



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109799349 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201910189098.2

(22)申请日 2019.03.13

(71)申请人 石家庄洄众生物科技有限公司

地址 050000 河北省石家庄市高新区珠江
大道313号方亿科技园A区3号楼四层

(72)发明人 李晓春 张少丹

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

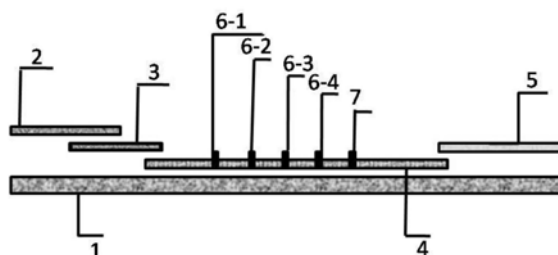
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的
荧光免疫试纸条

(57)摘要

本发明提供了一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条,属于医学检测技术领域,所述试纸条包括顺次衔接于PVC底板的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;所述结合垫上喷涂有荧光微球标记的单克隆抗体混合液;所述单克隆抗体混合液包括第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜上依次平行设置4条检测线和一条质控线;所述4条检测线上分别包被第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体。所述荧光免疫试纸条操作简单、误差低;检测结果可靠,精确度高。



1. 一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条, 所述试纸条包括顺次衔接于PVC底板的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;

所述结合垫上喷涂有荧光微球标记的单克隆抗体混合液;

所述荧光微球标记的单克隆抗体混合液中包括荧光微球标记的第一卵泡刺激素单克隆抗体、荧光微球标记的第一黄体生成素单克隆抗体、荧光微球标记的第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和荧光微球标记的第一血清抑制素B单克隆抗体;

所述硝酸纤维素膜上依次平行设置4条检测线和一条质控线; 所述4条检测线上分别包被第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体;

所述检测线上包被的第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体分别与对应所述第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体识别不同的抗原表位。

2. 根据权利要求1所述的荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体与荧光微球的质量比独立为 $(0.2 \sim 0.5):1$ 。

3. 根据权利要求2所述的荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述荧光微球标记的单克隆抗体混合液在结合垫上的喷涂浓度为 $2 \sim 6 \mu\text{L}/\text{cm}$ 。

4. 根据权利要求1或2所述的荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述样品垫为全血样品垫。

5. 根据权利要求1或2所述的荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述检测线和质控线的宽度独立为 $1 \sim 2 \text{mm}$ 。

6. 根据权利要求5所述的荧光免疫试纸条, 其特征在于, 相邻检测线之间的间距独立为 $5 \sim 8 \text{mm}$; 靠近质控线的检测线与质控线之间的间距为 $5 \sim 8 \text{mm}$ 。

7. 根据权利要求1所述的荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述质控线上喷涂羊抗鼠IgG多克隆抗体。

8. 根据权利要求1所述的荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述试纸条还包括外壳; 所述外壳包括底部卡槽和卡壳。

9. 根据权利要求8所述的荧光免疫试纸条, 其特征在于, 所述外壳设置加样孔和结果检测窗口。

一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,尤其涉及一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条。

背景技术

[0002] 卵巢储备功能是指卵巢皮质区卵泡生长、发育、并形成可受精的卵母细胞的能力,即卵巢内存留卵子的数量和质量。随着年龄的增长或者其他因素,引起卵子数量的减少和质量的下降,即卵巢储备功能的衰退。影响卵巢储备功能的因素众多,有年龄、遗传因素、自身免疫因素、卵巢及周围组织手术、社会心理因素等。卵巢储备功能的衰退是一个渐进性的过程,早期发现及诊断、及时进行治疗干预,能够有效改善女性的卵巢功能,提高受孕能力及妊娠结局。目前临床采用的女性卵巢储备功能的参考指标或方法有:年龄、激素水平、超声检查、刺激试验、细胞因子检测等。尽管如此,尚未存在一项指标可以满足检测要求,建立一种操作简单、对人体伤害少、经济适用且有良好预测价值的检测方法,来综合检测多项卵巢储备功能生物学指标至关重要。

