



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109738644 A

(43)申请公布日 2019.05.10

(21)申请号 201811586090.1

(22)申请日 2018.12.24

(71)申请人 恩碧乐(杭州)生物科技有限公司

地址 311100 浙江省杭州市余杭区余杭经济开发区新颜路22号501F

(72)发明人 糸岡朝树 根本浩史 高宇 饶琪  
范可君

(74)专利代理机构 杭州宇信知识产权代理事务  
所(普通合伙) 33231

代理人 王健

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/27(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

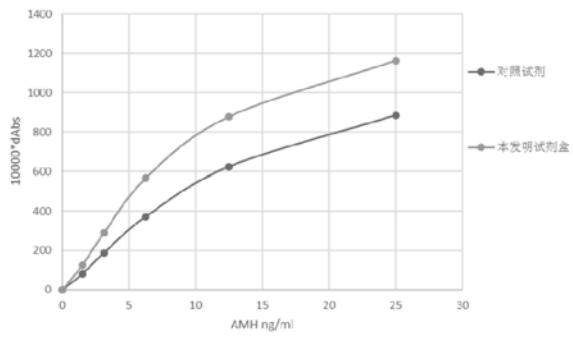
(54)发明名称

一种抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试

剂

(57)摘要

本发明为一种抗穆勒氏管激素定量检测试剂,所述试剂通过化学交联法制备,其使用三嗪系缩合剂为交联剂使抗人抗穆勒氏管激素抗体包被在具有羧基的微球。该交联方法能够有效控制抗体与微球连接时的方向,实现抗穆勒氏管激素(AMH)定量试剂灵敏度高、类风湿因子(RF)等对干扰物的影响减轻,理化性质稳定,可用于各种生化分析仪。



1. 一种使用三嗪系缩合剂为交联剂使抗人抗穆勒氏管激素抗体包被在具有羧基的微球,通过化学交联法制备的抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂。

2. 根据权利要求1所述的一种抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂,其特征在于,所述三嗪类缩合剂为2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪和4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐中的一种或两种。

3. 根据权利要求1所述的一种抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂,其特征在于,所述三嗪系缩合剂与具有羧基的微球的质量比为1:1000~1:0.1。

4. 根据权利要求1所述的一种抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂,其特征在于,所述具有羧基的微球直径为50~500nm。

5. 根据权利要求1所述的一种抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂,其特征在于,所述具有羧基的微球由聚苯乙烯,苯烯酸,苯烯酸相关酯类的一种或几种聚合而成。

6. 根据权利要求1所述的一种抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂,其特征在于,所述抗人抗穆勒氏管激素抗体为小鼠单克隆抗体或山羊,绵羊,兔子多克隆抗体。

## 一种抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂

### 技术领域

[0001] 本发明属于医学免疫体外诊断领域,具体地说是涉及一种抗穆勒氏管激素(AMH)定量检测试剂。

### 背景技术

[0002] 抗穆勒氏管激素(AMH),是一种人体内由抗穆勒氏管激素(AMH)基因编码的蛋白质,可以反映原始卵泡分泌生物酶的活跃程度和卵巢中的卵子储备、卵巢生殖功能,可以预测绝经期。检测人体抗穆勒氏管激素(AMH)水平,对评估女性生育能力,制定个体化生育计划,诊断女性卵巢疾病具有重要意义。现有抗穆勒氏管激素(AMH)诊断试剂盒酶联免疫法(ELISA)应用较普遍,但该方法为非均相免疫检测系统,其优点在于:通过使用过量的固定化抗体和标记抗体,实现高灵敏度和较高水平的精确性;缺点在于:测定过程中需要进行洗涤分离步骤,耗时长,缺少单位测试运行时间;自动化程度不高,且受人为因素影响较大;针对不同的步骤需要配备多种专门的设备,一定程度上增加了产品的成本。

