



## 研究报告

## 荧光标记噬菌体快速检测 K1 荚膜大肠杆菌方法的建立及应用

黄豪圣<sup>1</sup> 王许航<sup>1</sup> 席静<sup>2</sup> 巩倩雯<sup>1</sup> 薛峰<sup>1</sup> 任建鸾<sup>1</sup> 汤芳<sup>\*1</sup> 戴建君<sup>1,3</sup><sup>1</sup> 南京农业大学动物医学院 农业农村部动物细菌学重点实验室 江苏 南京 210095<sup>2</sup> 广州海关技术中心 广东 广州 510623<sup>3</sup> 中国药科大学生命科学与技术学院 江苏 南京 210095

**摘要:**【背景】大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是引发新生儿脑膜炎和禽类脑膜炎最常见的革兰氏阴性菌,其中含 K1 荚膜大肠杆菌是重要的病原菌。目前, K1 荚膜大肠杆菌的检测方法存在一些弊端。【目的】利用 PNJ1809-36 噬菌体的宿主特异性建立快速检测 K1 荚膜大肠杆菌的方法。

【方法】用荧光染料 SYBR Gold 标记 PNJ1809-36 噬菌体,侵染 33 株受试菌,在荧光显微镜下观察,测定该方法的特异性;倍比稀释宿主菌 DE058,用荧光标记噬菌体侵染,测定该方法的灵敏度;用荧光标记噬菌体检测 8 份模拟粪样,测定该方法的临床应用效果;测定 4 °C 避光保存 4 个月的荧光标记噬菌体的效价和检测效果。【结果】33 株受试菌中的 9 株 K1 荚膜大肠杆菌有 8 株可见环状荧光,1 株未能检出;20 株非 K1 荚膜大肠杆菌以及 4 株非大肠杆菌属细菌均不能观察到荧光,检测灵敏度达 100 CFU/mL。8 份模拟粪样的检测结果显示,3 份含有 K1 荚膜大肠杆菌的粪样均可见环状荧光,5 份不含 K1 荚膜大肠杆菌的粪样均无荧光。荧光标记噬菌体 4 °C 避光保存 4 个月后效价无明显下降,检测效果无明显变化,表明该荧光标记噬菌体在 4 °C 避光条件下较稳定。【结论】用荧光标记的 PNJ1809-36 噬菌体能够在 15 min 内特异、快速、直观地检测 K1 荚膜大肠杆菌。

**关键词:** 噬菌体, 荧光标记, 大肠杆菌, 检测, K1 荚膜

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2019YFC1605400); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20180075)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-25-84396517; E-mail: tfalice@126.com

**Received:** 08-06-2021; **Accepted:** 29-06-2021; **Published online:** 06-07-2021

**基金项目:** 国家重点研发计划(2019YFC1605400); 江苏省自然科学基金优秀青年基金(BK20180075)

**\*通信作者:** Tel: 025-84396517; E-mail: tfalice@126.com

**收稿日期:** 2021-06-08; **接受日期:** 2021-06-29; **网络首发日期:** 2021-07-06

## Establishment and application of fluorescence labeled phage for rapid detection of *Escherichia coli* K1

HUANG Haosheng<sup>1</sup> WANG Xuhan<sup>1</sup> XI Jing<sup>2</sup> GONG Qianwen<sup>1</sup> XUE Feng<sup>1</sup>  
REN Jianluan<sup>1</sup> TANG Fang<sup>\*1</sup> DAI Jianjun<sup>1,3</sup>

1 Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

2 Guangzhou Customs District Technology Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China

3 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

**Abstract:** [Background] *Escherichia coli* (*E. coli*) is one of the most common Gram-negative bacteria causing neonatal meningitis and poultry meningitis. The strain *E. coli* K1 is an important pathogen. Current methods for detecting *E. coli* K1 have some disadvantages. [Objective] A rapid detection method for *E. coli* K1 was established by using the host specific phage PNJ1809-36. [Methods] Phage PNJ1809-36 was labeled with fluorescent dye SYBR gold, and 33 tested strains were infected by this fluorescent phage. The specificity was determined by observing the 33 test strains using the fluorescence microscopy. The sensitivity was determined by observing the host bacteria DE058 with gradient tenfold dilution after being infected with fluorescence labeled phage. Eight simulated feces were detected by fluorescent labeled phages. Moreover, the titer change and detection efficiency of fluorescent labeled phages stored at 4 °C in darkness were investigated. [Results] Among the 33 strains tested, 8 strains of 9 *E. coli* can be observed with fluorescence around the bacteria, but one could not be detected. No fluorescence was observed in 20 non-*E. coli* K1 strains and 4 non-*E. coli* strains. The detection sensitivity was 100 CFU/mL. The detection results of 8 simulated fecal samples showed that fluorescence could be observed in 3 samples containing *E. coli* K1, and no fluorescence could be detected in 5 samples without *E. coli* K1. After stored at 4 °C for 4 months, the titer of fluorescence labeled phages showed no obvious decrease, and the detection efficiency did not change significantly. [Conclusion] The fluorescence labeled phage PNJ1809-36 could be used to detect *E. coli* K1 rapidly and intuitively within 15 min.

