



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109444399 A

(43)申请公布日 2019.03.08

(21)申请号 201811260602.5

(22)申请日 2018.10.26

(71)申请人 重庆中元汇吉生物技术有限公司
地址 400000 重庆市大渡口区建桥工业园C
区泰康路6号30栋第1-4层

(72)发明人 李元丽 刘霖 张艳军

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

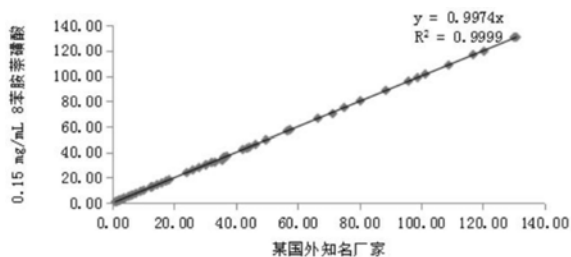
权利要求书4页 说明书19页 附图4页

(54)发明名称

一种甘胆酸检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种甘胆酸检测试剂盒,并且提供了甘胆酸检测试剂盒中甘胆酸-蛋白偶联物与抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法,本甘胆酸检测试剂盒采用了竞争法对甘胆酸进行检测,通过在试剂盒中添加8-苯胺-1-萘磺酸明显提高了试剂盒的分析灵敏度以及精密度,扩大检测的线性范围,并且本试剂盒中的具体的物质的制备步骤简单,成本低,更适用于工业生产和临床应用。



1. 一种甘胆酸检测试剂盒,其特征在于:包括以下成分:

甘胆酸R1试剂:

甘胆酸-蛋白偶联物	0.0005-0.005 mg/mL
8-苯胺-1-萘磺酸	0.05-0.2mg/mL
表面活性剂	1-30mg/mL
稳定剂	5-20mg/mL
防腐剂	0.5-5mg/mL
缓冲液	PH 5.5-7.5

甘胆酸R2试剂:

抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	0.5-10mg/mL
缓冲液	PH 5.5-7.5
稳定剂	5-10mg/mL
防腐剂	0.5-5mg/mL
细胞保护剂	1-10mg/mL

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:包括如下成分:

甘胆酸R1试剂:

甘胆酸-蛋白偶联物	0.001-0.005 mg/mL
8-苯胺-1-萘磺酸	0.1-0.2mg/mL
表面活性剂	5-30mg/mL
稳定剂	5-10mg/mL
防腐剂	1-5mg/mL
缓冲液	PH 5.5-7.5

甘胆酸R2试剂:

抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	1.0-10mg/mL
缓冲液	PH 5.5-7.5
稳定剂	6-8mg/mL
防腐剂	1-3mg/mL
细胞保护剂	1-8mg/mL

3. 如权利要求2所述的试剂盒,其特征在于:包括如下成分:

甘胆酸R1试剂:

甘胆酸-蛋白偶联物	0.002 mg/mL
8-苯胺-1-萘磺酸	0.15mg/mL
表面活性剂	10mg/mL
稳定剂	7mg/mL
防腐剂	2mg/mL
缓冲液	PH 5.5-7.5

甘胆酸R2试剂:

抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	5mg/mL
缓冲液	PH 5.5-7.5
稳定剂	7mg/mL
防腐剂	2mg/mL
细胞保护剂	5mg/mL

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:包括如下成分:

甘胆酸R1试剂:

甘胆酸-蛋白偶联物	0.001-0.005mg/mL
8-苯胺-1-萘磺酸	0.15mg/mL
PEG-6000	10mg/mL
稳定剂	5-20mg/mL
防腐剂	1-3mg/mL
缓冲液	PH 5.5-7.5

甘胆酸R2试剂:

抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	1.0-10mg/mL
缓冲液	PH5.5-7.5
稳定剂	7mg/mL
防腐剂	2mg/mL
细胞保护剂	5mg/mL

5. 如权利要求1-4任意一项所述的试剂盒,其特征在于:所述的表面活性剂为A-90、B-66、Brij58、Tween-20、Tween-80、Triton-100、PEG-6000中的一种或者几种,优选为A-90、B-66、Brij58、PEG-6000中的一种或者几种,更优选为PEG-6000;所述的稳定剂选自蛋白质、无机盐、金属络合剂、助悬剂和抗氧化剂中的一种或几种,优选的,所述的蛋白质为牛血清白蛋白或明胶;所述的无机盐选自氯化钠、氯化钾或氯化镁中的一种或几种,优选氯化钠;所述的金属络合剂为含有氨基二乙酸基团的络合剂,选自EGTA、EDTP、DTPA、EDTA中的一种或几种;所述的助悬剂选自乙二醇、丙三醇、乳糖、蔗糖、麦芽糖中的一种或几种;所述抗氧化

剂选自2,6-二叔丁基对甲酚、叔丁基对羟基茴香醚、没食子酸丙酯中的一种或几种;所述的防腐剂为PC300、苯甲酸、苯甲酸钠、叠氮钠中的一种或者几种,优选为PC300、叠氮钠中的一种或者几种,更优选为PC300;所述的缓冲液为磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、MES缓冲液、PB缓冲液、醋酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液及硼砂缓冲液中的一种或者几种,优选为磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液和MES缓冲液中的一种或者几种,更优选为柠檬酸盐缓冲液;所述的细胞保护剂为卵清蛋白、牛转铁蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白及血蓝蛋白中的一种或者几种,优选为牛血清白蛋白、血蓝蛋白中的一种或者几种,更优选为牛血清白蛋白;所述甘胆酸-蛋白偶联物中的蛋白为卵清蛋白、牛转铁蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白及血蓝蛋白中的一种或者几种,优选为牛血清白蛋白、血蓝蛋白中的一种或者几种,更优选为牛血清白蛋白。

6.如权利要求1-5任意一项所述的试剂盒,其特征在于:所述甘胆酸-蛋白偶联物中蛋白与甘胆酸的体积比为:7:1。

7.如权利要求1-6任意一项所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中的甘胆酸-蛋白偶联物的制备方法,包括如下步骤:

1)称取甘胆酸纯品,用DMF进行溶解,得甘胆酸溶液;用DMF配制NHS溶液,得NHS溶液;用DMF配制EDC溶液,得EDC溶液;称取蛋白,将其溶解在纯水中,得蛋白溶液;

2)将NHS溶液和EDC溶液加入甘胆酸溶液中,室温搅拌,得混合溶液;

3)将步骤2)得到的混合溶液加入蛋白溶液中,室温搅拌;

4)将步骤3)得到的产物置于缓冲液中,进行透析,最后得到甘胆酸-蛋白偶联物。

8.如权利要求7所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中的甘胆酸-蛋白偶联物的制备方法,包括如下步骤:

1)称取甘胆酸纯品,用DMF进行溶解,制备10-30mg/mL甘胆酸溶液,优选的,制备20mg/mL甘胆酸溶液;用DMF配置8-15mg/mL NHS溶液,优选的,用DMF配置12mg/mL NHS溶液;用DMF配置10-40mg/mL EDC溶液,优选的,用DMF配置19.2mg/mL EDC溶液;用超纯水配置10-40mg/mL蛋白溶液,优选的,所述蛋白为牛血清白蛋白,更优选的,用超纯水配置20mg/mL牛血清白蛋白溶液;

2)将NHS溶液和EDC溶液加入甘胆酸溶液中,室温搅拌,得混合溶液,NHS溶液体积与甘胆酸溶液体积比为:9:14;EDC溶液体积与甘胆酸溶液体积比为:33:70;

3)将步骤2)得到的混合溶液加入牛血清白蛋白溶液中,室温搅拌,牛血清白蛋白溶液体积与甘胆酸溶液体积比为:14:1-6:1;优选为:牛血清白蛋白溶液体积与甘胆酸溶液体积比为:10:1-6:1;更优选的,牛血清白蛋白溶液体积与甘胆酸溶液体积比为:7:1。

4)将步骤3)得到的产物置于PH6.0的0.01mol/L柠檬酸缓冲液中,进行透析,最后得到甘胆酸-蛋白偶联物。

9.如权利要求1-8任意一项所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中的抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:

1)将甘胆酸-蛋白偶联物皮下免疫小鼠,将免疫后的小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合,筛选得到抗甘胆酸抗体;

2)向甘胆酸R2试剂中的缓冲液中加入胶乳颗粒以及步骤1)所得抗甘胆酸抗体,混匀搅拌,然后加入EDC,继续搅拌;

3) 向步骤2) 最后得到的溶液中加入封闭液,继续搅拌;

4) 离心步骤3) 最后得到的溶液,弃上清,采用甘胆酸R2试剂中的缓冲液进行重悬沉淀,即得到抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒。

