



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110412300 A

(43)申请公布日 2019.11.05

---

(21)申请号 201810383860.6

(22)申请日 2018.04.26

(71)申请人 江苏正大天创生物工程有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城口  
泰路西侧、陆家路东侧G60幢51号四层  
东

(72)发明人 魏赵延 李思慧 林伟强 吴凯  
朱庆平

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

---

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检  
测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种抗缪勒氏管激素快速免疫  
荧光定量检测试剂盒，适用于生物技术以及医学  
领域。试剂盒提供了用于检测抗缪勒氏管激素，  
其中所述试剂盒含有硝酸纤维素膜，抗缪勒氏管  
激素单克隆抗体-2，羊抗鼠 IgG，甘氨酸缓冲液、  
Tris-HCl缓冲液、硼酸盐缓冲液内标系统。本发  
明所提供的试剂盒用于检测抗缪勒氏管激素具  
有特异性强、敏感度高、操作简单快速、高通量、  
安全、结果判读客观等优势。

1. 一种抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒，其特征包括硝酸纤维素膜，在硝酸纤维素膜的一端设置有样品垫、标记垫，在硝酸纤维素膜的另一端设置有吸水垫，所述硝酸纤维素膜的位于吸水垫和样品垫之间的区域内分别包被抗抗缪勒氏管激素的抗体和内部质控抗体。

2. 如权利要求 1 所述的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒，其特征在于，所述硝酸纤维素膜上，检测线 位于离加样端较近一侧，质控线位于离加样端较远一侧。

3. 如权利要求 1 所述的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒，其特征在于，所述检测线上包被有抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体-2。

4. 如权利要求 1 所述的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒，其特征在于，质控线上包被有羊抗鼠 IgG。

5. 如权利要求 1 所述的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒，其特征在于，所述样品垫采用缓冲液处理，所述缓冲液选自 PBS 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸盐缓冲液和柠檬酸 - 磷 酸盐缓冲液中的一种或多种的组合，缓冲液的浓度为 50 ~ 100mM。

6. 如权利要求 1 所述的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒，其特征在于，所述标记垫采用缓冲液处理，所述缓冲液选自甘氨酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、硼酸盐缓冲液的一种或多种的组合，缓冲 液的浓度为 10 ~ 40mM。

7. 如权利要求 1 所述的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒，其特征在于，还包括卡壳，所述卡壳包括背卡和上盖，所述背卡设有试纸卡卡槽，所述试纸卡嵌于所述试纸卡卡槽内，所述上盖设有测试窗和加样孔，所述测试窗的位置与所述检测线和质控线的位置相配合，所述加样孔的位置与所述样品垫的位置相配合。

8. 如权利要求 1 所述的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒，其特征在于，所述检测试剂盒用于检测样品中的抗缪勒氏管激素，所述样品选自人全血、血清或血浆中的一种或多种的组合。

9. 根据权利要求 1~ 8任一权利要求所述的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒的制备方法，具体包括如下步骤：

1) 用荧光材料标记的抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体-1，溶液喷涂经预处理的金标垫，制得包含抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体-1的标记垫；

2) 在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体-2及羊抗鼠 IgG，制得包被后的硝酸纤维素膜；

3) 将样品垫、步骤 1) 制备金标垫、步骤 2) 制备的硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘贴在底板上，切裁制得检测试纸卡；最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

## 一种抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,特别是涉及一种抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒及其制备方法和用途。

### 背景技术

[0002] 抗缪勒氏管激素(anti-Mullerian hormone, AMH)是转化生长因子 $\beta$ 超家族的成员之一,由Professor Alfred Jost于1974年首先发现。AMH是由两个相同的70KD亚基,通过二硫键连接组成的二聚糖蛋白,相对分子质量为140KD;人类AMH编码基因位于19号染色体短臂,大小2.4~2.8kb,含有5个外显子。

[0003] 抗缪勒氏管激素(AMH)在性腺器官发育过程中起着重要作用,是男女性腺功能的重要标记物之一。在男性AMH主要由睾丸间质细胞产生,始于胚胎形成并贯穿生命始终;在男性胎儿的发育过程中,AMH导致缪勒氏管退化,形成正常发育的男性生殖管道。在女性AMH主要由卵巢颗粒细胞产生,血清AMH保持相对于男性较低的一个水平,从青春期开始,血清AMH水平随时间慢慢降低,并在更年期降低到ELISA法检测不到的水平。

[0004] AMH的正常值界于2~6.8ng/ml之间,AMH数值越高,代表卵子存量越丰沛,适合受孕的黄金期较长,AMH值越低则卵巢功能越差,35岁过后AMH值会开始急剧下降,当AMH值低于0.7ng/ml时,表示卵子库存量已严重不足,几乎难以受孕。若AMH值大于6.8时,可考虑有多囊性卵巢症候群的体质,使用排卵针剂、药物时,卵巢也容易对反应过度而排出过多的卵子,造成卵巢过度刺激症候群。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒及其制备方法和用途,用于检测抗缪勒氏管激素。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明采用以下技术方案:

本发明的第一方面,提供一种抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒,包括试纸卡,所述试纸卡包括底板、及位于底板表面的从加样端开始依次排列的样品垫、标记垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述标记垫上包含荧光颗粒标记的抗抗缪勒氏管激素白单克隆抗体-1,所述硝酸纤维素膜上包被有检测线和质控线。

[0007] 所述底板为PVC底板。

[0008] 所述硝酸纤维素膜上,检测线位于离加样端较近一侧,质控线位于离加样端较远一侧。

[0009] 所述检测线上包被有抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体-2。

[0010] 所述质控线上包被有羊抗鼠IgG。

[0011] 所述抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体-1为博茵生物抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体M050502,所述抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体-2为博茵生物抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体M050501。

[0012] 所述样品垫采用缓冲液处理,所述缓冲液选自 PBS 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、甘氨酸缓冲液、硼酸盐缓冲液和柠檬酸 - 磷酸盐缓冲液中的一种或多种的组合,缓冲液的浓度为 50-100mM。

[0013] 本发明所述的标记垫还经过预处理,预处理时所使用的预处理缓冲液选自甘氨酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、硼酸盐缓冲液的一种或多种的组合,缓冲液的浓度为10-40mM。

[0014] 所述预处理缓冲液的溶剂为水。

[0015] 所述预处理的具体步骤为:将标记垫在预处理液中浸泡 1.5 ~ 2h,取出放于 36 ~38℃烘干。

[0016] 所述预处理缓冲液可使用本领域各种常用的 pH 调节剂进行 pH 值的调节。

[0017] 所述试剂盒还包括卡壳,所述卡壳包括背卡和上盖,所述背卡设有试纸卡卡槽,所述试纸卡嵌于所述试纸卡卡槽内,所述上盖设有测试窗和加样孔,所述测试窗的位置与所述检测线和质控线的位置相配合,所述加样孔的位置与所述样品垫的位置相配合。

[0018] 所述卡壳为塑料卡壳。

[0019] 所述检测试剂盒用于检测样品中的抗缪勒氏管激素,所述样品选自人全血、血清或血浆中的一种或多种的组合。

[0020] 本发明第二方面提供所述抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤 :

1) 用荧光微球标记的抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体 -1 溶液喷涂标记垫,制得包含抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体 -1 的标记垫 ;

2) 在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂抗抗缪勒氏管激素单克隆抗体 -2 及羊抗鼠 IgG,制得包被后的硝酸纤维素膜 ;

3) 将样品垫、步骤 1) 制备标记垫、步骤 2) 制备的硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘贴在底板上,裁制得检测试纸卡 ;最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

[0021] 本发明所述的标记垫还经过预处理,预处理时所使用的预处理缓冲液选自甘氨酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液、硼酸盐缓冲液的一种或多种的组合,缓冲液的浓度为10-40mM。

[0022] 所述预处理缓冲液的溶剂为水。

[0023] 所述预处理的具体步骤为 :将标记垫在预处理液中浸泡 1.5 ~ 2h,取出放于 36 ~38℃烘干。

[0024] 所述预处理缓冲液可使用本领域各种常用的 pH 调节剂进行 pH 值的调节。

[0025] 本发明第三方面提供所述抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒在抗缪勒氏管激素检测领域的用途。

[0026] 本发明的有益效果为 :

本发明所提供的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒兼具高灵敏性和高特异性,能够快速检测抗缪勒氏管激素。此外,所述检测试剂盒具有操作快速简便、结果准确、经济适用等优点。

## 具体实施方式

[0027] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具

体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0028] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0029] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0030] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组 DNA 技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见 Sambrook 等 MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989 and Third edition,2001 ;Ausubel 等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons,New York,1987 and periodic updates ;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego ;Wolffe,CHROMAT INSTRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998 ;METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol.304,Chromatin (P.M.Wasserman and A.P.Wolffe,eds.), Academic Press, San Diego,1999 ; 和 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.119, Chromatin Protocols (P.B.Becker,ed.) Humana Press,Totowa,1999 等。

### [0031] 实施例 1 本发明试纸卡的制备

1) 使用预处理缓冲液对标记垫进行预处理,预处理缓冲液为:氯化钠 0.3mg/ml,甘氨酸 2.0mg/ml 的水溶液,pH = 7.4,预处理的具体步骤为:将标记垫在预处理液中浸泡 2h,取出放于 37℃烘干;然后用荧光微球标记的抗抗缪勒氏管激素-1单克隆抗体溶液喷涂经预处理的标记垫,制得包被抗抗缪勒氏管激素-1单克隆抗体的标记垫,溶液中荧光微球与单克隆抗体的摩尔比为 5:1,溶液的浓度为 10mg/ml,喷涂量为 4ul/cm;