**Keywords:** phage, fluorescence labeling, *Escherichia coli*, detection, K1 capsule

大肠杆菌是引发新生儿脑膜炎和禽类脑膜炎最常见的革兰氏阴性菌,其中含 K1 荚膜大肠杆菌是重要的病原菌<sup>[1-3]</sup>。目前对于大肠杆菌的检测方法有常规培养法<sup>[4-5]</sup>、免疫学方法<sup>[6]</sup>、PCR 法<sup>[7]</sup>、环介导等温扩增法<sup>[8]</sup>、光学生物传感器法<sup>[9-10]</sup>和电化学法<sup>[11-13]</sup>等,这些方法都有其各自的优点,但也存在一些弊端,例如耗时长、操作繁琐、不能区分活死菌等。因此传统的检测方法在一定程度上已经不能满足实际需要。

由于噬菌体具有分布广泛、专一性强、繁殖迅速等特点,近年来被用于细菌检测。De Siqueira 等<sup>[14]</sup>利用噬菌体扩展法检测出沙门氏菌。Chang 等<sup>[15]</sup>和 Neufeld 等<sup>[16]</sup>将噬菌体结合电阻抗法、电化学法,检测出大肠杆菌 O157:H7 和大

肠杆菌 TG1。Wu 等<sup>[17]</sup>、Mei 等<sup>[18]</sup>和 Franche 等<sup>[19]</sup>利用噬菌体介导的生物发光法检测出沙门氏菌、克雷伯菌和大肠杆菌。Cox 等<sup>[20]</sup>将噬菌体结合侧流层析试纸条用于检测炭疽杆菌。其中,荧光标记噬菌体检测法因检测快速、直观、敏感性高而备受青睐。Goodridge 等<sup>[21-22]</sup>用 YOYO-1 染料标记了噬菌体 LG1,实现了大肠杆菌 O157:H7 的检测,但 YOYO-1 染料使噬菌体失去向宿主菌注入核酸的能力,从而显示光环状外观。Mosier-Boss 等<sup>[23]</sup>使用 SYBR Gold 染料制备荧光标记的噬菌体 P22 检测出其宿主鼠伤寒沙门氏菌 LT2。蒋鲁岩等<sup>[24]</sup>用 SYBR Gold 标记沙门氏菌属特异性 O-1 噬菌体实现食品中沙门氏菌的快速、直观、准确且高通量的检测。Low 等<sup>[25]</sup>用流式细胞仪和 Syto 13 染色的

噬菌体检测到其宿主菌荧光假单胞菌 DSM50090。目前没有将荧光噬菌体检测应用于 K1 荚膜大肠杆菌的研究。本文利用 SYBR Gold 荧光染料标记 K1 荚膜大肠杆菌特异性噬菌体 PNJ1809-36，实现粪便中 K1 荚膜大肠杆菌的快速检测。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及噬菌体

噬菌体 PNJ1809-36 由本实验室分离并保存，

属肌尾病毒科噬菌体，该噬菌体能够特异性识别具有 K1 荚膜的大肠杆菌<sup>[26]</sup>。本研究中所涉及菌株见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器

荧光染料 SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain 10 000×，Molecular Probes；SM 缓冲液：NaCl 5.5 g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 g，1 mol/L pH 7.5 Tris-HCl 50 mL，明胶 0.1 g，ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L。玻璃抽滤装置，d=25 mm，建湖县军明玻璃仪器厂；真空

表 1 试验所用菌株

Table 1 Strains used in this work

Strain No.	Species	Animal source	Origin
DE058	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
RS218	<i>Escherichia coli</i>	Human	California, USA
DE205	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE205B	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
CVCC249	<i>Escherichia coli</i>	Chicken	Tianjin, China
CVCC1350	<i>Escherichia coli</i>	—	Beijing, China
CVCC1502	<i>Escherichia coli</i>	Swine	Shanghai, China
CVCC1359	<i>Escherichia coli</i>	—	Beijing, China
DE127	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE203	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE250	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE202	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE209	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE252	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE201	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE208	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE215	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE210	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE214	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE410	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE427	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE433	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE197	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE435	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE207	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE211	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE309	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE320	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
DE206	<i>Escherichia coli</i>	Duck	Jiangsu, China
ATCC13182	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Human	USA
ATCC25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	Human	USA
CVCC1800	<i>Salmonella pullorum</i>	Chicken	Jiangsu, China
RIMD2210633	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Human	Maryland, USA

泵, Science-Tool 公司; 聚碳酸酯滤膜,  $d=25$  mm, Pore=0.03  $\mu\text{m}$ , Whatman 公司; 荧光倒置显微镜, ZEISS 公司; 超声细胞破碎仪, Fisher Scientific 公司。

### 1.2 噬菌体及细菌的培养

将本实验室前期分离保存的噬菌体进行复苏与富集。取 100  $\mu\text{L}$  噬菌体原液与 100  $\mu\text{L}$  对数期宿主菌 DE058 涡旋混匀, 加至 5 mL 55  $^{\circ}\text{C}$  预热的 0.5% 半固体 LB 培养基中, 轻摇混匀后倒在 1.5% 固体 LB 培养基上, 待凝固后于 30  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养过夜, 次日向平板中加入约 5 mL 的 SM 缓冲液于 4  $^{\circ}\text{C}$  浸泡 6–8 h, 然后用注射器吸取浸泡液, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤。将上述复苏的噬菌体悬液进行 10 倍比稀释( $10^{-5}$ – $10^{-7}$ ), 与宿主菌混合后, 双层琼脂平板法测定效价。

将大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、产酸克雷伯菌接种于 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养至对数期。

### 1.3 K1 荚膜大肠杆菌的 PCR 鉴定

对表 1 中的大肠杆菌进行 K1 荚膜的 PCR 鉴定。以 F (5'-CATCCAGACGATAAGCATGAGCA-3') 和 R (5'-GCGCATTTGCTGATACTGTTG-3') 为鉴定 K1 荚膜的特异性引物<sup>[27]</sup>, 对数期菌液作为模板, 扩增产物长度为 270 bp。PCR 反应体系: Green Taq Mix (Vazyme) 12.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 超纯水 8.5  $\mu\text{L}$ , 菌液模板 2  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  20 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。取 7  $\mu\text{L}$  PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定目的条带。

### 1.4 荧光噬菌体的制备与收集

将 SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain 10 000 $\times$  用 DMSO 10 倍稀释为 1 000 $\times$  SYBR Gold 保存液, 将噬菌体与 1 000 $\times$  SYBR Gold 保存液按 1 000:1 混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育过夜。将混合液用直径 25 mm、孔径 0.03  $\mu\text{m}$  的聚碳酸酯滤膜过滤, 收集荧光标记的噬菌体, SM 液洗涤 3–4 次去除多余的染料, 用 SM 液冲洗滤膜, 收集冲洗液, 即获得荧光噬

