



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106226512 B

(45)授权公告日 2018.10.16

(21)申请号 201610620346.0

G01N 21/31(2006.01)

(22)申请日 2016.07.29

审查员 许珊萍

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106226512 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(73)专利权人 胡清

地址 310006 浙江省杭州市下城区武林路
100号427室

(72)发明人 胡清

(74)专利代理机构 昆明合众智信知识产权事务
所 53113

代理人 丁茂林

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

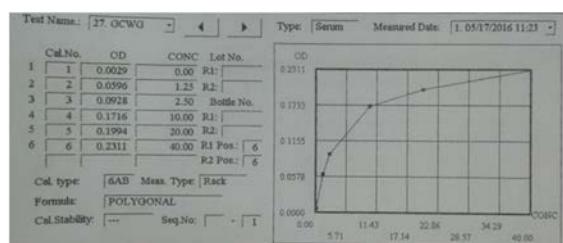
权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

一种试剂盒、试剂盒的制备方法及利用该试剂盒实现的外周血甘氨酸的检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种试剂盒,包括试剂R1、试剂R2,所述试剂R1含有:三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液,抗牛磺酸抗体,抗甘氨酸抗体,葡萄糖-6-磷酸(G6P);所述试剂R2含有:三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液,甘氨酸-G-6-PD偶联物,NADP,BSA。本发明同时公开了试剂盒的制备方法,尤其是抗牛磺酸抗体、抗甘氨酸抗体的制备方法。同时,本发明也公开了利用该试剂盒实现的外周血甘氨酸的检测方法。本发明能够封闭牛磺酸的干扰,检测灵敏度高达0.1 μ g/mL,特异性强,检测重复性高和稳定性好等优点。



1. 一种试剂盒,其特征在于:包括试剂R1、试剂R2,所述试剂R1含有:三羟甲基氨基甲烷缓冲液,抗牛磺酸抗体,抗甘氨酸抗体,G6P(葡萄糖-6-磷酸);

所述试剂R2含有:三羟甲基氨基甲烷缓冲液,甘氨酸-G-6-PD偶联物,NADP(辅酶II),BSA(牛血清白蛋白)。

2. 如权利要求1所述的一种试剂盒,其特征在于:还包括标准液,

所述标准液为:取浓度为80 μ g/mL甘氨酸,用内含5g/L BSA、50mM三羟甲基氨基甲烷缓冲液作倍比稀释成系列浓度溶液。

3. 如权利要求2所述的一种试剂盒,其特征在于:还包括质控品,

所述质控品为:取纯度97%的甘氨酸钠盐1.000mg溶解于6.25mL三羟甲基氨基甲烷缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/L BSA;甘氨酸浓度为160 μ g/mL,然后再用健康人新鲜血清作1:8和1:32稀释。

4. 如权利要求3所述的一种试剂盒,其特征在于:所述抗牛磺酸抗体包括抗牛磺酸单克隆IgG抗体或抗牛磺酸多克隆IgG抗体。

5. 如权利要求4所述的一种试剂盒,其特征在于:所述抗牛磺酸单克隆IgG抗体包括IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4中的一种;所述抗牛磺酸多克隆IgG抗体包含F(ab)'₂特异性抗体片段。

6. 如权利要求3所述的一种试剂盒,其特征在于:所述抗甘氨酸抗体包括抗甘氨酸单克隆IgG抗体或抗甘氨酸多克隆IgG抗体。

7. 如权利要求6所述的一种试剂盒,其特征在于:所述抗甘氨酸单克隆IgG抗体为IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4中的一种;所述抗甘氨酸多克隆IgG抗体含F(ab)'₂特异性抗体片段。

8. 制备如权利要求1所述试剂盒的方法,其特征在于:其中的抗牛磺酸抗体的制备方法如下:利用牛磺酸上的-NH₂与蛋白质分子上的-COOH进行偶联;再利用这些偶联物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔,最后获得特异性的抗牛磺酸抗体,牛磺酸与蛋白质的摩尔比是1:20-200;其中的抗甘氨酸抗体的制备方法如下:利用甘氨酸支链末端的-COOH与蛋白质分子上的-NH₂进行偶联;再利用这些偶联物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔,最后获得特异性的抗甘氨酸抗体,甘氨酸与蛋白质的摩尔比是1:20-200。

一种试剂盒、试剂盒的制备方法及利用该试剂盒实现的外周 血甘氨酸胆酸的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学检测技术领域,具体为一种试剂盒、试剂盒的制备方法,以及利用该试剂盒实现的外周血甘氨酸胆酸的检测方法。

背景技术

[0002] 血清甘氨酸胆酸(Cholyglycine,CG)是胆固醇在肝细胞内的代谢产物,是胆酸中的主要组分之一。参与的胆酸的生理性肠-肝循环。在肝细胞内,胆固醇经过一系列酶促反应,转变成初级胆酸,经毛细胆管和胆管排入胆囊,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,经门静脉再回到肝脏,由肝细胞摄取再利用;未被重吸收的胆汁酸在肠菌作用下形成胆烷酸衍生物,由粪便排出,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,其血清胆酸浓度稳定在低水平。当肝细胞受损时,肝细胞摄取胆酸能力下降,致使血中胆酸含量增高;胆汁郁滞时,肝脏排泄胆酸发生障碍,而返流血液循环的胆酸含量增高,也使血胆酸含量增高。因此,测定血清胆酸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。然而血清中胆酸组成成分复杂,异质性明显,总胆酸测定往往不能敏感反映肝细胞损伤或胆汁淤积。甘氨酸胆酸是胆酸中的主要组分之一,且性质和含量稳定,能敏感反映肝细胞损伤或胆汁淤积。

