



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102866254 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201210352435. 3

(22) 申请日 2012. 09. 21

(73) 专利权人 潍坊市康华生物技术有限公司

地址 261000 山东省潍坊市经济开发区月河
路 699 号

(72) 发明人 杨致亭 杨爱香 邱香廷 宋玉翠

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公
司 37205

代理人 李江

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101086500 A, 2007. 12. 12, 权利要求
1-6, 说明书第 1 页第 22 行至第 4 页第 26 行.

CN 200979552 Y, 2007. 11. 21, 说明书实施例

1.

CN 102520155 A, 2012. 06. 27, 权利要求 1,
说明书的具体实施方式.

CN 1330270 A, 2002. 01. 09, 全文.

CN 101427137 A, 2009. 05. 06, 全文.

CN 1743849 A, 2006. 03. 08, 全文.

CN 101825639 A, 2010. 09. 08, 全文.

CN 101086500 A, 2007. 12. 12, 权利要求
1-6, 说明书第 1 页第 22 行至第 4 页第 26 行.

高荣等. 人 β -hCG 化学发光免疫分析方法
的建立. 《中国生物制品学杂志》. 2008, 第 21 卷
(第 3 期),

审查员 许珊萍

权利要求书4页 说明书10页

(54) 发明名称

一种高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试
剂盒及其制备和检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种高灵敏度孕中期唐氏综合
症产前筛查试剂盒及其制备检测方法, 所述试剂
盒包括盒体, 以及 AFP 和 β -HCG 包被板条、AFP
和 β -HCG 标准品、AFP 和 β -HCG 质控品、AFP 和
 β -HCG 酶结合物、标本稀释液、发光底物液、浓缩
洗涤液等, 制备方法包括制备 AFP、 β -HCG 单克
隆抗体包被板条, 配制 AFP、 β -HCG 标准品和质控
品, 制备 AFP、 β -HCG 酶结合物, 配制标本稀释液,
配制发光底物液 A 和发光底物液 B 和配制浓缩洗
涤液等步骤; 本发明的优点在于: 实现了孕中期
唐氏综合症产前筛查的目的, 与临床诊断符合率
达 99. 7% 以上, 灵敏度高、特异性强, 结果更准确
可靠。

1. 一种高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒,其特征在于:

所述试剂盒包括盒体,以及设置在所述盒体内的 AFP 包被板条、AFP 标准品、AFP 质控品、AFP 酶结合物、 β -HCG 包被板条、 β -HCG 标准品、 β -HCG 质控品、 β -HCG 酶结合物、标本稀释液、发光底物液 A、发光底物液 B、浓缩洗涤液;

所述 AFP 包被板条和 β -HCG 包被板条,为乳白色不透明聚苯乙烯 96 孔化学发光酶标板包被板条;所述酶标板的各孔包被有固相化的 AFP 单克隆抗体和 β -HCG 单克隆抗体,上述单克隆抗体浓度 $1\mu\text{g/mL}$;

所述 AFP 标准品为浓度分别为:0 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40ng/mL 的 AFP 标准溶液;

所述 β -HCG 标准品为浓度分别是:0 mIU/mL、2.5 mIU/mL、5 mIU/mL、10 mIU/mL、20 mIU/mL、40 mIU/mL 的 β -HCG 标准溶液;

所述 AFP 质控品为浓度分别为:5 ng/mL、20 ng/mL 的 AFP 溶液;

所述 β -HCG 质控品为浓度分别为:5 mIU/mL、20 mIU/mL 的 β -HCG 溶液;

所述 AFP 酶结合物,为辣根过氧化物酶标记的与包被板条配对的另一株 AFP 单克隆抗体,双抗体夹心法需要一对抗体,一株用于包被,另一株用于标记,是针对蛋白不同表位的抗体,工作浓度为 1:1000;

所述 β -HCG 酶结合物,为辣根过氧化物酶标记的与包被板条配对的另一株 β -HCG 单克隆抗体,工作浓度为 1:1000;

所述标本稀释液为 pH=7.0 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液,还含有体积分数 10% 小牛血清和 0.1% 硫柳汞,硫柳汞用于防腐,小牛血清使所检测样本保持同样的基质;

所述浓缩洗涤液为含有体积分数分别为 0.05% 的吐温 20、0.1% 的硫柳汞的 pH=7.5 浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液;

所述发光底物液 A 为每 250mL 溶液含有 N, O- 双三甲硅基乙酰胺(BSA)2.5g、三羟甲基氨基甲烷(Tris)1.5g、3- 氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺)0.05g、对位碘酚 0.0075g,另外还有极少量盐酸,每 1000mL 底物液 A 加 500 μL 盐酸,用作调节溶液的 pH 值至 pH=9;

所述发光底物液 B 为每 250mL 溶液含有 BSA 2.5g、Tris1.5g、过氧化氢 0.25mL,另外还有极少量盐酸,每 1000mL 底物液 B 加 500 μL 盐酸,用作调节溶液的 pH 值至 pH=9;

上述试剂盒按照以下步骤制备:

(1) AFP、 β -HCG 单克隆抗体包被板条的制备

a 采用单克隆抗体技术,先使用 AFP 或 β -HCG 纯品按常规对小鼠进行免疫,取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,加以筛选配对,建立 AFP 和 β -HCG 单克隆抗体细胞库,然后再经接种小鼠腹腔制备腹水,再将腹水纯化后获得特异性为 100%、纯度大于 96% 的 AFP 或 β -HCG 配对单克隆抗体;

b 预包被板的准备:预包 AFP 板的板条一头涂黄色,预包 β -HCG 板的板条一头涂红色,以便区分;

c AFP 包被液的配制:用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液,配方:0.34g Na_2CO_3 + 0.57g Na_2HCO_3 定容至 100mL,将 3mg/mL 的 AFP 抗体溶液稀释成 $1\mu\text{g/mL}$, pH=9.6;

d β -HCG 包被液的配制:用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液将 1mg/mL 的 β -HCG 抗体溶液稀释成 $1\mu\text{g/mL}$, pH=9.6;

f 包被量:AFP、 β -HCG 包被板均按 100 μ l/孔包被,待全部包被完毕,置 2~8℃静止、吸附 48 小时;

g 洗涤:分别将上述包被后的板条用洗涤液洗涤两次,间隔 10 秒,在洁净纱布或吸水纸上拍干;

h 封闭:分别将上述洗涤后的板条每孔加封闭液 130 μ l,室温 20~25℃封闭 3 小时;

i 干燥:甩出板孔中的封闭液,18~25℃干燥 48 小时;

j 分别将上述干燥后的板条装入铝箔袋,封口,2~8℃保存备用;

