



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103760348 B

(45) 授权公告日 2015.03.11

(21) 申请号 201410047767.X

(22) 申请日 2014.02.11

(73) 专利权人 苏州博源医疗科技有限公司
地址 215163 江苏省苏州市高新区锦峰路 8 号

(72) 发明人 虞留明 李冬 陆丽华 张曼 胡瑜

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林

(51) Int. Cl.

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102944673 A, 2013.02.27, 全文.

US 2005118152 A1, 2005.06.02, 全文.

HU 41822 A2, 1987.05.28, 摘要, 说明书实施例 1-4, 图 1-2, 权利要求 1-7.

CN 1632578 A, 2005.06.29, 全文.

H. Jörg Wildgrube. Radioimmunoassay of Bile Acids in Tissue, Bile, and Urine. 《Clin Chem》. 1983, 第 29 卷 (第 3 期), 494-498.

审查员 胡晓佳

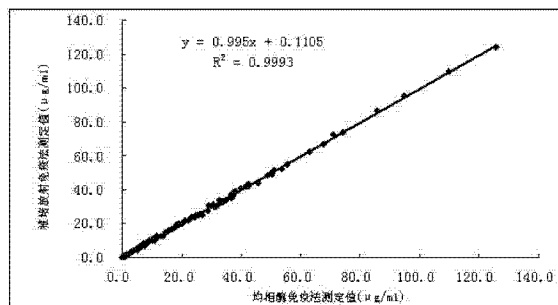
权利要求书3页 说明书16页 附图1页

(54) 发明名称

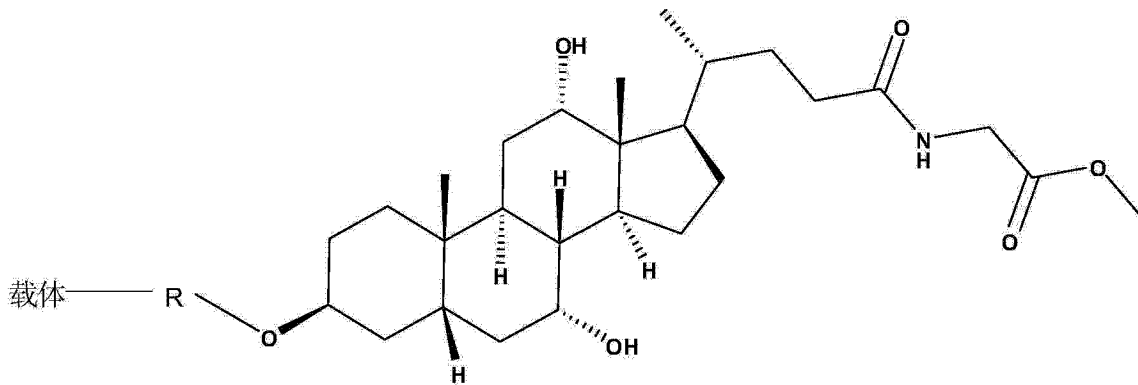
一种甘胆酸免疫检测试剂及其制备和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种甘胆酸检测试剂及其制备和检测方法,具体涉及一种甘胆酸免疫检测试剂及其制备和检测方法,包括:抗甘胆酸特异性抗体、用于检测抗甘胆酸特异性抗体-甘胆酸复合物的指示试剂;上述抗甘胆酸特异性抗体由甘胆酸免疫原免疫动物得到。本发明的有益之处在于:本发明的甘胆酸免疫原特异性强、免疫原性高,制备出的抗甘胆酸特异性抗体特异性强、效价高,并且与常见的 45 种药物无任何交叉反应;含有上述抗甘胆酸特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的甘胆酸含量,并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现甘胆酸的高通量快速化测定,准确度高,特异性强,精确度和检测效率有了较大的提高。



1. 一种甘胆酸免疫检测试剂, 其特征在于, 包括: 抗甘胆酸特异性抗体、用于检测抗甘胆酸特异性抗体-甘胆酸复合物的指示试剂; 上述抗甘胆酸特异性抗体由甘胆酸免疫原免疫动物得到, 甘胆酸免疫原的结构式如式 (I) 所示:

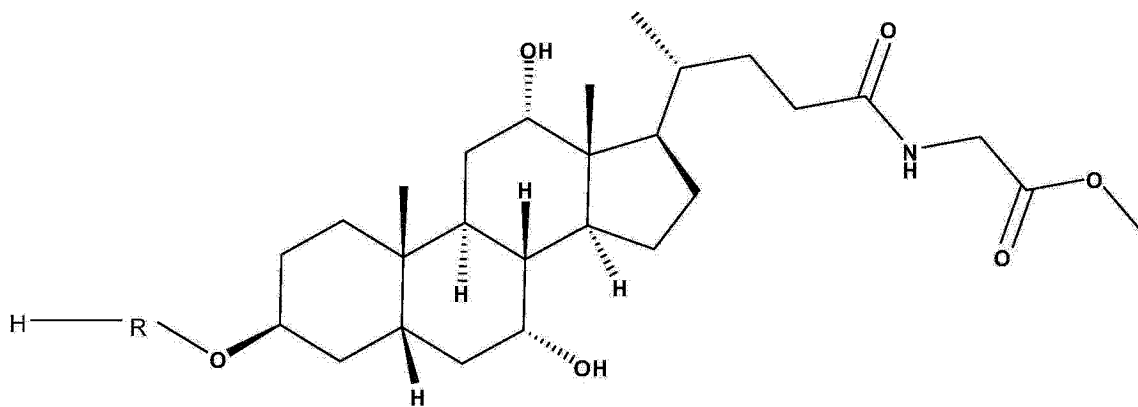


式 (I)

式中, R 为连接基团 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$, n 为 1 至 20 之间的任意整数, 载体为具有免疫原性的蛋白质, 载体为血清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白; 上述指示试剂选自酶试剂; 酶试剂, 包括: 酶标偶联物和酶的底物; 上述酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物; 上述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

2. 根据权利要求 1 所述的甘胆酸免疫检测试剂, 其特征在于, R 为 $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的甘胆酸免疫检测试剂, 其特征在于, 上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与甘胆酸衍生物偶联形成, 上述甘胆酸衍生物的结构式如式 (II) 所示:



式 (II)

上述 R 为 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$, n 为 1 至 20 之间的整数。

4. 根据权利要求 3 所述的甘胆酸免疫检测试剂, 其特征在于, 上述 R 为 $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ 。

5. 一种甘胆酸免疫检测试剂的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(1) 权利要求 3 所述的甘胆酸衍生物的合成与纯化, 并进行结构鉴定;

(2) 甘胆酸免疫原的合成: 使甘胆酸衍生物的 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ 基团与具有免疫原性的蛋白质载体连接, n 为 1 至 20 之间的整数;

(3) 用甘胆酸免疫原免疫动物, 制备并纯化抗甘胆酸特异性抗体;

(4) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备: 制备葡萄糖-6-磷酸脱氢酶溶液, 激活甘胆酸衍生物, 使 G6PDH 与甘胆酸衍生物连接, 纯化连接产物;

(5) 甘胆酸均相酶免疫检测试剂的制备:

试剂 A 的制备: 由抗甘胆酸特异性抗体和均相酶底物混合而成;

试剂 B 的制备: 由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与 Tris 缓冲液混合而成。

6. 根据权利要求 5 所述的一种甘胆酸免疫检测试剂的制备方法, 其特征在于, 所述的步骤 (2) 中, 蛋白质载体为 BSA, $n = 2$, 具体合成步骤如下:

1) 将 20mg BSA 溶解于 5ml 0.2M、pH 8.5 的 PBS 中, 上述溶液置于烧杯 A 中;

2) 将如下化学品加入到烧杯 B 中搅拌溶解: 20mg 甘胆酸衍生物、0.35ml 二甲基酰胺 DMF、0.35ml 乙醇、0.7ml 10mM pH 5.0 的磷酸钾缓冲液、40mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺、5mg N-羟基琥珀酰亚胺, 于室温下搅拌溶解, 反应 30 分钟;

