

流感嗜血杆菌快速检测胶体金试纸的研制

陶冶¹, 郝惠文¹, 李杰¹, 王猛¹, 王毅^{1,2,3}, 张改平⁴, 胡征^{1,2,3}

1 湖北工业大学 生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430068

2 发酵工程教育部重点实验室 (湖北工业大学), 湖北 武汉 430068

3 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430068

4 河南农业大学, 河南 郑州 450002

陶冶, 郝惠文, 李杰, 等. 流感嗜血杆菌快速检测胶体金试纸的研制. 生物工程学报, 2019, 35(5): 901–909.

Tao Y, Hao HW, Li J, et al. Colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of *Haemophilus influenzae*. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 901–909.

摘要: 以流感嗜血杆菌外膜蛋白 P6 为检测标志物, 利用胶体金免疫层析技术建立一种快速、灵敏、准确检测流感嗜血杆菌的方法。对 P6 蛋白 (GenBank 登录号: AGH02799) 进行生物信息学分析, 获取其胞外结构域中抗原表位最丰富的肽段, 预测其中的线性抗原表位 P6Line (62–75 aa), 化学合成后经免疫、抗体纯化得到线性表位抗体, 同时利用重组 P6 蛋白制备多克隆抗体, 建立基于双抗体夹心免疫层析技术的流感嗜血杆菌快速检测方法, 并对该方法的特异性、灵敏性、重复性和稳定性作出评价, 同时对该方法进行临床模拟试验, 平板培养法验证其准确性。建立的检测方法可在 15 min 内完成对样本的检测, 检测敏感度高 (1×10^5 CFU/mL)、特异性强, 与其他诸如肺炎链球菌、卡他莫拉菌、肺炎支原体、嗜肺军团菌等常见 9 种的呼吸道病原菌无交叉反应; 试纸条在 25 °C 保存具有良好的重复性和稳定性; 200 份临床样品检测结果与平板培养法的阳性符合率为 90.5%。P6 蛋白具有高度的表面暴露性和较强的抗原性, 可作为流感嗜血杆菌检测标的物, 胶体金免疫层析法具有快速、简便、灵敏的特点, 适用于呼吸道感染的临床快速检测。

关键词: 流感嗜血杆菌, 线性抗原表位, 胶体金免疫层析法, P6 蛋白

Colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of *Haemophilus influenzae*

Ye Tao¹, Huiwen Hao¹, Jie Li¹, Meng Wang¹, Yi Wang^{1,2,3}, Gaiping Zhang⁴, and Zheng Hu^{1,2,3}

1 School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

2 Key Laboratory of Fermentation Engineering (Hubei University of Technology), Ministry of Education, Wuhan 430068, Hubei, China

3 Hubei Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation, Wuhan 430068, Hubei, China

4 Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: To establish a novel colloidal gold immunochromatography assay (GICA) for rapid, sensitive and accurate

Received: October 17, 2018; **Accepted:** February 11, 2019

Corresponding author: Zheng Hu. Tel: +86-27-59750497; E-mail: zhenghu@mail.hbut.edu.cn

detection of *Haemophilus influenzae* infection by using the outer membrane protein P6 as detection target. First, the linear antigen epitope located in the extracellular domain of the P6 protein (GenBank accession number: AGH02799) was predicted by bioinformatics analysis. The region (62–75 aa of the protein) with strong antigen specificity was chosen and synthesized. Two rabbits were then immunized by the polypeptides (14 aa) for production of polyclonal antibodies. Then, the recombinant P6 proteins were also obtained to produce polyclonal antibodies. Finally, based on the two antibodies, a novel colloidal GICA for detection of *Haemophilus influenzae* infection was established and the specificity, sensitivity, repeatability and stability of this method were evaluated. At the same time, the method was tested in clinical simulation, and the plate culture method was used to verify its accuracy. The test strip for *Haemophilus influenzae* infection was successfully prepared. The detection limit of the test strip was as low as 1×10^5 CFU/mL and the whole process can be completed within 15 minutes. The strip specifically recognized *Haemophilus influenzae* and did not react with nine of other common respiratory pathogens such as *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumonia*, and *Legionella pneumophila*. And the strips could be stored at 25 °C for at least 6 months without losing sensitivity or specificity. The coincidence rate between the results of 200 clinical samples and the plate culture method was 90.5%. *Haemophilus influenzae* protein P6, which possessed a high degree of surface antigen accessibility and antigenicity, could be used as a marker for *Haemophilus influenzae* detection. The immunochromatographic colloidal gold test strip which bears the features of rapidity, convenience and sensitivity provides a unique tool for the on-site surveillance and diagnosis of *Haemophilus influenzae* infection in clinical test.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, linear antigen epitope, colloidal gold immunochromatography assay, protein P6

