



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480006372.X

[43] 公开日 2006年4月12日

[11] 公开号 CN 1759318A

[22] 申请日 2004.3.9
 [21] 申请号 200480006372.X
 [30] 优先权
 [32] 2003. 3. 10 [33] JP [31] 063832/2003
 [86] 国际申请 PCT/JP2004/003025 2004. 3. 9
 [87] 国际公布 WO2004/081568 日 2004. 9. 23
 [85] 进入国家阶段日期 2005. 9. 8
 [71] 申请人 第一化学药品株式会社
 地址 日本东京
 [72] 发明人 小堀樹一郎 川本道子 年澤幸司

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
 代理人 范征

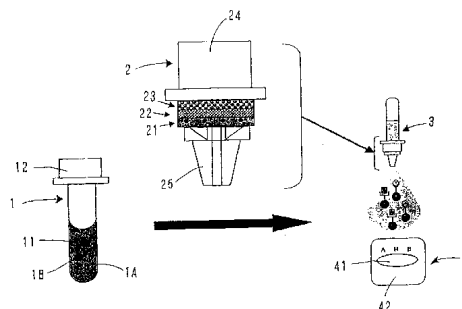
权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 1 页

[54] 发明名称

检测样品的方法和用于检测方法中的样品容器

[57] 摘要

一种免疫检测样品的方法，它包括将具有其内部浸渍标记抗体的嵌入式过滤器的帽连接于含有稀释的液体样品的容器体，将稀释的液体样品从容器倒入测试装置，观察反应从而检测样品中是否存在分析物。此检测方法由于能使个体操作者中的差异的影响最小化并可防止发生非特异性反应，因而有非常优良的检测结果复验性和测试试剂的储存稳定性。用于上述方法的样品容器装有其内部浸渍标记抗体的过滤器的帽。该容器适当地用作构成简化的诊断试剂盒的组件。



-
1. 一种免疫检测样品的方法，包括将具有浸渍标记抗体的嵌入式过滤器的帽连接于容纳稀释的液体样品的容器体；将稀释的液体样品从容器导入测试装置并观察
5 反应；并确定样品中是否存在分析物。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述标记的抗体是胶体金标记的抗体。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中，所述样品中的分析物是流感病毒。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法，进一步包括使用将样品与标记的抗体在简化的诊断试剂盒中反应的方法。
- 10 5. 一种用于如权利要求 1-4 中任一项所述检测方法的样品容器，包括具有浸渍标记抗体的嵌入式过滤器的帽，此帽连接于容纳稀释的液体样品的容器体。
6. 如权利要求 5 所述的样品容器，其中，所述标记的抗体是胶体金标记的抗体。
7. 如权利要求 5 或 6 所述的样品容器，其中，所述样品中的分析物是流感病毒。
8. 如权利要求 5-7 中任一项所述的样品容器，其中，所述容器被用作简化的诊
15 断试剂盒的组件。

检测样品的方法和用于检测方法中的样品容器

5 技术领域

本发明涉及使用抗原-抗体反应在免疫测定的样品中检测是否存在分析物的方法和用于该检测方法的样品容器。具体地说，本发明涉及新颖的测定方法和用于该检测方法的新颖的样品容器，该测定方法可简单和快速地在适用抗原-抗体免疫反应的检测方法的样品中测定是否存在分析物。

10

背景技术

使用抗原-抗体反应的免疫学检测方法已广泛地应用于各种临床检测。其典型的流程是使样品(例如血液、尿液、痰、唾液和鼻涕或其样品稀释溶液)与用颜色鉴定物质(例如酶、贵金属胶体、染色乳胶和色素)标记的抗体溶液相接触，使得样品中的抗原特异地与标记的抗体反应形成抗原-抗体免疫复合物，然后通过目测来测定免疫复合物的量或作为光学变化进行定性或定量测定样品中的抗原。

各种简化的、适用于上述检测方法的诊断试剂盒已开发并可市售，它们可作为简单和快速地进行检测并诊断各种感染、妊娠判断和癌症鉴定的工具。我们描述了检测和诊断流感病毒感染的简化诊断试剂盒的现状作为其例子。

20 因为除避免不必要的给与常规抗生素和镇痛药之外，有疗效的抗病毒药物制剂近来可应用，简单和快速地诊断流感病毒的试剂和工具已迅速投入实际使用。因此，各种医药公司已经开发并利用以 ELISA(酶联结免疫吸附测定)为基础的简化的诊断试剂盒。其中的一个例子公开于 JP-A-2001-124775 和 JP-A-2000-230931。自从分别出现对流感 A 病毒和流感 B 病毒有效的药物，已开发了能鉴定和区分 A 或 B 型的测试试剂和工具。以下描述了一种使用胶体金标记的抗体溶液、用于流感感染的简化的诊断试剂盒的用途作为代表性的例子。(参考实施例 1)〈使用常规的胶体金标记的抗体溶液、用于流感感染的简化的诊断试剂盒的用途(使用流通式技术的夹心型简化测定方法)〉

