

## 荧光素标记检测乙型肝炎病毒表面抗原特异性 杀伤性 T 淋巴细胞方法的探讨

吴婷,陈敏,欧山海,何水珍,程通,张军,夏宁邵  
(厦门大学 福建省医学分子病毒学研究中心,福建 厦门 361005)

**摘要:**用绿色荧光前体化合物 Calcein AM 标记靶细胞,经过与杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)效应细胞数小时的孵育,通过分析培养上清中的荧光强度检测 CTL 效应。通过对一系列标记条件的研究:不同浓度 Calcein AM 标记靶细胞、不同洗涤缓冲液、不同标记细胞浓度、不同洗涤次数、不同裂解液配方,确定 Calcein AM 荧光素标记法的最佳条件。用该方法检测乙型肝炎病毒表面抗原的 DNA 疫苗免疫 Balb/c 小鼠对 P815S 细胞的 CTL 效应,E/T 比为 10 时,杀伤效率接近饱和,达到 65%。通过荧光显微镜直接观察杀伤后的 P815S 细胞,细胞破裂程度与计算出的杀伤效率有一定相关性。

**关键词:**绿色荧光前体化合物 Calcein AM;细胞免疫;乙型肝炎表面抗原

**中图分类号:**R373.21 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2005)02-0113-05

杀伤性 T 淋巴细胞(CTL)在消除体内病毒感染、抗移植免疫、抗肿瘤免疫过程中起着极其重要的作用<sup>[1-3]</sup>,建立灵敏、快速的 CTL 检测方法是免疫学家们不断追求的目标<sup>[4,5]</sup>。在疫苗研制、病毒性疾病致病机理、抗肿瘤免疫研究中,CTL 的检测是一个十分重要的组成部分,目前最常用的 CTL 检测方法为<sup>51</sup>Cr 释放法<sup>[6]</sup>,但该方法需要专门的同位素操作室,大大限制了该方法的推广使用;其它 CTL 检测方法包括酶联免疫斑点分析实验(ELISPOT)<sup>[7,8]</sup>、MHC 四聚体分析<sup>[9]</sup>、乳酸脱氢酶释放法<sup>[10]</sup>、流式细胞仪分析<sup>[11]</sup>等方法。这些方法存在检测结果不直接反映 CTL 杀伤靶细胞活性,灵敏度不高或操作步骤繁琐等缺点。

1994 年 Lichtenfels 等<sup>[12]</sup>尝试了使用绿色荧光前体化合物 Calcein AM 标记靶细胞的方法检测 CTL 效应,但该方法的本底较高,影响该方法的检测灵敏度。本文在其基础上改进了 Calcein AM 标记的检测条件,改变荧光标记靶细胞的裂解液配方,降低本底,用该方法对乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)DNA 疫苗免疫 Balb/c 鼠的 CTL 效应。

### 材料与方法

**1 细胞株和质粒** P815S 为染色体整合有 HBsAg 基因的稳定转染细胞株,其母代细胞株 P815(H-2<sup>d</sup>)(ATCC 编号 TIB-64)为小鼠肥大细胞瘤细胞,均由香港大学 Ng 教授实验室惠赠。用于痘苗病毒扩增的非洲绿猴肾细胞 CV-1(ATCC 编号 CCL-70)和用于痘苗病毒的重组人骨髓瘤细胞 143-B(ATCC 编号 CRL-8303)均购自 ATCC。

质粒 pcDNA3.1-S 由本室构建,即在载体 pcDNA3(购自 Clontech)的多克隆位点中插入单拷贝 HBsAg。质粒大量提取采用 QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Mega Kit。重组痘苗病毒用载体 pV,由香港大学 Ng 教授实验室惠赠。

**2 试剂和仪器** Calcein AM 购自 Molecular probes 公司。细胞培养基 MEM、DMEM、1640、质粒转染试剂 Lipofectamine<sup>™</sup>购自 Invitrogen。HBsAg ELISA 检测试剂盒购自北京万泰生物药业有限公司。微孔板荧光检测仪 Fluoroskan Acent<sup>®</sup> FL 购自 Thermo LabSystems 公司;荧光倒置显微镜为 Nikon Diaphot 300 型。