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, 简写 *H. influenzae*)是一种革兰氏阴性杆菌,是感染人类的一种重要的呼吸道病原微生物,根据有无荚膜可将其分类为荚膜型和无荚膜型,其中荚膜型又可分为 a–f 6 个血清型,无荚膜型只有一种不可分型流感嗜血杆菌,其中 b 型流感嗜血杆菌 (Hib) 是 5 岁以下儿童细菌性脑膜炎和其他侵入细菌性疾病的主要原因^[1]。目前世界范围内开展的 *H. influenzae* 血清学检查大多也只针对侵袭力较强的荚膜 b 型。而由于该型菌株荚膜多糖疫苗的成功研发与应用,其流行已被有效控制。近年来研究显示,不可分型流感嗜血杆菌 (NTHi) 是目前引起多种上呼吸道疾病和下呼吸道疾病的主要致病菌之一^[2],能引起包括急性中耳炎^[3]、肺炎、支气管炎^[4]、慢性阻塞性肺疾病和结膜炎^[5]等疾病。此外,NTHi 的发病率正逐年增加,其临床分离率已达 50% 以上^[6]。因此对这两种 *H. influenzae* 菌株同时进行快速、准确的检测,在感染早期进行诊断干预更具临床意义。

目前常见的 *H. influenzae* 检测方法主要有 3 类:血清学检测法^[7]、核酸检测法^[8]和病原体直接检测法^[9]。其中血清学检测法检测标的物为抗

荚膜抗体,无法检测出没有荚膜的 NTHi;核酸检测需要特殊试剂及设备;病原体直接检测法操作复杂、培养时间长。因此这 3 类方法难以满足临床快速简便精准检测需求。为了解决 *H. influenzae* 的检测,急需建立一种高灵敏度和高特异性的检测方法。胶体金免疫层析试纸快速检测技术具有快速、灵敏、简便、特异、无需特殊设备及试剂、结果判定直观等优点,目前已得到广泛应用^[10]。本研究根据胶体金免疫层析原理,基于针对流感嗜血杆菌特异性的表面蛋白胞外暴露区的高亲和力抗体,建立了一套 *H. influenzae* 的快速检测方法,为呼吸道感染的临床快速检测提供了初步的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

重组工程菌 pET-28a(+)-P6,由本实验室赵可胜构建;感受态细胞大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta 购自 TaKaRa 公司。流感嗜血杆菌标准菌株 (ATCC 49247) 及本实验涉及到的 4 种病原菌株肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, ATCC

25238)、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*, ATCC 33152)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, ATCC 15531)、卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*, ATCC 49619) 均购自美国菌种保藏中心;金黄色 (*Staphylococcus aureus*) 葡萄球菌由本实验室分离鉴定;其他病原菌株:肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytosis*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 均由湖北省武警总医院提供。

1.1.2 主要设备、试剂及层析试纸条耗材

无标记分子相互作用仪购自 ForteBio 公司; IPTG、BSA 购自 Biosharp 公司;二水合柠檬酸钠购自国药集团化学试剂有限公司;四水合氯金酸购自 Sigma 公司;羊抗兔 IgG 购自武汉飞羿科技有限公司;硝酸纤维素膜 (CN140) 购自 Sartorius 公司;玻璃纤维膜 (CB08)、吸水纸 (CH37K)、PVC 板 (SM31-40) 购自上海良信科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 人流感嗜血杆菌 P6 抗原的制备

流感嗜血杆菌 P6 蛋白胞外结构域单一线性表位抗原的制备:经生物信息学分析(表面可及性预测及线性表位预测均由武汉百意欣生物技术有限公司提供技术服务),选定人流感嗜血杆菌 P6 蛋白(GenBank 登录号:AGH02799.1) V62-E75 位的 14 个氨基酸组成的短肽作为制备兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白的线性抗原表位,该段氨基酸序列为 VLVEGNTDERGTPE (P6Line)。在氨基酸序列的 N 端添加 1 个半胱氨酸后,用多肽自动合成仪合成多肽并纯化,纯化后的多肽与载体蛋白 KLH (Keyhole limpet hemocyanin, 钥孔血蓝蛋白) 偶联,形成 P6Line-KLH 复合蛋白。

流感嗜血杆菌 P6-His 融合蛋白的制备:将重组工程菌 *E. coli* pET-28a-P6 接种于 LB 培养基,37 °C 培养至吸光度 $OD_{600}=0.6$,加入 IPTG 至终浓

