



人血清淀粉样蛋白A (SAA)



血 清淀粉样蛋白A载脂蛋白家族包含三种家族蛋白，分别由SAA1、SAA2和SAA4基因编码(1-3)。其中SAA1和SAA2为急相亚型。当机体对炎症产生应答时，其表达水平会升高。SAA4是组成型，在急相反应

应答期间，其表达水平不会发生改变。此外，还有一种SAA相关基因(SAA3)也已经得到了鉴别，该基因在人类中并没有表达。

SAA 的生化性质

SAA1和SAA2由肝脏合成并分泌释放进入血液循环。在血液中，SAA会与高密度脂蛋白(HDL)形成复合物。

SAA1和SAA2都有不同形式的等位基因，SAA1有三个不同的变异型而SAA2有2个不同的变异型，这些变异型之间存在1-3个氨基酸残基的差异。SAA1和SAA2均含有104个氨基酸残基。在人类的血液样本中，全长序列的SAA以及N末端精氨酸被酶切的SAA均有发现。急相SAA1和SAA2蛋白具有高度同源性，这两种蛋白至少存在97个相同的氨基酸残基。SAA4由112个氨基酸残基组成，SAA4与两种急相SAA蛋白的同源性接近50%。

最近，包含有N末端组氨酸Tag的重组人SAA1的晶状结构已被发表。报告显示，SAA包含4条螺旋，其氨基酸序列区域分别为1-27、32-47、50-69以及73-88(4)。在

溶液中，人重组SAA与纯化的内源性SAA都有聚集为低聚物的倾向(4-6)。据推测，这种聚集是由位于1号螺旋(氨基酸序列区域为2-8)和3号螺旋(氨基酸序列区域为52-59)内的氨基酸残基所介导的(4)。

SAA的生物学功能

SAA在炎症反应中的生物学功能尚未研究透彻。有研究认为，SAA参与了损伤组织中胆固醇的回收。SAA可能扮演着一种信号分子，可以重新配置HDL颗粒从而激活巨噬细胞并介导巨噬细胞中储存的胆固醇的清除。这些被释放的胆固醇随后与高密度脂蛋白(HDL)结合然后被用于新细胞的细胞膜，这些新细胞在急性炎症和组织修复时发挥作用(7)。此外，根据已经发表的研究，重组的SAA在体外研究中具有显著的促炎症活性，这种活性是通过诱导多种细胞因子的合成以及促进单核细胞和中性粒细胞的趋药性而产生的(1,8)。然而在生理条件下，SAA是否也具有相同的特性仍然不得而知(9)。SAA在生理及病理条件下精确的生物学功能仍有待进一步研究。

SAA可作为一种诊断标志物

SAA是一种非特异性的炎症标志物。当机体受到如组织损伤、感染或创伤所引起的炎症刺激后，它在血液中的浓度水平会升高。与CRP类似，SAA是人类的一种主要的急相蛋白。正常情况下，血清中SAA的浓度大约为1-10 μ g/ml。然而，在急相反应中，SAA的浓度会达到1mg/ml甚至更高。急相反应通常会持续数天之久，当机体没有受到新的炎症刺激时，SAA的水平会逐渐下降。

SAA可以用于炎症的诊断、预后以及疗效评估。尤其

在类风湿患者中，大量研究表明SAA的浓度可以反映患者的疾病活动度及炎症程度(10,11)。对于急性肾移植排异反应而言，SAA是一种灵敏的标志物。对肾移植患者进行SAA监测可以用于急性排异反应发生的早期检查(12,13)。在心梗患者中，SAA的浓度会升高至极限高值，并与梗死后并发症及死亡率相关(14,15)。在由多种病原体所引起的细菌感染患者中，SAA浓度也会出现升高(16)。在尿路感染患者中，SAA的检测有助于评估抗菌疗效(17)。

SAA免疫检测系统的原料产品

HyTest可提供一系列小鼠抗SAA单克隆抗体，这些抗体适用于人外周血中SAA定量免疫检测系统的开发。同时，这些抗体也可以用于Western blotting中SAA的免疫检测。

人SAA特异性单克隆抗体

我们精选出8株用于检测人SAA的小鼠单克隆抗体。8株单抗均可以识别重组人SAA1抗原以及人外周血中的内源性SAA。单抗VSA25的抗原表位位于SAA的23-29氨基酸序列；单抗VSA6的抗原表位位于SAA的72-86氨基酸序列。其余单抗的抗原表位信息仍有待考察。

