

抗心型脂肪酸结合蛋白单克隆抗体制备、鉴定和在侧向免疫层析方法中的应用*

康可人^{1,2**} 吴培钿^{2***} 李悦琳² 黄绮玲² 李高辉² 唐时幸² 王继华²

(1 华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510660)

(2 自检型快速诊断国家地方联合工程实验室 广州万孚生物技术股份有限公司 广州 510663)

摘要 目的:制备抗心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)单克隆抗体(mAb),并建立侧向免疫层析方法检测血浆中H-FABP。方法:用H-FABP蛋白免疫纯系Balb/c小鼠,采用杂交瘤技术建立能稳定分泌抗人H-FABP的单克隆杂交瘤细胞株。常规制备腹水,纯化后得到特异性抗H-FABP单克隆抗体,进行效价、特异性、亲和力的鉴定分析,并在ELISA平台进行抗体配对,用所筛选到的抗体对初步建立了检测H-FABP的侧向免疫层析方法。结果:成功获得12株稳定分泌抗体的阳性细胞株,并筛选出能相互配对,并应用于侧向免疫层析平台的抗体3D1和5F4,检测临床样品与对照试剂比较总符合率为100%。结论:筛选能稳定分泌抗体的细胞株,配对抗体应用于侧向免疫层析检测方法中,能快速、特异、灵敏的检测出临床样品中H-FABP,为临床应用快速检测H-FABP指标提供了方法和关键材料。

关键词 H-FABP 单克隆抗体 POCT 免疫层析

中图分类号 Q511

自R. K. Ockner等人1972年发现脂肪酸结合蛋白以来,人们陆续分离并鉴定了9种不同类型的脂肪酸结合蛋白^[1-2],不同型FABP的氨基酸序列的同源性为38%~70%。H-FABP是一种可溶性蛋白,分子量为14~15kDa,大量存在于心肌细胞质中,占胞质蛋白的15%^[3-5]。正常状况下,血液中不含或仅含极少量H-FABP,血浆参照浓度为(1.1~2.1) $\mu\text{g/L}$,上限为5 $\mu\text{g/L}$ 。当心肌细胞受损时,H-FABP由于分子量小,可迅速释放入血或尿液中,因此在早期诊断AMI及评估心肌梗死面积大小,监测AMI的复发,监测AMI后再灌注及预后评估中均具有重要价值^[6-8]。

目前,血浆H-FABP的临床检测主要有放射免疫分析(RIA)、酶联免疫分析(ELISA)、免疫比浊法等方法。RIA检测步骤繁琐,且存在放射性污染,不适合临床应

用;ELISA操作繁琐,不适合单个样品的检测;免疫比浊法借助临床全自动免疫比浊分析仪,自动化程度高,但对仪器设备要求高,需要专业人士操作,因此这些方法在简便、快捷的应用模式上,均存在不可忽略的弊端,尤其不适合急诊及现场检验。胶体金免疫层析技术属于即时检测(point-of-care testing, POCT)领域中的成熟技术,能快速、灵敏、简捷的实现指标的定性检测,而且此技术正逐渐向定量检测发展,尤其适合于单样品的急诊检验。抗H-FABP单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)是诊断试剂盒中最关键的原材料,无论在何种免疫学的检测方法中均有使用,其亲合力和特异性直接决定了H-FABP检测试剂盒临床应用结果的准确性。商品化mAb在国外已经制备成功,国内尚无此mAb能成功用于临床诊断。本研究制备H-FABP的mAb,旨在建立检测H-FABP的侧向免疫层析法和免疫荧光定量检测等相关检测体系,为临床相关疾病的辅助诊断、病情监测、预后判断和科学研究提供切实有效的工具与手段。

收稿日期:2012-10-28 修回日期:2012-11-13

* 卫生部《重组蛋白和抗体库研制平台》资助项目(2011ZX09506-001)

