



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109490531 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811391612.2

(22)申请日 2018.11.21

(71)申请人 长沙金域医学检验所有限公司

地址 410000 湖南省长沙市高新开发区麓
天路28号金瑞麓谷科技园D1-D2栋1-8
层101-801号

(72)发明人 欧阳伟 邓文博 李姣

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种抗缪勒氏管激素的定量检测方法

(57)摘要

本发明公开一种抗缪勒氏管激素的定量检测方法,涉及生物检测的技术领域。本发明提供的抗缪勒氏管激素定量检测方法,是通过三步双抗体夹心法酶联免疫进行定量检测,采用生物素-抗体与故乡抗体-抗原复合物结合之后,再与链酶亲和素-辣根过氧化物酶结合物结合,这样抗体-抗原-抗体生物素复合物-SHRP结合在微孔上,通过酶-底物显色反应,酶和底物反应程度由主波长为450nm,参考波长620/630nm的双波长来测定吸光度值,然后根据标准曲线方程计算待测样本的AMH的浓度。本发明提供的检测方法步骤简明,操作简单,使用方便,能准确检测AMH浓度,对检测结果进行定量分析。

1. 一种抗缪勒氏管激素的定量检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 试剂配制:

A、AMH校准品B-F和AMH质控品I& II 分别用纯化水溶解,并轻轻振荡充分溶解、混匀后待用;

B、洗涤液:用纯化水25倍稀释浓缩洗液;

(2) 样本处理:

A、标记选择使用的微孔条,并依次加入校准品、质控品和待检样本到相应的微孔中;

B、每微孔依次加入AMH反应缓冲液、抗AMH-生物素结合物及AMH链霉亲和素-霉结合物分别进行孵育和洗板;

(3) 显色反应:每微孔加入显色液,室温条件下振荡孵育8-12min;

(4) 终止反应:每微孔加入终止液,轻敲板壁混合后,用酶标仪读数;

(5) 结果判断:检测样本的数据使用对数-对数运算,利用立方回归分析模型进行标准曲线及方程确定,并通过曲线方程进行结果计算。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,在步骤(2) B中微孔内加入AMH反应缓冲液后的孵育过程为:每微孔加入AMH反应缓冲液,转至微孔板摇床上,室温条件下震荡孵育90min,在孵育过程的最后20-30min,准备洗涤液,待孵育完成后洗板。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,在步骤(2) B中微孔内加入抗AMH-生物素结合物后的孵育过程为:每微孔加入抗AMH-生物素结合物,转至微孔板轨道摇床上,室温条件下振荡孵育30min,洗板。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,在步骤(2) B中微孔内加入AMH链霉亲和素-霉结合物后的孵育过程为:每微孔加入AMH链霉亲和素-霉结合物,转至微孔板轨道摇床上,室温条件下振荡孵育30min,洗板。

5. 根据权利要求1-4所述的检测方法,其特征在于,所述洗板的方法为:用全自动洗板机洗板时,自动洗板5次;手动洗板时,则在加入洗涤液后静置5-10s,再手动甩干重复洗板5次。

6. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,在步骤(3) 中,所述孵育时间随目测颜色变化进行调节,整体颜色偏浅时,可适当延长显色时间。

7. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,在步骤(4) 中,所述酶标仪读数需在10min内完成,且酶标仪读数为450nm、620/630nm双波长读数。

8. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,在步骤(5) 中,所述对数-对数为lgA-1gNG,其中lgA为检测样本吸光度值以10为底的对数值,1gNG为样本的浓度值以10为底的对数值。

9. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,在步骤(5) 中,所述结果计算步骤如下:

A、先在酶标仪上比色,比出校准品、质控品及样本的吸光度值,然后在酶标仪上直接选择四参数方程,即酶标仪根据读出来的吸光度值以及已知的校准品浓度,绘制出四参数曲线,从而根据样本吸光度值酶标仪直接计算出样本浓度。

B、若样本浓度超过18ng/mL,应使用校准品A/样本稀释液进行稀释后重新实验,最后结果乘以稀释倍数;

C、若浓度低于校准品B浓度的样本应如实报告。

一种抗缪勒氏管激素的定量检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,尤其涉及一种抗缪勒氏管激素的定量检测方法。

