

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810171280.7

[43] 公开日 2009年5月6日

[11] 公开号 CN 101424602A

[22] 申请日 2008.10.30

[21] 申请号 200810171280.7

[30] 优先权

[32] 2007.10.31 [33] JP [31] 2007-284073

[71] 申请人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县神户市中央区脇浜海岸通1
丁目5番1号

[72] 发明人 藤本幸太郎 冈本尚

[74] 专利代理机构 北京金之桥知识产权代理有限公司

代理人 梁朝玉 刘良勇

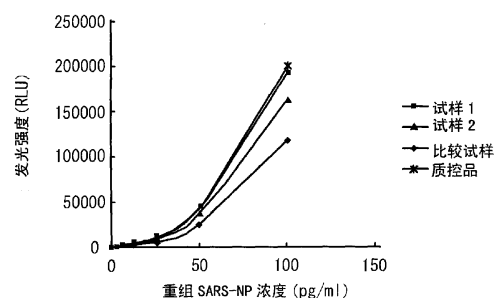
权利要求书3页 说明书16页 附图2页

[54] 发明名称

标本前处理液、病毒检测用试剂盒及病毒检测方法

[57] 摘要

本发明提供一种可以提高病毒检测灵敏度的标本前处理液以及用此标本前处理液测定病毒的试剂盒及其病毒检测方法。其中，用前处理液制备的试样用于与病毒特异性结合的抗体的免疫测定法检测鼻涕或痰中所含病毒，前处理液包含抑制蛋白质分解酶对病毒影响的蛋白质分解酶抑制剂。



1. 一种前处理液，用于制备试样，以便通过使用与病毒特异性结合的抗体的免疫测定法测定鼻涕或痰中所含病毒，其包含抑制蛋白质分解酶对病毒产生影响的蛋白质分解酶抑制剂。

2. 权利要求 1 所述前处理液，其特征在于：所述病毒为 SARS 病毒。

3. 权利要求 1 所述前处理液，其特征在于：所述免疫测定法为酶免疫测定法。

4. 权利要求 3 所述前处理液，其特征在于：所述酶免疫测定法是利用化学发光底物的方法。

5. 权利要求 1 所述前处理液，其特征在于：所述蛋白质分解酶抑制剂为选自丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂中的至少一种。

6. 权利要求 5 所述前处理液，其特征在于：所述丝氨酸蛋白酶抑制剂为苯甲基磺酰氟。

7. 权利要求 1 所述前处理液，还包含螯合剂。

8. 权利要求 1 所述前处理液，还包含表面活性剂。

9. 权利要求 1 所述前处理液，其特征在于：所述抗体为与病毒的核衣壳蛋白质特异性结合的抗体。

10. 一种用免疫测定法测定鼻涕或痰中所含病毒的试剂盒，包括：

含蛋白质分解酶抑制剂、用于抑制蛋白质分解酶对病毒的影响的前处理液；

与所述病毒特异性结合的第一抗体；及

与所述病毒特异性结合的第二抗体。

11. 权利要求 10 所述试剂盒，其特征在于：所述免疫测定法为酶免疫测定法。

12. 权利要求 11 所述试剂盒，其特征在于：所述酶免疫测定法利用化学发光底物。

13. 权利要求 10 所述试剂盒，其特征在于：所述蛋白质分解酶抑制剂为选自丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂中的至少一种。

