



技术报告



临床与科研领域

心肌标志物



人proBNP、BNP和NT-proBNP



BNP和NT-proBNP均是心衰诊断及预后的生物标志物。心衰的普遍性及其带来的经济负担已经对临床和公共健康造成了严重影响。根据美国心脏协会的数据显示，在美国心衰患者的人数已达650万人之众，并且每年都有近100

万新发心衰病例（1）；在全球范围内，心衰患病人数已经达到2300万人。慢性心脏疾病、高血压和糖尿病均是已知的诱发心衰的风险因素，且65岁以上人群更易发生心衰。心衰伴有较高的发病率和死亡率。

BNP、NT-proBNP和proBNP作为诊断标志物

对于疑似急性心衰患者，临床指南建议首先使用BNP或NT-proBNP用于排除心衰。这两种标志物也可用于疾病进程监控。BNP和NT-proBNP的临床价值相似（2-3），目前均被广泛用于临床实践中。

在健康成年人体内，血浆BNP的参考上限为35pg/mL，NT-proBNP的参考上限为125pg/mL（4）。然而测试结果水平取决于年龄和性别，老年人群和妇女的结果会偏高。

两种标志物的浓度与疾病严重程度成正比，浓度差异可达数百倍。有报道指出在心衰最早期的无症状阶段（纽约心脏病协会心功能I级）已经可以发现这两种标志物的水平升高。在纽约心脏病协会心功能II级和III级，特别是在IV级患者中，两种标志物的浓度则会显著升高。因此，血液中两种标志物的检测已经被广泛用于疑似心衰患者的评估及疾病严重程度评价。



临床用途

- ✓ 心衰的鉴别与排除
- ✓ 心衰严重程度评估
- ✓ 疾病预后监测
- ✓ 心衰药物疗效监控

BNP或NT-proBNP的浓度检测还可以用于不同心脏病患者的危险分层。在未来发生并发症的患者，其BNP或NT-proBNP的浓度要显著高于无并发症患者。对于充血性心衰患者，高浓度BNP或NT-proBNP可预测死亡风险和心血管危险。而对于患有急性冠状动脉综合征的患者，两种标志物的水平升高则是严重心力衰竭和死亡的先兆。

此外，研究发现BNP和NT-proBNP的前体proBNP1-108也大量存在于心衰患者的血液中。因此只检测proBNP的试剂可能会进一步提高检测结果的特异性。

proBNP及其相关多肽的生化性质

当心脏由于压力或室壁过载发生扩张，BNP的编码基因会在心肌细胞中被激活。编码基因激活后会在细胞内表达134个氨基酸残基长度的preproBNP。随后preproBNP的信号肽被移除形成了proBNP，其进一步裂解为有生物活性的BNP（1-32aa）和生物活性未知的NT-proBNP（1-76aa）。BNP、NT-proBNP及未裂解的proBNP均会被释放进入外周循环（图1）。进入外周循环后，BNP会被有效地清除，半衰期约为20分钟。NT-proBNP的半衰期较长，为60-120分钟，这也解释了血液中NT-proBNP浓度显著高于BNP的原因。

ProBNP是一种O-多糖蛋白，存在7个糖基化位点（5）。所有糖基化位点均位于NT-proBNP区域，而BNP分子上则无糖基化位点。在之前的研究中，我们发现T71糖基化位点是proBNP进一步裂解为NT-proBNP和BNP的关键。T71位点与发生分裂的部位很近，只有当T71位点没有被糖基化时，这种转换酶依赖的分裂才会发生。因此，血液中绝大多数未裂解的proBNP分子的T71残基是糖基化的，而在NT-proBNP分子中T71残基却非糖基化（6）。

用于免疫检测分析系统开发的试剂

HyTest已经对proBNP及其相关衍生多肽进行了多年研究。迄今为止，我们在相关同行评审期刊中发表了多篇文章（更多信息请参考8-10页）。我们提供多株性能优异的单克隆抗体，可用于灵敏度高、性能可靠的检测临床样本的BNP、NT-proBNP和proBNP的免疫检测系统的开发。

我们还提供数种重组抗原，可以用于标准品和校准品的制备。

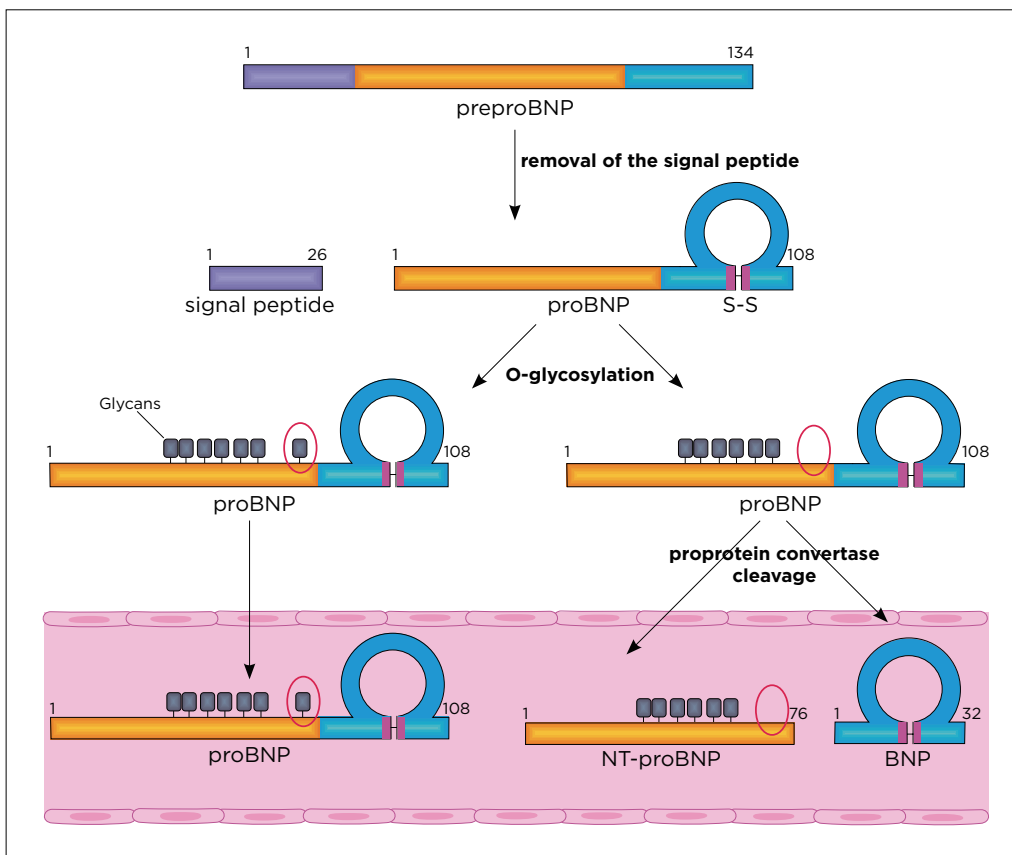


图1. proBNP分裂示意图。 preproBNP翻译后经过信号肽的切除形成proBNP。proBNP分子上若干个糖基化位点会发生糖基化，进一步可分成T71糖基化和T71非糖基化两种proBNP分子。T71的糖基化会抑制proBNP进一步裂解。只有当proBNP的T71非糖基化，才能继续裂解为BNP和NT-proBNP。BNP、NT-proBNP及完整的proBNP均会被释放进入血液中。

