



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110702928 A

(43)申请公布日 2020.01.17

(21)申请号 201910911536.1

(22)申请日 2019.09.25

(71)申请人 迪瑞医疗科技股份有限公司

地址 130103 吉林省长春市高新区宜居路
3333号

(72)发明人 张丹丹 孟令敏 韩美玉 王凯
高威 孙成艳 何浩会

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理
有限公司 22214

代理人 刘微

(51)Int.Cl.

G01N 33/82(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

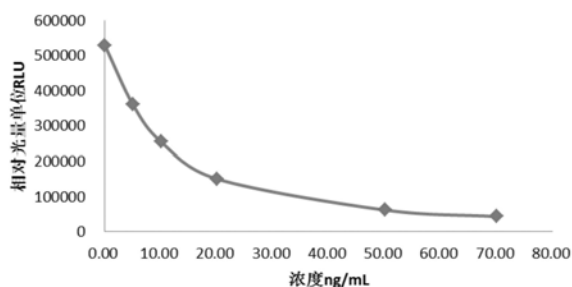
权利要求书3页 说明书18页 附图1页

(54)发明名称

一种稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫
检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,包括试剂R1、试剂R2、试剂R3、试剂R4和试剂R5;其中:R1为包含链霉亲和素磁颗粒的缓冲液,R2为包含化学发光标记物的25-羟基维生素D多克隆抗体和保护剂的缓冲液,R3为包含生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物和保护剂的缓冲液,R4和R5为样本预处理试剂,用于解离血清或血浆中以结合蛋白形式存在的25-羟基维生素D。本发明的试剂盒将酪蛋白胶束作为保护剂添加在试剂缓冲液中,用于检测血清或血浆中25-羟基维生素D的含量,有效提高了抗原衍生物的稳定性和测试结果的准确性,解决了现有技术中存在的缺陷问题,便于试剂的储存于运输。



1. 一种稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括试剂R1、试剂R2、试剂R3、试剂R4和试剂R5;

其中:

R1为包含链霉亲和素磁颗粒的缓冲液,R1中链霉亲和素磁颗粒的浓度为0.01%~1%,所述磁颗粒的粒径是0.05~3 μ m;

R2为包含化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体和保护剂的缓冲液,R2中保护剂采用浓度为0.1%~2%的酪蛋白胶束,化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体的浓度为0.15 μ g/mL,抗体与标记物的标记比例是1:3~1:20;

R3为包含生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物和保护剂的缓冲液,R3中保护剂采用浓度为0.1%~2%的酪蛋白胶束,生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物的浓度为0.05 μ g/mL;

R4为样本预处理试剂1,具体为含有2~10mM还原剂的0.1M~1M碳酸酯缓冲液;

R5为样本预处理试剂2,具体为0.1M~0.5M氢氧化钠溶液。

2. 根据权利要求1所述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述保护剂为酪蛋白、酪蛋白酸钠、琥珀酸酪蛋白、重组酪蛋白酸钠和重组琥珀酸酪蛋白的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,R2中的化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钼。

4. 根据权利要求1所述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,R4中的还原剂选自二硫苏糖醇,碳酸酯选自碳酸乙烯酯。

5. 根据权利要求1所述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述缓冲液为HEPES缓冲液、PIPES缓冲液、MOPS缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、BISTRIS缓冲液、TRIS缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液中的一种或多种。

6. 根据权利要求1所述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,R1中链霉亲和素磁颗粒的制备方法为:取浓度50~100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液,加入10倍体积的TBST溶液充分混匀,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒;重复清洗3次后采用含50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.01%~1%的固相试剂,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

7. 根据权利要求1所述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,R2中化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体的制备方法为:将25-羟基维生素D抗体离心20s~30s后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2mg/mL吖啶酯DMF溶液,离心0.5min~1min,密封后避光混匀3h~4h;加入20%~30%赖氨酸封闭液,混匀后封闭1h~2h;将封闭好的抗体纯化、收集,用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300、pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.1 μ g/mL,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

8. 根据权利要求1所述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,R3中生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物的制备方法为:用DMSO将生物素结合的维生素粉末进行复溶,得到浓度为1mg/mL的一级稀释液;再用DMSO稀释一级稀释液得到浓度为20 μ g/mL的二级稀释液,-80 $^{\circ}$ C保存;使用时将二级稀释液,用400mM Bistris丙烷、0.1%吐温-20、0.05%Proclin300、PH 8.6的缓冲液稀释至终浓度为0.05 μ g/mL,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C

保存。

9. 根据权利要求1所述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在在于,所述的试剂盒还包括25-羟基维生素D校准品,所述校准品包括浓度分别为0.00ng/mL、5.00ng/mL、10.00ng/mL、20.00ng/mL、50.00ng/mL和70.00ng/mL的25-羟基维生素D溶液。

10. 根据权利要求1所述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,其特征在在于,

R1试剂组成成分:

缓冲液	10~30mmol/L
盐类	100~300mmol/L
链霉亲和素磁颗粒	0.01%~1%

R2试剂组成成分:

缓冲液	100~400 mmol/L
盐 类	100~300mmol/L
保护剂	0.1%~2%
防腐剂	0.1%~2%
表面活性剂	0.1%~2%
纯化水	1L

化学发光标记物标记的 25-羟基维生素 D 多克隆抗体 0.15 μ g/mL

R3试剂组成成分:

缓冲液	100~400 mmol/L
盐 类	100~300mmol/L
保护剂	0.1%~2%
防腐剂	0.1%~2%
表面活性剂	0.1%~2%
纯化水	1L

生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物 0.05 μ g/mL

R4试剂组成成分:

碳酸酯	0.1M~1M
还原剂	2~10mM

R5试剂组成成分:

氢氧化钠	0.1M~0.5M
------	-----------

其中所述缓冲液为HEPES缓冲液、PIPES缓冲液、MOPS缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、BISTRIS缓冲液、TRIS缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液中的一种或多种;

其中所述的盐类为NaCl、KCl和MgCl₂中的一种或多种;

