

C-反应蛋白上转发光免疫层析试纸条的研制

周明泽 (北京热景生物技术有限公司,北京 100076)

摘要 [目的]研制 C-反应蛋白上转发光免疫层析试纸条。[方法]在上转发光技术平台上,通过抗体筛选、反应条件的选择来确定 C-反应蛋白的测定条件。[结果]通过抗体配对筛选,3C8 标记和 3B11 包被可以实现一个较优组合,2 mg/ml 的包被浓度及反应时间在 15 min 时,能保证 T/C 值,线性和灵敏度较好。[结论]该检测方法具有反应时间短,灵敏度高,特异性、准确性、稳定性好,无环境污染和放射危害的特点。
关键词 C-反应蛋白(CRP);免疫层析试纸条;炎症;上转发光
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)32-211-01

Development of C-reactive Protein Supersversion Luminescence Immune Chromatography Test Slip

ZHOU Ming-ze (Beijing Hotgen Biotech Co., Ltd, Beijing 100076)

Abstract [Objective]The aim was to develop C-reactive protein supersversion luminescenceimmune chromatography test slip. [Method]In supersversion luminescence technology platform, through antibody screening and selection of reaction conditions , the conditions of C-reactive protein was determined. [Result]By antibodies matching filter, 3C8 tags and 3B11 package could achieve a better combination. Package concentration of 2 mg/ml and reaction condition of 15 min could guarantee T/C value, and linearity and sensitivity was good. [Conclusion]The detection method had the characteristics of short reaction time, high sensitivity, specificity, accuracy, good stability and no environmental pollution and radiation damage.
Key words C-reactive protein; Immune chromatography test slip; Inflammation;Supersversion Luminescence

上转磷光技术(UPT)是近年来发展起来的一种具有高灵敏度,基于上转磷光体 UCP 的新型生物检测技术^[1]。其中,上转磷光颗粒是纳米级的晶体颗粒,它由包埋于氧化硫等惰性材料中的稀土镧系元素组成。其特性可由红外线激发,而发射红、蓝、绿等不同波长的可见光^[2]。磷光信号可由改进的落射显微镜进行观察,并可用计算机系统进行检测和分析,达到定性、定量检测生物活性分子的目的^[3]。

UCP 具有高度的灵敏性、稳定性、简易性、灵活性、安全性等独特光学特性,使其作为新型标记物在生物检测领域将发挥巨大的潜能。迄今为止,上转磷光技术已被应用于免疫标记分析、免疫层析分析等多种标记检测技术中。近年来发现 C-反应蛋白浓度甚至在正常范围内的轻度升高都与心血管疾病发生的危险性增加有关,可以推测心肌梗死事件发生的可能性。超敏 C-反应蛋白是心脑血管疾病中的一项独立风险预测指标,可以敏感地预测糖尿病合并心脑血管事件的危险发生率^[4]。所以 CRP 的定量测定至关重要。

CRP 是一种能与肺炎链球菌 C 多糖体反应的急性时相蛋白,在组织损伤、感染等刺激下,被激活的单核细胞释放白细胞介素 1(IL-1),刺激肝细胞加速合成 CRP,对炎症感染的发生发展存在很大的相关^[5-6]。笔者是在双抗体夹心免疫分析的基础上建立起来的检测方法,具有反应时间短,灵敏度高,特异性、准确性、稳定性好,无环境污染和放射危害的特点^[7]。

1 材料与方法

1.1 抗体配对筛选 抗体配对筛选采用的是同时对几组抗体标记及包被,最后相互配对来测定 CRP 校准品,根据试验结果来选择标记及包被抗体。主要利用克隆号为 3B11、3C8 等抗体来标记及包被,包被量按 2.0 mg/ml,标记比例按 $m_{ucp}:m_{抗体}$

=20:1来测定 CRP 校准品,最终根据测定的灵敏度、测定结果梯度及反应强度等来选择抗体配对。

表 1 抗体配对组合

序号	UCP 标记抗体	Nc 膜包被抗体
1	3C8	3B11
2	3B11	3C8
3	3C8	3C8
4	3B11	3B11

1.2 反应条件的选择 由于 CRP 测定过程中反应时间对测定结果有影响,为了满足临床快速诊断的要求,同时也要保证试剂测定的准确性及符合率,故在相同的试纸条测定相同样本在不同时间的变化,该试验主要是加样孔中分别加入稀释后的样本 100 μ l,室温反应不同时间后,测量各试纸条的 T/C 值来平行对比。

