

• 论 著 •

测值稳定的抗人 AMH 单克隆抗体制备及应用*

何进军¹, 章成龙¹, 葛超坤¹, 邹继华¹, 叶邦策^{2△}

1. 美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315104; 2. 浙江工业大学药学院, 浙江杭州 310014

摘要:目的 制备用于化学发光免疫诊断的抗缪勒氏管激素(AMH)单克隆抗体(单抗),以解决临床应用中样本保存后 AMH 测值升高的问题。方法 利用杂交瘤技术制备结合 AMH 不同氨基酸位点的单抗,通过检测室温保存样本测值变化筛选测值稳定的抗体对,同时对 AMH 测值升高的原因进行分析。结果 获得了结合 AMH 15 个不同位点的单抗,抗体对筛选结果表明,结合 AMH 351~380 氨基酸的全部单抗及部分结合 426~541 氨基酸、477~501 氨基酸的单抗用于检测室温保存 3 d 的样本测值稳定(<10%),而其他位点的单抗测值均显著上升。样本中 C1q 浓度及抗体 Fc 段均与 AMH 测值升高无关,重组 AMH 抗原室温保存后测值不上升。用所获抗体对 260/80 配置的化学发光试剂检测灵敏度达 0.08 ng/mL,测值与罗氏试剂比较, $R^2=0.997\ 9$,有较好的相关性,且偏差无统计学意义($P=0.264$)。结论 保存样本测值升高推测是由 AMH 构象改变而非补体干扰所致,获得了测值稳定的单抗,建立了满足临床要求的 AMH 化学发光检测方法。

关键词:抗缪勒氏管激素; 单克隆抗体; 卵巢储备

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.02.005 中图法分类号:R446.6

文章编号:1673-4130(2023)02-0154-06 文献标志码:A

Production and application of monoclonal antibodies against human anti-Müllerian hormone which give stable measured values*

HE Jinjun¹, ZHANG Chenglong¹, GE Chaokun¹, ZOU Jihua¹, YE Bangce^{2△}

1. Medical System Biotechnology Co. Ltd., Ningbo, Zhejiang 315104, China; 2. College of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China

Abstract: **Objective** To prepare anti-Müllerian hormone (AMH) monoclonal antibody for chemiluminescence immunodiagnosis, and to solve the problem of the increase of AMH measurement value after sample preservation in clinical application. **Methods** The hybridoma technology was used to prepare monoclonal antibodies combining different amino acid sites of AMH. The antibody pairs with stable measurement values were screened by detecting the changes in measurement values of samples stored at room temperature. At the same time, the reasons for the increase of AMH measurement values were explored. **Results** Antibodies recognizing 15 different sits on AMH were obtained. The results showed that all the antibodies binding to 351—380 amino acid and part of that recognizing 426—541 amino acid or 477—501 amino acid of AMH gave stable results (<10%) in measuring samples stored at room temperature for three days. However, significant increases were observed when antibodies binding to the other sits were used. The study also confirmed that neither C1q content in sample nor the Fc fragment of antibody caused the rise, and the concentration of recombinant AMH did not increase after storage at room temperature. Sensitivity up to 0.08 ng/mL was achieved by chemiluminescence reagent prepared with the obtained antibody pair 260/80, when samples were measured, the values had good correlation with that acquired by Roche AMH kit ($R^2=0.997\ 9$), with $P=0.264$, suggesting no statistical significance. **Conclusion** Changes in AMH conformation, rather than complement interference, caused the rise of AMH value of stored samples, monoclonal antibody pairs giving stable results were obtained, and chemiluminescence detection suitable for clinical use was established.

