



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106405069 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610210270.4

(22)申请日 2016.04.06

(71)申请人 李松羊

地址 201600 上海市松江区广富林路1188
弄154号304室

(72)发明人 李松羊

(74)专利代理机构 宁波市鄞州盛飞专利代理事
务所(普通合伙) 33243

代理人 张向飞

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法

(57)摘要

本发明属于生物医药技术领域,涉及一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法。本发明的制备方法包括甘胆酸抗体溶液的制备、甘胆酸酶偶联物溶液的制备、甘胆酸校准品的制备;甘胆酸酶偶联物溶液的制备:将甘胆酸加入到MES缓冲液中,加入羧基活化剂进行羧基活化,然后在羧基活化后的甘胆酸中加入6-磷酸葡萄糖脱氢酶进行缩合反应得到甘胆酸酶偶联物粗品,经透析纯化后加入到Tris-HCl缓冲液中,并加入辅助试剂,混合均匀,即为甘胆酸酶偶联物溶液。采用本发明的制备方法制备的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂安全快速、高效、灵敏、能准确检测出待测样本中甘胆酸含量。

1. 一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括甘胆酸抗体溶液的制备、甘胆酸酶偶联物溶液的制备、甘胆酸校准品的制备;

甘胆酸抗体溶液的制备:将甘胆酸抗体加入到Tris-HCl缓冲液中,并加入酶底物6-磷酸葡萄糖、NADP、辅助试剂,混合均匀,即为甘胆酸抗体溶液;

甘胆酸酶偶联物溶液的制备:将甘胆酸加入到MES缓冲液中,加入羧基活化剂进行羧基活化,然后在羧基活化后的甘胆酸中加入6-磷酸葡萄糖脱氢酶进行缩合反应得到甘胆酸酶偶联物粗品,经透析纯化后加入到Tris-HCl缓冲液中,并加入辅助试剂,混合均匀,即为甘胆酸酶偶联物溶液;

甘胆酸校准品的制备:将BSA溶于PBS缓冲液中制成BSA-PBS溶液,再将甘胆酸溶于BSA-PBS溶液中,即为甘胆酸校准品。

2. 根据权利要求1所述的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,其特征在于,所述甘胆酸抗体溶液中甘胆酸抗体的浓度为0.05-10mg/ml。

3. 根据权利要求1所述的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,其特征在于,所述甘胆酸酶偶联物浓度为1.0-10.0 μ g/ml。

4. 根据权利要求1所述的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,其特征在于,所述羧基活化剂为EDC-NHS。

5. 根据权利要求1所述的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,其特征在于,所述甘胆酸进行羧基活化的温度为0-37 $^{\circ}$ C,时间为5-60min,pH为5.5-6.5。

6. 根据权利要求1所述的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,其特征在于,所述缩合反应时加入的6-磷酸葡萄糖脱氢酶与甘胆酸的质量比为1:1000-1000:1。

7. 根据权利要求1所述的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,其特征在于,所述透析纯化的透析液为PBS缓冲液,pH为7.4-7.8,温度为0-5 $^{\circ}$ C,透析时间10-20h。

8. 根据权利要求1所述的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,其特征在于,甘胆酸抗体溶液中所述辅助试剂包括稳定剂、防腐剂,所述稳定剂为BSA、蔗糖、甘露糖、海藻糖、PEG中的一种或多种,所述防腐剂为叠氮化钠。

9. 根据权利要求1所述的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,其特征在于,甘胆酸酶偶联物溶液中所述辅助试剂包括金属离子化合物、防腐剂,所述金属离子化合物选自含Mg²⁺、Ba²⁺、Ca²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺的化合物中的一种或多种,所述防腐剂为叠氮化钠。

10. 如权利要求1-9任一权利要求所述的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂在人血清中甘胆酸含量体外定量测定中的应用。

