

미립자 응집반응을 이용한 C-reactive Protein의 면역측정법에 관한 연구

한국과학기술연구원 생명공학연구소, 한국과학기술연구원 도핑콘트롤 센터*,
인제대학교 임상병리학과**

김재화[†] · 송은영 · 이희구 · 최용경 · 최명자* · 김용호** · 최인성 · 정태화

국문초록: 환자의 복수와 늑막액으로부터 p-diazonium phenylphosphorylcholine(DPPC) coupled Separose-4B affinity chromatography와 hydroxylapatite chromatography를 실시하여 C-reactive protein (CRP)를 분리, 정제하였다. 정제된 CRP를 토끼에게 면역화하여 항혈청을 얻고 affinity chromatography를 하여 면역항체(IgG)를 분리하였다. 분리된 면역항체를 미립자에 감작시킨 후 미립자 응집반응에 의하여 3분내에 CRP를 측정할 수 있는 간이 면역측정법을 개발하였다. 본 연구에서 개발된 CRP측정법의 검출범위는 0.5~20mg/dl이며, 임상 시험 결과 0.7~2.9mg/dl에서는 강한 응집반응을, 5.0~13.2mg/dl에서는 약한 응집반응을 보였고 28mg/dl 이상에서는 항원 과잉으로 인한(zone of Ag excess phenomenon) 위음성을 나타냈다. 74명의 환자 혈청을 대상으로 CRP의 농도를 조사한 결과 평균치는 3.8mg/dl이었으며 대부분의 환자에서는 10mg/dl 이하의 농도로 존재하였다. 그러므로 1차판정시 음성을 나타낸 시료라도 혈청을 5~10배정도 희석하여 재분석한다면 오차없이 CRP를 검출할 수 있었다. 환자 혈청을 검체로 하여 본 연구에서 개발한 면역측정법과 현재 수입 시판 중인 프랑스의 B사 제품과 일본의 I사 제품을 비교한 결과 좋은 상관관계를 보였다. 이와 같은 평가 분석을 통하여 볼 때 본 연구에서 개발한 간이 면역측정법은 사용이 비교적 간편하며 신빙성이 있어 CRP를 스크리닝 하는데 효과적임을 알 수 있었다.

서 론

C-reactive protein(CRP)은 급성 질환에 감염되었을 때 분비되는 혈청 단백질로, 1930년 Tillet와 Francis에 의해 처음 발견, 보고되었으며 폐렴균의 세포막에 존재하는 C-polysaccharide와 Ca⁺⁺의 도움을 받아 침전반응을 일으킨다는 사실로부터 CRP라 명명되었다(Anderson et al., 1951, A-bernethy, 1937). CRP는 고전적인 보체계를 활성화 하거나, 혈소판의 응집이나 매개성 물질의 방출을 저해하거나 T림파구의 subpopulation에 작용함으로써 급성감염에 대응한다고 알려져 있다. 따라서 CRP는 정상 상태에서는 검출되지

않으나 급성염증과 같은 질병상태에서는 다량으로 검출되며, 염증이외에도 여러종류의 암, 조직이식 거부반응, 화상 및 조직손상과 같은 경우에도 상당량이 증가된다(Fiedel et al., 1976, Kaplan et al., 1974, Mortensen et al., 1975). 일반적으로 CRP는 정상인의 경우 혈청내에 0.007~0.8mg/dl 농도로 존재하지만 질병에 감염되면 50mg/dl까지 증가되고 질병의 상태와 종류에 따라 분비양이 변하며 질병이 호전되면 급격히 감소된다(Cassart et al., 1983). 그러므로 혈청 중 CRP의 측정은 여러 질병상태를 진단하고 치료하는데 중요한 지표가 된다.

