



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110161232 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201810143149.3

(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 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 方莉

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

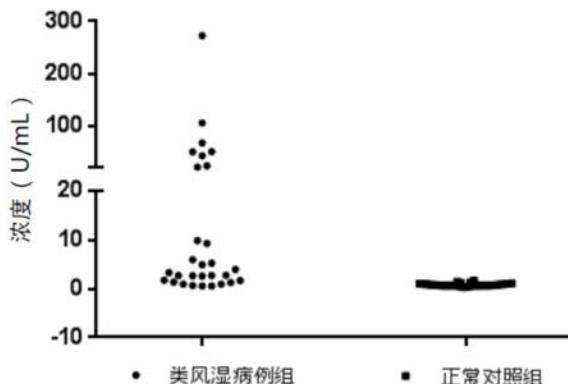
权利要求书3页 说明书28页 附图1页

(54)发明名称

检测抗CCP抗体的均相免疫检测试剂盒及其  
应用

(57)摘要

本发明涉及一种抗-CCP抗体均相免疫检测试剂盒。该试剂盒采用高灵敏度和特异性瓜氨酸化牛血清白蛋白作为抗原，结合能够区分出免疫复合物状态下的抗体和非特异性抗体、未结合抗原的游离的特异性抗体的抗免疫复合物抗体和光激化学发光技术制成。该试剂盒在检测过程中不受非特异性抗体的干扰而可以省略传统间接法中需要洗涤的过程。该试剂盒特异性高、灵敏度好、线性范围宽、反应速度快、操作简便，并可实现全自动化高通量测试。



1. 一种用于检测抗-CCP抗体的均相免疫检测试剂套装,其包括:
  - 组分a,其包含能够与抗-CCP抗体的抗原表位结合位点特异性结合的第一抗原;
  - 组分b,其包含抗免疫复合物抗体,所述抗免疫复合物抗体能够特异性识别和结合与第一抗原形成的第一免疫复合物中的抗-CCP抗体,不识别游离的、未结合抗原的抗-CCP抗体。
2. 根据权利要求1所述的试剂套装,其特征在于,所述第一抗原或所述抗免疫复合物抗体与受体相结合,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。
3. 根据权利要求2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。
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,所述试剂套装还包含组分c,其包含能够在激发状态产生单线态氧的供体;优选所述供体与特异性结合配对成员中的一员结合,而特异性结合配对成员中的另一员与所述第一抗原或所述抗免疫复合物抗体结合;进一步优选地,所述供体与链霉亲和素结合,相应地第一抗原或所述抗免疫复合物抗体与生物素结合。
5. 根据权利要求4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。
6. 根据权利要求1-5中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述抗免疫复合物抗体通过识别表位与第一免疫复合物中的抗-CCP抗体结合,所述识别表位是构象表位和/或线性表位。
7. 根据权利要求1-6中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述抗免疫复合物抗体识别第一免疫复合物中抗-CCP抗体的恒定区部分。
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,所述抗免疫复合物抗体不识别第一免疫复合物中抗-CCP抗体的轻链部分。
9. 根据权利要求1-8中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述抗免疫复合物抗体特异性识别第一免疫复合物中抗-CCP抗体的Fc段。
10. 根据权利要求1-9中任意一项所述的试剂套装,其特征在于,所述抗免疫复合物抗体为多克隆抗体和/或单克隆抗体;优选地,所述抗免疫复合物抗体为单克隆抗体。
11. 根据权利要求10所述的试剂套装,其特征在于,所述多克隆抗体的制备方法包括:用人免疫复合物对动物进行免疫,获取含有所述多克隆抗体的动物血清;所述动物血清经亲和层析纯化得到特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体。
12. 根据权利要求10所述的试剂套装,其特征在于,所述单克隆抗体的制备方法包括:将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行培养,对细胞培养上清液进行检测,保留阳性细胞株。
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,所述第一抗原选自合成的含瓜氨酸的环型肽、含瓜氨酸的线型肽、由至少2个单一含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽、含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物和瓜氨酸化蛋白。
14. 根据权利要求13所述的试剂套装,其特征在于,所述第一抗原选自合成的含环瓜氨酸的环型肽、含瓜氨酸的线型肽、由至少2个单一含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的

多肽和含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物。

15. 根据权利要求14所述的试剂套装,其特征在于,所述第一抗原为由2-4个含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽或含有2-4个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物;优选所述含瓜氨酸的肽段选自SEQ ID No.1-4。

16. 根据权利要求14或15所述的试剂套装,其特征在于,所述第一抗原通过中间体与受体相结合,所述中间体为亲水性高分子物质。

17. 根据权利要求16所述的试剂套装,其特征在于,所述中间体为蛋白质,优选选自血蓝蛋白、卵清蛋白、牛血清白蛋白或牛甲状腺球蛋白。

18. 根据权利要求16所述的试剂套装,其特征在于,所述中间体选自树枝状大分子、聚羧酸酯、聚巯基和聚乙二醇。

19. 根据权利要求1-18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 $\mu$ g/mL,优选20-150 $\mu$ g/mL,更优选25-100 $\mu$ g/mL;和/或,所述抗免疫复合物抗体及与之结合的特异性结合配对成员中的一员的总浓度为0.1-10 $\mu$ g/mL,优选0.5-5 $\mu$ g/mL,更优选1-3 $\mu$ g/mL。

20. 一种用于检测抗-CCP抗体的均相免疫检测试剂盒,其包含权利要求1-19中任意一项所述的均相免疫检测试剂套装。

21. 一种如权利要求1-19中任意一项所述的均相免疫检测试剂套装或如权利要求20所述的均相免疫检测试剂盒用于检测待测样本中抗-CCP抗体的免疫测定方法,其包括如下步骤:

S1,将第一抗原与待测样本中的抗-CCP抗体结合,形成由第一抗原-抗-CCP抗体构成的第一免疫复合物;

S2,将抗免疫复合物抗体与所述第一免疫复合物结合,形成由第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体所构成的第二免疫复合物;

S3,检测第二免疫复合物是否存在;如果第二免疫复合物存在,则表明待测样本中存在抗-CCP抗体。

22. 根据权利要求21所述的方法,其特征在于,步骤S3中通过化学发光的方法检测第二免疫复合物是否存在。

23. 根据权利要求21或22所述的方法,其特征在于,所述第一免疫复合物通过第一抗原与供体结合,相应的所述第二免疫复合物通过抗免疫复合物抗体与受体结合,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,所述供体能够在激发状态产生单线态氧。

24. 根据权利要求21或22所述的方法,其特征在于,所述第一免疫复合物通过第一抗原与受体结合,相应的所述第二免疫复合物通过抗免疫复合物抗体与供体结合,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,所述供体能够在激发状态产生单线态氧。

25. 根据权利要求21-24中任意一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

T1,将与生物素结合的第一抗原同待检样本中的抗-CCP抗体结合,形成由生物素-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第三免疫复合物;

T2,将与受体结合的特异性识别第三免疫复合物中的抗-CCP抗体的抗免疫复合物抗体同第三免疫复合物结合,形成由生物素-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-受体构成的第四免疫复合物;

T3, 将与链霉亲和素结合的供体同第四免疫复合物结合, 形成由供体-链霉亲和素-生物素-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-受体构成的第五免疫复合物;

T4, 检测第五免疫复合物是否存在; 如果第五免疫复合物存在, 则待测样本中存在抗-CCP抗体;

或者,

R1, 将与受体结合的第一抗原同待检样本中的抗-CCP抗体结合, 形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第六免疫复合物;

R2, 将与生物素结合的特异性识别第六免疫复合物中的抗-CCP抗体的抗免疫复合物抗体同第六免疫复合物结合, 形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-生物素构成的第七免疫复合物;

R3, 将与链霉亲和素结合的供体同第七免疫复合物中的生物素结合, 形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-生物素-链霉亲和素-供体所构成的第八免疫复合物;

R4, 检测第八免疫复合物是否存在; 如果第八免疫复合物存在, 则待测样本中存在抗-CCP抗体;

其中, 当第五免疫复合物或第八免疫复合物存在时, 用能量或者活性化合物激发供体产生单线态氧, 所述受体与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其特征在于, 所述方法还包括在步骤T1或步骤R1之前制作抗-CCP抗体标准工作曲线的步骤。

27. 根据权利要求26所述的方法, 在步骤T4或步骤R4中, 检测所述化学发光信号的强度, 并基于抗-CCP抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-CCP抗体的含量。

28. 根据权利要求25-27中任意一项所述的方法, 其特征在于, 利用600-700nm波长的激发光照射第五免疫复合物或第八免疫复合物, 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, 检测发射光的信号值, 从而判断待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

29. 一种如权利要求1-19中任意一项所述的均相免疫检测试剂套装或如权利要求20所述的均相免疫检测试剂盒或如权利要求21-28中任意一项所述的方法在检测待测样品中抗-CCP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。

30. 一种如权利要求1-19中任意一项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-CCP抗体, 由此确定所述待测样品中抗-CCP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。

## 检测抗CCP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-CCP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] 抗环瓜氨酸肽 (Anticyclic citrullinated peptide antibodies, 抗CCP) 抗体是一种新型的血清标志物, 临床检验实践表明, 抗-CCP抗体的滴度通常和疾病的活动度相关, 70-80% 患者在疾病很早期就在血清和滑膜液中出抗-CCP抗体, 此抗体具有高度的特异性和一定的预后价值。

[0003] 目前国内外市场上的抗环瓜氨酸肽抗体检测试剂盒主要应用酶联免疫吸附法 (ELISA法), 然而该方法检测背景值较高、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。

[0004] 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抗-CCP抗体的均相免疫化学发光检测试剂盒。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足提供一种检测待测样本中抗-CCP抗体的免疫测定方法及其在间接均相免疫检测人血清或血浆中抗-CCP 抗体中的应用。所述方法采用一种特异性识别人免疫复合物的抗免疫复合物抗体, 该抗体的特异性识别性能较高, 利用该抗体实现了间接法在均相免疫检测平台中的应用。

[0006] 为此, 本发明第一方面提供了一种用于检测抗-CCP抗体的均相免疫检测试剂套装, 其包括:

[0007] 组分a, 其包含能够与抗-CCP抗体的抗原表位结合位点特异性结合的第一抗原;