(2) AFP、 β -HCG 标准品、质控品的配制

先将 AFP、 β -HCG 冻干标准品溶解并稀释至所需的最高浓度,再采用倍比稀释法稀释至所需浓度;AFP、 β -HCG 的 S0 标准品为未添加 AFP、 β -HCG 的标准品稀释液;

(3) AFP、 β -HCG 酶结合物的制备

a 称取辣根过氧化物酶倒入一棕色小玻璃瓶内,取 1mL 双蒸水溶解,用加样器取 200 μ l 高碘酸钠溶液,滴入盛辣根过氧化物酶的小瓶内,室温振荡 20min;

b 振荡好的辣根过氧化物酶溶液取入透析袋,放入配制好的醋酸缓冲液中,4℃冰箱透析过夜;

c 取待标记抗体加入另一透析袋中,放入配制好的碳酸盐缓冲液中,置于 4℃冰箱内透析过夜;

d 次日,取出辣根过氧化物酶溶液,和抗体混匀,放入碳酸盐缓冲液中搅拌透析 3 小时;

e 将透析好的辣根过氧化物酶和抗体溶液,置于棕色小瓶内,加入硼氢化钠溶液充分混匀,用振荡器振荡 2 小时;

f 将葡聚糖凝胶 G-200 装柱,将上述标记物加于柱顶部,洗脱液洗脱;

g 用小试管依次分段接收流出物,用事先包被好的羊抗鼠板条进行检测,取显兰色板孔对应试管内的酶结合物;

h 将收集的酶结合物加入等量甘油混匀,甘油能更好的稳定酶结合物活性,放置于 -20℃冰箱保存;

i、将酶结合物稀释到工作浓度,装入试剂瓶冷藏备用;

(4) 标本稀释液的配制

用电子天平准确称量 NaCl 7g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.8g、 KH_2PO_4 0.2g、KCl 0.2g 加入容量瓶;先加适量纯水,轻摇使之溶解完全;再用电子天平准确称量硫柳汞 0.5g,轻摇使之溶解完全;量取小牛血清 200mL 加入容量瓶,搅拌均匀,以纯水定容至 1000mL,即得标本稀释液;

(5) 发光底物液 A 的配制

用电子天平准确称取 BSA (N, O- 双三甲硅基乙酰胺) 2.5g、Tris 1.5g,加入容量瓶;加适量纯水,轻摇使之溶解完全,以纯水定容至 250mL;再用 HCl 调节 pH=9.0,完全混匀;再用电子天平准确称取鲁米诺 0.05g、对位碘酚 0.0075g,倒入容量瓶,充分溶解,摇匀;

(7) 发光底物液 B 的配制

用电子天平准确称取 BSA 2.5g、Tris 1.5g,加入容量瓶;加适量纯水,轻摇使之溶解完全,以纯水定容至 250mL;再用 HCl 调节 pH=9.0,完全混匀;用加样器取 0.25mL H_2O_2 加入上述液体中,混匀;

(8) 浓缩洗涤液的配制

用电子天平准确称量 NaCl 150.9g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 96g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 g 加入容量瓶；先加适量纯水，轻摇使之溶解完全；再用电子天平准确称量硫柳汞 1g，轻摇使之溶解完全；量取 5mL 吐温 -20 加入容量瓶，搅拌均匀，以纯水定容至 1000mL，即得浓缩洗涤液；

上述试剂盒的检测方法，包括以下步骤：

(1) 样品收集

抽取孕中期，14 ~ 21 周，孕妇静脉血 3mL，置一次性采血管内，于 37℃ 水浴箱放置 20 ~ 30 分钟让纤维蛋白原充分凝固后，4000 转 / 分钟离心 15 分钟，吸取血清；若血清标本不能及时检测，应 -20℃ 冻存，检测时应将标本融化后混合均匀，并避免反复冻融；血清标本 4℃ 冰箱存放最好不要超过 3 天；

(2) 加样检测步骤

AFP 测定：

- a. 将在冷藏环境中贮藏的试剂室温平衡；
- b. 从铝箔袋中取出所需的微孔板条插入框架内，将不用的微孔条放回铝箔袋，放在装有干燥剂的自封口袋，仍然 2 ~ 8℃ 保存；
- c. 将浓缩洗涤液按 1 : 40 的比例稀释，摇匀备用，作为应用洗涤液；
- d. 根据 AFP 标准品、质控品及待测标本数确定所需孔数；
- e. AFP 标准品、质控品直接取 50 μL 加入相应孔内，用前摇匀；
- f. 在待测标本孔中先分别加 45 μL 标本稀释液；
- g. 取 5 μL 血清加入已加标本稀释液的孔内，用移液器吹打，孔内液体由绿色变为蓝色；
- h. 每孔加入 50 μL AFP 酶结合物，用振荡器振荡 30 秒钟，盖上封板膜，置水浴箱 37℃ 水浴 1 小时；
- i. 洗板：甩尽板中液体，用洗涤液注满各孔，停留 10 秒后用力甩去，重复 5 次后拍干；
- j. 加底物：根据使用量，将底物液 A 和底物液 B 按 1 : 1 充分混匀，每孔加入新配制的发光底物 50 μL ，用振荡器振荡 20 秒，放入发光仪内，于 10 ~ 20 分钟内测量结果；

