



(21) 申请号 201810498236.0

G01N 33/531 (2006.01)

(22) 申请日 2018.05.22

审查员 张婷

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108918848 A

(43) 申请公布日 2018.11.30

(73) 专利权人 德康润生物科技(北京)有限公司

地址 100000 北京市北京经济技术开发区

科创六街88号院8号楼4单元301室

(72) 发明人 杨玮 王昊 董常慧 陶然 王慧

张锦萍

(74) 专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理

事务所(普通合伙) 11371

代理人 杨志廷

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

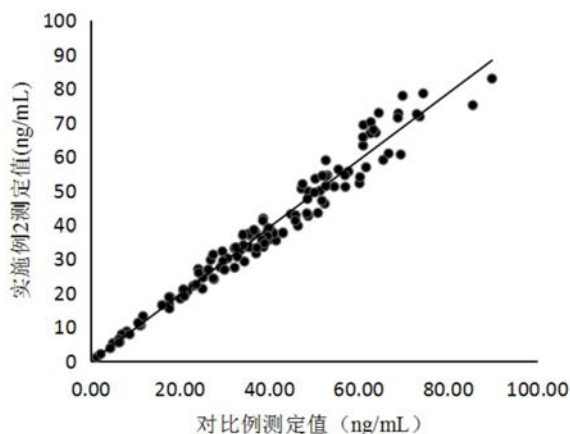
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

维生素D释放剂及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及体外诊断免疫检测试剂技术领域,尤其是涉及一种维生素D释放剂及其制备方法与应用。维生素D释放剂,包括第一试剂和第二试剂;第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 1~5份,甲醇100~300份和余量的磷酸盐缓冲液;第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.0115~0.0462份,牛血清白蛋白0.75~2.25份和酪蛋白钠0.15~1.2份。本发明试剂组成成分较简单,处理时间短,避免了长时间处理所带来的时间成本,降低了检测工续的复杂度,同时操作步骤较少,减小了引入系统误差的概率,结果的可控性更强,更加有利于在临床应用上的推广使用。



1. 一种维生素D释放剂,其特征在于,包括第一试剂和第二试剂;

所述第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 2份,甲醇200份和余量的磷酸盐缓冲液;所述磷酸盐缓冲液的浓度为10mM;

所述第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.023份,牛血清白蛋白1.5份和酪蛋白钠0.75份;

所述第一试剂与所述第二试剂混合均匀后,用于与待处理的样品混合。

2. 根据权利要求1所述的维生素D释放剂,其特征在于,所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.4。

3. 一种如权利要求1或2所述的维生素D释放剂的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

第一试剂的制备:取配方量各原料,搅拌均匀;

第二试剂的制备:取配方量各原料,溶解后,得到原液,对原液进行冷冻干燥。

4. 根据权利要求3所述的维生素D释放剂的制备方法,其特征在于,所述冷冻干燥的工艺包括以下步骤:

将所述原液置于-80℃下冷冻2h;

抽真空1h后,开始升温,当隔板温度升至5~20℃时,保持12h;

继续调节冷冻干燥的温度至20℃,保持2h,取出,备用。

5. 权利要求1或2所述的维生素D释放剂或应用如权利要求3或4所述的维生素D释放剂的制备方法制备得到的维生素D释放剂在测定血清中25-羟维生素D含量中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述测定血清中25-羟维生素D含量包括以下步骤:

将150μL第一试剂加入第二试剂中,振荡混匀,使其完全溶解,得到混合试剂;

向上述混合试剂中加入5μL血清样品,混合均匀后,室温下反应10min;

吸取上述反应后的血清样品120μL,采用胶体金试纸条进行免疫层析反应,并采用胶体金免疫分析仪进行检测。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述免疫层析反应的时间为20min。

维生素D释放剂及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断免疫检测试剂技术领域,尤其是涉及一种维生素D释放剂及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 维生素D在人体骨代谢中起着十分重要的作用。25-羟维生素D是维生素D在体内的主要存在形式。研究表明,25-羟维生素D₂和25-羟维生素D₃的含量可以表征人体维生素D的水平。临床上合并检测这两个项目来指示总维生素D的含量。

