



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107632154 A

(43)申请公布日 2018.01.26

(21)申请号 201710777953.2

(22)申请日 2017.08.31

(71)申请人 王明丽

地址 230032 安徽省合肥市梅山路81号

(72)发明人 王明丽 陈鲲鹏 赵俊 张文昌
鲁江徽

(74)专利代理机构 合肥天明专利事务所(普通
合伙) 34115

代理人 赵瑜 金凯

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

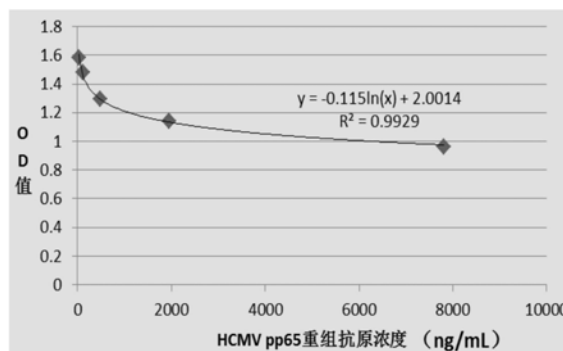
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法
检测试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明属于生物医学领域,特别是用于HCMV活动性感染诊断的一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒及其检测方法。该方法先用HCMV重组pp65抗原包被酶标反应板,然后加入待测样本和HRP标记的HCMV pp65多克隆抗体或单克隆抗体进行反应,通过测定HRP标记的HCMV pp65多克隆抗体或单克隆抗体的量显示竞争ELISA检测结果。该发明试剂盒与荷兰IQ公司的pp65抗原血症免疫荧光法检测试剂盒分别对40份试验样品进行了平行试验,两种方法检测符合率为100%,相比pp65抗原血症免疫荧光法检测试剂盒,本发明试剂盒具有操作简便、特异性和敏感性高等特点,为HCMV活动性感染检测提供了一种有效技术手段。



1. 一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括: HCMV pp65重组抗原包被的酶标反应板、HRP标记的特异性HCMVpp65多克隆抗体或单克隆抗体、样品稀释液、辣根过氧化物酶底物显色液、终止液、阳性对照品、阴性对照品。

2. 根据权利要求1所述的一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒,其特征在于,所述HCMV pp65重组抗原是以HCMV AD169毒株基因组为模板,用针对HCMV pp65基因设计的特异性引物进行PCR扩增,再将扩增得到的HCMV pp65基因与表达质粒pET-32a连接后导入大肠杆菌BL21中原核表达获得。

3. 根据权利要求2所述的一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒,其特征在于:所述特异性引物中,上游引物序列为5'-GGATCCATGGAGTCGCGCGGTC-3',下游引物序列为5'-GAGCTCACCTCGGTGCTTTTT-3',上下游引物分别引入BamHI和SacI酶切位点。

4. 根据权利要求2所述的一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒,其特征在于:所述扩增的HCMV pp65目的基因的核酸序列如SEQ ID NO:1所示。

5. 利用权利要求1~4任一项所述的HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒的检测方法,该竞争ELISA检测方法步骤包括:样品稀释、抗原包被、封闭、混合、反应、显色与终止、数据检测与处理,其特征在于,

步骤1) 样品稀释:将血清样品稀释为原体积的2~4倍,得到待测血清样品;

步骤2) 抗原包被:用HCMV pp65重组抗原包被酶标反应板,包被抗原的包被浓度为100~1000ng/孔;

步骤3) 封闭:用含1~10%小牛血清的PBS缓冲液封闭步骤2)的酶标反应板,37℃温箱封闭30~60min;

步骤4) 混合:将步骤1)得到的待测血清样品、不同浓度梯度阳性对照品或阴性对照品分别与HRP标记特异性HCMVpp65多克隆抗体或单克隆抗体混合,37℃温箱反应30~60min;

步骤5) 反应:将步骤4)得到的混合反应液体加入到步骤3)的酶标反应板中,37℃温箱反应30~60min;

步骤6) 显色与终止:在步骤5)得到的酶标反应板中加入新鲜配制的底物溶液,振荡混合后室温避光孵育10~20min进行显色,再每孔加入终止液,在450nm处测定吸光值OD_{450nm};

步骤7) 数据处理:利用不同浓度梯度阳性对照品得到的吸光值进行线性拟合,得到试剂盒的标准曲线;将待测血清样品测定的吸光值带入标准曲线计算出待测样品血清中HCMV pp65蛋白含量;利用待测血清样品和阴性对照品测定的吸光值计算待测血清样品的抑制率并进行判定。