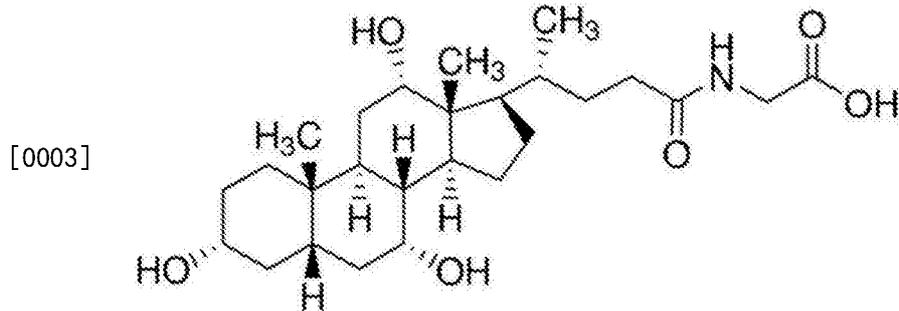
一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,涉及一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法。

背景技术

[0002] 甘胆酸是血清中胆酸和甘氨酸结合而成的结合型胆酸之一,分子结构式如下:



[0004] 甘胆酸由肝细胞合成,同胆汁进入肠道,经门静脉再回肝脏,当肝细胞受损时,肝细胞摄取甘胆酸能力下降,致使血中含量增加,因此,甘胆酸是肝细胞功能及其肝胆系物质循环功能的敏感指标,急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、胆石症伴黄疸患者胆管、胆囊排泄功能障碍、梗阻性肝病、肠-肝循环障碍、肝癌都会引起甘胆酸升高,甘胆酸也是检测胆汁郁积和早期酒精肝损伤的重要指标,同时甘胆酸的检测对孕妇妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)的诊断具有重要的临床意义。

[0005] 目前,体外定量测定甘胆酸主要使用放射免疫分析法(RIA),化学发光免疫分析法(CLIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)等。放射免疫法需要有专业放免设施,普通实验室难以开展,且放免法准确度低,放射性射线还会对操作人员的健康产生极大的危害,国际上已很少使用。化学发光法灵敏度较高,但是测定速度较慢,测试结果的准确度和试剂稳定性较差,而且需要昂贵的专用化学发光检测设备,不利于常规实验室开展,临床应用局限性明显。酶联免疫法一般用于半定量测定,且操作繁琐,检测时间长,自动化程度低,重复性较差,不利于广泛应用于临床检验。

[0006] 目前市场上缺乏灵敏度高、特异性强的甘胆酸检测试剂,尤其是质量好的自动化检验试剂。

[0007] 均相酶免疫检测法,以其检测速度快、操作简单、灵敏度高、特异性强且可以在全自动生化分析仪上实现对小分子物质的高通量快速化检测的优点,开始得到越来越多的关注。

发明内容

[0008] 本发明的目的是针对现有技术存在的上述问题,提出了一种安全快速、高效、灵敏、能准确检测出待测样本中甘胆酸含量的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法。

[0009] 本发明的目的可通过下列技术方案来实现:一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制

备方法,所述制备方法包括甘胆酸抗体溶液的制备、甘胆酸酶偶联物溶液的制备、甘胆酸校准品的制备;

[0010] 甘胆酸抗体溶液的制备:将甘胆酸抗体加入到Tris-HCl缓冲液中,并加入酶底物6-磷酸葡萄糖、NADP、辅助试剂,混合均匀,即为甘胆酸抗体溶液;

[0011] 甘胆酸酶偶联物溶液的制备:将甘胆酸加入到MES缓冲液中,加入羧基活化剂进行羧基活化,然后在羧基活化后的甘胆酸中加入6-磷酸葡萄糖脱氢酶进行缩合反应得到甘胆酸酶偶联物粗品,经透析纯化后加入到Tris-HCl缓冲液中,并加入辅助试剂,混合均匀,即为甘胆酸酶偶联物溶液;