度为 0.7 mmol/L,18 °C、170 r/min 诱导过夜,收集菌体,超声破碎后取沉淀和上清进行 SDS-PAGE 检测。取超声破碎上清液用 0.45 μm 的滤膜进行过滤后用 His Trap 亲和层析柱 (GE 公司) 进行纯化,按照说明书分步收集洗脱液,各取 10 μL 进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.2 抗人流感嗜血杆菌外膜蛋白 P6 多克隆抗体的制备和纯化

将 2 只新西兰大白兔分别免疫 P6Line-KLH 复合蛋白和 P6-His 融合蛋白,具体免疫方法如下:将抗原蛋白与佐剂以 1:1 (V/V) 混合,总体积 0.5 mL,抗原量 1 mg,使用 S10 高速分散器将抗原充分乳化,乳化后分别在兔腹部皮下多点注射,先后注射 3 次,每次间隔 7-10 d,除初次免疫使用弗氏完全佐剂,后续免疫均使用弗氏不完全佐剂,第 3 次注射 10-12 d 后,分别收集、分离得到含有流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗体的血清,分别记为 P6 蛋白胞外结构域单一线性表位抗体 (AbP6Line) 和 P6 融合蛋白多克隆抗体 (AbP6-His),ELISA 检测血清中兔抗人流感嗜血杆菌 P6 蛋白抗体的效价,效价均可达到 1:512 000 以上。

AbP6Line 的纯化:采用 GE 公司的 rProtein A 亲和层析柱,按照其说明书收集洗脱液,以磷酸盐为缓冲体系经超滤更换缓冲液后,使用 SMART-LIFESCIENCES 公司的 PabPur Sulfolink Beads 多肽亲和层析柱,按照其说明书偶联肽链 P6Line。经蛋白 A 亲和纯化后的抗体再次进行肽链亲和纯化,得到高纯度 AbP6Line。

AbP6-His 的纯化:采用 GE 公司的 rProtein A 亲和层析柱,按照其说明书收集洗脱液,以磷酸盐为缓冲体系超滤浓缩。超微量分光光度计测浓度定量,分装后贴上标签,使用离心冻干机冻至干粉状态,存于-80 °C 备用。

1.2.3 多克隆抗体效价检测及鉴定

分别以纯化的 P6-His 融合蛋白和 P6Line-KLH

为包被抗原,羊抗兔 IgG-HRP 为酶标二抗,用间接 ELISA 方法测定 2 种抗体的效价^[11]。结果判定方法, S/N=待检样品 OD_{450} /阴性对照 OD_{450} 。S/N>2.1 为阳性。以 S/N>2.1 所对应的抗体最高稀释倍数作为该抗体的效价。

生物膜干涉技术 (BLI) 检测:采用无标记分子相互作用仪分别对纯化后的 AbP6Line 和 AbP6-His 抗体进行抗原抗体相互作用力检测。将两种抗体分别固化到 AMC 传感器上,再浸入含分析物 (P6 重组抗原) 的缓冲液中进行结合,浓度梯度分别为 1 000 nmol/L、500 nmol/L、250 nmol/L、125 nmol/L、61.25 nmol/L。然后浸入缓冲溶液中进行解离,并利用分子互作仪的分析软件得到动力学常数。利用 GraphPad Prism 7 软件对数据进行整理生成结合解离曲线。

采用 Western blotting 对纯化后的 2 种抗体进行鉴定:离心收集 *H. influenzae* 菌体,经超声破碎、离心,分别收集菌体上清和沉淀进行 SDS-PAGE,得到 *H. influenzae* 菌体超声破碎上清和沉淀蛋白条带,转至 PVDF 膜,将制备的 2 种多克隆抗体分别作为一抗孵育,以 HRP 标记的羊抗兔为二抗,通过 ECL 化学发光进行显影。

1.2.4 免疫层析试纸条的制备

胶体金结合垫的制备:采用柠檬酸钠还原法^[10]制备 40 nm 的胶体金颗粒。取 1 mL 制备好的胶体金加 2 μ L 的 0.2 mol/L K_2CO_3 调 pH 至 8.0,1 mL 胶体金标记 4 μ g AbP6Line,标记好后离心重悬至 100 μ L,以 8 μ L/cm 喷涂于玻璃纤维膜上,37 $^{\circ}$ C 鼓风干燥箱放置 1 h 以上。

检测线和质控线的包被:将 P6 融合蛋白多克隆抗体和羊抗兔 IgG 分别稀释至 2 mg/mL 和 1 mg/mL,以 1 μ L/cm 通过喷金划膜仪在硝酸纤维素膜上划线,分别作为检测线 (T 线) 和质控线 (C 线),37 $^{\circ}$ C 鼓风干燥箱放置 12 h 以上。

