



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102944673 A

(43) 申请公布日 2013.02.27

(21) 申请号 201210498639.8

(22) 申请日 2012.11.30

(71) 申请人 北京华宇亿康生物工程技术有限公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区超前路
13号2号楼三层

(72) 发明人 孟琛

(51) Int. Cl.

G01N 33/536 (2006.01)

G01N 21/82 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种用于检测血清中甘胆酸含量的试剂盒
(胶乳增强免疫比浊法)

(57) 摘要

本发明涉及胶乳增强免疫比浊法用于测定人血清中甘胆酸含量的试剂盒,具体地,提供的甘胆酸检测试剂盒包括试剂 R1、试剂 R2 和校准品,其中试剂 R1 包含反应促进剂、防腐剂、表明活性剂、稳定剂、电解质及缓冲液;试剂 R2 包含结合有抗甘胆酸抗体的胶乳颗粒、防腐剂、表面活性剂、稳定剂、电解质及缓冲液;校准品包含防腐剂、电解质、稳定剂、甘胆酸纯品及缓冲液。本发明采用多克隆抗体包被胶乳颗粒的方法保证了试剂盒的高灵敏度和宽线性范围,同时还具有准确度高、重复性好、特异性强、操作简单等优点,可用于临床常用的全自动生化分析仪。

1. 一种采用胶乳增强免疫比浊法测定血清中甘胆酸含量的试剂盒,其特征在于包含试剂 R1, R2 以及校准品,其中所述甘胆酸试剂 R1 包含电解质、促凝剂、稳定剂、表面活性剂、防腐剂及缓冲液;所述甘胆酸试剂 R2 包含甘胆酸多克隆抗体包被胶乳颗粒、电解质、稳定剂、表面活性剂、防腐剂及缓冲液;所述甘胆酸校准品包含防腐剂、电解质、稳定剂、甘胆酸纯品及缓冲液。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,该试剂盒包括:甘胆酸 R1 试剂、甘胆酸 R2 试剂盒和甘胆酸校准品,其中:所述甘胆酸 R1 试剂包含:防腐剂 0.5-1g/L、稳定剂 0.5-2g/L、表面活性剂 1-5g/L、反应促进剂 0.1-5g/L、电解质 0.3-2g/L、其余为 pH7.0-8.0 的 50mmol/L 缓冲液;所述 R2 试剂包含抗人甘胆酸的多克隆抗体包被胶乳颗粒,其中包括:0.2-3g/L 的 60-300nm 胶乳颗粒、0.5-1g/L 防腐剂、0.5-2g/L 的稳定剂、1-5g/L 的表面活性剂、0.3-2g/L 的电解质、pH6.5-7.5 的 100mmol/L 的缓冲液;所述甘胆酸校准品为甘胆酸纯品,其中包括:0.5-1g/L 防腐剂、0.5-2g/L 稳定剂、1-5g/L 的表面活性剂、0.3-2g/L 的电解质。

3. 根据权利要求 1-2 任一项所述试剂盒,其特征在于所述胶乳颗粒直径为 60-300nm。

4. 根据权利要求 1-2 任一项所述试剂盒,其特征在于所述抗甘胆酸多克隆抗体为兔抗人甘胆酸多克隆抗体或羊抗人甘胆酸多克隆抗体。

5. 根据权利要求 1-2 任一项所述的试剂盒,其特征在于所述缓冲液选自甘氨酸-氢氧化钠缓冲液、磷酸盐缓冲液或 Tris 缓冲液。

6. 根据权利要求 1-2 任一项所述试剂盒,其特征在于所述的稳定剂选自蛋白质、无机盐、金属络合剂、抗氧化剂中的一种或几种。

7. 根据权利要求 1-2 任一项所述试剂盒,其特征在于所述的表面活性剂为非离子表面活性剂,选自 Tween20、Tween40、Span40、Span80、TritonX-100 中的一种或几种。

8. 根据权利要求 1-2 任一项所述的试剂盒,其特征在于所述的电解质为钠离子或钾离子。

9. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述的反应促进剂选自聚乙二醇 2000、溴化乙二甲胺等。

10. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于所述的防腐剂选自叠氮钠、叠氮锂、苯甲酸钠、亚硝酸钠中的一种或几种。

一种用于检测血清中甘胆酸含量的试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学技术领域,具体涉及一种采用胶乳增强免疫比浊法测定人血清中甘胆酸(CG)含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 血清甘胆酸(CG)是胆酸与甘氨酸结合二次的结合型胆酸之一,在肝细胞内,胆固醇经过极其复杂的酶促反应,转变成初级胆汁酸。其中有胆酸(CA)和鹅去氧胆酸(CD-CA)。胆酸的类固醇核上有三个羟基(C3、C7、C12),侧链末端的羟基以肽键与甘氨酸结合,分子量为462U。

[0003] CG正常代谢途径为肠—肝循环,CG由肝细胞合成,经毛细胆管、胆管排入胆囊,随同胆汁进入十二指肠,帮助食物消化。95%胆酸在回肠末端重吸收,经门静脉再回肝脏,由肝细胞摄取再利用。在血清中主要以蛋白结合形式存在,溢入体循环的总量小于1%。在正常情况下,外周血中胆酸含量甚微,正常成人无论空腹或餐后,其血清CG浓度稳定在低水平。

[0004] 甘胆酸是肝脏分泌到胆汁中最大量的有机酸,进入肠腔帮助脂肪消化吸收,在回肠和结肠大部分被重吸收,经门静脉入肝脏。肝细胞能高效能地从门静脉摄取大量的甘胆酸,以致血液中的甘胆酸量小于1.9g/ml。重吸收的甘胆酸又进入肝肠循环,通过这种机制,机体能充分利用甘胆酸。一旦肝细胞病变,血中的甘胆酸浓度升高,其中急性肝炎、慢性肝炎轻度升高,肝硬变,肝癌病人显著升高。

[0005] 当肝细胞受损时,肝细胞摄取CG能力下降,致使血中CG含量增高;胆汁郁滞时,肝脏排泄胆酸发生障碍,而返流血液循环的CG含量增高,也使血CG含量增高。因此,测定血清甘胆酸(CG)是评价肝细胞功能及其肝胆系物质循环功能的敏感指标之一。

[0006] 目前已知的甘胆酸测定方法有放射免疫法(RIA)、化学发光法、酶联免疫吸附法(ELISA)法等,

放射免疫分析步骤繁琐,试剂价格昂贵,需使用配套的仪器且存在放射性污染。酶联免疫吸附法存在检测时间长、操作复杂、重复性差、不适于急诊和临床病人及时诊断的需要。胶乳增强免疫比浊法操作简单、快速、灵敏度高,可适用于自动化分析仪等优点,适合于临床样本批量检测,将为临床肝病的诊断及诊断提供强有力的支持。

发明内容

[0007] 本发明提供一种胶乳增强免疫比浊法测定人血清中甘胆酸含量的试剂盒,所述甘胆酸检测试剂盒包括:(1)甘胆酸R1试剂;(2)甘胆酸R2试剂;(3)甘胆酸校准品。

[0008] 本发明的技术方案如下

本发明的目的在于克服现有技术的不足和缺点,提供一种具有高灵敏度和宽线性范围的甘胆酸含量检测试剂盒,同时具有准确、自动化检测,适于临床样本大量检测等优点。所述甘胆酸检测试剂盒包括试剂R1、试剂R2和校准品,其中:

试剂 R1, 提供了试剂的反应环境、控制反应达到终点的时间和速率, 为了保证试剂的稳定性和反应活性及使抗原位点充分暴露, 试剂中包含电解质、促凝剂、稳定剂、表面活性剂、防腐剂及缓冲液。

[0009] 试剂 R2 是一种含有抗甘胆酸的多克隆抗体包被胶乳颗粒的均一的乳白色液体, 包含抗人甘胆酸多克隆抗体包被胶乳颗粒、电解质、稳定剂、表面活性剂、防腐剂及缓冲液。其中乳胶颗粒直径为 60-300nm。

