



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103940816 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 06

(21) 申请号 201410159298. 0  
(22) 申请日 2014. 04. 18  
(73) 专利权人 安徽大千生物工程有限公司  
地址 230031 安徽省合肥市蜀山区新产业园  
井岗路自主创新产业基地 6 栋  
(72) 发明人 吴定昌 芮双印  
(74) 专利代理机构 安徽省合肥新安专利代理有  
限责任公司 34101  
代理人 何梅生 王伟  
(51) Int. Cl.  
G01N 21/82(2006. 01)  
G01N 33/531(2006. 01)  
(56) 对比文件  
CN 102944673 A, 2013. 02. 27,  
CN 102955033 A, 2013. 03. 06,  
CN 102628868 A, 2012. 08. 08,  
CN 103163306 A, 2013. 06. 19,  
CN 102650641 A, 2012. 08. 29,  
US 2003/0003602 A1, 2003. 01. 02,  
EP 0710838 A1, 1996. 05. 08,  
CN 102998445 A, 2013. 03. 27,  
CN 202542111 U, 2012. 11. 21,  
审查员 颜春艳

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒及制备方法

(57) 摘要

一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒及制备方法, 试剂盒包括: 甘胆酸 R1 试剂; 甘胆酸 R2 试剂和甘胆酸校准品; 甘胆酸 R1 试剂是将甘胆酸-蛋白偶联物与缓冲液充分混合得到, 甘胆酸 R2 试剂是由甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒与悬浮缓冲液混合得到, 甘胆酸校准品是由人源性甘胆酸和缓冲液组成, 该方法是将含有甘胆酸的人血浆、血清样本与甘胆酸-蛋白偶联物竞争结合甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒, 与甘胆酸结合的甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒不产生浊度, 而与甘胆酸-蛋白偶联物结合甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒会产生浊度变化, 通过测定反应后体系浊度的降低程度来对甘胆酸进行定量分析。本发明极大地提高了免疫反应的信号强度, 使低含量物质在免疫结合时也能产生较强的浊度反应, 以供检测。

1. 一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒,其特征在于包括:甘胆酸 R1 试剂;甘胆酸 R2 试剂和甘胆酸校准品;

所述甘胆酸 R1 试剂由甘胆酸-蛋白偶联物和缓冲液组成,所述缓冲液为浓度 10-100mM 的 Tirs-HCl 溶液,所述缓冲液的 pH 值为 7-8;所述缓冲液中含有浓度 2-6wt% 的 PEG-6000、0.7-0.9wt% 的氯化钠、0.05-0.1wt% 的叠氮钠、0.3wt% 的 PC-300、0.1-1wt% 牛血清白蛋白以及 20mM EDTA;所述甘胆酸 R1 试剂中甘胆酸-蛋白偶联物的浓度为 0.05-2mg/mL;所述甘胆酸-蛋白偶联物是通过偶联剂将甘胆酸和蛋白偶联后获得;所述甘胆酸-蛋白偶联物中蛋白浓度为 0.1-2.0mg/mL;

所述甘胆酸 R2 试剂由悬浮缓冲液和甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒组成,所述悬浮缓冲液为含有稳定剂和防腐剂的浓度为 20-100mM 的甘氨酸-NaOH 缓冲液;所述稳定剂由终浓度 0.1-1.0wt% 的牛血清白蛋白、0.7-0.9wt% 的氯化钠、5-50mM 的乙二胺四乙酸二钠、体积浓度 0.1-1.0% TX-100 组成;所述防腐剂为 PC-300,终体积浓度为 0.05-0.1%;所述甘胆酸 R2 试剂中甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒的质量分数为 0.05-1.0%;

所述甘胆酸校准品是由人源性甘胆酸和缓冲液组成,所述缓冲液为浓度 50-200mM 的 Tirs-HCl 溶液,所述缓冲液中含有终浓度 0.1-1wt% 的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt% 的 PC-300、5-50mM 的乙二胺四乙酸二钠;所述甘胆酸校准品包括人源性甘胆酸浓度分别为 0、2.5、5、10、20、40、80ug/ml 的一组校准品。

2. 根据权利要求 1 所述的一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒,其特征在于,与甘胆酸偶联的蛋白选自人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛转铁蛋白、血蓝蛋白中的一种亚型或多种亚型的混合;所述偶联剂选自碳化二亚胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的一种或多种。

3. 根据权利要求 1 所述的一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒,其特征在于,所述胶乳颗粒为核壳结构,直径范围为 100-450nm,浓度为 1-5mg/mL;所述胶乳颗粒的表面带有由羧基、氨基、羟基、酰肼基或氯甲基修饰的化学基团;所述甘胆酸-蛋白抗体与胶乳颗粒本身携带的化学基团通过化学键结合在胶乳颗粒表面。