Key words: anti-Müllerian hormone; monoclonal antibody; ovarian reserve

* 基金项目:国家自然科学基金项目(22134003)。
作者简介:何进军,男,工程师,主要从事诊断原料及诊断试剂研究。△ 通信作者,E-mail:bcye@ecust.edu.cn。
网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1176.R.20230104.0954.001.html\(2023-01-05\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1176.R.20230104.0954.001.html(2023-01-05))

抗缪勒氏管激素(AMH)是评估女性卵巢储备及指导辅助生殖的主要标志物^[1],其临床应用还包括卵巢早衰、绝经年龄预测和多囊卵巢综合征辅助诊断等^[2-3]。AMH 以二聚体表达,分泌前被酶切为 N 端与“成熟区”C 端,N 端与 C 端以非共价键结合^[4]。研究表明血清中酶切与未酶切的 AMH 共存^[5]。

1993 年 REY 等^[6]用自配的酶联免疫试剂检测发现,-20 ℃ 保存样本 AMH 测值升高。2012 年,RUSTAMOV 等^[7]用贝克曼 AMH Gen II 试剂检测并报告,样本在室温存放 7 d 及-20 ℃ 存放 5 d 测值分别上升 58%、23%,且稀释样本测值与稀释倍数不成比例。回顾性研究进一步证实,AMH 测值上升幅度与样本保存温度、时间、保存方式(血清或全血)有关^[8-9]。测值稳定性是诊断试剂的重要指标,且临床上常有样本运输和检测不及时的情况,上述结果对 AMH 的广泛应用造成了巨大困扰。有研究者推测样本保存中 AMH 构象改变致使其与抗体结合能力上升或出现新的结合位点^[7,9],贝克曼的科学家则认为补体干扰 AMH 检测,样本保存后补体失活测值逐渐升高^[10]。

笔者发现大量 AMH 单抗检测室温保存样本测值升高,根据已有经验,仅少数抗体的补体结合位点容易暴露而易受干扰,因此推测 AMH 测值不稳定非补体干扰而是分子构象改变所致,制备结合能力不受构象变化影响的单抗或可解决该问题。本文通过制备结合 AMH 不同位点的单抗以验证该推测,并建立了满足临床要求的 AMH 化学发光检测方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 抗体测值稳定性检测的 400 份样本取自 3 天内宁波美康盛德医学检验所体检的 400 例 12~50 岁健康女性,混合分装并-80 ℃ 冻存。测值相关性检测的 60 份梯度样本搜集于 2021 年 9—10 月。BALB/c 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。研究过程遵循美康盛德医学检验所伦理委员会相关原则,研究方案经伦理委员会审核并批准。

1.2 仪器与试剂 自配化学发光试剂,采用美康 CL3080 免疫分析仪检测 AMH,对照试剂盒 Elecsys AMH(电化学发光法)及配套质控品购自罗氏公司,使用 Roche Cobas e602 全自动免疫分析仪检测。用于试剂特异性检测的激活素 A、抑制素 A、促卵泡生成激素(FSH)、促黄体生成激素(LH)均购自 R&D Systems 公司。

1.3 方法

1.3.1 人 AMH 抗原和单抗制备 AMH 基因由金唯智生物科技有限公司合成,C 末端添加 8×His 标签,分别用 5'-Nhe I、3'-EcoR I 酶切并插入

pcDNA3.3 质粒。电转染 293T 细胞,培养结束后用 HisTrap FF 柱及分子筛 HiPrep Sepha S-300HR 纯化抗原。以 AMH 抗原(100 μg/只)免疫小鼠,3 周后加强免疫 3 次(50 μg/只),间隔 2 周。取小鼠脾细胞与 SP 2/0 细胞进行 PEG 3000 介导的细胞融合,酶联免疫法检测和筛选单克隆。

1.3.2 AMH 多肽合成 每条多肽长 30 个氨基酸,相邻有 5 个氨基酸重叠,编号 1~21,由吉尔生化(上海)有限公司合成。其中编号 1~17 位于 AMH N 端,编号 18~21 位于 AMH C 端,多肽 17 长 26 个氨基酸且与 18 不重叠,多肽 21 长 39 个氨基酸(见图 1C)。多肽耦联 BSA 并用于抗体识别位点测定。

1.3.3 发光试剂配置 发光试剂:取 0.1 mg 单抗,以分子数 1:15 标记吖啶酯,室温反应 2 h,PB 缓冲液透析 3 次,用 PBS(1% BSA)稀释至 1 μg/mL 备用。固相试剂:取 0.1 mg 单抗,以分子数 1:15 标记生物素,室温反应 2 h,PB 缓冲液透析 3 次,用 PBS(1% BSA)稀释至 0.5 mg/mL 备用。取 0.5 mL 磁珠,PB 清洗 3 次,稀释至 5 mg/mL,加入等体积生物素标记抗体,室温反应 2 h,PBS(1% BSA)清洗 3 次并稀释至 0.1 mg/mL 备用。

