

初探酶联免疫斑点法检测 T 细胞免疫功能质控要点*

谭 遥, 黄 莉, 刘 凯, 徐 丽, 李亚伟, 王若峥[△](新疆医科大学附属肿瘤医院头颈放疗科, 乌鲁木齐 830011)

【关键词】 酶联免疫斑点法; 肿瘤免疫; 质量控制

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 23. 069 文献标志码: C 文章编号: 1672-9455(2014)23-3384-02

恶性肿瘤逐渐成为影响人类健康的主要因素, 在传统治疗手段的基础上, 人们开始关注免疫功能在疾病发生过程中的变化情况, 而肿瘤细胞在人体中的免疫反应主要以细胞免疫为主, 如何高效、准确地检测特异性细胞免疫功能的变化成为研究的热点^[1]。在诸多的免疫检测方法中, 酶联免疫斑点法(ELISPOT)由于其灵敏度高、特异性强、操作简便而受到重视。该方法可以有效检测特异性抗体分泌细胞的数量和功能, 可以在单细胞水平测定分泌特定细胞因子的功能和细胞数量, 广泛应用于人类免疫缺陷病毒疫苗、病毒感染相关疾病及肿瘤等方面的研究中^[2-5]。目前本实验室应用 ELISPOT 技术检测 EB 病毒(EBV)感染的鼻咽癌患者放射治疗前后特异性 T 细胞免疫功能的变化情况, 筛选特定的多肽, 并致力于为生物治疗提供临床依据, 已经取得初步的结果^[6-7]。由于 ELISPOT 技术的高敏感性, 实验的结果容易受到诸多因素的影响, 为了得到真实、准确的结果, 严格规范实验流程, 加强实验室的质量控制是确保实验结果的关键。经过近年来对 ELISPOT 技术的应用及总结, 现将 ELISPOT 技术的质控要点总结如下。

1 实验前准备

1.1 标准化实验流程 实验前的准备工作是检测成功与否的前提, 就 ELISPOT 检测技术, 在进行正式标本检测之前, 必须对实验的每一个步骤进行规范化。

1.1.1 标本采集分离时间 ELISPOT 技术用以检测循环中特异性 T 细胞的功能, 因此所分离出 T 细胞的质量就尤其重要。为保证实验的顺利进行, 要求晨起空腹采血, 采集的血液标本用肝素钠抗凝, 常温保存, 经统一编号后立即送往实验室, 4 h 内分离外周血单个核细胞(PBMC)。血液存放时间过长可能导致淋巴细胞数目和质量下降, 检测的结果受到影响。

1.1.2 试剂的检测 在开始正式检测标本之前, 需要对所有

实验过程中可能使用的试剂进行检测。通过预实验, 确定试剂能够正常工作后, 按照同一规格、同一厂家、同一批号预订实验过程中所需要的试剂, 并按要求保存且注明试剂开启的日期, 防止因试剂过期以及保存不当导致的检测结果异常。

1.1.3 实验步骤的细化 通过预实验, 确定每一个步骤的具体操作, 包括细胞分离过程中离心的时间, 转速, 96 孔板中每孔加入的多肽量、细胞量, 包被 96 孔板的时间, 反应体系孵育的时间、二抗反应的时间, 显色的时间。标准化流程后, 确立相应的实验记录表格, 严格记录每一步操作开始的时间、加入标本或试剂的剂量。

