



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109975536 A

(43)申请公布日 2019.07.05

(21)申请号 201910289735.3

(22)申请日 2019.04.11

(71)申请人 安徽大千生物工程有限公司

地址 231200 安徽省合肥市经开区桃花工业园繁华大道工投·立恒工业广场B12C

(72)发明人 符修乐 吴瑶瑶 芮双印 王俊薇  
陆大伟 郭荣芳 程虎 支新梅  
高帆

(74)专利代理机构 合肥兴东知识产权代理有限公司 34148

代理人 王伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C07K 14/495(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

C07K 1/18(2006.01)

C07K 16/22(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

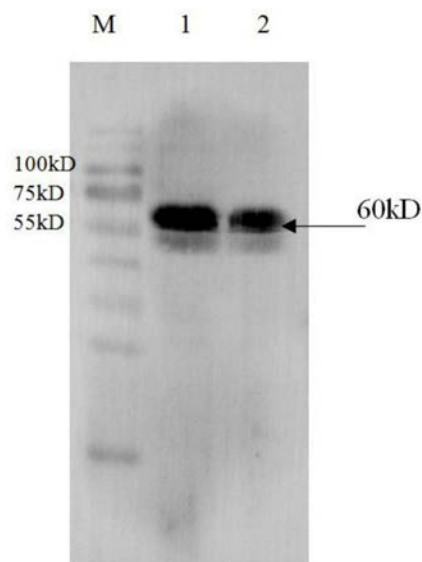
权利要求书7页 说明书19页  
序列表2页 附图2页

## (54)发明名称

抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

## (57)摘要

本发明提供了一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,试剂R1: HEPES、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、PEG6000、BSA等;试剂R2: HEPES、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、PEG6000、交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球等。本发明还提供了一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备、使用方法。本发明首次利用胶乳增强免疫透射比浊法来测定抗缪勒激素,可在全自动生化分析仪上使用,成本低廉、自动化高,能大大节省检测时间;并且,在高稳定性和高精密度情况下,相比ELISA产品具有更高的灵敏度,相比化学发光产品具有更好的特异性,大大提升了抗缪勒激素检测的临床应用价值。



1. 一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

试剂R1:

HEPES	75~150 mM/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5~30 mM/L
PEG6000	10~30 g/L
BSA	10~20 g/L
NaCl	4~16 g/L
NaN <sub>3</sub>	0.1~1.0 g/L
EDTA	0.1~1.0 g/L

其溶剂为纯化水;

试剂R2:

HEPES	75~150 mM/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5~30 mM/L
PEG6000	10~30 g/L
BSA	10~20 g/L
NaCl	4~16 g/L
交联山羊抗人 AMH 多克隆抗体的胶乳微球	5%~20%
TX-100	0.5~3.0%
NaN <sub>3</sub>	0.1~1.0 g/L
EDTA	0.1~1.0 g/L

其溶剂为纯化水。

2. 根据权利要求1所述的抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒,其特征在于,包括的成分及相应含量具体为:

试剂R1:

HEPES	100 mM/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	15 g/L
NaCl	9 g/L
NaN <sub>3</sub>	0.65 g/L
EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水；

试剂R2：

HEPES	100 mM/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	15 g/L
NaCl	9 g/L
交联山羊抗人 AMH 多克隆抗体的胶乳微球	12%
TX-100	1.5%
NaN <sub>3</sub>	0.65 g/L
EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水。

3. 根据权利要求1所述的抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒，其特征在于，还包括AMH校准品，包括的成分及相应含量为：

HEPES	75~150 mM/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5~30 mM/L
PEG6000	10~30 g/L
BSA	10~20 g/L
NaCl	4~16 g/L
rAMH	1~10 mg/L
NaN <sub>3</sub>	0.1~1.0 g/L
EDTA	0.1~1.0g/L

其溶剂为纯化水。

4. 根据权利要求3所述的抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒，其特征在于，所述AMH校准品包括的成分及相应含量具体为：

HEPES	100 mM/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10mM/L
PEG6000	20 g/L
BSA	15 g/L
NaCl	9 g/L

rAMH	5 mg/L
NaN <sub>3</sub>	0.65 g/L
EDTA	0.3 g/L

其溶剂为纯化水。

5. 根据权利要求3所述的抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒, 其特征在于, 所述AMH校准品中rAMH具体为重组人AMH蛋白, 获取方法具体如下:

①人AMH基因的获取:

参考GENBANK登录号NM\_000479.4, 上游添加酶切位点EcoRI, 下游添加酶切位点XhoI, 获得如SEQ ID NO.1所示基因序列; 得到基因序列后, 送基因公司合成, 测序合格, 获得目标基因序列;

②表达载体构建:

使用EcoR I和XhoI两种内切酶对合成的基因及pET-32a质粒进行双酶切, 将双酶切产物使用连接酶连接, 并导入BL21大肠埃希菌感受态细胞中; LB培养基37℃、220rpm发酵2h, 涂布于含氨苄青霉素的LB琼脂平板培养过夜, 取氨苄青霉素LB平板上生长的单菌落, 扩大培养后提取质粒进行基因测序, 鉴定目的基因; 当鉴定为阳性, 即表示表达载体构建成功, 记为pET-32a/rAMH工程菌;

③重组人AMH的表达和纯化:

取经测序AMH阳性菌于含氨苄青霉素的LB培养基中37℃摇菌1h以复苏工程菌活性, 在氨苄青霉素LB培养基中放大培养4h后测其OD值; 当OD值达到1.0时, 加入IPTG, 32℃诱导表达5h, 并收集细菌; 取菌体, 并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀, 经高压均质机破碎, 12000r/min离心取上清, 即得带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品;

在上述带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品中加入肠激酶, 并于23℃环境下酶切过夜; 酶切后, 将粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱, 并用第一Elution buffer梯度洗脱, 收集rAMH峰; 将上一步纯化的rAMH过脱盐柱, 用脱盐柱缓冲液置换, 再分别用Loading buffer平衡好柱体, 上样后用第二Elution buffer梯度洗脱, 收集rAMH峰; 最后, 将离子交换层析收集到的rAMH过分子筛层析柱, 用第三Elution buffer收集rAMH峰; 其中, 所述第一Elution buffer的配方为: 50mM Tris-Cl, 40mM还原性谷胱甘肽, pH7.0; 所述脱盐柱缓冲液的配方为: 50mM Tris-Cl, pH9.0; 所述Loading buffer的配方为: 50mM Tris-Cl, pH7.0; 所述第二Elution buffer的配方为: 50mM Tris-Cl, 1M NaCl, pH7.0; 所述第三Elution buffer的配方为: 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, pH7.0;

使用AMH抗体为第一抗体, 使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB, 当收集的上述rAMH蛋白样品在60kD处显示有阳性条带, 即表明纯化后所得的rAMH为目标所需的重组人AMH蛋白; 此时, 加入20%甘油无菌分装, 于-80℃保存备用。

6. 根据权利要求1-5任一所述的抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒, 其特征在于, 所述交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为: 使用直径30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球, 并采用共价偶联法将山羊抗人AMH多克隆抗体交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

7. 根据权利要求6所述的抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒, 其特征在于, 所述山羊抗人AMH多克隆抗体的制备方法为:

## (1) 重组人AMH的制备

## ①人AMH基因的获取:

参考GENBANK登录号NM\_000479.4,上游添加酶切位点EcoRI,下游添加酶切位点XhoI,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

