

V 妊娠相关血浆蛋白A (PAPP-A)

妊娠相关血浆蛋白A (PAPP-A) 最初在人妊娠血清中以一个高分子量成分被发现。PAPP-A是一种金属蛋白酶,属于锌肽酶metzincin超家族。已发现胰岛素样生长因子结合蛋白4 (IGFBP-4),以及IGFBP-5在体外是PAPP-A的特异底物(1, 2)。IGFBP-4和IGFBP-5被妊娠相关血浆蛋白A裂解,释放出与之结合的IGF,而IGF对于促进细胞的分化和增殖起重要的作用。

PAPP-A在妊娠妇女血液中以共价(二硫键)异构四聚体形式存在,含有两个200 kDa的PAPP-A单体和两个50-90 kDa的嗜红细胞主要碱性蛋白(proMBP)前体。这样的复合物被称为异构四聚体PAPP-A (PAPP-A/proMBP或htPAPP-A)。经证实proMBP对htPAPP-A异构四聚体复合物中PAPP-A的蛋白酶活性有抑制作用(2)。

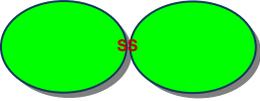
htPAPP-A已经被广泛认可为筛查孕早期唐氏综合症(DS)的生物标记物。妊娠血清中的htPAPP-A水平随着妊娠周期的增加而增高,直至分娩。在DS妊娠中,孕早期的htPAPP-A浓度明显降低(3)。因此,htPAPP-A目前和人绒毛膜促性腺激素b-亚基单体(bhCG)以及颈项透明层一起被用作孕早期筛查DS的生化指标。在这套标记物组合确立之前,DS的筛查只能在孕中期(16-18孕周)进行。因此,同旧方法相比,这个筛查DS的新方法使更早期实施医学干预成为可能。

目前有资料表明另外一种形式的蛋白—同型二聚体PAPP-A (dPAPP-A),分子量大约400 kDa,大量存在于不稳定冠状动脉粥样硬化斑块中(4)。而

且,经证实不稳定心绞痛或急性心肌梗死患者血液中的dPAPP-A水平,比稳定心绞痛和正常对照血液中dPAPP-A水平有显著升高(5, 6)。此外,dPAPP-A还被证实为一个很好的急性冠脉综合症(ACS)患者预后评估独立指标(7)。与ACS相关的PAPP-A形式,可能源于破裂的动脉粥样硬化斑块,它不同于htPAPP-A,不和proMBP亚基形成复合物。因此可以推断,在动脉粥样硬化斑块中,dPAPP-A是作为一个活性蛋白酶,从而促进IGF的释放。因而,人们可推测dPAPP-A可以影响稳定动脉粥样硬化斑块向不稳定动脉粥样硬化斑块的转变。dPAPP-A在ACS病理生理学中的这种作用提示它可能作为一个不稳定型动脉粥样硬化斑块的标记物。患者血液中PAPP-A的检测将可能对动脉粥样硬化斑块破裂的早期预测非常有帮助。

dPAPP-A与妊娠相关htPAPP-A的结构差异使得免疫化学区分这两种PAPP-A形式成为可能(8)。不与htPAPP-A发生交叉反应的dPAPP-A特异性抗体可被用于开发精确选择性检测血液中dPAPP-A的免疫检测系统。

我公司是全球最大的htPAPP-A(从胎盘血中提纯)抗原供应商。目前我公司还可以提供一项新产品—重组dPAPP-A。此外,我们现在还可以提供PAPP-A和proMBP特异性单克隆抗体,适用于开发定量检测母体血液中htPAPP-A以及ACS患者血液中dPAPP-A的高灵敏度快速夹心PAPP-A免疫检测系统。我们还提供新一代的dPAPP-A特异单克隆抗体,它只能识别重组dPAPP-A和动脉粥样硬化dPAPP-A,不与抗原的htPAPP-A形式发生交叉反应。

	异构四聚体形式, htPAPP-A	同型二聚体形式, dPAPP-A
结构		
分子量, kDa	500	400
(蛋白水解) 酶活性	被proMBP抑制	可假定活跃
诊断应用	唐氏综合症	心肌梗死
心肌梗死	PAPP-A总量, htPAPP-A夹心免疫分析法 (见第49页)	选择性dPAPP-A夹心免疫分析法 (见第51页)