[0008] 组分b, 其包含抗免疫复合物抗体, 所述抗免疫复合物抗体能够特异性识别和结合与第一抗原形成的第一免疫复合物中的抗-CCP抗体, 不识别游离的、未结合抗原的抗-CCP 抗体。

[0009] 本发明中, 所述第一抗原或所述抗免疫复合物抗体与受体相结合, 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。

[0010] 在本发明的一些实施例中, 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。

[0011] 根据本发明, 所述试剂套装还包含组分c, 其包含能够在激发状态产生单线态氧的供体。

[0012] 在本发明的一些实施例中所述供体与特异性结合配对成员中的一员结合, 而特异

性结合配对成员中的另一员与所述第一抗原或所述抗免疫复合物抗体结合。

[0013] 在本发明的一些具体优选的实施例中,所述供体与链霉亲和素结合,相应地第一抗原或所述抗免疫复合物抗体与生物素结合。

[0014] 在本发明的一些实施例中,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。

[0015] 在本发明中,所述抗免疫复合物抗体通过识别表位与第一免疫复合物中的抗-CCP抗体结合,所述识别表位是构象表位和/或线性表位。

[0016] 在本发明的一些实施方式中,所述抗免疫复合物抗体识别第一免疫复合物中抗-CCP抗体的恒定区部分。

[0017] 在本发明的一些实施方式中,所述抗免疫复合物抗体不识别第一免疫复合物中抗-CCP抗体的轻链部分。

[0018] 在本发明的另一些实施方式中,所述抗免疫复合物抗体特异性识别第一免疫复合物中抗-CCP抗体的Fc段。

[0019] 在本发明的一些实施方式中,所述抗免疫复合物抗体为多克隆抗体和/或单克隆抗体。

[0020] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述抗免疫复合物抗体为单克隆抗体。

[0021] 在本发明中,所述多克隆抗体的制备方法包括:用人免疫复合物对动物进行免疫,获取含有所述多克隆抗体的动物血清;所述动物血清经亲和层析纯化得到特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体。

[0022] 在本发明中,所述单克隆抗体的制备方法包括:将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行培养,对细胞培养上清液进行检测,保留阳性细胞株。

[0023] 在本发明的一些实施方式中,所述第一抗原选自合成的含瓜氨酸的环型肽、含瓜氨酸的线型肽、由至少2个单一含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽、含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物和瓜氨酸化蛋白。

[0024] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述第一抗原选自合成的含环瓜氨酸的环型肽、含瓜氨酸的线型肽、由至少2个单一含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽和含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物;优选所述第一抗原为由2-4个含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽或含有2-4个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物。

[0025] 在本发明的一些优选的实施例中,所述含瓜氨酸的肽段选自SEQ ID No.1-4。

[0026] 在本发明的一些进一步优选的实施方式中,所述第一抗原通过中间体与受体相结合,所述中间体为亲水性高分子物质。

[0027] 在本发明的一些实施例中,所述中间体为蛋白质,优选选自血蓝蛋白、卵清蛋白、牛血清白蛋白或牛甲状腺球蛋白。

[0028] 在本发明的另一些实施例中,所述中间体选自树枝状大分子、聚羧酸酯、聚巯基和聚乙二醇。

[0029] 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总浓度为 10-200 $\mu$

g/mL, 优选20–150 $\mu$ g/mL, 更优选25–100 $\mu$ g/mL。

[0030] 在本发明的一些实施例中, 所述抗免疫复合物抗体及与之结合的特异性结合配对成员中的一员的总浓度为0.1–10 $\mu$ g/mL, 优选0.5–5 $\mu$ g/mL, 更优选1–3  $\mu$ g/mL。

[0031] 本发明第二方面提供了一种用于检测抗-CCP抗体的均相免疫检测试剂盒, 其包含如本发明第一方面所述的均相免疫检测试剂套装。

[0032] 本发明第三方面提供了一种如本发明第一方面提供的均相免疫检测试剂套装或如本发明第二方面提供的均相免疫检测试剂盒用于检测待测样本中抗-CCP 抗体的免疫测定方法, 其包括如下步骤:

[0033] S1, 将第一抗原与待测样本中的抗-CCP抗体结合, 形成由第一抗原-抗-CCP 抗体构成的第一免疫复合物;

[0034] S2, 将抗免疫复合物抗体与所述第一免疫复合物结合, 形成由第一抗原-抗-CCP 抗体-抗免疫复合物抗体所构成的第二免疫复合物;

[0035] S3, 检测第二免疫复合物是否存在; 如果第二免疫复合物存在, 则表明待测样本中存在抗-CCP抗体。

[0036] 在本发明的一些实施例中, 步骤S3中通过化学发光的方法检测第二免疫复合物是否存在。

[0037] 根据本发明的一些实施方式, 在上述免疫测定方法中, 所述第一免疫复合物通过第一抗原与供体结合, 相应的所述第二免疫复合物通过抗免疫复合物抗体与受体结合, 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, 所述供体能够在激发状态产生单线态氧。

[0038] 在本发明的一些具体实施方式中, 所述方法包括如下步骤:

[0039] T1, 将与生物素结合的第一抗原同待检样本中的抗-CCP抗体结合, 形成由生物素-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第三免疫复合物;

[0040] T2, 将与受体结合的特异性识别第三免疫复合物中的抗-CCP抗体的抗免疫复合物抗体同第三免疫复合物结合, 形成由生物素-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-受体构成的第四免疫复合物;

[0041] T3, 将与链霉亲和素结合的供体同第四免疫复合物结合, 形成由供体-链霉亲和素-生物素-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-受体构成的第五免疫复合物;

[0042] T4, 检测第五免疫复合物是否存在; 如果第五免疫复合物存在, 则待测样本中存在抗-CCP抗体。

[0043] 在本发明的一些实施例中, 当第五免疫复合物存在时, 用能量或者活性化合物激发供体产生单线态氧, 所述受体与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号。

[0044] 在本发明的一些实施例中, 所述方法还包括在步骤T1之前制作抗-CCP抗体标准工作曲线的步骤。

[0045] 在本发明的一些实施例中, 在步骤T4, 检测所述化学发光信号的强度, 并基于抗-CCP抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-CCP抗体的含量。

[0046] 在本发明的一些实施例中, 利用600–700nm波长的激发光照射第五免疫复合物, 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, 检测发射光的信号值, 从而判断待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0047] 根据本发明的另一些实施方式,所述第一免疫复合物通过第一抗原与受体结合,相应的所述第二免疫复合物通过抗免疫复合物抗体与供体结合,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,所述供体能够在激发状态产生单线态氧。

[0048] 在本发明的一些具体实施方式中,所述方法包括如下步骤:

[0049] R1,将与受体结合的第一抗原同待检样本中的抗-CCP抗体结合,形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第六免疫复合物;

[0050] R2,将与生物素结合的特异性识别第六免疫复合物中的抗-CCP抗体的抗免疫复合物抗体同第六免疫复合物结合,形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-生物素构成的第七免疫复合物;

[0051] R3,将与链霉亲和素结合的供体同第七免疫复合物中的生物素结合,形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-生物素-链霉亲和素-供体所构成的第八免疫复合物;

[0052] R4,检测第八免疫复合物是否存在;如果第八免疫复合物存在,则待测样本中存在抗-CCP抗体。

[0053] 在本发明的一些实施例中,当第八免疫复合物存在时,用能量或者活性化合物激发供体产生单线态氧,所述受体与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号。

[0054] 在本发明的一些实施例中,所述方法还包括在步骤R1之前制作抗-CCP抗体标准工作曲线的步骤。

[0055] 在本发明的一些实施例中,在步骤R4,检测所述化学发光信号的强度,并基于抗-CCP抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-CCP抗体的含量。

[0056] 在本发明的一些实施例中,利用600-700nm波长的激发光照射第八免疫复合物,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,检测发射光的信号值,从而判断测待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0057] 本发明第四方面提供了一种如本发明第一方面所述的均相免疫检测试剂套装或如本发明第二方面所述的均相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抗-CCP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。

[0058] 本发明第五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怀疑患有类风湿性关节炎的受治疗者的待测样品中的抗-CCP抗体,由此确定所述待测样品中抗-CCP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。

[0059] 本发明的有益效果:

[0060] 1) 该试剂盒所采用的检测技术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。

[0061] 2) 本发明提供了一种抗瓜氨酸肽抗体光激化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法,此试剂盒用于光激化学发光免疫分析仪。采用的方法为一步间接均相免疫检测方法,与传统间接法相比:省略中间洗涤步骤,一步法完成整个反应过程,既省时又免清洗。同时,

光激化学发光免疫分析方法与现有免疫分析方法相比具有以下优点:1、灵敏度高;2、免清洗、高通量;3、全自动,稳定性好。但本发明的一步法间接法反应模式不局限于应用于光激化学发光检测技术。本发明的均相免疫检测试剂盒中含有能够区分出已形成免疫复合物的抗体和非特异性抗体、未结合抗原的游离的抗体的物质,从而省略传统间接法中需要洗涤的过程,形成一步法完成整个反应,与传统间接法相比既省时又免去清洗步骤的复杂繁琐的工艺。

## 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3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-CCP Ab含量的分布对比。

## 具体实施方式

[0064] 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。

[0065] 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。

[0066] 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。

[0067] I、术语

[0068] “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。

[0069] 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。

[0070] 本发明所述用语“待测样本”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本包括体液,如血液、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。

[0071] 本发明所述用语“抗体”是指哺乳动物B淋巴细胞分泌的抗-CCP抗体。

[0072] 本发明所述用语“免疫复合物”(immune complex)即抗原-抗体复合物;而所述“人免疫复合物”是指人体内存在的免疫复合物,其既可以是存在于血液循环中的免疫复合物,

也可以是沉积于组织中的免疫复合物。

[0073] 本发明所述用语“抗免疫复合物抗体”指的是能特异性识别和结合抗原-抗体免疫复合物的物质,其不识别游离的、未结合抗原的抗体以及游离的人IgG抗体。具体地,样本中特异性抗体与相应抗原结合后形成抗原抗体-免疫复合物,该免疫复合物状态下的抗体构象或表位发生变化,表现出与其他游离的非特异性抗体构象或表位有差异,这种差异被本发明所述的抗免疫复合物抗体所特异性识别。应用这种抗免疫复合物抗体能够区分出免疫复合物状态下的抗体和非特异性抗体、未结合抗原的游离的特异性抗体。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] 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。例如,本发明所述第一抗原为能够与抗-CCP抗体的抗原表位结合位点特异性结合的抗原。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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。