생체내의 물질을 정성적 또는 정량적으로 분석하는 면역측정법에는 미립자 응집반응을 이용한 면역측정법(microparticles-based immunoassay), 방사 면역측정법(radiimmunoassay, RIA) 효소 면역측정법(enzyme immunoassay, EIA)과 형광 면역

*논문접수 1996년 3월 5일, 수정재접수 1996년 5월 1일.

[†]별책요청 저자

측정법(fluorimmunoassay)등이 있다. 미립자 응집 반응에 의한 면역측정법은 미립자에 항원이나 항체를 결합시킨 후 검체 내에 존재하는 항원이나 항체의 응집반응을 관찰하는 것으로 미립자에 결합되어 있는 물질에 따라 간접 미립자 응집법과 직접 미립자 응집법으로 구별한다. 간접 미립자 응집법은 미립자에 항원을 결합시키고 여기에 항체와 검체를 slide plate 위에서 반응시켜 응집반응을 보는 것으로 양성인 경우 미립자에 결합된 항원과 검체중 항원이 항혈청에 대하여 서로 경쟁반응을 일으켜 응집반응을 일으키지 못하고, 음성 검체인 경우에는 미립자에 결합된 항원과 항혈청이 반응하여 응집반응을 일으키게 된다. 직접 미립자 응집법은 미립자에 항체를 직접 결합시킨 후 검체와 반응시켜 응집반응을 관찰하는 것으로 양성 검체에서는 응집반응을, 음성 검체에서는 비 응집반응을 일으킨다. 미립자 응집법은 1957년 Dr. Jacques Singer에 의해 처음 소개되어 온 고전적인 방법이지만 방사성 물질이나 효소를 사용하지 않아도 된다는 점, 특정한 기기가 필요하지 않다는 점, 휴대가 간편하고 검사 결과를 짧은 시간내에 얻을 수 있다는 점, 육안으로 판정이 가능하다는 점, 많은 검체를 경제적으로 분석할 수 있다는 이점 때문에 현재까지 여러 질병에 대한 간이 진단법으로 널리 이용되고 있다.

재료 및 방법

재 료

CRP의 원료로써 CRP의 함량이 많은 늑막염 또는 복막염 환자의 늑막액 또는 복수를 이용하였다. C-polysaccharide(CPS)는 Liu and Gotschlich (1963) 방법에 따라 rough streptococcus pneumoniae종으로 부터 분리하고 p-diazoniumphenylphosphorylcholine(DPPC)는 Umezawa et al. (1968) 방법으로 제조하여 사용하였다. CNBr-activated Sepharose-4B, Sephacryl S-200 superfine, Sephadex G-25는 Pharmacia(스웨덴)에서 구입하였다. 미립자(0.42 μ m)는 Rubber Co.(일본)에서 구입하였고 시판하고 있는 CRP 간이 측정용 제품으로 일본의 I사와 프랑스의 B사 제품을 구입하여 사용하였다. 그 외 시약은 Sigma(미국)에서 구입하거나 실험실에 비치된 특급시약을 사용하였다.

방 법

CRP의 분리 정제: 1987년 한국생화학회지에 보고된 방법(Hee Gu Lee et al., 1989)에 의해 늑막액으로 부터 DPPC-affinity chromatography와 hydroxylapatite chromatography 분리과정을 통하여 CRP를 정제하고 효소 면역측정법, 단일확산 침전법으로 활성을 확인하였으며, SDS-PAGE 전기영동으로 그 순도를 확인하였다.

CRP 특이 항체 제조: 정제된 CRP와 Freund's complete adjuvant를 혼합하여 토끼에게 면역화하고 1주일 간격으로 항체를 채취하여 역가를 측정 하였다. 역가가 떨어질 때 Freund's incomplete adjuvant 유탁액으로 2차 면역화하였다. 항체의 생성정도를 double immunodiffusion법과 1% agarose gel immunoelectrophoresis를 하여 측정하였다.

