



脂联素



脂 联素是脂肪因子家族的一员，是一种在人体内含量丰富的蛋白类激素。脂联素主要由脂肪细胞表达，是脂类和糖类代谢重要的调控因子。脂联素是一种胰岛素敏感性激素，具有抗糖尿病、抗

炎症和抗动脉粥样硬化等特性（1）。研究显示，血液中一定量的脂联素可以降低二型糖尿病、冠状动脉疾病和胰岛素抵抗的发病风险（2-6）。

人脂联素由244个氨基酸残基组成，并含有一个明显的域结构：由胶原样和球状C1q样结构域组成。三个脂联素分子的胶原样区域可以形成一种非常类似于胶原蛋白的三重螺旋结构（7）。而C1q样区域则会形成脂联素多聚体的头部（图1），该区域与补体C1q的结构非常类似。

在血液循环中，脂联素以三聚体（低分子量形式，LMW）、六聚体（中等分子量形式，MMW）和多聚体（高分子量形式，HMW）三种形式存在。高分子量形式脂联素可能由若干LMW和MMW脂联素形成，但是具体的结

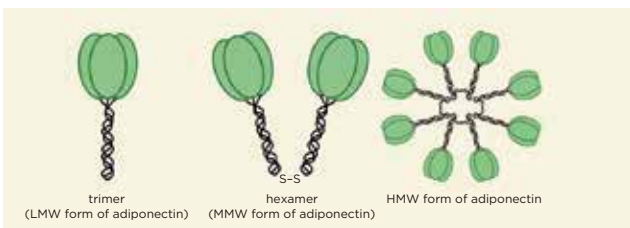


图1. 脂联素多聚体形式示意图



临床应用

✓ 二型糖尿病

构仍然没有被研究透彻。目前研究已经证实，不同低聚物形式的脂联素均以相互分离的形式存在血液当中，且不会相互转换（8）。脂联素可以与钙离子结合，这可能与维持脂联素构象稳定有关（9）。

血液中总脂联素的浓度约为3-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而与脂联素结构最接近的补体C1q的浓度则为80-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此，抗脂联素抗体与人类补体C1q无交叉反应是非常重要的（10）。研究显示，成人脂联素水平存在显著的性别差异。这种差异可用于解释不同研究者对于脂联素研究的结果差异。目前，已经证实HMW脂联素或者HMW脂联素与总脂联素的比值与胰岛素抵抗和代谢综合征的相关性价值均要优于总脂联素浓度（11-12）。

用于脂联素可靠检测平台开发的试剂

HyTest提供若干抗人脂联素单克隆抗体和天然抗原，可用于脂联素特异性夹心免疫检测系统的开发。

人脂联素特异性单克隆抗体

杂交瘤细胞由Sp2/O骨髓瘤细胞和用重组人脂联素或天然人脂联素免疫后的Balb/c小鼠的脾细胞融合而产生。

所有的抗体都在直接ELISA中测试了与C1q的交叉反应，而C1q是血液中含有最丰富的类似于脂联素的物质。筛选的单抗都不与C1q发生交叉反应。

夹心免疫检测系统

所有单抗均用天然脂联素通过夹心免疫系统作为捕获抗体或检测抗体进行了验证。最终优选出7对特异性识别不同低聚物脂联素的灵敏配对：

- Adn20 - Adn23
- Adn36 - Adn27
- Adn94 - Adn63
- Adn279 - Adn94
- Adn214 - Adn27
- Adn222 - Adn94
- Adn305 - Adn279

配对Adn279-Adn94检测纯化天然脂联素抗原的校准曲线如图2所示。

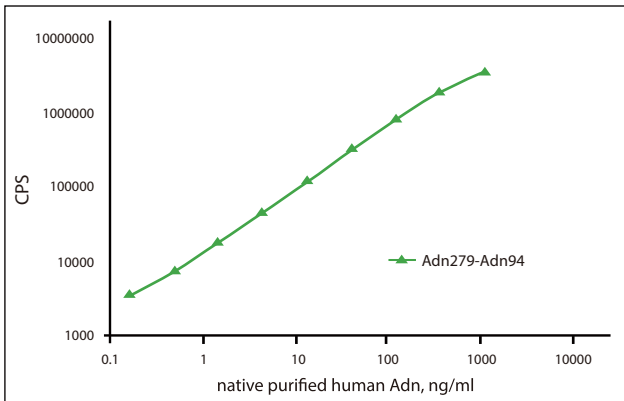


图2. 脂联素夹心免疫检测系统的校准曲线
单抗Adn279为包被抗体（1 μg/孔），单抗Adn94为检测抗体（0.2 μg/孔）并标有稳定铈整合物标记。人血浆中提纯的天然脂联素作为校准品。