[0080] 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成员的连接基团。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:1,4-二羧基

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。

[0081] 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-烷基吖啶满、芳乙烯醚、双环氧乙烯、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烃类;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腙类或酰肼类,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,所述受体包含烯烃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)。

[0082] 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。

[0083] 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,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一个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)。

[0084] 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。

[0085] 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。

[0086] 本发明所述用语“所述瓜氨酸肽段混合物”是指由至少2个单一含瓜氨酸的肽段混合后形成的混合物,其中所述含瓜氨酸的肽段可以是含瓜氨酸的环型肽段,也可以是含瓜氨酸的线型肽段。

## [0087] II、实施方案

[0088] 本发明所基于的原理是:待测样品中特异性抗体与相应抗原结合后形成抗原-抗体免疫复合物,该免疫复合物状态下的抗体构象或表位发生变化,表现出与其他游离的非特异性抗体构象或表位有差异,这种差异被本发明所述的抗免疫复合物抗体所特异性识别。应用这种抗免疫复合物抗体能够区分出免疫复合物状态下的抗体和非特异性抗体、未结合抗原的游离的特异性抗体,从而在检测过程中不受非特异性抗体的干扰而可以省略传统间接法中需要洗涤的过程,该试剂盒特异性高、灵敏度好、线性范围宽、反应速度快、操作简便,并可实现全自动化高通量测试。

[0089] 因此,本发明第一方面所涉及的用于检测抗-CCP抗体的均相免疫检测试剂套装,其包括:

[0090] 组分a,其包含能够与抗-CCP抗体的抗原表位结合位点特异性结合的第一抗原;

[0091] 组分b,其包含抗免疫复合物抗体,所述抗免疫复合物抗体能够特异性识别和结合与第一抗原形成的第一免疫复合物中的抗-CCP抗体,不识别游离的、未结合抗原的抗-CCP抗体;

[0092] 组分c,其包含能够在激发状态产生单线态氧的供体。

[0093] 在该均相免疫检测试剂套装中,所述第一抗原或所述抗免疫复合物抗体与受体相结合,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。

[0094] 在本发明的一些实施例中,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。

[0095] 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。

[0096] 在本发明的一些实施例中,所述供体与特异性结合配对成员中的一员结合,而特异性结合配对成员中的另一员与所述第一抗原或所述抗免疫复合物抗体结合。例如,在本发明的一些具体优选的实施例中,所述供体与链霉亲和素结合,相应地第一抗原或所述抗免疫复合物抗体与生物素结合。

[0097] 在本发明的一些实施例中,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。

[0098] 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。

[0099] 在本发明中,所述抗免疫复合物抗体通过识别表位与第一免疫复合物中的抗-CCP抗体结合,所述识别表位是构象表位和/或线性表位。

[0100] 在本发明的一些实施方式中,所述抗免疫复合物抗体识别第一免疫复合物中抗-CCP抗体的恒定区部分。

[0101] 在本发明的一些实施方式中,所述抗免疫复合物抗体不识别第一免疫复合物中抗-CCP抗体的轻链部分。

[0102] 在本发明的另一些实施方式中,所述抗免疫复合物抗体特异性识别第一免疫复合物中抗-CCP抗体的Fc段。

[0103] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述识别表位的氨基酸序列包含5-10个氨基酸。

[0104] 在本发明的一些实施方式中,所述抗免疫复合物抗体为多克隆抗体和/或单克隆抗体。

[0105] 在本发明的一些优选的实施方式中,所述抗免疫复合物抗体为单克隆抗体。

[0106] 在本发明中对多克隆抗体的制备方法没有特别的限制,可以采用本领域常规的制备方法制备,例如所述多克隆抗体的制备方法包括:用人免疫复合物对动物进行免疫,获取含有所述多克隆抗体的动物血清;所述动物血清经亲和层析纯化得到特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体。

[0107] 在本发明的一些具体实施方式中,所述多克隆抗体的制备方法包括以下步骤:

[0108] L1,用第一组人免疫复合物对动物进行免疫,免疫结束后,收集动物血清;

[0109] L2,将所述动物血清上样至结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱上,经洗涤、洗脱后,获得含特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体的洗脱液;

[0110] L3,将所述洗脱液经透析后上样至抗人IgG亲和层析柱上,穿透液中获得特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体。

[0111] 在本发明的另一些具体实施方式中,所述结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱的制备方法为:将与免疫时不同的抗原固定在亲和层析柱上,然后将与所述抗原特异反应的阳性人血清上样至所述亲和层析柱上,使阳性人血清中的特异性抗体与所述抗原形成第二组人免疫复合物,获得结合有第二组人的抗原抗体免疫复合物的亲和层析柱。

[0112] 在本发明的一些具体实施方式中,步骤L2中,所述动物血清上样前通过盐析进行粗提。

[0113] 根据本发明,所述动物对人IgG免疫耐受;所述动物可以选自豚鼠,兔子,山羊等。

[0114] 本发明对步骤L2中洗脱时采用的洗脱液没有特殊限定,所述洗脱液可为pH值为3.0的0.1M甘氨酸缓冲液。

[0115] 在本发明的一些具体实施例中,所述多克隆抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0116] (1)在正式免疫前一周待免疫动物(例如豚鼠、兔子和山羊等)通过静脉注射较高剂量的人IgG以诱导动物产生对人IgG的免疫耐受。一周后用第一组人免疫复合物(如待免疫动物的红细胞与人抗该种动物红细胞抗体的免疫复合物)以合适剂量对该动物进行免

疫,后续进行若干次加强免疫。加强免疫结束后,收集动物血清。

[0117] (2) 将与免疫时不同的抗原通过合适途径固定在亲和层析柱上,然后将与所述层析柱上的抗原特异反应的阳性人血清过所述层析柱,使固定在层析柱上的抗原与阳性人血清中的特异性抗体形成第二组人免疫复合物(与免疫时所用免疫复合物不同,如免疫时使用待免疫动物的红细胞与人抗该种动物红细胞抗体的免疫复合物,而亲和层析柱上为乙肝核心抗原与人抗乙肝核心抗原的免疫复合物),获得纯化步骤(1)获得的动物血清的结合有第二组人免疫复合物的亲和层析柱。

[0118] (3) 将步骤(1)获得的动物血清通过盐析粗提后,上样至步骤(2)制备的亲和层析柱上并充分洗涤,然后用pH值为3.0的0.1M甘氨酸缓冲液进行洗脱,获得含特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体的洗脱液;采用上述缓冲液进行洗脱时,能洗脱掉亲和层析柱上所有的抗体(特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体和与亲和层析柱上所固定的抗原相结合的抗体),因此上述洗脱液中还含有与亲和层析柱上所固定的抗原相结合的抗体。

[0119] (4) 将步骤(3)获得的洗脱液经透析后上样至抗人IgG亲和层析柱上以吸附掉与亲和层析柱上所固定的抗原相结合的抗体,经再次洗脱和透析后检测该多克隆抗体的浓度活性,获得特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体。

[0120] 根据本发明,所述单克隆抗体的制备方法可以为细胞融合法或噬菌体展示法。

[0121] 在本发明中,所述单克隆抗体的制备方法包括:将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行培养,对细胞培养上清液进行检测,并保留阳性细胞株。

[0122] 在本发明的一些具体实施方式中,所述单克隆抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0123] Z1,用第一组人的抗原抗体免疫复合物对小鼠进行免疫,免疫结束后,获取小鼠的脾脏细胞;

[0124] Z2,将小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合后进行培养,获得细胞培养上清液;

[0125] Z3,利用表面结合有第二组人的抗原抗体免疫复合物的酶标板对所述细胞培养上清液进行间接法ELISA检测,获得阳性反应克隆;

[0126] Z4,将所述阳性反应克隆分别与表面结合有与步骤T3相同抗原的酶标板和表面结合有人IgG的酶标板进行间接法ELISA检测,舍弃有任意一项为阳性反应的所述阳性反应克隆;

[0127] Z5,剩余的阳性反应克隆的稳定细胞株经培养或制备腹水,获得特异性结合抗原抗体免疫复合物的单克隆抗体。

[0128] 在本发明进一步优选的具体实施方式中,所述表面结合有第二组人的抗原抗体免疫复合物的酶标板的制备方法为:将与免疫时不同的抗原结合到酶标板上,然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清,反应后洗涤,获得表面结合有第二组人的抗原抗体免疫复合物的酶标板。

[0129] 在本发明进一步优选的具体实施方式中,步骤Z2中,所述小鼠骨髓瘤细胞为小鼠骨髓瘤细胞SP2/0。

[0130] 本发明中,所述小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞可在PEG介导下进行融合。

[0131] 本发明中,利用表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板对所述细胞培养上清液

进行间接法ELISA检测的具体操作为：

[0132] (1) 在表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板中加入所述细胞培养上清,反应后充分洗涤; (2) 加入HRP标记的抗鼠二抗,反应后充分洗涤; (3) 加入 TMB底物反应15min后显色,加入2M硫酸终止反应并在OD<sub>450nm</sub>下读数。

[0133] 本发明中,所述阳性反应克隆与表面结合有与步骤Z3相同抗原的酶标板进行间接法ELISA检测以及与表面结合有人IgG的酶标板进行间接法ELISA检测的操作如上。

[0134] 在本发明的进一步优选的具体实施方式中,所述单克隆抗体的制备方法具体包括:

[0135] (1) 选取3-5只8周左右的Balb/c雄性小鼠,在正式免疫前通过尾静脉注射 2mg人IgG以诱导小鼠产生对人IgG的免疫耐受。一周后用第一组人免疫复合物(如待免疫动物的红细胞与人抗该种动物红细胞抗体的免疫复合物)以合适剂量对小鼠进行免疫,后续进行若干次加强免疫。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脏细胞,获得小鼠的脾脏细胞。

[0136] (2) 在PEG介导下,将小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤进行融合,并用有限稀释法滴加至96孔细胞培养板进行培养,培养10天左右后,获得细胞培养上清液。

[0137] (3) 将与免疫时不同的抗原(如乙肝表面抗原)包被至酶标板上,然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清,反应后充分洗涤,获得表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板。利用该酶标板可以对上述细胞培养上清液进行间接法 ELISA检测。

