

王怡雯, 齐颖颖, 张红星, 等. 福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体的制备及 ELISA 方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 450-455.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.023

福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体的制备及 ELISA 方法的建立

王怡雯, 齐颖颖, 张红星, 张 帅, 谢远红, 刘 慧

(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/微生态制剂关键技术开发北京市工程实验室/北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206)

摘要: 为制备特异性和灵敏度较高的抗福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体, 并建立双抗夹心酶联免疫吸附检测法, 用于检测生鲜食品中的福氏志贺氏菌 2a。本研究利用自制的福氏志贺氏菌 2a 抗原免疫 BALB/c 小鼠, 并用杂交瘤技术进行细胞融合, 经筛选克隆后, 获得 3 株分泌抗福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体稳定的杂交瘤细胞, 分别命名为 5C12、1B5 和 6A11。3 株杂交瘤细胞注射进小鼠腹腔后, 诱导产生的腹水中抗体的效价为 $1:2.048 \times 10^5 \sim 1:1.024 \times 10^5$, 免疫球蛋白亚型均为 IgG。3 株抗体识别抗原表位的最佳配对为 5C12 和 6A11, 由此建立双抗夹心 ELISA 体系, 测得其灵敏度为 1 000 CFU/g, 且具有良好的特异性。

关键词: 福氏志贺氏菌 2a; 单克隆抗体; 杂交瘤; 双抗夹心 ELISA

中图分类号: R378.2⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0450-06

Preparation of *Shigella flexneri* 2a monoclonal antibodies and establishment of ELISA for its detection

WANG Yi-wen, QI Ying-ying, ZHANG Hong-xing, ZHANG Shuai, XIE Yuan-hong, 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 Microecologies/College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: Preparation of specific and highly sensitive *Shigella flexneri* 2a monoclonal antibodies. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the detection of *Shigella flexneri* 2a in food. In this study, BALB/c mice were immunized with *Shigella flexneri* 2a antigen. Hybridization techniques were used for cell fusion. After screening and cloning, three hybridoma cells lines, 5C12, 1B5 and 6A11, were obtained secreting monoclonal antibodies against *S. flexneri* 2a stably. Three hybridoma cells were named. The hybridoma cells was injected into the abdominal cavity of mice, and the induced antibodies titers were $1:1.024 \times 10^5$, $1:1.024 \times 10^5$ and $1:2.048 \times 10^5$. Their immune globulin subtypes were IgG. The best pairing of three antibodies was 5C12 and 6A11. The sandwich ELISA system established afterwards was good in sensitivity and specificity.

Key words: *Shigella flexneri* 2a; monoclonal antibody; hybridoma; sandwich ELISA

收稿日期: 2016-11-11

基金项目: 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); 北京农学院协同创新建设项目

作者简介: 王怡雯 (1992-), 女, 北京大兴人, 硕士研究生, 主要从事食品安全快速检测研究。 (E-mail) 791096628@qq.com

通讯作者: 张红星, (E-mail) hxzhang511@163.com

志贺氏菌 (*Shigella* spp.) 又称痢疾杆菌, 是一种具有高传染性的革兰氏阴性兼性厌氧菌, 每年全球大约有 1.6×10^8 人感染志贺氏菌, 其中死亡人数高达 1×10^4 多人, 感染者多数为老人、免疫力低下者以

及 1~5 岁的儿童^[1-3]。志贺氏菌大多出现在被污染的畜产品及水产品中,一般是由于养殖、运输以及储藏等环境不清洁引起的^[4-5]。一些发展中国家,由于水源的缺乏和污染、营养不良、医疗设施不完全等原因,成为志贺氏菌的高发地区,在中国,临床上最常见的志贺氏菌是福氏志贺氏菌 2a 血清型。感染福氏志贺氏菌 2a,在临床上轻者表现为腹痛和水样性腹泻等症状,重者会出现严重的急性肠道炎症反应、脱水、溶血性尿毒综合症及肠穿孔等症状,甚至死亡^[6-7]。因此,建立一种快速、有效的方法检测生鲜食品中的福氏志贺氏菌 2a,具有十分重要的意义。

