

# 2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080006

參展科別 生物化學

作品名稱 PMCA 技術在漸凍症(ALS)致病蛋白 TDP-43  
纖維之高靈敏度偵測開發及應用

得獎獎項

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 陳怡旻、陳韻如

作者姓名 簡筱潔

關鍵詞 PMCA 技術、TDP-43、漸凍症

## 作者簡介



我是簡筱潔，目前就讀北一女中科學班，高一時開始在中研院的實驗室開始進行科展研究，過程中體會到研究的快樂與辛苦，對生物化學的實驗技巧也有更深入的了解。

感謝中研院基因體中心陳韻如教授，讓我有進入實驗室學習的機會。感謝實驗室的黃詩涵學姊，陪我進行實驗並一起討論報告。感謝北一女中陳怡旻老師，在專研路上給的扶持與協助。最後感謝我的家人朋友，給了我一直做下去的動力。

## 摘要

TDP-43 是漸凍症(ALS)以及額顳葉失智症(FTLD)等神經退化性疾病的致病蛋白，在患者腦內會有不正常的類澱粉蛋白 TDP-43 錯誤折疊而產生蛋白質堆積，而不同堆積階段依序為單體(monomer)、多倍體(oligomer)、纖維(fiber)。其中纖維為許多神經退行性疾病的病理標誌，且相較於已有的 TDP-43 oligomer 單株抗體(Yu-Sheng Fang et al.(2014))，目前沒有對於 TDP-43 纖維抗體的研究，因此本實驗利用單株抗體技術所製造出對應 TDP-43 纖維的不同抗體進行純化及濃縮，找出對 TDP-43 fiber 專一性最高、結合效率及結合率皆最好抗體，以作為能夠檢測漸凍症患者血液中 TDP-43 fiber 的生物標誌(Biomarker)。

同時為了增加偵測的靈敏度，本實驗成功創新利用 PMCA (protein misfolding cyclic amplification) 技術快速放大纖維的數量以提高檢測準確度，搭配高專一性、高結合效率的編號 3-2 自製抗體作為 Biomarker，只需五個小時便可以將極少量纖維的訊號約提高至原先的 17 倍，具有極高的靈敏性可以準確辨認出有無 TDP-43 纖維的樣本差別。

## Abstract

Patients suffering from Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) are generally characterized by the accumulation of an incorrectly folded amyloid - TDP-43. TDP-43 exists in numerous forms throughout different stages, as monomers, oligomers, or fibers, in which the presence of fibers are considered as pathological indicators. In comparison to the researches carried out on monoclonal antibodies of TDP-43 oligomers (Yu-Sheng Fang et al.(2014)), little to none experimentation has been conducted on TDP-43 fiber antibodies. Hence, in my research I set out to resolve this complication by selecting various antibodies that are capable of binding to TDP-43 and its polymerized forms, then further evaluating antibodies with the highest specificities and binding coefficients to act as potential biomarkers. In addition, this experiment successfully implemented Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) to increase detection sensitivity and accuracy, allowing for a self-made antibody (#3-2) to amplify signals by 17 times the original strength. This antibody with high sensitivity and binding efficiency is thus able to act as an accurate biomarker for identifying the presence of TDP-43 fibers in samples.

# 壹、前言

## 一、研究背景介紹

### (一) 類澱粉蛋白

類澱粉蛋白是一種蛋白質，容易堆積形成不可溶的纖維，在許多神經性疾病如阿茲海默症、帕金森氏症中，都可以觀察到神經系統中出現大量類澱粉蛋白的累積沉澱。

### (二) TDP-43

TDP-43 的全名為 TAR DNA-binding protein 43，大小為 43 kDa，含有 414 個胺基酸。且會造成神經變性。( Buratti, Baralle(2012) )

TDP-43 屬於核內不均一核糖核酸蛋白(hnRNP)家族的一員，可以與單鏈 RNA 的特定序列結合，轉錄並剪接 miRNA，協助 mRNA 的轉運、降解及蛋白質的轉譯。

( Mackenzie, Rademakers, Neumann(2010) )

TDP-43 的 C 端富含甘氨酸、谷氨酰胺及天冬酰胺，複雜度小，也因此當 TDP-43 被 caspase-3 切成較小的 25 kD 和 35 kD 片段時很容易與其他蛋白質結合，造成錯誤的摺疊與聚合，形成聚合體並在神經細胞中沉積時便會造成原先的功能無法運作，進而造成漸凍症(ALS)及額顳葉退化症(FTLD)。( Feneberg, Gray, Ansorge, Talbot, Turner(2018) )

大多數的時間 TDP-43 為一種核蛋白，而在 ALS 和 FTLN 病患體內，TDP-43 會易位到細胞質中，從 monomer 聚集成 oligomer，進而糾纏形成 fiber 轉為聚集體。

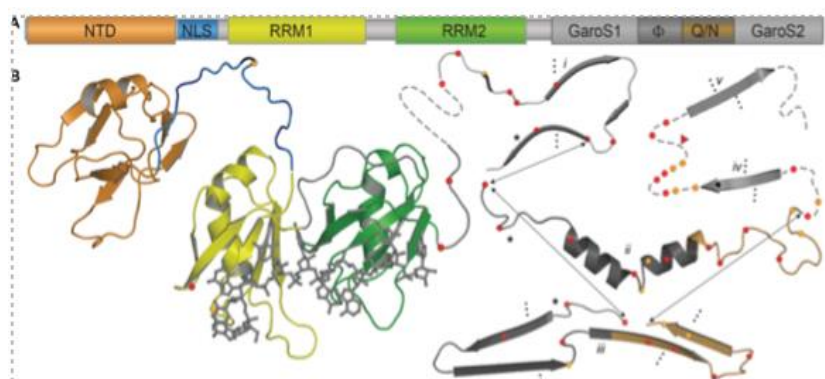


圖 1、TDP-43 結構示意圖( François-Moutal, Perez-Miller, Scott, Miranda, Mollasalehi, Khanna(2019) )

### (三) 蛋白質錯折疊循環擴增技術(protein misfolding cyclic amplification, PMCA)

蛋白質錯折疊循環擴增技術(protein misfolding cyclic amplification, PMCA)曾被使用於狂牛症中普立昂蛋白的探測以及阿茲海默症中  $A\beta$  類澱粉蛋白的偵測。PMCA 的步驟為超音波震盪(sonication)及培養(incubation)兩個階段的不斷重複。原理為利用現有的錯誤折疊的蛋白質做為種子(seed)，並利用超音波震盪不斷打破他們成更小的碎片，以其進行育種(seeding)，與正常蛋白質混合時就能更快的將正常蛋白質轉化並複製為錯誤折疊的型態。而這個型態上的轉換在人體可能需要耗費數年時間，透過 PMCA 即可達到快速大量複製的效果，對於病患樣本的檢測有很大的幫助。

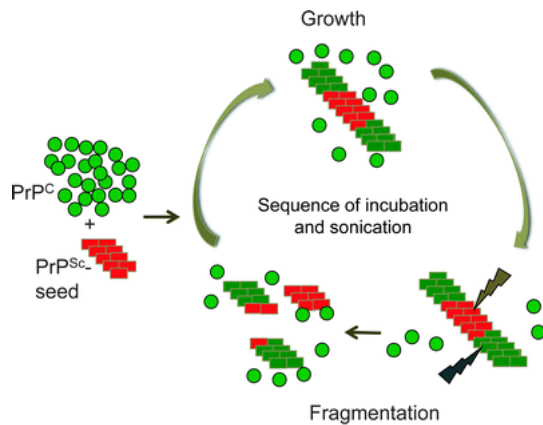


圖 2、PMCA 實驗示意圖，以普立昂蛋白為例(Fabio Moda, Sandra Pritzkow & Claudio Soto (2012))

## 二、研究動機

漸凍症(ALS)是一種致命的神經退化性疾病，目前仍未找到完善的檢測方法，只能依照臨床上的症狀進行病況的判斷，初期容易與其他症狀相似的疾病混淆，造成診斷的延誤及不必要的治療及手術。在市面上仍沒有可以根治的方法，只能透過藥物針對症狀進行緩解。

研究指出，在 ALS 病患的體內細胞中，會有大量的全長 TDP-43 多倍體(oligomer)及被人體中 caspase-3 切割後堆積而成的纖維(fiber)( Buratti, Baralle(2012) )。當 TDP-43 被 caspase-3 切成較小的 25 kDa 和 35 kDa C 端片段時很容易與其他蛋白質結合，造成錯誤的摺疊與聚合，進而造成漸凍症(ALS)及額顳葉退化症(FTLD)。( Feneberg, Gray, Ansorge, Talbot, Turner(2018) )，其中類澱粉蛋白的 fiber 不僅為許多神經退行性疾病的病理標誌 (Suk, Rousseaux (2020))，同時也代表被 caspase-3 切割後的類澱粉蛋白樣本，且相較已有的 TDP-43 oligomer 單株抗體(Yu-Sheng Fang et al.(2014))，目前沒有對於 TDP-43 fiber 抗體的研究，因此我採用 TDP-43 fiber 作為我研究的對象，製造出對應的抗體進行偵測。