**3 Calcein AM 标记靶细胞及荧光自发释放率的计算** 用 5% PBS(含 5% FCS 的 PBS)洗涤对数生长期的 P815 细胞 1 次,计数。取  $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$  或  $4 \times 10^6$  的 P815 细胞(据具体实验而定),重悬于 200 $\mu$ l 含 1mmol/L、10mmol/L 或 25mmol/L(据具体实验而定) Calcein AM 的 5% PBS 中,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,5% PBS 洗涤 1~3 次(据具体实验而定),重悬于无酚红 1640(含 10% FBS、2mmol/L 谷氨酰胺、10mmol/L HEPES、100U/ml 青霉素钠、100U/ml 硫酸链霉素),调节细胞浓度至每 100 $\mu$ l 含 5 000、10 000 或 20 000 个细胞(据具体实验而定),取 100 $\mu$ l 至 96 孔 U 型板。加入

收稿日期:2004-03-30,修回日期:2004-11-08

基金项目:教育部跨世纪优秀人才优秀培养计划

作者简介:吴婷(1973-),女,博士,讲师。

通讯作者:夏宁邵,厦门大学福建省医学分子病毒学研究中心,  
361005

(E-mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn)

100 $\mu$ l 10% 无酚红 1640 或 100 $\mu$ l 不同浓度 (0.003% ~ 0.1%) SDS (据具体实验而定)、0.1% Triton、50mmol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , 37 $^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱孵育 4h, 700g 离心 5min, 取 150 $\mu$ l 上清液, 微孔板荧光检测仪 485nm (激发波长)、518nm (发射波长) 检测荧光强度。分别检测荧光自发释放值 (sp 值) 或全裂解荧光值 (tt 值)。荧光自发释放率 =  $\text{sp}/\text{tt} \times 100\%$ 。每次实验均采用 3 孔重复, 取平均值分析。

**4 重组痘苗病毒的构建、扩增及病毒滴度测定** 用限制性内切酶 *EcoRV* 酶切质粒 pMD18-T-S (由本室构建, 为 pMD18-T 载体上插入 HBsAg 基因), 回收 685bp 的片段, 插入经限制性内切酶 *SmaI* 线性化的载体 pV 中, 置于痘苗病毒早晚期启动子 P7.5 下游, 构建重组痘苗病毒用载体 pV-S (图 1)。载体 pV 构建重组痘苗病毒的具体方法参照文献<sup>[13]</sup>。野生痘苗病毒 WR 感染 CV-1 细胞, 37 $^\circ\text{C}$  感染 2h 后转染 pV-S 质粒 (具体方法详见转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 产品说明), 48h 后刮下细胞, 冻融 3 次, 作为重组病毒 WR-S 储存液。将重组病毒储存液稀释不同倍数后感染 143-B 细胞, 37 $^\circ\text{C}$  2h, PBS 洗 1 次, 加入含 0.05mg/ml 5-溴脱氧尿嘧啶 (BrdU)、100 $\mu$ g/ml X-gal、1% 低熔点琼脂糖的 2% MEM, 48h 后挑取蓝色空斑, 进一步用 CV-1 细胞扩增。按试剂盒说明书检测 HBsAg 的表达。获得的病毒用 CV-1 细胞测定病毒滴度。将 CV-1 种入 6 孔板内, 待细胞铺满约 95%, PBS 洗 1 次。将获得的病毒液用 2% MEM 做 10 倍系列稀释, 分别取 500 $\mu$ l 感染细胞, 37 $^\circ\text{C}$  1h, 弃去病毒液, PBS 洗 1 次, 加入含 0.05mg/ml BrdU、100 $\mu$ g/ml X-gal、1% 低熔点琼脂糖的 2% MEM, 72h 后计数蓝色空斑, 计算病毒滴度 = 蓝色空斑数  $\times 2 \times$  稀释倍数 PFU/ml。