[0012] 甘胆酸校准品的制备:将BSA溶于PBS缓冲液中制成BSA-PBS溶液,再将甘胆酸溶于BSA-PBS溶液中,即为甘胆酸校准品。

[0013] 本发明通过对甘胆酸分子结构上的羧基进行活化后,与蛋白酶6-磷酸葡萄糖脱氢酶上的氨基共价结合,生成甘胆酸酶偶联物。在液相均相反应体系中,待测样品中游离的甘胆酸与甘胆酸酶偶联物竞争性结合抗甘胆酸特异性抗体位点。待测样品中游离的甘胆酸越多,竞争结合的抗体位点越多,抗体释放出的酶标偶联物越多。游离出的酶标偶联物催化 NAD^+ 生成NADH,待测样品中甘胆酸的含量与NADH的生成量成正比,在340nm波长下测定NADH的生成速率可计算出甘胆酸的含量。本发明甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法操作简单,反应稳定可靠,制得的试剂高效准确灵敏。

[0014] 作为优选,所述甘胆酸校准品的浓度范围为0-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0015] 将甘胆酸校准品的浓度范围设置在上述数值范围内,标准曲线线性好,比较适合取样量的大小以及控制准确度。在上述数值范围内选取若干点值,以甘胆酸校准品的浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制甘胆酸校准曲线,以待测样品的吸光度值在标准曲线上可求得相应甘胆酸的含量。

[0016] 作为优选,所述甘胆酸抗体溶液中甘胆酸抗体的浓度为0.05-10 mg/ml 。

[0017] 作为优选,所述甘胆酸酶偶联物浓度为1.0-10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0018] 作为优选,所述羧基活化剂为EDC-NHS。

[0019] 采用EDC-NHS对甘胆酸进行羧基活化,活化效率高,活化条件易控制,后续纯化过程较易进行。

[0020] 作为优选,所述甘胆酸进行羧基活化的温度为0-37 $^{\circ}\text{C}$,时间为5-60min,pH为5.5-6.5。

[0021] 在上述反应条件下,羧基活化反应平稳,速度较快,反应较完全。

[0022] 作为优选,所述缩合反应时加入的6-磷酸葡萄糖脱氢酶与甘胆酸的质量比为1:1000-1000:1。

[0023] 作为优选,所述透析纯化的透析液为PBS缓冲液,pH为7.4-7.8,温度为0-5 $^{\circ}\text{C}$,透析时间10-20h。

[0024] 在上述条件下透析能将生成的甘胆酸酶偶联物保留在透析袋内,而将其他杂质分子排出透析袋外,从而达到纯化甘胆酸酶偶联物的目的,同时保证适当的透析速度,保持在较低的温度下保证透析液在透析过程中不发生变质。

[0025] 作为优选,甘胆酸抗体溶液中所述辅助试剂包括稳定剂、防腐剂,所述稳定剂为BSA、蔗糖、甘露糖、海藻糖、PEG中的一种或多种,所述防腐剂为叠氮化钠。

[0026] 甘胆酸抗体是一种蛋白质,蛋白在高浓度时不容易降解($>1\text{mg/ml}$),在低浓度时($<0.1\text{mg/ml}$)易降解而失活,因此需要加入稳定剂确保其活性,加入的稳定剂也可以减少抗体由于管壁吸附所造成的损失。

[0027] 作为优选,甘胆酸酶偶联物溶液中所述辅助试剂包括金属离子化合物、防腐剂,所述金属离子化合物选自含 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的化合物中的一种或多种,如 MgCl_2 、 BaCl_2 、 CaCl_2 、 CuCl_2 、 ZnCl_2 等,所述防腐剂为叠氮化钠。