[0003] 近年来,由于不断增长的检测数量,临幊上迫切需要一种更为简便、快速的方法取代传统的检测方法。胶乳增强免疫比浊法检测抗穆勒氏管激素(AMH)是基于均相免疫分析测定系统的一种方法,在普通的生化分析仪上即可完成反应全程,可实现快速、高通量样本的检测。由于抗穆勒氏管激素(AMH)在正常人体内含量相对较低,而在多种疾病时含量又异常增高,所以需要一种测定线性范围广又能同时保证测试灵敏度的用于自动生化分析仪的抗穆勒氏管激素(AMH)检测试剂,目前市场上少有抗穆勒氏管激素(AMH)免疫比浊试剂。

[0004] 目前常用于提高胶乳增强免疫比浊试剂测试灵敏度的方法,包括使用更高亲和力的抗体,使用粒径更大且稳定性更好的微球等,然而类风湿因子(RF)和人抗鼠抗体(HAMA)等干扰物对胶乳增强免疫比浊法等基于均相免疫分析测定系统的影响还比酶联免疫方法大,抗穆勒氏管激素(AMH)的测定浓度范围是从10-10<sup>4</sup>pg/ml,有可能由于这种干扰物质微小的非特异反应从而降低试剂的准确性。所以胶乳增强免疫比浊法必须改良其抗干扰能力。

[0005] 在公开专利CN 1021595959A中建议将动物来源的抗体成分添加到试剂1中,以此来减少干扰物质的影响。但是这个方法不仅使试剂的制造成本变高,同时由于添加了动物来源的抗体,可能诱发新的非特异反应。另一方面在专利CN107764992 (A)提出将IgG抗体酶切去除Fc片段的方法,用F(ab')<sup>2</sup>替代完整的IgG,既保留其识别结合抗体的活性,又消除Fc的干扰,减少试剂的非特异性反应。但在IgG的酶切、纯化制备工艺中会损失一部分抗体且对抗体活性也有一定程度影响,并且提高试剂成本,更重要的是试剂制备过程进一步复杂,对控制试剂批间差设置了不可逾越的障碍,从而限制了此类试剂在临幊上的推广。而在专利CN104931691 (A)中提及使用4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐为交联剂的方法,该方法的目的在于提供一种操作简便和成本低试剂,但该方法并没有讨论其对胶乳增强免疫比浊试剂的抗干扰性能的影响,而且没有研究该方法与既知的碳二亚胺(EDC)为交联剂的方法及N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)为交联剂的两步法方法的比较试验。

[0006] 因此,目前非常有必要开发一种能够应用于自动生化仪的特异性高,理化性质稳定,同时具有高灵敏度和宽线性范围的抗穆勒氏管激素(AMH)胶乳增强免疫比浊检测试剂。

## 发明内容

[0007] 本发明为解决上述问题,提供了一种能够有效抑制类风湿因子(RF)干扰,组成简单,针对胶乳增强免疫比浊试剂具有广泛的通用性,特异性高,准确性好的抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂。

[0008] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案如下:抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂,所述试剂通过化学交联法制备,其使用三嗪系缩合剂为交联剂使抗人抗穆勒氏管激素(AMH)抗体包被在具有羧基的微球。

[0009] 作为优选,所述三嗪类缩合剂为2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪和4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐中的一种。

[0010] 进一步地,所述具有羧基的微球直径为50~500nm。

[0011] 进一步地,所述三嗪系缩合剂与具有羧基的微球在其交联反应的重量比为1:0.1~1:1000。

[0012] 进一步地,所述抗人抗穆勒氏管激素(AMH)抗体为小鼠单克隆抗体或山羊,绵羊,兔子多克隆抗体。

[0013] 相比较现有的技术,本发明的优点:

[0014] 1、本发明的试剂克服现有抗穆勒氏管激素(AMH)检测方法单一的缺陷,使用免疫比浊方法测定抗穆勒氏管激素(AMH)含量,所述试剂通过化学交联法制备,其使用三嗪系缩合剂为交联剂使抗人抗穆勒氏管激素(AMH)抗体包被在具有羧基的微球,该交联方法能够有效控制抗体与微球连接时的方向,实现抗穆勒氏管激素(AMH)定量试剂能够有效回避类风湿因子(RF)等对干扰物的影响,并提高试剂灵敏度,理化性质稳定,可用于各种生化分析仪;

