

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710056895.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 9 月 10 日

[11] 公开号 CN 101261272A

[22] 申请日 2007.3.9

[21] 申请号 200710056895.0

[71] 申请人 天津市秀鹏生物技术开发有限公司

地址 300384 天津市南开区新技术产业园区
二纬路 6 号 F 座 3 门 601

[72] 发明人 赵卫军

[74] 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限公司

代理人 王融生

权利要求书 3 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

HCMVPP65 抗原血症间接免疫荧光法检测试剂盒

[57] 摘要

一种名称为 HCMVPP65 抗原血症间接免疫荧光法检测试剂盒，以巨细胞病毒 - AD169 病毒株 pp65 蛋白为免疫原，免疫 Balb/c 小鼠，取免疫小鼠的脾细胞和同系小鼠的骨髓瘤细胞进行常规融合，通过间接 ELISA 的筛选和有限稀释克隆化，获得鼠抗巨细胞病毒 pp65 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株，通过 ELISA 和免疫荧光实验等方法鉴定其特性；成功地建立了 2 株稳定分泌 pp65 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株，分别命名为 1A6，和 4A8。制备了与以往报道不同的针对巨细胞病毒(CMV) pp65 蛋白的单克隆抗体，同时建立制备红细胞快速裂解的方法，其试剂盒与其它同类试剂盒相比，更为快速，简单，方便，特异性与敏感性更高。

1、一种名称为HCMVPP65抗原血症间接免疫荧光法检测试剂盒

其特征在于：制备了与以往报道不同的针对巨细胞病毒 CMV pp65 蛋白的单克隆抗体，同时建立制备红细胞快速裂解的方法，其试剂盒与其它同类试剂盒相比，更为快速，简单，方便，特异性与敏感性更高。

具体制作方法为：

采用的关键技术为 （1）人 巨 细 胞 病 毒 1A6 与 4A8 单 克 隆 抗 体 制 备 与 鉴 定 。 （2）直接裂解红细胞技术。

（1）巨细胞病毒 CMV pp65蛋白的单克隆抗体制备基本过程

基本过程：

以巨细胞病毒-AD169病毒株pp65蛋白为免疫原，免疫Balb / c小鼠，取免疫小鼠的脾细胞和同系小鼠的骨髓瘤细胞进行常规融合，通过间接 ELISA 的筛选和有限稀释克隆化，获得鼠抗巨细胞病毒pp65蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株，通过 ELISA 和免疫荧光实验等方法鉴定其特性；

成功地建立了 2 株稳定分泌pp65蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株，分别命名为1A6, 和 4A8；通过 ELISA, 免疫荧光实验等方法的鉴定，抗pp65蛋白的单克隆抗体性能与pp65蛋白发生特异性反应；免疫荧光实验的结果表明，pp65 蛋白的单克隆抗体性能与以巨细胞病毒-AD169病毒株pp65蛋白发生特异性结合；结果显示，以 C10/C11 单克隆抗体--阳性对照抗体，与待筛选单克隆抗体作用的巨细胞病毒感染的人胚成纤维细胞株细胞的胞核均出现明显的pp65蛋白荧光反应，与小鼠 IgG 作用不发生反应；由此获得了特异性识别抗巨细胞病毒pp65蛋白单克隆抗体，为人巨细胞病毒pp65蛋白抗原血症检测试剂的研制奠定了基础；

所需材料

动物：6～8 周的 Balb /C 小鼠，雌性，北京大学医学部实验动物科学部提供——SCXK(京) 2004 - 002 ；

试剂：100 × HAT 及100 ×HT添加剂、82氮杂鸟嘌呤、福氏完全佐剂及福氏不完全佐剂、RPM 1640培养基均为 Gibco BRL 产品；相对分子质量为 1 500 的聚乙二醇为 Sigma 产品；胎牛血清为 Hyclone 产品；FITC标记的羊抗鼠 IgG 为 Sigma 产品；巨细胞病毒-AD169 病毒株与人胚成纤维细胞株HELFL；pp65蛋白 C10/C11 单克隆抗体，IgG 亚类检测试剂盒

