

技术与方法

建立超敏 ELISA-双酶底物循环法检测 tau 蛋白*

胡元元 周新文 何善述 王建枝**

(华中科技大学同济医学院, 武汉 430030)

摘要 利用酶联免疫吸附法 (ELISA) 的高特异性和双酶底物循环的高灵敏度, 建立了 ELISA-双酶底物循环扩增检测法. 用传统 ELISA 测定纯化 tau 蛋白和阿尔茨海默病异常磷酸化 tau 蛋白的范围值分别为 1~32 ng 和 0.2~10 ng, 而此法的测定范围值分别为 0.75~200 pg 和 0.5~50 pg, 比传统 ELISA 的灵敏度分别提高 1300 倍和 400 倍, 可测定范围值亦分别扩大了 8.5 倍和 2 倍. 可准确测定阿尔茨海默病患者脑脊液样品中的微量 tau 蛋白和异常磷酸化 tau 蛋白, 为阿尔茨海默病的早期诊断和鉴别诊断提供了新技术.

关键词 ELISA-双酶底物循环, tau 蛋白, 异常磷酸化 tau 蛋白, 阿尔茨海默病

学科分类号 R745.7, Q513

自 1966 年 Avrameas 首创采用酶作为抗原或抗体的标记物以来, 免疫酶技术已成为抗原、抗体的定位、定性和定量检测的常规手段^[1-6]. 由于灵敏度的限制, 测定生物体内极微量的抗原或抗体, 就必须设法对所标记的酶信号进行放大^[7,8]. 虽然放射免疫分析 (radioimmunoassay, RIA) 极大地提高了检测灵敏度, 但 RIA 存在着放射性标记物半衰期短, 对人体有害, 需要昂贵而复杂的检测设备等缺陷. 采用多酶级联或双酶底物循环扩增, 不仅可达到 RIA 的灵敏度而且可避免 RIA 的诸多弊端. 为了建立阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 早期诊断的客观指标, 检测 AD 患者脑脊液中超微量异常磷酸化 tau 蛋白 (p-tau). 本文研究建立了 ELISA-荧光双酶底物循环扩增检测法, 用该法检测 tau 和 p-tau 标准品的灵敏度分别为 0.75 pg 和 0.5 pg, 比传统 ELISA 的灵敏度分别提高了 1300 倍和 400 倍, 可有效测定 AD 患者脑脊液样品中微量的 tau 和 p-tau, 从而可用于 AD 的早期诊断和鉴别诊断^[9].

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和实验材料

偶氮间苯四酚 (resazurin, R2127), 四甲基伞形酮磷酸 (4-methylumbelliferyl phosphate, 4Mup), 9-羟基-3-异咯草啶酮试卤灵 (resorufin, R3257), 四甲基伞形酮 (4-methylumbelliferon, 4Mu), 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP⁺), 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸

(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺, N1511), 碱性磷酸酶 (alkaline phosphorase, EC3.1.3.1, P3681), NADH 依赖性黄酶 (diaphorase, Dia, EC1.8.1.4, D5540), NAD⁺ 依赖性乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH, EC1.1.1.1, A3263) 均购自 Sigma 公司. NADP⁺ (NAD-free) 购自 Boehringer Mannheim 公司. 多克隆抗体 92e (识别总 tau), 单克隆抗体 tau 1 (识别 Ser199/202 非磷酸化 tau) 和单克隆抗体 PHF-1 (识别 Ser396/404 磷酸化 tau) 分别由 Iqbal 教授 (Institute for Basic Research, NY, USA), Binder 教授 (North Western University, Chicago, IL, USA) 和 Davis 教授 (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA) 馈赠^[7]. 碱性磷酸酶标记羊抗鼠二抗购自 Jackson 公司 (West Grove, PA, USA). 主要仪器 HITACHI MODEL 850 荧光分光光度计购自日本 (Tokyo, Japan). 大肠杆菌表达的重组 Tau 蛋白 (τ 39) 经超速离心, 磷酸纤维素 (PC11) 离子交换层析和 Sephadex G-50 凝胶过滤层析后, 经电泳鉴定达单点纯^[10]. 过度磷酸化 Tau 蛋白 (p-tau) 从 AD 患者脑组织中纯化^[11].

