



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109975559 A

(43)申请公布日 2019.07.05

(21)申请号 201910357266.4

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2019.04.29

(71)申请人 厦门稀土材料研究所

地址 361021 福建省厦门市集美区兑山西  
珩路258号

(72)发明人 张云 张肖 宋良

(74)专利代理机构 杭州千克知识产权代理有限公司 33246

代理人 冷红梅

(51)Int.Cl.

G01N 33/82(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

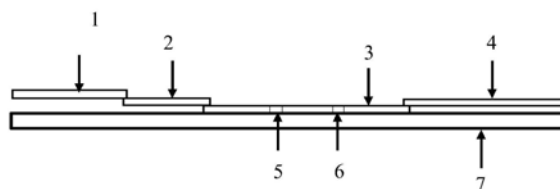
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

### (54)发明名称

一种时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D  
的试剂盒及方法

### (57)摘要

本发明涉及一种利用时间分辨荧光免疫层析技术的灵敏性,利用稀土钷酸盐纳米荧光标记材料,结合干式免疫荧光分析仪实现高灵敏度、可准确定量、简便快捷的25羟基维生素D时间分辨荧光免疫层析试剂盒及检测方法。本发明试剂盒能够准确定量检测人血清、血浆和全血样本中25羟基维生素D的含量,通过滤血膜样品垫的处理可过滤全血样本,利用时间分辨检测技术,可避免样本本身荧光干扰,荧光微球为稀土钷酸盐纳米材料具有背景低,荧光信号强,信噪比高等优势,标记通过共价键将稀土钷酸盐纳米颗粒与抗体连接,标记产物稳定,具有检测范围宽(3~100ng/mL)、灵敏度高(检出限3ng/mL)、准确度高、检测快速简便等特点。



1. 一种时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D的试剂盒,包括时间分辨荧光试纸卡、样本解离液和含有定标曲线的ID卡,其特征在于:

所述时间分辨荧光试纸卡包括检测试纸条,所述检测试纸条由底衬以及粘贴在底衬上的滤血膜样品垫、玻璃纤维结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成,所述滤血膜样品垫、玻璃纤维结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸顺次搭接粘贴在底衬上;

所述滤血膜样品垫处喷涂有样品垫处理液;

所述结合垫设置有微球线,喷涂有时间分辨荧光微球标记的25羟基维生素D单克隆抗体,所述时间分辨荧光微球为稀土钒酸盐纳米颗粒,粒径为 $150 \pm 50\text{nm}$ ,其组成为 $\text{LnVO}_4:\text{xEu}$ ,其中, $\text{LnVO}_4$ 为基质,Ln为镧、铈、钇、钆、铽中的一种或多种;冒号“:”表示为铕掺杂;x为Eu的摩尔百分数,范围是 $5\% \sim 50\%$ ;25羟基维生素D单克隆抗体的含量为 $50 \sim 200\mu\text{g}$ 抗体/ $200\mu\text{l}$ 荧光微球;

所述硝酸纤维素膜上依次设置有检测线和质控线,检测线和质控线相互平行,间隔距离为 $3 \sim 5\text{mm}$ ,其中检测线靠近加样孔,质控线远离加样孔;

所述检测线包被有25羟基维生素D重组抗原,质控线包被有羊抗鼠IgG抗体;25羟基维生素D重组抗原包被浓度为 $0.1 \sim 2\text{mg/ml}$ 、用量为 $0.5 \sim 1.5\mu\text{l}$ 包被液量/cm膜,羊抗鼠IgG抗体包被浓度为 $0.5 \sim 2\text{mg/ml}$ 、用量为 $0.5 \sim 1.5\mu\text{l}$ 包被液量/cm膜;

所述样本解离液为含 $20\text{mM}$ 乙酸钠, $1\%$ 氯化胆碱, $1\%$ Tween-20的 $50\text{mM}$ 、 $\text{pH}8.0$  Tris-HCl缓冲液。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述检测试纸条由如下方法制备:

(1) 稀土钒酸盐纳米荧光微球的制备方法

在 $50\text{mL}$ 圆底烧瓶中,按摩尔比例,加入2份蒸馏水, $(1-x)$ 份Ln的硝酸盐或醋酸盐或氯化物, $x$ 份Eu的硝酸盐或醋酸盐或氯化物, $x$ 为摩尔百分数,范围是 $5\% \sim 50\%$ ,1份原钒酸, $(1 \sim 5)$ 份柠檬酸或柠檬酸钠,用氢氧化钠调节 $\text{pH}$ 值 $6 \sim 8$ ,通入氮气, $85^\circ\text{C}$ 反应24小时, $10000\text{rpm}$ 离心,用蒸馏水洗涤3次,干燥得到分散性好的水溶性 $\text{LnVO}_4:\text{x Eu}$ 纳米荧光探针;