## 一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学技术领域,具体涉及一种采用免疫竞争法、胶乳增强比浊法测定人体中甘胆酸(CG)含量的试剂及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 血清甘胆酸(Cholyglycine, 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,胆固醇经过及其复杂的酶促反应,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,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。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。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。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。另外孕妇在怀孕的中后期,由于婴儿的增大,会压迫肝脏,使肝脏排泄胆酸发生障碍而导致甘胆酸偏高,另外由于妊娠期胎盘合成和分泌大量雌激素和孕激素以及代谢负荷增大,可诱发肝胆系统的变化,使孕妇易患妊娠肝内胆汁淤积症(ICP),对胎儿产生严重的影响,随ICP患者血清CG增高使羊水污染率、早产率、胎儿宫内窘迫率及剖宫产率增高,严重者可导致婴儿的死亡,因此测定孕妇血清甘胆酸,对及早发现ICP和了解ICP的严重程度有着非常重要的意义,甘胆酸的测定可作为筛查和随访ICP的指标。从而降低围产儿病死率。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。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。

[0003] 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、胶乳增强比浊法等,放射免疫分析法步骤繁琐,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。现有胶乳增强免疫比浊法虽然操作简单、快速、但是灵敏度低,低值重复性差。

### 发明内容

[0004] 本发明为了避免现有技术存在的不足之处,提供一种能够应用到全自动化生化分

析仪器上甘胆酸 (CG) 试剂盒及其制备方法。该试剂能够快速、准确的检测人血浆样本中的甘胆酸含量。

[0005] 本发明通过用偶联在蛋白上的甘胆酸包被胶乳颗粒并悬浮在特定缓冲液中制作 R2 试剂。由于甘胆酸分子量非常小, 只有一个抗原位点, 不能制成胶乳试剂, 抗原与抗体的反应不能形成胶联而产生浊度, 只能让甘胆酸首先通过化学键偶联在大分子蛋白上, 形成多个位点, 而分子量较大的蛋白可以更好的与胶乳颗粒结合, 偶联有甘胆酸的蛋白浓度为 0.1-2.0mg/mL。偶联有甘胆酸的蛋白进一步通过化学交联方法包被在胶乳颗粒表面。

[0006] 本发明通过在特定缓冲液中加入甘胆酸-蛋白偶联物制作 R1 试剂, 特定缓冲液中要添加无机盐、促凝剂、蛋白质和防腐剂。所选择的甘胆酸-蛋白复合体首先要通过间接 ELISA 方法检测, 确认不会产生非特异性反应。其中要求缓冲液的缓冲能力为调节 pH 范围在 7-9 之间, 可以选择各种缓冲液, 优选 HEPES、甘氨酸、Tris 等, 与其他缓冲液相比, 上述缓冲液具有缓冲能力强、溶解度高、很好的生物适应性和反应。其中 Tris-HCl 能较长时间控制恒定的 pH 范围, 因此更优选 Tris-HCl, 其浓度范围为 10-100mM, pH 范围为 7-8。促凝剂选择 PEG-6000, 可以加快免疫反应速度, 缩短检测时间, 其终浓度为 2-6%。蛋白质选择牛血清白蛋白, 终浓度为 0.1-1%。氯化钠浓度为 0.7-0.9%, 叠氮钠浓度为 0.05-0.1%。

[0007] 本发明通过在特定缓冲液中添加甘胆酸浓度分别为 0、2.5、10、20、40、80ug/mL 制作多点校准品, 其中要求缓冲液的缓冲能力为调节 pH 范围在 7-9 之间, 可以选择各种缓冲液, 优选 HEPES、甘氨酸、Tris 等, 与其他缓冲液相比, 具有缓冲能力强、溶解度高、很好的生物适应性和反应。其中 Tris-HCl 能较长时间控制恒定的 pH 范围, 因此更优选 Tris-HCl, 其浓度范围为 10-200mM, pH 范围为 7-8。其中含有特定的蛋白稳定剂如牛血清白蛋白浓度为 0.1-1%, 含有特定的防腐剂如 PC-300 浓度为 0.05-0.5%, 含有特定的抗氧化剂如 EDTA-2Na 浓度为 5-50mM。

[0008] 本发明提供用于测量在人血浆、血清样品中的甘胆酸竞争免疫比浊测定方法, 该方法是将含有甘胆酸的人血浆、血清样本与甘胆酸-蛋白偶联物竞争结合甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒, 与甘胆酸结合的甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒不产生浊度, 而与甘胆酸-蛋白偶联物结合甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒会产生浊度变化, 甘胆酸与甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒结合优于甘胆酸-蛋白偶联物结合甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒结合的效率, 估样本中甘胆酸含量越高, 反应所产生的浊度越低。下降的程度与人血浆、血清中的甘胆酸含量成正比, 使用全自动生化分析仪器可以计算出人血浆、血清样本中甘胆酸的含量。

[0009] 本发明具体技术方案如下:

[0010] 一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒, 其特点在于包括: 甘胆酸 R1 试剂; 甘胆酸 R2 试剂和甘胆酸校准品;

