

# 人C-反应蛋白磁微粒化学发光酶免疫测定法的建立

罗梦洁<sup>1</sup>, 肖 铎<sup>2</sup>, 曾 璇<sup>1</sup>, 谭楚帆<sup>1,3</sup>, 徐 叶<sup>3</sup>, 钟志宏<sup>1</sup>, 刘如石<sup>1,3,4</sup>, 郑 姣<sup>1,4\*</sup>

(1. 湖南师范大学 医学院, 中国湖南 长沙 410013; 2. 湘潭县人民医院 消化内科, 中国湖南 湘潭 411228; 3. 湖南旭翔生物科技有限公司, 中国湖南 长沙 410221; 4. 免疫诊断试剂湖南省工程研究中心, 中国湖南 长沙 410013)

**摘要:** 人C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是炎症以及各种相关疾病如病毒感染、心血管疾病等诊断、治疗和预后的临床检测指标。为了建立一种快速、准确的CRP定量免疫测定方法,将表达纯化的重组CRP作为抗原免疫小鼠,获得了5株稳定分泌抗体的单克隆抗体细胞株,采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, DAS-ELISA)初步鉴定筛选的抗人CRP单克隆抗体,并分别选择mAb 9D6和mAb 9G4作为捕获抗体与检测抗体,建立用于人CRP检测的化学发光酶免疫测定法(chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA),最后通过测定分析临床血清CRP样本,评价CLEIA的性能。结果显示,基于9D6/9G4-AP单克隆抗体对的CLEIA测定范围为0.176 7~500  $\mu\text{g/L}$ (可扩展至100 mg/L);所建立的CLEIA与医院采用的免疫散射比浊法( $R^2: 0.949 6, P < 0.000 1$ )表现出良好的相关性,且Bland-Altman分析中96.36% (106/110)的点在95%一致性界限范围内显示两种检测方法具有较好的一致性。结果初步表明,建立的分析方法在临床诊断中具有较好的应用前景。

**关键词:** C-反应蛋白(CRP); 单克隆抗体(mAb); 双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(DAS-ELISA); 化学发光酶免疫测定法(CLEIA)

中图分类号: Q503, R446.6

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)02-0135-08

## Development of Magnetic Particle-based Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Human C-reactive Protein

LUO Mengjie<sup>1</sup>, XIAO Duo<sup>2</sup>, ZENG Xuan<sup>1</sup>, TAN Chufan<sup>1,3</sup>, XU Ye<sup>3</sup>,  
ZHONG Zhihong<sup>1</sup>, LIU Rushi<sup>1,3,4</sup>, ZHENG Jiao<sup>1,4\*</sup>

(1. School of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013, Hunan, China; 2. GI Medicine of Xiangtan County People's Hospital, Xiangtan 411228, Hunan, China; 3. Hunan Xuxiang Biotechnology Co., Ltd., Changsha 410221, Hunan, China; 4. Immunodiagnostic Reagents Engineering Research Center of Hunan Province, Changsha 410013, Hunan, China)

**Abstract:** Human C-reactive protein (CRP) is an excellent clinical biomarker for the diagnosis, treatment and prognosis of inflammation and various related diseases such as viral infections and cardiovascular diseases. Herein, the expressed recombinant CRP as an antigen was used to immunize mice for establishing a rapid and accurate quantitative immunoassay for CRP. Five hybridoma cell lines for stable monoclonal antibody production were obtained. The developed monoclonal antibodies (mAbs) screened against human CRP were initially identified by a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA), and then mAb 9D6 and mAb 9G4 were selected as the capture and detection antibodies, respectively, to establish the magnetic particle-based chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for detection of CRP. Fi-

收稿日期: 2023-03-17; 修回日期: 2023-04-09; 网络首发日期: 2023-09-20

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81702005); 湖南省自然科学基金项目(2019JJ50370)

作者简介: 罗梦洁(1998—), 女, 湖南耒阳人, 硕士研究生; \*通信作者: 郑姣(1990—), 女, 湖南岳阳人, 硕士, 实验师, 主要从事免疫诊断试剂研究, E-mail: 16743@hunnu.edu.cn。

nally, the analytical performance of the established CLEIA was evaluated by measuring CRP in clinical serum samples. The results showed that CLEIA based on the monoclonal antibody pair of 9D6/9G4-AP was characterized by the measurement interval from 0.176 7  $\mu\text{g/L}$  to 500  $\mu\text{g/L}$  (extended to 100 mg/L), and had an excellent correlation with the immune scattering turbidimetry commonly used in hospitals ( $R^2$ : 0.949 6,  $P < 0.000$  1). In the Bland-Altman analysis, 96.36% (106/110) of the points were within the consistency limit of 95%, indicating that the two detection methods had good consistency. These results preliminarily showed that the developed analytical method may have a good application prospect in clinical diagnosis.

**Key words:** C-reactive protein (CRP); monoclonal antibody (mAb); double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA); chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA)

(*Life Science Research*, 2024, 28(2): 135-142)

炎症是机体防御机制的一部分,是机体对不同有害刺激物(如病原体、刺激性物质或坏死组织等)的非特异性免疫反应,可分为感染性炎症和非感染性炎症。炎症的诊断、治疗和预后与生物标志物的检测密切相关<sup>[1]</sup>。C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)一直被广泛研究并作为炎症筛查及各种相关疾病(如病毒感染、心血管疾病、败血症等)的早期临床诊断指标<sup>[2-3]</sup>。近期研究也表明,CRP是与2019冠状病毒病(coronavirus disease 2019, COVID-19)发展相关的关键生物标志物<sup>[4]</sup>。CRP是由5个相同的单体亚基组成的血浆蛋白,主要以五聚体(23 kD)形式存在于血液循环中<sup>[5-6]</sup>。目前,相关研究已在特定炎症微环境中观察到五聚体CRP向单体CRP的转化<sup>[7-8]</sup>,并描述了五聚体和单体CRP的促炎亚型<sup>[9]</sup>。炎症刺激下CRP主要在肝脏中合成<sup>[10]</sup>,通过血流到达炎症反应区域后,CRP分解成在炎症反应中起直接作用的单体。