(2) 时间分辨荧光微球的活化

超声波处理荧光微球2min后,取 $200\mu\text{l}$ 荧光微球以 $14000\text{rpm}$ 高速离心 $5 \sim 15\text{min}$ 后,沉淀物用 $10 \sim 100\text{mM}$ , $\text{pH}$ 为 $5.0 \sim 7.0$ 的MES溶液洗涤至 $1\text{ml}$ ,超声波处理2min;加入 $10 \sim 100\mu\text{l}$ 的 $20 \sim 100\text{mg/ml}$ 碳二亚胺,混匀 $5 \sim 10\text{min}$ ,再加入 $50 \sim 200\mu\text{l}$ 的 $20 \sim 100\text{mg/ml}$  N-羟基琥珀酰亚胺,混匀 $10 \sim 20\text{min}$ 后 $14000\text{rpm}$ 高速离心 $5 \sim 15\text{min}$ ,沉淀用 $\text{pH}$ 为 $5.0 \sim 7.0$ 的MES溶液洗涤至 $1\text{ml}$ ;

(3) 时间分辨荧光微球标记25羟基维生素D单克隆抗体的制备

在上述活化后的荧光微球超声波处理2min后按照 $50 \sim 200\mu\text{g}/200\mu\text{l}$ 加入25羟基维生素D单克隆抗体,混匀 $1 \sim 3$ 小时,用含 $0.5\%$ BSA的 $10 \sim 50\text{mM}$ 、 $\text{pH}7.5 \sim 8.5$  Tris-HCl封闭液封闭 $0.5 \sim 1$ 小时后 $14000\text{rpm}$ 高速离心 $5 \sim 15\text{min}$ ,用含 $1\%$ NaCl、 $0.5\%$ BSA、 $0.1\%$ Tween-20的 $10 \sim 50\text{mM}$ 、 $\text{pH}7.5 \sim 8.5$  Tris-HCl保存液洗涤并重悬至 $200\mu\text{l}$ 于 $4^\circ\text{C}$ 避光保存;

(4) 样品垫的制备

用样品垫处理液在滤血膜上平行均匀喷涂两条线,用量为 $2 \sim 4\mu\text{l}$ 液量/cm样品垫,所述样品垫处理液为含 $0.5\%$ NaCl、 $0.5\%$ Tween-20、 $0.1\%$ BSA的 $20\text{mM}$ 、 $\text{pH}8.0$ 的Tris-HCl;

(5) 结合垫的制备

在结合垫上将时间分辨荧光微球标记的25羟基维生素D单克隆抗体用微球解离液稀释8~30倍均匀喷涂一条线,用量为2~4 $\mu$ l液量/cm样品垫。置于烘箱中,37℃烘干过夜;所述样品垫处理液为含0.5%NaCl、0.5%Tween-20、0.1%BSA的20mM、pH8.0的Tris-HCl;所述微球稀释液为含0.5%BSA、30%蔗糖的20mM Tris-Hcl缓冲液;

(6) 包被膜的制备

分别用包被缓冲液将25羟基维生素D重组抗原和羊抗鼠IgG抗体调整浓度到0.5~2mg/ml,用量为0.5~1.5 $\mu$ l包被液量/cm膜,分别作为检测线和质控线平行划于硝酸纤维素膜上进行包被,质控线和检测线间隔3~7mm,置于烘箱中,45℃烘干过夜;

(7) 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸得到试纸板,切割得到所述试纸条。

3. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述时间分辨荧光试纸卡由检测试纸条固定在塑料底卡上,试纸表面用卡面压紧,且卡面在对应样品垫和硝酸纤维素膜的部分分别预留加样孔和观察窗。

4. 如权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于,所述含有标准曲线的ID卡,是通过时间分辨荧光试纸条测定不同浓度的校准品,以校准品浓度为横坐标,以荧光信号比值作为纵坐标,绘制成标准曲线,写入并生成相应二维码信息存储在ID卡中获得。

5. 利用权利要求1所述试剂盒的定量检测25羟基维生素D的方法,所述方法包括:

- (1) 将检测试剂盒和样品置于室温下,待恢复至室温后使用;
- (2) 开启干式荧光免疫分析仪,预热5min后插入对应ID卡;
- (3) 精确吸取20 $\mu$ L待测血液加入样本解离液中,混匀;
- (4) 吸取混合后样本80 $\mu$ L,加入到检测卡加样孔中;
- (5) 将检测卡插入检测槽,10min后检测并读取和打印检测结果。

## 一种时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D的试剂盒及方法

### (一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D的试剂盒及检测方法。

### (二) 背景技术

[0002] 维生素D是一种脂溶性类固醇前体,主要由皮肤经光照后产生,维生素D的两种重要形式包括维生素D<sub>3</sub>(胆钙化醇)和维生素D<sub>2</sub>(麦角钙化醇),在人体中,维生素结合蛋白与维生素D<sub>3</sub>和维生素D<sub>2</sub>相结合,并将它们转运到肝脏中,两者经羟基化生成25-羟基维生素D。25-羟基维生素D是一种代谢产物,可在血中检出,而血清检测出来的大部分25-羟基维生素D为25-羟基维生素D<sub>3</sub>,因此通过检测25-OH VD可以确定维生素D的情况。维生素D能够促进肠道对钙的吸收以及调节钙平衡,是维持骨骼健康的主要元素。儿童期维生素D的严重缺乏将导致骨骼畸形,即佝偻病。25-羟基维生素D浓度降低与骨密度下降有关。结合其它临床资料,检测结果有助于评估骨代谢情况。25-羟基维生素D检测的临床应用主要与佝偻病(儿童),骨软化症,绝经后骨质疏松和肾性骨病的诊断、治疗和监测有关。另外,维生素的缺乏与糖尿病、不同种类的癌症、心血管疾病、自身免疫性疾病和先天性免疫性疾病有关。

