



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116449031 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 18

(21) 申请号 202310300955.8

G01N 33/543 (2006.01)

(22) 申请日 2017.07.28

(30) 优先权数据

62/368,940 2016.07.29 US

(62) 分案原申请数据

201780046834.8 2017.07.28

(71) 申请人 DIAZYME 研究室有限公司

地址 美国加利福尼亚州圣地亚哥

(72) 发明人 袁崇生 法赫里·本·赛达

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理

有限公司 11129

专利代理师 刘丹

(51) Int. Cl.

G01N 33/82 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

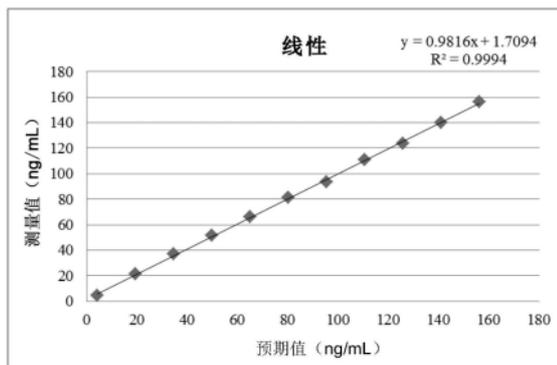
权利要求书2页 说明书23页 附图7页

(54) 发明名称

用于测定维生素D的方法和成分

(57) 摘要

本发明提供用于测定样品中维生素D部分的方法和成分,例如试剂盒,包括或使用,特别包括,能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液,和至少两种抗体,例如至少两种单克隆抗体,其分别偶联在颗粒上,例如乳胶颗粒上,其中至少一种所述抗体(或第一抗体)对维生素D部分具有特异的结合亲和力,而至少另一种所述抗体(或第二抗体)对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物(如果存在于所述样品中)具有特异的结合亲和力。在一些实施例中,测量所述抗体与维生素D部分之间的凝集反应引起的光学变化以确定样品中维生素D的含量。还提供用于测定样品中维生素D部分的试剂盒和反应混合物。



1. 用于测定样品中维生素D部分的试剂盒,所述试剂盒包括:
  - a) 能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液;
  - b) 至少两种抗体,例如至少两种单克隆抗体,其连接到,例如分别偶联到,表面或颗粒,例如,乳胶颗粒,其中所述抗体中至少一种抗体(或第一抗体)对维生素D部分具有特异的结合亲和力,而至少另一种所述抗体(或第二抗体)对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物(如果存在于所述样品中)具有特异的结合亲和力,并且任选地,所述抗体不同于所述维生素D部分的天然维生素D结合蛋白。
2. 权利要求1所述的试剂盒,还包括用于评估所述至少两种抗体和所述维生素D部分之间的结合以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量的工具。
3. 权利要求1所述的试剂盒,其包括:
  - 1) 包含酸性pH缓冲液的第一检测试剂,所述酸性pH缓冲液包含盐、聚合物和/或洗涤剂,和
  - 2) 包含配对抗体的第二检测试剂,所述抗体分别偶联在颗粒上,例如纳米颗粒上,其中一种抗体或第一抗体对25(OH)D具有特异的结合亲和力,而另一种抗体或第二抗体对第一抗体和25(OH)D之间形成的复合物具有特异的结合亲和力。
4. 使用权利要求1-3任一所述的试剂盒测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:
  - a) 形成样品和第一检测试剂的混合物并孵育所述混合物一段时间,然后向所述混合物中加入第二检测试剂;和
  - b) 通过测量反应混合物的光学变化并使用一组25(OH)D校准品来定量样品中的25(OH)D。
5. 使用权利要求1-3任一所述的试剂盒测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:
  - a) 在第一检测试剂存在的情况下使样品接触包被在微量滴定板上的第一抗体,并孵育混合物一段时间;和
  - b) 加入标记有信号分子(例如HRP)的第二抗体,和
  - c) 在孵育和洗涤步骤之后,基于信号强度和校准曲线确定所述样品中维生素D部分的存在、缺失和/或数量。
6. 用于测定样品中维生素D部分的试剂盒,所述试剂盒包括:
  - a) 酸性pH缓冲液;
  - b) 包被有第一抗体的颗粒,例如磁性颗粒,所述第一抗体对所述维生素D部分具有特异的结合亲和力;
  - c) 标记有信号生成分子的第二抗体,所述信号生成分子选自吖啶酯、异鲁米诺、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或荧光素;
  - d) 化学发光或荧光信号生成所需的底物溶液和/或引发剂。
7. 权利要求6所述的试剂盒,还包括底物溶液和/或引发剂。
8. 权利要求6或7所述的试剂盒,其被配置为在信号检测之前包含相分离步骤和/或洗涤步骤的非均相测定。
9. 用于测定样品中维生素D部分的制品,所述制品包括权利要求6-8任一所述的试剂

盒,以及化学发光或荧光信号生成所需的底物溶液和/或引发剂。

10. 用于测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:

a) 使所述样品接触第一试剂,所述第一试剂包含酸性pH缓冲液以使所述样品中的维生素D部分与其结合蛋白分离;

b) 使步骤a)得到的所述样品中的维生素D部分接触第二试剂,所述第二试剂包含颗粒,例如磁性颗粒,所述颗粒包被有第一抗体,所述第一抗体对所述维生素D部分具有特异的结合亲和力以形成维生素D部分/第一抗体复合物;

c) 使所述维生素D部分/第一抗体复合物接触第三试剂,所述第三试剂包含标记有信号生成基团或分子的第二抗体,以形成所述维生素D部分、所述第一抗体和所述标记有信号生成基团或分子的第二抗体之间的复合物;和

d) 评估来自所述维生素D部分、所述第一抗体复合物和所述第二抗体之间的复合物的信号,以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量。

11. 权利要求10所述的方法,其中所述信号生成基团或分子选自由吡啶酯、异鲁米诺、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和荧光素组成的组。

12. 用于测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:

a) 使含有或疑似含有维生素D部分的样品接触能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液,以及至少两种抗体,例如至少两种单克隆抗体,所述抗体中至少一种抗体(或第一抗体)对维生素D部分具有特异的结合亲和力并连接到固体表面,例如微量滴定板或颗粒的固体表面,而至少另一种所述抗体(或第二抗体)对所述第一抗体和所述维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力并标记有信号生成基团;和

b) 评估所述抗体,例如所述特异性抗体,和所述维生素D部分之间的结合以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量。

13. 权利要求12所述的方法,其中所述抗体不同于所述维生素D部分的天然维生素D结合蛋白。

14. 权利要求10-13任一所述的方法,其中所述测定在40分钟或更短的时间内完成。

15. 权利要求1-14任一所述的方法,其中使用免疫测定分析仪进行所述测定。

## 用于测定维生素D的方法和成分

本申请是申请号为201780046834.8,申请日为2017年7月28日,发明名称为“用于测定维生素D的方法和成分”的中国发明专利申请的分案申请。

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2016年7月29日提交的序列号为62/368,940的美国临时申请的优先权,通过引用将其全部内容并入本文中。

### 技术领域

[0002] 本发明主要涉及维生素D检测领域。具体地,本发明提供用于测定样品(如生物液体)中维生素D部分的新方法和试剂盒。

### 背景技术

[0003] 维生素D是一种类固醇样、脂溶性激素原。维生素D有两种主要形式:D2(麦角钙化醇)和D3(胆钙化醇)。维生素D3可以由人体在紫外线照射下产生。维生素D3和维生素D2通过它们在肝脏和肾脏中的代谢作用均转化为活性激素1,25-二羟基维生素D。

[0004] 维生素D3由皮肤经阳光照射(紫外线辐射)后合成以及从饮食中获取,主要来自鱼肝油和蛋黄中。维生素D2主要从营养补充剂中获取,美国唯一用于治疗维生素D缺乏症的处方药由维生素D2制成。维生素D3或D2由肝脏代谢为25(OH)D,然后由肾脏转化为1,25(OH)<sub>2</sub>D。25(OH)维生素D是反映体内维生素D水平的主要循环形式,但1,25(OH)<sub>2</sub>维生素D是最具生物活性的形式。

[0005] 阳光照射不足或者饮食或补充剂摄入不足可能导致维生素D缺乏。维生素D缺乏会减弱骨矿化,导致儿童佝偻病和成人骨软化,并可能导致骨质疏松症。最近的研究表明,维生素D缺乏也与癌症、心血管疾病、糖尿病、多发性硬化症、帕金森病、阿尔茨海默病、药物疗效和全因死亡率有关。

[0006] 维生素D典型的正常或足够范围约为30-100ng/mL。维生素D水平约为10-30ng/mL被认为是不足。维生素D水平低于10ng/mL被认为是严重缺乏。维生素D水平超过150ng/mL被认为是中毒。

[0007] 本领域已知多种维生素D测定方法。例如,在美国专利号为5,821,020,7,087,395B1,7,482,162B2,7,964,363B2,8,133,694B2,美国专利公开号为2004/0132104A1以及WO

2012/091569A1中公开了多种维生素D测定方法。

[0008] 仍然需要一种可靠、灵敏和特定的方法来测定样品(如生物液体)中的维生素D部分,尤其是可以进行均相测定的方法和/或适用于典型临床实验室环境中的自动临床化学分析仪的方法。

### 发明内容

[0009] 一方面,本发明提供一种用于测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:a)

使含有或疑似含有维生素D部分的样品接触能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液,以及至少两种抗体(例如,至少两种单克隆抗体),其连接到(例如,分别连接到)表面或颗粒,其中一种抗体(例如,一种单克隆抗体或第一抗体)对维生素D部分具有特异的结合亲和力,而另一种抗体(例如,另一种单克隆抗体或第二抗体)对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力;和b)评估所述特异性抗体和所述维生素D部分之间的结合以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量。任选地,所述抗体不同于维生素D部分的天然维生素D结合蛋白。

[0010] 另一方面,本发明提供一种用于测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:a)使含有或疑似含有维生素D部分的样品接触能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液,以及至少两种抗体(例如,至少两种单克隆抗体),所述抗体中至少一种抗体(或第一抗体)对维生素D部分具有特异的结合亲和力并连接到固体表面(例如,微量滴定板或颗粒的固体表面),而至少另一种所述抗体(或第二抗体)对所述第一抗体和所述维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力并标记有信号生成分子;和b)评估所述抗体(例如,所述特异性抗体)和所述维生素D部分之间的结合以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量。任选地,所述抗体不同于维生素D部分的天然维生素D结合蛋白。

[0011] 仍在另一方面,本发明提供一种用于测定样品中维生素D部分的试剂盒,所述试剂盒包括:a)能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液;b)至少两种抗体(例如,至少两种单克隆抗体),其连接到(例如,分别连接到)表面或颗粒(如乳胶颗粒),其中一种抗体(例如,一种单克隆抗体或第一抗体)具有结合维生素D部分的亲和力,而另一种抗体(例如,另一种单克隆抗体或第二抗体)具有结合第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物的亲和力。

[0012] 还在另一方面,本发明提供一种用于测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:a)使所述样品接触第一试剂,所述第一试剂包含使所述样品中的维生素D部分与其结合蛋白分离的酸性pH缓冲液;b)使步骤a)得到的所述样品中的维生素D部分接触第二试剂,所述第二试剂包含颗粒(例如,磁性颗粒),所述颗粒包被有第一抗体,所述第一抗体对所述维生素D部分具有特异的结合亲和力以形成维生素D部分/第一抗体复合物;和c)使所述维生素D部分/第一抗体复合物接触第三试剂,所述第三试剂包含标记有信号生成分子的所述第二抗体,以形成所述维生素D部分、所述第一抗体复合物和所述标记有信号生成基团或分子的第二抗体之间的复合物;和d)评估来自所述维生素D部分、所述第一抗体和所述第二抗体之间的复合物的信号,以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量。在一些实施例中,所述信号生成基团或分子选自由吖啶酯、异鲁米诺、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和荧光素组成的组。

[0013] 还在另一方面,本发明提供一种用于测定样品中维生素D部分的反应混合物,所述反应混合物包括:能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液;和至少两种抗体(例如,至少两种单克隆抗体),其连接到(例如,分别连接到)表面或颗粒(如乳胶颗粒),其中一种抗体(例如,一种单克隆抗体或第一抗体)具有结合维生素D部分的亲和力,而另一种抗体(例如,另一种单克隆抗体或第二抗体)具有结合第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物的亲和力。

