

抗苗勒氏管激素的生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶酶促化学发光免疫分析方法的建立^{*}

薛燕平¹ 王坤¹ 李莉华¹ 任倩² 罗衬银³ 张德力⁴ 姚鹏¹

[摘要] 目的:抗苗勒氏管激素(AMH)在评价卵巢储备功能方面具有更高的准确性,将其用于青春期、生育期女性的生育指导时具有很好的临床价值。目前对于 AMH 的检测,临床上常采用的是酶联免疫分析法,但存在灵敏度低、检测范围窄等缺点,而影响 AMH 实际水平的测定,使得对病情的预估不准确对疾病的治疗产生影响。因此,建立一种低成本、高敏感度的检测 AMH 水平的方法尤为重要。**方法:**利用生物素-亲和素放大系统,将一组抗 AMH 的第一抗体包被微孔板,同时用生物素标记第二抗体,与第一抗体-抗原复合物结合之后,再与生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶结合物结合,加入发光底物,建立 AMH 酶促化学发光免疫分析方法,同时对这一体系的线性、灵敏度、特异性、稳定性、回收率等参数进行检测,并与常规 ELISA 法进行相比检测 AMH 浓度。**结果:**线性检测范围为(0.42~50.00)U/ml,该体系稳定性好,灵敏度 0.42 U/ml,批内差异小于 10.0%,批间差异小于 10.0%,与常规 ELISA 对比差异有统计学意义。**结论:**AMH 的生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶酶促化学发光免疫分析易于操作、灵敏度高、价格低廉,适用于临床检测。

[关键词] 抗苗勒氏管激素;生物素;链霉亲和素;辣根过氧化物酶;酶促化学发光免疫分析方法

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2019.02.023

[中图分类号] R459.1 **[文献标志码]** A

Establishment of biotin-streptavidin-horseradish peroxidase enzymatic chemiluminescence immunoassay for anti-Mullerian hormone

XUE Yanping¹ WANG Kun¹ LI Lihua¹ REN Qian² LUO Chenyin³
ZHANG Deli⁴ YAO Peng¹

(¹Department of Clinical Laboratory, Yellow-River Sanmenxia Hospital, Sanmenxia, 472000, China; ²Department of Gynecology, Yellow-River Sanmenxia Hospital; ³Dongguan Xie-gang Hospital; ⁴Dongguan Shi-jie Hospital)

Corresponding author: YAO Peng, E-mail: jykyapeng@163.com

Abstract Objective: Anti-Mullerian hormone(AMH) has a higher accuracy in evaluating ovarian reserve function, and it is of great clinical value in the reproductive guidance of female during puberty and growing period. At present, the enzyme-linked immunoassay is commonly used in the detection of AMH, but there are some disadvantages, such as low sensitivity and narrow detection range, which affect the actual level of AMH, which makes the prediction of the condition inaccurate to the treatment of the disease. Therefore, it is very important to establish a low cost and high sensitivity method to detect AMH level. **Method:** Using the Biotin-affinity amplification System, a group of anti-AMH first antibody packages were coated with microporous plates, a method of AMH enzyme-induced chemiluminescence immunoassay was established by combining the biotin-streptavidin-horseradish peroxidase binding with biotin-labeled second antibody and the first antibody-antigen complex, and adding the luminescent substrate, the parameters such as linearity, sensitivity, specificity, stability and recovery rate of the system were detected, and compared with the conventional Elisa method to detect AMH concentration. **Result:** The linear detection range is (0.42-50.00)U/ml, the system has good stability, sensitivity 0.42 U/ml, the difference between batches is less than 10%, the difference between batches is less than 10%, and the difference is statistically significant compared with the conventional ELISA. **Conclusion:** AMH biotin-streptavidin-horseradish peroxidase enzymatic chemiluminescence immunoassay is easy to operate, high sensitivity and low price, and is suitable for clinical detection.

