

# 基于核酸适体微球的沙门氏菌检测方法研究

金娜<sup>1</sup>, 孔先利<sup>2</sup>, 林敏<sup>1</sup>, 左鹏<sup>3</sup>

(1.温州出入境检验检疫局,浙江温州 325000; 2.台州出入境检验检疫局,浙江台州 318000;  
3.华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

**摘要:**目的:研究基于核酸适体的微球芯片系统应用于沙门氏菌检测的可行性。方法:采用偶联有沙门氏菌适体的微球作为载体,以荧光作为检测信号建立微球芯片体系,并优化影响检测结果的各项因素。结果:通过此方法检测 20 份水产样品,6 份检出沙门氏菌,检出率为 30%。结论:建立的检测体系能实现对沙门氏菌的快速、准确的检测,且具有较高的特异性。

**关键词:**沙门氏菌,适体,微球,检测

## Study on detection method of *salmonella* using aptamer-conjugated microbeads

JIN Na<sup>1</sup>, KONG Xian-li<sup>2</sup>, LIN Min<sup>1</sup>, ZUO Peng<sup>3</sup>

(1.Wenzhou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of P.R.C, Wenzhou 325000, China  
2.Taizhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Taizhou 318000, China;  
3.East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Objective: To investigate the feasibility of aptamer-conjugated microbeads for the detection of *salmonella*. Methods: Amino-terminal aptamer probes were covalently attached onto the surface of microbeads. Fluorescence from microbeads was detected as signal source, and parameters were optimized which may affect detection of the target. Results: *Salmonella* were detected in six of 20 aquatic product samples by this method, and the detection rate was 30%. Conclusion: The aptamer-conjugated microbeads can be used for high throughput and accurate detection of *salmonella*.

**Key words:** *salmonella*; aptamer; microbeads; detection

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)13-0321-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.058

沙门氏菌(*Salmonella*)是重要的肠道致病菌,根据抗原成分的不同分成 2000 多个血清型,我国已发现的血清型有 216 个<sup>[1]</sup>。沙门氏菌在港湾环境里可繁殖和生活数周,鱼类和贝类由于生活在污水中而遭受沙门氏菌污染<sup>[2-4]</sup>。人类由于食用了生鲜或未经彻底加热的水产品而导致食物中毒,临床表现为恶心、呕吐、腹泻、发热、头痛,严重时引起胃肠炎、败血症和其它炎症,甚至危及生命。世界各国均对水产品中沙门氏菌的污染状况非常重视,将其列为水产品中不得检出的致病菌并进行严格的检测和监控。我国对水产品的致病菌检测中,沙门氏菌被定为必检项目。相关数据显示,水产品沙门氏菌的检出率约为 20%<sup>[5]</sup>。

目前沙门氏菌的主要检测方法有国标法、ELISA<sup>[6-7]</sup>、免疫磁珠法<sup>[8-10]</sup>、PCR<sup>[11-13]</sup>等。传统检测

方法包括前增菌、增菌、生化鉴定,以及血清学鉴定等,不仅耗时长,也易发生漏检;ELISA 由于抗原抗体的交叉反应,灵敏度低,很难对致病菌进行准确的检定,容易造成漏检,同时抗体的生产、保存以及抗体效价也受到一定条件的限制,这也在一定程度上限制了 ELISA 方法的应用;PCR 技术以其敏感性、特异性、简单快速的优点,已广泛应用,但 PCR 往往需要昂贵的仪器,同时容易非特异性扩增导致假阴性(假阳性);而核酸适体(aptamer)的出现为传统免疫传感器的发展开辟了一条新的道路。由于核酸适体的高亲和力、高特异性、易合成和标记、易储存且成本低等优点,现已被广泛应用于各类目标物质的富集和检测<sup>[14-17]</sup>,本研究主要以纳米微球为载体,利用沙门氏菌与相应适体的特异性结合能力,从而达到对沙门氏菌的检测。

收稿日期:2014-09-09

作者简介:金娜(1983-),女,硕士研究生,研究方向:食品安全与检测。

表1 本实验中使用的沙门氏菌适体<sup>[14]</sup>和寡核苷酸序列  
Table 1 Sequence of *salmonella* aptamer and oligonucleotides used