[0014] 在一些实施例中,第一抗体可以包被在表面或颗粒(如磁性颗粒)上,而另一种抗体或第二抗体可以使用信号生成分子标记,例如酶(例如,碱性磷酸酶和过氧化物酶),或者化学发光信号生成分子(如吖啶酯、异鲁米诺),或者荧光分子(如荧光素和绿色荧光蛋白)。当反应混合物中存在维生素D部分时,第二抗体结合由样品中的维生素D部分与包被在表面或颗粒上的第一抗体形成的复合物以形成复合物,例如,“三明治”复合物(第一抗体-维生素D-第二抗体),所述表面或颗粒上形成的“三明治”的数量与样品中维生素D部分的数量成正比,并且可以通过检测第二抗体分子上标记的信号生成分子的信号来定量评估。

[0015] 在一些实施例中,所述至少两种抗体可以连接到同一颗粒或表面,或者相同类型的颗粒或表面。在其它实施例中,所述至少两种抗体可以连接到不同颗粒或表面,或者不同类型的颗粒或表面。

[0016] 在一些实施例中,本发明的方法和试剂盒可以使用或者合并美国专利申请13/707,514和14/169,118,以及PCT申请PCT/US2015/013831中记载和/或请求保护的方法和试剂盒的选定元素或特征,这些申请的全部内容通过引用并入本文中。

## 附图说明

[0017] 图1显示了在AU680分析仪上使用乳胶增强的免疫分析法测定总25(OH)D的示例性或典型的校准曲线。

[0018] 图2显示了在AU680分析仪上使用乳胶颗粒增强的免疫测定法测定总25(OH)D的示例性或典型的线性曲线。

[0019] 图3显示了使用乳胶增强的免疫测定法与商用的化学发光免疫测定法(DiaSorin测定法)测定总25(OH)D的示例性或典型的方法比较数据。

[0020] 图4显示了使用乳胶颗粒增强的免疫测定法与金标准方法(LC-MS/MS法)测定总25(OH)D的示例性或典型的方法比较数据。

[0021] 图5显示了使用基于磁性颗粒的免疫分析检测方法测定总25(OH)D的示例性或典型的校准曲线。

[0022] 图6显示了使用基于磁性颗粒的免疫分析检测方法与商用的化学发光免疫测定法测定总25(OH)D的示例性或典型的方法比较数据。

[0023] 图7显示了示例性的线性试验结果。

[0024] 图8显示了示例性的方法比较结果。

[0025] 图9显示了示例性的基质比较结果(K2-EDTA v.血清)。

[0026] 图10显示了示例性的基质比较结果(K3-EDTA v.血清)。

[0027] 图11显示了示例性的基质比较结果(K2-Li-肝素v.血清)。

[0028] 图12显示了示例性的方法比较结果(v.Roche VD测定)。

图13显示了使用Beckman AU 680分析仪的测定程序。

本发明的详细说明

[0029] 为了清楚地公开,而非以限制的方式,本发明的详细说明分为以下各部分。

### A. 定义

[0030] 除非另有定义,本文使用的全部科技术语具有与本发明所属领域技术人员通常理解的含义相同的含义。本文引用的所有专利、专利申请、公开的专利申请以及其它出版物,

通过引用的方式将它们的全部内容并入本文中。如果本节规定的定义与通过引用并入本文的专利、专利申请、公开的专利申请以及其它出版物中规定的定义相反或不一致,本节所规定的定义胜于通过引用并入本文的定义。

[0031] 如本文所使用的,“一(个或种)”(a)或“一(个或种)”(an)是指“至少一(个或种)”或者“一或更多(个或种)”。

[0032] 如本文所使用的,“维生素D部分”指维生素D家族的所有成员或形式,是一组负责肠道吸收钙和磷酸盐的脂溶性开环类固醇。示例性的维生素D形式包括维生素D<sub>1</sub>,D<sub>2</sub>(麦角钙化醇),D<sub>3</sub>(胆钙化醇),D<sub>4</sub>和D<sub>5</sub>。示例性的维生素D部分还包括钙二醇(calcidiol),也被称为骨化二醇(calcifediol, INN);25-羟基胆钙化醇,或25-羟基维生素D,简称25(OH)D,它是特定的维生素D代谢物,通过在血清中测定其含量以确定一个人的维生素D状况;以及钙三醇,维生素D的生物活性形式。在一些实施例中,“维生素D部分”指25-羟基维生素D,简称25(OH)D,包括D2和D3形式。

[0033] 如本文所使用的,“抗体”不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(例如Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv)、单链(ScFv)、双特异性抗体、由抗体片段形成的多特异性抗体、其突变体、包含抗体部分的融合蛋白,以及包含所需特异性抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它修饰结构。抗体包括任何类别的抗体,例如IgG、IgA或IgM(或其子类别),且抗体不必属于任何特定的类别。如本文所使用的,术语“特异地结合”是指结合试剂(例如抗体)的特异性使其优先结合到确定的分析物或靶点,例如维生素D部分。当存在其它潜在靶点时,通过结合试剂或抗体识别特定分析物或靶点是这种结合的一个特征。在一些实施例中,特异地结合分析物的结合试剂避免结合待测样品中的其它干扰部分。

[0034] “维生素D结合蛋白”也被称为gc-球蛋白(组特异性成分)。在一些实施例中,“维生素D结合蛋白”是指白蛋白家族中的维生素D结合蛋白。“维生素D结合蛋白”通常存在于血浆、腹水、脑脊液和/或许多细胞类型的表面。“维生素D结合蛋白”通常与维生素D及其代谢产物结合并将其运输到体内的靶组织。人类典型的“维生素D结合蛋白”由GC基因编码。在一些实施例中,“维生素D结合蛋白”是指本领域已知的维生素D结合蛋白,例如,<https://en.wikipedia.org/wiki/Albumin>网站中所记载的维生素D结合蛋白。

[0035] 在一些实施例中,使用<https://en.wikipedia.org/wiki/Ascites>网站中所记载的“腹水”。在一些实施例中,使用[https://en.wikipedia.org/wiki/Cerebrospinal\\_fluid](https://en.wikipedia.org/wiki/Cerebrospinal_fluid)网站中所记载的“脑脊液”。

[0036] 如本文所使用的,术语“评估”旨在包括定量和定性测定,即获得样品中分析物的量或浓度的绝对值,以及获得指示样品中分析物水平的指数、比率、百分比、图像或其它值。评估可以是直接或间接的,并且实际检测到的化学物质当然不必是分析物本身,而可以是,例如其衍生物或一些其它物质。

[0037] 如本文所使用的,术语“样品”是指任何可能含有需要进行分析物测定的分析物的物质。所述样品可以是生物样品,例如生物液体或生物组织。生物液体的例子包括尿液、血液、血浆、血清、唾液、精液、粪便、痰、脑脊液、泪液、粘液、羊水等。生物组织是细胞的集合体,通常是特定种类的细胞及其细胞间物质,形成人、动物、植物、细菌、真菌或病毒结构的结构材料之一,包括结缔、上皮、肌肉和神经组织。生物组织的例子还包括器官、肿瘤、淋巴结、动脉和单个细胞。

[0038] 如本文所使用的,“血样”是指全血样品或者从中提取的血浆或者血清部分。优选地,所述血样是指人类血样,例如全血或从中提取的血浆或血清部分。此外优选地,在测定之前对血样进行预处理,通过基本上去除所有血红蛋白(即红血球)以消除或显著减少血红蛋白分子的氧化干扰。

[0039] 如本文所使用的,术语“全血”是指未经分割的血样,含有细胞和液体成分。如本文所使用的,“全血”是指在血块凝结之前检测的新鲜抽取的血液,或常规抽取的血样,其可被抽取到真空采血管中,并可含有抗凝剂,如肝素锂、EDTA等,或者在常规临床检测过程中可向其中加入一种或多种其它的标准临床药剂。

[0040] 如本文所使用的,短语“基本上去除所有血红蛋白”是指血样,其中优选地,至少约50%、60%或70%,更优选地,至少约80%、90%或95%,以及最优选地,至少约96%、97%、98%、99%或100%的样品中含有血红蛋白的红细胞已被去除以消除或显著减少血红蛋白的氧化干扰。

[0041] 如本文所使用的,术语“血浆”是指全血中的液体、非细胞成分。根据所使用的分离方法不同,血浆可以完全不含细胞成分,或者可以含有不同数量的血小板和/或少量其它细胞成分。由于血浆包括各种凝血因子,如纤维蛋白原,因此术语“血浆”区别于如下所述的“血清”。

[0042] 如本文所使用的,术语“血清”是指哺乳动物全血清,如人全血清。此外,如本文所使用的,“血清”是指去除了凝血因子(例如纤维蛋白原)的血浆。

[0043] 如本文所使用的,术语“液体”是指任何能够流动的成分。因此,液体包括以半固体、糊状物、溶液、水性混合物、凝胶、乳液、乳霜和其它此类成分的形式存在的成分。

[0044] 如本文所使用的,术语“疾病”或“病症”是指生物体病理状态,由例如感染或遗传缺陷等引起,并具有可识别的症状。

[0045] 如本文所使用的,“接触”是指将两种或多种成分放在一起。“接触”可以通过在流体或半流体混合物中混合所有成分来实现。当一种或多种组分与固体表面上的一种或多种其它组分(如固体组织切片或基质)接触时也可实现“接触”。

[0046] 如本文所使用的,术语“比较”通常是指为了指出两个或多个值之间的相似之处或不同之处而进行检查。优选地,“比较”是指定量比较,例如,从另一个值中减去一个值、计算两个值的比率、计算一个值相对于另一个值的百分比,或将这些类型的计算结合起来生成一个数字。如本文所使用的,“比较”还指由人进行的比较,由计算机或其它处理器进行的比较,以及由人与计算机或其它处理器联合进行的比较。

[0047] 应理解的是,本文描述的本发明的各方面和实施例包括“组成的”和/或“基本上组成”方面和实施例。

[0048] 本发明的其它目的、优点和特点通过以下结合附图的说明将变得显而易见。

#### B. 用于测定维生素D部分的方法

[0049] 一方面,本发明提供一种用于测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:a)使含有或疑似含有维生素D部分的样品接触酸性pH缓冲液,至少两种抗体(例如,至少两种单克隆抗体),其连接到(例如,分别连接到)颗粒或表面(例如,乳胶颗粒),其中一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有特异的结合亲和力,而另一种抗体或第二抗体对第一抗体和所述维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力;和b)评估结合(例如,由所述

至少两种抗体和所述维生素D部分之间形成复合物而导致的颗粒凝集程度,例如,所述至少两种单克隆抗体和所述维生素D部分之间形成的“三明治”复合物)以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量。任选地,所述抗体不同于维生素D部分的天然维生素D结合蛋白。在一些实施例中,所述至少两种抗体可以连接到同一颗粒或表面,或者相同类型的颗粒或表面。在其它实施例中,所述至少两种抗体可以连接到不同颗粒或表面,或者不同类型的颗粒或表面。

[0050] 另一方面,本发明提供一种用于测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:  
a) 使含有或疑似含有维生素D部分的样品接触能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液,以及至少两种抗体(例如,至少两种单克隆抗体),所述抗体中至少一种抗体(或第一抗体)对维生素D部分具有特异的结合亲和力并连接到固体表面(例如,微量滴定板或颗粒的固体表面),而至少另一种所述抗体(或第二抗体)对所述第一抗体和所述维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力并标记有信号生成基团;和b) 评估所述抗体(例如,所述特异性抗体)和所述维生素D部分之间的结合以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量。任选地,所述抗体不同于维生素D部分的天然维生素D结合蛋白。

[0051] 在一些实施例中,本方法在评估特异性抗体与维生素D部分之间的结合之前,不包括从样品中去除蛋白质(如维生素D部分的天然维生素D结合蛋白)的步骤(参见,例如美国专利号5,821,020)。在其它实施例中,本方法不包括任何洗涤步骤。

