



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104062440 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201410308883. 2

CN 103588872 A, 2014. 02. 19,

(22) 申请日 2014. 06. 30

CN 102985826 A, 2013. 03. 20,

CN 103857698 A, 2014. 06. 11,

(73) 专利权人 韩雅君

审查员 贾静

地址 710054 陕西省西安市雁塔路南段 2 号
南 6 号楼 6 单元

(72) 发明人 韩雅君

(74) 专利代理机构 西安创知专利事务所 61213

代理人 谭文琰

(51) Int. Cl.

G01N 33/82(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2012/129650 A1, 2012. 04. 10,

CN 103439519 A, 2013. 12. 11,

WO 2012/129650 A1, 2012. 04. 10,

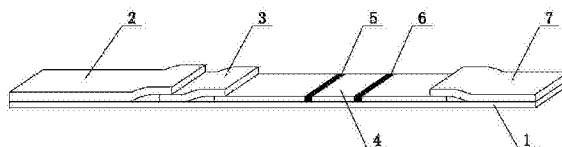
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种快速检测维生素 D 的试纸条

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测维生素 D 的试纸条,包括不吸水的支撑板,所述支撑板上依次设置有样品垫、结合垫、层析膜和吸收垫,所述结合垫上包被有标记物标记的维生素 D 与载体蛋白的偶联物,所述层析膜为硝酸纤维素膜,层析膜上设置有质控 C 线和检测 T 线,所述检测 T 线位于结合垫和质控 C 线之间,检测 T 线上包被有维生素 D 特异性抗体,质控 C 线上包被有能够与载体蛋白结合的特异性抗体。本发明的试纸条使用方便,操作简单,检测速度快,容易普及到基层医疗单位使用,满足市场需求,能够填补国内外市场空白,试纸条结果判断容易,用符号表示,摆脱了维生素 D 检测对设备、仪器以及人员的特殊要求。



1. 一种快速检测维生素D的试纸条,包括不吸水的支撑板(1),所述支撑板(1)上依次设置有样品垫(2)、结合垫(3)、层析膜(4)和吸收垫(7),所述结合垫(3)上包被有标记物标记的维生素D与载体蛋白的偶联物,所述层析膜(4)为硝酸纤维素膜,层析膜(4)上设置有质控C线(6)和检测T线(5),所述检测T线(5)位于结合垫(3)和质控C线(6)之间,检测T线(5)上包被有维生素D特异性抗体,质控C线(6)上包被有能够与载体蛋白结合的特异性抗体;所述维生素D特异性抗体为鼠抗维生素D单克隆抗体,维生素D特异性抗体的包被量为2 μ L,包被浓度为0.25mg/mL~5mg/mL;所述能够与载体蛋白结合的特异性抗体的包被量为2 μ L,包被浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL,其特征在于,所述标记物标记的维生素D与载体蛋白的偶联物的制备方法包括以下步骤:

步骤一、将1mg~10mg维生素D溶解于100 μ L有机溶剂中,然后在搅拌条件下向10mL浓度为0.1mg/mL~5mg/mL的载体蛋白溶液中逐滴加入溶解后的维生素D,再逐滴加入体积百分比浓度为50%的戊二醛水溶液至溶液中戊二醛的体积百分比浓度为1%~3%,搅拌5min~20min后移至4 $^{\circ}$ C下搅拌反应16h~18h,反应后的反应液用PBS缓冲溶液在4 $^{\circ}$ C下透析8h,透析过程中换液2~3次,透析物离心后取上清液,最后将上清液用0.45 μ m滤膜过滤,得到维生素D与载体蛋白的偶联物,-20 $^{\circ}$ C保存备用;

步骤二、向标记物溶液中加入步骤一中所述维生素D与载体蛋白的偶联物至溶液中维生素D的终浓度为10 μ g/mL~1000 μ g/mL,搅拌5min后加入BSA溶液至BSA的质量体积百分浓度为0.1%~1%,在4 $^{\circ}$ C下避光搅拌反应30min后加入聚乙二醇溶液至聚乙二醇的质量体积百分浓度为0.1%~1%,继续反应5min后离心,弃去上清,将沉淀复溶后得到标记物标记的维生素D与载体蛋白的偶联物。