BNP试剂开发

人BNP是一种3.5KDa的肽段，由proBNP裂解而来（proBNP裂解后C端为BNP，N端为NT-proBNP）。BNP氨基酸序列即为proBNP的77-108氨基酸序列。对BNP分子而言，氨基酸序列通常记为1-32。BNP的理论等电点为10.95。

BNP是一种具有利尿、血管舒张和肾素抑制功能的多肽类激素（7-9），属于一类具有类似环状结构的多肽激素家族，该家族还包括ANP、CNP和尿扩张素。该家族的典型结构为一个由一对半胱氨酸之间二硫键所形成的17个氨基酸的环状结构。对于该家族不同的利钠肽成员，环状结构高度同源，17个氨基酸中有11个氨基酸完全一致。人BNP的二硫键位置为C10和C26（图2）。

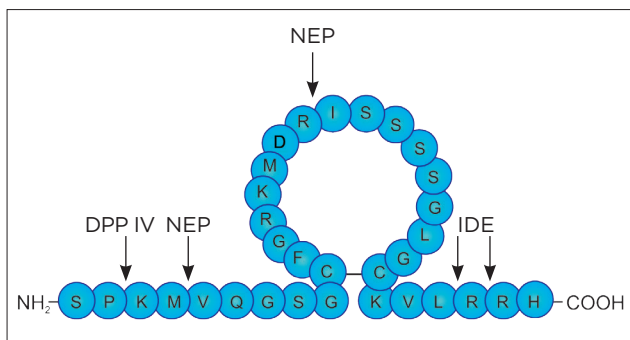


图2. BNP分子不同蛋白酶作用位点解析。DDP IV为二肽基肽酶IV，NEP为脑啡肽酶，IDE为胰岛素降解酶。

BNP是一种不稳定的分子

BNP分子极不稳定（10-11），已经有若干研究显示，在心衰患者血液中存在N端或C端部分截断的多种形式的BNP分子。其中全长1-32BNP仅占很小一部分（12）。其中二肽基肽酶和脑啡肽酶会使BNP部分截断，从而分别产生3-32BNP和5-32BNP（13-14）。此外还有研究显示，胰岛素降解酶也会使BNP部分截断（15-16）。目前已知的BNP截断位点如图2所示。

人血中BNP的主要免疫活性形式

ProBNP仅有部分会裂解为BNP和NT-proBNP，且该过程取决于翻译后的蛋白质糖基化。因此，proBNP和BNP均会被释放进入血液。这两种分子均可被BNP特异性抗体所识别，除非抗体位点被蛋白酶破坏。

我们对心衰患者血浆样本进行了凝胶过滤层析，并用高灵敏的BNP单抗配对50E1-24C5（该配对可等效识别多种形式的BNP分子）对凝胶产物进行免疫活性测定。结果显示，所有样本的凝胶过滤产物均出现了两个BNP活性峰

值，其中第一个峰为proBNP，而第二个较小的峰为BNP（图3）。我们之前的研究显示proBNP为BNP的主要免疫活性形式（17）。

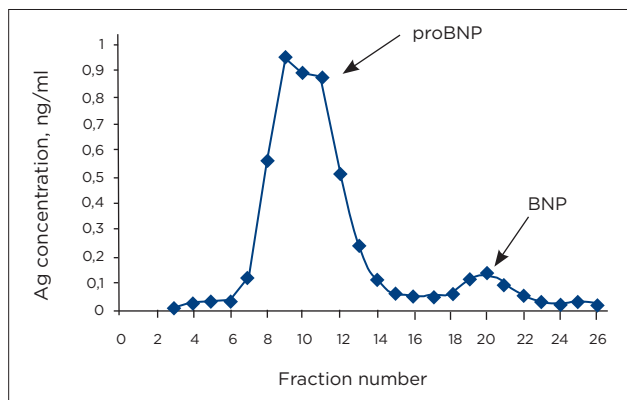


图3.内源性proBNP和BNP的凝胶过滤层析研究。将一例典型的心衰患者血浆样本用Superdex肽层析柱（GE Healthcare）进行分析。然后使用50E1-24C5抗体对对产物的BNP活性进行测定。其中第一个主峰代表proBNP，第二个峰代表BNP。

传统BNP夹心免疫检测系统

我们提供8株特异性识别BNP分子不同区域的单抗（图4）。这些单抗可以组成若干配对以开发灵敏、特异及快速的传统BNP定量夹心免疫检测系统。推荐配对如表1所示。

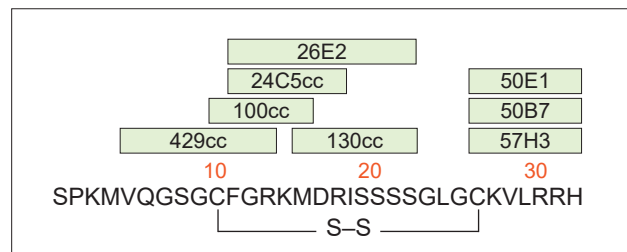


图4.BNP单抗位点图。

我们所有推荐的配对均可以等效识别BNP和未裂解的proBNP（图5），且均经过心衰患者血浆的测试验证。需要注意的是，目前已经上市的商品化试剂盒与proBNP的交叉反应却存在差异（18-20）。由于抗体在不同平台上的反应性不同，因此我们建议在开发新的BNP免疫检测系统时，应至少尝试4-5种配对以确保筛选出合适的最优配对。

Capture	Detection
50E1cc	24C5cc
50E1cc	26E2
24C5cc	50B7
24C5cc	57H3cc
57H3cc	429cc
50E1cc	130cc
50E1cc	100cc
100cc	57H3cc

表1. 传统BNP夹心免疫检测系统推荐配对。数据基于HyTest时间分辨免疫荧光分析系统。

因为proBNP是血液中BNP主要的免疫活性形式，因此我们推荐使用重组糖基化proBNP作为标准品（货号8GBP3，见7页）。

校准曲线。所有推荐配对均可以等效识别三种含有BNP的肽段，包括人工合成BNP、重组非糖基化proBNP（8PRO9）和重组糖基化proBNP。其中50E1-24C5（A）和57H3-429（B）测试三种抗原的校准曲线如图5所示。我们之前发表的一篇关于50E1-24C5的文章显示在我们内部的平台上以人工合成BNP作为校准品，灵敏度高于0.5pg/mL（17）。其他表1中的配对也同样具有极高的灵敏度。

