



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106565809 B

(45)授权公告日 2018.05.01

(21)申请号 201610946486.7

(22)申请日 2016.10.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106565809 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(66)本国优先权数据
201610536792.3 2016.07.08 CN

(73)专利权人 北京九强生物技术股份有限公司
地址 100083 北京市海淀区花园东路15号
旷怡大厦5层

(72)发明人 封建新 龚俊 张启飞 高秋峰
王贵利 刘希

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟 程云

(51)Int.Cl.

C07J 41/00(2006.01)

C07J 43/00(2006.01)

C12N 9/38(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

(56)对比文件

CN 103760348 B,2015.03.11,全文.

CN 1632578 A,2005.06.29,全文.

CN 105524898 A,2016.04.27,全文.

CN 102955033 A,2013.03.06,全文.

CN 103940816 A,2014.07.23,全文.

审查员 张建宏

权利要求书2页 说明书12页
序列表5页 附图2页

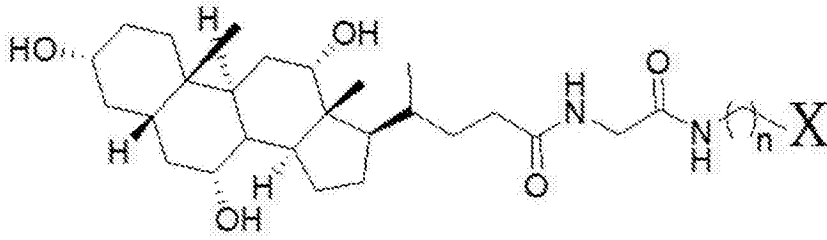
(54)发明名称

一种β半乳糖苷酶的酶供体偶联物及其在甘胆酸检测中的用途

(57)摘要

本申请涉及一种β半乳糖苷酶的酶供体偶联物及其在甘胆酸检测中的用途。具体而言,本申请提供了一种肝胆酸检测试剂盒,其包含第一试剂,第二试剂以及任选的甘胆酸校准品或质控品。第一试剂包含β半乳糖苷酶的酶受体和甘胆酸的特异性抗体,第二试剂包含甘胆酸衍生物与酶供体偶联物。在本申请中,甘胆酸衍生物被定向偶联到酶供体的特定氨基酸残基上。当酶受体与酶供体结合时才能发挥酶活性,且此种结合受样本中甘胆酸含量的控制。与放射免疫检测方法相比,本申请提供的检测试剂灵敏度高、特异性强、检测结果准确并且不涉及同位素污染的问题。

1. 一种通式 (I) 所示的化合物:



(I)

其中, n为0至20之间的任意整数;

X代表马来酰亚胺。

2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。

3. 根据权利要求2所述的化合物, 其中n为2、3、4、5或6。

4. 一种偶联物, 其由权利要求1所述的化合物与 β 半乳糖苷酶的酶供体共价偶联而成。

5. 根据权利要求4所述的偶联物, 权利要求1所述的化合物与 β 半乳糖苷酶的酶供体的摩尔比为1:1。

6. 一种甘胆酸检测试剂盒, 其包含第一试剂和第二试剂,

其中, 所述第一试剂包含 β 半乳糖苷酶的酶受体、甘胆酸抗体;

所述第二试剂包含权利要求4所述的偶联物。

7. 根据权利要求6所述的甘胆酸检测试剂盒, 其还包含校准品和/或质控品。

8. 根据权利要求6所述的甘胆酸检测试剂盒, 其包含:

第一试剂, 其包含:

10mM至500mM缓冲液、

β 半乳糖苷酶的酶受体、

甘胆酸抗体、

2mM至10mM $MgCl_2$ 、

0.1g/L至5g/L稳定剂、

0.1g/L至5g/L表面活性剂、

0.1g/L至5g/L防腐剂;

第二试剂, 其包含:

10mM至500mM缓冲液、

权利要求4所述的偶联物、

0.5g/L至10g/L底物、

0.1g/L至5g/L稳定剂、

0.1g/L至5g/L表面活性剂、

0.1g/L至5g/L防腐剂;

所述稳定剂选自: 牛血清白蛋白、海藻糖、蔗糖、甘露醇、甘油、甘氨酸、聚乙二醇6000及其组合;

所述表面活性剂选自: Triton X-100、TritonX-405、Tween 80、Tween 20、Brij 35、Brij 23及其组合;

所述防腐剂选自：叠氮化合物、MIT、以及生物防腐剂PC；

所述底物选自：p-氨基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、2'-N-(十六醇)-N-(氨基-2'-硝基苯)- β -D-半乳吡喃糖苷、4-甲基伞形酮酰- β -D-半乳吡喃糖苷、萘基-AS-B1- β -D-半乳吡喃糖苷、1-萘基- β -D-半乳吡喃糖苷、2-萘基- β -D-半乳吡喃糖苷、o-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、m-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、p-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、苯基- β -D-半乳吡喃糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳吡喃糖苷、(9-羟基-3-异吩恶嗪酮)- β -D-半乳吡喃糖苷、7-羟基-4-三氟甲基-香豆素、 ω -硝基苯乙烯基- β -D-半乳吡喃糖苷、荧光素-D-半乳吡喃糖苷及其组合。

9. 根据权利要求8所述的甘胆酸检测试剂盒，所述缓冲液是磷酸缓冲液。

10. 根据权利要求8所述的甘胆酸检测试剂盒，所述稳定剂是牛血清白蛋白。

11. 根据权利要求8所述的甘胆酸检测试剂盒，所述表面活性剂是Tween 20。

12. 根据权利要求8所述的甘胆酸检测试剂盒，所述叠氮化合物是叠氮钠或叠氮锂。

13. 根据权利要求8所述的甘胆酸检测试剂盒，所述生物防腐剂PC是PC-300。

14. 根据权利要求8所述的甘胆酸检测试剂盒，所述底物是o-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷。

15. 根据权利要求6所述的甘胆酸检测试剂盒，所述 β 半乳糖苷酶的酶受体是SEQ ID No.2所示。

16. 根据权利要求7所述的甘胆酸检测试剂盒，所述校准品或质控品包含10mM至500mM缓冲液和0mg/L至40mg/L甘胆酸。

17. 权利要求4所述的偶联物在制备甘胆酸检测装置中的用途。

18. 根据权利要求17所述的用途，所述检测装置是试剂盒。

19. 权利要求4所述的偶联物以及SEQ ID No.2所示的 β 半乳糖苷酶的酶受体组合用于制备甘胆酸检测装置中的用途。

20. 根据权利要求19所述的用途，所述检测装置是试剂盒。

一种 β 半乳糖苷酶的酶供体偶联物及其在甘胆酸检测中的用途

技术领域

[0001] 本申请涉及临床检验、生物学领域。更具体地,涉及一种检测血清中甘胆酸含量的方法,以及还涉及一种 β 半乳糖苷酶的酶供体偶联物。

背景技术

[0002] 血清甘胆酸(Cholyglycine,CG)是胆酸与甘氨酸结合而成的结合型胆酸之一。在肝细胞内,胆固醇经过及其复杂的酶促反应,转变成初级胆汁酸,其中有胆酸(CA)和鹅去氧胆酸(CDCA)。胆酸与甘氨酸结合即形成甘胆酸。

[0003] CG正常代谢途径为肠肝循环,CG由肝细胞合成后,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,溢入体循环的总量小于1%。

[0004] 在正常情况下,外周血中胆酸含量甚微,正常成人无论是空腹还是餐后,其血清CG浓度稳定在低水平。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(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。

