



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105241986 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201510574277. X

(22) 申请日 2015. 09. 10

(71) 申请人 首都医科大学附属北京儿童医院
地址 100045 北京市西城区南礼士路 56 号

(72) 发明人 申阿东 李洁琼 孙琳 徐放
綦辉 肖婧 申晨 焦伟伟
郭雅洁 王咏红 佟月娟

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

G01N 30/88(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核患者的蛋白特征谱

(57) 摘要

本发明公开了区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核患者的蛋白特征谱。本发明所提供的特征谱中差异表达的蛋白质为 TSSK4、LOX、RASGRF2、XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11；与儿童活动性结核病患者比较，儿童潜伏结核感染者 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 的表达量上调，XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 的表达量下调。实验证明，这 12 种蛋白质组成的蛋白质谱可以区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者。

1. 检测 12 种蛋白质含量的系统在制备区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者产品中的应用；

所述 12 种蛋白质为 TSSK4、LOX、RASGRF2、XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于:所述检测蛋白质含量的系统包括利用液相色谱-电喷雾电离串联质谱检测蛋白质含量所需的试剂和/或仪器。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在于:所述检测蛋白质含量的系统还包括进行蛋白质的提取、蛋白质的定量和/或蛋白质的酶解所需的试剂和/或仪器。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的应用,其特征在于:所述检测蛋白质含量的系统还包括数据处理系统,所述数据处理系统用来依据液相色谱-电喷雾电离串联质谱的检测结果确定所述 12 种蛋白质的含量。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的应用,其特征在于:所述儿童为 3 个月-16 岁的儿童。

6. 以权利要求 1 所述 12 种蛋白质作为标志物的区分潜伏结核感染者和活动性结核病人的系统在制备区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者产品中的应用。

7. 根据权利要求 6 所述的应用,其特征在于:所述系统为权利要求 1-5 中任一所述检测 12 种蛋白质含量的系统。

8. 区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病人的系统,为权利要求 1-5 中任一所述检测 12 种蛋白质含量的系统。

9. 区分或辅助区分潜伏结核感染者和活动性结核病人的蛋白特征谱,其特征在于:所述特征谱中差异表达的蛋白质为 TSSK4、LOX、RASGRF2、XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11。

10. 区分或辅助区分潜伏结核感染者和活动性结核病人的方法,包括检测待测儿童中 TSSK4、LOX、RASGRF2、XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 的含量。

区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核患者的蛋白特征谱

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学领域中区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核患者的蛋白特征谱。

背景技术

[0002] 结核病 (Tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染引发的慢性传染性疾病, 具有流行性广、病死率高等特点, 严重威胁人类健康。近年来, 随着艾滋病以及耐药结核菌的流行, 结核病的发病率和病死率居高不下。2012 年世界卫生组织统计数据表明: 2011 年全球新增结核病患者 870 万, 因结核病或其并发症死亡的人数多达 140 万, 其中儿童结核病约占全球结核病负担的五分之一。中国是结核病的重灾区, 不仅是全球 22 个结核病高负担国家之一, 也是全球 27 个耐多药结核病流行严重的国家之一。结核病人数量位居全球第 2 位, 每年新增结核病患者超过 100 万人, 其中超过 11 万病例呈现不同程度的耐药。结核病防治形势十分严峻。

[0003] 在群体中, 只有约 10% 的个体在感染 MTB 后发展为活动性结核病 (Active tuberculosis, ATB), 活动性结核病是指结核病处在活动期, 呈现低热和结核中毒症状, 具有传染性, 须进行隔离和严格的抗结核治疗。大部分个体感染 MTB 后呈现带菌生存状态, 并不会发展为 ATB, 称为潜伏结核感染 (Latent tuberculosis infection, LTBI)。潜伏结核感染虽然不表现任何结核病的临床症状, 但具有发展为活动性结核病的风险。约有 10% 的潜伏结核感染者在其一生中会发展为活动性结核病, 如此庞大数目的潜伏结核感染者是活动性结核病的重要来源。因此, 有效地区别诊断潜伏结核感染者和活动性结核病患者, 并予以及时相应的疾病监控甚至是预防性治疗, 防止潜伏结核感染者发展成为活动性结核病患者, 是防治结核病的关键之一。