[0011] 所述甘胆酸 R1 试剂由甘胆酸-蛋白偶联物和缓冲液组成, 所述缓冲液为浓度 10-100mM 的 Tris-HCl 溶液, 所述缓冲液的 pH 值为 7-8; 所述缓冲液中含有浓度 2-6wt% 的 PEG-6000、0.7-0.9wt% 的氯化钠、0.05-0.1wt% 的叠氮钠、0.3wt% 的 PC-300、0.1-1wt% 牛血清白蛋白以及 20mM EDTA; 所述甘胆酸 R1 试剂中甘胆酸-蛋白偶联物的浓度为 0.05-2mg/mL; 所述甘胆酸-蛋白偶联物是通过偶联剂将甘胆酸和蛋白偶联后获得; 所述甘胆酸-蛋白偶联物中蛋白浓度为 0.1-2.0mg/mL;

[0012] 所述甘胆酸 R2 试剂由悬浮缓冲液和甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒组成, 所述

悬浮缓冲液为含有稳定剂和防腐剂的浓度为20-100mM的甘氨酸-NaOH缓冲液；所述稳定剂由终浓度0.1-1.0wt%的牛血清白蛋白、0.7-0.9wt%的氯化钠、5-50mM的乙二胺四乙酸二钠、体积浓度0.1-1.0% TX-100组成；所述防腐剂为PC-300，终体积浓度为0.05-0.1%；所述甘胆酸R2试剂中甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒的质量分数为0.05-1.0%；

[0013] 所述甘胆酸校准品是由人源性甘胆酸和缓冲液组成，所述缓冲液为浓度50-200mM的Tirs-HCl溶液，所述缓冲液中含有终浓度0.1-1wt%的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt%的PC-300、5-50mM的乙二胺四乙酸二钠；所述甘胆酸校准品包括人源性甘胆酸浓度分别为0、2.5、5、10、20、40、80ug/ml的一组校准品；

[0014] 本发明试剂盒，其特点还在于：

[0015] 与甘胆酸偶联的蛋白选自人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛转铁蛋白、血蓝蛋白中的一种亚型或多种亚型的混合；所述偶联剂选自碳化二亚胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的一种或多种。

[0016] 所述胶乳颗粒为核壳结构，直径范围为100-450nm，浓度为1-5mg/mL；所述胶乳颗粒的表面带有由羧基、氨基、羟基、酰肼基或氯甲基修饰的化学基团；所述甘胆酸-蛋白抗体与胶乳颗粒本身携带的化学基团通过化学键结合在胶乳颗粒表面。

[0017] 本发明同时公开了一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒的制备方法，其特点征在于包括如下步骤：

[0018] 一、甘胆酸-蛋白偶联物的制备：

[0019] 1) 准确称取2mg甘胆酸，将其溶解在100 $\mu$ l DMF试剂中，所得溶液为A液；用DMF配制89.4mg/mL的NHS溶液，所得溶液为B液；用DMF配制60.2mg/mL的二环己基碳二亚胺溶液，所得溶液为C液；称取16mg血蓝蛋白，将其溶解在1mL pH7.2、浓度0.02mol/L磷酸盐缓冲液中；所得溶液为D液；

[0020] 2) 分别取B液和C液各30.7 $\mu$ l加到100 $\mu$ l A液中，室温下搅拌90min；

[0021] 3) 将搅拌完毕的混合液加到D液中，在4 $^{\circ}$ C条件下搅拌12h；

[0022] 4) 将步骤3)处理的反应液放入pH7.4、浓度0.01mol/L磷酸盐缓冲液中透析12h，即得到甘胆酸-蛋白偶联物；

[0023] 二、甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒制备：

[0024] 1) 以步骤一所得的甘胆酸-蛋白偶联物皮下免疫小鼠；选择免疫后血清效价大于10000的小鼠脾脏细胞与SP2/0骨髓瘤细胞进行融合，通过BSA-CG板筛选得到甘胆酸单克隆细胞抗体；

[0025] 2) 把1.5g胶乳颗粒加入150ml pH5.5、浓度80mmol/L的2-吗啉代乙磺酸缓冲液中，搅拌30分钟；然后添加0.067mg/ml的碳化二亚胺20ml以及0.033mg/ml的N-羟基琥珀酰亚胺20ml，常温反应45分钟；

[0026] 3) 把经步骤2)反应后的混合物，以15000转/mim离心15分钟，去上清液，然后用150ml pH 8.2、浓度0.1mol/L的磷酸盐缓冲液重悬；得到胶乳颗粒混悬液；

[0027] 4) 将所得的胶乳颗粒混悬液重复步骤3)，重复后所得到的胶乳颗粒混悬液进行清洗；清洗后，用浓度0.1mol/L的磷酸盐缓冲液把体积调整至700ml；

[0028] 5) 将180mg甘胆酸单克隆细胞抗体加入到300ml pH8.2、0.1mol/L磷酸缓冲液中，搅拌均匀；加入到步骤4)的胶乳溶液中；然后置于37度的摇床中，反应2-4个小时；再加

入 0.5g/ml 甘氨酸 10ml,再次反应 30 分钟;

