



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110514832 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201910854231.1

(22)申请日 2019.09.10

(71)申请人 广西大学

地址 530003 广西壮族自治区南宁市西乡塘区大学东路100号

(72)发明人 张为宇 侯林静 吴文德 靳纬坤 吴正姣

(74)专利代理机构 北京天奇智新知识产权代理有限公司 11340

代理人 韦莎

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/96(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

C07K 1/14(2006.01)

C12N 9/64(2006.01)

C07K 14/78(2006.01)

C07K 14/435(2006.01)

C12N 9/08(2006.01)

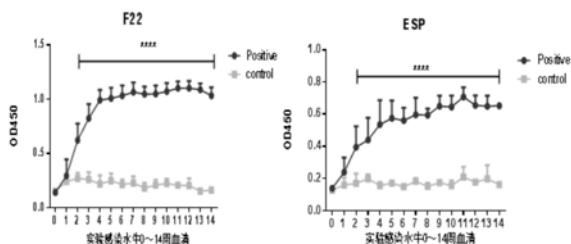
权利要求书1页 说明书16页 附图5页

## (54)发明名称

大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原的制备方法与应用

## (57)摘要

本发明提供大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原的制备方法与应用,一种大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原有效成分的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:(1)大片形吸虫分泌排泄产物制备;(2)层析组分收集;(3)层析组分的筛选。本发明还提供一种检测/辅助大片形吸虫病的试剂盒,所述试剂盒含有权利要求1所述的F22层析组分。本发明还涉及含有诊断抗原在检测/辅助水牛大片形吸虫病早期诊断中的应用。本发明筛选出的F22层析组分作为大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原具有检测快速、操作简便、易于判定等优点,能够为水牛大片形吸虫的检测提供实用有效的方法。



1. 一种大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 大片形吸虫分泌排泄产物制备:采集感染大片形吸虫的水牛胆囊,收集胆囊中的大片形吸虫,用1×PBS缓冲液进行虫体培养,将培养液进行离心处理,取上清,得到大片形吸虫分泌排泄产物,将收集的所有批次大片形吸虫分泌排泄产物混合,将蛋白冻干浓缩,用于层析;

(2) 层析组分收集:用蛋白质快速层析仪将50mg大片形吸虫分泌排泄产物以1mL/min收集流速,在UV280条件下,进行层析组分收集,每次层析收集96管层析组分,并依据收集顺序将收集到的层析组分分别命名为F1、F2.....F96,共进行5次层析,每次层析用5mL的冻干浓缩分泌排泄产物,浓度为10mg/ml,每次蛋白量为50mg,并将5次层析,标记序号对应的5管分别进行混合,冻干浓缩,由层析图分析,主要有3个峰,层析组分从第19管开始,第一个峰为第19管到第25管;

(3) 层析组分的筛选:采用间接ELISA方法,以大片形吸虫分泌排泄产物、层析第一个波峰及其附近不同层析组分作为抗原,用实验室保存4wpi,14wpi感染大片形吸虫水牛阳性血清与各层析组分反应,通过比较各个组分与血清反应的阳性平均值/阴性平均值高低筛选出4wpi阳性平均值/阴性平均值最高的F22层析组分;

所述间接ELISA方法的具体步骤如下:

a、包被:用0.05M的碳酸缓冲液将大片形吸虫分泌排泄产物抗原稀释至2.5μg/mL,1.0μg/mL,选取冻干浓缩后第一个波峰左右的层析组分F21-F33进行稀释为1μg/mL,F19,F20层析组分用BCA蛋白试剂盒未测出浓度,因此F19,F20层析组分浓度按10倍,50倍,100倍稀释,每孔加100μL,在37℃恒温箱孵育2.5h,4℃包被过夜;

b、封闭:用洗涤缓冲液PBST洗涤4次,150μL/孔,每次5min。加入1%明胶封闭液,每孔加150μL,在37℃恒温箱孵育2h;

c、血清:用洗涤缓冲液PBST洗涤4次,200μL/孔,每次5min。血清用PBST以1:400稀释后,每孔100μL,设3个重复孔,37℃恒温箱孵育1h;

d、酶标二抗:用洗涤缓冲液PBST将96孔板洗涤4次,200μL/孔,每次计时5min。将辣根过氧化物酶标记羊抗牛IgG,用PBST以1:40000稀释,每孔100μL,在37℃恒温箱孵育1h;

e、显色液:用洗涤缓冲液PBST将96孔板洗涤4次,200μL/孔,每次计时5min。避光加入显色液,每孔加入100μL,在37℃恒温箱孵育20min;

f、终止液:每孔加50μL,OD<sub>450nm</sub>处读取吸光值。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,在步骤(1)中,所述虫体培养的环境为37℃温度下进行培养。

3. 一种检测/辅助大片形吸虫病的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有权利要求1所述的F22层析组分。

4. 权利要求1所述的大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原在检测/辅助水牛大片形吸虫病早期诊断中的应用。

5. 权利要求1所述的大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原在辅助检测水牛血清IgG抗体中的应用。

## 大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原的制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种诊断抗原,具体涉及一种大片形吸虫分泌排泄产物 (*Fasciola gigantica* Excretory-Secretory Products, FgESP) 诊断抗原的制备方法及其含有该抗原的试剂盒与应用。

### 背景技术

[0002] 片形吸虫 (*Fasciola* spp.) 属于扁形动物门,吸虫纲,复殖目,片形科,片形属。片形属中以肝片形吸虫 (*Fasciola hepatica*) 和大片形吸虫 (*Fasciola gigantica*) 两种最为常见。

[0003] 大片形吸虫竹叶形,肩不明显,末端钝圆。体长25~50mm,体长与体宽3:1以上,腹吸盘约为口吸盘的1.5倍,睾丸分支复杂,占1/2,卵巢分支多。对大片形吸虫的成虫体被结构进行电镜观察,虫体体表有体棘,虫体可分为体被、肌层和细胞体层。片形吸虫生活史过程包括虫卵、毛蚴、胞蚴、雷蚴、尾蚴、囊蚴、童虫和成虫等阶段,中间宿主为椎实螺科的淡水螺,终宿主主要为牛、羊等动物,也可寄生于人体,成虫寄生在终宿主的肝脏和胆囊。寄生虫在完成生活史的过程中,会产生大量的产物,包括寄生虫代谢物,如腺体分泌物、消化道排泄物、幼虫蜕皮液等;寄生虫虫体物,如寄生虫发育过程脱落表膜、寄生虫死亡时的降解物等。片形吸虫排泄分泌排泄产物 (Excretory-Secretory Products, ESP) 含有很多寄生虫在宿主体内移行、定居、摄取营养和免疫逃避等起着重要作用的功能性蛋白分子,ESP组分在不同阶段的作用功能不一样。在片形吸虫与反刍动物的关系中,不同种的动物对片形吸虫易感性不同。

[0004] 片形吸虫病 (*Fascioliasis*) 是由片形吸虫主要寄生于反刍动物的肝脏、胆管,引起的人畜共患寄生虫病。肝片形吸虫主要流行于中国北部、欧洲、澳大利亚等温带地区,偶尔出现在北非、中美洲、南美洲和中东,大片形吸虫主要流行于中国南部、非洲、南亚等热带及亚热带地区,在亚洲和非洲部分地区两种吸虫均存在。

[0005] 片形吸虫病的诊断方法主要有病原学检查、临床诊断、分子生物学诊断、免疫学诊断等。免疫学诊断仍是目前诊断方法研究的重点。免疫诊断方法有变态反应、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、免疫胶体金滴渗法 (Dig-ELISA) 和生物素-亲和素酶联免疫吸附试验 (BA-ELISA) 等。血清学已经成为诊断片形吸虫最快、最有效的方法。ELISA技术因其灵敏、定量等特点在很大程度上取代了粪检、其他寄生虫检测。检测对象包括抗体和抗原;检测的抗原有关粪抗原、ES抗原、虫卵抗原、循环抗原等。检测的样品包括血清、血浆、血纸、粪便和牛奶等。

[0006] 常见的诊断抗原有ESP、肝片形吸虫的提取物半胱氨酸蛋白酶Fas1、Fas2、肝片形吸虫Cat L-1、大片形吸虫Cat L-3、大片形吸虫Cat L-1D、谷胱甘肽转移酶 (Glutathione S-transferase, GST)、SOD、MM3、CD59等。

[0007] 目前市场上还见到一些检测片形吸虫的试剂盒产品,应用酶联免疫检测片形吸虫血清中IgG抗体的试剂盒有CreativeDiagnostics公司生产的检测片形吸虫抗体的 *Fasciola* IgG ELISA Kit,ALPCO公司检测片形吸虫抗体的 *Fasciola hepatica* IgG ELISA