[0003] 甘氨酸胆酸是胆酸与甘氨酸结合而成的结合型胆酸之一。血清中胆酸复合体成分复杂。按结构分类包括结合胆酸(甘氨酸胆酸、肝鹅脱氧甘氨酸胆酸)和游离胆酸;游离胆酸按来源分类包括初级胆酸(胆酸、鹅脱氧甘氨酸胆酸)和次级胆酸(脱氧胆酸、石胆酸、熊脱氧胆酸)。CG的分子式 $C_{26}H_{43}NO_6$,其分子量465.5;属于小分子半抗原物质。

[0004] 甘氨酸胆酸增高是反映妊娠期肝内胆汁淤积症(Intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP)的敏感指标。正常妊娠时,由于血中孕酮水平的增高,降低了平滑肌的张力,导致妊娠期间胆囊张力降低和排空抑制,使肝脏对胆汁的摄取及排泄发生障碍,引起胆汁不同程度的淤积。因此,部分妊娠妇女血清甘氨酸胆酸值可出现生理性升高,并没有明显的妊娠期肝内胆汁淤积症症状。当孕妇肝小叶、中央区和毛细血管内有胆汁淤积及胆栓存在,胆汁排泄障碍导致胆酸在外周循环中的堆积,致使血中甘氨酸胆酸含量增高,并产生皮肤瘙痒等症状,则使羊水污染率、早产率、胎儿宫内窘迫率及剖宫产率增高。然而对ICP孕妇何时终止妊娠,仍是许多医生所关注而棘手的问题。过早终止妊娠则会因为早产而增加围产儿患病率和病死率,但如果未及时终止妊娠,则又有胎儿宫内窘迫,甚至胎死宫内的危险。2015年ICP诊疗指南中明确血清胆汁酸水平改变是ICP最主要的实验室证据,血清胆汁酸水平的测定主要包括总胆汁酸和甘氨酸胆酸。既往(2011年ICP诊疗指南)将总胆汁酸和甘氨酸胆酸列为同等重要。

[0005] 准确、快速地检测血清甘氨酸胆酸水平是一个关键问题。国内外文献报道的测定血清甘氨酸胆酸水平方法有:放射免疫测定、高效液相(紫外/荧光)测定、气相/液相-质谱、均相酶免法等。放射免疫测定需要有放免设施,又有放射性污染;高效液相(紫外)测定、气相/液

相-质谱均需要较昂贵的设备,是测定血清甘氨酸胆酸水平的确认方法,但不适合临床实验室常规检测。尽管有用免疫比浊法测定样本中的甘氨酸胆酸方法,即用抗甘氨酸胆酸抗体胶乳颗粒与样本中的甘氨酸胆酸抗原反应,出现凝集反应,在600nm波长检测其吸光度的变化,其变化程度与样本中的甘氨酸胆酸含量成正比,能自动化检测,但其特异性有待进一步证实。均相酶免疫技术(Homogeneous Enzyme Immunoassay, HEIA)主要用于小分子物质的测定,是一种基于液相均相体系的竞争性反应,并兼具了“抗原和抗体”及“酶和底物”两种系统的特点,具有检测速度快、定量准确、精密度高、特异性强等优点;同时可应用于各种类型的生化分析仪,实现样本的高通量和自动化测定,但其检测特异性取决于所用抗体的特异性。

[0006] 正常情况下,血清中同时存在着甘氨酸胆酸和牛磺胆酸。甘氨酸胆酸与牛磺胆酸结构极其相似,用免疫动物诱导的相应抗体会存在特异性的交叉反应,即抗甘氨酸胆酸抗体会与牛磺胆酸发生特异性的结合。在采用基于抗体的免疫检测方法时,易发生交叉反应,导致甘氨酸胆酸测定的不准确。

发明内容

[0007] 本发明所解决的技术问题在于提供一种试剂盒、试剂盒的制备方法,以及利用该试剂盒实现的外周血甘氨酸胆酸的检测方法,从而解决上述背景技术中的问题。

[0008] 本发明所解决的技术问题采用以下技术方案来实现:

[0009] 一种试剂盒,包括试剂R1、试剂R2,

[0010] 所述试剂R1含有:Tris-HCL(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,抗牛磺酸抗体,抗甘氨酸胆酸抗体,G6P(葡萄糖-6-磷酸);

[0011] 所述试剂R2含有:Tris-HCL(三羟甲基氨基甲烷)缓冲液,甘氨酸胆酸-G-6-PD偶联物(杭州博谱医药科技有限公司),NADP(辅酶II),BSA(牛血清白蛋白)。

[0012] 本发明中,一种试剂盒,还包括标准液,

[0013] 所述标准液为:取浓度为80 μ g/mL甘氨酸胆酸,用内含5g/L BSA、50mM三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液作倍比稀释成系列浓度溶液。

[0014] 本发明中,一种试剂盒,还包括质控品,

[0015] 所述质控品为:取甘氨酸胆酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于6.25mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/L BSA;甘氨酸胆酸浓度为160 μ g/mL,然后再用健康人新鲜血清作1:8和1:32稀释,即甘氨酸胆酸浓度分别为20 μ g/mL和5 μ g/mL。

[0016] 更进一步的,所述试剂R1含有:1-10 μ g/mL抗牛磺酸IgG抗体,10-100 μ g/mL抗甘氨酸胆酸牛磺酸抗体,50-500 μ g/mL G6P,0.01-0.5%Tween-20,0.3-10mM MgCl₂,0.01-0.1% NaN₃,溶剂为pH6.5-8.0的Tris-HCL缓冲液;

[0017] 所述试剂R2含有:0.2-3U/mL甘氨酸胆酸-G6PDH偶联物,50-1000 μ g/mL NADP,0.1-1% BSA,溶剂为pH6.5-8.0的Tris-HCL缓冲液。

