



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110488008 A

(43)申请公布日 2019.11.22

(21)申请号 201910918407.5

(22)申请日 2019.09.26

(71)申请人 北京华科泰生物技术股份有限公司  
地址 101111 北京市通州区科创东五街2号  
14幢4层F4E

(72)发明人 林斯 杨国平 付琼

(74)专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司 11228

代理人 李岩

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

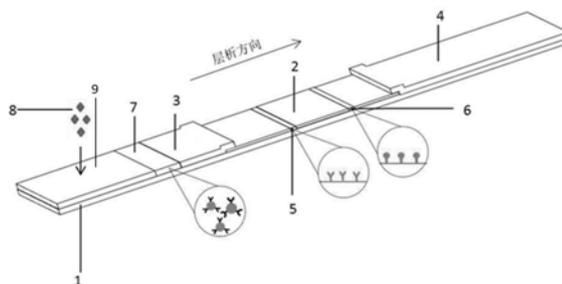
权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒及其制备方法和应用,该试剂盒包括25羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡和释放剂,所述25羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡包括试纸条,所述试纸条包括检测线及质控线,所述检测线上包被有25-羟基维生素D<sub>3</sub>完全抗原,所述质控线上包被有羊抗兔多克隆抗体。本发明所提供的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒灵敏度高、稳定性强、线性范围宽,具有优异的准确性和精密度。



1. 一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒,其特征在于,包括25羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡和释放剂,所述25羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡包括试纸条,所述试纸条包括检测线及质控线,所述检测线上包被有25-羟基维生素D<sub>3</sub>完全抗原,所述质控线上包被有羊抗兔多克隆抗体;1L的所述释放剂包括以下含量的各组分:154mg~771mg的二硫苏糖醇、0.1g~2g的十二烷基硫酸钠、2.92g~14.61g的乙二胺四乙酸、11.76g~29.41g的柠檬酸钠、12.9g~25.81g的柠檬酸三钠、10g~50g的乙醇,余量为蒸馏水。

2. 如权利要求1所述的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒,其特征在于,所述试纸条还包括PVC板,所述PVC板上固定有依次连接的样品垫、标记物垫、包被垫及吸水垫,所述包被垫上依次设有检测线及质控线,所述样品垫和标记物垫连接为一体。

3. 如权利要求2所述的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒,其特征在于,所述包被垫靠近检测线的一端连接有标记物垫,靠近质控线的一端连接有吸水垫。

4. 如权利要求3所述的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒,其特征在于,所述标记物垫上包被有羊抗25-羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的乳胶荧光微球和兔IgG标记的乳胶荧光微球,所述羊抗25-羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的荧光乳胶微球和兔IgG标记的荧光乳胶微球的摩尔比为1:0.2~4。

5. 如权利要求1-4任一项所述的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒,其特征在于,所述25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测卡还包括用于卡设试纸条的卡壳。

6. 如权利要求5所述的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒,其特征在于,所述卡壳包括:

底槽,其连接于所述PVC板;

上盖,其连接于所述底槽,所述上盖上设置有用于向所述样品垫上加样的加样孔;

观察窗,其设置于上盖上并用于检测线和质控线的数据采集。

7. 一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 包被垫的制备:将25-羟基维生素D<sub>3</sub>完全抗原和羊抗兔多克隆抗体分别包被到硝酸纤维素膜上,干燥备用;

2) 标记物垫的制备:将羊抗25-羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的乳胶荧光微球和兔IgG标记的乳胶荧光微球混合后,喷涂在玻璃纤维素膜上,干燥备用;

3) 组装试纸条:在PVC板上粘接包被垫,并在靠近该包被垫上的质控线的一端搭接吸水垫,在靠近该包被垫上的检测线的一端搭接标记物垫及其连接的样品垫;然后将其切成所需宽度的试纸条,之后将该试剂条安装入卡壳。

8. 一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将所采取的血液样本与释放剂按照1~10:10的体积比进行稀释;

2) 取30~100μL步骤1)中稀释后的血液样本滴加到所述25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测卡的加样孔中,室温静置5~20min进行免疫层析反应,然后将25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测卡插入到荧光免疫分析仪进行检测,即时可获得检测结果。

9. 如权利要求8所述的使用方法,其特征在于,所述血液样本选自末梢血。

10. 如权利要求9所述的使用方法,其特征在于,所述末梢血选自指尖血或耳垂血。

## 一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断领域,涉及一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 维生素D为类固醇衍生物,属于脂溶性维生素,有调节钙磷代谢、影响细胞增殖分化等作用,是维持人体健康必不可少的一种类固醇激素。人体内的维生素D主要通过阳光照射后合成,只有少部分从食物中摄入,维生素D在体内出现的主要形式是25-羟基维生素D。25-羟基维生素D包括5种化合物,其中与健康密切相关的是25羟基维生素D<sub>2</sub>(胶钙化醇)和25-羟基维生素D<sub>3</sub>(胆钙化醇)。维生素D的主要作用是调节磷、钙代谢,促进磷和钙在肠道内的吸收,以及肾小管重吸收磷钙的方式,来提高血液中的磷钙水平,钙化的方法,与降钙素、甲状腺激素以及其他的激素共同作用,使骨质变得坚硬。除了具有传统意义上的骨骼效应,还能够影响肿瘤、糖尿病、心血管疾病、自身免疫疾病等非骨骼效应。

