



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110058028 A

(43)申请公布日 2019. 07. 26

(21)申请号 201910367609.5

(22)申请日 2019.05.05

(71)申请人 苏州长光华医生物医学工程有限公司

地址 215100 江苏省苏州市高新区锦峰路8号4号楼

(72)发明人 欧赛英 涂策 李大军

(74)专利代理机构 苏州知途知识产权代理事务所(普通合伙) 32299

代理人 马刚强 时萌萌

(51)Int.Cl.

G01N 33/82(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

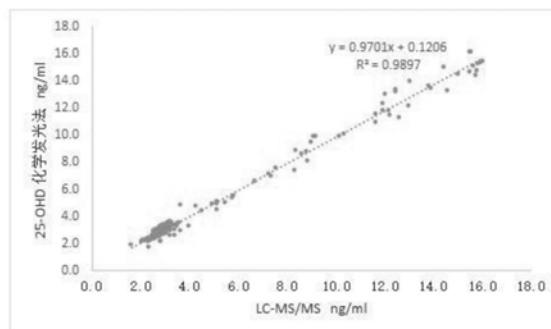
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

### (54)发明名称

一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其应用

### (57)摘要

本发明涉及一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其应用,试剂盒包括:全氟辛酸工作液、生物素工作液、抗体工作液、链霉亲和素包被的磁颗粒试剂、24,25-(OH)<sub>2</sub>-VitD校准品溶液及化学发光底物液,所述抗体工作液包含化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)<sub>2</sub>-VitD免疫单抗、未标记的抗25-OH-VitD免疫单抗、未标记的抗1,25-(OH)<sub>2</sub>-VitD免疫单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD免疫单抗。本发明还采用上述试剂盒对24,25-(OH)<sub>2</sub>-VitD进行化学发光免疫检测,结果准确。



1. 一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,其特征在于,包括:全氟辛酸工作液、生物素工作液、抗体工作液、链霉亲和素包被的磁颗粒试剂、24,25-(OH)2-VitD校准品溶液及化学发光底物液,所述抗体工作液包含化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗、未标记的抗25-OH-VitD免疫单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD免疫单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD免疫单抗。

2. 根据权利要求1所述的24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,其特征在于,所述抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗、抗25-OH-VitD免疫单抗、抗1,25-(OH)2-VitD免疫单抗、抗3-epi-25OH-VitD免疫单抗均为绵羊单抗。

3. 根据权利要求1或2所述的24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,其特征在于,所述抗体工作液中含有异噬性抗体阻断剂HBR,异噬性抗体阻断剂HBR的浓度优选为0.5-3mg/mL,所述抗体工作液优选为由PBS或CBS缓冲液配制而成,PBS或CBS缓冲液的浓度优选为0.05-0.15M、pH优选为8.5-10.5。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,其特征在于,所述抗体工作液中含有蛋白、多糖及多元醇;所述蛋白为白蛋白和/或酪蛋白,浓度优选为0.5-2mg/mL;所述多糖为果糖和/或蔗糖,浓度优选为3-5mg/mL;所述多元醇为丙三醇和/或乙二醇,浓度优选为3-5mg/mL;所述抗体工作液优选为由PBS或CBS缓冲液配制而成,PBS或CBS缓冲液的浓度优选为0.05-0.15M、pH优选为8.5-10.5。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗的制备方法为:将抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗与化学发光标记物在PBS或CBS缓冲液中按1:10~20的摩尔比反应0.5-1.5小时,透析去除未交联的小分子,得到化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗;所述PBS或CBS缓冲液的浓度优选为0.02-0.08M、pH优选为8.5-10.5。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,其特征在于,所述全氟辛酸工作液中含有5-15体积%的乙二醇,全氟辛酸工作液优选为PBS或CBS缓冲液配制而成,PBS或CBS缓冲液的浓度优选为0.05-0.15M、pH优选为8.5-10.5。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,其特征在于,所述24,25-(OH)2-VitD校准品溶液由去类固醇激素血清配制而成,24,25-(OH)2-VitD校准品溶液中优选为含有0.05wt%-0.2wt%的Proclin300。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物选自鲁米诺或其衍生物、异鲁米诺或其衍生物、吖啶酯或吖啶磺酰胺。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光底物液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含无机酸和过氧化物,所述化学发光激发液2含氢氧化物。

10. 一种24,25-(OH)2-VitD化学发光免疫检测试剂盒的应用,其特征在于,按照以下步骤使用:

将待测样本与全氟辛酸工作液加热反应,之后加入生物素工作液和抗体工作液加热孵育,再加入链霉亲和素包被的磁颗粒试剂加热孵育,形成磁性复合物悬浮液;

将磁性复合物悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合物;

向洗涤后的磁性复合物中注入化学发光底物液,检测其化学发光光子强度。

## 一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其应用,属于体外检测技术领域。

### 背景技术

[0002] 维生素D在人体中主要以胆钙化醇(D3)和麦角钙化醇(D2)两种形式存在,其中,胆钙化醇(D3)来源于阳光和肉制品,麦角钙化醇(D2)来源于膳食植物源。维生素D内分泌系统在人体中起着重要的生物学功能,维生素D经血液循环进入肝脏,在25-羟化酶CYP2R1的作用下转化为25-羟基维生素D(25-OH-VitD,包括25-OH-VitD<sub>2</sub>和25-OH-VitD<sub>3</sub>),继而在肾脏中被24-羟化酶CYP24A1催化生成24,25-双羟基维生素D(24,25-(OH)2-VitD),25-OH-VitD还可在体内代谢为具有生物学活性的1,25-(OH)2-VitD及3-epi-25OH-VitD。

[0003] 研究表明,24,25-(OH)2-VitD与25-OH-VitD呈依赖关系,25-OH-VitD与24,25-(OH)2-VitD的浓度比值在血清25-OH-VitD浓度低于20ng/ml时显著增加,而在血清25-OH-VitD浓度高时此比值下降,这可能是由于血液循环中25-OH-VitD下降导致CYP24A1下调,以促进分解代谢产物1,25-(OH)2-VitD的产生;而在25-OH-VitD高浓度个体中,则倾向于产生24,25-(OH)2-VitD以降低1,25-(OH)2-VitD的产量,起到预防毒性的作用。因此,血清24,25-(OH)2-VitD浓度的测定有助于识别CYP24A1功能缺失突变的患者,且血清中25-OH-VitD与24,25-(OH)2-VitD浓度的比值可以作为维生素D分解代谢状态的指标,尤其对于肾钙化或肾结石患者,如果检测到25-OH-VitD与24,25-(OH)2-VitD的浓度比值升高,说明要限制或避免补充维生素D,以防止高钙血症和进一步的结石形成。

[0004] 目前,对于25-OH-VitD的检测已经应用得比较成熟,常使用的检测方法有竞争法或蛋白结合免疫法及色谱法,其中,液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法为检测的标准方法,然而此方法专业水平要求极高、费时费力,而免疫方法相对简单、通量高,目前国内外各大体外诊断试剂厂家提供各种25-OH-VitD免疫检测试剂,包括从样本准备阶段(如从VDBP中完全连续地释放25-OH-VitD)、结合系统(单抗、多抗还是VDBP)、检测系统(酶、荧光物质、发光物质等)、信号系统(如光吸收、化学发光、放射标记等)等各个阶段所用到的各种试剂,目前国际标准品已建立起来,为消除方法间差异打下基础。然而,对于24,25-(OH)2-VitD的检测,国内外仅有使用LC-MS/MS法测定24,25-(OH)2-VitD的报道,LC-MS/MS操作复杂费时而且需要高端精密的仪器,但是目前尚无免疫学方法可以准确检测24,25-(OH)2-VitD。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是:为解决现有技术中尚无免疫学方法可以准确检测24,25-(OH)2-VitD的技术问题,提供一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其应用。

[0006] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0007] 一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒,包括:全氟辛酸工作液、生物素工作液、抗体工作液、链霉亲和素包被的磁颗粒试剂、24,25-(OH)2-VitD校准品溶液及化学发光

底物液,所述抗体工作液包含化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗、未标记的抗25-OH-VitD免疫单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD免疫单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD免疫单抗。

[0008] 优选地,所述抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗、抗25-OH-VitD免疫单抗、抗1,25-(OH)2-VitD免疫单抗、抗3-epi-25OH-VitD免疫单抗均为绵羊单抗。

[0009] 优选地,所述抗体工作液中含有异噬性抗体阻断剂HBR,异噬性抗体阻断剂HBR的浓度优选为0.5-3mg/mL,异噬性抗体阻断剂HBR可以消耗样本中的异噬性抗体,避免异噬性抗体与化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗反应,以进一步避免假性结果;进一步,所述抗体工作液优选为由PBS或CBS缓冲液配制而成,PBS或CBS缓冲液的浓度优选为0.05-0.15M、pH优选为8.5-10.5。