[0018] 所述标准液配制过程如下:精确称取美国Sigma公司甘氨酸胆酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于12.5mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/L BSA;甘氨酸胆酸浓度为80 μ g/mL,然后再用内含5g/L BSA,50mM,三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液作倍比稀释为40 μ g/mL、20 μ g/mL、10 μ g/mL、5 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1.25 μ g/mL、0.625 μ g/mL、0.3125 μ g/mL、0.16 μ g/mL和0.08 μ g/mL等。

[0019] 所述质控品配制如下：精确称取美国Sigma公司甘氨酸钠盐（纯度97%）1.000mg溶解于6.25mL三羟甲基氨基甲烷（Tris-HCL）缓冲液50mM，pH6.8，内含5g/L BSA；甘氨酸浓度为160μg/mL，然后再用健康人新鲜血清作1:8和1:32稀释，即甘氨酸浓度分别为20μg/mL和5μg/mL。

[0020] 如上所述的试剂盒，其中，所述抗牛磺酸抗体包括抗牛磺酸单克隆IgG抗体或抗牛磺酸多克隆IgG抗体。

[0021] 所述抗牛磺酸单克隆IgG抗体包括IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4中的一种；所述抗牛磺酸多克隆IgG抗体包含F(ab)'₂特异性抗体片段。

[0022] 所述抗甘氨酸抗体包括抗甘氨酸单克隆IgG抗体或抗甘氨酸多克隆IgG抗体。

[0023] 所述抗甘氨酸单克隆IgG抗体为IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3或IgG4中的一种；所述抗甘氨酸多克隆IgG抗体含F(ab)'₂特异性抗体片段。

[0024] 试剂盒的制备，关键在于抗牛磺酸抗体以及抗甘氨酸抗体的制备。

[0025] 抗牛磺酸抗体的制备方法如下：利用牛磺酸上的-NH₂与蛋白质分子上的-COOH进行偶联；再利用这些偶联物免疫物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔，最后获得特异性的抗牛磺酸抗体。

[0026] 其中，抗牛磺酸单克隆IgG抗体为鼠源性单克隆IgG型抗体，抗牛磺酸多克隆IgG抗体为兔源性多克隆IgG抗体。

[0027] 上述步骤中，牛磺酸与蛋白质或多聚赖氨酸的摩尔比是1:20-200，以1:100为优选。

[0028] 抗甘氨酸抗体的制备方法如下：利用甘氨酸支链末端的-COOH与蛋白质或多聚赖氨酸分子上的-NH₂进行偶联；再利用这些偶联物免疫物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔，最后获得特异性的抗甘氨酸抗体。

[0029] 其中，抗甘氨酸单克隆IgG抗体为鼠源性单克隆IgG型抗体，抗甘氨酸多克隆IgG抗体为兔源性多克隆IgG抗体。

[0030] 上述步骤中，甘氨酸与蛋白质或多聚赖氨酸的摩尔比是1:20-200，以1:100为优选。

[0031] 制备抗甘氨酸单克隆IgG抗体时，分别用甘氨酸的类似物10μg/mL的甘氨酸、脱氧胆酸、胆酸、鹅胆酸、鹅脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸进行阻断检测筛选，保留交叉反应率<10%的抗体克隆孔。

[0032] 再配制三羟甲基氨基甲烷（Tris-HCL）缓冲液、G6P、Tween-20、MgCl₂、NaN₃，即得到试剂R1。

[0033] 同时配制好三羟甲基氨基甲烷（Tris-HCL）缓冲液、NADP、甘氨酸-G6PDH偶联物、BSA即得到试剂R2，配制方法不做赘述。

[0034] 利用该试剂盒实现的外周血甘氨酸的检测方法，采用免疫测定法，以均相酶免疫测定法为优先，先采用抗牛磺酸抗体封闭样本中可能存在的牛磺胆酸的干扰，再用抗甘氨酸抗体进行甘氨酸的检测。抗牛磺酸抗体的工作浓度为1-10μg/mL，以5μg/mL为优选。

[0035] 检测方法，包括如下步骤：

[0036] 将试剂R1与待测样品混合,25-37℃反应3-5min,再加入试剂R2,25-37℃反应5-10min,检测340nm处吸光值,根据标准曲线获得待测样品中甘氨酸浓度;

[0037] 上述检测方法中,标准曲线的绘制如下:将甘氨酸用含体积浓度0.25%牛血清白蛋白的缓冲液稀释成0μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL、40μg/mL、80μg/mL的稀释液,以含所述牛血清白蛋白的缓冲液为空白对照,将所述不同浓度的甘氨酸稀释液与试剂R1与混合,25-37℃反应5-10min,然后加入试剂R2,25-37℃反应5-10min,检测340nm处吸光值,以吸光值为纵坐标,以稀释液中甘氨酸浓度作为横坐标制作标准曲线。

[0038] 由于采用了以上技术方案,本发明具有以下有益效果:

[0039] 本发明先用抗牛磺酸抗体封闭牛磺酸参与反应,然后用抗甘氨酸抗体检测外周血甘氨酸的方法,有效降低了检测甘氨酸的特异性。

[0040] 进一步的,本发明提供一种试剂盒,利用试剂盒,能够先用抗牛磺酸抗体封闭牛磺酸参与反应,然后用抗甘氨酸抗体检测外周血甘氨酸的方法。是一种基于特异性单克隆或多克隆抗体建立的甘氨酸检测方法。同时,本发明试剂盒的制备方法包括甘氨酸和牛磺酸特异性单克隆或多克隆抗体的制备方法,并用于外周血(包括血清、血浆和全血)等体液中甘氨酸的检测。