名称	序列(5'-3')
Salmonella enterica aptamer(Ap)	NH <sub>2</sub> -(T)13-TAT GGC GGC GTC ACC CGA CGG GGA CTT GAC ATT ATG ACA G
Cy5-tagged aptamer(Cy5-Ap)	Cy5-TAT GGC GGC GTC ACC CGA CGG GGA CTT GAC ATT ATG ACA G
Target A	NH <sub>2</sub> -(T)13-TCG CTA ATT TAA CCG GGC ACC GGA TTA GGT TCC GGC CTT G

注:Ap为氨基修饰的沙门氏菌适体;Cy5-Ap为荧光修饰的沙门氏菌适体;Target A为与沙门氏菌适体等碱基数的经氨基修饰的任意寡核苷酸。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

沙门氏菌 ATCC15611、副溶血性弧菌 ATCC17802、志贺氏菌 ATCC29930、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠埃希氏菌 ATCC25922,以及李斯特菌 CICC21633 均由温州出入境检验检疫局微生物实验室菌种中心提供;玻璃微珠(平均直径 250 $\mu$ m,密度:2.05g/mL) 购自 sigma-aldrich 公司;实验所需各种致病菌的培养基以及配套试剂 均由北京陆桥技术有限责任公司提供;其它化学试剂均为国产分析纯 购自温州金山化学试剂公司;寡核苷酸探针和引物 均为上海生工生物工程技术有限公司合成,并经反向高压液相层析纯化。

Gene pix 4000B 扫描仪 带分析软件 GenePix Pro 3.0,美国 AXON instruments;全自动微生物鉴定及药物敏感实验分析系统 VITEK32,法国梅里埃公司;微量核酸定量仪 ND-1000 Spectrophotometer,美国 thermo fisher 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 纳米微球制备方法

1.2.1.1 玻璃微珠的酸洗(微珠表面羟基活化) 500mg 未经处理的玻璃微珠浸入 1mL 6mol/L HCl 溶液中,室温振荡反应过夜,多遍水洗至中性,110 $^{\circ}$ C 真空干燥 2h。

1.2.1.2 玻璃微珠的硅烷化 将酸洗玻璃微珠浸入 2% 3-氨丙基三甲氧基硅烷(APTMS)的无水甲苯溶液,室温下振荡反应 5h,用无水甲苯溶液清洗 5 次,每次 3min;110 $^{\circ}$ C 真空干燥至少 3h。硅烷化反应后的微珠直接置于室温下保存。

1.2.2 活性基团的偶联 在用 APTMS 硅烷化试剂反应得到氨基硅烷珠后,本文用 1,4-苯二异硫氰酸酯(PDITC)偶联得到异硫氰酸化珠 NCS-Beads。

异硫氰酸化珠 NCS-Beads 的制备:10mg 硅烷化处理的玻璃微珠浸泡在 500 $\mu$ L 0.2% PDITC/10% 吡啶的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶液中,37 $^{\circ}$ C 振荡反应 2h,DMF 洗 5 遍,无水乙醇洗 3 遍,二氯甲烷洗 3 遍,室温真空干燥。

1.2.3 沙门氏菌适体(Ap)在微珠上的固定 2mg 异硫氰酸化珠 NCS-Beads 置于 5 $\mu$ mol/L NH<sub>2</sub>-Ap 的 0.05mol/L 硼酸钠缓冲液(pH8.5)20 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 振荡避光反应过夜,用去离子水洗 5 次,常温真空干燥。

1.2.4 适体与沙门氏菌在 NCS-Beads 反应条件的优化 将 *S.enterica* 标准菌株用营养肉汤活化(37 $^{\circ}$ C, 24h),划线接种于 DHL 和 BS 平板,单菌落以血平板

纯化后,进行 VITEK 鉴定,同时挑取血平板纯菌落溶于结合缓冲液(50mmol/L Tris-HCl,5mmol/L KCl,100mmol/L NaCl,1.0mmol/L MgCl<sub>2</sub> pH7.4),制得目标菌悬液浓度,加入 NCS-Beads-NH<sub>2</sub>-Ap,室温反应 10min 后,吸取上清液后,以结合缓冲液清洗三次后,加入 20 $\mu$ L 5 $\mu$ mol/L Cy5 标记适体(Cy5-Ap),室温反应 10min 后,吸取上清液后,以结合缓冲液清洗三次,常温真空干燥。将微珠进行扫描。

