

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710074001.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/76 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G06F 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 15 日

[11] 公开号 CN 101285837A

[22] 申请日 2007.4.10

[21] 申请号 200710074001.0

[71] 申请人 深圳欣康基因数码科技有限公司

地址 518057 广东省深圳市高新区中区高新
中一道生物孵化器大楼 1-217

[72] 发明人 许元峰 谢德康 王小明 黄列波
吴玲智 王荣娥

[74] 专利代理机构 深圳市科吉华烽知识产权事务
所

代理人 胡吉科

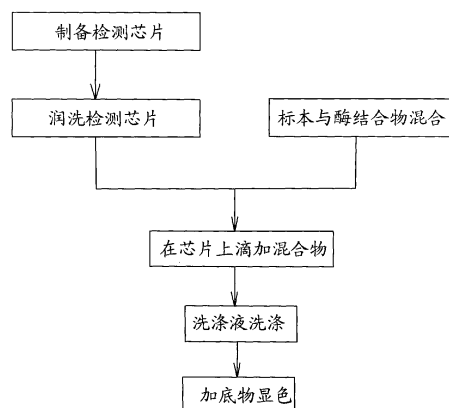
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 6 页

[54] 发明名称

唐氏综合征检测、分析方法及检测中所用芯片的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一步检测法在唐氏综合征检测、分析方法中的应用及检测中所用芯片的制备方法。是通过将待检测标本与酶结合物相混合，再将此混合物与检测芯片上的甲胎蛋白抗体和绒毛膜促性腺激素抗体进行反应，通过添加辣根过氧化物酶催化底物实现显示反应，并通过芯片阅读装置对芯片反应结果进行数据采集、分析的一种唐氏综合征的检测方法。该方法与传统检测方法比较，避免了对孕妇血清中各项目指标的连续反复检测，实现了多种项目指标的一次性检测完成，大大缩短检验和分析的时间，在保障检测准确性的同时，提高了临床检验的效率。



1. 一种唐氏综合征检测方法, 其特征在于: 所述唐氏综合征检测的方法包括步骤:

a1. 将待检测标本与酶结合物混合, 形成甲胎蛋白-甲胎蛋白酶标抗体复合物和绒毛膜促性腺激素-绒毛膜促性腺激素酶标抗体复合物;

a2. 将a1步所述甲胎蛋白-甲胎蛋白酶标抗体复合物和绒毛膜促性腺激素-绒毛膜促性腺激素酶标抗体复合物滴加到检测芯片上, 进行反应;

a3. 将底物滴加到所述a2已完成反应的芯片上, 进行显色处理。

2. 根据权利要求1所述的唐氏综合征检测方法, 其特征在于: 所述a2步又包括子步骤:

a21. 用洗涤液润洗所述检测芯片;

a22. 将甲胎蛋白-甲胎蛋白酶标抗体复合物和绒毛膜促性腺激素-绒毛膜促性腺激素酶标抗体复合物滴加到检测芯片上, 进行反应;

a23. 用洗涤液洗涤所述a22步反应完成后的芯片, 去除未与所述芯片上甲胎蛋白抗体和绒毛膜促性腺激素抗体相结合的物质。

3. 根据权利要求2所述的唐氏综合征检测方法, 其特征在于: 所述3000ml洗涤液包括: 硼酸盐缓冲液 950ml-1200ml、吐温-20 (原倍) 38 ml-42ml 和去离子水 1700ml-2050ml。

4. 根据权利要求1所述的唐氏综合征检测方法, 其特征在于: 所述酶结合物通过酶标抗体稀释液稀释甲胎蛋白酶标抗体原液和绒毛膜促性腺激素酶标抗体原液制成, 稀释后使得甲胎蛋白定量化检测范围为 10—150ng/ml、绒毛膜促性腺激素定量化检测范围为 1—12ug/ml。

5. 根据权利要求4所述的唐氏综合征检测方法, 其特征在于: 所述酶标抗体稀释液 500mL 的量配制包括: 含有 0.14—0.16M 磷酸盐缓冲液(PH7.4) 500 ml、小牛血清白蛋白 5.00 g—10.00g、浓度为 1%—5% 硫柳汞 5 ml。

6. 根据权利要求1所述的唐氏综合征检测方法, 其特征在于: 所述底物包括底物A和底物B, 通过所述底物A与所述底物B液以 15: 1 的比例混合而成; 其中, 所述底物A包括 0.2mol/l 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液与 0.003g/ml 1-萘酚溶液, 通过 940—960: 55—65 的体积配比, 充分搅拌, 混合均匀制成; 所述底物B中过氧化氢在灭菌水中的终浓度为 0.15%—0.25%, 并搅拌均匀。

7. 一种唐氏综合征检测结果分析方法, 其特征在于: 所述唐氏综合征检测

结果分析包括步骤:

b1. 对反应完成后的所述芯片上信息的采集、分析;

b2. 输入待检测孕妇检测所需数据指标;

b3. 根据公式: $Risk = Risk_Afp * Risk_Hcg * \frac{1}{Risk_Age}$ 计算唐氏检测风险数值。

8. 根据权利要求 7 所述的唐氏检测结果分析方法, 其特征在于: 所述 b2 步中待检测孕妇检测所需数据指标包括末次月经时间、孕妇年龄、孕周、胎数、孕妇体重和既往病史。