[0041] 更进一步的,本发明首先分别利用甘氨酸支链末端的-COOH与蛋白质或多聚赖氨酸分子上的-NH₂进行偶联;利用牛磺酸上的-NH₂与蛋白质分子上的-COOH进行偶联;接着利用这些偶联物免疫物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔,最后获得特异性的抗甘氨酸单克隆或多克隆抗体与抗牛磺酸单克隆或多克隆抗体。并将上述特异性的抗甘氨酸单克隆或多克隆抗体与抗牛磺酸单克隆或多克隆抗体制备成相应的试剂盒。当进行均相酶免疫测定时,先用抗牛磺酸单克隆或多克隆抗体结合样本中的牛磺酸,以封闭牛磺酸的干扰,然后再用抗甘氨酸单克隆或多克隆抗体检测样本中的甘氨酸含量。

[0042] 本发明用于检测外周血中甘氨酸的均相酶免疫测定方法的原理是基于甘氨酸与其特异性抗体的特异性结合。

[0043] 与现有技术相比,本发明有益效果主要体现在:本发明所述检测外周血中甘氨酸的方法可在生化分析仪等大型自动化仪器上进行大样本自动化检测分析。方法具有检测灵敏度高,特异性强,检测重复性高和稳定性好等优点。本发明方法检测灵敏度0.1μg/mL。

附图说明

[0044] 图1为甘氨酸与蛋白质和/或多聚赖氨酸偶联示意图;

[0045] 图2为牛磺酸与蛋白质和/或多聚赖氨酸偶联示意图;

[0046] 图3为甘氨酸测定反应标准曲线。

具体实施方式

[0047] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0048] 本实施例提供的试剂盒,包括试剂R1、试剂R2。

[0049] 其中,所述试剂R1含有:1μg/mL抗牛磺酸单克隆IgG抗体,10μg/mL抗甘氨酸牛磺酸单克隆抗体,50μg/mL G6P,0.01% Tween-20,0.3mM MgCl₂,0.01% NaN₃,溶剂为pH6.5的

Tris-HCL缓冲液;

[0050] 所述试剂R2含有:0.2U/mL甘氨酸胆酸-G6PDH偶联物,50ug/mL NADP,0.1%BSA,溶剂为pH6.5的Tris-HCL缓冲液。

[0051] 另外,试剂盒可以包括标准液。而标准液也可以在试剂盒使用时,自行配制。

[0052] 所述标准液配制过程如下:精确称取美国Sigma公司甘氨酸胆酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于12.5mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/L BSA;甘氨酸胆酸浓度为80μg/mL,然后再用内含5g/L BSA,50mM,三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液作倍比稀释为40μg/mL、20μg/mL、10μg/mL、5μg/mL、2.5μg/mL、1.25μg/mL、0.625μg/mL、0.3125μg/mL、0.16μg/mL和0.08μg/mL等。

[0053] 同样,试剂盒可以包括质控品。而质控品也可以在试剂盒使用时,自行配制。

[0054] 所述质控品配制如下:精确称取美国Sigma公司甘氨酸胆酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于6.25mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/L BSA;甘氨酸胆酸浓度为160μg/mL,然后再用健康人新鲜血清作1:8和1:32稀释,即甘氨酸胆酸浓度分别为20μg/mL和5μg/mL。

[0055] 本实施例主要描述了抗牛磺酸抗体、抗甘氨酸胆酸抗体的制备方法。而试剂盒的制备,关键就在于抗牛磺酸抗体以及抗甘氨酸胆酸抗体的制备。

[0056] 抗牛磺酸抗体的制备方法如下:利用牛磺酸上的-NH₂与蛋白质分子上的-COOH进行偶联;再利用这些偶联物免疫物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔,最后获得特异性的抗牛磺酸抗体。其中,抗牛磺酸单克隆IgG抗体为鼠源性单克隆IgG型抗体,抗牛磺酸多克隆IgG抗体为兔源性多克隆IgG抗体。上述步骤中,牛磺酸与蛋白质或多聚赖氨酸的摩尔比是1:20-200,以1:100为优选。

[0057] 再配制三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液、甘氨酸胆酸-G-6-PD偶联物即得到试剂R1,配制方法不做赘述。

[0058] 抗甘氨酸胆酸抗体的制备方法如下:利用甘氨酸胆酸支链末端的-COOH与蛋白质或多聚赖氨酸分子上的-NH₂进行偶联;再利用这些偶联物免疫物作为免疫原进行免疫小鼠或家兔,最后获得特异性的抗甘氨酸胆酸抗体。其中,抗甘氨酸胆酸单克隆IgG抗体为鼠源性单克隆IgG型抗体,抗甘氨酸胆酸多克隆IgG抗体为兔源性多克隆IgG抗体。上述步骤中,甘氨酸胆酸与蛋白质或多聚赖氨酸的摩尔比是1:20-200,以1:100为优选。制备抗甘氨酸胆酸单克隆IgG抗体时,分别用甘氨酸胆酸的类似物10μg/mL的甘氨酸脱氧胆酸、脱氧胆酸、胆酸、鹅胆酸、鹅脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸进行阻断检测筛选,保留交叉反应率<10%的抗体克隆孔。

[0059] 再配制好三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液、NADPH、葡萄糖-6-磷酸、BSA即得到试剂R2,配制方法不做赘述。

[0060] 利用该试剂盒实现的外周血甘氨酸胆酸的检测方法,采用免疫测定法,以均相酶免疫测定法为优先,先采用抗牛磺酸抗体封闭样本中可能存在的牛磺胆酸的干扰,再用抗甘氨酸胆酸抗体进行甘氨酸胆酸的检测。抗牛磺酸抗体工作浓度为1-10μg/mL,以5μg/mL为优选。

