



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108195815 A

(43)申请公布日 2018.06.22

(21)申请号 201810096782.1

G01N 33/74(2006.01)

(22)申请日 2018.01.31

(71)申请人 李翀

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号中
国科学院生物物理研究所

(72)发明人 李翀 康星 张旭 范祖森
闫慧娟

(74)专利代理机构 北京创遇知识产权代理有限
公司 11577

代理人 武媛 吕学文

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

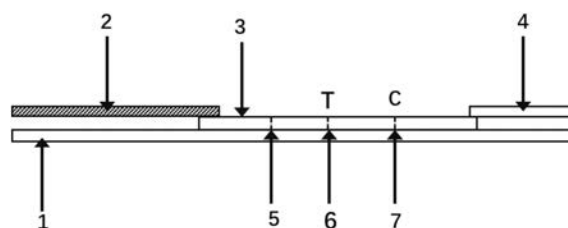
权利要求书2页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、试剂盒及方法

(57)摘要

本发明涉及一种快速、便捷、经济的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、试剂盒及方法,所述试纸条包括PVC底板、全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸;所述试剂盒包括上述时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、样本缓冲液和含有AMH标准曲线的ID卡。本发明技术方案能够满足单人份、小批量检测AMH的要求,其具有灵敏度高、特异性高、用量少、检测时间短、操作简便、检测结果准确可靠的优点。



1. 一种时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条,其特征在于,所述试纸条包括PVC底板、全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸;所述全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上;所述抗体承载膜包括基底膜和所述基底膜上依次涂有的相互平行的微球线、检测线和控制线,其中所述微球线靠近全血滤垫,所述控制线靠近吸水纸;

所述控制线由兔抗小鼠IgG组成,所述检测线由AMH单克隆抗体组成,微球线由结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球组成。

2. 根据权利要求1所述的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条,其特征在于,所述微球线距全血滤垫4~6mm;所述微球线和检测线间距为4~6mm;且所述检测线和控制线的间距为4~6mm。

3. 根据权利要求2所述的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条,其特征在于,所述微球线、检测线和控制线均为实心线状。

4. 根据权利要求3所述的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条,其特征在于,所述抗体承载膜的基底膜为硝酸纤维素膜。

5. 根据权利要求4所述的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条,其特征在于,所述试纸条还包括外壳,所述外壳将全血滤垫、抗体承载膜、吸水纸和PVC底板装入其中,所述外壳包括上壳和下壳,上壳将全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸压紧在PVC底板上,且上壳在对应全血滤垫和抗体承载膜的部分分别设有加样孔和观察窗。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括下列步骤:

(1) 时间分辨荧光微球的预处理

将时间分辨荧光微球用超声分散处理1min后,取200 μ l,17500rpm高速离心20min后去除上清液,沉淀物用10~100mmol/L,pH为6.0的MES缓冲液洗涤;加入碳二亚胺和琥珀酰亚胺,使二者终浓度均为0.1mg/ml,室温反应10~30min后,17500rpm高速离心20min,沉淀物用pH为6.0的MES溶液洗涤并重悬至1ml,获得时间分辨荧光微球溶液;

(2) 结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球的制备

每250 μ l上述时间分辨荧光微球溶液中加入50~200 μ g AMH单克隆抗体,混匀,室温反应1.5~2.5小时,用含1~2%BSA的10~50mmol/L、pH为7.5~8.5的Tris-HCl封闭液室温封闭2小时后,17500rpm高速离心20min,用含0.2~1%BSA、0.2~0.3%Tween20、0.1%NaN₃的10~50mmol/L、pH为7.5~8.5的Tris-HCl保存液洗涤并重悬至250 μ l,于4 $^{\circ}$ C避光保存,获得结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球溶液;

(3) 抗体承载膜的制备

用含有1%蔗糖的10mmol/L PBS缓冲液分别稀释兔抗小鼠IgG和小鼠抗人AMH单克隆抗体至浓度0.5~1.5mg/ml,取上述结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球溶液100 μ l,17500rpm高速离心20min,用200 μ l-500 μ l含0.5~1%BSA、0.2~0.3%Tween20、10%蔗糖的10~50mmol/L、pH为7.5~8.5的Tris-HCl微球重悬液重悬;用定量喷膜仪以1~5 μ l/cm的量在硝酸纤维素膜上间隔4~6mm平行喷涂控制线、检测线和微球线;放入烘箱,35~38 $^{\circ}$ C避光烘干,加入干燥剂封存备用;

(4) 试纸条的组装

在PVC底板上依次搭接粘贴全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸,使得微球线靠近全血滤

垫,控制线靠近吸水纸,得到试纸板,再将试纸板切割得到所述时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述制备方法还包括,用外壳将全血滤垫、抗体承载膜、吸水纸和PVC底板装入其中,并将全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸压紧在PVC底板上,且外壳中的上壳在对应全血滤垫和抗体承载膜的部分分别设有加样孔和观察窗。

