(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110229827 A
(43)申请公布日 2019.09.13

(21)申请号 201910439971.9

(22)申请日 2019.05.22

(71)申请人 华中农业大学
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72)发明人 贺兰 敖阳思琦 战雪燕 喻龙 聂政 崔杰 刘琴 赵俊龙

(74)专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104
代理人 徐绍新

(51)Int.Cl.
C12N 15/30(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)

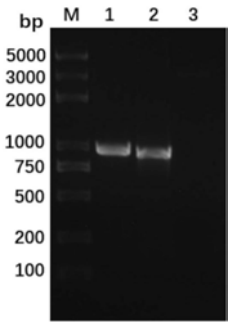
权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH,编码所述蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,本发明还公开了所述表面蛋白在制备犬吉氏巴贝斯虫和犬巴贝斯虫检测试剂盒中的应用以及一种检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法,该方法用于检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体具有灵敏度高、特异性好、快速简便等优点,同时该方法还具有检测范围广的优点,可以实现多种病原IgG抗体的特异性检测。



CN 110229827 A

1.犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH,编码所述蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2.权利要求1所述的犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH在制备犬吉氏巴贝斯虫检测试剂盒中的应用。

3.如权利要求2所述的应用,其特征在于:所述试剂盒是检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫试剂盒。

4.一种检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫试剂盒,含有酶标板、包被原和酶标二抗,其特征在于:所述包被原是权利要求1所述的犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH。

5.如权利要求4所述的检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫试剂盒,其特征在于:所述酶标二抗是HRP标记的山羊抗犬IgG。

6.一种检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法,其特征在于包括以下步骤:

1)将权利要求1所述的犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH稀释后包被酶标板;

2)用封闭液封闭酶标板;

3)将犬血清稀释后加入酶标板,37℃孵育1h;

4)将HRP标记的山羊抗犬IgG稀释后加入酶标板,37℃孵育1h;

5)加入显色液,室温避光显色反应,反应终止后在630nm波长处读数。

7.如权利要求6所述检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法,其特征在于:所述犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH稀释后的终浓度为2μg/mL。

8.如权利要求6所述检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法,其特征在于:所述犬血清稀释的倍数为体积的200倍。

9.如权利要求6所述检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法,其特征在于:所述HRP标记的山羊抗犬IgG稀释的倍数为体积8000倍。

10.如权利要求6所述检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法,其特征在于:所述显色反应的时间为10min。

一种犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白，本发明还涉及该蛋白在制备犬吉氏巴贝斯虫检测试剂盒中的应用以及一种检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫(ELISA)方法。

技术背景

[0002] 吉氏巴贝斯虫病是由寄生在犬红细胞内的一种蜱传吉氏巴贝斯虫所致，犬临床表现为发热、贫血、黄疸、血红蛋白尿和消瘦，严重时可导致死亡。吉氏巴贝斯虫病广泛流行于我国东北、西北、华东、华中、华南、西南等地区，且近年来流行趋势愈发广泛。该病的主要感染途径是蜱的叮咬，同时也可通过输血、胎盘、唾液等方式进行传播。由于蜱是犬巴贝斯虫的终末宿主以及传播媒介，因此本病的发生、发展以及分布与蜱的活动季节和区域具有密切关系，一年中的春季、夏季、和秋季属该病的多发季节，在只要能滋生蜱的地区，都有可能存在该病的传播，并且该病的发生与动物的性别以及年龄无相关性，任何年龄的犬均可发病。