2. 根据权利要求1所述的一种快速检测维生素D的试纸条,其特征在于,所述标记物为胶体金颗粒。

3. 根据权利要求1所述的一种快速检测维生素D的试纸条,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清白蛋白,能够与载体蛋白结合的特异性抗体为BSA免疫球蛋白。

4. 根据权利要求1所述的一种快速检测维生素D的试纸条,其特征在于,所述载体蛋白为鸡卵清白蛋白,能够与载体蛋白结合的特异性抗体为兔抗鸡卵清白蛋白。

5. 根据权利要求1所述的一种快速检测维生素D的试纸条,其特征在于,所述维生素D为25-羟基维生素D3或25-羟基维生素D2。

6. 根据权利要求1所述的一种快速检测维生素D的试纸条,其特征在于,所述检测T线(5)和质控C线(6)之间的距离为1cm。

7. 根据权利要求1所述的一种快速检测维生素D的试纸条,其特征在于,步骤一中所述有机溶剂为正己烷、乙腈、二甲基亚砜或1,4-二氧六环。

一种快速检测维生素D的试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种快速检测维生素D的试纸条。

背景技术

[0002] 维生素D在调节人体内钙代谢、维持肌肉骨骼和免疫系统的健康和稳定、预防部分恶性肿瘤发生有着不可或缺的作用。联合国卫生组织统计数据显示,全球大约90%人口患有维生素D不足之症。由于维生素D的分子特性(高度亲脂性)使其分离提纯难度增加,检测条件要求高,限制了维生素D检测在临床的推广应用,也限制了我们获得更多的有关维生素D的信息。到目前为止,已经报道并被临床接受的人血清维生素D检测方法有试剂盒检测以及仪器检测两类。

[0003] 一、仪器检测。1)直接检测法(Direct Detection Methodology)。这类方法中最著名的是液相色谱分析法(HPLC)以及后来改进了的液相色谱-质谱联用分析法(LC/MS)。2)自动分析检测仪(Automated Instrumentation Methodology)。仪器检测其优点是精确度高,缺点是仪器投资大,样品必须有机溶剂提取并纯化,分析人员需要经过专业培训,并且分析过程中有机溶剂消耗大,不利于环境保护。目前直接分析法多局限于研究型实验室使用。

[0004] 美国的Nichols Institute Diagnostics公司,DiaSorin公司以及德国Roche Diagnostics公司分别宣布其研发出血清维生素D自动检测仪器。应用此类自动分析仪,血清样品不需要任何前期处理即可直接进行检测。此类仪器检测的原理是化学荧光分析技术。其优点是仪器自动完成样品的分离,提取,检测,数据整理,结果判断等步骤。样品的检测周期约一个半小时。其缺点是自动分析仪价格尤其昂贵,限制了其的推广使用。

[0005] 二、试剂盒检测,按作用原理又分为以下几种:

[0006] 1)竞争性蛋白结合分析法(CPBA)

[0007] 2)放射免疫分析法(RIA)

[0008] 3)酶联免疫吸附法(ELISA)

[0009] 目前已有的试剂盒检测分析方法基本上均使用免疫反应板,通过直接或间接酶联免疫反应检测样品中维生素D含量。在这些检测方法中,绝大多数需要进行样品的有机溶剂提取,一些方法中反应物有同位素标记,易造成环境有机溶剂以及放射性物质污染,且检测必须由专业人员在实验室通过仪器操作完成。平均检测过程在100分钟左右。

[0010] 由上述分析可以看出,目前已有的维生素D检测方法,无论仪器检测或酶联免疫反应板检测,其均存在着仪器设备投资高,检测人员要求高,检测过程中有机溶剂或放射性物质污染等问题,使得维生素D检测普及受到限制,这也造成临床用药缺少检验指标支持,用药带有极大的盲目性,甚至给患者身体带来更多的危害。为此,开发一种操作简便、快速、价格低、适合基层推广使用的血清维生素D检测方法是未来的发展趋势,也是临床工作者和广大患者的迫切要求。

