



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110398589 A

(43)申请公布日 2019.11.01

(21)申请号 201910701278.4

(22)申请日 2019.08.17

(71)申请人 宁波奥丞生物科技有限公司

地址 315000 浙江省宁波市海曙区望春工
业园区春华路885号

(72)发明人 周义正 唐静 黄丹娣

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理
有限公司 11616

代理人 郑丰平

(51) Int. Cl.

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及其检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及其检测方法,试剂盒包括NHS磁珠悬浮液、抗缪勒氏管激素单抗I、抗缪勒氏管激素单抗II、偶联缓冲液、封闭液、增强液、清洗液、校准品;本发明将时间分辨荧光免疫分析法的灵敏性、磁分离技术的快速性相结合,检测方法操作简便,检测时间大大缩短,重复性良好,可大面积用于临床检测。

1. 一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒,其特征在于,包括:NHS磁珠悬浮液、抗缪勒氏管激素单抗I、抗缪勒氏管激素单抗II、偶联缓冲液、封闭液、增强液、清洗液、校准品。

2. 一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 取抗缪勒氏管激素单抗I用偶联缓冲液稀释至浓度 $\geq 20\mu\text{g}/\text{mL}$;

(2) 取 $100\mu\text{L}$ 的NHS磁珠悬浮液于反应管中,磁性分离,保留NHS磁珠,弃上清液;加入 $500\mu\text{L}$ 的偶联缓冲液于反应管中,涡旋 15s ;磁性分离,保留NHS磁珠,弃上清液;

(3) 取 1mL 已稀释的抗缪勒氏管激素单抗I加入到反应管中,涡旋 30s ,混匀NHS磁珠;将反应管置于旋转混合仪上,室温孵育 2h ;

(4) 孵育结束后,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;加入 1mL 的封闭液于反应管中,涡旋 20s ,将反应管置于旋转混合仪上,室温孵育 1h ,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;最后加入 1mL 的清洗液于反应管中,涡旋 20s ,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;重复上述清洗步骤 1 次;得到偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,加入保存液后, 4° 保存待用;

(5) 取 $500\mu\text{L}$ 抗缪勒氏管激素单抗II、 $200\mu\text{L}$ 的 Eu^{3+} -DTPA加入到反应管中, 25°C 磁力搅拌反应 24h ,得到 Eu^{3+} 标记的抗缪勒氏管激素单抗II,将 Eu^{3+} 标记的抗缪勒氏管激素单抗II用蛋白柱纯化后保存待用;

(6) 在96孔微孔板中,依次加入偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠、 $50\mu\text{L}$ 校准品或待测血清、 $150\mu\text{L}$ Tris-HCL反应缓冲液, 25°C 振荡孵育 5min ,静置 2min ,保留偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,弃上清;用清洗液重复上述清洗步骤 5 次;再加入 $200\mu\text{L}$ 的 Eu^{3+} 标记的抗缪勒氏管激素单抗II, 25°C 振荡孵育 5min ;用清洗液重复上述清洗步骤 5 次;加入 $200\mu\text{L}$ 增强液, 25°C 振荡孵育 5min ;采用时间分辨荧光免疫分析仪进行检测。

3. 根据权利要求2所述的一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒的检测方法,其特征在于,所述偶联缓冲液为浓度 0.2M 、 $\text{pH}8.3$ 的碳酸钠缓冲液。

4. 根据权利要求2所述的一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒的检测方法,其特征在于,所述清洗液为含有 $8\text{mmol}/\text{L}$ NaCl、 0.1% BSA、 0.2% 牛血清白蛋白、 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 的Tween-80、 0.1% NaN_3 的Tris-HCL缓冲液($50\text{mmol}/\text{L}$ 、 $\text{pH}7.8$)。

5. 根据权利要求2所述的一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒的检测方法,其特征在于,所述封闭液为含 1% BSA的PBS缓冲液(0.02M , $\text{pH}7.4$)。

6. 根据权利要求2所述的一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒的检测方法,其特征在于,所述保存液为含 5% BSA、 10% 海藻糖、 0.1% Tween-20的Tris-HCL缓冲液(0.05M , $\text{pH}8.0$)。