[0010] 甘胆酸校准品, 用于与样本比较进行结果计算, 包括防腐剂、电解质、稳定剂、甘胆酸抗原及缓冲液。

[0011] 本发明所述试剂盒的试剂 R1 是一种使样本中甘胆酸特异地抗原位点充分暴露, 有利于与抗甘胆酸抗体充分结合的试剂。其中包括: 防腐剂 0.5-1g/L、稳定剂 0.5-2g/L、表面活性剂 1-5g/L、反应促进剂 0.1-5g/L、电解质 0.3-2g/L、其余为 pH7.0-8.0 的 50mmol/L 缓冲液。

[0012] 本说明所述试剂盒的试剂 R2 包含有兔抗人甘胆酸多克隆抗体的致敏胶乳颗粒, 可特异性识别并结合血清中甘胆酸抗原, 其中包括: 0.2-3g/L 的 60-300nm 胶乳颗粒、0.5-1g/L 防腐剂、0.5-2g/L 的稳定剂、1-5g/L 的表面活性剂、0.3-2g/L 的电解质、pH6.5-7.5 的 100mmol/L 的缓冲液。

[0013] 本发明所述的甘胆酸校准品, 用来做标准曲线, 对测定结果计算, 包括 0.5-1g/L 防腐剂、0.5-2g/L 稳定剂、1-5g/L 的表面活性剂、0.3-2g/L 的电解质, 使用时用生理盐水稀释成多个不同浓度梯度作为参考校准品。

[0014] 本发明所使用的兔抗人甘胆酸多克隆抗体, 通过外购获得。

[0015] 本发明所述试剂盒的试剂 R2 中胶乳颗粒与抗甘胆酸多克隆抗体结合通过化学交联法制备, 稳定性好, 在 2-8 度可以保存 12 个月。而采用物理吸附法的胶乳抗体试剂, 批间差异太大, 而且稳定性不好。

[0016] 本发明中所使用的反应促进剂可以使聚乙二醇 2000、溴化乙二甲胺等。

[0017] 本发明中所使用的电解质为钠离子或钾离子。

[0018] 本发明中所使用的缓冲液可以是甘氨酸-氢氧化钠缓冲液、磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液, 优选 Tris 缓冲液。

[0019] 本发明中所使用的防腐剂选自叠氮钠、叠氮锂、苯甲酸钠、亚硝酸钠中的一种或几种。

[0020] 本发明中所使用的表面活性剂为非离子型表面活性剂, 可以是 Tween20、Tween40、Span40、Span80、TritonX-100 中的一种或几种。

[0021] 本发明中所使用的稳定剂选自蛋白质、无机盐、金属络合剂、抗氧化剂中的一种或几种。所述的蛋白质为牛血清白蛋白。所述的无机盐选自氯化钠或氯化钾, 所述的络合剂为 EDTA; 所述的助悬剂选自乙二醇、丙三醇、蔗糖、麦芽糖中的一种或几种; 所述抗氧化剂选自 2,6-二叔丁基对甲酚、叔丁基羟基茴香醚、没食子酸丙酯中的一种或几种。

[0022] 本发明采用胶乳增强免疫比浊法, 开发出可检测血清中甘胆酸的试剂。胶乳增强免疫比浊法的反应原理是: 包被了高特异性抗体的胶乳颗粒, 与样本中相应的甘胆酸抗原发生特异性结合, 形成不溶性的抗原-抗体-胶乳颗粒复合物, 产生一定的浊度, 其浊度的高低与样本中的甘胆酸浓度成正比, 在一定波长下进行浊度测定, 即可测定样本中被检测

甘胆酸的含量。

[0023] 本发明中,选取的检测波长为 450nm。

[0024] 采用本发明所述的试剂盒测定血清中的甘胆酸时,先将样本与 R1 混匀后 37℃ 孵育 5 分钟,然后加入试剂 R2,混匀 1 分钟后读取吸光度 A_1 ,5 分钟后读取各管吸光度 A_2 ,计算吸光度差值,根据校准曲线得到样本中甘胆酸的含量。