蛋白質錯折疊循環擴增技術(protein misfolding cyclic amplification, PMCA)曾被應用在狂牛症及帕金森氏病的檢測，但從未有人將它運用在漸凍症的檢測上。PMAC 利用超聲波將極少量的錯誤摺疊蛋白質的數量放大，幫助檢測。由於漸凍症早期在血漿內的 TDP-43 切割後的 fiber 片段較少，且並沒有明顯症狀，因此我認為若能將 PMCA 應用在 TDP-43 的判斷上，將幫助漸凍症初期檢測，幫助有家族病史的人或漸凍症高風險族群定期進行檢測，及早治療，同時對於患病後的病程判斷也會是個很好的指標。

因此本研究使用 caspase-3 切割全長 TDP-43 oligomer 製造出 fiber 後，篩選 TDP-43 纖維單株抗體，比較出具有最高專一性、結合效率、結合效率的抗體，並搭配 PMCA 技術放大、複製少量 TDP-43 fiber，開發出透過少量血液樣本就能在疾病初期以高靈敏度檢測的方法。

### 三、研究動機

- (一) 製造出 TDP-43 纖維，並了解其型態變化
- (二) 製作出 TDP-43 的單株抗體，並以 Protein G 進行純化，得到高純度、高濃度的抗體
- (三) 分析 TDP-43 的單株抗體對於 TDP-43 的 oligomer、fiber 型態是否具有專一性，並達到最高的結合效果
- (四) 實際了解 TDP-43 纖維與單株抗體的結合
- (五) 了解 TDP-43 纖維以 PMCA 技術複製放大的可行性，並找出 TDP-43 纖維以 PMCA 技術複製放大的最佳環境
- (六) 利用自製單株抗體作為 Biomarker 對 PMCA 過後的樣本進行偵測，了解其結合

## 貳、研究方法

### 一、TDP-43 纖維製造

(一) 利用大腸桿菌生產 TDP-43 重組蛋白，並模擬人體中 caspase-3 切割全長 TDP-43 的狀況，製作出 TDP-43 fiber

1. 將能轉譯出 TDP-43 胺基酸序列的質體植入大腸桿菌基因中
2. 將大腸桿菌以培養基培養，使其表現出 TDP-43 全長蛋白質，得到 TDP-43 多倍體 (oligomer)
3. 將收集到的菌液以快速蛋白質液相色譜(FPLC)進行純化，並離心濃縮
4. 濃度大於 15  $\mu\text{M}$  後，加入 1/100 倍體積的 caspase-3，切割 TDP-43 蛋白，在室溫搖晃過夜，形成 fiber

(二) 由於 TDP-43 纖維不溶於水，因此需了解何種溶液能使 TDP-43 纖維復溶以方便進行實驗

1. 將 TDP-43 的 oligomer、fiber 分別以 PBS、SDS 進行處理後，配置成 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作為抗原，取 50 $\mu\text{L}$  加入 96 孔盤內，放置過夜
2. 以 PBST 清洗過後三次，將 BSA 加入 PBST 中，配 0.2% 溶液，每孔加入 300  $\mu\text{L}$  進行封閉
3. 以 PBST 清洗三次，將市售 TDP-43 抗體 10782 以 1% BSA 稀釋為 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，在室溫下搖晃均勻 2 小時
4. 以 PBST 清洗三次，將 Goat anti mouse IgG-HRP 抗體作為二抗，以 1% BSA 稀釋為 0.04  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨
5. 將 100  $\mu\text{l}$  TMB 加入孔中，TMB 與二抗上的 HRP 反應呈現藍色，搖晃 10 分鐘
6. 在孔中加入 100  $\mu\text{l}$  250 mM HCl 停止反應，呈現黃色
7. 測量 O.D 450nm



(三) 以圓二色性(CD)光譜了解 TDP-43 纖維在加入溶液前後的型態差異，確認以溶液將纖維復溶後不會影響纖維結構並影響實驗結果

1. 將 TDP-43 纖維分別加入不同濃度的 PBS 及 SDS 後，放入石英管中
2. 將樣本放入圓二色性光譜儀中，測量波長 195nm~255nm 的圓二色性光譜，藉以了解蛋白質特性

## 二、TDP-43 纖維的單株抗體製造、純化、濃縮

(一) 製造出可能對 TDP-43 纖維結構具有專一性的單株抗體

1. 將 TDP-43 纖維抗原交給生技公司進行小鼠免疫並製成融合瘤細胞，以生產單株抗體

(二) 利用抗體會與 Protein G 結合的特性，將 medium 中的抗體純化並濃縮

1. 將接上 Protein G 的樹脂與含有抗體的 medium 充分混合，並將液體過濾，留下樹脂與其所結合的抗體
2. 以酸性溶液 0.2M glycine (pH2.7)將抗體從樹脂上洗出，並滴入緩衝溶液(1.5M Tris pH8.0)中
3. 以 30 kDa 濃縮管提高抗體的濃度，並偵測抗體 280nm 的吸光度推算抗體濃度
4. 分別取抗體原液、純化後的上清液、純化並濃縮後 30kDa 以上液體及純化並濃縮後 30kDa 以下液體命名為 a、b、c、d 樣本，以了解抗體是否純化完全

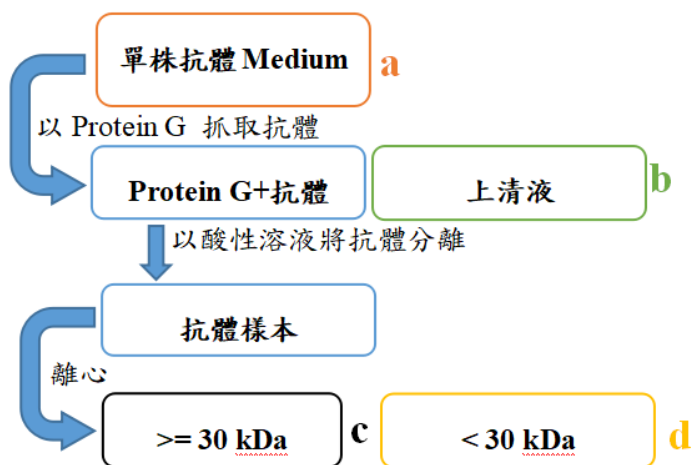


圖 3、抗體純化及濃縮步驟，在步驟中選取四處(a 為抗體原液、b 為純化後的上清液、c 為處理後樣品、d 為濃縮後 30kDa 以下液體)作為樣本，了解抗體是否完全純化完成。

(三) 確認抗體中是否含有雜質，並且是否為實驗所需之 IgG

1. 將樣本進行 SDS 膠體電泳
2. 以 CBB 染色，確定蛋白質的大小，以及雜質的有無
3. 以 Goat anti mouse IgG-HRP 作為二抗，進行 western blot 染色，確定其中是否有 IgG 抗體

### 三、找出對於 TDP-43 具有專一性的抗體

(一) 利用 Indirect ELISA 確認抗體與 TDP-43 的 oligomer 及 fiber 的結合情形

1. 將 TDP-43 的 oligomer、fiber 以 SDS 進行處理後，配置成  $0.5 \mu\text{g/mL}$  作為抗原，取  $50\mu\text{L}$  加入 96 孔盤內，放置過夜
2. 以 PBST 清洗過後三次，將 BSA 加入 PBST 中，配為 2% 溶液，每孔加入  $300 \mu\text{l}$  進行封閉
3. 以 PBST 清洗三次，將本實驗所製抗體以 1% BSA 稀釋為  $2 \mu\text{g/ml}$ ，在室溫下搖晃均勻 2 小時
4. 以 PBST 清洗三次，將 Goat anti mouse IgG-HRP 抗體作為二抗，以 1% BSA 稀釋為
5.  $0.04 \mu\text{g/ml}$ ，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨
6. 將  $100 \mu\text{l}$  TMB 加入孔中，TMB 與二抗上的 HRP 反應呈現藍色，搖晃 10 分鐘
7. 在孔中加入  $100 \mu\text{l}$  250 mM HCl 停止反應，呈現黃色
8. 測量 O.D 450nm



圖 4、Indirect ELISA 實驗示意圖

(二) 利用 Indirect ELISA 確認不同濃度抗體與 TDP-43 的結合情形

1. 將 TDP-43 的 oligomer、fiber 分別以 PBS、SDS 進行處理後，配置成  $0.5 \mu\text{g/mL}$  作為抗原，取  $50\mu\text{L}$  加入 96 孔盤內，放置過夜
2. 以 PBST 清洗過後三次，將 BSA 加入 PBST 中，配為 2% 溶液，每孔加入  $300 \mu\text{l}$  進行封閉
3. 以 PBST 清洗三次，將抗體以 1% BSA 分別稀釋為 4、2、1、0.5、0.25、 $0.125 \mu\text{g/ml}$ ，在室溫下搖晃均勻 2 小時
4. 以 PBST 清洗三次，將 Goat anti mouse IgG-HRP 抗體作為二抗，以 1% BSA 稀釋為  $0.04 \mu\text{g/ml}$ ，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨
5. 將  $100 \mu\text{l}$  TMB 加入孔中，TMB 與二抗上的 HRP 反應呈現藍色，搖晃 10 分鐘
6. 在孔中加入  $100 \mu\text{l}$  250 mM HCl 停止反應，呈現黃色
7. 測量 O.D 450nm

