

• 研究论文 •

## 一种简便灵敏测定 C 反应蛋白的免疫共振散射光谱分析新方法

梁爱惠\* 张南南

(桂林工学院材料与化学工程系 有色金属与材料加工新技术教育部重点实验室 桂林 541004)

**摘要** 在 pH 6.0 的柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液中及 PEG-6000 存在下, C 反应蛋白(CRP)与羊抗人 C 反应蛋白可聚集形成免疫复合物微粒, 在 350, 390, 440 nm 处有三个共振散射峰. 激光散射法测得免疫复合物微粒的平均粒径为 1720.0 nm. 在最佳实验条件下, CRP 浓度在  $0.03 \sim 1.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的范围内与 390, 440 nm 处共振散射强度都呈良好的线性关系, 其回归方程、相关系数、检出限分别为  $\Delta I_{390 \text{ nm}} = 306.4c + 17.3$ ,  $\Delta I_{440 \text{ nm}} = 296.0c + 10.7$ ; 0.9993, 0.9996;  $0.011, 0.012 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . 该方法选择性较好, 操作简便, 用于人血清中 C 反应蛋白的测定, 结果与免疫透射比浊法结果一致, 相对标准偏差在 0.90%~4.12%.

**关键词** C 反应蛋白; 免疫复合物微粒; 免疫反应; 共振散射

## A Simple and Sensitive Immunoresonance Scattering Spectral Assay for C Reactive Protein

LIANG, Ai-Hui\* ZHANG, Nan-Nan

(Key Laboratory of New Processing Technology for Nonferrous Metals and Materials of Ministry of Education,  
Department of Materials and Chemical Engineering, Guilin University of Technology, Guilin 541004)

**Abstract** In pH 6.0 citric acid- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  buffer solution goat-anti-human C reactive protein (CRP) was combined with human CRP specifically, to aggregate with formation of immune complex particles that exhibited three resonance scattering peaks at 350, 390 and 440 nm respectively, in the presence of PEG-6000. The laser scattering measurement indicates that the average diameter of the immune complex particles is 1720.0 nm. CRP concentration in the range from 0.03 to  $1.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  is all proportional to the resonance scattering intensity at 390 and 440 nm. Its regression equation is  $\Delta I_{390 \text{ nm}} = 306.4c + 17.3$  and  $\Delta I_{440 \text{ nm}} = 296.0c + 10.7$ , the correlation coefficient is 0.9993 and 0.9996, and the detection limit is 0.011 and  $0.012 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively. The method has been applied to the determination of CRP in the human blood serum, and its results are in agreement with those of the immunoturbidity, with relative standard deviation of 0.90%~4.12%.

**Keywords** C reactive protein; immune complex particle; immunoreaction; resonance scattering

C 反应蛋白(CRP)是一种典型的急性时相蛋白, 正常人体血清中 CRP 小于  $10 \mu\text{g/mL}$ , 在癌症及组织损伤时血浓度在 6~8 h 内迅速上升, 可达正常浓度的 10~100 倍甚至更高<sup>[1]</sup>. 检测 CRP 浓度升高值是各种原因引起的炎症和组织损伤的更为可靠和灵敏的急性期反应指标, 在临床上具有重要意义. 目前 CRP 的检测方法可

分为免疫沉淀法、免疫浊度法和标记免疫法三类<sup>[2]</sup>. 免疫沉淀法快速简便, 但灵敏度低且分析时间较长; 免疫浊度法的灵敏度低且不能进行定量分析, 受补体、RF 影响较大. 近几年逐渐发展起来的标记免疫测定方法, 其中包括放射免疫测定法(RIA)<sup>[3]</sup>、酶联免疫分析法(ELISA)<sup>[4]</sup>、磁免疫分析法(MIA)<sup>[5]</sup>、免疫发光分析法

\* E-mail: ahliang@glite.edu.cn

Received November 29, 2006; revised January 30, 2007; accepted March 20, 2007.

国家自然科学基金(Nos. 20365001, 20667001)、广西新世纪十百千人才工程计划和桂林工学院科研启动基金资助项目.

