



技术报告



临床与科研领域

兽医



炎症



犬CRP (cCRP) – 系统性炎症标志物



C反应蛋白(CRP)是一种主要的急相蛋白。在系统性炎症发作期间,CRP的浓度水平会迅速显著升高;随着炎症源的清除,CRP的浓度水平又会迅速下降至正常水平。在急相应答过程中,犬CRP(cCRP)的反应动力学与人CRP类似。当机体受到炎症刺激后,炎症细胞因子会在很短时间内诱导肝脏细胞合成CRP。CRP同时也在先天免疫应答中扮演重要角色。然而,其具体的生物学功能非常复杂,仍没有被研究透彻。

反应蛋白(CRP)是一种主要的急相蛋白。在系统性炎症发作期间,CRP的浓度水平会迅速显著升高;随着炎症源的清除,CRP的浓度水平又会迅速下降至正常水平。在急相应答过程中,犬CRP(cCRP)的反应动力学与人CRP类似。当机体受到炎症刺激后,炎症细胞因子会在很短时间内诱导肝脏细胞合成CRP。CRP同时也在先天免疫应答中扮演重要角色。然而,其具体的生物学功能非常复杂,仍没有被研究透彻。

cCRP可作为诊断标志物

犬CRP已经广泛应用于炎症诊断及炎症严重性评估。若干研究证实cCRP也是一种检测急相应答非常有价值的标志物。在病毒或细菌感染、败血症及子宫蓄脓等多种炎症性紊乱中均有发现cCRP浓度水平的迅速升高,同时在外科手术中也可以检测到cCRP的升高(1-3)。cCRP目前已经被建议可用于可能的术后感染监测(4,5)。而且,cCRP还可以用于指导犬细菌性肺炎的抗生素治疗(6)。如果在治疗期间使用cCRP指导抗生素治疗,可以降低抗生素的使用剂量。

CRP的生化性质

CRP属于正五聚体蛋白家族。这是一种在进化上非常保守的蛋白家族,并且具有钙离子依赖的配体结合性质。正五聚体蛋白的主要功能是保护机体抵御外来抗原以及变异抗原(7)。CRP包含5个独立亚基,呈环状结构。CRP的分子量约为115KDa,每个亚基含有204个氨基酸,分子量约为23KDa。人CRP与犬CRP的主要区别在于犬CRP中有两个糖基化亚基,而人CRP则不含有多糖(8)。

用于开发CRP免疫检测系统的原料产品

在很多情况下,cCRP的免疫检测试剂使用的抗体为抗人CRP抗体。然而,两种CRP在血液中经历的修饰并不同。通常情况下cCRP为糖基化,而人CRP却为非糖基化。因此,抗人CRP抗体与cCRP的交叉反应水平很大程度上取决于抗体所识别的抗原表位,尤其是多克隆抗体,因此多抗的批间差会导致差异进一步被放大。

HyTest提供犬CRP抗体和抗原,这些原料可以用于开发灵敏且特异的犬CRP免疫检测试剂。我们提供的单克隆抗体对于识别犬血清中的CRP具有高度的特异性及灵敏度,并且对抗凝剂(如EDTA等)不敏感。我们已经在夹心免疫、直接和间接酶免及蛋白免疫印迹分析系统中对这些抗体进行了验证。

重组抗原可以用于犬CRP免疫检测系统中校准品的制备。此外,我们还提供犬CRP特异性的多克隆抗体。

抗cCRP特异性单克隆抗体

我们有四株特异性和灵敏度俱佳的抗体。这些抗体均可用于多种平台的cCRP定性或定量检测试剂的开发。这些抗体与犬血清中其他组分无交叉反应,且与人CRP无反应。此外,用这些抗体测试猫、马、兔及山羊血清时,也未检测到反应信号。

其中,有三株抗体非常适合夹心免疫,另一株抗体在直接ELISA及WB平台中表现优秀。关于四株cCRP单抗的基本性能以及应用推荐请参见表1。

表1. 抗cCRP单抗的基本性能以及应用推荐

单抗	亚型	表位	夹心免疫检测	间接ELISA	WB
cCRP1cc	IgG1	构象	+++	+	-
cCRP3	IgG2b	线性	-	+++	+++
cCRP11cc	IgG1	构象	+++	-	-
cCRP34cc	IgG1	构象	+++	-	-