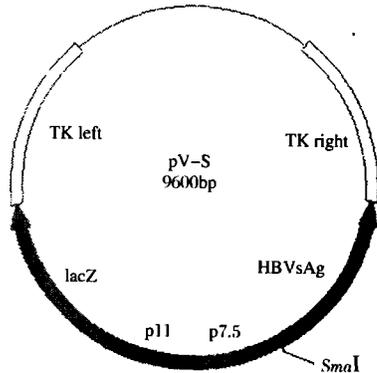


图 1 质粒 pV-S 图谱

Figure 1 Map of plasmid pV-S

**5 DNA 疫苗的构建** 用限制性内切酶 *HindIII* 和 *EcoRI* 酶切质粒 pMD18-T-S, 插入经限制性内切酶 *HindIII* 和 *EcoRI* 线性化的载体 pcDNA3.1 中, 转染 HepG2 细胞 (由于 HepG2 细胞的转染效率及 CMV 启动子在其中的表达效率较高, 故选择该细胞), ELISA 法确证 pcDNA3.1-S 能够在哺乳动物细胞内表达有活性的 HBsAg。

**6 免疫小鼠** 取 6~8 周龄的 Balb/c 鼠 (SPF 级), 腿部肌肉注射 1 $\mu$ g/ $\mu$ l pcDNA3.1-S 100 $\mu$ l, 两周后加强 1 针, 第四周末

腹腔注射  $1 \times 10^7$  PFU WR-S。7 天后, 取小鼠脾脏检测 CTL。

**7 CTL 的检测** 取免疫后小鼠脾脏, 2ml 注射器研磨, 200 目筛网过滤, 5% PBS 洗涤后离心, 3ml 0.83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  室温处理 3min, 加入 2ml PBS, 离心, PBS 洗涤后重悬于 10% 1640 (含 10% FCS、1% 非必需氨基酸、50 $\mu$ mol/L  $\beta$ -巯基乙醇、2mmol/L 谷氨酰胺、1mmol/L 丙酮酸钠、10mmol/L HEPES、100U/ml 青霉素钠、100U/ml 硫酸链霉素) 中, 种 24 孔板,  $0.5 \times 10^6$  细胞/孔。用 10 个感染复数 (MOI) 的重组痘苗病毒 WR-S 37 $^\circ\text{C}$  感染 Balb/c 鼠脾脏细胞 1h 做为刺激细胞, 刺激细胞与反应细胞的比例为 1:40, 37 $^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱培养 5 天, 每天补充培养液。检测时 Calcein AM 标记 P815S 和 P815 细胞作为靶细胞, 标记方法同 3。将效应细胞与靶细胞以效/靶比 (E/T) 分别为 100:1、33:1、10:1、1:1 的比例种入 96 孔圆底板, 300g 离心 30s, 37 $^\circ\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱孵育 4h, 700g 离心 5min, 取 150 $\mu$ l 上清液, 检测荧光强度。分别用 10% 无酚红 1640 及 0.025% SDS (裂解液) 孵育荧光素标记的靶细胞, 以检测其 sp 值及 tt 值, CTL 对靶细胞的裂解率 = (样品荧光值-sp)/(tt-sp)  $\times 100\%$ 。

## 结 果

### 1 不同裂解液对 Calcein AM 标记靶细胞荧光释放的影响

在计算 CTL 的杀伤效率时, 裂解液裂解靶细胞测得的全裂解荧光值的大小, 对于杀伤效率的计算有着重要的影响。用裂解液处理荧光标记靶细胞后, 靶细胞完全破裂, 荧光释放至上清液, 此时测得的荧光值与靶细胞的总量呈正相关。在研究中发现, 采用裂解液 0.1% Triton + 50mmol/L  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ <sup>[12]</sup>, 测得的 sp/tt 较高。而改用 0.5% SDS 裂解细胞测得上清液的全裂解荧光值, 比用 10% 1640 孵育细胞测得的荧光自发释放值还低 (结果未显示), 故推测裂解液可能会对荧光产生淬灭作用。因此试验用不同浓度的 Triton 裂解液和 SDS 裂解液裂解细胞, 以选择对细胞释放荧光淬灭最小的裂解液。结果表明 (图 2), 0.025% SDS 裂解细胞后测得的 sp/tt 值最低。

