



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Для исследований
и клинического
применения

Сердечные
маркеры



Сердечный тропонин Т (сТnТ)



Сердечная изоформа тропонина Т человека (сТnТ) широко используется в диагностике как маркер повреждения клеток миокарда. сТnТ имеет сходную с сердечной изоформой тропонина I (сТnI) кинетику высвобождения в кровотоке; концентрация обоих биомаркеров в крови увеличивается даже при небольших повреждениях миокарда.

Сердечная изоформа тропонина Т человека кодируется геном TNNT2. В миокарде взрослого человека основной изоформой сТnТ является изоформа б (или TNT3), с молекулярной массой 34,6 кДа, состоящая из 287 аминокислотных остатков.

Реагенты для разработки иммуноферментных анализов

Мы предлагаем моноклональные антитела (МоАт), специфичные к сТnТ, которые можно использовать для разработки иммуноферментных диагностических систем, а также для проведения научных исследований (рис. 1). Кроме того, мы предлагаем поликлональные антитела, очищенный рекомбинантный сТnТ человека, и рекомбинантные «быструю» и «медленную» скелетные изоформы ТnТ человека (fsТnТ и ssТnТ соответственно), которые могут быть использованы для контроля кросс-реактивности к этим изоформам.



КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

✓ Ранний маркер острого инфаркта миокарда (ОИМ)

Моноклональные антитела для высокочувствительных сТnТ тестов (hs-сТnТ)

Мы разработали три МоАт, специфичные к сТnТ (300сс, 329сс и 406сс; Кат. № 4Т19сс), которые можно использовать для разработки иммуноферментных анализов (ИФА) с высокой чувствительностью (граница определения концентрации 0,3 нг/л и ниже) и высокой специфичностью (отсутствие или минимальное взаимодействие с сТnI и с fsТnТ). МоАт 406сс также предлагаются в виде рекомбинантных химерных антител, включающих в себя исходные переменные домены мышиного антитела и константные домены IgG1 человека (Кат. # RC4Т19). МоАт RecChim406, по нашим предварительным данным, более чувствительно, чем исходное мышиное антитело, и может использоваться для разработки высокочувствительного иммуноферментного анализа как в качестве антитела подложки, так и в качестве детекторного антитела (рис. 2).

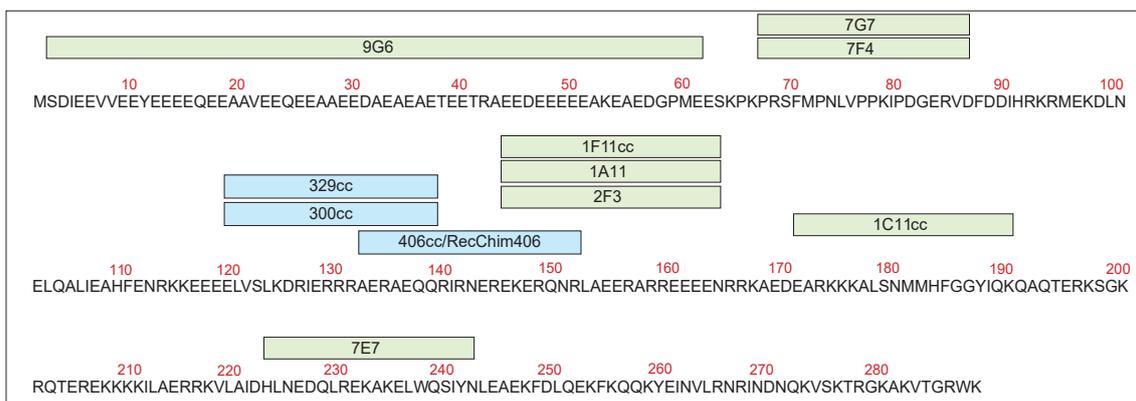


Рис. 1. Картирование эпитопов моноклональных антител HyTest, специфичных к сТnТ. Мы предлагаем антитела для разработки высокочувствительных сТnТ тестов (синий), и для проведения научных исследований (зеленый).