6. 根据权利要求5所述的一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒的检测方法,其特征在于,所述抑制率的计算通过以下公式进行:

抑制率 = $100 \times (1 - OD_{\text{待检样品}} / OD_{\text{阴性对照}}) \%$;

其中OD_{阴性对照}为HRP标记特异性HCMVpp65抗体和阴性对照品混合的板孔的OD₄₅₀值; OD_{待检样品}为加入了HRP标记特异性HCMVpp65抗体和待检血清样品的板孔的OD₄₅₀值;

判定待检血清样品:抑制率 ≥ 30%,则判定待检血清样品为阳性。

一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,特别是用于HCMV活动性感染诊断的一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 人巨细胞病毒(human Cytomegalovirus, HCMV)属于疱疹病毒β亚科,为双链DNA病毒。在全球范围成人血清抗体阳性率为60~90%以上。在发展中国家,约有80%儿童在2岁以前就已经感染该病毒,至成年几乎所有人已感染。HCMV的原发感染多发生在20岁以前,大多为隐性感染,不引起严重的症状。与所有的疱疹病毒一样,一旦发生感染, HCMV会在宿主体内(唾液腺、白细胞等处)建立持续终生的潜伏感染,潜伏感染常会间断性地被激活而发生复发性感染。HCMV感染在免疫正常者大多无临床症状,但免疫功能低下者(AIDS患者、器官和细胞移植受者)则为致命性感染,导致死亡;孕妇妊娠期原发性CMV感染可能经过胎盘血路感染胎儿,导致胎儿出生缺陷,如神经性耳聋(SNHI)和智力发育迟缓等。对HCMV易感人群中,常引起显性感染,其主要临床症状有:发烧、白细胞减少症、乏力、肝炎、肺炎、胃肠病、视网膜炎等;

[0003] 近期的研究表明,在临床众多的炎症性疾病和肿瘤疾病中, HCMV同样扮演着重要角色。如已发现, HCMV与动脉粥样硬化有密切的相关性, HCMV潜伏感染的再激活可引起病毒介导的血管炎症反应增强,血管平滑肌细胞增生等。

[0004] 由于HCMV活动性感染时发生的临床症状没有特征性,因此,仅凭临床经验医生难以及早做出明确诊断,而早期治疗却对于HCMV感染患者的预后至关重要:可以降低患者血流中的病毒载量,减少对机体的病理损害。但传统病毒分离培养法虽然被认为是HCMV活动性感染诊断的“金标准”,由于需要4周左右才能判定结果,无法进行早期诊断;而市场上用于检测HCMV特异性IgM抗体的ELISA试剂盒,可能会因为免疫抑制患者特异性抗体应答能力的减弱或抗体延迟出现,导致出现假阴性而检出率低。根据目前临床实践显示,可以通过检测患者HCMV pp65抗原血症,以准确检测临床不同易感人群(尤其是免疫功能低下人群)的人巨细胞病毒活动性感染状态。但全球仅荷兰IQ Products生产的CMV Brite™ Turbo Kit获得了FDA的批准,可正式用于临床检测,但该产品难以被我国医院检验科接受,主要原因在于该试剂盒采用免疫荧光法,操作特别繁琐,检测过程需要4h以上,不适合大量临床样本检测。本发明以安徽医科大学微生物学教研室四代科研人员数十年对HCMV的深入研究而建立的重组蛋白与单克隆抗体研发平台为基础,将荷兰IQ Products生产的CMV Brite™ Turbo Kit产品质量标准作为模板,进行检测方法学升级换代,将原来的免疫荧光法改为操作简便、特异性好和敏感性高的ELISA法,研制了人巨细胞病毒pp65抗原血症ELISA检测试剂盒。该试剂盒所用核心原料HCMVpp65多克隆抗体和阳性参考品均为自行制备,具有自主知识产权。

发明内容

[0005] 一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒,该试剂盒主要含有:HCMV pp65重组抗原包被酶标反应板、HRP标记特异性HCMVpp65多克隆抗体或单克隆抗体、样品稀释液、辣根过氧化物酶底物显色液、终止液、阳性对照品、阴性对照品组成。

[0006] 优选地,所述HCMV pp65重组抗原是以HCMV AD169毒株基因组为模板,用针对HCMV pp65基因设计的特异性引物进行PCR扩增,再将扩增得到的HCMV pp65基因与表达质粒pET-32a连接后导入大肠杆菌BL21中原核表达获得。

[0007] 优选地,所述特异性引物中,上游引物序列为5'-GGATCCATGGAGTCGCGCGGTC-3',下游引物序列为5'-GAGCTCACCTCGGTGCTTTTT-3',上下游引物分别引入BamHI和SacI酶切位点。

