



ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ

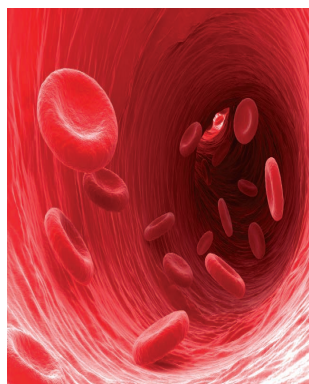


Для исследований и производства

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.



КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

- ✓ Системное воспаление
- ✓ Сепсис

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).

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.

ПКТ кодируется геном CALC-1 и является предшественником гормона кальцитонина. Он производится из пре-прокальцитонина длиной в 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 CAPA), которое также включает кальцитонин, пептиды I и II, связанные с геном кальцитонина, амилин и адреномодулин.

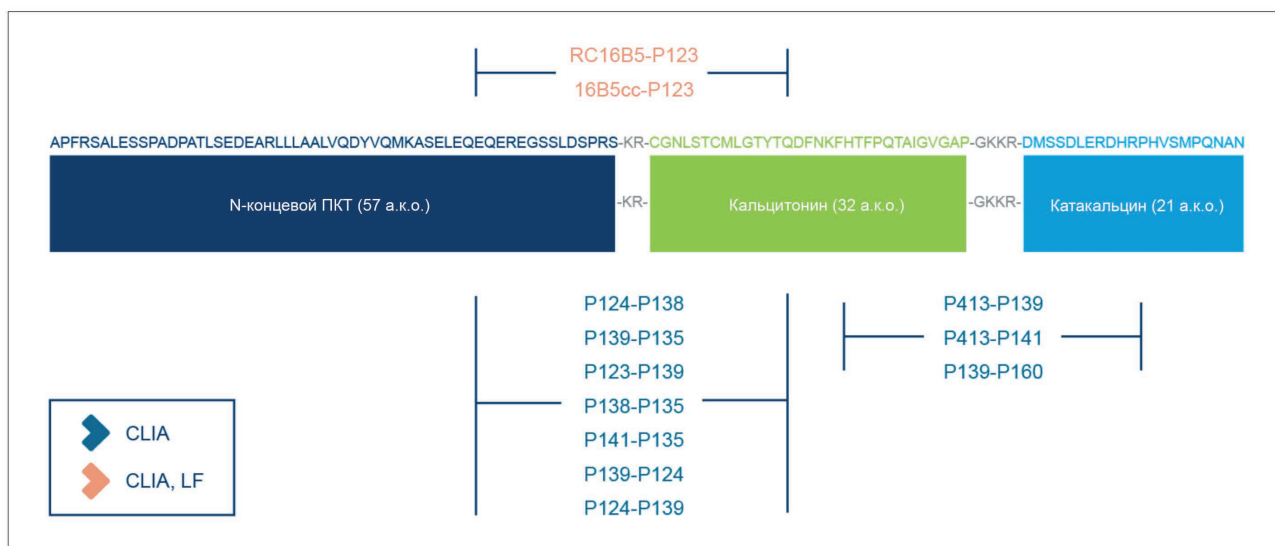


Рисунок 1. Аминокислотная последовательность прокальцитонина человека (116 а.к.о.), N-концевой ПКТ (1-57), кальцитонин (60-91) и катакальцин (96-116), а также рекомендованные пары антител для сэндвич-иммуноанализа ПКТ (захват-обнаружение).

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.

Согласно результатам исследований лучшей чувствительностью наблюдалась при использовании следующих пар: P124-P138, P139-P135 и P123-P138 (см. табл. 1). Однако большинство МоАт можно использовать и в других комбинациях в зависимости от используемых платформ, в т. ч. CLIA и LF. Все комбинации показали отсутствие или малую перекрестную реакцию с изолированным кальцитонином, катакальцином, а также связанные с геном кальцитонина пептид-1 и пептид-2 (CGRP1 и CGRP2). Подробности представлены в таблице 2.

Таблица 1. Рекомендованные пары МоАт к ПКТ для сэндвич-иммуноанализов в CLIA и LF. LOD – предел чувствительности. Данные корреляции с анализом Roche Elecsys® BRAHMS на ПКТ получены в результате работы с тремя независимыми пулами образцов реальных пациентов (n=34, 46, and 103).

