



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110161249 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201810143200.0

(22)申请日 2018.02.11

(71)申请人 北京科美生物技术有限公司  
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B座二  
层

(72)发明人 廖智星 饶星 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 方莉

(51)Int.Cl.  
G01N 33/68(2006.01)  
G01N 33/536(2006.01)  
G01N 21/76(2006.01)

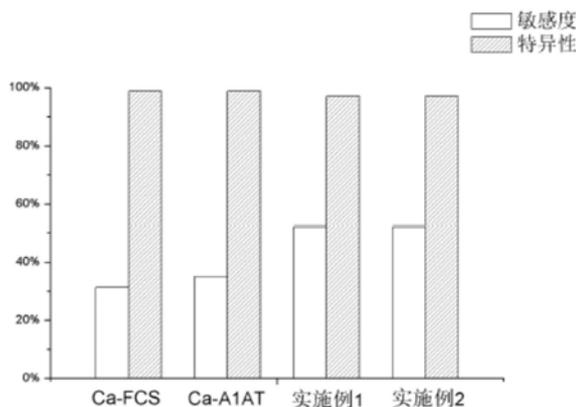
权利要求书3页 说明书20页  
序列表3页 附图3页

## (54)发明名称

检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒及其应用

## (57)摘要

本发明涉及一种检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒及其制备方法和使用方法。本发明提供了一种抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒,该试剂盒所采用的检测技术为光激化学发光免疫分析法,为一种均相反应体系,相较于现有的非均相反应体系检测方法,存在着无需清洗、包被/标记工艺对抗原抗体的活性无影响、特异性高、灵敏度好、线性范围宽、背景干扰小、反应速度快、操作简便、技术要求不高等优点,并可实现全自动化高通量测试。



1. 检测抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与至少一种抗原形成的免疫复合物的存在的试剂在制备用于采用均相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抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与至少一种抗原形成的免疫复合物;

其中,所述抗-Carp抗体或免疫复合物的存在指示受治疗者的类风湿性关节炎,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、唾液、滑液和肺气肿积液。

2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述步骤还包括检测抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原形成的免疫复合物的含量。

3. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于,基于抗-Carp抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-Carp抗体的含量。

4. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于,所述步骤还包括将所测得的抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与至少一种抗原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抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与至少一种抗原形成的免疫复合物的含量进行比较。

5. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述步骤包括将所述样品与包含能够与抗-Carp抗体特异性结合形成免疫复合物的至少一种抗原结合。

6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的用途,其特征在于,所述抗原包括能够与抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点特异性结合的第一抗原以及能够与抗-Carp抗体的抗原表位第二结合位点特异性结合的第二抗原,其中抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点和抗原表位第二结合位点不相重叠。

7. 根据权利要求6所述的用途,其特征在于,所述第一抗原与受体结合,所述受体能够与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号。

8. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

9. 根据权利要求6所述的用途,其特征在于,所述第一抗原和第二抗原为氨甲酰化抗原;优选所述氨甲酰化抗原为氨甲酰化人血清白蛋白,进一步优选所述人血清白蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

10. 一种用于检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂套装,其包括:

组分a,其包含能够与单线态氧反应生成可检测信号的受体以及与之结合的第一抗原,所述第一抗原的抗原表位能够与抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点特异性结合;

组分b,其包含能够与抗-Carp抗体的抗原表位第二结合位点特异性结合的第二抗原,抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点和抗原表位第二结合位点不相重叠;

组分c,其包括能够在激发状态产生单线态氧的供体。

11. 根据权利要求10所述的试剂套装,其特征在于,所述第一抗原和第二抗原为氨甲酰化抗原;优选所述氨甲酰化抗原为氨甲酰化人血清白蛋白;进一步优选所述人血清白蛋白如SEQ ID No.1所示。

12. 根据权利要求10或11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抗-Carp抗体纯品,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。

13. 根据权利要求10-12中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述第二抗原与特异性结合配对物中的一员结合,而所述供体与特异性结合配对物中的另一员结合。

14. 根据权利要求13所述的试剂套装,其特征在于,所述第二抗原与生物素结合,而所述供体与链霉亲和素结合。

15. 根据权利要求10-14中任意一项所述的试剂套装,其特征在于:所述受体及与之结合的第一抗原的总浓度为10-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,优选20-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,更优选25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;和/或,所述第二抗原及与之结合的特异性结合配对物中的一员的总浓度为0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,优选0.5-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,更优选1-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

16. 根据权利要求10-15中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

17. 根据权利要求10-16中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述供体为光活化的或化学活化的敏化剂,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒,在光激发下能够产生单线态氧。

18. 一种用于检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒,其包含权利要求10-17中任意一项所述的均相免疫检测试剂套装。

19. 一种检测待测样品中抗-Carp抗体的均相免疫检测方法,其包括使用如权利要求10-17中任意一项所述的均相免疫检测试剂套装或使用如权利要求18所述的均相免疫检测试剂盒来判断待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量。

20. 根据权利要求19所述的方法,其特征在于,该方法包括:

步骤R1,将待测样品与组分a和组合b混合,得到第三混合物;

步骤R2,将第三混合物与组分c混合,得到第四混合物;

步骤R3,使能量或者活性化合物与所述第四混合物接触,激发所述供体产生单线态氧,所述受体能够与接收到的单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;

步骤R4,检测步骤R3中所述化学发光信号的存在和/或强度,从而判断待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量。

21. 根据权利要求20所述的方法,其特征在于,所述方法还包括在步骤R1之前的制作抗-Carp抗体标准工作曲线的步骤。

22. 根据权利要求21所述的方法,其特征在于,在步骤R4中,检测步骤R3中所述化学发光信号的强度,并基于抗-Carp抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-Carp抗体的含量。

23. 根据权利要求20-22中任意一项所述的方法,其特征在于,步骤R1和R2之间以及步骤R2和R3之间没有分离和/或洗涤的步骤。

24. 根据权利要求20所述的方法,其特征在于,在步骤R3中,使用600-700nm波长的激发光照射第四混合物,激发供体产生单线态氧,受体与接触到的单线态氧反应生成520-620nm的发射光。

25. 一种如权利要求10-17中任意一项所述的均相免疫检测试剂套装或如权利要求18

所述的均相免疫检测试剂盒或如权利要求19-24中任意一项所述的方法在检测待测样品中抗-Carp抗体的存在和/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、唾液、滑液和肺气肿积液。

26. 一种如权利要求10-17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抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量;

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抗-Carp抗体的含量比较;

其中,所述待测样品选自所述待测样本选自血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、唾液、滑液和肺气肿积液。

27. 根据权利要求26所述的应用,其特征在于,与正常对照样样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体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。

28. 根据权利要求26所述的应用,其特征在于,与正常对照样样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体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。

29. 根据权利要求28所述的应用,其特征在于,与正常对照样样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体的含量不低于123.5U/ml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26所述的应用,其特征在于,与类风湿性关节炎对照样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体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。

31. 根据权利要求26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,所述待测样品中抗-Carp抗体的相对含量指示治疗方案的效力。

32. 根据权利要求26-31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18-24中任意一项所述的方法来判断测待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量。

## 检测抗-Carp抗体的均相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,具体涉及一种检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒及其制备方法和使用方法。

### 背景技术

[0002] 抗氨甲酰化蛋白抗体(anti-Carbamylated protein antibody,anti-Carp Ab)是最近几年发现的与类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis,RA)疾病诊断和病程监控的密切相关的一个新的生物标志物。氨甲酰化是一种非酶介导的蛋白质翻译后修饰方式,其具体过程是蛋白质的赖氨酸残基在尿素的衍生物一氰酸酯或氰酸盐的作用下转变成高瓜氨酸残基。该过程能打破人体免疫耐受并诱导自身免疫抗体抗-Carp抗体(anti-Carp Ab)的产生。

[0003] 专利W02012/105838A1及W02016/014612A2中公开的anti-Carp Ab的检测方法分别为以氨甲酰化胎牛血清(Car-FCS)和氨甲酰化人类 $\alpha$ 1抗胰蛋白酶(Car-hA1AT)作为抗原,采用免疫印迹法(Immunoblotting)及酶联免疫吸附法(ELISA)进行测定。

[0004] 专利W02012/105838A1中的检测方法存在的缺陷是:1、人体内的anti-Carp Ab是针对自身体内氨甲酰化蛋白所产生的抗体,而氨甲酰化胎牛血清(Car-FCS)作为动物源性的抗原,与人体自身氨甲酰化蛋白所具有的抗原表位并不完全相同;2、氨甲酰化胎牛血清中包含大量可与人类血清样本中anti-CarpAb抗体及其他免疫球蛋白非特异性相互作用的蛋白质及其它复杂组分,导致实验的背景值高,从而对结果分析产生干扰;3、氨甲酰化胎牛血清难以重复制备,存在着批间差异,可能会对实验结果复现性产生影响;4、检测的anti-CarpAb的亚型仅为IgA和IgG、并未对IgM和IgD型抗体进行检测;5、采用免疫印迹法(Immunoblotting)进行检测时实验步骤较为复杂、不同检测机构的实验操作标准不一、耗时长、不能实现全自动高通量分析及采用动物血清作为二抗进行检测时在印迹膜上产生的非特异性检测条带对实验结果的干扰。