[0011] 侧向层流免疫分析技术兴起在上世纪90年代,在近10年有了长足的发展,已经被广泛应用于快速检测诊断领域。而维生素D的检测由于样品提纯过程复杂,样品不稳定,标

准参照物难得等等原因,一直未能在临床广泛开展。

发明内容

[0012] 本发明所要解决的技术问题在于针对上述现有技术的不足,提供一种快速检测维生素D的试纸条。该试纸条是基于竞争性免疫结合原理,采用侧向层析法检测维生素D浓度,其检测方法简单、结果易于判断、检测成本低廉,适合在基层医院、诊所以及体检中心等单位使用,对于降低维生素D检测成本、普及人体维生素D检测、减少临床盲目用药具有重要意义。

[0013] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:一种快速检测维生素D的试纸条,包括不吸水的支撑板,所述支撑板上依次设置有样品垫、结合垫、层析膜和吸收垫,其特征在于,所述结合垫上包被有标记物标记的维生素D与载体蛋白的偶联物,所述层析膜为硝酸纤维素膜,层析膜上设置有质控C线和检测T线,所述检测T线位于结合垫和质控C线之间,检测T线上包被有维生素D特异性抗体,质控C线上包被有能够与载体蛋白结合的特异性抗体。

[0014] 上述的一种快速检测维生素D的试纸条,所述标记物为胶体金颗粒。

[0015] 上述的一种快速检测维生素D的试纸条,所述载体蛋白为牛血清白蛋白,能够与载体蛋白结合的特异性抗体为BSA免疫球蛋白。

[0016] 上述的一种快速检测维生素D的试纸条,所述载体蛋白为鸡卵清白蛋白,能够与载体蛋白结合的特异性抗体为兔抗鸡卵清白蛋白。

[0017] 上述的一种快速检测维生素D的试纸条,所述维生素D为25-羟基维生素D3或25-羟基维生素D2。

[0018] 上述的一种快速检测维生素D的试纸条,所述检测T线和质控C线之间的距离为1cm。

[0019] 上述的一种快速检测维生素D的试纸条,所述维生素D特异性抗体为鼠抗维生素D单克隆抗体,维生素D特异性抗体的包被量为2 μ L,包被浓度为0.25mg/mL~5mg/mL。

[0020] 上述的一种快速检测维生素D的试纸条,所述能够与载体蛋白结合的特异性抗体的包被量为2 μ L,包被浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL。

[0021] 上述的一种快速检测维生素D的试纸条,所述标记物标记的维生素D与载体蛋白的偶联物的制备方法包括以下步骤:

[0022] 步骤一、将1mg~10mg维生素D溶解于100 μ L有机溶剂中,然后在搅拌条件下向10mL浓度为0.1mg/mL~5mg/mL的载体蛋白溶液中逐滴加入溶解后的维生素D,再逐滴加入体积百分比浓度为50%的戊二醛水溶液至溶液中戊二醛的体积百分比浓度为1%~3%,搅拌5min~20min后移至4 $^{\circ}$ C下搅拌反应16h~18h,反应后的反应液用PBS缓冲溶液在4 $^{\circ}$ C下透析8h,透析过程中换液2~3次,透析物离心后取上清液,最后将上清液用0.45 μ m滤膜过滤,得到维生素D与载体蛋白的偶联物,-20 $^{\circ}$ C保存备用;

[0023] 步骤二、向标记物溶液中加入步骤一中所述维生素D与载体蛋白的偶联物至溶液中维生素D的终浓度为10 μ g/mL~1000 μ g/mL,搅拌5min后加入BSA溶液至BSA的质量体积百分比浓度为0.1%~1%,在4 $^{\circ}$ C下避光搅拌反应30min后加入聚乙二醇溶液至聚乙二醇的质量体积百分比浓度为0.1%~1%,继续反应5min后离心,弃去上清,将沉淀复溶后得到标记物标

