



临床与科研领域

兽医



炎症



炎症标志物 ——猫、犬和马血清淀粉样蛋白A (SAA)



血 清淀粉样蛋白A (SAA) 是存在于许多物种中的一种主要的急性相蛋白, 包括人、犬、猫和马。一旦机体受到感染、创伤及外科手术等引起的炎症刺激后, SAA的浓度水平会在数小时内迅速升高。由于SAA的半衰期非常短, 随着炎症源的清除, SAA的浓度水平又会迅速下降。

在外周循环中, SAA与高密度脂蛋白(HDL)相关。已知的数种SAA亚型在若干个氨基酸残基上有种属差异。除急性相SAA亚型外, 组成型SAA (Constitutive SAA) 已经在人类及大鼠中得到了鉴定。在急性相应答过程中, 这些组成型SAA的表达水平并不会升高。

SAA在脊椎动物中高度保守。人SAA含有104个氨基酸; 而犬、猫和馬的SAA相当于人SAA分子的中间区域插入了额外的一段氨基酸序列。猫和犬的SAA含有111个氨基酸, 而馬SAA含有110个氨基酸。更多关于SAA信息请参见综述(1-3)。

SAA可作为一种诊断标志物

SAA是一种灵敏的炎症和组织损伤标志物。在兽医学中, 测定血液中的SAA可以用于诊断亚临床炎症、监控动物炎症和感染的治疗效果以及监控病患外科手术。

用于开发可靠且种属特异的SAA免疫分析系统的原料

HyTest可提供多种单克隆抗体, 用于开发猫、犬和馬SAA的免疫分析检测系统。我们在夹心免疫、直接ELISA和Western blotting平台上对这些抗体进行了测试, 这些抗体能够识别动物血清中的SAA。此外, 我们还提供重组的猫、犬和馬SAA抗原。

SAA特异性单克隆抗体

HyTest可提供八株高品质的抗SAA单克隆抗体, 这些抗体可用于检测猫、犬和馬的SAA。其中由人SAA免疫获得的单抗为SAA19、SAA21和SAA11, 由犬SAA获得的单抗为VSA34、VSA31和VSA38以及由犬SAA 79-104氨基酸序列的合成多肽获得的单抗VSA2和VSA43。这些单抗的亚型以及特异性请参见表1。其中六株单抗可以在直接ELISA及Western blotting平台中识别猫SAA。同时所有单抗均可以在直接ELISA及Western blotting平台中识别犬和馬SAA。

表1. 抗SAA单抗的基本描述及特异性

单抗	亚型	特异性		
		犬SAA	猫SAA	馬SAA
VSA2	IgG1	+++	-	+++
SAA11	IgG2b	+++	++	+++
SAA19	IgG2a	+++	+++	+++
SAA21	IgG2b	+++	+++	+++
VSA31	IgG2a	+++	+++	+++
VSA34	IgG2b	+++	+++	+++
VSA38	IgG2a	+++	+++	+++
VSA43	IgG2b	+++	+/-	+++

1. Jacobsen, S. and Andersen, P.H. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. Equine Vet Educ, 2007, 19: 38-46.

2. Ceron J.J. et al. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. Vet Clin Pathol, 2005, 34:85-99.

3. Yamada T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. Clin Chem Lab Med, 1999, 37:381-388.

猫SAA夹心免疫分析系统的开发

我们推荐如下两组单抗配对用于开发可检测猫血清样本中SAA的夹心免疫分析系统：SAA19-VSA34和SAA21-VSA34（捕获抗体-检测抗体）。使用抗体配对SAA19-VSA34测试重组猫SAA的线性稀释曲线如图1所示。