25 A. 首先，将以鼻涕或鼻腔擦拭液体收集到的样品加入通过向缓冲液中加入表面活性剂制得的稀释液中，然后搅拌。所得到的混合物作为稀释的液体样品(预处理的

30

样品溶液)注入第一个管式容器中, 该容器的末端用具有一嵌入式过滤器的帽覆盖。

B. 稀释的液体样品通过帽上的过滤器从第一个管式容器转移至第二个管式容器, 然后向第二个管式容器中滴入几滴胶体金标记的抗流感抗体的悬浮液(胶体金标记的抗体溶液), 接着它们其充分混合, 在样品和胶体金标记的抗流感抗体中形成流感病毒的复合物。第二个管式容器装有不同于在上述步骤 A 中使用的过滤帽, 然后维持 2 到 5 分钟。

C. 第二个管式容器中全部量的混合物注射入测试装置(用于免疫测定的装置), 该装置填充有固定的抗流感抗体和吸收剂(例如吸水棉或吸水纸)的载体(多孔的薄膜物质例如膜), 使载体吸收样品和胶体金标记的抗流感抗体中的流感病毒复合物, 然后向测试装置注射入洗涤溶液来洗涤载体。

D. 随后, 观察测试装置上发生的反应来鉴定和诊断以确定流感病毒感染和流感病毒的类型(A 或 B)。

用于检查流感感染的常规简化的诊断试剂盒是一种简单的检测工具, 但有一些需要改进的缺陷。

更具体地说, 为进行稀释的液体样品与胶体金标记的抗体的反应, 如上所述, 操作者应将胶体金标记的抗体溶液滴入稀释的液体样品中, 因此需要复杂的操作, 例如从第一个容器转移至第二个容器。此外, 胶体金标记的抗体溶液的液滴量由于每个操作者中的差异也会不同, 因此试验结果的复验性有困难。此外, 胶体金标记的抗体溶液仅依赖于其温度就会凝聚, 因此它不能通过滤帽。此外, 胶体金标记的抗体未洗涤和过滤, 因此在测试过程中可能留在测试装置上。所以, 胶体金标记的抗体可能染色整个载体或非特异地与固定在载体上的抗体结合, 从而导致会是假阳性判断的原因的错误染色。特别是在低温条件下或在贫溶液中, 超过一年的长期保存推测是困难的。

许多市场上可市售的、应用免疫学检测方法的简化诊断试剂盒采用将稀释的液体样品与标记的抗体溶液混合并形成免疫复合物的方法, 这些试剂盒可在上述用于流感病毒感染的示例性诊断试剂盒中发现。因此, 检查流感病毒感染的诊断试剂盒中应改进的问题要直接符合于市场上可买到的通用的简单诊断试剂盒。

更具体地说, 为了在市场上常规的诊断试剂盒中产生样品和标记抗体的反应, 需要混合稀释的液体样品和标记的抗体溶液。在许多情况下已采用操作者将几滴标记的抗体溶液滴入稀释的液体样品的方法。然而, 在该方法中标记的抗体样品的液滴量会由于操作者中的差异而不同。例如, 比较滴一液滴和滴三液滴的情况, 二者

之间所滴入的溶液量会很不同。如果所滴入的标记的抗体溶液的量少，那么由于敏感度不充分而不能发生充分的反应。如果所滴入的抗体溶液的量多，在测试结果中容易出现由于标记的抗体的液滴量所导致的错误，这是因为造成非特异反应等的概率增加了。此外，如果标记的抗体以液体形式长期存放，有可能难以正确检测。因此，本发明试图解决常规检测方法和工具中的所有问题。

此外，Minoru Kanazawa 和 Norio Sagaya 所编辑的非专利文献“流感诊断手册”(Influenza Diagnostic Manual) (第一次印刷，2001年2月20日出版，Nankodo, Co., Ltd. 第110-115页)中所描述的内容作为参考文献。