正常人血浆中的CRP水平低于10 mg/L,病毒感染时在10~40 mg/L之间,活动性炎症和细菌感染时在40~200 mg/L,在创伤等严重组织损伤的24~72 h内,CRP血浆水平会升高到500 mg/L以上,然而,当机体未处于应急状态后,CRP值在18~20 h内可迅速下降,接近CRP的半衰期<sup>[10]</sup>。低于5 mg/L的慢性低水平CRP(超敏CRP)也被证明在冠心病、急性心肌梗死和缺血性中风的发展中起着重要作用,血清CRP浓度升高是心脑血管疾病的危险信号<sup>[11-12]</sup>。在胰腺炎、脑膜炎、阑尾炎和肺炎等感染性疾病中,CRP也可以作为病情严重程度和疾病预后判断的预测因子<sup>[13]</sup>。此外,对于COVID-19患者,CRP水平可以提供有关COVID-19感染的严重程度或关键趋势信息,并有助于及时预测疾病恶化的风险,对患者进行分流。相关研究显示,CRP水平较高( $\geq 26.9$  mg/L)的COVID-

19感染者发展为重症的风险显著升高<sup>[14-16]</sup>。因不同疾病对应的CRP检测范围不同,各病情严重程度和疾病预后判断也有相应的区别,所以开发快速、灵敏度高及线性检测范围广的CRP检测方法具有很高的临床应用价值。

目前,临床免疫化学实验室常规CRP检测技术主要有酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫比浊法和免疫荧光法等<sup>[17-19]</sup>,但它们存在操作复杂、成本高、耗时长等问题,因此需要开发更加完善的方法对CRP进行定量检测。本研究旨在开发具有自主知识产权的抗CRP的高特异性、高亲和性单克隆抗体,并建立快速、低成本的磁微粒化学发光酶免疫测定法(chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA)。将CLEIA测定的血清CRP值与医院临床免疫散射比浊法的检测值进行比较,结果显示两种方法具有较好的相关性和一致性,表明本研究建立的CLEIA在临床诊断中具有良好的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物和细胞株

BALB/c小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司; *E. coli* Top 10F', Rosetta-gami B (DE3)菌株、SP2/0骨髓瘤细胞系由本实验室保存。

#### 1.1.2 血清样本和伦理审批

血清样本取自湖南省人民医院(湖南师范大学第一附属医院),冷冻保存备用。所有动物实验均获得湖南师范大学伦理委员会批准。

#### 1.1.3 主要试剂

天然CRP和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)-羊抗鼠二抗由厦门大学夏宁邵教授惠赠; CRP-pMD 18T质粒(Cat: HG11250-M)

购自北京义翘神州科技股份有限公司; 质粒 pCold (SUMO) 由本实验室保存; 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 源自日本 Takara 公司; RPMI 1640 培养基和 DMEM 基础培养基购自美国 Gibco 公司; 次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷培养基(hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium, HAT)、次黄嘌呤和胸苷培养基(hypoxanthine-thymidine medium, HT)、完全和不完全弗氏佐剂、聚乙二醇(PEG 1500)购自美国 Sigma 公司; Protein A/G 亲和色谱柱、抗 His-tag 鼠单克隆抗体、BCA 蛋白质检测试剂盒、Ni-TED 亲和层析柱购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 分子生物级或更高级别的化学用品购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.2 CRP 的原核表达及蛋白质纯化

以购买的重组质粒 CRP-pMD 18T 为模板, PCR 扩增 CRP 编码序列。构建重组表达质粒 CRP-pCold(SUMO), 并转至大肠杆菌 Rosetta-gami B (DE3) 进行 CRP 的重组表达。CRP 目的基因引物为: Fp, 5'-CGGGATCCATGGAGAAGCTGTTGTG-TTTCTTGG-3'; Rp, 5'-CCGCTCGAGAGGGCCA-CAGCTGGGG-3'。

将经异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside, IPTG)诱导表达重组蛋白后的菌液超声裂解, 用包涵体洗涤液(300 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl、13 mmol/L EDTA, pH 8.0) 进行蛋白质包涵体纯化, 在变性条件下采用 Ni-TED 亲和层析柱纯化重组蛋白(25 mmol/L、50 mmol/L、75 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L 咪唑梯度洗脱)。用 PBS 缓冲液(pH 7.4)透析以去除咪唑, 随后收集样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)鉴定。

### 1.3 免疫印迹分析

将纯化的重组 CRP 或天然 CRP 进行 SDS-PAGE 后电转移到聚偏氟乙烯[poly(vinylidene fluoride), PVDF]膜上(200 mA, 1 h), 用含 5% 脱脂奶的 TN 缓冲液(150 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)室温封闭 2 h; 用 TBST 缓冲液(150 mmol/L NaCl、10 mmol/L Tris-HCl、20% Tween 20, pH 7.5)洗膜 3 次, 每次 10 min, 随后加入一抗抗 His-tag 鼠单克隆抗体(1 : 2 000), 室温孵育 2 h; 洗膜, 加入二抗 HRP-羊抗鼠(1 : 5 000), 室温反应 2 h; 再次洗膜, 并用 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)底物显色液进行显色。

### 1.4 抗 CRP 单克隆抗体的制备和鉴定

将纯化后的重组 CRP 与弗氏佐剂充分乳化后, 采用皮下多点注射的方法取 4 只 4~6 周龄 BALB/c 雌鼠进行免疫, 每两周进行 1 次免疫, 共免疫 4 次, 剂量为 150  $\mu$ g/只。对达到免疫效价的小鼠, 在细胞融合前 3 d 对脾脏进行加强免疫, 剂量为 50  $\mu$ g/只。将 RPMI 1640 培养基中培养的生长状态良好的 SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠的脾脏细胞用 DMEM 培养基混匀, 以 PEG 1500 进行融合后在 HAT/HT-DMEM 培养基中培养, 用有限稀释法进行 4 次亚克隆后, 得到能稳定分泌特异性抗 CRP 单克隆抗体的细胞株。

在接种杂交瘤细胞 1~2 周前, 取 6 周龄以上的 BALB/c 小鼠用 0.5 mL 石蜡进行腹腔注射, 诱导小鼠产生无菌性腹膜炎后, 接种密度为  $1 \times 10^6$  L<sup>-1</sup> 的杂交瘤细胞。7~12 d 后, 消毒腹部皮肤并用注射器抽取腹水, 离心取腹水上清, 采用辛酸-硫酸铵法和 Protein A/G 亲和层析纯化单克隆抗体。以天然 CRP (1 mg/L) 为抗原, 通过蛋白质免疫印迹法对筛选的单克隆抗体的特异性进行鉴定。

