



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103588872 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 19

(21) 申请号 201210287219. 5

G01N 33/82 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 08. 13

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

(71) 申请人 北京博晖创新光电技术股份有限公司

地址 100195 北京市海淀区北坞村路甲 25
号静芯园 G 座

(72) 发明人 杨奇 崔建华

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞 张庆敏

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 14/77 (2006. 01)

C07K 14/795 (2006. 01)

C07K 1/113 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

一种维生素 D 合成抗原、其制备方法及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种维生素 D 合成抗原及其制备方法,所述维生素 D 合成抗原为维生素 D 与蛋白载体的偶联物,所述维生素 D 为 25- 羟基维生素 D3 或 1, 25- 二羟基维生素 D3,所述蛋白载体为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白中的一种或多种。本发明还提供所述维生素 D 合成抗原在维生素 D 免疫学检测中的应用。本发明进一步提供维生素 D 检测试剂盒,其集成了现有临床维生素 D 检测方法的优点,可适用于所有酶标仪、化学发光仪和时间分辨分析仪,检测时间大大缩短,且灵敏度、准确度、精密度均可满足检测要求。采用本发明的通用性强的免疫吸附检测试剂盒,可实现血清(或血浆)中维生素 D 的批量、快速检测。

1. 一种维生素 D 合成抗原,其特征在于,其为维生素 D 与蛋白载体的偶联物,所述维生素 D 为 25-羟基维生素 D₃ 或 1,25-二羟基维生素 D₃,所述蛋白载体为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白中的一种或多种。

2. 根据权利要求 1 所述的合成抗原,其特征在于,所述维生素 D 与蛋白载体的重量比为 1:16~20。

3. 制备权利要求 1 或 2 所述维生素 D 合成抗原的方法,其特征在于,包括步骤:

1) 将蛋白载体溶于 pH8.5 的缓冲液中,得溶液 A;

2) 将维生素 D 溶于乙醇、二甲基亚砜或吡啶中,得溶液 B;

3) 分别向溶液 A 和 B 中加入活化剂,得到活化的蛋白载体和维生素 D;

4) 以 N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐或 N,N'-二环己基碳二亚胺为偶联剂,将上述活化的蛋白载体和维生素 D 进行偶联;

5) 透析、干燥,即得维生素 D 合成抗原;

其中,步骤 3) 中所述活化剂为含乙二胺和乙二胺二盐酸盐的磷酸氢二钠溶液、4-二甲氨基吡啶-丙酮混合液、戊二醛或甲醛。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于,步骤 1) 中所述的缓冲液为磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或 Tris 缓冲液。

5. 权利要求 1 或 2 所述维生素 D 合成抗原在维生素 D 免疫学检测中的应用。

6. 根据权利要求 5 所述的应用,其特征在于,其是将所述维生素 D 合成抗原与标记物结合作为竞争性抗原,通过与样品中的维生素 D 竞争结合维生素 D 单克隆抗体,从而检测样品中的维生素 D 含量。

7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在于,所述标记物为:

a) 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;

b) 吖啶酯类化合物;或

c) 螯合有 Eu³⁺、Sm³⁺、Tb³⁺ 或 Dy³⁺ 的二乙烯三胺五乙酸、2-[(4-氰基苯基)甲基]-1,4,7,10-四氮环十二烷-1,4,7,10-四乙酸或 4,7-二氯磺基苯-1,10-菲罗啉-2,9-二羧酸。

8. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在于,所述维生素 D 单克隆抗体为 Abcam 公司的维生素 D 单抗产品。

9. 维生素 D 免疫学检测试剂盒,其特征在于,其包括包被维生素 D 单克隆抗体的酶标板、权利要求 1 或 2 所述的维生素 D 合成抗原经标记物标记后得到的竞争性抗原;