**通讯作者,电子信箱:keren_kang@hotmail.com

***共同第一作者

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及动物 H-FABP 抗原购自芬兰 HyTest 公司;人 H-FABP(ELISA)试剂盒购自北京爱迪博生物科技有限公司;H-FABP(胶体金)试剂盒购自深圳康生保生物技术有限公司;辣根过氧化物酶(HRP) 购自上海雪满生物科技有限公司;HRP 标记山羊抗小鼠抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;H-FABP 阳性血清、H-FABP 阴性和健康人血清收集自广州华侨医院及广州市红十字会医院;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自美国 Sigma 公司;小鼠单克隆抗体亚型检测试剂盒购自洛阳佰奥通实验材料中心;PRMI1640 培养基、胎牛血清、HAT、HT、聚乙二醇(PEG, Mw4000)均为美国 Gibco 公司产品;Immobilon-PSQ PVDF 膜购美国 Millipore 公司;ECL PLUS 化学发光剂为上海碧云天生物技术有限公司产品;小鼠骨髓瘤细胞系(SP2/0)为本实验室传代保存。SPF 级 BALB/c 纯系小鼠,鼠龄 6~8 周,体重 18~22g,由中山大学实验动物中心提供。

1.1.2 仪器 BB15 型 CO₂ 培养箱、Multiskan MK3 酶标仪和 NanoDrop 2000C 分光光度计均为美国 Thermo Fisher 公司产品;倒置显微镜为重庆奥特光学仪器有限公司产品;Milli-Q AdvantageA10 超纯水仪为美国 Millipore 公司产品;高速冷冻离心机为日本 HITACH 产品;接触式喷膜机为美国 Imagene Technology Inc 产品。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫 取 4 只 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠,首次免疫将福氏完全佐剂与等体积的 H-FABP 乳化后予小鼠皮下注射,50μg/只,以后每隔 2 周以福氏不完全佐剂加等体积 H-FABP 乳化后同上免疫,50μg/只,经 3 次加强免疫后,尾静脉采血,间接 ELISA 法检测小鼠血清效价,选择血清抗体效价高于 1:10 000 的小鼠,经腹腔冲击免疫一次,冲击剂量为 50μg,3d 后取脾细胞制备杂交瘤。

1.2.2 单克隆抗体的制备 取冲击免疫后 3d 的小鼠脾脏细胞,用半固体法融合,有限稀释法进行亚克隆化,间接 ELISA 法进行反复筛选,最终获得阳性细胞株 12 株。采用小鼠体内诱生法制备各细胞株的单抗腹水,正辛酸-饱和硫酸铵法纯化得到抗体。所有单抗采用改良过碘酸钠法标记 HRP。

1.2.3 单克隆抗体的鉴定 (1)效价测定。采用间接 ELISA 法测定纯化单抗效价。按常规方法将 H-FABP

抗原包被酶标板,抗原浓度为 1μg/ml,4℃ 孵育过夜;然后使用含 3% BSA 的 PBST(吐温含量为 0.05%)于 37℃ 下封闭 2 h,倒掉封闭液后,晾干,于 -20℃ 保存备用。检测时将抗体稀释到 1mg/ml 后从 1:1 000 开始做 10 倍连续稀释。稀释后的抗体加入孔中,每孔 100μl,设复孔,并设阴性(N)和阳性(P)对照,37℃ 孵育 1h。PBST 洗板 3 次,加入标记 HRP 的羊抗鼠二抗 100μl,37℃ 孵育 30 min。PBST 洗板 3 次,加入显色液,10 min 后终止,放微孔酶标仪读值,P/N>2.1 为阳性。

1.2.4 Ig 类及亚类测定 采用小鼠 mAb 分型试剂盒测定获得的 12 株 H-FABP 单克隆抗体 Ig 亚类,严格依照试剂盒说明书操作。

1.2.5 特异性鉴定 采用免疫印迹法(Western blot)鉴定抗体特异性。以 12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳,上样量 1μg,电泳至溴酚蓝指示剂到达胶板下缘约 1/3 处停止电泳,进行湿转印,将蛋白转移到预处理过的 0.2μm PVDF 膜上。转印条件为 300mA,50min。转印后利用膜上吸附蛋白处折射率不同,确定转印效果。将转印后的膜放 100% 甲醇中浸泡 10s 后,置于滤纸上晾干 15min。分别加入筛选出的 12 株抗体,于室温孵育 1h,一抗浓度为 0.5μg/ml。PBST 洗涤 3 次,每次 5min;加入 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体,于室温孵育 45min,二抗稀释比例为 1:20 000。用 PSBT 洗涤 3 次,每次 5min,最后加入增强型化学发光(ECL)底物,进行显影。