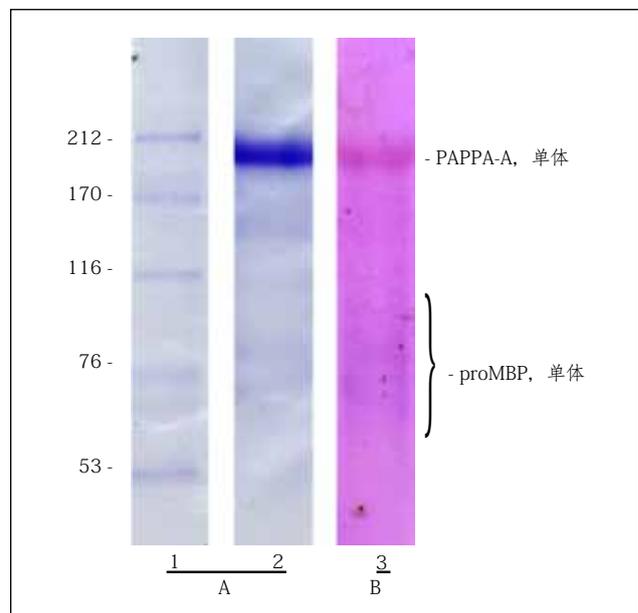
1 异构四聚体PAPP-A/proMBP复合物 (htPAPP-A)

来源: 混合胎盘血
 提纯方法: 各种层析法结合
 物理状态: 冷冻干燥品
 应用: PAPP-A免疫检测系统的校准品或标准品
 保存: -20°C

本公司的htPAPP-A从混合胎盘血中提纯, SDS-PAGE表明其纯度超过85% (图49)。htPAPP-A可被识别PAPP-A不同部位或proMBP的单克隆抗体 (目录号4P41) 识别。抗原可用作检测PAPP-A总量或htPAPP-A的夹心免疫检测系统的校准品 (见49和51页)。

图49 还原性htPAPP-A SDS凝胶电泳

泳道1: 分子量标准品
 泳道2, 3: 人htPAPP-A
 抗原加入量: 5 μg
 凝胶染色: A: 考马斯亮蓝R-250, B: 全部染色 (糖蛋白染色)。
 注释: proMBP亚基在凝胶中迁移的条带弥散, 分子量大约50-90 kDa, 由于大量糖基化 (约40%) 而不被考马斯亮蓝染色。



订购信息

产品名称	目录号	纯度	来源
PAPP-A, 异构四聚体形式 (htPAPP-A)	8P64	>85%	混合胎盘血

2 htPAPP-A和PAPP-A特异性单克隆抗体

宿主动物: Balb/c小鼠
 融合用细胞系: Sp2/0
 抗原: 人htPAPP-A (目录号8P64)
 提纯方法: 蛋白A亲和层析
 特异性: 单抗识别htPAPP-A异构四聚体复合物的PAPP-A或proMBP亚基
 物理状态: 单抗溶于PBS, 并含有0.1%叠氮钠
 应用: htPAPP-A和dPAPP-A免疫分析, htPAPP-A和dPAPP-A免疫沉淀, PAPP-A亚基免疫印记检测

产生单抗的杂交瘤细胞由Sp2/0骨髓瘤细胞和用纯化人htPAPP-A抗原免疫后的Balb/c小鼠的脾细胞融合而产生 (目录号8P64)。PAPP-A亚基特异性单抗可识别已知的两种内源性抗原形式—htPAPP-A或dPAPP-A。

2.1 应用

2.1.1 PAPP-A总量和htPAPP-A夹心免疫分析

所有的单抗都在使用两种抗原 (htPAPP-A和dPAPP-A) 的夹心荧光免疫配对实验中作为捕获抗体和检测抗体被测试。对于定量PAPP-A免疫检测, 我们推荐了几种双部位抗体的组合。

表8 推荐夹心免疫检测系统抗体配对

人htPAPP-A抗原检测 (捕获抗体-检测抗体)	PAPP-A总量 (htPAPP-A和/或dPAPP-A) 检测 (捕获抗体-检测抗体)
10E2 - 5H9	10E2 - 10E1
5H9 - 10E2	4G11 - 3C8
5H9 - 7A6	4G11 - 10H9
10E1 - 11E4	10E1 - 7A6

