



技术报告

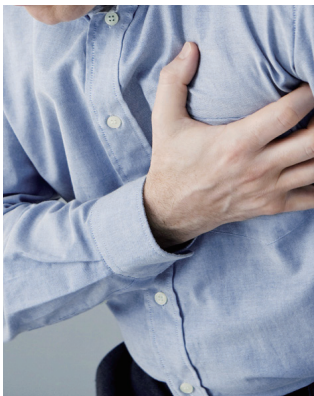


临床与科研领域

心肌标志物



脂蛋白相关磷脂酶A2



脂 蛋白相关磷脂酶A2 (Lp-PLA2, 也叫做血小板活化因子) 是一种钙离子依赖性的磷脂酶, 并以与脂蛋白颗粒结合的形式存在于血液循环中(1,2)。

Lp-PLA2在脂类促炎症物质的代谢以及促动脉硬化代谢物的产生过程中发挥着关键作用, 如溶血卵磷脂和氧化型游离脂肪酸的形成。Lp-PLA2主要与LDL颗粒结合, 也有较少部分的Lp-PLA2与HDL颗粒结合。Lp-PLA2所结合的脂蛋白种类与个体的病理生理学状况相关(3)。其与脂蛋白的结合为糖基化依赖性。

Lp-PLA2的临床意义

Lp-PLA2的水平状况可以预测稳定性冠心病患者(5)和健康人群(6)的不良心血管事件。Lp-PLA2水平升高可以预测人体外周血管不良事件的发展状况(7)。一份包含了所有前瞻性研究的Meta分析指出, 通过对79036例患者的Lp-PLA2测试发现, 其浓度水平与健康人群冠心病、中风的发生率及心血管疾病死亡率有关, 同时也与稳定性心血管病患者的死亡率有关(8)。

近日, 国际上最主要的四个学会(欧洲心脏学会、美国心脏病学会、美国心脏学会和美国内分泌学会)所发布的指南中均指出, Lp-PLA2的测定可以用于无症状成人患者的危险分层。



临床用途

✓ 不良心血管事件的预后标志物

用于开发Lp-PLA2定量检测免疫分析系统开发的试剂

HyTest提供若干株可用于人Lp-PLA2定量检测免疫分析系统开发的小鼠单克隆抗体(Mabs)。此外, 我们也提供重组的Lp-PLA2抗原。

需要注意的是, 目前一些Lp-PLA2的检测方法为该磷脂酶活性测定。而我们所提供的抗体则用于定量检测免疫分析系统的开发, 其测定结果为质量单位(ng/ml)。

1. Stafforini, D.M., Biology of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH, lipoprotein associated phospholipase A2). *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009. 23(1): p. 73-83.
2. Stafforini, D.M., Plasma PAF-AH (PLA2G7): Biochemical Properties, Association with LDLs and HDLs, and Regulation of Expression. *Enzymes*, 2015. 38: p. 71-93.
3. Gardner, A.A., et al., Identification of a domain that mediates association of platelet-activating factor acetylhydrolase with high density lipoprotein. *J Biol Chem*, 2008. 283(25): p. 17099-106.
4. Tselepis, A.D., et al., N-linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL. *J Lipid Res*, 2001. 42(10): p. 1645-54.
5. Brilakis, E.S., et al., Association of lipoprotein-associated phospholipase A2 levels with coronary artery disease risk factors, angiographic coronary artery disease, and major adverse events at follow-up. *Eur Heart J*, 2005. 26(2): p. 137-44.
6. Ballantyne, C.M., et al., Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*, 2004. 109(7): p. 837-42.
7. Garg, P.K., et al., Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 and Incident Peripheral Arterial Disease in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *ArteriosclerThrombVascBiol*, 2016. 36(4): p. 750-6.
8. Lp, P.L.A.S.C., et al., Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet*, 2010. 375(9725): p. 1536-44.