(LIA)<sup>[6]</sup>、免疫荧光分析法(IFMA)<sup>[7]</sup>等. RIA 的灵敏度和选择性较高, 但有同位素污染之缺点. ELISA 的线性范围较宽( $0.04 \sim 14.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )且灵敏, 但使用具有致癌性底物. MIA 法省时, 但灵敏度欠佳且需专门仪器. LIA 和 IFMA 具有较高的灵敏度和选择性, 但分析过程较长. 因此, 研究简便、灵敏、选择性好、易于推广使用的 CRP 分析新方法具有重要意义. 共振散射(RS)光谱分析具有灵敏度高和简便等特点, 已用于蛋白质分析等<sup>[8~11]</sup>, 但已报道一些蛋白质的共振散射光谱法的选择性不高. 近来研究表明<sup>[12~15]</sup>, 将特异性的免疫复合物微粒反应与简便灵敏的共振散射光谱技术结合是获得高灵敏、高选择性的共振散射光谱法的重要途径之一. 本文将共振散射光谱与 CRP 的特异性免疫反应相结合, 建立了一种定量分析人血清中 CRP 含量的免疫共振散射(IRS)新方法. 该法操作简便、灵敏度高, 效果较好.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

CRP 与羊抗人 CRP(批号 20060511, 上海科华生物工程股份有限公司); 实验中所用羊抗人 CRP 工作液为稀释 10 倍的羊抗人 CRP;  $0.20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$  与  $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柠檬酸储备液用于配制不同 pH 值的柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液;  $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  三羟甲基氨基甲烷(Tris)与  $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸储备液用于配制不同 pH 值的 Tris-HCl 缓冲溶液; 聚乙二醇 4000 (PEG-4000), PEG-6000, PEG-10000. 所用试剂均为分析纯, 实验用水为去离子水.

LS55 型荧光分光光度计(美国 PE 公司); DK-8B 型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司); PT-10 型 pH 计(Sartorius); Nano-ZS90 型纳米粒度与 zeta 电位分析仪(英国 Malvern 公司).

### 1.2 实验方法

依次移取  $0.10 \text{ mL}$  pH 为 6.0 的柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液,  $0.05 \text{ mL}$  稀释 10 倍的羊抗人 CRP 溶液, 一定量 CRP 溶液,  $0.15 \text{ mL}$   $300.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PEG-6000 于  $5 \text{ mL}$  带刻度的试管中, 用去离子水定容至  $3.0 \text{ mL}$ , 混匀, 在  $37^\circ\text{C}$  温育  $30 \text{ min}$ . 取适量于石英池中, 置于荧光分光光度计上. 用  $650 \text{ V}$  电压,  $1\%$  透过率, 激发波长和发射波长缝宽均为  $10 \text{ nm}$ , 同步扫描( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ ), 得到体系的同步散射光谱. 测定  $390$  和  $440 \text{ nm}$  处的共振散射光强度  $I_{\text{Rs}}$ , 不加 CRP 作空白, 测其共振散射光强度  $I_{\text{b}}$ , 计算  $\Delta I_{\text{Rs}} = I_{\text{Rs}} - I_{\text{b}}$ .

## 2 结果与讨论

### 2.1 CRP 免疫复合物的形成

CRP 和羊抗人 CRP 之间存在结构和空间上的互补

及亲和性, 通过电荷引力、范德华力、氢键结合力、疏水作用力等生成免疫复合物; 在聚乙二醇(PEG)存在下, 由于 PEG 与蛋白质有较好的相容性和惰性, 可以解除蛋白质(抗原、抗体)周围的电子云和水化层, 促进有结合力的抗原、抗体靠近并结合成大复合物; 并且免疫复合物和 PEG 之间存在较强的分子间作用力和疏水作用力而自动聚集形成了免疫复合物-PEG 颗粒和固液界面, 从而使体系的散射信号增强. 激光散射测得免疫复合物的平均粒径为  $1720.0 \text{ nm}$ (图 1).

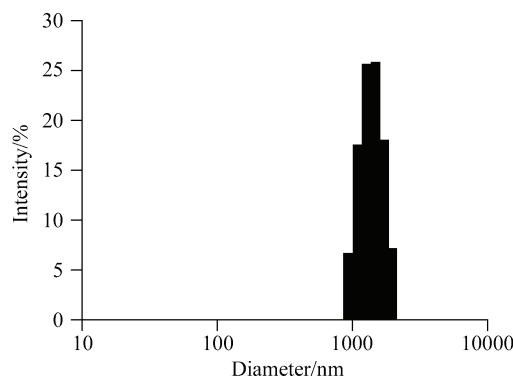


图 1 CRP 与羊抗人 CRP 免疫复合物的激光散射图  
 $0.15 \text{ mL}$  pH 6.0 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $0.05 \text{ mL}$  羊抗人 CRP- $0.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP- $15.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PEG-6000