[0008] 优选地,所述扩增的HCMV pp65目的基因的核酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0009] 该竞争ELISA检测方法步骤包括:样品稀释、抗原包被、封闭、混合、反应、显色与终止、数据检测与处理,其具体操作如下:

[0010] 步骤1) 样品稀释:将血清样品稀释为原体积的2~4倍,得到待测血清样品;

[0011] 步骤2) 抗原包被:用HCMV pp65重组抗原包被酶标反应板,包被抗原的包被浓度为100~1000ng/孔;

[0012] 步骤3) 封闭:用含1~10%小牛血清的PBS缓冲液封闭步骤2)的酶标反应板,37℃温箱封闭30~60min;

[0013] 步骤4) 混合:将步骤1)得到的待测血清样品、不同浓度梯度阳性对照品或阴性对照品分别与HRP标记特异性HCMVpp65多克隆抗体或单克隆抗体混合,37℃温箱反应30~60min;

[0014] 步骤5) 反应:将步骤4)得到的混合反应液体加入到步骤3)的酶标反应板中,37℃温箱反应30~60min;

[0015] 步骤6) 显色与终止:在步骤5)得到的酶标反应板中加入新鲜配制的底物溶液,振荡混合后室温避光孵育10~20min进行显色,再每孔加入终止液,在450nm处测定吸光值OD_{450nm};

[0016] 步骤7) 数据处理:利用不同浓度梯度阳性对照品得到的吸光值进行线性拟合,得到试剂盒的标准曲线;将待测血清样品测定的吸光值带入标准曲线计算出待测样品血清中HCMV pp65蛋白含量;利用待测血清样品和阴性对照品测定的吸光值计算待测血清样品的抑制率并进行判定。

[0017] 优选地,所述抑制率的计算通过以下公式进行:

[0018] 抑制率 = $100 \times (1 - OD_{\text{待检样品}} / OD_{\text{阴性对照}}) \%$;

[0019] 其中OD_{阴性对照}为HRP标记特异性HCMVpp65抗体和阴性对照品混合的板孔的OD₄₅₀值;OD_{待检样品}为加入了HRP标记特异性HCMVpp65抗体和待检血清样品的板孔的OD₄₅₀值;

[0020] 判定待检血清样品:抑制率≥30%,则判定待检血清样品为阳性。

[0021] 本发明的有益效果在于:

[0022] 本研究所述一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒及其检测方法,采用HCMV pp65抗原包被酶标反应板,特异性高、灵敏度强、包被效果好;检测过程中先将待

测样品与抗体混合反应,再加入到包被有抗原的酶标反应板中,使样品能够充分反应,提高了检测的准确性;该方法与荷兰IQ公司的pp65免疫荧光方法分别对40份阳性和阴性试验样品进行了平行试验,两种方法检测符合率为100%,与其它几种疱疹病毒参考阳性血清无交叉反应。其意义在于具有操作简便、特异性和敏感性高等特点,为HCMV活动性感染检测提供了一种有效技术手段。

附图说明

[0023] 图1为本发明试剂盒检测的标准曲线。

具体实施方式

[0024] 为了实现本发明的技术方案,本发明采用了如下具体实施方式。

[0025] 实施例1 HCMVpp65重组抗原的制备

[0026] 1.HCMV pp65基因与pET-32a载体的连接:HCMV AD169毒株由安徽医科大学微生物学教研室提供。用针对HCMV pp65基因设计的特异性引物进行PCR扩增,上游引物序列为5'-GGATCC ATGGAGTCGCGCGGTC-3',下游引物序列为5'-GAGCTC ACCTCGGTGCTTTTT-3',上下游引物分别引入BamHI和SacI酶切位点,目的基因片段长度为1686bp。用BamHI和SacI分别双酶切pp65基因片段和pET-32a载体,在0.5ml EP管中加入双酶切过的pp65基因片段和pET-32a载体、连接缓冲液及T4连接酶至总体积为10 μ L,在16 $^{\circ}$ C下连接12~16h。

[0027] 2.连接产物转化E.coli BL21 (DE3)感受态细胞:取5 μ L连接产物加入到15ml BL21 (DE3)感受态细胞中,冰浴30min。中间摇晃3次,以防菌体沉底。42 $^{\circ}$ C热激90s。37 $^{\circ}$ C水浴5min,然后迅速置于冰上冷却3~5分钟。加入无抗生素的LB培养基200 μ L,混匀后,37 $^{\circ}$ C水浴30~60min。取50 μ L转化菌在含氨苄青霉素的固体LB培养基平皿上涂布,室温下干燥,然后倒置于37 $^{\circ}$ C温箱中培养过夜。

