



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110940817 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 201911313451.X

(22)申请日 2019.12.19

(71)申请人 武汉华美生物工程有限公司
地址 430206 湖北省武汉市东湖开发区高新大道818号高科医疗器械园B11栋

(72)发明人 邓陈玲 华权高

(74)专利代理机构 北京众达德权知识产权代理有限公司 11570

代理人 刘杰

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

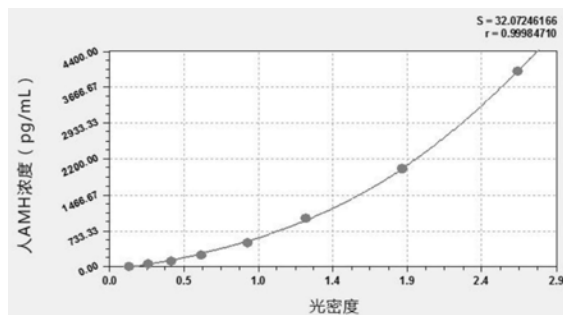
权利要求书3页 说明书21页 附图2页

(54)发明名称

一种检测抗苗勒管激素含量的酶联免疫试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明提供一种检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒及其检测方法,所述试剂盒包括由捕获抗体包被的酶标板、样本稀释液、标准品、生物素标记的检测抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素、浓缩洗涤液、底物溶液和终止液;其中,所述捕获抗体为鼠抗人AMH抗体;所述样本稀释液为1×PBS+1%BSA+0.05%Tween-20+0.1%Proclin300;所述标准品为人AMH冻干标准品;所述检测抗体为抗人AMH抗体;所述浓缩洗涤液为含有25×PBS+1.25%Tween20+2.5%Proclin300的25×PBST,其pH为7.6;所述底物溶液为TMB显色底物溶液;所述终止液为2M硫酸。本发明所述试剂盒及其检测方法减少了人力及设备成本,减少了原料、样本使用量以及降低了成本,从而提高了使用效率。



1. 一种检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括由捕获抗体包被的酶标板、样本稀释液、标准品、生物素标记的检测抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素、浓缩洗涤液、底物溶液和终止液;

其中,所述捕获抗体为鼠抗人AMH抗体;

所述样本稀释液为 $1 \times \text{PBS} + 1\% \text{BSA} + 0.05\% \text{Tween-20} + 0.1\% \text{Proclin300}$;

所述标准品为人AMH冻干标准品;

所述检测抗体为抗人AMH抗体;

所述浓缩洗涤液为含有 $25 \times \text{PBS} + 1.25\% \text{Tween20} + 2.5\% \text{Proclin300}$ 的 $25 \times \text{PBST}$,其pH为7.6;

所述底物溶液为TMB显色底物溶液;

所述终止液为2M硫酸。

2. 根据权利要求1所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述由捕获抗体包被的酶标板的制备方法包括以下步骤:

(1) 将鼠抗人AMH抗体用缓冲液稀释至 $1 \sim 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 后包被酶标板,每孔为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$;其中所述缓冲液选自pH为9.6的碳酸盐缓冲液和/或pH为7.2~7.4的磷酸盐缓冲液;

其中,所述碳酸盐缓冲液的制备步骤为:将 2.352g NaHCO_3 和 $2.332 \text{g Na}_2\text{CO}_3$ 混合,添加水至1L;

所述磷酸盐缓冲液的制备步骤为:将 8g NaCl 、 0.2g KCl 、 $1.44 \text{g Na}_2\text{HPO}_4$ 和 $0.44 \text{g KH}_2\text{PO}_4$ 混合,加水至1L;

(2) 将经步骤(1)处理的酶标板置于 4°C 下过夜或者置于 37°C 恒温箱2h后再于 4°C 下过夜;

(3) 拍干后向每孔添加封闭液进行封闭,然后置于 37°C 恒温箱2h,再拍干,然后向每孔添加 10% 蔗糖溶液固定0.5h;其中所述封闭液选自 $1 \sim 5\%$ 牛血清白蛋白、 $2 \sim 5\%$ 脱脂奶粉和/或 $5 \sim 10\%$ 小牛血清;

优选地,所述由捕获抗体包被的酶标板的制备方法包括以下步骤:

(1) 将鼠抗人AMH抗体用pH为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 后包被酶标板,每孔为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$;

(2) 将经步骤(1)处理的酶标板置于 4°C 下过夜;

(3) 拍干后向每孔添加 2% 牛血清白蛋白封闭液进行封闭,然后置于 37°C 恒温箱2h,再拍干,然后向每孔添加 10% 蔗糖溶液固定0.5h。

3. 根据权利要求1所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述浓缩洗涤液中的 $25 \times \text{PBS}$ 的制备步骤为:将 200g NaCl 、 5g KCL 、 $36 \text{g Na}_2\text{HPO}_4$ 和 $11 \text{g KH}_2\text{PO}_4$ 混合,添加水至1L,调节pH为6.0~6.5;

优选地,所述生物素标记的检测抗体的浓度为 $0.1 \sim 0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$;

优选地,所述生物素标记的检测抗体的浓度为 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$;

优选地,所述辣根过氧化物酶标记的亲合素的浓度为 $0.125 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$;

优选地,所述辣根过氧化物酶标记的亲合素的浓度为 $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

4. 一种使用根据权利要求1至3中任一项所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述检测方法包括以下步骤:

(1) 制备待测样本处理液,其中所述待测样本选自血清样本、血浆样本、细胞培养物上清液样本、尿液样本或组织裂解液样本;

(2) 制备标准品溶液、生物素标记的检测抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲素稀释液、浓缩洗涤液工作液;

(3) 将所述待测样本处理液、所述标准品溶液、所述生物素标记的检测抗体稀释液、所述辣根过氧化物酶标记的亲素稀释液、所述浓缩洗涤液工作液、所述TMB显色底物溶液和所述2M硫酸在18~25℃下平衡15~30min;

(4) 取所述由捕获抗体包被的酶标板,分别设标准品孔和待测样本孔,向每个所述标准品孔添加所述标准品溶液50uL,并向每个所述待测样本孔添加所述待测样本处理液50uL;然后向每个孔添加50uL所述生物素标记的检测抗体稀释液,混匀,并于18~25℃下振荡60~120min;

(5) 弃去每个孔内的液体,甩干,然后向每个孔中添加所述浓缩洗涤液工作液200uL保持1~2min,重复3次,然后甩干;

(6) 向每个孔中添加所述辣根过氧化物酶标记的亲素稀释液100uL,于18~25℃下振荡30~45min;

(7) 弃去每个孔内的液体,甩干,然后向每个孔中添加所述浓缩洗涤液工作液200uL保持1~2min,重复5次,然后甩干;

(8) 向每个孔中添加所述TMB显色底物溶液50~100uL,于18~25℃下避光显色15~30min;

(9) 向每个孔中添加所述2M硫酸50~100uL,终止反应;

(10) 用酶标仪测定经所述步骤(9)处理后的酶标板在450nm波长下的光密度值。

5. 根据权利要求4所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述步骤(1)中所述待测样本处理液的制备方法为:

将所述血清样本于室温下静置2小时或者于4℃下过夜后于2~8℃1000xg离心15min,取上清液用于检测;

或者,采集所述血浆样本后于2~8℃1000xg离心15min,取上清液用于检测;

或者,采集所述细胞培养物上清液样本或尿液样本,于2~8℃1000xg离心15min,取上清液用于检测;

或者,取100mg所述组织裂解液样本,用1×PBS洗涤,然后添加至1mL 1×PBS中,制得匀浆,然后置于-20℃下过夜后反复冻融2次,再于2~8℃5000xg离心5min,取上清液用于检测;

优选地,将所述用于检测的上清液于-20℃或-80℃下保存以待检测。

6. 根据权利要求4所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述步骤(2)中所述标准品溶液的制备方法为:将4ng人AMH冻干标准品于6000-10000rpm下离心30~60秒,然后用1mL所述样本稀释液溶解,得到标准品溶液S7,所述标准品溶液S7的浓度为4000pg/mL;取7个1.5mL离心管,各加入250uL样本稀释液,然后吸取250uL标准品溶液S7到离心管S6中,得到标准品溶液S6,所述标准品溶液S6的浓度为2000pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S6到离心管S5中,得到标准品溶液S5,所述标准品溶液S5的浓度为1000pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S5到离心管S4中,得到标准品溶液S4,

所述标准品溶液S4的浓度为500pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S4到离心管S3中,得到标准品溶液S3,所述标准品溶液S3的浓度为250pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S3到离心管S2中,得到标准品溶液S2,所述标准品溶液S2的浓度为125pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S2到离心管S1中,得到标准品溶液S1,所述标准品溶液S1的浓度为62.5pg/mL;标准品溶液S0为250uL所述样本稀释液,所述标准品溶液S1的浓度为0pg/mL。

7. 根据权利要求4所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述步骤(2)中的所述生物素标记的检测抗体稀释液的制备步骤为:将所述生物素标记的检测抗体用所述样本稀释液进行稀释,得到生物素标记的检测抗体稀释液;其中所述生物素标记的检测抗体与所述生物素标记的检测抗体稀释液的体积比为1:1000。

