



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108051603 A

(43)申请公布日 2018.05.18

(21)申请号 201711215396.1

(22)申请日 2017.11.28

(71)申请人 泰州泽成生物技术有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城口
泰路西侧、陆家路东侧G59幢62号西半
侧一至四层

(72)发明人 汪丹 刘振世 薛黎 金鑫
徐茜茜

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411

代理人 黄冠华

(51)Int.Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图1页

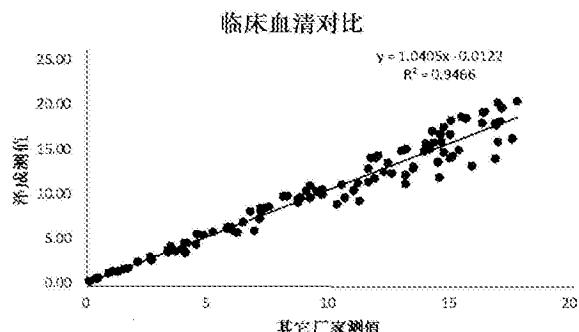
(54)发明名称

一种测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及
其测试方法

(57)摘要

本发明公开了一种采用磁微粒化学发光法
测定人血清中抗缪勒氏管激素(AMH)含量的试剂
盒。试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒
试剂、发光底物；其中抗试剂异硫氰酸荧光素标记
的抗缪勒氏管激素包被抗体和碱性磷酸酶标记
的抗缪勒氏管激素标记抗体；磁微粒试剂为磁
微粒与羊抗FITC连接物。本发明将化学发光技术
与免疫磁微粒相结合，提供了一种接近均相的反
应体系，并且采用了一步法反应模式，使得检测
灵敏度、精密性大大提高、检测范围扩大，反应时
间大大缩短，从开始加样到检测结果，时间少于
25min，明显快于同类试剂盒；并且可以在全自动
化学发光仪上同时测定多个样本，实现抗缪勒氏
管激素的高通量快速化测定，准确度高，特异性
强，精确度和检测效率有了较大的提高。

A
CN 108051603 A



CN

1. 一种测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒，其特征在于，包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物；

所述磁微粒试剂是将抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基磁珠偶联制成，所述发光底物是将ALPS溶解于发光底物缓冲液中制成；

分别配制校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物；将校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物，独立地置于包装容器内，得到抗缪勒氏管激素的定量测定试剂盒；

(一)、所述校准品、质控品的配制，包括以下步骤：

用校准品缓冲溶液溶解抗缪勒氏管激素抗原，配制抗试剂的校准品和质控品；其中，所述校准品缓冲溶液是通过在1L的新生牛血清中加入0.01g~0.05g的四环素和0.1g~0.5g的硫酸新霉素，完全溶解后经过0.22μm滤膜处理制备而成；

(二)、所述抗试剂的配制：

1) 抗试剂缓冲液的制备：将10g~20g的Na₂PO₃H · 12H₂O、1~2g的NaPO₃H₂ · 12H₂O、1g~5g的绵羊血清、3g~10g的新生牛血清、1g~5g的马血清加入1L纯化水中，充分搅拌至完全溶解，用4M HCl调节pH至5~6，制得所述抗试剂缓冲液；

2) 异硫氰酸荧光素与抗缪勒氏管激素抗体偶联，获得异硫氰酸荧光素标记的抗缪勒氏管激素包被抗体：

首先用缓冲液将异硫氰酸荧光素配制浓度为1.0~5.0mg/mL的异硫氰酸荧光素溶液，然后按照抗缪勒氏管激素抗体：异硫氰酸荧光素溶液=1:1.1~1:1.5的质量比将二者转移到棕色玻璃瓶里，充分混匀；充分反应后使用pH为8~9的碳酸盐缓冲液平衡，然后使用凝胶层析分离纯化得到异硫氰酸荧光素标记的抗缪勒氏管激素包被抗体；

