

一种改进的检查鼠伤寒沙门氏菌的酶联免疫测定法(ELISA)

E. Prusak · Sochaczewski 和 J. H. T. Luong

摘要:研究了ELISA法在检测食品中沙门氏菌的应用。探讨了影响ELISA灵敏度的诸因子,如用于封闭酶标板的蛋白质类型、抗体标记的方法、抗体——抗原和酶——底物之间反应的促进剂。证明在检测系统中,用辣根过氧化物酶标记抗体和用邻——苯二胺作为底物进行酶测定是最适宜的。

根据这些发现,建立了一种检测鼠伤寒沙门氏菌的改进的ELISA法。该法可检出少至 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 细胞/ml的沙门氏菌。从食物样品中增殖细菌到测定结束约需24小时。修改的ELISA测定法可达到高水平的灵敏度和极好的重复性。

一般检查食品中存在的沙门氏菌时有费时间和难确定的弊端。其原因是,这类细菌存在数量少,且与其它污染菌混杂在一起。虽然在过去的数年里报道了很多快速分离沙门氏菌的方法,ELISA法也得到广泛认可,但是很多人还在集中精力改进ELISA流程,以便得到灵敏和快速的测定方法;集中研究专一性高、可用于检测所有沙门氏菌的单克隆和多克隆抗体。在推荐的众多检查沙门氏菌的方法中,一般花费的总时间为48小时或更长,可检出的细菌水平是 10^6 细胞/ml。自使用Rappaport—Vassiliadis(RV)培养基后,缩短了培养沙门氏菌的时间。因而,ELISA法应用的关键似乎主要是灵敏度问题。

ELISA操作过程中的一些事宜也有待完善。如抗原的固定、抗体的专一性、标记抗体用酶的选择、酶与抗体的偶联以及酶活性的测定方法等。还有包被后封板用的蛋白质的选择也须研究,因为它可影响背景的读数,抗体的活性和结合力。影响ELISA检查沙门氏菌灵敏度的因子并不完全清楚。鉴于ELISA程序差异极大,所以只能从检查沙门氏菌需要的总时间、可检出的细菌水平和试

验重复性三方面比较。

本研究主要目的是,探讨影响ELISA灵敏度的因子和改进现用的检测食品中人为污染沙门氏菌的ELISA程序。

材料和方法

抗原:鼠伤寒沙门氏菌LJ2有毒菌株SA1355和无毒菌株SA1377及大肠杆菌JM83,均得自加拿大国立研究委员会。

菌种保藏在1.5%营养洋菜斜面上(4℃),在营养肉汤中增殖(37℃),活菌记数采用平板涂布法。

人为污染肉馅样品(10克)预先增菌于100ml营养肉汤中(37℃)6—24小时,取此液0.5ml加至RV增菌培养基37℃培养6—18小时。

鞭毛抽提物:将细菌置沸水中处理20分钟即是。

酶标抗体:亲和纯化沙门氏菌共同结构抗原的抗体,以及用辣根过氧化物酶(HRPO)或碱性磷酸酯酶(AP)标记的酶和抗体复合物购自孟德尔科技有限公司(加拿大)

与此同时,HRPO—抗体标记复合物用

HRPO (Sigma VI 型)通过修改的过碘酸钠法制备。

AP—抗体标记复合物用 AP (Sigma VII 型)通过碘酸钠法或戊二醛法制备。

ELISA: ELISA 法都是在平底 96 孔微量板中进行的,总体积 100μl,置室温(22—26℃)孵育。板孔预先用 0.2mol/L Na₂CO₃ (PH9.6)缓冲液配制的 5μg/ML 的沙门氏菌抗体溶液包被 1 小时,移去过量抗体,各孔加 0.5%酪蛋白溶液[用含 0.5mol/L NaCl 的 0.2mol/L Tris(PH7.4)缓冲液(TBS)配制]封闭 15 分钟,以消除非专一性蛋白质吸附位点。倾去封闭液,用含 0.1%酪蛋白 TBS 加满倾空板各孔,连续洗涤五次。加入抗原(完整的细菌或鞭毛抽提物)培育 15 分钟,按上法洗涤后加 2μg/ml HRPO 标记的抗体溶液(用含 0.1%酪蛋白的 TBS 溶液配制),反应 15 分钟,结合的 HRPO 活性用 100μl 底物溶液[以 0.2mol/L 柠檬酸盐—磷酸盐(PH5.0)缓冲液配制的内含 0.6%邻—苯二胺二氯化物(OPD)、0.1%H₂O₂ 和 1%吐温₂₀或曲里通 x-100]测定,其步骤是酶与底物反应后加 150μl 0.2mol/L H₂SO₄ 终止反应,以微量滴定板读数器直接读出每孔吸光值或用 Beckman Du-7 分光光度计测定吸光值。