## ②表达载体构建:

使用EcoR I和XhoI两种内切酶对合成的基因及pET-32a质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并导入BL21大肠埃希菌感受态细胞中;LB培养基37℃、220rpm发酵2h,涂布于含氨苄青霉素的LB琼脂平板培养过夜,取氨苄青霉素LB平板上生长的单菌落,扩大培养后提取质粒进行基因测序,鉴定目的基因;当鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a/rAMH工程菌;

## ③重组人AMH的表达和纯化:

取经测序AMH阳性菌于含氨苄青霉素的LB培养基中37℃摇菌1h以复苏工程菌活性,在氨苄青霉素LB培养基中放大培养4h后测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,并收集细菌;取菌体,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀,经高压均质机破碎,12000r/min离心取上清,即得带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品;

在上述带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品中加入肠激酶,并于23℃环境下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;将上一步纯化的rAMH过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;最后,将离子交换层析收集到的rAMH过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rAMH峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH7.0;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.15 M NaCl,pH7.0;

使用AMH抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述rAMH蛋白样品在60kD处显示有阳性条带,即表明纯化后所得的rAMH为目标所需的重组人AMH蛋白;此时,加入20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用;

## (2) 山羊抗人AMH多克隆抗体的获得

## ①山羊的免疫:

选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊,取1mL 5mg/mL rAMH抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次免疫;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rAMH抗原;55日取耳缘静脉血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

## ②多克隆抗体的纯化:

将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,再取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓

慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人AMH多克隆抗体;

③多克隆抗体的验证:

使用上述制备的rAMH为抗原,上述制备的山羊抗人AMH多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在60kD处有阳性条带产生;因rAMH已经商品化抗体验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rAMH同样出现阳性条带,表明山羊抗人AMH多克隆抗体制备成功。

8.一种如权利要求1-7任一所述的抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下具体步骤:

(1)重组人AMH的制备

①人AMH基因的获取:

参考GENBANK登录号NM\_000479.4,上游添加酶切位点EcoRI,下游添加酶切位点XhoI,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

②表达载体构建:

使用EcoR I和Xho I两种内切酶对合成的基因及pET-32a质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并导入BL21大肠埃希菌感受态细胞中;LB培养基37℃、220rpm发酵2h,涂布于含氨苄青霉素的LB琼脂平板培养过夜,取氨苄青霉素LB平板上生长的单菌落,扩大培养后提取质粒进行基因测序,鉴定目的基因;当鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a/rAMH工程菌;

③重组人AMH的表达和纯化:

取经测序AMH阳性菌于含氨苄青霉素的LB培养基中37℃摇菌1h以复苏工程菌活性,接着在氨苄青霉素LB培养基中放大培养4h后测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,并收集细菌;取菌体,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀,经高压均质机破碎,12000r/min离心取上清,即得带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品;

在上述带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品中加入肠激酶,并于23℃环境下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;将上一步纯化的rAMH过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;最后,将离子交换层析收集到的rAMH过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rAMH峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH7.0;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.15 M NaCl,pH7.0;

使用AMH抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述

rAMH峰蛋白样品在60kD处显示有阳性条带,即表明纯化后所得的rAMH为目标所需的重组人AMH蛋白;此时,加入20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用;

## (2) 山羊抗人AMH多克隆抗体的获得

### ①山羊的免疫:

选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊,取1mL5mg/mL rAMH抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次免疫;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL2.5mg/mL rAMH抗原;55日取耳缘静脉血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

### ②多克隆抗体的纯化:

将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,再取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人AMH多克隆抗体;

### ③多克隆抗体的验证:

使用上述制备的rAMH为抗原,上述制备的山羊抗人AMH多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在60kD处有阳性条带产生;因rAMH已经商品化抗体验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rAMH同样出现阳性条带,表明山羊抗人AMH多克隆抗体制备成功;

## (3) 交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球的制备

使用直径30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将步骤(2)制得的山羊抗人AMH多克隆抗体交联到聚苯乙烯胶乳微球上,即得目标所需的交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球;

## (4) 抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备

### ①配制试剂R1:

按照试剂R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

### ②配制试剂R2:

按照试剂R2的组分含量,将步骤(3)制得的交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2;

### ③配制AMH校准品:

AMH校准品包括的成分及相应含量如下:

HEPES	75~150 mM/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5~30 mM/L
PEG6000	10~30 g/L
BSA	10~20 g/L
NaCl	4~16 g/L
rAMH	1~10 mg/L
NaN <sub>3</sub>	0.1~1.0 g/L
EDTA	0.1~1.0g/L

其溶剂为纯化水；

按照试剂上述AMH校准品的组分含量,将步骤(1)制得的重组人AMH蛋白以及余下的其他组分于同一容器中混合,混合均匀后,制得AMH校准品。

9.一种如权利要求1-7任一所述的抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法,其特征在于,包括如下具体步骤:

(1)吸取20μL样本,加入240μL试剂R1,37℃孵育5min;

(2)再加入60μL试剂R2进行混合,并使其充分反应;

(3)1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算ΔA;

(4)定标方法为6点定标,采用全自动生化分析仪进行检测,并设置校准品浓度分别为:0、1、2、4、8、16ng/mL;依据定标值,根据ΔA测算样本中AMH含量。

## 抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域与免疫学测定分析领域,尤其涉及一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法。

### 背景技术

[0002] 抗缪勒激素 (Anti-Mullerhormone, AMH) 是转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超家族成员,是性腺功能标志物之一,能诱导缪勒氏管退化,对性腺器官发育具有重要作用。男性AMH主要是睾丸未成熟的Sertoli细胞产生,形成于胚胎时期,并贯穿整个生命;女性AMH主要是卵巢窦前卵泡和小窦卵泡的颗粒细胞产生,其水平相对男性较低;当女性发育到达青春期后,AMH水平逐渐降低,至更年期是几乎检测不到。AMH是两个相同亚基经二硫键组成的二聚糖蛋白,临床主要应用于卵巢储备功能评价、ART预测、隐睾症、多囊卵巢综合征、卵巢颗粒细胞瘤、卵巢早熟、青春期内分泌早熟。

[0003] 早期建立的AMH检测方法是免疫细胞化学检测及放射免疫分析技术 (Radioimmunoassay, RIA), 研究侧重于AMH在动物组织中的定位及功能研究,无法应用于临床检测诊断。为满足AMH检测的需求, Immunotech (IOT) 与 Diagnostic Systems Laboratories (DsL) 先后推出了两个独立的商品化ELISA检测试剂盒。第一代ELISA检测试剂盒使用的配对抗体及标准品都不一样,因此获得的检测结果差异较大。为了获得统一的AMH检测标准, Beckman-Coulter整合了这两个商品化ELISA检测试剂盒,建立了第二代ELISA检测技术。另外, AnshLabs在2012年及2013年分别推出了两个商品化的AMHELISA检测试剂盒,即超灵敏的AMH ELISA检测试剂盒及pico AMH ELISA检测试剂盒,本文依据其检测原理同样把它们列为第二代ELISA检测技术。2014年,罗氏诊断率先推出全自动AMH检测系统—Elecsys AMH检测系统,标志着AMH检测技术进入了全自动化阶段。后期Beckman-Coulter也推出了全自动的AMH检测—Access AMH检测系统。这两种AMH检测方法在临床应用上可以互相替换,具有较小的检测结果误差及较高的分析灵敏度,但与第二代ELISA检测结果相比均偏低。国内AMH商品化检测系统发展较为落后,基本被国外顶级体外诊断试剂厂家所垄断。并且,AMH检测系统仅在少数三甲医院配备,普及率极低,需要特定的仪器设备,检测价格昂贵,严重制约了国内AMH检测的推广。

