



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109212195 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201811213296.X

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2018.10.18

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区经开第十五大街199号

(72)发明人 张跃峰 刘功成 渠海 汤久停
朱宇皇 孙理智 张创 郑业焕
付光宇

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒,包括包被有羊抗人AMH多克隆抗体的磁微粒,酶标记的经修饰的鼠抗人AMH单克隆抗体,AMH校准品,浓缩洗液和底物。本发明的优点在于采用了目前推广应用最快、最先进的化学发光免疫分析方法,与现有技术相比,化学发光免疫分析法克服了RIA放射性污染的不足、酶联免疫吸附测定法中酶标记物的不稳定性和定量范围窄的缺陷,同时还克服了ELISA法中荧光标记易受环境干扰的难点和ECLI的非直接标记等缺点,检测灵敏度和精确度较酶免法、荧光法等高几个数量级,减少了检测步骤和反应时间,应用范围广,能够应用于自动化和半自动化仪器,具有很好的发展前景。

1. 一种利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括包被有羊抗人AMH多克隆抗体的磁微粒,酶标记的经修饰的鼠抗人AMH单克隆抗体,AMH校准品,浓缩洗液和底物。

2. 根据权利要求1所述的利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒,其特征在于:所述用于酶标记的经修饰的鼠抗人AMH单克隆抗体切去Fc片段且能够与AMH抗原上的稳定位点相结合。

3. 根据权利要求1所述的利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒,其特征在于:所述磁微粒为粒径1.1 μ m的氨基磁微粒。

4. 根据权利要求1所述的利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒,其特征在于:所述磁微粒包被羊抗人AMH多克隆抗体的储存液中含有BSA、Procline300、EDTA、磷酸盐缓冲液和免疫检测活性剂;其中免疫检测活性剂为吐温20、聚乙二醇。

5. 根据权利要求1所述的利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒,其特征在于:所述酶为辣根过氧化物酶。

一种利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术,尤其是涉及一种利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒。

背景技术

[0002] 根据世界卫生组织 (WHO) 公布的数据,生育问题困扰着全球约10%的夫妻,影响多达8000万人,而且这一数字还在不断上升。因此,对女性生育能力的尽早评估是十分必要的。

[0003] 目前对女性的生育能力是通过卵巢储备功能来进行评估的。卵巢储备功能是指卵泡库质量和卵泡数量,且育龄期女性的卵巢储备功能随年龄增加而下降。

[0004] 目前,临床上用来评估卵巢储备功能的指标包括年龄,基础卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone,FSH)、促黄体生成素 (luteotropic hormone,LH)、雌二醇 (Estradiol,E2)、窦卵泡计数 (antral follicle count,AFC)、抗缪勒管激素 (Anti-Mullerian Hormone,AMH)、抑制素B (Inhibin B,INHB) 等多个指标。年龄是最常用的卵巢储备评估指标,高龄女性卵母细胞数量减少,卵母细胞质量下降,导致自然妊娠率降低,自然流产、胎儿畸形及各种出生缺陷风险增高。但对于某些特殊人群,年龄并不能代表卵巢功能的真实状态,例如多囊卵巢综合征 (PCOS) 和卵巢早衰 (POF/POI)。PCOS患者的基础窦卵泡数目 (AFC) 较多,卵巢储备较好;而POF/POI患者,由于卵母细胞先天储备不足或提前耗竭,其生育期显著缩短。因此,采用一个稳定可靠的衡量卵巢储备功能的指标将会给整个生殖医学带来巨大的便利。

[0005] 近年来,借助抗缪勒管激素 (AMH) 的测定,可以更准确地评估卵巢储备,尤其是青春期、年轻女性人群,对她们进行适时的生育指导,是非常流行的。

[0006] 抗缪勒管激素 (AMH) 是转化生长因子 β 超家族的成员之一,由Profess Alfred Jost于1947年首先发现,由两个相同的72kb亚基通过二硫键连接组成的二聚糖蛋白,相对分子质量为140KDa。

[0007] AMH在男性,最初表达在8周胎儿睾丸支持细胞中,抑制缪勒氏管发育;在女性,由卵泡颗粒细胞分泌,在小于4mm窦卵泡中强表达,4至8mm窦卵泡中弱表达,大于8mm窦卵泡不表达;女性一生的分泌趋势为:最初表达在36周胎儿的卵巢中,在青春期达到高峰,之后逐渐降低直至绝经期。