我们提供的抗体除可以识别人SAA外，还可以识别其他物种的SAA（具体信息见表1）。关于更多用于检测犬、猫和马SAA的试剂原料信息，请参见我们的动物SAA技术报告或者访问我们的官方网站：www.hytest.fi。

表1. 抗人SAA单抗的与其他物种SAA的交叉反应情况

货号	克隆	特异性			
		人SAA	犬SAA	马SAA	猫SAA
4SA11	VSA6	+	+	+	-
	VSA25	+	+	+	+
	SAA1	+	+	-	-
	SAA6	+	+	-	-
	SAA15	+	+	-	-
4VS4	VSA31	+	+	+	+
	VSA38	+	+	+	+
	SAA11	+	+	+	+

人SAA夹心免疫检测系统的开发

针对于开发人血浆样本中SAA夹心免疫检测系统，我们推荐两组抗体配对：VSA25-VSA31 和 VSA6-VSA38（详见表2）。抗体配对VSA25-VSA31的测试校准曲线请参见图1。

表2. 抗体配对推荐

捕获抗体 (货号4SA11)	检测抗体 (货号4VS4)	检出限*
VSA25	VSA31	2 ng/ml
VSA6	VSA38	4 ng/ml

*数据基于HyTest内部的评测系统

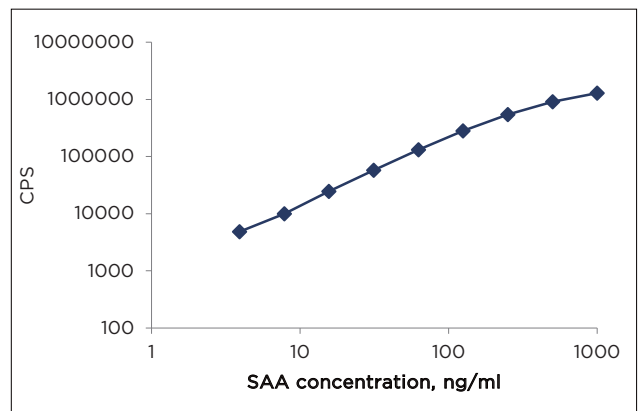


图1 抗体配对VSA25-VSA31的测试校准曲线。

捕获抗体VSA25（货号4SA11）包被于Costar EIA/RIA微孔板。微孔板于室温下封闭1小时，封闭液包含有1%酪蛋白和0.05%吐温20。重组人SAA（Cell Sciences）和标记了钨螯合物的检测抗体VSA31（货号4VS4）经稀释液稀释后于微孔板37 °C 孵育1小时，稀释液包含有0.05%吐温20。

以上两组抗体配对对正常人以及不同来源炎症疾病患者血浆样本的测试情况请参见图2。健康个体血浆SAA浓度的中位数约为3µg/ml（n=18），该数值由两组抗体配对测试后得出。炎症性疾病患者的SAA浓度显著升高，其浓度值的中位数约为1000µg/ml（n=20），该数值与文献报道一致。

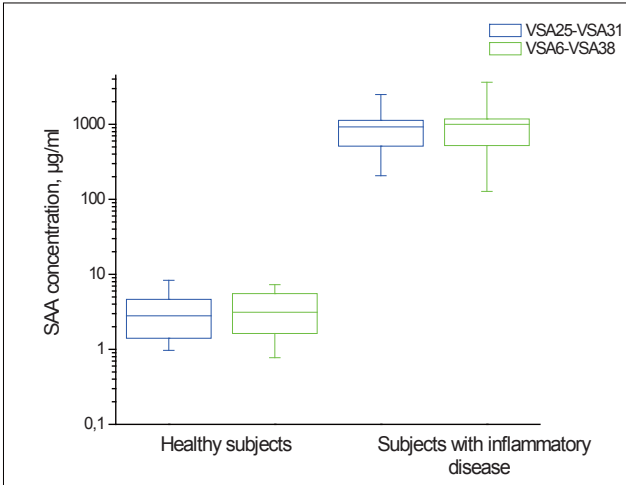


图2 抗体配对为VSA6-VSA38和VSA25-VSA31的免疫检测系统对健康个体 (n=18) 和炎症性疾病患者 (n=20) 的血浆SAA浓度测定情况。结果如盒须图所示。横线为中位数, 箱体范围表示25%和75%的百分位数。须状位置表示最大值和最小值。