1.2 工作液

包被液: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5 和 10 mmol/L NaCl (TBS); 封闭液: TBS 加 3% BSA 和 0.02% NaN₃; 洗板液: TBS 加 0.05%

* 国家杰出青年科学基金 (39925012), 国家基础研究发展规划基金 (G1999054007), 国家教育部教技司基金 (2001-171 号) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 027-83692625, E-mail: wangjz@mails.tjmu.edu.cn

收稿日期: 2002-03-05, 接受日期: 2002-04-05

Tween 20 (TTBS), 抗体稀释液: TBS 加 3% BSA、0.05% Tween 20 和 0.02% NaN_3 ; 二乙醇胺缓冲液: 0.225 mol/L, pH 9.5 二乙醇胺 (DEA) 和 0.04 mmol/L MgCl_2 ; 酶循环扩增液: 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (PBS), pH 7.4, 含 6% 乙醇、不同配比的乙醇脱氢酶和黄传酶 (ADH/Dia) 以及 resazurin.

1.3 简要操作步骤

高亲和酶标板用 100 μl 多克隆抗体 (92e) 4 $^\circ\text{C}$ 包被 24 h; 加 150 μl 封闭液 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 1 h; 加 100 μl 纯化的重组 tau 蛋白或 p τ 4 $^\circ\text{C}$ 过夜; 加 100 μl 一抗 tau-1 或 PHF-1 37 $^\circ\text{C}$ 温育 1 h; 加碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗 37 $^\circ\text{C}$ 温育 1 h. 此后, 视加入碱性磷酸酶底物的不同, 分别进行下述反应.
a. 以 4MuP 为底物的常规 ELISA: 加 100 μl 含 4MuP 的 DEA 缓冲液 37 $^\circ\text{C}$ 1 h; 将酶标板内液体转入 EP 管并立即沸水浴 5 min, 荧光读数. b. 以 NADP^+ 为底物的 ELISA-荧光双酶底物循环法: 加 100 μl 含 NADP^+ 的 DEA 缓冲液, 30 $^\circ\text{C}$ 温育 45 min 后, 将反应液由酶标板转入 EP 管中, 再加入双酶底物循环缓冲液 100 μl , 37 $^\circ\text{C}$ 温育 30 min 后沸水浴 5 min, 荧光读数.

1.4 统计学分析

实验数据用 STATA 5.0 统计软件进行方差分析, 所有数据均为至少 3 次重复实验的平均值.

2 结果

2.1 双酶底物循环部分

当 E_x 为 560 nm, E_m 为 590 nm 时, 荧光产物 resorufin 读数在 10 nmol/L ~ 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈线性关系. 在荧光底物 resazurin 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 resorufin 的淬灭作用不明显, 若 $c(\text{resazurin}) \geq 16 \mu\text{mol/L}$, 则对 resorufin 呈现明显淬灭作用, 在 resazurin 浓度为 8 $\mu\text{mol/L}$ 时, resorufin 浓度在 25 nmol/L ~ 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 范围内的荧光值呈现良好的线性关系 (原始数据省略). 因为双酶底物循环法中有两个底物—— NAD^+ 和 resazurin, 前者是高浓度的辅助底物, 后者是微量的待测底物. 前者最适浓度的选择对后者测定的灵敏度和范围有很大影响. 因此, 本文采用双酶底物循环法, 在不同浓度 resazurin (2 $\mu\text{mol/L}$, 8 $\mu\text{mol/L}$, 64 $\mu\text{mol/L}$) 条件下, 系统检测了不同浓度 NAD^+ 的时间反应曲线. 结果进一步指出: 当 resazurin 为 8 $\mu\text{mol/L}$, 在 37 $^\circ\text{C}$ 保温 40 min 内,

NAD^+ 浓度在 5~100 nmol/L 范围内均呈线性关系 (原始数据略). 此外, 在双酶底物循环反应中, 当 ADH/Dia 为 0.5 U/0.0125 U 时, 对 NAD^+ 的测定灵敏度最高, 测定的线性范围最广 (图 1). 故将 8 $\mu\text{mol/L}$ resazurin 和 ADH/Dia 为 0.5 U/0.0125 U 作为双酶底物循环的最适作用条件.

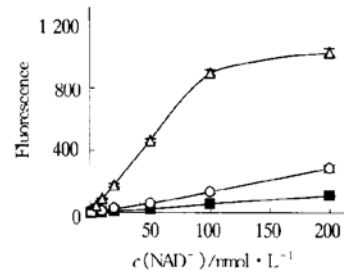


Fig. 1 The units match of ADH/ Dia in detecting NAD^+

■ — ■: ADH/ Dia= 0.125/0.003; ○ — ○: ADH/ Dia= 0.25/0.006;
△ — △: ADH/ Dia= 0.5/0.0125.

2.2 起始反应部分

指碱性磷酸酶 (ALP) 催化 NADP^+ 脱磷酸生成 NAD^+ 的反应, 是 ELISA 与双酶底物循环串联的关键.