菌体悬液。双层琼脂平板计数法测定荧光噬菌体效价, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存。

### 1.5 荧光 PNJ1809-36 噬菌体侵染宿主菌的最适时间测定

将 DE058 培养至对数期后, 用去离子水稀释至  $10^6$  CFU/mL, 每管取 5  $\mu\text{L}$  稀释后的菌液与 5  $\mu\text{L}$  荧光噬菌体混匀, 室温暗处分别孵育 5、10、15、20 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 小心吸去上清, 用 5  $\mu\text{L}$  去离子水重悬沉淀, 取 5  $\mu\text{L}$  在盖玻片上涂抹成直径约 1.5 cm 圆形, 风干后在荧光显微镜下观察。在 1 000 $\times$  放大倍数下, 每组观察 10 个视野, 分别在荧光模式和微分干涉差(Differential Interference Contrast, DIC)模式下对视野内形状较为完整的细菌进行计数。

### 1.6 特异性测定

对 9 株 K1 荚膜大肠杆菌、20 株非 K1 荚膜大肠杆菌、1 株副溶血弧菌、1 株金黄色葡萄球菌、1 株产酸克雷伯杆菌以及 1 株沙门氏菌进行检测。将待检细菌培养至对数期并用去离子水稀释至  $10^6$  CFU/mL, 用 1.5 方法进行检测, 室温避光孵育时间为 5 min。

### 1.7 灵敏度测定

将对数期 DE058 用去离子水洗涤 2 次, 室温 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用原体积 1/10 的去离子水重悬沉淀, 即浓缩至  $10^9$  CFU/mL, 并以 10 倍梯度作  $10^{-1}$ – $10^{-8}$  稀释, 每稀释度取 50  $\mu\text{L}$  菌液与 50  $\mu\text{L}$  效价  $10^8$  PFU/mL 荧光噬菌体反应, 按照 1.5 方法进行检测, 室温避光孵育时间为 5 min。10  $\mu\text{L}$  体系时, 每稀释度取 5  $\mu\text{L}$  菌液与 5  $\mu\text{L}$  效价  $10^8$  PFU/mL 荧光噬菌体, 如上方法检测。

### 1.8 模拟粪样检测

将 7 株待检大肠杆菌 DE205B、DE058、RS218、DE250、DE252、DE202、DE210 培养至对数期, 取 8 个 2 mL 离心管, 每管称取 0.4 g 鸡粪, 加入 20  $\mu\text{L}$   $10^8$  CFU/mL 待检细菌、1 mL PBS 缓冲液, 对照组用无菌去离子水代替菌液, 涡旋混匀, 2 500 r/min 离心 5 min, 收集上清。将收集

的上清以 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 500  $\mu$ L 去离子水重悬沉淀, 按照 1.5 方法进行检测, 室温避光孵育时间为 5 min。

### 1.9 死菌检测

试验分为 3 个组, 将对数期 DE058 用去离子水稀释至  $10^6$  CFU/mL 后, 按照下述方法处理: 第 1 组, 将 1 mL 菌液以 60 Hz、50% 振幅超声破碎 30 min; 第 2 组, 将 1 mL 菌液 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 1 mL 4% 多聚甲醛重悬沉淀, 固定 20 min 后, 用去离子水洗菌 3 次; 第 3 组, 不做任何处理。处理后, 取样进行菌落计数和荧光噬菌体检测。

### 1.10 荧光噬菌体的保存稳定性检测

将标记好的荧光噬菌体用棕色离心管保存于 4  $^{\circ}$ C, 每 2 周取 10  $\mu$ L 用双层琼脂平板法测定效价, 同时将对数期 DE058 用无菌去离子水稀释至  $10^6$  CFU/mL, 取 5  $\mu$ L 荧光噬菌体与 5  $\mu$ L 稀释后的 DE058 进行荧光检测, 观察检测效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 K1 荚膜大肠杆菌的 PCR 鉴定结果

电泳结果显示(图 1), 29 株大肠杆菌中, 9 株鉴定为 K1 荚膜大肠杆菌, 20 株鉴定为非 K1 荚膜大肠杆菌。详细结果见表 2。

### 2.2 荧光噬菌体的效价

荧光噬菌体在双层琼脂平板上可以形成正常

的噬菌斑, 通过双层琼脂平板计数法测定效价, 本研究所收集荧光噬菌体的效价均  $>10^8$  PFU/mL。

### 2.3 荧光 PNJ1809-36 噬菌体侵染宿主菌的最适时间

镜检结果显示(图 2), 噬菌体和细菌共孵育 5 min 时, 噬菌体围绕细菌形成明亮的环状轮廓, 细菌形状完整、清晰、容易辨别, 而且与明场下细菌一一对应。10 min 时, 细菌内部和四周开始出现点状荧光, 少数荧光细菌的形状变得不完整。15 min 和 20 min 时, 大多数细菌表面不能形成完整的环状荧光, 只有少部分细菌能根据荧光辨别形状, 而且在细菌附近能观察到弥散的荧光小点。细菌的显微镜计数结果显示(图 3), 随着噬菌体与细菌共孵育时间的延长, 视野内完整的荧光细菌数量显著减少( $P<0.0001$ ), 但明场下的细菌数量并没有显著下降, 这可能是由于部分噬菌体进入细菌内部复制增殖, 进而在细菌细胞壁上打孔, 释放出子代噬菌体, 但尚未造成细菌完全裂解, 所以基本形态尚未被完全破坏。因此为了能够观察到清晰、完整的荧光细菌, 本试验确定 5 min 为荧光 PNJ1809-36 噬菌体侵染宿主菌的最适时间。为了避免荧光细菌在显微镜下游动而影响照片拍摄, 本研究采用风干方式固定细菌, 因此在 DIC 和 Merge 图片中可能出现点状、块状或树枝状的结晶。在实际检测中, 我们仅通过观察荧光视野即可辨认是否存在 K1 荚膜大肠杆菌, 结晶不影响检测结果。