Основные рекомендуемые пары				
Захват-детекция	Специфичность	LoD (нг/мл)	Корреляция	Приложение
P124-P138	N-C	0.27	0.9961	CLIA
P139-P135	C-N	0.28	0.9880	CLIA
P123-P138	N-C	0.28	0.9998	CLIA
P138-P135	C-N	0.53	0.9964	CLIA
P141-P135	C-N	0.68	0.9973	CLIA
P139-P124	C-N	0.73	0.9953	CLIA
P124-P139	N-C	0.87	0.9975	CLIA
P413-P139	K-C	1.43	0.9930	CLIA
RC16B5-P123	C-N	1.47	0.9846	CLIA, LF
P413-P141	K-C	1.82	0.9970	CLIA
Другие рекомендации				
P135-P138	N-C	0.35	0.9994	CLIA
P135-P139	N-C	0.42	0.9984	CLIA
P141-P223	C-N	0.78	0.9850	CLIA
P123-P139	N-C	1.09	0.9991	CLIA
P141-P160	C-K	1.40	0.9993	CLIA
P139-P223	C-N	1.43	0.9800	CLIA
16B5cc-P123	C-N	2.08	0.9523	CLIA, LF
P139-P160	C-K	2.32	0.9999	CLIA

Таблица 2. Данные кросс-реактивности пар МоАт в сэндвич-иммуноанализе по определению ПКТ. Кальцитонин, катакальцин, CGRP1 и CGRP2 используются в концентрациях 10 нг/мл в CLIA. Данные представлены в процентах от иммунореактивности полноразмерного ПКТ.

Пары	Специфичность	Кросс-реактивность, в % (для 10 нг/мл в CLIA)			
		Кальцитонин	Катакальцин	CGRP1	CGRP2
P124-P138	N-C	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
P139-P135	C-N	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
P123-P138	N-C	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
P138-P135	C-N	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
P141-P135	C-N	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
P139-P124	C-N	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
P124-P139	N-C	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
P413-P139	K-C	0.0335	0.0141	0.0008	0.0042
RC16B5-P123	C-N	0.0231	0.0056	0.0060	0.0000
P413-P141	K-C	0.0278	0.0043	0.0092	0.0355
P135-P138	N-C	0.0170	0.0100	0.0030	<0.0050
P135-P139	N-C	<0.005	0.0070	0.0410	0.039
P141-P223	C-N	0.0924	0.0102	0.0201	0.0000
P123-P139	N-C	0.0297	0.0113	0.0038	0.0065
P141-P160	C-K	0.0154	0.0000	0.0057	0.0069
P139-P223	C-N	0.0095	0.0067	0.0085	0.0088
16B5-P123	C-N	0.0175	0.0035	0.0023	0.0066
P139-P160	C-K	0.0206	0.0046	0.0041	0.0030

Калибровочные кривые шести прототипов анализов представлены на рисунке 2. Мы также проверили несколько прототипов анализов на их способность обнаруживать нативный ПКТ в сыворотке крови человека с использованием образцов сыворотки от двух пациентов с сепсисом и одного здорового человека.

Данные о корреляции результатов анализа Roche Elecsys BRAHMS и наших прототипов представлены на рисунке 3 и в таблице 1. Все анализы проходили проверку на уровень ПКТ с помощью анализатора Roche Cobas e 411 или модульной платформы Roche cobas® 6000, после чего сверялись с данными наших прототипов на основе CLIA анализа.