特异性识别Lp-PLA2的单克隆抗体

我们精选了四株性能优异的人Lp-PLA2特异性小鼠单克隆抗体，可用于检测人血浆样本中的Lp-PLA2。这些抗体的免疫原是哺乳动物细胞系所表达的重组人Lp-PLA2。

Lp-PLA2的定量夹心免疫分析方法

针对人血浆样本中Lp-PLA2定量夹心免疫分析方法的开发，我们首推两组抗体配对，分别为：PL42cc-PL46cc和PL26cc-PL4cc。当然，其他配对组合也可以用于该分析方法的开发。我们所推荐的所有配对均可检测人血浆/血清中的天然Lp-PLA2。

全部配对推荐请参考表1。配对PL42cc-PL46cc的校准曲线请参见图1。

表1. 最灵敏的抗体配对（捕获—检测）。
以下数据均基于HyTest内部免疫分析平台。

捕获	检测	最低检出限ng/mL
PL42cc	PL46cc	0.2
PL26cc	PL46cc	0.2
PL26cc	PL4cc	0.5

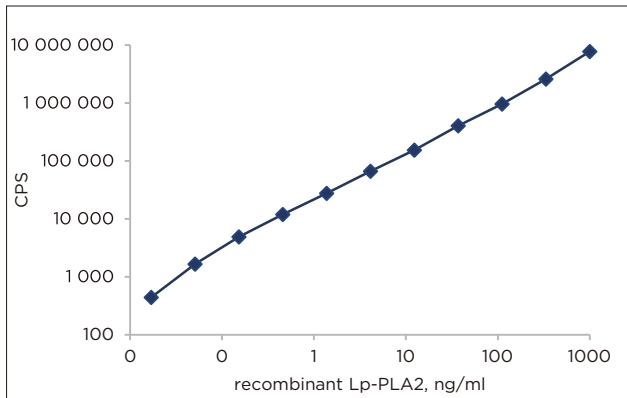


图1. 抗体配对PL42cc-PL46cc的校准曲线

捕获抗体PL42cc包被于Costar酶标板中，用含有1%酪蛋白和0.05%吐温20的缓冲液于室温条件下封闭15分钟。重组人Lp-PLA2（货号8PL7）和Eu³⁺标记的检测抗体PL46cc用反应缓冲液进行稀释，并在酶标板中37°C孵育2.5小时。

注意：Lp-PLA2的脂质结合特性使其具有与塑料表面非特异性吸附的趋势。为了避免非特异吸附，我们在反应缓冲液中添加了1%的酪蛋白并将终浓度变为0.5%。

对重组Lp-PLA2和正常人血清中内源性Lp-PLA2进行系列稀释，并用配对PL42cc-PL46cc进行测试，两组信号值的下降情况相同（见图2）。这说明重组Lp-PLA2的免疫化学性质与天然抗原类似。

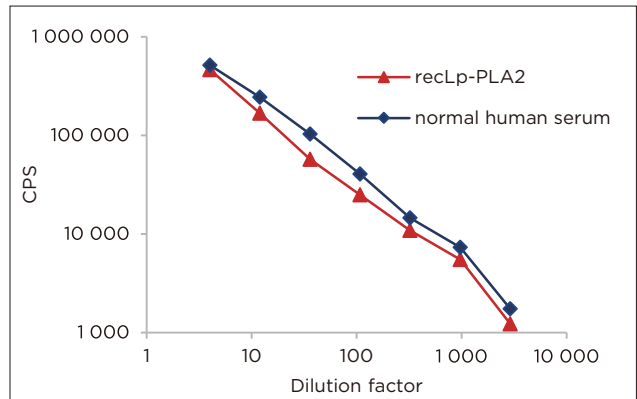


图2. 稀释线性研究

基于抗体配对PL42cc-PL46cc的重组Lp-PLA2与天然Lp-PLA2（源自健康人血清）的稀释线性研究。实验流程请参见图1。重组人Lp-PLA2抗原的初始浓度为111ng/ml。

