



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107656076 A

(43)申请公布日 2018.02.02

(21)申请号 201710683881.5

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2017.08.11

(71)申请人 普菲特益斯生物科技(北京)有限公司

地址 101111 北京市大兴区亦庄经济技术开发区科创六街88号生物医药园E6座

(72)发明人 魏照征

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 杨立 王灏增

(51)Int.Cl.

G01N 33/82(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法,包括:S1,荧光微球标记物制备;S2,结合垫的制备;S3,硝酸纤维素膜的制备;S4,样品垫的制备;S5,检测卡组装。本发明通过在荧光微球上标记羊抗鼠IgG,然后再结合鼠抗25羟基维生素D单克隆抗体,相比在荧光微球上直接标记鼠抗25羟基维生素D单克隆抗体灵敏度更高,生产成本更低;本发明质控线上包被兔抗鸡IgY,相比哺乳动物IgG具有更低的交叉反应性和更高的特异性,使检测非特异性结合得到改善;本发明制备的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂灵敏度达到1ng/ml,并且同时具备生产成本低、特异性强,适合基层医疗机构使用的优点。

1. 一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法,其特征在于,包括:

S1, 荧光微球标记物制备:将鸡IgY加入荧光微球中混合反应,形成荧光微球和鸡IgY偶联的标记物;在荧光微球中加入羊抗鼠IgG混合反应后,再加入鼠抗25羟基维生素D,形成荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联的标记物;

S2, 结合垫的制备:将荧光微球和鸡IgY偶联的标记物与荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联的标记物混合得到混合荧光胶乳微粒,混合荧光胶乳微粒用微球稀释液稀释后喷涂在玻璃纤维上,干燥后形成结合垫;

S3, 硝酸纤维素膜的制备:

将25羟基维生素D-BSA蛋白复合物用KPBS缓冲液稀释并在在硝酸纤维素膜上划线,干燥,制得检测线;将兔抗鸡IgY用KPBS缓冲液稀释并在硝酸纤维素膜上划线,干燥,制得质控线;

S4, 样品垫的制备:将玻璃纤维浸泡入样品垫处理液中,待玻璃纤维完全浸透,取出后干燥;

S5, 检测卡组装:将结合垫、吸水纸、样品垫、硝酸纤维素膜和底板分别裁切至预设大小,在底板上依次黏贴裁切好的硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫和样品垫,得到检测卡。

2. 根据权利要求1所述的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法,其特征在于,所述步骤S1中,所述荧光微球为经EDC/NHS活化的荧光微球;所述荧光微球与鸡IgY的质量比为10:1~2;所述荧光微球与羊抗鼠IgG的质量比为10:1~2;所述荧光微球与鼠抗25羟基维生素D的质量比为20:0.5~1。

3. 根据权利要求1所述的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法,其特征在于,所述步骤S2中,荧光微球和鸡IgY偶联的标记物与荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联的标记物的质量比为1:3~5;所述微球稀释液的稀释倍数为80~100倍;所述干燥温度为37℃,干燥时间为3小时。

4. 根据权利要求1所述的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法,其特征在于,所述步骤S3中,稀释后的25羟基维生素D-BSA蛋白复合物的浓度为0.5mg/ml,检测线的溶液用量为1.0u1/cm;稀释后的兔抗鸡IgY溶液的浓度为1.0mg/ml,质控线的溶液量为1.0u1/cm。

5. 根据权利要求4所述的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法,其特征在于,所述步骤S3中,所述KPBS缓冲液的浓度为15mmol/L;干燥温度:37℃,干燥时间:3小时。

6. 根据权利要求1所述的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法,其特征在于,所述步骤S4中,干燥温度为37℃,干燥时间为3小时以上。

7. 根据权利要求1-6任一所述的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法,其特征在于,所述检测试剂还包括检测缓冲液,所述检测缓冲液由以下方法制备:将磷酸氢二钾、二水合磷酸二氢钠、氯化钠、牛血清白蛋白和表面活性剂S9混合得到含有牛血清白蛋白和表面活性剂的缓冲液。

8. 一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂,其特征在于,包括检测卡和与检测卡配套使用的检测缓冲液,