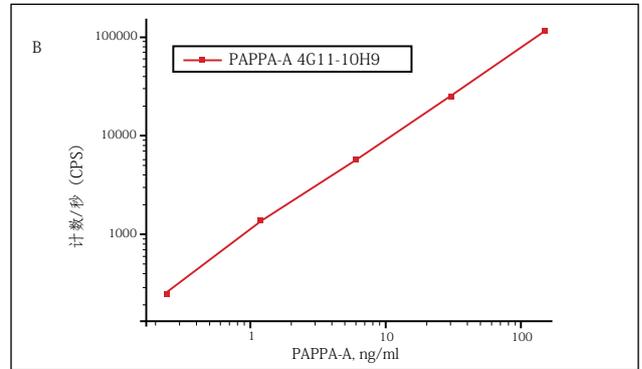
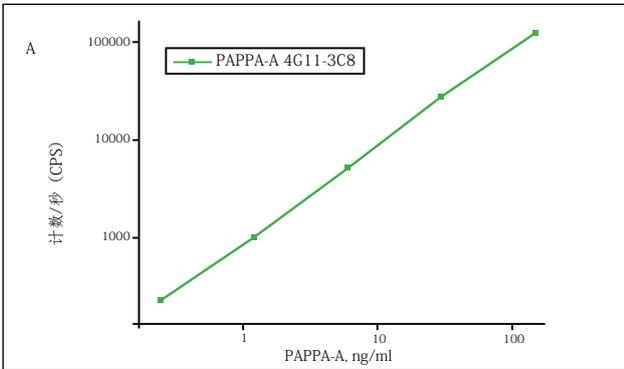


图50 两种PAPP-A夹心免疫检测系统的校准曲线, (A) 4G11-3C8和 (B) 4G11-10H9

捕获单抗: 4G11 (生物素化)

检测单抗: 3C8或10H9 (稳定的三价钅螯合物标记)

抗原: htPAPP-A

抗体和抗原混合物在链霉亲和素包被板上室温下反应30分钟。

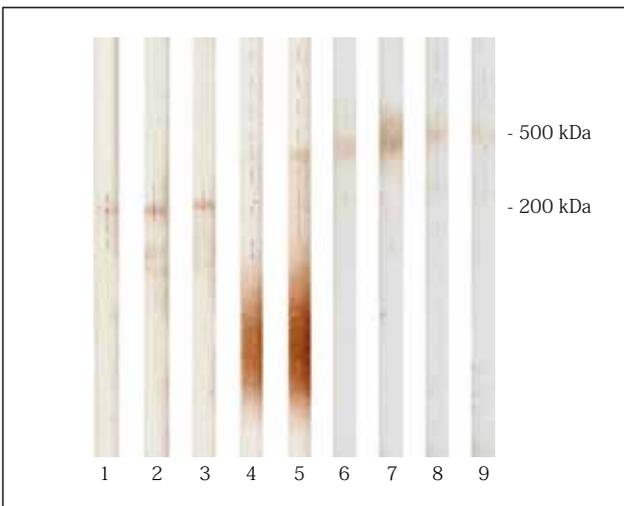


图51 单克隆抗体经免疫印记法检测人htPAPP-A中PAPP-A和proMBP亚基

泳道1: 18A10

泳道2: 7A6

泳道3: 3C8

泳道4: 5H9 (proMBP特异)

泳道5: 11E4 (proMBP特异)

泳道6: 7A6

泳道7: 10A5

泳道8: 3C8

泳道9: 10E1

泳道1-5: 还原性SDS-PAGE后。

泳道6-9: 非还原SDS-PAGE。异构四聚体用抗PAPP-A单抗检测

2.1.2 PAPP-A免疫印记检测

免疫印记在还原和非还原SDS凝胶电泳后进行, 其中使用的单抗18A10、3C8和7A6都可识别htPAPP-A复合物中的PAPP-A亚基, 而单抗5H9和11E4可识别proMBP亚基。