#### 四、單株抗體與 TDP-43 纖維結合過程研究

(一) 以穿透式電子顯微鏡(TEM)，確認抗體與纖維實際的結合情形

1. 在銅網上靜置  $10\mu\text{L}$  TDP-43 樣本五分鐘
2. 以 ddH<sub>2</sub>O 清洗五次
3. 以 1% BSA/PBS 浸泡 30 分鐘固定
4. 在銅網上靜置  $10\mu\text{L}$  TDP-43 抗體樣本並靜置 2 小時
5. 以 PBS 沖洗三次
6. 在銅網上加入  $10\mu\text{L}$  的 Goat anti mouse binding 10nm nanogold (1:40) 做為二抗
7. 以 PBS 沖洗三次，在以 ddH<sub>2</sub>O 清洗五次
8. 以 2% PTA 染色 30 秒

(二) 以 Western-Page 了解抗體與纖維在不同濃度 SDS 復溶後的結合

1. 取相同量的抗體，分別溶於 2%、1%、0.5%、0.125% SDS、及 PBS 中，做為樣本

2. 將樣本進行電泳，並轉漬到 NC 膜上
3. 將 NC 膜浸泡 5%脫脂牛奶/TBST 中封閉，搖晃一小時
4. 以 PBST 清洗三次，將抗體以 5%脫脂牛奶/TBST 分別稀釋  $0.5 \mu\text{g/ml}$ ，在室溫下搖晃均勻 2 小時
5. 以 PBST 清洗三次，將 Goat anti mouse IgG-HRP 抗體作為二抗，以 5%脫脂牛奶/TBST 1:5000 稀釋，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨
6. 加入 ECL 試劑，放出冷光呈色

(三) 以 Dot-Blot 了解抗體與纖維以 caspase-3 切割後不同形成程度的結合

1. 在 TDP-43 oligomer 中加入 caspase-3，在 0、5、15、60、120、240 分鐘時，取出 5uL，分別配置成 0.2% SDS 溶液，以及以等量 ddH<sub>2</sub>O 稀釋
2. 將取出後的樣本靜置 15 分鐘後，取 2uL 點在 NC 膜上
3. 將 NC 膜靜置放乾後，置入 5%脫脂牛奶/TBST 中，搖晃 30min
4. 以最有潛力做為 biomarker 的抗體為二抗，以 5%脫脂牛奶/TBST 稀釋為  $0.04 \mu\text{g/ml}$ ，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨
5. 以 PBST 清洗三次，將 Goat anti mouse IgG-HRP 抗體作為二抗，以 5%脫脂牛奶/TBST 1:5000 稀釋，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨
6. 加入 ECL 試劑，放出冷光呈色

## 五、了解 TDP-43 纖維以 PMCA 技術複製放大的最佳環境

(一) 以蛋白質錯誤折疊擴增循環(PMCA)放大 TDP-43fiber 訊號，比較 seeding 與否的放大效果，並測試最佳的偵測染劑

1. 在 96 孔盤內放入 TDP-43 全長蛋白並加入以超音波震盪 40 秒後的等量 TDP-43 纖維作為 seed
2. 分別加入螢光染劑 K114 及 ThT 以方便定量並了解何者能作為 TDP-43 fiber 的偵測染劑

3. 利用超音波震盪使 TDP-43 全長蛋白質斷裂，以 40 秒的超音波震盪後，靜置 29 分 20 秒為一循環，分別在不同循環數時取出樣本
4. 偵測螢光訊號，判斷 TDP-43 纖維濃度

(二) 了解加入超音波切斷的 fiber 能否對 oligomer 造成育種(seeding)，探討 PMCA 的作用

1. 在 96 孔盤內放入 TDP-43 全長 oligomer 及少量經過超音波震盪後不同濃度的 TDP-43 纖維做為 seed
2. 加入實驗所測試出的偵測染劑以偵測 fiber 訊號
3. 放於螢光光譜儀，並每靜置 30 分鐘後，以波長 350nm 的光激發，並偵測在波長 446nm 的螢光強度
4. 連續偵測兩天，並將結果繪製成圖，並與經過 PMCA 的 fiber 複製比較

(三) 模擬漸凍症患者血漿，測試 PMCA 對微量 fiber 的放大作用

1. 在 96 孔盤內放入 TDP-43 全長蛋白並分組分別加入以超音波震盪 40 秒後的少量不同濃度 TDP-43 纖維作為 seed
2. 加入螢光染劑定量 TDP-43 fiber
3. 利用超音波震盪使 TDP-43 全長蛋白質斷裂，以 40 秒的超音波震盪後，靜置 29 分 20 秒為一循環，分別在不同循環數時取出樣本
4. 偵測螢光訊號，判斷 TDP-43 纖維濃度

## 六、將自製單株抗體作為 Biomarker 對 PMCA 過後的樣本進行偵測，了解其結合

(一) 利用 Indirect ELISA 確認抗體 3-2 與 PMCA 過後的 TDP-43 oligomer 及 fiber 的結合情形

1. 將經過 144 cycle PMCA 的 oligomer, fiber, 以 10% fiber seeding 過後的 oligomer 三組樣本以 SDS 處理後，配置成  $0.5 \mu\text{g/mL}$  作為抗原，取 50 $\mu\text{L}$  加入 96 孔盤內靜置兩小時
2. 以 PBST 清洗過後三次，將 BSA 加入 PBST 中，配為 2% 溶液，每孔加入 300  $\mu\text{l}$  封閉
3. 以 PBST 清洗三次，加入  $4 \mu\text{g/ml}$  的 3-2 抗體(經前面實驗篩選出最具潛力之抗體)，在

室溫下搖晃均勻 2 小時

- 4 · 以 PBST 清洗三次，將 Goat anti mouse IgG-HRP 抗體作為二抗，以 1% BSA 稀釋為 0.04  $\mu\text{g/ml}$ ，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨
- 5 · 將 100  $\mu\text{l}$  TMB 加入孔中，TMB 與二抗上的 HRP 反應呈現藍色，搖晃 10 分鐘
- 6 · 在孔中加入 100  $\mu\text{l}$  250 mM HCl 停止反應，呈現黃色
- 7 · 測量 O.D 450nm

## 參、結果與討論

### 一、製造 TDP-43 纖維並推算其濃度，了解其在 PBS/BSA 中的復溶效果

(一) 利用 caspase-3 製作 TDP-43 fiber，並了解其與 oligomer 的分子量差異

在 TDP-43 oligomer 加入 caspase-3 後，靜置一晚，可以看到離心管中有明顯沉澱產生，從處理後的樣本、樣本上清液與 oligomer 的 SDS-Page 結果可知，在以 caspase-3 處理後，oligomer 由原先的 63kDa 被切割為 25、32、48 kDa，比對文獻可知 caspase-3 能夠將 TDP-43 切為 25kDa 及 35kDa 兩個 C 端片段，可推論 25kDa 的條帶為 TDP-43 的 C 端，分子量 48 的條帶則可能為其二聚體(dimer)。(圖 5)

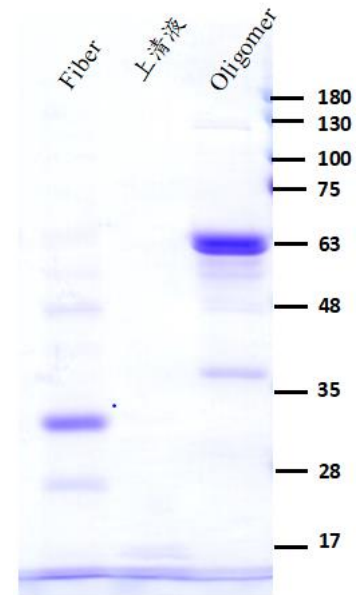


圖 5、將 TDP-43 fiber、fiber 上清液、oligomer 進行 SDS-Page 後所得膠片圖

(二) 利用 BSA 標準曲線推知 TDP-43 fiber 濃度

TDP-43 fiber 的 25、32、48 kDa 三個條帶相加後影像強度為 3357.014，經由 BSA 標準曲線能推知濃度為 0.610 ug/well-10ul。(圖 6)