[0052] 本方法能够以任何合适的测定形式进行。在一些实施例中,本方法以均相测定形式进行。在其它实施例中,本方法以非均相测定形式进行。

[0053] 样品可在一个步骤或多个步骤(例如,2或3步)中与酸性pH缓冲液以及分别包被在颗粒(例如,乳胶颗粒)上的两种抗体(例如,两种单克隆抗体)接触。示例性的多步接触顺序可以是:1) 酸性pH缓冲液,孵育一段时间,然后添加分别包被有两种所述单克隆抗体的乳胶颗粒;2) 酸性pH缓冲液、包被有第一抗体的乳胶颗粒,孵育一段时间,然后添加包被有所述第二抗体的乳胶颗粒。

[0054] 包含样品、酸性pH缓冲液、分别包被有两种特异性抗体的颗粒(例如,乳胶颗粒)的最终反应混合物的pH可以是任何合适的值或范围。在一些实施例中,包含样品、酸性pH缓冲液和乳胶颗粒的最终反应混合物的pH为2.5或更高。在其它实施例中,包含样品、酸性pH缓冲液和乳胶颗粒的最终反应混合物的pH为13或更低。还在其它实施例中,包含样品、酸性pH缓冲液和乳胶颗粒的最终反应混合物的pH在约2.5至约13的范围内,例如,约2.5,3,3.5,4,4.5,5,5.5,5.6,5.7,5.8,5.9,6,6.5,7,7.5,8,8.5,9,9.5,10,10.5,11,11.5,12,12.5或13。

[0055] 在一些实施例中,本方法不包括使样品接触包含环糊精、水杨酸钠和NaOH的维生素D释放组合物的步骤,例如美国专利号7,087,395B1中公开的维生素D释放组合物。

[0056] 在一些实施例中,本方法不包括使样品接触全氟烷基酸,或其盐,以从维生素D结合蛋白上释放25(OH)维生素D的步骤,例如在W0 2012/091569 A1中公开的步骤。

[0057] 在一些实施例中,本方法不包括使样品接触具有内切和外切蛋白水解活性的丝氨酸蛋白酶以消化样品中维生素D结合蛋白的步骤,例如美国专利号7,964,363B2中公开的步骤。

[0058] 本方法可用于任何合适的目的。在一些实施例中，本方法可用于评估个体中维生素D部分的状态，所述样品是从所述个体获得和/或衍生的生物样品。本方法可用于评估任何合适的个体(例如哺乳动物、非人类哺乳动物、人类或实验动物)中维生素D部分的状态。

[0059] 本方法可用于测定任何合适的样品中的维生素D部分。在一些实施例中，所述样品是生物液体，例如全血、血浆、血清或尿液。

[0060] 本方法可用于测定样品中任何合适的维生素D部分。在一些实施例中，所述维生素D部分是维生素D<sub>3</sub>、维生素D<sub>2</sub>、维生素D代谢物或1,25-二羟基维生素D<sub>3</sub>[1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]。在其它实施例中，所述维生素D部分是25-羟基维生素D(25(OH)D)，例如，25(OH)D<sub>3</sub>、25(OH)D<sub>2</sub>或者25(OH)D<sub>2</sub>和25(OH)D<sub>3</sub>的总和。

[0061] 本方法中可使用任何酸性pH缓冲液。在一些实施例中，酸性pH缓冲液可以是乙酸钠、柠檬酸钠或磷酸，或在酸性pH范围内具有缓冲功能的其它缓冲液。

[0062] 在其它实施例中，特异地结合25(OH)D的抗体以及特异地结合25(OH)D与第一抗体的复合物的抗体可以是任何合适的形式。例如，可以使用多克隆抗体或单克隆抗体或抗体片段(例如Fab片段)或单链抗体。还在其它实施例中，可使用美国专利公开号2011/0097733A1中公开的示例性抗体。

[0063] 任何合适的颗粒都可用于当前基于颗粒的测定形式。在一些实施例中，所述颗粒包括聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基萘、聚(二乙烯基苯)、聚乙烯萘、苯乙烯的共聚物、丙烯酸二乙烯苯、萘、碳60、磁珠、金、银、硅、二氧化硅、二氧化铬和/或二氧化钛。在其它的实施例中，所述颗粒为纳米颗粒。所述纳米颗粒可以具有任何合适的尺寸或直径。例如，所述纳米颗粒可以具有约30nm至约500nm范围内的任何直径，例如，约30nm, 40nm, 50nm, 60nm, 70nm, 80nm, 90nm, 100nm, 150nm, 200nm, 250nm, 300nm, 350nm, 400nm, 450nm或500nm。

[0064] 本方法可以用于任何合适的测定形式。在一些实施例中，使用颗粒增强的免疫比浊法来实施本方法。参见，例如美国专利号4,703,018。在其它实施例中，使用颗粒增强的免疫散射比浊法来实施本方法。参见，例如美国专利号4,690,906。仍在其它实施例中，使用基于磁性颗粒(珠)的免疫测定法来实施本方法。参见，例如Yu et al., *Journal of Immunological Methods*, 218(1-2):1-8(1998)。还在其它实施例中，使用基于颗粒的免疫凝集测定法来实施本方法。参见，例如Wang et al., *Clinical Chemistry*, 52(11):2065-2071(2006)。

[0065] 在一些实施例中，磁性颗粒的大小可在500至2000纳米，优选800-1500纳米范围内。

[0066] 在一些实施例中，所述磁性颗粒与第一抗体偶联，所述第二抗体与信号分子(例如吖啶酯、异鲁米诺、碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)偶联。

[0067] 在一些实施例中，使用两步法化学发光免疫测定形式进行维生素D测定。使样品与酸性pH缓冲液接触，孵育一段时间，然后添加结合在颗粒(例如，磁性颗粒)上的抗体。孵育后，使用洗涤缓冲液洗涤颗粒(例如，磁性颗粒)1-3次，然后将颗粒重悬于缓冲液中，并添加信号分子标记的第二抗体。孵育后，再次洗涤所述磁性颗粒，然后将颗粒重悬于缓冲液中，并添加化学发光反应所需底物。

[0068] 在一些实施例中，使用一步法化学发光免疫测定形式进行维生素D测定。使样品同时接触酸性pH缓冲液、包被有第一抗体的颗粒(例如磁性颗粒)以及标记有信号分子的第二

抗体。孵育一段时间后,洗涤所述颗粒(例如磁性颗粒)1-3次,然后将颗粒重悬于缓冲液中,并添加化学发光反应所需底物。

[0069] 在一些实施例中,使用均相测定形式实施本方法。在其它实施例中,使用非均相测定形式实施本方法。仍在其它实施例中,使用夹心或竞争测定形式实施本方法。还在其它实施例中,使用酶联免疫吸附测定(ELISA)的形式实施本方法。

[0070] 可以使用任何合适的均相测定形式。在一些实施例中,在单一反应混合物中进行均相测定,没有相分离或洗涤步骤,例如美国专利公开号U.S.2004/0132104 A1或美国专利号8,133,694 B2中公开的颗粒分离和洗涤步骤。

[0071] 本方法可以进行任何合适的反应时间。在一些实施例中,本方法的总测定时间为约60分钟或更短,例如,约59,58,57,56,55,54,53,52,51,50,49,48,47,46,45,44,43,42,41,40,39,38,37,36,35,34,33,3,31,30,29,28,27,26,25,24,23,22,21,20,19,18,17,16,15,14,13,12,11,10,9,8,7,6,5,4,3,2或1分钟。例如,本方法从开始(例如,加入样品和/或试剂)到信号读出时刻的测定时间为约60分钟或更短,例如,约59,58,57,56,55,54,53,52,51,50,49,48,47,46,45,44,43,42,41,40,39,38,37,36,35,34,33,3,31,30,29,28,27,26,25,24,23,22,21,20,19,18,17,16,15,14,13,12,11,10,9,8,7,6,5,4,3,2或1分钟。

[0072] 本方法可以在任何合适的分析仪上进行。在一些实施例中,本方法在通用化学分析仪或临床化学分析仪上进行,例如,Roche,Hitachi,Modular P,Cobas系列,Beckman/Olympus AU系列,Beckman Synchron和DXC系列,或Abbot Architect系列的通用化学分析仪或临床化学分析仪。

[0073] 本方法可以达到任何合适的精度。在一些实施例中,本方法可以达到约30%或更小的精度或CV,例如,约30%,29%,28%,27%,26%,25%,24%,23%,22%,21%,20%,19%,18%,17%,16%,15%,14%,13%,12%,11%,10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,1%或更小。例如,对于30ng/ml或更少的维生素D部分水平,例如,约30ng/ml,25ng/ml,20ng/ml,15ng/ml,10ng/ml,5ng/ml,4ng/ml,3ng/ml,2ng/ml,1ng/ml或更少,本方法可以达到约5%或更小的精度或CV,例如,约5%,4%,3%,2.5%,2%,1.5%,1%,0.5%或更小。在另一个实施例中,对于100ng/ml或更少的维生素D部分水平,例如,约100ng/ml,90ng/ml,80ng/ml,70ng/ml,60ng/ml,50ng/ml,40ng/ml,30ng/ml,20ng/ml,10ng/ml或更少,本方法可以达到约10%或更小的精度或CV,例如,约10%,9%,8%,7%,6%,5%,4.5%,4.0%,3%,2.5%,2%,1.5%,1%,0.5%或更小。

### C. 用于测定维生素D部分的试剂盒及其应用

[0074] 另一方面,本发明提供一种用于测定样品中维生素D部分的试剂盒,所述试剂盒包括:a)能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液(R1);b)由至少两种抗体包被(例如,分别包被)的表面或颗粒(如乳胶颗粒)(R2),其中一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有特异的结合亲和力,而另一种抗体或第二抗体对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力。任选地,所述抗体不同于维生素D部分的天然维生素D结合蛋白。在一些实施例中,所述至少两种抗体可以连接到同一颗粒或者相同类型的颗粒或表面。在其它实施例中,所述至少两种抗体可以连接到不同颗粒或表面,或者不同类型的颗粒或表面。

[0075] 本试剂盒中可以使用任何合适的酸性pH缓冲液。在一些实施例中,酸性pH缓冲液

是乙酸钠缓冲液,或柠檬酸钠缓冲液或磷酸缓冲液。

[0076] 可以使用任何合适的抗体组合,包括特异地结合维生素D部分的一种抗体或第一抗体以及特异地结合第一抗体与维生素D部分之间形成的复合物的另一种抗体或第二抗体。可以使用任何合适的抗体形式。例如,可以使用多克隆抗体或单克隆抗体,抗体片段(例如Fab片段),或单链抗体。还在其它实施例中,可使用美国专利公开号2011/0097733A1中公开的示例性抗体。

[0077] 本试剂盒可以包含任何额外的合适的试剂或成分。在一些实施例中,本试剂盒还包括用于评估所述特异性抗体和所述维生素D部分之间的结合以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量的工具。

[0078] 本试剂盒中的试剂或组分可以配置或布置成任何合适的方式或形式。在一些实施例中,本试剂盒包括以下试剂:(1)包含酸性pH缓冲液的第一检测试剂(R1);(2)包含两种特异性抗体的第二检测试剂(R2),所述抗体包被(例如,分别包被)在表面或颗粒(例如,乳胶颗粒)上,其中一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有亲和力,而另一种抗体或第二抗体对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有亲和力。

[0079] 上述试剂盒可以在测定样品中维生素D部分的方法中使用,所述方法包括:a)形成样品和第一检测试剂的混合物,孵育所述混合物一段时间,然后向所述混合物中加入第二检测试剂(例如,包被有特异性抗体的乳胶颗粒);和b)通过测量反应混合物的光学变化并使用一组维生素D部分(例如,一组25(OH)D校准品)来量化样品中的维生素D部分(例如,25(OH)D)的量。

[0080] 仍在其它实施例中,本试剂盒包括(1)包含酸性pH缓冲液的第一检测试剂,和(2)包含对维生素D部分具有特异性结合亲和力的固定化抗体的固体表面,和(3)包含对固定化抗体与样品维生素D部分之间形成的复合物具有结合亲和力的抗体的检测试剂。本试剂盒还可以包括合适的洗涤试剂。所述测定程序在添加不同试剂之间可以包括洗涤步骤。

[0081] 仍在另一些实施例中,本试剂盒包括(1)包含酸性pH缓冲液的第一检测试剂;和(2)包被有对维生素D部分具有亲和力的抗体的表面或颗粒,例如,磁性颗粒;和(3)标记有化学发光所需信号分子的抗体;和(4)引发化学发光反应所需的底物(引发剂)。所述试剂盒还可以包括校准品、对照品、稀释缓冲液和/或洗涤缓冲液。

