

# 人 tau 蛋白 N 端结构域特异性单克隆抗体筛选及在血液检测中的应用

闫子迪<sup>1</sup>, 张译文<sup>1</sup>, 姜家龙<sup>1</sup>, 刘振武<sup>1</sup>, 王荷<sup>1</sup>, 张莹<sup>1\*</sup>, 何金生<sup>1</sup>, 洪涛<sup>1,2</sup>

1 北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044

2 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052

闫子迪, 张译文, 姜家龙, 刘振武, 王荷, 张莹, 何金生, 洪涛. 人 tau 蛋白 N 端结构域特异性单克隆抗体筛选及在血液检测中的应用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(5): 1571-1583.

YAN Zidi, ZHANG Yiwon, JIANG Jialong, LIU Zhenwu, WANG He, ZHANG Ying, HE Jinsheng, HONG Tao. Human tau N-terminal domain-specific monoclonal antibodies: screening and application in blood detection[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(5): 1571-1583.

**摘要:** 微管相关蛋白 tau 抗体在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)及其他 tau 蛋白病的基础和临床研究中发挥重要作用。采用重组人 tau441 作为免疫原, 通过细胞融合及有限稀释法筛选并获得分泌抗人 tau 蛋白 N 端结构域(tau N-terminal domain, NTD-tau)单克隆抗体杂交瘤细胞株, 通过制备小鼠腹水及亲和层析获得纯化的单克隆抗体; 分别采用间接 ELISA 检测其灵敏度, 蛋白质印迹检测其特异性; 建立并优化人 tau 蛋白双抗体夹心 ELISA 检测方法。结果显示, 杂交瘤细胞克隆阳性率为 83.6%, 建立分泌 ZD8F7 单克隆抗体的稳定细胞株, 细胞上清中抗体效价为 1:16 000; 腹水中抗体效价高于 1:256 000; 纯化后单克隆抗体效价高于 1:128 000; 表位分析显示, ZD8F7 单克隆抗体识别 tau21-37 位氨基酸, 位于 N 端结构域; 蛋白质印迹分析显示, ZD8F7 单克隆抗体识别 50-70 kDa 重组人 tau 蛋白及转基因 AD 模型小鼠(APP/PS1/tau)脑组织中 50 kDa 的人 tau 蛋白; 以 ZD8F7 单克隆抗体作为捕获抗体建立的人 tau 蛋白定量检测方法, 线性范围在 7.8-500.0 pg/mL, 可以识别 AD 转基因小鼠脑组织以及血浆中的人 tau 蛋白, 而不识别小鼠 tau 蛋白。综上, 本研究制备的人 NTD-tau 特异性单抗和双抗体夹心 ELISA 检测方法灵敏度高, 为神经退行性疾病中 tau 蛋白检测提供了有力工具。

**关键词:** 阿尔茨海默病生物标志物; 微管相关蛋白 tau; 双抗体夹心 ELISA; 单克隆抗体

资助项目: 国家自然科学基金(81271417); 山东省重点研发计划(2019JZZY011011); 北京交通大学人才基金(2024XKRC032); 中山市重大科技专项(2020A1003)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81271417), the Key Research and Development Program of Shandong Province (2019JZZY011011), the Beijing Jiaotong University Talent Fund (2024XKRC032), and the Major Science and Technology Project of Zhongshan City (2020A1003).

\*Corresponding author. E-mail: yingzhang@bjtu.edu.cn

Received: 2023-09-23; Accepted: 2024-02-20; Published online: 2024-02-23

# Human tau N-terminal domain-specific monoclonal antibodies: screening and application in blood detection

YAN Zidi<sup>1</sup>, ZHANG Yiwen<sup>1</sup>, JIANG Jialong<sup>1</sup>, LIU Zhenwu<sup>1</sup>, WANG He<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1\*</sup>, HE Jinsheng<sup>1</sup>, HONG Tao<sup>1,2</sup>

1 College of Life Sciences and Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China

2 National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

**Abstract:** The antibodies to the microtubule-associated protein tau play a role in basic and clinical studies of Alzheimer's disease (AD) and other tauopathies. With the recombinant human tau441 as the immunogen, the hybridoma cell strains secreting the anti-human tau N-terminal domain (NTD-tau) monoclonal antibodies were generated by cell fusion and screened by limiting dilution. The purified monoclonal antibodies were obtained by inducing the mouse ascites and affinity chromatography. The sensitivity and specificity of the monoclonal antibodies were examined by indirect ELISA and Western blotting, respectively. A double antibody sandwich ELISA method for detecting human tau protein was established and optimized. The results showed that the positive cloning rate of hybridoma cells was 83.6%. A stable cell line producing ZD8F7 antibodies was established, and the antibody titer in the supernatant of the cell line was 1:16 000. The antibody titer in the ascitic fluid was higher than 1:256 000; and the titer of purified ZD8F7 monoclonal antibodies was higher than 1:128 000. The epitope analysis showed that the ZD8F7 antibody recognized tau21–37 amino acid in the N-terminal domain. The Western blotting results showed that the ZD8F7 antibody recognized the recombinant human tau protein of 50–70 kDa and the human tau protein of 50 kDa in the brain tissue of transgenic AD model mice (APP/PS1/tau). With ZD8F7 as a capture antibody, a quantitative detection method for human tau protein was established, which showed a linear range of 7.8–500.0 pg/mL and could identify human tau protein in the brain tissue of AD transgenic mice and human plasma but not recognize the mouse tau protein. In conclusion, the human NTD-tau-specific monoclonal antibody and the double antibody sandwich ELISA method established in this study are highly sensitive and can serve as a powerful tool for the detection of tau protein in neurodegenerative diseases.

**Keywords:** biomarkers of Alzheimer's disease; microtubule-associated protein tau; double antibody sandwich ELISA; monoclonal antibody

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是引起老年人痴呆的最常见原因,其病理特征是β淀粉样蛋白(amyloid β, Aβ)在脑内沉积形成老年

斑(senile plaques, SPs)、tau蛋白异常磷酸化形成神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)和神经元损伤<sup>[1]</sup>。起病隐匿,渐进性认知障碍,最终

出现痴呆。目前尚未能解决 AD 的早期诊断、预防和根治的问题<sup>[2]</sup>。

人 tau 蛋白分 4 个结构域,分别是氨基端结构域(或 N 端结构域)(N-terminal domain, NTD) (1–151 aa)、脯氨酸富集域(proline-rich domain, PRD) (152–244 aa)、微管结合域(microtubule-binding domain, MBD) (245–369 aa)和羧基端结构域(C-terminal domain, CTD) (370–441 aa)<sup>[3]</sup>。

在生理条件下, tau 蛋白主要在神经元轴突中表达,在神经胶质细胞中低水平表达<sup>[4]</sup>。目前发现, AD 病理性 tau 聚集物仅存在于神经元中,且被认为是由 A $\beta$  蛋白驱动或加速的;而在原发性 tau 病变中,包括匹克病(Pick's disease, PiD)、皮质基底变性(corticobasal degeneration, CBD)和进行性核上性麻痹(progressive supranuclear palsy, PSP)等,胶质细胞则存在更显著的 tau 蛋白包涵体<sup>[5]</sup>。