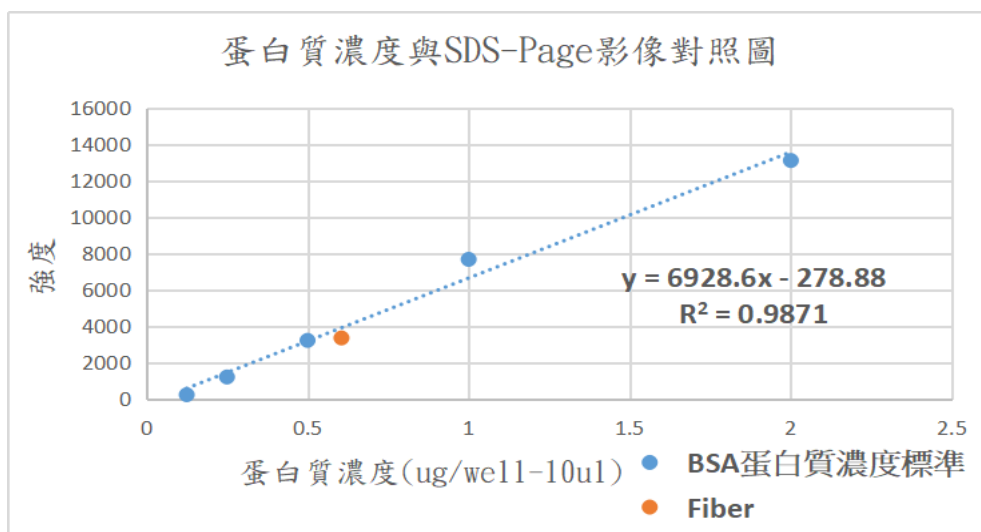


圖 6、BSA 蛋白標準直線與 TDP-43 fiber 蛋白質總量 BCR 染色後影像色彩強度比較(藍色線條為 BSA 濃度對影像強度標準曲線、橘色點為 TDP-43 fiber 強度與濃度推算)。

### (三) 了解 TDP-43 最能復溶在何種液體中

由於 TDP-43 的 fiber 在水中無法溶解，為了讓 TDP-43 的 fiber 及 oligomer 能夠附著在 96 孔盤上，我參照文獻( Geumann, Grønberg, Hellwig, Martens, Jahn(2010) )使用 PBS、2% SDS、2% SDS+1% Triton 將纖維溶於溶液中，以市售抗體 10782 作為一抗進行 ELISA，10782 為 TDP-43 的序列辨認抗體，可以與各個結構結合比對 oligomer 與 fiber 吸光強度，可以得知在加入同樣濃度抗體時，加入 SDS 能使抗體與 fiber 的結合強度達到最高，代表 SDS 溶液最能將纖維溶解在其中，因此我們將以 SDS 溶液復溶 TDP-43 fiber 進行實驗。

(圖 7)

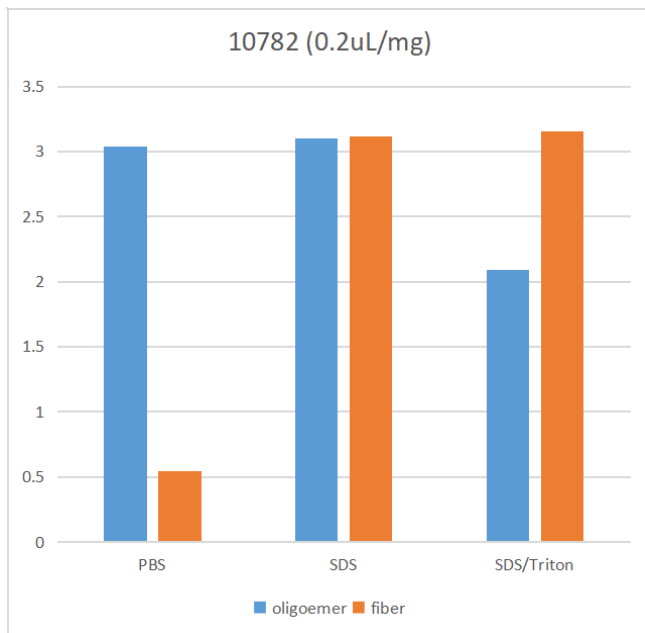


圖 7、將 TDP-43 oligomer、fiber 以 PBS、SDS 及 SDS 加上 0.1% Triton 後以 10782 作為抗體所得 ELISA 吸光強度圖



## 二、製造 TDP-43 纖維的單株抗體，純化並濃縮後了解其純度與及結合對象

在本次實驗中製作出 6 株單株抗體，分別命名為 2-6,3-2,3-3,3-4,3-5,3-6。

由於 Protein G 會與抗體的 Fab 和 Fc 區結合，因此我們使用 Protein G 純化出我們所需之 IgG 抗體，純化並濃縮後抗體的濃度可以達到原先的 100 倍(表 1)

	2-6	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6
純化前濃度	約為 20~50 ug/mL					
處理後濃度	3.88 mg/mL	4.03 mg/mL	3.66 mg/mL	3.48 mg/mL	2.98 mg/mL	3.50 mg/mL

表 1、抗體在以 Protein G 純化及濃縮前後濃度比較圖

純化完成後，利用 SDS-PAGE 分析樣本內蛋白質分子數，顯示抗體 medium 原液及純化後的上清液中蛋白質的分子量較大，因此可以判斷在純化後，分子量較大的雜蛋白已被排除，而在純化後的樣本中，由於 Protein G 不會與 FBS 及培養液中的雜質蛋白等結合，因此純度較高，可看到分子量約為 50 kDa 及 25 kDa 的兩個條帶，為抗體的輕鏈及重鏈，而濃縮後 30 kDa 以下則沒有條帶，代表在純化後沒有其他雜質。(圖 8)

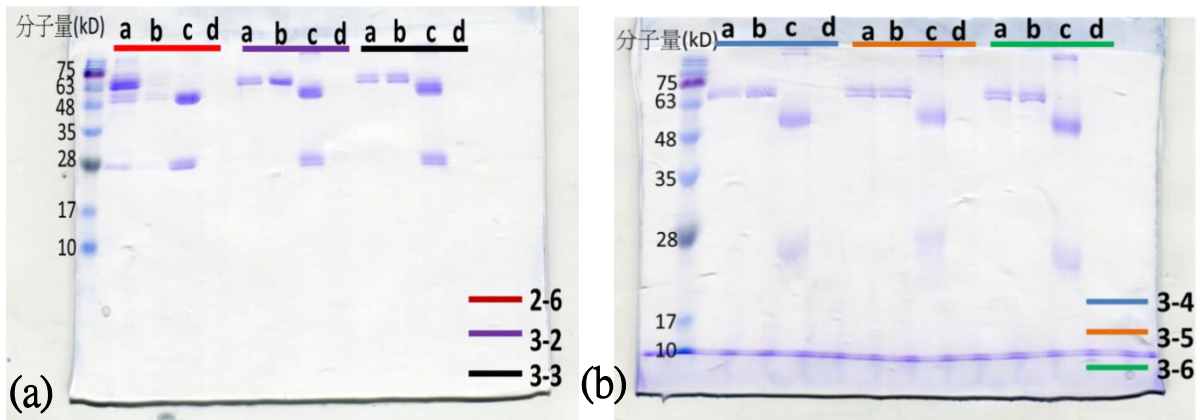


圖 8、6 種抗體在製造的 4 個階段樣本 SDS-PAGE 膠圖(a,b,c,d 為圖 3 中純化不同階段的抗體樣本)

將樣本與 Goat anti Mouse IgG-HRP 結合後，在抗體原液、上清液、樣本中皆能看到代表與 Goat anti Mouse IgG-HRP 結合的 IgG 抗體，可能因為 2-6 是從腹水萃取，濃度過高而無法純化完全，而抗體 3-2、3-3、3-4、3-6 皆在樣本中能夠看到 IgG 抗體，可以繼續進行

抗體篩選實驗，抗體 3-5 則皆沒有抗體的訊號，判斷 3-5 不是能夠與 Goat anti Mouse IgG 抗體結合的抗體。(圖 9)

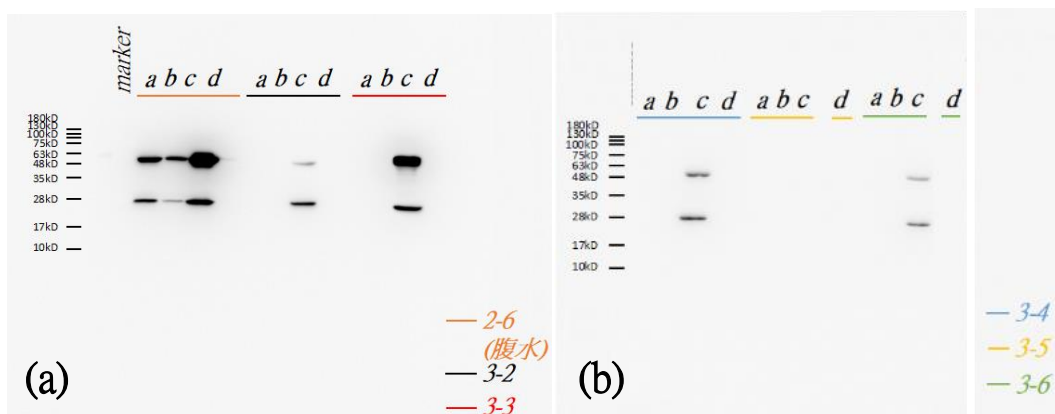


圖 9、6 種抗體在製造的 4 個階段樣本以 Goat anti Mouse IgG-HRP 作為二抗所得 Western-Blot 結果(a,b,c,d 為圖 3 中純化不同階段的抗體樣本)