[0003] 吉氏巴贝斯虫病流行广泛，给宠物行业带来巨大危害，目前尚无权威的检测标准和商品化检测试剂盒，这使吉氏巴贝斯虫病的诊断显得尤为困难。目前针对该病的检测方法主要有以下三种:病原学检测、分子生物学诊断以及血清学诊断。病原学检测主要依赖于血液涂片镜检，这种方法一直被认为是急性诊断的金标准，但这种检测方法在宿主体内原虫水平低、慢性感染时是很难检测到的，也不适合样本数量大的规模检查。分子生物学诊断方法中以PCR法最为常见，此方法对于检测低水平寄生虫血症、区分寄生虫种类尤其有用，具有灵敏度高、特异性好的优点，是实验室检测吉氏巴贝斯虫病的重要手段。但PCR检测需要专业的实验室花费较多的时间进行样品的处理以及检测，因此在临床上很难适用。血清学诊断主要包括IFA(间接免疫荧光试验)和ELISA(酶联免疫吸附试验)，其优点是可以提示以往或持续存在的感染。间接免疫荧光试验较常用于犬巴贝斯虫的诊断，但不同品种巴贝斯虫间和其他原虫间存在交叉反应。ELISA方法则敏感性高、特异性好，易实现自动化操作，快速简便，并且对操作者无特殊要求，可以在短时间内处理大量样品，因此受到广泛的关注。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种能与犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体特异性反应的表面蛋白GPI32-WH，本发明的另一个目的是建立一种检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法和试剂盒。

[0005] 本发明的具体方案包括以下步骤：

[0006] 提取犬吉氏巴贝斯虫虫体RNA后，利用Takara反转录试剂盒得到cDNA，根据所需目的片段利用clonemanager分子克隆软件设计相关的引物，通过PCR方法扩增目的片段，用双酶切的方法将GPI32-WH-CDs片段连接到pET-28a载体上，经过酶切鉴定测序验证无误后将

构建的pET-28a-GPI32-WH质粒转到大肠杆菌BL21(DE3)中用于表达。将pET-28a-GPI32-WH表达菌株扩大培养,分离、纯化后得到犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH,编码所述蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 该蛋白由于能与犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体特异性反应,因此可用于制备犬吉氏巴贝斯虫检测试剂盒。

[0008] 所述试剂盒是检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫试剂盒。

[0009] 一种检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫试剂盒,含有酶标板、包被原和酶标二抗,所述包被原是以上所述的犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH。

[0010] 所述酶标二抗是HRP标记的山羊抗犬IgG。

[0011] 一种检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法,该方法包括以下步骤:

[0012] 1)将犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH稀释后包被酶标板;

[0013] 2)用封闭液封闭酶标板;

[0014] 3)将犬血清稀释后加入酶标板,37℃孵育1h;

[0015] 4)将HRP标记的山羊抗犬IgG稀释后加入酶标板,37℃孵育1h;

[0016] 5)加入显色液,室温避光显色反应,反应终止后在630nm波长处读数。

[0017] 优选地,所述犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH稀释后的终浓度为2μg/mL。

[0018] 优选地,所述犬血清稀释的倍数为体积的200倍。

[0019] 优选地,所述HRP标记的山羊抗犬IgG稀释的倍数为体积8000倍。

[0020] 优选地,所述显色反应的时间为10min。

[0021] 本发明成功建立了针对犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法,与其它检测方法相比本发明具有以下优点:

[0022] 1.灵敏度高:本发明所提供的表面蛋白以及所建立的检测方法对犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的反应具有很高的灵敏度,对动物血清的检测敏感性大于1:800,符合现场检测的需求。

[0023] 2.特异性好:本方法不与犬弓形虫、狂犬病毒、犬粪类圆线虫阳性血清发生交叉反应,但是能与犬巴贝斯虫阳性血清发生交叉反应,说明本发明提供的蛋白以及建立的ELISA检测方法和试剂盒能同时用于犬吉氏巴贝斯虫和犬巴贝斯虫的特异性检测。

[0024] 3.快速简便:易实现自动化操作,对操作者无特殊要求,可以在短时间内处理大量样品,直接根据读数大小(比值)就可定性判断为犬吉氏巴贝斯虫或犬巴贝斯虫阳性/阴性。