Key words anti-mullerian hormone; biotin; streptomyces affinity; horseradish peroxidase; enzymatic chemiluminescence immunoassay

^{*} 基金项目:2017 年东莞市社会科技发展(一般)项目(No:201750715011315)

¹ 黄河三门峡医院检验科(河南三门峡, 472000)

² 黄河三门峡医院妇科

³ 东莞市谢岗医院

⁴ 东莞市石碣医院

通信作者:姚鹏, E-mail: jykyapeng@163.com

基础性激素、窦卵泡计数、抑制素 B、基础卵巢体积等均是临床上用来评估卵巢储备力的指标^[1],但是大多存在敏感性不高的问题。抗苗勒氏管激素(anti-mullerian hormone, AMH)^[2]由 2 个 72 000 的二聚体单体通过二硫键组成的糖蛋白,出生后少量 AMH 由卵巢颗粒细胞产生,绝经期后检测不到,其参与调节初级卵泡从静息状态转为生长状态再转为次级卵泡的过程。近年来研究^[3-4]发现,AMH 再评价卵巢储备功能方面具有更高的准确性,将其用于青春期、生育期女性的生育指导时具有很好的临床价值。研究认为,AMH 在出生后生长卵泡的卵巢颗粒细胞分泌,在月经周期中可保持由恒定的水平,采集血样进行检测时方便可随时进行^[5],因此,相较于卵泡刺激素能较好的反映卵巢储备变化趋势,具有更高的预测价值。研究还发现,正常排卵的女性血清 AMH 水平比卵泡刺激素等激素水平的变化出现要早^[6-7];血清基础 AMH 水平在 0.5~1.1 ng/ml,预示卵巢储备下降。因此,AMH 可作为早期评估卵巢储备功能的敏感指标。研究还发现多囊卵巢综合征(polycystic ovarian syndrome, PCOS)患者血清 AMH 水平与接受体外受精(in vitro fertilization, IVF)/卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)-胚胎移植(embryo transfer, ET)助孕过程中控制性促排卵结局呈正相关^[8]。总之,AMH 在预测卵巢卵泡的库存量,女性的生育力以及卵巢对促排卵药物的反应性方面具有重要的指导意义。目前对于 AMH 的检测,临床上常采用的是酶联免疫分析法,但存在灵敏度低、检测范围窄等缺点影响 AMH 实际水平的测定,从而使得对病情的预估不准确对疾病的治疗产生影响等。因此,建立一种低成本、高敏感度的检测 AMH 水平的方法尤为重要,本研究通过生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶酶促化学发光免疫分析方法与常规酶联免疫分析法进行线性、灵敏度、特异度、稳定性、回收率等参数比较,确定生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶酶促化学发光免疫分析方法在 AMH 检测中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

本研究中使用试剂及仪器:BHP951M 型微孔板发光分析仪(北京滨松光子公司);微量移液器(德国 Eppendorf 公司);DEM.2 型自动洗板机(北京拓普分析仪器公司);电热恒浴箱(北京长安科学仪器公司);96 孔微孔板(深圳金灿华工业有限公司);LG15W 型离心机(北京医用离心机厂);链霉亲和素(美国 emo fisher scientific 公司);N-羟基琥珀酰亚胺生物素(美国 emo fisher scientific 公

司);辣根过氧化物酶(Sigma 公司);化学底物发光液(北京科美生物技术有限公司);质控血清(中国药品生物制品检定所);AMH 抗体(重庆探生科技有限公司)。

1.2 样本血清

空腹抽取正常体检女性外周静脉血 5 ml,迅速离心处理(3 500 r/min, 15 min)吸取血清, -20℃ 保存。

1.3 方法

1.3.1 链霉亲和素包被板的制备 50 mmol/L、pH 5.0 柠檬酸包被缓冲液将链霉亲和素配制成 0.5 μg/ml 溶液,混匀后加入微孔板中,每孔 150 μl, 2~8℃ 下保存 24 h,甩干后加入封闭液(含 10 g/L BSA),每孔 200 μl, 2~8℃ 下过夜,甩去封闭液,扣干、干燥、密封, 2~8℃ 保存。