背景技术

[0002] 抗缪勒氏管激素(anti-Mullerian hormone,AMH)是转化生长因子 β 超家族的成员之一,由Professor Alfred Jost于1974年首先发现。AMH是由两个相同的70KD亚基,通过二硫键连接组成的二聚糖蛋白,相对分子质量为140X103Da,人类AMH编码基因位于19号染色体短臂,大小2.4~2.8kb,含有5个外显子。

[0003] 随着现代生活方式的改变,普遍晚婚晚育现象、不良的现代生活方式(如过度节食减肥、吸烟、饮酒、熬夜)、巨大的工作精神压力,造成不孕不育率迅速上升。因此,对男性女性生育能力的尽早评估是十分有必要的。抗缪勒氏管激素(AMH)在性腺器官发育过程中起着重要作用,是男女性腺功能的重要标记物之一。在男性中AMH主要由睾丸间质细胞产生,始于胚胎形成并贯穿生命始终;在男性胎儿的发育过程中,AMH导致苗勒氏管退化,形成正常发育的男性生殖管道。在女性中AMH主要由卵巢颗粒细胞产生,血清AMH保持相对于男性较低的一个水平,从青春期开始,血清AMH水平随时间慢慢降低,并在更年期降低。AMH是由卵巢窦前卵泡和小窦状卵泡颗粒细胞分泌的活性因子,不受促性腺激素(Gn)的反馈调节,可抑制卵泡的募集和选择,在始基卵泡上无表达,在初级卵泡的颗粒细胞上弱表达,在 $\leq 4\text{mm}$ 的小窦卵泡中强表达,而在 $>4\text{mm}$ 窦卵泡中表达逐渐减弱至完全消失。抑制卵泡生长,参与了卵泡形成的两个重要调控,始基卵泡募集和周期募集。较其它卵巢评价指标更能准确地反映育龄期女性机体内分泌状态。人体内,AMH的平均半衰期为 $(27.6 \pm 0.8)\text{h}$,完全清除约需8d。正常生育期女性血清AMH与年龄呈负相关,在 $0.43 \sim 43.19\text{pmol/L}$ 间波动,峰值处于18~25岁,36岁后显著下降,41~47岁时降至 8.0pmol/L ,各个年龄段AMH的正常参考范围均较大。随着AMH的作用被越来越多人所熟知,AMH逐步被应用于妇科内分泌疾病、生殖医学领域、性别异常等范畴。

[0004] 对于AMH的检测,目前国内外采用的方法主要有酶联免疫法(ELISA)、化学发光法(CLIA)、电化学发光法、胶体金法和荧光免疫层析法。酶联免疫法主要采用96微孔板检测,由于定量准确,广泛应用于医院检验科,但检测时间长,步骤繁琐不便捷,检测精度较差;化学发光法和电化学发光法需要专用的分析仪,且价格昂贵,不适合单人份或较小批量检测用;胶体金法操作简单,使用方便,检测速度快,但不能对AMH进行准确的定量分析;当胶体金法与荧光免疫层析法结合使用时,对试纸条的要求较多,处理麻烦。

[0005] 为了解决上述问题,克服现有技术AMH检测方法中所存在的问题,本发明提供一种采用三步双抗体夹心法酶联免疫对AMH进行定量检测,该方法步骤简明,操作简单,使用方便,能准确检测AMH浓度,对检测结果进行定量分析。

发明内容

[0006] 本发明通过三步双抗体夹心法酶联免疫检测AMH含量,解决了现有技术中步骤繁

琐,操作麻烦,仪器成本高,检测结果不准确等技术问题。

[0007] 为了解决上述技术问题,本发明提供的检测方法包括以下步骤:

[0008] (1) 试剂配制:

[0009] A、AMH校准品B-F和AMH质控品I& II 分别用纯化水溶解A,并轻轻振荡充分溶解、混匀后待用。

[0010] B、洗涤液:用纯化水25倍稀释浓缩洗液。

[0011] (2) 样本处理:

[0012] A、标记选择使用的微孔条,并依次加入校准品、质控品和待检样本到相应的微孔中。

[0013] B、每微孔加入AMH反应缓冲液,转至微孔板摇床上,室温条件下震荡孵育90min,在孵育过程的最后20-30min,准备洗涤液。

[0014] C、孵育完成后洗板,如用全自动洗板机,自动洗板5次;如手动洗板,则在加入300 μ L洗涤液后静置5-10s,再手动甩干重复洗板5次。

[0015] D、每微孔加入抗AMH-生物素结合物,转至微孔板轨道摇床上,室温条件下振荡孵育30min,洗板同以上步骤C。

[0016] E、每微孔加入AMH链霉亲和素-霉结合物,转至微孔板轨道摇床上,室温条件下振荡孵育30min,洗板同以上步骤C。

[0017] (3) 显色反应:每微孔加入显色液,转至微孔板轨道摇床上,室温条件下振荡孵育8-12min,若整体颜色偏浅时,可适当延长孵育时间。

[0018] (4) 终止反应:每孔加入终止液,轻敲板壁混合后,在10min内用酶标仪450nm、620/630nm双波长读数。

[0019] (5) 结果判断:检测样本的数据使用对数-对数($\lg A - \lg NG$,其中 $\lg A$ 为检测样本吸光度值以10为底的对数值, $\lg NG$ 为样本的浓度值以10为底的对数值)运算,利用立方回归分析模型进行标准曲线及方程确定,并通过曲线方程进行结果计算,结果计算具体操作如下:

[0020] A、先在酶标仪上比色,比出校准品、质控品及样本的OD值(吸光度值),然后在酶标仪上直接选择四参数方程,即酶标仪根据读出来的OD值以及已知的校准品浓度,绘制出四参数曲线,从而根据样本OD值酶标仪直接计算出样本浓度。

[0021] B、若样本浓度超过18ng/mL,应使用校准品A/样本稀释液进行稀释后重新实验,最后结果乘以稀释倍数;

[0022] C、若浓度低于校准品B浓度的样本应如实报告。

[0023] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明是采用生物素-抗体与故乡抗体-抗原复合物结合之后,再与链霉亲和素-辣根过氧化物酶结合物结合,这样抗体-抗原-抗体生物素复合物-SHRP(链霉亲和素-辣根过氧化物酶)结合在微孔上,通过酶-底物显色反应。酶和底物反应程度由主波长为450nm,参考波长620/630nm的双波长来测定,测得的吸光度(A值)反应了样本品与校准品中的抗缪勒氏管激素(AMH)的浓度,且成正相关,通过建立A值与浓度二者对数标准曲线,根据标准曲线方程计算待测样本的AMH的浓度。该方法的三步孵育和洗涤过程,步骤简明,操作简单,使用方便,并且检测结果能准确计算出AMH的浓度,对AMH进行定量分析。

具体实施方式

[0024] 下面结合实施例对本发明作进一步说明,应当理解的是,本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的具体改进都属于本发明要求保护的范围。

[0025] 具体实施例:

[0026] 一、试剂的准备

[0027]

	组份名称	规格	主要组成成分	数量
反应组份	AMH 反应板	96T	包被了抗 AMH 单抗的 96 孔微孔板	1
	AMH 反应缓冲液	12mL/瓶	含 0.2%BSA 的 0.05M Tris 缓冲液	1
	抗 AMH 抗体-生物素结合物	12mL/瓶	生物素标记的抗 AMH 抗体	1
	AMH 链霉亲和素-酶结合物	12mL/瓶	链霉亲和素-辣根过氧化物酶	1
	浓缩洗液 (25x)	60mL/瓶	含 3.6M NaCl 的 0.62M Tris 缓冲液	1
	显色液	11mL/瓶	四甲基联苯胺	1
	终止液	11mL/瓶	浓度为 2M 的 H ₂ SO ₄	1
校	AMH 校准品 A/样本稀释液	11mL/瓶	甘氨酸-Tris 缓冲液	1
	AMH 校准品 B (冻干粉)	瓶	AMH 冻干粉	1

[0028]