其中所述的保护剂为酪蛋白、酪蛋白酸钠、琥珀酸酪蛋白、重组酪蛋白酸钠和重组琥珀酸酪蛋白的一种或多种；

其中所述的表面活性剂为聚氧乙烯月桂醚、曲拉通X-100、BRIJ35、EMULGEN 24B、吐温-20、吐温-80、司盘60中的一种或多种；

其中所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌；

其中所述还原剂选自二硫苏糖醇，碳酸酯选自碳酸乙烯酯。

一种稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测技术领域,尤其涉及一种稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒。

背景技术

[0002] 维生素D为类固醇衍生物,属脂溶性维生素。维生素D主要由人体皮肤经紫外线照射后合成,少部分从食物或补充品中摄入。维生素D不仅仅影响钙磷代谢,而且具有广泛的生理作用,是维持人体健康、细胞生长和发育的必不可少的物质,与多种疾病密切相关。

[0003] 在人体内有两种形式的维生素D,维生素D3(胆钙化醇)和维生素D2(麦角钙化醇),维生素D在肝脏中通过羟基化作用转化成25-羟基维生素D(25-OH VD),然后在肾脏中转换为具有活性的1,25-二羟基维生素D。维生素D的其他代谢物,以比25-羟基维生素D低至一千倍的浓度进行循环,对总的循环维生素D代谢物的评价没有显著贡献。

[0004] 25-羟基维生素D是维生素D在体内的主要存在形式,其半衰期较长且波动小,通过检测它可以确定整个维生素D的情况,因此血清25-OH VD含量是目前国际公认的衡量机体VD营养状态的指标。现已有的25-OH VD检测方法有放射免疫法(RIA),酶联免疫法(ELISA),化学发光法(CLIA),液相色谱-串联质谱法(LC-MS)。其中化学发光法以其灵敏度高,线性范围宽,无污染,操作方便等优势,成为发展趋势。

[0005] 在检测25-羟基维生素D时,需要用到25-羟基维生素D抗原衍生物,然而,25-羟基维生素D抗原衍生物是一种稳定性差,对光和热非常敏感的物质,遇光、遇热时,将失去与双键相连的 α 氢原子成为烯丙基自由基,同时VD中的22碳易被氧化而断裂使其结构破坏。因此,由于25-羟基维生素D抗原衍生物的不稳定性,导致测定试剂盒不能长期稳定保存。此外,由于稳定性差导致试剂盒不方便储存及运输的缺点也影响了测试试剂的使用及检测结果,这也是目前25-羟基维生素D检测技术上存在的最大问题。

[0006] 酪蛋白是一种含磷钙的结合蛋白,直径为200nm的近似球状的复合物,即“酪蛋白胶束”。他的功能受其组成和灵活构像的控制,其耐热性较强,在低于100℃的温度加热时,酪蛋白的化学性质不受影响,同时对紫外线、高压及酶消化等外部环境的改变具有稳定性,保障了负载生物活性物质的作用活性。本专利利用酪蛋白上述的特点,作为保护剂添加在试剂缓冲液中,提高25-羟基维生素D测定试剂盒的稳定性,便于试剂的储存于运输。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,将酪蛋白胶束作为保护剂添加在试剂缓冲液中,有效提高了抗原衍生物的稳定性及测试结果的准确性,解决了现有技术中存在的缺陷问题,用于检测血清或血浆中25-羟基维生素D的含量。

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供的技术方案如下:

[0009] 本发明提供了一种稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒包括试剂R1、

试剂R2、试剂R3、试剂R4和试剂R5；

[0010] 其中：

[0011] R1为包含链霉亲和素磁颗粒的缓冲液，R1中链霉亲和素磁颗粒的浓度为0.01%~1%，所述磁颗粒的粒径是0.05~3 μ m；

[0012] R2为包含化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体和保护剂的缓冲液，R2中保护剂采用浓度为0.1%~2%的酪蛋白胶束，化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体的浓度为0.15 μ g/mL，抗体与标记物的标记比例是1:3~1:20；

[0013] R3为包含生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物和保护剂的缓冲液，R3中保护剂采用浓度为0.1%~2%的酪蛋白胶束，生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物的浓度为0.05 μ g/mL；

[0014] R4为样本预处理试剂1，具体为含有2~10mM还原剂的0.1M~1M碳酸酯缓冲液；

[0015] R5为样本预处理试剂2，具体为0.1M~0.5M氢氧化钠溶液。

[0016] 优选地，所述保护剂为酪蛋白、酪蛋白酸钠、琥珀酸酪蛋白、重组酪蛋白酸钠和重组琥珀酸酪蛋白的一种或多种。

[0017] 优选地，R2中的化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌。

[0018] 优选地，R4中的还原剂选自二硫苏糖醇，碳酸酯选自碳酸乙烯酯。

[0019] 优选地，所述缓冲液为HEPES缓冲液、PIPES缓冲液、MOPS缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、BISTRIS缓冲液、TRIS缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液中的一种或多种。

[0020] 具体地，上述的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒中，R1中链霉亲和素磁颗粒的制备方法为：取浓度50~100mg/ml的链霉亲和素磁颗粒溶液，加入10倍体积的TBST溶液充分混匀，放置于磁分离器上，直至上清无混浊，弃上清，留取磁颗粒；重复清洗3次后采用含50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300，pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.01%~1%的固相试剂，2℃~8℃保存。

[0021] R2中化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体的制备方法为：将25-羟基维生素D抗体离心20s~30s后加入碳酸缓冲溶液，充分混匀，混匀后加入2mg/mL化学发光标记物吖啶酯DMF溶液，离心0.5min~1min，密封后避光混匀3h~4h；加入20%~30%赖氨酸封闭液，混匀后封闭1h~2h；将封闭好的抗体纯化、收集，用50mM MES、0.05%吐温、0.05%Proclin300、pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.1 μ g/mL，2℃~8℃保存。