### 1.5 ELISA 法检测单克隆抗体的性能

将纯化后的重组 CRP 用  $1 \times$  CB 缓冲液稀释至 1 mg/L, 包被 ELISA 板, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗板后加入 ED (0.25% casein) 封闭液, 37  $^{\circ}$ C 放置 2 h。洗板 5 次, 加入 5 株纯化的单克隆抗体为一抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。洗板 5 次, 加入 1 : 5 000 稀释的 HRP-羊抗鼠二抗, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min。洗板 5 次, 加入 3,3',5,5'-四甲基联苯(3,3',5,5'-tetramethylbiphenyl, TMB)底物显色液, 37  $^{\circ}$ C 反应 10 min 后加终止液, 450 nm/630 nm 双波长处检测吸光度值(OD 值)。

### 1.6 单克隆抗体的辣根过氧化物酶标记

将纯化的单克隆抗体 4  $^{\circ}$ C 搅拌透析 6 h。将冻存的 HRP 平衡至室温; 取 HRP 和 NaIO<sub>4</sub> 分别加水溶解, 再将 NaIO<sub>4</sub> 溶液缓慢加入 HRP 溶液中, 溶液由棕色转变成绿色, 而后置于 4  $^{\circ}$ C 避光活化 30 min; 加入乙二醇, 室温避光终止 30 min, 至溶液由绿色变为棕色。将活化的 HRP 加入透析的抗体中, 4  $^{\circ}$ C 避光透析 2 h。配制 20 g/L 的 NaBH<sub>4</sub> 溶液, 取 1/10 体积的 NaBH<sub>4</sub> 溶液加至 HRP 与抗体的混合液中, 4  $^{\circ}$ C 放置 2 h, 每隔 30 min 混匀 1 次。用等体积的饱和硫酸铵沉淀 HRP 标记抗体, 离心后沥干。沉淀蛋白质经 50% 甘油溶解后保存于 -20  $^{\circ}$ C。用间接 ELISA 法检测 HRP 标记抗体的活性。

### 1.7 双抗体夹心 ELISA 法检测单克隆抗体的配对

以 10 mg/L 的捕获抗体进行包被, 37 °C 孵育 2 h 或 4 °C 过夜。洗板 5 次后加 ED 封闭液, 37 °C 放置 2 h。洗板 5 次, 加入重组 CRP, 于 37 °C 放置 2 h。洗板 5 次后, 用 ED 封闭液按 1 : 5 000 稀释 HRP 标记抗 CRP 单克隆抗体, 37 °C 孵育 30 min。洗板后加入 TMB 底物显色液, 37 °C 避光显色 10 min, 随后用终止液终止反应, 并在酶标仪上于 450 nm/630 nm 双波长处, 检测各孔 OD 值。

### 1.8 磁珠包被抗体和碱性磷酸酶标记抗体

取 1 mL 磁珠悬浮液至 EP 管中, 置于磁力架上 2~3 min, 小心取出上清液; 加入 900  $\mu$ L 的结合缓冲液(0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 9.5)并涡旋混匀; 加入 100  $\mu$ g 的抗体, 涡旋混匀; 加入 50  $\mu$ L 的催化溶液(3.0 mol/L 硫酸铵、0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 9.8), 37 °C 旋转反应 18 h。在 10 °C 以下加入 10  $\mu$ L 的封闭液(10%牛血清白蛋白), 37 °C 反应 6 h, 在磁力架上放置 2~3 min 后, 小心吸去上清; 加入适量的 TBST 洗涤缓冲液并涡旋磁珠, 重复洗涤 3 次; 用 PBS 缓冲液(pH 7.2)悬浮磁珠, 储存于 2~8 °C。

用 PBS 缓冲液(pH 7.4)溶解碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP), 离心去除不溶性沉淀, 加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)和 *N*-羧基磺基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)溶液(均用 MES 缓冲液配置, pH 4.5), 活化 1 h; 加入抗体(PBS 缓冲液配置, pH 4.5), 离心两次, 再加入 PBS 缓冲液(pH 7.4), 活化 3 h; 加入 1%牛血清白蛋白(PBS 缓冲液配置, pH 7.4), 用 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤两次后离心取沉淀; 最后用 PBS 缓冲液(pH 7.4)悬浮沉淀, 并加入等体积的甘油, -20 °C 保存。

### 1.9 配对抗体对 9D6/9G4-AP 的 CLEIA 法的建立

基于 HRP 标记的双抗体夹心 ELISA 法检测结果, 用磁珠标记单克隆抗体 9D6, 同时用 AP 标记单克隆抗体 9G4, 建立人 CRP CLEIA 法, 并对磁微粒抗体(100 mg/L 和 200 mg/L)和 AP 抗体(1 : 1 000 和 1 : 2 000 稀释)的工作浓度进行优化。将 MY-C 反应蛋白(德国西门子公司)检测试剂盒(免疫散射比浊法; REF OQIY21, Lot No. 167501)中的标准品用作校准物, 并用稀释缓冲液稀释至 3 个梯度质量浓度(S1: 0, S2: 62.5  $\mu$ g/L, S3: 125  $\mu$ g/L), 标准品的浓度由试剂盒指定。然后, 在 RangeCL-1200i 化学发光免疫分析仪(湖南远璟生物技术有

限公司)上进行校准。将 30  $\mu$ L 样品、50  $\mu$ L 磁珠包被抗体加入反应管中, 孵育 5 min 后进行洗涤; 再加入 50  $\mu$ L AP 标记的抗体, 孵育 5 min 后洗涤; 最后加入 200  $\mu$ L 化学发光底物溶液(Lot No. 20210615, 湖南远璟生物技术有限公司), 并在 10 s 内读取总相对发光单位(relative light unit, RLU)。Logistic 四参数拟合由免疫分析仪自带软件根据 CRP 标准品的浓度和获得的 RLU 读数的相应平均值实施。

