



技术报告

临床和研究领域

兽医



心肌标志物



犬NT-proBNP — 犬心力衰竭最有希望的标志物



过去十年中，NT-proBNP 的检测已用于兽医实践领域。患有二尖瓣疾病和扩张型心肌病的狗，其 NT-proBNP 的水平会升高。最高浓度的 NT-proBNP 常见于发生充血性心力衰竭的狗。NT-proBNP 的检测

有助于将充血性心力衰竭与原发性呼吸道疾病区分开来，这是犬呼吸症状的潜在原因 (1)。血液中的 NT-proBNP 浓度与疾病的严重程度相关，并反映了后续并发症的风险。越来越多的研究表明，NT-proBNP 可成功用于犬心脏病的诊断，评估犬心脏病的严重程度和犬心脏病的预后 (综述见 2)。

犬 NT-proBNP 检测的主要挑战之一是血液样本中分析物的不稳定性。样品储存和运输过程中 NT-proBNP 的降解会导致样品中检测的 NT-proBNP 浓度下降。

分析物的表观稳定性取决于免疫检测中使用的抗体特异性，并且可以通过使用分子稳定部分的特异性抗体来改善。通过选择对 NT-proBNP 降解不太敏感的抗体，可能可以降低对样品处理和储存方面严格和复杂的规定。这种试剂将大大提高犬 NT-proBNP 检测的临床应用。

HyTest提供单克隆抗体和校准品

我们提供校准品和各种单克隆抗体推荐配对，用于开发特异性识别犬 NT-proBNP 的免疫检测试剂。这些工具有助于开发高特异性的免疫检测分析，用于检测血液中大犬 NT-proBNP 的浓度。根据我们的初步研究，使用我们最佳的单克隆抗体推荐配对制备的原型试剂，观察到血浆样品可以在 +4°C 下储存至少 72 小时，或在 +20°C 下储存 24 小时，分析物中 NT-proBNP 的免疫反应性几乎没有损失。

NT-proBNP和BNP是人心力衰竭公认的生物标志物

B型利钠肽 (BNP) 是一种心脏激素，参与维持血压、水和电解质平衡。它降低血管阻力并增加利尿和钠的排泄，从而降低全身血压。BNP作为激素原合成，其前体分子特异性裂解形成BNP和NT-proBNP。BNP和NT-proBNP以等摩尔量分泌到血液中。更多信息可以在Goetze (2012) 和Potter (2011) (3-4) 的文章中找到。

犬 NT-proBNP 单克隆抗体

HyTest 提供多种单克隆抗体，这些抗体特异性识别犬 NT-proBNP 的不同区域（图 1）。所有的抗体均能识别重组和来自犬血浆的天然 NT-proBNP。

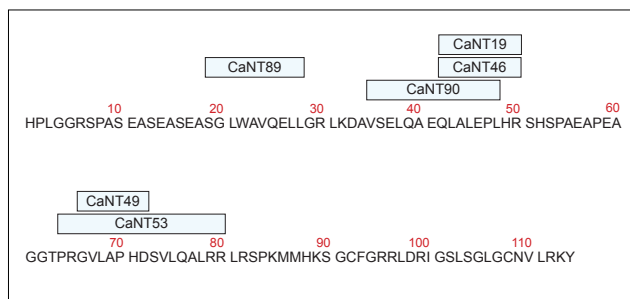


图1. 犬NT-proBNP单克隆抗体位点图

犬 NT-proBNP 定量免疫检测试剂

针对犬 NT-proBNP，我们开发了超过 60 种单克隆抗体。所有抗体分别作为捕获抗体和检测抗体，在夹心免疫检测中进行测试，以确定最佳抗体配对。捕获抗体包被 96 孔板上，而检测抗体以钨螯合物标记。重组犬 NT-proBNP（货号 #8CNT9）和来自狗血浆的天然犬 NT-proBNP 作为评估抗体配对的抗原。多组配对在检测重组和天然 NT-proBNP 的结果中表现出高灵敏度。最优的单克隆抗体配对见表 1。

表1. 最敏感的抗体配对

捕获抗体	检测抗体
CaNT90	CaNT89
CaNT19	CaNT89
CaNT90	CaNT53

这些免疫检测分析测定重组 NT-proBNP 的灵敏度为 25 pg/ml¹。推荐配对的校准曲线如图 2 所示。

¹ NT-proBNP浓度换算：1pmol/L = 1÷10.545 pg/ml

请注意，免疫分析检测的性能取决于多种因素。包括检测平台、与检测抗体结合的标记类型和标记工艺。因此，具有非重叠表位的 NT-proBNP 抗体的其他配对在我们客户的免疫测定平台中体现更优的性能。

