



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ

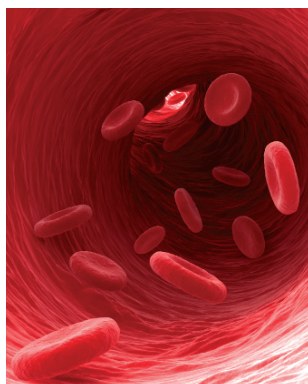


Для исследований и производства

Воспаление



Прокальцитонин (ПКТ)



Прокальцитонин (ПКТ) представляет собой небольшой белок (~ 13 кДа), который синтезируется С-клетками щитовидной железы. Он считается основным маркером расстройств, которые сопровождаются системным воспалением и сепсисом.

ПКТ кодируется геном CALC-1 и является предшественником гормона кальцитонина. Он производится из пре-прокальцитонина длиной 141 аминокислоту. После удаления сигнального пептида (аминокислоты 1-25), 116 аминокислот ПКТ подвергаются последовательному расщеплению с образованием трех молекул: N-концевого фрагмента (N-концевой ПКТ, 57 аминокислотных остатков (а.к.о.)), кальцитонина (32 а.к.о.) и катакальцина (21 а.к.о.) (рис. 1).

ПКТ принадлежит к семейству родственных белков (семейство пептидов САРА), которое также включает кальцитонин, пептиды I и II, связанные с геном кальцитонина, амилин и адреномодулин.

ПКТ в диагностике

В 1993 году впервые было обнаружено повышенное содержание ПКТ у пациентов, заразившихся инфекциями бактериального происхождения. Было установлено, что вырабатываемый в результате воспаления ПКТ образовывался в паренхиматозных тканях и различных типах клеток, а не в С-клетках (2-4). Таким образом, ПКТ является оптимальным маркером для выявления бактериальных инфекций, так как у здоровых людей он остается на низком уровне, а при вирусных инфекциях поднимается незначительно.

К тому же актуальность диагностики ПКТ дополнительно подтверждается тесной корреляцией между концентрацией ПКТ и тяжестью воспаления (1, 5).



КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

- ✓ Системное воспаление
- ✓ Сепсис

В некоторых случаях повышение концентрации ПКТ может быть вызвано факторами, не связанными с сепсисом и инфекцией. Хирургическое вмешательство, тепловой шок, множественные травмы, ожоги и кардиогенный шок также приводят к повышению уровня ПКТ (1). Кроме того, многие исследования доказывают важность наблюдения за уровнем ПКТ после операции на сердце или его трансплантации для выявления отторжения импланта из-за бактериальных или грибковых инфекций.

Разработка иммунометрических систем и рекомендованные пары

Для разработки ИФА тестов для определения ПКТ мы предлагаем моноклональные антитела, обладающие высокой специфичностью к различным фрагментам молекулы ПКТ: N-концевому фрагменту ПКТ, кальцитонину и катакальцину. Данные антитела могут быть использованы для обнаружения как полноразмерной молекулы ПКТ, так и её участков с помощью пар антител, специфичных к различным частям ПКТ.

Эпитопная специфичность моноклонов и рекомендуемые пары для сэндвич-иммуноанализов (обнаружение-захват) показаны на рис. 1. В дополнение к антителам мы также предлагаем рекомбинантный полноразмерный антиген ПКТ, который можно использовать в качестве калибратора в иммунометрических системах для определения ПКТ или кальцитонина.

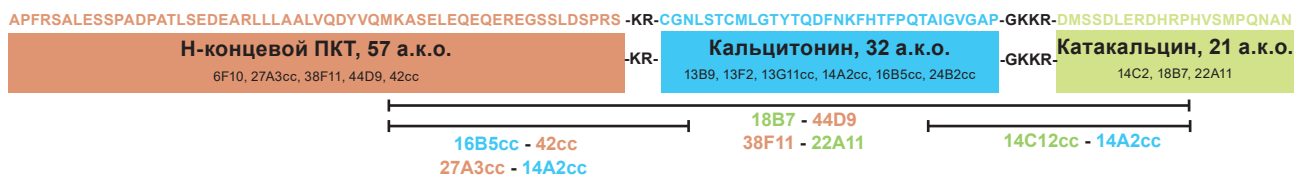


Рисунок 1. Аминокислотная последовательность прокальцитонина человека (116 а.к.о.), эпитопная специфичность и рекомендованные пары антител для сэндвич-иммуноанализа ПКТ (захват-обнаружение).

