



技术报告

临床与科研领域

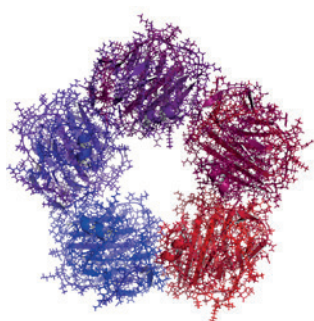
心肌标志物



炎症



人超敏C反应蛋白(hsCRP)



人 C反应蛋白(CRP)是一种急性相蛋白。当机体对炎症产生应答时,血液中的CRP浓度会迅速升高。CRP含有224个氨基酸残基,单体分子量约为25 kDa,理论等电点为6.4 (1-4)。CRP属于一个进化上非常保守的蛋白

家族—正五聚体蛋白,这类蛋白的特征是钙依赖的配体结合,以及五个单体形成一个放射对称的环状结构。(5)。

CRP在人体内的确切功能仍在讨论中。经证实CRP参与了炎症和先天性免疫过程。CRP的重要生理活性取决于它与各种配体的结合能力,例如损伤的细胞膜、亡细胞、纤连蛋白等等,而它与胆碱磷酸残基的亲合力最强。当CRP结合配体以后,它可以被补体成分C1q识别,从而激活经典补体途径。另一方面,CRP通过与补体因子H的相互作用来调节补体旁路途径(6)。

CRP与诊断

CRP是目前临床上使用的主要的、尽管是非特异性的炎症标志物。健康人中,CRP的浓度水平通常低于5mg/l。在病理状态下,CRP具有高达10000倍的动态范围(约0.05-500mg/l)(7)。CRP的最高浓度水平(超过30mg/l)出现在细菌感染中,如化脓性关节炎、脑膜炎和肺炎等。

临床应用



- ✓ 未来心血管风险预测
- ✓ 炎症反应

2003年,美国疾病预防控制中心(CDC)和美国心脏病协会(AHA)联合发表声明,确认CRP为目前临床实践中评估心血管风险的最佳炎症标志物(8)。许多流行病学研究表明CRP是未来心血管事件的强有力的独立预测指标,包括心肌梗死,缺血性中风,末梢血管疾病以及未知病因的心源性猝死(Clarified等概述(9))。CDC/AHA的指南支持使用CRP进行初级预防,并根据相对风险设定了参考值:低风险(<1.0mg/l)、中度风险(1.0-3.0mg/l)和高度风险(>3.0mg/l)。这就是为什么目前超敏CRP(hsCRP)力争达到ng/ml浓度水平的检测限的原因。

用于超敏CRP免疫检测系统开发的原料

新型免疫检测系统搭配HyTest公司生产的CRP单克隆抗体,可以获得很好的灵敏度。在磁性传感器检测系统上,线性检测范围为0.025mg/l到2.5mg/l(10),在化学发光免疫检测系统上,线性检测范围为0.01mg/l到50mg/l(11)(两种方法的检测限都为0.004mg/l)。使用纳米晶体固相夹心荧光免疫检测系统可达检测限0.001mg/l(12)。我们的最优抗体配对C2cc-C6cc和C5-CRP135cc以及其他几个配对可在实验性荧光免疫系统中达到10000倍的线性范围。这些抗体可以用于不同诊断平台的hsCRP检测系统的开发。除了单克隆抗体,我们还提供纯化的CRP天然抗原和去CRP的血清。

抗CRP单克隆抗体

应用

在天然CRP分子中，每一个原聚体都含有两个配位的钙离子（13）。我公司提供对溶液中钙离子缺失敏感和不敏感的抗CRP单抗。有些抗体只在钙离子存在时识别抗原（克隆C3，C4）。HyTest提供的大多数单抗在夹心免疫检测系统中并不依赖钙离子，甚至当样本中有EDTA存在的情况下也能够高效识别CRP抗原（克隆C1，C2cc，C5，C6cc，C7，CRP11，CRP30cc，CRP36，CRP135cc，CRP169）。