1.2.4.1 反应时间对沙门氏菌适体固定量的研究 按照 1.2.3.1 反应过程,选取了 8 个时间点(4、8、12、18、24、30、36、48、60h)作为研究,观察适体固定量的变化。

1.2.4.2 特异性研究 适体与 *S.enterica* 特异性研究:实验选取了金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌、志贺氏菌和李斯特菌作为对照菌株与沙门氏菌适体进行特异性反应。各菌种标准菌株经肉汤活化后接种选择性培养基并纯化后,制得菌悬液。

*S.enterica* 与寡核苷酸 DNA 特异性研究:实验选取了一段碱基数量与适体相同的寡核苷酸序列(Target A),与沙门氏菌进行特异性反应。取适量(2mg)的异硫氰酸化微珠溶于 20 $\mu$ L 0.05mmol/L 硼酸钠(pH8.5)缓冲液后加入 20 $\mu$ L 5 $\mu$ mmol/L Ap 和 Target A,37 $^{\circ}$ C 振荡避光反应 48h,以去离子水洗 5 次,常温真空干燥后加入 50 $\mu$ L 沙门氏菌菌悬液(浓度 0.2MCF),室温反应 10min,以结合缓冲液清洗三次,加入 20 $\mu$ L 5 $\mu$ mol/L Cy5 标记适体,室温反应 10min,吸取上清液,以结合缓冲液清洗三次,常温真空干燥。将微珠进行扫描。

1.2.4.3 微珠颗粒数量的影响 本实验中选取了 20、50 和 100 颗微珠研究其微珠数量对其结合力的影响,实验过程同上。

1.2.4.4 适体与沙门氏菌反应时间的研究 本实验中选取了 5、10、15、20、25、30min 六个时间点研究其反应时间长短对其结合力的影响,实验过程同上。

1.2.4.5 微珠重复性研究 适体与靶标分子结合后,可用洗脱缓冲液(elution buffer)进行洗脱,从而将靶标分子与适体分离,实现 NCS-beads-Aptamer 的重复利用,本实验将洗脱下来的 NCS-beads-Aptamer 进行重复利用反应,观察其重复利用次数。

1.2.5 样本测定 样品处理过程参照《饲料中沙门氏菌的快速检测方法 PCR 法》(GB/T 28642-2012)和《出口食品沙门氏菌属检验方法》(SN0170-1992),过程如下:取 25g 样品于 225mL 的缓冲蛋白

胨水中, 37℃ 培养 4h 进行预增菌, 取 10mL 预增菌液于 100mL 四硫磺酸盐煌绿增菌液中 42℃ 培养 20h 进行选择增菌, 取选择性增菌液 1mL 于离心管中 10000g 离心 10min, 弃上清液, 1mL 结合缓冲液去离子水悬浮离心 10min, 弃上清, 再以 0.2mL 结合缓冲液制得样品菌悬液。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应时间对沙门氏菌适体固定量的研究

研究表明<sup>[15,18]</sup>, 长链 DNA 相对于短链 DNA 需要更长的固定时间, 而该研究中 DNA 固定量对于检测结果具有很大影响, 从理论上来说, 固定在微球的 DNA 量越多, 结合的沙门氏菌靶标量越多, 从而提高检测灵敏度。从图 1 中可以看出, 适体 Aptamer 的固定量在 48h 左右趋于稳定, 此后随着时间的延长, 其固定量基本没有变化, 说明适体在微珠上的固定量基本趋于饱和状态。因此本实验中确定适体 Aptamer 固定 NCS-Beads 的反应时间为 48h。

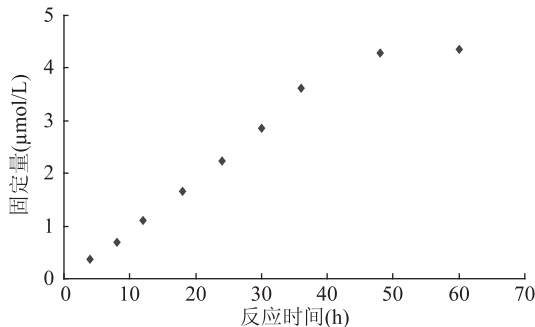


图1 反应时间对适体固定量的影响  
Fig.1 Effect of immobilization time of binding amount aptamer onto NCS beads