目前检测志贺氏菌的方法有分子生物学方法、细菌培养和免疫学方法等。分子生物学方法操作相对复杂,需要特殊操作人员,细菌培养方法虽然在人员上没有特殊要求,但操作过程较长,且需要大量劳动力,不能满足现代食品快速检测的要求。然而,经典的免疫学方法操作相对简单、成本较低、检测周期相对较短、检测方法多样,而且免疫学方法应用了抗原和抗体的特异性结合进行检测,有很强的特异性以及灵敏度,从而广泛应用于现代生鲜食品的致病菌检测中。但是在中国,对于志贺氏菌检测的试剂盒通常依赖于进口,因此,建立国产的高质量志贺氏菌检测试剂盒十分必要。本研究拟制备抗福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体,为生产检测福氏志贺氏菌 2a 的 ELISA 试剂盒奠定基础^[8-11]。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

福氏志贺氏菌 2a (BNCC108833)、宋内志贺氏菌(ATCC25931)、鲍氏志贺氏菌(ATCC9207)、阪崎肠杆菌(ATCC29544)、枯草芽孢杆菌(BD366)、鼠伤寒沙门氏菌(ATCC13311)、单增李斯特菌(ATCC54003)、大肠杆菌 O157:H7(CMCC44828)等标准株以及小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞、福氏志贺氏菌 2a 免疫原和检测原由北京农学院食品科学与工程学院实验室保存。

雌性 BALB/c 小鼠(SPF 级),购自北京实验动物中心。

志贺氏菌培养基购于北京陆桥技术有限责任公司,HAT 培养基、HT 培养基、PEG4000、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购于 Sigma 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗

小鼠 IgG 购于北京华美生物技术有限公司,DMEM 培养基、细胞培养板购于 GIBCO 公司。其他试剂均为分析纯。

酶标测试仪购自美国 BioTek 公司,二氧化碳培养箱购自上海力康生物医疗科技控股有限公司,4MK2 型洗板机、NANODROP 2000 微量分光光度计购自美国 Thermo 公司。

1.2 抗原制备

取实验室保存的福氏志贺氏菌 2a,将活化后的福氏志贺氏菌 2a 接种于固体培养基中,静置于 37℃ 恒温培养箱中培养 48 h,将培养 48 h 后的单菌落挑入志贺氏菌液体培养基中,置于 37℃、150 r/min 摇床培养 24 h,将培养后的菌液按 1% 扩大培养至 2 L,置于 37℃、150 r/min 摇床,培养 12 h,取少量菌液,10 倍稀释 9 个梯度,每个梯度做 3 个平行,进行平板计数,取 5 ml 对数生长期的菌液,3 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 pH 值 7.4 浓度 0.01 mol/L 的磷酸缓冲盐溶液(PBS)将菌体洗涤 3 次,再用 10 ml 0.01 mol/L 的 PBS 重悬,倒去上清液,加 100 μ l 福尔马林溶液,静置在室温下灭活 24 h,灭活后,用 0.01 mol/L PBS 3 000 r/min 离心洗涤 3 次,倒去上清液后用 0.01 mol/L PBS 稀释调节浓度到 1×10^9 CFU/ml,此为福氏志贺氏菌 2a 免疫原,保存于 -20℃ 备用^[8]。

1.3 动物免疫

取 6 只雌性 6 周龄 BALB/c 小鼠,首次基础免疫用自制的福氏志贺氏菌 2a 免疫原与相等体积的完全佐剂混合,使其充分乳化后,用背部皮下多点注射方法免疫小鼠,免疫剂量为每只小鼠 100 μ l,随后的基础免疫用福氏志贺氏菌 2a 免疫原与相等体积的不完全佐剂混合乳化,免疫剂量为每只 100 μ l,每间隔 2 周基础免疫 1 次,并测定小鼠血清抗体效价,抗体效价达到 1:640 000 后进行腹腔注射加强免疫,在细胞融合前 3 d 用 20 μ l 免疫原对小鼠进行脾脏注射加强免疫^[12]。

1.4 杂交瘤细胞株的建立

融合前 1 d 将冻存的小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞进行培养,融合当天取对数生长的 SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫的小鼠脾细胞混合,用预热后的 50% 的聚乙二醇(PEG)进行细胞融合,融合后每天查看是否污染,7 d 后取培养上清液进行效价测定,选择呈强阳性的细胞,进行数次有限稀释亚克隆筛选培养,直至

阳性达到 100%。最终筛选出 3 株稳定分泌高效价、高特异性、高亲和力抗体的杂交瘤细胞,并将这 3 株杂交瘤细胞及其产生的抗体命名为 5C12、1B5、6A11,置于液氮中保存^[13]。

