



# ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Для исследований  
и производства

Сердечные  
маркеры



Воспаление



## С-РЕАКТИВНЫЙ БЕЛОК (СРБ)



**С**-реактивный белок человека (СРБ) относится к так называемым белкам острой фазы. СРБ вырабатывается в печени, и его концентрация в крови быстро увеличивается в ответ на воспаление. Как правило, он применяется в роли неспецифического маркера воспаления. СРБ представляет

собой белок из 224 аминокислотных остатков с молекулярной массой мономера приблизительно 25 кДа и  $pI$  6,4(1-4). Он принадлежит к пентраксинам, эволюционно консервативному семейству белков, характеризующихся кальций-зависимым связыванием лиганда и радиальной симметрией пяти мономеров, образующих кольцо вокруг центральной поры. Общая масса пентамера CRP составляет примерно 120 кДа.

Точная функция СРБ *in vivo* не установлена до сих пор, но исследования показали, что уровень СРБ повышается за счет секреции интерлейкина-6, вырабатываемого, например, макрофагами и Т-клетками (6). Было установлено, что СРБ участвует как в воспалительных процессах, так и в процессах врожденного иммунитета. Уровень СРБ в крови здоровых людей обычно низкий, но при бактериальных инфекциях концентрация СРБ вполне может увеличиваться в десятки раз. В то же время инфекции вирусного происхождения обычно приводят лишь к умеренному повышению уровня

СРБ. Важная биоактивность СРБ определяется его способностью связываться с различными лигандами - поврежденными клеточными мембранами, апоптозными клетками и фибронектином, - достигая максимального уровня аффинности с остатками фосфохолина. СРБ, связываясь с лигандами, может быть распознан компонентом комплемента C1q, что приводит к активации классической системы комплемента. Если же СРБ взаимодействует с фактором комплемента Н, то далее он развивается по альтернативному пути комплемента (7).

### Применение СРБ в диагностике

В современной медицине С-реактивный белок считается основным, хоть и неспецифическим, маркером воспаления в организме. У здоровых людей уровень СРБ обычно ниже 5 мг/л. При патологии, концентрация СРБ может увеличиваться в 10.000-кратном размере (примерно 0,05-500 мг/л)(8). Наивысшие значения СРБ (выше 30 мг/л) наблюдаются при бактериологических инфекциях - септическом артрите, менингите и пневмонии.

### КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

- ✓ Прогнозирование рисков сердечно-сосудистых заболеваний
- ✓ Воспаление

В 2003 году Центр по контролю и профилактике заболеваний США (CDC) и Американская ассоциация кардиологов (AHA) в совместном заявлении признали СРБ маркером воспаления, наиболее подходящим для оценки риска сердечно-сосудистых заболеваний в современной клинической практике (9).

Многочисленные эпидемиологические исследования показали, что СРБ является надежным независимым предвестником развития сердечно-сосудистых осложнений, в том числе инфаркта миокарда, ишемического инсульта, заболевания периферических сосудов и остановки сердца без каких-либо признаков сердечно-сосудистых заболеваний (согласно обзору Clearfield (9)).

Рекомендации CDC/AHA предписывают использование СРБ в первичной профилактике и устанавливают пороговые значения в соответствии с категориями относительного риска: низкий (<1,0 мг/л), средний (1,0-3,0 мг/л) и высокий (>3,0 мг/л) уровни. Именно поэтому современные высокочувствительные наборы для определения СРБ (hsCRP) направлены на распознавание уровней СРБ в нанограммах на миллилитр (нг/мл), в то время как традиционное измерение уровня СРБ происходит в диапазоне от 10 до 1000 мг/л (11).

Заболевания, при которых уровень СРБ повышается, представлены в таблице 1. Измерение СРБ в стандартной клинической практике включает в себя, например, скрининговый тест на органические

заболевания, оценку активности заболевания при воспалительных состояниях, диагностику и лечение инфекций, а также дифференциальную диагностику или классификацию воспалительных заболеваний (12).

#### Реагенты для разработки hsCRP тестов

Моноклональные антитела (МоАт) ХайТест применяются в новейших ИФА анализах, которые демонстрируют превосходную чувствительность с линейным диапазоном обнаружения от 0,025 мг/л до 2,5 мг/л в магнитном биосенсорном анализе (13), и от 0,01 мг/л до 50 мг/л в иммунохемилюминесцентном анализе (14).

