

# 双抗夹心酶联免疫吸附快速检测冷鲜肉中的6种血清型沙门氏菌

张 帅, 齐颖颖, 张红星\*, 王怡雯, 谢远红, 刘 慧

(北京农学院食品科学与工程学院, 食品质量与安全北京实验室, 农产品有害微生物及农残安全检测与控制北京市重点实验室, 北京市食品安全免疫快速检测工程技术研究中心, 微生物制剂关键技术开发北京市工程实验室, 北京 102206)

**摘 要:** 为快速检测冷鲜肉中的沙门氏菌, 筛选出1株产抗6种沙门氏菌单克隆抗体的细胞株, 运用产生的抗体建立酶联免疫吸附检测方法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。实验采用6种血清型致病沙门氏菌制备出混合抗原, 对BALB/c小鼠及新西兰大白兔进行免疫, 运用杂交瘤技术进行细胞融合, 制备出抗沙门氏菌单克隆抗体以及多克隆抗体, 并建立双抗夹心ELISA体系检测冷鲜肉中沙门氏菌。结果表明, 成功筛选出1株能稳定分泌抗沙门氏菌的单克隆抗体杂交瘤细胞株6E7, 保藏编号为CGMCC 10313以及多克隆抗体, 效价分别为 $1:1.28 \times 10^6$ 和 $1:8.0 \times 10^5$ ; 将多抗作为包被抗体吸附于96孔酶标板上, 并用辣根过氧化物酶标记单抗, 建立双抗夹心ELISA体系; 检测模拟污染肉样中沙门氏菌, 其检测限为800 CFU/g; 并与其他血清型沙门氏菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌、大肠杆菌O157:H7、金黄色葡萄球菌及单增李斯特菌均无交叉反应, 特异性良好。

**关键词:** 沙门氏菌; 杂交瘤技术; 单克隆抗体; 双抗夹心ELISA

## Rapid Detection of Six *Salmonella* Serotypes in Chilled Fresh Meat by Double Antibody Sandwich ELISA

ZHANG Shuai, QI Yingying, ZHANG Hongxing\*, WANG Yiwen, XIE Yuanhong, LIU Hui

(Beijing Laboratory of Food Quality and Safety, Beijing Key Laboratory of Agricultural Product Detection and Control for Spoilage Organisms and Pesticide, Beijing Engineering Technology Research Center of Food Safety Immune Rapid Detection, Beijing Engineering Laboratory of Key Technology Development of Microecology, College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract:** This study aimed to prepare antibodies specific for *Salmonella* and to use them establish an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) system for the rapid detection of six *Salmonella* serotypes in chilled fresh meat. In this study, BALB/c mice and rabbits were immunized with mixed antigens from six pathogenic strains of *Salmonella* for the production of monoclonal antibodies using hybridoma technology for cell fusion. The results showed that a hybridoma cell line (6E7 CGMCC 10313) which could stably secrete monoclonal antibody (McAb, M23) specific for *Salmonella* was successfully screened and the polyclonal antibody (P23) was also obtained at the same time. The titer of the prepared highly pure monoclonal and polyclonal antibodies was  $1:1.28 \times 10^6$  and  $1:8.0 \times 10^5$ , respectively. P23 was adsorbed on 96-well microtiter plates as coating antibody and M23 was labeled with horseradish peroxidase for the establishment of sandwich ELISA. The limit of detection (LOD) for *Salmonella* in artificially contaminated meat samples was 800 CFU/g. There was no cross-reactivity with *Shigella*, *Enterobacter sakazakii*, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and other *Salmonella*.