免疫层析试纸条的组装:将样品垫、结合垫、吸水纸依次贴在 PVC 底板上,用斩切机将试纸切割

成 0.4 cm 的试纸条,然后与干燥剂封装在铝箔袋内。

1.2.5 测试方法与判定标准

将待检样品溶于生理盐水 (0.85% NaCl 溶液),取 150 μ L 滴在样品垫上,层析 15 min 后判断结果。若 C 线和 T 线均出现条带,则结果为阳性,若 C 线有条带且 T 线无条带,则结果为阴性,若 C 线和 T 线均无条带,说明试纸条失效,结果无效。

1.2.6 试纸条的质量测试

特异性测试:用试纸条分别检测流感嗜血杆菌 *H. influenzae*、肺炎链球菌 *S. pneumoniae*、嗜肺军团菌 *L. pneumophila*、肺炎支原体 *M. pneumoniae*、卡他莫拉菌 *M. catarrhalis*、金黄色葡萄球菌 *S. aureus*、肺炎克雷伯菌 *K. pneumoniae*、产酸克雷伯菌 *K. oxytoca*、鲍曼不动杆菌 *A. baumannii*、铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 十种呼吸道常见病原菌稀释液 (10 mmol/L PBS 将菌体浓度稀释至 1×10^8 CFU/mL),鉴定试纸条的特异性。

灵敏性测试:将流感嗜血杆菌用 10 mmol/L PBS 分别稀释至 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 CFU/mL,以能观察到阳性结果的最低菌浓度为试纸条的检测极限。

稳定性和重复性测试:将 3 个不同批次的试纸条置于 25 $^{\circ}$ C 储存 6 个月,每隔 30 d 用阳性样本和阴性样本进行检测,且每个样本检测 3 次以观察重复性。

1.2.7 试纸条的初步临床应用

用所制备的流感嗜血杆菌的胶体金试纸条对采集的湖北省中西医结合医院的 200 份病人咽拭子样品进行检测,同时用平板培养法做平行试验,比较两者的符合率情况,评价该方法的临床应用价值。

2 结果与分析

2.1 重组 P6 抗原的制备和纯化

重组工程菌经 IPTG 诱导表达,取表达前菌液、表达后菌液、表达后菌体超声破碎上清和沉

淀进行 SDS-PAGE 检测, 如图 1 所示, 可看到约在分子量 14 kDa 处出现表达条带, 与预期大小一致, 表明表达产物为 rP6 蛋白, 且部分可溶, 取超破上清经镍柱亲和纯化, 目标蛋白在 100 mmol/L 咪唑浓度的洗脱液中纯度达到 90% 以上 (图 1), 测定浓度后离心冻干得到 10 mg 纯蛋白。

2.2 抗人流感嗜血杆菌外膜蛋白 P6 多克隆抗体的纯化

AbP6Line 经 A 蛋白亲和纯化、肽链亲和纯化, AbP6-His 经 A 蛋白亲和纯化分别得到 AbP6Line 纯抗体 5.69 mg、AbP6-His 纯抗体 268.29 mg, 纯度均达到 90% 以上。

2.3 抗人流感嗜血杆菌外膜蛋白 P6 多克隆抗体的鉴定

用间接 ELISA 方法测定 2 种抗体的效价, 结果如图 2 所示。当用倍比稀释法将待检抗体稀释 512 000 倍时, AbP6Line 和 AbP6-His 的 S/N 值分别为 4.46、4.65, 均大于 2.1, 则判定为阳性结果。因此两种待测抗体的效价均达到 1 : 512 000。

采用无标记分子相互作用仪分别对纯化后的 AbP6Line 和 AbP6-His 抗体进行抗原抗体相

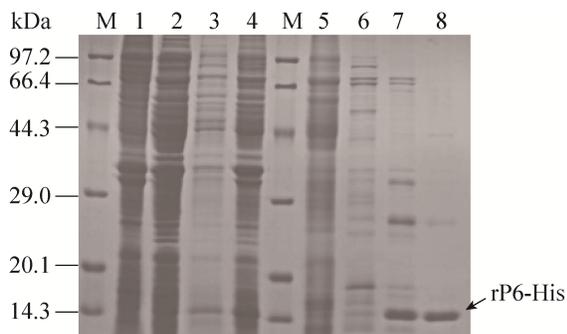


图 1 P6-His 融合蛋白的诱导表达及纯化结果

Fig. 1 Expression and purification of recombinant protein P6-His. M: protein marker; 1: negative control; 2: recombinant P6 expression after 4 h IPTG induction; 3: supernatant collected from ultrasound disrupted *E. coli*; 4: precipitation collected from ultrasound disrupted *E. coli*; 5: penetrating fluid; 6: eluent with 20 mmol/L imidazole; 7: eluent with 40 mmol/L imidazole; 8: eluent with 100 mmol/L imidazole.

