



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103760347 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 27

(21) 申请号 201410040889. 6

(22) 申请日 2014. 01. 28

(73) 专利权人 山西医科大学

地址 030001 山西省太原市迎泽区新建南路 56 号

(72) 发明人 樊卫平 孔令文 罗旭光 刘玲玲 王亮

(74) 专利代理机构 山西五维专利事务所(有限公司) 14105

代理人 雷立康

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101261272 A, 2008. 09. 10,

CN 1651918 A, 2005. 08. 10,

CN 103276008 A, 2013. 09. 04,

US 2009/0004198 A1, 2009. 01. 01,

ROBERT H. YOLKEN 等. Comparison of Seven Enzyme Immunoassay Systems for Measurement of Cytomegalovirus. 《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》. 1980, 第 11 卷(第 6 期),

李娜 等. 人巨细胞病毒及功能鉴定 PP65<sub>322~561</sub> 片段的原核表达及功能鉴定. 《国际病毒学杂志》. 2010, 第 17 卷(第 1 期),

王兴满 等. HCMV pp65 在原核细胞中的表达、纯化及其抗血清的制备. 《安徽医科大学学报》. 2010, 第 45 卷(第 6 期),

审查员 段晓露

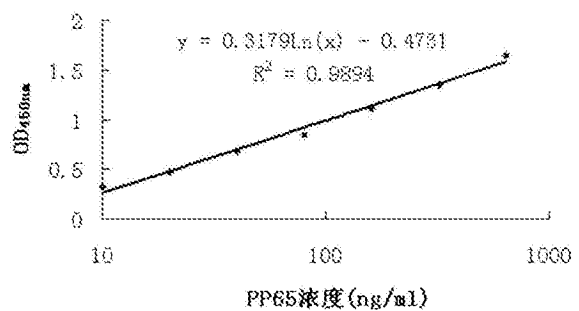
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测人巨细胞病毒 PP65 抗原的 ELISA 方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测人巨细胞病毒 (HCMV) PP65 抗原的 ELISA 方法, 它是一种检测 HCMV 活动性感染指标的临床检测方法。本发明主要是解决现有 HCMV 活动性感染检测方法存在的敏感性或特异性低、费时费力、操作繁琐和使用不便的问题。本发明采用的技术方案是: 一种检测人巨细胞病毒 PP65 抗原的 ELISA 方法, 其包括下列步骤: 1) 制备检测试剂盒: 所述检测试剂盒包括: 包被有大鼠抗重组 PP65<sub>322 561</sub> 多克隆抗体 (pAb) 的酶标板、兔抗重组 PP65<sub>322 561</sub> pAb、标准品、HRP- 羊抗兔 IgG、PBST 洗涤液、底物显色液、终止液和封板膜; 2) 制备待测标本; 3) 检测人巨细胞病毒 PP65 抗原。本发明具有较好的特异性、敏感性、稳定性和可重复性, 易于规模化和标准化操作等优点。



CN 103760347 B

1. 一种非诊断目的检测人巨细胞病毒 PP65 抗原的 ELISA 方法,其特征是:包括下列步骤:

1) 制备检测试剂盒

所述检测试剂盒包括:包被有大鼠抗重组 PP65<sub>322-561</sub> 多克隆抗体 (pAb) 的酶标板、兔抗重组 PP65<sub>322-561</sub>pAb、标准品、HRP-羊抗兔 IgG、PBST 洗涤液、底物显色液、终止液和封板膜;

①所述包被有大鼠抗重组 PP65<sub>322-561</sub>pAb 的酶标板的制备:

a) 大鼠抗重组 PP65<sub>322-561</sub>pAb 的制备:

免疫前大鼠断尾采血,分离血清,作为免疫血清效价检测的阴性对照;取 70-170  $\mu$ g 重组 PP65<sub>322-561</sub> 抗原与等体积弗氏完全佐剂混合,振荡混匀制成乳化剂,皮下及皮内多位点免疫大鼠;免疫后 14-21 天,取 70-130  $\mu$ g 重组 PP65<sub>322-561</sub> 抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合,振荡混匀制成乳化剂,第二次皮下及皮内多位点免疫大鼠;第二次免疫后 21-30 天,与第二次方法一样再次加强免疫;第三次免疫后第 10 天,采血分离血清,ELISA 检测抗体效价,证明免疫成功后,心脏采血获取免疫血清,饱和硫酸铵沉淀法纯化免疫血清,得到所需大鼠抗重组 PP65<sub>322-561</sub> 的 pAb;

b) 包被酶标板:

包被液稀释大鼠抗重组 PP65<sub>322-561</sub>pAb 为 1 : 2000,每孔 50  $\mu$ l 加入酶标板中,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;弃去孔内的包被液,PBST 洗 2 次,拍干,加封闭液每孔 100  $\mu$ l,置 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,PBST 洗 3 次,拍干;

②所述兔抗重组 PP65<sub>322-561</sub>pAb 的制备:

免疫前兔耳缘静脉采血,分离血清,作为免疫血清效价检测的阴性对照;取 100-300  $\mu$ g 重组 PP65<sub>322-561</sub> 抗原与等体积弗氏完全佐剂混合,振荡混匀制成乳化剂,皮下及皮内多位点免疫兔子;免疫后 14-28 天,取 90-170  $\mu$ g 重组 PP65<sub>322-561</sub> 抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合,振荡混匀制成乳化剂,第二次皮下及皮内多位点免疫兔子;第二次免疫后 28-42 天,与第二次方法一样再次加强免疫;第三次免疫后第 10-20 天,采血分离血清,ELISA 检测抗体效价,证明免疫成功后,心脏采血获取免疫血清,饱和硫酸铵沉淀法纯化免疫血清,得到所需兔抗重组 HCMV PP65<sub>322-561</sub> 的 pAb;

③所述标准品为封闭液对倍稀释重组 PP65<sub>322-561</sub> 抗原从 640ng/ml 至 10ng/ml 共 7 个标准浓度梯度,即 640ng/ml、320ng/ml、160ng/ml、80ng/ml、40ng/ml、20ng/ml 和 10ng/ml;

2) 制备待测标本

取待测新鲜抗凝血 2-3ml,溶解破坏红细胞,150-250  $\mu$ l 生理盐水悬浮白细胞,调白细胞浓度为  $10^5$ /ml 左右,冰浴环境下超声裂解白细胞释放核内抗原,或采用反复冻融裂解法释放核内抗原,离心取上清即为制备的待测标本;

3) 检测人巨细胞病毒 PP65 抗原

a) 将标准品各浓度 PP65<sub>322-561</sub> 抗原和待测标本每孔 50  $\mu$ l 加入酶标板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗涤 5 次,拍干;

b) 加兔抗重组 PP65<sub>322-561</sub>pAb,每孔 50  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗涤 5 次,拍干;

c) 加 HRP-羊抗兔 IgG,每孔 50  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,PBST 洗涤 5 次,拍干;

d) 加底物显色液,每孔 100  $\mu$ l,室温避光显色 15min;

e) 加终止液,每孔 50  $\mu$ l,酶标仪检测并记录 OD450 值,根据标准曲线,计算待测样本的

PP65 抗原含量。

## 一种检测人巨细胞病毒 PP65 抗原的 ELISA 方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测人巨细胞病毒 (HCMV) PP65 抗原的 ELISA 方法,它是一种检测 HCMV 活动性感染指标的临床检测方法。

