



技术报告

临床与科研领域

兽医



炎症



猫、犬和马血清淀粉样蛋白A (SAA)



SAA作为一种急相蛋白，存在于包括猫、狗和马等很多物种体内。SAA由肝脏分泌并释放进入血液，此外SAA也在多种肝外组织的炎症部位所产生。血液中大部分的SAA均与高密度脂蛋白 (HDL) 结合。与其他急相蛋白类似，当机体受到炎症刺激后，SAA浓度也会迅速升高。

SAA - 诊断标志物

SAA是一种炎症与组织损伤的敏感标志物。在兽医学中，SAA检测可用于亚临床炎症的诊断、感染或炎症个体的疗效监测以及术后病情监测等。

SAA的生化性质

猫和犬的SAA由111个氨基酸组成，而马SAA则由110个氨基酸组成。与人或者鼠的SAA相比，猫、犬和马的SAA分子中间区域有额外的8个氨基酸存在。不同哺乳动物体内的SAA氨基酸序列呈高度保守，序列一致程度为61-80% (Lu et al., 2014)。这提示所有SAA的家族成员均存在一种通用的折叠结构。

X光射线结晶结构的结果表明，无脂蛋白结合的人SAA1和鼠SAA3为由SAA单体所形成的四螺旋结构， α 折叠的程度为75% (Lu et al., 2014; Derebe et al., 2014; Hu et al., 2019)。然而，溶液状态下的无脂蛋白SAA的 α 折叠的程度较低。大鼠无脂蛋白SAA1在5°C条件下，其 α 折叠的程度为25%；在25°C条件下，其大部分为非折叠状态 (α 折叠的程度低于10%)；而在37°C下，SAA1呈完全非折叠结构 (Frame et al., 2020; Jayaraman et al., 2015)。换言之，在近似生理条件下的水溶液中，游离的SAA缺乏稳定的二级结构。在与脂质结合后，SAA1的 α 折叠的程度会维持在50%左右；同时，在5-25°C加热的条件下，其构象会保持不变 (Frame et al., 2020)。在5°C条件下，溶液中游离的SAA1的部分折叠位于1-70氨基酸区域内。与N末端不同，溶液中的大部分游离SAA或者脂蛋白结合的SAA的C末端三分之一区域缺乏稳定的二级结构。

临床应用

- ✓ 炎症敏感标志物
- ✓ 治疗监测

此外，对于溶液中人和大鼠SAA蛋白的分析显示，SAA存在多种低聚物形式。不同的SAA蛋白会形成不同形式的低聚物。这表明，由于溶液中游离的SAA单体很不稳定，SAA可能需要其他疏水作用来掩埋它们暴露的疏水表面。SAA低聚物含有一个疏水空腔，可与视黄醇结合 (Hu et al., 2019)。使用小鼠模型进行研究发现，尽管外周循环中大部分的SAA与HDL发生结合，但是在急性感染后仍存在小部分游离的SAA。急性感染的小鼠体内，游离的SAA可与视黄醇发生结合。

用于开发可靠且种属特异的SAA检测系统的原料试剂

HyTest提供若干株可用于开发猫、犬和马SAA检测系统的单克隆抗体。这些抗体可以识别动物血清样本中的SAA。此外，我们还提供猫、犬和马的重组SAA抗原。

SAA特异性单克隆抗体

HyTest提供一系列单抗，可用于开发猫、犬和马血液SAA定量检测试剂。其中部分抗体还可识别人SAA1 (表1)。

表1. SAA抗体特异性信息

克隆	猫 SAA	犬 SAA	马 SAA	人 SAA1
F501	+	-	-	-
F529	+	-	-	-
F550	+	-	-	-
F571	+	-	-	-
F173	+	+	+	+
F227	+	+	+	+
F231	+	+	+	+
F240	+	+	+	+
SAA19cc	+	+	+	+
SAA21cc	+	+	+	+
VSA31cc	+	+	+	+
VSA34cc	+	+	+	+
VSA38cc	+	+	+	+
VSA2	-	+	+	+
VSA43	+/-	+	+	+