记的维生素D与载体蛋白的偶联物。

[0024] 上述的一种快速检测维生素D的试纸条,步骤一中所述有机溶剂为正己烷、乙腈、二甲基亚砷或1,4-二氧六环。

[0025] 本发明与现有技术相比具有以下优点:

[0026] 1、本发明的快速检测维生素D的试纸条是基于竞争性免疫结合原理,采用侧向层析法检测维生素D浓度,其检测方法简单、结果易于判断、检测成本低廉,适合在基层医院、诊所以及体检中心等单位使用,对于降低维生素D检测成本、普及人体维生素D检测、减少临床盲目用药具有重要意义。

[0027] 2、本发明的试纸条使用方便,操作简单,检测速度快,容易普及到基层医疗单位使用,满足市场需求,能够填补国内外市场空白。

[0028] 3、本发明的试纸条结果判断容易,用符号表示,摆脱了维生素D检测对设备、仪器以及人员的特殊要求。

[0029] 4、本发明的试纸条不仅可采用胶体金颗粒作为标记物,还可采用荧光化学物质、染色剂、乳胶颗粒、酶或磁性颗粒作为标记物,按照常规方法进行维生素D与载体蛋白的偶联物的标记。

[0030] 下面结合附图和实施例,对本发明的技术方案作进一步的详细描述。

附图说明

[0031] 图1为本发明试纸条的结构示意图。

[0032] 附图标记说明:

[0033] 1—支撑板; 2—样品垫; 3—结合垫;

[0034] 4—层析膜; 5—检测T线; 6—质控C线;

[0035] 7—吸收垫。

具体实施方式

[0036] 实施例1标记物标记的维生素D(25-羟基维生素D₃)与载体蛋白的偶联物的制备

[0037] 步骤一、将1mg维生素D(250HD33-HS,购于Toronto Research Chemicals公司)溶解于100μL有机溶剂(正己烷、乙腈、二甲基亚砷或1,4-二氧六环)中,然后在搅拌条件下向10mL浓度为0.1mg/mL的载体蛋白(牛血清白蛋白BSA,或鸡卵清白蛋白OVA)溶液中逐滴加入溶解后的维生素D,再逐滴加入体积百分比浓度为50%的戊二醛水溶液至溶液中戊二醛的体积百分比浓度为1%,搅拌5min后移至4℃下搅拌反应16h,反应后的反应液用PBS缓冲溶液在4℃下透析8h,透析过程中换液2~3次,透析物离心后取上清液,最后将上清液用0.45μm滤膜过滤,得到维生素D与载体蛋白的偶联物,-20℃保存备用;

[0038] 步骤二、向40nm胶体金溶液(OD1.0,购于上海杰一生物公司)中加入步骤一中所述维生素D与载体蛋白的偶联物至溶液中维生素D的终浓度为10μg/mL,搅拌5min后加入BSA溶液至BSA的终浓度(质量体积百分浓度)为0.1%(即100mL溶液中含0.1g BSA),在4℃下避光搅拌反应30min后加入聚乙二醇溶液至聚乙二醇的终浓度(质量体积百分浓度)为0.1%(即100mL溶液中含0.1g聚乙二醇),继续反应5min后离心,弃去上清,将沉淀复溶后得到标记物胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物(含维生素D30ng/mL~40ng/mL)。

[0039] 实施例2标记物标记的维生素D(25-羟基维生素D₂)与载体蛋白的偶联物的制备

[0040] 步骤一、将5mg维生素D(250HD₂,购于Toronto Research Chemicals公司)溶解于100μL有机溶剂(正己烷、乙腈、二甲基亚砷或1,4-二氧六环)中,然后在搅拌条件下向10mL浓度为2mg/mL的载体蛋白(牛血清白蛋白BSA,或鸡卵清白蛋白OVA)溶液中逐滴加入溶解后的维生素D,再逐滴加入体积百分比浓度为50%的戊二醛水溶液至溶液中戊二醛的体积百分比浓度为2%,搅拌10min后移至4℃下搅拌反应17h,反应后的反应液用PBS缓冲溶液在4℃下透析8h,透析过程中换液2~3次,透析物离心后取上清液,最后将上清液用0.45μm滤膜过滤,得到维生素D与载体蛋白的偶联物,-20℃保存备用;