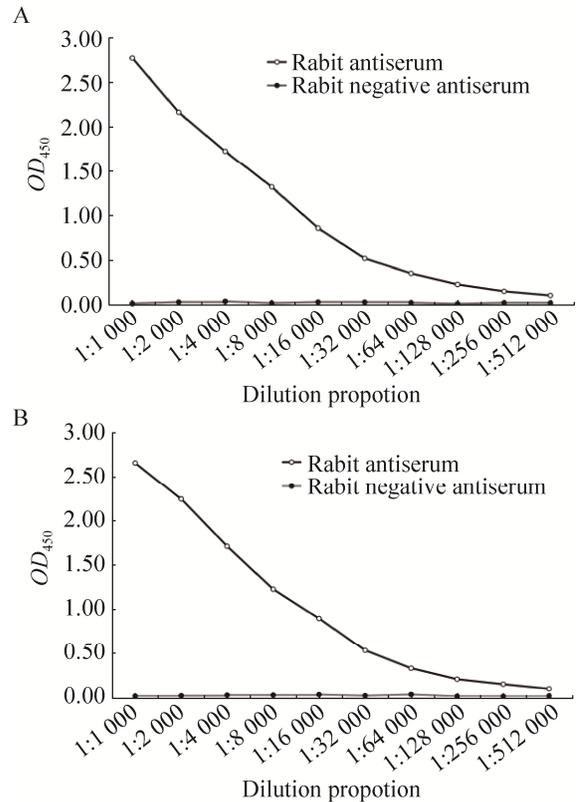


图 2 间接 ELISA 法测定抗体效价

Fig. 2 Determination of antibody titer by indirect ELISA. (A) P6-Line complex protein antiserum titer. (B) P6-His recombinant protein antiserum titer.

互作用力检测, 结果见图 3 和表 1。由曲线可看出, 2 种抗体分别与抗原相互作用, 结果显示相互作用力均在 10^8 以上, 有较好的亲和力^[12]。表中 K_D 值为解离速率常数 (k_{dis}) 和结合速率 (k_{on}) 比值, 解离速率在 10^{-4} , 说明抗原抗体结合得很稳定, 解离常数越小, K_D 越小; 而 K_D 值越小则抗原抗体的相互作用力越强; $R^2 > 0.9$, 说明拟合曲线与实际曲线拟合度高, 数据更有说服力; 由此可得 2 种抗体均有较好的亲和力。

Western blotting 鉴定 AbP6Line 结果见图 4, 泳道 1 和泳道 2 在 17 kDa 以下均出现一条清晰条带, 与 Hi 天然表面蛋白 P6 的分子量 (约 16 kDa) 吻合, 且没有其他杂带, 表明 AbP6Line 能够高特异性识别天然 Hi 抗原。

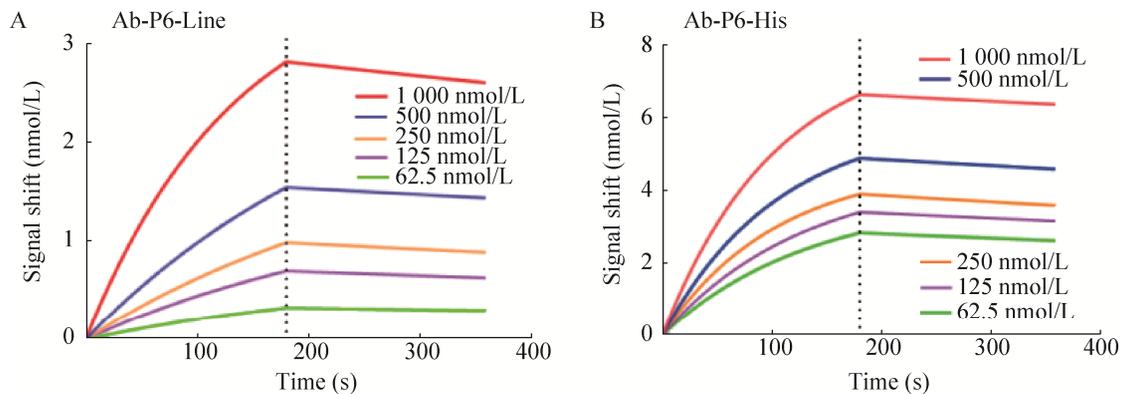


图3 生物膜干涉技术 (BLI) 检测抗体亲和力

Fig. 3 Detection of antibody affinity by Bio-layer interference (BLI). (A) AbP6Line binding and dissociation curves. (B) AbP6-His binding and dissociation curves.