单抗4G11、10A5和10E1仅在非还原条件下识别htPAPP-A (图51)。

订购信息

单抗名称	目录号	特异性	亚型	应用
10E1	4P41	PAPP-A 亚基	IgG2b	EIA (capture, detection), WB
10E2	4P41	PAPP-A 亚基	IgG2b	EIA (capture, detection)
5H9	4P41	proMBP 亚基	IgG2b	EIA (capture, detection), WB
4G11	4P41	PAPP-A 亚基	IgG2a	EIA (capture), WB
7A6	4P41	PAPP-A 亚基	IgG2a	EIA (detection), WB
10A5	4P41	PAPP-A 亚基	IgG2a	WB
3C8	4P41	PAPP-A 亚基	IgG2a	EIA (detection), WB
10H9	4P41	PAPP-A 亚基	IgG2a	EIA (detection)
18A10	4P41	PAPP-A 亚基	IgG2a	WB
11E4	4P41	proMBP 亚基	IgG2b	EIA (capture, detection), WB
PAPP52	4P41	PAPP-A 亚基	IgG1	EIA (capture)

EIA: 酶免疫分析 WB: 免疫印记分析 capture: 捕获抗体 detection: 检测抗体

3 重组同型二聚体PAPP-A (dPAPP-A)

来源: 哺乳动物细胞系中表达
 提纯方法: 各种层析法结合
 物理状态: 冰冻品
 应用: dPAPP-A免疫检测系统的校准品或标准品
 保存: -70°C

重组的人dPAPP-A是在哺乳动物细胞中表达, 具有此蛋白的全长度(约200 kDa)。重组dPAPP-A的免疫活性与内源性蛋白(存在于动脉粥样硬化斑块中)相似, 因而可被用作dPAPP-A免疫检测系统的校准品或标准品。

还原性SDS-PAGE研究显示, 重组蛋白中PAPP-A亚基的表观分子量与从动脉粥样硬化组织中提纯的PAPP-A以及妊娠血清中的PAPP-A相同—大约200 kDa(图52A)。

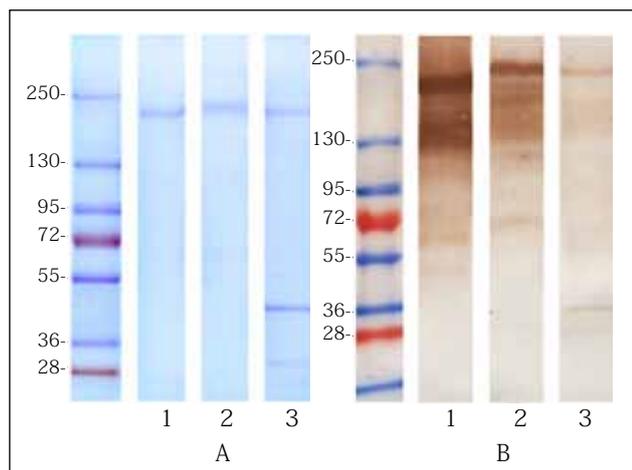


图52

A—人重组dPAPP-A和组织dPAPP-A(提纯于动脉粥样硬化斑块)还原性SDS-PAGE分析

泳道1: 人htPAPP-A(目录号8P64)

泳道2: 重组dPAPP-A(目录号8P97)

泳道3: 组织dPAPP-A

凝胶染色: 考马斯亮蓝R-250

注释: 还原条件下htPAPP-A中释放的proMBP亚基由于其高度糖基化而不被考马斯亮蓝染色。

重组dPAPP-A中PAPP-A亚基与从粥样硬化动脉以及htPAPP-A中提纯的dPAPP-A之免疫化学性质相似性也被使用PAPP-A亚基特异性单抗的免疫印记分析所验证(图52B)。

而且, 重组dPAPP-A与人妊娠血液中PAPP-A的一致性也被液相色谱/串联质谱分析所证实。

B—从动脉粥样硬化组织中提纯的PAPP-A免疫印记分析
 免疫印记分析使用抗PAPP-A单抗(18A10、7A6和3C8)(目录号4P41)混合物。泳道注释同图52A。

同样还被证实，重组dPAPP-A是一个活跃的蛋白酶，可以裂解IGFBP-4。PAPP-A蛋白水解活性反应如(9)中所述：100ng IGFBP-4在裂解反应液（2 mM CaCl₂, 50 mM Tris, pH 7.5, 5 nM IGF-II 标准蛋白酶抑制剂，含或不含2 ng重组dPAPP-A）中37℃孵育过夜。反应液经SDS-PAGE分析后，在免疫印记中使用多克隆抗IGFBP-4抗体检测（图53）。