经过长期实验发现, 在提取 PBMC 的环节中, 离心机的转速以及淋巴细胞分离液的质量对所提取细胞的质量和数量有很大的影响。为了进一步确定更为有效的提取 PBMC 的过程, 通过预实验认为 Sigma 公司的淋巴细胞分离液明显优于其他品牌。在离心速度及时间方面, 根据文献[8-11]选定了 4 种较为常用的方法。为进一步选出更加有效的方法, 将每份 8 mL 的血液标本分为 4 个组(每组 2 mL), 共 10 份, 进行比较; 分别采用 1 800 r/min 离心 30 min(A 组), 2 000 r/min 离心 30 min(B 组), 2 200 r/min 离心 30 min(C 组), 2 500 r/min 离心 25 min(D 组) 4 种方法分离 PBMC, 并对分离出的细胞活度及数目取均数进行比较。实验结果提示, 4 组在细胞活度方面没有明显差异, 且以方差分析法比较 4 组提取的 PBMC 数差异亦无统计学意义($P=0.199$)。见表 1。但考虑到样本数目较少, 取 4 组 PBMC 数的均数分别为: A 组 3.230×10^6 个、B 组 3.339×10^6 个、C 组 4.628×10^6 个、D 组 3.673×10^6 个, 可以看出 C 组的均数明显高于其他 3 组。根据预实验结果, 为保证实验质量, 推荐使用 Sigma 公司的淋巴细胞分离液, 2 200 r/min 离心 30 min, 离心机采用缓慢升降速度模式。

表 1 10 例标本在 4 组不同离心速度中提取的 PBMC 数比较(10^6 个)

组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	1.46	1.69	3.77	2.57	6.02	1.92	2.6	5.1	3.19	3.98
B	1.52	2.01	2.89	2.66	6.91	1.78	3.06	4.99	4.01	3.56
C	2.24	3.19	5.03	4.54	7.26	4.32	2.49	6.22	4.92	6.07
D	1.27	2.58	2.79	4.08	3.97	2.29	4.07	6.06	3.78	5.84

1.2 实验人员培训 实验应由专业人员进行操作, 操作人员必须经过严格的培训、考核, 熟悉本专业的技术知识及相关知

识, 如工作原理、实验意义、仪器的性能及维护、检测技巧、数据处理等, 并且具有一定的分析能力。整个实验操作自始至终由

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区国际合作资助项目(20126024, 201141138)。

[△] 通讯作者, E-mail: wr28526@126.com。

专门人员操作,以减少人员误差。

1.3 确定质量控制办法 在整个实验过程中必须建立完善的质量控制办法,每个多肽均设 2 个反应孔,每份标本均采用聚羟基脂肪酸酯(PHA)作为阳性对照,同时设立阴性对照。全部实验开始前,通过筛选一个健康志愿者的血液标本作为质控标本,要求对 80% 以上的多肽均有反应,排除其他病毒感染可能。一次性采集 PBMC 冻存,每周按需解冻一定数目的细胞进行质控。

2 实验过程中质控

ELISPOT 实验的每个步骤都很重要,每一个操作的细节都将影响实验结果,导致研究失败。所以建立一套严格的实验操作规范,按照规范进行实验是保证实验质量的关键。

2.1 上样 由于所有标本的剂量都较小,上样的过程中要观察枪头内是否有气泡,排枪枪头内液面是否平齐;尽可能做到慢吸快放,加入反应多肽时应将枪头接触到细胞悬液液面缓慢抽吸混匀,避免产生气泡及由于细胞分布不均匀导致的结果统计困难。注意不能将液体溅出或产生气,并要及时更换枪头,做到每孔一枪头,避免出现交叉污染。

2.2 包被、孵育 ELISPOT 实验中,包被一抗是十分重要的步骤,通过比较和观察,一抗包被后最好用保鲜膜封闭后,放入 4 ℃ 冰箱内过夜(至少 12 h)后再使用,保证抗体能够均匀的与底部的膜结合,在加入反应体系前一定要检查每个孔中包被液是否已干燥,干燥的孔需要进行标记并放弃使用。反应体系需要在 37 ℃ 5% CO₂ 培养箱内孵育,每次实验前一定要检查孵育箱的温度、湿度,确保酶标板加盖密封,并检查孵育箱门关闭正常。孵育时间不少于 14 h。

