

· 论 著 ·

## 人血清微量 sCR1 蛋白双抗体夹心 ELISA 试剂盒的评价与应用\*

孙振威<sup>1</sup>, 仓宝成<sup>1</sup>, 刘亚利<sup>2△</sup>, 尚伟<sup>1</sup>, 王广兰<sup>1</sup>

(解放军第 153 中心医院: 1. 临检中心; 2. 肾内科, 河南郑州 450042)

**摘要:**目的 对研制的人血清微量 sCR1 蛋白双抗体夹心 ELISA 试剂盒的重复性、稳定性进行评价, 并了解其实际应用效果。方法 选取中、晚期肝硬化患者 50 例和健康体检者 50 例分别作为肝病组和正常对照组, 以鼠抗人 CD35 单克隆抗体、兔抗人 sCR1 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 为包被抗体、夹心抗体和检测抗体, 以纯化后的重组人 sCR1 蛋白为标准品, 建立人血清微量 sCR1 蛋白双抗体夹心 ELISA 试剂盒, 进行试剂盒重复性和稳定性检验, 并应用该试剂盒检测两组血清 sCR1 蛋白水平。结果 双抗体夹心 ELISA 法检测人血清微量 sCR1 蛋白的线性范围是 15.60~250.00 ng/mL; 血清 sCR1 蛋白水平对吸光度值的回归方程为  $Y=112.10X^2+18.21X+1.694(r^2=0.998)$ ; 重复性检测中, 高、低水平标准品检测值的批内相对标准偏差(RSD)分别为 6.20%、7.40%, 批间 RSD 分别为 6.70% 和 7.90%; 试剂盒稳定性检测中, RSD 均不大于 0.01; 肝病组血清 sCR1 表达水平显著高于正常对照组( $P<0.01$ )。结论 人血清微量 sCR1 蛋白双抗体夹心 ELISA 试剂盒线性范围广、重复性好、易于保存, 适合于临床和科研检测工作。

关键词: 可溶性补体受体 1 型; 双抗体夹心法; 酶联免疫吸附试验

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.21.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)21-2952-03

## Evaluation and application of double antibody sandwich ELISA kit for micro-quantitative soluble complement receptor 1 protein in human serum\*

SUN Zhenwei<sup>1</sup>, CANG Baocheng<sup>1</sup>, LIU Yali<sup>2△</sup>, SHANG Wei<sup>1</sup>, WANG Guanglan<sup>1</sup>

(1. Clinical Laboratory Center; 2. Department of Nephrology, 153 Hospital of PLA, Zhengzhou, Henan 450042, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the repeatability and stability of double antibody sandwich ELISA kit for micro-quantitative soluble complement receptor 1 (sCR1) in human serum and to understand its practical application effect. **Methods** 50 patients with middle and advanced liver cirrhosis and 50 individuals undergoing physical examination served as the liver disease group and normal control group respectively. The mouse anti-human CD35 monoclonal antibody, rabbit anti-human sCR1 polyclonal antibody and goat anti-rabbit IgG labeled by horseradish peroxidase served as the envelope antibody, sandwich antibody and detection antibody. The purified recombinant human sCR1 protein served as the standard substance. The human serum micro-quantitative double antibody sandwich CR1 ELISA kit was established. Then the repeatability and stability tests were performed. Then the sCR1 protein level of two group of serum was detected by this kit. **Results** The linear range of double antibody sandwich ELISA for detecting human serum micro-quantitative sCR1 protein was 15.60–250.00 ng/mL; the regression equation of sCR1 protein concentration to absorbance value was  $Y=112.10X^2+18.21X+1.694(r^2=0.998)$ ; in the repeatability test, the intra-batch relative standard deviation (RSD) in high and low concentrations of standard substance detection value was 6.20% and 7.40% respectively, the inter-batch RSD was 6.70% and 7.90% respectively; in the stability test, RSD was not more than 0.01; the serum sCR1 expression level in the liver disease group was significantly higher than that in the normal control group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The human serum double antibody sandwich ELISA kit for detecting human sCR1 has wide linear range, good repeatability, is easy to be stored and suitable for clinical and scientific research detection work.