[0004] 胶乳增强免疫比浊法是20世纪70年代出现的能够动态测定抗原抗体结合的检测方法。在特定的稀释系统中,抗原抗体发生结合,并且在结合比例合适时,会形成微粒从液相析出,在抗原和抗体结合的前后,会发生浊度的变化,最后通过全自动生化分析仪检测这种浊度变化,利用标准品绘制线性曲线,从而得出样品中待测物质的含量。免疫透射比浊法不需要特殊的仪器,操作上简单便捷。此外,胶乳增强免疫比浊法能够利用胶乳载体增强反应的吸光度,使检测的敏感性大大提高,通过全自动生化分析仪进行检测实现了检测的自动化,更加方便、快捷、节省时间,能够满足临床大样本检测的需求。

[0005] 因此,针对现有自动化检测试剂盒特异性低、检测成本高的问题,目前急需一种基于多克隆抗体交联底物的抗缪勒激素胶乳增强比浊检测试剂盒,使其保持灵敏度的同时,

能进一步地提高检测的特异度,进一步地降低检测成本。

## 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种特异度高、灵敏度好、检测成本低,且适用于各类全自动生化分析仪的基于多克隆抗体交联底物的抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法。

[0007] 本发明采用以下技术方案解决上述技术问题:

[0008] 一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0009] 试剂R1:

HEPES 75~150 mM/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5~30 mM/L

PEG6000 10~30 g/L

[0010] BSA (牛血清白蛋白) 10~20 g/L

NaCl (氯化钠) 4~16 g/L

NaN<sub>3</sub> (叠氮化钠) 0.1~1.0 g/L

EDTA 0.1~1.0 g/L

[0011] 其溶剂为纯化水;

[0012] 试剂R2:

HEPES 75~150 mM/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5~30 mM/L

[0013] PEG6000 10~30 g/L

BSA (牛血清白蛋白) 10~20 g/L

NaCl (氯化钠) 4~16 g/L

交联山羊抗人 AMH 多克隆抗体的胶乳微球 5%~20%

TX-100 (曲拉通 X-100) 0.5~3.0%

[0014] NaN<sub>3</sub> (叠氮化钠) 0.1~1.0 g/L

EDTA 0.1~1.0 g/L

[0015] 其溶剂为纯化水。

[0016] 作为本发明的优选方式之一,包括的成分及相应含量具体为:

[0017] 试剂R1:

	HEPES	100 mM/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM/L
	PEG6000	20 g/L
[0018]	BSA	15 g/L
	NaCl	9 g/L
	NaN <sub>3</sub>	0.65 g/L
	EDTA	0.3 g/L
[0019]	其溶剂为纯化水；	
[0020]	试剂R2：	
	HEPES	100 mM/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM/L
	PEG6000	20 g/L
	BSA	15 g/L
[0021]	NaCl	9 g/L
	交联山羊抗人 AMH 多克隆抗体的胶乳微球	12%
	TX-100	1.5%
	NaN <sub>3</sub>	0.65 g/L
	EDTA	0.3 g/L
[0022]	其溶剂为纯化水。	
[0023]	作为本发明的优选方式之一，还包括AMH校准品，包括的成分及相应含量为：	
	HEPES	75~150 mM/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5~30 mM/L
[0024]	PEG6000	10~30 g/L
	BSA（牛血清白蛋白）	10~20 g/L
	NaCl（氯化钠）	4~16 g/L
	rAMH	1~10 mg/L
[0025]	NaN <sub>3</sub> （叠氮化钠）	0.1~1.0 g/L
	EDTA	0.1~1.0g/L
[0026]	其溶剂为纯化水。	
[0027]	作为本发明的优选方式之一，所述AMH校准品包括的成分及相应含量具体为：	

	HEPES	100 mM/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10mM/L
	PEG6000	20 g/L
[0028]	BSA	15 g/L
	NaCl	9 g/L
	rAMH	5 mg/L
	NaN <sub>3</sub>	0.65 g/L
	EDTA	0.3 g/L

[0029] 其溶剂为纯化水。

[0030] 作为本发明的优选方式之一,所述AMH校准品中rAMH具体为重组人AMH蛋白,获取方法具体如下:

[0031] ①人AMH基因的获取:

[0032] 参考GENBANK登录号NM\_000479.4,上游添加酶切位点EcoRI,下游添加酶切位点XhoI,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

[0033] ②表达载体构建:

[0034] 使用EcoR I和XhoI两种内切酶对合成的基因及pET-32a质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并导入BL21大肠埃希菌感受态细胞中;LB培养基37℃、220rpm发酵2h,涂布于含氨苄青霉素的LB琼脂平板培养过夜,取氨苄青霉素LB平板上生长的单菌落,扩大培养后提取质粒进行基因测序,鉴定目的基因;当鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a/rAMH工程菌;

[0035] ③重组人AMH的表达和纯化:

[0036] 取经测序AMH阳性菌于含氨苄青霉素的LB培养基中37℃摇菌1h以复苏工程菌活性,接着在氨苄青霉素LB培养基中放大培养4h后测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,并收集细菌;取菌体,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀,经高压均质机破碎,12000r/min离心取上清,即得带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品;

[0037] 在上述带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品中加入肠激酶,并于23℃环境下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;将上一步纯化的rAMH过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;最后,将离子交换层析收集到的rAMH过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rAMH峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH 7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.15M NaCl,pH7.0;

[0038] 使用AMH抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述rAMH蛋白样品在60kD处显示有阳性条带,即表明纯化后所得的rAMH为目标所需的重组

人AMH蛋白;此时,加入20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用。

[0039] 作为本发明的优选方式之一,所述交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将山羊抗人AMH多克隆抗体交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0040] 作为本发明的优选方式之一,所述山羊抗人AMH多克隆抗体的制备方法为:

[0041] (1) 重组人AMH的制备

[0042] ①人AMH基因的获取:

[0043] 参考GENBANK登录号NM\_000479.4,上游添加酶切位点EcoRI,下游添加酶切位点XhoI,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

[0044] ②表达载体构建:

[0045] 使用EcoRI和XhoI两种内切酶对合成的基因及pET-32a质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并导入BL21大肠埃希菌感受态细胞中;LB培养基37℃、220rpm发酵2h,涂布于含氨苄青霉素的LB琼脂平板培养过夜,取氨苄青霉素LB平板上生长的单菌落,扩大培养后提取质粒进行基因测序,鉴定目的基因;当鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a/rAMH工程菌;

[0046] ③重组人AMH的表达和纯化:

[0047] 取经测序AMH阳性菌于含氨苄青霉素的LB培养基中37℃摇菌1h以复苏工程菌活性,接着在氨苄青霉素LB培养基中放大培养4h后测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,并收集细菌;取菌体,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀,经高压均质机破碎,12000r/min离心取上清,即得带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品;

[0048] 在上述带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品中加入肠激酶,并于23℃环境下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;将上一步纯化的rAMH过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;最后,将离子交换层析收集到的rAMH过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rAMH峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;所述脱盐柱缓冲液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,1M NaCl,pH 7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.15M NaCl,pH7.0;

[0049] 使用AMH抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述rAMH蛋白样品在60kD处显示有阳性条带,即表明纯化后所得的rAMH为目标所需的重组人AMH蛋白;此时,加入20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用;