2 结果与分析

2.1 抗体配对筛选 由图 1 可知,经过 2 株抗体 3B11 及 3C8 的相互配对,结果表明:①3C8 标记和 3B11 包被测定结果灵敏度好,线性相关也很好,在抗体配对中,该标记、包被的配对情况均符合要求;②3B11 标记和 3C8 包被测定结果灵敏度不是特别好,线性相关也不是特别好,但抗体配对仍有反应,若 3C8 标记与 3B11 配对仍无法调节到最优,可以考虑使用此配对方案来调整;③3C8 标记及 3C8 包被配对不成功,反应均没有一定的梯度,高浓度仍与阴性相同;④3B11 标记及 3B11 包被配对并不是最好,线性相关并不好,目前暂且不使用此配对。综上分析,目前 CRP 测定使用 3C8 标记和 3B11 包被,可以实现一个较优组合。

2.2 反应条件的选择 由图 2 可知,反应 5 min 时 T/C 值较低,线性也不够理想,反应 10~20 min 时 T/C 值基本稳定,线性、灵敏度也较满意。考虑到免疫层析反应的特点,一般 15 min 才能完成层析过程,所以选择 15 min 作为反应时间。

(下转第 240 页)

作者简介 周明泽(1958-),男,湖南常宁人,助理工程师,从事生物化学和分子生物学研究。
收稿日期 2015-10-16

K 复合肥施肥水平为 75 g/株时,地径生长量最大达 0.180 cm,施肥效果最好。

(2)在施用不同肥料后,苗高、地径生长在 6~7 月出现一次生长高峰,之后苗高呈缓慢生长趋势,10 月后生长基本停止,而地径生长在 8~9 月出现第 2 次生长高峰,之后缓慢生长趋于停止。

(3)通过对促进祁连圆柏苗高、地径生长的最适施肥量的比较,发现施用尿素 100 g/株,N、P、K 复合肥 75 g/株,为促进祁连圆柏幼树生长的最优施肥方案。

参考文献

- [1] 王军辉,张建国,张守攻,等.祁连圆柏网袋容器扦插繁殖技术的研究[J].福建林学院学报,2006,26(2):135-139.
- [2] 朱春云,赵越,冷肖荀.祁连圆柏愈伤组织诱导和胚状体分化的研究[J].青海农林科技,1992(3):23-26.
- [3] 沈海岗,张宏斌,翟玉新.祁连山区祁连圆柏种子育苗技术研究[J].防

护林科技,2011(3):20-22.

- [4] 李秉新,王金叶,米占山.祁连圆柏苗期生长规律初步研究[J].甘肃林业科技,1998(1):21-22.
- [5] 李德庆,高国雄.ABT2 号生根粉处理祁连圆柏嫩枝扦插育苗技术的研究[J].河北林业科技,2008(6):33-39.
- [6] 吕东,李秉新,张宏斌,等.ABT-6 号生根粉处理祁连圆柏扦插育苗技术研究[J].安徽农业科学,2014,42(15):4699-4701.
- [7] 赵越.祁连圆柏嫩枝扦插育苗技术[J].林业实用技术,2007(1):18-19.
- [8] 杨占武,朱春云,陈武生.祁连圆柏扦插繁殖采穗母株幼嫩化培育技术试验[J].青海农林科技,2006(3):48-49.
- [9] 孟好军,潘爱华,姜梅.干旱山地祁连圆柏的营造技术[J].甘肃科技,2004,20(11):161-162.
- [10] 张玉峰,崇玉林.祁连圆柏苗圃地病虫害防治[J].甘肃林业,2008(1):36-37.
- [11] 陈锋,杨青,倪自银,等.祁连山自然保护区祁连圆柏林害虫及防治初步研究[J].甘肃科技,2008,24(13):155-157.
- [12] 邓坦,贾黎明.杨树营养及施肥研究进展[J].世界林业研究,2009,22(5):51-56.