附图说明

[0025] 图1:本发明吉氏巴贝斯虫BgGPI32-WH编码序列的PCR扩增结果。图中:泳道M:DNA分子质量标准;1:BgGPI32-WH基因组序列扩增产物;2:BgGPI32-WH编码序列扩增产物;3:阴性对照。

[0026] 图2:本发明重组质粒pET-28a-GPI32-WH的鉴定结果,图中:泳道M:蛋白分子质量标准;1:pET-28a-GPI32-WH质粒酶切产物。

[0027] 图3:本发明pET-28a-GPI32-WH表达产物的SDS-PAGE分析结果,图中:泳道M:蛋白分子质量标准;1:未诱导His-pET-28a-GPI32-WH;2:诱导His-pET-28a-GPI32-WH。

具体实施方式

[0028] 实施例1:表面蛋白GPI32-WH的制备

[0029] 提取武汉株吉氏巴贝斯虫(WH)虫体RNA后,利用Takara反转录试剂盒得到cDNA,根据所需目的片段利用clonmanager分子克隆软件设计相关的引物通过PCR方法扩增目的片段,用双酶切的方法将GPI32-WH-CDs片段连接到pET-28a载体上,经酶切鉴定测序验证无误后,将构建的pET-28a-GPI32-WH质粒转到大肠杆菌BL21(DE3)中用于表达。

[0030] 1.GPI32-WH目的片段的获得

[0031] (1)吉氏巴贝斯虫RNA的提取

[0032] 将收集的染虫血离心,弃上清,加入1ml Trizol重悬沉淀,并反复吹打混匀后将样品转入1.5ml无RNase的离心管中,剧烈震荡涡旋3min,使虫体充分裂解,室温放置10min;按200μL氯仿/mL Trizol加入氯仿,用力振荡15sec,室温静置2～3min;4℃,12000rpm离心15min;小心吸取上层水相置于新的1.5mL无RNase的离心管中,加入等体积的异丙醇,充分混匀后,置于室温沉淀10min;4℃,12000rpm离心10min,弃上清,RNA将以白色沉淀的形式沉于管底;加入1mL用DEPC水配成的75%乙醇,翻转离心管,洗涤沉淀;4℃,7500rpm离心5min,尽量弃去上清,在超净台中风干;加入30μL无RNase DEPC水,溶解RNA沉淀;用1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定所提取的总RNA质量并通过紫外分光光度计测定总RNA浓度和纯度。

[0033] (2)吉氏巴贝斯虫cDNA的制备

[0034] 根据需要取0.1ng～5μg总RNA通过Takara反转录试剂盒得到cDNA,按照顺序加入以下反应物:

[0035] 步骤一:

[0036]	总RNA	0.1ng～5μg
[0037]	Oligo(dT)18	1μL
[0038]	无核酸酶的高纯水	补至12μL

[0039] 在PCR仪中65℃反应5min,冰上冷却。将下列组分按照顺序加入:

[0040]

5× Reaction Buffer	4 μL
RiboLock™ RNA 酶抑制剂	1 μL
10 mM dNTP Mix	2 μL
RevertAid™ M-MuLV 逆转录酶	1 μL
步骤一产物	12 μL
总体积	20 μL

[0041] 在PCR仪中42℃60min,70℃5min,产物-20℃储存。

[0042] (3)目的片段的PCR扩增

[0043] 将反转录得到的cDNA作为扩增目的基因编码序列的模板,该基因的上下游特异引物通过clonmanager分子克隆软件设计,分别是GPI32-WH-F(CAGGATCCAATGAAGGTGGCCAAGGTAATC)、GPI32-WH-R(GGCTCGAGTTAAAATACAGCGACAGCAACAG),通过PCR扩增,获得大小为942bp的条带,与预测大小一致,结果见图1,用凝胶回收试剂盒回收该片段。

[0044] PCR反应体系如下:

[0045]