### 三、找出對於 TDP-43 纖維具有最高專一性及結合效率之抗體

在前述實驗中所篩選出具有抗體的 2-6, 3-2, 3-3, 3-4, 3-6 五管抗體分別與 TDP-43 oligomer 及 fiber 結合後，由實驗結果比較不同抗體的訊號強度，可以得知抗體 2-6、3-2、3-4、3-6 對於 TDP-43 的型態具有較高的專一性，抗體對於 TDP-43 的 fiber 型態結合度遠高於 oligomer 型態。(圖 10)

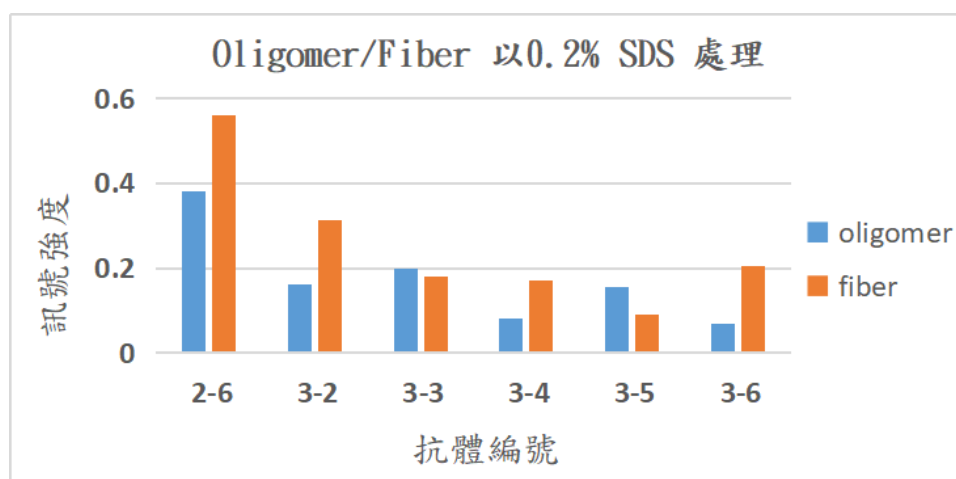


圖 10、不同種抗體與經由 2%SDS 處理後的 TDP-43 蛋白 oligomer、fiber 反應的 Elisa 強度，其中 2-6、3-2、3-4、3-6 對於 fiber 的結合高於 oligomer

在比較 fiber 與 oligomer 的結合度後留下的 4 種抗體(2-6、3-2、3-4、3-6)中，得知 2-6 抗體較無專一性，而 3-2、3-4、3-6 皆不與 TDP-43 oligomer 結合，能明顯分辨 TDP-43 的 fiber 與 oligomer。

當抗體與 TDP-43 結合線段斜率轉小時，代表兩者的結合趨近於完全，3-6 抗體在濃度為 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$  時大量結合完畢，3-2、3-4 抗體則在濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，便可完全結合，可證實其結合效率高。

比較吸光強度，3-2 較 3-4 來的高，代表定量的抗體中，抗體 3-2 能與較多的 TDP-43 fiber 結合，結合率高，因此抗體 3-2 為較具潛力成為 biomarker 的抗體。(圖 11)

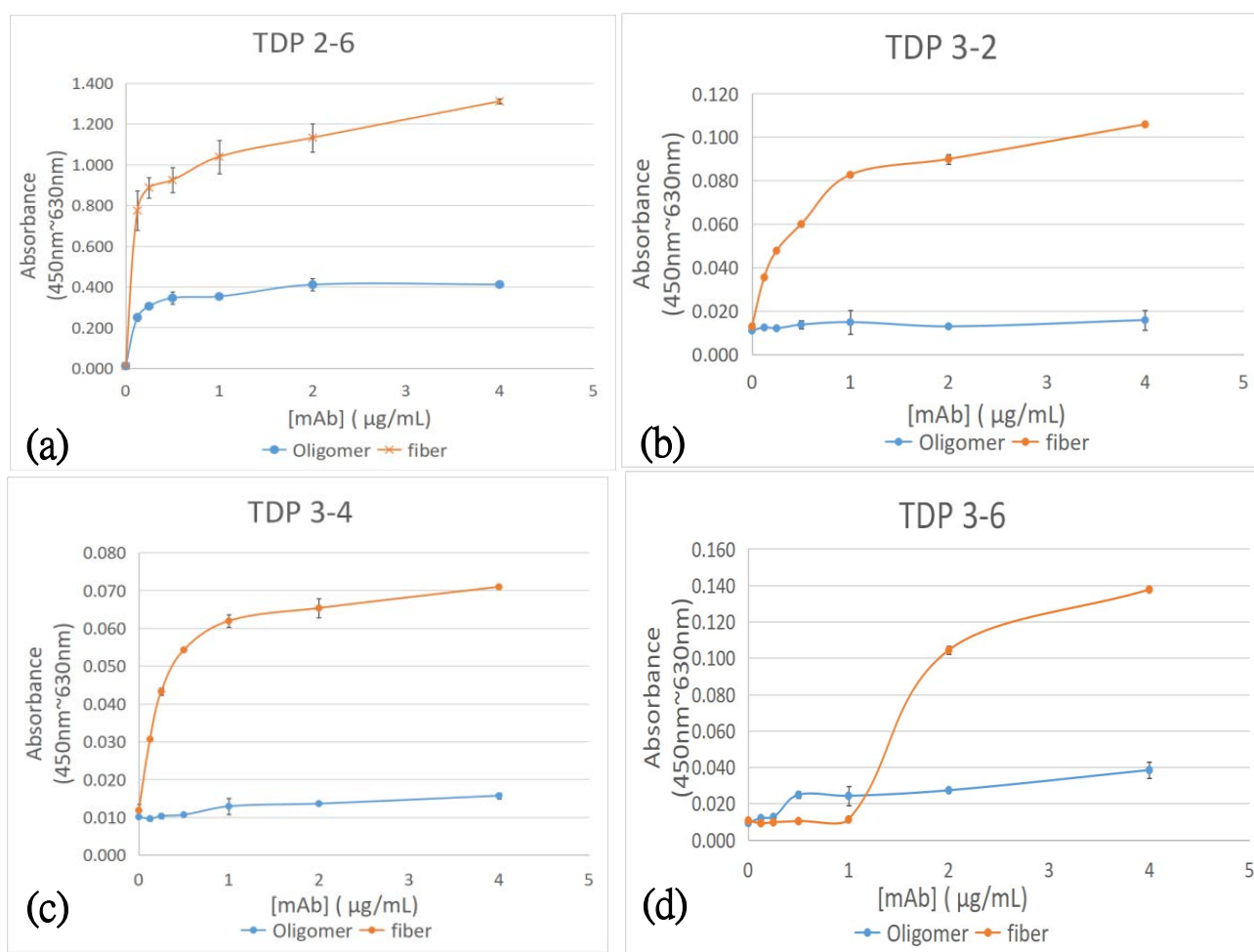


圖 11、不同濃度抗體與經由 2% SDS 處理後的 TDP-43 蛋白 oligomer、fiber 反應的 Elisa 強度，其中。

#### 四、單株抗體與 TDP-43 纖維結合過程研究

將抗體與抗原結合後，接合上奈米金粒子，在穿透式電子顯微鏡下可以觀察到抗體 2-6、3-2、3-4、3-6 皆可與 fiber 結合，在相同的抗體濃度下，可看到圖 10.b 的纖維上有最多的奈米金粒子附著，代表 3-2 抗體的結合率最好，與 ELISA 結果相符。

TDP-43 oligomer 在電子顯微鏡下為顆粒狀，使用 3-3 作為抗體時仍會少許附著在 oligomer 上，可以證實抗體 3-3 對於 fiber 的專一性較差。

相較於 10782，實驗所製抗體不會在纖維外背景區域有奈米金殘留，可證本實驗抗體的專一性高於市售抗體。(圖 12)