所述检测卡包括底板和依次黏贴在底板上的硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫和样品垫；所述结合垫上喷涂有荧光微球和鸡IgY偶联标记物与荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联的标记物混合得到混合荧光胶乳微粒；所述硝酸纤维素膜上设有含有25羟基维生素D-BSA蛋白复合物的检测线和含有兔抗鸡IgY的质控线；

所述检测缓冲液为包含牛血清白蛋白和表面活性剂的缓冲液。

9. 根据权利要求8所述的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂,其特征在於,还包括与检测卡一一对应的ID卡,所述ID卡用于读取产品校准品的信号值、浓度、批号及单位信息。

10. 根据权利要求8所述的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂,其特征在於,所述检测缓冲液中的表面活性剂包括:磷酸氢二钾、二水合磷酸二氢钠、氯化钠和表面活性剂S9。

## 一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体地说,涉及一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 维生素D为一类脂溶性类固醇衍生物,分为维生素D<sub>2</sub>和维生素D<sub>3</sub>,在人体中,维生素D主要来源于阳光照射皮肤后合成,少部分从食物中摄入。合成的维生素D通过与维生素D结合蛋白结合而运输到肝脏,而摄入的维生素D通过与脂蛋白结合转运到肝脏。在肝脏内转变成25-羟基维生素D。

[0003] 维生素D缺乏在世界范围内普遍存在,影响着30%~50%的人口。25-羟基维生素D是衡量维生素D营养状态的最佳指标。

[0004] 目前在国内市场上,已有的25-羟基维生素D检测方法主要有酶联免疫法和化学发光法,酶联免疫法和化学发光法检测25-羟基维生素D虽然线性范围宽,灵敏度高,但反应时间长,检测成本高,对检测人员要求高,这些原因导致其在基层医院难以推广。普通荧光免疫层析法克服了以上困难,仍存在灵敏度低,成本高,不能满足准确检测的要求,因此,开发一种生产成本低、灵敏度高、特异性强,适合基层医疗机构使用的检测试剂盒具有重要意义。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足,提供一种生产成本低、灵敏度高、特异性强,适合基层医疗机构使用的检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂及其制备方法。

[0006] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:

[0007] 本发明提供一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法,包括:

[0008] S1,荧光微球标记物制备:将鸡IgY加入荧光微球中混合反应,形成荧光微球和鸡IgY偶联的标记物;在荧光微球中加入羊抗鼠IgG混合反应后,再加入鼠抗25羟基维生素D,形成荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联的标记物;

[0009] S2,结合垫的制备:将荧光微球和鸡IgY偶联的标记物与荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联的标记物混合得到混合荧光胶乳微粒,混合荧光胶乳微粒用微球稀释液稀释后喷涂在玻璃纤维上,干燥后形成结合垫;

[0010] S3,硝酸纤维素膜的制备:

[0011] 将25羟基维生素D-BSA蛋白复合物用KPBS缓冲液稀释并在在硝酸纤维素膜上划线,干燥,制得检测线;将兔抗鸡IgY用KPBS缓冲液稀释并在硝酸纤维素膜上划线,干燥,制得质控线;

[0012] S4, 样品垫的制备: 将玻璃纤维浸泡入样品垫处理液中, 待玻璃纤维完全浸透, 取出后干燥;

[0013] S5, 检测卡组装: 将结合垫、吸水纸、样品垫、硝酸纤维素膜和底板分别裁切至预设大小, 撕掉底板上部纸膜, 在底板上依次黏贴裁切好的硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫和样品垫, 得到检测卡。

[0014] 进一步, 所述步骤S1中, 所述荧光微球为经EDC/NHS活化的荧光微球; 所述荧光微球与鸡IgY的质量比为10:1~2; 所述荧光微球与羊抗鼠IgG的质量比为10:1~2; 所述荧光微球与鼠抗25羟基维生素D的质量比为20:0.5~1。

[0015] 进一步, 所述步骤S2中, 荧光微球和鸡IgY偶联的标记物与荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联的标记物的质量比为1:3~5; 所述稀释液的稀释倍数为80~100倍; 所述干燥温度为37℃, 干燥时间为3 小时。