[0005] 克隆酶供体免疫检测(Enzyme Donor Immunoassay,CEDIA)是一种均相的免疫检测技术,结合了 β 半乳糖苷酶 α 互补原理和抗原抗体的特异性结合性质。将小分子抗原(Ag)与酶供体(ED)偶联,形成ED-Ag偶联物,此偶联物能与酶受体(EA)自发结合形成有活性的 β 半乳糖苷酶;但是如果在反应体系中加入针对该小分子抗原的抗体(Ab),抗原抗体的特异性结合会形成ED-Ag-Ab复合物,此时由于抗体空间位阻的影响,ED-Ag-Ab复合物不能再与EA结合形成具有活性的 β 半乳糖苷酶。如果血清中含有待检测的小分子抗原,此时反应体系中含有两种形式的抗原,一种是血清中的游离抗原,一种是试剂盒中与ED偶联的抗原,即ED-Ag偶联物,这两种形式的抗原都具有与抗体特异性结合的能力。显然,这两种形式的抗原会竞争性的与反应体系中的抗体结合,血清中游离抗原越多,其结合的抗体就越多,从而导致有更多的剩余ED-Ag偶联物(未与抗体结合的部分)能与EA自发结合形成具有活性的 β 半乳糖苷酶,且酶活性的高低与血清中游离抗原的含量成正比。

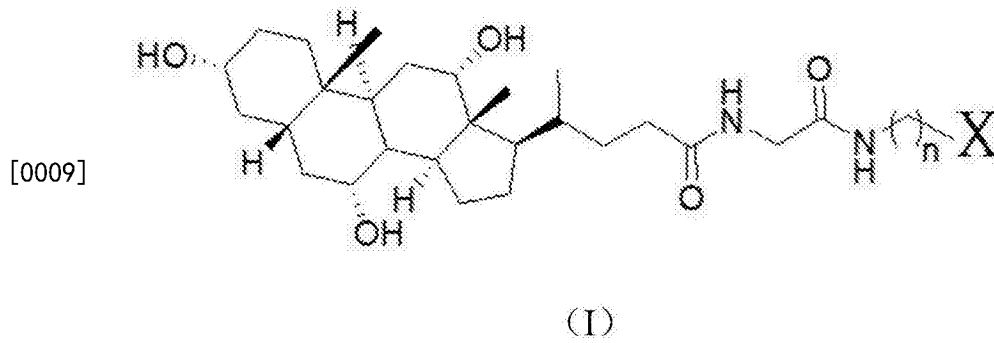
[0006] 临床测定血清甘胆酸的常规方法包括化学发光(CLIA)和酶联免疫(ELISA)。前者灵敏度高,但是需要昂贵的化学发光仪器;后者操作繁琐,检测时间长,自动化程度低,重复性较差。

[0007] 新近出现的一种基于EMIT的甘胆酸检测方法(CN103760348A),是一种均相免疫检测方法,可以在全自动生化仪上进行血清甘胆酸含量的高通量检测,但是特异性和试剂热稳定性有待改进。

发明内容

[0008] 为了给临床提供更有价值的诊断信息,根据本公开的一些实施方案,提供了一种

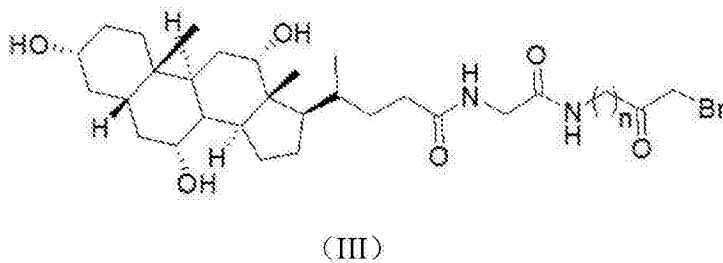
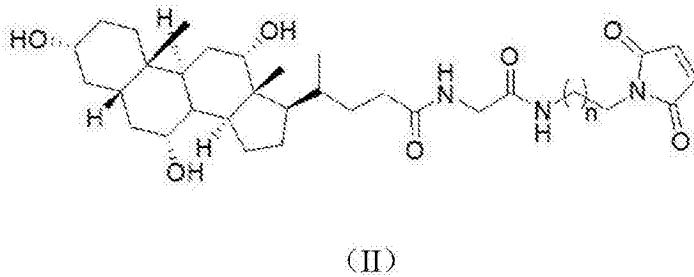
甘胆酸衍生物,其如通式(I)所示:



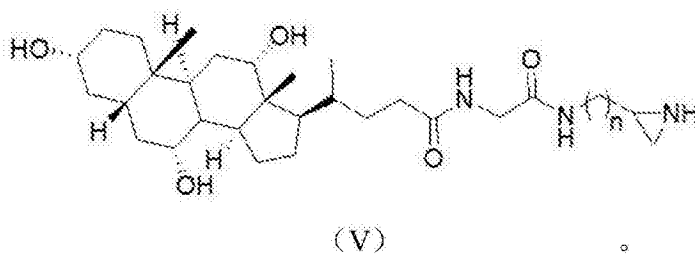
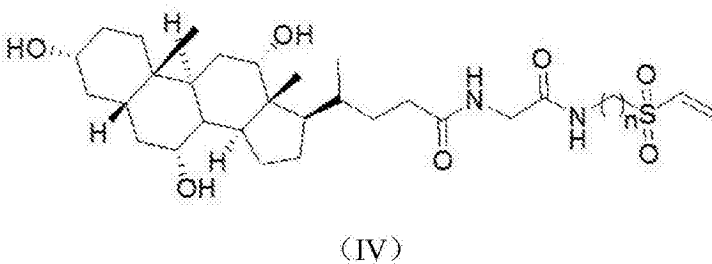
[0010] 其中n为0至20之间的任意整数,例如但不限于n为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10,更优选n为2、3、4、5或6;

[0011] X为能与巯基发生反应的基团,例如但不限于马来酰亚胺、溴乙酰基、乙烯基砜、氮丙啶。在一个具体的实施方案中,X是马来酰亚胺。

[0012] 在一些具体的实施方案中,提供甘胆酸衍生物,其如通式(II)至(V)中任一项所示:



[0013]



[0014] 根据本申请的甘胆酸衍生物能与 β 半乳糖苷酶的酶供体(以下简称ED)分子按照1:1摩尔比定向偶联。

[0015] 在本申请中,任何已知的或未来的 β 半乳糖苷酶的酶供体均适用于实施本申请的技术方案,只要能够和酶受体结合后能够具有 β 半乳糖苷酶活性即可(酶活性是指:能够催化底物显色)。例如,野生型 β 半乳糖苷酶的酶供体、或者经工程改造的 β 半乳糖苷酶的酶供体(比如CN105524898A中公布的酶供体)。

[0016] 根据一些实施方案,提供一种偶联物,其由本申请的甘胆酸衍生物与ED分子偶联而成。在本申请的上下文中,还可以称为“ED-甘胆酸偶联物”。这种偶联物能被甘胆酸的特异性抗体(单抗或多抗)识别,也能与EA分子互补形成具有活性的全酶。

[0017] β 半乳糖苷酶的底物包括但不限于:p-氨基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、2'-N-(十六醇)-N-(氨基-2'-硝基苯)- β -D-半乳吡喃糖苷、4-甲基伞形酮酰- β -D-半乳吡喃糖苷、萘基-AS-B1- β -D-半乳吡喃糖苷、1-萘基- β -D-半乳吡喃糖苷、2-萘基- β -D-半乳吡喃糖苷、o-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、m-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、p-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、苯基- β -D-半乳吡喃糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳吡喃糖苷、(9-羟基-3-异吩恶嗪酮)- β -D-半乳吡喃糖苷、7-羟基-4-三氟甲基-香豆素、 ω -硝基苯乙烯基- β -D-半乳吡喃糖苷、荧光素-D-半乳吡喃糖苷。在具体实施方式中,底物是o-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷(简称ONPG)。

[0018] 根据一些实施方案,提供一种甘胆酸抗体,其能特异性地识别并结合甘胆酸分子。所述甘胆酸抗体是单抗或者多抗。所述甘胆酸抗体与甘胆酸分子的结构类似物交叉反应很小甚至没有,其中甘胆酸分子的结构类似物包括但不限于:胆酸、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、牛黄胆酸、甘氨脱氧胆酸、甘氨鹅脱氧胆酸、甘氨牛黄胆酸。

