反应; 研究未经药物处理过的 T 细胞的实际分泌过程<sup>[18]</sup>。如果观察到 T 细胞分泌物净产量减少,以此方法可以确定这种原因是来自于分泌细胞的减少,还是每个细胞分泌产量的减少; 低温储藏后的淋巴细胞可以继续保持其生物学活性<sup>[19]</sup>。治疗前和治疗后的样本可以同时进行测试,进行对比,以鉴定治疗结果,能够重复实验步骤; 所需细胞浓度低。和其他细胞学分析方法比较,ELISPOT 法对细胞浓度没有太高的要求。如 45 ml 的血液就足以用于测试 600 种不同抗原或肽类物质的反应。

### 3 ELISPOT 在动物免疫研究中的应用

随着 ELISPOT 技术的逐渐成熟和 ELISPOT 酶联斑点分析系统的日渐完善,ELISPOT 在动物免疫学中的应用越来越多。

Li W 等用脂质体结合的肠炎沙门氏菌眼内接种鸡后,用 ELISPOT 可以测出免疫鸡哈德氏腺中的抗体分泌细胞<sup>[20]</sup>。Kamm C 等应用体外方法分析针对产单核细胞增生性李斯特菌的 CD8<sup>+</sup> T 细胞应答,并用 ELISPOT 法分析了不同自然途径加工的抗原肽<sup>[21]</sup>。Bastos R G 等用 ELISPOT 法检测到表达猪繁殖障碍与呼吸道综合症病毒(PRRSV) GP5 及 M 蛋白的重组卡介苗(rBCG) 免疫猪 67 d 后的 BCG 抗原产生的 IFN 应答<sup>[22]</sup>。许晓光等应用 ELISPOT 与 ELISA 方法同时检测 ImmunEasyTM 及弗氏佐剂免疫小鼠的脾脏中分泌不同类和亚类抗 APRIL 抗体的 B 细胞频率。ELISPOT 方法能反映出短时间(6 h) 内分泌特异性抗体的脾细胞频率,而 ELISA 所测免疫血清中抗体效价则反映在体内一段时期内脾细胞分泌的抗体量<sup>[23]</sup>。焦新安等应用 ELISPOT 方法检测到表达大肠杆菌 M1E 蛋白的重组卡介苗(rBCG.M1E) 诱导的 T 细胞应答是 CD4<sup>+</sup> T 细胞依赖的,rBCG.M1E 诱导的特异 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答存在 Th1/ Th2 平衡转换现象,并逐步形成 Th1/ Th2 混合应答<sup>[24]</sup>。

### 4 ELISPOT 展望

ELISPOT 方法的建立最初用于检测抗体分泌细胞,随着技术的发展,它渐渐成为检查各种抗体形成细胞及 CK 分泌细胞的主要检测技术。尤其是自动图像分析系统的使用,大大提高了实验准确性及实验效率,将促使 ELISPOT 技术发展成为基础实验室及临床诊断实验室的标准技术之一。

目前 ELISPOT 技术主要还是应用于人类医学研究的领域,在动物免疫学研究领域应用还较少。我国药品生物制品检定所在《预防用 DNA 疫苗临床前研究技术指导原则》和《预防用以病毒为载体的活疫苗制剂的技术指标原则》中均指出,ELISPOT 是检测和评价疫苗的细胞免疫的有效方法。由 ELISPOT 所具有的独特优势,可以预见该检测方法在动物免疫研究领域将会得到广泛的应用,发挥重要作用。

#### 参考文献

- [1] CZERKINSKY C, NILSSON L A, NYGREN H, et al. A solid phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells[J]. *Immune Methods*, 1983, 65: 109-121.