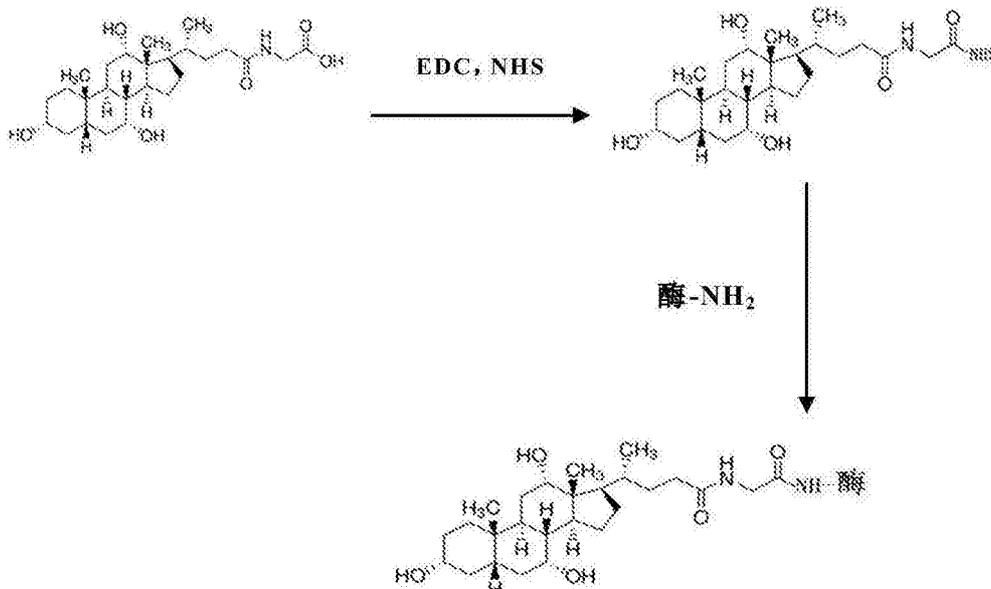
[0028] 作为优选,甘胆酸酶偶联物溶液中所述金属离子的浓度为 $0.5\text{--}20\text{mmol/L}$ 。

[0029] 上述金属离子作为酶蛋白辅助因子酶的重要组成成分,能与酶及底物形成各种形式的三元络合物,不仅保证了酶与底物的正确定向结合,而且金属离子还可作为催化基团,参与各种方式的催化作用,在酶促反应中起着传递电子、原子或某些化学基团的作用。

[0030] 作为优选,所述甘胆酸抗体溶液和甘胆酸酶偶联物溶液中叠氮化钠的质量百分比含量为 $0.1\text{--}0.3\%$ 。

[0031] 作为优选,所述甘胆酸抗体溶液和甘胆酸酶偶联物溶液中Tris-HCl缓冲液的pH均为 $7.4\text{--}9.0$ 。

[0032] 甘胆酸酶偶联物的合成路线如下:



[0033]

[0034] 甘胆酸均相酶免疫诊断试剂用于人血清中甘胆酸含量的体外定量测定,使用方法如下:

[0035] (1)在甘胆酸校准品中分别加入甘胆酸抗体溶液,混匀,在 37°C 下孵育 $3\text{--}5\text{min}$,然后加入甘胆酸酶偶联物溶液,混匀, 37°C 孵育 1.5min ,在测定波长下连续监测 $1\text{--}3\text{min}$ 的吸光度变化,计算 $\Delta A/\text{min}$,以甘胆酸校准品的浓度为横坐标,以所得的 $\Delta A/\text{min}$ 为纵坐标绘制校准曲线。

[0036] (2)按照上述方法检测计算新鲜血清标本的 $\Delta A/\text{min}$,以 $\Delta A/\text{min}$ 在校准曲线上可求得新鲜血清标本中甘胆酸的含量。

[0037] 与现有技术相比,本发明的制备方法制备过程简单易控,制备出的胆酸均相酶免疫诊断试剂使用起来操作简单,对检测人员要求不高,安全快速、高效、灵敏,能准确检测出待测样本中甘胆酸含量。

附图说明

[0038] 图1为甘胆酸校准品的校准曲线图。

具体实施方式

[0039] 以下是本发明的具体实施例,对本发明的技术方案作进一步的描述,但本发明并不限于这些实施例。

[0040] 下面通过具体实施例1-5对本发明中的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法作进一步解释,通过实施例6-10对本发明中的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂在人血清甘胆酸含量的体外测定中的应用作进一步解释。

[0041] 实施例1

[0042] 一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法:

[0043] (1)制备甘胆酸抗体溶液,

[0044] 将甘胆酸抗体加入到pH为7.4的Tris-HCl缓冲液中,并加入6-磷酸葡萄糖、NADP、BSA、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸抗体溶液,在甘胆酸抗体溶液中甘胆酸抗体的浓度为0.05mg/ml,叠氮化钠的质量百分比含量为0.1%;

[0045] (2)制备甘胆酸酶偶联物溶液,

[0046] 将甘胆酸加入到MES缓冲液中,加入羧基活化剂EDC-NHS进行羧基活化,羧基活化的温度为0℃,时间为5min,pH为5.5,然后在羧基活化后的甘胆酸中加入6-磷酸葡萄糖脱氢酶进行缩合反应得到甘胆酸酶偶联物粗品,6-磷酸葡萄糖脱氢酶与甘胆酸的质量比为1:1000,将甘胆酸酶偶联物粗品在pH为7.4的PBS缓冲液中透析10h后得到甘胆酸酶偶联物,透析温度为0℃,

[0047] 将甘胆酸酶偶联物加入到pH为7.4的Tris-HCl缓冲液中,并加入MgCl₂、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸酶偶联物溶液,甘胆酸酶偶联物浓度为1.0μg/ml,MgCl₂浓度为0.5mmol/L,叠氮化钠的质量百分比含量为0.1%;

[0048] (3)制备甘胆酸校准品,将质量百分比为0.2%的BSA溶于PH7.4的PBS缓冲液中制成BSA-PBS溶液,再将甘胆酸溶于 BSA-PBS溶液中制成浓度分别为0、2.5、5、10、20、50μg/ml的甘胆酸校准品。

[0049] 实施例2

[0050] 一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法:

[0051] (1)制备甘胆酸抗体溶液,

[0052] 将甘胆酸抗体加入到pH为8.0的Tris-HCl缓冲液中,并加入6-磷酸葡萄糖、NADP、蔗糖、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸抗体溶液,其中,甘胆酸抗体的浓度为0.2mg/ml,叠氮化钠的质量百分比含量为0.2%;

[0053] (2)制备甘胆酸酶偶联物溶液,

[0054] 将甘胆酸加入到MES缓冲液中,加入羧基活化剂EDC-NHS进行羧基活化,羧基活化的温度为10℃,时间为15min,pH为6.0,然后在羧基活化后的甘胆酸中加入6-磷酸葡萄糖脱氢酶进行缩合反应得到甘胆酸酶偶联物粗品,其中,6-磷酸葡萄糖脱氢酶与甘胆酸的质量比为1:10,将甘胆酸酶偶联物粗品在pH为7.8的PBS缓冲液中透析13h后得到甘胆酸酶偶联

物,透析温度为2℃,

[0055] 将甘胆酸酶偶联物加入到pH为8.0的Tris-HCl缓冲液中,并加入BaCl₂、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸酶偶联物溶液,其中,甘胆酸酶偶联物浓度为3.0μg/ml,BaCl₂浓度为2.0mmol/L,叠氮化钠的质量百分比含量为0.2%;

[0056] (3)制备甘胆酸校准品,将质量百分比为0.5%的BSA溶于PH7.4的PBS缓冲液中制成BSA-PBS溶液,再将甘胆酸溶于BSA-PBS溶液中制成浓度分别为0、5、10、15、25、50μg/ml的甘胆酸校准品。

[0057] 实施例3

[0058] 一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法:

[0059] (1)制备甘胆酸抗体溶液,

[0060] 将甘胆酸抗体加入到pH为8.5的Tris-HCl缓冲液中,并加入6-磷酸葡萄糖、NADP、甘露糖、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸抗体溶液,其中,甘胆酸抗体的浓度为5mg/ml,叠氮化钠的质量百分比含量为0.3%;

[0061] (2)制备甘胆酸酶偶联物溶液,

[0062] 将甘胆酸加入到MES缓冲液中,加入羧基活化剂EDC-NHS进行羧基活化,羧基活化的温度为20℃,时间为25min,pH为6.5,然后在羧基活化后的甘胆酸中加入6-磷酸葡萄糖脱氢酶进行缩合反应得到甘胆酸酶偶联物粗品,其中,6-磷酸葡萄糖脱氢酶与甘胆酸的质量比为1:1,将甘胆酸酶偶联物粗品在pH为7.4的PBS缓冲液中透析15h后得到甘胆酸酶偶联物,透析温度为3℃,