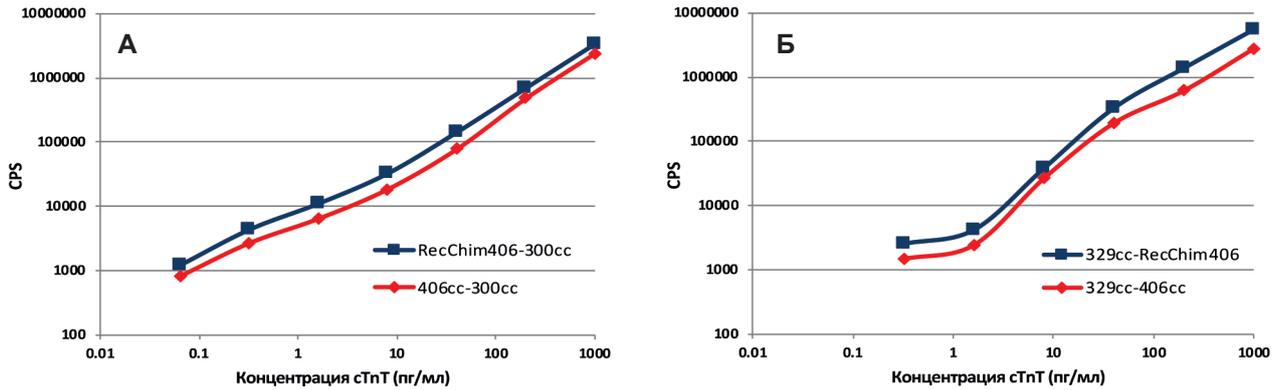


Рис. 2. Сравнение эффективности МоАт 406сс и RecChim406 с использованием хемилюминесцентного иммуферментного анализа (CLIA). МоАт 406сс и RecChim406 использовались как антитела подложки МоАт (в паре с 300сс), так и как детекторные антитела (в паре с 329сс).

Способность пар антител 329сс-406сс и 406сс-300сс распознавать сТnT в крови пациентов с острым инфарктом миокарда (ОИМ) была протестирована на более чем 38 образцах сыворотки и плазмы. Результаты тестирования демонстрируют хорошую корреляцию с одним из представленных на рынке коммерческих высокочувствительных сТnT тестов. Результаты тестирования 38 образцов сыворотки представлены на Рис. 3.

Минимальная кросс-реактивность со скелетными изоформами ТnT

Специфичность антител, используемых в высокочувствительных тестах, к сердечному тропонину Т имеет первостепенное значение, поскольку даже незначительная кросс-реактивность может привести к ложноположительным результатам.

Мы изучили кросс-реактивность МоАт 300сс, 329сс и 406сс со скелетными изоформами тропонина Т. Первоначально, МоАт тестировали в непрямой ELISA с очищенным нативным сТnT или смесью рекомбинантных быстрой и медленной скелетных изоформ, сорбированными на подложке. Все МоАт распознавали только сТnT (рис. 4). Далее кросс-реактивность протестировали в двух прототипных системах для проведения иммуферментного анализа сендвич-типа с очищенным нативным сТnT и рекомбинантными fsТnT и ssТnT. Антигены IGFBP-4 и миелопероксидазу (МПО) использовали в качестве отрицательных контролей. Кросс-реактивность использованных систем детекции была значительно ниже 0,1% (рис. 5).

Антитела для проведения научных исследований

Для проведения научных исследований мы предлагаем МоАт, взаимодействующие с сТnT разных видов животных (Таблица 1).

Таблица 1. Перекрестное взаимодействие МоАт с сердечным ТnT разных видов животных в вестерн-блоттинге (ВБ).