[0082] 还在另一些实施例中,本发明提供一种用于测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:a)使所述样品与包含酸性pH缓冲液的第一试剂接触以使所述样品中的所述维生素D部分与其结合蛋白分离;b)使步骤a)得到的所述样品中的所述维生素D部分接触第二试剂,所述第二试剂包含颗粒(例如,磁性颗粒),所述颗粒包被有第一抗体,所述第一抗体对所述维生素D部分具有特异的结合亲和力以形成维生素D部分/第一抗体复合物;和c)使所述维生素D部分/第一抗体复合物接触第三试剂,所述第三试剂包含标记有信号生成基团或分子的第二抗体,以形成所述维生素D部分、所述第一抗体和所述标记有信号生成基团或分子的第二抗体之间的复合物;和d)评估来自所述维生素D部分、所述第一抗体复合物和所述第二抗体之间的所述复合物的信号,以确定所述样品中维生素D部分的存在、缺失和/或数量。任选地,所述抗体不同于维生素D部分的天然维生素D结合蛋白。在一些实施例中,所述信号生成分子选自自由吡啶酯、异鲁米诺、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶和荧光素组成的组。

[0083] 上述试剂盒可以在测定样品中维生素D部分的方法中使用,所述方法包括:a)形成

样品和第一检测试剂的混合物并孵育所述混合物一段时间;和b)使所述混合物接触包被有特异性结合维生素D部分的第一抗体的表面或颗粒(例如,磁性颗粒),和c)孵育一段时间后,进行洗涤步骤,和d)重悬所述表面或颗粒(例如,磁性颗粒)并接触第二抗体,所述第二抗体对表面或颗粒(例如,磁性颗粒)上的第一抗体与样品维生素D部分之间形成的复合物是特异的且标记有化学发光信号分子;和e)孵育一段时间后,进行另一个洗涤步骤,将所述表面或磁性颗粒与引发化学发光反应的引发剂或底物混合。检测化学发光强度(RLU)以确定样品中维生素D部分的存在、缺失和/或数量。

[0084] 本反应混合物或试剂盒可以配置或布置成任何合适的形式或方式。在一些实施例中,本反应混合物或试剂盒包含在单相或均相中。在其它实施例中,本反应混合物或试剂盒包含在多相中(非均相测定),例如,两相或三相中。

[0085] 任选地,上述试剂盒和方法中的抗体不同于维生素D部分的天然维生素D结合蛋白。

[0086] 本试剂盒可以配置成进行任何合适的反应时间。在一些实施例中,本试剂盒可以配置成具有约60分钟或更短的总测定时间,例如,约59,58,57,56,55,54,53,52,51,50,49,48,47,46,45,44,43,42,41,40,39,38,37,36,35,34,33,3,31,30,29,28,27,26,25,24,23,22,21,20,19,18,17,16,15,14,13,12,11,10,9,8,7,6,5,4,3,2或1分钟。例如,本试剂盒可以配置成从开始(例如,加入样品和/或试剂)到信号读出时刻的测定时间为约60分钟或更短,例如,约59,58,57,56,55,54,53,52,51,50,49,48,47,46,45,44,43,42,41,40,39,38,37,36,35,34,33,3,31,30,29,28,27,26,25,24,23,22,21,20,19,18,17,16,15,14,13,12,11,10,9,8,7,6,5,4,3,2或1分钟。

[0087] 本试剂盒可以配置成达到任何合适的精度。在一些实施例中,本试剂盒可以配置成达到约30%或更小的精度或CV,例如,约30%,29%,28%,27%,26%,25%,24%,23%,22%,21%,20%,19%,18%,17%,16%,15%,14%,13%,12%,11%,10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,1%或更小。例如,对于30ng/ml或更少的维生素D部分水平,例如,约30ng/ml,25ng/ml,20ng/ml,15ng/ml,10ng/ml,5ng/ml,4ng/ml,3ng/ml,2ng/ml,1ng/ml或更少,本试剂盒可以配置成达到约5%或更小的精度或CV,例如,约5%,4%,3%,2.5%,2%,1.5%,1%,0.5%或更小。在另一个实施例中,对于100ng/ml或更少的维生素D部分水平,例如,约100ng/ml,90ng/ml,80ng/ml,70ng/ml,60ng/ml,50ng/ml,40ng/ml,30ng/ml,20ng/ml,10ng/ml或更少,本试剂盒可以配置成达到约10%或更小的精度或CV,例如,约10%,9%,8%,7%,6%,5%,4.5%,4.0%,3%,2.5%,2%,1.5%,1%,0.5%或更小。

#### D. 示例性实施例

[0088] 在一些实施例中,本发明提供一种用于测定样品(例如血液样品)中总25-羟基维生素D 25(OH)D浓度的方法,例如均相或非均相方法,其中25(OH)D与维生素D结合蛋白(VBP)的分离、分离的[25(OH)D]或游离的25(OH)D与两种单克隆抗体的结合(形成抗体-维生素D-抗体复合物),以及样品中25(OH)D的检测均在单一反应混合物中进行,不涉及相分离或洗涤步骤。

[0089] 所述实施例的特别优点是总测定时间明显较短(在均相测定形式中通常<13min)及其方便用户的均相测定形式,消除了样品预处理或相分离/洗涤步骤的需要,使该测定方法容易适用于临床实验室常用的通用化学分析仪。

[0090] 在一些实施例中,本发明提供一种用于检测血液或血液成分样品以定量25-羟维生素D的方法,包括:a)混合样品和能够使25(OH)D与其结合蛋白分离的酸性pH缓冲液;b)加入分别包被在乳胶颗粒上的两种单克隆抗体,其中一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有特异的亲和力;和c)用单一反应混合物确定样品中25(OH)D的浓度,其中维生素D结合蛋白没有从样品中去除,并且不涉及相分离或洗涤步骤。

[0091] 在一些实施例中,酸性pH缓冲液是含有适量盐、聚合物(例如PEG 100K)和洗涤剂的乙酸钠缓冲液。酸性缓冲液的pH可在2.5到6.5之间。酸性pH缓冲液也可以是柠檬酸钠缓冲液或磷酸缓冲液或在酸性pH范围内具有缓冲功能的其它缓冲液。

[0092] 在一些实施例中,所述乳胶颗粒具有30nm至500nm,优选120nm至360nm的直径。

[0093] 在一些实施例中,所述样品是生物液体,包括但不限于全血、血浆、血清和尿液。

[0094] 在一些实施例中,所述25(OH)D的浓度包括25(OH)D的总浓度,所述25(OH)D包括25(OH)D<sub>3</sub>和25(OH)D<sub>2</sub>。

[0095] 在一些实施例中,所述25(OH)D的均相测定法的测定形式为颗粒增强免疫比浊法。在其它实施例中,所述25(OH)D的均相测定法的测定形式为颗粒增强免疫散射比浊法。仍在其它实施例中,所述25(OH)D的测定形式为基于磁性颗粒(珠)的非均相免疫测定法。

[0096] 在一些实施例中,所述25(OH)D的非均相测定法的测定形式为酶联免疫吸附测定法(ELISA)。

[0097] 可以使用任何合适的抗体。在一些实施例中,所述抗体是多克隆的。在其它实施例中,所述抗体是单克隆的。

[0098] 可以使用任何合适的颗粒。在一些实施例中,所述颗粒为纳米颗粒,包括但不限于由聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基萘、碳60、苯乙烯的共聚物、丙烯酸、萘、磁性颗粒、金、银、硅、二氧化硅、二氧化铬和二氧化钛制成的颗粒。

[0099] 在一些实施例中,本发明提供一种用于测定样品中25(OH)D的试剂盒,所述试剂盒包括两种试剂:(1)能够使25(OH)D与其结合蛋白分离的酸性pH缓冲液;和(2)分别包被有两种单克隆抗体的乳胶颗粒,其中一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有结合亲和力,而另一种抗体或第二抗体对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有结合亲和力。在示例性的测定中,将血浆或血清之类的样品与酸性pH缓冲液混合,短时间孵育后添加含有结合在乳胶颗粒上的抗体的第二试剂。通过测量反应混合物的光学变化并使用一组25(OH)D校准品来定量样品中的25(OH)D浓度。

[0100] 在一些实施例中,本发明提供一种用于测定样品中25(OH)D的试剂盒,所述试剂盒包括两种试剂:(1)能够使25(OH)D与其结合蛋白(部分或完全地)分离的酸性pH缓冲液;和(2)包含分别结合在颗粒上的两种抗体的试剂,其中一种抗体对维生素D部分具有结合亲和力,而另一种抗体对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有结合亲和力。在示例性的测定中,将血浆或血清之类的样品与酸性pH缓冲液混合,短时间孵育后添加含有包被在颗粒上的抗体的第二试剂。通过测量反应混合物的光学变化并使用一组25(OH)D校准品来定量样品中的25(OH)D浓度。

[0101] 在一些实施例中,本发明提供一种用于测定样品中25(OH)D的试剂盒,所述试剂盒包括含有酸性pH缓冲液的解离溶液。该试剂盒可用于ELISA测定形式,用微量滴定板测定25(OH)D。

[0102] 在一些实施例中,示例性的维生素D测定使用与化学发光或荧光信号分子耦合的磁性颗粒。维生素D测定方法使用包被有一种对维生素D部分具有结合亲和力的单克隆或多克隆抗体的磁性颗粒,并使用另一种标记有化学发光检测分子且对包被在磁性颗粒上的抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有结合亲和力的抗体。经孵育和洗涤步骤后,根据化学发光的信号强度(RLU)和校准曲线确定样品中维生素D的浓度。

[0103] 在一些实施例中,示例性的维生素D测定法与本领域的维生素D测定法相比具有某些优点。示例性的优点包括以下一项或多项:快速或最快的维生素D测定(~10分钟或更短的时间内出结果);广泛适用于通用化学分析仪的维生素D测定;液体稳定,随时可用的双试剂系统;液体稳定的校准品和对照品;自动化或全自动化;无需预处理或预稀释步骤;对25-OH维生素D2和25-OH维生素D3同等识别;适用于在临床化学分析仪上进行高通量测定;和/或可追踪至NIST SRM972。其它示例性的优点包括以下一项或多项:快速测试时间(少于10分钟);双试剂形式,这是一种方便用户的维生素D测定法;和/或测定形式适用于多种或所有自动临床化学分析仪(在各种规模的临床实验室中最常用的仪器)。在一些实施例中,这些优点使所述示例性的维生素D测定法有可能用作实际的常规临床检测。

[0104] 通过以下示例性实施例进一步阐明本发明。

[0105] 1.用于测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:a)使含有或疑似含有维生素D部分的样品接触能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液,以及两种或更多种抗体,其中至少一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有特异的结合亲和力,而另一种抗体(第二抗体)对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有结合亲和力;和b)评估所述特异性抗体和所述维生素D部分之间的结合以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量。所述酸性pH缓冲液可以包含任何合适的盐、聚合物和/或洗涤剂。

[0106] 2.实施例1所述的方法,在评估所述特异性抗体和所述维生素D部分之间的结合之前不包括除去维生素D部分的天然维生素D结合蛋白的步骤。

[0107] 3.实施例1或2所述的方法,不包括洗涤步骤。

[0108] 4.实施例1-3任一所述的方法,采用均相测定法实施。

[0109] 5.实施例1-4任一所述的方法,所述样品与单一反应混合物接触,所述单一反应混合物包含酸性pH缓冲液和分别包被有两种抗体的乳胶颗粒,其中一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有结合亲和力,而另一种抗体或第二抗体对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有结合亲和力。