9. 根据权利要求 7 所述的唐氏检测结果分析方法, 其特征在于: 所述 b3 中

$$\text{甲胎蛋白风险: } Risk_Afp = \frac{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * std_afp}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{afp - mean_afp * 0.74}{std_afp} \right)^2}}{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * std_afp}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{afp - mean_afp}{std_afp} \right)^2}};$$

$$\text{绒毛膜促性腺激素风险: } Risk_Hcg = \frac{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * std_hcg}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{hcg - mean_hcg * 2.08}{std_hcg} \right)^2}}{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * std_hcg}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{hcg - mean_hcg}{std_hcg} \right)^2}};$$

$$\text{年龄风险: } Risk_Age = \frac{0.999373 - e^{(0.286 * Age - 16.2395)}}{0.000627 + e^{(0.286 * Age - 16.2395)}};$$

10. 一种唐氏综合征检测中所用芯片的制备方法, 其特征在于: 所述芯片的

制备方法包括步骤:

c1. 将所述芯片上的膜面用去离子水浸泡5-10分钟, 取出晾干;

c2. 将甲胎蛋白抗体和绒毛膜促性腺激素抗体用磷酸盐缓冲液稀释到 1.0mg/ml;

c3. 通过点样装置将所述c2步稀释后的甲胎蛋白抗体和绒毛膜促性腺激素抗体固定在经所述c1处理后的所述膜面上;

c4. 将所述芯片膜组装成芯片使用。

唐氏综合征检测、分析方法及检测中所用芯片的制备方法

【技术领域】

本发明属于生物医学研究及临床应用领域，具体涉及一步检测法在唐氏综合征检测、分析方法中的应用及检测中所用芯片的制备方法。

【背景技术】

唐氏综合征又称 21 三体综合征，是常见的染色体异常病之一，发病率约为 1/750。目前，对于唐氏综合征的检测采用的是对母体血清中两项标志物—甲胎蛋白（AFP）和绒毛膜促性腺激素（HCG）的指标进行筛查，通过对 AFP 和 HCG 的定量测定和数据结果分析，计算出唐氏综合征的危险系数。

早在 20 多年前就开始出现了产前筛查的方法，从那以后得到逐步发展。直到 20 世纪 80 年代初，母亲的年龄和病史是可提供进行唐氏综合征筛查的唯一方法。这一状况自 20 世纪 80 年代中期开始发生了改变，当时 Cuckle 证明，把母亲的血清 AFP 和 HCG 与母亲年龄结合起来，可以从实质上提高检测结果的准确率。

目前，在唐氏检测方法中，对母体血清中 AFP 和 HCG 这两个指标进行检测的主要方法是 ELISA 板检测法。ELISA 板检测法检测的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记。结合在固相载体—ELISA 板表面上的 AFP 和 HCG 的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记反应物的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。在测定时，首先，将待检测标本与固相载体—ELISA 板表面上的 AFP 和 HCG 的抗原或抗体起反应；其次，用洗涤的方法使固相载体—ELISA 板上形成的 AFP 和 HCG 抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开；最后，加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体—ELISA 板上。此时固相载体上的酶量与待检测标本中受检物质的量呈一定的比例。加入底物后，底物被酶催化成为有色产物，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。

ELISA 板检测存在的缺陷在于：对需要检测的母体血清中 AFP 和 HCG 这两项指标必须分两次进行检测。操作过程中必须对 AFP 和 HCG 这两个项目按不同比例分别稀释血清，这样就使操作过程复杂繁琐，在对母体血清中 AFP 和 HCG 这

两个项目进行检测过程中需要进行重复性检测，这就导致了检测过程需要耗费大量时间。检测一人份就需要耗时 6 小时、同时检测 10 人份耗时 8 小时、同时检测 20 人份耗时 10 小时，这样就影响了检测的效率，而且每次必须自己配置标准品并制定标准曲线再通过标准曲线进行计算得出检测结果，不能对检测结果中 AFP 和 HCG 这两个检测项目同时实现联合定量分析，对于检测结果也不能实现精确的判断。

【发明内容】

为了解决现有技术中的存在的检测效率低并且不能实现对 AFP 和 HCG 这两个检测项目进行同时联合定量检测的问题，本发明提供了一种运用一步检测法结合唐氏综合征检测方法。

为了解决现有技术中的存在的检测效率低、不能对检测结果中 AFP 和 HCG 这两个检测项目实现联合定量分析并对检测结果进行准确判断的问题，本发明提供了一种对唐氏综合征检测结果的分析方法。

为了配合唐氏综合征检测方法的进行，本发明提供了一种唐氏综合征检测中所用芯片的制备方法。

本发明解决第一个技术问题所采用的方案是：提供一种唐氏综合征检测方法，该方法包括步骤：第一步、将待检测标本与酶结合物混合，形成甲胎蛋白-甲胎蛋白酶标抗体复合物和绒毛膜促性腺激素-绒毛膜促性腺激素酶标抗体复合物；第二步、将第一步中所述甲胎蛋白-甲胎蛋白酶标抗体复合物和绒毛膜促性腺激素-绒毛膜促性腺激素酶标抗体复合物滴加到检测芯片上，进行反应；第三步、将底物滴加到所述第二步已完成反应的芯片上，进行显色处理。

根据本发明的一优选实施例：上述第二步又包括子步骤：首先、用洗涤液润洗所述检测芯片；其次、将甲胎蛋白-甲胎蛋白酶标抗体复合物和绒毛膜促性腺激素-绒毛膜促性腺激素酶标抗体复合物滴加到检测芯片上，进行反应；最后、用洗涤液洗涤上一步反应完成后的芯片，去除未与所述芯片上甲胎蛋白抗体和绒毛膜促性腺激素抗体相结合的物质。

