

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080014

參展科別 生物化學

作品名稱 針對漸凍症(ALS)致病蛋白 TDP-43 纖維的專
一性抗體篩選與研究

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 陳怡旻

作者姓名 簡筱潔

關鍵詞 專一性抗體篩選、TDP-43、蛋白質纖維

摘要

在漸凍症(ALS)以及額顳葉失智症(FTLD)等神經疾病中的病患腦內，caspase-3 會加速 TDP-43 片段化，使其切為 25kDa 及 35kDa 兩個片段，分別為 C 端片段及 N 端片段，必造成病患腦內會有不正常的類澱粉蛋白 TDP-43 錯誤折疊而產生的蛋白質堆積，而不同堆積階段依序為依序為單體(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。目前在 TDP-43 相關的疾病中，沒有生物標誌(Biomarker)及有效藥物來進行檢測及治療。在本研究中我利用由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，並透過酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)鑑定這些抗體對於 TDP-43 不同型態的親和力，並找出對 TDP-43 纖維專一性最高、結合效率最好的抗體，並實際了解抗體與 TDP-43 纖維的結合過程，了解抗體所能認的抗原表位(epitope)。以期做為疾病不同階段的生物標誌(Biomarker)來預測疾病進展並評估對治療的反應。

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, such as monomers, oligomers, or fibers. Unfortunately, effective detection of the disease progression is hampered due to the current lack of biomarkers that reports TDP-43 aggregation. 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 conducting Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to observe and evaluate antibodies with the highest specificities and binding coefficients. I hope that with the utilization of these antibodies as potential biomarkers, a better evaluation of disease progression could be made to assess the efficiency of treatment.

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 FTLD 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。

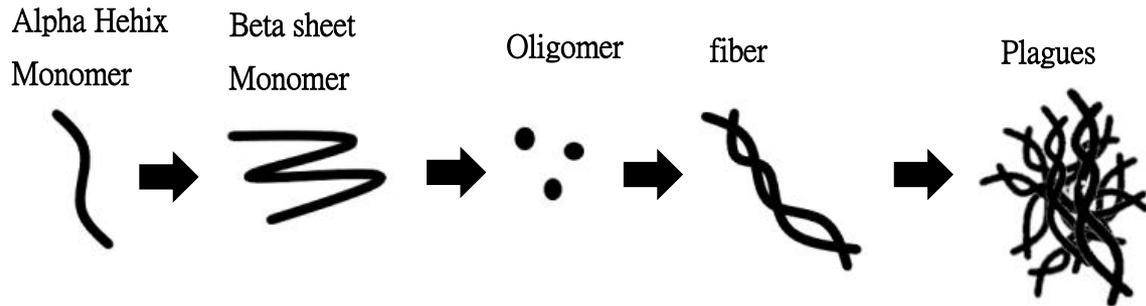


圖 1、TDP-43 型態演變示意圖

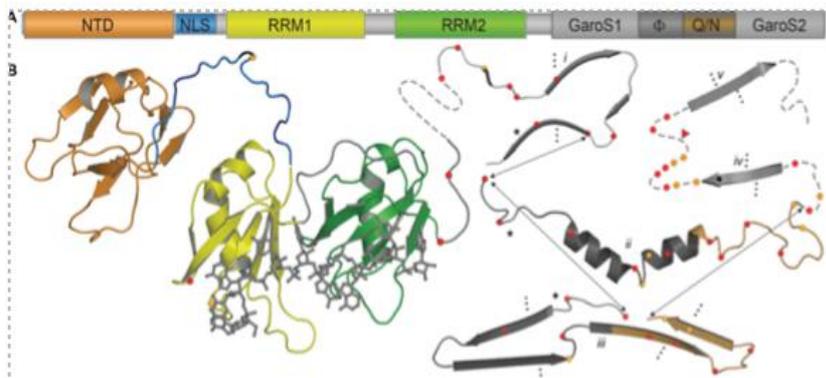


圖 2、TDP-43 結構示意圖(François-Moutal, Perez-Miller, Scott, Miranda, Mollasalehi, Khanna (2019))

