



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106018787 A

(43)申请公布日 2016. 10. 12

(21)申请号 201610201218.2

(22)申请日 2016.03.31

(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 刘洁 崔锡平 吴盼盼  
秦静 胡青青 焦洛莹 陈莹珊  
沈定

(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2页

### (54)发明名称

一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法  
及免疫试剂盒

### (57)摘要

本发明属于免疫学技术领域,公开了一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法及免疫试剂盒。本发明旨在研发甘胆酸检测的荧光增强免疫试剂盒,该试剂盒具有前处理简单、快速准确、成本低廉、稳定,可用于现场大批量检测等特点。本发明通过甘胆酸包被抗原,荧光标记羊抗兔的制备,在甘油,吐温等保护剂下,实现信号的增强放大,从而达到对甘胆酸含量的检测。本发明的检测甘胆酸的免疫分析方法为一步法竞争荧光增强免疫分析方法,是一种简便、快速且能够高通量的检测方法。

1. 一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,其特征包括以下操作步骤:

(1)取甘胆酸完全抗原,用碳酸盐缓冲液进行稀释,将稀释后的甘胆酸完全抗原包被至固相载体表面,4℃包被过夜,随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体并甩干,得到包被有甘胆酸完全抗原的固相载体;

(2)随后加入封闭缓冲液封闭步骤(1)获得的包被有甘胆酸完全抗原的固相载体表面的空余间隙,37℃封闭过夜,随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体并甩干;

(3)取抗甘胆酸多克隆抗体50μL,与等体积的浓度梯度为0.00μg/mL、0.02μg/mL、0.10μg/mL、0.20μg/mL、1.00μg/mL、2.00μg/mL、10.00μg/mL、20.00μg/mL、100μg/mL的甘胆酸标准溶液混合,37℃下孵育30分钟,加入步骤(2)获得的固相载体上包被的甘胆酸完全抗原反应连接,在37℃条件下进行反应,随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体并甩干;

(4)随后加入荧光标记的羊抗兔100μL,与步骤(3)获得的固相载体表面反应连接后,加入荧光稳定剂100μL,进行信号放大检测;以抑制率 $F-F_0/F_{max}$ 为纵坐标,甘胆酸浓度为横坐标作标准曲线,其 $IC_{50}$ 为4.48μg/mL,线性方程为:

$$\frac{F-F_0}{F_{max}} = -0.23c + 0.71$$
,线性范围为0.1-20μg/mL,最低检测线为0.09μg/mL。

2. 根据权利要求1所述的一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,其特征包括:步骤(1)所述碳酸盐缓冲液的浓度为0.05M且pH值为9.6;步骤(1)、(2)和(3)所述洗涤缓冲液含有浓度为0.01M且pH值为6-8的磷酸盐缓冲液和质量浓度为0.05%的吐温20;步骤(2)所述封闭缓冲液是将脱脂奶粉溶于蒸馏水中形成质量浓度为30mg/mL的封闭缓冲液,其用量为200μL。

3. 根据权利要求1所述的一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,其特征包括:步骤(1)所述甘胆酸完全抗原是由N,N'-二环己基二亚胺羧基活化剂将甘胆酸与载体蛋白连接形成;所述稀释后的甘胆酸完全抗原的浓度为5-60μg/mL;所述固相载体为聚苯乙烯酶标板、聚苯乙烯珠、尼龙膜、聚偏氟乙烯膜、硝酸纤维素膜或磁性微珠。

4. 根据权利要求3所述的一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,其特征包括:所述载体蛋白为牛血清蛋白、卵血清蛋白或多聚赖氨酸。

5. 根据权利要求1所述的一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,其特征包括:步骤(1)所述甘胆酸完全抗原的制备方法包括以下步骤:

将甘胆酸、N-羟基琥珀酰亚胺完全溶于N,N'-二甲基甲酰胺中,随后加入N,N'-二环己基二亚胺,在4℃条件下搅拌反应8-24小时,离心后吸取上清滴加到溶有0.5mmol-3mmol载体蛋白的PBS中,在4℃条件下搅拌反应8-24小时,离心后吸取上清装入透析袋,在PBS中透析3天,每隔12小时换液一次,得到甘胆酸完全抗原;所述PBS的浓度为10mM,pH为7.4。

6. 根据权利要求1所述的一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,其特征包括:步骤(4)所述荧光标记的羊抗兔是将羊抗兔和荧光素反应并透析完全获得;所述荧光稳定剂为甘油或者吐温20。

7. 根据权利要求1所述的一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,其特征包括:步骤(4)所述荧光标记的羊抗兔具体按照以下步骤进行制备:将羊抗兔溶于PBS,随后加入荧光素溶液,羊抗兔和荧光素的摩尔比例为1:10-1:500,4℃下搅拌过夜;将反应液装入透析袋中透析三天,每隔12小时换液一次,得到荧光标记的羊抗兔。

8. 根据权利要求6或7所述的一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,其特征在於:所述荧光素为FITC或者RITC。

9. 根据权利要求1所述的一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,其特征在於:步骤(3)所述抗甘胆酸多克隆抗体的浓度为其与磷酸缓冲溶液体积比为1000:1-32000:1,步骤(4)所述荧光标记的羊抗兔的浓度为其与磷酸缓冲溶液体积比为1:2000。

10. 一种利用上述检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法建立的免疫试剂盒,其特征在於:该免疫试剂盒包括:权利要求1步骤(1)所述包被有甘胆酸完全抗原的固相载体,甘胆酸标准溶液,荧光标记的羊抗兔和荧光稳定剂。

## 一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法及免疫试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫学技术领域,特别涉及一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法及免疫试剂盒。

### 背景技术

[0002] 甘胆酸(Glycocholic acid hydrate,CG)是胆酸与甘氨酸结合而成的结合型胆酸之一,相对分子质量为466.3。胆固醇在肝细胞内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。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。肝细胞受损时摄取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,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(SCG)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] 肝脏疾病是危害人体健康的一大杀手,其中肝炎、肝硬化、肝癌等更是因其流行广泛、病程长、预后较差、死亡率高等特点而受到医学界的普遍关注。以血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及谷酰转肽酶(GGT)为代表的肝脏酶学指标可较好地反映肝细胞的病理状态,是临床上肝功能检测的经典方法。但是,这些常规指标反映肝脏损害的特异性较差,如某些心脏疾病、胰腺疾病也会导致血清ALT等升高,常规肝功能检验指标还可能因为服用某些药物,或者是一些生理原因而发生改变。此外,有研究者指出在现有的医疗水平下,某些医院特别是基层医疗机构对常规肝功能指标的临床检测标准缺乏足够的统一性,导致这些检验的诊断能力都有一定的缺陷。

[0004] 国内外大量研究报道了甘胆酸在肝胆疾病诊断中的临床意义。早期的一些研究指出,肝细胞一旦病变,血液中的甘胆酸浓度随即升高,肝胆疾病患者甘胆酸水平升高的阳性率很高,在肝病中具有出现早、恢复慢的特点,且较ALT、AST、总胆红素(TBIL)、碱性磷酸酶(ALP)、谷酰转肽酶(GGT)及血清白蛋白(ALB)等常规肝功能指标更为敏感。各种肝脏疾病如:肝癌、肝硬化、急性肝炎、慢性肝炎等患者的甘胆酸水平均显著升高,因此甘胆酸可作为诊断这些疾病的良好指标。此外,甘胆酸水平也是多种胆道系统疾病、妊娠期肝内胆汁淤积症及酒精性肝损伤等的重要诊断依据