3) 将烧杯 B 中的溶液滴加至烧杯 A 中, 得到混合溶液, 在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 下搅拌过夜; 将上述搅拌后的混合溶液经过中性磷酸盐缓冲液透析纯化, 得到 BSA-甘胆酸免疫原, 储存于 -20°C 。

7. 根据权利要求 5 所述的一种甘胆酸免疫检测试剂的制备方法, 其特征在于, 所述的步骤 (4) 具体过程为:

1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 溶液的制备:

a. 称取 15mg 规格为 100KU 的 G6PDH, 室温溶解于 12mL 含有 72.6mg (0.05M) Tris、8mg MgCl_2 (3.3mM) 和 100mg NaCl 的溶液中, 该溶液 $\text{pH} = 9.0$;

b. 加入 225mg 还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NADH, 135mg 葡萄糖-6-磷酸 G-6-P 以及 0.75mL 卡必醇;

c. 逐滴加入 2mL 二甲基亚砷;

2) 甘胆酸衍生物的激活

a) 在无水状态下称取 10mg 甘胆酸衍生物, 溶解于 $600 \mu\text{L}$ DMF 中;

b) 使上述溶液温度降到 $-2 \sim -8^{\circ}\text{C}$;

c) 加入 $3 \mu\text{L}$ 三丁胺;

d) 加入 $1.5 \mu\text{L}$ 氯甲酸异丁酯;

e) $-2 \sim -8^{\circ}\text{C}$ 搅拌 30 分钟;

3) G6PDH 与甘胆酸衍生物的连接

a) 将上述激活的甘胆酸衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中;

b) $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 搅拌过夜;

4) 纯化产物

通过 G-25 凝胶层析柱纯化连接产物, 获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物, 于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 下储存。

8. 根据权利要求 5 所述的一种甘胆酸免疫检测试剂的制备方法, 其特征在于, 步骤 (5) 的具体过程如下:

试剂 A 的制备: 将 4.036g (11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD、1.711g (11.25mM) 葡萄糖-6-磷酸 G6P 用 1L 55mM、 $\text{pH} = 8.0$ 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物; 将制备的抗甘胆酸特异性抗体加到上述均相酶底物中, 抗体与均相酶底物的体积

比为 1:100 ~ 1:10000 ;

试剂 B 的制备 :将制备的葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物加到 120mM、pH = 8.2 的 Tris 缓冲液中,上述偶联物与 Tris 缓冲液的体积比为 1:100 ~ 1:10000。

9. 利用权利要求 1 至 4 任意一项所述的甘胆酸免疫检测试剂的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

- 1) 将待测样本与抗甘胆酸特异性抗体接触;
 - 2) 根据待测样本中甘胆酸与抗甘胆酸特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中甘胆酸的含量;
- 所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液;

指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原酶标偶联物;上述酶的底物为葡萄糖 -6- 磷酸。

一种甘胆酸免疫检测试剂及其制备和检测方法

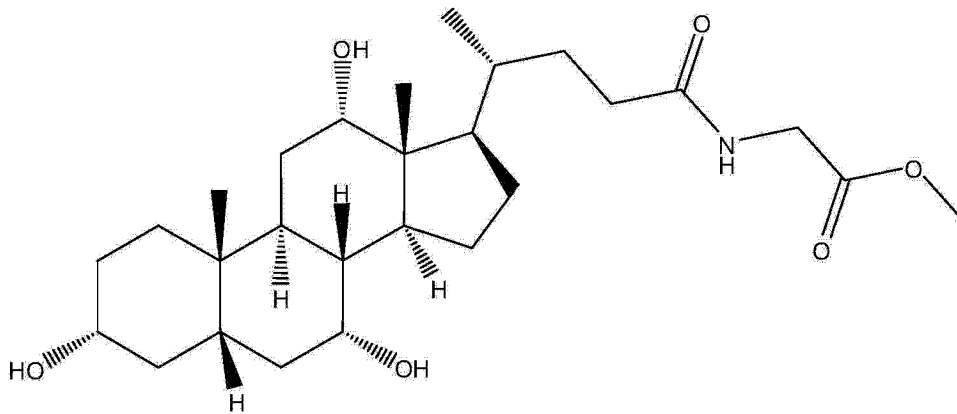
技术领域

[0001] 本发明涉及一种甘胆酸检测试剂及其制备和检测方法,具体涉及一种甘胆酸均相酶免疫检测试剂及其制备和检测方法。

背景技术

[0002] 甘胆酸 (Cholyglycine, CG) 结构式如(III)所示:

[0003]



[0004] 式(III)

[0005] 甘胆酸是胆酸与甘氨酸结合而成的结合型胆酸之一,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。研究显示,肝硬化、肝癌、急性肝炎和慢性活动性肝炎等肝病患者的甘胆酸含量明显高于正常人,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。

[0006] 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。

[0007] 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。

[0008] 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。

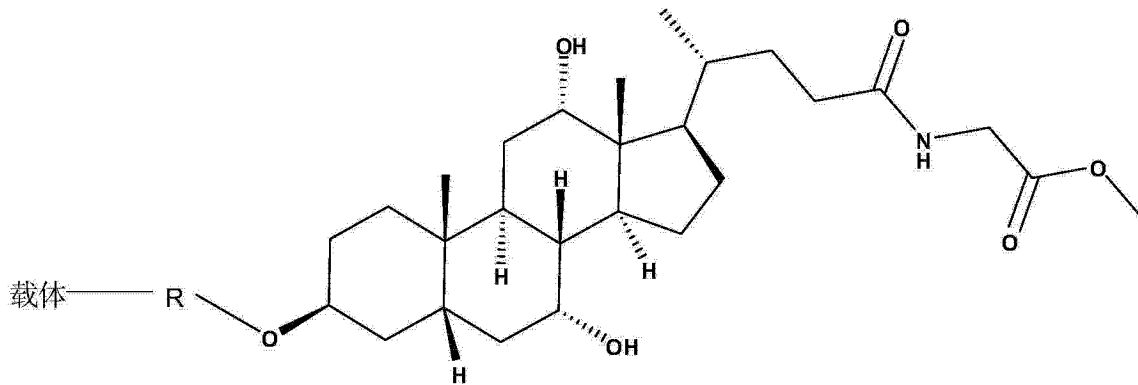
发明内容

[0009] 为解决现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种既安全又可快速、高效、灵敏、准确检测出待测样本中甘胆酸含量的甘胆酸均相酶免疫检测试剂及其制备方法,以及可以与各种类型的自动生化分析仪联用、对检测人员要求不高的甘胆酸均相酶免疫检测方法。

[0010] 为了实现上述目标,本发明采用的技术方案是:

[0011] 一种甘胆酸免疫检测试剂,其特征在于,包括:抗甘胆酸特异性抗体、用于检测抗甘胆酸特异性抗体-甘胆酸复合物的指示试剂;上述抗甘胆酸特异性抗体由甘胆酸免疫原免疫动物得到,甘胆酸免疫原的结构式如式(I)所示:

[0012]



[0013] 式(I)

