[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02805313.3

[51] Int. Cl.
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100503638C

[22] 申请日 2002.1.29 [21] 申请号 02805313.3
[30] 优先权
[32] 2001. 2. 2 [33] AT [31] A175/2001
[86] 国际申请 PCT/EP02/00897 2002.1.29
[87] 国际公布 WO02/062851 英 2002.8.15
[85] 进入国家阶段日期 2003.8.21
[73] 专利权人 阿克松神经科学研究和发展股份有限公司
地址 奥地利维也纳
[72] 发明人 M·诺瓦克
审查员 吴永庆

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 刘晓东

权利要求书 1 页 说明书 45 页 附图 14 页

[54] 发明名称

tau 蛋白

[57] 摘要

本发明涉及对在构象上不同于正常 tau 且不与正常 tau 蛋白结合的异常截短形式的 tau 蛋白具有特异性的抗体、在构象上不同的 tau 蛋白("tauons")和与阿尔茨海默病和相关 tauo 病(tauopathies)有关的诊断和治疗方面。

1. 由在 ECACC 中保藏的具有保藏号 00082216 的杂交瘤细胞系 DC-11 产生的抗体。

2. 产生权利要求 1 的抗体的杂交瘤细胞系。

3. 权利要求 2 的杂交瘤细胞系，其为在 ECACC 中保藏的具有保藏号 00082216 的杂交瘤细胞系 DC-11。

4. 在 N-末端或 C-末端或两末端上被截短的人 tau 蛋白的截短形式，所述的截短形式在构象上不同于正常的人 tau，且所述的截短形式至少包括由 441 个氨基酸组成的最长人 tau 同种型中的第 300 位氨基酸到第 400 位氨基酸残基，所述的人 tau 蛋白截短形式可由权利要求 1 的抗体特异性识别。

5. 用于检测或分离脑组织或体液样品中权利要求 4 的人 tau 蛋白的截短形式的试剂盒，该试剂盒包括权利要求 1 的抗体和用于装载所述样品的适宜容器。

6. 权利要求 5 的试剂盒，其特征在于它进一步含有用于检测所述抗体与所述人 tau 蛋白截短形式之间结合情况的工具。

7. 权利要求 6 的试剂盒，其中所述工具为次级抗体。

8. 权利要求 7 的试剂盒，其中所述次级抗体是特异性标记的次级抗体。

9. 权利要求 5-8 任一项的试剂盒，其特征在于它进一步含有用于对所述人 tau 蛋白截短形式定量的工具。

10. 权利要求 5-8 任一项的试剂盒，其特征在于进一步含有用于对所述人 tau 蛋白截短形式的标准制品定量的工具。

11. 权利要求 1 的抗体在制备用于检测权利要求 4 的人 tau 蛋白截短形式的诊断剂中的用途。

12. 权利要求 1 的抗体在制备用于治疗阿尔茨海默病患者的药物中的应用。

tau蛋白

本发明涉及阿尔茨海默病（Alzheimer's disease）和其它 tauo 病（tauopathies）.

阿尔茨海默病(AD)是最常见的慢性神经变性疾病，其在临床上的特征在于进行性和不可逆的认知和行为功能丧失．这种疾病可能持续 10 年以上，从轻度症状开始到极其严重的表现．AD 危害了约 10%的 65 岁以上人群和 20%的 80 岁以上人群．随着西方社会的不断增长，患病人数正在上升：仅在美国就已经有 500 万患者，且截至到 2000 年年底，世界上大约有 1800 万人患痴呆．在他们中，认为有大约三分之二的病例、即 1200 万人将成为阿尔茨海默病．它是心脏病、癌症和中风之后的西方世界中的第四大杀手．患痴呆的人的数量正在快速增加．到 2025 年，在发达国家患痴呆的人的数量将会为 1980 年的 2 倍。护理这些患者的社会成本是巨大的。例如，据估计美国社会用于诊断和控制 AD、主要是用于监护的成本目前每年在 800 亿美元。目前，既没有 AD 症状发生前的诊断试验、也不能治愈 AD。因此，在临床上是在症状发生而基本上排除其它形式的痴呆后才能诊断该病．巴伐利亚精神病学家 Alois Alzheimer 在 93 年前的 1907 年观察到的 AD 大脑中的传统指征老年(神经炎)斑和神经原纤维缠结(NFT)的累积仍然保留为 AD 的神经病理学特征。

胞内神经原纤维结构(神经原纤维缠结、营养不良性轴突和神经纤维网丝)的常见共同特征在于成对螺旋纤丝(PHFs)。PHFs 的主要蛋白亚单位是异常高磷酸化形式的微管结合蛋白 tau(Grundke-Iqbal 等，1986；Wischik 等，1988 a, b)。带有神经原纤维改变的神经元变性，且这种变性的程度直接与受侵害个体的痴呆程度有关(Blessed 等，1968)。

正常 tau 是主要分布至轴突的微管结合蛋白．tau 蛋白参与调节

神经元且可能是神经胶质细胞体中的微管(MT)装配、空间结构和特性(Drewes 等，1998；Drubin 和 Kirschner，1986；LoPresti 等，1995)。tau 蛋白由位于第 17 染色体上的单一基因编码，且在来自成人大脑的组织提取物中以多同种型（isoform）被检测到(Goedert 等，1989；Himmler A.，1989；Kosik 等，1989)。tau 蛋白的异质性部分是由于可选剪接所导致的，从而在成人大脑中产生 6 个同种型。这些不同的同种型的区别在于在氨基末端区上存在或不存在 29-或 58-氨基酸插入片段，以及在称作微管结合结构域的 tau 羧基末端区上添加或缺失了衔接重复(可以重复 3 或 4 次)。该区由不完全重复的 31 或 32 个氨基酸残基组成。在人体中，最小的 tau 同种型在 MT 结合结构域上含有带有三个衔接重复的 352 个氨基酸残基且不含氨基末端插入片段，而最长同种型含有 441 个残基，带 4 个重复片段和两氨基末端插入片段。为简便起见，在本专利申请中所有的编号均指的是含有 Goedert 等(1989)的全部插入片段(441 个氨基酸长)的最长人 tau 蛋白同种型 htau40。

已知许多神经疾病带有含微管结合蛋白 tau 的丝状细胞包涵体，这些神经疾病例如有：阿尔茨海默病(AD)、进行性核上麻痹(PSP)、皮质基底（corticobasal）的变性 (CBD)、皮克病（Pick's disease）(PiD)和共同称作带有与第 17 染色体相关的帕金森综合征的额颞痴呆的一组相关疾病(FTDP-17)、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、克罗伊茨费尔特-雅各布病(Creutzfeldt-Jakob disease)(CJD)、拳击性痴呆(dementia pugilistica)(DP)、格-施-沙病(Gerstmann-Straussler-Scheinker disease)(GSSD)、雷维小体病和亨廷顿舞蹈病(Huntington disease)(Dickinson 等，1998；DiFiglia 等，1997；Forno，1986；Hirano 和 Zimmerman，1962；Nishimura 等，1995；Prusiner 1996；Reed 等，1998；Roberts，1998；Schmidt 等，1996；Shankar 等，1989；Spillantini 等，1998)。尽管这些疾病中包含的病因学、临床症状、病理学发现和生化组成不同，但是出现的证据提示涉及正常细胞蛋白聚集成各种丝状包涵体的机制相差无

几。认为启动生成用于纤丝装配的核心或种子的微管结合蛋白 tau 的最初构象改变是关键特征。该过程可以受到正常蛋白质的翻译后修饰、某些基因的突变或缺失和结合正常蛋白质且由此改变其构象的因素的影响。tau 蛋白是极为亲水性的。可以易于从大脑组织或培养细胞中提取它。比较而言，提取自阿尔茨海默病态大脑组织的丝状 tau 是相对不溶性的。不溶性和正常可溶性的 tau 在翻译后修饰的程度不同，除磷酸化外，还包括糖基化、糖化、遍在蛋白化和外消旋化(Kenessey 等，1995；Ko 等，1999；Mori 等，1987；Wang 等，1996；Yan 等，1994)。

尚不了解修饰 tau 蛋白以参与 AD 中纤丝形成的机制。tau 是已知的最可溶性蛋白之一 (Cleveland 1977 a, b；Lee 等 1988)，且由此 AD 中它的聚集特别令人费解。tau 的磷酸化影响了 tau 形成聚集物的可能性，从而产生了刺激或抑制作用，推断这取决于磷酸化位点(Crowther 等，1994；Schneider 等，1999)。许多体外研究证明在有还原剂二硫苏糖醇(DTT)、不饱和游离脂肪酸类、RNA 或糖胺聚糖类存在的情况下，正常 tau 可以被转化成纤丝(Goedert 等，1996；Kampers 等，1996；Perez 等，1996；Wilson 和 Binder，1997)。此外，通过 Cys322 上氧化生成的交联 tau 的存在也可以加速纤丝形成过程(Schweers 等，1995)。不同纤丝装配研究中不同的参数已经包括了 tau 蛋白浓度、pH，而温育的离子强度高于生理条件下存在于胞质中的离子强度许多倍。扫描透射电镜(STEM)对体外形成的 tau 纤丝进行的检验显示这些纤丝不同于天然成对螺旋纤丝(Ksiezak-Reding，1998)。在没有聚糖或 RNA 存在的情况下，在含有未磷酸化或磷酸化野生型 tau、正常 tau 的样品中没有可检测到的 PHF-样纤丝。对化学交联的肝素处理的 tau 的研究表明肝素处理诱导 tau 蛋白中的构象改变(Paudel 和 Li，1999)。与体外数据共同提示：(a) 微管结合结构域对 tau 纤丝装配而言是重要的；和(b) tau 纤丝的形成要求 tau 的构象改变。这些研究同时表明所述的 tau 修饰中没有一种能够单独诱导与阿尔茨海默病的临床表现相关的丝状 tau 形成。对引起导致疾病

情况中纤丝形成的 tau 改变而言重要的因素的确定和描述对开发症状发生前的诊断标记和干预 tauo 病进展的治疗剂而言是重要的。

因此本发明的一个目的是提供用于阿尔茨海默病或其它 tauo 病中的早期治疗干预的可靠药物靶物。此外，希望提供能够特异性检测该药物靶物并与之发生相互作用的特异性单克隆抗体。这种抗体不仅应适合于在症状发生前检测所述分子、而且也应适合于抑制和消除该分子，由此适合于阿尔茨海默病或其它 tauo 病的症状发生前的诊断、治疗和预防。

使用本发明实现了这些目的，而本发明在一个方面中涉及对构象上不同于正常 tau 的 tau 蛋白的异常形式具有特异性的抗体，所述的抗体对正常 tau 蛋白而言是非特异性的。这类 tau 蛋白的异常形式代表一族新的分子，它们是在构象上不同于正常 tau 的 tau 蛋白的位于神经元内和神经元外的可溶和不溶性的、优选异常截短的形式(Novak 等，1991,1993)。使用本发明可以证实这些构象不同形式的在本说明书中称作"tauons"的 tau 蛋白是种子、即与阿尔茨海默病临床表现相关的丝状 tau 形成的自我繁殖过程中的成核中心，由此 tauons 是阿尔茨海默病的重要治疗靶物。本发明的 tauons 可以是异常截短的 tau 蛋白。使用本发明的抗体可以在体外和神经元内抑制 tauons 的生物活性。这些抗体具有在 AD 症状发生前的 I、II 和 III 期中对存在的 tauons 进行染色的能力，从而使它们适合于该病的症状发生前的诊断。对本发明的抗体而言，关键是仅不同构象形式的 tau 蛋白(即"tauon")由这种抗体识别，而正常的 tau 蛋白不与本发明的抗体结合。

在本发明的过程中，将微管结合蛋白 tau 的 AD 截短形式纯化至同质且证实是来自阿尔茨海默病态神经元的丝状 tau 分离物的主要部分。氨基酸序列数据显示 tauons 的主链与蛋白质 tau 的主链没有区别，而 tauons 在免疫学上区别于正常人 tau 的方面可能在于本发明构象特异性单克隆抗体所揭示的不同构象。这类抗体的具体实例是由保藏在欧洲细胞培养物保藏所(ECACC)、保藏号为 00082216 的杂交瘤