**Key words:** *Salmonella*; hybridoma technology; monoclonal antibody; sandwich ELISA

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201616034

中图分类号: TS251.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 16-0211-05

收稿日期: 2015-12-11

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863计划) 项目 (SS2012AA101606-5; 2012BAD28B02-01);

北京市属高等学校高层次人才引进与培养长城学者计划项目 (CIT&TCD20140315)

作者简介: 张帅 (1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全快速检测。E-mail: 1570129950@163.com

\*通信作者: 张红星 (1975—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全检测与控制。E-mail: hxzhang511@163.com

引文格式:

张帅, 齐颖颖, 张红星, 等. 双抗夹心酶联免疫吸附快速检测冷鲜肉中的6种血清型沙门氏菌[J]. 食品科学, 2016, 37(16): 211-215. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201616034. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Shuai, QI Yingying, ZHANG Hongxing, et al. Rapid detection of six *Salmonella* serotypes in chilled fresh meat by double antibody sandwich ELISA[J]. Food Science, 2016, 37(16): 211-215. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201616034. <http://www.spkx.net.cn>

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是革兰氏阴性菌, 无芽孢, 周生鞭毛, 需氧或兼性厌氧<sup>[1]</sup>, 对营养要求较低, 能在普通的培养基上生长。沙门氏菌是自然界中普遍存在的一种食源性致病菌, 是最重要的人畜共患病病原菌<sup>[2]</sup>。在世界各地的食物中毒中沙门氏菌引起的中毒病例占第一位<sup>[3]</sup>, 我国内陆地区也以沙门氏菌为首<sup>[4]</sup>。沙门氏菌对人类身体健康和生命安全已构成较大威胁, 常引起人类腹泻、呕吐、胃肠炎、高烧和败血症等疾病<sup>[5-6]</sup>。人类患病的原因主要为食用了被沙门氏菌感染的食品, 其中因食用被沙门氏菌污染的肉制品而患病的占多数<sup>[7-8]</sup>。

目前, 检测沙门氏菌的方法主要有传统的生物学分离培养法、分子生物学检测法、免疫检测法。其中传统的细菌培养及生化反应实验不仅费时费力还相当繁琐<sup>[9]</sup>, 一般需5~10 d, 分子检测方法价格昂贵。包括免疫检测法在内, 多数方法为检测单一一种的沙门氏菌, 而且灵敏度和特异性各有不同。基于冷鲜肉中常见沙门氏菌包括鸡沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、鸭沙门氏菌和肠炎沙门氏菌的现状, 本研究运用以上6种血清型的沙门氏菌混合免疫, 成功取得1株产生抗6种血清型的沙门氏菌单克隆抗体的细胞株和多克隆抗体, 进而研制出双抗夹心酶联免疫吸附检测方法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 相对于其他方法, 此方法不但具有广谱性, 而且提高了灵敏度、增强了特异性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

鸡伤寒沙门氏菌 (ATCC54003)、鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC13311)、甲型副伤寒沙门氏菌 (ATCC9150)、猪霍乱沙门氏菌 (ATCC10708)、鸭沙门氏菌 (ATCC9270) 和肠炎沙门氏菌 (ATCC9270); 都柏林沙门氏菌 (CMCC50761)、伤寒沙门氏菌 (CMCC50041)、乙型副伤寒沙门氏菌 (CMCC50071)、志贺氏菌 (ATCC25931)、阪崎肠杆菌 (ATCC29544)、大肠杆菌 O157:H7 (CMCC44828)、金黄色葡萄球菌 (CMCC26003) 及单增李斯特菌 (ATCC54003) 等标准株为本实验室保存。

BALB/c小鼠和新西兰大白兔由北京实验动物中心提供。小鼠SP2/0骨髓瘤细胞、6种沙门氏菌混合免疫原和检测原由北京农学院食品科学与工程学院保存和制备。

沙门氏菌培养基 北京陆桥技术有限责任公司; HAT培养基、HT培养基、聚乙二醇4000、完全佐剂和不完全佐剂以及小鼠单克隆抗体亚型鉴定试剂盒 美国Sigma公司; DMEM培养基、细胞培养板 美国Gibco公司; 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗小鼠IgG 北京华美生科生物技术有限公司。其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

