

C-反应蛋白放射免疫分析试剂盒的研制

袁志刚, 贾娟娟, 韩世泉, 刘一兵

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

摘要: C-反应蛋白是动脉粥样硬化血栓形成的生物标志物。定期检测血液中 C-反应蛋白含量的变化对预测心血管疾病的发生和发展有重要意义。本研究开发的 C-反应蛋白放射免疫分析试剂盒的测量范围为 1~50 mg/L, 灵敏度为 0.30 mg/L, 回收率为 91.7%~114.0%, 批内、批间平均变异系数分别为 3.4% 和 6.3%; 高浓度血样系列倍比稀释后测定, 实测值和计算值呈线性相关, 相关系数 >0.990 。这将为检测心血管疾病的发生、治疗及预后提供方便。

关键词: C-反应蛋白; 放射免疫分析; 动脉粥样硬化; 心血管疾病;

中图分类号: R446.61

文献标志码: A

文章编号: 1000-6931(2008)S0-0068-04

Development of Radioimmunoassay Kit for C-Reactive Protein

YUAN Zhi-gang, JIA Juan-juan, HAN Shi-quan, LIU Yi-bing

(Isotope Department, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China)

Abstract: C-reactive protein (CRP) is a biomarker of thrombosis in atherosclerosis. Therefore, it is important for us to regularly detect the level of CRP in serum, which would predict cardiovascular disease's occurrence and development. A radioimmunoassay method was established for detecting CRP in our lab. The measurement range of the assay is 1-50 mg/L, sensitivity is 0.30 mg/L, recovery rate is 91.7%-114.0%. Intra- and inter-assay variation coefficients are 3.4% and 6.3%, respectively. The correlation coefficients between measured and expected values are more than 0.990 after serial dilution of the serum samples with high concentrations of CRP. The kit would provide a convenience in the control, treatment and prognosis of cardiovascular disease.

Key words: CRP; radioimmunoassay; atherosclerosis; cardiovascular disease

C-反应蛋白(CRP)最初被称为 C-反应素, 是由 Tillet 等在 1930 年提出的, 他们发现肺炎病人的血清可与肺炎球菌荚膜 C 多糖物质形成复合物, 由此推断血清中存在一种物质, 并将之定名为 C-反应素。1941 年, Aberneth 确认 C-反应素为蛋白质, 并称之为 CRP。CRP

不仅在肺炎病人的血清中可检测到, 在动脉粥样硬化斑块中也可检测到。在动脉粥样硬化斑块中, CRP 主要与部分降解的低密度脂蛋白结合。1999 年, Ross 提出动脉粥样硬化属于炎症性疾病并得到证实。目前对 CRP 的研究已颇为深入, 它在进化过程中高度保守, 是一种宿

主防御分子。它能够与修饰的低密度脂蛋白以及凋亡细胞的磷酸胆碱配体结合并掩饰它们的毒性。该过程中 CRP 所形成的复合物是通过 CRP 配体激活其补体来实现^[1]。另外,CRP 在心血管疾病的形成中也发挥作用,有人提出炎症可能是连接高血压和动脉粥样硬化的桥梁^[2]。

正常人血清中,CRP 含量小于 10 mg/L。CRP 含量 > 2.1 mg/L 的人是含量 < 1 mg/L 者发生心肌梗塞几率的 2.9 倍,发生缺血性中风的 1.9 倍,发生外周动脉血管性疾病的 4.1 倍^[3]。对于老年人,即使对传统的冠心病发病危险因素进行校正之后,如果其体内的 CRP 水平 > 3.0 mg/L,他们发生冠心病的危险性会增加近 50%^[4]。有人将 CRP 的分界点定义为 3 mg/L^[5]。

目前,国外已有用于针对心血管疾病方面的 CRP 检测试剂盒,而国内所用的试剂盒基本为代理商提供,价格昂贵。所以,本工作拟研制针对心血管疾病的 CRP 试剂盒,该试剂盒既有良好的应用前景,又存在一定的挑战。

