

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.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.036

快速检测生鲜肉中三种食源性致病菌

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/微生态制剂关键技术开发北京市工程实验室, 北京 102206)

摘要: 为同时快速检测生鲜肉中鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌和福氏志贺氏菌 3 种食源性致病菌, 降低检测成本, 制备了特异性单克隆抗体和多克隆抗体, 研制出能够同时检测以上 3 种致病菌的胶体金免疫层析试纸条。结果表明, 本试验成功筛选出 3 株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株 2E3、2E7 和 2E8, 3 种单克隆抗体效价均在 1.28×10^6 以上, 3 种多克隆抗体效价均在 2.00×10^6 以上。制备的胶体金免疫层析试纸条对鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌和福氏志贺氏菌 3 种食源性致病菌的特异性良好, 灵敏度均为 1×10^4 CFU/g。

关键词: 食源性致病菌; 单克隆抗体; 多克隆抗体; 胶体金免疫层析试纸条

中图分类号: S851.347.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)04-0939-07

Rapid detection of three foodborne pathogens in raw meat

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

Abstract: To achieve the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri* in raw meat, three hybridoma cell strains, 2E3, 2E7 and 2E8, stably secreting antibodies against above pathogens were screened. The titers of three monoclonal antibodies and three polyclonal antibodies were more than 1.28×10^6 and 2.00×10^6 , respectively. The immunochromatographic strip developed could detect all three pathogens as low as 1×10^4 CFU/g. *L. monocytogenes* was detected by the strip in market sample which was free of other two pathogens.

Key words: foodborne pathogen; monoclonal antibody; polyclonal antibody; immunochromatographic strip

现有研究结果显示, 在生鲜肉中最常见的食源性致病菌包括鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌和志贺氏菌等^[1]。沙门氏菌是公共卫生学上有重要意

义的人畜共患病原菌之一, 具有 2 500 种以上的血清型^[2], 据报道中国已有约 292 种血清型^[3]。目前在中国流行的众多血清型中, 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)最为常见, 也是引起沙门氏菌食物中毒的主要血清型之一^[4], 同时也是导致鸡肉及相关产品污染的主要原因之一^[5]。

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是李斯特菌属中唯一 1 种能引起人类和动物疾病的人畜共患病的病原菌, 为革兰氏阳性杆菌^[6]。在主要的食源

收稿日期: 2016-05-20

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(CIT&TCD20140315); 北京农学院协同创新建设项目

作者简介: 张 帅(1992-), 男, 山东聊城人, 硕士研究生, 主要从事食品安全快速检测研究。(E-mail) 15701299950@163.com

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

性致病菌中,单增李斯特菌在各种食品中均可造成污染,尤其肉类食品极易被污染,污染率高达10%~30%^[7]。该菌在4℃的环境中仍可生长繁殖,是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一^[8-9]。

志贺氏菌属细菌(*Shigella*)通称痢疾杆菌,是一类具有高度传染性和危害严重的革兰氏阴性肠道致病菌,每年造成全球约 1.6×10^8 人患病,近 1.1×10^6 人死亡,绝大多数为5岁以下儿童。据报道,志贺氏菌在中国感染性腹泻病原菌中居首位,每年因志贺氏菌引起食物中毒事件频繁发生,尤其以牲畜禽肉和水产品的污染更为严重^[10-11]。

胶体金免疫层析技术(Colloidal gold immunochromatographic assay, GICA)是一种以胶体金为示踪标记物,基于抗原抗体反应的免疫标记技术^[12]。该技术应用于食品安全检测,操作简单,不需要特殊设备就能得到识别结果,适用于现场大量样品的快速筛查^[13-14]。由于可污染生鲜肉类的食源性致病菌种类较多,现有的研究成果趋向于同时快速检测多种致病菌。如Moongkarndi等^[15]首次建立了有2条T线的免疫层析试纸条,可以同时检测肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌;伍燕华等^[16]建立的双抗夹心ELISA可检测5种沙门氏菌,但这2种方法的检测对象只局限于沙门氏菌属。夏俊芳等^[17]采用可视化抗体阵列联合检测大肠杆菌O157:H7和鼠伤寒沙门氏菌;兰全学等^[18]建立了能同时检测4种致病菌的多重荧光聚合酶链式反应(PCR)快速检测体系,但这2种方法操作专业性较强,需要专业人员进行操作。