[0019] 当甘胆酸的特异性抗体与ED-甘胆酸偶联物结合后形成复合物,则EA分子不再能与上述复合物结合,从而不能产生全酶的活性。

[0020] 根据另一些实施方案,提供一种甘胆酸检测试剂盒,其包含第一试剂、第二试剂、以及任选地校准品和/或质控品。

[0021] 在一些实施方案中,根据本申请的甘胆酸检测试剂盒包含根据本申请的ED-甘胆酸偶联物。

[0022] 在一些实施方案中,第一试剂包含 β 半乳糖苷酶的酶受体和甘胆酸抗体。

[0023] 在一些实施方案中,第二试剂包含根据本申请的ED-甘胆酸偶联物。

[0024] 在本申请的上下文中,任何已知的或未来的 β 半乳糖苷酶的酶受体都能够用于实施本申请的技术方案,只要其能够与 β 半乳糖苷酶的酶供体结合后产生 β 半乳糖苷酶活性即可。在一个具体的实施方案中, β 半乳糖苷酶的酶受体是中国专利申请201610841474.8中公开的酶受体,所述酶受体的氨基酸序列是SEQ ID No.2所示;或者所述酶受体由SEQ ID No.1的多核苷酸所编码。和野生型相比,SEQ ID No.2所示的酶受体缺失第13至33位氨基酸残基。发明人出乎意料地发现,经过这种工程改造的 β 半乳糖苷酶受体具有非常低的检测本底,同时有利于表达和互补活性的提高。中国专利申请201610841474.8的全部内容通过引用并入此处。

[0025] 在一个实施方案中,提供了一种检测样本中甘胆酸含量的检测试剂盒,其包含第一试剂和第二试剂,其中

[0026] 第一试剂,包含:

- | | | |
|--------|---|---------------------|
| | 10mM 至 500mM | 缓冲液、 |
| | 0.01mg/ml 至 10mg/ml | β 半乳糖苷酶的酶受体、 |
| | 1mg/L 至 100mg/L | 甘胆酸抗体、 |
| [0027] | 2mM 至 10mM | MgCl ₂ 、 |
| | 0.1g/L 至 5g/L | 稳定剂、 |
| | 0.1g/L 至 5g/L | 表面活性剂、和 |
| | 0.1g/L 至 5g/L | 防腐剂； |
| [0028] | 第二试剂,包含: | |
| | 10mM 至 500mM | 缓冲液、 |
| | 1mg/L 至 100mg/L | 本申请的偶联物、 |
| [0029] | 0.5g/L 至 10 g/L | 底物、 |
| | 0.1g/L 至 5g/L | 稳定剂、 |
| | 0.1g/L 至 5g/L | 表面活性剂、和 |
| | 0.1g/L 至 5g/L | 防腐剂。 |
| [0030] | 在一些实施方案中,缓冲液的浓度是50mM至100mM。 | |
| [0031] | 在一些实施方案中,稳定剂浓度是0.1g/L至0.5g/L。 | |
| [0032] | 在一些实施方案中,表面活性剂浓度是0.1g/L至0.5g/L。 | |
| [0033] | 在一些实施方案中,防腐剂浓度是0.1g/L至0.5g/L。 | |
| [0034] | 在一些实施方案中,MgCl ₂ 浓度是2mM至5mM。 | |
| [0035] | 在一些实施方案中, β 半乳糖苷酶的酶受体浓度是0.01mg/ml至0.05mg/ml。 | |
| [0036] | 在一些实施方案中,甘胆酸抗体浓度是10mg/L至50mg/L。 | |
| [0037] | 在一些实施方案中,本申请偶联物的浓度是5mg/L至50mg/L。 | |
| [0038] | 在一些实施方案中,底物的浓度是0.5g/L至3.0g/L。 | |
| [0039] | 在一些实施方案中,缓冲液选自:磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris缓冲液、硼酸缓冲液和MOPS缓冲液;在一个具体的实施方案中,缓冲液是磷酸缓冲液; | |
| [0040] | 在一些实施方案中,缓冲液的pH为6.0至8.0,优选7.0至7.5,包括7.1、7.2、7.3、7.4或7.5。 | |
| [0041] | 在一些实施方案中,稳定剂选自:牛血清白蛋白、海藻糖、蔗糖、甘露醇、甘油、甘氨酸、聚乙二醇6000及其组合。在一个具体的实施方案中,稳定剂是牛血清白蛋白。 | |
| [0042] | 在一些实施方案中,表面活性剂选自:Triton X-100、TritonX-405、Tween 80、Tween 20、Brij 35、Brij 23及其组合。在一个具体的实施方案中,表面活性剂是Tween 20。 | |
| [0043] | 在一些实施方案中,防腐剂选自:叠氮化合物、MIT、以及生物防腐剂PC。在具体的实施方案中,叠氮化合物是叠氮钠或叠氮锂;在具体的实施方案中,所述生物防腐剂PC是PC-300。 | |
| [0044] | 在一些实施方案中,底物选自:p-氨基苯- β -D-半乳糖苷、2'-N-(十六醇)-N- | |

(氨基-2'-硝基苯)- β -D-半乳吡喃糖苷、4-甲基伞形酮酰- β -D-半乳吡喃糖苷、萘基-AS-B1- β -D-半乳吡喃糖苷、1-萘基- β -D-半乳吡喃糖苷、2-萘基- β -D-半乳吡喃糖苷、o-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、m-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、p-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷、苯基- β -D-半乳吡喃糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳吡喃糖苷、(9-羟基-3-异吩恶嗪酮)- β -D-半乳吡喃糖苷、7-羟基-4-三氟甲基-香豆素、 ω -硝基苯乙烯基- β -D-半乳吡喃糖苷、荧光素-D-半乳吡喃糖苷及其组合,优选o-硝基苯- β -D-半乳吡喃糖苷。

[0045] 在具体的实施方案中,提供了一种检测样本中甘胆酸含量的检测试剂盒,其包含第一试剂和第二试剂,其中

[0046] 第一试剂,包含:

PB 缓冲液 100mM, PH 7.3

酶受体 0.02 mg/ml

甘胆酸抗体(单抗) 50mg/L

[0047] MgCl₂ 5mM

牛血清白蛋白 1g/L

Tween 20 1g/L

叠氮钠 1 g/L;

[0048] 第二试剂,包含:

PB 缓冲液 100 mM, PH7.3

ED-甘胆酸偶联物 10mg/L

ONPG 3g/L

[0049] 牛血清白蛋白 1g/L

Tween 20 1g/L

叠氮钠 1 g/L;

[0050] 任选地,校准品

[0051] PB缓冲液 10mM

[0052] 甘胆酸 0至40mg/L;

[0053] 任选地,质控品

[0054] PB缓冲液 10mM

[0055] 甘胆酸 4.0至15.0mg/L。

[0056] 根据一些实施方案,提供本申请的ED-甘胆酸偶联物在制备甘胆酸检测装置中的用途。在具体的实施方案中,所述检测装置是试剂盒,尤其是CEDIA试剂盒。

[0057] 根据一些实施方案,提供本申请的ED-甘胆酸偶联物和SEQ ID No.2所示的 β 半乳糖苷酶的酶受体两者的组合在制备甘胆酸检测装置中的用途。在具体的实施方案中,所述检测装置是试剂盒,尤其是CEDIA试剂盒。

附图说明

- [0058] 图1:甘胆酸衍生物的合成路线。
- [0059] 图2:定标曲线。
- [0060] 图3:本申请的试剂盒(CEDIA方法)和HPLC方法检测血清中甘胆酸含量之间的相关性。
- [0061] 图4:37℃热加速破坏,不同天数的定标吸光度活性残余。■对照;◆本申请的试剂盒。