### 2 不同洗涤缓冲液及不同洗涤次数对荧光自发释放的影响

用 Calcein AM 标记靶细胞之后, 需要经过多次洗涤以去除细胞外的游离荧光素, 充分而不过量的洗涤条件对于有效降低 sp/tt 值非常重要。洗涤次数太少, 游离荧光素的存在造成荧光自发释放增高的假象; 洗涤次数过多可能损伤细胞膜, 亦会造成荧光自发释放增高。试验了不同洗涤缓冲液, 不同洗

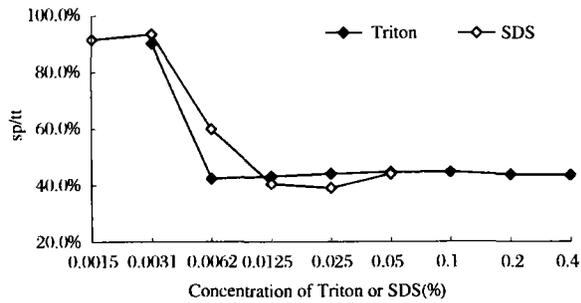


图2 不同裂解液裂解 Calcein AM 标记细胞测得的全裂解荧光值比较

Figure 2 sp/tt ratio detected by lysing the Calcein AM labeled cells with different lysis buffers

条次数对 sp/tt 的影响,结果(图 3)表明,用含 5% FCS 的 PBS 洗涤 3 次,sp/tt 最低。

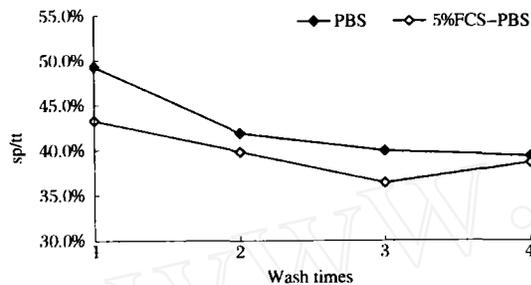


图3 不同洗涤缓冲液及不同洗涤次数对荧光自发释放的影响

Figure 3 sp/tt ratio detected by washing the labeled cells with different buffers for different times

### 3 Calcein AM 使用浓度和初始细胞密度的选择

分别用  $1\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$  和  $25\mu\text{mol/L}$  的 Calcein AM 标记细胞,其 sp/tt 值分别为  $46.2\% \pm 9.3\%$ 、 $45.4\% \pm 3.8\%$  和  $44.8\% \pm 3.3\%$ ,不同浓度标记的 sp/tt 值未见明显差别,以  $25\mu\text{mol/L}$  Calcein AM 标记较低一些。

用  $25\mu\text{mol/L}$  calcein AM 标记初始密度分别为  $0.5 \times 10^7/\text{ml}$ 、 $1 \times 10^7/\text{ml}$  和  $2 \times 10^7/\text{ml}$  的靶细胞,其 sp/tt 值分别为  $44.5\% \pm 2.1\%$ 、 $45.0\% \pm 1.8\%$  和  $46.6\% \pm 1.7\%$ ,未见明显差别,但似乎有随着靶细胞密度的增加 sp/tt 值呈升高的趋势。

最终确定标记条件为  $25\mu\text{mol/L}$  Calcein AM  $37^\circ\text{C}$  标记 30min,标记细胞密度为  $0.5 \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$ ,洗涤缓冲液为 PBS + 5% FCS,洗涤 3 次,细胞全裂解液采用 0.025% SDS。

### 4 Calcein AM 标记细胞数与上清中荧光强度的相关性

Calcein AM 标记靶细胞的方法检测 CTL 效应,是通过检测效应细胞与靶细胞培养上清的荧光强度

来计算靶细胞的裂解率。因此,已标记的靶细胞破裂后释放的荧光强度与靶细胞数量是否成正比直接影响检测结果。检测不同浓度 Calcein AM 标记靶细胞后,不同数量靶细胞全裂解的荧光强度,结果表明,不论用何种浓度 Calcein AM 标记,靶细胞全裂解的荧光强度与靶细胞数量呈良好的线性关系(图 4)。