[0003] 对于维生素D的定量检测方法大致分为:高效液相色谱法(HPLC),液相色谱-质谱联用法(LC-MS)和免疫法。其中免疫法以其操作简便、检测仪器在临床上应用较普遍等优点,被广大体外诊断试剂厂家所采纳,包括索灵(Diasorin)、罗氏(Roche)、雅培(Abbott)等知名体外诊断厂商先后推出了该项目的相关产品。

[0004] 由于25羟维生素D多与载体蛋白结合(10%-15%与白蛋白松散结合,85%-90%与维生素D结合蛋白紧密结合),而只有不足1%的是以游离形式存在的。游离形态是其可检出的形态,所以在检测前需对其进行释放。维生素D结合蛋白与维生素D亲和常数较高,目前,要使维生素D结合蛋白与维生素D解离,需要采用较剧烈的变性方法,所采用的释放剂组成成分较复杂,操作步骤较多,处理时间较长。

发明内容

[0005] 本发明的第一目的在于提供一种维生素D释放剂,以解决现有技术中存在的释放剂组成成分较复杂,操作步骤较多且处理时间较长的技术问题。

[0006] 本发明的第二目的在于提供一种上述维生素D释放剂的制备方法,以解决现有技术中存在的释放剂组成成分较复杂、制备工艺繁琐的技术问题。

[0007] 本发明的第三目的在于提供一种上述维生素D释放剂的应用。

[0008] 基于上述第一目的,本发明提供了一种维生素D释放剂,包括第一试剂和第二试剂;

[0009] 所述第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 1~5份,甲醇100~300份和余量的磷酸盐缓冲液;

[0010] 所述第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.0115~0.0462份,牛血清白蛋白0.75~2.25份和酪蛋白钠0.15~1.2份。

[0011] 可选地,所述第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 1.5~3.5份,甲醇150~250份和余量的磷酸盐缓冲液;

[0012] 所述第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.015~0.04份,牛血清白蛋白1~2份和酪蛋白钠0.5~1份。

[0013] 可选地,所述第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 2份,甲醇200份和余量的磷酸盐缓冲液;

[0014] 所述第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成：二硫苏糖醇0.023份，牛血清白蛋白1.5份和酪蛋白钠0.75份。

[0015] 可选地，所述磷酸盐缓冲液的浓度为10mM。

[0016] 可选地，所述磷酸盐缓冲液的pH值为7.4。

[0017] 基于上述第二目的，本发明还提供了一种上述维生素D释放剂的制备方法，所述制备方法包括以下步骤：

[0018] 第一试剂的制备：取配方量各原料，搅拌均匀；

[0019] 第二试剂的制备：取配方量各原料，溶解后，得到原液，对原液进行冷冻干燥。

[0020] 可选地，所述冷冻干燥的工艺包括以下步骤：

[0021] 将所述原液置于-80℃下冷冻2h；

[0022] 抽真空1h后，开始升温，当隔板温度升至5~20℃时，保持12h；

[0023] 继续调节冷冻干燥的温度至20℃，保持2h，取出，备用。

[0024] 基于上述第三目的，本发明还提供了一种上述维生素D释放剂或应用所述的维生素D释放剂的制备方法制备得到的维生素D释放剂在测定血清中25-羟维生素D含量中的应用。

[0025] 可选地，所述测定血清中25-羟维生素D含量包括以下步骤：

[0026] 将150μL第一试剂加入第二试剂中，振荡混匀，使其完全溶解，得到混合试剂；

[0027] 向上述混合试剂中加入5μL血清样品，混合均匀后，室温下反应10min；

[0028] 吸取上述反应后的血清样品120μL，采用胶体金试纸条进行免疫层析反应，并采用胶体金免疫分析仪进行检测。

[0029] 可选地，所述免疫层析反应的时间为20min。

[0030] 与现有技术相比，本发明的有益效果为：

[0031] 本发明提供的维生素D释放剂，包括第一试剂和第二试剂；所述第一试剂以1000重量份计，包括吐温-80 1~5份，甲醇100~300份和余量的磷酸盐缓冲液；所述第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成：二硫苏糖醇0.0115~0.0462份，牛血清白蛋白0.75~2.25份和酪蛋白钠0.15~1.2份。上述各原料相容性良好，通过各原料特定组分和配比之间的协同配合，实现了对维生素D的快速有效地释放。本发明试剂组成成分较简单，在使用时，将第一试剂和第二试剂混合均匀后，加入待处理的样品，只需对样品进行一次处理，而不必对其进行额外的分离操作，处理时间为即时性的，样本与释放剂充分混合之后就代表释放的完成，避免了长时间处理所带来的时间成本，降低了检测工续的复杂度，同时操作步骤较少，减小了引入系统误差的概率，结果的可控性更强，更加有利于在临床应用上的推广使用。