[0016] 进一步, 所述步骤S3中, 所述KPBS缓冲液的浓度为15mmol/L; 稀释后的25羟基维生素D-BSA蛋白复合物的浓度为0.5mg/ml, 检测线的溶液用量为1.0ul/cm; 稀释后的兔抗鸡IgY溶液的浓度为1.0mg/ml, 质控线的溶液量为1.0ul/cm。

[0017] 进一步, 所述步骤S3中, 所述KPBS缓冲液的浓度为15mmol/L; 干燥温度: 37℃, 干燥时间: 3小时。

[0018] 进一步, 所述步骤S4中, 干燥温度为37℃, 干燥时间为3小时以上。

[0019] 进一步, 所述检测试剂还包括检测缓冲液, 所述检测缓冲液由以下方法的制备: 将磷酸氢二钾、二水合磷酸二氢钠、氯化钠、牛血清白蛋白和表面活性剂S9的溶液混合得到含有牛血清白蛋白和表面活性剂的缓冲液。

[0020] 一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂, 包括检测卡和与检测卡配套使用的检测缓冲液,

[0021] 所述检测卡包括底板和依次黏贴在底板上的硝酸纤维素膜、吸水纸、结合垫和样品垫; 所述结合垫上喷涂有荧光微球和鸡IgY偶联标记物与荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联的标记物混合得到混合荧光胶乳微粒; 所述硝酸纤维素膜上设有含有25羟基维生素D-BSA蛋白复合物的检测线和含有兔抗鸡IgY的质控线;

[0022] 所述检测缓冲液为包含牛血清白蛋白和表面活性剂的缓冲液。

[0023] 进一步, 还与检测卡一一对应的包括ID卡, 所述ID卡用于读取产品校准品的信号值、浓度、批号及单位信息。

[0024] 进一步, 所述检测缓冲液中的表面活性剂包括: 磷酸氢二钾、二水合磷酸二氢钠、氯化钠和表面活性剂S9。

[0025] 本发明的有益效果是:

[0026] 1、本发明通过在荧光微球上标记羊抗鼠IgG, 然后再结合鼠抗25羟基维生素D单克隆抗体, 相比在荧光微球上直接标记羊鼠抗25羟基维生素D 单克隆抗体灵敏度更高, 生产成本更低;

[0027] 2、本发明质控线上包被兔抗鸡IgY, 相比哺乳动物IgG具有更低的交叉反应性和更高的特异性, 使检测非特异性结合得到改善;

[0028] 3、本发明制备的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂灵敏度达到1ng/ml, 并且同时具备生产成本低、特异性强, 适合基层医疗机构使用的优点。

## 具体实施方式

[0029] 以下结合实施例对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0030] 实施例1

[0031] 一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法如下:

[0032] S1. 荧光微球标记物制备:

[0033] 具体的,包括如下步骤:

[0034] S1.1:采用荧光微球对鸡IgY进行标记,形成荧光微球标记的鸡IgY;

[0035] 将荧光微球和鸡IgY按质量比10:1混合,室温下进行偶联反应3h,形成荧光微球标记的鸡IgY,置于2-8℃备用。其中,所述荧光微球由市售荧光微球经EDC/NHS活化处理后得到,具体活化处理工艺为:取100ul市售荧光微球(1000ug),用pH6.0浓度为0.1M的MES缓冲溶液清洗3次;加入EDC终浓度为4mg/ml,加入NHS终浓度为10mg/ml,室温反应30min。其中,EDC表示1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,NHS表示N-羟基琥珀酰亚胺。

[0036] S1.2:采用荧光微球对羊抗鼠IgG进行标记,并加入鼠抗25羟基维生素D,形成荧光微球、羊抗鼠IgG结合鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联标记物;具体的,将荧光微球和羊抗鼠IgG按质量比10:1混合,室温下进行偶联反应3h,形成荧光微球标记的羊抗鼠IgG;然后加入1M的甘氨酸10ul 反应30min,再按比例加入鼠抗25羟基维生素D反应15min,形成荧光微球标记的羊抗鼠IgG结合鼠抗25羟基维生素D的复合物,置于2-8℃备用。其中,所述鼠抗25羟基维生素D的加入量以该复合物中所用荧光微球量计算,所述荧光微球与25羟基维生素D单克隆抗体按质量比为20:0.5;所用荧光微球同为活化处理后的荧光微球,其活化处理工艺与步骤1相同。