[0005] 专利W02016/014612A2中的检测方法存在的缺陷是采用的是ELISA间接法对anti-Carp Ab进行检测,检测背景值较高、灵敏度较低、线性范围窄、易产生假阳性的实验结果;同时针对检测不同亚型的抗体,需要采用相应的酶标二抗进行检测,实验操作较为繁琐。

[0006] 由此可见,现有的抗-Carp抗体检测方法均为非均相反应体系,其存在检测背景值较高、选择性及重复性较差、灵敏度较低、线性范围窄、反应速度较小、易产生假阳性的实验结果等问题。

[0007] 因此,为了克服现有检测技术中存在的上述缺陷,需要研究开发出一种抗原特异性强、信号放大效果好、灵敏度高、线性范围宽、操作简单、测试更稳定的用于检测anti-Carp Ab的均相免疫化学发光检测试剂盒。

### 发明内容

[0008] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒。该

试剂盒采用高灵敏度和特异性的氨甲酰化人血清白蛋白作为抗原结合均相免疫化学发光检测技术制成,其具有特异性强、信号放大效果好、灵敏度高、线性范围宽、操作简单、稳定性好和精密度高的优点。

[0009] 为此,本发明第一方面提供检测抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与至少一种抗原形成的免疫复合物的存在的试剂在制备用于采用均相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:

[0010] 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;

[0011] b) 检测所述待测样品中抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与至少一种抗原形成的免疫复合物;

[0012] 其中,所述抗-Carp抗体或免疫复合物的存在指示受治疗者的类风湿性关节炎,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、唾液、滑液和肺气肿积液。

[0013] 在本发明的一些实施方式中,所述步骤还包括检测抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原形成的免疫复合物的含量。

[0014] 在本发明的一些优选的实施例中,基于抗-Carp抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-Carp抗体的含量。

[0015] 在本发明的一些实施方式中,所述步骤还包括将所测得的抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与至少一种抗原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抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与至少一种抗原形成的免疫复合物的含量进行比较。

[0016] 根据本发明,所述步骤包括将所述样品与包含能够与抗-Carp抗体特异性结合形成免疫复合物的至少一种抗原。

[0017] 在本发明的一些实施方式中,所述抗原包括能够与抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点特异性结合的第一抗原以及能够与抗-Carp抗体的抗原表位第二结合位点特异性结合的第二抗原,其中所述抗原表位第一结合位点和所述抗原表位第二结合位点不相重叠。

[0018] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗原与受体结合,所述受体能够与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号。

[0019] 本发明中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗原和第二抗原为氨甲酰化抗原,优选所述氨甲酰化抗原为氨甲酰化人血清白蛋白。

[0021] 在本发明的一些实施例中,所述人血清白蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0022] 为此,本发明第二方面提供了一种用于检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂套装,其包括:

[0023] 组分a,其包含能够与单线态氧反应生成可检测信号的受体以及与之结合的第一抗原,所述第一抗原的抗原表位能够与抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点特异性结合;

[0024] 组分b,其包含能够与抗-Carp抗体的抗原表位第二结合位点特异性结合的第二抗原,抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点和抗原表位第二结合位点不相重叠;

[0025] 组分c,其包括能够在激发状态产生单线态氧的供体。

[0026] 根据本发明,所述第一抗原和第二抗原为氨甲酰化抗原;优选所述氨甲酰化抗原为氨甲酰化人血清白蛋白。

[0027] 在本发明的一些实施例中,所述人血清白蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0028] 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抗-Carp抗体纯品,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。

[0029] 本发明中,所述第二抗原与特异性结合配对物中的一员结合,而所述供体与特异性结合配对物中的另一员结合。

[0030] 在本发明的一些实施方式中,所述第二抗原与生物素结合,而所述供体与链霉亲和素结合。

[0031] 在本发明的一些实施例中,所述受体及与之结合的第一抗原的浓度为10-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,优选20-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,更优选25-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0032] 在本发明的另一些实施例中,所述第二抗原及与之结合的特异性结合配对物中的一员的浓度为0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,优选0.5-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,更优选1-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0033] 本发明中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

[0034] 本发明中,所述供体为光活化的或化学活化的敏化剂,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒,在光激发下能够产生单线态氧。

[0035] 本发明第三方面提供了一种用于检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒,其包含本发明第二方面所述的均相免疫检测试剂套装。

[0036] 本发明第四方面提供了一种检测待测样品中抗-Carp抗体的均相免疫检测方法,其包括使用如本发明第二方面所述的均相免疫检测试剂套装或使用如第三方面所述的均相免疫检测试剂盒来判断待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量。

[0037] 根据本发明,该方法包括:

[0038] 步骤R1,将待测样品与组分a和组合b混合,得到第三混合物;

[0039] 步骤R2,将第三混合物与组分c混合,得到第四混合物;

[0040] 步骤R3,使能量或者活性化合物与所述第四混合物接触,激发所述供体产生单线态氧,所述受体能够与接收到的单线态氧反应生成可检测的化学发光信号;

[0041] 步骤R4,检测步骤R3中所述化学发光信号的存在和/或强度,从而判断待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量。

[0042] 根据本发明,所述方法还包括在步骤R1之前的制作抗-Carp抗体标准工作曲线的步骤。

[0043] 在本发明的一些进一步的具体实施例中,在步骤R4中,检测步骤R3中所述化学发光信号的强度,并基于抗-Carp抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-Carp抗体的含量。

[0044] 本发明中,步骤R1和R2之间以及步骤R2和R3之间没有分离和/或洗涤的步骤。

[0045] 在本发明的一些实施例中,在步骤R3中,使用600-700nm波长的激发光照射第四混合物,激发供体产生单线态氧,受体与接触到的单线态氧反应生成520-620nm的发射光。

[0046] 本发明第五方面提供了一种如本发明第二方面所述的均相免疫检测试剂套装或

如本发明第三方面所述的均相免疫检测试剂盒或如本发明第四方面所述的方法在检测待测样品中抗-Carp抗体的存在和/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、唾液、滑液和肺气肿积液。

[0047] 本发明第六方面提供了一种如本发明第二方面所述的均相免疫检测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:

[0048] 步骤M1,提供来自待测主体的待测样品;

[0049] 步骤M2,判断测待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量;

[0050] 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抗-Carp抗体的含量比较;

[0051] 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、唾液、滑液和肺气肿积液。

[0052] 在本发明的一些实施方式中,与正常对照样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体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。

[0053] 在本发明的一些实施方式中,与正常对照样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体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。

[0054] 在本发明的另一些实施方式中,与正常对照样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体的含量不低于123.5U/ml是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

[0055] 在本发明的一些实施方式中,其特征在于,与类风湿性关节炎对照样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体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。

[0056] 在本发明的另一些实施方式中,与来自同一待测主体的治疗前的样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体的相对含量指示治疗方案的效力。

[0057] 根据本发明方法,在步骤M2中,采用本发明第四方面所述的方法来判断测待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量。

[0058] 本发明的有益效果如下:

[0059] 1) 该试剂盒所采用的检测技术为均相反应体系,相较于现有的非均相反应体系检测方法,存在着无需清洗、包被/标记工艺对抗原抗体的活性无影响、特异性高、灵敏度好、线性范围宽、背景干扰小、反应速度快、操作简便、技术要求不高等优点,并可实现全自动化高通量测试。

[0060] 2) 在本申请中,意外的发现,采用氨甲酰化人血清白蛋白作为抗原,相较于氨甲酰化胎牛血清,其在抗原特异性、抗原纯度、批间差异上存在着明显优势。即以人自身性氨甲酰化蛋白作为抗原的特异性更强,明显提高了人血清/血浆样本中的anti-Carp Ab的检出率。而且,选用的人血清白蛋白为纯化后产物,其纯度>95%,不会与人血清/血浆样本中的其它物质发生非特异性相互作用,检测受到的干扰小。此外,人血清白蛋白的提取和纯化工艺成熟可靠,批间差异小,能稳定获得。

[0061] 3) 在本申请中,所采用检测方法学为双抗原夹心,相较于现有的免疫印迹法和ELISA间接法,能检测出所有亚型的抗体,而无需引入针对于不同亚型的二抗,实验步骤操作简便,可行性更高。

## 附图说明

[0062] 为使本发明容易理解,下面结合附图来说明本发明。

[0063] 图1示出采用实施例1制备的试剂盒进行临床血清样本测试时anti-Carp Ab诊断水平升高为RA疾病的受试者工作特征曲线(ROC)。

[0064] 图2示出采用实施例1制备的试剂盒进行临床血清样本测试时,非RA患者和RA患者体内anti-Carp Ab含量的分布对比。

[0065] 图3示出采用实施例2制备的试剂盒进行临床血清样本测试时anti-Carp Ab诊断水平升高为RA疾病的受试者工作特征曲线(ROC)。

[0066] 图4示出采用实施例2制备的试剂盒进行临床血清样本测试时,非RA患者和RA患者体内anti-Carp Ab含量的分布对比。

[0067] 图5示出对比例中采用实施例1和实施例2制备的试剂盒进行临床血清样本测试时与专利W02012/105838A1、专利W02016/014612A2中anti-Carp Ab的检测方法用于RA诊断的敏感度和特异性进行对比。