1 实验材料

CRP, BIODESIGN 公司产品; Na¹²⁵I, 活度浓度约为 11 MBq/L, 美国杜邦公司产品; 温育液(含 0.2% BSA 和 0.1% NaN₃ 的 0.05 mol/L、pH=7.4 的磷酸(PB)缓冲液)和分离试剂,均为本实验室配制; CG-12 型 γ 计数器, 美国德普公司产品; 紫外分光光度计, Varian 公司产品。

2 实验方法

2.1 CRP 标记

采用氯胺 T 法^[5]进行碘标记。在 100 μ L PB 缓冲液(0.1 mol/L、pH=7.4)中加入 30 μ L 1 g/L CRP、约 37 MBq Na¹²⁵I, 混匀, 加入 4.5 μ L Ch-T (1 g/L), 混匀反应 2 min 后加入 4.5 μ L 偏重亚硫酸钠(2 g/L)终止。用 G-25 凝胶柱分离标记物, 于 4~8 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.2 CRP 标准的配制

将 1 g/L CRP 经紫外测定校正后, 用温育液配制成 1、2、5、10、20 和 50 mg/L CRP 标准品, 并以每瓶 1 mL 分装, 4~8 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.3 CRP 的放射免疫分析(RIA)程序

向放免管中依次加入 100 μ L 标准品、

100 μ L ¹²⁵I-CRP, 混匀, 加入 100 μ L 抗 CRP 抗血清, 于 37 $^{\circ}$ C 下温育; 然后, 每管加入 500 μ L 分离试剂, 摇匀, 室温放置 15 min, 以 3 500 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 之后, 测沉淀的放射性计数。以 B/B_0 (B 为各标准管的计数率 (min^{-1}), B_0 为零标准管的计数率 (min^{-1})) 为纵坐标, 标准品浓度为横坐标, 在半对数坐标下绘制标准曲线。

3 实验结果

3.1 抗体稀释度曲线

采用放射免疫分析方法对抗体进行滴度测定, 结果示于图 1。由图 1 可知, 抗体稀释 1.5×10^5 倍后, 结合率 B/T 为 50%, 则抗体滴度为 $1 : 1.5 \times 10^5$ 。

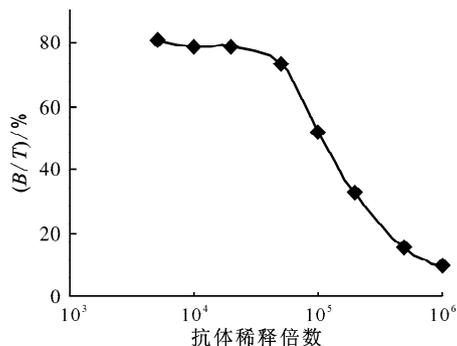


图 1 抗体稀释度曲线

Fig. 1 Curve of antibody dilution

3.2 抗体的亲和性

采用 Scatchard 作图法算得抗体的亲和常数为 6.4×10^{10} L/mol, 表明抗体的亲和性较高。

3.3 标记物比活度的选择

在抗体工作浓度为 $1 : 2\ 000$ 时, 绘制不同标记物比活度下 CRP 标准曲线, 结果示于图 2。可看出, 比活度为 17.8 GBq/g 时, 得到的标准曲线更能满足在心血管疾病方面的预测, 所以, 选择标记物比活度约为 17.8 GBq/g。

CRP 在心血管疾病预测上的临界点为 3 mg/L, 它需要的免疫分析测量范围较宽。本实验中直接得到的标记物比活度不能满足分析的需要, 因此, 加入未标记的 CRP 降低标记物比活度来满足需要。

3.4 反应动力学

反应时间对分析的影响示于图 3。其中:

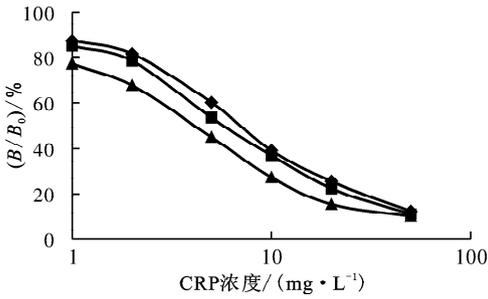


图2 比活度对C-反应蛋白RIA标准曲线的影响

Fig. 2 Effect of different marker activity for CRP RIA standard curves

◆——35.5 GBq·g⁻¹; ■——17.8 GBq·g⁻¹;
▲——7.03 GBq·g⁻¹

NSB 为非特异结合; S₀ 为零标准点; S₂、S₁₀、S₅₀ 分别为 2、10、50 mg/L 标准点。从图 3 可看出, 系列标准品与 CRP 反应, 在 30 min 均可达到平衡。本工作选反应时间为 45 min。