其中,所述维生素 D 单克隆抗体为 Abcam 公司的维生素 D 单抗产品;所述标记物为:a) 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;b) 鲁米诺或吖啶酯类化合物;或 c) 螯合有 Eu³⁺、Sm³⁺、Tb³⁺ 或 Dy³⁺ 的二乙烯三胺五乙酸、2-[(4-氰基苯基)甲基]-1,4,7,10-四氮环十二烷-1,4,7,10-四乙酸或 4,7-二氯磺基苯-1,10-菲罗啉-2,9-二羧酸。

10. 根据权利要求 9 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括洗涤液、维生素 D 标准品、底物显色液、反应终止液中的一种或多种。

一种维生素 D 合成抗原、其制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,具体地说,涉及一种维生素 D 合成抗原、其制备方法及应用。

背景技术

[0002] 维生素 D 是体内一类非常重要的维生素,在体内的主要作用是调节钙磷的代谢,同时和机体的健康状态也有很大的关系。

[0003] 维生素 D 的主要循环形式是 25-羟基维生素 D(包括 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃),它是最重要的维生素 D 新陈代谢产物,应用广泛。当体内缺乏维生素 D 时会引起一系列疾病。其中,1,25-二羟基维生素 D₃ 的生物学活性最大,1,25-二羟基维生素 D₃ 可以促进钙的吸收,并具有其它重要的生物学功能。

[0004] 由于维生素 D 的重要性,因此对于体内维生素 D 的含量检测也越来越受到人们的关注。

[0005] 由于维生素 D 的特殊分子结构,长时间以来都没有太好的检测方法,一般来说维生素 D 的检测花费时间较长,需要特殊的设备等,随着分子生物学技术的发展,目前用于测定 25-羟基维生素 D₃ 的方法主要有放射竞争性蛋白结合法(CPB),放射免疫法(RIA),高效液相色谱法(HPLC),罗氏的电化学发光法和英国 IDS 的酶联免疫法等。分别简述如下:

[0006] (1)放射竞争性蛋白结合法

[0007] Wei S, Tanaka H, Kubo T 等, A multiple assay for vitamin D metabolites without high-performance liquid chromatography. Anal Biochem, 1994, 222(2):359-365 文献中公开了一种无需 HPLC 纯化,仅 0.5ml 血清即可测定血清 25(OH)D₃ 含量的方法。主要步骤包括用乙腈提取血清,在 C-18/OH 柱和硅胶 Sep-Pak 柱上分离和纯化,最后用维生素 D 结合蛋白法定量测定 25(OH)D₃,该方法有简便快速,样本用量少、重复性好、可同时对维生素 D 的三种主要代谢产物进行定量等优点,但回收率较低。

[0008] (2)放射免疫法

[0009] 《中华妇产科杂志》1993 年第 3 期中报道了用放射免疫法测定血清中的 25-(OH)D₃,该方法应用放射性元素标记示踪物,检测结果与放射性受体测定法高度相关,具有方法简便,灵敏度高,特异性好等优点,但其缺点在于标记的同位素不稳定,操作时对实验室要求很高,且产生的辐射对操作人员健康有不利影响。

[0010] (3)高效液相色谱法

[0011] 即国标和药典中对维生素 D 的检测方法。色谱分析法由于复杂的仪器设备和繁琐的过程,不适合临床大量样本筛查。

[0012] (4)电化学发光法

[0013] 目前罗氏公司采用的是电化学发光法测定血清中的 25-(OH)D₃,其原理是用电化学发光剂三联吡啶钌标记抗体,通过抗原-抗体反应和磁珠分离技术,根据三联吡啶钌在

