



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107796937 A

(43)申请公布日 2018.03.13

(21)申请号 201710794610.7

(22)申请日 2017.09.06

(66)本国优先权数据

201710289772.5 2017.04.27 CN

(71)申请人 广东工业大学

地址 510062 广东省广州市越秀区东风东
路729号

(72)发明人 赵肃清 沈定 崔锡平 陈莹珊
何绮怡 吕瑞

(74)专利代理机构 广东广信君达律师事务所
44329

代理人 张燕玲 杨晓松

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分
析方法及其应用

(57)摘要

本发明属于免疫分析技术检测领域,公开了一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法。该方法包括:将荧光示踪物与已知不同浓度的甘胆酸标准品溶液混合,再加入甘胆酸多克隆抗体溶液混合孵育进行竞争反应,测得该体系的荧光偏振值;将测得的荧光偏振值与空白组的荧光偏振值的比值即为抑制率,以抑制率为纵坐标,已知甘胆酸标准品的浓度为横坐标,绘制标准曲线;以待测样品代替已知浓度的甘胆酸标准品,在相同条件下,测得孵育后体系的荧光偏振值,再根据标准曲线,计算得到该待测样品中甘胆酸的浓度。该方法与ELISA甘胆酸试剂盒进行对比,结果表明这两种方法有较好的相似性。交叉反应结果表明该多克隆抗体对甘胆酸具有很高的特异性。

1. 一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 将荧光示踪物与一系列已知浓度的甘胆酸标准品溶液混合,再加入甘胆酸多克隆抗体溶液混合孵育进行竞争反应,测得该体系的荧光偏振值;将测得的荧光偏振值 mP 与空白组的荧光偏振值 mP_0 的比值即为抑制率,以抑制率 mP/mP_0 为纵坐标,已知甘胆酸标准品的浓度为横坐标,绘制标准曲线; $y=0.80675/[1+(x/682.21468)^{0.96872}]+0.1536$;

(2) 将荧光示踪物与待测样品混合,再加入甘胆酸多克隆抗体溶液混合孵育进行竞争反应,测得该体系的荧光偏振值,再根据标准曲线,计算得到该待测样品中甘胆酸的浓度。

2. 根据权利要求1所述的一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:步骤(1)所述荧光示踪物为甘胆酸半抗原与荧光素的偶联物:

所述甘胆酸半抗原是由胆酸与4-氨基丁酸反应生成的N-(3,7,12-三羟基-24-羰基胆烷-24-基)-丁氨酸作为甘胆酸半抗原;

所述荧光素为异硫氰酸荧光素乙二胺。

3. 根据权利要求1所述的一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:步骤(1)所述甘胆酸多克隆抗体的具体制备过程是按照申请号为201610727381.2的中国专利申请中所记载的步骤进行制备的。

4. 根据权利要求1所述的一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:步骤(1)所述一系列已知浓度的甘胆酸标准品溶液的溶质为甘胆酸标准品,溶剂为磷酸盐缓冲溶液;

所述磷酸盐缓冲溶液中, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 的摩尔质量为1-8mmol/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 的摩尔质量为8-15mmol/L,氯化钠的摩尔质量为10-20mmol/L,pH值为7.0-8.5;

所述一系列已知浓度为 10^6 ng/mL, 10^5 ng/mL, 10^4 ng/mL, 10^3 ng/mL,100ng/mL,10ng/mL和1ng/mL共7个梯度浓度。

5. 根据权利要求1所述的一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:步骤(1)所述荧光示踪物的工作浓度是以10-15倍空白溶液的偏振光强度作为其工作浓度,空白溶液选用硼酸盐缓冲液;

所述硼酸盐缓冲溶液中,硼酸钠的摩尔质量为4-30mmol/L,氯化钠的摩尔质量为1-10mmol/L,pH值为7.0-9.0。

6. 根据权利要求1所述的一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:步骤(1)所述甘胆酸多克隆抗体的稀释度为1:1000-1:3000。

7. 根据权利要求1所述的一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:步骤(1)所述加入荧光示踪物的体积,甘胆酸标准品溶液的体积,甘胆酸多克隆抗体溶液的体积分别为400-500 μ L,10-50 μ L,400-500 μ L;所述孵育时间为1-8min,竞争反应温度为20-30 $^{\circ}$ C。