(20-FhGHU-E01), 价格为469美元/个、DRG公司检测片形吸虫抗体的Fasciola hepatica IgG ELISA (EIA-4503), 价格为470美元/个。Demeditec公司检测片形吸虫抗原的Fasciola hepatica Ag bovine试剂盒。国内张雪娟等利用Dot-ELISA反应原理建立了家畜肝片形吸虫病斑点酶标诊断技术, 并研制了斑点酶标诊断试剂盒, 经临床应用显示该诊断试剂盒具有敏感性高、特异性强、成本低和易操作等特点。国内研发的有关诊断片形吸虫的试剂盒较少, 且在早期诊断方面的应用需要更多的验证。目前很少有大片形吸虫诊断试剂盒, 2013年陈汉忠等报道研制了一种检测大片形吸虫抗原的双抗体夹心酶联免疫吸附测定试剂盒。

[0008] 广西地区的虫种主要为大片形吸虫, 其感染动物主要为水牛。水牛作为经济动物感染片形吸虫较为严重。目前片形吸虫检测的试剂盒较少且较为昂贵, 多为国外进口产品, 其是否适用于水牛大片形吸虫诊断尤其早期诊断还需要进一步验证。早期诊断抗原是大片形吸虫功能分子的一类, 国内对发掘新的有潜在诊断价值的抗原分子尤其能应用于早期诊断的抗原分子的研究相对较少。FgESP作为诊断抗原目前通常限于实验室研究使用, 其在早期诊断上效果还不够显著, 还需要深入发掘其有效组分以优化其诊断效果。

## 发明内容

[0009] 本发明的发明目的是, 针对上述问题, 提供了大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原的制备方法与应用, 从大片形吸虫分泌排泄产物 (Fasciola gigantica Excretory-Secretory Products, FgESP) 凝胶过滤层析组分中筛选出大片形吸虫病的诊断抗原, 并且通过研究发现能应用在大片形吸虫病早期诊断中, 且为大片形吸虫病的诊治及开发早期诊断试剂盒奠定基础。

[0010] 为达到上述目的, 本发明所采用的技术方案是:

[0011] 一种大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原的制备方法, 包括以下步骤:

[0012] (1) 大片形吸虫分泌排泄产物制备: 采集感染大片形吸虫的水牛胆囊, 收集胆囊中的大片形吸虫, 用1×PBS缓冲液进行虫体培养, 将培养液进行离心处理, 取上清, 得到大片形吸虫分泌排泄产物, 将收集的所有批次大片形吸虫分泌排泄产物混合, 将蛋白冻干浓缩, 用于层析;

[0013] (2) 层析组分收集: 用蛋白质快速层析仪将50mg大片形吸虫分泌排泄产物以1mL/min收集流速, 在UV280条件下, 进行层析组分收集, 每次层析收集96管层析组分, 并依据收集顺序将收集到的层析组分分别命名为F1、F2……F96, 共进行5次层析, 每次层析用5mL的冻干浓缩分泌排泄产物, 浓度为10mg/ml, 每次蛋白量为50mg, 并将5次层析, 标记序号对应的5管分别进行混合, 冻干浓缩, 由层析图分析, 主要有3个峰, 层析组分从第19管开始, 第一个峰为第19管到第25管;

[0014] (3) 层析组分的筛选: 采用间接ELISA方法, 以大片形吸虫分泌排泄产物、层析第一个波峰及其附近不同层析组分作为抗原, 用实验室保存4wpi, 14wpi感染大片形吸虫水牛阳性血清与各层析组分反应, 通过比较各个组分与血清反应的阳性平均值/阴性平均值高低筛选出4wpi阳性平均值/阴性平均值最高的F22层析组分;

[0015] 所述间接ELISA方法的具体步骤如下:

[0016] a、包被: 用0.05M的碳酸缓冲液将大片形吸虫分泌排泄产物抗原稀释至2.5μg/mL, 1.0μg/mL, 选取冻干浓缩后第一个波峰左右的层析组分F21-F33进行稀释为1μg/mL, F19,

F20层析组分用BCA蛋白试剂盒未测出浓度,F19,F20层析组分浓度按10倍,50倍,100倍稀释,每孔加100 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育2.5h,4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0017] b、封闭:用洗涤缓冲液PBST洗涤4次,150 $\mu$ L/孔,每次5min。加入1%明胶封闭液,每孔加150 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育2h;

[0018] c、血清:用洗涤缓冲液PBST洗涤4次,200 $\mu$ L/孔,每次5min。血清用PBST以1:400稀释后,每孔100 $\mu$ L,设3个重复孔,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育1h;

[0019] d、酶标二抗:用洗涤缓冲液PBST将96孔板洗涤4次,200 $\mu$ L/孔,每次计时5min。将辣根过氧化物酶标记羊抗牛IgG,用PBST以1:40000稀释,每孔100 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育1h;

[0020] e、显色液:用洗涤缓冲液PBST将96孔板洗涤4次,200 $\mu$ L/孔,每次计时5min。避光加入显色液,每孔加入100 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育20min;

[0021] f、终止液:每孔加50 $\mu$ L,OD<sub>450nm</sub>处读取吸光值。

[0022] 进一步说明,在步骤(1)中,所述虫体培养的环境为37 $^{\circ}$ C温度下进行培养。

[0023] 本发明还提供一种检测/辅助大片形吸虫病的试剂盒,所述试剂盒含有权利要求1所述的F22层析组分。

[0024] 本发明还提供所述的大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原在检测大片形吸虫病诊断中的应用。

[0025] 本发明还提供所述的大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原在辅助检测水牛大片形吸虫病早期诊断中的应用。

[0026] 本发明还提供所述的大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原在辅助检测水牛血清IgG抗体中的应用。

[0027] 由于采用上述技术方案,本发明具有以下有益效果:

[0028] 1、本发明经过研究发现的F22层析组分具有检测快速、操作简便、易于判定等优点,能够为水牛大片形吸虫的检测提供实用有效的方法。且本发明的方法对检测人员操作技术要求不高,且不需要特殊的仪器设备,适合在基层做推广使用。

[0029] 2、以F22层析组分为诊断抗原的间接ELISA方法,最优条件为抗原浓度0.157 $\mu$ g/mL,水牛血清稀释倍数为1:400,二抗稀释倍数为1:40000。应用于检测实验感染水牛血清准确率为100%。应用于检测自然感染奶牛血清,阳性检出率为50.43%高于常规实验室FgESP的检出率。

## 附图说明

[0030] 图1为标准蛋白回归曲线;

[0031] 图2为标准蛋白浓度回归曲线;

[0032] 图3为蛋白凝胶过滤层析图;

[0033] 图4为4wpi,14wpi I阳性水牛血清检测F19-F33层析组分;

[0034] 图5为层析组分F21、F22、F23与FgESP质谱成分韦恩图;

[0035] 图6为FgESP抗原与血清最佳工作浓度确定;

[0036] 图7为F22抗原与血清最佳工作浓度确定;

[0037] 图8为FgESP酶标二抗最佳工作浓度确定;

- [0038] 图9为F22酶标二抗最佳工作浓度确定；  
[0039] 图10为F22最佳显色时间确定；  
[0040] 图11为F22与FgESP检测0~14周水牛血清IgG抗体水平变化；  
[0041] 图12为F22与FgESP检测0~14周水牛血清IgG抗体水平差异；  
[0042] 图13为自然感染牛血清来源，注：★为样品采集地区。

## 具体实施方式

[0043] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0044] 实验：

[0045] 1.1大片形吸虫分泌排泄产物 (*Fasciola gigantica* Excretory-Secretory Products, FgESP) 制备

[0046] 1、器材准备：将需要器材提前高压灭菌，放入干燥箱烘干备用，用前将烘干器材放入超净台紫外灭菌30min，采虫前夜将1×PBS缓冲液放入37℃恒温箱。

[0047] 2、培养虫体：从南宁市广西大学周边的屠宰场采集感染大片形吸虫的水牛胆囊，收集胆囊中的大片形吸虫，用毛笔小心的挑选完整无损伤的虫体于平皿中，用PBS (提前放37℃) 洗3~4次，至虫体表面无明显胆汁，转移至超净台，挑取于100mm细胞培养皿，大虫体按2条/mL，小虫体按4条/mL的量加入0.22μm过滤的1×PBS缓冲液，在37℃培养0.5h弃去液体，挑用所有形态完整、活力良好、血或胆汁已从体内排净的片形吸虫于新的100mm细胞培养皿，重新加1×PBS缓冲液，37℃培养箱培养3h。

