

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410061926.8

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年4月29日

[11] 授权公告号 CN 100483133C

[22] 申请日 2004.6.29

[21] 申请号 200410061926.8

[30] 优先权

[32] 2003.6.30 [33] JP [31] 188065/2003

[32] 2003.6.30 [33] JP [31] 188066/2003

[73] 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本神户市

[72] 发明人 一口毅 古谷基 安岐昌子

[56] 参考文献

US5081010 1992.1.14

CN1202621A 1998.12.23

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 陈 昕

权利要求书2页 说明书12页 附图1页

[54] 发明名称

免疫检测用样本前处理液及其处理方法

[57] 摘要

本发明提供了通过免疫层析法检测流感病毒时使检测更为准确和简便所必须的样本前处理液和前处理方法。本发明的上述目的可以通过使用含有非离子表面活性剂和0.3M碱金属离子以及硫氰酸类化合物的样本前处理液，对样本如鼻涕、痰液、咽喉擦拭液等进行处理而实现。

1. 通过免疫层析法检测病毒用样本的样本前处理液，含有硫氰酸类化合物，所述样本选自鼻涕、痰液或咽喉擦拭液。
2. 如权利要求1记载的样本前处理液，其中至少含有0.1M的所述硫氰酸类化合物。
3. 如权利要求1记载的样本前处理液，其中所述硫氰酸类化合物的浓度为0.125M~1.0M。
4. 如权利要求1记载的样本前处理液，其中所述硫氰酸类化合物是选自硫氰酸、硫氰酸酯、硫氰酸盐中的一种。
5. 如权利要求1记载的样本前处理液，其中所述硫氰酸类化合物是选自硫氰酸钠、硫氰酸钾、硫氰酸铵、硫氰酸胍中的一种。
6. 如权利要求1记载的样本前处理液，其中含有聚氧乙烯类非离子表面活性剂。
7. 如权利要求6记载的样本前处理液，其中所述聚氧乙烯类表面活性剂是选自聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯以及聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物的一种。
8. 如权利要求6记载的样本前处理液，其中所述非离子表面活性剂的浓度为0.05~2(v/v)%。
9. 如权利要求6记载的样本前处理液，其中所述非离子表面活性剂的浓度为0.1~0.5(v/v)%。
10. 如权利要求6记载的样本前处理液，其中含有碱金属离子。
11. 如权利要求1记载的样本前处理液，其中所述碱金属离子是钠离子。
12. 如权利要求1~11中任一项记载的样本前处理液，其中所述病毒为流感病毒。
13. 免疫层析法检测用样本的前处理方法，其特征在于，将该样本与权利要求1记载的样本前处理液相混合；所述样本为鼻涕、痰液或咽喉擦拭液。

14. 免疫层析检测试剂盒，具有权利要求 1 记载的样本前处理液和免疫层析用装置。

15. 如权利要求 14 记载的免疫层析检测试剂盒，其中所述免疫层析用装置具有加样用部件、标记保持部件和层析用膜载体。

免疫检测用样本前处理液及其处理方法

技术领域

本发明涉及免疫层析检测用的样本前处理液，更详细的，涉及用于流感病毒检测的样本的前处理液。

背景技术

流感病毒是直径为 80~120nm 的 RNA 病毒，有外壳，表面覆盖有 HA（红细胞凝集素）和 NA（神经氨酸苷酶）这两种酶蛋白的突起。HA 为血细胞凝集性抗原，在吸附于人体细胞侵入人体时与细胞表面的唾液酸结合、病毒粒子进入细胞内部这个过程中起着重要的作用。而 NA 是用来在感染后期病毒粒子离开细胞表面时切断唾液酸，起到获得传染性的作用。抗原性是由 HA 和 NA 一起来决定的，大致分为 A、B、C 三种类型。A 型又已知有香港型等亚型。A 型中，大约以十余年为周期会有不同的亚型出现，引起非连续变异大流行。而且，即使是同一亚型，抗原性每年也在不断一点点变异。因此，在检测流感病毒的时候，不管有无流感抗原的变异，必须对通用的可检测区域进行检测。

