(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110579597 A
(43)申请公布日 2019.12.17

(21)申请号 201810812808.8

(22)申请日 2018.07.23

(66)本国优先权数据
201810503732.0 2018.05.23 CN

(71)申请人 科美诊断技术股份有限公司
地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中路7号北科现代制造园孵化楼一层、六层

(72)发明人 饶星 廖智星 刘宇卉 李临
其他发明人请求不公开姓名

(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 陈伟

(51)Int.Cl.
*G01N 33/543*(2006.01)
*G01N 33/532*(2006.01)
*G01N 33/558*(2006.01)

权利要求书4页 说明书24页
序列表2页

(54)发明名称

检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒。该试剂盒采用能够与14-3-3 eta蛋白特异性结合的第一抗体、第二抗体，以及与第二抗体为结合14-3-3 eta蛋白的相同表位的同株抗体的第三抗体制成；其以双抗体夹心的方式，利用化学发光免疫分析平台的灵敏度高、线性范围宽、精密度好等优势，为临床诊断类风湿提高确诊率，为预防类风湿和提早发现类风湿提供辅助检测。

CN 110579597 A

1.一种用于检测14-3-3eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂套装,其包括:

组分a,其包含固相载体以及与之直接结合或间接结合的第一抗体或其结合片段,所述第一抗体或其结合片段能够与14-3-3eta蛋白的第一表位特异性结合;

组分b,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号第一标记物以及与之直接结合或间接结合的第二抗体或其结合片段,所述第二抗体或其结合片段能够与14-3-3eta蛋白的第二表位特异性结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠;

组分d,其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第二标记物以及与之直接结合或间接结合的第三抗体或其结合片段,所述第三抗体或其结合片段能够与14-3-3eta蛋白的第二表位特异性结合,且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

2.根据权利要求1所述的试剂套装,其特征在于,直接结合或间接结合第二标记物的第三抗体与直接结合或间接结合第一标记物的第二抗体为结合14-3-3eta蛋白的相同表位的同株抗体。

3.根据权利要求1所述的试剂套装,其特征在于,所述的第一抗体、第二抗体、第三抗体分别独立地选自单克隆抗体和/或多克隆抗体,优选单克隆抗体。

4.根据权利要求1-3中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述试剂套装还包括作为校准品的14-3-3eta蛋白纯品,所述校准品被校准品稀释液按照比例梯度稀释成不同浓度的工作校准品溶液。

5.根据权利要求1-4中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述第一抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述固相载体与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第一抗体或其结合片段与生物素结合,而所述固相载体与链霉亲和素结合。

6.根据权利要求1-4中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述第二抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述第一标记物与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第二抗体或其结合片段与生物素结合,而所述第一标记物与链霉亲和素结合。

7.根据权利要求1-4中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述第三抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述第二标记物与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第三抗体或其结合片段与生物素结合,而所述第二标记物与链霉亲和素结合。

8.根据权利要求1-7中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述第一标记物、第二标记物分别独立地为化学发光标记物,选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯及其衍生物、金刚烷、稀土元素和联吡啶钌配合物。

9.根据权利要求1-7中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述第一标记物、第二标记物分别独立地为化学发光催化剂,其选自辣根过氧化物酶和/或碱性磷酸酶。

10.根据权利要求1-7中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述固相载体选自磁性微球、塑料微球、塑胶微粒、微孔板、玻璃、毛细管和尼龙;优选磁性微球。

11.根据权利要求10所述的试剂套装,其特征在于,所述磁性微球的粒径0.05-50微米;优选0.1-40微米;更优选5-20微米。

12.根据权利要求1-11中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述组分a中固相载

体以及与之结合的第一抗体或其结合片段的浓度为1-100mg/mL,优选10-50mg/mL;和/或,所述组分b中第一标记物以及与之结合的第二抗体或其结合片段的浓度为1-100mg/mL,优选10-50mg/mL;和/或,所述组分d中第二标记物以及与之结合的第三抗体或其结合片段的浓度为1-100mg/mL,优选10-50mg/mL。

13.根据权利要求1-12中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述试剂套装还包括组分c,底物溶液;优选所述底物溶液包括A溶液和B溶液;进一步优选所述A溶液为过氧化氢溶液,所述B溶液为氢氧化钠溶液。

14.根据权利要求1-13中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述14-3-3eta蛋白的氨基酸序列如SEQUENCE NO.1所示。

15.根据权利要求14所述的试剂套装,其特征在于,所述第二表位和所述第一表位分别独立地选自氨基酸片段为14-3-3eta蛋白的序列的相对特异性片段:1-6aa、27-38aa、71-83aa、112-119aa和141-154aa。

16.一种用于检测14-3-3eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒,其包含权利要求1-15中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装。

17.根据权利要求16所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括以下组分:

组分a:其包含直接连接或间接连接有第一抗体的磁性微球;

组分b:其包含直接连接或间接连接有第一标记物或第二标记物的第二抗体。

18.根据权利要求16所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括组分d:其包含直接连接或间接连接有第一标记物或第二标记物的第三抗体。

19.根据权利要求17或18所述的试剂盒,其特征在于,所述第一标记物和第二标记物相同;和/或,所述第三抗体与第二抗体相同。

20.根据权利要求17-19中任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括组分c:其包含含有过氧化氢溶液和氢氧化钠溶液的底物溶液。

21.一种检测待测样品中14-3-3eta蛋白的非均相化学发光免疫检测方法,其包括使用如权利要求1-15中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或使用如权利要求16-20中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒来判断测待测样品中是否存在14-3-3eta蛋白和/或确定14-3-3eta蛋白的含量。

22.根据权利要求21所述的方法,其特征在于,该方法包括:

步骤T1,将待测样品与组分a和组合b混合,得到第三混合物;

步骤T2,将第三混合物与组分d混合,得到第五混合物;

步骤T3,将第五混合物与组分c混合,得到产生了可检测信号的第六混合物;

步骤T4,检测步骤T3中所述化学发光信号的存在和/或强度,从而判断测待测样品中是否存在14-3-3eta蛋白和/或确定14-3-3eta蛋白的含量。

23.根据权利要求22所述的方法,其特征在于,所述方法还包括在步骤T1之前的制作14-3-3eta蛋白标准工作曲线的步骤。

24.根据权利要求23所述的方法,其特征在于,在步骤T4中,检测步骤T3中所述化学发光信号的强度,并基于14-3-3eta蛋白标准工作曲线来确定待测样品中14-3-3eta蛋白的含量。

25.一种检测14-3-3eta蛋白的方法,其特征在于,采用权利要求16-20所述的试剂盒,

包括以下步骤：

1)第一次加样：将待测样本与组分a混合，温育，形成复合物；

2)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

3)第二次加样：将组分b加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第一双抗夹心复合物；

4)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

5)第三次加样：将组分d加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第二双抗夹心复合物；

6)检测：外加磁场将上述双抗夹心复合物沉淀，去除上清液，清洗后，加入发光底物，检测发出的相对光强度，计算得到14-3-3eta蛋白的含量。

26.一种如权利要求1-15中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或如权利要求16-20中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒或如权利要求21-25中任意一项所述的方法在检测待测样品中14-3-3eta蛋白的存在和/或含量中的应用，其中，所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织。

27.一种如权利要求1-15中任意一项所述的试剂套装在制备用于检测类风湿性关节炎的试剂盒中的应用，其包括：

步骤M1，提供来自待测主体的待测样品；

步骤M2，判断测待测样品中是否存在14-3-3eta蛋白和/或确定14-3-3eta蛋白的含量；

步骤M3，将其与正常对照样品、类风湿性关节炎对照样品、或来自同一待测主体的治疗前的样品中所述14-3-3eta蛋白的含量比较；

其中，所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织。

28.根据权利要求27所述的应用，其特征在于，与正常对照样样品相比，所述待测样品中14-3-3eta蛋白的存在是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

29.根据权利要求27所述的应用，其特征在于，与正常对照样样品相比，所述待测样品中14-3-3eta蛋白的含量的增加是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

30.根据权利要求27所述的应用，其特征在于，与正常对照样样品相比，所述待测样品中14-3-3eta蛋白的含量增加0.2ng/ml是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

31.根据权利要求27所述的应用，其特征在于，与类风湿性关节炎对照样品相比，所述待测样品中14-3-3eta蛋白的相对含量是所述待测主体中类风湿性关节炎的预后性指示物。

32.根据权利要求27所述的应用，其特征在于，与来自同一待测主体的治疗前的样品相比，所述待测样品中14-3-3eta蛋白的相对含量指示治疗方案的效力。

33.根据权利要求27-32中任意一项所述的应用，其特征在于，在步骤M2中，采用如权利要求21-25中任意一项所述的方法来判断测待测样品中是否存在14-3-3eta蛋白和/或确定14-3-3eta蛋白的含量。

34.一种如权利要求1-15中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或如权利要求16-20中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒或如权利要求21-25中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测方法在化学发光免疫分析仪中的应用。

35.如权利要求34所述的应用中的所述的化学发光免疫分析仪，其包括：

样本加注模块，其用于向化学发光分析仪的预设位置加注怀疑患有类风湿性关节炎的受治疗者的待测样品；

试剂加注模块，其用于向化学发光分析仪的预设位置加注各种试剂的移液；

孵育模块，其用于为待测样品及试剂发生免疫反应提供合适的温育反应环境；

磁分离模块，其用于清洗反应混合液中的磁微粒，并将温育反应后的反应液排出，留下清洗后的磁微粒；

检测模块，其用于检测化学发光信号，判断待测样本中14-3-3eta蛋白的浓度；

电气控制模块，用于协调控制所述孵育模块、样本加注模块、试剂加注模块，所述磁分离模块和所述检测模块按照设定的程序动作。

36.一种控制如权利要求35所述的化学发光免疫分析仪的方法，其包括如下步骤：

步骤T1，将待测样品与组分a和组合b混合，得到第三混合物；

步骤T2，将第三混合物与组分d混合，得到第五混合物；

步骤T3，将第五混合物与组分c混合，得到产生了可检测信号的第六混合物；

步骤T4，检测步骤T3中所述化学发光信号的存在和/或强度，从而判断测待测样品中是否存在14-3-3eta蛋白和/或确定14-3-3eta蛋白的含量。

37.根据权利要求36所述的方法，其特征在于，所述方法还包括在步骤T1之前的制作14-3-3eta蛋白标准工作曲线的步骤。

38.根据权利要求37所述的方法，其特征在于，在步骤T4中，检测步骤T3中所述化学发光信号的强度，并基于14-3-3eta蛋白标准工作曲线来确定待测样品中14-3-3eta蛋白的含量。

