

马泰勒虫新疆株 *EMA-1* 基因的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立

宋瑞其¹, 王盼举¹, 王振宝², 瓦热斯·吐尔松¹, 闻秀秀¹, 张 杨¹, 巴音查汗^{1*}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052;

2. 伊犁出入境检验检疫局综合技术服务中心, 伊宁 835000)

摘 要: 马泰勒虫裂殖子表面抗原 1(EMA-1)是用于马梨形虫病诊断的重要靶抗原之一。为建立实用有效的间接酶联免疫吸附试验方法,笔者根据马泰勒虫 *EMA-1* 基因序列设计并合成引物,将新疆株 *EMA-1* 全基因序列克隆于原核表达载体 pGEX-4T-1 上,构建 pGEX-4T-1/*EMA1* 重组质粒,转化至 BL21(DE3)中,经 IPTG 诱导得到 *EMA-1* 融合蛋白,切胶纯化后作为包被抗原建立检测马泰勒虫抗体的 rELISA 方法。结果显示:①GST-*EMA1* 蛋白相对分子质量 56 ku,与其理论值基本一致;②通过 Western blot 分析证明其具有很好的特异性和反应原性;③以 GST-*EMA1* 蛋白作为包被抗原建立的 rELISA 可明显区分马泰勒虫、鬃巴贝斯虫阳性血清和健康马血清;批内和批间重复试验的最大变异系数分别为 14.79%和 11.06%;④使用建立的间接 ELISA 与 cELISA 商品试剂盒分别对新疆伊犁马场收集的 96 份马血清样品进行检测,检出阳性率分别为 27.1%(26/96)和 25.0%(24/96),两者总符合率为 95.8%。结果表明,基于原核表达的 GST-*EMA1* 蛋白所建立的 rELISA 特异性、重复性好,检出率与马泰勒虫临床分离率接近,可为新疆马泰勒虫病(特别是隐性带虫马)的检测、监控提供有效手段。

关键词: 马泰勒虫;新疆株 *EMA-1*;间接 ELISA;抗体;诊断

中图分类号:S852.72

文献标志码:A

文章编号:0366-6964(2017)09-1737-07

Prokaryotic Expression of the *EMA-1* Gene of Xinjiang Strain of *Theileria equi* and Establishment of Indirect ELISA Detection Method

SONG Rui-qi¹, WANG Pan-ju¹, WANG Zhen-bao², WARESI Tuersun¹,

WEN Xiu-xiu¹, ZHANG Yang¹, BA Yinchahan^{1*}

(1. College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Yili Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Yining 835000, China)

Abstract: The erythrocytic-stage surface protein, Equi Merozoite Antigen 1 (EMA-1), is a major candidate for the development of a diagnostic antigen for equine piroplasmosis. The aim of the present study was to establish an indirect ELISA for practical use. According to the specific sequence of *EMA-1* genes of *Theileria equi*, a pair of primers was designed and synthesized. The *EMA-1* gene of Xinjiang strain was cloned, and then was inserted into the prokaryotic vector pGEX-4T-1. The recombinant plasmid (pGEX-4T-1/*EMA1*) were transformed into *Escherichia coli* BL12(DE3), and the GST-*EMA1* protein was obtained by induction of IPTG. The fusion protein was purified by extracting the inclusion bodies with gel slices, and the purified protein was used as coated antigen for the establishment of indirect ELISA method to detect the antibody to *Theileria equi*. The results indicated that the expressed *EMA-1* had an apparent molecular mass

收稿日期:2017-03-02

基金项目:国家自然科学基金-新疆联合基金重点项目(U1403283)