[0010] 优选地,所述抗体工作液中含有蛋白、多糖及多元醇;所述蛋白为白蛋白和/或酪蛋白,浓度优选为0.5-2mg/mL;所述多糖为果糖和/或蔗糖,浓度优选为3-5mg/mL;所述多元醇为丙三醇和/或乙二醇,浓度优选为3-5mg/mL;所述多元醇为丙三醇和/或乙二醇,蛋白、多糖和多元醇的加入可以有效防止抗体相互聚集,进一步避免出现假阳性。

[0011] 优选地,所述化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗的制备方法为:将抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗与化学发光标记物在PBS或CBS缓冲液中按1:10~20的摩尔比反应0.5-1.5小时,透析去除未交联的小分子,得到化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗;所述PBS或CBS缓冲液的浓度优选为0.02-0.08M、pH优选为8.5-10.5。

[0012] 优选地,所述全氟辛酸工作液中含有5-15体积%的乙二醇,全氟辛酸工作液优选为PBS或CBS缓冲液配制而成,PBS或CBS缓冲液的浓度优选为0.05-0.15M、pH优选为8.5-10.5。

[0013] 优选地,所述24,25-(OH)2-VitD校准品溶液由去类固醇激素血清配制而成,24,25-(OH)2-VitD校准品溶液中优选为含有0.05wt%-0.2wt%的Proclin300。

[0014] 优选地,所述化学发光标记物选自鲁米诺或其衍生物、异鲁米诺或其衍生物、吡啶酯或吡啶磺酰胺。

[0015] 优选地,所述化学发光底物液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含无机酸和过氧化物,所述化学发光激发液2含氢氧化物。

[0016] 本发明还提供上述24,25-(OH)2-VitD化学发光免疫检测试剂盒的应用,按照以下步骤使用:

[0017] 将待测样本与全氟辛酸工作液加热反应,之后加入生物素工作液和抗体工作液加热孵育,再加入链霉亲和素包被的磁颗粒试剂加热孵育,形成磁性复合物悬浮液;

[0018] 将磁性复合物悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合物;

[0019] 向洗涤后的磁性复合物中注入化学发光底物液,检测其化学发光光子强度。

[0020] 本发明的有益效果是:

[0021] 本发明首次采用化学发光免疫检测试剂盒对24,25-(OH)2-VitD进行检测,检测方法简单,样本用量较少,较LC-MS/MS适合于临床推广,尤其试剂盒的抗体工作液包含化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗、未标记的抗25-OH-VitD免疫单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD免疫单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD免疫单抗,能够有效避免24,25-(OH)2-VitD免疫单抗与25-OH-VitD、1,25-(OH)2-VitD、3-epi-25OH-VitD等其他维生素

D代谢物发生交叉反应,检测结果准确,有望应用于临床补充维生素D的疗效监测及CYP24A1突变患者的筛查;进一步,所述抗体工作液中加入的异噬性抗体阻断剂HBR、蛋白、多糖及多元醇等,可以进一步避免假性结果。

## 附图说明

[0022] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0023] 图1是本发明对比例1的方法与实施例4的方法检测的血清样本中24,25-(OH)2-VitD含量的对比图。

## 具体实施方式

[0024] 现在结合附图对本发明作进一步详细的说明。这些附图均为简化的示意图,仅以示意方式说明本发明的基本结构,因此其仅显示与本发明有关的构成。

[0025] 实施例1

[0026] 本实施例提供一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其制备方法,试剂盒包括:全氟辛酸工作液、生物素工作液、抗体工作液、链霉亲和素包被的磁颗粒试剂、24,25-(OH)2-VitD校准品溶液及化学发光底物液,所述抗体工作液包含鲁米诺标记的抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗25-OH-VitD绵羊单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD绵羊单抗;

[0027] 24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒的制备方法为:

[0028] 全氟辛酸工作液的制备:用含有5体积%乙二醇的PBS缓冲液配制成浓度为100ng/mL的全氟辛酸工作液,所述PBS缓冲液的浓度为0.05M、pH为8.5;

[0029] 生物素工作液的制备:用浓度为0.05M、pH为8.5的PBS缓冲液配制成浓度为100ng/mL的生物素工作液;

[0030] 抗体工作液的制备:用浓度为0.02M、pH为8.5的CBS缓冲液配制抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗溶液;