具体实施方式

- [0062] 实施例
- [0063] 实施例1:甘胆酸衍生物的合成
- [0064] 具体的合成步骤如下(图1):
- [0065] 向干燥洁净的25mL两口瓶中加入甘胆酸(1.0eq)、马来酰亚胺基乙胺(1.0g, 1.0eq)、三乙胺(3.0eq),再加入二甲基甲酰胺(5mL)搅至全溶,加入二氯乙烷(1.25eq)。
- [0066] 在25℃搅拌2h。HPLC监测,直至反应完毕。把上述反应混合物加入水(25mL)中,加入乙酸乙酯20mL×3进行萃取。合并有机相,无水Na₂SO₄干燥,减压浓缩,所得油状物用柱层析法纯化得到1.04g乳白色粉末状固体,收率45%。M+:589.4。
- [0067] 实施例2:甘胆酸衍生物与ED分子的偶联
- [0068] 根据本申请的ED-甘胆酸偶联物,可以有多种偶联方式:如甘胆酸衍生物分子上的羧基与ED分子上的氨基,甘胆酸衍生物分子上的巯基反应性基团(如马来酰亚胺基团)与ED分子上的巯基。
- [0069] 1.溶液配制:
- [0070] 甘胆酸衍生物溶液:实施例1制备的甘胆酸衍生物10mg/mL溶于DMF;
- [0071] ED溶液(见US7135325B2):1.5mg/mL ED,PB 100mmol,NaCl 100mmol,pH=7.0;
- [0072] Mops溶液:Mops 100mmol,NaCl 1%,pH=7.3。
- [0073] 脱盐溶液:PB 100mM,0.1%Na₃,1%NaCl,pH=7.0。
- [0074] 2.偶联操作:6.0mL ED溶液、22.5mL Mops溶液和4.5mL甘胆酸衍生物溶液,在室温(20至25℃)反应4h。
- [0075] 3.将上述反应体系室温振荡反应4h后,用上述脱盐溶液使用脱盐柱进行洗脱,收集蛋白峰,所得产物即ED-甘胆酸偶联物。
- [0076] 实施例3.制备β半乳糖苷酶的酶受体
- [0077] 按照中国专利申请201610841474.8中公开的方法制备酶受体。
- [0078] 实施例4:克隆酶供体免疫检测方法的甘胆酸试剂的制备
- [0079] 1.第一试剂R1的制备:
- [0080] a)向烧杯A中准确称取28.65g的Na₂HPO₄·12H₂O、3.12g的NaH₂PO₄·2H₂O、1.02g的MgCl₂·6H₂O、1.0g/L Tween 20、1.0g的BSA、1.0g的Na₃、900mL的去离子水,室温搅拌30min,制成溶液1;
- [0081] b)在上述烧杯A中加入25mL浓度为2mg/mL的甘胆酸抗体(实验室自制,也可以采用任何市售抗体),抗体与溶液1的体积比为1:10至1:1000,优选的1:40,室温搅拌5min;
- [0082] c)在上述烧杯A中加入2mL浓度为10mg/mL的酶受体(任何酶受体均可,例如野生型

EA。优选地,当采用实施例3制备的EA时,可以进一步提高互补活性并降低本底背景),酶受体与溶液1的体积比为1:10至1:2000,优选的1:500,室温搅拌5min;

[0083] d) 上述烧杯A中溶液pH调节至7.3后定容至1000mI,即为第一试剂。

[0084] 2. 第二试剂R2的制备:

[0085] a) 向烧杯B中准确称取28.65的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、3.12g的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、3g的ONPG、1.0g/L的Tween 20、1.0g的 NaN_3 、1.0g的BSA、950mI的去离子水,室温搅拌30min,制成溶液2;

[0086] b) 在上述烧杯B中加入20mI浓度为0.5mg/mI的酶供体-甘胆酸偶联物,酶供体-甘胆酸偶联物与溶液2的体积比为1:10至1:1000,本实施例中具体的比例为1:50,室温搅拌5min;

[0087] c) 上述烧杯B中溶液调节pH至7.3后定容至1000mI,即为第二试剂。

[0088] 将第一试剂和第二试剂,以及任选的校准品和/或质控品,组装成试剂盒。

[0089] 测试例

[0090] 测试例1. 酶受体的活性检测

[0091] 将实施例3所得的大肠杆菌 β 半乳糖苷酶的酶受体进行活性检测。

[0092] 大肠杆菌 β 半乳糖苷酶EA能够和ED互补,形成 β 半乳糖苷酶。 β 半乳糖苷酶能够将ONPG水解,生成半乳糖和黄色的邻硝基苯酚(ONP)。测定ONP的量可以确定半乳糖苷酶的酶活,从而确定EA的互补活性。

[0093] (1) EA用PB缓冲液(100mM PBS、150mM NaCl、0.1% NaN_3 、pH 7.3)稀释至0.2mg/mI,ED以PB缓冲液稀释至1 μ g/mI。以西门子生化分析仪1800测定互补活性:

[0094] 100 μ I EA溶液作为R1;

[0095] 100 μ I ONPG底物溶液(5mg/mI ONPG、100mM PBS、150mM NaCl、10mM MgCl_2 、0.1% NaN_3 , pH7.3)作为R2;

[0096] 10 μ I酶供体溶液作为样本S,用于测定EA的互补活性。

[0097] 10 μ I PB缓冲液作为空白对照样本,用于测定EA的本底活性;

[0098] 运行EA-ED程序,确定反应速率,

[0099] (2) 以M15为对照,平行进行上述操作(Langley KE和Zabin I发表的论文Biochemistry.1976,VoI 2;15:4866-75中提到的一种 β 半乳糖苷酶EA,和野生型EA相比,缺失第11至41位的氨基酸残基,被称为M15)。

[0100] (3) 结果:

[0101] 本申请的EA互补活性比M15高11.2%,而本底活性低21%。

[0102] 表1. 互补活性

[0103]

EA	OD ₅₇₁	%
M15	0.21874	100
本申请的EA	0.24332	111.2

[0104] 表2. 本底活性

[0105]

EA	OD ₅₇₁	%
----	-------------------	---

M15	0.00167	100
本申请的EA	0.00132	79

[0106] 测试例2:特异性甘胆酸抗体对各种胆酸的交叉反应

[0107] 1. 干扰物包括:

[0108] 胆酸<5.0%、脱氧胆酸<1.0%、鹅脱氧胆酸<1.0%、牛磺胆酸<2.0%、甘氨酸胆酸<3.0%、甘氨酸鹅脱氧胆酸<1.0%、甘氨酸牛磺胆酸<2.0%。

[0109] 2. 对照试剂:

[0110] 对照试剂的检测原理:样本中游离甘胆酸与葡萄糖六磷酸脱氢酶-甘胆酸偶联物竞争性结合抗甘胆酸特异性抗体。样本中游离的甘胆酸越多,竞争结合的抗体就越多,而未与抗体结合的酶-甘胆酸偶联物就越多。游离的酶-甘胆酸偶联物催化 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型(NAD^+)转化为 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原型(NADH),样本中的甘胆酸浓度与NADH的生成量成正比,通过340nm吸光度的变化可得到样本中甘胆酸的含量。

[0111] 对照试剂组分浓度:

[0112] 第一试剂R1,50mM缓冲液、0.1mM葡萄糖六磷酸、0.1mM β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型、 $\leq 1.0\%$ 抗甘胆酸抗体、0.05%防腐剂;

[0113] 第二试剂R2,100mM缓冲液、 $\leq 1.0\%$ 葡萄糖六磷酸脱氢酶-甘胆酸偶联物、0.05%防腐剂。

[0114] 3. 交叉反应的检测方法:

[0115] 使用缓冲液溶解甘胆酸纯品,配制不同浓度甘胆酸校准品。使用相同缓冲液配制浓度为10mg/ml胆酸、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、甘氨酸牛磺胆酸样品。

