



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107621540 A

(43)申请公布日 2018.01.23

(21)申请号 201710749748.5

(22)申请日 2017.08.31

(71)申请人 德迈基生物技术(北京)有限公司  
地址 100070 北京市丰台区科学城海鹰路8  
号2号楼105室

(72)发明人 李道锋 潘文东 朱建峰 贺率

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图2页

### (54)发明名称

定量检测抗缪勒管激素(AMH)的双光子荧光  
免疫层析试剂盒及其制备方法

### (57)摘要

本发明公开了一种以荧光染料为标记物的双光子荧光免疫定量检测抗缪勒管激素(AMH)荧光免疫层析试剂盒。本发明的双光子荧光免疫层析试剂盒实现了对抗缪勒管激素(AMH)的荧光免疫定量检测,具有稳定性好、线性范围宽、特异性好、灵敏度高、定量准确以及简单快速的优势,可同时检测全血、血清及血浆样品,并适用于各级医院及家庭医疗。

1. 一种定量检测抗缪勒管激素 (AMH) 的双光子荧光免疫层析试剂盒, 包括扣卡 (11)、荧光免疫层析试纸条和Wash缓冲液, 其特征在于:

扣卡 (11) 为荧光免疫层析试纸条的外部壳结构, 包括加样孔 (9) 和观察窗 (10);

荧光免疫层析试纸条包括样品垫 (1)、标记垫 (2)、层析膜 (6)、吸水垫 (7) 和底板 (8), 样品垫 (1)、标记垫 (2)、层析膜 (6) 和吸水垫 (7) 搭载于底板 (8) 之上, 样品垫 (1) 位于加样孔 (9) 的下方, 且连接于标记垫 (2), 标记垫 (2) 连接于层析膜 (6), 层析膜 (6) 连接于吸水垫 (7), 层析膜 (6) 上固定有一条定量检测线 (4) 和一条质控线 (5), 检测线 (4) 和质控线 (5) 位于观察窗 (10) 的下方;

标记垫 (2) 上同时固定有荧光染料修饰的 (AMH) 特异性抗体, 和荧光染料修饰的质控分子, 修饰抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体的荧光染料的发射波长与修饰质控分子的荧光染料的发射波长相同, 波长范围为300-500nm;

定量检测线 (4) 上固定有荧光染料修饰的抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体, 该特异性抗体所识别的抗原决定簇与固定在标记垫 (2) 上的荧光染料修饰的抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体所识别的抗原决定簇不同; 以及质控线 (5) 上固定有能与质控分子特异性结合的荧光染料修饰的生物分子, 修饰包被抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体的荧光染料的发射波长与修饰质控分子的荧光染料的发射波长相同, 波长范围为500-800nm。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述荧光免疫层析试纸条还包括血液分离膜 (3), 其设置在标记垫 (2) 和层析膜 (6) 之间, 此时标记垫 (2) 连接于血液分离膜 (3), 血液分离膜 (3) 连接于层析膜 (6); 或者设置在样品垫 (1) 和标记垫 (2) 之间, 此时样品垫 (1) 连接于血液分离膜 (3), 血液分离膜 (3) 连接于标记垫 (2); 或者直接与样品垫 (1) 合并为同一结构。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述标记荧光染料为有机荧光染料、稀土元素荧光染料或者量子点荧光染料, 发射波长为300-500nm, 本例选365nm。荧光染料为有机荧光染料、稀土元素荧光染料或者量子点荧光染料, 发射波长为500-800nm, 本例选635nm, 且标记和包被荧光染料可以互换。所述的其中一个染料为稀土元素荧光染料、荧光微球或者量子点荧光染料; 所述另外一个染料是机荧光染料为Alexa系列近红外荧光化合物、DyLight系列近红外荧光化合物和CF系列近红外荧光化合物中的至少一种; 其特征在于, 所述近有机荧光染料为Alexa Fluro系列 (Alexa Fluro647、610、633、700、750) 的荧光素、DyLight系列、(DyLight649、633、549、680)、CF647中的至少一种等。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述层析膜、底板和扣卡在大于550nm时荧光很弱或不含有荧光剂, 优选底板为白色, 表面附有不干胶, 且两者均不含荧光剂。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒, 其特征在于, 所述Wash缓冲液包含牛血清白蛋白、蔗糖和表面活性剂, pH值为7.0-8.0, 其中, 牛血清白蛋白的浓度为0.05~2%, 蔗糖的浓度为1~15%, 表面活性剂的浓度为0.05~2%。