[0003] 目前,临床上25-OH-D<sub>3</sub>的检测常用方法有化学发光、胶体金免疫层析、酶联免疫法、电化学发光,这些检测方法大部分都需要对采集的全血样本进行处理,耗时较长,操作繁琐,所采用的血液样本需求量大且均为静脉血。然而对于婴幼儿、儿童、大面积烧伤等患者而言,采足需求量的血样较为困难且不易反复抽取静脉。相比之下,末梢血的采集操作简便、快捷,采血量较少,不需要专业人员操作,对人体造成的创伤较小,并且临床上的一些检测指标与静脉血没有差异,是较好的血液样本的来源。

[0004] 目前临床上,25-羟基维生素D<sub>3</sub>的检测几乎很少采用末梢血进行检测。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的主要目的在于提供用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒及其制备方法和应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供了如下技术方案:

[0007] 一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒,包括25羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡和释放剂,所述25羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡包括试纸条,所述试纸条包括检测线及质控线,所述检测线上包被有25-羟基维生素D<sub>3</sub>完全抗原,所述质控线上包被有羊抗兔多克隆抗体;所述1L的释放剂包括以下含量的各组分:154mg~771mg的二硫苏糖醇、0.1g~2g的十二烷基硫酸钠、2.92g~14.61g的乙二胺四乙酸、11.76g~29.41g的柠檬酸钠、12.9g~25.81g的柠檬酸三钠、10g~50g的乙醇,余量为蒸馏水。

[0008] 在本发明的一个具体方案中,其中所述试纸条还包括PVC板,所述PVC板上固定有依次连接的样品垫、标记物垫、包被垫及吸水垫,所述包被垫上依次设有检测线及质控线,所述样品垫和标记物垫连接为一体。

[0009] 在本发明的一个具体方案中,其中所述包被垫靠近检测线的一端连接有标记物

垫,靠近质控线的一端连接有吸水垫。

[0010] 在本发明的一个具体方案中,其中所述标记物垫上包被有羊抗25-羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的乳胶荧光微球和兔IgG标记的乳胶荧光微球,所述羊抗25-羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的荧光乳胶微球和兔IgG标记的荧光乳胶微球的摩尔比为1:0.2~4。

[0011] 在本发明的一个具体方案中,其中所述25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测卡还包括用于卡设试纸条的卡壳。

[0012] 在本发明的一个具体方案中,其中所述卡壳包括:

[0013] 底槽,其连接于所述PVC板;

[0014] 上盖,其连接于所述底槽,所述上盖上设置有用于向所述样品垫上加样的加样孔;

[0015] 观察窗,其设置于上盖上并用于检测线和质控线的数据采集。

[0016] 一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0017] 1) 包被垫的制备:将25-羟基维生素D<sub>3</sub>完全抗原和羊抗兔多克隆抗体分别包被到硝酸纤维素膜上,干燥备用;

[0018] 2) 标记物垫的制备:将羊抗25-羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的乳胶荧光微球和兔IgG标记的乳胶荧光微球混合后,喷涂在玻璃纤维素膜上,干燥备用;

[0019] 3) 组装试纸条:在PVC板上粘接包被垫,并在靠近该包被垫上的质控线的一端搭接吸水垫,在靠近该包被垫上的检测线的一端搭接标记物垫及其连接的样品垫;然后将其切成所需宽度的试纸条,之后将该试剂条放入卡壳。

[0020] 一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0021] 1) 将所采取的血液样本与释放剂按照1~10:10的体积比进行稀释;

[0022] 2) 取30~100 $\mu$ L步骤1)中稀释后的血液样本滴加到所述25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测卡的加样孔(对应试纸条的样品垫)中,室温静置5~20min,然后将25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测卡插入到荧光免疫分析仪进行检测,即时可获得检测结果。

[0023] 在本发明的一个具体方案中,其中所述血液样本选自末梢血。

[0024] 在本发明的一个具体方案中,其中所述末梢血选自指尖血或耳垂血。

[0025] 本发明的有益效果:

[0026] 1、本发明所提供的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒,可用于静脉血(血清、血浆、全血)、末梢血的检测以及用于维生素D<sub>3</sub>缺乏相关疾病的诊断,特别是能够进行末梢血的检测,样本用量小,检测在5~20min之内即可完成,线性检测范围为4ng/mL~100ng/mL,极大地提高了检测效率,能够有效解决婴幼儿、儿童、大面积烧伤患者采血难得问题。