8. 一种时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1-5中任一项所述的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、样本缓冲液和含有AMH标准曲线的ID卡。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述样本缓冲液的制备包括:在pH 7.5~8.5的Tris-HCl缓冲液中溶入0.5%NaCl、0.5%BSA和1%Tween20,100 μ l/管分装至离心管中;

所述含有AMH标准曲线的ID卡的烧制包括:通过所述试纸条测定不同浓度的AMH校准品,以AMH校准品浓度为X轴,检测线、控制线荧光强度的比值为Y轴,绘制成标准曲线,写入并生成条码信息存储在ID卡中。

10. 一种应用权利要求8或9所述的试剂盒检测AMH的方法,所述方法包括下列步骤:

(1) 将待检测样本及检测试剂复温至室温;

(2) 取100 μ l待测全血加入100 μ l样本缓冲液中,混匀,获得混合样本;

(3) 吸取上述混合样本100 μ l,加入到试纸条的加样孔中,室温避光反应15分钟;

(4) 开启干式荧光免疫分析仪,初始化自检完毕后插入对应检测AMH的ID卡;

(5) 将试纸条插入仪器的试纸条插口中,运行仪器,通过分析软件自动计算出待检测样本中的AMH浓度。

时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、试剂盒及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及激素检测技术领域,具体涉及一种时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、试剂盒及方法。

背景技术

[0002] 抗缪勒管激素 (Anti-Müllerian hormone, AMH), 也被称为缪勒管抑制激素 (Müllerian-inhibiting hormone MIH), 是一种结构上与转化生长因子- β (TGF- β) 超家族成员抑制素和激活素相关的糖蛋白激素, 其主要作用是调控生长分化和卵泡生成。在男性胚胎中, AMH由男性胎儿的睾丸Sertoli细胞SOX9基因激活, 其表达抑制女性生殖道或缪勒管(副中肾管)的发展, 从而抑制输卵管、子宫和阴道的产生。AMH的表达在胚胎发育的特定时期对性别分化至关重要。在女性中, AMH由窦前颗粒细胞和小窦状卵泡分泌, 直至绝经期逐渐停止。AMH通过抑制卵泡的募集和优势卵泡选择来调节卵泡生长。卵巢内的小窦卵泡数量越多, AMH的浓度便越高; 反之, 当卵泡随着年龄及各种因素逐渐消耗, AMH浓度也会随之降低。因此AMH可作为预测卵巢储备功能的分子标志物。随着AMH的作用被越来越多的人所认识, AMH在妇科内分泌疾病、生殖医学、性别异常等领域的应用越来越受到关注。具体而言, AMH有以下用途:

[0003] 评价大体生育能力方面, 比较个人的AMH水平与同年龄段的平均水平在评价生育能力方面是有帮助的。它提供了一个确定女性卵巢储备的指南, 能够识别可能需要考虑卵子冷冻或尽快尝试怀孕的女性, 而不是等以后她们的长期生育能力变差的时候再考虑尝试生育。

[0004] 体外受精方面, AMH是预测体外受精 (IVF) 中卵巢低反应的有利工具。此外, AMH水平还能用于评价一位女性的剩余卵子供应量。根据NICE体外受精指南, $AMH \leq 5.4 \text{ pmol/l}$ (0.8 ng/mL) 预示着卵巢过度刺激低反应, 而 $AMH \geq 25 \text{ pmol/l}$ (3.6 ng/mL) 预示高反应。其次, AMH水平越高, IVF后出生几率越大。因此, AMH可用于合理化制定排卵诱导方案, 决定辅助生殖技术中转移胚胎的数量, 以最大限度地提高妊娠成功率, 同时尽量减少卵巢过度刺激综合征 (OHSS) 发生的风险。AMH预测对于OHSS过度反应的敏感性和特异性分别为82%和76%。但AMH水平应结合经阴道卵巢扫描结果综合评估卵泡数量和卵巢体积。

[0005] 女性肿瘤方面: 放疗和化疗会损伤卵巢储备。在这种情况下, 治疗前AMH检测能够预测长期化疗后卵巢功能丧失程度, 决定是否采取生育能力保存策略, 如卵母细胞的冷冻保存。而治疗后AMH检测往往预示着生育能力下降。颗粒细胞瘤卵巢分泌AMH, AMH测试在诊断这些肿瘤方面的灵敏度在76和93%之间。

[0006] 多囊卵巢综合征 (PCOS) 是一种最常见于育龄期妇女的内分泌疾病, 其特点是寡或无排卵、雄激素增多, 多囊卵巢。这类患者的AMH高出正常值的二到三倍。

[0007] 越来越多的人认为, AMH是一种诊断或提示PCOS的工具或生物标志物。

[0008] AMH是一个崭新的检测指标, 相较于现有的性激素检测项目, 它具有以下优点: AMH水平不受月经周期内与周期之间的变化影响; AMH可在月经周期内的任何时间抽血检查;