细胞系产生的单克隆抗体 DC-11 和保藏在 ECACC、保藏号为 00082215 的杂交瘤细胞系 DC-11/I 产生的单克隆抗体 DC-11/I。由本发明提供的该族单克隆抗体通过识别 tauon-特定构象而不识别正常人可溶性 tau 来确定。与正常人 tau 相比不同的构象在病理学上是由迄今为止来自阿尔茨海默病患者测试样品中 tau 分子 N-末端或 C-末端或两末端上的异常截短所导致的。令人关注的是不同构象与 tau 同种型和磷酸化水平无关。这种使 tauons 获得典型构象的不可缺少的病理学要求是存在大量脯氨酸和微管结合结构域和截短侧翼区。此外，tauons 区别于正常人 tau 的方面可能在于其病理活性，即 tauons 代表启动 tau 聚集和由正常 tau 和微管蛋白装配的 tauons 解装配微管的种子、即成核中心。与本发明抗体、尤其是 DC-11 族单克隆抗体一起预保温的 tauons 没有表现出解装配的能力或由正常 tau 和微管蛋白装配微管。此外，tauons 在对分化的人神经元微注射时明显导致由微管结合的 tau 部分取代内源性 tau、神经元收缩并使细胞变性。如果将 tauons 与本发明的单克隆抗体一起微注射，那么在分化的神经元中没有观察到神经变性改变。这一结果表明本发明的抗体、尤其是 DC-11 单克隆抗体抑制神经元内 tauons 活性，且由此可以用作胞内药物(例如用作胞内治疗抗体、即内体（intrabodies）)。在免疫组织学方面，正如使用本发明抗体所观察到的，tauons 已经在 AD 的 transenthorinal 和 enthorinal 区中的前-α-神经元内的症状发生前 I、II 和 III 期出现，因此，在适当偶联示踪物后，可以将本发明的抗体用于活体的 AD 症状发生前的诊断。

优选本发明的抗体与抗体 DC-11 相比表现出对 tau 的构象不同形式("tauon")至少 50%、优选至少 90%的特异性。可以通过任意用于检测抗体特异性的标准试验检测特异性，例如 ELISA 试验、放射性免疫测定、使用悬臂连接的结合配偶体的原子力显微术等。

一般来说，与构象不同的 tau 蛋白、尤其是其异常截短形式发生特异性反应而不与正常可溶性 tau 反应的所有抗体也包括在本发明的范围内。

优选地，认为本发明的抗体与分子发生"特异性反应"，条件是它能够与分子结合而由此使该分子与所述抗体偶联。术语"表位"指的是可以由抗体识别和结合的抗原部分。抗原可以带有一个或一个以上的表位。"抗原"能够诱导动物产生能够结合该抗原表位的抗体。上述所指的特异性反应指的是该抗原可以以高度选择性方式与其相应的抗体发生免疫反应，而不与由其它抗原产生的众多其它抗体发生免疫反应。

本发明特别优选的抗体来源于保藏的杂交瘤细胞系 DC-11 (ECACC 保藏号 00082216)和 DC-11/I(ECACC 保藏号 00082215)，它们表现出高度特异性和选择性，且与 tau 的构象不同形式("tauon")反应而不与正常的可溶性 tau 反应。可以通过任意用于检测抗体特异性的标准试验检测特异性，例如 ELISA 试验、放射性免疫测定等。

本文所用的"抗体"用以指包括完整分子及其片段及其合成和生物衍生物，诸如：例如不含 Fab、$F(ab')_2$ 和 F_v 片段，游离或例如在 pIII 或 pVIII 或其它表面蛋白上的丝状噬菌体表面或细菌表面上表达，其能够结合抗原。Fab、$F(ab')_2$ 和 Fv 片段缺乏完整抗体的 F_c 片段、从循环中更为快速地清除，且可以具有较低的非特异性抗体组织结合能力。此外，易于改造 F_v 抗体(通常称作小抗体 (minibody))以在其 C-末端上携带特异性示踪物，并用于 AD 的活体早期症状发生前诊断，这是因为由本发明抗体识别的 AD 的 I、II 和 III 期与智力下降无关。

在本发明中，优选单克隆抗体或单克隆抗体片段。因此，本发明在另一个方面中还涉及产生本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

本申请中所用的术语"tau"指的是如 M. Goedert 等 1989 所述的含有全部可选的剪接插入片段的人微管结合蛋白 tau 的最长同种型。

按照本申请的另一个方面，本发明涉及属于 tau 蛋白的构象不同形式的 tau 蛋白的异常截短形式，所述的 tau 蛋白的构象不同形式可由本发明的抗体特异性识别。

因此，本发明涉及一族新的位于神经元内和神经元外的可溶和不

溶性异常截短形式的 tau 蛋白，它们在构象上不同于正常的 tau 且称作"tauons"。

"tauons"由此是可以由本发明所述抗体特异性识别的 tau 蛋白的构象不同形式。用于本发明的 tauons 包括 SEQ ID No. 1 的序列，且可以进一步侧翼接有其它氨基酸(参见 SEQ ID No. 2、3)。tauons 适宜在约 100－400 个氨基酸范围内，且在该范围内代表 tau 蛋白的截短形式。本发明的 tauons 可以在 N-或 C-末端或两末端被异常截短(参见附图 2-13)。本文所用的术语"异常截短的"指的是用本发明提供的 tauon 特异性单克隆抗体在患病的 AD 神经元中鉴定的 tau 肽("tauons")。

可以通过使用许多任意众所周知的合成重组技术来制备人 tau 蛋白的异常截短形式 tauons。简单地说，在本领域中广泛实施了用于转化细胞、构建载体、提取信使 RNA、制备 cDNA 文库的大部分技术，且大部分本领域技术人员熟知描述具体条件和步骤的标准来源资料。然而，为方便起见，将下面的段落用作指导原则。

用于产生重组蛋白质的最常用原核生物系统为大肠杆菌(E.coli)，然而，也可以使用其它微生物菌株，诸如：芽孢杆菌属(Bacilli)，例如枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)；假单胞菌属(Pseudomonas)的不同种类；或其它细菌菌株。在这类原核系统中，使用了含有来源于与宿主相容的种类的复制位点和控制序列的质粒载体。常用的原核控制序列包括用于转录起始的启动子，可选的操纵子以及核糖体结合位点序列。

目前各种真核宿主也用于产生重组外源蛋白质。当在细菌中时，可以用直接产生所需蛋白的表达系统转化真核宿主，但更常见的情况是提供信号序列来实现蛋白质的分泌。真核系统具有另外的优点，即它们能够加工可以在编码高级生物体蛋白质的基因组序列中出现的内含子。真核系统还提供了各种加工机制，这些机制例如使某些氨基酸残基糖基化、氧化或发生衍生作用、构象控制等。

常用的真核系统包括酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞、鸟类细胞

和高级植物细胞。所列实例并未穷尽。合适的启动子是可得到的，它们对用于这些宿主类型中的每一种而言是相容性和可操作的，且是终止序列和增强子，诸如：例如杆状病毒多角体启动子。如上所述，启动子可以是组成型的或诱导型的。例如，在哺乳动物系统中，可以通过添加重金属离子来诱导 MTII 启动子。

用于构建适合于所需宿主的表达系统的具体实例对本领域技术人员而言是公知的。为了所述蛋白质的重组生产，将编码它的 DNA 适当连入所选择的表达系统，然后将该系统转入相容的宿主细胞，随后在发生外源基因表达的条件下培养和维持该细胞。通过裂解该细胞或从培养基中回收这种方式产生的本发明 tauons，这是本领域技术人员所公知的。

可以通过首先用连接混合物转化适宜的宿主来证实用于质粒构建的正确连接。正如本领域中可理解的，用氨苄青霉素、四环素或其它抗生素抗性或使用其它标记来筛选成功的转化体，这取决于质粒的构建方式。

本发明由此涉及 tauons 制品、尤其是基本上不含其它蛋白的来自人或重组来源的 tauons 制品、尤其是来自正常 tau 蛋白的 tauons 制品。可以通过一定方法来提供这类制品，所述的方法包括使用本发明抗体进行免疫亲和的步骤。优选本发明的制品在总蛋白中含有 80%以上的 tauons、尤其是 95%以上的 tauons。

此外，本发明还涉及用于检测阿尔茨海默病脑组织样品或体液样品中构象上不同于正常 tau 的 tau 蛋白的异常截短形式 tauons 的试剂盒，该试剂盒包括本发明的抗体和用于装载所述探针的适宜容器。能够在试剂盒中提供所述抗体以用于检测或分离 tauons。借助于本发明抗体可以检测 tauon 蛋白，并从包括 transenthorinal、enthorinal 区和海马的阿尔茨海默病态神经元在内的各种来源中分离它。可以将按照这种方式分离的 tauons 进一步用作例如对小鼠进行免疫接种的免疫原，以便构建产生针对 tauons 而不识别正常全长 tau 的特异性单克隆抗体的杂交瘤。该方法包括下列步骤：鉴定来自

阿尔茨海默病态脑组织 transenthorinal、enthorinal 和海马区的神经元并使其释放入防止 tauons 异常构象的溶液中。

在制备和纯化后，将 tauons 用作免疫原，每隔一个月经皮下注入小鼠。将来自这些动物的脾脏用于构建产生针对 tauons 的单克隆抗体的杂交瘤。使用首先由 Köhler 和 Milstein 介绍的充分建立的杂交瘤技术生产这些杂交瘤(参见 M. Köhler 和 C. Milstein, "分泌预定特异性抗体的融合细胞的连续培养"("Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Pre-Defined Specificity"),《自然》(Nature), 256, pp. 495-497, 1975)。在足够长时间的免疫接种后，从动物的脾脏、淋巴结或外周血液中得到产生抗体的淋巴细胞。优选这些淋巴细胞获自脾脏。然后通常在有诸如聚乙二醇(PEG)这样的融合剂存在的情况下使脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞系融合。按照标准技术可以将任意数量的骨髓瘤细胞系用作融合配偶体；例如 P3-NS 1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653 骨髓瘤细胞系。随后使包含所需杂交瘤的所得细胞生长在诸如 HAT 培养基这样的选择培养基中，其中未融合的亲本骨髓瘤或淋巴细胞最终死亡。仅杂交瘤细胞存活，且可以在限制条件下生长至得到分离的克隆。例如，通过使用已经用于免疫接种的抗原的免疫测定技术筛选杂交瘤上清液中存在的具有所需特异性的抗体。然后在有限稀释条件下或在软琼脂上亚克隆阳性克隆，且可以分离产生的单克隆抗体。可以使用本领域中所公知的技术使按照这些方法生产的杂交瘤在体外或体内增殖(腹水中)。用于纯化(purfying)单克隆抗体的常用方法包括硫酸铵沉淀、离子交换、层析法和亲和层析法(例如，参见 H. Zola 等，"用于单克隆抗体产生和性质鉴定的技术"("Techniques for the Production and Characterization of Monoclonal Antibodies")-《单克隆杂交瘤抗体：技术与应用》(Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications), J. G. R. Hurell (编辑), pp. 51-52 (CRC Press 1982))。

优选本发明的试剂盒进一步含有用于检测所述抗体与所述构象不

同的 tau 蛋白之间结合情况的工具。优选次级抗体、尤其是特异性标记的次级抗体。此外，在本发明范围内可以使用磁珠技术以及应用抗体的其它蛋白质鉴定方法。该方法包括在来自人的测试样品中鉴定异常截短的 tau 蛋白 tauon 的步骤。本文所用的"测试样品"指的是来自怀疑含有 tauons 的人的生物样品。测试样品可以包括含异常截短的 tau 蛋白的脑组织，诸如海马组织或额皮质组织；或所述的测试样品可以包括脑脊液(CSF)。在一个优选的实施方案中，所述的测试样品包括 CSF，且所鉴定的蛋白是 CSF-tauon。异常截短的 tau 蛋白 tauons 的鉴定适宜包括鉴定测试样品中的抗原的步骤，该抗原能够结合与异常截短的 tau 蛋白 tauons 发生特异性反应的抗体，其中所述的 tauons 包含序列(SEQ ID No. 1)，且侧翼接有氨基酸以使得所述的 tauons 的长度在约 100－400 个氨基酸的范围，且特征在于不同于正常可溶性蛋白 tau 的 tauon 的特异构象；或该抗原能够结合与异常截短的 tau 蛋白 tauons 发生特异性反应的抗体，其中所述的 tauons 包含序列(SEQ ID No. 1)，且侧翼接有氨基酸以使得所述的 tauons 的长度在约 100－400 个氨基酸的范围，且特征在于不同于正常可溶性蛋白 tau 的 tauon 特异构象。tauon 的存在表明与 AD 患者和其它患 tauo 病（tauopathies）的患者体内 tauons 的累积有关的疾病。