МоАт	Человек	Бык	Свинья	Коза	Собака	Кролик	Кот	Крыса	Мышь	Рыба
7F4	++	Н/Д	++	Н/Д	-	-	-	Н/Д	Н/Д	-
7G7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2F3	++	+	++	++	+	+	+	+	+	+
1A11	++	++	++	++	+	+	+	+	++	+
1F11	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+

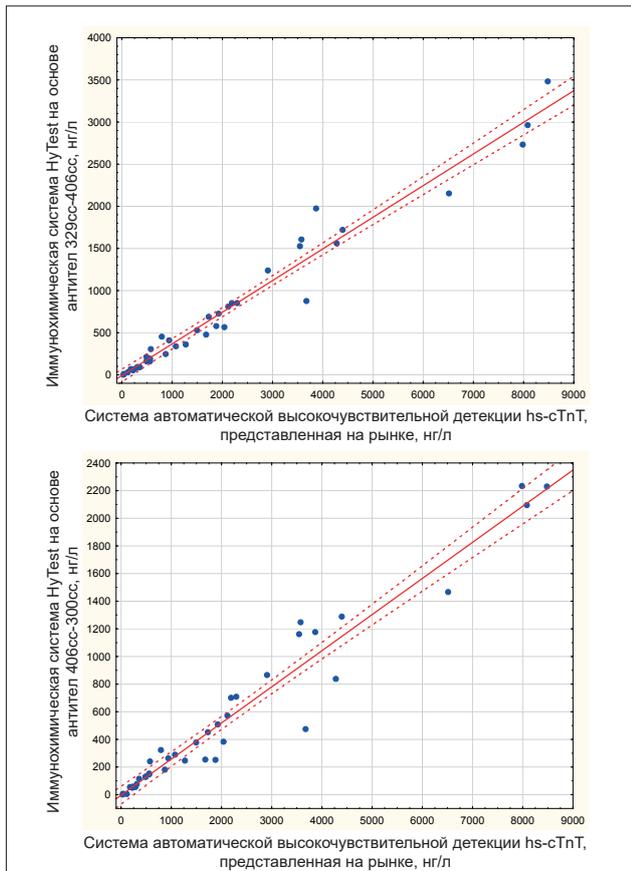


Рис. 3. Иммуферментные прототипы диагностических систем NuTest демонстрируют хорошую корреляцию с коммерческим высокочувствительным сТnT тестом, представленным на рынке. Концентрацию сТnT в 38 образцах сыворотки, полученных от пациентов с ОИМ, определяли с использованием двух иммуферментных систем детекции – с антителами NuTest (пары 329сс-406сс и 406сс-300сс) и hs-сТnT тестом, представленном на рынке.