39.一种检测14-3-3eta蛋白的方法，其特征在于，采用权利要求16-20所述的试剂盒和如权利要求35所述的化学发光免疫分析仪，包括以下步骤：

1)第一次加样：将待测样本与组分a混合，温育，形成复合物；

2)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

3)第二次加样：将组分b加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第一双抗夹心复合物；

4)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

5)第三次加样：将组分d加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第二双抗夹心复合物；

6)检测：外加磁场将上述双抗夹心复合物沉淀，去除上清液，清洗后，加入发光底物，检测发出的相对光强度，计算得到14-3-3eta蛋白的含量。

40.一种如权利要求1-15中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或如权利要求16-20中任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒或如权利要求21-25中任意一项所述的方法或如权利要求35中所述的化学发光免疫分析仪或如权利要求36-39中任意一项在检测待测样品中14-3-3eta蛋白的存在和/或含量中的应用，其中，所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织。

# 检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒及其应用

## 技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析技术领域，具体涉及一种检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法、使用方法。

## 背景技术

[0002] 14-3-3eta(η)蛋白是一种新型的血清/血浆蛋白标志物，诱导炎症因子，如白细胞介素(IL)-1和-6，并联系到关节损伤。7种亚型中只有14-3-3η蛋白在RA活动性炎症滑膜和血清中高表达，并与RA前炎性因子表达和滑膜炎症呈正相关，且滑膜液14-3-3η蛋白水平至少高于血清水平5倍以上，提示滑膜是14-3-3η蛋白的主要来源。与健康的人相比，14-3-3η亚型在关节炎患者中高水平表达，这被认为与14-3-3η蛋白诱导相关的炎症因子和关节损伤的能力直接相关。

[0003] 现有的检测14-3-3蛋白的非均相免疫检测法灵敏较低，准确度不高。并且，国内、外市场上尚没有发现商品化14-3-3eta蛋白检测试剂盒。曾报道有酶联免疫吸附法(ELISA法)检测患者血清中14-3-3eta蛋白，但是其灵敏较低，特异性也较差。

[0004] 因此，目前亟需研究开发一种灵敏度高、特异性好的14-3-3eta蛋白非均相免疫检测试剂盒。

## 发明内容

[0005] 为解决上述技术问题，本发明提供了一种用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒。该试剂盒采用能够与14-3-3 eta蛋白特异性结合的第一抗体和第二抗体制成，结合化学发光技术制成；利用化学发光免疫分析平台的灵敏度高、线性范围宽、精密度好等优势，为临床诊断类风湿提高确诊率，为预防类风湿和提早发现类风湿提供辅助检测，成为类风湿新型标志物。

[0006] 为此，本发明第一方面提供了一种用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂套装，其包括：

[0007] 组分a，其包含固相载体以及与之直接结合或间接结合的第一抗体或其结合片段，所述第一抗体或其结合片段能够与14-3-3 eta蛋白的第一表位特异性结合；

[0008] 组分b，其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号第一标记物以及与之直接结合或间接结合的第二抗体或其结合片段，所述第二抗体或其结合片段能够与14-3-3 eta蛋白的第二表位特异性结合，且所述第二表位和所述第一表位不相重叠；

[0009] 组分d，其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第二标记物以及与之直接结合或间接结合的第三抗体或其结合片段，所述第三抗体或其结合片段能够与14-3-3 eta蛋白的第二表位特异性结合，且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

[0010] 本发明中，直接结合或间接结合第二标记物的第三抗体与直接结合或间接结合第一标记物的第二抗体为结合14-3-3 eta蛋白的相同表位的同株抗体。

[0011] 本发明中,所述的第一抗体、第二抗体、第三抗体分别独立地选自单克隆抗体和/或多克隆抗体,优选单克隆抗体。

[0012] 根据本发明的一些实施方式,所述试剂套装还包括作为校准品的14-3-3 eta蛋白纯品,所述校准品被校准品稀释液按照比例梯度稀释成不同浓度的工作校准品溶液。

[0013] 在本发明的一些实施例中,所述第一抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述固相载体与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第一抗体或其结合片段与生物素结合,而所述固相载体与链霉亲和素结合。

[0014] 在本发明的一些实施例中,所述第二抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述第一标记物与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第二抗体或其结合片段与生物素结合,而所述第一标记物与链霉亲和素结合。

[0015] 在本发明的一些实施例中,所述第三抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述第二标记物与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第三抗体或其结合片段与生物素结合,而所述第二标记物与链霉亲和素结合。

[0016] 根据本发明的一些实施方式,所述第一标记物、第二标记物分别独立地为化学发光标记物,所述第一标记物、第二标记物分别独立地选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯及其衍生物、金刚烷、稀土元素和联吡啶钌配合物。

[0017] 根据本发明的另一些实施方式,所述第一标记物、第二标记物分别独立地为化学发光催化剂,所述第一标记物、第二标记物分别独立地选自辣根过氧化物酶和/或碱性磷酸酶。

[0018] 本发明中,所述固相载体选自磁性微球、塑料微球、塑胶微粒、微孔板、玻璃、毛细管及尼龙;优选磁性微球。

[0019] 在本发明的一些实施例中,所述磁性微球的粒径0.05-50微米;优选0.1-40微米;更优选5-20微米。

[0020] 在本发明的一些实施例中,所述组分a中固相载体以及与之结合的第一抗体或其结合片段的浓度为1-100mg/mL,优选10-50mg/mL。

[0021] 在本发明的一些实施例中,所述组分b中第一标记物以及与之结合的第二抗体或其结合片段的浓度为1-100mg/mL,优选10-50mg/mL。

[0022] 在本发明的一些实施例中,所述组分d中第二标记物以及与之结合的第三抗体或其结合片段的浓度为1-100mg/mL,优选10-50mg/mL。

[0023] 根据本发明,所述试剂套装还包括组分c,底物溶液。

[0024] 根据本发明的一些实施方式,所述底物溶液包括A溶液和B溶液。

[0025] 在本发明的一些实施例中,所述A溶液为过氧化氢溶液。

[0026] 在本发明的一些实施例中,所述B溶液为氢氧化钠溶液。

[0027] 在本发明的一些实施例中,所述14-3-3 eta蛋白的氨基酸序列如SEQUENCE NO.1所示。

[0028] 在本发明的一些优选的实施例中,所述第二表位和所述第一表位分别独立地选自氨基酸片段为14-3-3 eta蛋白的序列的相对特异性片段:1-6aa、27-38aa、71-83aa、112-119aa和141-154aa。

[0029] 本发明第二方面提供了一种用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检

测试剂盒，其包含本发明第一方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装。

[0030] 根据本发明，所述试剂盒包括以下组分：

[0031] 组分a：其包含直接连接或间接连接有第一抗体的磁性微球；

[0032] 组分b：其包含直接连接或间接连接有第一标记物或第二标记物的第二抗体。

[0033] 在本发明的一些实施方式中，所述试剂盒还包括组分d：其包含直接连接或间接连接有第一标记物或第二标记物的第三抗体。

[0034] 在本发明的一些优选的实施例中，所述第一标记物和第二标记物相同。

[0035] 在本发明的另一些优选的实施例中，所述第三抗体与第二抗体相同。

[0036] 在本发明的一些实施方式中，所述试剂盒还包括组分c：其包含含有过氧化氢溶液和氢氧化钠溶液的底物溶液。

[0037] 本发明第三方面提供了一种检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测方法，其包括使用如本发明第一方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或使用如本发明第二方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒来判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量。

[0038] 根据本发明，该方法包括：

[0039] 步骤T1，将待测样品与组分a和组合b混合，得到第三混合物；

[0040] 步骤T2，将第三混合物与组分d混合，得到第五混合物；

[0041] 步骤T3，将第五混合物与组分c混合，得到产生了可检测信号的第六混合物；

[0042] 步骤T4，检测步骤T3中所述化学发光信号的存在和/或强度，从而判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量。

[0043] 在本发明的一些实施例中，所述方法还包括在步骤T1之前的制作14-3-3 eta蛋白标准工作曲线的步骤。

[0044] 在本发明的一些进一步的实施例中，在步骤T4中，检测步骤T3中所述化学发光信号的强度，并基于14-3-3 eta蛋白标准工作曲线来确定待测样品中14-3-3eta蛋白的含量。

[0045] 本发明第四方面提供了一种检测14-3-3 eta蛋白的方法，其特征在于，采用第二方面所述的试剂盒，包括以下步骤：

[0046] 1)第一次加样：将待测样本与组分a混合，温育，形成复合物；

[0047] 2)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

[0048] 3)第二次加样：将组分b加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第一双抗夹心复合物；

[0049] 4)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

[0050] 5)第三次加样：将组分d加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第二双抗夹心复合物；

[0051] 6)检测：外加磁场将上述双抗夹心复合物沉淀，去除上清液，清洗后，加入发光底物，检测发出的相对光强度，计算得到14-3-3 eta蛋白的含量。

[0052] 本发明第五方面提供了一种如第一方面任意一项所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或如本发明第二方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒或如本发明第三方面所述的方法在检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的存在和/或含量中的应用，其中，所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积

液和组织。

[0053] 本发明第六方面提供了一种如本发明第一方面所述的试剂套装在制备用于检测类风湿性关节炎的试剂盒中的应用，其包括：

[0054] 步骤M1，提供来自待测主体的待测样品；

[0055] 步骤M2，判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量；

[0056] 步骤M3，将其与正常对照样品、类风湿性关节炎对照样品、或来自同一待测主体的治疗前的样品中所述14-3-3 eta蛋白的含量比较；

[0057] 其中，所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织。

[0058] 在本发明的一些实施例中，与正常对照样样品相比，所述待测样品中14-3-3eta蛋白的存在是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