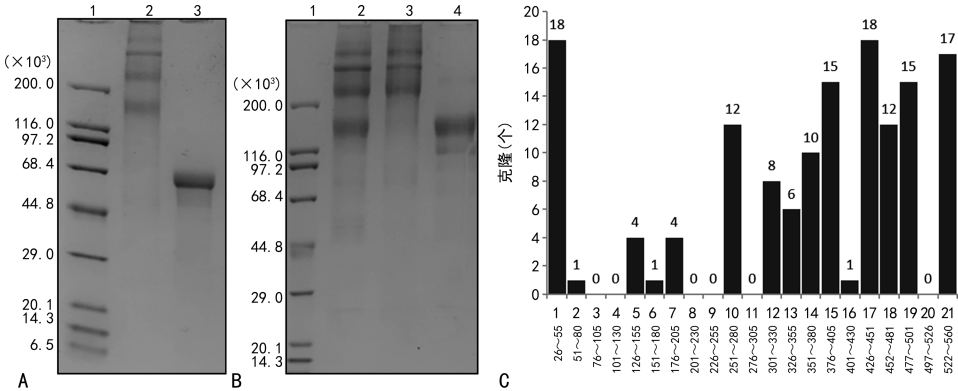
1.3.4 抗体配对及测值稳定性测试 抗体对同时检测空白对照(PBS,1% BSA)及阳性样本并计算比值(信噪比),信噪比大于 10 倍为有效配对。测试条件:1 步法,100 μL 发光试剂、50 μL 固相试剂、30 μL 样本,37 ℃ 孵育 15 min,清洗,检测并记录光度值。样本第 1 天测值记为 D₀ 并于室温(约 25 ℃)保存,72 h 后再次测试标记为 D₃。

1.3.5 补体干扰检测 C1q 从枸橼酸钠抗凝血浆中纯化,操作按照丁国英等的方法进行^[11],浓度用美康公司补体 C1q 检测试剂盒(免疫比浊法)测定。搜集 AMH 阴性样本测定 C1q 水平,分别混合大于 220 μg/mL(高),大于 170 μg/mL 且小于 220 μg/mL(中)及小于 170 μg/mL(低)的样本,各取一半混合样本 53 ℃、10 min 灭活补体。灭活及未灭活样本中均添加 10 ng/mL AMH 抗原,测试完成后灭活样本添加终浓度 300 μg/mL 的 C1q 再次测试对测值的影响。抗体 Fc 段用胃蛋白酶酶切,protein G 纯化酶切后抗体。

1.3.6 发光试剂分析性能测试 用 PBS(1% BSA)梯度稀释 AMH 抗原,罗氏 Elecsys AMH 试剂盒检测并赋值。用抗体对 260/80 配置发光试剂,选择赋值浓度在 0.1~20 ng/mL 内的 5 点作为定标点,美康 CL3080 免疫分析仪定标及检测样本。分别检测最低检测线、测值相关性、特异度。特异度检测分别测试含激活素 A(100 ng/mL)、抑制素 A(100 ng/mL)、

FSH(200 IU/L)、LH(200 IU/L)的样本,测值不高于 0.1 ng/mL 为无明显交叉。

1.4 统计学处理 测值稳定性每个测试重复 3 次计算均值及比值,比值计算:光亮值(X 天)/光亮值(0 天)×100%,≥10%为显著上升,<10%为测值稳定。分析性能测试每个检测重复 2 次并计算均值,相关性用线性方程拟合。用 SPSS26.0 软件进行统计学分析,样本测值稳定性连续检测及补体灭活、添加实验、AMH 抗原添加实验数据分析采用独立样本 *t* 检验,并验证方差齐性,自配试剂与罗氏试剂测值偏差分析采用成对样本 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。



注:A 为镍柱纯化 AMH 电泳, lane 1 表示分子 marker, lane 2 表示非还原, lane 3 表示还原(DTT); B 为分子筛纯化 AMH 电泳, lane 1 表示分子 marker, lane 2 表示过柱前, lane 3 表示组分 1(多聚体), lane 4 表示组分 2(二聚体); C 为单抗位点检测, 横轴表示多肽编号及氨基酸位点。