1.2.6 单克隆抗体亲和力测定 采用非竞争酶免疫实验,参照 G. P. S. Raghava 方法^[9],按公式 $Ka = (n-1)/2(n[Ab']_t - [Ab]_t)$ 计算亲和力常数 Ka 值。经预实验,选择 0.125、0.0625、0.03125μg/ml, H-FABP 抗原包被 ELISA 板,加入倍比稀释的 mAb,37℃ 作用 30min 后,洗涤 ELISA 板,加入 1:20 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠二抗,37℃ 反应 30min, TMB 显色,测 450nm OD 值。以抗体浓度为横坐标, OD 值为纵坐标作图,以每条曲线上部平坦段的 OD 值作为 100%,拟合算出 50% OD 所对应的抗体浓度,然后按照公式计算出亲和力。 $n = [Ag']_t/[Ag]_t$, $[Ag']_t$ 和 $[Ag]_t$ 为不同包被抗原浓度, $[Ab']_t$ 、 $[Ab]_t$ 是对应不同抗原浓度下, 50% OD 处对应的抗体浓度。

1.2.7 H-FABP 抗体配对筛选 以双抗体夹心 ELISA 初步筛选 H-FABP 配对抗体对。捕获抗体包被浓度为 5μg/ml, 0.05mol/L PBS 包被, 4℃ 孵育过夜;然后使用含 3% BSA 的 PBST(吐温含量为 0.05%)于 37℃ 下封

闭 2h, 洗涤拍干后, 加入 HRP 标记检测抗体及 H-FABP 标准品的混合物, 反应 30min, PBST 洗板 3 次, 加入显色液, 10 min 后终止, 微孔酶标仪读值。筛选出可配对抗体, 进入胶体金免疫层析平台验证。

1.3 胶体金免疫层析试剂盒的研制及临床应用

1.3.1 标准品的配制 将 H-FABP 复溶, 用健康人阴性血清配制母液 (约 200ng/ml), 并以 H-FABP (ELISA) 检测试剂盒测定其浓度。根据母液的浓度, 用 H-FABP 阴性血清将母液稀释到 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 10ng/ml, 5ng/ml, 然后用 H-FABP (ELISA) 检测试剂盒确定上述样本浓度。

1.3.2 胶体金免疫层析试纸条的制备及组装 按最佳工作浓度, 将捕获抗体通过机器划线包被在硝酸纤维素膜, 干燥密封保存; 将检测抗体按枸橼酸钠法标记到胶体金颗粒上, 并将标记物吸附到玻璃纤维上, 冷冻干燥。将包被硝酸纤维素膜和含标记物的玻璃纤维配合 PVC 板、吸水材料等组装成检测试纸条。

1.3.3 临床初步应用 使用筛选得到的抗 H-FABP 抗体对, 建立双抗体夹心胶体金免疫层析试剂盒, 对 203 份临床样品进行检测, 以并同市售的试剂盒检测结果对照, 初步验证我们建立的试剂盒的灵敏度、特异性及阴阳符合率。

1.3.4 操作方法 用微量吸血管吸取 50 μ l ~ 100 μ l 血清标本, 直接滴加到测试条的样品加样端, 同时将对照条分别加入上述标定的不同浓度 H-FABP 标准品。血清标本通过层析作用向前爬行, 在移动过程中先与胶体金标记的抗体结合, 然后再与包被在硝酸纤维素膜上抗体反应, 产生肉眼可见的红色条带, 全部试验过程 15min。

1.3.5 测试结果判断 (1) 若被测条无测试线出现, 或测试线颜色浅于或相当于 5ng/ml 标准品的显色, 可判为阴性或 $\leq 5\mu\text{g/L}$ 。(2) 若被测条测试线颜色比 5 $\mu\text{g/L}$ 标准品深, 可判为阳性或 $\geq 5\mu\text{g/L}$ 。(3) 若质控线和测试线均不出现, 则表明测试条无效。