Tau 蛋白异常代谢、过度磷酸化修饰(p-tau181、p-tau217 和 p-tau231 等)和聚集反映了 AD 脑组织的病理改变。相比于 p-tau, 血液中非磷酸化 tau 作为生物标志物在 AD 诊断中的作用仍不确定,而不同 tau 片段的特异性抗体则是解决这一问题的关键<sup>[6]</sup>。早期文献中<sup>[7]</sup>建立的 tau 单克隆抗体,部分由牛脑组织作为免疫原,得到的抗体通常存在人、小鼠和牛的交叉反应;也有用 AD 患者脑组织提取物作为免疫原,得到的抗体多是针对成熟的配对螺旋样纤维(paired helical filaments, PHF)或者原纤维,无法用来检测血液中 tau 蛋白及其片段。目前市售的 tau 单克隆抗体,有些是采用重组人 tau 蛋白作为免疫原,但是并未明确其识别 tau 不同结构域的信息,有些不适用于酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等高通量检测方法。这些都给 AD 检测用途的 tau 蛋白单克隆抗体选择带来了困难。

本研究用重组人 tau441 蛋白作为免疫原,

通过杂交瘤技术筛选并鉴定人 tau 蛋白 N 端结构域(tau N-terminal domain, NTD-tau)特异性单克隆抗体,同时建立了灵敏度较高的人 tau 蛋白定量检测方法,适合于血液检测的线性范围在 7.8–500.0 pg/mL,为我国老龄人群健康体检、AD 及 tau 蛋白病的血液样本早诊早筛提供了技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 实验动物和细胞株

实验用 BALB/c 小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,转基因小鼠(APP/PS1/tau)购自北京华卓康生物科技股份有限公司,饲养于北京实验动物研究中心有限公司无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物房。所有动物实验均遵守北京实验动物研究中心伦理委员会的相关规定(批准号:2022030)。小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0-AG14 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

#### 1.1.2 试剂、重组蛋白和抗体

弗氏完全佐剂(freund's complete adjuvant, FCA)、弗氏不完全佐剂(freund's incomplete adjuvant, FIA)、PEG 1450 (polyethylene glycol 1450)、降植烷(pristane)、HAT、HT 和小鼠单克隆抗体同种型试剂盒均为 Sigma-Aldrich 公司产品;RPMI 1640 培养液、HT7-Bio 单抗和 BT2-Bio 单抗均购自 ThermoFisher Scientific 公司;Tau5 单抗为 BioLegend 公司产品;兔抗人 sTREM2 单抗购自 Abcam 公司;重组人 tau441 蛋白为 Rockland 公司产品;重组人 His-tau441 和 sTREM2 蛋白由本实验室制备<sup>[8]</sup>;800 通道近红外染料标记驴抗兔 IgG (IRDye 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H+L))和 680 通道近红外染料标记驴抗小鼠 IgG (IRDye 680CW Donkey anti-Mouse IgG (H+L))均为 LI-COR 公司产品。

## 1.2 重组人 tau 蛋白特异性单克隆抗体的筛选和制备

### 1.2.1 小鼠免疫

取 6–8 周龄雌性 BALB/c 小鼠，用重组人 His-tau441 蛋白免疫(免疫程序见图 1A)。

### 1.2.2 免疫组化检测小鼠血清识别转基因小鼠脑组织的情况

转基因小鼠(APP/PS1/tau)脑组织常规取材、固定和包埋，石蜡切片脱蜡至水，用 EDTA 抗原修复缓冲液(pH 9.0)微波修复。3%双氧水以阻断内源性过氧化物酶。加免疫小鼠血清(1:100)，湿盒内 4 °C 过夜。常规显色、复染、封片和镜检。

### 1.2.3 细胞融合

无菌条件下，取冲击免疫 3–4 d 后的小鼠脾脏，制备单细胞悬液。常规方法与 Sp2/0-AG14 细胞融合，接种于含有饲养层细胞的 96 孔培养板，HAT 和 HT 筛选。

### 1.2.4 阳性克隆的筛选、亚克隆和建株

间接 ELISA 检测克隆上清，阳性孔的判断标准：P/N 值 $\geq 2.10$ ，即(样品孔平均值-空白孔平均值)/(阴性对照孔平均值-空白孔平均值) $\geq 2.10$ ，且  $OD_{450}$  值 $\geq 0.10$ 。克隆阳性率(%)=(克隆阳性孔/检测的细胞克隆生长孔) $\times 100\%$ 。采用有限稀释法对分泌抗体的阳性孔进行反复克隆化，至所有单克隆孔上清抗体阳性率为 100%，选定的细胞株稳定培养 90 d 以上，期间以 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$

tau441 蛋白为包被抗原，间接 ELISA (方法同 1.3)检测其细胞上清效价。

### 1.2.5 单克隆抗体的大量制备和纯化

降植烷预处理 BABL/c 小鼠，腹腔注射筛选所得杂交瘤细胞 $[(0.5-1.0)\times 10^7]$ 个细胞/只]诱生腹水，并使用间接 ELISA 检测其效价(方法同 1.3)。使用 AKTA explore 100 蛋白纯化系统通过 Protein A 亲和层析柱纯化腹水，获得单克隆抗体，并用 SDS-PAGE 对该抗体进行检测。

### 1.3 间接 ELISA 检测纯化后单抗的效价

重组人 tau441 蛋白(Rockland，以下简称为 tau441R) (20 ng/孔)包板，10% FBS，37 °C 封闭 2 h。加入纯化后单抗，每孔 50  $\mu\text{L}$ ，同时设置阳性对照和阴性对照，室温孵育 1.5 h。二抗为山羊抗小鼠 IgG-HRP (1:3 000 稀释)，3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)显色，0.5 mol/L 硫酸终止反应，测定  $OD_{450}$  光吸收值。阳性结果的判定标准同 1.2.4。

### 1.4 小鼠脑组织总蛋白的提取

用 RIPA 裂解液[50 mmol/L Tris (pH 7.4)、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、1% Sodium deoxycholate、0.1% SDS、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L PMSF 和 25 $\times$ cOmplete™ 蛋白酶抑制剂混合物]制备 AD 转基因小鼠(APP/PS1/tau)<sup>[9]</sup>和野生型(wild type, WT)小鼠(背景品系 C57BL/6J)脑组织裂解液，BCA 试剂盒测定总蛋白浓度，