8. 根据权利要求4所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述步骤(2)中的所述辣根过氧化物酶标记的亲素稀释液的制备步骤为:将所述辣根过氧化物酶标记的亲素用所述样本稀释液进行稀释,得到辣根过氧化物酶标记的亲素稀释液;其中所述辣根过氧化物酶标记的亲素与所述辣根过氧化物酶标记的亲素稀释液的体积比为1:4000。

9. 根据权利要求4所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述步骤(2)中的所述浓缩洗涤液工作液的制备步骤为:将所述浓缩洗涤液用去离子水进行稀释,得到浓缩洗涤液工作液;其中所述浓缩洗涤液与所述浓缩洗涤液工作液的体积比为1:25。

10. 根据权利要求1至3中任一项所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒以及使用根据权利要求1至3中任一项所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法在检测抗苗勒管激素含量中的应用。

一种检测抗苗勒管激素含量的酶联免疫试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及一种检测抗苗勒管激素含量的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 抗苗勒管激素又被称苗勒管为抑制素 (Muellerian-inhibiting factor, Anti-Muellerian hormone AMH),其属于转化生长因子 β (TGF- β) 超家族成员,是一种由二硫键连接的多肽激素。人类AMH基因位于19号染色体短臂,含有5个外显子,编码560个氨基酸的蛋白前体,其羧基端为活性作用端,由二硫键连接而成,分子量为140kDa的二聚糖蛋白。AMH是由两个分子量为70kDa的单体通过二硫键连接而成的同源二聚体糖蛋白,AMH的激活需要水解释放出羧基末端二聚体,才具有促进苗勒管退化的生物活性并能抑制某些肿瘤的生长与分化。AMH与抑制素 (Inhibins)、激活素 (Activins)、生长分化因子 (GDFS) 等共同构成转化生长因子 (TGF- β) 超家族。

[0003] AMH能够抑制颗粒细胞增殖和卵泡成熟,降低卵泡对卵泡刺激素 (FSH) 的敏感性,抑制卵泡生长和优势卵泡的选择,从而减慢卵泡群的消耗,因此AMH过多或不足都将引起卵泡发育异常和生殖功能的紊乱血清。AMH浓度与阴道超声下囊状卵泡的数量相关,对卵泡募集起重要作用。AMH只由性腺分泌,女性的血清浓度可能反映卵泡群的大小,是反映卵巢老化和卵巢储备功能新的标记物。近年来,临床上开始使用抗苗勒管 (Anti-Müllerian hormone:AMH) 做为卵巢功能的评估,AMH一直以来扮演著影响胎儿性别发育的重要角色。目前又发现在女性卵巢中的颗粒细胞也会分泌AMH,因此藉由检测血液中AMH的量,便可做为评估卵巢功能的指标,而选择AMH的好处如下:随著年龄增长或卵巢功能开始衰退,在FSH、E2、inhibins尚未产生变化,AMH即可明确反应出衰退的徵兆。AMH在经期任何一天或者在周期与周期之间进行测量,变动性不大。AMH联合其他评估指标可以更正确地评估卵巢功能。

[0004] 多囊卵巢综合征是育龄期妇女常见的内分泌代谢紊乱性疾病,在国内的发病率为5%-10%,是无排卵性不孕的最常见病因,而血清AMH水平可精确反映窦卵泡数目,可作为诊断PCOS并评估其疗效的一种工具,并可成为B超诊断PCOS的替代物。

[0005] 目前,血清AMH定量分析方法包括酶联免疫法 (ELISA)、化学发光法、电化学发光法、胶体金法和荧光免疫层析法、胶乳增强比浊法等。化学发光法和电化学发光法灵敏度较高但所需专用设备昂贵,不适合较小批量检测或一般实验室使用;胶体金法操作简单,反应时间短,使用方便但不适于准确的定量分析;当胶体金法与荧光免疫层析法结合使用时,对试纸条的要求则较多,处理过程麻烦;胶乳增强免疫比浊法操作简单、反应快速且定量准确,可用于临床,但其低值重复性差且需要使用专用生化仪,价格昂贵。

[0006] 酶联免疫法采用96微孔板作为固相载体包被抗体,利用抗原抗体免疫反应,可实现定量检测;其因特异性好、灵敏度高、定量准确、对实验设备要求不高等优势受到广泛应用,但其存在反应时间长、步骤繁琐、重复性差等缺点。

[0007] 市面上的定量ELISA试剂盒多采用双抗夹心温育三步法,即将包被捕获抗体固定

在96孔微孔板中,制成固相载体,向微孔中分别加入标准品或待测样本并在37℃下温育90min,其中目标抗原与连接于固相载体上的捕获抗体结合,洗涤3次后拍干,然后加入生物素化的检测抗体在37℃下温育60min,洗涤3次后拍干,然后加入HRP标记的亲合素在37℃下温育30min,再次彻底洗涤5次后加入TMB底物显色15min。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的抗原呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(OD值),计算待测样本含量。

发明内容

[0008] 鉴于上述问题,本发明提供一种检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒及其检测方法,本发明的优点在于采用双抗夹心室温震荡两步法,第一步为加标准品/样品+生物素标记的检测抗体(60-120min),第二步为加辣根过氧化物酶(30-45min)。现有技术为三步法:第一步加标准品/样品(90min),第二步加生物素抗体(60min),第三步是加辣根过氧化物酶(30min)。本发明中反应步骤为两步,标准品/待测样本及检测抗体的上样量为50uL,将反应时间缩短至2.5h,减少了人力及设备成本,减少了原料、样本使用量以及降低了成本,从而提高了使用效率。

[0009] 用于实现上述目的的技术方案如下:

[0010] 本发明提供一种检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括由捕获抗体包被的酶标板、样本稀释液、标准品、生物素标记的检测抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素、浓缩洗涤液、底物溶液和终止液;

[0011] 其中,所述捕获抗体为鼠抗人AMH抗体;

[0012] 所述样本稀释液为1×PBS+1%BSA+0.05%Tween-20+0.1%Proclin300;

[0013] 所述标准品为人AMH冻干标准品;

[0014] 所述检测抗体为抗人AMH抗体;

[0015] 所述浓缩洗涤液为含有25×PBS+1.25%Tween20+2.5%Proclin300的25×PBST,其pH为7.6;

[0016] 所述底物溶液为TMB显色底物溶液;

[0017] 所述终止液为2M硫酸。

[0018] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中,所述由捕获抗体包被的酶标板的制备方法包括以下步骤:

[0019] (1) 将鼠抗人AMH抗体用缓冲液稀释至1~4ug/mL后包被酶标板;其中所述缓冲液选自pH为9.6的碳酸盐缓冲液和/或pH为7.2~7.4的磷酸盐缓冲液;

[0020] 其中,所述碳酸盐缓冲液的制备步骤为:将2.352g NaHCO₃和2.332g Na₂CO₃混合,添加水至1L;所述磷酸盐缓冲液的制备步骤为:将8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄和0.44g KH₂PO₄混合,加水至1L;

[0021] (2) 将经步骤(1)处理的酶标板置于4℃下过夜或者置于37℃恒温箱2h后再于4℃下过夜;

[0022] (3) 拍干后向每孔添加封闭液进行封闭,然后置于37℃恒温箱2h,再拍干,然后向每孔添加10%蔗糖溶液固定0.5h;其中所述封闭液选自1~5%牛血清白蛋白、2~5%脱脂奶粉和/或5~10%小牛血清。

[0023] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中,所述由捕获抗体包被的酶标板的制备方法包括以下步骤:

[0024] (1) 将鼠抗人AMH抗体用pH为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至2ug/mL后包被酶标板,每孔为100ug/mL;

[0025] (2) 将经步骤(1)处理的酶标板置于4℃下过夜;

[0026] (3) 拍干,向每孔添加2%牛血清白蛋白封闭液进行封闭,然后置于37℃恒温箱2h,再拍干,然后向每孔添加10%蔗糖溶液固定0.5h。

[0027] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中,所述浓缩洗涤液中的25×PBS的制备步骤为:将200g NaCl、5g KCl、36g Na₂HPO₄和11g KH₂PO₄混合,添加水至1L,调节pH为6.0~6.5。

[0028] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中,所述生物素标记的检测抗体的浓度为0.1~0.4ug/mL。

[0029] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中,所述生物素标记的检测抗体的浓度为0.2ug/mL。

[0030] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中,所述辣根过氧化物酶标记的亲合素的浓度为0.125~0.5ug/mL。

[0031] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中,所述辣根过氧化物酶标记的亲合素的浓度为0.25ug/mL。

[0032] 本发明还提供一种使用本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述检测方法包括以下步骤:

[0033] (1) 制备待测样本处理液,其中所述待测样本选自血清样本、血浆样本、细胞培养物上清液样本、尿液样本或组织裂解液样本;

[0034] (2) 制备标准品溶液、生物素标记的检测抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液工作液;