다클론 항체의 분리정제: 정제된 CRP를 면역화하여 얻은 토끼의 항혈청은 Affigel-15에 CRP를 결합시켜 만든 affinity chromatography를 사용하여 비결합 단백질을 제거한 후 3M KSCN-NaOH 용액을 통과시켜 CRP 특이반응성 항체만을 분리 정제하였다. 다클론 항체는 미립자 응집법으로 역가를 측정하였다.

항혈청의 역가 측정: 미립자에 CRP를 결합시켜 현탁시킨 뒤 동일한 용량의 항혈청과 혼합, 2-3분간 교반시켜 응집반응을 시켰을 때 응집반응을 보이면 항체로서 역할을 한다고 간주한다. 이 항혈청을 응집반응이 보이지 않을 때까지 2배씩 희석하여 희석농도를 항체의 역가로 간주하였다.

단일확산 침전법(SRID)에 의한 CRP 측정: 1.5% agarose gel을 PBS(pH7.2)용액에 녹여 0.3%의 CRP에 대한 항체를 56℃에서 가하여 gel bond film에 1mm 두께로 부어 식힌 후 직경 2mm의 구멍을 뚫은 뒤 표준액과 측정하고자 하는 CRP 용액을 5 μ l씩 넣어 48시간 반응시켰다. 반응 후 침강운의 크기를 재고 표준용액에 의한 침강운과 크기와 비교하여 검체의 CRP의 농도를 구하였다.

미립자 응집법을 이용한 CRP 면역측정법 개발: slide위에 혈청 검체 1방울과 2 \times 2 \times 의 역가를 갖는 분리·정제된 CRP항체 1방울을 떨어뜨려 혼합하고 CRP 감작미립자를 가하여 교반하였다. 약 3분 후 미립자가 응집반응을 보이면 양성,

응집반응을 보이지 않으면 음성반응으로 판정한다. CRP의 농도가 20mg/dl 이상 존재하면 과잉항원으로 인해 음성반응을 보일 우려가 있으므로 혈청을 5배 정도 희석하여 재 분석한다.

CRP 감작미립자 제조법: 분리 정제된 CRP항체의 IgG(역가 2⁵) 0.2g을 결합용액 (Glycine buffered saline, 50mM, pH 8.2) 1ml에 녹이고 미립자(0.42 μ m, 10%) 50 μ l와 혼합하여 4 $^{\circ}$ C에서 17시간 동안 반응시켰다. 미립자에 결합하지 않은 항체를 세척용액(GBS-0.02% polyvinylpyrrolidon (PVP) -2% Tween20)으로 2회 세척하여 제거한 후 보관액 (GBS-0.02% PVP-2mM CaCl₂) 0.5ml에 현탁시켜 냉장 보관하였다.

표지항체 제조 (radiolabeling): 항체(항 CRP의 IgG)를 Na¹²⁵I와 반응시켜 chloramin-T 방법에 의하여 ¹²⁵I를 항체에 표지시켰다. 0.5 mCi의 Na¹²⁵I, 50 μ l의 0.5M sodium phosphate buffer(pH 7.5), 100 μ l의 IgG용액(22.6 μ g), 25 μ l의 chloramine T (0.8mg/ml)을 순서대로 넣고 잘 섞은 후 2분 반응시켰다. 여기에 40 μ l의 sodium metabisulfite (2.5mg/ml) 용액과 100 μ l의 KI (160mg/ml)를 넣어 반응을 종결시킨 후 Sephadex G-25 column에 통과시켜 ¹²⁵I로 표지화된 CRP 면역항체를 분리하여 γ -counter로 specificity를 측정하였다.

결과 및 고찰

CRP의 분리 정제: 1987년 한국생화학회지에 보고된 방법 (Hee Gu Lee et al., 1989)에 의해 녹막액으로 부터 DPPC-affinity chromatography와 hydroxylapatite chromatography 분리과정을 통하여 purification fold가 3435인 정제된 CRP(수율 45%)를 얻었으며 SDS-PAGE 전기영동을 실시한 결과 그 순도를 확인할 수 있었다.