[0061] 检测方法,包括如下步骤:

[0062] 将试剂R1与待测样品混合,25-37℃反应3-5min,再加入试剂R2,25-37℃反应5-

10min,检测340nm处吸光值,根据标准曲线获得待测样品中甘氨酸浓度;

[0063] 上述检测方法中,标准曲线的绘制如下:将甘氨酸用含体积浓度0.25%牛血清白蛋白的缓冲液稀释成0 μ g/mL、1.25 μ g/mL、2.5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL的稀释液,以含所述牛血清白蛋白的缓冲液为空白对照,将所述不同浓度的甘氨酸稀释液与试剂R1与混合,25-37℃反应5-10min,然后加入试剂R2,25-37℃反应5-10min,检测340nm处吸光值,以吸光值为纵坐标,以稀释液中甘氨酸浓度作为横坐标制作标准曲线。

[0064] 更加详细的制备方法、检测方法,步骤如下。

[0065] 1.蛋白质偶联物制备(如图1和图2所示)

[0066] 1.1甘氨酸-蛋白质偶联物制备

[0067] 称取100mg甘氨酸(美国Sigma公司)与10mg牛血清白蛋白(BSA)或血蓝蛋白(KLH)或卵清蛋白(OVA)或多聚赖氨酸(德国Roche公司)溶解于pH7.6,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌15分钟,再加入125mg水溶性碳二亚胺粉末(上海阿拉丁公司),室温避光温和搅拌180分钟,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续6-8次。

[0068] 1.2甘氨酸蛋白质偶联物偶联效率鉴定

[0069] 取1.1偶联的甘氨酸-蛋白质偶联物用pH7.6,100mM的磷酸盐缓冲液稀释至浓度<1mg/mL,分别用分光光度计测定波长210nm、280nm的吸光度,按下列公式计算偶联效率,当甘氨酸:蛋白质>20:1时,判为合格。

[0070] 偶联效率= $A_{210} \times 69000 / A_{280} \times 483$

[0071] 1.3牛磺酸-蛋白质偶联物制备

[0072] 称取100mg牛磺酸(美国Sigma公司)与10mg牛血清白蛋白或血蓝蛋白或卵清蛋白(德国Roche公司)溶解于pH7.6,100mM的磷酸盐缓冲液中,室温搅拌15分钟,再加入125mg水溶性碳二亚胺粉末(上海阿拉丁公司),室温避光温和搅拌180-240分钟,装入透析袋(自由通透分子大小<14KD),置4℃透析,每6小时换液1次,连续6-8次。

[0073] 2.抗甘氨酸单克隆IgG型抗体制备方法

[0074] 2.1动物免疫

[0075] 以上述步骤1.1制备的甘氨酸-蛋白质偶联物,以甘氨酸-血蓝蛋白为优选,以100 μ g甘氨酸-蛋白质偶联物/次/只小鼠的浓度与等量的完全福氏佐剂混匀,皮下多点注射免疫Balb/c雌性小鼠(5-6周龄,体重18-20g),第1次与第2次间隔10-14天,以后每次间隔7天,连续5次,第2-5次甘氨酸-蛋白质偶联物与等量的不完全福氏佐剂乳化混匀,间隔1周后采用尾静脉/腹腔注射无菌的100 μ g(100 μ L体积)甘氨酸-多聚赖氨酸偶联物(以尾静脉为优选),以加强免疫1次,3天后细胞融合。

[0076] 2.2杂交瘤细胞的制备

[0077] 按照常规细胞融合方法进行。取步骤2.1免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按体积比1:6在50%PEG(MW400-800)的作用下融合,融合细胞先在次黄嘌呤-氨甲喋呤-胸腺嘧啶(HAT)选择培养基中(美国Hyclone公司),在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养,2周后换为次黄嘌呤-胸腺嘧啶(HT)培养基(美国Hyclone公司),继续在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养。待克隆孔长至1/3-1时,取培养上清液进行抗体检测筛选。

[0078] 2.3特异性克隆孔筛选

[0079] 用ELISA法筛选抗体表达阳性孔。用50mM的碳酸盐缓冲液稀释甘氨酸-蛋白质偶联物(以甘氨酸-OVA为优选)至10 μ g/mL后,以100 μ L/孔包被反应微孔4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C 120min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris-HCL缓冲液(PBS)洗涤3次,用10%小牛血清室温封闭30min,再加入100 μ L上述步骤2.2培养上清液室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris-HCL缓冲液(PBS)洗涤3次,最后再加入1:2000稀释的羊抗小鼠IgG-HRP室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris-HCL缓冲液(PBS)洗涤3次,加入四甲基联苯氨(TMB)底物显色观察。凡出现明显蓝色反应者为阳性,否则为阴性。保留与甘氨酸-蛋白质偶联物有反应的细胞克隆孔,再采用有限稀释法进行3次克隆筛选,建株的杂交瘤细胞再扩大培养、冻存,用于制备腹水。

[0080] 2.4腹水的制备和纯化

[0081] 将稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞扩大培养后,以 $0.5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 个/只接种到预先用0.5mL降植烷或液体石蜡致敏7-10天Balb/c小鼠的腹腔,7-12天内观察,收取腹水,离心后测定效价。经50%饱和硫酸铵沉淀保存或者低温冻存。腹水采用50%饱和硫酸铵沉淀-正辛酸沉淀,或者用50%饱和硫酸铵沉淀-rProteinA-Sepharose Fast Flow亲和层析纯化,最后用SDS-PAGE检测纯度,需达到90%。本步骤制备的抗甘氨酸-蛋白质偶联物特异性单克隆抗体能与甘氨酸-蛋白质偶联物发生特异性结合反应,而不与非甘氨酸-蛋白质偶联物发生非特异性反应。