(上接第 211 页)

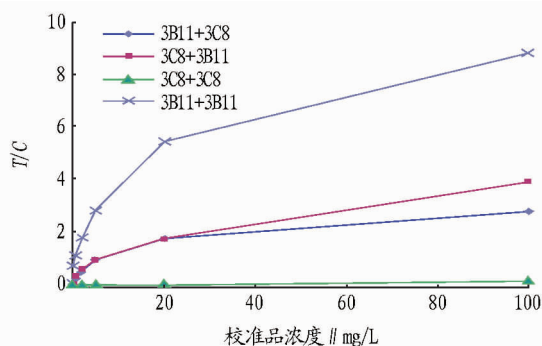


图1 不同抗体配对与 T/C 的关系

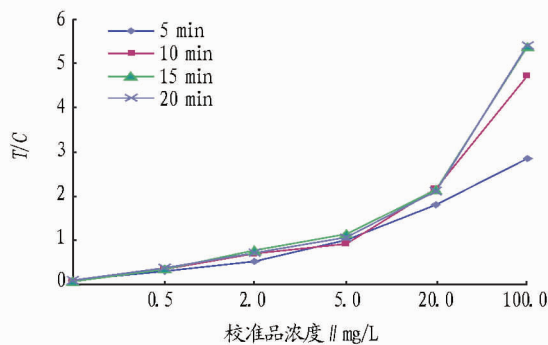


图2 反应时间与 T/C 值关系

3 讨论

上转换发光材料的出现为免疫层析技术的发展提供了新的空间。自然界中所有物质的发光过程均需遵循 Stokes 规则,即发射光的波长长于激发光的波长^[8]。

上述特点使得 UCP 作为生物标记物有着极为广泛的应用前景。因而在以抗原抗体为代表(还可包括核苷酸等)的 UCP 标记技术平台的基础上,使其与免疫层析技术相结合,再利用微型化的光电子材料可以开发出一种灵敏、快速、操控简易的免疫诊断分析仪^[9]。

目前美国国防部研制的 UPT 仪器用于生物反恐检测鼠

疫、定量检测炭疽芽孢,美国 Orasure 公司研制的 UPT 仪器用于检测艾滋病病毒抗体、毒品含量定量检测等,我国国内科研单位如军事医学科学院流行病学研究所杨瑞馥课题组研究该领域已经将近 10 年,已经研制成功鼠疫、O157 细菌、炭疽芽孢、表面抗体定量检测等免疫层析检测试剂,相关文献发表 20 余篇,SCI 文献发表 10 余篇^[10]。

4 结论

该研究主要在上转发光技术平台上,通过抗体筛选、反应条件的选择来确立 C-反应蛋白测定条件,建立起包被浓度 2 mg/ml 和反应时间 15 min 时,与人血清白蛋白、胆红素等结构类似物无交叉反应,且具有反应时间短,灵敏度高,特异性、准确性、稳定性好,无环境污染和放射危害的试剂。同时通过抗体配对筛选,3C8 标记和 3B11 包被可以实现一个较优组合,2 mg/ml 的包被浓度及反应时间在 15 min 时,能保证 T/C 值,线性 and 灵敏度较好。

参考文献

- [1] 陶义训.免疫测定进展[J].上海免疫学杂志,1999(2):2-5.
- [2] ZLEMAN H, BONNET S, BURTON J. Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: A new reporter technology[J]. Analytical biochemistry, 1999, 267: 30-36.
- [3] INEDIBLE R S, VAIL T L, FEINT H. Multi photon up-converting phosphors for use in rapid immunoassays: In in-vitro diagnostic instrumentation[J]. Proceedings of SPIED, 2000, 3913: 193-203.
- [4] ZHAO Y, ZHOU L, HUANG H, et al. UPT-based biosensor and its application[J]. Proc of SPIE, 2005, 5630: 833-843.
- [5] GUTIERREZ S L, WELTY T E. Point-of-care testing: An introduction[J]. Ann Pharmacotherapy, 2004, 38: 119-125.
- [6] BLACK S, KUSHNER I, SAMOS D. C-reactive protein[J]. J Bill Cham, 2004, 279: 487-490.
- [7] HIRSCHFIELD G M, PEPYS M B. C-reactive protein and cardiovascular disease: New insights from an old molecule[J]. QJM, 2003, 96: 793-807.
- [8] 卢健,周雷,赵永凯,等.上转换发光免疫试纸条扫描检测系统研究[J].光子学报,2006,35(4):555-560.
- [9] 王静,周雷,胡孔新,等.2 种免疫层析技术用于 4 种传染病及其病原体检测的研究[J].中国国境卫生检疫杂志,2006(29):27-34.
- [10] 赵永凯,周雷,黄惠杰,等.基于上转换发光技术生物传感器及其应用[J].光学学报,2005,25(6):841-847.