CRP 특이 항체 제조 및 역가측정: 정제된 CRP를 면역화하여 얻은 토끼의 항혈청을 affinity chromatography를 실시, CRP 특이반응성 항체만을 분리정제하였다. 이때 얻은 다클론 항체는 미립자 응집법으로 역가를 측정했을 때 2⁵~2⁸으로 나타났다.

표지항체 제조: 미립자에 흡착된 항체의 양을 측정하기 위하여 CRP에 대한 다클론 항체의 정제된 IgG를 chloramin-T 방법에 의하여 ¹²⁵I를 항체에 표지시킨 후 sephadex G-50을 통과시켜 방사선으로 표지화된 항체를 분리한 결과 3.23 \times

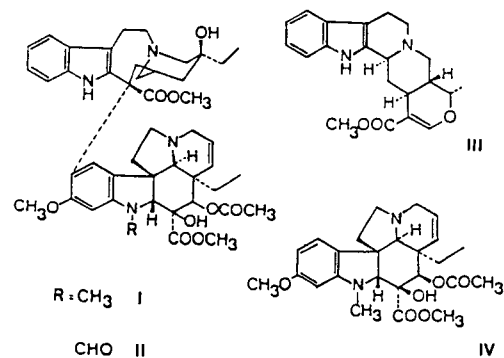


Fig. 1. Fractionation of radiolabeled IgG by Sephadex G-50 chromatography. 0.5mCi Na¹²⁵I and 22.6 μ g anti-CRP-IgG were reacted by the chloramin T method. I: anti-CRP-IgG*, II: free iodine.

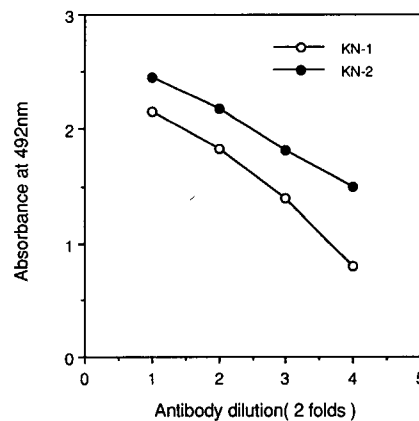


Fig. 2. Antibody immobilization to the microparticles. Microparticles were reacted with varying concentration of ¹²⁵I-labeled antibody in coupling solution for 24hr at RT with shaking. After antibody-bound microparticles were washed and resuspended in GBS, the bound antibody concentrations were counted (□: bound antibody after 1st. centrifuging, ■: bound antibody after 3rd washing, ▲: efficiency(%)).

10⁶ cpm/ μ g IgG 얻었다(Fig. 1).

미립자에 결합된 면역항체의 양 및 적정 조건: CRP 표지항체를 농도별로 희석한 후 미립자에 결합시켜 결합된 항체의 양을 조사하였다. 이때 사용한 미립자의 크기는 0.42 μ m이었으며 10% 현탁액이었다. 이 미립자와 항체를 24시간 동안 반응시킨 후 원심 분리하여 침전된 미립자의 cpm값을 측정하고 GBS(pH 8.2) 완충액으로 1회 세척하고 0.1% BSA가 함유된 GBS 완충액으로 2회 세척한 후 침전물의 cpm값을 측정하여 초기 결