10 发明内容

考虑到上述情况，在使用抗原-抗体反应的免疫检测方法方面，本发明的第一个目的是提供一种检测方法和用于该检测方法的样品容器。该检测方法具有在操作者中个体差异的影响小、阻止非特异反应的产生并具有较高的诊断结果复验性且使检测试剂具有保存稳定性。此外，在检查流感病毒感染的检测方法方面，本发明的第二个目的是提供一种检测方法和用于该检测方法的样品容器。该检测方法具有操作者个体差异的影响小、阻止非特异反应的产生并具有较高的诊断结果复验性且使检测试剂具有保存稳定性。另外，在应用免疫检测方法的简化诊断试剂盒方面，本发明的第三个目的是提供一种使得试剂盒更简单使用的检测方法和用于该检测方法的样品容器。该检测方法具有操作者个体差异的影响小、阻止非特异反应的产生并具有较高的诊断结果复验性且使检测试剂具有保存稳定性。

为解决上述的问题，如权利要求1所述，本发明涉及一种免疫检测样品的方法，包括：将具有浸渍标记抗体的嵌入式过滤器的帽连接于容纳稀释液体样品的容器体，然后将稀释液体样品从容器导入测试装置并观察反应；并测定样品中是否存在分析物。

25 如本发明权利要求2所述，本发明涉及如权利要求1所述的方法，其中标记的抗体是胶体金标记的抗体。

如本发明权利要求3所述，本发明涉及如权利要求1或2所述的方法，其中样品中的分析物是流感病毒。

30 如本发明权利要求4所述，本发明涉及如权利要求1到3中任一所述的方法，它进一步包括使用在简单的诊断试剂盒中样品与标记抗体反应的方法。

如本发明权利要求5所述，本发明涉及一种用于如权利要求1到4中任一所述

的检测方法中的样品容器，包括将具有浸渍标记抗体的嵌入式过滤器帽连接于容纳稀释液体样品的容器体。

如本发明权利要求 6 所述，本发明涉及如权利要求 5 所述的样品容器，其中标记的抗体是胶体金标记的抗体。

5 如本发明权利要求 7 所述，本发明涉及如权利要求 5 或 6 所述的样品容器，其中样品中的分析物是流感病毒。

如本发明权利要求 8 所述，本发明涉及如权利要求 5 到 7 中任一所述的样品容器，其中该容器用作简化的诊断试剂盒的一个部分。

10 附图简述

图 1 是按照本发明检测样品的示范性方法和用于该检测方法的示范性样品容器的示意图。在图 1 中，参考号数 1 表示样品容器的容器体，11 表示稀释的液体样品，12 表示容器的开口末端部分。此外，参考符号 1A 表示流感 A 病毒抗原，1B 表示流感 B 病毒抗原。另外，参考号数 2 表示帽，21 表示浸渍胶体金标记的抗体的过滤器，22 和 23 表示其它过滤器，24 表示帽的装配部分，25 表示帽的喷嘴部分，3 表示在容器体上装有帽的样品容器。而参考号数 4 表示测试装置，41 表示其开口部分，42 表示其表面。

本发明的最佳实施方式

20 本发明将样品与标记抗体接触的方法，而不是按常规方法将标记的抗体溶液滴入使稀释的液体样品和标记的抗体溶液混合，而是采纳一种方法，该方法包括制备浸渍标记的抗体的过滤器，将该过滤器装在帽中并将帽连接于容纳稀释液体样品的容器体。当稀释的液体样品通过帽中的过滤器注射入测试装置时，在稀释的液体样品中的样品与浸渍在过滤器中的标记抗体相接触形成免疫复合物。过滤器可以是膜，25 一般用滤布或滤纸(例如高密度聚乙烯聚合物滤布、以玻璃纤维为基础的滤纸和纤维素为基础的滤纸)。

此外，本发明中的术语“帽”指至少一种可装在充有或容纳稀释的液体样品等的容器体上和一种在结构上能使液体通过并在其中装有过滤器的装置。帽的形状可选择所需的形式如锥形、碟形或管形与锥形的组合等。

30 在本发明中，例如将过滤膜(滤布或滤纸)浸在标记的抗体溶液或将标记的抗体溶液涂布或滴加在膜上的方法，均可采用作为用标记的抗体溶液浸渍过滤器的方法。

对于工业生产过滤器，可用涂布机来施加一定量的溶液。以下描述了如何生产浸渍标记抗体的过滤器的例子。标记的抗体溶液充足地滴加到合适的滤布或滤纸上要，而滤布或滤纸剪裁成与要连接于容纳稀释的液体样品的容器主体的帽的内部形状和大小一样，然后在 35 到 38℃干燥 30 到 40 分钟。另外，它也可在正常温度下自然干燥。

浸渍标记抗体的过滤器可用任何方式装在帽中。通过将浸渍标记抗体的过滤器与其它过滤器组合形成的多层结构可装在帽中。例如，从帽的喷嘴一侧(排料开口侧)，将浸渍标记抗体的、含有基于玻璃纤维的滤纸的过滤器，含有另一种基于玻璃纤维的滤纸的过滤器和含有高密度聚乙烯聚合物滤布的过滤器以这种顺序层压制得。