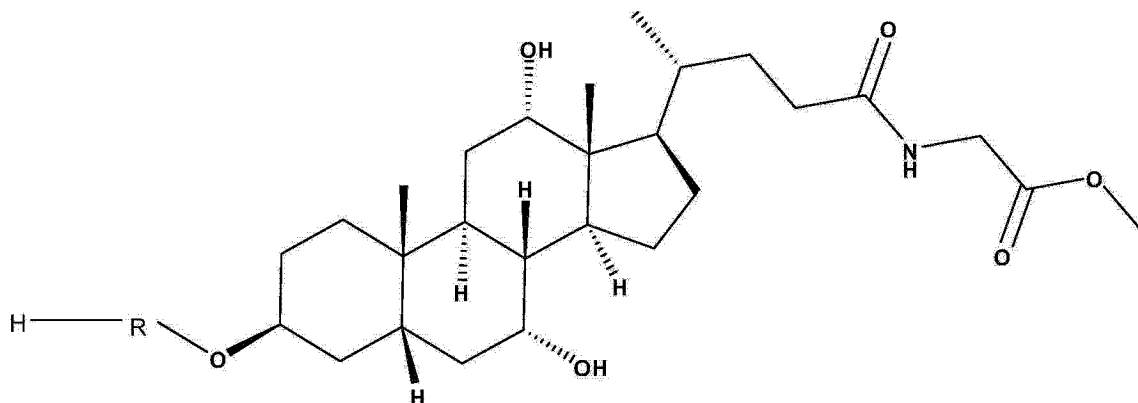
[0014] 式中,R为连接基团 $-(CH_2)_n-O-CH_2-COO-$,n为1至20之间的任意整数,载体具有免疫原性的蛋白质,载体为血清蛋白、血蓝蛋白或甲状腺球蛋白;上述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂或化学发光试剂。

[0015] 前述的甘胆酸免疫检测试剂,R为 $-(CH_2)_2-O-CH_2-COO-$ 。

[0016] 前述的甘胆酸免疫检测试剂,上述指示试剂选自酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物;上述酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物;上述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

[0017] 前述的甘胆酸免疫检测试剂,上述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物由葡萄糖-6-磷酸脱氢酶与甘胆酸衍生物偶联形成,上述甘胆酸衍生物的结构式如式(II)所示:

[0018]



[0019] 式 (II)

[0020] 上述 R 为 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$, n 为 1 至 20 之间的整数。

[0021] 前述的甘胆酸免疫检测试剂, 上述 R 为 $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ 。

[0022] 一种甘胆酸免疫检测试剂的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

[0023] (1) 甘胆酸衍生物的合成与纯化, 并进行结构鉴定;

[0024] (2) 甘胆酸免疫原的合成: 使甘胆酸衍生物的 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ 基团与具有免疫原性的蛋白质载体连接, n 为 1 至 20 之间的整数;

[0025] (3) 用甘胆酸免疫原免疫动物, 制备并纯化抗甘胆酸特异性抗体;

[0026] (4) 葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物的制备: 制备葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶溶液, 激活甘胆酸衍生物, 使 G6PDH 与甘胆酸衍生物连接, 纯化连接产物;

[0027] (5) 甘胆酸均相酶免疫检测试剂的制备:

[0028] 试剂 A 的制备: 由抗甘胆酸特异性抗体和均相酶底物混合而成;

[0029] 试剂 B 的制备: 由葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物与 Tris 缓冲液混合而成。

[0030] 前述的一种甘胆酸免疫检测试剂的制备方法, 所述的步骤 (2) 中, 蛋白质载体为 BSA, n=2, 具体合成步骤如下:

[0031] 1) 将 20mg BSA 溶解于 5ml 0.2M、pH8.5 的 PBS 中, 上述溶液置于烧杯 A 中;

[0032] 2) 将如下化学品加入到烧杯 B 中搅拌溶解: 20mg 甘胆酸衍生物、0.35ml 二甲基酰胺 DMF、0.35ml 乙醇、0.7ml 10mM pH5.0 的磷酸钾缓冲液、40mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺、5mg N-羟基琥珀酰亚胺, 于室温下搅拌溶解, 反应 30 分钟;

[0033] 3) 将烧杯 B 中的溶液滴加至烧杯 A 中, 得到混合溶液, 在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下搅拌过夜; 将上述搅拌后的混合溶液经过中性磷酸盐缓冲液透析纯化, 得到 BSA-甘胆酸免疫原, 储存于 -20°C 。

[0034] 前述的一种甘胆酸免疫检测试剂的制备方法, 所述的步骤 (4) 具体过程为:

[0035] 1) 葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 (G6PDH) 溶液的制备:

[0036] a. 称取 15mg 规格为 100KU 的 G6PDH, 室温溶解于 12mL 含有 72.6mg (0.05M) Tris、8mg MgCl_2 (3.3mM) 和 100mg NaCl 的溶液中, 该溶液 pH=9.0;

[0037] b. 加入 225mg 还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NADH, 135mg 葡萄糖 -6- 磷酸 G-6-P 以及 0.75mL 卡必醇;

[0038] c. 逐滴加入 2mL 二甲基亚砷;

[0039] 2) 甘胆酸衍生物的激活

[0040] a) 在无水状态下称取 10mg 甘胆酸衍生物, 溶解于 600 μL DMF 中;

[0041] b) 使上述溶液温度降到 $-2 \sim -8^\circ\text{C}$;

[0042] c) 加入 3 μL 三丁胺;

[0043] d) 加入 1.5 μL 氯甲酸异丁酯;

[0044] e) $-2 \sim -8^\circ\text{C}$ 搅拌 30 分钟;

[0045] 2) G6PDH 与甘胆酸衍生物的连接

[0046] a) 将上述激活的甘胆酸衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中;

[0047] b) $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 搅拌过夜;

[0048] 4) 纯化产物

[0049] 通过 G-25 凝胶层析柱纯化连接产物, 获得的最终产物为葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物, 于 2-8°C 下储存。

[0050] 前述的一种甘胆酸免疫检测试剂的制备方法, 步骤(5) 的具体过程如下:

[0051] 试剂 A 的制备: 将 4.036g (11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD、1.711g (11.25mM) 葡萄糖 -6- 磷酸 G6P 用 1L 55mM、pH=8.0 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物; 将制备的抗甘胆酸特异性抗体加到上述均相酶底物中, 抗体与均相酶底物的体积比为 1:100 ~ 1:10000;

[0052] 试剂 B 的制备: 将制备的葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶 - 半抗原偶联物加到 120mM、pH=8.2 的 Tris 缓冲液中, 上述偶联物与 Tris 缓冲液的体积比为 1:100 ~ 1:10000。

[0053] 利用甘胆酸免疫检测试剂的检测方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

[0054] 1) 将待测样本与抗甘胆酸特异性抗体接触;

[0055] 2) 根据待测样本中甘胆酸与抗甘胆酸特异性抗体的结合情况,

[0056] 利用指示试剂判断样本中甘胆酸的含量;

[0057] 所述待测样本为血清、血浆、唾液或尿液。

[0058] 本发明的有益之处在于: 本发明的甘胆酸免疫原特异性强、免疫原性高, 制备出的抗甘胆酸特异性抗体特异性强、效价高, 并且与常见的 45 种药物无任何交叉反应; 含有上述抗甘胆酸特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的甘胆酸含量, 并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品, 实现甘胆酸的高通量快速化测定, 准确度高, 特异性强, 精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高, 同时实现了检测过程的全自动化, 对检测人员的要求不高, 易于实现和推广使用。

附图说明

[0059] 图 1 是甘胆酸均相酶免疫反应标准曲线图;

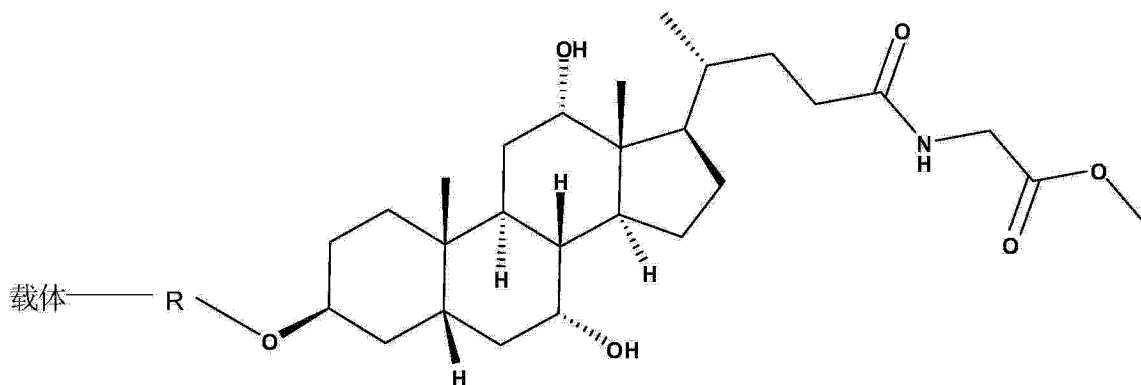
[0060] 图 2 是甘胆酸均相酶免疫相关性分析图。

具体实施方式

[0061] 本发明所采取的技术方案是:

[0062] 甘胆酸免疫原, 其结构式如式(I) 所示:

[0063]



[0064] 式(I)

[0065] 式中,R为连接基团,可以是 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$,n为1至20之间的整数,特别的,R为 $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$;载体具有免疫原性,优选的,载体为具有免疫原性的蛋白质。虽然其他足够大的具备免疫原性的物质也可以作为载体,但通常情况下选用蛋白质作为载体。最常用的免疫原性载体包括血清蛋白,血蓝蛋白(KLH)和甲状腺球蛋白。本发明中的载体优选为血清蛋白。

[0066] 一种抗甘胆酸特异性抗体,由式(I)所示的甘胆酸免疫原免疫动物得到。

[0067] 本发明中所指的“抗体”不仅仅指完整的抗体分子,也包括保留完整抗体特异性结合能力的抗体片断或者衍生物。本发明的抗体可以是多克隆抗体也可以是单克隆抗体,优选为多克隆抗体。

[0068] 获得多克隆抗体的方法是使用式(I)所示的甘胆酸免疫原,在加或者不加佐剂后,在动物的一个或者多个部位进行免疫,宿主动物包括:兔,山羊,小鼠,绵羊,豚鼠或马。持续免疫一直进行,直至抗体效价达到最高。动物定时采血得到适量的特异抗血清,抗血清可以纯化。

[0069] 单克隆抗体可通过体细胞杂交技术来制作。

[0070] 一种甘胆酸均相酶免疫检测试剂,包括:上述抗甘胆酸特异性抗体、用于检测抗甘胆酸特异性抗体-甘胆酸复合物的指示试剂。指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优选的,指示试剂为酶试剂,包括:酶标偶联物和酶的底物。其中,酶标偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,其可通过化学合成方法得到。

[0071] 上述甘胆酸均相酶免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

[0072] 1) 将待测样本与上述抗甘胆酸特异性抗体接触;

[0073] 2) 根据待测样本中甘胆酸与上述抗甘胆酸特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断样本中甘胆酸的含量。

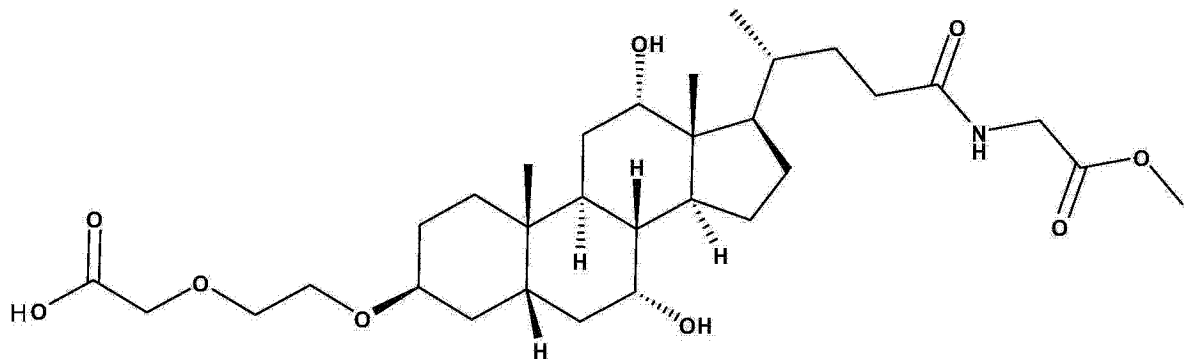
[0074] 待测样本为各种生理样本,例如血清、血浆、尿液、唾液等。优选的,待测样本为血清或血浆。

[0075] 下面结合具体的实施例,进一步说明本发明。

[0076] 实施例一:甘胆酸衍生物的合成及其结构确认

[0077] 以下实施例中使用的甘胆酸衍生物化学结构如式(IV)所示:

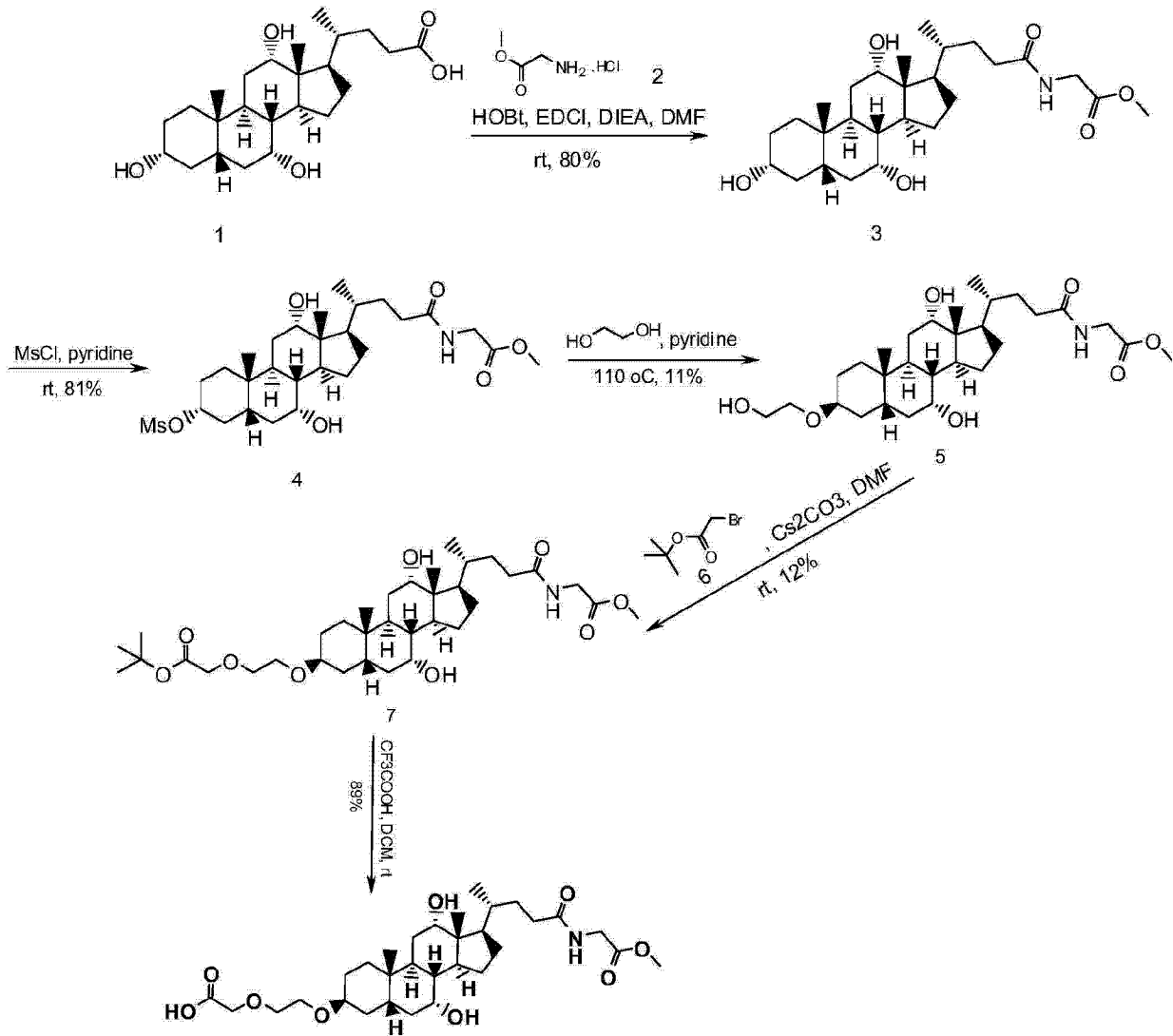
[0078]