[0041] 步骤二、向40nm胶体金溶液(OD1.0,购于上海杰一生物公司)中加入步骤一中所述维生素D与载体蛋白的偶联物至溶液中维生素D的终浓度为100μg/mL,搅拌5min后加入BSA溶液至BSA的终浓度(质量体积百分浓度)为0.5%,在4℃下避光搅拌反应30min后加入聚乙二醇溶液至聚乙二醇的终浓度(质量体积百分浓度)为0.5%,继续反应5min后离心,弃去上清,将沉淀复溶后得到标记物胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物(含维生素D30ng/mL~40ng/mL)。

[0042] 实施例3标记物标记的维生素D(25-羟基维生素D₃)与载体蛋白的偶联物的制备

[0043] 步骤一、将10mg维生素D(250HD₃,购于Toronto Research Chemicals公司)溶解于100μL有机溶剂(正己烷、乙腈、二甲基亚砷或1,4-二氧六环)中,然后在搅拌条件下向10mL浓度为5mg/mL的载体蛋白(牛血清白蛋白BSA,或鸡卵清白蛋白OVA)溶液中逐滴加入溶解后的维生素D,再逐滴加入体积百分比浓度为50%的戊二醛水溶液至溶液中戊二醛的体积百分比浓度为3%,搅拌20min后移至4℃下搅拌反应18h,反应后的反应液用PBS缓冲溶液在4℃下透析8h,透析过程中换液2~3次,透析物离心后取上清液,最后将上清液用0.45μm滤膜过滤,得到维生素D与载体蛋白的偶联物,-20℃保存备用;

[0044] 步骤二、向40nm胶体金溶液(购于上海杰一生物公司)中加入步骤一中所述维生素D与载体蛋白的偶联物至溶液中维生素D的终浓度为1000μg/mL,搅拌5min后加入BSA溶液至BSA的终浓度(质量体积百分浓度)为1.0%,在4℃下避光搅拌反应30min后加入聚乙二醇溶液至聚乙二醇的终浓度(质量体积百分浓度)为1.0%,继续反应5min后离心,弃去上清,将沉淀复溶后得到胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物(含维生素D30ng/mL~40ng/mL)。

[0045] 实施例4维生素D单克隆抗体的制备

[0046] 以实施例1、实施例2或实施例3的步骤一中制备的维生素D与载体蛋白的偶联物作为免疫原,按50μg/只~200μg/只的剂量免疫Balb/c小鼠,使其产生抗血清;约6-8周后取小鼠脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合得到杂交瘤细胞;所得杂交瘤细胞应用25-羟基维生素D₃包被的免疫反应板,经过酶联免疫反应筛选得到稳定分泌抗25-羟基维生素D₃的单克隆抗体的细胞株,筛选得到的细胞株经过克隆复选,复选采用25-羟基维生素D₂包被的免疫反应板,得到稳定分泌抗25-羟基维生素D的单克隆抗体的细胞株;在DMEM培养液中扩增培养细胞,细胞培养上清液经过离心,浓缩,经G蛋白(GE Healthcare Life Sciences)层析柱纯化,得到纯化后的鼠抗维生素D单克隆抗体,-20℃保存备用。