### 背景技术

[0002] 人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 属疱疹病毒科  $\beta$  属双链 DNA 病毒。HCMV 可通过口腔、生殖道、胎盘、授乳以及输血或器官移植等多途径传播。人群感染 HCMV 的显著特点是感染率高,正常成人 HCMV 抗体阳性率为 76.7%—95.8%,我国也是 HCMV 感染高度流行国家之一。然而正常人初次感染此病毒多无明显症状,病毒也不能彻底清除,而是潜伏体内。当机体免疫功能低下时,潜伏病毒开始复制并大量增殖,继发活动性感染并表现多种临床症状。临床活动性 HCMV 感染多见于孕妇,新生儿、输血患者、恶性肿瘤和艾滋病患者以及器官移植等使用免疫抑制剂的患者。孕妇活动性感染可通过胎盘、产道或授乳传给胎儿,导致流产,死胎,胎儿形态畸形,器官功能障碍。先天感染的新生儿出生时可伴有黄疸、瘀斑、脉络膜视网膜炎、小头畸形等,而无症状的部分新生儿,随着发育才逐渐被发现听觉、视力低下,智力发育迟缓,运动障碍等。在恶性肿瘤、艾滋病、器官移植等免疫功能减弱或受抑制的患者 HCMV 的活动性感染常并发间质性肺炎、视网膜炎、食管炎、结肠炎和脑膜脑炎等多器官脏器损害的各种临床综合征,是患者致死或移植术失败的重要原因。因此,早期快速检测 HCMV 活动性感染以便及时抗病毒药物治疗或及时终止妊娠是降低 HCMV 危害的重要措施之一。

[0003] 目前,临床检测 HCMV 活动性感染常用的检测方法是:① ELISA 检测 HCMV 特异抗体 IgM 的方法:优点是简便、快速、廉价、易于标准化和规模化操作。但因 IgM 产生早而消失快,仅感染早期可检测到,所以 IgM 检测 HCMV 活动性感染敏感性低,而且由于免疫功能低下者不能充分产生 IgM,所以特异性也不够理想。② FQ-PCR 检测 HCMV 核酸的方法:通过定量 HCMV DNA 判断是否为活动性感染,目前已代替因敏感性过高而被淘汰的普通 PCR,尽管如此,由于定量标准不统一,需要配套的特殊设备,敏感性高而特异性较低等因素, FQ-PCR 也不是最完美的检测方法。③ 荧光免疫组化或酶免疫组化检测 HCMV PP65 抗原的方法:PP65 在不同 HCMV 病毒株中高度保守。HCMV 一旦复制出被膜磷蛋白 PP65 就说明病毒完成复制、产生大量子代病毒并将导致临床疾病的发作,即 HCMV 的活动性感染。PP65 在被膜蛋白中占 95% 以上,在受感染者外周白细胞中检出率极高,所以 PP65 是检测 HCMV 活动性感染既敏感又特异的指标。但是 PP65 抗原主要存在于白细胞核内,检测 PP65 抗原需要将白细胞固定在玻片上进行荧光免疫组化或酶免疫组化,显微镜下观察计数 PP65 抗原阳性细胞,不仅需要配备荧光显微镜或者配套输出设备和有经验的镜检人员,而且操作繁琐,每个样本需要一个玻片固定检测,难以规模化检测。为此,国内个别医院已将荧光免疫组化法改进为流式细胞术检测,但是仍然离不开流式细胞仪和有经验流式细胞术操作分析人员,难以普及到基层医院,也难以规模化批量检测。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的是解决现有 HCMV 活动性感染检测方法存在的敏感性或特异性低、费时费力、操作繁琐和使用不便的问题,提供一种简便、快速、准确、费用低廉、易于普及和标准化的检测人巨细胞病毒 PP65 抗原的 ELISA 方法。

[0005] 为解决上述问题,本发明采用的技术方案是:

[0006] 一种检测人巨细胞病毒 PP65 抗原的 ELISA 方法,其包括下列步骤:

[0007] 1) 制备检测试剂盒

[0008] 所述检测试剂盒包括:包被有大鼠抗重组 PP65<sub>322-561</sub> 多克隆抗体 (pAb) 的酶标板、兔抗重组 PP65<sub>322-561</sub>pAb、标准品、HRP-羊抗兔 IgG、PBST 洗涤液、底物显色液、终止液和封板膜;

[0009] ①所述大鼠抗重组 PP65pAb 的酶标板的制备:

[0010] a) 大鼠抗重组 PP65pAb 的制备:

[0011] 免疫前大鼠断尾采血,分离血清,作为免疫血清效价检测的阴性对照;取 70-170  $\mu$ g 重组 PP65 抗原与等体积弗氏完全佐剂混合,振荡混匀制成乳化剂,皮下及皮内多位点免疫大鼠;免疫后 14-21 天,取 70-130  $\mu$ g 重组 PP65 抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合,振荡混匀制成乳化剂,第二次皮下及皮内多位点免疫大鼠;第二次免疫后 21-30 天,与第二次方法一样再次加强免疫;第三次免疫后第 10 天,采血分离血清,ELISA 检测抗体效价,证明免疫成功后,心脏采血获取免疫血清,饱和硫酸铵沉淀法纯化免疫血清,得到所需大鼠抗重组 PP65 的 pAb;

[0012] b) 包被酶标板:

[0013] 包被液稀释大鼠抗重组 PP65pAb 为 1:2000,每孔 50  $\mu$ l 加入酶标板中,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;弃去孔内的包被液,PBST 洗 2 次,拍干,加封闭液每孔 100  $\mu$ l,置 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,PBST 洗 3 次,拍干;

[0014] ②所述兔抗重组 PP65pAb 的制备:

[0015] 免疫前兔耳缘静脉采血,分离血清,作为免疫血清效价检测的阴性对照;取 100-300  $\mu$ g 重组 PP65 抗原与等体积弗氏完全佐剂混合,振荡混匀制成乳化剂,皮下及皮内多位点免疫兔子;免疫后 14-28 天,取 90-170  $\mu$ g 重组 PP65 抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合,振荡混匀制成乳化剂,第二次皮下及皮内多位点免疫兔子;第二次免疫后 28-42 天,与第二次方法一样再次加强免疫;第三次免疫后第 10-20 天,采血分离血清,ELISA 检测抗体效价,证明免疫成功后,心脏采血获取免疫血清,饱和硫酸铵沉淀法纯化免疫血清,得到所需兔抗重组 HCMV PP65 的 pAb;

[0016] ③所述标准品为封闭液对倍稀释重组 PP65 抗原从 640ng/ml 至 10ng/ml 共 7 个标准浓度梯度,即 640ng/ml、320ng/ml、160ng/ml、80ng/ml、40ng/ml、20ng/ml 和 10ng/ml;

[0017] 2) 制备待测标本

[0018] 取待测新鲜抗凝血 2-3ml,溶解破坏红细胞,150-250  $\mu$ l 生理盐水悬浮白细胞,或调白细胞浓度为  $10^5$ /ml 左右,冰浴环境下超声裂解白细胞释放核内抗原,或反复冻融裂解法释放核内抗原,离心取上清即为制备的待测标本;

[0019] 3) 检测人巨细胞病毒 PP65 抗原

[0020] a) 将标准品各浓度 PP65 抗原和待测标本每孔 50  $\mu$ l 加入酶标板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,

PBST 洗涤 5 次, 拍干;

[0021] b) 加兔抗重组 PP65pAb, 每孔  $50 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h, PBST 洗涤 5 次, 拍干;

[0022] c) 加 HRP- 羊抗兔 IgG, 每孔  $50 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  孵育 1h, PBST 洗涤 5 次, 拍干;

[0023] d) 加底物显色液, 每孔  $100 \mu\text{l}$ , 室温避光显色 15min;

[0024] e) 加终止液, 每孔  $50 \mu\text{l}$ , 酶标仪检测并记录 OD450 值, 根据标准曲线, 计算待测样本的 PP65 抗原含量。

[0025] 所述大鼠抗重组 PP65pAb 和兔抗重组 PP65pAb 还能用针对重组 PP65<sub>322-561</sub> 抗原的任意两种多克隆抗体搭配或者与单克隆抗体搭配。

