

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03136487. X

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 7 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1266474C

[22] 申请日 2003.6.5 [21] 申请号 03136487. X

[71] 专利权人 马 旭

地址 100081 北京市海淀区大慧寺 12 号
国家计划生育委员会出生缺陷干预
工程技术中心

[72] 发明人 马 旭 侯林浦 姜英涛 高 英

审查员 姜 涛

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

四种病原体特异性免疫球蛋白 G 抗体及其亲和指数检测试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及巨细胞、风疹、单纯疱疹病毒和弓形虫四种病原体的特异性 IgG 抗体及其亲和指数检测试剂盒，即将巨细胞病毒 AD₁₆₉ 株、单纯疱疹病毒 I 型 SM-44 株、单纯疱疹病毒 II 型 G 株接种于人胚肺二倍体细胞，将风疹病毒 Gos 株、弓形虫 RH 株接种于 Vero 细胞，经培养获取抗原，再经纯化滴定后确定适当浓度和条件，用于包被聚苯乙烯 ELISA 反应板，同时再配制辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG、标本稀释液、浓缩清洗液、显色液、终止液、阳性对照、阴性对照、临界值、定量标准品、蛋白变性剂等，组成特异性 IgG 及其亲和指数检测试剂盒。

1. 一种巨细胞病毒特异性 IgG 抗体及其亲和指数的检测试剂盒, 该试剂盒包括:
 - a. 抗原包被板条: 以巨细胞病毒 AD₁₆₉ 株经培养获取抗原, 经纯化后包被于聚苯乙烯制成的 8 孔或 12 孔为一条的 ELISA 专用板条;
 - b. 用辣根过氧化物酶自行标记或以商品形式购入的抗人 IgG 或葡萄球菌 A 蛋白;
 - c. 显色液 A 为含 H₂O₂ 的溶液, 显色液 B 为 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺;
 - d. 其它试剂盒配套试剂: 包括标本稀释液为含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 浓缩清洗液为含 Tween-20 的磷酸缓冲液, 终止液为 2N 的 H₂SO₄ 溶液;
 - e. 定量标准品为已知巨细胞病毒特异性免疫球蛋白抗体 G 含量为 10IU/ml 的血清, 阳性对照为已知巨细胞病毒特异性免疫球蛋白抗体 G 含量为 6.4IU/ml 的人血清, 阴性对照为已知巨细胞病毒特异性免疫球蛋白抗体 G 含量小于 0.4IU/ml 的人血清, 临界值为已知巨细胞病毒特异性免疫球蛋白抗体 G 含量为 0.4IU/ml 的人血清;
 - f. 温和蛋白变性剂: 为含 8M 尿素的磷酸盐缓冲液或含 35mM 二乙胺的磷酸盐缓冲液。
2. 一种风疹病毒特异性 IgG 抗体及其亲和指数的检测试剂盒, 该试剂盒包括:
 - a. 抗原包被板条: 以风疹病毒 Gos 株经培养获取抗原, 经纯化后包被于聚苯乙烯制成的 8 孔或 12 孔为一条的 ELISA 专用板条;
 - b. 用辣根过氧化物酶自行标记或以商品形式购入的抗人 IgG 或葡萄球菌 A 蛋白;
 - c. 显色液 A 为含 H₂O₂ 的溶液, 显色液 B 为 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺;
 - d. 其它试剂盒配套试剂: 包括标本稀释液为含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 浓缩清洗液为含 Tween-20 的磷酸缓冲液, 终止液为 2N 的 H₂SO₄ 溶液;
 - e. 定量标准品为已知风疹病毒特异性免疫球蛋白抗体 G 含量为 120IU/ml 的血清, 阳性对照为已知风疹病毒特异性免疫球蛋白抗体 G 含量为 100IU/ml 的人血清, 阴性对照为已知风疹病毒特异性免疫球蛋白抗体 G 含量小于 10IU/ml 的人血清, 临界值为已知风疹病毒特异性免疫球蛋白抗体 G 含量为 15IU/ml 的人血清;
 - f. 温和蛋白变性剂: 为含 8M 尿素的磷酸盐缓冲液或含 35mM 二乙胺的磷酸盐缓冲液。