准品	AMH 校准品 C (冻干粉)	瓶	AMH 冻干粉	1
	AMH 校准品 D (冻干粉)	瓶	AMH 冻干粉	1
	AMH 校准品 E (冻干粉)	瓶	AMH 冻干粉	1
	AMH 校准品 F (冻干粉)	瓶	AMH 冻干粉	1
质控品	AMH 质控品 I (冻干粉)	瓶	AMH 冻干粉	1
	AMH 质控品 II (冻干粉)	瓶	AMH 冻干粉	1

[0029] 二、试剂配制 (试剂准备区)

[0030] 1. AMH校准品B-F和AMH质控品I&II: 分别用1mL的纯化水溶解AMH校准品B-F及AMH质控品I&II, 并轻轻振荡充分溶解、混匀后待用。

[0031] 2. 洗涤液: 用纯化水25倍稀释浓缩洗液 (25X), 如量取20mL浓缩洗液, 需加入480mL的纯化水。稀释后的洗液在密封容器中可以室温 (22-28℃) 存在1个月, 但一般情况为现配先用。

[0032] 3. 微孔: 选择检测所需要数量的微孔。剩下的微孔应该放在有干燥剂的密封袋中,

密封袋必须封紧防潮。

[0033] 三、样本处理

[0034] 试剂在使用前必须先平衡至常温(24-26℃),并且轻轻充分摇匀。校准品、质控品和样本检测必要时应进行复孔实验。

[0035] 1. 标记选择使用的微孔条,并依次加入25μL校准品、质控品和待检样本到相应的微孔中。

[0036] 2. 每孔加入100μL的AMH反应缓冲液,转至微孔板摇床上(600-800rpm),室温条件下震荡孵育90min,在孵育过程的最后20-30min,准备浓缩洗液(25X)稀释(一般现配现用)。

[0037] 3. 孵育完成后洗板,如用全自动洗板机,自动洗板5次;如手动洗板,则在加入300μL洗液后静置5-10s,再手动甩干重复洗板5次。避免微孔间洗液交叉污染。

[0038] 4. 每孔加入100μL的抗AMH-生物素结合物,转至微孔板轨道摇床上(600-800rpm),室温条件下振荡孵育30min,洗板同以上步骤3。

[0039] 5. 每孔加入100μL的AMH链霉亲和素-霉结合物,转至微孔板轨道摇床上(600-800rpm),室温条件下振荡孵育30min,洗板同以上步骤3。

[0040] (3) 显色反应:每孔加入100μL显色液(避免阳光直射),转至微孔板轨道摇床上(600-800rpm),室温条件下振荡孵育8-12min。孵育时间随目测颜色变化进行调节,整体颜色偏浅时,可适当延长显色时间。

[0041] (4) 终止反应:每孔加入100μL终止液,轻敲板壁混合后,在10min内用酶标仪450nm、620/630nm双波长读数,读数时,如果酶标仪功能允许,将校准品A的A值设定为空白。

[0042] (5) 结果判断:检测样本的数据使用对数-对数($\lg A - \lg NG$,其中 $\lg A$ 为检测样本吸光度值以10为底的对数值, $\lg NG$ 为样本的浓度值以10为底的对数值)运算,利用立方回归分析模型进行标准曲线及方程确定,并通过曲线方程进行结果计算,结果计算具体操作如下:

[0043] 1. 先在酶标仪上比色,比出校准品、质控品及样本的OD值(吸光度值),然后在酶标仪上直接选择四参数方程,即酶标仪根据读出来的OD值以及已知的校准品浓度,绘制出四参数曲线,从而根据样本OD值酶标仪直接计算出样本浓度。

[0044] 2. 若样本浓度超过18ng/mL,应使用校准品A/样本稀释液进行稀释后重新实验,最后结果乘以稀释倍数;

[0045] 3. 若浓度低于校准品B浓度的样本应如实报告。

[0046] (6) 检测结果的分析

[0047] 1. 若检测计算浓度低于0.06ng/mL,不能说明样本AMH含量一定低于本试剂的有效检测下限(0.06ng/mL),不排除样本中存在高水平的干扰物质,如溶血样本、高血脂样本、高胆红素样本。该情况需结合样本情况及患者的病史、症状等做出正确判断。