[0004] 目前针对 TB 的临床诊断, 其金标准仍然是经典的痰涂片染色显微镜下查找抗酸杆菌以及结核杆菌培养法, 已有近百年的历史。这两种检测方法的敏感性均不高, 痰涂片染色法的敏感性约 30%, MTB 培养法的敏感性约 60%, 且在儿童 TB 中的敏感度更低, 仅有不到 20%。痰涂片染色法虽然可以当天出结果, 但不能区分 MTB 和非结核分枝杆菌, 也不能区分活菌还是死菌。MTB 培养法的敏感性虽高一些, 但耗时较长, 即使快速培养也需要 1 个月的时间才能得到结果。另外, 对于肺外结核和涂阴、菌阴的结核病, 金标准检测方法的应用受到限制, 加剧了诊断的困难, 给及时治疗带来了阻力。近年来虽然陆续出现了一些先进的基于核酸扩增的分子生物学检测技术 (如 XpertMTB/RIF assay), 但由于受到仪器设备和诊断费用的限制, 以及假阳性率偏高等问题, 还无法全面推广。临床上沿用已久的结核菌素皮试实验 (TST), 容易受到既往 BCG 疫苗接种和非结核分枝杆菌感染的干扰。特别是在我国, 婴儿出生后即会接种卡介苗, 导致 TST 结果假阳性偏多, 诊断不够明确。新近推行的 γ -干扰素释放试验, 虽然能够检测 MTB 感染, 但无法区分潜伏结核感染和活动性结核病。因此, 现行的 TB 诊断方法或辅助诊断手段都无法实现快速有效的鉴别诊断结核病, 使得临

床上面临严重的治疗延误以及治疗性诊断等问题。因此，寻找新的结核病特异标志物，区别诊断潜伏结核感染和活动性结核病，已经成为结核病临床诊断中一项亟待解决的难题。

[0005] 机体感染 MTB 后成为潜伏结核感染或者发展为活动性结核病，是由免疫系统与病原菌间的相互作用决定的。虽然已经确认宿主免疫系统在决定感染结局方面起到重要的作用，但目前参与这一过程的基因类别和分子机制尚未得到阐明。从潜伏结核感染发展到活动性结核病，宿主体内必然会经历一系列基因及蛋白表达的改变，其中表达变化较显著的一些基因和蛋白无疑会成为区别诊断潜伏结核感染和活动性结核病的特异分子标识。既往研究探讨了在潜伏结核感染和活动性结核病中，某些细胞因子或趋化因子的表达变化。但这些研究均基于已知的免疫应答信息，检测的数量较少，着眼点也比较局限。同时由于儿童免疫系统发育尚不完全，在 MTB 中参与的基因及蛋白的表达变化可能与成人有所不同。因此，分别针对不同年龄阶段的患者筛选疾病特异性的诊断标记物，将具有更好的临床应用价值和实际意义。

[0006] 蛋白质组学是在 1994 年由 Williams 和 Wilkins 提出的，通过寻找特异性蛋白质，为研究疾病机制提供线索。近年来随着人类蛋白质组学计划的全面启动，蛋白质组学的研究也产生了巨大进展，蛋白质组学研究中应用的定量方法主要有两种，一种是基于传统双向凝胶电泳及染色基础上的定量，另外一种是基于质谱检测技术的定量，包括标记定量技术 (iTRAQ) 和非标记定量技术 (Label free quantification) 两种。非标记定量技术 (Label-free quantification) 不需要昂贵的同位素标签做内部标准，实验耗费低；对样本的操作也最少，从而使其最接近原始状态；并且不受样品条件的限制，克服了标记定量技术在对多个样本进行定量方面的缺陷，因此它在定量蛋白质组学研究以及诊断标志物筛选中受到了众多科学工作者的推崇，得到了越来越广泛的应用。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是如何区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者。