二、研究動機

漸凍症(ALS)是一種致命的神經疾病，而在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，許多研究指出，在 ALS 病患的體內細胞中，會有大量的 TDP-43 oligomer 及 fiber 產生，因此 TDP-43 在疾病中作用也漸漸被重視。

在本實驗中，由於相較於已有的 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，因此於本研究我們篩選 TDP-43 纖維專一性單株抗體，並希望能透過所找的抗體，對於 TDP-43 在體內的狀態進行定量及定性，以作為疾病的生物標誌。

三、研究目的

- (一) 製造出 TDP-43 纖維，並了解其型態變化
- (二) 了解何種溶液能使 TDP-43 纖維溶解
- (三) 了解 TDP-43 纖維復溶在不同水溶液中的型態變化
- (四) 將 TDP-43 的單株抗體以 Protein G 進行純化，得到高純度、高濃度的抗體
- (五) 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
- (六) 實際了解 TDP-43 纖維與單株抗體的結合

貳、研究過程及方法

一、TDP-43 纖維製造

- (一) 利用大腸桿菌製作 TDP-43 蛋白
 1. 將能轉譯出 TDP-43 氨基酸序列的 RNA 對應的 DNA 序列植入大腸桿菌基因中
 2. 將大腸桿菌以培養基培養，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)進行純化及濃縮後
 4. 濃度大於 15 μ 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) 了解何種溶液能使 TDP-43 纖維復溶
 1. 將 TDP-43 的 oligomer、fiber 分別以 PBS、SDS 進行處理後，配置成 0.5 μ g/mL 作為抗原，取 50 μ 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，在每格每孔加入 300 μ l 進行封閉。

3. 以 PBST 清洗三次，將市售抗體 10782 以 1% BSA 稀釋為 2 μ 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 μ g/ml，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨。
6. 將 100 μ 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 μ l 250 mM HCl 停止反應，呈現黃色。
8. 測量 O.D 450nm。

(三) 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

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) TDP-43 纖維的單株抗體製造

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 濃縮管進行濃縮，提高抗體的濃度，偵測抗體 280nm 的吸光度，以推算抗體濃度

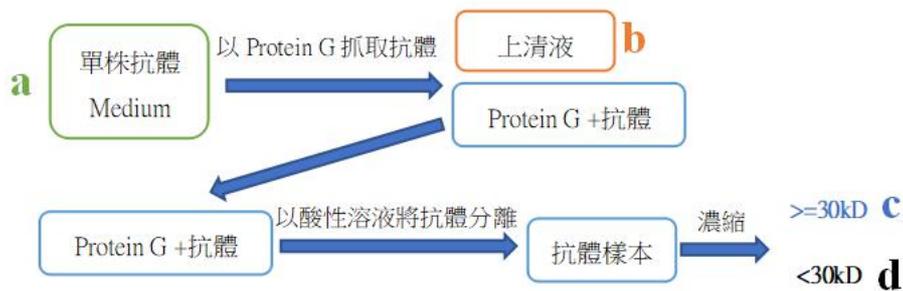


圖 3、抗體純化及濃縮步驟，在步驟中選取四處(a 為抗體原液、b 為純化後的上清液、c 為處理後樣品、d 為濃縮後 30kD 以下液體)作為樣本，了解抗體是否完全純化完成。

(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 monomer 的結合情形

1. 將 TDP-43 的 oligomer、fiber 以 SDS 進行處理後，配置成 0.5 μ g/mL 作為抗原，取 50 μ 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，在每格每孔加入 300 μ 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 μ 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 μ g/ml，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨。

- 將 100 μ l TMB 加入孔中，TMB 與二抗上的 HRP 反應呈現藍色，搖晃 10 分鐘。
- 在孔中加入 100 μ l 250 mM HCl 停止反應，呈現黃色。
- 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

