

郝福星,左伟勇,刘 莉. Clin ProTool 结合质谱分析弓形虫急性感染小鼠血清多肽[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):240-241.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.079

Clin ProTool 结合质谱分析弓形虫急性感染小鼠血清多肽

郝福星¹, 左伟勇¹, 刘 莉^{1,2}

(1. 江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室, 江苏泰州 225300; 2. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009)

摘要:为分析血清差异表达多肽,并寻找具有潜在诊断意义的弓形虫感染标志物,建立弓形虫急性感染小鼠模型,采集急性感染组与健康对照组小鼠的血清,采用包被 C8 基团的磁珠纯化试剂盒富集血清多肽,应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF Mass Spectrometry)检测,采用 flexanalysis 2.0 软件、Clin ProTools 软件分析检测图谱并建立检测模型。在 m/z 800 ~ 12 000 区段,比较急性感染组、健康对照组的小鼠血清,共有 8 个峰存在显著性差异,其中 m/z 1 788.99、1 971.85、5 004.32、7 500.89、5 817.47 区段的 5 个多肽峰的表达均显著上调,而 m/z 1 849.00、8 115.66、4 056.31 区段的 3 个峰则显著下调,应用 Clin ProTools 建模方程建立感染小鼠的检测模型。MALDI-TOF 质谱结合 Clin ProTools 分析可建立弓形虫感染检测的新方法,为弓形虫的诊断提供新思路。

关键词:弓形虫;基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱;磁珠富集

中图分类号: S855.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0240-02

弓形虫(*Toxoplasma gondii*)是一种专性细胞内寄生的机会性致病原虫,可导致严重的人兽共患寄生虫病,可在人与牛、羊、猪、鸡、猫等多种动物间传播^[1],严重危害人类健康^[2]与畜牧业发展^[3]。部分猪场的流行病学调查显示,弓形虫感染率较高,最高达 96%^[3-4],兽类、鸟类、灵长类等野生动物的弓形虫抗体总阳性率为 22.7%^[4-5],人类尤以孕妇的感染为主^[6-7],可见该病具有重要的公共卫生意义。目前,该病的防控主要以控制传染源、加强疾病诊断为主,尚无理想的药物和疫苗^[8-9]。该病在猪等家畜的发病率、病死率均很高,其常规诊断以实验室检查为主,包括病原学和血清学检查^[9]。病原学检查主要以动物内脏组织做涂片,或动物接种后检查腹腔液虫体,发现病原体后确诊,此方法稳定可靠,但费时费力且检出率低。血清学方法主要有酶联免疫吸附试验(ELISA)、间接血凝试验(IHA)、间接免疫荧光抗体试验(IFA)、PCR 检测等,血清学方法操作简便、快捷,但特异性和敏感性不高,且易产生假阳性^[10]。该病的早期诊断对于畜牧生产具有重要的经济与社会意义;因此,在动物活体上建立快速、准确的弓形虫感染检测方法,是目前亟待解决的重要课题。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)结合 Clin ProTool 软件分析是血清临床蛋白质组学研究的主要分析技术之一^[11],具有高通量、高灵敏度、易操作等优点,已被用于包括寄生虫病等诸多疾病标志物的研究和临床诊断^[12]。本研究以试验动物小鼠为模型,分析弓形虫急性感染组、健康对照组小鼠血清多肽图谱的差异,建立一种弓形虫感染诊断的新方法,为家畜弓形虫病的诊断及研究提供新的

思路和应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试剂

试验动物为 40 只 Balb/c 小鼠,5~6 周龄,雌雄各半,每只体质量 18~20 g,购自扬州大学比较医学中心(编号:SYXK2007-0003)。将小鼠分为弓形虫急性感染组、健康对照组,每组各 20 只。试验弓形虫虫种为弓形虫国际标准株(RH 株),来自扬州大学寄生虫教研室。

主要试剂:WB-C8 磁珠纯化试剂盒(Bruker Daltonics 公司);丙酮、甲醇、异丙醇、乙腈、三氟乙酸、甲酸等均为色谱纯级;基质:HCCA(α -氰-4-羟肉桂酸),300 mg/L,溶于乙醇-丙酮(2:1),新鲜配制。

1.2 方法

1.2.1 弓形虫感染小鼠模型的建立 取弓形虫国际标准株(RH 株)感染 72 h 的小鼠腹水,用生理盐水将纯化的弓形虫速殖子调整为浓度 1×10^4 个/mL 的悬液。弓形虫急性感染组每只小鼠腹腔注射悬液 0.2 mL,健康对照组每只小鼠腹腔注射灭菌生理盐水 0.2 mL。