[0003] 现有技术中测定25-羟基维生素D的检测方法包括放射免疫分析、液相色谱串联质谱(LC-MS-MS)、酶联免疫法、电化学发光法和免疫荧光法等。放射免疫分析因有放射污染且操作复杂,已经逐渐被其他方法替代;液相色谱串联质谱法作为25-羟基维生素D测定的金标准,对操作技术要求较高,非自动化,检测效率低,只有少数的医疗或检验机构使用;酶联免疫法在医疗或检验机构使用较多,但是其多为手工操作,步骤复杂,检测耗时长,不利于快速得到检测报告;电化学发光法灵敏度高,检测结果准确,但是需要特定的仪器且试剂盒的价格较为昂贵,给患者造成较大的经济负担。免疫荧光法是将25羟基维生素D抗体共价结合于荧光微球表面活性基团上,通过激发后检测线是否产生荧光来判断结果,快速便捷可准确定量同时具有高灵敏度、标记物稳定等优点,在医学免疫检测领域广泛应用。

[0004] 然而在生物流体和血清中的许多复合物和蛋白本身就可以发荧光,因此使用传统的荧光素等发色团进行荧光检测时灵敏度就会严重下降,但大部分背景荧光信号是短时存在的,可利用稀土纳米材料(镧系元素螯合物)作为标记物来标记抗体或抗原。稀土纳米材料是一种广泛使用的生物标记物,与传统标记物相比,稀土掺杂纳米材料具有稳定的物理化学性质,窄带发射,长寿命等优点,从而排除激发光干扰,可通过时间分辨消除本底荧光干扰,在生物标记过程中不容易受环境影响。钆酸盐在深紫外的吸收截面较大,是优良的荧光标记材料,稀土离子掺杂的钆酸盐发光材料由于稀土离子具有丰富的能级,可以在不同能级之间跃迁,大大提高稀土钆酸盐纳米材料的光学性能。因此采用稀土钆酸盐纳米荧光微球作为标记物,利用时间分辨荧光免疫技术,同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨,可有效地排除非特异荧光的干扰,极大地提高了分析灵敏度。

[0005] 另外血液中大部分25-OH VD与维生素结合蛋白VDBP结合,因此需要样本解离液把25-OH VD从VDBP上解离后测定,现有的解离方法大多解离不充分影响测定结果。因此开发一种具有检测范围宽、灵敏度高、从血液中将25-OH VD稳定解离、测定准确度高、检测快速

简便且适合基层医疗机构使用的时间分辨试剂盒有重要意义。

### (三) 发明内容

[0006] 本发明目的是针对现有技术的不足和缺陷提供一种利用时间分辨荧光免疫层析技术的灵敏性,结合干式免疫荧光分析仪实现高灵敏度、可准确定量、简便快捷的时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D的试剂盒及检测方法。

[0007] 本发明采用的技术方案是:

[0008] 一种时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D的试剂盒,包括时间分辨荧光试纸卡、样本解离液和含有定标曲线的ID卡;

[0009] 所述时间分辨荧光试纸卡包括检测试纸条,所述试纸条由底衬以及粘贴在底衬上的滤血膜样品垫、玻璃纤维结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成,所述样品垫、结合垫硝酸纤维素膜和吸水纸顺次搭接粘贴在底衬上;

[0010] 所述滤血膜样品垫处喷涂有样品垫处理液;

[0011] 所述玻璃纤维结合垫设置有微球线,喷涂有时间分辨荧光微球标记的25羟基维生素D单克隆抗体(含量为50~200 $\mu$ g抗体/200 $\mu$ l荧光微球),所述时间分辨荧光微球为稀土钆酸盐颗粒(组成为LnVO<sub>4</sub>:xEu),LnVO<sub>4</sub>为基质,Ln为镧、铈、钇、钆、铽中的一种或多种,优选为GdVO<sub>4</sub>,掺杂离子为铕(Eu<sup>3+</sup>),冒号“:”表示为铕掺杂;x为其摩尔百分数,范围是5%~50%,优选为30%,粒径为150 $\pm$ 50nm;所述时间分辨荧光微球在基态下稳定,在250~350nm的激发光源作用下发射出波长范围在600~620nm的荧光;

[0012] 所述硝酸纤维素膜上依次设置有检测线和质控线,检测线和质控线相互平行,间隔距离为3~5mm,其中检测线靠近加样孔,质控线远离加样孔,所述检测线包被有25羟基维生素D重组抗原,质控线包被有羊抗鼠IgG抗体。检测线中25羟基维生素D重组抗原包被浓度为0.1~2mg/ml、用量为0.5~1.5 $\mu$ l包被液量/cm膜,质控线中羊抗鼠IgG抗体包被浓度为0.5~2mg/ml、用量为0.5~1.5 $\mu$ l包被液量/cm膜。

[0013] 所述样本解离液为含20mM乙酸钠,1%氯化胆碱,1%Tween-20的50mM、pH8.0Tris-HCl缓冲液。

[0014] 所述检测试纸条由如下方法制备:

[0015] (1) 稀土钆酸盐纳米荧光微球的制备方法

[0016] 在50mL圆底烧瓶中,按摩尔比例,加入2份蒸馏水,(1-x)份Ln的硝酸盐或醋酸盐或氯化物,x份Eu的硝酸盐或醋酸盐或氯化物,x为摩尔百分数,范围是5%~50%,1份原钆酸,(1~5份)柠檬酸或柠檬酸钠,用氢氧化钠调节pH值6~8,通入氮气,85℃反应24小时,10000rpm离心,用蒸馏水洗涤3次,干燥得到分散性好的水溶性LnVO<sub>4</sub>:xEu纳米荧光探针。LnVO<sub>4</sub>为基质优选为GdVO<sub>4</sub>,掺杂离子为铕(Eu<sup>3+</sup>),其摩尔百分数优选为30%。所述的GdVO<sub>4</sub>:30%Eu材料结构为纯四方相结构,尺寸约为250nm且形貌均一,发光性能好。

[0017] (2) 时间分辨荧光微球的活化

[0018] 超声波处理荧光微球2min后,取200 $\mu$ l荧光微球以14000rpm高速离心5~15min后,沉淀物用10~100mM,pH为5.0~7.0的MES溶液洗涤至1ml,超声波处理2min;加入10~100 $\mu$ l的20~100mg/ml碳二亚胺,混匀5~10min,再加入50~200 $\mu$ l的20~100mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺,混匀10~20min后14000rpm高速离心5~15min,沉淀用pH为5.0~7.0的MES溶

液洗涤至1ml;

[0019] (3) 时间分辨荧光微球标记25羟基维生素D单克隆抗体的制备

[0020] 在上述活化后的荧光微球超声波处理2min后按照50~200 $\mu$ g/200 $\mu$ l加入25羟基维生素D单克隆抗体,混匀1~3小时,用含0.5%BSA的10~50mM、pH 7.5~8.5Tris-HCl封闭液封闭0.5~1小时后14000rpm高速离心5~15min,用含1%NaCl、0.5%BSA、0.1%Tween-20的10~50mM、pH7.5~8.5Tris-HCl保存液洗涤并重悬至200 $\mu$ l于4℃避光保存。

[0021] (4) 样品垫的制备

[0022] 用样品垫处理液(含0.5%NaCl、0.5%Tween-20、0.1%BSA的20mM、pH8.0的Tris-HCl)在滤血膜上平行均匀喷涂两条线,用量为2~4 $\mu$ l液量/cm样品垫,置于烘箱中,37℃烘干过夜。

[0023] (5) 结合垫的制备

[0024] 在结合垫上将时间分辨荧光微球标记的25羟基维生素D单克隆抗体用微球稀释液(含0.5%BSA、30%蔗糖的20mM Tris-HCl缓冲液)稀释8~30倍均匀喷涂一条线,用量为2~4 $\mu$ l液量/cm样品垫。置于烘箱中,37℃烘干过夜。

[0025] (6) 包被膜的制备

[0026] 分别用包被缓冲液(含2.5%海藻糖的10mM PBS缓冲液)将25羟基维生素D重组抗原和羊抗鼠IgG抗体调整浓度到0.1~2mg/ml,用量为0.5~1.5 $\mu$ l包被液量/cm膜,分别作为检测线和质控线平行划于硝酸纤维素膜上进行包被,质控线和检测线间隔3~7mm,置于烘箱中,45℃烘干过夜。

[0027] (7) 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸得到试纸板,切割得到所述试纸条。

[0028] 所述时间分辨荧光试纸卡由检测试纸条固定在塑料底卡上,试纸表面用卡面压紧,且卡面在对应样品垫和硝酸纤维素膜的部分分别预留加样孔和观察窗。

[0029] 所述样本解离液以180 $\mu$ l/管分装于离心管中,用于解离和层析样品。

[0030] 所述含有标准曲线的ID卡,是通过时间分辨荧光试纸条测定不同浓度的校准品,以校准品浓度为横坐标,以荧光信号比值作为纵坐标,绘制成标准曲线,写入并生成相应二维码信息存储在ID卡中获得。通过干式荧光免疫分析仪可读取试剂卡上对应的二维码信息并测得相应浓度。

[0031] 本发明还涉及利用所述试剂盒定量检测25羟基维生素D的方法,所述方法包括:

[0032] (1) 将检测试剂盒和样品置于室温下,待恢复至室温后使用;

[0033] (2) 开启干式荧光免疫分析仪,预热5min后插入对应ID卡;

[0034] (3) 精确吸取20 $\mu$ L待测血液加入样本解离液中,混匀;

[0035] (4) 吸取混合后样本80 $\mu$ L,加入到检测卡加样孔中;

[0036] (5) 将检测卡插入检测槽,10min后检测并读取和打印检测结果。检测范围3~100ng/mL。

[0037] 本发明所述时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D的试剂盒的检测原理是竞争法,检测人血液中25羟基维生素D的含量。含25羟基维生素D的血液样滴加在样本加样区,滤血膜可过滤全血中红细胞和样品中颗粒杂质并阻断样品中非特异性结合蛋白,过滤后通过毛细作用层析至结合垫,与时间分辨荧光微球标记的25羟基维生素D单克隆抗体结合,形成