1A6，4A8 抗PP65蛋白单克隆抗体的基本特性以PP65蛋白为抗原，间接 ELISA 检测腹水的抗体滴度分别为 1 : 10⁴ 与 1 : 10⁵；这些单克隆抗体均为 IgG2a 亚类免疫球蛋白；

1A6，4A8 间接免疫荧光技术检测巨细胞病毒感染人胚成纤维细胞株HELFL细胞中pp65蛋白的表达；结果显示，C10/C11 单克隆抗体--阳性对照与待筛选单克隆抗体作用的巨细

胞病毒感染的人胚成纤维细胞株HELFL细胞的胞核均出现明显的pp65蛋白荧光反应，小鼠IgG作用不与病毒感染细胞发生反应；

(2) 直接裂解红细胞技术：

基本过程：

采用的快速抗原血症检测采用直接在2ml全血中裂解红细胞的程序，然后是对细胞密度进行调整/离心分离，大大缩短了处理时间；

操作程序：

使用前完全混合均匀，按1：19—20倍的比例加入到去离子水中；

轻轻地倒置容器混合样本；不要使用混匀器；

将2ml全血 + 6ml配制后的红细胞裂解液加入一个15ml锥形离心管中用移液器轻轻混合均匀在室温放置5分钟；

在+2 ~ +8℃、160g下离心10分钟；

轻轻翻转试管，将上清液倒入消毒液中——0.5%或1%的次氯酸钠；保留沉淀物，小心操作，不要将细胞沉淀去除；

加入3ml配制后的红细胞裂解液使血细胞重新悬浮；不要在室温放置，立即执行下一步操作；

在+2 ~ +8℃、160g下离心10分钟；

按照前面的方法再一次将试管翻转去除上清液，注意不要将细胞沉淀去除；

加入1ml配制后的试剂A——PBS使血细胞重新悬浮，用移液器将其轻轻混合均匀；调整细胞密度

技术指标：镜下检测显微镜下细胞易于辨别，细胞形态好，红细胞碎片少；

试剂盒中试剂组份

SUPER002-A	PBS	5 瓶	干 粉	稀 释 至 5 L
SUPER002-B	红 细 胞 裂 解 液	1 瓶	45 ml (20x 浓 缩)	稀 释 至 900 ml
SUPER002-C	固 定 液	1 瓶	110 ml (5x 浓 缩)	稀 释 至 550 ml
SUPER002-D	胎 牛 血 清	1 瓶	30 ml	用 于 洗 液
SUPER002-E	通 透 液	1 瓶	110ml (5x 浓 缩)	稀 释 至 550 ml
SUPER002-F	抗 HCMVpp65 单克隆混合抗体	1 瓶	3 ml	备 用
SUPER002-H	FITC 标记的二抗 (抗鼠 IgG+IgM) F(ab) ₂	1 瓶	3 ml	备 用
SUPER002-J	封 片 剂	1 瓶	4 ml	备 用
SUPER002-K	白 细 胞 分 离 液 (右旋糖苷)	1 瓶	60 ml	备 用
SUPER002-M	显 微 镜 载 玻 片	100 张		备 用

各组份配方:

A PBS: 磷酸盐缓冲液—PBS, pH 7.3 0.15mol/L NaCl ,0.01mol/L NaH₂PO₄, NaOH 调pH至 7.3

B 红细胞裂解液:

C 固定液: 中性多聚甲醛溶液 多聚甲醛, 双蒸水配成4%溶液, NaOH 调pH至 7.3

D 胎牛血清: 外购

E 通透液:

F 抗 HCMVpp65 单克隆混合抗体:

H FITC 标记的二抗——抗鼠 IgG+IgM —F(ab)₂: 购自 SIGMA 公司

J 封片剂:

K 白细胞分离液——右旋糖苷: 称取5g葡聚糖于烧杯中, 加入 100ml PBS, 0.02g 叠氮钠, 混匀。

M 显微镜载玻片: 多具赖氨酸处理。

HCMVPP65 抗原血症间接免疫荧光法检测试剂盒

技术领域

本发明属于特别涉及一种 HCMVPP65 抗原血症间接免疫荧光法检测试剂盒。

背景技术

国外巨细胞感染检测相关技术的研究与开发现状：尽管病毒壳脱落离心培养技术得到了极其广泛的应用，但其耗时较长，结果受标本保存时间影响大，所以其临床应用价值尚不明朗。血清学试验由于只能在感染 2~4W 后才能检出阳性结果，而且受器官移植后免疫抑制剂的影响，不能分辨潜伏性感染和活动性感染，其临床应用价值受到一定的限制。近来，国外报道了标准化的 HCMV 分析法有助于预测 HCMV 病。抗原血症检测技术是一种更快速、更敏感、早期检测 CMV 活动性感染的技术，pp65 抗原分析能敏感地在早期预测 HCMV 病。在出现临床症状以前，抗原血症检测技术和 PCR 技术均可检测和鉴定出 CMV 的感染。目前 HCMV pp65 抗原血症检测试剂盒在国外已有两家公司商品化，并在美国 FDA 注册。在我国已有此方面的诊断技术引入，但均为进口试剂。

国内巨细胞感染检测相关技术的研究与开发现状：目前，国内对器官移植患者的感染合并症，虽然临床上经常遇到，但实际认识水平大都不高，研究也不多，诊断手段还不全，广泛使用的还是血清学诊断方法，不能够达到早期诊断的目的。在国内采用的同类产品全部是进口试剂，而至今在我国尚未有开发上市的国产试剂，虽有应用方面的相关研究，但国内未见研制和生产方面的研究。

我们目前的研究表明，一旦出现 CMV 感染的临床症状，抗病毒药物不能控制该病的病理进程，这意味着抗病毒药物必须在 CMV 感染的临床症状出现前就使用，这就有赖于实验室的分析来预测 CMV 病。本研究前瞻性地研究了白细胞中 CMV 阳性细胞数量与 CMV 临床症状之间的关系，证实 CMV 阳性细胞数量可以预测 CMV 临床症状，其峰值要比 CMV 感染临床症状出现早 1~2 个月。因此我们认为使用 HCMVpp65 抗原血症间接免疫荧光法检测白细胞中 CMV 阳性细胞数量是一个简单、快速而敏感的预测 CMV 感染的方法。原有的 HCMVPP65 抗原血症间接免疫荧光法检测，制作方法落后，过程复杂，中间过程控制较难，结果不理想。特异性与敏感性低。

从巨细胞 pp65 单克隆抗体制备的角度，研究了白细胞中 CMV 阳性细胞数量与 CMV 临床症状之间的关系。通过新型抗体组的开发，提高试剂的敏感度，增加阳性样本细胞的着色数

量。此理论基础已从临床应用中获得验证,阳性样本的染色细胞数量明显高于国外试剂。弥补无同类国产试剂空白,临床评估证明产品性能已达国际水平。应用 pp65 抗原血症检测指导抗病毒药物的使用进行早期性预排空治疗,对提高器官移植存活率意义重大。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是:提供一种 HCMVP65 抗原血症间接免疫荧光法检测试剂。方法先进,步骤简化,结果理想。

本发明的技术方案:

采用的关键技术为(1)人巨细胞病毒 1A6 与 4A8 单克隆抗体制备与鉴定。(2)直接裂解红细胞技术。

(1) 巨细胞病毒 (CMV) pp65 蛋白的单克隆抗体制备基本过程与鉴定

pp65 蛋白的单克隆抗体其制作方法为:以巨细胞病毒-AD169 病毒株 pp65 蛋白为免疫原,免疫 Balb / c 小鼠,取免疫小鼠的脾细胞和同系小鼠的骨髓瘤细胞进行常规融合,通过间接 ELISA 的筛选和有限稀释克隆化,获得鼠抗巨细胞病毒 pp65 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株,通过 ELISA 和免疫荧光实验等方法鉴定其特性;