### 1.10 临床血清样本 CRP 的测定

采用 9D6/9G4-AP 抗体对检测于 2022 年 5 月至 2023 年 2 月收集的 110 例门诊和住院患者临床血清样本的 CRP, 其中正常人血清 10 例, 年龄为 18~65 岁。以 MY-C 反应蛋白(德国西门子公司)检测试剂盒提供的标准品绘制标准曲线, 计算检测值, 再与湖南省人民医院免疫散射比浊法检测的临床值进行比较, 评价配对抗体的实际应用价值。向反应管中加入标准品、临床血清样本以及浓度为 100 mg/L 的 9D6 磁珠包被抗体, 孵育 5 min 后进行清洗; 加入 50  $\mu$ L 的 1 : 1 000 稀释的 9G4-AP 抗体, 孵育 5 min 后洗涤; 加入化学发光底物, 读取 10 s 内的 RLU, 对检测值与医院临床值的相关性进行分析。

### 1.11 统计学分析

应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。两种检测方法测量结果的一致性界限采用 Bland-Altman 进行分析, 用两种方法测定结果的差值的均数  $\bar{d}$  估计偏倚,  $\bar{d}$  的变异情况则用差值的标准差  $s_d$  来描述。如果绝大多数差值位于 95% 的一致性界限内, 则可以认为这两种方法具有较好的一致性。采用线性回归分析两种检测方法之间的相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 CRP 重组蛋白的表达纯化与鉴定

将构建成功的重组质粒 CRP-pCold(SUMO)转化至 Rosetta-gami B (DE3)表达菌株中进行重组表达。重组蛋白约为 45 kD, 分子质量大小与预期相符(图 1), 其主要表达在包涵体。经包涵体洗涤、Ni-TED 亲和层析纯化后, SDS-PAGE (图 1A)和 Western-blot (图 1B)的鉴定结果显示: 纯化后的重组 CRP 有较好的免疫反应性, 且纯度满足下一步实验的要求。

### 2.2 抗 CRP 单克隆抗体的制备及鉴定

将纯化的重组 CRP 免疫 BALB/c 小鼠, 通过细胞融合、ELISA 检测和 4 次亚克隆化, 最终筛选

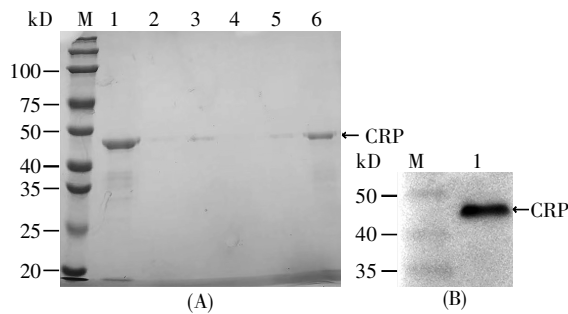


图 1 重组 CRP 的原核表达、纯化与鉴定

(A) 重组 CRP 的纯化。M: 蛋白质分子量标准, 1: 溶解于 8 mol/L 尿素缓冲液的重组蛋白, 2~6: Ni-TED 亲和层析纯化蛋白质; (B) 重组 CRP 的免疫反应性鉴定。M: 蛋白质分子量标准, 1: Ni-TED 亲和层析纯化的蛋白质。

**Fig.1 Prokaryotic expression, purification and identification of recombinant CRP**

(A) Purification of recombinant CRP. M: Protein molecular weight marker. 1: Recombinant protein dissolved in 8 mol/L urea buffer. 2~6: Protein purified with Ni-TED affinity chromatography; (B) The immunoreactivity identification of recombinant CRP. M: Protein molecular weight marker. 1: Protein purified with Ni-TED affinity chromatography.

获得 5 株稳定分泌抗 CRP 单克隆抗体的杂交瘤细胞株。收集注射杂交瘤细胞的小鼠腹水, 采用辛酸-饱和硫酸铵沉淀和 Protein A/G 亲和层析对其进行纯化。以天然 CRP 为抗原, 纯化后的单克隆抗体为一抗(1 : 2 000), 采用 Western-blot 鉴定抗体特异性, 结果显示: 5 株单克隆抗体在 23 kD 附近均有特异性条带(图 2), 说明它们均能特异性地识别天然 CRP。

用间接 ELISA 法检测单克隆抗体的性能。首先, 以 5 株纯化的单克隆抗体(1  $\mu\text{g/L}$ )为一抗, 抗 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM 的抗体为二抗, 鉴定筛选的单克隆抗体的亚型。结果如图 3A 所示, 2C6、9D6、9G4 和 1F11 这 4 株单克隆抗体均为

IgG1 亚型, 单克隆抗体 9B6 为 IgG2a 亚型。然后, 以纯化的 5 株单克隆抗体(1  $\mu\text{g/L}$ )为一抗, 从 1 : 80 开始进行倍比稀释, 稀释 5 个梯度, 以 PBS 缓冲液(pH 7.4)为空白对照, 对单克隆抗体结合抗原的灵敏度进行测定, 当抗原抗体特异结合达到饱和时, 对应的 50% OD 值表示灵敏度。如图 3B 所示, 5 株单克隆抗体均对重组 CRP 检测具有良好的敏感性, 且 5 株单克隆抗体的抗原结合灵敏度为 9G4>2C6>1F11>9B6>9D6。

**2.3 单克隆抗体配对**

采用双抗体夹心 ELISA 法对单克隆抗体进行配对筛选。未标记的抗体为捕获抗体, HRP 标记的抗体为酶标二抗。结果如图 4A 所示, 筛选得到 2 对灵敏度较好的抗体对, 分别为 9D6 与 1F11-HRP、9D6 与 9G4-HRP。对 2 对抗体对的灵敏度进行比较, 用 PBS 缓冲液(pH 7.4)将 CRP 重组蛋白稀释至 1.95  $\mu\text{g/L}$ 、7.81  $\mu\text{g/L}$ 、31.25  $\mu\text{g/L}$ 、125  $\mu\text{g/L}$ 、500  $\mu\text{g/L}$  5 个质量浓度, 以 PBS 作为空白对照。结果显示, 9D6/9G4-HRP 的检测灵敏度优于 9D6/1F11-HRP (图 4B)。这些结果也表明, 所开发的抗 CRP 单克隆抗体在检测 CRP 时具有良好的敏感性和特异性, 具有检测血清 CRP 的潜力。

**2.4 配对抗体对 9D6/9G4-AP CLEIA 法的建立**

从图 5A 可知, 当磁微粒抗体 9D6 的质量浓度为 100 mg/L、9G4-AP 抗体的稀释度为 1 : 1 000 时, 建立的人 CRP CLEIA 法具有可接受的灵敏度, 可用于进一步的性能评估。