模板	1 ug
上游引物	1 μL
下游引物	1 μL
5×KD plus buffer	10 μL
2.5 mM dNTPs	4 μL
KD plus DNA 聚合酶	1.0 μL

[0046] 灭菌水 补至 50 μL

[0047] PCR反应条件如下：

[0048]

95℃ 预变性	2~5 min	
95℃ 变性	30 sec	35 个循环
56~60℃ 退火	30 sec	
68℃ 延伸	1kb/min	
68℃ 彻底延伸	10 min	
15℃ 冷却	15min	

[0049] (4)目的片段回收

[0050] 按照DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒的说明进行操作，将单一条带的目的片段进行切胶回收，放入1.5mL离心管中；加入3倍体积的溶胶液，55℃水浴作用10min，每2min将离心管颠倒混匀一次，使凝胶充分融化；将融化的凝胶液体冷却至室温，加入到DNA回收柱中，室温静置5～10min；12000rpm室温离心1min，弃掉收集管中流出液；向回收柱中加入650μL洗涤液，12000rpm室温离心1min，弃掉收集管中流出液；将空回收柱12000rpm离心2min，弃掉收集管中剩余流出液，将回收柱放入新的1.5mL离心管中，室温干燥使残留的乙醇挥发；向回收柱中间膜上加入65℃预热的10～30μL灭菌水，室温静置5～10min，12000rpm室温离心2min，收集流出液体，-20℃保存。

[0051] 2.pET-28a-GPI32-WH质粒的构建

[0052] 利用双酶切的方法，将GPI32-WH-CDS片段和pET-28a载体片段连接，连接后用热激的方法，将连接产物转入到大肠杆菌感受态细胞DH5α中，将转化产物涂于含有卡那霉素抗性的LB平板上，倒置生长过夜，挑取单菌落，扩大培养提取质粒，并对其进行酶切验证。酶切验证正确的质粒，再进行测序验证。重组质粒经酶切后，得到的条带结果与预期一致，说明构建的pET-28a-GPI32-WH质粒的完整性，结果见图2。将经过酶切验证的质粒pET-28a-GPI32-WH中的GPI32-WH-CDS进行测序，测序结果与数据库中的GPI32-WH基因的CDS进行比对，因为不同地理株的原因，两者有少许差异，该结果证明重组表达质粒pET-28a-GPI32-WH构建成功。

[0053] (1)双酶切构建重组表达质粒

[0054] 按照Takara公司T4DNA Ligase试剂盒说明进行操作，根据说明书中的体系配置：

[0055]

双酶切后载体	x ng
双酶切后片段产物	x ng
10×T4 DNA Ligase buffer	2 μL
T4 DNA Ligase	1 μL
灭菌水	补至 20 μL

[0057] 将上述液体混匀后,PCR仪中25℃反应40min,冰浴5min后做转化。

[0058] 建议插入片段DNA与载体DNA的摩尔比为3:1。

[0059] (2)连接产物转化

[0060] 取-80℃保存的大肠杆菌化学感受态细胞,冰上融化;加入连接产物(或质粒),混匀,冰上放置30min;42℃水浴热击激45sec,迅速取出,冰浴2min;

[0061] 加入400μL无抗生素LB液体培养基,37℃180rpm复苏培养45min;5000rpm离心3min,弃200μL上清,用剩余培养基重悬沉淀后取出涂布于含有卡那霉素的LB平板上,倒置于37℃培养10～12h。