还有，感染流感后数日即治愈的情况也很多，因此为了准确诊断流感和提供正确的治疗方法，人们希望能够迅速得到检测结果。目前实际使用的方法有检测抗原的组织培养法、检测抗体的红细胞凝集抑制(HI)和补体结合试验(CF)以及间接荧光抗体法(IFA)等检查方法。

长久以来，很多报告都提出了简便利用抗原抗体反应的方法。比如，有报告（特开昭 61-145459 号公开公报、特开平 6-160388 号公开公报）公开了只要将采集的样本渗入含有目标抗体的检测器材中即可测知抗原的存在与否及其量的免疫层析法检测方法。这种方法是指，在硝酸纤维素等多孔膜的一端含有与目标特定抗原相应的特异性抗体，在多孔膜的中部同样只能和特定抗原相结合的另外的特异性抗体以带状固定于多孔膜上。将一端含有的特异性抗体先进行着色，再将样品液点在有特

异性抗体存在的多孔膜的一端上，如果样品液中含有与特异性抗体反应的抗原，则此抗原与特异性抗体相结合后以附着有着色粒子的状态通过毛细现象沿多孔膜向点有样品液一端相对的另一端方向移动。移动过程中，当通过以带状固定于膜上的另一种特异性抗体所处的地方时，抗原被多孔膜上的特异性抗体捕获，在多孔膜上呈现带状染色。由此可以确定目标抗原在样品中存在与否以及它的量。

运用此项技术，可以快速检测流感，是一种有效的方法。流感检测通常选取鼻涕、痰液或咽喉擦拭液作为样本。理论上来说，能够用于上述免疫层析方法的样本一定要能够在多孔膜中发生毛细现象，通过多孔膜。但是鼻涕或咽喉擦拭液中存在的高粘性物质如粘蛋白会堵塞多孔膜的孔，粘蛋白还会使人体上脱落的上皮粘膜细胞凝结在一起，导致这些物质堵塞多孔膜的孔，无法进行检测。

比如，有报告公开了在对人的唾液样本中的变形链球菌用免疫层析法进行定性、定量分析的时候采用唾液前处理试剂盒的方法（特开2002-357599号公报），该试剂盒由含有氢氧化钠的水溶液、含有酒石酸和/或柠檬酸的三羟甲基氨基甲烷缓冲液、非离子表面活性剂和/或两性表面活性剂组成、表面活性剂或预先与水溶液和/或缓冲液混合好，或与水溶液和缓冲液分开放置。但是，关于流感检测，未见有任何公开。

另外在W002/10744号公报中公开了流感检测样本的前处理方法，即使用含有选自表面活性剂、还原性物质中的至少一种物质、有机酸或其盐的样本前处理液进行处理。

发明内容

本发明提供了免疫层析法检测流感病毒时为使检测更准确简便而必要的样本前处理液以及前处理方法。

附图的简要说明

图1 表示免疫层析用测试条的简要示意图。

附图标记

- 1 加样部件
- 2 标记部件 (抗流感抗体标记着色粒子保持区)
- 3 层析用膜载体
- 4 检测区 (抗流感抗体固定区)
- 5 吸收部件

具体实施方式

本发明人等着眼于表面活性剂破坏病毒膜这一点,经过反复研究后发现,在用免疫层析法检测流感时,如果将来自于生物体的样本用至少含有非离子表面活性剂和 0.3M 以上的碱金属离子以及硫氰酸类化合物的样品前处理液进行处理,那么就可以更加简便而准确地检测流感。从而完成了本发明。

作为检测对象的流感病毒,可以是通常定义下的流感病毒,没有特别的限制。具体说来,可以是 A 型、B 型、C 型中的任意一种。另外,只要是属于流感病毒的病毒,可以是已经发生变异的病毒或将来可能出现的变异病毒。

(样本)

作为检测对象的样本可以由生物体采集,只要是可能混入流感病毒的物质即可,没有特别的限制,但优选如鼻涕、痰液和/或咽喉擦拭液等。对采集这些样本所用方法没有特别的限制,可以采用常规的方法。具体说来,可以用棉签采集鼻涕、痰液或咽喉擦拭液。

(样本前处理液)