6. 根据权利要求1所述的定量检测抗缪勒管激素 (AMH) 的荧光免疫层析试剂盒的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

步骤 (1): 用化学交联或生物分子间特异性作用分别将标记荧光染料偶联到标记抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体和质控分子的表面, 分别得到荧光染料修饰的抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体和荧光染料修饰的质控分子, 修饰所述质控分子的荧光染料的发射波长

与修饰抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体的荧光染料的发射波长相同, 波长范围为300~500nm; 用化学交联或生物分子间特异性作用分别将包被荧光染料偶联到包被抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体和质控分子的表面, 分别得到荧光染料修饰的包被抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体和荧光染料修饰的质控分子, 修饰所述质控分子的荧光染料的发射波长与修饰抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体的荧光染料的发射波长相同, 波长范围为500~800nm;

步骤(2): 将步骤(1)得到的荧光染料修饰的抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体和荧光染料修饰的质控分子均固定到标记垫(2)上;

步骤(3): 在层析膜(6)上分别设置一条定量检测线(4)和一条质控线(5), 其中, 质控线(5)上固定有能与质控分子特异性结合的荧光染料标记的生物分子, 定量检测线(4)上固定有荧光染料标记的抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体, 且该特异性抗体所识别的抗原决定簇与固定在标记垫(2)上的荧光染料修饰的抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体所识别的抗原决定簇不同;

步骤(4): 将样品垫(1)、标记垫(2)、层析膜(6)、吸水垫(7)和底板(8)构建成荧光免疫层析试纸条;

步骤(5): 将荧光免疫层析试纸条装卡。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其特征在于, 还包括设置血液分离膜(3)的步骤, 血液分离膜(3)设置在标记垫(2)和层析膜(6)之间, 此时标记垫(2)连接于血液分离膜(3), 血液分离膜(3)连接于层析膜(6); 或者设置在样品垫(1)和标记垫(2)之间, 此时样品垫(1)连接于血液分离膜(3), 血液分离膜(3)连接于标记垫(2); 或者直接与样品垫(1)合并为同一结构。

8. 根据权利要求6所述的方法, 其特征在于, 还包括配制Wash缓冲液的步骤, Wash缓冲液包含牛血清白蛋白、蔗糖和表面活性剂, pH值为7.0-8.0, 其中, 牛血清白蛋白的浓度为0.05~2%, 蔗糖的浓度为1~15%, 表面活性剂的浓度为0.05~2%。

## 定量检测抗缪勒管激素 (AMH) 的双光子荧光免疫层析试剂盒 及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验领域中的癌症临床免疫诊断试剂盒领域,具体涉及定量检测抗缪勒管激素 (AMH) 的双光子荧光免疫层析试剂盒。

### 背景技术

[0002] 近20多年来,辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART) 不断进步,成功率显著提高,但是卵巢储备功能仍然是影响体外受精-胚胎移植 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET) 成功率的主要因素。大量的研究发现抗缪勒管激素 (anti-Mullerian hormone, AMH) 较传统的指标能更准确的评估卵巢的储备功能和预测卵巢对促性腺激素的反应性,甚至发现卵泡合成AMH的能力与卵子和胚胎的质量相关,认为AMH可以预测ART妊娠结局,因此成为辅助生殖技术研究的热点。

[0003] 卵巢储备 (Ovarian reserve, OR) 是指卵巢皮质区卵泡生长、发育、形成可受精卵母细胞的能力,包括卵巢内存留的卵泡数量和卵泡质量两方面内容,代表女性配子发生及黄体激素生成的能力,前者可反映女性的生育潜能,后者则决定女性绝经的年龄。若卵巢内存留的可募集卵泡数量减少,卵母细胞质量下降,导致生育能力降低或出现过早绝经的倾向,称为卵巢储备降低 (Declined ovarian reserve DOR)。

[0004] 目前卵巢储备下降在育龄妇女中发生率越来越高且呈年轻化趋势。卵巢储备下降是一个渐进发展的过程,且病程中受多种因素的影响,存在个体差异性。受不同年龄阶段或不同外界因素的影响,卵巢储备下降的发生率有所不同。

