



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109369796 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201811127705.4

(22)申请日 2018.09.27

(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 申邦 李迎迎 赵俊龙 周艳琴
方瑞 贺兰 王敏 侯伦 李明俊

(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.

C07K 14/45(2006.01)

C12N 15/30(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

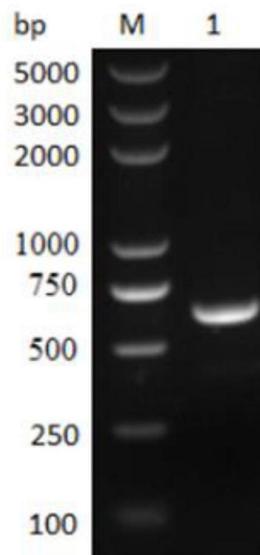
权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法

(57)摘要

本发明公开了一种弓形虫致密颗粒蛋白GRA1,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致密颗粒蛋白GRA1在制备羊弓形虫病酶联免疫检测试剂盒中的应用以及一种检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法,该方法用于检测弓形虫病具有灵敏度高、特异性强、准确性好、快速简便等优点。



1. 弓形虫致密颗粒蛋白GRA1, 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所述的弓形虫致密颗粒蛋白GRA1在制备羊弓形虫病酶联免疫检测试剂盒中的应用。
3. 一种检测羊弓形虫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所述的弓形虫致密颗粒蛋白GRA1稀释后包被酶标板;
 - 2) 用封闭液封闭酶标板;
 - 3) 将山羊血清稀释后加入酶标板, 37℃孵育1h;
 - 4) 将HRP标记的兔抗羊IgG稀释后加入酶标板, 37℃孵育45min;
 - 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。
4. 如权利要求3所述检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法, 其特征在于: 所述GRA1蛋白稀释后的终浓度为1.25μg/mL。
5. 如权利要求3所述检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法, 其特征在于: 所述山羊血清稀释的倍数为体积的100倍。
6. 如权利要求3所述检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法, 其特征在于: 所述HRP标记的兔抗羊IgG稀释的倍数为体积5000倍。
7. 如权利要求3所述检测羊弓形虫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。

一种检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法(ELISA),本发明还涉及一种能与羊弓形虫IgG抗体特异性反应的弓形虫致密颗粒蛋白GRA1。

技术背景

[0002] 弓形虫是一种在世界范围内广泛分布的人兽共患寄生原虫,可以引起人和多种动物患病,据估计,全球约有1/3的人感染弓形虫。在动物中,猪的感染率最高,一般在20%以上,有的养殖场甚至高达100%。羊是除小鼠以外对弓形虫最敏感的动物,羊感染弓形虫后容易引起流产、死胎、弱胎等,在有些国家,高达20%的羊流产是由弓形虫感染所导致的,给畜牧业带来了很大的损失。在中国,羊群平均感染率在10%左右,而在北部和西北部达到了20%或更高。目前国际上虽然有一个针对羊弓形虫病的疫苗,但安全风险较大,没有被大范围使用。

[0003] 由于弓形虫感染不同的动物其基因表达情况有差异,不同动物对弓形虫感染的免疫应答强度也不一,而且弓形虫感染没有特征性的临床症状用于鉴别,国内也没有任何检测标准和产品,所以弓形虫病的诊断显得尤为困难,特别是对孕畜来讲。目前检测弓形虫病的主要方法有病原学检测、分子生物学检测和血清学方法。病原学检测是从分离的病料中检测卵囊或滋养体,此方法准确可靠,但耗时费力,检出率低且不宜进行大规模检查。分子生物学方法主要包括PCR,灵敏、特异,是实验室弓形虫病诊断的重要手段。血清学方法是利用免疫学反应检测弓形虫抗体或抗原,主要分为LAT(乳胶凝集试验)、IHA(间接血凝试验)、IFA(间接免疫荧光试验)、ELISA(酶联免疫吸附试验)等。其中ELISA方法敏感性高、特异性高,易实现自动化操作,快速简便,对操作者无特殊要求,可以在短时间内可以处理大量样品,适用于现场调查和推广,因此受到广泛的关注。

发明内容

[0004] 本发明的目的是建立一种检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法,本发明的另一目的是提供一种能与羊弓形虫IgG抗体特异性反应的弓形虫致密颗粒蛋白GRA1。

[0005] 本发明的具体方案包括以下步骤:

[0006] 提取弓形虫虫体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,用同源重组的方法将GRA1-CDs片段连接到pE-SUMO载体上,经酶切鉴定测序验证无误后,将构建的pE-SUMO-GRA1质粒转到大肠杆菌BL21(DE3)中用于表达。将pE-SUMO-GRA1表达菌株扩大培养,分离、纯化后得到弓形虫致密颗粒蛋白GRA1,编码所述蛋白的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 该蛋白可用于制备羊弓形虫病酶联免疫检测试剂盒或用于羊弓形虫IgG抗体的非诊断目的酶联免疫检测。

[0008] 将致密颗粒蛋白GRA1作为候选抗原优化ELISA的各项条件,得到检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法,该方法包括以下步骤:

- [0009] 1) 将弓形虫致密颗粒蛋白GRA1稀释后包被酶标板;
- [0010] 2) 用封闭液封闭酶标板;
- [0011] 3) 将山羊血清稀释后加入酶标板,37℃孵育1h;
- [0012] 4) 将HRP标记的兔抗羊IgG稀释后加入酶标板,37℃孵育45min;
- [0013] 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。
- [0014] 优选地,所述GRA1蛋白稀释后的终浓度为1.25μg/mL。
- [0015] 优选地,所述山羊血清稀释的倍数为体积的100倍。
- [0016] 优选地,所述HRP标记的兔抗羊IgG稀释的倍数为体积5000倍。
- [0017] 优选地,所述显色反应的时间为10min。
- [0018] 本发明的有益效果是:
- [0019] 本发明成功建立了针对羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法,与其它检测方法相比本发明有以下优点:
- [0020] 1. 本方法灵敏度高:结果显示本发明所建的GRA1-iELISA诊断方法敏感性大于1:100,符合现场检测的需求。
- [0021] 2. 本方法特异性良好:本方法不与羊莫氏巴贝斯虫、吕氏泰勒虫、捻转血毛线虫发生交叉反应。
- [0022] 3. 本方法快速简便: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。
- [0023] 4. 本方法检测结果简单:直接根据读数大小(比值)就可定性判断为羊弓形虫阳性/阴性。

附图说明

- [0024] 图1是本发明弓形虫GRA1编码序列的PCR扩增结果,图中:泳道M:DNA分子质量标准;1:GRA1编码序列扩增产物。
- [0025] 图2是本发明pE-SUMO的PCR扩增结果,图中:泳道M:DNA分子质量标准;1:pE-SUMO载体扩增产物。
- [0026] 图3是本发明重组质粒pE-SUMO-GRA1的鉴定结果,图中:泳道M:蛋白标准品;1:pE-SUMO-GRA1质粒酶切产物。
- [0027] 图4图是本发明pE-SUMO-GRA1表达产物的SDS-PAGE分析结果,图中:泳道M:蛋白质质量标准;1:诱导His-GRA1;2:未诱导His-GRA1。

具体实施方式

- [0028] 实施例1:致密颗粒蛋白GRA1的制备
- [0029] 提取弓形虫虫体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,用同源重组的方法将GRA1-CDs片段连接到pE-SUMO载体上,经酶切鉴定测序验证无误后,将构建的pE-SUMO-GRA1质粒转到大肠杆菌BL21(DE3)中用于表达。
- [0030] 1. GRA1目的片段的获得
- [0031] (1) 弓形虫RNA的提取

[0032] 将收集的虫体离心,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200 μ L氯仿/mL Trizol加入氯仿,用力振荡15sec,室温静置2~3min;4 $^{\circ}$ C,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 $^{\circ}$ C,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 $^{\circ}$ C,7500rpm离心5min,尽量弃去上清,在超净台中风干;加入30 μ L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) 弓形虫cDNA的制备

[0034] 根据需要取0.1ng~5 μ g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~5 μ g

[0037] Oligo (dT) 18 1 μ L

[0038] 无核酸酶的高纯水 补至12 μ L

[0039] 在PCR仪中65 $^{\circ}$ C反应5min,冰上冷却。将下列组分按照顺序加入:

5 \times Reaction Buffer 4 μ L

RiboLockTM RNA 酶抑制剂 1 μ L

10 mM dNTP Mix 2 μ L

[0040] RevertAidTM M-MuLV 逆转录酶 1 μ L

步骤一产物 12 μ L

总体积 20 μ L

[0041] 在PCR仪中42 $^{\circ}$ C60min,70 $^{\circ}$ C5min,产物-20 $^{\circ}$ C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GRA1-F (CCGGTGGTGGTGGTGAATTCATGGCAGACCAGCTGAC)、GRA1-R (CAGTCACGATGAATTAAGCTTTTACTTTGCCATCATCATTTTAACG),通过PCR扩增,获得大小为579bp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。根据商业化pE-SUMO质粒的序列,利用clonmanager软件设计扩增pE-SUMO载体的上游引物SUMO-F和下游引物SUMO-R。以pE-SUMO质粒为模板,PCR扩增获得5727bp大小的条带,与预期一致,结果见图2,用凝胶回收试剂盒回收该片段。