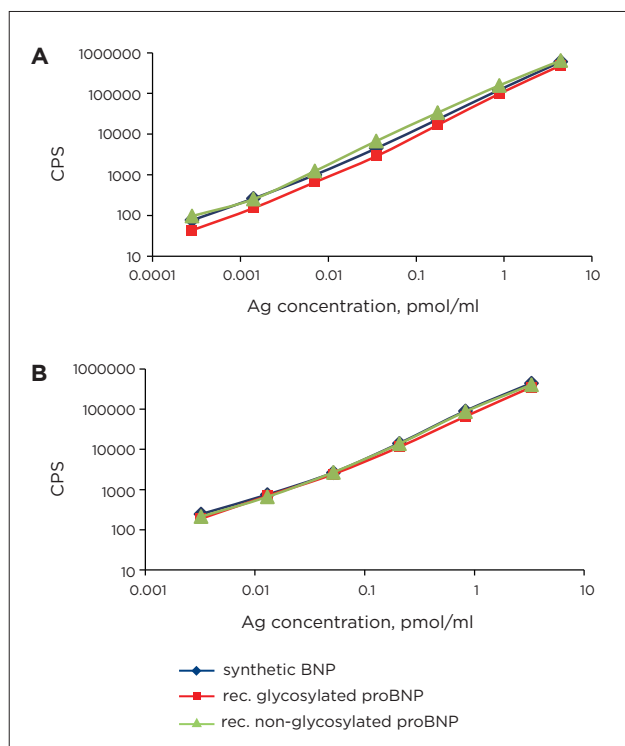


图5.50E1-24C5和57H3-429分别测试三种含有BNP的多肽的校准曲线。捕获抗体生物素标记，检测抗体钡标记。待测抗原分别为人工合成BNP（Bachem），重组非糖基化proBNP（货号8PRO9）和重组糖基化proBNP。抗体（50μL）和抗原（50μL）进行混合，于链霉亲和素包被的微孔板中室温孵育反应30分钟。

HyTest BNP免疫检测系统与商品化试剂盒之间存在良好的相关性。用两种HyTest内部BNP检测系统和两种商品化BNP试剂盒同时对40例心衰患者血浆进行BNP测定。图6（A）中，我们用配对57H3（26-32aa）-429（5-13aa）与雅培iSTAT BNP进行了样本测试比对。结果显示两组检测系统结果的相关系数 $R^2=0.99$ 。在图6（B）中，我们用配对50E1（26-32aa）-130（15-22aa）与西门子BNP（抗体位点为27-32aa和14-21aa）进行了样本测试比对。结果显示两组检测系统结果的相关系数 $R^2=0.97$ 。

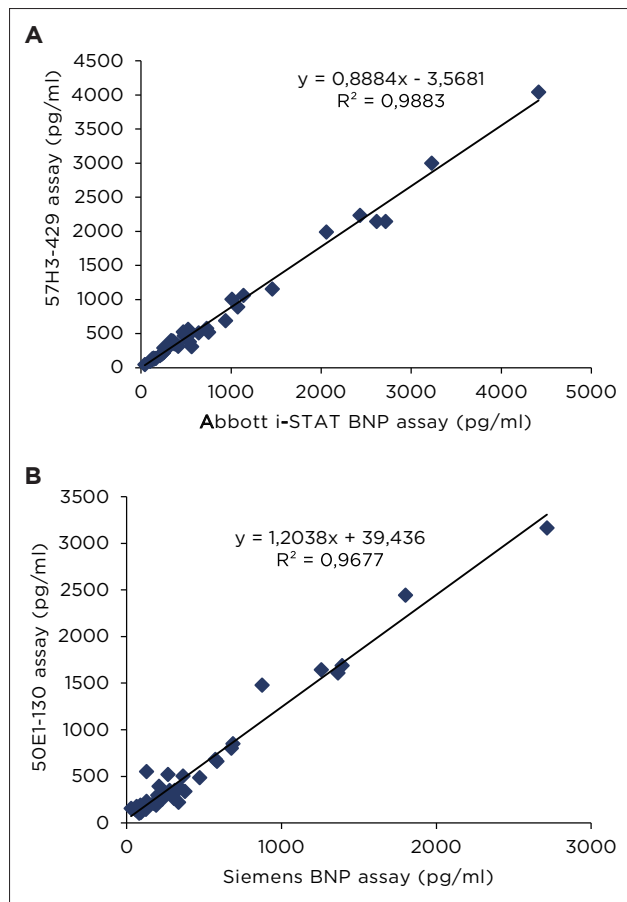


图6. HyTest BNP免疫检测系统与商品化试剂盒之间存在良好的相关性。

每组检测均使用了与之相对应的内部校准物质。其中商品化试剂盒位点的信息由IFCC（www.ifcc.org）提供。

脑啡肽酶抑制剂及其对于BNP检测结果的影响

通过脑啡肽酶抑制剂抑制BNP降解从而提高BNP水平被认为是一种潜在的心衰治疗策略。近期，一种心衰新药Entresto™（诺华）已经通过FDA审批。该药的活性成分之一就是脑啡肽酶抑制剂，因此使用该药物进行心衰治疗可能会对BNP相关检测造成影响。

绝大多数传统双抗体夹心BNP检测系统所使用的抗体配对至少有一株的位点位于环状区域，而另一株则通常位于C末端。因为脑啡肽酶的作用位点之一也在BNP环状区域（R17-118，图2），因此若BNP试剂所使用的抗体位点包含酶切位点，将会对脑啡肽酶降解BNP非常敏感。但是由于利钠肽系统复杂生化特性以及心衰形式的多样性，目前关于脑啡肽酶抑制剂对于BNP检测的影响仍无法给出明确答案。

我们通过BNP和proBNP对脑啡肽酶的敏感性研究分析了脑啡肽酶活性对不同BNP检测试剂的影响。根据我们的结果显示，配对57H3-429也对脑啡肽酶不敏感（数据未显示）。

NT-proBNP试剂开发

NT-proBNP是proBNP的N端部分，生物活性未知，由76个氨基酸组成并含有7个O-多糖位点，理论等电点为8.45，理论分子量为8.5KDa，然而由于糖基化的存在，实际分子量可能会更高。其半衰期比BNP长3-6倍，因此某种程度上而言NT-proBNP是更稳定的标志物（17）。

糖基化对于NT-proBNP检测的影响

我们的研究结果显示NT-proBNP糖基化会对部分抗体造成负面影响。NT-proBNP分子中间区域（28-56aa）由于O-多糖的存在很难被抗体识别，而分子的两端（13-27aa和61-76aa）却可以很好地被抗体识别。

我们还研究了脑啡肽酶对proBNP的影响，作为血液中主要的免疫活性形式，proBNP并没有受到脑啡肽酶的影响。因此，仅识别proBNP的试剂理论上应该不会受到Entresto™之类药物的影响（21）。