[0028] 3.挑取转化子接种LB培养基,提取质粒。在0.5mL Eppendorf管中加入10 $\times$ Buffer 2 μ L,转化后不同的菌株质粒16 μ L,BamHI酶1 μ L,SacI酶1 μ L混匀,37 $^{\circ}$ C水浴4h。琼脂糖凝胶电泳观察酶切效果。酶切结果为两条带,其中一条为目的基因片段1686bp。

[0029] 4.IPTG诱导表达HCMV-pp65蛋白与包涵体复性挑取已构建成功的工程菌,加入LB培养基中37 $^{\circ}$ C培养,当菌浓度在吸光度0.6~0.8时加入终浓度为1mmol/L的IPTG,诱导5h后收取菌液SDS-PAGE鉴定,与空菌相比在80KD左右处可见表达条带。HCMV pp65重组蛋白是以包涵体形式表达,故将菌体超声破碎后,纯化包涵体并透析复性,得到正确折叠状态的HCMV pp65蛋白。

[0030] 5.HCMV pp65蛋白纯化工程菌诱导表达破碎后收集到的包涵体经复性后,依次经镍离子亲和层析、DEAE阴离子交换层析和分子筛层析,得到纯度>95%的HCMVpp65重组抗原。

[0031] (1)亲和层析

[0032] 复性后的HCMV pp65蛋白用0.22 μ m孔径滤膜过滤后,用AKTA explorer 100蛋白纯化系统进行亲和层析。首先用Binding Buffer I (PBS)平衡镍离子亲和层析柱,上样,再用PBS缓冲液洗去未结合的蛋白,直到A280nm稳定,用Elution buffer I (50mM Tris,10mM reduced glutathione,pH8.0)洗脱,收集蛋白峰。

[0033] (2) DEAE阴离子交换层析

[0034] 经过亲和层析纯化后收集的蛋白置换到Binding Buffer II (50mM Bis-Tris pH6.5) 中后,上样通过用Binding Buffer II平衡好的DEAE阴离子交换层析柱,再用Binding Buffer II过柱至A280nm值稳定后用Elution Buffer II (50mM Bis-Tris, 1M NaCl, pH6.5) 线性梯度洗脱,收集蛋白峰。

[0035] (3) 分子筛

[0036] 离子交换层析收集到的样品浓缩后上样通过用Binding Buffer III (50mM Na₂HPO₄ 0.15M NaCl pH7.4) 平衡好Superdex 200分子筛层析柱,用Binding Buffer III洗脱,收集蛋白峰。

[0037] 实施例2 抗HCMVpp65多克隆抗体的制备

[0038] 将实施例1中制备的HCMVpp65重组抗原与弗氏佐剂乳化后免疫家兔,采集兔血清并纯化获得抗HCMVpp65多克隆抗体。具体操作过程为:选取体重为4.0kg的雄性家兔,于皮下多点注射注射纯化后的HCMVpp65重组抗原1mg,共注射4次。第一次免疫将抗原与等量的弗氏完全佐剂混合,后3次与等量弗氏不完全佐剂混合,每次免疫间隔10d。于末次免疫后1周,经耳缘静脉小量采血,通过琼脂双扩散实验测试抗体效价,滴度大于1:32时经腹主动脉放血,分离血清备用。血清经饱和硫酸铵沉淀法,分离出免疫球蛋白,再经Protein G层析柱纯化,Lowry法测定纯化后抗体浓度的为21mg/ml,得到的兔抗HCMVpp65多克隆抗体经SDS-PAGE电泳和HPLC鉴定纯度>95%。

[0039] 实施例3 HRP标记的抗HCMV pp65多克隆抗体的制备

[0040] 采用改良过碘酸钠法,称5mgHRP溶解于1mL蒸馏水中,于上液中加入0.2mL新配制的0.1M NaIO₄溶液,4℃避光搅拌20min;将上述溶液装入透析袋中,对1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液透析;加入20μL 0.2M pH9.5碳酸氢钠缓冲液,使以上醛基化的HRP的pH升高到9.0,然后立即加入10mg抗HCMV pp65多克隆抗体,在1mL 0.01M碳酸盐缓冲液中,室温避光搅拌2h;将上述溶液装入透析袋中,对10mM pH7.4的PBS进行透析,加入等体积的饱和硫酸铵溶液静置1h;3000r/min离心30min,弃上清;沉淀物用半饱和硫酸铵洗两次,最后沉淀物溶于5mL 10mM pH7.4的PBS中;将上述溶液装入透析袋中,对10mM pH7.4的PBS透析,去除铵离子后(奈氏试剂检测),10000r/min离心30min去除沉淀,上清为HRP标记的抗HCMV pp65多克隆抗体。

