

3. Корнев Н.А., Сироткин А.Н. Основы радиэкологии сельскохозяйственных животных. М.: Энергоатомиздат, 1989, 272 с.
4. Жебрин К.А., Чуловин А.Б. Радиационная гематология. М.: Медицина, 1989.
5. Иванов В.В. Изменения размеров лимфоцитов при хроническом воздействии на организм факторов радиационной и химической природы. Гигиена и санитария, 1990. №6, с. 42-44.

УДК 619:616-097.3

## МЕТОД ELISPOT ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛО-СЕКРЕТИРУЮЩИХ КЛЕТОК В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ ЖИВОТНЫХ

А.И.Жаданов

Всероссийский НИИЭВ им. Я.Р.Коваленко, г. Москва

Описанный в 1982 году J.D Sedgwick и P.G. Holt метод ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay) для определения специфических антитело-секретирующих клеток (АСК), пришёл на смену более трудоёмкому и менее чувствительному методу гемолитических бляшек Jerne (1974).

Метод ELISPOT, или точечный иммуноферментный анализ (ИФА) обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Эти свойства связаны с применением специфических антител и системы авидин-биотиона.

Принцип ELISPOT-метода подобен широко распространённому в настоящее время классическому ИФА. Разница заключается в использовании микропанелей: для ИФА - 96-луночные пластиковые «MaxiSorp» «F» или им подобные, а для ELISPOT - 96-луночные микропанели с плоским нитроцеллюлозным дном «Millipore, Bedford» «HA». Кроме того используются разные хромогенные субстраты, отличающиеся по растворимости: орто-фенилендиамин для ИФА и аминок-этил карбазол (АЭК) - для ELISPOT.

Этот метод позволяет оценивать состояние системного и местного иммунитета. Он широко используется иммунологами, бактериологами и вирусологами (J.L. VanCott et al., 1993; L.J. Salf et al., 1994; S.C. Kyriakis et al., 1994; P.Schielen et al., 1995; B. Cukrowska et al., 1995). Кроме АСК этим методом можно выявлять клетки, секретирующие цитокины, или другие продукты, при наличии специфических антител к исследуемому антигену.

Мы применили этот метод для изучения динамики изменений АСК в лимфоидных органах мышей при введении им ассоциированной вакцины, содержащей вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней и ротавирус свиней.

На первом этапе, как и при классическом ИФА, проводили сенсibilизацию микропанелей антигеном. Оптимальную сенсibilизирующую дозу антигена подбирали в предварительных опытах с использованием ИФА. После внесения антигена микропанели в течение часа инкубировали в термостате при 37°C и затем ещё час при комнатной температуре. Перед внесением клеточной суспензии, несвязавшие антиген участки дна лунок, блокировали 2% раствором бычьего сывороточного альбумина.

Второй этап заключался в выделении мононуклеарных клеток из селезёнки, паховых и подколенных лимфатических узлов, тимуса, костного мозга и лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником. Органы гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в присутствии культуральной среды DMEM или RPMI 1640 с последующим центрифугированием при 1500 об/мин. Затем, суспензию центрифугировали в одноступенчатом градиенте плотности гистобака 1.077 г/мл., при 400g в течение 30 мин. Выделенные клетки подсчитывали в камере Горяева с определением их жизнеспособности.

На заключительном этапе клеточную суспензию, содержащую не менее 1000 жизнеспособных клеток в мл., вносили по 100 мкл. в лунки нитроцеллюлозной микропанели. Для каждого органа и изотипа АСК (G,M,A) отводили не менее трёх лунок. Для более точного учёта количества внесённых клеток, суспензию, в том же разведении и объёме, дополнительно вносили в лунки пластиковой микропанели с прозрачным дном. После оседания клеток на дно, их количество подсчитывали под инвертированным микроскопом. Таким образом, контролировали количество мононуклеарных клеток в лунке. Далее проводили инкубацию клеток в термостате при 37°C в течение 3 час.

После инкубации в лунки вносили антитела к IgG, IgM, IgA мыши (Sigma) в разведениях, рекомендуемых фирмой. Инкубацию с конъюгатами проводили в термостате при температуре 37°C в течение 1.5 час., при постоянном встряхивании на микрошейкере. После отмывания вносили авидин, конъюгированный с пероксидазой и инкубировали при тех же условиях, что и с антителами, но в течение часа.

Для проявления реакции использовали набор для окрашивания АЭК (Sigma). После внесения субстрата, под малым увеличением микроскопа определяли степень проявления точек и при наилучшей их видимости реакцию останавливали удалением из лунок субстратного раствора и заполнением их дистиллированной водой для полной остановки реакции.

Учёт реакции проводили под малым увеличением микроскопа (объектив  $\times 4$ , окуляр  $\times 10$ , увеличение 40). Подсчитывались все точки, имеющие правильную круглую форму. Количество окрашенных точек сравнивали с числом клеток, внесённых в лунку. Таким образом, определяли число АСК относительно общего количества мононуклеарных клеток и по его изменению оценивали динамику формирования иммунного ответа.