[0062] 3.表面蛋白GPI32-WH的表达和纯化

[0063] 将上述构建成功的原核表达质粒pET-28a-GPI32-WH转化到大肠杆菌表达感受态菌株BL21(DE3)中,将转化后的菌液涂于带有卡那霉素抗性的LB平板上,37℃培养过夜,挑单菌落,扩大培养,用终浓度为1.0mM的IPTG,在培养温度为37℃,振摇速度为180rpm/min,诱导时间为3h的条件下进行诱导表达,并且设置未诱导的对照组。将诱导表达结束后的诱导组和未诱导组的菌液集菌,弃上清,样品处理之后进行SDS-PAGE分析,结果见图3。结果发现,与未诱导组相比,诱导组在35kDa处有一条较粗的蛋白条带,说明重组质粒pET-28a-GPI32-WH顺利在感受态菌株BL21(DE3)中表达。以上述相同条件培养和诱导pET-28a-GPI32-WH表达菌,然后进行压力破碎,12000rpm离心10min分离上清和包涵体,对上清和包涵体取样进行处理,之后做SDS-PAGE分析,该结果表明,与包涵体样品相比,绝大多数的his-GPI32-WH表达在上清。

[0064] 将pET-28a-GPI32-WH表达菌株扩大培养,加入终浓度为1.0mM的诱导剂(IPTG)28℃诱导过夜,离心收集菌体,用压力破碎仪破碎菌体,4℃离心取上清液,将上清液用0.45um的滤器过滤,然后与his标签的亲和层析柱结合2h,用不同浓度的咪唑,由低到高洗脱蛋白,将洗脱下来的蛋白做SDS-PAGE分析,然后将纯度较好的蛋白进行透析和浓缩,经BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

[0065] 实施例2:建立快速准确的吉氏巴贝斯虫病现场诊断方法(GPI32-WH-iELISA)

[0066] 1.检测参数的优化

[0067] (1)抗原包被浓度和血清稀释倍数的确定:将GPI32-WH蛋白分别按8μg/mL、4μg/mL、2μg/mL、1μg/mL、0.5μg/mL、0.25μg/mL、0.125μg/mL、0.0625μg/mL的梯度稀释,包被酶标板,每个浓度包被一纵列5孔。将阴、阳性对照血清用保温液分别按1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600稀释,每个稀释度加到一横列5孔。按ELISA常规步骤操作,用酶标仪测定OD_{630}值,比较各抗原对应的P/N值的大小,选择其中最优的抗原的P/N值较大处对应的抗原包被浓度和血清稀释倍数稀释较方便的作为最佳条件。

[0068] (2)最佳封闭时间的优化:按照优化好的抗原包被浓度和血清稀释倍数的最佳条

件进行封闭浓度和封闭时间的优化。固定其他试验条件，用1％的BSA(牛血清白蛋白)封闭20min、30min、45min、60min、75min，按ELISA常规步骤操作，用酶标仪读数，绘制成折线图，比较OD_{630}处P/N(阳性血清/阴性血清)值的大小，选择P/N值最大处对应的封闭浓度和封闭时间作为最佳条件。

[0069] (3)血清最佳作用时间的优化：按照上述确定好的条件，固定其他试验条件，加入血清后分别作用30min、45min、60min、75min，按ELISA常规步骤操作，根据P/N值大小选择血清作用时间。

[0070] (4)二抗最佳作用浓度及时间的优化：按照上述确定好的条件，固定其他试验条件，将酶标二抗分别按1:2000、1:4000、1:8000、1:16000的比例稀释，按ELISA常规步骤操作，根据P/N值大小选择二抗作用浓度。同理，固定其他试验条件，加入酶标二抗后分别作用30min、45min、60min、75min，按ELISA常规步骤操作，根据P/N值大小选择二抗作用时间。

[0071] (5)底物最佳作用时间的优化固定其他试验条件，分别使底物作用5min、7.5min、10min、12.5min，按ELISA常规步骤操作，根据P/N值大小选择底物作用时间。

