



Searching for a BNP standard: Glycosylated proBNP as a common calibrator enables improved comparability of commercial BNP immunoassays

Alexander G. Semenov^{a,*}, Natalia N. Tamm^a, Fred S. Apple^{b,c}, Karen M. Schulz^b, Sara A. Love^b, Ranka Ler^b, Evgeniya E. Feygina^d, Alexey G. Katrukha^{a,d}

^a HyTest Ltd., Turku, Finland

^b Department of Laboratory Medicine and Pathology, Hennepin County Medical Center and University of Minnesota, Minneapolis, MN, United States

^c Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota, Minneapolis, MN, United States

^d School of Biology, Department of Biochemistry, Moscow State University, Moscow, Russia

译：王楠 校对：奚苏静

BNP标准化的探索：糖基化proBNP作为通用校准品可改善不同商品化试剂间的可比性

1.简介

外周循环中B型脑钠肽（BNP）的检测已经被广泛用于心脏功能评估、心衰诊断以及心衰治疗监测领域。目前市场上已经有多种商业化检测试剂盒可供使用，但是不同试剂之间的检测结果却存在着较大差异。由于试剂之间的可比性较差，而BNP检测又使用的是统一的cut-off值，当患者同时采取两种以上试剂检测时往往会导致结果分析复杂化。导致该差异的主要原因之一是缺乏通用的校准品，目前关于使用何种形式的BNP作为校准品仍然没有一致看法，不同试剂所使用的校准品也各不相同。因此，使用合适的通用校准品是改善不同试剂之间差异的方向之一。

在外周循环中，除BNP活性分子外，还存在未降解的糖基化proBNP，该分子被认为是BNP主要的免疫活性形式。因此，该形式的BNP可能会成为最潜力的通用校准品。在本篇研究中，研究人员使用了不同形式的BNP分子对不同的BNP试剂进行校准比对，通过了一系列系统性分析对proBNP作为通用校准品进行了考察验证。

2.实验材料与方法：

2.1样本：

20例急性心衰和20例慢性心衰患者EDTA血浆。

2.2校准品：

6组，每组5个浓度；6组校准品所使用的抗原分别为：合成BNP（Bachem）、重组BNP（大肠杆菌，Raybiotech）、重组非糖基化proBNP（大肠杆菌，HyTest）、His标签重组非糖基化proBNP（大肠杆菌，Raybiotech）、重组糖基化proBNP（HEK细胞，HyTest）和重组糖基化proBNP（CHO细胞）；稀释基质为无BNP/proBNP/NT-proBNP的EDTA血浆（HyTest）。

2.3样本采集：

使用EDTA采血管进行采血，离心之后立即转入含有苯甲脒（SIGMA，抑制剂终浓度为10mmol/L）和4-2-胺乙基苯磺酰氟酸盐（SIGMA，抑制剂终浓度为5mmol/L）的储存管中。

2.4重组proBNP的去糖基化：

去糖基化酶混合物与重组糖基化proBNP抗原于磷酸缓冲液 (pH=5.0) 37摄氏度下反应16小时, 通过SDS-PAGE缓冲液终止并于WB中分析; WB中所使用的检测抗体为15F11 (抗NT-proBNP抗体, 位点13-20, HyTest)。

2.5SDS-PAGE电泳和WB:

SDS-PAGE电泳的分离胶为16.5%, 浓缩胶为3%, 上样量为1.5ug/泳道。WB中所使用的检测抗体为15F11 (抗NT-proBNP抗体, 位点13-20, HyTest), 显色剂为DAB。

2.6BNP检测:

使用5种商业化试剂盒对校准品和样本进行一轮内两次的重复测定。试剂盒分别为: Alere Triage、Siemens Centaur XP、Abbott I-STAT、Beckman Access2 和ET Healthcare Pylon BNP。

2.7BNP浓度的外部校准:

BNP样本的初始浓度由制造商的内部校准品所测得。后续使用外部校准品生成新的校准曲线对试剂进行再校准。

2.8数据分析:

Passing-Bablok回归分析; 相关系数R²计算; 试剂间不精密度计算。

*详细信息请参见原文

3.结果分析:

目前不同BNP检测试剂之间普遍缺乏标准化, 不同试剂使用的抗体配对和校准品均不同, 详细信息如表1所示。通过使用5种不同试剂对40例心衰患者样本进行测定发现 (试剂由制造商内部校准品校准), 不同试剂之间的测试结果差异可高达3.6倍 (平均1.9倍, 0.9-3.6)。如表2所示, 通过对不同试剂测试结果的Passing-Bablok回归分析发现, 除HEK表达的糖基化proBNP (后简称HEK proBNP) 作为外部校准品外, 其余外部校准品校准后的试剂之间的线性回归方程均不理想。但是通过R²结果来看, 所有试剂在所有校准品校准后的结果之间的相关性依然很好。当HEK proBNP作为外部校准品时, 不同试剂之间的差异被显著降低, 线性斜率接近0.9-1.0。同时还发现, 使用HEK proBNP作为校准品可以使试剂间的不精密度CV降低约一倍 (表3)。

Table 1
Characteristics of antibodies and standard materials of BNP immunoassays used in the study [6,23,27].

Immunoassay/ Instrument	Epitope recognized by capture antibody	Epitope recognized by detection antibody	Standard material
Alere Triage	5-13	Omniconal (epitope not characterized)	Recombinant BNP
Siemens Centaur XP	27-32	14-21	Synthetic BNP
Abbott I-STAT	5-13	26-32	Synthetic BNP
Beckman Access2	Omniconal (epitope not characterized)	5-13	Recombinant BNP
ET Healthcare Pylon	11-17	Recognizes the immune complex of capture antibody with BNP/proBNP	Glycosylated proBNP

Table 2
Agreement between BNP concentrations measured by different BNP assays with different calibrators.
The equations obtained with Passing-Bablok regression analysis ($y = ax + b$) and coefficient of determination (R^2) for every calibrator used to recalculate the BNP values in patients' plasma samples are presented in table cells for every pair of assays.

Calibrator							
Assays combination	Internal calibrator	Synthetic BNP	Recombinant BNP	Recombinant proBNP nonglyc	Recombinant proBNP nonglyc His-tagged	Recombinant proBNP glyc (CHO cells)	Recombinant proBNP glyc (HEK cells)
Alere Triage/Abbot I-STAT	0.53x + 4.36 R ² = 0.99	0.78x - 5.23 R ² = 0.99	0.81x - 1.89 R ² = 0.99	1.21x - 5.19 R ² = 0.99	1.67x + 24.19 R ² = 0.99	0.44x - 2.47 R ² = 0.99	0.97x - 15.84 R ² = 0.99
Beckman Access2/Abbot I-STAT	0.69x + 3.33 R ² = 0.98	0.57x - 1.09 R ² = 0.98	0.56x + 5.16 R ² = 0.98	0.62x - 4.84 R ² = 0.98	0.73x - 17.06 R ² = 0.97	0.44x - 3.40 R ² = 0.98	0.87x - 3.03 R ² = 0.98
Beckman Access2/Alere Triage	1.35x - 22.0 R ² = 0.98	0.76x - 6.31 R ² = 0.98	0.71x + 2.90 R ² = 0.99	0.54x - 22.53 R ² = 0.98	0.45x - 64.64 R ² = 0.98	0.27x - 31.93 R ² = 0.98	0.92x - 3.58 R ² = 0.99
Beckman Access2/Siemens Centaur XP	1.29x - 3.41 R ² = 1.00	1.07x - 4.29 R ² = 1.00	0.94x + 0.41 R ² = 1.00	1.10x - 2.85 R ² = 1.00	1.37x - 6.82 R ² = 1.00	0.84x + 6.89 R ² = 1.00	0.83x - 16.43 R ² = 0.99
ET Healthcare Pylon/Abbot I-STAT	0.93x + 9.33 R ² = 0.96	0.77x + 9.90 R ² = 0.95	0.99x - 2.66 R ² = 0.96	1.10x - 19.14 R ² = 0.98	1.16x - 61.91 R ² = 0.96	0.49x - 11.84 R ² = 0.96	1.04x - 7.53 R ² = 0.96
ET Healthcare Pylon/Alere Triage	1.69x - 15.24 R ² = 0.94	0.96x + 11.02 R ² = 0.92	1.20x - 0.78 R ² = 0.93	0.88x - 19.60 R ² = 0.94	0.66x - 84.12 R ² = 0.94	0.28x - 18.39 R ² = 0.93	1.04x + 8.20 R ² = 0.93
ET Healthcare Pylon/Beckman Access2	1.29x - 8.7 R ² = 0.93	1.23x + 12.37 R ² = 0.92	1.72x - 11.09 R ² = 0.94	1.69x - 5.32 R ² = 0.98	1.58x - 32.06 R ² = 0.93	0.63x + 0.54 R ² = 0.93	1.14x - 1.75 R ² = 0.93
ET Healthcare Pylon/Siemens Centaur XP	1.65x - 19.09 R ² = 0.94	1.37x + 7.19 R ² = 0.93	1.57x - 11.41 R ² = 0.94	1.86x - 17.95 R ² = 0.93	2.12x - 44.51 R ² = 0.93	0.88x - 5.04 R ² = 0.93	0.97x - 24.38 R ² = 0.94
Siemens Centaur XP/Abbot I-STAT	0.56x + 1.82 R ² = 0.99	0.56x + 1.07 R ² = 0.99	0.63x + 3.44 R ² = 0.99	0.58x - 4.65 R ² = 0.99	0.54x - 14.16 R ² = 0.98	0.85x - 9.92 R ² = 0.99	1.07x + 11.24 R ² = 0.99
Siemens Centaur XP/Alere Triage	1.06x - 11.11 R ² = 0.99	0.72x + 1.41 R ² = 0.99	0.78x + 1.88 R ² = 0.99	0.50x - 10.35 R ² = 0.99	0.34x - 39.18 R ² = 0.98	0.53x - 41.10 R ² = 0.99	1.09x + 19.76 R ² = 0.99