[0032] 本发明提供的维生素D释放剂的制备方法，包括第一试剂的制备：取配方量各原料，搅拌均匀；以及第二试剂的制备：取配方量各原料，溶解后，得到原液，对原液进行冷冻干燥。该方法操作简单，且通过采用冷冻干燥工艺，能够有效地缓解二硫苏糖醇被空气氧化，同时也能够使牛血清白蛋白和酪蛋白钠得到有效的保护，从而延长了第二试剂的保存期，保证良好的释放效果。

[0033] 本发明提供的维生素D释放剂或通过本发明提供的维生素D释放剂的制备方法制备得到的维生素D释放剂，能够应用在测定血清中25-羟维生素D含量中，操作过程简单，处理时间短，避免了长时间处理所带来的时间成本，降低了检测工续的复杂度，同时操作步骤

较少,减小了引入系统误差的概率,结果的可控性更强,更加有利于在临床应用上的推广使用。

[0034] 综上所述,本发明具有上述诸多的优点及实用价值,并在同类产品中未见有类似的方法公开发表或使用而确属创新,产生了较好的实用的效果,并具有广泛的产业价值。

附图说明

[0035] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0036] 图1为本发明实施例2提供的维生素D释放剂与对比例提供的维生素D释放剂的释放效果的比较关系图。

具体实施方式

[0037] 下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例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。未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0038] 以下实施例中,除特别注明外,所使用的原料均市售可得。

[0039] 本发明提供了一种维生素D释放剂,包括第一试剂和第二试剂;

[0040] 第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 1~5份,甲醇100~300份和余量的磷酸盐缓冲液;

[0041] 第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.0115~0.0462份,牛血清白蛋白0.75~2.25份和酪蛋白钠0.15~1.2份。

[0042] 其中,吐温-80是一种表面活性剂,易溶于水,溶于乙醇、植物油、乙酸乙酯、甲醇和甲苯。其含量例如可以为,但不限于1份、2份、3份、4份或5份。

[0043] 甲醇为蛋白变性剂,使维生素D结合蛋白的分子结构发生变化,以使与其结合的维生素D得到释放。甲醇的含量例如可以为,但不限于100份、120份、140份、160份、180份、200份、220份、240份、250份、260份、280份或300份。

[0044] 磷酸盐缓冲液为缓冲体系,能够溶解并保护试剂,与吐温-80配合,能够使血液样本中的蛋白颗粒物与脂类物质得到充分的分散,使后续处理更加彻底。

[0045] 二硫苏糖醇是一种常用还原剂,又叫二巯基苏糖醇(简称DTT),具有很强的还原性,其还原性很大程度上是由于其氧化状态六元环(含二硫键)的构象稳定性。二硫苏糖醇的作用是使维生素D结合蛋白的二硫键得到还原,使变性更彻底,对目的物质(维生素D)的释放更完全。二硫苏糖醇的含量例如可以为,但不限于0.0115份、0.0175份、0.023份、0.0285份、0.0345份、0.0385份、0.0425份或0.0462份。

[0046] 由于第一试剂中含有可使蛋白质变性的成分,这些成分会使反应中的抗体结构发生一定的变化,从而带来削弱免疫反应的不良影响。该第二试剂中含多种保护蛋白(牛血清

白蛋白和酪蛋白钠),用以中和第一试剂对免疫反应所产生的负面影响,最终实现增强免疫反应的作用。

[0047] 其中,牛血清白蛋白的含量例如可以为,但不限于0.75份、0.95份、1.15份、1.35份、1.5份、1.75份、1.8份、1.95份、2.15份或2.25份。

[0048] 酪蛋白钠的含量例如可以为,但不限于0.15份、0.45份、0.75份、1.05份或1.2份。

[0049] 需要说明的是,第二试剂在生产时,以“支”为单位,每支第二试剂中,含有的有效成分为二硫苏糖醇0.0115~0.0462份,牛血清白蛋白0.75~2.25份和酪蛋白钠0.15~1.2份。