[0015] 2、本发明的试剂应用于自动生化仪,具有特异性高,理化性质稳定,同时具有高灵敏度和宽线性范围。

[0016] 本发明的三嗪系缩合剂可以单独使用,也可以是几种缩合剂同时复合使用。具体情况视试剂最终性能而定。复合使用时的缩合剂与乳胶颗粒量比配不变。本发明适合一般市场销售的带有羧基的全部乳胶颗粒,对其羟基量没有特别要求。本发明的抗体使用量可以根据试剂设计要求,使用抗体活性及纯度,包被方法等具体性能要求而设置。

[0017] 使用本发明的三嗪系缩合剂偶联抗体与羟基乳胶颗粒的包被方法可以是一步法,二步法的等通常包被方法。一步法即将本发明的三嗪系缩合剂与乳胶颗粒及抗体同时添加,同时反应。二步法即先加偶联剂活化乳胶颗粒羟基,清洗反应副产品后再添加抗体进行反应。也可以不清洗反应副产品,直接加入抗体进行反应。

[0018] 本发明的羟基乳胶颗粒由聚苯乙烯,苯烯酸,苯烯酸相关酯类的一种或几种通过乳化聚合反应而得到。这种羟基乳胶颗粒一般可以通过市场采购或直接合成而获得。

## 附图说明:

[0019] 图1为本发明试剂及对照试剂的标准曲线。

**具体实施方式：**

[0020] 实施例对本发明作进一步描述,但是本申请不限于这些实施例,这些实施例也不能解释为对本申请的限制。下述试剂的配制方法如无特别说明,均为常规方法,所使用的试剂材料如无特别说明,均可从商业公司获得。

[0021] 实施例1:抗穆勒氏管激素(AMH)检测试剂的制备

[0022] ①胶乳颗粒包被--方法一(一步法):

[0023] 1)用50mM HEPS缓冲液(pH 7.0)稀释1ml直径为441nm的胶乳溶液(日本JSR Life Sciences公司),使胶乳浓度为1%,放并置于37℃水浴锅中加温;

[0024] 2)用50mM HEPS缓冲液(pH 7.0)稀释2ml羊抗人抗穆勒氏管激素(AMH)多克隆抗体(日本医学生物研究所公司),至抗体终浓度为1mg/ml,并放置于37℃水浴锅中加温;

[0025] 3)将稀释好的胶乳和抗体溶液混匀,37℃震荡15分钟后加入50mM HEPS缓冲液(pH 7.0)配制的1mg/ml 4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMT-MM)(日本和光纯药工业株式会社)溶液2.5ml,37℃反应1小时后离心去上清;

[0026] 4)向离心沉淀中加入1%BSA 10ml,分散混匀后,室温搅拌1小时,进行封闭;

[0027] 5)离心去上清,用加入了0.1%防腐剂和0.1%BSA的50mM HEPS缓冲液(pH 7.0)稀释胶乳至1%,超声分散后得到胶乳悬浮液1。

[0028] ②胶乳颗粒包被--方法二(二步法):

[0029] 1)取1ml 1mM的2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(CDMT)(Sigma-Aldrich)与1ml 1mM的4-甲基吗啉(NMM)在溶剂四氢呋喃(THF)中室温反应30分钟,制成溶液A;

[0030] 2)用50mM PBS缓冲液(pH 7.0)稀释1ml直径为441nm的胶乳溶液,使胶乳浓度为1%,放并置于37℃水浴锅中加温;

[0031] 3)加入50ul溶液A,3950ul纯化水,37℃反应1小时后离心去上清;

[0032] 4)用50mM PBS缓冲液(pH 7.0)稀释2ml羊抗人抗穆勒氏管激素(AMH)多克隆抗体,至抗体终浓度为1mg/ml,并放置于37℃水浴锅中加温;

[0033] 5)将稀释好的胶乳和抗体溶液混匀,37℃反应1小时后离心去上清;

[0034] 6)向离心沉淀中加入1%BSA 10ml,分散混匀后,室温封闭1小时;

