

抗巨细胞病毒 pp65 抗原单克隆抗体的制备及临床初步比对检测

陈兰兰, 崔京涛, 倪安平[△], 闫文娟(中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730)

【摘要】 目的 制备抗巨细胞病毒 pp65 单克隆抗体并建立外周血巨细胞病毒抗原血症免疫荧光检测方法。**方法** CMV AD169 感染人胚胎肺成纤维细胞 MRC-5 后 24、48、72h, 超声波破碎和甲醛灭活制备 CMV 抗原, 以及 CMV pp65 重组抗原免疫 BALB/C 小鼠, 标准方法制备抗巨细胞病毒 pp65 单克隆抗体。利用所得单克隆抗体建立检测外周血巨细胞病毒抗原血症检测的实验方法, 并与进口试剂盒 CMV Brite™ Kit 进行比对。**结果** 共有两株杂交瘤细胞产生特异性抗体, 克隆名称为 13D1-3 和 29F1-1, 免疫球蛋白亚型分别是 IgG1 型和 IgG2a 型, 制备的腹水抗体纯化后仍具有良好的免疫学特性。单克隆抗体 13D1-3 与 CMV Brite™ Kit 试剂盒比对, 阳性符合率为 88.8%, 阴性符合率为 98.9%, 总符合率为 97.3%, Kappa 值为 0.895, 吻合度较高。**结论** 成功制备抗巨细胞病毒 pp65 单克隆抗体, 建立以 13D1-3 单克隆抗体为基础的检测外周血巨细胞病毒抗原血症方法, 与 CMV Brite™ Kit 试剂盒比对具有良好的符合性。

【关键词】 巨细胞病毒; 单克隆抗体; 抗原血症

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.23.015 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)23-3269-03

The preparation of monoclonal antibodies against the CMV pp65 antigen and preliminary clinical comparison test
CHEN Lan-lan, CUI Jing-tao, NI An-ping[△], YAN Wen-juan (Department of Clinical Laboratories, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China)

【Abstract】 Objective To prepare monoclonal antibodies (McAbs) against the CMV pp65 antigen, and establish immunofluorescence method for detection of CMV antigenemia in peripheral blood leukocytes. **Methods** 24, 48, 72 h after CMV AD169 infected human embryonic lung fibroblast (MRC-5), CMV antigen was prepared through ultrasonic fragmentation and formalin inactivation, BALB/C mice were immunized by the CMV pp65 antigens, and the standard method was used to produce monoclonal antibodies against the CMV pp65 antigen. The prepared monoclonal antibodies were used to establish immunofluorescence method for detection of CMV antigenemia in peripheral blood leukocytes, and the established method was compared to CMV Brite™ kit. **Results** There was two hybridoma cells producing specific monoclonal antibodies, and named 13D1-3 and 29F1-1, respectively. The immunoglobulin subtypes were IgG1 and IgG2a. After purification, monoclonal antibodies of ascites fluid also had good immunological characteristics. Compared monoclonal antibody 13D1-3 with CMV Brite™ kit, the positive coincidence rate was 88.8%, negative coincidence rate was 98.9% and the total coincidence rate was 97.3% (kappa=0.895), predicted high consistency. **Conclusion** This study might have successfully produced monoclonal antibodies against the CMV pp65 antigen and established immunofluorescence method for detection of CMV antigenemia in peripheral blood leukocytes, which could indicate high consistency compared with CMV Brite™ kit.

【Key words】 Cytomegavirus; monoclonal antibody; antigenemia

人巨细胞病毒(HCMV/CMV)在患者体内的活动性复制会影响患者基础疾病的疗效及预后, 可能诱导或加重自身免疫疾病, 甚至威胁患者生命^[1-3]。因此早期诊断、及时治疗可有效预防 CMV 病的发生, 改善基础疾病的预后。Van der 等在 1988 年报道采用单克隆抗体检测外周血白细胞核内巨细胞病毒低基质结构磷蛋白抗原(CMV pp65 抗原)。CMV pp65 抗原血症仍是目前公认的 CMV 活动性感染早期、快速诊断指标, 该指标的诊断敏感性高于病毒培养, 且与 CMV-DNA 核酸检测具有相同的敏感性^[4]。但目前国内 CMV pp65 抗原检测试剂几乎均为进口, 价格昂贵。本文利用 CMV 抗原免疫小鼠, 制备抗 CMV pp65 的单克隆抗体, 建立外周血检测方法, 并与 CMV Brite™ Kit 比对, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 CMV AD169 毒株来自国家疾病预防控制中心; 人胚肺成纤维细胞(MRC-5), 即 ATCC CCL-171, 购自美国标准生物品收藏中心(ATCC); 小鼠骨髓瘤细胞(NS-1 细胞)来自英国南安普敦大学医学院微生物系; SPF 级 BALB/C 小鼠由北京协和医院动物实验中心外购并寄养; DMEM 培养基和 RPMI1640 培养基购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清为 HyClone 公司产品; 融合剂 PEG4000、HAT 培养基添加剂、FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体、鼠类单克隆抗体免疫球蛋白亚型鉴定试剂盒、非离子去污剂 IGEPAL CA-630、Lowry 法蛋白浓度检测酚试剂、完全和不完全福氏佐剂、降植烷均购自 Sigma 公司; 重组 CMV pp65 抗原购自杭州启泰生物技术有限公司; CMV