[0022] R3中生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物的制备方法为：用DMSO将生物素结合的维生素粉末进行复溶，得到浓度为1mg/mL的一级稀释液；再用DMSO稀释一级稀释液得到浓度为20 μ g/mL的二级稀释液，-80℃保存；使用时将二级稀释液，用400mM Bistris丙烷、0.1%吐温-20、0.05%Proclin300、PH 8.6的缓冲液稀释至终浓度为0.05 μ g/mL，2℃~8℃保存。

[0023] 此外，上述的试剂盒中，还包括25-羟基维生素D校准品，所述校准品包括浓度分别为0.00ng/mL、5.00ng/mL、10.00ng/mL、20.00ng/mL、50.00ng/mL和70.00ng/mL的25-羟基维生素D溶液。

[0024] 优选地，上述稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒中各试剂组成成分如下：

[0025] R1试剂组成成分：

[0026] 缓冲液 10~30mmol/L
[0027] 盐类 100~300mmol/L
[0028] 链霉亲和素磁颗粒 0.01%~1%

[0029] R2试剂组成成分：

[0030] 缓冲液 100~400 mmol/L
盐类 100~300mmol/L
保护剂 0.1%~2%
防腐剂 0.1%~2%
表面活性剂 0.1%~2%
纯化水 1L

[0031] 化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体0.15μg/mL

[0032] R3试剂组成成分：

[0033] 缓冲液 100~400 mmol/L
盐类 100~300mmol/L
保护剂 0.1%~2%
防腐剂 0.1%~2%
表面活性剂 0.1%~2%
纯化水 1L
生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物 0.05μg/mL

[0034] R4试剂组成成分：

[0035] 碳酸酯 0.1M~1M
[0036] 还原剂 2~10mM

[0037] R5试剂组成成分：

[0038] 氢氧化钠 0.1M~0.5M

[0039] 其中所述缓冲液为HEPES缓冲液、PIPES缓冲液、MOPS缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、BISTRIS缓冲液、TRIS缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液中的一种或多种；

[0040] 其中所述的盐类为NaCl、KCl和MgCl₂中的一种或多种；

[0041] 其中所述的保护剂为酪蛋白、酪蛋白酸钠、琥珀酸酪蛋白、重组酪蛋白酸钠和重组琥珀酸酪蛋白的一种或多种；

[0042] 其中所述的表面活性剂为聚氧乙烯月桂醚、曲拉通X-100、BRIJ35、EMULGEN 24B、吐温-20、吐温-80、司盘60中的一种或多种；

[0043] 其中所述化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钌；

[0044] 其中所述还原剂选自二硫苏糖醇,碳酸酯选自碳酸乙烯酯。

[0045] 与现有技术相比,本发明的技术效果:

[0046] 本发明提供的稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒,基于化学发光免疫分析技术的竞争法进行检测。试剂组成包括R1、R2、R3、R4和R5五部分,R1为链霉亲和素磁颗粒试剂,R2为化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体试剂,R3为生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物试剂,R4和R5为样本预处理试剂,用于解离血清或血浆中以结合蛋白形式存在的25-羟基维生素D;生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物与处理后样本中的25-羟基维生素D竞争结合化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体,免疫复合物通过生物素与链霉亲和素之间的反应结合到磁颗粒上,以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成对25-羟基维生素D的检测,样本中的25-羟基维生素D含量与系统所检测的相对光单位(RLU)成反比,检测灵敏度高、线性范围宽、特异性好。本发明的试剂盒中,将酪蛋白胶束作为保护剂添加在试剂缓冲液中,用于准确检测血清或血浆中25-羟基维生素D的含量,有效提高了抗原衍生物的稳定性和测试结果的准确性,进而提高25-羟基维生素D测定试剂盒的稳定性,解决了现有技术中存在的缺陷问题,便于试剂的储存于运输。

附图说明

[0047] 为了更清楚地说明本申请实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明中记载的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0048] 图1为本发明25-羟基维生素D化学发光检测试剂盒的测试校准品检测相对光单位的标准曲线,横坐标为校准品浓度,单位为ng/mL,纵坐标为相对光单位(RLU)。

具体实施方式

[0049] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案,下面将结合附图对本发明作进一步的详细介绍。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0050] 本发明的试剂盒,包括试剂R1、试剂R2、试剂R3、试剂R4和试剂R5;其中:

[0051] R1为包含链霉亲和素磁颗粒的缓冲液,R1中链霉亲和素磁颗粒的浓度为0.01%~1%,优选0.072%,所述磁颗粒的粒径是0.05~3 μ m,优选3 μ m;所述缓冲液为HEPES缓冲液、PIPES缓冲液、MOPS缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、BISTRIS缓冲液、TRIS缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液中的一种或多种。

[0052] R2为包含化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体和保护剂的缓冲液,R2中保护剂采用浓度为0.1%~2%的酪蛋白胶束,化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体的浓度为0.15 μ g/mL,抗体与标记物的标记比例是1:3~1:20,优选1:3;所述保护剂为酪蛋白、酪蛋白酸钠、琥珀酸酪蛋白、重组酪蛋白酸钠和重组琥珀酸酪蛋白的一种或多种;化学发光标记物为吖啶酯、鲁米诺、异鲁米诺或三联吡啶钡;所述缓冲液为HEPES缓冲

液、PIPES缓冲液、MOPS缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、BISTRIS缓冲液、TRIS缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液中的一种或多种。

[0053] R3为包含生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物和保护剂的缓冲液,R3中保护剂采用浓度为0.1%~2%的酪蛋白胶束,生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物的浓度为0.05 μ g/mL;所述保护剂为酪蛋白、酪蛋白酸钠、琥珀酸酪蛋白、重组酪蛋白酸钠和重组琥珀酸酪蛋白的一种或多种;所述缓冲液为HEPES缓冲液、PIPES缓冲液、MOPS缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、BISTRIS缓冲液、TRIS缓冲液、巴比妥钠-盐酸缓冲液中的一种或多种。