根据本发明的一优选实施例：所述 3000ml 洗涤液中包括：硼酸盐缓冲液 950ml-1200ml、吐温-20（原倍）38 ml-42ml 和去离子水 1700ml-2050ml。

根据本发明的一优选实施例：所述酶结合物通过酶标抗体稀释液稀释甲胎蛋白抗体酶标抗体原液和绒毛膜促性腺激素抗体酶标抗体原液制成，稀释后使得甲胎蛋白定量化检测范围为 10—150ng/ml、绒毛膜促性腺激素定

量化检测范围为 1—12ug/ml。

根据本发明的一优选实施例：所述 500mL 酶标抗体稀释液配制包括：含有 0.14—0.16M 磷酸盐缓冲液 (PH7.4) 500 ml、小牛血清白蛋白 20.00 g—30.00g、浓度为 1%—5% 硫柳汞 5 ml。

根据本发明的一优选实施例：所述底物包括底物 A 和底物 B，通过所述底物 A 与所述底物 B 液以 15:1 的比例混合而成；其中，所述底物 A 包括 0.2mol/l 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐缓冲液与 0.003g/ml 1-萘酚溶液，通过 940—960:55—65 的体积配比，充分搅拌，混合均匀制成；所述底物 B 中过氧化氢在灭菌水中的终浓度为 0.15%—0.25%，并搅拌均匀。

本发明解决第二个技术问题所采用的方案是：提供一种唐氏检测结果分析方法，该方法包括步骤：第一步、进行所述芯片上信息的采集、分析；第二步、输入待检测孕妇检测所需数据；第三步、根据公式：

$$\text{Risk} = \text{Risk_Afp} * \text{Risk_Hcg} * \frac{1}{\text{Risk_Age}} \text{ 计算唐氏检测风险数值。}$$

根据本发明一优选实施例：所述第二步中待检测孕妇检测所需数据指标包括末次月经时间、孕妇年龄、孕周、胎数、孕妇体重和既往病史。

根据本发明一优选实施例：所述第三步中

$$\text{甲胎蛋白风险: Risk_Afp} = \frac{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * \text{std_afp}}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{\text{afp} - \text{mean_afp} * 0.74}{\text{std_afp}} \right)^2}}{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * \text{std_afp}}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{\text{afp} - \text{mean_afp}}{\text{std_afp}} \right)^2}};$$

$$\text{绒毛膜促性腺激素风险: Risk_Hcg} = \frac{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * \text{std_hcg}}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{\text{hcg} - \text{mean_hcg} * 2.08}{\text{std_hcg}} \right)^2}}{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * \text{std_hcg}}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{\text{hcg} - \text{mean_hcg}}{\text{std_hcg}} \right)^2}};$$

$$\text{年龄风险: Risk_Age} = \frac{0.999373 - e^{(0.286 * \text{Age} - 16.2395)}}{0.000627 + e^{(0.286 * \text{Age} - 16.2395)}}。$$

本发明解决第三个技术问题所采用的方案是：提供一种检测中所用芯片的制备方法，该方法包括步骤：第一步、将所述芯片上的膜面用去离子水浸泡 5—10 分钟，取出晾干；第二步、将甲胎蛋白抗体和绒毛膜促性腺激素抗体用磷酸

盐缓冲液稀释到1.0mg/ml；第三步、通过点样装置将所述第二步稀释后的甲胎蛋白抗体和绒毛膜促性腺激素抗体固定在经所述处理后的所述膜面上；第四步、将所述芯片膜组装成芯片使用。

本发明的有益效果是：与传统检测方法比较，避免了对孕妇血清中项目指标的连续反复检测，实现了AFP、HCG两种项目指标的一次性检测完成，大大缩短检验和分析的时间，在保障检测准确性的同时，提高了临床检验的效率；检测结果采取数据化显示，定性、半定量和定量相结合，并且具备强大的数据储存和调用统计功能，操作高度自动化，简便快速，10-20分钟可以完成检测，显著的提高了检测效率，并且可方便进行单人份操作。

【附图说明】

图 1. 是本发明唐氏综合征检测、分析方法及检测中所用芯片的制备方法中唐氏综合征检测所用芯片制备方法流程图。

图 2. 是唐氏综合征检测方法流程图。

图 3. 是唐氏综合征检测结果分析过程流程图。

图 4. 是AFP理想检测曲线图。

图 5. 是HCG理想检测曲线图。

图 6. 是根据实验得到的AFP、HCG实验结果数据图。

图 7. 是根据实验得到的AFP检测曲线图。

图 8. 是根据实验得到的HCG检测曲线图。

图 9. 是芯片阅读分析装置数据库存储的AFP标准曲线检测数据图。

图 10. 芯片阅读分析装置数据库存储的AFP标准曲线图。

图 11. AFP检测曲线方程验证数据图。

图 12. 芯片阅读分析装置数据库存储的HCG标准曲线检测数据图。

图 13. 芯片阅读分析装置数据库存储的HCG标准曲线图。

图 14. HCG检测曲线方程验证数据图。

图 15. 底物反应原理图。

【具体实施方式】

下面结合附图和实施例对本实用新型进一步说明。

请参阅图1，本发明唐氏综合征检测、分析方法及检测中所用芯片的制备方法中唐氏综合征检测所用芯片制备方法流程图。如图1所示，唐氏综合征检测所用芯片制备方法包括步骤：首先、将制备检测芯片时所用的芯片反应膜-NC膜用去离子水浸泡5-10分钟，浸泡好捞出晾干。根据生产芯片的规格型号，在裁膜机上进行剪裁；其次、将AFP单克隆抗体和HCG单克隆抗体分别按抗体给定的浓