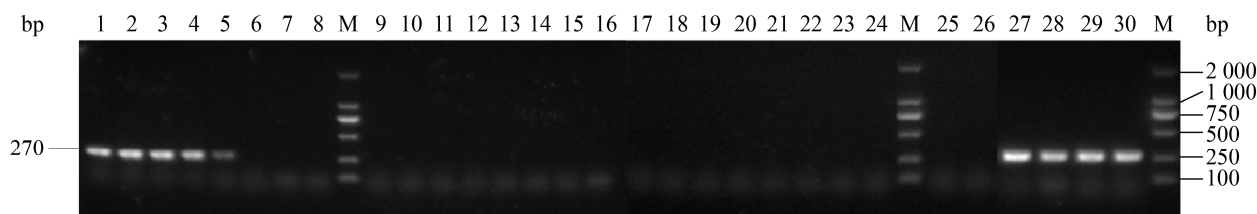


图 1 大肠杆菌的 K1 荚膜 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification results of K1 capsule of *E. coli*

Note: 1: DE058; 2: RS218; 3: DE205; 4: DE205B; 5: DE127; 6: DE203; 7: DE250; 8: DE202; M: DNA marker; 9: DE209; 10: DE252; 11: DE201; 12: DE208; 13: DE215; 14: DE210; 15: DE214; 16: DE410; 17: DE427; 18: DE433; 19: DE197; 20: DE435; 21: DE207; 22: DE211; 23: DE309; 24: DE320; 25: DE206; 26: Negative control; 27: CVCC249; 28: CVCC1350; 29: CVCC1502; 30: CVCC1359

表 2 大肠杆菌的 K1 荚膜 PCR 鉴定结果

Table 2 Identification of *E. coli* K1 capsule by PCR

Strain No.	Results
DE058	+
RS218	+
DE205	+
DE205B	+
DE127	+
CVCC249	+
CVCC1350	+
CVCC1502	+
CVCC1359	+
DE203	-
DE250	-
DE202	-
DE209	-
DE252	-
DE201	-
DE208	-
DE215	-
DE210	-
DE214	-
DE410	-
DE427	-
DE433	-
DE197	-
DE435	-
DE207	-
DE211	-
DE309	-
DE320	-
DE206	-

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

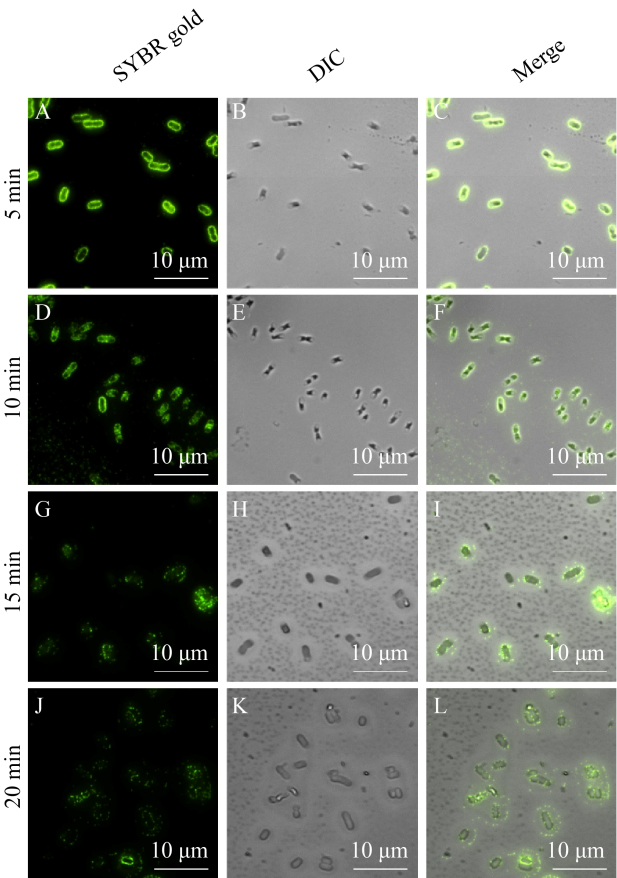


图 2 不同孵育时间的检测效果

Figure 2 Detection efficiency of different incubation time (1 000×, Oil)

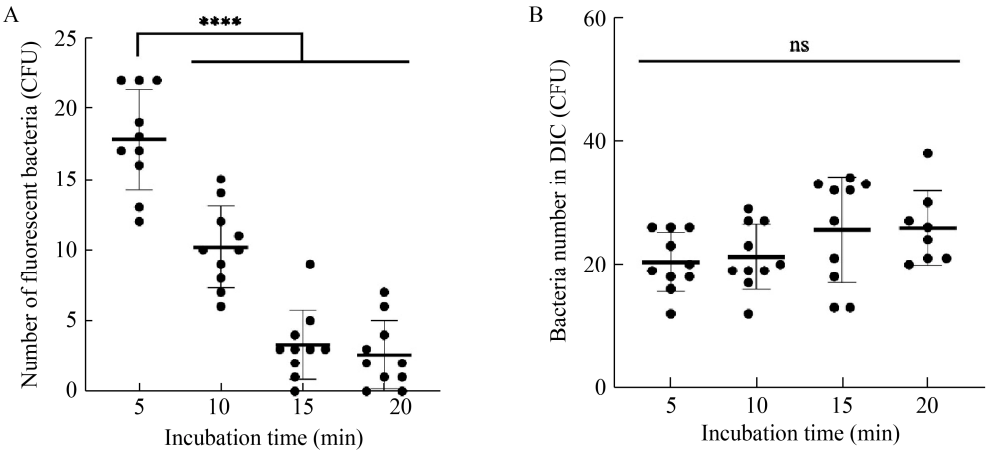


图 3 不同孵育时间下的细菌数量

Figure 3 Bacteria number of different incubation time (1 000×, Oil)

注: A: 荧光视野下形态完整的荧光细菌数; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ 。B: DIC 视野下的细菌数; ns: 无显著差异

Note: A: The number of complete fluorescent bacteria in fluorescent vision; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . B: The number of bacteria in the DIC vision; ns: Not significant