成功地建立了 2 株稳定分泌 pp65 蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株,分别命名为 1A6, 和 4A8;通过 ELISA, 免疫荧光实验等方法的鉴定,抗 pp65 蛋白的单克隆抗体性能与 pp65 蛋白发生特异性反应;免疫荧光实验的结果表明, pp65 蛋白的单克隆抗体性能与以巨细胞病毒-AD169 病毒株 pp65 蛋白发生特异性结合;结果显示, C10/C11 单克隆抗体--阳性对照抗体,与待筛选单克隆抗体作用的巨细胞病毒感染的人胚成纤维细胞株细胞的胞核均出现明显的 pp65 蛋白荧光反应,与小鼠 IgG 作用不发生反应;由此获得了特异性识别抗巨细胞病毒 pp65 蛋白单克隆抗体,为人巨细胞病毒病毒 pp65 蛋白抗原血症检测试剂的研制奠定了基础;

所需材料与方法

A 动物

6~8 周的 Balb / C 小鼠,雌性,北京大学医学部实验动物科学部提供[SCXK(京) 2004 - 002]。

1. 2 试剂

100 × HAT 及 100 × HT 添加剂、82 氮杂鸟嘌呤、福氏完全佐剂及福氏不完全佐剂、RPM 1640 培养基均为 Gibco BRL 产品。相对分子质量为 1 500 的聚乙二醇为 Sigma 产品。胎牛血清为 Hyclone 产品。FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为 Sigma 产品。巨细胞病毒-AD169 病毒株与人胚成纤维细胞株 (HELF) 购于美国 autogen 公司。pp65 蛋白 C10/C11 单克隆抗体 (购于荷兰 DAKO 公司),

IgG亚类检测试剂盒购自SIGMA公司。

B 小鼠骨髓瘤细胞的培养

小鼠骨髓瘤细胞s12 为本室常规传代细胞株,融合前经82Azaguanine筛选2周。

动物免疫

将纯化的pp65蛋白与等体积的福氏佐剂混合制成油包水乳剂, 每只小鼠腹腔注射0.5 mL上述混合液(含pp65蛋白180 μ g), 共注射10只小鼠。两周后同剂量抗原加福氏不完全佐剂加强免疫, 7 d后以间接ELISA(波长为490 nm)检测小鼠血清pp65蛋白多抗的效价, 效价高者尾静脉再冲击免疫1次, 每只500 μ g, 3 d后进行细胞融合。

C 杂交瘤细胞株的建立

将免疫小鼠的脾细胞悬液和上述体内培养的s12细胞以5:1的比例在聚乙二醇作用下按常规法融合^[1], 用HAT完全1640培养基筛选培养。以重组pp65蛋白(1.5 mg/L)作为抗原包被酶标96孔板, 间接ELISA法检测杂交瘤细胞培养上清, 所测的 D_{490} 比阴性对照高10倍的克隆, 进行亚克隆化, 并进行扩增冻存。经过3次有限稀释克隆化, 将分泌特异性抗体的杂交瘤细胞系大量扩增并冻存, 长期传代培养后, 以相同的方法再次克隆化鉴定之。

D 单克隆抗体腹水的制备

Balb /C小鼠腹腔内分别注射0.5 mL不完全福氏佐剂, 5~7 d后每只小鼠腹腔内注射0.5 mL含 2×10^6 的杂交瘤细胞, 7~10 d后视小鼠腹部膨胀程度收集腹水。

E 单克隆抗体的纯化

将pp65蛋白单克隆抗体腹水先后用50% (质量分数)饱和硫酸铵盐析和Protein G亲和层析的方法进行纯化, 得到的纯化单克隆抗体用SDS2PAGE电泳法鉴定纯度。