第 1 种样本前处理液中所含的非离子表面活性剂,虽然没有特别的限制,但优选使用聚氧乙烯类物质,更加优选使用醚型的聚氧乙烯类物质。具体来说,优选从使用聚氧化乙烯(9)辛基苯基醚、聚氧乙烯(10)辛基苯基醚、聚氧乙烯(9)壬基苯基醚等聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯、聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯等聚氧乙烯

脱水山梨醇脂肪酸酯、聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物、聚氧乙烯烷基醚中选出的任意一种或两种以上的混合物。

非离子表面活性剂在样本前处理液中的浓度可以是 0.05 ~ 2 (v/v) %，优选 0.1 ~ 0.5 (v/v) %，更加优选 0.3 (v/v) % 左右的浓度。

第 1 种样本前处理液中所含的碱金属离子，可以举出锂离子 (Li^+)、钠离子 (Na^+)、钾离子 (K^+)、铷离子 (Rb^+)、铯离子 (Cs^+)、钫离子 (Fr^+) 等，优选使用钠、钾。另外碱金属离子可以使用一种或两种以上。可以生成上述这些碱金属离子的化合物没有特别的限制，比如可以使用氯化钠、氯化钾、氢氧化钠、氢氧化钾、EDTA 钠盐、叠氮化钠中选出的任意一种化合物或两种以上化合物的混合物。样本前处理液中必须含有至少 0.3M 的碱金属离子，优选 0.4M，更优选 0.45M 以上。但是如果加入 2M 以上的碱金属离子，则有可能给免疫层析的灵敏度带来不好的影响。使用时浓度优选 1.5M 以下，更加优选 1.0M 以下。

第 2 种样本前处理液中所含的硫氰酸类化合物除硫氰酸 (HNCS) 外，只要是硫氰酸酯和硫氰酸盐等水溶性的也可，没有特别的限制。构成硫氰酸的盐可以举出含钠、钾等金属的无机碱、或有机碱铵盐等。也包括它们的盐的水合物或溶剂化物。具体可以举出硫氰酸钠、硫氰酸钾、硫氰酸铵、硫氰酸胍等。优选使用硫氰酸钾、硫氰酸胍。

样本前处理液中所含硫氰酸类化合物的浓度可以是至少 0.1M、优选 0.125 ~ 1.0M，更加优选 0.125 ~ 0.375M。

第 1 种样本前处理液中，除以上成分以外可以含有使 pH 值保持在最适合反应的 5 ~ 9 范围内的缓冲液或有机酸等。

第 2 种样本前处理液中，除以上成分以外可以含有表面活性剂、能够使 pH 值保持在最适合反应的 5 ~ 9 范围内的缓冲液或有机酸等。

样本的处理采用常规的方法即可，比如可以在样本前处理液 0.5 ~ 1.0mL 中加入样本 0.1 ~ 0.2mL，充分振荡混合进行处理。也可以将采集有鼻涕等样本的棉签浸入样本前处理液，使样本前处理液和样本充分混合来进行处理。本说明书中将样本用样本前处理液处理后得到的物质，简便起见称之为“样品”。

对于样本前处理液以及通过处理方法得到的样品，可以用常规的免疫层析法通过抗原抗体反应进行流感的鉴定/定量检测。

(免疫层析)

免疫层析的操作方法已经是众所周知的了，其原理模式图如图 1 所示。

在图 1 的标记部件 (2) 上保持抗流感抗体标记着色粒子，在流感病毒检测区 (4) 固定抗流感抗体。

将上述经过处理的样本作为样品滴在图 1 的加样部件 (1) 上，借助于层析用膜载体 (3) 使样品向吸收部件方向 (5) 展开。如果在样本中混入了作为目标对象的流感病毒，那么流感病毒和抗流感抗体标记着色乳胶粒子发生反应，它们的复合体就会被固定有抗流感抗体的流感病毒检测区 (4) 捕获，呈现出显色区带。通过 (4) 上出现的区带的颜色深浅可以大致确定样本中所含流感病毒的量。