在本发明中，任何物质，例如酶、贵金属胶体、色素和染色乳胶可用作着色剂。当然，优选使用贵金属胶体的颗粒。在贵金属胶体颗粒中，特别优选使用本领域熟知的金属胶体制备方法制得的胶体金颗粒。

以下将参考附图描述本发明检测样品的的方法和用于该检测方法的样品容器。

图 1 是本发明实施例的示意图，解释了检测流感病毒的方法和用于该检测方法的样品容器。在图 1 中，参考号数 1 表示含有稀释的液体样品 11、具有试管形状的塑料容器体。将收集自病人的鼻涕、含有流感 A 病毒抗原 1A(由钻石形状表示)和流感 B 病毒抗原 1B(由四方形状表示)的样品配制在添加表面活性剂等的缓冲液中制备稀释的液体样品 11。

在图 1 中，参考号数 2 表示具有适合于容器体 1 的开口末端部分 12 的装配部分 24 和喷嘴部分 25 的塑料帽。在帽 2 的腰部，从靠近喷嘴部分 25 的一侧，将浸渍胶体金标记的抗体的玻璃纤维滤纸制备过滤器 21，含有玻璃纤维滤纸的过滤器 22 和含有高密度聚乙烯聚合物滤布的过滤器 23 以该顺序装载建成三层结构(在图中，过滤器 21 中的黑圈代表金胶体，制备胶体金标记的抗体溶液等方法见下述的实施例 1)。

参考号数 3 代表了将帽 2 装配到容纳稀释的液体样品 11 的容器体 1 来制造样品容器的情况。参考号数 4 表示在其表面形成具有开口部分 41 的塑料测试装置。在测试装置中，从底层，吸水棉、吸水纸与固定流感 A 和 B 病毒的膜以此顺序安放。稀释的液体样品 11 放置在样品容器 3 中并维持约 5 分钟，然后其全部量从帽 2 的喷嘴部分 25 滴入测试装置 4 的开口部分 41。随后，膜用洗涤溶液洗涤并目测检查在开口部分 41 产生的斑点情况和进行流感病毒感染的诊断等。

实施例

以下将参考实施例对本发明进行更详细的描述。在以下的描述中，对应于图 1 描述的参考号数分别以[] (括号) 代表。

(实施例 1)

<本发明检测流感病毒感染的方法>

5 1. 测试试剂的制备

(1) 抗体固定的膜的制备

1- μ L 的小鼠抗流感 A 病毒抗体溶液(A)、小鼠抗流感 B 病毒溶液(B)和抗小鼠 IgG 抗体溶液(R)各自独立地滴加到如图 1 所示安放的硝酸纤维素膜(孔径 60 μ m)上，然后干燥。因此，3 种不同的抗体以直径约 2mm 的斑点固定在膜上。此外，膜用含有
10 0.1% MALLALIM AFB-1521(由 NOF 公司制造)和 2.5%蔗糖的 Tris-HCl 缓冲液(pH7.4) 封闭处理来制备抗体固定的膜。

(2) 测试装置的生产

如图 1 所示，在其表面装有用于加入稀释的液体样品的开口部分[41]的塑料盒子[42]中，吸水棉、吸水棉纸和抗体固定的膜从底部以该顺序层压，使得 3 种固定
15 化抗体安放在开口部分的中部附近以提供测试装置[4]。

此外，如图 1 所示，测试装置[4]上所示的字母 A、R 和 B 分别指小鼠抗流感 A 病毒抗体溶液、抗小鼠 IgG 抗体溶液和小鼠抗流感 B 病毒溶液在斑点中固定的区域。

(3) 标记抗体的制备

四氯金酸氢(III)水溶液和柠檬酸三钠水溶液加入沸腾的蒸馏水中，然后加热同
20 时搅拌。随后将混合物在冰水中冷却，产生金胶体。金胶体的粒径约 60nm。所得到的金胶体与小鼠抗流感 A 病毒抗体溶液和小鼠抗流感 B 病毒溶液(分别识别不同于固定在硝酸纤维素膜上的抗体的其它表位)在硼酸缓冲液(pH9.0)中混合，然后于室温搅拌得到标记的抗体。混合物进一步加入 10%BSA 水溶液进行封闭处理，然后离心使之沉淀，得到两种胶体金标记的抗体。

25 (4) 标记抗体溶液的制备

两种不同的胶体金标记的抗体溶液一起悬浮在含有 0.2%吐温 20、1.0%蔗糖和 0.2%BSA 的 PBS 中，从而制得含有用于流感 A 病毒和流感 B 病毒的两种胶体金标记的抗体的溶液。