[0003] 卵泡刺激素(FSH)是由腺垂体促卵泡激素细胞分泌的,与黄体生成素(LH)统称为促性腺激素。基础FSH是指月经第2~5d(即卵泡早期)的血清FSH水平,它能反映卵巢的储备功能。一般认为,血清基础FSH<10U/L表明卵巢储备功能正常,若FSH>10-15U/L则预示着卵巢储备功能下降。垂体分泌的FSH和LH在生理状态下随着卵巢储备功能的降低均升高,在卵巢储备功能下降的初期,FSH比LH上升更显著,所以他们的比值首先出现改变,表现为比值的升高。多数学者认为基础FSH/LH>2时,患者往往对超促排卵反应不良,FSH/LH>3.6被视作评估卵巢功能下降的标志点。

[0004] 抗缪勒氏管激素(AMH)又称为苗勒管抑制物质,属于转化生长因子- β (TGF- β)家族。AMH主要由卵巢早期生长卵泡的颗粒细胞分泌,其浓度受始基卵泡的募集速度及卵泡储备的影响;故AMH能反映原始卵泡及窦前卵泡的数量,而不受下丘脑分泌的促性腺激素的影响。研究表明AMH不随女性月经周期而变化,其对卵巢储备功能的评估价值优于基础内分泌激素。有研究发现,基础AMH水平在女性35岁前变化不大,>30岁时开始下降,35岁后呈直线下降;当血清AMH水平 $\leq 1.3\text{ng/ml}$ 时,其获卵数明显减少。低AMH值与卵巢低反应、胚胎质量低及妊娠结局差等结果相关。与周期第三天的FSH、LH、抑制素B相比,AMH值与早期窦卵泡数相关性更密切,目前认为AMH是预测卵巢储备和生殖潜能较为可靠的指标。

[0005] 血清抑制素B(INHB)是一种糖蛋白激素,同样属于转化生长因子- β 家族;它能反映生长卵泡的数量及质量,可作为评估卵泡发育情况及卵子数量的标志物。INHB由中小窦状卵泡的颗粒细胞分泌,在卵泡早期开始上升,卵泡中期达到最大值,排卵后在FSH、LH峰出现后1~2d开始下降,整个黄体期均处于低水平。INHB会随年龄增长呈降低的趋势,INHB的水平要先于FSH发生变化,又能够避免因为FSH脉冲式分泌带来的误差,优于其他预测指标,INHB用于卵巢储备功能下降和卵巢早衰的诊断现在已被普遍认可。

[0006] 目前,检测上述生物学指标的方法主要有放射免疫法(RIA)、高灵敏度的免疫放射

法 (IRMA)、酶免疫法 (EIA)、微粒子酶免疫法 (MEIA)、胶体金法等。RIA法有放射性污染,而 IRMA法费时费力,自动化程度不高。而上述方法均无法简单快速的检测与卵巢储备功能相关的多个指标。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条。

[0008] 为了实现上述发明目的,本发明提供了以下技术方案:

[0009] 一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条,所述试纸条包括顺次衔接于PVC底板的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;

[0010] 所述结合垫上喷涂有荧光微球标记的单克隆抗体混合液;

[0011] 所述荧光微球标记的单克隆抗体混合液中包括荧光微球标记的第一卵泡刺激素单克隆抗体、荧光微球标记的第一黄体生成素单克隆抗体、荧光微球标记的第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和荧光微球标记的第一血清抑制素B单克隆抗体;

[0012] 所述硝酸纤维素膜上依次平行设置4条检测线和一条质控线;所述4条检测线上分别包被第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体;

[0013] 所述检测线上包被的第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体分别与对应所述第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体识别不同的抗原表位。

[0014] 优选的,所述第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体与荧光微球的质量比独立为(0.2~0.5):1。