[0079] 式(IV)

[0080] 该甘胆酸衍生物的合成路线如下:

[0081]

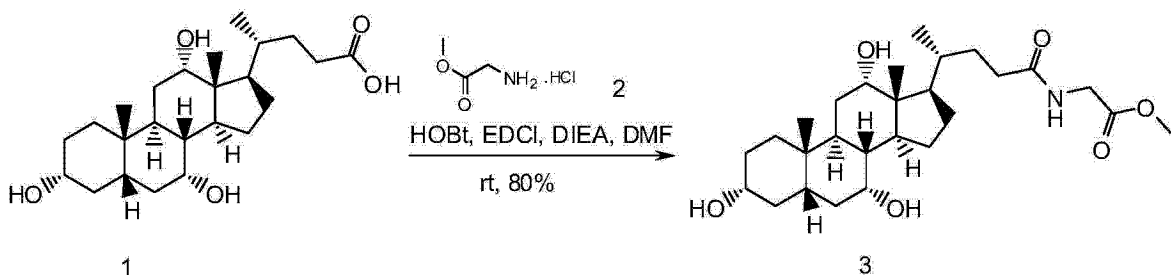


[0082] 甘胆酸衍生物

[0083] 具体的合成步骤如下：

[0084] 化合物 3 的合成

[0085]



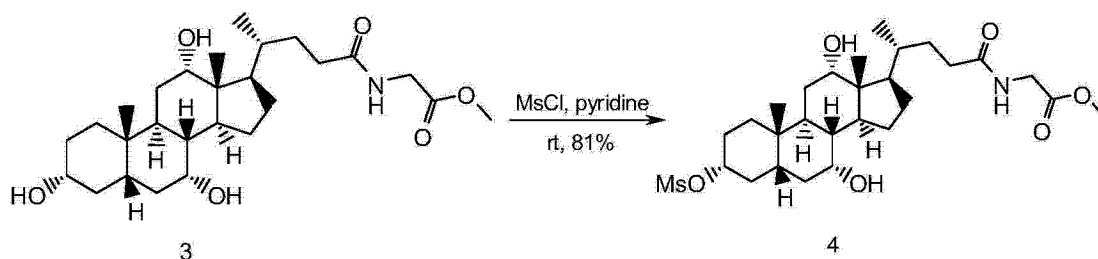
[0086] 1)称取 10.0g (24.5mmol)化合物 1 胆酸,将化合物 1 溶解于 100mL 无水二甲基甲酰胺(DMF)中,室温下加入 7.04g (36.7mmol)碳二亚胺盐酸盐(EDCI)、4.96g (36.7mmol)羟基苯并三氮唑(HOBT)和 10.7mL(61.2mmol)二异丙基乙胺(DIEA),再加入 3.07g(24.5mmol)化合物 2 甘氨酸,搅拌 4 小时,得到合成溶液；

[0087] 2)将上述合成溶液用水稀释后再用乙酸乙酯(EtOAc)萃取,使用水和卤水冲洗有机层,加入 Na₂SO₄干燥,通过减压方法使溶剂蒸发,最后得到 9.38g 白色固体化合物 3,即甘

氨胆酸,产率 80%。

[0088] 化合物 4 的合成

[0089]

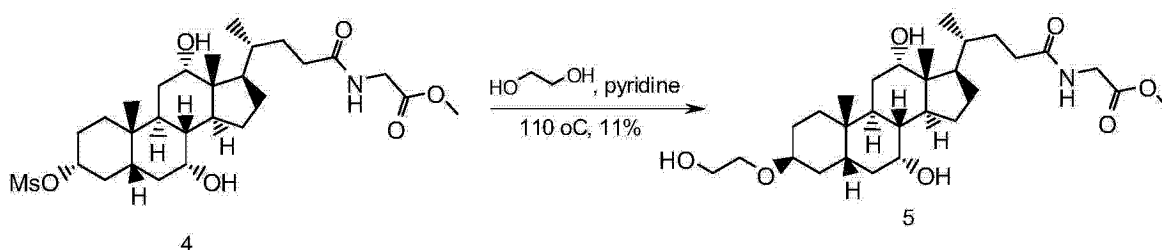


[0090] 1) 称取 8.27g (17.2mmol) 化合物 3 溶解于 90mL 的吡啶中,0℃下加入 2.37g (20.7mmol) 甲基磺酰氯 (MsCl),将此溶液在室温下搅拌 1 小时,得到合成溶液。

[0091] 2) 将上述合成溶液用水稀释后再用乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取,使用水和卤水冲洗有机层,加入 Na_2SO_4 干燥,通过减压方法使溶剂蒸发,最后得到 6.67g 白色固体化合物 4,产率 81%。

[0092] 化合物 5 的合成

[0093]

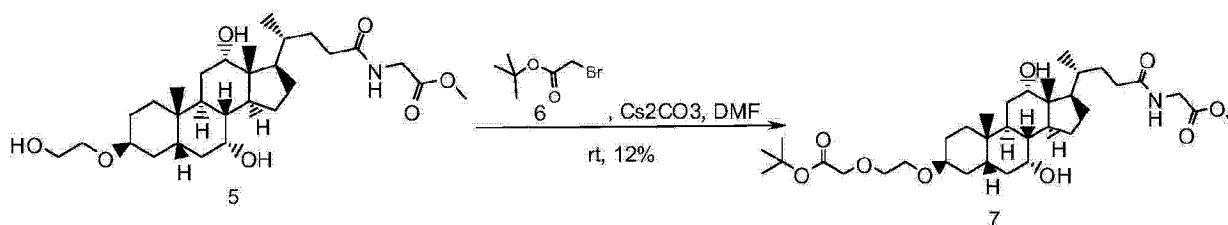


[0094] 1) 称取 10.0g (18.0mmol) 化合物 4 溶解于 100mL 的吡啶中,室温下加入 20mL 的乙二醇,将此反应混合液加热至 110℃过夜。

[0095] 2) 将上述反应混合液除去溶剂,残留物用水稀释后再用乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取,使用卤水冲洗有机层,加入 Na_2SO_4 干燥,过滤,浓缩并通过 FCC (DCM/MeOH=30/1) 方法纯化得到 1.33g 白色固体化合物 5 粗品,产率 11%。

[0096] 化合物 7 的合成

[0097]

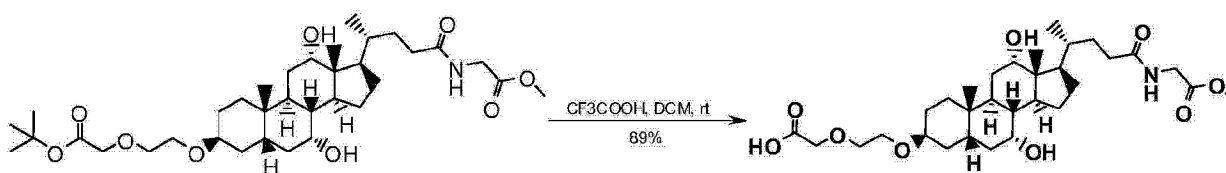


[0098] 1) 称取 100mg (0.191mmol) 化合物 5 和 64mg (0.21mmol) 碳酸铯 (Cs_2CO_3),共同悬浮于 5mL 的无水二甲基甲酰胺 (DMF) 中,冰浴条件下加入 41mg (0.21mmol) 化合物 6 (溴乙酸叔丁酯),室温下搅拌反应过夜。