作者简介:宋瑞其(1990-),男,河南人,硕士生,主要从事预防兽医学研究,E-mail:812084208@qq.com

* 通信作者:巴音查汗(1964-),女,蒙古族,教授,博士,博士生导师,主要从事预防兽医学研究,E-mail:byinch@hotmail.com

of 56 kDa which was largely consistent with its theoretical value, and expression of protein was identified by Western blot, which confirmed that the protein had highly specificity and reactionogenicity; the purified recombinant GST-EMA1 protein was tested in an ELISA for the detection of antibodies anti-*T. equi* in horses, and the indirect ELISA could clearly differentiate the *T. equi*-infected horse sera from *Babesia caballi*-infected horse sera or normal horse sera; The intra- and inter-assay demonstrated that the coefficient of maximum variation was 14.79% and 11.06% respectively; 96 serum samples collected from horses in the state of Yili, Xinjiang were used to compare the indirect ELISA and cELISA commercial kit, the results showed that their positive rates of *T. equi* infection were 27.1% (26/96) and 25.0% (24/96) respectively, and the total coincidence rate was 95.8%. These results suggest that the GST-EMA1 protein expressed in *E. coli* could be a reliable immunodiagnostic antigen for indirect ELISA test and that provided the means of effective detecting and monitoring for *T. equi* (especially in recessive infection) in Xinjiang.

Key words: *Theileria equi*; EMA-1 gene of Xinjiang strain; indirect ELISA; antibody; diagnosis

马梨形虫病(equine piroplasmosis, EP)是由马泰勒虫(*Theileria equi*)^[1-2]和/或弩巴贝斯虫(*Babesia caballi*)^[3-4]引起的蜱传血液原虫病^[5]。该病主要感染马属动物(马、骡、驴和斑马),呈急性、亚急性或慢性发病等。患病时动物通常呈发烧,贫血,黄疸,肝、脾肿大,血管内溶血,可视黏膜黄染及血红蛋白尿等表征^[6],但慢性感染时临床症状不明显^[7];患病马匹即使后期治愈后也会终身带虫,作为传染源传播给其他马属动物;该病广泛分布在热带和亚热带地区^[8],据联合国粮食和农业组织的数据显示,2013年世界范围内马匹存栏量约1.12亿匹,其中全球大约90%的马属动物分布在马梨形虫病流行地区^[9]。近年来,多个国家有马梨形虫病的报道,如韩国、蒙古、委内瑞拉、突尼斯、苏丹、意大利、匈牙利、沙特阿拉伯、墨西哥及美国德克萨斯等^[7],对马产业造成重大经济损失;在国际马术竞技比赛中马梨形虫病作为重要的检测项目之一^[10]。为保持健康良好的国际性马产业市场,对马梨形虫病的防控至关重要。

补体结合试验(CFT)是常用于检测马泰勒虫病的方法^[10],然而因其低灵敏度和检测速率等因素对检测造成一定的限制^[12]。间接荧光抗体试验(IF-AT)也可用于诊断马泰勒虫感染,但通常受到抗体的检测范围和交叉反应性的影响;除CFT和IFAT之外,基于马泰勒虫裂殖子抗原的ELISA已被用于抗体检测^[13]。近几年,通过重组抗原建立的几种ELISA检测方法,已证明其诊断慢性马泰勒虫病感染是非常有效的^[14]。新疆作为马泰勒虫病的流行疫区,其急性病例死亡率达30%,制约着新疆马产

业的健康发展^[15]。笔者拟构建马泰勒虫新疆株EMA-1基因原核表达载体及其间接ELISA方法,为马泰勒虫病的血清学诊断及地方疫区马梨形虫病的检测、监控及综合防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

马泰勒虫新疆流行虫株 Te-Y(伊犁分离株), pGEX-4T-1 表达载体及马泰勒虫标准阳性、阴性血清均由新疆农业大学动医学院寄生虫实验室提供;待检血清样品采自于新疆伊犁地区的放牧马。

组织/全血 DNA 提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自德国 QIAGEN 公司;胶回收试剂盒购自美国 OMEGA 公司;限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、T4 连接酶和 pMD18-T 载体购自宝生物工程(大连)有限公司;大肠杆菌 DH5 α 、BL21 感受态细胞为北京全式金生物技术有限公司产品;HRP 标记的兔抗马 IgG、DAB 显色试剂盒和四甲基联苯胺(TMB)购自上海生工生物有限公司;马泰勒虫 cELISA 检测试剂盒购自美国 RMVD 公司;其他常规试剂均为国产分析纯;所用水为超纯水。