[0110] 6.实施例1-5任一所述的方法,其不包括使所述样品与8-苯胺基-1-萘磺酸铵盐和/或3-(丙酮基苄基)-4-羟基香豆素接触的步骤。

[0111] 7.实施例1-5任一所述的方法,其不包括使所述样品与可将样品中的维生素D部分从其结合蛋白分离的非竞争性置换剂接触的步骤。

[0112] 8.实施例1-7任一所述的方法,其中最终反应混合物的pH(酸性pH缓冲液加样品加乳胶颗粒)为3.0或更高。

[0113] 9.实施例1-8任一所述的方法,其中包含样品、酸性pH缓冲液和乳胶颗粒的最终反应混合物的pH为13或更低。

[0114] 10.实施例1-9任一所述的方法,其不包括使样品接触包含环糊精、水杨酸钠和

NaOH的维生素D释放组合物的步骤。

[0115] 11. 实施例1-10任一所述的方法,其不包括使样品接触全氟烷基酸,或其盐,以从维生素D结合蛋白上释放25(OH)D的步骤。

[0116] 12. 实施例1-11任一所述的方法,其不包括使样品接触具有内切和外切蛋白水解活性的丝氨酸蛋白酶以消化样品中维生素D结合蛋白的步骤。

[0117] 13. 实施例1-12任一所述的方法,其用于评估个体中维生素D部分的状态,所述样品是从所述个体获得和/或衍生的生物样品。

[0118] 14. 实施例13所述的方法,其中所述个体为哺乳动物。

[0119] 15. 实施例14所述的方法,其中所述哺乳动物为人类。

[0120] 16. 实施例13-15任一所述的方法,其中所述样品为生物液体。

[0121] 17. 实施例16所述的方法,其中所述生物液体选自由全血、血浆、血清和尿液组成的组。

[0122] 18. 实施例1-17任一所述的方法,其中所述维生素D部分是25-羟基维生素D<sub>3</sub>、25-羟基维生素D<sub>2</sub>、维生素D代谢物或1,25-二羟基维生素D<sub>3</sub>(1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)。

[0123] 19. 实施例18所述的方法,其中所述维生素D代谢物是25-羟基维生素D(25(OH)D)。

[0124] 20. 实施例19所述的方法,其中所述25(OH)D是25(OH)D<sub>3</sub>。

[0125] 21. 实施例19所述的方法,其中所述25(OH)D是25(OH)D<sub>2</sub>。

[0126] 22. 实施例19所述的方法,其中所述25(OH)D是25(OH)D<sub>2</sub>和25(OH)D<sub>3</sub>的总和。

[0127] 23. 实施例1-22任一所述的方法,其中所述酸性pH缓冲液是乙酸钠缓冲液,包含适量的盐,例如NaCl,共聚物,例如PEG 100k,以及洗涤剂,例如Tween 20。所述酸性pH缓冲液也可以是柠檬酸钠缓冲液,或磷酸缓冲液,或其组合。

[0128] 24. 实施例23所述的方法,其中所述酸性缓冲液的pH为2.5至6.5,优选4.0至5.5。

[0129] 25. 实施例1-24任一所述的方法,其中所述单克隆抗体是指抗体中具有至少一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有特异的结合亲和力,而另一种抗体或第二抗体对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力。

[0130] 26. 实施例25所述的方法,其中一种抗体或第一抗体特异地结合25(OH)D<sub>3</sub>或25(OH)D<sub>2</sub>。

[0131] 27. 实施例25所述的方法,其中一种抗体或第二抗体特异地结合第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物。

[0132] 28. 实施例25-27所述的方法,其中所述抗体是单克隆抗体。

[0133] 29. 实施例25-27所述的方法,其中所述抗体是多克隆抗体或单克隆抗体和多克隆抗体的组合。

[0134] 30. 实施例1-29任一所述的方法,使用颗粒增强免疫比浊法实施所述方法。

[0135] 31. 实施例1-29任一所述的方法,使用颗粒增强免疫散射比浊法实施所述方法。

[0136] 32. 实施例1-29任一所述的方法,使用基于磁性颗粒(珠)的免疫测定法实施所述方法。

[0137] 33. 实施例30-33任一所述的方法,其中所述颗粒包含聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基萘、聚(二乙烯基苯)、聚乙烯萘、苯乙烯的共聚物、丙烯酸二乙烯苯、萘、碳60、磁珠、金、银、硅、二氧化硅、二氧化铬,和/或二氧化钛。

- [0138] 34. 实施例30-33任一所述的方法,其中所述颗粒是纳米颗粒。
- [0139] 35. 实施例34所述的方法,其中所述纳米颗粒具有约30nm至约500nm的直径。
- [0140] 36. 实施例1-35任一所述的方法,使用均相或非均相测定形式实施所述方法。
- [0141] 37. 实施例1-36任一所述的方法,使用夹心或竞争测定形式实施所述方法。
- [0142] 38. 实施例1-37任一所述的方法,所述方法是在单一反应混合物中进行的没有相分离或洗涤步骤的均相测定。
- [0143] 39. 实施例1-38任一所述的方法,均相形式的总测定时间少于30min,通常少于15min,而非均相测定形式的总测定时间少于60min,通常少于45min。
- [0144] 40. 实施例1-39任一所述的方法,所述方法在通用化学分析仪或临床化学分析仪上进行。
- [0145] 41. 实施例40所述的方法,其中所述通用化学分析仪或临床化学分析仪包括但不限于Roche,Hitachi,Modular P,Cobas系列,Beckman/Olympus AU系列,Beckman Synchron和DXC系列,或Abbot Architect系列。
- [0146] 42. 用于测定样品中维生素D部分的试剂盒,所述试剂盒包括:a)能够使维生素D部分与其结合蛋白分离的缓冲液和/或酸性pH缓冲液;和b)由至少两种抗体包被(例如,分别包被)的颗粒(如乳胶颗粒),其中一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有特异的结合亲和力,而另一种抗体或第二抗体对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力。
- [0147] 43. 实施例42所述的试剂盒,还包括用于评估维生素D部分和所述包被在乳胶颗粒上的抗体之间的结合以确定所述样品中所述维生素D部分的存在、缺失和/或数量的工具。
- [0148] 44. 实施例43所述的试剂盒,其包括试剂:(1)包含酸性pH缓冲液的第一检测试剂,所述酸性pH缓冲液包含盐、聚合物和洗涤剂;(2)包含乳胶颗粒悬浮液的第二检测试剂,所述乳胶颗粒包被有至少两种抗体,其中一种抗体或第一抗体对维生素D部分具有结合亲和力,而另一种抗体或第二抗体对第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力。
- [0149] 45. 实施例44所述的试剂盒,其包括:(1)包含酸性pH缓冲液的第一检测试剂;和(2)含有特异地结合维生素D部分或其类似物的固定化抗体的微量滴定板孔。
- [0150] 46. 使用实施例44所述的试剂盒测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:a)形成样品和第一检测试剂的混合物,孵育所述混合物一段时间,然后向所述混合物中加入第二检测试剂;和b)通过测量反应混合物的光学变化并使用一组25(OH)D校准品来定量样品中的25(OH)D。
- [0151] 47. 使用实施例45所述的试剂盒测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:a)在微量滴定板孔中形成样品和第一检测试剂的混合物,并孵育所述混合物一段时间;和b)使所述混合物接触标记有过氧化物酶(HRP)的第二抗体并孵育一段时间;c)洗涤步骤之后,向微量滴定板孔中加入HRP底物并显色以量化所述样品中维生素D部分的存在、缺失和/或数量。
- [0152] 48. 使用试剂盒测定样品中维生素D部分的方法,所述试剂盒包含试剂,所述试剂包括酸性pH缓冲液;包被有特异性结合维生素D部分的抗体或第一抗体的磁性颗粒,以及标记有信号分子且对包被在磁性颗粒上的第一抗体和维生素D部分之间形成的复合物具有特

异性结合亲和力的第二抗体,其中所述信号分子为吡啶酯、异鲁米诺、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、荧光素或任何其它常用于信号检测的化学发光或荧光信号分子。

[0153] 49. 使用实施例48所述的试剂盒测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:  
a) 形成样品、酸性pH缓冲液和包被有第一抗体的磁性颗粒的混合物,并孵育一段时间;b) 洗涤磁性颗粒并加入第二抗体,所述第二抗体标记有信号分子且对包被在磁性颗粒上的第一抗体和样品维生素D部分之间形成的复合物具有特异的结合亲和力,然后孵育一段时间;c) 洗涤磁性颗粒,如需通过化学发光或荧光检测方法检测信号则加入底物(引发剂)。

[0154] 50. 使用实施例49所述的试剂盒测定样品中维生素D部分的方法,所述方法包括:  
a) 形成样品、酸性pH缓冲液、包被在磁性颗粒上的第一抗体以及标记有信号分子且对包被在磁性颗粒上的第一抗体和样品维生素D部分之间形成的复合物具有特异性结合亲和力的第二抗体的混合物,并孵育一段时间;b) 洗涤磁性颗粒,如需通过化学发光或荧光检测方法检测信号则加入底物。

[0155] 51. 实施例1-41任一所述的方法,其中所述另一种抗体(第二抗体)特异地结合所述维生素D部分的表位,所述表位未被所述一种抗体(或第一抗体)结合。

[0156] 52. 实施例1-41任一所述的方法,其中所述另一种抗体(第二抗体)结合或特异地结合所述一种抗体(或第一抗体)。

#### 示例

##### 示例1:25(OH)D测定试剂盒

[0157] 下面列出了本示例中使用的乳胶颗粒增强免疫测定试剂:

##### 试剂1

0.05M乙酸钠,pH 4.0  
10%NaCl  
5%氯化胆碱0.5M MES  
0.5%糖  
0.04%吐温20  
0.9%PEG 100k0.09%NaN<sub>3</sub>

##### 试剂2

0.6M Tris,pH 8.0  
0.1%BSA  
10%蔗糖  
0.2%吐温20  
0.05%第一抗体-乳胶颗粒共轭物  
0.08%第二抗体-乳胶颗粒共轭物  
0.09%NaN<sub>3</sub>

1. 使用Beckman AU 680分析仪的测定程序如图13所示。

[0158] 将三(3) μL样品与160 μL试剂1在试管中混合,并在37°C下孵育约3.5min。将四十(40) μL试剂2添加到所述混合物中并孵育约4min。使用下面参数表(表1)中所示的测定参数测量700nm处吸光度的变化。

表1.AU 680分析仪上的测定参数

常规的

测试名称: VITD            类型: 血清            操作: 是  
 样品体积 3.0µl            稀释 0µl            预稀释率 1

试剂:                            最小 OD            最大 OD  
 R1 体积 160µl 稀释 0µl            L:                    H:  
 R2 体积 40µl 稀释 0µl

波长:                            试剂 OD 限值:  
 方法: FIXED                    第一 L: -2.000; 第一 H: 3.000  
 反应斜率: +                    最后 L: -2.000; 最后 H: 3.000  
 测量点 1: 第一 11; 最后 22            动态范围:  
 测量点 2: 第一; 最后            L:                    H:  
 线性:                            相关因素:  
 滞后时间: 无                    A: 1.0000 B: 0.000  
                                       试剂稳定期

校准类型: 5AB            公式: Spline            计数:2  
 程序: CONC

Cal No.	CONC	因素/OD-L	因素 OD-H
OD			
Point 1 : 1	0.00	-2.00000	3.0000
Point 2 : 2	*.**	-2.00000	3.0000
Point 3 : 3	*.**	-2.00000	3.0000
Point 4 : 4	*.**	-2.00000	3.0000
Point 5 : 5	*.**	-2.00000	3.0000

Point 6 : 6  
 Point 7 :  
 1-Point Cal. Point            \_with CONC-0            高级校准: No

MB 类型因素:                    校准稳定期:

1. 测定校准曲线(仅示例)

[0159] 使用已知25 (OH) D浓度的血清校准品校准25 (OH) D测定试剂盒。校准曲线如图1所

示。

[0160] 成功校准25(OH)D测定试剂盒后,测试对照品和线性标准品。此外,对患者血清样品进行测试,并将结果与FDA批准的商用维生素D测定方法(DiaSorin免疫测定法)以及总维生素D的液相色谱-质谱(LC-MS)法(被视为维生素D检测的金标准)进行比较。结果见下表1-3和图2-6。