表1 生物膜干涉技术 (BLI) 检测数据结果

Table 1 Data results of Bio-layer interference (BLI) test

	Concentration (nmol/L)	Response	K_D (mol/L)	K_{on} (1/Ms)	K_{dis} (1/s)	Full R^2
AbP6-Line	1 000.00	2.891 8	3.77E-08	6.04E+03	2.28E-04	0.996 8
	500.00	1.519 4	4.99E-08	8.19E+03	4.09E-04	0.998 8
	250.00	0.974 9	6.29E-08	9.46E+03	5.95E-04	0.998 5
	125.00	0.636 9	2.65E-08	1.10E+04	2.92E-04	0.991 0
	61.25	0.379 2	4.44E-08	9.90E+03	4.39E-04	0.997 4
AbP6-His	1 000.00	6.558 4	9.70E-09	2.38E+04	2.31E-04	0.994 5
	500.00	4.856 2	1.18E-08	3.03E+04	3.57E-04	0.991 9
	250.00	3.891 8	1.03E-08	4.58E+04	4.72E-04	0.987 5
	125.00	3.371 6	8.42E-09	4.95E+04	4.17E-04	0.991 8
	61.25	2.807 2	6.28E-09	7.03E+04	4.42E-04	0.990 8

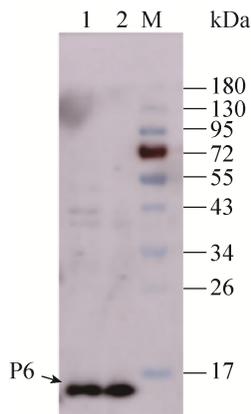


图4 Western blotting 鉴定 AbP6Line

Fig. 4 Identification of AbP6Line by Western blotting. M: protein marker; 1: supernatant of *H. influenzae* after ultrasonication; 2: recipitation of *H. influenzae* after ultrasonication.

Western blotting 鉴定 AbP6-His 结果见图 5, 泳道 1、2、3 在 17 kDa 以下出现条带, 根据分子量大小确定泳道 1 中条带为 rP6-His 重组蛋白 (约 14 kDa), 泳道 2、3 中为 Hi 天然 P6 蛋白 (约 16 kDa), 表明 AbP6-His 能够识别天然 Hi 抗原。

2.4 特异性测试

检测流感嗜血杆菌的试纸条, C 线和 T 线均出现条带, 结果为阳性; 其他呼吸道常见病原菌, 如肺炎链球菌 *S. pneumoniae*、嗜肺军团菌 *L. pneumophila*、肺炎支原体 *M. pneumoniae*、卡他莫拉菌 *M. catarrhalis*、金黄色葡萄球菌 *S. aureus*、肺炎克雷伯菌 *K. pneumoniae*、产酸克雷伯菌

K. oxytoca、鲍曼不动杆菌 *A. baumannii*、铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 检测结果均为阴性 (图 6), 说明制备的流感嗜血杆菌检测试纸条具有较高的特异性。

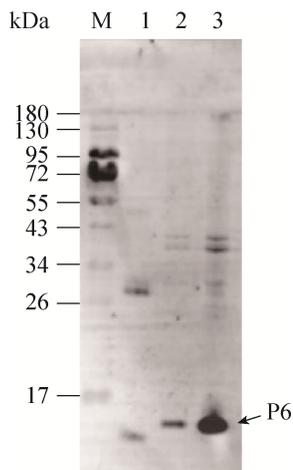


图 5 Western blotting 鉴定 AbP6-His

Fig. 5 Identification of AbP6-His by Western blotting. M: protein marker; 1: recombinant protein P6-His; 2: supernatant of *H. influenzae* after ultrasonication; 3: precipitation of *H. influenzae* after ultrasonication.