1.2 引物设计与合成

基于马泰勒虫虫株(GenBank 登录号 AF255730)EMA-1 全基因序列设计的 PCR 引物:EMA1-P1 (5'-CGGATCCATGATTTCCAAATCCT-3')和 EMA1-P2(5'-TTGCGGCCGCTTAGTAAATAGAGTAGAGT-3'),加下划线的序列分别对应 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点,基因片段大小为 819 bp。引物由上海生工公司合成。

1.3 EMA-1 基因的扩增

使用 DNA 提取试剂盒提取马泰勒虫新疆株 (Te-Y) 的基因组 DNA。通过 PCR 技术对 EMA-1 全长基因 (819 bp) 进行扩增 (94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s; 30 个循环), 扩增的 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳加以确证, 并用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收。

1.4 表达载体的构建与鉴定

将回收产物连接到 pMD18-T 载体中, 并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落接种至含 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 收集菌液进行测序。对重组质粒和 pGEX-4T-1 载体双酶切 (*Bam*H I 和 *Eco*R I) 回收目的片段和空载体, 用 T4 DNA ligase 于 16 °C 过夜连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。测序和酶切验证正确的重组质粒 pGEX-4T-1/EMA1 转化至大肠杆菌菌株 BL21(DE3)。

1.5 重组 GST-EMA1 蛋白的诱导条件筛选及鉴定

在含 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基 (50 mL) 中小规模诱导, 测定重组蛋白质的表达情况。于 37 °C 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下进行诱导时间 (1、3、5、7 和 12 h) 和诱导剂 IPTG 浓度 (0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的最佳条件筛选, 通过 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析蛋白质表达情况。

1.6 重组蛋白质的纯化及其反应原性测定

1.6.1 蛋白质的纯化 根据高慎阳等^[16]的 KCl 染色胶纯化法稍作改进, 收集最佳诱导条件下菌体, 样品处理后进行 SDS-PAGE 电泳, 用适量的 0.25 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液染色后, 切下目的条带碾碎加入 500 μL PBS 涡旋混匀, 置于 -80 °C 反复冻溶 3 次后 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min 取上清, 用紫外分光光度仪测定上清中蛋白质浓度, 置于 -20 °C 保存备用。

1.6.2 Western blot 取 10 μL 重组蛋白质样品 (~5 μg 的蛋白质含量) 进行 SDS-PAGE 电泳后, 半干转印于 NC 膜上, 封闭液 (5% 脱脂奶, 含 0.5% Tween 的 PBS 稀释) 封闭 1 h; 加马泰勒虫阳性血清 37 °C 反应 1.5 h; 加二抗 (HRP-兔抗马 IgG) 37 °C 温育 1 h。最后, 向膜上滴加 DAB 显色液, 避光 37 °C 孵育 10 min, 观察结果。

1.7 重组 EMA-1 为包被抗原建立间接 ELISA

1.7.1 抗原包被浓度和血清稀释倍数的选择

采用九宫格的方法: 包被质量浓度分别为 1、2、3、4、5 和 6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 血清稀释倍数分别为 1:100、1:200、1:400、1:800。P/N 值最大的一组为最佳蛋白质浓度和血清稀释倍数。

1.7.2 最佳酶标二抗稀释倍数的选择 以确定的包被浓度和血清稀释倍数为基础, 按 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:10 000、1:20 000 稀释二抗。P/N 值最大的一组为二抗最佳稀释倍数。

1.7.3 最佳包被液的选择 分别以碳酸盐缓冲液 (0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH9.6, CB)、磷酸盐缓冲液 (0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.4, PBS)、Tris-HCl 缓冲液 (0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH8.5)、NaOH (0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH9.6)、生理盐水 (0.05 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.0, NS) 和双蒸水 (dH₂O) 作为包被液, 按照优化好的最佳抗原包被浓度进行包被, 每孔 100 μL , 4 °C 过夜包被, 按照优化好的最佳血清稀释浓度进行检测, 以 P/N 值最大为判定标准, 即为最佳包被液。