酶标测试仪 美国BioTek公司; NANODROP 2000、4MK2型洗板机 美国Thermo公司; 二氧化碳培养箱 上海力康公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 抗原制备及动物免疫

将鸡伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、鸭沙门氏菌和肠炎沙门氏菌活化后分别接种于普通 (luria-bertani, LB) 培养基, 静置37℃培养24 h; 挑取单菌落接种于10 mL LB培养基中, 180 r/min摇床37℃培养24 h; 将其菌液按1%扩大培养至2 L, 37℃、180 r/min摇床培养12 h; 分别取少量6株菌的菌液, 采用三梯度三平行进行平板计数, 分别取1 mL菌液4 000 r/min离心15 min, 收集菌体; 分别用pH 7.4、0.01 mol/L磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤菌体3次, 用10 mL 0.01 mol/L的PBS重悬; 加100 μL福尔马林溶液, 室温条件下放置24 h灭活; 灭活结束后, 分别用0.01 mol/L PBS洗涤3次并调节浓度, 最后将6株菌液按1:1:1:1:1:1均匀混合, 得到混合沙门氏菌抗原, 调整抗原数量浓度为10<sup>9</sup> CFU/mL, 于-20℃保存备用。

选取8只6周雌性BALB/c小鼠, 初次基础免疫采用尾静脉注射50 μL自制免疫原; 二次基础免疫采用尾静脉30 μL自制免疫原。免疫间隔为2周。内眦取血并分离血清, 间接ELISA检测小鼠血清抗体效价。待血清效价达到1:400 000后采用腹腔注射加强免疫, 于融合前3 d脾脏免疫注射免疫原20 μL加强免疫<sup>[10]</sup>。

采用6株混合沙门氏菌特异性抗原作为免疫原, 进行背部皮下多点免疫新西兰大白兔, 先与等量完全弗氏

佐剂混合, 抗原免疫量为200 μL/只; 而后与不完全弗氏佐剂混合, 抗原免疫量为100 μL/只。每周进行耳静脉取血, 进行间接非竞争ELISA法测定抗体效价, 待血清效价达到1:16 000 000后进行动脉取血, 用辛酸-硫酸铵法纯化多抗, 测得其蛋白质量浓度后于-20 °C分装保存<sup>[11]</sup>。

### 1.3.2 杂交瘤细胞株的建立

取对数生长期的鼠SP2/0骨髓瘤细胞与免疫脾细胞, 按常规方法50%聚乙二醇进行细胞融合。检测培养上清抗体效价, 选择强阳性的细胞, 从而进行数次有限稀释亚克隆筛选培养, 直至100%阳性。制备出稳定的分泌高特异性、高效价、高亲和力抗体的杂交瘤细胞株, 置于液氮中。

### 1.3.3 单抗的制备及抗体的特性分析

将抗沙门氏菌杂交瘤细胞克隆及扩大培养接种于提前注射石蜡油的雌性BALB/c小鼠腹腔, 诱生腹水产生抗沙门氏菌单克隆抗体。7~10 d后收集3~9 mL腹水进行抗体的ProteinG纯化, 采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测抗体纯度<sup>[12-13]</sup>; 采用紫外吸收法测定抗体质量浓度; 采用间接ELISA法进行抗体效价测定; 采用Sigma公司抗体亚型检测试剂盒鉴定抗体亚型。采用高碘酸钠的方法进行抗体标酶。