[0054] R4为样本预处理试剂1,具体为含有2~10mM还原剂的0.1M~1M碳酸酯缓冲液;优选地,R4中的还原剂选自二硫苏糖醇,碳酸酯选自碳酸乙烯酯。

[0055] R5为样本预处理试剂2,具体为0.1M~0.5M氢氧化钠溶液。

[0056] 本发明的试剂盒还包括25-羟基维生素D校准品,所述校准品包括浓度分别为0.00ng/mL、5.00ng/mL、10.00ng/mL、20.00ng/mL、50.00ng/mL和70.00ng/mL的25-羟基维生素D溶液。

[0057] 此外,本发明的试剂盒还包括化学发光激发液,所述化学发光激发液包括A液和B液;所述A液为过氧化氢和硝酸溶液,B液为氢氧化钠溶液。

[0058] 这种化学发光免疫分析试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测仪器,完成25-羟基维生素D的检测。这种化学发光免疫分析试剂盒与仪器配套,缩短了临床检测所需的时间,检测准确度较高。

[0059] 试剂盒检测方法:

[0060] 以全自动化学发光免疫分析仪(CM-180)为检测仪器,试剂盒测定原理是竞争法,即仪器依次加入30 μ L的样本,40 μ LR4试剂和40 μ LR5试剂,反应7min后,加入50 μ LR2试剂,40 μ LR1试剂及50 μ LR3试剂,反应20min后,进行磁分离。仪器将反应物送入暗室,依次加入发光激发液A液(H₂O₂+HNO₃溶液)和B液(NaOH溶液)进行反应,最后记录相对光单位(RLU)。

[0061] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的描述。其中,链霉亲和素磁珠购自安捷伦科技有限公司(货号PL6727-1001)。

[0062] 实施例1 25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0063] R1试剂组成成分:

[0064] TRIS缓冲液 25mmol/L

[0065] NaCl 150mmol/L

[0066] 链霉亲和素磁颗粒的质量比 0.072%

[0067] 磁颗粒的粒径是3 μ m。

[0068] R2试剂组成成分:

- | | | |
|--------|-------------|------------|
| | BISTRIS 缓冲液 | 400 mmol/L |
| | NaCl | 150 mmol/L |
| [0069] | 酪蛋白 | 0.5% |
| | 酪蛋白酸钠 | 0.5% |
| | 吐温-20 | 0.1% |
| | 纯化水 | 1L |
- [0070] 化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体0.15μg/mL
- [0071] 化学发光标记物为吖啶酯,抗体与标记物的标记比例是1:3。
- [0072] R3试剂组成成分:
- | | | |
|--------|-------------|------------|
| | BISTRIS 缓冲液 | 400 mmol/L |
| | NaCl | 150 mmol/L |
| [0073] | 酪蛋白 | 0.5% |
| | 酪蛋白酸钠 | 0.5% |
| | 吐温-20 | 0.1% |
| | 纯化水 | 1L |
- [0074] 生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物浓度为0.05μg/mL。
- [0075] R4试剂组成成分:
- [0076] 缓冲液选自0.5M碳酸乙烯酯,还原剂选自二硫苏糖醇(DTT)。
- [0077] R5试剂组成成分:
- [0078] 0.3M氢氧化钠。
- [0079] 试剂盒的制备:
- [0080] (1) 试剂R1的制备:
- [0081] 链霉亲和素磁颗粒工艺:取浓度是100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液0.5mL,加入10mL的TBST溶液充分混匀10分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后采用含50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.072%的固相试剂,2℃~8℃保存。
- [0082] 根据上述R1试剂的组成成分,将链霉亲和素磁颗粒与其他组分混合,灌封于试剂瓶中,得到R1试剂。
- [0083] (2) 试剂R2的制备:
- [0084] 化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体标记工艺:将500μg 25-羟基维生素D抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入0.75μL 2mg/mL吖啶酯DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(25℃),混匀4h。加入1mL 20%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(25℃),中速混匀,封闭时间为1h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液

放置于2℃~8℃保存。使用时将纯化后的25-羟基维生素D抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.15μg/mL,2℃~8℃保存。

[0085] 根据上述R2试剂的组成成分,将化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体与其他组分混合,灌封于试剂瓶中,得到R2试剂。

[0086] (3) 试剂R3的制备:

[0087] 生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物制备:取1mL DMSO将生物素结合的维生素粉末进行复溶,得到浓度为1mg/mL的一级稀释液;再取10μL浓度为1mg/mL的一级稀释液,加入至490μL的缓冲液DMSO中,得到浓度为20μg/mL的二级稀释液。使用时将二级稀释液,用400mM Bistris丙烷、0.1%吐温-20、0.05%Proclin300,PH 8.6的缓冲液稀释至终浓度为0.05μg/mL,2℃~8℃保存。

[0088] 根据上述试剂R3的组成成分,将生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物与其他组分混合,灌封于试剂瓶中,得到R3试剂。

[0089] (4) 试剂R4的制备:

[0090] 取适量还原剂DTT,用0.5M碳酸乙烯酯,PH5.5缓冲液稀释至终浓度为6.7mM,2℃~8℃保存。

[0091] (5) 试剂R5的制备:

[0092] 取适量氢氧化钠,用纯化水溶解,终浓度为0.5M,2℃~8℃保存。

[0093] (6) 校准品的制备:

[0094] 用血清基质配制浓度为0.00ng/mL、5.00ng/mL、10.00ng/mL、20.00ng/mL、50.00ng/mL和70.00ng/mL的25-羟基维生素D的校准品。

[0095] 采用实施例1制备的试剂盒测定校准品,绘制标准曲线,如图1所示,横坐标为校准品浓度,单位为ng/mL,纵坐标为相对光单位(RLU)。

[0096] 实施例2 25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒的制备

[0097] R1试剂组成成分:

[0098] HEPES缓冲液 10mmol/L

[0099] KCl 100mmol/L

[0100] 链霉亲和素磁颗粒的质量比 0.01%

[0101] 磁颗粒的粒径是0.05μm。

[0102] R2试剂组成成分:

PIPES 缓冲液 100 mmol/L

KCl 100 mmol/L

酪蛋白酸钠 0.05%

[0103] 琥珀酸酪蛋白 0.05%

聚氧乙烯月桂醚 0.1%

纯化水 1L

[0104] 化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体0.15μg/mL

[0105] 化学发光标记物为鲁米诺,抗体与标记物的标记比例是1:10。

[0106] R3试剂组成成分:

MOPS 缓冲液 100 mmol/L

KCl 100 mmol/L

[0107] 酪蛋白酸钠 0.05%

琥珀酸酪蛋白 0.05%

曲拉通 X-100 0.1%

[0108] 纯化水 1L

[0109] 生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物浓度为0.05 μ g/mL。

[0110] R4试剂组成成分:

[0111] 缓冲液选自0.1M碳酸乙烯酯,还原剂选自二硫苏糖醇 (DTT)。

[0112] R5试剂组成成分:

[0113] 0.1M氢氧化钠。

[0114] 试剂盒的制备:

[0115] (1) 试剂R1的制备:

[0116] 链霉亲和素磁颗粒工艺:取浓度是50mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液1mL,加入5mL的TBST溶液充分混匀15分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后采用含50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.01%的固相试剂,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

[0117] 根据上述R1试剂的组成成分,将链霉亲和素磁颗粒与其他组分混合,灌封于试剂瓶中,得到R1试剂。

[0118] (2) 试剂R2的制备:

[0119] 化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体标记工艺:将500 μ g 25-羟基维生素D抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心20s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入2.5 μ L 2mg/mL鲁米诺的DMF溶液,用离心机室温条件下离心20s。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(23 $^{\circ}$ C),混匀3h。加入0.5mL 30%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(23 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为2h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。使用时将纯化后的25-羟基维生素D抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.15 μ g/mL,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

[0120] 根据上述R2试剂的组成成分,将化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体与其他组分混合,灌封于试剂瓶中,得到R2试剂。

[0121] (3) 试剂R3的制备:同实施例1。

[0122] (4) 试剂R4的制备:取适量还原剂DTT,用0.1M碳酸乙烯酯,PH5.5缓冲液稀释至终浓度为2mM,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

[0123] (5) 试剂R5的制备:取适量氢氧化钠,用纯化水溶解,终浓度为0.1M,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

- [0124] (6) 校准品的制备:同实施例1。
- [0125] 采用实施例2制备的试剂盒测定校准品,绘制标准曲线通实施例1类似。
- [0126] 实施例3 25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒的制备
- [0127] R1试剂组成成分:
- | | | |
|--------|-------------------|-----------|
| [0128] | 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 | 30mmol/L |
| [0129] | MgCl ₂ | 300mmol/L |
| [0130] | 链霉亲和素磁颗粒的质量比 | 1% |
- [0131] 磁颗粒的粒径是1 μ m。
- [0132] R2试剂组成成分:
- | | | |
|--------|-------------------|------------|
| | 磷酸盐缓冲液 | 400 mmol/L |
| | MgCl ₂ | 300 mmol/L |
| | 酪蛋白 | 1% |
| [0133] | 重组酪蛋白酸钠 | 1% |
| | BRIJ35 | 2% |
| | 纯化水 | 1L |
- [0134] 化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体0.15 μ g/mL
- [0135] 化学发光标记物为三联吡啶钌,抗体与标记物的标记比例是1:20。
- [0136] R3试剂组成成分:
- | | | |
|--------|-------------------|------------|
| | 巴比妥钠-盐酸缓冲液 | 400 mmol/L |
| | MgCl ₂ | 300 mmol/L |
| | 酪蛋白 | 1% |
| [0137] | 重组酪蛋白酸钠 | 1% |
| | 吐温-80 | 2% |
| | 纯化水 | 1L |
- [0138] 生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物浓度为0.05 μ g/mL。
- [0139] R4试剂组成成分:
- [0140] 缓冲液选自0.1M碳酸乙烯酯,还原剂选自二硫苏糖醇(DTT)。
- [0141] R5试剂组成成分:
- [0142] 0.5M氢氧化钠。
- [0143] 试剂盒的制备:
- [0144] (1) 试剂R1的制备:
- [0145] 链霉亲和素磁颗粒工艺:取浓度是100mg/mL的链霉亲和素磁颗粒溶液1mL,加入10mL的TBST溶液充分混匀15分钟后,放置于磁分离器上,直至上清无混浊,弃上清,留取磁颗粒。重复清洗3次后采用含50mM MES、0.05%吐温-20、0.05%Proclin300,pH6.5的缓冲液中配成磁珠浓度为0.01%的固相试剂,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

[0146] 根据上述R1试剂的组成成分,将链霉亲和素磁颗粒与其他组分混合,灌封于试剂瓶中,得到R1试剂。

[0147] (2) 试剂R2的制备:

[0148] 化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体标记工艺:将500 μ g 25-羟基维生素D抗体放入离心管中,保证抗体位于离心管底部位置(离心机室温离心30s)后加入碳酸缓冲溶液,充分混匀,混匀后加入5 μ L 2mg/mL三联吡啶钼的DMF溶液,用离心机室温条件下离心30s。将离心管用封口膜密封后放入避光暗盒中,之后将暗盒放入气浴恒温振荡器(23 $^{\circ}$ C),混匀4h。加入0.5mL 30%赖氨酸封闭液,放入气浴恒温振荡器(23 $^{\circ}$ C),中速混匀,封闭时间为2h。将封闭好的抗体上葡聚糖凝胶G250柱纯化,用PB缓冲液洗脱,分部收集。将收集好的抗体溶液放置于2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。使用时将纯化后的25-羟基维生素D抗体浓溶液用50mM MES、0.05%吐温20、0.05%Proclin300, pH6.5的缓冲液稀释至终浓度为0.15 μ g/mL, 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

[0149] 根据上述R2试剂的组成成分,将化学发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体与其他组分混合,灌封于试剂瓶中,得到R2试剂。

[0150] (3) 试剂R3的制备:同实施例1。

[0151] (4) 试剂R4的制备:取适量还原剂DTT,用1M碳酸乙烯酯, pH5.5缓冲液稀释至终浓度为10mM, 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

[0152] (5) 试剂R5的制备:取适量氢氧化钠,用纯化水溶解,终浓度为0.5M, 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存。