[0063] 将甘胆酸酶偶联物加入到pH为8.5的Tris-HCl缓冲液中,并加入CaCl₂、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸酶偶联物溶液,其中,甘胆酸酶偶联物浓度为5.0μg/ml,CaCl₂浓度为5mmol/L,叠氮化钠的质量百分比含量为0.3%;

[0064] (3)制备甘胆酸校准品,将质量百分比为1.0%的BSA溶于PH7.4的PBS缓冲液中制成BSA-PBS溶液,再将甘胆酸溶于BSA-PBS溶液中制成浓度分别为0、2.5、5、10、20、50μg/ml的甘胆酸校准品。

[0065] 实施例4

[0066] 一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法:

[0067] (1)制备甘胆酸抗体溶液,

[0068] 将甘胆酸抗体加入到pH为9.0的Tris-HCl缓冲液中,并加入6-磷酸葡萄糖、NADP、海藻糖、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸抗体溶液,其中,甘胆酸抗体的浓度为8mg/ml,叠氮化钠的质量百分比含量为0.1%;

[0069] (2)制备甘胆酸酶偶联物溶液,

[0070] 将甘胆酸加入到MES缓冲液中,加入羧基活化剂EDC-NHS 进行羧基活化,羧基活化的温度为30℃,时间为40min,pH为5.5,然后在羧基活化后的甘胆酸中加入6-磷酸葡萄糖脱氢酶进行缩合反应得到甘胆酸酶偶联物粗品,6-磷酸葡萄糖脱氢酶与甘胆酸的质量比为10:1,将甘胆酸酶偶联物粗品在pH为7.8的PBS缓冲液中透析18h后得到甘胆酸酶偶联物,透析温度为4℃,

[0071] 将甘胆酸酶偶联物加入到pH为7.4的Tris-HCl缓冲液中,并加入CuCl₂、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸酶偶联物溶液,其中,甘胆酸酶偶联物浓度为9.0μg/ml,CuCl₂浓度为

10mmol/L,叠氮化钠的质量百分比含量为0.1%;

[0072] (3)制备甘胆酸校准品,将质量百分比为2%的BSA溶于PH7.4的PBS缓冲液中制成BSA-PBS溶液,再将甘胆酸溶于BSA-PBS溶液中制成浓度分别为0、5、10、15、25、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的甘胆酸校准品。

[0073] 实施例5

[0074] 一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法:

[0075] (1)制备甘胆酸抗体溶液,

[0076] 将甘胆酸抗体加入到pH为8.0的Tris-HCl缓冲液中,并加入6-磷酸葡萄糖、NADP、PEG、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸抗体溶液,甘胆酸抗体的浓度为10mg/ml,叠氮化钠的质量百分比含量为0.3%;

[0077] (2)制备甘胆酸酶偶联物溶液,

[0078] 将甘胆酸加入到MES缓冲液中,加入羧基活化剂EDC-NHS进行羧基活化,羧基活化的温度为37 $^{\circ}\text{C}$,时间为60min,pH为6.0,然后在羧基活化后的甘胆酸中加入6-磷酸葡萄糖脱氢酶进行缩合反应得到甘胆酸酶偶联物粗品,6-磷酸葡萄糖脱氢酶与甘胆酸的质量比为1000:1,将甘胆酸酶偶联物粗品在pH为7.4的PBS缓冲液中透析20h后得到甘胆酸酶偶联物,透析温度为5 $^{\circ}\text{C}$,

[0079] 将甘胆酸酶偶联物加入到pH为8.0的Tris-HCl缓冲液中,并加入 ZnCl_2 、叠氮化钠,混合均匀,即为甘胆酸酶偶联物溶液,其中,甘胆酸酶偶联物浓度为10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ZnCl_2 浓度为20mmol/L,叠氮化钠的质量百分比含量为0.3%;