为了更清晰地阐释糖基化对于NT-proBNP的影响。我们使用两组抗体配对对8例心衰患者血浆去糖基化前后的检测结果进行了分析。其中一组是对糖基化不敏感的15C4-13G12，另一组是对糖基化敏感的11D1-13G12。结果显示，去糖基化对后一种配对即11D1-13G12产生了显著影响（图7）。

在开发NT-proBNP免疫检测系统时，应该要将糖基化影响加以考虑。我们推荐选择对糖基化不敏感的配对进行试剂开发。

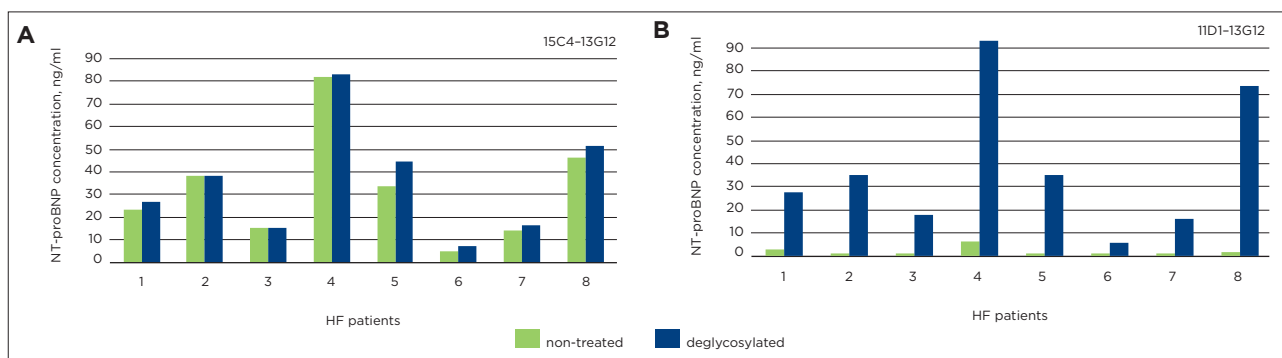


图7.糖基化对于NT-proBNP检测的影响很大程度上取决于所选择的抗体。使用两组不同配对的夹心检测系统对8例心衰患者血浆去糖基化处理前后分别进行测试。配对15C4-13G12 (A) 对于糖基化和去糖基化样本的检测结果基本一致。相反，配对11D1-13G12 (B) 对于糖基化高度敏感，仅能检出去糖基化的NT-proBNP。

NT-proBNP夹心免疫检测系统

HyTest提供13株特异识别NT-proBNP不同区域的单抗（图8）。需要注意的是，大部分NT-proBNP检测试剂也可以一定程度上识别proBNP。我们用心衰患者血浆和重组非糖基化NT-proBNP及proBNP在夹心免疫分析系统中对所有抗体进行了彻底验证。根据验证结果，我们推荐使用一株位点位于5-27的抗体和一株位点

位于61-76的抗体进行搭配（表2）。这些配对可以等效识别内源性和重组抗原。而使用位于最N端的抗体（1-12aa）则仅能检出重组抗原。这可能是由于内源性NT-proBNP发生了截断。使用识别中间区域（28-56aa）的抗体也得到了类似的结果，原因是糖基化阻断了抗体对抗原的识别。

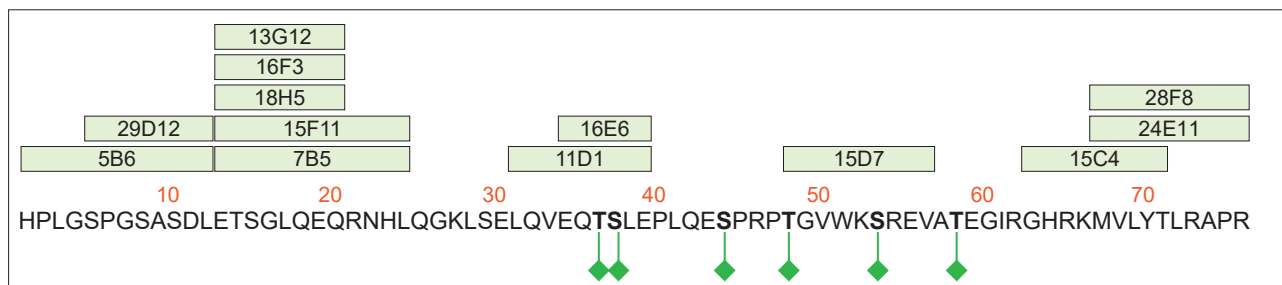


图8.NT-proBNP糖基化位点及抗体位点分布图。

Capture	Detection
15C4cc	13G12cc
15C4cc	29D12cc
15F11cc	24E11cc
15C4cc	18H5cc
29D12cc	NT34cc

表2.NT-proBNP推荐配对。数据基于我们内部的时间分辨免疫荧光平台。

由于在不同的平台和反应条件下抗体的表现会有所不同，因此我们建议尝试表中所有配对以筛选出最佳配对。

我们推荐使用重组非糖基化NT-proBNP（货号：8NT2，见第8页）作为标准品。识别NT-proBNP不同区域的抗体均可以等效识别该抗原。

校准曲线。所有推荐配对都具有极佳的灵敏度（10-15pg/mL）、反应动力学和线性范围。具有代表性的15C4-13G12的校准曲线如图9所示。更多关于该配对的信息请见参考文献（17）。

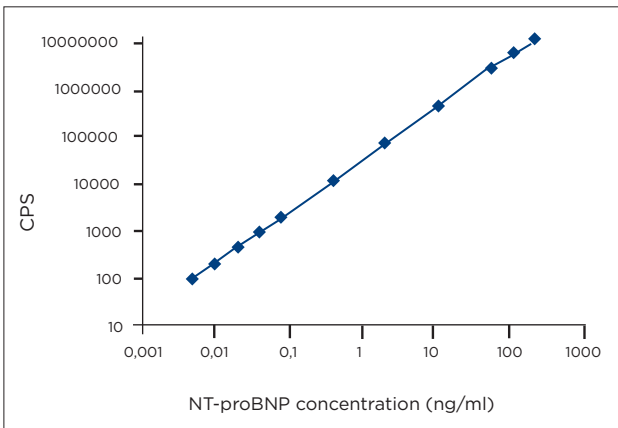


图9. 15C4-13G12的校准曲线。生物素标记的单抗15C4作为捕获抗体，标记的单抗13G12作为检测抗体。人重组非糖基化NT-proBNP（货号8NT2）作为抗原。抗体（50μL）和抗原（50μL）进行混合，于链霉亲和素包被微孔板中室温孵育反应30分钟。