[0153] (6) 校准品的制备:同实施例1。

[0154] 采用实施例3制备的试剂盒测定校准品,绘制标准曲线通实施例1类似。

[0155] 对比例1 25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒R2、R3的制备

[0156] (不添加酪蛋白, R1、R4、R5试剂配方及制备方法均同实施例1)

[0157] R2试剂组成成分:

	BISTRIS 缓冲液	400 mmol/L
	NaCl	150 mmol/L
[0158]	吐温-20	0.1%
	纯化水	1L
[0159]	化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体0.15 μ g/mL	
[0160]	化学发光标记物为吖啶酯,抗体与标记物的标记比例是1:3。	
[0161]	R3试剂组成成分:	
	BISTRIS 缓冲液	400 mmol/L
	NaCl	150 mmol/L
[0162]	吐温-20	0.1%
	纯化水	1L
[0163]	生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物浓度为0.05 μ g/mL。	

- [0164] 对比例2 25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒R2、R3的制备
 [0165] (蛋白保护剂采用BSA,R1、R4、R5试剂配方及制备方法均同实施例1)
 [0166] R2试剂组成成分:

BISTRIS 缓冲液 400 mmol/L

- [0167] NaCl 150 mmol/L

BSA 0.5%

吐温-20 0.1%

- [0168] 纯化水 1L

- [0169] 化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体0.15 μ g/mL

- [0170] 化学发光标记物为吖啶酯,抗体与标记物的标记比例是1:3。

- [0171] R3试剂组成成分:

BISTRIS 缓冲液 400 mmol/L

NaCl 150 mmol/L

- [0172] BSA 0.5%

吐温-20 0.1%

纯化水 1L

- [0173] 生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物浓度为0.05 μ g/mL。

- [0174] 实施例4 25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒性能指标评价

- [0175] 1、线性评价:

[0176] 将接近线性范围上限的高值样本按一定比例稀释为至少5种浓度,其中低值浓度样本须接近线性范围的下限。采用实施例1、对比例1、对比例2制备的试剂盒对每一浓度的样本均重复检测3次,计算平均值,将测定浓度的平均值与理论浓度或稀释比例用最小二乘法进行直线拟合,计算线性相关系数r,结果如表1-3所示,三种配方线性相关系数分别为0.9990,0.9981,0.9985。

- [0177] 表1实施例1线性的评价结果

[0178]	样本	理论浓度 (ng/mL)	测定 1	测定 2	测定 3	均值	相关 系数 r
	线性样本 1	2.19	1.46	1.39	1.32	1.39	0.9990
	线性样本 2	4.38	4.02	3.79	4.11	3.97	
	线性样本 3	8.75	8.26	8.96	7.39	8.2	
	线性样本 4	17.50	17.34	18.85	17.68	17.96	
	线性样本 5	35.00	32.72	34.44	32.76	33.31	
	线性样本 6	70.00	73.77	73.91	72.88	73.52	

- [0179] 表2对比例1线性的评价结果

[0180]

样本	理论浓度 (ng/mL)	测定 1	测定 2	测定 3	均值	相关 系数 r
线性样本 1	2.19	1.01	1.15	1.89	1.35	0.9981
线性样本 2	4.38	3.41	3.62	3.56	3.53	
线性样本 3	8.75	7.37	8.77	8.96	8.37	
线性样本 4	17.50	18.17	17.2	18.28	17.88	
线性样本 5	35.00	32	31.46	33.54	32.33	
线性样本 6	70.00	72.55	75.89	74.63	74.36	

[0181] 表3对比例2线性的评价结果

[0182]

样本	理论浓度 (ng/mL)	测定 1	测定 2	测定 3	均值	相关 系数 r
线性样本 1	2.19	1.57	1.93	1.17	1.56	0.9985
线性样本 2	4.38	3.02	3.59	3.51	3.37	
线性样本 3	8.75	7.36	8.14	8.83	8.11	
线性样本 4	17.50	18.8	18.23	18	18.34	
线性样本 5	35.00	34.51	31.44	31.34	32.43	
线性样本 6	70.00	75.58	71.69	70.48	72.58	

[0183] 2、空白限评价：

[0184] 采用实施例1对比例1、对比例2制备的试剂盒对零值校准品进行20次测定相对光单位,取其平均值减去两倍的标准差,带入标准曲线所得即为空白限;结果如表4-6所示,三种配方的空白限分别为0.75ng/mL、0.91ng/mL、0.90ng/mL。

[0185] 表4实施例1空白限的评价结果

[0186]

测试次数	相对光单位 (RLU)	测试次数	相对光单位 (RLU)
1	561131	11	541822
2	568775	12	571593
3	558592	13	561132
4	558545	14	541291
5	562732	15	556791
6	562353	16	554569
7	575567	17	580999
8	613409	18	569995
9	553698	19	558439
10	557988	20	570449
平均值		563993.5	
标准差		15258.2164	
空白限 (ng/mL)		0.75	

[0187] 表5空白限的评价结果(对比例1)

[0188]

测试次数	相对光单位 (RLU)	测试次数	相对光单位 (RLU)
1	561131	11	536404
2	546024	12	571593
3	530662	13	555521
4	541789	14	519639
5	562732	15	540087
6	539859	16	549023
7	569811	17	551949
8	588873	18	564295
9	531550	19	541686
10	535668	20	570449
平均值		550437	
标准差		17304.6587	
空白限 (ng/mL)		0.91	

[0189] 表6空白限的评价结果(对比例2)

[0190]

测试次数	相对光单位 (RLU)	测试次数	相对光单位 (RLU)
1	555520	11	530986
2	551712	12	548729
3	553006	13	533075
4	541789	14	530465
5	562732	15	551223
6	551106	16	526841
7	552544	17	563569
8	601141	18	569995
9	542624	19	530517
10	541248	20	547631
平均值		549323	
标准差		17098.8618	
空白限 (ng/mL)		0.90	