2.4 特异性测定结果

镜检结果显示(图 4), 9 株 K1 大肠杆菌中有 8 株能被检测到, 呈现明显的杆形荧光, 一株不能被检测到, 阳性检出率为 88.9%。20 株非 K1 大肠杆菌和 4 株非大肠杆菌属细菌均未被检出。结果见表 3。

2.5 灵敏度测定结果

显微镜下观察结果显示(图 5), 100  $\mu$ L 体系检测范围为  $10^2$ – $10^7$  CFU/mL。低于  $10^2$  CFU/mL 则无法在显微镜下观察到细菌, 高于  $10^7$  CFU/mL 时噬菌体与细菌数量相当, 因此没有足够的噬菌体在细菌周围形成明显的环状荧光, 仅能观察到无规则的荧光小点。100  $\mu$ L 体系灵敏度为  $10^2$  CFU/mL, 10  $\mu$ L 体系灵敏度为  $10^3$  CFU/mL。

2.6 模拟粪样检测结果

显微镜镜检结果显示(图 6), 在模拟粪样中能够检出 K1 荚膜大肠杆菌 DE058、DE205B、RS218; 未检测到非 K1 荚膜大肠杆菌 DE202、DE210、DE250、DE252。

2.7 死菌检测结果

无处理组菌落计数结果为  $3.64\times 10^6$  CFU/mL, 超声处理组下降至  $2.34\times 10^2$  CFU/mL, 4%多聚甲醛处理组无菌落形成。显微镜镜检结果显示(图 7), 超声处理组检出细菌数量与无处理组相比大大

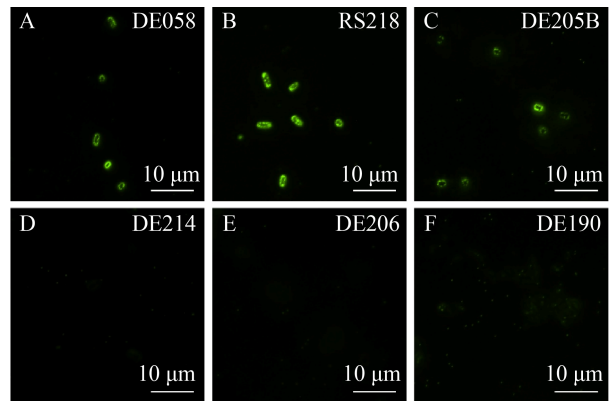


图 4 部分荧光检测结果  
Figure 4 Part of the results of fluorescence detection (1 000 $\times$ , Oil)

表 3 特异性测定结果

Table 3 Specificity test results			
Strain No.	Species	K1 capsule	Fluorescence test
DE058	<i>Escherichia coli</i>	+	+
DE205	<i>Escherichia coli</i>	+	+
DE205B	<i>Escherichia coli</i>	+	+
RS218	<i>Escherichia coli</i>	+	+
CVCC249	<i>Escherichia coli</i>	+	+
CVCC1350	<i>Escherichia coli</i>	+	+
CVCC1502	<i>Escherichia coli</i>	+	+
CVCC1359	<i>Escherichia coli</i>	+	+
DE127	<i>Escherichia coli</i>	+	–
DE203	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE250	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE202	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE209	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE252	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE201	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE208	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE215	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE210	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE214	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE410	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE427	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE433	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE197	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE435	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE207	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE211	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE309	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE320	<i>Escherichia coli</i>	–	–
DE206	<i>Escherichia coli</i>	–	–
ATCC13182	<i>Klebsiella oxytoca</i>	–	–
ATCC25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–
CVCC1800	<i>Salmonella pullorum</i>	–	–
RIMD2210633	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	–	–

注: +: 阳性; –: 阴性  
Note: +: Positive; –: Negative



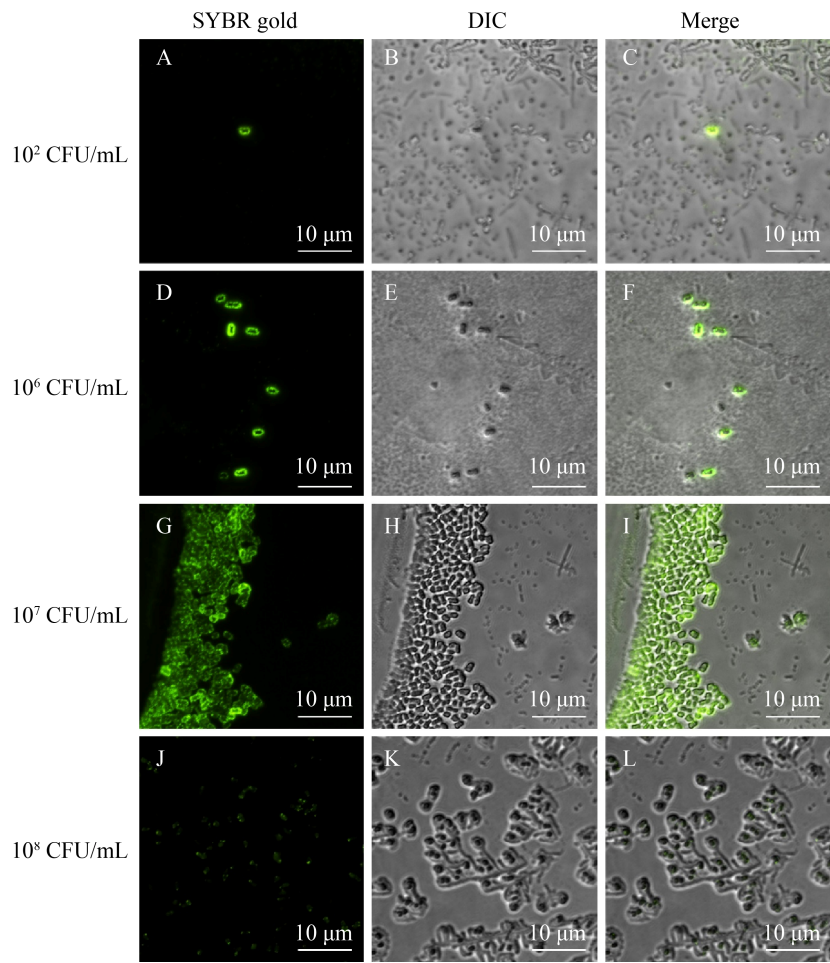


图 5 100 μL 体系的灵敏度  
Figure 5 Sensitivity of 100 μL system (1 000×, Oil)