[0050] 本发明提供的维生素D释放剂,各原料相容性良好,通过各原料特定组分和配比之间的协同配合,实现了对维生素D的快速有效地释放。本发明试剂组成成分较简单,在使用时,将第一试剂和第二试剂混合均匀后,加入待处理的样品,只需对样品进行一次处理,而不必对其进行额外的分离操作,处理时间为即时性的,样本与释放剂充分混合之后就代表释放的完成,避免了长时间处理所带来的时间成本,降低了检测工续的复杂度,同时操作步骤较少,减小了引入系统误差的概率,结果的可控性更强,更加有利于在临床应用上的推广使用。

[0051] 在一个优选的实施方式中,第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 1.5~3.5份,甲醇150~250份和余量的磷酸盐缓冲液;

[0052] 第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.015~0.04份,牛血清白蛋白1~2份和酪蛋白钠0.5~1份。

[0053] 当本发明提供的维生素D释放剂应用上述组分和配比协同配合时,能够对维生素D的快速有效地释放,结果的可控性更强,更加有利于在临床应用上的推广使用。

[0054] 优选地,第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 2份,甲醇200份和余量的磷酸盐缓冲液;

[0055] 第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.023份,牛血清白蛋白1.5份和酪蛋白钠0.75份。

[0056] 当本发明提供的维生素D释放剂应用上述组分和配比协同配合时,能够对维生素D的快速有效地释放,结果的可控性更强,更加有利于在临床应用上的推广使用。

[0057] 在一个优选的实施方式中,磷酸盐缓冲液的浓度为10mM。

[0058] 在一个优选的实施方式中,磷酸盐缓冲液的pH值为7.4。

[0059] 优选地,磷酸盐缓冲液主要包括以下质量份的原料:十二水合磷酸氢二钠3580份,磷酸二氢钾240份,氯化钠8000份,氯化钾200份以及去离子水1000份。制备得到pH值为7.4、浓度为10mM的磷酸盐缓冲液。

[0060] 需要说明的是,也可以采用市售常见的磷酸盐缓冲液。

[0061] 本发明还提供了上述维生素D释放剂的制备方法,包括以下步骤:

[0062] 第一试剂的制备:取配方量各原料,搅拌均匀;

[0063] 第二试剂的制备:取配方量各原料,溶解后,得到原液,对原液进行冷冻干燥。

[0064] 本发明提供的维生素D释放剂的制备方法,操作简单,且通过采用冷冻干燥工艺,能够有效地缓解二硫苏糖醇被空气氧化,同时也能够使牛血清白蛋白和酪蛋白钠得到有效的保护,从而延长了第二试剂的保存期,保证良好的释放效果。