对 ALP 作用的缓冲液、二价阳离子、反应时间及温度进行了系统研究, 发现当 Mg^{2+} 为 0.04 mmol/L, DEA 为 0.225 mol/L (pH 9.5), 30 $^\circ\text{C}$ 反应 45 min 时, ALP 活性达峰值且本底不高, 故作为 ALP 的最适反应条件; 若将 NADP^+ 贮存液置 -20 $^\circ\text{C}$, 反复冻融 10 次不会引起明显的自发水解.

用不同浓度 (0.2~20 $\mu\text{mol/L}$) NADP^+ 与不同含量 (0.05×10^{-20} ~ 200×10^{-20} mol/L) ALP 在上述最适条件下反应 45 min 后, 再串联 2.1 节中建立的双酶底物循环法, 观察 ALP 催化底物 NADP^+ 反应的线性范围. 发现 NADP^+ 浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 时, ALP 活性的灵敏度虽较高 (0.1×10^{-20} mol/L), 但线性范围窄; NADP^+ 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 或 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, ALP 活性的灵敏度低且本底高; 而当 NADP^+ 为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, ALP 活性的灵敏度既高 (0.25×10^{-20} mol/L) 且线性范围宽, 因此本文选用 1 $\mu\text{mol/L}$ NADP^+ 作为 ALP 的最适底物浓度.

2.3 ELISA 部分

测得 4Mu 在 E_x 为 358 nm, E_m 为 448 nm 时, 在 0.15~160 $\mu\text{mol/L}$ 范围内浓度与荧光值间呈线

性相关. 在 ALP 反应的最适条件下, 标记 ALP 的二抗在 $1: 1.5 \times 10^7 \sim 1: 2.5 \times 10^5$ 稀释度范围内, 呈线性关系催化 0.8 mmol/L 4MuP 生成 4Mu (原始数据略). 还测得不同滴度 92e 与不同滴度 ALP 标记二抗间、92e 与 tau 间、92e 与 PHF-1 间、 tau 与 PHF-1 间均无交叉反应; 此外, tau 与 PHF-1 及 P-tau 与 Taur-1 间无显著交叉反应, 证明不同一抗与二抗间、以及 PHF-1 和 Taur-1 的结合

反应是高度专一性的 (原始数据略).

2.4 常规 ELISA 和 ELISA-双酶底物循环法比较

用常规 ELISA 测定结果显示: 标准重组 tau 蛋白在 $1 \sim 32 \text{ ng}$ 之间与荧光值呈线性关系 (图 2a); 而 AD 患者 p-tau 在 $0.2 \sim 10 \text{ ng}$ 之间与其荧光值有线性关系 (图 2b). 可见, 常规 ELISA 检测 tau 和 p-tau 的最低检出值分别为 1 ng 和 0.2 ng .

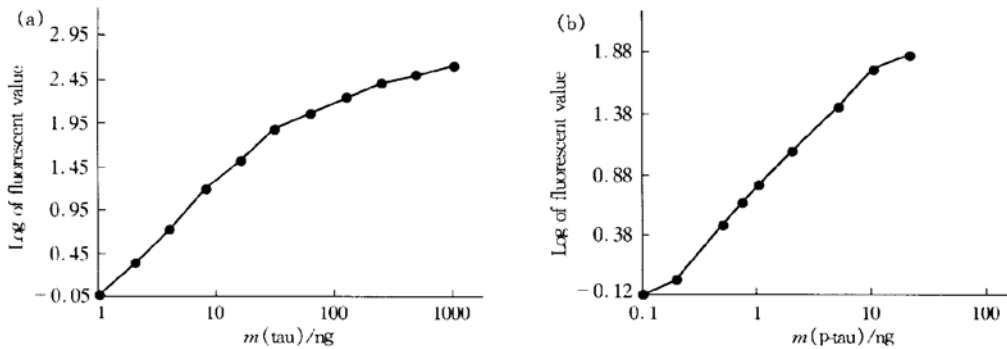


Fig. 2 Detection of tau (a) and p tau (b) by conventional ELISA

用 ELISA-双酶底物循环法的测定结果: 标准重组 tau 在 $0.75 \sim 200 \text{ pg}$ 内与其荧光值呈线性关系 (图 3a), 比常规 ELISA 扩大 1 300 多倍, 线性范

围值增加 8.5 倍; AD 患者 p-tau 在 $0.5 \sim 50 \text{ pg}$ 内呈线性关系 (图 3b), 比常规 ELISA 扩大 400 倍, 线性范围值增加 2 倍.