CRP夹心免疫检测系统

我们对cCRP单抗在夹心免疫检测系统中的表现进行了测试。除了cCRP3，其余所有抗体均可以作为捕获抗体或检测抗体用于夹心免疫检测系统。单抗cCRP11(捕获抗体)和cCRP1(检测抗体)测试天然cCRP的校准曲线如图1所示。在夹心免疫荧光分析系统中，我们推荐的配对具有很高的灵敏度(0.1ng/mL)及很宽的线性范围。

抗体配对推荐请参见表2。

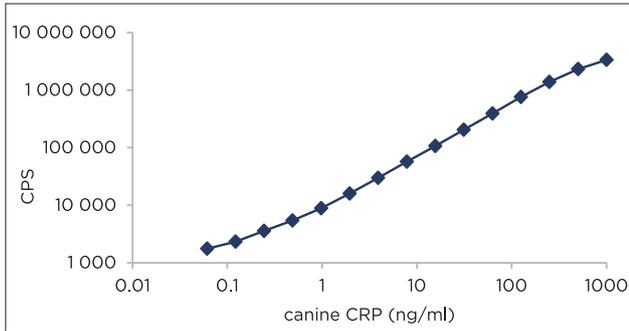


图1. 夹心免疫分析系统中天然cCRP抗原的校准曲线
cCRP11和Eu3+标记的cCRP1分别作为捕获抗体和检测抗体。

表2. 灵敏度最佳的抗体配对。以下数据均基于我们内部的DELFIA免疫分析系统。

捕获抗体	检测抗体
异源夹心免疫	
cCRP11cc	cCRP1cc
cCRP34cc	cCRP1cc
同源夹心免疫	
cCRP11cc	cCRP11cc

血清样本中的CRP检测

我们对cCRP单抗检测血清样本中内源性cCRP的性能进行了评测。结果显示，大多数抗体配对均能可靠地检出内源性cCRP。我们对34例犬血清进行了cCRP检测，其中包括不同原因引起的系统性炎症样本26例和健康样本8例，结果如图2所示。其中，cCRP34和cCRP1分别作为捕获抗体和检测抗体。结果显示，炎症个体样本中的cCRP浓度显著高于健康个体。

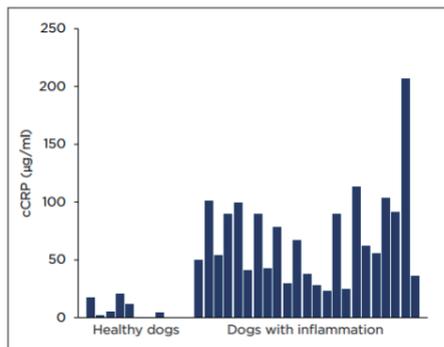


图2. 炎症个体和健康个体血清中的cCRP浓度水平。
cCRP34和Eu3+标记的cCRP1分别作为捕获抗体和检测抗体。

钙离子缺失情况下的cCRP检测

据文献介绍，有很多cCRP检测方法使用的捕获抗体为交联了载体蛋白的磷酸胆碱(PC)。PC作为特异性配体对cCRP有很高的亲和力。然而，这种结合非常依赖钙离子，一旦钙离子缺失，反应会立即失效。相反，我们的单抗并不会受钙离子影响。如图3所示，cCRP11作为捕获抗体，在钙离子存在与缺失的均可以灵敏地检出cCRP，而PC在钙离子缺失的情况下无法捕获cCRP。

