

• 临床检验研究论著 •

快速化学发光高敏 C-反应蛋白定量试剂盒的研制*

陈中平¹, 赵世巧², 刘海波³, 陈忠余^{2△}, 甘晓玲⁴

(1. 重庆市九龙坡区第一人民医院检验科, 重庆 400050; 2. 重庆市中医院检验科, 重庆 400021;

3. 重庆州泰生物科技有限公司, 重庆 400025; 4. 重庆医药高等专科学校, 重庆 400030)

摘要:目的 快速化学发光高敏 C-反应蛋白定量试剂盒的研制及评价。方法 建立以链霉亲和素包被微孔板, 生物素连接一株单克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记另一株单克隆抗体, 鲁米诺和过氧化脲为发光底物的化学发光定量试剂盒, 对反应条件进行优化, 并对性能参数作出评价。结果 该试剂盒敏感度为 0.005 mg/L, 线性范围为 1~500 mg/L, 批内变异系数为 5.4%~6.4%, 批间变异系数为 6.0%~7.8%, 相对偏倚小于 4.2%, 165 例临床标本的测试结果显示该试剂与国外试剂的测定结果 Youden 指数为 0.951 1, Kappa 指数为 0.951 5。结论 该试剂盒灵敏度高, 有良好的准确性和重复性, 线性范围宽, 符合临床检测需要。

关键词: C 反应蛋白质; 化学发光测定法; 试剂盒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)17-2229-02

Development of a rapid chemiluminescent immunoassay test kit for quantitative determination of high sensitivity C-reactive protein*

Chen Zhongping¹, Zhao Shiqiao², Liu haibo³, Chen Zhongyu^{2△}, Gan Xiaoling⁴

(1. Department of Clinical Laboratory, Jiulongpo District the First People's Hospital of Chongqing City, Chongqing 400050, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China;

3. Chongqing Zoutai Biological Technology Corporation Limited, Chongqing 400025, China;

4. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China)

Abstract: **Objective** To develop and evaluate a rapid chemiluminescent immunoassay (CLIA) test kit for quantitative determination of high sensitivity C-reactive protein in human serum. **Methods** Coated microplate with streptavidin, the double antibody sandwich method was used to develop the high sensitivity C-reactive protein kit, biotinylated one monoclonal antibody and labeled the other monoclonal antibody with horseradish peroxidase, luminol and peroxide was used for substrate system, optimized the reaction condition, Then the methodological evaluation was assessed. **Results** The sensitivity was reached to 0.005 mg/L, The linear range of the kit was 1—500 mg/L, the intra and inter-assay coefficient of variation were 5.4%—6.4% and 6.0%—7.8% respectively, The reagents kit of bias was less than 4.2%. The Youden index between the developmental assay and imported kit for high sensitivity C-reactive protein of 165 blood samples was 0.951 1, Kappa index was 0.951 5. **Conclusion** The developed CLIA kit for the detection of high sensitivity C-reactive protein in human serum is a sensitive method with broad linear range, high accuracy and reproducibility. It could meet the clinical requirements for the detection of the concentration.

Key words: C-reactive protein; chemiluminescent measurements; reagent kits

C 反应蛋白 (CRP) 是炎症因子刺激下由肝脏分泌的急性时相反应蛋白, 相对分子质量为 $115 \sim 140 \times 10^3$ 的血清 β 球蛋白, 是机体重要的防御分子^[1-4]。近年来, 随着检测技术的进步, 采用超敏感方法检测到的 CRP 被称为超敏 CRP (hs-CRP)。大量研究显示在冠心病、中风、周围血管栓塞等疾病诊断和预测中发挥越来越重要的作用, 甚至被认为是心血管病危险评估的“金标准”^[5-6]。化学发光免疫分析具有灵敏度高, 线性范围宽, 无放射性污染等优点, 是目前应用最广的免疫标记技术^[7-8]。本试剂盒的研制采用以链霉亲和素包被微孔板, 生物素标记抗体和辣根过氧化物酶标记的双抗体夹心法, 鲁米诺和过氧化脲为发光底物的化学发光定量试剂盒, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 包被板购自厦门云鹏科技有限公司, 链霉亲和素、生物素、辣根过氧化物酶、鲁米诺、过氧化脲购自 Sigma 公司, 生物素标记抗体、辣根过氧化物酶标记抗体购自厦门光免生物科技有限公司, 校准品购自中国生物制品检定所。其