[0035] (3) 将所述待测样本处理液、所述标准品溶液、所述生物素标记的检测抗体稀释液、所述辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、所述浓缩洗涤液工作液、所述TMB显色底物溶液和所述2M硫酸在18~25℃下平衡15~30min;

[0036] (4) 取所述由捕获抗体包被的酶标板,分别设标准品孔和待测样本孔,向每个所述标准品孔添加所述标准品溶液50uL,并向每个所述待测样本孔添加所述待测样本处理液50uL;然后向每个孔添加50uL所述生物素标记的检测抗体稀释液,混匀,于18~25℃下振荡60~120min;

[0037] (5) 弃去每个孔内的液体,甩干,然后向每个孔中添加所述浓缩洗涤液工作液200uL保持1~2min,重复3次,然后甩干;

[0038] (6) 向每个孔中添加所述辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液100uL,于18~25℃下振荡30~45min;

[0039] (7) 弃去每个孔内的液体,甩干,然后向每个孔中添加所述浓缩洗涤液工作液200uL保持1~2min,重复5次,然后甩干;

[0040] (8) 向每个孔中添加所述TMB显色底物溶液50~100uL,于18~25℃下避光显色15~30min;

[0041] (9) 向每个孔中添加所述2M硫酸50~100uL,终止反应;

[0042] (10) 用酶标仪测定经所述步骤(9)处理后的酶标板在450nm波长下的光密度值。

[0043] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法中,所述步骤(1)中的所述待测样本处理液的制备方法为:

[0044] 将所述血清样本于室温下静置2小时或者于4℃下过夜后于2~8℃ 1000xg离心15min,取上清液用于检测;

[0045] 或者,采集所述血浆样本后于2~8℃ 1000xg离心15min,取上清液用于检测;

[0046] 或者,采集所述细胞培养物上清液样本或尿液样本,于2~8℃ 1000xg离心15min,取上清液用于检测;

[0047] 或者,取100mg所述组织裂解液样本,用1×PBS洗涤,然后添加至1mL 1×PBS中,制得匀浆,然后置于-20℃下过夜后反复冻融2次,再于2~8℃5000xg离心5min,取上清液用于检测。

[0048] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法中,将在制备所述待测样本处理液的过程中得到的用于检测的上清液于-20℃或-80℃下保存以待检测。

[0049] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法中,所述步骤(2)中的所述标准品溶液的制备方法为:将4ng人AMH冻干标准品于6000-10000rpm下离心30~60秒,然后用1mL所述样本稀释液溶解,得到标准品溶液S7,所述标准品溶液S7的浓度为4000pg/mL;取7个1.5mL离心管,各加入250uL样本稀释液,然后吸取250uL标准品溶液S7到离心管S6中,得到标准品溶液S6,所述标准品溶液S6的浓度为2000pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S6到离心管S5中,得到标准品溶液S5,所述标准品溶液S5的浓度为1000pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S5到离心管S4中,得到标准品溶液S4,所述标准品溶液S4的浓度为500pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S4到离心管S3中,得到标准品溶液S3,所述标准品溶液S3的浓度为250pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S3到离心管S2中,得到标准品溶液S2,所述标准品溶液S2的浓度为125pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S2到离心管S1中,得到标准品溶液S1,所述标准品溶液S1的浓度为62.5pg/mL;标准品溶液S0为250uL所述样本稀释液,所述标准品溶液S1的浓度为0pg/mL,如表1所示:

[0050] 表1:标准品溶液S0~S7的浓度

编号	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
pg/mL	4000	2000	1000	500	250	125	62.5	0

[0052] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法中,所述步骤(2)中的所述生物素标记的检测抗体稀释液的制备步骤为:将所述生物素标记的检测抗体用所述样本稀释液进行稀释,得到生物素标记的检测抗体稀释液;其中所述生物素标记的检测抗体与所述生物素标记的检测抗体稀释液的体积比为1:1000。

[0053] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法中,所述步骤(2)中的所述辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液的制备步骤为:将所述辣根过氧化物酶标记的亲合素用所述样本稀释液进行稀释,得到辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液;其中所述辣根过氧化物酶标记的亲合素与所述辣根过氧化物酶

标记的亲合素稀释液的体积比为1:4000。

[0054] 在一个实施方案中,本发明所述的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法中,所述步骤(2)中的所述浓缩洗涤液工作液的制备步骤为:将所述浓缩洗涤液用去离子水进行稀释,得到浓缩洗涤液工作液;其中所述浓缩洗涤液与所述浓缩洗涤液工作液的体积比为1:25。

[0055] 本发明还提供本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒以及使用本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的检测方法在检测抗苗勒管激素含量中的应用。

[0056] 本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒及其检测方法的有益效果:在现有技术中,该类试剂盒多采用双抗夹心温育三步法,其反应时间为3.5h,反应步骤为三步,标准品/待测样本及检测抗体的上样量为100uL,实验设备为37℃恒温培养箱;而本发明的优点在于采用双抗夹心室温震荡两步法,其中反应步骤为两步,标准品/待测样本及检测抗体的上样量为50uL,将反应时间缩短至2.5h,减少了人力及设备成本,减少了原料、样本使用量以及降低了成本,从而提高了使用效率,如表2所示:

[0057] 表2:本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒与现有技术的对比

[0058]

	本发明	现有技术
反应时间	2.5h	3.5h
反应步骤	两步法	三步法
反应温度	室温	37℃
使用仪器	微孔板振荡器	37℃恒温箱
标准品/待测样本上样量	50uL	100uL
检测抗体上样量	50uL	100uL

附图说明

[0059] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0060] 图1为实施例12中本发明所述抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫检测方法的标准曲线图;

[0061] 图2为实施例13中本发明所述室温震荡两步法标准曲线图;

[0062] 图3为实施例13中现有技术温育三步法标准曲线图。

具体实施方式

[0063] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0064] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0065] 实施例1:本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒

[0066] 本发明检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括由捕获抗体包被的酶标板、样本稀释液、标准品、生物素标记的检测抗体、辣根过氧化物酶标记

的亲合素、浓缩洗涤液、底物溶液和终止液；

[0067] 其中,所述捕获抗体为鼠抗人AMH抗体;所述样本稀释液为1×PBS+1%BSA+0.05% Tween-20+0.1%Proclin300;所述标准品为人AMH冻干标准品;所述检测抗体为抗人AMH抗体;所述浓缩洗涤液为含有25×PBS+1.25%Tween20+2.5%Proclin300的25×PBST,其pH为7.6;所述底物溶液为TMB显色底物溶液;所述终止液为2M硫酸;所述25×PBS的制备步骤为:将200g NaCl、5g KCL、36g Na₂HPO₄和11g KH₂PO₄混合,添加水至1L,调节pH为6.0;其中,所述生物素标记的检测抗体的浓度为0.1ug/mL;所述辣根过氧化物酶标记的亲合素的浓度为0.125ug/mL。

[0068] 实施例2:本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒

[0069] 本发明检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括由捕获抗体包被的酶标板、样本稀释液、标准品、生物素标记的检测抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素、浓缩洗涤液、底物溶液和终止液;

[0070] 其中,所述捕获抗体为鼠抗人AMH抗体;所述样本稀释液为1×PBS+1%BSA+0.05% Tween-20+0.1%Proclin300;所述标准品为人AMH冻干标准品;所述检测抗体为抗人AMH抗体;所述浓缩洗涤液为含有25×PBS+1.25%Tween20+2.5%Proclin300的25×PBST,其pH为7.6;所述底物溶液为TMB显色底物溶液;所述终止液为2M硫酸;所述25×PBS的制备步骤为:将200g NaCl、5g KCL、36g Na₂HPO₄和11g KH₂PO₄混合,添加水至1L,调节pH为6.5;其中,所述生物素标记的检测抗体的浓度为0.4ug/mL;所述辣根过氧化物酶标记的亲合素的浓度为0.5ug/mL。

[0071] 实施例3:本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒

[0072] 本发明检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒,所述试剂盒包括由捕获抗体包被的酶标板、样本稀释液、标准品、生物素标记的检测抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素、浓缩洗涤液、底物溶液和终止液;

[0073] 其中,所述捕获抗体为鼠抗人AMH抗体;所述样本稀释液为1×PBS+1%BSA+0.05% Tween-20+0.1%Proclin300;所述标准品为人AMH冻干标准品;所述检测抗体为抗人AMH抗体;所述浓缩洗涤液为含有25×PBS+1.25%Tween20+2.5%Proclin300的25×PBST,其pH为7.6;所述底物溶液为TMB显色底物溶液;所述终止液为2M硫酸;所述25×PBS的制备步骤为:将200g NaCl、5g KCL、36g Na₂HPO₄和11g KH₂PO₄混合,添加水至1L,调节pH为6.5;其中,所述生物素标记的检测抗体的浓度为0.2ug/mL;所述辣根过氧化物酶标记的亲合素的浓度为0.25ug/mL。