[0044] PCR反应体系如下:

	模板	1 ug	
	上游引物	1 μ L	
	下游引物	1 μ L	
[0045]	5 \times KD plus buffer	10 μ L	
	2.5 mM dNTPs	4 μ L	
	KD plus DNA 聚合酶	1.0 μ L	
	灭菌水	补足 50 μ L	
[0046]	PCR反应条件如下:		
	95 $^{\circ}$ C 预变性	2~5 min	
	95 $^{\circ}$ C 变性	30 sec	} 30 个循环
[0047]	56~60 $^{\circ}$ C 退火	30 sec	
	68 $^{\circ}$ C 延伸	1kb/min	
	68 $^{\circ}$ C 彻底延伸	10 min	
	15 $^{\circ}$ C 冷却	15min	

[0048] (4) 目的片段回收

[0049] 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 $^{\circ}$ C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650 μ L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 $^{\circ}$ C预热的10~30 μ L灭菌水,室温静置5~10min,12000rpm室温离心2min,收集流出液体,-20 $^{\circ}$ C保存。

[0050] 2. pE-SUMO-GR1质粒的构建

[0051] 利用同源重组的方法,将GR1-CDS片段和pE-SUMO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DH5 α 中,将转化产物涂于带有氨苄抗性的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4094bp和2212bp的条带,该结果与预期一致,说明构建的pE-SUMO-GR1质粒的完整性,结果见图3。将经过酶切验证的质粒pE-SUMO-GR1中的GR1-CDS进行测序,测序结果与数据库中的GR1基因的CDS进行比对,二者可以完全匹配,没有出现移码或者突变的碱基,该结果证明重组表达质粒pE-SUMO-GR1构建成功。

[0052] (1) 同源重组构建质粒

[0053] 按照诺唯赞多片段克隆试剂盒说明进行操作,根据说明书中的体系配置:

	5×CE MultiS buffer	4 μL
[0054]	线性化克隆载体	x ng
	插入片段扩增产物	x ng
	ExnaseTMMultis	2 μL
[0055]	灭菌水	补至 20 μL

[0056] 将上述液体混匀后,PCR仪中37℃反应30min,冰浴5min后做转化。

[0057] 每片段最适使用量 = $[0.02 \times \text{片段碱基对数}] \text{ng}$ (0.03pmol)。

[0058] (2) 连接产物转化

[0059] 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90sec,迅速取出,冰浴2min;

[0060] 加入400μL无抗生素LB液体培养基,37℃180rpm复苏培养60min;取300μL涂布于相应的LB平板上,倒置于37℃培养10~12h。

[0061] 3. 致密颗粒蛋白GRA1的表达和纯化

[0062] 将上述构建成功的原核表达质粒pE-SUMO-GRA1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氨苄抗性的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4h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4。结果发现,与未诱导组相比,诱导组在38kDa处有一条较粗的蛋白条带,说明重组质粒pE-SUMO-GRA1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SUMO-GRA1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,该分析结果表明,与包涵体样品相比,绝大多数的SUMO-GRA1表达在上清。

[0063] 将pE-SUMO-GRA1表达菌株扩大培养,加入终浓度为1.0mM的诱导剂(IPTG)37℃诱导4h,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标签的亲层析柱结合过夜,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。

[0064] 实施例2:建立快速准确的羊弓形虫病现场诊断方法(GRA1-iELISA)

[0065] 1. (1) 抗原包被浓度和血清稀释倍数的确定:将GRA1蛋白分别按5μg/mL、2.5μg/mL、1.25μg/mL、0.625μg/mL、0.3125μg/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1:25、1:50、1:100、1:200、1:400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OD₆₃₀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值最大处对应的抗原包被浓度和血清稀释倍数作为最佳条件。

[0066] (2) 最佳封闭浓度和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,分别用0.5%、1%、1.5%、2%的BSA(牛血清白蛋白)封闭20min、30min、45min、60min,按ELISA常规步骤操作,用酶标仪读数,绘制成折线图,比较OD₆₃₀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。

[0067] (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。

[0068] (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1:3000、1:4000、1:5000、1:6000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。

[0069] (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。

[0070] 最终确定检测方法如下:

[0071] 1) 用稀释液将GRA1蛋白稀释至终浓度为1.25 μ g/mL,包被酶标板;

[0072] 2) 用封闭液封闭酶标板(最佳封闭时间为30min);