### 2.2 特异性研究

*S. enterica* 与寡核苷酸 DNA 特异性研究: 从图 2 信号值可以看出, 适体 Aptamer 与沙门氏菌的特异性很好, 与其他的致病菌(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺氏菌、李斯特菌和副溶血性弧菌)基本不发生反应, 图 3 中等碱基数的任意 DNA 寡核苷酸链与沙门氏菌之间也不发生反应, 说明该适体与沙门氏菌的特异性较好, 而且适体合成简单方便, 这也是未来适体代替抗体的一大优势。

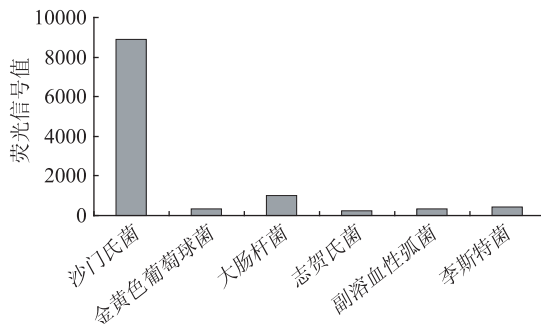


图2 不同标准菌株与适体特异性研究  
Fig.2 Selectivity of salmonella towards different bacteriums

### 2.3 微珠颗粒数量的影响

理论上来说, 微珠数量越多, 固定适体量相应增

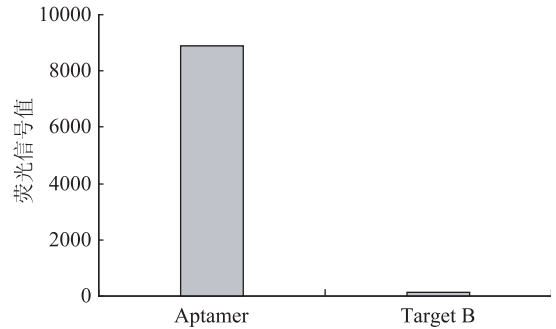


图3 DNA 寡核苷酸与沙门氏菌特异性研究

Fig.3 Selectivity of aptamer towards target B

加, 同时可以加强沙门氏菌检测灵敏度。但是 DNA 适体和沙门氏菌反应本身结构变化目前还未有详细研究, DNA 的固定化密度过大, 会由于空间位阻<sup>[19]</sup>和 DNA 片段上带电磷酸基团之间的静电排斥作用等原因<sup>[20]</sup>, 使反应特异性降低; 密度过小, 则会使杂交的量减小, 灵敏度降低。因此, DNA 的固定化密度是研究 DNA 固定的重要内容之一。从图 4 中可以看出, 随着微珠颗粒数目增加至 50 个时, 荧光值达到一个较高值, 而当微珠数量继续增加至 100 颗时, 信号值反而下降, 说明随着微珠颗粒数的增加, 固定适体量的增加可能导致了 DNA 的空间位阻, 最终影响信号 DNA 分子的结合。

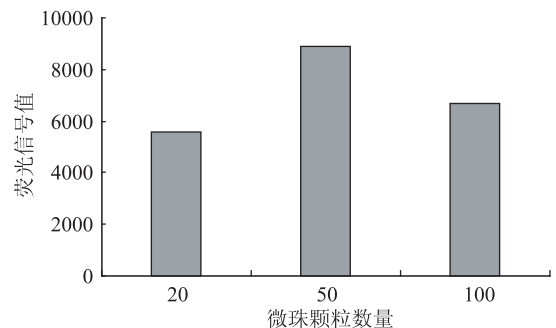


图4 微珠颗粒数量对荧光信号值的影响

Fig.4 Effect of different bead number on fluorescence intensity

### 2.4 适体与沙门氏菌反应时间的研究

由于适体与靶标分子的结合力相对于抗原抗体反应更强, 适体与靶标分子的结合常数 Kd 通常为 nmol/L 级<sup>[21]</sup>, 因此反应相对于抗原抗体而言更快速, 且通常于室温条件进行, 从图 5 中可以看出, 适体与靶标分子的反应在 15min 基本已经达到平衡状态, 随着时间的延长, 沙门氏菌的结合率反而下降, 导致最终荧光信号值的降低, 因此本研究选取最适合的反应时间为 15min。