[0048] 3、离心分装：在超净台，将培养液吸入50mL离心管，4℃700g离心15min去除虫卵，虫体脱落物，再3000g离心30min，取上清，0.45μm滤器过滤，分装于EP管 (1~2mL/管) 用于测蛋白浓度，其余装于用50mL离心管，置于冰箱备用 (-80℃)，标记大小虫体培养液、制备时间等。

[0049] 4、虫体保存：取一部分虫体保存于冻存管 (提取RNA备用)，一部分保存于10%福尔马林 (免疫组化备用)，其余保存于75%酒精 (提取DNA备用)，做好标记用于后续实验。形状特别的虫体单独保存。

[0050] 5、FgESP冻干：按上述制备成虫FgESP；收集约1L，将收集的所有批次FgESP混合，将蛋白冻干浓缩，用于层析。

[0051] 冻干浓缩步骤如下：

[0052] (1) 将需要器材提前高压灭菌，放入干燥箱烘干备用，用前将烘干器材放入超净台紫外灭菌30min，并将西林瓶超声干烤以备用。

[0053] (2) 将混合后的FgESP用巴氏管按2.5mL分装于西林瓶中，半盖瓶盖，放于-80℃冻存1个小时，同时打开冻干机预冷1小时。

[0054] (3) 将西林瓶放入冻干机，冻干14h以上，至瓶中液体变成白色粉末。

[0055] (4) 取出西林瓶放入装满碎冰的泡沫盒中，将所有西林瓶中的粉末用少量的双蒸水溶解至10mL EP管，混匀，取出少量稀释40倍，测定浓度。

[0056] (5) 浓缩FgESP测定浓度后，用0.45μm的滤器过滤分装，一小部分浓缩FgESP用于

ELISA测定,剩下的用于凝胶过滤层析。

[0057] 2.1大片形吸虫层析组分制备及筛选

[0058] 2.1.1FgESP凝胶过滤层析

[0059] 1、样品、工作溶液准备:0.22 $\mu$ m滤器过滤的1 $\times$ PBS缓冲液,0.22 $\mu$ m滤器过滤的三蒸水,0.22 $\mu$ m滤器过滤的20%乙醇,0.45 $\mu$ m滤器过滤的FgESP,所有工作溶液和样品必须经过0.22 $\mu$ m或0.45 $\mu$ m的滤膜过滤。

[0060] 2、仪器准备:打开电脑电源,仪器主电源,待仪器自检完毕(主机控制面板白灯常亮),输入自己的大型仪器使用账号,双击桌面UNICORN图标,输入小写字母default,进入显示的四个界面,Administration、System control、Evaluation、Method Editor点System Control进入操作。

[0061] 3、清洗及管道准备:将管子(假如用A2管道)放入平衡缓冲液(需要用洗脱液用另一管子),在工具栏内的Manual,选execute manual Instructions→pump→pump A wash→A2→insert→execute。系统按20mL/min冲洗流路1min,洗完自动停止。

[0062] 4、设置参数、安装柱子及平衡

[0063] (1)Manual instructions→pump→selected column→type→system flow(根据柱子建议流速)→pressure control→pre column pressure→insert;

[0064] (2)flow path→column position→1(表示柱子为流通状态)→down flow→insert;

[0065] (3)monitor→wavelength→UV1 280nm(根据自己样品,本研究样品为蛋白)→insert;

[0066] (4)Alarms→alarms pre column pressure→high alarm(根据柱子建议)→insert;待连接柱子的管道流出液体后,将管路接入柱子的上端,稍拧紧后将柱子下端的堵头卸掉介入管道。平衡至少一个柱体积。

[0067] 5、注射样品:平衡完后,放收集管,之后准备上样(上样环),先用缓冲液洗上样环几次,然后用注射器吸取样品,推掉气泡,把样品推进去,不取下注射器,Manual instructions→flow path→injection valve→inject→insert;(如果用泵上样:将管子(假如用A1管道)放入样品,Manual instructions→flow path→A inlet→A1,insert,待样品上完Flow path→injectmark,insert,execute,在manual instructions选择flow path→A inlet→A2,使用平衡液继续洗柱子。

[0068] 6、洗脱:上样后用平衡缓冲液尽量将穿透峰洗回基线(如果有洗脱液:在manual instructions选择pump→gradient,按照自己设置梯度target(100%)和length)。

[0069] (1)Fraction collection→fractionation→fraction size(输入收集每管体积)→insert→execute;上样,收集所有波峰大概3h,可根据自己样品,减少时间。

[0070] (2)结束体积收集:fraction collection→stop fractionation→insert→execute。

[0071] 7、清洗:收集完样品,清洗通路(此时点By pass),将A2放入缓冲液,Manual instructions→pump→pump A wash→A2→insert→execute;如果时间长不用层析仪,再把A2放入20%乙醇,pump→pump A wash→A2→insert→execute。

[0072] 8、卸下柱子:Manual instructions→pump→system flow→insert→execute;给

系统慢流速,设置系统保护压力与层析柱压力保持一致,拆下柱子的下端接头,在滴水状态下将堵头拧上。再拆柱子上端接头,拧上上端堵头,层析柱也用20%乙醇封存。

[0073] 9、退出账号,提交使用情况,关AKTA电源,关电脑,拔掉插座。

[0074] 2.1.2层析组分收集

[0075] 制备成虫FgESP;按上述步骤用蛋白质快速层析仪将50mgFgESP (5mL,10mg/mL) 以1mL/min收集流速,在UV280条件下,进行层析组分收集,每管2mL,并依据收集顺序将收集到的层析组分分别命名为F1、F2.....Fn;共进行5次层析,蛋白量为250mg。并将5次层析,标记序号对应的5管分别进行混合,冻干浓缩。这次收集是在本实验室之前进行层析收集的基础上进一步改进。

[0076] 2.1.3间接ELISA筛选较优层析组分

[0077] 4wpi (weeks post infection)、14wpi水牛阳性血清:广西大学寄生虫实验室保存血清。

[0078] 间接ELISA方法建立

[0079] (1) 包被:用0.05M的碳酸缓冲液将FgESP抗原稀释至2.5 $\mu$ g/mL,1.0 $\mu$ g/mL,将F21~F33层析组分稀释为1 $\mu$ g/mL,F19,F20层析组分浓度按10倍,50倍,100倍稀释,每孔加100 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育2.5h,4 $^{\circ}$ C包被过夜。

[0080] (2) 封闭:用洗涤缓冲液PBST洗涤4次,150 $\mu$ L/孔,每次5min。加入1%明胶封闭液,每孔加150 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育2h。

[0081] (3) 血清:用洗涤缓冲液PBST洗涤4次,200 $\mu$ L/孔,每次5min。血清用PBST以1:400稀释后,每孔100 $\mu$ L,设3个重复孔,37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育1h。

[0082] (4) 酶标二抗:用洗涤缓冲液PBST将96孔板洗涤4次,200 $\mu$ L/孔,每次计时5min。将辣根过氧化物酶标记羊抗牛IgG,用PBST以1:40000稀释,每孔100 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育1h。

[0083] (5) 显色液:用洗涤缓冲液PBST将96孔板洗涤4次,200 $\mu$ L/孔,每次计时5min。避光加入显色液,每孔加入100 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C恒温箱孵育20min。

[0084] (6) 终止液:每孔加50 $\mu$ L,OD<sub>450nm</sub>处读取吸光值。

[0085] 3.1大片形吸虫分泌排泄产物及层析组分质谱

[0086] 将FgESP和筛选出的一些较优层析组分分别分装为100 $\mu$ g/管,用Q-Exactive质谱质谱联用仪进行质谱分析,鉴定蛋白成分。选用肝片形吸虫的库比对(ST\_Fasciola hepatica\_[6192]\_15305.fasta)。选取指标#Unique Peptides $\geq$ 2的蛋白进行分析,检测与Fasciola spp有关的蛋白个数。

[0087] 3.1.1蛋白提取和浓度测定

[0088] 1、蛋白裂解:沉淀加入适量Lysis Buffer(含8M Urea,2mM EDTA,10mM DTT,1% protease inhibitor cocktail),冰浴超声1~2min。

[0089] 2、丙酮沉淀:12000rpm(或16000g),4 $^{\circ}$ C离心10min,取上清液。向上清加入3倍体积预冷丙酮,-20 $^{\circ}$ C沉淀3h。