[0059] 在本发明的一些实施例中，与正常对照样样品相比，所述待测样品中14-3-3eta蛋白的含量的增加是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

[0060] 在本发明的一些实施例中，与正常对照样样品相比，所述待测样品中14-3-3eta蛋白的含量增加0.2ng/ml是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

[0061] 在本发明的一些实施例中，与类风湿性关节炎对照样品相比，所述待测样品中14-3-3 eta蛋白的相对含量是所述待测主体中类风湿性关节炎的预后性指示物。

[0062] 在本发明的一些具体的实施例中，与来自同一待测主体的治疗前的样品相比，所述待测样品中14-3-3 eta蛋白的相对含量指示治疗方案的效力。

[0063] 在本发明的一些具体的实施例中，在步骤M2中，采用如本发明第三或第四方面所述的方法来判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量。

[0064] 本发明第七方面提供了一种如本发明第一方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或如本发明第二方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒或如本发明第三或第四方面所述的非均相化学发光免疫检测方法在化学发光分析仪中的应用。

[0065] 本发明第八方面提供了上述应用中所述化学发光免疫分析仪，其包括：

[0066] 样本加注模块，其用于向化学发光分析仪的预设位置加注怀疑患有类风湿性关节炎的受治疗者的待测样品；

[0067] 试剂加注模块，其用于向化学发光分析仪的预设位置加注各种试剂的移液；

[0068] 孵育模块，其用于为待测样品及试剂发生免疫反应提供合适的温育反应环境；

[0069] 磁分离模块，其用于清洗反应混合液中的磁微粒，并将温育反应后的反应液排出，留下清洗后的磁微粒；

[0070] 检测模块，其用于检测化学发光信号，判断待测样本中14-3-3eta蛋白的浓度；

[0071] 电气控制模块，用于协调控制所述孵育模块、样本加注模块、试剂加注模块，所述磁分离模块和所述检测模块按照设定的程序动作。

[0072] 本发明第九方面提供了一种控制如本发明第八方面所述的化学发光免疫分析仪的方法，其包括如下步骤：

[0073] 步骤T1，将待测样品与组分a和组合b混合，得到第三混合物；

[0074] 步骤T2,将第三混合物与组分d混合,得到第五混合物;

[0075] 步骤T3,将第五混合物与组分c混合,得到产生了可检测信号的第六混合物;

[0076] 步骤T4,检测步骤T3中所述化学发光信号的存在和/或强度,从而判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量。

[0077] 在本发明的一些实施例中,所述方法还包括在步骤T1之前的制作14-3-3 eta蛋白标准工作曲线的步骤。

[0078] 在本发明的一些进一步的实施例中,在步骤T4中,检测步骤T3中所述化学发光信号的强度,并基于14-3-3 eta蛋白标准工作曲线来确定待测样品中14-3-3 eta蛋白的含量。

[0079] 本发明第十方面提供了一种检测14-3-3 eta蛋白的方法,该方法采用权本发明第二方面所述的试剂盒和如本发明第八方面所述的化学发光免疫分析仪,包括以下步骤:

[0080] 1)第一次加样:将待测样本与组分a混合,温育,形成复合物;

[0081] 2)清洗:外加磁场将上述反应产物沉淀,去除上清液,并以缓冲液清洗;

[0082] 3)第二次加样:将组分b加入上述沉淀中,混合均匀,温育,形成第一双抗夹心复合物;

[0083] 4)清洗:外加磁场将上述反应产物沉淀,去除上清液,并以缓冲液清洗;

[0084] 5)第三次加样:将组分d加入上述沉淀中,混合均匀,温育,形成第二双抗夹心复合物;

[0085] 6)检测:外加磁场将上述双抗夹心复合物沉淀,去除上清液,清洗后,加入发光底物,检测发出的相对光强度,计算得到14-3-3 eta蛋白的含量。

[0086] 本发明第十一方面提供了一种如本发明第一方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或如本发明第二方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒或如本发明第三或第四方面所述的方法或本发明第八方面所述的化学发光免疫分析仪或第九或第十方面所述的方法在检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的存在和/或含量中的应用,其中,所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织。

[0087] 本发明所提供的用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒采用能够与14-3-3 eta蛋白特异性结合的第一抗体、第二抗体,以及与第二抗体为结合14-3-3 eta蛋白的相同表位的同株抗体的第三抗体制成,与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0088] 本发明的检测14-3-3eta蛋白的试剂盒,通过设置第一标记物体系和第二标记物体系,使用该试剂盒检测14-3-3eta蛋白时,首先进行一次加样,将待测样本与第一标记物体系和磁性微球体系混合,温育反应后清洗,再进行二次加样,再次加入第二标记物体系,彻底形成抗体-抗原-抗体结合的双抗夹心复合物,再进行检测,从而既能提高样本检测的灵敏度,又不会对抗原浓度极高的样本测不准。

[0089] 本发明的一种检测14-3-3eta蛋白的方法,在两步加样中均加入标记物体系,从而在第一步反应中即形成双抗夹心复合物,避免了清洗过程中损失抗原的问题,因为所有的抗原均会与抗体反应形成“三明治”复合物,这样就能保证低值样本的检测灵敏度;并且在第二步反应中继续加入标记物体系,如样本中抗原的含量极高,此时磁性微球表面还存在

未与标记物体系结合的抗原，则在第二步反应中和新加入的标记物体系充分反应结合，使样本中与磁性微球体系结合的抗原都能形成双抗夹心复合物，避免了产生HOOK效应。该方法具有灵敏度高和不会产生HOOK效应的优点。

[0090] 本发明的检测14-3-3eta蛋白的试剂盒以双抗体夹心的方式，利用非均相化学发光免疫分析平台的灵敏度高、线性范围宽、精密度好等优势，为临床诊断类风湿提高确诊率，为预防类风湿和提早发现类风湿提供辅助检测。

[0091] 将本发明的试剂盒应用于非均相均相免疫分析仪具有以下有点：1、信号值范围宽，达到定量测试标准；2、灵敏度高，对早期RA与确定RA患者的敏感度高；3、稳定性好，精密度好；4、此试剂盒适用于非均相化学发光免疫分析仪，成为国内首个14-3-3eta蛋白检测试剂盒。推动类风湿临床诊断的进步，为行业建立新标准。

## 具体实施方式

[0092] 为使本发明容易理解，下面将详细说明本发明。但在详细描述本发明前，应当理解本发明不限于描述的具体实施方式。还应当理解，本文中使用的术语仅为了描述具体实施方式，而并不表示限制性的。

[0093] 在提供了数值范围的情况下，应当理解所述范围的上限和下限和所述规定范围中的任何其他规定或居间数值之间的每个居间数值均涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立包括在较小的范围中，并且也涵盖在本发明内，服从规定范围中任何明确排除的限度。在规定的范围包含一个或两个限度的情况下，排除那些包括的限度之任一或两者的范围也包含在本发明中。

[0094] 除非另有定义，本文中使用的所有术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以在本发明的实施或测试中使用，但是现在描述了优选的方法和材料。

[0095] Ⅰ.术语

[0096] “待测主体”、“受治疗者”和“患者”可互换使用，在没有特别说明或限定的情况下，是指哺乳动物，诸如人和非人灵长类、以及兔、大鼠、小鼠、山羊、猪和其它哺动物物种。

[0097] 本发明所述用语“非均相”所对应的英文定义为“heterogeneous”，其是指须对结合的抗原抗体复合物和剩余的游离抗原或抗体进行分离才可进行检测。

[0098] 本发明所述用语“待测样品”是指可能含有被分析物的一种混合物，被分析物包括但不限于蛋白质、激素、抗体或抗原。可以被用在本发明公开的方法中的典型待测样品包括体液和组织，如血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织等。

[0099] 本发明所述用语“14-3-3”和“14-3-3蛋白”可互换使用，是指在真核细胞中普遍表达的保守胞内调节分子的14-3-3家族的至少一个成员。14-3-3蛋白具有结合许多功能各异的信号转导蛋白，包括激酶、磷酸酶和跨膜受体的能力。实际上，多于100种信号转导蛋白已被报道为14-3-3的配体。14-3-3蛋白可被认为是Tetratrico肽重复片段超家族的演化成员。它们通常具有9或10个α螺旋，通常沿着其氨基末端螺旋形成同二聚体和/或异二聚体相互作用。这些蛋白包含多个已知结构域，所述结构域包括用于二价阳离子相互作用、磷酸化&乙酰化和蛋白水解裂解的区域及其它。已知在哺乳动物中表达七种不同遗传编码的14-

3-3蛋白同种型，每种同种型包含242-255个氨基酸。七种14-3-3蛋白同种型命名为14-3-3α/β(alpha/beta)、14-3-3δ/ξ(delta/zeta)、14-3-3ε(epsilon)、14-3-3γ(gamma)、14-3-3η(eta)、14-3-3τ/θ(tau/theta)和14-3-3σ(sigma/stratifin)。14-3-3蛋白具有高程度的序列相似性，已知经历翻译后处理如，磷酸化、瓜氨酸化、等等。参见如，Megidish等(1998)J.Biol.Chem.273:21834-45。因此，抗14-3-3自身抗体可特异性结合和/或识别多于一种14-3-3蛋白同种型，或可特异性结合和/或识别仅一种同种型(如，14-3-3η)。另外，抗14-3-3抗体可结合和/或识别已被如，天然(如，翻译后)或化学方法修饰的14-3-3-蛋白。

[0100] 本发明中所述用语“相对特异性片段”是指针对14-3-3家族的7个同种型14-3-3蛋白，本发明人通过研究发现如SEQUENCE NO.1所示的14-3-3eta蛋白或其片段的氨基酸序列中片段1-6aa、27-38aa、71-83aa、112-119aa和141-154aa为仅属于14-3-3η(eta)蛋白的特异性表位，其与14-3-3家族的其他6个同种型14-3-3蛋白的氨基酸序列无任何交叉，由其产生的单克隆抗体，只识别或结合14-3-3η(eta)蛋白，不识别或结合14-3-3家族的其他6个同种型14-3-3蛋白。