Key words: soluble complement receptor type 1; double antibody sandwich; ELISA

补体是存在于人和动物正常血清、组织液和细胞膜表面的一组由生物大分子组成的连续而分级的激活反应系统。补体系统的激活可介导机体防御反应和免疫调控, 其异常活化也可介导机体毛细血管扩张、通透性增加、中性粒细胞黏附聚集、细胞因子和血管活性介质释放、细胞毒作用及组织的炎症损伤等一系列重要的病理生理反应<sup>[1]</sup>。补体系统的生物学效应多是通过补体受体介导的。可溶性补体受体 1 型(sCR1), 即补体受体 1 型的胞外片段, 保留了与 C3b/C4b 高度亲和、抑制 C3/C5 转化酶形成、加快 C3/C5 转化酶活性衰变、辅助 I 因子裂

解 C3b/C4b 补体调节蛋白的功能, 可同时抑制经典、甘露糖结合凝集素和旁路 3 条补体激活途径, 是一种强效的补体抑制剂<sup>[2-3]</sup>。sCR1 在诊断和治疗补体介导的自身免疫性疾病等方面具有广阔的应用前景。在前期研究成果中, 本研究组构建了人 sCR1 在原核和真核细胞中的表达系统<sup>[4-6]</sup>, 将 sCR1 蛋白复性后作为抗原免疫家兔, 获得了兔抗人 sCR1 特异性多克隆抗体<sup>[7]</sup>。本研究研制人血清微量 sCR1 蛋白双抗体夹心 ELISA 试剂盒, 并在肝硬化患者中进行试验, 旨在探讨人血清微量 sCR1 表达水平在补体介导疾病的临床诊断、疗效观察和预后

\* 基金项目: 河南省重点科技攻关项目(102102310161)。

作者简介: 孙振威, 男, 主管技师, 主要从事血液免疫学研究。△ 通信作者, E-mail: pinkle@126.com。

判断中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1—12 月本院收治的中、晚期肝硬化患者 50 例作为肝病组,其中男 33 例,女 17 例,年龄 42~67 岁。入选标准:符合 2000 年病毒性肝炎防治方案临床诊断标准的患者<sup>[8]</sup>。排除标准:排除肝癌患者、HIV 感染患者和孕妇。同时选取健康体检者作为正常对照组,其中男 29 例,女 21 例,年龄 26~54 岁。

1.2 仪器与试剂 纯化人重组 sCR1 蛋白、兔抗人多克隆抗体(PcAb)由本院制备;96 孔微量反应板购自郑州绿科生物工程有限公司;鼠抗人 CD35 mAb、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 购自郑州创生生物工程有限公司;ELX800 全自动酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 双抗体夹心 ELISA 法的建立 (1)用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释鼠抗人 CD35 单克隆抗体至 78.00 ng/mL,每孔 100 μL 包被微量反应板,4 °C 过夜,用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗涤 3 次后甩干,其中 1 孔作为试剂空白,不加包被抗体。(2)用含 100.00 g/L 牛血清蛋白的 PBST 液封闭板上空白位点,每孔 200 μL,37 °C 放置 2 h 后甩干。(3)将纯化人重组 sCR1 蛋白倍比稀释后制成标准品,除试剂空白、阴性对照(加封闭液 100 μL)外,其余每孔加入标准品 100 μL,37 °C 孵育 2 h 后,用 PBST 洗涤 3 次后甩干。(4)加入夹心抗体:将兔抗人 sCR1 PcAb 按 1:100 稀释,每孔加入 100 μL,37 °C 孵育 2 h 后,用 PBST 洗涤 3 次后甩干。(5)将 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 按 1:1 000 稀释,每孔加入 100 μL,37 °C 孵育 2 h 后,用 PBST 洗涤 3 次后甩干。(6)每孔加入显色底物 100 μL,37 °C 孵育 15 min。(7)每孔加 50 μL 2.00 mol/L 硫酸终止反应,10 min 内在酶标仪上测 450 nm 波长的吸光度值(A<sub>450 nm</sub>值)。(8)分别以 sCR1 标准品水平和对应的 A<sub>450 nm</sub> 值为纵、横坐标轴制作标准曲线。