- 將 TDP-43 的 oligomer、fiber 分別以 PBS、SDS 進行處理後，配置成 0.5 μ g/mL 作為抗原，取 50 μ L 加入 96 孔盤內，放置過夜。
- 以 PBST 清洗過後三次，將 BSA 加入 PBST 中，配為 2% 溶液，在每格每孔加入 300 μ l 進行封閉。
- 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 μ g/ml，在室溫下搖晃均勻 2 小時。
- 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 μ g/ml，在室溫下搖晃均勻 1 小時後洗淨。
- 將 100 μ l TMB 加入孔中，TMB 與二抗上的 HRP 反應呈現藍色，搖晃 10 分鐘。
- 在孔中加入 100 μ l 250 mM HCl 停止反應，呈現黃色。
- 測量 O.D 450nm。

參、研究結果與討論

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)

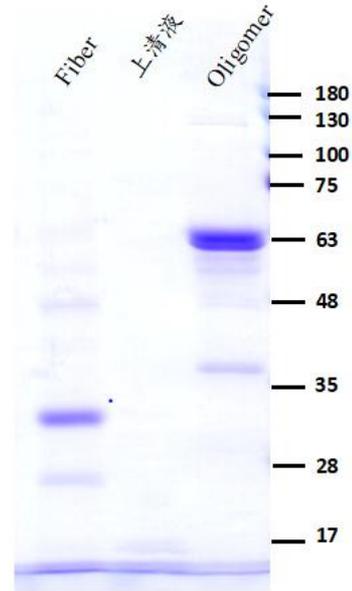


圖 5、將 TDP-43 fiber、fiber 上清液、oligomer 進行 SDS-Page 後所得膠片圖

(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)

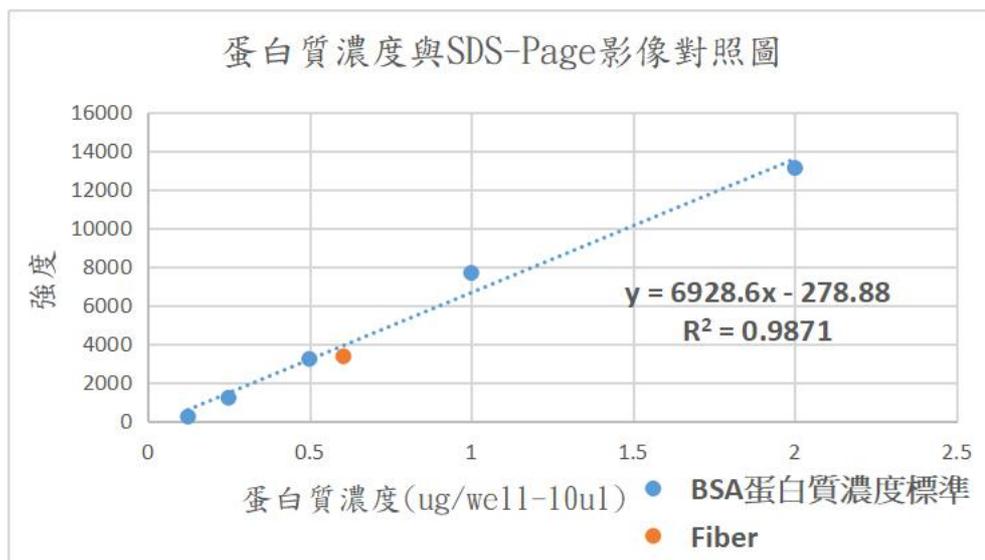


圖 6、以 BSA 蛋白 BCR 染色後影像色彩強度做出之標準曲線與 TDP-43 fiber 25、32、48 kDa 條帶強度相加比較(藍色線條為 BSA 濃度對影像強度標準曲線、橘色點為 TDP-43 fiber 強度與濃度推算)。

(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，我們參照文獻(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-48 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)