14. 权利要求 10 所述试剂盒，其特征在于：所述第一和第二抗体分别与病毒的核衣壳蛋白质的不同识别位点特异性结合。

15. 权利要求 10 所述试剂盒，还包含固定所述第一抗体的固相。

16. 权利要求 10 所述试剂盒，其特征在于：所述第一抗体包含在第一试剂中，所述第二抗体包含在第二试剂中。

17. 权利要求 15 所述试剂盒，其特征在于：所述第一抗体所述固相所固定。

18. 一种用免疫测定法检测包括鼻涕或痰在内的标本中所含病毒的方法，包括以下步骤：

用含蛋白质分解酶抑制剂的前处理液处理所述标本；

让与病毒特异性结合的第一抗体和与病毒特异性结合的第二抗体结合到在所述处理步骤获得的处理标本所含病毒中，形成所述病毒、所述第一抗体和所述第二抗体的复合物；及

检测在所述复合物形成步骤获得的复合物。

19. 权利要求 18 所述方法，其特征在于：复合物的所述第一

抗体被固相所固定。

20. 权利要求 18 所述方法，其特征在于：所述第二抗体被标记物标记，所述检测步骤是通过检测所述复合物所含第二抗体的标记物，检测所述复合物。

标本前处理液、病毒检测用试剂盒及病毒检测方法

技术领域：

本发明涉及一种标本前处理液以及用此标本前处理液检测病毒的试剂盒及其病毒检测方法。

背景技术：

SARS（严重急性呼吸道症候群，Severe Acute Respiratory Syndrome）是近年来发现的传染病。已确认引起 SARS 的病原体是属于冠状病毒科的新型病毒（SARS 病毒）。SARS 病毒是一种感染呼吸器官的病毒。SARS 的初期症状表现为突然发热、咳嗽、气喘、呼吸困难等疑似流感的症状。发热初诊后约一星期，部分病例开始出现呼吸困难的症状。在同一时期许多病例对他人的传染力也增强。

一般在流感诊断中，先用含表面活性剂的前处理液对鼻涕和痰等标本进行处理后，再用免疫测定法测定该标本中所含来源于流感病毒的抗原（蛋白质）（参照如专利公开 2006-189304 号公报和 US2004265800）。

测定流感病毒时，用上述方法完全可以测定。但是测定 SARS 病毒时，从 SARS 患者采集的鼻涕和痰等标本中的 SARS 病毒含量比流感病毒少得多。因此，用上述方法难以准确检测 SARS 病毒。

发明内容：

本发明的范围只由后附权利要求书所规定，在任何程度上都不受这一节发明内容的陈述所限。

本发明的目的是提供一种在用免疫测定法测定象 SARS 病毒这样在鼻涕和痰等标本中含量极少的病毒时为提高检测敏感度、正确检测所需的标本前处理液。

本发明的另一个目的是提供一种用上述标本前处理液检测病毒的试剂盒和病毒检测方法。

即，本发明的目的是提供一种前处理液，用于制备试样，以便通过使用与病毒特异性结合的抗体的免疫测定法检测鼻涕或痰中所含病毒，其包含抑制蛋白质分解酶对病毒影响的蛋白质分解酶抑制剂。

所述前处理液，其中所述病毒为 SARS 病毒。

所述前处理液，其中所述免疫测定法为酶免疫测定法。所述酶免疫测定法是利用化学发光底物的方法。

所述前处理液，其中所述蛋白质分解酶抑制剂为选自丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂中的至少一种。其中所述丝氨酸蛋白酶抑制剂为苯甲基磺酰氟。

所述前处理液，还包括螯合剂；还包括表面活性剂。

所述前处理液，其中所述抗体为与病毒的核衣壳蛋白质特异性结合的抗体。

本发明另提供一种用免疫测定法检测鼻涕或痰中所含病毒的试剂盒，包括：含蛋白质分解酶抑制剂的前处理液，该蛋白质分解酶抑制剂用于抑制蛋白质分解酶对病毒的影响；与上述病毒特异性结合的第一抗体；及与上述病毒特异性结合的第二抗体。

所述试剂盒，其中所述免疫测定法为酶免疫测定法。

其中所述酶免疫测定法是利用化学发光底物的方法。

所述试剂盒，其中所述蛋白质分解酶抑制剂为选自丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂中的至少一种。

所述试剂盒，其中所述第一和第二抗体分别与病毒的核衣壳蛋白质的不同识别位点特异性结合。

所述试剂盒，还包括固定所述第一抗体的固相。

所述试剂盒，其中所述第一抗体包含在第一试剂中，所述第二抗体包含在第二试剂中。

其中所述第一抗体被所述固相所固定。

本发明再提供一种用免疫测定法检测包括鼻涕或痰在内的标本中所含病毒的方法，包括以下步骤：用含蛋白质分解酶抑制剂的前处理液处理上述标本；让与病毒特异性结合的第一抗体和与病毒特异性结合的第二抗体结合到在上述处理步骤获得的处理标本中所含病毒中，形成上述病毒、上述第一抗体和第二抗体的复合物；及检测在上述复合物形成步骤获得的复合物。