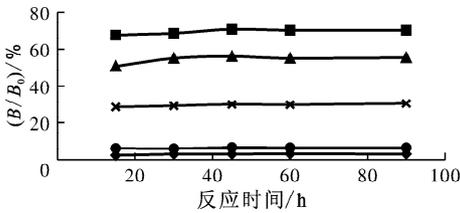


图3 反应动力学曲线

Fig. 3 Curves of reaction kinetics

◆——NSB; ■——S₀; ▲——S₂; ×——S₁₀; ●——S₅₀

3.5 方法学鉴定

1) 灵敏度。同时测定 20 个“零”标准的放射性计数率(min^{-1}), 以其 $\bar{x}-2s$ 在曲线上对应的浓度为灵敏度, 测得灵敏度为 0.30 mg/L。

2) 精密度。采用本方法对 3 种不同浓度的 CRP 溶液重复测定, 计算批内、批间变异系数, 结果列于表 1。

表1 批内、批间变异系数测定结果

Table 1 Intra- and inter-assay variation coefficients

样品	批内(n=10)			批间(n=10)		
	\bar{x}	s	CV/%	\bar{x}	s	CV/%
低	2.73	0.10	3.6	2.79	0.16	5.8
中	8.77	0.14	1.6	9.67	0.57	5.8
高	16.91	0.86	5.0	18.53	1.34	7.2

注: \bar{x} 、s 的单位均为 mg/L

3) 健全性。一份高值血样经系列倍比稀释后测定其 CRP 浓度, 结果列于表 2。对表 2 数据进行处理, 得到稀释度和测量值的相关方程为 $y=40.5x+0.98$, $r=0.999$ 。说明血样经倍比稀释后, 不影响测量结果, 同时说明本试剂盒健全性良好。

4) 回收率。向一份血样中加入 3 种不同浓度的 CRP, 测定其回收率, 结果列于表 3。本方法回收率为 91.7%~114.0%。

表2 健全性实验结果

Table 2 Result of perfection

稀释倍数	CRP 浓度/(mg·L ⁻¹)	
	计算值	测定值
1		41.23
2	21.24	22.05
4	11.10	10.66
8	6.04	5.7
16	3.51	2.84
32	2.24	1.55
64	1.61	1.04

表3 回收率实验结果

Table 3 Result of recovery rate

加入量/ (mg·L ⁻¹)	测定值/ (mg·L ⁻¹)	计算值/ (mg·L ⁻¹)	回收率/ %
0	7.81		
2.5	10.35	10.31	101.6
10	16.98	17.81	91.7
25	36.31	32.81	114.0

3.6 稳定性实验

1) 抗体的稳定性。将抗体用温育液以 1:2 000 稀释后于 37 °C 保存, 考察抗血清在 37 °C 的稳定性, 结果示于图 4。由图 4 可知, 21 d 内各标准点的 B/T 基本无变化, 即抗血清在 37 °C 下放置 21 d, 活性基本未变化, 说明本工作制得的抗体稳定性良好。

2) 标记物的稳定性。由于 CRP 标记物在 -20 °C 下极易失活, 所以, 考察其 4 °C 和 37 °C 下的稳定性, 结果示于图 5。可见, 标记物在 4 °C 下存放 42 d 内, 各标准点的 B/T 变化不大, 即标记物在 4 °C 下可稳定存放 42 d (图 5a); 标记物在 37 °C 下存放 21 d, 各标准点