### 具体实施方式

[0068] 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。

[0069] 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内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,服从规定范围内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。

[0070] 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。

#### [0071] I. 术语

[0072] “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、猪和其它哺乳动物物种。

[0073] 本发明所述用语“均相”所对应的英文定义为“homogeneous”,其是指无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既可进行检测。

[0074] 本发明所述用语“待测样本”是指可能含有被分析物anti-Carp Ab的一种混合物,可以被用在本发明公开的方法中的典型待测样本包括血液、血液衍生物、血清、血浆、尿液、脑脊髓液、唾液、滑液和肺气肿积液等。待测样本可以是在使用前根据需要利用稀释液或缓冲溶液对可能含有被分析物的样本进行稀释后的溶液。例如,为了避免HOOK效应,可以在上机检测前使用样本稀释液将被分析物进行稀释后再在检测仪器上进行检测,此时可能含有被分析物的稀释后的溶液均统称为待测样本。

[0075] 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。明确定义的光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。

[0076] 本发明所述用语“抗体”是指哺乳动物B淋巴细胞分泌的抗-Carp抗体,抗-Carp抗体产生的具体过程为:类风湿性关节炎患者体内的某些蛋白质的赖氨酸残基在尿素的衍生物一氰酸酯或氰酸盐的作用下转变成高瓜氨酸残基,该过程打破哺乳动物免疫耐受并诱导自身免疫产生抗-Carp抗体。

[0077] 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,具体为氨甲酰化抗原。

[0078] 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。

[0079] 本发明所述用语“特异性结合”,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。

[0080] 本发明所述用语“特异性结合配对物”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物的例子是生物素-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物中的任一员。

[0081] 本发明所述用语“供体”是指通过能量或者活性化合物的激活后能够产生与受体反应的诸如单线态氧的活性中间体的敏化剂。供体可以是光活化的(如染料和芳香化合物)或者化学活化的(如酶、金属盐等)。在本发明一些具体实施例中,所述供体是光敏剂,所述光敏剂可以是本领域已知的光敏剂,优选相对光稳定且不与单线态氧有效反应的化合物,其非限定性的例子包括例如美国专利US5709994(该专利文献在此全文引为参考)公开的亚甲基蓝、玫瑰红、卟啉、酞菁和叶绿素等化合物,以及这些化合物的具有1-50个原子取代基的衍生物,所述取代基用于使得这些化合物更具有亲脂性或更具有亲水性、和/或作为连接至特异性结合配对物的连接基团。本领域技术人员已知的其他光敏剂的例子也可以在本发明中使用,例如美国专利US6406913中记载的内容,该专利文献并入本文以供参考。在本发明另一些具体实施例中,所述供体是化学活化的其他敏化剂,其非限定性的例子是某些化合物,它们催化过氧化氢转化为单线态氧和水。其他一些供体的例子包括:1,4-二羧乙基-1,4-萘内过氧化物、9,10-二苯基蒽-9,10-内过氧化物等,加热这些化合物或者这些化

合物直接吸收光会释放单线态氧。

[0082] 本发明所述用语“受体”是指能够与单线态氧反应可以产生可检测信号的物质。供体被能量或者活性化合物诱导激活并释放高能态的单线态氧,该高能态的单线态氧被近距离的受体俘获,从而传递能量以激活所述受体。在本发明的一些具体实施例中,所述受体是这样的物质,其经历与单线态氧的化学反应以形成不稳定的亚稳态中间体,所述亚稳态中间体可以分解,同时或随后发光。这些物质的典型例子包括但不限于:烯醇醚、烯胺、9-烷叉黄原胶、9-烷叉-N-烷基吡啶满、芳乙烯醚、双环氧乙烷、二甲基噻吩、芳香性咪唑或光泽精。在本发明的另一些具体实施例中,所述受体是能够与单线态氧反应以形成可以分解成酮类或羧酸衍生物的氢过氧化物或二氧环丁烷的烯炔类;可以通过光的作用分解的稳定二氧环丁烷;可以与单线态氧反应以形成二酮类的乙炔类;可以形成偶氮化合物或偶氮羰基化合物的腈类或酰肼类,诸如鲁米诺;和可以形成内过氧化物类的芳族化合物。可以根据本公开和要求保护的发明利用的受体的具体的、非限制性实例记载于美国专利号US5340716(该专利文献在此全文引为参考)。在本发明另一些具体实施例中,所述受体包含烯炔化合物和金属螯合物,其是非粒子化的并且在含水介质中可溶,这种受体的情况可参见专利PCT/US2010/025433(该专利文献在此全文引为参考)。

[0083] 在本发明中,所述供体可以是通过功能基团被包被在基体上形成填充有感光化合物的高分子微粒,在光激发下能够产生单线态氧,此时供体也可以称为感光微球或感光微粒,包含这种感光微球或感光微粒的溶液可以称为感光液或通用液;和/或,所述受体可以是通过功能基团被包被在基体上形成填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒,此时可以称为发光微球或发光微粒。在本申请中,系统基于包被在基体表面的发光物质经光激发和能量传递诱导发光信号,能量传递依赖于抗原-抗体结合导致感光微球和发光微球相互靠近而实现。因此无需分离过程。纳米微球的直径更小,其悬浮性能更强,同时采用了三级放大发光系统,因而具有更高的分析灵敏度;整个检测过程无需清洗,即无需分离结合标记和结合标记物,因此反应时间更短;示踪物质(感光剂和发光剂)标记在基体上,而不是标记在生物分子上,对生物分子的活性没有影响,同时,因基体存在较大的比表面积,故其表面上能够包被更多的示踪物质及生物分子,致其在试剂的有效浓度和灵敏度及检测背景等方面的表现会更优。

[0084] 本发明所述“基体”是本领域技术人员所公知的微球或微粒,其可以是任何尺寸的,但优选纳米级尺寸;其可以是有机的或是无机的;其可以是可膨胀或不可膨胀的;其可以是多孔的或非多孔的;其具有任何密度,但优选具有和水接近的密度;优选能漂浮于水中,且由透明、部分透明或不透明的材料构成。所述基体可以有或没有电荷,当带有电荷时,优选是负电荷。所述基体可以是固体(如聚合物、金属、玻璃、有机和无机物诸如矿物、盐和硅藻)、小油滴(如碳氢化合物、碳氟化合物、硅质流体)、囊泡(如合成的诸如磷脂、或天然的诸如细胞、及细胞器官)。基体可以是乳胶颗粒或是含有有机或无机聚合物的其他颗粒、脂双层如脂质体、磷脂囊泡、小油滴、硅颗粒、金属溶胶、细胞和微晶染料。基体通常具有多功能性,或者能够通过特异或非特异的共价或非共价相互作用而结合到供体或受体上。有许多官能团是可用的或者将其合并进来。典型的官能团包括羧酸、乙醛、氨基、氰基、乙烯基、羟基、巯基等。适用于本发明的基体的非限制性的例子是羧基或醛基改性的乳胶颗粒。这种基体的详细情况可参见美国专利US5709994与US5780646(这两篇专利文献在此全文引为参

考)。

[0085] 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结合的区域。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、磷酸基和/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。

[0086] 本发明所述用语“均相免疫检测试剂套装”是指均相免疫检测所必须使用的全部试剂或药剂的组合。

[0087] 本发明所述用语“抗-Carp抗体的抗原表位结合位点”是指亦称为“结合抗原表位的位点”是指抗-Carp抗体所具有的识别和结合“氨甲酰化抗原的抗原表位”区域,例如,抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点和抗-Carp抗体的抗原表位第二结合位点,二者不相重叠,也就是说二者属于具有相同结合特性的不同位置的抗原表位识别(结合)位点或区域。

[0088] II. 实施方案

[0089] 如前所述,现有的检测抗-Carp抗体的方法均为非均相免疫检测法,这些方法灵敏较低,准确度不高,操作也较为复杂。本发明人研究发现,采用均相免疫检测法检验抗-Carp抗体灵敏度高、线性范围宽、精密度好,且检测过程中免去洗涤等步骤,操作较为简便。

[0090] 因此,本发明第一方面涉及检测抗-Carp抗体或与所述抗-Carp抗体形成的免疫复合物的存在的在制备用于采用均相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) 提供来自疑似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抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原形成的免疫复合物;其中所述抗-Carp抗体或免疫复合物的存在指示受治疗者的类风湿性关节炎,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、唾液、滑液和肺气肿积液,优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,进一步优选所述待测样品为血清。

[0091] 在本发明的一些实施方式中,所述步骤还包括检测抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原形成的免疫复合物的含量;并进一步将所测得的抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原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抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原形成的免疫复合物的含量进行比较。

[0092] 在本发明的一些优选的实施例中,基于抗-Carp抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-Carp抗体的含量。

[0093] 在一些实施例中,将所测得的抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原形成的免疫复合物的含量,与正常对照样品中抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原形成的免疫复合物的含量进行比较。例如,与正常对照样品相比,所述待测样品中所述抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原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,将所测得的抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原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抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原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抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原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。

[0094] 在一些实施例中,将所测得的抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原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抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原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抗-Carp抗体或所述抗-Carp抗体与抗原形成的免疫复合物的相对含量指示治疗方案的效力。

