

# 一种定量检测人血清高敏 C 反应蛋白的化学发光免疫方法

刘平果<sup>1\*</sup>, 李国强<sup>2\*</sup>, 陈毅歆<sup>2</sup>, 罗海峰<sup>2</sup>, 黄德党<sup>2</sup>, 王颖彬<sup>2</sup>, 葛胜祥<sup>2</sup>, 张军<sup>2</sup>, 夏宁邵<sup>2</sup>

1 厦门大学附属中山医院 肝胆外科, 厦门 361004

2 厦门大学生命科学学院 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门 361005

**摘要:** 旨在建立一种可定量检测人血清高敏 CRP 的化学发光检测方法 (High-sensitivity C-reactive protein quantifiable chemiluminescent immunoassay, hs-CRP CLIA)。首先利用亲和层析和离子交换层析技术从肝硬化病人腹水中纯化出高纯度的天然 CRP 作为免疫原制备了 22 株 CRP 单克隆抗体 (单抗), 其中 13 株单抗在磷酸胆碱配体捕获 ELISA 中呈阳性, 然后利用方正滴定法筛选出单抗 10C5 和 10C11 建立了 hs-CRP CLIA。试剂盒评估结果显示: 该方法对血清中干扰物质 IgG、血红蛋白、甘油三酯等无非特异性反应; 该方法检测灵敏度高, 在 0.04~20.38 mg/L 范围内定量检测人血清 CRP 标准品呈良好线性关系 ( $R^2 > 0.993$ ); 该方法准确性高、可重复性好, 平均回收率为 99%, 批内差为 4.2%~5.8%, 批间差为 9.0%~11.5%; 该方法与进口商品化高敏 CRP ELISA 试剂盒平行比较检测 90 份血清标本, 结果显示两者有良好的可比性 ( $r=0.968$ )。综上, 建立的 hs-CRP CLIA 是一种准确、可靠、可定量的高灵敏 C 反应蛋白检测方法, 该方法的临床应用, 有利于改善我国心脏病风险评估及肠炎性疾病预后判断。

**关键词:** 高敏, C 反应蛋白, 单克隆抗体, 化学发光, 心血管疾病, 肠炎性疾病

## Chemiluminescent immunoassay for high-sensitivity C-reactive protein

Pingguo Liu<sup>1\*</sup>, Guoqiang Li<sup>2\*</sup>, Yixin Chen<sup>2</sup>, Haifeng Luo<sup>2</sup>, Dedang Huang<sup>2</sup>, Yingbin Wang<sup>2</sup>, Shengxiang Ge<sup>2</sup>, Jun Zhang<sup>2</sup>, and Ningshao Xia<sup>2</sup>

1 Department of Hepatobiliary Surgery, Zhongshan Hospital, Xiamen University, Xiamen 361004, China

2 National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Abstract:** We developed a high-sensitivity C-reactive protein quantifiable chemiluminescent immunoassay (hs-CRP CLIA). The high-purity native CRP was purified from hepatic cirrhosis patient ascetic fluid by affinity and ion exchange chromatography and used as an immunogen to develop the monoclonal antibodies (mAbs) against CRP. Twenty-two mAbs were identified reactive with CRP in ELISA and 13 of them were reactive in the phosphorycholine ligand capture ELISA. The mAbs 10C5 and 10C11 were selected to develop the hs-CRP CLIA. The linearity and performance of the hs-CRP CLIA was characterized. It was showed not

**Received:** February 3, 2010; **Accepted:** April 12, 2010

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program (863 Program) (No. 2006AA020905), Fujian Medical Innovation Program (No. 2009-CXB-55).

**Corresponding author:** Yixin Chen. Tel: +86-592-2188393; Fax: +86-592-2181258; E-mail: yxchen2008@xmu.edu.cn

\*These authors contributed equally to this work.

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA020905), 福建省医学创新课题 (No. 2009-CXB-55) 资助。

reactive when testing against other serum materials (IgG, hemoglobin and triglyceride). The reliable correlation ( $R^2 > 0.993$ ) was obtained between testing value (RLU/S) and the concentration of human serum CRP calibrator. The linearity fell in the range of 0.04–20.38 mg/L. The assay has good accuracy and reproducibility, the mean recovery was 99% and the precision of the intra- and inter assay was CVs (4.2%–5.8%) and (9.0%–11.5%), respectively. In testing of 90 human sera, this assay performed well and correlated comparably with a commercial hs-CRP ELISA kit. Thus, hs-CRP CLIA is an accurate, reliable, quantifiable assay for detection of high-sensitive C-reactive protein in serum, it may be useful to improve the risk assessment of cardiovascular disease and the prognosis of inflammatory bowel disease.