1.7.4 最佳封闭液的选择 分别用 0.05% 脱脂奶、2.0% 脱脂奶、5.0% 脱脂奶、0.05% BSA、2.0% BSA、5.0% BSA 作为封闭液, 每孔 150 μL , 37 °C 封闭 1 h, 按照上述优化好的条件进行检测, 以 P/N 值最大的一组作为最佳封闭液。

1.7.5 血清稀释液的选择 分别以 PBS、PBST1 (0.05% Tween-20)、PBST2 (0.1% Tween-20)、0.1% BSA、5% 脱脂奶 (SM) 和 0.05% Tween-20 的 SM (SMT) 作为一抗稀释液。选定最大 P/N 值一组作为最佳稀释液。

1.7.6 血清反应时间的选择 加入稀释的一抗后, 分别在 37 °C 孵育 0.5、1.0、1.5、2.0 h, 进行 ELISA 检测, 选定 P/N 值最大时为最佳反应时间。

1.7.7 酶标抗体反应时间的选择 加入稀释的酶标二抗后, 分别在 37 °C 孵育 0.5、1.0、1.5、2.0 h, 进行 ELISA 检测, P/N 值最大时选为最佳反应时间。

1.7.8 TMB 底物反应时间的选择 避光环境下, 加入 TMB 底物溶液后分别于 37 °C 培养箱反应 10、15、20、25 min, 加入 50 μL 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂SO₄ 终止反应, P/N 值最大时选为最佳反应时间。

1.7.9 ELISA 判定标准的确定 用上述优化好的 ELISA 检测方法, 对实验室保存的 36 份马泰勒虫病阴性血清进行检测, 每份血清做 3 个重复检测, 取 3 份检测孔的平均值, 计算检测样品 OD_{450 nm} 的 $\bar{x} \pm s$, 根据统计学, 当样品的 OD_{450 nm} 值大于阴性样

品 OD_{450 nm} 值的 $\bar{x} \pm 2s$ 时,即可判定样品为阳性,否则为阴性。

1.7.10 敏感性试验 将马泰勒虫标准阳性血清按照 1:100、1:200……1:12 800 倍比稀释,其余条件同 ELISA。

1.7.11 特异性试验 用 ELISA 方法同时检测马泰勒虫病、弩巴贝斯虫病阳性血清和健康马血清,判断 ELISA 与其他马病的病原有无交叉反应。

1.7.12 批内批间重复性试验 用同一批次和不同批次纯化的蛋白质包被,分别检测 10 份阳性血清和 5 份阴性血清,重复试验 3 次,分别计算每个样品的平均值、标准方差和变异系数,确定 ELISA 同批和不同蛋白质抗原的变异系数范围。

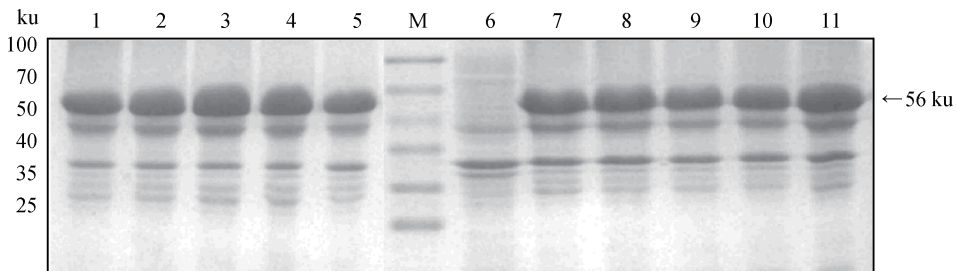
1.7.13 符合性试验 对采集的 96 份马血清,分别用建立的间接 ELISA 和 cELISA 检测试剂盒检测,结果以商品试剂盒的结果为标准,计算二者的符合率。对结果不一致的样品,以试剂盒的结果为准。

$$\text{符合率} = \frac{\text{结果相同的样品数}}{\text{样品总数}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 GST-EMA1 重组蛋白质表达质粒的构建