所有的检测系统都经系列稀释的正常人血清测试，以检测单抗与天然脂联素在复杂环境中的相互作用。所有的系统都证实了信号随着血清稀释度增高而稳定降低。图3为检测系统Adn94-Adn63（捕获抗体-检测抗体）的代表性滴定曲线。

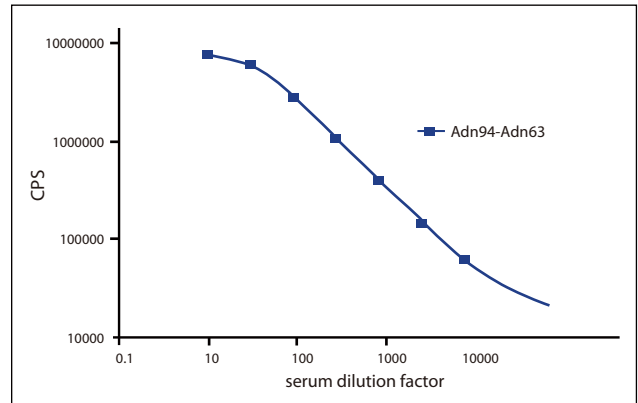


图3. 夹心荧光免疫检测系统的正常人血清滴定曲线
单抗Adn94为包被抗体（1 μg/孔），单抗Adn63用作检测抗体（0.2 μg/孔）。抗原采用了磷酸盐缓冲液（10 mM 磷酸钾，pH 7.4，150 mM 氯化钠，0.1% Tween-20）系列稀释的正常人血清。

检测系统Adn36-Adn27和Adn20-Adn23在血清与柠檬酸钠血浆中与脂联素反应不同（图4）。其他单抗的双位点组合（Adn94-Adn63、Adn279-Adn94、Adn214-Adn27、Adn222-Adn94、Adn305-Adn279）在血清和血浆中与抗原反应相同。

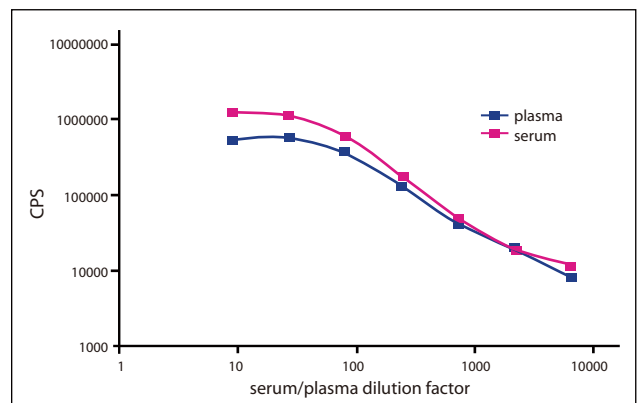


图4. 单抗Adn36-Adn27检测系统的正常人血清或柠檬酸钠血浆的滴定曲线
抗原采用了磷酸盐缓冲液（10 mM 磷酸钾，pH 7.4，150mM 氯化钠，0.1% Tween-20）系列稀释的正常人混合血清或柠檬酸钠血浆。

检测系统Adn20-Adn23和Adn36-Adn27对于血清中脂联素的识别受钙离子影响(图5)。用EGTA螯合作用去除钙离子导致脂联素的结构重组,引起其中一个抗体与抗原的反应性改变。其他检测系统对抗原的识别没有显示出钙离子依赖性,与脂联素在血清和柠檬酸钠血浆中的反应相同。