[0005] 临床应用的评估卵巢储备功能的指标主要有:年龄、基础卵泡刺激素 (FSH)、雌二醇 (E2)、黄体生成激素 (LH)、FSH/LH、孕酮 (P)、抑制素B (INHB),基础窦状卵泡数 (AFC)、卵巢体积、和卵巢动脉收缩期峰血流 (PSV) 等。因以上指标都存在一定的局限性,故现今临床上仍缺乏一个早期、稳定、敏感及方便的检测指标以早期诊断DOR。近年,抗缪勒管激素 (anti-Mullerian hormone, AMH) 作为一种新型的卵巢储备指标引起广泛关注。AMH主要由卵巢小卵泡及窦前卵泡的颗粒细胞分泌,血清AMH浓度可直接反映卵巢中始基卵泡池的储备,其被认为是预测卵巢储备的可靠指标。血清AMH水平反应卵巢储备及预测卵巢储备下降的能力,同时寻找血清AMH诊断DOR的界值,为临床医师有效的评估卵巢功能,早期预测DOR,以便及时采取干预措施保护卵巢功能,提供理论依据。

[0006] 临床上不论是医生还是患者都越来越关注各种妇科手术对卵巢功能的影响,尤其是腹腔镜手术因损伤小恢复快已在临床获得广泛应用。如何评价腹腔镜不同妇科手术方式对卵巢的影响以及如何早期、有效及便捷的评估卵巢有创治疗后的卵巢储备状态,是临床医师关注的热点。通过临床对比研究,检测了血清AMH评估各种常见的卵巢、子宫及输卵管手术后卵巢储备功能的敏感性和优越性以及腹腔镜不同手术方式对卵巢储备储备的影响,旨在对妇科术后出现卵巢储备功能下降尤其是可能出现卵巢衰竭的患者进行早期筛查和及时干预,同时为临床医师术前选择适宜的手术方式以保护患者卵巢功能提供依据。

[0007] AMH引起关注的另一原因是研究发现其与多囊卵巢综合症 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 卵泡发育异常相关。AMH在 PCOS窦前卵泡中表达改变使卵泡募集增多, 生长卵泡数目增加。同时PCOS妇女明显增高的血AMH可能降低卵泡对FSH的敏感性, 抑制优势卵泡的选择, 导致PCOS卵泡发育停滞。而且发现增高的血 AMH反应了PCOS的严重程度。PCOS妇女是ART治疗中最常见的人群之一, 但关于PCOS增高的AMH与其ART中卵巢反应性以及妊娠结局的研究很少。

[0008] 此外, 目前已经明确血AMH不仅反映了窦卵泡数目, 而且与窦卵泡合成AMH的能力相关。确实, 以多个小窦卵泡增多为特征的 PCOS妇女血AMH水平的增高部分是由于单个卵泡合成AMH的能力增加。对卵巢储备功能低下的妇女, 血AMH水平的降低通常认为是由于窦卵泡数目的减少。

[0009] 目前, 临床上常用的AMH检测免疫方法学有酶联免疫法、化学发光法、电化学发光法等; 由于酶联免疫法需要酶标记, 过程复杂, 需要专业的人员操作, 并且美联免疫法位液体试剂, 需要低温冷藏运输, 对于基层医疗机构带来很大的不便; 管式化学发光法和电化学发光法均为需要大型设备, 且为封闭系统, 价格昂贵; 也有人采用时间分辨率荧光法, 该方法的发射波长通常在300nm左右, 血液样本里有大量的蛋白质分子, 蛋白质分子在紫外有很强的吸收, 造成灵敏度降低等。

## 发明内容

[0010] 本发明的目的是针对上述现有技术中存在的不足, 提供一种基层医院到三甲医院均适用的、灵敏度高、准确性强、操作简便、能够快速诊断卵巢功能的诊断试剂盒。

[0011] 为解决上述技术问题, 本发明采用双光子荧光免疫层析技术, 以抗缪勒管激素 (AMH) (Anti-Mullerian Hormone) 作为检测指标, 具体的技术方案为:

[0012] 本发明的一个方面提供了一种定量检测抗缪勒管激素 (AMH) 的荧光免疫层析试剂盒, 包括扣卡 (11)、双光子荧光免疫层析试纸条和缓冲液, 其中, 扣卡 (11) 为荧光免疫层析试纸条的外部壳结构, 包括加样孔 (9) 和观察窗 (10), 如图3所示。