3. 一种单纯疱疹病毒特异性 IgG 抗体及其亲和指数的检测试剂盒, 该试剂盒包括:
- a. 抗原包被板条: 以单纯疱疹病毒 I 型 SM-44 株及单纯疱疹 II 型 G 株经培养获取抗原, 经纯化后等量混合包被于聚苯乙烯制成的 8 孔或 12 孔为一条的 ELISA 专用板条;
 - 5 b. 用辣根过氧化物酶自行标记或以商品形式购入的抗人 IgG 或葡萄球菌 A 蛋白;
 - c. 显色液 A 为含 H_2O_2 的溶液, 显色液 B 为 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺;
 - d. 其它试剂盒配套试剂: 包括标本稀释液为含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 浓缩清洗液为含 Tween-20 的磷酸缓冲液, 终止液为 2N 的 H_2SO_4 溶液;
 - 10 e. 定量标准品为已知单纯疱疹病毒 I 型加 II 型特异性免疫球蛋白抗体 G 含量为 64AU/ml 的血清, 阳性对照为已知单纯疱疹病毒 I 型加 II 型特异性免疫球蛋白抗体 G 含量为 32AU/ml 的人血清, 阴性对照为已知单纯疱疹病毒 I 型加 II 型特异性免疫球蛋白抗体 G 含量小于 4AU/ml 的人血清, 临界值为已知单纯疱疹病毒 I 型加 II 型特异性免疫球蛋白抗体 G 含量为 4AU/ml 的人血清;
 - 15 f. 温和蛋白变性剂: 为含 8M 尿素的磷酸盐缓冲液或含 35mM 二乙胺的磷酸盐缓冲液。
4. 一种弓形虫特异性 IgG 抗体及其亲和指数的检测试剂盒, 该试剂盒包括:
- a. 抗原包被板条: 以弓形虫 RH 株经培养获取抗原, 经纯化后包被于聚苯乙烯制成的 8 孔或 12 孔为一条的 ELISA 专用板条;
 - 20 b. 用辣根过氧化物酶自行标记或以商品形式购入的抗人 IgG 或葡萄球菌 A 蛋白;
 - c. 显色液 A 为含 H_2O_2 的溶液, 显色液 B 为 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺;
 - d. 其它试剂盒配套试剂: 包括标本稀释液为含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 浓缩清洗液为含 Tween-20 的磷酸缓冲液, 终止液为 2N 的 H_2SO_4 溶液;
 - 25 e. 定量标准品为已知弓形虫特异性免疫球蛋白的 G 抗体含量为 240IU/ml 的血清, 阳性对照为已知弓形虫特异性免疫球蛋白的 G 抗体含量为 120IU/ml 的人血清, 阴性对照为已知弓形虫特异性免疫球蛋白的 G 抗体含量小于 15IU/ml 的人血清, 临界值为已知弓形虫特异性免疫球蛋白的 G 抗体含量为 15IU/ml 的人血清;
 - 30 f. 温和蛋白变性剂: 为含 8M 尿素的磷酸盐缓冲液或含 35mM 二乙胺的磷酸盐缓冲液。

四种病原体特异性免疫球蛋白 G 抗体及其亲和指数检测试剂盒

5 技术领域

本发明属于医学和生物学检测领域，具体而言，本发明涉及巨细胞、风疹、单纯疱疹和弓形虫四种病原体特异性 IgG 抗体及其亲和指数检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

10 预防出生缺陷儿的降生，对中国具有特殊的重要意义。宫内感染是造成出生缺陷儿降生的重要原因之一，近年来中国各地区的计生系统也已逐步开展了预防宫内感染方面的工作，如对未孕的育龄妇女和已孕的孕妇进行有关可能引起宫内感染、造成出生缺陷的一些疾病的检测工作，目前主要集中于巨细胞病毒 (CMV)、风疹病毒 (RV)、单纯疱疹病毒 (HSV) 和弓形虫 (Toxo) 感染的检测，检测方法
15 多为检测其相应的特异性抗体。这些工作的开展无疑是对预防和减少出生缺陷儿的降生有重要价值的，但是我们发现在这一工作开展过程当中尚存在一些严重问题，应当引起重视，特别是以下几个问题：

(1) 对预防工作重视不够：表现在对已婚未孕的育龄妇女的检测不够重视，而只重视对孕妇的检测，事实上若在孕前进行检测，根据检测结果采取一些预防措施是非常有价值的。例如对已婚的育龄妇女于孕前检测风疹病毒 IgG 抗体，对此
20 抗体阴性或低于 15IU/ml 的妇女进行疫苗注射，可有效地预防孕期风疹病毒的感染。