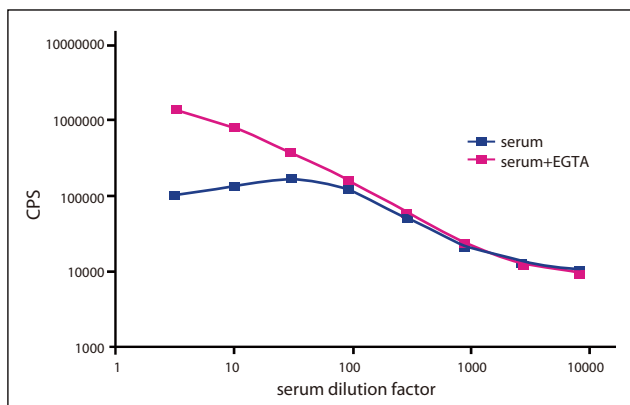


图5. Adn20-Adn23检测系统的血清滴定曲线
正常人混合血清被有/无EGTA磷酸盐缓冲液(10mM 磷酸钾, pH 7.4, 150mM 氯化钠, 0.1% Tween-20, 10 mM EGTA)系列稀释。

蛋白免疫印迹

所有单抗在免疫印记分析中识别脂联素的能力都经过了测定。只有5种被测试的抗体—单抗Adn20、Adn23、Adn63、Adn214和Adn222在还原性SDSPAGE电泳后能够识别转移到硝酸纤维素膜上的脂联素(图6)。

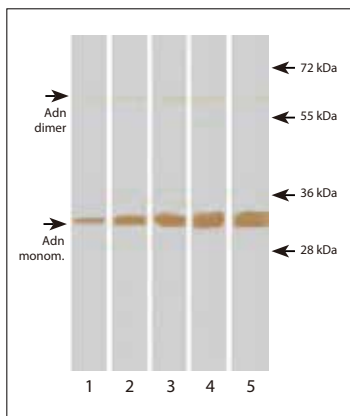


图6. 还原性SDS凝胶电泳后使用抗脂联素单抗免疫印记检测天然脂联素
每个泳道加入40ng纯化天然脂联素。抗原被转移到硝酸纤维素膜上后,与5µg/ml不同的抗脂联素单抗反应。反应液使用了含有5%奶粉和0.1% Tween-20的磷酸盐缓冲液。

泳道1 - Adn20
泳道2 - Adn23
泳道3 - Adn63
泳道4 - Adn214
泳道5 - Adn222
箭头所示为分子量标记。

总脂联素、高分子量脂联素或低分子量脂联素的检测系统

为确定我公司检测系统识别不同低聚物的特异性,在血清蛋白根据分子量通过凝胶排阻层析分离后,我们对各分组的免疫活性进行了测定。Adn20-Adn23检测系统可以检测两种形式的脂联素:高分子量脂联素为主以及小部分分子量脂联素(图7A)。Adn94-Adn63检测系统可以检测脂联素的所有三种形式—总脂联素(图7B), Adn214-Adn27检测系统主要识别低分子量脂联素(图7C)。

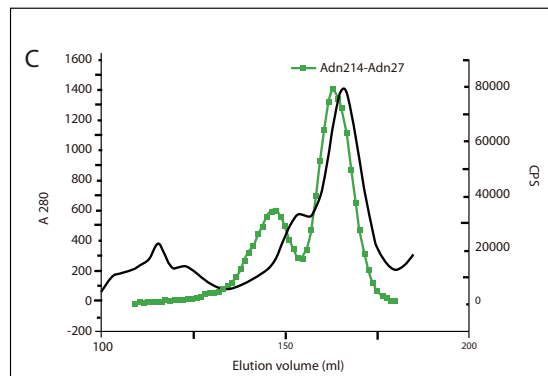
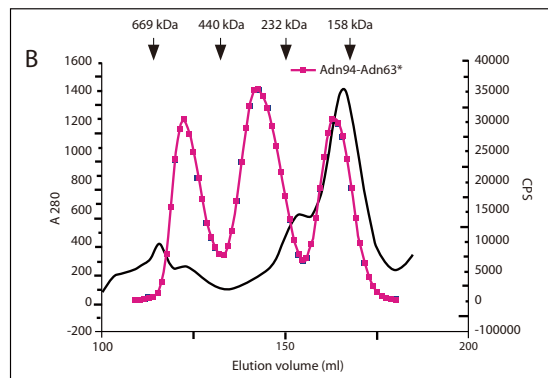
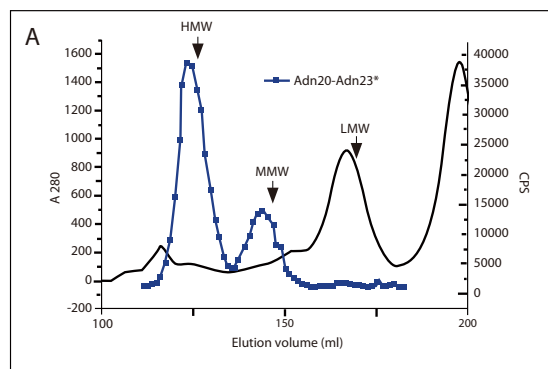