猫 SAA

猫个体内的SAA蛋白的异构体组成

猫SAA基因仅有少部分被表征。有研究报道，猫个体内有高达四种功能基因负责SAA蛋白的编码(van Rossum et al., 2004)。猫SAA基因有若干种基因多态性，这导致SAA蛋白中会有少数氨基酸发生改变。据报道，最常见的氨基酸替代为E1/Q1 (Tei et al., 2018)， I29/K29 (van Rossum et al., 2004)， Q45/R45 (Niewold et al., 1999; Tei et al., 2018; van Rossum et al., 2004)， A51/V51 (Niewold et al., 1999; Tei et al., 2018; van Rossum et al., 2004)和 N75/S75 (van Rossum et al., 2004)。此外，根据猫SAA基因的数据库显示 (UniProtKB P19707)， C末端也有额外的一些氨基酸替代 (E88/A88, Y102/F102, E105/A105, D109/S109)。因此，猫染色体中可能包含不同种的SAA变异型。文献报道，阿比西尼亚猫、暹罗猫、本底短毛猫以及日本家猫均发现了SAA不同变异型(Niewold et al., 1999; Tei et al., 2018; van Rossum et al., 2004)。目前，关于猫SAA基因的等位基因频率尚无更多信息。

猫SAA的临床意义

SAA是一种对于如感染、组织损伤、外伤、手术、肿瘤或免疫紊乱等急性感染敏感但特异性的标志物。当对临床表现和实验室检测结果进行解读时，SAA的水平有助于疾病诊断与管理。当猫出现炎症时，SAA浓度会在8小时内迅速升高且24-48小时内达到峰值(Kajikawa et al., 1999)。外科手术后，SAA会在3-6小时内迅速升高，并且在术后的21-24小时内到达峰值(Sasaki et al., 2003)。因此，猫SAA是一种炎症早期的急相蛋白。

可能由于使用了不同的方法学，不同研究之间的健康个体的SAA浓度存在差异。不同研究中，正常猫血清中的SAA浓度水平分别为 $16.6 \pm 11.4 \mu\text{g/ml}$ (Kajikawa et al., 1999)， $0.6 \pm 1.06 \mu\text{g/ml}$ (Sasaki et al., 2003)和 $10.21 \pm 8.32 \mu\text{g/ml}$ (Giordano et al., 2004)。

猫炎症期间，SAA可能会升高100倍，不同炎症病例状况下猫SAA的升高情况如表2所示。急相反应通常会持续数天，随后SAA浓度会在没有新刺激出现后逐渐下降。对一只患有胰腺炎的猫进行SAA浓度的连续检测监测，结果显示，在疾病发作时SAA浓度增加；而在治疗后，随着临床条件的改善SAA逐步降低(Tamamoto et al., 2009)。这些研究提示，SAA的连续检测有助于猫胰腺炎治疗及病情评估。最近的一项研究表明，高灵敏度的SAA检测可反映出肥胖症猫的低级别炎症。SAA浓度升高与低脂联素水平或高脂血症进行结合，可用于体重超标猫个体的肥胖疾病分类(Okada et al., 2019)。

还有研究显示，SAA可作为预后标志物。在患有肿瘤性疾病、炎症性疾病以及其他疾病如肾衰竭、糖尿病、甲状腺机能亢进、心肌病等的猫中，首次医院检查时的SAA浓度被证明是一项重要的预后指标。SAA水平升高的猫的平均生存时间 (72天) 远远低于SAA水平没有升高的猫 (571天) (Tamamoto et al., 2013)。

表2. 不同疾病状态下的猫SAA浓度水平(Yuki et al., 2020).

