

# 维生素D免疫层析快速检测方法研究

王广交 陆维克 沈红萍 梁伟伟

杭州奥泰生物技术股份有限公司, 中国·浙江 杭州 310018

**【摘要】**开发了一种适合快速检测血清中维生素D的免疫层析试剂条。使用胶体金分别标记兔IgG抗体, 抗25羟基维生素D抗体, 混合后喷涂在聚酯纤维素膜上, 分别将25羟基维生素D抗原与羊抗兔IgG抗体喷涂于NC膜的质控线和检测线位置处, 将二者组合构建维生素D免疫层析试剂条, 并对其进行功能评价。结果表明该试剂条可以在20 min内实现血清中是否缺乏维生素D的定性分析。定性灵敏度为20 ng/mL, 且与其它维生素之间无交叉反应。该维生素D免疫层析快速检测试剂条适用于实验室专业检测, 具有较大科研价值。

**【关键词】**维生素D; 免疫层析; 快速检测

维生素D(环戊烷多氢菲类化合物)是具有胆钙化固醇生物活性的所有类固醇的总称, 为一种脂溶性维生素, 可由维生素D原经紫外线激活形成。维生素D主要以维生素D<sub>3</sub>与维生素D<sub>2</sub>两种不同的形式存在于人体中<sup>[1]</sup>。其中维生素D<sub>2</sub>主要来源为植物源食物, 由植物中的麦角固醇经紫外线激活转化而获得, 而维生素D<sub>3</sub>除可从动物源食物中获得外还可以通过皮下的7-脱氢胆固醇经紫外线激活转化而自主合成<sup>[2-3]</sup>。故人体中维生素D大多素以D<sub>3</sub>形式存在, 他们的化学差异仅在于侧链结构不同, 它们的化学结构式如图1所示。

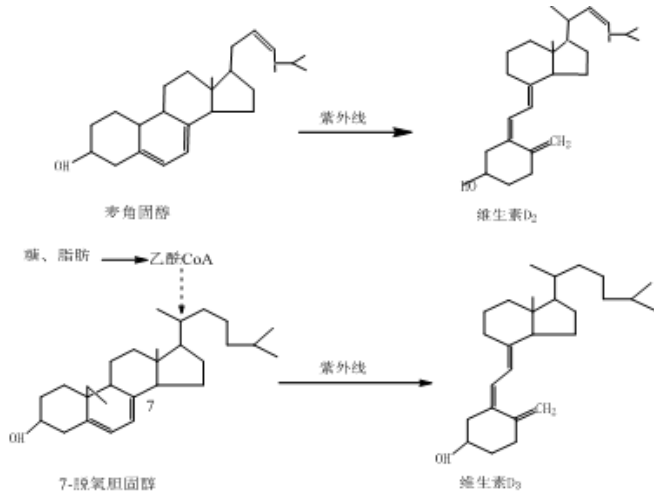


图1. 维生素D<sub>2</sub>与D<sub>3</sub>结构图

维生素D也被看做是一种用作钙、磷代谢激素前体, 维持血清中钙、磷浓度在正常范围, 维持神经、肌肉功能正常和骨骼的健全, 是生命必需的营养元素。研究表明维生素D缺乏会导致多种疾病或使某些疾病的患病率升高。众所周知, 维生素D缺乏会导致佝偻病、骨质疏松等骨骼疾病, 研究亦发现维生素D含量影响心肌梗死患病率, 研究表明仅在维生素D水平低于30 ng/mL的个体中观察到心肌梗死风险较高<sup>[4]</sup>。除此之外, 小儿呼吸道感染、哮喘、骨质疏松、自身免疫疾病、肾脏疾病、心血管系统疾病、癫痫前期、过敏性哮喘、风湿性关节炎、I型及II型糖尿病、痴呆及感染性疾病以及十几种肿瘤均与维生素D缺乏相关<sup>[5-9]</sup>。近年来, 检测维生素D含量变得越来越被重视。25-(OH)维生素D的循环水平是维生素D营养状况良好的测试指标, 临床上以检测血清中25-OH维生素D含量的方式判定体内维生素D含量。中华人民共和国国家卫生健康委员会2020年5月6日(2020年11月1日开始实施)发布的《人群维生素D缺乏筛查方法》<sup>[10]</sup>中明确规定, 血清中25-OH维生素D不低于20 ng/mL(50 nmol/L)为正常, 12-20 ng/mL(30-50 nmol)为不足, 低于12 ng/mL(30nmol/L)为缺乏。而41.8%的人维生素D含量不足, 所以维生素D含量的测定至关重要, 临床中以25-羟基维生素D的含量作为判断体内维生素D含量的指标。