[0025] 本发明采用数学模型 Logit-log(4p) 或 Spline 计算模式,绘制标准曲线。

[0026] 本发明试剂盒与市售的甘胆酸检测试剂盒相比,检测结果无显著差异,检测结果可靠,大大缩短了检测时间,适于临床批量检测。

[0027] 本发明所述的试剂盒,用于测定血清或尿液中抗体,与现有技术相比,具有特异性好、灵敏度高、准确性好、线性范围宽、适用于全自动生化分析仪等优点。

附图说明

[0028] 图 1 所示是本发明试剂盒与对照试剂盒检测结果相关性比较。

[0029] 图 2 所示是本发明试剂盒线性范围实验,回归方程。

具体实施方式

[0030] 实施例 1

胶乳增强免疫比浊法测定血清中甘胆酸的试剂盒：

试剂盒主要成分及浓度如下：

试剂 R1：

Tris 缓冲液	50mmol/L	pH7.2
叠氮钠	0.8g/L	
牛血清白蛋白	1.5g/L	
TritonX-100	2g/L	
聚乙二醇 2000	0.5g/L	
NaCl	0.8g/L	

试剂 R2：

Tris 缓冲液	100mmol/L	pH7.5
叠氮钠	0.5g/L	
牛血清白蛋白	2g/L	
Tween20	1.5g/L	
溴化乙二甲胺	0.8g/L	
NaCl	1g/L	

包被有兔抗人甘胆酸多克隆致敏的胶乳颗粒,胶乳粒径 :200nm,胶乳浓度 0.5%

甘胆酸校准品：

Tris 缓冲液	30mmol/L	pH7.0
叠氮钠	0.4g/L	
牛血清白蛋白	0.5g/L	
NaCl	0.6g/L	

按照需要的甘胆酸参考校准品浓度将相应的甘胆酸纯品分别加入上述缓冲液,制备得浓度为:0.5mg/L、5mg/L、10mg/L、20mg/L、40mg/L、80mg/L的多浓度甘胆酸校准品。

[0031] 二、试剂盒测定方法

分析方法:两点终点法

反应方向:上升反应

校准方式:logit-log(4p)

测定波长:450nm

测定温度:37℃

样本:R1 :R2= 5 :200 :50(u1)

操作步骤:将 200u1 试剂 R1 加入 5u1 样本,37℃ 孵育 5 分钟后加入 50u1 试剂 R2,1 分钟后读取吸光度 A1,3 分钟后读取吸光度 A2。

[0032] 采用 6 点定标法,用日立 7020 全自动生化分析仪进行检测,校准品浓度分别为:0.5mg/L、5mg/L、10mg/L、20mg/L、40mg/L、80mg/L

实施例 2

胶乳增强免疫比浊法测定血清中甘胆酸的试剂盒:

一、试剂盒主要成分及浓度如下:

试剂 R1:

Tris 缓冲液 50mmol/L pH8.0

叠氮钠 1.2g/L

牛血清白蛋白 2.0g/L

Span80 2g/L

聚乙二醇 2000 0.5g/L

NaCl 1.5g/L

试剂 R2:

Tris 缓冲液 100mmol/L pH7.5

叠氮钠 0.5g/L

牛血清白蛋白 1g/L

Span80 1.2g/L

溴化乙二甲胺 0.8g/L

NaCl 1g/L

包被有兔抗人甘胆酸多克隆致敏的胶乳颗粒,胶乳粒径:200nm,胶乳浓度 0.5%

甘胆酸校准品:

Tris 缓冲液 30mmol/L pH7.0

叠氮钠 0.4g/L

牛血清白蛋白 0.5g/L

NaCl 0.6g/L

按照需要的甘胆酸参考校准品浓度将相应的甘胆酸纯品分别加入上述缓冲液,制备得浓度为:0mg/L、4mg/L、8mg/L、16mg/L、32mg/L、64mg/L的多浓度甘胆酸校准品。

[0033] 二、试剂盒测定方法

分析方法:两点终点法

反应方向:上升反应

校准方式:logit-log(4p)

测定波长:450nm

测定温度:37℃

样本:R1 :R2= 5 :200 :50(u1)

操作步骤:将 200u1 试剂 R1 加入 5u1 样本,37℃ 孵育 5 分钟后加入 50u1 试剂 R2,1 分钟后读取吸光度 A1,3 分钟后读取吸光度 A2。