我公司所有CRP单抗都通过了不同的免疫应用测试。

直接ELISA

我们所有的CRP单抗都经过直接ELISA测试，测试结果显示所有抗体均可以识别天然CRP抗原，并且具有很高的灵敏度。

大多数抗体无论有无钙离子存在，均可识别天然CRP抗原。单抗C3仅当有钙离子存在的情况下识别CRP。（图1和图2）

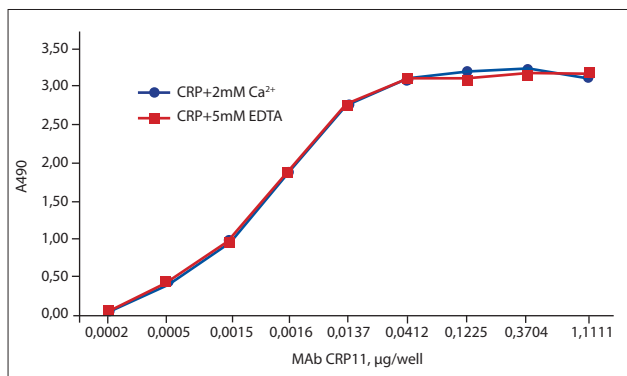


图1. 单抗CRP11和人天然CRP在直接法ELISA中的反应
每孔包被100ng天然CRP（HyTest），包被液使用Tris缓冲液，含有2 mM CaCl₂或5 mM EDTA。

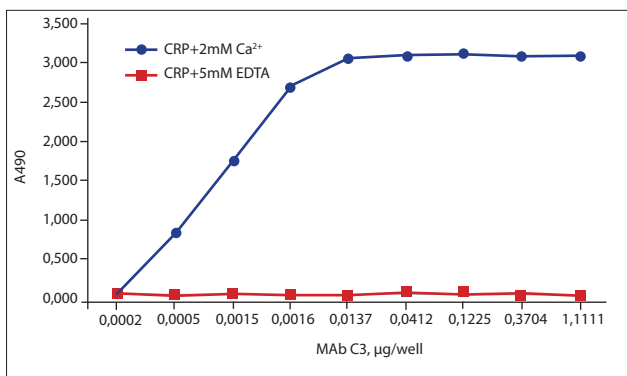


图2. 单抗C3和人天然CRP在直接法ELISA中的反应
每孔包被100ng天然CRP（HyTest），包被液使用Tris缓冲液，含有2 mM CaCl₂或5 mM EDTA。

CRP Western blotting检测

抗原转移到硝酸纤维素膜上以后，克隆C1，CRP11，CRP36和CRP169都可以在WB中识别人CRP抗原。图3为使用克隆CRP36和CRP169在Western blotting检测CRP的实验结果。

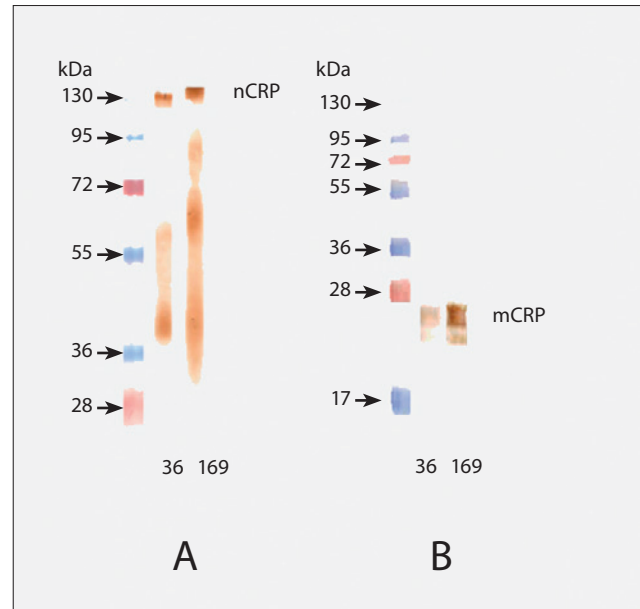


图3. SDS凝胶电泳后，使用抗CRP单抗免疫印记检测CRP
天然CRP被添加到非还原性（A）和还原性（B）凝胶中。电泳后蛋白被转移到硝酸纤维素膜上，分别标记单抗CRP36和CRP169进行反应。
A：在非还原性SDS凝胶电泳后的CRP，方法参照Taylor和van der Berg（14）。
B：还原性SDS凝胶电泳后的CRP。
为使单抗-CRP免疫复合物显色，实验使用了HRP标记的抗小鼠IgG和作为HRP显色底物的3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐（DAB）。

超敏CRP夹心免疫检测系统

所有单抗都被作为捕获抗体和检测抗体在夹心免疫检测系统中有/无钙离子情况下的正常人血清进行测试。我们推荐的最佳抗体配对为（捕获抗体—检测抗体）：

- C2cc - C6cc
- C5 - C6cc
- C7 - C6cc
- C5 - CRP135cc
- CRP30cc - CRP135cc
- C3 - C6cc (Ca²⁺-sensitive assay)
- C2cc - C4cc (Ca²⁺-sensitive assay)