[0008] AMH在女性的生理作用为:抑制原始卵泡启动、抑制FSH刺激作用下的卵泡生长、抑制卵巢颗粒细胞增殖、抑制芳香化酶活性,目的是防止卵泡池过快消耗。

[0009] AMH应用于临床具有其明显优势,首先相对于其他激素指标,可以更敏感更准确反映年龄相关卵巢储备功能的下降;其次受月经周期的影响小、稳定性强;再次受短期激素避孕药影响小,便于临床使用:1、进行卵巢储备的评估,由于AMH 是最早的随年龄增长发生变化的卵巢功能评估指标,它可以在早期更准确的预测妇女卵巢储备功能;其在月经周期内和周期间保持稳定,是临床上评价卵巢储备的良好指标。2、多囊卵巢综合征 (PCOS) 诊断指

标之一,研究表明,AMH对PCOS诊断的敏感性和特异性分别为92%和67%;PCOS患者AMH高于正常人2至3倍。3、辅助生殖技术,通过AMH在辅助生殖技术(ART)中的预测作用,可对患者进行卵巢储备及卵巢反应的正确评估,制定理想的个体化治疗方案,在一定程度上可提高妊娠率,降低并发症等危险因素。4、卵巢颗粒细胞瘤(GCT)的检查,一般正常绝经后妇女不表达AMH,90%成人型GCT的AMH表达呈高水平(6.8 ng/ml-117.9ng/ml),因此AMH可作为成人型GCT的肿瘤标记物。

[0010] 目前对AMH指标的测定常采用免疫方法有放射免疫分析法(radioimmunoassay,RIA)、酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)、电化学发光免疫分析法(electro-chemiluminescence immunoassay,ECLI)等。RIA由于放射性污染,对环境和操作者影响较大,同时批内批间变异较大,难于自动化;ELISA采用大分子酶标记,酶容易失活,这种依靠比色法或偏振光法的检测技术所受的干扰因素太多,其灵敏度、线性和稳定性不高;ECLI法为非开放系统,试剂依赖进口,价格昂贵,维修及检测成本高,限制了其推广应用。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒。与现有技术相比,该试剂盒的反应时间短、检测步骤少且灵敏度高。

[0012] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒,包括包被有羊抗人AMH多克隆抗体的磁微粒,酶标记的经修饰的鼠抗人AMH单克隆抗体,AMH校准品,浓缩洗液和底物。

[0013] 所述用于酶标记的经修饰的鼠抗人AMH单克隆抗体切去Fc片段且能够与AMH抗原上的稳定位点相结合,极大的提高了反应的特异性。

[0014] 所述磁微粒为粒径1.1 μ m的氨基磁微粒。

[0015] 所述磁微粒包被羊抗人AMH多克隆抗体的储存液中含有BSA、Procline300、EDTA、磷酸盐缓冲液和免疫检测活性剂;其中免疫检测活性剂为Tween20、聚乙二醇(PEG)。其中适量的EDTA能消除二价金属离子对反应检测的影响,并且可以用于消除血样本中补体对检测结果的影响;Procline300防腐剂具有广谱抗菌活性,能在比较长的时间内抑制细菌、真菌和酵母菌等微生物的生长,同时它又能保持体系中酶的活性,是一种理想的生物防腐剂;Tween20是一种非离子型去污剂,不破坏蛋白的结构,适量的Tween20可以降低免疫反应的阴性本底;PEG作为反应增强介质,是一种无电荷的线形分子结构的聚醚,其作用是能消除蛋白质(抗原、抗体)分子周围的电子云和水化层,因而能够促进抗原、抗体分子结合形成大分子复合物,可以提高抗原抗体反应的敏感性,快速达到反应平衡。

[0016] 所述酶为辣根过氧化物酶。

[0017] 本试剂盒采用了双抗体夹心磁微粒化学发光法,以羊抗人AMH多克隆抗体包被磁微粒,辣根过氧化物酶标记修饰过的鼠抗人AMH单克隆抗体作为示踪物。在磁微粒抗体混悬液中加入AMH的校准品或待测样本,同时加入适量的酶标抗体,孵育,校准品或待测样本中的AMH与磁微粒上的AMH多克隆抗体以及示踪物结合,形成磁微粒-包被抗体-AMH-标记抗体-酶复合物,洗涤去除未结合物质。加入底物,振荡,利用化学发光法的原理检测发光值,

发光值强度与校准品或样本中的AMH的含量成正比。

[0018] 本发明的优点在于采用了目前推广应用最快、最先进的化学发光免疫分析方法,与现有技术相比,化学发光免疫分析法克服了RIA放射性污染的不足、酶联免疫吸附测定法中酶标记物的不稳定性和定量范围窄的缺陷,同时还克服了ELISA法中荧光标记易受环境干扰的难点和ECLI的非直接标记等缺点,检测灵敏度和精确度较酶免法、荧光法等高几个数量级,减少了检测步骤和反应时间,应用范围广,能够应用于自动化和半自动化仪器,具有很好的发展前景。