电极上发出的光强度对待测定的抗原或抗体进行定量或定性。但其技术通用性差,需要用专用的设备,且设备成本较高。

[0014] (5) 酶联免疫检测法

[0015] 应用 ELISA 法定量测定人血清、血浆、细胞培养物上清或其它相关液体中的 25 (OH) D₃ 含量。基本原理是应用竞争酶联免疫分析法测定标本中 25 (OH) D₃ 水平。用多克隆抗体包被微孔板,制成固相抗体,向包被多抗的微孔中依次加入 25 (OH) D₃ (样品)、生物素化的人 25 (OH) D₃ 抗原、HRP 标记的亲合素,经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 25 (OH) D₃ 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度(OD 值),计算样品浓度。此类试剂盒的缺点是用生物素标记 25-羟基维生素 D₃,用 HRP 标记亲合素,且固相抗体选用多克隆抗体检测,特异性不强,且检测时间过长。

发明内容

[0016] 本发明的目的是提供一种新型的维生素 D 合成抗原、其制备方法及应用。

[0017] 为了实现本发明目的,本发明的一种维生素 D 合成抗原,其为维生素 D 与蛋白载体的偶联物,所述维生素 D 为 25-羟基维生素 D₃ 或 1, 25-二羟基维生素 D₃,所述蛋白载体为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、人血清白蛋白中的一种或多种。其中,所述维生素 D 与蛋白载体的重量比为 1:16~20。

[0018] 本发明还提供制备上述维生素 D 合成抗原的方法,包括以下步骤:1) 将载体蛋白溶于 pH8.5 的缓冲液中,得溶液 A;2) 将维生素 D 溶于乙醇、二甲基亚砜或吡啶等试剂中,得溶液 B;3) 分别向溶液 A 和 B 中加入活化剂,得到活化的蛋白载体和维生素 D;4) 以 N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐或 N,N'-二环己基碳二亚胺等为偶联剂,将上述活化的蛋白载体和维生素 D 进行偶联;5) 透析、干燥,即得维生素 D 合成抗原。

[0019] 其中,步骤 1) 中所述的缓冲液为磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或 Tris 缓冲液。

[0020] 步骤 3) 中所述活化剂为含乙二胺和乙二胺二盐酸盐的磷酸氢二钠溶液、4-二甲氨基吡啶-丙酮混合液、戊二醛或甲醛等。活化剂优选为含乙二胺和乙二胺二盐酸盐的 0.05M 磷酸氢二钠溶液 pH10.4,其中乙二胺浓度为 10%(v/v),乙二胺二盐酸盐浓度为 20mg/ml。更优选活化剂为质量比 21:80 的 4-二甲氨基吡啶-丙酮混合液。

[0021] 本发明还提供上述维生素 D 合成抗原在维生素 D 免疫学检测中的应用,其是将所述维生素 D 合成抗原与标记物结合作为竞争性抗原,通过与样品中的维生素 D 竞争结合维生素 D 单克隆抗体,从而检测样品中的维生素 D 含量。

[0022] 其中,所述标记物为:

[0023] a) 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;

[0024] b) 吖啶酯类化合物;或

[0025] c) 螯合有 Eu³⁺、Sm³⁺、Tb³⁺ 或 Dy³⁺ 的二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、2-[(4-氰基苯基)甲基]-1,4,7,10-四氮环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)或 4,7-二氯磺基苯-1,10-菲罗啉-2,9-二羧酸(BCPDA)等双功能螯合剂。

[0026] 所述维生素 D 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

[0027] 本发明进一步提供维生素 D 免疫学检测试剂盒,其包括包被维生素 D 单克隆抗体的酶标板、上述维生素 D 合成抗原经标记物标记后得到的竞争性抗原。

[0028] 其中,所述维生素 D 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

[0029] 所述标记物为:

[0030] a) 辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;

[0031] b) 吖啶酯类化合物;或

[0032] c) 螯合有 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 或 Dy^{3+} 的二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、2-[(4-氰基苯基)甲基]-1,4,7,10-四氮环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)或 4,7-二氯磺基苯-1,10-菲罗啉-2,9-二羧酸(BCPDA)等双功能螯合剂。