[0099] 2) 将上述反应液用水稀释后再用乙酸乙酯 (EtOAc) 萃取,使用水和卤水冲洗有机层,加入 Na_2SO_4 干燥,过滤,浓缩并通过 FCC (DCM/MeOH=35/1) 方法纯化得到 15mg 黄色固体化合物 7,产率 12%。

[0100] 甘胆酸衍生物的合成

[0101]



[0102] 1) 称取 80mg (0.13mmol) 化合物 7 溶解于 5mL 的二氯甲烷(DCM)中,冰浴条件下加入 1mL 三氟乙酸(CF_3COOH),室温下搅拌反应 2 小时。

[0103] 2) 将上述反应液除去溶剂后用 1N 的氢氧化钠(NaOH)调节 pH 值至 9.0,再用乙酸乙酯(EtOAc)萃取。将水相用 1N 的盐酸(HCl)调节 pH 值至 6.0,再用乙酸乙酯(EtOAc)萃取。

[0104] 3) 使用卤水冲洗有机层,加入 Na_2SO_4 干燥,浓缩得到 65mg 无色固体产物,即式(IV)所示的甘胆酸衍生物,产率 89%,纯度 >95%。

[0105] 对上述无色固体纯化产物进行结构鉴定

[0106] 1、利用 Bruker Avance III plus400MHz 和 VARIAN MERCURY plus300M 对上述无色固体化合物进行核磁共振光谱扫描,采用 TMS 作为内标。结果如下: ^1H NMR(400MHz, CD_3O D): δ 4.61(s, 2H), 4.27(t, $J=5.2\text{Hz}$, 2H), 3.95(s, 1H), 3.90(s, 2H), 3.79(s, 1H), 3.71(s, 3H), 3.60-3.61(m, 3H), 2.14-2.43(m, 4H), 1.73-1.92(m, 6H), 1.55-1.65(m, 7H), 1.28-1.45(m, 7H), 1.03(d, $J=6.4\text{Hz}$, 3H), 0.92(s, 3H), 0.71(s, 3H)。表征为式(IV)所示的甘胆酸衍生物。

[0107] 2、利用色谱/质谱技术(LCMS)对得到的衍生物进行分析鉴定,采用安捷伦公司的串联四级杆质谱仪 LC/MSD1200 系列,离子源采用正离子或负离子化模式。色谱柱规格为: Symmetry C18(50 \times 4.6mm, 5 μ m),柱温为 30 $^\circ\text{C}$,流速为 1.5mL/min,检测波长为 214nm,流动相为 5-60% 乙腈-0.02% NH_4OAc 。LCMS 结果显示:纯度 >95%;保留时间 3.637min。

[0108] 综合上述结果,可以确定该无色固体化合物为式(IV)所示的甘胆酸衍生物。

[0109] 实施例二:BSA-甘胆酸免疫原的合成

[0110] BSA-甘胆酸免疫原由牛血清白蛋白 BSA 与式(IV)所示的甘胆酸衍生物的 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ 基团连接而成,在本实施例中,以 $n=2$ 为例详细说明该免疫原的合成方法,具体步骤如下:

[0111] 1) 将 20mg BSA 溶解于 5mL 0.2M, pH8.5 的磷酸缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS)中,上述溶液置于烧杯 A 中;

[0112] 2) 将如下化学品加入到烧杯 B 中搅拌溶解:20mg 甘胆酸衍生物,0.35ml 二甲基酰胺(dimethylformamide, DMF),0.35ml 乙醇,0.7ml 10mM pH5.0 的磷酸钾缓冲液。40mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺,5mg N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysulfosuccinimide, Sulfo-NHS),于室温下搅拌溶解,反应 30 分钟;

[0113] 3) 将烧杯 B 中的溶液滴加至烧杯 A 中,得到混合溶液,在 2~8 $^\circ\text{C}$ 下搅拌过夜;将上述搅拌后的混合溶液经过中性磷酸盐缓冲液透析(4 \times 4L)纯化,得到 BSA-甘胆酸免疫原,储存于 -20 $^\circ\text{C}$ 。

[0114] 类似的, n 取 1~20 范围内的其他整数时,用同样的方法可以制备出如式(I)所示的甘胆酸免疫原。当然,载体仍为具有免疫原性的蛋白质,可以是血清蛋白,血蓝蛋白(KLH)

和甲状腺球蛋白。优选的,载体为牛血清白蛋白。

[0115] 本发明仅公开了连接基团 R 为 $-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}-$, 且 $n=2$ 的甘胆酸衍生物的合成实施例并进行了相关后续实验, 由于连接基团主要起小分子衍生物与载体的连接作用, 免疫原性强弱与所合成的甘胆酸衍生物分子结构及所选载体种类有关, 因此理论上 n 取 1 至 20 之间的任意整数时, 实验结果并无显著差异, 使用不同 n 值的甘胆酸衍生物制备的甘胆酸免疫原均具备强免疫原性, 相应制备的特异性抗体均具有优异性能。

[0116] 实施例三: 抗甘胆酸特异性抗体的制备

[0117] 将上述制得的 BSA- 甘胆酸免疫原采用常规方法接种实验动物兔, 加强免疫后取抗血清, 具体步骤如下:

[0118] 用 PBS 将上述合成的 BSA- 甘胆酸免疫原稀释至 1.0mg/ml, 得到抗原溶液, 然后用 1.0ml 抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对实验动物兔进行注射。

[0119] 2~3 周后, 再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对上述实验动物兔注射一次, 之后每隔四周注射一次, 共计注射 4 次。

[0120] 对上述实验动物兔取血, 分离纯化得到抗甘胆酸特异性抗体, 经测定, 该抗甘胆酸特异性抗体的效价为 1:30000。

[0121] 实施例四: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0122] 1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0123] 1) 准确称取 15mg 规格为 100KU 的 G6PDH, 室温溶解于 12mL 含有 72.6mg (0.05M) Tris、8mg MgCl_2 (3.3mM) 和 100mg NaCl 的溶液中, 该溶液 pH=9.0, 本步骤在烧杯 C 中进行。

[0124] 2) 在上述烧杯 C 中加入 225mg 还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NADH, 135mg 葡萄糖-6-磷酸 G-6-P 以及 0.75mL 卡必醇(Carbitol)。

[0125] 3) 在上述烧杯 C 中再逐滴加入 2mL 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)。

[0126] 1) 甘胆酸衍生物的激活

[0127] 1) 在无水状态下称取 10mg 上述甘胆酸衍生物, 溶解于 600 μ LD MF 中。

[0128] 2) 使上述溶液温度降到 $-2 \sim -8^\circ\text{C}$ 。

[0129] 3) 加入 3 μ L 三丁胺(tributylamine)。

[0130] 4) 加入 1.5 μ L 氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate)。

[0131] 5) $-2 \sim -8^\circ\text{C}$ 搅拌 30 分钟。

[0132] 2) G6PDH 与甘胆酸衍生物的连接

[0133] 1) 将上述激活的甘胆酸衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中。

[0134] 2) $2-8^\circ\text{C}$ 搅拌过夜。

[0135] 3) 纯化产物

[0136] 通过 G-25 凝胶层析柱纯化步骤 3) 中的溶液, 获得的最终产物为葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物, 于 $2-8^\circ\text{C}$ 下储存。

[0137] 实施例五: 甘胆酸均相酶免疫检测试剂的制备

[0138] 甘胆酸均相酶免疫检测试剂, 包括: 上述抗甘胆酸特异性抗体, 用于检测抗甘胆酸特异性抗体-甘胆酸复合物的指示试剂。指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。优选的, 指示试剂为酶试剂, 包括: 酶标偶联物和酶的底物。其中, 酶标