[0101] 本发明中所述“关节炎”与“关节炎疾患”和“关节痛”可互换使用，除了指明之处以外，通常是指人体关节的炎症性疾患。疼痛、肿胀、僵硬和难以移动通常与关节炎疾患有关。关节炎由多于100种不同情况组成。这些情况可以是任何情况，从相对轻微的形式到严重损害的系统形式。关节炎疾患可由多种原因的任何原因造成，包括感染、创伤、退行性疾病、代谢紊乱或干扰或其它未知病因。关节炎疾患可按照亚型更具体地描述，例如，类风湿性关节炎、混合性结缔组织病(MCTD)、晶体性关节炎、反应性关节炎、脊椎关节病、骨关节炎、类肉瘤病、复发性风湿病、创伤后关节炎、恶性肿瘤相关的关节炎、脓毒性关节炎、莱姆关节炎、骨关节炎、细菌传染性关节炎、等等。关节炎还可伴有其它鉴定的疾病，包括痛风、强直性脊柱炎、系统性红斑狼疮、炎症性肠病、银屑病、等等。明确定义的关节炎疾患是指知晓关于关节炎的类型和其阶段，如，发作、缓解、复发、等等。

[0102] 本发明所述用语“抗体”和“免疫球蛋白”以最广含义使用，包括任何同种型的抗体或免疫球蛋白，保留对抗原的特异性结合的抗体片段；包括但不限于Fab、Fv、scFv、Fd片段，嵌合抗体，人源化抗体，单链抗体，双特异性抗体，以及包含抗体的抗原结合部分和非抗体蛋白的融合蛋白。在任何需要的情况下，抗体可以进一步与其它部分，诸如特异性结合配对成员，例如生物素或链霉亲和素(生物素-链霉亲和素特异性结合配对成员中的一员)等缀合。

[0103] 本发明所述用语“单克隆抗体”是指由单克隆的B淋巴细胞分泌的免疫球蛋白，其可以通过本领域技术人员所公知的方法来制备得到。

[0104] 本发明所述用语“多克隆抗体”是指由一个以上的B淋巴细胞克隆产生的免疫球蛋白集合，其可以通过本领域技术人员所公知的方法来制备得到。

[0105] 本发明所述用语“抗原”是指能够刺激机体产生免疫应答，并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞在体内外结合，发生免疫效应的物质。

[0106] 本发明所述用语“结合”指由于例如共价、静电、疏水、离子和/或氢键等相互作用，包括但不限于如盐桥和水桥等相互作用引起的两个分子间的直接联合。

[0107] 本发明所述用语“特异性结合”或“特异结合”，是指两种物质之间的相互辨别和选择性结合反应，从立体结构角度上说就是相应的反应物之间构象的对应性。

[0108] 本发明所述用语“特异性结合配对成员”是指这样一对分子，它们能够相互特异性结合，例如，酶-底物、抗原-抗体、配基-受体。一个具体的特异性结合配对成员对的例子是生物素-链霉亲和素系统，其中“生物素”广泛存在于动植物组织中，其分子上有两个环状结构，分别为咪唑酮环和噻吩环，其中咪唑酮环是与链霉亲和素结合的主要部位。活化的生物素可以在蛋白质交联剂的介导下，与已知的几乎所有生物大分子偶联，包括蛋白质、核酸、多糖和脂类等；而“链霉亲和素”是由链霉菌分泌的一种蛋白质，分子量为65kD。“链霉亲和素”分子由4条相同的肽链组成，其中每条肽链都能结合一个生物素。因此每个抗原或抗体可同时偶联多个生物素分子，从而产生“触手效应”提高分析灵敏度。在任何需要的情况下，本发明中所用任何试剂，包括抗原、抗体、受体或供体，可以根据实际需要缀合生物素-链霉亲和素特异性结合配对成员中的任一员。

[0109] 本发明所述用语“表位”是指能够特异性结合免疫球蛋白或者T细胞受体的任何蛋白决定簇。在本发明的一些具体实施例中，表位是抗原表面能够被抗体特异性集合的区域。表位决定簇通常可以包括分子的化学活性表面基团，例如但不限于：氨基酸、糖侧链、磷酰基和/或磺酰基。在本发明的其他一些具体实施例中，表位可以具体特定三位结构特征以及特定电荷特征。

[0110] 本发明所述用语“非均相化学发光免疫检测试剂套装”是指非均相化学发光免疫检测所必须使用的全部试剂或药剂的组合。

[0111] 本发明中所述用语“HOOK效应”即钩状效应，是指由于抗原抗体比例不合适而导致假阴性的现象，其中抗体过量叫做前带效应；抗原过量叫做后带效应。

[0112] Ⅱ.实施方案

[0113] 本发明人研究发现，在采用一步法非均相化学发光免疫检测法检测14-3-3η(eta)蛋白抗原浓度过高时会出现检测不准确的问题，例如，采用夹心检测法时，在加入连接第一抗体的固相载体的同时加入连接有标记物的第二抗体，温育反应结束后形成第一抗体-抗原(14-3-3η蛋白)-第二抗体的“三明治”复合物。如样本中抗原浓度(14-3-3η蛋白)极高时会出现明显的HOOK效应，即当样本中待测抗原浓度过高时，过量抗原(14-3-3η蛋白)分别和连接第一抗体的固相载体及连接有第一标记物的第二抗体结合，而不再形成夹心复合物，由此所检测的结果将低于14-3-3η蛋白实际含量而导致出现HOOK效应。而对于灵敏度不高的问题，则是由于采用了两步法，即在第一步加样中，仅加入连接第一抗体的固相载体，使抗原(14-3-3η蛋白)充分与连接第一抗体的固相载体反应结合，清洗后再在第二步加入连接标记物的第二抗体，形成第一抗体-抗原(14-3-3η蛋白)-第二抗体的“三明治”复合物，虽然避免了出现HOOK效应的可能，但是，该两步法的第一步加样反应中，只是样本中的抗原(14-3-3η蛋白)和连接第一抗体的固相载体反应，没有形成第一抗体-抗原(14-3-3η蛋白)-第二抗体结合的“三明治”复合物，因此在清洗过程中会损失掉一定的抗原(14-3-3η蛋白)，造成检测灵敏度的降低。

[0114] 在上述研究发现的基础上，本发明在上述一步法和两步法的基础上进行了改进，在该试剂盒中设置第一标记物体系和第二标记物体系，使用该试剂盒检测14-3-3η蛋白抗原时，首先进行一次加样，将待测样本与第一标记物体系和固相载体体系混合，温育反应后清洗，再进行二次加样，再次加入第二标记物体系，彻底形成抗体-抗原-抗体结合的双抗夹心复合物，再进行检测，从而既避免了产生HOOK效应的问题，又避免了清洗过程中会损失一

定抗原,造成灵敏度下降的问题。

[0115] 本发明涉及检测14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的存在的在制备用于采用非均相化学发光免疫检测方法通过下列步骤评价受治疗者的类风湿性关节炎的试剂中的用途:a)提供来自怀疑患有类风湿性关节炎的受治疗者的待测样品;b)检测所述待测样品中14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物;其中所述14-3-3eta蛋白或其片段或免疫复合物的存在指示受治疗者的类风湿性关节炎;其中,所述14-3-3eta蛋白或其片段包含至少一个14-3-3eta表位,所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织,优选所述待测样品选自血液、血浆、血清、滑膜液和组织,进一步优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,更进一步优选所述待测样品为血清。

[0116] 在本发明的一些实施方式中,所述步骤还包括测量14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量;并进一步将所测得的14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量,与正常对照样品、类风湿性关节炎对照样品或来自同一受治疗者的治疗前样品中所述14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量进行比较。

[0117] 在本发明的一些优选的实施例中,基于14-3-3eta蛋白标准工作曲线来确定待测样品中14-3-3eta蛋白的含量。

[0118] 在一些实施例中,将所测得的14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量,与正常对照样品中所述14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量进行比较。例如,与正常对照样样品相比,所述待测样品中所述14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量的增加是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。在一些实施例中,将所测得的14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量,与类风湿性关节炎对照样品中所述14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量进行比较。例如,与类风湿性关节炎对照样品相比,所述待测样品中所述14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的相对含量是所述待测主体中类风湿性关节炎的预后性指示物。

[0119] 在一些实施例中,将所测得的14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量,与来自同一待测主体的治疗前的样品中所述14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的含量进行比较。例如,与来自同一待测主体的治疗前的样品相比,所述待测样品中所述14-3-3eta蛋白或其片段或所述14-3-3eta蛋白或其片段与至少一种抗体形成的免疫复合物的相对含量指示治疗方案的效力。

[0120] 根据本发明,所述步骤包括将所述样品与包含能够与14-3-3eta蛋白或其片段的至少一种特异表位特异性结合形成免疫复合物的抗体接触。

[0121] 在本发明的一些实施方式中,所述抗体包括能够与14-3-3eta蛋白的第一表位特

异性结合的第一抗体以及能够与14-3-3eta蛋白的第二表位特异性结合的第二抗体，其中所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

[0122] 在本发明的一些实施方式中，所述第一抗体和第二抗体中的一个与第一标记物直接结合或间接结合，另一个则与固相载体直接结合或间接结合；所述第一标记物能够与底物反应生成化学发光信号或能够催化底物反应生成化学发光信号。

[0123] 在本发明的一些实施方式中，所述抗体还包括能够与14-3-3 eta蛋白的第一或第二表位特异性结合的第三抗体；所述第三抗体与第二标记物直接结合或间接结合。

[0124] 本领域技术人员应该了解的是，本发明中直接结合或间接结合第二标记物的第三抗体与直接结合或间接结合第一标记物的第一抗体或第二抗体为结合14-3-3eta蛋白的相同表位的同株抗体。

[0125] 本发明中，所述第二标记物与第一标记物相同或者不相同。

[0126] 本发明中，所述第一标记物和第二发光标记物为发光标记物，其分别独立地选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯及其衍生物、金刚烷、稀土元素和联吡啶钌配合物。优选地，所述吖啶酯及其衍生物包括吖啶酯、吖啶酯磺酰胺、吖啶酯对甲基磺酰胺、吖啶酯三氟甲基磺酰胺。

