



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104076155 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 31

(21) 申请号 201410328010. 8

(22) 申请日 2014. 07. 10

(73) 专利权人 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

地址 518052 广东省深圳市南山区艺园路  
200 号 A 座 3 楼

(72) 发明人 饶微 李婷华 杜凯 袁锦云  
罗凯 余慧玲

(74) 专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 吴大建 刘烽

(51) Int. Cl.

G01N 33/82(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103857698 A, 2014. 06. 11,

CN 103857698 A, 2014. 06. 11,

CN 1070509 A, 1993. 03. 31,

WO 2009070594 A1, 2009. 06. 04,

WO 2007140962 A2, 2007. 12. 13,

WO 2011144661 A1, 2011. 11. 24,

审查员 胡晓佳

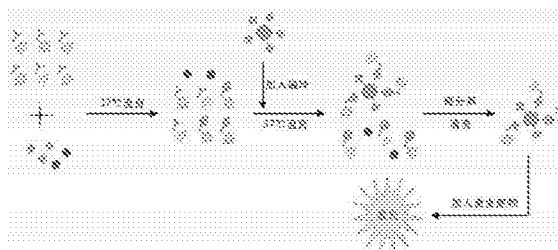
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

用于检测 25- 羟基维生素 D 的检测剂及制备  
方法和应用

(57) 摘要

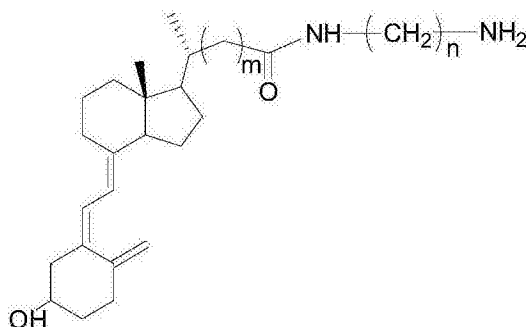
本发明提供了一种用于检测羟基维生素 D 的检测剂及其制备方法, 以及其在 25- 羟基维生素 D 免疫学检测中的应用。该检测剂包括 25- 羟基维生素 D 抗原衍生物与蛋白载体形成的偶联物, 以及被所述偶联物包被的磁球。通过对 25- 羟基维生素 D 抗原衍生物进行上述修饰, 所产生的检测剂的稳定性得到明显改善, 对 25- 羟基维生素 D 检测的特异性和准确性也得到提高。本发明进一步提供包含所述检测剂的 25- 羟基维生素 D 检测试剂盒, 其稳定性好、准确度高、通用性强。



1. 一种用于检测25-羟基维生素D的检测剂,其包括25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体形成的偶联物,以及被所述偶联物包被的磁球,

其中,所述磁球的粒径大小为0.8-3.0 $\mu\text{m}$ ;

所述25-羟基维生素D抗原衍生物的结构式为:



其中, $m$ 为0、1、2或3, $n$ 为2、3、4、5或6。

2. 根据权利要求1所述的检测剂,其特征在于,所述蛋白载体选自牛血清白蛋白、阳离子牛血清白蛋白、血蓝蛋白、卵清蛋白、血清白蛋白、牛 $\gamma$ 球蛋白和人 $\gamma$ 球蛋白中的任一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的检测剂,其特征在于,所述磁球表面带有环氧基、磺酰基、羧基、氨基、醛基、酰胺基、巯基和羟基中的一种或多种基团。

4. 一种如权利要求1-3中任一项所述的用于检测25-羟基维生素D的检测剂的制备方法,包括使用所述25-羟基维生素D抗原衍生物和蛋白载体形成的偶联物包被磁球。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述方法还包括在包被磁球之前,使用第一活化剂将磁球进行活化处理,并将经所述活化处理后的磁球分散于缓冲液中,并加入25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体形成的偶联物进行反应,经固液分离,清洗固体,得到所述检测剂;

其中,所述第一活化剂为N,N-二环己基碳二亚胺和1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐中的至少一种或N,N-二环己基碳二亚胺和1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐中的至少一种与N-羟基琥珀酰亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐中的至少一种的混合物。

6. 根据权利要求4或5所述的方法,其特征在于,所述方法还包括25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体形成的偶联物的制备步骤,所述制备步骤包括使所述25-羟基维生素D抗原衍生物和所述蛋白载体在偶联剂和溶剂的存在下进行偶联反应生成所述偶联物;

其中,所述偶联剂选自戊二醛、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯中的至少一种;和/或所述溶剂选自二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、丙酮、氯仿中的至少一种。

7. 根据权利要求4或5所述的方法,其特征在于,所述方法还包括25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体形成的偶联物的制备步骤,所述制备步骤包括:

i) 使25-羟基维生素D抗原衍生物带有羧基,并使用第二活化剂进行活化;

ii) 将活化后的25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体在溶剂的存在下进行偶联,经分离得到所述偶联物;

其中,所述第二活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐中的至少一种和N,N-二环己基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐中的至少一

种的混合物；和/或所述溶剂选自二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、丙酮、氯仿中的至少一种。

8. 根据权利要求6所述的方法，其特征在于，所述25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体的摩尔比为10-20:1。

9. 一种用于检测25-羟基维生素D的免疫学方法，包括使结合标记物的25-羟基维生素D抗体和如权利要求1-3中任一项所述的检测剂与待测样本中的25-羟基维生素D竞争结合。

10. 根据权利要求9所述的方法，其特征在于，所述标记物选自荧光标记物、发光标记物、生物素标记物、金标记物或酶标记物。

11. 一种用于检测25-羟基维生素D的发光免疫学方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

- a) 将待测样本与发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体进行温育；
- b) 向步骤a)的混合物中加入如权利要求1-3中任一项所述的检测剂，使所述发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体与所述检测剂和待测样本中的25-羟基维生素D竞争结合；
- c) 磁分离，得到发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体与所述检测剂的结合物；
- d) 向步骤c)得到的结合物中加入激发底物，使其产生发光信号；
- e) 根据步骤d)测定的发光信号强度计算待测样本中的25-羟基维生素D含量。

12. 一种25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括结合标记物的25-羟基维生素D抗体，以及如权利要求1-3中的任一项所述的用于检测25-羟基维生素D的检测剂。