偶联物包括葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原酶标偶联物,其通过上述化学合成方法得到。

[0139] 甘胆酸均相酶免疫检测试剂在使用之前,为了避免指示试剂中的酶标偶联物和酶的底物发生反应,酶标偶联物和酶的底物是分开放置的,不混合,所以将酶的底物与上述抗甘胆酸特异性抗体混合在一起。也就是说,甘胆酸均相酶免疫检测试剂包括两种分开设置的试剂,具体如下:

[0140] 1. 试剂 A 的制备:将 4.036g (11.25mM) 氧化态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD、1.711g (11.25mM) 葡萄糖-6-磷酸 G6P 置于烧杯 D 中,用 1L55mM、pH=8.0 的 Tris 缓冲液溶解制成均相酶底物;将上述制备的抗甘胆酸特异性抗体加到上述均相酶底物中,抗体与均相酶底物的体积比可以为 1:100 ~ 1:10000,在本实施例中具体的比例为 1:400。

[0141] 2. 试剂 B 的制备:将上述制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到 120mM、pH=8.2 的 Tris 缓冲液中,上述偶联物与 Tris 缓冲液的体积比可以为 1:100 ~ 1:10000,在本实施例中具体的比例为 1:1500。

[0142] 上述甘胆酸均相酶免疫检测试剂的使用方法,包括以下步骤:

[0143] 1) 将待测样本与上述抗甘胆酸特异性抗体接触;

[0144] 2) 根据待测样本中甘胆酸与上述抗甘胆酸特异性抗体的结合情况,利用指示试剂判断待测样本中甘胆酸的含量。

[0145] 具体的,检测时,将待测样本加到试剂 A 中,待测样本中的甘胆酸与试剂 A 中的抗甘胆酸特异性抗体发生特异性结合,生成抗甘胆酸特异性抗体-甘胆酸复合物;再加入试剂 B,此时试剂 B 中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与试剂 A 中的酶的底物混合、接触,发生酶促反应,构成检测抗甘胆酸特异性抗体-甘胆酸复合物的指示试剂,指示试剂根据待测样本中甘胆酸与上述抗甘胆酸特异性抗体的结合情况判断待测样本中甘胆酸的含量。

[0146] 由于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与待测样本中的甘胆酸竞争性结合抗甘胆酸特异性抗体,所以,待测样本中甘胆酸的量越多,均相酶溶液中游离的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的量越多,酶促反应越快,导致 OD₃₄₀上升。

[0147] 上述待测样本为生理样本,例如血清、血浆、尿液、唾液等。

[0148] 作为一种优选的方案,上述待测样本为血清或血浆。

[0149] 实施例六:甘胆酸均相酶免疫检验

[0150] 1、获得标准曲线:设置迈瑞 BS200 全自动生化分析仪反应参数(见表 1),操作过程为:先加试剂 A,再加入标准品,最后加入试剂 B。加入试剂 B 后,测定不同时间点的 OD₃₄₀吸光值,算出不同标准品浓度时的反应速率,实际操作过程中需不断调整试剂 A 和试剂 B 的体积比例,同时调整测光点,最后得出较理想的反应标准曲线图,如图 1 所示。

[0151] 表 1 迈瑞 BS200 全自动生化分析仪反应参数

[0152]

迈瑞 BS-200 参数	
项目名称	甘胆酸
试剂 1	150 μ l
试剂 2	150 μ l
样本量	15 μ l
分析方法	动力学方法
主波长	340
次波长	405
反应时间	5 - 15
孵育时间	5
反应方向	上升
结果	μ g/ml
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
标准品浓度	0.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 μ g/mL

[0153] 通过本发明的均相酶免疫检测试剂得到的标准曲线,重复测定低、中、高浓度质控样本 10 次,上述质控样本为:将甘胆酸标准品溶解于人血清中,至浓度分别为 1.20, 5.00, 30.00 μ g/ml。检测数据及数据分析见表 2。

[0154] 表 2 样品测定及精密度和回收率评估

[0155]

血液样品	低	中	高
样品浓度 (μ g/ml)	1.20	5.00	30.00
1	1.23	5.25	31.90
2	1.19	5.14	30.45
3	1.25	4.97	29.16
4	1.15	5.23	32.39
5	1.18	5.29	31.07
6	1.27	5.12	30.52
7	1.25	5.05	30.25
8	1.17	5.15	28.98
9	1.20	5.09	31.03
10	1.26	4.94	30.41

平均值 ($\mu\text{g/ml}$)	1.22	5.12	30.62
标准差 (SD)	0.0422	0.1154	1.0637
精密度 (CV%)	3.46	2.25	3.47
回收率 %	101.7	102.4	102.1

[0156] 检测结果：本发明的均相酶免疫检测试剂测定的准确度高，回收率达到 95%–105%，精密度高，CV 均低于 4%。

[0157] 实施例七：药物干扰试验

[0158] 选取 45 种常见药物，调整浓度至 $10.0 \mu\text{g/ml}$ ，进行干扰试验测定。常见的 45 种药物以及测定结果具体参见表 3。

[0159] 表 3 常见干扰药物

[0160]

ID#	化合物名称	等价于甘胆酸的 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ID#	化合物名称	等价于甘胆酸的 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
1	阿司匹林	0.0	24	苯丙醇胺	0.0
2	β -苯基乙胺	0.0	25	普鲁卡因胺	0.0
3	安非他命	0.0	26	普鲁卡因	0.0
4	氨基青霉素	0.0	27	奎尼丁	0.0
5	甲氨二氮卓	0.0	28	佐美酸	0.0
6	氯丙嗪	0.0	29	苯肾上腺素	0.0
7	氯拉卓酸	0.0	30	桂皮酰艾克宁	0.0
8	二甲苯氧庚酸	0.0	31	芽子碱	0.0
9	非诺洛芬	0.0	32	地西洋	0.0
10	甲基苯丙胺	0.0	33	可替宁	0.0
11	龙胆酸	0.0	34	阿替洛尔	0.0
12	吉非贝齐	0.0	35	心得安	0.0
13	氢可酮	0.0	36	苯乙哌啶酮	0.0
14	布洛芬	0.0	37	苯基丁氮酮	0.0
15	丙咪嗪	0.0	38	麦角酸二乙基酰胺	0.0
16	二氨基二苯砒	0.0	39	大麻酚	0.0
17	萘普生	0.0	40	洛哌丁胺	0.0
18	氢氯噻嗪	0.0	41	异克舒令	0.0
19	哌替啶	0.0	42	苯基丙氨酸	0.0
20	烯丙羟吗啡酮	0.0	43	盐酸氟西汀	0.0
21	麻黄素	0.0	44	柳丁氨醇	0.0
22	烟酰胺	0.0	45	青霉素	0.0
23	甲胺呋硫	0.0			

[0161] 测定结果：上述 45 种常见药物等价于甘胆酸的浓度均小于 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 。可见，本发明的抗体是抗甘胆酸的特异性抗体。

[0162] 实施例八：相关性分析

[0163] 对包括 81 例阳性标本和 24 例阴性标本在内的 105 例临床标本分别使用雅培的放

射免疫法和本发明的均相酶免疫法进行相关性分析,测定的数据参见表 4。

[0164] 表 4 真实样本测定值

样本号	均相酶免疫法测定值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	放射免疫法测定值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	24.74	25.12
2	5.92	6.17
3	42.60	41.97
4	30.45	31.23
5	26.39	25.98
6	36.54	35.47
7	71.02	72.31
8	12.00	12.01
9	23.37	23.94
10	33.98	33.25
11	19.25	20.06
12	5.77	6.13
13	8.31	7.99
14	11.69	12.31
15	25.50	25.50
16	41.90	42.25
17	24.33	23.67
18	37.58	37.75
19	22.39	21.96
20	6.04	6.00
21	15.83	16.52
22	39.96	41.03
23	51.01	51.59
24	12.95	12.34
25	10.86	10.04
26	7.07	7.98
27	37.53	36.44
28	28.87	28.05
29	14.90	15.21
30	3.49	3.53