[0008] 为解决上述技术问题，本发明首先提供了检测 12 种蛋白质含量的系统在制备区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者产品中的应用。

[0009] 本发明所提供的检测 12 种蛋白质含量的系统在制备区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者产品中的应用中，所述 12 种蛋白质为 TSSK4、LOX、RASGRF2、XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11。

[0010] 所述 12 种蛋白质构成了区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者蛋白特征谱，所述特征谱中差异表达的蛋白质为表达上调的蛋白质和表达下调的蛋白质；与儿童活动性结核病患者相比较，儿童潜伏结核感染者中所述表达上调的蛋白质为 TSSK4、LOX 和 RASGRF2，所述表达下调的蛋白质为 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11；与儿童潜伏结核感染者相比较，儿童活动性结核病患者中所述表达下调的蛋白质为 TSSK4、LOX 和 RASGRF2，所述表达上调的蛋白质为 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11。

[0011] 上述应用中，所述检测蛋白质含量的系统可包括利用液相色谱 - 电喷雾电离串联质谱检测蛋白质含量所需的试剂和 / 或仪器。

[0012] 上述应用中,所述检测蛋白质含量的系统还可包括进行蛋白质的提取、蛋白质的定量和 / 或蛋白质的酶解所需的试剂和 / 或仪器。

[0013] 上述应用中,所述检测蛋白质含量的系统还可包括数据处理系统,所述数据处理系统用来依据液相色谱-电喷雾电离串联质谱的检测结果确定所述 12 种蛋白质的含量。所述数据处理系统可为进行数据分析所需的软件或模块,如提取一级质谱定量信息的软件或模块、进行蛋白质定量的软件或模块或进行数据检索和整合的软件或模块。所述提取一级质谱定量信息的软件或模块可为 Trans-Proteomic Pipeline 软件,所述进行蛋白质定量的软件或模块可为 ProfileAnalysis2.0 软件,所述进行数据检索和整合的软件或模块可为 ProteinScape2.1 软件。

[0014] 所述检测蛋白质含量的系统可只由检测蛋白质含量所需的试剂和 / 或仪器组成,也可由检测蛋白质含量所需的试剂和 / 或仪器与下述 A1、A2、A3 和 A4 中的至少一种组成:

[0015] A1、进行蛋白质的提取所需的试剂和 / 或仪器;

[0016] A2、进行蛋白质的定量所需的试剂和 / 或仪器;

[0017] A3、进行蛋白质的酶解所需的试剂和 / 或仪器;

[0018] A4、所述数据处理装置。

[0019] 所述进行蛋白质的提取所需的试剂和 / 或仪器可为利用液相色谱-电喷雾电离串联质谱检测蛋白质含量所需的试剂和 / 或仪器,具体来说,利用液相色谱-电喷雾电离串联质谱检测蛋白质含量所需的试剂和 / 或仪器可由液相色谱串联质谱仪以及进行液相色谱-电喷雾电离串联质谱所需的试剂组成。所述液相色谱串联质谱仪可为液相色谱-电喷雾电离串联质谱仪(Q-Exactive Thermo Finnigan),所述进行液相色谱-电喷雾电离串联质谱所需的试剂可为与所述液相色谱-电喷雾电离串联质谱仪(Q-Exactive Thermo Finnigan) 配套的试剂。

[0020] 所述进行蛋白质的提取所需的试剂和 / 或仪器可为默克公司的 ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit。

[0021] 所述进行蛋白质的定量所需的试剂和 / 或仪器可为利用牛血清标准蛋白法进行蛋白质的定量所需的试剂和 / 或仪器或试剂盒,如 Thermo Scientific Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒,货号为 NCI3225CH。

[0022] 所述进行蛋白质的酶解所需的试剂和 / 或仪器可为利用胰蛋白酶酶解蛋白质所需的试剂和 / 或仪器。所需试剂可为 8M 尿素溶液、1 M DTT 溶液、1 M IAA 溶液和 / 或胰蛋白酶。