[0013] 荧光免疫层析试纸条结构如图1和图2所示, 包括样品垫 (1)、标记垫 (2)、层析膜 (6)、吸水垫 (7) 和底板 (8)。当进行全血样品检测时, 试纸条还包括血液分离膜 (3)。其中, 样品垫 (1)、标记垫 (2)、血液分离膜 (3)、层析膜 (6) 和吸水垫 (7) 搭载于底板 (8) 之上, 样品垫 (1) 位于加样孔 (9) 的下方, 且连接于标记垫 (2), 标记垫 (2) 连接于层析膜 (6), 层析膜 (6) 连接于吸水垫 (7), 其上固定有一条定量检测线 (4) 和一条质控线 (5), 优选二者距离3mm~8mm, 并位于观察窗 (10) 的下方。在包括血液分离膜 (3) 的情况下, 血液分离膜 (3) 设置在标记垫 (2) 和层析膜 (6) 之间, 此时标记垫 (2) 连接于血液分离膜 (3), 血液分离膜 (3) 连接于层析膜 (6), 或者血液分离膜 (3) 设置在样品垫 (1) 和标记垫 (2) 之间, 此时样品垫 (1) 连接于血液分离膜 (3), 血液分离膜 (3) 连接于标记垫 (2), 或者血液分离膜 (3) 直接与样品垫 (1) 合并为同一结构。

[0014] 标记垫 (2) 上同时固定有荧光染料修饰的抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体, 和荧光染料修饰的质控分子, 修饰抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体的荧光染料的发射波长与修饰质控分子的荧光染料的激发波长相同, 波长范围为300-500nm。

[0015] 定量检测线 (4) 上固定有荧光染料标记的抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体, 该特

异性抗体所识别的抗原决定簇与固定在标记垫(2)上的荧光染料修饰的抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体所识别的抗原决定簇不同或者抗鼠抗体。

[0016] 质控线(5)上固定有能与质控分子特异性结合的荧光染料修饰生物分子。

[0017] 修饰抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体的荧光染料的发射波长与修饰质控分子的荧光染料的发射波长相同,波长范围为500~800nm。

[0018] 本发明的另一个方面提供了上述定量检测抗缪勒管激素(AMH)的双光子荧光免疫层析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0019] 步骤(1):用化学交联或生物分子间特异性作用分别将荧光染料偶联到抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体和质控分子的表面,分别得到荧光染料修饰的抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体和荧光染料修饰的质控分子,修饰所述质控分子的荧光染料的发射波长与修饰抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体的荧光染料的发射波长相同,波长范围为300~500nm;

[0020] 步骤(2):将步骤(1)得到的荧光染料修饰的抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体和荧光染料修饰的质控分子均固定到标记垫(2)上;

[0021] 步骤(3):在层析膜(6)上分别设置一条定量检测线(4)和一条质控线(5),其中,质控线(5)上固定有能与质控分子特异性结合的荧光染料修饰的生物分子,定量检测线(4)上固定有荧光染料修饰的抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体,且该特异性抗体所识别的抗原决定簇与固定在标记垫(2)上的荧光染料修饰的抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体所识别的抗原决定簇不同;

[0022] 步骤(4):将样品垫(1)、标记垫(2)、层析膜(6)、吸水垫(7)和底板(8)构建成荧光免疫层析试纸条,当进行全血样品检测时,试纸条还包括血液分离膜(3);

[0023] 步骤(5):将荧光免疫层析试纸条装卡。

[0024] 本发明采用化学交联或生物分子间特异性作用将荧光染料偶联到抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体的表面或质控分子的表面,分别得到荧光染料修饰的抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体和荧光染料修饰的质控分子。在本发明中,当荧光染料表面存在活性基团时,可将其直接与特异性抗体反应,不需用化学交联剂;反之,则需通过化学交联剂将荧光染料与抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体或质控分子相偶联。其中,化学交联剂包括1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳化二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)及戊二醛等。

[0025] 在本发明的一个优选实施例中,采用有活性基团的荧光染料修饰抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体或质控分子,步骤为:将纯化后的荧光染料溶解,然后加入一定量的抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体或质控分子,以缓冲液作为反应介质,反应2~4小时,加入盐酸羟胺终止反应,用色谱、层析柱或超滤离心等方式纯化,得到荧光染料修饰的抗缪勒管激素(AMH)特异性抗体或质控分子。