人体中, 维生素D<sub>2</sub>与D<sub>3</sub>通过血液运输到肝脏, 在肝脏中代谢为25-OH维生素D<sub>2</sub>与D<sub>3</sub>, 由于25-OH维生素D半衰期较长(25 d), 稳定性相对较好, 含量相对较高, 因此, 在临床中通过测量血清中总25-OH维生素D的含量测定人体内维生素D的含量<sup>[11]</sup>。

本文选择了一种简单、快速检测体内维生素D含量的检测方法—免疫层析法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

实验试剂与材料: 硝酸纤维素膜(NC膜), 塑料大卡, 玻璃纤维, 滤纸, 聚酯纤维素膜, 羊抗兔IgG抗体, 抗25羟基维生素D抗体, 25羟基维生素D抗原, 兔IgG抗体, 胶体金偶联物, 蔗糖, 海藻糖, 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钠, 牛血清蛋白。

实验仪器: 精密分析天平, 喷金标机, 连续划膜机, 旋涡震荡器, 可编程切条机。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 免疫胶体金试剂条的制备

以25羟基维生素D抗原与抗25羟基维生素D抗体为主要反映物质制作免疫层析试剂条对血清中25-羟基维生素D是否缺乏做定性分析。

硝酸纤维素膜的喷点: 将硝酸纤维素膜固定于专用纸板上, 将羊抗兔IgG抗体与25羟基维生素D抗原分别以一定的喷量喷洒在硝酸纤维素膜上, 作为质控线与检测线。烘干后使用。

金标垫的制备: 使用胶体金偶联物分别标记兔IgG抗体, 抗25羟基维生素D抗体。将兔IgG抗体金标溶液与抗25羟基维生素D抗体金标溶液以一定的喷量喷洒于聚酯纤维素膜上, 形成金标垫。烘干后使用。

将上述准备的硝酸纤维素膜、金标垫与样品垫, 吸水垫组合, 将组装好的产品切割为免疫层析试剂条, 如图2所示。

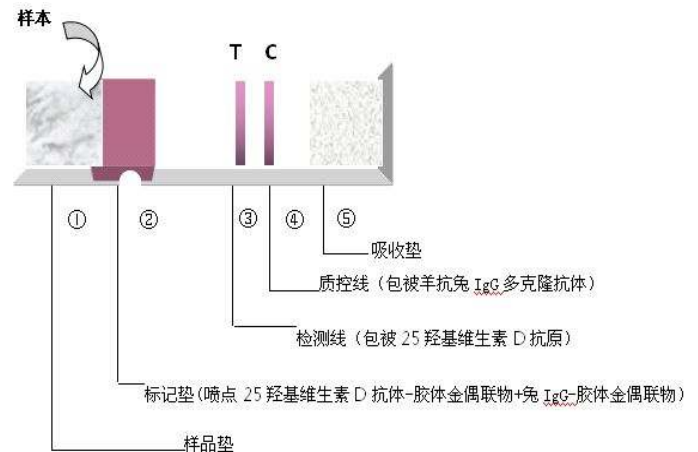


图2. 维生素D免疫层析试剂条

#### 1.2.2 维生素D快速检测试剂条功能性评价

##### 1.2.2.1 特异性

使用三组不同批次的维生素D免疫层析试剂条,在同一时间,同一地点,分别检测维生素A、B、C、D、E、K、M阳性样本,观察并记录结果,检测维生素D免疫层析试剂条特异性。