修改的 ELISA 程序:

板的活化:根据 Klasen 等方法用 0.025%戊二醛[用 0.1mol/L Na₂CO₃(PH9.0)配制]溶液处理聚苯乙烯板,板置 56℃(暗处)活化 2 小时,用水漂洗三次后干之。

板的包被:经戊二醛活化的板,用 0.1mg/ml 抗体[用 mol/L Na₂CO₃(PH9.0)溶液配制]包被,室温过夜。未活化的板用 5—100μg/ml 抗体溶液[用 0.2mol/L Na₂CO₃(PH9.6)配制]包被 1—18 小时。

板的封闭:以 1%牛血清白蛋白(BSA)、0.5%酪蛋白或 0.5%白明胶作为封闭蛋白,

为了对照还加过非离子清洁剂 0.05%的吐温₂₀。封闭试剂以 TBS 配制后加入板中,室温培育 15—60 分钟,如不立即使用,在湿态下板可贮存一周(4℃)。

抗原的孵育:沙门氏菌体或鞭毛抽提物用生长培养基稀释后,加入板中孵育 10—60 分钟。抗原也曾用过含 3%聚乙二醇或 3%葡聚糖的培养基溶液稀释。

酶标抗体的孵育:依试验设计,以 TBS 溶液配制不同浓度的标记物(0.1—10μg/ml)加入板中,需要时,也加封闭用的 1%蛋白和 0.05%吐温₂₀,3%葡聚糖或聚乙二醇,孵育 10—60 分钟。对上述五种标记物,二种用 HRPO 标记,三种用 AP 标记作了研究。

洗涤:在培育之间用上述的含 0.05%吐温₂₀或 0.1%蛋白质的 TBS 液洗板。

HRPO 的测定:用三种不同的底物比较,所用试剂现用现配。

邻—苯二胺(OPD):用 0.1mol/L 磷酸盐—柠檬酸盐(PH5.0)缓冲液配制的 0.04%OPD,0.012%H₂O₂ 溶液为标准底物溶液。Bovarid 等(1982)曾试验过底物高浓度,OPD 直到 1.8%,H₂O₂ 到 0.15%。最适浓度 OPD 为 0.6%,H₂O₂ 为 0.1%。两种非离子清洁剂(1%吐温₂₀和 1%曲里通 x-100)对 HRPO 活性的影响也作了评估,被评估的还有 0.005%香草醛。在 492nm 直接读每孔吸光值或加 0.2N H₂SO₄ 终止反应后置微型小杯读吸光值。

2,2—偶氮—双—(3—乙基苯偶氮宁)[2,2—Azino—bis—(3—ethylbenzotiazoline), ABTS]:用磷酸盐—柠檬酸盐(PH5.0)缓冲液配制 0.04%ABTS 和 0.012%H₂O₂ 溶液为 HRPO 的底物溶液(含或不含 0.005%香草醛),其吸光值可直接读或加 1%氟化钠终止反应后在 415nm 测定。

3—(对—羟基苯)—丙酸[3—(P—Hydroxyphenyl)—propionic acid, HPPH]:

30mol/L HPPH 和 2mol/LH₂O₂ 溶液是用 0.12mol/L Tris (PH8.5)缓冲液配制的,反应后加 0.1mol/L 甘氨酸-HCL (PH10.3)缓冲液终止反应,荧光强度用荧光光度计测定(激发光波长 320nm,吸收光波长 404nm)。