[0019] 本发明利用磁微粒作为化学发光法的固相载体,极大的提高了反应速度,可在15min有效检测人抗缪勒管激素。由于有特异的标记抗体,灵敏度较高,检测灵敏度达到0.005ng/ml,为人AMH的检测提供了有效的检测手段。

[0020] 本发明应用了修饰过的酶标记鼠单克隆抗体,增加了抗原抗体反应表位的专一亲和力,提高了抗原抗体的特异性反应,包被的羊多抗又能提高反应的敏感性,避免了漏检,从而解决了免疫检测实验中经常遇到的低灵敏度和非特异性反应等问题,更快地获得理想的数据而省去那些反复查找失败原因并尝试改进的麻烦。

具体实施方式

[0021] 下面通过具体实施例对本发明做更加详细的说明。如无特殊说明,实施例中所用的试剂和试验仪器均为常规的市售产品。

[0022] 实施例1 制备检测AMH试剂盒

本发明试剂盒包括:包被有羊抗人AMH多克隆抗体的磁微粒;辣根过氧化物酶标记的经修饰的鼠抗人AMH单克隆抗体,AMH校准品,浓缩洗液和底物;

一、制备包被有羊抗人AMH多克隆抗体的磁微粒:

将磁微粒用包被缓冲液(50mmol/L、pH7.6的磷酸盐缓冲液)洗涤5次,加入10%戊二醛活化;洗涤后与稀释至100~500 μ g/mL的包被抗体进行包被,震荡反应2h;洗涤固相载体,然后再用含有50mmol/L乙酸的pH4.4、0.02mol/L的缓冲液封闭1h;封闭液移除后加入含有0.5%吐温-20、1% BSA、1% EDTA、0.1% Procline300、4% PEG6000的 pH7.4、0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液进行储存,2~8 $^{\circ}$ C保存备用;

二、制备酶标记的经修饰的鼠抗人AMH单克隆抗体

1、制备切除片段的标记抗体

1.1 将抗体用 0.1mol/L 醋酸钠-醋酸缓冲液(pH5.5)透析 6h;

1.2 称取木瓜蛋白酶,以相同缓冲液配成25 mg/mL溶液,加入 EDTA(终浓度 2 mmol/L),DTT(终浓度 1 mmol/L),混匀后于 37 $^{\circ}$ C活化木瓜蛋白酶40 min;

1.3 将酶液过 Sephadex G-25 柱,用含 2 mmol/L EDTA 的上述缓冲液洗脱,收集蛋白峰获得活化木瓜蛋白酶;

1.4 将经透析处理的抗体与活化木瓜蛋白酶按重量比 3:1 混合,于 37 $^{\circ}$ C孵育 9 h后,再加入等量酶液,继续孵育 9 h;

1.5 加入终浓度 20~30 mmol/L的碘乙酰胺,避光冰浴 1 h 终止反应;

1.6 将木瓜蛋白酶反应产物用 0.01 mmol/L Tris-HCl 透析 16 h ;

1.7 用DEAE离子交换树脂柱纯化透析液,经0.1 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱,收集

首峰，获得纯化的切去Fc片段的标记抗体。

[0023] 2、制备酶标记物

2.1 称取5mg HRP溶解于1mL蒸馏水中；

2.2 于上液中加入0.06mol/L NaIO₄水溶液(10ml双馏水+128mg NaIO₄) 0.5mL，混匀，置4℃30min；

2.3 将上述溶液装入透析袋中，对1mM PH4.4的醋酸钠缓冲液透析，4℃过夜；

2.4 加入含 5mg纯化抗体的水溶液 1mL，混匀，并装入透析袋，加入 0.05mol/L pH 9.5 的碳酸盐缓冲液，缓缓搅拌透析6h，使之结合；

2.5 加入 NaBH₄ 溶液(5mg/mL) 0.2mL，混匀，置于4℃ 2h；

2.6 在以上溶液中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液，混匀，4℃ 30min，离心，去上清，沉淀以少许0.02mol/L pH7.4 的 PBS 溶液复溶，装入透析袋，以同样液体在4℃透析除盐过夜；

2.7 次日取出离心，以除去不溶物，即得酶-抗体结合物，以 0.02mol/L pH 7.4 PBS 溶液稀释后，分装成 1mL/瓶，低温保存。

[0024] 三、制备 AMH 的校准品

1、AMH原核表达载体的构建

1.1 根据人AMH的结构信息，选取全分子构建并合成PCR引物；

1.2 使用Trizol抽提人卵巢颗粒细胞瘤细胞的总RNA，通过PCR引物逆转录扩增出大量DNA；

1.3 根据酶切位点，将目标PCR产物以及相应载体进行酶切，获得粘性末端的DNA产物后，并将具有相同酶切位点的载体与DNA片段进行连接；

1.4 将连接好的目的片段转化至感受态细胞中，并在LB平板上进行过夜培养。

[0025] 2、重组人AMH的表达与纯化

2.1 扩大菌种培养，并诱导AMH的表达；

2.2 由于载体中包含了His标签，故采用镍柱进行纯化。

[0026] 3、AMH校准品

将纯化得到的重组人AMH用含有1%BSA、50%去激素人血清(经检测无传染性)、50mmol/L、pH7.8的HEPES-NaOH缓冲液稀释成S0-S5 6个校准品；其浓度分别为0、0.16、0.6、4、10、25ng/mL。