pp65 抗原血症检测试剂盒 CMV Brite™ Kit 系荷兰 IQ 公司产品;蛋白 G 亲和层析柱购自 GE healthcare 公司。

1.2 方法

1.2.1 巨细胞病毒抗原 (1)巨细胞病毒包涵体抗原片:CMV AD169 感染 MRC-5 单层细胞,24、48、72 h 后 0.05% 胰酶消化,0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤再悬浮,约 10 μ L 每孔滴于 28 孔载玻片,自然晾干后冷丙酮固定 10 min,然后经 0.5% 非离子型去污剂 IGEPAL CA-630 透化处理 10 min^[5];0.5% 牛血清清蛋白(BSA)、0.01 mol/L PBS 封闭 5 min,用 CMV Brite™ Kit 接免疫荧光法染色,确定再悬浮细胞中含有 CMV pp65 抗原。此法制作的抗原片经铝箔纸封口,保存于 -20 $^{\circ}$ C,作为 IFA 法筛选单抗的检测抗原。(2)巨细胞病毒可溶性抗原:将 CMV AD169 感染 MRC-5 24、48、72 h 包涵体细胞经 0.01 mol/L PBS 洗涤、再悬浮后,超声波破碎,制备含有 CMV pp65 的可溶性抗原溶液,Lowry 法进行蛋白含量测定,甲醛固定后保存于 2~8 $^{\circ}$ C,作为单抗制备小鼠免疫抗原或酶联免疫吸附试验(ELISA)法单抗筛查的包被抗原。(3)重组 CMV pp65 抗原:5 mg/mL,作为小鼠免疫抗原或 ELISA 单抗筛查的包被抗原。

1.2.2 单克隆抗体制备 采用经典单克隆抗体制备技术进行抗巨细胞病毒 pp65 抗原单克隆抗体的制备^[6],主要步骤包括:动物免疫,CMV 可溶性抗原以及 CMV pp65 重组抗原分别免疫 6~7 周龄的 BALB/C 小鼠,初次免疫剂量每只 60~80 μ g,与等量完全福氏佐剂混合;加强免疫剂量每只 50 μ g,与等量不完全福氏佐剂混合;细胞融合,小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 NS-1 以 1:1 的比例在 PEG4000 条件下融合,于含有 HAT 的 RPMI1640 培养基中培养;杂交瘤细胞筛选,ELISA、间接免疫荧光法(IFA)进行特异性抗体检测,阳性杂交瘤细胞经单细胞分离培养后,反复检测均为阳性的杂交瘤细胞,进行有限稀释法克隆化培养并及时冻存于 -196 $^{\circ}$ C 液氮中。

1.2.3 单克隆抗体腹水制备及纯化 杂交瘤细胞注射前 2 周将降植烷注射于 BALB/C 小鼠腹腔,每只 0.4 mL,杂交瘤细胞注入小鼠腹腔,剂量约 10⁷ 杂交瘤细胞/只,3~4 周后抽取小鼠腹水,蛋白 G 亲和层析进行纯化,测定抗体滴度。