(2) 分清检测对象：目前国内不少地区对未孕的育龄妇女和已孕的孕妇一律单一的检测有关这些病原体的 IgM 抗体，这样做显然是不合理的。应该在合理的安
25 排检测项目的前提下对未孕的育龄妇女主要检测有关 IgG 抗体而不是 IgM 抗体，因为检测 IgG 抗体可以反应是否感染过这种病原体，检测 IgM 是看是否近期有急性感染。对于未孕的育龄妇女检测过 IgG 抗体，孕后若发生急性感染，可根据孕前 IgG 检测结果判断孕后是原发感染还是再感染，可采取不同的措施；而对未孕的妇女检测有关 IgM 抗体则无必要，因为未孕的妇女即使发生有关急性感染，对
30 一般免疫功能正常的人无大的影响，也不需治疗。而对已孕的孕妇来讲，如孕前未检查过有关 IgG 抗体，此时若单纯再查 IgG 抗体已无意义，应该检查有关 IgM 抗体，因为只有孕期发生急性感染才可能对胎儿有所损害。

(3) 孕妇孕期的感染是原发感染还是继发再感染对引发宫内感染的机率和对胎儿造成的损伤程度有很大的不同，原发感染要比继发再感染严重得多，因此区分

孕妇原发感染和继发感染也很重要。如果未孕前检测过有关 IgG 抗体则很容易根据孕后检测有关 IgM 的结果进行区分, 但我国的具体情况是绝大多数未孕的育龄妇女并未检测过有关 IgG 抗体, 而多数是孕后才做有关 IgM 的检测, 但是单靠一份血清检测 IgM 阳性并不能区分是原发还是继发再感染, 因此还必须对 IgM 阳性者加试有关 IgG 的亲合指数。若 IgM 阳性而其相应的 IgG 亲合指数小于 50% 则为近期原发感染, 而 IgM 虽然阳性但其相应的 IgG 亲合指数大于 60% 则多不是近期原发感染, 对于原发感染的孕妇必须进一步观察做必要的产前诊断。

本发明所涉及的四种病原体是可能引发宫内感染最常见的几种病原体其共同点在于孕妇感染后都可能引起胎儿的感染, 对胎儿造成损害产生出生缺陷, 影响中国人口素质, 给社会、个人及其家庭带来难以估计的损失, 尤其是孕妇原发感染的危害又远较继发再感染严重。考虑到对同一患者经常要同时对此四种病原体的抗体进行检测, 因此这四种检测试剂盒同时制备。

综上所述, 可以清楚的看出制备这四种病原体的 IgG 特异性抗体及其亲合指数的检测试剂盒的必要性和重要性。客观要求导致本发明的产生。

15 发明内容

因此, 本发明的目的是提供对育龄妇女孕前检测血清中巨细胞病毒 (CMV)、风疹病毒 (RV)、单纯疱疹病毒 (HSV) 和弓形虫 (Toxo) 的特异性 IgG 抗体分别简写成 CMV-IgG 为巨细胞病毒特异性免疫球蛋白抗体 G、RV-IgG 为风疹病毒特异性免疫球蛋白抗体 G、TOXO-IgG 为弓形虫特异性免疫球蛋白的 G 抗体、HSV₁₊₂-IgG 为单纯疱疹病毒 I 型加 II 型特异性免疫球蛋白抗体 G、及对孕妇检测其 IgG 抗体亲合指数之用的试剂盒。

本发明的内容包括下面的四种病原体特异性免疫球蛋白 G 抗体及其亲合指数检测试剂盒, 即:

1. 一种巨细胞病毒特异性 IgG 抗体及其亲合指数的检测试剂盒, 该试剂盒包括:
 - 25 a. 抗原包被板条: 以巨细胞病毒 AD₁₆₉ 株经培养获取抗原, 经纯化后包被于聚苯乙烯制成的 8 孔或 12 孔为一条的 ELISA 专用板条;
 - b. 用辣根过氧化物酶自行标记或以商品形式购入的抗人 IgG 或葡萄球菌 A 蛋白;
 - c. 显色液 A 为含 H₂O₂ 的溶液, 显色液 B 为 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺;
 - 30 d. 其它试剂盒配套试剂: 包括标本稀释液为含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 浓缩清洗液为含 Tween-20 的磷酸缓冲液, 终止液为 2N 的 H₂SO₄ 溶液;
 - e. 定量标准品为已知 CMV-IgG 含量为 10IU/ml 的血清, 阳性对照为已知 CMV-IgG 含量为 6.4IU/ml 的人血清, 阴性对照为已知 CMV-IgG 含量小于 0.4IU/ml