- [0065] 在一个优选的实施方式中,冷冻干燥的工艺包括以下步骤:
- [0066] (a) 将原液置于-80℃下冷冻2h;
- [0067] (b) 抽真空1h后,开始升温,当隔板温度升至5~20℃时,保持12h;
- [0068] (c) 继续调节冷冻干燥的温度至20℃,保持2h,取出,备用。
- [0069] 可选地,该冷冻干燥的工艺可以采用现有的冷冻干燥机进行。
- [0070] 步骤(a)中,将原液分装至规格为500uL的EP管中,原液的含量为20uL/支。例如,可以称取二硫苏糖醇11.565mg,牛血清白蛋白750mg,酪蛋白钠375mg,用10mL去离子水溶解。
- [0071] 步骤(b)中,隔板温度例如可以为,但不限于5℃、10℃、15℃或20℃。
- [0072] 本发明还提供了上述维生素D释放剂或应用的维生素D释放剂的制备方法制备得到的维生素D释放剂在测定血清中25-羟维生素D含量中的应用。
- [0073] 在一个优选的实施方式中,测定血清中25-羟维生素D含量包括以下步骤:
- [0074] 将150μL第一试剂加入第二试剂中,振荡混匀,使其完全溶解,得到混合试剂;其中,第二试剂的量为一支。
- [0075] 向上述混合试剂中加入5μL血清样品,混合均匀后,室温下反应10min;
- [0076] 吸取上述反应后的血清样品120μL,采用胶体金试纸条进行免疫层析反应,并采用胶体金免疫分析仪进行检测。
- [0077] 胶体金试纸条为现有技术,由胶体金垫(胶体金标记鼠源25羟维生素D单克隆抗体)、硝酸纤维素膜(C线包被羊抗鼠IgG多克隆抗体,T线包被牛血清白蛋白偶联的25羟维生素D)、样品垫、吸样垫和PVC板组成。
- [0078] 在一个优选的实施方式中,免疫层析反应的时间为20min。
- [0079] 下面结合具体实施例和对比例,对本发明作进一步说明。
- [0080] 实施例1
- [0081] 本实施例提供了一种维生素D释放剂,包括第一试剂和第二试剂;第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 1份,甲醇100份和余量的磷酸盐缓冲液;
- [0082] 第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.0115份,牛血清白蛋白0.75份和酪蛋白钠0.15份。
- [0083] 实施例2
- [0084] 本实施例提供了一种维生素D释放剂,包括第一试剂和第二试剂;第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 2份,甲醇200份和余量的磷酸盐缓冲液;
- [0085] 第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.023份,牛血清白蛋白1.5份和酪蛋白钠0.75份。
- [0086] 实施例3
- [0087] 本实施例提供了一种维生素D释放剂,包括第一试剂和第二试剂;第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 3份,甲醇250份和余量的磷酸盐缓冲液;
- [0088] 第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成:二硫苏糖醇0.0345份,牛血清白蛋白1.8份和酪蛋白钠0.45份。
- [0089] 实施例4
- [0090] 本实施例提供了一种维生素D释放剂,包括第一试剂和第二试剂;第一试剂以1000重量份计,包括吐温-80 5份,甲醇300份和余量的磷酸盐缓冲液;

[0091] 第二试剂主要由以下重量份的原料制备而成：二硫苏糖醇0.046份，牛血清白蛋白2.25份和酪蛋白钠1.2份。

[0092] 实施例5~8

[0093] 本实施例提供了一种维生素D释放剂，应用如下制备方法制备得到：

[0094] 第一试剂的制备：取配方量的实施例1~7提供的第一试剂的各原料，搅拌均匀；

[0095] 第二试剂的制备：取配方量的实施例1~7提供的第二试剂的各原料，溶解后，得到原液，对原液进行冷冻干燥。

[0096] 实施例9~12

[0097] 本实施例提供了一种应用本发明实施例1~4提供的维生素D释放剂测定血清中25-羟维生素D含量的方法，包括以下步骤：

[0098] 将150 μ L第一试剂加入第二试剂中，振荡混匀，使其完全溶解，得到混合试剂；其中，第二试剂的量为一支。

[0099] 向上述混合试剂中加入5 μ L血清样品，混合均匀后，室温下反应10min；

[0100] 吸取上述反应后的血清样品120 μ L，采用胶体金试纸条进行免疫层析反应，并采用胶体金免疫分析仪进行检测。

[0101] 对比例

[0102] 本对比例为现有的维生素D释放剂，具体为DiaSource公司的Elisa试剂盒 (25OH VITAMIN D TOTAL ELISA ASSAY)。

[0103] 实验例1

[0104] 为了对本发明提供的维生素D释放剂进行进一步的说明，分别采用本发明实施例1~4及对比例提供的维生素D释放剂处理血清样品，重复10次，测定OD_{450nm}值，计算维生素D的含量，结果如下表所示：

[0105]

测定次数	对比例	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4
1	54.96	37.65	49.99	39.44	32.27
2	50.84	37.16	49.96	35.45	36.03
3	51.62	35.06	53.53	41.28	35.37
4	54.67	38.19	49.62	35.14	36.7
5	49.61	37.88	53.25	41.71	32.12
6	46.62	34.11	49.12	38.88	33.86
7	53.18	33.12	46.09	37.85	36.81
8	51.64	35.57	53.52	41.05	34.06
9	48.99	35.58	49.2	35.79	34.54
10	55.16	33.08	51.05	38.28	33.33
均值 (ng/mL)	51.73	35.74	50.53	38.49	34.51
标准差	2.83	1.93	2.37	2.45	1.7
变异 (%)	5.5%	5.4%	4.7%	6.4%	4.9%
与对照的相 对偏差 (%)	0.0%	-30.9%	-2.3%	-25.6%	-33.3%

