

## 用荧光标记 O-I 噬菌体快速检测食品源沙门氏菌

蒋鲁岩<sup>1</sup>, 姜琴<sup>2</sup>, 黄克和<sup>2</sup>, 张常印<sup>1</sup>, 唐泰山<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 江苏省出入境检验检疫局, 南京 210001)

(<sup>2</sup> 南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

**摘要** 【目的】利用 O-I 噬菌体几乎可裂解沙门氏菌属细菌的特性建立快速检测食品中沙门氏菌的方法。【方法】用核酸荧光染料 SYBR<sup>®</sup> gold 染料标记 O-I 噬菌体侵染 100 株试验菌及 120 份食品样品菌, 荧光显微镜鉴定沙门氏菌, 并测灵敏度。【结果】100 株试验菌中 40 株沙门氏菌可见杆状荧光, 而 10 株变形杆菌、20 株志贺氏菌、20 株大肠杆菌和 10 株葡萄球菌均无荧光, 沙门氏菌检测灵敏度达 10 CFU/100  $\mu$ L; 120 份食品样品中沙门氏菌的 O-I 噬菌体检测与生化鉴定结果的阳性率分别为 9.17% 和 10%, 符合率为 91.7%。【结论】试验表明用荧光标记的 O-I 噬菌体可以快速、直观、准确、大量地检测食品中沙门氏菌。

**关键词:** O-I 噬菌体, 荧光标记, 沙门氏菌

**中图分类号:** Q933-3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0372-06

沙门氏菌属是一群形态和培养特性都类似的肠杆菌科中的一个属, 由之引起的食物中毒病例在食物中毒中位居首位, 是当前所检病原菌的主要细菌之一<sup>[1]</sup>。目前, 检测沙门氏菌的方法有常规法、基于生化的免疫学方法<sup>[2-4]</sup>和核酸水平的各种 PCR 法<sup>[5-7]</sup>等, 这些方法在病原菌的检测上发挥了举足轻重的作用, 但都存在一定的弊端, 如 PCR 法不能区分死活细胞, 假阳性的发生率很高, 免疫学法要求被检对象具有一定浓度, 存在很高的假阴性。因此, 传统方法在一定程度上已不能满足实际需要。

近年来, 利用噬菌体侵染宿主菌的方法鉴定病原菌的技术能区分死活细胞, 检测方法快速、简洁, 精确度和敏感度高, 且理论上不会出现假阳性和假阴性等特点而广受人们的推崇<sup>[8-9]</sup>。相关研究途径有琼脂平板上直接观察裂解噬菌斑, 比较菌液和噬菌体反应前后 OD 值, 荧光显微技术观察反应液, 测噬菌体作特异性溶菌酶的相关指标, 以及利用抗原抗体的噬菌体库技术<sup>[10-13]</sup>, 其中, 荧光标记噬

菌体检测病原菌的方法因检测快速、直观、敏感性高而倍受青睐。Goodridge 和 Mosier-boss 等<sup>[14-15]</sup>分别用 YOYO-1 和 SYBR<sup>®</sup> gold 染料标记大肠杆菌 O157:H7 噬菌体 LG1 和沙门氏菌 LT2 噬菌体 P22, 实现了 O157:H7 和 LT2 的检测, 其中 YOYO-1 染料使噬菌体丧失向宿主注入核酸的能力, 显微镜下只见荧光环, SYBR<sup>®</sup> gold 染料不但不会影响噬菌体的特性, 而且还荧光效应较高, 提高检测效率。但上述方法所选用的噬菌体只能针对特定的细菌种, 以致检测目标相对单一, 推广应用时受到限制。本文利用几乎可裂解所有沙门氏菌的属特异性噬菌体 O-I, 高效荧光染料 SYBR<sup>®</sup> gold 标记后检测食品沙门氏菌, 必要时辅以简单的生化试验, 实现食品中沙门氏菌的快速、直观、准确且高通量的检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及噬菌体来源:** 试验用细菌共 100 株

基金项目 国家自然科学基金项目(30371060) 江苏检验检疫局科研项目(2006KJ017)