## 2. 结果

[0161] 测定精度如下表2所示。

表2. 维生素D测定精度

精度							
	1 级	2 级	3 级	4 级	5 级	6 级	7 级
Rep. 1	5.0	12.1	24.5	46.1	59.3	101.2	157.1
Rep. 2	6.6	12.5	25.3	46.5	59.9	100.2	158.9
Rep. 3	5.9	12.5	24.5	46.0	60.7	102.1	154.8
Rep. 4	5.7	12.5	23.9	46.8	59.3	100.6	158.2
Rep. 5	3.5	11.8	24.3	46.8	60.4	103.4	155.7
Rep. 6	4.7	12.0	24.8	46.9	60.0	99.2	157.3
Rep. 7	5.7	12.0	24.4	46.1	60.0	102.0	163.4
Rep. 8	5.2	12.5	24.8	46.4	59.7	101.5	158.4
Rep. 9	4.2	12.5	24.7	47.1	59.9	102.6	161.6
Rep. 10	4.9	12.1	24.6	46.9	60.2	100.8	159.1
Rep. 11	3.5	12.5	24.6	47.1	60.5	103.3	161.1
Rep. 12	2.9	12.3	24.9	46.4	60.4	101.7	155.7
均值(ng/ml)	<b>4.8</b>	<b>12.3</b>	<b>24.6</b>	<b>46.6</b>	<b>60.0</b>	<b>101.6</b>	<b>158.4</b>
%CV	<b>23.1%</b>	<b>2.1%</b>	<b>1.4%</b>	<b>0.8%</b>	<b>0.7%</b>	<b>1.2%</b>	<b>1.6%</b>

[0162] AU 680分析仪上的测定线性如图2所示。与DiaSorin Liason法比较的测定准确度如图3所示。与LC-MS/MS法比较的测定准确度如图4所示。

### 示例2: 25(OH)D测定试剂盒

[0163] 本实施例中列出了所使用的基于磁性颗粒的化学发光免疫测定试剂:

#### 试剂1:

0.05M乙酸钠缓冲液, pH 4.0

8%NaCl

1.2%蔗糖

0.05%吐温20

0.09%NaN<sub>3</sub>

#### 试剂2:

1x PBS缓冲液, pH 7.4

0.3%BSA

0.04%吐温20  
 0.09%NaN<sub>3</sub>  
 0.1mg/ml包被有第一抗体的磁性颗粒

试剂3:

1x PBS缓冲液, pH 8.0  
 0.2%BSA  
 0.04%吐温20  
 1ug/ml ABEI标记的第二抗体  
 NaN<sub>3</sub> 0.09%

引发剂(底物):

a) 5%NaOH; b) 0.1%过氧化物

洗涤溶液:

0.1M Tris-HCl缓冲液和洗涤剂

使用商用设备的测定程序:

[0164] 将五ul (5ul) 血清样品与180ul试剂1混合, 孵育5分钟, 使样品中的维生素D与其结合蛋白分离。吸取上述样品/试剂1混合物100ul, 与20ul试剂2混合, 孵育20分钟, 再加入50ul试剂3。再孵育10分钟后, 用洗涤缓冲液洗涤磁性颗粒3次。加入200ul底物, 读取化学发光强度或RLU 3秒。样品中维生素D的含量是根据RLU和相同分析条件下建立的校准曲线确定的。

结果:

[0165] 化学发光检测方法的示例性校准曲线如图5所示。测定精度(每级对照重复10次)如下表3所示。本发明的示例性方法与商用的predicate方法(免疫测定)在测定准确度上的比较数据如图6所示。

表3. 测定精度(每级对照重复10次)

	Vit.D对照I	Vit.D对照II	Vit.D对照III
Conc.ng/ml	10.5	30.1	60.9
CV%	3.4%	2.9%	2.2%

示例3:分析性能

a. 精度/再现性

[0166] 根据临床和实验室标准协会(CLSI) EP5-A2指南评估示例性的Diazyme维生素D测定法(实施例1中的乳胶颗粒增强免疫测定)的精度。在Beckman AU680化学分析仪上进行精度评价。在这项研究中使用了三批试剂。每批试剂测试12个样品: 2个维生素D对照品和10个维生素D人血清样品。经IRB批准的受试血清样品来自商业来源(PromedDx)并覆盖了测定的动态范围。按照CLSI EP5-A2指南的建议, 在20个工作日内, 每天运行两次, 每次运行对精度样品进行重复测试。每个样品和每批试剂获得八十(80)个数据点。

[0167] 下表4总结了一批代表性试剂的精度结果。

表4

样品	均值 (N=80)	批内		全部	
		SD	%CV	SD	%CV
对照 1	22.3	0.92	4.2%	1.33	6.0%
对照 2	43.7	1.07	2.4%	1.40	3.2%
样品 1	11.1	0.87	7.8%	1.86	16.7%
样品 2	14.1	0.75	5.3%	2.14	15.1%
样品 3	18.6	0.86	4.6%	1.69	9.0%
样品 4	22.1	0.86	3.9%	1.41	6.4%
样品 5	43.4	0.89	2.1%	1.22	2.8%
样品 6	59.7	1.17	2.0%	1.89	3.2%
样品 7	80.6	1.32	1.6%	2.31	2.9%
样品 8	99.8	2.32	2.3%	3.25	3.3%
样品 9	118.5	2.27	1.9%	4.11	3.5%
样品 10	140.0	3.58	2.6%	4.34	3.1

b. 线性/分析报告范围

[0168] 使用CLSI EP6-A指南(定量分析方法的线性评估;2003年批准)评估示例性的Diazyme维生素D测定法的线性。

验收标准

[0169] 测量值与预期值的线性回归的斜率为 $1.0 \pm 0.05$ , 相关系数 $R^2 > 0.95$ 。

[0170] 在Beckman AU680化学分析仪上进行线性研究。向人血清样品中加入维生素D储备溶液至浓度为156.3ng/mL(使用示例性的Diazyme维生素D测定法进行三次测量)。维生素D原料购买自Sigma-Aldrich, 并使用分析报告提供的信息计算摩尔浓度。因此, 用4.3ng/ml(使用示例性的Diazyme维生素D测定法进行三次测量)的低样品稀释制备的高样品, 以产生如下总共11个线性水平:

01级: 1.00ml低样品+0.00ml高样品

02级: 0.90ml低样品+0.10ml高样品

03级: 0.80ml低样品+0.20ml高样品

04级: 0.70ml低样品+0.30ml高样品

05级: 0.60ml低样品+0.40ml高样品

06级: 0.50ml低样品+0.50ml高样品

07级: 0.40ml低样品+0.60ml高样品

08级: 0.30ml低样品+0.70ml高样品

09级: 0.20ml低样品+0.80ml高样品

10级:0.10ml低样品+0.90ml高样品

11级:0.00ml低样品+1.00ml高样品

[0171] 使用一批试剂,用示例性的Diazyme维生素D测定法对上述制备的线性组进行三次重复测试。线性测试结果如下表5和图7所示。

表5

线性水平	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	测量值 (ng/mL)	预期值 (ng/mL)	%偏差
1 级	3.5	4.4	5.0	4.3	4.3	0.0%
2 级	22.4	21.3	20.4	21.4	19.5	9.6%
3 级	38.0	35.6	37.6	37.1	34.7	6.8%
4 级	49.7	53.7	51.0	51.5	49.9	3.1%
5 级	66.4	66.1	65.4	66.0	65.1	1.3%
6 级	83.6	78.9	81.4	81.3	80.3	1.2%
7 级	94.0	94.1	91.9	93.3	95.5	-2.3%
8 级	113.0	110.7	110.0	111.2	110.7	0.5%
9 级	126.9	122.4	121.1	123.5	125.9	-2.0%
10 级	143.7	138.0	138.9	140.2	141.1	-0.7%
11 级	157.3	157.1	154.6	156.3	156.3	0.0%

#### 示例4:比较研究

##### a. 与predicate设备的方法比较

[0172] 这项方法比较研究,使用示例性的Diazyme维生素D测定法(示例1中的乳胶颗粒增强免疫测定法)测试单个血清样品并与predicate设备(DiaSorin Liaison LX)进行比较。血清样品来自商业来源,经过生物化学处理并获得IRB批准。排除返回值超出测定的动态范围的样品。在准确度评估中共使用了40个未改变的样品扫描分析AMR。结果如图8所示。

##### b. 基质比较

[0173] 为了评价抗凝剂的效果,采用示例性的Diazyme维生素D测定法测定匹配组的血清、K<sub>2</sub>-EDTA、K<sub>3</sub>-EDTA血浆和锂肝素血浆中25-OH维生素D的浓度。本研究使用的样品来自经认证的商业来源(ProMedDx, LLC)。所有测试样品均按照IRB批准的规程由商业供应商收集。每个样品和每种基质的报告值都是从单次测量中获得的。测试的匹配组总数为54。为了覆盖每种基质的声称测量范围,本研究中包括了7个加标患者样品。结果如图9-11所示。

#### 示例5:示例性的Diazyme维生素D化学发光测定法

[0174] 示例性的Diazyme维生素D化学发光测定法由3种试剂组成:第一抗体偶联的磁珠;提取缓冲液;以及实施例2中所述的ABEI分子(ISO-lumina)偶联的第二抗体。测定程序如下表6所示:

表6. 测定程序

Diazyme 化学发光测定形式	
样品 / 酸性缓冲液 / 磁珠	2 ul + 50 ul + 20 ul
孵育	15 min
ABEI/AE 标记	150 ul
孵育	15 min
循环洗涤 (3 个循环)	400 ul
测量	3 秒

[0175] 将示例性的Diazyme维生素D化学发光测定法与Roche VD测定法比较。比较结果如图12所示。示例性的Diazyme维生素D化学发光测定法的精度如下面的表7和8所示。

表7. 测定精度

样品	维生素 D (ng/ml)
1	17.5

2	16.3
3	17.4
4	17.6
5	16.8
6	16.9
7	16.9
8	17.3
9	16.5
10	16.5
11	16.9
12	17.4
13	16.4
14	16.1
15	16.6
16	16.3
17	16.9
18	17.1
19	17.2
20	17.2
均值	16.9
stdev	0.4
CV	2.6%

表8. 测定精度

样品	维生素 D (ng/ml)
21	70
22	64.2
23	68.6
24	64.5
25	60.0
26	69.8
27	63.1

28	66.7
29	67.2
30	65.1
31	67.4
32	65.5
33	64.7
34	67.4
35	69.6
36	60.9
37	64.5
38	66.4
39	60.4
40	63.9
均值	65.5
stdev	3.0
CV	4.5%

[0176] 上述实施例仅用于说明的目的而不用于限制本发明的范围。上述实施例的多种变型是可能的。由于上述实施例的修改和变化对于本领域技术人员来说是显而易见的,因此本发明仅限于所附权利要求的范围。