本发明的另一个方面涉及患者体液中构象上不同于正常 tau 的 tau 蛋白的异常截短形式的检测方法，该方法包括下列步骤：将所述体液与本发明的抗体混合、检测所述抗体与构象不同的 tau 蛋白(tauon)之间存在的结合情况，且可选地测定与所述抗体结合的构象不同的 tau 蛋白的量。tauon 的存在表明包括 AD 和其它 tauo 病（tauopathies）在内的疾病的人体内 tauons 的累积有关的疾病。患者的体液可以是来自怀疑含有 tauons 的人的任意生物测试样品。这种体液可以包括脑组织，诸如海马组织或额组织或皮质组织或脑脊液(CSF)。在一个优选的实施方案中，所述的体液包括 CSF 且所鉴定的蛋白质是 CSF-tauons。

正如本领域中可以理解的，可以通过生化或细胞化学方法或通过诸如许多免疫测定生产商的手册中所述的酶免疫测定法便利地完成这种对 tauons 的鉴定。当使用生化方法时，优选使用 0.01－10 g、尤其是 0.5－1 g 的含有患病 tau 蛋白的组织；使其在凝胶上迁移并通过 Western 印记来鉴定。认为这类技术确实适于在没有已经证实不与本发明抗体反应的年龄匹配的对照组的情况下进行。细胞化学方法染色已经证实与正常组织无反应性。

通过 ELISA 检测来自患 AD 的患者和患非-AD 神经性疾病以及正常受试者的 CSF 以便对 tauons 的水平进行定量。与患非 AD 神经性疾病的患者和对照组相比，AD 患者体内的 CSF tauon 水平显著增加。在 AD 中，发现这种显著增加与发作的年龄、载脂蛋白 E 基因型和临床阶段无关。对 AD CSF 蛋白的 Western 印记显示了几种具有与异常截短的 tau 蛋白一致的 50 －15 kD 的表观分子量免疫反应带。这些结果表明 CSF-tauons 反映出由 AD 进展导致的患病 tau 渐进累积。

本发明的抗体在另一个方面中可以用于制备治疗阿尔茨海默病患者的药物。可以将该抗体以生物技术方式修饰成装配有靶向序列的单链分子，其能够将所述的分子转运入表达 tauons 的成神经细胞瘤细胞。在本 AD 细胞模型内，抗体结合 tauons 并干扰其病理作用(正常 tau 的结合)，且增加 tau 蛋白的异常截短形式的降解。使用异常截短的 tau 蛋白及其与阿尔茨海默病严重程度的相关性进行的体外试验(tau 蛋白结合、纤丝装配、微管解装配)证实它们是重要的药物靶物。

通过下列实施例和附图来更具体地描述本发明，但它们不应用来限制本发明。

附图 1 表示 tauon 制备的概述；附图 2 表示 tauon 氨基酸序列的总示意图；附图 3 表示最小 tauon；附图 4 表示 C-末端截短的 tauon；附图 5 表示 N-末端截短的 tauon；附图 6 表示 tau 的示意图；附图 7 表示人 tau 37；附图 8 表示人 tau 39；附图 9 表示人 tau 40；附图 10 表示人 tau 43；附图 11 表示人 tau 44；附图 12 表示人 tau 46；

且附图13表示大鼠的大tau。

实施例

实施例1

对tauons具有特异性的DC11族单克隆抗体的制备

作为免疫接种用抗原的可溶性和不溶性tauons的制备(附图1)

为了从人AD大脑中分离tauons，部分基于Kopke等(1993)以及Greenberg和Davies (1990)所述的方法开发了一种新方法。选择表现出具有短期死后延缓(post mortem delay)(PMD)的AD I.-III. Braak's阶段改变特征的人大脑。选择包括enthorinal和transenthorinal区、扁桃体和海马区的颞叶块。解剖该组织并立即浸入最低必需培养基(Gibco)中。将组织精细切碎并压过150μm目网筛。在该阶段将大脑样品分成两个等分部分：样品A和样品B。

将样品A进一步在20 mM pH 8的TRIS、0.32 M蔗糖、10 mM β-巯基乙醇、5 mM EGTA、1mM EDTA、5 mM $MgSO_4$、5 mM 苄脒、10 mM甘油磷酸、6 mM苯甲基磺酰氟、50 mM氟化钠、5μg/ml亮抑酶肽、1.5 μg/ml胃酶抑制剂和2 μg/ml抑酶肽中处理并在4℃下以25 000 x g离心35分钟以除去细胞碎片。然后以200 000 x g 40分钟使上清液沉淀。在室温下将所得沉淀用8 M脲萃取70分钟并在室温下以300 000 x g旋转45分钟。将上清液对频繁更换的pH 7.6的10 mM TRIS透析24小时且然后对100 mM MES、0.5 mM $MgCl_2$、1 mM EDTA、2 mM EGTA、1 mM二硫苏糖醇、0.75 mM NaCl、0.1 mM苯甲基磺酰氟和50 mM NaF、pH 2.7透析24小时。通过以200 000 x g离心40分钟而除去沉淀的蛋白质。将200 000 x g上清液对pH 6.4的25 mM MES、0.5 mM $MgCl_2$、0.1 mM EDTA和1 mM二硫苏糖醇透析、且随后在用相同缓冲液平衡的磷酸纤维素柱上进行分级分离。使2 mg/ml的蛋白质上柱并用20 ml线性梯度的NaCl(0-1M)的平衡缓冲液溶液洗脱。通过Western印迹评价用0.1-0.8 M NaCl洗脱的蛋白质，并通过真空离心蒸发浓缩(speed vacuum)设备浓缩。

将样品 B 放入玻璃匀化器内 10 个体积的冷缓冲液(10 mM TRIS, 1 mM EGTA, 0.8 M NaCl, 10%蔗糖, pH 7.4)中。在 4℃下以 27 000 x g 离心 30 分钟后，保留上清液并将沉淀与所述缓冲液一起匀化，且以 27 000 x g 离心 30 分钟。合并来自两次离心的 27 000 x g 上清液、调节至 1% (wt/vol) N-月桂酰基肌氨酸和 1% (vol/vol)β-巯基乙醇，并在 37℃下的摇动器上保温 3 小时。在以 35 000 rpm 离心 30 分钟后，将沉淀在补充了 1 %巯基乙醇的 5 ml 匀化缓冲液中匀化并通过 0.45 μm 滤膜过滤。将滤液以 35 000 rpm 离心 1 小时。将沉淀重新悬浮于 pH 6.8 的 50 mM Tris 中，并用 2.5%甲酸萃取 2 分钟，且然后以 10 000 x g 离心 10 分钟以沉淀不溶性物质。在 4℃下将上清液对 pH 7.4 的 10 mM Tris 透析过夜，并如上所述进行离心。使用真空离心蒸发浓缩设备浓缩所得上清液(级分 II)，并通过 SDS-PAGE、随后通过 Western 印迹评价。保留来自用 2.5%甲酸萃取后含有不溶性 tauons(级分 III)的样品 B 的沉淀并用于免疫接种和斑点试验。合并级分(I、II 和 III)中的 Tauons，并用作对小鼠进行免疫接种的抗原(参见附图 1)。

产生 DC-11 族单克隆抗体的杂交瘤的制备

将 6 周龄 Balb/c 小鼠分成 3 组(A, B, C)。使前 2 组(A, B)接触溶于弗氏完全佐剂(Sigma)的 50μg 抗原，且间隔 3 周加强接种 5 次溶于弗氏不完全佐剂的 50μg 相同抗原(Ag)。在 A 组中，将所有剂量注入足垫，在 B 组中经皮下给予 Ag 的剂量。对第 3 组小鼠仅将溶于 PBS 中的一个剂量直接注入脾(脾内免疫接种)，并在该接触抗原后的 1 周将脾用于融合。融合前 3 天时经静脉内对 A 组和 B 组中的小鼠注射 50 μg 溶于 PBS 的免疫原。按照 Kontsekova 等 1988 的方法使来自免疫接种小鼠的脾细胞与 NS/0 骨髓瘤细胞融合。将 10^8 个脾细胞与 2 x 10^7 个 NS/0 骨髓瘤细胞混合(比例 5: 1)，并在补充了 10%二甲亚砜的不含血清的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(DMEM)内的 1ml 50% PEG 1550 (Serva)中融合 1 分钟。将融合的细胞以 2.5 x 10^5 个

脾细胞/孔的密度重新悬浮于 96-孔平板上的 DMEM 中，该 DMEM 含有 20%马血清、L-谷氨酰胺(2 mM)、次黄嘌呤(0.1 mM)、氨基蝶呤(0.004 mM)、胸苷(0.016 mM)和庆他霉素(40 U/ml)。将细胞在 37℃下保温 10 天，并通过 ELISA 和免疫组织化学筛选用于产生抗-tauon 特异性单克隆抗体的生长的杂交瘤。

通过 ELISA 进行抗 tauons 抗体筛选

将 ELISA 用于检测针对 tauons 的杂交瘤培养物上清液中的单克隆抗体。使用如上所述制备且具有下列改变的 tauons 作为固相。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳从级分中分离真空离心蒸发浓缩的合并物，并通过按照 Donofrio 等(1986)的方法经电洗脱回收 tau 蛋白的截短形式，且通过 SDS-PAGE 评价。在 4℃下用异常截短的 tau 蛋白 PBS 溶液将微量滴定板包被过夜(10μg/ml，50 μl/孔)。在用 1 %脱脂奶粉封闭以减少非特异性结合后，将该平板用 PBS-0.05% Tween 20 洗涤，并在 37℃下与 50μl/孔的培养物上清液一起保温 1 小时。用与辣根过氧化物酶(DAKO)缀合的绵羊抗小鼠 Ig 检测结合的单克隆抗体。用邻苯二胺溶液作为过氧化物酶底物使反应显色，并用 50 μl 2 M H_2SO_4 终止该反应。使用 Multiscan MCC/340 ELISA 读出器(Labsystems)测定 492 nm 处的吸收度。将至少两倍于阴性对照值的读取值看作是阳性的。

按照 Kontsekova 等 1991 的步骤在软琼脂上进一步亚克隆阳性培养物。重新筛选用于产生特异性抗-tauon 单克隆抗体的分离的亚克隆。

抗 tauon 抗体的免疫组织化学筛选

如下在 AD 大脑组织上重新筛选在抗-tauon ELISA 中鉴定为阳性而对正常 tau 鉴定为阴性的单克隆抗体的特异性：

在冠状板上将尸解时取出的 AD 患者的大脑切成 1cm 间隔的切片并储存在-20℃下。将海马、enthorinal、颞、额、枕和顶叶皮层块

固定在4℃的4%缓冲低聚甲醛中4天以上。在振动切片机上切一系列额切片(50 μm)并储存在4℃下的PBS (pH 7.0)中。用98%冷甲酸将自由移动的振动切片机切片预处理2-3分钟、与PBS/Triton X 100中的免疫前血清一起保温。所用的血清与第二抗体来自相同动物种类。在37℃下将切片与ELISA (如上所述)中阳性的单克隆抗体一起保温60分钟。