### 1.2.2.2 灵敏度

将高浓度的维生素D标准品梯度稀释为100 ng/mL,80 ng/mL,60 ng/mL,40 ng/mL,20 ng/mL,10 ng/mL。使用三组不同批次的维生素D免疫层析试剂条分别对以上样本进行检测,观察并记录检测结果。

### 1.2.2.3 临床样本检测

在搜集到的临床样本中随机抽取三个阴性,三个阳性样本,使用三组不同批次免疫层析试剂条对临床血清样本进行测定。样本预处理:使用解离液解离血清样本中被结合蛋白包被的维生素D,解离液与血清以一定的比例混合,室温下静置5 min,使用一次性胶头滴管在进样口滴加解离后的血清样本,10-20 min后读数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测原理

25-OH维生素D免疫层析试剂盒检测原理如图3所示,本实验使用竞争法检测血清中的维生素D含量。右侧线为质控线以C表示,胶体金标记的兔IgG抗体与硝酸纤维素膜C线位置的羊抗兔IgG抗体结合。左侧线为检测线以T表示,当血清中维生素D含量较低时( $\leq 20$  ng/mL)仅结合金标垫上标记的部分抗体,剩余的抗体则与硝酸纤维素膜上C线处的维生素D抗原结合,显色,呈阴性如图3(a)所示。当血清中维生素D浓度 $>20$  ng/mL时,血清中的维生素D几乎结合掉金标垫上标记的全部抗体,不再有或仅有非常少的剩余抗体与硝酸纤维素膜中T线位置的维生素D抗原结合,故在T线位置不再显色(或肉眼不可见较浅颜色),此时检测结果为阳性,如图3(b)所示。

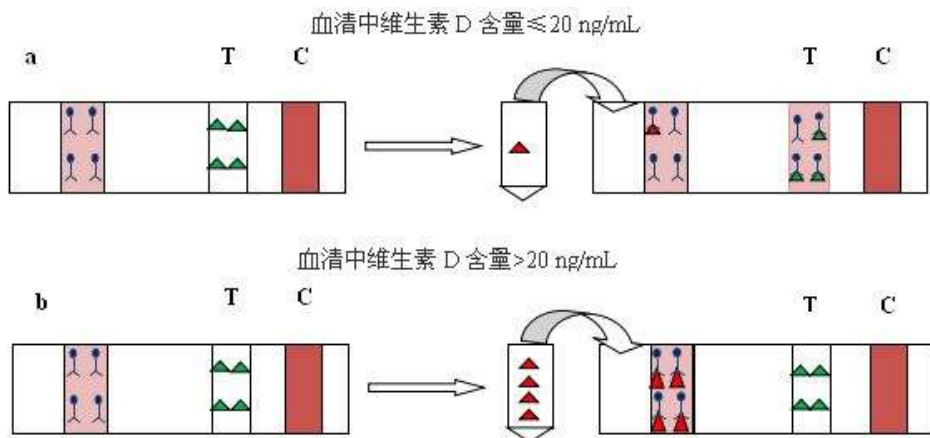


图3. 维生素D免疫层析试剂条检测原理图

### 2.2 检测结果

#### 2.2.1 特异性检测结果

使用三组不同批次的产品对可能与维生素D出现交叉反应的物质进行检测,消除实验偶然性。检测检测结果如下表所示。实验结果表明维生素D免疫层析试剂条对维生素A、B、C、E、K、M无交叉反应。特异性良好。

表2-1 交叉实验检测结果

类别 批号	维生素D	维生素A	维生素B	维生素C	维生素E	维生素K	维生素M
Lot1	阳性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
Lot2	阳性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
Lot3	阳性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