[0191] 3、重复性评价：

[0192] 利用实施例1、对比例1、对比例2制备的试剂盒对重复性低值 (8~20ng/mL) 和重复性高值 (30~50ng/mL) 的两个样本各重复检测10次, 计算10次测量浓度结果的平均值M和标准差SD, 结果如表7-9所示, 三种配方重复性CV均<8%。

[0193] 表7实施例1重复性评价结果

[0194]

测定次数	重复性低值 (ng/mL)	重复性高值 (ng/mL)
Rep1	10.22	48.66
Rep2	10.15	49.31
Rep3	10.47	49.37
Rep4	9.34	47.41
Rep5	10.42	46.54
Rep6	9.93	49.31
Rep7	9.67	46.82
Rep8	10.26	47.91
Rep9	9.98	49.01
Rep10	9.43	47.49
M	9.987	48.183
SD	0.40	1.08
CV	3.96%	2.25%

[0195] 表8对比例1重复性评价结果

[0196]

测定次数	重复性低值 (ng/mL)	重复性高值 (ng/mL)
Rep1	9.8	47.74
Rep2	10.26	48.45

Rep3	9.8	49.43
Rep4	9.05	47.48
Rep5	9.16	47.51
Rep6	9.96	46.35
Rep7	10.21	47.66
Rep8	10.41	48.5
Rep9	9.91	46.51
Rep10	9.16	48
M	9.77	47.76
SD	0.49	0.92
CV	5.02%	1.92%

[0197] 表9对比例2重复性评价结果

[0198]

测定次数	重复性低值 (ng/mL)	重复性高值 (ng/mL)
Rep1	9.85	48.08
Rep2	9.48	48.00
Rep3	9.39	49.83
Rep4	9.27	46.06
Rep5	10.27	46.08
Rep6	9.16	48.40
Rep7	10.41	48.39
Rep8	9.48	48.57
Rep9	10.14	47.89
Rep10	10.42	46.55
M	9.79	47.79
SD	0.49	1.21
CV	5.00%	2.52%

[0199] 4、长期稳定性评价：

[0200] 将实施例1、对比例1、对比例2制备的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒在2℃~8℃条件下贮存,分别对3个月、6个月、9个月、12个月、15个月时的外观、空白限、线性、重复性指标进行评价,结果表10-12所示,缓冲液中添加酪蛋白的试剂(实施例1)不同效期试剂测试空白限、线性、重复性均达到检测要求,说明该试剂具有较好的效期稳定性,便于长期存储。添加BSA的试剂(对比例2)效期9个月时各项指标均达到标准要求,超过12个月后,部分指标出现不合格,说明试剂效期稳定性较差。而试剂中不添加保护剂(对比例1)的试剂在6个月效期时就出现不合格的指标,说明试剂效期稳定性不好,试剂不能进行长期储存。

[0201] 表10实施例1长期稳定性评价

检测指标	检测要求	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	15 个月
[0202] 外观	各组分应齐全、完整,液体无渗漏;包装标签应清晰,无磨损	合格	合格	合格	合格	合格
线性	相关系数 r 应 ≥ 0.9900	0.9994	0.9999	0.9994	1.0000	0.9995
空白限	$< 2.0\text{ng/mL}$	0.289	0.233	0.177	0.229	0.283
重复性低值	$CV \leq 8\%$	3.51%	2.29%	2.31%	2.64%	2.69%
重复性高值		1.35%	1.27%	1.26%	1.29%	1.23%

[0203] 表11对比例1长期稳定性评价

检测指标	检测要求	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	15 个月
[0204] 外观	各组分应齐全、完整,液体无渗漏;包装标签应清晰,无磨损	合格	不合格	不合格	不合格	不合格
线性	相关系数 r 应 ≥ 0.9900	0.9985	0.9826	0.9900	0.9825	0.9802
空白限	$< 2.0\text{ng/mL}$	1.63	2.98	4.69	5.11	11.25
重复性低值	$CV \leq 8\%$	3.85%	4.63%	5.14%	5.25%	4.76%
重复性高值		2.58%	7.45%	6.25%	8.18%	12.11%

[0205] 表12对比例2长期稳定性评价

检测指标	检测要求	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	15 个月
[0206] 外观	各组分应齐全、完整,液体无渗漏;包装标签应清晰,无磨损	合格	合格	合格	不合格	不合格
线性	相关系数 r 应 ≥ 0.9900	0.9985	0.9991	0.9980	0.9972	0.9988
空白限	$< 2.0\text{ng/mL}$	0.316	1.257	1.98	3.75	5.29
重复性低值	$CV \leq 8\%$	2.48%	3.30%	4.21%	5.11%	7.52%
重复性高值		1.11%	1.21%	3.15%	4.25%	6.13%

[0207] 5、热稳定性评价:

[0208] 取实施例1、对比例1、对比例2制备的有效期内试剂盒及罗氏公司25-羟基维生素D检测试剂盒在37℃条件下放置3天、7天、10天,分别置于CM-180全自动化学发光免疫分析仪和罗氏E411仪器内,测试外观空白限、线性、重复性,结果如表13-16所示,缓冲液中添加酪蛋白的试剂(实施例1)与罗氏试剂高温放置后测试空白限、线性、重复性均达到检测要求,说明该试剂与罗氏试剂均具有良好的热稳定性,方便运输。添加BSA的试剂(对比例2)以及不添加保护剂(对比例1)的试剂高温放置后指标检测均出现不合格情况,试剂CV较大,说明该试剂在高温过程中蛋白部分降解,影响测试结果。