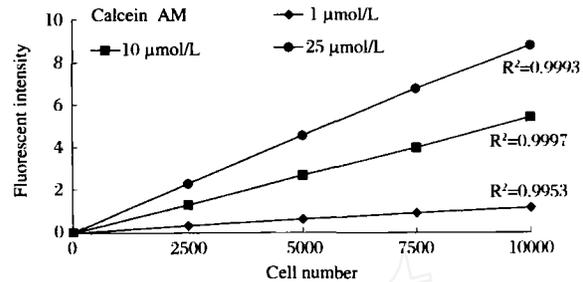


图4 不同浓度 Calcein AM 标记细胞的孵育上清中的荧光强度与细胞数量的关系

Figure 4 The relationship between cell number and fluorescent intensity in culture supernatant of cells labeled with different concentrations of Calcein AM

### 5 用改良 Calcein AM 标记法检测 pcDNA3.1-S 免疫鼠的 CTL

以 pcDNA3.1-S 免疫 Balb/c 鼠 4 周后,  $2 \times 10^7$  PFU 痘苗病毒 WR-S 加强 1 针,7 天后取脾脏细胞,体外刺激 5 天后,Calcein AM 荧光素标记法检测其效应细胞对 p815S、p815 细胞的杀伤作用。以空白载体 pcDNA3.1 免疫的 Balb/c 鼠作为阴性对照。结果(图 5)表明,pcDNA3.1-S 免疫鼠在 E/T 比为 10 时,对 p815S 的裂解率即接近饱和,达到 65% 左右;而对阴性对照 p815 的裂解率仅有 10.4%。空白载体 pcDNA3.1 免疫鼠对 p815S、p815 细胞的杀伤效率均在 10% 以内。

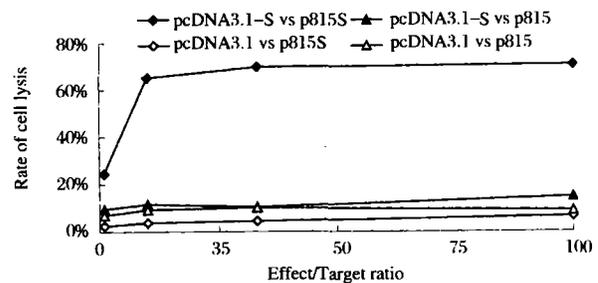


图5 DNA 疫苗免疫鼠对 HBsAg 的特异性 CTL 应答  
Figure 5 HBsAg-specific CTL response of mice immunized with DNA vaccine

在荧光显微镜下直接观察 CTL 杀伤后的 P815S 细胞,可见 E/T 比为 33 时,已几乎见不到形态完整的细胞,而仅可见细胞残骸(图 6)。

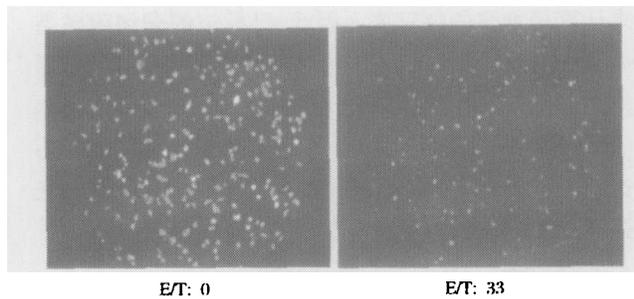


图 6 荧光显微镜观察 DNA 疫苗免疫鼠 CTL 对靶细胞的杀伤效应

Figure 6 HBsAg-specific CTL response of mice immunized by DNA vaccine observed under fluorescent microscope

## 讨 论

目前国际上最常用的 CTL 检测方法为<sup>51</sup>Cr 释放法<sup>[6]</sup>,该方法将 CTL 效应细胞与同位素<sup>51</sup>Cr 标记的靶细胞孵育数小时之后,被 CTL 杀伤的靶细胞将<sup>51</sup>Cr 释放至上清液中,通过  $\gamma$ -计数仪检测上清中<sup>51</sup>Cr 的释放量即可计算杀伤效率。该方法检测本底低,灵敏度高,但成本较高,操作复杂,需要专门的同位素操作室,且对操作者的健康和环保不利。