AP 测定:AP 标记物是用三种不同底物检测的:对一硝基苯磷酸盐(P-Nitrophenyl phosphate, pNp-p):用 1mol/L 二乙醇胺 (PH9.8)配制 5mol/L PNP-P 溶液,反应液加 1.5mol/L NaOH 终止,在 405nm 测吸光值。

4-甲基-7 羟基香豆素(或称撒形酮)磷酸盐(4-Methyl-umbelliferyl phosphate, 4Mu-p):用 1mol/L 二乙醇胺(ph9.8)配制 0.2mmol/L4MU-P 液,反应液加 1.5mol/L NaoH 终止,荧光强度在 455nm 测定(激发光波长 365nm)。

酶放大(译者注:酶灵敏度的提高):stanley 等建立的酶放大法已用于 AD 活性的测定:加 0.2mol/L NADP⁺溶液 0.1ml [0.05mol/L 二乙醇胺(ph9.5 缓冲液配制)于小孔中培育 20 分钟,再加 0.2ml 酶放大溶液(含 2mg 乙醇脱氢酶、2mg 硫辛酰胺脱氢酶、3%乙醇和 1mol/L 对一碘硝基四唑紫溶于 12ml 25mol/L 磷酸盐缓冲液(ph7.0)]再培育 10 分钟,出现颜色后加 0.05mL 0.2mol/L hH7.0)]终止反应,在 492nm 测吸光值。

结果

抗体包被:图一所示在不同程序中用沙门氏菌抗体包被板孔表面时的结果。用戊二醛活化的聚乙烯板并不能增加抗体对其的吸附作用。抗体与没有进行任何预活化的板的直接结合,在培育 1-18 小时范围内与时间长短无关,5ug/ml 左右的抗体浓度足够包被板子。板子用高浓度抗体处理并不能改善 ELISA 的灵敏度(见图 2)。

板的封闭和洗涤:用三种蛋白质和吐温

20 封闭和洗涤板子后得到的结果表明,所用的蛋白质类型并不影响 ELISA 的灵敏度,但酪蛋白背景最浅(见图 3)。用吐温 20 封闭和

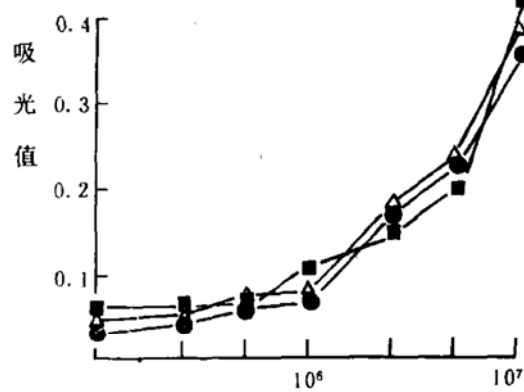


图 1 沙门氏菌细胞/ml

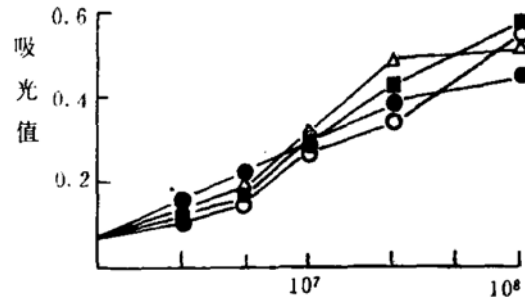


图 2 沙门氏菌细胞/ml

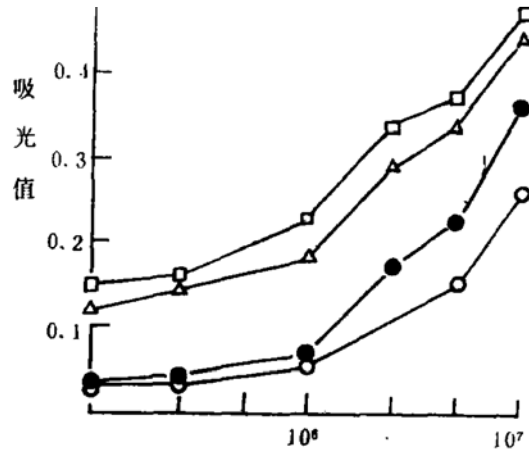


图 3 沙门氏细胞/ml

洗涤后产生的背景类似于酪蛋白,但吸光值也降低约 20%。封闭 15 分钟是足够的,延长培育时间并不能进一步改善。板可直接使用或 4℃ 存放一周(≤7 天)再结合抗体。