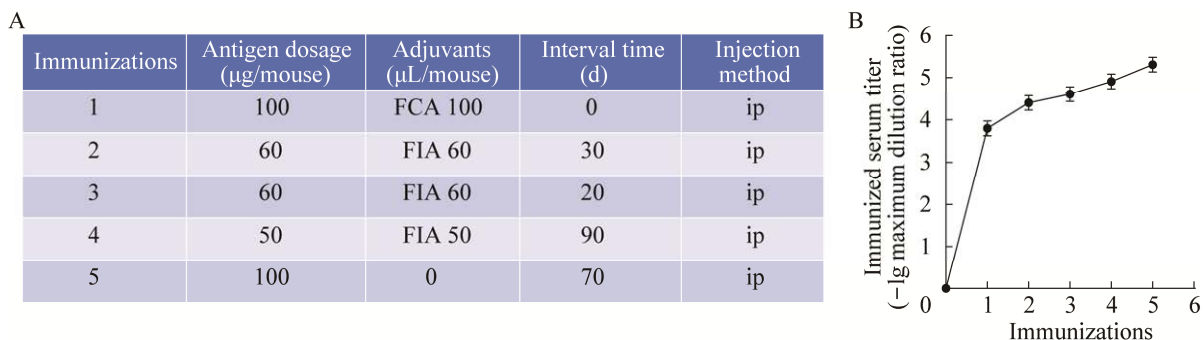


图 1 小鼠免疫效果检测 A: 小鼠免疫程序. B: 免疫后小鼠血清中 IgG 效价

Figure 1 Mouse immune efficacy testing. A: The mouse immunization schedule. B: The IgG titers in serum of immunized mice.

分装,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

## 1.5 单克隆抗体特异性的检测

### 1.5.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

取重组蛋白  $0.5\ \mu\text{g}$  或者小鼠脑组织裂解液  $30\ \mu\text{g}$ , 与  $5\times$  样品缓冲液混匀后上样。样品通过浓缩胶时电压为  $80\ \text{V}$ , 通过分离胶时电压为  $120\ \text{V}$ 。

### 1.5.2 蛋白质印迹(Western blotting)

半干转膜, 电流约为膜面积的 1.2 倍, 时间为 1 h。当一抗为筛选所得单抗( $1:1\ 000$ )和阳性对照 Tau5 单抗时, 二抗使用 Odyssey 680 通道驴抗小鼠 IgG [IRDye 680CW Donkey anti-Mouse IgG (H+L)] ( $1:10\ 000$ )。阴性对照蛋白为 sTREM2 蛋白, 识别 sTREM2 的一抗为兔抗人 sTREM2 单抗, 二抗为 Odyssey 800 通道驴抗兔 IgG [IRDye 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)] ( $1:10\ 000$ )。参照抗体使用说明书进行孵育, 使用 LI-COR Odyssey Clx Imager 近红外扫描成像系统分析。

## 1.6 单克隆抗体同种型的鉴定

小鼠单克隆抗体同种型试剂盒(Sigma-Aldrich 公司)鉴定筛选所得单克隆抗体同种型。使用同种型特异性抗体(IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3)包板, 杂交瘤细胞培养上清为样品, 碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgG (Fab 特异性)抗体检测。具体按照说明书操作。

## 1.7 单克隆抗体表位的鉴定

使用重组人 tau 441 蛋白及其截短体( $1-52\ \text{aa}$ 、 $45-230\ \text{aa}$ 、 $151-233\ \text{aa}$  和  $231-441\ \text{aa}$ ) (本实验室保存)包板( $10^5-10^{-3}\ \text{ng/mL}$ ), tau  $1-52$  位氨基酸截短体( $1-17\ \text{aa}$ 、 $6-22\ \text{aa}$ 、 $11-27\ \text{aa}$ 、 $16-32\ \text{aa}$ 、 $21-37\ \text{aa}$ 、 $26-42\ \text{aa}$ 、 $31-47\ \text{aa}$  和  $36-52\ \text{aa}$ )包板 ( $5\ 000-78.125\ \text{pg/mL}$ ), 方法同 1.3, 检测单抗的抗原识别情况。

## 1.8 人 tau 蛋白双抗体夹心 ELISA 检测方法条件优化

### 1.8.1 封闭液的选择

为了降低背景信号, 比较了不同封闭液

(BSA、FBS、脱脂牛奶和酪蛋白)的效果。以阴性对照  $OD_{450}$  值在 0.10 以下作为合格, 均进行 3 次独立性重复试验, 进行统计分析。

### 1.8.2 抗体对匹配方案

采用不同的抗体匹配, 方案见表 1。

### 1.8.3 抗体稀释比例的优化

采用棋盘滴定方法检测, 筛选确定一抗和二抗合适的稀释比例, 将一抗从  $1:1\ 000$  稀释到  $1:2\ 000$ , 二抗从  $1:1\ 000$  稀释到  $1:8\ 000$ , 其他的反应条件均保持不变。用酶标仪读取  $OD_{450}$  值, 根据 P/N 值选取最优的一抗和二抗稀释比例, 均进行 3 次独立性重复试验, 进行统计分析。

### 1.8.4 标准曲线的建立和特异性

选择重组人 tau 蛋白为双抗体夹心 ELISA 的校准品, 梯度稀释为 500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8  $\text{pg/mL}$ , 每孔  $50\ \mu\text{L}$ 。

按照最终优化的条件, 完成对以上校准物质的检测, 测定  $OD_{450}$  反应值。同时, 为了检测其特异性, 同时使用  $A\beta_{42}$  和 sTREM2 作为对照校准物。

## 1.9 检测小鼠脑组织蛋白和人外周血

### 1.9.1 小鼠脑组织蛋白提取

方法同 1.4。

### 1.9.2 人外周血的采集和处理

静脉血充满整个采血管(EDTA- $\text{Na}_2$  为抗凝剂), 轻柔反转混匀, 于  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $1\ 500\times g$  离心 15 min,  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.9.3 样本的检测

使用 1%酪蛋白将校准物依次稀释为 500、250、125、62.5、31.25、15.6、7.8  $\text{pg/mL}$ , 用 1%酪蛋白将检测抗体(HT7-Bio 和 BT2-Bio)以  $1:1\ 000$  稀释。将 tau441 标准品和血浆以每孔  $50\ \mu\text{L}$  加到包被好的酶标板中; 同时每孔加入检测抗体工作液  $50\ \mu\text{L}$ 。轻拍酶标板边框混匀, 室温反应后, 每孔加入  $100\ \mu\text{L}$  HRP 标记的链霉亲和素(1%酪蛋白以  $1:2\ 000$  稀释), 显色、终止,

表 1 抗体对匹配方案

Table 1 Matching scheme of antibody pairs

Groups	Capture antibody	Detection antibody
1	Screened anti-tau monoclonal antibody	Commercial anti-tau monoclonal antibody HT7-Bio and BT2-Bio
2	Rabbit anti-tau polyclonal antibody	Commercial anti-tau monoclonal antibody HT7-Bio and BT2-Bio
3	Rabbit anti-tau polyclonal antibody	Screened anti-tau monoclonal antibody
4	Screened anti-tau monoclonal antibody	Rabbit anti-tau polyclonal antibody
5	Screened anti-tau monoclonal antibody	Commercial anti-tau monoclonal antibody HT7-Bio
6	Screened anti-tau monoclonal antibody	Commercial anti-tau monoclonal antibody BT2-Bio

