



# ТЕХНИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ



Для исследований  
и клинического  
применения

Фертильность и  
беременность



Кардиомакеры



## Ассоциированный с беременностью протеин-А плазмы (PAPP-A)



**А**ссоциированный с беременностью плазменный протеин-А (PAPP-A) представляет собой металлопротеазу, принадлежащую к надсемейству метцинциновых цинковых пептидаз. Его основным субстратом является IGF-связывающий белок-4 (IGFBP-4). Расщепление IGFBP-4

вызывает высвобождение инсулиноподобного фактора роста (IGF), играющего важную роль в стимулировании дифференцировки и пролиферации клеток. PAPP-A впервые был обнаружен в сыворотке беременных женщин, с чем и связано его название. Позднее было установлено, что он экспрессируется в различных тканях.

### Две формы PAPP-A

Гетеротетрамерный PAPP-A (htPAPP-A) является скрининговым маркером синдрома Дауна. Уровень htPAPP-A в материнской сыворотке увеличивается в прямой корреляции с гестационным возрастом вплоть до момента, когда ребенок считается доношенным. Сильно сниженная концентрация htPAPP-A в первом триместре указывает на повышенный риск синдрома Дауна (1). htPAPP-A представляет собой

белковый комплекс, состоящий из двух субъединиц PAPP-A и двух субъединиц проформы основного белка эозинофилов (proMBP), ковалентно связанных друг с другом. Было установлено, что proMBP ингибирует протеолитическую активность PAPP-A в этом гетеротетрамерном комплексе (2).

Гомодимерный PAPP-A (dPAPP-A) экспрессируется в нестабильных коронарных атеросклеротических бляшках (3). dPAPP-A циркулирует в кровотоке в виде гомодимера, а не в комплексе с proMBP. Согласно нескольким исследованиям, dPAPP-A считается перспективным маркером дестабилизации бляшек у пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС). К сожалению, тест-системы для определения dPAPP-A также обнаруживают htPAPP-A, который является маркером синдрома Дауна, но не связан с атеросклеротическими бляшками. Необходимо учитывать это при разработке тест-систем для определения dPAPP-A, чтобы он мог распознавать только dPAPP-A без перекрестной реакции с htPAPP-A.

Еще одним важным аспектом, который может повлиять на измерение dPAPP-A как сердечного маркера, является гепарин - антикоагулянт, часто используемый при лечении пациентов с острым инфарктом миокарда. Таким образом, при анализе образцов следует учитывать инъекции гепарина. Перспективным суррогатным маркером dPAPP-A является его основной субстрат IGFBP-4. Для получения дополнительной информации вы можете обратиться к нашему техническому описанию про IGFBP-4.

### Реагенты для разработки тест-систем

Мы предлагаем моноклональные антитела (MoAb), специфичные к PAPP-A и proMBP, подходящие для разработки высокочувствительных количественных тест-систем htPAPP-A. Мы также предоставляем реагенты для разработки тест-систем, специфичных к dPAPP-A. Кроме того, мы предлагаем димерный рекомбинантный PAPP-A человека для использования в тест-системах для определения PAPP-A.

### Клиническое применение

- ✓ Скрининговый маркер синдрома Дауна в первом триместре
- ✓ Маркер дестабилизации атеросклеротических бляшек

### Моноклональные антитела, специфичные к htPAPP-A

Мы предоставляем несколько различных МоАт, специфичных к htPAPP-A. Некоторые из МоАт распознают субъединицу PAPP-A, в то время как другие специфичны к проМВР гетеротетрамерного комплекса.

#### Тест-системы для определения htPAPP-A и общего PAPP-A

Все МоАт были протестированы попарно в тест-системах сэндвич-типа в качестве антител подложки и детекции с обеими формами антигена – htPAPP-A и dPAPP-A. Пары антител, которые показали наилучшие результаты в наших исследованиях, перечислены в таблице 1. Калибровочные кривые для двух рекомендованных пар представлены на рисунке 1.