[0035] 7)离心去上清,用加入了0.1%防腐剂和0.1%BSA的50mM缓冲液(pH 7.0)稀释胶乳至1%,超声分散后待用。

[0036] 3、在50mM pH 7.0磷酸盐缓冲液中,添加0.1%BSA、0.1%Proclin 950,稀释包被后的胶乳颗粒含量至0.1%,制得胶乳悬浮液2。

[0037] ③校准品配制

[0038] 4、在50mM pH 7.0磷酸盐缓冲液中,添加5%NaCl、0.1%EDTA-2Na、0.1%BSA、0.1%Proclin 950,制得反应缓冲液。

[0039] 5、在50mM pH 7.0磷酸盐缓冲液中,添加0.1%、0.1%Proclin 950,制得校准品缓冲液,按照校准品所需浓度将抗穆勒氏管激素(AMH)抗原(日本医学生物研究所公司)加入上述缓冲液中,制得不同浓度的校准品。

[0040] ④检测试剂的检测方法

[0041] 以日立7180生化分析仪为例:测定波长700nm,首先加入180μL试剂1,重蒸水15μL,校准品15μL,混合均匀,37℃孵育5分钟;其后加入60μL试剂2,混合,37℃孵育1分钟,在测量

波长下读取吸光度值A1,再孵育5分钟后读取吸光度A2,  $\Delta A$ 样品或标准=A2-A1。将校准品浓度为横轴,相应的 $\Delta OD700$ 为纵轴,采用非线性拟合,结果见图1。取待测样品,同样方法测得吸光度差值,将其带入校准曲线,即可计算出待测样品的抗穆勒氏管激素(AMH)含量。

[0042] 实施例2交联剂比较实验

[0043] 以实施例1中①所述方法1、使用碳二亚胺(EDC)代替其中的4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMT-MM)为交联剂使抗穆勒氏管激素(AMH)抗体包被在具有羧基的微球的方法制得的试剂作为对照进行研究。

[0044] 实施例3:不同交联剂偶联的,不同直径乳胶试剂的抗风湿因子效果

[0045] 以实施例1中①描述的方法1分别使用碳二亚胺(EDC)与4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMT-MM)为交联剂使抗穆勒氏管激素(AMH)抗体包被在不同直径微球的表面。

[0046] 以实施例1中②描述的方法2使用2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(CDMT)为交联剂使抗穆勒氏管激素(AMH)抗体包被在不同直径微球的表面进行交联剂比较实验,按实施例1描述的方法分别测量用正常血清(外部购买)3倍稀释RF阳性样本制得的RF500(RF 500IU/ml)样本和稀释用的正常血清,比较RF500和正常血清的检测浓度,结果见表1。

[0047] 表1不同交联剂偶联的,不同直径乳胶试剂的抗风湿因子结果

[0048]

**抗穆勒氏管激素(AMH)测值**

[0049]

交联剂	EDC(比较例)			DMT-MM			CDMT		
	68	240	441	68	240	441	68	240	441
微球直径(nm)	68	240	441	68	240	441	68	240	441
RF500 血清(ng/ml)	5.62	7.16	4.89	3.15	2.54	3.14	2.50	2.69	2.81
正常人血清(ng/ml)	1.57	1.44	1.54	1.64	1.73	1.67	1.60	1.82	1.99
RF500 血清值/正常人血清	3.58	4.97	3.18	1.92	1.47	1.88	1.56	1.48	1.41

[0050] 由上述表格得知,在使用交联剂DMT-MM一步法制备的试剂RF500检测值与正常血清检测值得比值分别为1.92,1.47,1.88,交联剂CDMT二步法制备的试剂RF500检测值与正常血清检测值得比值分别为1.56,1.48,1.41;结果表明在选用交联剂三嗪类缩合剂DMT-MM与CDMT制备的试剂其RF 500和正常血清的测量值差异比交联剂EDC制备的试剂明显减少,并不受乳胶颗粒直径影响。直径68nm,240nm,441nm的微球均为日本JSR Life Science公司产品。