[0116] 本申请的试剂使用甘胆酸校准品定标,测定上述样品3次,测定值与理论值的比值即为交叉反应率。结果如表3所示。

[0117] 表3. 特异性甘胆酸抗体测定各种胆酸

[0118]

化学名称	本申请试剂	对照试剂
甘胆酸	100%	100%
胆酸	4.6%	18.2%
脱氧胆酸	0.2%	0.1%
鹅脱氧胆酸	0.1%	0.1%
牛磺胆酸	1.4%	3.5%
甘氨酸胆酸	2.3%	5.1%
甘氨酸鹅脱氧胆酸	0.1%	0.2%
甘氨酸牛磺胆酸	1.7%	3.6%

[0119] 测试例3:甘胆酸均相免疫检测(克隆酶受体免疫检测法)的临床检测

[0120] 1. 反应原理:待检样本中的甘胆酸与试剂R1中的ED-甘胆酸偶联物竞争结合甘胆酸抗体;未与甘胆酸抗体结合的ED-甘胆酸偶联物能与R2试剂中的EA分子互补性形成全酶;而已被抗体结合的ED-甘胆酸偶联物由于空间位阻的原因不能与EA互补行程全酶;形成的 β 半乳糖苷酶全酶具有酶活性,能催化底物显色。

[0121] 2. 样本类型:待检样本为各种生理样本,如血清、血浆、尿液等,优选待检样本为血清。

[0122] 3. 检测结果:

[0123] 表4. 上机参数

日立7180参数	
项目名称	甘胆酸
Assay point	[2point END][10][18][34]
WAVE(SUB/MAIN)	[660][410]
S.VIL.	[3.0]
[0124] S.R1	[160]
S.R3	[40]
ABS.LIMIT:	[32000][Increase]
CALIB TYPE:	[Spline]
POINT:	[6] SPAN PONIT[6]
校准品	0.0、2.5、5.0、、10.0、、20.0、40.0 mg/L

[0125] 表5. 准确度、精密度、回收率 (图2)

[0126]

血清样品	1	2	3
样品浓度 (mg/L)	1.50	5.00	20.00
1	1.47	5.05	21.05
2	1.52	5.12	20.55
3	1.63	5.07	20.73
4	1.52	4.88	19.95
5	1.49	4.95	19.64
6	1.45	4.94	20.40
7	1.62	5.06	21.21
8	1.50	5.02	20.72
9	1.55	4.93	19.77
10	1.44	4.89	20.39
准确度 (前三次测定)	2.67%	1.60%	3.88%
均值	1.52	4.99	20.44
SD	0.065	0.083	0.524
CV	4.3%	1.7%	2.6%
回收率	101.3%	99.8%	102.2%

[0127] 表6. 线性

[0128]

稀释比例	测定 1	测定 2	测定 3	均值	理论值	相对偏差
0	0.01	0.08	0.05	0.03	-1.04	-
0.125	3.96	3.87	4	3.94	4.26	-7.38%
0.250	9.61	9.51	9.47	9.53	9.56	-0.28%
0.375	14.31	14.15	14.51	14.32	14.86	-3.58%
0.500	19.63	19.96	19.88	19.82	20.15	-1.64%
0.625	25.12	23.77	24.62	24.50	25.45	-3.73%
0.750	30.76	31.02	30.59	30.79	30.75	0.12%
0.875	37.11	36.17	36.54	36.61	36.05	1.54%
1	41.23	42.97	41.33	41.84	41.35	1.19%

[0129] 测试例4:相关性分析

[0130] 1. 试验方法:

[0131] 取新鲜血清样本80例,每例样本均分为两份,每份体积不少于500 μ I,使用本申请的试剂在日立7180仪器上测定其中一份样本两次,使用岛津HPLC测定另一份样本。两种方法测值使用散点图进行相关性分析。

[0132] 2. 试验结果:

[0133] 所得函数为 $y=1.0057x-0.0247$,相关系数 $R^2=0.9962$ 。

[0134] 结果表明本申请的试剂测定样本中甘胆酸浓度值,与HPLC法(可视为金标准)测定样本中甘胆酸浓度值具有良好相关性。

[0135] 表7. 本申请的试剂(CEDIA法)与HPLC法之间的相关性分析

[0136] (单位:mg/L) (图3)

[0137]

样本号	CEDIA	HPLC	样本号	CEDIA	HPLC
样本1	1.74	1.70	样本41	40.36	41.53
样本2	1.51	1.76	样本42	10.86	10.59
样本3	1.34	1.21	样本43	9.69	9.99
样本4	1.94	1.86	样本44	13.19	13.77
样本5	0.44	0.55	样本45	14.71	13.72
样本6	0.70	0.87	样本46	21.93	22.03
样本7	1.48	1.40	样本47	4.38	4.17
样本8	1.55	1.76	样本48	21.60	22.43
样本9	1.29	1.43	样本49	16.27	17.03
样本10	0.67	0.84	样本50	8.12	7.92
样本11	2.55	2.37	样本51	4.06	4.29
样本12	1.19	1.36	样本52	13.89	12.83
样本13	1.31	1.26	样本53	3.07	2.82

[0138]	样本14	0.70	0.78	样本54	22.20	24.13
	样本15	1.53	1.62	样本55	21.65	20.73
	样本16	1.44	1.55	样本56	21.12	22.35
	样本17	0.41	0.48	样本57	2.63	2.39
	样本18	0.59	0.74	样本58	10.39	10.17
	样本19	0.98	0.89	样本59	2.21	2.06
	样本20	1.04	0.95	样本60	13.07	13.71
	样本21	32.84	33.7	样本61	3.32	3.59
	样本22	14.24	15.47	样本62	10.50	11.29
	样本23	30.99	29.42	样本63	26.20	27.36
	样本24	9.20	8.79	样本64	2.49	2.68
	样本25	4.04	3.84	样本65	21.48	22.33
	样本26	4.11	4.30	样本66	2.16	2.35
	样本27	7.85	7.19	样本67	3.42	3.19
	样本28	2.55	2.37	样本68	2.20	2.11
	样本29	1.63	1.51	样本69	26.76	27.19
	样本30	25.68	26.99	样本70	33.45	34.66
	样本31	2.94	3.10	样本71	23.07	21.63
	样本32	21.07	19.37	样本72	22.35	21.9
	样本33	40.87	39.44	样本73	16.25	15.01
	样本34	29.81	30.49	样本74	22.50	23.82
	样本35	3.43	3.27	样本75	38.05	37.83
	样本36	17.21	16.13	样本76	20.41	20.42
	样本37	20.56	19.45	样本77	29.70	28.88
	样本38	5.61	5.58	样本78	7.91	8.11
	样本39	25.17	24.20	样本79	37.86	39.39
	样本40	5.71	5.91	样本80	12.65	13.28

[0139] 测试例5:热稳定性分析

[0140] 热稳定性测试结果显示于表8和表9中。

[0141] 表8. 37℃热加速破坏不同天数定标吸光度活性剩余量

[0142]

37℃热加速破坏天数	本申请试剂	对照试剂
0天	100%	100%
1天	91%	25%
4天	70%	15%
7天	55%	10%

[0143] 表9. 37℃热加速破坏7天后线性测定(图4)

稀释比例	本申请试剂			对照试剂		
	均值	理论值	相对偏差	均值	理论值	相对偏差
0	0.02	-0.42	-	1.51	-0.39	-
0.1	3.78	3.61	4.53%	2.92	3.24	-10.07%
0.2	7.17	7.64	-6.26%	5.93	6.88	-13.74%
0.3	10.92	11.68	-6.48%	10.26	10.51	-2.45%
0.4	15.66	15.71	-0.33%	13.88	14.15	-1.88%
0.5	20.70	19.74	4.86%	17.26	17.78	-2.95%
0.6	23.66	23.77	-0.49%	20.79	21.42	-2.96%
0.7	27.86	27.80	0.20%	25.10	25.06	0.18%
0.8	31.39	31.84	-1.40%	28.70	28.69	0.02%
0.9	35.86	35.87	-0.01%	32.24	32.33	-0.27%
1.0	40.14	39.90	0.60%	37.05	35.96	3.03%