13. 根据权利要求12所述的试剂盒，其特征在于，所述标记物选自荧光标记物、发光标记物、生物素标记物、金标记物或酶标记物。

## 用于检测25-羟基维生素D的检测剂及制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物免疫学检测领域,具体涉及一种用于检测25-羟基维生素D的检测剂及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 维生素D是一种脂溶性维生素。人体中的维生素D仅有小部分来源于食物(<10%),体内所需的维生素D的90%来源于阳光中紫外线照射皮肤产生。维生素D在体内出现的主要形式是维生素D2(麦角钙化醇)和维生素D3(胆钙化醇)。维生素D2的营养来源主要是一些蔬菜、酵母和真菌类食物,维生素D3是由皮下的7-脱氢胆固醇在阳光的作用下转化而成。

[0003] 食物源和自身合成的维生素D2和维生素D3经血液循环进入肝脏,在25-羟化酶作用下分别转化为25-OH维生素D2和25-OH维生素D3,总称为25-OH维生素D。血清或血浆中25-OH维生素D的含量能反映事物摄入和自身合成的维生素D总量,因此25-OH维生素D是衡量维生素D营养状态的最佳指标。

[0004] 25-羟基维生素D是人体的存储维生素D的主要形式,是人体内代谢活动不可缺少的营养物质。除了具有传统意义上的骨骼效应,还具有影响自身免疫疾病、心血管病、糖尿病、肿瘤等非骨骼效应。研究发现,维生素D缺乏会直接影响人类基因的表达,这些基因与风湿性关节炎和糖尿病等众多疾病有关。

[0005] 目前,临床上对维生素D的定量检测已成为常规检测项目和体检项目。建立一种快速、简便、灵敏、准确可靠的检测维生素D水平的方法尤为重要。25-羟基维生素D的定量检测主要有理化检验方法和免疫学方法。理化检验方法采用液相色谱-质谱联用技术(LC-MS),由于存在仪器昂贵、样本前处理复杂、过程繁琐费时等缺陷,该方法的应用受到限制。免疫学方法具有灵敏、快速、特异和简便等优势,现在成为维生素D测定的主流方法。在目前的市场上,用于测定25-羟基维生素D的主流产品是意大利Diasorin公司生产的检测试剂盒,检测方法是采用标记ABEI(N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺)的25-羟基维生素D抗原衍生物和样本中的抗原与包被于磁性微球上的25-羟基维生素D抗体竞争结合,然后加入激发底物产生发光信号,从而实现25-羟基维生素D的定量检测,图1更形象地展示了其操作原理(具体操作步骤及实验条件可参考其DiaSorin-VD说明书)。在检测过程中,标记ABEI的25-羟基维生素D抗原衍生物的稳定性的影响检测稳定性的最主要的因素,而25-羟基维生素D抗原衍生物是一种稳定性差,遇光、遇热等都会导致活性下降的物质,因此上述检测试剂盒中的试剂稳定性差,活性易下降。

[0006] 因此,免疫学竞争法测定所采用的25-羟基维生素D抗原衍生物的不稳定性导致了25-羟基维生素D免疫学方法测定试剂不能长期稳定地保存,从而影响其使用和检测结果,且保存条件苛刻,不方便储存和运输,这成为目前此类方法大规模商品化应用的瓶颈。

### 发明内容

[0007] 针对以上缺陷,本发明提供一种用于检测25-羟基维生素D的检测剂,其是将25-羟基维生素D抗原衍生物偶联至载体蛋白后固定到磁性微球上,通过固定至磁性微球使得抗原衍生物稳定性得到显著提高,同时该衍生物的特定结构使得25-羟基维生素D的测定更加准确。

[0008] 本发明还提供了上述用于检测25-羟基维生素D的检测剂的制备方法以及采用上述检测剂对25-羟基维生素D进行免疫学检测的方法,还提供了包含所述25-羟基维生素D检测剂的试剂盒。

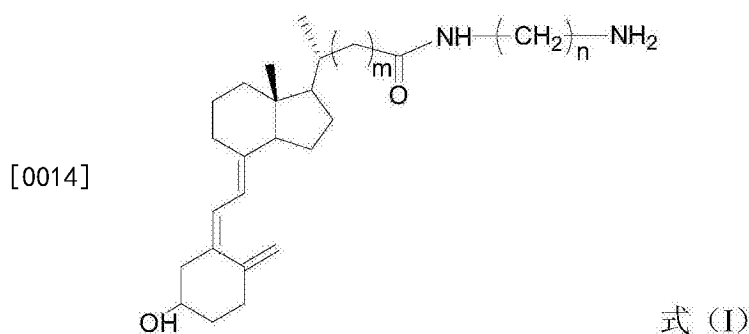
[0009] 根据本发明,提供了一种用于检测25-羟基维生素D的检测剂,其包括25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体形成的偶联物,以及被所述偶联物包被的磁球。

[0010] 在现有技术中,用于检测25-羟基维生素D的25-羟基维生素D抗原衍生物被发光标记物标记,而25-羟基维生素D抗体则包被磁球,其作用原理如图1所示。然而,该产品存在稳定性较差的缺点。因为25-羟基维生素D抗原衍生物具有光敏性,且容易被氧化,用发光标记物标记25-羟基维生素D抗原衍生物的过程中容易造成其部分失活,而且发光标记物标记的25-羟基维生素D抗原衍生物在溶液中的长期稳定性不好,容易造成活性下降。因此,用于检测25-羟基维生素D的这类检测剂的保存条件较为苛刻,稳定性较差,从而造成使用期限较短、使用效果较差。

[0011] 本发明将25-羟基维生素D抗原衍生物包被在固相载体磁球上,一方面减少了25-羟基维生素D抗原衍生物分子的自由度,另一方面磁球的颜色屏蔽了部分光照对25-羟基维生素D抗原衍生物分子的影响,因此大大增强了25-羟基维生素D抗原衍生物在溶液中的稳定性,从而可以延长其有效使用期限以及提高测定结果的准确性。