[0005] 甘胆酸测定是诊断肝胆疾病重要而灵敏的指标,自1973年Simmonds等。首先应用RIA测定血清甘胆酸含量以来,各国研究者对甘胆酸检测的方法和临床应用进行了广泛而深入的研究。目前,应用于体外定量测定甘胆酸含量的方法主要有RIA、酶联免疫法(ELISA)、化学发光免疫分析法(CLIA)等。RIA法需要使用配套的专业放射免疫设施,试剂价格昂贵,分析步骤繁琐,废弃物难以处理,因此普通实验室难以开展,而且RIA检测耗时长准确度低,试剂有效期(半衰期)较短,还存在放射性污染,会对操作人员的健康产生极大的危害,目前国际上已很少使用。CLTA法灵敏度较高,但测定速度较慢,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。除以上方法以外,检测甘胆酸的方法还有高效液相色谱(HPLC)、气液色谱(GLC)、气相色谱和质谱联用(GC-MS)等,但这些方法都不适合广泛应用于临床检验。

### 发明内容

[0006] 为了克服现有技术的缺点与不足,本发明的首要目的在于提供一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法。

[0007] 本发明的另一目的在于提供上述一种利用上述检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法建立的免疫试剂盒。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0009] 一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法,包括以下操作步骤:

[0010] (1)取甘胆酸完全抗原,用碳酸盐缓冲液进行稀释,将稀释后的甘胆酸完全抗原包被至固相载体表面,4℃包被过夜,随后用洗涤缓冲液洗涤所述固相载体并甩干,得到包被有甘胆酸完全抗原的固相载体;

[0011] (2)随后加入封闭缓冲液封闭步骤(1)获得的包被有甘胆酸完全抗原的固相载体表面的空余间隙,37℃封闭过夜,随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体并甩干;

[0012] (3)取抗甘胆酸多克隆抗体50μL,与等体积的浓度梯度为0.00μg/mL、0.02μg/mL、0.10μg/mL、0.20μg/mL、1.00μg/mL、2.00μg/mL、10.00μg/mL、20.00μg/mL、100μg/mL的甘胆酸标准溶液混合,37℃下孵育30分钟,加入步骤(2)获得的固相载体上包被的甘胆酸完全抗原反应连接,在37℃条件下进行反应,随后用洗涤缓冲液洗涤固相载体并甩干;

[0013] (4)随后加入荧光标记的羊抗兔100μL,与步骤(3)获得的固相载体表面反应连接后,加入荧光稳定剂100μL,进行信号放大检测;以抑制率 $F-F_0/F_{max}$ 为纵坐标,甘胆酸浓度为

横坐标作标准曲线,其 $IC_{50}$ 为4.48μg/mL,线性方程为: $\frac{F-F_0}{F_{max}} = -0.23c + 0.71$ ,线性

范围为0.1-20μg/mL,最低检测线为0.09μg/mL。

[0014] 步骤(1)所述碳酸盐缓冲液的浓度为0.05M且pH值为9.6;步骤(1)、(2)和(3)所述洗涤缓冲液含有浓度为0.01M且pH值为6-8的磷酸盐缓冲液和质量浓度为0.05%的吐温20;步骤(2)所述封闭缓冲液是将脱脂奶粉溶于蒸馏水中形成质量浓度为30mg/mL的封闭缓冲液,其用量为200μL。

[0015] 步骤(1)所述甘胆酸完全抗原是由N,N'-二环己基二亚胺(DCC)羧基活化剂将甘胆酸与载体蛋白连接形成;所述稀释后的甘胆酸完全抗原的浓度为5-60μg/mL;所述固相载体为聚苯乙烯酶标板、聚苯乙烯珠、尼龙膜、聚偏氟乙烯膜、硝酸纤维素膜或磁性微珠。所述载体蛋白为牛血清蛋白、卵血清蛋白或多聚赖氨酸。

[0016] 步骤(1)所述甘胆酸完全抗原的制备方法包括以下步骤:

[0017] 将甘胆酸(CG)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)完全溶于N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)中,随后加入N,N'-二环己基二亚胺(DCC),在4℃条件下搅拌反应8-24小时,离心后吸取上清滴加到溶有0.5mmol-3mmol载体蛋白的PBS中,在4℃条件下搅拌反应8-24小时,离心后吸取上清装入透析袋,在PBS(10mM,pH7.4)中透析3天,每隔12小时换液一次,得到甘胆酸完全抗原;所述PBS的浓度为10mM,pH为7.4。

[0018] 步骤(4)所述荧光标记的羊抗兔是将羊抗兔和荧光素反应并透析完全获得;所述

荧光稳定剂为甘油或者吐温20。

[0019] 步骤(4)所述荧光标记的羊抗兔具体按照以下步骤进行制备:将羊抗兔溶于PBS,随后加入荧光素溶液,羊抗兔和荧光素的摩尔比例为1:10-1:500,4℃下搅拌过夜;将反应液装入透析袋中透析三天,每隔12小时换液一次,得到荧光标记的羊抗兔。

[0020] 所述荧光素为FITC或者RITC。

[0021] 步骤(3)所述抗甘胆酸多克隆抗体的浓度为其与磷酸缓冲溶液体积比为1000:1-32000:1,步骤(4)所述荧光标记的羊抗兔的浓度为其与磷酸缓冲溶液体积比为1:2000。

[0022] 一种利用上述检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法建立的免疫试剂盒,该免疫试剂盒包括:权利要求1步骤(1)所述包被有甘胆酸完全抗原的固相载体,甘胆酸标准溶液,荧光标记的羊抗兔和荧光稳定剂。

[0023] 与现有技术相比,本发明具有以下优点及有益效果:本发明通过样品与甘胆酸完全抗原竞争结合抗甘胆酸多克隆抗体,荧光标记二抗在保护剂作用下增强放大信号,实现对甘胆酸含量的检测。检测效果更加灵敏稳定,荧光效果可保持1小时以上稳定。与传统荧光免疫分析方法对比,检测信号增强2倍以上。本发明提供的一种检测甘胆酸的免疫分析方法为一步法竞争荧光增强免疫分析方法,简便、快速且能够高通量检测。

## 附图说明

[0024] 图1为本发明实施例1制得的甘胆酸完全抗原的具体制备流程图。

[0025] 图2为本发明荧光增强免疫分析方法的具体反应流程图。

[0026] 图3为本发明间接竞争荧光增强免疫分析法检测甘胆酸间接竞争抑制曲线,及以系列浓度(0.00 $\mu$ g/mL,0.02 $\mu$ g/mL,0.10 $\mu$ g/mL,0.20 $\mu$ g/mL,1.00 $\mu$ g/mL,2.00 $\mu$ g/mL和10.00 $\mu$ g/mL,20.00 $\mu$ g/mL,100 $\mu$ g/mL)的甘胆酸进行间接竞争荧光增强免疫法测定,建立的标准工作曲线。

## 具体实施方式

[0027] 下面结合实施例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。

[0028] 实施例1:一种甘胆酸完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0029] 将CG(0.1mmoI),NHS(0.15mmoI)完全溶于DMF(1mL)中,随后加入DCC(0.15mmoI),4℃搅拌反应12小时;离心后(1000g/min,10min)吸取上清缓慢滴加到溶有OVA(2mmoI)的PBS(8mL,10mM,pH7.4)中,4℃搅拌反应12小时;离心后(10000g/min or 3000rpm/min,10min)吸取上清装入透析袋,在PBS(10mM,pH7.4)中透析3天,每隔12小时换液一次,得到甘胆酸完全抗原。其合成路线的流程如图1

[0030] 实施例2:荧光标记羊抗兔的制备方法,包括以下步骤:

[0031] 将羊抗兔溶于PBS(0.01M,pH=7.4),随后加入FITC溶液(CBS,0.05M,pH=9.2),羊抗兔和FITC的摩尔比例为1:10,4℃下搅拌过夜。将反应液装入透析袋中,于PBS(0.01M,pH=7.4)中透析三天,每隔12小时换液一次,得到标记FITC的羊抗兔。