### 2.5 微珠重复性研究

从图 6 中可以得知, 固定了 Ap 的微球在重复利用 5 次后, 信号值可达到原始值的 70% 左右, 对于检测完全符合要求, 可以达到二次利用的目的。说明适体在微球上的共价作用结合的比较稳定, 而随着重复次数达到 7 次或更多时, 荧光信号值基本只剩下原始值的 20% 左右, 此时已不适合作为检测载体, 从环保经济的角度, 本实验将微球的重复利用次数



确定为 5 次。

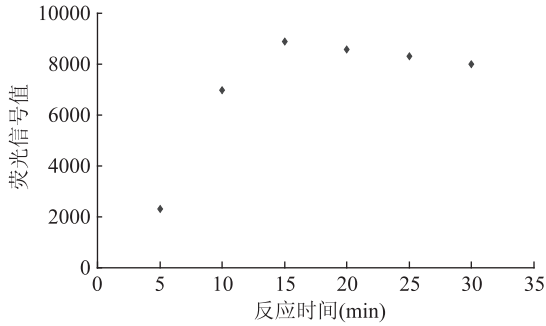


图 5 反应时间对荧光信号值的影响

Fig.5 Effect of reaction time on fluorescence intensity

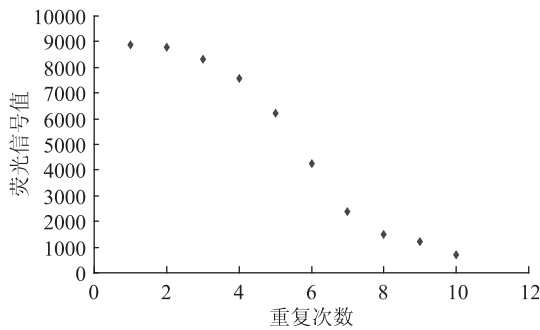


图 6 微珠重复性研究

Fig.6 The repetition of NCS-beads

## 2.6 样本的测定

对 20 例水产实际样本以建立的微球芯片分析系统进行了检测,同时以 GB4789.4-2010 作为比较参照,两种方法的阳性符合率为 100%,其中沙门氏菌阳性(6 例)符合率为 100%,阴性符合率为 100%,该分析系统能够有效对沙门氏菌进行快速检测,检测时间比传统检测方法 5d(数据未给出)缩短至 2d。

## 3 结论

随着适体研究的广泛发展与其相对应的适体传感器有望得到更深入与快速的发展,为生命科学研究中核酸与其它生物分子间的相互作用提供更多的分析方法。此外也为临床诊断和环境检测等领域提供更先进的测试工具,为核酸传感技术与方法的研究与应用注入新的活力。

本文以 250 $\mu\text{m}$  的玻璃微珠作为固定适体 DNA 的载体,与沙门氏菌特异性结合后,以荧光标记的适体进行信号输出,研究了反应过程中适体固定时间,适体与沙门氏菌的特异性,微珠颗粒数以及重复性各项因素的影响,最终建立了一种快速简便的方法实现了对沙门氏菌的检测,该方法检测时间比传统方法缩短了 3d。同时随着筛选得到的致病菌和病毒的适体越来越多,该项技术可以应用到更多的致病菌检测系统中,达到快速而有效的检测目的,同时可以考虑在微珠上同时固定两种或其以上的适体探针,以期达到多元检测的目的。

### 参考文献

[1] Collette F, Rachel S, Linda L G, et al. Molecular analysis of the rfbO antigen gene cluster of *Salmonella enterica* serogroup O: 6,14 and development of a serogroup-specific PCR assay [J].

Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69 (10): 6099-6015.

[2] 范放,洪小柳,赵芳,等.进口冷冻肉类沙门氏菌快速检验方法的研究[J].检验检疫学报,2009(1):45-48.

[3] 刘晓霞.关于食品中沙门氏菌快速检测方法的新进展[J].化学工程与装备,2009(10):133-134.

[4] 江为民,肖光明.关于我国水产品质量安全问题及应对措施[J].内陆水产,2008(1):7-10.

[5] 林涛,兰敏,黄伟,等.荧光酶免疫分析仪-微生物鉴定仪在水产品沙门氏菌检测中的应用[J].食品与发酵工业,2008,34(8):133.