**Keywords:** high-sensitivity, C-reactive protein, monoclonal antibody, chemiluminescent, cardiovascular disease, inflammatory bowel disease

C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 是一种能与肺炎球菌 C 多糖发生沉淀反应的血浆急性时相蛋白<sup>[1]</sup>。正常人体血浆中 CRP 浓度一般低于 10 mg/L, 在机体出现疾病炎症或组织损伤的 6~8 h 后血浆中 CRP 浓度迅速升高上百倍, 在炎症消除后血浆 CRP 以 4~9 h 半衰期快速减少至 10 mg/L 以下, 即体内 CRP 水平升高幅度与炎症感染程度呈正相关, 因此 CRP 在临床上常被用作炎症检测指标<sup>[2]</sup>。在研究发现炎症是冠状动脉粥样硬化形成的重要因素后<sup>[3-4]</sup>, CRP 作为一种优秀的炎症标志物引起了许多心血管疾病专家的兴趣<sup>[5]</sup>。目前国内外已有大量临床流行病学研究结果证实 CRP 是一个理想的心血管疾病发病风险预测指标, 人血浆中 CRP 在 0~10 mg/L 范围内的浓度高低与未来发生心血管疾病的风险高低有关<sup>[6-13]</sup>。因此, CRP 还是一个评估心脏病发生率、复发率、死亡率的临床重要指标。

临床上使用的 CRP 诊断试剂大致分成 2 大类<sup>[14]</sup>: 第一类是普通 CRP 诊断试剂, 其检测灵敏度较低, 检测下限不低于 3 mg/L, 用作鉴别 CRP 浓度介于 10~40 mg/L 间的慢性炎症和介于 40~200 mg/L 间的急性炎症。第二类是高敏 CRP 诊断试剂 (High-sensitivity CRP, hs-CRP), 其检测灵敏度高, 检测下限可低于 0.3 mg/L, 能准确定量 0.1~10 mg/L 浓度范围内的 CRP, 使临床上根据血浆 CRP 在 0~10 mg/L 范围内的浓度高低评估心脏病发病风险的方式得以实现。国外已有基于多种不同方法学的商品化 hs-CRP 诊断试剂盒, 包括乳胶增强比浊法、酶联免疫吸附法、免疫层析法、化学发光法等<sup>[15]</sup>。其中 Dade Behring 公司的乳胶增强比浊法产品是第一个被美国 FDA 批准的专门用于心血管疾病风险评估的国际标准 hs-CRP 试剂盒, 由于该产品需要配备

大型生化分析仪、且价格较高, 因而限制了自身的推广应用<sup>[16]</sup>。免疫层析法产品虽然具有操作方便的优点, 但其分析灵敏度、定量分析性能等问题仍有待完善。化学发光法与酶联免疫法是新的 hs-CRP 测定方法, 具有更高的灵敏度、准确度、重复性及成本低等优势, 其中化学发光法的定量分析能力比 ELISA 更好, 技术也较成熟, 容易被临床单位接受, 具有较好的应用前景。目前我国临床心脏病风险预测尚较少使用 hs-CRP 检测指标, 除了我国此方面研究起步比国外晚之外, 最主要原因是 hs-CRP 试剂盒主要依赖进口, 价格昂贵不利于大规模推广使用, 虽然近年来国内诊断公司也有新开发的 hs-CRP 试剂盒, 但其关键单抗原料也多依赖进口<sup>[17-18]</sup>。因此, 本研究目的是建立天然 CRP 及其特异性单抗的原料制备方法, 然后以识别天然 CRP 的单抗为原料, 基于化学发光检测技术建立一种国产 hs-CRP 化学发光定量检测试剂盒 (hs-CRP CLIA)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

用作实验对照和特异性分析的材料包括: 人血清 CRP 标准品 (Human serum CRP calibrator, Dako Cytomation)、兔抗 CRP 多抗 (Dako Cytomation)、商品化 CRP 纯化蛋白 (Calbiochem)、人 IgG (南京奥多福尼生物科技有限公司)、血红蛋白标准品 (上海楷洋生物技术有限公司)、甘油三酯 (上海汇普工业化学品有限公司)。富含天然 CRP 蛋白的肝硬化病人腹水来自厦门大学附属中山医院; 人血清标本来自厦门市中心血站。