[0095] 根据本发明,所述步骤包括将所述样品与包含能够与抗-Carp抗体特异性结合形成免疫复合物的抗原。

[0096] 在本发明的一些实施方式中,所述抗原包括能够与抗-Carp抗体的第一结合位点特异性结合的第一抗原以及能够与抗-Carp抗体的第二结合位点特异性结合的第二抗原,其中所述第一结合位点和所述第二结合位点不相重叠。

[0097] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗原与受体结合,所述受体能够与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号。

[0098] 本发明中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶。

[0099] 本发明中,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

[0100] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗原和第二抗原为氨甲酰化抗原,优选所述氨甲酰化抗原为氨甲酰化人血清白蛋白。

[0101] 在本发明的一些实施例中,所述人血清白蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0102] 下文中第二到第六方面进一步提供了实现本发明的具体实施方案。

[0103] 本发明第二方面提供了一种用于检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂套装,其包括:

[0104] 组分a,其包含能够与单线态氧反应生成可检测信号的受体以及与之结合的第一抗原,所述第一抗原的抗原表位能够与抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点特异性结合;

[0105] 组分b,其包含能够与抗-Carp抗体的抗原表位第二结合位点特异性结合的第二抗原,所述抗原表位第一结合位点和所述抗原表位第二结合位点不相重叠;

[0106] 组分c,其包括能够在激发状态产生单线态氧的供体。

[0107] 根据本发明,所述第一抗原和第二抗原为氨甲酰化抗原。

[0108] 在本发明的一些优选的实施例中,所述氨甲酰化抗原为氨甲酰化人血清白蛋白,优选所述人血清白蛋白如SEQ ID No.1所示。

[0109] 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抗-Carp抗体纯品,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。

[0110] 应该理解的是,本发明中所述的特异性结合配对物起到桥联的作用,因此也被称为桥连体系。本发明中,所述第二抗原与特异性结合配对物中的一员结合,而所述供体与特异性结合配对物中的另一员结合。在一些实施例中,例如,所述第二抗原与生物素结合,而所述供体与链霉亲和素结合。

[0111] 在本发明的一些实施例中,所述受体及与之结合的第一抗原的浓度为10-200 $\mu$ g/mL,优选20-150 $\mu$ g/mL,更优选25-100 $\mu$ g/mL。在一些例子中,例如,所述受体及与之结合的第一抗原的浓度包括但不限于:20 $\mu$ g/mL、30 $\mu$ g/mL、40 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL、60 $\mu$ g/mL、70 $\mu$ g/mL、80 $\mu$ g/mL或90 $\mu$ g/mL。

[0112] 在本发明的一些实施例中,所述第二抗原及与之结合的特异性结合配对物中的一员的浓度为0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,优选0.5-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,更优选1-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在一些例子中,例如,所述第二抗原及与之结合的特异性结合配对物中的一员的浓度包括但不限于:0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0113] 本发明中,所述受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

[0114] 在本发明的一些优选的实施例中,所述受体为填充有发光化合物和镧系元素的高分子微粒。

[0115] 本发明中,所述供体为光活化的或化学活化的敏化剂,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶;和/或,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒,在光激发下能够产生单线态氧。

[0116] 在本发明的一些优选的实施例中,所述供体为填充有感光化合物的高分子微粒,在光激发下能够产生单线态氧。

[0117] 本发明第三方面提供了一种用于检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒,其包含本发明第二方面所述的均相免疫检测试剂套装。其可以通过将所述用于检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂套装装入试剂盒中制得。所述试剂盒包括:

[0118] 试剂I,其由能够与单线态氧反应生成可检测信号的受体以及与之结合的第一抗原构成,所述第一抗原的抗原表位能够与抗-Carp抗体的抗原表位第一结合位点特异性结合;

[0119] 试剂II,其由能够与抗-Carp抗体的抗原表位第二结合位点特异性结合的第二抗原以及与之结合的特异性结合配对物中的一个成员构成;

[0120] 试剂III,其由能够在激发状态产生单线态氧的供体以及与之结合的特异性结合配对物中的另一个成员构成。

[0121] 具体地,本发明提供的用于检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒,其包括anti-Carp Ab校准品、包被受体(例如,发光微粒)的氨甲酰化抗原、生物素标记的氨甲酰化抗原、供体(例如,感光液)以及样本稀释液。

[0122] 在一个具体实施方式中,所述氨甲酰化抗原为氨甲酰化人血清白蛋白,所述人血清白蛋白如SEQ ID No.1所示。

[0123] 在一个具体实施方式中,所述发光微粒选自含醛基活性基团、含羧基活性基团中的至少一种。

[0124] 在一个具体实施方式中,所述标记物选自生物素。

[0125] 在一个具体实施方式中,所述感光液包括如下组分:表面包被有感光物质酞菁及链霉亲和素。

[0126] 在一个具体实施方式中,anti-Carp Ab校准品的制备包括以下步骤:

[0127] A1) 校准品缓冲液的制备:准确称取HEPES 4.77g、NaCl 1.7g,添加纯化水160mL混匀30min,调节pH值至 $7.4 \pm 0.2$ ,继续添加Proclin300 0.1g、BSA30g、1M  $\text{MgCl}_2$  0.5mL、0.1M  $\text{ZnCl}_2$  0.1mL,搅拌30min后添加纯化水定容至200mL,复测pH值后,2-8 $^\circ\text{C}$ 备用;

[0128] B1) 校准品的配制:将已知活性浓度的anti-Carp Ab加入至步骤A1)中所述缓冲

液,配制成具备一定浓度梯度的标准品。至少配制3个浓度,优选配制5个浓度。

[0129] 在一个具体实施方式中,所述抗原被氨甲酰化的步骤如下:

[0130] I) 采用KOCN(氰酸钾)溶液对抗原进行体外氨甲酰化修饰;

[0131] II) 将氨甲酰化修饰完后的所述抗原进行透析,以除去残留的KOCN。

[0132] 在一个具体实施方式中,在步骤I)中,1-10mg的所述抗原加入至0.5-2M的KOCN进行36-38℃反应24-36h。例如,将1mg的人血清白蛋白加入至1M的KOCN(0.2M的PB缓冲液配制,pH=7.2)中进行37℃反应24h。

[0133] 在一个具体实施方式中,在步骤II)中,2-8℃条件下采用0.1-0.25M的PB缓冲液透析48-72h以除去残留的KOCN。例如,在2-8℃条件下采用0.2M的PB缓冲液透析48h以除去残留的KOCN。

[0134] 在一个具体实施方式中,氨甲酰化抗原包被的受体(发光微粒)包括以下步骤:

[0135] 氨甲酰化抗原包被受体(含有醛基活性基团的发光微粒):

[0136] A2) 取一定量的氨甲酰化人血清白蛋白进行透析,采用1L交联透析缓冲液在2-8℃条件下进行透析,透析时间不少于5h,每2h更换一次透析液,换液2-3次;

[0137] B2) 将透析好的氨甲酰化人血清白蛋白吸出转移至干净离心管中,并取样测定蛋白浓度,蛋白浓度的测定方法为紫外光谱吸收法或采用BCA蛋白定量分析试剂盒;

[0138] C2) 取一定量的发光微粒加入离心管中,并对发光微粒进行洗涤。清洗方法为12000rpm离心10min,弃上清,向离心管中加入10-20倍体积的交联透析缓冲液,并采用超声波清洗5min。再次离心,重复以上清洗步骤2次。

[0139] D2) 将步骤C2)中洗涤完毕的发光微粒置于分析天平上进行调零,将步骤A2)中透析后的0.01-0.1倍发光微粒质量的氨甲酰化人血清白蛋白全部加入至洗涤完毕的发光微粒中并计算体积(密度按1g/mL计算),补充一定体积的交联透析缓冲液至发光微粒中,使总体积为200μL。氨甲酰化人血清白蛋白与发光微粒混匀后将离心管置于37℃垂直旋转混合器上25-40rpm过夜反应。

[0140] E2) 将步骤D2)中反应完成的离心管置于2-8℃条件下冷却10min,取0.1-0.5倍发光微粒质量的NaBH<sub>4</sub>,加入至离心管中并混匀,随后将离心管置于2-8℃垂直旋转混合器上25-40rpm反应2小时。

[0141] F2) 在步骤E2)中反应完成的离心管中加入1-3倍发光微粒质量的Gly,室温条件下垂直旋转混合器上25-40rpm反应1小时。

[0142] G2) 洗涤步骤F2)中氨甲酰化人血清白蛋白包被的发光微粒,清洗方法为12000rpm离心10min,弃上清,向离心管中加入200μL的清洗缓冲液,并采用超声波清洗5min。再次离心,重复以上清洗步骤2次,最后使用微粒保存液清洗一次。

[0143] H2) 加入200μL微粒保存液保存氨甲酰化人血清白蛋白包被的发光微粒,保存在2-8℃备用。

[0144] 氨甲酰化抗原包被含有羧基活性基团的发光微粒:

[0145] A3) 取一定量的氨甲酰化人血清白蛋白进行透析,采用1L交联透析缓冲液在2-8℃条件下进行透析,透析时间不少于5h,每2h更换一次透析液,换液2-3次;

[0146] B3) 将透析好的氨甲酰化人血清白蛋白吸出转移至干净离心管中,并取样测定蛋白浓度,蛋白浓度的测定方法为紫外光谱吸收法或采用BCA蛋白定量分析试剂盒;