1.5 单克隆抗体的制备及特性分析

用石蜡油对雌性 BALB/c 小鼠进行腹腔注射致敏,致敏 7 d 后将 3 株抗福氏志贺氏菌 2a 杂交瘤细胞克隆并扩大培养,分别接种于致敏后的小鼠腹腔内,诱导腹水产生单克隆抗体。7 至 10 d 后收集腹水进行抗体 ProteinG 纯化,用间接 ELISA 法测定抗体效价,用紫外吸收法测定抗体浓度,用 SDS-PAGE 法检测抗体纯度^[14-15]。用 Sigma 公司生产的抗体亚型检测试剂盒鉴定抗体亚型,用高碘酸钠方法对抗体进行标酶,作为检测抗体。

1.6 单克隆抗体识别抗原表位特性分析

首先测定酶标山羊抗小鼠 IgG 与抗体结合的饱和和稀释度,以及 3 株抗体与包被抗原结合的饱和稀释度和相对应的吸光度,用自制的福氏志贺氏菌 2a 抗原包被 96 孔酶标板,包被浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,每孔 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 2 h,用 PBST(0.5%吐温-20 的 PBS)洗涤 3~5 次包被好的酶标板,加入封闭液(含 10%小牛血清的 PBS/T20),每孔 150 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 20 min,PBST 洗涤 3 次,加入其中 1 株抗体,浓度为其饱和稀释度,每孔 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 35 min,用 PBST 洗涤 3~5 次,再加入另 1 株抗体,浓度为其饱和稀释度,每孔 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 35 min,洗涤 3~5 次,加入饱和稀释度的酶标山羊抗小鼠 IgG,每孔 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 35 min,洗涤 5 次,加入三甲基苯底物显色液(TMB)进行显色,每孔 100 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱避光孵育 5 min,加入终止液,每孔 50 μl ,酶标仪检测,波长为 450 nm,测吸光度 OD 值^[16]。

1.7 双抗夹心 ELISA 检测抗体灵敏度与特异性

选择相加性较好的 1 对福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体建立双抗夹心 ELISA 体系,选择抗体效价高的 1 株抗体作为检测抗体,另 1 株为捕捉抗体。用 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的捕捉抗体包被酶标板,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱温育 2 h,PBST 洗涤 3 遍,加入封闭液,每孔 150 μl ,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 20 min,PBST 洗涤 3 次,加入待测的样品或标准品,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 35 min,PBST 洗涤 3 次,加入标酶的检测抗体,浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 35 min,PBST 洗涤 5 次,加入显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min,

加入终止液,酶标仪测定吸光值。

将新鲜猪肉在紫外灯下照射 30 min 杀菌,每 5 min 翻转 1 次,并用培养法测定杀菌后的猪肉样品不含有福氏志贺氏菌 2a。无菌称取 8 份猪肉样品,每份 10 g 进行均质,取 1 份无菌猪肉样做阴性对照,其他 7 份加入福氏志贺氏菌 2a 进行模拟污染,使模拟污染肉样品中福氏志贺氏菌 2a 的终浓度分别为 10^7 CFU/g、 10^6 CFU/g、 10^5 CFU/g、 10^4 CFU/g、 10^3 CFU/g、100 CFU/g、10 CFU/g,用 2 株抗体建立的 ELISA 体系,检测其灵敏度^[17]。

用此 ELISA 体系检测福氏志贺氏菌 2a、宋内志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、阪崎肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、大肠杆菌 O157:H7,浓度为 1×10^5 CFU/ml,福氏志贺氏菌 2a 为阳性对照,同时用 PBS 做阴性对照,以此方法检测以这对抗体为基础建立的 ELISA 体系的特异性,所测 OD 值大于阴性对照 OD 值 2.1 倍为阳性。

2 结果与分析

2.1 单克隆抗体的鉴定

细胞融合后获得 3 株杂交瘤细胞,分别将 3 株杂交瘤细胞及其产生的抗体命名为 5C12、1B5 和 6A11。将杂交瘤细胞注射进致敏后的雌性 BALB/c 小鼠腹腔内,诱导产生腹水,每只小鼠获取 5~10 ml 腹水,通过间接 ELISA 检测腹水中抗体的效价均为 1×10^5 以上。经过蛋白纯化后抗体的蛋白浓度分别为 32.23 mg/ml、25.96 mg/ml、26.47 mg/ml(表 1)。

