

• 新技术·新方法 •

定量检测细胞凋亡的 ELISA 法

管孝鞠¹, 王治乔², 王爱平²(1. 第三军医大学免疫学研究所, 重庆 400038; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 细胞凋亡普遍存在在于胚胎发生及个体发育的多种生理和病理过程中, 本文介绍了细胞凋亡定量检测 ELISA 法的原理、方法及有关注意事项。

关键词: 细胞凋亡; ELISA; 定量

中图分类号: R965.2 文献标识号: A 文章编号: 1006-0111(2000)01-0039-04

Quantitative detection of apoptosis by ELISA assay

GUAN Xiao-ju¹, WANG Zhi-qiao², WANG Ai-ping²(1. Institute of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038; 2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical science, Beijing 100850)

ABSTRACT: Apoptosis is one form of cell death which commonly occurs during many physiological and pathological processes. The principle, working procedures and related problems of ELISA assay were described in detail in this article, which allows quantitative determination of mono- and oligonucleosomes in apoptotic cells.

KEY WORDS: apoptosis; ELISA; quantitation

细胞凋亡是一种受基因调控的细胞死亡形式, 参与多种生理、病理过程的调节, 具有重要的生物学意义。现已有形态学、生物学等多种检测方法, 但多数是定性或半定量的方法, 很难满足人们对细胞凋亡作用及机制研究日益深入的需要, 而酶联免疫法(ELISA法)可以定量测定凋亡细胞胞浆中组蛋白相联 DNA 片段——核小体和寡聚核小体(mon- and oligonucleosomes)的富集, 而且操作简便快速。下面就以德国宝灵曼公司 ELISA^{PLUS}试剂盒为例, 介绍该法的原理及方法。

1 检测原理

细胞发生凋亡时, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性内源性核酸内切酶激活, 在核小体连接区切开双链 DNA, 产生带有单个或寡聚核小体的 DNA 片段。相反, 核小体 DNA 与中心组蛋白 H2A, H2B, H3 和 H4 紧密结合, 可以防止核酸内切酶的切割作用, 故产生的 DNA 片段是 180-200bp

的整数倍, 在凋亡细胞的胞浆中出现核小体或寡聚核小体^[1,2]。

ELISA 法利用的是小鼠单克隆抗体两端分别与 DNA 和组蛋白结合的“夹心定量酶标免疫测定法”原理, 可以特异测定凋亡细胞裂解物中的单个或寡聚核小体。样品(细胞裂解物, 血清或培养上清液等)加至亲合素包被的 MTP 中, 然后加入抗组蛋白—生物素和抗 DNA—POD 的混合物, 一起孵育 2h; 在孵育期间, 抗组蛋白抗体可结合到核小体的组蛋白成分上, 通过生物素——亲合素作用使免疫复合物固定在亲合素包被的 MTP 上, 同时, 抗 DNA—POD 抗体与核小体的 DNA 成分结合。洗涤除去未结合的抗体后, 加入底物 ABTS(2, 2'-Azino-di[ethyl-benzthiazolin-sulfonate], 2, 2'-连氮-双-[3-乙基苯丙噻唑啉磺酸]), 与结合在免疫复合物中的 POD 作用后显色, 通过酶标测定仪分析, 即可定量反映细胞凋亡的水平。

2 材料与试剂

2.1 材料与主要仪器

ELISA 试剂盒(购自德国宝灵曼公司),酶标分析仪,平台振荡器。ELISA 试剂盒内容:①瓶 1,生物素标记的抗组蛋白抗体(clone H11-4):抗组蛋白一生物素;②瓶 2,过氧化物酶标记的抗 DNA 抗体(Klon M-CA-33):抗 DNA-POD;③瓶 3, DNA-组蛋白复合物:阳性对照;④瓶 4, 100ml 孵育缓冲液;⑤瓶 5, 100ml 裂解缓冲液;⑥瓶 6, 15ml 底物缓冲液;⑦瓶 7, ABTS^R片 15mg。

亲和素包被的 96 孔微滴定板;微滴定析粘

表 1 免疫反应液的配制

内 容	试验份次				
	10	20	40	50	100
瓶 1 抗组蛋白一生物素(μ l)	40	80	160	200	400
瓶 2 抗 DNA-POD(μ l)	40	80	160	200	400
瓶 4 孵育缓冲液(μ l)	720	1440	2880	3600	7200
免疫反应液 总体积(μ l)	800	1600	3200	4000	8000

所需孵育缓冲液应放于合适的容器内,加入抗组蛋白一生物素和抗 DNA-POD 后要充分混匀,临用前配制,不能放置。

底物溶液的配制:ABTS^R片(瓶 7)溶于 15ml 底物缓冲液(瓶 6 总体积),ABTS^R溶液长时间见光会发生反应,此溶液避光保存,可稳定保存达 1mo。

3 测定方法

3.1 样品及处理

3.1.1 样品材料 来自细胞株的细胞浆成分(lysate,细胞裂解物)、来自离体(ex vivo)细胞的细胞浆成分(细胞裂解物)、细胞培养上清液和血浆(血清)。