β -HCG 测定：

- a. 将在冷藏环境中贮藏的试剂室温平衡；
- b. 从铝箔袋中取出所需的微孔板条插入框架内，将不用的微孔条放回铝箔袋，放在装有干燥剂的自封口袋，仍然 2 ~ 8℃ 保存；
- c. 将浓缩洗涤液按 1 : 40 的比例稀释，摇匀备用，作为应用洗涤液；
- d. 根据 β -HCG 标准品、质控品及待测标本确定所需孔数；
- e. β -HCG 标准品、质控品混匀后直接取 50 μL 加入相应孔内；
- f. 在待测标本孔中先分别加 25 μL 标本稀释液；
- g. 取 25 μL 血清加入已加标本稀释液的孔内，用移液器吹打几次，孔内液体由绿色变为蓝色；
- h. 用振荡器振荡 30 秒钟，盖上封板膜，置 37℃ 水浴 1 小时；
- i. 洗板：甩尽板中液体，用洗涤液注满各孔，停留 10 秒后用力甩去，重复 5 次后拍干；
- j. 孔加入 50 μL β -HCG 酶结合物，37℃ 水浴 15 分钟，甩尽板中液体，用洗涤液注满各

孔,停留 10 秒后用力甩去,重复 5 次后拍干;

k. 加底物:根据使用量,将底物液 A 和底物液 B 按 1:1 充分混匀,每孔加入新配制的发光底物 50 μ L,用振荡器振荡 20 秒钟,放入发光仪内,于 10 ~ 20 分钟内测量结果;

(3) 检测结果

根据各标准溶液发光值,借助微孔板化学发光仪分析软件进行四参数 Logistic 拟合,坐标选择 X-Y,得标准曲线;根据标准曲线即可计算出 AFP、 β -HCG 的浓度;

将标本对应的孕妇年龄、孕周、体重输入配套的数据分析软件;

将 AFP、 β -HCG 测定的浓度输入配套的数据分析软件;

结合输入的浓度,通过数据分析软件,计算唐氏综合症或胎儿其他染色体异常的危险系数。

一种高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒及其制备和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种产前筛查试剂盒,具体地说是一种高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒及其制备方法,属于产前筛查试剂盒领域。

背景技术

[0002] 唐氏综合症又称 21- 三体综合症或先天愚型(Down's Syndrome, DS),是造成智力发展障碍的最常见的先天缺陷,它的发生率大约为 1/750,其特征主要表现为严重的智力低下,智商多为 20 ~ 60,只有同龄正常人的 1/4 ~ 1/2,有小头、枕部扁平、项厚、眼裂小、外侧上斜、内眦深等症状,其发生具有偶然性、随机性,发生率会随孕妇年龄的增大而升高,该病目前没有有效的治疗方法,防止此类疾病发生所采取的办法,就是在怀孕期间进行产前筛查和必要的产前诊断,尽早发现并采取相应措施,目前,临床上产前诊断的方法主要采用绒毛膜取样或者羊水穿刺来进行产前诊断,这些方法对于产前检出唐氏综合症胎儿,防止这类胎儿的出生起到了一定作用,但由于羊膜腔穿刺有一定的创伤性,可引起流产,且不可能直接的大范围的对所有孕妇用确诊的方法进行检测,另外还需要一定的技术设备条件、花费时间较长、费用较大,不可能在所有的孕妇中广泛开展。

[0003] 现在,还出现了应用单克隆抗体技术、酶标记技术和酶催化化学发光定量检测技术,来检测孕妇血清中的 AFP 和 β -HCG,例如,名称为“孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒”申请号为“CN200610044608.X”的中国发明专利,然而,该试剂盒的缺点在于:操作繁琐、制备方法复杂,而且灵敏度受到限制。

发明内容

[0004] 为了解决上述问题,本发明设计了一种高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒及其制备方法,将酶催化化学发光定量检测技术应用到孕妇血清中 AFP 和 β -HCG 的检测,结合化学发光定量检测技术,实现孕中期唐氏综合症产前筛查的目的,与临床诊断符合率达 99.7% 以上,比时间分辨荧光法和 ELISA 法的灵敏度高、特异性强,结果更准确可靠,实现了对孕妇及胎儿安全无创伤的产前筛查,具有较高的市场推广价值。

[0005] 孕中期唐氏综合症产前筛查由两个项目组成,分别是:甲胎蛋白-AFP、人绒毛膜促性腺激素游离 β 亚单位-HCG。

[0006] 本发明的技术方案为:

[0007] 一种高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒,包括盒体,以及设置在所述盒体内的 AFP 包被板条、AFP 标准品、AFP 质控品、AFP 酶结合物、 β -HCG 包被板条、 β -HCG 标准品、 β -HCG 质控品、 β -HCG 酶结合物、标本稀释液、发光底物液 A、发光底物液 B、浓缩洗涤液等。

[0008] 所述 AFP 包被板条和 β -HCG 包被板条,优选乳白色不透明聚苯乙烯 96 孔化学发光酶标板包被板条;所述酶标板的各孔包被有固相化的 AFP 单克隆抗体和 β -HCG 单克隆抗

体,上述单克隆抗体浓度优选 1 μ g/mL。

[0009] 所述 AFP 标准品为浓度分别为 :0 ng/ml、2.5 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、40ng/ml 的 AFP 标准溶液 ;

[0010] 所述 β -HCG 标准品为浓度分别是 :0 mIU/ml、2.5 mIU/ml、5 mIU/ml、10 mIU/ml、20 mIU/ml、40 mIU/ml 的 β -HCG 标准溶液 ;

[0011] 所述 AFP 质控品为浓度分别为 :5 ng/ml、20 ng/ml 的 AFP 溶液 ;