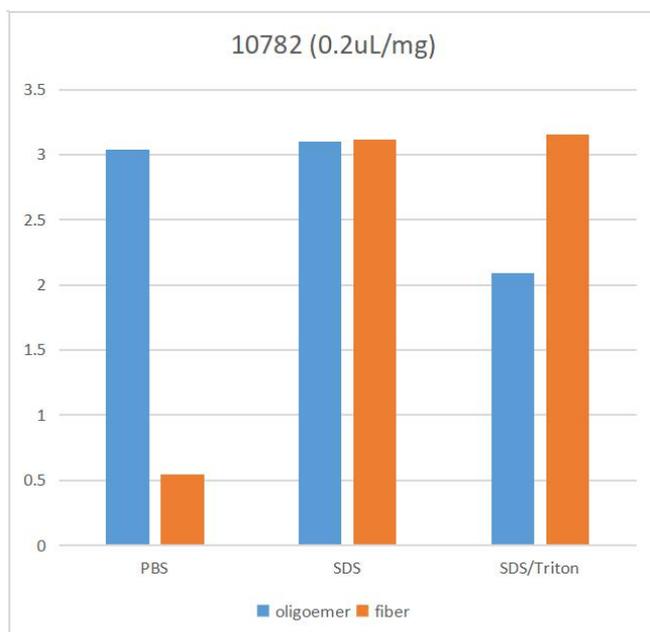


圖 7、將 TDP-43 oligomer、fiber 以 PBS、SDS 及 SDS 加上 0.1% Triton 後以 10782 作為抗體所得 ELISA 吸光強度圖

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	4.03	3.66	3.48	2.98	3.50
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL	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，分子量較大的雜質已被排除，而在純化後的樣本中，由於 Protein G 不會與 FBS 及培養液中的菌殼碎片等結合，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(a)、8(b))

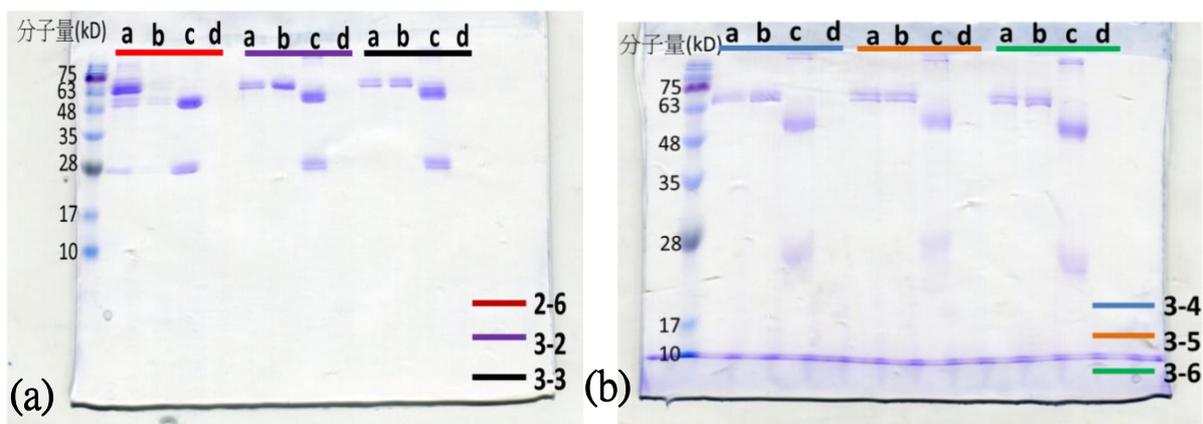


圖 8(a,b)、6 種抗體在製造的 4 個階段樣本 SDS-PAGE 膠圖(a,b,c,d 為純化不同階段的抗體樣本)

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 是從腹水草

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(a)、7(b))