10. 如权利要求9所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中的抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:

1) 将甘胆酸-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骨髓瘤细胞融合,通过BSA-CG板筛选得到抗甘胆酸抗体;

2) 向甘胆酸R2试剂中的缓冲液中加入胶乳颗粒以及步骤1) 所得抗甘胆酸抗体,混匀搅拌,然后加入EDC溶液,继续搅拌,甘胆酸R2试剂中的缓冲液、抗甘胆酸抗体、胶乳颗粒以及EDC的质量比为:180:16:1:4,优选的,EDC的量为10-50uL,优选的,EDC的量为15-30uL,更优选的,EDC的量为20uL;

3) 向步骤2) 最后得到的溶液中加入0.5%的酪蛋白,继续搅拌,酪蛋白与甘胆酸R2试剂中的缓冲液的质量比为:4:9;

4) 离心步骤3) 最后得到的溶液20min,弃上清,采用甘胆酸R2试剂中的缓冲液进行重悬沉淀,即得到抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒。

一种甘胆酸检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测技术领域,具体涉及一种甘胆酸检测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,由肝细胞合成,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,经门静脉再回到肝脏,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,外周血中胆酸含量非常少,因此正常成人无论空腹或餐后,其血清CG浓度均稳定在低水平。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,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淤积和早期酒精肝损伤的重要指标。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临床意义。

[0003] 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。现有的甘胆酸测定方法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以及急诊需求,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,线性范围窄。

发明内容

[0004] 为了克服上述技术问题,本发明提供了一种灵敏度、精密度更高、重复性更好以及检测线性范围更宽的甘胆酸检测试剂盒。

[0005] 本发明提供了一种甘胆酸试剂盒,包括如下成分:

[0006] 甘胆酸R1试剂:

	甘胆酸-蛋白偶联物	0.0005-0.005 mg/mL
	8-苯胺-1-萘磺酸	0.05-0.2mg/mL
[0007]	表面活性剂	1-30mg/mL
	稳定剂	5-20mg/mL
	防腐剂	0.5-5mg/mL
	缓冲液	PH 5.5-7.5
[0008]	甘胆酸R2试剂:	
	抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	0.5-10mg/mL
	缓冲液	PH 5.5-7.5
[0009]	稳定剂	5-10mg/mL
	防腐剂	0.5-5mg/mL
	细胞保护剂	1-10mg/mL
[0010]	进一步的,本发明中的试剂盒,包括如下成分:	
[0011]	甘胆酸R1试剂:	
	甘胆酸-蛋白偶联物	0.001-0.005 mg/mL
	8-苯胺-1-萘磺酸	0.1-0.2mg/mL
[0012]	表面活性剂	5-30mg/mL
	稳定剂	5-10mg/mL
	防腐剂	1-5mg/mL
	缓冲液	PH 5.5-7.5
[0013]	甘胆酸R2试剂:	
	抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	1.0-10mg/mL
	缓冲液	PH 5.5-7.5
[0014]	稳定剂	6-8mg/mL
	防腐剂	1-3mg/mL
[0015]	细胞保护剂	1-8mg/mL
[0016]	进一步的,本发明中的试剂盒,包括如下成分:甘胆酸R1试剂:	

- | | | |
|--------|---|------------------|
| | 甘胆酸-蛋白偶联物 | 0.002 mg/mL |
| | 8-苯胺-1-萘磺酸 | 0.15mg/mL |
| [0017] | 表面活性剂 | 10mg/mL |
| | 稳定剂 | 7mg/mL |
| | 防腐剂 | 2mg/mL |
| | 缓冲液 | PH 5.5-7.5 |
| [0018] | 甘胆酸R2试剂: | |
| | 抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒 | 5mg/mL |
| | 缓冲液 | PH 5.5-7.5 |
| [0019] | 稳定剂 | 7mg/mL |
| | 防腐剂 | 2mg/mL |
| | 细胞保护剂 | 5mg/mL |
| [0020] | 进一步的,本发明中的试剂盒,包括如下组分:甘胆酸R1试剂: | |
| | 甘胆酸-蛋白偶联物 | 0.001-0.005mg/mL |
| | 8-苯胺-1-萘磺酸 | 0.15mg/mL |
| [0021] | PEG-6000 | 10mg/mL |
| | 稳定剂 | 5-20mg/mL |
| | 防腐剂 | 1-3mg/mL |
| | 缓冲液 | PH 5.5-7.5 |
| [0022] | 甘胆酸R2试剂: | |
| | 抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒 | 1.0-10mg/mL |
| | 缓冲液 | PH5.5-7.5 |
| [0023] | 稳定剂 | 7mg/mL |
| | 防腐剂 | 2mg/mL |
| | 细胞保护剂 | 5mg/mL |
| [0024] | 进一步的,本发明中的表面活性剂为A-90、B-66、Brij58、Tween-20、Tween-80、Triton-100、PEG-6000中的一种或者几种。 | |
| [0025] | 进一步的,本发明中的表面活性剂为A-90、B-66、Brij58、PEG-6000中的一种或者几种。 | |
| [0026] | 更进一步的,本发明中的表面活性剂为PEG-6000。 | |
| [0027] | 进一步的,本发明中的稳定剂为选自蛋白质、无机盐、金属络合剂、助悬剂和抗氧化剂中的一种或几种; | |
| [0028] | 进一步的,其中的无机盐选自氯化钠、氯化钾或氯化镁中的一种或几种,优选氯化 | |

钠；

[0029] 进一步的，其中的金属络合剂为含有氨基二乙酸基团的络合剂，选自EGTA、EDTP、DTPA、EDTA中的一种或几种；

[0030] 进一步的，其中的助悬剂选自乙二醇、丙三醇、乳糖、蔗糖、麦芽糖中的一种或几种；

[0031] 进一步的，其中的抗氧化剂选自2,6-二叔丁基对甲酚、叔丁基对羟基茴香醚、没食子酸丙酯中的一种或几种。

[0032] 进一步的，本发明中的防腐剂为PC300、苯甲酸、苯甲酸钠、叠氮钠中的一种或者几种。

[0033] 进一步的，本发明中的防腐剂为PC300、叠氮钠中的一种或者几种。

[0034] 更进一步的，本发明中的防腐剂为PC300。

[0035] 进一步的，本发明中的缓冲液为磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、MES缓冲液、醋酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液及硼砂缓冲液中的一种或者几种。

[0036] 进一步的，本发明中的缓冲液为磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液和MES缓冲液中的一种或者几种。

[0037] 更进一步的，本发明中的缓冲液为柠檬酸盐缓冲液。

[0038] 进一步的，本发明中的细胞保护剂为卵清蛋白、牛转铁蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白及血蓝蛋白中的一种或者几种。

[0039] 进一步的，本发明中的细胞保护剂为牛血清白蛋白、血蓝蛋白中的一种或者几种。

[0040] 更进一步的，本发明中的细胞保护剂为牛血清白蛋白。

[0041] 进一步的，本发明中的甘胆酸-蛋白偶联物中的蛋白为卵清蛋白、牛转铁蛋白、人血清白蛋白、牛血清白蛋白及血蓝蛋白中的一种或者几种，优选为牛血清白蛋白、血蓝蛋白中的一种或者几种，更优选为牛血清白蛋白。

[0042] 进一步的，所述甘胆酸-蛋白偶联物中蛋白与甘胆酸的体积比为：7:1。

[0043] 进一步的，本发明中的试剂盒中的甘胆酸-蛋白偶联物的制备方法，包括如下步骤：

[0044] 1) 称取甘胆酸纯品，用DMF进行溶解，得甘胆酸溶液；用DMF配制NHS溶液，得NHS溶液；用DMF配制EDC溶液，得EDC溶液；称取蛋白，将其溶解在纯水中，得蛋白溶液；

[0045] 2) 将NHS溶液和EDC溶液加入甘胆酸溶液中，室温搅拌，得混合溶液；

[0046] 3) 将步骤2)得到的混合溶液加入蛋白溶液中，室温搅拌；

[0047] 4) 将步骤3)得到的产物置于缓冲液中，进行透析，最后得到甘胆酸-蛋白偶联物。

[0048] 进一步的，本发明中的试剂盒中的甘胆酸-蛋白偶联物的制备方法，包括如下步骤：

[0049] 1) 称取甘胆酸纯品，用DMF进行溶解，制备10-30mg/mL甘胆酸溶液，优选的，制备20mg/mL甘胆酸溶液；用DMF配置8-15mg/mL NHS溶液，优选的，用DMF配置12mg/mL NHS溶液；用DMF配置10-40mg/ml EDC溶液，优选的，用DMF配置19.2mg/mL EDC溶液；用超纯水配置10-40mg/mL蛋白溶液，优选的，所述蛋白为牛血清白蛋白，更优选的，用超纯水配置20mg/mL牛血清白蛋白溶液；