[0012] 在本发明中,用于制备所述检测剂的25-羟基维生素D抗原衍生物可以是本领域中常用的,例如在美国专利申请US20130059825A1中所描述的25-羟基维生素D抗原衍生物,该专利申请的内容通过引用而并入本文中。

[0013] 在一些具体实施方案中,25-羟基维生素D抗原衍生物具有如下结构式(I):



[0015] 其中,m为0、1、2或3,n为2、3、4、5或6。

[0016] 如式(I)所示的25-羟基维生素D抗原衍生物是用于测定25-羟基维生素D的有用的试剂,能够同时识别25-羟基维生素D2和25-羟基维生素D3。本发明将具有该所示特定结构的25-羟基维生素D抗原衍生物偶联与蛋白载体上,并进一步包被磁球,以此极大改善了其稳定性。本发明的发明人注意到,这类25-羟基维生素D抗原衍生物具有一定长度的侧链(即在维生素D基本结构的C22位置上引入一段连接臂),针对这类抗原衍生物,将其偶联至蛋白载体并包被磁球时,由于维生素D基本结构和蛋白载体之间通过一定长度的链来桥接,因而可以减小空间效应,显著地限制该抗原衍生物分子的活动性,减少分子的自由度;再进一步

地借助磁球屏蔽部分光照对该抗原衍生物分子的影响,即可以大大提高这类抗原衍生物的稳定性和稳定性,减少了储存和运输过程对该抗原衍生物的影响,从而延长其有效使用期限;同时,由于该抗原衍生物分子的活动性受到限制,分子的自由度减少,更有利于于抗体结合的位点的暴露,因而有利于抗原衍生物与抗体的结合,提高了抗原衍生物与抗体结合的特异性,从而提高测定结果的准确性,使测定结果更加接近真实值。本发明的发明人还采用25-羟基维生素D抗原进行了对比试验,即将25-羟基维生素D抗原与蛋白载体偶联,然后包被磁球,并采用该产品对一系列样品进行检测。将该检测结果与采用LC-MS对同样的样品进行检测的结果进行比较,发现两种方法的检测结果的线性相关性并不如本发明采用25-羟基维生素D抗原衍生物所提供的检测剂对样品进行检测的结果与相应的LC-MS检测结果的线性相关性好。

[0017] 适合用于本发明的蛋白载体可以是动物源性或人源性蛋白,包括但不限于牛血清白蛋白(BSA)、阳离子牛血清白蛋白(cBSA)、血蓝蛋白(KLH)、卵清蛋白(OVA)、血清白蛋白HAS、牛 $\gamma$ 球蛋白和人 $\gamma$ 球蛋白。蛋白载体可以介导25-羟基维生素D抗原衍生物与抗体之间的结合。并且,在本发明中,蛋白载体起到连接25-羟基维生素D抗原衍生物与磁球的桥梁作用,使得所述抗原衍生物与蛋白载体偶联之后进一步与磁球结合形成一个整体的检测剂,从而提高抗原衍生物的稳定性和稳定性。

[0018] 在此所述使用的磁球可以是空心或实心的,也可以是多孔的,但不限于这几种形式。在磁球是多孔磁球的情况下,所述偶联物还存在于磁球的孔隙中。本发明所使用的磁球优选为球形,这样能够使所述偶联物更加均匀地包被磁球,从而能够减少在所获得检测剂的使用中的非特异性吸附,进而提供结果的准确性。在本发明中,优选粒径为0.5 $\mu$ m-5 $\mu$ m,并进一步优选为0.8-3.0 $\mu$ m的磁球。该粒径范围既能使磁球在溶液中具有良好的分散性,又能满足免疫分析对固相载体粒径范围的要求。

[0019] 为了使所述偶联物和磁球之间形成较为稳定的连接关系,本发明所采用的磁球表面带有功能修饰基团,所述修饰基团用于直接或间接地与25-羟基维生素D与蛋白载体形成的偶联物连接,包括但不限于环氧基、磺酰基、羧基、氨基、醛基、酰胺基、巯基和羟基中的一种或多种。当磁球表面带有例如羧基、氨基、羟基、巯基等官能团时,磁球可以直接与所述偶联物缩合连接;当磁球表面带有其他官能基团时,通常需要通过本领域中公知技术手段将磁球进一步修饰活化,使其带有能够与所述偶联物化学键合的官能基团。

[0020] 本发明还提供了一种如上所述的用于检测25-羟基维生素D的检测剂的制备方法,包括使用25-羟基维生素D抗原衍生物和蛋白载体形成的偶联物包被磁球。应理解,该包被过程包括两种情况,一种是首先将25-羟基维生素D抗原衍生物和蛋白载体偶联形成偶联物,然后再将其包被磁球;另一种情况是25-羟基维生素D抗原衍生物和蛋白载体的偶联反应与对磁球的包被作用同时进行。

[0021] 在一些具体实施方案中,上述方法还包括在包被磁球之前,使用第一活化剂将磁球进行活化处理,并将经所述活化处理后的磁球(例如以1-100mg/mL的浓度)分散于缓冲液中,并加入25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体形成的偶联物(例如以1-20 $\mu$ g每毫克磁球的量加入)进行反应,经固液分离,清洗固体,得到所述检测剂;其中,所述第一活化剂为N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)和1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)中的至少一种或其与N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐中的至少一种的混

合物。上述缓冲液包括但不限于碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液和Tris缓冲液。

[0022] 在一些实施方案中,上述方法还包括25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体形成的偶联物的制备步骤,所述制备步骤包括使所述25-羟基维生素D抗原衍生物和所述蛋白载体在偶联剂和溶剂的存在下进行偶联反应生成所述偶联物;其中,所述偶联剂选自戊二醛、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯中的至少一种;和/或所述溶剂选自二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、丙酮、氯仿中的至少一种。

[0023] 在另一些实施方案中,25-羟基维生素D抗原衍生物和蛋白载体的偶联物的制备步骤包括:m)使25-羟基维生素D抗原衍生物带有羧基,并使用第二活化剂进行活化;n)将活化后的25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体在溶剂的存在下进行偶联,经分离得到所述偶联物;其中,所述第二活化剂可以为N-羟基琥珀酰亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐中的至少一种和N,N'-二环己基碳二亚胺、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐中的至少一种的混合物;和/或所述溶剂可以选自二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砷、丙酮、氯仿中的至少一种。在一个具体实施方案中,在步骤m)中使25-羟基维生素D抗原衍生物与环状酸酐反应而引入羧基基团。所述环状酸酐可以是任意环状的二元酸酐,例如可以选自丁二酸酐、戊二酸酐和二甘醇酸酐中的至少一种。