度用磷酸盐 (PBS) 稀释液稀释到1.0mg/ml; 再次、将稀释好的AFP单克隆抗体和HCG单克隆抗体放入市场上购买的芯片点样装置, 将AFP单克隆抗体和HCG单克隆抗体点到NC膜上并进行固定, 将抗体固定在NC膜上后, 采用含0.1%-0.5%小牛血清白蛋白 (BSA) 的封闭液进行封闭处理; 最后、将经过固定抗体前、后处理过的NC膜片按顺序装配到壳体内, 整个芯片由壳体、NC膜片、吸水材料组成。

在运用唐氏综合征检测芯片进行唐氏检测的过程, 可以参阅图 2, 本发明唐氏综合征检测、分析方法及检测中所用芯片的制备方法中唐氏综合征检测方法流程图。如图 2 所示, 该检测方法包括步骤:

第一、将待检测标本与酶结合物进行混合, 使待检测标本 - 孕妇血清中的待检物质 AFP 与 HCG 同各自相对应的酶标抗体充分结合, 形成 AFP—AFP 酶标抗体复合物和 HCG—HCG 酶标抗体复合物。在待检测标本与酶结合物混合过程中, 通过酶标抗体稀释液稀释 AFP 和 HCG 两种酶标抗体原液, 稀释后使得对 AFP 定量化检测范围为 10—150ng/ml、HCG 定量化检测范围为 1—12ug/ml。其中酶标抗体稀释液的配置包括 PBS、BSA、硫柳汞, 例如, 在本实施例中, 配置 500mL 酶标抗体稀释液, 需要 0.15M PBS (PH7.4) 500 ml、25.00 g BSA、浓度为 1%-5%的硫柳汞 5 mL。其中, 0.15M PBS (PH7.4) 溶液的配制包括: 通过将 0.24 g KH_2PO_4 、2.90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.00 g NaCl 和 0.20 g KCl, 加去离子水定容至 1000mL, 用 HCl 溶液调 PH 值至 7.4 左右后再用 500mL 试剂瓶分装, 高压灭菌 25min。

第二步、将第一步中待检测标本与酶结合物的混合体滴加到检测芯片的检测窗口内, 该混合体在下渗的过程中会同检测芯片上的 AFP 抗体和 HCG 抗体充分接触, 并发生如下反应: AFP—AFP 酶标抗体复合物同检测芯片上的 AFP 抗体结合, 形成 AFP 固相抗体—AFP—AFP 酶标抗体复合物; HCG—HCG 酶标抗体复合物同检测芯片上的 HCG 抗体结合, 形成 HCG 固相抗体—HCG—HCG 酶标抗体。为了达到更好的反应效果, 在进行反应前应用洗涤液润洗固定有 AFP 抗体和 HCG 抗体的 NC 膜面, 反应完成后, 用洗涤液再次清洗所述 NC 膜面, 去除未与所述 NC 膜上抗体相结合的物质。此时检测芯片上带有的酶量与标本中受检物质的量呈一定的相关。生物芯片所用的洗涤液包括硼酸盐缓冲液 (TBE)、吐温-20 (Tween-20) 和去离子水。各成分的配比: 例如在本实施例中 3000ml 洗涤液各成分的含量为硼酸盐缓冲液: 1000ml、Tween-20 (原倍): 40ml 和去离子水: 1960ml, 上述物质经充分混合搅拌 10min, 分装后置于 4℃ 环境下保存。其中 TBE

缓冲液的配制过程包括：称量 54g TrisBase，倒入 1000ml 烧杯；称量 27.5 克硼酸，倒入 1000ml 烧杯；往 1000ml 烧杯中加入 800ml 去离子水，通过磁力搅拌器搅拌 5 分钟，使得 TrisBase 和硼酸充分溶解到去离子水中；再加入 10ml 0.5M 乙二胺四乙酸纳（EDTA）溶液；将上述混合溶液再倒入 1000 ml 量筒通过去离子水定容至 1000ml，利用磁力搅拌器搅拌；最后、将溶解混合均匀后的液体倒入 1000ml 磨口瓶，即可盖上瓶盖备用。EDTA 溶液配制过程包括：第一步、称量 46.53g 乙二胺四乙酸二钠，倒入 500ml 烧杯；第二步、往烧杯中加入 200ml 去离子水，通过磁力拌器进行搅拌使得乙二胺四乙酸二钠溶解到去离子水中；第三步、填加 NaOH 将上步中经过混合后溶液的 PH 值调至 8.0；第四步、溶解混匀后液体倒入 500 ml 量筒内通过去离子水将上述混合溶液定容至 250ml；第五步、定容后液体倒回 500ml 烧杯，磁力搅拌器搅拌；第六步、将第五步中混匀均匀的液体倒入 500ml 刻度瓶，盖紧瓶盖；最后，将 EDTA 溶液放置于 4℃—8℃ 的环境下存放备用。