[0072] 最终确定检测方法如下：

[0073] 1)用稀释液将GPI32-WH蛋白稀释至终浓度为2μg/mL，包被酶标板；

[0074] 2)用封闭液封闭酶标板(最佳封闭时间为30min)；

[0075] 3)用稀释液将犬血清稀释200倍后加入酶标板，37℃孵育1h；

[0076] 4)用稀释液将HRP标记的山羊抗犬IgG稀释8000倍后加入酶标板，37℃孵育60min；

[0077] 5)加入显色液，室温避光显色10min，最后加入氢氟酸终止反应，在630nm波长处读数。

[0078] 2.检测试剂盒阴阳临界值的确定

[0079] 将实验室保存的确定为犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体阴性的85份犬血清样品，同时设标准阳性对照及阴性对照，经多次重复检测OD_{630}值，最终确定本方法的阴阳性临界值为0.21，即S(样本OD_{630}值)/P≥0.21即可判为阳性；反之为阴性。

[0080] 详细操作步骤如下：

[0081] 用碳酸盐包被缓冲液(pH 9.6)稀释GPI32-WH蛋白至终浓度为2μg/mL，包被酶标板，4℃过夜。每孔用200ul PBS-T(0.01mol/L PBS，0.05％Tween-20，pH 7.4)洗涤缓冲液洗涤3次，用配制的1％的BSA(牛血清白蛋白)37℃封闭30min。将犬血清用0.1％的BSA按1:200稀释后每孔加入100uL，每个样品设3个重复，并在37℃孵育60min。然后用PBS-T(0.01mol/L PBS，0.05％Tween-20，pH 7.4)洗涤缓冲液洗涤3次，将按1:8000稀释的HRP标记的山羊抗犬IgG以100ul/每孔加入，37℃孵育60min。每孔加入100uL显色液(底物缓冲液：TMB母液＝1:19，0.2uL/mL 30％过氧化氢)，室温避光显色10min。最后每孔加入50uL 0.25％的氢氟酸终止反应，在630nm波长处读数。若样本S(样本$OD_{630值}$)/P(阳性血清$OD_{630值}$)≥0.21则判为阳性；反之，则判为阴性。

[0082] 实施例3：犬吉氏巴贝斯虫间接ELISA检测方法敏感性试验和特异性试验

[0083] 按照实施例2的方法对5份阳性血清各作1:25、1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200稀释进行检测，并设阳性、阴性、空白对照。结果见表1。结果显示本发明所建的ELISA检测方法敏感性大于1:800。用建立的方法对犬弓形虫阳性血清、狂犬病毒阳性血清、犬粪类圆线虫阳性血清、犬巴贝斯虫阳性血清进行检测。若样本S(样本$OD_{630值}$)/P(阳性

血清$OD_{630值}$)≥0.21则判为阳性;反之,则判为阴性。结果见表2。结果显示本方法特异性良好,不与犬弓形虫阳性血清、狂犬病毒阳性血清、犬粪类圆线虫线虫阳性血清发生交叉反应,但是能与犬巴贝斯虫阳性血清发生交叉反应,说明本发明提供的蛋白及建立的检测方法能同时用于犬吉氏巴贝斯虫和犬巴贝斯虫的特异性检测。

[0084] 表1敏感性试验结果

[0085]

稀释倍数	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
血清1(S/P)	1.030	0.998	0.959	0.855	0.689	0.561	0.396	0.264
血清2(S/P)	0.986	0.937	0.882	0.744	0.743	0.584	0.383	0.256
血清3(S/P)	1.096	1.053	1.025	0.970	0.787	0.636	0.437	0.269
血清4(S/P)	1.081	1.063	1.042	0.988	0.969	0.923	0.830	0.720
血清5(S/P)	1.017	1.007	0.976	0.919	0.810	0.625	0.438	0.274

[0086] 表2特异性试验结果

[0087]