F 单克隆抗体的特性分析

滴度测定 间接ELISA法测定抗体滴度。以pp65蛋白为包被抗原(2.5 μ g/ml), 取小鼠腹水做倍比稀释, 设阳性(c10/c11)和阴性(无抗体腹水)对照, 分别加入不同孔中, 37℃与包被抗原反应2 h充分结合, 洗去未结合抗原, 加HRP 标记的羊抗鼠抗体1 h后显色测OD值。

间接免疫荧光技术

巨细胞病毒-AD169病毒株感染的人胚成纤维细胞株(HELF)阳性细胞收集, 洗涤, 记数(2×10^6), 可进一步纯化, 贴片25 μ L/孔。以未感染巨细胞病毒-AD169病毒株人胚成纤维

细胞株 (HELF) 为阴性对照; (2) 将 $25\mu\text{L}$ 的 C10/C11 单克隆抗体 (阳性对照) 与待筛选单克隆抗体小心加到不同的玻片上, 小鼠 IgG 为阴性对照, 室温孵育 30 min, 反应完毕后用含 0.2% (体积分数) Tween 20 的 PBS 洗涤 5 min。 (3) 加 $20\mu\text{L}$ FITC 标记的羊抗鼠 IgG (SIGMA 公司产品) 于玻片上, 室温反应 30 min, 反应完毕后用 PBS 洗涤 5 min。 (3) 最后加甘油 $10\mu\text{L}$, 封片, 荧光, 显微镜 (OLYMPUS, IX71) 下观察结果。

IgG 亚类鉴定 取杂交瘤细胞培养上清液, 用 SIGMA 公司提供的 Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents 进行 IgG 亚类鉴定。具体操作过程按照说明书进行

G 结果

分泌抗 pp65 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立经 2 次细胞融合、间接 ELISA 克隆筛选和 3 次亚克隆化, 获得了 2 株稳定分泌抗 pp65 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 1A6, 4A8。这些杂交瘤细胞系具有双亲代的生物学性质, 腹腔接种到 Balb/C 小鼠后可以形成肿瘤, 并稳定地产生特异性抗体。稳定传代后冻存于液氮罐中, 6 个月后复苏, 细胞生长良好, 抗体分泌水平未见改变。

1A6, 4A8 抗 PP65 蛋白单克隆抗体的基本特性以 PP65 蛋白为抗原, 间接 ELISA 检测腹水的抗体滴度分别为 $1:10^4$ 与 $1:10^5$ 。这些单克隆抗体均为 IgG2a 亚类免疫球蛋白。

1A6, 4A8 间接免疫荧光技术检测巨细胞病毒感染人胚成纤维细胞株 (HELF) 细胞中 pp65 蛋白的表达。结果显示, C10/C11 单克隆抗体 (阳性对照) 与待筛选单克隆抗体作用的巨细胞病毒感染的人胚成纤维细胞株 (HELF) 细胞的胞核均出现明显的 pp65 蛋白荧光反应, 小鼠 IgG 作用不与病毒感染细胞发生反应。

(2) 直接裂解红细胞技术:

采用的快速抗原血症检测采用直接在 2ml 全血中裂解红细胞的程序, 然后是对细胞密度进行调整/离心分离, 大大缩短了处理时间;

操作程序:

使用前完全混合均匀, 按 1:19 (20 倍) 的比例加入到去离子水中;

轻轻地倒置容器混合样本; 不要使用混匀器;

将 2ml 全血 + 6ml 配制后的红细胞裂解液加入一个 15ml 锥形离心管中;

用移液器轻轻混合均匀;

在室温放置 5 分钟;

在 $+2\sim+8^{\circ}\text{C}$ 、160g 下离心 10 分钟;