HyTest 的NT-proBNP检测模型与罗氏NT-proBNP具有等效的临床价值。我们将51心衰患者EDTA血浆和53例健康人血浆（年龄匹配的）分别使用罗氏试剂和基于配对15C4-13G12和29D12-NT34 的HyTest内部系统进行测定。通过ROC曲线对不同试剂试剂的结果准确性进行了分析。我们所使用的抗体的识别位点均为无糖基化区域，而罗氏的一株抗体则位于糖基化区域（42-46aa）。由于受糖基化影响，罗氏试剂仅能检出一小部分内源性NT-proBNP（22-24）。罗氏试剂的ROC曲线面积为0.965（敏感性0.86，特异性0.98），HyTest 15C4-13G12的ROC曲线面积为0.950（敏感性0.84，特异性0.98），HyTest 29D12-NT34的ROC曲线面积为0.951（敏感性0.86，特异性0.93）。说明HyTest的抗体配对与罗氏NT-proBNP试剂具有相同的临床价值（图10）。

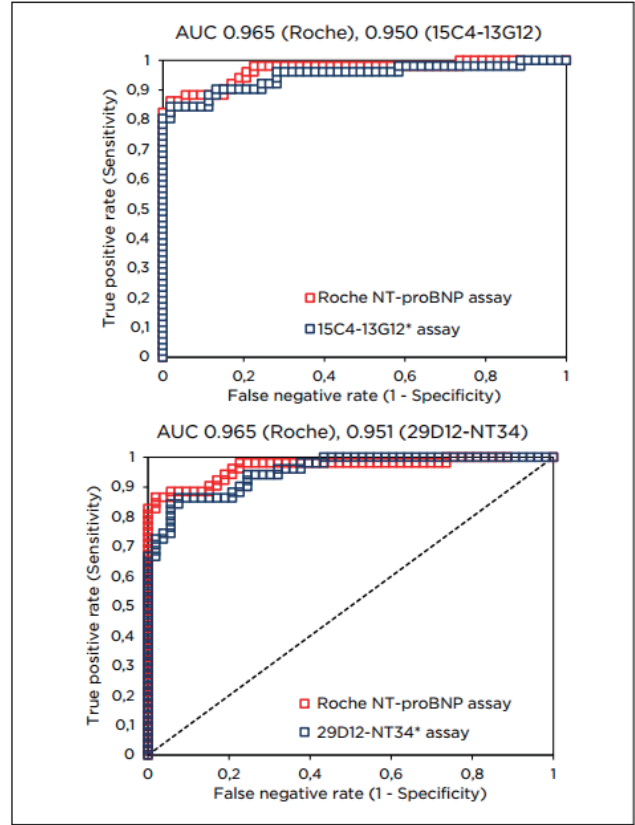


图10.NT-proBNP诊断准确性的ROC曲线。罗氏NT-proBNP与HyTest 15C4-13G12和HyTest 29D12-NT34的比对结果。

临床样本内源性NT-proBNP的稳定性。我们使用识别NT-proBNP稳定区域的配对15C4-13G12（位点分别为63-71aa和13-20aa）对心衰患者血清样本中的NT-proBNP稳定性进行了分析。在4°C孵育72小时后，仍然能够检出90%以上的免疫活性，而在室温孵育24小时后也依然能检出85-90%的免疫活性（图11）。说明如果选择识别分子稳定区域的抗体，即使样本在4°C或室温储存相当长一段时间也依然能够被可靠地检出。

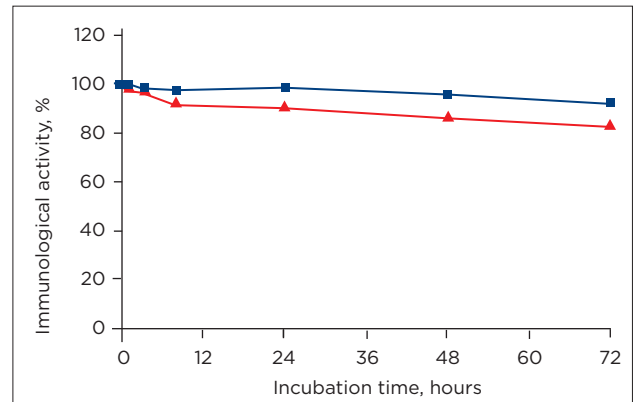


图11. 配对15C4-13G12对内源性NT-proBNP稳定性的研究。混合心衰患者血清分别于4°C（蓝色）和室温（红色）孵育72小时。

因此，如果所使用的抗体的识别区域位于分子的稳定区域，对于在4°C或室温条件下存放了相当长一段时间的样本而言，依然可以得到准确的定量检测结果。

proBNP试剂开发

除了我们自己的研究，其他研究者也发现除了NT-proBNP和BNP，proBNP也大量存在于心衰患者血液中（17，25-26）。ProBNP的理论等电点为10.12，理论分子量为11.9KDa。由于O-多糖的存在，实际分子量可能会更高（26）。

目前现有的绝大多数BNP和NT-proBNP试剂均与proBNP的存在不同程度的交叉反应。这使得BNP/NT-proBNP与proBNP的相关性更加接近。

研究显示，心衰患者血液中proBNP水平与BNP和NT-proBNP高度相关，这使得proBNP可以用于长期随访中对患者心血管死亡高风险进行评估（27）。另一篇研究显示，外周proBNP水平与心血管不良事件结局风险相关，并且独立于BNP（28）。

相比于目前商业化BNP和NT-proBNP试剂盒，仅检测proBNP 1-108的试剂可能会进一步提升分析特异性。

proBNP夹心免疫检测系统

我们设计的proBNP夹心免疫检测系统模型，使用一株特异识别BNP区域的抗体和一株特异识别NT-proBNP区域的抗体。模型及抗体位点信息如图12所示，推荐配对见表3。

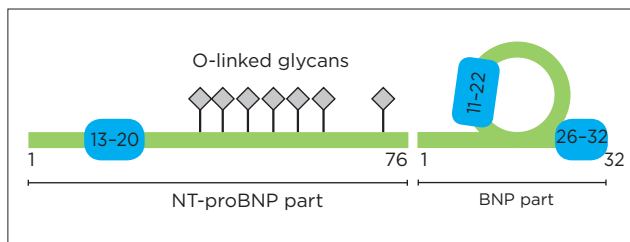


图12.ProBNP夹心免疫检测系统的推荐抗体位点。

Capture	Detection
50E1cc	16F3
50E1cc	18H5cc

表3.ProBNP夹心免疫检测系统推荐配对。

以上推荐配对均具有极佳的灵敏度及反应动力学。可以很好地识别重组非糖基化和糖基化proBNP及心衰患者血液中的内源性proBNP。

校准曲线。使用重组非糖基化proBNP（货号：8PRO9）作为校准品时，抗体配对50E1-16F3的灵敏度（LoD）可达到3pg/mL甚至更低（图13）。

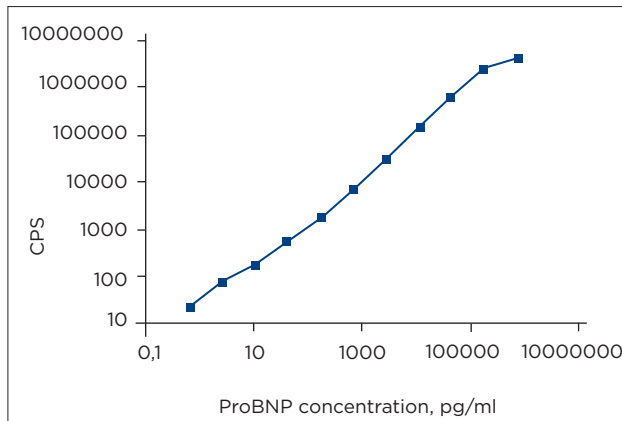


图13.配对50E1-16F3的校准曲线。生物素标记的单抗50E1作为捕获抗体，链霉亲和素标记的16F3作为检测抗体。重组非糖基化proBNP（货号：8PRO9）作为抗原。抗体（50μL）和抗原（50μL）进行混合，于链霉亲和素包被微孔板中室温孵育反应30分钟。