### 1.3.4 双抗体夹心ELISA体系的建立

采用棋盘滴定法确定包被抗体和酶标单抗的稀释度。将实验所得抗沙门氏菌多克隆抗体用包被液做不同质量浓度稀释至0~2.5 μg/mL, 横向加入96孔酶标板中, 100 μL/孔, 于37 °C孵育2 h, 4 °C过夜; 次日, 用PBST (0.5%吐温-20的PBS) 洗涤3次, 每次3 min; 每孔加入封闭液 (含1%牛血清白蛋白的PBS) 于37 °C封闭1 h; PBST洗涤3次, 每次3 min; 加入菌液和PBS空白对照, 100 μL/孔, 37 °C孵育30 min后用PBST洗涤3次, 每次3 min; 用PBS将HRP标记单抗稀释0~1.5 μg/mL, 100 μL/孔, 纵向加入。37 °C孵育1 h, 之后PBST洗涤5次, 每次2 min; 使用三甲基苯底物显色液显色, 100 μL/孔, 避光作用5 min。以2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止显色反应, 50 μL/孔。酶标仪检测OD<sub>450 nm</sub>, 选取P/N值>2.1且OD<sub>450 nm</sub>值接近1的孔对应的稀释度为夹心ELISA体系中的抗体最佳工作质量浓度。

### 1.3.5 ELISA体系的灵敏度和特异性

分别以鸡伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、鸭沙门氏菌和肠炎沙门氏菌6种血清型为检测原, 模拟ELISA体系的检测。用样品稀释液将上述沙门氏菌稀释成1.6×10<sup>6</sup>、4×10<sup>5</sup>、1×10<sup>5</sup>、2.5×10<sup>4</sup>、6.25×10<sup>3</sup>、1.56×10<sup>3</sup>、3.9×10<sup>2</sup>、1×10<sup>2</sup> CFU/mL, 按照自制ELISA检测方法步骤进行检测, 并绘制标准曲线。

将都柏林沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌、大肠杆菌O157:H7、

金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌稀释成1×10<sup>8</sup>、1×10<sup>7</sup>、1×10<sup>6</sup>、1×10<sup>5</sup>、1×10<sup>4</sup>、1×10<sup>3</sup> CFU/mL, 于本ELISA体系中测定OD<sub>450 nm</sub>值, 并设有阴性及阳性对照, 每个浓度做8次测定平均值, 做3次重复实验, 以检测体系的特异性和实用性。

将整块鸡胸肉紫外灯照射30 min, 每10 min翻转一次, 以杀死表面原先存在的杂菌, 无菌称量10 g鸡胸肉<sup>[14]</sup>。将沙门氏菌液污染肉样2 min, 取出沥干, 污染肉样均质5 min, 取均质液进行梯度稀释, 用该ELISA体系检测, 确定本试剂盒的灵敏度。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗体鉴定结果

将得到的1株杂交瘤细胞注射到成年BALB/c小鼠腹腔内诱发腹水, 每只获取3~9 mL腹水, 经间接ELISA检测, 腹水效价为1:1.28×10<sup>6</sup>, 用Sigma公司的抗体亚型试剂盒鉴定单抗为IgG2a; 两抗体的蛋白质量浓度和纯度见表1。

表1 抗体鉴定结果  
Table 1 Results of antibody identification

抗体	效价	蛋白含量/(mg/mL)	抗体纯度/%	亚型
M23	1:1.28×10 <sup>6</sup>	4.3	98.21	IgG2a
P23	1:8.0×10 <sup>5</sup>	36.28	93.22	

### 2.2 双抗体夹心ELISA体系的确立

棋盘滴定法结果表明, 当包被抗体稀释度为1:400且血清稀释度为1:1 600时, OD<sub>450 nm</sub>值为1.012, 最接近1.0, 所以确定了该体系抗沙门氏菌多克隆抗体作为包被抗体的最佳包被质量浓度为2.8 μg/mL<sup>[12]</sup>; 辣根过氧化物酶标记抗沙门氏菌单克隆抗体的最佳质量浓度为1.3 μg/mL。进而制备成检测各类冷鲜肉中沙门氏菌的双抗体夹心ELISA体系。

表2 棋盘滴定法结果 (OD<sub>450 nm</sub>值)  
Table 2 Results of checkerboard titration (OD<sub>450 nm</sub>)