[0027] 四、制备浓缩洗液

含有2% Tween20、1% Procline300 的 pH7.5、2mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0028] 五、制备底物

鲁米诺和双氧水。

[0029] 实施例2 本发明试剂盒的使用方法

其具体操作步骤为：

1、试剂准备

1.1 校准品和磁微粒：将试剂取出并平衡至室温(20~25℃)；

1.2 洗涤液：将 10mL浓缩洗液和 990mL纯化水在干净的容器中混合，作为工作洗涤液备用。纯化水请用户自备；

1.3 底物:取出并平衡至室温。

[0030] 2、试验操作

2.1 吸取 20 μ L 的 AMH 校准品、待测样本依次加入50 μ L磁微粒抗体混悬液中,同时加入 100 μ L酶标记抗体 ;

2.2 混合溶液在室温下,振荡孵育 15min ;

2.3 孵育结束后,用洗涤工作液洗涤 6次 ;

2.4 向每个反应位中加入底物100 μ L;

2.5 固相载体于室温下振荡混匀18秒后检测,并进行分析结果 。

[0031] 实施例3 本发明试剂盒的性能检测

1、最低检出量:参照CLSI EP-17A 文件推荐的实验方案检测试剂盒的灵敏度,测得 AMH 的最低检出量不高于 0.005ng/mL,功能灵敏度为 0.01ng/mL 。

[0032] 2、线性:AMH 在 0.01~25ng/mL 间,实测值与理论值的线性相关系数 r 大于 0.99。

[0033] 3、准确度:AMH 在 0.01~25ng/mL 间 ;检测企业参考品,实测值与理论值相对偏差均在 $\pm 15.0\%$ 内。

[0034] 4、HOOK 效应:检测AMH 在2000 ng/mL 内,发光值不会出现钩状效应。

[0035] 5、稳定性:试剂盒自成品生产之日起于 37 $^{\circ}$ C放置 10 天(有效期为 18 个月) ;成品剩余效期内,则按 37 $^{\circ}$ C放置 10 天有效期为 18 个月推算 37 $^{\circ}$ C放置的时间进行检测,结果符合各项目规定的要求。

[0036] 6、特异性:

干扰物	添加最高浓度	干扰率
甘油三酯	3000mg/dl	0.03%
血红蛋白	400mg/dl	0.04%
胆红素	100mg/dl	0.03%

①在所示浓度检测以下内源性物质,没有发现显著的干扰性。

干扰物	添加最高浓度	交叉率
抑制素 A	150 ng/mL	0.04%
活化素 A	100 ng/mL	0.02%
促黄体生成素	500 mIU/mL	0.06%
卵泡刺激素	500 mIU/mL	0.02%
TGF β -1	70 ng/mL	0.05%

[0037] ②在所示浓度检测以下交叉物质,没有发现显著的干扰性。

专利名称(译)	一种利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒		
公开(公告)号	CN109212195A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN201811213296.X	申请日	2018-10-18
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图生物工程股份有限公司		
[标]发明人	张跃峰 刘功成 渠海 汤久停 朱宇皇 孙理智 张创 郑业焕 付光宇		
发明人	张跃峰 刘功成 渠海 汤久停 朱宇皇 孙理智 张创 郑业焕 付光宇		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543 G01N33/76 G01N21/76		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用磁微粒化学发光法快速检测人AMH的试剂盒，包括包被有羊抗人AMH多克隆抗体的磁微粒，酶标记的经修饰的鼠抗人AMH单克隆抗体，AMH校准品，浓缩洗液和底物。本发明的优点在于采用了目前推广应用最快、最先进的化学发光免疫分析方法，与现有技术相比，化学发光免疫分析法克服了RIA放射性污染的不足、酶联免疫吸附测定法中酶标记物的不稳定性和定量范围窄的缺陷，同时还克服了ELISA法中荧光标记易受环境干扰的难点和ECLI的非直接标记等缺点，检测灵敏度和精确度较酶免法、荧光法等高几个数量级，减少了检测步骤和反应时间，应用范围广，能够应用于自动化和半自动化仪器，具有很好的发展前景。

干扰物	添加最高浓度	干扰率
甘油三酯	3000mg/dl	0.03%
血红蛋白	400mg/dl	0.04%
胆红素	100mg/dl	0.03%