[0090] 3、风干:16000g,4 $^{\circ}$ C,离心5min,弃去丙酮,打开管盖通风橱风干5~10min使残留的丙酮挥发干净。

[0091] 4、复溶:加入适量Resolution Buffer(含8M Urea,100mM TEAB,pH 8.0)复溶蛋白沉淀块。



- [0092] 5、采用Bradford法对蛋白浓度进行测定。
- [0093] 3.1.2蛋白酶解
- [0094] 1、调平:根据定量结果,取50μg蛋白,进行组学实验。
- [0095] 2、还原:加入终浓度10mM DTT于37℃孵育60min,还原蛋白二硫键。
- [0096] 3、烷基化:加入终浓度25mM IAM室温孵育30min,烷化保护巯基基团。
- [0097] 4、稀释:用100mM TEAB稀释至Urea浓度低于2M后进行酶解。
- [0098] 5、酶解:根据质量比1:50加入trypsin,37℃酶解过夜。
- [0099] 6、二次酶解:根据质量比按1:100加入trypsin,37℃酶解4h。
- [0100] 3.1.3肽段脱盐
- [0101] 1、除盐:SPE Strata X (phenomenex) 脱盐柱除盐。步骤如下:
- [0102] (1) 活化1mL甲醇。
- [0103] (2) 平衡1mL水。
- [0104] (3) 上样0.5~1mL蛋白酶解液。
- [0105] (4) 清洗1 mL 5%~60%甲醇(用10%甲醇)。
- [0106] (5) 洗脱2次0.5mL甲醇或乙腈(含2%FA)。
- [0107] 2、抽干:台式冷冻真空浓缩仪真空干燥后-20℃保存。
- [0108] 3.1.4肽段质谱鉴定
- [0109] 1、上样
- [0110] 将干燥后的肽段样品溶于20μL nanoLC A液,进样2μL。
- [0111] 2、梯度洗脱
- [0112] 液相流速:300nL/min
- [0113] 液相流动相:A液:(2%乙腈,0.1%FA);B液:(98%乙腈,0.1%FA)。
- [0114] 液相梯度:0~5min,2%~15%B;5~50min,15%~35%B;50~55min,35%~98%B;55~58min,98%B。
- [0115] 经分析柱梯度洗脱进入Q-Exactive色谱质谱联用仪鉴定。
- [0116] 3、质谱参数设置:
- [0117] (1) Run Time:0~58min。
- [0118] (2) 一级参数
- [0119] Scan Type:Full;Resolution:70000;AGC Target:3e6;Maximum IT:100ms;Polarity:+;Scan Range:200~2000m/z。
- [0120] (3) 二级参数
- [0121] Resolution:17500;AGC Target:1e5;Maximum IT:50ms;Dynamic Exclusion:10s;Top N:15;NCE:32。
- [0122] 3.1.5质谱数据搜库
- [0123] 1、搜库软件
- [0124] 使用Proteome Discoverer 1.3(Thermo Scientific)软件将Q-Exactive色谱质谱联用仪对肽段鉴定的原始图谱文件(raw文件)通过Sequest软件进行图谱匹配与打分。根据FDR<0.01的标准对肽段置信度进行筛选,至少2个Unique Peptides作为可靠鉴定,获得高度可信的定性结果。

[0125] 2、搜库参数设置

[0126] 配置好该物种数据库与该实验定量方法后,按照如下参数配置搜库:ST\_Fasciola hepatica\_[6192]\_15305.fasta.Enzyme:Trypsin/P;Missed Cleavages:2;Fixed Modification:Caramidomethyl (C);Variable Modifications:Acetyl (N-term), Oxidation (M);Peptide Tolerance:10ppm;MS/MS Tolerance:0.02Da;Peptide Charge:2+,3+,4+;Use Target-Decoy,Mass Values:Monoisotopic;Peptide FDR<0.01。

[0127] 4.1实验结果

[0128] 4.1.1大片形吸虫分泌排泄产物浓度测定

[0129] 1、大片形吸虫分泌排泄产物浓度测定

[0130] 根据BCA测定蛋白步骤,测定倍比稀释标准蛋白的OD<sub>595nm</sub>值,如表1,绘制标准曲线,如图1,标准曲线 $y=0.0006x+0.1559$ , $R^2=0.9836$ 。浓缩后FgESP稀释40倍OD<sub>595nm</sub>值为0.311。计算得出FgESP浓度约为10mg/mL。

[0131] 4.1.2层析组分收集和浓度测定

[0132] 1、用蛋白质快速层析仪共进行5次层析,蛋白量为250mg。每次层析收集96管层析组分,每管2mL。由层析图(图3)可知主要有3个峰,第一个波峰收集的洗脱液,层析组分从第19管开始。第一个峰为第19管到第25管,2mL/管,每一管依次命名为F19、F20、F21……F25,标记序号对应的5管分别进行混合,冻干浓缩。

[0133] 2、部分层析组分浓度的测定

[0134] 我们选取冻干浓缩后第一个波峰左右的层析组分F19-F33进行浓度测定。根据BCA蛋白测定步骤,测定倍比稀释标准蛋白的OD<sub>595nm</sub>值,如表2,绘制标准曲线,如图2,标准曲线 $y=0.0005x+0.1694$ , $R^2=0.9776$ ,计算得出F21-F33层析组分浓度如表3。由于F19、F20层析组分浓度较低未测出浓度。

[0135] 表1标准蛋白不同稀释度OD<sub>595nm</sub>

[0136]	标准蛋白浓度								
	( $\mu\text{g/mL}$ )	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	0
	OD <sub>595nm</sub>	1.336	0.836	0.564	0.316	0.237	0.165	0.134	0.111

[0137] 表2标准蛋白不同稀释度OD<sub>595nm</sub>

[0138]	标准蛋白浓度							
	( $\mu\text{g/mL}$ )	2000	1000	500	250	125	62.5	0
	OD <sub>595nm</sub>	1.162	0.78	0.498	0.311	0.217	0.179	0.108

[0139] 表3 F19-F33层析组分蛋白浓度OD<sub>595nm</sub>

	样品编号	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27
	样品浓度							
[0140]	( $\mu\text{g/mL}$ )	819.2	1250.4	1031.6	496.2	618.7	540.2	548.2
	样品编号	F28	F29	F30	F31	F32	F33	
	样品浓度							
	( $\mu\text{g/mL}$ )	488.7	435.7	643.7	522.2	504.7	454.7	

[0141] 4.1.3层析组分的筛选

[0142] 各个组分OD<sub>450nm</sub>值如表4。用4wpi血清检测F19~F33层析组分,P/N值相对高的有F20(100)、F20(50)、F20(10)、F21、F22、F23和F24,OD<sub>450nm</sub>值较高的为F20(50),F22,其次为F21。用14wpi血清检测F19~F33层析组分,P/N值相对高的有F20(50)、F20(10)、F21、F22、F23、F24,较高的为F21、F20(10),其次为F22,如图4。由表4数值可知,用4wpi血清检测时,F22层析组分值高于F21层析组分,且14wpi血清检测时F22数值也较高。由于F20值高是由于浓度未测出,包被浓度高。所以综合考虑,筛选F22做最优层析组分并进行间接ELISA方法建立与优化。同时选取OD<sub>450nm</sub>值较高层析组分F21、F22、F23和FgESP进行质谱分析,检测与Fasciola spp有关蛋白个数。

[0143] 表4 F19-F33层析组分的P/N值

	4wpi 阳平均值/ 阴平均值 (P/N)	F19 (10)	1.15	F21	3.44	F27	1.77	F33	1.37
		F19 (50)	1.00	F22	3.49	F28	1.82	ESP1.0	1.86
		F20 (10)	3.32	F23	3.22	F29	1.77	ESP2.5	1.66
		F20 (50)	3.55	F24	2.79	F30	1.96		
		F19 (100)	1.15	F25	2.30	F31	1.53		
		F20 (100)	3.23	F26	2.11	F32	1.47		
[0144]	14wpi 阳平均值/ 阴平均值 (P/N)	F19 (10)	1.61	F21	3.82	F27	2.37	F33	1.68
		F19 (50)	1.29	F22	3.57	F28	2.53	ESP1.0	2.18
		F20 (10)	3.81	F23	3.53	F29	2.28	ESP2.5	2.01
		F20 (50)	3.71	F24	2.97	F30	2.38		
		F19 (100)	1.32	F25	2.29	F31	1.84		
		F20 (100)	2.59	F26	2.24	F32	1.82		

[0145] 4.1.4大片形吸虫分泌排泄产物及部分层析组分质谱结果

[0146] 选取层析组分F21、F22和F23及FgESP进行质谱分析(Q Exactive组合式质谱仪),每个组分有九个指标,分别为Score(得分)、Coverage(肽段覆盖率)、Proteins(蛋白家族)、Unique Peptides(特有肽段)、Peptides(肽段)、PSMs(肽段谱图匹配)、AAs(氨基酸)、MW(蛋