偶联程序:用 HRPO 或 AP 标记沙门氏菌的商品抗体试验证明是满意的(见图 4)。本文制备的偶联物使 ELISA 有较高的灵敏度,且偶联物用量少。用戊二醛法制备的商品

AP 偶联物和本实验室制备的一批 AP 偶联物优于过碘酸法。

酶测定:用二种比包法和一种荧光法测定 ELISA 中的 HRPO 活性时,其中用 OPD 作底物比用 ABTS 作底物产生的吸光值高(见图 5)。在这两种测定中,加入 0.005% 香草醛对 ABTS 底物有促进作用,能使 HRPO 活性增加 700%,而对 OPD 底物则使 HRPO 活性降低 30%,但是用 OPD 作底物测定的结果比有香草醛催化的 ABTS 好得多。

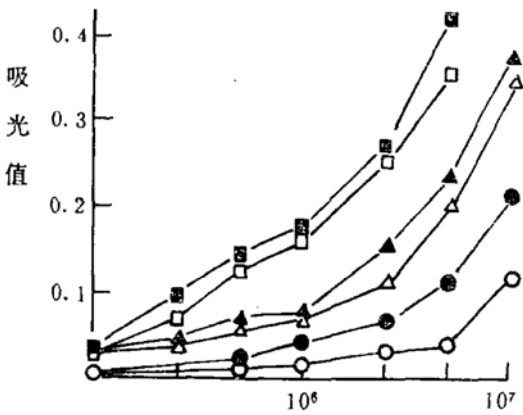


图 4 沙门氏菌细胞/ml

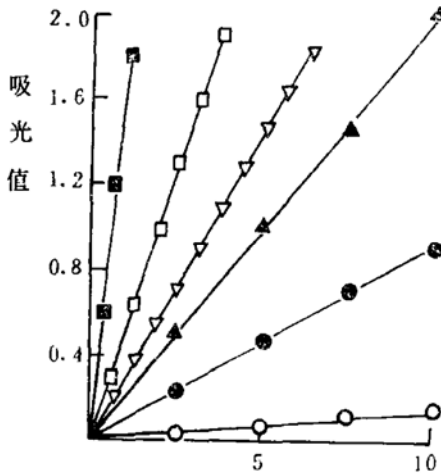


图 5 HRPO-抗体的 ng 数

加 1% 曲里通 x-100 或吐温 20 到 OPD 底物溶液中,HRPO 活性分别增加 1.8 和 1.6 倍与未加者比)。此外用 OPD 测定的最佳条件表明,用较高的底物浓度(0.6%, H₂O₂0.1%),HRPO 活性增加 6 倍是可能的(见图 5)。

最佳 OPD 测定法和标准测定法比较研究表明,就沙门氏菌的剂量反应曲线而言,前法比后法的灵敏度并不是严格的高出 6 或 10 倍,而是得到了明显的高灵敏度,约为 5 × 10⁴ - 10⁵ 细胞/ml(见图 6)。

用荧光比色法底物 HPPA 测出的灵敏度不比 OPD 高。这大概是由于底物荧光值高,致使背景吸收值也高的缘故。进一步纯化 HPPP 有可能增加信号/噪声比率。

以 PNP-P 作底物,用比色法测定 AP 活性与 NADP 作底物的酶放大法进行比较,在反应中得到的 NAD 被用于 NAD 和 NADH 的氧化还原循环中,可产生有色的甲潜染料。酶放大法测出的游离 AP 活性比比色法高 500 倍,但在沙门氏菌测定的剂量反应曲线仅高 30-50 倍,并低于用 HRPO 标记得到的结果(见图 6)。