表 1 福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体鉴定结果

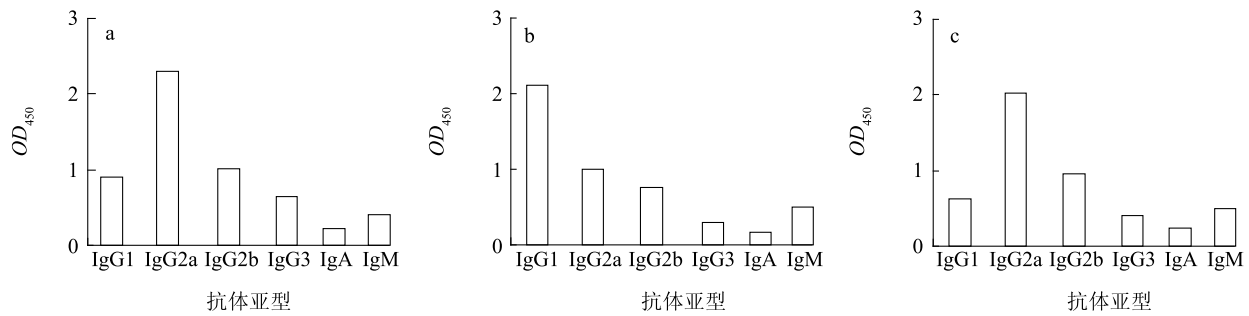
Table 1 *Shigella flexneri* 2a monoclonal antibody identification

抗体	抗体效价	蛋白浓度 (mg/ml)
5C12	1 : 2.048×10^5	32.23
1B5	1 : 1.024×10^5	25.96
6A11	1 : 1.024×10^5	26.47

用 Sigma 公司生产的抗体亚型试剂盒对 3 株抗体进行亚型鉴定,结果(图 1)表明,3 株抗体亚型均为 IgG。

2.2 单克隆抗体的纯化

利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法测定纯化后的 3 株福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体纯度以及分子量,结果表明,经纯化后的 3 株抗体中 5C12 单克隆抗体的纯度最高(图 2),1B5 与 6A11 单克隆

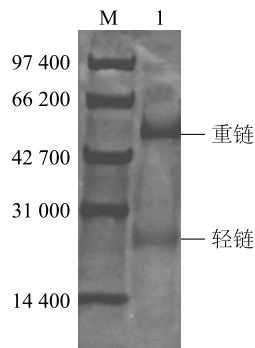


a: 5C12; b: 1B5; c: 6A11。

图 1 单克隆抗体亚型鉴定

Fig.1 Identification of monoclonal antibody subtype

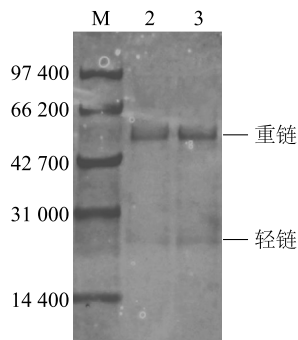
抗体的纯度良好(图 3)。纯化后的 3 株抗体经还原后均裂解为重链和轻链,重链分子量为 55 000,轻链分子量为 25 000,与 IgG 分子量相符^[18]。



M: Marker; 1: 5C12。

图 2 5C12 单克隆抗体 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE of 5C12 monoclonal antibody



M: Marker; 2: 1B5; 3: 6A11。

图 3 1B5 与 6A11 单克隆抗体 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE of 1B5 and 6A11 monoclonal antibodies

2.3 抗体识别抗原表位特性分析

以棋盘滴定法测定酶标山羊抗兔 IgG 的饱和

稀释度,并确定最终稀释度为 1:5 000,同时测定 3 株抗体与包被抗原结合的饱和稀释度为 1:200~1:1 000 倍稀释,结果以相加指数 AI 大小来判定^[9]。