所述方法，其中复合物的上述第一抗体被固相所固定。

所述方法，其中所述第二抗体被标记物标记，所述检测步骤是通过检测所述复合物所含第二抗体的标记物，检测所述复合物。

当用免疫测定法测定标本中的病毒时，用本发明的标本前处理液处理标本，可以提高检测敏感度。因此，即使象 SARS 病毒那种标本中含量极少的病毒也可以准确检测。

附图说明：

图 1 为实施例 1 的结果显示图。

图 2 为实施例 2 的结果显示图。

图 3 为实施例 3 的结果显示图。

具体实施方式：

在本实施方式中使用的标本是可以从生物采集、有可能含有 SARS 病毒的标本。具体而言，是包括鼻涕和痰至少其中之一在内的标本。采样方法无特别限定，可使用众所周知的方法，具体而言，可以用吸出器和棉棒等采集鼻涕或痰。

本实施方式的标本前处理液含有蛋白质分解酶抑制剂。此蛋白质分解酶抑制剂抑制蛋白质分解酶对标本中所含 SARS 病毒的影响。以此可以防止 SARS 病毒分解。作为蛋白质分解酶抑制剂可以使用丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、天冬氨酸蛋白酶抑制剂以及其他蛋白酶抑制剂等。作为丝氨酸蛋白酶抑制剂如有抗凝血酶 III、TLCK（N-甲苯磺酰-L-赖氨酸氯甲基化酮）、TPCK（甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲酮）、肝素辅因子 II、抑肽酶、胰蛋白酶抑制剂(PSTI)、AEBSF（4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟）、PMSF（苯甲基磺酰氟）等。作为半胱氨酸蛋白酶抑制剂，如有抗蛋白酶（antipain）和 E-64 等。作为丝氨酸和半胱氨酸蛋白酶两者的抑制剂，如有亮抑酶肽、胰凝乳蛋白酶抑制剂等。作为天冬氨酸蛋白酶抑制剂如有抑肽素 A (PepstatinA)等。作为其他蛋白酶抑制剂，如有抑氨肽酶 A 素、氨肽酶抑制剂（Bestatin）等。其中，最好使用选自丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂等类的一种或二种以上的混合物。二种

以上混合物也可以适当混合分别购买的二种以上的蛋白质分解酶抑制剂。也可以使用市面上销售的数种蛋白质分解酶抑制剂混合而成的调制品。

标本前处理液最好还包括螯合剂。有时金属离子在酶的活性上是必需的。螯合剂可以与金属离子结合，形成螯合化合物。因此，可以和蛋白质分解酶抑制剂同样抑制蛋白质分解酶的作用。作为螯合剂如有乙二胺四乙酸（EDTA）的钠盐和钙盐、1、3-丙二胺四乙酸（PDTA）的钠盐和钙盐、氨基三乙酸等。

标本前处理液还可包含表面活性剂。表面活性剂具有破坏病毒膜，使病毒内的蛋白质显露出来的功能。作为表面活性剂如有非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂和两性离子表面活性剂。表面活性剂可以将一种或二种组合起来使用。具体而言，表面活性剂有烷基酚聚氧乙烯醚、烷基聚氧乙烯醚、聚氧化乙烯山梨糖醇酐酯、烷基吡啶盐和高级醇醚硫酸盐等。

标本前处理液除上述蛋白质分解酶抑制剂、螯合剂和表面活性剂外，还可以加入该专业人员常用的成份。比如，使 pH 值保持适于反应的 pH5~9 的缓冲液的构成成份。还可以适当加入有机酸。

标本的前处理按通常方法进行即可。如可以通过混合标本前处理液和标本进行前处理。比如，前处理也可以将采集鼻涕等标本的棉棒浸入标本前处理液，使标本前处理液与标本充分混合。在本说明书中，为了方便，将经前处理液处理的标本称为“试样”。

关于用标本前处理液处理标本所得的试样，可以通过用传统的免疫测定法引起抗原抗体反应来测定 SARS 病毒。在此，所谓 SARS 病毒指属于 SARS 病毒的病毒。SARS 病毒也包括变异的 SARS 病毒。

免疫测定法为利用与抗体的结合能力定量测定物质的方法。比如可以使用放射免疫测定法（RIA）、酶免疫分析法（EIA 或 ELISA）、荧光免疫分析法（FIA）、荧光偏振法、免疫层析法。