[0080] (3)制备甘胆酸校准品,将质量百分比为5%的BSA溶于PH7.4的PBS缓冲液中制成BSA-PBS溶液,再将甘胆酸溶于BSA-PBS溶液中制成浓度分别为0、2.5、5、10、20、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的甘胆酸校准品。

[0081] 实施例6

[0082] (1)取实施例1中制备的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂,在甘胆酸校准品中分别加入200 μl 的甘胆酸抗体溶液,混匀,在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育3min,然后加入50 μl 甘胆酸酶偶联物溶液,混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5min,在测定波长下连续监测1分钟的吸光度变化,计算 $\Delta A/\text{min}$,以甘胆酸校准品的浓度为横坐标,以所得的 $\Delta A/\text{min}$ 为纵坐标绘制校准曲线,如图1所示。

[0083] (2)按照上述方法检测计算12 μl 的新鲜血清标本的 $\Delta A/\text{min}$,以 $\Delta A/\text{min}$ 在校准曲线上可求得新鲜血清标本中甘胆酸的含量。

[0084] 实施例7-10

[0085] 分别取实施例2-5中制备的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂,按实施例6中所述的方法检测新鲜血清标本中甘胆酸的含量,此处不再累述。

[0086] 对本发明中制备的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的准确度和精确度进行检验:

[0087] (1)准确度的检验:

[0088] 采用比对试验,选用不同已知浓度的待测样品样品1-样品5,采用本发明实施例1中制备的试剂进行测定,测定结果如表1所示。

[0089] 表1:准确度检验结果

	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5
理论值 ($\mu\text{g/mL}$)	0.0	15.0	30.0	45.0	60.0
[0090] 测定值 ($\mu\text{g/mL}$)	0.52	15.72	27.26	43.67	55.55
	0.01	15.87	24.34	43.77	54.90
	0.16	15.73	26.51	42.66	54.45
平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	0.23	15.77	26.04	43.37	54.97
估计值 ($\mu\text{g/mL}$)	0.66	14.37	28.07	41.78	55.49
绝对或相对偏差	0.43	-8.9%	7.8%	-3.7%	0.9%

[0091] 求得线性回归方程： $y=0.914x+0.661$ ，理论值与测得值的相关系数 $r^2=0.9976\geq 0.95$ ，说明测得值与理论值的相关性较好。

[0092] (2)精确度的检验：

[0093] 批内精密度测定：

[0094] 分别取较低浓度和较高浓度的两个血清样品，采用本发明实施例1中方法制备的同一批次试剂分别进行10次测定，计算标准差、相对偏差和批内变异系数，所得数值如表2所示，所得标准差数值较小，说明测定值较接近平均值，测定结果稳定。

[0095] 表2批内精密度测定数值

靶值 ($\mu\text{g/mL}$)	3.5	15
[0096] 测定值 ($\mu\text{g/mL}$)	3.63	14.16
	3.56	14.83
	3.60	13.50
	3.75	15.06
	3.82	14.83
	3.84	13.67
	3.60	15.03
	3.68	13.24
	3.59	15.71
	3.65	14.74
平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	3.67	14.48
标准差	0.1	0.8
相对偏差 (%)	4.86	3.47
批内变异系数 CV (%)	2.72	5.52

[0097] 批间精密度测定：

[0098] 选取较低浓度和较高浓度的两个血清样品，采用本发明实施例1中方法制备的三个不同批次的试剂进行测定，所得结果如表3所示。

[0099] 表3批间精密度测定数据

[0100]

批号	低浓度血清			高浓度血清		
	1	2	3	1	2	3
测得值 ($\mu\text{g/mL}$)	3.35	3.63	3.65	14.37	14.76	15.34
	3.40	3.56	3.62	14.55	14.83	15.25
	3.29	3.60	3.62	14.58	14.50	15.31
平均值 ($\mu\text{g/mL}$)	3.35	3.60	3.63	14.50	14.70	15.30
相对极差 (%)	8.04			5.39		

