

The use of digoxigenin-labeled oligonucleotide probes for the specific detection of Salmonella in foods

Follow this and additional works at: <https://www.jfda-online.com/journal>

Recommended Citation

Wang, S.-J.; Gong, S.-F.; and Tsen, H.-Y. (1996) "The use of digoxigenin-labeled oligonucleotide probes for the specific detection of Salmonella in foods," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 4 : Iss. 3 , Article 1.
Available at: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2977>

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.



應用毛地黃素標幟之寡核苷酸探針於食品中 沙門氏菌之檢測

王淑珍^{1*} 龔賢鳳² 曾浩洋³

¹私立嘉南藥理學院 食品衛生系

²私立大仁藥學專科學校 食品衛生科

³國立中興大學 食品科學系

摘 要

以毛地黃素標幟三段寡核苷酸片段，TS11，TS21 及 TS31，並與臺灣出現頻率較高之沙門氏菌及非沙門氏菌進行菌落雜交，確認這三段經毛地黃素標幟之寡核苷酸片段之雜交特異性。接著，利用上述非放射性寡核苷酸探針於食品中，包括豬肉、魚及草蝦樣品中沙門氏菌之檢測。結果發現使用 Lactose combined tetrathionate 培養基增殖目標菌，將菌液劃線培養於 *Salmonella Shigella* agar 上，並將可疑菌落點菌於平鋪於 Luria agar 上硝化纖維膜上，進行菌落雜交，可得清楚之檢測結果，每克食品只要含有 3 cfu 或以上的沙門氏菌，即可檢測出來。

關鍵詞：沙門氏菌，毛地黃素，寡核苷酸探針。

前 言

沙門氏菌 (*Salmonella*) 是人畜共通的病原菌，常引起人類食物中毒，引發腸炎、傷寒、副傷寒等疾病，或造成幼獸之急性腸炎或敗血症，故無論在食品衛生或家畜生產方面均很重要⁽¹⁾。沙門氏菌的傳統檢測方法，包括預培養、選擇性培養、後培養、生化型試驗及血清型鑑定，共須 5~7 天⁽²⁾。因此快速檢測相當受到重視⁽³⁾。DNA-DNA 雜交法，即為其中一種方法。此種方法已用於各種細菌的檢測，例如含內毒素之大腸菌^(4,5)，*Yersinia enterocolitica* ⁽⁶⁾，*Lishmania* spp. ⁽⁷⁾，*Staphylococcus aureus*⁽⁸⁾，及 *Salmonella*⁽⁹⁻¹¹⁾ 等之檢測。

曾等作者⁽¹⁰⁾ 曾以分子選殖的方法，選殖到一段沙門氏菌特異性的 DNA 片段，其長度約為 1.8Kb⁽¹⁰⁾，根據此 DNA 序列，合成六段寡核

苷酸；長度為 17~26 mer，經 ³²p 標幟後，檢測沙門氏菌及非沙門氏菌，證明其中三段 TS11、TS21、及 TS31 具雜交特異性⁽¹¹⁾，然放射性檢測，半衰期短，廢棄物污染等問題，一般食品工業或檢測單位，無法利用，本研究曾以缺口轉移(nick translation) 的方法將上述之沙門氏菌檢測用 1.8Kb DNA 探針，以生物素 (biotin) 標幟之，並應用於沙門氏菌之檢測⁽¹²⁾，然以分子選殖方法來生產 DNA 探針，製備不易，且產量少，故進一步以生物素標幟三段寡核苷酸，並應用於食品中沙門氏菌之檢測⁽¹³⁾，然很多食品含有 avidin，易與 biotin 連接，在菌體處理或菌落雜交處理不完全，易造成非特異性干擾之現象，影響結果的判斷。

因此，本研究主要目的，即擬發展毛地黃素(digoxigenin)標幟寡核苷酸探針，並應用於食品中沙門氏菌之檢測。毛地黃素標幟於寡核

苷酸探針，在雜交過程以毛地黃素之抗體確認，再加以呈色，應無類似 biotin 有非特異性干擾等問題。

材料與方法

一、實驗材料

菌種

本研究所用菌種包括不同血清型之沙門氏菌（表一）及非沙門氏菌；非沙門氏菌主要包括 *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Shigella* spp. 等腸內菌屬。其來源包括國內食品工業發展研究所菌種保存中心(CCRC)，屏東技術學院獸醫系及衛生署藥物食品檢驗局。