$$AI = \left(\frac{A_{1+2} \times 2}{A_1 + A_2} - 1 \right) \times 100\%$$

其中 A_1 、 A_2 分别是单独使用 1 株单克隆抗体饱和稀释度所测定的 OD 值, A_{1+2} 为 2 株不同的单克隆抗体所测定的 OD 值。如果 2 株抗体识别抗原的表位完全相同, A_{1+2} 应等于 A_1 和 A_2 总和的平均值, AI 应为零;如果 2 株抗体识别的表位完全不同, A_{1+2} 应该等于 A_1 和 A_2 的总和, AI 应为 100%。而在实际测定中,一般当 AI 值小于 50% 时判定 2 株抗体识别的表位相同,当 AI 值大于 50% 时判定 2 株抗体识别的表位不同。结果(表 2)表明,5C12 与 1B5 和 1B5 与 6A11 这 2 对抗体互交相加后,得出 AI 值最大为 35.85%,小于 50%,因此 2 对抗体所结合包被抗原的表位是相同的,互补性和相加性较差。而 5C12 与 6A11 这对抗体互交相加后,得出的 AI 值最低为 87.42%,大于 50%,因此这对抗体具有良好的互补性和相加性,它们所识别的包被抗原上的表位不同且识别表位的距离很远,即最终认为 5C12 与 6A11 这对抗体是识别抗原上不同构象表位的。

2.4 抗体灵敏度检测

选择互补和相加特性最好的 5C12 和 6A11 单克隆抗体建立双抗夹心 ELISA 体系,选择效价相对较高的 5C12 抗体作为检测抗体,6A11 抗体作为捕捉抗体,检测 7 个不同稀释度的模拟污染猪肉样,同时做空白阴性对照,结果(图 4)表明,此双抗夹心 ELISA 体系的灵敏度为 1 000 CFU/g。

表 2 ELISA 测定抗体相加试验的 OD 值及 AI 值

Table 2 The titer of the combined test value and AI by indirect ELISA

福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体	5C12		1B5		6A11	
	OD ₄₅₀	AI(%)	OD ₄₅₀	AI(%)	OD ₄₅₀	AI(%)
5C12	0.32	—	0.45	35.85	0.79	92.22
1B5	0.46	21.58	0.31	—	0.49	14.83
6A11	0.81	87.42	0.42	28.67	0.41	—

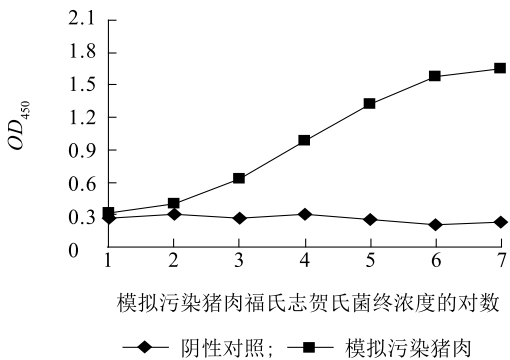


图 4 福氏志贺氏菌 2a 模拟污染猪肉检测结果

Fig.4 The detection of *Shigella flexneri* 2a simulated contamination

2.5 抗体特异性检测

用双抗夹心 ELISA 体系检测福氏志贺氏菌 2a、宋内志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、阪崎肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌、大肠杆菌 O157:H7。结果(表 3)表明,5C12 和 6A11 2 株单克隆抗体建立的双抗夹心 ELISA 体系特异性良好,与福氏志贺氏菌 2a(阳性对照)呈明显阳性反应,与宋内志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、阪崎肠杆菌、枯草芽孢杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌以及大肠杆菌 O157:H7 均呈阴性,无明显交叉反应。

3 讨论

1983 年,Carlin 等^[19]利用单克隆抗体技术,证明福氏志贺氏菌 2a 可以直接被一种单克隆抗体识别。在中国最常见的志贺氏菌是福氏志贺氏菌 2a 血清型,在临床上免疫学方法检测福氏志贺氏菌 2a 相对于传统的培养方法和分子生物学方法,试验周期短,操作简单,不需要特殊操作人员。现有的研究中,徐峰等^[20]制备的志贺氏菌单克隆抗体灵敏度为 10⁶ CFU/ml,秦巧玲^[10]建立的志贺氏菌 ELISA 体系

表 3 ELISA 体系特异性检测结果

Table 3 The specificity of the ELISA

菌株	菌株编号	交叉反应结果
福氏志贺氏菌 2a	BNCC108833	1.041
宋内志贺氏菌	ATCC25931	0.088
鲍氏志贺氏菌	ATCC9207	0.074
阪崎肠杆菌	ATCC29544	0.068
枯草芽孢杆菌	BD366	0.073
鼠伤寒沙门氏菌	ATCC13311	0.059
单增李斯特菌	ATCC54003	0.061
大肠杆菌 O157:H7	CMCC44828	0.093
阴性对照(PBS)		0.051