3.1.2 样品制备 细胞类别不同和细胞凋亡诱导剂不同时,ELISA 所需要的细胞数目也可能不同,因此,细胞数目应当通过预实验来确定。

以喜树碱(CAM)诱导的人淋巴细胞株 U937(ATCC CRL 1593)细胞凋亡为例^[3],取一定量细胞加入含不同浓度喜树碱(0、1、2、4 μ g/ml)的 Eppendorf 管中,用不含 CAM 的培养是作为阴性对照,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 孵箱中培养 4h,于

性铝箔。

2.2 试剂配制

试剂盒包括全部所需试剂,足够 96 份次。

2.2.1 干冻粉剂的处理 抗组蛋白一生物素(瓶 1)、抗 DNA-POD(瓶 2)和阳性对照(瓶 3)为干冻试剂,分别加入 400 μ l 双蒸水稀释,100min,充分混匀,可 4 $^{\circ}$ C 稳定保存 2mo。

2.2.2 免疫反应液的配制 由 1/20 体积抗 DNA-POD(瓶 2)和 1/20 体积抗组蛋白一生物素(瓶 1)与 18/20 体积孵育缓冲液(瓶 4)混合而成。表 1 显示的分别是 10, 20, 40, 50, 100 份次试验所需的配比。

1500r/min,离心 5min,收集细胞,去除上清。将细胞重新悬浮于细胞裂解液(瓶 5)中,室温裂解 30min;于 13000r/min 离心 10min,小心吸出上清(不要摇动沉淀物,避免吸出细胞核,其中含有高分子量未断裂、未降解的 DNA),加入微孔板中,样品最好立即进行核小体的酶标分析,因为 4 $^{\circ}$ C 或 -20 $^{\circ}$ C 保存均会降低 ELISA 信号,我们的实验也验证了这一点。

我们对全胚培养所得给药胚胎及正常胚胎中的细胞凋亡进行了 ELISA 测定,样品的制备与上述基本相似,只是首先进行凋亡处理,然后制备一定浓度的单细胞悬液,最后进行裂解。此外,ELISA 试验中每个 MTP 孔加 20 μ l 样品(即样品浓度相当于 1×10^3 细胞/孔或 5×10^3 细胞/ml),80 μ l 免疫反应液进行测定。每次实验,样品最好做复孔,并设阴性对照(未经药物处理的细胞),并计算富集系数。

3.2 操作步骤

3.2.1 样品转移和孵育 每份样品取 20 μ l 加到 MTP 中,所加样品包括:待测样品;阳性对照(重新配制后的瓶 3);阴性对照;本底对照(孵育缓冲液,瓶 4)。每孔加入 80 μ l 免疫反应混合

液(1),用试剂盒内粘性铝箔盖住 MTP,室温孵育 2h,孵育期间 MTP 放在 MTP 振荡器上轻轻振摇(500r/min)。

3.2.2 洗涤 轻轻吹打或吸去上面液体,用 250~300 μ l 孵育缓冲液(瓶 4)冲洗各孔,小心移去洗涤液。

3.2.3 底物反应

MTP 模板每孔滴加 100 μ l 底物溶液(II),平板振荡器上 250/min 孵育,经 10~20min 颜

$$\text{富集系数} = \frac{\text{样品 OD 值} - \text{本底 OD 值(经处理的细胞)}}{\text{阴性对照 OD 值(未经处理的细胞)}}$$

为了方便,表 2 例出了本法的操作一览表,仅供参考,具体条件还要根据各实验的目的和要

色反应后,进行酶标测定仪分析。

3.2.4 测定 405nm 处,以底物溶液为空白对照进行测定(参考波长 492nm)。

3.2.5 结果处理 将样品双吸收波长测定的值求平均,从其均值中减去免疫测定的本底值,可用下式计算各特测样品释入胞浆内单个和寡聚核小体的特异性富集,反映了各处理组样品相对于未处理样品核小体富集的程度,即处理组样品中组胞凋亡的相对水平。

表 2 ELISA 试验操作一览表

步骤	操作	体积/孔	反应条件
1	细胞与凋亡诱导剂中共孵育	200 μ l	4h/37 $^{\circ}$ C(可变)
2	离心(1500r/min)	200 μ l	5min/RT
	去上清(留 20 μ l)于 4 $^{\circ}$ C 保存,以备与细胞裂解物一起分析(步骤 4)	200 μ l	4 $^{\circ}$ C
3	用裂解缓冲液裂解细胞(瓶 5)	200 μ l	30min/RT
4	离心(13000r/min)	200 μ l	10min/RT
	将细胞裂解物转移至 ELISA-MTP 中	20 μ l	RT
5	与免疫反应液(I)一起孵育	80 μ l	2h/RT
6	各孔用 250 μ l 孵育缓冲液(瓶 4)洗涤 3 次	250 μ l	RT
7	与底物溶液(II)孵育	100 μ l	约 15min/RT
8	于 405nm 处测定吸收度值(参考波长 492nm)	-	-