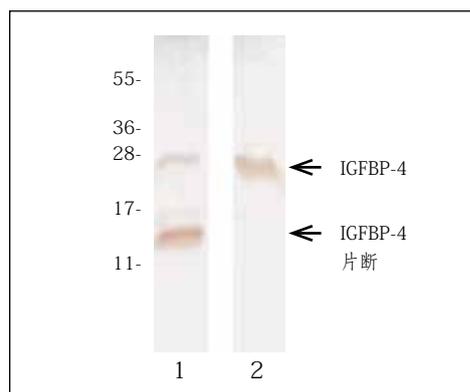


图53—重组dPAPP-A蛋白酶活性检测
dPAPP-A可裂解重组IGFBP-4。
泳道1：IGFBP-4，同重组dPAPP-A（目录号8P97）一起孵育
泳道2：IGFBP-4，无重组dPAPP-A条件下孵育

订购信息

产品名称	目录号	纯度	来源
PAPP-A, 同形二聚体形式 (dPAPP-A)	8P97	>90%	重组蛋白，哺乳动物细胞中表达

4 抗dPAPP-A单克隆抗体

宿主动物：	Balb/c小鼠
融合用细胞系：	Sp2/0
抗原：	从动脉粥样硬化组织中提纯的人dPAPP-A
提纯方法：	蛋白A亲和层析
物理状态：	单抗溶于PBS，并含有0.1%叠氮钠
应用：	与htPAPP-A无交叉反应的dPAPP-A特异性免疫分析方法，dPAPP-A免疫沉淀，特异性免疫印记检测。

产生单抗的杂交瘤细胞用提纯于人动脉粥样硬化动脉中的dPAPP-A免疫Balb/c小鼠而产生。四株抗dPAPP-A单抗 (PAPP2、PAPP7、PAPP8和PAPP30)

的挑选是基于他们的特异性以及与重组dPAPP-A和动脉粥样硬化组织dPAPP-A反应的亲和力。这些单抗只识别dPAPP-A，与抗原的四聚体无交叉反应。

4.1 应用

4.1.1 选择性dPAPP-A夹心免疫分析 **新资料!**

我们推荐使用几种单抗的组合以开发dPAPP-A夹心免疫检测系统。一株抗体(捕获抗体)具dPAPP-A特异性，另外一株(检测抗体)可以识别PAPP-A的所有形式。所有推荐的组合都经提纯于动脉粥样硬化动脉中的dPAPP-A以及人重组dPAPP-A和htPAPP-A所测试。所有的单抗组合都能高度特异性地识别抗原的二聚体形式，而不与htPAPP-A发生交叉反应。

这些单抗组合可被用于高度灵敏快速的夹心免疫检测系统的开发，从而可以选择性的定量检测人血液中的dPAPP-A。

推荐夹心免疫检测系统所用抗体对(捕获抗体 - 检测抗体)

PAPP52 - PAPP30
PAPP2 - 7A6

图54中,我们展示了使用单抗PAPP2作为捕获抗体和单抗7A6作为检测抗体的夹心荧光免疫检测系统的校准曲线。以人重组dPAPP-A(目录号8P97)作为校准品,这种免疫检测系统的检测限低于0.3 ng/ml。此检测系统与PAPP-A的异构体形式无交叉反应。

我们新开发的PAPP52-PAPP30(捕获抗体-检测抗体)夹心免疫检测系统可特异性检测dPAPP-A(图55)。在这种检测系统中,一株抗体,PAPP30,具dPAPP-A特异性(与htPAPP-A无交叉反应),另一株抗体,PAPP52,能够识别PAPP-A的所有形式。检测单抗PAPP30标记有稳定的三价钨螯合物。这种方法能够识别内源性和重组dPAPP-A,并被证实与htPAPP-A有很少的交叉反应(<1%)。