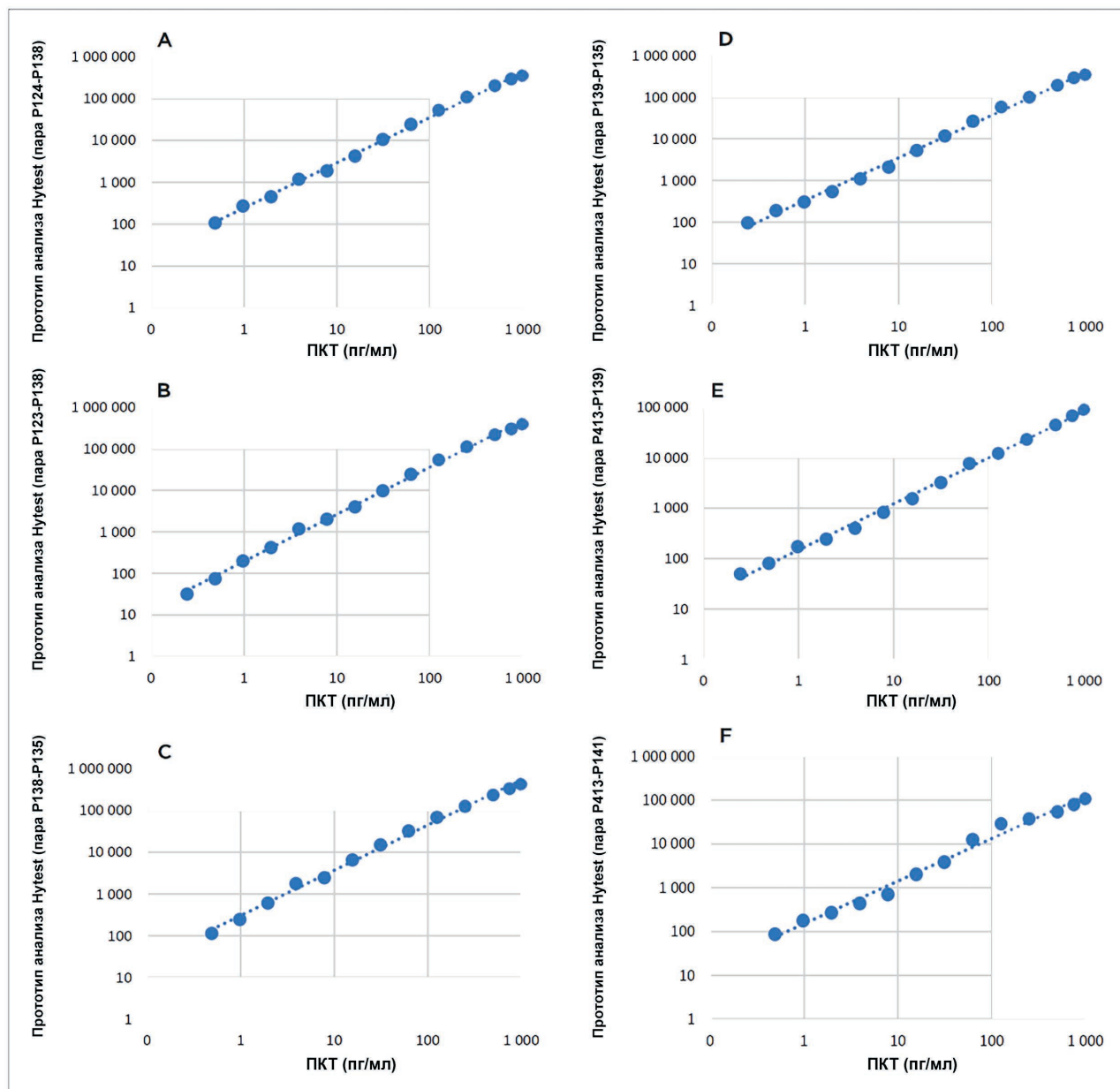


Рисунок 2. Калибровочные кривые для шести протитипов иммуноанализов на определение ПКТ CLIA человека методом CLIA с использованием пар МоАт с различной эпитопной специфичностью.

- A) P124-P138
- B) P139-P135
- C) P123-P138
- D) P138-P135
- E) P413-P139
- F) P413-P141

МоАт для захвата: 0,05 мкг на лунку

МоАт для детекции, биотинилированные: 12,5 нг на лунку

Конъюгат стрептавидина с полимеризованной пероксидазой (ThermoFisher): 1:50000

Антиген: ПКТ человеческий рекомбинантный

Время инкубации: 30 мин.