目前认为, 由人血清纯化而得的同质化内源SAA并不适合作为免疫检测系统的标准品, 因为相比于血清中天然的SAA, 纯化的SAA被抗体的识别程度会有所不同 (18)。这两种不同形式的SAA在免疫活性上的差异, 可以理解为纯化过程导致SAA天然构象发生了改变。另一方面, 血清中绝大多数SAA均与HDL颗粒结合, 这一定程度地阻碍了抗体的识别。这也是目前SAA免疫检测系统选择富含含有SAA的急相HDL颗粒或者半纯化的SAA作为标准品的原因。

我们的测试结果显示, HyTest内部的免疫检测系统对于重组人SAA (Cell Sciences) 和SAA升高的病人血浆样本的稀释曲线是平行的 (详见图3)。因此, 在我们内部的免疫检测系统中, 我们使用了重组人SAA作为校准品。

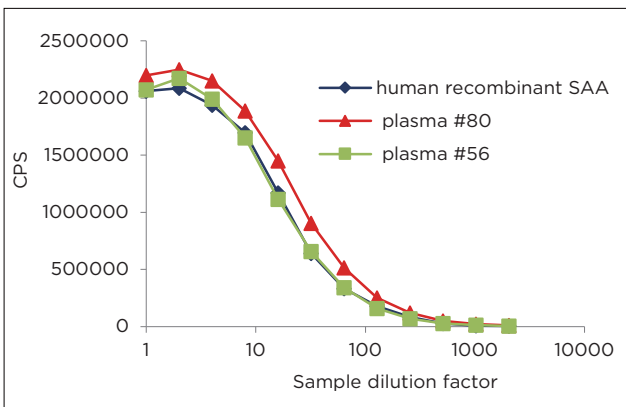


图3. 两例血浆样本和重组人SAA在抗体配对为VSA25-VSA31的免疫检测系统中的滴度曲线。血浆样本和重组人SAA均连续稀释两倍。源自于炎症性疾病病人的EDTA血浆先稀释400倍。人重组SAA (Cell Sciences) 的初始浓度为2.5µg/mL。

避免SAA与微孔板发生吸附

根据早期的文献报道, 人SAA会与微孔板表面的聚苯乙烯发生非特异吸附。在我们的评测过程中, 也遇到了类似情况。因此在开发板式SAA免疫检测系统时, 避免非特异性吸附非常重要。在封闭以及抗原稀释过程中, 要对工艺进行优化。

根据我们的实验数据, 对于SAA免疫检测系统而言, 酪蛋白是一种非常有效的封闭剂 (详见图4)。针对于我们推荐的抗体配对, 我们采用的封闭液中含有1%酪蛋白以及0.05%吐温20。