[6] 王堯,闰磊,曾庆祝.沙门氏菌的检测技术与方法[J].现代食品科技,2007,23(5):82-85.

[7] 王福厚,霍贵成,主德国,等.食品中沙门氏菌检测方法的研究进展[J].中国乳品工业,2009(10):38-41.

[8] 余晓峰,张萍,宗凯,等.免疫磁珠法检测脱水蒜制品中沙门氏菌[J].食品科学,2012,33(24):257-259.

[9] 许学斌,顾宝科,金汇明,等.免疫磁珠法检测食品中的沙门氏菌及分离菌株的耐药性[J].中国食品卫生杂志,2006,18(3):202-204.

[10] 山珊,牛瑞江,等.免疫磁珠法富集沙门氏菌的优化及应用[J].食品工业科技,2013,34(13):153-156.

[11] Sheng-Quan Jin, Bin-Cheng Yin, Bang-Ce Ye. Multiplexed Bead-Based Mesofluidic System for Detection of Food-Borne Pathogenic Bacteria [J]. Applied and environmental microbiology, 2009, 75 (21): 6647-6654.

[12] Wolffs PF, Glencross K, Thibaudeau R, et al. Direct quantitation and detection of *salmonella* in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR [J]. Appl. Environ. Microbiol, 2006, 72: 3896-3900.

[13] Wang L, P.C.H. Li. Flexible microarray construction and fast DNA hybridization conducted on a microfluidic chip for greenhouse plant fungal pathogen detection [J]. J. Agric. Food Chem, 2007, 55: 10509-10516.

[14] R. Joshi, H. Janagama, H.P. Dwivedi. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of *Salmonella enterica* serovars [J]. Mol. cell. Probes, 2009, 23: 20-28.

[15] Gioi Dong Huy, Na Jin, Bin-Cheng Yin, et al. A novel separation and enrichment method of 17 $\beta$ -estradiol using aptamer-anchored microbeads [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2011, 34(2): 189-195.

[16] Ma X, Jiang Y, Jia F, et al. An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of *salmonella* [J]. J Microbiol Methods, 2014, 3: 94-98.

[17] Wenhe Wu, Jun Li, et al. Gold nanoparticle-based enzyme-linked antibody-aptamer sandwich assay for detection of *Salmonella typhimurium* [J]. ACS Appl mater interfaces, 2014, 6(19): 16974-16981.

[18] Han Sheng, Bang-Ce Ye. Different strategies of covalent attachment of oligonucleotide probe onto glass beads and the hybridization properties [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2009, 152:

(下转第 333 页)

免疫抗原筛选,分别制备得到 14 株和 34 株单抗,经三聚氰胺阻断鉴定,BSA-ACS-Mel 抗原免疫所获得的单克隆抗体中有 6 株具有较好的反应特异性,占总数的 42.9%,免疫原性较强。而 BSA-Mel 抗原免疫所获得的单克隆抗体则未能筛选出特异性的三聚氰胺单抗。以两种不同抗原免疫得到的单克隆抗体亚类数量及其用三聚氰胺阻断实验的测定结果如表 3 所示:

表 3 三聚氰胺偶联抗原免疫原性对比

Table 3 Comparison on immunity of melamine conjugates antigens

单抗亚类	特异性单抗/单抗		特异性单抗获得率(%)	
	BSA-ACS-Mel	BSA-Mel	BSA-ACS-Mel	BSA-Mel
IgM	0/4	0/6	0	0
IgG	6/10	0/28	60	0
合计	6/14	0/34	42.9	0

经过动物体内免疫,带连接手臂的抗原得到了 14 株单抗,其中 6 株三聚氰胺单抗具有特异性,而无连接手臂的抗原得到 34 株单抗,但经阻断实验证明均不具有特异性。说明无连接手臂的偶联抗原免疫原性弱,很难获得针对三聚氰胺的特异性单抗。而带连接手臂的三聚氰胺抗原,由于手臂有利于减少抗原抗体识别时的空间位阻作用,能将三聚氰胺分子提呈到整个抗原分子的表面,因而具有较好的免疫原性,更适合做为免疫原。

### 3 结论

通过改进抗原制备方法得到带手臂的三聚氰胺抗原,免疫动物后获得特异性单克隆抗体,经 ELISA、Western blot 等方法进行免疫原性分析,证明该方法具有转化效率高(转化率 85.9%),偶联抗原的反应原性及免疫原性(特异性单抗获得率 42.9%)均较好等优点,可以用于三聚氰胺的快速免疫检测等方面,并对其它小分子抗原的合成和鉴定提供参考。

(上接第 324 页)

54-65.

