



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106290820 A

(43)申请公布日 2017.01.04

(21)申请号 201610663497.4

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2016.08.12

G01N 33/576(2006.01)

(71)申请人 泰州泽成生物技术有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城
泰路西侧、陆家路东侧G59幢62号西半
侧一至四层

(72)发明人 季连星 刘振国 王赞 孙裔雷
孔晓凯 丁文健 夏振伟

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411

代理人 刘刚

(51)Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/551(2006.01)

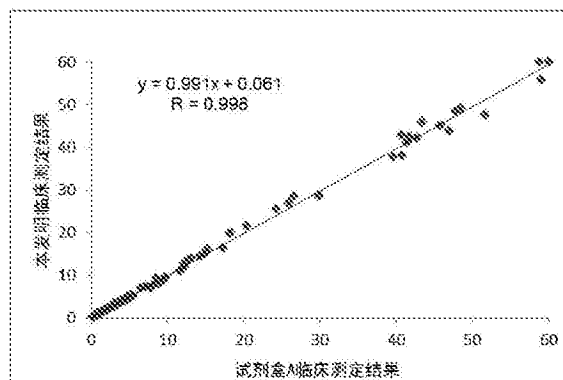
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种检测血清中甘胆酸含量的试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测血清中甘胆酸含量的试剂盒,包括抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液和浓缩洗液;抗试剂A是碱性磷酸酶标记的甘胆酸衍生物抗试剂A;抗试剂B是FITC标记的甘胆酸抗体,磁微粒试剂是包被有FITC抗体的羧基磁微粒混同时还公开了该试剂盒的制备方法。该试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,提供了一种接近均相的反应体系,并且采用了一步法反应模式,使得检测性能大大提高(灵敏度、精密性、检测范围等),反应时间大大缩短,从开始加样到检测结果,时间少于35min,明显快于同类试剂盒);偶联效率高,结合牢固,且工艺稳定,在提高产品性能的同时,大大降低了产品成本。



1. 一种检测血清中甘胆酸含量的试剂盒,其特征在于,包括:抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液;

其中,所述抗试剂A是碱性磷酸酶标记的甘胆酸衍生物,含BSA的抗试剂A缓冲液;所述碱性磷酸酶标记的甘胆酸衍生物是通过偶联剂将甘胆酸衍生物和碱性磷酸酶偶联后获得,浓度为0.8ug/mL;所述抗试剂A缓冲液为10~100mM的Tris-HCl溶液,pH值为7-8,含有浓度为2-6wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.05-0.1wt%的叠氮钠、0.3wt%的PC-300、0.1-1wt%牛血清白蛋白以及20mMEDTA;

所述抗试剂B是FITC标记的甘胆酸抗体,含BSA的抗试剂B缓冲液;所述FITC标记的甘胆酸抗体是通过偶联剂将甘胆酸抗体和FITC偶联后获得;所述抗试剂A缓冲液为10~100mM的Tris-HCl溶液,pH值为7-8,0.12wt%的ANS、2-6wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.05-0.1wt%的叠氮钠、0.3wt%的PC-300、0.1-1wt%牛血清白蛋白以及20mMEDTA;

所述磁微粒试剂是包被有FITC抗体的羧基磁微粒混悬液;

所述校准品和质控品由人源性甘胆酸和缓冲液组成,缓冲液为浓度50-200mM的Tris-HCl溶液,含有浓度为0.1~1wt%的牛血清白蛋白、0.05~0.5wt%的PC-300、5~50mM的乙二胺四乙酸二钠;

所述发光底物液是含有AMPPD的Tris-HCl溶液,所述Tris-HCl溶液的pH值为8.0~10.0,含有浓度20V%的AMPPD、16wt%的NaCl、0.4wt%的KCl和2.42wt%的Tris。

2. 根据权利要求1所述的检测血清中甘胆酸含量的试剂盒,其特征在于,所述偶联剂选自碳化二亚胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的一种或多种。