图4和图5分别为配对C2-C6和C5-CRP135的代表性校准曲线。我公司的单抗可以高灵敏地识别CRP抗原，并具有良好的反应动力学；线性范围超过10000倍。

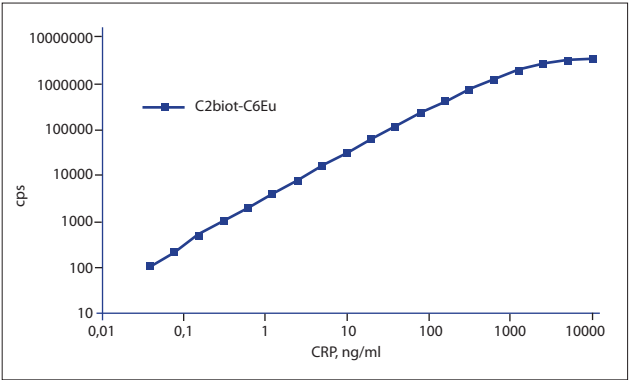


图4. C2-C6配对在ELISA中测试CRP标准品的反应曲线
C2经生物素化，C6标有稳定的销螯合物。抗原抗体混合物（100μl）于室温下在链霉亲和素包被板上孵育10分钟。

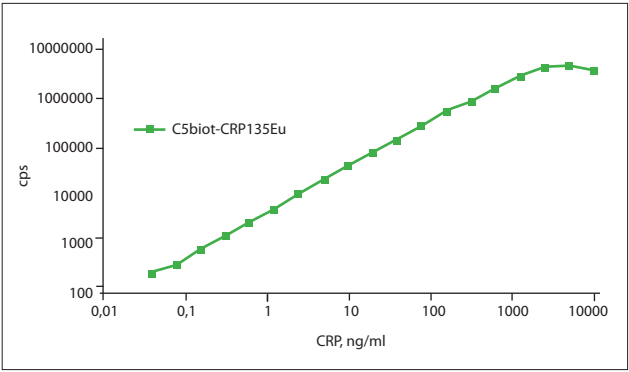


图5. C5-CRP135配对在ELISA中测试CRP标准品的反应曲线
C5经生物素化，CRP135标有稳定的销螯合物。抗原抗体混合物（100μl）于室温下在链霉亲和素包被的板上孵育30分钟。

尽管个别推荐配对对溶液中EDTA的存在敏感，多数配对并不受EDTA的影响（图6）。C5-CRP135等配对在有/无钙离子的情况下都可以使用，而C3-C6配对则对钙离子有强烈的依赖性。

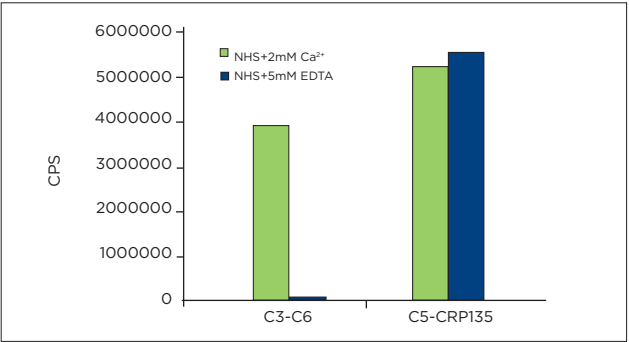


图6. EDTA对C3-C6和C5-CRP135检测的影响
抗原来自正常人血清（含2 mM CaCl₂或5 mM EDTA）

亲和力信息

对于某些应用而言，例如比浊法和竞争免疫法，需估算所用抗体的亲和常数。我公司提供一系列不同亲和力的单抗（图7和表1），并使用Biacore® 技术测试了一些CRP单抗的亲和常数。Biacore技术基于表面等离子体共振效应，能够实时测量两个大分子间的相互作用。结合和解离速率可显示在屏幕上，从而计算出亲和常数。

表1. 部分CRP单抗的亲和常数

MAb	Kd (M)
C2	1.93×10^{-9}
C5	1.7×10^{-8}
CRP30	4.3×10^{-7}
CRP135	4.4×10^{-9}

去CRP血清基质

去CRP血清基质由正常人血清通过免疫亲和层析制备而得。亲和吸附剂的基质中使用了3种特异性识别CRP抗原的不同位点的单克隆抗体。根据夹心免疫检测系统的测定结果，去CRP血清基质中的人CRP抗原浓度低于0.02 μg/ml（图8）去CRP血清基质可以作为制备校准品和标准品的基质。