[0037] S2. 结合垫的制备:

[0038] S2.1微球稀释液的配置:三羟甲基氨基甲烷2.42mg/mL,蔗糖150mg/mL,牛血清白蛋白5mg/mL,聚乙烯吡咯烷酮(40K)4mg/mL,叠氮钠0.5mg/mL 混合制得微球稀释液。

[0039] S2.2将荧光微球和鸡IgY偶联标记物与荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗 25羟基维生素D的复合物偶联的标记物按1:3比例混合得到混合荧光胶乳微粒,混合荧光胶乳微粒用微球稀释液稀释100倍(按照体积倍数稀释)后喷在玻璃纤维上,37℃干燥3小时后形成结合垫。

[0040] S3. 硝酸纤维素膜的制备:

[0041] S3.1缓冲液KPBS的配置:将浓度为0.191mg/mL的磷酸氢二钾,浓度为0.055mg/mL的磷酸二氢钾,浓度为0.85mg/mL的氯化钠,浓度为0.5mg/mL 的叠氮钠混合制得缓冲液KPBS;所述缓冲液KPBS的pH值为7.4。

[0042] S3.2检测线的制备:将25羟基维生素D-BSA蛋白复合物用15mmol/L 的KPBS缓冲液稀释到0.5mg/ml的浓度,按1.0ul/cm的量在硝酸纤维素膜上划线,制得检测线;

[0043] S3.3质控线的制备:将兔抗鸡IgY用浓度为15mmol/L KPBS缓冲液稀释到1.0mg/ml的浓度,按1.0ul/cm的量在硝酸纤维素膜上划线,制得质控线;

[0044] S3.4将包被的硝酸纤维素膜放置在相对湿度≤30%,温度为37℃的条件下干燥3

小时以上,干燥完成后封存备用。

[0045] S4. 样品垫的制备:

[0046] S4.1 样品垫处理液的配置:将浓度为17.1mg/mL的十二水合磷酸氢二钠,浓度为1.86mg/mL的二水合磷酸二氢钠,浓度为2.35mg/mL的吐温20 混合制得样品垫处理液。

[0047] S4.2 将玻璃纤维浸泡入样品垫处理液中,浸泡至少30分钟,保证玻璃纤维完全浸透,取出后37度干燥3小时以上,干燥完成后封存备用。

[0048] S5. 检测卡组装:裁切样品垫为300mm\*29mm;裁切结合垫为300mm\*5mm;裁切吸水滤纸为300mm\*27mm撕掉底板上部纸膜,贴上吸水滤纸,与硝酸纤维素膜交错重叠约2mm,撕掉底板下部纸膜,贴上结合垫,与硝酸纤维素膜交错重叠约1mm,再贴上样品垫,与结合垫交错重叠约2mm,将贴好膜的底板置于切条机上,将其裁切成 $3.9 \pm 0.1$ mm宽,将已切好的层析条装入扣板内,用压壳机压实。

[0049] S6. 检测缓冲液的制备:将磷酸氢二钾、二水合磷酸二氢钠、氯化钠、牛血清白蛋白、表面活性剂S9溶解在水中制备检测缓冲液,其中磷酸氢二钾的浓度为1.82mg/mL,二水合磷酸二氢钠的浓度为0.29g/mL,氯化钠的浓度为6.82mg/mL,牛血清白蛋白的浓度为1mg/mL,表面活性剂S9的浓度为10mg/mL。(上述浓度也可以根据实验或者检测需要进行替换)

[0050] S7. ID卡的制备:用生产的25羟基维生素D产品检测浓度分别为0ng/mL、3ng/mL、8ng/mL、18ng/mL、35ng/mL、70ng/mL产品校准品,读取检测结果,将信号值、浓度、批号、单位等信息输入计算机,制备标准曲线,刻录于ID卡。

[0051] 实施例2

[0052] 一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法如下:

[0053] S1. 荧光微球标记物制备:

[0054] 具体的,包括如下步骤:

[0055] S1.1:采用荧光微球对鸡IgY进行标记,形成荧光微球标记的鸡IgY;