[0015] 优选的,所述荧光微球标记的单克隆抗体混合液在结合垫上的喷涂浓度为2~6 μ L/cm。

[0016] 优选的,所述样品垫为全血样品垫。

[0017] 优选的,所述检测线和质控线的宽度独立为1~2mm。

[0018] 优选的,相邻检测线之间的间距独立为5~8mm;靠近质控线的检测线与质控线之间的间距为5~8mm。

[0019] 优选的,所述质控线上喷涂羊抗鼠IgG多克隆抗体。

[0020] 优选的,所述试纸条还包括外壳;所述外壳包括底部卡槽和卡壳。

[0021] 优选的,所述外壳设置加样孔和结果检测窗口。

[0022] 本发明的有益效果:本发明提供的联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条,所述结合垫上喷涂有荧光微球标记的单克隆抗体混合液;所述单克隆抗体混合液中包括第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体;所述硝酸纤维素膜上依次平行设置4条检测线,可以同时检测样本中FSH、LH、AMH、INHB的浓度,通过免疫荧光分析仪即可读取结果,具有方便快捷、操作简单、结果准确等优点,适用于临床诊断和POCT检测。本发明提供的荧光

免疫试纸条将FSH、LH、AMH、INHB检测集合于同一检测试纸中,不仅降低了多次检测各项指标造成的误差,简化了多项指标检测的复杂操作步骤,也减少了检测费用。并且根据实施例记载本发明所述的免疫试纸条的检测结果显示与临床化学发光法检测结果的相关性非常高,在0.9698~0.9957之间;因此检测结果可靠,精确度高。综上,本发明提供的荧光免疫试纸条在卵巢储备功能衰退的早期诊断和治疗干预,提高女性受孕能力及妊娠结局的应用上有显著临床意义。

附图说明

[0023] 图1为联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸内部侧面示意图;

[0024] 图2为联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸俯视示意图。

具体实施方式

[0025] 本发明提供了一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条,所述试纸条包括顺次衔接于PVC底板的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸;

[0026] 所述结合垫上喷涂有荧光微球标记的单克隆抗体混合液;

[0027] 所述单克隆抗体混合液中包括第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体;

[0028] 所述硝酸纤维素膜上依次平行设置4条检测线和一条质控线;所述4条检测线上分别包被第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体;

[0029] 所述检测线上包被的第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体分别与对应所述第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体识别不同的抗原表位。

[0030] 在本发明中,所述荧光免疫试纸条包括PVC底板,本发明对所述的PVC底板的来源和规格没有特殊要求,采用本领域常规的试纸条用PVC底板即可。

[0031] 在本发明中,所述PVC底板上顺次搭接样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸。

[0032] 在本发明中,所述样品垫优选为全血过滤样品垫。所述样品垫的材质优选为玻璃纤维素膜;所述样品垫的制备方法优选的包括以下步骤:将所述玻璃纤维素膜置于封闭液中浸泡后,干燥;所述浸泡的时间优选为3~7min,更优选为5min;所述封闭液优选的包括以下浓度的组分:0.05wt% Tris、1wt% tritonX-100、0.5wt% PEG6000、0.4wt% 牛血清蛋白和0.02wt% 鼠抗人红细胞。

[0033] 本发明中,所述结合垫搭接于样品垫后,所述结合垫上喷涂有荧光微球标记的单克隆抗体混合液;所述单克隆抗体混合液中包括第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体;本发明中,所述第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体与荧光微球的质量比独立优选为(0.2~0.5):1,更优选为(0.3~0.4):1。本发明中,所述荧光微球标记的第一卵泡刺激素单克隆抗体、荧光微球标记的第一黄体生成素单克隆抗体、荧光微球标记的第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体

和荧光微球标记的第一血清抑制素B单克隆抗体,四种荧光微球标记的单克隆抗体在单克隆抗体混合液中的体积比例优选为1:1:1:1。本发明中,所述荧光微球标记的单克隆抗体混合液在结合垫上的喷涂浓度优选为2~6 μ L/cm,更优选为4 μ L/cm。