[0127] 本发明中，所述第一标记物和第二发光标记物为化学发光催化剂，其分别独立地选自辣根过氧化物酶和/或碱性磷酸酶。

[0128] 在本发明的一些优选的实施例中，固相载体表面可以进行表面修饰，引进特定的功能团，进而在固相载体表面连接上醛基(-CHO)、羧基(-COOH)、氨基(-NH2)、羟基(-OH)、巯基(-SH)等活性基团修饰，可以与生物分子有效而稳定地键合连接。

[0129] 本发明中，所述固相载体选自磁性微球、塑料微球、塑胶微粒、微孔板、玻璃、毛细管及尼龙；优选磁性微球。

[0130] 在本发明的一些实施例中，所述磁性微球的粒径0.05-50微米；优选0.1-40微米；更优选5-20微米。

[0131] 在本发明的一些实施方式中，所述第一抗体、第二抗体和第三抗体分别独立地选自单克隆抗体和/或多克隆抗体，优选单克隆抗体。

[0132] 在本发明的一些实施例中，所述14-3-3eta蛋白或其片段的氨基酸序列如SEQUENCE NO.1所示。

[0133] 在本发明的一些实施例中，所述表位选自氨基酸片段为14-3-3 eta蛋白的序列的相对特异性片段：1-6aa、27-38aa、71-83aa、112-119aa和141-154aa。

[0134] 下文中第一到第十一方面进一步提供了实现本发明的具体实施方案。

[0135] 本发明第一方面所涉及的用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂套装包括：

[0136] 组分a，其包含固相载体以及与之结合的第一抗体或其结合片段，所述第一抗体或其结合片段能够与14-3-3 eta蛋白的第一表位特异性结合；

[0137] 组分b，其包含能够与底物反应生成可检测信号的标记物以及与之结合的第二抗体或其结合片段，所述第二抗体或其结合片段能够与14-3-3 eta蛋白的第二表位特异性结合，且所述第二表位和所述第一表位不相重叠；

[0138] 组分d，其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第二标记物以

及与之直接结合或间接结合的第三抗体或其结合片段，所述第三抗体或其结合片段能够与14-3-3 eta蛋白的第二表位特异性结合，且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

[0139] 本领域技术人员应该了解的是，直接结合或间接结合第二标记物的第三抗体与直接结合或间接结合第一标记物的第二抗体为结合14-3-3 eta蛋白的相同表位的同株抗体。

[0140] 本发明人研究发现，采用加入与结合第一标记物的第二抗体为结合14-3-3 eta蛋白的相同表位的同株抗体以及与之结合的第二标记物可以最大限度地避免或克服检测过程中的Hook效应，大大提高检测结果的准确度。

[0141] 本发明中，所述14-3-3 eta蛋白的序列如Sequence NO.1所示。而所述第二表位和所述第一表位分别独立第选自氨基酸片段为14-3-3 eta蛋白的序列的相对特异性片段：第1位-第6位氨基酸(1-6aa)、第27位-第38位氨基酸(27-38aa)、第71位-第83位氨基酸(71-83aa)、第112位-第119位氨基酸(112-119aa)和第141位-第154位氨基酸(141-154aa)。

[0142] 本发明中，所述的第一抗体、第二抗体和第三抗体分别独立地选自单克隆抗体和/或多克隆抗体，优选单克隆抗体。

[0143] 本发明中所述单克隆抗体能够与14-3-3 eta蛋白的表位特异性结合。例如，本发明中所述的单克隆抗体为能够与所述14-3-3 eta蛋白的序列的相对特异性片段(表位)：1-6aa、27-38aa、71-83aa、112-119aa和141-154aa特异性结合的抗体。

[0144] 本发明中对所述单克隆抗体的制备方法没有特别的限制，其可以通过本领域技术人员所公知的方法来制备得到。例如，在一些实施例中，制备14-3-3eta单抗，其包括：

[0145] 步骤一、动物免疫

[0146] 1、首次免疫

[0147] 选取3-5只8周左右的Balb/c雄性小鼠，首次免疫将14-3-3eta抗原和弗氏完全佐剂等体积混合乳化，每只小鼠经腹腔注射乳化后抗原，免疫剂量为100μg/只小鼠。

[0148] 2、加强免疫

[0149] 首次免疫后，每隔2周进行一次免疫，用14-3-3eta抗原和弗氏不完全佐剂等体积混合乳化，每只小鼠经腹腔注射乳化后抗原，免疫剂量为50μg/只小鼠，共进行3次免疫。隔2周后，经尾静脉注射未乳化抗原50μg/只小鼠进行最后一次加强免疫。

[0150] 步骤二、细胞融合

[0151] 最后一次加强免疫结束后第三天，无菌环境下处死小鼠取小鼠脾脏并用适当的方法均匀分散脾细胞。在PEG介导下与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行融合，并采用有限稀释法滴加至96孔细胞培养板进行培养。

[0152] 步骤三、抗体检测

[0153] 融合结束10天左右，待克隆长至适当大小，对各孔的细胞培养上清进行检测。具体检测方案如下：

[0154] 1)用14-3-3eta抗原进行包板，并用2％BSA进行封闭；

[0155] 2)加入细胞培养板中各孔的细胞培养上清，反应后充分洗涤；

[0156] 3)加入HRP标记的抗鼠二抗，反应后充分洗涤；

[0157] 4)加入TMB底物反应15min显色，加入2M硫酸终止反应并进行OD450读数，并确定阳性克隆对应的孔号。

[0158] 步骤四、克隆化

[0159] 将阳性克隆进行2-3次克隆化，使细胞株稳定。

[0160] 步骤五、扩大培养，制备单抗

[0161] 用体外培养或制备腹水等方式进行单抗制备。

[0162] 本发明中对所述多克隆抗体的制备方法没有特别的限制，其可以通过本领域技术人员所公知的方法来制备得到。例如，在一些实施例中，制备14-3-3eta羊多抗，其包括：

[0163] 步骤一、动物免疫及采血

[0164] 1、首次免疫

[0165] 将14-3-3eta重组蛋白浓度调节至2mg/mL，将2mL的完全佐剂和2mL14-3-3eta重组蛋白分别吸人两个5mL注射器内，然后插入三通管内，交替推动针管混匀，往复操作直至形成粘稠的乳剂为止。取少量乳化后抗原，滴至清水表面，乳化抗原不扩散说明乳化成功。

[0166] 选择2头健壮公羊，进行皮下多点注射，每头羊注射2mL乳化抗原(即2mg14-3-3eta抗原)。

[0167] 2、加强免疫

[0168] 首次免疫后每隔2周进行一次加强免疫，共进行4次加强免疫

[0169] 将14-3-3eta重组蛋白浓度调节至1mg/mL，将2mL的不完全佐剂和2mL14-3-3eta重组蛋白用相同方法进行乳化。

[0170] 首次免疫后，由于完全佐剂中卡介苗以及抗原的刺激，羊会出现淋巴结肿大，此时用乳化的抗原进行淋巴结注射，尽可能多注射几个淋巴结。

[0171] 3、取血，分离血清

[0172] 最后一次加强免疫后一周，颈动脉放血，全血凝集后切成块状放置于37度孵育1-2小时，吸取血清并12000rpm离心5min去除血细胞等固体。

[0173] 步骤二、多抗纯化

[0174] 1、14-3-3 eta抗原免疫亲和柱制备

[0175] 将14-3-3 eta抗原(与免疫用抗原带不同亲和标签，如免疫原带His标签，亲和纯化用抗原带GST标签)透析至0.1M $NaHCO_3$，0.5M NaCl，pH8.3缓冲液中；

[0176] 按每克干粉可溶胀成3mL凝胶，每mL凝胶偶联5mg抗原，称取适当量的CNBr activated sepharose 4B(GE)干粉，用1mM HCl溶胀并在抽滤瓶中不断洗涤，通常1mL凝胶需用100mL1mM HCl进行洗涤，将凝胶干粉中的保护剂洗涤干净；

[0177] 用抽滤瓶滤干凝胶上残留液体，将溶胀好的凝胶加至透析好的14-3-3 eta抗原溶液中，并缓慢搅拌，2-8度反应过夜，使抗原通过共价键结合至凝胶上；

[0178] 滤掉反应后的溶液上清，向偶联好的凝胶加入10倍体积的0.1M Tris.HCl，PH8.0，用Tris的游离氨基分别凝胶上未反应的活性基团；

[0179] 凝胶装柱，用0.1M Tris.HCl，0.5M NaCl，pH8.5和0.1M HAc，0.5M NaCl，PH4.0两种缓冲液轮流冲洗10倍柱体积，重复冲洗5遍，以去除非共价结合的抗原，至此亲和柱制备完成。

[0180] 2、多抗亲和层析纯化

[0181] 用3倍体积生理盐水稀释14-3-3eta抗血清，并在搅拌的情况下逐渐加入稀释后抗血清等体积的饱和硫酸铵溶液，使之产生沉淀；

[0182] 12000rpm离心以上混合液10min，弃上清，沉淀用原始抗血清3-5倍体积的PBS溶

解,并用0.22μm过滤器过滤;

[0183] 用PBS平衡14-3-3 eta抗原亲和柱,将以上滤液上样至亲和柱,上样完毕后用PBS进行洗涤,直至没有蛋白被洗涤出来;

[0184] 用0.1M甘氨酸,pH3.0缓冲液对以上柱进行洗脱,收集洗脱液并及时用3M Tris.HCl,PH8.5进行中和;

[0185] 洗脱液用20倍体积的PBS进行透析,每4小时以上换透析液一次,共换2次透析液,得到亲和纯化的14-3-3 eta多抗。

[0186] 在本发明的一些优选的实施例中,所述试剂盒还包括作为校准品的14-3-3 eta蛋白纯品,所述校准品被校准品稀释液按照比例梯度稀释成不同浓度的工作校准品溶液。