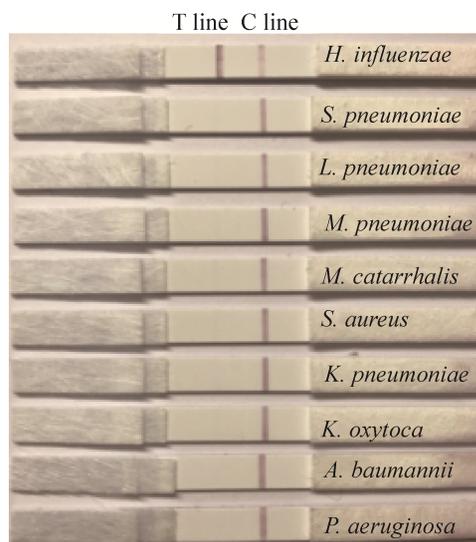


图 6 流感嗜血杆菌胶体金免疫层析试纸条的特异性检测

Fig. 6 Specificity test of *H. influenzae* colloidal gold immunochromatography strip.

2.5 灵敏性测试

当样本中菌浓度稀释至 1×10^5 CFU/mL 时, T 线上出现一条较弱的红带, 继续稀释样本进行检测, 仅在 C 线上出现红带, 说明在流感嗜血杆菌的连续稀释液中, 试纸条的检出限为 1×10^5 CFU/mL, 结果见图 7。

2.6 稳定性和重复性测试

将试纸条置于 25°C 储存 6 个月后取出, 对流感嗜血杆菌进行检测, 其特异性和灵敏性都没有发生明显变化, 且平行实验结果稳定。

2.7 初步临床应用检测结果

2017 年 11 月至 2018 年 2 月对湖北省中西医结合医院呼吸内科所采集的 200 份病人咽拭子临床样品, 如表 2, 采用所制备的流感嗜血杆菌胶体金试纸条进行检测, 结果检出 57 份阳性样品, 平板培养法检出的阳性样品为 63 份, 二者阳性符合率为 90.5%。

3 讨论

流感嗜血杆菌是一种可引起人类严重呼吸道疾病的病原微生物, 其主要致病型为 Hib 和

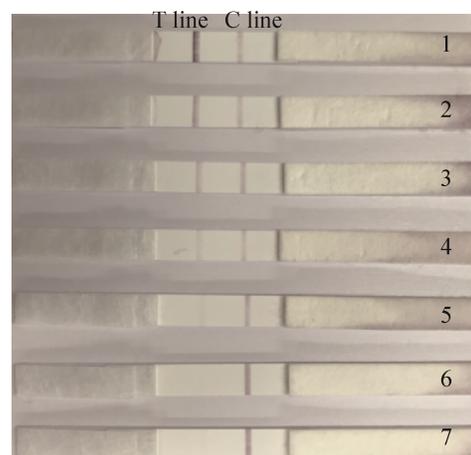


图 7 流感嗜血杆菌胶体金免疫层析试纸条的灵敏度检测
Fig. 7 Sensitive test of *H. influenzae* colloidal gold immunochromatography strip. 1-6: represents the concentration of *H. influenzae*: 1×10^9 CFU/mL, 1×10^8 CFU/mL, 1×10^7 CFU/mL, 1×10^6 CFU/mL, 1×10^5 CFU/mL, 1×10^4 CFU/mL; 7: negative control.

表 2 流感嗜血杆菌胶体金免疫层析试纸条的初步临床检测结果

Table 2 Preliminary clinical test results of *Haemophilus influenzae* colloidal gold immunochromatographic test strip

		Test strip		Total
		Positive sample	Negative sample	
Culture	Positive sample	57	6	63
	Negative sample	0	137	137
	Total	57	143	200
Positive coincidence rate		90.5%		

NTHi^[13]。因此, 开发用于有效检测两种不同流感嗜血杆菌菌株的方法十分重要。研究发现, P6 蛋白是一种肽聚糖偶联的脂蛋白, 在所有 *H. influenzae* 菌株间均有表达, 其具有种属特异性、广谱表达性和充分的表面暴露性^[14], 且在一些临床样本中 P6 蛋白序列或基因序列都具有高度保守性^[15-16], 因此本研究确定以 P6 蛋白作为 *H. influenzae* 的检测标的物。

在本研究中, 通过生物信息学方法预测 P6 蛋白胞外结构域单一线性表位抗原决定簇, 选定一条由 14 个氨基酸序列组成的短肽作为线性表位抗原, 免疫得到兔抗血清, 经 A 蛋白亲和纯化、免疫亲和纯化得到纯抗体, 间接 ELISA 测定效价均达到 1 : 512 000, 且通过生物膜干涉技术 (BLI) 验证均有较高亲和力, 同时 Western blotting 鉴定其与天然 *H. influenzae* 抗原结合特异性强, 条带单一, 达到单克隆抗体的效果。将 AbP6Line 作为金标抗体、AbP6-His 作为捕获抗体, 形成双抗体夹心, 制备免疫层析检测试纸条, 具有良好的灵敏度和特异性, 此外, 用本实验所制备的流感嗜血杆菌胶体金试纸条和平板培养法同时对 200 份临床样品进行检测, 结果两者阳性符合率为 90.5%。本研究建立的双抗夹心免疫层析法可在 15 min 内得到准确结果, 相较于其他传统检测流感嗜血杆菌的方法, 具有快速、简便、特异、灵敏的特点, 不需要专业人员的培训和昂贵的仪器