3. 根据权利要求3所述的检测血清中甘胆酸含量的试剂盒,其特征在于,所述FITC抗体选自人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛转铁蛋白和血蓝蛋白中的一种或多种。

4. 根据权利要求1所述的检测血清中甘胆酸含量的试剂盒,其特征在于,所述羧基磁微粒为核壳结构,直径范围为100~4500nm,浓度为1~5mg/mL;所述羧基磁微粒的表面带有由羧基、氨基、羟基、酰肼基或氯甲基的一种或多种修饰的化学基团;所述FITC抗体通过羧基磁微粒携带的基团键合在羧基磁微粒表面。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的检测血清中甘胆酸含量的试剂盒,其特征在于,还包括浓缩洗涤液,所述浓缩洗涤液是含有吐温20的Tris-HCl溶液,pH值为7.4,含有浓度16wt%的NaCl、0.4wt%的KCl、2.42wt%的Tris,使用时用双蒸水15倍稀释。

6. 如权利要求5所述的检测血清中甘胆酸含量的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

一、磁微粒试剂的制备:

1)、将羧基磁微粒用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)在pH4.5~pH5.5下进行活化,然后在磁场上静置使羧基磁微粒与液体分开,弃去上清;

2) 用pH7.6的0.01M的PBS缓冲液洗去多余活化剂,然后加入适量的FITC抗体,使FITC抗体的浓度为0.5ul/mg,在pH7.4~pH7.8下震荡反应;

3) 反应结束后在磁场上静置使羧基磁微粒与液体分开,弃去上清,用含有1wt%牛血清白蛋白的0.01M的PBS缓冲液进行封闭;

4) 封闭结束后,加入封闭液以保存磁微粒试剂,使包被有FITC抗体的羧基磁微粒的最终浓度为2mg/mL;该磁微粒混悬液置于2-8℃保存,以备使用;

二、抗试剂A的制备

甘胆酸衍生物的制备

使用SMCC活化剂将甘胆酸进行活化,生成马来酰亚胺-甘胆酸衍生物;马来酰亚胺-甘胆酸衍生物含有可以与-SH基团反应的马来酰亚胺基团,加入含有-SH的碱性磷酸酶,将CG衍生物与碱性磷酸酶连接在一起;

抗试剂A缓冲液的制备

将9gNaCl、0.5g叠氮钠、3gPC-300、10g牛血清白蛋白和5.84g EDTA溶于900mL双蒸水中,用HCl调整pH7.0-8.0,用双蒸水定容至1000mL;

三、抗试剂B的制备

将1.2gANS、9gNaCl、0.5g叠氮钠、3gPC-300、10g牛血清白蛋白和5.84g EDTA溶于900mL双蒸水中,用HCl调整pH7.0~8.0,用双蒸水定容至1000mL,获得含BSA的缓冲液;

在BSA缓冲液中,25℃条件下,FITC与甘胆酸抗体产生偶联反应,经过蛋白纯化仪纯化,收集包被有FITC的甘胆酸抗体,经过紫外分光光度计检测包被有FITC的甘胆酸抗体的浓度,调整至工作浓度为1.4ug/mL;

四、校准品和质控品的制备

用含有终浓度0.1-1wt%的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt%的PC-300、5-50mM的乙二胺四乙酸二钠的BSA缓冲液将人源性甘胆酸纯品配制成浓度为0ug/mL、1ug/mL、2.5ug/mL、10ug/mL、20ug/mL、40ug/mL的一系列校准品;

用含有终浓度0.1-1wt%的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt%的PC-300、5-50mM的乙二胺四乙酸二钠的BSA缓冲液将人源性甘胆酸纯品配制成浓度为2.5ug/mL、20ug/mL的质控品;

五、发光底物液的制备

将200mL AMPPD、160gNaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷溶于900mL双蒸水中,用HCl调整pH8.0~10.0,用双蒸水定容至1000mL;

六、浓缩洗涤液的制备

将160NaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷、1mL吐温20溶于900mL双蒸水中,用HCl调整至pH7.4,用双蒸水定容至1000mL,使用时用双蒸水15倍稀释。