### 2.2.2 灵敏度检测结果

为避免实验偶然性,使用三组不同批次产品对样本进行检测。检测结果如下表所示。对浓度为100 ng/mL,80 ng/mL,60 ng/mL,40 ng/mL的维生素D标准品检测结果均为阳性,20 ng/mL的维生素D检测结果显示阴性,其中检测线颜色较浅,而10 ng/mL样本检测结果为阴性,显示两条清晰的线条。我国《人群维生素D缺乏筛查方法》[10]中指出血清中25-羟基维生素D不低于20 ng/mL(50 nmol/L)为正常,而研发出的免疫层析试剂条可实现在维生素D浓度 $> 20$  ng/mL时出现一条肉眼可见彩色线(质控线)为阳性,维生素D浓度 $\leq 20$  ng/mL时出现两条肉眼可见彩色线条(质控线与检测线)为阴性的检测标准。检测结果符合国家现执行《人群维生素D缺乏筛查方法》,灵敏度良好。

表2-1 灵敏度实验检测结果

浓度 (ng/mL)	100	80	60	40	20	10
批号						
Lot1	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性
Lot2	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性
Lot3	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性

### 2.2.3 临床样本检测结果

使用维生素D免疫层析试剂条检测阴性样本全部为阴性,检测阳性样本全部为阳性,检测结果如下图所示。该实验证明该产品不仅可检测维生素D标准品,同样可检测血清中非游离状态下的维生素D。该产品不仅可用于科研,同样可用于临床中的快速初检实验。