2.3 洗板、显色 孵育结束后,需要弃去反应体系,终止反应过程,洗板的过程关系到显色后背景的清晰程度以及结果的分析。本实验室采用手洗的方法,将反应体系从孵育箱中取出后,快速地甩去反应体系,然后用 0.01 mol 磷酸盐缓冲液(PBS)洗板 6 次;每次均要进行拍板,尽可能将孔板中的液体去除干净;加入下一步抗体前再弃去最后一次洗涤液,防止孔板放置在空气中时间过长导致膜干燥而影响结果。在常温下进行显色,标本的显色时间为 15 min;显色液的配置需要用去离子水及专用的缓冲液,配置过程中需减少显色试剂在常温中放置的时间;使用完毕后迅速放入 -20 ℃ 内保存。配置好的显色液不宜放置时间过长,原则上要求现配现用。显色结束后弃去显色液,用清水冲洗 96 孔板 6 次后甩干,室温下晾干后用于读板,若不能马上进行读数的,将板避光保存。

3 结果判读

为防止人工读数引起的误差,需要使用专业的读板机进行读板分析,在机器读数的基础上要逐一一对每孔的斑点进行分析,去除背景上的斑点,计入表格用于结论分析。每月从所有结果中抽查 5 份,进行复核,结果误差小于 5% 可以认为合格,否则需要更换人员对结果进行再次分析,确认无误后方可计入实验结果进行分析。

综上所述,ELISPOT 技术实验操作的步骤多,反应经历的时间较长,任何一个步骤的差错均可能影响实验结果,所以建立规范的操作流程和完善的实验室质控制度至关重要。在整个研究进行的过程中,为确保实验的可信度,一经预实验明确后,实验的试剂、抗体、重要耗材均不要随意更换,若需要更换

必须重新进行预实验,确保无误后再继续实验。实验过程中定期进行质量控制也是不可或缺环节,设备运行情况也要有专门的检测记录。只有保证实验每个环节的准确性,才能保证结果的可信度。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Bae J, Smith R, Daley J, et al. Myeloma-specific multiple peptides able to generate cytotoxic T lymphocytes: a potential therapeutic application in multiple myeloma and other plasma cell disorders[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(17): 4850-4860.
- [3] Hashem M, El-Karaksy H, Shata MT, et al. Strong hepatitis C virus (HCV)-specific cell-mediated immune responses in the absence of viremia or antibodies among uninfected siblings of HCV chronically infected children[J]. J Infect Dis, 2011, 203(6): 854-861.
- [4] Camisaschi C, Casati C, Rini F, et al. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites[J]. J Immunol, 2010, 184(11): 6545-6551.
- [5] Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, et al. Cancer-induced immunosuppressive cascades and their reversal by molecular-targeted therapy[J]. Ann N Y Acad Sci, 2013, 1284: 80-86.
- [6] 王若峥, 谭遥, 王多明, 等. 酶联免疫斑点法检测鼻咽癌患者放疗前后 T 细胞对 EB 病毒肽段的特异性反应[J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(11): 928-931.
- [7] 王若峥, 谭遥, 黄丽, 等. ELISPOT 法检测鼻咽癌放疗前后细胞免疫反应的变化[J]. 广西医科大学学报, 2009, 26(3): 420-422.
- [8] Suzuki H, Fukuhara M, Yamaura T, et al. Multiple therapeutic peptide vaccines consisting of combined novel cancer testis antigens and anti-angiogenic peptides for patients with non-small cell lung cancer[J]. J Transl Med, 2013, 11(1): 97.
- [9] Rasmussen SB, Harndahl MN, Stryhn A, et al. Peptide pool immunization and CD8+ T cell reactivity[J]. Immunol Lett, 2013, 151(1/2): 48-53.
- [10] Singh SK, Meyering M, Ramwadhoebe TH, et al. The simultaneous ex vivo detection of low-frequency antigen-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses using overlapping peptide pools[J]. Cancer Immunol Immunother, 2012, 61(11): 1953-1963.
- [11] Saletti G, Cuburu N, Yang JS, et al. Enzyme-linked immunospot assays for direct ex vivo measurement of vaccine-induced human humoral immune responses in blood[J]. Nat Protoc, 2013, 8(6): 1073-1087.