本试验拟研制胶体金免疫层析试纸条,对生鲜肉中的鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌和福氏志贺氏菌同时进行快速检测,相对于单独的检测试纸条节约制作成本和使用成本。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鼠伤寒沙门氏菌(ATCC13311)、单增李斯特菌(ATCC54003)、福氏志贺氏菌(ATCC25931)、甲型副伤寒沙门氏菌(ATCC9150)、猪霍乱沙门氏菌(ATCC10708)、都柏林沙门氏菌(CMCC50761)、绵羊李斯特菌(ATCC19119)、英诺克李斯特菌(ATCC33091)、阪崎肠杆菌(ATCC29544)、大肠杆菌O157:H7(CMCC44828)、金黄色葡萄球菌

(CMCC26003)等标准株以及小鼠SP2/0骨髓瘤细胞由本实验室保存。

BALB/c小鼠和新西兰大白兔由北京实验动物中心提供,3种食源性致病菌培养基购自北京陆桥技术有限公司,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均购自Sigma公司,小牛血清、DMEM培养基和细胞培养板均购自Gibco公司,HRP标记山羊抗小鼠IgG购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。其他试剂均为分析纯。

酶标测试仪、NANADORP 2000和4MK2型洗板机均购自美国Thermo公司,二氧化碳培养箱购自江苏Heal Force公司。

1.2 抗原准备及动物免疫

将鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌和福氏志贺氏菌标准株活化,接种于固体培养基,37℃静置培养24h,挑取单菌落接种于10ml液体培养基中,180r/min、37℃摇床培养18h,将其菌液按1%扩大培养至2L,37℃、180r/min摇床培养16h,分别取少量菌液,进行平板计数。取5ml菌液3000r/min离心15min,收集菌体,分别用pH7.4的0.01mol/L PBS洗涤菌体3次,用5ml的0.01mol/L的PBS重悬,加100μl的0.3%的福尔马林溶液,室温下放置24h灭活。灭活结束后,用0.01mol/L的PBS洗涤3次,并调节抗原浓度为 1×10^9 CFU/ml,于-20℃保存备用。

单克隆抗体的制备: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50μl自制免疫原,二次及后期采用100μl自制免疫原和弗氏不完全佐剂混合进行背部多点免疫。免疫间隔为2周。内眦取血并分离血清,间接ELISA法检测小鼠血清抗体效价。待血清效价达到 $1:4.0 \times 10^5$ 后采用腹腔注射加强免疫,于融合前3d对脾脏注射免疫原20μl加强免疫^[19-20]。

多克隆抗体的制备:将上述制备的抗原采用背部皮下多点的方式免疫新西兰大白兔,首次是与等量的完全弗氏佐剂混合,抗原免疫量为每只200μl,二次及后期免疫则与不完全弗氏佐剂混合,抗原免疫量为每只100μl。每周进行耳静脉取血,采用间接ELISA法测定抗体效价,待血清效价达到 $1:1.6 \times 10^5$ 后进行动脉取血,用辛酸-硫酸铵法纯化多抗^[21],测得其蛋白浓度后于-20℃分装保存。

1.3 杂交瘤细胞株的建立

取处在对数生长期的小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞与免疫脾细胞,按常规方法用 50% 聚乙二醇(PEG)进行细胞融合。检测培养上清抗体效价,选择强阳性的细胞,采用有限稀释法进行亚克隆并筛选培养,直至 100% 阳性。制备并筛选出 3 株稳定分泌高特异性、高效价、高亲和力抗体的杂交瘤细胞株,并分别编号为 2E3、2E7 和 2E8,置于液氮中。