Человеческий прокальцитонин, рекомбинантный

Человеческий рекомбинантный ПКТ экспрессируется в E.coli в виде полноразмерного полипептида длиной 116 аминокислот без сигнального пептида и аффинных тагов (последовательность соответствует UniProt P01258 без сигнального пептида). Белок очищают с помощью иммуоаффинной и ионообменной хроматографии. Чистота прокальцитонина составляет более 95% (см. Рис. 2). Рекомбинантный ПКТ компании Хайтест может быть использован в качестве калибратора в иммуноанализах для определения уровня содержания прокальцитонина или кальцитонина.

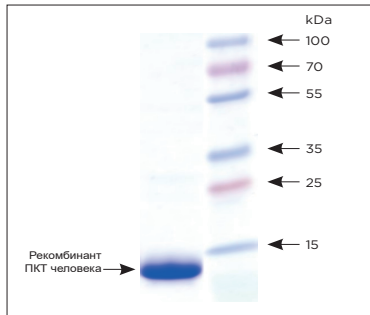


Рисунок 2. ДСН-электрофорез очищенного рекомбинантного ПКТ (5 мкг) в восстанавливающих условиях. Чистоту определяли денситометрическим анализом.

Исследование стабильности

Чтобы выяснить, насколько хорошо наш рекомбинантный антиген сохраняет свою иммунореактивность после растворения лиофилизированного продукта в буфере, мы сделали следующий раствор 1 мг/мл - 20 mM Трис, 150 mM NaCl, pH 8 - и проверили его эффективность после хранения полученного раствора при разных температурах (рис. 3). Также была протестирована работоспособность белка после нескольких циклов замораживания-оттаивания (рис. 4). Полученные результаты показывают, что антиген остается устойчивым и хорошо сохраняет свою активность в описанных условиях.

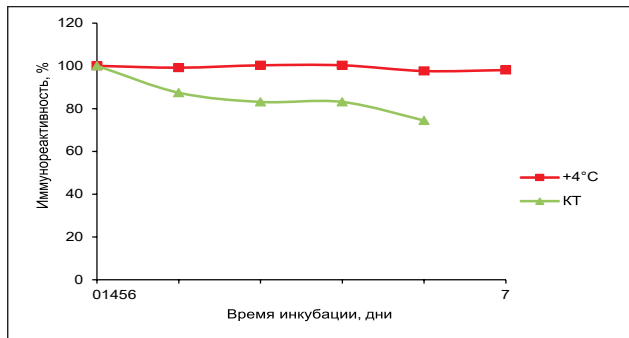


Рисунок 3. Стабильность 1 мг/мл раствора антигена при +4°C и комнатной температуре. ПКТ в концентрации 1 мг/мл инкубировали при + 4 °C или комнатной температуре в течение указанных периодов времени. Иммунореактивность измеряли в сэндвич-ELISA парой моноклональных антител 16B5cc-42cc.

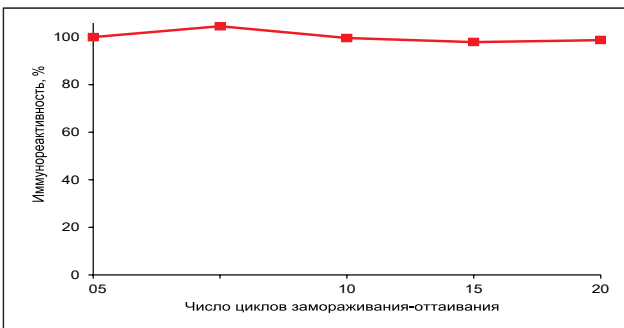


Рисунок 4. Стабильность 1 мг/мл раствора антигена после повторных циклов замораживания-оттаивания. ПКТ в концентрации 1 мг/мл замораживали при -70 °C и оставили при комнатной температуре до полного размораживания указанное количество раз. Иммунореактивность измеряли по методике "сэндвич"-ELISA парой моноклональных антител 16B5cc-42cc.