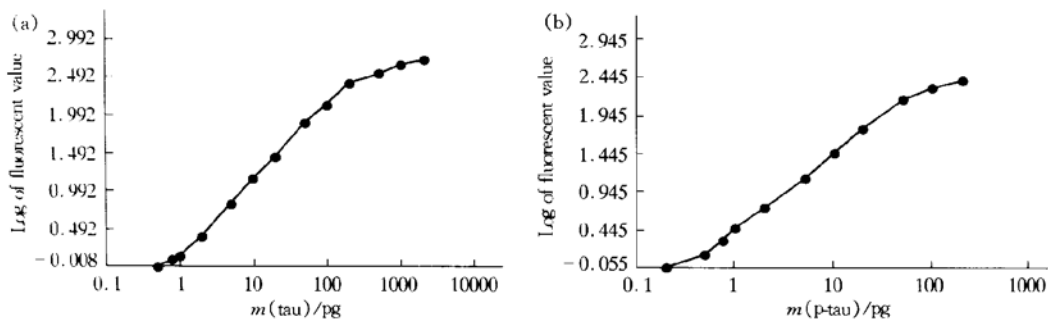


Fig. 3 Detection of tau (a) and p tau (b) with ELISA-双酶底物循环法

3 讨论

将常规 ELISA 的二抗用碱性磷酸酶 (ALP) 标记, 后者将底物 NADP^+ 去磷酸化生成 NAD^+ , NAD^+ 在乙醇脱氢酶和黄传酶的协同作用下进入一个双底物的氧化还原循环. 首先 NAD^+ 被乙醇脱氢酶还原为 NADH , 同时另一底物乙醇被脱氢生成乙醛; 接着 NADH 被黄传酶氧化为 NAD^+ , 另一荧光底物 resazurin 被还原为荧光产物 resorufin. 随着每一次 NAD^+ 、 NADH 的循环, 荧光产物亦

相应增加而扩增, 其扩增的幅度与 NAD^+ 的量成正比. 因此通过测定荧光产物量可以反映 NAD^+ 量. 在 NADP^+ 过量的条件下, NAD^+ 的生成量与 ALP 的量成正比, 故双酶底物循环法可将 ELISA 中由 ALP 携带的信号放大^[7,8]. 从理论上说, 这一双酶底物循环的放大倍数只受乙醇脱氢酶底物乙醇和黄传酶底物 resazurin 耗尽的限制. 但在 ELISA-双酶底物循环的实际操作过程中, 这种高效的双酶底物循环反应的扩增效率将受许多因素的影响. 故本研究对 ELISA-双酶底物循环每一步的

影响因素进行了系统研究, 通过对所得一万余数据进行统计学分析和综合调配, 成功建立了高灵敏度和高特异性的 ELISA-双酶底物循环法。

根据酶动力学, 底物 resazurin 应尽可能大于其 K_m 值, 才能使反应速度更接近最大反应速度。但底物 resazurin 对产物 resorufin 发射的荧光有明显的淬灭作用, 为探索最适的反应底物浓度, 本研究同时检测了不同浓度的 resazurin 对不同浓度 NAD^+ 的双酶底物循环扩增效率。发现当 resazurin 浓度为 $8 \mu\text{mol/L}$ 时, 一方面满足了底物足量的要求, 另一方面对产物无明显淬灭作用; 经双酶底物循环 30 min 时, 有较宽的 NAD^+ 线性范围。

当底物浓度一定时, 酶浓度与反应速度成正比, 因此, 必须要求有足够的双酶的绝对浓度。本文通过比较不同配对的双酶浓度对催化反应的影响, 发现随 ADH/Dia 浓度增加, 反应产物随循环底物 NAD^+ 增加而增加, 当双酶浓度配对为 0.5U/0.0125U 时, 可测出低至 0.1 nmol/L 的 NAD^+ , 其线性范围宽达 $0.1 \sim 100 \text{ nmol/L}$, 这一灵敏度和高低值达 1 000 倍的线性范围已完全满足了实验的要求, 通过酶动力学的理论指标, 这个双酶配对浓度催化的速度已近于最大速度。

乙醇脱氢酶属于双底物双产物氧化还原酶, 该酶活性受一些金属离子和 pH 的影响, 因此本文采用 pH 7.4 磷酸缓冲液, 后者可与重金属结合, 而除去这些离子对乙醇脱氢酶的抑制作用。由于双酶底物循环的底物 NAD^+ 来自 $NADP^+$ 的去磷酸化, 因此要使双酶底物循环结果能准确地反映碱性磷酸酶的催化活性, 必须选用高特异性依赖 NAD^+ 的乙醇脱氢酶品种, 以避免 $NADP^+$ 亦参与脱氢酶反应。本研究选用的酵母乙醇脱氢酶品种 (Sigma 公司, A3263), 正可满足上述特性的要求。