[0101] 综上所述,本发明采用对甘胆酸进行羧基活化然后与6-磷酸葡萄糖脱氢酶缩合制备的方式甘胆酸酶偶联物,甘胆酸酶偶联物与甘胆酸抗体、甘胆酸校准品共同构成甘胆酸均相酶免疫诊断试剂,该甘胆酸均相酶免疫诊断试剂安全快速、高效、灵敏、能准确检测出待测样本中甘胆酸含量的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法,并且使用起来操作简单,对检测人员要求不高;该制备方法制备过程简单易控。

[0102] 本文中所描述的具体实施例仅仅是对本发明精神作举例说明。本发明所属技术领域的技术人员可以对所描述的具体实施例做各种各样的修改或补充或采用类似的方式替代,但并不会偏离本发明的精神或者超越所附权利要求书所定义的范围。

甘氨酸校准曲线

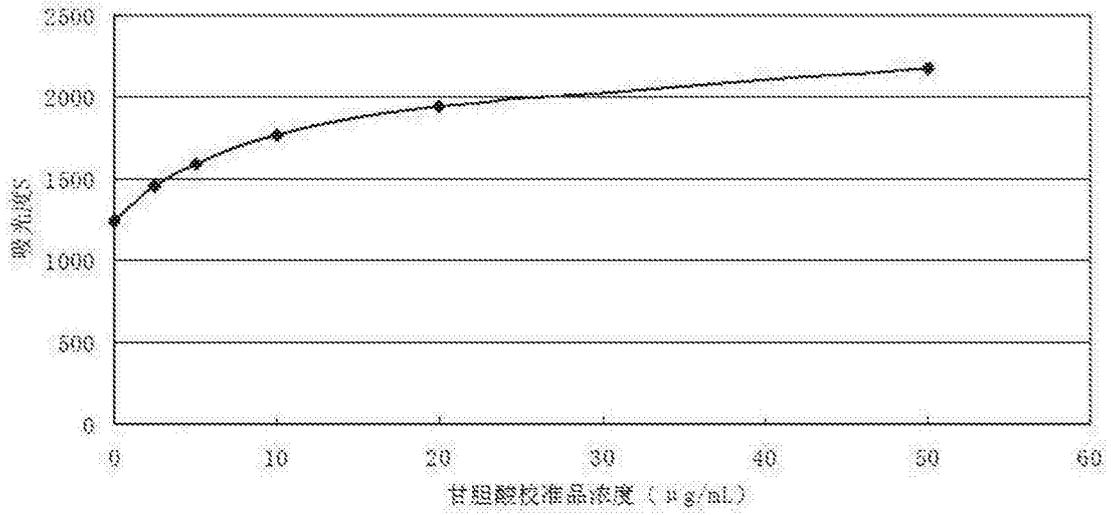


图1

专利名称(译)	一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法		
公开(公告)号	CN106405069A	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201610210270.4	申请日	2016-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	李松羊		
申请(专利权)人(译)	李松羊		
当前申请(专利权)人(译)	李松羊		
[标]发明人	李松羊		
发明人	李松羊		
IPC分类号	G01N33/531 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/31		
代理人(译)	张向飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物医药技术领域，涉及一种甘胆酸均相酶免疫诊断试剂的制备方法。本发明的制备方法包括甘胆酸抗体溶液的制备、甘胆酸酶偶联物溶液的制备、甘胆酸校准品的制备；甘胆酸酶偶联物溶液的制备：将甘胆酸加入到MES缓冲液中，加入羧基活化剂进行羧基活化，然后在羧基活化后的甘胆酸中加入6-磷酸葡萄糖脱氢酶进行缩合反应得到甘胆酸酶偶联物粗品，经透析纯化后加入到Tris-HCl缓冲液中，并加入辅助试剂，混合均匀，即为甘胆酸酶偶联物溶液。采用本发明的制备方法制备的甘胆酸均相酶免疫诊断试剂安全快速、高效、灵敏、能准确检测出待测样本中甘胆酸含量。