在室温下与第二生物素化抗体(Vectastain Elite 试剂盒, Vector)保温1小时。使用抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物(Vectastain Elite 试剂盒, Vector)和6 mg 3-3-二氨基联苯胺-4 HCl(SIGMA)、250 mg $NiCl_2$ (MERCK)的含100μl H_2O_2的10 ml 0.1 M 乙酸盐缓冲液(pH 6)使免疫反应显色。通过在PBS/Triton中洗涤切片终止反应(Kiss 等, 1988; Cuello 等, 1993, Thorpe 和 Kerr, 1994)。

实施例2

使用DC-11族单克隆抗体对异常截短的tau蛋白(tauons)进行的定量测定

如上所述分离tauons。单克隆抗体DC 30 (识别正常和病理性tau)与DC-11族单克隆抗体(对异常截短的tau具有特异性)的组合对由AD-大脑制备的测试样品中的tauons进行量化。通过蛋白质A柱层析法从不含血清的培养基中纯化抗体。在4℃下用浓度为10μg/ml(50μl/孔)的DC-11单克隆抗体混合物的PBS溶液将高结合微量滴定板(Nunc)的孔包被过夜。通过加入200μl 1%的脱脂奶粉的磷酸缓冲盐水(PBS)在室温下60分钟而将孔中的非特异性结合饱和。将该平板用PBS-0.05% Tween 20 (v/v)洗3次。加入含浓度为100-1000pg/ml的重组tauons的PBS液的连续稀释的标准品和含有50 μl用量的AD-tauons测试样品。在37℃下保温60分钟后，洗涤平板，并加入在PBS中1/5000稀释的辣根过氧化物酶缀合的抗体DC 30(50μl/孔)、在37℃下持续60分钟。在最终的洗涤后，向各孔中

加入 50 μl 的邻苯二胺溶液和 0.003% H_2O_2，并将平板在黑暗中保温 20 分钟。用 50 μl 的 2M H_2SO_4 使反应终止。用 ELISA 读出器 Multiscan MC344 (Labsystems, Finland)上读取 492 nm 处的吸收度。

根据获得的数值构建重组 tauons 的标准曲线，并根据标准曲线确定测试样品中 tauons 的相应浓度。

实施例 3

通过 Western 印迹、使用单克隆抗体 DC-11 检测 tauons。

使纯化的重组全长人 tau 和异常截短的 tau 蛋白 tauons 上样 5-20%梯度 SDS-聚丙烯酰胺凝胶，并使其在 Laemmli (1970)的变性条件下迁移。SDS-PAGE 后，在 pH 12 的 10 mM CAPS 缓冲液中，将转移到聚氯乙烯膜(Milipore)上的步骤在 350 mA、冷却下进行 1 小时。印记后在 PBS 中洗涤该膜，并在室温下用 1%脱脂奶粉 PBS 液封闭 1 小时。将转移的蛋白质与单克隆抗体 DC-11 一起在 4℃下保温过夜。在用 PBS-0.05% Tween 20 (v/v)洗涤后，使用按 1/1000 稀释的用辣根过氧化物酶标记的大鼠抗小鼠免疫球蛋白并在室温下保温 1 小时。然后将该膜在 PBS-Tween 20 中洗涤 4 次、用底物溶液(12 mg 4-氯-1-萘酚（naphtol）、4 ml 甲醇、16 ml PB、0.03% v/v H_2O_2)使反应显色，并在 H_2O 中终止该反应。结果表明抗体 DC-11 仅识别异常截短的 tau 即 tauons，相反，单克隆抗体 DC 30 是普遍识别所有已知来自许多种类(人、猴、牛、猪、大鼠、小鼠)的 tau 同种型的全 tau 抗体，而与其翻译后修饰的状态无关。

实施例 4

tauons 的免疫组织化学鉴定

DC-11 族单克隆抗体适合于在不同类型免疫组织化学方法中使 AD-大脑中的 tauons 显色。

光学显微镜标记

在冠状板上将尸解时取出的患AD患者的大脑切成1cm间隔的切片并储存在-20℃下。将海马、entorhinal、颞、额、枕和顶叶皮层块固定在4℃的4%缓冲低聚甲醛中4天以上。在振动切片机上切一系列额切片(50 μm)并储存在4℃下的PBS (pH 7.0)中。用98%冷甲酸将自由移动的振动切片机切片预处理2分钟、与PBS/Triton X 100中的免疫前血清一起保温。所用的血清与第二抗体来自相同动物种类。在37℃下将切片与单克隆抗体DC-11一起保温60分钟。在室温下与第二生物素化抗体(Vectastain Elite 试剂盒, Vector)保温1小时。使用抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物(Vectastain Elite 试剂盒, Vector)和6 mg 3-3-二氨基联苯胺-4 HCl(SIGMA)、250 mg $NiCl_2$ (MERCK)的含100μl H_2O_2的10 ml 0.1 M乙酸盐缓冲液(pH 6)使免疫反应显色。通过在PBS/Triton中洗涤切片终止反应(Kiss等, 1988; Cuello等, 1993, Thorpe和Kerr, 1994)。

光学显微镜双标记

用98%冷甲酸将自由移动的振动切片机切片预处理2-3分钟、与PBS/Triton X 100中的免疫前血清一起保温。所用的血清与第二抗体来自相同动物种类。在37℃下将切片与在封闭溶液(5%马血清、PBS、0.1% Triton)中按1: 1000稀释的第一种过氧化物酶缀合的单克隆抗体DC-11一起保温60分钟、在0.06% DAB、0.01% H_2O_2的PBS溶液(pH 7.2)中展开。通过在PBS/Triton中洗涤切片终止反应。在37℃下将相同切片与第二单克隆抗体一起保温60分钟。在室温下与生物素化抗体(Vectastain Elite 试剂盒, Vector)保温1小时。使用抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物(Vectastain Elite 试剂盒, Vector)和0.06% 3-3-二氨基联苯胺-4 HCl(SIGMA)、0.01% H_2O_2、2.5% $NiCl_2$ (MERCK)的0.1 M乙酸盐缓冲液使免疫反应显色,并通过在0.1 M乙酸盐缓冲液中洗涤切片终止反应(Kiss等, 1988; Cuello, 1993)。

使用快速甲酚紫（cresyl violet）进行的复染

在完成免疫组织化学染色后，将切片置于载玻片上并放入 56℃下的恒温器中 60 分钟。在保温后将载玻片浸入蒸馏（destilled）水中 5 分钟、在 4℃下用快速甲酚紫溶液染色 5-10 分钟、用水冲洗并转入 96%乙醇，直到除去大部分甲酚紫染色、用二甲苯（xylen）净化并用 Entellan 固定。

免疫荧光染色

用 98%冷甲酸将自由移动的振动切片机切片（30μm）预处理 2 分钟、与 PBS/Triton X 100 中的免疫前血清一起保温。在 37℃下将切片与第一种初级单克隆抗体 DC-11 一起保温 60 分钟，然后在室温下与按照本领域中所用的标准方法与在 PBS/Triton 中按 1: 500 稀释的 FITC-缀合的山羊抗体小鼠次级抗体(Immunotech)一起保温 30 分钟。在用 PBS 洗涤后，在 37℃下将切片与 TRITC-缀合的初级抗体一起保温 60 分钟，并固定在 0.1 %对苯二胺/甘油溶液中。

实施例 5

使用 tauons 进行的微管装配和微管结合试验

微管蛋白纯化

通过温度依赖性微管聚合与解聚循环、随后通过磷酸纤维素(Watman P11 磷酸纤维素)离子交换层析法(Valee, 1986)从自当地屠宰厂获得的鲜猪脑中分离微管蛋白。

微管装配试验

在+4℃下将纯化的 tauons(5 mM)与预净化的纯化微管蛋白 (10 mM)和 GTP (1 mM)在装配缓冲液(100 mM PIPES pH 6.9,2 mM EGTA, 1 mM $MgSO_4$)中混合。该微管蛋白的浓度低于自发装配的临界浓度(Black, 1987)。将样品用移液管吸入预热至 37℃的石英池中。在热稳定控制的分光光度计(LKB)中以分光光度方式测定浊度的改变，并

记录为 10 s 间隔的 OD_{350} 改变、持续 30 分钟的期限.

微管结合试验

如上所述确定含微管的 tauons 的结合曲线(Gustke, 1992). 在 37℃下, 在有 GTP (1 mM)和紫杉醇(20 μM)存在的情况下, 将纯化的微管蛋白在结合缓冲液(100 mM PIPES pH 6.9、1 mM EGTA、1 mM $MgSO_4$、1 mM DTT)中保温 10 分钟. 用分别不干扰 tauons 或正常 tau 蛋白及其它 MAPs 结合的紫杉醇稳定微管(Valee, 1986; Wallis, 1993), 由此消除微管装配的影响. 加入浓度分别为 2.5 mM、5 mM、7.5 mM、10 mM、15 mM、20 mM 的 Tauons。在 37℃下以 43 000 x g 离心 35 分钟后, 将沉淀重新悬浮于 P 缓冲液(50 mM PIPES pH 6.9、1 mM EGTA、0.2 mM $MgCl_2$、5 mM DTT、500 mM NaCl)中. 在 SDS-PAGE 凝胶上分析上清液与沉淀(Laemmli, 1970)、用银染色(Bloom, 1987). 在 HPScanJet (Hewlett-Packard)扫描仪上扫描凝胶, 并应用公共域 NIH Image 程序(美国国家健康研究所(U. S. National Institutes of Health)研发并可在国际互连网上获得, 网址 http ://rsb. info. nih. gov/nih-image/)在 Macintosh 计算机上进行分析. 使用内标法和校正曲线将带强度转化成浓度。

实施例 6

重组 tauons 的制备

使用"Erase a Base System" (Promega)、按照技术手册制备 tau 蛋白的重组截短形式。该系统基于从 5'突出端开始特异性消化插入 DNA 的外切核酸酶 III. 在恒温下消化率是均匀的. 通过 NdeI-EcoRI 限制位点将 tau 基因克隆入 pET17b 载体产生 pET/T40. 向该基因的 C-末端添加 KpnI 限制位点和 KpnI 位点的全部三个读框下游中的三个终止密码子. EcoRI 酶留下 5'突出端作为 exoIII 的底物. KpnI 留下耐 exoIII 消化的 3'突出端. 将用 EcoRI、KpnI/NEB 双消化和乙醇沉淀的 1μg pET/T40 载体在 20μl 1xExoIII 缓冲液中稀释,

并在 37℃/消化率 450 个碱基/分钟条件下用 80 u exoIII 消化。在添加 ExoIII 后，就 1 份样品而言，间隔 30 s 将 2.5μl 样品转入冰上的 7.5μl S1-核酸酶混合物/1.5 u S 1-核酸酶中。在室温下将收集的样品保温 30 分钟以除去剩余的单链尾。用 Klenow DNA 聚合酶形成钝端。直接用样品的连接混合物转化 DH5α感受态细胞。通过 PstI-XhoI 限制性酶切筛选亚克隆，并使用 pET 载体中 T7-引物对合适的构建体测序。

重组 tauons 的表达、纯化和定量

在大肠杆菌 BL21(DE3) (Studier, 1986)中表达 Tauons。将单细菌菌落接种入 500 ml 的 LB AMP (LB 培养基，100μg/ml 氨苄青霉素)。使细菌培养物在 37℃下的旋转摇动器上生长，直到其 OD_{600} 达到 0.6-0.8，然后通过添加 IPTG (0.4 mM 终浓度)诱导。3 小时后，通过在 4℃下以 5000 g 离心 15 分钟使细菌细胞沉淀(Sigma 6K15，转子 12 500)，将细胞沉淀迅速冷冻在液氮中，且储存在-70℃下至进一步应用为止。为了制备细胞裂解物，将细菌沉淀重新悬浮于缓冲液 A 中：(20 mM PIPES pH 6.9、50 mM NaCl、1 mM EGTA、1 mM $MgSO_4$、2 mM DTT、0.1 mM PMSF)，通过在冰上超声处理 6 分钟使细胞破碎，并通过在+2℃下以 45 000 rpm 离心 15 分钟而除去细胞碎片(转子 TLA-120.2, Beckmann Optima TLX)。通过 0.22 μm 滤膜(Millipore)过滤上清液，并立即在磷酸纤维素柱(磷酸纤维素 Whatman P 11)上通过离子交换层析纯化 tauons。在使样品上柱后，用 10 个床体积的缓冲液 A 洗涤该柱。用 20 ml 线性梯度的 NaCl(50 mM-0.5 M)缓冲液 A 洗脱 Tauons。收集 1 ml 级分，并在 SDS-PAGE 上鉴定含有蛋白质的那些级分。合并含有 tauons 的级分，并在 4℃下对 PBS 透析 3 x 60 分钟。将来自透析液的等分部分真空干燥(SpeedVac)并储存在-20℃下。通过 PAGE、使用连续稀释的牛血清白蛋白(BSA)作为质量标准标记对重组 tauons 进行定量。用考马斯蓝染色凝胶、干燥并使用 Scion Image (Beta 3b, Scion Corp.)计算