1.3.2 检测范围和标准曲线的确定 将 50.00 mg/L 的纯化重组人 sCR1 蛋白倍比稀释为 0.00、1.95、3.90、7.80、15.60、31.30、62.50、125.00、250.00 g/L,分别检测其 A<sub>450 nm</sub> 值,确定该方法的检测范围。以纯化重组人 sCR1 蛋白水平为纵坐标(Y),A<sub>450 nm</sub> 值为横坐标(X),绘制标准曲线,求得回归方程。

1.3.3 试剂盒重复性检验 取 125.00、32.50 ng/mL 标准品各 1 份进行批内和批间重复性试验评价试剂盒重复性。(1)批内重复性试验。在尽可能短的时间内重复测定高、低水平标准品 A<sub>450 nm</sub> 值 20 次,计算相对标准偏差(RSD)。(2)批间重复性试验。将高、低水平标准品分为数份试验标本,1 d 内作 5 轮试验,每轮测定 4 次 A<sub>450 nm</sub> 值,获取 20 个测定数据,计算 RSD。

1.3.4 试剂盒稳定性检验 选取包被后在 4 °C 环境中分别储存 1、3、6 d 的微量反应板<sup>[9]</sup>,检测 3 例健康人(健康甲、健康乙、健康丙)和 3 例肝硬化患者(患者甲、患者乙、患者丙)血清 sCR1 蛋白水平来评价试剂盒稳定性。

1.3.5 血清 sCR1 水平检测 按上述方法采集血清标本进行检测。每份标本设立 2 个复检孔,取平均 A<sub>450 nm</sub> 值,查工作曲线计算标本中血清 sCR1 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件对数据进行统计学处理,对各组数据进行正态性检验和方差齐性检验,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 检测范围和标准曲线 双抗体夹心 ELISA 法检测人血清微量 sCR1 蛋白的线性范围是 15.60~250.00 ng/mL,回归方程为  $Y=112.1X^2+18.21X+1.694(r^2=0.998)$ 。见图 1。

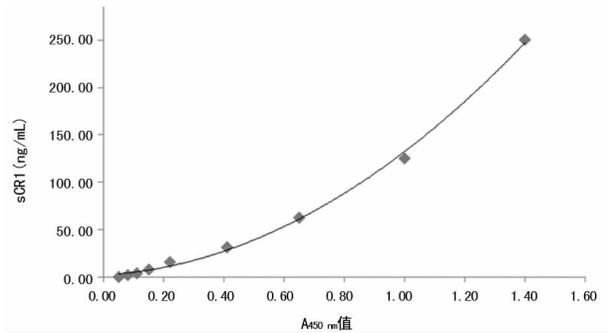


图 1 双抗体夹心 ELISA 法检测人血清 sCR1 工作曲线

2.2 试剂盒重复性和稳定性检测结果 高、低水平标准品批内 RSD 分别为 6.20%、7.40%,批间 RSD 分别为 6.70% 和 7.90%,试剂盒重复性较好。试剂盒在 4 °C 环境中分别储存 1、3、6 d 后,3 例健康人和 3 例肝硬化患者血清 sCR1 蛋白水平检测结果相近,其 RSD 均不大于 0.01,试剂盒稳定性较好。见表 1。

表 1 血清 sCR1 试剂盒稳定性检测结果(ng/mL)