用酶标仪测定  $OD_{450}$  值。

### 1.10 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  形式表示, 用 SPSS 22.0 软件中单因素方差分析、独立样本校正  $t$  检验和 Wilcoxon rank sum test 非参数检验进行显著性差异分析, 显著性水平,  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 Tau 蛋白特异性单克隆抗体的制备

#### 2.1.1 间接 ELISA 检测免疫后血清效价

间接 ELISA 检测重组人 tau441 蛋白免疫 5 次(图 1A)后小鼠血清效价, 结果显示高于

1:128 000, 血清最大稀释度取对数后绝对值大于 5 (图 1B)。

#### 2.1.2 免疫组化分析免疫血清对 APP/PS1/tau 转基因小鼠脑组织的识别

使用免疫组化检测免疫血清对 APP/PS1/tau 转基因小鼠脑组织的识别情况(图 2), 蓝色为苏木素染色显示的细胞核, 棕黄色为二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色的阳性信号。在图 2A 和图 2B 中, 可见胞浆棕黄色阳性信号出现, 而阴性对照(图 2C 和图 2D)则未检出。结果表明, 免疫后血清可特异性识别转基因 AD 模型小鼠脑组织中的 tau 蛋白。

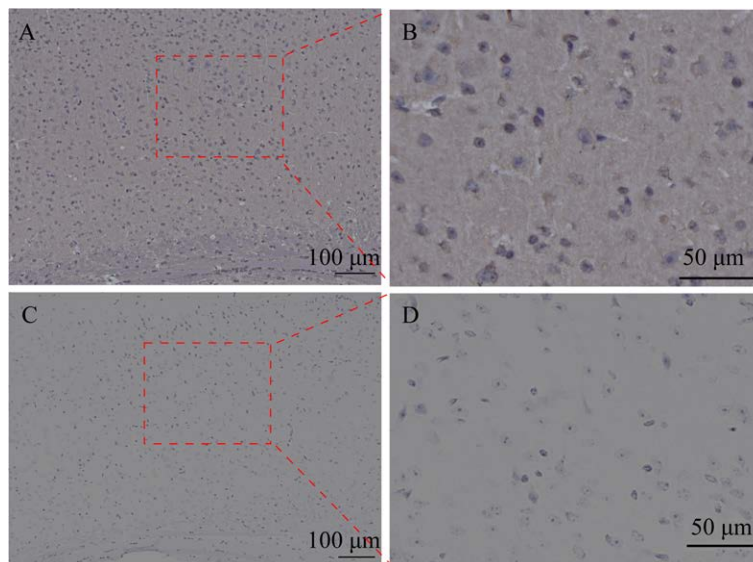


图 2 免疫组化分析免疫血清识别 APP/PS1/tau 转基因小鼠脑组织的情况 A、B: 一抗为小鼠免疫后血清. C、D: 阴性对照, 未加一抗

Figure 2 Recognition of APP/PS1/tau transgenic mice brain tissue by mouse serum after tau immunization through immunohistochemistry. A and B: Primary antibody is mouse serum. C and D: Negative control without primary antibody.



### 2.1.3 间接 ELISA 检测细胞上清和腹水中抗体效价

结果显示,克隆阳性率为 83.6%,阳性克隆细胞上清能够识别重组人 tau441 蛋白,亚克隆后稳定建株的细胞上清效价为 1:16 000;该细胞株诱生的小鼠腹水中抗体效价高于 1:256 000。

### 2.1.4 SDS-PAGE 鉴定纯化后抗体

SDS-PAGE 结果显示,经亲和层析(AKTA explore 100)纯化获得的单克隆抗体,其轻、重链条带均清晰可见,分别处于 25 kDa 和 50 kDa 附近,与预期位置相符(图 3)。提示成功纯化出单克隆抗体,命名为 ZD8F7 单抗,测得浓度为 0.64 mg/mL,效价高于 1:128 000。

## 2.2 Western blotting 分析单克隆抗体的特异性

Western blotting 结果显示,纯化的 ZD8F7 单克隆抗体可特异性识别重组人 tau441 蛋白,且与

阴性对照蛋白(这里用 sTREM2)无交叉反应(图 4),其中图 4A 中的一抗为纯化的 ZD8F7 单抗,图 4B 中的一抗为兔抗人 sTREM2 单抗(阴性对照)。

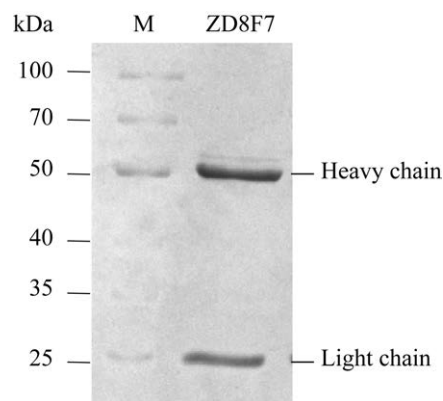


图 3 SDS-PAGE 鉴定纯化后 ZD8F7 单抗  
Figure 3 Identification of the purified ZD8F7 monoclonal antibody through SDS-PAGE.

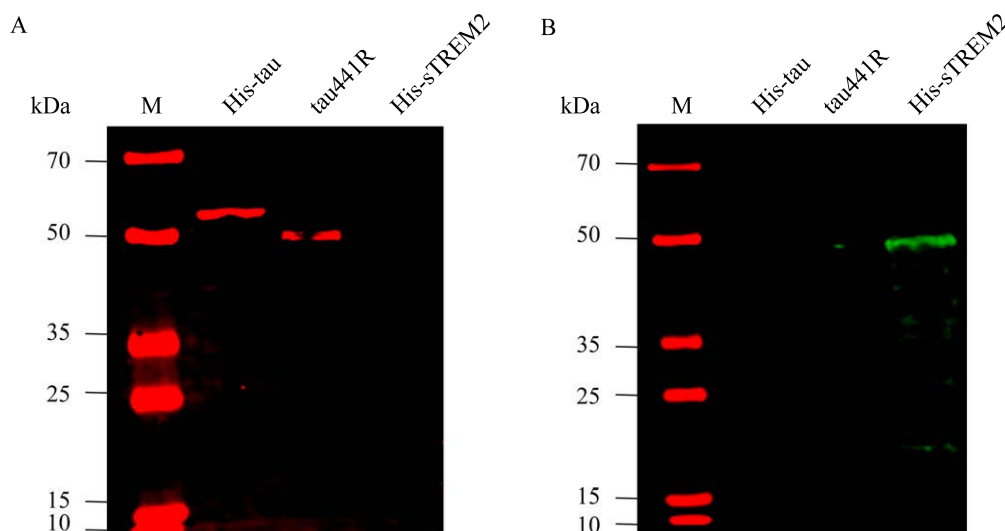


图 4 Western blotting 分析 ZD8F7 单抗识别重组人 tau441 蛋白的情况 A: 一抗为 ZD8F7 单抗. B: 阴性对照, 一抗为兔抗人 sTREM2 单抗

Figure 4 Recognition of recombinant human tau441 protein by ZD8F7 monoclonal antibody through Western blotting. A: Primary antibody is ZD8F7 monoclonal antibody. B: Negative control, primary antibody is rabbit anti-sTREM2 monoclonal antibody.