- 的人血清, 临界值为已知CMV-IgG含量为0.4IU/ml的人血清;
- f. 温和蛋白变性剂: 为含8M尿素的磷酸盐缓冲液或含35mM二乙胺的磷酸盐缓冲液。
2. 一种风疹病毒特异性IgG抗体及其亲和指数的检测试剂盒, 该试剂盒包括:
- 5 a. 抗原包被板条: 以风疹病毒Gos株经培养获取抗原, 经纯化后包被于聚苯乙烯制成的8孔或12孔为一条的ELISA专用板条;
- b. 用辣根过氧化物酶自行标记或以商品形式购入的抗人IgG或葡萄球菌A蛋白;
- c. 显色液A为含 H_2O_2 的溶液, 显色液B为3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺;
- 10 d. 其它试剂盒配套试剂: 包括标本稀释液为含Tween-20的磷酸盐缓冲液, 浓缩清洗液为含Tween-20的磷酸缓冲液, 终止液为2N的 H_2SO_4 溶液;
- e. 定量标准品为已知RV-IgG含量为120IU/ml的血清, 阳性对照为已知RV-IgG含量为100IU/ml的人血清, 阴性对照为已知RV-IgG含量小于10IU/ml的人血清, 临界值为已知RV-IgG含量为15IU/ml的人血清;
- 15 f. 温和蛋白变性剂: 为含8M尿素的磷酸盐缓冲液或含35mM二乙胺的磷酸盐缓冲液。
3. 一种单纯疱疹病毒特异性IgG抗体及其亲和指数的检测试剂盒, 该试剂盒包括:
- a. 抗原包被板条: 以单纯疱疹病毒I型SM-44株及单纯疱疹II型G株经培养获取抗原, 经纯化后等量混合包被于聚苯乙烯制成的8孔或12孔为一条的ELISA
- 20 专用板条;
- b. 用辣根过氧化物酶自行标记或以商品形式购入的抗人IgG或葡萄球菌A蛋白;
- c. 显色液A为含 H_2O_2 的溶液, 显色液B为3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺;
- d. 其它试剂盒配套试剂: 包括标本稀释液为含Tween-20的磷酸盐缓冲液, 浓缩清洗液为含Tween-20的磷酸缓冲液, 终止液为2N的 H_2SO_4 溶液;
- 25 e. 定量标准品为已知HSV₁₊₂-IgG含量为64AU/ml的血清, 阳性对照为已知HSV₁₊₂-IgG含量为32AU/ml的人血清, 阴性对照为已知HSV₁₊₂-IgG含量小于4AU/ml的人血清, 临界值为已知HSV₁₊₂-IgG含量为4AU/ml的人血清;
- f. 温和蛋白变性剂: 为含8M尿素的磷酸盐缓冲液或含35mM二乙胺的磷酸盐缓冲液。
- 30 4. 一种弓形虫特异性IgG抗体及其亲和指数的检测试剂盒, 该试剂盒包括:
- a. 抗原包被板条: 以弓形虫RH株经培养获取抗原, 经纯化后包被于聚苯乙烯制成的8孔或12孔为一条的ELISA专用板条;

- b. 用辣根过氧化物酶自行标记或以商品形式购入的抗人 IgG 或葡萄球菌 A 蛋白;
- c. 显色液 A 为含 H_2O_2 的溶液, 显色液 B 为 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺;
- d. 其它试剂盒配套试剂: 包括标本稀释液为含 Tween-20 的磷酸盐缓冲液, 浓缩清洗液为含 Tween-20 的磷酸缓冲液, 终止液为 2N 的 H_2SO_4 溶液;
- 5 e. 定量标准品为已知 Toxo-IgG 含量为 240IU/ml 的血清, 阳性对照为已知 Toxo-IgG 含量为 120IU/ml 的人血清, 阴性对照为已知 Toxo-IgG 含量小于 15IU/ml 的人血清, 临界值为已知 Toxo-IgG 含量为 15IU/ml 的人血清;
- f. 温和蛋白变性剂: 为含 8M 尿素的磷酸盐缓冲液或含 35mM 二乙胺的磷酸盐缓冲液。