[0138] (4) 在表面结合有第二组人免疫复合物的酶标板中加入细胞培养板各孔中的细胞培养上清液,反应后充分洗涤;加入HRP标记的抗鼠二抗,反应后充分洗涤;加入TMB底物反应15min后显色,加入2M硫酸终止反应并在OD<sub>450nm</sub> 下读数,获得阳性反应克隆。

[0139] (5) 将所述阳性反应克隆再分别与表面结合有与步骤(3)相同抗原的酶标板和表面结合有人IgG的酶标板进行间接法ELISA检测,舍弃有任意一项为阳性反应的所述阳性反应克隆。

[0140] (6) 将剩余的阳性反应克隆再进行几轮必要的克隆化(即重复上述步骤(4) 和(5)),使细胞株稳定。然后用体外培养或制备腹水等方式,进行单抗制备。纯化培养上清或腹水,获得特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体。

[0141] 在本发明的另一些实施方式中,所述单克隆抗体的制备方法包括:将经人免疫复合物免疫后的小鼠的脾脏细胞的总RNA反转录的cDNA为模板的PCR扩增产物克隆至噬菌体中;然后筛选出阳性噬菌体,并对阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达,获得特异性识别抗人免疫复合物的单克隆抗体。

[0142] 在本发明的一些具体实施方式中,所述单克隆抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0143] J1,用第一组人免疫复合物对小鼠进行免疫,免疫结束后,获取小鼠脾脏细胞的总RNA;

[0144] J2,将所述总RNA反转录至cDNA后,以cDNA为模板,利用小鼠IgG特异性引物进行PCR扩增,获得扩增产物;

[0145] J3,将扩增产物克隆至噬菌体中,并将克隆所得噬菌体与结合于固相表面的第二组人免疫复合物进行反应,获取阳性噬菌体;

[0146] J4, 将所述阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达和纯化, 获得特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体。

[0147] 根据本发明, 将与免疫时不同的抗原固定至固相表面, 然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清, 反应后洗涤, 形成结合于固相表面的第二组人免疫复合物。

[0148] 根据本发明, 所述阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达的方式为: 将阳性噬菌体上的抗体基因克隆至合适的表达载体, 然后将表达载体转化到合适的表达细胞中, 进而对抗体基因进行重组表达。

[0149] 本发明中, 所述小鼠对人IgG免疫耐受。本发明所述小鼠的类型无特殊限定, 所述小鼠可为8周左右的Balb/c雄性小鼠。

[0150] 在本发明的另一些具体实施方式中, 所述单克隆抗体的制备方法具体包括以下步骤:

[0151] K1, 用第一组人免疫复合物对小鼠进行免疫, 免疫结束后, 获取小鼠脾脏细胞的总RNA;

[0152] K2, 将所述总RNA反转录至cDNA后, 以cDNA为模板, 利用小鼠IgG特异性引物进行PCR扩增, 获得扩增产物;

[0153] K3, 将扩增产物克隆至噬菌体中, 并将克隆所得噬菌体与结合于固相表面的第二组人免疫复合物进行反应, 获取阳性噬菌体;

[0154] K4, 将所述阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达和纯化, 获得特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体。

[0155] 根据本发明, 将与免疫时不同的抗原固定至固相表面, 然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清, 反应后洗涤, 形成结合于固相表面的第二组人免疫复合物。

[0156] 根据本发明, 所述阳性噬菌体上的抗体基因进行重组表达的方式为: 将阳性噬菌体上的抗体基因克隆至合适的表达载体, 然后将表达载体转化到合适的表达细胞中, 进而对抗体基因进行重组表达。

[0157] 本发明中, 所述小鼠对人IgG免疫耐受。本发明所述小鼠的类型无特殊限定, 所述小鼠可为8周左右的Balb/c雄性小鼠。

[0158] 在本发明的进一步优选的具体实施方式中, 所述单克隆抗体的制备方法具体包括:

[0159] (1) 选取3-5只8周左右的Balb/c雄性小鼠, 在正式免疫前通过尾静脉注射 2mg人IgG以诱导小鼠产生对人IgG的免疫耐受。一周后用第一组人免疫复合物(如待免疫动物的红细胞与人抗该种动物红细胞抗体的免疫复合物)以合适剂量对小鼠进行免疫, 后续进行若干次加强免疫。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, 并提取小鼠脾脏总RNA, 获取小鼠脾脏细胞的总RNA。

[0160] (2) 将所述总RNA反转录至cDNA后, 以cDNA为模板, 利用适当的小鼠IgG特异性引物对所述总RNA进行PCR扩增, 获得扩增产物。

[0161] (3) 将与免疫时不同的抗原固定至固相表面, 然后加入与所述抗原特异反应的阳性人血清, 反应后充分洗涤, 形成结合于固相表面的第二组人免疫复合物。

[0162] (4) 将步骤(2)中的扩增产物克隆至噬菌体中, 并将克隆所得噬菌体与结合于固相表面的第二组人免疫复合物进行反应, 清洗与固相不结合的噬菌体, 洗脱与固相结合的噬

菌体, 获取阳性噬菌体并进行增殖。

[0163] (5) 重复步骤(4)3-4次, 且每次加强洗脱强度, 最终得到与固相上第二组人免疫复合物高度结合的阳性噬菌体。

[0164] (6) 将步骤(5)获得的阳性噬菌体上的抗体基因克隆至合适的表达载体, 然后将表达载体转化到合适的表达细胞中, 进而对抗体基因进行重组表达, 纯化后获得特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体。

[0165] 值得注意的是, 上述检测待测样本中目标抗体的均相免疫测定方法优选为间接均相免疫检测方法。

[0166] 根据本发明, 所述第一抗原为瓜氨酸化抗原。

[0167] 在本发明的一些实施方式中, 所述第一抗原选自合成的含瓜氨酸的环型肽、含瓜氨酸的线型肽、由至少2个单一含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽、含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物和瓜氨酸化蛋白。

[0168] 在本发明的一些优选的实施方式中, 所述第一抗原选自合成的含环瓜氨酸的环形肽、含瓜氨酸的线型肽、由至少2个单一含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽和含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物; 优选所述第一抗原为由2-4个含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽或含有2-4个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物。

[0169] 在本发明的一些优选的实施例中, 所述含瓜氨酸的肽段选自SEQ ID No.1-4。

[0170] 表1

[0171]

序列号	序列
SEQ ID No.1	环-(HQCHQEST-Cit-GRSRGRCGRSGS)
SEQ ID No.2	ARGGSRERARGRGRG-Cit-GEKR
SEQ ID No.3	GGSKTSLYNLR-Cit-GTALAIPQ
SEQ ID No.4	APPPISGGGY-cit-A-cit-PAKAAAT

[0172] 在本发明的一些实施例中, 对于由至少2个单一含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽, 所述第一抗原中多个不同肽段相互之间的摩尔比相同。

[0173] 在本发明的另一些实施例中, 对于含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物, 所述第一抗原中多个不同肽段相互之间的质量比相同。

[0174] 本领域技术人员应该了解的是, 对于选自合成的环瓜氨酸肽、含瓜氨酸的肽段、由至少2个单一含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽和含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物的第一抗原, 为减少空间位阻, 所述第一抗原可以通过中间体与受体相结合, 所述中间体为亲水性高分子物质。

[0175] 在本发明的一些实施例中, 所述中间体为蛋白质, 优选选自血蓝蛋白、卵清蛋白、牛血清白蛋白或牛甲状腺球蛋白。

[0176] 在本发明的另一些实施例中, 所述中间体选自树枝状大分子、聚羧酸酯、聚巯基和聚乙二醇。

[0177] 本发明中对于含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物的第一抗原偶联中间体的方式没有特别的限制, 既可以是单一含瓜氨酸的肽段的分别先偶联中间体,

然后混合形成偶联中间体的瓜氨酸肽段混合物；也可以是单一含瓜氨酸的肽段混合后形成瓜氨酸肽段混合物，然后再偶联中间体形成偶联中间体的瓜氨酸肽段混合物；优选地，单一含瓜氨酸的肽段混合后形成瓜氨酸肽段混合物，然后再偶联中间体形成偶联中间体的瓜氨酸肽段混合物。

[0178] 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总浓度为 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总浓度包括但不限于：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。

[0179] 在本发明的一些实施例中，所述抗免疫复合物抗体及与之结合的特异性结合配对成员中的一员的总浓度为0.1-10 $\mu$ g/mL，优选0.5-5 $\mu$ g/mL，更优选1-3  $\mu$ g/mL。在一些例子中，例如，所述抗免疫复合物抗体及与之结合的特异性结合配对成员中的一员的总浓度包括但不限于：0.5 $\mu$ g/mL、0.8 $\mu$ g/mL、1 $\mu$ g/mL、1.2 $\mu$ g/mL、1.5 $\mu$ g/mL、1.7 $\mu$ g/mL、1.9 $\mu$ g/mL、2 $\mu$ g/mL、2.2 $\mu$ g/mL、2.5 $\mu$ g/mL或 2.8 $\mu$ g/mL。

[0180] 本发明第二方面提供了一种用于检测抗-CCP抗体的均相免疫检测试剂盒，其包含本发明第一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-CCP抗体的均相免疫检测试剂套装装入试剂盒中制得。

[0181] 在本发明第三方面，本发明所涉及的检测待测样本中抗-CCP抗体的均相免疫检测方法包括使用如本发明第一方面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-CCP抗体和/或确定抗-CCP抗体的含量。

[0182] 类似地，本发明所涉及的检测待测样品中抗-CCP抗体的均相免疫检测方法，还包括使用如本发明第二方面所述的均相免疫检测试剂盒来判断测待测样品中是否存在抗-CCP抗体和/或确定抗-CCP抗体的含量。

[0183] 在本发明的一些实施方式中，所述检测待测样品中抗-CCP抗体的均相免疫检测方法包括：

[0184] 步骤S1，将第一抗原与待测样本中的抗-CCP抗体结合，形成由第一抗原-抗-CCP抗体构成的第一免疫复合物；

[0185] 步骤S2，将抗免疫复合物抗体与所述第一免疫复合物结合，形成由第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体所构成的第二免疫复合物；

[0186] 步骤S3，检测第二免疫复合物是否存在；如果第二免疫复合物存在，则表明待测样本中存在抗-CCP抗体。

[0187] 在上述均相免疫检测方法中，步骤S3中通过化学发光的方法检测第二免疫复合物是否存在。

[0188] 根据本发明的一些实施方式，在上述免疫测定方法上述中，所述第一免疫复合物通过第一抗原与供体结合，相应的所述第二免疫复合物通过抗免疫复合物抗体与受体结合，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，所述供体能够在激发状态产生单线态氧。