[0041] 实施例4 本发明试剂盒浓度梯度标准曲线的建立

[0042] 分别加入100μL 500000ng/mL、125000ng/mL、31250ng/mL、7812.5ng/mL、1953ng/mL、488ng/mL、122ng/mL、31ng/mL、7.63ng/mL、1.91ng/mL、0ng/mL HCMV pp65抗原标准品,同时加入HRP标记特异性HCMVpp65多克隆抗体或单克隆抗体,37℃温箱反应30~60min。PBS洗涤反应板3次后,每孔加入100μl新鲜配制的底物溶液,振荡混合后室温避光孵育10~20min进行显色,再每孔加入50μL终止液,在450nm处的吸光值OD_{450nm}值,以四参数拟合方式进行曲线拟合,得到试剂盒标准曲线的范围为30.52ng/mL<X<500000ng/mL,公式为 $y = -0.1151 \ln(x) + 2.0014$, $R^2 = 0.9929$ (图1)。

[0043] 实施例5 样品的测定

[0044] 该竞争ELISA检测方法步骤包括:样品稀释、抗原包被、封闭、混合、反应、显色与终止、数据检测与处理,其具体操作如下:

- [0045] 步骤1) 样品稀释:将血清样品稀释为原体积的2~4倍,得到待测血清样品;
- [0046] 步骤2) 抗原包被:用HCMV pp65重组抗原包被酶标反应板,包被抗原的包被浓度为100~1000ng/孔;
- [0047] 步骤3) 封闭:用含1~10%小牛血清的PBS缓冲液封闭步骤2) 的酶标反应板,37℃温箱封闭30~60min;
- [0048] 步骤4) 混合:将步骤1) 得到的待测血清样品或阴性对照品分别与HRP标记特异性HCMVpp65多克隆抗体或单克隆抗体混合,37℃温箱反应30~60min;
- [0049] 步骤5) 反应:将步骤4) 得到的混合反应液体加入到步骤3) 的酶标反应板中,37℃温箱反应30~60min;
- [0050] 步骤6) 显色与终止:在步骤5) 得到的酶标反应板中加入100μL新鲜配制的底物溶液,振荡混合后室温避光孵育10~20min进行显色,再每孔加入50μL终止液,在450nm处测定吸光值OD_{450nm};
- [0051] 步骤7) 数据处理:将待测血清样品测定的吸光值带入实施例4得到的标准曲线中计算出待测样品血清中HCMV pp65蛋白含量;利用待测血清样品和阴性对照品测定的吸光值计算待测血清样品的抑制率并进行判定。
- [0052] 抑制率的计算通过以下公式进行:
- [0053] $\text{抑制率} = 100 \times (1 - \text{OD}_{\text{待检样品}} / \text{OD}_{\text{阴性对照}}) \%$;
- [0054] 其中OD_{阴性对照}为HRP标记特异性HCMVpp65抗体和阴性对照品混合的板孔的OD₄₅₀值;OD_{待检样品}为加入了HRP标记特异性HCMVpp65抗体和待检血清样品的板孔的OD₄₅₀值;
- [0055] 判定待检血清样品:抑制率≥30%,则判定待检血清样品为阳性。
- [0056] 实施例6 本试剂盒质量标准的确定及与其他检测试剂盒的比较
- [0057] 1. 试剂盒精密度和准确性的检测
- [0058] 1.1精密度:分析不同批次试剂盒产品,批内精密度平均为7.03% (n=10),批间精密度平均7.82% (n=30),变异系数(CV%) 小于10%,见下表1。
- [0059] 表1 试剂盒精密度检测结果
- [0060]

试剂盒批号	2014001	2014002	2014003
批内 (CV%)	6.35	7.61	7.14
批间 (CV%)	7.41	8.54	7.51

- [0061] 1.2准确性:采用回收试验进行检测,回收率(实测浓度与理论浓度的比值) 为88-112%,见下表2。
- [0062] 表2 试剂盒回收率检测结果

[0063]