3) 碱性磷酸酶与抗缪勒氏管激素抗体偶联，获得碱性磷酸酶标记的抗缪勒氏管激素抗体：

首先用缓冲液将碱性磷酸酶配制浓度为1.0~5.0mg/mL的碱性磷酸酶溶液，抗缪勒氏管激素抗体和碱性磷酸酶分别将反应基团分别活化后按照摩尔比为碱性磷酸酶：抗缪勒氏管激素=1:1~1:3的反应比在催化剂的催化下充分混匀进行偶联反应，充分反应后，使用pH为8~9的tris缓冲液平衡，凝胶柱进行不同分子大小片度的分离纯化，得到碱性磷酸酶标记的抗缪勒氏管激素标记抗体；

将步骤2)中获得的异硫氰酸荧光素标记的抗缪勒氏管激素包被抗体和步骤3)中获得的碱性磷酸酶标记的抗缪勒氏管激素标记抗体加入含有表面活性剂的磷酸盐缓冲液中，充分搅拌后获得所述抗试剂。

2. 根据权利要求1所述的测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒，其特征在于，该试剂盒还包括清洗液，所述清洗液的配置方法将将160gNaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷、1mL吐温20溶于900ml双蒸水中，用HCL调整至PH7.4，用双蒸水定容至1000ml。

3. 根据权利要求1或2任一项所述的测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒，其特征在于，所述步骤3)中的表面活性剂为Tween 20、Triton X-100、Bronidox中的一种或多种，表面活性剂的添加量为0.01%~0.5%。

4. 根据权利要求1或2任一项所述的测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒，其特征在于所述磁微粒试剂是按照以下步骤制备的：

1) 将充分混匀后的羧基磁珠浓缩液放入反应瓶中，将该反应瓶在磁场内放置15~

20min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清,向反应瓶中加入相当于反应瓶中羧基磁珠体积2~5倍的磁微粒缓冲液,震荡清洗20~30min;再将反应瓶置于磁场中15~20min后吸去上清;重复清洗羧基磁珠3遍;最后将羧基磁珠溶液定容到10~50mg/mL,混匀待用;

2) 连接反应:按照质量比羧基磁珠溶液:抗异硫氰酸荧光素抗体=100:1的比例在步骤1)所制得的羧基磁珠溶液中加入抗异硫氰酸荧光素抗体,在2~8℃内保持混匀状态反应18小时;

3) 反应瓶在磁场中放置15min,待羧基磁珠沉降后用磁微粒缓冲液洗3遍,随后定容至10mg/mL,2~8℃保存,制得所需待用磁微粒试剂。

5. 根据权利要求4任一项所述的测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒,其特征在于,所述磁微粒缓冲液的配置方法是将12.12~15.26mg的Tris,5.82~8.58mg的氯化钠,50~60g的甲基纤维醚加入到1L纯化水中,充分搅拌至完全溶解即得。

6. 根据权利要求1所述的测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒,其特征在于:所述发光底物是用相当于ALPS体积4~10倍的发光底物缓冲液充分溶解ALPS制备而成的;所述发光底物缓冲液的配置方法是将12.12g~121.14g的Tris、5.82g的氯化钠、0.03g的光泽精加入到1L纯化水中,充分搅拌至完全溶解,用盐酸调节pH至9.5即得。

7. 利用权利要求1或2任一项所述的试剂盒测定抗缪勒氏管激素含量的方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

1) 取三支试管分别加20μL校准品、20μL质控品、200μL待测样本;

2) 每支试管中加入60μL抗试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管30s,置于37℃下水浴5min;

3) 每支试管中加入30μL磁微粒试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管30s,置37℃下水浴5min;

4) 将试管在磁分离器上沉淀3min,缓慢地倒转试管和磁分离器,倒出上清液;把倒转的试管连同磁分离器一起,放在滤纸上,拍击磁分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

5) 每支试管中加入30μL清洗液,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管30s,混匀后缓慢的倒转试管和磁分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同磁分离器一起,放在滤纸上,用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

6) 重复步骤5)一次;