[0050] (2) 山羊抗人AMH多克隆抗体的获得

[0051] ①山羊的免疫:

[0052] 选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊,取1mL 5mg/mL rAMH抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次免疫;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/

mL rAMH抗原;55日取耳缘静脉血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

[0053] ②多克隆抗体的纯化:

[0054] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,再取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人AMH多克隆抗体;

[0055] ③多克隆抗体的验证:

[0056] 使用上述制备的rAMH为抗原,上述制备的山羊抗人AMH多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在60kD处有阳性条带产生;因rAMH已经商品化抗体验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rAMH同样出现阳性条带,表明山羊抗人AMH多克隆抗体制备成功。

[0057] 一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下具体步骤:

[0058] (1)重组人AMH的制备

[0059] ①人AMH基因的获取:

[0060] 参考GENBANK登录号NM\_000479.4,上游添加酶切位点EcoRI,下游添加酶切位点XhoI,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

[0061] ②表达载体构建:

[0062] 使用EcoRI和XhoI两种内切酶对合成的基因及pET-32a质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并导入BL21大肠埃希菌感受态细胞中;LB培养基37℃、220rpm发酵2h,涂布于含氨苄青霉素的LB琼脂平板培养过夜,取氨苄青霉素LB平板上生长的单菌落,扩大培养后提取质粒进行基因测序,鉴定目的基因;当鉴定为阳性,即表示表达载体构建成功,记为pET-32a/rAMH工程菌;

[0063] ③重组人AMH的表达和纯化:

[0064] 取经测序AMH阳性菌于含氨苄青霉素的LB培养基中37℃摇菌1h以复苏工程菌活性,接着在氨苄青霉素LB培养基中放大培养4h后测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,并收集细菌;取菌体,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀,经高压均质机破碎,12000r/min离心取上清,即得带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品;

[0065] 在上述带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品中加入肠激酶,并于23℃环境下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,并用第一Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;将上一步纯化的rAMH过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液置换,再分别用Loading buffer平衡好柱体,上样后用第二Elution buffer梯度洗脱,收集rAMH峰;最后,将离子交换层析收集到的rAMH过分子筛层析柱,用第三Elution buffer收集rAMH峰;其中,所述第一Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl,40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0;所述脱盐柱缓冲

液的配方为:50mM Tris-Cl,pH 9.0;所述Loading buffer的配方为:50mM Tris-Cl,pH 7.0;所述第二Elution buffer的配方为:50mM Tris-Cl、1M NaCl,pH 7.0;所述第三Elution buffer的配方为:50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.15M NaCl,pH7.0;

[0066] 使用AMH抗体为第一抗体,使用HRP标记的山羊抗兔IgG为第二抗体做WB,当收集的上述rAMH峰蛋白样品在60kD处显示有阳性条带,即表明纯化后所得的rAMH为目标所需的重组人AMH蛋白;此时,加入20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用;

[0067] (2) 山羊抗人AMH多克隆抗体的获得

[0068] ①山羊的免疫:

[0069] 选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊,取1mL 5mg/mL rAMH抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次免疫;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rAMH抗原;55日取耳缘静脉血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

[0070] ②多克隆抗体的纯化:

[0071] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,再取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人AMH多克隆抗体;

[0072] ③多克隆抗体的验证:

[0073] 使用上述制备的rAMH为抗原,上述制备的山羊抗人AMH多克隆抗体为第一抗体,使用HRP标记的驴抗山羊IgG为第二抗体做WB,抗原在60kD处有阳性条带产生;因rAMH已经商品化抗体验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rAMH同样出现阳性条带,表明山羊抗人AMH多克隆抗体制备成功;

[0074] (3) 交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球的制备

[0075] 使用直径30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将步骤(2)制得的山羊抗人AMH多克隆抗体交联到聚苯乙烯胶乳微球上,即得目标所需的交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球;

[0076] (4) 抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备

[0077] ①配制试剂R1:

[0078] 按照试剂R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

[0079] ②配制试剂R2:

[0080] 按照试剂R2的组分含量,将步骤(3)制得的交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2;

[0081] ③配制AMH校准品：

	HEPES	75~150 mM/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5~30 mM/L
	PEG6000	10~30 g/L
	BSA	10~20 g/L
[0082]	NaCl	4~16 g/L
	rAMH	1~10 mg/L
	NaN <sub>3</sub>	0.1~1.0 g/L
	EDTA	0.1~1.0g/L

[0083] 其溶剂为纯化水；

[0084] 按照试剂上述AMH校准品的组分含量，将步骤(1)制得的重组人AMH蛋白以及余下的其他组分于同一容器中混合，混合均匀后，制得AMH校准品。

[0085] 一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的使用方法，包括如下具体步骤：

[0086] (1) 吸取20μL样本，加入240μL试剂R1，37℃孵育5min；

[0087] (2) 再加入60μL试剂R2进行混合，并使其充分反应；

[0088] (3) 1min后读取吸光值A1，3min后读取吸光值A2，计算ΔA；

[0089] (4) 定标方法为6点定标，采用全自动生化分析仪进行检测，并设置校准品浓度分别为：0、1、2、4、8、16ng/mL；依据定标值，根据ΔA测算样本中AMH含量。

[0090] 本发明试剂盒由试剂R1和试剂R2构成，所述试剂R1由缓冲液(HEPES、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、表面活性剂(PEG6000)、稳定剂(BSA、NaCl、EDTA)及防腐剂(NaN<sub>3</sub>)构成，所述试剂R2由缓冲液(HEPES、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、表面活性剂(PEG6000、TX-100)、稳定剂(BSA、NaCl、EDTA)、防腐剂(NaN<sub>3</sub>)及交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球构成。

[0091] 本发明相比现有技术的优点在于：

[0092] (1) 相比ELISA法，本发明试剂利用胶乳增强免疫透射比浊法来测定抗缪勒激素，检测信号倍数放大，提高了检测灵敏度；并且，可用于全自动生化分析仪，相对于全自动ELISA仪器更加省时，且一次检测样本量较ELISA方法更加灵活；

[0093] (2) 与罗氏等化学发光自动化检测系统相比，本发明试剂采用抗人AMH多克隆抗体与较小直径且均一的聚苯乙烯胶乳微球偶联，试剂的均一性较高，聚苯乙烯胶乳微球较磁珠微球成本低70%~80%，较高浓度的多克隆抗体胶乳微球的适用可以提高本试剂较化学发光的特异度；聚苯乙烯微球偶联抗体工艺较磁珠简单便于工业化生产，且在试剂中加入了抗干扰蛋白和表面活性剂，以保证试剂盒的稳定性和精密度；

[0094] (3) 本发明首次利用胶乳增强免疫透射比浊法来测定抗缪勒激素，可在全自动生化分析仪上使用，成本低廉、自动化高，能大大节省检测时间；并且，在高稳定性和高精密度情况下，相比ELISA产品具有更高的灵敏度，相比化学发光产品具有更好的特异性，大大提升了抗缪勒激素检测的临床应用价值。

### 附图说明

[0095] 图1是实施例4中重组AMH蛋白的Western Blot鉴定结果图(图中,泳道M:蛋白Marker26616;泳道1:abcam公司人AMH(ab201383)对照;泳道2:重组人AMH纯化后样本);

[0096] 图2是实施例4中多克隆抗体纯化后的Western Blot鉴定结果图(图中,泳道M:蛋白Marker 26616;泳道1:多克隆抗体纯化后样本);