[19] Alexander WP, Lauren KW, Rosina MG. Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces [J]. J AM CHEM SOC, 2002, 124: 14601-14607.

[20] Nuzzo R G, Fusco F A, Allara D L. Spontaneously organized molecular assemblies (3): preparation and properties of solution

(上接第 328 页)

结构与功能. 书名原文: Starch in Food: Structure, Function and Applications, edited by ELIASSON AC. 赵凯, 等译, 2009, 中国轻工业出版社, 北京.

[11] 顾正彪. DSC 在淀粉研究中的应用 [J]. 无锡轻工大学学报, 1996, 15(2): 179-182.

[12] (日) 二国二郎. 淀粉科学手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989.

[13] 项丽霞, 田翠华, 李洁, 等. 莲藕淀粉糊化温度的测定 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 63-64.

[14] 闵燕萍, 陈宗道, 耕耕, 等. 藕淀粉的加工性能研究 [J]. 农业工程学报, 2007, 27: 259-263.

### 参考文献

[1] Neerman MF, Chen HT, Parrish AR, et al. Reduction of drug toxicity using dendrimers based on melamine [J]. Mol Pharm, 2004, 1(5): 390-393.

[2] 冯楠, 路勇, 吴颖, 等. 超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 测定多种食品中三聚氰胺的残留量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(2): 248-250.

[3] GC-MS Screen for the presence of melamine and cyanuric acid [S]. FDA-ORA Forensic chemistry center SOP T015.

[4] Updated FCC developmental melamine quantitation (HPLC-V) [S]. FDA-ORA Forensic chemistry center SOP T015.

[5] 沈昊宇, 赵永纲, 王乐屏, 等. 三聚氰胺及其相关物质的性质、危害与检测技术 [J]. 化学通报, 2009(4): 341-349.

[6] 孔君, 刘菁, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2): 170-173.

[7] 夏骏, 赖卫华, 涂继平, 等. 三聚氰胺胶体金免疫层析方法的建立 [J]. 食品科学, 2013, 34(20): 139-143.

[8] 饶钦雄, 童敬, 王金芳, 等. 饲料和食品中三聚氰胺的毒性及残留检测方法的研究进展 [J]. 饲料工业, 2009, 30(11): 34-36.

[9] Lei HT, Shen YD, Song LJ, et al. Hapten synthesis and antibody production for the development of a melamine immunoassay [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 665: 84-90.

[10] 宋建武, 晁志, 董为人. 石杉碱甲人工抗原的合成、鉴定及免疫原性分析 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2128-2130.

[11] 陈继明, 龚晓明, 陆承平. T 细胞表位研究进展 [J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 1998, 18(1): 78-82.

[12] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 7-8.

[13] 任立松, 王颖, 党荣理, 等. 苏丹红单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(2): 201-203.

adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces [J]. J Am Chem Soc, 1987, 109(8): 2358-2361.

[21] Peng Zuo, XiuJun Li, Delfina C, et al. A PDMS/paper/glass hybrid microfluidic biochip integrated with aptamer-functionalized graphene oxide nano-biosensors for one-step multiplexed pathogen detection [J]. Lab Chip, 2013, 13: 3921-3928.

[15] 秦志荣, 许荣年, 汪庆旗, 等. 藕淀粉颗粒性质的研究及藕粉产品的鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 136-138.

[16] 高群玉, 吴磊, 刘 kun. 甘薯淀粉糊性质的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(8): 153-155.

[17] 谭洪卓, 谭斌, 刘明, 等. 甘薯淀粉性质与其粉丝品质的关系 [J]. 农业工程学报, 2009, 25(4): 286-292.

[18] COLLADO LS, MABESA RG, CORKE H. Genetic variation in the physical properties of sweet potato starch [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 4195-4201.

[19] DEFLOOR I, DEHING I, DELCOUR JA. Physicochemical properties of cassava starch [J]. Starch/Stärke, 1999, 50: 58-64.