10 由于间接 ELISA 方法检测特异性抗体具有经济、快速、简便、敏感、特异、可定量、适宜大量标本检测等优点, 适宜于在各种级别的医院和计生部门开展, 所以我们确定用该方法研制检测特异性 IgG 抗体及其亲和指数的试剂盒。本发明主要采用了现代分子生物学技术对抗原进行纯化, 以减少检测过程中可能出现的非特异性反应, 用我们自行研制的定量标准品滤纸干燥法、酶标记物稳定稀释液和

15 显色液, 制备的试剂盒稳定、灵敏、特异、简便、重复性及稳定性都较好, 与国外同类产品相近, 为本发明的产品商业化提供了保证。

本发明的内容是采用对各种病原体敏感的细胞株接种病原体标准株, 经增殖后收获病毒抗原, 再经不同步骤纯化后用标准阴阳血清滴定选出适宜的抗原包被浓度, 以适当条件包被固相载体, 经稳定性处理密封保存, 与其相应的配套试剂组

20 装成试剂盒。一种试剂盒为定量检测各相应特异性 IgG 抗体, 一种是检测各相应的 IgG 抗体的亲和指数。

具体实施方式

下面用实施例进一步说明本发明。应该理解的是, 本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发明要求保护的范

25 围。除非另有说明, 本发明中的百分数是重量百分数。

实施例 1: 风疹病毒特异性 IgG 抗体检测试剂盒及其制备

(一) 抗原制备

1. 将 Vero 细胞培养至单层, 将风疹病毒 Gos 株接种, 细胞生长液为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 37°C 吸附 1-2 小时后倾去接种物, 加入含 1% 小牛血清的 DMEM 维持液, 35°C、5% 的 CO_2 培养 5-7 天。
 2. 收集染毒细胞, 离心取上清加入 NaCl 和 PEG (MW=6000)。
- 30

3. 离心取沉淀。
4. 经 4℃、85000g、2h 蔗糖密度梯度离心纯化。
5. 取中间带经透析后测蛋白，经阴阳血清滴定确定包被浓度后分装，贮存于 -70℃。

5 (二) ELISA 包被固相载体

1. 用包被缓冲液将风疹抗原稀释至最佳包被浓度，包被载体，每孔 100 μl，室温 2h 后移入 4℃ 过夜。
2. 用 3%BSA+稳定剂封闭，每孔 120 μl，室温 2h 后洗两次，再经稳定剂处理两次，晾干后密封，4℃ 保存。

10 (三) 操作流程

1. 检测血清：将血清作 1:101 稀释后每孔加入 100 μl，阴阳对照、临界值或定量标准品溶化后直接加入各相应孔内，37℃，60min。
2. 洗五次后，加酶标记抗人 IgG（事先滴定选出最佳稀释度），每孔 100 μl，37℃，60min。
3. 洗五次后，加入 TMB-H₂O₂ 显色系统，室温，避光，30min。
4. 加入终止液（2M H₂SO₄），酶标仪 450nm 测各孔 OD 值。
5. 计算，判断结果。

(四) 试剂盒组成

- 20 密封包被板条（48 孔或 96 孔），酶标抗人 IgG，浓缩清洗液，标本稀释液，显色液 A，显色液 B，终止液，定量标准品（或阳性对照、阴性对照、临界值），说明书。

实施例 2：风疹病毒特异性 IgG 抗体亲和指数检测试剂盒及其制备

(一) 抗原制备：同实施例 1

25 (二) ELISA 包被固相载体：同实施例 1

(三) 操作流程

1. 检测血清：作 1:101 稀释后，每孔 100 μl，每份标本均作两孔，37℃，60min。
2. 洗液洗两次后，每份标本两孔中的一孔加入变性剂 300 μl 保持 10min，另一孔加入洗液 300 μl 保持 10min，然后甩掉，再用洗液各洗两次。
3. 均加入酶标记抗人 IgG，每孔 100 μl，37℃，60min。
4. 洗五次后，加入 TMB-H₂O₂ 显色系统，室温，避光，30min。

5. 加入终止液 (2M H_2SO_4), 酶标仪 450nm 测各孔 OD 值。

6. 按说明书提供的公式计算每份标本的亲合指数。

(四) 试剂盒组成

同实施例 1 所列, 再加一瓶变性剂。

5

实施例 3: 巨细胞病毒特异性 IgG 抗体检测试剂盒及其制备

(一) 抗原制备

1. 将人胚肺二倍体细胞培养至单层, 接种 CMV-AD₁₆₉ 株, 细胞生长液为含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 37°C 吸附 1-1.5 小时后倾去接种物, 加入含 1% 小牛血清的 DMEM 维持液, 35°C、5% 的 CO₂ 生长 5-6 天, 100% 病变, 胰酶消化。