[0189] 在本发明的一些具体实施方式中，所述方法包括如下步骤：

[0190] T1，将与生物素结合的第一抗原同待检样本中的抗-CCP抗体结合，形成由生物素-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第三免疫复合物；

[0191] T2, 将与受体结合的特异性识别第三免疫复合物中的抗-CCP抗体的抗免疫复合物抗体同第三免疫复合物结合, 形成由生物素-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-受体构成的第四免疫复合物;

[0192] T3, 将与链霉亲和素结合的供体同第四免疫复合物中结合, 形成由供体-链霉亲和素-生物素-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-受体构成的第五免疫复合物;

[0193] T4, 检测第五免疫复合物是否存在; 如果第五免疫复合物存在, 则待测样本中存在抗-CCP抗体;

[0194] 在本发明的一些实施例中, 当第五免疫复合物存在时, 用能量或者活性化合物激发供体产生单线态氧, 所述受体与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号。

[0195] 在本发明的一些实施例中, 所述方法还包括在步骤T1之前制作抗-CCP抗体标准工作曲线的步骤。

[0196] 在本发明的一些实施例中, 在步骤T4, 检测所述化学发光信号的强度, 并基于抗-CCP抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-CCP抗体的含量。

[0197] 在本发明的一些实施例中, 利用600-700nm波长的激发光照射第五免疫复合物, 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, 检测发射光的信号值, 从而判断测待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0198] 在本发明的一些优选的实施例中, 利用680nm波长的激发光照射第五免疫复合物, 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612nm的发射光, 检测发射光的信号值, 从而判断测待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0199] 在本发明的一些具体的实施例中, 所述免疫测定方法具体包括如下步骤:

[0200] (1) 准备如下试剂:

[0201] (i) 待测样本;

[0202] (ii) 第一组合物, 其包含与特异性结合配对成员中的一员相结合, 且能够特异性识别第一免疫复合物中的抗-CCP抗体的抗免疫复合物抗体;

[0203] (iii) 第二组合物, 其包含与第一抗原相结合的供体, 所述供体能在激发状态下生成单线态氧, 所述第一抗原能与抗-CCP抗体特异性结合;

[0204] (iv) 第三组合物, 其包含与特异性结合配对成员中的另一员的受体; 所述受体能与单线态氧反应生成检测信号; 所述特异性结合配对成员中的一员能够与特异性结合配对成员中的另一员特异性结合;

[0205] (2) 允许将试剂(i)、(ii)和(iii)相混合, 如果待测样本中存在抗-CCP抗体, 那么抗-CCP抗体将与第一抗原结合而形成由供体-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第三免疫复合物; 与特异性结合配对成员中的一员相结合的特异性识别人免疫复合物的抗免疫复合物抗体识别所述第三免疫复合物中的目标抗体, 从而与第三免疫复合物结合形成由供体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体构成的第四免疫复合物;

[0206] (3) 允许将试剂(iv)和所述第四免疫复合物相混合, 通过特异性结合配对成员中的一员与特异性结合配对成员中的另一员的特异性结合, 使受体与第四免疫复合物中特异性识别人免疫复合物中的抗免疫复合物抗体间接结合, 进而使供体能够靠近受体, 形成由供体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-受体构成的第五免疫复合物;

[0207] (4) 利用能量或活性化合物激发所述供体生成单线态氧, 第五免疫复合物中的受

体与接触的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号；

[0208] (5) 任选地重复步骤(2) – (4)；

[0209] (6) 分析化学发光信号值,从而判断待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0210] 根据本发明方法,所述方法还包括在步骤(2)之前制作抗-CCP抗体标准工作曲线的步骤。

[0211] 在本发明的一些实施例中,在步骤(6)中,检测步骤(4)中所述化学发光信号的强度,并基于抗-CCP抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-CCP抗体的含量。

[0212] 在本发明的一些优选的实施例中,所述特异性结合配对成员中的一员与特异性结合配对成员中的另一员中的任一种为生物素,另一种为链霉亲和素;优选地,所述特异性结合配对成员中的一员为生物素,特异性结合配对成员中的一员为链霉亲和素。

[0213] 在本发明的一些实施例中,利用600–700nm波长的激发光照射第五免疫复合物,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,检测发射光的信号值,从而判断测待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0214] 本发明中,所述抗免疫复合物抗体为多克隆抗体和/或单克隆抗体;优选地,所述抗免疫复合物抗体为单克隆抗体。

[0215] 在本发明的另一些具体的实施例中,所述免疫测定方法具体包括如下步骤:

[0216] (1) 准备如下试剂:

[0217] (i) 待测样本;

[0218] (ii) 第一组合物,其包含能够特异性识别第一免疫复合物中的抗-CCP抗体的抗免疫复合物抗体,以及与之相结合的受体,所述受体能与单线态氧反应生成检测信号;

[0219] (iii) 第二组合物,其包含与特异性结合配对成员中的一员相结合,且能够与抗-CCP抗体特异性结合的第一抗原;

[0220] (iv) 第三组合物,其包含与特异性结合配对成员中的另一员相结合的供体;所述供体能在激发状态下生成单线态氧;所述特异性结合配对成员中的一员能够与特异性结合配对成员中的另一员特异性结合;

[0221] (2) 允许将试剂(i)、(ii)和(iii)相混合,如果待测样本中存在抗-CCP抗体,那么抗-CCP抗体将与第一抗原结合而形成由供体-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第三免疫复合物;与特异性结合配对成员中的一员相结合的特异性识别人免疫复合物的抗免疫复合物抗体识别所述第三免疫复合物中的目标抗体,从而与第三免疫复合物结合形成由供体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体构成的第四免疫复合物;

[0222] (3) 允许将试剂(iv)和所述第四免疫复合物相混合,通过特异性结合配对成员中的一员与特异性结合配对成员中的另一员的特异性结合,使受体与第四免疫复合物中特异性识别人免疫复合物中的抗免疫复合物抗体间接结合,进而使供体能够靠近受体,形成由供体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-受体构成的第五免疫复合物;

[0223] (4) 利用能量或活性化合物激发所述供体生成单线态氧,第五免疫复合物中的受体与接触的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号;

[0224] (5) 任选地重复步骤(2) – (4)；

[0225] (6) 分析化学发光信号值,从而判断待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-

CCP抗体的浓度。

[0226] 根据本发明方法,所述方法还包括在步骤(2)之前制作抗-CCP抗体标准工作曲线的步骤。

[0227] 在本发明的一些实施例中,在步骤(6)中,检测步骤(4)中所述化学发光信号的强度,并基于抗-CCP抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-CCP抗体的含量。

[0228] 在本发明的一些优选的实施例中,所述特异性结合配对成员中的一员与特异性结合配对成员中的另一员中的任一种为生物素,另一种为链霉亲和素;优选地,所述特异性结合配对成员中的一员为生物素,特异性结合配对成员中的一员为链霉亲和素。

[0229] 在本发明的一些实施例中,利用600-700nm波长的激发光照射第五免疫复合物,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,检测发射光的信号值,从而判断测待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0230] 本发明中,所述抗免疫复合物抗体为多克隆抗体和/或单克隆抗体;优选地,所述抗免疫复合物抗体为单克隆抗体。

[0231] 根据本发明的另一些实施方式,所述第一免疫复合物通过第一抗原与受体结合,相应的所述第二免疫复合物通过抗免疫复合物抗体与供体结合,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,所述供体能够在激发状态产生单线态氧。

[0232] 在本发明的一些具体实施方式中,所述方法包括如下步骤:

[0233] R1,将与受体结合的第一抗原同待检样本中的抗-CCP抗体结合,形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第六免疫复合物;

[0234] R2,将与生物素结合的特异性识别第六免疫复合物中的抗-CCP抗体的抗免疫复合物抗体同第六免疫复合物结合,形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-生物素构成的第七免疫复合物;

[0235] R3,将与链霉亲和素结合的供体同第七免疫复合物中的生物素结合,形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-生物素-链霉亲和素-供体所构成的第八免疫复合物;

[0236] R4,检测第八免疫复合物是否存在;如果第八免疫复合物存在,则待测样本中存在抗-CCP抗体。

[0237] 在本发明的一些实施例中,当第八免疫复合物存在时,用能量或者活性化合物激发供体产生单线态氧,所述受体与单线态氧反应生成可检测的化学发光信号。

[0238] 在本发明的一些实施例中,所述方法还包括在步骤R1之前制作抗-CCP抗体标准工作曲线的步骤。

[0239] 在本发明的一些实施例中,在步骤R4,检测所述化学发光信号的强度,并基于抗-CCP抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-CCP抗体的含量。

[0240] 在本发明的一些实施例中,利用600-700nm波长的激发光照射第八免疫复合物,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,检测发射光的信号值,从而判断测待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0241] 在本发明的一些优选的实施例中,利用680nm波长的激发光照射第八免疫复合物,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612nm的发射光,检测发射光的信号值,从而判断测待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