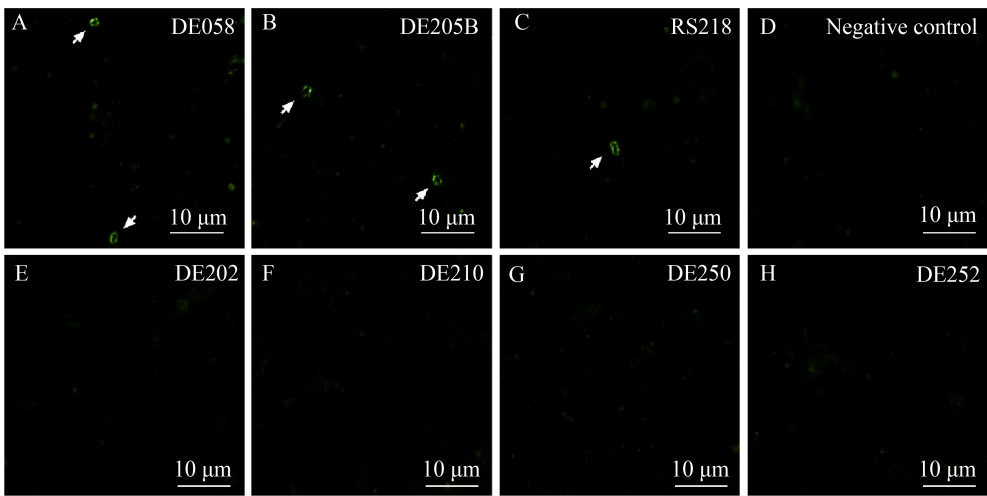


图 6 模拟粪样检测结果  
Figure 6 Detection result of simulated feces (1 000×, Oil)



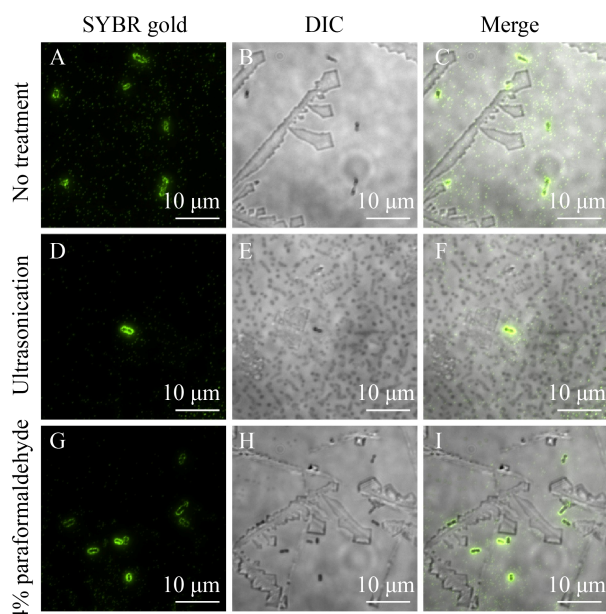


图7 死菌检测结果

Figure 7 Detection results of dead bacteria (1 000×, Oil)

减少, 4%多聚甲醛处理组细菌被全部灭活, 但仍然能检测到与无处理组数量相当的荧光细菌。这表明了荧光噬菌体对宿主菌的检测主要依赖于细菌结构的完整性。细菌被4%多聚甲醛灭活后其结构完整性并没有遭到破坏, 因此能被正常检出; 而经超声处理后, 大部分细菌被破碎, 其结构完整性遭到破坏, 活菌数下降至  $2.34 \times 10^2$  CFU/mL, 因此检出数量大大降低。

## 2.8 荧光噬菌体的保存稳定性

荧光标记的噬菌体在4℃避光保存98 d后效价从  $2.88 \times 10^9$  PFU/mL 降低至  $1.08 \times 10^9$  PFU/mL, 140 d后效价为  $3.545 \times 10^9$  PFU/mL, 没有明显下降(图8)。荧光检测仍然能观察到明亮、完整的环状荧光, 检测效果良好。

## 3 讨论与结论

噬菌体 PNJ1809-36 可特异性识别 K1 荚膜大肠杆菌。本研究用 SYBR Gold 染料标记 PNJ1809-36 噬菌体用于检测 K1 荚膜大肠杆菌, 9 株 K1 荚膜大肠杆菌检出 8 株, 阳性检出率为

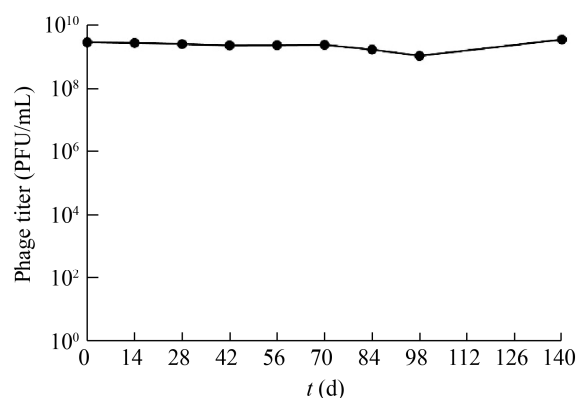


图8 荧光噬菌体效价变化

Figure 8 Titer change of fluorescent phage

88.9%, 20 株非 K1 荚膜大肠杆菌和 4 株非大肠杆菌属细菌检测结果均为阴性, 阴性准确率为 100%。阳性检出率稍有欠缺, 但未发现假阳性, 这是由噬菌体的特异性决定的, 后期如果能分离到特异性更好的噬菌体或者用噬菌体“鸡尾酒”制备荧光噬菌体, 覆盖所有 K1 荚膜大肠杆菌, 该方法的检测准确率会更高。K1 荚膜大肠杆菌 DE127 未能检出, 可能是由于其表面受体结构存在微小的差异, 导致噬菌体 PNJ1809-36 无法吸附或吸附量降低, 从而无法显示出环状荧光轮廓, 因此未能检出。