将新疆株 EMA-1 全基因序列克隆于原核表达载体 pGEX-4T-1,构建 pGEX-4T-1/EMA1 重组质粒,并酶切鉴定(图 1)。



M. 蛋白质相对分子质量标准;1~5. 诱导时间(1、3、5、7、12 h);6~11. IPTG 诱导浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol·L⁻¹)
M. Protein marker; 1-5. Induction time was 1, 3, 5, 7, 12 h, respectively; 6-11. Induction concentration of IPTG was 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol·L⁻¹, respectively

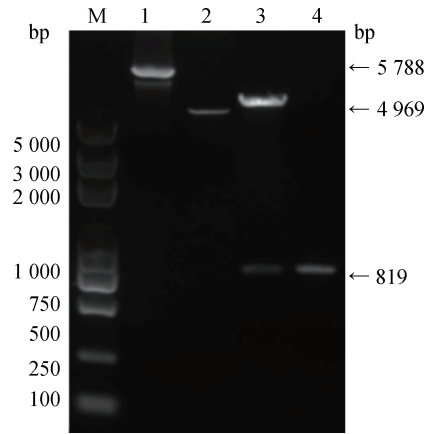
图 2 诱导时间及 IPTG 浓度对 GST-EMA1 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of induction time and IPTG concentration on the GST-EMA1 protein expression

2.3 蛋白质的纯化及其反应原性分析

2.3.1 纯化后重组蛋白质 SDS-PAGE 鉴定 紫外分光光度仪测定纯化后蛋白质质量浓度在 0.9~2.1 mg·mL⁻¹。取 10 μL 处理后样品进行 SDS-PAGE 电泳验证,见图 3。

2.3.2 Western blot 结果表明重组蛋白质能



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1. pGEX-4T-1/EMA1 重组质粒;2. pGEX-4T-1 空载体;3. 双酶切产物;4. EMA-1 酶切后片段

M. DL2000 DNA marker; 1. Recombinant plasmid; 2. pGEX-4T-1; 3. Restrictive digested recombinant plasmid; 4. The digested EMA-1 gene

图 1 GST-EMA1 重组表达质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of enzyme digestion of GST-EMA1 recombinant plasmids

2.2 GST-EMA1 蛋白表达条件优化

测序和酶切验证正确的重组质粒 pGEX-4T-1/EMA1 转化至大肠杆菌菌株 BL21(DE3)进行蛋白质表达。最佳诱导条件:加入终浓度 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 在 37 °C 200 r·min⁻¹ 条件下诱导 5 h 获得最佳表达;通过 12% 的 SDS-PAGE 分析蛋白质表达情况,见图 2。