[0026] 所述 HRP- 羊抗兔 IgG 还可以是碱性磷酸酶或生物素标记的羊抗兔 IgG。

[0027] 多克隆抗体 (pAb) 包含针对多种抗原表位的抗体成份, 检测抗原的敏感性较单克隆抗体高, 但容易发生非特异交叉反应, 本发明采用多次反复免疫动物以获取高效价 pAb (1:400000 的兔 pAb 和 1:20000 的大鼠 pAb), 并用免疫动物可能接触到的环境微生物 (大肠杆菌、变形杆菌、葡萄球菌、链球菌) 抗原与所得 pAb 反应, 克服了其容易出现交叉反应的缺点。通过比较兔和大鼠 pAb 包被酶标板的检出特异性, 选择了大鼠 pAb 为包被抗体, 兔 pAb 为检测一抗。通过对单纯疱疹病毒 I 型和 II 型感染患者的白细胞抗原的检测, 排除了本发明非特异结合单纯疱疹病毒抗原的可能, 更肯定了试剂的特异性。

[0028] 将 101 份临床疑似 HCMV 感染患者的血清分别用 FQ-PCR 试剂 (中山医科大学达安基因中心) 和 IgM 试剂 (意大利 DIA. PRO 公司) 检测, 同时用本发明检测患者外周白细胞 PP65 抗原。三种检测方法检出的阳性例数分别是 26 例、18 例和 25 例。检测结果的比较分别见表 1 和表 2。

[0029] 表 1 FQ-PCR 检测 HCMV-DNA 与本发明检测 HCMV-PP65 抗原检测结果比较

[0030]

HCMV-PP65 (ELISA)	HCMV-DNA(FQ-PCR)		合计
	+	-	
+	24	1	25
-	2	74	76
合计	26	75	101

[0031] 本发明与 HCMV-DNA (FQ-PCR) 检测试剂的一致率为 97.0%, 两种试剂的检测结果无差异 ( $P > 0.05$ )。本发明相对于 HCMV-DNA (FQ-PCR) 试剂的敏感度为 92.3%, 特异度 98.7%。但是 HCMV-DNA (FQ-PCR) 检测试剂存在着敏感性过高的问题, 所以本发明实际敏感性和特异性可能更好。

[0032] 表 2. 2 ELISA 检测 HCMV-IgM 与本发明检测 HCMV-PP65 抗原检测结果比较

[0033]

HCMV-PP65 (ELISA)	IgM 抗体		合计
	+	-	
+	17	8	25
-	1	75	76
合计	18	83	101

[0034] 本发明与进口 IgM 检测试剂的一致率为 91.1%。本发明的检出阳性数为 25 例高

于 HCMV-IgM(ELISA) 试剂的 18 例,由于 HCMV-IgM(ELISA) 试剂存在公认的敏感性低的问题,不适合做相对敏感性和特异性的比较。

[0035] 本发明批内变异系数介于 3.9-6.1%之间,批间介于 4.2-6.7%之间,均小于常规 10%的限制,说明检测体系稳定,有良好的重复性。本发明对 PP65 抗原的最低检出限是 5ng/ml。

[0036] 此外,利用本发明比较了 1 例使用免疫抑制剂的肾移植患者更昔洛韦治疗前与治疗 2 周后的 HCMV PP65 抗原的量,由 194ng 降低到 15ng,证明了本发明具有监测药物疗效的作用。

[0037] 因此,与背景技术相比,本发明具有较好的特异性、敏感性、稳定性和可重复性,不仅能够经济简便地早期快速检测 HCMV 活动性感染,而且易于普及基层医院,易于规模化和标准化操作,并能通过对 PP65 抗原的定量,判断疾病的预后和进展以及抗病毒药物的疗效。

#### 附图说明

[0038] 附图为本发明的间接双抗体夹心 ELISA 的标准曲线图。

#### 具体实施方式

[0039] 本实施例中的一种检测人巨细胞病毒 PP65 抗原的 ELISA 方法,其步骤如下:

[0040] 1) 制备检测试剂盒

[0041] 所述检测试剂盒包括:包被有 SD 大鼠抗重组 PP65<sub>322-561</sub> 多克隆抗体 (pAb) 的酶标板、新西兰大耳白兔抗重组 PP65<sub>322-561</sub>pAb、标准品、HRP-羊抗兔 IgG、PBST 洗涤液、底物显色液、终止液和封板膜;上述抗重组 PP65<sub>322-561</sub>pAb 中的 PP65<sub>322-561</sub> 以下简称重组 PP65;