经系统实验结果指出, 超敏反应的最适条件为 $0.04 \text{ mmol/L Mg}^{2+}$, pH 9.5 的 0.225 mol/L DEA , $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 min. $NADP^+$ 要求不杂含 NAD^+ 的高纯度商品, $NADP^+$ 贮存液应保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下, 以防止其自发水解, 以及 $NADP^+$ 的最适反应浓度为

$1 \mu\text{mol/L}$, 此时可测得 ALP 活性的高灵敏及 80 倍宽度的线性范围, 且本底较低。在 ELISA 反应过程中, 抗体纯度、滴度、交叉反应等均可影响检测结果, 本研究对此过程中的每一个环节都进行了实验分析, 并找出了最适的反应条件。本研究所得数据逾万, 为节省篇幅, 大部分原始数据均未能显示。

参 考 文 献

- Harris C C, Yolken R H, Krokhan H, *et al.* Ultrasensitive enzymatic radioimmunoassay: application to detection of cholera toxin and rotavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (10): 5336~ 5339
- Wilchek M, Bayer E A. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem*, 1988, **171** (1): 1~ 32
- Kricka L J. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem*, 1991, **37** (9): 1472~ 1481
- Avrameas S. Amplification systems in immunoenzymatic techniques. *J Immunological Methods*, 1992, **150** (1~ 2): 23 ~ 32
- Puget K, Michelson A M, Avrameas S. Light emission techniques for the microestimation of femtogram levels of peroxidase: application to peroxidase (and other enzymes) -coupled antibody cell antigen interactions. *Anal Biochem*, 1977, **79** (1~ 2): 447 ~ 456
- Maehara K, Kinoshita S, Watanabe K. A simple fluorometric method for the determination of serum free carnitine. *Clin Chim Acta*, 1998, **171** (2~ 3): 311~ 316
- Vera-Cabrera L, Handzel V, Laszlo A. Development of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) combined with a streptavidin-biotin and enzyme amplification method to detect anti-2, 3-di-O-acetylrehalose (DAT) antibodies in patients with tuberculosis. *J Immunol Met*, 1994, **177** (1~ 2): 69~ 77
- Ishizuca T, Kawagoe M, Suzuki K, *et al.* An ultrasensitive system to detect IL-4: enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) combined with an avidin-biotin and enzyme amplification system. *J Immunol Met*, 1992, **153** (1~ 2): 213~ 217
- 胡元元, 何善述, 王建枝. 测定脑脊液 tau 含量作为阿尔茨海默病诊断的生化指标. *中华医学杂志*, 2001, **81** (22): 1377 ~ 1379
- Hu Y Y, He S S, Wang J Z. *Chinese Medical Journal*, 2001, **81** (22): 1377~ 1379
- Wang J Z, Gong C X, Zaidi T, *et al.* Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase 2A and 2B. *J Biol Chem*, 1995, **270** (9): 4854~ 4860
- Köpke E, Tung Y C, Shaikh S, *et al.* Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 1993, **268** (32), 24374~ 24384

Development of an Ultrasensitive ELISA-dienzyme Substrate Recycle Assay for Measurement of Cerebrospinal Fluid Tau^{*}

HU Yuan-Yuan, ZHOU Xin-Wen, HE Shan-Shu, WANG Jian-Zhi^{**}

(Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract On the basis of conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and dienzyme substrate recycle, An highly specific and ultrasensitive biochemical assay, named ELISA-dienzyme substrate recycle was developed. The detective range of conventional ELISA for measuring recombinant tau and abnormally phosphorylated tau purified from Alzheimer disease brain was 1ng to 32 ng. It was 0.75pg to 200pg and 0.5pg to 50pg by ELISA-dienzyme substrate recycle. Compared with the conventional method, the sensitivity of the technique established in the present study increased 400 and 1300 times, with a enlarged detective range of 8.5 and 10 times, respectively. It could detect abnormally phosphorylated tau in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease and used effectively for the diagnosis of the disease.

Key words ELISA-dienzyme substrate recycle assay, tau, abnormally phosphorylated tau, Alzheimer disease

^{*} This work was supported in part by grants from The Youth Fund of Natural Science Foundation of China (39925012), Science and Technology Committee of China (G1999054007) and National Educational Committee of China (2001-171).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-27-83692625, E-mail: wangjz@mails.tjmu.edu.cn

Received: March 5, 2002 Accepted: April 5, 2002