诊断	猫个体数量	SAA 浓度中位数, $\mu\text{g/ml}$	SAA 浓度, 四分位差, $\mu\text{g/ml}$
上呼吸道感染	41	141.1	17.9-155.4
肺炎	14	134.3	12.5-168.7
龈口炎	37	1.3	0-52.8
肠胃炎	59	0.3	0-29.0
胰腺炎	20	3.9	0-138.1
肝炎/胆管炎	8	12	0-123.5
慢性肾病	83	0.03	0-5.9
下呼吸道感染	51	0	0-53.8
子宫蓄脓	7	154.8	0.1-182.4
酮中度	8	4.1	0.3-60.5
猫传染性腹膜炎	5	143.9	69.8-147.5
创伤性疾病	35	123.9	18.8-152.3
实体肿瘤	19	0.3	0-10.7
小圆形细胞肿瘤	30	0.5	0-42.7
心肌病	9	0	0-2.9
甲亢	13	0	0-20.4
糖尿病	5	0	0.08

猫SAA夹心免疫检测系统的开发

用于开发猫SAA免疫夹心检测系统的配对推荐如表3所示。

表3. 配对以及孵育温度推荐

捕获抗体	检测抗体	推荐孵育温度
F227	F529	RT
F231	F550	RT
F240	F501	RT
F240	F550	RT
SAA19cc	VSA34cc	RT
F571	F173	37°C*

* 室温条件下，配对F571-F173 很难识别SAA，因此该配对的推荐孵育温度为 37°C。

表4. 侧向层析平台中猫SAA的配对推荐

捕获抗体	检测抗体
F550	F231
F529	F227
F501	F240

猫血浆样本中SAA的检测

我们使用所有推荐配对 (除SAA19cc-VSA34cc) 对重组猫SAA抗原 (货号8FS5和8FT7) 以及猫血浆样本进行了同步的稀释检测。图1为使用配对F231-F550的混合猫血浆样本重组抗原的代表性稀释曲线。配对F227-F529测试健康猫和炎症猫样本的稀释曲线分别如图2A和2B所示。

对于检测猫血浆样本和重组抗原时可获得平行稀释曲线的抗体，可以使用重组猫SAA作为校准品以检测天然样本中的SAA。对于配对SAA19cc-VSA34cc，我们推荐使用含有Tag标签的重组抗原 (货号8FS5) 作为校准品。对于其他推荐配对，两种重组抗原均可使用。

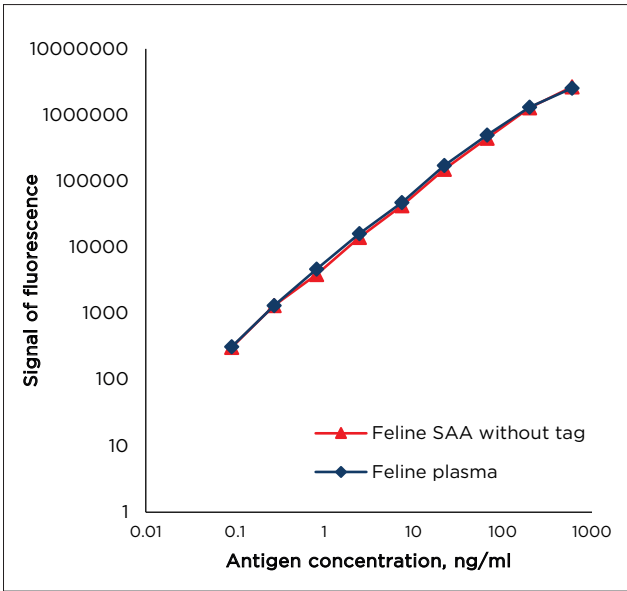


图1. 配对F231-F550原型试剂的校准曲线（抗原分别为无标签重组猫SAA-货号8FT7和混合猫血浆），混合猫血浆的SAA浓度为133 µg/ml，测试前稀释219.5倍。