7. 根据权利要求2所述的一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒的检测方法,其特征在于,所述增强液为含 0.03% 乙酸钠、 $0.0002\sim 0.0009\%$ β -NTA、 0.0024% TOPO、 0.08% 醋酸、 0.1% 无水乙醇、 0.05% 的Triton X-100的水溶液。

一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断领域,具体涉及一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 抗缪勒氏管激素又称AMH,是早期卵泡的直接产物,由二硫化物桥连接两个72KDa单体组成的糖蛋白二聚体,由女性卵巢组织的粒层细胞分泌。AMH最初表达于初级卵泡的颗粒细胞层,在直径约0.1~0.2mm的窦前卵泡及直径约2mm左右小窦状卵泡中表达最强,而在>4mm窦状卵泡中表达逐渐减弱至完全消失,对于卵泡发育具有重要的调节作用,血清AMH水平不受垂体促性腺激素的影响,在整个月经周期中数值变化不大。

[0003] 相对于目前常用的预测卵巢储备及卵巢反应性(年龄及窦卵泡数目,卵泡刺激素和雌二醇等)传统方法而言,血AMH值可即时生成,可准确、灵敏地反映卵巢储备功能。在监测卵巢储备力、诊断卵巢相关疾病、预测IVF成功率及预防OHSS并发症等方面具有其他指标不可比拟的优势。AMH是目前预测卵巢反应、评估卵巢储备功能的最理想生物标志物。

[0004] 对于AMH的检测,目前临床的方法包括:酶联免疫法、化学发光、电化学发光等方法。目前最常用的是酶联免疫法利用酶联免疫法检测抗缪勒氏管激素含量,灵敏度高,特异性强,但检测时间长,不能自动化;化学发光法检测血清中AMH,能自动化检测,但需要昂贵化学发光检测系统。传统时间分辨荧光免疫分析法中,抗体与微孔板上捕获物质结合较慢,而免疫磁珠均匀分散于溶液中,与抗体接触面积增大,从而增加了免疫磁珠与抗体的结合速率,大大提高了检测反应的比表面积,缩短了检测时间,本发明检测抗缪勒氏管激素的试剂盒将时间分辨荧光免疫层析技术与磁分离技术相结合,具有灵敏度高,操作快速简便的优点。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及其检测方法,具有特异性强、检测时间短、操作快速简便,短时间即可得结果等优点。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒,包括NHS磁珠悬浮液、抗缪勒氏管激素单抗I、抗缪勒氏管激素单抗II、偶联缓冲液、封闭液、增强液、清洗液、校准品。

[0007] 一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒的检测方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 取抗缪勒氏管激素单抗I用偶联缓冲液稀释至浓度 $\geq 20\mu\text{g}/\text{mL}$;

[0009] (2) 取100 μL 的NHS磁珠悬浮液于反应管中,磁性分离,保留NHS磁珠,弃上清液;加入500 μL 的偶联缓冲液于反应管中,涡旋15s;磁性分离,保留NHS磁珠,弃上清液;

[0010] (3) 取1mL已稀释的抗缪勒氏管激素单抗I加入到反应管中,涡旋30s,混匀NHS磁珠;将反应管置于旋转混合仪上,室温孵育2h;

[0011] (4) 孵育结束后,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;加入1mL的封闭液于反应管

中,涡旋20s,将反应管置于旋转混合仪上,室温孵育1h,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;最后加入1mL的清洗液于反应管中,涡旋20s,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;重复上述清洗步骤1次;得到偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,加入保存液后,4°保存待用;

[0012] (5)取500 μ L抗缪勒氏管激素单抗II、200 μ L的Eu³⁺-DTPA加入到反应管中,25°C磁力搅拌反应24h,得到Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II,将Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II用蛋白柱纯化后保存待用;

[0013] (6)在96孔微孔板中,依次加入偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠、50 μ L校准品或待测血清、150 μ L Tris-HCL反应缓冲液,25°C振荡孵育5min,静置2min,保留偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,弃上清;用清洗液重复上述清洗步骤5次;再加入200 μ L的Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II,25°C振荡孵育5min;用清洗液重复上述清洗步骤5次;加入200 μ L增强液,25°C振荡孵育5min;采用时间分辨荧光免疫分析仪进行检测。