血清稀释度	包被抗体稀释度									
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600
1:400	2.300	2.253	2.008	1.644	1.486	1.267	0.976	0.665	0.388	0.169
1:800	2.074	1.954	1.488	1.120	0.842	0.628	0.517	0.367	0.153	0.106
1:1 600	1.998	1.803	1.477	1.012	0.742	0.538	0.257	0.122	0.097	0.093
1:3 200	1.884	1.744	1.965	1.427	0.530	0.301	0.159	0.082	0.061	0.045
1:6 400	1.767	1.670	1.353	0.754	0.378	0.202	0.092	0.041	0.023	0.021
阴性对照	0.026	0.020	0.023	0.021	0.029	0.028	0.028	0.027	0.026	0.025
空白对照	0.012	0.013	0.012	0.015	0.014	0.013	0.012	0.011	0.010	0.012

### 2.3 ELISA体系灵敏度和特异性

将上述6种血清型沙门氏菌分别稀释成1.6×10<sup>6</sup>、4×10<sup>5</sup>、1×10<sup>5</sup>、2.5×10<sup>4</sup>、6.25×10<sup>3</sup>、1.56×10<sup>3</sup>、3.9×10<sup>2</sup>、1×10<sup>2</sup> CFU/mL, 按照自制ELISA检测方法步骤进行检测, 绘制出标准曲线见图1。

将沙门氏菌污染肉样,采用本体系对其进行检测,见图2,结果表明该ELISA体系的检出限为800 CFU/g。

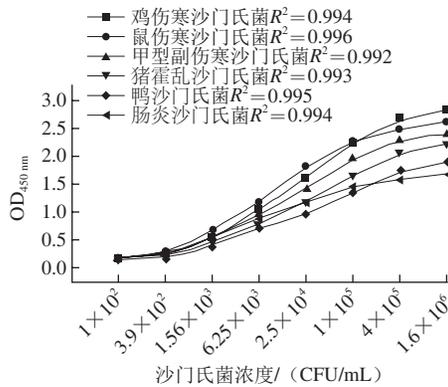


图1 单抗标准曲线

Fig. 1 Standard curve for monoclonal antibody M23

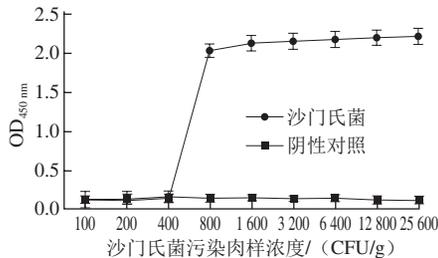


图2 沙门氏菌模拟检测结果

Fig. 2 Result of simulation for *Salmonella* detection

将都柏林沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌、大肠杆菌O157:H7、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌稀释成 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  CFU/mL,于本ELISA体系中测定 $OD_{450\text{ nm}}$ 值,并设有阴性及阳性对照,每个浓度进行8次测定,取平均值,做3次重复实验。图3结果表明,阳性正常显色,而 $10^3$  CFU/mL及以下浓度的其他检测菌株均无显色。由此说明本试剂盒与都柏林沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、阪崎肠杆菌、大肠杆菌O157:H7、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌无交叉反应,特异性良好。

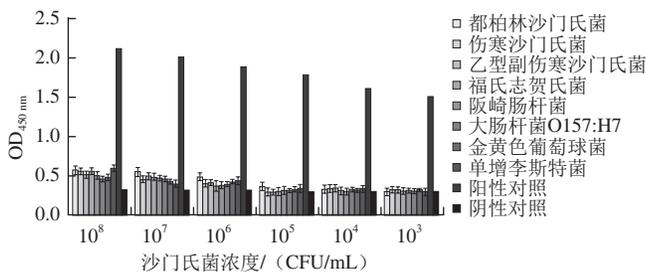


图3 ELISA体系特异性检测

Fig. 3 Specificity test of the developed ELISA system

### 3 讨论

食品安全问题愈发引起人们的关注,肉、蛋、奶等畜产品是人们日常生活不可或缺的食品材料,而沙门氏菌是畜产品污染中常见的食源性致病菌。因此,对沙门氏菌的检测和控制十分必要。