图 1 AMH 抗原及单抗制备

2.2 室温保存样本测值稳定的抗体对筛选 首先, 挑选抗原反应较强的 N 端及 C 端抗体各 20 个, 分别以 C(捕获)/N(检测)及 N(捕获)/C(检测)方式配对并检测样本测值稳定性。结果 C(捕获)/N(检测)方式可配对, 除了 1 对抗体 260(19)/152(14)测值稳定, 其他配对测值均显著上升。N(捕获)/C(检测)方式未获得有效配对。其次, 以 260(19)为包抗与所有 N 端抗体(检抗)配对并检测样本测值稳定性, 结果如表 1 所示。14 号位点(351~380 氨基酸)的 10 个克隆测值均稳定, 17 号位点(426~541 氨基酸)5 个克隆测值稳定, 5 个克隆显著上升。以 152(14)为检抗与所有 C 端抗体(包抗)配对并检测样本测值稳定性, 结果 19 号位点(477~501 氨基酸)2 个克隆测值稳定, 其余 13 个克隆均显著升高。N 端其他位点克隆作检抗及 C 端其他位点克隆作包抗测值均显著升高, 部分结果如表 2 所示。克隆 60(1)、133(12)同时作包抗及检抗分别与 260(19)及 152(14)配对(表 2), 两个克隆作包抗或检抗测值均显著上升。最后, 用 4 对测值稳定且信噪比较高的抗体对 260/361、260/45、260/80、260/152 及测值显著上升的抗体对 260/56、260/33(对照), 分

2 结 果

2.1 AMH 抗原及单抗制备 镍柱纯化 AMH 抗原结果如图 1A 所示, 重组表达 AMH 包含二聚体及多聚体, 还原后均变成单体。分子筛进一步纯化可分别获得多聚体及二聚体(图 1B), 二聚体组分用于免疫及克隆筛选。经过 4 次融合, 共获得单克隆 152 株, 抗体结合位点检测结果见图 1C。共获得 21 个多肽位点中 15 个位点的单克隆, 6 个位点(3、4、8、9、11、20)未获得单克隆, 3 个位点(2、6、16)仅获得 1 株单克隆。大部分单抗只结合 1 个位点, 少数可结合 2 个以上的位点(按反应较强的位点计算)。

别在样本保存第 1、3、5、7 天检测测值稳定性。结果如图 2 所示, 7 d 后(D₇)4 对抗体测值均稳定, 对照抗体分别上升至 155.5%及 181.2%, 与 D₀ 测值比较, 差异有统计学意义(*P*<0.01)。

2.3 保存样本测值升高由 AMH 构象改变而非补体干扰导致 由于补体干扰起始于 C1q 与抗体结合并激活补体系统, 灭活 AMH 阴性样本补体(图 3A)并向灭活前后样本中添加 AMH 抗原, 用测值上升的抗体对 260/295、260/60 检测补体灭活对测值的影响。结果如图 3B 所示, 灭活后 260/295 测值无明显改变, 260/60 测值下降且中、高补体样本下降超过 20.00%, 差异有统计学意义(*P*<0.05)。灭活样本中添加 C1q 再次检测, 260/295 测值没有明显改变, 260/60 测值上升至 200.00%以上, 与添加前比较差异有统计学意义(*P*<0.01)。说明 260/60 易受补体干扰导致测值升高, 可预见样本保存后补体失活其测值将下降, 而 260/295 测值基本不受补体干扰, 因此两对抗体检测室温保存样本测值升高均与补体干扰无关。

由于 C1q 结合位点在抗体 Fc 区, 切除 3 对抗体

260/295、260/49、260/60 的检抗 Fc 区(由 2.2 的结果可知 3 对抗体测值上升均由检抗所致,见图 3C)并用未酶切及酶切的抗体检测 20 份样本的测值稳定性。结果如图 3D 所示,未酶切及酶切的 295 测值平均分别上升至 209.70%、181.90%,抗体 49 及 60 测值分别上升至 132.50%、132.80%及 128.40%、129.30%,说明抗体测值上升不受 Fc 区影响,进一步证明保存样本 AMH 测值上升非补体干扰导致。