类别	犬弓形虫	狂犬病毒	犬粪类圆线虫	犬巴贝斯虫
S/P值	0.083	0.075	0.176	0.436
有无交叉反应	无	无	无	有

[0088] 实施例4:吉氏巴贝斯虫间接ELISA检测方法重复性试验

[0089] 重复性试验包括批内和批间重复试验。批内重复试验采用同一批次包被的酶标板,分别在五个不同时间对犬吉氏巴贝斯虫3份阳性血清和2份阴性血清按照已经优化好的条件进行检测,并计算其平均值、标准差和变异系数。结果见表3。批间重复试验分别取五个批次包被的酶标板在同一时间对3份阳性血清和2份阴性血清按照已经优化好的条件进行检测,并计算其平均值、标准差和变异系数。结果见表4。从试验结果可以看出,批内重复试验变异系数和批间重复试验变异系数均小于10%,说明重复性良好。

[0090] 表3 BgGPI32-WH批内重复试验结果

[0091]

	OD_{630}值						SD	CV%
	1	2	3	4	5	x		
血清 1	1.112	1.115	1.122	1.130	1.142	1.124	0.012	1.07
血清 2	1.050	1.043	1.046	1.037	1.057	1.046	0.007	0.669
血清 3	0.592	0.611	0.623	0.588	0.604	0.603	0.014	2.32
血清 4	0.132	0.136	0.144	0.135	0.133	0.136	0.005	3.68
血清 5	0.200	0.211	0.211	0.206	0.211	0.208	0.005	2.40

[0092] 表4 BgGPI32-WH批间重复试验结果

[0093]

	OD_{630}值						SD	CV%
	1	2	3	4	5	x		
血清 1	0.973	0.974	0.968	0.963	0.998	0.970	0.019	1.959
血清 2	0.962	0.954	0.937	0.941	0.963	0.951	0.012	1.262
血清 3	0.473	0.482	0.477	0.465	0.498	0.479	0.012	2.505
血清 4	0.194	0.217	0.235	0.233	0.220	0.220	0.016	7.472
血清 5	0.103	0.089	0.097	0.094	0.099	0.096	0.005	5.469

序列表

<110> 华中农业大学

<120> 一种犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白及其应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 977

<212> DNA

<213> 吉氏巴贝斯虫(Babesia gibsoni)

<400> 1

atgaagctct ttcatgcatt cctgctttcc ccaatcgcct tttccgttgt gagtgcaaat 60
gaaggtggcc aaggtaatct taggactgca gatgtccccc caaacccggt acatccaggt 120
cttgctacct ttagacaaca actagagttt tttaagaagt taaatgaggt atttgctgga 180
aatgaggaac aatataagaa ggtgcttgaa caggctccaa attacaatgc tgaagccttc 240
aaagacgttt ggggtcagtt gaaggatggt gttggtaagg ttgctgagct gcatcctctt 300
ttggttctcc ctaagtatgc tccaagaaat ggtaagtttg ttttttattc cttcaaagtt 360
ttttagatgc cgttcaaaca gtttttaata tatttgaaat agtggcagat gcggcatctg 420
acgcgcttag tgtcgctgat aaggctgtca aaactgctgc tggtatggac gttaagaagg 480
atgtgatgta taacgtgacc gttgaaacag ctggccttct atttgggttc ctacctgagt 540
tctttgaaaa acttttggag ttcaaaaagg tggttgagga tgcgtatgcc gctgaatccc 600
aagttgatgg tggtaagtta ttcacacgac ttggtcacag tccagttgat cctttcttga 660
agaagcacgg atttggcccc gccgaggtaa aaggtgatac tcctttagaa accttgaaga 720
caaagcttga agatatggtt ggtgctgata agccttttgc gaaggtcttg tgcgccctta 780
ctccacaggt aaatgaggtt caagtcggga ataccgtcga gggtacccag aaagcagcag 840
cagcagcaga agcagctaca caagccgcag ctaccccagc taaggaagga gcgaaaggcc 900
aaggtgaaga tggtgcacaa tttaatggtg ttggtatggc catggtcttt gtttctgttg 960
ctgtcgctgt attttaa 977