BSA和tau带的强度。构建BSA的校正曲线并用于对tauons定量。

实施例7

从人AD-大脑中分离tauons

为了从人AD大脑中分离tauons，部分基于Kopke等(1993)以及Greenberg 和 Davies (1990)所述的方法开发了一种新的方法。选择表现出具有短期死后延缓(PMD)的AD I.-III. Braak's 阶段改变特征的人大脑。选择包括enthorinal和transenthorinal区、扁桃体和海马区的颞叶块。解剖该组织并立即浸入最低必需培养基中(Gibco)。将组织精细切碎并压过150μm目网筛。在该阶段将大脑样品分成两个等分部分：样品A和样品B。

将样品A进一步在20 mM pH 8的TRIS、0.32 M蔗糖、10 mM β-巯基乙醇、5 mM EGTA、1mM EDTA、5 mM $MgSO_4$、5 mM 苄脒、10 mM 甘油磷酸、6 mM 苯甲基磺酰氟、50 mM 氯化钠、5μg/ml 亮抑酶肽、1.5 μg/ml 胃酶抑制剂和2 μg/ml 抑酶肽中处理并在4℃下以25 000 x g 离心35分钟以除去细胞碎片。然后以200 000 x g 40分钟使上清液沉淀。在室温下将所得沉淀用8 M 脲萃取70分钟并在室温下以300 000 x g 旋转45分钟。将上清液对频繁更换的pH 7.6的10 mM TRIS 透析24小时，且然后对100 mM MES、0.5 mM $MgCl_2$、1 mM EDTA、2 mM EGTA、1 mM 二硫苏糖醇、0.75 mM NaCl、0.1 mM 苯甲基磺酰氟和50 mM NaF、pH 2.7透析24小时。通过以200 000 x g 离心40分钟而除去沉淀的蛋白质。将200 000 x g 上清液对pH 6.4的25 mM MES、0.5 mM $MgCl_2$、0.1 mM EDTA和1 mM二硫苏糖醇透析，且随后在用相同缓冲液平衡的磷酸纤维素柱上进行分级分离。使2 mg/ml 的蛋白质上柱并用线性梯度的NaCl(0-1M)的平衡缓冲液溶液洗脱。通过Western印迹评价用0.1-0.8 M NaCl洗脱的蛋白质，并通过真空离心蒸发浓缩设备浓缩。

将样品B放入玻璃匀化器内10个体积的冷缓冲液(10 mM TRIS, 1 mM EGTA, 0.8 M NaCl, 10%蔗糖, pH 7.4)中。在4℃下以27

000 x g 离心 30 分钟后，保留上清液，并将沉淀与所述缓冲液一起匀化，且以 27 000 x g 离心 30 分钟。合并来自两次 27 000 x g 离心的上清液、调节至 1% (wt/vol) N-月桂酰基肌氨酸和 1% (vol/vol)β-巯基乙醇，并在 37℃下的摇动器上振动保温 3 小时。在以 35 000 rpm 离心 30 分钟后，将沉淀在补充了 1 %巯基乙醇的 5 ml 匀化缓冲液中匀化并通过 0.45 μm 滤膜过滤。将滤液以 35 000 rpm 离心 1 小时。将沉淀重新悬浮于 pH 6.8 的 50 mM Tris 中，并用 2.5%甲酸萃取 2 分钟，然后以 10 000 x g 离心 10 分钟以沉淀不溶性物质。将上清液对 pH 7.4 的 10 mM Tris 在 4℃下透析过夜，并如上所述进行离心。使用真空离心蒸发浓缩设备浓缩所得上清液，并通过 SDS-PAGE、随后通过 Western 印迹评价。

实施例 8

从人、猪和牛大脑组织中纯化正常 tau

通过对 Lindwall 和 Cole.，1984 方法进行修改的方法纯化 tau。将大脑组织(1 mg/ml)在 0.1 mM MES、0.5 mM $MgCl_2$、1 mM EGTA、1 M NaCl pH 6.5 中匀化，并在 4℃下以 100 000 x g 离心 90 分钟。将上清液制成 0.5% (v/v) 2-巯基乙醇溶液、在 100℃下加热 5 分钟并在 4℃下以 20 000 x g 离心 30 分钟。将该第二次的上清液制成 45%的 $(NH_4)_2SO_4$ 饱和溶液，且如上所述以 20 000 x g 离心，并将所得沉淀重新悬浮于不含 NaCl 的 MES 缓冲液中。在用 2.5% (v/v)高氯酸沉淀并进一步以 20 000 x g 离心后，将最终的上清液对 pH 7.4 的 5 mM Tris 4℃透析过夜。

实施例 9

由 tauons 逐渐导致的正常 tau 结合和聚集成纤丝缠结

将量逐渐增加的正常 tau (5-100μg/100ul)与固定量的分离自级分 I 的(10μg/100ul)tauons 混合。使该反应在 100ml 终体积的结合缓冲液(含有 2 mM EGTA、2%牛血清白蛋白、0.5 mM $MgCl_2$、1 μM 抑

酶肽和 20 μM 亮抑酶肽的 pH 7.6 的 100 mM MES)中进行。在室温下使该混合物发生相互作用 45 分钟，然后置于 150μl 80%蔗糖结合缓冲液溶液，以 100 000 x g 离心 1 小时。除去上部的 150μl，并对剩余部分超声处理以便通过放射性免疫-斑点-印记测定法测定 tauons 与正常 tau 之间的相互作用。蔗糖层中存在 tau 表明 tauon 结合了健康的 tau。

实施例 10

DC-11 族单克隆抗体抑制神经元变性

将神经元母细胞瘤细胞和生长因子一式三份置于培养皿上。第一组仅接受 tauons，而第二组接受 tauons 和 DC-11 单克隆抗体的混合物。

用免疫荧光检测转染的 tauons

在室温下将细胞在含有 80 mM PIPES、1 mM $MgCl_2$、1 mM EGTA，pH 6.6 的 0.2% Triton X 100 中透化 5 分钟。在相同缓冲液中用 2%低聚甲醛将细胞冰上固定 15 分钟。通过间接免疫荧光抗生物素蛋白罗丹明检测系统(Sigma)检测 Tauons。

神经元分化早期抑制的检测

使细胞与分化诱导因子一起生长。评价分化水平。带有 tauons 而不含抗体的该组细胞具有的分化能力显著下降。然而，用 tauons 和抗体混合物处理的组分化至与来自用无关蛋白处理的对照组的细胞相差无几的水平。

参考文献:

Black MM (1987) Comparison of the effects of microtubule-associated protein 2 and tau on the packing density of in vitro assembled microtubules Proc Natl Acad Sci USA 84: 7783-7787

Blessed G, Tomlison BE, Roth M (1968) The association between qualitative measaures of dementia and senile change in cerebral grey matter of elderly subjects. Br J Psychiatry 114: 797-811.

Bloom H, Beier H, Gross HS (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99.

Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Psysical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. J Mol Biol 116: 227-247

Cleveland DW, Hwo SY Kirschner MW (1977b) Purification of tau a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. J Mol Biol 116: 207-225

Crowther RA, Olesen OF, Smith MJ, Jakes R, Goedert M (1994) Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein. FEBS Letter 337:135-138

Cuello AC, Coté SL, Ribeiro-Da-Silva A (1993): Current protocols for light microscopy immunohistochemistry. Immunohistochemistry II John Wiley and sons Cichester, 148-167.

Dickson DW, Feany MB, Yen S-H, Mattiace LA; Davies P (1998) Cytoskeletal pathology in non-Alzheimer degener-ative dementia: new lesions in diffuse Lewy body disease, Pick's disease, and corticobasal degeneration. J Neural Transm 47: 31-46

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intra-nuclear inclusions and dystrophic neurites in brain, Science 277:1990-1993

Donofrio JC, Coonrod JD, Karathanasis V, Coelingh KV (1986) Electroelution for purification of influenza A matrix protein for use in immunoassay. 13: 107-120

Drewes G, Ebneth A, Mandelkow EM (1998) MAPs MARKs and microtubule dynamics. Trends Biochem Sci 23: 307-311

Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. J Cell Biol 103: 2739-2746

Forno LS (1986) The Lewy body in Parkinson's disease, In: Yahr MD, Bergmann KJ (eds) Parkinson's Disease, Advances in Neurology, Vol. 45, Raven Press: New York pp. 35-43

Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. Neuron 3: 519-526

Goedert M, Jakes R, Spillantini M, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA (1996) Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer~like filaments induced by sulfated glycosaminoglycans. Nature 383: 550-553

Greenberg SH, Davies P (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA 87: 5827-5831

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y-C, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci USA 83: 4913-17.

Gustke N, Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Meyer HE, Goedert M, Mandelkow E (1992) The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. FEBS Lett 307: 199-205.

Himmer A (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generates a protein family. Mol Cell Biol 9: 1389-1396

Hirano A, Zimmerman HM (1962) Alzheimer's neurofibrillary changes. Arch Neurol 7: 73-88

Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1996) RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. FEBS Lett 399: 344-349

Kenessey A, Yen S-H, Liu W-K, Yang X-R, Dunlop DS (1995) Detection of D-aspartate in tau proteins associated with Alzheimer paired helical filaments. Brain Res 675: 183-189

Kiss A, Palkovits M, Skirboll LR (1988) Light microscopic triple-colored immunohistochemical staining on the same vibratome section using the avidin-biotin-peroxidase complex technique. Histochem 88: 353-356

Kopke E, Tung Y-Ch, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993) Microtubule-associated protein tau abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer
disease. J Biol Chem 268: 24374-24384

Kontseková E, Novák M, Kontsek P, Borncký L, Lesso J. (1988) The effect of postfusion cell density on establishment of hybridomas. Folia Biol (Praque) 34:18-22

Kontseková E, Novák M, Mácikoyá I, Kontsek P. (1991) One-step method for establishing 8-azaguanine-resistant hybridomas suitable for the preparation of triomas. J Immunol Methods 145: 247-250

Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequence. Neuron 2: 1389-1397

Ksiezak-Reding H, Yang G, Simon M, Wall JS (1998) Assembled tau filaments differ from native paired helical filaments as determined by scanning transmission electron microscopy STEM. Brain Res. 814: 86-98.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Lindwall G, Cole RD (1984) The purifiction of tau protein and the Occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. J Biol Chem: 259:12241-12245

Ko LW, Ko EC, Nacharaju P, Liu WK, Chang E, Kenessey A, Yen SH (1999) An immunochemical study on tan glycation in paired helical filaments. Brain Res 830:301-313

LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski PR, Binder LI (1995) Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. Proc Natl Acad Sci USA 92:10369-10373

Mori H, Kondo J, Ihara Y (1987) Ubiquitin in a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Science 235: 1641~1644

Nishimura T, Ideda K, Akiyama H, Kondo H, Kato M, Li F, Iseki E, Kosaka K (1995) Immunohistochemical investigation of tau-positive structures in the cerebral cortex of patients with progressive supranuclear palsy. Neurosci Lett 201: 123-126

Novák M, Kabát J, Wischik CM (1993) Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. J EMBO, Vol. 12, pp 365-370

Novák M, Jakes R, Edwards PC, Milstein C, Wischik CM (1991) Difference between the tau protein of Alzheimer paired helical filament core and normal tau revealed by epitope analysis of monoclonal antibodies 423 and 7.51. Proc Natl Acad Sci USA 88: 5837-5841