[0027] 2、本发明所提供的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒,其灵敏度高、稳定性强、线性范围宽,具有优异的准确性和精密度。

[0028] 3、血液样本采用本发明中的释放剂稀释后,无需长时间等待,即可进行样本检测,操作简单,样本处理时间短,降低了时间成本,适用于临床快速诊断检测。

[0029] 4、本发明所提供的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试纸条,其样品垫和标记物垫连接为一体,制备简单,减少了繁琐的程序,降低试剂盒的生产成本。

## 附图说明

[0030] 图1为本发明所提供的25-羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡中试纸条示意图;

[0031] 图2A为本发明所提供的25-羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡中一种上盖的内部结构示意图；

[0032] 图2B为本发明所提供的25-羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡中一种底槽的内部结构示意图；

[0033] 图3为本发明25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒检测过程示意图；

[0034] 图4为实施例1中25羟基维生素D<sub>3</sub>的标准曲线示意图；

[0035] 图5为实施3中本发明25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测指尖末梢血与西门子25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测静脉血(血清)的检测结果的相关性图。

[0036] 图6为实施6中本发明25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测指尖末梢血与西门子25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测静脉血(血清)的检测结果的相关性图；

[0037] 其中,1-PVC板,2-包被垫,3-标记物垫,4-吸水垫,5-检测线,6-质控线,7-标记物结合处,8-样本,9-样品垫,11-上盖,12-底槽,13-加样孔,14-检测窗,15-试纸条放置区域,16-固定柱,17-定位孔,18-第一限定部,19-第二限定部,20-第三限定部,21-血液样本,22-释放剂,23-稀释后的血液样本,24-25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测卡,25-荧光免疫层析仪。

### 具体实施方式

[0038] 为了进一步理解本发明,下面结合实施例对本发明优选实施方案进行描述,但是应当理解,这些描述只是为进一步说明本发明的特征和优点,而不是对本发明权利要求的限制。

[0039] 以下材料或试剂,除非特别说明,均为市售。

[0040] 实施例1:25-羟基维生素D<sub>3</sub>(25-OH-D<sub>3</sub>)试剂盒的制备

[0041] 1.1 25-羟基维生素D<sub>3</sub>(25-OH-D<sub>3</sub>)免疫层析检测卡的制备

[0042] 1) 羊抗25-羟基维生素D<sub>3</sub>(25-OH-D<sub>3</sub>)单克隆抗体标记乳胶荧光微球

[0043] 取1mL乳胶荧光微球(购自Merck Millipore公司)加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)室温搅拌3h,然后加入0.1mg羊抗25-羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体,室温下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照11000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,取1mL 0.2M的磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)加入到离心后得到的固体沉淀物中,再加入1μL的Proclin300,在40Hz的超声波振荡器上振荡1min混合均匀,然后在4℃下保存待用。

[0044] 2) 兔IgG多克隆抗体标记乳胶荧光微球

[0045] 取1mL乳胶荧光微球(购自Merck Millipore公司)加入1mg碳化二亚胺(EDC),1mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)室温搅拌3h,然后加入0.1mg羊兔IgG多克隆抗体,室温下搅拌1h,再加入10mg BSA封闭液,继续搅拌1h。在2~8℃下,按照11000r/min的转速离心30min,除去上清液。最后,取1mL 0.2M的磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)加入到离心后得到的固体沉淀物中,再加入1μL的Proclin300,在40Hz的超声波振荡器上振荡1min混合均匀,然后在4℃下保存待用。

[0046] 3) 包被垫的制备

[0047] 将25-羟基维生素D<sub>3</sub>完全抗原和羊抗兔多克隆抗体分别用0.01mol/L的磷酸盐缓冲溶液(pH=7.4)稀释成1mg/mL,然后用划膜喷金仪在硝酸纤维素膜上进行划膜。含有25-

羟基维生素D<sub>3</sub>完全抗原的线作为检测线5,含有羊抗兔多克隆抗体的线作为质控线6,然后在37℃,湿度<30%的环境下干燥4h制成包被垫2。

[0048] 4) 标记物垫的制备

[0049] ①将玻璃纤维素膜在0.2M的磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中浸泡6h,然后在35℃下干燥8h,备用。

[0050] ②将摩尔比为1:1的羊抗25羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的乳胶荧光微球和兔IgG标记的乳胶荧光微球混合均匀后,按照10μL/cm的速度喷涂在玻璃纤维素膜上,然后放置在45℃下干燥2h制成标记物垫3。所述标记物垫3上包被有羊抗25羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的乳胶荧光微球和兔IgG标记的乳胶荧光微球的位置称为标记物结合处7。