2) 在硝酸纤维素膜的检测线和质控线上分别喷涂 4mg/ml 的抗抗缪勒氏管激素-2单克隆抗体溶液和羊抗鼠 IgG(购自博茵生物)溶液,喷涂量为 1ul/cm,制得包被后的硝酸纤维素膜;

3) 将样品垫、步骤 1) 制备标记垫、步骤 2) 制备的硝酸纤维素膜、吸水垫依次粘贴在 PVC 底板上,裁制得宽 3-5mm 的检测试纸卡;最后将检测试纸卡装入卡壳制得检测试剂盒。

### [0032] 实施例 2 检测试剂盒的灵敏度实验

取实施例 1 制得的抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒,将试剂盒放置在水平台上,分别检测 0.05ng/ml、0.1ng/ml、0.2ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、15ng/ml 的抗缪勒氏管激素标准品,每个浓度重复 5 次,以 0ng/ml 作为空白对

照。用移液器吸取样品液75ul滴加入到样品槽中,在加样品后 8-15 分钟判读结果。用荧光读数仪对试剂盒检测线上的显色结果进行判读定量分析。以抗缪勒氏管激素浓度为横坐标,荧光读数仪检测信号为纵坐标,建立标准曲线。在标准曲线上,随着标准品浓度的升高,测得的信号值也随之升高。

[0033] 根据标准曲线计算可知,本试剂盒对 0.05ng/ml、0.1ng/ml 的样品可以部分检出,对 0.2ng/ml 的样品全部检出,其最低检出限≤0.2ng/ml,并在0.2ng/ml-10ng/ml 的范围具有良好的线性,T 线颜色的深浅与样品中抗缪勒氏管激素浓度成正比。

[0034] 各浓度的批内最大 CVs 为 4.9%,平均 CVs 为 3.8% ( 每个浓度的样品同批进行测试 ),各浓度的批间最大 CVs 为 5.3%,平均 CVs 为 4.6% ( 每个浓度的样品分 5 批进行测试 ) 表明本发明所提供的试剂盒具有良好的重复性。

[0035] 选择未检测出抗缪勒氏管激素的小牛血清进行加标回收实验,加入抗缪勒氏管激素标准品,将抗缪勒氏管激素的浓度分别调整至0.5ng/ml、1ng/ml、4ng/ml、8ng/ml、10ng/ml,空白对照及每个浓度的样品均重复测定 5 次。各浓度的批内最大 CVs 为 4.6%,平均 CVs 为 3.9%,各浓度的加标回收率为 97.9% -99.8%,表明本发明所提供的试剂盒具有良好的准确度。

[0036] 实施例 3 检测试剂盒的稳定性实验

#### 试剂盒的稳定性实验

##### 1. 实验目的 :

将抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒密封保存,并存放于 4℃及室温 (25℃左右) 下,观察不同存放温度对试剂盒稳定性的影响。

[0037] 2. 实验方法 :

保存于 4℃的试剂盒每周取出 4 盒,分别检测 0.1ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2ng/ml、5ng/ml 的抗缪勒氏管激素标准品;保存于室温 (25℃) 的试剂盒每3天取出 4 盒,分别检测0.1ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2ng/ml、5ng/ml 的抗缪勒氏管激素标准品。

[0038] 3. 实验结果 :

经验证,试纸盒在 4℃下可保存 20 个月,在室温下可保存 16 个月 ;在可保存的期限内,试剂盒均可达到 0.2n/ml 的检测灵敏度。

[0039] 综上所述,本发明所提供的检测试剂盒具有很好的灵敏性,阴性本底更低,能够用于临床使用。

[0040] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

专利名称(译)	一种抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN110412300A</a>	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201810383860.6	申请日	2018-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	江苏正大天创生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏正大天创生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏正大天创生物工程有限公司		
[标]发明人	魏赵延 李思慧 林伟强 吴凯 朱庆平		
发明人	魏赵延 李思慧 林伟强 吴凯 朱庆平		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/533 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/577 G01N33/74 G01N2333/71 G01N2800/36		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种抗缪勒氏管激素快速免疫荧光定量检测试剂盒，适用于生物技术以及医学领域。试剂盒提供了用于检测抗缪勒氏管激素，其中所述试剂盒含有硝酸纤维素膜，抗缪勒氏管激素单克隆抗体-2，羊抗鼠IgG，甘氨酸缓冲液、Tris-HCl缓冲液、硼酸盐缓冲液内标系统。本发明所提供的试剂盒用于检测抗缪勒氏管激素具有特异性强、敏感度高、操作简单快速、高通量、安全、结果判读客观等优势。