二、實驗方法

(一)菌體培養

將一白金耳量之沙門氏菌或非沙門氏菌接入 5ml Luria broth (yeast extract 5g, tryptone 10g, NaCl 5g 及 H₂O 1000 ml) 於 37°C 培養 18 小時；部份菌液稀釋，並將菌塗抹於 Luria agar，作為菌數計算或暫時保存。

(二)寡核苷酸探針之序列及毛地黃素(digoxigenin)標幟

寡核苷酸片段 TS11、TS21、TS31 序列如下所示：

TS11: GTCACGGAACAAGACAAATCCGTACG

TS21: TACATCGTAAAGCACCATCGCAAAT

TS31: AGACCACTGACCCAGCCTAATCAA

上述寡核苷酸片段係委託中興大學遺傳工程中心所合成並純化之。以 digoxigenin 標幟寡核苷酸片段之方法，依 Boehringer mannheim Biochemica 提供之方法進行，將 digoxigenin 標幟於 oligonucleotide 的 3' 端。

(三)菌落雜交

以滅菌牙籤將受測目標菌點平鋪於 Luria agar 上之硝化纖維膜 (Hybond C extra, Amersham, Buckinghamshire, England)，於 37°C 培養至菌落直徑大小約為 2 mm。菌落的處理，則參考前報所述之方法行之。菌體以 proteinase K (20 unit/mg, Boehringer Mannheim) 600 µg~2 mg/ml 處理，處理時間依 proteinase K 濃度而定，由 2 小時至過夜不等，可達相同水解效果。處理過之濾紙加入預雜交溶液，包括 6XSSC (1XSSC 為 0.1M NaCl, 0.015M sodium citrate)，10X Denhardt's

溶液，0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS)，100µg/ml 之 denatured calf thymus DNA 及 50 mM sodium phosphate buffer, pH6.8，封於塑膠袋中於 65°C 反應 3~4 小時；接著進行雜交反應；雜交溶液 (6X SSC、10X Denhardt's 溶液⁽¹⁴⁾、0.1% SDS) 含 digoxigenin 標幟之 oligonucleotide 探針 (200 ng，配製於 3~4ml 雜交溶液中) 及含處理過菌落之濾紙，一起裝入塑膠袋中，於 55°C 下反應過夜；接著以 2X SDS 室溫洗滌 2 次，每次 5 分鐘，同樣溶液於 65°C 再洗 2 次，每次 15 分鐘，接著以 1X SSC、0.1% SDS 於 65°C 洗 2 次，每次 10 分鐘，最後以 2X SSC、0.1% SDS 潤濕。洗滌後之濾紙依照 Dig DNA labeling and detection (Boehringer Mannheim GmbH) 操作手冊行之。

(四)雜交靈敏度之測定

將一白金耳量沙門氏菌接種於 5ml Luria broth 中，於 37°C 培養過夜，以無菌水進行系列稀釋，一方面計算生菌數，一方面利用 Biodot (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA) 過濾器收集菌體於 NC 濾紙上，再依上述菌落處理及雜交方法，以 digoxigenin 標幟之寡核苷酸探針進行沙門氏菌之檢測。

(五)食品中沙門氏菌之檢測

取剝碎豬肉，魚及草蝦等食品 1g 與 9ml 之 lactose combined tetrathionate (CTET) 培養液 (lactose broth 13g、sodium thiosulfate 30g、calcium carbonate 10g、bile salt 1g、H₂O 1000ml，煮沸後放冷至 60°C，再加入 Iodine 溶液 2ml/100ml broth) 混合，一組加入 100µl 無菌水，其餘加入含不同菌數沙門氏菌之稀釋菌液 100 µl，於 43°C 培養 12 小時，取一白金耳菌液於 Salmonella-Shigella agar (SSA) 上劃線培養，37°C 培養 18~24 小時，以滅菌牙籤挑取 SSA 上疑似沙門氏菌菌落，點菌於置放在 LA 上之濾紙，37°C 培養至菌落直徑 2mm；NC 濾紙上菌體之處理及菌落雜交如前述。並使用 BAM 方法⁽²⁾，進行試驗作比較。