重组抗原

人重组糖基化proBNP

我们提供由哺乳动物细胞表达的重组proBNP抗原（货号：8GBP3）。该抗原为糖基化抗原，SDS-PAGE条带为明显的弥散性条带，分子量在30KDa左右（图14）。我们推荐使用该抗原作为BNP和proBNP试剂的校准品。

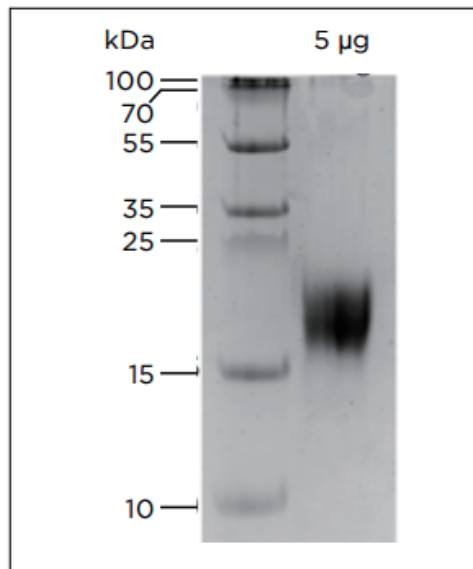


图14.重组proBNP还原性SDS-PAGE电泳结果。条带2和3为糖基化proBNP（8GBP3），由哺乳动物细胞表达，条带4是非糖基化proBNP（8PRO9），由大肠杆菌表达。

糖基化proBNP是BNP检测试剂的稳定校准品。不同BNP商品化试剂盒的检测结果之间存在显著差异，这使得检测结果的解读更加复杂。导致该差异的原因除了试剂之间抗体的选择不同之外，缺乏通用校准品是另一个主要原因。

一些BNP试剂所使用的校准品为合成BNP，然而血液中BNP主要的免疫活性形式却是proBNP。目前很多BNP试剂无法等效识别血液中的BNP和proBNP。另一方面，BNP溶解于血浆后的稳定性极差，这样进一步限制了其作为校准品的应用。

重组糖基化proBNP的优势在于它与内源性proBNP具有类似的O-多糖，稳定性远优于合成BNP。图15为用两种不同配对的BNP试剂对合成BNP、重组糖基化proBNP和心衰患者内源性proBNP的稳定性研究。结果显示，经过室温孵育24小时后，重组糖基化proBNP的活性仍然能保持90-96%，而合成BNP的活性则下降明显。

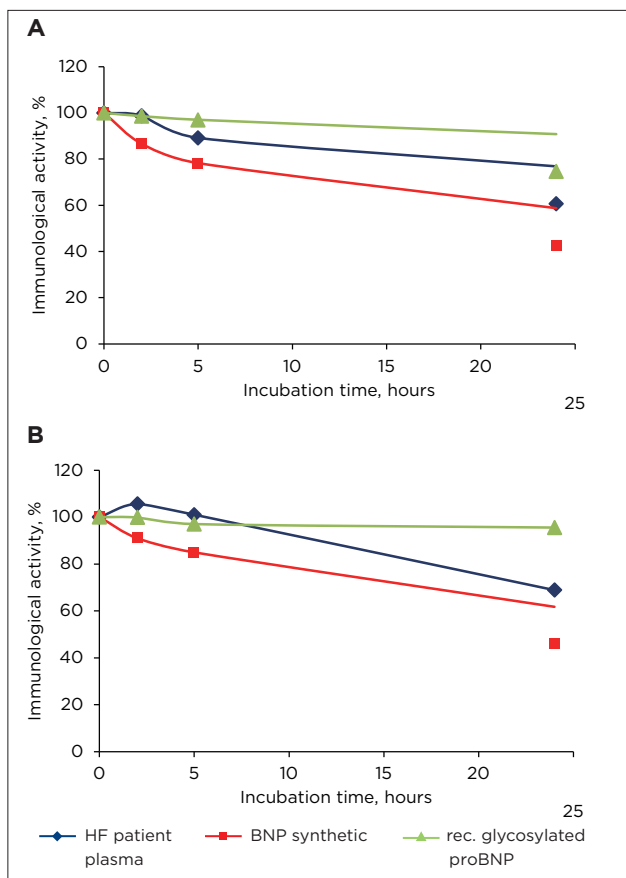


图15.合成BNP、内源性proBNP和重组糖基化proBNP的稳定性研究。分别将合成BNP（红色）、内源性proBNP（蓝色）和重组糖基化proBNP（绿色）溶解于正常混合EDTA人血浆中，于室温条件下孵育不同时间，然后用50E1-24C5（A）和57H3-429（B）进行活性测定。

重组非糖基化proBNP

人重组proBNP抗原（货号：8PRO9，1-108aa）由大肠杆菌表达，该多肽除了N端额外的甲硫氨酸之外，其序列与内源性proBNP序列完全一致。该抗原可被BNP特异性抗体（货号：4BNP2）和NT-proBNP特异性抗体（货号：4NT1）所识别。SDS-PAGE（图16）结果显示，该抗原的纯度超过95%。该抗原可以作为BNP、NT-proBNP和proBNP试剂的校准品或标准品。该非糖基化抗原的BNP试剂的校准曲线见图5，用于proBNP的校准曲线见图13。

重组非糖基化NT-proBNP

人重组NT-proBNP（货号：8NT2，1-76aa）由大肠杆菌表达，该多肽除了N端额外的甲硫氨酸之外，其序列与内源性NT-proBNP序列完全一致。该抗原可被特异识别NT-proBNP不同位点的抗体（货号：4NT1）所识别。

SDS-PAGE（图16）和HPLC分析结果显示，该抗原的纯度超过95%，可以被用做NT-proBNP试剂的校准品与标准品。该抗原作为校准品的校准曲线如前文NT-proBNP产品部分的图9所示。