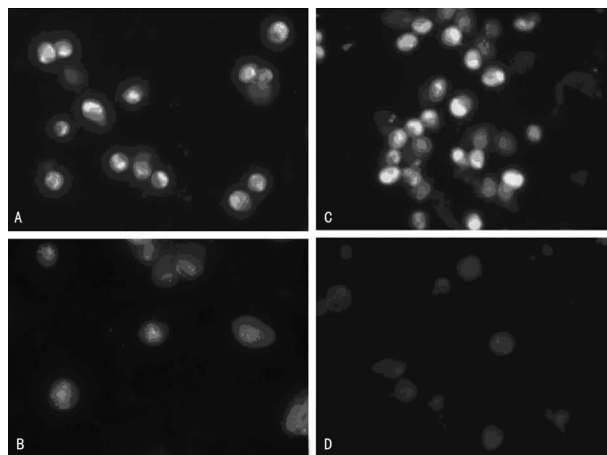
1.2.4 外周血白细胞 CMV pp65 抗原血症检测及临床比对试验 以自制 CMV pp65 单克隆抗体与 CMV Brite™ Kit 平行检测外周血白细胞 CMV pp65 抗原血症。CMV Brite™ Kit 操作见文献^[7]。即外周乙二胺四乙酸三钾(EDTA-K₃)抗凝血标本白细胞分离使用 6% 右旋糖酐富集和 0.83% NH₄Cl 溶血素溶血。Thermo 公司 cytospin 4 型离心涂片机制备白细胞涂片。在经固定、透化处理,试剂盒内抗 CMV pp65 单抗 C10/C11(一抗)和兔抗鼠荧光抗体(二抗)以间接荧光法检测 CMVpp65 抗原血症。本实验制备的抗 CMV pp65 单抗同样使用间接荧光法检测。即 3% 甲醛固定 10 min 后的白细胞涂片,0.5% IGEPAL CA-630 透化处理 10 min,0.5% BSA、0.01 mol/L PBS 封闭 5 min,一抗为杂交瘤细胞培养上清液/腹水,二抗为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体。Olympus BX51 型荧光显微镜下观察结果。阳性染色位于白细胞细胞核,呈苹果绿色荧光,形态呈分叶核状或单个核。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计学软件进行统计学分析;计数资料采用百分率表示,组间配对比较采用 McNemar 检验;不同方法学检测结果一致性分析采用 Kappa 检验;以

$\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单克隆抗体筛选 CMV 感染 MRC-5 单层细胞后 24、48、72 h 甲醛灭活的可溶性抗原以及 CMV pp65 重组抗原分别免疫多批次 BALB/C 小鼠,并进行多次融合,经 ELISA 和 IFA 筛选检测,最终获得 2 株抗 CMV pp65 抗原的杂交瘤细胞株,克隆株分别为 29F1-1 和 13D1-3,这 2 株单克隆抗体均来自 CMV 感染 24 h 后可溶性抗原免疫的小鼠。与 CMV AD169 的反应见图 1。



注:A、B、C 为感染 CMV AD169 24 h 的 MRC-5 细胞抗原片,D 为正常 MRC-5 细胞。A 为 CMV Brite™ Kit 试剂盒染色结果,B 的一抗为 29F1-1 杂交瘤细胞培养液,C 和 D 的一抗为 13D1-3 杂交瘤细胞培养液,B、C、D 的二抗均为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG。

图 1 间接免疫荧光检测结果(×400)

2.2 单克隆抗体免疫球蛋白亚型确定 按照小鼠免疫球蛋白亚型鉴定试剂盒说明书进行亚型鉴定,13D1-3 克隆株分泌的单抗为 IgG1 型,29F1-1 单抗为 IgG2a 型。

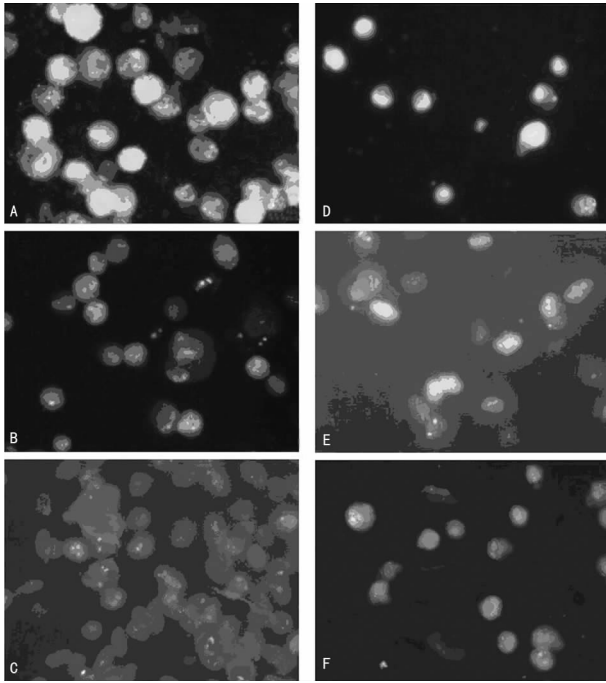
2.3 抗体交叉反应鉴定 ELISA 和 IFA 法检测,13D1-3 和 29F1-1 两株单克隆抗体与单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)、II 型(HSV-2)、水痘一带状疱疹病毒(VZV),正常 MRC-5、绿猴肾细胞(BGMK)均无交叉反应。