[0165]

[0166]

31	55.55	54.97
32	36.82	37.09
33	6.54	7.00
34	26.85	25.27
35	42.63	43.69
36	17.00	17.25
37	63.10	62.37
38	9.05	9.84
39	3.57	3.55
40	31.03	30.28
41	125.60	124.27
42	18.91	19.33
43	8.40	9.06
44	85.66	86.52
45	34.78	33.91
46	17.93	18.40
47	53.76	52.21
48	50.12	49.85
49	21.33	22.21
50	45.65	44.39
51	6.01	6.53
52	33.77	32.52
53	18.95	19.36
54	26.44	25.89
55	94.72	95.19
56	8.03	7.79
57	2.99	3.22
58	11.05	12.00
59	49.04	48.34
60	32.51	31.79
61	18.53	19.33
62	109.72	109.68
63	4.87	4.55
64	6.90	7.04
65	22.28	21.97
66	10.03	10.00
67	38.25	38.93
68	74.30	73.56
69	29.06	30.65
70	15.46	15.56
71	7.44	7.19
72	32.68	33.75
73	20.93	21.68

[0167]

74	50.37	49.46
75	13.59	12.90
76	37.41	38.65
77	20.20	20.06
78	4.50	5.11
79	10.02	10.77
80	67.83	66.96
81	31.80	30.57
82	0.57	0.37
83	0.94	0.86
84	1.11	1.04
85	0.64	0.70
86	0.62	0.52
87	0.05	0.02
88	0.28	0.31
89	1.59	1.66
90	0.51	0.41
91	0.41	0.39
92	1.56	1.45
93	0.01	0.00
94	0.25	0.19
95	2.00	1.87
96	0.09	0.21
97	0.57	0.64
98	1.03	0.89
99	0.33	0.52
100	0.08	0.12
101	0.03	0.06
102	0.29	0.34
103	0.60	0.72
104	0.99	0.74
105	0.87	0.91

[0168] 对上述数据作图, 参见图 2, 得到的线性方程为 $y=0.995x+0.1105$, 相关系数 $R^2=0.9993$, 表明本发明的检测试剂测定的甘胆酸临床标本准确度高。

[0169] 由于本发明的检测过程是由仪器全自动化完成, 所以对检测人员的要求不高, 易于实现和推广使用。

[0170] 需要说明的是, 以上所述仅为本发明的实施例, 并非因此限制本发明的专利范围, 凡是利用本发明说明书及附图内容所做的等效结构或等效流程变换, 或直接或间接运用在其他相关技术领域, 均同理包括在本发明的专利保护范围内。

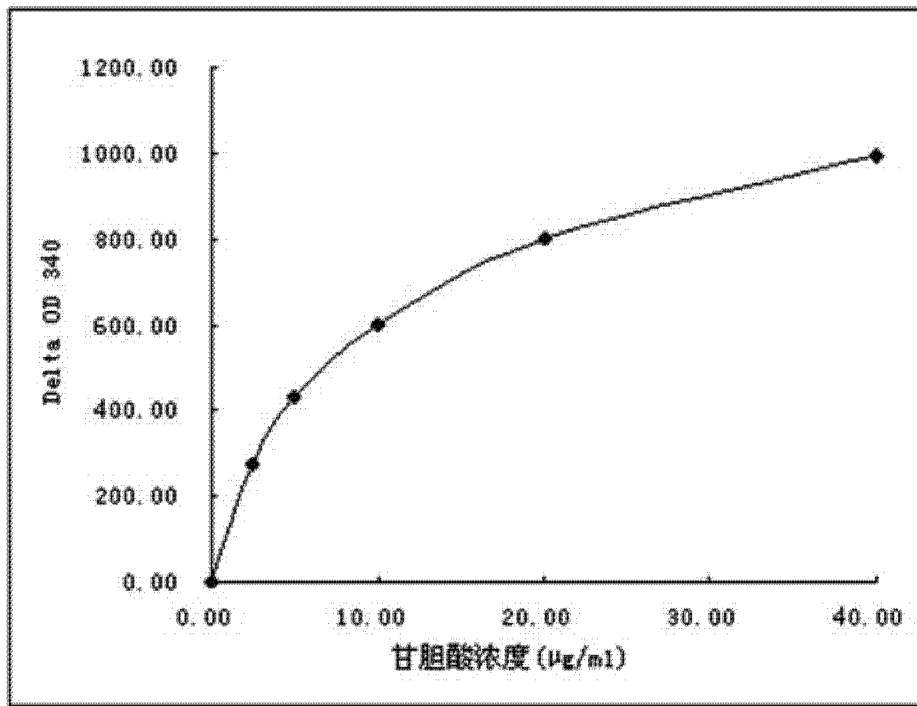


图 1

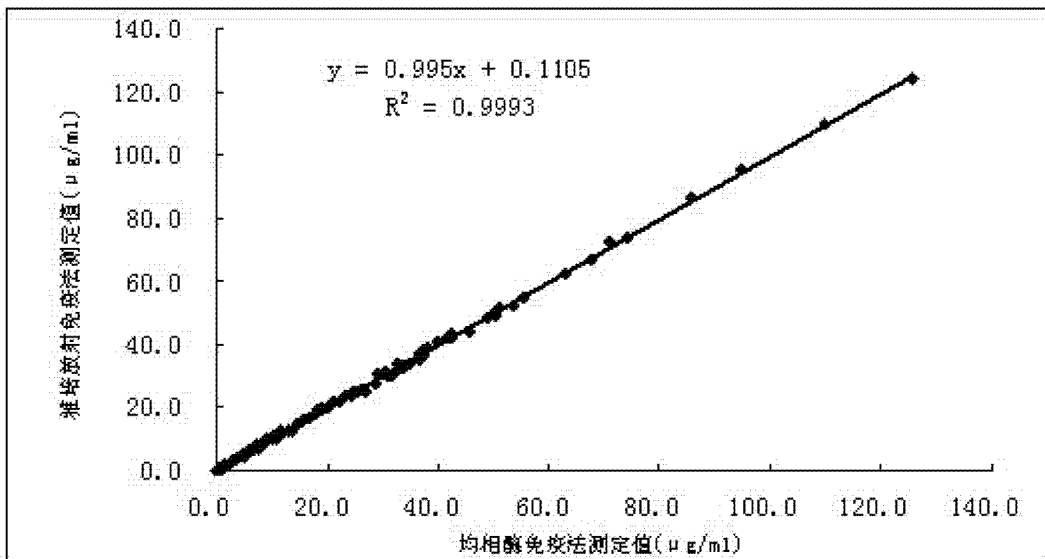


图 2

专利名称(译)	一种甘胆酸免疫检测试剂及其制备和检测方法		
公开(公告)号	CN103760348B	公开(公告)日	2015-03-11
申请号	CN201410047767.X	申请日	2014-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
[标]发明人	虞留明 李冬 陆丽华 张曼 胡瑜		
发明人	虞留明 李冬 陆丽华 张曼 胡瑜		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/576 G01N2800/08		
代理人(译)	董建林		
审查员(译)	胡晓佳		
其他公开文献	CN103760348A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种甘胆酸检测试剂及其制备和检测方法，具体涉及一种甘胆酸免疫检测试剂及其制备和检测方法，包括：抗甘胆酸特异性抗体、用于检测抗甘胆酸特异性抗体-甘胆酸复合物的指示试剂；上述抗甘胆酸特异性抗体由甘胆酸免疫原免疫动物得到。本发明的有益之处在于：本发明的甘胆酸免疫原特异性强、免疫原性高，制备出的抗甘胆酸特异性抗体特异性强、效价高，并且与常见的45种药物无任何交叉反应；含有上述抗甘胆酸特异性抗体的均相酶免疫检测试剂可以方便、快速、准确地确定样品中的甘胆酸含量，并且可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现甘胆酸的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率有了较大的提高。