需要注意的是, 以上建议仅为HyTest内部评测的最优化条件。因此, 对于客户而言, 由于反应体系的差异, 其他的反应条件可能会带来更优的实验结果。

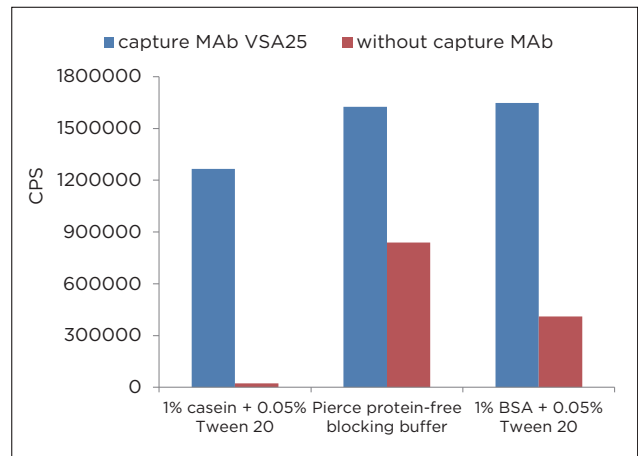


图4. 抗体配对为VSA25-VSA31的SAA免疫检测系统中, 三种不同的封闭剂对于非特异吸附的影响情况对比。

将Costar EIA/RIA微孔板一半包被捕获抗体VSA25 (货号4SA11), 另一半不包被任何抗体。微孔板分别用三种不同的封闭液进行封闭: (1) 1%酪蛋白 (Sigma-Aldrich, #C7078) 和0.05%吐温20, (2) Pierce无蛋白封闭液 (Thermo Scientific, #37572), (3) 1% BSA (Calbiochem, 无脂肪酸, #126575) 和0.05%吐温20。封闭条件为室温30分钟。将SAA浓度为2490µg/mL的EDTA血浆用含有0.05%吐温20的缓冲液稀释3200倍后, 添加于包被了捕获抗体以及未包被抗体的微孔板中。同时将标记了辅酶合物的检测抗体VSA31 (货号4VSA) 添加于微孔板中, 37 °C 孵育1小时。

蛋白免疫印迹平台的SAA免疫检测

我们提供的所有单抗均可以在蛋白免疫印迹 (WB) 平台中识别重组及内源性SAA。其中, 单抗SAA11的反应条带的亮度要高于其他单抗。单抗SAA1, SAA11和SAA15在WB平台中对炎症性疾病患者血浆中内源性SAA的检测情况如图5所示。

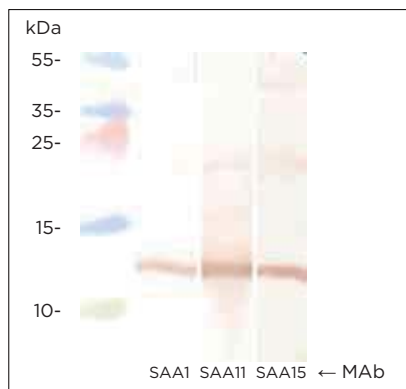


图5. 内源性SAA的免疫染色。
使用单抗SAA1, SAA11和SAA15 (货号4SA11) 在WB平台中对炎症性疾病患者的血浆SAA进行分析 (SAA浓度为2490µg/mL)。使用还原性SDS-PAGE电泳对血浆中的蛋白进行分离, 然后转移至硝酸纤维素膜上。在封闭之后, 在不同抗体的作用下, 膜上会呈现出条带。标准蛋白的分子量在图左方用KDa所示。

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	克隆	亚型	备注
人SAA	4SA11	VSA6	IgG1	EIA, WB
		VSA25	IgG1	EIA, WB
		SAA1	IgG1	EIA, WB
		SAA6	IgG1	EIA, WB
		SAA15	IgG1	EIA, WB
动物SAA	4VS4	VSA31	IgG2a	EIA, WB
		VSA38	IgG2a	EIA, WB
		SAA11	IgG2b	EIA, WB

参考文献

- Uhlir CM and Whitehead AS. Eur. J. Biochem. 1999, 265:501-523.
- Yamada T. Clin Chem Lab Med. 1999, 37(4):381-388.
- Malle E and De Beer FC. Eur J Clin Invest.1996, 26(6):427-435.
- Lu J et al. PNAS 2014,111(14):5189-5194.
- Malle E et al. Scand J Immunol. 1998, 48(5):557-561.
- Patke S et al. PLoS One. 2013, 8(6):e64974.
- Kisilevsky R and Manley PN. Amyloid. 2012, 19(1):5-14.
- Ye RD and Sun L. J. Leukoc. Biol. 2015, Epub ahead of print
- Kim MH et al. Cytokine. 2013, 61(2):506-512
- Targońska-Stepniak B and Majdan M. Mediators Inflamm. 2014, 2014:793628.
- Chambers RE et al. Ann. Rheum. Dis. 1983, 42(6):665-667.
- Maury CP et al. Clin. Sci. (Lond.). 1983, 65(5):547-550.
- Hartmann A et al. Nephrol Dial Transplant. 1997, 12(1):161-166.
- Casli MT et al. Ann. Clin. Biochem. 1995, 32 (2):196-200.
- Nakayama T et al. Clin. Chem. 1993, 39(2):293-297.
- Katayama T et al. Circ. J. 2005, 69(10):1186-1191.
- Casli MT et al. Ann. Clin. Biochem. 1993, 30(3):272-277.
- Godenir N et al. J. Immunol. Methods. 1985, 83: 217-225.
- McDonald TL et al. J. Immunol. Methods. 1991, 144(2):149-155.
- Marhaug G. A. Scand. J. Immunol. 1983, 18: 329-338.
- Casli MT and Grubb A. Ann. Clin. Biochem. 1993, 30: 278-286.