唐氏综合征检测方法中的最后一步是将酶催化底物滴加到已完成反应的芯片上，进行显色处理，根据颜色反应的程度进行待检物质 AFP 与 HCG 的定量分析。底物的反应原理图可以参阅图 15，如图 15 所示，其中 1-萘酚为供氢体， H_2O_2 为受氢体，在辣根过氧化物酶（HRP）的催化作用下两者迅速发生氧化还原反应，使检测芯片的 NC 膜上固定的抗体点表面上产生大量的蓝紫色的 1-萘酚多聚体沉淀。颜色反应的程度反映检测芯片上辣根过氧化物酶（HRP）量的多少，而检测芯片的 NC 膜上带有的酶量与标本中受检物质的量呈一定的相关，因此就可以达到定性或定量分析的目的。在上述底物反应的过程中所用到的底物包括底物 A 和底物 B，所述底物是通过将所述底物 A 与所述底物 B 液以 15: 1 的比例混合而成。其中，底物 A 的成分包括：Tris-HCl 缓冲液和 1-萘酚，各成分的配比为 0.2mol/l Tris-HCl (PH7.4) 缓冲液与 0.003g/ml 1-萘酚溶液的体积配比为 950: 60。在本实施例中，在配置底物 A 时，采用在 0.2mol/l Tris-HCl (PH7.4) 缓冲液 950ml 中填加 0.003g/ml 1-萘酚溶液 60ml 经充分搅拌混匀，分装后置于 4℃ 环境下避光保存，即可获得底物 A。其中底物 A 的组分中 0.2mol/l Tris-HCl (PH7.4) 缓冲液的配制方法是通过在 12.14 g 的 Tris-base 中填加去离子水约 450 ml，经过搅拌混匀后，加入高浓度 HCl 将液体的 PH 值调至 7.4，再搅拌均匀，倒入 500ml 量筒中，用去离子水定容到 500ml，倒回烧杯内搅拌均匀后 4 保存备用。0.003g/ml 1-萘酚的配制方法是通过在 0.15 g 的 1-萘酚中用乙醇定容至 50ml，液体混合均匀后将液体置于 4℃ 的避光环境下密闭保存备用。

底物 B 的成分包括 H_2O_2 和灭菌水, 各成分配比为 H_2O_2 在灭菌水中的终浓度为 0.15%—0.25%。制备方法, 在本实施例中采用将浓度在 30% 的 H_2O_2 450 μ l—750 μ l, 用灭菌水定容到 90ml, 待搅拌混匀后, 可以将溶液分装到 4℃ 环境下, 进行保存。

相对于常规的芯片检测方法, 本发明采取的是一步检测法的新模式对 AFP 和 HCG 进行检测。即将 AFP、HCG 的标记抗体直接与待测标本混合, 期间通过一步法来提高检测灵敏度。

采用一步法检测模式两者的理想检测曲线, 其中 AFP 理想曲线如图 4 所示、HCG 理想曲线如图 5 所示。

实验中用到的试剂包括酶标稀释液; 酶标抗体; 固定有 AFP、HCG 单抗的芯片; 洗涤液; 底物; PBS 和标准品。实验的操作步骤包括: 首先、用 PBS 将 AFP 标准品分梯度分别稀释成 10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、80 ng/ml 和 160 ng/ml; 用 PBS 将 HCG 标准品分别稀释成 1ug/ml、1.5ug/ml、2ug/ml、2.5ug/ml、4ug/ml 和 5ug/ml。其次、将酶标抗体浓度稀释至使用浓度; 最后、按一步法同时进行检测。上述实验得到的 AFP、HCG 实验结果数据可以参阅图 6。针对上述实验数据得出如图 7 所示的 AFP 检测曲线图和如图 8 所示 HCG 检测曲线图。

通过上面附图可以看出实验结果与理论推导的结果是吻合的。

在本发明中采取了一步检测法的新模式对母体血清中的 AFP 和 HCG 的含量进行检测。将 HCG、AFP 的标记抗体直接与待测标本混合, 将这样的反应模式运用到唐氏综合征检测中, 可以明显的提高检测的效率。

对于芯片反应结果的分析过程可以参阅图 3 本发明唐氏综合征检测、分析方法及检测中所用芯片的制备方法中唐氏综合征检测结果分析过程流程图。如图 3 所示, 该检测方法包括步骤: 首先、将需要分析的芯片放入芯片阅读分析装置中, 通过芯片阅读装置开始进行芯片上数据信息的采集并进行分析, 得到生物芯片上 AFP 和 HCG 的灰度值, 再与芯片阅读分析装置数据库存储的标准曲线参数, 通过标准曲线方程进行计算, 得到标本的浓度值。

芯片阅读分析装置数据库存储的标准曲线的制作过程包括: 首先、用 PBS 将 AFP 的标准品分别稀释成 10 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、60 ng/ml、80 ng/ml、120ng/ml、160 ng/ml。用阴性血清将 HCG

标准品分别稀释成 0.5 ug/ml、1 ug/ml、2 ug/ml 3 ug/ml、4 ug/ml、6 ug/ml、8 ug/ml、12 ug/ml；其次、将酶标抗体浓度稀释至最佳使用浓度，按一步法进行检测。检测完成后读值，检测结果数据值可以参阅图 9 芯片阅读分析装置数据库存储的 AFP 标准曲线检测数据图。根据如图 9 所示的检测数值，得到如图 10 所示的芯片阅读分析装置数据库存储的 AFP 标准曲线图，该图的曲线方程为： $Y=1.0079X-5.9804$ （方程中 X 代表灰度值，Y 代表 AFP 浓度）。

对方程进行验证，取前期实验中所做的结果经计算对比，结果可以参阅如图 11 所示的 AFP 检测曲线方程验证数据图。由图 11 可以看到该 AFP 曲线方程公式能准确的计算出血清中所含 AFP 的含量。