[0012] 所述 β -HCG 质控品为浓度分别为 :5 mIU/ml、20 mIU/ml 的 β -HCG 溶液 ;

[0013] 所述 AFP 酶结合物,为辣根过氧化物酶标记的 AFP 与包被板条配对的另一株单克隆抗体,双抗体夹心法需要一对抗体,一株用于包被,另一株用于标记,是针对蛋白不同表位的抗体,工作浓度为 1: 1000 ;

[0014] 所述 β -HCG 酶结合物,为辣根过氧化物酶标记的 β -HCG 与包被板条配对的另一株单克隆抗体,工作浓度为 1: 1000 ;

[0015] 所述标本稀释液为 pH=7.0 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液,还含有体积分数 10% 小牛血清和 0.1% 硫柳汞,硫柳汞用于防腐,小牛血清使所检测样本保持同样的基质 ;

[0016] 所述浓缩洗涤液为含有体积分数分别为 0.05% 的吐温 20、0.1% 的硫柳汞的 pH=7.5 浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液 ;

[0017] 所述发光底物液 A 为每 250ml 溶液含有 N, O- 双三甲硅基乙酰胺(BSA)2.5g、三羟甲基氨基甲烷(Tris)1.5g、3- 氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺)0.05g、对位碘酚 0.0075g,另外还有极少量盐酸(每 1000ml 底物液 A 加 500 μ l 盐酸),用作调节溶液的 pH 值至 pH=9。

[0018] 所述发光底物液 B 为每 250ml 溶液含有 BSA 2.5g、Tris1.5g、过氧化氢 0.25ml,另外还有极少量盐酸(每 1000ml 底物液 B 加 500 μ l 盐酸),用作调节溶液的 pH 值至 pH=9。

[0019] 另外,整个试剂盒内还包括用于固定包被板条的板架、防止潮湿的干燥剂、用于存放一次实验未用完板条的自封袋,以及用于实验时避光的封板膜。

[0020] 上述高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂的制备方法,包括以下步骤 :

[0021] (1) 制备 AFP、 β -HCG 单克隆抗体包被板条 ;

[0022] (2) 配制 AFP、 β -HCG 标准品和质控品 ;

[0023] (3) 制备 AFP、 β -HCG 酶结合物 ;

[0024] (4) 配制标本稀释液 ;

[0025] (5) 配制发光底物液 A 和发光底物液 B ;

[0026] (6) 配制浓缩洗涤液。

[0027] 本发明试剂盒中涉及的 AFP、 β -HCG 标准品,酶标 AFP、 β -HCG 抗体溶液(即 AFP 酶结合物和 β -HCG 酶结合物),化学发光溶液(发光底物液 A 和发光底物液 B),包被液,封闭溶液(封闭板条时使用),浓缩洗涤液及其配方对本发明试剂盒检测的灵敏度影响很大。

[0028] 所述 AFP 标准品的配制方法为 :以倍比稀释方法配制浓度分别为 0 ng/ml、2.5 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、40ng/ml 的 AFP 标准溶液 ;

[0029] 所述 β -HCG 标准品的配制方法为 :以倍比稀释方法配制浓度分别是 :0 mIU/ml、2.5 mIU/ml、5 mIU/ml、10 mIU/ml、20 mIU/ml、40 mIU/ml 的 β -HCG 标准溶液。

[0030] 所述 AFP 酶结合物的配制方法为 :辣根过氧化物酶标记的 AFP 抗体溶液,使用时用酶稀释液配制成 1:1000 的工作浓度。

[0031] 所述 β -HCG 酶结合物配制方法为：辣根过氧化物酶标记的 β -HCG 抗体溶液，使用时用酶稀释液配制成 1:1000 的工作浓度。

[0032] 上述酶稀释液为质量分数 10% 小牛血清 +1% Proclin 300+1% BSA，即 1000ml 酶稀释液里含小牛血清 100ml，Proclin 1ml、BSA 10ml。

[0033] 所述发光底物液 A 的配制方法为：每 250ml 水溶液含有 BSA (N, O- 双三甲硅基乙酰胺) 2.5g、Tris1.5g、鲁米诺 0.05g、对位碘酚 0.0075g，以及极少量盐酸调节溶液的 pH 值至 pH=9；

[0034] 所述发光底物液 B 的配制方法为：每 250ml 水溶液含有 BSA 2.5g、Tris1.5g、过氧化氢 0.25ml，以及极少量盐酸调节溶液的 pH 值至 pH=9。

[0035] 所述浓缩洗涤液的配制方法为：含有体积分数 0.05% 吐温 20 的 pH7.5 的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液。

[0036] 所述包被液为板条包被工艺中所用的溶液，配制方法是：将 0.34 g 碳酸钠和 0.57 g 碳酸氢钠溶于 100ml 水中，调节 pH=9.6。

[0037] 所述封闭溶液为包被板条工艺中所用的溶液，配制方法是：将 10 g BSA 溶于 1L 浓缩洗涤液中，再加入质量分数为 0.05% 的叠氮钠 (NaN₃)。

[0038] 所述 AFP 酶标板包被板体的包被方法为：将 AFP 抗体溶液溶于包被液中，以设定的浓度 (例如 1 μ g/ml)，在 4℃ 中反应包被 48 小时；

[0039] 所述 β -HCG 酶标板包被板体的包被方法为：将 β -HCG 抗体溶液溶于包被液中，以设定的浓度 (例如 1 μ g/ml)，在 4℃ 中反应包被 48 小时。

[0040] 本发明采用的缓冲溶液是 pH=9.6 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲溶液。

[0041] 本发明中微孔板中所包被的 AFP、 β -HCG 抗体在碱性环境下可以很好的结合在微孔板塑料表面上，可以经受多次洗板，采用的包被抗原浓度为 1 μ g/mL。