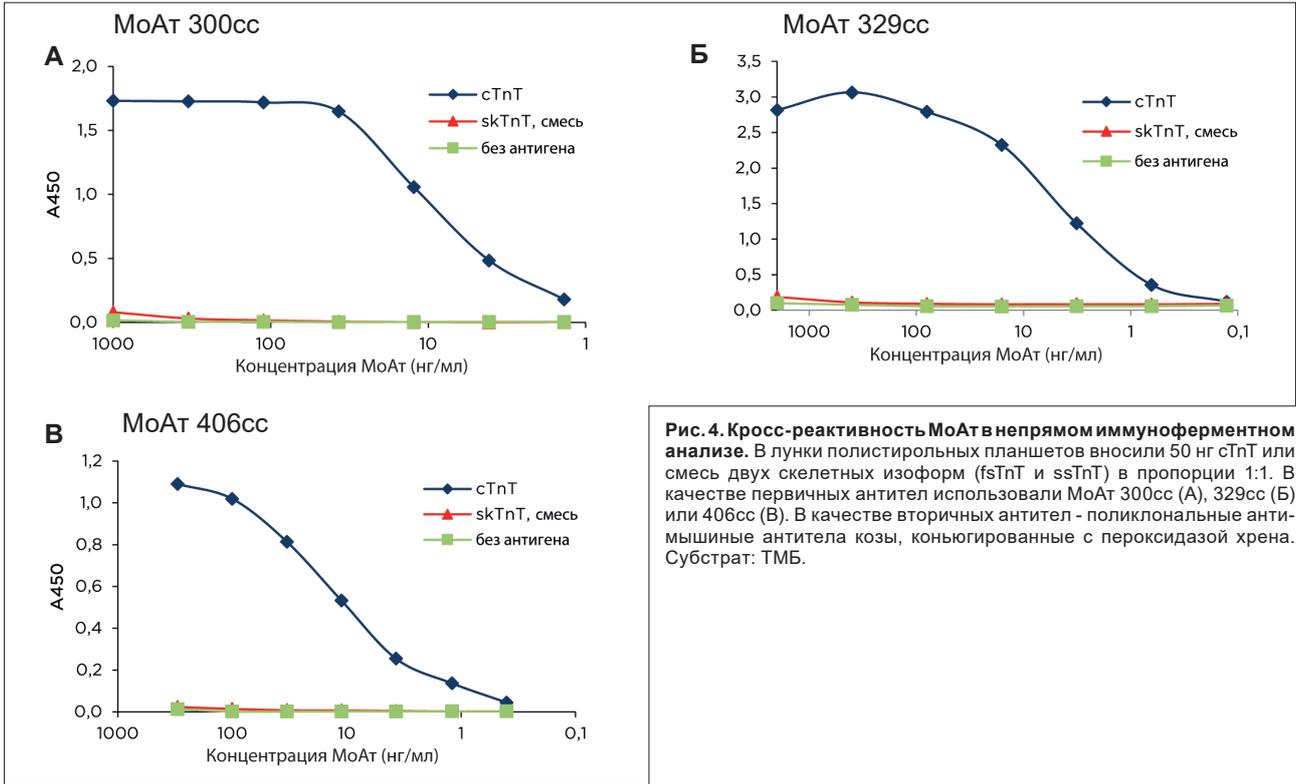


Рис. 4. Кросс-реактивность МоАт в непрямом иммуноферментном анализе. В лунки полистирольных планшетов вносили 50 нг сТnТ или смесь двух скелетных изоформ (fsTnТ и ssTnТ) в пропорции 1:1. В качестве первичных антител использовали МоАт 300сс (А), 329сс (Б) или 406сс (В). В качестве вторичных антител - поликлональные анти-мышинные антитела козы, конъюгированные с пероксидазой хрена. Субстрат: ТМБ.

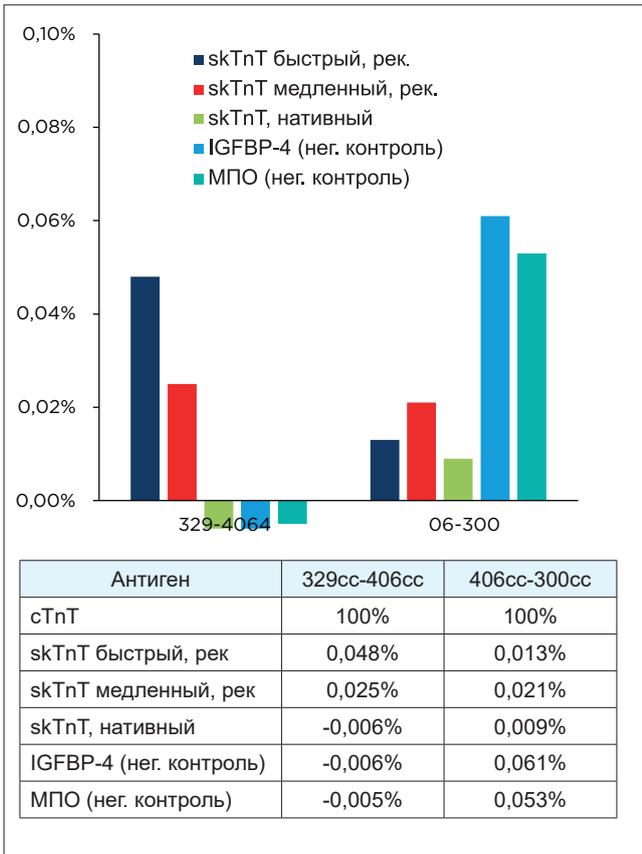


Рис. 5. Кросс-реактивность в прототипных тестах 329сс-406сс и 406сс-300сс. Реакционная способность к различным антигенам (100 нг/мл) была исследована при помощи сэндвич-иммуноферментного анализа. Обе пары продемонстрировали незначительную кросс-реактивность (0,01% - 0,05%) ко всем протестированным маркерам.