作者简介 蒋鲁岩(1968-)男, 山东济南人, 高级工程师, 主要从事食品微生物检验。Tel: +86-25-52345185; Fax: +86-25-52345176;

E-mail: jiangqin2006ok@163.com

收稿日期 2008-10-06; 修回日期 2008-11-18

(见表1),其中沙门氏菌40株,基本包括所有的血清型和5个群别(A、B、C、D、E),其余菌株包括大肠杆菌、志贺氏菌、葡萄球菌和变形杆菌。O-I噬菌体

(Felix O-I)购于广州虎克有限公司,必要时用液体法<sup>[16]</sup>制备并纯化。

表1 试验所用菌株

Table 1 Bacterial strains in study

Bacteria name	Bacteria number	Serotype	Sources	Bacteria name	Bacteria number	Serotype	Sources
<i>S. paratyphi A</i>	50973	A	CMCC	<i>S. dublin</i>	NAU3	D	NAU <sup>a</sup>
<i>S. typhimurium</i>	50013	B	ATCC	<i>S. anatum</i>	JS8	E1	JSCIQ
<i>S. paratyphi B</i>	50004	B	CMCC	<i>S. meleagridis</i>	NAU4	E1	NAU <sup>b</sup>
<i>S. saint paul</i>	JS1	B	JSCIQ	<i>S. regent</i>	YC4	E1	YCCIQ
<i>S. kingston</i>	WX1	B	WXCIQ	<i>S. sao</i>	WX5	E4	WXCIQ
<i>S. essen</i>	WX2	B	WXCIQ	<i>S. veneziana</i>	JS9	Other	JSCIQ
<i>S. abortus-equi</i>	TC1	B	TCCIQ	<i>S. chandans</i>	TC4	Other	TCCIQ
<i>S. abony</i>	WX3	B	WXCIQ	<i>S. cubana</i>	JS10	Other	JSCIQ
<i>S. kisangani</i>	TC2	B	TCCIQ	<i>S. ried</i>	WX6	Other	WXCIQ
<i>S. irumu</i>	JS2	C1	JSCIQ	<i>S. surat</i>	TC5	Other	TCCIQ
<i>S. typhisuis</i>	JS3	C1	JSCIQ	<i>S. shanghai</i>	TC6	Other	TCCIQ
<i>S. choleraesuis</i>	JS4	C1	JSCIQ	<i>S. III</i>	YC5	Other	YCCIQ
<i>S. montevideo</i>	YC1	C1	YCCIQ	<i>S. dahllem</i>	NAU5	Other	NAU <sup>b</sup>
<i>S. paratyphi C</i>	YC2	C1	YCCIQ	<i>S. zigong</i>	WX7	Other	WXCIQ
<i>S. infantis</i>	NAU1	C1	NAU <sup>a</sup>	<i>S. weston</i>	JS11	Other	JSCIQ
<i>S. rissen</i>	WX4	C1	WXCIQ	<i>Salmonella</i>	JS12	Other	JSCIQ
<i>S. edinburg</i>	YC3	C1	YCCIQ	<i>Shigella flexneri</i>	51302	-	JSCDC
<i>S. bovismorbificans</i>	JS5	C2	JSCIQ	19 <i>Shigella</i>	-	-	JSCIQ, NAU <sup>ab</sup>
<i>S. chailey</i>	TC3	C2	TCCIQ	<i>Staphylococcus</i>	4012	-	ATCC
<i>S. jerusalem</i>	NAU2	C4	NAU <sup>b</sup>	19 <i>Staphylococcus</i>	-	-	JSCIQ, NAU <sup>ab</sup>
<i>S. typhi</i>	50071	D	CMCC	<i>P. mirabilis</i>	97001	-	ATCC
<i>S. enteritidis</i>	50041	D	NICBPB	<i>P. vulgaris</i>	49102	-	JSCDC
<i>S. pullorum</i>	JS6	D	JSCIQ	18 <i>Proteus</i>	-	-	JSCIQ, TCCIQ
<i>S. II</i>	JS7	D	JSCIQ	20 <i>E. coli</i>	-	-	JSCIQ, NAU <sup>ab</sup>

"JSCIQ", "WXCIQ", "TCCIQ", "YCCIQ" represent of Jiangsu, Wuxi, Taicang and Yancheng Entry/Exit Inspection and Quarantine Bureau, respectively; "NICBPB": National institute for the control of pharmaceutical and biological products; "JSCDC": Center of Disease Control of Jiangsu; a. College of Animal Science and Technology of Nanjing Agricultural University, b. College of Veterinary Medicine of Nanjing Agricultural University; "-" no detail number.