白分子量)、calc.pI(等电点),选取指标#Unique Peptides $\geq 2$ 的蛋白进行分析,检测与 *Fasciola* spp有关的蛋白个数。发现F21含有217个蛋白质、F22含有216个蛋白质、F23含有194个蛋白质,FgESP含有60个蛋白质。许多蛋白能被肝片吸虫库辨认,但是也有一些未被注释的蛋白。将4个组分的质谱结果做成韦恩图,如图5。同时将各个组分质谱结果的部分蛋白成分筛选出来。

[0147] 通过对不同组分的数据进行比较,发现这些样本之间的蛋白质表达存在重叠,并在韦恩图中总结了这些蛋白质的相互关系。通过图5可以看出不同组分单独含有蛋白和交叉含有的蛋白个数。有30种蛋白只存在于F21组分中,15种蛋白只存在于F22组分中,23中蛋白只存在于F23组分中,有111中蛋白共同存在于F21、F22、F23组分中,34种蛋白共同存在于F21、F22组分中,17种蛋白共同存在于F22、F23组分中,16种蛋白只存在于FgESP组分,33种蛋白只存在于F21、F22、F23、FgESP组分中,4种蛋白只存在于F21、F23组分中,4种蛋白只存在于F21、F22、FgESP组分中,1种蛋白只存在于F21、FgESP组分中,2种蛋白只存在于F22、F23、FgESP组分中。

[0148] F21、F22、F23与FgESP组分质谱的蛋白成分有热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSP70)、膜连蛋白(Annexin)、14-3-3、硫氧还蛋白过氧化物酶(TPx)、烯醇酶(Enolase)、钙结合蛋白1(CaB P1)、组织蛋白酶L(Cat L)、钙结合蛋白4(CaB P4)、Ras家族蛋白(Ras family protein)、 $\alpha$ 微管蛋白(Tubulin alpha chain)、 $\beta$ 微管蛋白(Tubulin beta chain)、谷胱甘肽S转移酶(Gultathione S Transferases, GST)、脂肪酸结合蛋白(Fatty Acid-Binding Protein, FABP)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(Phosphoenolpyruvate carboxykinase)等。通过表5可以看出, F21、F22、F23与FgESP组分质谱的蛋白成分均含有TPx和Cat L。只存在于F22层析组分的蛋白有 $\beta$ 微管蛋白、蠕虫防御分子1(Helminth defence molecule-1)、超家族蛋白等。F22层析组分Score(得分)较高的蛋白有有CatL、TPx、纤维连接蛋白III型结构域蛋白(Fibronectin type III domain protein)、EGF样结构域蛋白(EGF-like domain protein)等。因此我们可以从中筛选一些蛋白做潜在诊断抗原。

[0149] 表5层析组分F21、F22、F23与FgESP评分较高蛋白组分

[0150]

Compon ents	Accession	Description	Score	Unique peptides	PSMs
F21	Q7KYH5	Cathepsin L	195.71	3	86
	B6DT35	Thioredoxin peroxidase	90.34	10	30
	A0A2H1CU99	C2 domain protein	88.71	10	29
	B1NI98	Heat shock protein 70	66.04	19	29
F22	Q7KYH5	Cathepsin L	143.76	3	59
	B6DT35	Thioredoxin peroxidase	103.37	10	39
	A0A2H1CWH8	Fibronectin type III domain protein	100.63	32	40
	A0A2H1CVB5	EGF-like domain protein	92.58	28	36
F23	B6DT35	Thioredoxin peroxidase	229.79	3	71
	A0A2H1CWM7	Fibronectin type III domain protein	192.93	49	78
	A0A2H1CVB5	EGF-like domain protein	179.79	36	65
	Q7KYH5	Cathepsin L	110.66	5	47
Fg ESP	Q7KYH5	Cathepsin L	379.53	3	140
	B6DT35	Thioredoxin peroxidase	173.62	9	57
	Q7JNQ9	Secreted cathepsin L 1	159.24	1	61
	Q24940	CathepsinL-like proteinase	156.21	1	60

[0151] 5.1F22层析组分作诊断抗原建立及优化间接ELISA方法

[0152] 1、血清来源

[0153] 水牛标准阳性血清、标准阴性血清：广西大学寄生虫实验室保存。

[0154] 水牛血清：广西大学寄生虫实验室保存。

[0155] 阳性血清用“+”表示，阴性血清用“-”表示。

[0156] 2、间接ELISA方法建立

[0157] (1) 包被：用0.05M的碳酸缓冲液将F22稀释为一定浓度，每孔加100μL，在37℃恒温箱孵育2.5h，4℃包被过夜。

[0158] (2) 封闭：用洗涤缓冲液PBST洗涤4次，150μL/孔，每次5min。加入1%明胶封闭液，

每孔加150μL,在37℃恒温箱孵育2h。

[0159] (3) 血清:用洗涤缓冲液PBST洗涤4次,200μL/孔,每次5min。血清用PBST以一定比例稀释后,每孔100μL,设3个重复孔,37℃恒温箱孵育1h。

[0160] (4) 酶标二抗:用洗涤缓冲液PBST将96孔板洗涤4次,200μL/孔,每次计时5min。将辣根过氧化物酶标记羊抗牛IgG,用PBST以一定比例稀释,每孔100μL,在37℃恒温箱孵育1h。

[0161] (5) 显色液:用洗涤缓冲液PBST将96孔板洗涤4次,200μL/孔,每次计时5min。避光加入显色液,每孔加入100μL,在37℃恒温箱孵育20min。

[0162] (6) 终止液:每孔加50μL,OD<sub>450nm</sub>处读取吸光值。

[0163] 3、间接ELISA方法优化(棋盘法)

[0164] (1) 抗原浓度及血清最佳工作浓度的确定

[0165] FgESP抗原浓度按2.5μg/mL、1.25μg/mL、0.625μg/mL、0.313μg/mL,F22层析组分浓度按2.5μg/mL、1.25μg/mL、0.625μg/mL、0.313μg/mL、0.157μg/mL、稀释;血清比例按1:100、1:200、1:400比例稀释。其他条件按以上实验确定好的操作。

[0166] (2) 酶标二抗最佳工作浓度确定

[0167] 羊抗牛IgG二抗按1:10000、1:20000、1:40000、1:80000比例稀释,其他条件按以上实验确定好的操作。

[0168] (3) 显色时间确定

[0169] 比较不同显色时间,分别在5min、10min、15min、20min、25min、30min时终止,其他条件按以上实验确定好的操作,选择最佳时间。

[0170] (4) 阴阳临界值确定

[0171] 根据以上确定的间接ELISA条件,选择15份水牛阴性血清进行检测,每份血清做2个重复,根据每份血清OD<sub>450nm</sub>读值,计算平均值(X)和标准方差(S),用X+3S的值作为判定阴阳性血清的临界值(阴阳临界值=均值+3\*标准方差)。

[0172] 6.1应用间接ELISA方法检测实验感染水牛和广西部分地区自然感染奶牛血清抗体水平

[0173] 1、血清来源

[0174] 血清样品:广西壮族自治区动物疫病预防控制中心提供。其它血清同上。

[0175] 阳性血清用“+”表示,阴性血清用“-”表示。

[0176] 2、间接ELISA检测实验感染水牛血清

[0177] 应用建立好的F22层析组分与FgESP间接ELISA方法检测广西大学寄生虫实验室保存的水牛血清IgG抗体水平,人工感染大片形吸虫的7头试验组水牛和4头对照组水牛。试验组与对照组水牛分别从0~14周采血,分离血清。对每个血清样品进行Student-t检验,比较FgESP与F22识别血清IgG抗体的差异性。

[0178] 3、间接ELISA检测广西部分地区自然感染牛血清

[0179] 本研究利用上述建立好的F22层析组分与FgESP间接ELISA方法检测700份由来自广西壮族自治区动物疫病预防控制中心提供奶牛血清。奶牛血清来自广西贺州市钟山温氏乳业有限公司。根据“(待测牛血清平均OD值-标准阴性血清平均OD值)/(标准阳性血清平均OD值-标准阴性血清平均OD值)\*100%”的公式计算,抗体百分度大于等于40%的判断为血

清样本呈阳性。。

#### [0180] 7.1数据统计

[0181] 采用GraphPad Prism 6.0软件进行统计学分析,采用Student-t检验;组间数据比较,采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。其中 $P<0.05$ 具有显著差异,图表中以\*表示;当 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.0001$ 代表极显著差异,图表中以\*\*、\*\*\*、\*\*\*\*表示。