[0051] 实施例4不同抗体种类的抗风湿因子效果

[0052] 以实施例1中①描述的方法分别使用碳二亚胺(EDC)与4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMT-MM)为交联剂使不同抗穆勒氏管激素(AMH)抗体包被在具有羧基的微球表面,以实施例1中②描述的方法使用2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(CDMT)为交联剂使不同抗穆勒氏管激素(AMH)抗体包被在具有羧基的微球表面进行交联剂比较实

验,按实施例1描述的方法分别测量用正常血清(外部购买)3倍稀释RF阳性样本制得的RF500(RF 500IU/ml)样本和稀释用的正常血清,比较RF500和正常血清的检测浓度,结果见表2。

[0053] 表2不同抗体的比较实验

[0054]

抗穆勒氏管激素(AMH)测值												
交联剂	EDC				DMT-MM				CDMT			
抗体名称	单抗1	单抗2	单抗1+单抗2	多抗	单抗1	单抗2	单抗1+单抗2	多抗	单抗1	单抗2	单抗1+单抗2	多抗
RF500 血清(ng/ml)	1.75	3.55	3.53	6.71	1.87	2.93	2.63	2.61	1.30	2.47	2.61	2.46
正常血清(ng/ml)	1.14	2.63	2.45	1.62	1.93	2.82	2.58	1.84	1.37	2.42	2.66	1.77

[0055]

RF500/ 血清	1.54	1.35	1.44	4.14	0.97	1.04	1.02	1.42	0.95	1.02	0.98	1.39
-----------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

[0056] 上述单抗1,单抗2均为市场日本医学生物研究所产品,分别有不同的表位。多抗为免疫兔子经过纯化而得到的本公司试用产品。

[0057] 由上述结果得知,在分别使用抗体为单抗1,单抗2,多抗时,交联剂EDC一步法制备的试剂RF500检测值与正常血清检测值得比值分别为1.54,1.35,4.14,而交联剂DMT-MM一步法制备的试剂RF500检测值与正常血清检测值得比值分别为0.97,1.04,1.42,交联剂CDMT二步法制备的试剂RF500检测值与正常血清检测值得比值分别为0.95,1.02,1.39;结果表明在选用不同抗体时,交联剂三嗪类缩合剂DMT-MM与CDMT制备的试剂RF 500和正常血清的测量值差异比交联剂EDC制备的试剂小(使用交联剂三嗪类缩合剂DMT-MM与CDMT制备的试剂相比较使用交联剂EDC制备的试剂RF的假阳性影响更少)。

[0058] 实施例5不同用量(交联剂与微球的重量比)的交联剂比较实验

[0059] 以实施例1中①描述的方法分别使用不同用量(交联剂与微球的质量比)的碳二亚胺(EDC)与不同用量(交联剂与微球的质量比)的4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMT-MM)为交联剂使抗穆勒氏管激素(AMH)抗体包被在具有羧基的微球表面,以实施例1中2描述的方法使用不同用量(交联剂与微球的质量比)的2-氯-4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪(CDMT)为交联剂使抗穆勒氏管激素(AMH)抗体包被在具有羧基的微球表面进行交联剂比较实验,按实施例1描述的方法分别测量用正常血清(外部购买)3倍稀释RF阳性样本制得的RF500(RF500IU/ml)样本和稀释用的正常血清,比较RF500和正常血清的检测浓度,结果见表3。

[0060] 表3不同用量(交联剂与微球的质量比)的交联剂比较实验

[0061]

抗穆勒氏管激素 (AMH) 测值									
交联剂	EDC			DMT-MM			CDMT		
质量比	1:500	1:10	1:0.2	1:500	1:10	1:0.2	1:500	1:10	1:0.2
血清 (ng/ml)	1.38	1.56	1.41	1.68	1.84	1.62	1.44	1.54	1.60
RF500 (ng/ml)	2.48	2.58	2.04	1.56	1.97	1.59	1.92	1.23	1.80
RF500/血清	1.80	1.65	1.45	0.93	1.07	0.98	1.33	0.80	1.13