[0032] 实施例3:棋盘滴定法确定包被抗原和抗体的最佳浓度,包括如下步骤:

[0033] (1)用包被缓冲液CBS(0.05M,pH 9.6)将实施例1所得甘胆酸完全抗原梯度稀释,每孔100 $\mu$ L加入到96孔黑板中,4℃包被过夜,甩干孔中液体,PBST洗涤一次,吸水纸拍干。

- [0034] (2)30mg/mL脱脂奶粉(PBS溶解)200 $\mu$ L/孔加入到孔中,37 $^{\circ}$ C温育1h。
- [0035] (3)甩干孔中液体,PBST洗涤三次,吸水纸拍干。
- [0036] (4)以PBS稀释免疫血清,特定浓度倍比稀释,100 $\mu$ L/孔加到孔中,同时设阴性对照和空白对照各2孔。37 $^{\circ}$ C温育2小时后,洗涤,拍干。
- [0037] (5)以PBS稀释实施例2所得标记FITC的羊抗兔至特定浓度,100 $\mu$ L/孔加到孔中,37 $^{\circ}$ C温育2小时后,洗涤,拍干。
- [0038] (6)加入100 $\mu$ L30%甘油(CBS溶解),室温下孵育3分钟,拍干,再于37 $^{\circ}$ C下孵育15分钟。
- [0039] (7)用酶标仪485nm的激发波长和538nm的吸收波长下测定其荧光值。
- [0040] 结果表明,当包被抗原浓度为10 $\mu$ g/mL,抗甘胆酸抗体浓度与磷酸缓冲溶液体积比为1:4000时,效果最佳。
- [0041] 实施例4:甘胆酸荧光增强免疫分析法标准工作曲线的建立和检测限的确定,包括以下步骤:
- [0042] 用10 $\mu$ g/mL的OVA-CG包被96孔酶标板黑板,100 $\mu$ L/孔,4 $^{\circ}$ C冰箱包被过夜,用封闭液封闭后洗涤拍干;向酶标板中,先加入50 $\mu$ L的各浓度甘胆酸标准溶液(0.00,0.02,0.10,0.20,1.00,2.00,10.00,20.00,100 $\mu$ g/mL),再加入50 $\mu$ L与磷酸缓冲溶液体积比为1:4000的抗体,混合均匀,在空白对照孔中加入100 $\mu$ L10%甲醇PBS缓冲液;37 $^{\circ}$ C恒温温浴2小时;洗涤三次,拍干;加入100 $\mu$ L荧光标记二抗工作液,37 $^{\circ}$ C恒温温浴2小时;洗涤三次,拍干;每孔加入100 $\mu$ L 30%甘油,常温下反应3分钟,拍干,再于37 $^{\circ}$ C温育避光反应15min,测试荧光值。整个荧光增强免疫分析方法的具体反应流程图如图2。
- [0043] 以抑制率 $F-F_0/F_{max}$ 为纵坐标,甘胆酸浓度( $\mu$ g/mL)为横坐标作标准曲线,其IC<sub>50</sub>为4.48 $\mu$ g/mL,线性方程为:
$$\frac{F-F_0}{F_{max}} = -0.23c + 0.71$$
,线性范围为0.1-20 $\mu$ g/mL,最低检测线为0.09 $\mu$ g/mL。测试结果如图3所示。
- [0044] 实施例5:该试剂盒的使用方法:
- [0045] (1)静脉采血,静置离心,分离血清,冰箱冰冻保存,1周内完成检测。
- [0046] (2)冰箱里取出试剂盒,室温复温,注意每种液体试剂使用前均须摇匀。取微孔黑板,预先标记空白对照孔、标准样品、样品的位置,推荐进行三孔平行检测。
- [0047] (3)取出微孔黑板先加入50 $\mu$ L的各浓度甘胆酸标准溶液,再加入50 $\mu$ L抗体工作液,混合均匀,在空白对照孔中加入100 $\mu$ L10%甲醇PBS缓冲液。
- [0048] (4)向步骤(3)酶标板剩余孔中,先加入50 $\mu$ L样品溶液,再加入50 $\mu$ L抗体工作液,混合均匀,共同于37 $^{\circ}$ C恒温温育2小时,微孔板盖上盖子。
- [0049] (5)温育完后,将微孔中的溶液快速甩入水槽中,用洗涤液清洗微孔板。
- [0050] (6)加入100 $\mu$ L荧光标记的羊抗兔,37 $^{\circ}$ C恒温温浴2小时。
- [0051] (7)步骤同(4),洗涤三次后于吸水纸拍干,每孔加入100 $\mu$ L30%甘油,常温下孵育3分钟,拍干,再于37 $^{\circ}$ C温育避光反应15min。
- [0052] (8)在酶标仪上485nm的激发波长和538nm的吸收波长下测定其荧光值。
- [0053] 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。