[0034] 本发明中,所述第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体的来源可采用市售商品,也可自行制备;在本发明具体实施过程中,上述4种单克隆抗体优选的自行制备获得;具体的本发明分别以英国国家生物制品检定所购买的人FSH蛋白、人LH蛋白、人AMH蛋白和人INHB蛋白作为免疫抗原,免疫小鼠后,采用杂交瘤技术制备和筛选生产特定单克隆抗体的特异性细胞株,将所述特异性细胞株分别注入小鼠腹腔生产上述4种单克隆抗体。本发明在所述筛选过程中,优选的采用以下相应的抗原:卵泡刺激素、黄体生成素、抗缪勒氏管激素、血清抑制素B、促甲状腺素、人绒毛膜促性腺激素、雌二醇、人胎盘泌乳素、催乳素作为非特异性抗原进行筛选获得特异性细胞株。本发明收集注入特异型细胞株后的小鼠腹水,再将小鼠腹水经辛酸-硫酸铵沉淀法纯化获得特定的单克隆抗体。本发明中,上述4种单克隆抗体的效价优选的在 4×10^5 以上,亚型优选为IgG1、IgG2a、IgG2b;经蛋白纯化,得到纯化后蛋白含量优选为17.6~45.9mg/mL。

[0035] 本发明中,所述硝酸纤维素膜搭接于结合垫后;所述硝酸纤维素膜上依次平行设置4条检测线和一条质控线;所述4条检测线上分别包被第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体。本发明对所述第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体的包被顺序没有特殊限定,在本发明具体实施过程中,包被顺序优选的为第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体、第二血清抑制素B单克隆抗体。

[0036] 本发明中,所述第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体的制备方法参见上述第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体的制备方法。本发明中,所述检测线上包被的第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体分别与对应所述第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体识别不同的抗原表位。本发明中,所述对应的单克隆抗体识别不同的抗原表位优选的根据相加指数确定;所述对应的单克隆抗体的相加指数优选的 $\geq 95\%$ 。所述相加指数 $AI = [(2A1+2)/(A1+A2)-1] \times 100\%$, $AI > 50\%$ 表示针对不同抗原决定簇, $AI < 50\%$ 表示为同一抗原决定簇。

[0037] 本发明中,所述检测线的喷涂优选的采用划膜喷金仪进行;所述检测线的宽度独立优选为1~2mm;所述相邻检测线之间的间距独立优选为5~8mm。靠近质控线的检测线与质控线之间的间距为5~8mm。本发明中,所述质控线上优选的喷涂羊抗鼠IgG多克隆抗体。在本发明中,所述FSH、LH、AMH、INHB单克隆抗体的包被浓度分别优选为(0.4~0.6)mg/mL、(0.4~0.6)mg/mL、(0.8~1.2)mg/mL、(0.8~1.2)mg/mL,更优选为0.5mg/mL、0.5mg/mL、1.0mg/mL、1.0mg/mL。本发明中,所述质控线上羊抗鼠IgG多克隆抗体的包被浓度优选为(0.8~1.2)mg/mL,更优选为1.0mg/mL。本发明中,所述喷金仪的划膜量优选为(0.8~1.2) μ

L/cm,更优选为1 μ L/cm。

[0038] 本发明中,所述硝酸纤维素膜后搭接吸水纸,本发明对所述吸水纸的来源和规格没有特殊要求,采用本领域常规的吸水纸即可。

[0039] 本发明中,所述荧光免疫试纸条的宽度优选为4~6mm,更优选为5mm。所述免疫试纸条优选的还包括外壳;所述外壳优选的包括底部卡槽和卡壳;所述外壳优选的设置加样孔和结果检测窗口。本发明对所述外壳的材质没有特殊要求,采用本领域常规的材质即可。