[0042] ①所述 SD 大鼠抗重组 PP65pAb 的酶标板的制备:

[0043] a) SD 大鼠抗重组 PP65pAb 的制备:

[0044] 免疫前 SD 大鼠断尾采血约 0.5ml,37℃ 放置 30min,再转入 4℃ 待血块完全收缩,3000rpm 离心 10min,分离血清,56℃ 水浴 30min 灭活补体,-20℃ 保存,作为免疫血清效价检测的阴性对照;取 200 μg/ml 的重组 PP65 抗原 150 μg(0.75ml) 与等体积弗氏完全佐剂混合,吸入 5ml 注射器中,振荡混匀制成乳化剂,背部皮下及皮内免疫 SD 大鼠,皮下注射乳化抗原 300 μl/位点,皮内注射 70 μl/位点,每只 SD 大鼠皮内及皮下各注射 4 个位点;第 15 天取 100 μg 重组 PP65 抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合,制成乳化剂后,第二次皮下及皮内各 4 个位点免疫 SD 大鼠,皮下注射乳化抗原 200 μl/位点,皮内注射 40 μl/位点;第二次免疫后 28 天,采用与第二次免疫相同的方法再次加强免疫;第三次免疫后第 10 天,采血分离血清,ELISA 检测抗体效价,效价为 1:20000,证明免疫成功,心脏采血获取免疫血清,饱和硫酸铵沉淀法纯化免疫血清,得到所需 SD 大鼠抗重组 PP65 的 pAb;

[0045] b) 包被酶标板:

[0046] 包被液稀释 SD 大鼠抗重组 PP65pAb 为 1:2000,每孔 50 μl 加入酶标板中,4℃ 包被过夜;弃去孔内的包被液,PBST 洗 2 次,每次放置 30 秒,拍干,加封闭液每孔 100 μl,置 37℃ 封闭 2h,PBST 洗 3 次,每次放置 30 秒,拍干;

[0047] ②所述新西兰大耳白兔抗重组 PP65pAb 的制备:

[0048] 免疫前兔耳缘静脉采血 1ml, 37℃放置 30min, 再转入 4℃放置待其血块完全收缩, 3000rpm 离心 10min, 分离血清, 再用 56℃水浴 30min 灭活补体, 置于 -20℃保存, 作为免疫血清效价检测的阴性对照; 取 200 μg/ml 的重组 PP65 抗原 1ml (200 μg) 与等体积弗氏完全佐剂混合, 吸入 5ml 的容器中, 振荡混匀制成乳化剂, 皮下及皮内多位点背部免疫已被皮的新西兰大耳白兔, 皮下注射 400 μl/位点, 皮内注射 50 μl/位点, 每只新西兰大耳白兔背部皮内及皮下各注射 4 个位点; 第 15 天取 150 μg 重组 PP65 抗原与等体积弗氏不完全佐剂混合, 制成乳化剂, 第二次背部皮下及皮内各 4 个位点免疫新西兰大耳白兔, 第二次免疫后 29 天, 采用与第二次免疫相同的方法再次加强免疫; 第三次免疫后第 15 天, 采血分离血清, ELISA 检测抗体效价, 效价为 1 : 400000, 证明免疫成功, 心脏采血获取免疫血清, 饱和硫酸铵沉淀法纯化免疫血清, 得到所需新西兰大耳白兔抗重组 HCMV PP65 的 pAb;

[0049] ③所述标准品为封闭液对倍稀释重组 PP65 抗原从 640ng/ml 至 10ng/ml 共 7 个标准浓度梯度, 即 640ng/ml、320ng/ml、160ng/ml、80ng/ml、40ng/ml、20ng/ml 和 10ng/ml;

[0050] ④所述 PBST 洗涤液的配方为: 0.15M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, 0.05% Tween-20 0.5ml, 加蒸馏水至 40ml;