1.4 抗体的制备及抗体的特性分析

分别将抗鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌和福氏志贺氏菌的杂交瘤细胞克隆扩大、培养,接种于提前注射石蜡油的雌性 BALB/c 小鼠腹腔,诱导其腹水产生单克隆抗体。7~10 d 后收集 3~9 ml 腹水进行抗体的 ProteinG 纯化^[20],采用紫外吸收法测定抗体浓度,采用间接 ELISA 法测定抗体效价,采用 Sigma 公司抗体亚型检测试剂盒鉴定抗体亚型^[22-23]。

1.5 免疫胶体金试纸条的制备及评价

胶体金溶液的制备和优化以及单克隆抗体标记胶体金均按照齐颖颖^[24]介绍的方法进行。当空气湿度降至 45% 左右时,采用 Bio-Dot XYZ3000 三维点膜仪,分别将稀释好的多克隆抗体喷于硝酸纤维素膜(NC 膜)的 T 线位置,山羊抗小鼠 IgG 稀释为 1 mg/ml,喷于 NC 膜的 C 线位置,喷好的 NC 膜放置于 30 ℃ 真空干燥箱干燥 2.5 h 以上。将 NC 膜、结合垫、样品垫、聚酯膜、吸水纸黏于 PVC 黏性底板上,然后用可编程切割机将组装好的条子切割成 3.9 mm 宽度的试纸条,置于常温干燥缸中保存备用。

1.6 试纸条灵敏度和特异性的确定

将实验室保存的标准菌株的菌液进行梯度稀释,检测试纸条的特异性。菌液人工污染样品进行模拟检测,将整块鸡胸肉紫外灯照射 30 min,每 10 min 翻转一次,以杀死表面存在的杂菌,无菌称量 10 g 鸡胸肉均质^[5],3 种致病菌分别污染肉样,至目标菌浓度约为 1.0×10^6 CFU/g,将均质液进行梯度稀释至污染量为 1.0×10^3 CFU/g、 8.0×10^3 CFU/g、 1.0×10^4 CFU/g、 1.6×10^4 CFU/g、 1.0×10^5 CFU/g 和 1.0×10^6 CFU/g,然后将相同浓度的 3 种均质液混合,取上清液点样检测。

1.7 试纸条实用性的验证

在本地超市和市场随机购买 100 份生鲜肉,在

无菌操作条件下用刀切碎样品,并称取检测样品 25 g 于自封袋中,每袋分别倒入 225 ml 已灭菌的增菌肉汤液体培养基,在拍击式均质器上连续均质 1~2 min,于 37 ℃ 培养箱中培养 12 h。用本试验研制的试纸条进行检测,同时每种样品分别按 GB 4789.4—2010《食品微生物学检验:沙门氏菌检验》、GB 4789.3—2010《食品微生物学检验:单核细胞增生李斯特氏菌检验》、GB 4789.5—2012《食品微生物学检验:志贺氏菌检验》检测^[25-27]。

2 结果与分析

2.1 间接 ELISA 最佳工作条件的确定

当鼠伤寒沙门氏菌抗原以 1:1 600 包被,且对应小鼠血清以 1:800 稀释时,其 OD 值(1.075)接近 1.0,且阴性对照较低(表 1),所以 1:1 600 为鼠伤寒沙门氏菌抗原最佳包被浓度^[22];同理,单增李斯特菌抗原的最佳包被浓度为 1:3 200(表 2);福氏志贺氏菌抗原的最佳包被浓度为 1:3 200(表 3),以此包被浓度测定单克隆抗体的效价和标准曲线。