[0209] 表13实施例1热稳定性评价

	检测指标	检测要求	高温 3 天	高温 7 天	高温 10 天
[0210]	外观	各组分应齐全、完整， 液体无渗漏；包装标签 应清晰，无磨损	合格	合格	合格
	线性	相关系数 r 应≥0.9900	0.9999	0.9999	0.9991
	空白限	<2.0ng/mL	0.284	0.299	0.313
	重复性低值	CV≤8%	3.19%	2.97%	2.61%
	重复性高值		1.18%	1.21%	0.99%
[0211]	表14对比例1热稳定性评价				
	检测指标	检测要求	高温 3 天	高温 7 天	高温 10 天
[0212]	外观	各组分应齐全、完整， 液体无渗漏；包装标签 应清晰，无磨损	不合格	不合格	不合格
	线性	相关系数 r 应≥0.9900	0.9985	0.9723	0.9631
	空白限	<2.0ng/mL	2.16	4.59	9.05
	重复性低值	CV≤8%	4.21%	7.45%	8.15%
	重复性高值		5.19%	7.52%	9.37%
[0213]	表15对比例2热稳定性评价				
	检测指标	检测要求	高温 3 天	高温 7 天	高温 10 天
[0214]	外观	各组分应齐全、完整， 液体无渗漏；包装标签 应清晰，无磨损	合格	不合格	不合格
	线性	相关系数 r 应≥0.9900	0.9990	0.9985	0.9827
	空白限	<2.0ng/mL	1.48	2.56	4.31
	重复性低值	CV≤8%	2.36%	6.25%	5.85%
	重复性高值		3.19%	5.13%	5.99%
[0215]	表16罗氏试剂热稳定性评价				

[0216]	检测指标	检测要求	高温 3 天	高温 7 天	高温 10 天
	外观	各组分应齐全、完整， 液体无渗漏；包装标签 应清晰，无磨损	合格	合格	合格
	线性	相关系数 r 应 ≥ 0.9900	0.9999	0.9998	0.9995
	空白限	$< 2.0\text{ng/mL}$	0.315	0.352	0.412
	重复性低值	$CV \leq 8\%$	2.14%	1.27%	1.65%
	重复性高值		1.05%	2.58%	0.78%

[0217] 综上，本发明的试剂盒检测灵敏度高、线性范围宽、特异性好，将酪蛋白胶束作为保护剂添加在试剂缓冲液中，提高储存和运输稳定性，与国际知名厂家产品相比，成本更低，适用范围广，实用性更好。

[0218] 以上只通过说明的方式描述了本发明的某些示范性实施例，毋庸置疑，对于本领域的普通技术人员，在不偏离本发明的精神和范围的情况下，可以用各种不同的方式对所描述的实施例进行修正。因此，上述附图和描述在本质上是说明性的，不应理解为对本发明权利要求保护范围的限制。

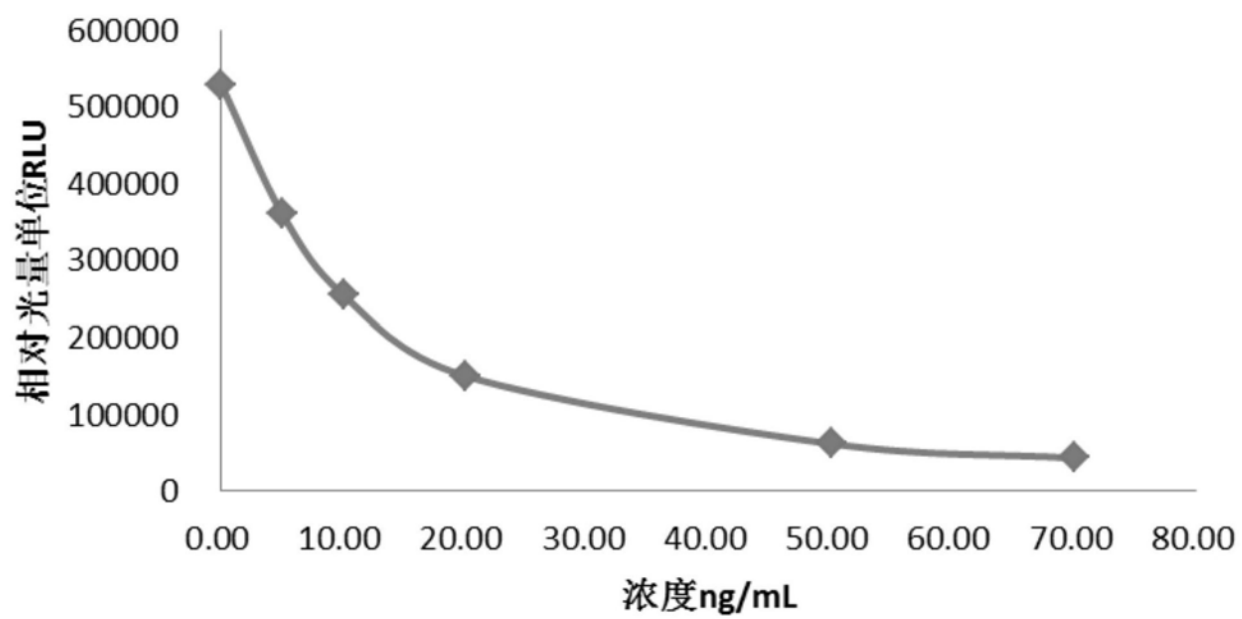


图1

专利名称(译)	一种稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN110702928A	公开(公告)日	2020-01-17
申请号	CN201910911536.1	申请日	2019-09-25
[标]发明人	张丹丹 孟令敏 韩美玉 王凯 高威 孙成艳 何浩会		
发明人	张丹丹 孟令敏 韩美玉 王凯 高威 孙成艳 何浩会		
IPC分类号	G01N33/82 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/82		
代理人(译)	刘微		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种稳定的25-羟基维生素D化学发光免疫检测试剂盒，包括试剂R1、试剂R2、试剂R3、试剂R4和试剂R5；其中：R1为包含链霉亲和素磁颗粒的缓冲液，R2为包含化学发光标记物标记的25-羟基维生素D多克隆抗体和保护剂的缓冲液，R3为包含生物素结合的维生素的小分子抗原衍生物和保护剂的缓冲液，R4和R5为样本预处理试剂，用于解离血清或血浆中以结合蛋白形式存在的25-羟基维生素D。本发明的试剂盒将酪蛋白胶束作为保护剂添加在试剂缓冲液中，用于检测血清或血浆中25-羟基维生素D的含量，有效提高了抗原衍生物的稳定性及测试结果的准确性，解决了现有技术中存在的缺陷问题，便于试剂的储存于运输。