[0074] 实施例4:本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中所述酶标板的制备方法

[0075] (1) 将鼠抗人AMH抗体用pH为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至1ug/mL后包被酶标板;其中,所述碳酸盐缓冲液的制备步骤为:将2.352g NaHCO₃和2.332g Na₂CO₃混合,添加水至1L;
(2) 将经步骤(1)处理的酶标板置于4℃下过夜;(3) 拍干,向每孔添加1%牛血清白蛋白封闭液进行封闭,然后置于37℃恒温箱2h,再拍干,然后向每孔添加10%蔗糖溶液固定0.5h。

[0076] 实施例5:本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中所述酶标板的制备方法

[0077] (1) 将鼠抗人AMH抗体用pH为7.2~7.4的磷酸盐缓冲液稀释至4ug/mL后包被酶标

板;其中,所述磷酸盐缓冲液的制备步骤为:将8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na₂HPO₄和0.44g KH₂PO₄混合,加水至1L;(2)将经步骤(1)处理的酶标板置于37℃恒温箱2h后再于4℃下过夜;(3)拍干,向每孔添加5%牛血清白蛋白封闭液进行封闭,然后置于37℃恒温箱2h,再拍干,然后向每孔添加10%蔗糖溶液固定0.5h。

[0078] 实施例6:本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中所述酶标板的制备方法

[0079] (1)将鼠抗人AMH抗体用pH为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至2ug/mL后包被酶标板;其中,所述碳酸盐缓冲液的制备步骤为:将2.352g NaHCO₃和2.332g Na₂CO₃混合,添加水至1L;(2)将经步骤(1)处理的酶标板置于4℃下过夜;(3)拍干,向每孔添加2%牛血清白蛋白封闭液进行封闭,然后置于37℃恒温箱2h,再拍干,然后向每孔添加10%蔗糖溶液固定0.5h。

[0080] 实施例7:本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中所述酶标板的制备方法

[0081] (1)将鼠抗人AMH抗体用pH为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至4ug/mL后包被酶标板;其中,所述碳酸盐缓冲液的制备步骤为:将2.352g NaHCO₃和2.332g Na₂CO₃混合,添加水至1L;(2)将经步骤(1)处理的酶标板置于4℃下过夜;(3)拍干,向每孔添加2~5%脱脂奶粉封闭液进行封闭,然后置于37℃恒温箱2h,再拍干,然后向每孔添加10%蔗糖溶液固定0.5h。

[0082] 实施例8:本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒中所述酶标板的制备方法

[0083] (1)将鼠抗人AMH抗体用pH为9.6的碳酸盐缓冲液稀释至4ug/mL后包被酶标板;其中,所述碳酸盐缓冲液的制备步骤为:将2.352g NaHCO₃和2.332g Na₂CO₃混合,添加水至1L;(2)将经步骤(1)处理的酶标板置于4℃下过夜;(3)拍干,向每孔添加5~10%小牛血清封闭液进行封闭,然后置于37℃恒温箱2h,再拍干,然后向每孔添加10%蔗糖溶液固定0.5h。

[0084] 实施例9:使用本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒进行检测

[0085] (1)制备待测样本处理液:

[0086] 将所述血清样本于室温下静置2小时或者于4℃下过夜后于2℃ 1000xg离心15min,取上清液作为待测样本处理液用于检测;或者将所述上清液分装,然后于-20℃下保存以待检测;应避免反复冻融,解冻后的待测样本处理液应再次进行离心,然后用于检测;

[0087] 或者,采集所述血浆样本后于2℃ 1000xg离心15min,取上清液作为待测样本处理液用于检测;或者将所述上清液分装,然后于-20℃下保存以待检测;应避免反复冻融,解冻后的待测样本处理液应再次进行离心,然后用于检测;

[0088] 或者,采集所述细胞培养物上清液样本或尿液样本,于2℃ 1000xg离心15min,取上清液作为待测样本处理液用于检测;或者将所述上清液分装,然后于-20℃下保存以待检测;应避免反复冻融;其中所述待测尿液样本上清液在检测前应再次离心,以去除该样本上清液在保存期间可能出现的沉淀;

[0089] 或者,取100mg所述组织裂解液样本,用1×PBS洗涤后剪成小块放入组织研磨器(匀浆管)中,然后添加至1mL 1×PBS中,制得匀浆,然后置于-20℃下过夜后反复冻融2次破坏细胞膜后,再于2℃ 5000xg离心5min,取上清液用于检测;或者将所述上清液分装,然后于-20℃下保存以待检测,解冻后的待测样本处理液应再次进行离心;

[0090] 需要注意的是,待测样本溶血会影响最终检测结果,因此溶血的待测样本不适宜进行该项检测。

[0091] (2) 制备标准品溶液、生物素标记的检测抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲生素稀释液、浓缩洗涤液工作液;

[0092] 所述标准品溶液的制备方法为:将4ng人AMH冻干标准品于6000rpm下离心30秒,然后用1mL所述样本稀释液溶解,得到标准品溶液S7,所述标准品溶液S7的浓度为4000pg/mL;取7个1.5mL离心管,各加入250uL样本稀释液,然后吸取250uL标准品溶液S7到离心管S6中,得到标准品溶液S6,所述标准品溶液S6的浓度为2000pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S6到离心管S5中,得到标准品溶液S5,所述标准品溶液S5的浓度为1000pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S5到离心管S4中,得到标准品溶液S4,所述标准品溶液S4的浓度为500pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S4到离心管S3中,得到标准品溶液S3,所述标准品溶液S3的浓度为250pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S3到离心管S2中,得到标准品溶液S2,所述标准品溶液S2的浓度为125pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S2到离心管S1中,得到标准品溶液S1,所述标准品溶液S1的浓度为62.5pg/mL;标准品溶液S0为250uL所述样本稀释液,所述标准品溶液S1的浓度为0pg/mL;

[0093] 所述生物素标记的检测抗体稀释液的制备步骤为:将所述生物素标记的检测抗体用所述样本稀释液进行稀释,得到生物素标记的检测抗体稀释液;其中所述生物素标记的检测抗体与所述生物素标记的检测抗体稀释液的体积比为1:1000;

[0094] 所述辣根过氧化物酶标记的亲生素稀释液的制备步骤为:将所述辣根过氧化物酶标记的亲生素用所述样本稀释液进行稀释,得到辣根过氧化物酶标记的亲生素稀释液;其中所述辣根过氧化物酶标记的亲生素与所述辣根过氧化物酶标记的亲生素稀释液的体积比为1:4000;

[0095] 所述浓缩洗涤液工作液的制备步骤为:将所述浓缩洗涤液用去离子水进行稀释,得到浓缩洗涤液工作液;其中所述浓缩洗涤液与所述浓缩洗涤液工作液的体积比为1:25;

[0096] (3) 将所述待测样本处理液、所述标准品溶液、所述生物素标记的检测抗体稀释液、所述辣根过氧化物酶标记的亲生素稀释液、所述浓缩洗涤液工作液、所述TMB显色底物溶液和所述2M硫酸在18℃下平衡15min;

[0097] (4) 取所述由捕获抗体包被的酶标板,分别设标准品孔和待测样本孔,向每个所述标准品孔添加所述标准品溶液50uL,并向每个所述待测样本孔添加所述待测样本处理液50uL;然后向每个孔添加50uL所述生物素标记的检测抗体稀释液,轻轻晃动混匀,用新的板贴覆盖,于18~25℃下用微孔板振荡器振荡90min;

[0098] (5) 弃去每个孔内的液体,甩干,然后向每个孔中添加所述浓缩洗涤液工作液200uL保持1min,重复3次,然后甩干;

[0099] (6) 向每个孔中添加所述辣根过氧化物酶标记的亲生素稀释液100uL,用新的板贴覆盖,于18℃下振荡30min;

[0100] (7) 弃去每个孔内的液体,甩干,然后向每个孔中添加所述浓缩洗涤液工作液200uL保持1min,重复5次,然后甩干;

[0101] (8) 向每个孔中添加所述TMB显色底物溶液90uL,于18℃下避光显色15min;

[0102] (9) 向每个孔中添加所述2M硫酸50uL,终止反应;

[0103] (10) 用酶标仪测定经所述步骤(9)处理后的酶标板在450nm波长下的光密度值(OD₄₅₀值)。

[0104] 实施例10:使用本发明所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒进行检测

[0105] (1) 制备待测样本处理液:

[0106] 将所述血清样本于室温下静置2小时或者于4℃下过夜后于8℃ 1000xg离心15min,取上清液作为待测样本处理液用于检测;或者将所述上清液分装,然后于-80℃下保存以待检测;应避免反复冻融,解冻后的待测样本处理液应再次进行离心,然后用于检测;

[0107] 或者,采集所述血浆样本后于8℃ 1000xg离心15min,取上清液作为待测样本处理液用于检测;或者将所述上清液分装,然后于-80℃下保存以待检测;应避免反复冻融,解冻后的待测样本处理液应再次进行离心,然后用于检测;

[0108] 或者,采集所述细胞培养物上清液样本或尿液样本,于8℃ 1000xg离心15min,取上清液作为待测样本处理液用于检测;或者将所述上清液分装,然后于-80℃下保存以待检测;应避免反复冻融;其中所述待测尿液样本上清液在检测前应再次离心,以去除该样本上清液在保存期间可能出现的沉淀;