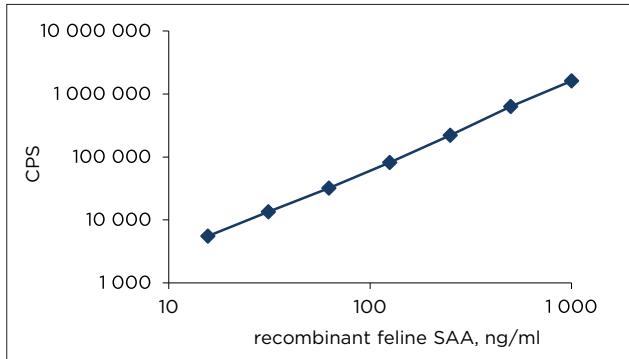


图1. 使用抗体配对SAA19-VSA34测定重组猫SAA的稀释曲线。将SAA19包被于微孔板并用酪蛋白酸钠于37℃封闭1小时。用含有0.01%CHAPS和1:1000的正常人血清的Tris缓冲液对重组猫SAA抗原（货号8FS5）进行系列稀释，然后在微孔板中于室温孵育1小时。检测抗体VSA34用钨螯合物进行标记，并用含有0.01%CHAPS的Tris缓冲液进行稀释。洗涤液同样为含有0.01% CHAPS的Tris缓冲液。

图2展示了抗体配对SAA19-VSA34测试猫血清样本SAA的情况。患有炎症性疾病个体的血清样本的反应信号要显著高于正常个体。

我们观察到，非离子表面活性剂Tween20作为一种抗原稀释液及洗涤液中的常规组分，会影响到抗体配对SAA19-VSA34和SAA21-VSA34的反应信号。因此我们在抗原稀释液以及洗涤液中使用的表面活性剂为两性离子表面活性剂CHAPS（0.01%）而非Tween20。

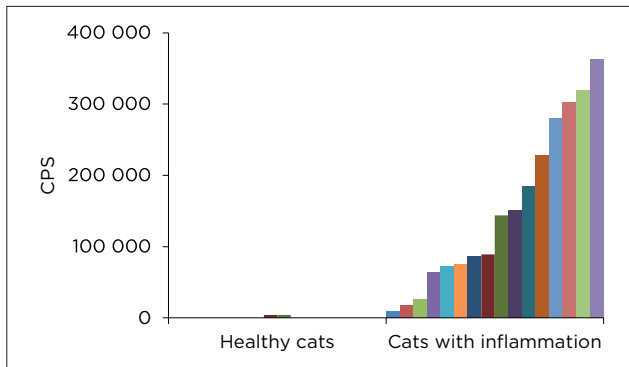


图2. 使用抗体配对SAA19-VSA34测试健康猫与病猫血清的免疫活性对比。具体试验的流程请参见图1注释。血清样本用含有0.01%CHAPS的Tris缓冲液稀释液800倍。

犬和马SAA夹心免疫分析系统的开发

犬和马的SAA具有高度的序列同源性，因此使用同一对抗体可以对两个物种的SAA进行测定。我们所有的单抗均可以检测犬和马的SAA。基于我们的测试结果，我们推荐三组不同的抗体配对：VSA2-VSA38, VSA2-VSA31和VSA38-VSA43，这三对配对均有很高的灵敏度和特异性。抗体配对VSA2-VSA38测试重组犬和马SAA抗原的稀释曲线如图3所示。