微球抗体-抗原复合物,层析至硝酸纤维素膜上检测区,因检测线固定的25羟基维生素D重组抗原和样本中25羟基维生素D与微球标记的25羟基维生素D单克隆抗体竞争结合,因此样本中25羟基维生素D越多,检测线处结合的微球抗体越少,而多余的荧光微球标记物继续向前层析,与固定在质控线羊抗鼠结合。用紫外光源(285nm)对检测区扫描检测,检测线和质控线上时间分辨荧光微球发出荧光(618nm),其衰变时间也较长。利用延缓测量时间,待样品基质中自然发生的短寿命荧光(1~10ns)全部衰变后,再测量稀土元素的特异性荧光,这样就可以完全排除特异本底荧光的干扰。通过检测线和质控线荧光强度的强弱及其比值,即可分析出样品中待测物的浓度。

[0038] 本发明的有益效果主要体现在:本发明试剂盒能够准确定量检测人血清、血浆和全血中微量25羟基维生素D的含量,解离液从血液中将25-OHVD稳定解离,利用时间分辨荧光微球检测技术,可避免样本本身荧光干扰,荧光微球为稀土钷酸盐纳米材料具有背景低,荧光信号强,信噪比高等优势,标记通过共价键将微球与抗体连接,标记产物稳定,具有检测范围宽(3~100ng/mL)、灵敏度高(检出限3ng/mL)、准确度高、检测快速简便等特点。

#### (四)附图说明

[0039] 图1为本发明的时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D的试剂盒中检测试纸条的结构示意图;

[0040] 其中:1、样品垫;2、结合垫;3、包被膜;4、吸水纸;5、检测线;6、质控线;7、底衬。

[0041] 图2为本发明的25羟基维生素D时间分辨检测试剂盒中检测卡的结构示意图;

[0042] 其中:8、二维码;9、加样孔;10、观察窗。

[0043] 图3为本发明实施例1所制备的试剂盒标准曲线。

[0044] 图4为本发明实施例1所制备的试剂盒与罗氏电化学发光法检测25羟基维生素D试剂盒检测结果相关性比较。

#### (五)具体实施方式

[0045] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0046] 实施例1:时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D试剂盒的制备

[0047] 时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D试剂盒,采用竞争法免疫层析原理,检测人血液中微量25羟基维生素D。由时间分辨荧光试纸卡、样本解离液和含有定标曲线的ID卡组成。

[0048] 如图1所示,在该实施例中,底衬7上顺次搭接样品垫1、结合垫2、包被膜3以及吸水纸4,样品垫1是加样区,用于吸取待测血液检测样本,结合垫2设有微球线,包被膜3上设有检测线和质控线。

[0049] 样品垫1上微球线上使用特定的激发光(285nm)/发射光(618nm)波长的稀土钷酸盐纳米颗粒( $GdVO_4:30\%Eu$ ) (直径约150nm)标记25羟基维生素D单克隆抗体(100 $\mu$ g抗体/200 $\mu$ l荧光微球),检测线包被25羟基维生素D重组抗原(0.5mg/ml),质控线包被浓度为0.5mg/ml的羊抗鼠IgG抗体(其中25羟基维生素D单克隆抗体和重组抗原采购自菲鹏生物股份有限公司,羊抗鼠IgG抗体来自长沙博优生物科技有限公司)。微球线用量为4 $\mu$ l包被液

量/cm样品垫、检测线和质控线用量为1 $\mu$ l包被液量/cm膜。

[0050] 在该实施例中,时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D的试剂盒的制备包括以下步骤:

[0051] 1. 稀土钒酸盐纳米荧光微球的制备方法

[0052] 在50ml圆底烧瓶中,加入水20ml,0.35mmol Gd(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>,0.15mmolEu(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>,2mmol柠檬酸钠,0.5mmol原钒酸钠,通入氮气,85℃反应24小时,10000rpm离心,用蒸馏水洗涤3次,干燥得到分散性好的水溶性GdVO<sub>4</sub>:30%Eu纳米荧光探针,所述的GdVO<sub>4</sub>:30%Eu材料结构为纯四方相结构,尺寸约为250nm且形貌均一,发光性能好。该稀土钒酸盐的化学式为GdVO<sub>4</sub>:30%Eu,冒号“:”表示为Eu<sup>3+</sup>掺杂。其中,GdVO<sub>4</sub>为基质,Eu<sup>3+</sup>为激活离子;冒号“:”表示为Eu<sup>3+</sup>掺杂;其摩尔百分数为30%。

[0053] 2. 时间分辨荧光微球的活化

[0054] 超声波处理荧光微球2min后,取200 $\mu$ l荧光微球以14000rpm高速离心15min后,沉淀物用100mM,pH为6.0的MES溶液洗涤至1ml,超声波处理2min;加入50 $\mu$ l的100mg/ml碳二亚胺,混匀5min,再加入100 $\mu$ l的100mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺,混匀15min后14000rpm高速离心15min,沉淀用pH为6.0的MES溶液洗涤至1ml。

[0055] 3. 时间分辨荧光微球标记25羟基维生素D单克隆抗体的制备

[0056] 在上述活化后的荧光微球超声波处理2min后按照100 $\mu$ g/200 $\mu$ l加入25羟基维生素D单克隆抗体,混匀2小时,用含0.5%BSA的50mM、pH8.0Tris-HCl封闭液封闭1小时后14000rpm高速离心15min,用含1%(w/w)NaCl、0.5%(w/w)BSA、0.1%(w/w)Tween-20的50mM、pH8.0的Tris-HCl保存液中缓冲液洗涤两次并超声处理重悬至200 $\mu$ l于4℃避光保存。