使用 Western blotting 检测 ZD8F7 单抗对 APP/PS1/tau 转基因小鼠<sup>[9]</sup>脑组织蛋白的识别情况。结果显示, ZD8F7 单抗可识别此转基因小鼠脑组织提取物中过表达的人 tau 蛋白, 信号条带位于 50 kDa 附近, 而此处信号在 WT 组则难以辨别(图 5A)。提示 ZD8F7 单抗识别的是转基因的人 tau 蛋白, 而不识别 WT 小鼠脑组织中的鼠源 tau 蛋白。同时使用市售的单抗 Tau5 作为阳性对照, 结果显示, Tau5 对 50 kDa 位置的小鼠 tau 蛋白和 Tg 组中的人 tau 识别信号没有明显差异(图 5B)。此外, 不加一抗的阴性对照(图 5C)也显示了在 35 kDa 附近的条带, 提示这条带是小鼠组织样品中 IgG 造成的非特异性信号。图 5A 中的一抗为纯化

的 ZD8F7 单抗, 图 5B 中的一抗为市售的 Tau5 单抗(阳性对照), 图 5C 未加一抗, 仅用同样的抗体稀释液完成孵育, 二抗与图 5A 和图 5B 相同, 为驴抗小鼠 IgG (阴性对照)。

### 2.3 单克隆抗体同种型的鉴定

使用小鼠单克隆抗体同种型试剂盒检测, 结果显示为 IgG2a。

### 2.4 单克隆抗体表位的鉴定

使用重组人 tau441 蛋白及截短体, 间接 ELISA 检测并分析单抗的表位。结果显示, ZD8F7 单抗的表位位于 tau 蛋白 1-52 位氨基酸(图 6A)。将 tau 1-52 位氨基酸进一步截短后, 确定其表位为 21-37 位氨基酸, 属 N 端结构域(图 6B)。

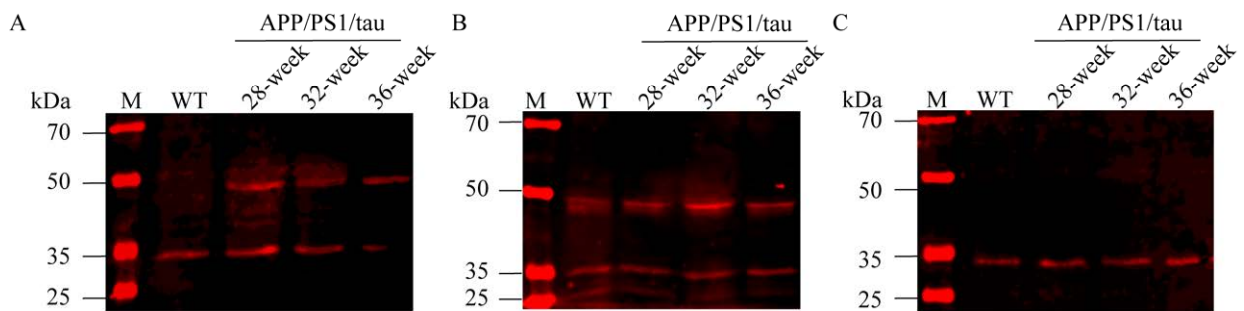


图 5 Western blotting 分析 ZD8F7 单抗识别 APP/PS1/tau 转基因小鼠脑组织蛋白的情况 A: 一抗为 ZD8F7 单抗. B: 阳性对照, 一抗为商品化单抗 Tau5. C: 未加一抗的阴性对照

Figure 5 Recognition of APP/PS1/tau transgenic mice brain tissue protein by ZD8F7 monoclonal antibody through Western blotting. A: Primary antibody is ZD8F7 monoclonal antibody. B: Positive control, primary antibody is commercial monoclonal antibody Tau5. C: Negative control without primary antibody.

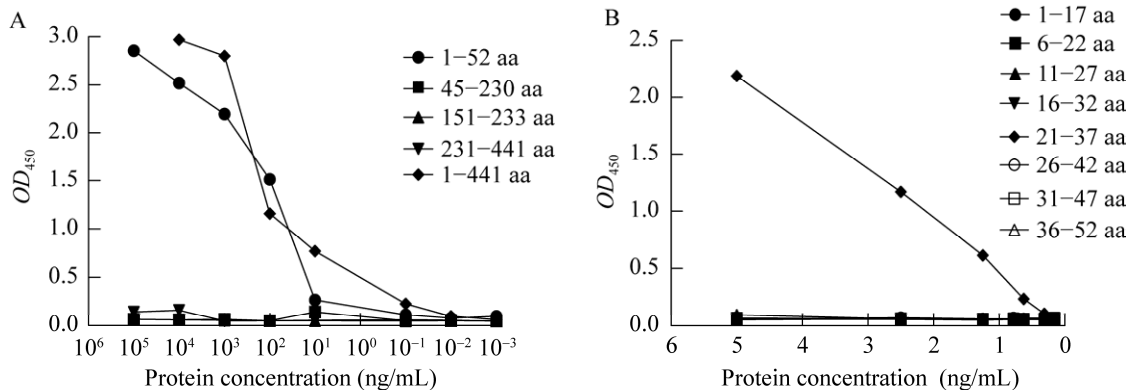


图 6 ZD8F7 单抗表位的鉴定 A: 全长 tau 1-441 蛋白范围内表位鉴定. B: 进一步截短 tau 1-52 位氨基酸进行表位鉴定

Figure 6 Identification of ZD8F7 monoclonal antibody epitopes. A: Full-length tau 1-441 protein epitope mapping. B: Tau 1-52 amino acid epitope mapping.



### 2.5 人 tau 蛋白双抗体夹心 ELISA 检测方法和条件的确立

抗体匹配预实验发现检测体系阴性对照  $OD_{450}$  值较高, 因此, 对封闭液进行了优化。结果显示, 5%脱脂牛奶-PBST 作为封闭液, 阴性  $OD_{450}$  值最低, 且在 0.10 以下(表 2)。所以选择 5%脱脂牛奶-PBST 作为检测体系的封闭液。

为了获得最佳的抗体匹配, 对比了不同的抗体匹配组, 结合 P/N 值和样品孔  $OD_{450}$  值, 结果显示, 组 1 (Group 1, ZD8F7 单抗作为捕获抗体包板, HT7-Bio 和 BT2-Bio 混合作为检测抗体) 明显优于其他组(表 3), 故选择该抗体对用于后续实验。

进一步优化了检测抗体和链霉亲和素-HRP 的稀释比例, 由棋盘滴定可得不同稀释比例下的 P/N 值(表 4), 结合阳性和阴性  $OD_{450}$  值, 确定两者的最佳稀释度分别为 1:2 000 和 1:1 000。

建立人 tau 蛋白双抗体夹心 ELISA 标准曲线, 当标准品浓度在 7.8–500.0 pg/mL 之间时, 线性关系较好。线性回归方程为  $y=0.005x+0.0369$ ,  $R^2=0.9941$ 。因此该校准曲线的检测范围为 7.8–500.0 pg/mL。