我们所提供的所有抗体均可以用于HRP标记。图3为部分抗体标记HRP的测试情况。

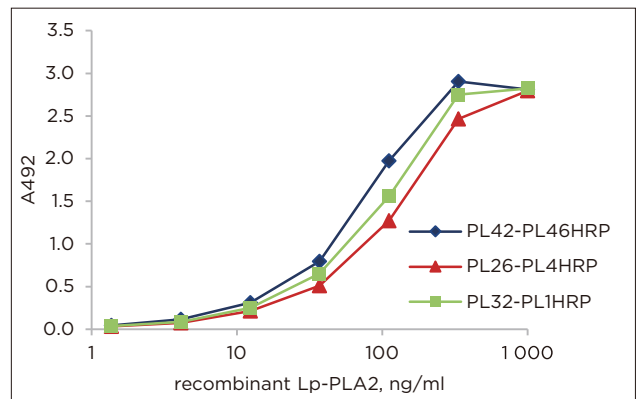


图3. 在夹心免疫分析平台中，HRP标记的抗体对于重组Lp-PLA2（货号8PL7）抗原的滴度曲线。捕获抗体以1μg/孔的浓度包被于酶标板中，并用含有1%酪蛋白的缓冲液进行封闭，以避免抗原与酶标板表面的非特异吸附。在酶标板中添加图中指定浓度的抗原，并用HRP标记的检测抗体进行测定（0.4μg/孔）。

患者样本测试

为了进行初步的临床研究，我们收集了13例AMI住院病人的血清样本和13例健康人血清样本。图4为抗体配对PL26cc-PL4cc(A)和PL42cc-PL46cc(B)以及商业化ELISA试剂盒(C)对样本测试的箱线图分析结果。

HyTest抗体配对PL26cc-PL4cc测试天然样本的结果与商业化ELISA试剂盒的测试结果非常相似。而抗体配对PL42cc-PL46cc测试天然样本的结果则略有不同。

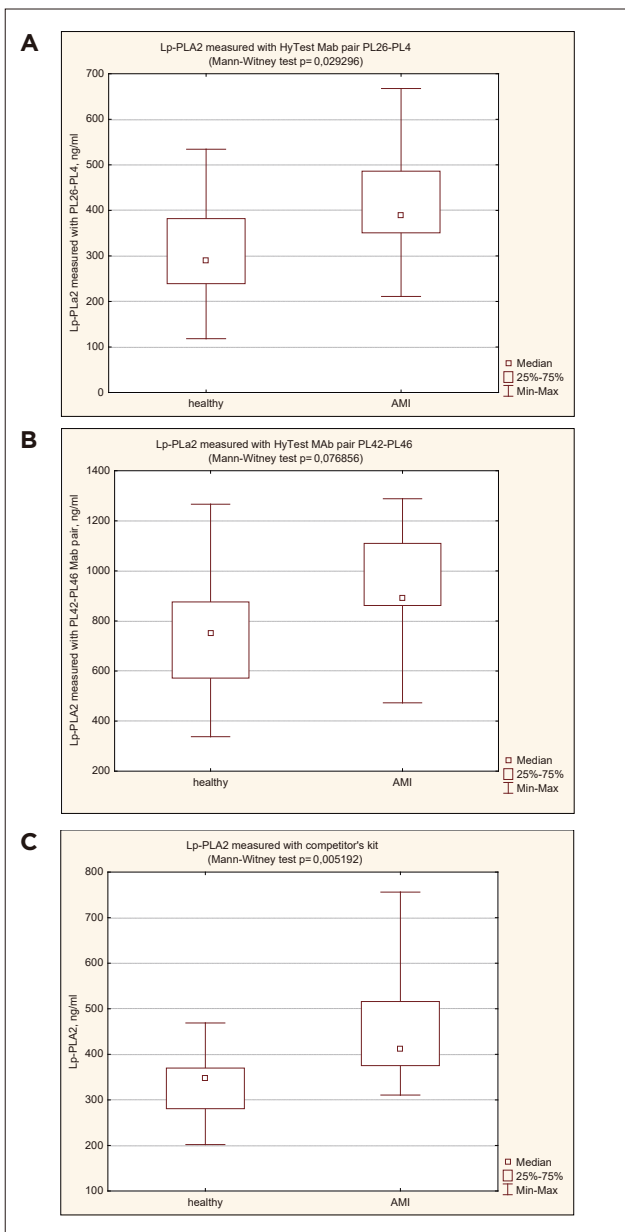


图4. 血清中天然Lp-PLA2的测试情况。

使用HyTest抗体配对PL26cc-PL4cc(A)和PL42cc-PL46cc(B)以及商业化ELISA试剂盒(C)对AMI患者和健康人群血清样本进行测试。血清样本用反应缓冲液稀释30倍(A和B)，或者根据商业化试剂盒供应商所提供的说明书进行操作(C)。样本于37°C孵育2.5小时(A和B)，或者于室温孵育3小时(C)。