混合比例 (高值: 低 值)	高值回收			低值回收		
	(高值=344.1, 低值=20.54)			(高值=40.23, 低值=4.04)		
	理论浓 度	实测浓 度	回收率	理论浓 度	实测浓 度	回收率
1:7	61.0	57.8	94.75%	7.70	6.8	88.31%
2:6	101.4	101.8	100.39%	12.3	11.4	91.94%
3:5	141.9	150.7	106.20%	17.0	16.4	96.47%
4:4	182.3	175.4	96.22%	21.6	22.9	106.02%
5:3	222.8	219.4	98.92%	26.3	27.1	103.04%
6:2	263.2	231.7	88.03%	30.9	29.8	96.44%
7:1	303.7	278.3	91.64%	35.6	39.7	111.52%

[0064] 1.3特异性:

[0065] 随机抽取我公司连续三批生产的HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒,检测阴性参考品、可能引起干扰的血清类风湿因子阳性标本、HSV-1活动性感染阳性标本、HSV-2活动性感染阳性标本、VZV活动性感染阳性标本、风疹病毒活动性感染阳性标本,用本产品进行检测,均不能检测出阳性,说明该试剂盒特异性符合标准。

[0066] 1.4稳定性

[0067] 随机抽取我公司连续三批生产的HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒在(2~8)℃条件下储存6个月、12个月、14个月以及(37±1)℃条件下储存3天、6天、7天时,分别采用阳性参考品和阴性参考品进行检测,发现均具有良好的灵敏度和特异性,检测值完全要求,我们暂定试剂盒的4℃保存有效期为12个月。

[0068] 2.与其它检测试剂盒检测临床标本的结果比较

[0069] 在检测方法建立后,我们分别对荷兰IQ products公司CMV pp65抗原血症检测试剂盒(免疫荧光法,FDA批准)、病毒分离检测以及荧光定量PCR三种检测方法同时检测为阳性或阴性的临床血浆/血清标本,用本发明中的试剂盒进行了检测,结果见表3和4。

[0070] 表3. 40份HCMV pp65抗原血症阳性标本在本试剂盒的检测结果比较

[0071]

样本 编号	荧光定量 PCR 检测	病毒分离 检测结果	IQ products 公司试剂盒		本公司试剂盒
			检测结果		检测结果
			阳性/阴性	阳性细胞数	阳性/阴性
1	阳性	阳性	阳性	5	阳性
2	阳性	阳性	阳性	25	阳性
3	阳性	阳性	阳性	31	阳性
4	阳性	阳性	阳性	27	阳性
5	阳性	阳性	阳性	48	阳性
6	阳性	阳性	阳性	124	阳性
7	阳性	阳性	阳性	3	阳性
8	阳性	阳性	阳性	41	阳性
9	阳性	阳性	阳性	10	阳性
10	阳性	阳性	阳性	16	阳性
11	阳性	阳性	阳性	52	阳性
12	阳性	阳性	阳性	147	阳性
13	阳性	阳性	阳性	22	阳性
14	阳性	阳性	阳性	8	阳性
15	阳性	阳性	阳性	15	阳性
16	阳性	阳性	阳性	32	阳性
17	阳性	阳性	阳性	4	阳性
18	阳性	阳性	阳性	29	阳性
19	阳性	阳性	阳性	33	阳性
20	阳性	阳性	阳性	15	阳性
21	阳性	阳性	阳性	44	阳性
22	阳性	阳性	阳性	38	阳性

[0072]

23	阳性	阳性	阳性	69	阳性
24	阳性	阳性	阳性	5	阳性
25	阳性	阳性	阳性	83	阳性
26	阳性	阳性	阳性	14	阳性
27	阳性	阳性	阳性	62	阳性
28	阳性	阳性	阳性	77	阳性
29	阳性	阳性	阳性	265	阳性
30	阳性	阳性	阳性	9	阳性
31	阳性	阳性	阳性	15	阳性
32	阳性	阳性	阳性	28	阳性
33	阳性	阳性	阳性	39	阳性
34	阳性	阳性	阳性	24	阳性
35	阳性	阳性	阳性	30	阳性
36	阳性	阳性	阳性	41	阳性
37	阳性	阳性	阳性	63	阳性
38	阳性	阳性	阳性	2	阳性
39	阳性	阳性	阳性	18	阳性
40	阳性	阳性	阳性	25	阳性

[0073] 表4. 40份HCMV pp65抗原血症阴性标本在本试剂盒的检测结果比较

样本编号	荧光定量 PCR	病毒分离检测	IQ products 公		本公司试剂盒
	检测	结果	司试剂盒检测	结果	检测结果
[0074]	1	阴性	阴性	阴性	阴性
	2	阴性	阴性	阴性	阴性
	3	阴性	阴性	阴性	阴性
	4	阴性	阴性	阴性	阴性
	5	阴性	阴性	阴性	阴性
	6	阴性	阴性	阴性	阴性