够与马泰勒虫阳性血清反应,具有很好的特异性和反应原性(图 4)。

2.4 ELISA 最佳反应条件的确定

通过对抗原包被浓度,血清、酶标二抗稀释倍数,最佳反应时间的确定,以及包被液、封闭液、稀释液的选择,确定如下操作程序:①酶标板每孔加入

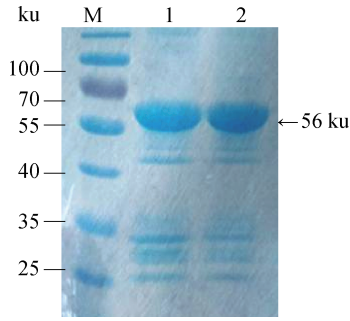


图 3 纯化的重组蛋白质的 SDS-PAGE 验证结果

M. 预染蛋白质相对分子质量标准;1,2. 纯化后不同浓度的 GST-EMA1 蛋白

M. Prestained protein marker;1,2. Different concentration of purification of GST-EMA1 protein

图 3 The SDS-PAGE analysis of purification of recombinant protein

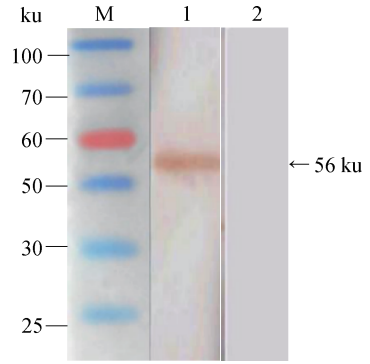


图 4 纯化的重组蛋白质的 Western blot 验证结果

M. 预染蛋白质相对分子质量标准;1. 纯化后的 GST-EMA1 蛋白;2. 阴性对照

图 4 The Western blot analysis of purification of recombinant protein

100 μL 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白质, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;②每孔加入 200 μL PBST 溶液洗涤 5 次;③加入 150 μL 0.05% 脱脂奶 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, 洗涤同上;④每孔按 1:400 加入血清与 5% 脱脂奶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 洗涤同上;⑤每孔按 1:10 000 加入 HRP 标记兔抗马 IgG 与 5% 脱脂奶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 洗涤同上;⑥各孔加入 100 μL TMB 底物溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min;⑦每孔加入 50 μL 2 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 ;⑧在 450 nm 处测定各孔的 OD 值。

2.5 阴阳性临界值的确定

用上述优化好的 ELISA 检测方法, 对实验室保存的马泰勒虫阴性血清取 36 份进行检测, 每份血清做 3 个重复检测, 取 3 份检测孔的平均值, 计算检测样品 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 的平均值和标准方差, 根据统计学, 当样品的 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值大于阴性样品 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值的 $\bar{x} + 2s$ 时, 即可判定样品为阳性。临界值为 0.353, 大于 0.353 为阳性; 小于 0.353 为阴性。见图 5。

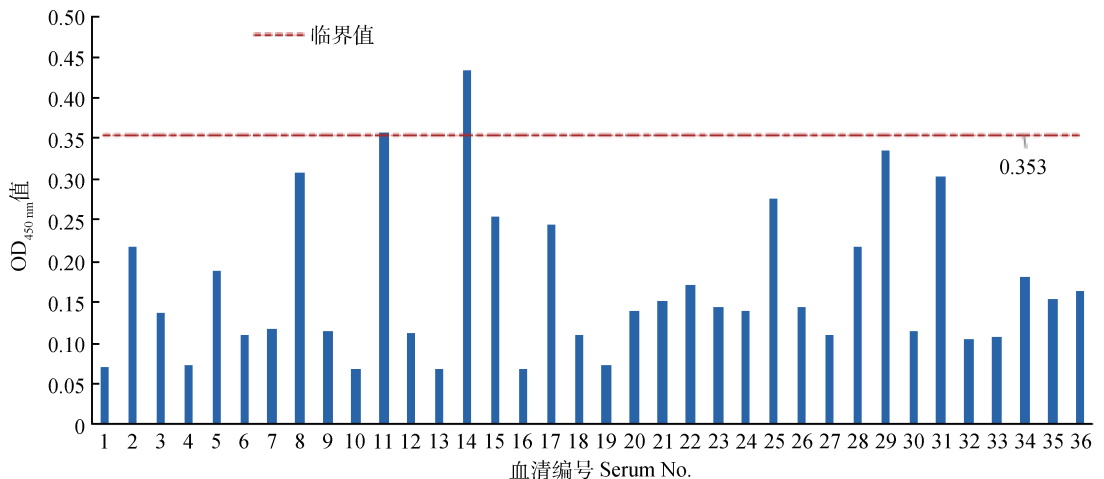


图 5 以 EMA-1 蛋白为包被抗原的 36 份马泰勒虫阴性血清 ELISA 检测结果

图 5 The detection of 36 negative serum of samples by rEMA1-ELISA

2.6 ELISA 方法评测情况

2.6.1 敏感性试验 将马泰勒虫标准阳性血清按照 1:100、1:200……1:12 800 倍比稀释, 其余条件同 ELISA。最终确定当阳性血清稀释至 1:1 600 时其结果仍为阳性。

2.6.2 特异性试验 用 ELISA 方法检测的马弩巴贝斯虫病阳性血清和健康马血清, $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值均在 0.2 以内, 判断 ELISA 与其他马病的病原有无交叉反应。