[0062] 由上述表格得知,在交联剂与微球的质量比为1:500,1:10,1:0.2时,使用交联剂EDC一步法制备的试剂RF500检测值与正常血清检测值得比值分别为1.80,1.65,1.45,而使用交联剂DMT-MM一步法制备的试剂RF500检测值与正常血清检测值得比值分别为0.93,1.07,0.98,使用交联剂CDMT二步法制备的试剂RF500检测值与正常血清检测值得比值分别为1.33,0.80,1.13;结果表明在交联剂与微球的质量比为1:500,1:10,1:0.2时,使用交联剂三嗪类缩合剂DMT-MM与CDMT制备的试剂RF 500和正常血清的测量值差异比使用交联剂EDC制备的试剂小(使用交联剂三嗪类缩合剂DMT-MM与CDMT制备的试剂相比较使用交联剂EDC制备的试剂RF的假阳性影响更少)。

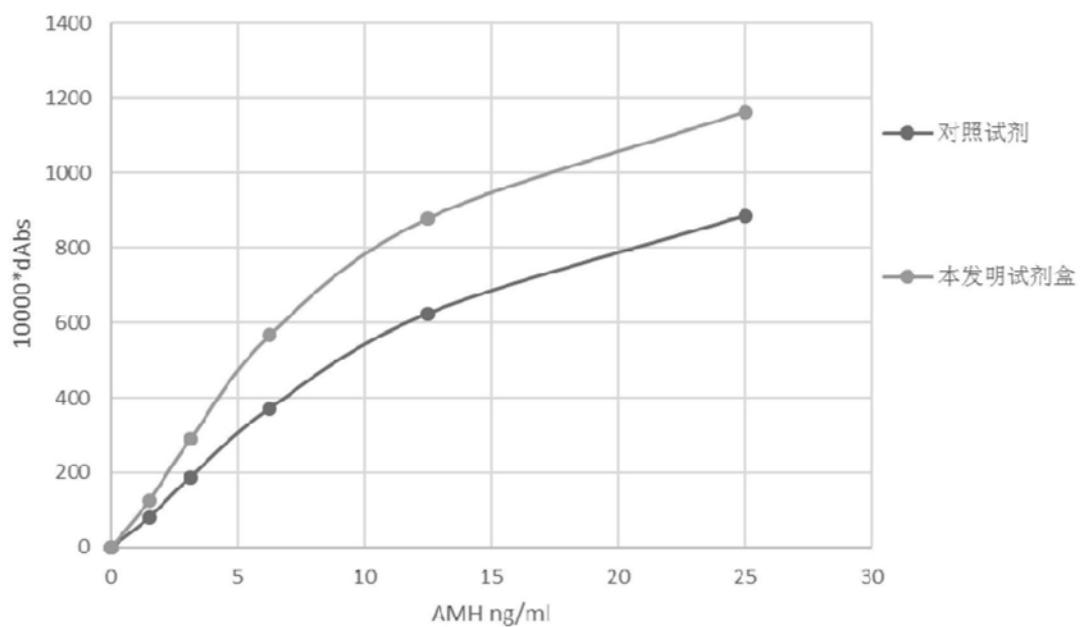


图1

专利名称(译)	一种抗穆勒氏管激素免疫比浊定量检测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN109738644A</a>	公开(公告)日	2019-05-10
申请号	CN201811586090.1	申请日	2018-12-24
[标]发明人	高宇 饶琪 范可君		
发明人	糸岡朝树 根本浩史 高宇 饶琪 范可君		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/543 G01N21/27		
代理人(译)	王健		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

## 摘要(译)

本发明为一种抗穆勒氏管激素定量检测试剂，所述试剂通过化学交联法制备，其使用三嗪系缩合剂为交联剂使抗人抗穆勒氏管激素抗体包被在具有羧基的微球。该交联方法能够有效控制抗体与微球连接时的方向，实现抗穆勒氏管激素(AMH)定量试剂灵敏度高、类风湿因子(RF)等对抗物的影响减轻，理化性质稳定，可用于各种生化分析仪。