[0042] 按照上述 AFP、 β -HCG 抗体溶液浓度 (1 μ g/ml) 包被和酶标 AFP、 β -HCG 抗体溶液浓度 (1 μ g/ml) 制备的试剂盒能够达到很好的线性范围，AFP 标准曲线范围可以达到 2.5 ng/mL $\sim$ 40 ng/mL； β -HCG 标准曲线范围可以达到 2.5 mIU/ml $\sim$ 40 mIU/ml，以及很好的灵敏度，AFP 灵敏度为 0.25ng/mL、 β -HCG 灵敏度为 0.17 mIU/ml。

[0043] 上述试剂盒的检测方法，包括以下步骤：

[0044] (1) 样品收集

[0045] 抽取孕中期孕妇静脉血，制备血清；

[0046] (2) 加样检测

[0047] AFP 测定：将浓缩洗涤液稀释、摇匀，作为应用洗涤液；根据 AFP 标准品、质控品及待测标本数确定所需孔数；将 AFP 标准品、质控品混匀加入相应孔内；在待测标本孔中先分别加标本稀释液；取制备的血清加入已加标本稀释液的孔内，吹打至孔内液体由绿色变为蓝色；每孔加入 AFP 酶结合物，用振荡器振荡，盖上封板膜，置水浴箱 37℃ 水浴；洗板；加底物，将发光底物液 A 和发光底物液 B 按 1:1 充分混匀，加入孔内，用振荡器振荡 20 秒，放入发光仪内，于 10 $\sim$ 20 分钟内测量结果；

[0048] β -HCG 测定：将浓缩洗涤液稀释、摇匀，作为应用洗涤液；根据 β -HCG 标准品、质控品及待测标本确定所需孔数； β -HCG 标准品、质控品混匀加入相应孔内；在待测标本孔中先分别加标本稀释液；取制备的血清加入已加标本稀释液的孔内，用移液器吹打至孔内

液体由绿色变为蓝色；用振荡器振荡 30 秒钟，盖上封板膜，置 37℃ 水浴 1 小时；洗板；孔内加入 β -HCG 酶结合物，37℃ 水浴 15 分钟，甩尽板中液体，用洗涤液注满各孔，停留 10 秒后用力甩去，重复 5 次后拍干；加底物，将发光底物液 A 和发光底物液 B 按 1:1 充分混匀，加入孔内，用振荡器振荡 20 秒钟，放入发光仪内，于 10 ~ 20 分钟内测量结果。

[0049] (3) 检测结果

[0050] 根据各标准溶液发光值，借助微孔板化学发光仪分析软件进行四参数 Logistic 拟合，坐标选择 X-Y，得标准曲线。根据标准曲线即可计算出 AFP、 β -HCG 的浓度。

[0051] (4) 结果分析

[0052] 唐氏综合症危险系数的临界值为 1/275。当危险系数大于临界值，建议做产前诊断，如抽取羊水，做羊水细胞培养染色体分析等；当危险系数小于临界值，则胎儿为唐氏综合症的危险较小，可继续妊娠。

[0053] 本发明是将双抗体夹心法免疫测定原理与酶标记技术和酶催化化学发光定量免疫分析相结合的定量检测产品，借助化学发光分析仪及专用数据处理软件，对唐氏综合症进行筛查。在微孔板的孔内预先包被了识别抗 AFP 或 β -HCG 的单克隆抗体，用辣根过氧化物酶标记另一株与之配对的单克隆抗体。检测时孕妇血清样本中的 AFP 或 β -HCG 与包被的和酶标记的两株单克隆抗体形成夹心抗原抗体反应，再加上发光底物液，用微孔板发光分析仪读取发光数值并计算含量。

[0054] 本发明的优点在于：将酶催化化学发光定量检测技术应用到孕妇血清中 AFP 和 β -HCG 的检测，结合化学发光定量检测技术，实现孕中期唐氏综合症产前筛查的目的，与临床诊断符合率达 99.7% 以上，比时间分辨荧光法和 ELISA 法的灵敏度高、特异性强，结果更准确可靠，实现了对孕妇及胎儿安全无创伤的产前筛查，具有较高的市场推广价值。

具体实施方式

[0055] 以下对本发明的优选实施例进行说明，应当理解，此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明，并不用于限定本发明。

[0056] 实施例 1

[0057] 一种高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒，包括盒体，以及设置在所述盒体内的 AFP 包被板条、AFP 标准品、AFP 质控品、AFP 酶结合物、 β -HCG 包被板条、 β -HCG 标准品、 β -HCG 质控品、 β -HCG 酶结合物、标本稀释液、发光底物液 A、发光底物液 B、浓缩洗涤液。

[0058] 所述 AFP 包被板条和 β -HCG 包被板条，优选乳白色不透明聚苯乙烯 96 孔化学发光酶标板包被板条；所述酶标板的各孔包被有固相化的 AFP 单克隆抗体和 β -HCG 单克隆抗体，上述单克隆抗体浓度优选 1 μ g/mL；

[0059] 所述 AFP 标准品为浓度分别为：0 ng/ml、2.5 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml、40ng/ml 的 AFP 标准溶液；

[0060] 所述 β -HCG 标准品为浓度分别是：0 mIU/ml、2.5 mIU/ml、5 mIU/ml、10 mIU/ml、20 mIU/ml、40 mIU/ml 的 β -HCG 标准溶液；

[0061] 所述 AFP 质控品为浓度分别为：5 ng/ml、20 ng/ml 的 AFP 溶液；

[0062] 所述 β -HCG 质控品为浓度分别为：5 mIU/ml、20 mIU/ml 的 β -HCG 溶液；

[0063] 所述 AFP 酶结合物,为辣根过氧化物酶标记的 AFP 与包被板条配对的另一株单克隆抗体,双抗体夹心法需要一对抗体,一株用于包被,另一株用于标记,是针对蛋白不同表位的抗体,工作浓度为 1: 1000 ;