[0048] 2. 若检测结果值异常偏高,可能为样本中存在某些干扰物质,产生交叉反应,应采用其他检测方法或试剂进行检验。

[0049] 3. 本试剂对人血清样本的检测结果仅供临床作为参考,不能成为病例或者排除病例的依据。

[0050] 4. 本检测可用于对卵巢功能的辅助评估,更好评估年龄相关的生育能力下降,还可以作为围绝经期过渡时卵巢功能改变的可靠标志;除此之外,还有对多囊卵巢综合症、卵巢早衰及在辅助生殖技术中具有一定的指导作用。

[0051] 本发明对适当临床样本进行研究分析,由于被分析物浓度在研究水平(性别、年龄)上呈现较为规则的正态分布,所以以置信区间在5.0%-95%作为本次参考值范围的低限及高限定值。研究结果见下表:

[0052]

参考分组	参考值范围 (ng/mL)
女性:0-6周岁	0.18-8.26
女性:7-18周岁	0.65-9.98
女性:19-35周岁	0.32-8.641
女性:36-42周岁	0.12-6.08
女性:>42周岁	0-3.61
男性:20-60周岁	1.45-18.77
男性:>60周岁	0.34-9.38

[0053] 注意:本次参考值研究成果仅作为参考。

[0054] 需注意的是,本发明仅用于体外辅助诊断,检测人血清中AMH的浓度,不能作为病例或排除病例的依据。对于溶血、高血脂、黄疸样本检测,本发明的检测结果可能表现为假阴性。

[0055] 另外,本发明提供的方案中,AMH质控品I、II检测必须在有效的检测范围(0.06-18.0ng/mL)内;AMH校准品检测,对对数拟合曲线分析,相关系数 $r \geq 0.9900$ 。

[0056] 上面对本发明进行了具体实施例描述,显然本发明的具体实现并不受上述方式的限制,只要采用了本发明的方法构思和技术方案进行的各种改进,或未经改进直接应用于其它场合,均在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种抗缪勒氏管激素的定量检测方法		
公开(公告)号	CN109490531A	公开(公告)日	2019-03-19
申请号	CN201811391612.2	申请日	2018-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	长沙金域医学检验所有限公司		
申请(专利权)人(译)	长沙金域医学检验所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	长沙金域医学检验所有限公司		
[标]发明人	欧阳伟 邓文博 李姣		
发明人	欧阳伟 邓文博 李姣		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/74		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种抗缪勒氏管激素的定量检测方法，涉及生物检测的技术领域。本发明提供的抗缪勒氏管激素定量检测方法，是通过三步双抗体夹心法酶联免疫进行定量检测，采用生物素-抗体与故乡抗体-抗原复合物结合之后，再与链酶亲和素-辣根过氧化物酶结合物结合，这样抗体-抗原-抗体生物素复合物-SHRP结合在微孔上，通过酶-底物显色反应，酶和底物反应程度由主波长为450nm，参考波长620/630nm的双波长来测定吸光度值，然后根据标准曲线方程计算待测样本的AMH的浓度。本发明提供的检测方法步骤简明，操作简单，使用方便，能准确检测AMH浓度，对检测结果进行定量分析。

组份名称		规格	主要组成成分	数量
反 应 组 份	AMH 反应板	96T	包被了抗 AMH 单抗的 96 孔微孔板	1
	AMH 反应缓冲液	12mL/瓶	含 0.2%BSA 的 0.05M Tris 缓冲液	1
	抗 AMH 抗体-生物素结合物	12mL/瓶	生物素标记的抗 AMH 抗体	1
	AMH 链酶亲和素-酶结合物	12mL/瓶	链酶亲和素-辣根过氧化物酶	1
	浓缩洗液 (25x)	60mL/瓶	含 3.6M NaCl 的 0.62M Tris 缓冲液	1
	显色液	11mL/瓶	四甲基联苯胺	1
	终止液	11mL/瓶	浓度为 2M 的 H ₂ SO ₄	1
校	AMH 校准品 A/样本稀释液	11mL/瓶	甘氨酸-Tris 缓冲液	1
	AMH 校准品 B (冻干粉)	瓶	AMH 冻干粉	1