[0106] 通过上表可以看出,实施例2对样本的释放效果最接近对比例。故综合考虑,优选实施例2作为维生素D释放剂的最佳配方。

[0107] 实验例2

[0108] 本发明实施例2提供的维生素D释放剂与对比例的测定值的相关性分析:

[0109] 相关性考察所用样品:随机抽取临床体检机构血清样本120例。

[0110] 采用本发明实施例2提供的维生素D释放剂,并按照实施例10提供的方法测得的结果与采用对比例提供的维生素D释放剂按照酶联免疫分析法测得的结果进行比较(参见图1所示),并采用免疫竞争法进行回归分析,其线性回归方程为: $y=0.9839x-0.1754$,相关系数为 $r^2=0.9655$,结果表明,采用本发明实施例2提供的维生素D释放剂处理后的样本与对比例处理后的样本具有较高的一致性,本发明能够很好地应用与血清样本中的25-羟维生素D的检测,具有广泛的应用前景。

[0111] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

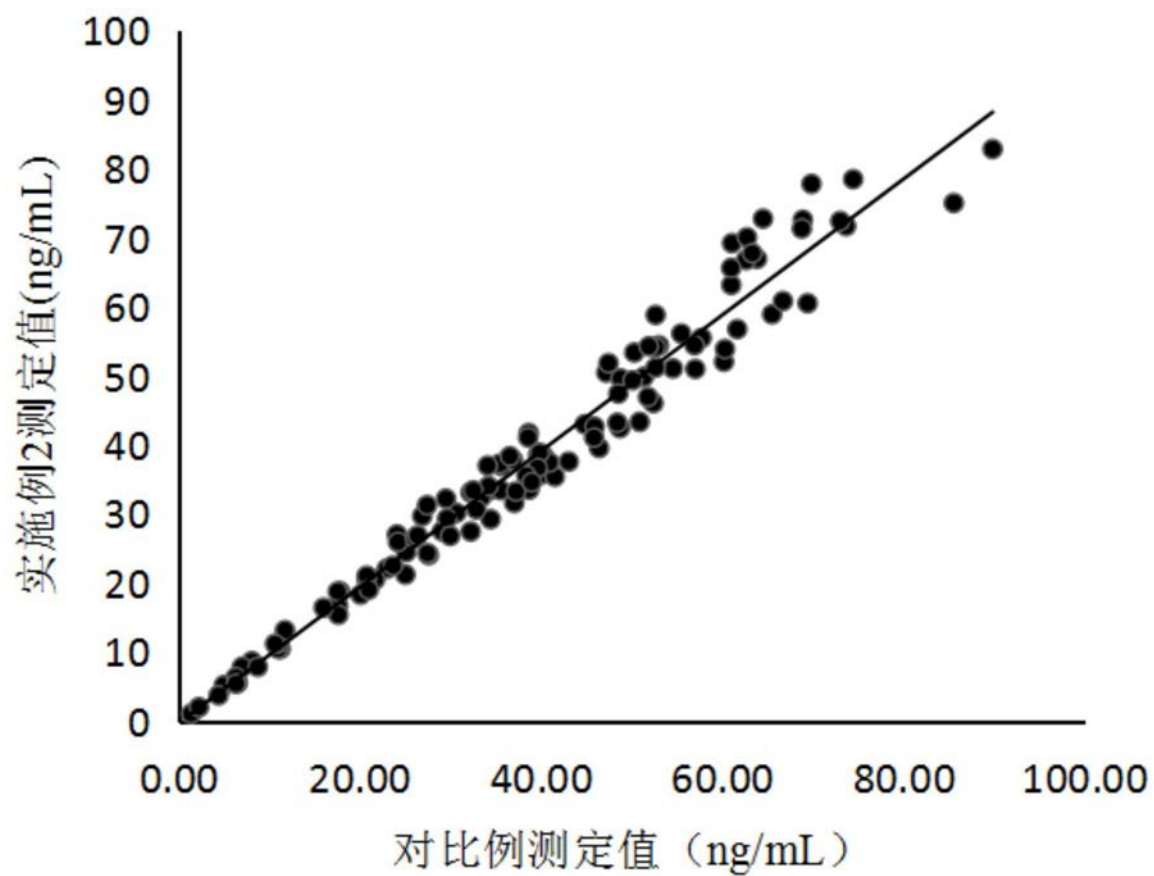


图1