結果與討論

一、毛地黃素標幟寡核苷酸探針之菌落雜交特性

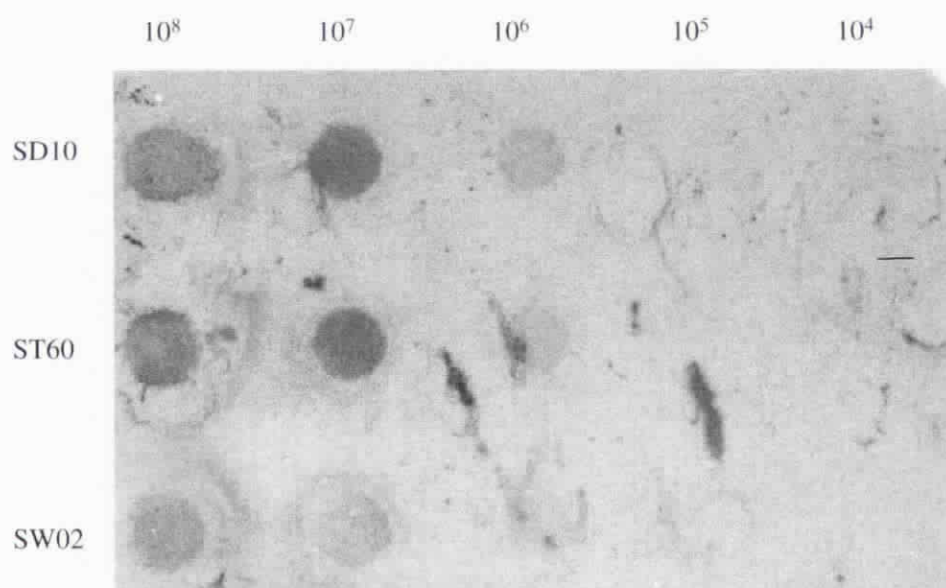
本研究以毛地黃素取代生物素，探討毛地黃素標幟之寡核苷酸的探針，對各種不同血清型沙門氏菌之雜交特性，結果顯示本研究之

Table 1. *Salmonella* strains used for colony hybridization with digoxigenin labeled oligonucleotide probes