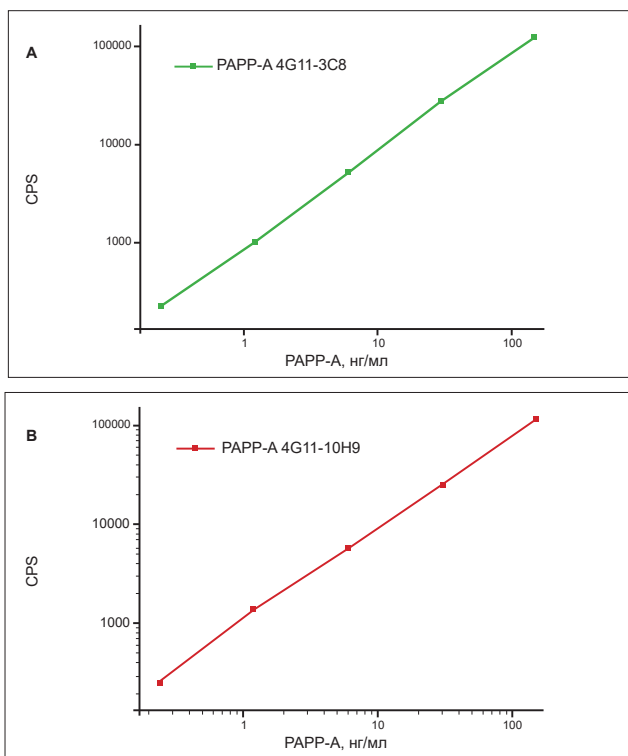


Рисунок 1. Калибровочные кривые для двух тест-систем сэндвич-типа для определения PAPP-A. (А) 4G11 – 3С8 и (Б) 4G11 – 10Н9.

МоАт подложки: 4G11 (биотинилированный)  
 Детектирующие МоАт: 3С8 или 10Н9 (помечены стабильным хелатом Eu3+)

Антиген: нативный htPAPP-A  
 Смесь антител и антигена инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в планшетах с предсорбированным стрептавидином.

Таблица 1. Рекомендуемые пары антител для определения htPAPP-A и общего PAPP-A в тест-системах сэндвич-типа.

Детекция антигена htPAPP-A человека (подложка – конъюгат)	Детекция антигена PAPP-A (htPAPP-A и/или dPAPP-A) (подложка – конъюгат)
10E2cc - 5H9	10E2cc - 10E1cc
5H9 - 10E2cc	4G11 - 3C8
5H9 - 7A6	4G11 - 10H9
10E1cc - 11E4	10E1cc - 7A6

### Моноклональные антитела, специфичные к dPAPP-A

Мы предлагаем МоАт, которое распознаёт только dPAPP-A, не давая перекрёстной реакции с htPAPP-A.

#### Тест-система сэндвич-типа для селективного определения dPAPP-A

Пара антител PAPP52-PAPP30 специфически распознает dPAPP-A. В этой тест-системе одно МоАт специфично к dPAPP-A (кат. № 4PD4), в то время как другое МоАт распознает все формы PAPP-A (кат. № 4P41). Этот прототип анализа был протестирован с dPAPP-A, очищенным из атеросклеротических коронарных артерий, а также с очищенным нативным htPAPP-A и рекомбинантным dPAPP-A человека дикого типа (собственная разработка ХайТест).

Данная тест-система позволяла распознавать димерные формы антигена с высокой специфичностью и незначительной перекрестной реактивностью (< 1 %) с htPAPP-A. Эта комбинация МоАт может быть использована для разработки высокочувствительного тест-систем, подходящих для селективного количественного измерения dPAPP-A в крови человека.

#### Уровни dPAPP-A в крови больных с ОК

Мы измерили концентрацию dPAPP-A в плазме, полученной от 43 пациентов с ОК (острый инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия), используя тест-прототип PAPP52-PAPP30. Образцы были получены от пациентов через 3-20 часов после начала боли в груди. В качестве контроля мы использовали образцы плазмы, полученные от 34 пациентов без ОК. Уровни dPAPP-A в плазме крови пациентов с ОК были в 2,77 раза выше, чем в плазме контрольной группы (P<0,0005) (рис. 2).