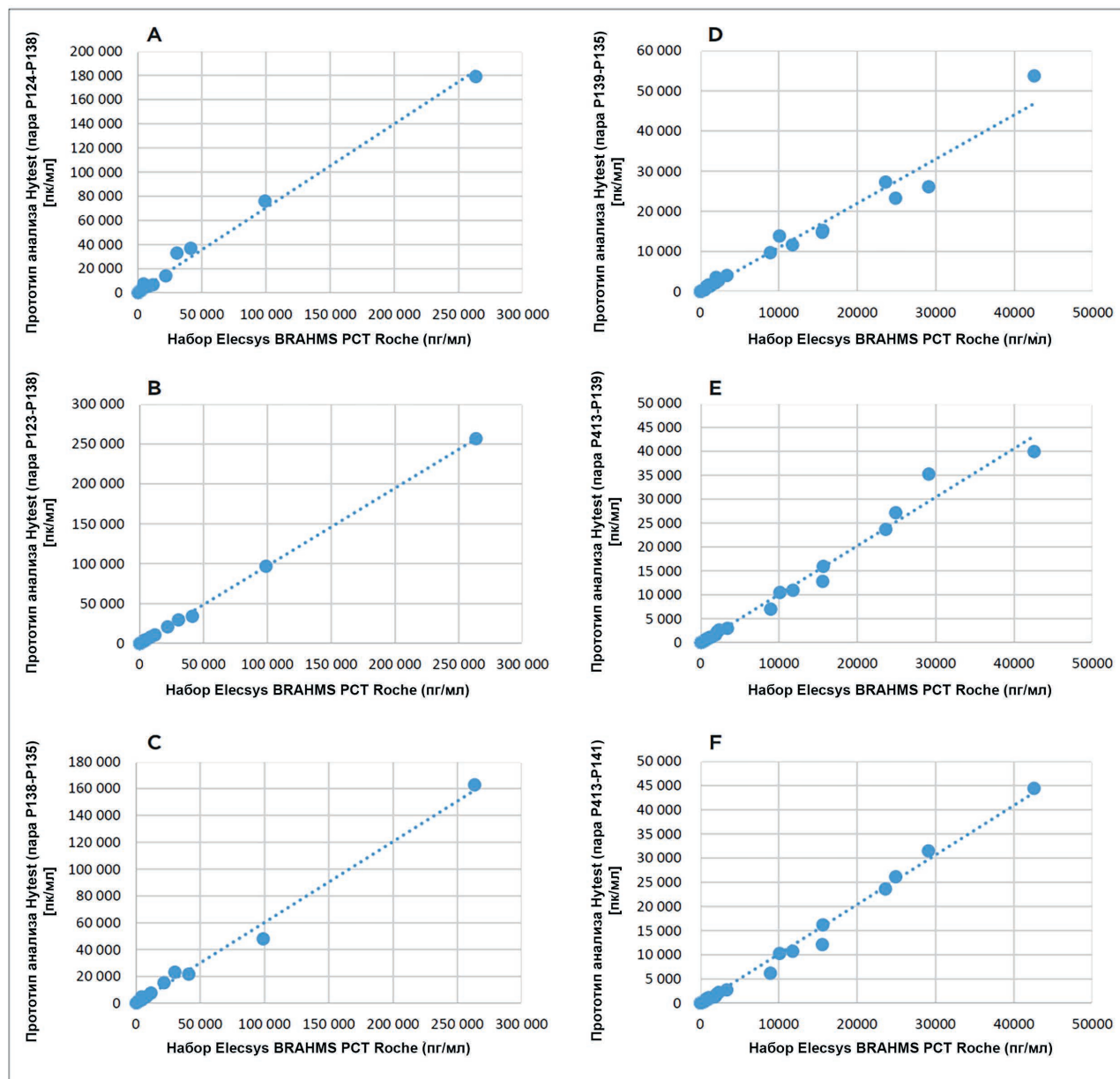


Рисунок 3. Корреляция наших прототипов с тестом с Roche Elecsys® BRAHMS PCT.

А) P124-P138 (n=34)

Б) P123-P135 (n=46)

В) P138-P135 (n=34)

Г) P139-P135 (n=103)

Д) P413-P139 (n=103)

Е) P413-P141 (n=103).

Для графиков корреляции А-С:

МоАт для захвата: 0,05 мкг/лунку

МоАт для детекции, биотинилированные: 12,5 нг на лунку

Конъюгат стрептавидина с полимеризованной пероксидазой (ThermoFisher): 1:50000

Время инкубации: 30 мин.

Для графиков корреляции D-F:

МоАт для захвата, покрытые парамагнитными частицами: 20 мкг на лунку

МоАт для захвата, помеченные эфиром акридиния: 30 нг на лунку

Время инкубации: 10 мин.

Рекомбинантные химерные антитела к ПКТ

Наша компания разработала два МоАт против ПКТ в рекомбинантном химерном формате с константными доменами IgG1 человека (RC16B5 и P223). Рекомбинантные химерные антитела демонстрируют чувствительность, аналогичную мышиним антителам, а также позволяют избежать ложноположительных сигналов в антителах человека к Ig мыши (НАМА) и ревматоидный фактор (RF). Результаты сравнения мышиных МоАт 16B5cc и химерных МоАт RC16B5 продемонстрированы на рисунке 4.