[0147] C3) 取一定量的发光微粒加入离心管中,并对发光微粒进行洗涤。清洗方法为12000rpm离心10min,弃上清,向离心管中加入10-20倍体积的交联透析缓冲液,并采用超声波清洗5min。再次离心,重复以上清洗步骤2次;

[0148] D3) 准确量取1-3倍发光微粒质量的硫化的氮羟基琥珀酰亚胺,加入一定体积预冷的交联透析缓冲液,使其浓度为45mg/ml;

[0149] E3) 准确量取2-6倍发光微粒的碳化二亚胺盐酸盐,加入一定体积预冷的的交联透析缓冲液,使其浓度为85mg/ml;

[0150] F3) 将步骤D3) 配制的硫化的氮羟基琥珀酰亚胺溶液及E3) 配制的碳化二亚胺盐酸盐溶液加入至C3) 中盛有清洗完毕的发光微粒的离心管中,将此发光微粒混悬液于2-8℃条件下混匀1-2小时,即完成对C3) 的活化;

[0151] G3) 将步骤F3) 中活化完成的的发光微粒置于分析天平上进行调零,将步骤A3) 中透析后的0.01-0.1倍发光微粒质量的氨甲酰化人血清白蛋白全部加入至活化完成的发光微粒中并计算体积(密度按1g/mL计算),补充一定体积的交联透析缓冲液至发光微粒中,使总体积为200 $\mu$ L。氨甲酰化人血清白蛋白与发光微粒混匀后将离心管置于37℃垂直旋转混合器上25-40rpm过夜反应。

[0152] H3) 将步骤G3) 中反应完成的离心管置于2-8℃条件下冷却10min,取0.1-0.5倍发光微粒质量的NaBH<sub>4</sub>,加入至离心管中并混匀,随后将离心管置于2-8℃垂直旋转混合器上25-40rpm反应2小时。

[0153] I3) 在步骤H3) 中反应完成的离心管中加入1-3倍发光微粒质量的Gly,室温条件下垂直旋转混合器上25-40rpm反应1小时。

[0154] J3) 洗涤步骤F3) 中氨甲酰化人血清白蛋白包被的发光微粒,清洗方法为12000rpm离心10min,弃上清,向离心管中加入200 $\mu$ L的清洗缓冲液,并采用超声波清洗5min。再次离心,重复以上清洗步骤2次,最后使用微粒保存液清洗一次。

[0155] K3) 加入200 $\mu$ L微粒保存液保存氨甲酰化人血清白蛋白包被的发光微粒,保存在2-8℃备用。

[0156] 在一个具体实施方式中,氨甲酰化抗原标记生物素包括以下步骤:

[0157] A4) 取一定量的氨甲酰化人血清白蛋白进行透析,采用1L交联透析缓冲液在2-8℃条件下进行透析,透析时间不少于5h,每2h更换一次透析液,换液2-3次。

[0158] B4) 将透析好的氨甲酰化人血清白蛋白吸出转移至干净离心管中,并取样测定蛋白浓度,蛋白浓度的测定方法为紫外光谱吸收法或采用BCA蛋白定量分析试剂盒。

[0159] C4) 取为一定量的氨甲酰化人血清白蛋白至离心管中,按两者之间标记的分子摩尔比大致为1:30加入生物素,加入生物素后迅速混匀,补充一定体积的标记缓冲液使总体积为200 $\mu$ L。将离心管置于2-8℃垂直旋转混合器上25-40rpm过夜反应。

[0160] D4) 将步骤C4) 中标记完成的生物素化氨甲酰化人血清白蛋白进行透析,采用1L标记透析缓冲液在2-8℃条件下进行透析,透析时间不少于5h,每2h更换一次透析液,换液2-3次。

[0161] E4) 将步骤D4) 中生物素化氨甲酰化人血清白蛋白转移至干净离心管中,取样测定蛋白浓度后保存在2-8℃备用。

[0162] 在一个具体实施方式中,所述样本稀释液包括如下组分:0.02M磷酸盐、0.15M氯化

钠、0.5%吐温-20及2%牛血清白蛋白片段5。

[0163] 样本稀释液的配制包括以下步骤：

[0164] 采用精密天平精确称量2.90g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.296g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、添加纯化水800mL混匀30min，调节pH值至 $7.2 \pm 0.2$ ，继续添加8.5g  $\text{NaCl}$ 、5g吐温-20及20g牛血清白蛋白片段5，搅拌30min后添加纯化水定容至1L，复测pH值后，2-8℃备用。

[0165] 在一个具体的实施方式中，作为所述供体的感光液的配制包括以下步骤：

[0166] A5) 缓冲液的制备：准确称取TRIS 6.05g、 $\text{NaCl}$  8.5g，添加纯化水800mL混匀30min，调节pH值至 $7.4 \pm 0.2$ ，继续添加Proclin300 0.5g、BSA 10g、Tween-20 1.0g，搅拌30min后添加纯化水定容至1000mL，复测pH值后，2-8℃备用；

[0167] B5) 供体(感光液)的配制：将已知浓度的感光液高浓度母液加入至步骤A5)中所述缓冲液，配制成具备一定浓度的工作液。

[0168] 本发明第四方面提供了一种检测待测样品中抗-Carp抗体的均相免疫检测方法，该方法包括：

[0169] 步骤R1，将待测样品与组分a和组合b混合，得到第三混合物；

[0170] 步骤R2，将第三混合物与组分c混合，得到第四混合物；

[0171] 步骤R3，使能量或者活性化合物与所述第四混合物接触，激发所述供体产生单线态氧，所述受体能够与接收到的单线态氧反应生成可检测的化学发光信号；

[0172] 步骤R4，检测步骤R3中所述化学发光信号的存在和/或强度，从而判断待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量。

[0173] 在一个具体实施方式中，检测待测样品中抗-Carp抗体的均相免疫检测方法的步骤如下：

[0174] 1) 配制anti-Carp Ab校准品；

[0175] 2) 以氨甲酰化抗原包被发光微粒；

[0176] 3) 以氨甲酰化抗原标记生物素；

[0177] 4) 配制样本稀释液。

[0178] 在一个具体实施方式中，还可以包括步骤5) 分装上述anti-Carp Ab校准品、氨甲酰化抗原包被发光微粒、氨甲酰化抗原标记生物素和样本稀释液，最后将各组分组装为成品。

[0179] 根据本发明，所述方法还包括在步骤R1之前的制作抗-Carp抗体标准工作曲线的步骤。

[0180] 在本发明的一些进一步的具体实施例中，在步骤R4中，检测步骤R3中所述化学发光信号的强度，并基于抗-Carp抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-Carp抗体的含量。

[0181] 本发明中，步骤R1和R2之间以及步骤R2和R3之间没有分离和/或洗涤的步骤。

[0182] 本发明中对步骤R1中待测样本与组分a和组分b混合的方式或顺序没有特别的限制，例如，在本发明的一些实施例中，步骤R1中，可以将中待测样本与组分a和组分b同时混合后反应得到第三混合物；而在本发明的另一些实施例中，步骤R1中，可以首先将待测样品与组分a混合得到第五混合物，然后再将第五混合物与组分b混合，得到第三混合物。

[0183] 在本发明的一些实施例中，在步骤R3中，使用600-700nm波长的激发光照射第四混合物，激发供体产生单线态氧，受体与接触到的单线态氧反应生成520-620nm的发射光。

[0184] 本发明所述方法中,所有试剂组合后,均可以根据需要进行混匀和/或温育(孵育)。具体地,所述温育的温度可以是35-45℃,时间可以是5-30min;优选地,所述温育的温度可以选自36℃、37℃、38℃、39℃、40℃、41℃或42℃;温育的时间可以选自10min、12min、15min、16min、18min、20min或25min。

[0185] 在本发明第五方面,本发明所涉及的如本发明第二方面所述的均相免疫检测试剂套装在检测待测样品中抗-Carp抗体的存在和/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均相免疫检测试剂套装来判断测待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量的方法,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、唾液、滑液和肺气肿积液,优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,进一步优选所述待测样品为血清。

[0186] 同样地,本发明所提供的如本发明第三方面所提供的均相免疫检测试剂盒在检测待测样品中抗-Carp抗体的存在和/或含量中的应用,可以理解为利用本发明第三方面所提供的均相免疫检测试剂盒来判断测待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量的方法,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、唾液、滑液和肺气肿积液,优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,进一步优选所述待测样品为血清。

[0187] 类似地,本发明所提供的如本发明第四方面所提供的均相免疫检测方法在检测待测样品中抗-Carp抗体的存在和/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均相免疫检测试剂套装,并采用如本发明第四方面所述的均相免疫检测方法来判断测待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量的方法,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、唾液、滑液和肺气肿积液,优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,进一步优选所述待测样品为血清。

[0188] 类似地,本发明所提供的如本发明第四方面所提供的均相免疫检测方法在检测待测样品中抗-Carp抗体的存在和/或含量中的应用,可以理解为利用本发明第三方面所提供的均相免疫检测试剂盒,并采用如本发明第四方面所述的均相免疫检测方法来判断测待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量的方法,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、唾液、滑液和肺气肿积液,优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,进一步优选所述待测样品为血清。