Paudel H, Li W (1999) Heparin-induced conformational change in microtubule-associated protein tau as detected by chemical cross-linking and phosphopeptide mapping. J Biol Chem 274: 8029-8038

Perez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E, Avila J (1996) Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. J Neurochem 67:1183-1190

Prusiner SB (1996) Human prion diseases and neurodegeneration. Curr Topics Microbiol Immunol 207:1-17

Reed LA Schmidt ML, Wszolek ZK, Balin BJ, Soontomniyomkij V, Lee VM, Trojanowski JQ, Schelper RL (1998) The neuropathology of a chromosome 17-linked autosomal dominant parkinsonism and dementia ("pallido-ponto-nigral degeneration"). J Neumpathol Exp Neurol 57: 588-601

Roberts GW (1988) Immunocytochemistry of neurofibrillary tangles in dementia pugilistica and Alzheimer's disease: Evidence for common genesis. Lancet 2:1456-458

Schneider A, Bieeemat J, Von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser2l4) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. Biochemistry 38: 3549-3558

Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E (1995) Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. Proc Natl Acad Sci USA 92: 8463-8467

Shankar SK, Yanagihara R, Garruto RM, Grundke-Iqbal I, Kosik KS, Gajdusek DC (1989) Immunocytochemical characterization of neurofibrillary tan~Ies in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. Ann Neurol 25: 146-151

Spillantini MG, Bird TD, Ghetti B (1998) Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: A new group of tauopathies. Brain Path 8: 387-402

Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol 189:113-130

Thorpe SJ, Kerr MA (1994) Common immunological techniques: ELISA, blotting, immunohistochemistry and immunocytochemistry. Immunochemistry BIOS Scientific publisher limited Oxford: 185-209

Vallee RB (1986) Reversible assembly punTication of microtubules without assembly-promoting agents and further purification of tubulin, microtubule-associated proteins, and MAP fragments. Methods Enzymol, 134: 89-104

Walls K, Azhar 5, Rho M, Lewis 5, Cowan N, Murphy D (1993) The mechanism of equilibrium binding of microtubule-associated protein 2 to microtubules. Binding is a multi-phasic process and exhibits positive coopeantivity. J Biol Chem 20: 15158-15167

Wang J-Z; Grundke-Iqbal I; Iqbal K (1996) Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal post-translational modification in Alzheimer's disease. Nature Med 2; 871-875

Wilson DM, Binder LI (1997) Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid b peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. Am J Pathol 150: 2181-2195

Wischik CM, Novak M, Edwards PC, Klug A, Tichelaar W, Crowther RA (1988a) Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4884-4888

Wischik CM, Novak M, Trogersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jake R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A (1988b) Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease, Proc Natl Acad USA 85: 4506-4510

Yan S-D, Chen X, Schmid A-M, Brett J, Godman G, Zou Y-S, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA, Perry G, Yen SH, Stern D (1994) Glycated tau protein in Alzheimer disease: A mechanism for induction of oxidant stress. Proc Natl Acad SC' USA 91: 7787-7791

序列表

<110> AXON Neuroscience Forschungs- und Entwicklungs Gmb

<120> Tau蛋白

<130> R 36957

<140>
<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 101
<212> PRT
<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 1
Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
35 40 45

Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
50 55 60

Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
65 70 75 80

Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys
85 90 95

Ser Pro Val Val Ser
100

<210> 2
<211> 400
<212> PRT
<213> 人类

<400> 2

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1   5   10   15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
            20   25   30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
        35   40   45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
    50   55   60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65   70   75   80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
                85   90   95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
            100   105   110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
        115   120   125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
    130   135   140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145   150   155   160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
                165   170   175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
            180   185   190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
        195   200   205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
    210   215   220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225   230   235   240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
                245   250   255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

<210> 3
<211> 142
<212> PRT
<213> 人类

<400> 3
Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
1 5 10 15

Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
35 40 45

Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val

50 55 60

Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
65 70 75 80

Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys
85 90 95

Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val
100 105 110

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr
115 120 125

Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
130 135 140

<210> 4
<211> 381
<212> PRT
<213> 人类

<400> 4
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
245 250 255

Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
260 265 270

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
275 280 285

Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
290 295 300

Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
305 310 315 320

Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
325 330 335

Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
340 345 350

Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
355 360 365

Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 5
<211> 410
<212> PRT
<213> 人类

<400> 5
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
305 310 315 320

Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
325 330 335

Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
340 345 350

Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
355 360 365

Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
370 375 380

Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
385 390 395 400

Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
405 410

<210> 6
<211> 441
<212> PRT
<213> 人类

<400> 6
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
65 70 75 80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
85 90 95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
100 105 110

Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
115 120 125

Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
145 150 155 160

Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
195 200 205

Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
210 215 220

Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
225 230 235 240

Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
260 265 270

Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser Asn Val Gln

275 280 285

Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro Gly Gly Gly
290 295 300

Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser
305 310 315 320

Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln
325 330 335

Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser
340 345 350

Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
355 360 365

Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
370 375 380

Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
385 390 395 400

Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
405 410 415

Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
420 425 430

Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
435 440

<210> 7
<211> 383
<212> PRT
<213> 人类

<400> 7
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
35 40 45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
210 215 220

Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
225 230 235 240

His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
245 250 255

Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
260 265 270

Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
275 280 285

Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
290 295 300

Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
305 310 315 320

Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
325 330 335

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
340 345 350

Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala
355 360 365

Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 8
<211> 352
<212> PRT
<213> 人类

<400> 8
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
35 40 45

Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
50 55 60

Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
65 70 75 80

Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
85 90 95

Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
100 105 110

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
115 120 125

Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160

Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190

Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205

Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
210 215 220

Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
225 230 235 240

His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
245 250 255

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
260 265 270

His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
275 280 285

Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
290 295 300

Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
305 310 315 320

Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
325 330 335

Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
340 345 350

<210> 9
<211> 412
<212> PRT
<213> 人类

<400> 9

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
20 25 30

Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
50 55 60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
165 170 175

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser

245 250 255

Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
275 280 285

Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
290 295 300

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
305 310 315 320

Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
325 330 335

Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
340 345 350

Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
355 360 365

Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
370 375 380

Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
385 390 395 400

Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
405 410

<210> 10
<211> 686
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 10
Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Asp Thr Met Glu Asp Gln Ala Gly
1 5 10 15

Asp Tyr Thr Met Leu Gln Asp Gln Glu Gly Asp Met Asp His Gly Leu
20 25 30

Lys Glu Ser Pro Pro Gln Pro Pro Ala Asp Asp Gly Ser Glu Glu Pro
35 40 45

```
Gly Ser Glu Thr Ser Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val
     50                  55                  60

Thr Ala Pro Leu Val Glu Glu Arg Ala Pro Asp Lys Gln Ala Thr Ala
 65                  70                  75                  80

Gln Ser His Thr Glu Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly
                 85                  90                  95

Ile Gly Asp Thr Pro Asn Met Glu Asp Gln Ala Ala Gly His Val Thr
            100                 105                 110

Gln Glu Pro Gln Lys Val Glu Ile Phe Ser Gln Ser Leu Leu Val Glu
        115                 120                 125

Pro Gly Arg Arg Glu Gly Gln Ala Pro Asp Ser Gly Ile Ser Asp Trp
    130                 135                 140

Thr His Gln Gln Val Pro Ser Met Ser Gly Ala Pro Leu Pro Pro Gln
145                 150                 155                 160

Gly Leu Arg Glu Ala Thr His Gln Pro Leu Gly Thr Arg Pro Glu Asp
                165                 170                 175

Val Glu Arg Ser His Pro Ala Ser Glu Leu Leu Trp Gln Glu Ser Pro
            180                 185                 190

Gln Lys Glu Ala Trp Gly Lys Asp Arg Leu Gly Ser Glu Glu Glu Val
        195                 200                 205

Asp Glu Asp Ile Thr Met Asp Glu Ser Ser Gln Glu Ser Pro Pro Ser
    210                 215                 220

Gln Ala Ser Leu Ala Pro Gly Thr Ala Thr Pro Gln Ala Arg Ser Val
225                 230                 235                 240

Ser Ala Ser Gly Val Ser Gly Glu Thr Thr Ser Ile Pro Gly Phe Pro
                245                 250                 255

Ala Glu Gly Ser Ile Pro Leu Pro Ala Asp Phe Phe Ser Lys Val Ser
            260                 265                 270

Ala Glu Thr Gln Ala Ser Pro Pro Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Ser
        275                 280                 285

Glu Glu Gly His Glu Ala Ala Pro Glu Phe Thr Phe His Val Glu Ile
    290                 295                 300
```

Lys Ala Ser Ala Pro Lys Glu Gln Asp Leu Glu Gly Ala Thr Val Val
305 310 315 320

Gly Ala Pro Ala Glu Glu Gln Lys Ala Arg Gly Pro Ser Val Gly Lys
325 330 335

Gly Thr Lys Glu Ala Ser Leu Leu Glu Pro Thr Asp Lys Gln Pro Ala
340 345 350

Ala Gly Leu Pro Gly Arg Pro Val Ser Arg Val Pro Gln Leu Lys Ala
355 360 365

Arg Val Ala Gly Val Ser Lys Asp Arg Thr Gly Asn Asp Glu Lys Lys
370 375 380

Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Gly Ala Lys Ile Ala Thr Pro Arg
385 390 395 400

Gly Ala Ala Thr Pro Gly Gln Lys Gly Thr Ser Asn Ala Thr Arg Ile
405 410 415

Pro Ala Lys Thr Thr Pro Ser Pro Lys Thr Pro Pro Gly Ser Gly Glu
420 425 430

Pro Pro Lys Ser Gly Glu Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro
435 440 445

Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro
450 455 460

Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser
465 470 475 480

Pro Ser Ala Ser Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro
485 490 495

Asp Leu Lys Asn Val Arg Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys
500 505 510

His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp
515 520 525

Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His
530 535 540

Val Pro Gly Gly Gly Ser Val His Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
545 550 555 560

Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
565 570 575

Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
580 585 590

Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
595 600 605

Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
610 615 620

Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys
625 630 635 640

Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val
645 650 655

Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr
660 665 670

Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
675 680 685

图1

AD脑

样品A
↓
匀化
↓
旋转(25 000g)→spt
↓
旋转(200 000g)→沉淀
↓
萃取（8M脲）
↓
旋转(300 000g)→spt
↓
透析(TRIS)
↓
沉淀（通过透析）
↓
旋转(200 000g)→spt
↓
透析(MES)
↓
PC柱
↓
洗脱(0－1 M NaCl)
↓
透析 (MES)
↓
真空离心蒸发浓缩（级分 I）

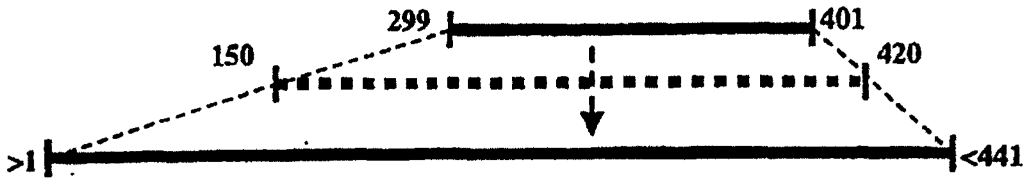
样品B
↓
匀化
↓
旋转(27 000g)→spt
↓
再萃取沉淀
↓
旋转(27 000g)→spt
↓
合并spts
↓
调节至1％N－月桂酰基肌氨酸
1％巯基乙醇
↓
37℃下保温3小时
↓
以35000rpm旋转→沉淀
↓
再萃取沉淀
↓
过滤(0,45um)→spt
↓
以35000rpm旋转→沉淀
↓
用2.5％甲酸萃取沉淀
↓
旋转(10 000g)→spt（级分Ⅱ）
↓
沉淀（级分Ⅲ）