用于上述免疫测定法的抗体只要能与 SARS 病毒特异性结合即可，此抗体可以用常用方法获得。比如，用 Kohler 和 Milstein（Kohler G, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 256:495-497. 1975）的通过细胞融合制作杂交瘤的方法可以获得该抗体。也可以通过单纯地在动物身上对抗原进行免疫，提纯其血清，获得该抗体。在免疫测定法中使用的抗体可以是一种，也可以二种以上。

在此，抗体中包含抗体片段和嵌合抗体、人化抗体等改型抗体以及变异抗体。这些抗体片段、改型抗体或变异抗体也具有与源抗体同样的对 SARS 病毒的特异性。这些抗体也可以由专业人员用已知手段或方法制造。

根据不同的测定方法，可以用标记物标记抗体或固定在固相上。

标记抗体的标记物可视测定法适当选择。比如：如果测定方法为放射免疫测定法（RIA），则标记物可以是 ^{125}I 、 ^{14}C 和 ^{32}P 等放射性同位素。如果为酶免疫分析法（EIA 或 ELISA），则可以用 β -半乳糖苷酶（ β -gal）、过氧化物酶、碱性磷酸酶等酶。若是

荧光免疫分析法（FIA）或荧光偏振法，则可以用荧光素衍生物和若丹明衍生物等荧光色素。若是免疫层析法，则可以使用不溶性粒状标记物等。

关于固定抗体的固相的材料或形状可根据测定法适当选择。固相的材料只要与抗体结合性高即可，无特别限定。比如有聚氯乙烯、聚偏氟乙烯（PVDF）、聚苯乙烯、苯乙烯-二乙烯苯共聚物、苯乙烯-无水马来酸共聚物、尼龙、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚丙烯腈、聚丙烯等合成有机高分子化合物、右旋糖苷衍生物、琼脂糖凝胶、纤维素等多糖类、玻璃、硅胶、硅等无机高分子化合物。以上这些也可以是插入氨基、氨基酰基、羧基、酰基、氢氧基、硝基等功能基的物质。固相的形状也可以根据测定方法适当选择。比如有酶标板（ELISA板）、磁盘等平板状、微珠等粒子状、试管、软管等管状、纤维状、膜状等。将抗体固定在固相上的方法可以使用物理吸附法、离子结合法、共价结合法和包埋法等众所周知的方法。

作为免疫测定法来说，要检测标本中所含极微量的 SARS 病毒，使用酶、荧光或放射性同位素的高灵敏度的测定法最适用。尤以安全简便的酶免疫分析法为宜。使用酶免疫分析法时，最好用化学发光底物为酶发挥作用的底物。通过测定在酶与化学发光底物的反应过程中生成的化学光可以灵敏准确地测定 SARS 病毒。

标本前处理液可适用于通过免疫测定法检测标本中所含 SARS 病毒的 SARS 检测用试剂盒。SARS 检测用试剂盒除标本前处理液外，包含能与 SARS 病毒特异性结合的第一和第二抗体。

SARS 检测用试剂盒用于运用上述免疫测定法检测标本中所含 SARS 病毒。在此，作为 SARS 检测用试剂盒的免疫测定法最好是酶免疫分析法，特别是以利用化学发光底物的酶免疫分析法为宜。

SARS 检测用试剂盒的标本前处理液含有上述蛋白质分解酶抑制剂。蛋白质分解酶抑制剂最好从丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂和天冬氨酸蛋白酶抑制剂中至少选择一种使用。

SARS 检测用试剂盒的标本前处理液除蛋白质分解酶抑制剂外，还可以加入上述螯合剂和表面活性剂等。

标本前处理液作为含有蛋白质分解酶抑制剂和其他成份的液体，可以装在一个容器中。但是，当蛋白质分解酶抑制剂在水溶液中容易分解时，将蛋白质分解酶抑制剂溶解于水溶性有机溶剂的第一液和含有其他成份的第二液也可以分别装入不同的容器。以此可以提高蛋白质分解酶抑制剂的保存稳定性。此时，只要测定时混合第一液和第二液用于测定即可。作为水溶性有机溶剂可以使用乙醇、二甲基亚砷（DMSO）、甲醇、乙腈、2-丙醇等。其中以乙醇、二甲基亚砷（DMSO）、甲醇为好。