1.3.2 生物素化抗体的制备 将 N-羟基琥珀酰亚胺生物素冰箱取出平衡至室温,称取 2 mg 于西林瓶中加超纯水 300 ml,轻轻摇匀活化。立即将活化的生物素溶液缓慢加入 2 ml 抗体溶液中,室温反应 30 min,反应液用 10 mmol/L 的 PBS 透析 4℃ 8 h(换液 4 次),收集,加入等量丙三醇, -20℃ 保存。

1.3.3 酶标记抗体的制备 将 5 mg 辣根过氧化物酶溶于 1 ml 蒸馏水中,加 0.2 ml 新配的 0.1 mol/L NaIO₄ 溶液,室温避光 20 min, 1 mmol/L pH 4.4 醋酸钠缓冲液透析, 4℃ 过夜(换液 3 次)。加入 20 μl 0.2 mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液,另加入 1 ml 0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液含 5 mg AMH 抗体,室温 2 h,加入 0.1 ml 新配 4 mg/ml NaBH₄,混匀, 4℃ 2 h。0.15 mol/L pH 7.4 PBS 透析 4℃ 过夜(换 4 次液)。收集酶结合物,加入等量丙三醇, -20℃ 保存。

1.3.4 校准品的配制 用校准品稀释液参照国家标准品将 AMH 抗原配制成 0.2、0.6、2.0、6.0、20.0、60.0 U/ml 系列标准溶液,每瓶 0.5 ml 分装冻干, -20℃ 保存。

1.3.5 抗体反应液的配制 用抗体稀释液(含 10 g/L BSA)将生物素化抗体以 1 : 3 000 和酶标记抗体以 1 : 20 000 的终浓度进行混合, 4℃ 保存。

1.3.6 操作步骤 向链霉亲和素包被板微孔中加入 50 μl 校准品或样本,再加 100 μl 抗体反应液,盖膜振动 10 s, 37℃ 水浴 45 min,洗涤 5 次后拍干;每孔加入发光底物 100 μl,避光 5 min,在发光分析仪上检测发光强度。常规酶联免疫分析法(ELISA)严格按照说明书操作进行。

1.4 统计学处理

使用 SPSS 18.0 软件分析数据。使用 K-S 检验确定样本中的浓度分布是否为正态分布。2 组间均值的比较采用 *t* 检验, 2 组以上的均值比较采

用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 回收率

取 AMH 为 2 U/ml 的人血清中, 分别加入 AMH 浓度为 30 U/ml、50 U/ml 和 150 U/ml 的 AMH, 回收率为别为 93.63%、97.16% 和 91.59%, 平均回收率为 94.13%。

2.2 线性范围

该检测体系中线性检测范围为(0.42~50.00) U/ml, 校准品与发光信号双对数剂量-反应曲线数学模型, 相关系数为 0.997 8。

2.3 灵敏度

平行测定 10 孔零校准品发光强度, 计算 $\bar{x} \pm s$, 平均值加 2 倍标准差所得的发光值, 代入线性方程计算出对应浓度, 重复 5 次, 得到的灵敏度为 0.42 U/ml。

2.4 精密度

对中国药品生物制品检定所的 3 个质控品分别进行 10 孔平行测定, 批内差异小于 10.0%, 批间差异小于 10.0%。

2.5 特异性

本研究选用其他 3 种激素进行交叉反应, 测定 AMH 用于临床检查的特异性, 结果见表 1。

表 1 交叉反应统计表		m U/ml
交叉反应因子	浓度	测定值
促甲状腺激素	500	<1
促黄体生成素	500	<1
人绒毛膜促性腺激素	200 000	<1

2.6 稳定性

37℃ 7 d 热稳定性试验结果与 4℃ 基本一致, 灵敏度 0.42 U/ml, 平均回收率为 94.11%, 曲线线性相关系数 0.992 5, 批内精密度和批间精密度均小于 10%。