免疫接种用抗原→合并的级分Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ

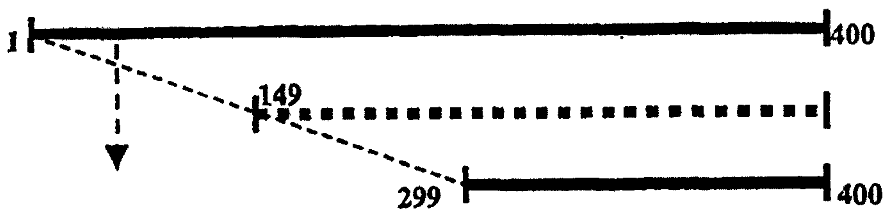
图2

1. tauon（数字表示由 441 个残基组成的最长人 tau 同种型中相应位置上的氨基酸残基）。

可以同时使最小 tauon 的 N－和 C－末端延伸，不过，不会达到该蛋白质的全长，例如 299－401，298－402 等。



2. C－末端截短的 tauons（N－末端残基可以由 1－299位氨基酸变化，例如 2－400，3－400等）



3. N－末端截短的 tauons（C－末端残基可以是 401－441 位上的任意残基，例如300－401，300－402）

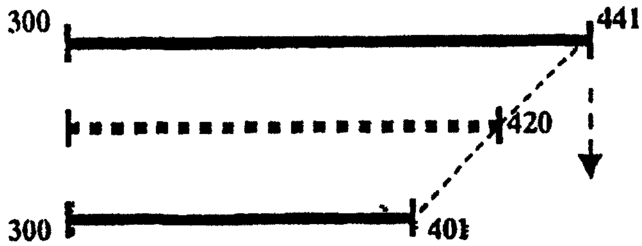


图3

SEQ. ID No: 1 最小 tauon

数字表示由 441 个残基组成的最长人 tau 同种型中相应位置上的氨基酸残基。

val 300
301 pro gly gly gly ser val gln ile val tyr lys pro val asp leu ser lys val thr ser
321 lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys pro gly gly gly gln val glu val lys
341 ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile
361 thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu
381 asn ala lys ala lys thr asp his gly ala glu ile val tyr lys ser pro val val ser

可以同时使最小 tauon 的 N－和 C－末端延伸，不过，不会达到该蛋白质的全长，例如 299－401，298－402 等。

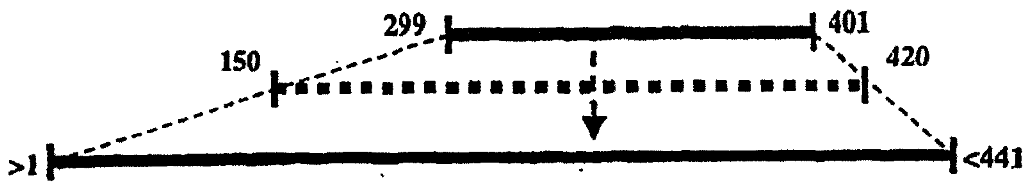


图4

SEQ. ID No: 2 C－末端截短的 tauons

1 met ala glu pro arg gln glu phe glu val met glu asp his ala gly thr tyr gly leu
21 gly asp arg lys asp gln gly gly tyr thr met his gln asp gln glu gly asp thr asp
41 ala gly leu lys glu ser pro leu gln thr pro thr glu asp gly ser glu glu pro gly
61 ser glu thr ser asp ala lys ser thr pro thr ala glu asp val thr ala pro leu val
81 asp glu gly ala pro gly lys gln ala ala ala gln pro his thr glu ile pro glu gly
101 thr thr ala glu glu ala gly ile gly asp thr pro ser leu glu asp glu ala ala gly
121 his val thr gln ala arg met val ser lys ser lys asp gly thr gly ser asp asp lys
141 lys ala lys gly ala asp gly lys thr lys ile ala thr pro arg gly ala ala pro pro
161 gly gln lys gly gln ala asn ala thr arg ile pro ala lys thr pro pro ala pro lys
181 thr pro pro ser ser gly glu pro pro lys ser gly asp arg ser gly tyr ser ser pro
201 gly ser pro gly thr pro gly ser arg ser arg thr pro ser leu pro thr pro pro thr
221 arg glu pro lys lys val ala val val arg thr pro pro lys ser pro ser ser ala lys
241 ser arg leu gln thr ala pro val pro met pro asp leu lys asn val lys ser lys ile
261 gly ser thr glu asn leu lys his gln pro gly gly gly lys val gln ile ile asn lys
281 lys leu asp leu ser asn val gln ser lys cys gly ser lys asp asn ile lys his val
301 pro gly gly gly ser val gln ile val tyr lys pro val asp leu ser lys val thr ser
321 lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys pro gly gly gly gln val glu val lys
341 ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile
361 thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu
381 asn ala lys ala lys thr asp his gly ala glu ile val tyr lys ser pro val val ser

C－末端截短的 tauons 的 N－末端残基可以由1－299位上的氨基酸变化，例如 2－400、3－400等

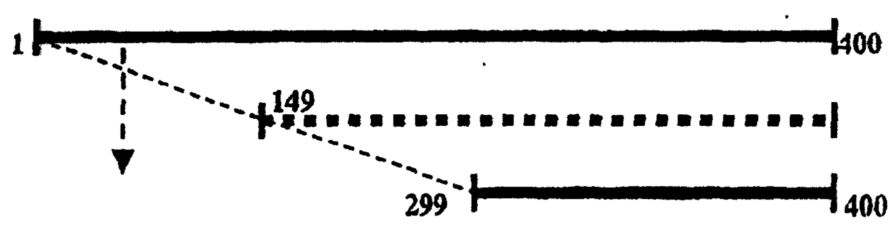


图5

SEQ. ID No: 3 N－末端截短的 tauons

val 300
301 pro gly gly gly ser val gln ile val tyr lys pro val asp leu ser lys val thr ser
321 lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys pro gly gly gly gln val glu val lys
341 ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile
361 thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu
381 asn ala lys ala lys thr asp his gly ala glu ile val tyr lys ser pro val val ser
401 gly asp thr ser pro arg his leu ser asn val ser ser thr gly ser ile asp met val
421 asp ser pro gln leu ala thr leu ala asp glu val ser ala ser leu ala lys gln gly
441 leu

N－末端截短的 tauons 的 C－末端残基可以是 401－441 位上的任意残基，例如 300－401、300－402

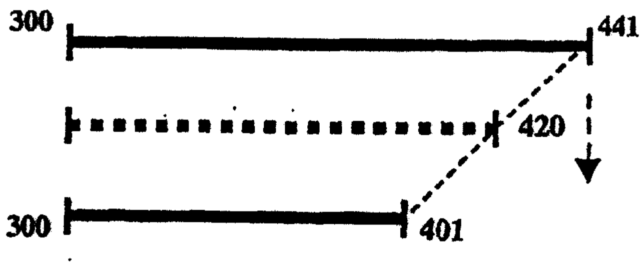


图6

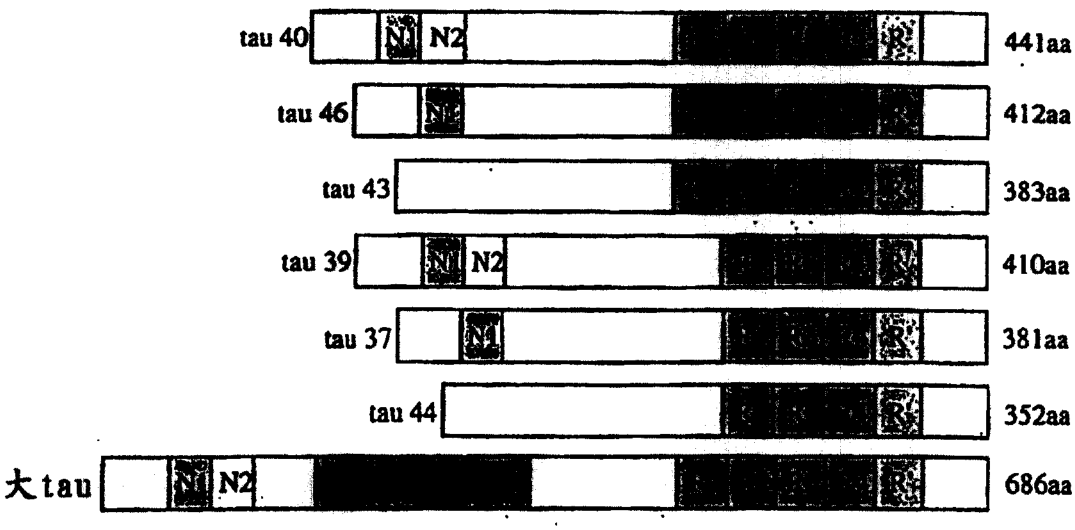
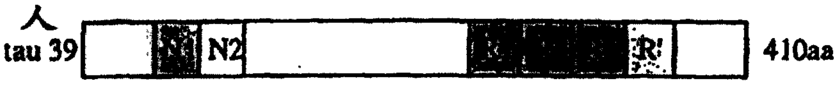

tau 40
N1
N2
R
441aa
tau 46
412aa
tau 43
383aa
tau 39
N1
N2
R
410aa
tau 37
N1
R
381aa
tau 44
R
352aa
大tau
N1
N2
R
686aa

图7

1
Met ala glu pro arg gln glu phe glu val met glu asp his ala gly thr tyr gly leu
21
gly asp arg lys asp gln gly gly tyr thr met his gln asp gln glu gly asp thr asp
41
ala gly leu lys glu ser pro leu gln thr pro thr glu asp gly ser glu glu pro gly
61
ser glu thr ser asp ala lys ser thr pro thr ala glu ala glu glu ala gly ile gly
81
asp thr pro ser leu glu asp glu ala ala gly his val thr gln ala arg met val ser
101
lys ser lys asp gly thr gly ser asp asp lys lys ala lys gly ala asp gly lys thr
121
lys ile ala thr pro arg gly ala ala pro pro gly gln lys gly gln ala asn ala thr
141
arg ile pro ala lys thr pro pro ala pro lys thr pro pro ser ser gly glu pro pro
161
lys ser gly asp arg ser gly tyr ser ser pro gly ser pro gly thr pro gly ser arg
181
ser arg thr pro ser leu pro thr pro pro thr arg glu pro lys lys val ala val val
201
arg thr pro pro lys ser pro ser ser ala lys ser arg leu gln thr ala pro val pro
221
met pro asp leu lys asn val lys ser lys ile gly ser thr glu asn leu lys his gln
241
pro gly gly gly lys val gln ile val tyr lys pro val asp leu ser lys val thr ser
261
lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys pro gly gly gly gln val glu val lys
281
ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile
301
thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu
321
asn ala lys ala lys thr asp his gly ala glu ile val tyr lys ser pro val val ser
341
gly asp thr ser pro arg his leu ser asn val ser ser thr gly ser ile asp met val
361
asp ser pro gln leu ala thr leu ala asp glu val ser ala ser leu ala lys gln gly
381
leu

图8



1
Met ala glu pro arg gln glu phe glu val met glu asp his ala gly thr tyr gly leu
21
gly asp arg lys asp gln gly gly tyr thr met his gln asp gln glu gly asp thr asp
41
ala gly leu lys glu ser pro leu gln thr pro thr glu asp gly ser glu glu pro gly
61
ser glu thr ser asp ala lys ser thr pro thr ala glu asp val thr ala pro leu val
81
asp glu gly ala pro gly lys gln ala ala ala gln pro his thr glu ile pro glu gly
101
thr thr ala glu glu ala gly ile gly asp thr pro ser leu glu asp glu ala ala gly
121
his val thr gln ala arg met val ser lys ser lys asp gly thr gly ser asp asp lys
141
lys ala lys gly ala asp gly lys thr lys ile ala thr pro arg gly ala ala pro pro
161
gly gln lys gly gln ala asn ala thr arg ile pro ala lys thr pro pro ala pro lys
181
thr pro pro ser ser gly glu pro pro lys ser gly asp arg ser gly tyr ser ser pro
201
gly ser pro gly thr pro gly ser arg ser arg thr pro ser leu pro thr pro pro thr
221
arg glu pro lys lys val ala val val arg thr pro pro lys ser pro ser ser ala lys
241
ser arg leu gln thr ala pro val pro met pro asp leu lys asn val lys ser lys ile
261
gly ser thr glu asn leu lys his gln pro gly gly gly lys val gln ile val tyr lys
281
pro val asp leu ser lys val thr ser lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys
301
pro gly gly gly gln val glu val lys ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln
321
ser lys ile gly ser leu asp asn ile thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile
341
glu thr his lys leu thr phe arg glu asn ala lys ala lys thr asp his gly ala glu
361
ile val tyr lys ser pro val val ser gly asp thr ser pro arg his leu ser asn val
381
ser ser thr gly ser ile asp met val asp ser pro gln leu ala thr leu ala asp glu
401
val ser ala ser leu ala lys gln gly leu