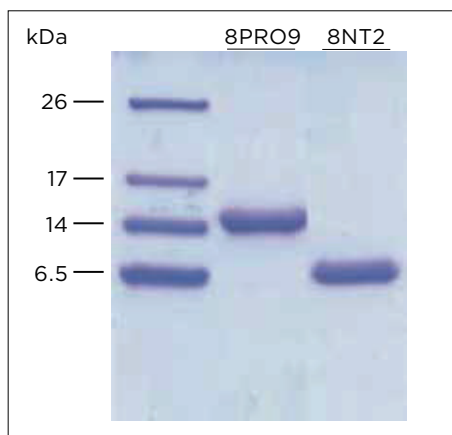


图16.重组非糖基化proBNP（货号：8PRO9）和重组NT-proBNP（货号：8NT2）还原性SDS-PAGE电泳结果。

参考文献

- Benjamin, EJ et al. Heart disease and stroke statistics –2017 update. *Circulation*. 2017, 135 (10): e146-e603.
- Emdin, M et al. Comparison of brain natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal ProBNP for early diagnosis of heart failure. *Clin Chem*. 2007, 53: 1289-1297.
- Mueller, T et al. Diagnostic accuracy of B type natriuretic peptide and amino terminal proBNP in the emergency diagnosis of heart failure. *Heart*. 2005, 91: 606-612.
- Ponikowski, P et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J*. 2016, 37: 2129-2200.
- Schellenberger, U et al. The precursor to B-type natriuretic peptide is an O-linked glycoprotein. *Arch Biochem Biophys*. 2006, 451: 160-166.
- Semenov, AG et al. Processing of proBNP is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. *Clin Chem*. 2009, 55(3): 489-498.
- Mair, J et al. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin Chem Lab Med*. 2001, 39: 571-588.
- Cowie, MR and Mendez, GF. BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002, 44: 293-321.
- Pandey, KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides*. 2005, 26: 901-932.
- Belenky, A et al. The effect of class-specific protease inhibitors on the stabilization of B-type natriuretic peptide in human plasma. *Clin Chim Acta*. 2004, 340: 163-172.
- Murdoch, DR et al. Disparity between studies of the stability of BNP in blood: comparison of endogenous and exogenous peptide. *Heart*. 1999, 81: 212-213.
- Niederkofer, EE et al. Detection of endogenous B-type natriuretic peptide at very low concentrations in patients with heart failure. *Circ. Heart Fail*. 2008, 1(4): 258-264.

13. Brandt, I et al. Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form. *Clin Chem.* 2006, 52(1): 82-87.
14. Pankow, K et al. Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. *Circ Res.* 2007, 101(9): 875-882.
15. Müller, D et al. Rat insulin-degrading enzyme: cleavage pattern of the natriuretic peptide hormones ANP, BNP, and CNP revealed by HPLC and mass spectrometry. *Biochemistry.* 1992, 31(45): 11138-11143.
16. Ralat, LA et al. Insulin-degrading enzyme modulates the natriuretic peptide-mediated signaling response. *J Biol Chem.* 2011, 286(6): 4670-4679.
17. Seferian, KR et al. The brain natriuretic peptide (BNP) precursor is the major immunoreactive form of BNP in patients with heart failure. *Clin Chem.* 2007, 53: 866-873.
18. Luckenbill, KN et al. Cross-reactivity of BNP, NT-proBNP, and proBNP in commercial BNP and NT-proBNP assays: preliminary observations from the IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage. *Clin Chem.* 2008, 54(3): 619-621.
19. Semenov, AG et al. Searching for a BNP standard: glycosylated proBNP as a common calibrator enables improved comparability of commercial BNP immunoassays. *Clin Biochem.* 2017, 50: 181-185.
20. Saenger, AK et al. Specificity of B-type natriuretic peptide assays: cross-reactivity with different BNP, NT-proBNP, and proBNP peptides. *Clin Chem.* 2017, 63(1): 351-358.
21. Seferian, KR et al. Immunodetection of glycosylated NTproBNP circulating in human blood. *Clin Chem.* 2008, 54: 866-873.
22. Nishikimi, T et al. The effect of glycosylation on plasma N-terminal proBNP-76 levels in patients with heart or renal failure. *Heart.* 2012, 98(2): 152-161.
23. Røsjø, H et al. Influence of glycosylation on diagnostic and prognostic accuracy of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in acute dyspnea: data from the Akershus Cardiac Examination 2 Study. *Clin Chem.* 2015, 61(8): 1087-1097.
24. Giuliani, I et al. Assay for measurement of intact B-type natriuretic peptide prohormone in blood. *Clin Chem.* 2006, 52: 1054-1061.
25. Liang, F et al. Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide. *J Am Coll Cardiol.* 2007, 49: 1071-1078.
26. Waldo, SW et al. Pro-B-type natriuretic peptide levels in acute decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2008, 51: 1874-1882.
27. Dries, DL et al. Simultaneous assessment of unprocessed proBNP1-108 in addition to processed BNP32 improves identification of high-risk ambulatory patients with heart failure. *Circ Heart Fail.* 2010, 3(2): 220-227

HyTest科学家发表的proBNP及其相关多肽研究的精选文章

Seferian KR, Tamm NN, Semenov AG, Mukharyamova KS, Tolstaya AA, Koshkina EV, Kara AN, Krasnoselsky MI, Apple FS, Esakova TV, Filatov VL, Katrukha AG. The brain natriuretic peptide (BNP) precursor is the major immunoreactive form of BNP in patients with heart failure. *Clin Chem.* 2007 May;53(5):866-873

在本研究中，我们描述了proBNP、NT-proBNP和BNP单抗的开发。通过使用基于这些单抗的免疫分析检测系统和贝克曼BNP试剂，我们发现proBNP是心衰患者血液中BNP主要的免疫活性形式。同时我们还发现proBNP和BNP的比率比之前预想的要高很多。

Seferian KR, Tamm NN, Semenov AG, Tolstaya AA, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Postnikov AB, Serebryanaya DV, Apple FS, Murakami MM, Katrukha AG. Immuno-detection of glycosylated NT-proBNP circulating in human blood. *Clin Chem.* 2008 May;54(5):866-873.

在本研究中，我们分析了糖基化对NT-proBNP抗体识别性能的影响。研究发现由于NT-proBNP分子中间区域O-多糖的存在使得该区域很难被抗体识别。Roche Elecsys 2010 NT-proBNP试剂所使用的一个多抗的识别位点有部分包含糖基化区域，因此也会一定程度上受到影响。此外，我们还发现糖基化对于抗体检测性能的影响在不同患者样本间存在差异，说明NT-proBNP糖基化存在个体差异，这将会导致检测结果出现不可预估的偏差。最后，我们发现特异性识别NT-proBNP N末端和C末端的抗体几乎不受糖基化影响，因此在开发新一代的NT-proBNP定量检测试剂时应考虑使用不受糖基化影响的抗体。

Semenov AG, Postnikov AB, Tamm NN, Seferian KR, Karpova NS, Bloshchitsyna MN, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Serebryanaya DV, Katrukha AG. Processing of pro-brain natriuretic peptide is suppressed by O-glycosylation in the region close to the cleavage site. *Clin Chem.* 2009 Mar;55(3):489-598.