用于标记部件 (2) 以及流感病毒检测区 (4) 的抗体，只要是识别流感不同区域的抗体即可。这些抗体可以通过常规的方法得到。比如，可以使用由 Kohler 和 Milstein (Kohler G, C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 256: 495-497, 1975) 建立的通过细胞融合形成杂交瘤的方法。也可以单纯用抗原给动物免疫，再精制其血清得到者。标记部件 (2) 的标记着色粒子，可以使用用于免疫层析法的常规物质。比如，可以举出胶体金和着色乳胶粒子等。层析用膜载体 (3) 可以是免疫层析法中普遍使用的膜，通常为多孔膜，具体来说可以使用硝酸纤维素。

(试剂盒)

也可以将上述样本前处理液与流感检测用免疫层析装置组合在一起成为检测试剂盒。具体可以举出由样本前处理液和免疫层析装置组成的检测试剂盒，也可以包含采集样本用的棉签。

实施例

为深入理解本发明，以下结合实施例加以说明，但本发明并不限于这些实施例。

实施例 1

非离子表面活性剂 (NP40) 的效果

实施本实施例，是为了确定样本前处理液中各种浓度的非离子表面活性剂 (NP40) 给层析用膜载体上的背景所带来的作用效果。

1) 样本前处理液的组成

在含有 100mM 柠檬酸-0.4MNaCl、10mM 二硫苏糖醇的溶液 (pH6.0) 中，加入 Nonidet P-40 (NP40) (聚氧乙烯 (9) 辛基苯基醚的商品名) 使其浓度分别达到 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 (v/v) %，制成样本前处理液。

2) 样本及其处理

用棉签采集鼻涕作为样本。

将棉签上含鼻涕部分浸入装有 0.8mL 上述样本前处理液的容器中，与样本前处理液混合后制成样品。然后，将静置后的样品液用滤膜 (孔径 1 μ m) 过滤，制成检测样品。鼻涕样本使用的是通过 MDCK 细胞培养法 (J. Clin. Microb. 28 (5) 1308-1313 (1990)) 鉴定为流感 A 和 B 为阳性的样本。

3) 免疫层析

作为免疫层析测试条 (图 1) 的材料，加样部件 (1) 为玻璃纤维滤纸，标记保持部件 (2) 为保持有致敏市售抗流感抗体、着色为蓝色的乳剂的经过聚乙烯处理的玻璃纤维滤纸，层析用膜载体 (3) 为硝酸纤维素膜，吸收部件 (5) 为玻璃纤维和纤维素的混合滤纸。而检测区 (4) 用市售的抗流感抗体进行致敏。对用培养法确认为流感阳性的样本，用常规方法进行前处理，点于免疫层析装置上，进行层析。

用含有各种浓度的 NP40 的样本前处理液进行前处理得到检测用样品液，取 0.20mL 点于免疫层析装置上，进行 20 分钟的层析。

结果如表 1 所示。完全不含 NP40 的情况下，由于层析用膜载体染

成乳胶粒子的蓝色，背景不良，未能用免疫层析对流感 A 和 B 进行鉴定。而用 NP40 含量在 0.05 (v/v)% 以上的样本前处理液进行处理的情况下，层析用膜载体未着色，背景良好，很容易就对流感 A 和 B 进行了鉴定。

表 1

NP40 浓度 (%)	背景	流感 A 和 B 阳性样品	
		A	B
0%	不良	未能判定	
0.05%	良好	1+	1+
0.10%	良好	1+	1+
0.20%	良好	1+	1+
0.40%	良好	1+	1+
0.80%	良好	1+	1+

实施例 2

各种非离子表面活性剂的效果 (背景)

实施本实施例，是为了确认样本前处理液中各种非离子表面活性剂对层析用膜载体上的背景所起的作用效果。

在含有 100mM 柠檬酸-0.4MNaCl、10mM 二硫苏糖醇的溶液 (pH6.0) 中加入如表 2 所示的各种非离子表面活性剂使其浓度达到 0.1 (v/v)%，制成样本前处理液。