[0056] 将荧光微球和鸡IgY按质量比10:2混合,室温下进行偶联反应3h,形成荧光微球标记的鸡IgY,置于2-8℃备用。其中,所述荧光微球由市售荧光微球经EDC/NHS活化处理后得到,具体活化处理工艺为:取100uL市售荧光微球(1000ug),用pH6.0浓度为0.1M的MES缓冲溶液清洗3次;加入EDC终浓度为4mg/mL,加入NHS终浓度为10mg/mL,室温反应30min。其中,EDC表示1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,NHS表示N-羟基琥珀酰亚胺。

[0057] S1.2:采用荧光微球对羊抗鼠IgG进行标记,并加入鼠抗25羟基维生素D,形成荧光微球、羊抗鼠IgG结合鼠抗25羟基维生素D的复合物偶联标记物;具体的,将荧光微球和羊抗鼠IgG按质量比10:2混合,室温下进行偶联反应3h,形成荧光微球标记的羊抗鼠IgG;然后加入1M的甘氨酸10uL 反应30min,再按比例加入鼠抗25羟基维生素D反应15min,形成荧光微球标记的羊抗鼠IgG结合鼠抗25羟基维生素D的复合物,置于2-8℃备用。其中,所述鼠抗25羟基维生素D的加入量以该复合物中所用荧光微球量计算,所述荧光微球与25羟基维生素D单克隆抗体按质量比为20:1;所用荧光微球同为活化处理后的荧光微球,其活化处理工艺与步骤1相同。

[0058] S2. 结合垫的制备:

[0059] S2.1 微球稀释液的配置:三羟甲基氨基甲烷2.42mg/mL,蔗糖150mg/mL,牛血清白

蛋白5mg/mL,聚乙烯吡咯烷酮(40K) 4mg/mL,叠氮钠0.5mg/mL 混合制得微球稀释液。

[0060] S2.2将荧光微球和鸡IgY偶联标记物与荧光微球、羊抗鼠IgG和鼠抗 25羟基维生素D的复合物偶联的标记物按1:5比例混合得到混合荧光胶乳微粒,混合荧光胶乳微粒用微球稀释液稀释100倍(按照体积倍数稀释)后喷在玻璃纤维上,37℃干燥3小时后形成结合垫。

[0061] S3.硝酸纤维素膜的制备:

[0062] S3.1缓冲液KPBS的配置:将浓度为0.191mg/mL的磷酸氢二钾,浓度为0.055mg/mL的磷酸二氢钾,浓度为0.85mg/mL的氯化钠,浓度为0.5mg/mL 的叠氮钠混合制得缓冲液KPBS;所述缓冲液KPBS的pH值为7.4。

[0063] S3.2检测线的制备:将25羟基维生素D-BSA蛋白复合物用15mmol/L 的KPBS缓冲液稀释到0.5mg/ml的浓度,按1.0ul/cm的量在硝酸纤维素膜上划线,制得检测线;

[0064] S3.3质控线的制备:将兔抗鸡IgY用浓度为15mmol/LKPBS缓冲液稀释到1.0mg/ml的浓度,按1.0ul/cm的量在硝酸纤维素膜上划线,制得质控线;

[0065] S3.4将包被的硝酸纤维素膜放置在相对湿度≤30%,温度为37℃的条件下干燥3小时以上,干燥完成后封存备用。

[0066] S4.样品垫的制备:

[0067] S4.1样品垫处理液的配置:将浓度为17.1mg/mL的十二水合磷酸氢二钠,浓度为1.86mg/mL的二水合磷酸二氢钠,浓度为2.35mg/mL的吐温20 混合制得样品垫处理液。

[0068] S4.2将玻璃纤维浸泡入样品垫处理液中,浸泡至少30分钟,保证玻璃纤维完全浸透,取出后37度干燥3小时以上,干燥完成后封存备用。

[0069] S5.检测卡组装:裁切样品垫为300mm\*29mm;裁切结合垫为300mm\*5mm;裁切吸水滤纸为300mm\*27mm撕掉底板上部纸膜,贴上吸水滤纸,与硝酸纤维素膜交错重叠约2mm,撕掉底板下部纸膜,贴上结合垫,与硝酸纤维素膜交错重叠约1mm,再贴上样品垫,与结合垫交错重叠约2mm,将贴好膜的底板置于切条机上,将其裁切成 $3.9 \pm 0.1$ mm宽,将已切好的层析条装入扣板内,用压壳机压实。