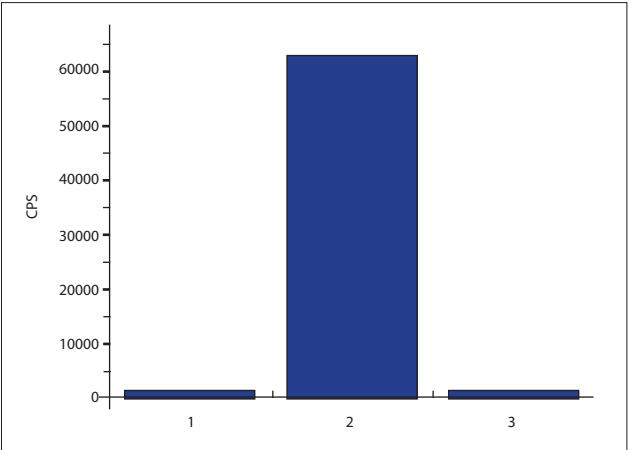


图8. 正常人血清和去C-反应蛋白血清的CRP检测结果（ELISA）
1. 缓冲液
2. 25倍稀释后的正常人血清检测信号（相当于4μg/ml）
3. 去C-反应蛋白血清的信号

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	克隆号	亚型	备注
C反应蛋白	4C28	C1	IgG2b	EIA, WB, 超敏
		C3	IgG1	EIA, IHC, 钙离子依赖, 超敏
		C5	IgG1	EIA, 超敏
		C7	IgG1	EIA, IHC, 超敏
		CRP11	IgG1	EIA, WB
		CRP36	IgG2a	EIA, WB, IHC
		CRP169	IgG2a	EIA, WB
	4C28cc	C2cc	IgG1	体外生产,EIA, 超敏
		C4cc	IgG1	体外生产,EIA, 钙离子依赖, 超敏
		C6cc	IgG2a	体外生产,EIA, 超敏
		CRP30cc	IgG1	体外生产,EIA, 低亲和力
		CRP135cc	IgG2b	体外生产,EIA, 超敏

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
人C反应蛋白	8C72	>95%	Human pleural/ascitic fluid or plasma
人CRP,重组	8CR8	>95%	重组

新产品!

阴性血清

产品名称	货号	来源
去C反应蛋白血清基质	8CFS	Pooled normal human serum

请注意技术资料中所呈现的数据使用的是体内生产版本的单克隆抗体。体外生产版本的单克隆抗体具有相同的性能。

参考文献

1. **Yasojima Koji et al.** "Generation of C-Reactive Protein and Complement Components in Atherosclerotic Plaques." Am J Pathol. 2001 March; 158(3): 1039-1051.
2. **Kobayashi S, Inoue N, et al.** "Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein." Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003, 23:1398-1404.
3. **Ciubotaru I., Potempa L.A., Wander R.C.** "Production of Modified C-Reactive Protein in U937-Derived Macrophages". Exp Biol Med (Maywood) 2005, 230(10):762-70.
4. **Diehl E. E. et al.** "Immunohistochemical Localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue." American Journal of the Medical Sciences 2000; 319(2):79.
5. **Hirschfield G.M., Pepys M.B.** "C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule." Q J Med 2003; 96:793-807.
6. **Biro A. et al.** "Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins" Immunology 2007 May;121(1):40-50.
7. **Lowe G.D.O., Pepys M.B.** "C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease: Weighing the Evidence" Current Atherosclerosis Reports 2006, 8:421-428.
8. **Ridker P.M.** "C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke" Circulation. 2003; 108:e81-e85.
9. **Clearfield M.B.** "C-reactive protein: a new risk assessment tool for cardiovascular disease" JAOA 2005; 105(9):409-416.
10. **Meyer M.H. et al.** "CRP determination based on a novel magnetic biosensor." Biosens Bioelectron 2007 Jan 15; 22(6):973-9.
11. **Shiesh S.C. et al.** "Determination of C-reactive protein with an ultra-sensitivity immunochemiluminometric assay". J Immunol Methods 2006 Apr 20;311(1-2):87-95.
12. **Sin K.K. et al.** "Fluorogenic nanocrystals for highly sensitive detection of C-reactive protein." IEE Proc Nanobiotechnol 2006 Jun;153(3):54-8.
13. **Karolina E. Taylor and Carmen W. van den Berg** "Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein." Immunology 2006; 120, 404-411.
14. **Thompson D., Pepys M.B., Wood S.P.** "The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine." Structure 1999; 7:169-177.