以纯化的重组dPAPP-A(目录号8P97)作为校准品,这种检测系统的分析检测限低于1 ng/mL。

43例ACS患者(急性心肌梗死,不稳定心绞痛,胸痛发作后3到20小时)和34例非ACS患者(对照组)的血浆样品dPAPP-A水平也被检测(图56)。

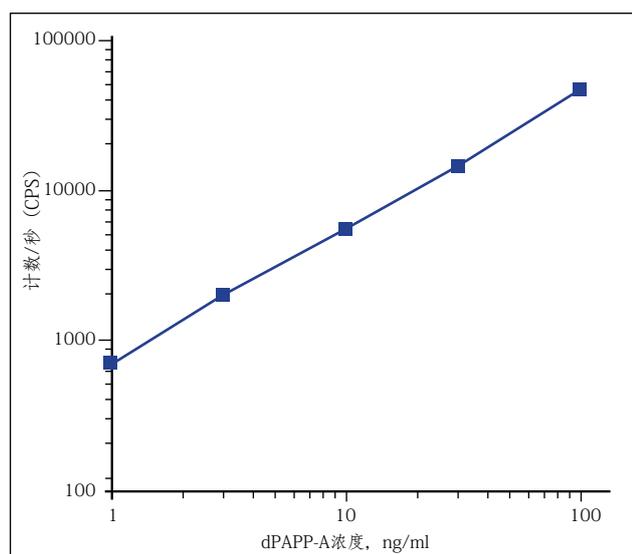


图55 新PAPP52-PAPP30夹心dPAPP-A特异性免疫检测系统的校准曲线
捕获单抗: PAPP52
检测单抗: PAPP30(三价钨螯合物标记)
反应溶液体积: 100 μ l。
反应时间: 室温30分钟。

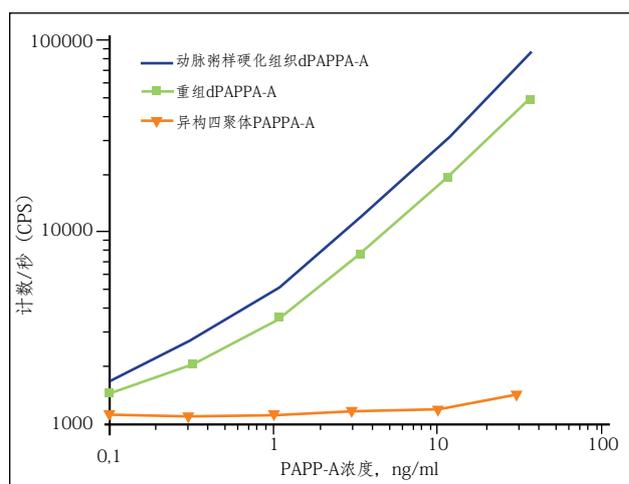


图54 新dPAPP-A免疫检测系统的校准曲线
捕获单抗: PAPP2
检测单抗: 7A6(三价钨螯合物标记)
反应溶液体积: 100 μ l。反应时间: 室温30分钟。

通过PAPP52-PAPP30检测系统检测,ACS患者血浆中dPAPP-A水平比对照组血浆样品高2.77倍($P<0.0005$)。因此,这种免疫检测系统适用于患者血浆中dPAPP-A的直接检测。