[0064] 所述 β -HCG 酶结合物,为辣根过氧化物酶标记的 β -HCG 与包被板条配对的另一株单克隆抗体,工作浓度为 1: 1000。

[0065] 所述标本稀释液为 pH=7.0 的 0.01M 的磷酸盐缓冲液(PBS)溶液,还含有体积分数 10% 小牛血清和 0.1% 硫柳汞,硫柳汞用于防腐,小牛血清使所检测样本保持同样的基质 ;

[0066] 所述浓缩洗涤液为含有体积分数分别为 0.05% 的吐温 20、0.1% 的硫柳汞的 pH=7.5 浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液。

[0067] 所述发光底物液 A 为每 250ml 溶液含有 N, O- 双三甲硅基乙酰胺(BSA)2.5g、三羟甲基氨基甲烷(Tris)1.5g、3- 氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺)0.05g、对位碘酚 0.0075g,另外还有极少量盐酸(每 1000ml 底物液 A 加 500 μ l 盐酸),用作调节溶液的 pH 值至 pH=9 ;

[0068] 所述发光底物液 B 为每 250ml 溶液含有 BSA 2.5g、Tris1.5g、过氧化氢 0.25ml,另外还有极少量盐酸(每 1000ml 底物液 B 加 500 μ l 盐酸),用作调节溶液的 pH 值至 pH=9。

[0069] 另外,整个试剂盒内还包括用于固定包被板条的板架、防止潮湿的干燥剂、用于存放一次实验未用完板条的自封袋,以及用于实验时避光的封板膜。

[0070] 实施例 2

[0071] 上述实施例 1 高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂的制备,包括以下步骤 :

[0072] (1) AFP、 β -HCG 单克隆抗体包被板条的制备

[0073] a 采用单克隆抗体技术,先使用 AFP 或 β -HCG 纯品按常规对小鼠进行免疫,取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合,加以筛选配对,建立 AFP 和 β -HCG 单克隆抗体细胞库,然后再经接种小鼠腹腔制备腹水,再将腹水纯化后获得特异性为 100%、纯度大于 96% 的 AFP 或 β -HCG 配对单克隆抗体 ;

[0074] b 预包被板的准备 :预包 AFP 板的板条一头涂黄色,预包 β -HCG 板的板条一头涂红色,以便区分 ;

[0075] c AFP 包被液的配制 :用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液(配方 :0.34g Na_2CO_3 + 0.57g Na_2HCO_3 定容至 100ml)将 3mg/ml 的 AFP 抗体溶液稀释成 1 μ g/ml, pH=9.6 ;

[0076] d β -HCG 包被液的配制 :用 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液将 1mg/ml 的 β -HCG 抗体溶液稀释成 1 μ g/ml, pH=9.6 ;

[0077] f 包被量 :AFP、 β -HCG 包被板均按 100 μ l/ 孔包被,待全部包被完毕,置 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 静止、吸附 48 小时 ;

[0078] g 洗涤 :分别将上述包被后的板条用洗涤液洗涤两次,间隔 10 秒,在洁净纱布或吸水纸上拍干 ;

[0079] h 封闭 :分别将上述洗涤后的板条每孔加封闭液 130 μ l,室温 20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 3 小时 ;

[0080] i 干燥 :甩出板孔中的封闭液,18 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 48 小时 ;

[0081] j 分别将上述干燥后的板条装入铝箔袋,封口,2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

[0082] (2) AFP、 β -HCG 标准品、质控品的配制

[0083] 先将 AFP、 β -HCG 冻干标准品溶解并稀释至所需的最高浓度,在采用倍比稀释法

稀释至所需浓度。AFP、 β -HCG 的 S0 标准品为未添加 AFP、 β -HCG 的标准品稀释液。

[0084] (3) AFP、 β -HCG 酶结合物的制备

[0085] a 称取辣根过氧化物酶倒入一棕色小玻璃瓶内,取 1ml 双蒸水溶解,用加样器取 200ul 高碘酸钠溶液,滴入盛辣根过氧化物酶的小瓶内,室温振荡 20min;

[0086] b 振荡好的辣根过氧化物酶溶液取入透析袋,放入配制好的醋酸缓冲液中,4℃冰箱透析过夜;

[0087] c 取待标记抗体加入另一透析袋中,放入配制好的碳酸盐缓冲液中,置于 4℃冰箱内透析过夜;

[0088] d 次日,取出辣根过氧化物酶溶液,和抗体混匀,放入碳酸盐缓冲液中搅拌透析 3 小时;

[0089] e 将透析好的辣根过氧化物酶和抗体溶液,置于棕色小瓶内,加入硼氢化钠溶液充分混匀,用振荡器振荡 2 小时;

[0090] f 将葡聚糖凝胶 G-200 装柱,将上述标记物加于柱顶部,洗脱液洗脱;

[0091] g 用小试管依次分段接收流出物,用事先包被好的羊抗鼠板条进行检测,取显兰色板孔对应试管内的酶结合物;

[0092] h 将收集的酶结合物加入等量甘油混匀(甘油能更好的稳定酶结合物活性),放置于 -20℃冰箱保存;

[0093] i、将酶结合物稀释到工作浓度,装入试剂瓶冷藏备用。

[0094] (4) 标本稀释液的配制

[0095] 用电子天平准确称量 NaCl 7g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.8g、 KH_2PO_4 0.2g、KCl 0.2g 加入容量瓶;先加适量纯水,轻摇使之溶解完全;再用电子天平准确称量硫柳汞 0.5g,轻摇使之溶解完全;量取小牛血清 200ml 加入容量瓶,搅拌均匀,以纯水定容至 1000ml,即得标本稀释液。