AMH不受激素避孕药的影响,便于临床使用;AMH可更早、更准确地反映年龄相关卵巢储备功能的下降。

[0009] 目前用于检测AMH的方法主要有酶联免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)、电化学发光法(electro-chemiluminescence immunoassay,ECLI)、化学发光法(chemiluminescent immunoassay,CLI)等,但这些方法都存在以下缺陷:检测设备要求高,成本高;干扰因素较多,重复性不好;检测时间长。因此这些方法都不适合AMH的临床快速诊断。

[0010] 目前常用于快速诊断的试纸条多基于胶体金或荧光素标记的方法。胶体金法在定量和灵敏度上存在弊端。荧光素标记灵敏度为 10^{-10} mol/L;背景信号强,有非特异荧光,特异性低;荧光素标记对光不稳定,容易发生光漂白现象,发光效率低,使分析结果可靠性和重复性降低;背景信号强,吸收光谱较窄,发射光谱较宽,Stokes位移小,容易发生光谱的交叠,影响结果准确度。

[0011] 时间分辨荧光免疫层析法(time-resolved fluorescence Immunoassay,TRFIA)用镧系元素(三价稀土离子及其螯合物)作为示踪物,标记抗原或抗体,免疫反应发生时,用时间分辨荧光分析仪测定免疫反应最后产物的荧光强度,再根据荧光强度和相对荧光强度比值,判断反应体系中分析物的浓度,达到定量分析的目的。TRFIA的灵敏度高达 10^{-18} mol/L;特异性强,通过时间延迟,将特异性荧光与非特异性荧光分辨开来,使理论本底达到0;荧光寿命极长,极长的荧光衰退时间,发光效率高,非常稳定;发射光谱带较窄,激发光谱带较宽,Stokes位移大,因此干扰少,灵敏度高,结果准确度高。

[0012] 然而,现有技术中针对采用TRFIA的干式荧光免疫分析仪,缺少一种能够快速、便捷、经济使用的试剂盒及方法,使其能够满足单人份、小批量检测AMH的要求。

发明内容

[0013] 本发明的目的是针对现有技术的不足,结合干式荧光免疫分析仪,提供一种快速、便捷、经济的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、试剂盒及方法,从而能够满足单人份、小批量检测AMH的要求,其具有灵敏度高、特异性高、用量少、检测时间短、操作简便、检测结果准确可靠的优点。

[0014] 为实现上述目的,本发明的第一个方面提供了一种时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条,所述试纸条包括PVC底板、全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸;全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸依次搭接粘贴在PVC底板上;所述抗体承载膜包括基底膜和基底膜上依次涂有的相互平行的微球线、检测线和控制线,其中所述微球线靠近全血滤垫,控制线靠近吸水纸;

[0015] 所述控制线由兔抗小鼠IgG组成,检测线由AMH单克隆抗体组成,微球线由结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球组成。

[0016] 进一步的,所述全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸依次相互交错1.8-2.3mm搭接粘贴在PVC底板上。上述相互交错尺寸优选为2mm。

[0017] 进一步的,所述微球线距全血滤垫4~6mm。

[0018] 进一步的,所述微球线和检测线间距为4~10mm;且所述检测线和控制线的间距为4~10mm。优选上述范围分别为4~6mm,更优选5~6mm。

[0019] 通过上述间距的设置,使得所述试纸条检测AMH的灵敏度和特异性达到最优化。

[0020] 进一步的,所述微球线、检测线和控制线均为实心线状。

[0021] 进一步的,所述抗体承载膜的基底膜为硝酸纤维素膜。

[0022] 硝酸纤维素又称硝化纤维素、纤维素硝酸酯,为纤维素与硝酸酯化反应的产物。以棉纤维为原料的硝酸纤维素称为硝化棉。硝酸纤维素是一种白色纤维状聚合物,耐水、耐稀酸、耐弱碱和各种油类。尤其适于作为本发明抗体承载膜的基底膜材质,可以使得所获得的抗体承载膜的理论层析速度达到15min左右。

[0023] 进一步的,所述AMH单克隆抗体为小鼠抗人AMH单克隆抗体。

[0024] 进一步的,所述试纸条还包括外壳,外壳将全血滤垫、抗体承载膜、吸水纸和PVC底板装入其中,外壳包括上壳和下壳,上壳将全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸压紧在PVC底板上,且上壳在对应全血滤垫和抗体承载膜的部分分别设有加样孔和观察窗。

[0025] 所述试纸条可用于干式荧光免疫分析仪的检测。

[0026] 本发明的第二个方面提供了上述时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条的制备方法,所述制备方法包括下列步骤:

[0027] (1) 时间分辨荧光微球的预处理

[0028] 将时间分辨荧光微球用超声分散处理1min后,取200 μ l,17500rpm高速离心20min后去除上清液,沉淀物用10~100mmol/L,pH为6.0的MES缓冲液洗涤;加入碳二亚胺和琥珀酰亚胺,使二者终浓度均为0.1mg/ml,室温反应10~30min后,17500rpm高速离心20min,沉淀物用pH为6.0的MES溶液洗涤并重悬至1ml,获得时间分辨荧光微球溶液。