[0023] 上述应用中,所述 12 种蛋白质含量可为血浆、血清或血液中所述 12 种蛋白质的含量。

[0024] 上述应用中,所述儿童可为 3 个月-16 岁的儿童。

[0025] 为解决上述技术问题,本发明还提供了以所述 12 种蛋白质作为标志物的区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核患者的系统在制备区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者产品中的应用。

[0026] 上述应用中,所述系统可为所述检测 12 种蛋白质含量的系统。

[0027] 为解决上述技术问题,本发明还提供了区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核患者的系统。

[0028] 本发明所提供的区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核患者的系统,为所述检测 12 种蛋白质含量的系统。

[0029] 为解决上述技术问题,本发明还提供了区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核患者的蛋白特征谱。

[0030] 本发明所提供的区分或辅助区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核患者的蛋白特征谱中,差异表达的蛋白质为表达上调的蛋白质和表达下调的蛋白质;与儿童活动性结核病患者相比较,儿童潜伏结核感染者中所述表达上调的蛋白质为 TSSK4、LOX 和 RASGRF2,所述表达下调的蛋白质为 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11;与儿童潜伏结核感染者相比较,儿童活动性结核病患者中所述表达下调的蛋白质为 TSSK4、LOX 和 RASGRF2,所述表达上调的蛋白质为 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11。

[0031] 为解决上述技术问题,本发明还提供了区分或辅助区分潜伏结核感染者和活动性结核患者的方法。

[0032] 本发明所提供的区分或辅助区分潜伏结核感染者和活动性结核患者的方法,包括检测待测儿童中 12 中蛋白质——TSSK4、LOX、RASGRF2、XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 的含量。所述 12 种蛋白质的含量可为血浆、血清或血液中所述 12 种蛋白质的含量,即所述待测儿童中 TSSK4、LOX、RASGRF2、XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 的表达量。

[0033] 与所述儿童活动性结核病患者比较,如果所述待测儿童 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 的表达量上调,且 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 的表达量下调,所述儿童为或候选儿童潜伏结核感染者;若所述待测儿童 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 中有至少一个蛋白质不上调,或所述待测儿童 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 中有至少一个蛋白质不下调,则所述待测儿童不为或候选不为儿童潜伏结核感染者。

[0034] 与所述儿童潜伏结核感染者比较,如果所述待测儿童 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 的表达量下调,且 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 的表达量上调,所述儿童为或候选为儿童活动性结核病患者;若所述待测儿童 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 中有至少一个蛋白质不下调,或所述待测儿童 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 中有至少一个蛋白质不上调,则所述待测儿童不为或候选不为儿童活动性结核病患者。

[0035] 其中,“上调”体现为比值 > 1.5 ,“下调”体现为比值 < 0.6 ,所述比值为某一蛋白在所述待测儿童中的表达量与在儿童活动性结核病患者中的表达量的比值或某一蛋白在所述待测儿童中的表达量与在儿童潜伏结核感染者中的表达量的比值,所述表达量即蛋白质在血浆中的含量。儿童活动性结核病患者中的表达量为待测儿童所属儿童群体中活动性结核病患者中该蛋白质的平均表达量;儿童潜伏结核感染者中的表达量为待测儿童所属儿童群体中潜伏结核感染者中该蛋白质的平均表达量。

[0036] 上述方法中,确定所述待测儿童是否为儿童潜伏结核感染者以用现有技术确诊的儿童活动性结核病患者作为参照,确定所述待测儿童是否为儿童活动性结核病患者以用现有技术确诊的儿童潜伏结核感染者作为参照,现有技术可以为病原学诊断和 / 或临床诊

断。

[0037] 上述方法中,所述儿童可为 3 个月-16 岁的儿童。

[0038] 实验证明,本发明从 3 个月-16 岁的儿童潜伏结核感染者与活动性结核患者的血浆样本中利用液相色谱-电喷雾电离串联质谱筛选得到的 12 种蛋白质的蛋白质谱,其中儿童潜伏结核感染者与活动性结核病患者血浆中的 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 含量的比值 > 1.5 ,儿童潜伏结核感染者与活动性结核病患者血浆中的 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 含量的比值 < 0.6 ,表明,这 12 种蛋白质组成的蛋白质谱可以区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者,检测血浆中这 12 种蛋白质含量的试剂和仪器可以用来区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者。