[0047] 实施例5胶体金标记维生素D结合垫的制备

[0048] 将玻纤膜(Ahlstrom8964)剪成5mm宽的长条,将剪好的玻纤膜置于平坦干净的玻

璃板上,将实施例1、实施例2或实施例3制备的胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物用稀释液稀释1.5倍,然后按每试纸条20 μ L~50 μ L的量均匀地加在玻纤膜上,使玻纤膜均匀浸透,在37 $^{\circ}$ C烘干(60分钟),防潮避光保存备用,所述稀释液为含有蔗糖、Tween-20和PEG20000的四硼酸钠溶液,稀释液中四硼酸钠的浓度为2mM~20mM,每100mL稀释液中含有0.5g~10g蔗糖,0.1mL~1mL Tween-20和0.5g~5g PEG20000。

[0049] 实施例6层析膜的制备

[0050] 层析膜选醋酸纤维素膜(millipore HF13502),裁成30mm宽的条形;检测T线5上包被鼠抗维生素D单克隆抗体,包被浓度0.25mg/mL~5mg/mL(优选0.25mg/mL、0.5mg/mL、1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、4mg/mL或5mg/mL),按2 μ L/试纸条抗体量制备,当采用的载体蛋白为牛血清白蛋白时,质控C线6上包被BSA免疫球蛋白(购于上海瑞齐生物技术有限公司),包被浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL(优选0.1mg/mL、0.3mg/mL、0.5mg/mL、0.8mg/mL或1.0mg/mL),按2 μ L/试纸条的抗体量制备,当采用的载体蛋白为鸡卵清白蛋白时,质控C线6上包被兔抗OVA,包被浓度为0.1mg/mL~1.0mg/mL(优选0.1mg/mL、0.3mg/mL、0.5mg/mL、0.8mg/mL或1.0mg/mL),按2 μ L/试纸条的抗体量制备,将裁好的醋酸纤维素膜固定于干净的有机玻璃板上,应用划膜仪(上海杰一生物科技公司)制备检测T线5以及质控C线6,检测T线5与质控C线6间距1cm;将制备好的层析膜在室温下真空干燥1小时,密封避光防潮保存。

[0051] 实施例7组装试纸条

[0052] 试纸条支撑板1购于上海杰一生物科技公司,支撑板1长7.8cm,宽5mm;将实施例6制备的层析膜裁成宽5mm,长3cm的层析膜4,使检测T线位于层析膜4的中央;样品垫2尺寸5mm $\times$ 2.3cm,吸收垫7尺寸5mm $\times$ 2.0cm;按图1所示,将样品垫2、结合垫3、层析膜4和吸收垫7依次粘贴于支撑板1上,样品垫2和结合垫3之间、结合垫3和层析膜4之间以及层析膜4和吸收垫7之间均有1mm~2mm的重叠,得到快速检测维生素D的试纸条,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C的环境中避光防潮储存,有效期12个月。

[0053] 实施例8试纸条的应用

[0054] 标准浓度样品制备:按照实施例1、实施例2或实施例3中步骤一的方法制备25-羟基维生素D与BSA的偶联物;HPLC检测偶联物中25-羟基维生素D的浓度;通过离心浓缩(Millipore Amicon centrifugal filter)得到标准样品,并使用BSA浓度为1mg/mL的PBS溶液稀释标准样品,得到维生素D浓度分别为:0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、25ng/mL、30ng/mL、35ng/mL、40ng/mL、60ng/mL和80ng/mL的标准浓度样品,其中0ng/mL样品为BSA浓度1mg/mL的PBS溶液。

[0055] 标准浓度样品检测:取20 μ L的标准浓度样品加入样品垫靠近结合垫的区域;将150 μ L检测剂逐滴加入样品垫靠近试纸条末端的部位,10~15分钟后观察结果;所述检测试剂为含有蔗糖、Tween-20和PEG20000的四硼酸钠溶液,检测试剂中四硼酸钠的浓度为2mM~20mM,每100mL检测试剂中含有0.5g~10g蔗糖,0.1mL~1mL Tween-20和0.5g~5gPEG20000。

[0056] 本发明试纸条的检测原理为:待检测样品与检测试剂混合液由毛细管引力引导沿试纸条向反应膜扩散,混合液经过结合垫时,结合垫所包被的胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物被释放并随混合液沿反应膜扩散;待检测样品中的维生素D与结合垫释放的胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物竞争与检测T线包被的维生素D单克隆抗体结