轻轻翻转试管，将上清液倒入消毒液中（例如 0.5%或 1%的次氯酸钠）；保留沉淀物，小心操作，不要将细胞沉淀去除；

加入 3ml 配制后的红细胞裂解液使血细胞重新悬浮；不要在室温放置，立即执行下一步操作；

在+2 ~ +8℃、160g 下离心 10 分钟；

按照前面的方法再一次将试管翻转去除上清液，注意不要将细胞沉淀去除；

加入 1ml 配制后的试剂 A（PBS）使血细胞重新悬浮，用移液器将其轻轻混合均匀；

调整细胞密度

技术指标：镜下检测荧光场景易于辨别，细胞形态好，红细胞碎片少。

试剂盒中试剂组份

SUPER002-A	PBS	5 瓶	干粉	稀释至 5 L
SUPER002-B	红细胞裂解液	1 瓶	45 ml (20x 浓缩)	稀释至 900 ml
SUPER002-C	固定液	1 瓶	110 ml (5x 浓缩)	稀释至 550 ml
SUPER002-D	胎牛血清	1 瓶	30 ml	用于洗液
SUPER002-E	通透液	1 瓶	110ml (5x 浓缩)	稀释至 550 ml
SUPER002-F	抗 HCMVpp65 单克隆混合抗体	1 瓶	3 ml	备用
SUPER002-H	FITC 标记的二抗（抗鼠 IgG+IgM）F(ab) ₂		3 ml	备用
SUPER002-J	封片剂	1 瓶	4 ml	备用
SUPER002-K	白细胞分离液（右旋糖苷）	1 瓶	60 ml	备用
SUPER002-M	显微镜载玻片	100 张		备用

各组份配方：

A PBS：磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.3) 0.15mol/L NaCl , 0.01mol/L NaH₂PO₄, NaOH 调 pH 至 7.3

B 红细胞裂解液：

C 固定液：中性多聚甲醛溶液 多聚甲醛(上海试剂一厂), 双蒸水配成 4%溶液, NaOH 调 pH 至 7.3

D 胎牛血清：外购

E 通透液：外购

F 抗 HCMVpp65 单克隆混合抗体：由本公司开发研制（见人巨细胞病毒 1A6 与 4A8 单克隆抗体制备与鉴定）

H FITC 标记的二抗（抗鼠 IgG+IgM）F(ab)₂：购自 SIGMA 公司

J 封片剂：外购

K 白细胞分离液（右旋糖苷）：称取 5g 葡聚糖于烧杯中，加入 100ml PBS, 0.02g 叠氮钠，混匀。

M 显微镜载玻片：购自天津市天玻玻璃仪器制品有限公司，多具赖氨酸处理。

本发明效果是

提高了本实验方法的特异性及敏感度，在临床评估试验中，于国外试剂比较，无确认假阴性报告，整体性能高于国外同类试剂。成功开发出以巨细胞病毒-AD169 病毒株 pp65 蛋白为免疫原的单克隆抗体杂交瘤细胞株，命名为 1A6 和 4A8。此组抗体的获得是我们攻克的技术难关。提高了本实验方法的特异性及敏感度，在临床评估试验中，于国外试剂比较，无确认假阴性报告，整体性能高于国外同类试剂。整个试剂盒方法先进，步骤简化，结果理想。