Table 3
Equivalence of 5 commercial BNP assays (Alere Triage, Siemens Centaur XP, Abbott I-STAT, Beckman Access2 and ET Healthcare Pylon BNP) calculated as the mean between-assay CV (%) for internal calibrators and 6 external calibrators.

Calibrator	Mean between-assay CV (%) (SD)
Internal calibrators	28.9 (4.8)
Synthetic BNP	27.4 (4.3)
Recombinant BNP	24.5 (4.4)
Nonglycosylated proBNP	33.1 (5.9)
His-tagged nonglycosylated proBNP	47.2 (11.1)
Glycosylated proBNP (CHO)	36.2 (5.9)
Glycosylated proBNP (HEK)	14.8 (6.5)

如图2所示，通过对CHO和HEK表达的糖基化proBNP进行SDS-PAGE电泳发现，HEK所表达的proBNP的迁移性要低于CHO表达的proBNP。但通过去糖基化处理后，两种蛋白的迁移性差异被显著缩小。说明HEK proBNP的O-糖基化程度要高于CHO proBNP。

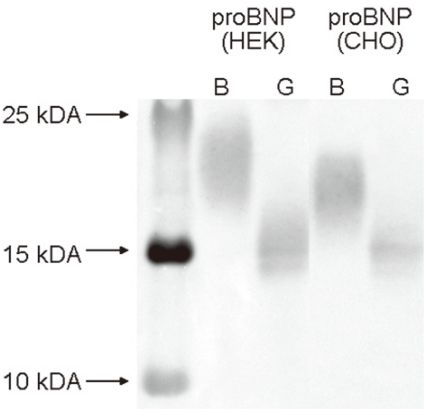


Fig. 2. Western blot analysis of purified proBNP expressed in HEK and CHO cells. Samples of recombinant proBNPs (1.5 µg/lane) were treated with either a deglycosylation cocktail (G) or buffer alone (B) for 16 h. Immunostaining was performed with anti-NT-proBNP antibodies 15F11 (epitope 13–20).