[0014] 所述偶联缓冲液为浓度0.2M、pH 8.3的碳酸钠缓冲液。

[0015] 所述清洗液为含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、0.2%牛血清白蛋白、0.1mol/L的Tween-80、0.1%NaN₃的Tris-HCL缓冲液(50mmol/L、pH7.8)。

[0016] 所述封闭液为含1%BSA的PBS缓冲液(0.02M,pH7.4)。

[0017] 所述保存液为含5%BSA,10%海藻糖,0.1%Tween-20的Tris-HCL缓冲液(0.05M,pH 8.0)。

[0018] 所述增强液为含0.03%乙酸钠、0.0002~0.0009% β -NTA、0.0024%TOPO、0.08%醋酸、0.1%无水乙醇、0.05%的Triton X-100的水溶液。

[0019] 本发明时间分辨荧光免疫定量检测AMH试剂盒的检测原理为夹心法,96孔微孔板中先加入偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,再将校准品或待测血清加入到反应孔中,150 μ L Tris-HCL反应缓冲液,25°C振荡孵育5min,静置2min。多次洗涤后,加入200 μ L的Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II,形成免疫磁珠-抗原-铕标/钆标抗体复合物。洗涤后,再加入增强液,在激发光的作用下,荧光物质发射一定波长的光信号,被时间分辨免疫荧光分析仪识别,样本中被测物越多,产生的荧光信号强度越强。将AMH浓度与荧光信号值拟定标曲线,根据待测样本的发光强度值推算AMH的浓度。

[0020] 本发明具有有益效果:本发明将时间分辨荧光免疫分析法的灵敏性、磁分离技术的快速性相结合,检测方法操作简便,检测时间大大缩短,重复性良好,可大面积用于临床检测。

[0021] 说明书附图

[0022] 图1为高纯度增强液与常见增强液时间-Eu³⁺计数曲线图。

具体实施方式

[0023] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。

[0024] 实施例1

[0025] 一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒,包括NHS磁珠悬浮液、抗缪勒氏管激素单抗I、抗缪勒氏管激素单抗II、偶联缓冲液、封闭液、增强液、清洗液、校准品。

[0026] 一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒的检测方法,包括如下步骤:

[0027] (1)取抗缪勒氏管激素单抗I用偶联缓冲液稀释至浓度20 μ g/mL;

[0028] (2) 取100 μ L的NHS磁珠悬浮液于反应管中,磁性分离,保留NHS磁珠,弃上清液;加入500 μ L的偶联缓冲液于反应管中,涡旋15s;磁性分离,保留NHS磁珠,弃上清液;

[0029] (3) 取1mL已稀释的抗缪勒氏管激素单抗I加入到反应管中,涡旋30s,混匀NHS磁珠;将反应管置于旋转混合仪上,室温孵育2h;

[0030] (4) 孵育结束后,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;加入1mL的封闭液于反应管中,涡旋20s,将反应管置于旋转混合仪上,室温孵育1h,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;最后加入1mL的清洗液于反应管中,涡旋20s,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;重复上述清洗步骤1次;得到偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,加入保存液后,4 $^{\circ}$ 保存待用;

[0031] (5) 取500 μ L抗缪勒氏管激素单抗II、200 μ L的Eu³⁺-DTPA加入到反应管中,25 $^{\circ}$ C磁力搅拌反应24h,得到Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II,将Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II用蛋白柱纯化后保存待用;

[0032] (6) 在96孔微孔板中,依次加入偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠、50 μ L校准品或待测血清、150 μ L Tris-HCL反应缓冲液,25 $^{\circ}$ C振荡孵育5min,静置2min,保留偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,弃上清;用清洗液重复上述清洗步骤5次;再加入200 μ L的Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II,25 $^{\circ}$ C振荡孵育5min;用清洗液重复上述清洗步骤5次;加入200 μ L增强液,25 $^{\circ}$ C振荡孵育5min;采用时间分辨荧光免疫分析仪进行检测。

[0033] 进一步地,所述偶联缓冲液为浓度0.2M、pH 8.3的碳酸钠缓冲液。

[0034] 进一步地,所述清洗液为含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、0.2%牛血清白蛋白、0.1mol/L的Tween-80、0.1%NaN₃的Tris-HCL缓冲液(50mmol/L、pH7.8)。