[0051] ⑤所述底物显色液的配方为:

[0052] 底物显色液是在临用前由底物液 A 和底物缓冲液 B 各一半混合而成。底物液 A 主要成份是四甲基联苯胺 (TMB): TMB 20mg, 无水乙醇 10ml, 加蒸馏水至 100ml; 底物缓冲液 B 主要成份是 PH5.0 的磷酸柠檬酸: 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  25.7ml, 0.1M 柠檬酸 24.3ml, 加蒸馏水至 100ml;

[0053] ⑥所述终止液的配方为:

[0054] 终止液主要成份是 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : 蒸馏水 178.3ml, 逐滴加入 98% 的浓硫酸 21.7ml;

[0055] ⑦所述封板膜为与酶标板的板面大小一致的透明塑料膜;

[0056] ⑧建立双抗夹心 ELISA 标准曲线:

[0057] a) 将 PBST 用蒸馏水稀释 25 倍, 混匀, 用于洗涤;

[0058] b) 加样: 封闭液对倍稀释重组 PP65 抗原从 640ng/ml 至 10ng/ml 共 7 个标准浓度梯度, 即 640ng/ml、320ng/ml、160ng/ml、80ng/ml、40ng/ml、20ng/ml 和 10ng/ml, 每孔 50 μl 分别加样, 每个样品重复做两个复孔; 同时设立封闭液阴性对照 2 孔, 空白对照 1 孔, 37℃孵育 1h, PBST 洗涤 5 次, 每次放置 30 秒, 拍干;

[0059] c) 加一抗: 每孔加 1 : 20000 的新西兰大耳白兔抗重组 PP65pAb 50 μl, 37℃孵育 1h, PBST 洗涤 5 次, 每次放置 30 秒, 拍干;

[0060] d) 加酶标抗体: 每孔加 HRP-羊抗兔 IgG 50 μl, 37℃孵育 1h, PBST 洗涤 5 次, 每次放置 30 秒, 拍干;

[0061] e) 每孔加底物显色液 100 μl, 室温避光显色 15min;

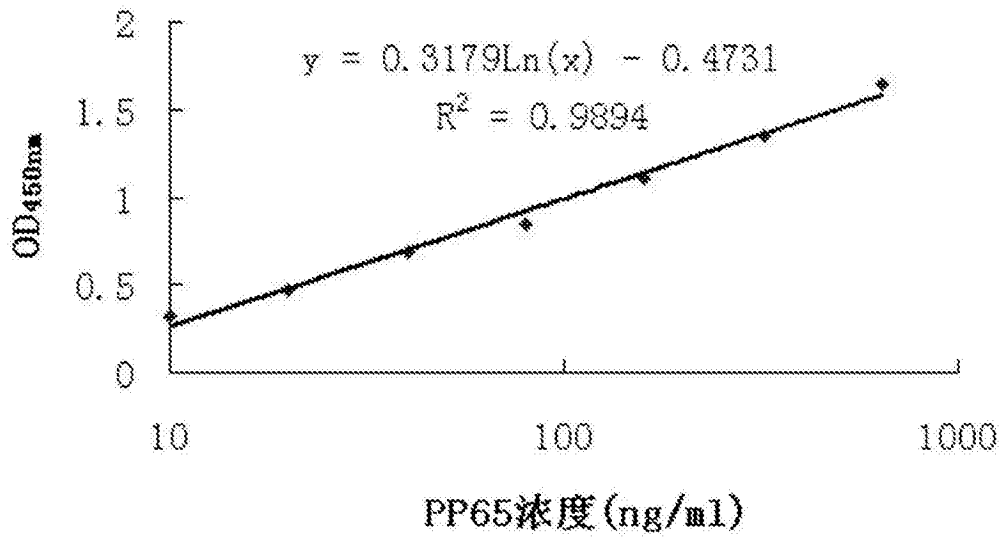
[0062] f) 加终止液: 每孔加终止液 50 μl, 读板, 记录 OD450 值, 建立标准曲线, 见附图;