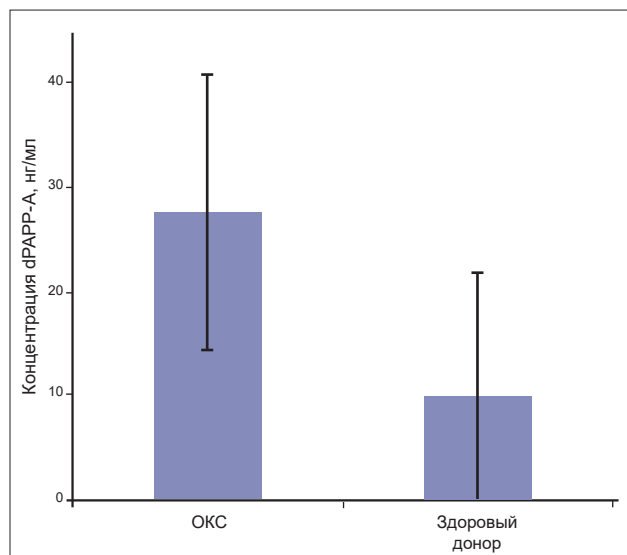


Рисунок 2. Концентрация dPAPP-A в образцах плазмы 43 пациентов с ОК и 34 пациентов без ОК в контрольной группе (Здоровый донор), измеренная с помощью тест-системы сэндвич-типа PAPP52-PAPP30 (среднее значение +/- стандартное отклонение).

МоАт подложки: PAPP52  
 МоАт детекции: PAPP30 (помечены хелатом Eu3+)  
 Инкубационный объем: 100 мкл.  
 Время инкубации: 30 мин при комнатной температуре.

### Димерный рекомбинантный PAPP-A человека

Димерный рекомбинантный PAPP-A человека, разработанный ХайТест, имеет мутацию E483A для стабилизации белка за счет подавления протеолитической активности и ауторасщепления.

Димерный рекомбинантный антиген PAPP-A содержит His10-тэг и экспрессируется в клетках млекопитающих. Продукт очищают металл-аффинной хроматографией.

Препарат содержит 5% сахарозу для хранения в лиофилизированной форме. Чистота белка составляет >90% (рис. 3).

Рекомбинантный димерный PAPP-A человека является иммунохимически активным в различных тест-системах сэндвич-типа (рис. 4).

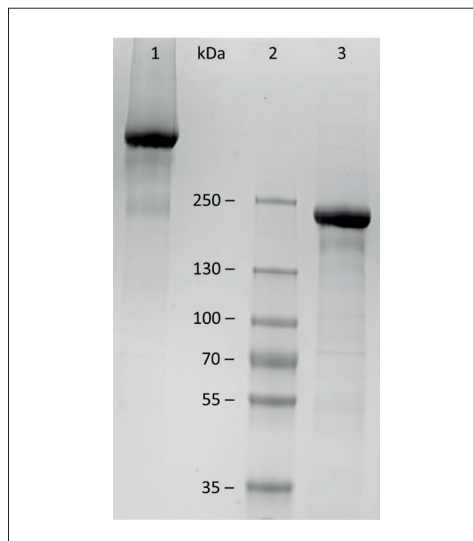


Рисунок 3. SDS-PAGE рекомбинантного димерного PAPP-A человека.

1. в невосстанавливающих условиях, 5 мкг;  
2. маркеры молекулярной массы;  
3. в восстанавливающих условиях, 5 мкг.