一种检测血清中甘胆酸含量的试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学技术领域,具体涉及一种采用免疫竞争法、磁微粒化学发光法测定人体中甘胆酸(CG)含量的试剂盒。

背景技术

[0002] 甘胆酸(Cholyglycine,CG),是由胆酸和甘氨酸结合而成的结合型胆酸,是胆汁酸的主要成分之一。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)。当肝细胞受损伤,肝有疾病时,就引起甘胆酸代谢和循环紊乱,血清中的肝胆酸量就增加,且较ALT、AST、总胆红素(TBIL)、碱性磷酸酶(ALP)、谷酰转氨酶(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。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。

[0003] 目前已知的甘胆酸测定方法有放射免疫法(RIA)、酶联免疫吸附法(ELISA)、胶乳增强比浊法等。放射免疫法步骤繁琐,试剂价格昂贵,需使用配套的仪器且存在放射性污染。酶联免疫吸附法存在检测时间长、操作复杂、重复性差、不适于急诊和临床病人及时诊断的需要。胶乳增强免疫比浊法操作简单、快速,但是灵敏度低、低值重复性差。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是克服现有技术的缺陷,提供一种检测血清中甘胆酸含量的试剂盒,

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提供了如下的技术方案:

[0006] 本发明的试剂盒包括抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液和浓缩洗液;

[0007] 其中,所述抗试剂A是碱性磷酸酶标记的甘胆酸衍生物,含BSA的抗试剂A缓冲液;所述碱性磷酸酶标记的甘胆酸衍生物是通过偶联剂将甘胆酸衍生物和碱性磷酸酶偶联后获得,浓度为0.8ug/mL;所述抗试剂A缓冲液为10~100mM的Tris-HCl溶液,pH值为7-8,含有浓度为2-6wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.05-0.1wt%的叠氮钠、0.3wt%的PC-300、0.1-1wt%牛血清白蛋白以及20mM EDTA;

[0008] 所述抗试剂B是FITC标记的甘胆酸抗体,含BSA的抗试剂B缓冲液;所述FITC标记的甘胆酸抗体是通过偶联剂将甘胆酸抗体和FITC偶联后获得;所述抗试剂A缓冲液为10~100mM的Tris-HCl溶液,pH值为7-8,0.12wt%的ANS、2-6wt%的PEG-6000、0.7-0.9wt%的氯化钠、0.05-0.1wt%的叠氮钠、0.3wt%的PC-300、0.1-1wt%牛血清白蛋白以及20mM EDTA;

[0009] 所述磁微粒试剂是包被有FITC抗体的羧基磁微粒混悬液;

[0010] 所述校准品和质控品由源性甘胆酸和缓冲液组成,缓冲液为浓度50-200mM的Tris-HCl溶液,含有浓度为0.1~1wt%的牛血清白蛋白、0.05~0.5wt%的PC-300、5~50mM

的乙二胺四乙酸二钠；

[0011] 所述发光底物液是含有AMPPD的Tris-HCl溶液，所述Tris-HCl溶液的pH值为8.0~10.0，含有浓度20V%的AMPPD、16wt%的NaCl、0.4wt%的KCl和2.42wt%的Tris；

[0012] 进一步的，所述偶联剂选自碳化二亚胺、戊二醛、二异氰酸化合物或二卤化二硝基苯中的一种或多种。

[0013] 进一步的，所述FITC抗体选自人血清白蛋白、牛血清白蛋白、牛转铁蛋白和血蓝蛋白中的一种或多种。

[0014] 进一步的，所述羧基磁微粒为核壳结构，直径范围为100~4500nm，浓度为1~5mg/mL；所述羧基磁微粒的表面带有由羧基、氨基、羟基、酰肼基或氯甲基的一种或多种修饰的化学基团；所述FITC抗体通过羧基磁微粒携带的基团键合在羧基磁微粒表面。

[0015] 进一步的，所述浓缩洗涤液是含有吐温20的Tris-HCl溶液，pH值为7.4，含有浓度16wt%的NaCl、0.4wt%的KCl、2.42wt%的Tris，使用时用双蒸水15倍稀释。