### 1.2 CRP 蛋白的纯化及鉴定

首先使用高速离心方法 (23 000×g, 30 min) 除

去人腹水中的杂质；然后用磷酸胆碱亲和介质 (Immobilized p-Amino phenyl Phosphoryl Choline Gel, PC-Gel, Pierce) 按操作说明书提供的方法从腹水中提取出粗纯的 CRP 蛋白；然后用 SDS-PAGE 鉴定出含有目标产物的洗脱峰样品，继续在 HPLC 上用阴离子交换层析柱 (Super Q 5PW 7.5×7.5, TOSOH) 纯化，用含有 0.15~1 mmol/L NaCl 的 Tris-HCl 溶液进行梯度洗脱，最终得到高纯度的 CRP 蛋白透析到含有 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的 Tris-HCl 缓冲液中长期保藏于 -70℃ 冰箱。CRP 蛋白纯度使用 SDS-PAGE 鉴定，CRP 特异性使用 CRP 兔多抗进行 Western blotting 鉴定，CRP 分子量大小使用 G5000 分子筛层析柱 (G5000 PW 7.8×30, TOSOH) 鉴定。

### 1.3 CRP 单克隆抗体的制备

按常规杂交瘤制备方法<sup>[19]</sup>，选用 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 (北京维通利华公司)，经皮下注射免疫天然 CRP 蛋白，免疫剂量为 100 μg/只，初免用等量福氏完全佐剂，免疫加强用等量不完全福氏佐剂，加强免疫 4 次，免疫间隔 2 周，融合前 3 天静脉注射 100 μg 天然 CRP 蛋白。收集免疫小鼠的脾脏 B 细胞与小鼠骨髓瘤细胞株 (Sp2/0-Ag14, Sp2/0) 用 PEG 1500 进行细胞融合，形成的杂交瘤细胞经过 ELISA 检测、克隆化操作、腹水诱导和纯化获得纯化 CRP 单抗。单抗采用改良过碘酸钠法<sup>[19]</sup>标记辣根过氧化酶 (HRP)。

### 1.4 间接 ELISA

使用间接 ELISA 筛选 CRP 单抗。使用含 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 稀释天然 CRP 蛋白，按 100 ng/孔包被在 96 孔微孔板上，37℃ 孵育 2 h；然后使用含 2% 明胶的 PB 缓冲液在 37℃ 下封闭 2 h，甩干封闭液，真空密封保存备用。检测时每孔加入 50 μL 单抗杂交瘤细胞上清，37℃ 孵育 30 min，用 1×PBST (北京万泰生物药业股份有限公司) 洗板 5 次，加入标记 HRP 的羊抗鼠二抗 100 μL，37℃ 孵育 30 min，PBST 洗板 5 次，加入显色液，10 min 后在微孔酶标仪 (TECAN) 读值。

### 1.5 配体捕获 ELISA

将天然 CRP 特异性配体偶联蛋白 (如 PC-BSA) 预包被于聚乙烯微孔板上，再通过配体将五聚体 CRP 结合于微孔板上，避免直接包被导致天然 CRP

抗原性发生改变，该方法可鉴定 CRP 单抗对天然 CRP 的捕获能力<sup>[20]</sup>。在 96 孔微孔板上包被 800 ng/孔的 PC-BSA (BioResearch Technologies)，37℃ 孵育 2 h，然后使用含 2% 明胶的 PB 缓冲液在 37℃ 下封闭 2 h，甩干封闭液，真空密封保存备用。检测时加入 20 ng/孔天然 CRP 蛋白，37℃ 孵育 30 min，再加入 50 μL 分泌 CRP 单抗的杂交瘤细胞上清，37℃ 孵育 30 min，PBST 洗板 5 次，加入预稀释的羊抗鼠 HRP 标记二抗 100 μL，37℃ 孵育 30 min，PBST 洗板 5 次，加入显色液，10 min 后在微孔酶标仪 (TECAN) 读值。