2.7 与 ELISA 法比较

将以上各参数与常规 ELISA 法所得参数进行比较, 结果显示, 本研究中使用检测方法的灵敏度和线性范围均明显优于常规 ELISA 法, 见表 2。

表 2 与 ELISA 法所得参数比较表				
方法	回收率 /%	灵敏度 /(U · ml ⁻¹)	精密度 /%	线性范围 /(U · ml ⁻¹)
ELISA	94.13	0.98	<10	(0.98~38.00)
CLIA	92.29	0.42	<10	(0.42~50.00)
χ^2/t	2.917	7.254	1.032	8.217
P	0.374	0.027	0.817	0.012

3 讨论

年龄、窦卵泡数目、滤泡刺激激素和雌激素水平是临床医生评估卵巢功能的传统方法^[9-11], 但是以上方法极易收到各种因素的影响而产生误差, 同时也容易受到检测者的主观判断而对结果造成影响。AMH 是一种糖蛋白二聚体, 仅在性腺中表达, 主要由处于生长期卵泡中颗粒细胞分泌, 主要作用是调控卵泡的生长和发育, 维持卵巢储备功能^[12-13]。目前对于 AMH 的检测主要使用的是酶免疫测定, 灵敏度低且影响因素较多, 极易出现假阳性和假阴性结果^[14-15]。化学发光免疫分析 (CLIA) 是将发光物质或酶标记在抗原或抗体上, 免疫反应结束后, 加入酶底物而发光, 通过测量发光强度和被测物的浓度关系, 建立光信号与浓度关系数学模型, 根据标准曲线测定待测物的浓度^[16-17]。CLIA 的主要优点有灵敏度高、线性范围宽、标记物的有效期长、无放射性危害等。链霉亲和素 (SA) 是由链霉菌分泌的一种蛋白质, 分子量为 65 kD。相对于亲和素, SA 不仅等电点显示弱酸性、分子量略小, 而且不带任何糖基, 所以在与聚苯乙烯板结合时, 单位面积吸附更多 SA, 也明显减少非特异性吸附^[18-19]。链霉亲和素-生物素系统在免疫分析中的应用有多种形式, 可用于间接包被, 亦可用于终反应放大^[20-22]。本文建立的方法是在固相上先预包被链霉亲和素, 将捕获抗体进行生物素化, 通过链霉亲和素-生物素反应将捕获抗体、酶标抗体复合物与固相桥联。在本研究中, 线性检测范围为(0.42~50.00) U/ml, 该体系稳定性好, 灵敏度 0.42 U/ml, 批内差异小于 10.0%, 批间差异小于 10.0%, 与常规 ELISA 对比差异有统计学意义。这提示, 链霉亲和素-生物素桥联间接包被法不仅可增加抗体吸附量, 而且使其结合点充分暴露, 建立的免疫分析方法可测范围变宽。

本文建立一种 AMH 的生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶酶促化学发光免疫分析方法, 更易于操作、灵敏度高、价格低廉, 适用于临床检测。

参考文献

[1] Chinya A, Ratan SK, Aggarwal SK, et al. Association of Levels of Serum Inhibin B and Follicle-stimulating Hormone with Testicular Vascularity, Volume, and Echotexture in Children with Undescended Testes [J]. J Indian Assoc Pediatr Surg, 2017, 22: 3-8.

[2] 郭丽, 银铎. 子宫切除术中预防性切除输卵管对卵巢储备功能的影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(2): 127-129.

[3] Jamil Z, Fatima SS, Ahmed K, et al. Anti-Mullerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers [J]. Dis Markers, 2016, 5246217.