1.4 统计学分析

应用 Microsoft Excel 2000 软件对数据记录、处理和作图。配对卡方检验采用 SPSS 软件进行, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 杂交瘤细胞株的建立及抗体制备

采用小鼠杂交瘤融合技术经过 4 次融合, 以间接

ELISA 方法反复筛选, 3 ~ 5 次亚克隆, 最终获得 12 株能稳定分泌 H-FABP 抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 5F4、7D10、7A5、1H11、1B1、1B2、1C2、2F7、1B9、1G1、3D1、3D6, 对以上细胞株进行亚克隆建株保存。经体内诱生法分别制备 12 株单抗腹水, 正辛酸-硫酸铵法纯化, 获得 12 株抗 H-FABP 单克隆抗体。纯化后的单抗经凝胶电泳分析可见抗体的重链和轻链条带, 未见其他条带 (图 1)。不同株的抗体之间重链分子量趋于一致, 轻链在 25kDa ~ 28kDa 之间变动, 考虑是由于不同轻链类型影响所致。

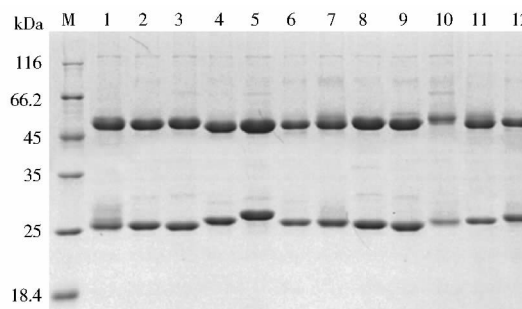


图 1 12 株 抗人 H-FABP 纯化抗体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified monoclonal antibody

M: Protein Marker; 1: 5F4; 2: 7D10; 3: 7A5; 4: 1H11; 5: 1B1; 6: 1B2; 7: 1C2; 8: 2F7; 9: 1B9; 10: 3D6; 11: 1G1; 12: 3D1

2.2 抗 H-FABP 单抗的鉴定

2.2.1 效价测定 采用间接 ELISA 检测单抗效价。图 2 结果显示 12 株细胞中, 11 株抗体效价均大于 1:10⁶, 符合筛选标准。仅有 3D6 株抗体效价为 1:10 000, 不参与配对筛选。

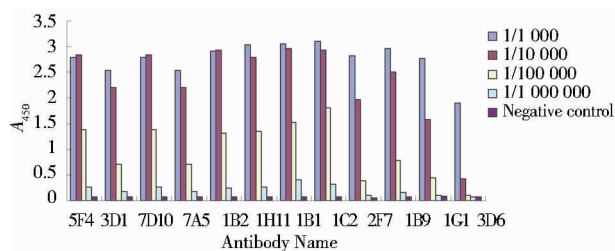


图 2 抗人 H-FABP 单抗效价图

Fig. 2 Determination of Sensitivity of mAb against H-FABP

2.2.2 亚类测定 经小鼠 mAb 分型试剂盒测定, 所获得的 12 株单抗中, 除 1G1 为 IgG2a 亚型外, 其余均为

IgG1 亚型。

2.2.3 抗体特异性鉴定 采用免疫印迹法鉴定抗体特异性,图3 结果显示,12 株单抗均能与 H-FABP 反应,在 14kDa 附近位置出现单一蛋白印迹条带,结果见图 3。

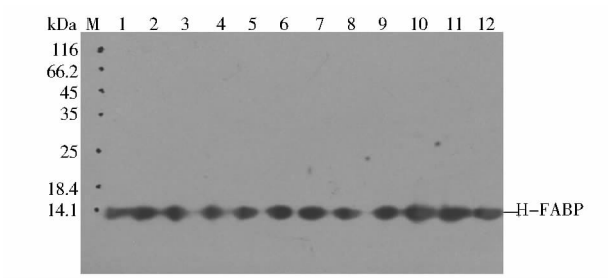


图3 12 株抗人 H-FABP 单抗免疫印迹分析
Fig.3 Western blot analysis of purified monoclonal antibody