[0039] 本发明所提供的筛查疑似潜伏结核感染者和活动性结核患者的儿童蛋白质组学产物,可用于建立血浆特征代谢产物模型以及应用于儿童潜伏结核感染和活动性结核病的鉴别诊断。本发明与其它儿童结核病的检测方法比较,具有以下优点:

[0040] 第一,本发明采用非标记定量蛋白质组学方法对儿童潜伏结核感染者与活动性结核病患者血浆的检测,并采用了传统统计学与现代生物信息学方法相结合的方法进行数据处理,从而得到儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者血浆蛋白质质谱检测模型,并且所发现的一系列蛋白质为寻找新的更理想的标志物提供了基础和资源。

[0041] 第二,与以往的血浆学检测方法比较具有较高的敏感性和特异性,并能用于区分儿童潜伏结核感染与活动性结核病的药物研究中。

[0042] 第三,本发明模型的构建方法设计合理可行,为提供区分儿童潜伏结核感染和活动性结核病的临床治愈率提供了新的筛查方法,同时也为探索疾病发生发展的机制提供了新的思路。

[0043] 第四,本发明检测方法结果准确,可对儿童结核病做区分诊断,尽早对活动性结核病患者以及潜伏结核感染者进行治疗。

具体实施方式

[0044] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0045] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0046] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0047] 实施例 1、儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者差异性蛋白特征谱的建立

[0048] 1、样本和仪器

[0049] 35 例选自年龄为 3 个月-16 岁的儿童血浆样本,其中 16 例为儿童潜伏结核感染者血浆,另外 19 例为儿童活动性结核病患者血浆,均有实验室及临床诊断报告确定。活动性结核患者的诊断标准为:病原学确诊和临床诊断,具体诊断标准为具有典型的临床症状和影像学证据,同时存在病原学检测或者组织病理学检测阳性者,同时具有 TB 患者接触史、结核菌素试验阳性、抗 TB 治疗有效、排除其他疾病四项中任意两项者。潜伏结核感染患儿入组标准为:无临床表现、胸片正常、PPD 结果阳性、IFN- γ 释放实验结果阳性。

[0050] 所有的血浆样本均在清晨空腹下抽取,分离血浆后储存在 -80 低温冰箱中。

[0051] 实验用仪器是液相色谱-电喷雾电离串联质谱(Q-Exactive Thermo Finnigan),

电泳仪 (Bio-rad, 美国), MultiSkans 酶标仪 (Thermo, 美国), 白蛋白 /IgG 去除试剂盒为德国 Merck 公司产品。

[0052] 2、蛋白质提取

[0053] 采用默克公司的 ProteoExtract Albumin/IgG Removal Kit 去除样本中的高丰度蛋白 (白蛋白 /IgG)。去高速离心后的血浆样本 50 μ L, 在冰上按使用说明书操作处理, 处理后的样本体积 1800 μ L。

[0054] 由于样本经过去除高丰度蛋白处理后, 浓度被稀释了 300 倍, 因此需要对样本进行浓缩处理。1800 μ L 处理后的样本加入 8mL-20 $^{\circ}$ C 预冷丙酮, 沉淀过夜。6000g 离心后, 弃去上清, 晾干丙酮后, 用 100 μ L 溶解液 (7M 尿素和 2M 硫脲) 溶解沉淀。溶解后的样本 4 $^{\circ}$ C 下 40000g 离心 30 min, 待用。

[0055] 3、蛋白质定量

[0056] 蛋白质定量采用 Thermo Scientific Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒, 货号为 NCI3225CH, 具体方法如下:

[0057] A. 方法

[0058] (1) 开分光光度计预热 20 min, 选择“光度测量”, 调节 $\lambda = 595$ nm。

[0059] (2) 用 CK (2 μ L 裂解缓冲液 +18 μ L ddH₂O+1 mL Bradford) 进行调零三次。(要点: 第一次按“Zero”即可, 观察第二、三次的 OD 值, 如果都很小且相差不大即可。调零完毕后, 显示“-0.301 Abs”。)