[0073] 3) 用稀释液将山羊血清稀释100倍后加入酶标板,37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0074] 4) 用稀释液将HRP标记的兔抗羊IgG稀释5000倍后加入酶标板,37 $^{\circ}$ C孵育45min;

[0075] 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。

[0076] 2. 羊弓形虫间接ELISA检测试剂盒阴阳临界值的确定

[0077] 检测经间接免疫荧光(IFA)检测为羊弓形虫IgG抗体阴性的40份山羊血清样品,同时设标准阳性对照及阴性对照,经多次重复检测OD₆₃₀值,最终确定本方法的阴阳性临界值判定标准如下:

[0078] 阳性对照平均OD值(PC):大于0.7;

[0079] 阴性对照平均OD值(NC):小于0.3;

[0080] Cut-off值计算方法:平均值(X)+3标准差(SD)

[0081] 阴阳性界线判定标准:

[0082] S(样本OD₆₃₀值) \geq 0.324且S/N \geq 2.3即可判为阳性;反之为阴性。

[0083] 结果见表1。

[0084] 表1临界点判定结果

[0085]

		OD ₆₃₀ 值									
		0.239	0.126	0.178	0.217	0.215	0.156	0.164	0.2	0.249	0.193
1-40		0.244	0.173	0.222	0.15	0.25	0.129	0.236	0.217	0.252	0.253
		0.149	0.145	0.24	0.114	0.122	0.11	0.161	0.135	0.27	0.11
		0.204	0.123	0.175	0.118	0.156	0.136	0.137	0.133	0.122	0.143
								0.324249619			
		0.17665 (X)			0.049199873 (SD)			(X+3SD)			

[0086] 详细操作步骤如下:

[0087] 用碳酸盐包被缓冲液 (pH 9.6) 稀释GRA1蛋白至终浓度为1.25 μ g/mL,包被酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜。每孔用200 μ l 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 $^{\circ}$ C封闭30min。将山羊血清用0.1%的BSA按1:100稀释后每孔加入100 μ L,每个样品设3个重复,并在37 $^{\circ}$ C孵育1h。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1:5000稀释的HRP标记的兔抗羊IgG以100 μ l/每孔加入,37 $^{\circ}$ C孵育45min。每孔加入100 μ L显色液 (底物缓冲液:TMB母液=1:19,0.2 μ L/mL 30%过氧化氢),室温避光显色10min。最后每孔加入50 μ L0.25%的氢氟酸终止反应,在630nm波长处读数。若样本OD_{630值} \geq 0.324且S (样本OD_{630值})/N (阴性血清OD_{630值}) \geq 2.3则判为阳性;反之,则判为阴性。

[0088] 实施例3:羊弓形虫间接ELISA检测方法敏感性试验和特异性试验

[0089] 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稀释进行检测,并设阳性、阴性、空白对照。结果见表2。结果显示本发明所建的GRA1-iELISA诊断方法敏感性大于1:100。用建立的方法对山羊无浆体阳性血清、山羊莫氏巴贝斯虫阳性血清、山羊吕氏泰勒虫阳性血清、捻转血矛线虫阳性血清进行检测。结果见表3。结果显示本方法特异性良好,不与羊莫氏巴贝斯虫、吕氏泰勒虫、捻转血毛线虫发生交叉反应。

[0090] 表2敏感性试验结果

[0091]

稀释倍数	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
血清1	1.219	1.138	1.099	0.993	0.943	0.887	0.729
血清2	0.737	0.56	0.493	0.316	0.172	0.115	0.078
血清3	1.102	0.899	0.864	0.696	0.464	0.291	0.162
血清4	0.833	0.68	0.562	0.38	0.211	0.128	0.089
血清5	1.22	1.088	1.099	0.998	0.902	0.838	0.675

[0092] 表3特异性试验结果

[0093]

类别	羊无浆体	羊莫氏巴贝斯虫	羊吕氏泰勒虫	羊捻转血矛线虫
OD ₆₃₀ 值	0.376	0.254	0.305	0.173
有无交叉反应	有	无	无	无

[0094] 实施例4:羊弓形虫间接ELISA检测方法重复性试验

[0095] 重复性试验包括批内重复试验和批间重复试验。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。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5。从试验结果可以看出,批内重复试验变异系数小于10%,说明重复性良好;批间重复试验变异系数小于10%,说明重复性良好。

[0096] 表4批内重复试验结果

[0097]