近几年来,人们一直在积极寻找非同位素的检测方法,新的 CTL 检测系统陆续被报道。例如 ELISPOT<sup>[7-8]</sup>、抗原肽特异四聚体染色法<sup>[9]</sup>、流式细胞仪检测<sup>[11]</sup>等方法。前二者是间接检测法,通过分析 CTL 分泌的细胞因子及 MHC-抗原肽四聚体与 CTL 表面 TCR 的结合检测 CTL 效应,该方法不如直接检测 CTL 对特异性靶细胞的杀伤客观,影响因素较多。流式细胞仪检测法可以同时分析 CTL 的细胞表面标志,获得信息较多,但样品制备步骤繁琐,检测过程耗时,且对检测人员的要求高,不适宜用作大量样品的检测。

Calcein AM 是绿色荧光素 Calcein 的乙酰氧甲基酯,经被动转运进入细胞后被酯酶水解成绿色荧光素 Calcein,Calcein 被滞留于完整的细胞膜内,当细胞膜损伤时,Calcein 释放出胞外。通过荧光酶标仪分析培养上清中的绿色荧光强度,即可检测 CTL 对靶细胞的杀伤效率。本实验在 Lichtenfels 等<sup>[12]</sup>的实验基础上改进了 Calcein AM 标记的细胞全裂解液配方,降低本底,确定 Calcein AM 荧光素标记法的最佳条件为 25  $\mu$ mol/L Calcein AM 37 $^{\circ}$ C 标记 30min,标记细胞密度为  $1 \times 10^6$  细胞/200  $\mu$ l,标记后

用含 5% FCS 的 PBS 洗涤 3 次,细胞全裂解液采用 0.025% /SDS。

以 Calcein AM 荧光素标记法检测 pcDNA3.1-S 免疫,重组痘苗病毒 WR-S 加强的 Balb/c 鼠的 CTL 效应,结果表明 E/T 比为 10 时,杀伤效率即可达到 65.2%。用荧光倒置显微镜直接观察杀伤后的靶细胞,发现在 10% 无酚红 1640 中培养 4h 的靶细胞形态完整,透光率好,说明 Calcein AM 荧光素标记对细胞活性没有影响。而随着 CTL 比例的增多,细胞破裂程度增加,待效靶比增至 33:1 时,靶细胞已基本完全破裂,荧光素基本释放至上清液中,但细胞残骸上仍粘有少量的绿色荧光。Calcein AM 标记法检测 CTL 效应操作简单,检测快速,并且可以通过荧光显微镜直接观察杀伤效果。

## 参考文献:

- [1] Palmowski M J, Lopes L, Ikeda Y, et al. Intravenous injection of a lentiviral vector encoding NY-ESO-1 induces an effective CTL response[J]. J Immunol, 2004, 172(3): 1582 - 1587.
- [2] Ali A, Lubong R, Ng H, et al. Impacts of epitope expression kinetics and class I downregulation on the antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes[J]. J Virol, 2004, 78(2): 561 - 567.
- [3] Yokomaku Y, Miura H, Tomiyama H, et al. Impaired processing and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte(CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection[J]. J Virol, 2004, 78(3): 1324 - 1332.
- [4] Fisher K, Andreesen R, Mackensen A. An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity[J]. J Immunol Methods, 2002, 259(1-2): 159 - 169.
- [5] Dias N, Lima N. A comparative study using a fluorescence-based and a direct-count assay to determine cytotoxicity in *Tetrahymena pyriformis* [J]. Res Microbiol, 2002, 153(5): 313 - 322.
- [6] Brunner K T, Muel J, Cerottini J C et al. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on <sup>51</sup>Cr-labelled allogeneic target cells *in vitro*: inhibition by isoantibody and drugs[J]. Immunology, 1968, 14(2): 181 - 196.
- [7] Liu W J, Zhao K N, Gao F G, et al. Polynucleotide viral vaccines: codon optimisation and ubiquitin conjugation enhances prophylactic and therapeutic efficacy[J]. Vaccine, 2001, 20(5-6): 862 - 869.
- [8] Park S H, Yang S H, Lee C G, et al. Efficient induction of T helper 1 CD4<sup>+</sup> T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost[J]. Vaccine, 2003, 21(31): 4555 - 4564.
- [9] Choi E M, Chen J L, Wooldridge L, et al. High avidity antigen-specific CTL identified by CD8-independent tetramer staining[J]. J Immunol, 2003, 171(10): 5116 - 5123.
- [10] Zhao P, Jiang C P, Zhao L J, et al. Strong and durable cellular immune response in mice induced by Hepatitis B virus envelope and core fusion gene DNA vaccine[J]. Prog Biochem Biophys, 2002, 29