[0026] 为了提高信号与背景的分度,本发明中荧光染料的波长范围为300~500nm,本例365nm。此外,层析膜、底板和扣卡一般在近红外区域(500~800nm)荧光强度极弱,因此,本例选波长635nm的荧光染料以进一步提高灵敏度,本例选荧光染料发射波长为680nm。

[0027] 本发明的荧光染料包括有机荧光染料、稀土元素和量子点荧光染料。本发明的荧光染料可以偶联到是胶乳微球上,变成了荧光微球的形式。本发明的荧光染料可以是单一化合物的荧光染料或者由几种化合物组成的复合荧光染料,但优选单一化合物荧光染料、且优选具有较强的光稳定性的荧光染料。本发明的荧光染料例如AlexaFluro系列

(AlexaFluro647、610、633、700、750)的荧光素、DyLight系列 (DyLight649、633、549、680)等。

[0028] 本发明的抗缪勒管激素 (AMH) 特异性抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。质控分子例如兔IgG,与质控分子特异性结合的生物分子例如羊抗兔IgG。

[0029] 为了降低对荧光染料荧光信号的影响,本发明采用弱荧光的层析膜、底板以及扣卡,其荧光噪声在大于550nm是会很弱,从而保证获得高荧光信背比,能良好区分信号与背景,进而提高检测灵敏度。优选底板为白色,表面附有不干胶,且扣卡、层析膜、底板及不干胶均不含有荧光剂。

[0030] 本发明中,待测样品可以是血清或血浆,此时荧光免疫层析试纸条不包括血液分离膜。待测样品也可以是全血,此时荧光免疫层析试纸条还包括血液分离膜,用于凝固、过滤细胞。血液分离膜可设置在标记垫和层析膜之间,分别与标记垫和层析膜直接毛细作用接触,或者设置在样品垫和标记垫之间,分别与样品垫和标记垫直接毛细作用接触,也可直接与样品垫合并为同一结构,从而样品垫同时具有样品收集、释放及过滤的作用。

[0031] 本发明的荧光免疫层析试剂盒对待测样品中的抗缪勒管激素 (AMH) 进行定量检测。检测时,将待测样品通过加样孔加入到样品垫中,样品沿层析膜向吸水垫方向层析运动。样品层析时间通常为 8~25分钟,优选15分钟。层析过后,用Wash缓冲液清洗层析膜,时间为3-8分钟,优选5分钟,以降低本底,提高检测灵敏度。本发明的Wash缓冲液中包含牛血清白蛋白、蔗糖和表面活性剂,pH值为 7.0-8.0,其中,牛血清白蛋白的浓度为0.05~2%,蔗糖的浓度为1~15%,表面活性剂的浓度为0.05~2%。表面活性剂优选吐温20、曲拉通X-100,缓冲液优选Tris-HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液。

[0032] 本发明的检测用荧光定量仪包含激发光源模块、滤光模块、光电转换模块、控制分析模块以及软件系统。其中激发光源模块包含光源及聚光装置,该光源为发光二极管或激光二极管,且波长位于600~ 750nm之间。滤光模块包含滤光片轮,该滤光片轮包含不同种滤光片,以获取相应的荧光信号。光电转换模块包括图像传感器或者光电倍增管。

[0033] 层析结束后,在光源激发下,试纸条产生的荧光信号经滤光模块滤除杂散光及背景荧光,到达光电转换模块,获得数字信号,质控线获得的荧光信号强度与检测线获得的荧光信号强度具有相关性:如果质控线荧光信号强度超出荧光定量仪内部设定的可接受值,说明检测结果无效;在检测结果有效前提下,检测线获得的荧光信号强度与质控线荧光信号强度的比值越高,表示样品中目标检测物的浓度越高,反之越低。

[0034] 本发明采用荧光定量仪检测一系列不同浓度的标准品,绘制标准曲线。其中标准曲线为标准品系列浓度(X)与所对应的荧光信号强度(Y)的关系曲线,关系式为 $Y=y_0+bX$ ,荧光信号强度为 $Y=$ 检测线峰面积/质控线峰面积,然后检测样品,依据标准曲线获得待测样品中抗缪勒管激素 (AMH) 的浓度。