**1.1.2 主要试剂和仪器** 荧光染料 SYBR<sup>®</sup> gold stain  $10^4 \times$  (Molecular Probes  $\lambda_{Ex} = 300 \text{ nm}$  或  $495 \text{ nm}/\lambda_{Em} = 537 \text{ nm}$ ) 购于 Invitrogen 公司 25 mm 手动过滤器、过氧化铝氧化滤膜(Whatman;  $d = 25 \text{ mm}$ ,  $pore = 0.2 \mu\text{m}/0.02 \mu\text{m}$ ) 购于上海生物工程技术有限公司, LB 肉汤培养基和 PBS 缓冲液购于南京生兴生物技术有限公司, 德国蔡司万能荧光显微镜(型号: HBO50, 规格  $35 \text{ mm } 2.5 \times 4'' \times 5'' 10 \times$ , Olympus 相机)。

## 1.2 O-I 噬菌体敏感性测定

将 100 株试验细菌复壮、纯化,并进行生化鉴定,同时用噬菌体平板法观察噬菌斑判定该细菌与 O-I 噬菌体的特异性。

## 1.3 荧光标记 O-I 噬菌体的制备与收集

O-I 噬菌体液与  $1 \times \text{SYBR}^{\text{®}}$  gold stain 工作液

( $10^4 \times$  的稀释液)按 10:1 的比例混合,摇匀,按染料说明在暗处作用 10 min,过滤( $d = 25 \text{ mm}$ ,  $pore = 0.02 \mu\text{m}$ ),收集荧光标记的噬菌体,  $1 \times \text{PBS}$  缓冲液冲洗 2~3 次除去标记噬菌体后多余的染料,去离子水洗涂滤膜回收噬菌体,按何晓青<sup>[8]</sup>的方法测效价。

## 1.4 标记的 O-I 噬菌体侵染宿主菌的最适时间

将 1 mL 过夜培养沙门氏菌菌液加入 4 mL LB 肉汤,  $37^\circ\text{C}$  培养 8 h,取 8 个  $100 \mu\text{L}$  菌液与  $100 \mu\text{L}$  已标记噬菌体混合,暗处分别作用 10、15、20、25、30、40、60 min 及 100 min,加入  $200 \mu\text{L}$  4% 多聚甲醛终止反应,加 5 mL 去离子水混合过滤( $d = 25 \text{ mm}$ ,  $pore = 0.2 \mu\text{m}$ ),荧光显微镜镜检,确定宿主菌与荧光标记的 O-I 噬菌体的最适反应时间。

### 1.5 玻片的制备及镜检

将 1.4 所得滤膜贴在滴有 1 滴 M 液(100  $\mu$ L 10% 的 Vc 液 4.9 mL 1  $\times$  PBS 5 mL 甘油)的玻片上,再滴 1 滴 M 液,盖上玻片镜检(根据 SYBR<sup>®</sup> gold strain 的可见波长范围选择荧光显微镜的滤光片  $\lambda = 510 \text{ nm} \sim 520 \text{ nm}$  放大倍数 1000, Oil)。

### 1.6 荧光标记 O-I 噬菌体与 100 株试验菌液作用

在 1.4 确定噬菌体和宿主菌的最适作用时间(20 min)后,将 100 株包括沙门氏菌、变形杆菌、志贺氏菌、大肠杆菌和葡萄球菌菌液用荧光标记噬菌体 O-I 侵染,过滤收集,镜检(同 1.5)。