[0082] 3.抗甘氨酸-蛋白质偶联物多克隆IgG抗体制备方法

[0083] 以上述步骤1.1制备的甘氨酸-蛋白质偶联物,以10mg甘氨酸-蛋白质偶联物/次/只与等量完全福氏佐剂混匀,以甘氨酸-血蓝蛋白为优选,家兔皮下多点注射免疫。每1-2周1次,连续5次,间隔1周后采用分离颈动脉,收集血液约80-120毫升,室温放置2小时,4 $^{\circ}$ C 10000rpm离心30min,分离收集血清。上述血清再用甘氨酸-蛋白质偶联物(以甘氨酸-OVA为优选),亲和层析柱纯化抗甘氨酸的特异性IgG型抗体,最后用8%SDS-PAGE检测纯度,需达到90%。获得兔源性多克隆IgG抗体。

[0084] 为获得抗甘氨酸的F(ab) $'_2$ 特异性抗体片段,上述纯化的兔源性多克隆IgG抗体进一步在pH 4.5的50mM醋酸盐缓冲液中用0.1%(质量比)的胃蛋白酶切除IgG的Fc'端,37 $^{\circ}$ C反应12小时,然后在调或不调pH值的情况下,用饱和硫酸铵和/或SPA和/或甘氨酸-蛋白质偶联物亲和层析方法纯化F(ab) $'_2$ 抗体片段。获得特异性的抗甘氨酸的F(ab) $'_2$ 特异性抗体片段。

[0085] 本实施例制备的抗甘氨酸多克隆抗体能与甘氨酸发生特异性结合反应,而不与非甘氨酸-蛋白质偶联物发生非特异性反应。

[0086] 4.抗牛磺酸单克隆IgG型抗体制备方法

[0087] 4.1动物免疫

[0088] 以上述步骤1.2制备的牛磺酸-蛋白质偶联物,以牛磺酸-血蓝蛋白为优选,以100 μ g牛磺酸-蛋白质偶联物/次/只小鼠的浓度与等量的完全福氏佐剂混匀,皮下多点注射免疫Balb/c雌性小鼠(5-6周龄,体重18-20g),第1次与第2次间隔10-14天,以后每次间隔7天,连续5次,第2-5次牛磺酸-蛋白质偶联物与等量的不完全福氏佐剂乳化混匀,间隔1周后采用尾静脉/腹腔注射100 μ g(100 μ L体积)无菌的牛磺酸-多聚赖氨酸偶联物(以尾静脉为优选),以加强免疫1次,3天后细胞融合。

[0089] 4.2杂交瘤细胞的制备

[0090] 按照常规细胞融合方法进行。取步骤2.1免疫小鼠的脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞按体积比1:6在50%PEG (MW400-800) 的作用下融合,融合细胞先在次黄嘌呤-氨甲喋呤-胸腺嘧啶 (HAT) 选择培养基中,在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养,2周后换为次黄嘌呤-胸腺嘧啶 (HT) 培养基,继续在37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下培养。待克隆孔长至1/3-1时,取培养上清液进行抗体检测筛选。

[0091] 4.3特异性克隆孔筛选

[0092] 用ELISA法筛选抗体表达阳性孔。用50mM的碳酸盐缓冲液稀释牛磺酸-蛋白质偶联物(以牛磺酸-OVA为优选)至10μg/mL后,以100μL/孔包被反应微孔4℃过夜或37℃120min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris-HCL缓冲液(PBS)洗涤3次,用10%小牛血清室温封闭30min,再加入100μL上述步骤2.2培养上清液室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris-HCL缓冲液(PBS)洗涤3次,最后再加入1:2000稀释的羊抗小鼠IgG-HRP室温反应60min,用含0.05%Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS)或Tris-HCL缓冲液(PBS)洗涤3次,加入四甲基联苯氨(TMB)底物显色观察。凡出现明显蓝色反应者为阳性,否则为阴性。保留与牛磺酸-蛋白质偶联物有反应的细胞克隆孔,再采用有限稀释法进行3次克隆筛选,建株的杂交瘤细胞再扩大培养、冻存,用于制备腹水。

[0093] 4.4腹水的制备和纯化

[0094] 将稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞扩大培养后,以 $0.5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 个/只接种到预先用0.5mL降植烷或液体石蜡致敏7-10天Balb/c小鼠的腹腔,7-12天内观察,收取腹水,离心后测定效价。经50%饱和硫酸铵沉淀保存或者低温冻存。腹水采用50%饱和硫酸铵沉淀-正辛酸沉淀,或者用50%饱和硫酸铵沉淀-rProteinA-Sepharose Fast Flow亲和层析纯化,最后用SDS-PAGE检测纯度,需达到90%。本步骤制备的抗牛磺酸-蛋白质偶联物特异性单克隆抗体能与牛磺酸-蛋白质偶联物发生特异性结合反应,而不与非牛磺酸-蛋白质偶联物发生非特异性反应。

[0095] 5.抗牛磺酸-蛋白质偶联物多克隆IgG抗体制备方法

[0096] 以上述步骤1.1制备的牛磺酸-蛋白质偶联物,以10mg牛磺酸-蛋白质偶联物/次/只与等量完全福氏佐剂混匀,家兔皮下多点注射免疫。每1-2周1次,连续5次,间隔1周后采用分离颈动脉,收集血液约80-120毫升,室温放置2小时,4℃10000rpm离心30min,分离收集血清。上述血清再用牛磺酸-蛋白质偶联物亲和层析柱纯化抗牛磺酸的特异性IgG型抗体,最后用8%SDS-PAGE检测纯度,需达到90%。获得兔源性多克隆IgG抗体。