用检测限(limit of detection, LoD)评价检测方法的灵敏度, 将 LoD 定义为平均 RLU 加 3 个标准差(standard deviation, SD) ( $n=20$ )换算的浓度。如图 5B 所示, 本研究建立的 CLEIA 法的 LoD 为

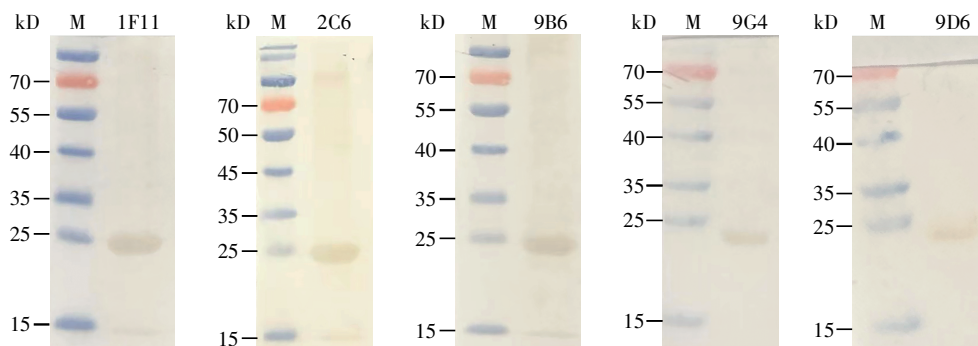


图 2 单克隆抗体的免疫反应性鉴定

M: 蛋白质分子量标准。

**Fig.2 Immunoreactivity identification of monoclonal antibodies**

M: Protein molecular weight marker.

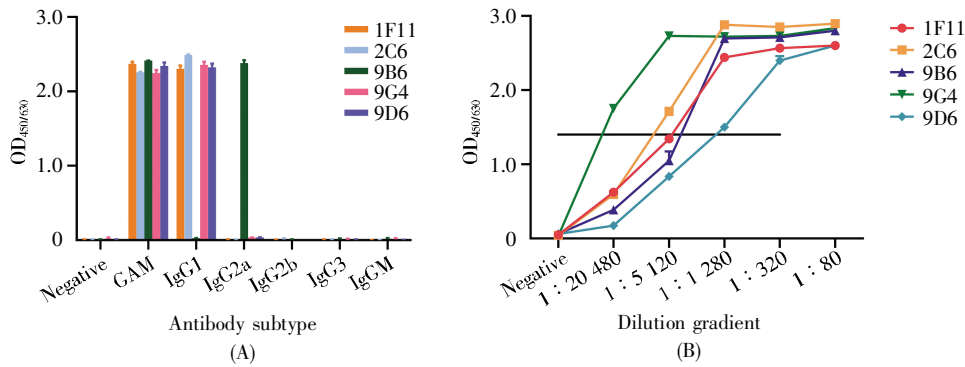


图3 抗CRP单克隆抗体的评价( $n=3$ )

(A) 间接ELISA法检测抗体亚型; (B) 间接ELISA法测定制备的单克隆抗体结合抗原的灵敏度。

Fig.3 Evaluation of the prepared anti-CRP monoclonal antibodies ( $n=3$ )

(A) Determination of the antibody subtypes by indirect ELISA; (B) Determination of the sensitivity of the prepared monoclonal antibodies binding to the antigen by indirect ELISA.

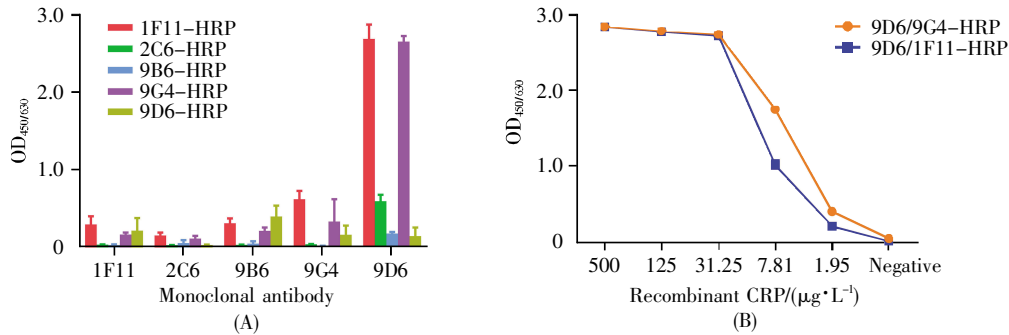


图4 双抗体夹心ELISA法筛选单克隆抗体对( $n=3$ )

(A) 5株单克隆抗体的配对; (B) 2对单克隆抗体对重组CRP检测效果的比较。

Fig.4 Screening of monoclonal antibody pairs using DAS-ELISA ( $n=3$ )

(A) Pairing of five monoclonal antibodies; (B) Comparison of the effectiveness of recombinant CRP detection with two monoclonal antibody pairs.

0.176 7  $\mu\text{g/L}$ 。

将100  $\mu\text{g/L}$ 的CRP标准品稀释到1~500  $\mu\text{g/L}$ 的6个梯度质量浓度,并用CLEIA法进行检测。如图5C所示,所建立的测定方法在检测中表现

出良好的检测线性( $R^2=0.9977$ )。

根据变异系数(coefficient of variation, CV)评估CLEIA法的精密度。对1  $\mu\text{g/L}$ 、10  $\mu\text{g/L}$ 、25  $\mu\text{g/L}$  3个质量浓度的CRP标准品进行检测,每个质量浓

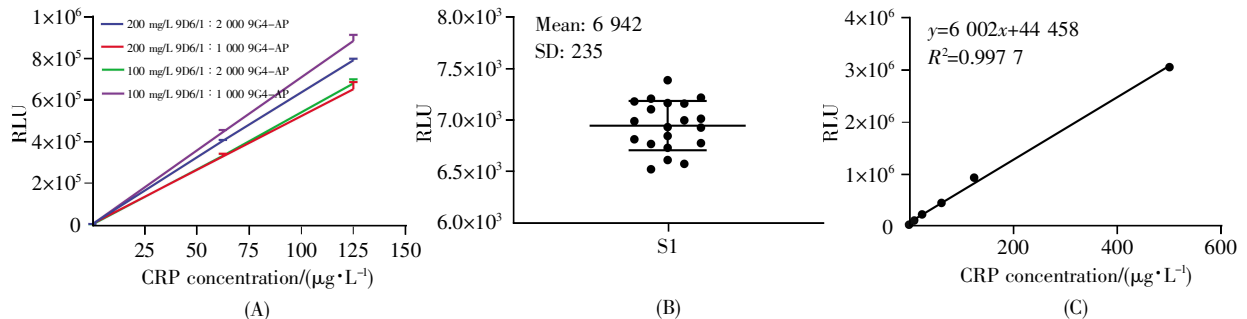


图5 单克隆抗体对在CLEIA法中的检测性能( $n=3$ )