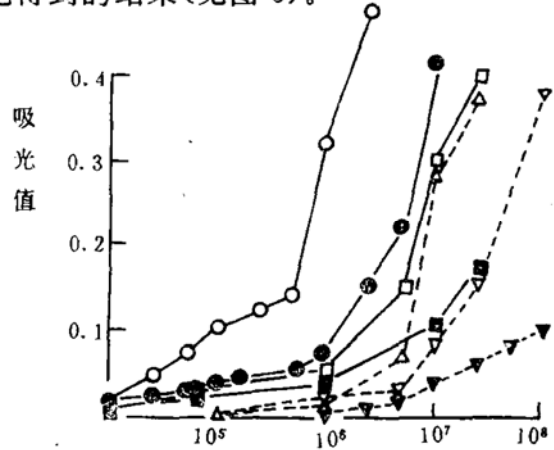


图 6 沙门氏菌细胞/ml

用 AP 荧光比色测定得到的结果比比色法高 10 倍左右,但测定沙门氏菌的灵敏度还是约为 10⁶ 细胞/ml。

促进剂对抗原-抗体培育时间的影响:葡聚糖、乙二醇和聚乙二醇作为抗原-抗体反应的促进剂已有报道。本研究观察到 3% 葡聚糖能明显地抑制 ELISA 的灵敏度(见图 7)。在抗原-抗体反应的孵育过程,3% 葡萄糖对 ELISA 灵敏度的影响与孵育时间有关。值得注意的是复合物形成的必要时间为 10-15 分钟,处于长保温时间仍然维持同一检

测水平。在孵育 10 分钟时,加 3% 葡聚糖吸光值可提高二倍,而在孵育 20 分钟时,则使吸光值有轻微的降低。原因是葡聚糖存在还

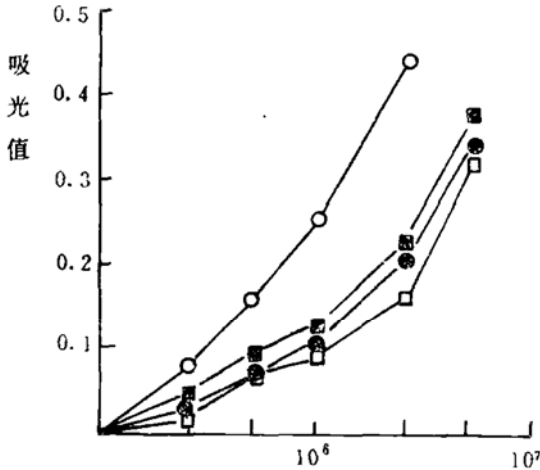


图 7 沙门氏菌细胞/ml

导致背景值极高(可达 0.4)。因而在 ELISA 中不推荐加葡聚糖。

食物样品中沙门氏菌的检测:当用纯沙门氏菌培养物时,对有毒株和无毒株的最低检出菌数分别是 $5 \times 10^4 \sim 10^5$ 和 $5 \times 10^5 \sim 10^6$,使用鞭毛抽提物观察到的 ELISA 灵敏度和前述菌细胞的相同。高达 10^8 的大肠杆菌存在时,并不影响所用程序对沙门氏菌的检测。也有人用人为污染食物样品观察。检测过沙门氏菌的灵敏度。一般来说,预增菌培养 6 小时,在 RV 培养基上选择性增菌 18 小时是充分的。在 20 个类似的试验中,以 300、30 和 3 个沙门氏菌分别污染 10 克食物,用预先测过细菌数的原菌液制备,增菌 24 小时后没有出现假阴性结果,所有样品给出的 ELISA 吸光值大于 0.5。这表明沙门氏菌的生长浓度至少在 $10^6 - 10^7$ /ml。预增菌 12 小时后,在第一培养基中直接检出沙门氏菌也是可能的。但继续增菌 13 小时后结果较好。最理想的结果是培养 20—24 小时。预增菌 18 小时,再增菌 6 小时结果也较好。然而分别培养 6 和 18 小时则是最理想的,因在这种情况下可得到较高数量的沙门氏菌细胞。用多透 500 个大肠杆菌细胞和沙门氏菌一起污