[0040] 本发明中优选的在所述PVC底板上,垂直PVC底板的方向,由下至上依次粘附硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫;然后在结合垫上层铺设有样品垫;本发明将上述材料组装后,进行切割,获得本发明所述的荧光免疫试纸条。

[0041] 本发明所述的荧光免疫试纸条具体的结构如图1所示,俯视图如图2所示;其中1为PVC底板,2为样品垫,3为结合垫,4为NC膜,5为吸水纸,6-1为FSH检测线,6-2为LH检测线,6-3为AMH检测线,6-4为INHB检测线,7为质控线;8为卡壳,9为加样孔,10为结果检测窗口。

[0042] 本发明所述的荧光免疫试纸条的检测原理和方法如下:

[0043] 本发明所述的联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条的检测原理是双抗体夹心法,所述荧光免疫试纸条中含有多条检测线,在具体的检测过程中,首先是样本中的FSH抗原在硝酸纤维素膜层析作用下与结合垫中标记有荧光微球的FSH抗体结合形成复合物,该复合物在层析作用下移动至硝酸纤维素膜的第一条检测线(6-1),该检测线上包被有识别FSH抗原的另一表位的抗体,形成荧光微球-FSH抗体-抗原-另一FSH抗体结构的双抗体夹心复合物,该复合物聚集在检测线(6-1)处;此时样本中未与6-1检测线处FSH抗体结合的样本继续进行层析作用,移动至第二检测线时,样本中的LH抗原(已与相应的荧光微球标记的LH单抗结合)同样以双抗体夹心的方式与第二条检测线处包被的另一LH单克隆抗体进行特异性结合,聚集在检测线(6-2)处。样本继续向前进行层析作用,依次移动至第三条检测线(6-3)、第四条检测线(6-4),样本中的AMH和INHB抗原(同样已分别与相应的荧光微球标记的AMH、INHB单抗结合)同样以双抗体夹心的方式与检测线处包被的单克隆抗体特异性结合,形成的复合物聚集在第三条和第四条检测处。最终,未与检测线处包被的FSH、LH、AMH、INHB单克隆抗体结合的荧光微球标记的抗体继续向前层析,移动至质控线处,将与质控线处包被的羊抗鼠IgG多克隆抗体进行特异性结合,聚集在质控线处。各复合物聚集在检测线处,受到光源激发释放出相应波长的发射光,样本中抗原浓度越高,检测线发射光的强度越高。利用荧光检测系统将光信号转化为数字信号,检测检测线和质控线区域的富集荧光强度,以浓度为横坐标,检测线信号值比质控线信号值(T/C)为纵坐标绘制标准曲线,从而可准确定量的计算出样本中FSH、LH、AMH、INHB各种抗原的浓度。

[0044] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0045] 实施例1

[0046] 联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸的结构

[0047] 一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条所述试纸条包括顺次衔接于PVC底板的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸。结构如图1所示;其中试纸条的PVC底板上由下而上依次粘有硝酸纤维素膜(4)、吸水纸(5)、结合垫(3)、在结合垫上层铺设有样品垫(2);其中硝酸纤维素膜(4)上依次平行划有1mm宽的FSH检测线(6-1)、LH检测线

(6-2)、AMH检测线(6-3)、INHB检测线(6-4)和质控线(7),各检测线和质控线的间距为8mm;组装后,按照宽度为6mm进行切割,获得联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条;将所述试纸条安装于外壳内,卡壳上设有加样孔和结果检测窗口(60mm×4mm)。

[0048] 联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸的制备方法

[0049] (1) 单克隆抗体的制备和纯化:分别以英国国家生物制品检定所购买的人FSH蛋白、人LH蛋白、人AMH蛋白和人INHB蛋白作为免疫抗原,免疫6周龄健康BALB/c雌性小鼠,采用杂交瘤技术制备、筛选单克隆抗体细胞株,在筛选过程中分别选取以下相应的抗原:卵泡刺激素、黄体生成素、抗缪勒氏管激素、血清抑制素B、促甲状腺素、人绒毛膜促性腺激素、雌二醇、人胎盘泌乳素、催乳素作为非特异性抗原进行筛选;筛选得到的特异性抗体细胞株注射到小鼠体内制备腹水,再将腹水经辛酸-硫酸铵沉淀法纯化获得单克隆抗体。