附图说明

图 1 是杂交瘤细胞原始细胞库生产流程图

图 2 是生产细胞库建立流程图

图 3 是成品试剂生产流程图

具体实施方式

血液样本的收集

抽取静脉血 3 ml，使用肝素抗凝剂，也可以使用 EDTA 抗凝剂。轻轻倒置混合样本。

实验程序

- 将 2ml 全血 + 6ml 配制后的红细胞裂解液加入一个 15ml 锥形离心管中。用移液器轻轻混合均匀。在室温放置 5 分钟。在 +2 ~ +8°C、160g 下离心 10 分钟。轻轻翻转试管，将上清液倒入消毒液中（例如 0.5%或 1%的次氯酸钠）。保留沉淀物，小心操作，不要将细胞沉淀去除。加入 3ml 配制后的红细胞裂解液使血细胞重新悬浮。不要在室温放置，立即执行下一步操作。在 +2 ~ +8°C、160g 下离心 10 分钟。按照前面的方法再一次将试管翻转去除上清液，注意不要将细胞沉淀去除。加入 1ml 配制后的试剂 A（PBS）使血细胞重新悬浮，用移液器将其轻轻混合均匀。
- 制备样本玻片：以 900rpm 低速率离心 100ul 浓度为 2×10^5 的细胞悬液载玻片 3 分钟。载玻片离心时，制备用于固定和通透步骤的洗液（见“试剂的配制”章节）。稍待玻片干燥，不要等待时间过长。
- 固定和通透：仅使用试剂盒内提供的固定液，不要使用丙酮，许多专家认为使用甲醛作为固定剂的效果优于丙酮。在室温，将玻片浸入配制后的固定液（试剂 C）10 分钟后取出。不要等玻片干燥，在室温立即浸入制备好的洗液中，5 分钟后取出，不要等玻片干燥，在室温立即将其浸入配制后的通透液（试剂 E）中，5 分钟后取出。不要等玻片干燥，在室温立即将其浸入制备好的洗液中，5 分钟 - 1 小时。

染色：滴入一滴抗 HCMVpp65 (IA6+4A8) 混合单克隆抗体，在 37℃ 的湿盒内温育 30 分钟。用 PBS (试剂 A) 清洗 3 次，每次清洗 1 分钟，每次清洗使用新鲜的洗液。小心的擦去样本区周围的多余液体，小心不要污染到样本，也不要让玻片干燥。滴入一滴 FITC 标记的二抗 (试剂 H)。注意：抗体必须一直保存在 2-8℃ 直到使用。在 37℃ 的湿盒内温育 30 分钟。温育结束后观察：玻片样本区不能干燥。如果出现干燥的样本区，则在相应的样本玻片上作标记并记住此玻片，在读取结果时如果出现问题，则可能是由此导致的。用 PBS (试剂 A) 清洗 3 次，每次清洗 1 分钟，每次

清洗使用新鲜的溶液。快速浸入自来水中去除结晶。使玻片完全干燥。使用试剂 J (封片剂) 封片。

结果解释：当白细胞的分页核细胞或单核细胞的核周或核被染色，表现为带荧光的苹果绿色，则可判定为阳性结果。

当样本玻片中的白细胞未表现出着色时，则可判定为阴性结果。如果没有核着色或核周着色，任何的细胞质着色均可被认为是阴性结果。

专利名称(译)	HCMVPP65抗原血症间接免疫荧光法检测试剂盒		
公开(公告)号	CN101261272A	公开(公告)日	2008-09-10
申请号	CN200710056895.0	申请日	2007-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	天津市秀鹏生物技术开发有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津市秀鹏生物技术开发有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津市秀鹏生物技术开发有限公司		
[标]发明人	赵卫军		
发明人	赵卫军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N21/64 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种名称为HCMVPP65抗原血症间接免疫荧光法检测试剂盒，以巨细胞病毒 - AD169病毒株pp65蛋白为免疫原，免疫Balb/c小鼠，取免疫小鼠的脾细胞和同系小鼠的骨髓瘤细胞进行常规融合，通过间接ELISA的筛选和有限稀释克隆化，获得鼠抗巨细胞病毒pp65蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株，通过ELISA和免疫荧光实验等方法鉴定其特性；成功地建立了2株稳定分泌pp65蛋白的单克隆抗体杂交瘤细胞株，分别命名为1A6，和4A8。制备了与以往报道不同的针对巨细胞病毒(CMV)pp65蛋白的单克隆抗体，同时建立制备红细胞快速裂解的方法，其试剂盒与其它同类试剂盒相比，更为快速，简单，方便，特异性与敏感性更高。