使用 tau、A $\beta$ 42 和 sTREM2 三种蛋白同时检测, 结果显示, 此反应体系与无关对照蛋白 A $\beta$ 42 和 sTREM2 无明显交叉反应(图 7)。说明建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法具有特异性。

表 2 封闭液的优化

Table 2 Optimization of blocking buffer

Tau (pg/mL)	5% skim milk	3% skim milk	5% FBS	5% BSA	2% BSA	1% casein
62.5	0.38±0.01	0.33±0.02	Overflow	Overflow	0.99±0.02	0.42±0.01
0	0.08±0.01	0.11±0.01	Overflow	2.10±0.01	0.74±0.01	0.14±0.01

表 3 抗体对的匹配

Table 3 Matching of antibody pairs

Tau (pg/mL)	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
62.5	0.28±0.01	0.12±0.01	0.10±0.02	0.13±0.02	0.10±0.01	0.18±0.01
0	0.09±0.01	0.10±0.02	0.09±0.02	0.10±0.01	0.07±0.02	0.08±0.01
P/N	3.11	1.20	1.11	1.30	1.43	2.25

表 4 检测抗体和链霉亲和素-HRP 的棋盘滴定

Table 4 Checkerboard titration for detection antibody and streptavidin-HRP

Tau (pg/mL)	HT7-Bio, BT2-Bio dilution rate	HRP-streptavidin dilution rate			
		1:1 000	1:2 000	1:4 000	1:8 000
62.5	1:1 000	0.43±0.01	0.33±0.01	0.24±0.01	0.19±0.02
	1:2 000	0.28±0.01	0.21±0.01	0.18±0.01	0.12±0.01
0	1:1 000	0.14±0.01	0.11±0.02	0.09±0.01	0.07±0.02
	1:2 000	0.09±0.01	0.08±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01
P/N		3.07	3.00	2.67	1.58
		3.11	2.63	2.57	1.71

## 2.6 样本的检测

### 2.6.1 AD 模型小鼠脑组织匀浆的检测

使用本检测体系分别检测野生型(WT)和不同周龄的 APP/PS1/tau 转基因 AD 模型小鼠脑组织匀浆, 结果显示, 未能检测到野生型(WT)小鼠样品, 但可检测到 AD 模型小鼠脑组织中过表

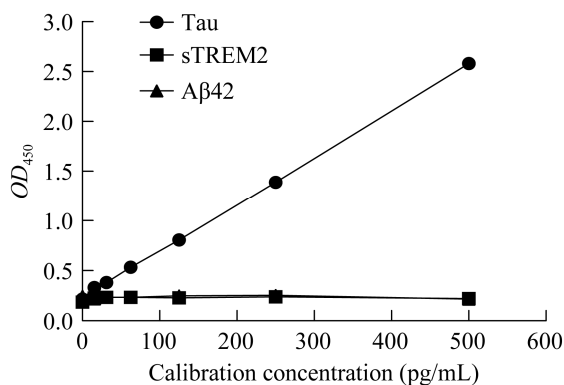


图 7 人 tau 蛋白双抗体夹心 ELISA 检测方法特异性的鉴定

Figure 7 Specificity of double antibody sandwich ELISA method to human tau protein.

达的人 tau 蛋白, 且呈现随龄增加的趋势(图 8)。说明本检测体系可以应用于此 AD 模型小鼠脑组织中转基因表达的人 tau 蛋白含量检测。

### 2.6.2 人血浆的检测

用人 tau 蛋白双抗体夹心 ELISA 方法, 检测临床血浆样本( $n=52$ )中 tau 含量。结果显示, AD 组为  $(19.47 \pm 7.15)$  pg/mL, 认知正常对照组 (normal cognition, NC) 为  $(13.52 \pm 2.59)$  pg/mL, 两组间具有显著性差异 ( $P=0.0005 < 0.001$ ) (表 5) (图 9A)。提示能够区分 AD 组和认知正常对照组 (NC) 血浆 tau 含量。

由于个体之间血浆 tau 蛋白含量的最大值和最小值差异较大, 导致标准差也较大(表 5), 所以将血浆 tau 含量数值取对数后, AD 组为  $1.25 \pm 0.19$ , NC 组为  $1.12 \pm 0.08$ , 标准差有所减小; 用秩和检验 (Wilcoxon rank sum test) 进行统计分析, 两组间仍然具有显著性差异  $P=0.0006 < 0.001$  (图 9B)。

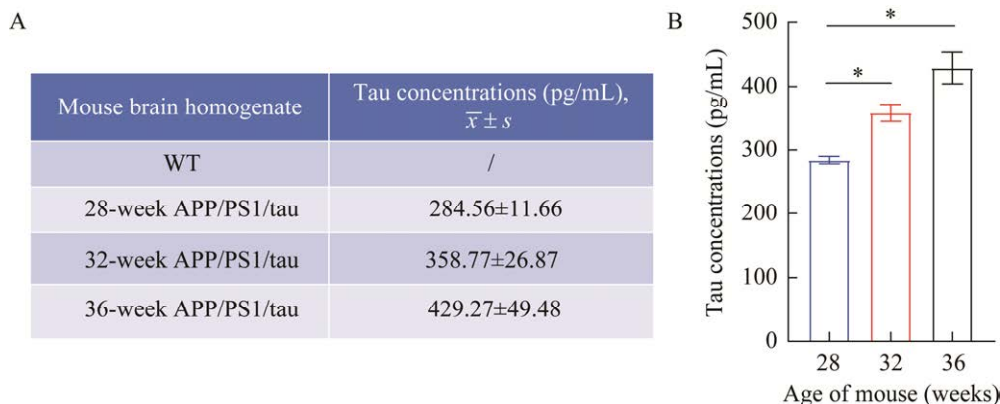


图 8 双抗体夹心 ELISA 检测 Tg 小鼠脑组织 tau 蛋白

Figure 8 Determinations of the tau concentrations in brain tissue of Tg mice through double antibody sandwich ELISA. \*:  $P < 0.05$ .