7) 每支试管中加入200μL发光底物,振荡混匀3s,用化学发光仪检测发光强度。

一种测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及其测试方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学技术领域,具体涉及一种采用磁微粒化学发光法测定人体中抗缪勒氏管激素(AMH)含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 抗缪勒氏管激素(Osteocalcin)又称骨 γ -羧基谷氨酸蛋白(Bone G-Gla Protein, AMH),是一种酸性蛋白,此蛋白类为维生素K依赖性,含有三个 γ 羧基谷氨酸侧链,AMH中 γ 羧基谷氨酸对其生物学特性非常重要,羧化后的AMH才能同Ca²⁺结合,AMH是骨中最丰富的非胶原骨蛋白之一,普遍存在于所有脊椎动物的骨骼和牙质中,在成人骨中它约占胶原骨蛋白总量的25%,维生素K是合成AMH不可缺少的物质,其合成受1,25(OH)₂D₃的调节。使用维生素K拮抗剂,可使此蛋白在骨中的含量减少,但并不影响其脯氨酸的含量,也不影响骨的机械强度。抗缪勒氏管激素(Osteocalcin)是骨骼中含量最大的非胶原蛋白,由成骨细胞合成进入血液。血中半衰期4~5min,是反映成骨细胞活性最为敏感、特异的指标。抗缪勒氏管激素值随年龄的变化以及骨更新率的变化而不同。骨更新率越快,抗缪勒氏管激素值越高,反之降低。

[0003] 在原发性骨质疏松中,绝经后骨质疏松症是高转换型的,所以抗缪勒氏管激素明显升高;老年性骨质疏松症是低转换型的,因而抗缪勒氏管激素升高不明显。故可根据抗缪勒氏管激素的变化情况鉴别骨质疏松是高转换型的还是低转换型的。需注意的是甲旁亢性骨质疏松症中抗缪勒氏管激素升高明显。

[0004] 目前已知的抗缪勒氏管激素测定方法有放射免疫法(RIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、胶乳增强比浊法等。放射免疫法步骤繁琐,试剂价格昂贵,需使用配套的仪器且存在放射性污染。酶联免疫吸附法存在检测时间长、操作复杂、重复性差、不适于急诊和临床病人及时诊断的需要。胶乳增强免疫比浊法操作简单、快速,但是灵敏度低、低值重复性差。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的缺陷,提供一种准确度高的采用磁微粒化学发光法测定人血清中抗缪勒氏管激素(AMH)含量的试剂盒。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 一种测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒,包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物;

[0008] 所述磁微粒试剂是将抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基磁珠偶联制成,所述发光底物是将ALPS溶解于发光底物缓冲液中制成;

[0009] 分别配制校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物;将校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物,独立地置于包装容器内,得到抗缪勒氏管激素的定量测定试剂盒;

[0010] (一)、所述校准品、质控品的配制,包括以下步骤:

[0011] 用校准品缓冲溶液溶解抗缪勒氏管激素抗原,配制抗试剂的校准品和质控品;其中,所述校准品缓冲溶液是通过在1L的新生牛血清中加入0.01g~0.05g的四环素和0.1g~0.5g的硫酸新霉素,完全溶解后经过0.22μm滤膜处理制备而成;

[0012] (二)、所述抗试剂的配制:

[0013] 1) 抗试剂缓冲液的制备:

[0014] 将10g~20g的Na₂PO₃H · 12H₂O、1~2g的NaPO₃H₂ · 12H₂O、1g~5g的绵羊血清、3g~10g的新生牛血清、1g~5g的马血清加入1L纯化水中,充分搅拌至完全溶解,用4M HCl调节pH至5~6,制得所述抗试剂缓冲液;

[0015] 2) 异硫氰酸荧光素与抗缪勒氏管激素抗体偶联,获得异硫氰酸荧光素标记的抗缪勒氏管激素包被抗体:

[0016] 首先用缓冲液将异硫氰酸荧光素配制成浓度为1.0~5.0mg/mL的异硫氰酸荧光素溶液,然后按照抗缪勒氏管激素抗体:异硫氰酸荧光素溶液=1:1.1~1:1.5的质量比将二者转移到棕色玻璃瓶里,充分混匀;充分反应后使用pH为8~9的碳酸盐缓冲液平衡,然后使用凝胶层析分离纯化得到异硫氰酸荧光素标记的抗缪勒氏管激素包被抗体;

[0017] 3) 碱性磷酸酶与抗缪勒氏管激素抗体偶联,获得碱性磷酸酶标记的抗缪勒氏管激素抗体:

[0018] 首先用缓冲液将碱性磷酸酶配制成浓度为1.0~5.0mg/mL的碱性磷酸酶溶液,抗缪勒氏管激素抗体和碱性磷酸酶分别将反应基团分别活化后按照摩尔比为碱性磷酸酶:抗缪勒氏管激素=1:1~1:3的反应比在催化剂的催化下充分混匀进行偶联反应,充分反应后,使用pH为8~9的tris缓冲液平衡,凝胶柱进行不同分子大小片度的分离纯化,得到碱性磷酸酶标记的抗缪勒氏管激素标记抗体;

[0019] 将步骤2)中获得的异硫氰酸荧光素标记的抗缪勒氏管激素包被抗体和步骤3)中获得的碱性磷酸酶标记的抗缪勒氏管激素标记抗体加入含有表面活性剂的磷酸盐缓冲液中,充分搅拌后获得所述抗试剂;优选的,所述步骤3)中的表面活性剂为Tween 20、Triton X-100、Bronidox中的一种或多种,表面活性剂的添加量为0.01%~0.5%。

[0020] 进一步的,该试剂盒还包括清洗液,所述清洗液的配置方法将将160gNaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷、1mL吐温20溶于900ml双蒸水中,用HCL调整至PH7.4,用双蒸水定容至1000ml。使用时用双蒸水15倍稀释。

[0021] 进一步的,所述磁微粒试剂是按照以下步骤制备的:

[0022] 1) 将充分混匀后的羧基磁珠浓缩液放入反应瓶中,将该反应瓶在磁场内放置15~20min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清,向反应瓶中加入相当于反应瓶中羧基磁珠体积2~5倍的磁微粒缓冲液,震荡清洗20~30min;再将反应瓶置于磁场中15~20min后吸去上清;重复清洗羧基磁珠3遍;最后将羧基磁珠溶液定容到10~50mg/mL,混匀待用;

[0023] 2) 连接反应按照质量比羧基磁珠溶液:抗异硫氰酸荧光素抗体=100:1的比例在步骤1)所制得的羧基磁珠溶液中加入抗异硫氰酸荧光素抗体,在2~8℃内保持混匀状态反应18小时;

[0024] 3) 反应瓶在磁场中放置15min,待羧基磁珠沉降后用磁微粒缓冲液洗3遍,随后定容至10mg/mL,2~8℃保存,制得所需待用磁微粒试剂。优选的,所述磁微粒缓冲液的配置方法是将12.12~15.26mg的Tris,5.82~8.58mg的氯化钠,50~60g的甲基纤维醚加入到1L纯

化水中,充分搅拌至完全溶解即得。

[0025] 进一步的,所述发光底物是用相当于ALPS体积4~10倍的发光底物缓冲液充分溶解ALPS制备而成的;所述发光底物缓冲液的配置方法是将12.12g~121.14g的Tris、5.82g的氯化钠、0.03g的光泽精加入到1L纯化水中,充分搅拌至完全溶解,用盐酸调节pH至9.5即得。

[0026] 采用该试剂盒测定抗缪勒氏管激素含量的方法,包括以下步骤:

[0027] 1)取三支试管分别加20μL校准品、20μL质控品、20μL待测样本;

[0028] 2)每支试管中加入60μL抗试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管30s,置于37℃下水浴5min;

[0029] 3)每支试管中加入30μL磁微粒试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管30s,置37℃下水浴5min;

[0030] 4)将试管在磁分离器上沉淀3min,缓慢地倒转试管和磁分离器,倒出上清液;把倒转的试管连同磁分离器一起,放在滤纸上,拍击磁分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0031] 5)每支试管中加入300μL清洗液,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管30s,混匀后缓慢的倒转试管和磁分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同磁分离器一起,放在滤纸上,用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0032] 6)重复步骤5)一次;