2.6.3 重复性试验 对采集的 10 份马泰勒虫阳

性血清和 5 份阴性血清,分别进行 3 次重复检测试验。其中同一批 EMA-1 蛋白抗原包被板批内变异系数在 1.43%~14.79%,不同批次 EMA-1 蛋白抗原包被板批间变异系数在 1.46%~11.06%。结果表明 EMA-1 蛋白的稳定性较好,具可重复性。

2.6.4 符合性试验 对采集的 96 份马血清,分别使用建立的 ELISA 和 cELISA 试剂盒进行检测:阳性率分别为 27.1%(26/96)和 25.0%(24/96);两者间阳性符合率为 92.3%,阴性符合率为 97.2%,总符合率为 95.8%。

3 讨论

本试验首次对新疆马泰勒虫地方流行虫株(伊犁分离株)EMA-1 基因进行克隆,并成功构建了重组质粒 pEGEX-4T-1/EMA1,经优化诱导时间和 IPTG 浓度后,以包涵体的形式高效表达,虽用尿素溶液变性纯化,但洗涤后蛋白质浓度低,杂蛋白质较多。故后期使用 KCl 染色切 SDS-PAGE 胶进行蛋白质回收,提高目的蛋白质的纯度和回收率;经 Western blot 鉴定,重组 GST-EMA1 蛋白能够被马泰勒虫阳性血清特异性识别,说明 EMA-1 抗原能与抗体特异性结合。

ELISA 检测马泰勒虫抗体与其他血清学诊断方法(CFT, IFAT)相比^[17-19],ELISA 方法速度快,对实验条件要求不高,更适用于基层实验室血清学诊断及大规模疫病普查^[20]。本研究所建立的间接 ELISA 具有很好的特异性、敏感性和重复性,与 cELISA 商品试剂盒相比,两者的符合率可达 95.8%,与其他学者建立的间接 ELISA 检测符合率^[21-23]的结果相符。

4 结论

基于马泰勒虫重组 EMA-1 蛋白建立的间接 ELISA 方法可以用于检测抗马泰勒虫血清抗体效价,虽然不能代表机体的中和抗体效价,但其检测速度快,对实验条件要求不高,安全便捷,在短时间内可以检测大量样品,非常适于基层大批临床马血清样品的检测,为患马泰勒虫病的马匹体内 IgG 抗体水平监测与检测试剂盒的开发奠定了基础。

参考文献(References):

[1] MEHLHORN H, SCHEIN E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehl-

horn, Schein 1998[J]. *Parasitol Res*, 1998, 84(6): 467-475.

- [2] KAPPEMEYER L S, THIAGARAJAN M, HERN-DON D R, et al. Comparative genomic analysis and phylogenetic position of *Theileria equi*[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 603.
- [3] DARLING S T. Equine piroplasmiasis in Panama[J]. *J Infect Dis*, 1913, 13(2): 197-202.
- [4] DARLING S T. Equine piroplasmiasis in the canal zone[J]. *Science*, 1913, 37(949): 370-371.
- [5] BRÜNING A, PHIPPS P, POSNETT E, et al. Monoclonal antibodies against *Babesia caballi* and *Babesia equi* and their application in serodiagnosis [J]. *Vet Parasitol*, 1997, 68(1-2): 11-26.
- [6] GARCÍA-BOCANEGRA I, ARENAS-MONTES A, HERNÁNDEZ E, et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids[J]. *Vet J*, 2013, 195(2): 172-178.
- [7] WANG M, GUO W, IGARASHI I, et al. Epidemiological investigation of equine piroplasmiasis in China by enzyme-linked immunosorbent assays[J]. *J Vet Med Sci*, 2014, 76(4): 549-552.
- [8] WISE L N, KAPPEMEYER L S, MEALEY R H, et al. Review of equine piroplasmiasis[J]. *J Vet Intern Med*, 2013, 27(6): 1334-1346.
- [9] BHOORA R, BUSS P, GUTHRIE A J, et al. Genetic diversity of piroplasms in Plains zebra (*Equus quagga burchellii*) and Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*) in South Africa [J]. *Vet Parasitol*, 2010, 174(1-2): 145-149.
- [10] BALDANI C D, HILARIO E, NAKAGHI A C H, et al. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immuno assay in horses from São Paulo State, Brazil[J]. *Rev Bras Parasitol Vet*, 2011, 20(1): 54-60.
- [11] FRERICHS W M, HOLBROOK A A, JOHNSON A J. Equine piroplasmiasis: complement-fixation titers of horses infected with *Babesia caballi*[J]. *Am J Vet Res*, 1969, 30(5): 697-702.
- [12] GUIDI E, PRADIER S, LEBERT I, et al. Piroplasmiasis in an endemic area: analysis of the risk factors and their implications in the control of Theileriosis and Babesiosis in horses[J]. *Parasitol Res*, 2015, 114(1): 71-83.
- [13] BALDANI C D, MACHADO R Z, BOTTEON P D