[0016] 本发明的试剂盒的制备方法，包括如下步骤：

[0017] 一、磁微粒试剂的制备：

[0018] 1)、将羧基磁微粒用1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)在pH4.5~pH5.5下进行活化，然后在磁场上静置使羧基磁微粒与液体分开，弃去上清；

[0019] 2)用pH7.6的0.01M的PBS缓冲液洗去多余活化剂，然后加入适量的FITC抗体，使FITC抗体的浓度为0.5ul/mg，在pH7.4~pH7.8下震荡反应；

[0020] 3)反应结束后在磁场上静置使羧基磁微粒与液体分开，弃去上清，用含有1wt%牛血清白蛋白的0.01M的PBS缓冲液进行封闭；

[0021] 4)封闭结束后，加入封闭液以保存磁微粒试剂，使包被有FITC抗体的羧基磁微粒的最终浓度为2mg/mL；该磁微粒混悬液置于2~8℃保存，以备使用；

[0022] 二、抗试剂A的制备

[0023] 甘胆酸衍生物的制备

[0024] 使用SMCC活化剂将甘胆酸进行活化，生成马来酰亚胺-甘胆酸衍生物；马来酰亚胺-甘胆酸衍生物含有可以与-SH基团反应的马来酰亚胺基团，加入含有-SH的碱性磷酸酶，将CG衍生物与碱性磷酸酶连接在一起；

[0025] 抗试剂A缓冲液的制备

[0026] 将9gNaCl、0.5g叠氮钠、3gPC-300、10g牛血清白蛋白和5.84g EDTA溶于900mL双蒸水中，用HCl调整pH7.0~8.0，用双蒸水定容至1000mL；

[0027] 三、抗试剂B的制备

[0028] 将1.2gANS、9gNaCl、0.5g叠氮钠、3gPC-300、10g牛血清白蛋白和5.84gEDTA溶于900mL双蒸水中，用HCl调整pH7.0~8.0，用双蒸水定容至1000mL，获得含BSA的缓冲液；

[0029] 在BSA缓冲液中，25℃条件下，FITC与甘胆酸抗体产生偶联反应，经过蛋白纯化仪纯化，收集包被有FITC的甘胆酸抗体，经过紫外分光光度计检测包被有FITC的甘胆酸抗体的浓度，调整至工作浓度为1.4ug/mL；

[0030] 四、校准品和质控品的制备

[0031] 用含有终浓度0.1~1wt%的牛血清白蛋白、0.05~0.5wt%的PC-300、5~50mM的乙二

胺四乙酸二钠的BSA缓冲液将人源性甘胆酸纯品配制成浓度为0ug/mL、1ug/mL、2.5ug/mL、10ug/mL、20ug/mL、40ug/mL的一系列校准品；

[0032] 用含有终浓度0.1-1wt%的牛血清白蛋白、0.05-0.5wt%的PC-300、5-50mM的乙二醇四乙酸二钠的BSA缓冲液将人源性甘胆酸纯品配制成浓度为2.5ug/mL、20ug/mL的质控品；

[0033] 五、发光底物液的制备

[0034] 将200mL AMPPD、160gNaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷溶于900mL双蒸水中，用HCl调整PH8.0~10.0，用双蒸水定容至1000mL；

[0035] 六、浓缩洗涤液的制备

[0036] 将160NaCl、4gKCl、24.2g三羟甲基氨基甲烷、1mL吐温20溶于900mL双蒸水中，用HCl调整至PH7.4，用双蒸水定容至1000mL，使用时用双蒸水15倍稀释。