他试剂为国产分析纯。对照试剂盒为 Abbott 公司产品。临床血清标本均来自本院和重庆市中医院检验科。仪器为宾松 BHP9504 酶促化学发光免疫分析仪。

1.2 方法

1.2.1 生物素化抗体和酶标记物抗体制备 将 CRP 抗体与生物素溶液, 充分混匀, 室温反应 2 h, 用 PBS (磷酸盐) 缓冲液在 4℃ 下透析制备生物素化抗体。按传统高碘酸钠法加以改进后, 用辣根过氧化物对 CRP 抗体进行标记, 制备酶标记物抗体。

1.2.2 包被链霉亲和素和素浓度选择 采用链霉亲和素浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行包被, 使用生物素、辣根过氧化物酶标记物考察链霉亲和素的包被浓度。对于包被的亲素选择最低饱和值时作为包被浓度。

1.2.3 最佳浓度选择 对生物素化抗体, 选择最低饱和值作为最佳浓度, 在选定的条件下, 滴加辣根过氧化物酶标记抗体, 要求标准曲线线性最佳, 且发光信号值最强的浓度作为辣根过

* 基金项目: 重庆市卫生局科学基金资助项目 (2012-2-180)。 作者简介: 陈中平, 男, 副主任技师, 主要从事临床生物化学、免疫学检验及实验室管理研究。 △ 通讯作者, E-mail: czy904798@sohu.com。

氧化物酶标记抗体最佳浓度。

1.2.4 反应时间的研究 对同一标准品用不同的反应时间(5、10、15、30 min、1 h)进行测定,在同一灵敏度条件下比较,选出最短的反应时间。

1.2.5 检测方法 测定前用生理盐水将标本按 1∶200 进行稀释,加 50 μL 稀释样本于链霉亲和素包被反应板,生物素-抗体 50 μL,酶标抗体 50 μL,37 ℃ 孵育不同的时间。洗涤 5 次,加发光底物: A、B 液各 50 μL,避光静置 3 min,用宾松 BHP9504 测定发光值(RLU 值)。根据标准品浓度值和测定的 RLU,用 log(X)-log(Y)线性定量。

1.3 性能参数评价 将浓度为 0、1、5、25、100、500 mg/L 系列浓度的标准品,用定量测定试剂盒进行免疫反应并建立剂量-反应曲线,及相关系数(*r*)。用零浓度校准品,重复测定 20 次,得出 20 次测量结果的相对发光值(RLU),计算其平均值(*M*)和标准差(*s*),*M*+2*s* 的 RLU 值对应的浓度值,即为灵敏度。批内 CV:采用同批试剂盒检测高、中、低值三组混合血清,每个标本各测 10 个孔,得出变异系数 CV。批间 CV:采用 3 批试剂盒检测高、中、低值 3 组混合血清,每批试剂盒重复检测 10 次,得到 30 次测量结果,计算变异系数 CV。用定值质控物,用试剂盒按标准的试验步骤进行测定,重复 3 次,取平均值。计算相对偏差,相对偏差应小于 15%。判断标准为雅培配套试剂 CRP≥5 mg/L 判断为阳性,本研究开发的试剂盒 CRP≥12 mg/L 判断为阳性。计算阳性符合率、阴性符合率、总符合率、Youden 指数和 Kappa 指数。

1.4 统计学处理 采用 Excel 2003 和 SPSS 17.0 软件进行数据处理,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 反应条件的优化 链霉亲和素浓度 1.5 μg/mL 时,包被板达到饱和。在生物素化抗体浓度为 1.5 μg/mL 时,辣根过氧化物酶标记抗体浓度为 1∶4 000 的标准曲线线性最佳,且信号值较高,在同一灵敏度条件下,反应 5 min 即可达到较佳的效果,因此选择亲和素包被浓度为 1.5 μg/mL,生物素化抗体浓度为 1.5 μg/mL,辣根过氧化物酶标记抗体浓度为 1∶4 000,反应时间为 5 min。