2.2 抗体的鉴定

细胞株 2E3、2E7 和 2E8 扩大培养后,每只 BABL/c 小鼠获取 3~9 ml 腹水,通过间接 ELISA 体系检测腹水效价,根据试剂盒说明书进行单抗亚型的检测。表 4 显示,单克隆抗体效价均在 1.28×10^6 以上,抗体亚型均为 IgG;单克隆抗体标准曲线见图 1,表明 3 种单克隆抗体对于鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌和福氏志贺氏菌具有良好的识别反应。将所得的多克隆抗体进行纯化后,测得 3 种多克隆抗体效价均在 2.00×10^6 以上。

2.3 试纸条特异性检测

根据齐颖颖等^[24]的研究方法,制备免疫胶体金试纸条,并对试纸条进行优化。试纸条上按照距离点样端距离由近及远依次为检测鼠伤寒沙门氏菌的 T1 线,检测单增李斯特菌的 T2 线,检测福氏志贺氏菌的 T3 线以及质控线(C 线)。用实验室保存的标准株对试纸条进行特异性测试,结果如表 5 所示,试纸条对于鼠伤寒沙门氏菌之外的其他沙门氏菌反应结果为阴性,对于单增李斯特菌之外的其他李斯特菌反应结果为阴性,说明试纸条对鼠伤寒沙门氏菌和单增李斯特菌特异性识别良好,大肠杆菌与鼠伤寒沙门氏菌以及福氏志贺氏菌有交叉反应,但信号较弱,对特异性识别影响较小。

表 1 鼠伤寒沙门氏菌方阵滴定结果

Table 1 The results of *Salmonella typhimurium* square matrix titration

血清稀释度	包被抗原 OD 值									
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600	阴性对照
1:200	2.547	1.922	1.578	1.396	1.198	0.987	0.856	0.456	0.257	0.041
1:400	2.436	1.690	1.552	1.630	1.478	1.450	1.228	1.060	0.796	0.045
1:800	2.306	1.568	1.328	1.285	1.075	0.775	0.525	0.316	0.220	0.042
1:1 600	2.161	1.353	0.878	0.719	0.571	0.402	0.389	0.238	0.191	0.047
1:3 200	1.934	1.185	0.703	0.486	0.442	0.351	0.227	0.234	0.157	0.050
阴性对照	0.034	0.036	0.035	0.049	0.036	0.055	0.047	0.039	0.035	0.046

表 2 单增李斯特菌方阵滴定结果

Table 2 The results of *Listeria monocytogenes* square matrix titration

血清 稀释度	包被抗原 OD 值									
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600	阴性对照
1:200	2.646	2.525	2.235	1.923	1.591	1.464	1.138	0.607	0.586	0.102
1:400	2.380	2.316	1.971	1.631	1.527	1.298	1.187	0.432	0.385	0.112
1:800	2.166	1.866	1.844	1.545	1.453	1.209	0.966	0.635	0.284	0.102
1:1 600	2.067	1.637	1.624	1.347	1.380	0.999	0.844	0.647	0.200	0.105
1:3 200	1.716	1.570	1.535	1.206	1.313	0.837	0.704	0.516	0.639	0.103
阴性对照	0.141	0.113	0.120	0.102	0.096	0.103	0.112	0.098	0.118	0.110

表 3 福氏志贺氏菌方阵滴定结果

Table 3 The results of *Shigella flexneri* square matrix titration

血清 稀释度	包被抗原 OD 值									
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600	阴性对照
1:200	2.557	2.418	2.359	2.056	1.745	1.430	0.920	0.588	0.321	0.042
1:400	2.423	2.367	2.333	2.138	1.848	1.591	1.144	0.728	0.409	0.051
1:800	2.417	2.230	2.144	1.805	1.432	1.053	0.616	0.370	0.209	0.041
1:1 600	2.459	2.360	2.299	1.908	1.755	1.396	0.990	0.634	0.339	0.045
1:3 200	2.071	1.801	1.358	1.130	0.819	0.596	0.350	0.254	0.135	0.056
阴性对照	0.041	0.043	0.039	0.043	0.046	0.051	0.049	0.067	0.042	0.045