[0037] 本发明的技术原理如下：

[0038] 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的甘胆酸抗体与碱性磷酸酶 (AP) 标记的甘胆酸配对抗体和样本、校准品或质控品中的甘胆酸结合形成“三明治”复合物。随后加入连有抗FITC抗体的磁微粒，通过抗FITC抗体与FITC的特异性结合使抗原抗体免疫复合物结合在磁微粒上。在外加磁场的作用下，将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离，清洗复合物后，加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解，形成不稳定的激发态中间体，当激发态中间体回到基态时发出光子，形成发光反应，即可使用化学发光仪检测反应的发光强度。在检测范围内，发光强度与样本中的甘胆酸的含量成正比，使用改良的四参数 Logistic 方程拟合可计算出样本中甘胆酸浓度。

[0039] 本发明的主要创新之处在于：

[0040] 1、该试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合，提供了一种接近均相的反应体系，并且采用了一步法反应模式，使得检测性能大大提高（灵敏度、精密性、检测范围等），反应时间大大缩短（从开始加样到检测结果，时间少于35min，明显快于同类试剂盒）；

[0041] 2、发明了一种新的FITC抗体与磁微粒偶联方法，该方法偶联效率高，结合牢固，且工艺稳定，在提高产品性能的同时，大大降低了产品成本。

[0042] 3、试剂盒中抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液和浓缩洗液均是该反应体系下的最优配方，给该试剂盒的使用效期及检测性能提供了有力保障。

附图说明

[0043] 附图用来提供对本发明的进一步理解，并且构成说明书的一部分，与本发明的实施例一起用于解释本发明，并不构成对本发明的限制。在附图中：

[0044] 图1是本发明试剂盒与市售试剂盒A临床测定结果的对照图。

具体实施方式

[0045] 以下对本发明的优选实施例进行说明，应当理解，此处所描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明，并不用于限定本发明。

[0046] 实施例

[0047] 1、样本采集

[0048] 采用正确医用技术收集血清(严重溶血或脂血的样本不能用于测定),收集后的样本在室温放置不可超过8小时;如果不在8小时内检测需将样本放置于2-8℃的冰箱中;若需72小时以上保存或运输,则应冻存于-20℃以下,避免反复冻融。使用前回复到室温,轻轻摇动混匀。

[0049] 2、实验前准备

[0050] ①取一瓶浓缩洗液用蒸馏水进行15倍稀释;

[0051] ②将恒温箱或水浴锅温度调至37℃,待温度稳定后使用;

[0052] ③将磁微粒混悬液充分混匀至无肉眼可见沉淀。

[0053] 3实验方法

[0054] ①取出一定量的反应容器(平底试管),编号。根据实验要求分别加入60u1校准品/质控品/临床样本;

[0055] ②每孔分别加入抗试剂A60u1、抗试剂B 60u1;

[0056] ②将反应容器内溶液混合均匀,37℃温育15分钟;

[0057] ③每孔分别加入摇匀的磁微粒试剂30u1;

[0058] ⑤将反应容器内溶液混合均匀,37℃温育5分钟;

[0059] ⑥取出反应容器,使用磁分离及洗涤设备,将反应容器中磁微粒用洗液洗涤3次;

[0060] ⑦洗涤完成后倒去洗液,每孔加发光底物液200u1,震荡;

[0061] ⑧化学发光检测仪器检测发光强度;

[0062] ⑨采用四参数拟合方式,以校准品浓度值为X轴,以校准品发光强度值为Y轴,建立定标曲线。根据待测样本的发光强度值回算相应的浓度值。

[0063] 将本发明试剂盒按照方法学鉴定,可达到如下指标:

[0064] 标准曲线线性: $R > 0.9900$ 最低检测限: $\leq 0.07 \text{ug/mL}$ 。

[0065] 表1为临床标本的检测结果,可知本发明试剂盒的最低检测限为 $\leq 0.07 \text{ug/mL}$,由表2临床标本检测结果的正确度可知本发明试剂盒的添加回收率为,85%-115%,由表3可知,本发明试剂盒的变异系数 $CV \leq 8\%$,由表4可知,本发明试剂盒的变异系数 $\leq 15\%$,由表5可知,,本发明试剂盒的线性稀释: R 大于0.9900。