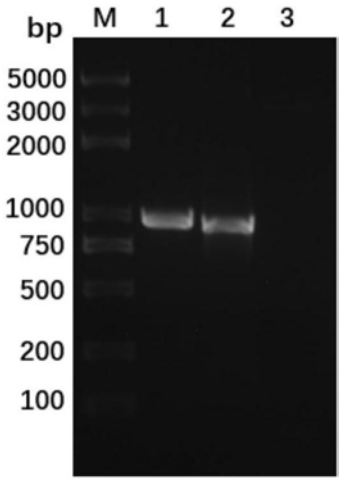

bp
M
1
2
3
5000
3000
2000
1000
750
500
200
100

图1

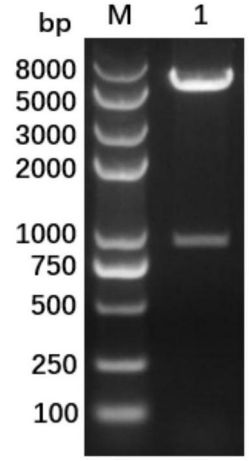

bp
M
1
8000
5000
3000
2000
1000
750
500
250
100

图2

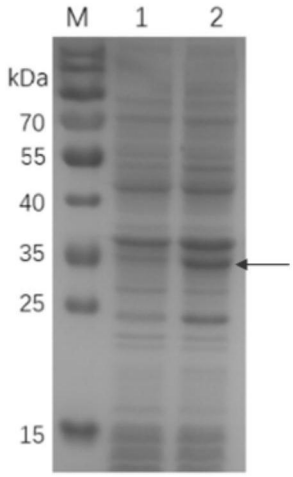
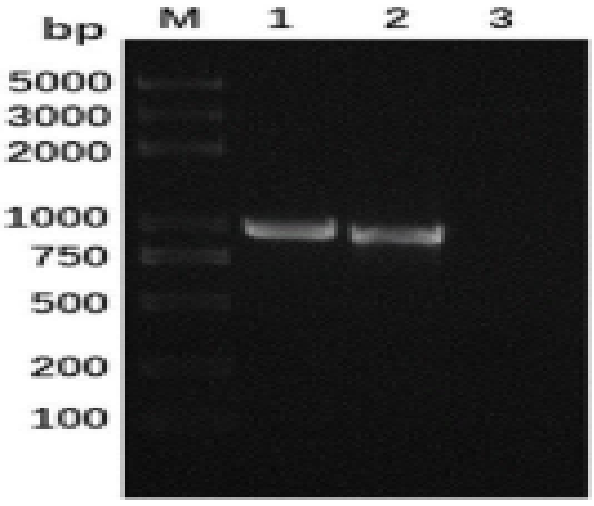

M
1
2
kDa
70
55
40
35
25
15

图3

专利名称(译)	一种犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白及其应用		
公开(公告)号	CN110229827A	公开(公告)日	2019-09-13
申请号	CN201910439971.9	申请日	2019-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	贺兰 敖阳思琦 战雪燕 喻龙 聂政 崔杰 刘琴 赵俊龙		
发明人	贺兰 敖阳思琦 战雪燕 喻龙 聂政 崔杰 刘琴 赵俊龙		
IPC分类号	C12N15/30 G01N33/68 G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	C07K14/44 G01N33/531 G01N33/56905 G01N33/6854 G01N2333/44 G01N2469/20		
代理人(译)	徐绍新		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种犬吉氏巴贝斯虫表面蛋白GPI32-WH，编码所述蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO：1所示，本发明还公开了所述表面蛋白在制备犬吉氏巴贝斯虫和犬巴贝斯虫检测试剂盒中的应用以及一种检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体的酶联免疫方法，该方法用于检测犬吉氏巴贝斯虫IgG抗体具有灵敏度高、特异性好、快速简便等优点，同时该方法还具有检测范围广的优点，可以实现多种病原IgG抗体的特异性检测。