[0051] 设置标记物结合处7的目的在于:释放剂稀释后的血液样本8滴加到样品垫9上,在吸水垫4的作用下,血液样本向前层析,在标记物结合处7血液样本中的25羟基维生素D<sub>3</sub>与标记物结合处包被的羊抗25羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的乳胶荧光微球反应,反应后的物质、未参加反应的羊抗25羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的乳胶荧光微球、兔IgG标记的乳胶荧光微球微随着血液样本继续层析,在检测线处未反应的羊抗25羟基维生素D<sub>3</sub>单克隆抗体标记的乳胶荧光微球与检测线包被的25-羟基维生素D<sub>3</sub>完全抗原反应而停留在检测线,在质控线处兔IgG标记的乳胶荧光微球与质控线包被的羊抗兔多克隆抗体反应而停留在质控线,其他物质继续层析,最后通过荧光免疫层析仪分别采集检测线的荧光微球的信号(记作T)和质控线的荧光微球的信号(记作C),计算T/C值,从25-羟基维生素D<sub>3</sub>的标准曲线中读取血液样本中25-羟基维生素D<sub>3</sub>的浓度。

[0052] 5) 免疫层析检测卡的组装

[0053] 首先在PVC板1上粘接包被垫2,然后在靠近包被垫2上的质控线6的一端搭接吸水垫4,在靠近包被垫上的检测线5的一端搭接标记物垫3及其连接的样品垫9,用切条机将其切成4mm±0.1mm的试纸条,之后将该试纸条安装到卡壳中,以制备成25-羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡;所述卡壳选自现有技术,例如,所述卡壳(如图2A、图2B所示)可以包括:底槽12,其连接于所述PVC板1;上盖11,其连接于所述底槽12,所述上盖11上设置有用于向所述样品垫9上加样的加样孔13;观察窗14,其设置于上盖11上,用于检测线5和质控线6的数据采集。

[0054] 如图2B所示,所述底槽12包括:位于其内表面的对称分布的多个定位孔17,多个所述定位孔17之间设有多个用于限定试纸条横向移动的第一限定部18以及用于限定试纸条纵向移动的第二限定部19;对称设置的所述第一限定部18与所述第二限定部19围设成纸条放置区域15(虚线区域),用于放置试纸条;

[0055] 如图2A所示,所述上盖11包括:与多个所述定位孔17相配合的多个定位柱16,这样配合使用以将上盖11和底槽12固定在一起;所述上盖11还包括用于限定试纸条的上下移动的第三限定部20。

[0056] 所述包被垫2的上方设有用于数据采集的观察窗14,以露出全部所述检测线5和质控线6,用于收集其检测结果;且所述观察窗14开设于所述上盖11上与试纸条放置区域15的中部相对应的位置。所述上盖11在与所述样品垫9相对应的位置处开设有加样孔,以用于样品垫9上滴加样本8。所述检测线距离加样孔15-25mm。

[0057] 1.2. 释放剂的制备

[0058] 将308mg的二硫苏糖醇 (DTT)、1g的十二烷基硫酸钠 (SDS)、5.84g的乙二胺四乙酸 (EDTA)、17.65g的柠檬酸钠、15.48g的柠檬酸三钠和20g乙醇加入到烧杯中,边加水边搅拌至全部溶解,然后用水定量至1000mL,得到释放剂,备用。

[0059] 实施例2实施例1的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒的检测

[0060] 2.1检测过程(见图3)

[0061] 1) 将所采取的血液样本21如指尖血与释放剂22按照3:10的体积比进行稀释;

[0062] 2) 取60 $\mu$ L步骤1)中稀释后的血液样本23滴加到所述25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测卡24的加样孔(对应试纸条的样品垫9)中,室温静置15min进行免疫层析反应,然后将25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测卡24插入到荧光免疫分析仪25中进行检测,即时可获得检测结果。

[0063] 2.2.标准曲线的建立

[0064] 配制不同浓度的25-羟基维生素D<sub>3</sub>标准品(0、4、10、20、40、100ng/mL),用本发明实施例1制备的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒按照2.1中的检测过程依次进行检测,空白检测限不高于4ng/mL,检测范围为4~100ng/mL,检测结果如表1所示,采用Logistic四参数进行曲线拟合,拟合度 $R^2=0.9997$ ,标准曲线如图4所示,T/C值与校准品在浓度为4~100ng/mL的范围内具有良好的相关性。

[0065] 表1检测数据

[0066]

标准浓度ng/mL	0	4	10	20	40	100
T/C值	3.5161	2.5998	1.9085	1.2408	0.7354	0.2156

[0067] 实施例3比对实验

[0068] 采用实施例1和2中制备的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒与西门子的25-羟基维生素D<sub>3</sub>检测试剂盒进行比对实验。通过采集20位病人指尖末梢血和静脉血(血清、血浆、全血)进行检测,以确定本发明申请中制备的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒是否适用于指尖末梢血中25-羟基维生素D<sub>3</sub>的检测,其中指尖血重复检测2次。检测结果如下表2所示。