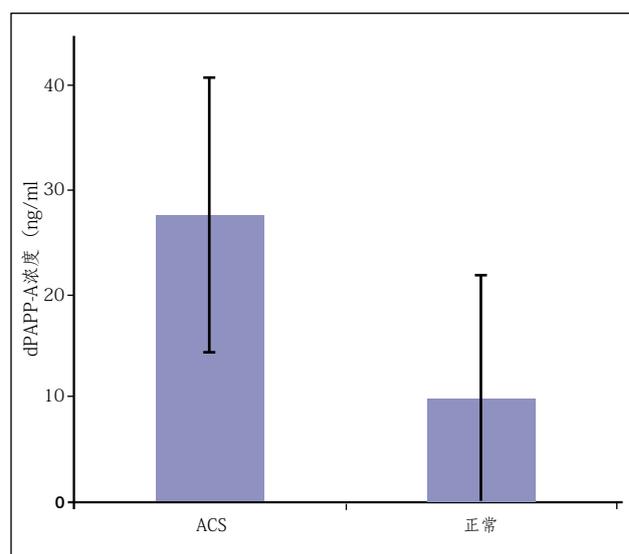


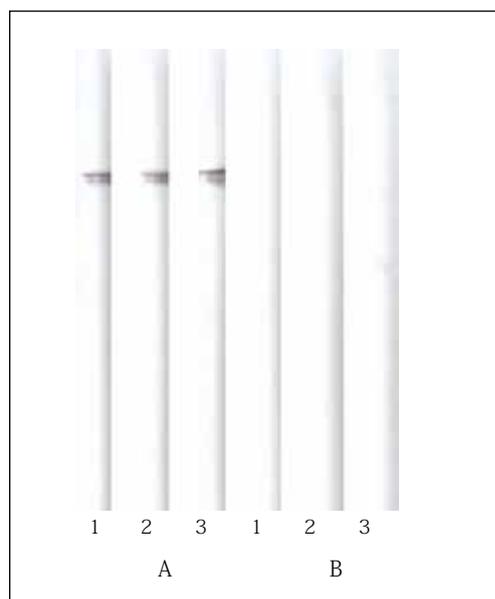
图56 通过PAPP52-PAPP30夹心免疫检测系统测定的43例ACS患者血浆样品和34例非ACS患者对照组(正常)的dPAPP-A浓度(平均值 \pm 标准偏差)
捕获单抗: PAPP52
检测单抗: PAPP30(三价钨标记)
反应溶液体积: 100 μ l
反应时间: 室温30分钟

4.1.2 选择性dPAPP-A免疫印记检测 **新资料!**

抗原经非还原性SDS凝胶电泳并被转移到硝酸纤维素膜上之后,单抗PAPP2、PAPP7和PAPP8可以识别dPAPP-A(图57)。然而,这些单抗不与人ht-PAPP-A发生交叉反应。因此,使PAPP-A二聚体选择性免疫印记检测成为可能。

图57 免疫印记检测重组dPAPP-A和htPAPP-A
所使用抗体可识别dPAPP-A, 并且不与htPAPP-A发生交叉反应。
A: 重组dPAPP-A
B: 人htPAPP-A

免疫印记通过:
泳道1: 单抗PAPP2
泳道2: 单抗PAPP7
泳道3: 单抗PAPP8



订购信息

单抗名称	目录号	特异性	亚型	应用
PAPP2	4PD4	人dPAPP-A	IgG 1	EIA (capture)
PAPP7	4PD4	人dPAPP-A	IgG 1	EIA (capture)
PAPP8	4PD4	人dPAPP-A	IgG 1	EIA (capture)
PAPP30	4PD4	人dPAPP-A	IgG 1	EIA (detection)

EIA: 酶免疫分析 capture: 捕获抗体 detection: 检测抗体

参考文献:

- Oxvig, C., Sand, O., Kristensen, T., Gleich GJ., Circulating human pregnancy associated plasma protein-A is disulfide-bridged to the proform of eosinophil major basic protein.// J Biol Chem 268:12243-6(1993).
- 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).
- 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.
- 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).
- Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Simoons ML, Zeiher AM. Pregnancy-associated plasma protein-A levels in patients with acute coronary syndromes Comparison with markers of systemic inflammation, platelet activation, and myocardial necrosis. //J Am Coll Cardiol 2005;45:229-37.
- Hájek P, Macek M, Hladíková M, Houbová B, Alan D, Durdil V, Fiedler J, Maly M, Ostádal P, Veselka J, Krebsová A. Pregnancy-associated plasma protein A and proform eosinophilic major basic protein in the detection of different types of coronary artery disease.// Physiol Res. 2008;57(1):23-32.
- Qin, Q.P.,Laitinen, P., Majamaa-Voltti, K., Eriksson, S., Kumpula, E.K., and Petterson, K. Release Patterns of Pregnancy Associated Plasma Protein A (PAPP-A) in Patients with Acute Coronary Syndroms.//Scand Cardiovasc J, 36(6), 358-61(2002).
- Qin QP, Kokkala S, Lund J, Tamm N, Voipio-Pulkki LM, Petterson K. Molecular distinction of circulating pregnancy-associated plasma protein A in myocardial infarction and pregnancy.// Clin Chem 2005;51:75-83.
- Michael T. Overgaard, Jesper Haaning, Henning B. Boldt, Inger M. Olsen, Lisbeth S. Laursen, Michael Christiansen, Gerald J. Gleich, Lars Sottrup-Jensen, Cheryl A. Conoveri, and Claus Oxvig. Expression of Recombinant Human Pregnancy-associated Plasma Protein-A and Identification of the Proform of Eosinophil Major Basic Protein as Its Physiological Inhibitor.//The journal of biological chemistry; 2000;275, 40:31128-31133.