Поликлональные антитела против прокальцитонина

ХайТест предлагает козыи поликлональные антитела к прокальцитонину человека (кат. № PPC3). В качестве иммуногена для данного продукта применяется человеческий рекомбинантный полноразмерный прокальцитонин. Для очистки поликлональных антител применялся иммуноаффинный метод с использованием РСТ-сефарозы в качестве аффинной матрицы.

Рекомендуемые сэндвич-пары антител для использования с поликлональными антителами против прокальцитонина представлены в таблице 3.

Таблица 3. Рекомендации по парам антител для захвата-детекции поликлональных антител к прокальцитонину человека (Кат. № PPC3).

Захват	Обнаружение
PPC3	16B5cc
PPC3	P139

Моноклональные антитела, специфичные к ПКТ

Мы проверили способность некоторых антител обнаруживать ПКТ в вестерн-блоттинге после электрофореза с SDS в восстанавливающих условиях (рис. 5)

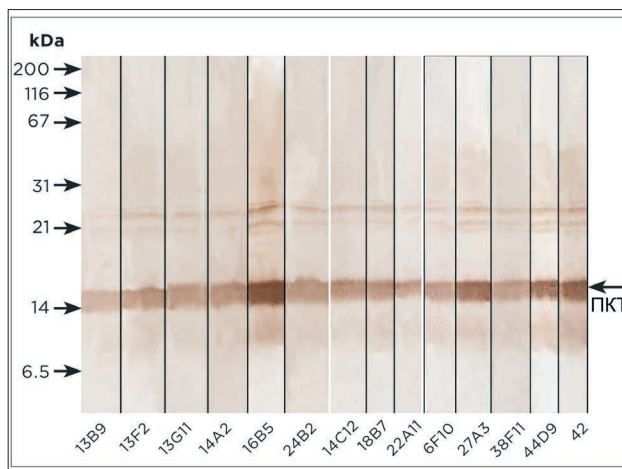


Рисунок 5. Определение человеческого рекомбинантного ПКТ (100 нг/полосу) с помощью моноклональных антител, специфичных к кальцитонину, катакальцину и N-концевому фрагменту ПКТ, в вестерн-блоттинге после 15% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях.