#### [0182] 8.1实验结果

##### [0183] 8.1.1F22层析组分作诊断抗原间接ELISA方法优化结果

##### [0184] 1、抗原及血清最佳工作浓度的确定

[0185] 用棋盘法得出FgESP和F22抗原和标准阴阳血清的最佳工作浓度分别见表6、表7和图6、图7。结果显示,FgESP抗原浓度为 $2.5\mu\text{g/mL}$ ,标准阴阳血清为1:400时,标准阳性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值在1.0左右,标准阴性血清值较低,且P/N值较大。因此确定FgESP的最佳稀释浓度为 $2.5\mu\text{g/mL}$ ,阴阳血清的最佳稀释浓度为1:400。F22层析组分抗原浓度为 $0.157\mu\text{g/mL}$ ,标准阴阳血清为1:400时,标准阳性血清的 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值在1.0左右,标准阴性血清值较低,且P/N值较大,因此F22的最佳稀释浓度为 $0.157\mu\text{g/mL}$ ,阴阳血清的最佳稀释浓度为1:400。

[0186] 表6 FgESP抗原与血清最佳工作浓度确定

血清 稀释比例	$\text{OD}_{450\text{nm}}$	FgESP 工作浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )			
		2.5	1.25	0.625	0.313
1:100+	1.108	0.908	0.670	0.440	
1:100-	0.404	0.296	0.241	0.191	
1:200+	1.024	0.817	0.605	0.404	
1:200-	0.322	0.267	0.173	0.136	
1:400+	0.994	0.765	0.559	0.375	
1:400-	0.261	0.200	0.163	0.124	
1:100P/N	2.743	3.068	2.780	2.304	
1:200P/N	3.180	3.060	3.497	2.971	
1:400P/N	3.808	3.825	3.429	3.024	

[0188] 表7 F22抗原与血清最佳工作浓度确定

血清 稀释比例	OD <sub>450nm</sub>	F22 工作浓度 (μg/mL)				
		2.5	1.25	0.625	0.313	0.157
[0189]	1:100+	1.623	1.538	1.470	1.436	1.315
	1:200+	1.553	1.468	1.445	1.375	1.246
	1:200-	1.016	0.898	0.828	0.608	0.478
	1:400+	1.552	1.487	1.498	1.390	1.250
	1:400-	0.790	0.690	0.598	0.483	0.339
	1:100P/N	1.441	1.378	1.396	1.575	1.942
	1:200P/N	1.529	1.635	1.745	2.262	2.607
	1:400P/N	1.965	2.155	2.505	2.878	3.687

[0190] 2、酶标二抗最佳工作浓度确定

[0191] 用棋盘法得出FgESP及F22的HRP-羊抗牛-IgG酶标二抗最佳工作浓度分别见表8、表9和图8、图9。FgESP的酶标二抗浓度为1:20000，F22酶标二抗浓度为1:40000时，标准阳性血清的OD<sub>450</sub>值在1.0左右，标准阴性血清值较低，且P/N值较大。因此确定由结果可知FgESP的最佳酶标二抗浓度为1:20000，F22层析组分的最佳酶标二抗浓度为1:40000。

[0192] 表8 FgESP酶标二抗最佳工作浓度确定

[0193]

FgESP 抗原浓度 及血清稀释比例	OD <sub>450nm</sub>	FgESP 酶标二抗工作浓度			
		1:10000+	1:10000-	1:20000+	1:20000-
2.5 μg/mL 1:400		1.384	0.413	1.105	0.263
P/N		3.351		4.202	
		1:40000+	1:40000-	1:80000+	1:80000-
2.5 μg/mL 1:400		0.768	0.167	0.466	0.126
P/N		4.599		3.698	

[0194] 表9 F22酶标二抗最佳工作浓度确定



F22 抗原浓度 及血清稀释比例		F22 的酶标二抗工作浓度			
OD <sub>450nm</sub>		1:10000+	1:10000-	1:20000+	1:20000-
0.157 µg/mL 1:400		1.517	0.560	1.250	0.339
[0195]	P/N	2.709		3.687	
OD <sub>450nm</sub>		1:40000+	1:40000-	1:80000+	1:80000-
0.157 µg/mL 1:400		0.981	0.217	0.662	0.151
	P/N	4.521		4.384	

[0196] 3、显色时间确定

[0197] 按上述优化好的步骤进行实验,在显色时间为5min、10min、15min、20min、25min、30min时进行终止,结果如表10和图10。结果显示15min,F22标准阳性血清的OD<sub>450nm</sub>值在1.0左右,标准阴性血清值较低,且P/N值较大,因此确定最佳反应时间为15min。

[0198] 表10 F22最佳显色时间确定

[0199]

OD <sub>450nm</sub>	F22 反应时间 (min)					
	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
标准阳性	0.644	0.908	1.222	1.479	1.777	1.951
标准阴性	0.166	0.208	0.258	0.306	0.352	0.403
P/N	3.88	4.365	4.736	4.833	5.04	4.841

[0200] 4、阴阳临界值确定

[0201] 按F22层析组分与FgESP优化好的方法,分别检测15份阴性血清,确定其临界值,F22层析组分阴阳临界值为均值加3倍标准方差,结果为0.391。FgESP阴阳临界值为0.249。

[0202] F22诊断抗原阴阳临界值

[0203]

血清样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
OD <sub>450nm</sub>	0.296	0.286	0.301	0.263	0.232	0.234	0.245	0.234	0.327	0.340	0.310	0.312	0.265	0.296	0.207
标准方差	0.038	均值	0.277												

[0204] FgESP诊断抗原阴阳临界值

[0205]

血清样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
OD <sub>450nm</sub>	0.181	0.171	0.162	0.178	0.156	0.165	0.119	0.192	0.209	0.215	0.180	0.199	0.162	0.208	0.155
标准方差	0.024	均值	0.177												

[0206] 8.1.2间接ELISA应用结果

[0207] 1、间接ELISA检测实验感染牛血清

[0208] 应用上述建立好的F22层析组分与FgESP间接ELISA方法检测广西大学寄生虫实验室保存的水牛血清,人工感染大片形吸虫的7头试验组水牛和4头对照组水牛。F22的最优条

件是抗原浓度为0.157 $\mu$ g/mL,标准阴阳性血清为1:400,酶标二抗浓度为1:40000,最佳反应时间为15min,阴阳临界值为0.391。FgESP的最优条件是抗原浓度为2.5 $\mu$ g/mL,标准阴阳血清为1:400,酶

[0209] 标二抗浓度为1:20000,阴阳临界值为0.249。实验结果如表11,图11,图12。从感染后第2周开始检测到感染组抗F22-IgG水平明显升高,差异极显著 ( $P<0.0001$ ),快速升至第4周后呈平缓上升趋势。从感染后第2周检测到感染组抗FgESP-IgG水平升高,抗体水平呈平缓上升趋势,差异极显著 ( $P<0.0001$ )。但从第2周开始,整个感染过程抗F22-IgG水平明显高于FgESP-IgG水平。

[0210] 表11 F22与FgESP诊断抗原检测0~14周水牛血清

周次	OD <sub>450nm</sub>	F22 阳性均值	F22 阴性均值	FgESP 阳性均值	FgESP 阴性均值
[0211]	0W	0.146	0.146	0.126	0.126
	1W	0.295	0.242	0.235	0.160
	2W	0.622	0.271	0.378	0.170
	3W	0.823	0.259	0.426	0.198
	4W	0.990	0.218	0.533	0.157
	5W	1.007	0.250	0.581	0.171
	6W	1.032	0.214	0.596	0.149
	7W	1.065	0.228	0.645	0.182
	8W	1.046	0.182	0.628	0.150
	9W	1.048	0.208	0.682	0.175
	10W	1.070	0.224	0.671	0.155
[0212]	11W	1.100	0.208	0.699	0.209
	12W	1.100	0.205	0.675	0.177
	13W	1.087	0.153	0.694	0.151
	14W	1.031	0.163	0.657	0.162

[0213] 2、间接ELISA检测广西部分地区自然感染牛血清

[0214] 本研究利用上述建立好的F22层析组分与FgESP间接ELISA方法检测700份由广西壮族自治区动物疫病预防控制中心提供的广西贺州市钟山温氏乳业有限公司奶牛血清。部分实验结果如表12和图13。F22检测到的阳性血清有353份,阳性率为50.43%,FgESP检测到的阳性血清为317份,阳性率为45.29%。

[0215] 表12广西部分地区牛感染阳性率

	总份数	阳性 (份)	阴性 (份)	阳性率
[0216] F22 检测血清份数	700	353	347	50.43%
FgESP 检测血清份数	700	317	383	45.29%

[0217] 上述说明是针对本发明较佳可行实施例的详细说明,但实施例并非用以限定本发明的专利申请范围,凡本发明所提示的技术精神下所完成的同等变化或修饰变更,均应属于本发明所涵盖专利范围。