[0024] 在一个具体实施方案中,所述25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体的摩尔比为10-20:1,优选为15:1。本发明选择该摩尔比既保证连接到蛋白载体上的抗原衍生物分子的数量,又保证了后续的蛋白载体能有效连接到磁球上。

[0025] 本发明还提供了一种用于检测25-羟基维生素D的免疫学方法,包括使结合标记物的25-羟基维生素D抗体和如上所述的检测剂与待测样本中的25-羟基维生素D竞争结合。从而测定样本中的25-羟基维生素D的含量。其中,所述标记物包括但不限于荧光标记物、发光标记物、生物素标记物、金标记物和酶标记物。当采用不同的标记物时,最后的检测参数或信号的获取方式和手段相应不同,但均为本领域技术人员所公知的技术,例如酶联免疫检测或化学发光检测方法。

[0026] 本发明还具体地提供了一种用于检测25-羟基维生素D的发光免疫学方法(例如图2所示),包括如下步骤:a)将待测样本与发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体进行温育,其中温育温度在常规的温育温度下即可,例如在4-40℃,温育时间可以是30-180min;b)向步骤a)的混合物中加入本发明提供的如上所述的检测剂,使所述发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体与所述检测剂和待测样本中的25-羟基维生素D竞争结合;c)磁分离,得到发光标记物标记的25-羟基维生素D抗体与所述检测剂的结合物;d)向步骤c)得到的结合物中加入激发底物,使其产生发光信号;e)根据步骤d)测定的发光信号强度计算待测样本中的25-羟基维生素D含量。具体地,可以将测试样本所产生的发光信号强度与采用25维生素D抗原标准品进行测试所得出的标准曲线进行对照,即可获知样本中25维生素D抗原的含量。其中,所述待测样本含有待测含量的25-羟基维生素D。所述发光标记物例如可以是ABEI。

[0027] 此外,本发明还提供了一种25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒,该试剂盒包括结合标记物的25-羟基维生素D抗体,以及如上所述的25-羟基维生素D检测剂。其中,所述标记物包括但不限于荧光标记物、发光标记物、生物素标记物、金标记物和酶标记物。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括置换剂(例如8-苯胺-1-萘磺酸(ANS))、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。由于本发明提供的试剂盒中使用了本发明提供的25-羟基维生素D检测剂,因而其稳定性得以提高,有效使用期限延长,测定结果的准确性得以提高。

[0028] 本发明首次提出将25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体偶联形成偶联物,并使偶联物包覆磁球,从而形成25-羟基维生素D检测剂。通过25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体以及固相载体磁球的相互协同作用,使得25-羟基维生素D抗原衍生物的稳定性的显著提高,即获得具有良好的稳定性的检测剂,并且所采用的25-羟基维生素D抗原衍生物经过蛋白载体和磁球的修饰之后,其与抗体结合的特异性也得到提高,因此本发明所提供的25-羟基维生素D检测剂改善了现有技术中由于25-羟基维生素D抗原衍生物不稳定而造成相关试剂盒保质期限比较有限或相关检测过程的不稳定性和结果不准确性等缺陷。并且,所述25-羟基维生素D检测剂的制备方法简单易行。此外,采用本发明提供的检测剂能够构成稳定性好、准确度高、通用性强的25-羟基维生素D检测试剂盒,可实现25-羟基维生素D的大批量的快速检测。

## 附图说明

[0029] 图1是根据意大利Diasorin公司提供的25-羟基维生素D检测试剂盒DiaSorin-VD说明书的检测原理示意图;其中,图中标记的意义如下:



[0031] 图2是根据本发明的25-羟基维生素D检测原理示意图;其中,图中标记的意义如下:



[0033] 图3是分别采用本发明提供的25-羟基维生素D检测剂和LC-MS对70个样本的25-羟基维生素D含量的测定结果的线性拟合图。

[0034] 图4是包含本发明提供的25-羟基维生素D检测剂的25-羟基维生素D检测试剂盒(1A、2A、3A)、包含标记物标记的25-羟基维生素D抗原衍生物的试剂盒(1B、2B、3B)以及市售25-羟基维生素D检测试剂盒(1C、2C、3C)的加速稳定性测试结果对比图。

## 具体实施方式

[0035] 下面将通过具体实施例对本发明做进一步说明,但应理解,本发明的范围并不限于此。

[0036] 实施例1 25-羟基维生素D检测剂M的制备

[0037] 1.1)25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体的偶联物的形成

[0038] 将1mg25-羟基维生素D抗原衍生物M'(在式(I)中 $m=0$ , $n=4$ )、0.262mg丁二酸酐和0.37 $\mu$ L三乙胺(催化剂)溶于无水DMF中,在氩气保护下,室温避光反应4h;再加入0.25mg

NHS和1.3mg DCC,在氩气保护下,室温避光静置过夜;然后将该溶液缓慢滴加到牛 $\gamma$ 球蛋白(20mg牛 $\gamma$ 球蛋白溶于2mI 0.1moI/L  $\text{NaHCO}_3$ )溶液中,室温搅拌反应4h;离心去沉淀,上清液用G25凝胶柱纯化,收集的蛋白峰(洗脱液:0.1moI/L磷酸盐缓冲液(PBS),pH7.4),即得到25-羟基维生素D抗原衍生物M'与蛋白载体的偶联物。

[0039] 1.2)磁球的活化

[0040] 取一定量的磁球(Merck公司生产的Estapor系列羧基化微球M1-180/20)纳米磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入DMF溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于在38℃水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时。

[0041] 1.3)磁球的包被

[0042] 将步骤1.2)活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);再以每毫克磁球10 $\mu$ g的量添加25-羟基维生素D抗原衍生物和蛋白载体形成的偶联物,然后置于室温震荡反应2小时。磁性分离,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到包被好25-羟基维生素D抗原衍生物和蛋白载体偶联物的磁球,即本发明所述检测剂。将该获得的检测剂加入稀释液(碳酸盐缓冲液,也可以是磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或Tris缓冲液)中,使其浓度为1mg/mL,备用。