[0031] 将抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗溶液加入鲁米诺反应0.5小时,抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗与鲁米诺反应的摩尔比为1:10反应,透析去除未交联的小分子,得到鲁米诺标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗;

[0032] 将鲁米诺标记的抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗用浓度为0.05M、pH为8.5的PBS缓冲液稀释,并加入未标记的抗25-OH-VitD绵羊单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD绵羊单抗,得到抗体工作液,所述抗体工作液中鲁米诺标记的抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗25-OH-VitD绵羊单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD绵羊单抗的浓度均为1mg/mL;所述PBS缓冲液中含有0.5mg/mL异噬性抗体阻断剂、0.5mg/mL白蛋白、3mg/mL果糖及5mg/mL丙三醇;

[0033] 24,25-(OH)2-VitD校准品溶液的制备:用含有0.05wt%Proclin300的去类固醇激素血清配制成浓度为0、0.2、0.5、2、5、20、50ng/mL系列标准溶液;

[0034] 化学发光底物液的制备:化学发光底物液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含0.1M硝酸和1wt%过氧化物,所述化学发光激发液2含0.1M氢氧化钠。

[0035] 实施例2

[0036] 本实施例提供一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其制备方法,试剂盒包括:全氟辛酸工作液、生物素工作液、抗体工作液、链霉亲和素包被的磁颗粒试剂、24,25-(OH)2-VitD校准品溶液及化学发光底物液,所述抗体工作液包含异鲁米诺标记的抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗25-OH-VitD绵羊单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD绵羊单抗;

[0037] 24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒的制备方法为:

[0038] 全氟辛酸工作液的制备:用含有15体积%乙二醇的CBS缓冲液配制全氟辛酸工作液,所述CBS缓冲液的浓度为0.15M、pH为10.5;

[0039] 生物素工作液的制备:用浓度为0.15M、pH为10.5的CBS缓冲液配制而成;

[0040] 抗体工作液的制备:用浓度为0.08M、pH为10.5的PBS缓冲液配制抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗溶液;

[0041] 将抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗溶液加入异鲁米诺反应1.5小时,抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗与异鲁米诺反应的摩尔比为1:20反应,透析去除未交联的小分子,得到异鲁米诺标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗;

[0042] 将异鲁米诺标记的抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗用浓度为0.15M、pH为10.5的CBS缓冲液稀释,并加入未标记的抗25-OH-VitD绵羊单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD绵羊单抗,得到抗体工作液,所述抗体工作液中异鲁米诺标记的抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗25-OH-VitD绵羊单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD绵羊单抗的浓度均为1mg/mL;所述PBS缓冲液中含有3mg/mL异噬性抗体阻断剂、2mg/mL酪蛋白、5mg/mL蔗糖糖及3mg/mL乙二醇;

[0043] 24,25-(OH)2-VitD校准品溶液的制备:用含有0.2wt%Proclin300的去类固醇激素血清配制成浓度为0、0.2、0.5、2、5、20、50ng/mL系列标准溶液;

[0044] 化学发光底物液的制备:化学发光底物液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含0.1M硝酸和1wt%过氧化物,所述化学发光激发液2含0.1M氢氧化钠。

[0045] 实施例3

[0046] 本实施例提供一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其制备方法,试剂盒包括:全氟辛酸工作液、生物素工作液、抗体工作液、链霉亲和素包被的磁颗粒试剂、24,25-(OH)2-VitD校准品溶液及化学发光底物液,所述抗体工作液包含吖啶酯标记的抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗25-OH-VitD绵羊单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD绵羊单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD绵羊单抗;

[0047] 24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒的制备方法为:

[0048] 全氟辛酸工作液的制备:用含有10体积%乙二醇的PBS缓冲液配制全氟辛酸工作液,所述PBS缓冲液的浓度为0.1M、pH为9.5;

[0049] 生物素工作液的制备:用浓度为0.1M、pH为9.5的PBS缓冲液配制而成;

[0050] 抗体工作液的制备:用浓度为0.05M、pH为9.5的CBS缓冲液配制抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗溶液;

[0051] 将抗24,25-(OH)2-VitD绵羊单抗溶液加入吖啶酯反应1小时,抗24,25-(OH)2-

VitD绵羊单抗与吡啶酯反应的摩尔比为1:15反应,透析去除未交联的小分子,得到吡啶酯标记的抗24,25-(OH) 2-VitD免疫单抗;