样本及其处理、免疫层析的操作过程同实施例 1。

结果表明，使用了如表 2 所示的各种非离子表面活性剂，则背景的显色减弱，从而得以正确判定结果。

表 2
背景的检测结果

商品名	结构名		浓度	判定结果
NP40	聚氧乙烯(9)辛基苯基醚	非离子型	0.1%	适合
TritonX-100	聚氧乙烯(10)辛基苯基醚	非离子型	0.1%	适合
Tween20	聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯	非离子型	0.1%	适合
HS-210	聚氧乙烯(10)辛基苯基醚	非离子型	0.1%	适合
NonionA-10R	聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物	非离子型	0.1%	适合
Emulgen909	聚氧乙烯(9)壬基苯基醚	非离子型	0.1%	适合
Brij97	聚氧乙烯(10)油基醚	非离子型	0.1%	适合
无表面活性剂				不适合

良好: 到判定时间时层析用膜载体未着色, 确认有蓝色的显色区带。

实施例 3

各种非离子表面活性剂的效果 (流感检测)

本实施例与实施例 2 同样, 是为了确认样本前处理液中各种非离子表面活性剂对免疫层析所起的作用效果。

样本前处理液、样本及其处理、免疫层析的操作过程与实施例 2 相同。

结果表明, 使用如表 3 所示的各种非离子表面活性剂后, 所有表面活性剂下的结果均判定为阳性。

表 3
流感病毒的测定结果

商品名	结构名		浓度	判定结果
NP40	聚氧乙烯(9)辛基苯基醚	非离子型	0.1%	++
TritonX-100	聚氧乙烯(10)辛基苯基醚	非离子型	0.1%	++
Tween20	聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯	非离子型	0.1%	+
HS-210	聚氧乙烯(10)辛基苯基醚	非离子型	0.1%	++
NonionA-10R	聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物	非离子型	0.1%	++
Emulgen909	聚氧乙烯(9)壬基苯基醚	非离子型	0.1%	++
Brij97	聚氧乙烯(10)油基醚	非离子型	0.1%	++
无表面活性剂				-

实施例 4

添加各种浓度 NaCl 的效果 (流感 A 和 B 的检测)

本实施例是为了确认样本前处理液中各种浓度 NaCl 对免疫层析所起的作用效果而实施的。

1) 样本前处理液的组成

在含有 0.1(v/v)%NP40、100mM 柠檬酸、10mM 二硫苏糖醇和 10mMEDTA 的溶液 (pH6.0) 中, 添加 NaCl 使其浓度分别达到如表 4 所示的各浓度, 制成样本前处理液。

2) 样本及其处理

对样本, 用培养法鉴定为流感 A 和 B 阴性的 3 个鼻腔吸引液样品和作为阳性对照的 A 型培养病毒、B 型培养病毒, 采用如实施例 1 记载的方法进行前处理。

3) 免疫层析

免疫层析的实施同实施例 1。

结果如表 4 和 5 所示。完全不含 NaCl 的情况下, 即使是阴性样品, 也判定为了阳性, 而添加了 NaCl 就抑制了非特异性反应的进行。而阳

性对照中，即使添加了 NaCl 也还是呈阳性。

表 4

流感病毒 A 型的检测结果

NaCl	流感病毒阴性样品			A 型培养病毒
(M)	001	002	003	
0	+	+	+	+
0.2	±	±	±	+
0.4	-	-	±	+
0.6	-	-	±	+
0.8	-	-	-	+
1.0	-	-	-	+

表 5

流感病毒 B 型的检测结果

NaCl	流感病毒阴性样品			B 型培养病毒
(M)	001	002	003	
0	+	+	+	+
0.2	±	±	±	+
0.4	-	-	±	+
0.6	-	-	±	+
0.8	-	-	-	+
1.0	-	-	-	+

实施例 5

样本前处理液中添加各种化合物时的效果

1) 样本前处理液的组成

在含有 0.1 (v/v) %NP40 (聚氧乙烯 (9) 辛基苯基醚)、100mM 柠檬酸-0.15MNaCl 的溶液 (pH6.0) 中，添加如表 5 所示的化合物使其浓度达到 0.5M，制成样本前处理液。

2) 样本及其处理

对样本，用培养法鉴定为流感 A 和 B 阴性的 3 个鼻腔吸引液样品、作为阴性对照的生理盐水和作为阳性对照的 A 型培养病毒、B 型培养病毒，采用如实施例 1 记载的方法进行前处理。