В обоих случаях предел обнаружения составлял 0,004 мг/л. Предел обнаружения 0,0011 мг/л был достигнут в твердофазном сэндвич-флуоресцентном иммуноанализе с использованием нанокристаллов (15). Наши лучшие пары С2сс–С6сс и С5–CRP135сс, а также несколько других пар обеспечивают 10000-кратную линейность в экспериментальных иммунофлуориметрических системах. Наши антитела могут быть использованы для разработки высокочувствительных анализов для детекции СРБ на различных диагностических платформах. В дополнение к моноклональным антителам мы предоставляем рекомбинантный С-реактивный белок.

Таблица 1. Патологии, приводящие к повышению уровня СРБ

Инфекции	Бактериальные Системные/тяжелые грибковые
Аллергические осложнения после инфекции	Ревматическая лихорадка Узловатая эритема
Воспалительные заболевания	Ревматоидный артрит Ювенильный идиопатический артрит Анкилозирующий спондилит Псориатический артрит Системный васкулит Ревматическая полимиалгия Болезнь Рейтера Болезнь Крона Семейная средиземноморская лихорадка
Некроз	Инфаркт миокарда Эмболизация опухоли Острый панкреатит
Травмы	Хирургия Ожоги Переломы
Злокачественные опухоли	Лимфома Карцинома Саркома

**Моноклональные антитела, специфичные к СРБ**

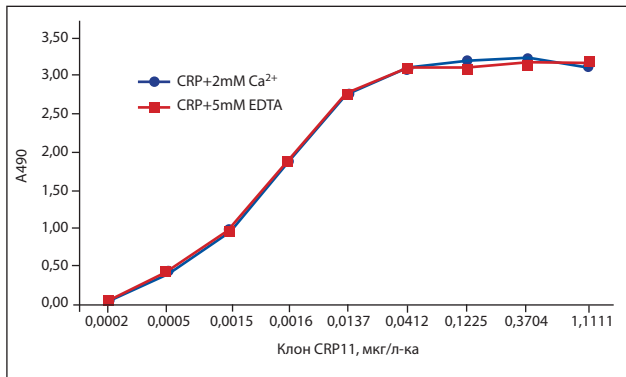
**Применение**

В нативной молекуле СРБ каждый протомер имеет двух-координированные ионы  $Ca^{2+}$  (13). ХайТест предлагает МоАт к СРБ, которые либо чувствительны, либо нечувствительны к присутствию  $Ca^{2+}$  в растворе. Некоторые из наших антител распознают антиген только в присутствии  $Ca^{2+}$  (клоны С3, С4сс). Большинство моноклонов Хайтест не зависят от присутствия  $Ca^{2+}$  в сэндвич-иммуноанализе и способны эффективно распознавать антиген даже в присутствии EDTA в тестируемом образце (клоны С1, С2сс, С5, С6сс, С7, CRP11, CRP30сс, CRP36, CRP135сс, CRP169).

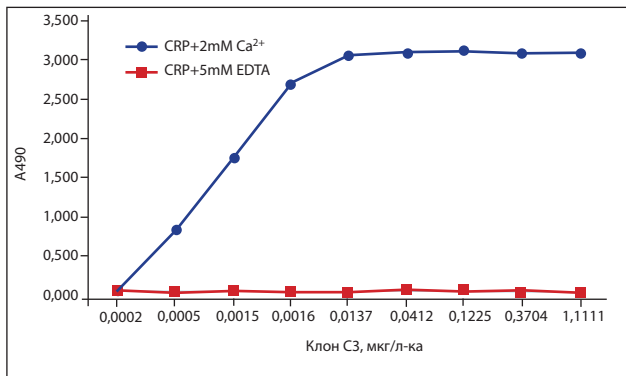
Все наши антитела к СРБ проходили тестирование в различных иммунологических приложениях.

**Прямой ИФА**

Все моноклональные антитела к СРБ нашей компании были протестированы в прямом ELISA и выявляли нативный СРБ с высокой чувствительностью. Большинство антител распознают нативный белок как при наличии, так и в отсутствии  $Ca^{2+}$ , тогда как клон С3 связывается с СРБ только в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  (рис.1 и рис.2).