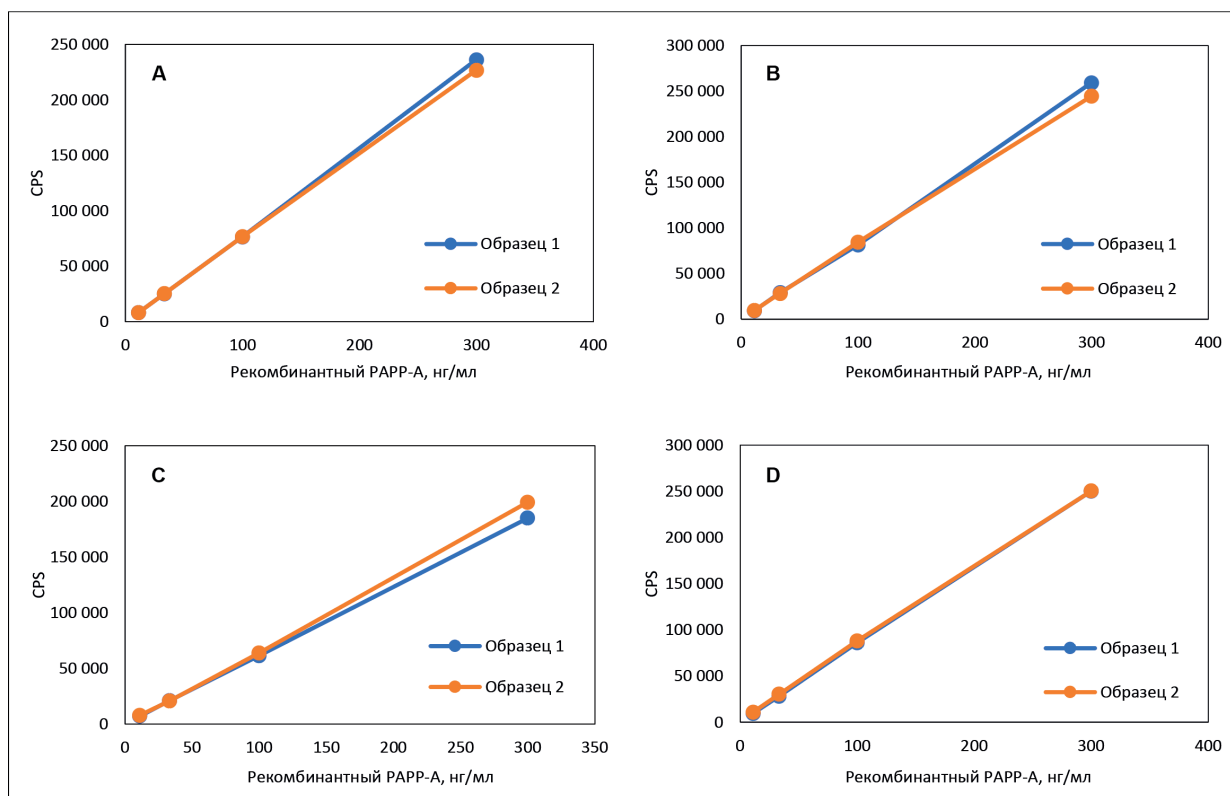


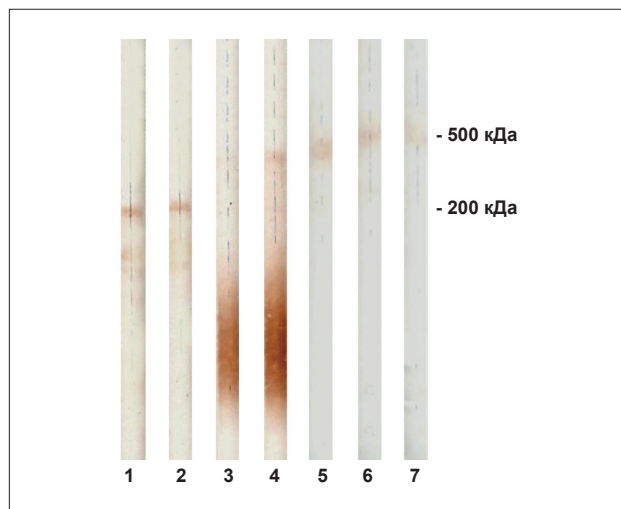
Рисунок 4. Калибровочная кривая для рекомбинантного димерного PAPP-A человека в тест-системах сэндвич-типа со следующими парами MoAT (подложка-конъюгат) - А) 10A5-3C8, В) 10E2cc-10E1cc, С) 4G11-10H9 и D) 10E1cc-7A6. Антитела на подложке сорбировали на микропланшетах для иммунологического анализа. Смесь антигена и конъюгированных со стабильным хелатом Eu<sup>3+</sup> антител, инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Образцы 1 и 2 рекомбинантного димерного PAPP-A человека были получены независимо.