4 注意事项

利用试验盒法,要特别注意合理安排好实验,因为一些试剂稀释后保存的时间有限,且总共可测 96 份次。实验本底光密度值因实验条件不同会有所变化,阴性对照细胞因不同的细胞培养条件会有所不同,待测样品中凋亡细胞的数量各不相同,要预先测定。实验中要注意以下一些问题:

4.1 稳定性

试剂盒应保存于 4 $^{\circ}$ C,在规定的有效期内使用。

4.2 免疫测定的本底

根据各自测定条件的不同,本底值(用孵育缓冲液取代样品溶液)也各异,通常情况下底物反应 15min 后本底值小于 100mU。

4.3 阴性对照

根据细胞培养条件,呈指数持续生长的细胞培养液含有一定量的死亡细胞(正常约(3~

8)%)。免疫测定中,这些固有的死亡细胞在未经处理的样品(未经细胞死亡诱导剂处理)中可引起吸收度值的改变,根据死亡的细胞数,此值可能超过免疫测定本底的吸收度值。

4.4 阳性对照

试剂盒中含阳性对照(DNA-组蛋白复合物),底物反应 15min 后,减去本底,显示信号应大于 600mU。

4.5 检测限底

某一特定样品中正在或已死亡细胞确切的测定限度取决于细胞死亡的动力学,所用细胞毒剂和总细胞群中受影响的细胞数。抗体夹心 ELISA 法最低可检测 5 \times 10² 个细胞/ml(相当于每孔 50 个细胞)胞浆中的核小体和寡聚核小体。

4.6 问题及解决办法

不同种类细胞,在培养、孵育时间,对细胞毒剂反应性等方面表现极大的不同,实验中可

能遇到一些问题,如吸收度值过高或过低。表 3 列出了一些常见问题及相应的解决办法,仅供参考:

表 3 ELISA 试验中的问题及解决办法

问 题	原 因	解 决 办 法
样品吸收度值过低	细胞凋亡诱导过低 核小体释放效率低 细胞培养基中含生物素过多(> 25ng/l) 细胞过少	增加诱导剂浓度;延长诱导剂孵育时间。 延长与孵育缓冲液的孵育时间 在振荡器上孵育减少生物素或改用别的培养基 增加细胞浓度;孵育后更加小心移去介质
样品吸收度值过高	细胞凋亡诱导作用过强,阴性对照在允许范围内	降低诱导剂浓度;缩短孵育时间
阴性对照吸收度值	细胞培养状差(有许多死亡细胞)	采用指数生长期细胞,台盼蓝阳性反应细胞最多为(3~8)%;
过高	细胞浓度过高	降低细胞浓度
本底吸收度值过高	底物太旧,未避光保存或未加酶情况下已显色	采用新的底物溶液
变异过大	各孔细胞数不同 孵育后去介质时丢失细胞	加入孔之间细胞悬液混匀 多离心一会儿;吸取液体时要加倍小心;采用 MTP-倒置法,离心后倒置 MTP;不要拍打,去除液体后的细胞将留在底部

5 ELISA 法检测凋亡的优点

ELISA 法具有以下一些优点:

一步 ELISA 夹心法(样品,生物素标记的抗组蛋白和过氧化物酶结合的抗 DNA 抗体混合物在亲合素包被的微滴定板,即 MTP 中共同孵育),一次免疫测定中可检测出组蛋白联结的 DNA 片段,显示凋亡过程中出现核小体间基因组 DNA 降解;

灵敏度高(5×10^2 细胞/ml);

操作快捷(3~4h);

无放射性同位素;

定量测定细胞死亡;

无需预先标记细胞(这使得凋亡的定量也可以在体外不增殖的细胞中进行,如新鲜分离,离体肺癌细胞);

所用抗体不是种属特异性的(可检测不同来源的细胞凋亡),抗组蛋白抗体可与人、小鼠、大鼠、仓鼠、牛、负鼠(opossum)、爪蟾、猪和果蝇等多种生物的组蛋白结合;POD 标记的抗 DNA 抗体可与单链和双链的 DNA 起反应,据此设计的抗体夹心酶联免疫分析法可以测定核小体单

体和聚合物,因而可以用于许多不同的培养细胞株或动物组织细胞的凋亡研究。

所得结果与标准方法得到一致;

阳性对照(试剂盒中提供了组蛋白-DNA 复合物);

人抗鼠因子(HAMA)受抑(可对 HAMA 阳性血清进行分析)。

鉴于上述优点,相信 ELISA 法会在细胞凋亡研究中得到越来越多的应用,并得到不断的完善与发展。

参考文献:

- [1] Teni Y, Furukawa Y, Kkuchi J, et al. Apoptosis during HL-60 cell differentiation is closely related to a G_0/G_1 cell cycle arrest [J]. J Cellular Physiol, 1995, 164(1): 74.
- [2] Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, et al. Apoptosis and necrosis, two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(16): 7162.
- [3] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry [J]. Cytometry, 1992, 13(8): 795.

收稿日期: 1999-09-01