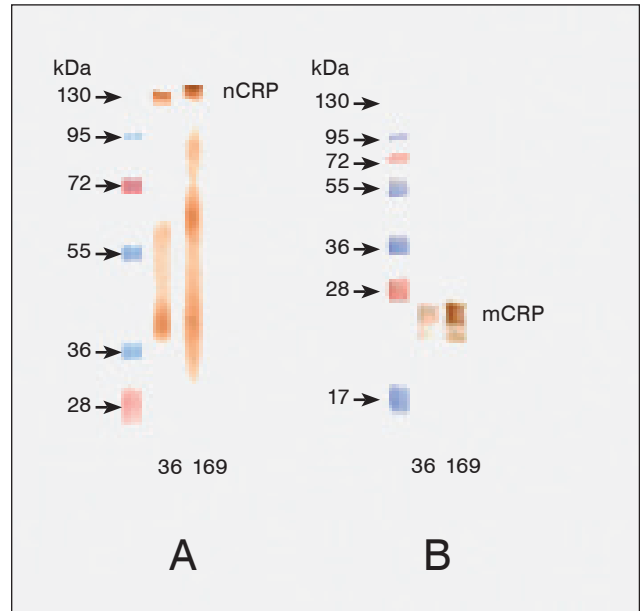
**Рисунок 1.** Взаимодействие клона CRP11 с нативным СРБ человека в прямом ELISA. 100 нг нативного СРБ (Хайтест) наносили на лунки в трис-буферном солевом растворе, содержащем 2 мМ CaCl<sub>2</sub> или 5 мМ ЭДТА.



**Рисунок 2.** Взаимодействие клона С3 с нативным СРБ человека в прямом ИФА. 100 нг/лунку нативного СРБ (Хайтест) наносили на лунки в трис-буферном солевом растворе, содержащем 2 мМ CaCl<sub>2</sub> или 5 мМ ЭДТА.

**Иммунодетекция СРБ в Вестерн-блоттинге**

Клоны С1, CRP11, CRP36 и CRP169 распознают человеческий СРБ в вестерн-блоттинге после переноса антигена на нитроцеллюлозную мембрану. Результаты экспериментов, иллюстрирующих иммунодетекцию СРБ в вестерн-блоттинге с помощью антител CRP36 и CRP169, представлены на рис. 3.



**Рисунок 3.** Иммунодетекция С-реактивного белка с использованием моноклональных антител к СРБ в Вестерн-блоттинге после гель-электрофореза в SDS. Нативный СРБ наносили на гель в невосстанавливающих (А) или восстанавливающих (В) условиях. После электрофореза белок переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану и зондировали с помощью моноклонов CRP36 и CRP169. А: СРБ в невосстанавливающих условиях после гель-электрофореза SDS по Тейлору и Ван дер Бергу (14). В: СРБ в восстанавливающих условиях после гель-электрофореза SDS. Для визуализации МоАт были конъюгированы с HRP (стрептавидин-конъюгат пероксидазы хрена) и 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлоридом (DAB) в качестве субстрата HRP.

### Высокочувствительные иммуноаналитические анализы к СРБ

Все клоны были протестированы в сэндвич-флюороиммунологическом анализе в качестве антител для захвата и обнаружения с сывороткой человеческой крови при наличии или отсутствии ионов  $Ca^{2+}$ . Лучшие пары, рекомендуемые для использования (захват - обнаружение):

- C2сс - C6сс
- C5 - C6сс
- C7 - C6сс
- C5 - CRP135сс
- CRP30сс - CRP135сс
- C3 - C6сс (чувствителен к  $Ca^{2+}$ )
- C2сс - C4сс (чувствителен к  $Ca^{2+}$ )

Калибровочные кривые для пар C2сс-C6сс и C5-CRP135сс показаны на рис. 4 и рис. 5 соответственно. Моноклональные антитела производства ХайТест распознают антиген СРБ с отличной чувствительностью и хорошей кинетикой, в диапазоне линейности, превышающем четыре порядка.

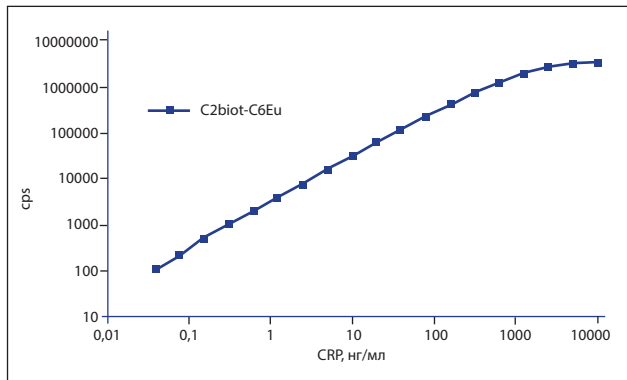


Рисунок 4. Иммунодетекция СРБ (стандарта) в сэндвич-иммуноанализе по паре C2-C6.