[0069] 表2检测数据

[0070]

试剂盒	本发明制备的 25-OH-D <sub>3</sub> 试剂盒(ng/mL)					西门子试剂盒 (ng/mL)
	指尖血		全血	血浆	血清	血清
样本类型	检测 1	检测 2				
样本与释放剂的稀释比例	3:10	3:10	3:10	1:6	1:6	/
样本 1	5.89	6.01	5.95	5.97	5.75	6.35
样本 2	4.98	5.01	4.56	4.12	4.55	4.75
样本 3	25.43	24.67	26.48	26.39	26.39	25.61
样本 4	23.15	23.46	25.35	24.49	23.47	24.59
样本 5	24.67	24.39	23.46	25.98	24.96	25.36
样本 6	31.96	32.76	32.96	33.03	32.16	33.62
样本 7	43.64	42.69	42.82	43.93	43.01	45.29
样本 8	17.05	16.98	16.35	18.67	17.65	16.35
样本 9	24.51	23.64	23.86	26.78	25.14	24.63
样本 10	37.46	36.97	37.64	36.98	35.96	34.85
样本 11	58.21	57.38	57.94	56.23	56.71	55.69
样本 12	46.38	46.96	47.28	48.23	48.47	47.16
样本 13	42.36	41.48	39.76	40.78	40.95	40.13
样本 14	35.94	35.78	36.93	35.96	36.21	34.56
样本 15	36.94	37.68	35.21	36.97	35.59	33.16
样本 16	29.48	28.76	32.38	30.26	30.24	29.65
样本 17	27.15	26.49	28.43	29.46	28.95	27.46
样本 18	27.98	28.46	29.46	26.49	27.83	29.35
样本 19	75.94	75.68	74.34	74.46	73.41	74.86
样本 20	63.58	63.49	63.46	62.63	61.28	61.49

[0071] 本发明实施例1中25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测指尖末梢血与西门子25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测静脉血(血清)的检测结果进行相关性分析如图5所示,回归方程为 $y=0.9636x+0.8521$ , $R^2=0.9923$ , $n=20$ ,表明本发明25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测指尖末梢血与西门子25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测静脉血(血清)的检测结果显著相关,具有同样的等效性。指尖血检测1和检测2结果进行相关性分析,回归方程为 $y=0.9952x-0.0371$ , $R^2=0.9989$ , $n=20$ ,表明本发明实施例1的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒的稳定性良好。并且本发明试剂盒检测指尖末梢血、静脉血(血清、血浆、全血)的检测结果进行相关性分析,回归方程分别为: $y=0.9791x+0.8087$ , $R^2=0.9938$ ; $y=0.9661x+1.4114$ , $R^2=0.9948$ ; $y=0.9597x+1.1742$ , $R^2=0.9961$ 。表明本发明25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测指尖末梢血与检测静脉血(血清、血浆、全血)的检测结果显著相关,具有同样的等效性。

[0072] 因此本发明的实施例1的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒可以满足末梢血、静脉血(血清、血浆、全血)辅助临床诊断的需求。

[0073] 实施例4 25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒的制备

[0074] 4.1 25-羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡的制备

[0075] 该过程与实施例1的“1.1 25-羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析检测卡的制备”中的过程一致。

[0076] 4.2释放剂的制备

[0077] 将463mg的二硫苏糖醇 (DTT)、1.8g的十二烷基硫酸钠 (SDS)、8.77g的乙二胺四乙酸 (EDTA)、17.65g的柠檬酸钠、15.48g的柠檬酸三钠和40g的乙醇加入到烧杯中,边加水边搅拌至全部溶解,然后用水定量至1000mL,得到释放剂,备用。

[0078] 实施例5实施例4的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒的检测

[0079] 该过程与实施例1的“1.3.检测”中的过程一致。

[0080] 实施例6比对实验

[0081] 采用本发明实施例4中制备的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒与西门子总25-羟基维生素D<sub>3</sub>测定试剂盒进行比对实验。通过采集20位病人末梢血和静脉血(血清)进行检测,以确定本发明实施例4中制备的25-羟基维生素D<sub>3</sub>免疫层析是否适用于指尖末梢血中25-羟基维生素D<sub>3</sub>的检测,其中指尖血重复检测2次。检测结果如下表3所示:

[0082] 表3检测数据

[0083]