另一方面,抗体对 260/295 检测室温存放 AMH 抗原测值并不上升(99.43%),添加同样浓度的抗原至阳性样本并检测测值稳定性,未添加及添加抗原的样本光度值分别上升 267 022 及 210 788(图 3E),偏差无统计学意义($P=0.104$)。说明仅样本中天然 AMH 分子在测值上升中起作用,重组 AMH 不能引起测值上升,且证明 AMH 测值升高并非样本中干扰物如补体引起,虽然两种来源的蛋白序列一样但构象并不相同,样本测值升高与 AMH 分子构象改变有关。

表 1 测值稳定的单抗筛选

捕获抗体	检测抗体	D ₃ /D ₀ (%) ^b	捕获抗体	检测抗体	D ₃ /D ₀ (%)
260(19) ^a	48(14)	92.2 [#]	396(19)		260.1
	45(14)	89.2 [#]	397(19)		505.4
	47(14)	103.3 [#]	401(19)		193.0
	80(14)	97.5 [#]	386(19)		349.0
	144(14)	88.5 [#]	395(19)	152(14)	171.2
	152(14)	94.6 [#]	405(19)		128.7
	209(14)	102.7 [#]	406(19)		216.9
	284(14)	107.6 [#]	429(19)		113.2
	287(14)	91.6 [#]	436(19)		144.9
	309(14)	90.5 [#]	89(19)		153.5
	368(17)	102.7 [#]	164(19)		246.9
	376(17)	94.8 [#]	186(19)		243.6
	398(17)	96.3 [#]	232(19)		117.8
	361(17)	97.8 [#]	250(19)		106.5 [#]
	362(17)	101.8 [#]	260(19)		97.5 [#]
	367(17)	117.4			
	381(17)	150.5			
	383(17)	125.1			
	359(17)	117.1			
	364(17)	113.3			

注:^a 克隆编号,括号内为结合位点;^bD₃ 测值与 D₀ 测值比值(3 次检测平均值);[#] 为测值稳定克隆;—表示无数据。

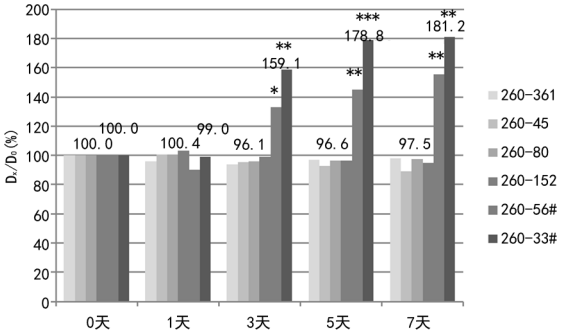
2.4 抗体对 260/80 在人 AMH 化学发光检测试剂

中的应用 选择测值稳定且信噪比较高的抗体对 260/80 进行化学发光试剂配置及分析性能测试。以空白检测限 LoB 评估,自配发光试剂的检测灵敏度达 0.08 ng/mL(表 3)。自配试剂与罗氏电化学发光试剂同时检测 60 份(0~30 ng/mL)样本,两种试剂测值有良好的相关性(图 4), $R^2=0.9979$,且测值偏差无统计学意义($P=0.264$)。用 TGF- β 家族的激活素 A、抑制素 A 及性激素 FSH、LH 检测试剂特异度,自配试剂对 4 种干扰物均无明显交叉反应(表 4)。抗体对 260/80 配置的化学发光试剂检测灵敏度、相关性、特异度均达到临床要求。