[0187] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述第一抗体和第二抗体中的一个通过特异性结合配对成员与第一标记物间接结合,另一个则通过特异性结合配对成员与固相载体间接结合,而所述第三抗体则通过特异性结合配对成员与第二标记物间接结合。

[0188] 应该理解的是,本发明中所述的特异性结合配对成员起到桥联的作用,因此也被称为桥连体系。例如,本发明中,所述第一抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述固相载体与特异性结合配对成员中的另一员结合;在一些优选的实施例中,所述第一抗体或其结合片段与生物素结合,而所述固相载体与链霉亲和素结合。

[0189] 再例如,本发明中,所述第二抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述第一标记物与特异性结合配对成员中的另一员结合。在一些实施例中,例如,所述第二抗体或其结合片段与生物素结合,而所述第一标记物与链霉亲和素结合。

[0190] 还例如,在本发明的一些优选的实施例中,所述第三抗体或其结合片段与特异性结合配对成员中的一员结合,而所述第二标记物与特异性结合配对成员中的另一员结合;优选所述第三抗体或其结合片段与生物素结合,而所述第二标记物与链霉亲和素结合。

[0191] 在本发明的一些实施例中,所述组分a中固相载体以及与之结合的第一抗体或其结合片段的浓度为1-100mg/mL,优选10-50mg/mL;进一步优选为10mg/mL。

[0192] 在本发明的一些实施例中,所述组分b中第一标记物以及与之结合的第二抗体或其结合片段的浓度为1-100mg/mL,优选10-50mg/mL。

[0193] 在本发明的一些实施例中,所述组分d中第二标记物以及与之结合的第三抗体或其结合片段的浓度为1-100mg/mL,优选10-50mg/mL。

[0194] 本发明中,所述第一标记物和第二发光标记物为化学发光标记物,分别独立地选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吖啶酯及其衍生物、金刚烷、稀土元素和联吡啶钌配合物。

[0195] 本发明中,所述标记物和第二发光标记物为化学发光催化剂,分别独立地选自辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

[0196] 本发明中,所述固相载体选自微孔板、磁珠、塑胶微粒和塑料微球,优选所述固相载体为磁珠。

[0197] 在本发明的一些优选的实施例中,所述试剂套装还包括组分c,底物溶液。

[0198] 本发明中,所述底物溶液包括A溶液和B溶液,在一些实施例中,例如,所述A溶液为过氧化氢溶液,所述B溶液为氢氧化钠溶液。

[0199] 在本发明的一些实施方式中,本发明所述用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学

发光免疫检测试剂套装的制备方法主要包括，制备试剂Ⅰ(组分a)的步骤、制备试剂Ⅱ(组分b)的步骤和制备试剂Ⅲ(组分d)的步骤，其中，组分a包含固相载体以及与之结合的第一抗体或其结合片段，所述第一抗体或其结合片段能够与14-3-3 eta蛋白的第一表位特异性结合；组分b包含能够与底物反应生成可检测信号或者催化底物反应生成可检测信号的第一标记物以及与之结合的第二抗体或其结合片段，所述第二抗体或其结合片段能够与14-3-3 eta蛋白的第二表位特异性结合，且所述第二表位和所述第一表位不相重叠；组分d，其包含能够与底物反应或能够催化底物生成可检测信号的第二标记物以及与之直接结合或间接结合的第三抗体或其结合片段，所述第三抗体或其结合片段能够与14-3-3 eta蛋白的第二表位特异性结合，且所述第二表位和所述第一表位不相重叠。

[0200] 本发明第二方面所涉及的用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒，其包含本发明第一方面所述的用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂套装。其可以通过将所述用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂套装装入试剂盒中制得。

[0201] 在本发明的一些实施方式中，所述试剂盒包括以下组分：

[0202] 组分a：其包含直接连接或间接连接有第一抗体的磁性微球；

[0203] 组分b：其包含直接连接或间接连接有第一标记物或第二标记物的第二抗体。

[0204] 在本发明的一些实施方式中，所述试剂盒还包括组分d：其包含直接连接或间接连接有第一标记物或第二标记物的第三抗体。

[0205] 在本发明的一些实施例中，所述第一标记物和第二标记物相同。

[0206] 在本发明的另一些实施例中，所述第三抗体与第二抗体相同。

[0207] 在本发明的一些实施方式中，所述试剂盒还包括组分c：其包含含有过氧化氢溶液和氢氧化钠溶液的底物溶液。

[0208] 在本发明第三方面，本发明所涉及的检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测方法，包括使用如本发明第一方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装来判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量。

[0209] 类似地，本发明所涉及的检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测方法，还包括使用如本发明第三方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒来判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量。

[0210] 在本发明的一些实施方式中，所述检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测方法包括：

[0211] 步骤T1，将待测样品与组分a和组合b混合，得到第三混合物；

[0212] 步骤T2，将第三混合物与组分d混合，得到第五混合物；

[0213] 步骤T3，将第五混合物与组分c混合，得到产生了可检测信号的第六混合物；

[0214] 步骤T4，检测步骤T3中所述化学发光信号的存在和/或强度，从而判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量。

[0215] 在本发明的一些实施例中，所述方法还包括在步骤R1之前的制作14-3-3 eta蛋白标准工作曲线的步骤。在本发明的一些具体实施例中，所述制作14-3-3 eta蛋白标准工作曲线的步骤包括：首先根据步骤T1-T4，检测出含有不同浓度的14-3-3 eta蛋白的工作校准品溶液的化学发光信号值，然后根据浓度与信号值的对应关系，拟合出14-3-3 eta蛋白标

准工作曲线，得到14-3-3 eta蛋白的浓度与化学发光信号值之间的函数关系。

[0216] 在本发明的一些进一步的实施例中，在步骤T4中，检测步骤T3中所述化学发光信号的强度，并基于14-3-3 eta蛋白标准工作曲线来确定待测样品中14-3-3eta蛋白的含量。

[0217] 本发明中，待检样品在非均相条件下反应，过程需分离和洗涤，亦即步骤T1和T2之间、步骤T2和T3之间以及步骤T3和T4之间还有分离和洗涤的步骤。

[0218] 在本发明的一些实施例中，在步骤T3中，第六混合物产生470nm波长的发射光。

[0219] 在本发明的一些具体实施例中，判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白，所述检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测方法包括：

[0220] (1)将待测样品与组分a和组合b混合，得到第三混合物；

[0221] (2)将第三混合物与组分d混合，得到第五混合物；

[0222] (3)将第五混合物与组分c混合，得到产生了可检测信号的第六混合物；

[0223] (4)检测步骤(3)中的化学发光信号是否存在。

[0224] 在本发明的另一些具体实施例中，确定14-3-3 eta蛋白的含量，所述检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测方法包括：

[0225] 步骤一、制作14-3-3 eta蛋白标准工作曲线。

[0226] (1)将作为校准品的14-3-3 eta蛋白纯品用校准品稀释液按照比例梯度稀释成不同浓度的工作校准品溶液；

[0227] (2)取工作校准品溶液与组分a和组合b混合，得到第三混合物；

[0228] (3)将第三混合物与组分d混合，得到第五混合物；

[0229] (4)将第五混合物与组分c混合，得到产生了可检测信号的第六混合物；

[0230] (5)检测步骤(4)中产生的化学发光信号的强度；

[0231] (6)重复步骤(2)-(5)检测出含有不同浓度的14-3-3 eta蛋白的工作校准品溶液的化学发光信号值(强度)，然后根据浓度与信号值的对应关系，拟合出14-3-3 eta蛋白标准工作曲线，得到14-3-3 eta蛋白的浓度与化学发光信号值之间的函数关系。

[0232] 步骤二、检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的含量。

[0233] (1)将待测样品与组分a和组合b混合，得到第三混合物；

[0234] (2)将第三混合物与组分d混合，得到第五混合物；

[0235] (3)将第五混合物与组分c混合，得到产生了可检测信号的第六混合物；

[0236] (4)检测步骤(3)中产生的化学发光信号的强度，并基于14-3-3 eta蛋白标准工作曲线来确定待测样品中14-3-3 eta蛋白的含量。

[0237] 第四方面，本发明所提供的检测14-3-3 eta蛋白的方法，采用前述试剂盒进行检测，具体包括：

[0238] 1)第一次加样：将待测样本与组分a混合，温育，形成复合物；

[0239] 2)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

[0240] 3)第二次加样：将组分b加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第一双抗夹心复合物；

[0241] 4)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

[0242] 5)第三次加样：将组分d加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第二双抗夹心复合物；

[0243] 6)检测:外加磁场将上述双抗夹心复合物沉淀,去除上清液,清洗后,加入发光底物,检测发出的相对光强度,计算得到14-3-3 eta蛋白的含量。

[0244] 在本发明第五方面,本发明所提供的如本发明第一方面所提供的非均相化学发光免疫检测试剂套装在检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的存在和/或含量中的应用,可以理解为利用本发明第一方面所提供的非均相化学发光免疫检测试剂套装来判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量的方法,其中,所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织,优选所述待测样品选自血液、血浆、血清、滑膜液和组织,进一步优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,更进一步优选所述待测样品为血清。

[0245] 同样地,本发明所提供的如本发明第二方面所提供的非均相化学发光免疫检测试剂盒在检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的存在和/或含量中的应用,可以理解为利用本发明第二方面所提供的非均相化学发光免疫检测试剂盒来判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量的方法,其中,所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织,优选所述待测样品选自血液、血浆、血清、滑膜液和组织,进一步优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,更进一步优选所述待测样品为血清。

[0246] 类似地,本发明所提供的如本发明第三方面所提供的非均相化学发光免疫检测方法在检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的存在和/或含量中的应用,可以理解为利用本发明第一方面所提供的非均相化学发光免疫检测试剂套装,并采用如本发明第三方面所述的非均相化学发光免疫检测方法来判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量的方法,其中,所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织,优选所述待测样品选自血液、血浆、血清、滑膜液和组织,进一步优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,更进一步优选所述待测样品为血清。