[0096] (5) 发光底物液 A 的配制

[0097] 用电子天平准确称取 BSA (N, 0- 双三甲硅基乙酰胺)2.5g、Tris1.5g,加入容量瓶;加适量纯水,轻摇使之溶解完全,以纯水定容至 250ml;再用 HCl 调节 pH=9.0,完全混匀;再用电子天平准确称取鲁米诺 0.05g、对位碘酚 0.0075g,倒入容量瓶,充分溶解,摇匀。

[0098] (7) 发光底物液 B 的配制

[0099] 用电子天平准确称取 BSA 2.5g、Tris1.5g,加入容量瓶;加适量纯水,轻摇使之溶解完全,以纯水定容至 250ml;再用 HCl 调节 pH=9.0,完全混匀;用加样器取 0.25ml H_2O_2 加入上述液体中,混匀。

[0100] (8) 浓缩洗涤液的配制

[0101] 用电子天平准确称量 NaCl 150.9g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 96g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 20 g 加入容量瓶;先加适量纯水,轻摇使之溶解完全;再用电子天平准确称量硫柳汞 1g,轻摇使之溶解完全;量取 5ml 吐温 -20 加入容量瓶,搅拌均匀,以纯水定容至 1000ml。即得浓缩洗涤液。

[0102] 实施例 3

[0103] 上述实施例 1 孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒的检测方法,包括以下步骤:

[0104] (1) 样品收集

[0105] 抽取孕中期(14 ~ 21 周)孕妇静脉血 3ml,置一次性采血管内,于 37℃水浴箱放置

20 ~ 30 分钟让纤维蛋白原充分凝固后,4000 转 / 分钟离心 15 分钟,吸取血清。若血清标本不能及时检测,应 -20℃ 冻存,检测时应将标本融化后混合均匀,并避免反复冻融。血清标本 4℃ 冰箱存放最好不要超过 3 天。

[0106] (2) 加样检测步骤

[0107] AFP 测定

[0108] a. 将在冷藏环境中贮藏的试剂室温平衡;

[0109] b. 从铝箔袋中取出所需的微孔板条插入框架内,将不用的微孔条放回铝箔袋,放在装有干燥剂的自封口袋,仍然 2 ~ 8℃ 保存;

[0110] c. 将浓缩洗涤液按 1 :40 的比例稀释,摇匀备用,作为应用洗涤液;

[0111] d. 根据 AFP 标准品、质控品及待测标本数确定所需孔数;

[0112] e. AFP 标准品、质控品直接取 50u1 加入相应孔内,用前摇匀;

[0113] f. 在待测标本孔中先分别加 45u1 标本稀释液;

[0114] g. 取 5u1 血清加入已加标本稀释液的孔内,用移液器吹打,孔内液体由绿色变为蓝色;

[0115] h. 每孔加入 50u1 AFP 酶结合物,用振荡器振荡 30 秒钟,盖上封板膜,置水浴箱 37℃ 水浴 1 小时;

[0116] i. 洗板:甩尽板中液体,用洗涤液注满各孔,停留 10 秒后用力甩去,重复 5 次后拍干;

[0117] j. 加底物:根据使用量,将底物液 A 和底物液 B 按 1 :1 充分混匀,每孔加入新配制的发光底物 50u1,用振荡器振荡 20 秒,放入发光仪内,于 10 ~ 20 分钟内测量结果;

[0118] β-HCG 测定

[0119] a. 将在冷藏环境中贮藏的试剂室温平衡;

[0120] b. 从铝箔袋中取出所需的微孔板条插入框架内,将不用的微孔条放回铝箔袋,放在装有干燥剂的自封口袋,仍然 2 ~ 8℃ 保存;

[0121] c. 将浓缩洗涤液按 1 :40 的比例稀释,摇匀备用,作为应用洗涤液;

[0122] d. 根据 β-HCG 标准品、质控品及待测标本确定所需孔数;

[0123] e. β-HCG 标准品、质控品混匀后直接取 50u1 加入相应孔内;

[0124] f. 在待测标本孔中先分别加 25u1 标本稀释液;

[0125] g. 取 25u1 血清加入已加标本稀释液的孔内,用移液器吹打几次,孔内液体由绿色变为蓝色;

[0126] h. 用振荡器振荡 30 秒钟,盖上封板膜,置 37℃ 水浴 1 小时;

[0127] i. 洗板:甩尽板中液体,用洗涤液注满各孔,停留 10 秒后用力甩去,重复 5 次后拍干;

[0128] j. 孔加入 50u1 β-HCG 酶结合物,37℃ 水浴 15 分钟,甩尽板中液体,用洗涤液注满各孔,停留 10 秒后用力甩去,重复 5 次后拍干;

[0129] k. 加底物:根据使用量,将底物液 A 和底物液 B 按 1 :1 充分混匀,每孔加入新配制的发光底物 50u1,用振荡器振荡 20 秒钟,放入发光仪内,于 10 ~ 20 分钟内测量结果。

[0130] (3) 检测结果

[0131] 根据各标准溶液发光值,借助微孔板化学发光仪分析软件进行四参数 Logistic

拟合,坐标选择 X-Y,得标准曲线。根据标准曲线即可计算出 AFP、 β -HCG 的浓度。

[0132] 将标本对应的孕妇年龄、孕周、体重等输入配套的数据分析软件;

[0133] 将 AFP、 β -HCG 测定的浓度输入配套的数据分析软件;

[0134] 结合输入的浓度,通过数据分析软件,计算唐氏综合症或胎儿其他染色体异常的危险系数。

[0135] (4) 结果分析

[0136] 唐氏综合症危险系数的临界值为 1/275。当危险系数大于临界值,建议做产前诊断,如抽取羊水,做羊水细胞培养染色体分析等;当危险系数小于临界值,则胎儿为唐氏综合症的危险较小,可继续妊娠。

[0137] 实施例 4

[0138] 上述实施例 1 孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒的质量参数

[0139] (1) 试剂盒灵敏度:

[0140] 重复测定零标准品 10 次,计算出发光值的均值($\bar{x}$)和标准差(sd),将($\bar{x} + 2sd$)的值带入反应曲线,计算出相应浓度值。