[0029] 6) 步骤 5) 反应结束后,将 5g 牛血清白蛋白加到上述混合液中,搅拌均匀后,室温放置 12h;然后 9000 转/mim 离心 15 分钟,去上清液,用 500ml pH 8.2、浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液重悬;得胶乳颗粒混悬液;

[0030] 7) 将所得到的胶乳颗粒混悬液再经 9000 转/mim 离心 15 分钟,去上清液,用 500ml pH8.2、浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液重悬;将再次重悬后所得的胶乳颗粒混悬液用 pH 8.2、浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液把体积调整至 1000ml;所得溶液即为甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒;

[0031] 三、甘胆酸 R1 试剂的制备

[0032] 将步骤一制备获得的甘胆酸-蛋白偶联物与缓冲液充分混合即得甘胆酸 R1 试剂,所述缓冲液为浓度 10-100mM 的 Tirs-HCl 溶液,所述缓冲液的 pH 值为 7-8;所述缓冲液中含有浓度 2-6wt% 的 PEG-6000、0.7-0.9wt% 的氯化钠、0.05-0.1wt% 的叠氮钠、0.3wt% 的 PC-300、0.1-1wt% 牛血清白蛋白以及 20mM EDTA;所述甘胆酸 R1 试剂中甘胆酸-蛋白偶联物的浓度为 0.05-2mg/mL;

[0033] 四、甘胆酸 R2 试剂的制备

[0034] 将步骤二制备获得的甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒与悬浮缓冲液混合即得甘胆酸 R2 试剂,所述悬浮缓冲液为含有稳定剂和防腐剂的浓度为 20-100mM 的甘氨酸-NaOH 缓冲液;所述稳定剂由终浓度 0.1-1.0wt% 的牛血清白蛋白、0.7-0.9wt% 的氯化钠、5-50mM 的乙二胺四乙酸二钠、体积浓度 0.1-1.0% TX-100 组成;所述防腐剂为 PC-300,终体积浓度为 0.05-0.1%;所述甘胆酸 R2 试剂中甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒的质量浓度为 0.05-1.0%。

[0035] 五、甘胆酸校准品的制备

[0036] 向缓冲液中加入不同量的人源性甘胆酸得到浓度分别为 0、2.5、5、10、20、40、80ug/ml 的一组校准品;所述缓冲液为浓度 0-200mM 的 Tirs-HCl 溶液,所述缓冲液中含有终浓度 0.1-1wt% 的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt% 的 PC-300、5-50mM 的乙二胺四乙酸二钠。

[0037] 与已有技术相比,本发明有益效果体现在:

[0038] 1、本发明胶乳比浊试剂极大地提高了免疫反应的信号强度,使低含量物质在免疫结合时也能产生较强的浊度反应,以供检测。

[0039] 2、本发明竞争免疫比浊测定方法的好处在于抗干扰性更强,与传统免疫比浊法试剂相比,在低值部分信号强度更大,因人体中甘胆酸的正常范围是 0-2.5ug/ml,低值部分的准确性,对于临床应用来说是最重要的部分,竞争法试剂就让低值测试的重复性和准确性得到了极大的提高。

[0040] 3、本发明基于一个特异性针对甘胆酸的单克隆抗体和交联有甘胆酸-人血清白蛋白的胶乳颗粒悬浮液,在特定的反应体系中发生抗原抗体反应形成一定的浊度,能够被基于分光光度计的生化分析仪检测到。而人血浆中如果有游离状态的甘胆酸存在,会与固定在胶乳颗粒表面的甘胆酸竞争结合单克隆抗体,使浊度下降,通过测定反应后体系浊度的降低程度来对甘胆酸进行定量分析。

[0041] 5、本发明同时解决了甘胆酸检测的特异性和自动化程度低的问题,可以广泛应用。

## 附图说明

[0042] 图 1 是本发明试剂盒与市售试剂盒检测结果相关性线性回归方程。

[0043] 图 2 是本发明试剂盒对甘胆酸纯品检测的线性回归方程。

## 具体实施方式

[0044] 以下通过具体实施例对本发明技术方案做进一步解释说明。

[0045] 以下实施例中所使用到试剂均为市售产品, 实施例中所涉及的鉴定方法、筛选方法等均为本领域常规技术手段。

[0046] 实施例 1 肝胆酸 - 蛋白偶联物制备

[0047] 一、试剂准备:

[0048] A 液: 准确称取 2mg 甘胆酸, 将其溶解在 100  $\mu$ l DMF 试剂中; B 液: 用 DMF 配制 89.4mg/mL 的 NHS 溶液; C 液: 用 DMF 配制 60.2mg/mL 的 DCC(二环己基碳二亚胺) 溶液; D 液: 称取 16mg BSA(牛血清白蛋白), 将其溶解在 1mL pH 为 7.2 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液溶液中。

[0049] 本发明实施例中的磷酸盐缓冲液均选自市售磷酸氢二钠 - 磷酸二氢钠或磷酸氢二钾 - 磷酸二氢钾缓冲液。

[0050] 二、试剂配置:

[0051] 1、分别取 B 液和 C 液各 30.7  $\mu$ l 加到 100  $\mu$ l A 液中, 室温下搅拌 90min。

[0052] 2、搅拌完毕的混合液加到 D 液中并剧烈混合, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下搅拌 12h。

[0053] 3、把反应液放入 pH 为 7.4 浓度 0.01mol/L PBS 溶液中透析 12h, 即得到甘胆酸 - 蛋白偶联物。

[0054] 三、肝胆酸 - 蛋白复合体的鉴定:

[0055] 1、人工合成抗原的紫外鉴定用紫外分光光度法对 BSA 标准品、偶联产物和甘胆酸进行紫外扫描, 根据偶联产物最大吸收峰的位移判断是否偶联成功。如果最大吸收峰与 BSA 标准品或甘胆酸一致的话, 表示未偶联成功, 若偶联产物最大吸收峰与 BSA 标准品最大吸收峰产生偏移, 则表示偶联成功。采用本发明方法所得偶联产物收率为 80%。

[0056] 实施例 2 甘胆酸单抗制备

[0057] 1、制备

[0058] 以 KLH 蛋白偶联 CG 后皮下免疫 BalB/c 小鼠 (BalB/c 为市售小鼠品种), 经过四次免疫 (一次初免三次加强免疫), 取免疫效果理想 (即采用间接 ELISA 法鉴定免疫后血清效价大于 10000 的) 的 BalB/c 小鼠脾脏细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞 (由 ATCC 提供) 进行融合, 通过 BSA-CG 板筛 (现有仪器) 选得到甘胆酸单克隆细胞抗体。

[0059] 2、关于肝胆酸单克隆抗体的筛选以及鉴定

[0060] 鉴定小分子单抗, 选用“BSA-CG 包被 ELISA 板”通过竞争 ELISA 实验, 与游离 CG 有竞争抑制反应的抗体就是特异性针对 CG 的单抗。竞争关系越明显, 说明对 CG 亲和力越高, 反之说明亲和力越弱。

[0061] 实施例 3 肝胆酸 - 蛋白抗体与乳胶反应物制备

[0062] 1、把 1.5g 乳胶颗粒 (该颗粒为核壳结构, 其乳核是聚苯乙烯聚合物, 乳壳由苯乙

烯、丙烯酸正丁酯和甲基丙烯酸共聚物组成,其表面所带的化学基团不同可以选自羧基、氨基、羟基、酰肼基、氯甲基修饰的一种;胶乳颗粒直径范围为 100-450nm,市场购买获得,如 JSR 公司提供的型号为 P0220 型羧基微球)加入 pH 为 5.5,浓度为 80 毫摩尔/L 的 2-吗啉代乙磺酸缓冲液 150ml 中,搅拌 30 分钟;

[0063] 2、往上述溶液中,添加碳化二亚胺 20 毫升(浓度为 0.067mg/ml)以及 N 羟基琥珀酰亚胺 20 毫升(浓度为 0.033mg/ml),反应 45 分钟。

[0064] 3、把上述混合物,放置在转速为 15000 转/mim 离心 15 分钟,去掉上清液,用 pH 为 8.2,浓度为 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液 150ml 重悬。如溶液无法立即重悬,可以使用超声仪器对溶液进行超声。

[0065] 4、重复第 3 步,重悬后所得胶乳颗粒混悬液,用 pH 为 8.2,浓度为 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液把体积调整至 700ml。

[0066] 5、把 180mg 甘胆酸单克隆细胞抗体加入到 300ml pH8.2、0.1mol/L 磷酸缓冲液中,搅拌均匀。然后缓慢的加入到第 4 步的胶乳溶液中。

[0067] 6、抗体添加完毕后,把上述乳胶混合物置于 37 度的摇床中,反应 2-4 个小时。

[0068] 7、反应完全后,把 0.5g/ml 甘氨酸 10ml 加到上述混合中,反应 30 分钟

[0069] 8、反应完全后,把 5g 牛血清白蛋白加到上述混合中,搅拌均匀后,室温放置 12h。

[0070] 9、把上述混合物,放置在转速为 9000 转/mim 离心 15 分钟,去掉上清液,用 pH 为 8.2,浓度为 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液 500ml 重悬,得到胶乳颗粒混悬液。如溶液无法立即重悬,可以使用超声仪器对溶液进行超声。

[0071] 10、将所得到的胶乳颗粒混悬液再经 9000 转/mim 离心 15 分钟,去上清液,用 500ml pH8.2、浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液重悬;将再次重悬后所得的胶乳颗粒混悬液用 pH 8.2、浓度 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液把体积调整至 1000ml;所得溶液即为甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒。