### 1.7 灵敏度测定

将沙门氏菌接种于 LB 肉汤,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,取 100  $\mu$ L 菌液以 10 倍梯度作  $10^{-2} \sim 10^{-7}$  稀释,每一稀释度菌液各取 100  $\mu$ L 菌落记数和滴加 10  $\mu$ L 效价  $> 10^7$  PFU/mL 的荧光标记噬菌体,收集反应液荧光显微镜镜检,以 25 mm 滤膜能观察到 3~5 个发荧光菌体的浓度为灵敏度,重复 1 次。

### 1.8 荧光标记 O-I 噬菌体对模拟样品的检测

取沙门氏菌和任意的非 O-I 噬菌体宿主菌混合,用 1.4 和 1.6 方法进行检测。

### 1.9 食品样品沙门氏菌检测

从市场上随机抽取食品样品 120 份(海虾仁 30 份,鲜牛肉 25 份,熟食制品 25 份,牡蛎 20 份,生牛奶 20 份),保持 3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C 2 h 内送到实验室,固体样品(实验室样品多为肉类)用灭菌剪刀剪成块状(尽量不剪碎)称取 25 g 样品与 225 mL 缓冲蛋白胨水混合,于 37 $^{\circ}$ C 静止培养 6 h 预增菌,取上清液按照 1.6 方法进行沙门氏菌鉴定,并与生化检测作对比。

### 1.10 非 O-I 噬菌体裂解菌株的鉴定

食品样品中出现不被 O-I 噬菌体裂解的沙门氏

菌,按何晓青<sup>[8]</sup>提供的肠杆菌科细菌的五项生化试验进行鉴定。

## 2 结果和分析

### 2.1 试验细菌生化鉴定

试验所用 100 株细菌,经生化鉴定为沙门氏菌 40 株、志贺氏菌和大肠杆菌各 20 株、葡萄球菌和变形杆菌各 10 株。

### 2.2 O-I 噬菌体的特异性及效价

40 株沙门氏菌全被 O-I 噬菌体裂解,而 20 株志贺氏菌、20 株大肠杆菌、10 株葡萄球菌和 10 株变形杆菌均未被 O-I 噬菌体裂解。试验所用噬菌体效价均  $> 10^7$  PFU/mL。

### 2.3 荧光标记 O-I 噬菌体侵染宿主菌的最适时间

荧光标记的 O-I 噬菌体和沙门氏菌作用不同时间后镜检结果显示,反应 10、15 和 20 min 的视野出现杆状荧光物质逐渐增多,且 20 min 时杆状形态规则,25 min 后杆状逐渐减少,并有彗星状杆形物质;60 min 后几乎不见杆形物质。所以本试验确定荧光标记噬菌体 O-I 和宿主菌的最适反应时间为 20 min。

### 2.4 荧光标记 O-I 噬菌体侵染沙门氏菌

40 株沙门氏菌与标记的 O-I 噬菌体反应后镜检显示(图 1),A 图只有细菌,荧光视野里不见任何发光物质;B 图中只有荧光标记 O-I 噬菌体,视野下偶尔可见少量圆点状的荧光物质,不见菌形;C 图是荧光标记 O-I 噬菌体和沙门氏菌混合,可见大量杆状物,少量点状物,极少数彗星状杆状物,将杆状物质与沙门氏菌的革兰氏染色形态进行比较,两者一致。由此可推知,A 图中杆形物是侵有荧光噬菌体的沙门氏菌,点状物是标记的 O-I 噬菌体,结合 2.3 可知彗星状杆形物是即将裂解的宿主菌。