[0033] 优选前述检测试剂盒中还包括洗涤液、维生素 D 标准品、底物显色液、反应终止液等中的一种或多种。

[0034] 本发明首次提供维生素 D 合成抗原及其制备方法,将小分子的维生素 D 直接连接于载体蛋白上,并通过在蛋白载体上连接免疫检验用的示踪物,例如辣根过氧化物酶(或碱性磷酸酶)、荧光素(如镧系元素螯合物)、化学发光剂(鲁米诺或吖啶酯)等,因此,可适用于大多数免疫学检测方法。

[0035] 本发明提供的维生素 D 检测试剂盒,其集成了现有临床维生素 D 检测方法的优点,可适用于所有酶标仪、化学发光仪和时间分辨分析仪,实现了一步检测法,与两步法相比,检测时间大大缩短,且灵敏度、准确度、精密度均可满足检测要求。采用本发明的通用性强的免疫吸附检测试剂盒,可实现血清(或血浆)中维生素 D 的批量、快速检测。

具体实施方式

[0036] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0037] 实施例 1 25-羟基维生素 D3 抗原的合成及酶联免疫试剂盒的制备

[0038] 1.1 25-羟基维生素 D3 抗原的合成

[0039] A、将 100mg 牛血清白蛋白(BSA)溶于 10ml pH8.5 0.05M 的磷酸盐缓冲液中;

[0040] B、将 5mg 25-羟基维生素 D3 溶于 0.5ml 乙醇中,再加入二琥珀酰亚胺基碳酸酯 108mg (预先溶于 400 μ l 二甲基甲酰胺中),室温下将所述混合物避光搅拌过夜(一般为 16~22h);

[0041] C、向溶解的牛血清白蛋白液中加入 2ml 含乙二胺和乙二胺二盐酸盐的 0.05M pH10.4 的磷酸氢二钠溶液(磷酸氢二钠缓冲液中乙二胺浓度为 10v/v%,乙二胺二盐酸盐浓度为 20mg/ml),在室温下反应 3~4 小时;

[0042] D、反应完成后向 C 所得溶液中加入 37% 甲醛溶液 1ml,室温下避光搅拌均匀;

[0043] E、将 B 所得溶液滴加至 D 的溶液中,室温下避光搅拌过夜;

[0044] F、将终产物用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液透析 16 小时,每 4 小时更换一次透析液。

[0045] 1.2 用辣根过氧化物酶(HRP)标记合成抗原

[0046] G、称取 5mg HRP 溶解于 1ml 蒸馏水中;

[0047] H、向上述溶液中加入 0.2ml 新配制的 0.1M NaIO_4 溶液,室温下避光搅拌 20 分钟;

[0048] I、将上述溶液装入透析袋中,用 1mM pH4.4 的醋酸钠缓冲液透析,4℃过夜;

[0049] J、向透析后的溶液中加入 20 μ l 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液,使上述醛化 HRP 的 pH 值升高到 9.0~9.5,然后立即加入 10mg 25-羟基维生素 D3 合成抗原(预先溶于 1ml 0.01M 碳酸盐缓冲液中),室温避光轻轻搅拌 2 小时;

[0050] K、向其中加入 0.1ml 新配制的 4mg/ml NaBH_4 溶液,混匀,4℃放置 2 小时;

[0051] L、将上述溶液装入透析袋中,用 0.15M pH7.4 PBS 液透析,4℃过夜;

[0052] M、将透析后的溶液转移至合适的容器内,搅拌下逐滴加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4℃放置 1 小时;

[0053] N、3000rpm 离心 30 分钟,弃上清;沉淀物用半饱和硫酸铵溶液洗二次,最后将沉淀物溶于少量 0.15M pH7.4 的 PBS 液中;

[0054] O、将上述溶液装入透析袋中,用 0.15M pH7.4 的磷酸盐缓冲液透析,去除铵离子后,10,000rpm 离心 30 分钟去除沉淀,上清液即为酶结合物,分装后,-20℃冰冻保存。