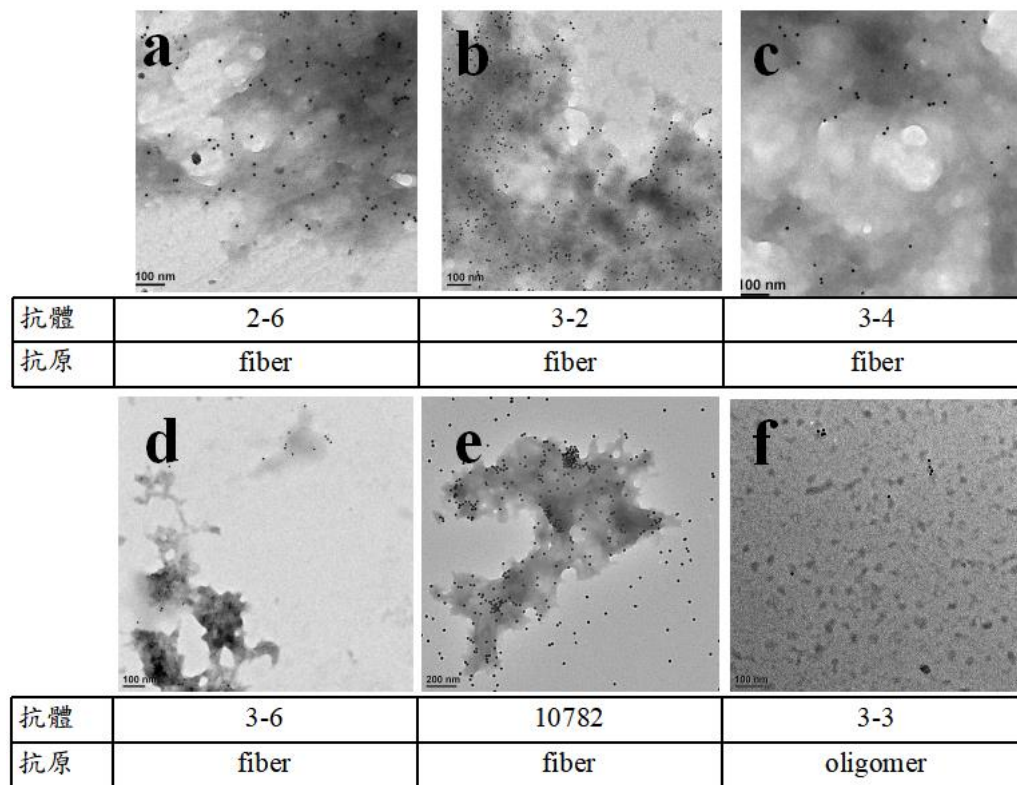


圖 12、TDP-43 纖維與不同抗體結合 TEM 圖，灰黑色陰影部分為纖維、黑色點則為抗體與其  
所附著的奈米金粒子

3-2 抗體會與分子量大小為 48kDa 的 TDP-43 雙聚體(dimer)以及較大的分子結合，且並不會 C 端單體結合，與相較於 10782 抗體，所結合的蛋白質片段較少，可以驗證本實驗所製抗體為結構專一性抗體。(圖 13)

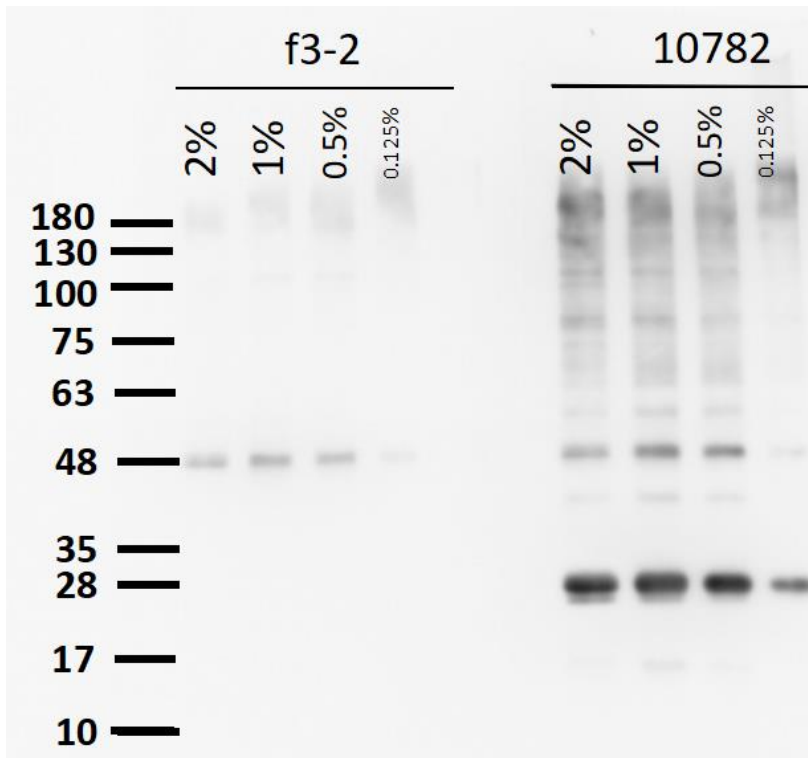


圖 13、TDP-43 fiber 以不同濃度 SDS 復溶後和抗體 3-2、10782 結合的 Western Blot 比較圖

以 caspase-3 將 TDP-43 處理 4 小時後與抗體 3-2 結合，在放光 90 秒即可看到明顯的成色，代表結合率高訊號大，而處理 15 分鐘、30 分鐘的纖維則 200 秒才能夠呈像。

當 TDP-43 在加入 caspase-3 後，至少需要 15 分鐘，才能重新聚集形成纖維，並與抗體 3-2 結合。且 Fiber 在加入 SDS 後與未加入的原液相比，較能在膜上附著。(圖 14)

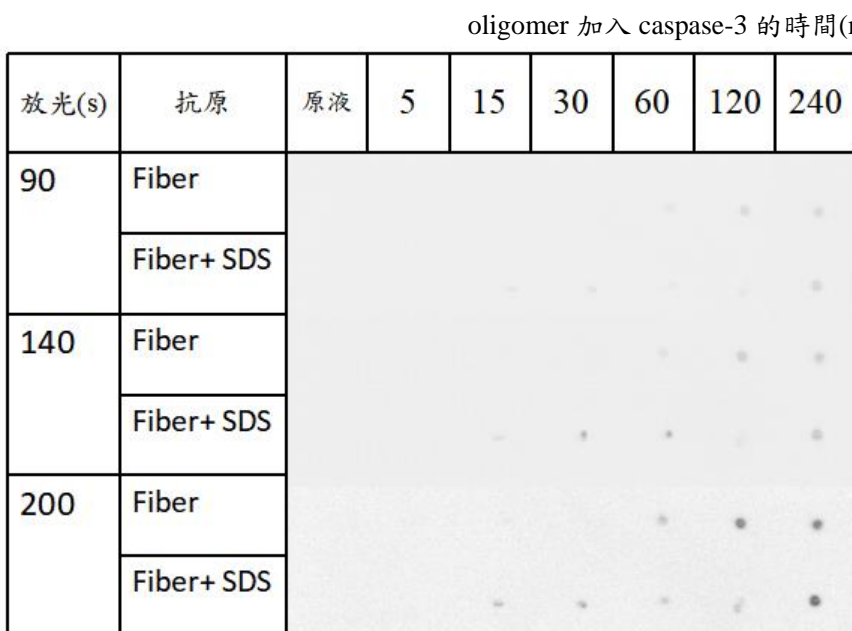


圖 14、以 Dot Blot 了解抗體 3-2 與用 caspase-3 切割不同時間製作的纖維結合。

## 五、TDP-43 纖維以 PMCA 技術複製放大研究

(一) 以蛋白質錯誤折疊擴增循環(PMCA)放大 TDP-43 fiber 訊號，比較 seeding 與否的放大效果，並測試最佳的偵測染劑

為了能夠在 PMCA 過程中得知 fiber 訊號的增長，我參考文獻(Veli Selmani, Kevin J Robbins, Valerie A Ivancic, Noel D Lazo (2015))使用 K114, ThT 兩種能夠增測類澱粉蛋白 fiber 訊號的螢光染劑，並將 oligomer 以 2 倍 fiber seeding 並偵測訊號，在兩者的螢光訊號圖中可以看到加入 ThT 染劑後，訊號極低，不具有參考價值而無法作為偵測染劑。而加入 K114 後，訊號會隨著 cycle 數增加而增加，且有 seeding 後的訊號增長速度較只有 oligomer 的訊號高許多，當 PMCA 進行到 40 個 cycle 後，訊號接近水平，代表 fiber 的數量趨向飽和，代表使用 fiber seeding 並配合 PMCA 能夠成功增長 TDP-43 fiber 複製的速度。因此在後續實驗中，我選擇以 K114 染劑作為 fiber 的偵測劑進行進一步的研究。

(圖 15)