对于去离子水稀释的细菌, 100 μL 体系检测范围为  $10^2$ – $10^7$  CFU/mL, 最低检测限为 100 CFU/mL。蒋鲁岩等<sup>[24]</sup>的最低检测限是 100 CFU/mL, 与我们的最低检测限相同。最低检测限会受到反应体系大小的影响, 增加体积可以在一定程度上提高灵敏度, 降低体积能够节省材料但也会降低灵敏度, 10 μL 体系的最低检测限为  $10^3$  CFU/mL。当细菌浓度低于 100 CFU/mL 时, 最终离心收集得到的沉淀中细菌数量太少, 在显微镜下观察时几乎找不到细菌, 可将样品离心浓缩或者预增菌后检测。该方法的缺陷之一是有最高检测限, 当细菌浓度大于  $10^7$  CFU/mL 时, 噬菌体数量与细菌数量相当, 没有足够的荧光噬菌体环绕在细菌周围, 不足以在细菌表面形成环状荧光, 因此需要对样品进行稀释后检测。在实际检测工作中, 对

于细菌浓度较高的样品, 可以 10 倍比稀释 2 个梯度同时进行检测以解决最高检测限的问题。

我们在荧光噬菌体的制备过程中选用了聚碳酸酯滤膜, 而不是先前研究<sup>[24]</sup>中使用的过氧化铝氧化滤膜, 并且将细菌富集的方式由过氧化铝氧化滤膜过滤改进成了离心, 降低了检测成本, 但离心的方式也会一定程度上降低灵敏度。由于只需要噬菌体吸附在宿主菌表面即可检测到荧光细菌, 整个检测过程仅需约 15 min, 操作简便, 镜检时可以观察到清晰的由于噬菌体吸附在细菌表面而形成的环状绿色荧光, 以及散落的噬菌体发出的绿色点状荧光。由于散落的点状荧光与环状荧光形态差异大, 不影响细菌辨别, 因此不需要特意清除未吸附的荧光噬菌体。随着细菌与噬菌体共孵育时间延长, 噬菌体会将带有荧光的核酸注入细菌内部进行复制增殖, 进而在细菌细胞壁上打孔, 释放出子代噬菌体, 细菌表面的荧光因此减少, 从而导致荧光细菌的形态不完整、亮度降低、难以辨认, 使得检出细菌数量减少, 因此最佳孵育时间为 5 min。由于荧光细菌会随着液体流动而不断移动, 难以获得清晰的图片, 因此我们将玻片风干后拍摄, 难以避免地在明场下观察到大量结晶, 但这并不影响我们对荧光细菌形态和位置的辨别, 也不影响检测。

在模拟粪样中能够检测到 K1 荚膜大肠杆菌, 不受其他细菌的影响。由于粪样的处理过程较简单, 显微镜下会观察到许多杂质, 对视野有一定影响, 但杂质呈棕黄色, 荧光噬菌体呈明亮的绿色, 仍然能够明显区分出 K1 荚膜大肠杆菌。在死菌检测中, 由于 4% 多聚甲醛没有破坏大肠杆菌的结构完整性, 因此仍然能够被荧光噬菌体识别并且吸附, 从而被检测到。可见, 该方法仅能区分完整细菌与不完整细菌, 无法真正意义上区分活、死菌。

SYBR Gold 荧光染料通过与噬菌体核酸结合从而标记噬菌体, 不影响 PNJ1809-36 噬菌体的吸

附、繁殖能力, 能够形成正常的噬菌斑。SYBR Gold 最大的优势是荧光强度大, 当与核酸结合时, 它的荧光增强 1 000 倍以上, 而 YOYO-1 与核酸结合时荧光仅增强 100–1 000 倍<sup>[23]</sup>, 因此检测效率大大提高。同时, 利用荧光显微镜技术可以直观地观察荧光噬菌体和细菌, 噬菌体只需要吸附即可检测到细菌, 将检测时间减少到约 15 min, 大大提高了检测速度。此外, 噬菌体核酸被衣壳包被, 并且与 SYBR Gold 结合后, 染料被保护免受外部溶剂的极性和 pH 值的影响, 从而确保了染料的荧光强度, 荧光噬菌体可以在 4 °C 下避光保存 4 个月, 效价无明显下降, 荧光强度和检测效果无明显改变, 表明该荧光噬菌体的保存稳定性较好。本研究用 SYBR Gold 荧光染料标记的 PNJ1809-36 噬菌体实现了 K1 荚膜大肠杆菌的快速检测, 该方法可以推广应用于其他细菌的检测。但噬菌体的选择非常重要, 需要筛选对于某一类细菌特异性强、覆盖面广的噬菌体, 才能保证检测的准确率。

## REFERENCES

- [1] Ling C, Zhang QW, Song K, Jiang JJ, Yan GQ. Research advances in *Escherichia coli* K1 penetration across blood-brain barrier[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 44(3): 686-691 (in Chinese)  
凌晨, 张奇文, 宋康, 蒋建军, 剡根强. 大肠杆菌 K1 侵袭血脑屏障的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(3): 686-691
- [2] Michels KR, Lambrecht NJ, Carson WF, Schaller MA, Lukacs NW, Bermick JR. The role of iron in the susceptibility of neonatal mice to *Escherichia coli* K1 Sepsis[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2019, 220(7): 1219-1229
- [3] Janowski A, Newland J. Of the Phrensy: an update on the epidemiology and pathogenesis of bacterial meningitis in the pediatric population[J]. F1000Research, 2017, 6: F1000 Faculty Rev-F1000 Faculty R86
- [4] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. National Standard (Mandatory) of the People's Republic of China: National standard for food safety food microbiological testing diarrheagenic *Escherichia coli* testing GB 4789.6—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese)