[0034] 采用 6 点定标法,用日立 7020 全自动生化分析仪进行检测,校准品浓度分别为:0mg/L、4mg/L、8mg/L、16mg/L、32mg/L、64mg/L

实施例 3:甘胆酸试剂盒性能评价

一、线性相关性

将实施例 1 配制的本发明是试剂盒与市售甘胆酸 ELISA 检测试剂盒 A,同时检测 46 份血清样本,比较本发明试剂盒与市售 ELSIA 检测试剂盒检测结果的相关性。(结果见图 1, X, Y 轴均为测定值,单位 mg/L。)相关系数 $r=0.9946$,线性回归方程为: $y=0.9854x+0.0623$,结果表明发明试剂与酶联免疫试剂盒检测结果相关性较好。实验数据如表 1 所示,回归方程见附图 1。

[0035] 表 1

样本编号	试剂盒 1	试剂盒 A	样本编号	试剂盒 1	试剂盒 A
1	1.68	1.72	26	2.44	2.39
2	2.51	2.59	27	0.24	0.21
3	2.61	2.79	28	1.06	1.05
4	0.20	0.19	29	19.19	18.96
5	1.23	1.11	30	0.64	0.68
6	9.53	8.55	31	0.52	0.58
7	2.88	2.60	32	0.49	0.53
8	0.49	0.57	33	9.32	8.74
9	6.99	7.63	34	1.12	1.05
10	1.02	0.88	35	9.47	10.36
11	0.39	0.43	36	1.90	2.07
12	0.88	0.76	37	17.96	15.46
13	4.25	3.86	38	2.36	2.64
14	0.15	0.18	39	2.60	2.89
15	2.83	2.47	40	7.06	8.00
16	0.51	0.54	41	1.18	1.11
17	19.74	20.62	42	1.46	1.40
18	2.69	2.49	43	2.15	2.17
19	1.73	1.94	44	8.82	9.77
20	16.26	16.08	45	1.23	1.17
21	2.97	3.02	46	6.18	6.69
22	0.93	0.84	47	1.13	1.14
23	2.88	2.59	48	4.72	5.01
24	6.69	7.31	49	2.20	2.20
25	1.34	1.17	50	0.88	0.82

二、线性范围实验

用甘胆酸纯品配制成浓度 100mg/L 的高值样本,用生理盐水分别稀释成 100mg/L、

80mg/L、60mg/L、40mg/L、20mg/L、10mg/L、5mg/L、2.5 mg/L、1.25 mg/L、0.5 mg/L、0 mg/L (水)。按照试剂盒各自的检测方法,每个样本重复测定三次,求出测定结果的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以测定结果均值(y_i)为因变量求出线性回归方程,计算线性回归的相关系数(r)。以稀释浓度(x_i)代入求出线性回归方程,计算 y_i 的估计值及 y_i 与估计值的相对偏差。结果表明本发明试剂盒线性范围可达 100mg/L, y_i 的估计值及 y_i 与估计值的相对偏差均小于 10%。见表 2

表 2

试剂盒 1(理论值)	1	2	3	平均值 (y_i)	估计值 (y_i)	相对偏差(%)
100	96.50	102.70	102.75	100.65	99.96	0.7
80	79.92	82.82	76.46	79.74	79.98	0.3
60	58.55	57.17	60.01	58.58	60.00	2.4
40	40.85	40.84	40.27	40.65	40.02	1.6
20	20.80	20.84	20.21	20.62	20.04	2.9
10	9.93	10.49	9.76	10.06	10.05	0.1
5	4.92	4.89	5.16	4.99	5.05	1.2
2.5	2.44	2.55	2.55	2.52	2.55	1.5
1.25	1.28	1.30	1.23	1.27	1.31	2.9
0.5	0.50	0.52	0.51	0.51	0.56	8.5
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.0

三 准确度

取具有溯源性的血清高值质控和低值质控各一份,用发明试剂盒进行检测三次,求均值,与质控靶值进行对照。结果表明,检测结果均值接近靶值,相对偏差较小,准确度较好。结果见表 3。

[0036]

表 3

样本	低值质控 靶值 (1.52)	高值质控 靶值 (8.52)
1	1.49	8.45
2	1.56	8.65
3	1.54	8.59
均值	1.53	8.56
相对偏差	0.6%	0.4%