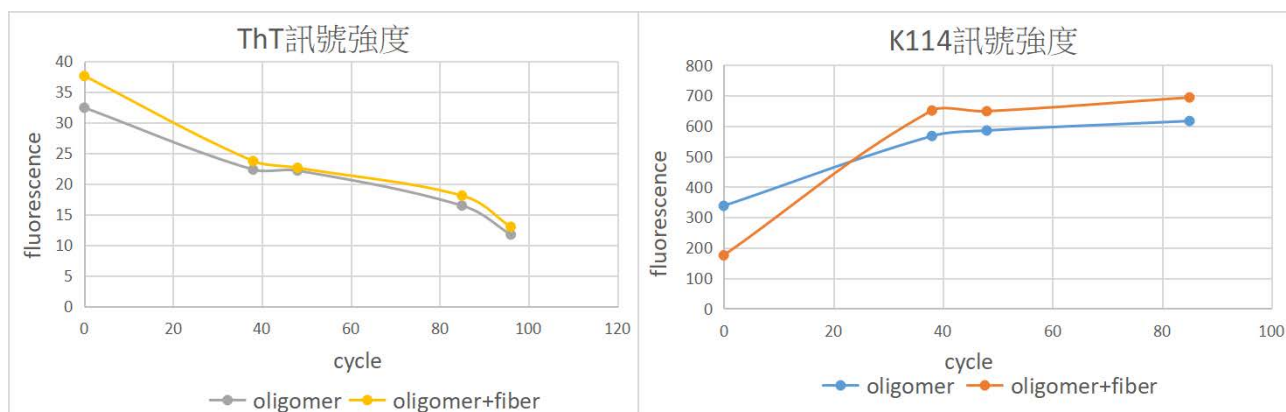


圖 15、以不同螢光偵測染劑測試 PMCA 技術對於 TDP-43 fiber 複製的結果

(二) 了解加入超音波切斷的 fiber 能否對 oligomer 造成 seeding，探討 PMCA 的作用

為了確認 PMCA 會對 fiber 的放大造成作用，我將 oligomer 中只加入超音波斷裂後的 fiber 進行長時間的培養而不配合 PMCA 技術，對照 oligomer 經過不同時間成為 fiber 的量，可以判斷 seeding 與否對於 oligomer 形成 fiber 過程的變化並不會造成影響，變化趨勢完全重合。因此可以確定在實驗中 fiber 大量的形成與放大為 PMCA 的作用。(圖 16)

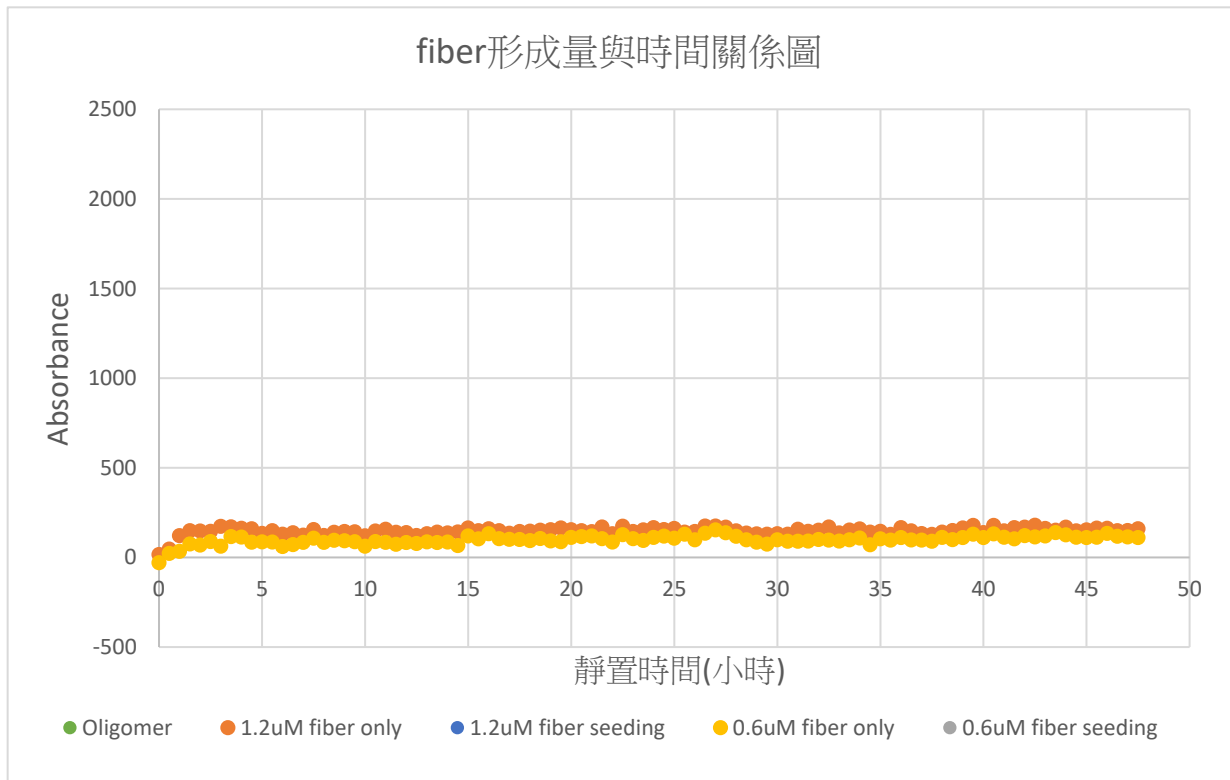


圖 16、以 fiber seeding 與否對於 TDP-43 oligomer 變化形成 fiber 的比較

(三) 模擬漸凍症患者血漿，測試 PMCA 對微量 fiber 的放大作用

比較不同比例 seeding 對 fiber 形成的影響，可以看到以 0.3 倍 oligomer 濃度的 fiber seeding 時，仍可以有效放大 fiber 訊號，K114 強度變化明顯高於只有 oligomer 的組別，代表 fiber 有迅速的增加，而 fiber 的訊號只需要 10 cycle 便可以接近飽和，證明透過 PMCA 技術，可以有效在短時間放大微量 fiber 的訊號，其中以加入 0.8 倍 oligomer 濃度的 fiber(2uM)效果最好，可以在五小時內讓 fiber 訊號達到原先的 17 倍。(圖 17)

而在未加入 oligomer 的 fiber 經過 PMCA 的強度變化圖中，可以看到在前 10cycle fiber 訊號強度的變化量極少，代表 fiber 的量並沒有明顯改變，且在後續 cycle 中，fiber 的訊號也極低，並不會對 seeding 的結果造成誤差。(圖 18)

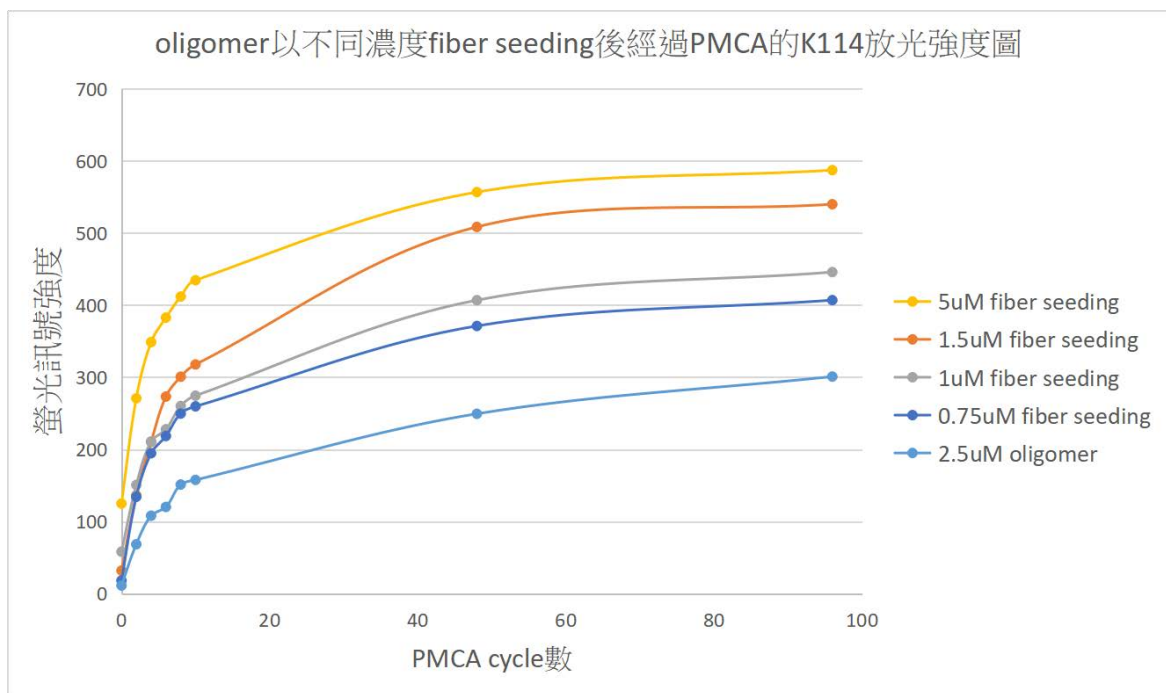


圖 17、加入不同濃度 fiber seeding 並經過 PMCA 後，fiber 訊號在前 10cycle 增加速率高，且有 seeding 的組別訊號皆高於 oligomer，其中以加入 2uM fiber 的訊號最高，在第 10cycle 達到原先的 17 倍