重组人Lp-PLA2

HyTest提供的重组Lp-PLA2抗原由哺乳动物细胞系所表达。该蛋白的C末端GC环处，连接有包含6个组氨酸的Tag标签。该重组蛋白的计算分子量为48,968Da，等电点为7.1。与天然蛋白类似，该重组蛋白含有N-链接的多糖。

重组Lp-PLA2抗原由哺乳细胞培养基经由若干次层析后纯化而得。分离提纯后的重组抗原基本不含杂质，通过还原性SDS-PAGE电泳对纯度进行测试，结果大于75%。

重组Lp-PLA2与血浆组分的结合情况与内源性Lp-PLA2类似

通过凝胶过滤发现，天然Lp-PLA2的免疫活性在洗脱图中呈现三个不同峰值。三个峰值的洗脱体积与VLDL、LDL和HDL的结合情况高度一致(9)。将重组抗原添加于正常人血清中，我们发现重组蛋白的洗脱图与内源性Lp-PLA2情况类似(如图5所示)。重组蛋白的峰值与天然蛋白的类似，提示重组Lp-PLA2与血清组分的结合情况与天然蛋白相同。

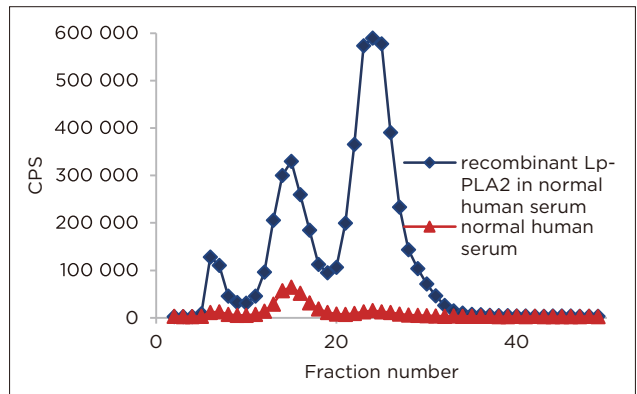


图5. 重组人Lp-PLA2与正常人血清中脂质结合状况的凝胶过滤研究。将150μl的正常人血清和添加有3μg重组Lp-PLA2蛋白的正常人血清分别填入Superose 6层析柱。使用抗体配对为PL42cc-PL46cc的荧光免疫分析系统测定分馏组分的免疫活性。重组Lp-PLA2加入血清后显示出具有和内源性Lp-PLA2相同的脂质结合特性。

9. Innis-Whitehouse, W., et al., An efficient chromatographic system for lipoprotein fractionation using whole plasma. J Lipid Res, 1998. 39(3): p. 679-90.

重组Lp-PLA2在人血清中的回收率

将重组Lp-PLA2添加到正常人血清中，检测信号值代表了在宽浓度范围内，天然血清中添加的重组Lp-PLA2和天然Lp-PLA2的总和（如图6所示）。

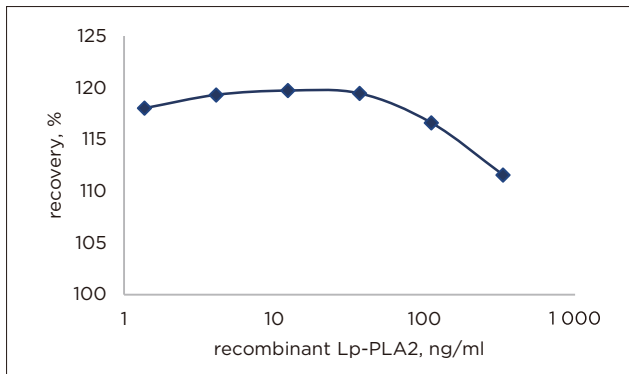


图6. 用抗体配对PL42-PL46进行正常人血清中重组人Lp-PLA2的回收率研究。
将以缓冲液为基质的重组人Lp-PLA2添加到人血清中，以反应缓冲液对血清进行稀释，并对其进行天然Lp-PLA2的免疫活性测定。