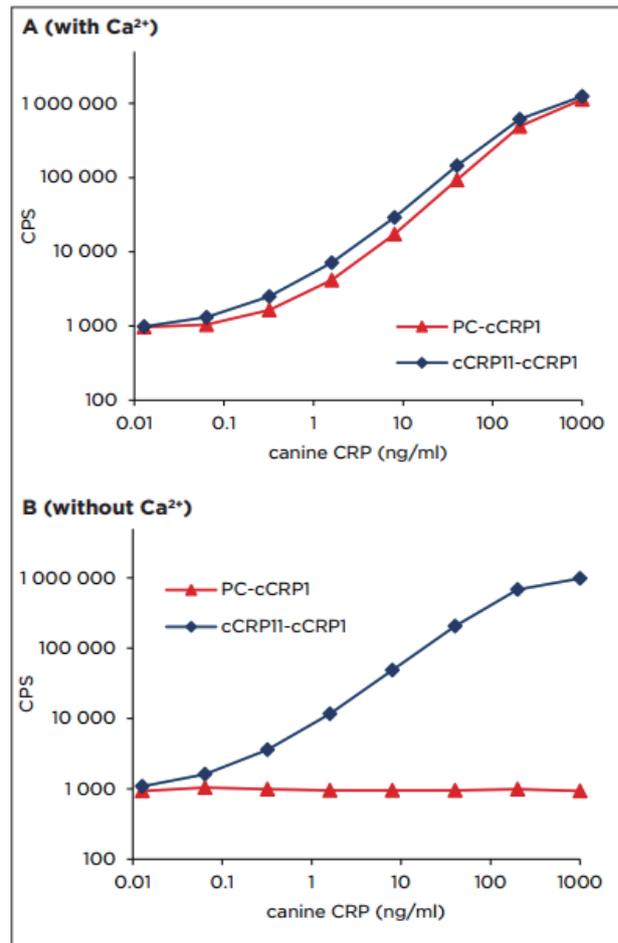


图3. PC与单抗cCRP11分别作为捕获抗体在钙离子存在(A)和缺失(B)情况下的对比。PC与BSA交联，天然cCRP作为抗原，Eu3+标记的cCRP1作为检测抗体。反应缓冲液中分别添加了2mM钙离子(A)和5mMEDTA(B)。

磷酸胆碱的结合不会影响抗体对cCRP的检测

在个体发生系统性炎症及多发伤期间，源于细菌入侵或细胞损伤所产生的磷酸胆碱可能会出现在血液中，使血液循环中的部分CRP与磷酸胆碱结合。如果使用磷酸胆碱作为捕获分子，可能影响cCRP的检测。

我们的抗体对于磷酸胆碱与CRP的复合物并不敏感。使用两株抗体对CRP进行夹心免疫测定，在磷酸胆碱存在或缺失的情况下，反应信号并没有发生变化，具体结果见图4。

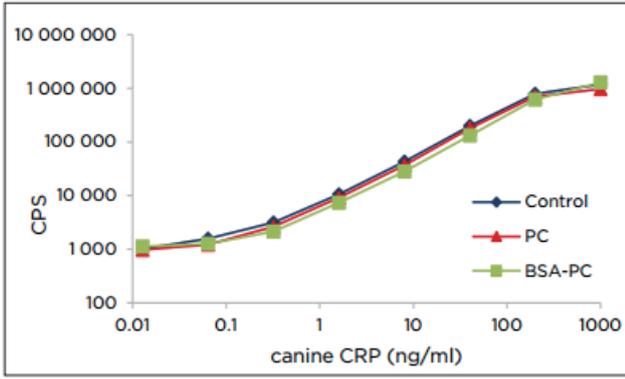


图4.磷酸胆碱的存在不会影响CRP在双单抗夹心免疫分析中的检测。天然cCRP作为抗原，Eu3+标记的cCRP1作为检测抗体。反应缓冲液中分别添加了磷酸胆碱和磷酸胆碱-BSA交联物

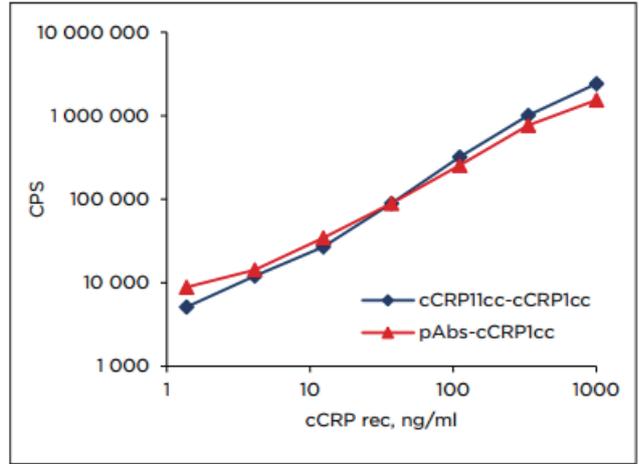


图6.单抗-单抗(蓝色)配对以及多抗-单抗(红色)配对测试重组cCRP的校准曲线。Eu3+的cCRP1为标记抗体。

直接ELISA与蛋白免疫印迹

我们提供的cCRP3适合在直接ELISA(图5)和蛋白免疫印迹平台上进行cCRP检测。该单抗也可用于间接ELISA,但是不能用于夹心免疫分析系统。可能因为cCRP3所识别的抗原表位为线性位点,只有抗原被固定于微量滴定板或经过还原性SDS-PAGE电泳后暴露线性位点才可以被识别。