1.2.2 血清样本采集 感染后 5 d 于小鼠眼眶采血,每只采取全血 0.5 mL,并立即置于 4℃ 冰箱保存,30 min 后以 12 000 r/min,4℃ 离心 10 min,分离血清并冷冻于 -80℃ 冰箱待测。以同样方法采集健康对照组小鼠血清。

1.2.3 血清 WCX 磁珠处理 根据试剂盒标准操作规程,将 10 μ L 样本结合液与 10 μ L C8 磁珠试剂混合,轻轻混匀后,加入 10 μ L 完全融解的血清样本至 200 μ L PCR 管,混匀并于室温静置 5 min;将 PCR 管放入磁珠富集器(MBS),使磁珠贴壁并弃上清;利用冲洗液(WS, wash solution)将磁珠清洗 3 次,每次 100 μ L,最后弃上清;加入 5 μ L 洗脱液(ES)与磁珠混匀,室温静置 5 min 后放入磁珠富集器,最后加 5 μ L 稳定液(SS)至离心管并混匀;将其取出 1 μ L 与 10 μ L 基质完全混合,制成混悬液。

收稿日期:2015-01-12

基金项目:江苏省青蓝工程中青年学术带头人项目;江苏省六大人才高峰科研项目(编号:NY-023)。

作者简介:郝福星(1982—),男,江苏如皋人,硕士,主要从事动物医学研究。E-mail: vethfx@163.com。

通信作者:刘 莉,博士,主要从事动物医学研究。E-mail: vetlily@163.com。

1.2.4 点靶 取 1 μL 混悬液点靶,室温干燥后上机检测。

1.2.5 MALDI-TOF-MS 检测 设置 MALDI-TOF-MS 仪器参数,利用 flexcontrol 软件,选择 LP-Clinprot. pa 方法,靶 MTP_polished steel 384,激光能量 40% 左右,检测分子量范围为 m/z 800 ~ 12 000。应用 flexanalysis 软件、Clin ProTools 软件对采集图谱进行分析。

2 结果与分析

2.1 血清多肽指纹图谱(质谱图)分析

将健康对照组与弓形虫急性感染时期的血清多肽质谱图进行比较及统计分析(表 1),发现在 m/z 800 ~ 12 000 区段,与对照组相比,感染组小鼠 m/z 1 788.99、1 971.85、5 004.32、7 500.89、5 817.47 的 5 个多肽峰的表达均显著或极显著上调,而 m/z 1 849.00、8 115.66、4 056.31 的 3 个峰则显著下调。

表 1 弓形虫急性感染小鼠与对照小鼠血清的差异表达多肽

质荷比 (m/z)	峰值平均数 \pm 标准差		P 值
	感染组	对照组	
1 788.99	201.33 \pm 72.15	85.11 \pm 43.01 *	<0.01
1 971.85	81.76 \pm 67.09	13.17 \pm 7.89 *	<0.01
5 004.32	35.53 \pm 8.01	11.12 \pm 3.53 *	<0.01
7 500.89	199.34 \pm 32.55	35.97 \pm 10.21 *	<0.05
5 817.47	30.45 \pm 7.99	9.87 \pm 5.33 *	<0.05
1 849.00	45.97 \pm 25.98	100.59 \pm 55.99 **	<0.05
4 056.31	104.66 \pm 49.97	54.93 \pm 45.68 **	<0.05
8 115.66	255.96 \pm 150.84	113.72 \pm 50.28 **	<0.05

注:“*”“**”分别表示上调、下调。

2.2 Clin ProTools 建模及验证

利用 Clin ProTools 2.0 软件,根据 m/z 800 ~ 12 000 区段内 8 个差异表达峰建立弓形虫急性感染的诊断模型,并运用该模型验证急性感染组,结果显示均为阳性,表明模型准确率达 100%。

3 结论与讨论

作为公共卫生领域的重要感染性疾病,弓形虫病逐渐受到兽医学与临床医学重视。作为一种人兽共患寄生虫,弓形虫可感染多种动物,猫感染后可传染人,孕妇感染后可直接将弓形虫传给胎儿,造成胎儿先天性感染等严重后果^[7,13]。弓形虫几乎能够感染所有哺乳动物和鸟类,且感染率较高,易造成畜牧生产经济损失,阻碍养殖业的发展。

常规的弓形虫病诊断主要依靠病原学方法和血清学方法,但仍存在较多未解决的难题^[14]。血清蛋白质组学技术具有高通量、高敏感性、样本需求少等优点,自动化分析使其具有较好的重复性与应用价值^[15-16]。包被基团的磁珠可在特定窄谱的分子量范围内富集血清多肽和蛋白质,本研究利用这一特性,考察弓形虫感染后的小鼠血清多肽与蛋白的变化。与常规的二维电泳等方法相比,本方法具有更高的分辨率与敏感性,且样本需求少,更适于兽医临床应用。