[0063] 2) 制备待测标本

[0064] 取待测新鲜抗凝血 2ml, 溶解破坏红细胞, 200 μl 生理盐水悬浮白细胞, 冰浴环境下超声裂解释放白细胞核内抗原, 离心取上清即为制备的待测标本, 其具体的制备过程为:

[0065] ①取待测新鲜抗凝血 2ml 于 15ml 离心管中;

- [0066] ②加蒸馏水至 15ml, 上下翻转混匀 10 次, 静置 5min, 常温 3000rpm 离心 15min, 彻底弃上清;
- [0067] ③加蒸馏水 2ml 悬浮细胞;
- [0068] ④重复步骤②和③, 直至彻底破坏红细胞;
- [0069] ⑤加生理盐水 200  $\mu$ l 悬浮白细胞, 转移白细胞至 1.5ml EP 管;
- [0070] ⑥在冰浴环境下超声裂解提取白细胞核内抗原, 每超声 2s 间隔 2s, 共超声 99 次;
- [0071] ⑦ 4°C 下 3000rpm 离心 15min, 转移上清液至 EP 管即为制备的待测标本;
- [0072] 3) 检测人巨细胞病毒 PP65 抗原
- [0073] a) 将标准品各浓度 PP65 抗原和待测标本每孔 50  $\mu$ l 加入酶标板中, 37°C 孵育 1h, PBST 洗涤 5 次, 每次放置 30 秒, 拍干;
- [0074] b) 加兔抗重组 PP65pAb, 每孔 50  $\mu$ l, 37°C 孵育 1h, PBST 洗涤 5 次, 每次放置 30 秒, 拍干;
- [0075] c) 加 HRP- 羊抗兔 IgG, 每孔 50  $\mu$ l, 37°C 孵育 1h, PBST 洗涤 5 次, 每次放置 30 秒, 拍干;
- [0076] d) 加底物显色液, 每孔 100  $\mu$ l, 室温避光显色 15min;
- [0077] e) 加终止液, 每孔 50  $\mu$ l, 以空白孔调零, 酶标仪检测 450nm 波长处吸光度值, 即 OD450 值, 根据标准曲线, 计算待测样本的 PP65 抗原含量。
- [0078] 上述实施例中所述的 SD 大鼠抗重组 PP65pAb 和新西兰大耳白兔抗重组 PP65pAb 还能用针对重组 PP65<sub>322-561</sub> 抗原的任意两种多克隆抗体搭配或者与单克隆抗体搭配。
- [0079] 上述实施例中所述 HRP- 羊抗兔 IgG 还可以是碱性磷酸酶或生物素标记的羊抗兔 IgG。
- [0080] 本发明的保护范围不受以上实施例具体数值的限制。



专利名称(译)	一种检测人巨细胞病毒PP65抗原的ELISA方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103760347B</a>	公开(公告)日	2016-01-27
申请号	CN201410040889.6	申请日	2014-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	山西医科大学		
申请(专利权)人(译)	山西医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	山西医科大学		
[标]发明人	樊卫平 孔令文 罗旭光 刘玲玲 王亮		
发明人	樊卫平 孔令文 罗旭光 刘玲玲 王亮		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56994 G01N2333/045		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN103760347A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测人巨细胞病毒(HCMV)PP65抗原的ELISA方法，它是一种检测HCMV活动性感染指标的临床检测方法。本发明主要是解决现有HCMV活动性感染检测方法存在的敏感性或特异性低、费时费力、操作繁琐和使用不便的问题。本发明采用的技术方案是：一种检测人巨细胞病毒PP65抗原的ELISA方法，其包括下列步骤：1)制备检测试剂盒：所述检测试剂盒包括：包被有大鼠抗重组PP65322-561多克隆抗体(pAb)的酶标板、兔抗重组PP65322-561pAb、标准品、HRP-羊抗兔IgG、PBST洗涤液、底物显色液、终止液和封板膜；2)制备待测标本；3)检测人巨细胞病毒PP65抗原。本发明具有较好的特异性、敏感性、稳定性和可重复性，易于规模化和标准化操作等优点。