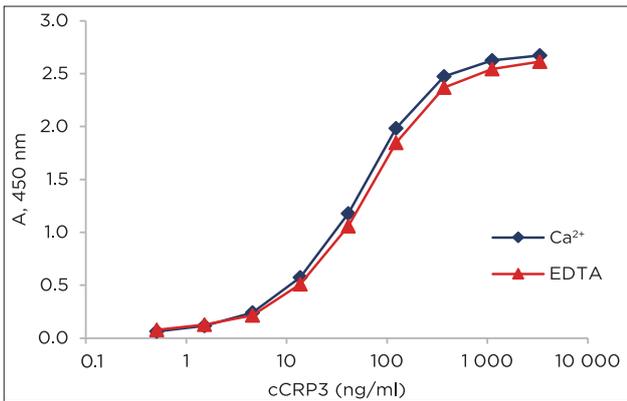


图5.分别在钙离子与EDTA存在的情况下,使用cCRP3在直接ELISA平台中对天然cCRP进行检测。将50ng天然cCRP抗原包被于96孔板上,然后用含有cCRP3的Tris缓冲液进行滴定,Tris缓冲液中分别添加2mM钙离子和5mM EDTA。

犬cCRP多克隆抗体

除单抗外,我们还提供可用于开发cCRP免疫检测系统的多克隆抗体。

配对cCRP11-cCRP1以及多抗-cCRP1(多抗做为捕获抗体)测试重组cCRP的校准曲线如图6所示,两组配对在夹心免疫检测系统中的表现非常接近。

我们还使用了含有天然cCRP的犬血清对该多抗进行了验证。

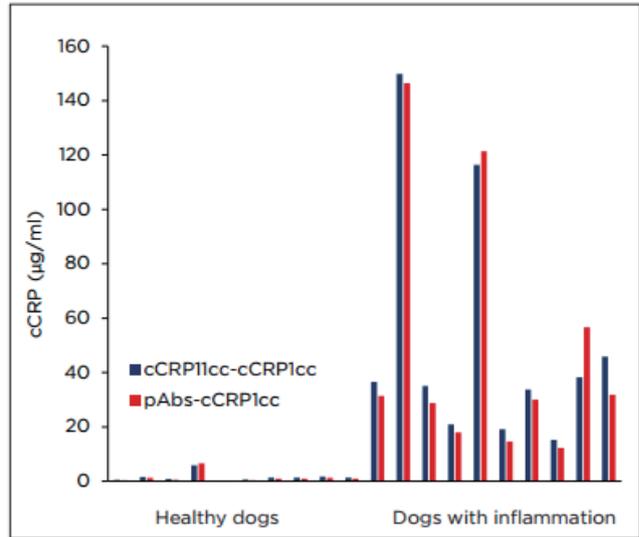


图7.用两种配对对正常犬只和患有系统性炎症犬只的血清cCRP的检测结果。检测抗体cCRP为Eu3+标记。

重组cCRP

HyTest提供重组的犬CRP抗原,含有204个氨基酸,该抗原由真核细胞所表达,纯度超过95%。该抗原为部分糖基化,其生化与免疫化学性质与天然cCRP非常相似,可用于配制犬CRP免疫检测试剂的校准品。

重组cCRP是部分糖基化的

已知犬CRP是一种糖蛋白,据推测,其五个亚基中的两个被糖基化。在还原性的SDS-PAGE电泳中,天然cCRP的条带为两条,上面的条带代表糖基化亚基(8)。

我们提供的重组cCRP表达于一个可以对蛋白进行糖基化修饰的系统。当纯化后的抗原进行还原性SDS-PAGE电泳时，可以发现与天然cCRP条带类似的两条分离的条带(图8)。两条下方条带具有同样的迁移性，代表着非糖基化亚基。不过代表着糖基化亚基的上方条带则有略微差异。这说明重组的和天然的cCRP一样，都只有部分抗原糖基化，但在糖基化模式上似乎有所区别。