M: Protein Marker;1: 5F4;2: 7D10;3: 7A5;4: 1H11;5: 1B1;6: 1B2;7: 1C2;8: 2F7;9: 1B9;10: 1G1;11: 3D1;12: 3D6

2.2.4 抗人 H-FABP 配对抗体的筛选 将已纯化的上述 11 株单抗,使用过碘酸氧化法分别标记 HRP,以双抗体夹心 ELISA 筛选配对抗体。OD 值越低,说明两株抗体之间的抗原识别表位越接近;OD 值越高,说明两者的抗原结合表位相差越远。由表 1 可知,无论是作为包被抗体还是标记抗体,3D1 和 5F4,1C2 和 5F4,1B9 和 1C2 三对抗体 OD 值均大于 1.0,说明配对间的两株抗体抗原表位相差较远,其中 3D1 和 5F4 两株抗体识别的表位应该属于远隔表位。考虑侧向免疫层析方法不同于 ELISA 的微量液相反应平台,对抗体在灵敏度和特异性上的要求更高,因此选取配对效果最好的 3D1 和 5F4 进行免疫层析方法的应用尝试。

表 1 H-FABP 单抗配对抗体的筛选
Table 1 Antibody Pair screening by sandwich ELISA

		Capture Antibody(Coated)										
Antibody		5F4	7D10	7A5	1H11	1B1	1B2	1C2	2F7	1B9	1G1	3D1
Detection Antibody (Labeled)	5F4	0.052	0.087	0.375	0.048	1.8	0.444	1.48	1.502	0.069	0.093	2.089
	7D10	0.133	0.069	0.046	0.532	0.08	0.057	0.234	0.046	0.07	0.057	0.053
	7A5	0.054	0.126	0.047	0.047	0.495	0.211	0.879	0.884	0.23	0.227	0.0126
	1H11	0.066	0.307	0.049	0.071	0.172	0.041	0.47	0.035	0.114	0.025	0.088
	1B1	0.941	0.041	0.644	0.195	0.045	0.06	0.055	0.449	1.613	1.613	1.038
	1B2	0.298	0.055	0.295	0.045	0.047	0.08	0.145	0.247	0.939	0.646	0.365
	1C2	1.155	0.034	0.631	0.228	0.045	0.057	0.223	0.677	1.594	1.295	1.399
	2F7	0.815	0.044	0.547	0.046	0.12	0.151	0.743	0.042	0.447	1.412	0.056
	1B9	0.094	0.431	0.542	1.183	0.052	1.041	1.336	0.572	0.06	0.173	0.056
	1G1	0.093	0.174	0.272	0.088	0.6	0.445	0.468	0.294	0.201	0.053	0.066
	3D1	1.954	0.046	0.061	0.069	0.435	0.434	1.275	0.056	0.901	0.091	0.063

2.2.5 亲和力测定 采用非竞争酶免疫实验,参照 G. P. S. Raghava 方法测定。12 株单抗均与 3 个不同包被浓度的 H-FABP 蛋白结合,经 Raghava 推导公式,计算亲和力,3D1、5F4 亲和力分别为 7.95×10^{-7} 、 8.10×10^{-7} L/mol,结果见图 4。

2.3 胶体金免疫层析检测方法的建立

以 ELISA 平台筛选信号最强的配对抗体为包被及标记材料,基于胶体金免疫层析技术,建立 H-FABP 的双抗体夹心的免疫层析检测系统。通过棋盘滴定法,以灵敏度高、本底低、线性范围广为选择标准,对上述抗体对进行筛选,最终确定 3D1 为捕获抗体,5F4 为检

测抗体,建立 H-FABP 胶体金免疫层析试剂盒,确定其灵敏度、特异性,并对临床样品进行检测。

2.3.1 灵敏度实验 以经过标定的 H-FABP 系列标准品进行灵敏度测定,结果低于 5μg/L 标准品在 15 min 仍然不显色,为阴性。其余标准品在 15 min 均显示两条红线,随着标准品浓度增加,显色呈梯度递增,显色深浅与 H-FABP 含量成正相关。