图7. 用凝胶排阻层析分离的各组分蛋白的免疫活性,免疫活性用夹心ELISA检测。
Adn20-Adn23 (A)、Adn94-Adn63 (B)、Adn214-Adn27 (C) 1ml正常人血清被加入到层析柱中。脂联素各形式的位置和分子量标记如图中所示。黑线为用280 nm测得的光密度。

脂联素天然纯化抗原

经人血浆提纯的天然脂联素抗原是免疫检测系统校准品的最佳选择。天然脂联素从正常人血浆中通过多种层析方法提纯后，纯度约为95%。

天然脂联素抗原在经过冻干及去离子水复溶后可恢复其所有的免疫活性（图8）。

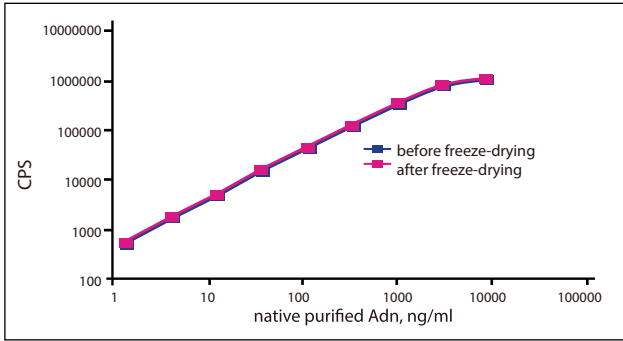


图8. 冻干不影响天然纯化脂联素的免疫活性，免疫活性通过Adn94-Adn63免疫检测系统测定

纯化的天然脂联素抗原包含所有三种形式的脂联素（图9），因此可以用作总脂联素、高分子量脂联素或低分子量脂联素检测系统的校准品。

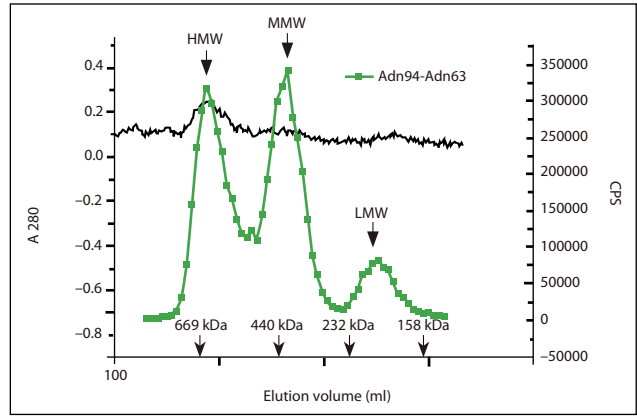


图9. 天然纯化脂联素含有所有多聚体形式
3μg脂联素被加入到凝胶过滤层析柱中，各组分的免疫活性通过我公司Adn94-Adn63检测系统测定。箭头所示为分子量标记，黑色曲线代表在280 nm测得的光学密度。

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	克隆	亚型	备注
脂联素，人	2AN6	Adn20	IgG2a	WB
		Adn23	IgG2a	WB
		Adn27	IgG2a	EIA
		Adn36	IgG2a	EIA
		Adn63	IgG1	EIA, WB
		Adn94	IgG1	EIA
		Adn214	IgG1	EIA, WB
		Adn222	IgG1	EIA, WB
		Adn279	IgG1	EIA
		Adn305	IgG1	EIA

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
脂联素，人	8AN7	>95%	混合人血浆