(上接第7863页)

- [2] CZERKINSKY C, ANDERSSON G, EKREH P, et al. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma interferon secreting cells[J]. *Immunity Methods*, 1998, 110:29-32.
- [3] NORDSTROMI, FERRUA B. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. . Enumeration of interleukin-1-secreting cells by amplified (avidin-biotin- peroxidase) assay[J]. *J Immunol Methods*, 1992, 150(1/2):199-206
- [4] HERR W, LINN B, LEISTER N, et al. The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes producing tumor necrosis factor alpha spots in response to peptide antigens[J]. *Immunity Methods*, 1997, 203(2):141-52.
- [5] NORDSTORMI, FERRUA B. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production[J]. *Immunity Methods*, 1992, 150:199-206.
- [6] CLAY T M, HOBIKA A C, MSCAP J, et al. Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7:1127-1135.
- [7] TANGUAY S, KILION J J. Direct comparison of ELISPOT and ELISA based assays for detection of individual cytokine-secreting cells[J]. *Lymphokine Cytokine Res*, 1994, 13(4):259-263.
- [8] SHRAI A, HOMES K, KLINMAN D M, et al. Detection and quantitation of cells secreting IL-6 under physiologic conditions in BALB/c mice[J]. *Immunity*, 1993, 150:793-799.
- [9] KOEHNE G, SMITH K M, FERGUSON T L, et al. Quantitation, selection, and functional characterization of Epstein Bar virus-specific and alloreactive T cells selected by intracellular interferon gamma production and growth of cytotoxic precursors[J]. *Blood*, 2002, 99(5):1730-1740.
- [10] GIVAN A L, FISHER J L, VAUGH M, et al. A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens[J]. *J Immunol Methods*, 1999, 230(122):99-112.
- [11] GREEN D R, SCOTT D W. Activation-induced apoptosis in lymphocytes[J]. *Curr Opin Immunol*, 1994(6):476-487.
- [12] DOHERTY P C, TOPHAN D J, TRIPP R A. Establishment and persistence of Virus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell memory[J]. *Immunity Rev*, 1996, 150:23-44.
- [13] BUSCH D H, HIIPPI M, VJHS, et al. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection[J]. *Immunity*, 1998(8):353-362.
- [14] TAN L C, GUDGEON N, ANNELS N E, et al. Re-evaluation of the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells specific for EBV in healthy virus carriers[J]. *J Immunol*, 1999, 162:1827-1835.
- [15] YANG J, VICTOR M L, IAN W F, et al. Application of the ELISPOT assay to the characterization of CD8<sup>+</sup> responses to Epstein Bar virus antigens[J]. *Blood*, 2000, 95(1):241-248.
- [16] KHEIF S N, ABRAMS S I, HAMILTON J M, et al. A phase vaccine trial with peptides reflecting ras oncogene mutations of solid tumors[J]. *J Immunother*, 1999, 22(2):155-165.
- [17] 侯世芳, 张丽, 闫晓波, 等. 重症肌无力患者外周血干扰素 C 和白细胞介素 10 分泌细胞检测[J]. *中华神经科杂志*, 2000, 33(2):107-109.
- [18] VANDER MEIDE P H, JOOSIEN A M, HERMANS P, et al. Assessment of the inhibitory effect of immunosuppressive agents on rat T cell interferon production using an ELISPOT assay[J]. *Immunity Methods*, 1991, 144:203-205.
- [19] KREHER C R, DITTRICH M T, GUERKOV R, et al. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2003, 278:79-93.
- [20] LI W, WATARI S, IWASAKI T, et al. Suppression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fibriate proteins incorporated in liposomes[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28:29-38.
- [21] KAMMC, KOBERNE M, GEGNAT G, et al. CD8<sup>+</sup> T cell immune analysis of *Listeria monocytogenes*[J]. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2003, 35:235-242.
- [22] BASTOS R G, DELLAGOSIIN O A, BARLETTA R G, et al. Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Vaccine*, 2004, 22:467-474.
- [23] 许晓光, 朱勇, 刘雪松, 等. 新型免疫佐剂在淋巴细胞杂交瘤技术中的应用[J]. *免疫学杂志*, 2003, 19(6):419-423.
- [24] 焦新安, Lo2 Min R, Deriand E, 等. 应用 ELISPOT 试验测定重组卡介苗诱导的 T 细胞应答[J]. *中国预防兽医学报*, 2001, 23(1):46-49.