SARS 检测用试剂盒所含第一和第二抗体中至少应有一个是能与 SARS 病毒核衣壳蛋白（SARS-NP）特异性结合的抗体。因为 SARS-NP 较难发生突然变异。最好上述第一和第二抗体为分别与 SARS-NP 不同识别位点特异性结合的抗体。因为使用能分别与 SARS-NP 不同识别位点特异性结合的抗体作为第一和第二抗体，可以提高灵敏度和特异性，从而提高检测精度。

上述 SARS 检测用试剂盒也可以含有固定第一抗体的固相。此固相可以使用与前述固相相同的東西。当 SARS 检测用试剂盒包含上述固相时，固相可以与含有第一抗体的第一试剂和含有第二抗体的第二试剂在一起，也可以作为固定有第一抗体的固相（如酶标板）单加入上述试剂盒。

SARS 检测用试剂盒除上述以外，可以加入比如清洗酶标板样池的清洗剂和标记第二抗体的酶的相应底物等。上述清洗剂如有一定盐浓度的缓冲液。

本实施方式的标本前处理液可以适用于用免疫测定法检测标本中所含 SARS 病毒的 SARS 病毒检测方法。SARS 病毒检测方法包括以下步骤：用含有蛋白质分解酶抑制剂的标本前处理液处理上述标本，作为试样；让与 SARS 病毒特异性结合的第一抗体和与 SARS 病毒特异性结合的第二抗体作用于所得试样中的 SARS 病毒，形成含有上述 SARS 病毒、上述第一抗体和第二抗体的复合物；检测所得复合物。

此 SARS 病毒检测法在标本处理步骤中用标本前处理液处理标本，获得试样。在复合物形成步骤中使试样中的 SARS 病毒与能和 SARS 病毒特异性结合的第一和第二抗体产生反应，形成由 SARS 病毒、第一抗体和第二抗体组成的复合物。即，此 SARS 病毒检测法是以夹心法为测定原理的免疫测定法。

当使用固定第一抗体的固相和标记第二抗体的标记物时，在复合物形成步骤中形成的复合物的第一抗体被固相固定，复合物的第二抗体被标记物标记。因此，在检测步骤检测此第二抗体的标记物，即可检测出复合物。

在此检测方法中，作为固定第一抗体的固相和标记第二抗体的标记物可以使用上述免疫测定法中所说的固相和标记物。比如，作为固相可以举出酶标板、塑料管、玻璃微球等。作为标记物，可以举出过氧化物酶、半乳糖苷酶、碱性磷酸酶等酶。这些标记物可以直接与第二抗体结合，也可以间接结合。比如，用生物素标记第二抗体。再用标记物标记与生物素特异性结合的抗原。由于生物素—抗原的结合，即可用标记物标记第二抗体。

下面就运用上述检测法的免疫测定方法进行说明。

将捕捉待测物（来源于 SARS 病毒的抗原）的抗体（第一抗体）吸附于固相（酶标板）上。然后，向固定有第一抗体的酶标板添加经前处理液处理标本所得的试样。以此形成试样中待测物与上述被固定的第一抗体的复合物。接下来，添加生物素标记的第二抗体。以此在酶标板上形成含有被固化的第一抗体、待测物和生物素标记的第二抗体的复合物。再添加被标记物（酶）标记的抗原，使其与第二抗体的生物素结合。清洗后，添加作为抗原标记物的酶的底物（化学发光底物）。测定酶反应结果生成的化学光，检测待测物。

实例

实施例使用的第一抗体是杂交瘤鼠—鼠杂交瘤（Mouse—Mouse Hybridoma） SARS—23 产生的单克隆抗体（以下称“第一单克隆抗体”）。该杂交瘤已由希森美康株式会社寄存到独立行政法人产业技术综合研究所专利微生物托管中心（AIST）（地址：日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）。于 2006 年 9 月 19 日递交保藏，保藏号为 FERM BP—10680。此杂交瘤为小鼠

脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞的融合细胞，产生能识别位于 SARS-NP 的氨基酸序列 N 端起第 283~第 422 个范围内的表位的抗体（第一单克隆抗体）。

同样，第二抗体是由杂交瘤鼠—鼠杂交瘤（Mouse—Mouse Hybridoma） SARS-12 产生的单克隆抗体（以下称“第二单克隆抗体”）。该杂交瘤已由希森美康株式会社寄存到独立行政法人产业技术综合研究所专利微生物托管中心（日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）。于 2006 年 9 月 26 日保藏，保藏号为 FERM BP-10687。此杂交瘤为小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞的融合细胞，产生能识别位于 SARS-NP 的氨基酸序列 N 端起第 1~第 141 个范围内的表位的抗体（第二单克隆抗体）。