Сравнительное исследование

Мы сравнили наш рекомбинантный ПКТ без тагов с рекомбинантным бестаговым ПКТ другого поставщика. Наши исследования не выявили различий в иммунореактивности сравниваемых белков (рис. 5).

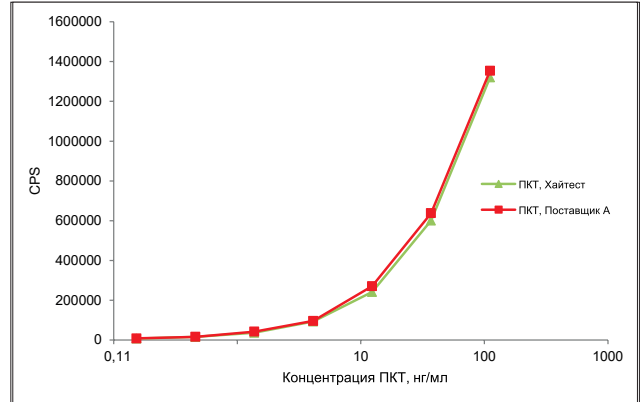


Рисунок 5. Сравнительное титрование ПКТ без тагов от Хайтест и от другого поставщика. Иммунореактивность измеряли в сэндвич-ELISA парой моноклональных антител 16B5cc-42cc.

Моноклональные антитела, специфичные к ПКТ, кальцитонину или катакальцину

Моноклональные антитела к ПКТ

В нашей собственной иммунометрической системе (иммуноанализ DELFIA®) наилучшая чувствительность к ПКТ была получена в следующих парах моноклональных антител: иммобилизованный клон 16B5cc (специфичен к кальцитонину) и детекторный клон 42cc (обнаруживает N-концевую часть ПКТ) (рис. 6). Тем не менее, большинство моноклональных антител может использоваться в различных комбинациях, и подходящие комбинации необходимо выявлять отдельно для каждой платформы.

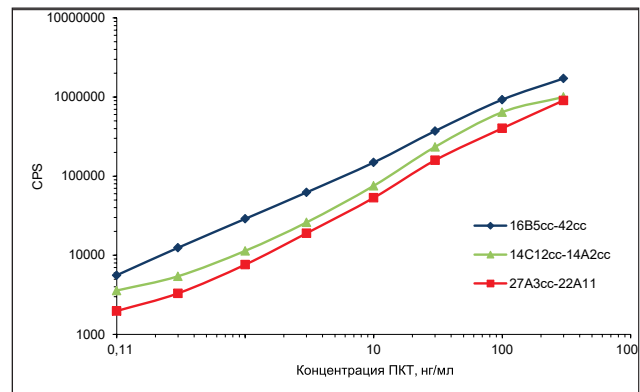


Рисунок 6. Калибровочные кривые для трех сэндвич-флюороиммуноанализов на ПКТ человека с использованием антител с различной эпитопной специфичностью. Антитела подложки: 1 мкг/лунку. Детекторные антитела (метка Eu3+): 0,1 мкг/лунку. Антиген: ПКТ, человеческий рекомбинантный. Время инкубации: 30 мин.

Мы также протестировали различные иммунометрические системы на их способность обнаруживать нативный ПКТ в сыворотке человека. Образцы сыворотки от двух пациентов с сепсисом и одного здорового человека были проанализированы с использованием различных комбинаций моноклональных антител к ПКТ человека. Кривые титрования сыворотки для иммунометрического анализа 16В5сс (захват) - 42сс (обнаружение) показаны на рис. 7.

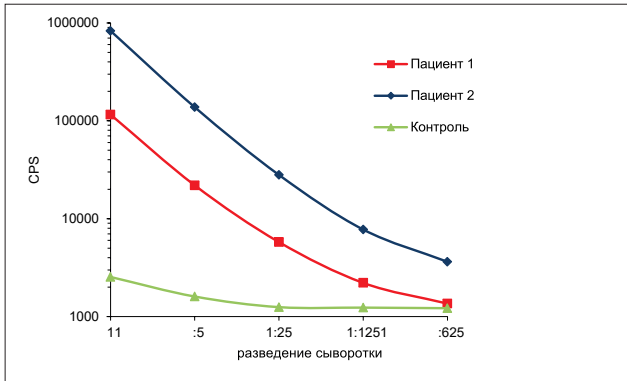


Рисунок 7. Титрование образцов сывороток пациентов с сепсисом бактериального происхождения и контрольной сыворотки здорового человека (нормальная сыворотка). Пара 16В5сс-42сс (обнаружение захват) использовалась в сэндвич-флюороиммуноанализе. Антитело подложки 16В5сс: 1 мкг/лунку. Детекторное антитело 42сс (метка Eu3+): 0,1 мкг/лунку. Время инкубации: 45 мин.