2. 收集染毒细胞, 加入 0.05M/L 甘氨酸-NaOH、pH9.0 的缓冲液悬浮。

3. 超声波处理后离心取上清。

4. 测蛋白, 经阴阳血清棋盘滴定确定包被浓度后分装, 贮存于-70°C。

(二) ELISA 包被固相载体: 同实施例 1

15 (三) 操作流程: 同实施例 1

(四) 试剂盒组成: 同实施例 1

实施例 4: 巨细胞病毒特异性 IgG 抗体亲和指数检测试剂盒及其制备

(一) 抗原制备: 同实施例 3

20 (二) ELISA 包被固相载体: 同实施例 1

(三) 操作流程: 同实施例 2

(四) 试剂盒组成: 同实施例 2

实施例 5: 弓形虫特异性 IgG 抗体检测试剂盒及其制备

25 (一) 抗原制备

1. 将 Vero 细胞培养至单层, 接种弓形虫 RH 株, 培养 3-5 天。

2. 收集大量繁殖满视野的虫体及细胞, 经 G₃ 漏斗过滤。

3. 收集滤液 1700rpm 离心 20min。

4. 将沉淀悬浮于 PBS 中, 超声处理。

30 5. 离心处理, 1500rpm、30min, 取上清。

6. 测蛋白, 经阴阳血清棋盘滴定确定包被浓度后分装, 贮存于-70°C。

(二) ELISA 包被固相载体: 同实施例 1

(三) 操作流程: 同实施例1

(四) 试剂盒组成: 同实施例1

实施例6: 弓形虫特异性IgG抗体亲和指数检测试剂盒及其制备

5 (一) 抗原制备: 同实施例5

(二) ELISA 包被固相载体: 同实施例1

(三) 操作流程: 同实施例2

(四) 试剂盒组成: 同实施例2

10 实施例7: 单纯疱疹病毒I型II型特异性IgG抗体检测试剂盒及其制备

(一) 抗原制备

1. 将人胚肺二倍体细胞培养至单层, 分别接种单纯疱疹病毒I型 SM-44株和单纯疱疹病毒II型 G株, 细胞生长液为含10%小牛血清的DMEM培养液, 37℃吸附1-1.5小时后倾去接种物, 加入含1%小牛血清的DMEM维持液, 35℃、5%
15 的CO₂生长3天, 100%病变, 胰酶消化。

2. 收集染毒细胞, 加入0.05M/L甘氨酸-NaOH、pH9.0的缓冲液悬浮。

3. 超声波处理后离心取上清。

4. 测蛋白, 经阴阳血清棋盘滴定确定包被浓度混合后分装, 贮存于-70℃。

(二) ELISA 包被固相载体: 同实施例1

20 (三) 操作流程: 同实施例1

(四) 试剂盒组成: 同实施例1

实施例8: 单纯疱疹病毒I型II型特异性IgG抗体亲和指数检测试剂盒及其制备

25 (一) 抗原制备: 同实施例7

(二) ELISA 包被固相载体: 同实施例1

(三) 操作流程: 同实施例2

(四) 试剂盒组成: 同实施例2

专利名称(译)	四种病原体特异性免疫球蛋白G抗体及其亲和指数检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1266474C	公开(公告)日	2006-07-26
申请号	CN03136487.X	申请日	2003-06-05
[标]申请(专利权)人(译)	马旭		
申请(专利权)人(译)	马旭		
当前申请(专利权)人(译)	马旭		
[标]发明人	马旭 侯林浦 姜英涛 高英		
发明人	马旭 侯林浦 姜英涛 高英		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569		
其他公开文献	CN1553189A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及巨细胞、风疹、单纯疱疹病毒和弓形虫四种病原体的特异性IgG抗体及其亲和指数检测试剂盒，即将巨细胞病毒ADI69株、单纯疱疹病毒I型SM-44株、单纯疱疹病毒II型G株接种于人胚肺二倍体细胞，将风疹病毒Gos株、弓形虫RH株接种于Vero细胞，经培养获取抗原，再经纯化滴定后确定适当浓度和条件，用于包被聚苯乙烯ELISA反应板，同时再配制辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG、标本稀释液、浓缩清洗液、显色液、终止液、阳性对照、阴性对照、临界值、定量标准品、蛋白变性剂等，组成特异性IgG及其亲和指数检测试剂盒。