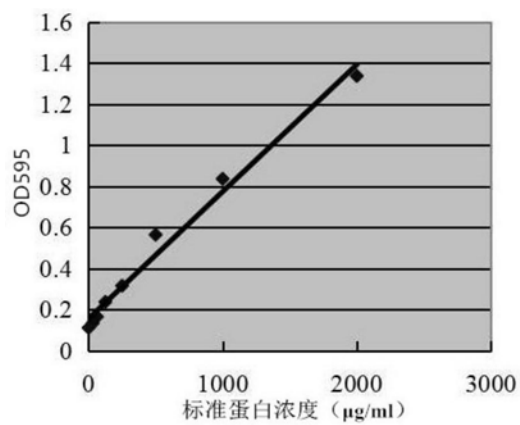


图1

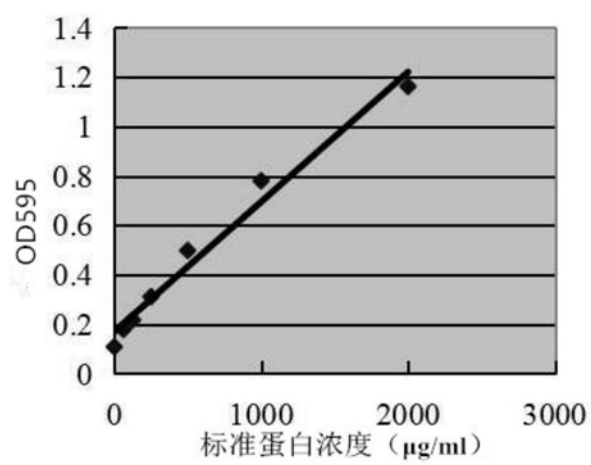


图2

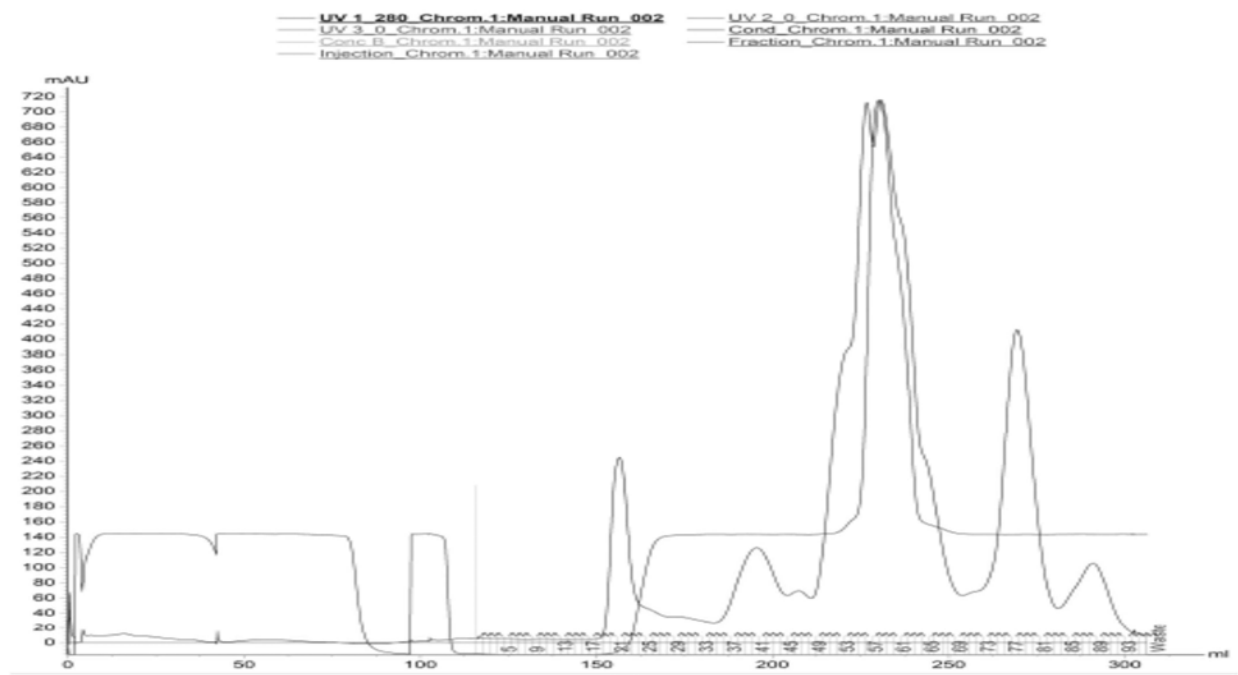


图3

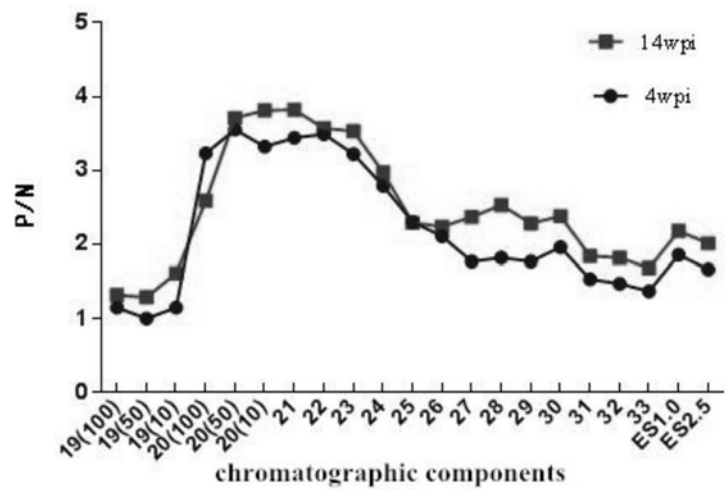


图4

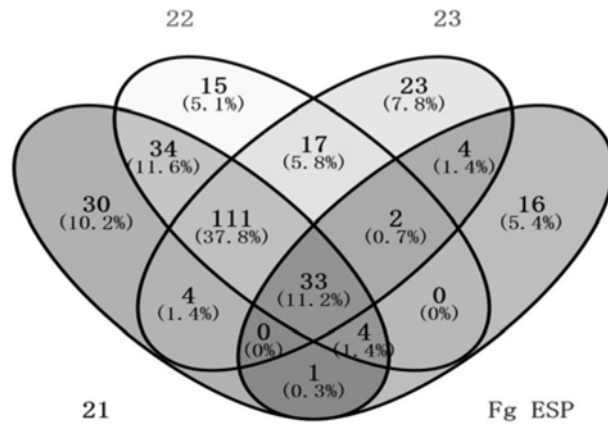


图5

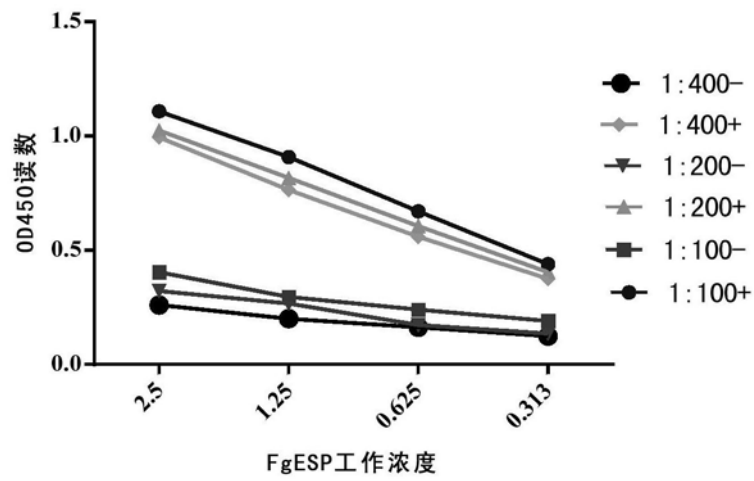


图6

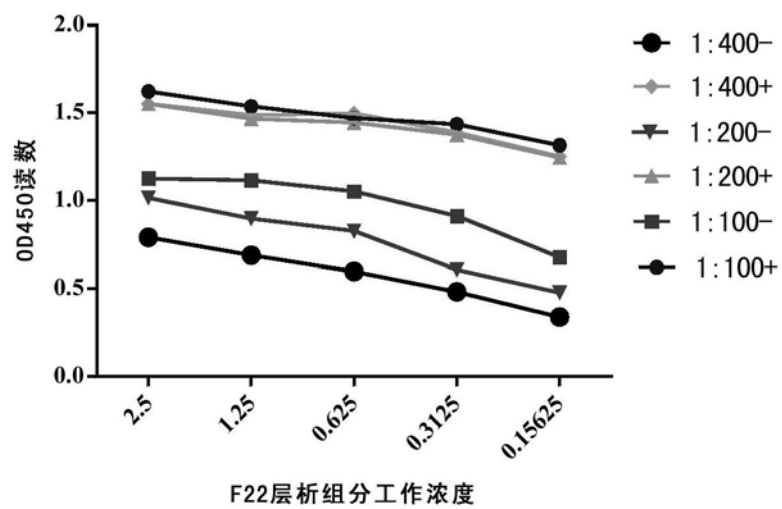


图7

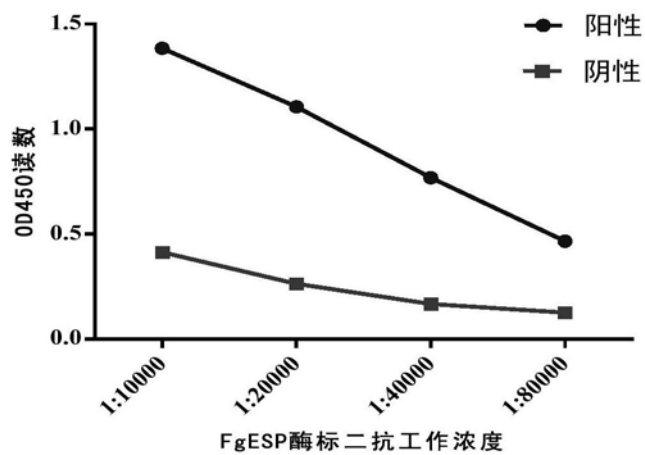


图8

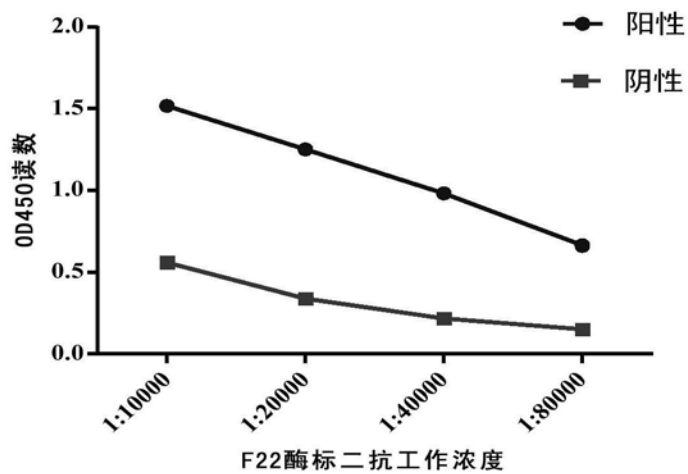


图9

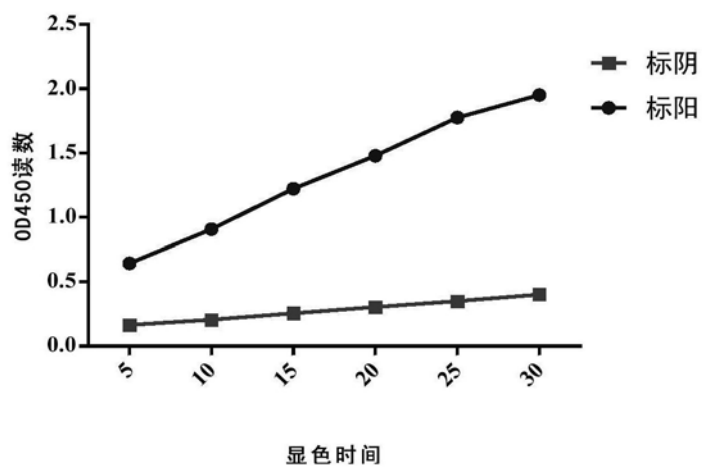


图10

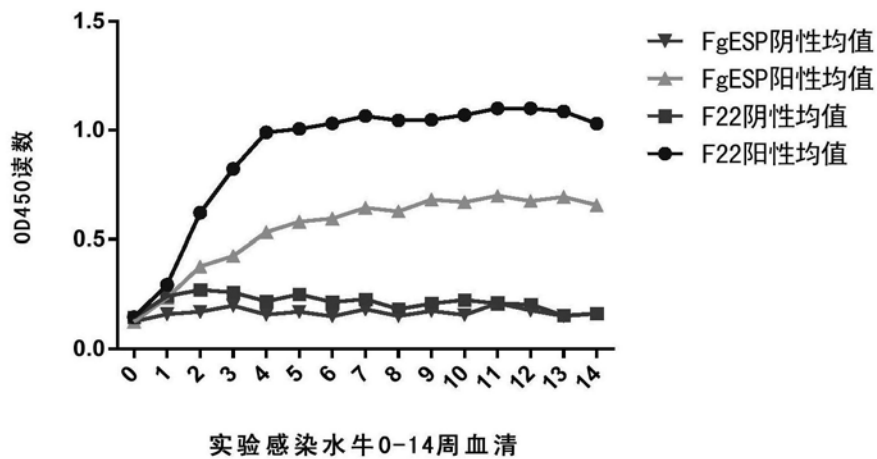


图11

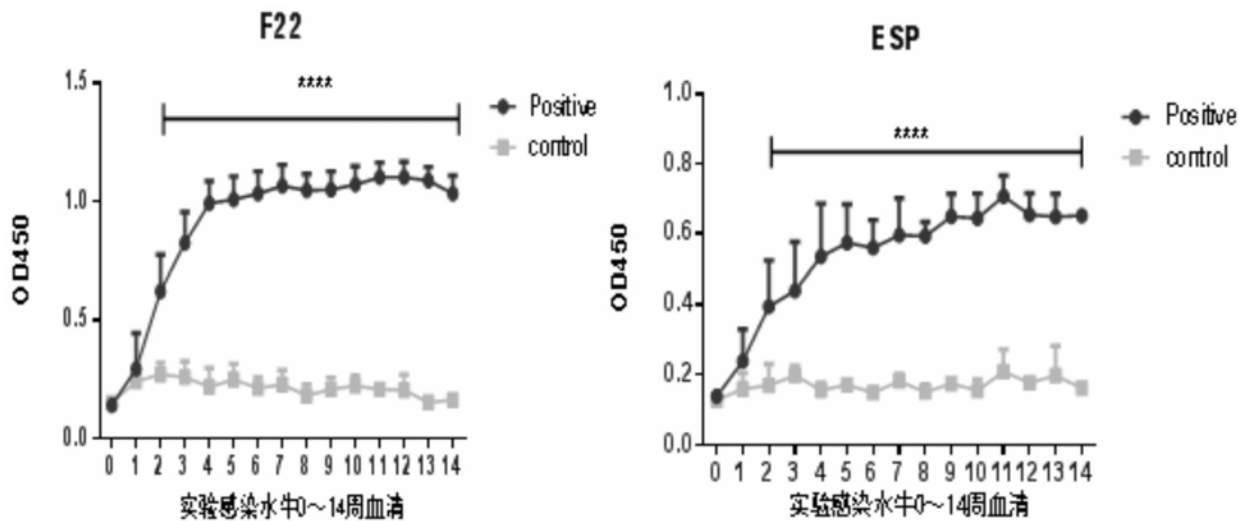


图12



图13

专利名称(译)	大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原的制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110514832A</a>	公开(公告)日	2019-11-29
申请号	CN201910854231.1	申请日	2019-09-10
[标]申请(专利权)人(译)	广西大学		
申请(专利权)人(译)	广西大学		
当前申请(专利权)人(译)	广西大学		
[标]发明人	侯林静 吴文德		
发明人	张为宇 侯林静 吴文德 靳纬坤 吴正姣		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535 G01N33/68 G01N33/543 G01N33/96 C07K1/16 C07K1/14 C12N9/64 C07K14/78 C07K14/435 C12N9/08		
CPC分类号	C07K1/145 C07K1/16 C07K14/43559 C07K14/78 C12N9/0065 C12N9/641 C12Y111/01015 C12Y304/22015 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56905 G01N33/6854 G01N33/96		
代理人(译)	韦莎		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原的制备方法与应用，一种大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原有效成分的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：(1)大片形吸虫分泌排泄产物制备；(2)层析组分收集；(3)层析组分的筛选。本发明还提供一种检测/辅助大片形吸虫病的试剂盒，所述试剂盒含有权利要求1所述的F22层析组分。本发明还涉及含有诊断抗原在检测/辅助水牛大片形吸虫病早期诊断中的应用。本发明筛选出的F22层析组分作为大片形吸虫分泌排泄产物诊断抗原具有检测快速、操作简便、易于判定等优点，能够为水牛大片形吸虫的检测提供实用有效的方法。