重组人Lp-PLA2的稳定性

我们提供的重组Lp-PLA2为冻干产品。该蛋白在保存缓冲液中储存于不同温度的免疫活性保持情况如图7所示。结果显示，在室温条件下，重组Lp-PLA2抗原约80%的免疫活性可以保持至少两周。同时，当储存温度为37°C时，4天后活性下降超过了50%。

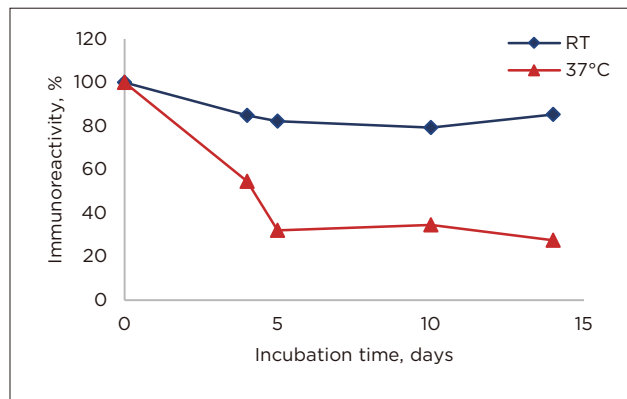


图7. 重组Lp-PLA2的短期耐热性。
将等份的重组Lp-PLA2溶液分别于室温和37°C条件下孵育两周。在指定的时间节点，将重组Lp-PLA2溶液用反应缓冲液进行稀释并使用抗体配对为PL42cc-PL46cc的免疫分析系统对其活性进行测定。

使用抗体配对为PL42cc-PL46cc的免疫分析系统对重组Lp-PLA2的冻融稳定性进行考察，经历了15个冻融循环之后，重组蛋白的活性并没有出现显著变化（如图8所示）。

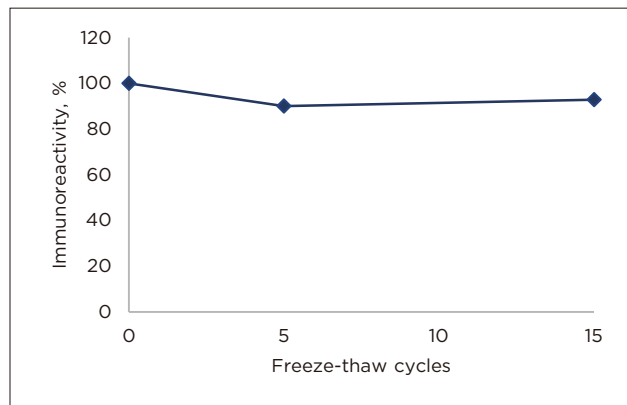


图8. 重组Lp-PLA2的冻融稳定性。
将重组Lp-PLA2进行反复冻融处理。在经历指定的冻融循环次数之后，用抗体配对为PL42cc-PL46cc的免疫分析系统进行分析，同时将-20°C保存的重组蛋白作为对照。结果显示，该重组蛋白对于多次冻融不敏感。

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	克隆	亚型	备注
人脂蛋白相关磷脂酶A2 (Lp-PLA2), 体外生产	4LA7cc	PL4cc	IgG1	体外生产, EIA, WB
		PL26cc	IgG1	体外生产, EIA, WB
		PL42cc	IgG1	体外生产, EIA, WB
		PL46cc	IgG1	体外生产, EIA, WB
		PL11cc	IgG1	体外生产, EIA

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
人脂蛋白相关磷脂酶A2 (Lp-PLA2), 重组	8PL7	>75%	重组