表 5 人血浆 tau 蛋白浓度检测

Table 5 Detection of tau concentrations in plasma

Groups	$n$	Tau concentrations (pg/mL) ( $\bar{x} \pm s$ )	Maximum value (pg/mL)	Minimum value (pg/mL)	$P$ -value
AD	25	$19.47 \pm 7.15$	33.85	7.40	0.0005
NC	27	$13.52 \pm 2.59$	20.55	9.49	

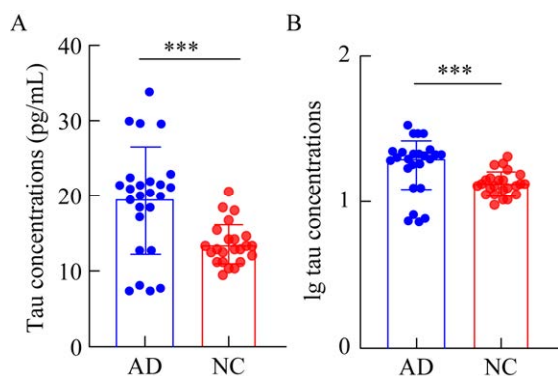


图9 双抗体夹心 ELISA 检测人血浆样本 A: 人血浆 tau 蛋白浓度分析. B: 将人血浆 tau 蛋白浓度取对数分析

Figure 9 Determinations of plasma tau concentrations through double antibody sandwich ELISA. A: Plasma tau concentrations. B: Logarithmic graph of tau concentrations. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 3 讨论与结论

相对于脑脊液检测,血液检测具有微创、采样便捷以及样品来源相对充足的特点,用于 AD 的早期筛查更容易被接受。据文献报道,磷酸化 tau 蛋白(包括 p-tau217、p-tau181 和 p-tau231 位点等)在 AD 血液检测中显示出巨大潜力<sup>[10-11]</sup>。但由于外周 tau 代谢产物的影响<sup>[12-14]</sup>,血浆中总 tau 蛋白在区分 AD 与其他神经退行性疾病时诊断性能较差<sup>[15]</sup>。那么,是否特定位点或片段的 tau 检测能够提高其对 AD 早期筛查的特异性?本文制备的人 NTD-tau 蛋白单抗,具有较高的特异性和灵敏度,在区分 AD 和认知正常的血样本检测方面显示了较好的效果。

本研究建立的 ZD8F7 单克隆抗体由全长重组人 tau 蛋白作为免疫原获得,免疫原制备方法简单。所得抗体能识别脑组织天然 tau 蛋白,能够特异性识别 AD 血液中的 tau 蛋白,有望用于 AD 的早期诊断。并且,表位分析显示其识别 tau 21-37 位氨基酸,位于 N 端结构域,与文献<sup>[16-17]</sup>报道的治疗性单抗表位相似,推测 ZD8F7 单抗

也可能同时具有治疗潜能。

采用免疫学方法对 ZD8F7 单抗识别抗原的特异性进行了研究。Western blotting 表明 ZD8F7 单抗识别 50-70 kDa 重组人 tau 蛋白而不识别无关对照 sTREM2 蛋白;ZD8F7 单抗识别转基因 AD 模型小鼠脑组织中大约 50 kDa 的人 tau 蛋白,而不识别 WT 小鼠的鼠源 tau 蛋白。双夹心 ELISA 的结果与 Western blotting 结果一致,即 ZD8F7 单抗识别人 tau 蛋白,而不识别小鼠 tau 蛋白。转基因 AD 模型小鼠(APP/PS1/tau)是通过转基因技术,在小鼠脑组织过量表达人源 APP、PSEN1 和 MAPT 基因(含 3 个突变位点:APP KM670/671NL、PSEN1 M146V 和 MAPT P301L)<sup>[9,18]</sup>,该小鼠会出现随年龄进行性的脑内 A $\beta$  淀粉样斑块含量升高及 tau 蛋白异常聚集所形成的神经纤维缠结。

对制备的抗体进行初步应用研究<sup>[19]</sup>,将所述 ZD8F7 单克隆抗体作为捕获抗体,tau 蛋白作为标准品,生物素标记的小鼠抗 tau 单抗作为检测抗体,形成抗体-抗原-抗体“夹心复合物”,之后加入的链霉亲和素-HRP 和检测抗体上标记的生物素结合,反应原理见图 10。制备了人 tau 蛋白定量检测方法<sup>[20-21]</sup>,并完成了多项条件的优化。

该体系适用于血液检测的线性范围在 7.8-500.0 pg/mL,能够涵盖文献报道的人血液 tau 蛋白含量(20.0 pg/mL 左右)<sup>[22]</sup>。本研究显示该检测体系对外周血中 tau 含量检测可以区分 AD 和认知正常对照组,提示该单抗及检测体系值得进一步用于多中心验证,助力我国 AD 人群临床前期筛查、预警以及 AD 药物疗效评估研究<sup>[23]</sup>。此外,本研究筛选所得的 ZD8F7 单克隆抗体特异性识别 N 端结构域,有可能利于调控 tau 寡聚体的游离 N 端相关的信号通路<sup>[16-17]</sup>。因此,该单克隆抗体也可能应用于研发预防和/或治疗 AD 的药物<sup>[24-26]</sup>。

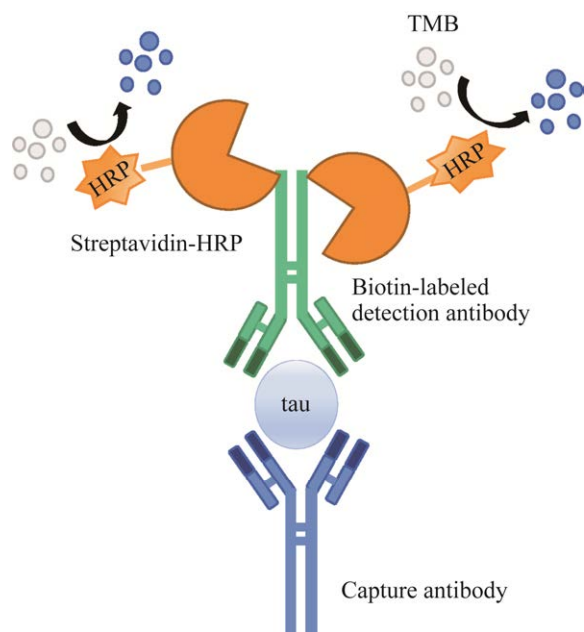


图 10 人 tau 蛋白双抗体夹心 ELISA 检测体系原理图

Figure 10 Illustration of double antibody sandwich ELISA detection system to human tau protein.

综上,本研究建立的人 NTD-tau 特异性单克隆抗体及双抗体夹心 ELISA 检测方法,可用于 AD 血液检测,将为 AD 的早期诊断、预防和治疗提供科技支持。