通过图1发现，5种不同的试剂对于BNP、非糖基化proBNP和糖基化proBNP并非等克识别。

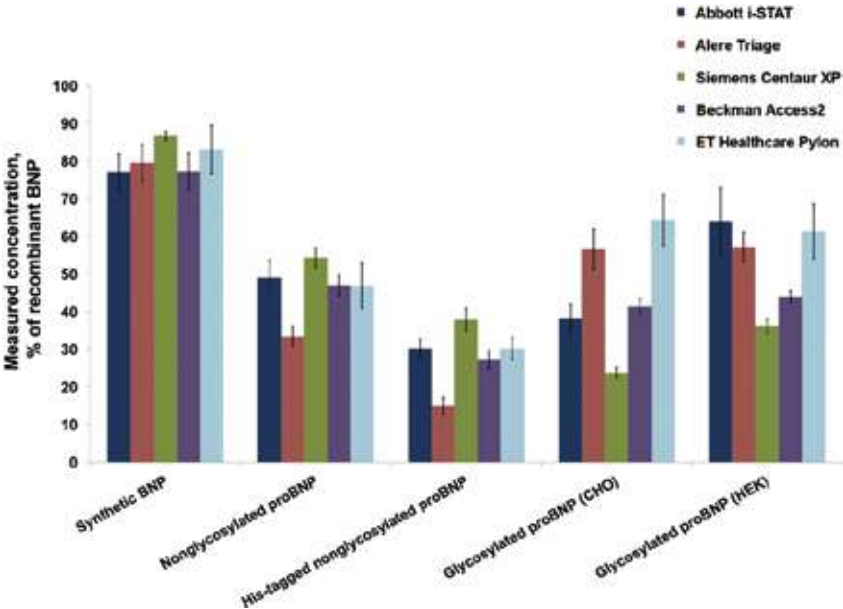


Fig. 1. Relative measured concentrations of human synthetic BNP, recombinant nonglycosylated proBNP, recombinant His-tagged nonglycosylated proBNP, recombinant glycosylated proBNP (HEK cells) and recombinant glycosylated proBNP (CHO cells) measured with Alere Triage, Siemens Centaur XP, Abbott I-STAT, Beckman Access2 and ET Healthcare Pylon BNP assays. The data are expressed as percentage of measured concentration obtained for recombinant BNP. The ratios of values for 4 measurements (0.585, 0.195, 0.065, 0.022 nM for each calibrator) were averaged (\pm SD).

4. 启示与讨论：

目前市场上有多种不同方法学平台的BNP检测试剂，但是由于缺乏通用标准品和标准参考测量程序，不同试剂之间的结果可比性较差。尽管FDA建议的急性心衰排除的参考值为100ng/L，但是考虑到试剂之间的差异，因此建议不同试剂应当建立自己的专属参考值或者使用通用校准品对所有BNP试剂进行重新校准。

导致BNP试剂之间差异的主要原因可以概括为a. 不同试剂所使用的抗体的识别位点不同以及b. 缺乏通用的标准品。除ET Healthcares使用单抗原决定簇夹心系统——SES-BNP，该系统的捕获抗体识别环状结构11-17位点，检测抗体仅识别捕获抗体和BNP/proBNP所形成的免疫复合物，其他试剂均使用了双抗体夹心的方法，其中一株抗体的识别位点位于环状结构上，另一株抗体的识别位点则位于N端或者C端。抗体的特异性作为试剂的内在特性，并不会被外在因素所影响。但是可以推断，若使用通用的校准品可能会使试剂之间的差异得到改善。

外周循环中proBNP相关多肽存在高度的异质性，加上不同试剂所使用的BNP抗体的特异性不同，一定程度上解释了检测结果的差异，也说明寻找一种与内源性BNP完全一致的通用校准品并不现实。然而，糖基化proBNP广泛存在于外周循环中，并且是BNP主要的免疫活性形式，这使

得糖基化proBNP作为通用且稳定的标准品成为了可能。

在本研究中，通过对6种候选的校准品对不同试剂进行再校准并进行相关性比对后，我们发现通过HEK proBNP校准品进行再校准后，试剂间差异显著降低。另外，通过对比不同糖基化proBNP（HEK proBNP和CHO proBNP）以及非糖基化proBNP的结果来看，尽管理论上三者的BNP部分结构一致，但是结果却差异很大，这说明糖基化程度对于检测结果具有重要影响，可能的原因是糖基所造成的空间位阻影响了抗体对于proBNP的识别。

作为校准品，另一更重要的特性是稳定性。众所周知，BNP在体外稳定性不好，proBNP相比BNP在稳定性方面有显著提升。根据之前的研究显示，HEK proBNP在-70条件下保存1年半，依然可以保持良好的活性。

除此之外，该研究中也存在一些不足之处，比如HEK proBNP的批间差有待进一步验证，因为基于本研究的结果，糖基化是减少试剂之间差异的关键，因此对于不同批次之间糖基化程度的差异控制至关重要；不能排除HEK proBNP对于改善试剂间差异的原因可能并非糖基化，而是蛋白制备过程中的其他物质，不过糖基化对于抗体识别的影响已经在之前的研究中得到了确认。