[0060] (3) 配置表 1 中的各牛血清标准蛋白溶液并测定 OD595 值, 绘制标准曲线。

[0061] (4) 测 B2 (2 μ L BSA+18 μ L ddH₂O+1 mL Bradford)、B5 (5 μ L BSA+15 μ L ddH₂O+1mL Bradford)、B8 (8 μ L BSA+12 μ L ddH₂O+1 mL Bradford) 各三管, 用于确定校正系数, 校正蛋白浓度。其中, 标准曲线计算方法为: 在 excel 表格中, 一列蛋白质浓度, 一列对应 OD 值, 插入图标, 选择折线图, 选项中选择显示 R 值和公式。

[0062] 注: BSA 为牛血清标准蛋白; 要点: 所有管加好 BSA 和 ddH₂O 后, 加一管 Bradford, 测一管; 动作要领“三摇一拍”; 读值为放入比色皿 1s 后的第一个值; 如有数值异常可舍弃读值或多做一次重复。

[0063] (5) 测样品蛋白 OD595 值。操作同上。将 OD595 值代入标准曲线方程, 得到蛋白浓度测定值, 进而计算实际蛋白浓度, 实际蛋白浓度 = 蛋白浓度测定值 \times 校正系数。

[0064] 表 1、牛血清标准蛋白溶液的设置及 OD595 值测定结果

[0065]

| BSA 体积 (μ L) | OD1 | OD2 | OD3 | OD4 | OD5 | 平均值 | 理论浓度 (μ g/ μ L) |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------------------------|
| 1 | 0.06 | 0.07 | 0.077 | 0.069 | 0.07 | 0.0692 | 0.5 |
| 2 | 0.135 | 0.124 | 0.133 | 0.128 | 0.132 | 0.1304 | 1 |
| 3 | 0.196 | 0.2 | 0.195 | 0.19 | 0.191 | 0.1944 | 1.5 |
| 4 | 0.256 | 0.244 | 0.244 | 0.242 | 0.256 | 0.2484 | 2 |
| 5 | 0.304 | 0.304 | 0.304 | 0.302 | 0.312 | 0.3052 | 2.5 |

[0066]

| | | | | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----|
| 6 | 0.35 | 0.348 | 0.354 | 0.352 | 0.354 | 0.3516 | 3 |
| 7 | 0.406 | 0.403 | 0.406 | 0.408 | 0.42 | 0.4086 | 3.5 |
| 8 | 0.467 | 0.482 | 0.483 | 0.488 | 0.492 | 0.4824 | 4 |
| 9 | 0.533 | 0.532 | 0.534 | 0.535 | 0.54 | 0.5348 | 4.5 |
| 10 | 0.577 | 0.575 | 0.575 | 0.574 | 0.583 | 0.5768 | 5 |

[0067] 注:OD1-OD5 为五个重复。

[0068] B. 结果

[0069] 根据表 1 测定结果,得到标准曲线方程为 $y = 8.7949x - 0.1539$, $R^2 = 0.9985$ 。其中, x 为 OD595, y 为蛋白浓度。

[0070] 根据上述步骤 (4) 计算得到校正系数为 0.9985。

[0071] 进一步,测定步骤 2 所得的儿童潜伏结核感染者血浆处理后样品中的蛋白浓度为 $7.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 儿童活动性结核病患者血浆处理后样品中的蛋白浓度为 $7.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

[0072] 4、胰蛋白酶解样本

[0073] (1) 蛋白质定量后取 $200 \mu\text{g}$ 蛋白溶液置于离心管中,用 8M 尿素溶液将体系定至 $125 \mu\text{L}$;

[0074] (2) 加入现配的 $5 \mu\text{L}$ 1M DTT 溶液至体系中,混匀后, 37°C 孵育 1h;

[0075] (3) 加入现配的 $20 \mu\text{L}$ 1M IAA 溶液至体系中,混匀后,避光,室温 (25°C) 反应 1h;