[0109] 或者,取100mg所述组织裂解液样本,用1×PBS洗涤后剪成小块放入组织研磨器(匀浆管)中,然后添加至1mL 1×PBS中,制得匀浆,然后置于-20℃下过夜后反复冻融2次破坏细胞膜后,再于8℃ 5000xg离心5min,取上清液用于检测;或者将所述上清液分装,然后于-80℃下保存以待检测,解冻后的待测样本处理液应再次进行离心;

[0110] 需要注意的是,待测样本溶血会影响最终检测结果,因此溶血的待测样本不适宜进行该项检测。

[0111] (2) 制备标准品溶液、生物素标记的检测抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲生素稀释液、浓缩洗涤液工作液;

[0112] 所述标准品溶液的制备方法为:将4ng人AMH冻干标准品于10000rpm下离心60秒,然后用1mL所述样本稀释液溶解,得到标准品溶液S7,所述标准品溶液S7的浓度为4000pg/mL;取7个1.5mL离心管,各加入250uL样本稀释液,然后吸取250uL标准品溶液S7到离心管S6中,得到标准品溶液S6,所述标准品溶液S6的浓度为2000pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S6到离心管S5中,得到标准品溶液S5,所述标准品溶液S5的浓度为1000pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S5到离心管S4中,得到标准品溶液S4,所述标准品溶液S4的浓度为500pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S4到离心管S3中,得到标准品溶液S3,所述标准品溶液S3的浓度为250pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S3到离心管S2中,得到标准品溶液S2,所述标准品溶液S2的浓度为125pg/mL;然后吸取250uL标准品溶液S2到离心管S1中,得到标准品溶液S1,所述标准品溶液S1的浓度为62.5pg/mL;标准品溶液S0为250uL所述样本稀释液,所述标准品溶液S1的浓度为0pg/mL;

[0113] 所述生物素标记的检测抗体稀释液的制备步骤为:将所述生物素标记的检测抗体用所述样本稀释液进行稀释,得到生物素标记的检测抗体稀释液;其中所述生物素标记的检测抗体与所述生物素标记的检测抗体稀释液的体积比为1:1000;

[0114] 所述辣根过氧化物酶标记的亲生素稀释液的制备步骤为:将所述辣根过氧化物酶标记的亲生素用所述样本稀释液进行稀释,得到辣根过氧化物酶标记的亲生素稀释液;其

中所述辣根过氧化物酶标记的亲合素与所述辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液的体积比为1:4000;

[0115] 所述浓缩洗涤液工作液的制备步骤为:将所述浓缩洗涤液用去离子水进行稀释,得到浓缩洗涤液工作液;其中所述浓缩洗涤液与所述浓缩洗涤液工作液的体积比为1:25;

[0116] (3) 将所述待测样本处理液、所述标准品溶液、所述生物素标记的检测抗体稀释液、所述辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、所述浓缩洗涤液工作液、所述TMB显色底物溶液和所述2M硫酸在25℃下平衡30min;

[0117] (4) 取所述由捕获抗体包被的酶标板,分别设标准品孔和待测样本孔,向每个所述标准品孔添加所述标准品溶液50uL,并向每个所述待测样本孔添加所述待测样本处理液50uL;然后向每个孔添加50uL所述生物素标记的检测抗体稀释液,轻轻晃动混匀,用新的板贴覆盖,于25℃下用微孔板振荡器振荡120min;

[0118] (5) 弃去每个孔内的液体,甩干,然后向每个孔中添加所述浓缩洗涤液工作液200uL保持2min,重复3次,然后甩干;

[0119] (6) 向每个孔中添加所述辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液100uL,用新的板贴覆盖,于25℃下振荡45min;

[0120] (7) 弃去每个孔内的液体,甩干,然后向每个孔中添加所述浓缩洗涤液工作液200uL保持2min,重复5次,然后甩干;

[0121] (8) 向每个孔中添加所述TMB显色底物溶液100uL,于25℃下避光显色30min;

[0122] (9) 向每个孔中添加所述2M硫酸100uL,终止反应;

[0123] (10) 用酶标仪测定经所述步骤(9)处理后的酶标板在450nm波长下的光密度值(OD₄₅₀值)。

[0124] 实施例11:确定最佳检测条件

[0125] (1) 筛选包被捕获抗体的最佳条件

[0126] 分别用pH为9.6的碳酸盐缓冲液、pH为7.2~7.4的磷酸盐缓冲液包被所述捕获抗体来制备酶标板,直接放置于4℃过夜或者放置于37℃恒温箱2h后再4℃过夜,均设置3复孔,根据S7/S0孔OD₄₅₀值最大者则为最佳缓冲液,结果如表3所示:

[0127] 表3:

包被条件	4℃ 过夜		37℃ 恒温箱 2h 后再 4℃ 过夜	
	碳酸盐缓冲液	磷酸盐缓冲液	碳酸盐缓冲液	磷酸盐缓冲液
S7	2.897	2.464	2.854	2.642
S0	0.135	0.131	0.175	0.154
S7/S0	21.459	18.809	16.309	17.156

[0130] 结论:最佳包被条件包括使用pH为9.6的碳酸盐缓冲液,在4℃下过夜。

[0131] (2) 筛选最佳封闭条件

[0132] 分别向所述酶标板的每个孔添加2%牛血清白蛋白、5%脱脂奶粉或10%小牛血清的封闭液,其中均设置3复孔,然后放置于37℃恒温箱2h,拍干后向每孔添加10%蔗糖溶液

固定0.5h;根据S7/S0孔OD₄₅₀值最大者则为最佳封闭条件,结果如表4所示:

[0133] 表4:封闭效果对比

[0134]	封闭条件	2%牛血清白蛋白	5%脱脂奶粉	10%小牛血清
	S7	2.653	2.464	2.653
	S0	0.125	0.141	0.125
	S7/S0	21.224	17.475	21.224

[0135] 结论:从表4可以看出,小牛血清与牛血清白蛋白均能达到很好的封闭效果,但是小牛血清受批次影响较大,不如牛血清白蛋白稳定,因此优选2%牛血清白蛋白来配制本发明所述封闭液。

[0136] (3) 筛选包被抗体的最佳浓度和生物素标记的检测抗体的最佳浓度

[0137] 在标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素 (Streptavidin-HRP) 使用条件固定的情况下,采用棋盘滴定方法分别设置不同包被抗体浓度、生物素标记的检测抗体浓度,根据S7/S0孔OD₄₅₀值最大者则为最佳包被抗体浓度和生物素标记的检测抗体浓度,结果如表5所示:

[0138] 表5:包被抗体浓度和生物素标记的检测抗体浓度的效果对比

[0139]	包被抗体浓度 生物素标记的 检测抗体浓度 标准品		0.5 ug/mL	1 ug/mL	2 ug/mL	4 ug/mL
			S7	1.158	2.042	2.214
	0.1 ug/mL	S0	0.064	0.098	0.115	0.121
		S7/S0	18.094	20.837	19.252	19.38
S7		1.654	2.241	2.568	2.697	
[0140]	0.2 ug/mL	S0	0.097	0.115	0.124	0.134
		S7/S0	17.052	19.487	20.71	20.127
		S7	1.924	2.464	2.648	2.789
	0.4 ug/mL	S0	0.118	0.128	0.132	0.142
S7/S0		16.305	19.25	20.061	19.641	
S7		2.168	2.654	2.848	2.988	
0.8 ug/mL	S0	0.121	0.148	0.154	0.161	
	S7/S0	17.917	17.932	18.494	18.559	

[0141] 结论:从表5可以看出,本发明所述最佳条件为选取包被抗体浓度为2ug/mL,并选取生物素标记的检测抗体的浓度为0.2ug/mL。

[0142] (4) 筛选标准品溶液S7的最佳浓度和辣根过氧化物酶标记的亲合素的最佳浓度

[0143] 在包被抗体浓度和生物素标记的检测抗体浓度固定的情况下,采用棋盘滴定方法

分别设置不同浓度的标准品溶液S7、辣根过氧化物酶标记的亲合素 (Streptavidin-HRP)，选择标准品溶液S7浓度最低且OD₄₅₀值≥2.5且S0孔OD₄₅₀值≤0.15为最佳条件，结果如表6所示：

[0144] 表6:标准品溶液S7浓度和辣根过氧化物酶标记的亲合素浓度的效果对比

标准品溶液 S7 浓度	辣根过氧化物酶标记的亲合素浓度			
	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
1 ug/mL	3.458	3.462	3.356	2.852
1 ug/mL	3.456	3.455	3.415	2.831
100 ng/mL	3.122	3.054	2.998	2.025
100 ng/mL	3.119	3.061	2.965	2.031
10 ng/mL	3.012	2.989	2.868	1.452
10 ng/mL	3.001	2.978	2.903	1.465
1 ng/mL	2.456	2.045	1.425	0.951
1 ng/mL	2.501	2.055	1.418	0.932
0 ug/ml	0.178	0.152	0.124	0.109
0 ug/ml	0.182	0.149	0.123	0.112