[0029] (2) 结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球的制备

[0030] 每250 μ l上述时间分辨荧光微球溶液中加入50~200 μ g AMH单克隆抗体,混匀,室温反应1.5~2.5小时,用含1~2%BSA的10~50mmol/L、pH为7.5~8.5的Tris-HCl封闭液室温封闭2小时后,17500rpm高速离心20min,用含0.2~1%BSA、0.2~0.3%Tween20、0.1%Na₃的10~50mmol/L、pH为7.5~8.5的Tris-HCl保存液洗涤并重悬至250 μ l,于4 $^{\circ}$ C避光保存,获得结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球溶液。

[0031] (3) 抗体承载膜的制备

[0032] 用含有1%蔗糖的10mmol/L PBS缓冲液分别稀释兔抗小鼠IgG和小鼠抗人AMH单克隆抗体至浓度0.5~1.5mg/ml,取上述结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球溶液100 μ l,17500rpm高速离心20min,用200 μ l~500 μ l含0.5~1%BSA、0.2~0.3%Tween20、10%蔗糖的10~50mmol/L、pH为7.5~8.5的Tris-HCl微球重悬液重悬;用定量喷膜仪以1~5 μ l/cm的量在硝酸纤维素膜上间隔4~6mm平行喷涂控制线、检测线和微球线;放入烘箱,35~38 $^{\circ}$ C避光烘干,加入干燥剂封存备用。

[0033] (4) 试纸条的组装

[0034] 在PVC底板上依次搭接粘贴全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸,使得微球线靠近全血滤垫,控制线靠近吸水纸,得到试纸板,再将试纸板切割得到所述时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条。

[0035] 所述试纸条的制备方法还包括,用外壳将全血滤垫、抗体承载膜、吸水纸和PVC底板装入其中,并将全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸压紧在PVC底板上,且外壳中的上壳在对应全血滤垫和抗体承载膜的部分分别设有加样孔和观察窗。

[0036] 本发明的第三个方面提供了一种时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试剂盒,所述试剂盒包括上述时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、样本缓冲液和含有AMH标准曲线的ID卡。

[0037] 所述样本缓冲液的制备包括:在pH 7.5~8.5的Tris-HCl缓冲液中溶入0.5% NaCl、0.5% BSA和1% Tween20,100 μ l/管分装至离心管中。该样本缓冲液用于层析样品。

[0038] 所述含有AMH标准曲线的ID卡的烧制包括:通过所述试纸条测定不同浓度的AMH校准品,以AMH校准品浓度为X轴,检测线、控制线荧光强度的比值为Y轴,绘制成标准曲线,写入并生成条码信息存储在D卡中。当检测AMH浓度时,干式荧光免疫分析仪可读取试纸条外壳上对应的条码信息。

[0039] 本发明的第四个方面提供了一种应用上述试剂盒检测AMH的方法,所述方法包括下列步骤:

[0040] (1) 将待检测样本及检测试剂复温至室温;

[0041] (2) 取100 μ l待测全血加入100 μ l样本缓冲液中(如前所述,样本缓冲液已分装成100 μ l/管),混匀,获得混合样本;

[0042] (3) 吸取上述混合样本100 μ l,加入到试纸条的加样孔中,室温避光反应15分钟;

[0043] (4) 开启干式荧光免疫分析仪,初始化自检完毕后插入对应检测AMH的ID卡;

[0044] (5) 将试纸条插入仪器的试纸条插口中,运行仪器,通过分析软件自动计算出待检测样本中的AMH浓度。

[0045] 本发明所述时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试剂盒的检测原理是双抗夹心法。其中,所述微球线为时间分辨荧光微球标记的AMH单克隆抗体;所述检测线包被有小鼠抗人AMH单克隆抗体;所述控制线包被有兔抗小鼠IgG抗体。测试时在全血滤垫上滴加待检测样本稀释液,通过层析作用,待检测样本向吸水纸端移动,流经微球线时将时间分辨荧光微球标记的AMH单克隆抗体复溶,若待检测样本中含有待测抗原,即形成微球抗体-抗原复合物,移至检测线时形成微球抗体-抗原-抗体复合物,微球抗体被固定下来,多余的微球标记抗体移至控制线被兔抗小鼠抗体捕获。避光反应结束后用干式荧光免疫分析仪检测,得到检测线和控制线荧光强度的强弱及其比值,仪器软件结合ID卡中信息,将实际检测值代入预设的标准曲线中即可分析出样品中待测物的浓度。

[0046] 本发明技术方案具有如下优点:

[0047] 本发明试剂盒能够准确定量检测人全血中AMH的含量,利用时间分辨荧光层析技术,可避免样本本身的荧光干扰,具有特异性强、灵敏度高、准确度高等特点;标准曲线预设于ID卡中,可实现单人份、小批量检测,无需每次检测都制作标准曲线;检测样本为全血,不受检测场地限制,检测快速,操作简便。

附图说明

[0048] 图1为本发明的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条的侧面结构示意图;

[0049] 其中:1、底板;2、全血滤垫;3、抗体承载膜;4、吸水纸;5、微球线;6、检测线;7、控制线。

[0050] 图2为本发明的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条的正面结构示意图。

[0051] 图3为本发明实施例2中检测AMH的ID卡中存储的标准曲线。

[0052] 图4为应用本发明制备的试剂盒与罗氏AMH试剂盒(电化学发光法)检测结果相关性的比较。

具体实施方式

[0053] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步的描述,但本发明的保护范围并不限于此。

[0054] 实施例1:时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试剂盒的制备

[0055] 时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试剂盒,采用双抗夹心法免疫层析原理,检测人全血中AMH含量。所述试剂盒由时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、样本缓冲液和含有AMH标准曲线的ID卡组成。在此实施例中,如图1和图2所示:PVC底板1上依次搭接着全血滤垫2、抗体承载膜3(硝酸纤维素膜作为基底膜)和吸水纸4;抗体承载膜3上设有微球线5、检测线6和控制线7;全血滤垫2作为加样区,用于吸取待检全血样本。

[0056] 微球线上使用含有稀土荧光染料的聚丙烯球包被小鼠抗人AMH单克隆抗体,固含量1%(1ml溶液中含有10mg微球颗粒),微球的平均粒径为200nm,激发波长360nm,发射波长615nm;包被浓度为50 μ g抗体/250 μ l荧光微球;检测线中小鼠抗人AMH单克隆抗体包被浓度为1mg/ml;质控线中兔抗小鼠IgG抗体包被浓度为0.5mg/ml。微球线用定量喷膜仪以3 μ l包被液量/cm喷涂于硝酸纤维素膜上;检测线和控制线用定量喷膜仪以1 μ l包被液量/cm喷涂于硝酸纤维素膜上。所用时间分辨荧光微球采购自美国Bangs Lab公司,小鼠抗人AMH单克隆抗体和兔抗小鼠IgG抗体采购自杭州博茵生物技术有限公司。

[0057] 在该实施例中,其中所述的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条采用如下方法制备:

[0058] (1) 时间分辨荧光微球的预处理

[0059] 将时间分辨荧光微球用超声分散处理1min后,取200 μ l,17500rpm高速离心20min后去除上清液,沉淀物用1ml 50mmol/L,pH为6.0的MES缓冲液洗涤;加入20 μ l碳二亚胺和20 μ l琥珀酰亚胺,使二者终浓度均为0.1mg/ml,室温反应30min后,17500rpm高速离心20min,沉淀物用pH为6.0的MES溶液洗涤并重悬至1ml,获得时间分辨荧光微球溶液;

[0060] (2) 结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球的制备

[0061] 每250 μ l上述时间分辨荧光微球溶液中加入50 μ g AMH单克隆抗体,混匀,室温反应2小时,用含1%BSA的50mmol/L、pH为8.0的Tris-HCl封闭液室温封闭2小时后,17500rpm高速离心20min,用含0.1%BSA、0.2%Tween20、0.1%NaN₃的50mmol/L、pH为8.0的Tris-HCl保存液洗涤并重悬至250 μ l,于4 $^{\circ}$ C避光保存,获得结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球溶液;

[0062] (3) 抗体承载膜的制备

[0063] 用含有1%蔗糖的10mmol/L PBS缓冲液分别稀释兔抗小鼠IgG和小鼠抗人AMH单克隆抗体至浓度1mg/ml,取上述结合AMH单克隆抗体的时间分辨荧光微球溶液100 μ l,17500rpm高速离心20min,用200 μ l-500 μ l含0.5-1%BSA、0.2-0.3%Tween20、10%蔗糖的10~50mmol/L、pH为7.5~8.5的Tris-HCl微球重悬液重悬;用定量喷膜仪以1 μ l/cm的量在硝酸纤维素膜上平行喷涂控制线和检测线,间隔4mm,用定量喷膜仪以3 μ l/cm的量在硝酸纤维素膜上平行喷涂微球线,间隔检测线4mm;放入37 $^{\circ}$ C烘箱避光烘干10小时,加入干燥剂封存

备用；

[0064] (4) 试纸条的组装

[0065] 在PVC底板(尺寸为80*300mm)上依次相互交错2mm搭接粘贴全血滤垫(尺寸为30*300mm,玻璃纤维棉材质)、抗体承载膜(尺寸为25*300mm,硝酸纤维素质)和吸水纸(尺寸为28*300mm),其中微球线靠近全血滤垫,控制线靠近吸水纸,从而得到试纸板,切割成4mm的试纸条。