表 2 不同位点单抗的测值稳定性

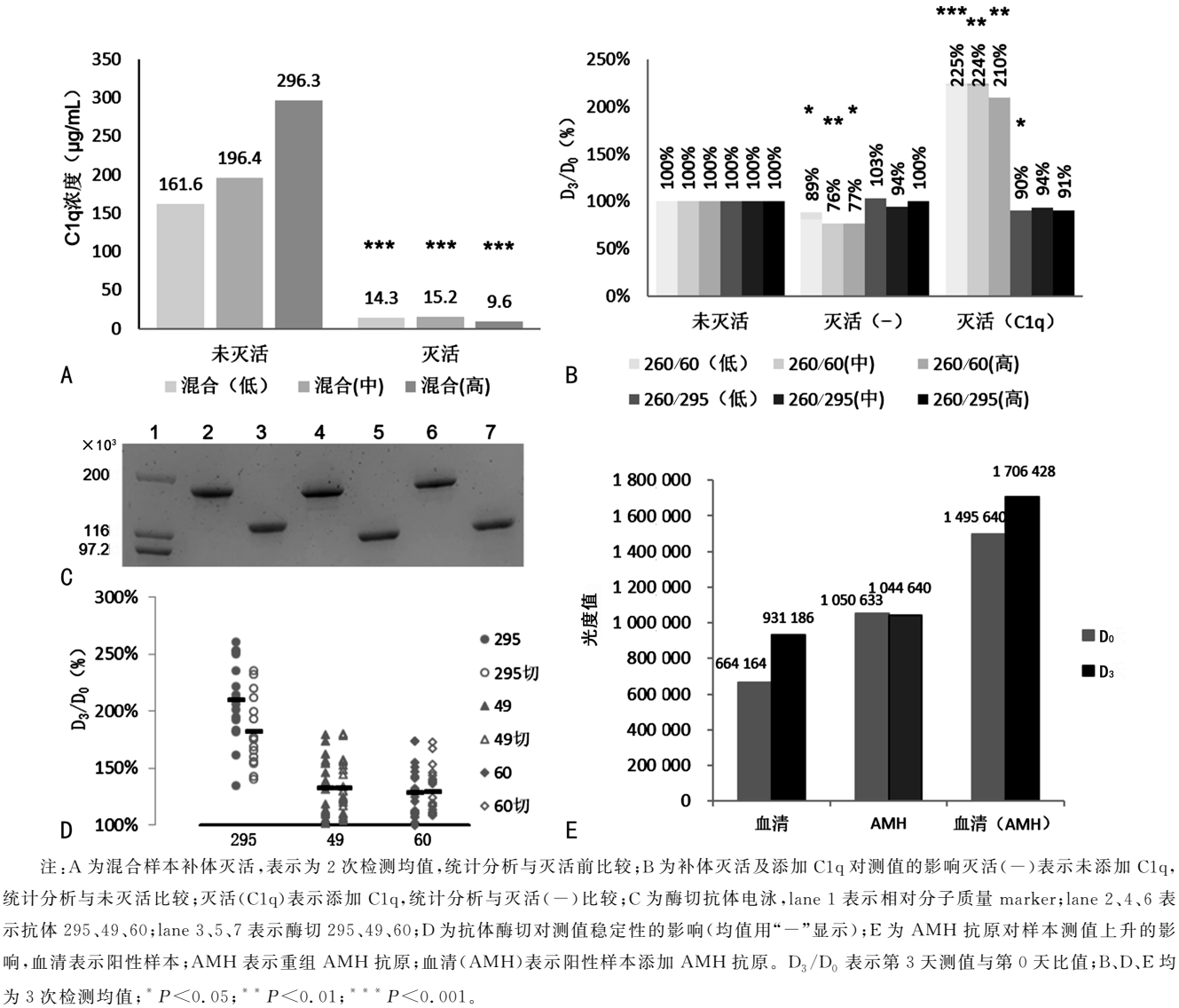
捕获抗体	检测抗体	配对方式	D ₃ /D ₀ (%) ^b
260(19) ^a	295(1)	C-N	142.3
	56(2)	C-N	131.0
	33(5)	C-N	149.9
	39(6)	C-N	132.3
	261(10)	C-N	164.3
	6(12)	C-N	152.1
	25(13)	C-N	136.8
	80(14)	C-N	97.5 [#]
	47(15)	C-N	118.2
	3(16)	C-N	168.8
396(18)	368(17)	C-N	102.7 [#]
		C-N	260.1
	152(14)	C-N	153.5
		C-N	128.7
	60(1)	C-N	124.3
	133(12)	C-N	117.5
	152(14)	N-N	113.3
		N-N	121.0

注:^a 克隆编号,括号内为结合位点;^bD₃ 测值与 D₀ 比值(3 次检测平均值);[#] 为测值稳定克隆;—表示无数据。



注:D_x 测值与 D₀ 比值(3 次检测平均值,x=1、3、5、7),260-80、260-33 测值比值标于柱状图顶端;横轴为样本室温保存时间。与 D₀ 测值比较,* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$;[#] 为对照抗体对。