(5) 浸渍标记抗体的过滤器的制备

30 从表 1 所列的成分中选择基于玻璃纤维的滤纸 F075-14，然后裁成碟形部分(直径 7.5mm)来配合帽内的形状和大小。在每一个碟形部分上滴加 60 μ l 的胶体金标记

的抗体溶液，然后自然干燥，从而制得浸渍胶体金标记抗体的过滤器[21]。

(6) 具有浸渍标记抗体的嵌入式过滤器的帽的制备

如图 1 所示，从供给稀释的液体样品的一侧，将用高密度聚乙烯聚合物滤布制成的过滤器[23]、用基于玻璃纤维的滤纸制成的过滤器[22]和浸渍胶体金标记的抗体的过滤器[21]以这种顺序叠加并安放在帽[2]内，从而制得具有浸渍胶体金标记抗体的嵌入式过滤器的帽(以下称为“本发明的帽”)。如图 1 所示，所得到的本发明的帽是连接于容纳稀释的液体样品[11]的容器体[1]并使用的。

2. 检测病毒的方法

(1) 稀释溶液

10 使用含有 2%BSA 的 PBS (pH7.4)

(2) 洗涤溶液

使用含有 12%尿素的 PBS (pH7.4)

(3) 检测过程

15 A. 含有纯化的流感抗原的稀释的液体样品 (A 型病毒：来源于病毒株 Kitakyushu/159/93, B 型病毒：来源于 Lee/40 病毒株)通过将各个病毒分别加入稀释溶液中制备，病毒浓度为 2×10^6 到 1×10^5 (TCID₅₀/测试单位)。

B. 将收集有鼻涕的棉花体放入有 1.2ml 的稀释液体样品的容器中，使得鼻涕成份洗脱在稀释的液体样品中，制得含有鼻涕的稀释的液体样品。

20 C. 本发明的帽[2]连接于含有 1.2ml 的稀释液体样品的容器体[1]，稀释液体样品含有在上述步骤 A 或 B 中分别制备的纯化的流感抗原或鼻涕样品，然后将其全部量滴在测试装置[4]的开口部分[41]中。

D. 在抗体固定的膜上没有发现稀释的液体样品[11]之后，500 μ l 的洗涤液滴在开口部分中，洗涤抗体固定的膜。

25 E. 抗体固定的膜在洗涤之后目测并检查是否存在红色检测斑点。具体的判断由以下四条标准评判。当观察到红色检测斑点时，取决于其强度将结果按下列两条不同的标准评级，即+ (阳性)和++ (更阳性)。当检测的斑点不清晰时，可评级为± (不确定)。当未观察到检测斑点时，可评级为- (阴性)。

测试实施例

30 以下将参考测试实施例对本发明进一步的描述。

(测试实施例 1)

<为各成分所选择的测试>

(1)测试流程

使用列于表 1 的成分、按照实施例 1 的方法制备本发明的帽。将本发明的帽连接于含有 1.2ml 稀释的液体样品的容器体，该稀释的液体样品既不含有流感纯化的抗原也不含有鼻涕，然后将其全部量滴在试管中。从所得到的滤液在波长 537nm 处的吸光度计算滤液中胶体金标记的抗体的量，然后将其与浸渍在过滤器中的胶体金标记的抗体的量进行比较以获得回收率。测试的结果见表 1。

(2)测试结果

10 表 1

过滤器	商品名(公司名)	过滤器厚度 (mm)	孔径 (μ m)	回收率 (%)
高密度聚乙烯聚合物	LG20(Flon Industry Co., Ltd.)	1.9	20	96.7
基于玻璃纤维的滤纸	F0-75-14(Advantec MFS Inc.)	0.355	23	95.4
基于玻璃纤维的滤纸	GB-140(Advantec MFS Inc.)	0.56	0.4	71.2
基于纤维素的滤纸	17chr(Whatman Japan KK)	0.92	未给出	57.5

(3)讨论

从表 1 所显示的结果，按照本实施例的方法，以胶体金标记的抗体的回收率为基础可揭示由于标记抗体的大小，用于生产浸渍标记抗体的过滤器的成分(滤布或滤纸)、过滤器中所浸渍的标记抗体的量和原材料以及过滤器的厚度等均可以合适地选择。

(测试实施例 2)

<基础性质的验证测试>

20 (1)测试流程

使用 LG20 作为过滤器成分制备本发明的帽，然后将其连接于容器体，该容器体

含有表 2 所示浓度的纯化流感抗原(A 形和 B 形)的 1.2ml 稀释液体样品,然后按照实施例 1 的方法进行测试。进行以下测试作为对照方法。具体地说,向含有纯化的流感抗原的稀释液体样品的容器体中进一步加入 60 μ l 胶体金标记的抗体溶液。随后用未浸渍标记抗体的过滤器替换安放在本发明的帽中的浸渍标记抗体的过滤器,然后进行测试。测试结果见表 2。