[0070] S6.检测缓冲液的制备:将磷酸氢二钾、二水合磷酸二氢钠、氯化钠、牛血清白蛋白、表面活性剂S9溶解在水中制备检测缓冲液,其中磷酸氢二钾的浓度为1.82mg/mL,二水合磷酸二氢钠的浓度为0.29g/mL,氯化钠的浓度为6.82mg/mL,牛血清白蛋白的浓度为1mg/mL,表面活性剂S9的浓度为 10mg/mL。(上述浓度也可以根据实验或者检测需要进行替换)

[0071] S7.ID卡的制备:用生产的25羟基维生素D产品检测浓度分别为 0ng/mL、3ng/mL、8ng/mL、18ng/mL、35ng/mL、70ng/mL产品校准品,读取检测结果,将信号值、浓度、批号、单位等信息输入计算机,制备标准曲线,刻录于ID卡。

[0072] 将本发明实施例1和实施例2中的25羟基维生素D检测试剂与以荧光素为标记物的普通荧光免疫层析检测试剂灵敏度的比较,分别进行20次检测,并对所得数据进行数据分析;所得数据如表1所示。

[0073] 表1 25羟基维生素D最低检出限数据记录表单位:ng/mL



[0074]

方 法 检测次数/结果	实施例 1 检测试剂	实施例 2 检测试剂	普通荧光免疫层析
1	0.92	0.83	3.23
2	0.87	1.02	3.45

[0075]

3	0.91	0.88	3.12
4	0.96	0.91	2.98
5	1.02	1.01	3.22
6	0.81	0.93	3.14
7	0.89	1.02	2.89
8	0.87	0.87	3.45
9	0.84	0.95	2.67
10	0.91	0.92	2.92
11	0.86	0.89	2.67
12	0.77	1.04	3.03
13	0.79	0.83	2.69
14	0.97	0.93	2.72
15	0.95	1.01	3.18
16	0.87	0.91	3.01
17	0.92	0.99	3.12
18	0.88	0.82	3.86
19	1.01	1.11	4.24
20	0.89	0.96	2.85
$\bar{X}$	0.896	0.94	3.122
SD	0.066	0.078	0.397
最低检测线	1.03	1.09	3.91

[0076] 由表1可以明显看出,本发明的实施例1中的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂平均最低检测线为1.03,本发明的实施例2中的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂平均最低检测线为1.09,均远远低于平均最低检测线为3.91的市售检测试剂,故而本发明的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂,有着更好的灵敏度,并且同时具备生产成本低、特异性强,适合基层医疗机构使用的优点。

[0077] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107656076A</a>	公开(公告)日	2018-02-02
申请号	CN2017110683881.5	申请日	2017-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	普菲特益斯生物科技北京有限公司		
申请(专利权)人(译)	普菲特益斯生物科技(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	普菲特益斯生物科技(北京)有限公司		
[标]发明人	魏照征		
发明人	魏照征		
IPC分类号	G01N33/82 G01N33/558 G01N33/533 G01N33/543 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/82 G01N21/6408 G01N33/533 G01N33/54313 G01N33/558		
代理人(译)	杨立 王灏增		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂的制备方法，包括：S1，荧光微球标记物制备；S2，结合垫的制备；S3，硝酸纤维素膜的制备；S4，样品垫的制备；S5，检测卡组装。本发明通过在荧光微球上标记羊抗鼠IgG，然后再结合鼠抗25羟基维生素D单克隆抗体，相比在荧光微球上直接标记鼠抗25羟基维生素D单克隆抗体灵敏度更高，生产成本更低；本发明质控线上包被兔抗鸡IgY，相比哺乳动物IgG具有更低的交叉反应性和更高的特异性，使检测非特异性结合得到改善；本发明制备的高灵敏检测25羟基维生素D的时间分辨荧光免疫层析检测试剂灵敏度达到1ng/ml，并且同时具备生产成本低、特异性强，适合基层医疗机构使用的优点。

方法 检测次数/结果	实施例1 检测试剂	实施例2 检测试剂	普通荧光免疫层析
1	0.92	0.83	3.23
2	0.87	1.02	3.45