합 용액의 cpm값과 비교하여 미립자입자에 결합된 양을 계산하였다 (Fig. 2). 초기 면역항체의 농도가 0.2mg/ml일때까지는 크게 증가하다가 (결합된 항체: 60.4 μ g/50 μ l 미립자, 결합 효능: 60.4%) 그 이상의 농도에서 포화되는 것을 볼 수 있었다. 면역항체 0.5mg을 미립자 50 μ l와 혼합하여 1-52시간동안 반응시키면서 반응시간에 따른 면역항체의 결합 정도를 보았을 때 반응시간 6시간을 기준으로 거의 비슷한 양의 항체 (결합항체: 43.1 μ g/50 μ l 미립자(10%액), 결합 효능: 86.2%)가 미립자에 결합되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3). 이 결과로 0.42 μ m 미립자 1g당 약 10mg의 면역항체가 결합함을 알 수 있었다. 이는 0.42 μ m 미

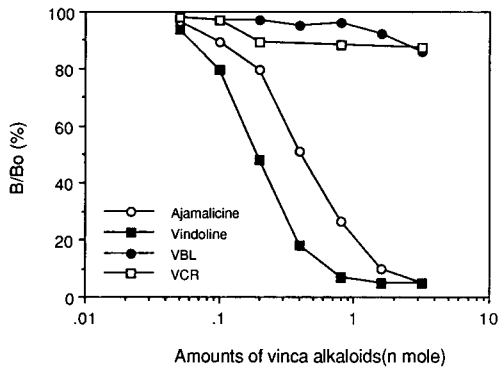


Fig. 3. Microparticles were reacted with 0.5mg/ml ¹²⁵I-labeled antibody in coupling solution for varying coupling time at RT with shaking. After antibody-bound microparticles were washed and resuspended in GBS, the bound antibody concentrations were counted (□: bound antibody after 2nd washing, ▲: efficiency(%)).

립자의 이론상 최대 흡착량인 35.7mg IgG/g microparticles (Cantarero LA et al. 1980)의 1/2-1/3에 미치는 양이다.

미립자 응집반응에 의한 CRP 면역측정법 개발: 역가가 2⁵인 정제된 면역항체를 농도별로 희석하여 미립자에 결합시킨 CRP 감작미립자를 만들었다. 이것을 slide상에서 CRP가 함유되어 있는 혈청 검체와 반응시켰을 때 초기 결합항체의 농도가 0.2mg/ml인 경우 가장 민감하고 강한 응집반응을 보였다(Table 1). 항체의 농도가 0.2mg/ml이하일 경우 CRP와 약한 응집 반응을 보였고 그 이상 농도에서는 미립자들끼리 응집 반응을 일으켜 판정 오차를 보였다. 항체와 미립자를 결합시킬때의 적정 반응시간과 온도를 조사한 결과 4℃에서 17시간 동안 반응시켜 만든 CRP 감작미립자가 가장 민감하고 강한 응집반

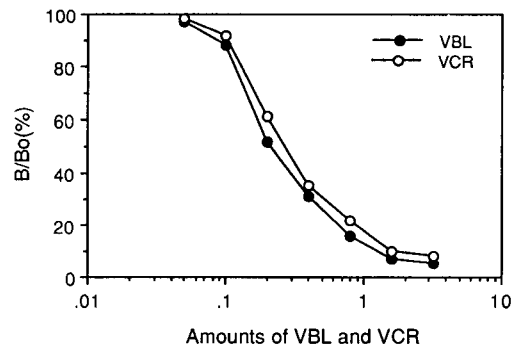


Fig. 4. Distribution of CRP concentration in patient serum. 74 patient sera were determined CRP concentration by SRID method.

Table 1. Study of antibody coupling conditions for the microparticles agglutination

Antibody concentration	Wash solution	Incubation time & temperature	Agglutination response					
			CRP conc. (mg/dl)					
Titer/conc. (mg/ml)			neg. control	0.5	1	5	10	20
2 ⁵ /0.1	GBS-0.1% BSA	6 hr., RT	—	±	±	—	—	—
0.2			—	++	++	+	+	±
0.5-1.0			±					
2 ⁵ /0.2	GBS-0.1% BSA	4 hr., 37℃	—	++	++	+	+	+
0.5			±					
0.2			—	++	++	+	±	±
0.5-1.0			±					
2 ⁵ /0.1	GBS-0.1% BSA	17 hr., 4℃	—	+	+	±	±	—
0.2			—	+++	+++	++	+	+
0.5-1.0			±					