图 2 抗体对测值稳定性验证 D_x/D₀ (%)



注：A 为混合样本补体灭活，表示为 2 次检测均值，统计分析与灭活前比较；B 为补体灭活及添加 C1q 对测值的影响灭活（-）表示未添加 C1q，统计分析与未灭活比较；灭活（C1q）表示添加 C1q，统计分析与灭活（-）比较；C 为酶切抗体电泳，lane 1 表示相对分子质量 marker；lane 2、4、6 表示抗体 295、49、60；lane 3、5、7 表示酶切 295、49、60；D 为抗体酶切对测值稳定性的影响（均值用“—”显示）；E 为 AMH 抗原对样本测值上升的影响，血清表示阳性样本；AMH 表示重组 AMH 抗原；血清（AMH）表示阳性样本添加 AMH 抗原。D₃/D₀ 表示第 3 天测值与第 0 天比值；B、D、E 均为 3 次检测均值；* *P* < 0.05；** *P* < 0.01；*** *P* < 0.001。

图 3 样本 AMH 测值升高原因

表 3 自配试剂检测灵敏度			
测值(ng/mL)	光度值	测值(ng/mL)	光度值
0.03	1 184	0.03	1 220
0.05	1 980	0.07	2 740
0.05	1 988	0.02	892
0.05	1 836	0.03	1 164
0.03	1 084	0.01	724
0.04	1 412	0.04	1 412
0.03	1 232	0.01	708
0.03	1 236	0.04	1 424
0.03	1 360	0.03	1 304
0.02	956	0.06	2 132
0.05	1 808	0.07	2 704
0.05	1 792	0.06	2 472
0.07	2 716		

注：测值平均值=0.04 ng/mL；标准差=0.02；空白检测值 LOB=0.08 ng/mL。

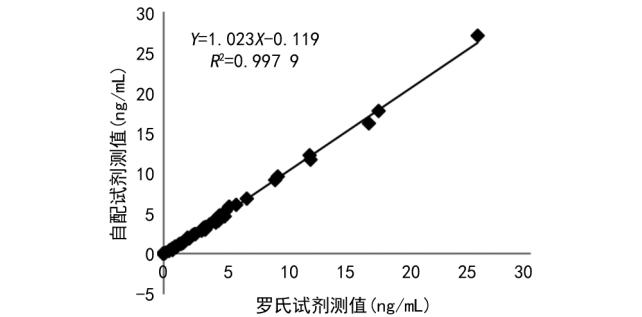


图 4 自配试剂与罗氏试剂测值相关性

表 4 自配试剂检测特异性 (ng/mL)			
干扰物	测值	干扰物	测值
Activin A(100 ng/mL)	0.003	FSH(200 IU/L)	0.003
Inhibin A(100 ng/mL)	0.010	LH(200 IU/L)	0.007

3 讨 论

AMH 主要用于女性卵巢储备及辅助生殖的诊断评估，具有广阔的应用前景。AMH Gen II 试剂一度作为该指标的参考标准。2012 年 RUSTAMOV 等^[7]

发现, AMH Gen II 试剂测值不稳定的问题, 推测样本保存中非共价结合的 N、C 端逐渐解离并暴露新的抗体结合位点。2013 年贝克曼在 AMH Gen II 试剂中增加样本稀释步骤, 认为补体干扰导致测值不稳定, 而样本稀释可以加速补体失活。随后的研究证明, 稀释样本致使 AMH 测值升高但明显改善存放样本的测值稳定性^[12-13]。自动化 AMH 检测已进入临床应用, 贝克曼 Access AMH 通过整合样本稀释步骤, 罗氏 Elecsys AMH 采用贝克曼的抗体, 其解决测值稳定性问题的方法尚不清楚^[14]。虽然样本检测及时性 & 测值稳定性都得到了较大改善, 但从上游抗体原料解决 AMH 测值稳定性问题对简化检测流程及 AMH 检测的广泛应用都具有重要意义。