## 致谢

感谢北京交通大学生命科学与生物工程研究院徐寒黎老师对统计学分析部分提供的帮助。

## REFERENCES

- [1] BLENNOW K. A review of fluid biomarkers for Alzheimer's disease: moving from CSF to blood[J]. *Neurology and Therapy*, 2017, 6(1): 15-24.
- [2] SELF WK, HOLTZMAN DM. Emerging diagnostics and therapeutics for Alzheimer disease[J]. *Nature Medicine*, 2023, 29(9): 2187-2199.
- [3] FISCHER I, BAAS PW. Resurrecting the mysteries of big tau[J]. *Trends in Neurosciences*, 2020, 43(7): 493-504.
- [4] GÖTZ J, HALLIDAY G, NISBET RM. Molecular pathogenesis of the tauopathies[J]. *Annual Review of Pathology*, 2019, 14: 239-261.
- [5] CHUNG DE C, ROEMER S, PETRUCCELLI L, DICKSON DW. Cellular and pathological heterogeneity of primary tauopathies[J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2021, 16(1): 57.
- [6] SIMRÉN J, ELMGREN A, BLENNOW K, ZETTERBERG H. Fluid biomarkers in Alzheimer's disease[J]. *Advance in Clinical Chemistry*, 2023, 112: 249-281.
- [7] MERCKE M, VANDERMEEREN M, LÜBKE U, SIX J, BOONS J, VANMECHELEN E, van de VOORDE A, GHEUEN J. Affinity purification of human tau proteins and the construction of a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human tau detection[J]. *Journal of Neurochemistry*. 1992, 58(2): 548-553.
- [8] 姜家龙, 刘振武, 王子奇, 聂中梁, 李培昀, 王荷, 张莹, 何金生, 洪涛. 重组人 tau441 (P301S)蛋白表达纯化及生物学特性分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2021, 35(5): 543-547.  
JIANG JL, LIU ZW, WANG ZQ, NIE ZL, LI PY, WANG H, ZHANG Y, HE JS, HONG T. Expression, purification and biological characterization of recombinant human tau441 (P301S)[J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2021, 35(5): 543-547 (in Chinese).
- [9] CHEN SY, SUN J, ZHAO G, GUO A, CHEN YL, FU RX, DENG YQ. Liraglutide improves water maze learning and memory performance while reduces hyperphosphorylation of tau and neurofilaments in APP/PS1/tau triple transgenic mice[J]. *Neurochemical Research*. 2017, 42(8): 2326-2335.
- [10] BRICKMAN AM, MANLY JJ, HONIG LS, SANCHEZ D, REYES-DUMEYER D, LANTIGUA RA, LAO PJ, STERN Y, VONSATTEL JP, TEICH AF, AIREY DC, PROCTOR NK, DAGE JL, MAYEUX R. Plasma p-tau181, p-tau217, and other blood-based Alzheimer's disease biomarkers in a multi-ethnic, community study[J]. *Alzheimer's Dementia*. 2021, 17(8): 1353-1364.
- [11] ASHTON NJ, JANELIDZE S, MATTSSON-CARLGREN N, BINETTE AP, STRANDBERG O, BRUM WS, KARIKARI TK, GONZÁLEZ-ORTIZ F, Di MOLFETTA G, MEDA FJ, JONAITIS EM, KOSCIK RL, CODY K, BETTHAUSER TJ, LI Y, VANMECHELEN E,

- PALMQVIST S, STOMRUD E, BATEMAN RJ, ZETTERBERG H, et al. Differential roles of A $\beta$ 42/40, p-tau231 and p-tau217 for Alzheimer's trial selection and disease monitoring[J]. *Nature Medicine*, 2022, 28(12): 2555-2562.
- [12] MATTSSON N, ZETTERBERG H, JANELIDZE S, INSEL PS, ANDREASSON U, STOMRUD E, PALMQVIST S, BAKER D, TAN HEHIR CA, JEROMIN A, HANLON D, SONG L, SHAW LM, TROJANOWSKI JQ, WEINER MW, HANSSON O, BLENNOW K. Plasma tau in Alzheimer disease[J]. *Neurology*, 2016, 87(17): 1827-1835.
- [13] GONZALEZ-ORTIZ F, TURTON M, KAC PR, SMIRNOV D, PREMI E, GHIDONI R, BENUSSI L, CANTONI V, SARACENO C, RIVOLTA J, ASHTON NJ, BORRONI B, GALASKO D, HARRISON P, ZETTERBERG H, BLENNOW K, KARIKARI TK. Brain-derived tau: a novel blood-based biomarker for Alzheimer's disease-type neurodegeneration[J]. *Brain*, 2023, 146(3): 1152-1165.
- [14] ZETTERBERG H, WILSON D, ANDREASSON U, MINTHON L, BLENNOW K, RANDALL J, HANSSON O. Plasma tau levels in Alzheimer's disease[J]. *Alzheimer's Research Therapy*, 2013, 5(2): 9.
- [15] CORSI A, BOMBIERI C, VALENTI MT, ROMANELLI MG. Tau isoforms: gaining insight into *MAPT* alternative splicing[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23): 15383.
- [16] YANAMANDRA K, JIANG H, MAHAN TE, MALONEY SE, WOZNIAC DF, DIAMOND MI, HOLTZMAN DM. Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy[J]. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2015, 2(3): 278-288.
- [17] YANAMANDRA K, KFOURY N, JIANG H, MAHAN TE, MA SM, MALONEY SE, WOZNIAC DF, DIAMOND MI, HOLTZMAN DM. Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding *in vitro* markedly decrease pathology and improve cognition *in vivo*[J]. *Neuron*, 2013, 80(2): 402-414.
- [18] SALEH B, SRIKANTH KD, SNEH T, YUE L, PELECH S, ELLIOTT E, GIL-HENN H. FAK-mediated signaling controls amyloid beta overload, learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(16): 9055.
- [19] TABATABAEI MS, AHMED M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2508: 115-134.
- [20] HAYRAPETYAN H, TRAN T, TELLEZ-CORRALES E, MADIRAJU C. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and applications[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2612: 1-17.
- [21] WAGSHAL D, SANKARANARAYANAN S, GUSS V, HALL T, BERISHA F, LOBACH I, KARYDAS A, VOLTARELLI L, SCHERLING C, HEUER H, TARTAGLIA MC, MILLER Z, COPPOLA G, AHLIJANIAN M, SOARES H, KRAMER JH, RABINOVICI GD, ROSEN HJ, MILLER BL, MEREDITH J, et al. Divergent CSF  $\tau$  alterations in two common tauopathies: Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy[J]. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 2015, 86(3): 244-250.
- [22] BARTHÉLEMY NR, HORIE K, SATO C, BATEMAN RJ. Blood plasma phosphorylated-tau isoforms track CNS change in Alzheimer's disease[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2020, 217(11): e20200861.
- [23] GAO F, LV XY, DAI LB, WANG Q, WANG P, CHENG ZZ, XIE Q, NI M, WU Y, CHAI XL, WANG WJ, LI HY, YU F, CAO YQ, TANG F, PAN B, WANG GP, DENG KX, WANG SC, TANG QQ, et al. A combination model of AD biomarkers revealed by machine learning precisely predicts Alzheimer's dementia: China aging and neurodegenerative initiative (CANDI) study[J]. *Alzheimer's & Dementia*, 2022, 19: 749-760.
- [24] ARAI H, GLABE C, LUECKE H. Crystal structure of a conformation-dependent rabbit IgG Fab specific for amyloid prefibrillar oligomers[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1820(12): 1908-1914.
- [25] CONGDON EE, SIGURDSSON EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2018, 14(7): 399-415.
- [26] ROBERTS M, SEVASTOU I, IMAIZUMI Y, MISTRY K, TALMA S, DEY M, GARTLON J, OCHIAI H, ZHOU Z, AKASOFU S, TOKUHARA N, OGO M, AOYAMA M, AOYAGI H, STRAND K, SAJEDI E, AGARWALA KL, SPIDEL J, ALBONE E, HORIE K, et al. Pre-clinical characterisation of E2814, a high-affinity antibody targeting the microtubule-binding repeat domain of tau for passive immunotherapy in Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathologica Communications*, 2020, 8(1): 13.

(本文责编 陈宏宇)