[0052] 将吡啶酯标记的抗24,25-(OH) 2-VitD绵羊单抗用浓度为0.05M、pH为9.5的PBS缓冲液稀释,并加入未标记的抗25-OH-VitD绵羊单抗、未标记的抗1,25-(OH) 2-VitD绵羊单抗、未标记的抗3-epi-250H-VitD绵羊单抗,得到抗体工作液,所述抗体工作液中吡啶酯标记的抗24,25-(OH) 2-VitD绵羊单抗、未标记的抗25-OH-VitD绵羊单抗、未标记的抗1,25-(OH) 2-VitD绵羊单抗、未标记的抗3-epi-250H-VitD绵羊单抗的浓度均为1mg/mL;所述PBS缓冲液中含有2mg/mL异噬性抗体阻断剂、1mg/mL酪蛋白、1mg/mL白蛋白、5mg/mL蔗糖糖及3mg/mL乙二醇;

[0053] 24,25-(OH) 2-VitD校准品溶液的制备:用含有0.1wt%Proclin300的去类固醇激素血清配制成浓度为0、0.2、0.5、2、5、20、50ng/mL系列标准溶液;

[0054] 化学发光底物液的制备:化学发光底物液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含0.1M硝酸和1wt%过氧化物,所述化学发光激发液2含0.1M氢氧化钠。

[0055] 实施例4

[0056] 本实施例提供一种采用实施例3的试剂盒检测148例临床血清样本的方法,包括以下步骤:

[0057] (1) 建立标准曲线:将50μL系列浓度的24,25-(OH) 2-VitD校准品溶液依次与100μL全氟辛酸工作液于37℃温浴5min,之后加入100μL生物素工作液和100μL抗体工作液在37℃下孵育10min,再加入20μL链霉亲和素包被的磁颗粒试剂在37℃下孵育10min,形成磁性复合物悬浮液;

[0058] 将磁性复合物悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合物;

[0059] 向洗涤后的磁性复合物中注入100μL化学发光激发液1,1.5秒后,注入100μL化学发光激发液2,检测其化学发光光子强度,并由24,25-(OH) 2-VitD校准品溶液的浓度与光子强度之间的对应关系建立线性标准曲线;

[0060] (2) 样品分析检测:将50μL上述148例临床血清样本依次与100μL全氟辛酸工作液于37℃温浴5min,之后加入100μL生物素工作液和100μL抗体工作液在37℃下孵育10min,再加入20μL链霉亲和素包被的磁颗粒试剂在37℃下孵育10min,形成磁性复合物悬浮液;

[0061] 将磁性复合物悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合物;

[0062] 向洗涤后的磁性复合物中注入100μL化学发光激发液1,1.5秒后,注入100μL化学发光激发液2,检测其化学发光光子强度;

[0063] (3) 结果计算:将步骤(2)所测总光子强度与步骤(2)所建立线性标准曲线进行对照,然后通过计算得到每个临床血清样本中24,25-(OH) 2-VitD的含量。

[0064] 对比例1

[0065] 本对比例将实施例4的148例临床血清样本采用LC-MS/MS检测每个临床血清样本中24,25-(OH) 2-VitD的含量,并以LC-MS/MS检测的结果为横坐标,以实施例4的方法检测结果为纵坐标,绘制散点图(如图1所示),并得到标准线性曲线,线性方程为 $y = 0.9701x + 0.1206$ ,相关系数 $R^2$ 为0.9897,可见,LC-MS/MS检测临床血清样本中24,25-(OH) 2-VitD含量的方法与实施例4的方法检测的结果差别较小,说明本发明的检测方法能够准确地检测样



本中24,25-(OH)2-VitD的含量。

[0066] 实施例5

[0067] 本实施例以20ng/mL的24,25-(OH)2-VitD标准溶液为基础样本,分别添加25-OH-VitD3、25-OH-VitD2、1,25-(OH)2-VitD、1,25-(OH)2-VitD2、3-epi-25OH-VitD3、3-epi-25OH-VitD2、维生素D3、维生素D2等8个交叉反应物,依次得到样本1、样本2、样本3、样本4、样本5、样本6、样本7、样本8等8个干扰样本,每个干扰样本中交叉反应物的浓度如表1所示;

[0068] 采用实施例4的方法检测8个干扰样本及基础样本24,25-(OH)2-VitD的浓度,并计算交叉反应性,所述交叉反应性%=(干扰样本浓度-基础样本浓度)/基础样本浓度\*100%;