8. 根据权利要求1所述的一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:步骤(2)所述加入荧光示踪物的体积,待测样品的体积,甘胆酸多克隆抗体溶液的体积分别为400-500 μ L,10-50 μ L,400-500 μ L;所述孵育时间为1-8min,竞争反应温度为20-30 $^{\circ}$ C。

9. 根据权利要求1所述的一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,其特征在于:步骤(2)所述待测样品为人血清。

10. 根据权利要求1所述的一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法在检测肝

炎患者血清和健康人血清中的应用。

一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术检测领域,具体涉及一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法及其应用。

背景技术

[0002] 甘胆酸是由胆酸和甘氨酸结合而成的结合型胆酸,是胆汁酸的主要成分之一。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,包含胆酸(CA)和鹅去氧胆酸(CDCA),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成为甘胆酸,分子量为466.3。甘胆酸由肝细胞合成后,经毛细胆管、胆管排入胆囊,随同胆汁进入十二指肠,帮助食物中脂肪的消化吸收。大部分胆汁酸在回肠和结肠被重吸收,经门静脉再回肝脏,由肝细胞摄取再利用,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。在正常情况下,外周血中甘胆酸含量甚微,正常人无论空腹或餐后,其甘胆酸浓度都稳定在低水平。当人体肝细胞受损或胆汁淤滞时,就会引起甘胆酸代谢和循环紊乱,使肝细胞摄取甘胆酸的能力下降,导致血液中甘胆酸含量升高,且甘胆酸含量的高低与肝细胞损害及胆汁酸代谢障碍的严重程度相关。有实验数据显示急性肝炎、原发性肝癌、肝硬化等患者血清中甘胆酸含量均明显高于正常人,且呈递性增高。甘胆酸含量还是反映多种胆道系统疾病、孕妇妊娠期肝内胆汁淤积症、酒精性肝损害等的重要指标。因此,甘胆酸检测作为一项重要的临床检验项目,可为多种疾病的临床诊断、治疗、疗效评价以及预后评估提供重要依据,应用和推广前景巨大。

[0003] 目前关于甘胆酸的检测方法主要是仪器方法,如高效液相-串联质谱法以及超高效液相色谱质谱方法,这些方法需要大型仪器和复杂的样品前处理;另一方面是免疫法,主要包括放射免疫法(RIA)、化学发光免疫法及免疫透射比浊法。虽然这些方法准确度高、重复性好,适用于定量检测等优点,但是这些检测技术操作复杂,大多是非均相的反应体系,需要多次孵育和洗涤,耗时长、成本高,不能满足高通量快速检测的要求;仪器设备价格昂贵、操作步骤流程多、耗时长等缺点,不利于常规实验室开展,临床应用局限性明显。

[0004] 免疫荧光技术是用化学方法使荧光素标记的抗体(或抗原)与组织或细胞中的相应抗原(或抗体)结合,进行定性定位检查抗原或抗体的方法。该方法具有高特异性、灵敏性、便捷等优点,被广泛的运用在小分子检测领域。

[0005] 荧光偏振免疫分析方法(FPIA)是一种简单、快速、高效和可靠的分析技术,体系完全在均相溶液内完成反应,不需要分离和洗涤操作,具有灵敏度高、特异性强、操作简单、成本低廉、易于自动化的高通量筛选等优点,逐渐成为临床,食品和环境等领域中小分子检测分析的常用技术。而且,血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法还未见报道,具有广阔的开发价值。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术中甘胆酸免疫检测技术,操作复杂、耗时长的缺点与不足,本发

明的首要目的在于提供一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法。该方法整个检测过程只需要一步竞争反应,操作简单,高效简便。

[0007] 本发明的目的在于提供一种上述检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法的应用。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0009] 一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 将荧光示踪物与一系列已知浓度的甘胆酸标准品溶液混合,再加入甘胆酸多克隆抗体溶液混合孵育进行竞争反应,测得该体系的荧光偏振值;将测得的荧光偏振值 mP 与空白组的荧光偏振值 mP_0 的比值即为抑制率,以抑制率 mP/mP_0 为纵坐标,已知甘胆酸标准品的浓度为横坐标,绘制标准曲线: $y=0.80675/[1+(x/682.21468)^{0.96872}]+0.1536$;