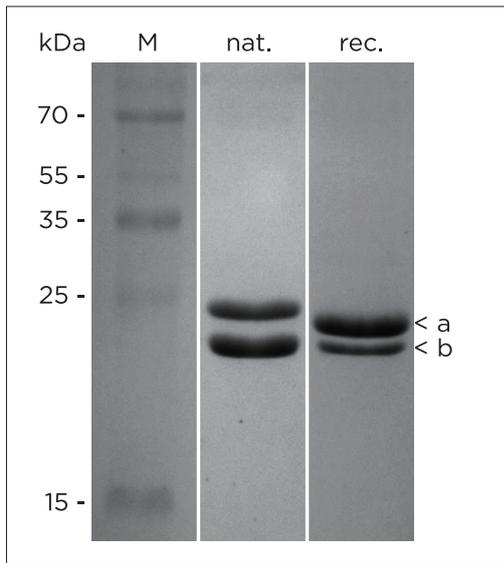


图8.重组与天然cCRP的SDS-PAGE电泳对比。3 μ g的纯化抗原在12.5%凝胶中进行还原性电泳。凝胶采用考马斯亮蓝R-250染色。
a: 糖基化CRP
b: 非糖基化CRP

在SDS-PAGE电泳后，重组蛋白的糖基化亚基由糖蛋白染色进行确认(图9)。

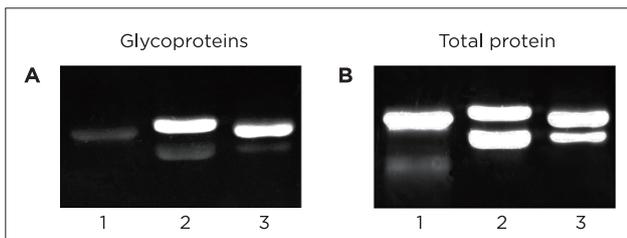


图9.天然与重组cCRP的碳水化合物染色。3 μ g的天然cCRP(泳道2)和重组cCRP(泳道3)在12.5%凝胶中进行还原性电泳。凝胶先采用Pro-Q emerald 300进行糖蛋白染色(A)，然后再采用SYPRO® Ruby对总蛋白进行染色(B)。3 μ g的人CRP(货号8C72)作为参考对照(泳道1)。

重组cCRP与天然cCRP在夹心免疫分析中的对比

重组与天然的cCRP抗原在我们内部的DELFIA免疫分析系统中具有相同的滴定曲线(图8)。在该实验中，cCRP11与cCRP1分别作为捕获抗体和检测抗体。

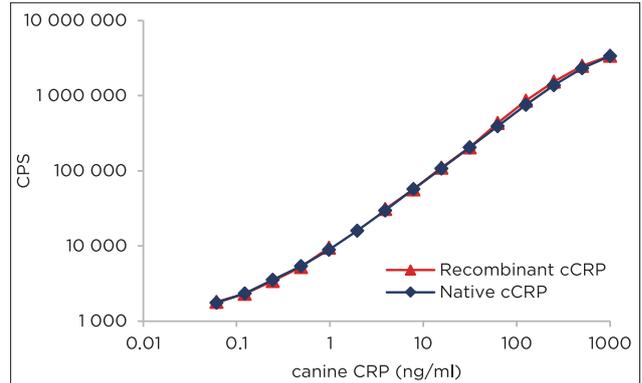


图10.天然与重组cCRP抗原在夹心荧光免疫分析系统中的校准曲线。cCRP11与Eu3+标记的cCRP1 分别作为捕获抗体和检测抗体。

重组cCRP与磷酸胆碱的结合

CRP的功能之一是在钙离子存在的条件下与细菌细胞壁的C-多糖结合。其中与CRP反应的主要基团是磷酸胆碱，该基团存在于C-多糖残基中。

为了测试重组cCRP是否会同天然cCRP一样结合磷酸胆碱，我们用磷酸胆碱-BSA交联物在夹心免疫分析系统中对两种蛋白进行了滴定试验。结果显示，重组与天然cCRP的磷酸胆碱结合能力没有差异(图11)。