[0050] (2) 4种配对单克隆抗体的筛选:获得的单克隆细胞株,经ELISA检测要求效价均在 4×10^5 以上,选择亚型为IgG1、IgG2a、IgG2b的单克隆抗体;经蛋白纯化,得到纯化后蛋白含量为17.6~45.9mg/ml;经ELISA相加试验检测筛选出各配对抗体,根据以下公式计算相加指数(AI): $AI = [(2A_1 + 2) / (A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$, $AI > 50\%$ 表示针对不同抗原决定簇, $AI < 50\%$ 表示为同一抗原决定簇,本发明中要求各配对抗体相加指数AI均在95%以上,保证相互配对的两种单克隆抗体识别不同的抗原表位。本实施例中选取的配对抗体为:1A2B5-FSH与6H9C6-FSH抗体;4G8D11-LH与7F10A2-LH;3B10E2-AMH与7G5A7-AMH;1F10B7-INHB与5C12E1-INHB。

[0051] (3) 单克隆抗体标记荧光微球

[0052] 将ThermoScientific生产的聚苯乙烯乳胶微球用MES(0.01mol/L)稀释,加入EDC(5mg/mL)和NHS(5mg/mL)进行活化,离心后弃上清,再用0.01mol/L的MES超声重悬,以单克隆抗体与微球质量比例为(0.2~0.5):1,加入单克隆抗体,搅拌反应2h。离心后,弃上清,洗涤2次。再将荧光微球用超声处理,重悬于质量分数为20%蔗糖、2%牛血清蛋白和0.02%的叠氮钠的PH7.4的0.01M PBS,4℃保存待用。

[0053] (4) 结合垫的制备

[0054] 所述结合垫为玻璃纤维素膜材质。先按照250μg单抗/1mg微球的比例,分别配制FSH、LH、AMH、INHB荧光微球标记的单克隆抗体,再将4种标记有荧光微球的单克隆抗体按照体积比为1:1:1:1的比例混合均匀,待用。开启划膜喷金仪,选择“喷金”程序,设置喷涂量为4μL/cm,均匀、连续地喷涂于玻璃纤维滤膜上,置于37℃温箱充分干燥后,制得结合垫。

[0055] (5) 样品垫的制备

[0056] 所述样品垫为全血过滤样品垫,其材质为玻璃纤维素膜,其处理方式于封闭液中浸泡5分钟,置于37℃温箱充分干燥后制得。封闭液含有0.05%Tris、1%tritonX-100、0.5%PEG6000、0.4%牛血清蛋白和0.02%鼠抗人红细胞。

[0057] (6) NC膜上检测线和质控线的包被

[0058] 将FSH、LH、AMH、INHB单克隆抗体依次平行包被于NC膜上,形成4条检测线:FSH检测线(6-1)、LH检测线(6-2)、AMH检测线(6-3)、INHB检测线(6-4),另将羊抗鼠IgG多克隆抗体包被于NC膜上,形成质控线(7);其中线宽均为1mm,各相邻检测线以及靠近质控线的检测线与质控线间隔均为8mm。其中FSH、LH、AMH、INHB单克隆抗体的包被浓度分别为:0.5mg/mL、0.5mg/mL、1.0mg/mL、1.0mg/mL;羊抗鼠IgG多克隆抗体的包被浓度为1.0mg/mL。利用划膜喷

金仪,设置划膜量为1 μ L/cm,要求划膜线条为均匀、连续、无断点的直线为合格,自然干燥后制得。

[0059] (7) 检测试纸制备

[0060] PVC底板上由下而上依次粘附和搭接硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫、在结合垫上层铺设样品垫得到试纸条后,按照宽度为6mm进行切割,将其安装至相应的卡壳中制得检测试纸。将检测试纸和干燥剂封入铝箔袋中,干燥保存。