[0057] 4. 样品垫的制备

[0058] 用样品垫处理液(含0.5%NaCl、0.5%Tween-20、0.1%BSA的20mM、pH8.0的Tris-HCl)在滤血膜上平行均匀喷涂两条线,用量为4 $\mu$ l液量/cm样品垫,置于烘箱中,37℃烘干过夜。

[0059] 5. 结合垫的制备

[0060] 在结合垫上将时间分辨荧光微球标记的25羟基维生素D单克隆抗体用微球稀释液(含0.5%(w/w)BSA、30%(w/w)蔗糖的20mM Tris-Hcl缓冲液)稀释20倍均匀喷涂一条线,用量为4 $\mu$ l液量/cm样品垫。置于烘箱中,37℃烘干过夜。

[0061] 6. 包被膜的制备

[0062] 分别用包被缓冲液(含2.5%(w/w)海藻糖的10mM PBS缓冲液)将25羟基维生素D重组抗原和羊抗鼠IgG抗体调整浓度到0.5mg/ml,用量为1 $\mu$ l包被液量/cm膜,分别作为检测线和质控线平行划于硝酸纤维素膜上进行包被,质控线和检测线间隔4mm,在湿度<30%,温度37℃烘箱中晾干10小时,封袋,备用;

[0063] 7. 在底衬(尺寸为80\*300mm)上顺次相互搭接地粘贴样品垫(尺寸为17\*300mm,滤血膜材质)、结合垫(16\*4mm,玻璃纤维材质)、包被膜(尺寸为25\*300mm,硝酸纤维素材质)和吸水纸(尺寸为27\*300mm)得到试纸板,按照要求切割成4mm宽度的试纸条。

[0064] 本发明检测25羟基维生素D的时间分辨荧光试纸卡包括检测试纸条,在使用时,试纸条组装在由塑料上壳和塑料下壳扣合而成的塑料外壳中,塑料上壳设有两个开孔,加样孔9和观察窗10,加样孔9对应于所述的检测25羟基维生素D的试纸条样品垫1,塑料下壳上

设置有固定检测试纸条的卡口,结果观察窗10对应于所述检测25羟基维生素D的试纸条的检测线5和质控线6,该检测25羟基维生素D的试纸条可以从该塑料外壳中取出。

[0065] 本发明试剂盒中,还包括样本解离液,为含20mM乙酸钠,1% (w/w) 氯化胆碱,1% (w/w) Tween-20的50mM、pH8.0Tris-Hcl缓冲液,以180 $\mu$ l/管分装于离心管中。样本解离液用于层析样品。

[0066] 本发明试剂盒中,每盒均含有标准曲线的ID卡(同批次标准曲线相同),通过时间分辨荧光试纸条测定不同浓度的校准品,以校准品浓度为横坐标,以荧光信号比值作为纵坐标,绘制成标准曲线,写入ID卡并生成二维码,通过干式荧光免疫分析仪可读取试剂卡上对应的二维码信息并测得相应浓度。

[0067] 实施例2:时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D试剂盒的定量检测

[0068] 1. 标准曲线的绘制

[0069] 按实施例1制备好的时间分辨荧光试纸卡加入不同浓度25羟基维生素D抗原质控品(100ng/mL、70ng/mL、50ng/mL、30ng/mL、20ng/mL、10ng/mL、3ng/mL共七个浓度,每个浓度设三个重复,均由3.7mg/ml 25羟基维生素D重组抗原用1%BSA+20mM pH7.4PBS稀释得到),加入样本解离液,层析10min后,通过广州蓝勃生物科技有限公司生产的AFS-1000型干式荧光免疫分析仪读取C、T线荧光信号及C/T值,实验结果及分析见表1:

[0070]

| 微量 25 羟基维生素 D 质控品<br>(ng/mL) |   | 100    | 70     | 50    | 30     | 20     | 10     | 3      |
|------------------------------|---|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 样本信号                         | 1 | 0.0517 | 0.0654 | 0.147 | 0.2262 | 0.4058 | 0.8334 | 2.6075 |

[0071]

|       |   |        |        |        |        |        |        |        |
|-------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| T/C 值 | 2 | 0.0427 | 0.0759 | 0.1409 | 0.2094 | 0.4516 | 0.8684 | 2.4119 |
|       | 3 | 0.0514 | 0.0724 | 0.1444 | 0.2278 | 0.4628 | 0.8647 | 2.2261 |
| Mean  |   | 0.097  | 0.0486 | 0.0712 | 0.1441 | 0.2211 | 0.4401 | 0.8555 |
| SD    |   | 0.015  | 0.0051 | 0.0053 | 0.0031 | 0.0102 | 0.0302 | 0.0192 |

[0072] 以25羟基维生素D质控品浓度取LOG值和样本信号T/C平均值取LOG值绘制标准曲线,曲线数据见表1,标准曲线如图2所示。其中R值为0.9919,通过该标线对样品中所含微量25羟基维生素D浓度进行浓度定量测定。

[0073] 2. 时间分辨荧光试纸卡性能测试。

[0074] 最低检出限:用零值样本进行重复测定20次,计算20次结果的均值M与标准差SD,以空白均值加两倍标准差报告方法的检测限(M+2SD),结果为2.80ng/mL,符合灵敏度3ng/mL。