### 1.6 CRP 化学发光免疫检测方法的建立

将纯化后的 CRP 捕获单抗用 20 mmol/L 的磷酸缓冲液 (PB, pH 7.4) 溶解，按每孔 100 ng 包被于聚乙烯微孔板上，37℃ 孵育 2 h，放置 4℃ 过夜，PBST 洗液洗板 1 次，37℃ 封闭 2 h。甩干封闭液，真空密封保存备用。检测时加入 100 μL 样品，37℃ 孵育 30 min，PBST 洗板 5 次，加入 100 μL CRP 酶标单抗，37℃ 孵育 30 min，PBST 洗板 5 次，加入化学发光显示底物 (Pierce)，在 Orion II 微孔板式化学发光检测仪 (Berthold) 上读取 RLU/S 值。

### 1.7 hs-CRP CLIA 的实验室评估

利用本研究建立的 hs-CRP CLIA 检测不同浓度的 IgG、血红蛋白标准品、甘油三酯等血清中常见干扰物质以判定该方法的检测特异性；检测不同浓度范围的人血清 CRP 标准品，采用回归分析确定该方法的线性检测范围；通过回收率实验和精密度实验判定该方法的准确性和可重复性。

### 1.8 hs-CRP CLIA 与同类试剂盒的比较

美国 BIOCHECK 公司生产的 hs-CRP ELISA 试剂盒是一种已通过美国 FDA 和中国 SFDA 认证的高敏 C 反应蛋白商品化试剂盒，选择该对照试剂盒与本研究建立的 hs-CRP CLIA 平行检测 90 份人血清标本，使用微孔酶标仪 (TECAN 公司) 读值，检测结果作线性回归分析。

## 2 结果

### 2.1 天然 CRP 蛋白的制备

病人腹水经亲和层析和离子交换层析两步纯化得到天然 CRP，再经 SDS-PAGE 鉴定纯度。如图 1A

所示,泳道 1 为经 PC-Gel 亲和介质一步纯化得到的粗纯 CRP,泳道 2 为再次经 Super Q 离子交换层析得到的电泳单一纯的纯度约 95% 的 CRP 蛋白,泳道 3 为商品化 CRP 纯化蛋白对照,其分子量约 23 kDa,与本研究纯化 CRP 的分子量大小一致;图 1B 显示在 Western blotting 中,所纯化的 CRP 与商品化 CRP 免多抗有特异反应性。进一步在 HPLC 上用 G5000 分子筛层析鉴定纯化后 CRP 的分子量,结果(图 2)显示样品主峰出现在约 20 min 处,与商品化天然五聚体 CRP 的出峰位置一致。上述结果表明本研究纯化的 CRP 是天然五聚体 CRP,为后续 CRP 单抗制备提供关键原料。

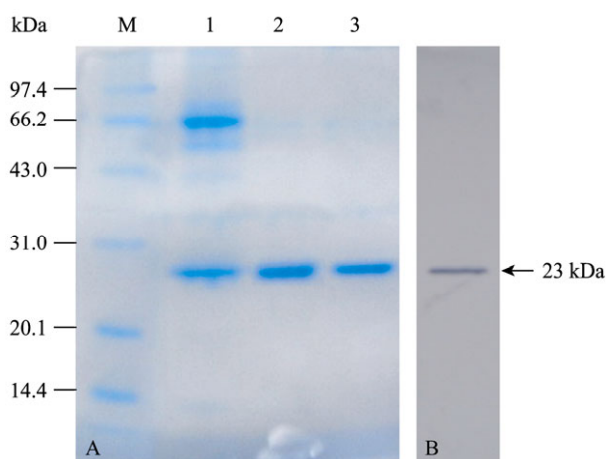


图 1 纯化 CRP 的 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定图  
Fig. 1 SDS-PAGE and Western blotting analysis of CRP purified from human ascetic fluid. (A) SDS-PAGE analysis. M: protein marker; 1: crude CRP sample eluted by PC-Gel affinity chromatography; 2: high-purity CRP sample eluted by Super Q ion exchange chromatography; 3: commercial native CRP control. (B) Western blotting analysis of high-purity CRP.