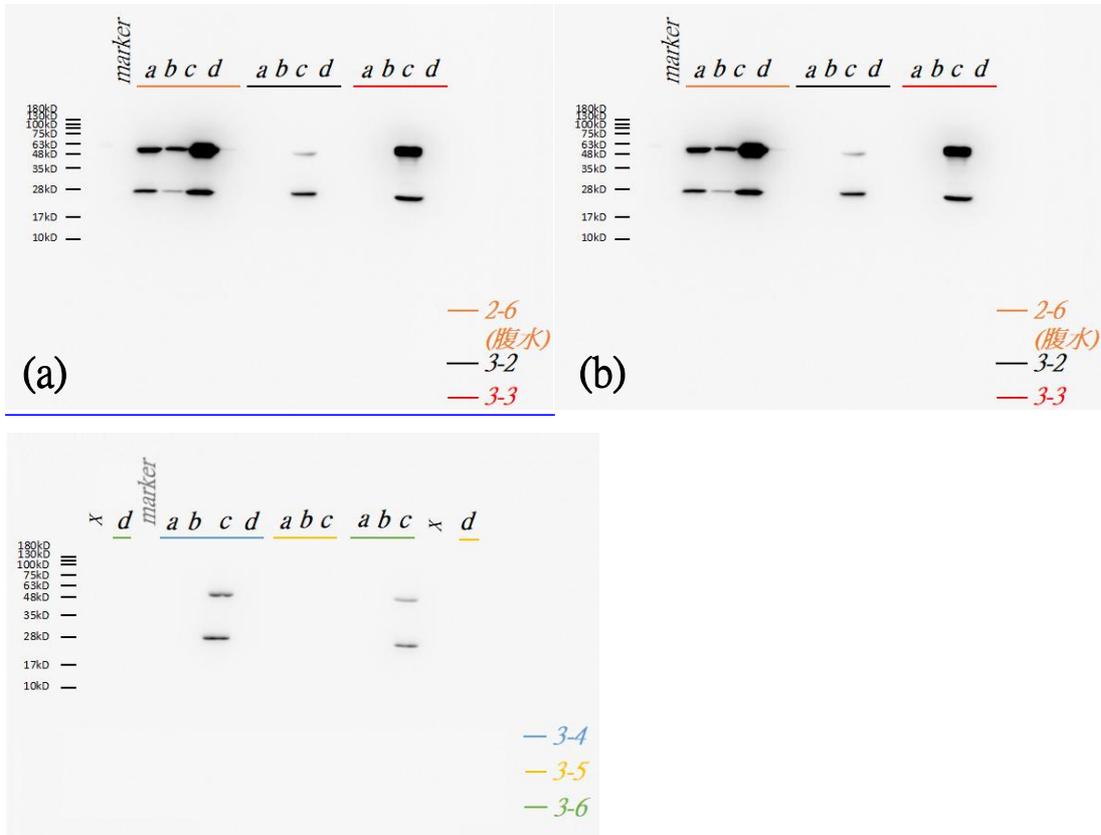


圖 9(a,b)、6 種抗體在製造的 4 個階段樣本以 Goat anti Mouse IgG-HRP 作為二抗所得 Western-Blot 結果(a,b,c,d 為純化不同階段的抗體樣本)

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，得出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、3-3、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 8(a)、8(b)、8(c))

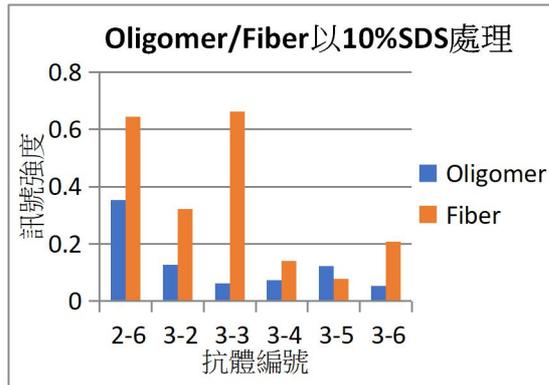


圖 8 不同種抗體與經由 PBS 2%SDS 2%SDS+1%Triton 處理後的 TDP-43 蛋白 oligomer、fiber 反應的 Elisa 強度

(四) 利用 Indirect Elisa 了解不同濃度抗體與 TDP-43 的結合情形 找出與 TDP-43 fiber

有專一性，且結合效率高的抗體

在篩選後留下的 4 種抗體(2-6,3-2,3-3,3-6)中，可以發現 2-6,3-3 抗體較無專一性，而 3-2、3-6 皆能明顯分辨 TDP-43 的 fiber 與 oligomer，其中又以 3-2 抗體在濃度為 0.5 ug/mL 時，線段斜率轉小，代表抗體與 TDP-43 的結合趨近於完全，因此他們的結合效率最高，同時 3-2 的放光強度也較 3-6 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 9(a)、9(b)、9(c)、9(d))