图9

人
tau 40  441aa

1
Met ala glu pro arg gln glu phe glu val met glu asp his ala gly thr tyr gly leu
21
gly asp arg lys asp gln gly gly tyr thr met his gln asp gln glu gly asp thr asp
41
ala gly leu lys glu ser pro leu gln thr pro thr glu asp gly ser glu glu pro gly
61
ser glu thr ser asp ala lys ser thr pro thr ala glu asp val thr ala pro leu val
81
asp glu gly ala pro gly lys gln ala ala ala gln pro his thr glu ile pro glu gly
101
thr thr ala glu glu ala gly ile gly asp thr pro ser leu glu asp glu ala ala gly
121
his val thr gln ala arg met val ser lys ser lys asp gly thr gly ser asp asp lys
141
lys ala lys gly ala asp gly lys thr lys ile ala thr pro arg gly ala ala pro pro
161
gly gln lys gly gln ala asn ala thr arg ile pro ala lys thr pro pro ala pro lys
181
thr pro pro ser ser gly glu pro pro lys ser gly asp arg ser gly tyr ser ser pro
201
gly ser pro gly thr pro gly ser arg ser arg thr pro ser leu pro thr pro pro thr
221
arg glu pro lys lys val ala val val arg thr pro pro lys ser pro ser ser ala lys
241
ser arg leu gln thr ala pro val pro met pro asp leu lys asn val lys ser lys ile
261
gly ser thr glu asn leu lys his gln pro gly gly gly lys val gln ile ile asn lys
281
lys leu asp leu ser asn val gln ser lys cys gly ser lys asp asn ile lys his val
301
pro gly gly gly ser val gln ile val tyr lys pro val asp leu ser lys val thr ser
321
lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys pro gly gly gly gln val glu val lys
341
ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile
361
thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu
381
asn ala lys ala lys thr asp his gly ala glu ile val tyr lys ser pro val val ser
401
gly asp thr ser pro arg his leu ser asn val ser ser thr gly ser ile asp met val
421
asp ser pro gln leu ala thr leu ala asp glu val ser ala ser leu ala lys gln gly
441
leu

图10

人
tau 43  383aa

1
Met ala glu pro arg gln glu phe glu val met glu asp his ala gly thr tyr gly leu
21
gly asp arg lys asp gln gly gly tyr thr met his gln asp gln glu gly asp thr asp
41
ala gly leu lys ala glu glu ala gly ile gly asp thr pro ser leu glu asp glu ala
61
ala gly his val thr gln ala arg met val ser lys ser lys asp gly thr gly ser asp
81
asp lys lys ala lys gly ala asp gly lys thr lys ile ala thr pro arg gly ala ala
101
pro pro gly gln lys gly gln ala asn ala thr arg ile pro ala lys thr pro pro ala
121
pro lys thr pro pro ser ser gly glu pro pro lys ser gly asp arg ser gly tyr ser
141
ser pro gly ser pro gly thr pro gly ser arg ser arg thr pro ser leu pro thr pro
161
pro thr arg glu pro lys lys val ala val val arg thr pro pro lys ser pro ser ser
181
ala lys ser arg leu gln thr ala pro val pro met pro asp leu lys asn val lys ser
201
lys ile gly ser thr glu asn leu lys his gln pro gly gly gly lys val gln ile ile
221
asn lys lys leu asp leu ser asn val gln ser lys cys gly ser lys asp asn ile lys
241
his val pro gly gly gly ser val gln ile val tyr lys pro val asp leu ser lys val
261
thr ser lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys pro gly gly gly gln val glu
281
val lys ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly ser leu asp
301
asn ile thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile glu thr his lys leu thr phe
321
arg glu asn ala lys ala lys thr asp his gly ala glu ile val tyr lys ser pro val
341
val ser gly asp thr ser pro arg his leu ser asn val ser ser thr gly ser ile asp
361
met val asp ser pro gln leu ala thr leu ala asp glu val ser ala ser leu ala lys
381
gln gly leu

图11

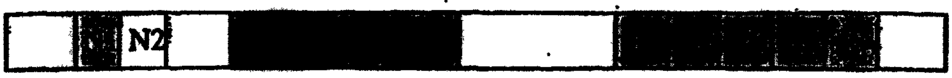
1
Met ala glu pro arg gln glu phe glu val met glu asp his ala gly thr tyr gly leu
21
gly asp arg lys asp gln gly gly tyr thr met his gln asp gln glu gly asp thr asp
41
ala gly leu lys ala glu glu ala gly ile gly asp thr pro ser leu glu asp glu ala
61
ala gly his val thr gln ala arg met val ser lys ser lys asp gly thr gly ser asp
81
asp lys lys ala lys gly ala asp gly lys thr lys ile ala thr pro arg gly ala ala
101
pro pro gly gln lys gly gln ala asn ala thr arg ile pro ala lys thr pro pro ala
121
pro lys thr pro pro ser ser gly glu pro pro lys ser gly asp arg ser gly tyr ser
141
ser pro gly ser pro gly thr pro gly ser arg ser arg thr pro ser leu pro thr pro
161
pro thr arg glu pro lys lys val ala val val arg thr pro pro lys ser pro ser ser
181
ala lys ser arg leu gln thr ala pro val pro met pro asp leu lys asn val lys ser
201
lys ile gly ser thr glu asn leu lys his gln pro gly gly gly lys val gln ile val
221
tyr lys pro val asp leu ser lys val thr ser lys cys gly ser leu gly asn ile his
241
his lys pro gly gly gly gln val glu val lys ser glu lys leu asp phe lys asp arg
261
val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile thr his val pro gly gly gly asn lys
281
lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu asn ala lys ala lys thr asp his gly
301
ala glu ile val tyr lys ser pro val val ser gly asp thr ser pro arg his leu ser
321
asn val ser ser thr gly ser ile asp met val asp ser pro gln leu ala thr leu ala
341
asp glu val ser ala ser leu ala lys gln gly leu

图12

人
tau46  412aa

1
Met ala glu pro arg gln glu phe glu val met glu asp his ala gly thr tyr gly leu
21
gly asp arg lys asp gln gly gly tyr thr met his gln asp gln glu gly asp thr asp
41
ala gly leu lys glu ser pro leu gln thr pro thr glu asp gly ser glu glu pro gly
61
ser glu thr ser asp ala lys ser thr pro thr ala glu ala glu glu ala gly ile gly
81
asp thr pro ser leu glu asp glu ala ala gly his val thr gln ala arg met val ser
101
lys ser lys asp gly thr gly ser asp asp lys lys ala lys gly ala asp gly lys thr
121
lys ile ala thr pro arg gly ala ala pro pro gly gln lys gly gln ala asn ala thr
141
arg ile pro ala lys thr pro pro ala pro lys thr pro pro ser ser gly glu pro pro
161
lys ser gly asp arg ser gly tyr ser ser pro gly ser pro gly thr pro gly ser arg
181
ser arg thr pro ser leu pro thr pro pro thr arg glu pro lys lys val ala val val
201
arg thr pro pro lys ser pro ser ser ala lys ser arg leu gln thr ala pro val pro
221
met pro asp leu lys asn val lys ser lys ile gly ser thr glu asn leu lys his gln
241
pro gly gly gly lys val gln ile ile asn lys lys leu asp leu ser asn val gln ser
261
lys cys gly ser lys asp asn ile lys his val pro gly gly gly ser val gln ile val
281
tyr lys pro val asp leu ser lys val thr ser lys cys gly ser leu gly asn ile his
301
his lys pro gly gly gly gln val glu val lys ser glu lys leu asp phe lys asp arg
321
val gln ser lys ile gly ser leu asp asn ile thr his val pro gly gly gly asn lys
341
lys ile glu thr his lys leu thr phe arg glu asn ala lys ala lys thr asp his gly
361
ala glu ile val tyr lys ser pro val val ser gly asp thr ser pro arg his leu ser
381
asn val ser ser thr gly ser ile asp met val asp ser pro gln leu ala thr leu ala
401
asp glu val ser ala ser leu ala lys gln gly leu

图13

大鼠大tau


686aa

1
Met ala glu pro arg gln glu phe asp thr met glu asp gln ala gly asp tyr thr met
21
leu gln asp gln glu gly asp met asp his gly leu lys glu ser pro pro gln pro pro
41
ala asp asp gly ser glu glu pro gly ser glu thr ser asp ala lys ser thr pro thr
61
ala glu asp val thr ala pro leu val glu glu arg ala pro asp lys gln ala thr ala
81
gln ser his thr glu ile pro glu gly thr thr ala glu glu ala gly ile gly asp thr
101
pro asn met glu asp gln ala ala gly his val thr gln glu pro gln lys val glu ile
121
phe ser gln ser leu leu val glu pro gly arg arg glu gly gln ala pro asp ser gly
141
ile ser asp trp thr his gln gln val pro ser met ser gly ala pro leu pro pro gln
161
gly leu arg glu ala thr his gln pro leu gly thr arg pro glu asp val glu arg ser
181
his pro ala ser glu leu leu trp gln glu ser pro gln lys glu ala trp gly lys asp
201
arg leu gly ser glu glu glu val asp glu asp ile thr met asp glu ser ser gln glu
221
ser pro pro ser gln ala ser leu ala pro gly thr ala thr pro gln ala arg ser val
241
ser ala ser gly val ser gly glu thr thr ser ile pro gly phe pro ala glu gly ser
261
ile pro leu pro ala asp phe phe ser lys val ser ala glu thr gln ala ser pro pro
281
glu gly pro gly thr gly pro ser glu glu gly his glu ala ala pro glu phe thr phe
301
his val glu ile lys ala ser ala pro lys glu gln asp leu glu gly ala thr val val
321
gly ala pro ala glu glu gln lys ala arg gly pro ser val gly lys gly thr lys glu
341
ala ser leu leu glu pro thr asp lys gln pro ala ala gly leu pro gly arg pro val
361
ser arg val pro gln leu lys ala arg val ala gly val ser lys asp arg thr gly asn
381
asp glu lys lys ala lys gly ala asp gly lys thr gly ala lys ile ala thr pro arg
401
gly ala ala thr pro gly gln lys gly thr ser asn ala thr arg ile pro ala lys thr
421
thr pro ser pro lys thr pro pro gly ser gly glu pro pro lys ser gly glu arg ser
441
gly tyr ser ser pro gly ser pro gly thr pro gly ser arg ser arg thr pro ser leu
461
pro thr pro pro thr arg glu pro lys lys val ala val val arg thr pro pro lys ser
481
pro ser ala ser lys ser arg leu gln thr ala pro val pro met pro asp leu lys asn
501
val arg ser lys ile gly ser thr glu asn leu lys his gln pro gly gly gly lys val
521

接下页

gln ile ile asn lys lys leu asp leu ser asn val gln ser lys cys gly ser lys asp
541
asn ile lys his val pro gly gly gly ser val his ile val tyr lys pro val asp leu
561
ser lys val thr ser lys cys gly ser leu gly asn ile his his lys pro gly gly gly
581
gln val glu val lys ser glu lys leu asp phe lys asp arg val gln ser lys ile gly
601
ser leu asp asn ile thr his val pro gly gly gly asn lys lys ile glu thr his lys
621
leu thr phe arg glu asn ala lys ala lys thr asp his gly ala glu ile val tyr lys
641
ser pro val val ser gly asp thr ser pro arg his leu ser asn val ser ser thr gly
661
ser ile asp met val asp ser pro gln leu ala thr leu ala asp glu val ser ala ser
681
leu ala lys gln gly leu