图4为抗体配对VSA38-VSA43检测犬（A）和马（B）血清中SAA的情况。患有炎症性疾病个体的SAA反应信号要显著高于正常个体。

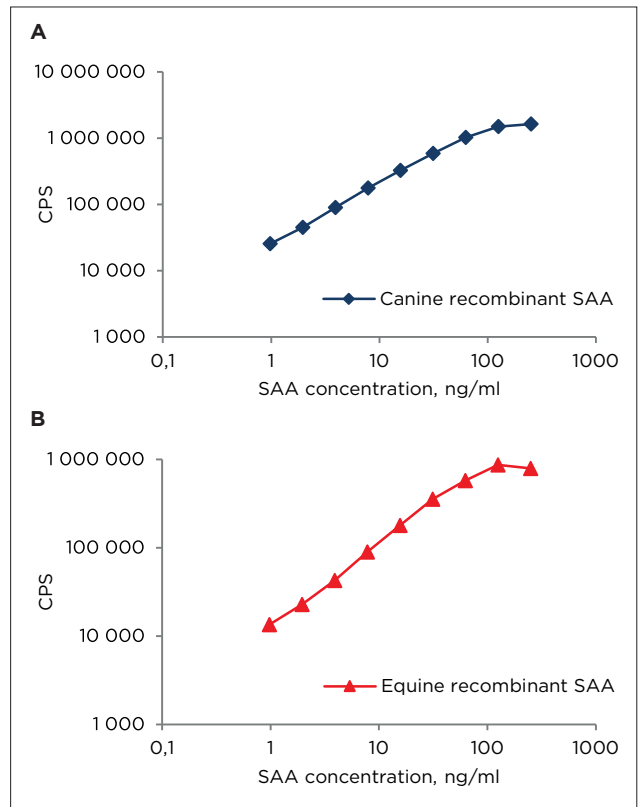


图3. 抗体配对VSA2-VSA38测试重组犬和马SAA抗原的稀释曲线。VSA2包被于微孔板并用含有1%酪蛋白和0.05%Tween的缓冲液于37℃封闭1小时。随后用同样的缓冲液对重组犬SAA（货号8CS4）和马SAA（货号8ES6）进行系列稀释，然后在微孔板中于37℃孵育1小时。单抗VSA38与钨螯合物进行标记作为检测抗体。

图4为抗体配对VSA38-VSA43检测犬（A）和马（B）血清中SAA的情况。患有炎症性疾病个体的SAA反应信号要显著高于正常个体。

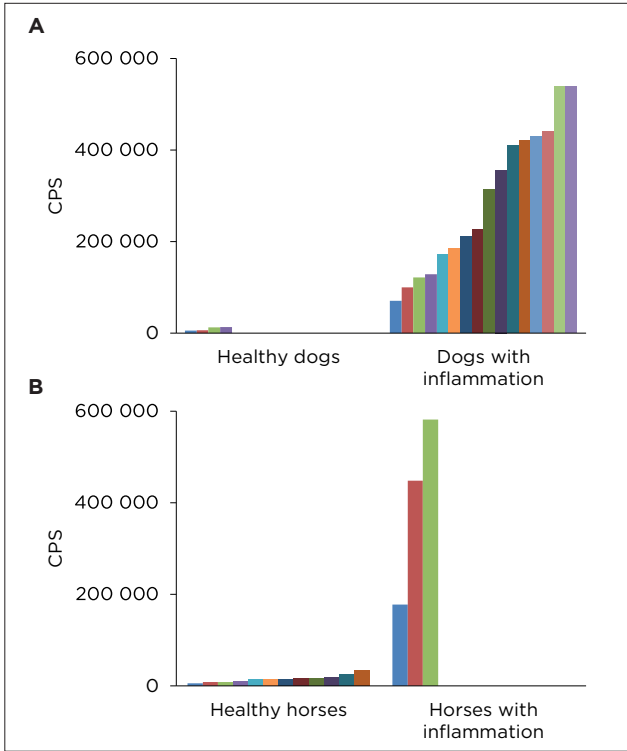


图4. 用抗体配对VSA38-VSA43测试健康与炎症性疾病犬 (A) 和马 (B) 血清SAA的对比情况。实验流程请参考图3注释。健康动物血清用含有1%酪蛋白和0.05%Tween20的封闭缓冲液稀释50倍。炎症性疾病犬血清稀释2000倍，炎症性疾病马血清稀释1000倍。

避免SAA吸附于微孔板

有研究发现人SAA会与微孔板中的聚苯乙烯发生非特异吸附(4,5)。我们研究了其他物种(包括犬、猫和马)的SAA,也发现了类似情况,血清中的SAA会优先吸附于微孔板表面。因此,当开发板式SAA免疫分析检测系统时,避免SAA与微孔板发生非特异吸附非常重要。微孔板封闭液以及抗原稀释液都需要进行优化。