Химерные антитела нивелируют НАМА-эффект

Мы проверили эффективность различных комбинаций химерных и исходных мышинных антител с помощью сывороток доноров, содержащих человеческие антимышинные антитела (human anti-mouse antibodies, НАМА), чтобы проверить чувствительность обоих видов антител к НАМА-эффекту. Все комбинации пар мышинных антител с химерными демонстрировали либо отсутствие сигнала, либо незначительный фоновый сигнал в протестированных сыворотках (Рис. 6).

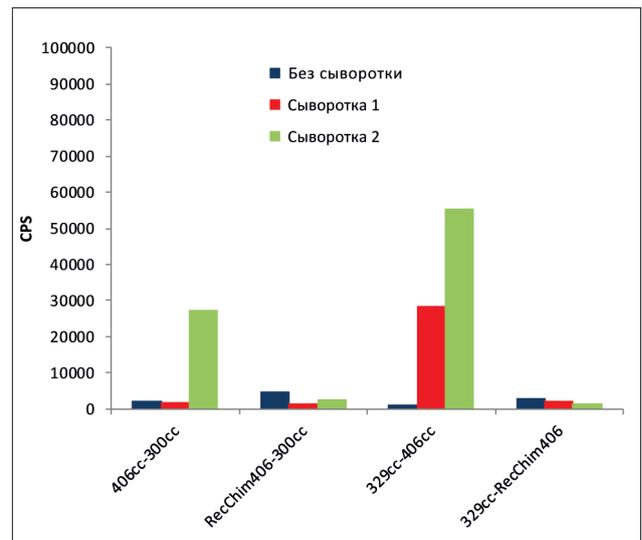


Рис. 6. Химерные антитела устраняют НАМА-эффект. Эффективность химерных антител по сравнению с исходными мышинными МоАт 406 была протестирована методом CLIA с использованием двух НАМА-содержащих сывороток со следующими концентрациями НАМА: 807 нг/мл в образце 1 и 1388 нг/мл в образце 2. В качестве контроля использовали буферный раствор, не содержащий сыворотки.

Очищенные антигены

Рекомбинантные человеческие «быстрый» и «медленный» sТnТ

Рекомбинантные fsТnТ(кат. № 8RST2) и ssТnТ (кат. № 8RFT4) идеально подходят для изучения кросс-реактивности с этими изоформами в иммуноферментных системах детекции. Эти белки также продуцируются в *E. coli* путем экспрессии генов, кодирующих соответствующие изоформы.

Рекомбинантный человеческий сТnТ

Изоформа 6 (также известная как ТnТ3) является основной изоформой тропонина Т в сердечной ткани взрослого человека.

Рекомбинантный человеческий сТnТ (Кат. № 8РТТ5) продуцируется в *E. coli* путем экспрессии гена, кодирующего изоформу 6 сТnТ, состоящую из 288 аминокислот. Белок имеет дополнительный Met остаток на N-конце.

Информация для заказа

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Изотип	Примечания
Тропонин Т сердечный	4Т19	9G6	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 2-61
		7F4	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 67-86
		7G7	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 67-86
		2F3	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 145-164
		1А11	IgG2b	ИФА, ВБ, а.к.о. 145-164
	4Т19сс	7E7	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 223-242
		300cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, а.к.о. 119-138
		329cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, а.к.о. 119-138
		406cc	IgG2a	<i>In vitro</i> , ИФА, а.к.о. 132-151
		1F11cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 145-164
	1С11cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ, а.к.о. 171-190	
	RC4Т19	RecChim406	IgG1	ИФА, рекомбинантное химерное антитело

АНТИГЕНЫ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Тропонин Т человека, сердечный, рекомбинантный	8РТТ5	>95%	Рекомбинантный
Тропонин Т человека, быстрый скелетный, рекомбинантный	8RFT4	>95%	Рекомбинантный
Тропонин Т человека, медленный скелетный, рекомбинантный	8RST2	>95%	Рекомбинантный