Клон C2 – биотинилированный.  
Клон C6 помечен стабильным хелатом  $Eu^{3+}$ .  
Смесь антител и образцы антигенов (100 мкл) инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре с нанесённым на планшеты стрептавидином.

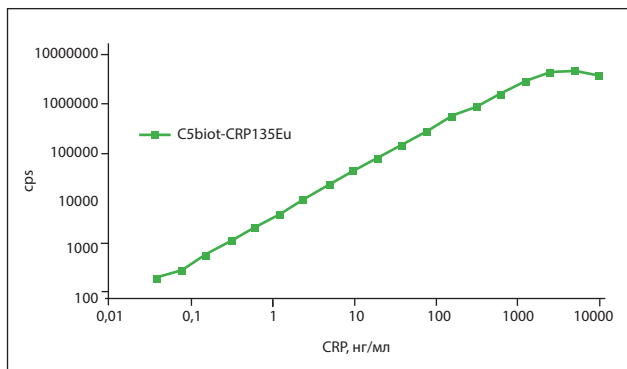


Рисунок 5. Иммунодетекция СРБ в сэндвич-иммуноанализе парой антител C5- СРБ135.

Клон C5 – биотинилированный.  
Клон СРБ135 помечен стабильным хелатом  $Eu^{3+}$ .  
Смесь антител и образцы антигенов (100 мкл) инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в планшетах, покрытых стрептавидином.

Некоторые рекомендованные пары моноклональных антител нашей компании чувствительны к наличию этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в растворе, остальные нечувствительны к ней (рис. 6). Пара C5 - CRP135сс и некоторые другие могут применяться вместе с ионами  $Ca^{2+}$ , так и без них. Пара моноклонов C3-C6сс сильно подвержена влиянию кальция.