[0066] 检测AMH的试纸条组装在由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料外壳中,塑料上壳上设有加样孔和观察窗,加样孔对应于AMH检测试纸条的全血滤垫2,结果观察窗对应于AMH检测试纸条的检测线6和控制线7。

[0067] 该实施例试剂盒包含的样本缓冲液为在pH 8.0的Tris-HCl缓冲液中溶入0.5% NaCl、0.5%BSA和1%Tween20,以100 μ l/管分装于离心管中。该样本缓冲液用于层析样品。

[0068] 该实施例试剂盒中,每盒均匹配一个含有AMH标准曲线的ID卡,相同批次的产品标准曲线相同,通过所述AMH试纸条测定不同浓度的校准品,以校准品浓度为X轴,检测线、控制线荧光强度的比值为Y轴,绘制成标准曲线,写入并生成相应条码信息存储在ID卡中,并打印出匹配的条码粘贴在试纸条外壳上。检测浓度时,ID卡插入仪器ID卡插口,干式荧光免疫分析仪读取试纸条外壳上对应的条码信息,获取相应的标准曲线。

[0069] 实施例2:时间分辨荧光免疫层析检测AMH浓度

[0070] 按实施例1制备好的试纸条中加入不同浓度的人AMH抗原校准品(16.0ng/ml、8.0ng/ml、4.0ng/ml、2.0ng/ml、1.0ng/ml、0.5ng/ml、0.1ng/ml、0.0ng/ml共八个浓度,每个浓度设置三个重复,均由1.0mg/ml人AMH抗原用样本缓冲液稀释而成),层析15min后,通过江苏苏州和迈精密仪器生物制药有限公司生产的FIC-S1型干式荧光免疫分析仪读取检测线、控制线的荧光强度比值(检测线检测值/控制线检测值)。

[0071] 以AMH校准品浓度为X轴,以样品检测线荧光强度/控制线荧光强度为Y轴建立方程并拟合成标准曲线,标准曲线如图3所示。R值为0.9982。

[0072] 该过程具体包括下列步骤:

[0073] (1) 将待检测样本及检测试剂复温至室温;

[0074] (2) 取100 μ l待测全血加入100 μ l样本缓冲液中(如前所述,已分装成100 μ l/管),混匀,获得混合样本;

[0075] (3) 吸取上述混合后样本100 μ l,加入到试纸条的加样孔中,室温避光反应15分钟;

[0076] (4) 开启干式荧光免疫分析仪,初始化自检完毕后插入对应检测AMH的ID卡;

[0077] (5) 将试纸条插入仪器的试纸条插口中,运行仪器,通过相应的分析软件自动计算出待测样本中的AMH的浓度。

[0078] 临床样本检测

[0079] 采集医院检测AMH的全血样本60份,用本发明的试剂盒与罗氏电化学发光法检测AMH的试剂盒进行比较。本发明试剂盒中,取全血100 μ l加入样本缓冲液,混匀后取100 μ l加入到检测卡加样孔中,层析15分钟后通过苏州和迈精密仪器有限公司生产的FIC-S1型干式荧光免疫分析仪读取浓度,同一血样采用对比系统罗氏电化学发光法检测AMH试剂盒进行浓度检测。两种方法检测结果进行线性分析,如图4所示,其相关性很好 $R=0.983$, $P>0.05$,平均相对偏差小于10%,结果符合临床分析要求,适合用于临床检测。

[0080] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施例对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