[0011] (2) 将荧光示踪物与待测样品混合,再加入甘胆酸多克隆抗体溶液混合孵育进行竞争反应,测得该体系的荧光偏振值,再根据标准曲线,计算得到该待测样品中甘胆酸的浓度。

[0012] 步骤(1)所述荧光示踪物为甘胆酸半抗原与荧光素的偶联物:

[0013] 所述甘胆酸半抗原是由胆酸与4-氨基丁酸反应生成的N-(3,7,12-三羟基-24-羰基胆烷-24-基)-丁氨酸作为甘胆酸半抗原;

[0014] 所述荧光素为异硫氰酸荧光素乙二胺(EDF)。

[0015] 步骤(1)所述甘胆酸多克隆抗体的具体制备过程是按照申请号为201610727381.2的中国专利申请中所记载的步骤进行制备的。

[0016] 步骤(1)所述一系列已知浓度的甘胆酸标准品溶液的溶质为甘胆酸标准品,溶剂为磷酸盐缓冲溶液;

[0017] 所述磷酸盐缓冲溶液中, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 的摩尔质量为1-8mmol/L, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 的摩尔质量为8-15mmol/L,氯化钠的摩尔质量为10-20mmol/L,pH值为7.0-8.5;

[0018] 所述一系列已知浓度为 10^6 ng/mL, 10^5 ng/mL, 10^4 ng/mL, 10^3 ng/mL,100ng/mL,10ng/mL和1ng/mL共7个梯度浓度。

[0019] 步骤(1)所述荧光示踪物的工作浓度是以10-15倍空白溶液的偏振光强度作为其工作浓度,空白溶液选用硼酸盐缓冲液;

[0020] 所述硼酸盐缓冲溶液中,硼酸钠的摩尔质量为4-30mmol/L,氯化钠的摩尔质量为1-10mmol/L,pH值为7.0-9.0。

[0021] 步骤(1)所述甘胆酸多克隆抗体的稀释度为1:1000-1:3000。

[0022] 步骤(1)所述加入荧光示踪物的体积,甘胆酸标准品溶液的体积,甘胆酸多克隆抗体溶液的体积分别为400-500 μ L,10-50 μ L,400-500 μ L;所述孵育时间为1-8min,竞争反应温度为20-30 $^{\circ}$ C。

[0023] 步骤(2)所述加入荧光示踪物的体积,待测样品的体积,甘胆酸多克隆抗体溶液的体积分别为400-500 μ L,10-50 μ L,400-500 μ L;所述孵育时间为1-8min,竞争反应温度为20-30 $^{\circ}$ C。

[0024] 步骤(2)所述待测样品为人血清。

[0025] 上述检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法可应用于检测肝炎患者血清和健康人血清。

[0026] 本发明检测结果表明：肝炎患者血清中甘胆酸的含量远远大于健康人血清中甘胆酸的含量，其阳性率为96.9%，所以甘胆酸可作为肝炎的一个临床检测指标。

[0027] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：本发明提供了一种均相的，高特异性，简便快速的甘胆酸荧光偏振免疫分析方法；该方法在缓冲溶液中标准曲线的检测范围为 $0.2-2.8\mu\text{g mL}^{-1}$ ， $1C_{50}$ 值是 $0.68\mu\text{g mL}^{-1}$ ， $R^2=0.9984$ ；该方法与ELISA甘胆酸试剂盒进行对比，结果表明这两种方法有较好的相似性，表明该方法是可靠而准确的；交叉反应结果表明该多克隆抗体对甘胆酸具有很高的特异性；本发明检测结果表明：肝炎患者血清中甘胆酸的含量远远大于健康人血清中甘胆酸的含量，甘胆酸可以作为肝炎的一个临床检测指标；该方法快速、简便高通量，而且能够满足甘胆酸的检测限量要求，十分适合血清中甘胆酸的检测需要。

附图说明

[0028] 图1为三种荧光示踪物与甘胆酸多克隆抗体结合的荧光强度图。

[0029] 图2为甘胆酸多克隆抗体的稀释曲线图。

[0030] 图3为甘胆酸荧光偏振免疫标准曲线图。

[0031] 图4为荧光偏振免疫分析法检测样品中甘胆酸的含量图。

[0032] 图5为荧光偏振免疫分析方法与ELISA试剂盒的对比图。

具体实施方式

[0033] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

[0034] 下述实施例中所用的试验方法如没有特殊说明，均为常规方法；下述实施例中所用的试剂，生物材料等，如没有特殊说明，均可从商业途径获得。

[0035] 下述实施例中所使用的荧光偏振检测器是便携式荧光偏振仪 (SENTARY200)，甘胆酸多克隆抗体的具体制备过程是按照申请号为201610727381.2的中国专利申请中所记载的甘氨胆酸多克隆抗体的制备步骤进行制备的。