现有的研究成果中,对于沙门氏菌的快速检测多为单一血清型的检测,也有多种血清型的同时检测,如殷月兰等<sup>[15]</sup>建立了检测猪霍乱沙门氏菌感染的单抗竞争ELISA法;Bang等<sup>[16]</sup>建立了检测鼠伤寒沙门氏菌的间接竞争ELISA法;Kumar等<sup>[17]</sup>采用ELISA法检测伤寒沙门氏菌;黄素珍等<sup>[18]</sup>采用竞争ELISA检测了肠炎沙门氏菌;朱春红等<sup>[19]</sup>采用间接ELISA法检测肠炎沙门氏菌;伍燕华等<sup>[20]</sup>建立的双抗夹心ELISA可检测5种沙门氏菌,检测限为 $10^4$  CFU/mL。夏诗琪等<sup>[21]</sup>运用胶体金免疫层析法联检了5种沙门氏菌,检测限为 $10^5$  CFU/mL。而本研究采用6种血清型沙门氏菌混合制备免疫原,通过大量筛选,筛出1株能产特异性抗6种血清型沙门氏菌单克隆抗体的细胞株,与制备的多克隆抗体构建双抗夹心ELISA体系。

相对于薛俊龙等<sup>[22]</sup>可以检出50 pg以上的鸡沙门氏菌DNA,荣策等<sup>[23]</sup>建立了实时荧光定量聚合酶链式反应方法检测鼠伤寒沙门氏菌,其灵敏度为300 CFU/mL等分子生物学方法而言,本体系的检测水平相对较低,但该ELISA体系具有快速、简便的检测优势,从样品处理开始,检测时间可由一般的8 h缩短到3.5 h,可达到定量检测目的,利用苏远科等<sup>[24]</sup>建立的ELISA-生长曲线方法可实现准确定量的目的。

以6种血清型沙门氏菌做混合免疫原并建立ELISA体系检测沙门氏菌的方法在现有的报道中较为少见。应用本体系,实验人员检测了50份冷鲜肉样品,结果显示,1份样品呈现阳性;同时采用国标方法进行检测,结果相同。此ELISA体系还需要进一步优化,需要进一步研究具有保护性的试剂盒来增强其准确性和稳定性;需要进行大量的样品检测以充分测试其特异性和实用性。

### 参考文献:

- [1] LEBLANC A M, CASTILLO N A, PERDIGON G, et al. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 138(3): 223-231.
- [2] MANZANO M, COCOLIN L, ASTORI G, et al. Development of a PCR microplate-capture hybridization method for simple, fast and sensitive detection of *Salmonella* serovars in food[J]. Molecular and Cellular Probes, 1998, 12(4): 227-234.
- [3] KUNWAR R, SINGH H, MANGLA V, et al. Outbreak investigation: *Salmonella* food poisoning[J]. Medical Journal of Armed Forces India, 2013, 69(4): 388-391. DOI:10.1016/j.mjafi.2013.01.005.