试剂盒	本发明制备的 25-OH-D <sub>3</sub> 试剂盒(ng/mL)		西门子(ng/mL)
样本类型	指尖血		血清
	检测 1	检测 2	
样本与释放剂的 稀释比例	3:10	3:10	
样本 1	6.83	7.05	6.35
样本 2	4.23	5.10	4.75
样本 3	28.13	27.86	26.61
样本 4	25.94	26.43	24.59
样本 5	29.16	28.46	25.36
样本 6	34.79	34.64	33.62
样本 7	44.75	43.28	45.29
样本 8	16.45	15.78	16.35
样本 9	26.73	25.78	25.63
样本 10	30.52	29.34	32.85
样本 11	59.38	58.67	58.69
样本 12	46.94	47.32	47.16
样本 13	36.54	37.52	38.13
样本 14	38.78	37.38	36.56
样本 15	36.42	36.97	35.16
样本 16	26.14	27.46	27.65

[0084]

样本 17	29.78	28.94	27.46
样本 18	31.78	30.23	30.35
样本 19	79.32	78.97	77.86
样本 20	65.46	64.28	64.49

[0085] 本发明实施例4中25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测指尖末梢血与西门子25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测静脉血(血清)的检测结果进行相关性分析如图6所示,回归方程为 $y=0.9893x-0.2878$ , $R^2=0.9930$ , $n=20$ ,表明本发明25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测指尖末梢血与西门子25-OH-D<sub>3</sub>试剂盒检测静脉血(血清)的检测结果显著相关,具有同样的等效性。

[0086] 指尖血检测1和检测2结果进行相关性分析,回归方程为 $y=0.9854x+0.1787$ , $R^2=0.9977$ , $n=20$ ,表明本发明的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒的稳定性良好。因此本发明的25-羟基维生素D<sub>3</sub>试剂盒可以满足末梢血辅助临床诊断的需求。

[0087] 附:所需溶液配置

[0088] (1) 0.2M磷酸盐缓冲溶液

[0089] NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 5.24g;

[0090] Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 28.83g;

[0091] 纯化水定容至1000mL。

[0092] 以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的实施例,本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换,均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