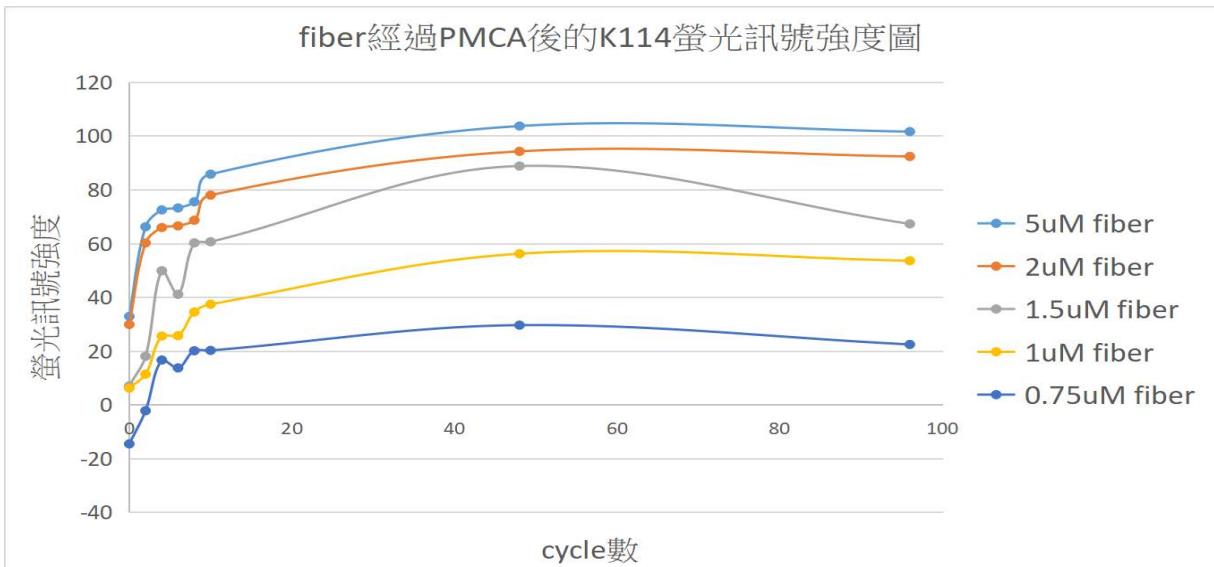


圖 18、不同濃度 fiber 經過 PMCA 後訊號強度皆極低，皆小於 120，並不會對實驗造成影響。

#### 六、將自製單株抗體作為 Biomarker 對 PMCA 過後的樣本進行偵測，了解其結合

將經過 PMCA 培養 144cycle 後的不同樣本取出，以抗體 3-2 進行偵測，抗體 3-2 能與 seeding 過後的 TDP-43 樣本結合，而不會對沒有 seeding 的 oligomer 結合，代表抗體 3-2 對 PMCA 所複製的 fiber 也具有專一性，可以搭配 PMCA 作為 biomarker，檢測微量的 TDP-43fiber 的存在。且 seeding 與否並不會對 10782 抗體辨認 TDP-43 訊號造成影響。(圖 19)

抗體 \ 抗原	3-2		10782	
	沒有 SDS	+2% SDS	沒有 SDS	+2% SDS
fiber only	弱訊號	弱訊號	無訊號	弱訊號
oligomer only	無訊號	無訊號	強訊號	強訊號
seeding	弱訊號	弱訊號	強訊號	強訊號

圖 19、利用 ELISA 了解抗體 3-2 與不同型態 TDP-43 蛋白經過 PMCA 後產物的結合，其中自製抗體與 seeding 過後的 fiber 結合訊號最高，為只有 oligomer 的 2.5 倍。

## 肆、結論

利用 caspase-3 切割 TDP-43 蛋白質可以得到 TDP-43 fiber，分子量會由 63kDa 的全長

TDP-43 蛋白被切割為 25、32kDa 的 C 端分子及 48 kDa 的 C 端雙聚體。

- 一、使用 0.2%SDS 可以將 TDP-43 fiber 復溶以方便實驗，同時保持蛋白質的 beta sheet 結構，不會造成變性。
- 二、將 TDP-43 fiber 以融合瘤細胞進行培養後，可以成功得到 6 株對應 TDP-43 纖維的單株抗體。在以 Protein G 純化與濃縮後，濃度可以達到原先的 100 倍，並且透過 SDS-PAGE 及 Western Blot 圖顯示其純度高，沒有多餘雜質。
- 三、透過 Indirect ELISA 確認抗體 3-2 對於 TDP-43 的 fiber 有最高的專一性、結合效率與結合率，有成為 TDP-43 Biomarker 的潛力。抗體 3-2 為 TDP-43 結構辨認抗體，只會與被 caspase-3 切斷後聚集結合而成的纖維結合，也不會與 TDP-43 C 端單體結合。
- 四、以 fiber 作為 seed 加入 oligomer 中，並搭配 PMCA 技術能有效快速複製 fiber 並放大訊號，只需要 0.8 倍 oligomer 濃度的極少量 fiber 就能在 5 個小時內將 fiber 訊號放大為原先的 17 倍，具有極高的靈敏度及效率。
- 五、以抗體 3-2 作為 biomarker，搭配 PMCA 技術放大 fiber 訊號，能準確判斷出樣本內是否具有 fiber，與只有 oligomer 的對照組具有明顯的差別。

## 伍、未來展望與應用

希望未來能分別以正常人血漿樣本、漸凍症初期患者血漿樣本、漸凍症後期患者血漿樣本做為 seed，加入相同濃度 oligomer 以 PMCA 技術放大 fiber 訊號，並用高專一性、高結合效率的抗體 3-2 作為 biomarker 定量 TDP-43 纖維量，以只有 oligomer 的組別作為對照組，比較與其三者的差別。希望能開發出透過少量血液樣本就能以高靈敏度檢測出漸凍症的方法，幫助有家族病史的人或漸凍症高風險族群定期進行檢測，並得到及時治療，同時作為患病後的病程判斷的指標。

## 陸、參考資料

- Constanze Geumann, Mads Grønberg, Michaela Hellwig, Henrik Martens, Reinhard Jahn(2010) A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of insoluble membrane and scaffold proteins. *Analytical Biochemistry* 402, 161-169
- Emanuele Buratti , Francisco E Baralle(2012) TDP-43: gumming up neurons through protein-protein and protein – RNA interactions. *ICGEB* 22534659
- Emily Feneberg, Elizabeth Gray, Olaf Ansorge, Kevin Talbot, Martin R. Turner(2018) Towards a TDP-43-Based Biomarker for ALS and FTL. *Molecular Neurobiology* 55:7789 – 7801
- Moda F., Pritzkow S., Soto C. (2013) Protein Misfolding Cyclic Amplification. In: Zou WQ., Gambetti P. (eds) *Prions and Diseases*. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5305-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5305-5_6)
- Terry R Suk , Maxime W C Rousseaux(2020)The role of TDP-43 mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Neurodegener*, doi: 10.1186
- Veli Selmani, Kevin J Robbins, Valerie A Ivancic, Noel D Lazo (2015)K114 (trans, trans)-bromo-2,5-bis(4-hydroxystyryl)benzene is an efficient detector of cationic amyloid fibrils. *Protein Sci*, doi: 10.1002/pro.2620
- Yu-Sheng Fang, Kuen-Jer Tsai, Yu-Jen Chang, Patricia Kao, Rima Woods, Pan-Hsien Kuo, Cheng-Chun Wu, Jih-Ying Liao, Shih-Chieh Chou, Vinson Lin, Lee-Way Jin, Hanna S. Yuan, Irene H. Cheng, Pang-Hsien Tu & Yun-Ru Chen(2014) Full-length TDP-43 forms toxic amyloid oligomers that are present in frontotemporal lobar dementia-TDP patients. *Nature Communications*, doi: 10.1038

## 【評語】 080006

本實驗利用單株抗體技術所製造出對應 TDP-43 纖維的不同抗體進行純化及濃縮，研究主題具重要性，並找出對 TDP-43 fiber 專一性最高、結合效率及結合率皆最好抗體，以作為能夠檢測漸凍症患者血液中 TDP-43 fiber 的生物標誌(Biomarker)。目前沒有對於 TDP-43 纖維抗體的研究，而針對錯誤折疊而產生蛋白質堆積纖維製成的抗體，對阿茲海默症已有臨床實驗有效的證據，因此本研究對漸凍症早期診斷及治療都值得一試。

建議：

1. 構想很好，也一步一步地成功做出數株抗 TDP-43 纖維單株抗體，雖然抗體 3-2 有達到作者設定的性質要求，但 ELISA 偵測後的強度皆不高 (圖 11b 與圖 19)，高出背景值不多，在檢驗上會很容易被誤判。
2. TDP-43 大小為 43 kDa，為何有 63kDa band？又 SDS-PAGE gel 為何還有二聚體(dimer)？所以本研究製備的 3-2 抗體是要認 48 kDa (圖 13)嗎？
3. 已有市售抗體 1078，圖七顯示 1078 會認 TDP-43 oligomer 及 fiber，本研究產生的抗體是否有比 1078 好？另外抗體 2-6 在

圖 10 及 11 的吸光度都是最高的，且在低濃度時就顯現高吸光，為何說抗體 3-2 能與較多的 TDP-43 fiber 結合，結合率高，因此抗體 3-2 較具潛力？雖然主要是依據接合上奈米金粒子，在穿透式電子顯微鏡下可以觀察到抗體與 fiber 結合的圖 12 結果，但如何解釋吸光度結果？