(2)测试结果

测试结果见表 2。

(3)讨论

从表 2 可以确认本发明方法(将稀释的液样品从浸渍标记抗体的过滤器滴入的方法)与对照方法(将稀释的液体样品与标记抗体混合的常规方法)在测试精度方面无差别。因此证明本发明的方法与对照方法具有相同的性能。

表 2

a. 检测流感 A 病毒

病毒的量	2×10^6	8×10^5	4×10^5	2×10^5	1×10^5	空白
本发明方法	++	++	++	+	+	-
对照方法	++	++	++	+	+	-

(病毒的量以“TCID₅₀/测试单位”表示)

15

b. 检测流感 B 病毒

病毒的量	2×10^6	8×10^5	4×10^5	2×10^5	1×10^5	空白
本发明方法	++	++	++	+	+	-
对照方法	++	++	++	+	+	-

(病毒的量以“TCID₅₀/测试单位”表示)

(测试实施例 3)

20 <对本发明方法的效果的验证测试>

(1)测试流程

LG20 用作过滤器成分和如表 3 所示改变浸渍过滤器的胶体金标记的抗体的量来制备本发明的帽。将本发明的帽连接于盛放含有鼻涕样品(阴性样品)的 1.2ml 稀释的液体样品的容器体,该鼻涕样品用 PCR 方法验证不存在流感 A 病毒或 B 病毒。随

后按照实施例 1 的方法进行测试。作为对照方法，1 到 3 液滴的胶体金标记的抗体溶液从滴瓶滴入含有纯化的流感抗原的稀释液体样品的容器体内，然后用未浸渍标记抗体的过滤器替换安放在本发明的帽中的浸渍标记抗体的过滤器，然后装上帽后进行测试。测试结果见表 3

5 (2)测试结果

测试结果列于表 3。

表 3

在 20 份样品中确定为“+”的样品数

		阴性样品	
		A 型	B 型
对照方法	1 滴(相当于 30 μ l)	0/20	0/20
	2 滴(相当于 60 μ l)	0/20	0/20
	3 滴(相当于 90 μ l)	1/20	1/20
本发明方法	浸渍有 54 μ l	0/20	0/20
	浸渍有 60 μ l	0/20	0/20
	浸渍有 66 μ l	0/20	0/20

10

(3)讨论

表 3 证实了当滴入 3 液滴标记抗体溶液时存在导致非特异反应的样品。相反在本发明方法中，标记抗体的量是恒定的，因此在样品中未观察到非特异反应。该测试结果证实本发明方法可以解决由于标记抗体的量所导致的检测错误。

15

(测试实施例 4)

<标记抗体溶液的保存稳定性的验证测试 1>

(1)测试流程

20 LG20 用作过滤器成分，然后按照实施例 1 制备本发明的帽并储存在 30°C (30%的湿度)或 37°C (30%的湿度)。从开始储存起 0 个月、6 个月和 9 个月时段将每个帽连接于容纳含有纯化的流感抗原(A-型病毒：来源于病毒株 Kitakyusyu/159/93, B-型病毒：来源于病毒株 Lee/40)、1.2ml 的稀释样品溶液(稀释的样品溶液含有 2×10^6

基于病毒 TCID₅₀/测试单位每种病毒)的容器体, 然后按照实施例 1 的方法进行测试。作为对照方法, 3 液滴各自储存于 30℃ (30%的湿度) 或 37℃ (30%的湿度) 0 个月、6 个月和 9 个月的胶体金标记的抗体溶液从滴瓶滴入盛放含有纯化的流感抗原的稀释液体样品的容器体中。随后给容器装上具有未浸渍标记抗体的过滤器而不是安放在本发明的帽中的浸渍标记抗体的过滤器, 然后进行测试。测试结果见表 4

(2) 测试结果

测试结果见表 4。

(3) 讨论

如表 4 所示, 该测试证实了当标记的抗体储存在 37℃ (30%的湿度) 时, 以溶液状态储存 6 个月的样品不可能进行正确的测量, 而本发明制成的过滤器即使储存 9 个月之后仍能进行正确的测量。

表 4

储存温度	储存时间	0 个月		6 个月		9 个月	
		A 形	B 形	A 形	B 形	A 形	B 形
37℃	对照方法	+	+	±	±	-	-
	本发明方法	+	+	+	+	+	+
30℃	对照方法	+	+	+	+	+	+
	本发明方法	+	+	+	+	+	+