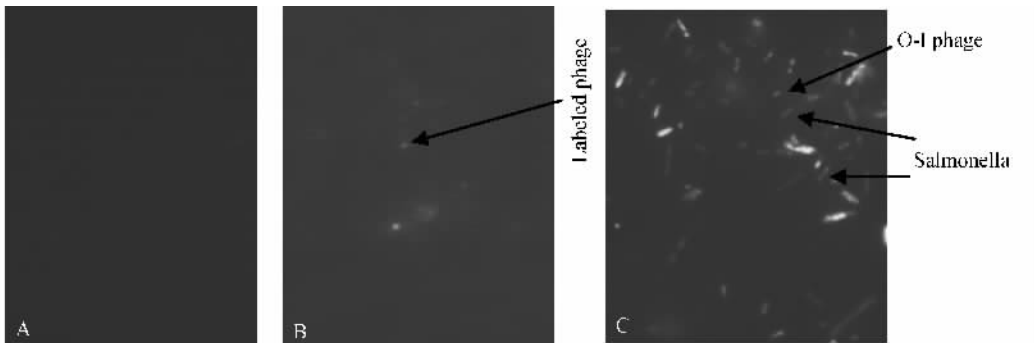


Fig. 1 SYBR<sup>®</sup> gold 染料标记的 O-I 噬菌体(图中的圆点表示)侵染沙门氏菌(图中的杆状表示)的荧光照片

Fig. 1 Fluorescent photograph of *Salmonella* (rod) infected by labeled O-I/ SYBR<sup>®</sup> gold stain phage (round). A: Only *Salmonella*; B: Only SYBR<sup>®</sup> gold stain labeled phage O-I; C: *Salmonella* and SYBR<sup>®</sup> gold stain labeled phage O-I (ZEISS,  $\lambda = 510 \text{ nm} \sim 520 \text{ nm}$ , 1000 $\times$ , Oil).

### 2.5 荧光标记 O-I 噬菌体与非宿主菌混合

荧光标记 O-I 噬菌体与变形杆菌、志贺氏菌、大肠杆菌及葡萄球菌等非宿主菌混合，镜检结果显示

(图 2)对照 A 图是标记的 O-I 与沙门氏菌的反应，可见杆状物质，B 图无荧光物质，偶尔出现荧光圆点，表明 O-I 噬菌体不与非宿主菌反应，无交叉反应。

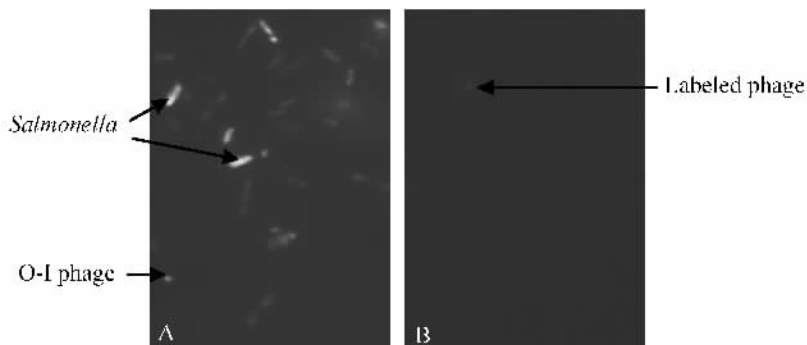


图 2 SYBR<sup>®</sup> gold 染料标记的 O-I 噬菌体对非宿主菌感染的显微镜下观察结果

Fig.2 Fluorescent photograph of non-host infected by labeled O-I/ SYBR<sup>®</sup> gold stain phage. A : *Salmonella* control ; B : Non-host bacteria and labeled O-I/ SYBR<sup>®</sup> gold stain phage( ZEISS ,  $\lambda = 510 \text{ nm} - 520 \text{ nm}$  ,  $1000\times$  , Oil ).

### 2.6 荧光标记 O-I 噬菌体与宿主菌和非宿主菌混合液作用

镜检结果显示(图 3),A 图中多种细菌混合可见杆状菌体和少量圆点状物，B 图无沙门氏菌，镜检无荧光物质，C 图是沙门氏菌和 1 种非宿主菌混合，

同样有杆状物和少量圆点，结合 2.3、2.4 结果可判断杆状和圆点分别是沙门氏菌和荧光标记 O-I 噬菌体，O-I 噬菌体未与非宿主菌反应，多细菌混合不影响镜检结果。