(A) 9D6/9C4-AP对CRP标准品的检测效果; (B) 20次空白试验检测的RLU; (C) 建立的CLEIA法的线性分析,CRP标准品的梯度稀释质量浓度分别为1  $\mu\text{g/L}$ 、10  $\mu\text{g/L}$ 、25  $\mu\text{g/L}$ 、50  $\mu\text{g/L}$ 、125  $\mu\text{g/L}$ 和500  $\mu\text{g/L}$ 。

Fig.5 Detection performances of monoclonal antibody pairs in CLEIA ( $n=3$ )

(A) The effectiveness of CRP calibrator detection with 9D6/9C4-AP; (B) The RLU's obtained in 20 blank tests; (C) Linearity analysis of the proposed CLEIA. The CRP calibrator was diluted at concentrations of 1  $\mu\text{g/L}$ , 10  $\mu\text{g/L}$ , 25  $\mu\text{g/L}$ , 50  $\mu\text{g/L}$ , 125  $\mu\text{g/L}$  and 500  $\mu\text{g/L}$ , respectively.

度每天测量 3 次,持续 3 d。如图 6 所示,CRP 测量的精密度 CV 低于 10%,说明本研究建立的 CLEIA 分析方法对线性范围内 CRP 的检测精密度较高,重复性较好。

### 2.5 CLEIA 法对临床血清样本 CRP 的测定

将本研究中建立的 CLEIA 法的检测值与湖南省人民医院免疫散射比浊法检测的临床值进行比较,结果如图 7A 所示:两种方法在 0~100 mg/L 范围内测定血清 CRP 的相关性显著( $R^2=0.949\ 6$ ,  $P<0.000\ 1$ ),表明该检测方法在临床诊断中具有较好的应用前景。

从 Bland-Altman 图(图 7B)中可以看出,110 例配对数据差值的均数  $\bar{d}=-0.189\ 3$  mg, 差值的标准差  $s_d=4.121\ 0$  mg, 说明 95% 一致性界限为  $(-0.189\ 3\pm 1.960\ 0\times 4.121\ 0)$  mg, 即  $(-8.266\ 5$  mg,  $7.887\ 9$  mg)。分析结果显示:3.64% (4/110) 的点在 95% 一致性界限以外,96.36% (106/110) 的点在一致性界限范围内,界限外的点对应的 4 个样本值均在 40 mg 以上。此外,本研究提出的 CLEIA 法与医院免疫散射比浊法相比,差值的绝对值最大为 21.47 mg,即两种方法测量结果最多相差 21.47 mg(图 7B 中最下面的点)。因此,本研究建立的 CLEIA 法与医院免疫散射比浊法具有较好的一致性(应用于炎症和相关疾病诊断的 CRP 临

床参考值为 3 mg/L)。

## 3 讨论

CRP 作为最著名的急性期蛋白质,是炎症过程可靠的标志物之一,并且伴随着任何类型的炎症显著增加<sup>[20]</sup>。CRP 被认为是许多疾病(包括心血管疾病)的通用生物标志物,是感染或炎症状况的早期指标<sup>[21]</sup>,也是相关癌症的独立预后指标以及精神疾病的生物标志物<sup>[22-23]</sup>。CRP 可以弥补病情观察时白细胞计数和中性粒细胞计数的不足,因此可作为细菌感染或病毒感染的鉴别诊断指标之一,也可作为抗菌治疗效果和术后感染控制的监测指标<sup>[24]</sup>。现阶段,国内 CRP 检测的主要技术和关键原材料基本完全依赖进口。建立具有自主知识产权的抗 CRP 单克隆抗体生产技术和 CRP 快速定量检测技术是目前我国炎症诊断试剂的发展方向。

单克隆抗体的质量对建立高灵敏度、高特异性的检测方法至关重要。本研究表达的重组 CRP 具有良好的抗原性和免疫反应性。经过多轮免疫筛选,获得具有自主知识产权的抗 CRP 单克隆抗体。本实验室筛选的 5 株优秀抗 CRP 单克隆抗体为研制诊断试剂盒提供了关键原料。此外,本研究筛选出的两对抗体对——9D6 与 1F11-HRP、9D6 与 9G4-HRP (9D6 为捕获抗体,HRP 酶标单

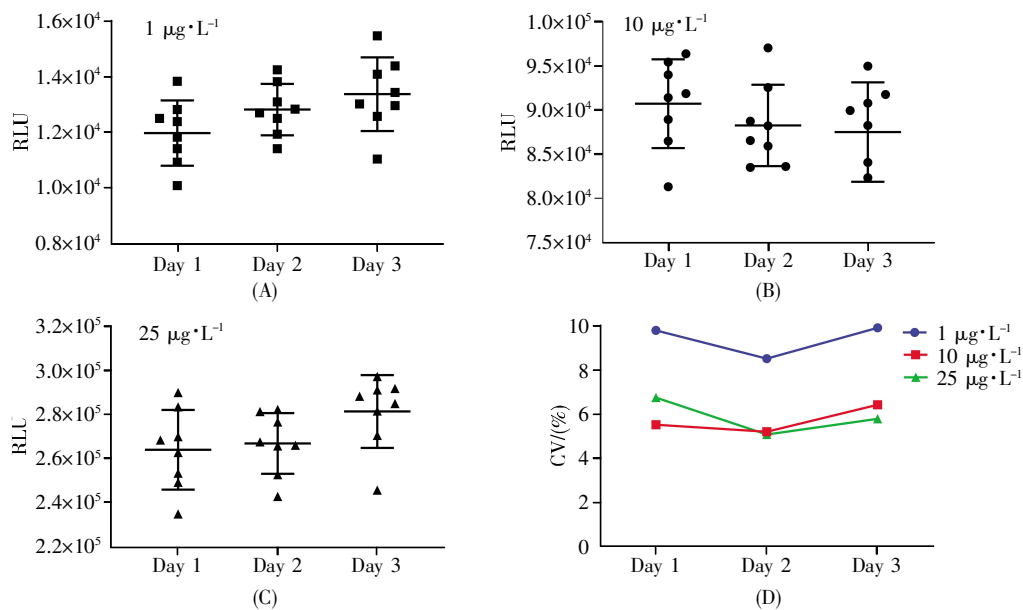


图 6 CLEIA 法的精密度分析( $n=3$ )