表 4 单克隆抗体鉴定结果

Table 4 Identification of monoclonal antibody

抗体	效价	蛋白浓度 (mg/ml)	亚型
2E3	2.56×10^6	29.31	IgG2a
2E7	2.56×10^6	30.28	IgG2a
2E8	1.28×10^6	31.00	IgG1

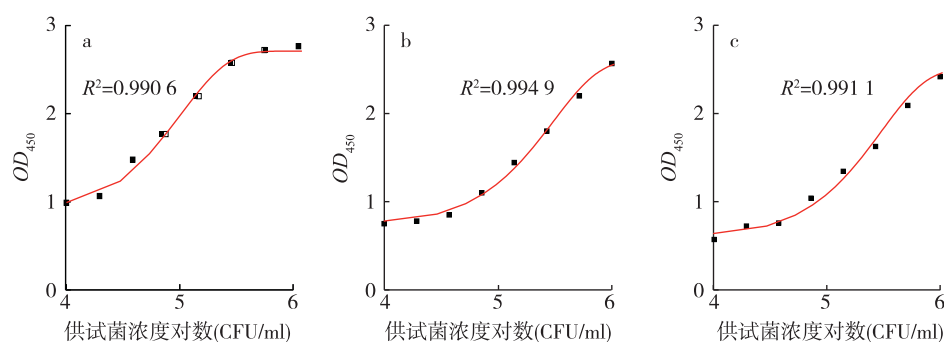
2.4 人工污染样品检测

利用标准菌株人工污染肉样 (1×10^3 CFU/g、 $8 \times$

10^3 CFU/g、 1×10^4 CFU/g、 1.6×10^4 CFU/g、 1×10^5 CFU/g 和 1×10^6 CFU/g) 按方法 1.6 所述进行模拟检测,上样 15 min 后,结果(图 2)表明,志贺氏菌检测线无法检测 8 000 CFU/g 的福氏志贺氏菌,当各菌污染浓度达到 1×10^4 CFU/g 后,试纸条可以检测到各供试菌(图 2),确定此试纸条的灵敏度为 1×10^4 CFU/g。

2.5 市场生鲜肉测试结果

结果(图 3)显示,试纸条检出 20 号样品单增李



a:鼠伤寒沙门氏菌;b:单增李斯特菌;c:福氏志贺氏菌。

图1 抗体抗原特异性反应标准曲线

Fig.1 Standard curve of antigen-antibody reaction

表5 试纸条特异性检测结果

Table 5 Specificity detected by immunochromatographic strip

菌 株	编号	反应阳性率		
		T1	T2	T3
PBS(阴性对照)		-	-	-
鼠伤寒沙门氏菌(阳性对照)	ATCC13311	++	-	-
单增李斯特菌(阳性对照)	ATCC54003	-	++	-
福氏志贺氏菌(阳性对照)	ATCC25931	-	-	++
甲型副伤寒沙门氏菌	ATCC9150	-	-	-
猪霍乱沙门氏菌	ATCC10708	-	-	-
都柏林沙门氏菌	CMCC50761	-	-	-
绵羊李斯特菌	ATCC19119	-	-	-
英诺克李斯特菌	ATCC33091	-	-	-
阪崎肠杆菌	ATCC29544	-	-	-
大肠杆菌 O157:H7	CMCC44828	+	-	+
金黄色葡萄球菌	CMCC26003	-	-	-

T1:鼠伤寒沙门氏菌检测线;T2:单增李斯特菌检测线;T3:志贺氏菌检测线。+:弱阳性;++,强阳性;-:阴性。

斯特菌和福氏志贺氏菌呈阳性,18号样品单增李斯特菌呈阳性。按照国标方法检测的结果,20和18号样品只被单增李斯特菌污染。对于其他样品,两种方法的检测结果相同,均无污染。