表 1 CRP 试剂盒批内、批间精密度

样本浓度	批内(<i>n</i> =10)		批间(<i>n</i> =30)	
	$\bar{x}\pm s$ (mg/L)	CV(%)	$\bar{x}\pm s$ (mg/L)	CV(%)
高值	144.6±7.8	5.4	143.8±8.6	6.0
中值	40.6±2.6	6.4	41.6±2.8	6.7
低值	4.9±0.3	6.1	5.1±0.4	7.8

表 2 CRP 试剂盒相对偏差

样本浓度	标本值(mg/L)	测量值(mg/L)	偏差(%)
高值	148.00	154.3	4.2
中值	56.00	57.90	1.6
低值	9.61	9.23	-3.9

2.2 方法学评价 在 1~500 mg/L 范围内成良好的线性,相关系数为 0.999 8,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。根据零浓度校准品得到灵敏度为 0.005 mg/L。精密度和准确度比较见表 1~2。开发的试剂盒与进口试剂比较,阳性符合率为 98.8%,阴性符合率为 96.3%,总符合率为

97.6%,Youden 指数 YI=0.951 1,Kappa 指数为 0.951 5,检验效能比较差异无统计学意义(*P*>0.05),一致程度高,适合临床检测。见表 3。

表 3 两种方法检测 165 例临床标本 CRP 结果分析(*n*)

研发试剂	雅培生化		合计
	+	-	
+	83	3	86
-	1	78	79
合计	84	81	165

3 讨 论

CRP 是一种急性相蛋白,当系统发生炎症时,CRP 会释放到血液循环。炎症、感染和组织损伤均可使其浓度升高,升高程度取决于炎症刺激的强度。血浆 CRP 浓度,在急性心肌梗死、创伤、炎症、手术、肿瘤浸润等情况下迅速显著地增高,甚至达正常水平的 2 000 倍。而 hs-CRP 可以预示部分表面正常,却存在的慢性低水平炎症反应。hs-CRP 是最佳的炎症标志物,是预测心血管疾病最有力与最重要的危险因子^[9]。hs-CRP 的检测在临床危急诊的应用越来越广泛。这就对试剂的灵敏性和检测速度提出了更高的要求。

本试剂盒的开发采用的是化学发光免疫分析。化学发光免疫分析是继荧光、放射性同位素和酶免分析之后发展起来的一项新的免疫分析技术,根据大量的实验结果及临床应用资料,从实用性、稳定性、准确性及发展前景来看,在非放射性标记分析技术中化学发光免疫分析处于领先的地位,他不仅具有免疫反应的特异度,而且具有化学发光的高灵敏性,且具有快速、准确、重复性好、效期长并安全无毒无污染等优点,成为取代放射免疫分析和酶免疫分析技术的首选^[10-13]。

本试剂盒采用链霉亲和素的包被板,生物素标记抗体和辣根过氧化物酶标记抗体的双抗体夹心法,以鲁米诺和过氧化脲为发光底物的化学发光定量试剂盒。在固相载体上吸附了链霉亲和素,使用了生物素-链霉素级联放大系统,辣根过氧化物酶-鲁米诺系统的化学发光低物灵敏度高,更进一步提高了整个体系的灵敏度。研究者还对试剂盒的反应模式和反应条件进行了试验研究,最终确定了一步法反应模式,就不同的反应时间对试验结果的影响进行了试验,确定了最适合的反应时间 5 min。对化学发光底物液发光持续时间的测定及不同发光时间对测定值的影响试验表明在加入发光底物 3~10 min 进行检测为最佳,其结果也较为准确。

本研究对试剂盒的精密密度、灵敏度、线性范围和偏倚进行了分析和评估,并与进口试剂进行对比分析,两者检验效能比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。本方法的建立大大提高了 hs-CRP 临床检验的灵敏度和特异度,具有良好的线性范围,准确性和重复性更好。本方法的建立使检测时间由免疫比浊的 20 min 缩短为 8 min,为临床急诊检验提供了方便。并且可以与全自动免疫分析仪器配套应用,也可以手工操作检验,有利于各级医院的推广应用。