- [4] 宫强, 李战丽, 牛明福, 等. 鼠伤寒沙门氏菌*ompC*基因PCR的检测方法[J]. 食品科学, 2015, 36(16): 251-254. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201516048.
- [5] SANCHEZ-VARGAS F M, ABU-EL-HAIJA M A, GOMEZ-DUARTE O G. *Salmonella* infections: all update on epidemiology, management, and prevention[J]. Travel Medicine and Infectious Disease, 2011, 9: 263-277. DOI:10.1016/j.tmaid.2011.11.001.
- [6] 刘家发, 朱建如. 食品安全存在的问题及对策[J]. 公共卫生与预防医学, 2005, 16(6): 35-38. DOI:10.3969/j.issn.1006-2483.2005.06.013.
- [7] 刘胜贵, 魏麟. 应用PCR技术检测猪肉中沙门氏菌的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 254-256. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2007.03.059.
- [8] 邝良德, 朱晓霞, 谢晓红, 等. 沙门氏菌快速检测技术概述[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(2): 227-232. DOI:10.3969/j.issn.0439-8114.2011.02.003.
- [9] LIN M, TODORIC D, MALLORY M, et al. Monoclonal antibodies binding to the cell surface of *Listeria monocytogenes* serotype 4b[J]. Journal of Medical Microbiology, 2006, 55: 291-299. DOI:10.1099/jmm.0.46305-0.
- [10] 霍华德G C, 凯瑟M R. 抗体制备与使用实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 97.
- [11] 牛瑞江, 赖卫华, 熊齐荣, 等. 鼠伤寒沙门氏菌特异性多克隆抗体的纯化方法[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 151-155.
- [12] 齐颖颖, 吴萌, 王怡雯, 等. 单增李斯特菌单克隆抗体的研制及特性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(2): 151-155.
- [13] 齐颖颖. 单增李斯特菌的单克隆抗体制备及胶体金试纸条的研制[D]. 北京: 北京农学院, 2014.
- [14] 颜成英, 汤晓艳, 康大成, 等. EMA RT-PCR法检测鸡肉中鼠伤寒沙门氏菌活菌[J]. 中国食品学报, 2015, 15(10): 179-184.
- [15] 殷月兰, 潘志明, 孟书霞, 等. 单抗竞争ELISA检测猪沙门氏菌感染方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(1): 65-68. DOI:10.3969/j.issn.1008-0589.2003.01.017.
- [16] BANG J, SHUKLA S, KIM Y H, et al. Development of indirect competitive ELISA for the detection of *Salmonella typhimurium*[J]. Romanian Biotechnological Letters, 2012, 17(2): 7194-7204.
- [17] KUMAR S, BALAKRISHNA K, BATRA H V. Enrichment-ELISA for detection of *Salmonella typhi* from food and water samples[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2008, 21(2): 137-143. DOI:10.1016/S0895-3988(08)60019-7.
- [18] 黄素珍, 杜元钊, 张艳红. 检测肠炎沙门氏菌ELISA方法的建立与应用研究[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(2): 196-200. DOI:10.3969/j.issn.1008-0589.2006.02.020.
- [19] 朱春红, 吴娟, 张伟娟, 等. 肠炎沙门氏菌基因表达和间接检测方法的初步建立[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(1): 44-48.
- [20] 伍燕华, 牛瑞江, 赖卫华, 等. 双抗夹心酶联免疫吸附法检测沙门氏菌[J]. 食品工业科技, 2014, 35(10): 63-67. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.10.004.
- [21] 夏诗琪, 徐超莲, 刘道峰, 等. 胶体金免疫层析法联检食品中5种典型沙门氏菌模型的建立和优化[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 154-158. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201422029.
- [22] 薛俊龙, 张伟业, 张国权, 等. 鸡白痢沙门氏菌PCR检测技术的建立与应用[J]. 畜牧兽医杂志, 2011, 30(6): 23-25; 27. DOI:10.3969/j.issn.1004-6704.2011.06.009.
- [23] 荣策, 赵彤彤, 许龙岩, 等. 实时荧光PCR法检测鼠伤寒沙门氏菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(4): 300-305.
- [24] 苏远科, 张国林, 李纯钢. 基于ELISA-生长曲线对食品中沙门氏菌定量检测的研究[J]. 河北医药, 2015, 37(6): 929-931. DOI:10.3969/j.issn.1002-7386.2015.06.047.