我们使用原型试剂对22例健康猫样本和21例炎症猫样本进行了测试，相比于正常猫，炎症猫的SAA水平显著升高（图3）。

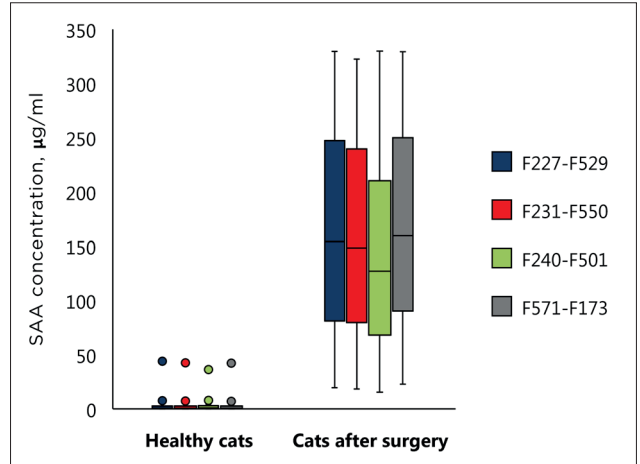


图3. 健康猫和术后炎症猫的SAA浓度。健康个体的样本预稀释100-2500倍，炎症猫样本预稀释8000倍。

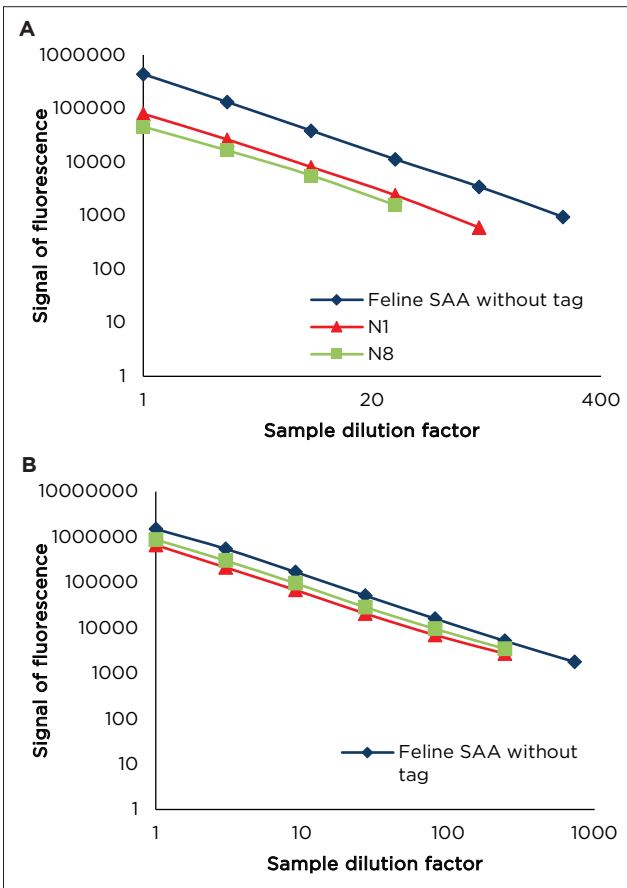


图2. 配对F227-F529原型试剂检测重组抗原和血浆样本的稀释曲线。(A) 健康个体 (N1, N8), SAA浓度分别为0.55 µg/ml 和 0.35 µg/ml。测试前，血浆样本的稀释倍数为35倍。重组猫SAA (货号8FT7) 的初始浓度为72 ng/ml。(B) 术后猫 (A26, A30). SAA 浓度分别为 178 µg/ml 和 217µg/ml。测试前，血浆样本的稀释倍数为200倍。重组猫SAA (货号8FT7) 的初始浓度为200 ng/ml。

猫SAA变异型的交叉反应

我们考察了HyTest核心推荐配对对于最常见的猫SAA变异型的交叉反应。其中SAA Q9XSG7作为参考序列，4种变异型为SAA Q9XSG7的部分氨基酸替代亚型 (I29/K29, Q45/R45, A51/V51, N75/S75) 以及SAA P19707 (与SAA Q9XSG7存在5个氨基酸差异) (图4)。

配对F227-F529, F231-F550和F240-F550的原型试剂可检出所有猫SAA变异型。F240-F501原型试剂对于SAA N75/S75的检出率很低。F571-F173原型试剂对于SAA P19707的检出率很低。同时，上述两个配对可检出其他所有SAA变异型。