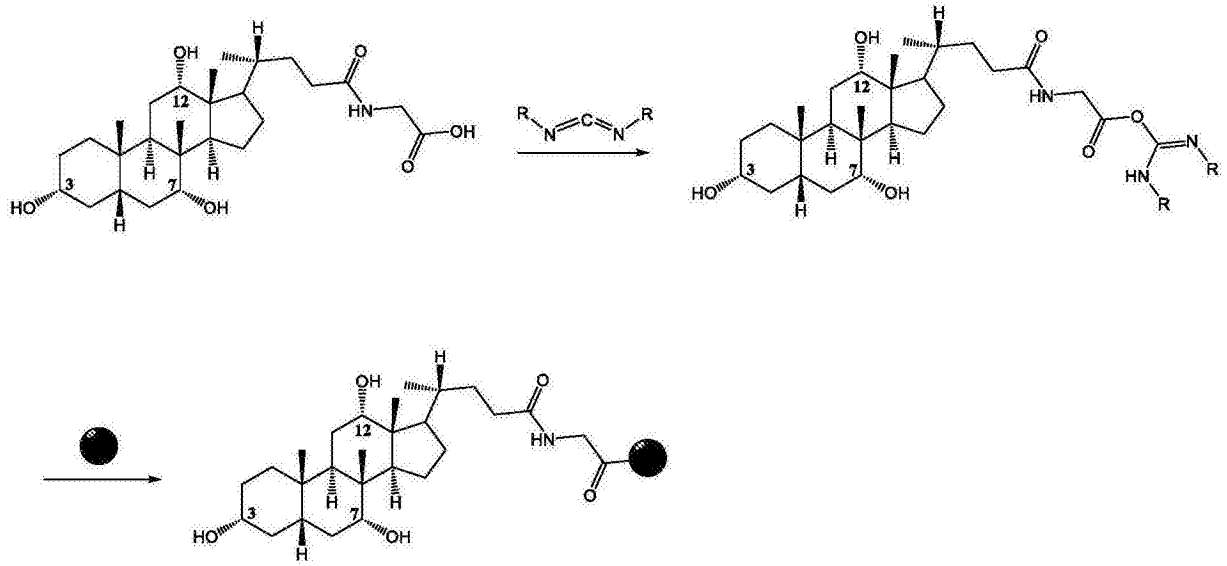


图1

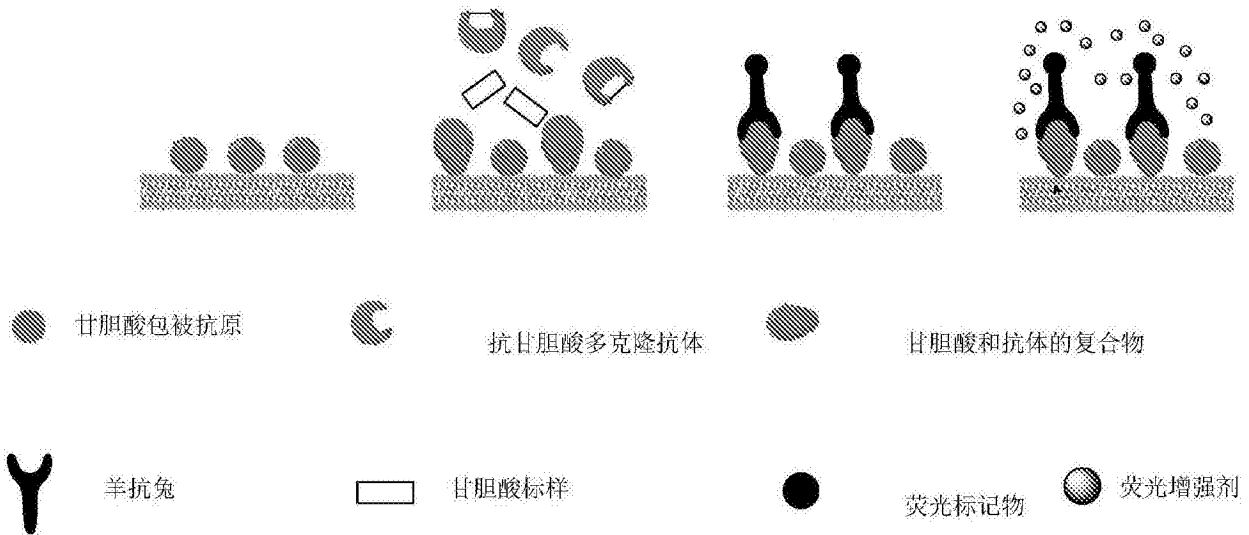


图2

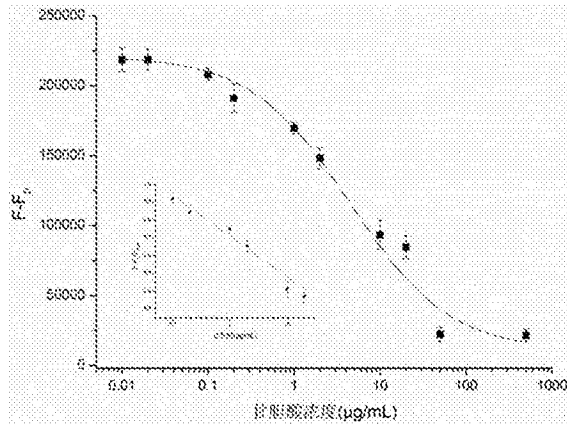


图3

专利名称(译)	一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法及免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN106018787A</a>	公开(公告)日	2016-10-12
申请号	CN201610201218.2	申请日	2016-03-31
[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 刘洁 崔锡平 吴盼盼 秦静 胡青青 焦洛莹 陈莹珊 沈定		
发明人	赵肃清 刘洁 崔锡平 吴盼盼 秦静 胡青青 焦洛莹 陈莹珊 沈定		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/64 G01N33/533		
代理人(译)	张燕玲 杨晓松		
其他公开文献	CN106018787B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于免疫学技术领域，公开了一种检测甘胆酸的荧光增强免疫分析方法及免疫试剂盒。本发明旨在研发甘胆酸检测的荧光增强免疫试剂盒，该试剂盒具有前处理简单、快速准确、成本低廉、稳定，可用于现场大批量检测等特点。本发明通过甘胆酸包被抗原，荧光标记羊抗兔的制备，在甘油，吐温等保护剂下，实现信号的增强放大，从而达到对甘胆酸含量的检测。本发明的检测甘胆酸的免疫分析方法为一步法竞争荧光增强免疫分析方法，是一种简便、快速且能够高通量的检测方法。