[0066] 表1:临床标本的检测结果

	校准品 A	RLU	校准品 A	RLU	校准品 A	RLU	校准品 A	RLU
	最低检测限	管 1	7963657	管 6	8092081	管 11	8171724	管 16
管 2		8014175	管 7	8146806	管 12	8204945	管 17	8243310
管 3		8053940	管 8	8158096	管 13	8207550	管 18	8277163
管 4		8082132	管 9	8160232	管 14	8234081	管 19	8280475
管 5		8082266	管 10	8168492	管 15	8236539	管 20	8283976
平均值 M		8164958.45	RLU SD	91728.67	CV	1.12%	最低检测限	0.07

[0068] 表2:临床标本检测结果的正确度

[0069]	准确度	参考物质	目标浓度 ug/mL	拟合浓度 ug/mL	RLU1	RLU2	AVERAGE	回收率	范围内?
	(无国 标品)	90B+10F	4.9	4.81	2902726	3077654	2990190	98%	是

[0070] 表3重复性质控品测定值

[0071]	重复性质 控品测定 值	质控 1	RLU	浓度 $\mu\text{g/mL}$	质控 2	RLU	浓度 $\mu\text{g/mL}$
		管 1	4021423	2.79	管 1	966831	21.41
		管 2	4123072	2.64	管 2	985922	20.96
		管 3	4139975	2.62	管 3	996158	20.73

[0072]		管 4	4157284	2.60	管 4	1007267	20.48
		管 5	4179188	2.57	管 5	1030437	19.98
		管 6	4188676	2.55	管 6	1032731	19.93
		管 7	4203928	2.53	管 7	1033430	19.91
		管 8	4206582	2.53	管 8	1034988	19.88
		管 9	4233035	2.49	管 9	1038044	19.82
		管 10	4297386	2.41	管 10	1057365	19.42
		质控 1 拟合浓度 M		2.57	质控 2 拟合浓度 M		20.25
		质控 1 拟合浓度 SD		0.10	质控 2 拟合浓度 SD		0.62
		质控 1 拟合浓度 CV		3.95%	质控 2 拟合浓度 CV		3.06%
		质控 1 拟合浓度偏差		2.91%	质控 1 拟合浓度偏差		1.25%
		范围内?		是	范围内?		是

[0073] 表4本发明试剂盒的批间差

[0074]	质控 1	RLU	浓度 $\mu\text{g/mL}$	质控 2	RLU	浓度 $\mu\text{g/mL}$	
	管 1	4021423	2.79	管 1	966831	21.41	
	管 2	4123072	2.64	管 2	985922	20.96	
	管 3	4139975	2.62	管 3	996158	20.73	
	管 4	4157284	2.60	管 4	1007267	20.48	
	管 5	4179188	2.57	管 5	1030437	19.98	
	管 6	4188676	2.55	管 6	1032731	19.93	
	管 7	4203928	2.53	管 7	1033430	19.91	
	管 8	4206582	2.53	管 8	1034988	19.88	
	管 9	4233035	2.49	管 9	1038044	19.82	
	管 10	4297386	2.41	管 10	1057365	19.42	
	管 1	4098438	2.62	管 1	977269	20.01	
	管 2	4114660	2.60	管 2	981355	19.91	
	管 3	4147354	2.56	管 3	991926	19.67	
	管 4	4157609	2.54	管 4	992411	19.65	
	管 5	4216789	2.47	管 5	1017001	19.10	
	管 6	4261696	2.42	管 6	1025446	18.91	
	管 7	4261966	2.42	管 7	1027903	18.86	
	管 8	4269273	2.41	管 8	1036182	18.68	
	管 9	4272177	2.40	管 9	1044400	18.51	
	管 10	4313490	2.36	管 10	1066809	18.05	
	管 1	4002613	2.62	管 1	905007	21.50	
	管 2	4066694	2.53	管 2	937807	20.63	
	管 3	4072676	2.52	管 3	940364	20.56	
	管 4	4087802	2.51	管 4	943276	20.49	
	管 5	4126838	2.46	管 5	950159	20.31	
	管 6	4136648	2.44	管 6	953514	20.23	
	管 7	4152233	2.43	管 7	954682	20.20	
	[0075]	管 8	4176424	2.40	管 8	984934	19.47
		管 9	4194948	2.37	管 9	994675	19.25
		管 10	4195464	2.37	管 10	1009950	18.91
		质控 1 拟合浓度 M		2.51	质控 2 拟合浓度 M		19.85
质控 1 拟合浓度 SD		0.10	质控 2 拟合浓度 SD		0.83		
质控 1 拟合浓度 CV		4.03%	质控 2 拟合浓度 CV		4.19%		
质控 1 拟合浓度偏差		0.22%	质控 1 拟合浓度偏差		-0.76%		
范围内?		是	范围内?		是		