SAA19cc和SAA21cc对于I29/K29变异型的检出率很低，VSA34cc 可检出所有变异型。

目前尚有关于猫SAA基因等位基因频率的文献资料，因此难以判断抗体对于不同变异型交叉反应的强弱与准确测定血液中SAA水平以及检测炎症意义之间的关系。

Amino acid residues	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7)	E	W	Y	S	F	L	G	E	A	A	Q	G	A	W	D	M	W	R	A	Y	S	D	M	R	E	A	N	Y	I	G	A	D	K	Y	F	H	A
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) I29/K29	E	W	Y	S	F	L	G	E	A	A	Q	G	A	W	D	M	W	R	A	Y	S	D	M	R	E	A	N	Y	K	G	A	D	K	Y	F	H	A
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) Q45/R45	E	W	Y	S	F	L	G	E	A	A	Q	G	A	W	D	M	W	R	A	Y	S	D	M	R	E	A	N	Y	I	G	A	D	K	Y	F	H	A
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) A51/V51	E	W	Y	S	F	L	G	E	A	A	Q	G	A	W	D	M	W	R	A	Y	S	D	M	R	E	A	N	Y	I	G	A	D	K	Y	F	H	A
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) N75/S75	E	W	Y	S	F	L	G	E	A	A	Q	G	A	W	D	M	W	R	A	Y	S	D	M	R	E	A	N	Y	I	G	A	D	K	Y	F	H	A
Feline SAA (UniProtKB P19707)	Q	W	Y	S	F	L	G	E	A	A	Q	G	A	W	D	M	W	R	A	Y	S	D	M	R	E	A	N	Y	I	G	A	D	K	Y	F	H	A
Amino acid residues	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7)	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E	N	S	Q	R	V	T	D	F	F	R	H	G
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) I29/K29	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E	N	S	Q	R	V	T	D	F	F	R	H	G
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) Q45/R45	R	G	N	Y	D	A	A	R	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E	N	S	Q	R	V	T	D	F	F	R	H	G
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) A51/V51	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	V	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E	N	S	Q	R	V	T	D	F	F	R	H	G
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) N75/S75	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E	N	S	Q	R	V	T	D	F	F	R	H	G
Feline SAA (UniProtKB P19707)	R	G	N	Y	D	A	A	Q	R	G	P	G	G	A	W	A	A	K	V	I	S	D	A	R	E	N	S	Q	R	V	T	D	F	F	R	H	G
Amino acid residues	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7)	N	S	G	H	G	A	E	D	S	K	A	D	Q	E	A	N	E	W	G	R	S	G	K	D	P	N	H	Y	R	P	E	G	L	P	D	K	Y
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) I29/K29	N	S	G	H	G	A	E	D	S	K	A	D	Q	E	A	N	E	W	G	R	S	G	K	D	P	N	H	Y	R	P	E	G	L	P	D	K	Y
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) Q45/R45	N	S	G	H	G	A	E	D	S	K	A	D	Q	E	A	N	E	W	G	R	S	G	K	D	P	N	H	Y	R	P	E	G	L	P	D	K	Y
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) A51/V51	N	S	G	H	G	A	E	D	S	K	A	D	Q	E	A	N	E	W	G	R	S	G	K	D	P	N	H	Y	R	P	E	G	L	P	D	K	Y
Feline SAA (UniprotKB Q9XSG7) N75/S75	S	S	G	H	G	A	E	D	S	K	A	D	Q	E	A	N	E	W	G	R	S	G	K	D	P	N	H	Y	R	P	E	G	L	P	D	K	Y
Feline SAA (UniProtKB P19707)	N	S	G	H	G	A	E	D	S	K	A	D	Q	E	A	N	E	W	G	R	S	G	K	D	P	N	H	F	R	P	A	G	L	P	S	K	Y

图4. 不同猫SAA变异型重组蛋白的序列比对以及抗体交叉反应研究。相同氨基酸以蓝色表示。

重组猫SAA

HyTest提供相同序列的两种重组猫SAA蛋白，蛋白序列与SAA Q9XSG7一致。其中，货号8FS5的重组SAA在N末端含有一个10个氨基酸长度的亲和标签；货号8FT7的重组SAA在N端仅含有一个额外的甲硫氨酸。重组猫SAA蛋白的纯度超过了95%（图5），两种不同版本的重组蛋白具有相似的免疫活性（图6）。