- [0242] 在本发明的一些具体的实施例中,所述免疫测定方法具体包括如下步骤:
- [0243] (1)准备如下试剂:
- [0244] (i)待测样本;
- [0245] (ii)第一组合物,其包含与特异性结合配对成员中的一员相结合,且能够特异性识别第一免疫复合物中的抗-CCP抗体的抗免疫复合物抗体;
- [0246] (iii)第二组合物,其包含与第一抗原相结合的受体,所述受体能与单线态氧反应生成检测信号,所述第一抗原能与抗-CCP抗体特异性结合;
- [0247] (iv)第三组合物,其包含与特异性结合配对成员中的另一员的供体;所述供体能在激发状态下生成单线态氧;所述特异性结合配对成员中的一员能够与特异性结合配对成员中的另一员特异性结合;
- [0248] (2)允许将试剂(i)、(ii)和(iii)相混合,如果待测样本中存在抗-CCP 抗体,那么抗-CCP抗体将与第一抗原结合而形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第六免疫复合物;与特异性结合配对成员中的一员相结合的特异性识别人免疫复合物的抗免疫复合物抗体识别所述第六免疫复合物中的目标抗体,从而与第六免疫复合物结合形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体构成的第七免疫复合物;
- [0249] (3)允许将试剂(iv)和所述第七免疫复合物相混合,通过特异性结合配对成员中的一员与特异性结合配对成员中的另一员的特异性结合,使供体与第七免疫复合物中特异性识别人免疫复合物中的抗免疫复合物抗体间接结合,进而使供体能够靠近受体,形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-供体构成的第八免疫复合物;
- [0250] (4)利用能量或活性化合物激发所述供体生成单线态氧,第八免疫复合物中的受体与接触的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号;
- [0251] (5)任选地重复步骤(2) - (4) ;
- [0252] (6)分析化学发光信号值,从而判断待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/ 或抗-CCP抗体的浓度。
- [0253] 根据本发明方法,所述方法还包括在步骤(2)之前制作抗-CCP抗体标准工作曲线的步骤。
- [0254] 在本发明的一些实施例中,在步骤(6)中,检测步骤(4)中所述化学发光信号的强度,并基于抗-CCP抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-CCP抗体的含量。
- [0255] 在本发明的一些优选的实施例中,所述特异性结合配对成员中的一员与特异性结合配对成员中的另一员中的任一种为生物素,另一种为链霉亲和素;优选地,所述特异性结合配对成员中的一员为生物素,特异性结合配对成员中的一员为链霉亲和素。
- [0256] 在本发明的一些实施例中,利用600-700nm波长的激发光照射第五免疫复合物,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,检测发射光的信号值,从而判断测待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。
- [0257] 本发明中,所述抗免疫复合物抗体为多克隆抗体和/或单克隆抗体;优选地,所述抗免疫复合物抗体为单克隆抗体。
- [0258] 在本发明的另一些具体的实施例中,所述免疫测定方法具体包括如下步骤:
- [0259] (1)准备如下试剂:
- [0260] (i)待测样本;

[0261] (ii) 第一组合物,其包含能够特异性识别第一免疫复合物的抗免疫复合物抗体,以及与之相结合的供体,所述供体能在激发状态下生成单线态氧;

[0262] (iii) 第二组合物,其包含与特异性结合配对成员中的一员相结合,且能够与抗-CCP抗体特异性结合的第一抗原;

[0263] (iv) 第三组合物,其包含与特异性结合配对成员中的另一员相结合的受体;所述受体能与单线态氧反应生成检测信号;所述特异性结合配对成员中的一员能够与特异性结合配对成员中的另一员特异性结合;

[0264] (2) 允许将试剂(i)、(ii)和(iii)相混合,如果待测样本中存在抗-CCP 抗体,那么抗-CCP抗体将与第一抗原结合而形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体构成的第六免疫复合物;与特异性结合配对成员中的一员相结合的特异性识别人免疫复合物的抗免疫复合物抗体识别所述第六免疫复合物中的目标抗体,从而与第六免疫复合物结合形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体构成的第七免疫复合物;

[0265] (3) 允许将试剂(iv)和所述第七免疫复合物相混合,通过特异性结合配对成员中的一员与特异性结合配对成员中的另一员的特异性结合,使供体与第七免疫复合物中特异性识别人免疫复合物中的抗免疫复合物抗体间接结合,进而使供体能够靠近受体,形成由受体-第一抗原-抗-CCP抗体-抗免疫复合物抗体-供体构成的第八免疫复合物;

[0266] (4) 利用能量或活性化合物激发所述供体生成单线态氧,第八免疫复合物中的受体与接触的单线态氧反应产生可检测的化学发光信号;

[0267] (5) 任选地重复步骤(2)–(4);

[0268] (6) 分析化学发光信号值,从而判断待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0269] 根据本发明方法,所述方法还包括在步骤(2)之前制作抗-CCP抗体标准工作曲线的步骤。

[0270] 在本发明的一些实施例中,在步骤(6)中,检测步骤(4)中所述化学发光信号的强度,并基于抗-CCP抗体标准工作曲线来确定待测样品中抗-CCP抗体的含量。

[0271] 在本发明的一些优选的实施例中,所述特异性结合配对成员中的一员与特异性结合配对成员中的另一员中的任一种为生物素,另一种为链霉亲和素;优选地,所述特异性结合配对成员中的一员为生物素,特异性结合配对成员中的一员为链霉亲和素。

[0272] 在本发明的一些实施例中,利用600–700nm波长的激发光照射第五免疫复合物,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,检测发射光的信号值,从而判断测待测样本中是否存在抗-CCP抗体和/或抗-CCP抗体的浓度。

[0273] 本发明中,所述抗免疫复合物抗体为多克隆抗体和/或单克隆抗体;优选地,所述抗免疫复合物抗体为单克隆抗体。

[0274] 值得注意的是,上述检测待测样本中目标抗体的均相免疫测定方法优选为间接均相免疫检测方法。

[0275] 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°C,时间可以是5–30min;优选地,所述温育的温度可以选自36°C、37°C、38°C、39°C、40°C、41°C或42°C;温育的时间可以选自10min、12min、15min、16min、18min、20min或25min。

[0276] 在本发明第四方面,本发明所涉及的如本发明第一方面所述的均相免疫检测试剂套装在检测待测样品中抗-CCP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-CCP抗体和/或确定抗-CCP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。

[0277] 同样地,本发明所提供的如本发明第二方面所提供的均相免疫检测试剂盒在检测待测样品中抗-CCP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盒来判断测待测样品中是否存在抗-CCP抗体和/或确定抗-CCP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。

[0278] 类似地,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方法在检测待测样品中抗-CCP抗体的存在和/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均相免疫检测试剂套装,并采用如本发明第三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-CCP抗体和/或确定抗-CCP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。

[0279] 类似地,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方法在检测待测样品中抗-CCP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盒,并采用如本发明第三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-CCP抗体和/或确定抗-CCP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。

[0280] 本发明第五方面涉及如本发明第一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-CCP抗体,由此确定所述待测样品中抗-CCP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:

[0281] 步骤M1,提供来自待测主体的待测样品;

[0282] 步骤M2,判断测待测样品中是否存在抗-CCP抗体和/或确定抗-CCP抗体的含量;

[0283] 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-CCP抗体的含量比较;

[0284] 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。

[0285] 在本发明的一些实施方式中,与正常对照样样品相比,所述待测样品中抗-CCP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。

[0286] 在本发明的另一些实施方式中,与正常对照样样品相比,所述待测样品中抗-CCP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。

[0287] 在本发明的又一些实施方式中,与正常对照样样品相比,所述待测样品中抗-CCP

抗体的含量不低于5U/mL是所述待测主体中类风湿性关节炎的诊断性指示物。

[0288] 在本发明中,与类风湿性关节炎对照样品相比,所述待测样品中抗-CCP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。

[0289] 在本发明一些实施方式中,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-CCP抗体的相对含量指示治疗方案的效力。

[0290] 根据本发明方法,在步骤M2中,采用如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-CCP抗体和/或确定抗-CCP抗体的含量。

### [0291] III. 实施例

[0292] 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。

[0293] 实施例1:制备特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体用作抗免疫复合物抗体

[0294] (1) 诱导新西兰大白兔对人IgG免疫耐受

[0295] 购买注射用人免疫球蛋白2.5克,浓度50mg/mL,取20mL在生理盐水进行透析,期间更换透析液3次。将完成透析的人免疫球蛋白在100000g离心力下离心90min,取上层1/3的液体,获得单体人IgG,并测定其浓度。

[0296] 取8只体重在2.5kg左右的雄性新西兰大白兔,每只兔子耳缘静脉注射单体人IgG 10mg,诱导新西兰大白兔对人IgG免疫耐受。

[0297] (2) 制备免疫复合物并用该免疫复合物对兔子进行免疫

[0298] 用5mL注射器预先抽取2mL阿氏液,从每只兔子的耳缘静脉各抽取全血2mL 左右,并与阿氏液迅速混匀,获得含阿氏液的兔全血。

[0299] 将含阿氏液的兔全血转移至15mL离心管中,1000rpm离心5min,弃上清液。用生理盐水重悬浮底层红细胞,1000rpm离心5min,弃上清,重复操作3次充分清洗红细胞并计数。

[0300] 保留 $5 \times 10^9$ 个红细胞,加入10mL正常人血清(正常人血清中含有针对动物红细胞的抗体),轻轻吹吸,使红细胞与人血清充分混匀,室温反应30min,期间不时混匀,以形成红细胞免疫复合物,1000rpm离心5min,弃上清;用生理盐水重悬浮红细胞免疫复合物,1000rpm离心5min,弃上清,重复本步骤3次,最终用5mL生理盐水重悬浮红细胞免疫复合物。按照 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 和 $2 \times 10^9$ 个红细胞的剂量,在第1、3、5天分3次免疫做过人IgG免疫耐受的兔子,免疫部位为背部皮下。

[0301] (3) 评估血清中抗体效价

[0302] 首次免疫后第10和第20天分别抽血,第30天放血处死兔子并收集血清,并用间接法ELISA检测兔血清中抗体效价。

[0303] 具体方法为:利用乙肝核心抗原包被酶标板并用BSA封闭,加入乙肝核心抗体阳性临床血清,并于37℃孵育60min,然后直接加入待评估的稀释后的兔血清 37℃再次孵育60min,洗板,加入HRP标记的羊抗兔IgG工作液37℃孵育60min,洗板,加入TMB底物37℃孵育15min,加入2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应并读数,具体数据如表2-4所示。

[0304] 表2:首次免疫后第10天兔血清中抗体效价

[0305]

稀释倍数	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#
------	----	----	----	----	----	----	----	----

10000	0.1106	0.1694	0.1403	0.1220	0.1446	0.1216	0.1267	0.1145
1000	0.1394	0.5199	0.3102	0.4200	0.3227	0.1721	0.1084	0.2842
100	0.9874	1.8699	1.3351	1.6106	1.3367	0.7115	0.5412	1.1412
10	1.5354	2.5083	2.4371	2.5663	2.5656	1.6474	1.5641	1.6241

[0306] 表3:首次免疫后第20天兔血清中抗体效价

[0307]

稀释倍数	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#
------	----	----	----	----	----	----	----	----

[0308]

10000	0.1124	0.1854	0.1547	0.1624	0.1154	0.1136	0.1101	0.1254
1000	0.3145	0.9654	0.6584	0.8541	0.4651	0.3895	0.1954	0.5412
100	1.3254	1.6741	1.4214	1.5821	1.2451	1.1874	0.8941	1.3512
10	2.5284	2.6541	2.6142	2.6421	2.5641	2.4254	1.5421	2.5142