(A~C) 用建立的 CLEIA 法测量 3 种质量浓度的 CRP 标准品(1 µg/L、10 µg/L 和 25 µg/L); (D) 根据每个样本每天的 RLU 读数计算变异系数。

### Fig.6 Precision analysis of the proposed CLEIA ( $n=3$ )

(A~C) Measurement of the CRP calibrator at three concentrations (1 µg/L, 10 µg/L and 25 µg/L) by the proposed CLEIA; (D) Calculation of CV based on daily RLU reads of each sample.

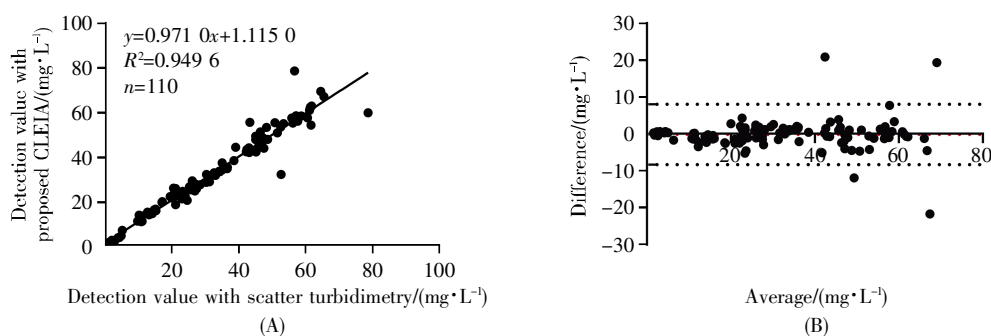


图7 两种分析方法所测血清 CRP 值的相关性分析

(A) 线性回归分析, CRP 的质量浓度范围为 0~100 mg/L; (B) Bland-Altman 分析, 两种方法检测的平均值在 0~80 mg/L。110 份血清样本采用免疫散射比浊法和本研究建立的基于 9D6/9G4-AP 单克隆抗体对的 CLEIA 法进行检测。

#### Fig.7 Correlation analysis of serum CRP values obtained by two methods

(A) Linear regression analysis showing that CRP mass concentration range was from 0 to 100 mg/L; (B) The Bland-Altman analysis showing that the average detection values for both methods ranged from 0 to 80 mg/L. In these analyses, 110 serum samples were measured with both the immune scattering turbidimetry and the proposed CLEIA based on the monoclonal antibody pair of 9D6/9G4-HRP.

克隆抗体 9G4 和 1F11 为检测抗体), 在双抗体夹心 ELISA 法中对重组 CRP 表现出较好的敏感性和特异性。

基于所开发单克隆抗体在双抗体夹心 ELISA 法中的性能, 本研究初步建立了检测人 CRP 的 CLEIA 法, 初步评估的检测结果较好, 检测限和线性范围均能满足临床检测要求。建立的 CLEIA 法的校准标准与目前医院临床检测人 CRP 采用的免疫散射比浊法[MY-C 反应蛋白(德国西门子)检测试剂盒]相同。依据临床诊断 CRP 的参考值 3 mg/L, 将两种方法用于检测临床血清 CRP, 结果显示有良好的相关性和一致性, 表明本研究建立的 CLEIA 法具有较好的临床检测潜力。在本研究中, 我们提出的 CLEIA 检测限为 0.176 7  $\mu\text{g/L}$ , 测定范围为 0.176 7~500  $\mu\text{g/L}$  (可扩展至 100 mg/L), 表明该方法在超灵敏检测慢性低水平 CRP (超敏 CRP) 时具有更宽的动态范围, 可作为预测冠心病、缺血性中风和急性心肌梗死发展的重要指标, 也能很好地补充 Beckman-Coulter 公司的速率散射比浊法在低水平 CRP 的测定范围(1~80 mg/L)<sup>[25-26]</sup>。需要指出的是, 在检测值与临床值相关性分析中, 有 3.64% (4/110) 的样本表现出非一致性, 这可能是 CLEIA 法的检测灵敏度较高以及检测中样本的稀释等原因所致。后续还需进行大量血清样本检测, 以得出更可信的结论。同时, 我们将进一步优化 CLEIA 法的临床应用反应条件。此外, 我们还计划利用这些新开发的单克隆抗体建立其他更敏感的免疫分析方法, 以用于即时诊断。

## 4 结论

本研究建立的用于 CRP 检测的 CLEIA 法具有良好的检测性能, 能降低检测费用、提高检测效率, 在炎症和感染监测中具有较好的临床应用前景, 为国内研发拥有自主知识产权的抗 CRP 单克隆抗体诊断试剂盒提供了较好的原材料和研究基础。

### 参考文献(References):

- [1] NAGY-SIMON T, HADA A M, SUARASAN S, *et al.* Recent advances on the development of plasmon-assisted biosensors for detection of C-reactive protein[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2021, 1246: 131178.
- [2] ANSAR W, GHOSH S. C-reactive protein and the biology of disease[J]. *Immunologic Research*, 2013, 56(1): 131-142.
- [3] GRETEN F R, GRIVENNIKOV S I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences[J]. *Immunity*, 2019, 51(1): 27-41.
- [4] GARG M, SHARMA A L, SINGH S. Advancement in biosensors for inflammatory biomarkers of SARS-CoV-2 during 2019-2020[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2021, 171: 112703.
- [5] YAO Z Y, ZHANG Y M, WU H B. Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation[J]. *Inflammation Research*, 2019, 68(10): 815-823.
- [6] NGWA D N, AGRAWAL A. Structure-function relationships of C-reactive protein in bacterial infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 166.
- [7] BRAIG D, NERO T L, KOCH H G, *et al.* Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14188.
- [8] MCFADYEN J D, KIEFER J, BRAIG D, *et al.* Dissociation of C-reactive protein localizes and amplifies inflammation: evidence for a direct biological role of C-reactive protein and its conformational changes[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1351.
- [9] THIELE J R, ZELLER J, BANNASCH H, *et al.* Targeting C-reactive protein in inflammatory disease by preventing conformational changes[J]. *Mediators of Inflammation*, 2015, 2015: 372432.