[0145] 结论:从表6可以看出,本发明所述标准品溶液S7的浓度范围可以为1~10ng/mL,最优为4ng/mL,即,将4ng人AMH冻干标准品用1mL所述样本稀释液进行稀释。

[0146] 实施例12:实验参数验证

[0147] 根据本发明所述实验条件,建立所述检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒的方法标准,其中所述验证实验参数如下:

[0148] (1) 标准曲线的建立

[0149] 本发明标准曲线OD₄₅₀值结果如表7所示:

[0150] 表7:

标准曲线 (pg/mL)	OD ₄₅₀ 1	OD ₄₅₀ 2	平均OD ₄₅₀
4000	2.617	2.641	2.629
2000	1.893	1.891	1.892
1000	1.291	1.256	1.274
500	0.897	0.901	0.899
250	0.599	0.612	0.606
125	0.408	0.407	0.408
62.5	0.265	0.258	0.262
0	0.141	0.143	0.142

[0151] 有理函数: $y = (a+bx) / (1+cx+dx^2)$

[0152] 系数数据: $a = -84.464; b = 487.949; c = -0.416; d = 0.057;$

[0153] 结论:通过拟合如附图1所示的标准曲线,得到标准曲线相关线性: $R > 0.9998$,其符合行业要求 $R > 0.9900$,下文用 $R > 0.9900$ 表示。

[0154] (2) 最低检测限(灵敏度)为15.56pg/mL,该值为20个空白样品(即所述样本稀释液)测定的平均值加二倍标准差所对应的浓度。

[0155] (3) 本发明所述待测样本测试:

[0158] 随机测试正常人血清样本原液56份,待测样本处理按照本发明所述血清样本处理,OD₄₅₀值如表8所示:

[0159] 表8:所述血清样本OD₄₅₀值

[0160]	2.487	3.110	1.867	0.189	3.089	0.914	2.995
	1.105	1.895	2.565	0.826	0.926	1.865	1.044
	0.447	1.565	3.071	1.254	1.353	1.898	2.882
	1.412	1.805	1.223	1.413	1.198	2.224	0.828
[0161]	2.989	3.060	1.444	1.345	0.732	2.667	1.543
	0.192	3.251	1.009	3.182	1.213	0.567	0.784
	2.900	3.098	0.987	0.343	1.687	0.838	2.481
	0.557	1.316	2.073	0.400	2.840	0.243	0.656

[0162] 根据上述拟合公式 $y = (a+bx) / (1+cx+dx^2)$ 得出OD₄₅₀值所对应的浓度ng/mL如表9所示:

[0163] 表9:所述血清样本浓度 (ng/ml)

[0164]	3.551	5.564	1.959	0.008	5.497	0.541	5.189
	0.746	2.018	3.789	0.458	0.554	1.954	0.677
	0.162	1.390	5.439	0.929	1.064	2.024	4.814
	1.148	1.832	0.888	1.151	0.857	2.805	0.460
	5.170	5.401	1.197	1.052	0.376	4.111	1.354
	0.010	6.007	0.639	5.793	0.876	0.246	0.421
	4.876	5.525	0.616	0.096	1.604	0.469	3.532
	0.239	1.011	2.424	0.132	4.677	0.038	0.314

[0165] 所述血清样本的浓度范围计算如表10所示:

[0166] 表10:

[0167] 血清样本数量	血清样本范围 (ng/mL)
n=8	<0.25
n=15	0.25-0.90
n=33	0.91-6.10

[0168] 其中有20份血清样本的OD₄₅₀值 ≥ 2.0 ,浓度计算偏差较大,而使用血清样本稀释液稀释5倍后再测,其测值(浓度ng/mL)如表11所示:

[0169] 表11:血清样本OD₄₅₀值和浓度

[0170]	OD ₄₅₀ 值	1.211	1.763	1.692	1.899	1.795	1.984	1.865	1.305	1.831	1.052
	浓度ng/mL	4.367	8.741	8.068	10.132	9.056	11.072	9.772	4.983	9.420	3.428
[0171]	OD ₄₅₀ 值	0.851	1.902	1.425	1.854	0.981	1.324	1.764	1.596	1.201	1.542

浓度ng/mL	2.407	10.165	5.841	9.657	3.048	5.113	8.751	7.213	4.305	6.760
---------	-------	--------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

[0172] 结论:从以上可以看出,随机测试正常人血清样本56份,该样本范围如表12所示,与所查询的资料(Mayo Clinic官网数据)相符。由此得出本发明试剂盒准确率合格,可适用于待测样本检测。

[0173] 表12:

血清样本数量	血清样本范围 (ng/mL)
n=8	<0.25
n=15	0.25-0.90
n=23	0.91-7.25
n=10	7.25-11.10

[0175] 根据Mayo Clinic官网数据,AMH参考值如表13所示:

[0176] 表13:

参考分组	参考范围 (ng/mL)
男性:<24个月	14-466
男性:24个月-12年	7.4-243
男性:>12年	0.7-19
女性:<24个月	<4.7
女性:24个月-12年	<8.8
女性:13-45年	0.9-9.5
女性:>45年	1.0
绝经期或者卵巢功能早衰妇女	<0.25

[0178] (4) 特异性检测

[0179] 选取12种不同种属的血清作为样本检测,根据其OD₄₅₀值对应浓度计算交叉率,根据交叉率大小判定本发明所述试剂盒特异性情况,数据如表14所示:

[0180] 表14:

标准曲线 pg/mL	OD ₄₅₀ 1	OD ₄₅₀ 2	平均 OD ₄₅₀	样本	OD ₄₅₀	样本	OD ₄₅₀	样本	OD ₄₅₀
	4000	2.517	2.641	2.579	小鼠 1	0.132	绵羊 1	0.138	狗 1
2000	1.958	2.022	1.990	小鼠 2	0.137	绵羊 2	0.140	狗 2	0.190
1000	1.263	1.246	1.254	大鼠 1	0.140	牛 1	0.093	兔 1	0.176
500	0.997	1.000	0.999	大鼠 2	0.131	牛 2	0.091	兔 2	0.161
250	0.589	0.660	0.624	豚鼠 1	0.093	马 1	0.103	鸡 1	0.244
125	0.408	0.427	0.418	豚鼠 2	0.150	马 2	0.110	鸡 2	0.217
62.5	0.265	0.248	0.256	山羊 1	0.204	猪 1	0.131	鸭 1	0.173
0	0.150	0.151	0.151	山羊 2	0.110	猪 2	0.128	鸭 2	0.116

[0181]

[0182] 结论:经种属间特异性检测得出,本发明所述试剂盒与其他种属均无交叉反应,特异性强。

[0183] (5) 精密度检测

[0184] 同一批次内精密度测试方法:用低、中、高值待测样本对同一批次的产品分别重复测定20次(n),计算该20次测量结果的平均值和标准差(SD),根据公式 $CV = \text{标准差} / \text{平均值} \times 100\%$,计算变异系数(CV);不同批次间精密度测试方法:用低、中、高值待测样本,对3个批次的产品分别重复测定20次(n),计算该20次测量结果的平均值和标准差(SD),根据公式 $CV = \text{标准差} / \text{平均值} \times 100\%$,计算变异系数CV,如表15所示:

[0185] 表15:

待测样本	同一批次内			不同批次间		
	低值	中值	高值	低值	中值	高值
n	20	20	20	20	20	20
平均值 (pg/mL)	125.661	562.883	1582.497	135.321	550.643	1605.497
SD	7.460	18.068	36.021	8.310	21.031	42.101
CV (%)	5.937%	3.210%	2.276%	6.141%	3.819%	2.622%

[0187] 结论:从以上可以看出,本发明所述试剂盒精密度较好,均符合行业要求同一批次内 $CV \leq 8\%$ 且不同批次间 $CV \leq 10\%$ 的标准。

[0188] (6) 稳定性检测

[0189] 测试方法:将本发明所述试剂盒中各试剂(由捕获抗体包被的酶标板、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素)放置于37℃下4天、7天进行热破坏实验,然后与于4℃下放置的各试剂进行对比,设置标准曲线及待测样本,计算下降的百分比,以此来判断稳定性,推算有效期,如表16所示:

[0190] 表16:

[0191]

放置条件	4°C 放置	37°C 4 天	37°C 7 天	37°C 4 天	37°C 7 天
标准曲线 (pg/ml)	OD ₄₅₀	OD ₄₅₀	OD ₄₅₀	下降率	下降率
4000	2.635	2.564	2.408	3%	9%
2000	1.860	1.803	1.752	3%	6%
1000	1.186	1.002	0.998	16%	16%
500	0.692	0.589	0.566	15%	18%
250	0.403	0.383	0.365	5%	9%
125	0.298	0.244	0.245	18%	18%
62.5	0.228	0.210	0.203	8%	11%
0	0.150	0.146	0.144	3%	4%
待测样本 1	1.561	1.502	1.407	4%	10%
待测样本 2	1.324	1.321	1.258	0%	5%
待测样本 3	1.158	1.023	0.997	12%	14%
待测样本 4	0.891	0.857	0.824	4%	8%
待测样本 5	0.752	0.713	0.654	5%	13%
待测样本 6	0.658	0.621	0.609	6%	7%
待测样本 7	0.469	0.438	0.403	7%	14%
待测样本 8	0.457	0.435	0.401	5%	12%