[0035] 进一步地,所述封闭液为含1%BSA的PBS缓冲液(0.02M,pH7.4)。

[0036] 进一步地,所述保存液为含5%BSA,10%海藻糖,0.1%Tween-20的Tris-HCL缓冲液(0.05M,pH 8.0)。

[0037] 进一步地,增强液为市场上常用品牌,品牌为江原。

[0038] 本发明时间分辨荧光免疫定量检测AMH试剂盒的检测原理为夹心法,96孔微孔板中先加入偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,再将校准品或待测血清加入到反应孔中,150 μ L Tris-HCL反应缓冲液,25 $^{\circ}$ C振荡孵育5min,静置2min。多次洗涤后,加入200 μ L的Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II,形成免疫磁珠-抗原-铕标/钆标抗体复合物。洗涤后,再加入增强液,在激发光的作用下,荧光物质发射一定波长的光信号,被时间分辨免疫荧光分析仪识别,样本中被测物越多,产生的荧光信号强度越强。将AMH浓度与荧光信号值拟定标曲线,根据待测样本的发光强度值推算AMH的浓度。

[0039] 实施例2

[0040] 本实施例中提供了另一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒的检测方法,包括如下步骤:

[0041] (1) 取抗缪勒氏管激素单抗I用偶联缓冲液稀释至浓度30 μ g/mL;

[0042] (2) 取100 μ L的NHS磁珠悬浮液于反应管中,磁性分离,保留NHS磁珠,弃上清液;加入500 μ L的偶联缓冲液于反应管中,涡旋35s;磁性分离,保留NHS磁珠,弃上清液;

[0043] (3) 取1mL已稀释的抗缪勒氏管激素单抗I加入到反应管中,涡旋30s,混匀NHS磁珠;将反应管置于旋转混合仪上,室温孵育2h;

[0044] (4) 孵育结束后,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;加入1mL的封闭液于反应管

中,涡旋50s,将反应管置于旋转混合仪上,室温孵育1h,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;最后加入1mL的清洗液于反应管中,涡旋50s,磁性分离,弃上清液,保留NHS磁珠;重复上述清洗步骤1次;得到偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,加入保存液后,4°保存待用;

[0045] (5)取500 μ L抗缪勒氏管激素单抗II、200 μ L的Eu³⁺-DTPA加入到反应管中,25°C磁力搅拌反应24h,得到Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II,将Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II用蛋白柱纯化后保存待用;

[0046] (6)在96孔微孔板中,依次加入偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠、50 μ L校准品或待测血清、150 μ L Tris-HCL反应缓冲液,25°C振荡孵育5min,静置2min,保留偶联抗缪勒氏管激素单抗I的磁珠,弃上清;用清洗液重复上述清洗步骤5次;再加入200 μ L的Eu³⁺标记的抗缪勒氏管激素单抗II,25°C振荡孵育5min;用清洗液重复上述清洗步骤4次;加入200 μ L增强液,25°C振荡孵育5min;采用时间分辨荧光免疫分析仪进行检测。

[0047] 进一步地,所述偶联缓冲液为浓度0.2M、pH 8.3的碳酸钠缓冲液。

[0048] 进一步地,所述清洗液为含有8mmol/L NaCl、0.1%BSA、0.2%牛血清白蛋白、0.1mol/L的Tween-80、0.1%NaN₃的Tris-HCL缓冲液(50mmol/L、pH7.8)。

[0049] 进一步地,所述封闭液为含1%BSA的PBS缓冲液(0.02M,pH7.4)。

[0050] 进一步地,所述保存液为含5%BSA,10%海藻糖,0.1%Tween-20的Tris-HCL缓冲液(0.05M,pH 8.0)。

[0051] 进一步地,增强液为市场上常用品牌,品牌为江原。

[0052] 实施例3

[0053] 时间分辨免疫荧光分析法是利用具有双功能基团结构的螯合剂将镧系元素标记到抗体上,经免疫反应,与抗原结合形成免疫复合物,由于结合于免疫复合物上的Eu³⁺发出的荧光强度相当微弱,只有加入增强液,使镧系元素从复合物中解离下来,并被增强液中所含的螯合剂螯合,形成新的螯合物,从而在紫外等光的激发下发射很强的荧光,增强效果可达上百万倍,增强液中的螯合剂对检测结果有直接的影响,螯合剂大多是 β -二酮类,其中效果最佳的是 β -NTA。