2.4 单克隆抗体滴度测定 IFA 法测定杂交瘤细胞诱导的小鼠腹水抗体滴度,13D1-3 抗体滴度 1:2 500,29F1-1 抗体滴度达 1:1 000,镜下结果见图 2。

2.5 检测外周血 CMV pp65 抗原血症实验方法建立 间接免疫荧光法检测外周血 CMV pp65 抗原血症,经反复多次试验,确定外周血白细胞涂片后甲醛固定浓度为 3%,固定时间 10 min;透化处理 IGEPAL CA-630 浓度 0.5%,处理时间 10 min;封闭剂 BSA 浓度 0.5%,封闭时间 5min。上述条件下本实验制备的单抗与 CMV Brite™ Kit 进口试剂盒检测结果没有差异,见图 3。

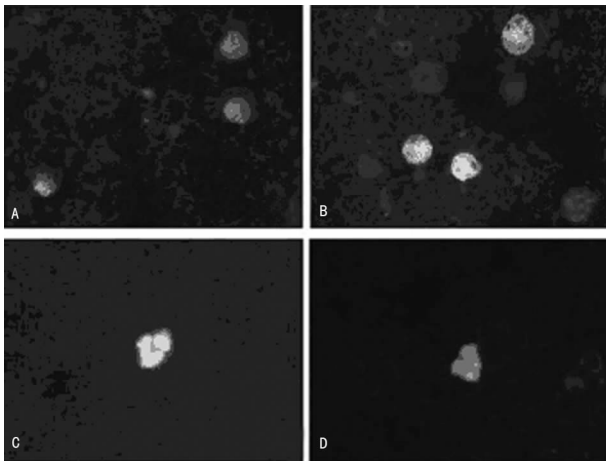
2.6 制备单克隆抗体与进口试剂的比对结果 在小样本的比对预试验中,克隆 29F1-1 抗体荧光染色较弱,与克隆 13D1-3 抗体混合后未增加荧光染色的强度,故最终选择 13D1-3 抗体与 CMV Brite™ Kit 进口试剂盒中的 C10/C11 混合抗体进行平行检测。共 1 039 份临床标本,两种方法同时阳性 143 份,同时阴性 868 份,13D1-3 单独阳性 10 份,C10/C11 单独阳性 18 份。与 CMV Brite™ Kit 进口试剂盒中的 C10/C11 混合抗体比较,13D1-3 抗体的阳性符合率为 88.8%,阴性符合率为 98.9%,总符合率为 97.3%。McNemar 检验结果 $P=0.185$,

两种方法诊断结果差异无统计学意义;Kappa=0.895,两种方法的吻合度较强。



注:A、B、C所用一抗为纯化 13D1-3 单克隆抗体,稀释度分别为 1:10、1:2500、1:5000;D、E、F 所用一抗为纯化 29F1-1,稀释度分别为 1:10、1:1000、1:2000。2A~F 所用二抗均为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG。

图 2 感染 CMV AD169 24h 的 MRC-5 细胞抗原片($\times 400$)



注:A、B 所用抗原片为 CMV Brite™ Kit 自带的阳性对照片,C、D 为同一患者外周血白细胞,A、C 所用一抗和二抗均来自 CMV Brite™ Kit,B、D 所用一抗均为 13D1-3 单抗,二抗为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG。

图 3 自建方法与进口试剂的 IFA 比对结果($\times 400$)

3 讨 论

CMV 属于疱疹病毒科 β 亚科,正式名称为人类疱疹病毒 5 型。正常成人 CMV 自然感染率高,约为 91.4%~97.8%^[8-9];多以无症状的潜伏感染为主,当机体免疫力降低时,CMV 活动性激活复制,引起临床不良后果^[1]。以往以检测 CMV IgM 诊断 CMV 活动性感染,但由于阳性率低,不适合作为早期诊断的指标^[10]。以荧光定量 PCR 为基础的 CMV 核酸定量检测,灵敏度高,重复性好,但对仪器设备及人员技术要求较高,广泛应用受到限制。