[0309] 表4:首次免疫后第30天兔血清中抗体效价

[0310]

稀释倍数	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#
10000	0.1074	0.5108	0.3250	0.3951	0.2055	0.1487	0.1243	0.2141
1000	0.6254	1.7009	1.3473	1.5012	1.0031	0.6207	0.3089	1.1254
100	1.9421	2.6115	2.5272	2.5142	2.3392	1.8743	1.1943	2.3241
10	2.6521	2.6685	2.6057	2.5254	2.6493	2.6583	2.0444	2.5214

[0311] (4) 亲和纯化血清中的抗体

[0312] 选取效价高的兔血清2#进行抗体纯化。具体方式如下：

[0313] 取重组乙肝核心抗原100mg,按照GE公司CNBr activated sepharose 4B说明书,将上述乙肝核心抗原偶联至sepharose 4B制成乙肝核心抗原免疫亲和层析柱。取人免疫球蛋白100mg,按同样方法制备人IgG免疫亲和层析柱。

[0314] 取200mL乙肝核心抗体阳性临床血清,20000rpm离心60min,上清用0.22um 过滤器过滤,并上样至乙肝核心抗原免疫亲和层析柱上,用pH值为7.4的0.01M PBS缓冲液冲洗亲和层析柱至无蛋白洗出,获得结合有乙肝核心抗原的抗原抗体免疫复合物的亲和层析柱。

[0315] 取2#兔血清20mL,20000rpm离心60min,上清用0.22um滤器过滤,并上样至结合有乙肝核心抗原的抗原抗体免疫复合物的亲和层析柱上。用pH值为7.4 的0.01M PBS缓冲液冲洗亲和层析柱至无蛋白洗出后,用pH值为3.0的0.1M甘氨酸缓冲液进行洗脱,收集洗脱峰,并用pH值为8.5的3M tris.HCl溶液将pH 及时调节至中性,获得含特异性结合抗原抗体免疫复合物的多克隆抗体的洗脱液。

[0316] 将上述洗脱液通过人IgG免疫亲和层析柱,吸附掉参杂的人乙肝核心抗体,穿透部分即为特异性识别人免疫复合物的多克隆抗体。

[0317] 实施例2:制备特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体用作抗免疫复合物抗体

[0318] (1) 诱导小鼠对人IgG免疫耐受

[0319] 购买注射用人免疫球蛋白2.5克,浓度50mg/mL,取20mL在生理盐水进行透析,期间

更换透析液3次。将完成透析的人免疫球蛋白在100000g离心力下离心90min,取上层1/3的液体,获得单体人IgG,并测定其浓度。

[0320] 取6只6-8周龄的Balb/c雄性小鼠,每只小鼠经尾静脉注射2mg单体人IgG,诱导小鼠对人IgG免疫耐受,一周后进行正式免疫。

[0321] (2) 制备免疫复合物并用该免疫复合物对小鼠进行免疫

[0322] 取3只小鼠,摘除眼球,收集全血至放有10mL阿氏液的15mL离心管,并迅速混匀,获得含阿氏液的小鼠全血。

[0323] 将含阿氏液的小鼠全血1000rpm离心5min,弃上清液。用生理盐水重悬浮底层红细胞,1000rpm离心5min,弃上清,重复本步骤3次,充分清洗红细胞并计数。

[0324] 保留 $5 \times 10^9$ 个红细胞,加入10mL正常人血清(正常人血清中含有针对动物红细胞的抗体),轻轻吹吸,使红细胞与人血清充分混匀,室温反应30min,期间不时混匀,以形成鼠红细胞免疫复合物,1000rpm离心5min,弃上清;用生理盐水重悬浮鼠红细胞免疫复合物,1000rpm离心5min,弃上清,重复本步骤3次,最终用1.5mL生理盐水重悬浮鼠红细胞免疫复合物。加入1.5mL弗氏完全佐剂并完全乳化,经皮下免疫6只做过人IgG耐受的Balb/c小鼠。2周后用同样的方法制备鼠红细胞免疫复合物,并将鼠红细胞浓度调节至 $1 \times 10^9$ 个细胞/mL,经尾静脉注射免疫以上6周BA1b/c小鼠,每只小鼠注射100 $\mu$ l即 $1 \times 10^8$ 个细胞。

[0325] (3) 细胞融合及阳性克隆筛选

[0326] 1) 细胞融合

[0327] 末次尾静脉注射免疫后第三天,处死小鼠,取小鼠脾脏进行细胞融合,细胞融合按经典PEG融合法操作,融合后采用96孔细胞培养板进行培养,获得细胞培养上清液。

[0328] 2) 阳性克隆筛选

[0329] (a) 先进行一轮负筛选,剔除与人IgG有阳性反应的克隆,具体方法如下:

[0330] 将人IgG用ELISA包被缓冲液稀释至5 $\mu$ g/mL,包被酶标板,2-8℃过夜;洗板后,加入2%BSA溶液200 $\mu$ L,37℃孵育1h进行封闭;加入细胞培养上清100 $\mu$ L,37℃孵育1h,弃上清并用PBST洗板3遍;加入HRP标记的羊抗鼠IgG工作液100 $\mu$ L,37℃孵育1h,弃上清并用PBST洗板3遍;加入TMB底物100 $\mu$ L,37℃孵育15min显色,加入2M硫酸终止反应并进行OD<sub>450nm</sub>读数,剔除负筛选阳性反应克隆。

[0331] (b) 在剔除负筛选阳性克隆后进行正筛选,具体方法如下:

[0332] 将重组乙肝核心抗原用ELISA包被缓冲液稀释至5 $\mu$ g/mL,包被酶标板,2-8℃过夜;洗板后,加入2%BSA溶液200 $\mu$ L,37℃孵育1h进行封闭;加入乙肝核心抗体阳性临床血清100 $\mu$ L,37℃孵育1h,再加入细胞培养上清,继续孵育1h;加入HRP标记的羊抗鼠IgG工作液100 $\mu$ L,37℃孵育1h,弃上清并用PBST洗板3遍;加入TMB底物100 $\mu$ L,37℃孵育15min显色,加入2M硫酸终止反应并进行OD<sub>450nm</sub>读数,保留正筛选阳性反应克隆。

[0333] (c) 完成以上正筛选后,再做最后一轮负筛选,具体方法如下:

[0334] 将重组乙肝核心抗原用ELISA包被缓冲液稀释至5 $\mu$ g/mL,包被酶标板,2-8℃过夜;洗板后,加入2%BSA溶液200 $\mu$ L,37℃孵育1h进行封闭;加入细胞培养上清,孵育1h;加入HRP标记的羊抗鼠IgG工作液100 $\mu$ L,37℃孵育1h,弃上清并用PBST洗板3遍;加入TMB底物100 $\mu$ L,37℃孵育15min显色,加入2M硫酸终止反应并进行OD<sub>450nm</sub>读数,剔除负筛选阳性反应克隆。

[0335] 经过以上筛选得到的阳性克隆再经过3轮克隆化操作(重复上述(a)-(b)3次)得

到稳定细胞株。

[0336] 然后用体外培养或制备腹水等方式,进行单抗制备。纯化培养上清或腹水,获得特异性识别人免疫复合物的单克隆抗体。

[0337] 实施例3:利用特异性识别免疫复合物的抗免疫复合物抗体检测抗-CCP抗体 1、制备第一抗原

[0338] (1)按照多肽合成常规操作合成单独肽段,获得SEQ ID No.2和SEQ ID No. 1肽,合成来源于生工生物工程(上海)股份有限公司,HPLC检测纯度为90%以上。

[0339] (2)按照多肽合成常规操作合成串联的多肽,获得SEQ ID No.2序列与SEQ ID No.1序列合成在一条肽段上,形成具有连续的氨基酸序列的多肽,合成来源于生工生物工程(上海)股份有限公司,HPLC检测纯度为90%以上。

[0340] (3)两个肽单独合成,获得SEQ ID No.2和SEQ ID No.1肽。按照多肽合成常规操作合成串联的多肽,合成来源于生工生物工程(上海)股份有限公司, HPLC检测纯度为90%以上。载体蛋白选择牛血清白蛋白BSA(Bovine Serum Albumin) (Roche公司),用交联剂磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸酯(Sulfo-SMCC) (PIERCE公司)连接法将合成的多肽与BSA进行偶联:4.6mgSMCC (334.32MW) 溶解于740ul DMSO,终浓度为20mM。干粉状的合成肽用水溶解至5mg/ml,肽溶液按照质量比1:1,充分混合0.1008gBSA 溶解于2ml PBS-EDTA溶液中,室温静置1h,在BSA溶液中加入100ul SMCC 溶液和4mg多肽室温过夜。用14KD透析膜在0.1M pH7.4PBS缓冲液中透析去除多余小分子和未偶联多肽,纯化后获得双肽偶联BSA的耦合物。

[0341] 2、受体和供体的制备

[0342] 用作本发明的受体和供体的制备方法、组成结构及其组分含量可以参见中国专利CN100429197C(该专利文献在此全文引为参考)中的实施例1。

[0343] 3、第一抗原包被作为受体的发光微粒(试剂1)的制备:

[0344] (1)包被过程

[0345] 1.1取2mg受体(发光微粒)加入离心管,加入0.05M pH9.6CB交联缓冲液,离心7500rpm,15min,弃上清,向离心管中加入400μL交联缓冲液,进行超声清洗微粒,再次离心。

[0346] 1.2加入200μL交联缓冲液将微粒重悬,使微粒浓度为10mg/mL,再加入 0.1mg第一抗原,混匀后将离心管置于37℃,垂直旋转混合器上25-40rpm混匀过夜。

[0347] 1.3将离心管放入2-8℃冷却10min,取4μL的8mg/mL NaBH4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2小时。

[0348] 1.4在离心管中加入32μL的75mg/mL Gly溶液混匀,垂直旋转混合器上 25-40rpm 反应1小时。

[0349] (2)清洗

[0350] 离心管称重配平后,离心7500rpm,15min,弃上清,加入0.1M pH7.4PBST 清洗缓冲液,进行超声清洗微粒。重复两次,再用微粒保存缓冲液清洗一次。