2.3.2 特异性实验 用组装的 H-FABP 试剂盒检测胆红素、胆固醇和甘油三酯等 3 种血清中常见干扰物质,结果显示均为阴性,表明此抗体对有较好的特异性,结果见图 5。

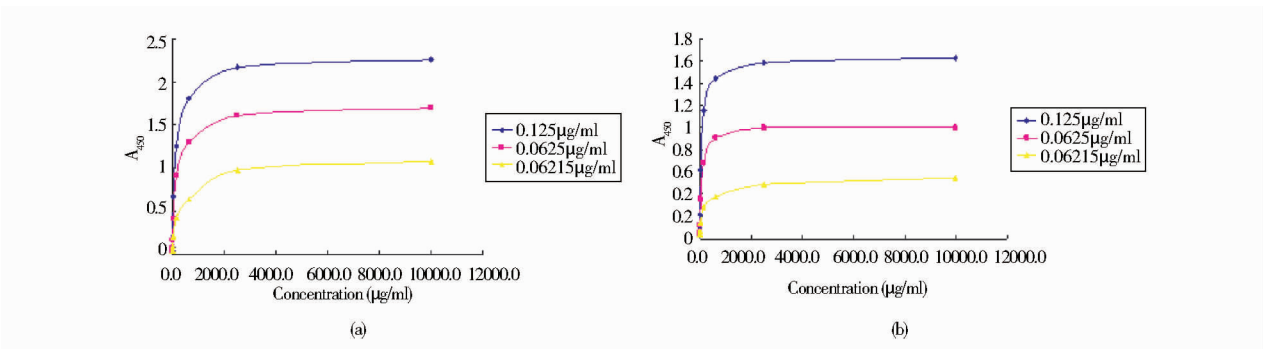


图4 抗人 H-FABP 单抗 3D1、5F4 亲和力曲线
Fig.4 Affinity determination of mAb against H-FABP
(a) 3D1 (b) 5F4

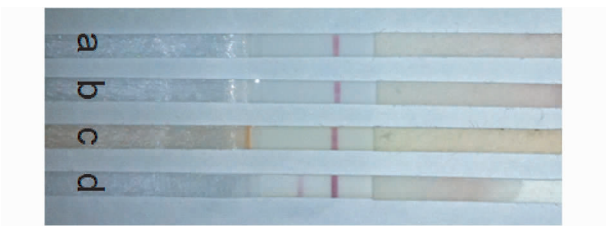


图5 三种血清常见干扰物质测试
Fig. 5 Detection of common serum
interfering substances

a: Cholesterol; b: Triglycerides; c: Bilirubin;
d: H-FABP(50 $\mu\text{g/L}$)

2.3.3 临床标本检测 用本研究建立的胶体金免疫层析试纸条与参照试剂盒(深圳康生保)对照,检测 203 份临床血清样品,结果见表 2。阳性符合率 100.00%, 阴性符合率 100.00%,总符合率为 100.00%。说明本文建立的胶体金免疫层析试纸条与参照试剂盒有较好的一致性。采用 SPSS 软件进行配对卡方检验, $P > 0.05$,即两种试剂的检测结果无显著性差异。

表2 对比检测 203 份样品结果

		参照试剂		合计
		+	-	
本研究制备试剂	+	35	0	35
	-	0	168	168
合计		35	168	203

3 讨论

H-FABP 是一类低分子量的胞浆蛋白,其三级结构是在晶体学和核磁共振技术的基础上得到的。它由 10 条反向平行的 β 链和 2 个 α 螺旋形成的类似麻花状的

管状结构。其分子量小(15KDa),可迅速被释放进入血液循环,因血浆 H-FABP 的大量升高与梗塞面积间有良好的相关性,近年来 H-FABP 与心肌特异性蛋白、肌红蛋白、肌钙蛋白一起,成为心肌损伤评估的重要血清学指标^[10-13]。