[0097] 图3是实施例6中本发明试剂盒与商品化AMH ELISA检测试剂盒线的性关系曲线图;

[0098] 图4是实施例6中本发明试剂盒的线性范围线性回归图。

### 具体实施方式

[0099] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0100] 实施例1

[0101] 本实施例的一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0102] 试剂R1:

HEPES	75 mM/L
-------	---------

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM/L
---------------------------------	--------

PEG6000	10 g/L
---------	--------

[0103] BSA	10 g/L
------------	--------

NaCl	4 g/L
------	-------

NaN <sub>3</sub>	0.1 g/L
------------------	---------

EDTA	0.1 g/L
------	---------

[0104] 其溶剂为纯化水;

[0105] 试剂R2:

	HEPES	75 mM/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM/L
	PEG6000	10 g/L
	BSA	10 g/L
[0106]	NaCl	4 g/L
	交联山羊抗人 AMH 多克隆抗体的胶乳微球	5%
	TX-100	0.5%
	NaN <sub>3</sub>	0.1 g/L
	EDTA	0.1 g/L
[0107]	其溶剂为纯化水。	
[0108]	此外,还包括AMH校准品,包括的成分及相应含量如下:	
	HEPES	75 mM/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM/L
	PEG6000	10 g/L
	BSA	10 g/L
[0109]	NaCl	4 g/L
	rAMH	1 mg/L
	NaN <sub>3</sub>	0.1 g/L
	EDTA	0.1 g/L
[0110]	其溶剂为纯化水。	
[0111]	进一步地,AMH校准品中rAMH具体为重组人AMH蛋白(制备方法见实施例4)。	
[0112]	进一步地,试剂R2中交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将山羊抗人AMH多克隆抗体(制备方法见实施例4)交联到聚苯乙烯胶乳微球上。	
[0113]	实施例2	
[0114]	本实施例的一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:	
[0115]	试剂R1:	
[0116]	HEPES	150 mM/L

	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM/L
	PEG6000	30 g/L
[0117]	BSA	20 g/L
	NaCl	16 g/L
	NaN <sub>3</sub>	1.0 g/L
	EDTA	1.0 g/L
[0118]	其溶剂为纯化水；	
[0119]	试剂R2：	
	HEPES	150 mM/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM/L
	PEG6000	30 g/L
	BSA	20 g/L
[0120]	NaCl	16 g/L
	交联山羊抗人 AMH 多克隆抗体的胶乳微球	20%
	TX-100	3.0%
	NaN <sub>3</sub>	1.0 g/L
	EDTA	1.0 g/L
[0121]	其溶剂为纯化水。	
[0122]	此外,还包括AMH校准品,包括的成分及相应含量如下：	
	HEPES	150 mM/L
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 mM/L
	PEG6000	30 g/L
	BSA	20 g/L
[0123]	NaCl	16 g/L
	rAMH	10 mg/L
	NaN <sub>3</sub>	1.0 g/L
	EDTA	1.0g/L
[0124]	其溶剂为纯化水。	
[0125]	进一步地,AMH校准品中rAMH具体为重组人AMH蛋白(制备方法见实施例4)。	
[0126]	进一步地,试剂R2中交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将山羊抗人AMH多克隆抗体(制备方法见实施例4)交联到聚苯乙烯胶乳微球上。	

[0127] 实施例3

[0128] 本实施例的一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒,包括彼此独立的试剂R1和试剂R2双液体组分,包括的成分及相应含量为:

[0129] 试剂R1:

HEPES 100 mM/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/L

PEG6000 20 g/L

[0130] BSA 15 g/L

NaCl 9 g/L

NaN<sub>3</sub> 0.65 g/L

EDTA 0.3 g/L

[0131] 其溶剂为纯化水;

[0132] 试剂R2:

HEPES 100 mM/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/L

PEG6000 20 g/L

BSA 15 g/L

[0133] NaCl 9 g/L

交联山羊抗人 AMH 多克隆抗体的胶乳微球 12%

TX-100 1.5%

NaN<sub>3</sub> 0.65 g/L

EDTA 0.3 g/L

[0134] 其溶剂为纯化水。

[0135] 此外,还包括AMH校准品,包括的成分及相应含量如下:

HEPES 100 mM/L

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM/L

PEG6000 20 g/L

[0136] BSA 15 g/L

NaCl 9 g/L

rAMH 5 mg/L

NaN<sub>3</sub> 0.65 g/L

[0137] EDTA 0.3 g/L

[0138] 其溶剂为纯化水。

[0139] 进一步地,AMH校准品中rAMH具体为重组人AMH蛋白(制备方法见实施例4)。

[0140] 进一步地,试剂R2中交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球的获取方法为:使用直径30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将山羊抗人AMH多克隆抗体(制备方法见实施例4)交联到聚苯乙烯胶乳微球上。

[0141] 实施例4

[0142] 本实施例的一种上述实施例1-3中抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备方法,包括如下具体步骤:

[0143] (1) 重组人AMH的制备

[0144] ①人AMH基因的获取:

[0145] 参考GENBANK登录号NM\_000479.4,上游添加酶切位点EcoRI,下游添加酶切位点XhoI,获得如SEQ ID NO.1所示基因序列;得到基因序列后,送基因公司合成,测序合格,获得目标基因序列;

[0146] ②表达载体构建:

[0147] 使用EcoRI和XhoI两种内切酶对合成的基因及pET-32a质粒进行双酶切,将双酶切产物使用连接酶连接,并导入BL21大肠埃希菌感受态细胞中;LB培养基37℃、220rpm发酵2h,涂布于含氨苄青霉素的LB琼脂平板培养过夜,取氨苄青霉素LB平板上生长的单菌落,扩大培养后提取质粒送华大基因测序鉴定目的基因,鉴定为阳性,表示表达载体构建成功,记为pET-32a/rAMH工程菌;

[0148] ③重组人AMH的表达和纯化:

[0149] 取经测序AMH阳性菌于含氨苄青霉素的LB培养基中37℃摇菌1h以复苏工程菌活性,接着在氨苄青霉素LB培养基中放大培养4h后测其OD值;当OD值达到1.0时,加入IPTG,32℃诱导表达5h,并收集细菌;取菌体,并加入质量体积比1:2的PBS来重悬沉淀,经高压均质机破碎,12000r/min离心取上清,即得带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品;

[0150] 在上述带HIS标签的目的蛋白rAMH粗制品中加入肠激酶(大连宝生物公司),并于23℃环境下酶切过夜;酶切后,将粗制蛋白过滤处理后过GST亲和层析柱,并用Elution buffer(50mM Tris-Cl、40mM还原性谷胱甘肽,pH 7.0)梯度洗脱,收集rAMH峰;将上一步纯化的rAMH过脱盐柱,用脱盐柱缓冲液(50mM Tris-Cl,pH 9.0)置换,再分别用Loading buffer(50mM Tris-Cl,pH 7.0)平衡好柱体,上样后用Elution buffer(50mM Tris-Cl、1M NaCl,pH 7.0)梯度洗脱,收集rAMH峰;最后,将离子交换层析收集到的rAMH过分子筛层析柱,用Elution buffer(50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.15M NaCl,pH7.0)收集rAMH峰;

[0151] 使用abcam公司AMH抗体(ab103233)为抗体,使用abcam公司山羊抗兔IgG(HRP标记)为第二抗体做WB,收集的上述rAMH峰蛋白样品在60kD处显示有阳性条带(见图1),表明纯化后所得的rAMH为目标所需的重组人AMH蛋白;此时,加入20%甘油无菌分装,于-80℃保存备用;