[0061] 实施例2

[0062] (1) 拟合标准曲线的绘制

[0063] 标准品抗原线性稀释:采用阴性牛血清将FSH和LH标准品抗原进行线性稀释:150mIU/mL、100mIU/mL、75mIU/mL、50mIU/mL、25mIU/mL、10mIU/mL、5mIU/mL、0mIU/mL;采用阴性牛血清将AMH标准品抗原进行线性稀释:10ng/mL、5ng/mL、2.5ng/mL、1ng/mL、0.5ng/mL、0.25ng/mL、0.1ng/mL、0ng/mL;采用阴性牛血清将INHB标准品抗原进行线性稀释:2000pg/mL、1000pg/mL、500pg/mL、250pg/mL、100pg/mL、50pg/mL、25pg/mL、0pg/mL。添加标准品样品至试纸加样孔中,采用同一批次试纸和试剂,每个浓度重复测定3次以上,利用荧光免疫分析仪,获取检测线和质控线的荧光强度数据,分析数据,以标准品的浓度为横坐标,以检测线和质控线的荧光强度比值(T/C)为纵坐标,拟合成标准曲线,写入分析仪的软件程序中,用于定量检测样品浓度。

[0064] (2) 样品的检测

[0065] 准备样品:血清、血浆、全血样本或标准品溶液,若低温保存需提前恢复至室温;

[0066] 准备检测试纸:打开铝箔袋取出检测试纸,若低温保存需提前恢复至室温;

[0067] 检测:将样品添加至检测试纸的加样孔中,点击“开始”进行检测。

[0068] 判读结果:15min后,荧光免疫分析仪自动显示各项检测指标浓度的数值和单位。按照上述样品稀释方法配制各种样品进行检测,结果显示:FSH的检测灵敏度为5mIU/mL,最大检测范围达150mIU/mL;LH的检测灵敏度为5mIU/mL,最大检测范围达150mIU/mL;AMH的检测灵敏度为0.1ng/mL,最大检测范围达10ng/mL;INHB的检测灵敏度为10pg/mL,最大检测范围达2000pg/mL。四种检测指标的线性相关系数 R^2 均大于0.99。

[0069] (3) 与临床化学发光法检测的相关性的验证

[0070] 选取河北省4家省级医院的生殖医学或妇产科室随机抽取60份血样,采用本发明的联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条和医院临床采用的化学发光法进行对比检测。以医院临床化学发光法检测结果为横坐标,本发明的免疫荧光试纸条检测结果为纵坐标,绘制相关性曲线。结果证明:本试纸在FSH检测范围内,两种检测方法的相关性 $R^2=0.9957$ ($y=1.0027x+1.2308$);本试纸在LH检测范围内,两种检测方法的相关性 $R^2=0.9767$ ($y=0.9681x+1.556$);本试纸在AMH检测范围内,两种检测方法的相关性 $R^2=0.9725$ ($y=0.9443x+0.1447$);本试纸在INHB检测范围内,两种检测方法的相关性 $R^2=0.9698$ ($y=1.0245x-3.8156$)。

[0071] 由上述实施例可知,本发明提供的免疫荧光试纸条将FSH、LH、AMH、INHB检测集合于同一检测试纸条中,操作简单、误差低;与临床化学发光法检测结果的相关性非常高,检测结果可靠,精确度高。