15 (测试实施例 5)

<标记抗体溶液的保存稳定性的验证测试 2>

(1) 测试流程

LG20 用作过滤器成分, 然后按照实施例 1 制备本发明的帽。含有本发明帽和胶体金标记的抗体溶液的滴瓶与干燥剂一起放在密封的容器中, 然后在 -30℃ 储存整天整夜。帽温暖至室温, 然后连接于盛放含有鼻涕样品 (阴性样品, 用 PCR 方法证实其中不存在流感 A 病毒或流感 B 病毒) 的 1.2ml 稀释液体样品或纯化的流感抗原 (A-型病毒: 来源于病毒株 Kitakyusyu/159/93, B-型病毒: 来源于病毒株 Lee/40, 每种病毒含有 2×10^6 TCID₅₀/测试单位) 的稀释的液体样品的容器体, 然后按照实施例 1 的方法进行测试。作为对照方法, 温暖至室温的 2 液滴胶体金标记的抗体溶液滴入盛放含有阴性样品或纯化的流感抗原的稀释的液体样品的容器体中。随后给容器装上具

有未浸渍标记抗体的过滤器而不是安放在本发明的帽中的浸渍标记抗体的过滤器，然后进行测试。作为标准方法，使用储存于室温而不是储存于-30℃的胶体金标记的抗体溶液，然后以与上述对照方法同样的流程进行测试。测试结果见表 5

(2) 测试结果

5 测试结果见表 5。

表 5

储存温度		阴性样品			纯化的流感抗原		
		A 型	B 型	R 部分	A 型	B 型	R 部分
-30℃	对照方法	+	+	+	+	+	+
	本发明方法	-	-	++	++	++	++
室温	标准方法	-	-	++	++	++	++

(3) 讨论

10 首先，在使用储存于-30℃后的胶体金标记的抗体溶液的对照方法中，当胶体金标记的抗体溶液和稀释的液体样品的混合物从测试装置的开口部分滴入时，以未浸渍标记抗体的过滤器替换安放在本发明帽中的浸渍标记抗体的过滤器的帽被染成红色。因此，这证实了胶体金标记的抗体被过滤器捕获。其次，在对照方法中，R 区域的显示着色“+”而不是其正常的着色“++”。此外，即使阴性样品显示着色为“+”，
15 而基本上应该未观察到不着色的。我们认为如果将胶体金标记的抗体溶液储存于-30℃会导致胶体金标记的抗体聚合并发生非特异性的反应。相反在本发明的方法中得到了与标准方法相同的结果并且即使储存于-30℃也没有影响。

这样，由测试实施例 4 和 5 可明显发现，本发明的帽显示出优良的标记抗体的储存稳定性，所以在运输等过程中无需严格控制温度。

20

工业应用性

如上所述，根据本发明检测样品的方法，具有浸渍标记抗体的嵌入式过滤器的帽连接于容纳稀释的液体样品的容器体，将稀释的液体样品从容器注射入测试装置，然后观察其中发生的反应。因此，与常规的方法相反，不需要将标记的抗体溶液滴
25 入稀释的液体样品。另外，不需要将稀释的液体样品从第一个容器转移至第二个容器。换言之，本发明的方法是一种非常简单的检测方法。此外，不需要将标记的抗

体溶液滴入稀释的液体样品，可防止由于滴入的标记抗体溶液的量所出现的误差。即，可以消除由于滴入量的个体差别所带来的反应不充分和产生非特异性反应，从而增加了检测的精度。本发明的方法不需要将溶液状态的标记抗体长期储存。因此不需要考虑防止标记的抗体溶液的变质。

5 另外，构建了本发明的样品容器，这样具有浸渍标记抗体的嵌入式过滤器的帽连接于容纳稀释的液体样品的容器体。因此，即使容器的结构极其简单，它还是易于操作的。此外，检测的精度不随操作者个体而变化。因此，该容器最适用作采用免疫反应的简化的样品诊断试剂盒的组间。