[0035] 本发明的荧光免疫层析试剂盒的工作原理为:采用荧光免疫层析技术及双抗体夹心法原理定量检测样品(全血、血清或血浆)中的抗缪勒管激素 (AMH) 的含量。检测时,将样品滴加到上样孔中,样品流经标记垫时与荧光染料标记物相结合,并沿着层析膜向吸水垫方向毛细运动,分别流经层析膜上的定量带及质控带。若样品中含有抗缪勒管激素 (AMH),则与被荧光染料修饰的抗缪勒管激素 (AMH) 抗体相结合,当层析至检测线时,会被预先包被于该条带的捕获抗体所捕获,从而构成双抗体夹心复合物。光源激发下,采用荧光定量仪

可获取检测线和质控线的荧光信号强度,依据荧光定量仪获取的标准曲线,进而可分析出样品中含有AMH的浓度。

[0036] 本发明的主要优点如下:

[0037] 1) 本发明采双有机荧光染料、稀土元素荧光染料或者量子点荧光染料作为特异性抗体的荧光标记物,其中短波长荧光染料发射光发射的两个光子被长波长荧光染料吸收产生一个长波长发射光,具有发光强度高、发射光谱窄、荧光寿命长、表面修饰多功能化、稳定性好及灵敏度高等优势。

[0038] 2) 本发明试剂盒组成部件中的扣卡、底板以及层析膜在大于 550nm时均具有低的荧光特性,可以减少对荧光染料荧光信号获取的影响,从而保证获得高的荧光信背比,进而达到提高灵敏度的目的。

[0039] 3) 本发明所述的定量检测抗缪勒管激素 (AMH) 的荧光免疫层析方法为Wash层析技术,可减少非特异性吸附,降低荧光本底,增强特异性结合,进而提高检测灵敏度,有利于样品中抗缪勒管激素 (AMH) 含量极低时的准确定量。

[0040] 4) 本发明方法与常规荧光免疫层析相比,具有标记稳定性好、非特异性低、灵敏度高、线性范围宽以及定量准确等优势。

## 附图说明

[0041] 图1为荧光免疫层析试纸条的组装示意图,其中1为样品垫,2 为结合垫,3为血液分离膜,4为检测线,5为质控线,6为层析膜, 7为吸水垫,8为底板。

[0042] 图2为实施例1中荧光免疫层析试纸条样品测试示意图,以及利用该试剂盒测试样品得到的检测峰和质控峰。

[0043] 图3为荧光免疫层析试剂盒示意图,其中11为扣卡,9为加样孔, 10为观察窗,4为检测线,5为质控线。

[0044] 图4为实施例1中荧光免疫层析试剂盒的标准曲线,以抗缪勒管激素 (AMH) 浓度为横坐标,以荧光强度(检测峰面积比质控峰面积比值)为纵坐标。

## 具体实施方式

[0045] 实施例1:以共价交联方式用荧光染料修饰抗体,并采Wash免疫层析技术对抗缪勒管激素 (AMH) 的定量检测

[0046] 1) 荧光染料与抗体的偶联

[0047] 将发射波长为365nm的荧光染料与1mg/ml的抗缪勒管激素 (AMH) 标记单克隆抗体混合,室温反应3h,加入1mol/L盐酸羟胺终止反应,并用色谱柱或层析柱分离纯化,得到荧光染料修饰的抗缪勒管激素 (AMH) 单克隆抗体。同理得到荧光染料修饰的兔1gG(质控分子)。其中修饰抗缪勒管激素 (AMH) 抗体的荧光染料的荧光发射波长与修饰兔1gG的荧光染料的荧光发射波长均为365nm。

[0048] 将发射波长为680nm的荧光染料与1mg/ml的包被抗缪勒管激素 (AMH) 单克隆抗体混合,室温反应3h,加入1mol/L盐酸羟胺终止反应,并用色谱柱或层析柱分离纯化,得到荧光染料修饰的抗缪勒管激素 (AMH) 单克隆抗体。同理得到荧光染料修饰的养抗兔1gG(质控分子)。其中修饰抗缪勒管激素 (AMH) 抗体的荧光染料的荧光发射波长与修饰兔1gG的荧光