组别	存储 1 d	存储 3 d	存储 6 d
健康甲	34.30	34.20	34.00
健康乙	38.70	38.60	37.80
健康丙	30.70	30.50	29.80
患者甲	178.90	177.90	178.00
患者乙	158.80	158.50	158.10
患者丙	197.50	196.70	196.50

2.3 两组血清 sCR1 水平检测结果比较 肝病组、正常对照组血清 sCR1 水平分别为 (162.65±27.78)、(32.16±6.53) ng/mL,差异有统计学意义(t=48.05,P<0.01)。见图 2。

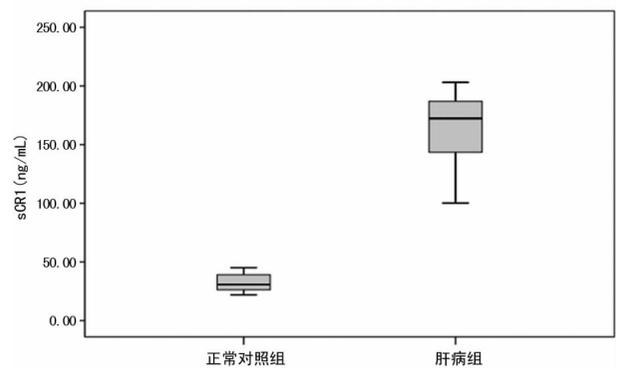


图 2 肝病组、正常对照组血清 sCR1 水平

3 讨论

自 1990 年 Weisman 等<sup>[10]</sup> 研究发现并重组出 sCR1 蛋白以来,国内外学者们开始关注其能够调控补体系统激活的特性,开展了大量关于其分子结构和功能的研究,以探索其在诊断和治疗补体系统相关疾病等方面的应用前景。现有研究表明,体外重组的 sCR1 或片段能够有效的防治或减轻实验动物

脑、心/骨骼肌、肠道和肝脏等器官的缺血再灌注损伤<sup>[3,11-13]</sup>。为进一步研究此类患者体内血清微量 sCR1 蛋白表达水平,发掘其在疾病诊断、疗效观察和预后判断中的作用,本研究以鼠抗人 CD35 mAb 为包被抗体,以免抗人 sCR1 PcAb 为夹心抗体,以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为检测抗体,以纯化后的重组人 sCR1 蛋白为标准品,研制了人血清微量 sCR1 蛋白双抗体夹心 ELISA 试剂盒。

本研究采用不同浓度的标准品评价试剂盒的检测范围,采用批内、批间和日间重复性试验评价试剂盒的重复性和稳定性,其研究结果表明:本试剂盒线性范围广、重复性较高、稳定性较好,能够满足临床和科研检测工作的需要。同时,本研究利用试剂盒检测肝病组和正常对照组血清 sCR1 水平,其中肝病组血清 sCR1 表达水平显著高于正常对照组,这与文献报道情况一致<sup>[14]</sup>。本课题组下一步将开展血清 sCR1 表达水平与肝功能受损情况相关性的研究,并在深入探究其中原理的基础上进行重组人 sCR1 蛋白在肝硬化患者治疗中的应用研究。

### 参考文献

- [1] Ducruet AF, Zacharia BE, Hickman ZL, et al. The complement cascade as a therapeutic target in intracerebral hemorrhage[J]. *Exp Neurol*, 2009, 219(2):398-403.
- [2] 汪晓艳,刘高科,汪正清,等.重组人补体受体 1 型 SCR15-18 对肠缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(10):1927-1930.
- [3] 李琛琪,王广兰,周明武,等.重组人 sCR1 蛋白对大鼠肢体缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国矫形外科杂志*, 2014, 22(14):1304-1309.
- [4] 王广兰,宫耀耀,王文丽,等.重组人 sCR1 在巴斯德毕赤酵母细胞中的表达、纯化及鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(11):1066-1068.
- [5] 王广兰,宫耀耀,王文丽,等.重组人 sCR1 真核表达载体

的构建、表达及其生物学活性[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(5):453-456.