[0097] 为获得抗牛磺酸的F(ab)[']₂特异性抗体片段,上述纯化的兔源性多克隆IgG抗体进一步在pH 4.5的50mM醋酸盐缓冲液中用0.1%(质量比)的胃蛋白酶切除IgG的Fc'端,37℃反应12小时,然后在调或不调pH值的情况下,用饱和硫酸铵和/或SPA和/或牛磺酸-蛋白质偶联物亲和层析方法纯化F(ab)[']₂抗体片段。获得特异性的抗牛磺酸F(ab)[']₂特异性抗体片段。

[0098] 本实施例制备的抗牛磺酸多克隆抗体能与牛磺酸-蛋白质偶联物发生特异性结合反应,而不与非牛磺酸-蛋白质偶联物发生非特异性反应。

[0099] 6.均相酶免疫法测定血清甘氨酸含量

[0100] 采用葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)法进行。

[0101] 6.1主要试剂组成成分

[0102] 试剂R1:10ug/mL抗牛磺酸多克隆IgG抗体(包含F(ab)'₂特异性抗体片段),100μg/mL抗甘氨酸牛磺酸多克隆IgG抗体(包含F(ab)'₂特异性抗体片段),500μg/mL G6P,0.5% Tween-20,10mM MgCl₂,0.1%NaN₃,溶剂为pH8.0的Tris-HCL缓冲液;

[0103] 试剂R2:3U/mL甘氨酸-G6PDH偶联物,1000ug/mL NADP,1%BSA,溶剂为pH8.0的Tris-HCL缓冲液。

[0104] 标准液配制:精确称取美国Sigma公司甘氨酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于12.5mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/LBSA;甘氨酸浓度为80μg/mL,然后再用内含5g/L BSA,50mM,三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液作倍比稀释为40μg/mL、20μg/mL、10μg/mL、5μg/mL、2.5μg/mL、1.25μg/mL、0.625μg/mL、0.3125μg/mL、0.16μg/mL和0.08μg/mL等,取适当做校准曲线。

[0105] 质控品配制:精确称取美国Sigma公司甘氨酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于6.25mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/LBSA;甘氨酸浓度为160μg/mL,然后再用健康人新鲜血清作1:8和1:32稀释,即甘氨酸浓度分别为20μg/mL和5μg/mL。

[0106] 6.2检测步骤

[0107] 反应类型:速率法 温度:37℃ 比色杯光径:0.6cm

[0108] 主/副波长:340nm 单位:U/ml 反应方向:上升

[0109]

	空白管(B)	标准管(S)	测定管(T)	质控管
试剂 R1	250μL	250μL	250μL	250μL
纯化水	8 μL			
标准液		8 μL		
样品			8 μL	
质控品				8 μL
混匀, 37℃孵育 3-5 分钟,				
试剂 R2	50μL	50μL	50μL	50μL
混匀, 37℃延迟 30 秒, 反应 5 分钟, 读取吸光度ΔA/min。				

[0110] 6.3结果确定:

[0111] 计算校准品吸光度的差值(A校准-A空白),建立合适的数学模(非线性)如Logit-Log等,拟合成多点定标的校准曲线(如图3)。根据校准曲线的反应变化幅度、线性范围、相关系数和反应可重复性确定血清甘氨酸含量。

[0112] 7.抗甘氨酸-蛋白质偶联物抗体交叉率测定

[0113] 7.1甘氨酸类似物配制

[0114] 甘氨酸类似物包括甘氨酸脱氧胆酸、脱氧胆酸、胆酸、鹅胆酸、鹅脱氧胆酸、石胆酸、牛磺胆酸、牛磺脱氧胆酸等均购自(上海阿拉丁公司)。上述各胆酸盐均溶于包含0.1%

Tween-80的三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液(100mM,pH8.0)中,浓度均为40 μ g/mL。

[0115] 7.2主要试剂组成成分

[0116] 试剂R1:1 μ g/mL抗牛磺酸单克隆IgG抗体,10 μ g/mL抗甘氨酸牛磺酸单克隆抗体,50 μ g/mL G6P,0.01%Tween-20,0.3mM MgCl₂,0.01%NaN₃,溶剂为pH6.5的Tris-HCL缓冲液;

[0117] 试剂R2:0.2U/mL甘氨酸-G6PDH偶联物,50 μ g/mL NADP,0.1%BSA,溶剂为pH6.5的Tris-HCL缓冲液。

[0118] 标准液配制:精确称取美国Sigma公司甘氨酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于12.5mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/LBSA;甘氨酸浓度为80 μ g/mL,然而再用内含5g/L BSA,50mM,三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液作倍比稀释为40 μ g/mL、20 μ g/mL、10 μ g/mL、5 μ g/mL、2.5 μ g/mL、1.25 μ g/mL、0.625 μ g/mL、0.3125 μ g/mL、0.16 μ g/mL和0.08 μ g/mL等,取适当做校准曲线。

[0119] 质控品配制:精确称取美国Sigma公司甘氨酸钠盐(纯度97%)1.000mg溶解于6.25mL三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液50mM,pH6.8,内含5g/LBSA;甘氨酸浓度为160 μ g/mL,然后再用健康人新鲜血清作1:8和1:32稀释,即甘氨酸浓度分别为20 μ g/mL和5 μ g/mL。

[0120] 7.3检测步骤

[0121] 反应类型:速率法 温度:37 $^{\circ}$ C 比色杯光径:0.6cm

[0122] 主/副波长:340nm 单位:U/ml 反应方向:上升

[0123]