H-FABP 检测从方法学角度考虑,首先应具有现场、快速、敏感、特异的特点,满足应急检测的需要。现有的心肌标志物检测方法中,化学发光法及酶联免疫法需要全自动生化仪器或酶标仪等大型、昂贵的仪器设备,需要熟练的专业操作人员,检测周期长,操作过程复杂,缺乏时效性,不能满足快速诊断的需要。随着微制造、微电子、固相技术、信号探测分析技术和免疫学的进步^[14],POCT 开始普遍应用于心脑血管疾病生物标志物的检测。国外有影响的 POCT 试剂及仪器不断涌现,目前国内市场基本被 Roche, Biosite 等国际大公司产品所占据,而试剂所用的单克隆抗体等核心生物原材料,更是为国外供应商所垄断。近年来,我国 POCT 领域通过前期引入吸收、后期创新发展的积极思路,在产品自主研发和产业化方向逐渐形成了产学研用一体化模式,拥有了一批真正能达到国际、国内领先水平的技术及产品,对民族产业的振兴起到了极其重要的推动作用。本研究通过成熟、规模化的抗体筛选及应用平台,自主研发制备单克隆抗体,建立侧向免疫层析方法,将关键性生物材料的应用与方法学的应用相结合,属于国内首创,突破 H-FABP 诊断试剂领域所面临的原料需进口,试剂需进口的严重依赖状况。建立的方法在 15min 内可以轻松检测出样本中 H-FABP 的浓度。胆固醇、胆红素和甘油三脂等血液中常见成分的存在对 H-FABP 的测定无干扰,也没有发现它与心

肌损伤发作后释放出的肌钙蛋白、肌红蛋白及肌血红素等物质发生交叉反应。在现场检测中,能充分满足快速、准确、简单的检测要求,在实施救助过程中,为病人和医生节约宝贵的急救时间,是一种行之有效的 POCT 检测技术及产品。

H-FABP 作为一种重要的、新型的、特异性的心肌损伤生化指标,是国内外研究热门,但是关于抗人 H-FABP 单克隆抗体的制备并应用于体外诊断平台鲜有报道,且基本处于研究阶段。^[14-15]。本研究通过抗体配对实验,从 12 株阳性细胞株中,初步筛选出 2 株稳定分泌抗人 H-FABP 单抗的细胞株,应用于免疫层析方法中,我们的试剂与常见的交叉物不反应,说明抗体特异性好。对临床阴阳性样品的检测,H-FABP 检测试剂灵敏度可达到 5ug/L,与已经上市的参比试剂相比总符合率为 100.00%,说明 2 株抗体在检测临床真实样本中能保证试剂的灵敏度及特异性。由于侧向免疫层析法为定性检测方法,阴阳性结果通过检测线(T 线)的出现来判断,我们在实验过程中发现,虽然同为阳性结果,但是应用 3D1 和 5F4 配对抗体制备的试剂盒与对照产品试剂盒,检测个别样本时,检测线显色深浅会有较为明显的差异,我们将差异较大的样本进行初步定量方法确定样本含量发现,通过包被抗体和标记抗体不同工艺调整,配对抗体在实际应用中与定量结果的相符性能会优于对照试剂,这也提示 3D1 和 5F4 抗体对,在实现试剂盒功效最佳状态方面具有较好的优势。同时,正在将所筛选出的抗体尝试用于快速免疫荧光定量检测平台,定量检测心肌损伤时 H-FABP,以及与心肌损伤程度的关联,为心肌损伤的检测和诊断提供更敏感的方法,填补该领域国内空白。