[0050] 2) 将NHS溶液和EDC溶液加入甘胆酸溶液中，室温搅拌，得混合溶液，NHS溶液体积

与甘胆酸溶液体积比为:9:14;EDC溶液体积与甘胆酸溶液体积比为:33:70;

[0051] 3) 将步骤2)得到的混合溶液加入牛血清白蛋白溶液中,室温搅拌,牛血清白蛋白溶液体积与甘胆酸溶液体积比为:14:1-6:1;(优选为10:1-6:1,进一步的,更优选为7:1)

[0052] 4) 将步骤3)得到的产物置于pH6.0的0.01mol/L柠檬酸缓冲液中,进行透析,最后得到甘胆酸-蛋白偶联物。

[0053] 进一步的,本发明中的试剂盒中的抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:

[0054] 1) 将甘胆酸-蛋白偶联物皮下免疫小鼠,将免疫后的小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合,筛选得到抗甘胆酸抗体;

[0055] 2) 向甘胆酸R2试剂中的缓冲液中加入胶乳颗粒以及步骤1)所得抗甘胆酸抗体,混匀搅拌,然后加入EDC溶液,继续搅拌;

[0056] 3) 向步骤2)最后得到的溶液中加入封闭液,继续搅拌;

[0057] 4) 离心步骤3)最后得到的溶液,弃上清,采用甘胆酸R2试剂中的缓冲液进行重悬沉淀,即得到抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒。

[0058] 进一步的,本发明中的试剂盒中的抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:

[0059] 1) 将甘胆酸-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骨髓瘤细胞融合,通过BSA-CG板筛选得到抗甘胆酸抗体;

[0060] 2) 向甘胆酸R2试剂中的缓冲液中加入胶乳颗粒以及步骤1)所得抗甘胆酸抗体,混匀搅拌,然后加入EDC溶液,继续搅拌,甘胆酸R2试剂中的缓冲液、抗甘胆酸抗体、胶乳颗粒以及EDC的质量比为:180:16:1:4;

[0061] 3) 向步骤2)最后得到的溶液中加入0.5%的酪蛋白,继续搅拌,酪蛋白与甘胆酸R2试剂中的缓冲液的体积比为:4:9;

[0062] 4) 离心步骤3)最后得到的溶液,弃上清,采用甘胆酸R2试剂中的缓冲液进行重悬沉淀,即得到抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒。

[0063] 进一步,步骤2)中的EDC量的为10-50uL,优选为15-30uL,进一步的,更优选为20uL。

[0064] 本发明中的A-90为表面活性剂。

[0065] 本发明中的B-66为表面活性剂。

[0066] 本发明中的PC300全称为Proclin300,具有防腐的作用。

[0067] 本发明中的MES缓冲液是指2-(N-吗啡啉)乙磺酸。

[0068] 本发明中的DMF是指N,N-二甲基甲酰胺,本发明中的NHS是指N-羟基琥珀酰亚胺,本发明中的EDC是指碳二亚胺。

[0069] 本发明中的抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法中的EDC溶液是采用超纯水(UP水)配置。

[0070] 相对于现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0071] 1、试剂盒中的具体的物质的制备步骤简单,成本低,更适用于工业生产和临床应用;

[0072] 2、通过在试剂盒中添加8-苯胺-1-萘磺酸明显提高了试剂盒的分析灵敏度以及精

密度,扩大检测的线性范围。

[0073] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0074] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0075] 图1不含有8-苯胺-1-萘磺酸的试剂盒与某国外知名厂家试剂盒的相关性分析图

[0076] 图2含有0.05mg/mL 8-苯胺-1-萘磺酸的试剂盒与某国外知名厂家试剂盒的相关性分析图

[0077] 图3含有0.10mg/mL 8-苯胺-1-萘磺酸的试剂盒与某国外知名厂家试剂盒的相关性分析图

[0078] 图4含有0.15mg/mL 8-苯胺-1-萘磺酸的试剂盒与某国外知名厂家试剂盒的相关性分析图

[0079] 图5含有0.20mg/mL 8-苯胺-1-萘磺酸的试剂盒与某国外知名厂家试剂盒的相关性分析图

[0080] 图6含有0.25mg/mL 8-苯胺-1-萘磺酸的试剂盒与某国外知名厂家试剂盒的相关性分析图

[0081] 图7含有0.30mg/mL 8-苯胺-1-萘磺酸的试剂盒与某国外知名厂家试剂盒的相关性分析图

具体实施方式

[0082] 实施例1

[0083] 本发明中具体成分浓度以及配方比例筛选实验

[0084] 1、8-苯胺-1-萘磺酸浓度筛选实验

[0085] 1.1实验方法:

[0086] 设计了以下实验,考察了8-苯胺-1-萘磺酸在甘胆酸(胶乳增强免疫比浊法)试剂盒中的作用。向R1溶液中添加8-苯胺-1-萘磺酸,最终分别配制成含8-苯胺-1-萘磺酸终浓度为0mg/mL、0.05mg/mL、0.10mg/mL、0.15mg/mL、0.20mg/mL、0.25mg/mL、0.30mg/mL的溶液。分别以上述七组溶液作为自制CG(胶乳增强免疫比浊法)试剂中的R1试剂,配套自制R2试剂和校准质控品,采用两点终点法为分析方法,设置上升反应为反应方向,采用SPLINE或Logit-log(4p)作为校准方式,设定实验测试波长为600nm,测试温度为37°C,样本:肝胆酸R1试剂:肝胆酸R2试剂=4:160:40(uL),采用生化仪将160uLR1试剂加入到4uL样本中,37°C孵育5分钟后加入40uL试剂R2,混匀后立即读取吸光度A1,5分钟后读取吸光度A2;采用五点定标法完成定标(校准品浓度分别为0、2.5、5.0、20、50mg/L),质控检测合格后,进行40例临床测试(临床值均匀分布于0.5-127之间),结果见下表2;

[0087] 1.2实验结果

[0088] 表1 8-苯胺-1-萘磺酸浓度筛选实验过程

[0089]

肝胆酸检测试剂盒（胶乳增强免疫比浊法）8-苯胺-1-萘磺酸浓度筛选实验							
一、	参数设置						
反应方向：	+	+	+	+	+	+	+
试剂比例：	4:160:40	4:160:40	4:160:40	4:160:40	4:160:40	4:160:40	4:160:40

[0090]

方法学：	END	END	END	END	END	END	END
公式：	SPLINE	SPLINE	SPLINE	SPLINE	SPLINE	SPLINE	SPLINE
正波长：	600nm	600nm	600nm	600nm	600nm	600nm	600nm
副波长：	none	none	none	none	none	none	none
读点：	11-27	11-27	11-27	11-27	11-27	11-27	11-27
生化仪器型号：	AU480	AU480	AU480	AU480	AU480	AU480	AU480
检测仪器：	AU480	AU480	AU480	AU480	AU480	AU480	AU480
8-苯胺-1-萘磺酸浓度：	0 mg/mL	0.05mg/mL	0.10mg/mL	0.15mg/mL	0.20mg/mL	0.25mg/mL	0.30 mg/mL

[0091] 表2 8-苯胺-1-萘磺酸浓度筛选实验结果

[0092]

序号	0 mg/mL	0.05 mg/mL	0.10 mg/mL	0.15 mg/mL	0.20 mg/mL	0.25 mg/mL	0.30 mg/mL	某国外知名厂家
1	0.51	0.88	1.04	1.07	1.10	1.13	1.25	1.08
2	1.09	1.30	1.52	1.63	1.62	1.64	1.84	1.64
3	1.45	1.67	1.99	2.00	2.05	2.16	2.27	1.99
4	2.60	3.05	3.56	3.66	3.68	3.71	4.15	3.68
5	2.47	2.90	3.50	3.74	3.71	3.62	4.26	3.75
6	1.00	1.20	1.53	1.64	1.62	1.65	1.88	1.65
7	1.49	1.80	2.17	2.37	2.33	2.34	2.74	2.38
8	1.27	1.52	1.88	2.01	1.98	1.99	2.15	2.04
9	1.16	1.45	1.75	1.85	1.87	1.86	2.03	1.89
10	0.96	1.23	1.52	1.73	1.60	1.60	1.88	1.72
11	1.44	1.88	2.21	2.41	2.35	2.20	2.57	2.45
12	2.13	2.61	3.15	3.42	3.33	3.21	3.49	3.44
13	2.15	2.55	3.00	3.19	3.28	3.27	3.67	3.19
14	5.12	5.91	7.05	7.52	7.70	7.35	8.53	7.52
15	6.70	7.72	9.50	10.12	9.88	9.46	12.47	10.11
16	8.50	9.88	11.88	12.53	11.58	10.58	14.79	12.49
17	4.33	5.03	6.04	6.42	6.45	6.50	8.55	6.40
18	9.11	10.42	12.46	12.88	11.79	11.97	15.37	12.85
19	18.25	21.00	24.89	26.04	24.18	27.35	30.44	26.00
20	1.56	1.85	2.15	2.31	2.27	2.57	2.68	2.33
21	40.33	45.20	53.89	56.55	54.67	60.49	62.39	56.58
22	10.28	11.92	14.22	14.42	15.00	17.86	18.56	14.39
23	38.72	45.02	54.07	56.80	55.46	61.38	63.47	56.77
24	28.16	33.14	40.16	42.21	40.58	43.18	45.16	42.19