[0192] 其中:37°C 7天下降率 = $(1 - 37^\circ\text{C} 7\text{天OD}_{450} / 4^\circ\text{C}\text{放置OD}_{450}) \times 100\%$

[0193] 37°C 4天下降率 = $(1 - 37^\circ\text{C} 4\text{天OD}_{450} / 4^\circ\text{C}\text{放置OD}_{450}) \times 100\%$

[0194] 结论:从以上可以看出,本发明所述试剂盒稳定性好,在37°C下热破坏7天,标准品及待测样本的平均下降率为11%,符合拟定的技术要求中的指标要求,以此推断本发明所述试剂盒稳定性为1年。

[0195] 通过以上详细数据可得出本发明所述试剂盒的参数如下:标准曲线线性: $R > 0.9900$;最低检测限(灵敏度):15.56pg/mL;特异性:无其他种属无交叉精密度:同一批次内 $CV \leq 8\%$,不同批次间 $CV \leq 10\%$;稳定性:有效期为一年;

[0196] 从以上所述可见,利用本发明制得的检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒具有特异性强、精密度好、稳定性好,且能准确检测AMH浓度,可根据对检测结果的定量分析来辅助评估卵巢功能的生育能力及早衰病症。

[0197] 实施例13:本发明与现有技术的对比实验

[0198] 将现有技术双抗夹心温育三步法与本发明所述双抗夹心温育两步法就所述试剂盒参数(标准曲线线性、待测样本范围、最低检测限、特异性、精密度、稳定性)进行对比实验,详细数据如表17、18、19和20所示:

[0199] (1) 标准曲线线性对比

[0200] 表17:标准曲线线性对比

标准曲线 (pg/ml)	本发明(室温震荡两步法)			现有技术(温育三步法)		
	OD ₄₅₀ 1	OD ₄₅₀ 2	平均 OD ₄₅₀	OD ₄₅₀ 1	OD ₄₅₀ 2	平均 OD ₄₅₀
4000	2.627	2.638	2.633	2.735	2.768	2.752
2000	1.889	1.890	1.890	1.925	1.931	1.928
1000	1.281	1.287	1.284	1.291	1.285	1.288
500	0.897	0.899	0.898	0.918	0.911	0.915
250	0.589	0.612	0.601	0.608	0.615	0.612
125	0.395	0.401	0.398	0.428	0.439	0.434
62.5	0.262	0.258	0.260	0.283	0.289	0.286

[0201]

[0202]

0	0.141	0.140	0.141	0.179	0.182	0.181
待测样本 1	1.321	1.350	1.336	1.456	1.501	1.479
待测样本 2	1.025	0.992	1.009	1.114	1.125	1.120
待测样本 3	0.925	0.913	0.919	1.0217	1.027	1.024
待测样本 4	0.768	0.782	0.775	0.857	0.872	0.865
待测样本 5	0.645	0.624	0.635	0.704	0.719	0.712
待测样本 6	0.581	0.576	0.579	0.625	0.634	0.630
待测样本 7	0.551	0.538	0.545	0.605	0.612	0.609
待测样本 8	0.498	0.469	0.484	0.534	0.551	0.543

[0203] 其中,本发明所述室温震荡两步法标准曲线如附图2所示,公式如下:

[0204] 有理函数: $y = (a+bx) / (1+cx+dx^2)$

[0205] 系数数据:

[0206] $a = -77.600$

[0207] $b = 472.407$

[0208] $c = -0.430$

[0209] $d = 0.061$

[0210] 现有技术温育三步法标准曲线如附图3所示,公式如下:

[0211] 有理函数: $y = (a+bx) / (1+cx+dx^2)$

[0212] 系数数据:

[0213] $a = -104.479$

[0214] $b = 508.708$

[0215] $c = -0.403$

[0216] $d = 0.057$

[0217] 结论:从以上可以看出,本发明(室温震荡两步法)标准曲线相关线性: $R > 0.9999$;
现有技术(温育三步法)标准曲线相关线性: $R > 0.9998$;

[0218] 因此,本发明(室温震荡两步法)与现有技术(温育三步法)线性R均 > 0.9900 ,符合行业要求标准,且本发明较现有技术更优。

[0219] (2) 待测样本范围对比

[0220] 表18:待测样本范围对比

待测样本	本发明(室温震荡两步法)		现有技术(温育三步法)		偏差率
	平均 OD ₄₅₀	浓度 ng/mL	平均 OD ₄₅₀	浓度 ng/mL	
待测样本 1	1.336	1.035	1.479	1.225	15%
待测样本 2	1.009	0.635	1.120	0.750	15%
[0221] 待测样本 3	0.919	0.543	1.024	0.635	14%
待测样本 4	0.775	0.410	0.865	0.483	15%
待测样本 5	0.635	0.296	0.712	0.347	15%
待测样本 6	0.579	0.254	0.630	0.281	10%
待测样本 7	0.545	0.229	0.609	0.264	13%
待测样本 8	0.484	0.187	0.543	0.215	13%

[0222] 其中:

[0223] 浓度由相对应的本发明(室温震荡两步法)的拟合曲线和现有技术(温育三步法)的拟合曲线所得出的公式计算;

[0224] 偏差率 = $(1 - \text{室温震荡两步法待测样本浓度} / \text{温育三步法待测样本浓度}) \times 100\%$

[0225] 结论:从以上可以看出,本发明所述方法和现有技术的偏差率均 $\leq 15\%$,偏差率较小,准确度测试合格。

[0226] (3) 最低检测限(灵敏度)对比如下:

[0227] 所述最低检测限为20个空白样品(即所述样本稀释液)测定的平均值加二倍标准差所对应的浓度。灵敏度越高,最低检测限值则越低。

[0228] 本发明所述室温震荡两步法的最低检测限测值为15.438pg/mL;现有技术温育三步法的最低检测限测值为17.598pg/mL;因此,本发明所述室温震荡两步法比现有技术温育三步法灵敏度更高。

[0229] (4) 特异性测试对比

[0230] 选取12种不同种属血清作为待测样本检测,根据其OD₄₅₀值对应浓度计算交叉率,根据交叉率大小判定该试剂盒特异性情况。

[0231] 结论:经种属间特异性检测得出,本发明所述室温震荡两步法、现有技术温育三步法均与其他种属无交叉反应,特异性强。

[0232] (5) 精密度对比

[0233] 同一批次内精密度测试方法:用低、中、高值待测样本对同一批次的产品分别重复测定20次(n),计算20次测量结果的平均值和标准差(SD),根据公式 $CV = \text{标准差} / \text{平均值} \times 100\%$,计算变异系数(CV)。

[0234] 不同批次间精密度测试方法:用低、中、高值待测样本,对3个批次间的产品分别重复测定20次(n),计算20次测量结果的平均值和标准差(SD),根据公式 $CV = \text{标准差} / \text{平均值} \times 100\%$,计算变异系数(CV)。

[0235] 同一批次内精密度如表19所示:

[0236] 表19:

待测样本	本发明(室温震荡两步法)			现有技术(温育三步法)		
	低值	中值	高值	低值	中值	高值
n	20	20	20	20	20	20
平均 (pg/mL)	124.261	542.823	1435.182	130.221	555.623	1585.417
SD	7.361	18.022	35.982	8.321	22.152	43.157
CV (%)	5.924%	3.320%	2.507%	6.390%	3.987%	2.722%

[0237] 不同批次间精密度如表20所示:

[0238] 表20:

待测样本	本发明(室温震荡两步法)			现有技术(温育三步法)		
	低值	中值	高值	低值	中值	高值
n	20	20	20	20	20	20
平均 (pg/mL)	124.261	542.823	1435.182	130.221	555.623	1585.417
SD	7.361	18.022	35.982	8.321	22.152	43.157
CV (%)	5.924%	3.320%	2.507%	6.390%	3.987%	2.722%

[0239] 结论:本发明所述室温震荡两步法和现有技术温育三步法均符合行业要求,即:同一批次内 $CV \leq 8\%$,不同批次间 $CV \leq 10\%$ 标准。本发明所述室温震荡两步法较现有技术温育三步法的精密度更高。

[0242] (6) 稳定性测试对比

[0243] 测试方法:将本发明所述试剂盒中各试剂(由捕获抗体包被的酶标板、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素)放置于37℃下4天、7天进行热破坏实验,然后与于4℃下放置的各试剂进行对比,设置标准曲线及待测样本,计算下降的百分比,以此来判断稳定性,推算有效期。

[0244] 结论:本发明所述室温震荡两步法和现有技术温育三步法经稳定性测试后,37℃热破坏7天,标准品及待测样本的平均下降率为11%,均符合拟定的技术要求中指标要求,以此推断两种方法的试剂盒稳定性均为1年。