（实施例 1）

本实施例的目的是确认标本前处理液中的蛋白质分解酶抑制剂对 SARS 病毒检测灵敏度的效果。

（1）标本前处理液的配制

在含有 0.3（v/v）% NP-40（聚氧乙烯（9）辛基酚醚）、15mM EDTA·2 Na·2 H₂O、60mM NaOH、6mM ACES（N-(2-乙酰胺)-2-氨基乙磺酸）、0.22M NaCl 和 15mM NaN₃ 的溶液（pH7.0）（以下称溶液 A）中添加 20μl 的 0.1M PMSF 乙醇溶液，作为标本前处理液 1。

在溶液 A 中添加 10μl 的 1%抑制剂混合物，作为标本前处理液 2。在此，所谓 1%抑制剂混合物为按协议用纯净水溶解蛋白酶抑制剂混合物（商品名）（产品编号 P1860、Sigma-Aldrich 公司）的物质。该蛋白酶抑制剂混合物（商品名）含有丝氨酸蛋白

酶抑制剂抑肽酶、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 E-64、丝氨酸和丝氨酸蛋白酶抑制剂亮肽素和天冬氨酸蛋白酶抑制剂抑肽素 A。

(2) 标本及其前处理

从 5 名健康者采集的鼻涕以大致等量混合，所得鼻涕混合液作为标本。

将此标本与上述标本前处理液 1 混合，将所得混合液装入市面上出售的安装有人用流感诊断试剂盒 Poctem 流感 A / B（希森美康株式会社）用过滤器的抽取用瓶进行过滤。用此过滤液将按照 PCT/JP2006/320330 上记述的方法制备的 His-tag 附加型重组 SARS-NP（以下称重组 SARS-NP）分别调制浓度到 0、3.125、6.25、12.5、25、50 和 100pg/ml，作为试样 1。

将标本与上述标本前处理液 2 混合，将所得混合液装入上述抽取用瓶过滤。用此过滤液将重组 SARS-NP 分别调制到 0、3.125、6.25、12.5、25、50 和 100pg/ml，作为试样 2。

将标本与上述溶液 A 混合，将所得混合液装入上述抽取用瓶过滤。用此过滤液将重组 SARS-NP 分别调制到 0、3.125、6.25、12.5、25、50 和 100pg/ml，作为比较试样 1。

不用鼻涕标本，只用上述溶液 A 将重组 SARS-NP 分别调制到 0、3.125、6.25、12.5、25、50 和 100pg/ml，作为比较试样 2。

(3) 测定方法

首先将第一单克隆抗体如下固定在测光用 ELISA 板上。

用含有 0.1%叠氮化钠的 0.1M 磷酸缓冲液（pH7.5）稀释第一单克隆抗体至最终浓度（固定浓度）达到 1μg/ml 作为感作缓冲

液，将 0.1ml 感作缓冲液加入测光用 ELISA 板（NUNCinternational 公司制）。4℃静置一晚后，用含有 150mM NaCl 和 0.05% 吐温-20（Tween-20）的 10mM 磷酸缓冲液（以下称板清洗剂）冲洗该板三遍，加入含有 2.5mM EDTA、1% BSA、150 mM NaCl 和 5% 酪朊的 10mM 缓冲液（pH7.0）（以下称封闭液）0.3ml，4℃静置一晚。

在固定有第一单克隆抗体的测光用 ELISA 板的各样池中加入含有 2mM EDTA、1%BSA、150mM NaCl 和 0.5%酪朊的 10mM 缓冲液（pH7.0）（以下称样品稀释液）50 μ l。然后，添加各种试样 50 μ l，室温搅拌一个小时。用上述板清洗剂冲洗三遍酶标板后，用生物素标记第二单克隆抗体，将用样品稀释液稀释到 1 μ g / ml 的标记抗体液 100 μ l 添加到酶标板的各样池，室温搅拌 30 分钟，让其反应。用上述板清洗剂冲洗三遍酶标板后，用样品稀释液将过氧化物酶（POD）标记链霉亲和素稀释到 0.02 μ g / ml，将稀释的 POD 标记链霉亲和素溶液 100 μ l 加入酶标板的各样池，室温搅拌 30 分钟。用上述板清洗剂冲洗三遍酶标板后，在发光酶标仪（多功能荧光发光分析仪（BMG, MORITEX））上添加发光底物（FEMTOGLOW（Funakoshi 株式会社）），搅拌、测光。其结果见图 1。