CMV pp65 是由 CMV UL83 基因编码的早期即刻蛋白(immediate-early antigen),位于衣壳和包膜之间,由 561 个氨基酸构成,相对分子质量约 65×10^3 ;是病毒在受感染细胞(如内皮细胞)内活动性复制时合成量最多的病毒蛋白,并通过细胞的短暂微融合将 CMV pp65 传递给外周血白细胞(PBL)并输入核内,出现巨细胞病毒 pp65 抗原血症。作为体内 CMV 活动性病毒复制的早期标志,检出 CMV pp65 抗原可有助于早期诊断 CMV 活动性感染^[11]。与 CMV DNA 血症检测相比,在诊断 CMV 活动性感染的发生发展方面,CMV pp65 抗原血症更具有特异性^[12];而且定期监测 CMV pp65 抗原血症可有效指导先驱治疗(preemptive therapy)方案中抗病毒药物使用^[13]。利用流式细胞术对外周血有核细胞 CMV pp65 抗原的检测还能对 CMV 感染的细胞群进行分析,有助于了解疾病病程及判断预后^[14]。虽然 CMV pp65 抗原检测由原来的酶标记二抗发展到现在的荧光素标记二抗,但仍然是以单克隆抗体检测为前提。

本实验所得 13D1-3 和 29F1-1 两种单克隆抗体与 HSV-1 型、HSV-2 型以及 VZV 等其他临床常见的疱疹病毒科病毒均无交叉反应,特异性好。13D1-3 抗体与 CMV Brite™ Kit 进口试剂盒中的 C10/C11 混合抗体平行检测临床外周血标本,初步比对结果显示,阳性符合率达 88.8%,阴性符合率达 98.9%,总符合率达 97.3%,敏感性较理想。

在 CMV Brite™ Kit 中的 C10/C11 混合抗体检测阳性而自制 13D1-3 单克隆抗体检测阴性的 18 份标本,有 5 份标本 CMV pp65 抗原阳性细胞分别为 (15、8、30、11、23/2) $\times 10^5$ WBC。由于患者的送检外周血血量少,因此在保证进口试剂盒检测用 PBL 足量前提下,用于 13D1-3 单克隆抗体检测的 PBL 较少,可能是自制抗体出现假阴性结果的原因;其余 13 份标本的 CMV pp65 抗原阳性细胞数均值是 $1.7/2 \times 10^5$ WBC。而 C10/C11 混合抗体检测阴性而自制 13D1-3 单克隆抗体检测阳性的 10 份标本,CMV pp65 抗原阳性细胞数均值是 $3.3/2 \times 10^5$ WBC。在未知原因的这 23 份结果不符标本中,阳性细胞数量均较少,与 PBL 离心甩片、固定、透化处理等操作过程未能完全同时同步进行或荧光镜下读片者的主观原因等造成假阴性或假阳性结果相关。

因此,本实验成功以自制抗体和自选试剂建立了检测外周血白细胞 CMV pp65 抗原血症的实验方法,主要检测流程如下:提取外周血白细胞后,以 3%甲醛浓度固定细胞 10 min,以 0.5% IGEPAL CA-630 透化处理 10 min,0.5% BSA、0.01 mol/L PBS 封闭 5 min,以 13D1-3 杂交瘤细胞所产抗体为一抗,37℃湿盒孵育 30 min,以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,37℃湿盒再次孵育 30 min。所自制的单克隆抗体与进口试剂盒检测的一致性较高(Kappa 值为 0.895),值得进一步研究。

参考文献

- [1] Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation[J]. Transplantation, 2013, 96(4): 333-360.
- [2] 李欲航,徐晨,陈健琳,等. 异基因造血干细胞移植后人 CMV 感染与 GVHD 相关性的临床研究[J]. 中华器官移植杂志, 2013, 34(2): 84-86. (下转第 3274 页)

种菌以上的混合感染可以很好的辨别、不易漏检。并且 CPS4 显色培养基能抑制变形杆菌的迁徙生长,有利于混合菌的分离。实验中发现用 CPS4 显色培养基分离混合感染菌 33 株,传统分离方法有 4 株漏检。

与传统的分离鉴定方法相比,CPS4 显色培养基仍存在不足之处。本研究发现,用 CPS4 显色培养基检测,其中有 5 株大肠埃希菌、1 株肠球菌未被检出;可能是这些菌株产生的 β 葡萄糖醛糖苷酶和(或) β 半乳糖苷酶含量较少或活性较弱,不足以游离出足够的产色基因而使菌落显色,亦可能是这些菌株在此次 CPS4 显色培养基中产生影响 β -葡萄糖醛糖苷酶活性的物质,从而干扰显色效果^[9]。此外,弧菌属细菌由于对盐的特别需求在此培养基上几乎不生长;实验中发现有 2 株棒状杆菌、1 株丹毒丝菌不生长;某些真菌生长慢。上述现象可能与细菌所需营养和生长速度不同,或培养基中加入的抑菌剂成分及浓度有关^[10]。