—: no agglutination, ±: weak agglutination, +: strong agglutination, ++: very strong agglutination

Table 2. Study of washing buffer and surfactant

Incubation time & temperature	Coupling antibody conc. (mg/ml)	Wash solution	Microparticles agglutination response				
			CRP conc. (mg/dl)				
			neg. control	0.1	0.5	5	10
4°C 17hr	0.2	GBS-0.02% BSA	±	+	+	+	+
		GBS-0.1% BSA	—	+	++	+	+
		GBS-0.02% BSA-1 mM CaCl ₂	±	+	+	+	+
		GBS-0.02% PVP-0.2% Tween 20	±	±	+	++	++
		GBS-0.02% PVP-2% Tween 20	—	±	+	++	++
		GBS-0.02% PVP	±	+	+	+	+

—: no agglutination, ±: weak agglutination, +: strong agglutination, ++:very strong agglutination

Table 3. The correlation of SRID data and microparticle agglutimoticism response

Microparticles agglutination response	—	±	+	++
CRP concentration in sample serum by SRID (mg/dl)	28	13.2	2.9	1.6
		10.2	2.2	0.7
		7.6	2.3	1.2
		8.4	1.2	1.2
		6.2	1.0	0.9
		7.5	2.2	1.6
		9.8		0.8
		5.5		1
		9.8		1
		7.3		0.9
		5		
n	1	11	6	10
X±SD (mg/dl)	28	8.22±2.28	1.96±0.65	1.09±0.29
Range of CRP conc in serum (mg/dl)	>28	5.0 - 13.2	1.0 - 2.9	0.7 - 1.6

—: no agglutination, ±: weak agglutination, +: strong agglutination, ++:very strong agglutination

응을 보였다(Table 1). 미립자와 결합되고 남은 면역항체는 원심분리하여 세척해 내야한다. 이때 완충액과, 계면 활성제의 종류 및 농도, 세척 횟수에 따라 잔여 항체의 세척효과가 달라지며 미립자와 미립자끼리의 자체 응집도 방지할 수 있다. PVP가 0.02%, Tween 20이 2% 함유된 GBS 완충액으로 세척할 경우 잔여 항체를 깨끗이 없앨 수 있고 자체응집도 방지할 수 있었다(Table 2). CRP 감작미립자로 CRP검체를 분석할 때 첨가물로서 역가가 2³ 또는 2² 정도되는 CRP 면역항체를 함께 반응시키면 미립자자체의 응집도 제거되고 반응속도도 빨라졌다. 또한 감작미립자 현탁액에 2mM CaCl₂를 함께 넣으면 보관 중 발생하는 미립자의 자체응집을 방지할 수 있었다.

SRID와의 비교실험: 환자의 혈청을 대상으로 SRID에 의해 측정된 CRP 농도와 본 연구에서 개발한 미립자 응집반응에 의한 면역측정법의 판정결과를 비교하였다(Table 3). CRP 검체의 농도가 0.7~2.9mg/dl인 경우 강한 미립자 응집반응을 보였으며 5~13.2mg/dl인 경우 약한 응집반응을 보였으며 CRP 농도가 28mg/dl일 경우 항원 과잉현상에 의해 응집반응을 보이지 않았다. 순수한 CRP 표준액으로 확인하여 본 결과 CRP 농도 0.5~20mg/dl에서 미립자 응집 양성반응을 보였으며, 74개의 양성 환자 검체를 대상으로 CRP 농도를 조사한 결과 0~19.6mg/dl 사이였고 보통 CRP 농도가 1~3mg/dl 이었다 (Fig 4). 그러므로 1차 음성검체로 판명된 혈청이라도 5배정도 희