- T L, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses[J]. *Ciênc Rural*, 2004, 34(5): 1525-1529.
- [14] JAFFER O, ABDISHAKUR F, HAKIMUDDIN F, et al. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmiasis[J]. *Parasitol Res*, 2010, 106(3): 709-713.
- [15] 巴音查汗. 马梨形虫在新疆地区的感染现状及其防治[C]//2015 中国(北京)国际马科技大会学术论文集. 北京: 中国畜牧兽医学会, 2015: 4.
BA Y C H. The infection situation and control of equine piroplasmiasis from Xinjiang area[C]. Beijing: Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine (CAAV), 2015: 4. (in Chinese)
- [16] 高慎阳, 查恩辉, 王 坤, 等. 一种“高性价比”切胶纯化原核表达蛋白的方法[J]. 中国农学通报, 2010, 26(22): 24-26.
GAO S Y, ZHA E H, WANG K, et al. A ‘cost-effective’ method for purification of prokaryotic expression proteins in gel slices[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(22): 24-26. (in Chinese)
- [17] KUMAR S, RAKHA N K, GOYAL L, et al. Diagnostic application of recombinant equine merozoite surface antigen-1 in elisa for detection of *Theileria equi* specific antibodies[J]. *Jpn J Vet Res*, 2015, 63(3): 129-137.
- [18] ROSALES R, RANGEL-RIVAS A, ESCALONA A, et al. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using competitive-inhibition ELISA and PCR[J]. *Vet Parasitol*, 2013, 196(1-2): 37-43.
- [19] VIANNA A M, GONÇALES R A, DE LARA A P D S S, et al. Expressão heteróloga da EMA-2 (*equi merozoite antigen*) de *Theileria equi* em *Pichia pastoris* com potencial utilização em imunobiológicos[J]. *Ciênc Rural*, 2014, 44(10): 1830-1836.
- [20] 曹增国, 王化磊, 盖微微, 等. 埃博拉病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(3): 615-619.
CAO Z G, WANG H L, GAI W W, et al. Development of an indirect ELISA for detecting Ebola virus antibody and its application[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(3): 615-619. (in Chinese)
- [21] 沈 婷, 周 斌, 陈溥言. 检测猪乙型脑炎病毒抗体间接 ELISA 方法的建立与应用[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(4): 1-7.
SHEN T, ZHOU B, CHEN P Y. Development and application of an indirect ELISA method for detection of antibody to porcine Japanese encephalitis virus[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 42(4): 1-7. (in Chinese)
- [22] 宫苗苗, 曾 妮, 程朝飞, 等. 狂犬病病毒基质蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(1): 17-22.
GONG M M, ZENG N, CHENG C F, et al. Development of indirect ELISA for detection of antibodies against rabies virus based on prokaryotic expression of matrix protein[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2013, 29(1): 17-22. (in Chinese)
- [23] 夏平安, 尹彦涛, 李素平, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒重组 N 蛋白的高效表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(5): 537-541.
XIA P A, YIN Y T, LI S P, et al. High-level expression of N protein of PRRSV Hn-1/06 strain and establishment of ELISA diagnosis based on the recombinant fusion protein[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2009, 29(5): 537-541. (in Chinese)

(编辑 白永平)