[0033] 7)每支试管中加入200μL发光底物,振荡混匀3s,用化学发光仪检测发光强度。

[0034] 本发明的磁微粒试剂是磁微粒与羊抗F1TC连接物,含BSA的缓冲液。

[0035] 本发明的校准品是分别添加了不同量抗缪勒氏管激素抗原的含BSA的缓冲液。

[0036] 本发明的技术原理为:异硫氰酸荧光素(F1TC)标记的AMH抗体与碱性磷酸酶(AP)标记的AMH配对抗体和样本、校准品或质控品中的AMH结合形成“三明治”复合物。随后加入连有抗F1TC抗体的磁微粒,通过抗F1TC抗体与F1TC的特异性结合使抗原抗体免疫复合物结合在磁微粒上。在外加磁场的作用下,将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离,清洗复合物后,加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时发出光子,形成发光反应,即可使用化学发光仪检测反应的发光强度。在检测范围内,发光强度与样本中的AMH的含量成正比,使用改良的四参数Logistic方程拟合可计算出样本中AMH浓度。

[0037] 本发明所达到的有益效果是:

[0038] 1、该试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,提供了一种接近均相的反应体系,并且采用了一步法反应模式,使得检测灵敏度、精密性大大提高、检测范围扩大,反应时间大大缩短,从开始加样到检测结果,时间少于25min,明显快于同类试剂盒;

[0039] 2、发明了一种新的F1TC抗体与磁微粒偶联方法,该方法偶联效率高,结合牢固,且工艺稳定,在提高产品性能的同时,大大降低了产品成本。

[0040] 3、试剂盒中抗试剂、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液和浓缩洗液均是该反应体系下的最优配方,给该试剂盒的使用效期及检测性能提供了有力保障。

[0041] 4、本发明可以在全自动化学发光仪上同时测定多个样本,实现抗缪勒氏管激素的高通量快速化测定,准确度高,特异性强,精确度和检测效率有了较大的提高。

附图说明

[0042] 附图用来提供对本发明的进一步理解，并且构成说明书的一部分，与本发明的实施例一起用于解释本发明，并不构成对本发明的限制。在附图中：

[0043] 图1是本发明的试剂盒与其他市售试剂盒检测临床血清的相关性；其中横坐标为其他市售试剂盒的检测结果，纵坐标为本发明试剂盒的检测结果。

具体实施方式

[0044] 以下对本发明的优选实施例进行说明，应当理解，此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明，并不用于限定本发明。

[0045] 采用本发明的试剂盒测试样本的操作程序如下：

[0046] 1、样本采集

[0047] 采用正确医用技术收集血清(严重溶血或脂血的样本不能用于测定)，收集后的样本在室温放置不可超过8小时；如果不在8小时内检测需将样本放置于2-8℃的冰箱中；若需72小时以上保存或运输，则应冻存于-20℃以下，避免反复冻融。使用前回复到室温，轻轻摇动混匀。