[0076] 表5本发明试剂盒的线性稀释率

[0077]	线性	稀释比例	浓度 μg/mL	RLU1	RLU2	RLU3	AVERAGE	相关系数 r	范围内?
		1	40.00	576807	576811	607958	587192		
		1/2	20.00	1114120	1124842	1123833	1120932		
		1/4	10.00	1996954	1930691	1937416	1955020		
		1/8	5.00	3700071	3779011	3489094	3656059		
		1/16	2.50	4431444	4680163	4458901	4523503		
		1/32	1.25	5731104	5673698	5805945	5736916		
							R=0.9940	是	

[0078] 将120份血清样本测值与市售甘胆酸检测试剂盒A对比,比较本发明试剂盒与市售甘胆酸试剂盒检测结果的相关性。结果见表6,附图1中显示本发明的试剂盒与市售甘胆酸检测试剂盒A对照的线性方程为 $y=0.991x+0.061$, $R=0.998$

[0079] 表6本发明的试剂盒与市售甘胆酸检测试剂盒A对照

序号	试剂盒 A	比对结果	序号	试剂盒 A	比对结果	序号	试剂盒 A	比对结果	
1	0.32	0.30	41	6.50	7.08	81	1.23	1.23	
2	8.21	7.80	42	11.56	10.99	82	4.02	3.91	
3	0.45	0.45	43	1.23	1.32	83	4.72	5.05	
4	3.83	3.57	44	0.60	0.65	84	29.84	28.77	
5	14.87	14.99	45	2.76	2.56	85	0.75	0.78	
6	3.37	3.12	46	24.32	25.69	86	8.93	8.27	
[0080]	7	0.17	0.16	47	45.87	45.24	87	1.36	1.48
8	18.30	19.86	48	1.24	1.12	88	3.24	3.05	
9	7.08	7.36	49	5.01	4.62	89	41.72	42.58	
10	12.67	13.52	50	15.19	16.10	90	2.94	2.70	
11	2.24	2.39	51	25.96	26.92	91	40.78	38.24	
12	26.58	28.48	52	2.83	3.07	92	1.54	1.64	
13	0.78	0.75	53	0.84	0.83	93	59.02	56.02	
14	4.43	4.11	54	3.91	3.58	94	12.19	12.80	

[0081]

15	0.15	0.14	55	3.94	4.14	95	51.72	47.71
16	60.00	60.00	56	58.83	60.00	96	3.46	3.52
17	8.55	9.38	57	5.42	5.32	97	8.89	8.17
18	0.86	0.80	58	41.42	41.37	98	29.80	28.62
19	9.76	9.59	59	13.04	13.88	99	3.45	3.33
20	0.58	0.57	60	4.14	4.14	100	2.00	2.09
21	5.26	5.22	61	0.61	0.55	101	0.63	0.66
22	1.55	1.47	62	1.07	1.11	102	0.47	0.48
23	48.46	49.11	63	0.69	0.67	103	42.70	42.24
24	1.06	1.05	64	1.65	1.75	104	3.19	3.46
25	1.72	1.67	65	39.61	37.80	105	7.74	7.06
26	0.77	0.84	66	0.95	0.99	106	1.29	1.33
27	0.96	0.91	67	2.92	3.11	107	2.75	2.93
28	47.78	48.56	68	0.63	0.57	108	40.73	42.90
29	1.96	1.80	69	0.73	0.77	109	1.33	1.23
30	0.84	0.84	70	1.02	1.09	110	1.87	1.79
31	1.23	1.24	71	3.61	3.70	111	43.39	46.04
32	0.69	0.67	72	20.29	21.48	112	0.45	0.46
33	1.46	1.51	73	17.24	16.47	113	1.32	1.37
34	1.56	1.51	74	1.26	1.14	114	0.86	0.83
35	0.90	0.89	75	0.83	0.76	115	0.42	0.45
36	12.17	11.87	76	1.04	1.09	116	0.54	0.59
37	2.78	2.55	77	2.99	2.70	117	0.56	0.52
38	3.14	3.26	78	14.25	14.40	118	2.07	2.18
39	9.48	8.99	79	0.58	0.60	119	2.41	2.37
40	47.00	43.96	80	2.93	3.19	120	1.01	1.06