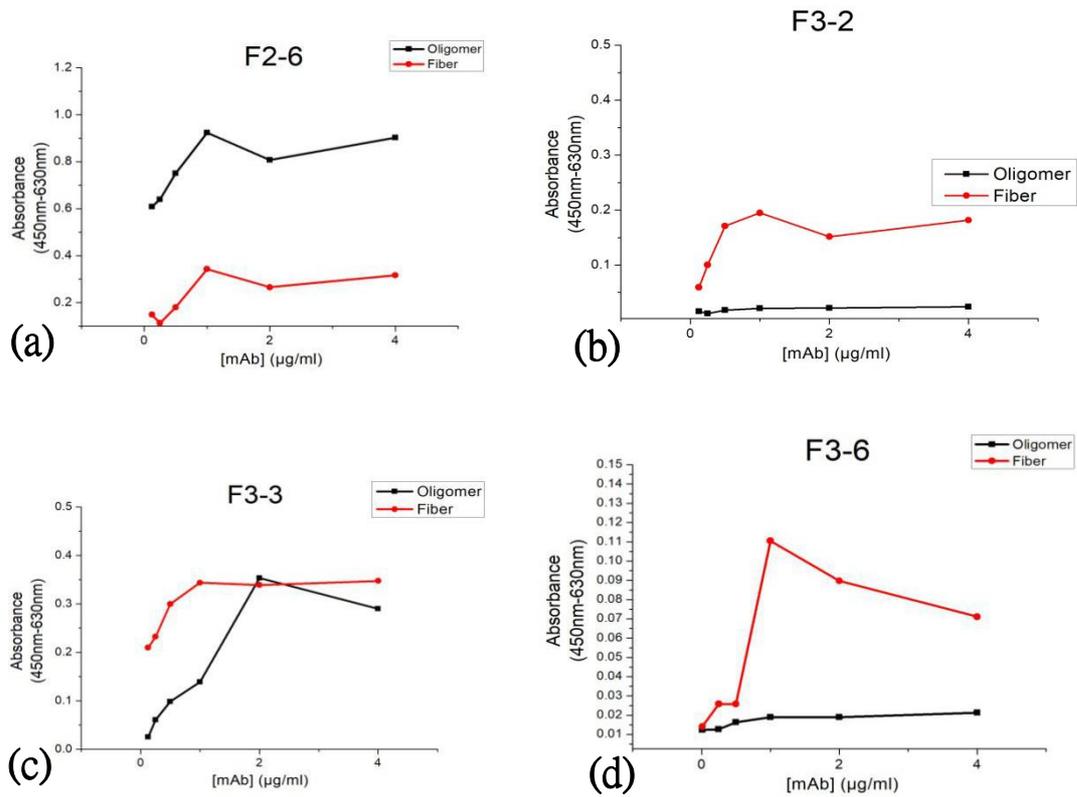


圖 9 (a,b,c,d)、不同濃度抗體與經由 2% SDS 處理後的 TDP-43 蛋白 oligomer、fiber 反應的 Elisa 強度。

肆、結論

一、利用 Caspase-3 切割 TDP-43 蛋白質可以得到 TDP-43 fiber，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 的單株抗體。

二、利用 Protein G 將 TDP-43 的抗體進行純化與濃縮，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、以 0.5% SDS 可以將 TDP-43 fiber 復溶於溶液中，以方便進行實驗，同時不會對 TDP-43 fiber 造成變性

四、透過 Indirect ELISA 確認抗體 3-2、3-6 對於 TDP-43 的 fiber 有較高的專一性，且抗體 3-2 可以以最低的濃度達到較高的結合效率，有成為 TDP-43 Biomarker 的潛力。