在图 1 中，比较试样 1 显示出低于比较试样 2 的发光强度。这表示鼻涕标本中所含成份对 SARS-NP 的检测灵敏度有影响。试样 1 和试样 2 显示出高于比较试样 1 的发光强度。特别是用含有 PMSF 作为蛋白质分解酶抑制剂的标本前处理液 1 获得的试样 1 显示出接近于比较试样 2 的发光强度。据此可以推测出影响

SARS-NP 检测灵敏度的成份为鼻涕标本中所含蛋白质分解酶。并可以知道，通过用含有蛋白质分解酶抑制剂的标本前处理液处理鼻涕标本，可以抑制蛋白质分解酶对 SARS-NP 的影响，提高检测灵敏度。

（实施例 2）

本实施例的目的是就蛋白质分解酶抑制剂的效果检查有无鼻涕标本的个体差异。

以从 11 名健康者采集的鼻涕（No. 1~No. 11）和实施例 1 中使用的鼻涕混合液为标本。

用上述标本前处理液 1 分别处理鼻涕 No. 1~No. 11，与实施例 1 一样，制备不含重组 SARS-NP 情况下（0pg/ml）和含 10pg/ml 情况下的试样（试样 1~11），测定所得各试样的发光强度。

再用上述标本前处理液 1 处理鼻涕混合液，与实施例 1 一样，制备不含重组 SARS-NP 情况下（0pg/ml）和含 10pg/ml 情况下的试样（试样 12），测定所得各试样的发光强度。

用溶液 A 取代标本前处理液 1，对以上述同样方法获得的各试样（比较试样）也同样进行发光强度测定。这些结果见图 2。

从图 2 可以确认，在试样 1~11 中鼻涕标本的个体差异对测定值的影响很小，11 例全部取得了与试样 12 和比较试样同样的效果。据此得知，不管鼻涕标本有无个体差异，前处理液所含蛋白质分解酶抑制剂均能够收到效果。

（实施例 3）

本实施例的目的是探讨当以从 SARS 患者采集的鼻涕为标本时，用前处理液的检测方法能否检出 SARS 病毒。

以从 18 名 SARS 患者采集的鼻涕和从 20 名健康者采集的鼻涕为标本。

将标本与上述标本前处理液 1 混合，将所得混合液放入实施例 1 中所述抽取用瓶中过滤。以所得过滤液为试样，除 POD 标记链霉亲和素溶液浓度稀释到 $0.1\mu\text{g/ml}$ 外，其他都以与实施例 1 同样的测定方法测定发光强度。

为了比较，对上述标本用 RT-PCR 法测定 SARS 病毒的 RNA 含量。关于从标本中提取 RNA 和用 PCR 合成 cDNA，按照潘 LL 等人著的《通过实时 RT-PCR 方法早期诊断 SARS 冠状病毒感染》(Poon LL, et al. "Early diagnosis of SARS Coronavirus infection by real time RT-PCR", J Clin Virol 2003;28:233-8) 上记述的方法进行。关于使用合成的 cDNA 的 PCR，按潘 LL 等人著的《实时定量 RT-PCR 检测 SARS 病人的 SARS 冠状病毒》(Poon LL, et al. "Detection of SARS Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome by Conventional and Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Assays", Clin Chem. 2004 Jan;50(1):67-72) 上记述的方法进行。

其结果见图 3。在图 3 中，纵轴表示用前处理液的免疫测定法获得的发光强度。横轴为用 RT-PCR 法获得的 SARS 病毒的 RNA 含量。图 3 中的虚线表示边界值 (718RLU)。

从图 3 可以看出，当关于发光强度设定图中虚线所示边界值 (718RLU) 时，由健康者鼻涕制备的全部试样其发光强度均低于

边界值，由 SARS 患者鼻涕制备的全部试样其发光强度均高于边界值。关于由 SARS 患者鼻涕制备的全部试样，用 RT-PCR 法获得的 SARS 病毒的 RNA 含量与用前处理液的免疫测定法获得的发光强度的值之间具有相关性。从以上得知，使用用标本前处理液的检测方法可以正确地检出 SARS 病毒。