Figure 1 Laser scattering image of CRP-goat-anti-human CRP immunocomplex

### 2.2 共振散射光谱(RSS)

CRP 为蛋白质大分子, 由于其水溶性较好, 界面不清晰, 故存在较弱同步散射峰. 当 CRP 和羊抗人 CRP 发生免疫结合后, 生成免疫复合物微粒, 其同步散射信号增强, 在  $350, 390, 440 \text{ nm}$  附近有 3 个同步散射峰, 已知该仪器在  $390 \text{ nm}$  处有最强发射, 故在  $390 \text{ nm}$  处出现了同步散射峰. CRP 和羊抗人 CRP 形成的免疫复合物微粒, 在一定 CRP 浓度范围内, 随着其浓度增加, 体系在  $390$  和  $440 \text{ nm}$  处的共振散射光强度线性增强(图 2), 据此可建立 CRP 的共振散射光谱分析方法. 纳米微粒共振散射光谱研究表明, 光源及其检测系统、分子吸收、共振散射效应是产生共振散射峰的三个主要因素<sup>[16]</sup>, 故在  $350, 390, 440 \text{ nm}$  处的 3 个同步散射峰为该免疫复合物产生的共振散射峰. 本文选择  $390$  和  $440 \text{ nm}$  测量其散射强度.

### 2.3 pH 值、缓冲溶液种类及用量的选择

分别实验了不同 pH 值( $5.6 \sim 7.6$ )的 Tris-HCl 和柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液对  $\Delta I_{\text{Rs}}$  的影响. 结果表明, 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液的灵敏度较高, 当 pH 值为 6.0 时,  $\Delta I_{\text{Rs}}$  具有最大值. 同时实验了该缓冲溶液用量的影响, 当缓冲溶液用量为  $0.10 \text{ mL}$  时,  $\Delta I_{\text{Rs}}$  达到最大值. 本实验

选取柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液的用量为 0.10 mL.

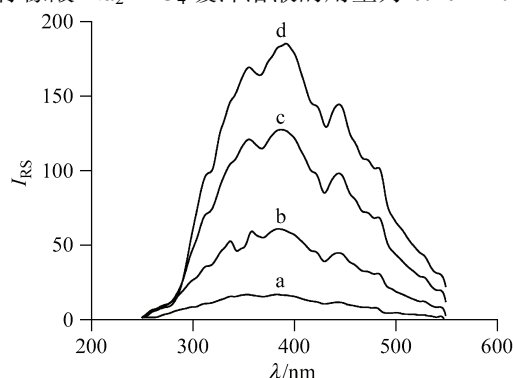


图2 CRP 与羊抗人 CRP 免疫复合物的共振散射光谱图

(a) 0.15 mL pH 6.0 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -0.05 mL 羊抗人 CRP-15.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PEG-6000; (b) (a)-0.22  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP; (c) (a)-0.44  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP; (d) (a)-0.77  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP

Figure 2 RSS image of CRP-goat-anti-human CRP immuno-complex

## 2.4 PEG 种类及浓度的影响

试验了 PEG-4000, PEG-6000, PEG-10000 用量对  $\Delta I_{\text{Rs}}$  的影响. 如图 3 所示, 所试验的几种 PEG 在一定程度上对  $\Delta I_{\text{Rs}}$  具有增敏作用. 其中, PEG-6000 为 15.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 其  $\Delta I_{\text{Rs}}$  具有最大值, 故实验选取 15.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 PEG-6000.

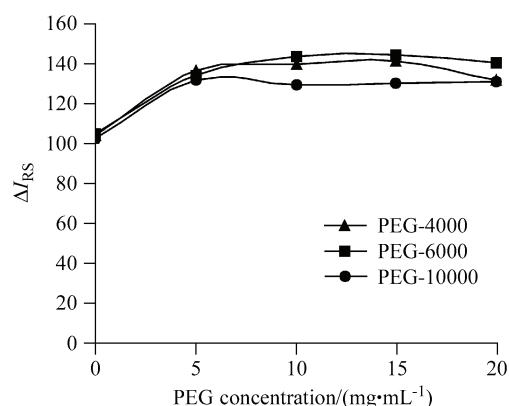


图3 不同 PEG 浓度的影响

pH 6.0 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -0.05 mL 羊抗人 CRP-0.733  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP-PEG

Figure 3 Effect of different PEG concentration

## 2.5 羊抗人 CRP 用量的影响

考察了稀释 10 倍的羊抗人 CRP 用量对  $\Delta I_{\text{Rs}}$  的影响. 图 4 表明, 在一定羊抗人 CRP 浓度范围内, 随着羊抗人 CRP 浓度的增加,  $\Delta I_{\text{Rs}}$  相应地增加, 当羊抗人 CRP 浓度为 0.05 mL 时, 体系的  $\Delta I_{\text{Rs}}$  达到最大值. 故本实验选取 0.05 mL 稀释 10 倍的羊抗人 CRP.