[0075] 线性范围:取3~100ng/mL之间八个浓度值,每个浓度重复测量三次,将测定浓度平均值于理论浓度进行线性分析,得到线性方程 $y=1.0085x-0.6493$ , $r=0.9977$ ,表明本发明试剂盒在3~100ng/mL线性范围内相关性很好。

[0076] 精密度:取三批实施例1中所制时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D试剂盒,分别检测70、30ng/mL重复性质控品,每批试剂盒用重复性质控品平行检测10次,70ng/mL浓度三批批内CV分别为9.60%、8.98%、8.89%,三批批间CV为9.25%,30ng/mL浓度三批批内CV分别为8.13%、10.59%、7.82%,三批批间CV为9.24%,均在10%以内。

[0077] 准确度:选择浓度为20ng/mL的质控物为检测样本,分为体积相同3份,在其中2份样本中分别加入100ng/mL和70ng/mL的准确度质控品,制成2个不同加入浓度的回收样本,计算加入的待测物的浓度。在另一份样本中加入同样量的无被测物的溶液,制成基础样本。对样本进行3次重复分析,取其均值进行计算。计算回收率=(分析样品浓度-基础样品浓度)/加入浓度 $\times 100\%$ 。回收样本100ng/mL的回收率为98.78%,70ng/mL的回收率为111.00%,平均回收率为104.89%。偏差在10%以内。

### [0078] 3. 临床样本检测

[0079] 采集医院检测25羟基维生素D的血液样本200份,用本发明的试剂盒和罗氏电化学发光法检测25羟基维生素D试剂盒两种方法进行检测比较。本发明试剂盒中,取血液20 $\mu$ l加入样本解离液,混匀后取80 $\mu$ l加入到检测卡加样孔中,层析10min后通过广州蓝勃生物科技有限公司生产的AFS-1000型干式荧光免疫分析仪读取浓度,同一血液采用对比系统罗氏电化学发光法检测25羟基维生素D试剂盒进行浓度检测。两种方法检测结果进行线性分析,如图3、图4所示,其相关性很好 $r=0.9862$ , $P>0.05$ ,平均相对偏差小于10%,结果符合临床分析要求,适合用于临床检测。