[0189] 本发明第六方面涉及如本发明第二方面所述的试剂套装在制备用于检测怀疑患有类风湿性关节炎的受治疗者的待测样品中的抗-Carp抗体,由此确定所述待测样品中抗-Carp抗体的水平,并将因此确定的水平与受治疗者的类风湿性关节炎的存在、风险、潜在性或倾向性相关联的试剂盒中的应用,其包括:

[0190] 步骤M1,提供来自待测主体的待测样品;

[0191] 步骤M2,判断测待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量;

[0192] 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抗-Carp抗体的含量比较;

[0193] 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、唾液、滑液和肺气肿积液,优选所述待测样品选自血液、血浆和血清,进一步优选所述待测样品为血清。

[0194] 在本发明的一些实施方式中,与正常对照样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体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。

[0195] 在本发明的一些实施方式中,与正常对照样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体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。

[0196] 在本发明的另一些实施方式中,与正常对照样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体的含量不低于123.5U/ml是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

[0197] 在本发明的一些实施方式中,其特征在于,与类风湿性关节炎对照样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体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。

[0198] 在本发明的另一些实施方式中,与来自同一待测主体的治疗前的样品相比,所述待测样品中抗-Carp抗体的相对含量指示治疗方案的效力。

[0199] 根据本发明方法,在步骤M2中,采用本发明第四方面所述的方法来判断待测样品中是否存在抗-Carp抗体和/或确定抗-Carp抗体的含量。

### [0200] III. 实施例

[0201] 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。

#### [0202] 实施例1

##### [0203] 一、制备anti-Carp Ab校准品

###### [0204] 1) 制备校准品缓冲液:

[0205] 准确称取HEPES 4.77g、NaCl 1.7g,添加纯化水160mL混匀30min,调节PH值至7.4±0.2,继续添加Proclin300 0.1g、BSA 30g、1M MgCl<sub>2</sub> 0.5ml、0.1M ZnCl<sub>2</sub> 0.1ml,搅拌30min后添加纯化水定重至200g,复测pH值后,2-8℃备用。

###### [0206] 2) 配制校准品

[0207] 将浓度为500U/mL的anti-Carp Ab,配制成40U/ml的溶液,随后依次稀释为1、2.5、8、20U/mL,加上40U/ml浓度点和0U/mL浓度点(缓冲液),共得到A:0U/mL、B:1U/mL、C:2.5U/mL、D:8U/mL、E:20U/mL、F:40U/mL,合计共6个浓度的校准品。

##### [0208] 二、制备氨甲酰化抗原

[0209] 1) 将1mg的人血清白蛋白加入至1M的KOCN溶液中进行37℃反应24h;

[0210] KOCN溶液:采用精密天平精确称量KOCN 8.112g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 5.9g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.488g、纯化水定容至100mL,调节pH值7.2±0.05;

[0211] 2) 反应完成后在2-8℃条件下采用超纯水透析48h以除去残留的KOCN,2-8℃保存备用。

[0212] 经以上反应后,氨甲酰化人血清白蛋白的一个或多个赖氨酸残基被氨甲酰化,即包括一个或多个anti-Carp Ab的结合位点。

##### [0213] 三、受体和供体的制备

[0214] 用作本发明的受体和供体的制备方法及组成结构可以参见中国专利CN100429197C(该专利文献在此全文引为参考)中的实施例1。

##### [0215] 四、制备试剂I(氨甲酰化抗原包被的作为受体的发光微粒)

[0216] 制备氨甲酰化抗原包被受体(含有醛基活性基团的发光微粒)步骤如下:

[0217] 1) 取0.2mg氨甲酰化人血清白蛋白进行透析,采用1L交联透析缓冲液1在2-8℃条件下进行透析,透析时间不少于5h,每2h更换一次透析液,换液2-3次;

[0218] 交联透析缓冲液1:采用精密天平精确称量 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.54g、 $\text{NaHCO}_3$  2.94g,加入纯化水定容至1L,调节pH值 $9.0 \pm 0.05$ ;

[0219] 2) 将步骤1)中透析好的氨甲酰化人血清白蛋白吸出转移至干净离心管中,并取样测定蛋白浓度,蛋白浓度的测定方法为紫外光谱吸收法或采用BCA蛋白定量分析试剂盒;

[0220] 3) 取2mg的发光微粒加入离心管中,并对发光微粒进行洗涤。洗涤方法为12000rpm离心10min,弃上清,向离心管中加入200 $\mu\text{l}$ 的交联透析缓冲液1,采用超声波清洗5min,再次离心弃上清,重复以上清洗步骤2次;

[0221] 4) 将步骤3)中洗涤完毕的发光微粒置于分析天平上进行调零,取步骤1)中透析后的0.1mg氨甲酰化人血清白蛋白全部加入至装有发光微粒的离心管中并计算体积(密度按1g/mL计算),补充一定体积的交联透析缓冲液1至发光微粒中,使总体积为200 $\mu\text{L}$ ,其中微粒的浓度为10mg/mL。将离心管中两者充分混匀后置于37℃垂直旋转混合器上25-40rpm过夜反应;

[0222] 5) 将步骤4)中反应完成的离心管置于2-8℃条件下冷却10min,准确称取8mg的 $\text{NaBH}_4$ ,溶解于1mL的交联透析缓冲液中,终浓度为8mg/mL;取4 $\mu\text{L}$ 的 $\text{NaBH}_4$ 溶液,加入至离心管中并混匀,随后将离心管置于2-8℃垂直旋转混合器上25-40rpm反应2小时;

[0223] 6) 在步骤5)中反应完成的离心管中加入32 $\mu\text{L}$ 的75mg/mL甘氨酸溶液(准确称取75mg甘氨酸,溶解于纯化水中,终浓度为75mg/mL),室温条件下垂直旋转混合器上25-40rpm反应1小时;

[0224] 7) 洗涤步骤6)中氨甲酰化人血清白蛋白包被的发光微粒,清洗方法为12000rpm离心10min,弃上清,向离心管中加入200 $\mu\text{l}$ 的清洗缓冲液,并采用超声波清洗5min,再次离心弃上清,重复以上清洗步骤2次,最后使用微粒保存液清洗一次;

[0225] 8) 加入200 $\mu\text{L}$ 微粒保存液保存步骤7)中清洗完成的氨甲酰化人血清白蛋白包被的受体(发光微粒),保存在2-8℃备用;

[0226] 清洗缓冲液:采用精密天平精确称量2.90g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.296g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,添加纯化水定容至100mL;

[0227] 微粒保存液:采用精密天平精确称量2.5g HEPES、17.5g  $\text{NaCl}$ 、1.0g吐温-20、10g牛血清白蛋白片段5,添加纯化水定容至100mL;

[0228] 9) 加入微粒保存液保存氨甲酰化人血清白蛋白包被的受体(发光微粒),保存在2-8℃备用,试剂I工作浓度为25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0229] 五、制备试剂II(标记生物素的氨甲酰化抗原)

[0230] 1) 取0.2mg氨甲酰化人血清白蛋白进行透析,采用1L交联透析缓冲液1在2-8℃条件下进行透析,透析时间不少于5h,每2h更换一次透析液,换液2-3次;

[0231] 2) 将步骤1)中透析后的氨甲酰化人血清白蛋白吸出转移至干净离心管中,并取样测定蛋白浓度,蛋白浓度的测定方法为紫外光谱吸收法或采用BCA蛋白定量分析试剂盒;

[0232] 3) 准确称取5mg生物素,溶解于DMSO中,终浓度为5mg/mL;

[0233] 4) 取0.1mg的氨甲酰化人血清白蛋白至离心管中,加入3 $\mu\text{L}$ 步骤3)中的生物素溶液(两者之间标记的分子摩尔比约为1:30),加入生物素溶液后迅速混匀,补充一定体积的交

联透析缓冲液1使总体积为200 $\mu$ L,随后将离心管置于2-8 $^{\circ}$ C垂直旋转混合器上25-40rpm过夜反应;

[0234] 5) 将步骤4) 中标记完成的生物素化氨甲酰化人血清白蛋白进行透析,采用1L交联透析缓冲液1在2-8 $^{\circ}$ C条件下进行透析,透析时间不少于5h,每2h更换一次透析液,换液2-3次;

[0235] 6) 将步骤5) 中生物素化氨甲酰化人血清白蛋白转移至干净离心管中,取样测定蛋白浓度后保存在2-8 $^{\circ}$ C备用。其中生物素化氨甲酰化人血清白蛋白工作浓度为1 $\mu$ g/mL。

[0236] 六、制备样本稀释液和感光液

[0237] 1、制备样本稀释液

[0238] 采用精密天平精确称量2.90g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.296g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、添加纯化水800mL混匀30min,调节pH值至 $7.2 \pm 0.2$ ,继续添加8.5g  $\text{NaCl}$ 、5g吐温-20及20g牛血清白蛋白片段5,搅拌30min后添加纯化水定容至1L,复测pH值后,2-8 $^{\circ}$ C备用。

[0239] 2、制备感光液(链霉亲和素包被的供体)

[0240] (1) 供体(感光微球)混悬液处理

[0241] 吸取一定量的感光微球于高速冷冻离心机中离心,弃去上清,加入一定量MES缓冲液,超声细胞破碎仪上超声至微粒重新悬浮,加入MES缓冲液调节感光微球浓度至100mg/ml。