	OD ₆₃₀ 值						SD	CV%
	1	2	3	4	5	x		
血清 1	1.107	1.094	1.114	1.143	1.151	1.122	0.022	1.93%
血清 2	0.93	0.941	0.983	0.959	0.969	0.956	0.019	1.99%
血清 3	1.041	1.04	1.102	1.103	1.091	1.075	0.029	2.68%
血清 4	0.191	0.178	0.162	0.182	0.163	0.175	0.011	6.39%
血清 5	0.218	0.192	0.21	0.214	0.223	0.211	0.011	5.02%

[0098] 表5批间重复试验结果

[0099]

	OD ₆₃₀ 值						SD	CV%
	1	2	3	4	5	x		
血清 1	1.09	1.041	1.049	1.047	1.017	1.049	0.024	2.25%
血清 2	0.802	0.745	0.755	0.776	0.721	0.760	0.028	3.62%
血清 3	1.073	1.051	1.068	1.032	1.061	1.057	0.015	1.37%
血清 4	0.152	0.152	0.151	0.162	0.163	0.156	0.005	3.42%
血清 5	0.117	0.129	0.119	0.118	0.128	0.122	0.005	4.25%

序列表

<110>	华中农业大学	
<120>	一种检测羊弓形虫IgG抗体的酶联免疫方法	
<160>	1	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	570	
<212>	DNA	
<213>	弓形虫 (<i>Toxoplasma gondii</i>)	
<400>	1	
	atggtgcgtg tgagcgctat tgtcggagct gctgcatcgg tgttcgtgtg cctgtctgcc	60
	ggcgcttacg ctgccgaagg cggcgacaac cagtcgagcg ccgtctcaga tcgggcgtct	120
	ctctttgggt tgctgagtgagg agggacaggg cagggattag gaatcggaga atctgtagat	180
	ttggagatga tggggaacac gtatcgtgtg gagagacca caggcaacc ggacttgctc	240
	aagatcgcca ttaaagcttc agatggatcg tacagcgaag tcggcaatgt taacgtggag	300
	gaggtgattg atactatgaa aagcatgcag agggacgagg acattttcct tcgtgcgttg	360
	aacaaaggcg aaacagtaga ggaagcgatc gaagacgtgg ctcaagcaga agggcttaat	420
	tcggagcaaa ccctgcaact ggaagatgca gtgagcgcgg tggcgtctgt tgttcaagac	480
	gagatgaagg tgatcgacga tgtgcagcag cttgaaaagg acaacaaca gcttaaggat	540
	gacattgggt tcctaacagg agagagagag	570

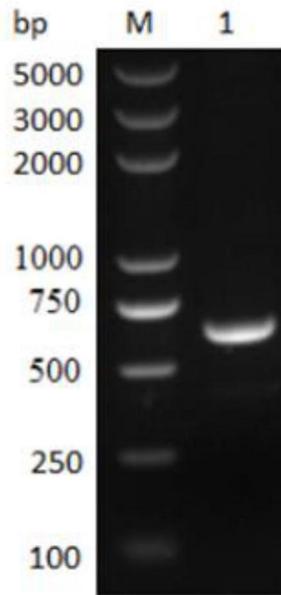


图1

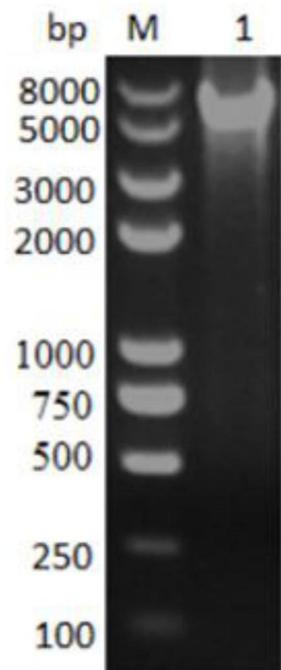


图2

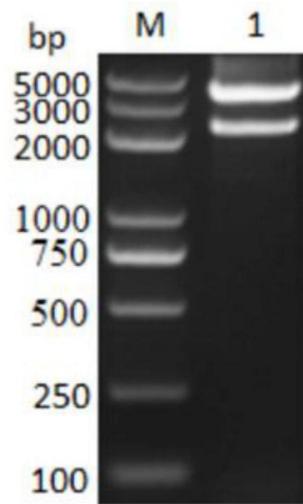


图3

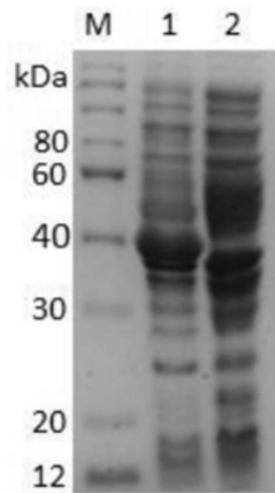


图4