[0247] 类似地,本发明所提供的如本发明第三方面所提供的非均相化学发光免疫检测方法在检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的存在和/或含量中的应用,可以理解为利用本发明第二方面所提供的非均相化学发光免疫检测试剂盒,并采用如本发明第三方面所述的非均相化学发光免疫检测方法来判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量的方法,其中,所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织,优选所述待测样品选自血液、血浆、血清、滑膜液和组织,进一步优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,更进一步优选所述待测样品为血清。

[0248] 本发明第六方面所涉及的如本发明第一方面所述的试剂套装在制备用于检测类风湿性关节炎的试剂盒中的应用,可以理解为利用如本发明第一方面所述的试剂套装来制备用于检测类风湿性关节炎的试剂盒中的方法,其包括:

[0249] 步骤M1,提供来自待测主体的待测样品;

[0250] 步骤M2,采用本发明第二方面所述的非均相化学发光免疫检测方法来判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量;

[0251] 步骤M3,将其与正常对照样品、类风湿性关节炎对照样品、或来自同一待测主体的

治疗前的样品中所述14-3-3 eta蛋白的含量比较；

[0252] 其中，所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织，优选所述待测样品选自血液、血浆、血清、滑膜液和组织，进一步优选所述待测样品选自血液、血浆和血清，更进一步优选所述待测样品为血清。

[0253] 本发明中，与正常对照样样品相比，所述待测样品中14-3-3 eta蛋白的存在是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

[0254] 本发明中，与正常对照样样品相比，所述待测样品中14-3-3 eta蛋白的含量的增加是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

[0255] 在一些优选的实施例中，与正常对照样样品相比，所述待测样品中14-3-3 eta蛋白的含量增加0.2ng/ml是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

[0256] 本发明中，与类风湿性关节炎对照样品相比，所述待测样品中14-3-3 eta蛋白的相对含量是所述待测主体中类风湿性关节炎的预后性指示物。

[0257] 本发明中，与来自同一待测主体的治疗前的样品相比，所述待测样品中14-3-3 eta蛋白的相对含量指示治疗方案的效力。

[0258] 第七方面，本发明涉及的如本发明第一方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或如本发明第二方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒或如第第三或第四方面所述的非均相化学发光免疫检测方法在化学发光分析仪中的应用。

[0259] 本发明第八方面提供了上述应用中所述化学发光免疫分析仪，其包括：

[0260] 样本加注模块，其用于向化学发光分析仪的预设位置加注怀疑患有类风湿性关节炎的受治疗者的待测样品；

[0261] 试剂加注模块，其用于向化学发光分析仪的预设位置加注各种试剂的移液；

[0262] 孵育模块，其用于为待测样品及试剂发生免疫反应提供合适的温育反应环境；

[0263] 磁分离模块，其用于清洗反应混合液中的磁微粒，并将温育反应后的反应液排出，留下清洗后的磁微粒；

[0264] 检测模块，其用于检测化学发光信号，判断待测样本中14-3-3eta蛋白的浓度；

[0265] 电气控制模块，用于协调控制所述孵育模块、样本加注模块、试剂加注模块，所述磁分离模块和所述检测模块按照设定的程序动作。

[0266] 本发明第九方面提供了一种控制如本发明第八方面所述的化学发光免疫分析仪的方法，其包括如下步骤：

[0267] 步骤T1，将待测样品与组分a和组合b混合，得到第三混合物；

[0268] 步骤T2，将第三混合物与组分d混合，得到第五混合物；

[0269] 步骤T3，将第五混合物与组分c混合，得到产生了可检测信号的第六混合物；

[0270] 步骤T4，检测步骤T3中所述化学发光信号的存在和/或强度，从而判断测待测样品中是否存在14-3-3 eta蛋白和/或确定14-3-3 eta蛋白的含量。

[0271] 在本发明的一些实施例中，所述方法还包括在步骤T1之前的制作14-3-3 eta蛋白标准工作曲线的步骤。

[0272] 在本发明的一些进一步的实施例中，在步骤T4中，检测步骤T3中所述化学发光信号的强度，并基于14-3-3 eta蛋白标准工作曲线来确定待测样品中14-3-3eta蛋白的含量。

[0273] 本发明第十方面提供了一种检测14-3-3 eta蛋白的方法，该方法采用权本发明第

二方面所述的试剂盒和如本发明第八方面所述的化学发光免疫分析仪，包括以下步骤：

[0274] 1)第一次加样：将待测样本与组分a混合，温育，形成复合物；

[0275] 2)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

[0276] 3)第二次加样：将组分b加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第一双抗夹心复合物；

[0277] 4)清洗：外加磁场将上述反应产物沉淀，去除上清液，并以缓冲液清洗；

[0278] 5)第三次加样：将组分d加入上述沉淀中，混合均匀，温育，形成第二双抗夹心复合物；

[0279] 6)检测：外加磁场将上述双抗夹心复合物沉淀，去除上清液，清洗后，加入发光底物，检测发出的相对光强度，计算得到14-3-3 eta蛋白的含量。

[0280] 本发明第十一方面提供了一种如本发明第一方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂套装或如本发明第二方面所述的非均相化学发光免疫检测试剂盒或如本发明第三或第四方面所述的方法或本发明第八方面所述的化学发光免疫分析仪或第九或第十方面所述的方法在检测待测样品中14-3-3 eta蛋白的存在和/或含量中的应用，其中，所述待测样品选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、精液、唾液、滑膜液、肺气肿积液和组织。

[0281] Ⅲ.实施例

[0282] 为使本发明更加容易理解，下面将结合实施例来进一步详细说明本发明，这些实施例仅起说明性作用，并不局限于本发明的应用范围。本发明中所使用的原料或组分若无特殊说明均可以通过商业途径或常规方法制得。

[0283] 本发明所述方法中，所有试剂在组合或混合后，均可以根据实际需要进行混匀和/或温育。具体地，所述温育的温度可以是25-45℃温度范围内的任意温度，温育时间可以是过夜或者10-20min均可。

[0284] 实施例1：

[0285] 1、试剂I(含抗14-3-3 eta蛋白抗体包被的磁性微球)的制备：

[0286] 本实施例中采用10μm的羧基磁微球一步法包被工艺，其中磁性微粒是以三氧化二铁为核心，外包一薄层聚苯乙烯组成。具体制备过程如下：

[0287] (1)清洗

[0288] 取10mg磁性微球加入离心管，加入包被缓冲液0.1M pH5.0MES，混匀后放置于磁分离器静置15秒，弃上清液，再次向离心管中加入包被缓冲液，清洗磁性微球两次。

[0289] (2)活化

[0290] 加入2000μL包被缓冲液将微粒重悬，使微粒浓度为5mg/ml，取50μL的10mg/ml EDC((1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)是个可溶于水的碳二亚胺，在酰胺合成中用作羧基的活化试剂，也用于活化磷酸酯基团、蛋白质与核酸的交联和免疫偶连物的制取。)溶液，立即加入离心管内并混匀，室温，垂直旋转混合器上25-40rpm反应15min，充分活化磁性微球表面羧基基团。

[0291] (3)包被

[0292] 加入0.1mg待包被蛋白原料，混匀后将离心管置于37℃，垂直旋转混合器上3小时，使蛋白的氨基充分与活化后的羧基基团偶联。

[0293] (4)清洗及保存

[0294] 将离心管放置于磁分离器静置15秒,弃上清液,向离心管中加入清洗缓冲液0.1M PH 7.4PBST,混匀后放置于磁分离器静置15秒,弃上清液,重复两次,以充分洗涤,去除未偶联的蛋白。

[0295] 加入1000μL磁性微球保存缓冲液0.1M pH 7.4PBS,使其保存浓度10mg/ml,记录批号。

[0296] 2、试剂Ⅱ和试剂Ⅲ(含抗14-3-3 eta蛋白抗体标记的吖啶酯)的制备:

[0297] 本实施例中采用SAE标记的工艺,具体如下所示:

[0298] (1)SAE配制

[0299] 称量10mg SAE,用有机溶剂二甲基甲酰胺(DMF)溶解成5mM溶液,-20℃低温、避光保存备用。

[0300] (2)标记

[0301] 在离心管中加入500μL标记缓冲液0.1M pH 8.0PBS标记缓冲液,再加入0.1mg待标记蛋白原料,加入10μL SAE溶液后立即混匀,放置于垂直旋转混合器上25-40rpm室温反应30min。

[0302] (3)封闭

[0303] 在离心管中加入50μL的10%赖氨酸溶液,以封闭未反应的活性基团。

[0304] (4)透析纯化

[0305] 选择14KD的透析袋,对0.1M pH6.3PBS透析缓冲液透析,每隔4小时换液一次,共五次,收集透析袋内的标记物,加入甘油保护剂,-20℃低温、避光保存备用。

[0306] 3、14-3-3 eta蛋白校准品的制备:

[0307] 1.1校准品稀释液的配制:称取HEPES 4.77g、NaCl 1.7g,添加纯化水160g混匀30min,使用1M的浓盐酸和1M的NaOH溶液调pH值至7.4±0.2,继续添加Proclin300 0.1g、BSA 30g、1M MgCl2 0.5ml、0.1M MgCl2 0.1ml,搅拌30min后添加纯化水定重至200g,复测pH值后,2-8℃备用。

[0308] 1.2校准品的配制:用校准品稀释液按照比例梯度稀释成工作校准品,再由由工作校准品标定出产品校准品抗体浓度,完成校准品的制备。

[0309] 4、实验操作:

[0310] 将上述组份组装成14-3-3 eta蛋白测定盒后,装载在全自动非均相化学发光免疫分析仪上,设置检测步骤:

[0311] 反应步骤:(全自动分析仪)

[0312] 1)样本50μL+50μL试剂I,加入反应杯,37度反应15min,磁分离,洗涤五次;

[0313] 2)加入100μL试剂II,37℃反应10min,磁分离,洗涤五次;

[0314] 3)加入100μL试剂III,37℃反应10min,磁分离,洗涤五次;

[0315] 4)加入200μL底物液,立即测信号值。

[0316] 5)底物液为氢氧化钠和过氧化氢及表面活性剂的混合物。

[0317] 6)根据校准品的信号值,按照四参数拟合方法拟合出标准曲线,得出信号值与14-3-3 eta蛋白浓度之间的方程式;