[0055] 1.325-羟基维生素 D3 的酶联免疫试剂盒的制备

[0056] 在 96 孔板上包被 25-羟基维生素 D3 的单克隆抗体(购自英国 Abcam 公司),以上述得到的标记抗原作为竞争性抗原,配制酶工作液,制备定标血清中值质控血清和高值质控血清(新生牛血清含适量 25-羟基维生素 D3),配制底物液 A (含 0.1% 过氧化氢、0.1M 醋酸钠和 10mM 柠檬酸)、底物液 B (含 0.05% 四甲基联苯胺、0.2% 柠檬酸和 10% 丙三醇)、样本稀释液(10mmol/L 磷酸盐缓冲液)、终止液(2M 硫酸)和浓缩洗涤液(含 5%Tween20 和 0.2M 磷酸盐缓冲液),即得 25-羟基维生素 D3 检测试剂盒(竞争法酶联免疫试剂盒)。

[0057] 实施例 2 25-羟基维生素 D3 抗原的合成及化学发光免疫试剂盒的制备

[0058] 1.1 25-羟基维生素 D3 抗原的合成

[0059] A、将 100mg 卵清蛋白溶于 8ml pH8.5 0.05M 的硼酸盐缓冲液中;

[0060] B、将 25-羟基维生素 D35mg 溶于 0.5ml 无水吡啶中;

[0061] C、向溶解的卵清蛋白溶液中加入 200 μ l 4-二甲氨基吡啶(42mg)和丙酮(200 μ l)混合液,室温下避光搅拌过夜;

[0062] D、向 B 的溶液中加入二琥珀酰亚胺基碳酸酯 108mg(预先溶于 400 μ l 二甲基甲酰胺),室温下将所述混合物避光搅拌过夜;

[0063] E、将 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 10mg 溶于 1ml pH8.5 0.05M 的硼酸盐缓冲液中,然后滴加至 D 和 C 的混合液中,室温下避光搅拌过夜;

[0064] F、将终产物用 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液透析 16 小时,每 4 小时更换一次透析液。

[0065] 1.2 用吡啶酯标记合成抗原

[0066] G、取 25-羟基维生素 D3 合成抗原 1mg 溶于 800 μ l 磷酸盐缓冲液(0.1mol/L, pH8.0)中;

[0067] H、取吡啶酯 20 μ l 溶于 180 μ l DMF 中;

[0068] I、取吡啶酯溶液 160 μ l 分 4 次加入抗原溶液中,每次加入后摇匀,室温避光反应 20min;

[0069] J、反应结束后加入赖氨酸(50mg/ml) 400 μ l,放置 15min 以终止反应;

[0070] K、用磷酸盐缓冲液(10mmol/L, pH6.3) 4℃避光透析 24 小时,期间换液 6 次;

[0071] L、取葡聚糖凝胶 G-25 作为层析柱填料纯化,柱(0.8cm×34cm)预先用 PBS (10mmol/L, pH6.3) 平衡,上样后用同一缓冲液洗脱,分布收集,测量收集管发光强度,高峰

管合并 4℃保存备用。

[0072] 1.3 25-羟基维生素 D3 的化学发光免疫试剂盒的制备

[0073] 在 96 孔板上包被 25-羟基维生素 D3 的单克隆抗体(购自英国 Abcam 公司),以上述得到的标记抗原作为竞争性抗原制备标记物溶液,配制样本稀释液(10mmol/L 磷酸盐缓冲液)、底物液 A (含 0.1M 硝酸和 0.1M 过氧化氢)、底物液 B (含 0.2M 氢氧化钠和 2%TritonX-100)、浓缩洗液(含 5%Tween20 和 0.2M 磷酸盐缓冲液)、定标血清、中值质控血清和高值质控血清(新生牛血清含适量 25-羟基维生素 D3),即得 25-羟基维生素 D3 检测试剂盒(竞争法化学发光免疫试剂盒)。