合;若待检样品中维生素D的含量高于所设定的检测阈值,则检测T线包被的抗体的结合位点由样品维生素D完全封闭,阻止胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物与之结合,检测T线不显色,而胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物可与质控C线包被的能够与载体蛋白结合的特异性抗体相结合,质控C线显色;若待检测样品液中维生素D含量低于所设检测阈值,则检测T线包被的抗体的结合位点不能被完全封闭,进而胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物与层析膜上维生素D抗体结合,检测T线显色,同时质控C线抗体也可与胶体金标记的维生素D与载体蛋白的偶联物结合,质控C线显色;若质控区不显示,则试纸条失效。

[0057] 结果判断:

[0058] 阴性:检测T线不显色,质控C线显出条带,判断为阴性,用“-”表示,代表所检样品维生素D含量超过所设检测阈值(维生素D含量充足);

[0059] 阳性:检测T线和质控C线均显示出条带,判断为阳性,用“+”表示,代表所检样品中维生素D含量低于所设检测阈值(维生素D含量不足);

[0060] 无效:当质控C线不显色,则判断为无效试纸条。

[0061] 标准浓度样品检测结果见表1。

[0062] 表1标准浓度维生素D样品检测结果

[0063]

25-羟基维生素D浓度(ng/mL)	检测线T	质控线C
0	+	+
10	+	+
20	+	+
25	+	+
30	-	+
35	-	+
40	-	+
60	-	+
80	-	+

[0064] 表1结果显示:1)样品维生素D:0、10ng/mL、20ng/mL和25ng/mL T线和C线均呈阳性;2)T线在样品维生素D浓度大于等于30ng/mL时消失。本实验结果经过不同批次间重复检验。

[0065] 人血清维生素D浓度检测:

[0066] (1)人全血样品5例,经传统酶联免疫方法(25-羟基维生素D酶联免疫试剂盒,英国IDS公司)检测人全血样品中25-羟基维生素D的浓度;

[0067] (2)取各样品20μL,按上述标准浓度样品检测方法检测人全血样品中的25-羟基维生素D,结果见表2。

[0068] 表2传统酶联免疫检测与本发明试纸条检测结果对比

[0069]

25-羟基维生素 D 酶联免疫试剂盒 (IDS)			维生素 D 检测试纸条	
样品号码	25-羟基维生素 D 浓度 (nmol/L)	维生素 D 浓度	试纸条检测结果	维生素 D 浓度
1	132	正常	C 线 + T 线 -	正常
2	95	正常	C 线 + T 线 -	正常
3	93	正常	C 线 + T 线 -	正常
4	65	不足	C 线 + T 线 +	不足
5	43	不足	C 线 + T 线 +	不足

[0070] 从表2可以看出,传统酶联免疫检测的正常浓度范围(75nmol/L~150nmol/L)的样品在试纸条检测中检测T线不显色,而低于正常浓度范围的样品其试纸条检测T线显色。

[0071] 实施例9试纸条检测限制条件

[0072] 1、特异性实验

[0073] 1)非特异性结合实验

[0074] 配制不同浓度的BSA的PBS溶液,浓度范围由1mg/mL至20mg/mL,取20 μ L各浓度的BSA溶液,按实施例6所述方法检测抗原抗体与一般蛋白分子的非特异性结合反应。检测结果显示不同浓度的BSA溶液均不能使本发明的维生素D检测试纸条检测T线消失。证明本发明所述维生素D胶体金试纸条与普通蛋白分子无非特异性结合反应。

[0075] 2)特异性结合实验

[0076] 选取已知浓度的维生素D血清样品,分别加入维生素D蛋白偶联物(强化)或1mg/mL BSA溶液(稀释),然后应用本发明维生素D检测试纸条观察检测T线变化。检测结果如表3所示。

[0077] 表3已知浓度维生素D血清样品稀释或强化后试纸条检测结果

[0078]