HCG 用阴性血清稀释后检测结果数据可以参阅图 12，根据检测数值，得到芯片阅读分析装置数据库存储的 HCG 标准曲线，如图 13 所示，该曲线的方程为 $Y=45.54e^{0.0281x}$ （方程中 X 代表灰度值，Y 代表 HCG 浓度）。随机抽取试剂盒检测过的孕妇血清，即为已知 HCG 浓度的血清，用芯片进行检测验证，所得数据结果经计算对比可得如图 14 所示的 HCG 标准曲线方程验证数据图。通过该图中数据可见，该 HCG 标准曲线方程公式也能准确的计算出血清中所含 HCG 的含量。

检测标本中 AFP 和 HCG 浓度的换算；将待测标本通过芯片阅读装置进行检测，根据芯片阅读装置数据库内存储的标准曲线，系统软件会自动计算出检测标本中 AFP 和 HCG 的含量。同时，检测标本中 AFP 和 HCG 的浓度值会被记录并判断是否影响芯片阅读装置的数据库。如有影响，则将新的数据补充到原数据库内，该次的检测结果便可以作为下一次检测的比对数据库资料，影响下一次的检测结果。如没有影响，则仍继续用原来数据库内存储的数据资料。在得到标本的浓度值后，芯片阅读装置的系统软件会把浓度值与芯片阅读装置数据库中存储的数据进行比较：得到该待检测标本中 AFP 和 HCG 两指标的中位数，再把该中位数代入计算公式中计算，得到风险值 AFP 和 HCG 两个指标的风险数值。同样，待检测标本中 AFP 和 HCG 两指标的中位数及每一次检测过程的中位值也会被记录下来，并自动生成分布图，作为下一次检测的比对数据库资料。

然后，芯片阅读分析装置的软件系统会提示检测人员输入待检测孕妇的相关信息，这些信息包括末次月经时间、孕妇年龄、孕周、胎数和孕妇体重等信

息。

根据风险值 AFP 和 HCG 这两个指标的计算计算出 AFP 的风险值和 HCG 的风险值。AFP 风险值 和 HCG 风险值的计算公式为：

$$\text{Afp 风险的计算公式为 Risk_Afp} = \frac{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * \text{std_afp}}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{\text{afp} - \text{mean_afp} * 0.74}{\text{std_afp}} \right)^2}}{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * \text{std_afp}}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{\text{afp} - \text{mean_afp}}{\text{std_afp}} \right)^2}};$$

$$\text{Hcg 风险的计算公式为 Risk_Hcg} = \frac{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * \text{std_hcg}}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{\text{hcg} - \text{mean_hcg} * 2.08}{\text{std_hcg}} \right)^2}}{\frac{1}{\sqrt{2 * \pi * \text{std_hcg}}} * e^{-\frac{1}{2} * \left(\frac{\text{hcg} - \text{mean_hcg}}{\text{std_hcg}} \right)^2}}$$

$$\text{年龄风险指标的计算公式为 Risk_Age} = \frac{0.999373 - e^{(0.286 * \text{Age} - 16.2395)}}{0.000627 + e^{(0.286 * \text{Age} - 16.2395)}}, \text{ 因为, 芯片阅}$$

读分析装置对待检测芯片分析的过程, 是根据中国正常人群妊娠中期 (孕 14-20 周) 妇女血清标本中 AFP、HCG 含量数据库, 计算 AFP 和 HCG 的正常人群中位数。在定量分析计算出标本 AFP、HCG 实际含量后, 综合孕妇末次月经时间、孕妇年龄、孕周、胎数和孕妇体重和既往病史等信息得到唐氏综合征的危险系数的。

唐氏综合征检测结果分析过程的最后一步是设备会针对采集到的芯片信息, 结合待检测孕妇的相关信息对唐氏风险根据公式:

$$\text{Risk} = \text{Risk_Afp} * \text{Risk_Hcg} * \frac{1}{\text{Risk_Age}}, \text{ 进行计算, 得到最终的唐氏风险, 并判断结果。}$$

唐氏综合征危险系数的临界值为 1/275, 当芯片阅读装置最后计算出来的危险系数大于该临界值, 系统会建议受检者做产前诊断, 如抽取羊水, 做羊水细胞培养染色体核型分析等; 当危险系数小于临界值, 则胎儿为唐氏综合征的危险较小, 可以继续妊娠。