[0152] (2) 山羊抗人AMH多克隆抗体的获得

[0153] ①山羊的免疫:

[0154] 选择7月龄、体重40~50kg的雌性山羊,取1mL 5mg/mL rAMH抗原与等量弗氏佐剂充分匀浆形成稳定乳液,记为乳化抗原;每只山羊于四蹄注射共2mL乳化抗原,进行第一次

免疫;7日后进行第二次免疫,免疫方案如前;21日后进行第三次免疫,免疫方案如前;42日后进行第四次免疫,免疫方案如前;49日后进行第五次免疫,采用耳缘静脉注射2mL 2.5mg/mL rAMH抗原;55日取耳缘静脉血,使用琼脂双扩散法测抗体效价,测得效价1:32及以上,终止免疫;采用颈部静脉无菌放血法获得全血;

[0155] ②多克隆抗体的纯化:

[0156] 将上述步骤获得的全血于室温划十字口静置2h,再取上清获得粗制血清;将粗制血清于4℃、3000r/min的条件下离心15min,再加入等体积的PBS混匀得混合液,并向混合液中缓慢滴加同等体积的饱和硫酸铵,4℃静置5h;于4℃、4200r/min条件下离心30min,上清弃去,将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,再于4℃、4200r/min条件下离心30min;此时,弃去上清,并将沉淀用200mL的PBS溶解,加入总体积量33%的饱和硫酸铵,4℃下静置3h后,4℃、4200r/min离心30min;离心后的沉淀再用200mL的PBS溶解,并进一步装入10kD透析袋;最后,将其置于4℃环境下,采用20倍体积的PBS透析液透析6h除盐,即得山羊抗人AMH多克隆抗体;

[0157] ③多克隆抗体的验证:

[0158] 使用上述制备的rAMH为抗原,上述制备的山羊抗人AMH多克隆抗体为第一抗体,使用abcam公司驴抗山羊IgG (HRP标记,ab6885) 为第二抗体做WB,抗原在60kD处有阳性条带产生(见图2);因rAMH已经商品化抗体验证,且无其他标签蛋白,使用多克隆抗体验证rAMH同样出现阳性条带,表明山羊抗人AMH多克隆抗体制备成功;

[0159] (3) 交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球的制备

[0160] 使用直径30~60nm的聚苯乙烯胶乳微球,并采用共价偶联法将步骤(2)制得的山羊抗人AMH多克隆抗体交联到聚苯乙烯胶乳微球上,即得目标所需的交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球;

[0161] (4) 抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备

[0162] ①配制试剂R1:

[0163] 按照试剂R1的组分含量,将各组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R1;

[0164] ②配制试剂R2:

[0165] 按照试剂R2的组分含量,将步骤(3)制得的交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球以及余下的其他组分物质于同一容器中混合,混合均匀后,制得试剂R2;

[0166] ③配制AMH校准品:

[0167] 按照试剂上述AMH校准品的组分含量,将步骤(1)制得的重组人AMH蛋白以及余下的其他组分于同一容器中混合,混合均匀后,制得AMH校准品。

[0168] 实施例5

[0169] 本实施例的一种上述实施例1-3中抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的测定方法:

[0170] 分析方法:两点终点法;

[0171] 反应方向:上升反应;

[0172] 校准方式:Logit-Log (4P);

[0173] 测定波长:600nm;

[0174] 测定温度:37℃;

[0175] 样本:试剂R1:试剂R2=20:240:60 (μL);

[0176] 测试步骤:吸取20μL样本,加入240μL试剂R1,37℃孵育5min,加入60μL试剂R2,1min后读取吸光值A1,3min后读取吸光值A2,计算ΔA。

[0177] 定标方法:6点定标,采用贝克曼AU680全自动生化分析仪进行检测,设置校准品浓度分别为:0、1、2、4、8、16ng/mL。

[0178] 依据定标值根据ΔA测算样本中AMH含量。

[0179] 实施例6

[0180] 本实施例用以评价上述实施例中抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒:

[0181] (1) 线性相关性验证

[0182] 利用实施例3配方配制试剂,与国家食品药品监督管理局认可的某上市公司的AMHELISA检测试剂盒进行对照检测。检测100份临床血清样本,检测结果如表1所示,获得了本发明试剂盒与上市某公司在售AMH ELISA检测试剂的相关性曲线(见图3),通过检测结果显示,两试剂盒的线性相关曲线为 $y=0.9846x-0.006$ ,相关系数 $R^2=0.8989$ ,说明两者具有较大的相关性。

[0183] 表1本发明试剂盒与某上市公司在售AMH检测试剂盒线性相关性对比值

[0184]

序号	测试值	对照值	序号	测试值	对照值	序号	测试值	对照值
1	0.77	0.67	35	2.79	1.99	69	4.51	3.71
2	5.35	4.95	36	0.47	0.33	70	1.56	1.56
3	3.58	3.58	37	2.27	1.47	71	1.11	1.51
4	5.05	4.25	38	4.73	4.73	72	4.34	4.74
5	2.02	2.42	39	5.29	5.29	73	1.84	1.84
6	1.56	1.16	40	3.44	4.24	74	4.85	4.85
7	4.35	4.35	41	3.75	4.15	75	1.64	2.04
8	4.05	4.85	42	1.03	1.83	76	4.84	4.04
9	2.35	3.15	43	4.68	4.68	77	4.15	4.15
10	4.00	4.00	44	2.38	3.18	78	4.04	4.84
11	1.04	0.24	45	5.62	5.22	79	0.49	0.89
12	4.27	4.27	46	2.61	2.21	80	4.06	3.26
13	4.45	4.05	47	3.75	2.95	81	2.96	2.16
14	1.53	1.53	48	1.66	1.66	82	4.97	4.97
15	3.29	2.89	49	4.70	3.90	83	3.37	3.77
16	1.49	1.09	50	4.84	4.44	84	5.40	5.40
17	3.24	4.04	51	2.14	2.14	85	5.47	5.87
18	4.28	3.88	52	5.00	5.40	86	1.64	0.84
19	2.27	2.27	53	1.94	1.94	87	3.41	3.81
20	4.21	5.01	54	4.61	5.41	88	3.16	3.16
21	2.65	2.65	55	0.51	0.91	89	4.52	3.72
22	0.60	0.60	56	0.94	0.94	90	5.08	4.28
23	2.41	2.41	57	3.54	3.14	91	4.47	5.27
24	1.52	1.12	58	3.80	3.00	92	3.79	3.79
25	0.85	0.45	59	2.26	3.06	93	3.40	2.60
26	0.54	0.26	60	3.76	4.16	94	4.65	3.85
27	4.68	5.08	61	2.37	1.57	95	4.52	4.52
28	5.14	4.74	62	1.29	1.29	96	1.34	0.94

[0185]

29	5.19	4.79	63	4.15	4.95	97	0.35	0.05
30	2.49	2.49	64	5.52	4.72	98	3.73	2.93
31	1.30	1.30	65	3.49	3.89	99	4.23	4.23
32	3.71	3.71	66	5.39	5.39	100	0.93	0.13
33	5.30	6.10	67	1.09	1.49			
34	3.70	3.70	68	1.48	1.88			