的灵敏度为 10⁵~10⁶ CFU/ml,以及葛萃萃等^[21]建立的志贺氏菌 ELISA 检测方法的灵敏度为 10⁵~10⁶ CFU/ml,相比之下,本试验制备的单克隆抗体建立的双抗夹心 ELISA 体系的灵敏度为 1 000 CFU/g,相对较高,具有良好的灵敏度。

在制备抗福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体时,还应注意细胞融合期间的污染问题,本试验在细胞融合期间在培养液中加入了抗生素,且试验中培养环境保持洁净,避免了细胞被污染。本试验是初步利用制备的抗福氏志贺氏菌 2a 单克隆抗体建立双抗夹心 ELISA 体系,还应该在之后的试验中对单克隆抗体的亲和力做进一步的测定,对于双抗夹心 ELISA 体系的包被浓度、酶标抗体稀释浓度、孵育时间以及显色液显色时间等关键步骤还应该进行更加精准的优化,并同时用本 ELISA 体系对大量样品进行测定,从而进一步确定并提高本双抗夹心 ELISA 体系的灵敏度及特异性。

参考文献:

[1] 林晓丽,赖卫华,张莉莉,等.志贺氏菌检测方法的最新研究进

- 展[J].食品科学,2009,30(15):271-275.
- [2] WARREN B R, PARISH M E, SCHNEIDER K R. Shigella as a food borne pathogen and current methods for detection in food[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006, 46(7): 551-567.
- [3] KOTLOFF K, WINICKOFF J, IVANOFF B, et al. Global burden of Shigella infections; implications for vaccine development and implementation of control strategies[J]. Bulletin of the World Health Organization, 1999, 77(8): 651-666.
- [4] 张 帅, 齐颖颖, 张红星, 等. 快速检测生鲜肉中的三种食源性致病菌[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 939-945.
- [5] 陈 伟, 李正国, 杨 平, 等. 肉制品中志贺氏菌 DNA 的快速提取方法[J]. 食品发酵工业, 2009, 35(5): 257-261.
- [6] TALUKDER K A, ISIAM M A, DUTTA D K. Phenotypic and genotypic characterization of serologically atypical strains of shigella flexneri type 4 isolated in Dhaka Bangladesh[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(7): 2490-2497.
- [7] 张纪中. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 27.
- [8] 黄宝华, 陈庆森, 庞广昌. 志贺氏菌研究及其快速检测技术发展现状[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 333-336.
- [9] 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.
- [10] 秦巧玲. 志贺氏菌多克隆抗体制备及 ELISA 检测方法的建立[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [11] 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.
- [12] HOWARD G C, KASER M R. 抗体制备与使用实验指南[M]. 张权庚, 张玉祥, 丁 卫, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2010: 97.
- [13] 徐 迪. 志贺氏菌多克隆、单克隆及基因工程抗体的制备与免疫层析试纸条的初步研制[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [14] 祭 芳, 曹摇欢, 徐剑宏, 等. 抗玉米赤霉烯酮单克隆抗体的制备[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(2): 417-422.
- [15] VAN ZIJDERVELD F G, VAN A M, ANAKOTTA J. Comparison of four different Enzyme Linked Immunosorbent assays for serological diagnosis of Salmonella enteritidis infections in experimentally infected chickens [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30(10): 2560-2566.
- [16] 刘苏燕, 董邦全, 李恩善. 分析不同单克隆抗体识别的表位特异性的三种 ELISA 方法比较[J]. 上海免疫学杂志, 1991, 11(2): 108-109, 112.
- [17] CUTTER, CATHERINE N, SIRAGUSA G R. Efficacy of organic acids against Escherichia coli O157 : H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer[J]. Journal of Food Protection, 1994, 57(2): 97-103.
- [18] 柳忠辉, 吴雄文. 医学免疫学实验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 18-19.
- [19] CARLIN N I, LINDBERG A A. Monoclonal antibodies specific for O-antigenic polysaccharides of Shigella flexneri: clones binding to II, II:3, 4, and 7, 8 epitopes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1983, 18(5): 1183.
- [20] 徐 锋, 武晓丽, 徐 迪, 等. 牛奶样品中志贺氏菌胶体金免疫试纸条检测方法的建立[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(5): 46-50.
- [21] 葛萃萃, 钟青萍. 抗志贺氏菌 IgY 的提纯及建立间接 ELISA 检测志贺氏菌[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 11-14.

(责任编辑: 陈海霞)