25	10.05	12.55	16.22	17.38	17.18	18.34	20.44	17.36
26	3.22	3.80	4.78	5.17	5.15	6.78	8.64	5.18
27	19.95	23.14	28.04	30.26	29.58	30.19	32.47	30.29
28	22.46	26.43	32.46	32.18	34.28	37.49	39.26	33.18
29	17.34	20.57	25.16	27.98	26.54	31.52	33.15	28.01
30	5.11	6.13	7.22	7.39	7.62	8.95	9.86	7.36
31	28.88	32.55	40.06	41.74	42.36	45.38	47.38	41.78
32	31.16	36.07	43.18	46.24	45.89	48.57	50.49	46.34
33	40.17	45.59	55.07	57.41	55.67	58.79	60.27	57.49
34	24.11	27.51	33.46	36.12	35.36	37.46	42.17	36.06
35	4.09	4.66	5.78	6.11	6.12	7.41	8.55	6.08
36	8.67	10.03	12.07	12.81	12.74	14.55	15.67	12.85
37	7.96	9.25	11.88	12.43	12.54	14.67	15.35	12.39
38	20.46	24.36	30.45	32.00	30.15	34.57	36.47	32.07
39	19.9	23.11	28.42	29.98	27.36	29.85	32.26	30.18
40	34.62	40.07	48.52	49.62	44.24	49.37	52.78	49.67
41	2.58	2.95	2.99	3.07	3.15	4.13	5.46	3.08
[0093] 42	1.89	2.04	2.23	2.44	2.40	2.79	3.15	2.41
43	1.62	1.78	1.89	1.96	1.98	2.35	2.58	1.98
44	3.48	3.55	3.61	3.68	3.71	4.17	4.79	3.78
45	0.74	0.78	0.82	0.85	0.88	1.52	1.66	0.88
46	1.05	1.13	1.25	1.32	1.35	1.78	2.16	1.37
47	94.34	95.24	99.37	101.37	95.28	101.32	126.98	101.33
48	72.18	74.40	78.25	80.25	75.64	80.19	88.35	80.29
49	32.15	34.50	35.61	36.96	33.17	36.42	42.17	36.97
50	51.42	52.51	56.90	57.43	52.46	57.10	61.36	57.41
51	38.45	39.99	42.76	43.16	38.44	43.05	45.16	43.55
52	19.08	20.70	22.23	23.98	21.79	26.46	30.35	24.00
53	6.72	6.90	7.57	9.05	7.93	9.47	10.48	9.04
54	12.75	14.59	15.54	15.69	14.38	17.31	20.17	15.89
55	30.43	32.02	34.03	33.58	30.47	35.32	36.25	35.52
56	14.35	15.89	17.28	18.32	18.26	20.47	22.45	18.31
57	31.82	33.82	35.40	36.27	36.18	38.47	40.39	36.15
58	38.19	40.26	41.22	42.31	40.67	43.17	45.46	42.35
59	39.27	41.92	43.88	44.06	41.66	44.15	47.35	44.32
60	35.06	36.11	37.69	37.49	35.39	38.22	40.31	38.44

[0094] 相关性分析:

[0095] 见图1-图7

[0096] 实验结果分析:当R1试剂中8-苯胺-1-萘磺酸的浓度为0时,即R1试剂中没有添加8-苯胺-1-萘磺酸时,将检测结果与某国外知名厂家的检测结果进行对比发现,当R1试剂中没有添加8-苯胺-1-萘磺酸时,血液中有37%-79%的甘胆酸没有被检测到,由此得出,添加8-苯胺-1-萘磺酸有利于对血液中的甘胆酸进行充分检测,极大的保障了检测结果的准确性。

[0097] 从表2中看出,采用本发明的试剂盒其检测范围达到0.5-127,而现有技术只能达到1.5-50这样一个检测范围,由此得出,采用本发明的试剂盒极大的扩大了试剂盒的检测范围。

[0098] 从图1-图7看出,随着R1试剂中8-苯胺-1-萘磺酸的浓度的增加(0-0.30mg/mL),临床检测结果呈升高趋势;但达到0.15mg/mL浓度后,临床相关性达到最佳(相关系数0.9974,且 $R^2=0.9999$),表明添加此浓度的8-苯胺-1-萘磺酸的试剂与某国外未知厂家试剂的相关性最佳;故最终选择0.15mg/mL作为最优试剂配方。

[0099] 2、PEG-6000浓度筛选实验

[0100] 2.1实验方法:

[0101] 我们设计了以下实验,考察了PEG-6000在甘胆酸(胶乳增强免疫比浊法)试剂盒中的最佳用量。向CG R1溶液中添加PEG-6000,最终分别配制成含PEG-6000终浓度为0mg/mL、1.0g/mL、5.0mg/mL、10.0mg/mL、20.0mg/mL、30.0mg/mL、40.0mg/mL的溶液。分别以上述七组溶液作为自制CG(胶乳增强免疫比浊法)试剂中的R1试剂,配套自制R2试剂和校准质控品,采用两点终点法为分析方法,设置上升反应为反应方向,采用SPLINE或Logit-log(4p)作为校准方式,设定实验测试波长为600nm,测试温度为37℃,样本:肝胆酸R1试剂:肝胆酸R2试剂=4:160:40(uL),采用生化仪将160uL R1试剂加入到4uL样本中,37℃孵育5分钟后加入40uL试剂R2,混匀后立即读取吸光度A1,5分钟后读取吸光度A2;采用五点定标法完成定标(校准品浓度分别为0、2.5、5.0、20、50mg/L),质控检测,结果见下表3;

[0102] 2.2实验结果:

[0103] 实验结果是定标数据,现把原始定标数据展示如下:

[0104] 表3 PEG-6000浓度筛选实验结果表

[0105]

PEG-6000 浓度:	0 mg/mL	1.0mg/mL	5.0mg/mL	10.0mg/mL	20.0mg/mL	30.0mg/mL	40.0mg/mL
Abs1	0.0264	0.0235	0.0205	0.0136	0.0130	0.0145	0.0136
	0.0318	0.0225	0.0199	0.0147	0.0138	0.0159	0.0147
Abs2	-0.0512	-0.0517	-0.0547	-0.0556	-0.0456	-0.0442	-0.0156
	-0.0517	-0.0525	-0.0572	-0.0561	-0.0468	-0.0486	-0.0179
Abs3	-0.0784	-0.0802	-0.0821	-0.0845	-0.0878	-0.0898	-0.0358
	-0.0789	-0.0809	-0.0818	-0.0839	-0.0869	-0.0912	-0.0338
Abs4	-0.1578	-0.1604	-0.1644	-0.1658	-0.1678	-0.1858	-0.1068
	-0.1545	-0.1619	-0.1638	-0.1661	-0.1670	-0.1861	-0.1079
Abs5	-0.2131	-0.2256	-0.2314	-0.2456	-0.2804	-0.3156	-0.2558
	-0.2111	-0.2271	-0.2302	-0.2471	-0.2812	-0.3171	-0.2473
S1 靶值	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
S2 靶值	2.50	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
S3 靶值	5.00	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
S4 靶值	20.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
S5 靶值	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
S1 均值	0.0291	0.0230	0.0202	0.0142	0.0134	0.0152	0.0142
S2 均值	-0.0515	-0.0521	-0.0560	-0.0559	-0.0462	-0.0464	-0.0168
S3 均值	-0.0787	-0.0806	-0.0820	-0.0842	-0.0874	-0.0905	-0.0348
S4 均值	-0.1562	-0.1612	-0.1641	-0.1660	-0.1674	-0.1860	-0.1074
S5 均值	-0.2121	-0.2264	-0.2308	-0.2464	-0.2808	-0.3164	-0.2516
S1 灵敏度	0	0	0	0	0	0	0
S2 灵敏度	0.0206	0.04168	0.0448	0.04472	0.03696	0.03712	0.01344
S3 灵敏度	0.01574	0.03224	0.0328	0.03368	0.03496	0.0362	0.01392
S4 灵敏度	0.00781	0.03224	0.03282	0.0332	0.03348	0.0372	0.02148
S5 灵敏度	0.00424	0.004528	0.00462	0.00493	0.00562	0.00633	0.00503