染,并不会影响检测沙门氏菌的灵敏度。

讨 论

固相免疫测定法是根据包被抗体或抗原的聚合物能专一地结合抗原或抗体的原理建立的,已推荐的方法很多。在聚合物(固相支持物)上抗原或抗体是以共价键方式结合的,如纤维素、琼脂糖、尼龙和玻璃都可作固相支持物。对特殊蛋白质在聚合物上吸附性弱时,采用共价结合对提高 ELISA 灵敏度或许是必要的。因为各种蛋白质对微孔板表面吸附性很不一致,主要取决于基质、PH 和离子强度。然而免疫球蛋白吸附到聚合物上容易达到最大饱和值,也不随抗体浓度和培育时间的增加而增加,并且在解吸能力和抗变性方面有很好的稳定性。通常各种蛋白质对聚氯乙烯板较聚苯乙烯板的吸附性好些,但聚苯乙烯板不易弯曲变形,使用方便,用它作材料时,沙门氏菌抗体浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$,孵育 1 小时,孔表面包被量达到最大。用戊二醛将抗体共价偶联到板上并不提高 ELISA 的灵敏度。用抗体包被板子至少一周内是稳定的,也不影响测定结果,可以不在试验时包被而预先制备以缩短检测沙门氏菌的时间。ELISA 包被抗体优于直接 ELISA,特别是对混合细菌培养物的测定,可消除抗体吸附力强,用细菌细胞包被板表面时的一些问题,还能使沙门氏菌细胞专一地吸附,使由食物和其它细菌非特异性吸附引起假阳性的可能性降低。

对几种蛋白质作为非专一性吸附封闭试剂的能力作了试验,酪蛋白通常对塑料具有很高的亲和性,而其它蛋白则亲和性低。酪蛋白用于封闭是最有效的物质,BSA 也常用。任何一种蛋白质作封闭剂均优于吐温₂₀,蛋白中以酪蛋白为最佳。用吐温₂₀测定灵敏度低的原因,大概是这种清洁剂使蛋白质解吸。此结果与近来的报道吐温₂₀干扰某些蛋白的免疫测定相一致。

AP、HRPO 和 β -半乳糖苷酶被广泛用

于免疫测定的标记物。对应这些一酶的底物能通过荧光计或比色计进行检测。普遍认为荧光计用的基质灵敏性比比色计的高,但本研究结果并非如此,利用荧光原性物质时,并无任何明显改进。用 4-甲基-7-羟基香豆素(撒形酮)衍生物作底物测定,β-半乳糖苷酶和 AP 的 ELISA、荧光计法灵敏度略同(Ishikawa 和 kato1987),AP 用此底物比色测得值高 16-39 倍。本研究中,荧光法比比色法(对 AP 测定)高 10 倍。然而这个灵敏度水平仍低于放大的硫辛酰胺脱氢酶对 AP 的测定,低于用 OPD 作底物对 HRPO 的比色测定。希望通过放大法提高 AP 活性灵敏度的检测,近来已有报道。这一检测法对 ELISA 许多抗原是很灵敏的。该法对沙门氏菌的灵敏度大约比标准程序 AP 法高 50 倍,但最低检测菌数仍为 10⁶ 细胞/ml(较使用 HRPO 能检出 5×10⁴~10⁵ 细胞/ml 的程序低一个数量级。用荧光原性物质(3-羟基苯丙酸)检测 HRPO 活性时,对于高度敏感的分析法,此物似乎纯度不够。因背景值极高,导致难以读出 HRPO 活性。2,2-偶氮-双-3-乙基苯偶氮宁是用于比色法测定 HRPO 活性的一种较好的底物,它较稳定,没有致癌性,但价格昂贵,反应产物不稳定。在本研究中,用此底物测 HRPO 活性比邻一苯二胺的低 10 倍,加 0.05% 香草醛到 ABTS 中,HRPO 活性增加 7 倍,但与用 OPD 相比未改善检测沙门氏菌的灵敏度。

OPD 作底物用比色法测 HRPO 活性时灵敏度高,尤其在最佳条件下容易检出沙门氏菌(甚至在比色测定前)。HRPO 测定的改善是用高浓度底物,加 1% 曲里通 x-100 或吐温₂₀和质量好的偶联物实现的。