[0076] (4) 吸取所有样品加入到 10 kD 超滤管中, 12000 rpm (不超过 $14000g$) 离心 20min, 弃掉收集管底部溶液;

[0077] (5) 加入 $100 \mu\text{L}$ 尿素溶液 (8M) 至超滤管中, 12000 rpm 离心 10 min, 重复 2 次。

[0078] (6) 在超滤管中加入胰蛋白酶 ($100\text{U}/\mu\text{g}$) $2-4 \mu\text{g}$ (与蛋白质量比 1:50-100), 体积 $50 \mu\text{L}$, 37°C 反应过夜 20h; 次日, 12000 rpm 离心 20 min, 酶解消化后的肽段溶液离心于收集管底部。

[0079] 5、液相分级以及蛋白质质谱检测

[0080] 取酶解产物,按照定量结果取 $10 \mu\text{g}$ 进行 LCMSMS 分析。采用纳升流速 HPLC 液相系统 EASY-nLC1000 进行分离。液相 A 液为含有 2% (体积分数) 乙腈和 0.1% (体积分数) 甲酸的水溶液 (即以 100mL 计算组成如下: 2mL 乙腈, 0.1mL 甲酸, 余量为水), B 液为含有 84% (体积分数) 乙腈和 0.1% (体积分数) 甲酸的水溶液 (即以 100mL 计算组成如下: 84mL 乙腈, 0.1mL 甲酸, 余量为水)。色谱柱 Thermo EASY column SC2001 $150 \mu\text{m} \times 100\text{mm}$ (RP-C18) 以 100% 的 A 液平衡。样品由自动进样器上样到 Thermo EASY column SC001 traps $150 \mu\text{m} \times 20\text{mm}$ (RP-C18) (Thermo), 再经色谱柱分离, 流速为 $400\text{nL}/\text{min}$ 。相关液相梯度如下: 0 min-100 min, B 液线性梯度从 0% 到 45% (体积百分比含量, 下同); 100 min-108 min, B 液线性梯度从 45% 到 100%; 108 min-120 min, B 液维持在 100%。酶解产物经毛细管高效液相色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪 (Thermo Finnigan) 进行质谱分析。分析时长: 120 min, 检测方式: 正离子, 母离子扫描范围: 300-1800 m/z, 多肽和多肽的碎片的质量电荷比按照下列方法采集: 每次全扫描 (full scan) 后采集 10 个碎片图谱 (MS2 scan, HCD)。MS1 在 M/Z 200 时分辨率为 70000, MS2 在 M/Z 200 时分辨率为 17500。

[0081] 6、质谱鉴定

[0082] 先利用 Trans-Proteomic Pipeline 软件提取一级质谱定量信息 (采用软件默认参数), 利用 ProfileAnalysis2.0 软件进行定量 (采用软件默认参数)。然后利用 ProteinScape2.1 软件进行数据检索和整合, 具体如下:

[0083] 以 $\text{Peptide FDR} \leq 0.05$ 对数据进行筛选过滤。导入 Maxquant 软件 (属于 ProteinScape2.1 软件的一部分) 进行 Label-free 分析。主要参数如下:

[0084] Main search ppm:6 Missed cleavage:2

- [0085] MS/MS tolerance ppm :20 De-Isotopic :TRUE
 [0086] enzyme :Trypsin database :ipi.human.3.87.fasta
 [0087] Fixed modification :Carbamidomethyl (C)
 [0088] Variable modification :Oxidation (M), Acetyl (Protein N-term)
 [0089] Decoy database pattern :reverse
 [0090] Lable free quantification (LFQ) :TRUE
 [0091] LFQ min ratio count :2
 [0092] Match between runs :2 min
 [0093] Peptide FDR :0.05
 [0094] Protein FDR :0.05

[0095] 筛选出 12 个 fold change (比值) > 1.5 或者 < 0.6 的差异蛋白 (见表 2), 从而获得区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者蛋白特征谱。其中, 比值 > 1.5 的蛋白为表达上调的蛋白, 比值 < 0.6 的蛋白为表达下调的蛋白, 所述比值为所述儿童潜伏结核感染者的相应蛋白的平均表达量与所述儿童活动性结核病患者的对应蛋白的平均表达量的比值。