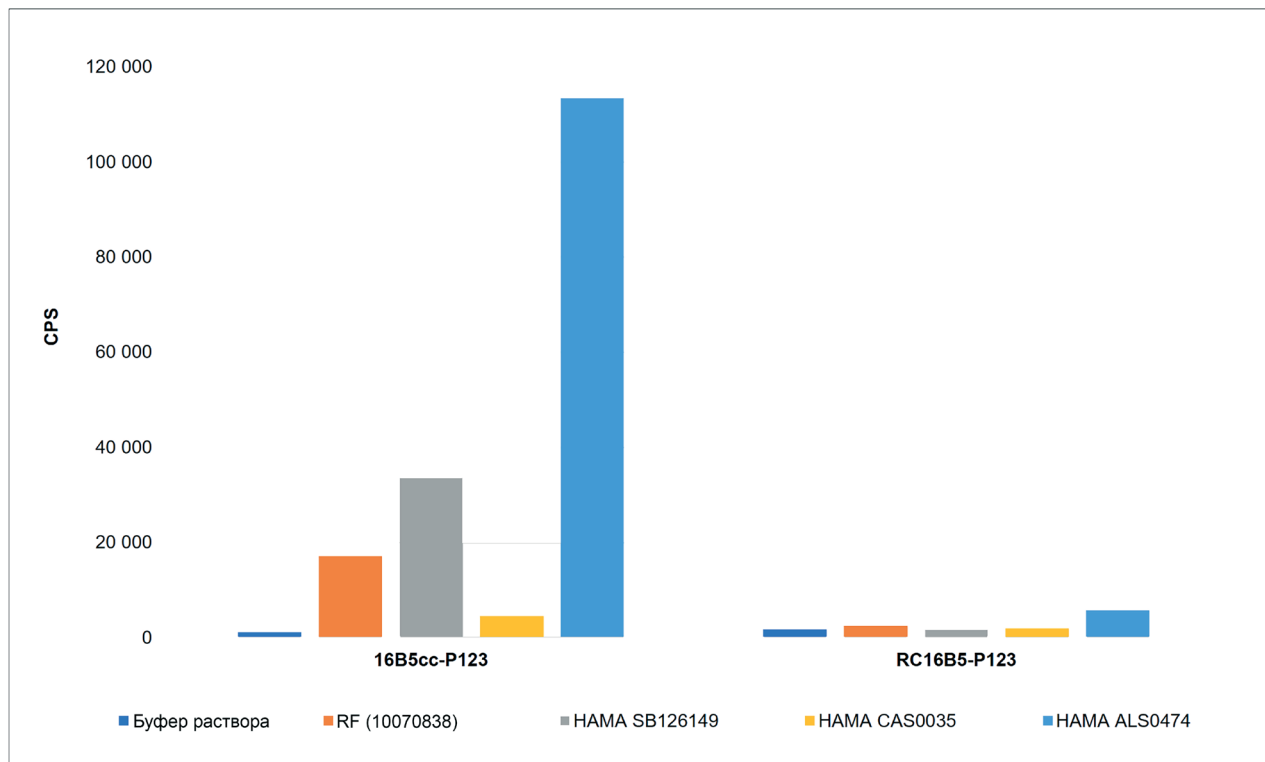


Рисунок 4. Сравнение анализов с использованием пар 16B5cc-P123 и RC16B5-P123, протестированных с RF и НАМА-положительными сыворотками (сыворотки здоровых доноров).

Рекомбинантный прокальцитонин человека

Человеческий рекомбинантный ПКТ (кат. № 8PC5) экспрессируется в *E.coli* в виде полноразмерного полипептида длиной 116 аминокислот без сигнального пептида и аффинных тагов (последовательность соответствует UniProt P01258 без сигнального пептида). Чистота составляет более 95% (см. Рис. 6). Рекомбинантный ПКТ компании ХайТест может быть использован в качестве калибратора в иммуноанализах для определения уровня содержания прокальцитонина или кальцитонина.

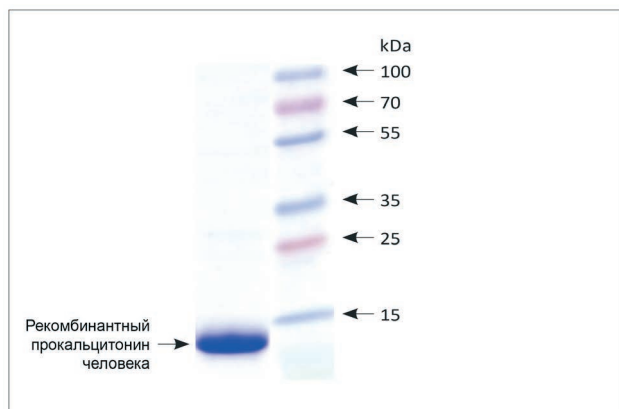


Рисунок 6. Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) 5 мкг очищенного человеческого рекомбинантного ПКТ в восстановительных условиях. Чистота определялась денситометрически.

Исследования 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 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 8 - и проверили его эффективность после хранения полученного раствора при разных температурах (рис. 7). 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.

Сравнительное исследование

Мы сравнили наш рекомбинантный ПКТ (кат. № 8PC5) без тагов с рекомбинантным бестаговым ПКТ от другого поставщика. Наши результаты показывают, что не было никакой разницы в иммунореактивности сравниваемых белков (рис. 9).

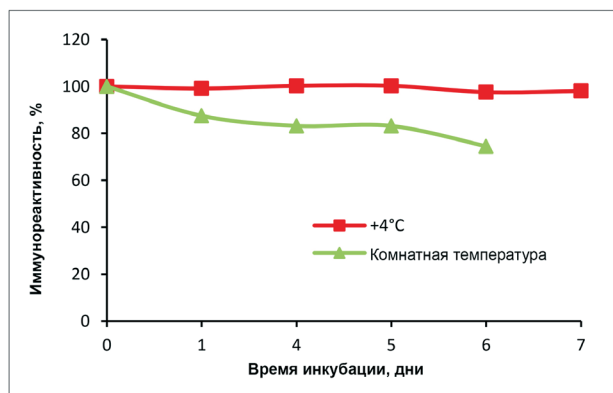


Рисунок 7. Стабильность 1 мг/мл раствора антигена при 4°C и при комнатной температуре. ПКТ в концентрации 1 мг/мл замораживали при +4°C и при комнатной температуре. Иммунореактивность измеряли по методике "сэндвич"-ELISA парой моноклональных антител 16B5-42.