上述的详细描述仅是示范性描述, 本领域技术人员在不脱离本发明所保护的范和精的情况, 可根据不同的实际需要设计出各种实施方式。

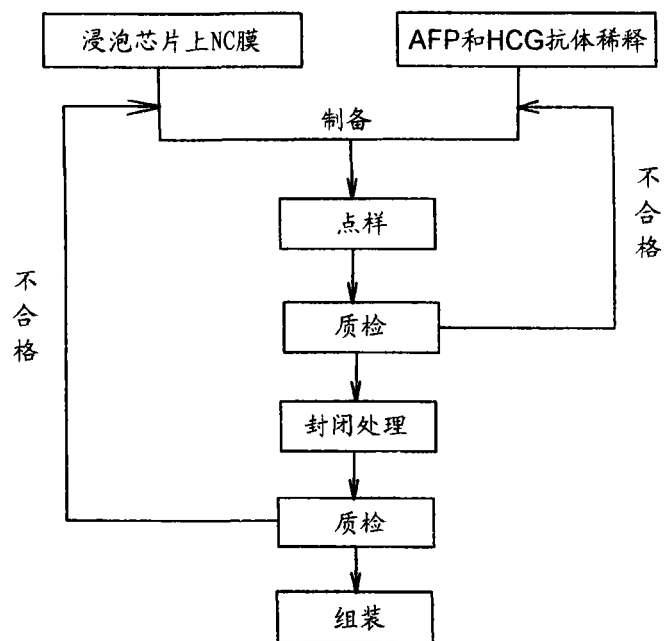


图1

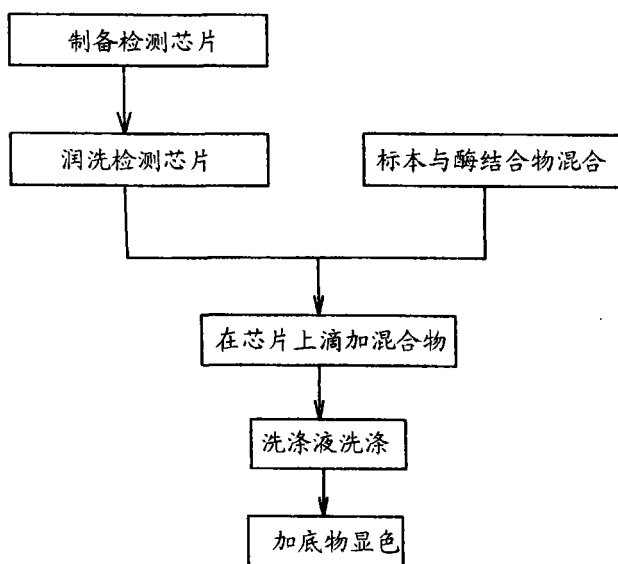


图2

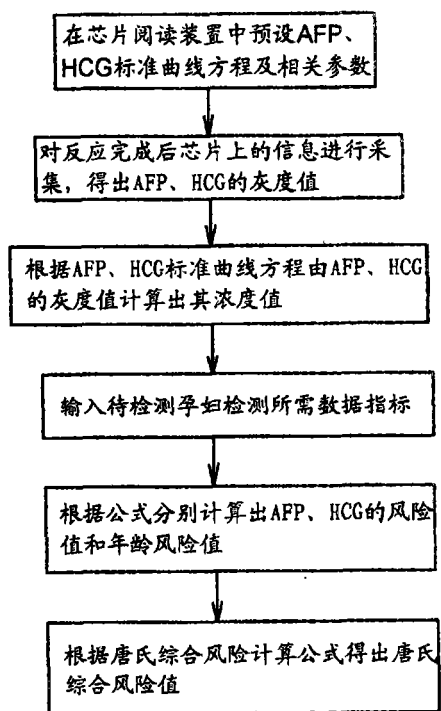


图 3

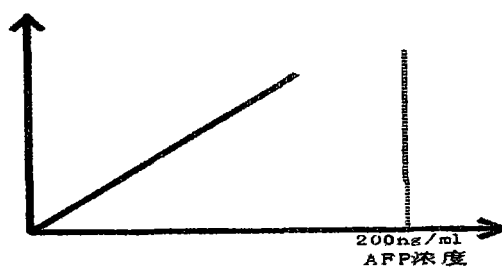


图 4

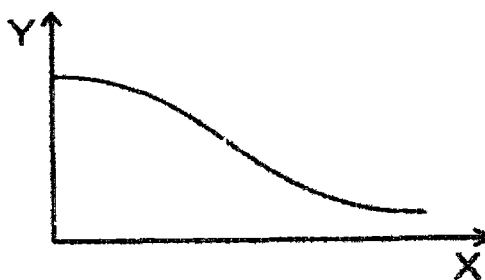


图 5

AFP 浓度	读值	HCG 浓度	读值
160ng/ml	60.403669	1ug/ml	93.214
80ng/ml	25.501287	1.5ug/ml	92.6969
40ng/ml	18.849064	2ug/ml	87.0862
30ng/ml	13.365701	2.5ug/ml	64.1656
20ng/ml	7.9209842	4ug/ml	43.3805
10ng/ml	6.3508197	5ug/ml	21.4125

图 6

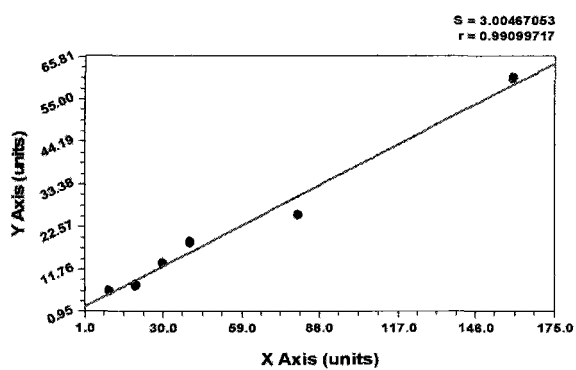


图 7

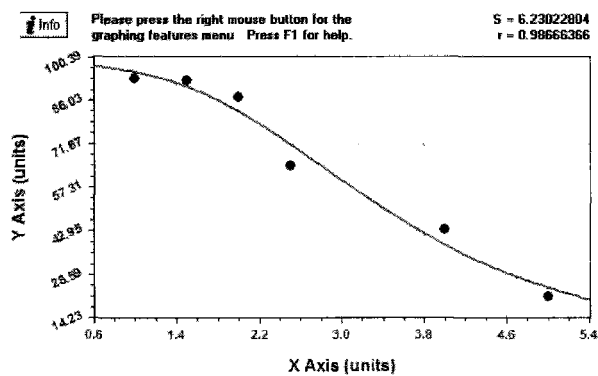


图 8

AFP

浓度 (ng/ml)	灰度值
10	7.306033
20	16.96916
30	41.25447
40	54.76714
60	74.03568
80	91.40374
120	120.12
160	157.55