- (4):576 - 582.
- [11]Sheehy M E,McDermott A B,Furlan S N, et al. A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis [J]. J Immunol Methods,2001,249(1-2):99 - 110.
- [12]Lichtenfels R, Biddison W E, Schulz H, et al. CARE-LASS(calcein-release-assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte activity[J]. J Immunol Methods, 1994,172(2):227 - 239.
- [13]Ausubel F M,Brent R,Kingston R E, et al. Current Protocols in Molecular Biology[M]. John Wiley & Sons, Inc,1998.

## A Sensitive and Convenient Fluorescence Assay for the Determination of Cytotoxic T Lymphocyte Activity Primed by HBsAg

WU Ting, CHEN Min, OU Shan-hai, HE Shui-zhen, CHENG Tong, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(The Molecular Medicinal Virology Research Center of Fujian Province, Xiamen University, Xiameng 361005, China)

**Abstract:** The use of chromium-release assay to determine the cytotoxicity of effector against target cells has various limitations mostly due to the inherent properties of the radioactive substance. Alternative methods to detect CD8<sup>+</sup> activity including ELISPOT, tetramer staining, or flow cytometry are indirect or time consuming detection. A non-fluorescent substance Calcein AM has been used to stain the target cells and then intracellularly converted to green fluorescent calcein by esterase activity, after several hours' coculturing with effector, intensity of fluorescence in supernatant was assayed to determine the specific lysis ratio of cytotoxic T lymphocyte (CTL). This method is convenient and nontoxic, but has high background which limits its large-scale use. In this report, several labeling conditions were tried to decrease its background and increase its sensitivity which included: labeled the target cells with 1 μmol/L, 10 μmol/L or 25 μmol/L Calcein AM; labeled the target cells at 1 × 10<sup>6</sup>, 2 × 10<sup>6</sup> or 4 × 10<sup>6</sup> cells/200 μl labeling buffer; washed the labeled cells with PBS or PBS containing 10% FCS 1 - 3 times to remove extracellular calcein; total lysis of the labeled target cells with different concentrations of SDS or Triton, and at last the optimal labeling and assay conditions were determined that were to label the target cells with 25 μmol/L Calcein AM in 37°C CO<sub>2</sub> incubator for 30 min; the labelling concentration of the target cells was 1 × 10<sup>6</sup> ~ 2 × 10<sup>6</sup> cells/200 μl labeling buffer; the labeled cells were washed with PBS containing 10% FCS for 3 times; 0.025% SDS was used for total lysis of the labeled target cells to determine the specific lysis ratio. This improved fluorescence assay was used to detect CTL activity of Balb/c mice primed by HBsAg DNA vaccine pcDNA3.1-S and boosted by recombinant vaccinia virus WR-S which contains HBsAg coding gene. The DNA vaccine vector pcDNA3.1 was used as negative control. One week later, the splenocytes were separated and *in vitro* stimulated by mitomycin C treated P815S for 5 days. The specific lysis of P815S cell line with lysis ratio 65% and P815 cell line with lysis ratio 10.4% at E/T 10 were observed. Splenocytes of DNA vaccine vector pcDNA3.1 immunized mice lysed P815S and P815 with lysis ratio below 10% at E/T 10. The cell lysis could be also observed under fluorescent microscope directly and showed consistence with assay results. This improved fluorescence assay method is low cost, convenient, and nontoxic.

**Key words:** Calcein AM; CTL; HBsAg