[0043] 实施例2 25-羟基维生素D的检测

[0044] 采用实施例1制备的25-羟基维生素D检测剂,通过化学发光检测方式检测样本中的25-羟基维生素D含量。

[0045] 2.1)25-羟基维生素D抗体的标记

[0046] 取1mg25-羟基维生素D抗体,用0.1moI/L碳酸盐缓冲液(pH9.5)将其体积调至1mI,然后放入透析袋中,并置于pH9.5碳酸盐缓冲液中透析1小时。取出透析好的25-羟基维生素D抗体,加入100 $\mu$ g ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS,室温震荡1.5小时。

[0047] 安装好G-25凝胶柱,用纯化水洗脱干净后,再用pH值7.4的PBS缓冲液进行平衡洗脱。G-25凝胶柱平衡洗脱完毕后,将标记好ABEI的25-羟基维生素D抗体过柱纯化,然后收集出现峰值的蛋白溶液。将收集好的蛋白溶液,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15 $\mu$ g/mL。

[0048] 2.2)化学发光检测

[0049] 检测方法如下:

[0050] 利用新产业生物医学工程股份有限公司的MagIumi系列化学发光测定仪测量。将100 $\mu$ I样本、50 $\mu$ I置换剂(例如ANS)与100 $\mu$ I ABEI标记的25-羟基维生素D单克隆抗体混合,温育10分钟;加入20 $\mu$ I实施例1中步骤1.3)制备得到的25-羟基维生素D抗原衍生物标记的磁性微球(即本发明制备的检测剂)备用溶液,温育10min。使用磁板使反应液中的磁球被分离,去除上清液,加入400 $\mu$ I清洗液(Tris $\cdot$ HCl溶液)清洗三次。加入化学发光激发物,监测3秒钟内发出的相对光强度(RLU)。参照在相同条件下测定不同浓度的25-羟基维生素D标准品溶液的发光信号强度所建立的25-羟基维生素D浓度和发光信号强度的标准曲线来计算所测样本中的25-羟基维生素D的含量。

[0051] 采用该方法检测70个不同样本中的25-羟基维生素D的量。

[0052] 对比例1

[0053] 采用LC-MS检测与实施例2的2.2中相同的70个样本中的25-羟基维生素D的量,并

将实施例2的检测结果和本对比例的检测结果进行线性回归,如图3所示。

[0054] 由图3可见,采用本发明提供羟基维生素D检测剂及相应的检测方法对70个不同样本进行测定的结果与采用LC-MS的测定结果的线性回归相关系数为0.924,说明了通过本发明提供的检测方法获得的测定结果与通过采用LC-MS设备获得的测定结果很接近,进而说明了本发明提供的检测方法的准确性很高,特异性好。

[0055] 对比例2

[0056] 1.1)25-羟基维生素D<sub>3</sub>与蛋白载体的偶联物的形成

[0057] 将1mg25-羟基维生素D<sub>3</sub>溶于0.1mL无水吡啶中,加入12.5mg丁二酸酐,在氩气保护下,室温避光反应4天,将反应混合物加入到10mL乙酸乙酯中,依次用水、稀盐酸、水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液(有机相)经真空干燥得到25-羟基维生素D<sub>3</sub>-3-半琥珀酸酯;将1mg25-羟基维生素D<sub>3</sub>-3-半琥珀酸酯溶于0.5mL无水二氯甲烷中,加入0.28mg NHS和0.37mg EDC,室温搅拌过夜,用水洗涤有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液(有机相)经真空干燥得到25-羟基维生素D<sub>3</sub>-3-半琥珀酸酯的活化酯,然后将1mg该活化酯溶于100μL DMF,该其缓慢滴加到牛γ球蛋白(20mg牛γ球蛋白溶于2mL0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>)溶液中,室温搅拌反应4h;离心去沉淀,上清液用G25凝胶柱纯化,收集的蛋白峰(洗脱液:0.1mol/L磷酸盐缓冲液(PBS),pH7.4),即得到25-羟基维生素D<sub>3</sub>与蛋白载体的偶联物。

[0058] 1.2)磁球的活化

[0059] 取一定量的磁球(Merck公司生产的Estapor系列羧基化微球M1-180/20)纳米磁球,按每毫克磁球加入0.5mg的DCC,然后加入DMF溶液使磁球的浓度为20mg/mL,置于在38℃水浴锅中并振摇或者机械搅拌2小时。

[0060] 1.3)磁球的包被

[0061] 将步骤1.2)活化好的纳米磁球溶液去除上清液,然后加入pH9.5的碳酸盐缓冲液,使其浓度达到20mg/mL(以纳米磁球计);再以每毫克磁球10μg的量添加25-羟基维生素D<sub>3</sub>和蛋白载体的偶联物,然后置于室温震荡反应2小时。磁性分离,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到包被好25-羟基维生素D<sub>3</sub>和蛋白载体偶联物的磁球。将该获得的检测剂加入稀释液(碳酸盐缓冲液,也可以是磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或Tris缓冲液)中,使其浓度为1mg/mL,备用。

[0062] 1.4)化学发光检测

[0063] 同实施例2中的检测方法,对70个相同样本进行检测,并与LC-MS的结果进行线性回归,线性回归相关系数为0.47,表明采用天然抗原25-羟基维生素D<sub>3</sub>作为抗原与蛋白载体偶联并包被磁球得到的检测剂对25-羟基维生素进行检测的准确度比本发明采用抗原衍生物形成的检测剂的准确度低很多。

[0064] 实施例3 25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒的加速稳定性测试

[0065] 本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒包括实施例1所制备的25-羟基维生素D检测剂、ABEI标记的25-羟基维生素D单克隆抗体、置换剂、25-羟基维生素D高点校准品和低点校准品。

[0066] 选取三个不同浓度的25-羟基维生素D样本溶液(1,2,3),采用上述试剂盒,在37℃条件下,通过新产业生物医学工程股份有限公司的MagLumi系列化学发光测定仪分别测定这三个样本溶液的发光强度,每天测一次,连续测定30天;其中,在整个测试过程中,用于测