本研究得到的结果未能证实用葡聚糖或聚乙二醇促进抗体-抗原反应的能力可提高 ELISA 的灵敏度。已证实抗原-抗体反应的必要时间为 15 分钟,在此时间内加 3% 葡聚

糖于培育液中,可使检测沙门氏菌的灵敏度增加 2 倍。但对较长的培育时间,葡聚糖的存在使灵敏度甚至稍微降低。3% 聚乙二醇的存在,也降低试验的灵敏度。

新介绍的检测食物样品中沙门氏菌的程序,可使预增菌或增菌时间少于 24 小时。24 小时培养足够了,未观察到假阴性结果。全细菌培养物和鞭毛抽提物均能被检出,从安全方便出发,试验时应加热杀死细菌后进行。

与近来介绍的一些沙门氏菌检测法比较,改进的 ELISA 检测沙门氏菌是灵敏和专一的,而且花时间少,操作仅需 1 小时,商品试剂包括未纯化的多克隆抗体可直接应用不需纯化。在本研究中仅用两株鼠伤寒沙门氏菌和人为污染样品进行了模拟试验,用另外的沙门氏菌污染食物样品的检测工作也已开展,随后将报道。

参 考 文 献

ALELXO, J. A. G., SWAMINATHAN, B. & MINNICH, S. A. 1984 Salmonella detection in foods and feeds in 27 hours by an enzyme immunoassay. *Journal of Microbiological Methods* 2, 135-145

ALI, A. & AIL, R. 1983 Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-DNA antibodies using fluorogenic and colorogenic substrates. *Journal of Immunological Methods* 56, 341-346

AI, KAISSI, E. & MOSTRATOS, A. 1983 Assessment of substrates for horseradish peroxidase in enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods* 58, 127-132.

ANDERSON, J. M. & HARTMAN, P. A. 1985 Direct immunoassay for detection of salmonellae in foods and feeds. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1124-1127.

ANSARI, A. A. HATTIKUDUR, N. S., JOSHI, S. R. & MEDEIRA, M. A. 1985 ELISA, solid phase, stability and binding characteristics, *Journal of Immunological Methods* 84, 117-124.

BIRD, CH. R. GEARING, A. J. H. & THORPE, R. 1988 The use of Tween 20 alone as a blocking agent for immunoblotting can cause artefactual results. *Journal of Immunological Methods* 106, 175-179.

BOVARID, J. H. NGO, T. T. & LENHOFF, H. M. 1982 Optimizing the o-phenylenediamine assay for horseradish peroxidase, effects of Phosphate and PH, substrate and enzyme concentrations, and stopping reagents. *Clinical Chemistry* 28, 2423-2426.

BULLOCK, S. L. & WALLS, K. W. 1977 Evaluation of some of the parameters of the enzyme-linked immunospecific assay, *Journal of Infectious Disease* 136, S279-S285.

CANT ARERO, L. A. BUTLER, J. E. & OSBORNE, J. W. 1980 The adsorptive characteristics of proteins for poly-