[0096] 最终所得区分儿童潜伏结核感染者和活动性结核病患者蛋白特征谱中含有表达差异的 12 种蛋白质, 儿童潜伏结核感染者与活动性结核病患者比较存在差异的蛋白质包括表达上调的蛋白质和表达下调的蛋白质; 表达上调的蛋白质为 TSSK4、LOX 和 RASGRF2; 表达下调的蛋白质为 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11。儿童活动性结核病患者与潜伏结核感染者比较存在差异的蛋白质包括表达下调的蛋白质和表达上调的蛋白质; 表达下调的蛋白质为 TSSK4、LOX 和 RASGRF2; 表达上调的蛋白质为 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11。

[0097] 与儿童活动性结核病患者比较, 如果待测儿童 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 的表达量上调, 且 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 的表达量下调, 所述儿童为儿童潜伏结核感染者; 若待测儿童 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 中有至少一个蛋白质不上调, 或待测儿童 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 中有至少一个蛋白质不下调, 则待测儿童不为儿童潜伏结核感染者。

[0098] 与儿童潜伏结核感染者比较, 如果待测儿童 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 的表达量下调, 且 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 的表达量上调, 所述儿童为儿童活动性结核病患者; 若待测儿童 TSSK4、LOX 和 RASGRF2 中有至少一个蛋白质不下调, 或待测儿童 XRCC4、PAMR1、ZMYM5、ATP11A、SF3B1、NKD2、OCRL、ATG2B 和 PCF11 中有至少一个蛋白质不上调, 则待测儿童不为儿童活动性结核病患者。

[0099] 表 2、12 种蛋白在 NCBI 数据库中的编号及对应基因号

[0100]

| 编号 | 蛋白质基因名称 | Unitprot 编号 | NCBI 中的 GI 编号 | LTBI:TB | 差异倍数 |
|----|---------|-------------|---------------|---------|------|
| 1 | TSSK4 | Q6SA08 | 296317364 | ↑ | 2.17 |
| 2 | LOX | P28300 | 20149540 | ↑ | 1.82 |
| 3 | RASGRF2 | 014827 | 38505170 | ↑ | 1.64 |
| 4 | XRCC4 | Q13426 | 4507945 | ↓ | 0.06 |
| 5 | PAMR1 | Q6UXH9 | 50659100 | ↓ | 0.07 |
| 6 | ZMYM5 | Q9UJ78 | 218083730 | ↓ | 0.10 |

| | | | | | |
|----|--------|--------|-----------|---|------|
| 7 | ATP11A | P98196 | 150421681 | ↓ | 0.17 |
| 8 | SF3B1 | 075533 | 54112117 | ↓ | 0.19 |
| 9 | NKD2 | Q969F2 | 14916427 | ↓ | 0.30 |
| 10 | OCRL | Q01968 | 13325070 | ↓ | 0.31 |
| 11 | ATG2B | Q96BY7 | 118197272 | ↓ | 0.34 |
| 12 | PCF11 | 094913 | 33620745 | ↓ | 0.46 |

[0101] 注:LTBI:TB 列为儿童潜伏结核感染者与活动性结核病患者相比,蛋白质的表达的上调或下调情况;差异倍数列中各数值表示与活动性结核病患者相比儿童潜伏结核感染者各蛋白的相对表达量。

[0102] 7、数据分析

[0103] (1) 样本检测总离子流强度一致,说明样本仪器检测上样量基本一致,具有定量分析意义。

[0104] (2) 样本检测 TIC 离子流峰型基本一致,说明样本酶解较完全,且各样本无蛋白损失,这与 SDS-PAGE 图谱也相符合。

[0105] (3) 样本肽段的串联质谱峰分布比较平均,且大部分出现在有效梯度内,说明液相色谱条件较适合样本分析。

[0106] (4) 样本的离子流峰保留时间比较一致,说明色谱比较稳定且重复性好,适合比较同一保留时间内的质谱峰,适合定量分析。