研究结果表明,MALDI-TOF 质谱结合 Clin ProTools 软件分析,可根据质荷比大小及表达量差异将小鼠血清多肽或蛋白直观反映在质谱峰上。统计分析结果表明,共有 8 个峰存在显著性差异,表明弓形虫感染后小鼠血清多肽或蛋白发生改变,可能是虫体在宿主体内代谢产生,或机体免疫反应而产生的免疫球蛋白片段,其差异表达的蛋白质多肽鉴定有待

进一步研究。根据差异表达峰建立的诊断模型,对健康组、感染组的测试结果准确率均为 100%,表明该方法可靠有效。

有报告显示,弓形虫感染小鼠后 2 ~ 3 d 即可在宿主体内检测到循环抗原^[17],而本试验以感染后 5 d 的小鼠作为急性感染组,保证了组内血清蛋白质组改变的一致性,确保后续分析的准确性。利用小鼠作为模型动物,可在单一因素下开展弓形虫感染的机理机制研究,其背景均一,试验条件易于控制,对于兽医临床诊断具有较好的借鉴价值。本研究筛选了急性感染弓形虫小鼠的血清多肽与蛋白质,确定具有潜在诊断意义的多肽差异峰,建立的 Clin ProTool 模型为弓形虫感染的血清学诊断提供新的检测方法,也为弓形虫新型药物及疫苗的研究提供新的靶标和候选分子。

参考文献:

- [1] 蒲元华,王 萌,杨晓宇,等. 感染弓形虫的肉鸡的临床症状及病理变化[J]. 中国兽医科学,2014,9(9):951-955.
- [2] 卓国荣,狄和双,卢 炜,等. 不同检测方法分析泰州地区猫血清中弓形虫抗体[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):190-191.
- [3] 陆桂丽,王 文,陈卫东,等. 新疆部分地区猪弓形虫抗体监测[J]. 动物医学进展,2014,35(7):125-127.
- [4] 陈仁锋,陈小丽,唐 耀,等. 福州动物园野生动物弓形虫感染的血清学调查及用药效果观察[J]. 畜牧与兽医,2014,46(12):25-28.
- [5] 李 倩,张 莉,李海龙. 非人灵长类弓形虫病研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2014,30(5):516-520.
- [6] 张燕萍,宋任浩. 孕妇弓形虫感染妊娠结局及危险因素调查[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2014,2(2):221-223.
- [7] 华海涌,唐 凤,刘一新,等. 江苏省孕妇弓形虫感染情况调查[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2013,25(1):56-58,79.
- [8] 卓国荣,周红蕾,张 斌,等. 泰州地区犬血清弓形虫抗体间接血凝与胶体金试纸对比调查研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):211-212.
- [9] 高 歌. 弓形虫病临床特征及诊治研究新进展[J]. 中国病原生物学杂志,2014,9(9):848-851.
- [10] Gutierrez J, O'donovan J, Williams E, et al. Detection and quatification of Toxoplasma gondii in ovine mater nal and fontally infected pregnant ewes using real-time PCR[J]. Veterinary Parasitology, 2010,172(1/2):8-15.
- [11] Huang Y Z, Yang G J, Kurian D, et al. Proteomic patterns as biomarkers for the early detection of schistosomiasis japonica in a rabbit model[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2011,299(2/3):191-195.
- [12] Ndao M, Spithill T W, Caffrey R, et al. Identification of novel diagnostic serum biomarkers for Chagas' disease in asymptomatic subjects by mass spectrometric profiling[J]. J Clin Microbiol, 2010,48(1):1139-1149.
- [13] Oz H S. Toxoplasmosis, Pancreatitis, Obesity and Drug Discovery. Pancreat Disord Ther, 2014,4(2):138.
- [14] Fekadu A, Shibre T, Cleare A J. Toxoplasmosis as a cause for behaviour disorders—overview of evidence and mechanisms[J]. Folia Parasitologica, 2010,57(2):105-113.
- [15] Savino R, Paduano S, Preiano M A. The proteomics big challenge for biomarkers and new Drug-Targets discovery[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012,13(11):13926-13948.
- [16] Köhler K, Seitz H. Validation processes of protein biomarkers in serum: a cross platform comparison[J]. Sensors, 2012,12(9):12710-12728.
- [17] 李 冕,尹 昆,闫 歌. 弓形虫病的诊断技术及其研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2011,6(12):942-944.