[0106] 由上表3可知:随着R1试剂中PEG-6000的浓度的增加(0-40.0mg/mL),试剂定标分析灵敏度呈升高趋势,当没有添加PEG-6000时和调节的PEG-6000浓度为40mg/mL时,,试剂检测灵敏度很低,达不到试剂检测标准,因此当PEG-6000的浓度为1-30mg/mL,其检测灵敏度达到试剂检测标准;当PEG-6000浓度为10、20与30mg/mL时,检测灵敏度相差不大,但是考虑到物料成本及R1试剂的稳定性等因素,我们最终选择10.0mg/mL作为最优试剂配方。

[0107] 3、甘胆酸-蛋白偶联物制备方法中牛血清白蛋白溶液体积与甘胆酸溶液体积比的筛选实验

[0108] 3.1实验方法:

[0109] 为确定甘胆酸-蛋白偶联物制备方法中牛血清白蛋白溶液体积与甘胆酸溶液的最佳体积比,设计如下筛选实验。

[0110] 分别采用权利要求书中甘胆酸-蛋白偶联物制备方法,按照6:1、7:1、8:1、10:1、12:1、14:1的比例,分别制备得到对应的甘胆酸-蛋白偶联物,进一步配制得到对应的R1试

剂。分别以上述六组体积比制备得到甘胆酸-蛋白偶联物制备自制CG(胶乳增强免疫比浊法)试剂中的R1试剂,配套自制R2试剂和校准质控品,采用两点终点法为分析方法,设置上升反应为反应方向,采用SPLINE或Logit-log(4p)作为校准方式,设定实验测试波长为600nm,测试温度为37℃,样本:肝胆酸R1试剂:肝胆酸R2试剂=4:160:40(uL),采用生化仪将160uL R1试剂加入到4uL样本中,37℃孵育5分钟后加入40uL试剂R2,混匀后立即读取吸光度A1,5分钟后读取吸光度A2;采用五点定标法完成定标(校准品浓度分别为0、2.5、5.0、20、50mg/L),结果见下表4;

[0111] 3.2实验结果:

[0112] 选用定标数据为选择标准进行牛血清白蛋白溶液体积与甘胆酸溶液的最佳体积比筛选。

[0113] 表4 牛血清白蛋白溶液体积与甘胆酸溶液的体积比筛选实验结果

体积比:	6:1	7:1	8:1	10:1	12:1	14:1
Abs1	0.0156	0.0114	0.012	0.0105	0.0119	0.0115
	0.0152	0.0125	0.0117	0.0119	0.0134	0.0126
Abs2	-0.0857	-0.1041	-0.0889	-0.0617	-0.0449	-0.0382
	-0.0828	-0.1029	-0.0895	-0.0629	-0.0458	-0.0387
Abs3	-0.1623	-0.1766	-0.1554	-0.1159	-0.0879	-0.0815
	-0.1654	-0.1753	-0.1505	-0.1183	-0.0858	-0.0798
Abs4	-0.315	-0.3305	-0.3014	-0.2618	-0.2257	-0.1954
	-0.3175	-0.3288	-0.3052	-0.2549	-0.2269	-0.1898
Abs5	-0.3648	-0.4017	-0.3584	-0.3019	-0.2804	-0.2649
	-0.3637	-0.3988	-0.3572	-0.3047	-0.2832	-0.2608
S1 靶值	0	0	0	0	0	0
S2 靶值	2.5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
S3 靶值	5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
S4 靶值	20	5	5	5	5	5
S5 靶值	50	50	50	50	50	50
S1 均值	0.0154	0.0120	0.0119	0.0112	0.0127	0.0121
S2 均值	-0.0843	-0.1035	-0.0892	-0.0623	-0.0454	-0.0385
S3 均值	-0.1639	-0.1760	-0.1530	-0.1171	-0.0869	-0.0807
S4 均值	-0.3163	-0.3297	-0.3033	-0.2584	-0.2263	-0.1926
S5 均值	-0.3643	-0.4003	-0.3578	-0.3033	-0.2818	-0.2629
S1 灵敏度	0	0	0	0	0	0
S2 灵敏度	0.03372	0.0828	0.07136	0.04984	0.03632	0.0308
S3 灵敏度	0.03278	0.0704	0.0612	0.04684	0.03476	0.03228
S4 灵敏度	0.01582	0.06594	0.06066	0.05168	0.04526	0.03852
S5 灵敏度	0.00729	0.008006	0.00716	0.00607	0.00564	0.00526

[0116] 由上表4可知:当牛血清白蛋白溶液体积与甘胆酸溶液的体积比为7:1时,试剂的定标分析灵敏度最高。

[0117] 4、抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒制备方法中EDC量的筛选实验

[0118] 4.1实验方法:

[0119] 为了确定抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒制备方法中最佳的EDC用量,我们设计了如下筛选实验;采用UP水作为溶剂,配制EDC溶液,在抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒制备过程中,分别加入10uL、15uL、20uL、30uL、40uL、50uL的EDC溶液,采用配套自制R1试剂和校准质控品,采用两点终点法为分析方法,设置上升反应为反应方向,采用SPLINE或Logit-log(4p)作为校准方式,设定实验测试波长为600nm,测试温度为37℃,样本:肝胆酸R1试剂:肝胆酸R2试剂=4:160:40(uL),采用生化仪将160uL R1试剂加入到4uL样本中,37℃孵育5分钟后加入40uL试剂R2,混匀后立即读取吸光度A1,5分钟后读取吸光度A2;采用五点定标法完成定标(校准品浓度分别为0、2.5、5.0、20、50mg/L),结果见下表5;

[0120] 4.2实验结果:

[0121] EDC用量筛选实验是以定标数据的分析灵敏度为判断标准,筛选实验数据见下表

[0122] 表5 抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒制备方法中EDC量的筛选实验结果表

EDC 用量:	10uL	15uL	20uL	30uL	40uL	50uL
Abs1	0.0077	0.0059	0.0085	0.0095	0.0075	0.0083
	0.0066	0.007	0.0079	0.0107	0.061	0.0109
Abs2	-0.0422	-0.0462	-0.0589	-0.0597	-0.0438	-0.0431
	-0.0416	-0.0489	-0.0593	-0.0606	-0.0472	-0.045

Abs3	-0.0619	-0.0739	-0.0951	-0.1047	-0.0938	-0.0892
	-0.0628	-0.0718	-0.0935	-0.1083	-0.0917	-0.0901
Abs4	-0.1233	-0.1479	-0.1957	-0.1729	-0.1654	-0.1675
	-0.1249	-0.1449	-0.1952	-0.1768	-0.1637	-0.1687
Abs5	-0.1658	-0.1978	-0.2837	-0.2539	-0.2465	-0.2386
	-0.1676	-0.1967	-0.2864	-0.2476	-0.243	-0.2418
S1 靶值	0	0	0	0	0	0
S2 靶值	2.5	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
S3 靶值	5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
S4 靶值	20	5	5	5	5	5
S5 靶值	50	50	50	50	50	50
S1 均值	0.0072	0.0065	0.0082	0.0101	0.0343	0.0096
S2 均值	-0.0419	-0.0476	-0.0591	-0.0602	-0.0455	-0.0441
S3 均值	-0.0624	-0.0729	-0.0943	-0.1065	-0.0928	-0.0897
S4 均值	-0.1241	-0.1464	-0.1955	-0.1749	-0.1646	-0.1681
S5 均值	-0.1667	-0.1973	-0.2851	-0.2508	-0.2448	-0.2402
S1 灵敏度	0	0	0	0	0	0
S2 灵敏度	0.01676	0.03808	0.04728	0.04816	0.0364	0.03528
S3 灵敏度	0.01248	0.02916	0.03772	0.0426	0.03712	0.03588
S4 灵敏度	0.00621	0.02928	0.0391	0.03498	0.03292	0.03362
S5 灵敏度	0.00333	0.003946	0.0057	0.00502	0.0049	0.0048

[0124] 由上表4可知:随着当EDC用量的增加时,试剂的定标分析灵敏度呈先升高后略降低,当选择的EDC的量为20uL时,试剂分析灵敏度最高,因此,选择EDC用量20uL作为最佳用量。