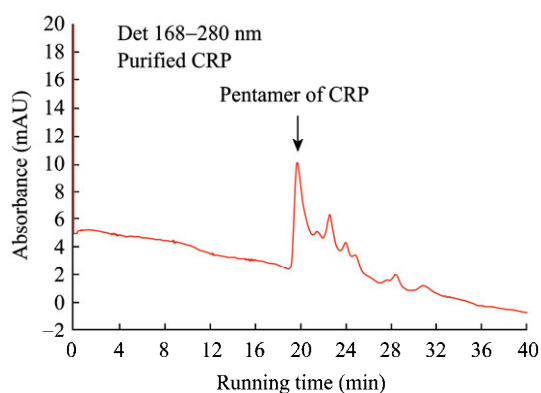


图 2 纯化 CRP 的分子筛分析图  
Fig. 2 Molecular exclusion chromatography analysis of the purified CRP protein.

## 2.2 CRP 单抗的制备及鉴定

以纯化天然 CRP 为免疫原,采用小鼠杂交瘤融合技术和间接 ELISA 方法筛选出 22 株能稳定分泌 CRP 抗体的杂交瘤细胞。配体捕获 ELISA 分析显示,22 株 CRP 单抗中有 13 株单抗反应阳性,分别是 1B10、5D4、7F3、7D9、9D5、10C5、10C11、10F7、12D8、13H9、14H6、15D6、16G2,表明这 13 株单抗能够结合天然 CRP,其识别表位可能位于五聚体蛋白表面,另外有 9 株 CRP 单抗(3D11、4F4、8A3、8D4、12A2、13H4、16C3、16H3、19H3)反应均为阴性,表明这 9 株单抗不能结合天然 CRP,其识别表位可能隐藏于 CRP 五聚体内部。进一步用条带 Western blotting 分析,结果(未给出)显示,22 株单抗中只有 10C11、8D4 和 16H3 等 3 株单抗反应呈阳性,提示这 3 株单抗识别 CRP 蛋白中偏线性表位,其中捕获 ELISA 阳性单抗 10C11 在 Western blotting 中呈强阳性,而捕获 ELISA 阴性单抗 8D4 和 16H3 在 Western blotting 中呈弱反应,提示单抗 10C11 可能识别 CRP 中优势表位。

## 2.3 高敏 CRP 化学发光检测方法 (hs-CRP CLIA) 的建立

制备上述 13 株能捕获天然 CRP 的单抗腹水,经硫酸铵沉淀和 DE-52 层析纯化得到高纯度 CRP 单抗,使用过碘酸氧化法标记辣根过氧化物酶 (HRP),基于化学发光检测技术,建立检测 CRP 的双抗体夹心 CLIA 方法,采用方正滴定法筛选配对单抗,以灵敏度高、本底低、线性范围广为选择标准,最终确定 10C5 为包被单抗,10C11 为酶标单抗,建立 hs-CRP CLIA。

用 hs-CRP CLIA 检测人 IgG (5 g/L、10 g/L、25 g/L)、血红蛋白 (12 g/L、24 g/L、36 g/L) 和甘油三酯 (2.5 g/L、5.0 g/L、7.5 g/L) 等 3 种血清中常见干扰物质。结果显示 hs-CRP CLIA 对人 IgG、血红蛋白、甘油三酯等 3 种物质的检测 P/N 值均小于 2.1,表明 hs-CRP CLIA 有较好的特异性。

将人血清 CRP 标准品从 163 mg/L 按 2 倍倍比连续稀释至 0.04 mg/L,然后用 hs-CRP CLIA 测定稀释后标准品的发光值,经回归分析绘制 CRP 检测标准曲线,结果(图 3)显示,hs-CRP CLIA 对浓度介

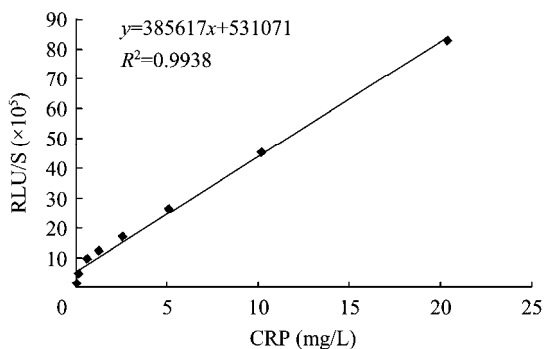


图3 hs-CRP CLIA 检测人血清 CRP 标准品的标准曲线  
Fig. 3 Calibration curve obtained for the hs-CRP CLIA with a linear dynamic range between 0 and 20.38 mg/L of human serum CRP calibrator.