[4] Shen Z, Bao J, Zeng Y, et al. Influence of Cyclophosphamidum Used in Different Time during Menstrual

- Cycle on Ovary Anti-müllerian Hormone[J]. China Pharmacist, 2018, 1: .
- [5] Anna J, Małgorzata S, Anna G, et al. The Relationship between AMH and AMHR2 Polymorphisms and the Follicular Phase in Late Reproductive Stage Women[J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13: 185—185.
- [6] Mumford SL, Legro RS, Diamond MP, et al. Baseline AMH Level Associated With Ovulation Following Ovulation Induction in Women With Polycystic Ovary Syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2016, 101: 3288—3296.
- [7] 陈华干, 杨婷, 伍萍芝, 等. 抗苗勒管激素在高龄妇女卵巢功能评估中的价值探讨[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(19): 3895—3898.
- [8] 路锦, 李杭生, 韦多, 等. 抗苗勒管激素及体质量指数与多囊卵巢综合征患者控制性促排卵结局的相关性分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(6): 529—532.
- [9] FeiDing XU. The Value of Age, Basal Follicle Stimulating Hormone and the Number of Sinus Follicle in Predicting Ovarian Response[J]. Medical Innovation of China, 2016.
- [10] Wang H, Chen L, Jiang Y, et al. Association of gene polymorphisms of estrogen receptor, follicle-stimulating hormone β and leptin with follicular cysts in Large White sows[J]. Theriogenology, 2017, 103: 143—148.
- [11] Zhang H, Luo Q, Lu X, et al. Effects of hPMSCs on granulosa cell apoptosis and AMH expression and their role in the restoration of ovary function in premature ovarian failure mice[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9: 20.
- [12] Kereilwe O, Pandey K, Borromeo V, et al. Anti-Müllerian hormone receptor type 2 is expressed in gonadotrophs of postpubertal heifers to control gonadotrophin secretion[J]. Reprod Fertil Dev, 2018, 14.
- [13] Pankhurst MW, Leathart BL, Batchelor NJ, et al. The Anti-Müllerian Hormone Precursor (proAMH) Is Not Converted to the Receptor-Competent Form (AMHN, C) in the Circulating Blood of Mice[J]. Endocrinology, 2016, 157: 1622.
- [14] Demirdjian G, Bord S, Lejeune C, et al. Performance characteristics of the Access AMH assay for the quantitative determination of anti-Müllerian hormone (AMH) levels on the Access family of automated immunoassay systems[J]. Clinical Biochemistry, 2016, 49: 1267—1273.
- [15] Pearson K, Long M, Prasad J, et al. Assessment of the Access AMH assay as an automated, high-performance replacement for the AMH Generation II manual ELISA[J]. Reproductive Biology & Endocrinology, 2016, 14: 1—9.
- [16] Zhu W, Zeng J, Tong LJ, et al. Evaluation of the application of Chemiluminescence immunoassay (CLIA) in blood screening[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2015, 29: 493—497.
- [17] Mei S, Wang J, Zhu L, et al. A UPLC-MS/MS method for analysis of vancomycin in human cerebrospinal fluid and comparison with the chemiluminescence immunoassay[J]. Biomed Chromatogr, 2017, 31.
- [18] Salehi N, Peng CA. Purification of CD47-streptavidin fusion protein from bacterial lysate using biotin-agarose affinity chromatography[J]. Biotechnology Progress, 2016, 32: 949—958.
- [19] Wetzel D, Müller JM, Flaschel E, et al. Fed-batch production and secretion of streptavidin by *Hansenula polymorpha*: Evaluation of genetic factors and bioprocess development[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 225: 3—9.
- [20] Yoon JG, Hwang HJ, Jin A C. Application of the biotin-labeled toxin mutant for affinity isolation of associated proteins in the mammalian cells[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2018, 125: 497—504.
- [21] Freitag S, Le IT, Chilkoti A, et al. Structural studies of binding site tryptophan mutants in the high-affinity streptavidin-biotin complex[J]. Journal of Molecular Biology, 2016, 279: 211—221.
- [22] Wang Q, Huang X, Fu X, et al. A sensitive and selective resonance Rayleigh scattering method for quick detection of avidin using affinity labeling Au nanoparticles[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2016, 162: 75—80.

(收稿日期: 2018-11-25)