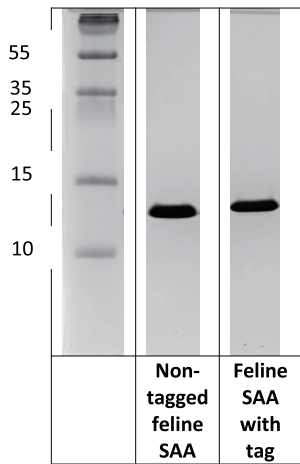


图5. 两种重组SAA蛋白的还原性SDS-PAGE结果。上样量为6 μg，染色为考马斯亮蓝R-250。

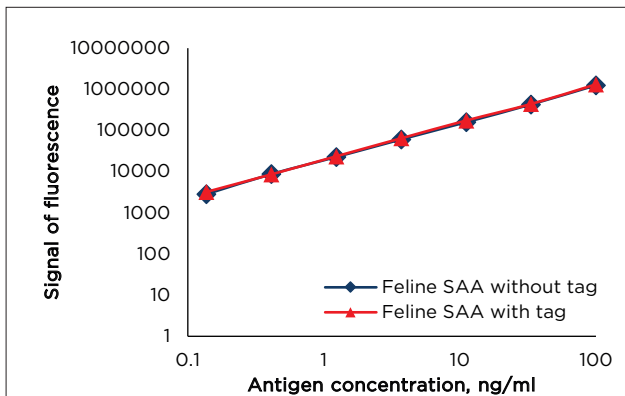


图6. F240-F501原型试剂测试两种抗原的校准曲线。

马和犬SAA

马和犬SAA夹心免疫检测系统的开发

由于马和犬SAA的序列高度同源，因此我们可以使用同样的抗体配对开发马和犬的SAA夹心检测系统。表5为我们提供的配对推荐，使用配对VSA2-VSA38cc测试重组犬(A)和马(B) SAA抗原的稀释曲线如图7所示。

表5. 用于马和犬SAA检测系统开发的配对推荐

捕获抗体	检测抗体	推荐孵育温度
SAA19cc	VSA34cc	RT
VSA2	VSA38cc	37°C
VSA2	VSA31cc	37°C
VSA38cc	VSA43	37°C

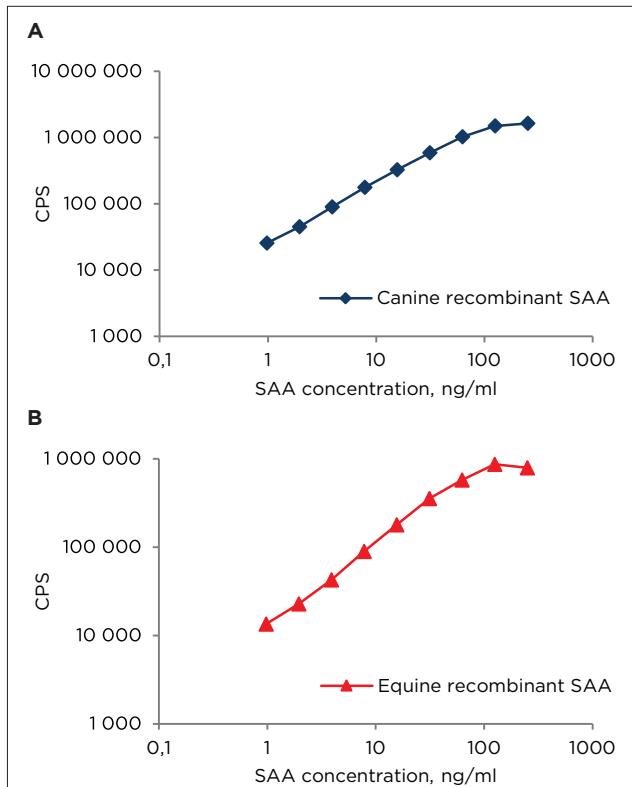


图7. 配对VSA2-VSA38cc 测试重组犬 (A) 和马 (B) SAA抗原的稀释曲线。VSA2包被于微孔板中，于37°C封闭1小时（封闭液含有1% casein 和0.05% Tween 20）。重组犬SAA（货号8CS4）和马SAA（8ES6）使用同样的稀释液进行梯度稀释后于37度孵育1小时。钡标记的VSA38cc作为检测抗体。