基于我们的实验数据,对于SAA而言,酪蛋白是一种非常有效的封闭剂。在抗体配对为SAA19-VSA34和SAA21-VSA34的反应体系中,可以使用含有1%酪蛋白或2.5%酪蛋白酸钠的Tris缓冲液作为封闭液。

对于抗体配对为VSA2-VSA38, VSA2-VSA31和VSA38-VSA43的反应体系,含有1%酪蛋白和0.05-0.1%Tween的Tris缓冲液是最为有效的封闭液及抗原稀释液。

需要注意的是,上述的封闭工艺以及反应缓冲液组分仅为HyTest内部免疫分析系统的最优条件。在客户的反应体系上,可能有其他的反应条件能进一步提高反应性能。

同时检测猫、犬和马SAA的单一免疫分析系统的开发

为了开发一种猫、犬和马通用的SAA免疫分析系统,我们推荐使用检测猫SAA的抗体配对:SAA19-VSA34和SAA21-VSA34。图5为抗体配对SAA19-VSA34检测犬(A)和马(B)血清SAA的测试情况。患有炎症性疾病个体的SAA反应信号要显著高于正常个体。该抗体配对测试猫血清的SAA的结果请参见图2。

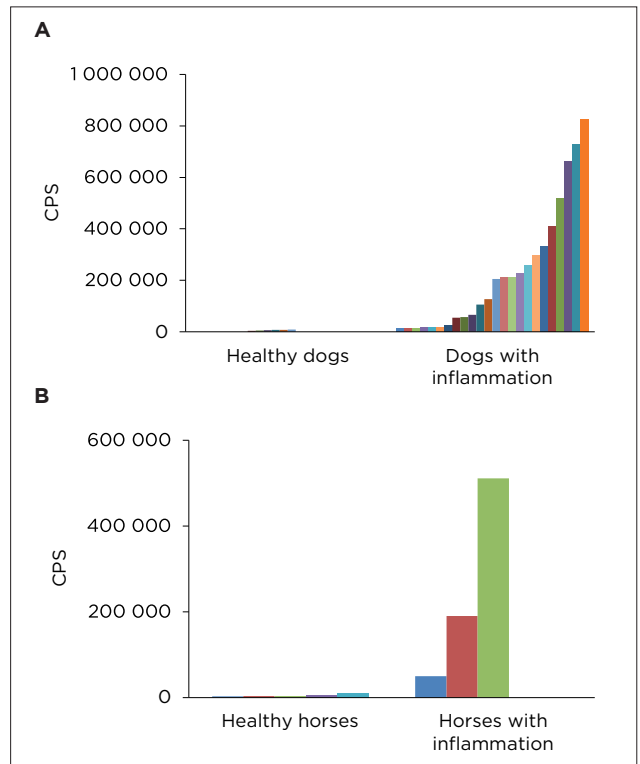


图5. 用抗体配对VSA19-VSA34测试健康与炎症性疾病犬 (A) 和马 (B) 血清SAA的对比情况。实验流程请参考图1注释。犬和马血清样本分别用含有0.01%CHAPS稀释500倍和800倍。

表2为夹心免疫中我们推荐的抗体配对。

捕获抗体	检测抗体
适用于犬和马	
VSA2	VSA38
VSA2	VSA31
VSA38	VSA43
适用于猫、犬和马	
SAA19	VSA34
SAA21	VSA34

表2. 最佳灵敏度的抗体配对。以下数据基于我们内部的时间分辨荧光免疫分析检测系统

4. Marhaug, G. Three assays for the characterization and quantitation of human serum amyloid A. Scand J Immunol, 1983, 18:329-338.

5. Časli, MT and Grubb, A. A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for serum amyloid A using sequence-specific antibodies. Ann Clin Biochem, 1993, 30: 278-286.