[0351] (3)配制

[0352] 加入工作稀释液,使其工作浓度为25μg/mL,完成试剂1的制备,备用。

[0353] 4、生物素标记抗免疫复合物抗体(试剂2)的制备

[0354] (1)预处理

[0355] 取待处理0.2mg抗体蛋白装入透析袋(截留分子量为14KD)中,将透析袋放入烧杯,在烧杯中加入100倍体积0.1M pH8.0NaHCO<sub>3</sub>透析缓冲液,放在磁力搅拌器上,2-8℃进行透析。至少更换透析液1次,每次至少透析4-5小时。将透析好的蛋白吸出转移至干净离心管中,取样测定蛋白浓度。

[0356] (2) 标记过程

[0357] 取200μL 0.1M pH8.0NaHCO<sub>3</sub>标记缓冲液加入离心管,加入0.1mg抗体蛋白,混匀。再加入配制好的5mg/mL生物素溶液8μL,迅速混匀。2-8℃垂直旋转混合器上25-40rpm反应过夜。

[0358] (3) 透析

[0359] 取待处理生物素标记溶液装入透析袋(截留分子量为14KD)中,将透析袋放入烧杯,在烧杯中加入100倍体积0.1M pH7.4PBS透析缓冲液,放在磁力搅拌器上,2-8℃进行透析。至少更换透析液1次,每次至少透析4-5小时。

[0360] (4) 配制

[0361] 加入工作稀释液,使其工作浓度为1μg/mL,完成试剂2的制备,备用。

[0362] 5、抗-CCP抗体校准品的制备:

[0363] 5.1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 MgCl<sub>2</sub> 0.5mL、0.1M MgCl<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。

[0364] 5.2校准品的配制:用校准品稀释液按照比例梯度稀释成以下浓度的工作校准品2U/mL、10U/mL、50U/mL、150U/mL、300U/mL。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。

[0365] 6、制备样本稀释液和感光液

[0366] 6.1制备样本稀释液

[0367] 采用精密天平精确称量2.90g Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> • 12H<sub>2</sub>O、0.296g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O、添加纯化水800mL混匀30min,调节pH值至7.2±0.2,继续添加8.5g 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。

[0368] 6.2制备供体(感光液)

[0369] (1) 感光微球(供体)混悬液处理

[0370] 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。

[0371] (2) 链霉亲和素溶液配制

[0372] 称量一定量链霉亲和素,加MES缓冲液溶解至8mg/ml。

[0373] (3) 混合

[0374] 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。

[0375] (4) 反应

[0376] MES缓冲液配制25mg/ml的NaBH<sub>3</sub>CN溶液,按照与反应液1:25的体积比加入,迅速混

匀。37℃旋转反应48小时。

[0377] (5) 封闭

[0378] MES缓冲液配制75mg/ml的Gly溶液以及25mg/ml的NaBH<sub>3</sub>CN溶液,按照与反应液2:1:10的体积比加入上述溶液中,混匀,37℃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℃旋转反应16小时。

[0379] (6) 清洗

[0380] 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 100μg/mL,作为感光液使用。

[0381] 7、实验操作:

[0382] 将上述组份组装成抗瓜氨酸肽抗体测定试剂盒后,装载在全自动光激化学发光免疫分析仪上,设置检测步骤:

[0383] 1) 加样Tip头吸取20μL校准品至反应微孔板中;

[0384] 2) 加样Tip头吸取25μL试剂1至反应微孔板中;

[0385] 3) 加样Tip头吸取25μL试剂2至反应微孔板中;

[0386] 4) 水平振荡混匀20秒后37℃孵育17min;

[0387] 5) 加样Tip头吸取175μL作为供体的感光液至反应微孔板中;

[0388] 6) 水平振荡混匀20秒后37℃孵育15min,;

[0389] 7) 在仪器产生激发光照射下,供体(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受体(发光微粒)俘获,从而传递能量以激活受体(发光微粒)中的发光化合物。数微妙后,受体(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;

[0390] 8) 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,得出信号值与抗-CCP抗体浓度之间的方程式;

[0391] 9) 同样再按照步骤1)~7)检测待测样本,由8)中的方程式计算得出待测样本中抗-CCP抗体浓度。

[0392] 8、实验结果

[0393] 8.1 检验工作校准品的线性范围,结果如表5所示:

[0394] 表5

	浓度 U/mL	信号值
	300	470205
[0395]	150	277684
	50	52650
	10	10200
	2	2357
[0396]	0	1294

[0397] 结论:标准曲线度拟合方程R2>0.98。线性范围可达10<sup>2</sup>,具有较宽的线性范围2-300U/mL,满足临床定量测定需求。

[0398] 8.2 灵敏度

[0399] 评价30例类风湿病例组样本和30例健康正常对照组(简称正常对照组)样本,结果如表6和图1所示。

[0400] 表6

病例组			正常组			
血样编号	信号值	浓度 U/ml	血样编号	信号值	浓度 U/ml	
36	2202	1.71	31	1664	0.70	
37	52041	49.60	32	1622	0.62	
38	3216	2.78	33	1674	0.71	
39	6520	5.99	35	1665	0.70	
40	1799	0.95	36	1837	1.02	
41	18569	20.17	37	1649	0.67	
42	2224	1.75	38	1515	0.42	
43	10113	9.90	39	1880	1.10	
44	1602	0.58	40	1862	1.07	
45	3827	3.35	41	1733	0.83	
46	1666	0.70	42	1652	0.67	
[0401]	47	20668	22.61	43	1759	0.87
	48	3053	2.63	44	1936	1.21
	49	9606	9.32	45	1652	0.67
	50	501598	334.93	46	1733	0.83
	51	1788	0.93	47	1712	0.79
	52	5478	4.94	48	2057	1.44
	53	1598	0.57	49	1812	0.97
	19	4472	3.96	50	1982	1.29
	20	1957	1.25	51	1633	0.64
	21	3077	2.65	52	2188	1.68
	22	444508	272.55	53	1849	1.04
	23	171824	104.90	54	1673	0.71
	24	41550	42.19	55	1618	0.61
	26	3165	2.74	56	1609	0.59

	27	52707	50.04	57	1494	0.38
	28	82544	66.64	58	1648	0.67
[0402]	56	3132	2.70	59	1662	0.69
	57	5796	5.26	60	1573	0.52
	58	2040	1.40	61	1827	1.00

[0403] 结论:从表6和图1可以看出,阳性反应明显,病例组与正常组区分明显,认为一步法反应模式成立,所使用的抗免疫复合物抗体能够很好的区分已结合抗原的抗体和未结合抗原的抗体,从而反应过程无需通过洗涤去除未结合抗原的抗体。

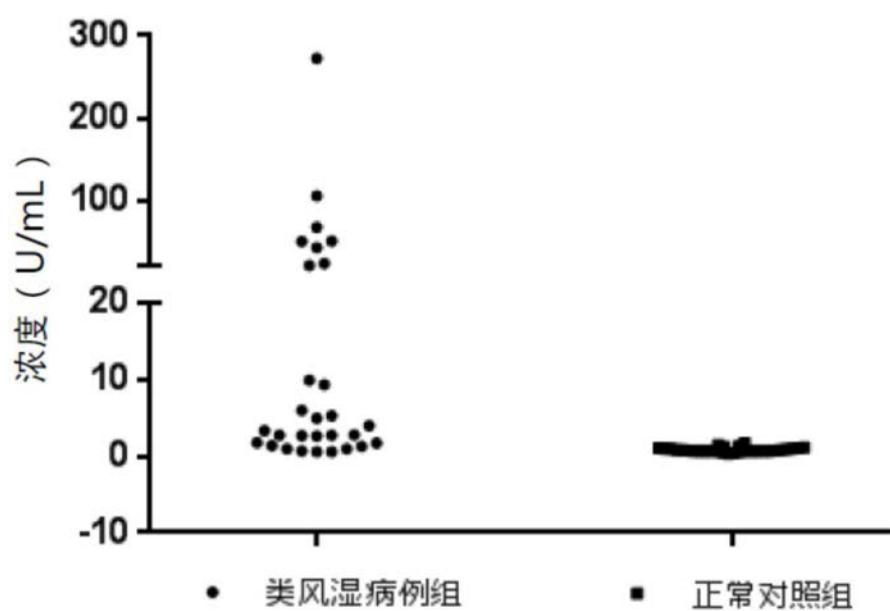
[0404] 通过对串联形成多肽的单一含瓜氨酸的肽段的量进行考察实验,结果表明,对于由至少2个单一含瓜氨酸的肽段合成在一条肽链上形成的多肽,多个不同肽段相互之间的摩尔比相同时,所制得的多肽的活性最高。

[0405] 通过对形成瓜氨酸肽段混合物的单一含瓜氨酸的肽段的量进行考察实验,结果表明,对于含有至少2个单一含瓜氨酸的肽段的瓜氨酸肽段混合物,多个不同肽段相互之间的质量比相同时,所制得的瓜氨酸肽段混合物的活性最高。

[0406] 将上述瓜氨酸肽段混合物偶联BSA后制成本发明的试剂盒用于临床血清样本测试,检测结果表明,该试剂盒的临床应用效果与实施例3制备的试剂盒处于同一水平。

[0407] 采用按照专利PCT/US2010/025433中记载的实施例中的制备方法来制备的第一抗原包被的受体,其结构为第一抗原-BSA-(二甲基噻吩)-(BHCT),其为非粒子形式,且在含水介质中可溶。利用该第一抗原包被的受体以及与实施例3中其他相应的试剂制备的试剂盒用于临床血清样本测试,检测结果表明,该试剂盒的临床应用效果与实施例3制备的试剂盒处于同一水平甚至更好。

[0408] 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。



专利名称(译)	检测抗CCP抗体的均相免疫检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110161232A</a>	公开(公告)日	2019-08-23
申请号	CN201810143149.3	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	饶星 廖智星 刘宇卉 李临 其他发明人请求不公开姓名		
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		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558		
代理人(译)	方莉		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

**摘要(译)**

本发明涉及一种抗-CCP抗体均相免疫检测试剂盒。该试剂盒采用高灵敏度和特异性瓜氨酸化牛血清白蛋白作为抗原，结合能够区分出免疫复合物状态下的抗体和非特异性抗体、未结合抗原的游离的特异性抗体的抗免疫复合物抗体和光激化学发光技术制成。该试剂盒在检测过程中不受非特异性抗体的干扰而可以省略传统间接法中需要洗涤的过程。该试剂盒特异性高、灵敏度好、线性范围宽、反应速度快、操作简便，并可实现全自动化高通量测试。