	7	阴性	阴性	阴性	阴性
	8	阴性	阴性	阴性	阴性
	9	阴性	阴性	阴性	阴性
	10	阴性	阴性	阴性	阴性
	11	阴性	阴性	阴性	阴性
	12	阴性	阴性	阴性	阴性
	13	阴性	阴性	阴性	阴性
	14	阴性	阴性	阴性	阴性
	15	阴性	阴性	阴性	阴性
	16	阴性	阴性	阴性	阴性
	17	阴性	阴性	阴性	阴性
	18	阴性	阴性	阴性	阴性
	19	阴性	阴性	阴性	阴性
	20	阴性	阴性	阴性	阴性
[0075]	21	阴性	阴性	阴性	阴性
	22	阴性	阴性	阴性	阴性
	23	阴性	阴性	阴性	阴性
	24	阴性	阴性	阴性	阴性
	25	阴性	阴性	阴性	阴性
	26	阴性	阴性	阴性	阴性
	27	阴性	阴性	阴性	阴性
	28	阴性	阴性	阴性	阴性
	29	阴性	阴性	阴性	阴性
	30	阴性	阴性	阴性	阴性
	31	阴性	阴性	阴性	阴性
	32	阴性	阴性	阴性	阴性
	33	阴性	阴性	阴性	阴性
	34	阴性	阴性	阴性	阴性
	35	阴性	阴性	阴性	阴性

	36	阴性	阴性	阴性	阴性
	37	阴性	阴性	阴性	阴性
[0076]	38	阴性	阴性	阴性	阴性
	39	阴性	阴性	阴性	阴性
	40	阴性	阴性	阴性	阴性

[0077] 由表3和4可见,本发明方法与荷兰IQ公司的pp65免疫荧光方法分别对40份阳性和阴性试验样品进行了平行试验,两种方法检测符合率为100%,与其它几种疱疹病毒参考阳性血清无交叉反应。

[0078] 以上所述实施方式仅仅是对本发明的优选实施方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进,均应落入本发明的权利要求书确定的保护范围内。

SEQUENCE LISTING

<110> 王明丽
 <120> 一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒及其检测方法
 <130> 1
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 1683
 <212> DNA
 <213> BL21/pET-32 α -pp65
 <400> 1
 atggagtcgc gcggtcgccg ttgtcccgaa atgatatecg tactgggtcc catttcgggg 60
 cacgtgctga aagccgtgtt tagtcgcggc gatacgccgg tgctgccgca cgagacgcga 120
 ctctgcaga cgggtatcca cgtacgcgtg agccagccct cgctgatctt ggtatcgag 180
 tacacgcccg actcgacgcc atgccaccgc ggcgacaatc agctgcaggt gcagcacacg 240
 tactttacgg gcagcgaggt ggagaacgtg tcggtcaacg tgcacaaccc cacgggccga 300
 agcatctgcc ccagccagga gcccatgtcg atctatgtgt acgcgctgcc gctcaagatg 360
 ctgaacatcc ccagcatcaa cgtgcaccac taccgctcgg cggccgagcg caaacaccga 420
 cacctgcccg tagctgacgc tgtgattcac gcgtcgggca agcagatgtg gcaggcgcgt 480
 ctcacggtct cgggactggc ctggacgcgt cagcagaacc agtggaaaga gcccgcgctc 540
 tactacacgt cagcgttcgt gtttcccacc aaggacgtgg cactgcggca cgtggtgtgc 600
 gcgcacgagc tggtttgctc catggagaac acgcgcgcaa ccaagatgca ggtgataggt 660
 gaccagtacg tcaaggtgta cctggagtcc ttctgcgagg acgtgccctc cggcaagctc 720
 tttatgcacg tcacgctggg ctctgacgtg gaagaggacc tgacgatgac ccgcaacccg 780
 caacccttca tgcgccccca cgagcgcaac ggctttacgg tgttgtgtcc caaaaatatg 840
 ataatcaaac cgggcaagat ctgcacatc atgctggatg tggcttttac ctcacacgag 900
 cattttgggc tgctgtgtcc caagagcatc ccgggcctga gcattctcagg taacctgttg 960
 atgaacgggc agcagatctt cctggaggta caagccatac gcgagaccgt ggaactgcgt 1020
 cagtacgatc ccgtggctgc gctcttcttt ttcatatcg acttgctgct gcagcgcggg 1080
 cctcagtaca gcgagcacc cacttcacc agccagtatc gcattccagg caagcttgag 1140
 taccgacaca cctgggaccg gcacgacgag ggtgccgccc agggcgacga cgacgtctgg 1200
 accagcggat cggactccga cgaagaactc gtaaccaccg agcgcaagac gcccgcgctc 1260
 accggcggcg gcgcatggc gggcgctcc acttcgcgg gccgcaaacg caaatcagca 1320
 tcctcggcga cggcgtgcac gtcgggcgtt atgacacgc gccgccttaa ggccgagtc 1380
 accgtcgcgc ccgaagagga caccgacgag gattccgaca acgaaatcca caatccggcc 1440
 gtgttcacct ggccgccctg gcaggccggc atcctgcccc gcaacctggt gcccatggtg 1500
 gctacggttc agggtcagaa tctgaagtac caggaaattct tctgggacgc caacgacatc 1560
 taccgcatct tcgccgaatt ggaaggcgta tggcagcccc ctgcgcaacc caaacgtcgc 1620