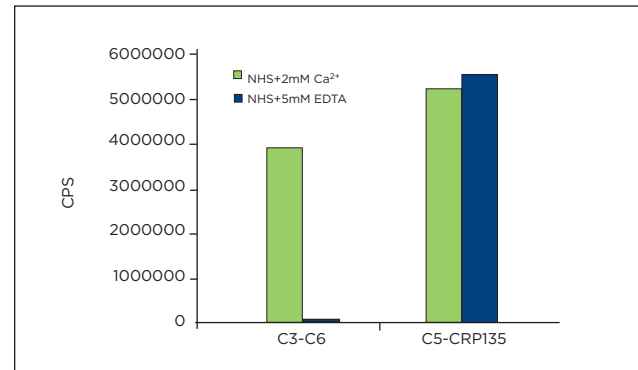


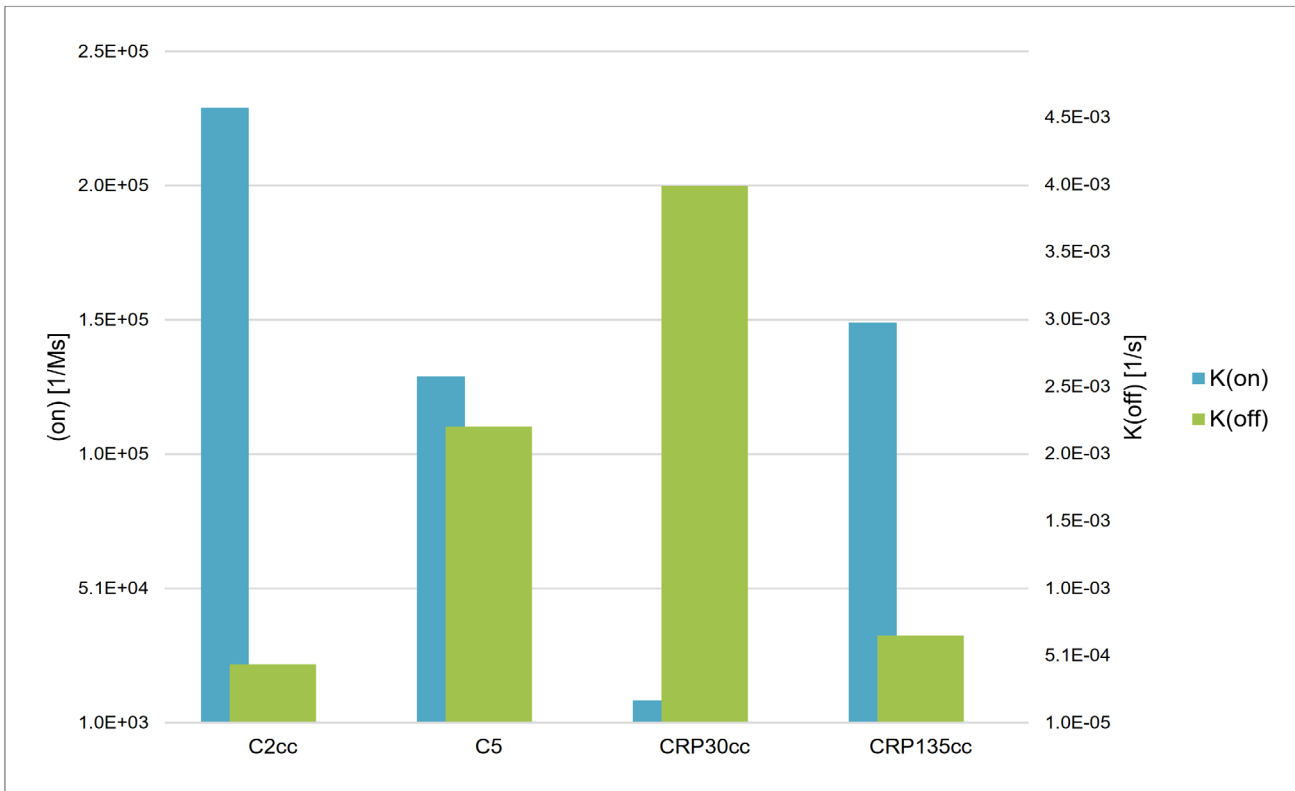
Рисунок 6. Влияние ЭДТА на измерения СРБ. Две разные пары антител были использованы в сэндвич-иммуноанализе. Пара C3-C6 (слева) показывает зависимость от ионов  $Ca^{2+}$ , так как данная пара не распознает СРБ в присутствии EDTA. Пара C5-CRP135 (справа), напротив, не зависит от EDTA в растворе. В качестве источника СРБ использовали нормальную человеческую сыворотку с добавлением 2 мМ  $CaCl_2$  или 5 мМ ЭДТА.

**Информация об аффинности антител**

Для некоторых приложений - турбидиметрии, нефелометрии или конкурентного иммуноанализа, необходимо оценивать константы аффинности используемых антител. ХайТест предлагает ряд МоАт с различной аффинностью к СРБ (таблица 2). Мы оценили константы аффинности для некоторых из них с использованием технологии Вiasoge®. Она основана на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, который позволяет оценить взаимодействие между двумя белками в режиме реального времени. Константа аффинности получается путём визуализации констант скорости ассоциации и диссоциации. Кинетика выбранных нами моноклональных антител различается, что делает их подходящими для разработки иммуноанализа на СРБ с широким динамическим диапазоном. Выбранные кинетические значения наших антител к СРБ представлены на рисунке 7.

**Таблица 2. Константы аффинности некоторых моноклональных антител к СРБ.**

Клон	$K_{on}$ (1/Мс)	$K_{off}$ (1/с)	$K_d$ (М)
C2cc	$2.3 \times 10^5$	$4.4 \times 10^{-4}$	$1.93 \times 10^{-9}$
C5	$1.3 \times 10^5$	$2.2 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-8}$
CRP30cc	$9.3 \times 10^3$	$4.0 \times 10^{-3}$	$4.3 \times 10^{-7}$
CRP135cc	$1.5 \times 10^5$	$6.6 \times 10^{-4}$	$4.4 \times 10^{-9}$



**Рисунок 7. Кинетические значения МоАт нашей компании к СРБ. В левой колонке указано значение  $K_{on}$ , в правой –  $K_{off}$ .**

### Рекомбинантный СРБ человека

Выработка СРБ в печени начинается мгновенно после единичного стимулирования, а концентрация в сыворотке поднимается выше 5 мг/мл примерно через 6 часов, достигая пиковых значений примерно через 48 часов. Период полураспада СРБ в плазме составляет около 19 часов, вне зависимости от состояния здоровья и наличия каких-либо болезней (12).