### Иммунодетекция PAPP-A в Вестерн-блоттинге

МоАт 3С8 и 7А6 распознают субъединицу PAPP-A, тогда как МоАт 5Н9 и 11Е4 распознают субъединицу proMBP htPAPP-A в вестерн-блоттинге после SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (рис. 5). МоАт 4G11 и 10E1cc распознают htPAPP-A в вестерн-блоттинге только после электрофореза в невосстанавливающих условиях (данные по 4G11 здесь не представлены).

**Рисунок 5. Обнаружение человеческого PAPP-A и proMBP субъединиц htPAPP-A моноклональными антителами в вестерн-блоттинге.**

Дорожка 1: 7А6  
 Дорожка 2: 3С8  
 Дорожка 3: 5Н9 (специфична к proMBP)  
 Дорожка 4: 11Е4 (специфична к proMBP)  
 Дорожка 5: 7А6  
 Дорожка 6: 3С8  
 Дорожка 7: 10Е1  
 Дорожки 1-4: после SDS-PAGE в восстанавливающих условиях.  
 Дорожки 5-7: после SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях.  
 Гетеротетрамерный комплекс выявляли с помощью МоАт к PAPP-A.



### Информация для заказа

#### МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	МоАт	Подкласс	Примечания
Ассоциированный с беременностью протеин А плазмы (PAPP-A) человека	4P41cc	10E1cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, WB, субъединица PAPP-A
		10E2cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, субъединица PAPP-A
	4P41	5Н9	IgG2b	ИФА, субъединица proMBP
		4G11	IgG2a	ИФА, ВБ, субъединица PAPP-A
		3С8	IgG2a	ИФА, ВБ, субъединица PAPP-A
		10Н9	IgG2a	ИФА, субъединица PAPP-A
		11Е4	IgG2b	WB, субъединица proMBP
		7А6	IgG2a	ИФА, субъединица PAPP-A
Димерная форма ассоциированного с беременностью протеина А плазмы (dPAPP-A) человека	4PD4	PAPP52	IgG1	ИФА, субъединица PAPP-A
		PAPP30	IgG1	ИФА, только димерная форма PAPP-A

#### АНТИГЕН

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
PAPP-A человека, рекомбинантный	8РА1	>90%	Рекомбинантный

Обратите внимание, что некоторые или все данные, представленные в этой технической заметке, были подготовлены с использованием МоАт, полученных *in vivo*. Предполагается, что МоАт, произведенные *in vitro*, будут иметь аналогичные свойства.

### Литература

1. Palomaki GE, Lambert-Messerlian GM, Canick JA A summary analysis of Down syndrome markers in the late first trimester.// Adv Clin Chem. 2007;43:177-210.
2. Overgaard, MT., Haaning, J., Boldt, HB., Olsen, IM., Laursen, LS., et al. Expression of recombinant human pregnancy-associated plasma protein-A and identification of the proform of eosinophil major basic protein as its physiological inhibitor.// J Biol Chem; 275:31128-33 (2000).
3. Bayes-Genis, A., Conover, C. A., Overgaard, M. T., Bailey, K. R., Christiansen, M., Holmes, D. R. Jr, et al. Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes.// N Engl J Med, 345 (14), 1022-9 (2001).