[0036] 实施例1. 基于改造后甘胆酸半抗原的荧光示踪物的制备。

[0037] 步骤1. 荧光素EDF的合成

[0038] 先配制20ml 甲醇三乙胺溶液，其中三乙胺浓度为10ml/L；将70ul 乙二胺和35.1mg F1TC 荧光素分别溶于15ml 甲醇三乙胺溶液和3ml 甲醇三乙胺溶液中；将含有F1TC的溶液逐渐滴加到乙二胺的三乙胺溶液中，常温避光搅拌5h，最后把反应液过滤，再反复用甲醇冲洗滤纸，待滤纸干了，把滤纸上的红黄色固体刮下来，得到荧光素EDF。

[0039] 步骤2. 甘胆酸半抗原的改造

[0040] 称取1.5g 胆酸加到50ml 烧瓶中，依次向其中加入3ml 无水的四氢呋喃，509ul 三乙胺和464ul 氯甲酸异丁酯，室温搅拌30min，待溶液变澄清后，再加入379mg 4-氨基丁酸，继续室温搅拌反应3天。反应完成后，加入少量的去离子水，减压旋转蒸发除去四氢呋喃，然后用盐酸调节溶液的pH至酸性，加入大量的乙酸乙酯进行多次萃取，按照少量多次的原则，收集乙酸乙酯层，减压旋转蒸发得到粗产品。最后以二氯甲烷：甲醇：乙酸=10:1:0.01为展开剂将上述粗产品通过硅胶柱进行分离提纯，得到甘胆酸半抗原。

[0041] 步骤3. 荧光示踪物的合成

[0042] 称取2mg甘胆酸半抗原加到500u1含有1mgN-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和2mg二环己基碳二亚胺(DCC)的DMF溶液中, 常温避光搅拌过夜; 取200u1上述溶液加入1mgEDF, 常温避光搅拌3h; 取40u1上述反应液用薄层色谱法(TLC)分离, 展开剂为CHCl₃, 刮下硅胶板上Rf=0.82,, 0.58, 0.36的三条黄色带, 分别用300u1甲醇洗脱, 得到三种荧光示踪物。

[0043] 实施例2. 最佳荧光示踪物的筛选

[0044] 分别将上述合成的三种荧光示踪物与同一浓度的甘胆酸多克隆抗体进行组合, 首先将三种荧光示踪物的工作浓度设定为荧光强度是缓冲溶液的荧光强度的10倍时对应的荧光示踪物的浓度, 再将示踪物和抗体各500u1混合均匀, 测量荧光强度的最大变化值 δmP , 其中Rf=0.36的示踪物与抗体结合的荧光强度变化值最大, 所以, 选定Rf=0.36的示踪物为最佳荧光示踪物。附图1为三种荧光示踪物与甘胆酸多克隆抗体结合的荧光强度。

[0045] 实施例3. 甘胆酸多克隆抗体的工作浓度的确定

[0046] 首先将最佳荧光示踪物的工作浓度设定为荧光强度是缓冲溶液的荧光强度的10倍时对应的荧光示踪物的浓度, 再将甘胆酸抗体用硼酸盐缓冲液按照1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16000, 1/32000倍比稀释, 然后将示踪物和抗体各500u1混合均匀, 测量荧光强度, 绘制抗体结合曲线, 附图2为甘胆酸多克隆抗体的稀释曲线。所以, 选定甘胆酸抗体的稀释倍数为1/2000, 即为甘胆酸多克隆抗体的工作浓度。