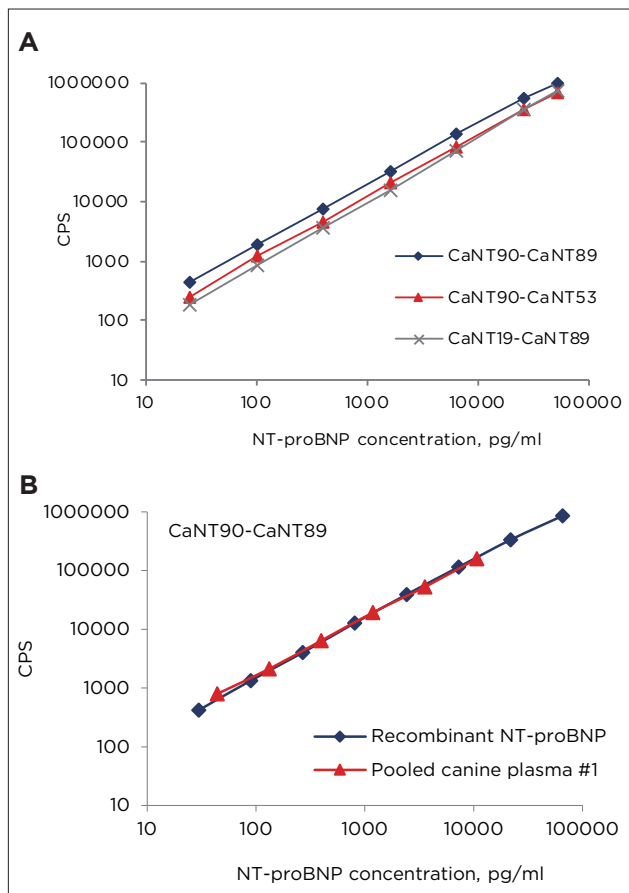


图2. NT-proBNP免疫检测校准曲线

（A）最优配对检测的校准曲线

（B）校准曲线和犬血浆样本稀释度比对

试剂类型：两步法夹心免疫荧光检测，链霉亲和素包被微孔板

捕获抗体：200ng/孔，偶联生物素

捕获抗体：200ng/孔，标记钨螯合物

抗原：犬重组NT-proBNP（Cat.# 8CNT9）

样本体积：50μl

孵育时间：室温40分钟

健康犬和心脏病犬血浆中NT-proBNP的定量检测

选定的抗体配对检测健康狗和患有心脏病的狗的血浆样本。在本次研究中的所有免疫检测中，患有心脏病狗的 NT-proBNP 浓度显著高于对照组。对于高浓度的 NT-proBNP，也不需要稀释步骤，结果显示检测试剂具有较宽的检测范围。图 3 显示抗体配对 CaNT90-CaNT89 检测单个血浆样本的 NT-proBNP 结果。

我们的结果表明，使用选定的抗体配对可用于狗血浆中 NT-proBNP 的定量测定。

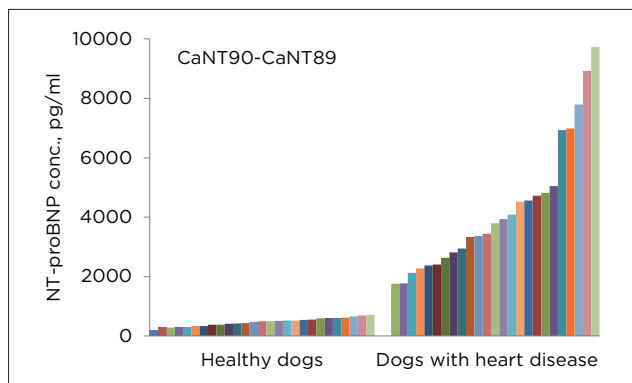


图3. 健康狗和患有心脏病的狗的EDTA血浆样本NT-proBNP浓度

试剂类型：两步法夹心免疫荧光检测，链霉亲和素包被微孔板

捕获抗体：CaNT90，1μg/孔

检测抗体：CaNT89，200ng/孔，标记钨螯合物

校准品：犬重组NT-proBNP (Cat.# 8CNT9)