[0074] 实施例 3 1, 25-二羟基维生素 D3 抗原的合成及时间分辨免疫试剂盒的制备

[0075] 1.1 1, 25-二羟基维生素 D3 抗原的合成

[0076] A、将 80mg 血蓝蛋白溶于 5ml pH8.50.05M 的 Tris-盐酸缓冲液中;

[0077] B、将 1, 25-二羟基维生素 D35mg 溶于 0.6ml 二甲基亚砷中溶解;将 3.5mg 赖氨酸及 3mg 1-羟基苯并三氮唑溶于 0.25ml 二甲基乙酰胺中,加入 16 μ l N,N'-二环己基碳二亚胺,室温下摇床反应 1 小时,再加入 1.5mg 4-二甲氨基吡啶,将混合液加入 1, 25-二羟基维生素 D3 的二甲基亚砷溶液中,室温避光搅拌反应 5 小时,产物真空干燥;

[0078] C、向溶解的血蓝蛋白溶液中逐滴加入 2ml 戊二醛,充分混匀;

[0079] D、将 B 中得到的产物溶于 0.5ml 二甲基亚砷,并向其中滴加血蓝蛋白溶液,37℃恒温摇床反应 2h;

[0080] E、将终产物用 0.015M pH7.4 磷酸盐缓冲液 4℃透析 24 小时,每 4 小时更换一次透析液。

[0081] 1.2 用螯合有稀土离子的双功能螯合剂标记 1, 25-二羟基维生素 D3 合成抗原

[0082] F、用 Tris-HCl 缓冲液(0.05M, pH7.8)溶解 EuCl_3 (或任一种稀土离子化合物,如 Sm^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Dy^{3+}),使其浓度为 10^{-6}mol/L ;

[0083] G、用上述溶液稀释螯合剂二乙烯三胺五乙酸(DTPA),使稀土离子和螯合剂的摩尔比为 2:1;

[0084] H、将上述溶液置于 37℃恒温水浴中加热反应 2 小时,制备双功能螯合标记试剂;

[0085] I、冷冻干燥上述螯合产物;

[0086] J、将上述冷冻干燥螯合物 1mg 溶于 50 μ l 二甲基甲酰胺(DMF);

[0087] K、将 1, 25-二羟基维生素 D3 合成抗原 1mg 溶于 500 μ l pH9.1 0.05M 的碳酸盐缓冲液中;

[0088] L、将溶解的螯合物分成 4 份,每 2 分钟 1 份加入溶解的抗原溶液中,室温避光搅拌反应 30 分钟;

[0089] M、取葡聚糖凝胶 G-50 作为层析填料,装柱后用水进行压柱流速控制在 2~3ml/min,柱子压好后,用 0.1mmol/LNaOH 对柱子进行处理,流速控制在 2~3ml/min,2 个柱体积即可。然后用水洗平,用柱平衡液对纯化柱进行平衡,大约 1h,柱平衡液为 0.1% 高纯度 BSA 水溶液,用 pH8.0 的 0.05M NH_4HCO_3 为洗脱液,洗脱液也可以是 pH7.8 的 0.05MTris-HCl (含 0.9%NaCl),洗脱流速为 1ml/min,分离终产物。收集蛋白浓度较高的几管合并,加入等倍甘油 -20℃冻存。

[0090] 1.31, 25-二羟基维生素 D3 时间分辨免疫试剂盒的制备

[0091] 在 96 孔板上包被 1, 25-二羟基维生素 D3 的单克隆抗体(购自英国 Abcam 公司), 以上述得到的标记抗原作为竞争性抗原制备标记物溶液, 制备定标血清、中值质控血清和高值质控血清(新生牛血清含适量 1, 25-二羟基维生素 D3), 配制实验缓冲液(含 1% 牛血清白蛋白、含 0.02% 乙二胺四乙酸二钠的 Tris-HCl 缓冲液)、增强液(含 2% TritonX-100、6% 冰醋酸和 0.005% β -NTA)和浓缩洗液(含 5% Tween20 和 0.2M Tris-HCl 缓冲液), 即得 1, 25-二羟基维生素 D3 检测试剂盒(竞争法时间分辨免疫试剂盒)。