Моноклональные антитела к кальцитонину

Кальцитонин – это небольшой пептидный гормон, который участвует в метаболизме кальция и фосфора. Кальцитонин образуется из ПКТ в результате посттрансляционного расщепления. Расщепленный незрелый кальцитонин затем преобразуется в зрелый кальцитонин путем удаления С-концевого глицина. Зрелый кальцитонин хранится в секреторных гранулах внутри клеток. Секреция кальцитонина регулируется уровнем Ca²⁺ в крови. Зрелый кальцитонин состоит из 32 аминокислотных остатков с молекулярной массой приблизительно 3,4 кДа и теоретической рI 6,72.

Компания Хайтест предлагает моноклональные антитела, которые обладают высокой специфичностью к разным эпитопам молекулы кальцитонина. Некоторые из этих антител также рекомендуются для иммунодетекции ПКТ при использовании в сочетании с N-концевыми ПКТ или специфическими антителами к катакальцину. Кривая титрования моноклонального антитела к кальцитонину 13В9 показана на рис. 8.

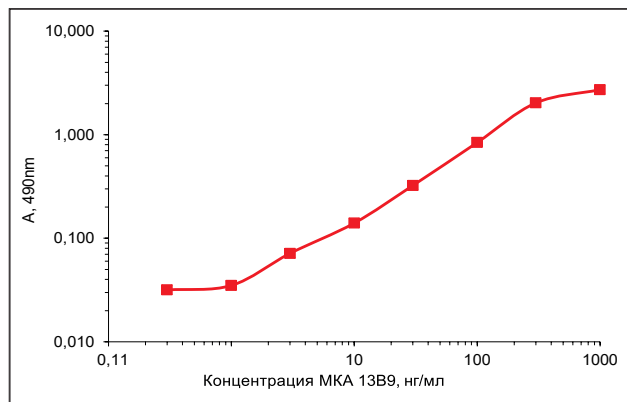


Рисунок 8. Кривая титрования моноклонального антитела к кальцитонину 13В9 в непрямом ИФА. Антиген: кальцитонин человеческий рекомбинантный - 0,02 мкг/лунку.

Моноклональные антитела к катакальцину

Катакальцин является С-концевой частью молекулы прокальцитонина и состоит из 21 аминокислотного остатка с молекулярной массой приблизительно 2,4 кДа и теоретической рI 5,26. Физиологическая роль катакальцина неизвестна. Антитела, специфичные к катакальцину, могут быть использованы для специфического высоко чувствительного выявления ПКТ в крови человека.

Мы рекомендуем использовать их в иммуноанализах в качестве иммобилизованных антител. Кривая титрования моноклонального антитела к катакальцину 14С12сс показана на рис. 9.

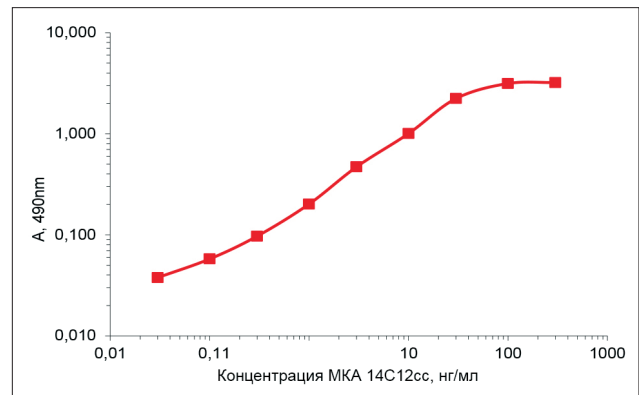


Рисунок 9. Кривая титрования моноклонального антитела к катакальцину 14С12сс в непрямом ИФА. Антиген: катакальцин, конъюгированный с БСА - 0,02 мкг/лунку.