于 0.04~20.38 mg/L 之间 CRP 有较好的检测线性 ( $R^2=0.9938$ )。

2.4 hs-CRP CLIA 的可重复性

本研究使用精密度实验和回收率实验确定 hs-CRP CLIA 的检测准确性和可重复性。精密度实验中, 将人血清 CRP 标准品稀释成低、中、高 3 个浓度样品, 在同一天内每隔 1 h 用 hs-CRP CLIA 测定一次, 共测 10 次, 得出 hs-CRP CLIA 的批内变异系数 (CV, %) 为 4.2%~5.8%, 小于标准值 10%; 取同样样品分成 10 份冻存, 每天测定 1 次, 连续测定 10 d, 得出批间变异系数 (CV, %) 为 9.0%~11.5%, 小于标准值 15% (表 1), 说明 hs-CRP CLIA 精密度良好。回收率实验中, 取人血清 CRP 标准品稀释成介于 0~10 mg/L 范围内的不同浓度样品, 每份样品重复检测 3 次, 取平均值后, 计算回收率 (回收率=检测值/实际值×100%)。结果表 2 显示, hs-CRP CLIA 检测不同浓度 CRP 标准品的回收率介于 95%~102% 之间, 平均回收率为 99%, 表明 hs-CRP CLIA 具有较好的检测准确性。

表 1 hs-CRP CLIA 的精密度分析

Table 1 Precision of the hs-CRP CLIA

Sample	Intra-assay precision (n=10)			Inter-assay precision (n=10)		
	$\bar{x}$ (mg/L)	s (mg/L)	CV (%)	$\bar{x}$ (mg/L)	s (mg/L)	CV (%)
1	0.190	0.005	2.63	0.117	0.013	11.50
2	3.107	0.129	4.20	2.999	0.315	10.50
3	10.217	0.595	5.80	10.124	0.911	9.00

表 2 hs-CRP CLIA 的回收率分析

Table 2 Recovery of the hs-CRP CLIA

Pair number	Expected CRP (mg/L)	Observed CRP (mg/L)	Recovery (%)
1	3.729	3.809	102
2	6.841	6.983	102
3	1.009	0.963	95
4	1.353	1.351	100
5	0.621	0.618	100
6	0.079	0.077	97
7	0.150	0.143	95

2.5 hs-CRP CLIA 与同类试剂盒的比较

用美国 BIOCHECK 公司生产的 hs-CRP ELISA 试剂盒与 hs-CRP CLIA 平行检测 90 份血清样品, 检测结果经线性回归分析 ( $r=0.968, P > 0.05$ ), 显示两者检测结果无显著性差异, 具有很好的可比性 (图 4)。

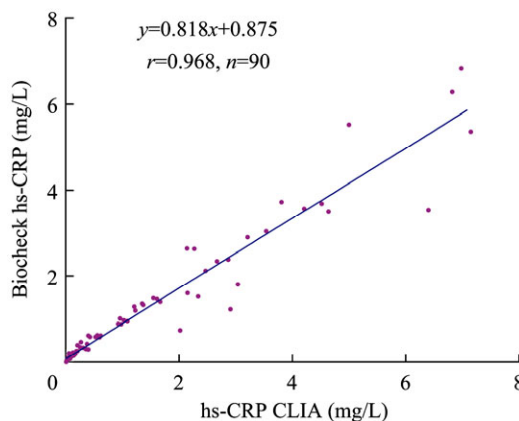


图 4 比较 hs-CRP CLIA 与 BIOCHECK hs-CRP ELISA 的检测相关性

Fig. 4 Comparison between the hs-CRP CLIA and the BIOCHECK hs-CRP ELISA.

3 讨论

本研究的主要目的之一是制备识别天然 CRP 的单抗原, 为此需要首先获得抗原性正确的 CRP 蛋白作为免疫原。血清中天然 CRP 是由 5 个完全相同的分子量约 23 kDa 的单体 CRP 蛋白以非共价键结合而成的平面对称五聚体 CRP, 分子量约 120 kDa。值得注意的是, Potempa 等<sup>[21-22]</sup>发现当天然 CRP 暴露于尿素、酸液、加热等环境下或直接包被于聚乙烯板上时, 天然五聚体 CRP 会解聚成单体 CRP, 表