染料的荧光发射波长均为680nm。

#### [0049] 2) 试剂盒的构建

[0050] 以1:1的比例混合两种荧光染料标记物,并加入牛血清白蛋白(含量为1%)、蔗糖(含量为10%)以及表面活性剂曲拉通X-100(含量为0.8%),随后均匀喷涂在标记垫上,45℃干燥后密封,室温下保存。

[0051] 如图1所示,组装定量检测AMH的荧光免疫层析试纸条,由样品垫(1)、标记垫(2)、血液分离膜(3)、层析膜(6)、吸水垫(7)组成,顺次粘贴于白色底板(8)上。其中,样品垫为孔状隔膜,选择玻璃纤维,为待测样品收集区;结合垫中含有荧光染料修饰的AMH特异性抗体及荧光染料修饰的兔IgG;层析膜上固定有定量检测线(4)和质控线(5),检测线和质控线的间隔为5mm,且检测线(4)固定有区别于标记垫中AMH特异性抗体的另一抗原表位的特异性抗体,质控线(5)固定有羊抗兔抗体。组装好后,按照要求切割为所需宽度,并置于扣卡(11)内,如图2所示,加入干燥剂封装,与Wash缓冲液共同构建为荧光免疫层析试剂盒。

#### [0052] 3) 样品的检测

[0053] a) 将AMH抗原标准品用正常人血清作为稀释液分别配制为0.02ng/mL和30ng/mL浓度;

[0054] b) 将步骤a)中两种浓度的AMH标准品溶液依次按照100:0、92:8、75:25、50:50、25:75、和0:100的比例进行混合;

[0055] c) 分别将步骤b)中配制的血清溶液(100μL)滴加于加样孔(9)中,正向层析反应15min;

[0056] d) 配制Wash缓冲液,pH值为7.5,缓冲系统为20mM的磷酸盐,加入牛血清白蛋白(浓度为1%)、蔗糖(浓度为10%)以及表面活性剂曲拉通X-100(浓度为0.8%),在样品孔加入50μL,静置5min。

[0057] e) 置于荧光定量仪中获取荧光信号强度,并绘制相应的标准曲线,请参见图4;

[0058] f) 同步步骤c)和步骤d)操作,对待测样品进行检测,荧光仪检测峰见图3,层析结束后,置于荧光定量仪内获取荧光信号强度,并依据步骤e)中的标准曲线分析该样品中AMH的含量;

[0059] g) 输出检测报告。

#### [0060] 4) 结果分析

[0061] 结果表明,其最低检测限为0.05ng/mL,最低定量限为0.020ng/mL,且批内与批间重复性均较好,相关系数 $R^2 > 0.99$ ,对卵巢储备功能的早期诊断具有参考价值。