Таким образом, концентрация циркулирующего СРБ зависит исключительно от скорости выработки/синтеза СРБ, по которой можно судить об интенсивности патологических процессов, инициировавших эту выработку СРБ (17).

Рекомбинантный СРБ человека нашей компании экспрессируется в клетках млекопитающих и очищается в нативных условиях, исключая этапы ренатурации. Рекомбинантный СРБ человека очищают с помощью аффинной хроматографии с фосфатидилхолиновой матрицей, что свидетельствует о функциональной активности рекомбинантного белка.

Наш рекомбинантный СРБ человека (кат. № 8CR8) не содержит меток. Он находится в форме, оптимальной для хранения в жидком состоянии. Чистота белка составляет более 95% (см. рис. 8). Результаты применения рекомбинантного СРБ человека в анализах с различными парами МоАт нашей компании представлены на рисунке 9.

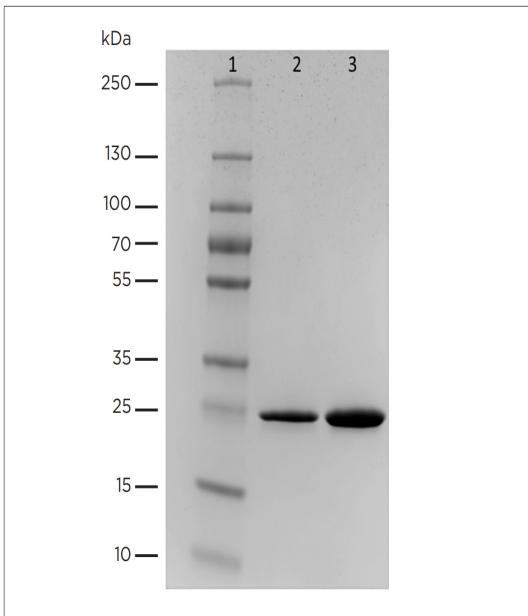


Рисунок 8. SDS-PAGE рекомбинантного СРБ человека в восстанавливающих условиях.

- 1) маркеры молекулярной массы
- 2) рекомбинантный СРБ человека, 2 мкг
- 3) рекомбинантный СРБ человека, 5 мкг