[0047] 实施例4. 荧光偏振免疫分析方法的建立

[0048] 步骤1. 竞争抑制反应: 用磷酸盐缓冲液分别配制 $10^6 ng/mL$, $10^5 ng/mL$, $10^4 ng/mL$, $10^3 ng/mL$, $100 ng/mL$, $10 ng/mL$ 和 $1 ng/mL$ 共7个梯度浓度的甘胆酸标准品; 在石英小试管中分别加入500u1荧光示踪物工作液和50u1标准品溶液, 混匀, 再加入500u1抗体工作液, 混合均匀, 常温孵育, 测量荧光强度值(mP)。其中空白组的荧光强度值(mP_0)是将标准品溶液替换成磷酸盐缓冲液所测得的。

[0049] 步骤2. 绘制标准曲线: 将测得的荧光强度值与空白值的比值(mP/mP_0)作为纵坐标, 以甘胆酸标准品浓度的对数值作为横坐标, 在软件Origin8.5中作图建立甘胆酸的拟合标准曲线, 如图3所示。

[0050] 该方法建立的标准曲线为 $y=0.80675/[(1+(x/682.21468)^{0.96872})]+0.1536$, 其检测范围为 $0.2-2.8 \mu g mL^{-1}$, $1C_{50}$ 值是 $0.68 \mu g mL^{-1}$, $R^2=0.9984$ 。该方法快速, 简便高通量, 而且能够满足甘胆酸的检测限量要求, 十分合适血清中甘胆酸的检测需要。

[0051] 实施例5. 交叉反应率的测定

[0052] 采用荧光偏振免疫分析方法测定甘胆酸结构和功能类似物(胆酸, 去氧胆酸, 石胆酸, 鹅去氧胆酸, 熊去氧胆酸, 甘氨熊去氧胆酸, 麦角固醇)与抗体做交叉反应, 将配制 $10^6 ng/mL$, $10^5 ng/mL$, $10^4 ng/mL$, $10^3 ng/mL$, $100 ng/mL$, $10 ng/mL$ 和 $1 ng/mL$ 共7个梯度浓度的类似物分别与抗体做竞争反应。利用甘胆酸抗体对甘胆酸的 $1C_{50}$ 值与抗体对各种类似物的 $1C_{50}$ 值的比值得到交叉反应率(CR%)。实验结果如表1所示。

[0053] 表1甘胆酸多克隆抗体与相关化合物的交叉反应

[0054]	化合物	IC50 (ng/ml)	交叉反应率 (%)
	甘氨酸	682.21	100
	胆酸	21699.99	3.14
	去氧胆酸	23383.29	2.17
	石胆酸	31380.61	2.91
	鹅去氧胆酸	13397.56	5.09
	熊去氧胆酸	47031.91	1.45
	甘氨酸熊去氧胆酸	99910.25	0.68
	麦角固醇	$>10^6$	<0.1

[0055] 实施例6. 样品检测的应用

[0056] 以383例肝炎患者血清和441例健康人血清为待测样品；

[0057] 所有的样品在4℃冷冻条件下3000g离心10min,取上层清液作为待测样品。其中用磷酸盐缓冲液将健康人血清和肝炎患者血清进行稀释,然后在沸水中煮5min,再进行荧光偏振免疫分析检测。实验结果见图4所示。

[0058] 由图4可见,甘氨酸在肝炎患者血清的含量明显高于健康人组,其阳性率为96.9%,表明甘氨酸可以作为一个肝炎的临床检测指标。由表1可见,这些相似化合物对该方法检测甘氨酸的干扰性很少,表明该方法具有高的特异性。本发明建立的甘氨酸荧光偏振免疫分析方法可以满足人血清中甘氨酸的检测要求,具有高特异性,高灵敏度,价格低廉,简单快速的优点,很好的避免了传统免疫方法操作复杂,耗时长等缺点,能够很好的运用在甘氨酸的快速,高通量的检测。

[0059] 实施例7. 荧光偏振免疫分析方法 (FP1A) 与酶联免疫吸附法 (ELISA) 对比

[0060] 同一批样品分别用荧光偏振免疫分析方法和酶联免疫吸附法进行检测,将FP1A的检测结果作为横坐标,ELISA的检测结果作为纵坐标,在软件Origin8.5中作图建立两种方法的对比图。如图5所示,结果表明这两种方法有较好的相似性。