Table 4. Comparison of our developed microparticles-based immunoassay system with other commercial products

Sample	SRID data (mg/dl)	Commercial product		Lab.
		I Co.	B Co.	
1	0	—	—	—
2	5.8	++	++	++
3	13.2	±	±	±
4	10.2	±	±	±
5	1.6	++	++	++
6	1	+	+	+
7	0.8	+	+	+
8	7.5	+	+	±
9	9.8	±	±	±
10	9.8	±	±	±
11	0.7	++	+	++
12	5.5	+	+	±
13	7.6	±	+	±
14	1.2	++	++	++
15	1.2	++	++	++
16	1.0	++	++	++
17	2.9	++	+	+
18	0.9	++	++	++
19	7.3	±	±	±
20	1.6	+	+	+
21	8.4	—	±	±
22	2.2	+	+	+
23	2.3	+	+	+
24	5.0	+	+	+
25	0.9	++	++	++
26	2.2	++	++	±
27	1.2	++	+	+
28	28	±	±	—
29	1	++	+	+

Lab.: our developed microparticle-based immunoassay for the detection of CRP

석하여 CRP 감작미립자와 응집반응을 시킨다면 판정오차 없이 검체를 분석할 수 있다.

타 제품과의 비교실험: SRID 방법으로 정량된, CRP 양성 환자의 혈청을 가지고 일본에서 수입한 I 사 제품과 프랑스에서 수입한 B사 제품과 본 연구에서 개발한 미립자 응집반응에 의한 면역측정법을 비교하여 실험하였다(Table 4). 본 연구에서 개발한 CRP 면역측정법과 I 사 제품을 비교해 보았을 때 같은 응집반응을 보인 것이 29명 환자의 검체 중 21개(72%), 유사한 반응을 보인 것은 8개 검체였다. 이로서 29개 검체 모두 한 block내에서 유사한 반응을 보인것으로 나타났다(100%)(Fig. 5). B사 제품과 비교해 보았을 때 같은 응집반응을 보인 것이 29개 검체중 22개(75%), 유사한 반응을 보인 것은 6개 검체였고

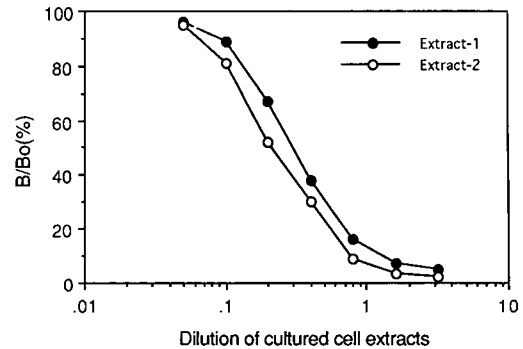


Fig. 5. Comparison of our microparticle-based immunoassay system and other commercial products. The number of patients responding to the assay system was marked in the each block (Lab.: our developed microparticle-based immunoassay for the detection of CRP). ● correlation of I Co. product: % of responses within the same block was 72 and within one block was 100, ● correlation of B Co. product: % of responses within the same block was 75 and within one block was 96.

1개의 검체에서만 상이한 응집반응을 보였다. 이로서 29개 검체 중 96%가 한 block내에서 반응을 보인것으로 나타났다(Fig. 4). 이로서 타제품과 유사한 응집반응을 보임을 알 수 있었다.