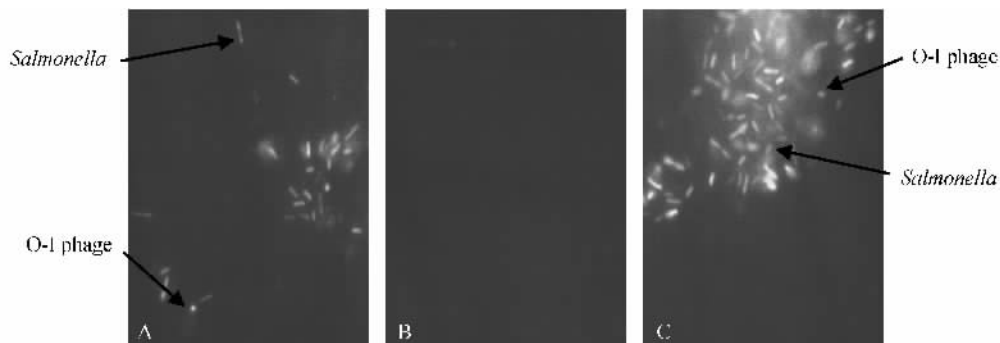


图 3 SYBR<sup>®</sup> gold 染料标记的 O-I 噬菌体对宿主菌和非宿主菌混合液的反应结果

Fig.3 Fluorescent photograph of the host and non-host mixture infected by labeled O-I/ SYBR<sup>®</sup> gold stain phage. A : Four kinds of bacteria mixed with *Salmonella* ; B : None of host bacterium ; C : One kind of bacterium mixed with *Salmonella* ( ZEISS ,  $\lambda = 510 \text{ nm} - 520 \text{ nm}$  ,  $1000\times$  , Oil ).

### 2.7 荧光标记 O-I 噬菌体检测病原菌的灵敏度测定

菌落计数和荧光显微镜下观察结果显示，利用荧光标记 O-I 噬菌体能检测低于  $10 \text{ CFU}/100 \mu\text{L}$  的沙门氏菌，敏感性高。

### 2.8 食品样品中沙门氏菌的检测

食品中沙门氏菌荧光镜检显示(图 4)5 种食品样品中沙门氏菌阳性者均能用荧光标记的 O-I 噬菌体检测，出现明显的杆状。另检测 1 株非 O-I 裂解菌，生化鉴定将其归属。所有样品生化鉴定与 O-I 噬菌体检测的阴阳性对比结果见表 2。

表 2 显示 5 种食品中沙门氏菌的阳性检出率为  $0\% \sim 16.7\%$ ，荧光标记的 O-I 噬菌体对沙门氏菌的

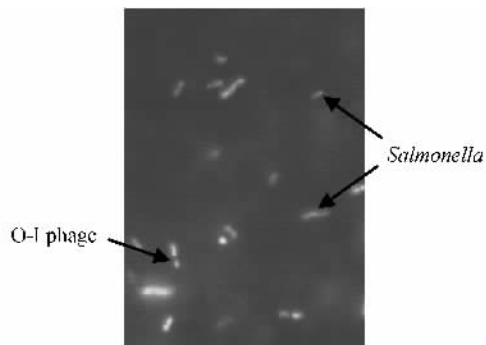


图 4 荧光标记噬菌体 O-I 对食品样品的检测结果

Fig.4 Fluorescent photograph of the food samples infected by labeled O-I/ SYBR<sup>®</sup> . gold stain phage ( ZEISS ,  $\lambda = 510 \text{ nm} - 520 \text{ nm}$  ,  $1000\times$  , Oil ).

阳性检出率与生化鉴定的阳性率分别为 9.17% 和 10% ,两者检测结果符合率为 91.7%。

表 2 食品样品中沙门氏菌检出的阳性检出率(%)及阳性份数

Table 2 Positive rate (%) and the number of *Salmonella* in food samples

Samples	Numbers	Biochemical Identification	Infected by labeled O-I phage
Fresh beef	25	16.0(4/25)	16.0(4/25)
Shelled sea shrimp	30	16.7(5/30)	16.7(5/30)
Oyster	20	5.0(1/20)	5.0(1/20)
Cooked food	25	0.0(0/25)	0.0(0/25)
Fresh milk	20	10.0(2/20)	5.0(1/20)
Total	120	10.0(12/120)	9.17(11/120)

(-/-) = (Positive numbers/Total numbers)