现出不同于天然 CRP 的“neo-CRP”的独特抗原性。而且 Ying 等<sup>[20]</sup>证实 5 类识别表位不同的 CRP 单抗结合天然五聚体 CRP 和单体 CRP 的能力不同,提示建立检测血浆中天然 CRP 的 hs-CRP 诊断试剂盒需使用构象正确的 CRP 抗原及其单抗,确保所使用的 CRP 单抗能够识别血清中天然 CRP。本研究曾试图利用原核表达系统表达 CRP 基因,结果得到的是单体 CRP,目前也尚无研究报道利用基因工程重组表达技术成功表达出天然五聚体 CRP,而且后续利用单体 CRP 制备的单抗也不能捕获血清中的天然五聚体 CRP,进一步证实制备天然 CRP 的必要性。本研究利用天然五聚体 CRP 在钙离子帮助下能与配体磷酸胆碱(PC)特异结合的特点<sup>[23]</sup>,使用 PC-Gel 亲和层析介质从肝硬化病人腹水中提取出高丰度的天然五聚体 CRP,进而利用离子交换层析方法得到高纯度的天然 CRP,建立了一种获得天然 CRP 的方法,解决了购买进口 CRP 蛋白价格昂贵的困扰,大大降低后续 CRP 单抗的制备成本,目前市场上纯度约 95%的进口 CRP 蛋白的价格约为 ¥3 000/mg。

为了获得能够特异捕获天然 CRP 的单抗,本研究参照文献<sup>[20]</sup>建立了基于 PC-BSA 的配体捕获 ELISA,该方法能够很好地筛选出特异性结合天然 CRP 的单抗,为后续筛选最佳的双抗体夹心配对单抗奠定了原料基础。值得注意的是,多数 CRP 单抗在 Western blotting 实验中不反应,提示天然 CRP 的优势表位可能以构象表位居多。单抗 10C11 在配体捕获 ELISA 和 Western blotting 中均有很强的反应性,提示天然 CRP 表面可能存在一个优势线性表位,这对建立诊断试剂具有重要意义,而后续单抗配对筛选中也证实 10C11 作为标记单抗具有良好的检测效果。总之,本研究制备的天然 CRP 特异性单抗为建立 hs-CRP 诊断试剂盒解决了关键的原料来源,有助于降低我国 hs-CRP 诊断试剂盒的生产成本,促进临床上早日广泛开展 hs-CRP 指标检测。

本研究建立的高敏 C 反应蛋白化学发光定量检测方法(hs-CRP CLIA)采用国际 CRP 标准品 CRM 470(WHO IS 85/506)进行校准,数据显示 hs-CRP CLIA 检测特异性良好,灵敏度高,可重复性好,而且定量检测线性范围较宽,能够定量检测 0.04~

20.38 mg/L 范围内人血清 CRP 标准品,可鉴别浓度大于 10 mg/L 的慢性炎症。2003 年美国疾病预防控制中心和美国心脏学会联合发布了一个评估欧美人群心脏病发病风险高低的血清 CRP 水平为:CRP 在 1 mg/L 以下为低风险、CRP 在 1~3 mg/L 为中等风险、3~10 mg/L 为高风险<sup>[7]</sup>。但是,由于中西方存在人种、健康状况、饮食和生活习惯等不同,可能导致我国人群的 CRP 标准高于或低于欧美人群<sup>[24]</sup>。因此,本研究建立的 hs-CRP CLIA 由于具有较广的线性检测范围,将有利于开展我国人群大规模的血清学调查研究,以制定出一个适合我国人群心脏病风险预测的 CRP 评估标准。另外,本研究建立的 hs-CRP CLIA 与美国 BIOCHECK 的 hs-CRP ELISA 试剂盒相比,两者检测结果具有良好的可比性,值得一提的是 hs-CRP CLIA 检测时无需稀释待测血清样品,在操作上比 BIOCHECK ELISA 方法更方便。

总之,本研究建立的 hs-CRP CLIA 是一种准确、可靠、可定量的高敏 CRP 检测方法,有利于我国各级医院和临床单位广泛开展 hs-CRP 指标检测,有利于提高我国心脏病风险预测水平。

## REFERENCES

- [1] Tillet W, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of the pneumococcus. *J Exp Med*, 1930, **52**(4): 561-571.
- [2] Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *J Emerg Med*, 1999, **17**(6): 1019-1025.
- [3] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, **340**(2): 115-126.
- [4] Zhang YX, Cliff WJ, Schoefl GI, et al. Coronary C-reactive protein distribution: its relation to development of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999, **145**(2): 375-379.
- [5] Taubes G. Cardiovascular disease. Does inflammation cut to the heart of the matter? *Science*, 2002, **296**(5566): 242-245.
- [6] de Ferranti SD, Rifai N. C-reactive protein: a nontraditional serum marker of cardiovascular risk. *Cardiovasc Pathol*, 2007, **16**(1): 14-21.
- [7] Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart

- Association. *Circulation*, 2003, **107**(3): 499–511.
- [8] Buckley DI, Fu R, Freeman M, *et al.* C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 2009, **151**(7): 483–495.
- [9] Boekholdt SM, Kastelein JJ. C-reactive protein and cardiovascular risk: more fuel to the fire. *Lancet*, 2010, **375**(9709): 95–96.
- [10] Ridker PM. C-reactive protein: eighty years from discovery to emergence as a major risk marker for cardiovascular disease. *Clin Chem*, 2009, **55**(2): 209–215.
- [11] Jiang S, Bao Y, Hou X, *et al.* Serum C-reactive protein and risk of cardiovascular events in middle-aged and older chinese population. *Am J Cardiol*, 2009, **103**(12): 1727–1731.
- [12] Casas JP, Shah T, Hingorani AD, *et al.* C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J Intern Med*, 2008, **264**(4): 295–314.
- [13] Jiao Y, Meng XG, Wang MY, *et al.* Correlation among the levels of serum high-sensitivity C-reactive protein and coronary artery disease, cerebrovascular disease. *Chin J Cardiovasc Rehabil Med*, 2009, **18**(5): 446–448.  
焦燕, 孟学刚, 王明远, 等. 超敏 C-反应蛋白水平与心脑血管病的关系分析. *心血管康复医学杂志*, 2009, **18**(5): 446–448.
- [14] Myers GL, Rifai N, Tracy RP, *et al.* CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: report from the laboratory science discussion group. *Circulation*, 2004, **110**(25): e545–e549.
- [15] Roberts WL. CDC/AHA Workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: laboratory tests available to assess inflammation-performance and standardization: a background paper. *Circulation*, 2004, **110**(25): e572–e576.
- [16] Arbel Y, Eros Y, Rogowski O, *et al.* Comparison of values of wide-range C-reactive protein to high-sensitivity C-reactive protein in patients undergoing coronary angiography. *Am J Cardiol*, 2007, **99**(11): 1504–1506.
- [17] Yuan H, Lü HW, Sang HQ, *et al.* Liquid chip: a new method for detection of serum high-sensitivity C-reactive protein. *Chin J Clin Lab Sci*, 2007, **25**(1): 7–9.  
袁洪, 闫宏伟, 桑海强, 等. 液相蛋白质芯片检测血清 C 反应蛋白方法的建立. *临床检验杂志*, 2007, **25**(1): 7–9.
- [18] Hang JF, Wu YS, Xu WW, *et al.* Time-resolved fluoroimmunoassay of high sensitive C-reactive protein. *J Fourth Mil Med Univ*, 2007, **28**(3): 279–282.  
杭建峰, 吴英松, 徐伟文, 等. 超敏 C-反应蛋白时间分辨荧光免疫分析法的建立. *第四军医大学学报*, 2007, **28**(3): 279–282.
- [19] Chen YX, Luo HF, Ge SX, *et al.* Development and characterization of MAb against haemagglutinin of highly pathogenic H5 Avian influenza virus. *Chin J Virol*, 2006, **21**(6): 422–427.  
陈毅歆, 罗海峰, 葛胜祥, 等. 高致病性 H5 亚型禽流感流行性感冒病毒血凝素单克隆抗体的制备与初步应用. *病毒学报*, 2006, **21**(6): 422–427.
- [20] Ying SC, Gewurz H, Kinoshita CM, *et al.* Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies. *J Immunol*, 1989, **143**(1): 221–228.
- [21] Potempa LA, Maldonado BA, Laurent P, *et al.* Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Mol Immunol*, 1983, **20**(11): 1165–1175.
- [22] Potempa LA, Siegel JN, Fiedel BA, *et al.* Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free, human C-reactive protein subunit. *Mol Immunol*, 1987, **24**(5): 531–541.
- [23] Volanakis JE, Kaplan MH. Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1971, **136**(2): 612–614.
- [24] Arima H, Kubo M, Yonemoto K, *et al.* High-sensitivity C-reactive protein and coronary heart disease in a general population of Japanese: the Hisayama study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, **28**(7): 1385–1391.