[0125] 实施例2

[0126] 一种甘胆酸试剂盒,包括如下成分:

[0127] 甘胆酸R1试剂:

甘胆酸-蛋白偶联物 0.002mg/mL

8 苯胺-1-萘磺酸 0.15mg/mL

PEG-6000 10mg/mL

氯化钠 7mg/mL

PC300 2mg/mL

柠檬酸盐缓冲液 PH 5.5

[0128] 甘胆酸R2试剂:

	抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	5mg/mL
	磷酸盐缓冲液	PH 5.5
[0131]	氯化钠	7mg/mL
	苯甲酸	2mg/mL
	牛血清白蛋白	5mg/mL

[0132] 本试剂盒中的甘胆酸-蛋白偶联物的制备方法,包括如下步骤:

[0133] 1) 称取甘胆酸纯品,用DMF进行溶解,制备10mg/mL甘胆酸溶液;用DMF配置8mg/mL NHS溶液;用DMF配置10mg/mL EDC溶液;用超纯水配置10mg/mL牛血清白蛋白溶液;

[0134] 2) 分别取45uL、33uL的NHS溶液和EDC溶液,加入到70uL甘胆酸溶液中,室温搅拌30min;

[0135] 3) 将步骤2) 处理得到的混合液加入到0.5ml牛血清白蛋白溶液中,室温条件下搅拌12h;

[0136] 4) 将步骤3) 所得混合物放置于pH 6.0的0.01mol/L柠檬酸缓冲液中,透析12h,既得到甘胆酸-蛋白偶联物。

[0137] 本发明中的抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:

[0138] 1) 将甘胆酸-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骨髓瘤细胞融合,通过BSA-CG板筛选得到甘胆酸单克隆细胞抗体;

[0139] 2) 向0.9mL甘胆酸R2试剂中的缓冲液中加入50uL胶乳颗粒以及步骤1) 所得400ug抗甘胆酸抗体,混匀搅拌20min,然后补加20uL EDC溶液,继续搅拌12h;

[0140] 3) 向步骤2) 最后得到的溶液中加入0.4mL 0.5%的酪蛋白,继续搅拌1h;

[0141] 4) 16,000rpm离心步骤3) 最后得到的溶液20min,弃上清,采用甘胆酸R2试剂中的缓冲液进行重悬沉淀,即得到抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒。

[0142] 实施例3

[0143] 甘胆酸R1试剂:

	甘胆酸-蛋白偶联物	0.0005 mg/mL
--	-----------	--------------

[0144]	8 苯胺-1-萘磺酸	0.05mg/mL
--------	------------	-----------

	Tween-80	1mg/mL
--	----------	--------

	氯化钠	5mg/mL
--	-----	--------

[0145]	苯甲酸钠	0.5mg/mL
--------	------	----------

	MES 缓冲液	PH 7.5
--	---------	--------

[0146] 甘胆酸R2试剂:

- | | | |
|--------|--------------|----------|
| | 抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒 | 0.5mg/mL |
| | 柠檬酸盐缓冲液 | PH 7.5 |
| [0147] | 氯化钠 | 5mg/mL |
| | 叠氮钠 | 0.5mg/mL |
| | 卵清蛋白 | 1mg/mL |
- [0148] 本试剂盒中的甘胆酸-蛋白偶联物的制备方法,包括如下步骤:
- [0149] 1) 称取甘胆酸纯品,用DMF进行溶解,制备30mg/mL甘胆酸溶液;用DMF配置15mg/mL NHS溶液;用DMF配置40mg/mL EDC溶液;用超纯水配置40mg/mL牛血清白蛋白溶液;
- [0150] 2) 分别取40.8uL、30uL的NHS溶液和EDC溶液,加入到63.6uL甘胆酸溶液中,室温搅拌30min;
- [0151] 3) 将步骤2) 处理得到的混合液加入到0.9mL牛血清白蛋白溶液中,室温条件下搅拌12h;
- [0152] 4) 将步骤3) 所得混合物放置于pH 6.0的0.01mol/L柠檬酸缓冲液中,透析12h,既得到甘胆酸-蛋白偶联物。
- [0153] 本发明中的抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:
- [0154] 1) 将甘胆酸-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骨髓瘤细胞融合,通过BSA-CG板筛选得到甘胆酸单克隆细胞抗体;
- [0155] 2) 向1.8mL甘胆酸R2试剂中的缓冲液中加入100uL胶乳颗粒以及步骤1) 所得800ug抗甘胆酸抗体,混匀搅拌40min,然后补加40uL EDC溶液,继续搅拌24h;
- [0156] 3) 向步骤2) 最后得到的溶液中加入0.8mL 0.5%的酪蛋白,继续搅拌1h;
- [0157] 4) 离心步骤3) 最后得到的溶液40min,弃上清,采用甘胆酸R2试剂中的缓冲液进行重悬沉淀,即得到抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒。
- [0158] 实施例4
- [0159] 甘胆酸R1试剂:
- | | | |
|--|------------|-------------|
| | 甘胆酸-蛋白偶联物 | 0.005 mg/mL |
| | 8 苯胺-1-萘磺酸 | 0.2mg/mL |
| | Tween-20 | 30mg/mL |
- [0160]
- | | | |
|--|--------|---------|
| | 氯化钠 | 20mg/mL |
| | 叠氮钠 | 5mg/mL |
| | 甘氨酸缓冲液 | PH 6 |
- [0161] 甘胆酸R2试剂:

	抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	10mg/mL
	硼砂缓冲液	PH 6
[0162]	氯化钠	10mg/mL
	叠氮钠	5mg/mL
	牛转铁蛋白	10mg/mL

[0163] 本试剂盒中的甘胆酸-蛋白偶联物的制备方法,包括如下步骤:

[0164] 1) 称取甘胆酸纯品,用DMF进行溶解,制备20mg/mL甘胆酸溶液;用DMF配置12mg/mL NHS溶液;用DMF配置19.2mg/mL EDC溶液;用超纯水配置20mg/mL牛血清白蛋白溶液;

[0165] 2) 分别取45uL、33uL的NHS溶液和EDC溶液,加入到70uL甘胆酸溶液中,室温搅拌30min;

[0166] 3) 将步骤2)处理得到的混合液加入到1mL牛血清白蛋白溶液中,室温条件下搅拌12h;

[0167] 4) 将步骤3)所得混合物放置于pH 6.0的0.01mol/L柠檬酸缓冲液中,透析12h,既得到甘胆酸-蛋白偶联物。

[0168] 本发明中的抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法,包括如下步骤:

[0169] 1) 将甘胆酸-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骨髓瘤细胞融合,通过BSA-CG板筛选得到甘胆酸单克隆细胞抗体;

[0170] 2) 向1.8mL甘胆酸R2试剂中的缓冲液中加入100uL胶乳颗粒以及步骤1)所得800ug抗甘胆酸抗体,混匀搅拌40min,然后补加40uL EDC溶液,继续搅拌24h;

[0171] 3) 向步骤2)最后得到的溶液中加入0.8mL 0.5%的酪蛋白,继续搅拌1h;

[0172] 4) 离心步骤3)最后得到的溶液40min,弃上清,采用甘胆酸R2试剂中的缓冲液进行重悬沉淀,即得到抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒。

[0173] 实施例5

[0174] 甘胆酸R1试剂:

	甘胆酸-蛋白偶联物	0.001 mg/mL
	8 苯胺-1-萘磺酸	0.1mg/mL
	Tween-20	5mg/mL
[0175]	氯化钠	5mg/mL
	叠氮钠	1mg/mL
	甘氨酸缓冲液	PH 5.5

[0176] 甘胆酸R2试剂:

	抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	1mg/mL
	硼砂缓冲液	PH 5.5
[0177]	氯化钠	6mg/mL
	叠氮钠	1mg/mL
	牛转铁蛋白	1mg/mL
[0178]	实施例6	
[0179]	甘胆酸R1试剂:	
	甘胆酸-蛋白偶联物	0.005 mg/mL
	8 苯胺-1-萘磺酸	0.2mg/mL
[0180]	Tween-20	30mg/mL
	氯化钠	10mg/mL
	叠氮钠	5mg/mL
	甘氨酸缓冲液	PH 7.5
[0181]	甘胆酸R2试剂:	
	抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	10mg/mL
	硼砂缓冲液	PH 7.5
[0182]	氯化钠	8mg/mL
	叠氮钠	3mg/mL
	牛转铁蛋白	8mg/mL
[0183]	实施例7	
	甘胆酸-蛋白偶联物	0.001 mg/mL
	8 苯胺-1-萘磺酸	0.15mg/mL
[0184]	PEG-6000	10mg/mL
	氯化钠	5mg/mL
	叠氮钠	1mg/mL
	甘氨酸缓冲液	PH 5.5
[0185]	甘胆酸R2试剂:	

	抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	1mg/mL
	硼砂缓冲液	PH 5.5
[0186]	氯化钠	7mg/mL
	叠氮钠	2mg/mL
	牛转铁蛋白	5mg/mL
[0187]	实施例8	
[0188]	甘胆酸R1试剂:	
	甘胆酸-蛋白偶联物	0.005 mg/mL
	8 苯胺-1-萘磺酸	0.15mg/mL
	PEG-6000	10mg/mL
[0189]	氯化钠	20mg/mL
	叠氮钠	3mg/mL
	甘氨酸缓冲液	PH 7.5
[0190]	甘胆酸R2试剂:	
	抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒	10mg/mL
	硼砂缓冲液	PH 7.5
[0191]	氯化钠	7mg/mL
	叠氮钠	2mg/mL
	牛转铁蛋白	5mg/mL

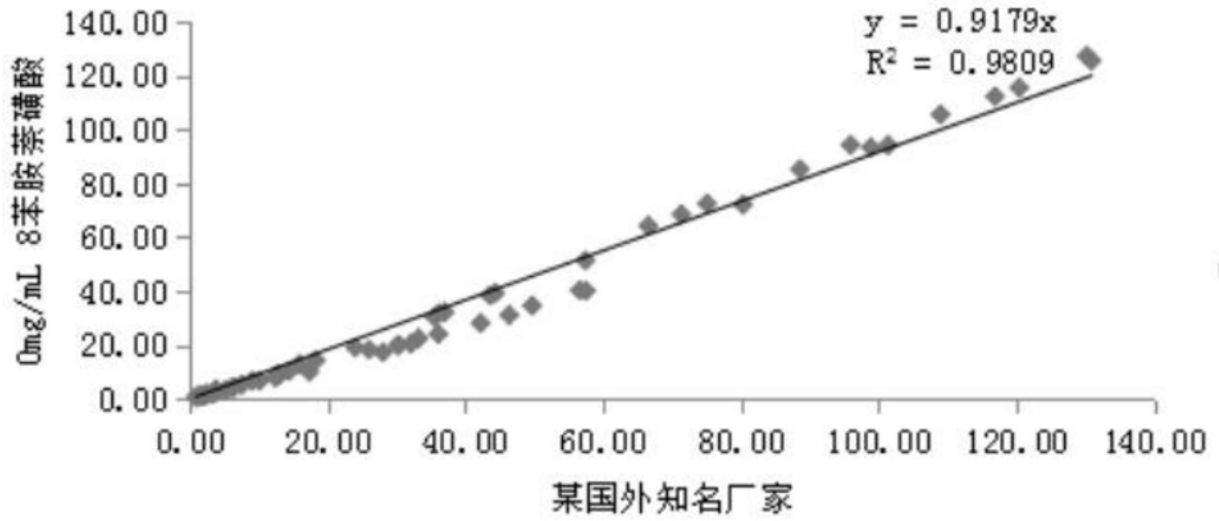


图1

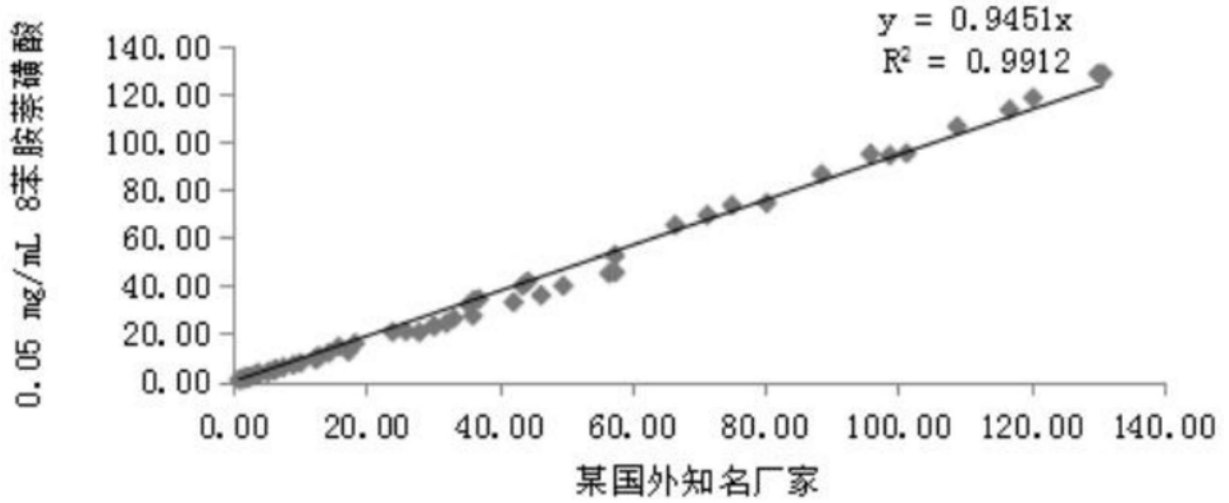


图2

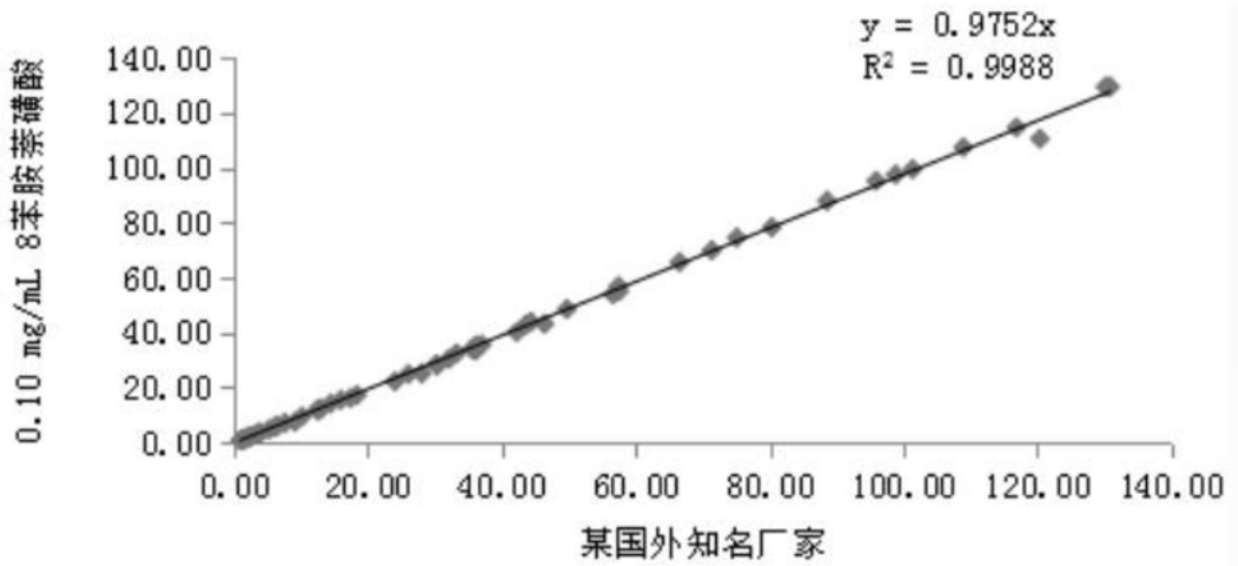


图3

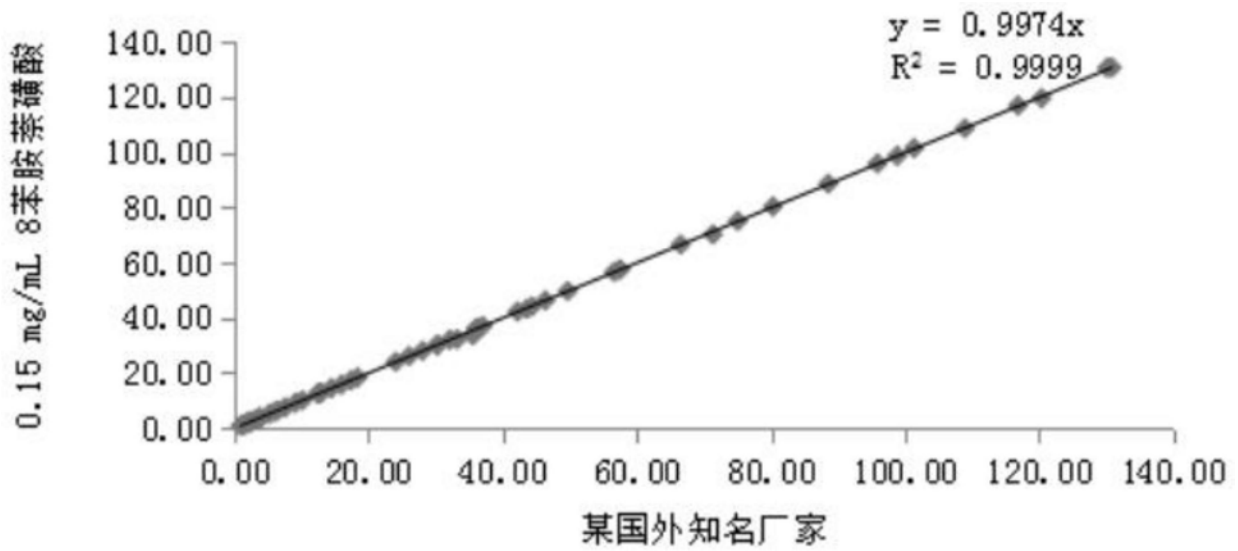


图4