[0092] 实施例 4 25-羟基维生素 D3 检测试剂盒的应用

[0093] 操作步骤如下:

[0094] A、取实施例 1 中制备的 25-羟基维生素 D3 检测试剂盒, 向相应的酶标板微孔中加入 50 μ L 稀释的定标血清、质控血清或样本, 再加入 50 μ L 的酶工作液。贴上封口胶, 于 37°C 条件下孵育 1 小时。

[0095] B、用工作洗涤液洗板 5 次; 向每孔加入 300 μ L 工作洗涤液, 在进行下一步操作前, 将酶标板倒置于吸水纸上, 用力拍打以除去残留的工作洗涤液。

[0096] C、向每孔加入 50 μ L 的底物液 A 和 50 μ L 的底物液 B, 贴上封口胶, 于 37°C 下孵育, 恒温培养箱或恒温鼓风干燥箱中反应 15 分钟。

[0097] D、向每孔加入 50 μ L 终止液。在加入终止液后立即于 450nm、630nm 波长处读取吸光度。

[0098] E、绘制标准曲线: 以 OD 值为纵坐标, 25-OH-D3 浓度为横坐标, 进行指数曲线拟合。根据标准曲线和每个样本检测的 OD 值, 在标准曲线上找到对应的 25-OH-D3 浓度值(μ g/L 或 nmol/L)。

[0099] 试剂盒性能分析:

[0100] (1) 25-羟基维生素 D3 检测试剂盒与高效液相色谱法测定结果的比较

[0101] 选择代表较大 25-羟基维生素 D3 范围(0-100 μ g/L)的 10 个样品, 分别采用上述两种方法进行检测, 在比较数据的基础上进行相关分析: 相关系数(r) ≥ 0.90 , 偏差 $\leq 15\%$ 。

[0102] (2) 灵敏度检测

[0103] 对样本进行浓度梯度稀释, 以稀释液作为检测样本, 平行测定 10 次, 检测结果的平均吸光度减去两倍标准偏差 SD 值所对应的浓度, 结果不高于 5 μ g/L。

[0104] (3) 批内精密度检测

[0105] 用中值质控血清, 平行测定 10 次, CV 值 $\leq 10\%$ 。

[0106] (4) 线性范围

[0107] 在试剂盒分析范围(5-100 μ g/L)内, 线性相关系数(r) ≥ 0.990 。

[0108] (5) 特异性分析

[0109] 样品中维生素 D3 浓度 $\leq 100 \mu$ g/L 时, 对检测结果没有影响, 即与未加入维生素 D3 的同一份样本检测结果相比, 其结果偏差 $\leq 10\%$ 。

[0110] 实施例 5 25-羟基维生素 D3 检测试剂盒的应用

[0111] 操作步骤如下:

[0112] A、取实施例 2 中制备的 25-羟基维生素 D3 检测试剂盒, 向相应的包被板微孔中加入 50 μ L 已稀释好的定标血清、质控血清或样本, 再加入 50 μ L 的标记物工作液。贴上封口胶, 于 37°C 条件下孵育 1 小时。

[0113] B、用工作洗涤液洗板 5 次；向每孔加入 300 μ L 工作洗涤液，在进行下一步操作前，将酶标板倒置于吸水纸上，用力拍打以除去残留的工作洗涤液。

[0114] C、向每孔加入 50 μ L 的底物液 A 和 50 μ L 的底物液 B。

[0115] D、加入底物液后立即于化学发光免疫分析仪上读取结果。

[0116] E、绘制标准曲线：以光强度值为纵坐标，25-OH-D3 浓度为横坐标，进行指数曲线拟合。根据标准曲线和每个样本检测的光强度值，在标准曲线上找到对应的 25-OH-D3 浓度值（ μ g/L 或 nmol/L）。试剂盒性能分析：