3) 免疫层析

免疫层析的实施同实施例 1。

表 6

使用含有各种化合物的样本前处理液处理后的非特异性反应抑制效果

	阴性对照	阳性对照		流感病毒阴性患者样本		
		流感 A	流感 B	1	2	3
未添加	-	+	+	+	+	+
氯化胆碱	-	+	+	+	+	+
硫氰酸胍	-	+	+	-	-	-
硫氰酸钾	-	+	+	-	-	-
盐酸胍	-	+	+	+	+	+

* 各添加物的浓度为 0.5M

结果表明，用含有如表 6 所示化合物中硫氰酸胍和硫氰酸钾的样本前处理液进行前处理，培养法判定为阴性的样本全部显示阴性。由此可知，如果使用含有硫氰酸类化合物的样本前处理液对样本进行前处理，非特异性反应就可以得到抑制。而阳性对照品即使添加了硫氰酸类化合物也还是全部显示阳性。

实施例 6

硫氰酸钾的效果

本实施例是为了确认样本前处理液中各种浓度的硫氰酸钾 (KSCN) 对免疫层析用膜载体上的背景所起的作用效果而实施的。

1) 样本前处理液的组成

在含有 0.1 (v/v) %NP40 (聚氧乙烯 (9) 辛基苯基醚)、100mM 柠檬酸-0.15MNaCl 的溶液 (pH6.0) 中, 添加硫氰酸钾使其浓度分别达到 0、0.100、0.125、0.250、0.375M, 制成样本前处理液。

样本及其处理、免疫层析的操作过程与实施例 5 相同。

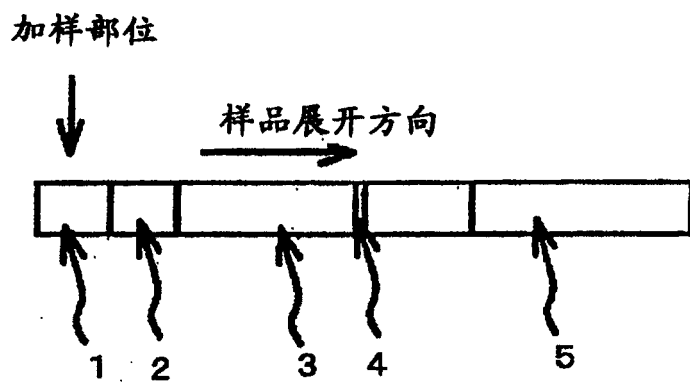
表 7

硫氰酸钾 (KSCN) 的效果

KSCN (M)	阴性对照	阳性对照		流感病毒阴性样本				
		流感 A	流感 B	①	②	③	⑤	⑥
0	-	++	++	+	+	+	+	±
0.100	-	++	++	+	+	+	±	-
0.125	-	++	++	-	±	±	-	-
0.250	-	++	++	-	-	-	-	-
0.375	-	+	+	-	-	-	-	-

结果表明, 如表 7 所示完全不含 KSCN 的情况下发生了非特异性反应, 而添加了 KSCN 的情况下非特异性反应得到了抑制。而阳性对照即使添加了 KSCN 也还是判定为阳性。

图1



专利名称(译)	免疫检测用样本前处理液及其处理方法		
公开(公告)号	CN100483133C	公开(公告)日	2009-04-29
申请号	CN200410061926.8	申请日	2004-06-29
[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	一口毅 古谷基 安岐昌子		
发明人	一口毅 古谷基 安岐昌子		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53 G01N1/28 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/56983 G01N33/54393 G01N2333/11		
代理人(译)	陈昕		
优先权	2003188065 2003-06-30 JP 2003188066 2003-06-30 JP		
其他公开文献	CN1576842A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了通过免疫层析法检测流感病毒时使检测更为准确和简便所必须的样本前处理液和前处理方法。本发明的上述目的可以通过使用含有非离子表面活性剂和0.3M碱金属离子以及硫氰酸类化合物的样本前处理液，对样本如鼻涕、痰液、咽喉擦拭液等进行处理而实现。

NP40 浓度 (%)	背景	流感 A 和 B 阳性样品	
		A	B
0%	不良	未能判定	
0.05%	良好	1+	1+
0.10%	良好	1+	1+
0.20%	良好	1+	1+
0.40%	良好	1+	1+
0.80%	良好	1+	1+