3 讨论

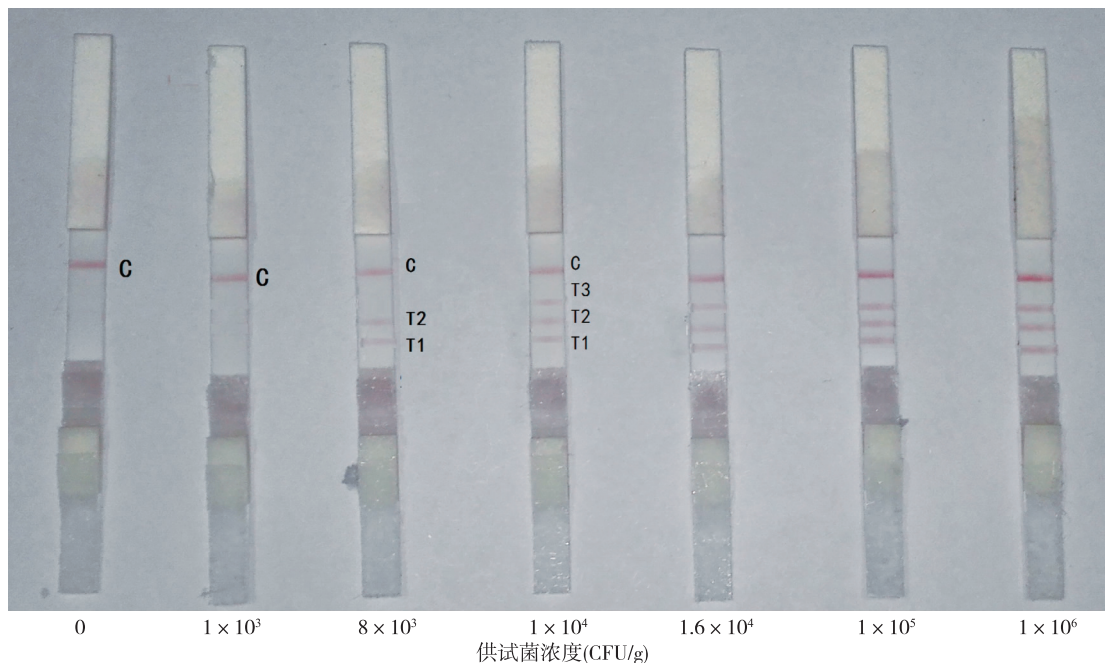
目前临床上对于食源性致病菌的检测是传统的培养方法,其结果准确可靠,但检测时间长(需要3~4 d),不能满足发生重大公共卫生事件时快速诊断的要求,影响患者的治疗。分子生物学方法灵敏度高但价格昂贵,需要特殊的设备和专门的技术人员。现有的研究成果中,能同时检测5种沙门氏菌

的胶体金免疫层析试纸条的灵敏度为 1×10^5 CFU/ml^[28]。本试验所制备的单克隆抗体与胶体金免疫层析试纸条固定3条T的方法较为少见,可针对生鲜肉中最常见的3种食源性致病菌同时进行定性和半定量快速检测,检测灵敏度为 1×10^4 CFU/g。

本试验制备的3种单抗试纸条的应用只是初步探索。因为免疫学快速检测方法有出现假阳性的特点,这与单克隆抗体的制备和特性密切相关。本试验结果表明,大肠杆菌 O157:H7与T1、T3线有较弱的交叉反应,样品检测时福氏志贺氏菌出现弱阳性,说明制备的抗鼠伤寒沙门氏菌和福氏志贺氏菌的单克隆抗体的识别位点还不够单一,在快速检测后对于部分弱阳性的样本还需要精确检测。试纸条的灵敏度为 1×10^4 CFU/g,但仍需前期增菌12 h甚至更长时间,因为样品处理后会有较多杂质干扰判断结果,需要有足够多的目标菌增强试纸条的准确性。若生产多条T线的试纸条,需要更进一步的优化试纸条的制备条件和保存条件,以减小各抗体间的相互影响,而且需要配套的喷金仪器和包装技术。

参考文献:

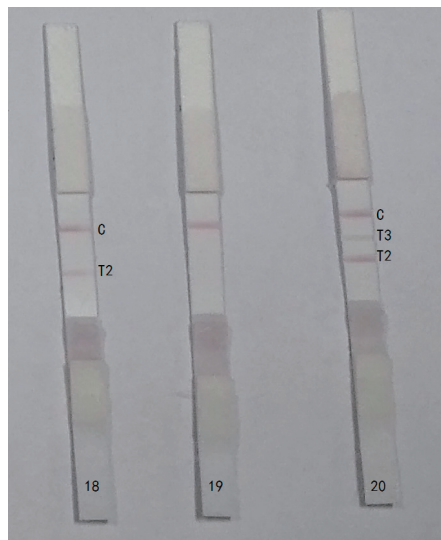
- [1] 蒲承君,崔兴博,杜 兰,等.市售生鲜鸡肉5种主要食源性致病菌污染检测及分布概率评估[J].食品科学,2015,36(10):201-205.
- [2] CALLAWAY T R, EDRINGTON T S, ANDERSON R C, et al. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to Salmonella[J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(14):163-172.
- [3] JIN H, CHETAN J, LEE J H. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: a review[J]. Food Research International, 2012, 45(2): 819-830.



T1、T2、T3 见表 5 注, C 为质控线。

图 2 人工污染样品检测结果

Fig.2 Detection of three pathogens in artificially contaminated samples



T1、T2、T3 见表 5 注, C 为质控线。

图 3 市场生鲜肉检测结果

Fig.3 Detection of three pathogens in fresh market meat

- [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.
- [5] 颜成英, 汤晓艳, 康大成, 等. EMA PT-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.
- [6] SHOUKAT S, MALIK S V S, RAWOOL D B, et al. A study on detection of pathogenic *Listeria monocytogenes* in ovine's of

kashmir region faving abortion or history of abortion[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2014, 84 (2): 311-316.

- [7] 李翠云. 单核细胞李斯特菌研究近况[J]. 中国热带医学, 2010 (1): 120-122.
- [8] VAZQUEZ-BOLAND J A, KUHN M, BERCHE P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 14 (3): 584-640.
- [9] CABANES D, DEHOUE P, DUSSURGET O, et al. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* [J]. Trends in Microbiology, 2002, 10 (5): 238-245.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 任 娟. 胶体金免疫层析技术研究现状及进展[J]. 新疆畜牧业, 2011 (12): 22-24.
- [13] 徐超莲, 赖卫华, 刘道峰. 胶体金免疫层析法检测食品中天然存在的危害物质的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35 (5): 257-261.
- [14] 郭建军. 胶体金免疫层析技术在水产品药物残留检测中的应用[J]. 北京农业, 2014 (5): 7-10.
- [15] MOONGKARNDI P, RODPAI E, KANARAT S. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Salmonella* en-

- terica serovars Typhimurium and enteritidis[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2011, 23(4): 797-801.
- [16] 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): 62-65.
- [17] 夏俊芳, 刘 芳, 刘 箐, 等. 可视化抗体阵列快速联合检测大肠杆菌 O157:H7 和鼠伤寒沙门氏菌[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1382-1393.
- [18] 兰全学, 刘小青, 李幸桓, 等. 多重 PCR 联合同源加尾技术检测四种食源性致病菌[J]. 中国食品工业, 2014(6): 59-64.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 李任峰. 检测口蹄疫病毒单抗 ELISA 方法的建立及口蹄疫病毒多抗原基因的融合表达[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 卫生部, 国家标准化管理委员会. 食品微生物学检验: 沙门氏菌检验: GB 4789.4-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 25-44.
- [26] 卫生部, 国家标准化管理委员会. 食品微生物学检验: 单核细胞增生李斯特氏菌检验: GB 4789.3-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 299-308.
- [27] 卫生部, 国家标准化管理委员会. 食品微生物学检验: 志贺氏菌检验: GB 4789.5-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012: 45-60.
- [28] 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.

(责任编辑: 王 妮)