## 2.9 不被 O-I 噬菌体裂解菌株的检测结果

食品样品中 1 株细菌不被 O-I 噬菌体裂解,按肠杆菌科细菌五项生化试验鉴定,结果三糖铁(斜面(酸)底层(酸)产气、硫化氢)阳性,脲基质、氰化钾阴性,尿素、赖氨酸阳性,按何晓青手册<sup>[8]</sup>判断为沙门氏菌变体。

## 3 讨论和小结

O-I 噬菌体是作用于沙门氏菌属特异性噬菌体,染色体为双链 DNA,受体是宿主细胞壁上核心多糖的乙酰氨基葡萄糖<sup>[17]</sup>。本研究选用 O-I 噬菌体荧光标记后检测沙门氏菌,100 株实验菌中 40 株沙门氏菌(整个属的几乎所有血清型)均被裂解,60 株其它属细菌均不被裂解,表明 O-I 噬菌体的属特异性极强,可以用之对沙门氏菌属细菌进行鉴定,这与宋克云<sup>[18]</sup>的研究结果一致。用荧光标记 O-I 噬菌体检测 120 份食品样品的沙门氏菌,阳性检出率与生化鉴定的阳性率分别为 9.17% 和 10% ,符合率为 91.7% ;食品样品检出 1 株沙门氏菌不能被标记的 O-I 噬菌体裂解,生化鉴定表明该沙门氏菌为非噬菌体裂解株,但这并不影响试验结果判断,简单的生化试验即可将其归属。标记的 O-I 噬菌体与非宿主菌混合,镜检只见少量点状荧光物质,经对比研究该物质是遗留在膜上未洗净的少量噬菌体,表明 O-I 噬菌体未与非宿主细菌反应;图片无其它非特异荧光,说明试验所制备荧光标记噬菌体 O-I 无游离荧光染料,从而保证试验的准确性,避免假阳性发生。灵敏性试验发现,该方法检测沙门氏菌的灵敏性很高,产生假阴性几率较小。

SYBR<sup>®</sup> gold 荧光染料标记的 O-I 噬菌体特性不

改变,借助荧光显微镜将荧光信号放大约 1000 倍,能使检测效率显著增强,表明核酸染料 SYBR<sup>®</sup> gold 将噬菌体标记后有确实效果。同时,使用荧光显微镜技术只需噬菌体侵入细菌即可观测,鉴定周期缩短为 8 h 左右,显著提高了检测速度。另外,噬菌体核酸外有衣壳包裹,SYBR<sup>®</sup> gold 染料与之结合后免受外界溶剂极性、pH 值等影响,保证了染料的荧光强度,实际操作简单易行。试验证明可以用 SYBR<sup>®</sup> gold 染料荧光标记的 O-I 噬菌体实现食品中沙门氏菌大量、快速、准确而直观的检测,具有很强的优势,应用前景广阔。但是多数噬菌体与宿主呈一一对应关系,特异性极高,宿主范围窄,且噬菌体与宿主作用的机理有待进一步研究,所以目前噬菌体在实践中的应用相对较少,研究空间较大。

## 参考文献

- [1] 陆承平. 兽医微生物学. 第四版,北京:中国农业出版社,2007,107-113.
- [2] 刘佩红,屠益平. 沙门氏菌检测技术研究进展. 上海畜牧兽医通讯(Shanghai Husbandry and Veterinary Communication),2005,(6):2-3.
- [3] Sai T. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Moldsin Cheese and Yogurt. *Journal of Dairy Science*, 2003,73(12):3366.
- [4] 黄玲,孟冬丽. 利用 mini-VIDAS 和 GB 方法检测食品中沙门氏菌的比较试验. 新疆师范大学学报(*Journal of Xinjiang Normal University*),2003,22(1):50-52.
- [5] Borucki MK. Discrimination among *Listeria monocytogene* isolates using an fixed genome DNA microarray. *Veterinary Microbiology*, 2003,92:342-351.
- [6] 郑大明,张静. 基因芯片技术在食品微生物检测和中的应用. 食品科学(*Food Science*),2004,25(8):118-120.
- [7] 钟伟军,赵明秋,张彩虹,等. 食品中沙门氏菌 PCR 快速检测方法的建立. 中国人兽共患病学报(*Chinese Journal of Zoonoses*),2007,23(12):1216-1221.
- [8] 何晓青,潘若男,何俭. 《中华人民共和国国家标准:食品卫生微生物学检验》. GB/T 4789.31-2003,北京:中国标准出版社. 2003,251-258.
- [9] 韩海英,于富丽,张金宝,等. 噬菌体试验在细菌质控中的应用. 内蒙古农业大学学报(*Journal of Inner Mongolia Agricultural University*),2007,28(1):207-208.
- [10] Stanley PE. A review of bioluminescence ATP techniques in rapid microbiology. *Bioluminal Chemilumin*, 1989,4:375-380.