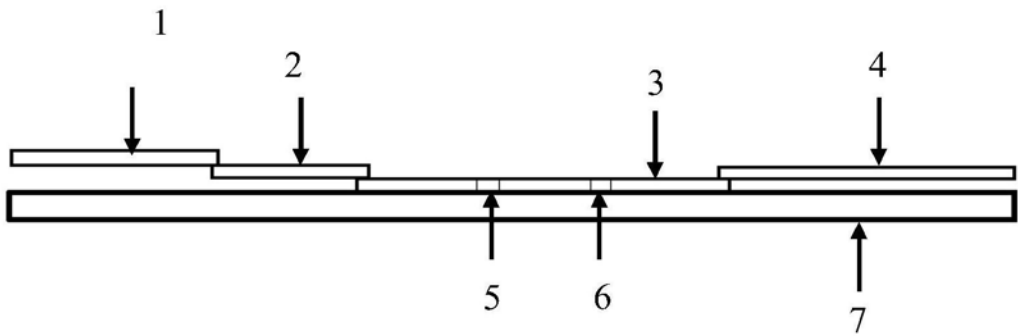


图1

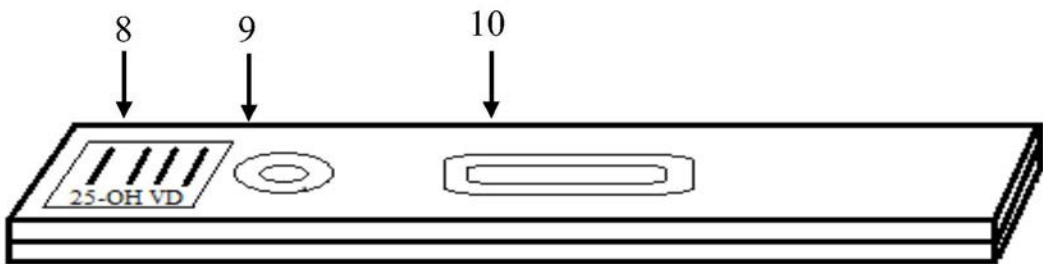


图2

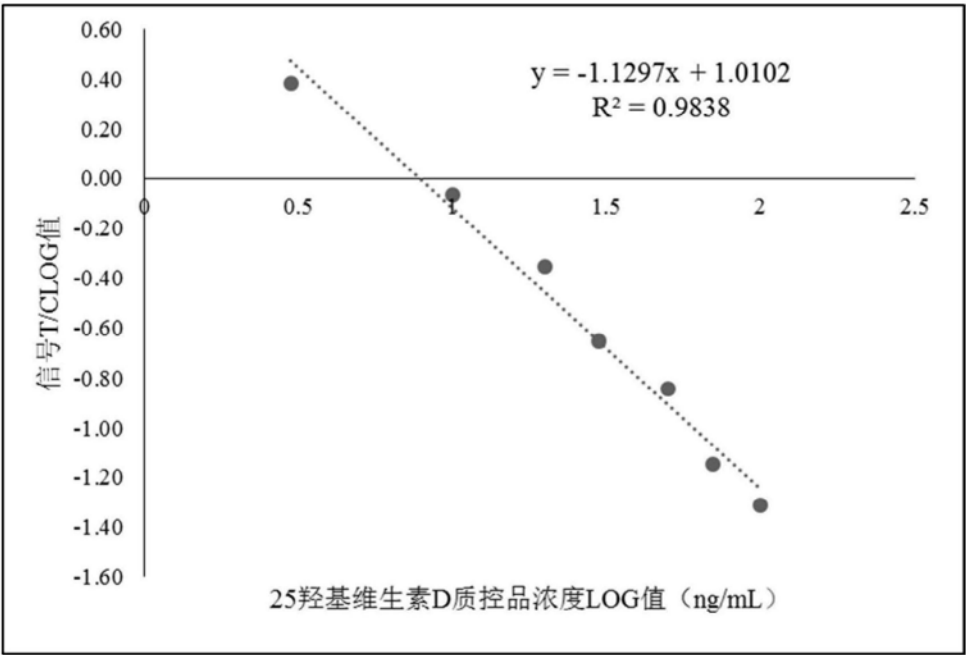


图3

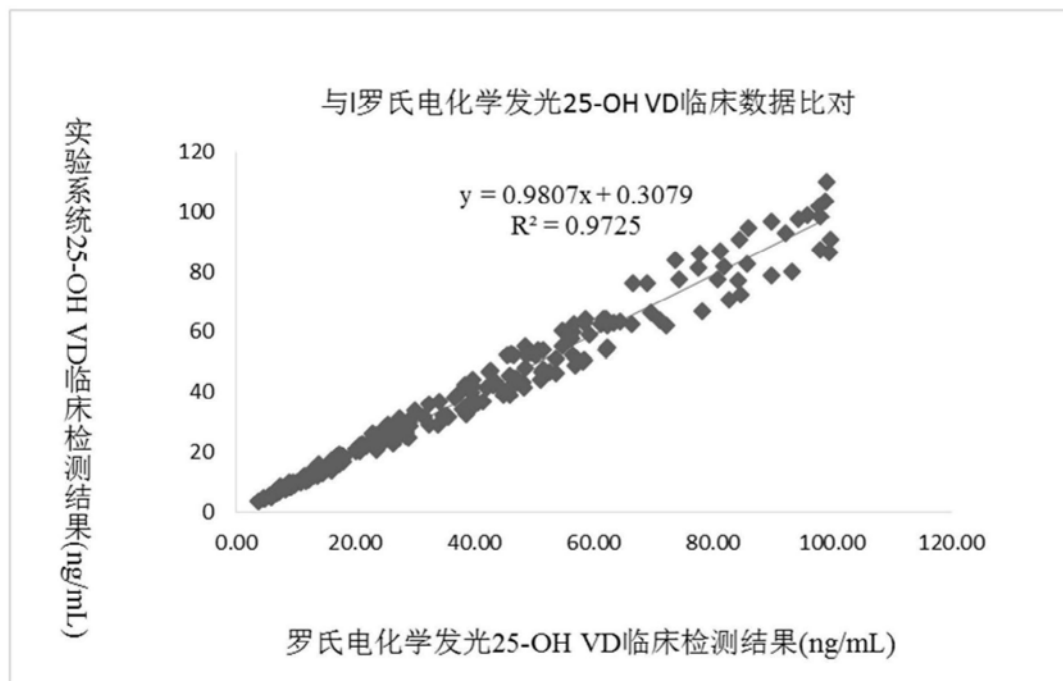


图4

|                |                                                                   |         |            |
|----------------|-------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种时间分辨荧光定量检测25羟基维生素D的试剂盒及方法                                       |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN109975559A</a>                                      | 公开(公告)日 | 2019-07-05 |
| 申请号            | CN201910357266.4                                                  | 申请日     | 2019-04-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 厦门稀土材料研究所                                                         |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 厦门稀土材料研究所                                                         |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 厦门稀土材料研究所                                                         |         |            |
| [标]发明人         | 张云<br>张肖<br>宋良                                                    |         |            |
| 发明人            | 张云<br>张肖<br>宋良                                                    |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/82 G01N33/58 G01N33/577 G01N33/533 G01N33/558 G01N21/64    |         |            |
| CPC分类号         | G01N21/6408 G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/582 G01N33/82 |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                    |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种利用时间分辨荧光免疫层析技术的灵敏性，利用稀土钒酸盐纳米荧光标记材料，结合干式免疫荧光分析仪实现高灵敏度、可准确定量、简便快捷的25羟基维生素D时间分辨荧光免疫层析试剂盒及检测方法。本发明试剂盒能够准确定量检测人血清、血浆和全血样本中25羟基维生素D的含量，通过滤血膜样品垫的处理可过滤全血样本，利用时间分辨检测技术，可避免样本本身荧光干扰，荧光微球为稀土钒酸盐纳米材料具有背景低，荧光信号强，信噪比高等优势，标记通过共价键将稀土钒酸盐纳米颗粒与抗体连接，标记产物稳定，具有检测范围宽(3~100ng/mL)、灵敏度高(检出限3ng/mL)、准确度高、检测快速简便等特点。