Моноклональные антитела к N-концевому ПКТ

N-концевой фрагмент прокальцитонина представляет собой пептид, состоящий из 57 аминокислотных остатков. Мы рекомендуем применять моноклональные антитела, специфичные к N-концевому ПКТ, для иммунодетекции ПКТ совместно с антителами к кальцитонину или катакальцину. Моноклональные антитела к N-концевому ПКТ показывают лучшую эффективность по сравнению с детектирующими антителами в сэндвич-иммунологическом анализе.

Кривая титрования для моноклонального антитела к N-концевому ПКТ 42сс показана на рис.10.

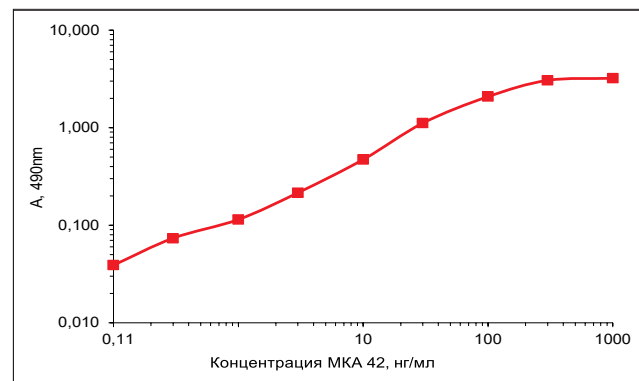
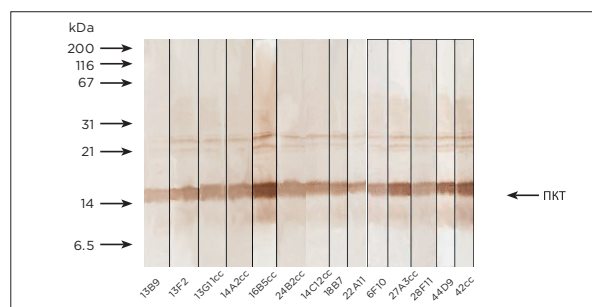


Рисунок 10. Кривая титрования моноклонального антитела к N-концевому ПКТ 42сс в прямом ИФА. N-концевой ПКТ, конъюгированный с БСА - 0,02 мкг/лунку.

Мы проводили проверку способности наших антител обнаруживать ПКТ в вестерн-блоттинге. Таким образом было установлено, что все клоны распознают ПКТ в вестерн-блоттинге после электрофореза в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия (по Лэммли) в восстановительных условиях (рис. 11).

Рисунок 11. Определение человеческого рекомбинантного ПКТ (100 нг/полосу) с помощью моноклональных антител, специфичных к кальцитонину, катакальцину и N-концевому фрагменту ПКТ, в вестерн-блоттинге после 15% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях.



Информация для заказа.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания	
	4C10cc	13G11cc	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ	
		14A2cc	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ	
		16B5cc	IgG2b	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ	
		24B2cc	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ	
	4C10	13B9	IgG2a	ИФА, а.к.о. 60-69 ПКТ	
		13F2	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ	
	Прокальцитонин	4PC47	6F10	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 21-40 ПКТ
			14C12cc	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 102-111 ПКТ
18B7			IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 102-111 ПКТ	
22A11			IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 96-105 ПКТ	
27A3cc			IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 21-40 ПКТ	
38F11			IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 21-40 ПКТ	
42cc			IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 21-40 ПКТ	
44D9			IgG2a	ИФА, ВБ	

ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Животное	Примечания
Прокальцитонин	PPC3	коза	ИФА

АНТИГЕН

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Прокальцитонин, без тагов, рекомбинантный	8PC5	>95%	Рекомбинант

Ссылки на литературу

- Assicot M, et al.** (1993) High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 341(8844), 515-518.
- Linscheid P, et al.** (2003) In vitro and in vivo calcitonin I gene expression in parenchymal cells: A novel product of human adipose tissue. *Endocrinology* 144, 5578-5584.
- Simon L, et al.** (2004) Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 39, 206-217.
- Sponholz C, et al.** (2006) Diagnostic value and prognostic implications of serum procalcitonin after cardiac surgery: a systematic review of the literature. *Critical Care* 10, R145.
- Meisner M and Reinhart K** (2001) Is procalcitonin really a marker of sepsis? *Int J Intensive Care* 8(1), 15-25.