[0318] 7)同样再按照步骤1)-5)检测待测样品,由6)中的方程式计算得出待测样品中14-

3-3 eta蛋白浓度。

[0319] 5、实验结果

[0320] 5.1检验工作校准品的线性范围

[0321] 检验工作校准品的线性范围，结果见表1。

[0322] 表1

[0323]

| 浓度 ng/mL | 信号值 |
|---|---|
| 0ng/ml | 1245 |
| 0.2ng/ml | 7242 |
| 1ng/ml | 38752 |
| 5ng/ml | 174522 |
| 10ng/ml | 320487 |
| 20ng/mL | 678510 |

[0324] 从表1的数据可以得出，标准曲线度拟合方程R2＞0.99。在0.2-20ng/mL的测量范围内具有非常好的线性。

[0325] 5.2评价结果

[0326] 评价96例类风湿病例组样本和102例正常对照组样品，结果见表2。

[0327] 表2

[0328]

| 正常对照样本组 | | 类风湿关节炎病例样本组 | |
|---|---|---|---|
| 样本编号 | 测值浓度（ng/mL） | 样本编号 | 测值浓度（ng/mL） |

[0329]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 0.02 | 1 | 0.04 |
| 2 | 0.00 | 2 | 17.59 |
| 3 | 0.02 | 3 | 2.8 |
| 4 | 20.00 | 4 | 0.01 |
| 5 | 0.03 | 5 | 0.01 |
| 6 | 0.05 | 6 | 0.03 |
| 7 | 0.06 | 7 | 0.1 |
| 8 | 0.11 | 8 | 0.07 |
| 9 | 0.01 | 9 | 0.04 |
| 10 | 0.00 | 10 | 0.05 |
| 11 | 0.36 | 11 | 0.61 |
| 12 | 0.07 | 12 | 0.04 |
| 13 | 0.03 | 13 | 0.04 |
| 14 | 0.00 | 14 | 1.69 |
| 15 | 0.01 | 15 | 0.04 |
| 16 | 0.03 | 16 | 0.07 |
| 17 | 0.01 | 17 | 0.23 |
| 18 | 0.16 | 18 | 2.67 |
| 19 | 0.05 | 19 | 3.2 |
| 20 | 0.01 | 20 | 0.05 |
| 21 | 0.00 | 21 | 0.15 |
| 22 | 0.02 | 22 | 0.03 |
| 23 | 0.00 | 23 | 20 |
| 24 | 0.06 | 24 | 0.14 |
| 25 | 0.00 | 25 | 5.14 |
| 26 | 0.14 | 26 | 17.31 |
| 27 | 0.02 | 27 | 0.01 |
| 28 | 0.00 | 28 | 0.05 |
| 29 | 0.00 | 29 | 0.04 |
| 30 | 0.03 | 30 | 0.05 |
| 31 | 0.04 | 31 | 0.04 |
| 32 | 0.01 | 32 | 1.56 |
| 33 | 0.07 | 33 | 0.98 |

[0330]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 34 | 0.00 | 34 | 20 |
| 35 | 0.00 | 35 | 0.04 |
| 36 | 0.05 | 36 | 0.05 |
| 37 | 0.03 | 37 | 0.35 |
| 38 | 0.11 | 38 | 0.77 |
| 39 | 0.01 | 39 | 0.04 |
| 40 | 0.00 | 40 | 4.8 |
| 41 | 0.03 | 41 | 0.02 |
| 42 | 0.00 | 42 | 0.07 |
| 43 | 0.07 | 43 | 0.03 |
| 44 | 0.00 | 44 | 0.05 |
| 45 | 0.04 | 45 | 3.29 |
| 46 | 0.15 | 46 | 0.07 |
| 47 | 0.00 | 47 | 0.01 |
| 48 | 0.11 | 48 | 12.9 |
| 49 | 0.00 | 49 | 0.04 |
| 50 | 0.02 | 50 | 0.83 |
| 51 | 0.00 | 51 | 13.93 |
| 52 | 0.01 | 52 | 0.02 |
| 53 | 0.07 | 53 | 0.04 |
| 54 | 0.00 | 54 | 0.29 |
| 55 | 0.03 | 55 | 0.16 |
| 56 | 0.46 | 56 | 0.42 |
| 57 | 0.01 | 57 | 0.38 |
| 58 | 0.20 | 58 | 11.77 |
| 59 | 0.01 | 59 | 0.12 |
| 60 | 0.00 | 60 | 0.95 |
| 61 | 0.03 | 61 | 0.01 |
| 62 | 0.00 | 62 | 0.53 |
| 63 | 0.04 | 63 | 0.06 |
| 64 | 0.06 | 64 | 0.12 |
| 65 | 0.15 | 65 | 0.02 |
| 66 | 0.00 | 66 | 0.06 |

[0331]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 67 | 0.06 | 67 | 0.07 |
| 68 | 0.13 | 68 | 0.05 |
| 69 | 0.01 | 69 | 0.06 |
| 70 | 0.02 | 70 | 1.96 |
| 71 | 0.01 | 71 | 0.04 |
| 72 | 0.01 | 72 | 0.06 |
| 73 | 0.03 | 73 | 0.02 |
| 74 | 0.04 | 74 | 0.08 |
| 75 | 2.81 | 75 | 0.05 |
| 76 | 0.06 | 76 | 0.15 |
| 77 | 0.02 | 77 | 0.17 |
| 78 | 0.00 | 78 | 5.63 |
| 79 | 0.00 | 79 | 0.05 |
| 80 | 0.00 | 80 | 7.15 |
| 81 | 0.05 | 81 | 0.03 |
| 82 | 0.09 | 82 | 0.02 |
| 83 | 0.04 | 83 | 0.2 |
| 84 | 0.04 | 84 | 0.01 |
| 85 | 0.05 | 85 | 0.41 |
| 86 | 0.01 | 86 | 1.23 |
| 87 | 0.01 | 87 | 0.04 |
| 88 | 0.00 | 88 | 20 |
| 89 | 0.00 | 89 | 2.2 |
| 90 | 0.02 | 90 | 0.8 |
| 91 | 0.00 | 91 | 0.1 |
| 92 | 0.09 | 92 | 0.1 |
| 93 | 0.00 | 93 | 0.14 |
| 94 | 0.00 | 94 | 0.05 |
| 95 | 0.00 | 95 | 0.03 |
| 96 | 0.08 | 96 | 0.04 |
| 97 | 0.04 | | |
| 98 | 0.11 | | |
| 99 | 0.14 | | |

[0332]

| | | | |
|---|---|---|---|
| 100 | 0.00 | | |
| 101 | 0.01 | | |
| 102 | 0.03 | | |

[0333] 结论:从表2的数据可以得出,两组样本的14-3-3eta浓度明显差异,正常对照组特异性为95%,类风湿关节炎病例组敏感度为36%,表明14-3-3η亚型蛋白在关节炎患者中高水平表达,在RA患者血清被检测出显著增高。

[0334] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

序列表

<110> 北京科美生物技术有限公司

<120> 检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒及其应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 246

<212> PRT

<213> (14-3-3eta蛋白)

<400> 1

Met Thr Met Asp Lys Ser Glu Leu Val Gln Lys Ala Lys Leu Ala Glu
1 5 10 15
Gln Ala Glu Arg Tyr Asp Asp Met Ala Ala Ala Met Lys Ala Val Thr
20 25 30
Glu Gln Gly His Glu Leu Ser Asn Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val
35 40 45
Ala Tyr Lys Asn Val Val Gly Ala Arg Arg Ser Ser Trp Arg Val Ile
50 55 60
Ser Ser Ile Glu Gln Lys Thr Glu Arg Asn Glu Lys Lys Gln Gln Met
65 70 75 80
Gly Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Ile Glu Ala Glu Leu Gln Asp Ile Cys
85 90 95
Asn Asp Val Leu Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Leu Ile Pro Asn Ala Thr
100 105 110
Gln Pro Glu Ser Lys Val Phe Tyr Leu Lys Met Lys Gly Asp Tyr Phe
115 120 125
Arg Tyr Leu Ser Glu Val Ala Ser Gly Asp Asn Lys Gln Thr Thr Val
130 135 140
Ser Asn Ser Gln Gln Ala Tyr Gln Glu Ala Phe Glu Ile Ser Lys Lys
145 150 155 160
Glu Met Gln Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn Phe
165 170 175
Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Glu Lys Ala Cys Ser
180 185 190
Leu Ala Lys Thr Ala Phe Asp Glu Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr Leu
195 200 205
Asn Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu Arg
210 215 220

Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Glu Asn Gln Gly Asp Glu Gly Asp
225 230 235 240
Ala Gly Glu Gly Glu Asn
245

| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒及其应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN110579597A | 公开(公告)日 | 2019-12-17 |
| 申请号 | CN201810812808.8 | 申请日 | 2018-07-23 |
| [标]发明人 | 饶星<br>廖智星<br>刘宇卉<br>李临<br>其他发明人请求不公开姓名 | | |
| 发明人 | 饶星<br>廖智星<br>刘宇卉<br>李临<br>其他发明人请求不公开姓名 | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 G01N33/532 G01N33/558 | | |
| CPC分类号 | G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/558 | | |
| 代理人(译) | 陈伟 | | |
| 优先权 | 201810503732.0 2018-05-23 CN | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |


摘要(译)

本发明涉及一种用于检测14-3-3 eta蛋白的非均相化学发光免疫检测试剂盒。该试剂盒采用能够与14-3-3 eta蛋白特异性结合的第一抗体、第二抗体，以及与第二抗体为结合14-3-3 eta蛋白的相同表位的同株抗体的第三抗体制成；其以双抗体夹心的方式，利用化学发光免疫分析平台的灵敏度高、线性范围宽、精密度好等优势，为临床诊断类风湿提高确诊率，为预防类风湿和提早发现类风湿提供辅助检测。


| 浓度 ng/mL | 信号值 |
|---|---|
| 0ng/ml | 1245 |
| 0.2ng/ml | 7242 |
| 1ng/ml | 38752 |
| 5ng/ml | 174522 |
| 10ng/ml | 320487 |
| 20ng/mL | 678510 |