- styrene and their significance in solid-phase immunoassays. *Analytical Biochemistry* 105, 375-382.
- CHILDS, R. E. & BARDSLEY, W. G. 1975 The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen. *Biochemical Journal* 145, 93-98.
- FRTS, R. DLAMOND, M. HAMILTON, C. & NERI, M. 1983 DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 1146-1151.
- GEERLICS, HJ. WEUER, WJ, BLOE, OHOFF, W, WELLING, G. W. & WELLING-WESTER, S. 1988 The influence of pH and ionic strength on the coating of peptides or herpes simplex virus type 1 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods* 106, 239-244.
- Hoffman, W. L. & jump, A. A. 1986 Tween 20 removes antibodies and other proteins from nitrocellulose. *Journal of Immunological Methods* 94, 191-196.
- Ibrosa G. F. Fleet, G. M, Lyons, MJ, & Walker, R. A. 1985 Production of potent salmonella H antisera by immunization with polymeric flagellins. *Journal of Clinical Microbiology* 22, 347-351.
- Ibrahim, G. F, Lyons MJ, Walker, R. A & Fleet, G. H. 1985 Rapid detection of salmonellae by immunoassays with titanous hydroxide as the solid phase. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 670-675.
- ISHIKAWA, E. & KATO, K. 1978 Ultrasensitive enzyme immunoassay. *Scandinavian Journal of Immunology*, suppl. 7, 43-55.
- KLASEN, E. A. RIGUTTI, A. BOS. & A. BERNINI, L. F. 1982 Development of a screening system for detection of somatic mutations. I. Enzyme immunoassay for detection of antibodies against specific hemoglobin determinants. *Journal of Immunological Methods* 54, 241-250.
- KONUN, A. M. LevY, R. LINK, G. & HERSHKO, C. 1982 A rapid and sensitive ELISA for serum ferritin employing a fluorogenic substrate. *Journal of Immunological Methods* 54, 297-307.
- MATTINGLY, J. A. 1984 An enzyme immunoassay for the detection of all *Salmonella* using a combination of a myeloma protein and a hybridoma antibody. *Journal of Immunological Methods* 73, 147-156.
- MATTINGLY, J. A. & GEHLE, W. D. 1984 An improved enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella*. *Journal of Food Science* 49, 807-809.
- PORSTMANN, B. PORSTMAN, T. GAEDE, D. NUGEL, E. & EGGER, E. 1981 Temperature dependent rise in activity of horseradish peroxidase caused by nonionic detergents and its use in enzyme immunoassay. *Clinica Chimica Acta* 109, 175-181.
- RYOHEI, Y, SHIGEKI, K. & AKIRA, M. 1987 Process for accelerating antigen-antibody reaction. *United States Patent* 4,692,330.
- SCHONHEYDER, H & ANDERSON, P. 1984 Effects of bovine serum albumin on antibody determination by the enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods*, 72, 251-259.
- SHHALEV, A. GREENBERG, A. H. & MCALPINE, P. J. 1980 Detection of attograms of antigen by a high sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (HHS-ELISA) using a fluorogenic substrate. *Journal of Immunological Methods* 38, 125-139.
- SPERBER, W. H. & DEIBEL, R. H. 1969 Accelerated procedure for *Salmonella* detection in dried foods and feeds involving only broth cultures and serological reactions. *Applied Microbiology* 17, 533-539.
- STANLEY, C.J. JOHANNSSON, A. & SELF, C. H. 1985 Enzyme amplification can enhance both the speed and the sensitivity of immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 83, 89-95.
- STOUT, R. L. 1985 Catalyzed colorimetric and fluorometric substrates for peroxidase enzyme determinations. *United States Patent* 4,521,511.
- SWAADNTHAN, B. ALELXO, J. A. G. & MININCH, S. A. 1985 Enzyme immunoassays for *Salmonella*; one day testing is now a reality. *Food Technology* 39, 83-89.
- THOMASON, B. M. 1981 Current status of immunofluorescent methodology for salmonellae. *Journal of Food Protection* 44, 381-384.
- VASSILIADIS, P. 1983 The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas. An overview. *Journal of Applied Bacteriology* 54, 69-76.
- VOGT, R. F. JR PHILLIPS, D. L. HENDERSON, L. O, WHITFIELD, W. & SPLERTO, F. W. 1987 Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *Journal of Immunological Methods* 101, 43-50.
- VOLLER, A. BIDWELL, D. & BARLETT, A. 1976 Micro-plate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In *Manual of Clinical Immunology* ed. Rose, N. R. & Friebman, H. PP. 506-512. Washington, American Society for Microbiology.
- WILLIAMS, D. G. 1984 Comparison of three conjugation procedures for the formation of tracers for use in enzyme immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 72, 261-268.
- WILSON, M. B. & MAKANE, P. K. 1978 Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In *Immunofluorescence and Related Staining Techniques* ed. Knapp, W. Holubar, K. & Wick, G. PP. 215-224. Amsterdam; Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- ZAITSU, K. & OHKURA, Y. 1980 New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase; rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase. *Rapid and Sensitive Assays for Hydrogen Peroxide and the Peroxidase* *Analytical Biochemistry* 109, 109-113.

[*Journal of Applied Bacteriology* vol 66 127-135 (1989) 武汉大学生物系赵永芳译]

* 陈宝联同志绘图, 特此致谢。