[0242] (2) 链霉亲和素溶液配制

[0243] 称量一定量链霉亲和素,加MES缓冲液溶解至8mg/ml。

[0244] (3) 混合

[0245] 将处理好的感光微球(供体)混悬液、8mg/ml的Avidin以及MES缓冲液,以2:5:1的体积比进行混合,迅速混匀,得到反应液。

[0246] (4) 反应

[0247] MES缓冲液配制25mg/ml的 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 溶液,按照与反应液1:25的体积比

[0248] 加入,迅速混匀。37 $^{\circ}$ C旋转反应48小时。

[0249] (5) 封闭

[0250] MES缓冲液配制75mg/ml的Gly溶液以及25mg/ml的 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 溶液,按

[0251] 照与反应液2:1:10的体积比加入上述溶液中,混匀,37 $^{\circ}$ C旋转反应2小时。再加入200mg/ml的BSA溶液(MES缓冲液),其与反应液体积比为5:8,迅速混匀,37 $^{\circ}$ C旋转反应16小时。

[0252] (6) 清洗

[0253] 向反应好的溶液中加入MES缓冲液,高速冷冻离心机离心,弃上清,加入新鲜MES缓冲液超声法重新悬浮,再次离心,如此清洗3次,最后用少量的感光试剂缓冲液进行悬浮,测定固含量,用感光试剂缓冲液调节工作浓度至100 $\mu$ g/mL,作为通用液使用。

[0254] 七、制备试剂盒

[0255] 将上述步骤制备的anti-Carp Ab校准品、包被发光微粒的氨甲酰化抗原、生物素标记的氨甲酰化抗原、感光液以及样本稀释液分装即为半成品,经抽检合格后组装为成品,2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0256] 八、实验操作

[0257] 样本收集:于四川TJ及吉林KZ收集临床血清anti-Carp Ab水平升高的病例共419例,其中包括已确诊为RA患者177例,非RA患者242例。以受试者工作特征曲线来确定阴阳判断标准。

[0258] 应用本实施例制备的试剂盒于全自动光激化学发光免疫分析仪LICA500(上海博阳生物科技有限公司)上的检测步骤如下:

[0259] 1) 样本在预稀释孔位按照1:10进行稀释,并混匀20秒;

[0260] 2) 样本加样Tip头吸取10ul已稀释样本或校准品至反应微孔板中;

[0261] 3) 试剂加样Tip头吸取25μl氨甲酰化人血清白蛋白包被发光微粒至反应微孔板中;

[0262] 4) 试剂加样Tip头吸取25μl生物素化的氨甲酰化人血清白蛋白至反应微孔板中;

[0263] 5) 混匀20秒后37℃孵育17min;

[0264] 6) 试剂加样Tip头吸取175μl感光液至反应微孔板中;

[0265] 7) 混匀20秒后37℃孵育15min;

[0266] 8) 在仪器产生激发光照射下,感光微粒被诱导激活,并释放高能态的活性氧离子。该高能态的活性氧离子在近距离被发光微粒俘获,从而传递能量以激活发光微粒中的发光化合物。数微秒后,发光微粒中的发光化合物将释放出高能级红光,用单光子计数器测定这些高能级光子;

[0267] 9) 按照上述步骤1)-8)分别测试不同浓度标准品的发光值,按照五参数拟合方法绘制标准曲线,得出发光值与anti-Carp Ab浓度之间的关系式;再按照步骤1)-8)分别测试待测样本的发光值,由上述关系式计算得出待测样本中anti-Carp Ab的浓度。

[0268] 九、检测结果

[0269] 1) 检验工作校准品的线性范围

[0270] 表1

浓度点	发光值
0 U/mL	340
1 U/mL	6418
2.5 U/mL	13739
8 U/mL	28231
20 U/mL	55612
40 U/mL	130136

[0272] 结论:标准曲线度拟合方程 $R^2 > 0.99$ ,满足临床定量测定需求。

[0273] 2) 样本检测结果

[0274] 以123.5U/ml为临界值,本实施例1试剂盒诊断anti-Carp Ab水平升高为RA的敏感度和特异性分别为52%、97.1%,如附图2所示:

[0275] 对于所有的血清anti-Carp Ab浓度升高的患者,计算取临界值为123.5U/ml时,其用于RA诊断的真阴性率为73.44%,真阳性率为92.93%,总准确率为78.04%,如表2所示:

[0276] 表2

	RA 样本 (例)	177
	非 RA 样本 (例)	242
	检出阴性 (例)	320
	真阴性 (例)	235
[0277]	真阴性率 (%)	73.44
	检出阳性 (例)	99
	真阳性 (例)	92
	真阳性率 (%)	92.93
	总准确率 (%)	78.04

[0278] 实施例2

[0279] 本实施例中的受体包含烯烃化合物和金属螯合物,其为非粒子形式,且在含水介质中可溶。

[0280] 一、制备anti-Carp Ab校准品

[0281] 参照实施例1。

[0282] 二、制备氨甲酰化抗原

[0283] 参照实施例1。

[0284] 三、制备试剂I (氨甲酰化抗原包被的受体)

[0285] 用作本实施例的第一抗原包被的受体的制备方法是按照专利PCT/US2010/025433中记载的实施例来制备的,氨甲酰化人血清白蛋白包被的受体的结构为氨甲酰化人血清白蛋白-BSA-(二甲基噻吩)-(BHHCT),其为非粒子形式,且在含水介质中可溶。其中,试剂I工作浓度为100 $\mu$ g/mL。

[0286] 四、制备试剂II (标记生物素的氨甲酰化抗原)

[0287] 参照实施例1,区别在于制得的生物素化氨甲酰化人血清白蛋白工作浓度为3 $\mu$ g/mL。

[0288] 五、制备样本稀释液和感光液

[0289] 参照实施例1,区别在于制得的感光液 (链霉亲和素包被的供体)的工作浓度为200 $\mu$ g/mL。

[0290] 六、制备试剂盒

[0291] 参照实施例1。

[0292] 七、实验操作

[0293] 参照实施例1。

[0294] 八、检测结果

[0295] 1) 检验工作校准品的线性范围

[0296] 表3

[0297]

浓度点	发光值
0U/mL	267
1U/mL	7034

2.5U/mL	14384
8U/mL	23547
20U/mL	60274
40U/mL	125871

[0298] 结论:标准曲线度拟合方程 $R^2 > 0.99$ ,满足临床定量测定需求。

[0299] 2) 样本检测结果

[0300] 血清测试:以123.5U/ml为临界值,本实施例2试剂盒诊断anti-Carp Ab水平升高为RA的敏感度和特异性分别为52%、97.1%,如附图3所示:

[0301] 对于所有的血清anti-Carp Ab浓度升高的患者,计算取临界值为123.5U/ml时,其用于RA诊断的真阴性率为73.44%,真阳性率为92.93%,总准确率为78.04%,如表4所示:

[0302] 表4

[0303]

RA样本(例)	177
非RA样本(例)	242
检出阴性(例)	320
真阴性(例)	235
真阴性率(%)	73.44
检出阳性(例)	99
真阳性(例)	92
真阳性率(%)	92.93
总准确率(%)	78.04

[0304] 以上检测结果表明,实施例2制备的试剂盒的临床应用效果与实施例1制备的试剂盒处于同一水平。

[0305] 对比例1

[0306] 将本发明中的实施例1和实施例2制备的anti-Carp Ab试剂盒与现有公开的专利文献中报道的anti-Carp Ab的检测试剂的性能进行对比。

[0307] 专利W02012/105838A1以氨甲酰化胎牛血清(Ca-FCS)为抗原,采用ELISA间接法检测anti-Carp Ab的敏感度和特异性分别为31.3%、98.8%;在专利文献W02016/014612A2中以氨甲酰化人 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶(Ca-A1AT)为抗原,采用ELISA间接法检测anti-Carp Ab的敏感度和特异性分别为35%、98.8%。其用于RA诊断的特异性与本实施例1及实施例2中方法检测RA诊断的特异性的差异较小,而敏感度则明显低于本实施例1和实施例2,如附图5所示。表明本发明中制备的Anti-Carp Ab试剂盒在用于RA的诊断上相比专利W02012/105838A1及W02016/014612A2中制备的anti-Carp Ab试剂盒在敏感度这一指标上具有明显的优势。

[0308] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,其仅用于解释本发明,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

&lt;110&gt; 北京科美生物技术有限公司

&lt;120&gt; 检测抗-Carp 抗体的均相免疫检测试剂盒及其应用

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; SIPOSequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; (人血清白蛋白)

&lt;400&gt; 1

```

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

```

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val  
 225 230 235 240  
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser  
 245 250 255  
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly  
 260 265 270  
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile  
 275 280 285  
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu  
 290 295 300  
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp  
 305 310 315 320  
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser  
 325 330 335  
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly  
 340 345 350  
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val  
 355 360 365  
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys  
 370 375 380  
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu  
 385 390 395 400  
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys  
 405 410 415  
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu  
 420 425 430  
 Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val  
 435 440 445  
 Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His  
 450 455 460  
 Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val  
 465 470 475 480  
 Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg  
 485 490 495  
 Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe  
 500 505 510  
 Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala  
 515 520 525  
 Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu



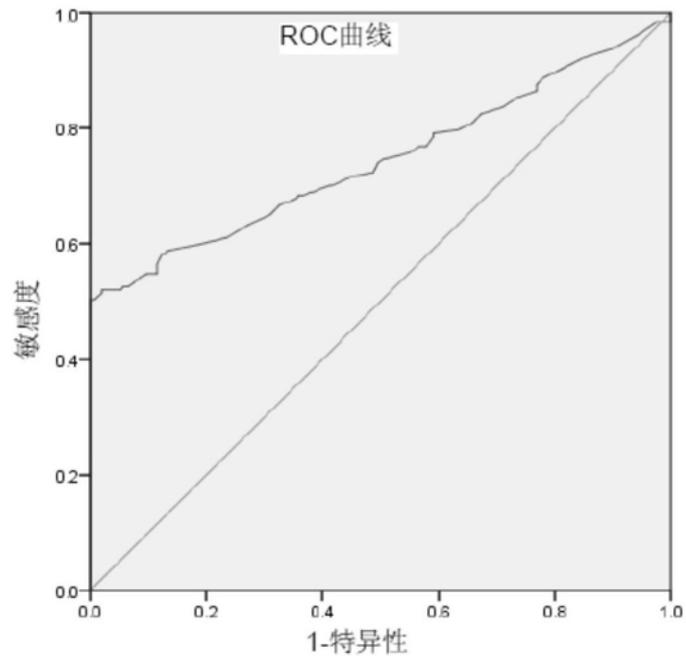


图1

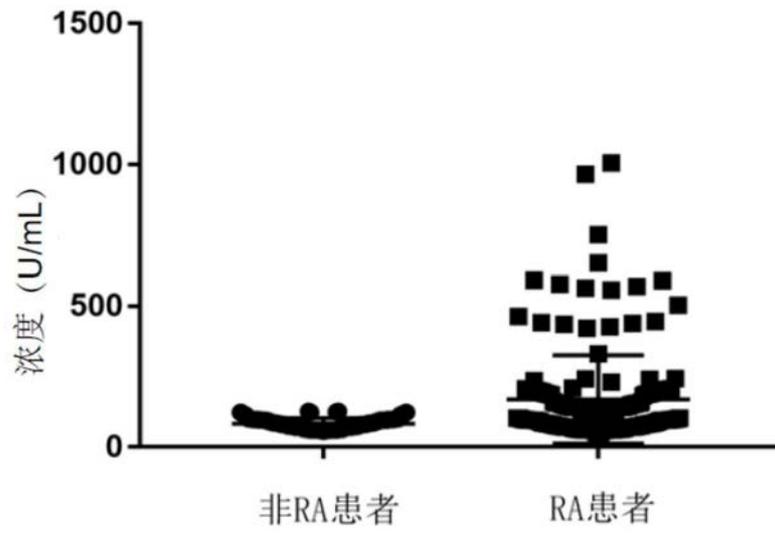


图2

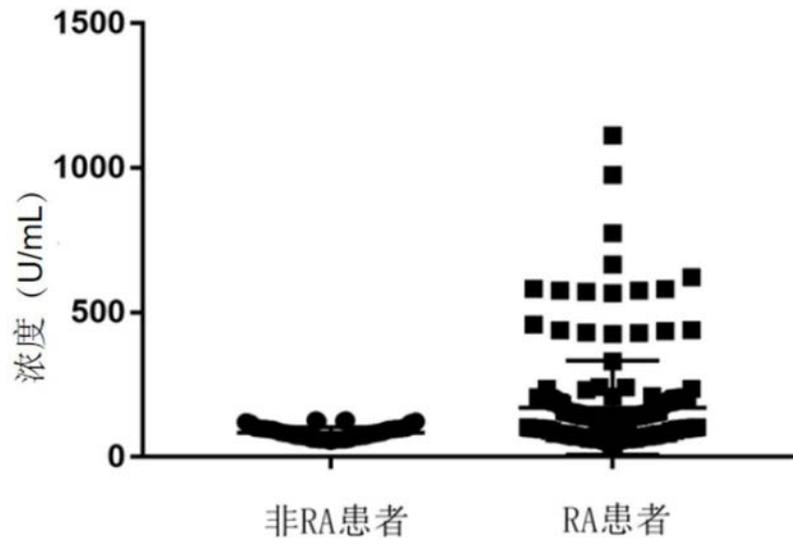


图3

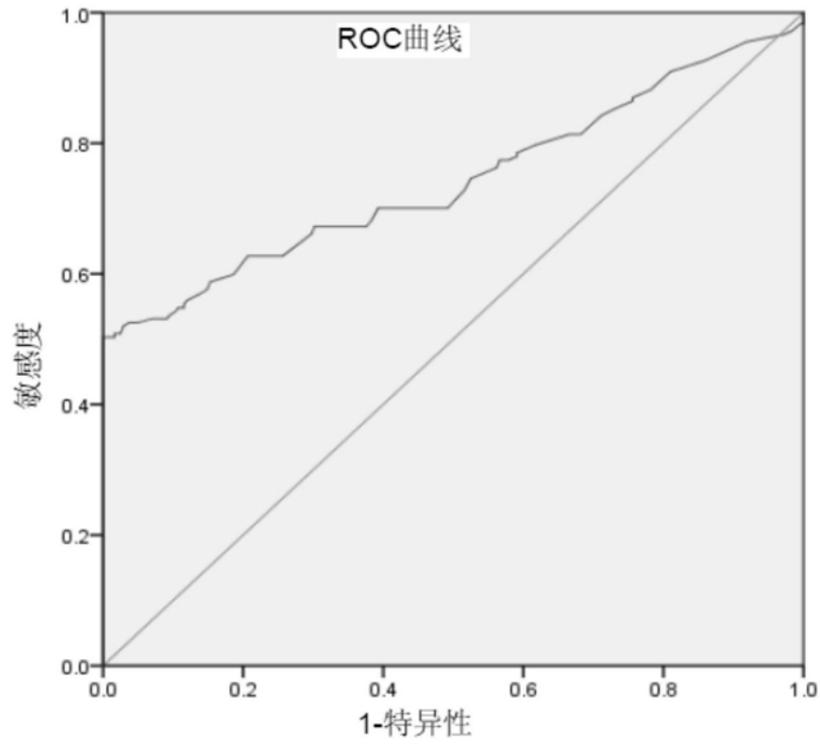


图4

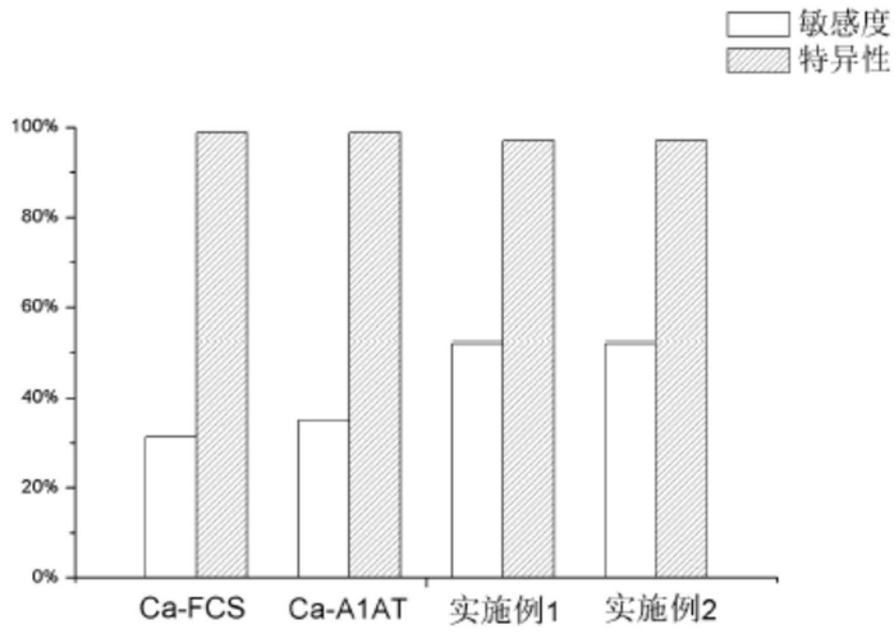


图5

专利名称(译)	检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110161249A</a>	公开(公告)日	2019-08-23
申请号	CN201810143200.0	申请日	2018-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美生物技术有限公司		
[标]发明人	廖智星 饶星 刘宇卉 李临 其他发明人请求不公开姓名		
发明人	廖智星 饶星 刘宇卉 李临 其他发明人请求不公开姓名		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/536 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/536 G01N33/6854 G01N33/6893 G01N2800/102		
代理人(译)	方莉		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒及其制备方法和使用方法。本发明提供了一种抗-Carp抗体的均相免疫检测试剂盒，该试剂盒所采用的检测技术为光激化学发光免疫分析法，为一种均相反应体系，相较于现有的非均相反应体系检测方法，存在着无需清洗、包被/标记工艺对抗原抗体的活性无影响、特异性高、灵敏度好、线性范围宽、背景干扰小、反应速度快、操作简便、技术要求不高等优点，并可实现全自动化高通量测试。