[0141] 表 1 试剂盒最低检测线的测定

[0142]

AFP	零标准品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	发光值	234	189	220	151	162	151	151	268	300	251
β -HCG	零标准品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	发光值	500	621	432	625	635	400	352	300	521	354

[0143] 测定的 AFP 零标准品的平均发光值 $\bar{x}$ = 207.7, sd = 54.73, 将($\bar{x} + 2sd$)的值带入此次反应曲线,得其灵敏度为: 0.25ng/ml。

[0144] 测定的 β -HCG 零标准品的平均发光值 $\bar{x}$ = 474, sd = 124.73, 将($\bar{x} + 2sd$)的值带入此次反应曲线,得其灵敏度为: 0.17mIU/ml。

[0145] (2) 剂量反应曲线的线性

[0146] AFP 在 0ng/ml ~ 40ng/ml 范围内,借助化学发光检测软件进行四参数 Logistic 拟合,坐标选择 X-Y,得标准曲线。标准曲线相关系数 $r=0.9998$;

[0147] β -HCG 在 0mIU/ml ~ 40mIU/ml 范围内,借助化学发光检测软件进行四参数 Logistic 拟合,坐标选择 X-Y,得标准曲线。标准曲线相关系数 $r=0.9999$ 。

[0148] (3) 准确度与精密度:

[0149] 用 20ng/ml 的 AFP 参考品测定 10 次,计算相对偏差(Bias%) $\leq 10\%$;变异系数(CV) $\leq 15\%$ 。

[0150] 用 20mIU/ml 的 β -HCG 参考品测定 10 次,计算相对偏差(Bias%) $\leq 10\%$;变异系数

(CV) $\leq$ 15%。

[0151] 表 2 试剂盒准确度和精密性的测定

[0152]

AFP 参考品 (20ng/ml)	编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	浓度	18.26	21.22	20.14	19.35	19.22	17.54	21.21	20.55	19.01	21.14
	相对偏差 (Bias%) = 1.18%					变异系数 (CV) = 6.56%					
β -HCG 参考品 (20mIU/ml)	编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	浓度	21.22	20.59	22.32	20.15	20.57	21.63	22.57	20.54	20.47	23.68
	相对偏差 (Bias%) = 6.87%					变异系数 (CV) = 5.40%					

[0153] (4) 批间精密性：

[0154] 取 3 个批次的试剂盒分别对 20ng/ml 的 AFP 参考品和 20mIU/ml 的 β -HCG 参考品各测定 10 次, 分别计算 AFP 和 β -HCG 的批间变异系数 (CV) $\leq$ 10%。

[0155] 表 3 试剂盒批间精密性的测定

[0156]

AFP 参考品 (20ng/ml)	编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	批号 1	18.26	21.22	20.14	19.35	19.22	17.54	21.21	20.55	19.01	21.14
	批号 2	19.21	20.14	21.33	18.34	19.12	17.88	19.24	18.88	19.22	19.98
	批号 3	21.30	19.38	18.24	20.14	21.32	19.32	18.88	19.32	19.64	21.62
	批间变异系数 (CV) = 5.79%										
β -HCG 参考品 (20mIU/ml)	编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	批号 1	21.22	20.59	22.32	20.15	20.57	21.63	22.57	20.54	20.47	23.68
	批号 2	19.32	18.73	19.22	18.96	21.33	20.38	21.22	19.33	19.21	19.06
	批号 3	18.12	19.26	18.25	21.62	20.18	19.33	18.16	19.66	18.73	9.66
	批间变异系数 (CV) = 6.95%										

[0157] 从上表中可以看出, 本发明设计的孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒在灵敏度、准确度、精密度以及批间精密性等各项质量参数均处于领先地位。

[0158] 考核试剂与临床诊断测定 1000 例比较

[0159]

组别	例数	t	P
考核试剂	1000	-0.916	>0.05
临床诊断	1000		

[0160] $t_{0.05, 1000}=1.962$, $t_{-0.916} < t_{0.05, 1000}$, $P > 0.05$, 考核试剂、临床诊断差别无显著性, 考核试剂、临床诊断结果高度相关, 具有等效性。

[0161] 考核试剂与临床诊断的特异性符合率为 100%, 灵敏度符合率为 99.7%, 总符合率为 99.7%。通过相关性分析、卡方检验及配对 t 检验, 说明考核试剂和临床诊断不存在显著性差异, 具有很好的相关性。

[0162] 除非另有说明, 本发明中所采用的百分数均为重量百分数。

[0163] 最后应说明的是: 以上所述仅为本发明的优选实施例而已, 并不用于限制本发明, 尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明, 对于本领域的技术人员来说, 其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改, 或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内, 所作的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN102866254B	公开(公告)日	2015-01-21
申请号	CN201210352435.3	申请日	2012-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	潍坊市康华生物技术有限公司		
[标]发明人	杨致亭 杨爱香 邱香廷 宋玉翠		
发明人	杨致亭 杨爱香 邱香廷 宋玉翠		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	李江		
其他公开文献	CN102866254A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种高灵敏度孕中期唐氏综合症产前筛查试剂盒及其制备检测方法，所述试剂盒包括盒体，以及AFP和β-HCG包被板条、AFP和β-HCG标准品、AFP和β-HCG质控品、AFP和β-HCG酶结合物、标本稀释液、发光底物液、浓缩洗涤液等，制备方法包括制备AFP、β-HCG单克隆抗体包被板条，配制AFP、β-HCG标准品和质控品，制备AFP、β-HCG酶结合物，配制标本稀释液，配制发光底物液A和发光底物液B和配制浓缩洗涤液等步骤；本发明的优点在于：实现了孕中期唐氏综合症产前筛查的目的，与临床诊断符合率达99.7%以上，灵敏度高、特异性强，结果更准确可靠。