- [6] 周明武,李琛琪,王广兰,等.人 sCR1 转化克隆菌的快速筛选和鉴定[J]. *生物医学工程与临床*, 2013, 17(5):487-492.
- [7] 王广兰,刘亚利,初霞,等.兔抗人 sCR1 抗体制备及临床初步应用[J]. *临床检验杂志*, 2010, 28(2):131-132.
- [8] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会.病毒性肝炎防治方案[J]. *中华内科杂志*, 2001, 40(1):62-68.
- [9] 徐志峰,李惠,王淑艳,等.ELISA 检测影响因素分析[J]. *中国误诊学杂志*, 2001, 1(4):584-585.
- [10] Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, et al. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing postschemic myocardial inflammation and necrosis[J]. *Science*, 1990, 249(4965):146-151.
- [11] Luan NM, Iwata H. Inhibition of instant blood-mediated inflammatory responses by co-immobilization of sCR1 and heparin on islets[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(21):5019-5024.
- [12] 何莉,杨永涛,汪正清,等. sCR1-SCR15-18 蛋白减轻补体介导的大鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(12):2436-2440.
- [13] 杨绍俊,张璇,汪正清,等.人 CR1-SCR1-3 蛋白对急性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(13):1323-1326.
- [14] 李守勇,张婷兰,王海滨,等.慢性肝病患者 sCR1 与血清层粘连蛋白含量变化的关系研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(3):481-489.

(收稿日期:2017-02-14 修回日期:2017-05-05)

(上接第 2951 页)

原菌药敏试验结果指导临床医师治疗,避免抗菌药物盲目使用或不合理应用增加病原菌的耐药性<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,伏立康唑、氟康唑、沃尔康唑、酮康唑、制霉菌素对部分病原菌的耐药率均超过 30.00%,临床在选择此类抗菌药物时,应尽量结合患者的病原菌构成情况。对于其他抗菌药物应按照抗菌药物临床应用规范,采用足量、完整疗程治疗,避免抗菌药物不合理使用导致感染反复发作<sup>[10]</sup>。

综上所述,真菌性角膜炎患者病原菌谱基本稳定,但耐药性呈上升趋势。加强抗菌药物的临床合理应用,延缓病原菌的耐药增长趋势是临床眼科医师的紧迫任务。

### 参考文献

- [1] 陈金桃.真菌性角膜炎病原学及药物性分析[J]. *国际眼科杂志*, 2013, 13(10):2028-2029.
- [2] 李正平,陈萍,张露文,等.真菌性角膜炎致病菌分布、耐药性及预后不良因素分析[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(9):156-159.
- [3] 高新宇.角膜炎的病原菌及耐药性分析[J]. *医药前沿*, 2014, 35(24):59-60.

- [4] 杨敏天,姜启阳.角膜炎的病原菌分布及耐药性研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(2):356-358.
- [5] 赵凌军.化脓性角膜炎的病原学特征及感染危险因素分析[J]. *眼科新进展*, 2014, 34(9):878-881.
- [6] 孙声桃,吕奇学,韩雷,等.我国中原地区 653 株真菌性角膜炎分离镰刀菌的基因型及药物敏感性[J]. *中华眼科杂志*, 2015, 51(9):660-667.
- [7] 张凤梅,尚彦霞,冯琳,等.邢台地区感染性角膜炎 1 928 例病原学及耐药性分析[J]. *重庆医学*, 2014, 42(34):4646-4648.
- [8] 李孝才,洪浩,赵培沛,等.某市化脓性角膜炎的致病菌分布和耐药性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(10):1249-1250.
- [9] 刘春林,徐红云,李红,等.茄病镰刀菌致急性真菌性角膜炎 1 例[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(11):1343-1344.
- [10] 夏元,薛春燕,吴艳,等.常见致病真菌所致角膜炎的激光扫描共焦显微镜图像特点分析[J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(2):155-159.

(收稿日期:2017-03-24 修回日期:2017-06-30)