综上所述,用 CPS4 显色培养基做尿道病原菌的分离和鉴定,省去了对菌株进行纯培养的步骤,直接根据菌落颜色就可以做出初步判断,可简化鉴定程序,提高检测效率,有助于泌尿道感染的快速诊断,值得临床推广。

参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:801-821.
 - [2] Pitkanen T, Paakkari P, Miettinen IT, et al. Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and Escherich-
- (上接第 3271 页)
- [3] Chang M, Pan MR, Chen DY, et al. Human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein: a humoral immunogen for systemic lupus erythematosus patients and autoantibody accelerator for NZB/W F1 mice[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 143(1): 167-179.
 - [4] Cariani E, Pollara CP, Valloncini B, et al. Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients[J]. BMC Infect Dis, 2007, 7(2): 138.
 - [5] Sui G, Soohoo C, Affar el B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(8): 5515-5520.
 - [6] 谷鸿喜,张凤民,凌虹. 细胞培养技术[M]. 北京:北京大学医学出版社,2012:194-198.
 - [7] 崔京涛,倪安平,吴叶丽,等. 自身免疫病和非自身免疫病患者巨细胞病毒抗原血症检测及抗病毒治疗后复检观察[J]. 中华医学杂志,2012,92(34): 2426-2429.
 - [8] 俞苏蒙,叶晓波,邢云卿,等. 新兵人群人巨细胞病毒感染的血清流行病学调查[J]. 现代预防医学,2010,37(20): 3927-3928.

ia coil in non disinfected water[J]. J Microbial Methods, 2007, 68(3): 522-529.

- [3] Ciragil P, Gul M, Aral M, et al. Evaluation of a new chromogenic medium for isolation and identification of common urinary tract pathogens[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006, 25: 108-111.
- [4] 朱德妹,汪复,胡付品. 2010 年中国 CHINET 尿液标本中细菌的分布和耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(4): 241-250.
- [5] 杨自副,陈默蕊. 定位显色培养基在细菌快速初步鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7): 760-762.
- [6] 谢国艳,高志生. 快速鉴定大肠埃希菌方法的临床适用性的评估[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(4): 96-97.
- [7] 赵声远,陈奕雯,李林徽. 显色培养基联合简单生化试验鉴定常见氧化酶阴性革兰阴性杆菌的能力验证[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(7): 525-530.
- [8] 潘高辉,毛彩萍. 科玛嘉尿道定位显色培养基的应用评价[J]. 中国微生态学杂志, 2006, 18(2): 140.
- [9] 李艳梅,刘洋,杨慧娟. 用尿道菌定位显色平板鉴定大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌的方法评估[J]. 吉林医学, 2010, 31(24): 4154.
- [10] 张淑红,郑扬云,吴清平. 两种大肠杆菌显色培养基检测效果的比较[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(10): 130-133.

(收稿日期:2014-02-10 修回日期:2014-07-04)

- [9] 吕静娟,胡文胜,余坚,等. 温州市区育龄妇女孕前巨细胞病毒感染现状调查[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(2): 100-101.
- [10] 万琼,瞿富明,邬国和,等. 白血病异基因造血干细胞移植受者巨细胞病毒感染的检测及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 874-875.
- [11] 官琳妹,蔡鹏,汪艳. 肾移植术后巨细胞病毒 pp65 检测的临床意义[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(2): 165-166.
- [12] 翟文静,魏嘉琳,赵明峰,等. 巨细胞病毒定量 PCR 与 pp65 抗原测定监测异基因造血干细胞移植巨细胞病毒感染的比较[J]. 中国实验血液学杂志, 2009, 17(6): 1522-1526.
- [13] Saracino A, Colucci R, Latorraca A, et al. The effects of preemptive therapy using a very low threshold of pp65 antigenemia to prevent cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: a single-center experience [J]. Transplant Proc, 2013, 45(1): 182-184.
- [14] 李薇,麦颖,张璇. 流式细胞术分析 HCMV-PP65 抗原在外周血各有核细胞群上的表达及意义[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(2): 61-64.

(收稿日期:2014-01-10 修回日期:2014-06-12)