参考文献

- [1] Ockner R K, Manning J A, Poppenhausen R B, et al. A bindingprotein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*, 1972, 177 (4043):56-58.
- [2] Su A I, Wiltshire T, Batalov S, et al. A geneatlas of the mouse and human protein-encodingtranscriptomes. *ProcNatI AcadSci USA* 2004, 101(16):6062-6067
- [3] Schaap F G, Binas B, Danneberg H, et al. Impaired long-chain fatty acid utilization by cardiac myocytes isolated from mice lacking the heart-type fatty acid binding protein gene. *Circ Res*, 1999, 85(4):329-337.
- [4] Tanaka T, Hirota Y, Sohmiya K, et al. Serum and urinary human heart fatty acid-binding protein in acute myocardial infarction. *Clin Biochem*, 1991, 24(2):195-201.
- [5] Pelsers M M, Hermens W T, Glatz J F. Fatty acid-binding proteins asplasma markers of tissue injury. *ClinChimActa*, 2005, 352(1-2):15-35.
- [6] Chan C P, Sanderson J E, Glatz J F, et al. A superior early myocardial infarction marker. Human heart-type fatty acid-binding protein. *Z Kardiol*, 2004, 93(5):388-397.
- [7] Bertinchant J P, Polge A. Diagnostic and prognostic value of heart-type fatty acid-binding protein (H-FABP), an early biochemical marker of myocardial injury. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2005, 98(12):1225-1231.
- [8] Alhadi H A, Fox K A. Do we need additional markers of myocyteneclerosis; the potential value of heart fatty-acid-binding protein. *QJM*, 2004, 97(4):187-198.
- [9] Raghava G P, Agrewala J N. Method for determining the affinity of monoclonal antibody using non-competitive ELISA: a computer program. *J Immunoassay*, 1994, 15(2):115-128.
- [10] Ghani F, Wu A H, Graff L, et al. Role of heart-type fatty acid-binding protein in early detection of acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 2000, 46(5):718-719.
- [11] Wu A H. Analytical and clinical evaluation of new diagnostic tests for myocardial damage. *Clin Chim Acta*, 1998, 272(1):11-21.
- [12] Trifonov I R, Katrukha A G, Deev A D, et al. Heart fatty acid binding protein in patients with ST-elevation acute coronary syndrome hospitalized within 6 hours after onset of pain. *Kardiologiia*, 2002, 42(6):18-23.
- [13] Nakata T, Hashimoto A, Hase M, et al. Human heart-type fatty acid-binding protein as an early diagnostic and prognostic marker in acute coronary syndrome. *Cardiology*, 2003, 99(2):96-104.
- [14] Suzuki M, Hori S, Noma S, et al. Prognostic value of a qualitative test for heart-type fatty acid-binding protein in patients with acute coronary syndrome. *Int Heart J*, 2005, 46(4):601-606.
- [15] Roos W, Eymann E, Symannek M, et al. Monoclonal antibodies to human heart fatty acid-binding protein. *J Immunol Methods*, 1995, 183(1):149-153.

Development and Characterization of Monoclonal Antibodies Against Human Heart Type Fatty Acid Binding Protein and Its Application in Lateral Flow Immunoassay

KANG Ke-ren^{1,2} WU Pei-dian² HUANG Qi-lin² LI Yue-lin² LI Gao-hui²
TANG Shi-xing² WANG Ji-hua²

(1 School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

(2 National Engineering Laboratory of Rapid Diagnostic Test, Guangzhou Wondfo Biotech Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract AIM: To develop and characterize monoclonal antibodies (mAb) against human heart type fatty acid binding protein (H-FABP); To develop a rapid lateral flow immunoassay for detecting H-FABP in plasma using the identified mAbs. Methods: BALB/c mice were immunized with H-FABP. The hybridoma cells were generated by fusing spleen cells and myeloma cells SP2/0 followed by screening and clonally selecting. The mAbs were purified from ascites and characterized by indirect ELISA and Western Blot, and were used for developing a rapid lateral flow immunoassay. Results: Twelve hybridoma cell lines were found to secrete anti-H-FABP with high titers, specificity and affinity. Among them, the antibody pair of 3D1 and 5F4 were used as conjugate and coating antibody, respectively, in lateral flow immunoassay. The newly developed assay was used to detect 203 patients plasma. A 100% consistence was observed when compared with the reference kit. Conclusion: Two mAbs against H-FABP with high titers, specificity and affinity were obtained. The rapid lateral flow immunoassay was successfully developed for sensitive and specific detection of H-FABP in human plasma by using these mAbs.

Key words H-FABP Monoclonal antibody Point of care testing Lateral flow immunoassay