参考文献

[1] 刘丹. C-反应蛋白的研究进展[J]. 岭南心血管病杂志, 2005, 11 (2): 143-144.
[2] Duclos TW. Function of C-reactive protein[J]. Ann Med, 2007, 32 (11): 274-278.
(下转第 2233 页)

型 10 例、16 型 7 例、58 型 6 例、81 型 6 例、33 型 5 例,感染率分别为 3.29%(10/304)、2.30%(7/304)、1.97%(6/304)、1.65%(5/304)。多重型别 HPV 感染者 42 例,占 13.82%(42/304),其中二重感染者 34 例,占多重感染的 80.95%(34/42),三重感染者 6 例,占多重感染的 14.29%(6/42),四重感染者 2 例,占多重感染的 4.76%(2/42)。提示男性尿道口细胞 HPV 感染,单一型别以低危型 HPV 感染为主,而多重型别中高危型 HPV 感染出现频率超过低危型别,且高危型多重 HPV 感染呈现出上升的趋势。(5)本研究男性 HPV 感染出现频率前 6 位的型别为 HPV6 型 47 人次、HPV11 型 22 人次、HPV 16 型 17 人次、HPV58 型 16 人次、HPV81 型 11 人次、HPV31 型 9 人次,这 6 种 HPV 型别是男性患者尿道口细胞感染出现频率最高的类型。由于高危型 HPV 致癌力是低危型 HPV 的 10 倍,因此,笔者在关注和监测低危型 HPV 的同时,更应该监控 HPV16 型、58 型、31 型,尤其是我国在研发 HPV 疫苗时,要充分考虑到 HPV58 型和 31 型在我国呈现出不断上升的流行趋势,应覆盖 HPV58 型和 31 型。(6)据报道,HPV 单一型别的感染可使宫颈癌的发病风险增加 19.9 倍,而多重型别的 HPV 感染可使宫颈癌的发病风险增加 31.8 倍^[6]。HPV 多重型别的感染载量要高于单一型别的 HPV 感染,癌变相关风险更大,是宫颈癌及其相关癌症发生的一个非常重要的危险因素,且致病力也更强,病变发展更快,复发率更高,因此,HPV 多重感染的资料对临床处理宫颈肿瘤性病变和制定有效的措施来阻止 HPV 传播具有重要的意义^[7-10]。有研究者^[11]报道妓女 HPV 感染 148 例中 78 例为 2 型以上的多重感染,表明多重感染与性活动程度和性伴侣数量有关。本研究高危 HPV16 型(10/7)、58 型(10/6)、18 型(5/2)、66 型(3/1)其多重型别的感染均超过单一型别的感染,值得重视和关注。一旦男性成为 HPV 携带者,他们将成为 HPV 传播的重要传染源,并通过性接触的方式感染不同的女性。提示临床和预防医学的医生更应该加强对男性多重型别 HPV 感染者的管理、治疗和跟踪检测工作。

由于 HPV 可在两性之间互相传播,如何阻断男性 HPV 的传播链,尽可能减少 HPV 在两性之间的传播。通过给男孩接种宫颈癌疫苗,对性活跃期的男性行 HPV 检测,对 HPV 阳性的男性给予及时管理和治疗,并在性事时采用安全套等措施,这样就可降低男性和女性的 HPV 感染率,宫颈癌及其他癌的发病率也会随之下降。如一、二级预防措施都能够落实到位,宫颈癌将会成为人类第一个可进行有效预防的恶性肿瘤,肛周癌、口腔癌及阴茎癌也随之下降,这将造福于广大民