[0082] 最后应说明的是：以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明，对于本领域的技术人员来说，其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

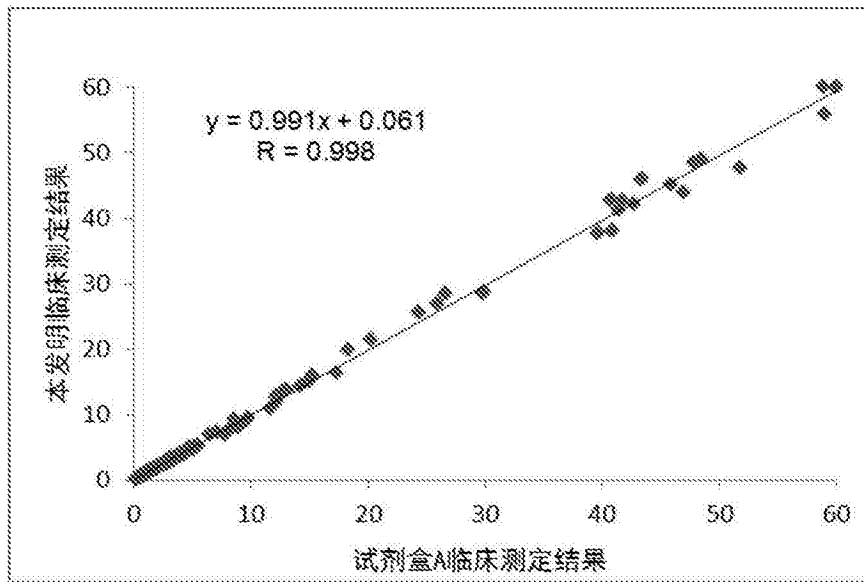


图1

专利名称(译)	一种检测血清中甘胆酸含量的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106290820A	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201610663497.4	申请日	2016-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	泰州泽成生物技术有限公司		
[标]发明人	季连星 刘振国 王赞 孙裔雷 孔晓凯 丁文健 夏振伟		
发明人	季连星 刘振国 王赞 孙裔雷 孔晓凯 丁文健 夏振伟		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/551 G01N33/574 G01N33/576		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/535 G01N33/551 G01N33/57438 G01N33/576 G01N2800/085		
代理人(译)	刘刚		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测血清中甘胆酸含量的试剂盒，包括抗试剂A、抗试剂B、磁微粒试剂、校准品、质控品、发光底物液和浓缩洗液；抗试剂A是碱性磷酸酶标记的甘胆酸衍生物抗试剂A；抗试剂B是FITC标记的甘胆酸抗体，磁微粒试剂是包被有FITC抗体的羧基磁微粒混同时还公开了该试剂盒的制备方法。该试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合，提供了一种接近均相的反应体系，并且采用了一步法反应模式，使得检测性能大大提高(灵敏度、精密性、检测范围等)，反应时间大大缩短，从开始加样到检测结果，时间少于35min,明显快于同类试剂盒)；偶联效率高，结合牢固，且工艺稳定，在提高产品性能的同时，大大降低了产品成本。