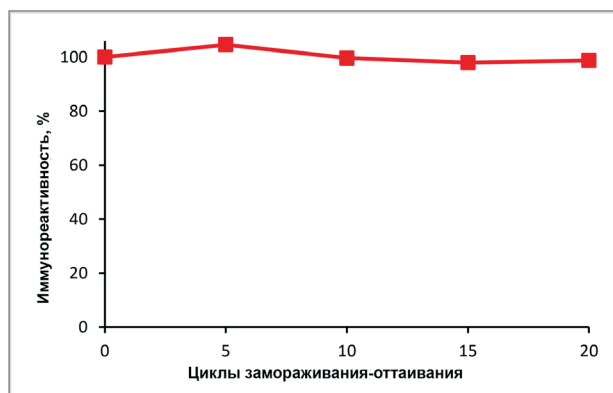


Рисунок 8. Стабильность 1 мг/мл раствора антигена после повторных циклов замораживания-оттаивания. ПКТ в концентрации 1 мг/мл замораживали при -70 °C и оставили при комнатной температуре до полного размораживания указанное количество раз. Иммунореактивность измеряли по методике "сэндвич"-ELISA парой моноклональных антител 16B5-42.

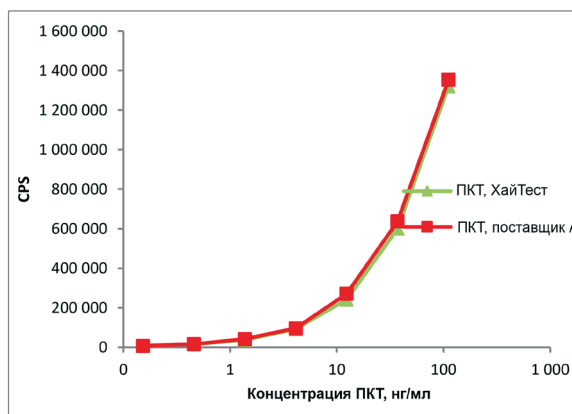


Рисунок 9. Сравнительное титрование ПКТ без тагов от Хайтест и другого поставщика. Иммунореактивность измеряли в сэндвич-ELISA парой моноклональных антител 16B5-42.

Информация для заказа.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Кальцитонин	4С10сс	P138	IgG1	In vitro, ИХЛА, а.к.о. 72-81 ПКТ
		P139	IgG1	In vitro, ИХЛА, а.к.о. 72-81 ПКТ
		P141	IgG1	In vitro, ИХЛА, а.к.о. 72-81 ПКТ
		RC16B5	IgG1	ИХЛА, ИХА, а.к.о. 72-81 ПКТ, рекомбинантные химерные антитела
		13G11сс	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ
		14A2сс	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ
		16B5сс	IgG2b	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ
		24B2сс	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ
	4С10	13B9	IgG2a	ИФА, а.к.о. 60-69 ПКТ
		13F2	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 72-81 ПКТ
Прокальцитонин	4РС47	P123	IgG1	In vitro, ИХЛА, ИХА, а.к.о. 11-25 ПКТ
		P223	IgG1	ИХЛА, а.а.г. 11-25 ПКТ, рекомбинантные химерные антитела
		P124	IgG1	In vitro, ИХЛА, а.к.о. 11-25 ПКТ
		P135	IgG2a	In vitro, ИХЛА, а.к.о. 11-25 ПКТ
		P413	IgG2a	In vitro, ИХЛА, а.к.о. 96-105 ПКТ, крысиные/мышинные гетерогрибридные антитела
		P160	IgG1	In vitro, ИХЛА, а.к.о. 102-108 ПКТ
		44D9	IgG2a	ИФА, ВБ
		6F10	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 21-40 ПКТ
		27A3сс	IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 21-40 ПКТ
		38F11	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 21-40 ПКТ
		42сс	IgG2a	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 21-40 ПКТ
		22A11	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 96-105 ПКТ
		14C12сс	IgG1	In vitro, ИФА, ВБ, а.к.о. 102-111 ПКТ
		18B7	IgG1	ИФА, ВБ, а.к.о. 102-111 ПКТ

ПОЛИКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Животное	Примечания
Прокальцитонин	PPC3	Коза	ИФА

АНТИГЕН

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

Обратите внимание, что некоторые данные, представленные в этом документе, были получены при работе с моноклональными антителами, полученными in vivo. МоАт, произведенные in vitro, должны показывать аналогичные результаты.

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.