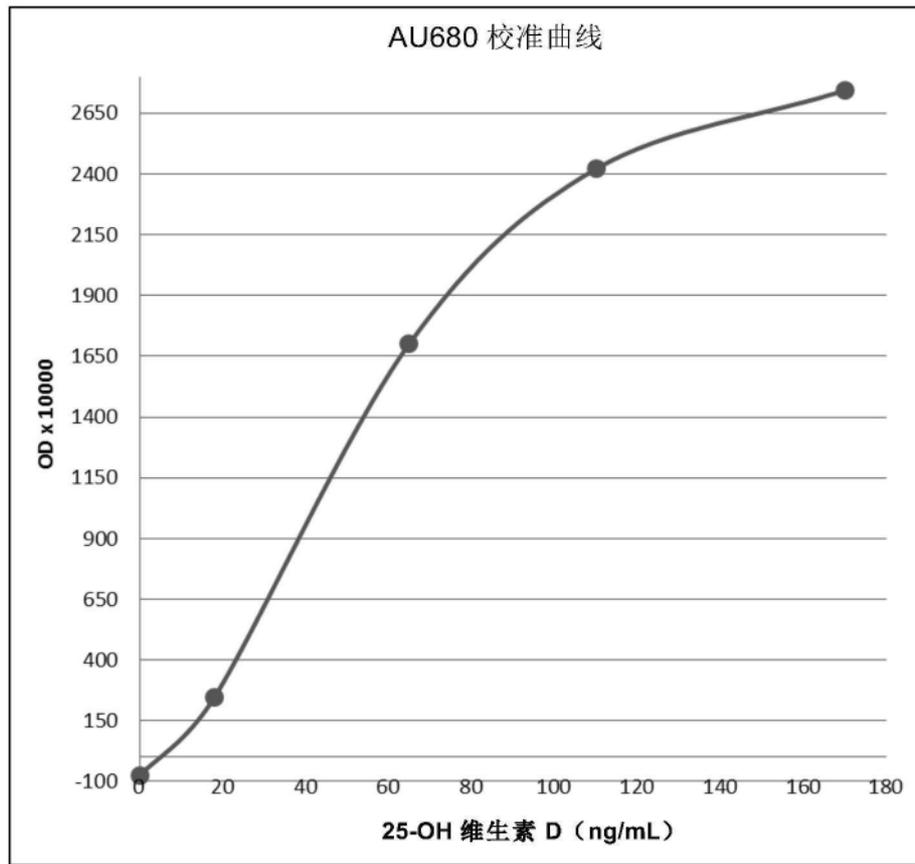


图1

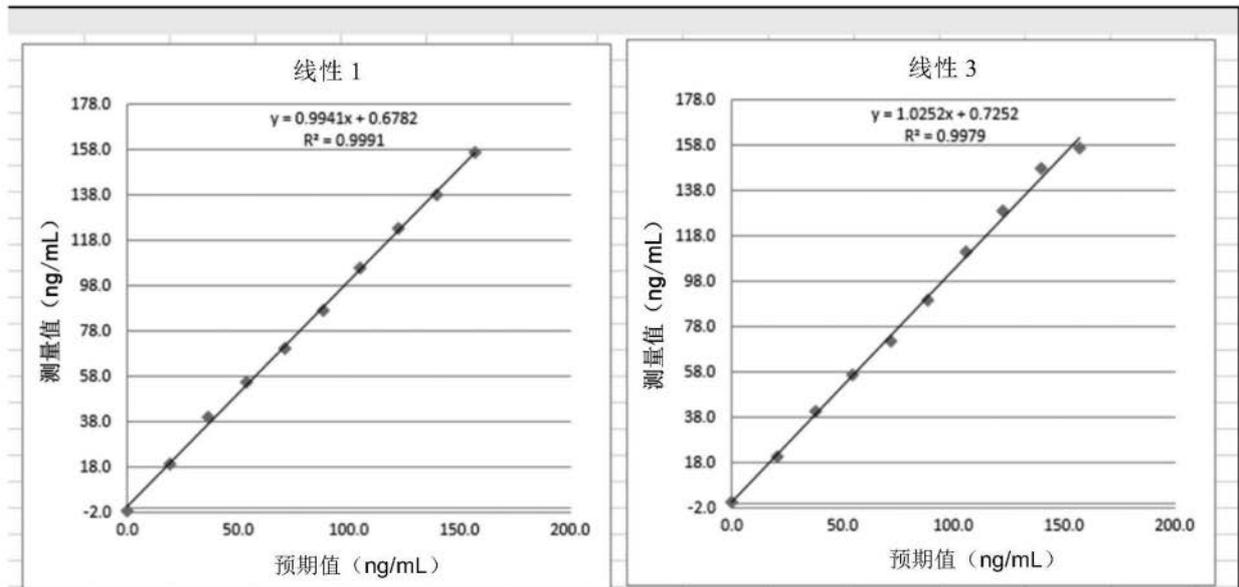


图2

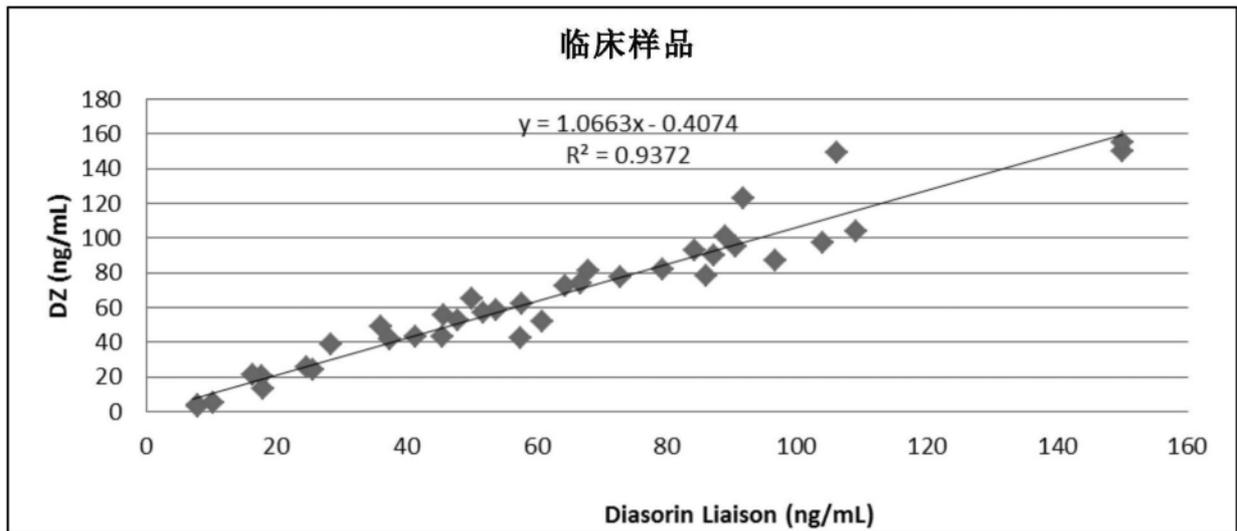


图3

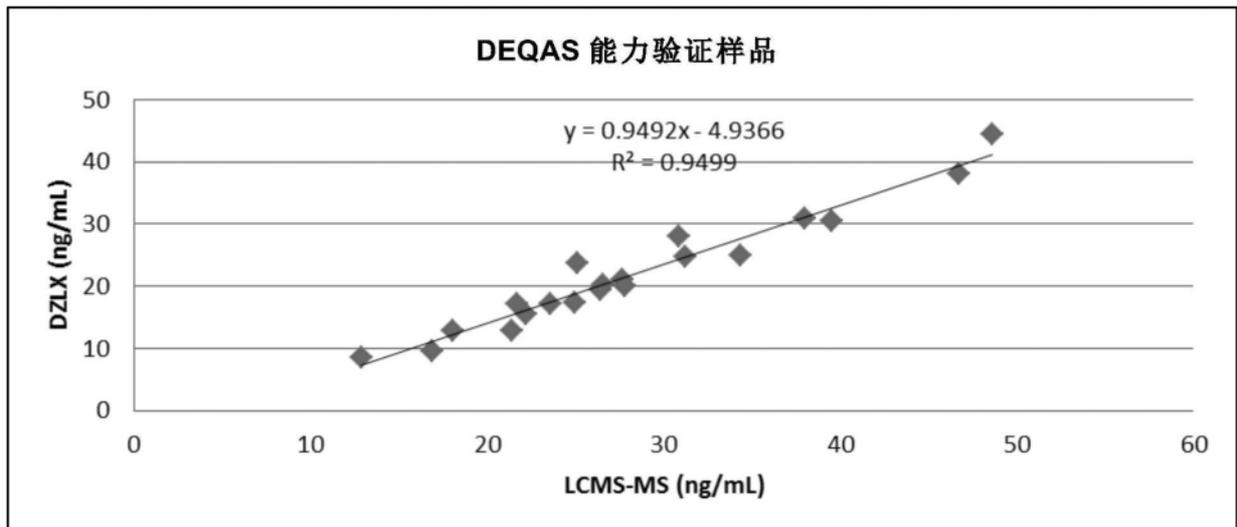


图4

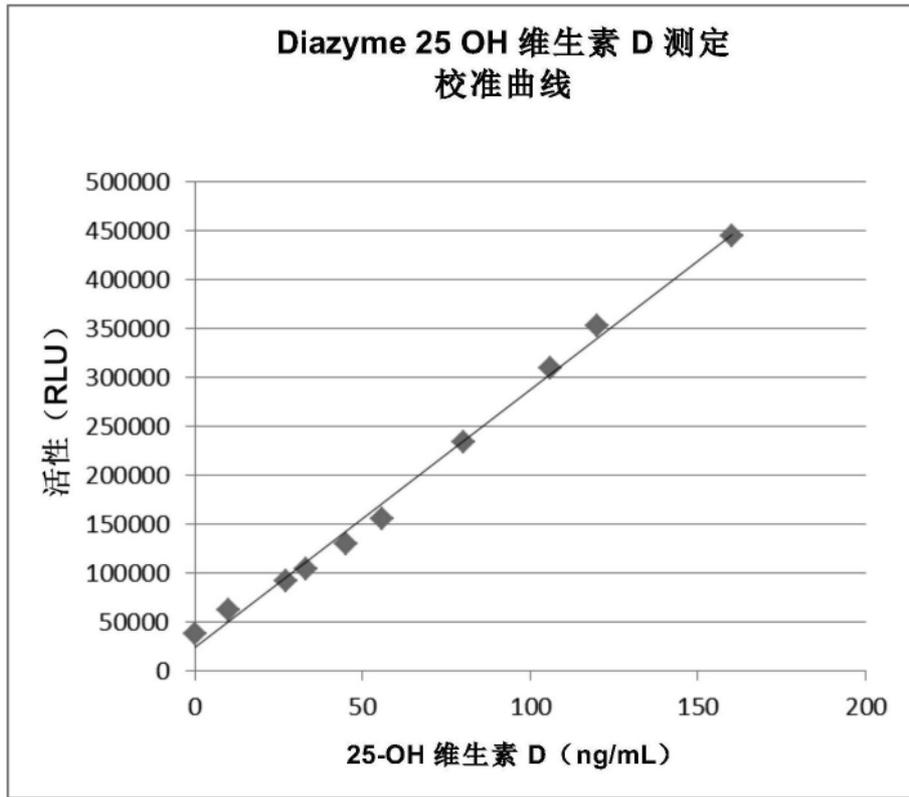


图5

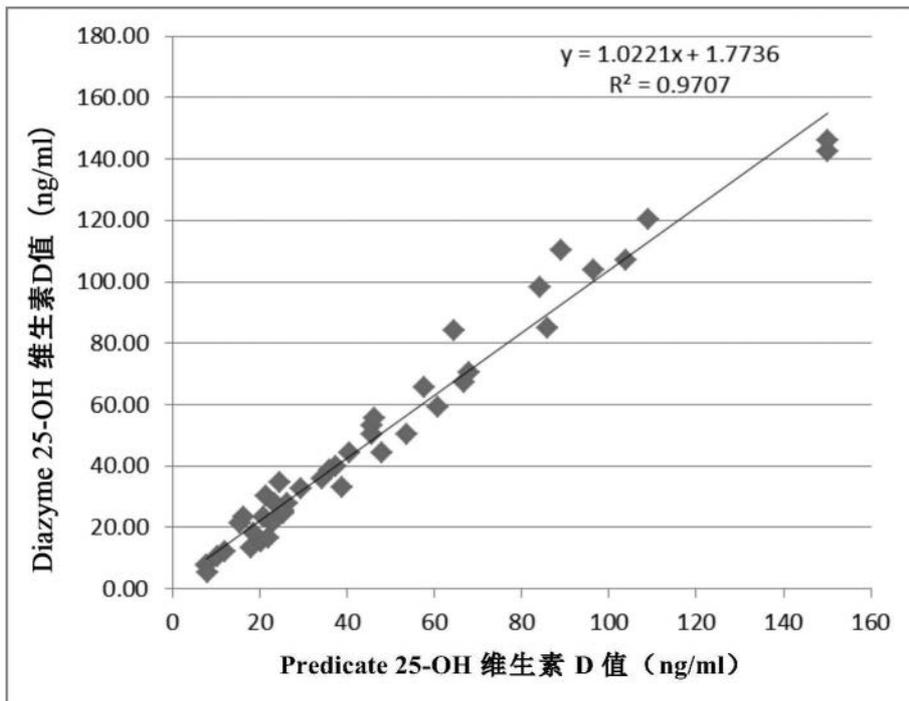


图6

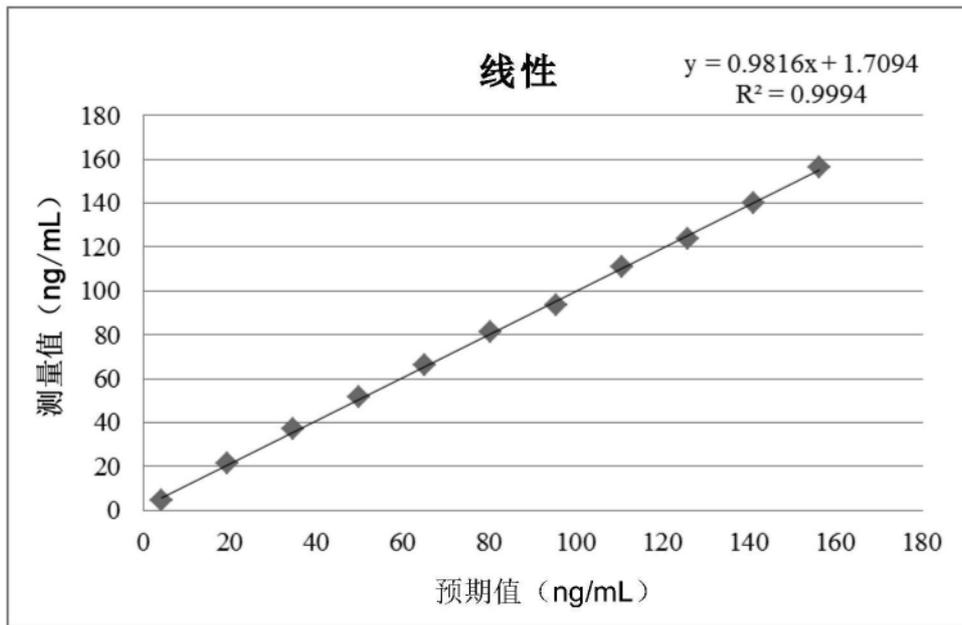