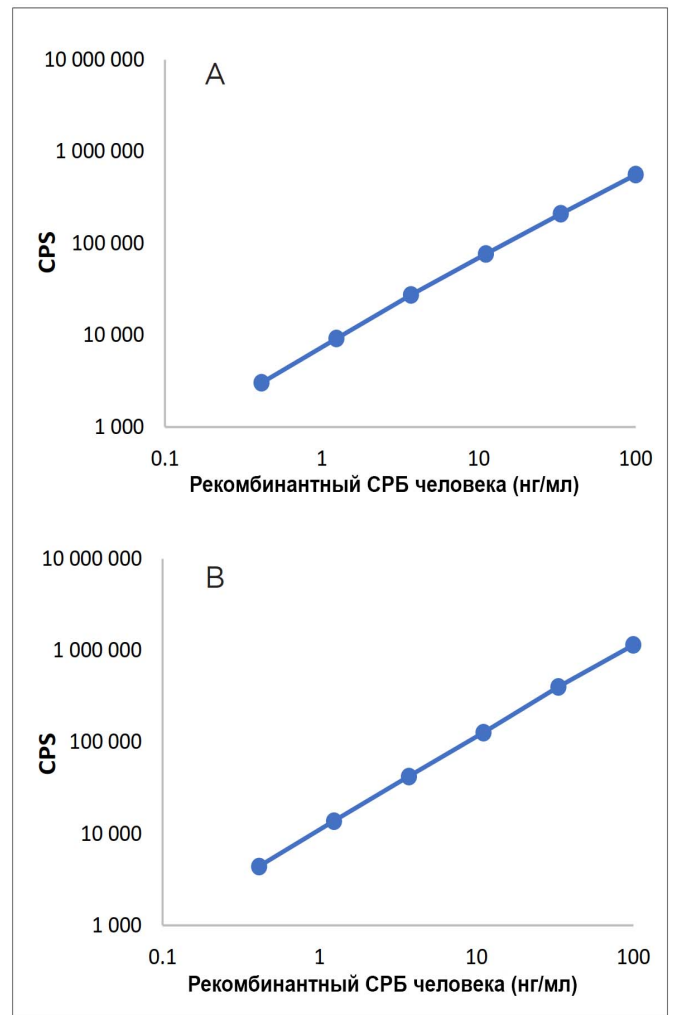


Рисунок 9. Калибровочная кривая для рекомбинантного СРБ человека. А) Калибровочная кривая пары CRP30сс-CRP135сс и В) С2сс-C4сс (захват-обнаружение). Антитела подложки адсорбировали на микропланшетах для иммунологического анализа. Смесь антигенов и детектирующих антител, помеченных стабильным хелатом Eu<sup>3+</sup>, инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре.

## Ссылки на литературу

1. **Yasojima Koji et al.** "Generation of C-Reactive Protein and Complement Components in Atherosclerotic Plaques." *Am J Pathol.* 2001 March; 158(3): 1039-1051.
2. **Kobayashi S, Inoue N, et al.** "Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23:1398-1404.
3. **Ciubotaru I., Potempa L.A., Wander R.C.** "Production of Modified C-Reactive Protein in U937-Derived Macrophages". *Exp Biol Med (Maywood)* 2005, 230(10):762-70.
4. **Diehl E. E. et al.** "Immunohistochemical Localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue." *American Journal of the Medical Sciences* 2000; 319(2):79.
5. **Hirschfield G.M., Pepys M.B.** "C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule." *Q J Med* 2003; 96:793-807.
6. **Thompson D., Pepys M.B., Wood S.P.** "The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine." *Structure* 1999; 7:169-177.
7. **Biro A. et al.** "Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins" *Immunology* 2007 May;121(1):40-50.
8. **Lowe G.D.O., Pepys M.B.** "C-Reactive Protein and Cardiovascular Disease: Weighing the Evidence" *Current Atherosclerosis Reports* 2006, 8:421-428.
9. **Ridker P.M.** "C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke" *Circulation.* 2003; 108:e81-e85.
10. **Clearfield M.B.** "C-reactive protein: a new risk assessment tool for cardiovascular disease" *JAOA* 2005; 105(9):409-416.
11. **Pearson T.A et al.** "Markers of inflammation and cardiovascular disease: application and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association". *Circulation* 2003 Jan 28;107(3):499-511.
12. **Pepys M.B & Hirschfield G.M.** "C-reactive protein: a critical update." *J Clin Invest* Jun 2003;111(12):1805-1812.
13. **Meyer M.H. et al.** "CRP determination based on a novel magnetic biosensor." *Biosens Bioelectron* 2007 Jan 15; 22(6):973-9.
14. **Shiesh S.C. et al.** "Determination of C-reactive protein with an ultra-sensitivity immunochemiluminometric assay". *J Immunol Methods* 2006 Apr 20;311(1-2):87-95.
15. **Sin K.K. et al.** "Fluorogenic nanocrystals for highly sensitive detection of C-reactive protein." *IEE Proc Nanobiotechnol* 2006 Jun;153(3):54-8.
16. **Karolina E. Taylor and Carmen W. van den Berg** "Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein." *Immunology* 2006; 120, 404-411.
17. **Gershov D. et al.** "C-reactive protein binds to apoptic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity." *J Exp Med* 2000;192:1353-1363.

## Информация для заказа.

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Изотип	Примечания
С-реактивный белок	4C28	C1	IgG2b	ИФА, ВБ, высокочувствительные
		C3	IgG1	ИФА, ИГХ, Са2+ зависимые, высокочувствительные
		C5	IgG1	ИФА, высокочувствительные
		C7	IgG1	ИФА, ИГХ, высокочувствительные
		CRP11	IgG1	ИФА, ВБ
		CRP36	IgG2a	ИФА, ВБ, ИГХ
		CRP169	IgG2a	ИФА, ВБ
	4C28cc	C2cc	IgG1	In vitro, ИФА, высокочувствительные
		C4cc	IgG1	In vitro, ИФА, Са2+ зависимые, высокочувствительные
		C6cc	IgG2a	In vitro, ИФА, высокочувствительные
		CRP30cc	IgG1	In vitro, ИФА, низкая аффинность
		CRP135cc	IgG2b	In vitro, ИФА, высокочувствительные

## АНТИГЕН

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
С-реактивный белок	8C72	>95%	Плевральная/асцитная жидкость или плазма человека

Новинка!