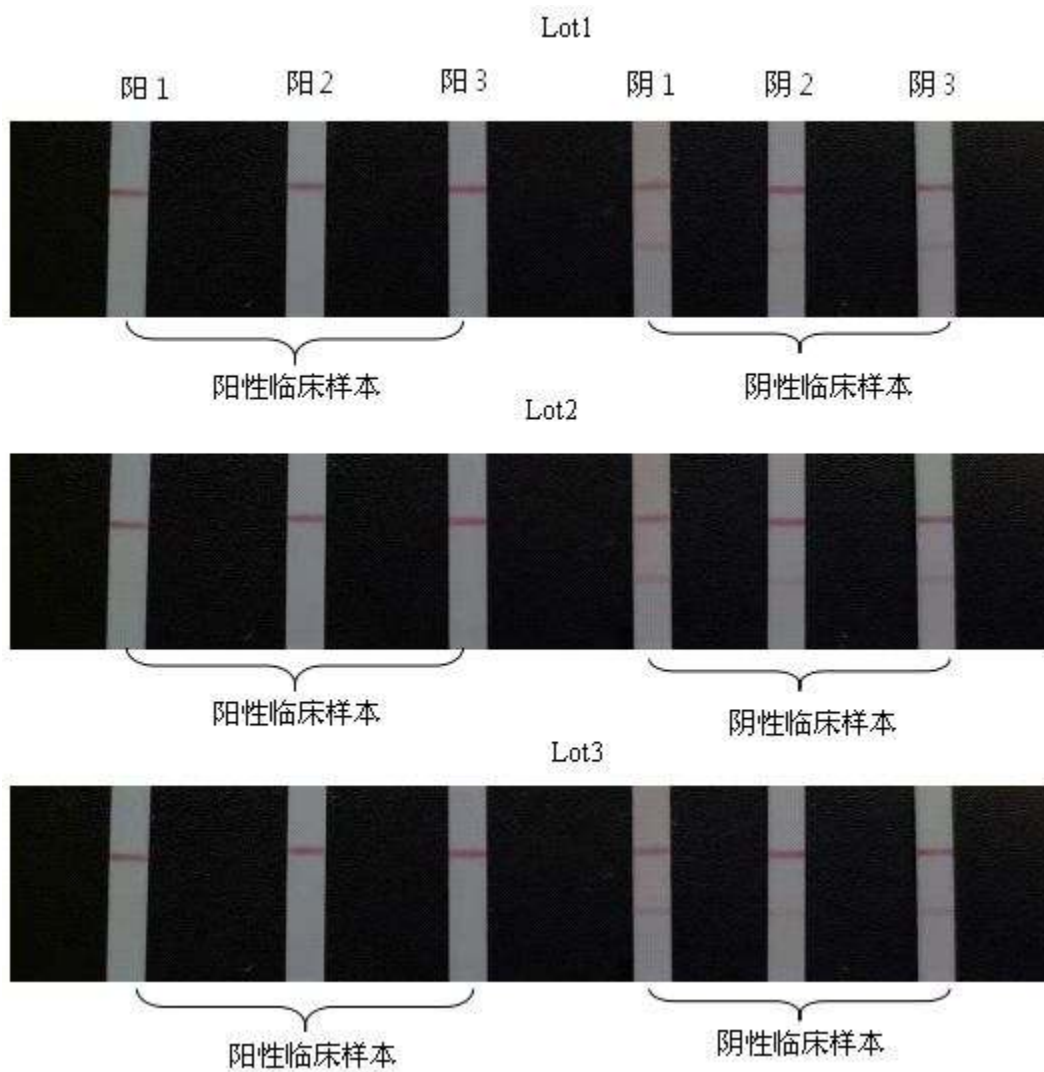


图4. 临床样本检测结果图

### 3 结论

近年来免疫层析快速诊断试剂凭借诊断快速、用户友好、操作简单、成本效益高等诸多优势成为现代实验室分析仪的替代品。该技术不仅被广泛应用于传染病检测,作为大量样本初筛的检测方式,有效预防传染病爆发与传播,也被应用于其他疾病的诊断,减少疾病发病率。

维生素D免疫层析检测试剂基于横向免疫分析的原理,使用胶体金免疫层析法构建生物传感器的纳米结构,在20 min内获得肉眼可见实验结果,可实现人体血清中维生素D是否缺乏的快速检测,并且研究发现该产品与其他维生素无交叉反应。

使用维生素D免疫层析试剂检测血清中维生素D的检测可以预防骨质疏松、佝偻病的发生,降低肾脏疾病、心血管系统疾病等疾病的病发率,具有较大科研价值。

### 参考文献:

[1]Silva M C, Furlanetto T W. Intestinal absorption of vitamin D: a systematic review[J]. Nutrition reviews, 2018, 76(1): 60-76.  
[2]刘又铭,房鑫,农可懿,周璐彤,喻赫,石庆珍,于江辉,张海文.维生素D3的

生物学功能研究进展[J].饲料研究,2021(18):133-137.

[3]Brogniez C, Dor é J F, Auriol F, et al. Erythematous and vitamin D weighted solar UV dose-rates and doses estimated from measurements in mainland France and on Reunion Island[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2021 ( 225 ): 112330.

[4]Acharya P, Dalia T, Ranka S, et al. The effects of vitamin D supplementation and 25-hydroxyvitamin D levels on the risk of myocardial infarction and mortality[J]. Journal of the Endocrine Society, 2021, 5(10): 124-135.

[5]Bouillon R, Carmeliet G, Verlinnden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice [J]. Endocr Rev, 2008, 29 ( 6 ): 726-776.

[6]Melamed ML, Astor B, Michos ED, et al. 25-hydroxy vitamin D levels, race, and the progression of kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20 ( 12 ): 2631-2639.

[7]Borkar V V, Devidayal, Verma S, et al. Low Levels of vitamin D In North Indian Children with newly diagnosed type 1 diabetes[J]. Pediatric Diabetes, 2010, 11 ( 5 ): 345-350.

[8]Kilkinen A, Knekt P, Aro A, et al. Vitamin D status and the risk of cardiovascular disease death[J]. Am J Epidemiol, 2009, 170 ( 8 ): 1032-1039.

[9]Heist R S, Zhou W, Wang Z, et al. Circulating 25-hydroxy vitamin D, VDR polymorphisms, and survival in advanced non small cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26: 5596-5602.

[10]WS/T 677-2020, 人群维生素D缺乏筛查方法[S].

[11]Barbara Altieri, Etienne Cavalier, Harjit Pal Bhattoa, Faustino R. P é rez-L ó pez, Mar í a T. L ó pez-Baena, Gonzalo R. P é rez-Roncero, Peter Chedraui, Cedric Annweiler, Silvia Della Casa, Sieglinde Zelzer, Markus Herrmann, Antongiulio Faggiano, Annamaria Colao, Michael F Holick. Vitamin D testing: advantages and limits of the current assays[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2020, 74(2): 231-247.

### 作者简介:

王广交(1995-),女,汉族,硕士,研究方向:生物医疗器械。