样本体积：50μl

孵育时间：室温40分钟

提高血浆样品中内源性 NT-proBNP 的表观稳定性

可靠测量样品中 NT-proBNP 浓度的主要挑战之一是蛋白质随时间的降解 (5-7)。虽然合适的样品处理和储存对减少降解至关重要，但另一个重要因素是检测试剂中抗体的选择。当捕获和检测抗体中至少一种抗体的表位受损或位于蛋白酶切割位点，分析物的免疫反应性会降低。因此，分析物的表观稳定性可以通过使用特异性识别分子稳定部分的抗体来提高。在开发犬 NT-proBNP 检测试剂时，必须特别注意选择不受 NT-proBNP 蛋白水解降解影响的抗体。

我们测试了我们的抗体在样品储存期间检测内源性犬 NT-proBNP 的能力。患有心脏病的狗 EDTA 血浆在两种不同的温度下孵育。+4°C 下 NT-proBNP 可保持稳定至少 72 小时 (样品中可检测到 95-105% 的初始免疫反应性, 图 4A)。同时, 血浆在 +20°C 下孵育, 24 小时后在样品中可检测到 89-98% 的初始免疫反应性 (图 4B)。初步数据表明, 使用我们推荐的抗体配对, 血浆可以在 +4°C 下储存至少 72 小时, 而免疫反应性几乎没有损失。当在室温下储存时, 信号在最初的 24 小时内有着微弱的减弱。请注意, 单个血浆样品或血清样品中天然 NT-proBNP 的稳定性可能与此处显示的结果不同。

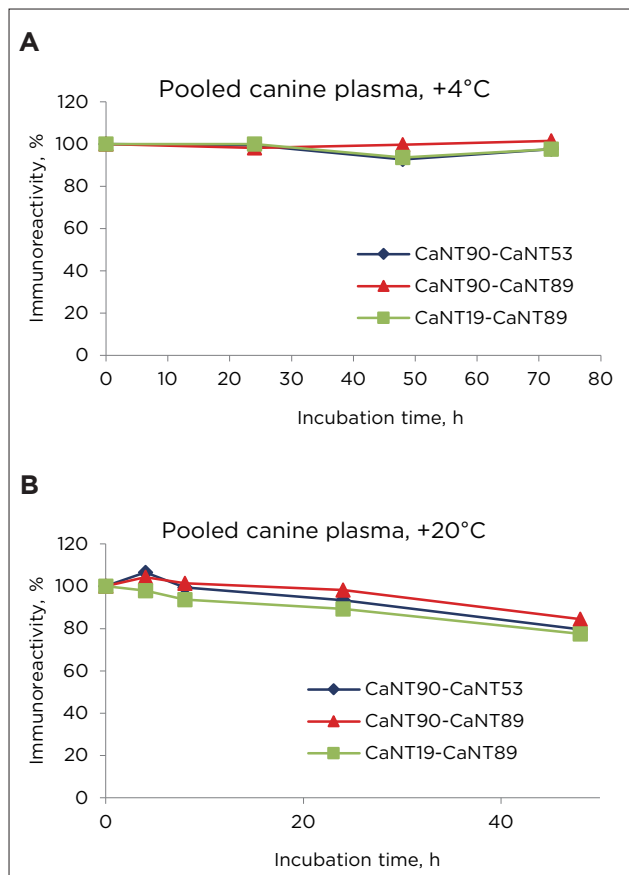


图4. EDTA血浆中内源性犬NT-proBNP的稳定性

(A) +4°C下孵育24、48和72小时血浆样品中NT-proBNP的免疫反应性。
(B) 在+20°C下孵育4、8、24和48小时血浆样品中NT-proBNP的免疫反应性。收集不含蛋白酶抑制剂的EDTA血浆; 样品在使用前离心、分离并保存于-70°C。EDTA血浆保存在+4°C或+20°C下, 加入0.1%的Na₃N以防止细菌生长。孵育后, 样品在测量前储存在-70°C。血浆中的NT-proBNP浓度为9 ng/ml (由 CaNT90-CaNT89 免疫测定确定)。使用CaNT90和CaNT19 作为捕获抗体, 分别使用CaNT53和CaNT89作为检测抗体的检测系统结果如图3中所述。

犬 NT-proBNP 免疫印迹分析

HyTest 抗体可用于 NT-proBNP 的免疫印迹分析。(图 5)

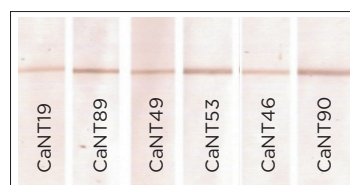


图5. 不同单克隆抗体在蛋白质印迹分析中检测犬重组NT-proBNP (Cat.#8CNT9)。在还原性tricine-SDS-PAGE中, 将NT-proBNP (0.1μg/泳道) 转移到硝酸纤维素膜上, 并通过HRP偶联的单克隆抗体进行直接检测。