[0062] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

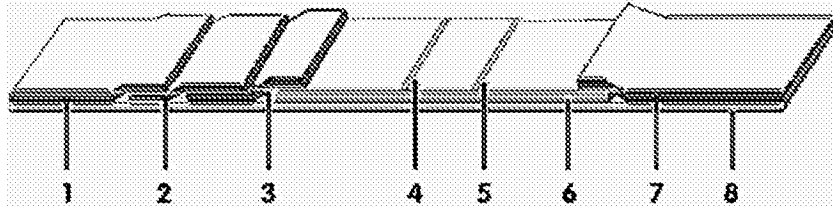


图1

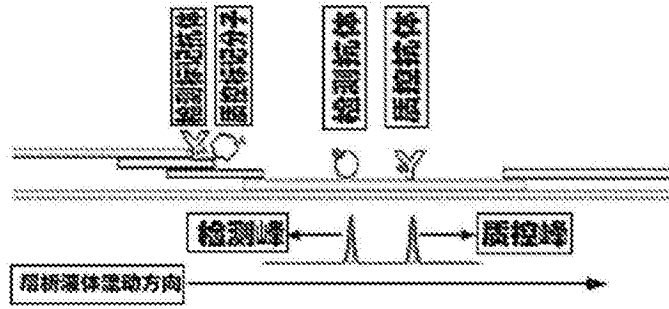


图2

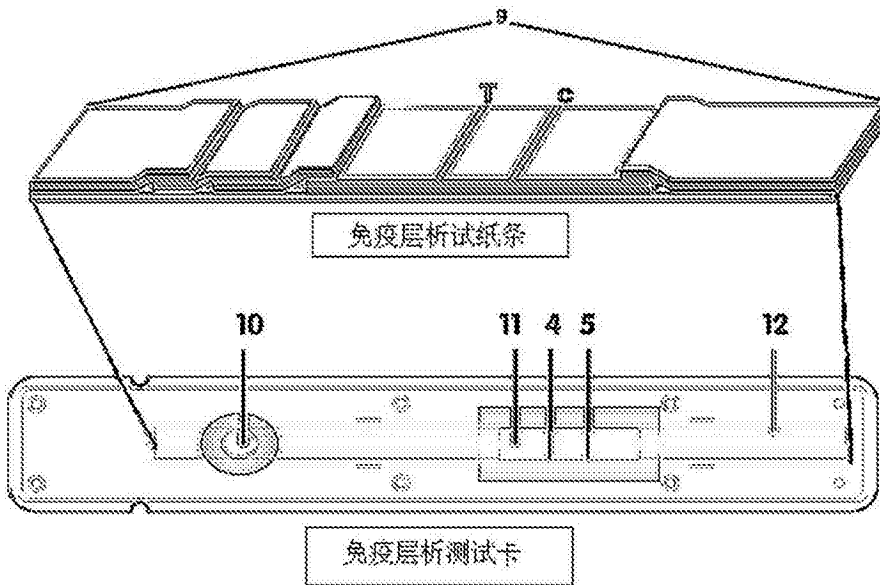


图3

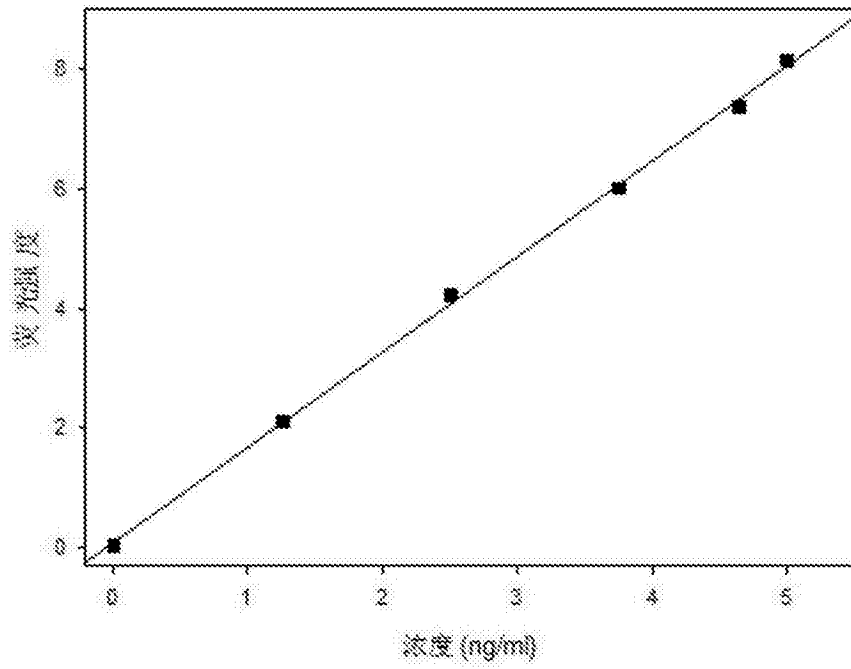


图4

专利名称(译)	定量检测抗缪勒管激素 ( AMH ) 的双光子荧光免疫层析试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107621540A</a>	公开(公告)日	2018-01-23
申请号	CN2017110749748.5	申请日	2017-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	德迈基生物技术(北京)有限公司		
申请(专利权)人(译)	德迈基生物技术(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	德迈基生物技术(北京)有限公司		
[标]发明人	李道锋 潘文东 朱建峰 贺率		
发明人	李道锋 潘文东 朱建峰 贺率		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种以荧光染料为标记物的双光子荧光免疫定量检测抗缪勒管激素 ( AMH ) 荧光免疫层析试剂盒。本发明的双光子荧光免疫层析试剂盒实现了对抗缪勒管激素(AMH)的荧光免疫定量检测，具有稳定性好、线性范围宽、特异性好、灵敏度高、定量准确以及简单快速的优势，可同时检测全血、血清及血浆样品，并适用于各级医院及家庭医疗。