四 精密度

选取低值血清样本和高值血清样本各一份,使用试剂盒对同一份血清样本连续测定 10 次,计算试剂盒检测样本的变异系数。精密度实验数据如表 4 所示:检测结果表明,发明试剂盒检测高值、低值样本变异系数分别为:3.23%、3.22%,精密度较好。数据见表 4

表 4

样本编号	低值	高值
1	2.8	13.5
2	2.7	13.0

3	2.5	12.2
4	2.6	12.8
5	2.7	13.4
6	2.6	12.8
7	2.8	13.6
8	2.6	12.9
9	2.6	12.9
10	2.8	13.6
平均值	2.7	13.1
标准差	0.09	0.42
CV%	3.23	3.22

五 灵敏度

以水作为空白样本,取一份甘胆酸血清样本做倍比稀释,组成浓度分别为 0mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、1 mg/ml、2 mg/ml、4mg/L 的甘胆酸系列检测样品。所有样品做 10 次批内重复测定。计算吸光度均值和标准差,以检测低限加 3 倍检测限样品标准差的方式,确定检测系统可定量报告分析物的最低浓度。结果表明发明试剂盒的检测低限为 :0.13mg/L。灵敏度检测结果如表 3。空白组的吸光度均值 A_0 为 0.102,标准差 S_0 为 0.012,采用 99.7% 的估计值来估算检测底限。有 99.7% 的可能性出现的空白吸光度可高到 $0.102+3 \times 0.012=0.138$ 。结果表明该试剂盒的检测灵敏度 $3 \times 0.102 / (0.174-0.102) \times 0.2=0.10\text{mg/L}$ 。结果见表 5

甘胆酸 (mg/L)	0	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2
检测吸光度 (A)	0.115	0.149	0.206	0.251	0.312	0.358
	0.089	0.156	0.174	0.194	0.258	0.364
	0.095	0.223	0.207	0.223	0.266	0.332
	0.115	0.161	0.239	0.214	0.264	0.421
	0.095	0.145	0.217	0.251	0.321	0.393
	0.115	0.203	0.184	0.245	0.318	0.387
	0.088	0.197	0.215	0.221	0.287	0.421
	0.106	0.154	0.165	0.191	0.229	0.385
	0.087	0.198	0.234	0.217	0.254	0.401
0.110	0.156	0.219	0.203	0.310	0.410	
平均值	0.102	0.174	0.206	0.221	0.282	0.387
标准差	0.012	0.028	0.025	0.022	0.032	0.029