[0061] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

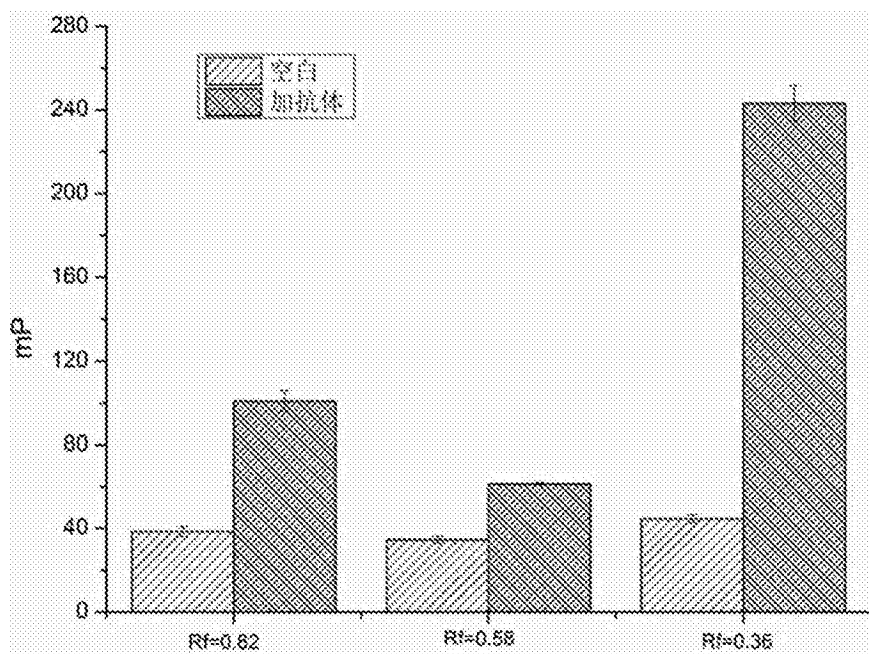


图1

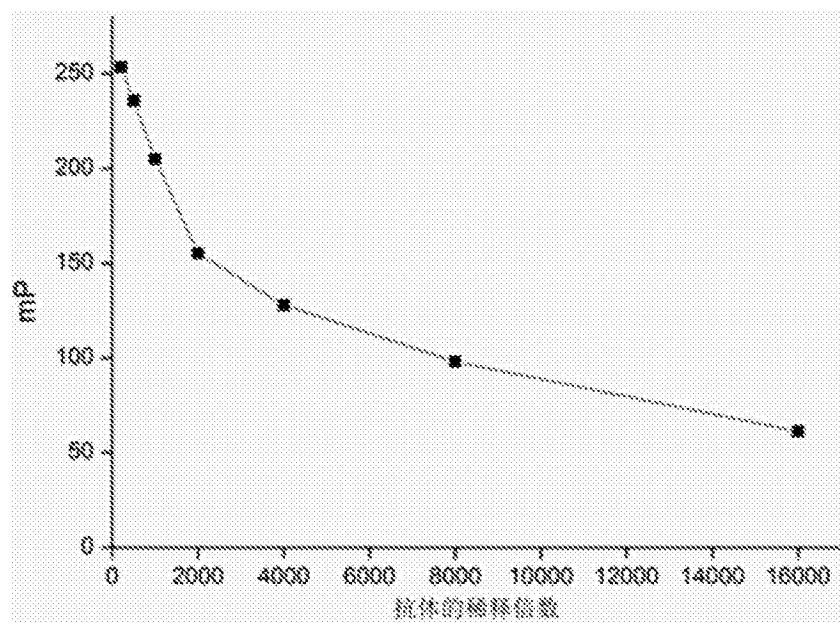


图2

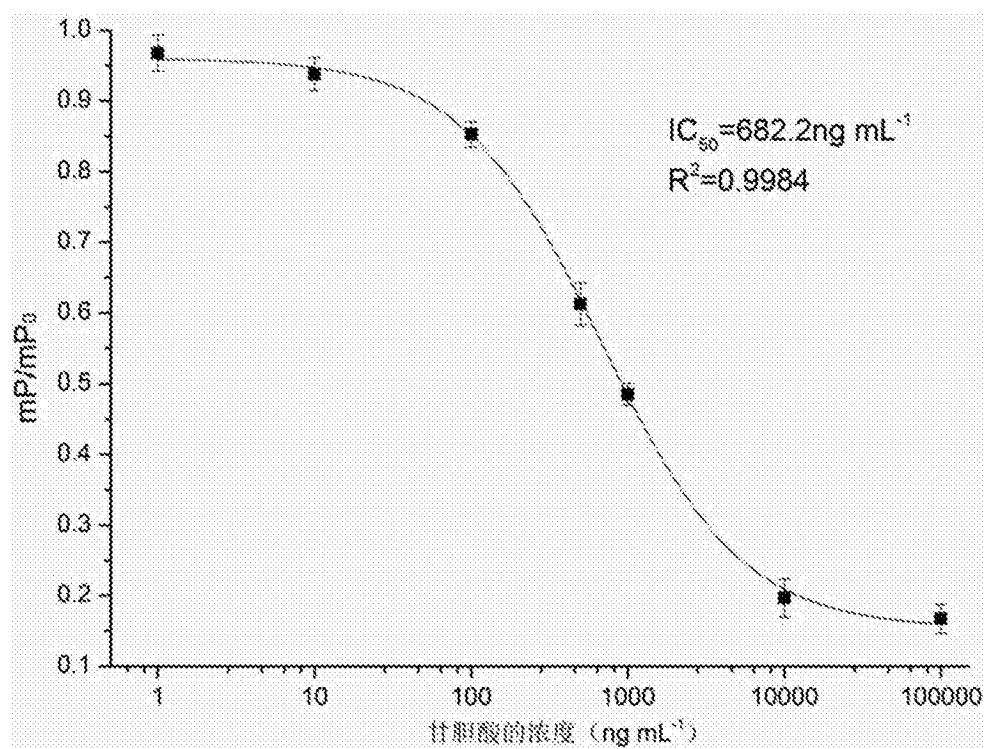


图3

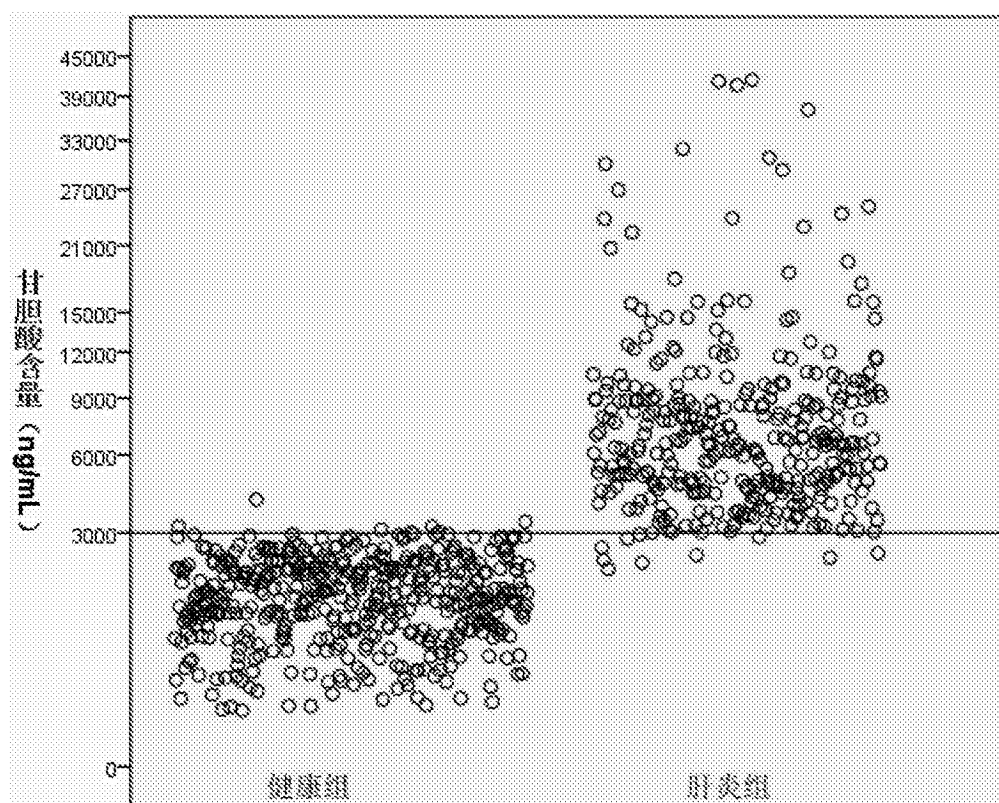


图4

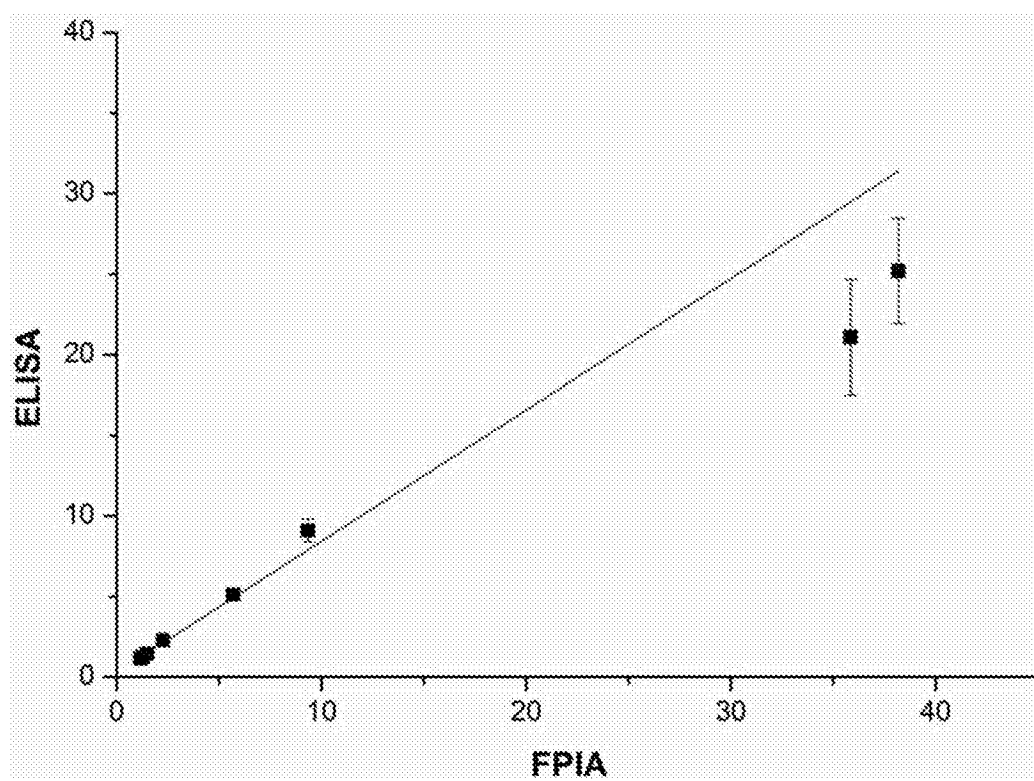


图5

专利名称(译)	一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法及其应用		
公开(公告)号	CN107796937A	公开(公告)日	2018-03-13