大肠杆菌表达的犬重组NT-proBNP

我们的重组 NT-proBNP 含有 1-85 个氨基酸片段的犬 proBNP，N 末端包含一个额外的 16 个氨基酸的亲序列标签。使用亲和层析纯化蛋白质（图 6）。

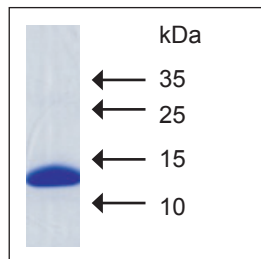


图6.还原条件下犬重组NT-proBNP (10μg)的Tricine-SDS-PAGE图谱。凝胶使用考马斯亮蓝R-250染色。

为了确认 N 端标签不会干扰抗体结合，使用夹心法免疫分析比较了含有和不含有标签的重组犬 NT-proBNP。使用了 9 个特异性针对 NT-proBNP 不同区域的抗体配对进行测试。结果表明，2 种重组蛋白的免疫化学活性高度相似。图 7 提供了代表配对的校准曲线。数据显示，N 端含有标签的重组 NT-proBNP 可作为犬 NT-proBNP 免疫检测的校准物质。

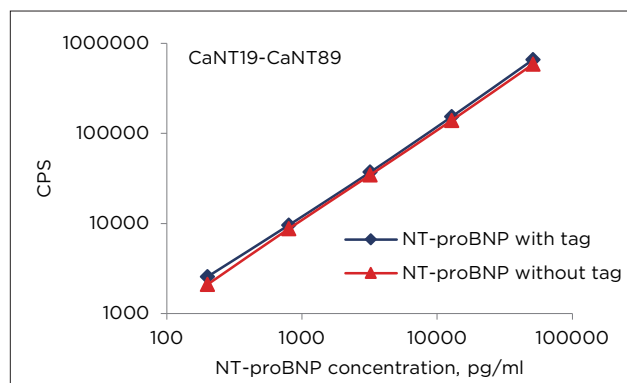


图7. 含有和不含有标签的重组犬NT-proBNP免疫化学活性比较

试剂类型：两步法夹心免疫荧光检测，链霉亲和素包被微孔板

捕获抗体：CaNT19，1μg/孔

捕获抗体：CaNT89，200ng/孔，标记链霉亲和素

校准品：含有标签的犬重组NT-proBNP (Cat.# 8CNT9) 和不含有标签的犬重组NT-proBNP

样本体积：50μl

孵育时间：室温40分钟

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	克隆号	亚型	备注
NT-proBNP, 犬	4CNT5	CaNT89	IgG1	EIA, a.a.r. 19-28
		CaNT90	IgG1	EIA, a.a.r. 35-48
		CaNT19	IgG1	EIA, a.a.r. 42-50
		CaNT46	IgG1	EIA, a.a.r. 42-50
		CaNT49	IgG1	EIA, a.a.r. 66-72
		CaNT53	IgG1	EIA, a.a.r. 64-80

这些产品和可能使用这些产品的某些应用可能在某些国家/地区受到专利保护。由于购买这些产品不包括执行任何专利申请的许可，因此这些产品的用户可能需要根据具体应用和产品使用国家获得专利许可。

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
NT-proBNP, 犬	8CNT9	>95%	重组

参考文献

1. Boswood A, Dukes-McEwan J, Loureiro J, James RA, Martin M, Stafford-Johnson M, Smith P, Little C, Attree S. The diagnostic accuracy of different natriuretic peptides in the investigation of canine cardiac disease. J Small Anim Pract. 2008, 49(1):26-32.
2. Oyama MA, Singletary GE. The use of NT-proBNP assay in the management of canine patients with heart disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2010, 40(4):545-58.
3. Goetze JP. B-type natriuretic peptide: from posttranslational processing to clinical measurement. Clin Chem. 2012, 58(1):83-91.
4. Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. FEBS J. 2011, 278(11):1808-17.
5. Collins, S. Measuring NT-proBNP in small animal practice. Royal College of Veterinary Surgeons Diploma in veterinary cardiology. 2013.
6. Collins SA, Patteson MW, Connolly DJ, Brodbelt DC, Torrance AG, Harris JD. Effects of sample handling on serum N-terminal proB-type natriuretic peptide concentration in normal dogs and dogs with heart disease. J Vet Cardiol. 2010 Apr, 12(1):41-8.
7. Hezzell MJ, Boswood A, Lötter N, Elliott J. The effects of storage conditions on measurements of canine N-terminal pro-B-type natriuretic peptide. J Vet Cardiol. 2015, 17(1):34-41.