- [ 11 ] Stewart GA , Jassim SA , Denyer SP , et al. The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within 4h using bacteriophage amplification. *Applied Microbiology* , 1998 , 84 : 778 – 783.
- [ 12 ] Neufeld T , Schwartz-Mittelmann A , Biran D. Combined phage typing and amperometric detection released enzymatic activity for the specific identification and quantification of bacteria. *Analytical Chemilumin* , 2003 , 75 : 580 – 585.
- [ 13 ] 王克霞 , 陈琳. 用噬菌体展示技术筛选幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白基因结合蛋白的研究. *中国病原生物学杂志 ( Chinese Magazine of Pathogen Biology )* , 2008 , 3(7) : 487 – 489.
- [ 14 ] Goodridge L , Griffiths M. Rapid and sensitive detection method of an *E. coli* O157:H7 by using fluorescently labeled phage. *Journal Food Microbiology* , 1999 , 47 : 43 – 47.
- [ 15 ] Mosier-boss PA , Lieberman SH , Andrews JM , et al. Use of fluorescently labeled phage in the detection and identification of bacterial species. *Applied Spectroscopy* , 2003 , 59 : 1138 – 1144.
- [ 16 ] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T 著. 金冬雁 , 黎孟枫 , 等译. 分子克隆实验指南. 第二版, 北京: 科学出版社, 1998, 47 – 90.
- [ 17 ] Gershman M , Markowsky B. Reduced set of phage for typing *Salmonella*. *Journal Clin Microbiology* , 1983 , 17 : 24 – 25.
- [ 18 ] 宋克云. O-I 噬菌体在从业人员沙门氏菌检测中的应用. *实用预防医学 ( Practical Preventive Medicine )* , 2004 , 11(3) : 551 – 552.

## Rapid detection of salmonella in food by using fluorescently labeled phage O-I

Luyan Jiang<sup>1\*</sup> , Qin Jiang<sup>2</sup> , Kehe Huang<sup>2</sup> , Changyin Zhang<sup>1</sup> , Taishan Tang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Jiangsu Entry/Exit Inspection and Quarantine Bureau , Nanjing 210001 , China )

(<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China )

**Abstract [ Objective ]** To develop a rapid detection method for *Salmonella* in food by using specific *Salmonella*-phage O-I. **[ Methods ]** One hundred bacteria strains and 120 food sample isolates were infected using fluorescently labeled O-I phage genome with SYBR<sup>®</sup> gold stain ( a nucleic acid dye , 1 × working solution ) , then were observed under epi-fluorescence microscopy . The sensitivity of the method was tested. **[ Results ]** Among the 100 strains infected with O-I/ SYBR<sup>®</sup> gold stain , 40 *Salmonella* strains exhibited rod fluorescence. Other bacteria including 10 *Proteus* , 20 *Shigella* , 20 *E. coli* and 10 *Staphylococcus* did not exhibit this feature The sensitivity of detecting *Salmonella* was 10 CFU/100 μL. The detection for 120 food samples by using the O-I/ SYBR<sup>®</sup> gold stain had similar results to those by using the biochemical method. **[ Conclusion ]** Fluorescent-labeled O-I phage could rapidly , sensitively and specifically detect *Salmonella* species in food samples.

**Keywords :** O-I Phage ; Fluorescent-labeled ; *Salmonella*

( 本文责编 张晓丽 )