[0069] 表1

	干扰样本	交叉反应物	交叉反应物浓度	交叉反应性
[0070]	样本 1	25-OH-VitD3	50 ng/mL	3.0%
	样本 2	25-OH-VitD2	50 ng/mL	2.2%
	样本 3	1,25-(OH)2-VitD3	50 ng/mL	4.2%
	样本 4	1,25-(OH)2-VitD2	50ng/mL	3.7%
	样本 5	3-epi-25OH-VitD3	50 ng/mL	2.8%
	样本 6	3-epi-25OH-VitD2	50 ng/mL	3.2%
[0071]	样本 7	维生素 D3	1000 ng/mL	0.6%
	样本 8	维生素 D2	1000 ng/mL	0.5%

[0072] 由表1可以看出,本发明的试剂盒可以准确检测样本中24,25-(OH)2-VitD的浓度,样本中的维生素D及除24,25-(OH)2-VitD的其他维生素D代谢物对24,25-(OH)2-VitD的检测影响甚微。

[0073] 以上述依据本发明的理想实施例为启示,通过上述的说明内容,相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内,进行多样的变更以及修改。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容,必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。

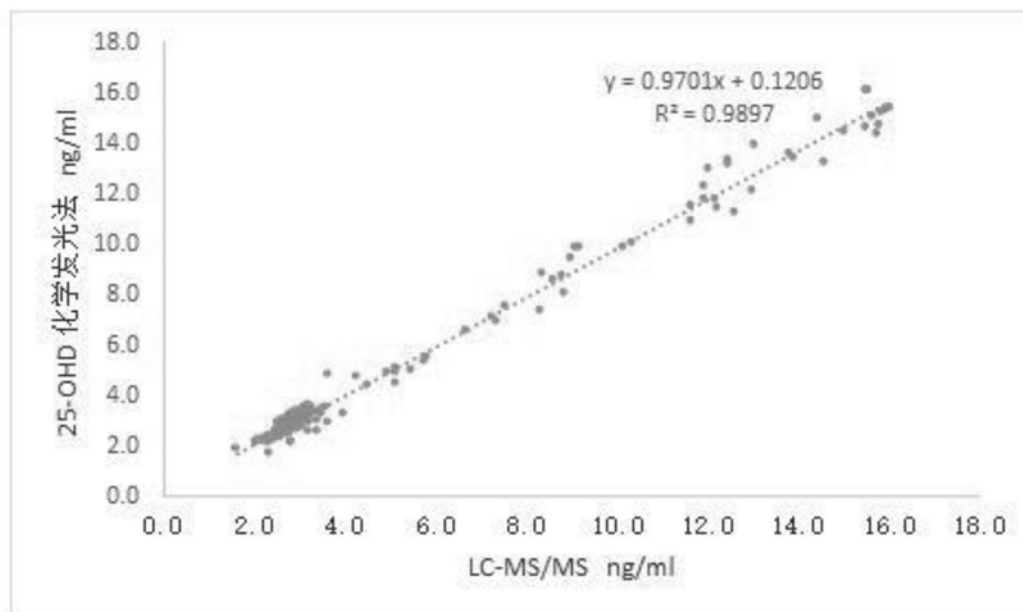


图1

专利名称(译)	一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110058028A</a>	公开(公告)日	2019-07-26
申请号	CN201910367609.5	申请日	2019-05-05
[标]申请(专利权)人(译)	苏州长光华医生物医学工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州长光华医生物医学工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州长光华医生物医学工程有限公司		
[标]发明人	欧赛英 涂策 李大军		
发明人	欧赛英 涂策 李大军		
IPC分类号	G01N33/82 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/82		
代理人(译)	时萌萌		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种24,25-双羟基维生素D免疫检测试剂盒及其应用, 试剂盒包括: 全氟辛酸工作液、生物素工作液、抗体工作液、链霉亲和素包被的磁颗粒试剂、24,25-(OH)2-VitD校准品溶液及化学发光底物液, 所述抗体工作液包含化学发光标记物标记的抗24,25-(OH)2-VitD免疫单抗、未标记的抗25-OH-VitD免疫单抗、未标记的抗1,25-(OH)2-VitD免疫单抗、未标记的抗3-epi-25OH-VitD免疫单抗。本发明还采用上述试剂盒对24,25-(OH)2-VitD进行化学发光免疫检测, 结果准确。