[0186] (2) 线性范围验证

[0187] 使用重组AMH纯化品和生理盐水配制成浓度200ng/mL、50ng/mL、12.5ng/mL、3.125ng/mL、0.782ng/mL和0ng/mL(生理盐水对照)的测试品,使用本发明试剂盒测定各测试品浓度,以稀释浓度为自变量,以测定结果为因变量求出线性回归方程,计算测定结果的相对偏差,计算结果如表2所示。结果显示,测定结果与稀释浓度之间的线性回归方程为 $y = 1.0066x + 0.0265$ ,  $R^2 = 0.9973$ ,见图4。其中,相关系数 $R^2 = 0.9973$ ,说明线性关系良好,线性范围可达200ng/mL。

[0188] 表2本发明试剂线性范围验证

[0189]

序号	稀释浓度	测试值1	测试值2	测试值3	平均数	绝对偏差	相对偏差
1	200	202.33	200.1	201.27	201.233	1.233	0.617%
2	50	51.21	50.98	50.34	50.843	0.843	1.687%
3	12.5	12.44	12.31	12.52	12.423	-0.077	-0.613%
4	3.125	3.123	3.101	3.007	3.077	-0.048	-1.536%
5	0.782	0.762	0.74	0.722	0.741	-0.041	
6	0	0	0	0	0.000	0.000	

[0190] (3) 准确度验证

[0191] 取具有溯源性高值血清质控和低值血清质控各一份,使用所述试剂盒检测6次,取均值,与质控靶值进行比对,比对结果如表3所示。结果表明,检测值较靶值相对偏差较小,准确度较高。

[0192] 表3所述试剂盒准确度验证结果

[0193]

测定值 1	测定值 2	测定 值 3	测定 值 4	测定 值 5	测定值 6	测定 均值	血清 靶值	相对偏差
----------	----------	-----------	-----------	-----------	----------	----------	----------	------

[0194]

4.95	4.97	5.03	4.93	5.04	4.99	4.99	5.00	-0.30%
1.07	0.94	0.93	1.09	0.94	0.96	0.99	1.00	-1.17%

## [0195] (4) 精密度验证

[0196] 取经在售试剂盒检测的临床血清样本高值和低值各一份,使用所述试剂盒对同一份血清样本连续检测10次,计算所述试剂盒的变异系数,精密度检测数据如表4所示。检测结果表明,所述试剂盒在检测高值和低值样本时的变异系数较小,分别为3.49%和3.98%,精密度较好。

[0197] 表4所述试剂盒精密度验证结果

[0198]

检测值1	检测值2	检测值3	检测值4	检测值5
7.39	7.25	6.79	6.94	7.28
0.37	0.33	0.38	0.36	0.34
检测值6	检测值7	检测值8	检测值9	检测值10
7.26	7.28	7.29	6.64	7.08
0.37	0.37	0.37	0.36	0.35
检测均值	标准差	变异系数		
7.12	0.25	3.49%		
0.36	0.01	3.98%		

## [0199] (5) 灵敏度及特异度验证

[0200] 选取确诊隐睾症、多囊卵巢综合征、卵巢颗粒细胞瘤三种疾病50份阳性血清和健康就诊者50份阴性血清,选择市售ELISA法AMH检测试剂盒、某AMH检测系统与所述试剂盒同步检测此100份血清样本,按各试剂盒判定标准设高于参考标准为阳性,低于参考标准为阴性,计算各试剂盒的灵敏度和特异度,结果如表5所示。结果表明,所述试剂盒较市售ELISA试剂盒有较高的灵敏度和特异度,较某AMH检测系统有较好的特异度和相同的灵敏度。本发明的突出优点是较ELISA检测试剂盒有较高的灵敏度和特异度,较化学发光有较好的特异度和相同的灵敏度,从而大大地提高临床检测的准确性,且试剂成本较低能使用全自动生化仪进行检测,能极大满足临床检测的需求。

[0201] 表5所述试剂盒灵敏度及特异度与市售检测试剂比较

[0202]

试剂盒	检测项	金标准 (临床诊断)		灵敏度	特异度
		真阳性	真阴性		
本发明试剂	检测阳性	48	2	96%	96%
	检测阴性	2	48		
某 ELISA 试剂盒	检测阳性	44	3	88%	94%
	检测阴性	6	47		
某自动检测系统 (化学发光法)	检测阳性	48	7	96%	86%
	检测阴性	2	43		

[0203] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 安徽大千生物工程有限公司

&lt;120&gt; 抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法

&lt;130&gt; 2019

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1700

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

```

cggaattcat gcgggacctg cctctcacca gcctggccct agtgctgtct gccctggggg 60
ctctgctggg gactgaggcc ctacagagcag aggagccagc tgtgggcacc agtggcctca 120
tcttccgaga agacttggac tggcctccag gcagcccaca agagcctctg tgcctggtgg 180
cactggggcgg ggacagcaat ggacagcagc cccccctgcg ggtggtgggg gctctaagcg 240
cctatgagca ggcccttcctg ggggccgtgc agagggcccc ctggggcccc cgagacctgg 300
ccaccttcgg ggtctgcaac accggtgaca ggacagctgc cttgccctct ctacggcggc 360
tgggggcctg gctgcgggac cctggggggc agcgctggtg ggtcctacac ctggaggaag 420
tgacctggga gccaacaccc tcgctgaggt tccaggagcc ccgcctgga ggagctggcc 480
ccccagagct ggcgctgctg gtgctgtacc ctgggcctgg ccctgaggtc actgtgacga 540
gggctgggct gccgggtgcc cagagcctct gccctcccc agacaccgcg tacctggtgt 600
tagcggtgga ccgccctgcg ggggcctggc gcggctccgg gctggccttg accctgcagc 660
ccgcgggaga ggactcccgg ctgagtaccg ccggctgca ggactgctg ttcggcgacg 720
accaccgctg cttcacacgg atgaccccg ccctgctcct gctgcccgcg tccgagcccc 780
cgccgctgcc tgcgcacggc cagctggaca ccgtgccctt ccgcgcgccc aggccatccg 840
cggaactcga ggagtcgcca cccagcgcag accccttcct ggagacgctc acgcgcctgg 900
tgcgggcgct gcgggtcccc ccggcccggg cctccgcgcc gcgcctggcc ctggatccgg 960
acgcgctggc cggttcccc cagggcctag tcaacctgtc ggaccccgcg gcgctggagc 1020
gcctactcga cggcgaggag ccgctgctgc tgctgctgag gccactgcg gccaccaccg 1080
gggatcctgc gccctgcac gacccacgt cggcgccgtg ggccacggcc ctggcgcgcc 1140
gcgtggctgc tgaactgcaa gcggcggtg ccgagctgcg aagcctccc ggtctgcctc 1200
cgccacagc ccgctgctg gcgcgctgc tcgcgctctg ccaggtggc ccggcgggcc 1260
tcggcgatcc cctgcgagcg ctgctgctcc tgaaggcgt gcagggcctg cgcgtggagt 1320
ggcgcgggcg ggatccgcgc gggccgggtc gggcacagcg cagcgcgggg gccaccgccg 1380
ccgacgggcc gtgcgcgctg cgcgagctca gcgtagacct ccgcgccgag cgctccgtac 1440
tcattccccg gacctaccg gccaaacatt gccagggcgt gtgcggctgg cctcagtcgg 1500
accgcaaccc gcgtacggc aaccacgtgg tgctgctgct gaagatgcag gcccggtggg 1560
ccgccctggc gcgcccaccc tgctgcgtgc ccaccgcta cgcgggcaag ctgctcatca 1620