在本研究中，我们对proBNP代谢机制的研究取得了新的进展。我们的数据显示，包括弗林蛋白酶和一小部分的丝氨酸蛋白酶均参与了NT-proBNP和BNP的形成。我们也第一次发现心衰患者血液中存在一部分71号酪氨酸未糖基化的proBNP，该位点的去糖基化通常会导致proBNP对于蛋白酶非常敏感从而裂解为NT-proBNP和BNP。这些发现使我们对外周循环中proBNP的多样性及其代谢机制有了更深入的理解。

Semenov AG, Tamm NN, Seferian KR, Postnikov AB, Karpova NS, Serebryanaya DV, Koshkina EV, Krasnoselsky MI, Katrukha AG. Processing of pro-Btype natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases. *Clin Chem.* 2010 Jul;56(7):1166-1176.

在本研究中，我们提供了关于proBNP代谢新的发现。研究数据显示，包括Furin和一小部分Corin均参与了proBNP裂解为NT-proBNP和BNP的过程。我们首次发现，在心衰患者的外周循环中，有相当一部分Thr71非糖基化的proBNP，该类型的proBNP通常对于蛋白酶非常敏感，从而裂解为NT-proBNP和BNP。该发现提高了我们对于外周循环中多种形式的NPs的认识，同时也使我们对于proBNP的裂解机制有了进一步的了解。

Semenov AG, Seferian KR. Biochemistry of the human B-type natriuretic peptide precursor and molecular aspects of its processing. Clin Chim Acta. 2011 May 12;412(11-12):850-60.

综述，本文对proBNP产生及代谢领域的研究数据进行汇总，同时对proBNP潜在的临床价值进行讨论。

Semenov AG, Seferian KR, Tamm NN, Artem'eva MM, Postnikov AB, Bereznikova AV, Kara AN, Medvedeva NA, Katrukha AG. Human pro-B-type natriuretic peptide is processed in the circulation in a rat model. Clin Chem. 2011 Jun;57(6):883-90.

本研究中，我们向大鼠注射了人proBNP，之后用不同的BNP、NT-proBNP和proBNP免疫检测系统以及质谱分析对proBNP在鼠体内的代谢情况进行了分析。结果显示，proBNP在鼠外周循环中会发生裂解产生有活性的BNP，这说明proBNP的次级代谢是一种非常重要的调控环节而非简单的降解。

Semenov AG, Katrukha AG. Different Susceptibility of B-Type Natriuretic Peptide (BNP) and BNP Precursor (proBNP) to Cleavage by Neprilysin: The N-Terminal Part Does Matter. Clin Chem. 2016 Apr;62(4):617-22

本研究中，我们研究了BNP和proBNP在体外对于脑啡肽酶的敏感性。结果显示，proBNP作为BNP最主要的免疫活性形式，会抑制脑啡肽酶的降解作用。同时，脑啡肽酶抑制剂（Entresto™）对于BNP检测的影响可能取决于试剂。我们推断，BNP试剂所使用的抗体的识别区域若包含R17-I18，相比于不包含该位点的试剂将会对脑啡肽酶更加敏感。

Semenov AG, Katrukha AG. Analytical Issues with Natriuretic Peptides – has this been Overly Simplified? EJIFCC. 2016 Jul; 27(3): 189–207.

综述，本综述汇总了近期利钠肽系统复杂性的相关研究进展，并对相关分析性问题进行了讨论，并对未来利钠肽相关临床诊断所面临的挑战进行了展望。

Semenov AG, Tamm NN, Apple FS, Schulz KM, Love SA, Ler R, Feygina EE, Katrukha AG. Searching for a BNP standard: Glycosylated proBNP as a common calibrator enables improved comparability of commercial BNP immunoassays. Clin Biochem. 2017 Mar;50(4-5):181-185.

在该研究中，我们与Fred Apple教授及其团队合作，比对了6种不同的重组BNP相关蛋白，尝试寻找可以降低5种不同商品化试剂间差异的校准品候选蛋白。结果显示，一种糖基化的proBNP可以作为通用校准品降低试剂间结果差异。

HyTest专利及商标

Immunoassay Kit for Quantification of BNP and proBNP (US 9,145,459)

BNP及proBNP定量检测免疫分析试剂盒

Stable Standards for BNP Immunoassays (EP 2084544, CN 101641601, CA 2669024).

BNP免疫检测系统的稳定标准品

Immunoassay for Quantification of an Unstable Antigen Selected from BNP and proBNP (US 9,034,591, US 9,034,592, JP 5686593, CN 101842707, CA 268391, EP 2135087).

BNP和proBNP的不稳定形式抗原的定量免疫检测分析系统

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	单抗	亚型	备注
BNP	4BNP2	26E2	IgG1	EIA, WB, a.a.r 11-17
	4BNP2cc	50E1cc	IgG1	体外培养, EIA, WB, a.a.r 26-32
		50B7cc	IgG2a	体外培养, EIA, WB, a.a.r 26-32
		57H3cc	IgG2a	体外培养, EIA, WB, a.a.r 26-32
		24C5cc	IgG1	体外培养, EIA, WB, a.a.r 11-17
		100cc	IgG2a	体外培养, EIA, a.a.r 10-15
		130cc	IgG1	体外培养, EIA, a.a.r 15-22
429cc	IgG1	体外培养, EIA, a.a.r 5-13		
NT-proBNP	4NT1	16F3	IgG1	EIA, WB, a.a.r 13-20
		15D7	IgG1	EIA, WB, a.a.r 48-56
		28F8	IgG2a	EIA, WB, a.a.r 67-76
	4NT1cc	5B6cc	IgG1	体外培养, EIA, WB, a.a.r 1-12
		29D12cc	IgG2a	体外培养, EIA, WB, a.a.r 5-12
		15F11cc	IgG2b	体外培养, EIA, WB, a.a.r 13-24
		13G12cc	IgG2a	体外培养, EIA, WB, a.a.r 13-20
		18H5cc	IgG1	体外培养, EIA, WB, a.a.r 13-20
		7B5cc	IgG1	体外培养, EIA, WB, a.a.r 13-24
		NT34cc	IgG1	体外培养, EIA, WB, a.a.r 25-34
		11D1cc	IgG1	体外培养, EIA, WB, a.a.r 31-39
		16E6cc	IgG1	体外培养, EIA, WB, a.a.r 34-39
		15C4cc	IgG2b	体外培养, EIA, WB, a.a.r 63-71
		24E11cc	IgG2a	体外培养, EIA, WB, a.a.r 67-76

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
NT-proBNP, 重组	8NT2	>95%	重组
proBNP, 重组	8PRO9	>95%	重组
proBNP, 糖基化, 重组	8GBP3	>95%	重组

基质

产品名称	货号	来源
去BNP和NT-proBNP血浆	8BPF	混合正常人血浆

注意: 在本技术手册中, 数据均来自于小鼠腹水体内生产的抗体。我们现提供的体外细胞培养生产的抗体与小鼠腹水体内生产的抗体具有相同的性能。