样品25-羟基维生素D浓度	维生素D实际浓度	T线	C线
17ng/mL	17ng/mL	+	+
17ng/mL稀释(50%v/v)	8.5ng/mL	+	+
17ng/mL强化	25ng/mL	+	+
17ng/mL强化	35ng/mL	-	+
38ng/mL	38ng/mL	-	+
38ng/mL稀释(50%v/v)	19ng/mL	+	+
38ng/mL稀释(66%v/v)	25ng/mL	+	+
38ng/mL稀释(80%v/v)	30ng/mL	-	+

[0079] 从表3可以看出,试纸条检测结果中检测T线的变化与样品中维生素D浓度的变化有关,与其他蛋白浓度变化没有明显关系。

[0080] 2、维生素D试纸条稳定性实验

[0081] 将试纸条干燥密封后,置于37 $^{\circ}$ C培养箱7天,然后取出,平衡至室温;同一生产批号

的试纸条干燥密封后,保存在4℃,于试验前取出,平衡至室温;然后比较两个试纸条免疫分析实验结果。结果显示37℃储存一周对本试纸条检测结果无影响。

[0082] 本发明的试纸条不仅可采用胶体金颗粒作为标记物,还可采用荧光化学物质、染色剂、乳胶颗粒、酶或磁性颗粒作为标记物,按照常规方法进行维生素D与载体蛋白的偶联物的标记。

[0083] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明做任何限制,凡是根据发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效结构变化,均仍属于本发明技术方案的保护范围内。

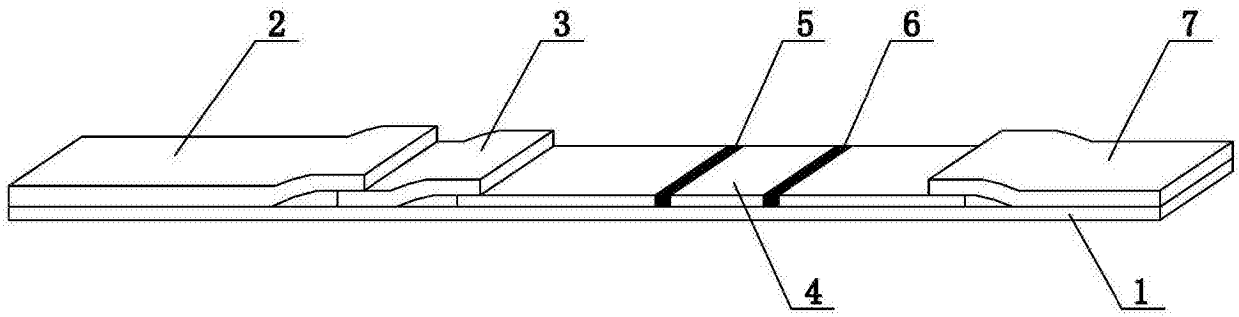


图1

专利名称(译)	一种快速检测维生素D的试纸条		
公开(公告)号	CN104062440B	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201410308883.2	申请日	2014-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	韩雅君		
申请(专利权)人(译)	韩雅君		
当前申请(专利权)人(译)	韩雅君		
[标]发明人	韩雅君		
发明人	韩雅君		
IPC分类号	G01N33/82 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/82		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN104062440A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测维生素D的试纸条，包括不吸水的支撑板，所述支撑板上依次设置有样品垫、结合垫、层析膜和吸收垫，所述结合垫上包被有标记物标记的维生素D与载体蛋白的偶联物，所述层析膜为硝酸纤维素膜，层析膜上设置有质控C线和检测T线，所述检测T线位于结合垫和质控C线之间，检测T线上包被有维生素D特异性抗体，质控C线上包被有能够与载体蛋白结合的特异性抗体。本发明的试纸条使用方便，操作简单，检测速度快，容易普及到基层医疗单位使用，满足市场需求，能够填补国内外市场空白，试纸条结果判断容易，用符号表示，摆脱了维生素D检测对设备、仪器以及人员的特殊要求。