[0072] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人

员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

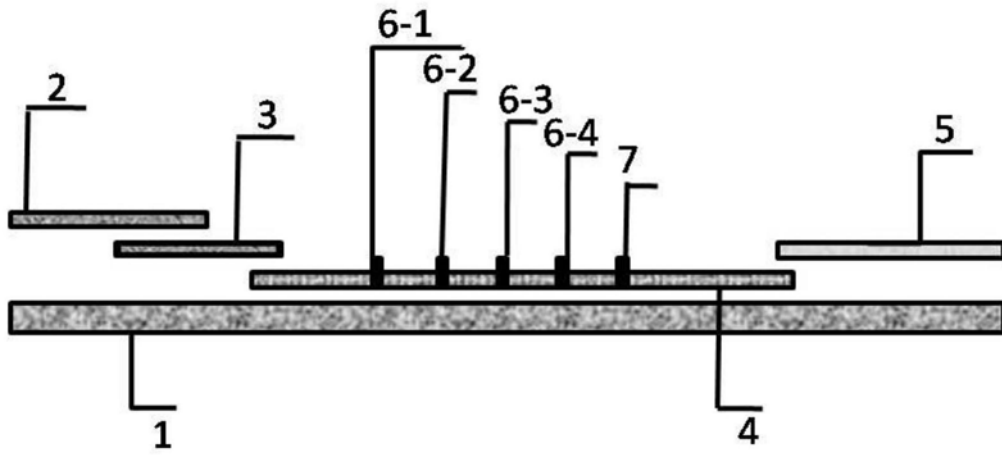


图1

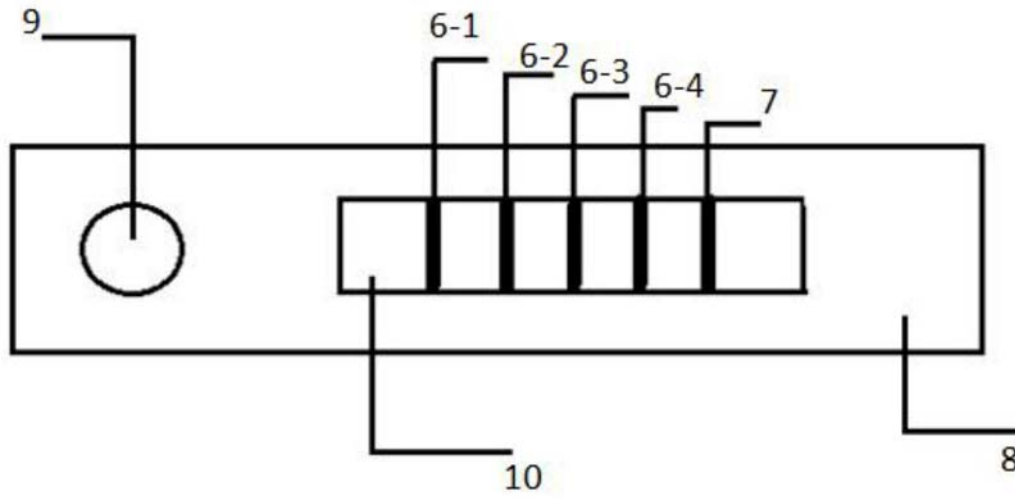


图2

专利名称(译)	一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条		
公开(公告)号	CN109799349A	公开(公告)日	2019-05-24
申请号	CN201910189098.2	申请日	2019-03-13
[标]发明人	李晓春 张少丹		
发明人	李晓春 张少丹		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种联合定量检测卵巢储备功能多项指标的荧光免疫试纸条，属于医学检测技术领域，所述试纸条包括顺次衔接于PVC底板的样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸；所述结合垫上喷涂有荧光微球标记的单克隆抗体混合液；所述单克隆抗体混合液中包括第一卵泡刺激素单克隆抗体、第一黄体生成素单克隆抗体、第一抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第一血清抑制素B单克隆抗体；所述硝酸纤维素膜上依次平行设置4条检测线和一条质控线；所述4条检测线上分别包被第二卵泡刺激素单克隆抗体、第二黄体生成素单克隆抗体、第二抗缪勒氏管激素单克隆抗体和第二血清抑制素B单克隆抗体。所述荧光免疫试纸条操作简单、误差低；检测结果可靠，精确度高。