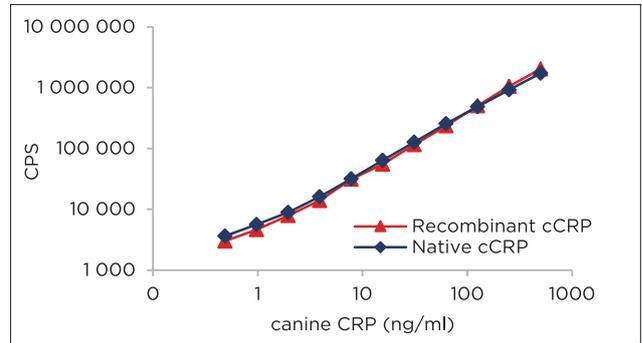


图11.重组与天然cCRP在使用磷酸胆碱作为捕获分子的夹心荧光免疫分析系统中的滴定曲线。磷酸胆碱与BSA交联作为捕获分子，Eu3+标记的cCRP1 分别作为检测抗体。

重组的cCRP为五聚体

为了研究我们的重组cCRP是否可以形成五聚体，我们采用同源夹心免疫对其进行了分析。如果该分子中存在超过一个特异性的抗原表位，那么使用一种抗体可以同时作为捕获抗体与检测抗体。我们将cCRP11同时作为捕获抗体与检测抗体对重组与天然cCRP抗原进行了测试，校准曲线如图12所示。结果显示，重组的cCRP为一种低聚物。基于这个结果以及其他的一些实验结果(HPLC、凝胶电泳以及还原性SDS-PAGE电泳；没有列出)，我们可以确认重组的cCRP为五聚体结构。

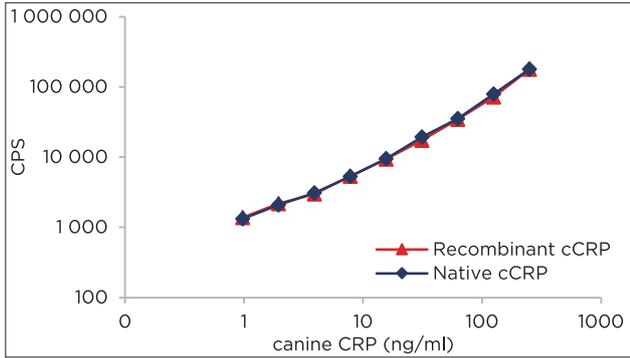


图12.重组与天然cCRP抗原在夹心荧光免疫分析系统中的校准曲线。单抗cCRP11同时作为捕获抗体和检测抗体。Eu3+标记的抗体作为检测抗体。

参考文献

1. **Cerón, J. J., Eckersall, P. D. & Martýnez-Subiela, S.** Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Pathol.* 34, 85–99 (2005).
2. **Eckersall, P. D. & Bell, R.** Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* 185, 23–27 (2010).
3. **Kjelgaard-Hansen, M.** Canine C-reactive protein – a study on the applicability of canine serum C-reactive protein. (Copenhagen: Department of Small Animal Clinical Sciences, The Royal Veterinary and Agricultural University, 2004).
4. **Löfqvist, K., Kjelgaard-Hansen, M. & Nielsen, M. B. M.** Usefulness of C-reactive protein and serum amyloid A in early detection of postoperative infectious complications to tibial plateau leveling osteotomy in dogs. *Acta Vet. Scand.* 60, 30 (2018).
5. **Christensen, M. B., Eriksen, T. & Kjelgaard-Hansen, M.** C-reactive protein: quantitative marker of surgical trauma and post-surgical complications in dogs: a systematic review. *Acta Vet. Scand.* 57, 71 (2015).
6. **Viitanen, S. J., Lappalainen, A. K., Christensen, M. B., Sankari, S. & Rajamäki, M. M.** The Utility of Acute-Phase Proteins in the Assessment of Treatment Response in Dogs With Bacterial Pneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* 31, 124–133 (2017).
7. **Du Clos, T. W.** Pentraxins: Structure, Function, and Role in Inflammation. *ISRN Inflamm.* 2013, 1–22 (2013).
8. **Caspi, D. et al.** Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology* 53, 307–313 (1984).

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	单抗	亚型	备注
犬CRP	4CC5	cCRP1cc	IgG1	体外培养, EIA
		cCRP3	IgG2b	EIA, WB
		cCRP11cc	IgG1	体外培养, EIA
		cCRP34cc	IgG1	体外培养, EIA

多克隆抗体

产品名称	货号	宿主动物	备注
犬CRP多克隆抗体	PRP4	山羊	EIA

新产品!

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
犬CRP (cCRP)	8CC5	>95%	重组