10 因此，检测样品的方法和用于该检测方法的样品容器可应用于检测和诊断各种症状，例如病毒(例如流感病毒)导致的感染和妊娠情况。

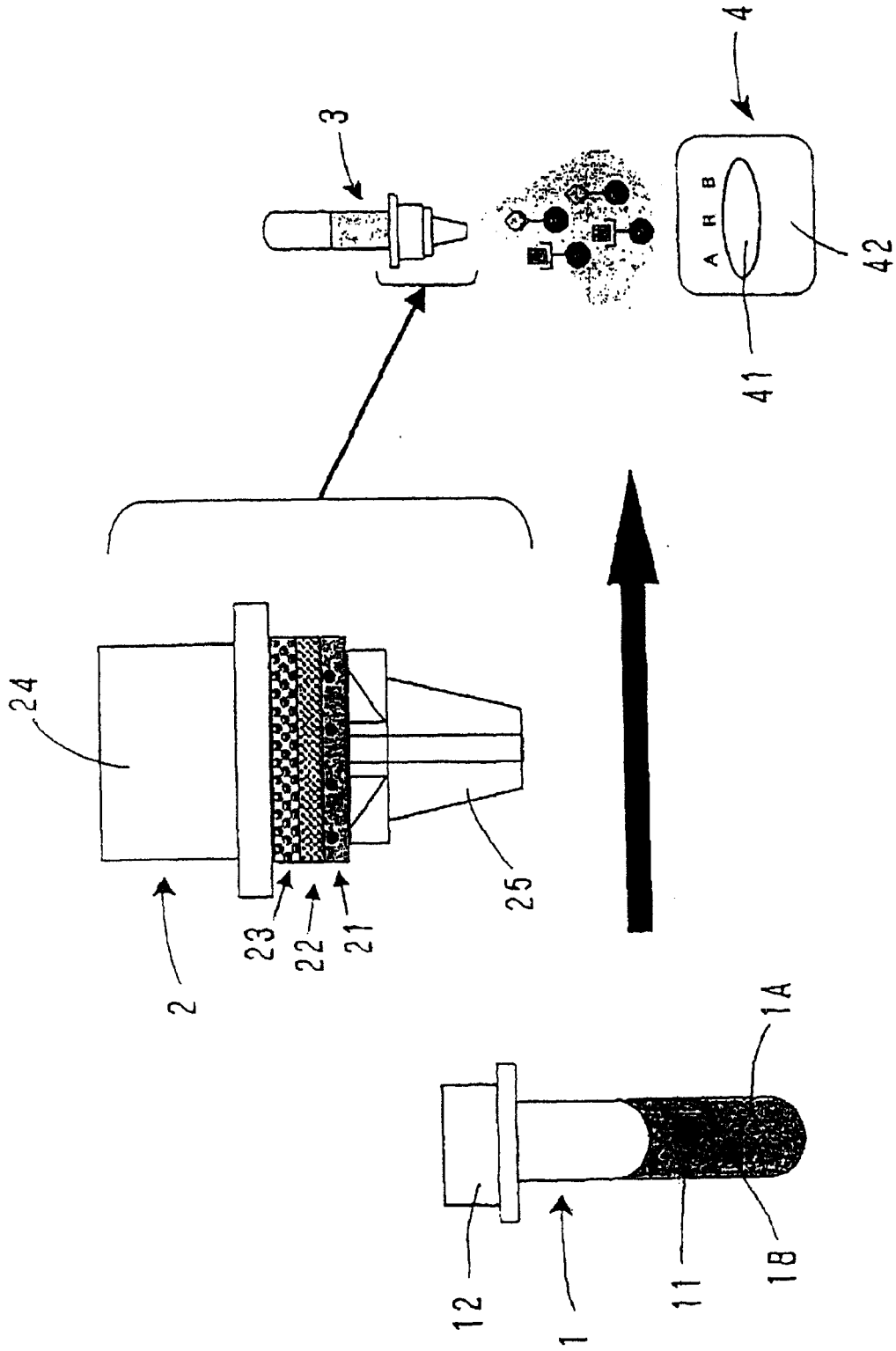


图 1

专利名称(译)	检测样品的方法和用于检测方法中的样品容器		
公开(公告)号	CN1759318A	公开(公告)日	2006-04-12
申请号	CN200480006372.X	申请日	2004-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	第一化学药品株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	第一化学药品株式会社		
[标]发明人	小堀樹一郎 川本道子 年澤幸司		
发明人	小堀樹一郎 川本道子 年澤幸司		
IPC分类号	G01N33/53 B01L3/14		
CPC分类号	B01L2300/046 B01L3/50825 G01N33/5304 B01L2300/0681 G01N2333/11		
代理人(译)	范征		
优先权	2003063832 2003-03-10 JP		
其他公开文献	CN1759318B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种免疫检测样品的方法，它包括将具有其内部浸渍标记抗体的嵌入式过滤器的帽连接于含有稀释的液体样品的容器体，将稀释的液体样品从容器倒入测试装置，观察反应从而检测样品中是否存在分析物。此检测方法由于能使个体操作者中的差异的影响最小化并可防止发生非特异性反应，因而有非常优良的检测结果复验性和测试试剂的储存稳定性。用于上述方法的样品容器装有其内部浸渍标记抗体的过滤器的帽。该容器适当地用作构成简化的诊断试剂盒的组件。