试的三个25-羟基维生素D样本溶液在冻存环境下保存,而所使用的试剂盒一直保存在37℃下。结果见图4(1A,2A,3A)。

[0067] 由图4可见,采用本发明提供的保存在37℃下的25-羟基维生素D测定试剂盒对不同的25-羟基维生素D浓度的三个样品进行测定,在30天的连续测定中,三个样品分别的测定结果基本恒定,这充分表明了本发明所提供的试剂盒具有良好的稳定性,能够确保在一定的使用期限内测量结果的准确性。

[0068] 对比例3

[0069] 本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒包括本对比例所制备的ABEI标记的25-羟基维生素D抗原衍生物、包被25-羟基维生素D单克隆抗体的磁球、置换剂、25-羟基维生素D高点校准品和低点校准品。

[0070] (1)25-羟基维生素D抗原衍生物的标记

[0071] 将1mg25-羟基维生素D抗原衍生物M'(在式(I)中 $m=0$ , $n=4$ )溶于100 $\mu$ I DMF,然后加入2.5mg ABEI-半琥珀酰胺酸-NHS和10 $\mu$ I 三乙胺,室温避光搅拌反应过夜,产物用HPLC纯化,加入等体积的含5%的BSA的保护液,加入稀释液稀释至0.15 $\mu$ g/ml。

[0072] (2)25-羟基维生素D抗体包被磁球

[0073] 同实施例1中1.2)和1.3)的方法,只是将用于包被磁球的25-羟基维生素D抗原衍生物和蛋白载体的偶联物替换为25-羟基维生素D单克隆抗体,得到25-羟基维生素D单克隆抗体和磁球的结合物,稀释到1mg/ml备用。

[0074] (3)化学发光检测

[0075] 利用新产业生物医学工程股份有限公司的MagLumi系列化学发光测定仪测量。将100 $\mu$ I样本、50 $\mu$ I置换剂(例如ANS)与100 $\mu$ I步骤(2)制备得到的25-羟基维生素D单克隆抗体和磁球的结合物备用溶液混合,温育10分钟,去除上清液,加入400 $\mu$ I清洗液(Tris·HCl溶液)清洗三次,然后加入100 $\mu$ I本对比例步骤(1)中制备得到的ABEI标记的抗原衍生物的备用溶液,温育10分钟,去除上清液,加入400 $\mu$ I清洗液(Tris·HCl溶液)清洗三次,加入化学发光激发物,监测3秒钟内发出的相对光强度(RLU)。参照在相同条件下测定不同浓度的25-羟基维生素D标准品溶液的发光信号强度所建立的25-羟基维生素D浓度和发光信号强度的标准曲线来计算所测样本中的25-羟基维生素D的含量。

[0076] 通过本对比例中的检测方法对70个不同样本(与实施例2相同)进行测定,与采用LC-MS的测定结果的线性回归相关系数为0.858(数据未列出)。与实施例2的结果比较可见,使用相同的抗原衍生物,本发明通过对抗原衍生物修饰从而提供的检测剂能够提高抗原衍生物和抗体结合的特异性,从而检测结果准确性更高。

[0077] 对本对比例中的试剂盒进行与实施例3相同条件下的加速稳定性测试,三个样本的信号强度下降幅度均显著高于实施例3(图4中1B,2B,3B)。可见,在使用相同的抗原衍生物的情况下,本发明通过对所使用的抗原衍生物修饰、即与蛋白载体偶联之后包被磁球从而提供的检测剂能够显著地提高相关检测试剂盒的稳定性。

[0078] 对比例4

[0079] 采用Diasorin公司25-羟基维生素D化学发光免疫分析试剂盒(产品代码:310600),在与实施例3相同的环境下对相同的三个样本进行30天的连续测定(在测定过程中,该试剂盒同样保存在37℃的温度下),结果见图4(1C,2C,3C)。

[0080] 由图4可见,Diasorin公司25-羟基维生素D化学发光免疫分析试剂盒测定的结果在30天内有显著的变化,这表明Diasorin公司25-羟基维生素D化学发光免疫分析试剂盒的稳定性不佳,本发明实施例3的稳定性显著优于对比例4。

[0081] 容易理解,使用稳定性差的检测剂进行检测得到的结果,很可能由于该检测剂潜在的变质而变得不准确,不能够表现真实值。

[0082] 实施例4 25-羟基维生素D检测剂N的制备和性能表征

[0083] 1.1)25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体的偶联物的形成

[0084] 将1mg25-羟基维生素D抗原衍生物N'(在式(I)中 $m=2$ , $n=2$ )溶于0.1mL DMF中,加入到牛 $\gamma$ 球蛋白(20mg牛 $\gamma$ 球蛋白溶于2mL0.1mol/L碳酸盐缓冲液)溶液中,再加入25%的戊二醛溶液使戊二醛的最终重量浓度为0.5%,室温搅拌反应2h;离心去沉淀,上清液用G25凝胶柱纯化,收集的蛋白峰(洗脱液:0.1mol/L磷酸盐缓冲液(PBS),pH7.4),即得到25-羟基维生素D抗原衍生物N'与蛋白载体的偶联物。

[0085] 1.2)磁球的包被

[0086] 取一定量的磁球(Merck公司生产的Estapor系列羧基化微球M1-180/20)纳米磁球,分散于pH7.0的磷酸盐缓冲液中(20mg/mL),以每毫克磁球10 $\mu$ g的量添加本实施例步骤1.1)制备得到的25-羟基维生素D抗原衍生物N'和蛋白载体的偶联物,再加入EDC使其终浓度为10mg/mL,然后置于40℃震荡反应2小时。磁性分离,用洗液(0.5%BSA溶液)清洗固体三遍,得到包被好25-羟基维生素D抗原衍生物N'和蛋白载体偶联物的磁球,即本发明所述检测剂。将该获得的检测剂加入稀释液(碳酸盐缓冲液,也可以是磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液或Tris缓冲液)中,使其浓度为1mg/mL,备用。