[0245] 综上所述:通过以上试剂盒各项参数验证对比实验得出,本发明所述室温震荡两步法与现有技术温育三步法均符合行业内标准,而本发明所述试剂盒的各项参数更优于现有技术,其反应时间更短、操作简单、原料及待测样本使用量更少、设备及实验要求更低,更适合普通实验室使用,受众更广,能带来的市场效益更大。

[0246] 因此,本发明所述试剂盒及其检测方法与现有技术相比,其有益效果是:本发明采用双抗夹心室温震荡两步法,缩短反应时间至2.5h,反应步骤为两步,标准品/待测样本及检抗上样量为50uL,实验设备为微孔板振荡器,减少了人力及设备成本,减少了原料、待测样本使用量及降低成本,对于较难收集或较珍贵的待测样本来说,提高了使用效率。本发明所述试剂盒及其检测方法的反应步骤简明、操作简单、使用方便,并且检测结果能准确计算出AMH的浓度,对AMH进行定量分析,如表21所示:

[0247] 表21:

	本发明	现有技术
反应时间	2.5 h	3.5 h
反应步骤	两步	三步
反应温度	室温	37℃
使用仪器	微孔板振荡器	37℃ 恒温培养箱
标准品/待测样本上样量	50 uL	100 uL
生物素化抗体上样量	50 uL	100 uL
线性 R	更优	符合
最低检测限	15.438 pg/mL	17.598 pg/mL
待测样本测试(准确度)	符合	符合
特异性	符合	符合
精密度	更优	符合
稳定性	符合	符合

[0250] 总之,以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明,本领域技术人员可以

根据本发明作出各种改变或变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求的范围。

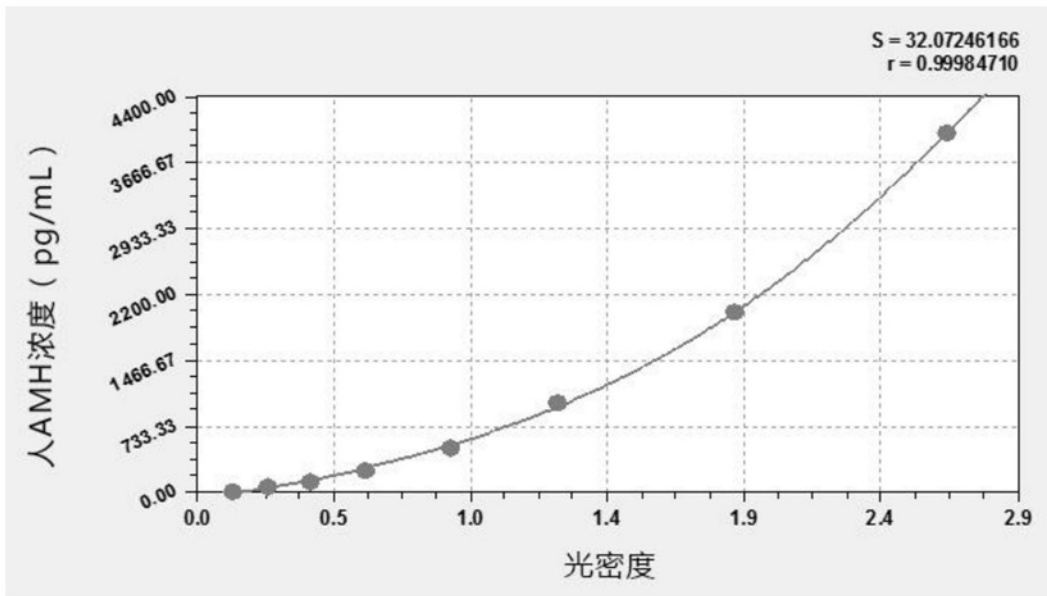


图1

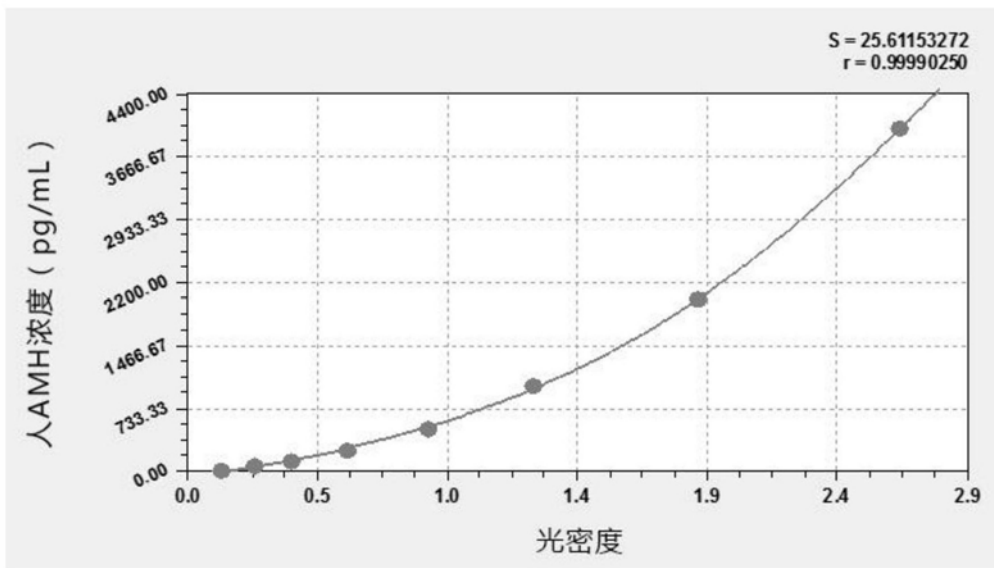


图2

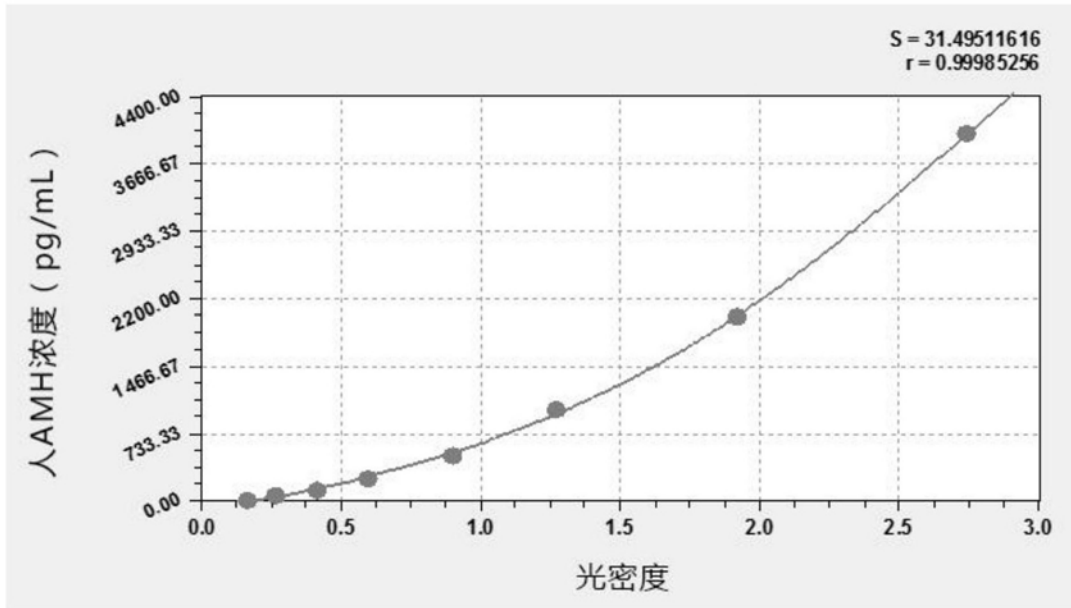


图3

专利名称(译)	一种检测抗苗勒管激素含量的酶联免疫试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN110940817A	公开(公告)日	2020-03-31
申请号	CN2019111313451.X	申请日	2019-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉华美生物工程有限公司		
[标]发明人	邓陈玲 华权高		
发明人	邓陈玲 华权高		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/74		
代理人(译)	刘杰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测抗苗勒管激素含量的双抗夹心酶联免疫试剂盒及其检测方法，所述试剂盒包括由捕获抗体包被的酶标板、样本稀释液、标准品、生物素标记的检测抗体、辣根过氧化物酶标记的亲合素、浓缩洗涤液、底物溶液和终止液；其中，所述捕获抗体为鼠抗人AMH抗体；所述样本稀释液为1×PBS+1%BSA+0.05%Tween-20+0.1%Proclin300；所述标准品为人AMH冻干标准品；所述检测抗体为抗人AMH抗体；所述浓缩洗涤液为含有25×PBS+1.25%Tween20+2.5%Proclin300的25×PBST，其pH为7.6；所述底物溶液为TMB显色底物溶液；所述终止液为2M硫酸。本发明所述试剂盒及其检测方法减少了人力及设备成本，减少了原料、样本使用量以及降低了成本，从而提高了使用效率。