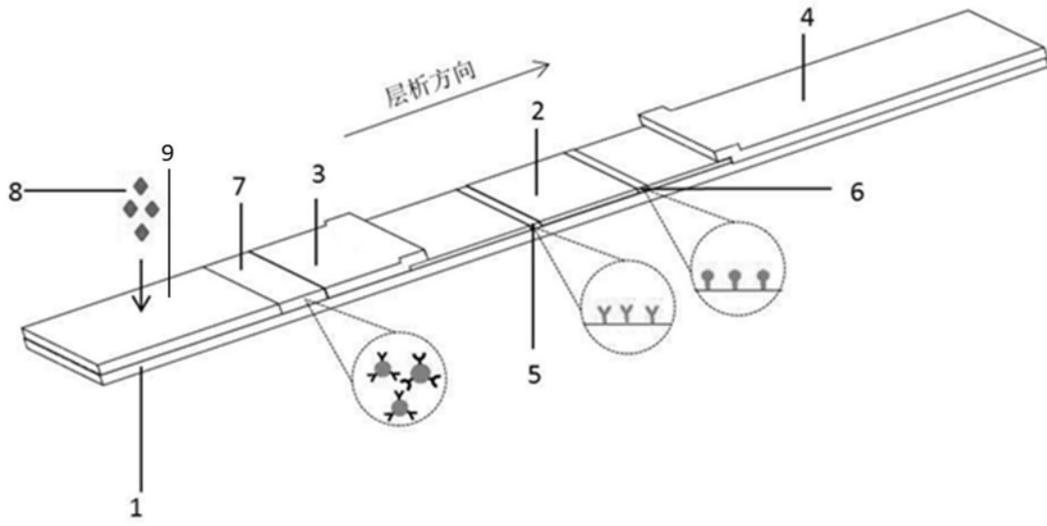


图1

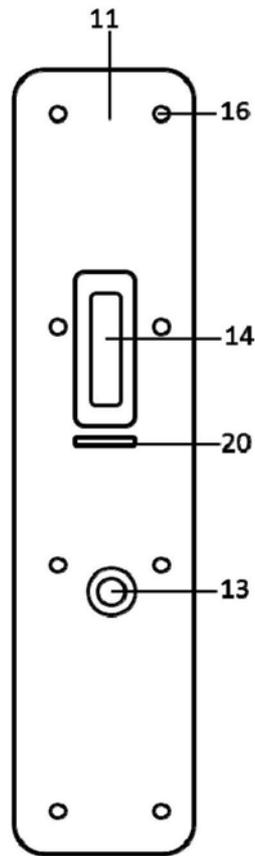


图2A

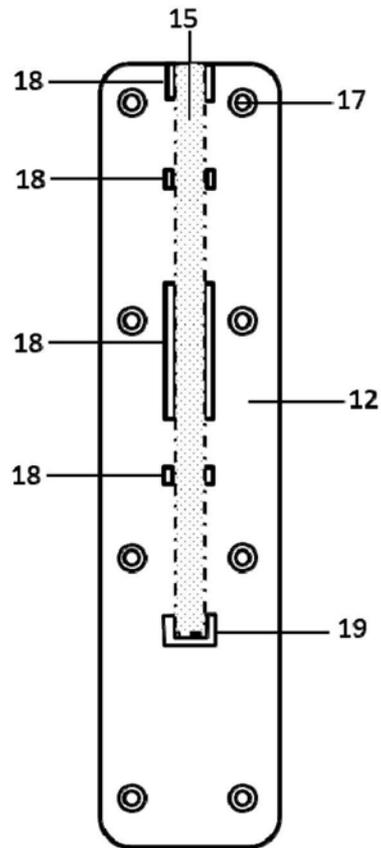


图2B

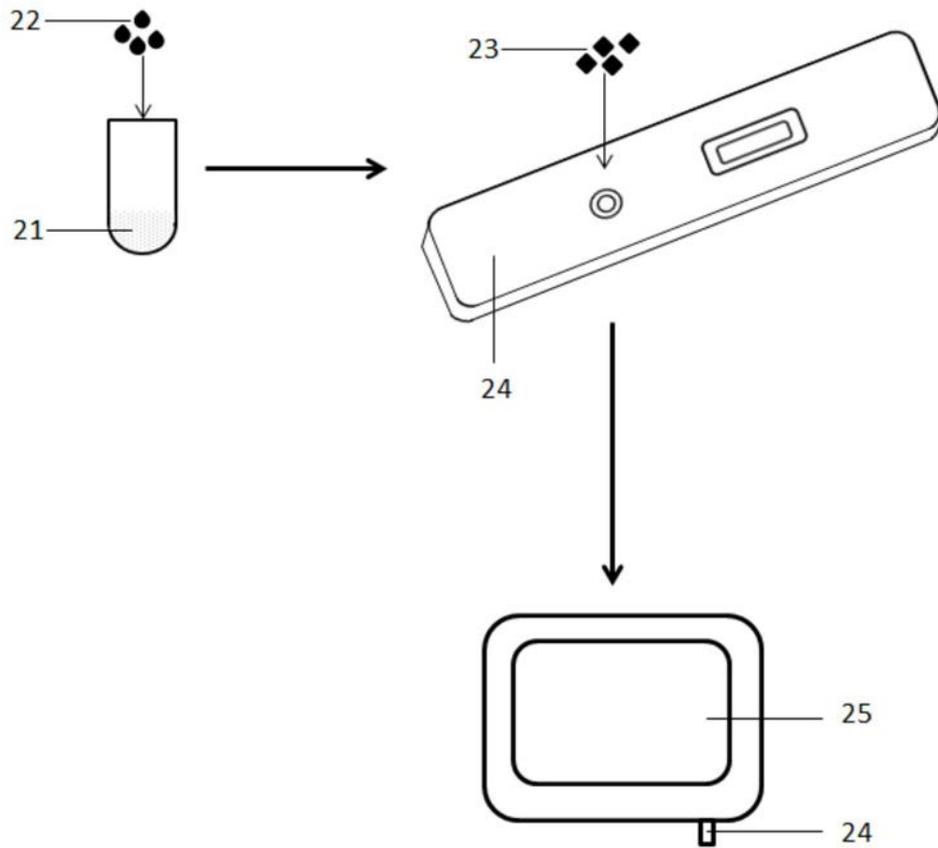


图3

四参数Logistic曲线拟合

---

方程:  $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$

---

A = 3.51533  
 B = 0.95244  
 C = 13.41474  
 D = -0.26775  
 r<sup>2</sup> = 0.99979

---

X	Y-反应值	Y-平均值CV(%)	Y-计算值	Y-残差
0.0000	3.5161		3.5153	-0.0008
4.0000	2.5998		2.6073	0.0075
10.0000	1.9085		1.8867	-0.0218
20.0000	1.2408		1.2683	0.0275
40.0000	0.7354		0.7198	-0.0156
100.0000	0.2156		0.2188	0.0032