[0144] 本申请首次将克隆酶供体免疫检测方法用于甘胆酸的检测。本申请采用经过基因工程改造的酶受体,本底活性极低,有效提高的检测的灵敏度。本申请是一种均相免疫检测方法,适用于多种全自动生化分析仪,操作简单,准确度高,特异性强。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 北京九强生物技术股份有限公司
- [0003] <120> 一种 β 半乳糖苷酶的酶供体偶联物及其在甘胆酸检测中的用途
- [0004] <130> 360243CG-360165
- [0005] <160> 2
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 3006
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <220>
- [0012] <223> β 半乳糖苷酶受体编码序列
- [0013] <400> 1
- [0014] accatgatta cggattcact ggccgtcgtt ttacaagcca gctggcgtaa tagcgaagag 60
- [0015] gcccgcaccg atcgccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgctttgcc 120
- [0016] tggtttccgg caccagaagc ggtgccgaa agctggetgg agtgcgatct tctgaggcc 180
- [0017] gatactgtcg tegtcccctc aaactggcag atgcacggtt acgatgcgcc catctacacc 240
- [0018] aacgtgacct atcccattac ggtcaatccg ccgtttgttc ccacggagaa tccgacgggt 300
- [0019] tgttactcgc tcacatttaa tgttgatgaa agctggctac aggaaggcca gacgcgaatt 360
- [0020] atttttgatg gcgttaactc ggcgtttcat ctgtgggtgca acgggcgctg ggtecggttac 420
- [0021] ggccaggaca gtctgttgc gtctgaattt gacctgagcg catttttacg cgccggagaa 480
- [0022] aaccgcctcg cggatgatgg gctgcgctgg agtgacggca gttatctgga agatcaggat 540
- [0023] atgtggcgga tgagcggcat ttccctgac gtctcgttgc tgcataaacc gactacacaa 600
- [0024] atcagcgatt tccatgttgc cactcgtttt aatgatgatt tcagccgcgc tgtactggag 660
- [0025] gctgaagttc agatgtcgg cgagttcgt gactacctac gggtaacagt ttctttatgg 720
- [0026] cagggtgaaa cgcagtcgc cagcggcacc gcgccttctg gcggtgaaat tatcgatgag 780
- [0027] cgtggtggtt atgccgatcg cgtcacacta cgtctgaacg tcgaaaacc gaaactgtgg 840
- [0028] agcgcgaaa tcccgaatct ctatcgtcgc gtggttgaac tgacaccgc cgacggcagc 900
- [0029] ctgattgaag cagaagcctg cgatgtcgg ttcgcgagg tgcggattga aaatggctctg 960
- [0030] ctgctgctga acggcaagcc gttgctgatt cgaggcgtta accgtcacga gcatcatcct 1020
- [0031] ctgcatggtc aggtcatgga tgagcagacg atggtgcagg atatcctgct gatgaagcag 1080
- [0032] aacaacttta acgccgtgcg ctgttcgcat tatccgaacc atccgctgtg gtacacgctg 1140
- [0033] tgcgaccgct acggcctgta tgtggtgat gaagccaata ttgaaacca cggcatggtg 1200
- [0034] ccaatgaatc gtctgaccga tgatccgcgc tggctaccgg cgatgagcga acgcgtaacg 1260
- [0035] cgaatggtgc agcgcgatcg taatcaccg agtgtgatca tctggtcgtc ggggaatgaa 1320
- [0036] tcaggccacg gcgctaatca cgacgcgctg tatcgtgga tcaaattctg cgatccttc 1380
- [0037] cgcccgttgc agtatgaag cgccggagcc gacaccacgg ccaccgatat tatttgeccg 1440
- [0038] atgtacgcgc gcgtgatga agaccagccc ttcccggctg tgccgaaatg gtccatcaaa 1500
- [0039] aaatggcttt cgctacctgg agagacgcgc ccgctgatcc tttgcgaata cgcccacgcg 1560
- [0040] atgggtaaca gtcttgccgg ttccgctaaa tactggcagg cgtttcgtca gtatccccgt 1620
- [0041] ttacagggcg gcttcgtctg ggactgggtg gatcagtcgc tgattaaata tgatgaaaac 1680

[0084]	Asn Pro Thr Gly Cys Tyr Ser Leu Thr Phe Asn Val Asp Glu Ser Trp
[0085]	100 105 110
[0086]	Leu Gln Glu Gly Gln Thr Arg Ile Ile Phe Asp Gly Val Asn Ser Ala
[0087]	115 120 125
[0088]	Phe His Leu Trp Cys Asn Gly Arg Trp Val Gly Tyr Gly Gln Asp Ser
[0089]	130 135 140
[0090]	Arg Leu Pro Ser Glu Phe Asp Leu Ser Ala Phe Leu Arg Ala Gly Glu
[0091]	145 150 155 160
[0092]	Asn Arg Leu Ala Val Met Val Leu Arg Trp Ser Asp Gly Ser Tyr Leu
[0093]	165 170 175
[0094]	Glu Asp Gln Asp Met Trp Arg Met Ser Gly Ile Phe Arg Asp Val Ser
[0095]	180 185 190
[0096]	Leu Leu His Lys Pro Thr Thr Gln Ile Ser Asp Phe His Val Ala Thr
[0097]	195 200 205
[0098]	Arg Phe Asn Asp Asp Phe Ser Arg Ala Val Leu Glu Ala Glu Val Gln
[0099]	210 215 220
[0100]	Met Cys Gly Glu Leu Arg Asp Tyr Leu Arg Val Thr Val Ser Leu Trp
[0101]	225 230 235 240
[0102]	Gln Gly Glu Thr Gln Val Ala Ser Gly Thr Ala Pro Phe Gly Gly Glu
[0103]	245 250 255
[0104]	Ile Ile Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Asp Arg Val Thr Leu Arg Leu
[0105]	260 265 270
[0106]	Asn Val Glu Asn Pro Lys Leu Trp Ser Ala Glu Ile Pro Asn Leu Tyr
[0107]	275 280 285
[0108]	Arg Ala Val Val Glu Leu His Thr Ala Asp Gly Thr Leu Ile Glu Ala
[0109]	290 295 300
[0110]	Glu Ala Cys Asp Val Gly Phe Arg Glu Val Arg Ile Glu Asn Gly Leu
[0111]	305 310 315 320
[0112]	Leu Leu Leu Asn Gly Lys Pro Leu Leu Ile Arg Gly Val Asn Arg His
[0113]	325 330 335
[0114]	Glu His His Pro Leu His Gly Gln Val Met Asp Glu Gln Thr Met Val
[0115]	340 345 350
[0116]	Gln Asp Ile Leu Leu Met Lys Gln Asn Asn Phe Asn Ala Val Arg Cys
[0117]	355 360 365
[0118]	Ser His Tyr Pro Asn His Pro Leu Trp Tyr Thr Leu Cys Asp Arg Tyr
[0119]	370 375 380
[0120]	Gly Leu Tyr Val Val Asp Glu Ala Asn Ile Glu Thr His Gly Met Val
[0121]	385 390 395 400
[0122]	Pro Met Asn Arg Leu Thr Asp Asp Pro Arg Trp Leu Pro Ala Met Ser
[0123]	405 410 415
[0124]	Glu Arg Val Thr Arg Met Val Gln Arg Asp Arg Asn His Pro Ser Val
[0125]	420 425 430