前述的详细说明及附图是通过文字解释和图示来进行的，其目的不在于限定权利要求的保护范围。本说明书中的具体实施方式的各个变种对于普通技术人员来说显而易见，并处于权利要求及其等同技术的保护范围内。

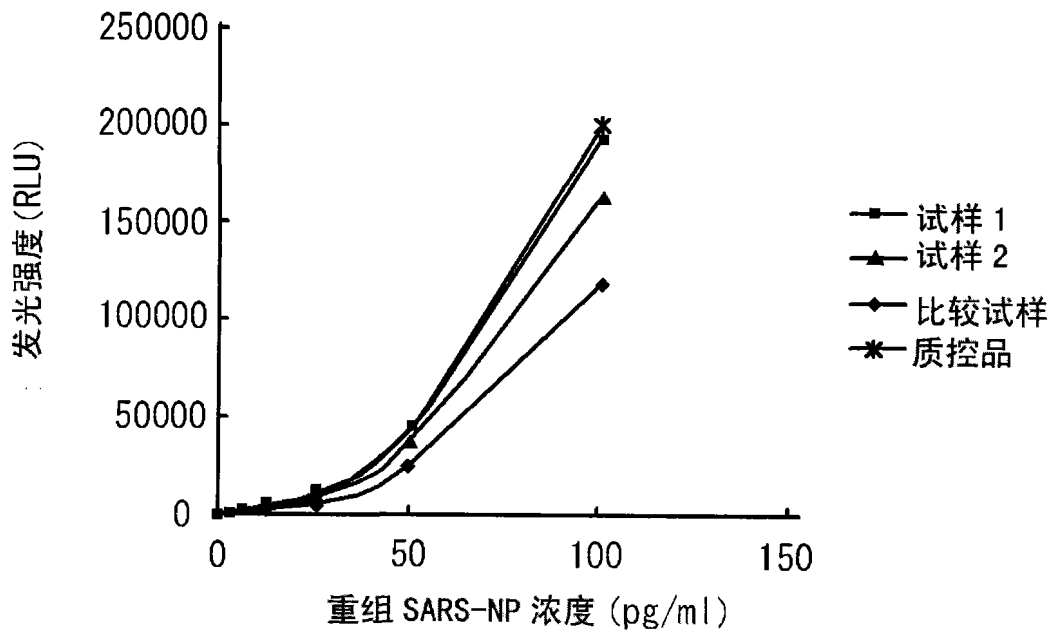


图. 1

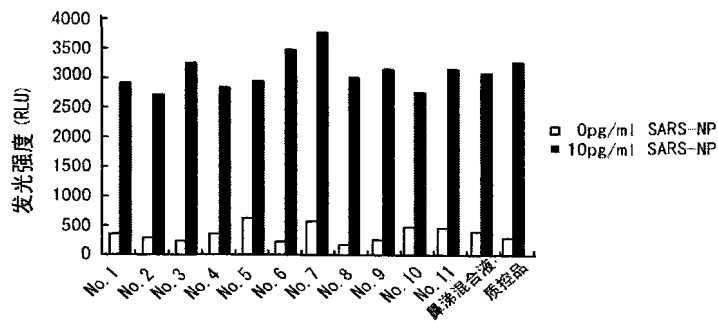


图. 2

专利名称(译)	标本前处理液、病毒检测用试剂盒及病毒检测方法		
公开(公告)号	CN101424602A	公开(公告)日	2009-05-06
申请号	CN200810171280.7	申请日	2008-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
[标]发明人	藤本幸太郎 冈本尚		
发明人	藤本幸太郎 冈本尚		
IPC分类号	G01N1/28 G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N2333/81 G01N2333/165 G01N33/5306 G01N33/56983		
代理人(译)	梁朝玉 刘良勇		
优先权	2007284073 2007-10-31 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种可以提高病毒检测灵敏度的标本前处理液以及用此标本前处理液测定病毒的试剂盒及其病毒检测方法。其中，用前处理液制备的试样用于以与病毒特异性结合的抗体的免疫测定法检测鼻涕或痰中所含病毒，前处理液包含抑制蛋白质分解酶对病毒影响的蛋白质分解酶抑制剂。