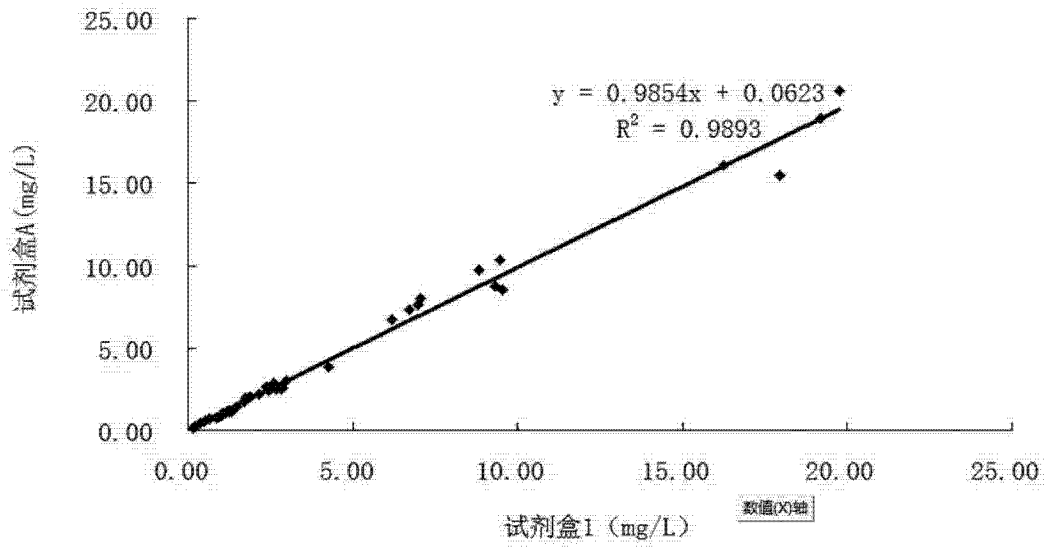


图 1

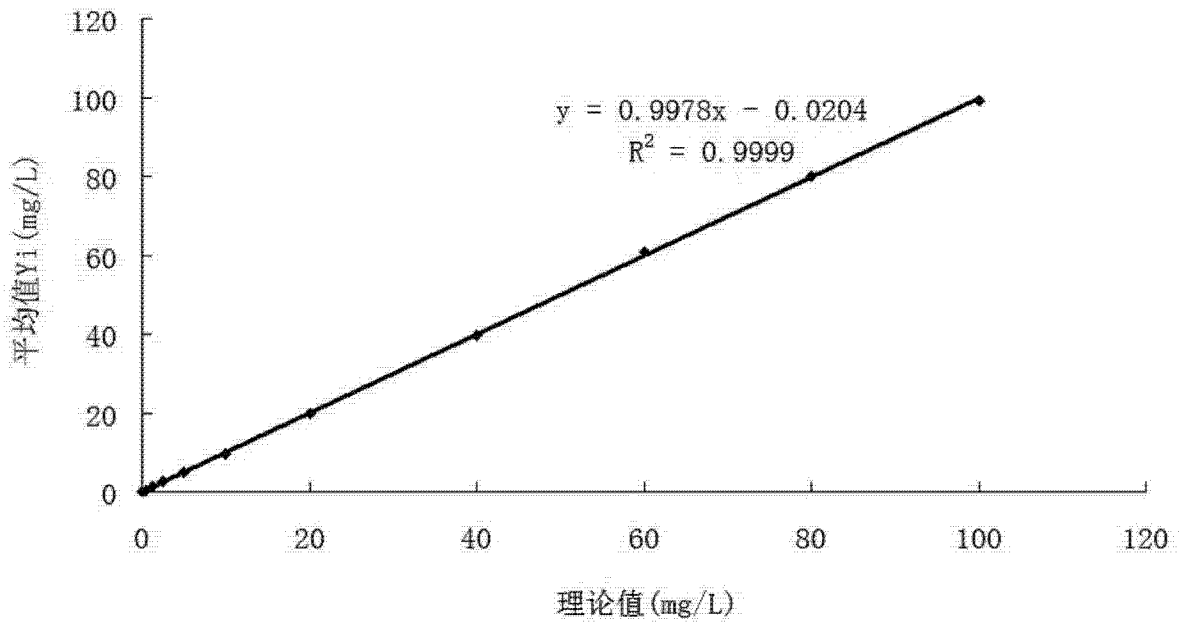


图 2

专利名称(译)	一种用于检测血清中甘胆酸含量的试剂盒(胶乳增强免疫比浊法)		
公开(公告)号	CN102944673A	公开(公告)日	2013-02-27
申请号	CN201210498639.8	申请日	2012-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	北京华宇亿康生物工程技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京华宇亿康生物工程技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京华宇亿康生物工程技术有限公司		
[标]发明人	孟琛		
发明人	孟琛		
IPC分类号	G01N33/536 G01N21/82		
其他公开文献	CN102944673B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及胶乳增强免疫比浊法用于测定人血清中甘胆酸含量的试剂盒，具体地，提供的甘胆酸检测试剂盒包括试剂R1、试剂R2和校准品，其中试剂R1包含反应促进剂、防腐剂、表明活性剂、稳定剂、电解质及缓冲液；试剂R2包含结合有抗甘胆酸抗体的胶乳颗粒、防腐剂、表面活性剂、稳定剂、电解质及缓冲液；校准品包含防腐剂、电解质、稳定剂、甘胆酸纯品及缓冲液。本发明采用多克隆抗体包被胶乳颗粒的方法保证了试剂盒的高灵敏度和宽线性范围，同时还具有准确度高、重复性好、特异性强、操作简单等优点，可用于临床常用的全自动生化分析仪。