[0048] 2、实验前准备

[0049] ①取一瓶洗液用蒸馏水进行15倍稀释；

[0050] ②将恒温箱或水浴锅温度调至37℃，待温度稳定后使用；

[0051] ③将磁微粒混悬液充分混匀至无肉眼可见沉淀。

[0052] 3实验方法

[0053] ①取出一定量的反应容器(平底试管)，编号。根据实验要求加入30u1校准品/质控品/临床样本；

[0054] ②每孔分别加入抗试剂60u1；

[0055] ③将反应容器内溶液混合均匀，37℃温育5分钟；

[0056] ④摇匀磁微粒混悬液，每孔分别加入30u1；

[0057] ⑤将反应容器内溶液混合均匀，37℃温育5分钟；

[0058] ⑥取出反应容器，使用磁分离及洗涤设备，将反应容器中磁微粒用洗液洗涤3次；

[0059] ⑦洗涤完成后倒去洗液，每孔加发光底物液200u1，震荡；

[0060] ⑧化学发光检测仪器检测发光强度；

[0061] ⑨采用四参数拟合方式，以校准品浓度值为X轴，以校准品发光强度值为Y轴，建立定标曲线。根据待测样本的发光强度值回算相应的浓度值。

[0062] 将本发明试剂盒按照方法学鉴定，可达到如下指标：

[0063] 标准曲线线性：R>0.9900。

[0064] 最低检测限： $\leq 0.06\text{ng}/\text{mL}$ 。

[0065] 准确度：相对偏差在 $\pm 10\%$ 范围内。

[0066] 重复性：变异系数CV $\leq 8\%$ 。

[0067] 批间差：变异系数 $\leq 15\%$ 。

[0068] 线性稀释：R大于0.9900。

[0069] 将100份血清样本测值与市售抗缪勒氏管激素检测试剂盒A对比,比较本发明试剂盒与市售抗缪勒氏管激素试剂盒检测结果的相关性,结果如图1所示。

[0070] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

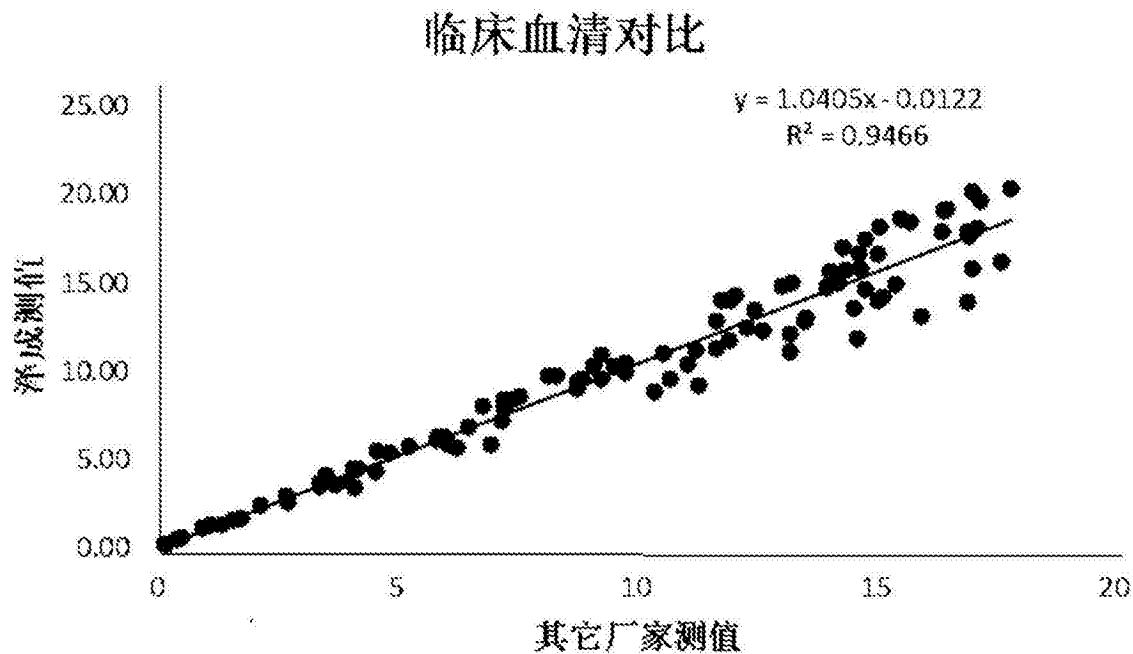


图1

专利名称(译)	一种测定抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及其测试方法		
公开(公告)号	CN108051603A	公开(公告)日	2018-05-18
申请号	CN201711215396.1	申请日	2017-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
[标]发明人	汪丹 刘振世 薛黎 金鑫 徐茜茜		
发明人	汪丹 刘振世 薛黎 金鑫 徐茜茜		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/532		
代理人(译)	黄冠华		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种采用磁微粒化学发光法测定人血清中抗缪勒氏管激素(AMH)含量的试剂盒。试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物；其中抗试剂异硫氰酸荧光素标记的抗缪勒氏管激素包被抗体和碱性磷酸酶标记的抗缪勒氏管激素标记抗体；磁微粒试剂为磁微粒与羊抗FITC连接物。本发明将化学发光技术与免疫磁微粒相结合，提供了一种接近均相的反应体系，并且采用了一步法反应模式，使得检测灵敏度、精密性大大提高、检测范围扩大，反应时间大大缩短，从开始加样到检测结果，时间少于25min,明显快于同类试剂盒；并且可以在全自动化学发光仪上同时测定多个样本，实现抗缪勒氏管激素的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率有了较大的提高。