伍、未來展望與應用

一、了解抗體與 TDP-43 蛋白結合的實際機制與部位。

二、透過抗體，研究對 TDP-43 堆積時 fiber 與 oligomer 的動力學。

三、實際運用抗體對於漸凍症患者的血漿、腦組織、進行實驗，驗證抗體作為漸凍症 Biomarker 的可行性。

四、由於本實驗中的抗體具有專一性，只會與特定結構的 TDP-43 蛋白錯誤堆積結合，因此在抗體與 TDP-43 接合後，使其能夠阻止 TDP-43 的繼續堆積，並能夠讓腦內微膠細胞進行吞噬功能時同時清除腦內 TDP-43 的錯誤堆積而不會傷到正常 TDP-43 蛋白。

五、除了漸凍症與腦前側額顳葉退化症外，研究指出在阿茲海默症患者中，TDP-43 蛋白也會產生作用，並主要見於年長者與臨床症狀更為嚴重的人，因此本研究可以幫忙改善診斷與治療。

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 FTLD. *Molecular Neurobiology* 55:7789–7801

Ian Ra Mackenzie, Rosa Rademakers, Manuela Neumann(2010) The role of TDP-43 in

amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Curr Opin Neurol* 18989115

Liberty François-Moutal, Samantha Perez-Miller, David D. Scott, Victor G. Miranda, Niloufar

Mollasalehi, May Khanna (2019) Structural Insights Into TDP-43 and Effects of

Post-translational Modifications. *Front Mol Neurosci* 31920533

Yu-Sheng Fang, Kuen-Jer Tsai, Yu-Jen Chang, Patricia Kao, Rima Woods, Pan-Hsien Kuo,

Cheng-Chun Wu, Jhih-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 myloid

oligomers that are present in frontotemporal lobar dementia-TDP patients. *Nature*

Communications, doi: 10.1038

【評語】 080014

在本研究利用由單株抗體技術所製造出對應 TDP-43 (漸凍症以及額顳葉退化症等神經疾病相關的類澱粉蛋白)纖維的不同抗體，進行純化及濃縮，並透過酵素結合免疫吸附分析(ELISA)鑑定這些抗體對於 TDP43 不同型態的親和力，並找出專一性最高、結合效率最好的抗體，以作為疾病同階段的生物標誌(Biomarker)，且希望可以以此來預測疾病進展並評估對治療的反應。

優點：在漸凍症(ALS)以及額顳葉退化症(FTLD)等神經疾病中，病患體內會有不正常的類澱粉蛋白 TDP-43 錯誤堆疊，在不同的堆積階段有單體(monomer)、多倍體(oligomer)、纖維(fiber)等不同的形態。目前在相關的疾病中，並沒有有效藥物及生物標誌(Biomarker)可以治療及進行檢測。由圖 8(a)、8(b)、8(c) 可得知抗體 2-6、3-2、3-3、3-6 對於 TDP-43 的型態具有較高的專一性，抗體對於 TDP-48 的 Fiber 型態結合度遠高於 Oligomer 型態。而圖 9(a)、9(b)、9(c)、9(d)更確定抗體 3-2 為較具潛力成為 biomarker 的抗體。本研究有利於此類疾病的診斷與治療。

缺點：抗體的製備仰賴別的研究，此研究只在抗體的純化及鑑別。在圖 6(a,b)、抗體 SDS-Page 結果(a,b,c,d 為純化不同階段的抗體樣本)，並無詳述是在什麼不同階段的抗體樣本？而比較不同抗體的訊號強度，可以得知抗體 2-6、3-2、3-3、3-6 對於 TDP-43 的型態具有較高的專一性，抗體對於 TDP-48 的 Fiber 型態結合度遠高於 Oligomer 型態。但 (圖 8(a)、8(b)、8(c))顯示 Oligomer 的訊號比 Fiber 無高，且無提到 TDP-48？有提到利用 Caspase-3 切割 TDP-43 蛋白質可以得到 TDP-43 fiber，但如何製備 Oligomer？

研究建議：圖八與九各組實驗中，宜有最少獨立三重複以上的重複試驗，並加以做初步的統計分析。