	空白管(B)	标准管(S)	测定管(T)	质控管
试剂 R1	250 μ L	250 μ L	250 μ L	250 μ L
纯化水	8 μ L			
标准液		8 μ L		
样本 (类似物)			8 μ L	
质控品				8 μ L
混匀, 37 $^{\circ}$ C孵育 3-5 分钟,				
试剂 R2	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
混匀, 37 $^{\circ}$ C延迟 30 秒, 反应 5 分钟, 读取吸光度 $\Delta A/min$ 。				

[0124] 7.4结果确定:

[0125] 计算校准品吸光度的差值(A校准-A空白),以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,建立多点定标的校准曲线,测定表1中已知各种类似物的浓度,测定浓度与已知浓度(40 μ g/mL)比值为抑制率。结果见表1。

[0126] 表1

	测定结果	
	品 名	浓度为 40ug/mL
[0127]	甘胆酸钠	100%
	鹅脱氧胆酸钠	0.6%
	熊去氧胆酸钠	1.7%
	脱氧胆酸钠	0.4%
	甘 氨 脱 氧 胆 酸 钠 (GDCA)	4.0%
[0128]	石胆酸	0.3%
	胆酸，无水	6.5%

[0129] 以上显示和描述了本发明的基本原理和主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

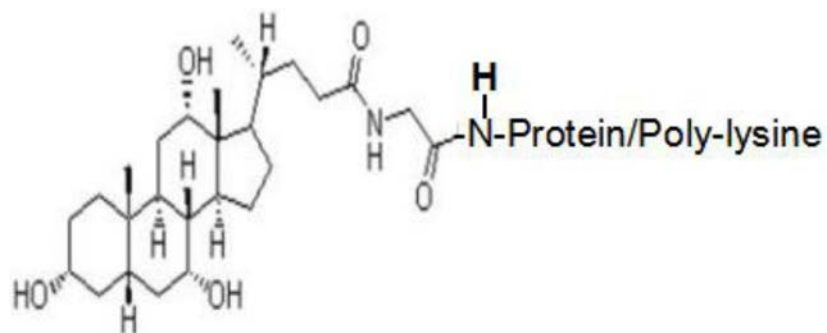


图1

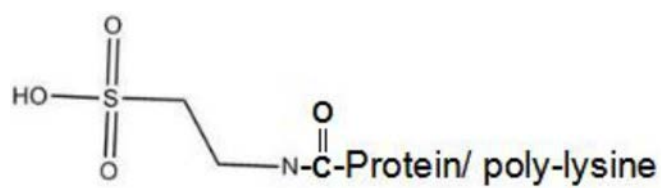


图2

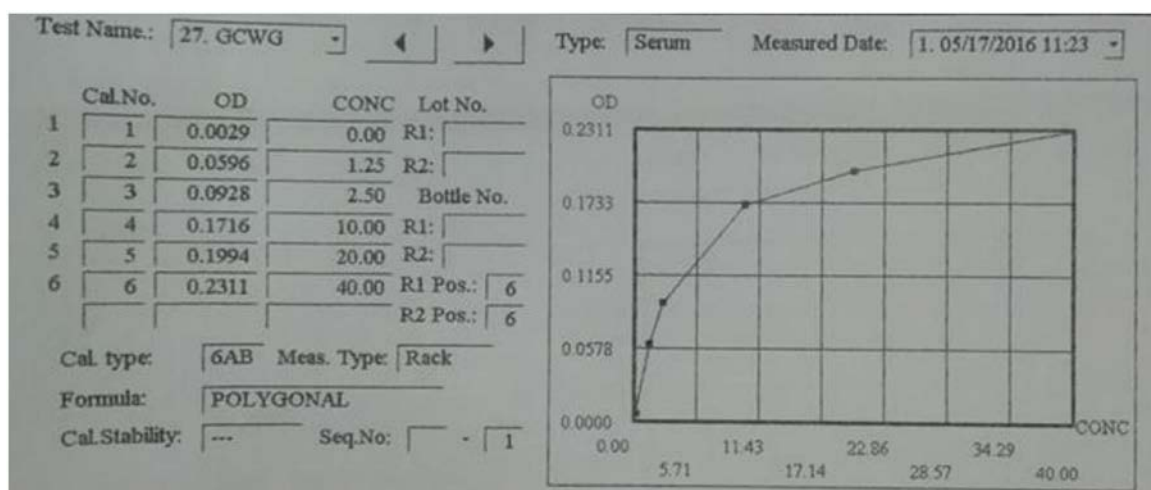


图3

专利名称(译)	一种试剂盒、试剂盒的制备方法及利用该试剂盒实现的外周血甘氨酸的检测方法		
公开(公告)号	CN106226512B	公开(公告)日	2018-10-16
申请号	CN201610620346.0	申请日	2016-07-29
[标]申请(专利权)人(译)	胡清		
申请(专利权)人(译)	胡清		
当前申请(专利权)人(译)	胡清		
[标]发明人	胡清		
发明人	胡清		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/531 G01N33/577		
代理人(译)	丁茂林		
其他公开文献	CN106226512A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种试剂盒，包括试剂R1、试剂R2，所述试剂R1含有：三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液，抗牛磺酸抗体，抗甘氨酸抗体，葡萄糖-6-磷酸(G6P)；所述试剂R2含有：三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCL)缓冲液，甘氨酸-G-6-PD偶联物，NADP，BSA。本发明同时公开了试剂盒的制备方法，尤其是抗牛磺酸抗体、抗甘氨酸抗体的制备方法。同时，本发明也公开了利用该试剂盒实现的外周血甘氨酸的检测方法。本发明能够封闭牛磺酸的干扰，检测灵敏度高达0.1ug/mL，特异性强，检测重复性高和稳定性好等优点。