[0072] 实施例 4、甘胆酸 R1 试剂的制备

[0073] 将步骤一制备获得的甘胆酸-蛋白偶联物与缓冲液充分混合即得甘胆酸 R1 试剂,所述缓冲液为浓度 10-100mM 的 Tris-HCl 溶液,所述缓冲液的 pH 值为 7-8;所述缓冲液中含有浓度 2-6wt% 的 PEG-6000、0.7-0.9wt% 的氯化钠、0.05-0.1wt% 的叠氮钠、0.3wt% 的 PC-300(市售产品, supelco 公司,商品名 proclin300)、0.1-1wt% 牛血清白蛋白以及 20mM EDTA;所述甘胆酸 R1 试剂中甘胆酸-蛋白偶联物的浓度为 0.05-2mg/mL;

[0074] 实施例 5 甘胆酸 R2 试剂的制备

[0075] 将步骤二制备获得的甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒与悬浮缓冲液混合即得甘胆酸 R2 试剂,所述悬浮缓冲液为含有稳定剂和防腐剂的浓度为 20-100mM 的甘氨酸-NaOH 缓冲液;所述稳定剂由终浓度 0.1-1.0wt% 的牛血清白蛋白、0.7-0.9wt% 的氯化钠、5-50mM 的乙二胺四乙酸二钠、体积浓度 0.1-1.0% TX-100 组成;所述防腐剂为 PC-300,终体积浓度为 0.05-0.1%;所述甘胆酸 R2 试剂中甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒的质量浓度为 0.05-1.0%。

[0076] 实施例 6 甘胆酸校准品的制备

[0077] 向缓冲液中加入不同量的人源性甘胆酸得到浓度分别为 0、2.5、5、10、20、40、80ug/ml 的一组校准品;所述缓冲液为浓度 0-200mM 的 Tris-HCl 溶液,所述缓冲液中含有

终浓度 0.1-1wt% 的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt% 的 PC-300、5-50mM 的乙二胺四乙酸二钠。

[0078] 以上实施例中所用防腐剂选自叠氮钠、硫柳汞、PC-300 和乙基汞硫代硫酸钠中的一种或两种以上。促凝剂选自 PEG-4000、PEG-6000、PEG-8000、硫酸葡聚糖钠、聚乙烯吡咯烷酮中的一种。

[0079] 三、试剂盒的测定方法

[0080] 分析方法：两点终点法

[0081] 反应方向：上升反应

[0082] 校准方式：logit-log(4p) 或 SPLINE

[0083] 测定波长：570nm

[0084] 测定温度：37℃

[0085] 样本：甘胆酸 R1 试剂：甘胆酸 R2 试剂 = 5:200:50 (ul)

[0086] 操作步骤：将 200ul 试剂 R1 加入 5ul 样本，37℃ 孵育 5 分钟后加入 50ul 试剂 R2，1 分钟后读取吸光度 A1，3 分钟后读取吸光度 A2。

[0087] 采用 6 点定标法，用日立 7180 全自动生化分析仪进行检测，校准品浓度分别为：0、2.5、10、20、40、80ug/mL

[0088] 四、试剂盒的性能评价实验

[0089] 1、线性相关性

[0090] 将实施例 4-6 制备的本发明试剂盒与市售甘胆酸化学发光法检测试剂盒 A 对比检测 102 份血清样本，比较本发明试剂盒与市售甘胆酸化学发光法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  $r = 0.9940$ ，线性回归方程为： $y = 1.019x - 0.014$ ，结果表明本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。

[0091] 表 1

[0092]

序号	对照试剂	比对结果1	序号	对照试剂	比对结果1	序号	对照试剂	比对结果1	序号	对照试剂	比对结果1
1	0.23	0.25	26	0.38	0.36	51	0.20	0.21	77	7.31	6.66
2	0.10	0.11	27	0.40	0.40	52	0.21	0.20	78	14.47	15.26
3	0.28	0.29	28	0.16	0.14	53	0.26	0.24	79	2.94	2.96
4	0.38	0.34	29	0.45	0.47	54	0.32	0.30	80	9.45	9.86
5	0.27	0.30	30	0.23	0.24	55	0.33	0.36	81	7.95	8.03
6	0.37	0.39	31	0.37	0.40	56	0.25	0.23	82	9.79	10.22
7	0.39	0.36	32	0.29	0.31	57	0.20	0.19	83	13.09	12.72
8	0.22	0.22	33	0.28	0.27	58	0.46	0.43	84	3.41	3.25
9	0.38	0.40	34	0.34	0.37	59	0.25	0.28	85	1.27	1.23
10	0.31	0.29	35	0.11	0.11	60	0.40	0.37	86	6.15	6.10
11	0.15	0.14	36	0.26	0.26	61	0.20	0.19	87	7.58	7.43
12	0.24	0.24	37	0.13	0.13	62	0.37	0.40	88	8.18	8.61
13	0.33	0.36	38	0.27	0.27	63	0.38	0.39	89	18.61	18.80
14	0.29	0.26	39	0.38	0.38	64	0.12	0.12	90	14.16	13.95
15	0.24	0.24	40	0.17	0.17	65	0.23	0.20	91	2.67	2.54

[0093]