(下转第 151 页)

- [35] ZHONG Y, WAN Y W, PANG K F, *et al.* Digital sorting of complex tissues for cell type-specific gene expression profiles[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 89.
- [36] LIEBNER D A, HUANG K, PARVIN J D. MMAD: microarray microdissection with analysis of differences is a computational tool for deconvoluting cell type-specific contributions from tissue samples[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(5): 682–689.
- [37] AHMED U, GRAF J F, DAYTZ A, *et al.* Ultrasound neuromodulation of the spleen has time-dependent anti-inflammatory effect in a pneumonia model[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 892086.
- [38] ZHANG S R, XIAO X, ZHU X L, *et al.* Dysregulated immune and metabolic microenvironment is associated with the post-operative relapse in stage I non-small cell lung cancer[J]. *Cancers*, 2022, 14(13): 3061.
- [39] MARCZYK M, QING T, O'MEARA T, *et al.* Tumor immune microenvironment of self-identified African American and non-African American triple negative breast cancer[J]. *NPJ Breast Cancer*, 2022, 8: 88.
- [40] MICK E, KAMM J, PISCO A O, *et al.* Upper airway gene expression differentiates COVID-19 from other acute respiratory illnesses and reveals suppression of innate immune responses by SARS-CoV-2[J/OL]. *medRxiv*, 2020 [2022-06-30]. <https://doi.org/10.1101/2020.05.18.20105171>.
- [41] ZHONG Y F, ZHANG W, HONG X P, *et al.* Screening biomarkers for systemic lupus erythematosus based on machine learning and exploring their expression correlations with the ratios of various immune cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 873787.
- [42] WANG J P, XIAO D, WANG J X. A 16-miRNA prognostic model to predict overall survival in neuroblastoma[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 827842.
- [43] QIN H S, WANG T C, ZHANG H. Identification of immune-related subtypes and characterization of tumor microenvironment infiltration in kidney renal clear cell carcinoma[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 906113.
- [44] XU J J, HUANG Z, WANG Y S, *et al.* Identification of novel tumor microenvironment regulating factor that facilitates tumor immune infiltration in cervical cancer[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 846786.
- [45] RIECKMANN J C, GEIGER R, HORNBURG D, *et al.* Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics[J]. *Nature Immunology*, 2017, 18(5): 583–593.
- [46] WANG L B, KARPOVA A, GRITSENKO M A, *et al.* Proteogenomic and metabolomic characterization of human glioblastoma[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(4): 509–528.e20.
- [47] SCHELKER M, FEAU S, DU J Y, *et al.* Estimation of immune cell content in tumour tissue using single-cell RNA-seq data[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 2032.

## (上接第 142 页)

- [10] WU R L, ZHOU S, CHEN T, *et al.* Quantitative and rapid detection of C-reactive protein using quantum dot-based lateral flow test strip[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1008: 1–7.
- [11] LIN M S, ZHANG L W, TANG X H, *et al.* Predictive value of the HEART score combined with hypersensitive C-reactive protein for 30 d adverse cardiovascular events in patients with acute chest pain[J]. *Emergency Medicine International*, 2022, 2022: 3606169.
- [12] PATHAK A, AGRAWAL A. Evolution of C-reactive protein[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 943.
- [13] PLANK A C, MASCHKE J, ROHLEDER N, *et al.* Comparison of C-reactive protein in dried blood spots and saliva of healthy adolescents[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 795580.
- [14] WANG G Y, WU C F, ZHANG Q, *et al.* C-reactive protein level may predict the risk of COVID-19 aggravation[J]. *Open Forum Infectious Diseases*, 2020, 7(5): ofaa153.
- [15] CHEN N S, ZHOU M, DONG X, *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10223): 507–513.
- [16] TAN C C, HUANG Y, SHI F X, *et al.* C-reactive protein correlates with computed tomographic findings and predicts severe COVID-19 early[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(7): 856–862.
- [17] VASHIST S K, CZILWIK G, VAN OORDT T, *et al.* One-step kinetics-based immunoassay for the highly sensitive detection of C-reactive protein in less than 30 min[J]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 456: 32–37.
- [18] BRAVIN C, AMENDOLA V. Wide range detection of C-reactive protein with a homogeneous immunofluorimetric assay based on cooperative fluorescence quenching assisted by gold nanoparticles[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 169: 112591.
- [19] YANG X, SHU W X, WANG Y Q, *et al.* Turbidimetric inhibition immunoassay revisited to enhance its sensitivity via an optofluidic laser[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 131: 60–66.
- [20] BUERKE M, SHERIFF A, GARLICH S D. CRP-apherese bei akutem myokardinfarkt bzw. COVID-19[J]. *Medizinische Klinik-Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 2022, 117(3): 191–199.
- [21] VASHIST S K, VENKATESH A G, MARION SCHNEIDER E, *et al.* Bioanalytical advances in assays for C-reactive protein[J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(3): 272–290.
- [22] ZHANG Y T, GU D S. Prognostic impact of serum CRP level in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 889844.
- [23] BAYSAK E, GUDEN D S, ARICIOGLU F, *et al.* C-reactive protein as a potential biomarker in psychiatric practice: are we there yet?[J]. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 2022, 23(4): 243–256.
- [24] LIN Z, LIN Q, YU P L, *et al.* Performance evaluation of routine blood and C-reactive protein analysis using Mindray BC-7500 CRP auto hematology analyzer[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2022, 10(10): 588.
- [25] CIFTCI İ H, KOROGLU M, KARAKECE E. Comparison of novel and familiar commercial kits for detection of C-reactive protein levels[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(8): 2295–2298.
- [26] DANG T, LI Z Y, ZHAO L Y, *et al.* Ultrasensitive detection of C-reactive protein by a novel nanoplasmonic immunoturbidimetry assay[J]. *Biosensors*, 2022, 12(11): 958.