참고 문헌

1. Anderson HC and McCarty M (1950): The occurrence in the rabbit of an acute phase protein analogous to human C-reactive protein, *J Exp Med*, **93**: 25.
2. Fiedel BA and Gewurz H (1976): Effects fo C-reactive protein on platelet function. I. Inhibition of platelet aggregation and release reactions, *J Immunol*, **116**(5): 1289.
3. Kaplan MH and Volanakis JE (1974): Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyeli, *J Immunol*, **112**(6): 2135.
5. Mortensen RF, Osmand AP and Gewurz H (1975): Effects on C-reactive protein on the lymphoid system. I. Binding to thymus-de-

- pendent lymphocytes and alteration of their functions, *J Exp Med*, **141**: 821.
7. Cassart DC, Mareschal D et al (1983): Automated particle-counting immunoassay of C-reactive protein and its application to serum, cord serum, and cerebrospinal fluid samples, *Clin Chem.*, **29(6)**: 1127.
 8. Liu TY and Gotschlich EC (1963): *J Biol Chem*, **238**: 1928.
 9. Umezawa H, Doi O, Oguar M, Kondo S and Tanaka N (1968): Phosphorylation and inactivation of kanamycin by *Pseudomonas aeruginosa*, *J Antibiot (Tokyo)* **21(2)**: 154.
 10. Lee Hee Gu, Kim Yong Ho, et al (1989): A simplified procedure for C-reactive protein purification, *Korean Biochem J*, **22(4)**: 498.
 11. Mancini G, Garbonara AC and Heremans TF (1968): Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion, *Immunochemistry*, **2(3)**: 235.
 12. Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature(Lond)* **227(259)**: 680.
 13. Price CP, Trull A et al (1987): Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C-reactive protein, *J Immunological Methods*, **99(2)**: 205.
 14. Harris RT, Stone PC, et al (1984): C-reactive protein rapid assay techniques for monitoring resolution of infection in immunosuppressed patients, *J Clin Pathol*, **37(7)**: 821.
 15. Winkles J, Lunec J and Deverill I (1987): Enhanced-latex-agglutination assay for C-reactive protein in serum, with use of a centrifugal analyzer, *Clin Chem*, **33(5)**: 685.
 16. Singer JM, Plotz CM (1956): The latex fixation test: I. Application to the serologic Diagnosis of *rheumatoid arthritis*, *Am J Med*, **21**: 888.
 17. Cantarero LA et al (1980): The adsorptive characteristics of proteins for polystyrene and their significance in solid-phase immunoassays, *Anal Biochem*, **105**: 375.

=Abstract=

Microparticle-based Immunoassay for the Detection of C-reactive Protein in Serum

Jae-Wha Kim[†], Eun-Young Song, Hee-Gu Lee, Yong-Kyung Choe,
Myung-Ja Choi*, Yong Ho Kim**, In-Seong Choe and Tai-Wha Chung

*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, Korea., *Doping Control Center, KIST, P.O.Box 131, Cheongryang, Seoul, Korea, **Department of medical laboratory Science, Inje University, 607 Obangdong, Kimhae 621-749*

The C-reactive protein(CRP) from ascitic and pleural fluid was purified using calcium dependent affinity chromatography of CNBr activated Sepharose-4B covalently coupled to p-diazonium phenylphosphorylcholine(DPPC) and hydroxylapatite chromatography. Polyclonal antibody was prepared from rabbit by immunizing the purified CRP. Specific immunoglobulin G was isolated using affinity chromatography and coupled to microparticles. A sensitive microparticle-based immunoassay was developed to measure CRP within 3 mins. The detection range was between 0.5mg/dl and 20mg/dl in serum, showing strong response in the range of 0.7~2.9 mg/dl, weak response in 5.0~13.2 mg/dl and zone phenomenon over 28mg/dl. The average value of CRP in 74 samples was 3.8mg/dl and most of the values were lower than 10mg/dl. The CRP values of serum samples were determined by our microparticle-based immunoassay, and were compared with those obtained using the other commercial products(B Co., France and I Co., Japan). Good correlations were shown between the values obtained by our developed microparticle-based immunoassay system and those by other commercial products. All performance characteristics evaluated make our developed microparticles-based immunoassay suitable for a simple, rapid, and reliable screening of CRP in serum.

Key Words: C-reactive protein, microparticle-based immunoassay.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(1): 41-48, June 1996]

[†]Corresponding author