---

数据个数 6  
 残差平方和 0.00154

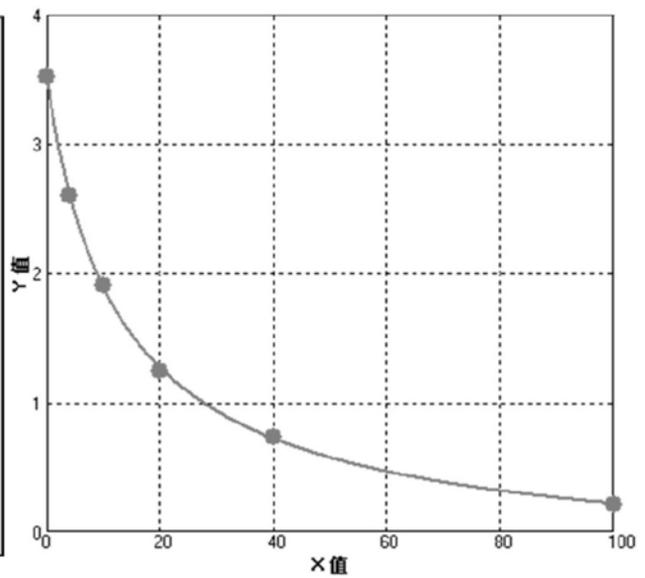


图4

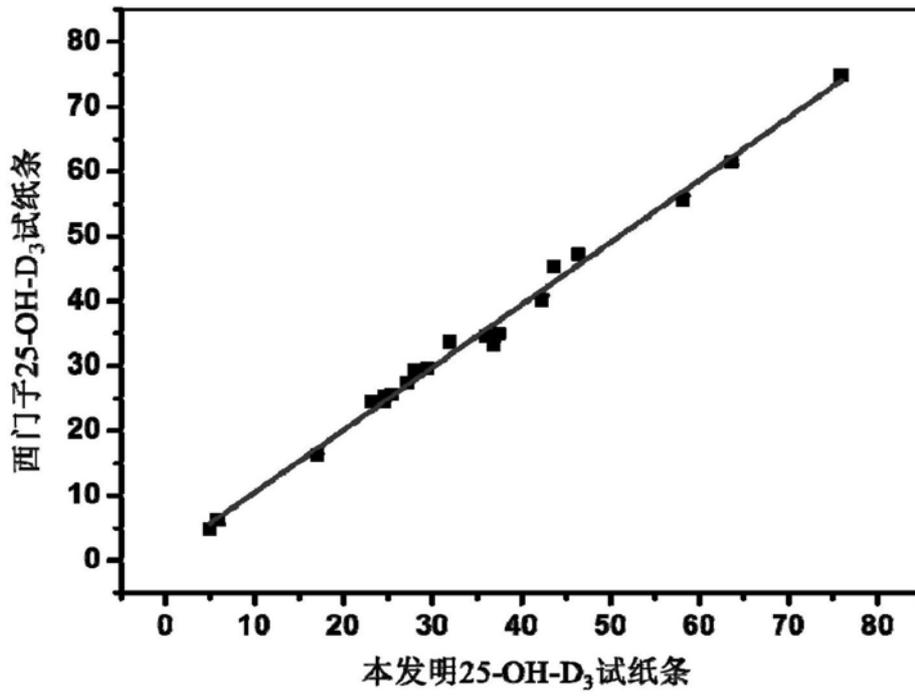


图5

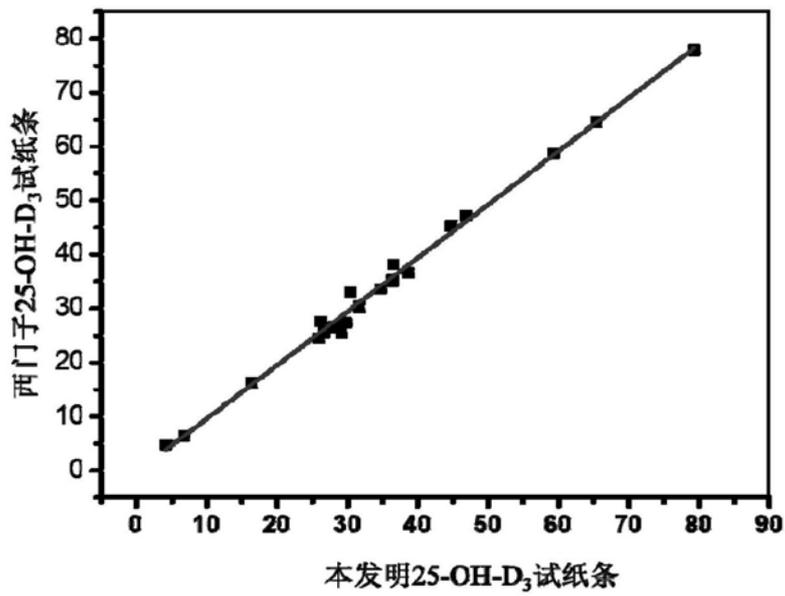


图6

专利名称(译)	一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D3试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110488008A</a>	公开(公告)日	2019-11-22
申请号	CN201910918407.5	申请日	2019-09-26
[标]发明人	林斯 杨国平 付琼		
发明人	林斯 杨国平 付琼		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558		
代理人(译)	李岩		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测末梢血的25-羟基维生素D3试剂盒及其制备方法和应用，该试剂盒包括25羟基维生素D3免疫层析检测卡和释放剂，所述25羟基维生素D3免疫层析检测卡包括试纸条，所述试纸条包括检测线及质控线，所述检测线上包被有25-羟基维生素D3完全抗原，所述质控线上包被有羊抗兔多克隆抗体。本发明所提供的25-羟基维生素D3试剂盒灵敏度高、稳定性强、线性范围宽，具有优异的准确性和精密度。