设备, 可进行床旁检测, 尤其适用于医院对呼吸道感染病人的实时诊断, 有助于精准检测及精准治疗, 有利于解决抗生素滥用等问题, 具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Hu HL, Hu YY, He LJ, et al. Study on *Haemophilus influenzae* type b: data from autopsy of community-acquired pneumonia among children. *Chin J Epidemiol*, 2005, 26(8): 604–607 (in Chinese). 胡惠丽, 胡翼云, 何乐健, 等. 儿童社区获得性肺炎死亡病例中 b 型流感嗜血杆菌的检测. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(8): 604–607.
- [2] Mason KW, Zhu DZ, Scheuer CA, et al. Reduction of nasal colonization of nontypeable *Haemophilus influenzae* following intranasal immunization with rLP4/rLP6/UspA2 proteins combined with aqueous formulation of RC529. *Vaccine*, 2004, 22(25/26): 3449–3456.
- [3] Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA*, 2002, 287(13): 1710–1715.
- [4] Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 2006, 116(7): 1121–1126.
- [5] Livorsi DJ, MacNeil JR, Cohn AC, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* in the United States, 1999–2008: epidemiology and outcomes. *J Infect*, 2012, 65(6): 496–504.
- [6] Liu DH, Hu YH. The infection status and antibiotic resistance of nontypeable *Haemophilus influenzae* in children with respiratory tract infection. *Chin J Gen Pract*, 2014, 12(8): 1304–1305, 1308 (in Chinese). 刘东华, 胡艳华. 儿童呼吸道不可分型流感嗜血杆菌感染及耐药现状. *中华全科医学*, 2014, 12(8): 1304–1305, 1308.

- [7] Martin D, Hamel J, Brodeur BR, et al. Antigenic relationships among the porin proteins of encapsulated *Haemophilus influenzae* clones. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(8): 1720–1724.
- [8] Van Ketel RJ, de Wever B, van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J Med Microbiol*, 1990, 33(4): 271–276.
- [9] Chapin KC, Doern GV. Selective media for recovery of *Haemophilus influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora. *J Clin Microbiol*, 1983, 17(6): 1163–1165.
- [10] Zhang GP. Immunochromatographic Lateral Flow Strip Test. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2015: 115–120 (in Chinese).
张改平. 免疫层析试纸快速检测技术. 郑州: 河南科学技术出版社, 2015: 115–120.
- [11] Wang H, Yang B, Zhao KS, et al. Preparation and identification of polyclonal antibodies against *Moraxella catarrhalis* USPA1 protein. *Chin J Biotech*, 2018, 34(1): 102–109 (in Chinese).
王辉, 杨波, 赵可胜, 等. 卡他莫拉菌 USPA1 蛋白多克隆抗体的制备及鉴定. *生物工程学报*, 2018, 34(1): 102–109.
- [12] Estep P, Reid F, Nauman C, et al. High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. *mAbs*, 2013, 5(2): 270–278.
- [13] Yadav MC, Chakraborti A, Ray P, et al. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* by *hel* gene polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 37(3): 190–195.
- [14] Zhao Q. Outer membrane protein and immune characteristics of *Haemophilus influenzae*. *Hebei Med J*, 2014, 36(1): 111–113 (in Chinese).
赵青. 流感嗜血杆菌外膜蛋白及免疫特性. *河北医药*, 2014, 36(1): 111–113.
- [15] Zhang YY, Wang RS, Chen X, et al. Predominant T-B-combined epitopes and their immunogenicity of P6 outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Chin J Zoonoses*, 2017, 33(12): 1053–1059 (in Chinese).
张颖颖, 王荣山, 陈旭, 等. 不可分型流感嗜血杆菌 OMP6 优势 T-B 联合抗原表位及其免疫原性研究. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(12): 1053–1059.
- [16] He DY, Li SX, Jia TJ, et al. Progress in molecular biology and immunology of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. *J Pract Med*, 2011, 27(14): 2680–2681 (in Chinese).
何多姣, 李双霞, 贾天军, 等. 流感嗜血杆菌外膜蛋白 P6 分子生物学及免疫学研究进展. *实用医学杂志*, 2011, 27(14): 2680–2681.

(本文责编 郝丽芳)