16	0.36	0.34	41	0.20	0.22	66	0.10	0.10	92	11.22	11.66
17	0.14	0.16	42	0.18	0.18	67	0.45	0.40	93	18.44	18.50
18	0.40	0.36	43	0.22	0.21	68	0.31	0.27	94	2.75	2.92
19	0.20	0.21	44	0.37	0.39	69	0.14	0.13	95	9.43	10.22
20	0.21	0.19	45	0.44	0.46	70	0.37	0.34	96	4.18	4.50
21	0.45	0.42	46	0.14	0.12	71	16.39	15.50	97	12.33	13.86
22	0.34	0.34	47	0.30	0.30	72	14.35	15.99	98	8.22	7.49
23	0.29	0.31	48	0.17	0.16	73	14.04	12.40	99	0.32	0.33
24	0.23	0.23	49	0.41	0.38	74	17.31	19.39	100	13.38	13.43
25	0.32	0.33	50	0.43	0.41	75	7.53	7.73	101	15.80	15.86
						76	0.28	0.29	102	0.21	0.20

[0094] 2、线性范围实验

[0095] 用甘胆酸纯品配制成浓度 160mg/L 的高值样本,用生理盐水分别稀 160mg/L、80mg/L、40mg/L、20mg/L、10mg/L、5mg/L、2.5mg/L、1.25mg/L、0.5mg/L、0mg/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,如图 2 所示,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。

[0096] 表 2

[0097]

序号	相对浓度	1	2	3	平均数	绝对偏差	相对偏差
1	160	161.20	163.50	162.30	162.33	2.33	1.44%
2	80	80.33	81.30	80.81	80.81	0.81	1.00%
3	40	42.30	40.80	42.08	41.73	1.73	4.14%
4	20	20.33	20.05	20.14	20.18	0.18	0.87%
5	10	9.79	10.12	10.26	10.06	0.06	0.57%
6	5	4.90	4.95	4.84	4.90	0.10	2.11%
7	2.5	2.40	2.47	2.61	2.49	0.01	0.22%

[0098]

8	1.25	1.29	1.24	1.24	1.26	0.01	0.74%
9	0.5	0.50	0.51	0.48	0.50	0.00	0.55%
10	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

[0099] 3、准确度

[0100] 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六次, 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。

[0101] 表 3

[0102]

测定值	平均值	定值血清浓度	相对误差
1.19	1.23	1.25	1.36%
1.19			
1.18			
1.32			
1.35			
1.17			
测定值	平均值	定值血清浓度	相对误差
67.57	63.80	63.5	0.47%
59.38			
58.50			
67.88			
62.30			
67.14			

[0103] 4、精密度

[0104] 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:4.80%、2.08%,精密度较好。本试剂盒的突出优点是在低值部分有着更好的精密度,从而满足了样本在低值区域的重复性、准确度更好的临床需求。数据见表 4

[0105] 表 4

[0106]

测试次数	结果(高值)	结果(低值)
1	31.54	0.85
2	32.23	0.87
3	28.75	0.86
4	31.83	0.88

5	28.94	0.86
6	29.10	0.85
7	31.13	0.88
8	29.23	0.87
9	28.71	0.82
10	31.47	0.86
平均值	30.29	0.86
SD	1.453	0.018
CV	4.80%	2.08%