```

---

gcctgtcgga ggagcgcac agcgcgcacc acgtgcccaa catggtggcc accgagtgtg 1680  
gctgccggtg actcgagggc 1700

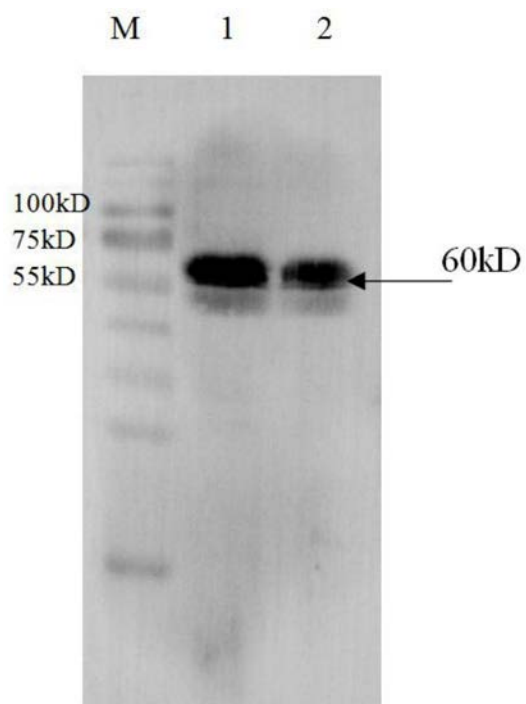


图1

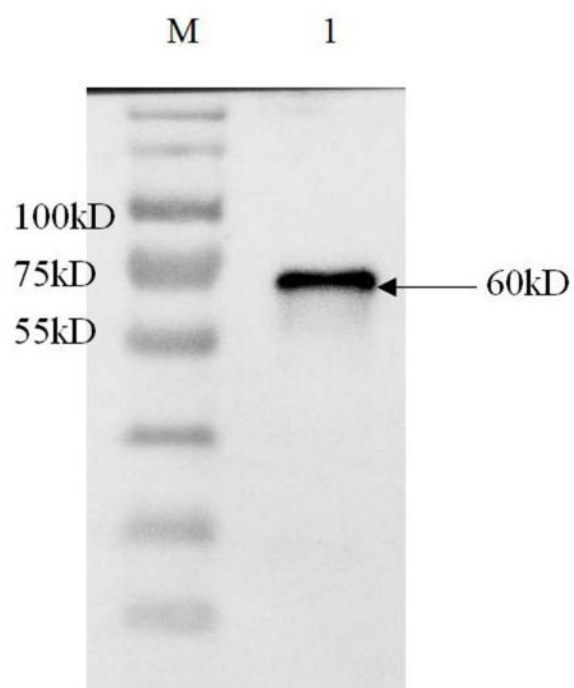


图2

本试剂对比某ELISA试剂线性关系曲线

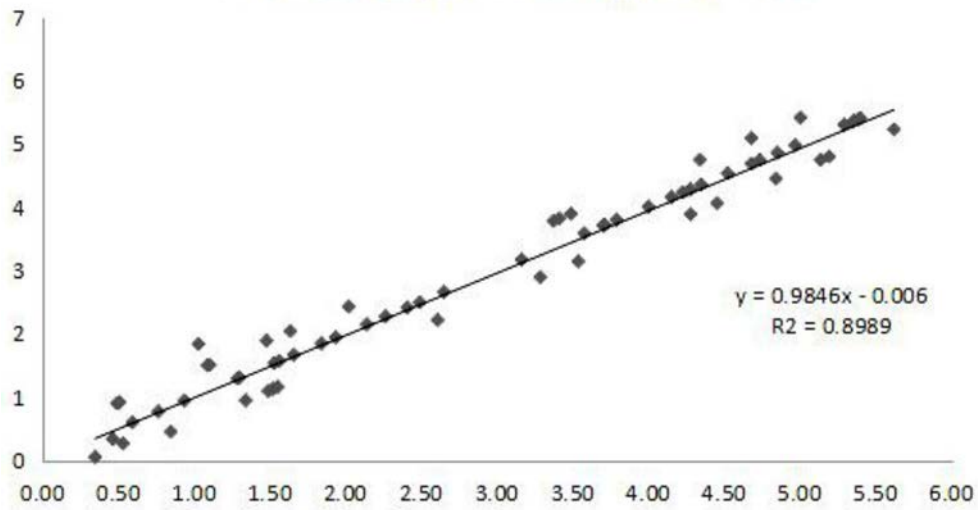


图3

本发明试剂线性范围曲线图

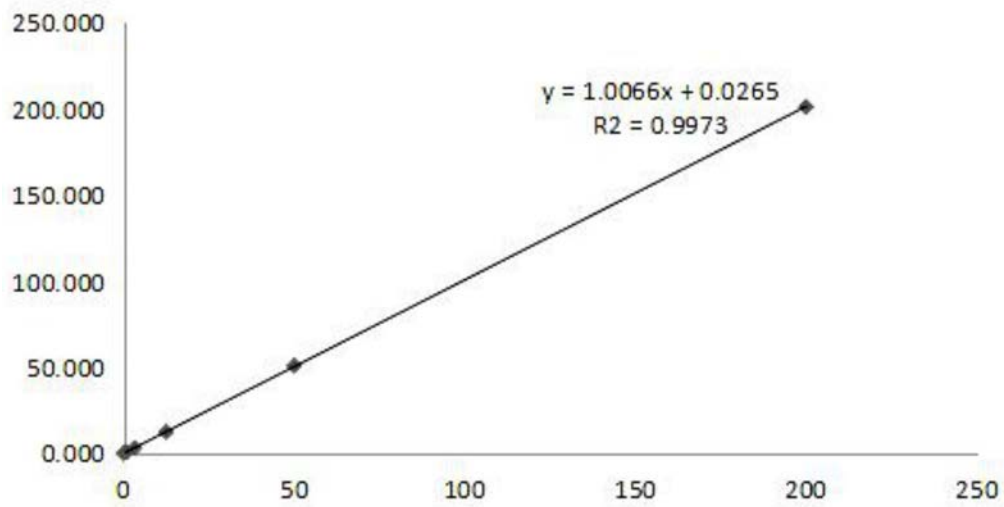


图4

专利名称(译)	抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒及其制备使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109975536A</a>	公开(公告)日	2019-07-05
申请号	CN201910289735.3	申请日	2019-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
[标]发明人	符修乐 吴瑶瑶 芮双印 王俊薇 陆大伟 郭荣芳 程虎 高帆		
发明人	符修乐 吴瑶瑶 芮双印 王俊薇 陆大伟 郭荣芳 程虎 支新梅 高帆		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/536 G01N33/74 C12N15/70 C07K14/495 C07K1/22 C07K1/18 C07K16/22 C07K16/06		
代理人(译)	王伟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒，包括试剂R1和试剂R2，试剂R1：HEPES、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、PEG6000、BSA等；试剂R2：HEPES、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、PEG6000、交联山羊抗人AMH多克隆抗体的胶乳微球等。本发明还提供了一种抗缪勒激素胶乳增强比浊法检测试剂盒的制备、使用方法。本发明首次利用胶乳增强免疫透射比浊法来测定抗缪勒激素，可在全自动生化分析仪上使用，成本低廉、自动化高，能大大节省检测时间；并且，在高稳定性和高精密度情况下，相比ELISA产品具有更高的灵敏度，相比化学发光产品具有更好的特异性，大大提升了抗缪勒激素检测的临床应用价值。