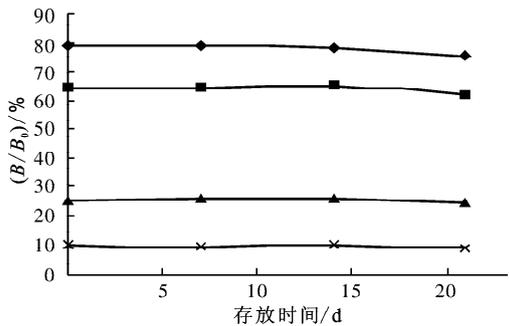


图 4 抗体 37 °C 下的稳定性

Fig. 4 Stability of antibody at 37 °C

◆—S0; ■—S1; ▲—S10; ×—S50

的 B/T 基本未变化(图 5b),表明标记物在 37 °C 下可存放 21 d。

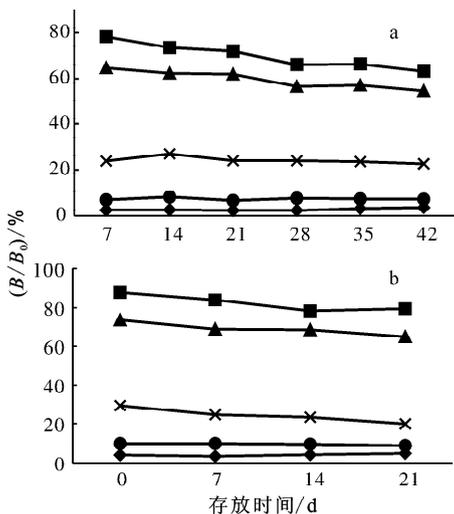


图 5 标记物在 4 °C (a) 和 37 °C (b) 下的稳定性

Fig. 5 Stability of marker at 4 °C (a) and 37 °C (b)

◆—NSB; ■—S0; ▲—S1; ×—S10; ●—S50

3) 标准品的稳定性。标准品在 37 °C 下、21 d 内比较稳定(表 4)。

3.7 试剂盒测量结果

本方法测定范围为 1~50 mg/L。这样,本方法能很好地区别在健康人中,不同 CRP 含量的人与心血管疾病之间的关系。对 76 例正常血样,82 例心血管病人血样及一些一般炎症血样进行了测定,正常值的范围为 0~9.69 mg/L,心血管值的范围为 0~109 mg/L。从样品的测定值上看,本试剂盒能很好地测定

表 4 标准品在 37 °C 下的稳定性

Table 4 Stability of standard preparation on 37 °C

标准点	不同时间标准品中的 CRP 含量/(mg · L ⁻¹)			
	0 d	7 d	14 d	21 d
1	1	0.98	0.98	0.70
2	2	1.96	1.75	1.33
3	5	5.11	4.38	3.57
4	10	9.56	7.78	7.41
5	20	20.66	17.32	23.05
6	50	56.42	45.91	48.26

出正常血样和心血管血样中的 CRP 高风险值,并能很好地与一般炎症值区分开。

在试剂盒的研制过程中,得到了王凤林、赵铁占等的帮助,在此深表感谢。

参考文献:

- [1] MONIEK P M, FRITS H C K. Relationship between CRP and clinical course of unstable angina depends on assay method[J]. *Vascul Pharma*, 2002, 39(3): 113-115.
- [2] 李建军. 炎症可能是联接高血压和动脉粥样硬化的桥梁[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2005, 5(1):385-388.
LI Jianjun. Inflammation may be a bridge linked between hypertension and atherosclerosis [J]. *Molecular Cardiology of China*, 2005, 5(1): 385-388(in Chinese).
- [3] CAO J J, ARNOLD A M, MANOLIO T A, et al. Association of carotid artery intima-media thickness, plaques, and C-reactive protein with future cardiovascular disease and all-cause mortality: The cardiovascular health study[J]. *Circulation*, 2007, 116(1): 32-38.
- [4] SCHWEDLER S B, FILEP J G, GALLE J, et al. C-reactive protein: A family of proteins to regulate cardiovascular function[J]. *Am J Kidney Dis*, 2006, 47(2): 212-222.
- [5] CURRIE C J, POOLE C D, CONWAY P. Evaluation of the association between the first observation and the longitudinal change in C-reactive protein, and all-cause mortality [J]. *Heart*, 2008, 94(4): 457-462.