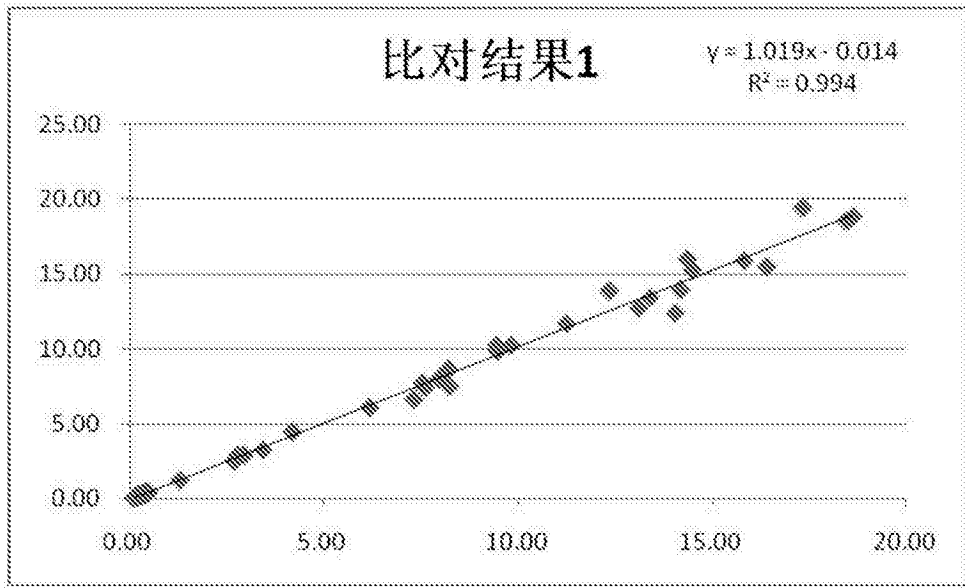


图 1

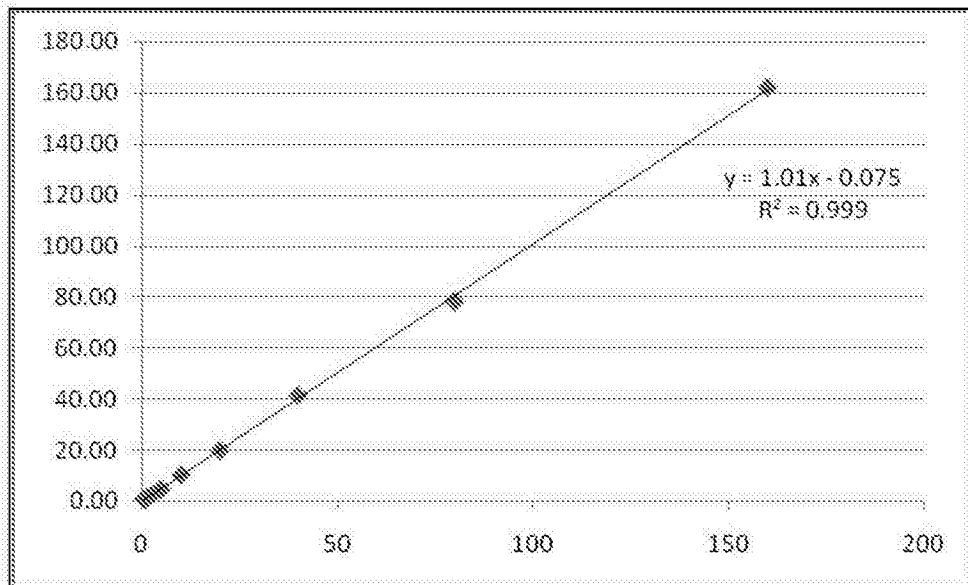


图 2

专利名称(译)	一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103940816B</a>	公开(公告)日	2016-04-06
申请号	CN201410159298.0	申请日	2014-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽大千生物工程有限公司		
[标]发明人	吴定昌 芮双印		
发明人	吴定昌 芮双印		
IPC分类号	G01N21/82 G01N33/531		
CPC分类号	G01N21/82 G01N33/577		
代理人(译)	何梅生 王伟		
审查员(译)	颜春艳		
其他公开文献	CN103940816A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种测定人体甘胆酸含量的试剂盒及制备方法，试剂盒包括：甘胆酸R1试剂；甘胆酸R2试剂和甘胆酸校准品；甘胆酸R1试剂是将甘胆酸-蛋白偶联物与缓冲液充分混合得到，甘胆酸R2试剂是由甘胆酸-蛋白抗体包被的胶乳颗粒与悬浮缓冲液混合得到，甘胆酸校准品是由人源性甘胆酸和缓冲液组成，该方法是将含有甘胆酸的人血浆、血清样本与甘胆酸-蛋白偶联物竞争结合甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒，与甘胆酸结合的甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒不产生浊度，而与甘胆酸-蛋白偶联物结合甘胆酸-蛋白抗体胶乳颗粒会产生浊度变化，通过测定反应后体系浊度的降低程度来对甘胆酸进行定量分析。本发明极大地提高了免疫反应的信号强度，使低含量物质在免疫结合时也能产生较强的浊度反应，以供检测。

序号	对照试剂	比浊结果1	序号	对照试剂	比浊结果1	序号	对照试剂	比浊结果1	序号	对照试剂	比浊结果1
1	0.23	0.25	26	0.38	0.36	51	0.20	0.21	77	7.31	6.66
2	0.10	0.11	27	0.40	0.40	52	0.21	0.20	78	14.47	15.26
3	0.28	0.29	28	0.16	0.14	53	0.26	0.24	79	2.94	2.96
4	0.38	0.34	29	0.45	0.47	54	0.32	0.30	80	9.45	9.86
5	0.27	0.30	30	0.23	0.24	55	0.33	0.36	81	7.95	8.03
6	0.37	0.39	31	0.37	0.40	56	0.25	0.23	82	9.79	10.22
7	0.39	0.36	32	0.29	0.31	57	0.20	0.19	83	13.09	12.72
8	0.22	0.22	33	0.28	0.27	58	0.46	0.43	84	3.41	3.25
9	0.38	0.40	34	0.34	0.37	59	0.25	0.28	85	1.27	1.23
10	0.31	0.29	35	0.11	0.11	60	0.40	0.37	86	6.15	6.10
11	0.15	0.14	36	0.26	0.26	61	0.20	0.19	87	7.58	7.43
12	0.24	0.24	37	0.13	0.13	62	0.37	0.40	88	8.18	8.64
13	0.33	0.36	38	0.27	0.27	63	0.38	0.39	89	18.61	18.80
14	0.29	0.26	39	0.38	0.38	64	0.12	0.12	90	14.16	13.95
15	0.24	0.24	40	0.17	0.17	65	0.23	0.20	91	2.67	2.54