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	克隆	亚型	备注	
血清淀粉样蛋白A (SAA), 动物	4VS4	F501	IgG1	重组嵌合抗体	New!
		F529	IgG1	重组嵌合抗体	New!
		F550	IgG1	重组嵌合抗体	New!
		F571	IgG1	重组嵌合抗体	New!
		F173	IgG2a	体外生产	New!
		F227	IgG1	体外生产	New!
		F231	IgG1	体外生产	New!
		F240	IgG2a	体外生产	New!
		SAA19cc	IgG2a	体外生产	
		SAA21cc	IgG2b	体外生产	
		VSA31cc	IgG2a	体外生产	
		VSA34cc	IgG2b	体外生产	
		VSA38cc	IgG2a	体外生产	
		VSA2	IgG1		
VSA43	IgG2b				

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
血清淀粉样蛋白A (SAA), 猫, 重组	8FS5	>95%	重组
血清淀粉样蛋白A (SAA), 猫, 重组, 无标签	8FT7	>95%	重组
血清淀粉样蛋白A (SAA), 犬, 重组	8CS4	>95%	重组
血清淀粉样蛋白A (SAA), 马, 重组	8ES6	>95%	重组

参考文献

- Derebe MG et al.** Serum amyloid A is a retinol binding protein that transports retinol during bacterial infection. *Elife*. 2014 Jul 29;3:e03206.
- Frame NM et al.** Structural Basis for Lipid Binding and Function by an Evolutionarily Conserved Protein, Serum Amyloid A. *J Mol Biol*. 2020 Mar 27;432(7):1978-1995.
- Giordano A et al.** Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Vet J*. 2004 Jan;167(1):38-44.
- Hu Z et al.** Molecular basis for retinol binding by serum amyloid A during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Sep 17;116(38):19077-19082.
- Jayaraman S et al.** Thermal transitions in serum amyloid A in solution and on the lipid: implications for structure and stability of acute-phase HDL. *J Lipid Res*. 2015 Aug;56(8):1531-42.
- Kajikawa T et al.** Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999 Mar 29;68(1):91-8.
- Lu J et al.** Structural mechanism of serum amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 8;111(14):5189-94.
- Niewold et al.** Familial amyloidosis in cats: Siamese and Abyssinian AA proteins differ in primary sequence and pattern of deposition. *Amyloid*. 1999 Sep;6(3):205-9.
- Okada et al.** Diagnostic Criteria for Obesity Disease in Cats. *Front Vet Sci*. 2019 Aug 27;6:284.
- van Rossum M et al.** Analysis of cDNA sequences of feline SAAs. *Amyloid*. 2004 Mar;11(1):38-43.
- Sasaki K et al.** Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. *J Vet Med Sci*. 2003 Apr;65(4):545-8.
- Tamamoto T et al.** Time-course monitoring of serum amyloid A in a cat with pancreatitis. *Vet Clin Pathol*. 2009 Mar;38(1):83-6.
- Tamamoto T et al.** Serum amyloid A as a prognostic marker in cats with various diseases. *J Vet Diagn Invest*. 2013 May;25(3):428-32.
- Tei M et al.** Variation of amino acid sequences of serum amyloid a (SAA) and immunohistochemical analysis of amyloid a (AA) in Japanese domestic cats. *J Vet Med Sci*. 2018 Feb 2;80(1):164-172.
- Yuki M et al.** A Clinical Investigation on Serum Amyloid A Concentration in Client-Owned Healthy and Diseased Cats in a Primary Care Animal Hospital. *Vet Sci*. 2020 Apr 15;7(2):45.