[0087] 1.3)对25-羟基维生素D进行化学发光检测

[0088] 采用本实施例步骤1.2)得到的检测剂,参照实施例2的方法对70个不同样本中的25-羟基维生素D的量进行检测,并将检测结果与采用LC-MS对该70个样品进行检测的结果进行比较,两者的线性回归相关系数为0.917,说明采用本实施例提供的检测剂与采用LC-MS对同样的样本的测定结果很接近,进而说明了本实施例提供的检测方法的准确性高。

[0089] 1.4)试剂盒的加速稳定性测试

[0090] 本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒包括本实施例步骤1.2)所制备的25-羟基维生素D检测剂、ABEI标记的25-羟基维生素D单克隆抗体、置换剂、25-羟基维生素D高点校准品和低点校准品。

[0091] 参照实施例3的加速稳定性测试实验步骤,测定本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒在37℃下在30天中的加速稳定性性能,结果与实施例3类似,即本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒分别对三个不同浓度的样品进行测定,每个样品在连续的30天的测定结果分别基本保持恒定,说明了本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒具有良好的稳定性。

[0092] 实施例5 25-羟基维生素D检测剂O的制备和性能表征

[0093] 1.1)25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体的偶联物的形成

[0094] 将1mg25-羟基维生素D抗原衍生物O'(在式(I)中 $m=1$ , $n=6$ )溶于0.1mL无水甲醇中,加入1.5mg N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯,室温搅拌反应2h;产物用薄层色谱(TLC)纯化,得到活化的衍生物,取1mg该衍生物溶于DMF,加入到牛 $\gamma$ 球蛋白(20mg牛 $\gamma$ 球蛋白溶于2mL0.1mol/L碳酸盐缓冲液)溶液中,室温搅拌反应2h,离心去沉淀,上清液用G25凝胶柱纯

化,收集的蛋白峰(洗脱液:0.1mol/L磷酸盐缓冲液(PBS),pH7.4),即得到25-羟基维生素D抗原衍生物O'与蛋白载体的偶联物。

[0095] 1.2)磁球的包被

[0096] 同实施例4,只是将偶联物替换为本实施例步骤1.1)制备得到的25-羟基维生素D抗原衍生物O'与蛋白载体的偶联物,得到本实施例的检测剂。

[0097] 1.3)对25-羟基维生素D进行化学发光检测

[0098] 采用本实施例步骤1.2)得到的检测剂,参照实施例2的方法对70个不同样本中的25-羟基维生素D的量进行检测,并将检测结果与采用LC-MS对该70个样品进行检测的结果进行比较,两者的线性回归相关系数为0.921,说明采用本实施例提供的检测剂与采用LC-MS对同样的样本的测定结果很接近,进而说明了本实施例提供的检测方法的准确性高。

[0099] 1.4)试剂盒的加速稳定性测试

[0100] 本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒包括本实施例步骤1.2)所制备的25-羟基维生素D检测剂、ABEI标记的25-羟基维生素D单克隆抗体、置换剂、25-羟基维生素D高点校准品和低点校准品。

[0101] 参照实施例3的加速稳定性测试实验步骤,测定本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒在37℃下在30天中的加速稳定性性能,结果与实施例3类似,即本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒分别对三个不同浓度的样品进行测定,每个样品在连续的30天的测定结果分别基本保持恒定,说明了本25-羟基维生素D免疫学检测试剂盒具有良好的稳定性。

[0102] 虽然本发明已作了详细描述,但对本领域技术人员来说,在本发明精神和范围内的修改将是显而易见的。此外,应当理解的是,本发明记载的各方面、不同具体实施方式的部分、和列举的各种特征可被组合或全部或部分互换。在上述的各个具体实施方式中,那些参考另一个具体实施方式的实施方式可适当地与其它实施方式组合,这是将由本领域技术人员所能理解的。此外,本领域技术人员将会理解,前面的描述仅是示例的方式,并不旨在限制本发明。