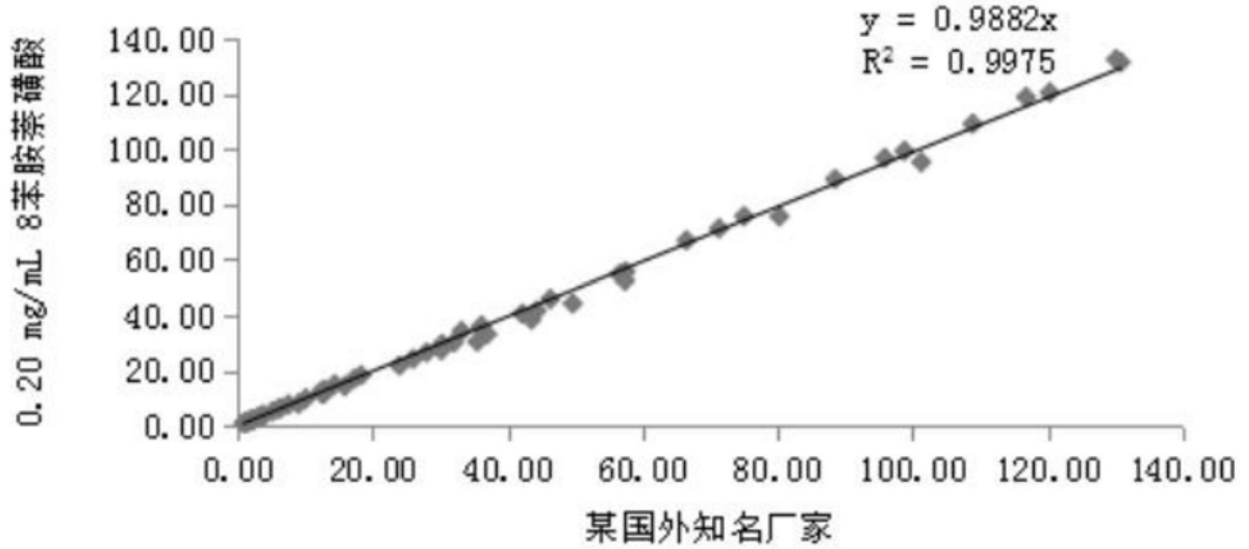


图5

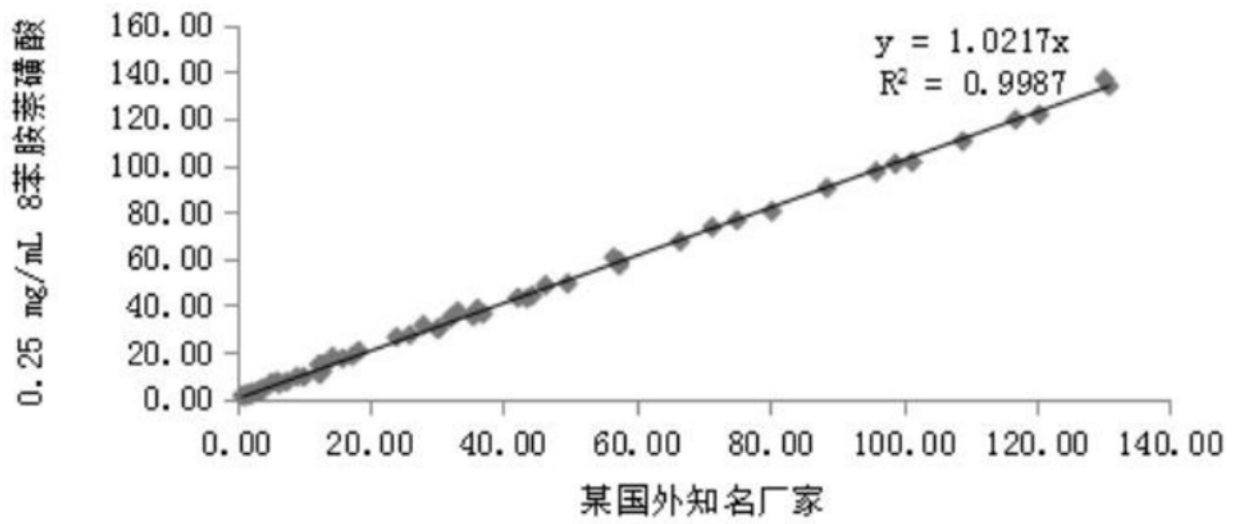


图6

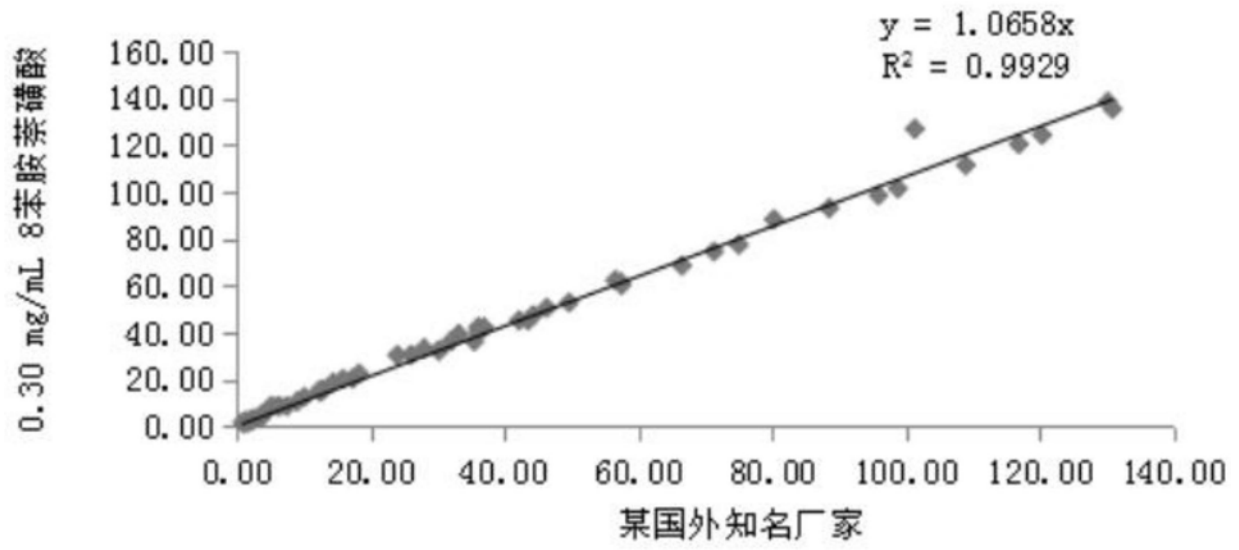


图7

专利名称(译)	一种甘胆酸检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109444399A	公开(公告)日	2019-03-08
申请号	CN201811260602.5	申请日	2018-10-26
[标]发明人	李元丽 刘霖 张艳军		
发明人	李元丽 刘霖 张艳军		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/531 G01N21/31 G01N33/54393 G01N2800/085		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种甘胆酸检测试剂盒，并且提供了甘胆酸检测试剂盒中甘胆酸-蛋白偶联物与抗甘胆酸抗体包被胶乳颗粒的制备方法，本甘胆酸检测试剂盒采用了竞争法对甘胆酸进行检测，通过在试剂盒中添加8-苯胺-1-萘磺酸明显提高了试剂盒的分析灵敏度以及精密度，扩大检测的线性范围，并且本试剂盒中的具体的物质的制备步骤简单，成本低，更适用于工业生产和临床应用。