[0126]	Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Gly His Gly Ala Asn His Asp
[0127]	435 440 445
[0128]	Ala Leu Tyr Arg Trp Ile Lys Ser Val Asp Pro Ser Arg Pro Val Gln
[0129]	450 455 460
[0130]	Tyr Glu Gly Gly Gly Ala Asp Thr Thr Ala Thr Asp Ile Ile Cys Pro
[0131]	465 470 475 480
[0132]	Met Tyr Ala Arg Val Asp Glu Asp Gln Pro Phe Pro Ala Val Pro Lys
[0133]	485 490 495
[0134]	Trp Ser Ile Lys Lys Trp Leu Ser Leu Pro Gly Glu Thr Arg Pro Leu
[0135]	500 505 510
[0136]	Ile Leu Cys Glu Tyr Ala His Ala Met Gly Asn Ser Leu Gly Gly Phe
[0137]	515 520 525
[0138]	Ala Lys Tyr Trp Gln Ala Phe Arg Gln Tyr Pro Arg Leu Gln Gly Gly
[0139]	530 535 540
[0140]	Phe Val Trp Asp Trp Val Asp Gln Ser Leu Ile Lys Tyr Asp Glu Asn
[0141]	545 550 555 560
[0142]	Gly Asn Pro Trp Ser Ala Tyr Gly Gly Asp Phe Gly Asp Thr Pro Asn
[0143]	565 570 575
[0144]	Asp Arg Gln Phe Cys Met Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp Arg Thr Pro
[0145]	580 585 590
[0146]	His Pro Ala Leu Thr Glu Ala Lys His Gln Gln Gln Phe Phe Gln Phe
[0147]	595 600 605
[0148]	Arg Leu Ser Gly Gln Thr Ile Glu Val Thr Ser Glu Tyr Leu Phe Arg
[0149]	610 615 620
[0150]	His Ser Asp Asn Glu Leu Leu His Trp Met Val Ala Leu Asp Gly Lys
[0151]	625 630 635 640
[0152]	Pro Leu Ala Ser Gly Glu Val Pro Leu Asp Val Ala Pro Gln Gly Lys
[0153]	645 650 655
[0154]	Gln Leu Ile Glu Leu Pro Glu Leu Pro Gln Pro Glu Ser Ala Gly Gln
[0155]	660 665 670
[0156]	Leu Trp Leu Thr Val Arg Val Val Gln Pro Asn Ala Thr Ala Trp Ser
[0157]	675 680 685
[0158]	Glu Ala Gly His Ile Ser Ala Trp Gln Gln Trp Arg Leu Ala Glu Asn
[0159]	690 695 700
[0160]	Leu Ser Val Thr Leu Pro Ala Ala Ser His Ala Ile Pro His Leu Thr
[0161]	705 710 715 720
[0162]	Thr Ser Glu Met Asp Phe Cys Ile Glu Leu Gly Asn Lys Arg Trp Gln
[0163]	725 730 735
[0164]	Phe Asn Arg Gln Ser Gly Phe Leu Ser Gln Met Trp Ile Gly Asp Lys
[0165]	740 745 750
[0166]	Lys Gln Leu Leu Thr Pro Leu Arg Asp Gln Phe Thr Arg Ala Pro Leu
[0167]	755 760 765

[0168]	Asp Asn Asp Ile Gly Val Ser Glu Ala Thr Arg Ile Asp Pro Asn Ala
[0169]	770 775 780
[0170]	Trp Val Glu Arg Trp Lys Ala Ala Gly His Tyr Gln Ala Glu Ala Ala
[0171]	785 790 795 800
[0172]	Leu Leu Gln Cys Thr Ala Asp Thr Leu Ala Asp Ala Val Leu Ile Thr
[0173]	805 810 815
[0174]	Thr Ala His Ala Trp Gln His Gln Gly Lys Thr Leu Phe Ile Ser Arg
[0175]	820 825 830
[0176]	Lys Thr Tyr Arg Ile Asp Gly Ser Gly Gln Met Ala Ile Thr Val Asp
[0177]	835 840 845
[0178]	Val Glu Val Ala Ser Asp Thr Pro His Pro Ala Arg Ile Gly Leu Asn
[0179]	850 855 860
[0180]	Cys Gln Leu Ala Gln Val Ala Glu Arg Val Asn Trp Leu Gly Leu Gly
[0181]	865 870 875 880
[0182]	Pro Gln Glu Asn Tyr Pro Asp Arg Leu Thr Ala Ala Cys Phe Asp Arg
[0183]	885 890 895
[0184]	Trp Asp Leu Pro Leu Ser Asp Met Tyr Thr Pro Tyr Val Phe Pro Ser
[0185]	900 905 910
[0186]	Glu Asn Gly Leu Arg Cys Gly Thr Arg Glu Leu Asn Tyr Gly Pro His
[0187]	915 920 925
[0188]	Gln Trp Arg Gly Asp Phe Gln Phe Asn Ile Ser Arg Tyr Ser Gln Gln
[0189]	930 935 940
[0190]	Gln Leu Met Glu Thr Ser His Arg His Leu Leu His Ala Glu Glu Gly
[0191]	945 950 955 960
[0192]	Thr Trp Leu Asn Ile Asp Gly Phe His Met Gly Ile Gly Gly Asp Asp
[0193]	965 970 975
[0194]	Ser Trp Ser Pro Ser Val Ser Ala Glu Phe Gln Leu Ser Ala Gly Arg
[0195]	980 985 990
[0196]	Tyr His Tyr Gln Leu Val Trp Cys Gln Lys
[0197]	995 1000