申请号	CN2017110794610.7	申请日	2017-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
[标]发明人	赵肃清 沈定 崔锡平 陈莹珊 何绮怡 吕瑞		
发明人	赵肃清 沈定 崔锡平 陈莹珊 何绮怡 吕瑞		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/6428		
代理人(译)	张燕玲 杨晓松		
优先权	201710289772.5 2017-04-27 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫分析技术检测领域，公开了一种检测血清中甘胆酸的荧光偏振免疫分析方法。该方法包括：将荧光示踪物与已知不同浓度的甘胆酸标准品溶液混合，再加入甘胆酸多克隆抗体溶液混合孵育进行竞争反应，测得该体系的荧光偏振值；将测得的荧光偏振值与空白组的荧光偏振值的比值即为抑制率，以抑制率为纵坐标，已知甘胆酸标准品的浓度为横坐标，绘制标准曲线；以待测样品代替已知浓度的甘胆酸标准品，在相同条件下，测得孵育后体系的荧光偏振值，再根据标准曲线，计算得到该待测样品中甘胆酸的浓度。该方法与ELISA甘胆酸试剂盒进行对比，结果表明这两种方法有较好的相似性。交叉反应结果表明该多克隆抗体对甘胆酸具有很高的特异性。

化合物	IC50 (ng/ml)	交叉反应率 (%)
甘氨酸胆酸	682.21	100
胆酸	21699.99	3.14
去氧胆酸	23383.29	2.17
石胆酸	31380.61	2.91
鹅去氧胆酸	13397.56	5.09
熊去氧胆酸	47031.91	1.45
甘氨酸熊去氧胆酸	99910.25	0.68
麦角固醇	>10 ⁶	<0.1