图 9

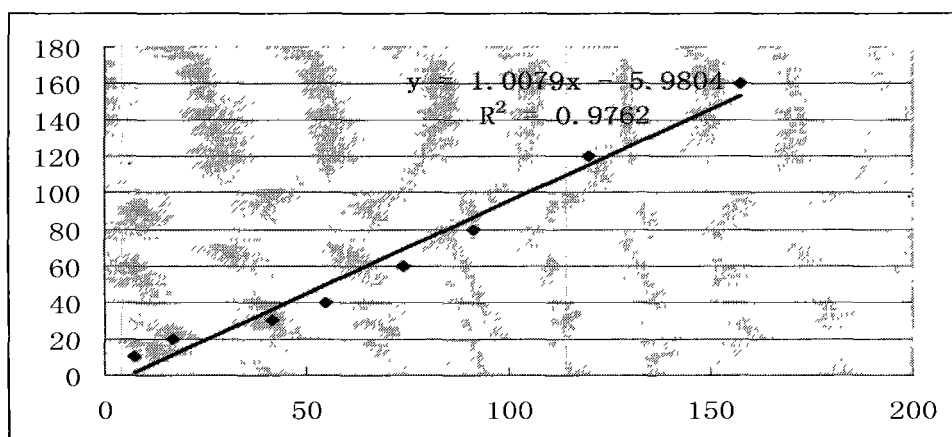


图 10

AFP 标准品浓度	AFP-HRP1: 100		计算结果	
	第一次	第二次	第一次	第二次
80ng/ml	98.58	100.38	77.60192	80.67847
	101.33	109.48	82.34463	98.15879
20ng/ml	43.16	45.14	23.49519	24.52075
	44.96	41.42	24.42373	22.62997

图 11

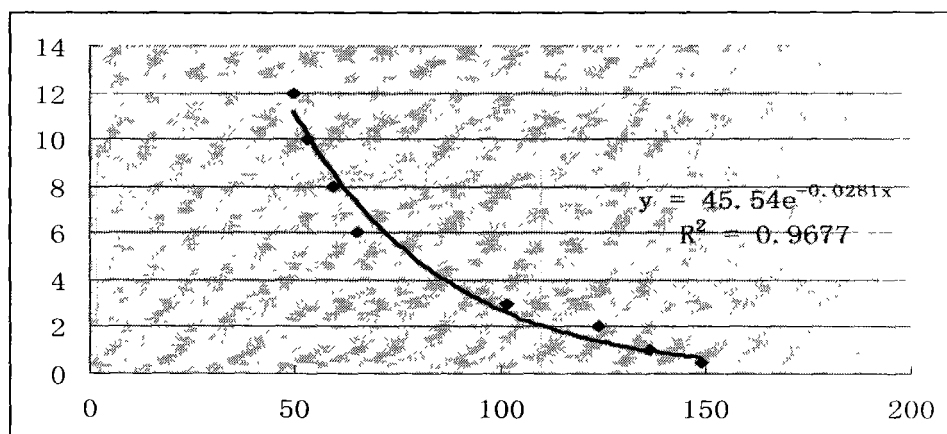


图 12

HCG 标准 品浓度	检测灰度 值
12ug/ml	50
10ug/ml	53.17593
8ug/ml	59.79661
6ug/ml	65.5053
4ug/ml	90
3ug/ml	101.6001
2ug/ml	124.1316
1ug/ml	136.5789
0.5ug/ml	148.973

图 13

血清编号	试剂盒结果 (ug/ml)	芯片结果 (ug/ml)
14W1	3.14	3.37
15W2	3.1	2.77
16W6	1.84	2.19
18W2	2.01	1.99

图 14

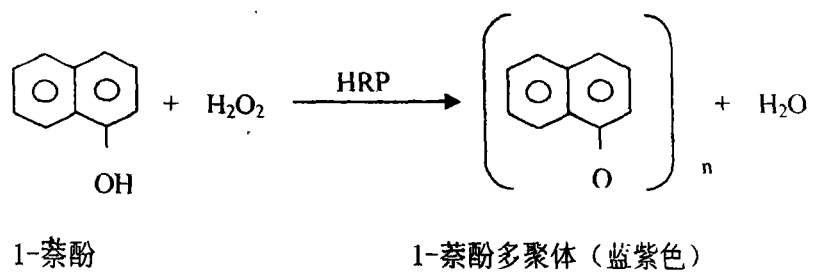


图 15

专利名称(译)	唐氏综合征检测、分析方法及检测中所用芯片的制备方法		
公开(公告)号	CN101285837A	公开(公告)日	2008-10-15
申请号	CN200710074001.0	申请日	2007-04-10
[标]发明人	许元峰 谢德康 王小明 黄列波 吴玲智 王荣娥		
发明人	许元峰 谢德康 王小明 黄列波 吴玲智 王荣娥		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N33/68 G01N33/76 G01N21/78 G06F19/00 G06F19/18		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一步检测法在唐氏综合征检测、分析方法中的应用及检测中所用芯片的制备方法。是通过将待检测标本与酶结合物相混合，再将此混合物与检测芯片上的甲胎蛋白抗体和绒毛膜促性腺激素抗体进行反应，通过添加辣根过氧化物酶催化底物实现显示反应，并通过芯片阅读装置对芯片反应结果进行数据采集、分析的一种唐氏综合征的检测方法。该方法与传统检测方法比较，避免了对孕妇血清中各项目指标的连续反复检测，实现了多种项目指标的一次性检测完成，大大缩短检验和分析的时间，在保障检测准确性的同时，提高了临床检验的效率。