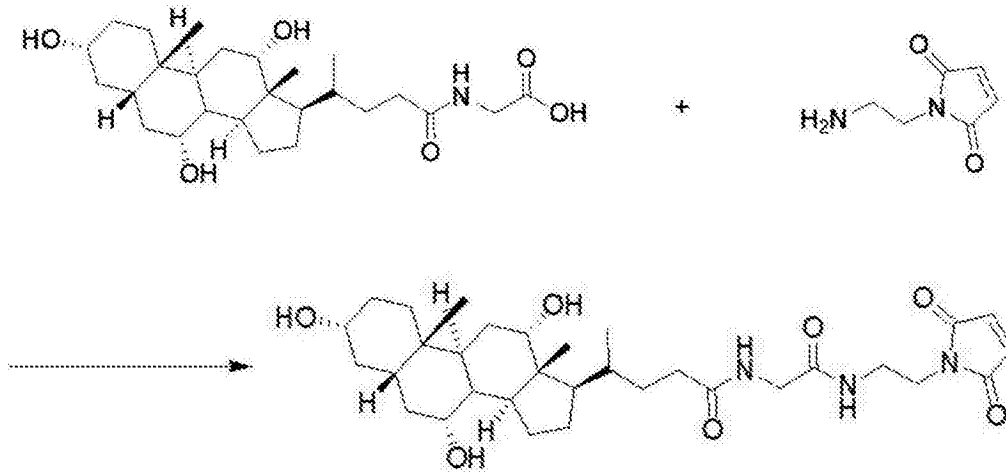


图1

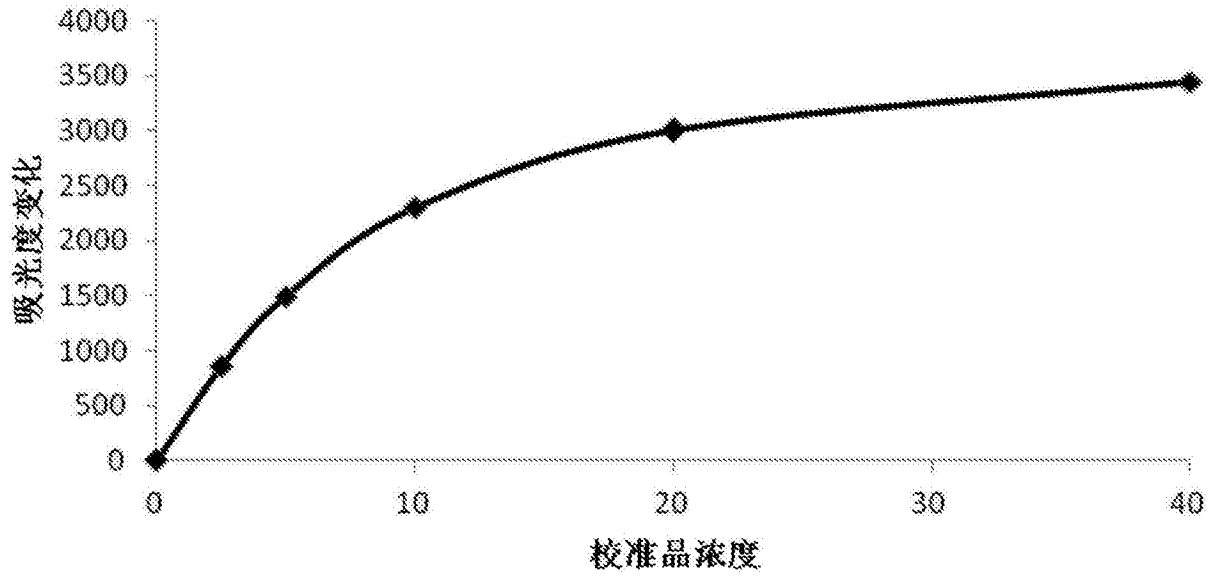


图2

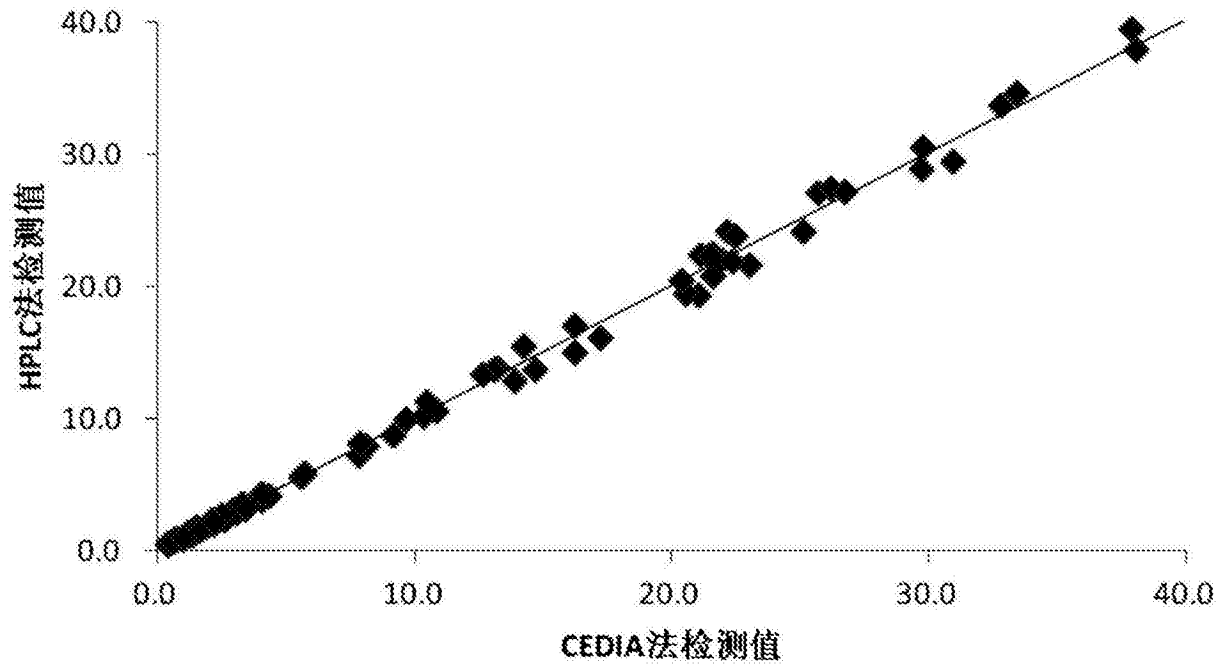


图3

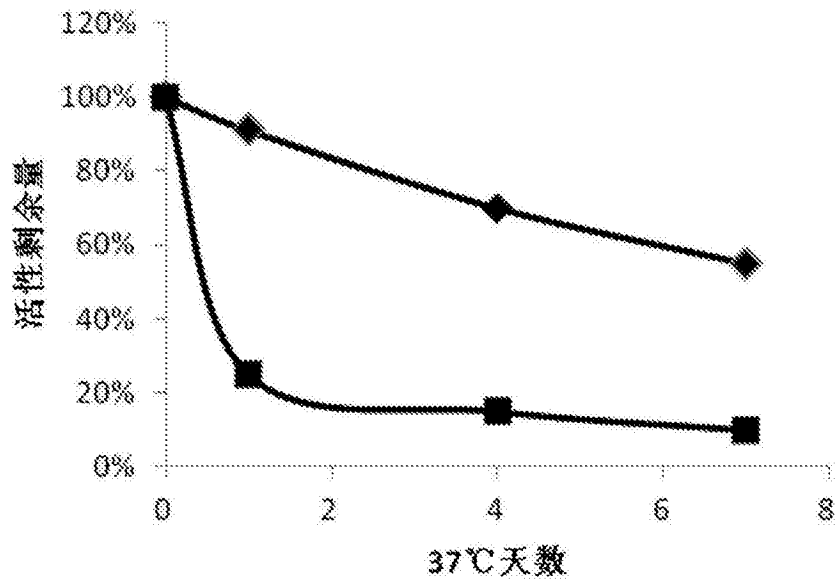
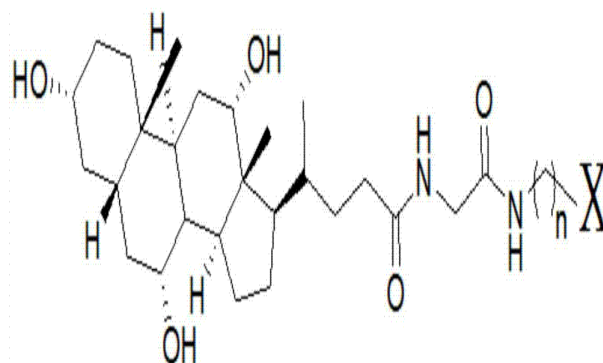


图4

专利名称(译)	一种β半乳糖苷酶的酶供体偶联物及其在甘胆酸检测中的用途		
公开(公告)号	CN106565809B	公开(公告)日	2018-05-01
申请号	CN201610946486.7	申请日	2016-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京九强生物技术股份有限公司		
[标]发明人	封建新 龚俊 张启飞 高秋峰 王贵利 刘希		
发明人	封建新 龚俊 张启飞 高秋峰 王贵利 刘希		
IPC分类号	C07J41/00 C07J43/00 C12N9/38 G01N33/53 G01N21/78		
CPC分类号	C07J41/0055 C07J43/003 C12N9/2471 C12Y302/01023 G01N21/78 G01N33/53		
代理人(译)	程伟 程云		
审查员(译)	张建宏		
优先权	201610536792.3 2016-07-08 CN		
其他公开文献	CN106565809A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请涉及一种β半乳糖苷酶的酶供体偶联物及其在甘胆酸检测中的用途。具体而言，本申请提供了一种肝胆酸检测试剂盒，其包含第一试剂，第二试剂以及任选的甘胆酸校准品或质控品。第一试剂包含β半乳糖苷酶的酶受体和甘胆酸的特异性抗体，第二试剂包含甘胆酸衍生物与酶供体偶联物。在本申请中，甘胆酸衍生物被定向偶联到酶供体的特定氨基酸残基上。当酶受体与酶供体结合时才能发挥酶活性，且此种结合受样本中甘胆酸含量的控制。与放射免疫检测方法相比，本申请提供的检测试剂灵敏度高、特异性强、检测结果准确并且不涉及同位素污染的问题。



(I)