## 2.6 反应温度和时间的影响

随着温度的升高(20~40  $^{\circ}\text{C}$ ),  $\Delta I_{\text{Rs}}$  缓慢增大, 本文选择 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热能较好地控制温度. 考察了反应时间(0~50 min)对  $I_{\text{Rs}}$  的影响. 实验结果表明, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  水

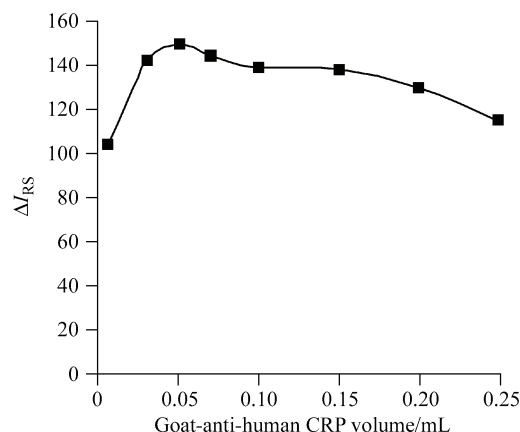


图4 羊抗人 CRP 用量对  $\Delta I_{\text{Rs}}$  的影响

pH 6.0 柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -羊抗人 CRP-0.733  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP-15.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PEG-6000

Figure 4 Effect of goat-anti-human CRP volume on  $\Delta I_{\text{Rs}}$

浴条件下, 反应能较快地进行, 25 min 后, 反应已基本发生完全且实验结果比较稳定, 在 50 min 内基本无变化. 实验选择在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴条件下温育 30 min.

## 2.7 线性关系

在最佳实验条件下, 取不同浓度 CRP 标准液, 按实验方法进行测定, 并以其共振散射强度  $\Delta I_{\text{Rs}}$  与 CRP 浓度作图. 在 390 nm 处, CRP 浓度在 0.03~1.80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内与  $\Delta I_{\text{Rs}}$  之间存在良好的线性关系, 回归方程为  $\Delta I_{\text{Rs}} = 306.4c + 17.3$ , 相关系数为 0.9993, 检出限为 0.011  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 在 440 nm 处, CRP 浓度在 0.03~1.80  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  范围内与  $\Delta I_{\text{Rs}}$  之间存在良好的线性关系, 回归方程为  $\Delta I_{\text{Rs}} = 296.0c + 10.7$ , 相关系数为 0.9996, 检出限为 0.012  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . 虽然目前一些方法的检测范围较宽, 检测限较低(表 1), 但这些方法一般操作比较复杂且需要专门仪器. 本法具有选择性好、灵敏度高、操作简便、易于推广等特点, 是测定 CRP 较好的方法.

## 2.8 共存物质的影响

按实验方法, 考察了共存物质对体系的影响. 当 CRP 的浓度为 0.733  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 相对误差在  $\pm 7\%$  之间时, 110 倍的 L-脯氨酸、苯丙氨酸; 73 倍的 L-精氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-赖氨酸、EDTA,  $\text{Ca}^{2+}$ ; 59 倍的 L-脯氨酸; 37 倍的葡萄糖、BSA; 22 倍的 DL-苏氨酸, HSA; 8 倍的 IgG, 基本不干扰 CRP 的测定, 故该法具有较好的选择性.

## 2.9 样品的测定

从医院取人血清三份, 用 pH 值为 6.0 的柠檬酸- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液将样品稀释 10 倍, 取稀释后的样品 200  $\mu\text{L}$  按实验方法进行测定(结果如表 2). 该法测定结果与免疫比浊法测定的结果基本一致.

表 1 CRP 分析方法的比较  
Table 1 Comparison of some assays for CRP

Method	Linear range/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Detection limit/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Sample	Remark	Ref.
RIA	5~2000	3	Blood serum	$^{125}\text{I}$ as marker, high sensitivity, but radioactive pollution	[3]
ELISA	0.04~14.4		Blood serum	Biotin as marker, excellent reliability, but complicated	[4]
MIA	0~260	3	Plasma	Superparamagnetic nanoparticles as marker, high selectivity, but specific equipment	[5]
LIA	6.25~400	0.0032	Blood serum	Lanthanum as marker, non-radioactive, high sensitivity and specificity, but complicated	[6]
IFMA	0~200	0.067	Canine serum	Europium chelates as marker, high precision, sensitivity and accuracy, but complicated	[7]
IRS assay	0.03~1.80	0.011	Blood serum	Sensitivity, selectivity, simplicity	This assay