众^[1,4,11-14]。

参考文献

- [1] 耿建祥,王旭波.人乳头瘤病毒检测及其临床应用[M].北京:人民卫生出版社,2009:381-427.
- [2] 兰建云,邵伟伟,袁苏娟,等.外耳道乳头状瘤中的人乳头瘤病毒检测及其临床意义[J].医学研究生学报,2010,23(4):391-393.
- [3] 张金浩,耿建祥,吴崑崙,等.结直肠肿瘤中 HPV 感染的基因分析[J].医学研究生学报,2011,24(2):154-157.
- [4] 李海,邓志勇,张阳,等.人乳头瘤病毒在阴茎鳞癌组织中的表达及意义[J].现代实用医学,2010,22(9):1037-1038.
- [5] 唐永发,耿建祥,张金浩,等.196 例肛门及肛管尖锐湿疣病变中 HPV 感染的研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(11):1303-1304.
- [6] 魏谨,耿建祥,朴正爱,等.已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒感染基因分型研究[J].中华医院感染学杂志,2012,22(23):5202-5205.
- [7] 董云灿,耿建祥,张劲松,等.1722 例已婚女性宫颈细胞中人乳头状瘤病毒基因的分型[J].国际检验医学杂志,2012,33(7):817-820.
- [8] 任晓惠,耿建祥,李海,等.某市 2109 例女性宫颈细胞中 HPV 基因型别的研究[J].国际检验医学杂志,2012,33(13):1424-1426.
- [9] 严粉琴,耿建祥,肖蔚,等.已婚女性宫颈上皮细胞中人乳头瘤病毒基因分型 2000 例分析[J].实用妇产科杂志,2012,28(5):390-393.
- [10] Giuliano AR, Tortolero-Luna G, Ferrer E, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection in men, cancers other than cervical and benign conditions[J]. Vaccine, 2008, 26(1):17-28.
- [11] 张佳立,邵红艺,张江宇,等. HPV 多重感染与宫颈癌及癌前病变发生、发展的关系研究[J].中国妇幼保健,2010,23(25):3270-3274.
- [12] Zhao R, Zhang WY, Wu MH, et al. Human Papillomavirus infection in Beijing, People's Republic of China: a population-based study[J]. Br J Cancer, 2009, 101(9):1635-1640.
- [13] Jiang P, Liu J, Zeng X, et al. Association of TP53 codon 72 polymorphism with cervical cancer risk in Chinese women[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 197(2):174-178.
- [14] 郎景和.妇科肿瘤临床诊治的挑战与对策[J].中国癌症防治杂志,2012,4(1):1-4.
- [15] McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses[J]. Virus Res, 2009, 143(2):195-208.

(收稿日期:2013-04-08)

(上接第 2230 页)

- [3] Tejani NR, Chonmaitree T, Rassin DK, et al. Use of C-reactive protein in differentiation between acute bacterial and viral otitis media[J]. Pediatrics, 2007, 95(8):664-669.
- [4] 杨春花,黄峰.高敏 C 反应蛋白研究进展[J].中华风湿病学杂志,2004,8(12):755-758.
- [5] 伍松娇,梁景云,张以昆,等.不同类型冠心病心绞痛患者血清 IL-18 和 hs-CRP 的检测及临床意义[J].检验医学,2009,24(1):36-39.
- [6] 岳学书. C 反应蛋白的检测及临床应用[J].河北联合大学学报:医学版,2013,15(2):171-173.
- [7] 高建钢,张彩虹,刘风华. C-反应蛋白的检测及临床应用研究进展[J].内蒙古医学院学报,2008,30(6):538.
- [8] 汪晨,吴洁,宗晨,等.化学发光免疫分析方法与应用进展[J].分

析化学,2012,40(1):3-10.

- [9] Jaye DL, Waite KB. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics[J]. Pediatr Infect Dis J, 1997, 16(8):735-746.
- [10] 王翔,林金明.化学发光免疫分析技术新发展[J].分析实验室,2007,26(6):111-122.
- [11] Safi MA. An overview of various labeled assays used in medical laboratory diagnosis. Immune and non-immune assays[J]. Saudi Med J, 2010, 31(4):359-368.
- [12] 魏光伟,余永鹏,魏文康,等.化学发光免疫分析技术及其应用研究进展[J].动物医学进展,2010,31(3):97-102.
- [13] 陈海斌.化学发光免疫分析技术及其进展[J].中国医学装备,2011,8(5):56-59.

(收稿日期:2013-04-08)