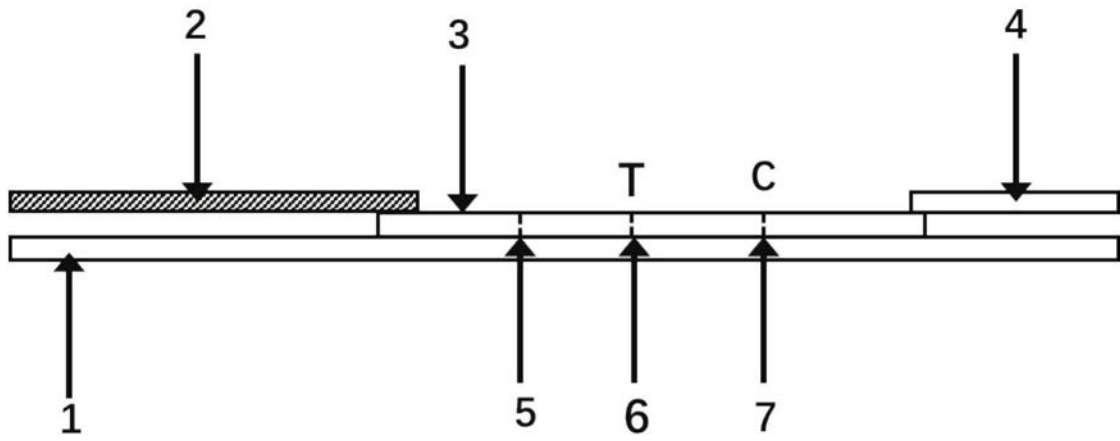


图1

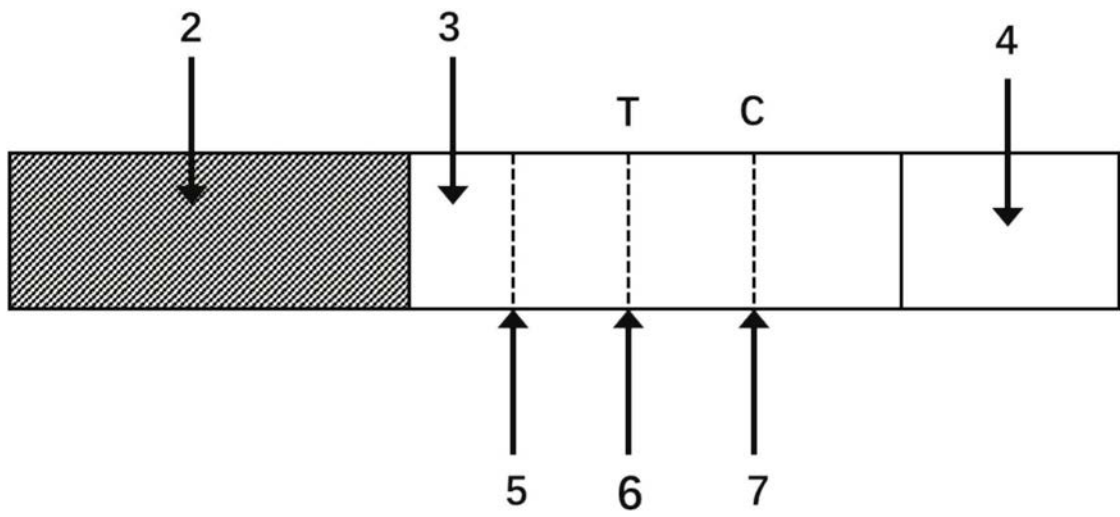


图2

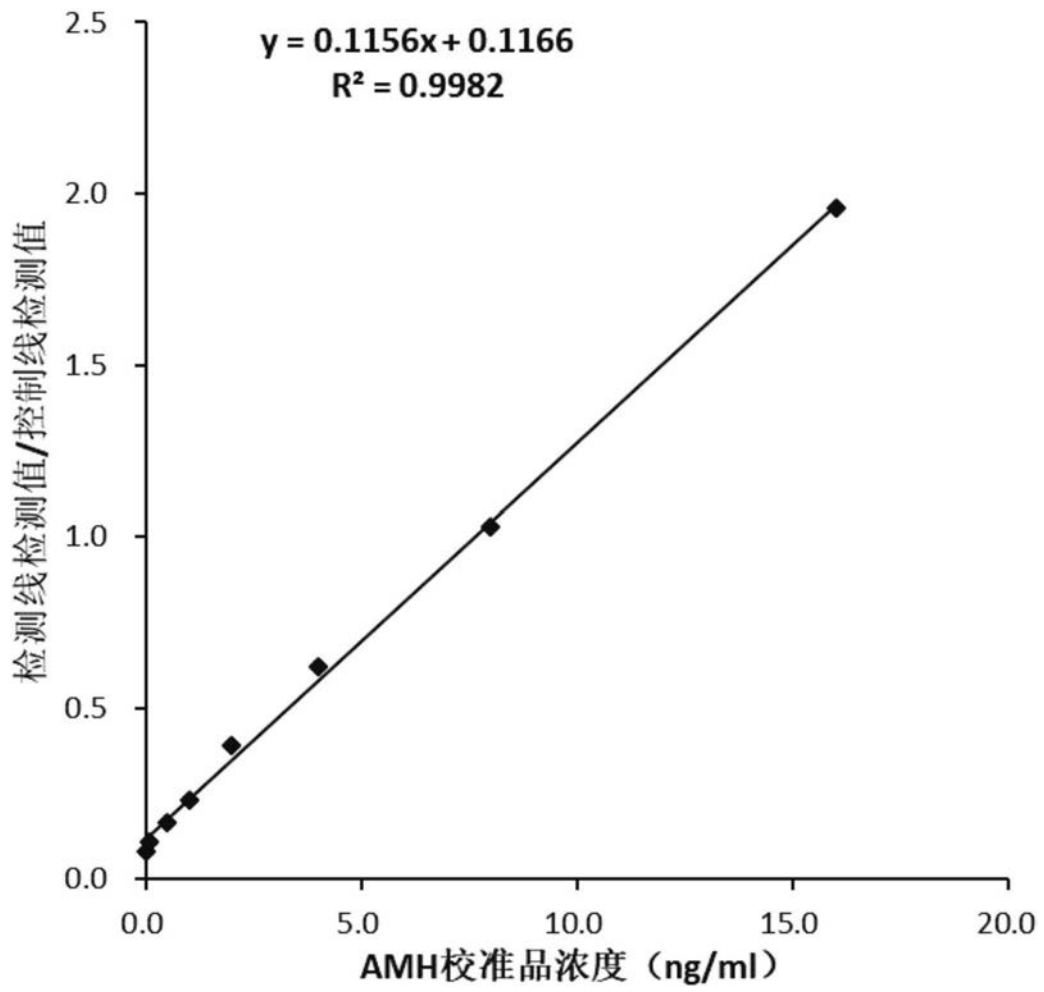


图3

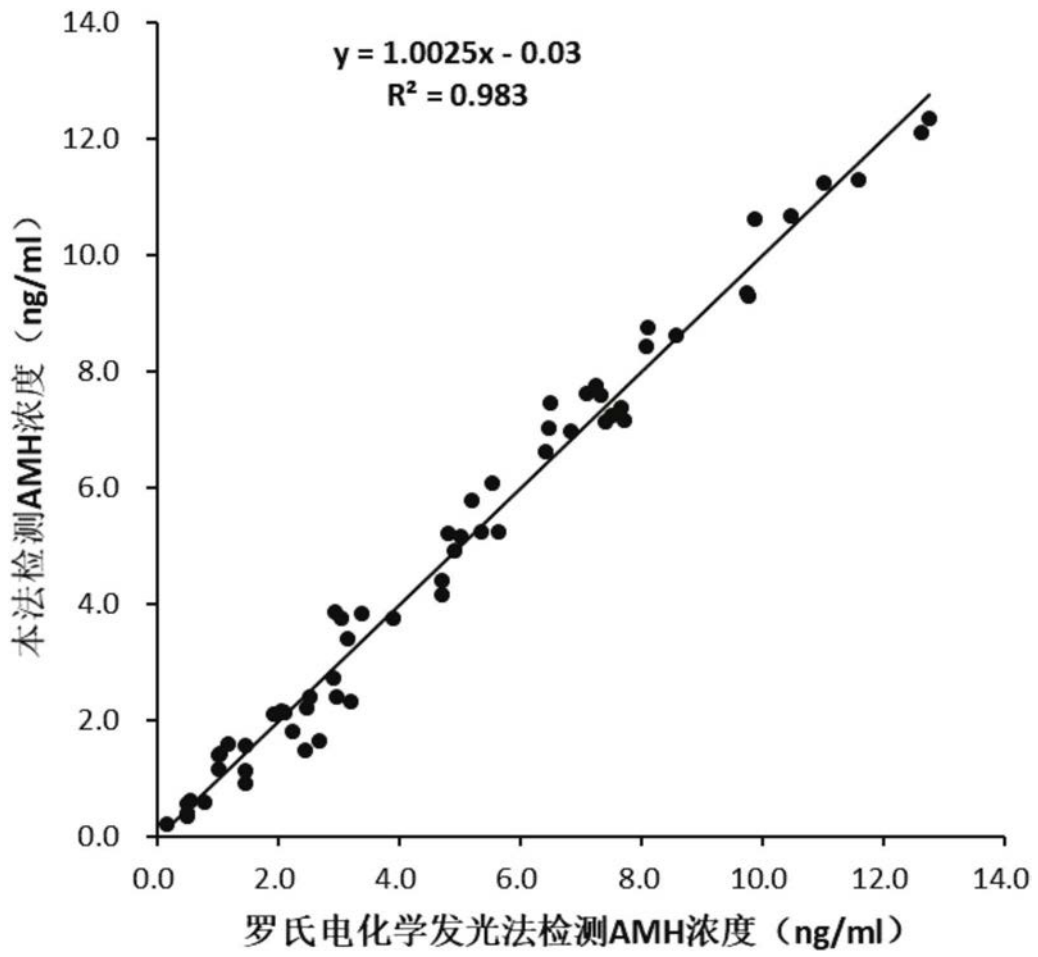


图4

专利名称(译)	时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、试剂盒及方法		
公开(公告)号	CN108195815A	公开(公告)日	2018-06-22
申请号	CN201810096782.1	申请日	2018-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	李翀		
申请(专利权)人(译)	李翀		
当前申请(专利权)人(译)	李翀		
[标]发明人	李翀 康星 张旭 范祖森 闫慧娟		
发明人	李翀 康星 张旭 范祖森 闫慧娟		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/74		
CPC分类号	G01N21/6486 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/74 G01N2333/575		
代理人(译)	武媛 吕学文		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种快速、便捷、经济的时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、试剂盒及方法，所述试纸条包括PVC底板、全血滤垫、抗体承载膜和吸水纸；所述试剂盒包括上述时间分辨荧光免疫层析法检测AMH的试纸条、样本缓冲液和含有AMH标准曲线的ID卡。本发明技术方案能够满足单人份、小批量检测AMH的要求，其具有灵敏度高、特异性高、用量量少、检测时间短、操作简便、检测结果准确可靠的优点。