本文的结果表明, 包抗和检抗均可导致样本测值升高, 切除引起测值上升抗体的 Fc 段后抗体对测值同样升高, 补体灭活及 C1q 添加试验表明 AMH 测值升高与补体无关。AMH 抗原测值并不升高与 AMH Gen II 混合质控测值稳定的结果一致, 添加至阳性样本也没有导致测值上升幅度增加^[10]。这些结果均表明 AMH 测值不稳定与其构象变化有关而非补体干扰引起。补体与抗体结合如果干扰抗原抗体结合将引起测值假性降低, 如果把包抗与检抗直接连在一起将导致测值假性升高, AMH Gen II 试剂可能属于前者, 但也可能稀释样本时 AMH 构象已经改变。样本 AMH 构象改变的机制需进一步研究, 将有利于 AMH 功能调控的阐明。

本研究获得了人 AMH 蛋白 15 个位点的单抗, 其中 14 号位点全部克隆及 17、19 号位点部分克隆用于检测室温存放样本测值稳定, 说明这 3 个位点全部或部分结构不易受 AMH 构象改变影响。有研究中并未测试所有可能的配对, 也许没有筛选出所有测值稳定的配对; 且有 6 个位点没有获得抗体, 部分位点单抗较少, 不排除这些位点的抗体也可用于 AMH 检测且不受样本保存影响。但本文的结果证明通过筛选特定位点单抗以解决 AMH 测值稳定性问题的方法是可行的。本研究采用抗体对 260/80 制备的化学发光试剂检测灵敏度、相关性、特异度均满足临床要求, 为 AMH 广泛应用于临床检测奠定了基础。

参考文献

[1] MOOLHUIJSEN L, VISSER J. Anti-Müllerian hormone and ovarian reserve; update on assessing ovarian function [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2020, 105(11): 3361-3373.

[2] ANDERSON R, CAMERON D, CLATOT F, et al. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve and premature ovarian insufficiency in children and women with cancer: a systematic review [J]. Hum Reprod Update, 2022, 28(3): 417-434.

[3] FLORIAN C, KELSEY T, MATTEO L, et al. Use of a

high-sensitivity anti-Müllerian hormone (AMH) assay to determine ovarian function after chemotherapy for early breast cancer [J]. J Clin Oncol, 2021, 39(15): 552-552.

[4] 林丽淑, 龙韵洪, 徐丽惠, 等. 抗缪勒氏管激素的结构、功能、临床应用与检测技术 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(24): 3061-3066.

[5] PANKHURST M, MCLENNAN I. Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Müllerian hormone and a complex of the NH₂- and COOH-terminal peptides [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013, 305(10): 1241-1247.

[6] REY R, LORDEREAU-RICHARD I, CAREL J, et al. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1993, 77(5): 1220-1226.

[7] RUSTAMOV O, SMITH A, ROBERTS S, et al. Anti-Müllerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability [J]. Hum Reprod, 2012, 27(10): 3085-3091.

[8] FLEMING R, FAIRBAIRN C, BLANEY C, et al. Stability of AMH measurement in blood and avoidance of proteolytic changes [J]. Reprod Biomed Online, 2013, 26(2): 130-132.

[9] HAN X, MCSHANE M, SAHERTIAN R, et al. Pre-mixing serum samples with assay buffer is a prerequisite for reproducible anti-Müllerian hormone measurement using the Beckman Coulter Gen II assay [J]. Hum Reprod, 2014, 29(5): 1042-1048.

[10] TURNER K, LARSON B, KREOFISKY N, et al. Assessment of complement interference in anti-Müllerian hormone immunoassays [J]. Clin Chem Lab Med, 2019, 58(1): e8-e10.

[11] 丁国英, 徐愤. 人血清中补体第一成份亚基的分离 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1986, 6(6): 345-348.

[12] CRACIUNAS L, ROBERTS S, YATES A, et al. Modification of the Beckman-Coulter second-generation enzyme-linked immunosorbent assay protocol improves the reliability of serum anti Müllerian hormone measurement [J]. Fertil Steril, 2015, 103(2): 554-559.

[13] BONIFACIO M, BRADLEY C, KARIA S, et al. The original beckman coulter generation II assay significantly underestimates AMH levels compared with the revised protocol [J]. J Assist Reprod Genet, 2015, 32(11): 1691-1696.

[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]. Clin Biochem, 2016, 49(16/17): 1267-1273.