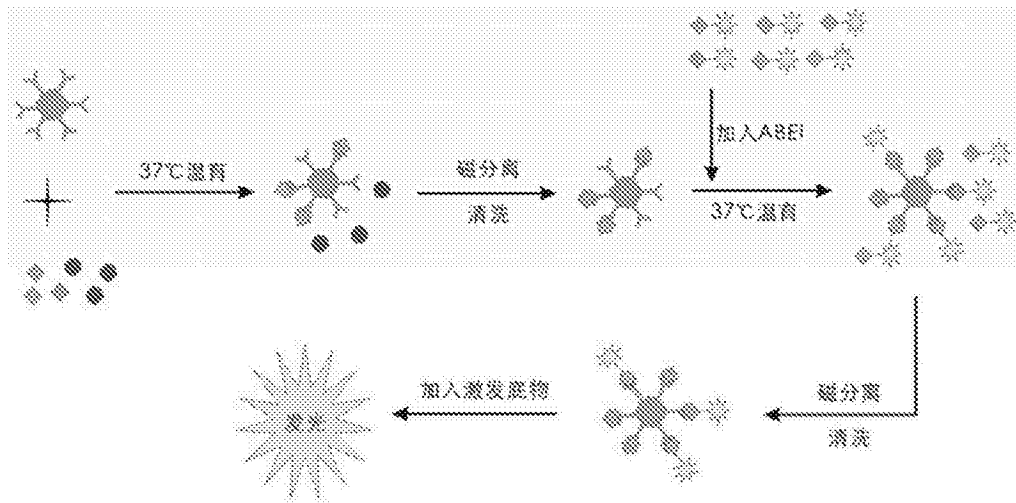


图1

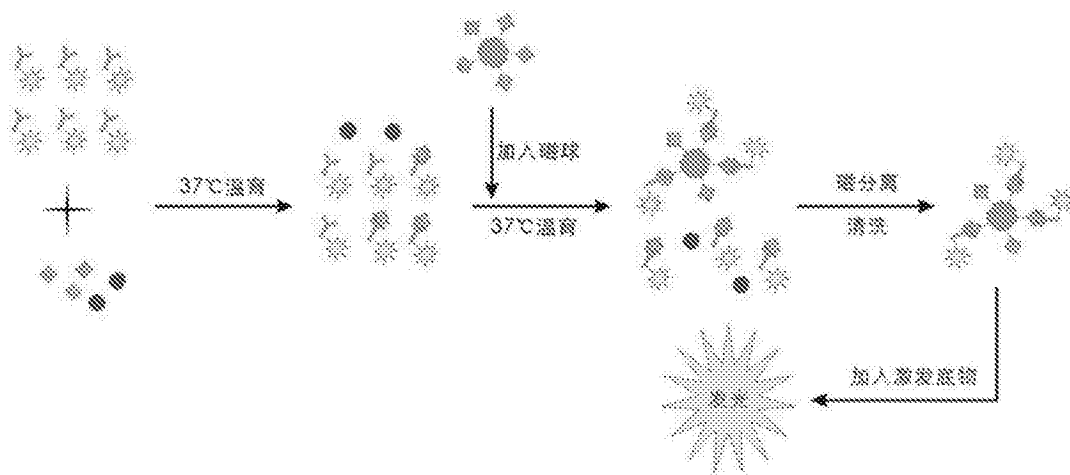


图2

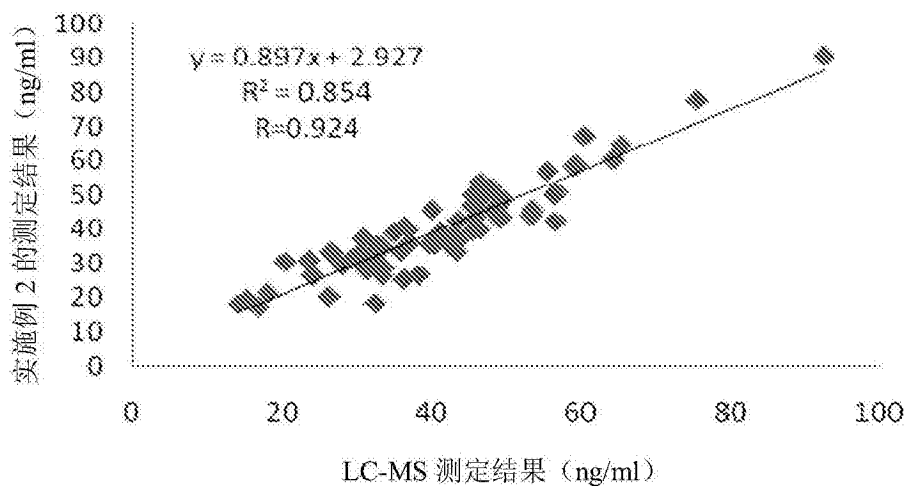


图3

## 试剂盒稳定性对比图

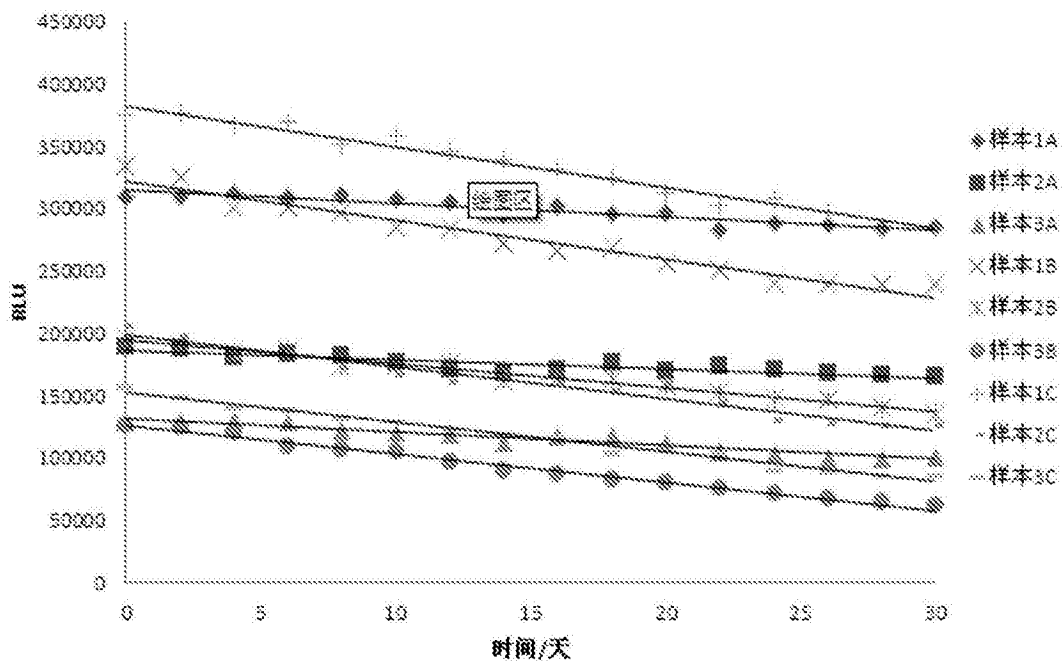


图4

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于检测25-羟基维生素D的检测剂及制备方法和应用                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN104076155B</a>                   | 公开(公告)日 | 2016-08-31 |
| 申请号            | CN201410328010.8                               | 申请日     | 2014-07-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司                             |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司                             |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司                             |         |            |
| [标]发明人         | 饶微<br>李婷华<br>杜凯<br>袁锦云<br>罗凯<br>余慧玲            |         |            |
| 发明人            | 饶微<br>李婷华<br>杜凯<br>袁锦云<br>罗凯<br>余慧玲            |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/82 G01N33/532                           |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/54326 G01N33/82                         |         |            |
| 代理人(译)         | 刘烽                                             |         |            |
| 审查员(译)         | 胡晓佳                                            |         |            |
| 其他公开文献         | CN104076155A                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供了一种用于检测羟基维生素D的检测剂及其制备方法，以及其在25-羟基维生素D免疫学检测中的应用。该检测剂包括25-羟基维生素D抗原衍生物与蛋白载体形成的偶联物，以及被所述偶联物包被的磁球。通过对25-羟基维生素D抗原衍生物进行上述修饰，所产生的检测剂的稳定性得到明显改善，对25-羟基维生素D检测的特异性和准确性也得到提高。本发明进一步提供包含所述检测剂的25-羟基维生素D检测试剂盒，其稳定性好、准确度高、通用性强。