图7

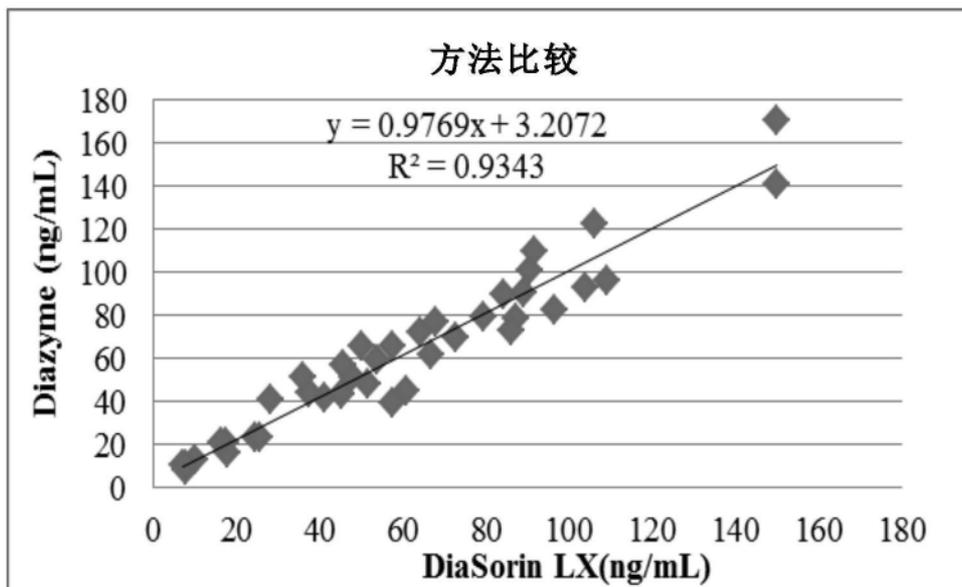


图8

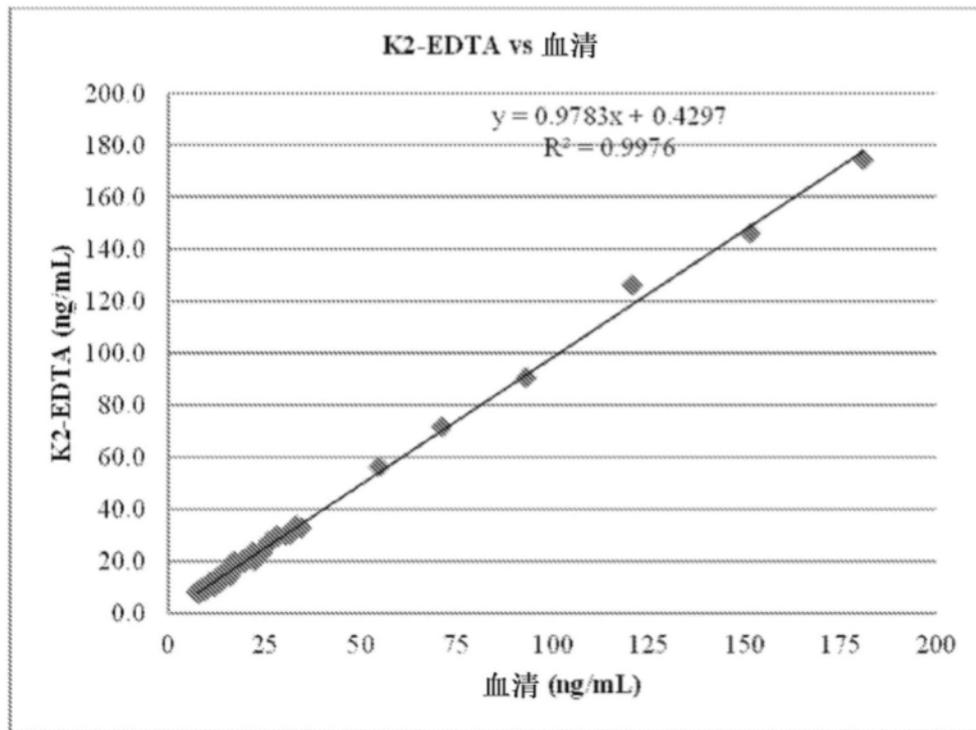


图9

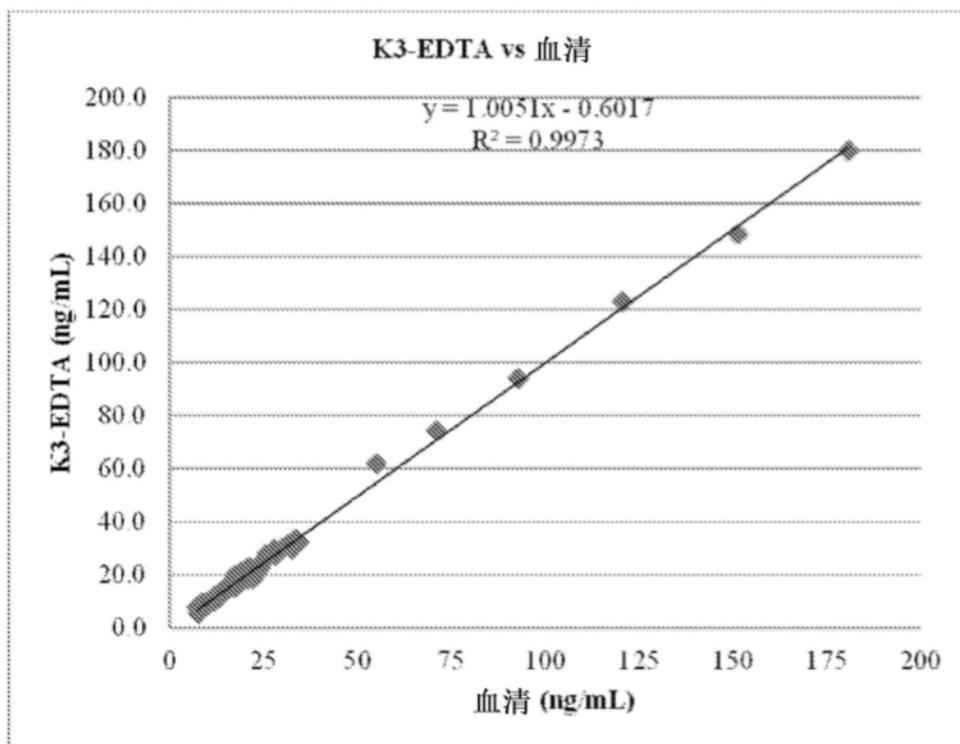


图10

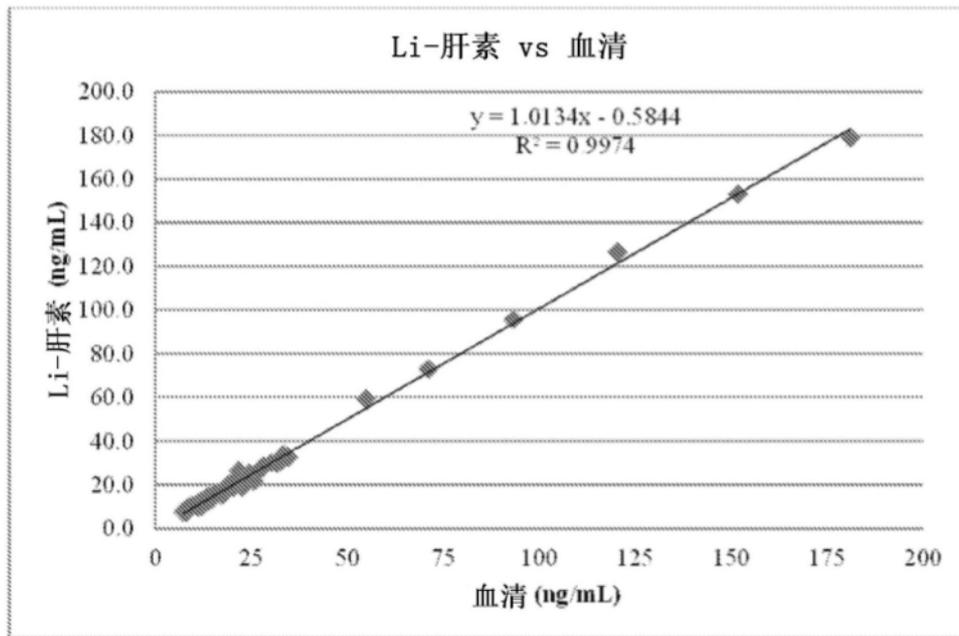


图11

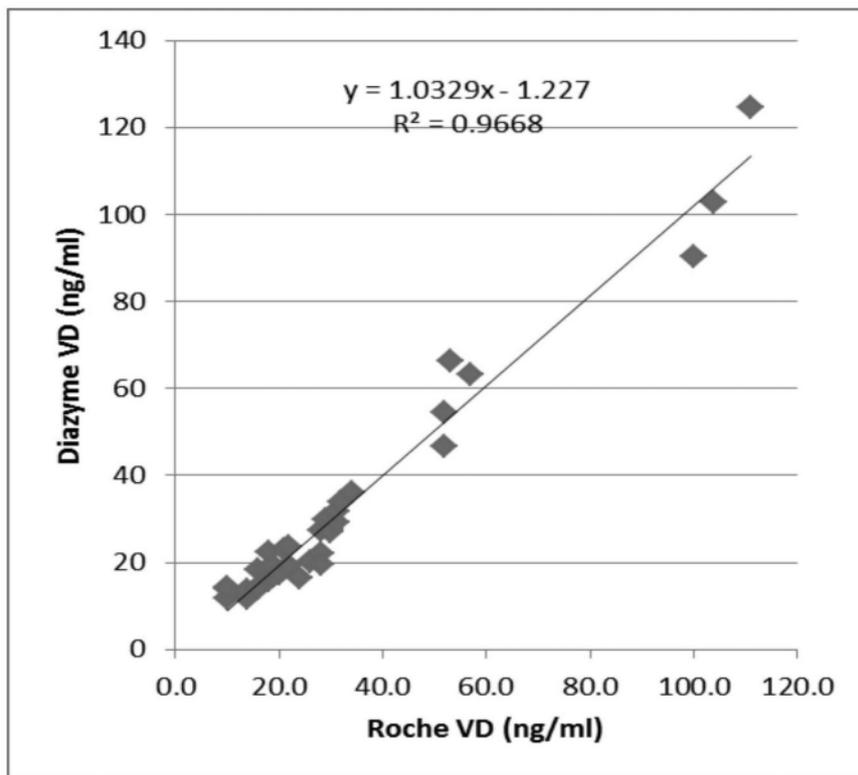


图12

Beckman AU 680分析仪

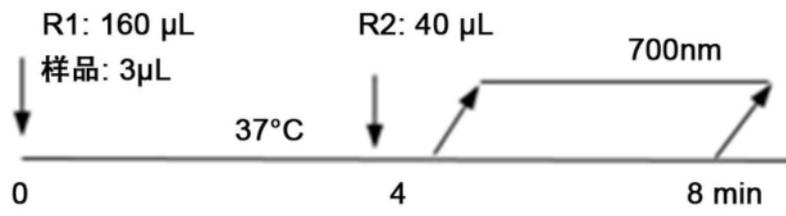


图13