cgccaccggc aagacgcctt gcccgggcca tgcacgcct cgacgccaa aaagcaccga	1680
ggt	1683

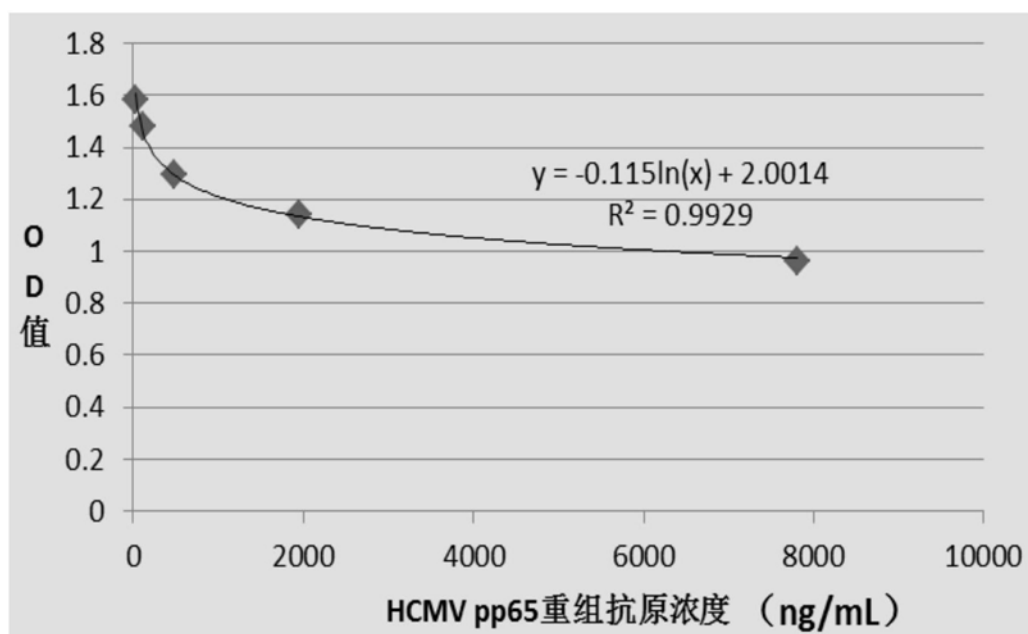


图1

专利名称(译)	一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN107632154A	公开(公告)日	2018-01-26
申请号	CN2017110777953.2	申请日	2017-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	王明丽		
申请(专利权)人(译)	王明丽		
当前申请(专利权)人(译)	王明丽		
[标]发明人	王明丽 陈鲲鹏 赵俊 张文昌 鲁江徽		
发明人	王明丽 陈鲲鹏 赵俊 张文昌 鲁江徽		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535 G01N33/68		
代理人(译)	赵瑜 金凯		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物医学领域，特别是用于HCMV活动性感染诊断的一种HCMV pp65抗原血症竞争抑制ELISA法检测试剂盒及其检测方法。该方法先用HCMV重组pp65抗原包被酶标反应板，然后加入待测样本和HRP标记的HCMV pp65多克隆抗体或单克隆抗体进行反应，通过测定HRP标记的HCMV pp65多克隆抗体或单克隆抗体的量显示竞争ELISA检测结果。该发明试剂盒与荷兰IQ公司的pp65抗原血症免疫荧光法检测试剂盒分别对40份试验样品进行了平行试验，两种方法检测符合率为100%，相比pp65抗原血症免疫荧光法检测试剂盒，本发明试剂盒具有操作简便、特异性和敏感性高等特点，为HCMV活动性感染检测提供了一种有效技术手段。