[0054] 本实施例中提供了增强液的制备方法:6mL0.1mol/L邻苯二甲酸氢钾用冰醋酸调pH为3.2,再依次加入15 μ mol的已纯化 β -NTA,50 μ mol的TOP0,1mL的Triton X-100,最后加超纯水定容至1L,搅拌均匀,4°暗保存待用。

[0055] 市售的 β -NTA(常见纯度99%)中,含有大量的氯离子和金属离子,对检测结果有干扰。

[0056] β -NTA的纯化方法:将 β -NTA置于圆底烧瓶中,加入70%乙醇溶解,于70°C恒温水浴放置20min;趁热抽滤,除去不溶的杂质;将滤液冷却,使结晶析出,用无水乙醇清洗结晶多次,最后将结晶干燥,即得纯化的 β -NTA。

[0057] 本实施例中提供了一种增强液的制备方法,通过纯化螯合剂 β -NTA,从而制备高纯度的增强液,达到提高荧光稀土离子Eu³⁺发光强度的目的,进一步提高检测结果的准确性。

[0058] 本实施例与实施例1检测方法相同,不同之处在于将市售常见增强液更换成本实施例中制备的高纯度增强液,结果如图1所示,高纯度增强液约在12min中计数达到最大值,后面基本保持不变,而常见增强液约在14min达到最大,但性能远远低于高纯度增强液。

[0059] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,对于本领域的普通技术人员而言,可以

理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

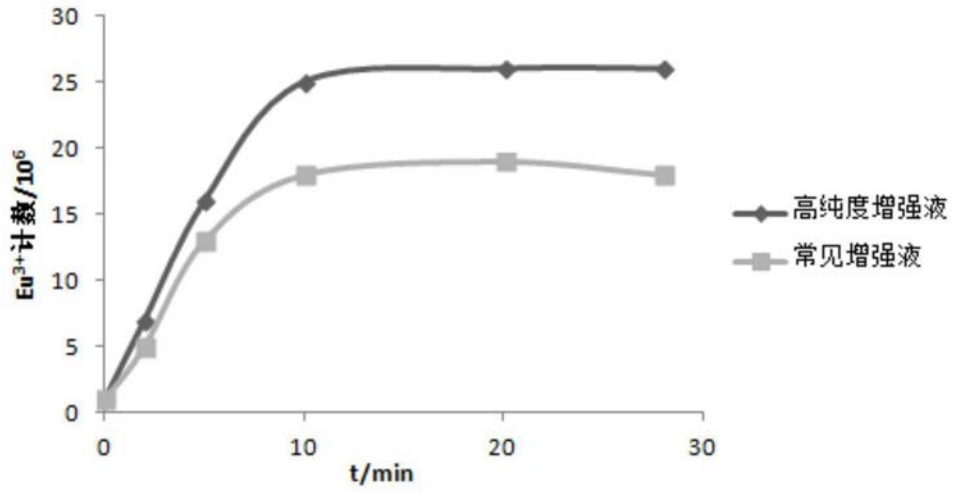


图1

专利名称(译)	一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及其检测方法		
公开(公告)号	CN110398589A	公开(公告)日	2019-11-01
申请号	CN201910701278.4	申请日	2019-08-17
[标]发明人	周义正 唐静 黄丹娣		
发明人	周义正 唐静 黄丹娣		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/543 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6408 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/74 G01N2021/6439		
代理人(译)	郑丰平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测抗缪勒氏管激素含量的试剂盒及其检测方法，试剂盒包括NHS磁珠悬浮液、抗缪勒氏管激素单抗I、抗缪勒氏管激素单抗II、偶联缓冲液、封闭液、增强液、清洗液、校准品；本发明将时间分辨荧光免疫分析法的灵敏性、磁分离技术的快速性相结合，检测方法操作简便，检测时间大大缩短，重复性良好，可大面积用于临床检测。