表 2 样品 CRP 含量分析结果<sup>a</sup>  
Table 2 Results for the assay of CRP in serum

Sample	Content/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )						Mean value/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	D/%	Ref. value <sup>a</sup> /( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
1#	72.6	72.3	73.2	74.0	73.7	72.8	73.1±0.07	0	71.1
2#	37.0	39.7	38.0	36.8	39.3	40.5	38.6±1.6	4.1	38.8
3#	47.2	47.2	48.9	47.7	49.7	47.6	48.0±1.1	2.1	46.2

<sup>a</sup> 参考值(免疫透射比浊法)和样品由桂林市一八一医院生化室提供。

## References

- Wei, Y.-R. *China Contem. Med.* **2001**, 7, 27 (in Chinese). (魏有仁, 当代医学, **2001**, 7, 27.)
- Yang, Z.-X. *Shanghai J. Med. Lab. Sci.* **1999**, 14, 261 (in Chinese). (杨振修, 上海医学检验杂志, **1999**, 14, 261.)
- Min, Y.-Q.; Huang, M.; Huang, R. *J. Henan Med. Univ.* **1994**, 29, 187 (in Chinese). (闵月琴, 黄玫, 黄茹, 河南医科大学学报, **1994**, 29, 187.)
- Xue, H.; Yan, G.-T.; Zhang, K. *Labeled Clin. Med.* **2004**, 11, 154 (in Chinese). (薛辉, 颜光涛, 张凯, 标记免疫分析与临床, **2004**, 11, 154.)
- Ibraimi, F.; Kriz, D.; Lu, M.; Hansson, L. O.; Kriz, K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 384, 651.
- Jiang, Z.-H.; Liu, N.-L.; Song, X.-G. *Chin. J. Immunol.* **1985**, 1, 36 (in Chinese). (蒋滋慧, 刘农乐, 宋晓国, 中国免疫学杂志, **1985**, 1, 36.)
- Parra, M. D.; Tuomola, M.; Cabezas-Herrera, J.; Ceron, J. J. *Veter. Res. Commun.* **2006**, 30, 113.
- Liu, S.-P.; Fan, L.; Hu, X.-L.; Liu, Z.-F.; Chen, Y.-H. *Acta Chim. Sinica* **2004**, 62, 1635 (in Chinese). (刘绍璞, 范莉, 胡小莉, 刘忠芳, 陈粤华, 化学学报, **2004**, 62, 1635.)
- Jiang, Z.-L.; Zou, M.-J.; Liang, A.-H.; Shen, X.-C. *Acta Chim. Sinica* **2006**, 64, 111 (in Chinese). (蒋治良, 邹明静, 梁爱惠, 沈星灿, 化学学报, **2006**, 64, 111.)
- Wu, H.-L.; Li, W.-Y.; He, X.-W. *Acta Chim. Sinica* **2002**, 60, 1822 (in Chinese). (吴会灵, 李文友, 何锡文, 化学学报, **2002**, 60, 1822.)
- Liu, S.-P.; Jiang, Z.-L.; Kong, L. *Sci. China., Ser. B* **2002**, 32, 554 (in Chinese). (刘绍璞, 蒋治良, 孔玲, 中国科学 B 辑, **2002**, 32, 554.)
- Jiang, Z.-L.; Sun, S.-J.; Liang, A.-H. *Clin. Chem.* **2006**, 52, 1389.
- Deng, J.-Y.; Sun, S.-J.; Jiang, Z.-L.; Liang, A.-H. *Spectrosc. Spectr. Anal.* **2006**, 26, 1487 (in Chinese). (邓俊耀, 孙双姣, 蒋治良, 梁爱惠, 光谱学与光谱分析, **2006**, 26, 1487.)
- Zhao, H.-W.; Huang, C.-Z.; Li, Y.-F. *Talanta* **2006**, 70, 609.
- Jiang, Z.-L.; Chen, Y.-Y.; Liang, A.-H.; Tao, H.-L.; Tang, N.-L.; Zhong, F.-X. *Sci. China., Ser. B* **2006**, 36, 419 (in Chinese). (蒋治良, 陈媛媛, 梁爱惠, 陶慧林, 唐宁莉, 钟福新, 中国科学 B 辑, **2006**, 36, 419.)
- Liang, A.-H.; Jiang, Z.-L.; Zhang, B.-M.; Liu, Q.-Y.; Lan, J.; Lu, X. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 530, 131.

(A0611295 DING, W. F.; ZHENG, G. C.)