[0117] （1）25- 羟基维生素 D3 检测试剂盒与高效液相色谱法的测定结果的比较

[0118] 选择代表较大 25- 羟基维生素 D3 范围（0-100 μ g/L）的 10 个样品，分别采用上述两种方法进行检测，在比较数据的基础上进行相关分析：相关系数（ r ） ≥ 0.90 ，偏差 $\leq 15\%$ 。

[0119] （2）灵敏度检测

[0120] 对样本进行浓度梯度稀释，以稀释液作为检测样本，平行测定 10 次，检测结果的平均吸光度减去两倍标准偏差 SD 值所对应的浓度，结果不高于 5 μ g/L。

[0121] （3）批内精密度检测

[0122] 用中值质控血清，平行测定 10 次，CV 值 $\leq 10\%$ 。

[0123] （4）线性范围

[0124] 在试剂盒分析范围（5-100 μ g/L）内，线性相关系数（ r ） ≥ 0.990 。

[0125] （5）特异性分析

[0126] 样品中维生素 D3 浓度 $\leq 100 \mu$ g/L 时，对检测结果没有影响，即与未加入维生素 D3 的同一份样本检测结果相比，其结果偏差 $\leq 10\%$ 。

[0127] 实施例 6 1, 25- 羟基维生素 D3 检测试剂盒的应用

[0128] 操作步骤如下：

[0129] A、取实施例 3 中制备的 1, 25- 羟基维生素 D3 检测试剂盒，向相应的包被板微孔中加入 50 μ L 已稀释好的定标血清、质控血清或样本，再加入 50 μ L 的钨标记物工作液。贴上封口胶，振荡器缓慢震荡 5 分钟，于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 1 小时。

[0130] B、用工作洗涤液洗板 5 次；向每孔加入 300 μ L 工作洗涤液，在进行下一步操作前，将酶标板倒置于吸水纸上，用力拍打以除去残留的工作洗涤液。

[0131] C、向每孔加入 100 μ L 的增强液，于振荡器上缓慢震荡 5 分钟。

[0132] D、用时间分辨免疫荧光分析仪检测。

[0133] E、绘制标准曲线：以荧光值为纵坐标，1, 25- (OH)₂-D3 浓度为横坐标，进行指数曲线拟合。根据标准曲线和每个样本检测的荧光值，在标准曲线上找到对应的 1, 25- (OH)₂-D3 浓度值（ng/L 或 pmol/L）。试剂盒性能分析：

[0134] （1）1, 25- 羟基维生素 D3 检测试剂盒与高效液相色谱法的测定结果的比较

[0135] 选择代表较大 1, 25- 二羟基维生素 D3 范围（0-240ng/L）的 10 个样品通过两种方法检测，在比较数据的基础上进行相关分析：相关系数（ r ） ≥ 0.90 ，偏差 $\leq 15\%$ 。

[0136] （2）灵敏度检测

[0137] 对样本进行浓度梯度稀释，以稀释液作为检测样本，平行测定 10 次，检测结果的平均吸光度减去两倍标准偏差 SD 值所对应的浓度，结果不高于 3ng/L。

[0138] （3）批内精密度检测

[0139] 用中值质控血清,平行测定 10 次, CV 值 $\leq 10\%$ 。

[0140] (4) 线性范围

[0141] 在试剂盒分析范围(3-240ng/L)内,线性相关系数(r) ≥ 0.990 。

[0142] (5) 特异性分析

[0143] 样品中维生素 D3 浓度 $\leq 10 \mu\text{g/L}$ 时,对检测结果没有影响,即与未加入维生素 D3 的同一份样本检测结果相比,其结果偏差 $\leq 10\%$ 。

[0144] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。