- 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 中华人民共和国国家标准: 食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验 GB 4789.6—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [5] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 4789.36-2016 National standard for food safety food microbiological testing *Escherichia coli* O157:H7/NM testing[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese)  
国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.36-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠埃希氏菌 O157:H7/NM 检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [6] Huang Z, Peng J, Han JJ, Zhang GG, Huang YJ, Duan ML, Liu DF, Xiong YH, Xia SQ, Lai WH. A novel method based on fluorescent magnetic nanobeads for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Chemistry, 2019, 276: 333-341
- [7] Liu JL, Liu DX, Dong WL, Li GJ. Establishment and application of multiple real-time fluorescent quantitative PCR detection methods for swine *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Clostridium perfringens*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2021, 41(9): 2410-2415 (in Chinese)  
刘嘉琳, 刘东旭, 董文龙, 李国江. 猪大肠杆菌、沙门菌及产气荚膜梭菌的多重实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(9): 2410-2415
- [8] Zhao YY, Wang J, Lin LP, Gao YY, Wu GP. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 from chicken using a real-time loop-mediated amplification isothermal assay[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(3): 281-288 (in Chinese)  
赵远洋, 王瑾, 林丽萍, 郜彦彦, 吴国平. 基于实时荧光环介导等温扩增快速检测鸡肉中的大肠杆菌 O157:H[J]. 中国食品学报, 2019, 19(3): 281-288
- [9] Hu RR, Yin ZZ, Zeng YB, Zhang J, Liu HQ, Shao Y, Ren SB, Li L. A novel biosensor for *Escherichia coli* O157:H7 based on fluorescein-releasable biolabels[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 78: 31-36
- [10] Torun Ö, Hakkı Boyacı İ, Temür E, Tamer U. Comparison of sensing strategies in SPR biosensor for rapid and sensitive enumeration of bacteria[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 37(1): 53-60
- [11] Ramanujam A, Neyhouse B, Keogh RA, Muthuvel M, Carroll RK, Botte GG. Rapid electrochemical detection of *Escherichia coli* using nickel oxidation reaction on a rotating disk electrode[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 411: 128453
- [12] Shi F, Gan LF, Wang YB, Wang P. Impedimetric biosensor fabricated with affinity peptides for sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(5): 825-832
- [13] Zhou RY, Wang C, Huang YX, Huang K, Wang YL, Xu WD, Xie LJ, Ying YB. Label-free terahertz microfluidic biosensor for sensitive DNA detection using graphene-metasurface hybrid structures[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 188: 113336
- [14] De Siqueira RS, Dodd CER, Rees CED. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2003, 34: 118-120
- [15] Chang TC, Ding HC, Chen S. A conductance method for the identification of *Escherichia coli* O157:H7 using bacteriophage AR1[J]. Journal of Food Protection, 2002, 65(1): 12-17
- [16] Neufeld T, Mittelman AS, Buchner V, Rishpon J. Electrochemical phagemid assay for the specific detection of bacteria using *Escherichia coli* TG-1 and the M13KO<sub>7</sub> phagemid in a model system[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(2): 652-657
- [17] Wu Y, Brovko L, Griffiths MW. Influence of phage population on the phage-mediated bioluminescent adenylate kinase (AK) assay for detection of bacteria[J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(4): 311-315
- [18] Mei CX, Wang JX, Lin H, Li M, Cui LQ. Rapid detection of *Klebsiella* by bacterial luciferase system combined with the bacteriophage lysis[J]. Proceedings of 2009 International Conference of Natural Product and Traditional Medicine, Vols 1 and 2, 2009: 235-239
- [19] Franche N, Vinay M, Ansaldi M. Substrate-independent luminescent phage-based biosensor to specifically detect enteric bacteria such as *E. coli*[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(1): 42-51
- [20] Cox CR, Jensen KR, Mondesire RR, Voorhees KJ. Rapid detection of *Bacillus anthracis* by  $\gamma$  phage amplification and lateral flow immunochromatography[J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 118: 51-56
- [21] Goodridge L, Chen J, Griffiths M. Development and characterization of a fluorescent-bacteriophage assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1397-1404
- [22] Goodridge L, Chen JR, Griffiths M. The use of a fluorescent bacteriophage assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated ground beef and raw milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 1999, 47(1/2): 43-50
- [23] Mosier-Boss PA, Lieberman SH, Andrews JM, Rohwer FL, Wegley LE, Breitbart M. Use of fluorescently labeled phage in the detection and identification of bacterial species[J]. Applied Spectroscopy, 2003, 57(9): 1138-1144
- [24] Jiang LY, Jiang Q, Huang KH, Zhang CY, Tang TS. Rapid

- detection of *Salmonella* in food by using fluorescently labeled phage O-I[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(3): 372-377 (in Chinese)
- 蒋鲁岩, 姜琴, 黄克和, 张常印, 唐泰山. 用荧光标记 O-I 噬菌体快速检测食品源沙门氏菌[J]. *微生物学报*, 2009, 49(3): 372-377
- [25] Low HZ, Böhnlein C, Sprotte S, Wagner N, Fiedler G, Kabisch J, Franz CMAP. Fast and easy phage-tagging and live/dead analysis for the rapid monitoring of bacteriophage infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 602444
- [26] Gong QW, Li YH, Zeng H, Yu PX, Qian XJ, Wang YX, Dai JJ, Tang F. Biological characteristics and whole genome analysis of phage PNJ1809-36 target *Escherichia coli* K1[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(6): 1677-1688 (in Chinese)
- 巩倩雯, 李一昊, 曾颀, 于沛欣, 钱新杰, 王瑜欣, 戴建君, 汤芳. 特异性识别 K1 荚膜大肠杆菌的噬菌体 PNJ1809-36 生物学特性及全基因组分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(6): 1677-1688
- [27] Johnson JR, O'Bryan TT. Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis gene *kpsM* by a rapid and specific PCR-based assay[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(4): 1773-1776