Strains	Symbol	No. of isolates	No. of positive results		
			TS11	TS21	TS31
<i>S. agona</i>	SA10	1	1	1	1
<i>S. azteca</i>	SA20	1	1	1	1
<i>S. bonn</i>	SB10	1	1	1	1
<i>S. bovis-mobifican</i>	SB30	1	1	1	1
<i>S. bredeney</i>	SB40	1	1	1	1
<i>S. barenderup</i>	SB50	1	1	1	1
<i>S. cairo</i>	SC10	1	1	1	1
<i>S. chailey</i>	SC20	1	1	1	1
<i>S. colorado</i>	SC30	1	1	1	1
<i>S. derby</i>	SD10	1	1	1	1
<i>S. eppendorf</i>	SE10	1	1	1	1
<i>S. essen</i>	SE20	1	1	1	1
<i>S. goerlitz</i>	SG20	1	1	1	1
<i>S. hadar</i>	SH10	1	1	1	1
<i>S. kuru</i>	SK10	1	1	1	1
<i>S. lagos</i>	SL10	1	1	1	1
<i>S. lanka</i>	SL20	1	1	1	1
<i>S. limete</i>	SL30	1	1	1	1
<i>S. litchfield</i>	SL40	1	1	1	1
<i>S. london</i>	SL50	1	1	1	1
<i>S. manhattan</i>	SM10	1	1	1	1
<i>S. muenchen</i>	SM20	1	1	1	1
<i>S. muenster</i>	SM30	1	1	1	1
<i>S. nchanga</i>	SN10	1	1	1	1
<i>S. ngor</i>	SN30	1	1	1	1
<i>S. anatum</i>	SA20	1	1	1	1
<i>S. nigeria</i>	SN40	1	1	1	1
<i>S. bousso</i>	SB20	1	1	1	1
<i>S. ohio</i>	SO10	1	1	1	1
<i>S. oranienburg</i>	SO20	1	1	1	1
<i>S. panama</i>	SP10	1	1	1	1
<i>S. paratyphi B</i>	SP30	1	1	1	1
<i>S. portsmouth</i>	SP40	1	1	1	1
<i>S. preston</i>	SP50	1	1	1	1
<i>S. saintpaul</i>	SS10	1	1	1	1
<i>S. sarajane</i>	SS20	1	1	1	1
<i>S. senftenberg</i>	SS30	1	1	1	1
<i>S. seremban</i>	SS40	1	1	1	1
<i>S. schwarzengrund</i>	SS50	1	1	1	1
<i>S. sinstorff</i>	SS60	1	1	1	1
<i>S. stanley</i>	SS70	1	1	1	1
<i>S. tananarive</i>	ST10	1	1	1	1
<i>S. tennessee</i>	ST20	1	1	1	1
<i>S. trachau</i>	ST30	1	1	1	1
<i>S. typhi</i>	ST50	1	1	1	1
<i>S. typhimurium</i>	ST70	1	1	1	1
<i>S. vejle</i>	SV10	1	1	1	1
<i>S. victoria</i>	SV20	1	1	1	1
<i>S. virchow</i>	SV30	1	1	1	1
<i>S. welteureden</i>	SW10	1	1	1	1
<i>S. worthington</i>	SW20	1	1	1	1
Total		51	51	51	51

Table 2. Detection of *Salmonella* in *Salmonella* spiked and non-spiked pork, fish and shrimp with oligonucleotide probes

Size of inoculum ^a (X3/g)	Pork				Fish				Shrimp			
	BAM ^b	TS11 ^c	TS21	TS31	BAM	TS11	TS21	TS31	BAM	TS11	TS21	TS31
0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10 ⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ¹	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a: Number of *S. typhimurium* inoculated per gram of foods.^b: BAM: Bacterial Analytical Manual method .^c: The oligonucleotide was labeled with digoxigenin as described in Material and Methods.**Figure 1.** Sensitivity of the detection of *Salmonella* with digoxigenin labeled oligonucleotide probe TS11
SD10: *S. derby*, ST60: *S. typhimurium*, SW02: *S. wassenaar*.

條件下，三段寡核苷酸的探針 TS11、TS21 及 TS31 皆可與表一所示之 51 株台灣常見不同血清型沙門氏菌得正反應之菌落雜交結果。由於本研究所用之 TS11、TS21 及 TS31 等三段寡核苷酸探針，在前報⁽¹³⁾，已使用生物素標幟之，確認其雜交特异性。故本研究使用毛地黃素標幟這三段寡核苷酸探針，與非沙門氏菌之雜交

反應，乃選擇與沙門氏菌血緣相近者，如 *Escherichia coli*、*Citrobacter* spp.、*Shigella* spp. 等，由結果顯示 TS11、TS21 及 TS31 等探針，皆無菌落雜交之訊號。結果可見在本研究操作條件下雜交結果清晰，而無雜訊產生。因此以毛地黃素標幟之片段寡核苷酸之菌落雜交特异性得以確立。

二、雜交靈敏度測定

非放射性毛地黃素標幟之片段寡核苷酸探針針對沙門氏菌菌落雜交之靈敏度測定結果，如圖一所示，主要菌種包括 *S. typhimurium*, *S. muenchen* 及 *S. wassenaar* 等發生率較高之血清型菌株，圖一可見每一菌落含 10^6 - 10^7 個沙門氏菌即可得到正反應的結果、此結果與 biotin 標幟寡核苷酸探針之靈敏度相同⁽¹³⁾。由於菌體過濾採用 Bio-Rad Bio dot 之過濾器，夾住濾膜，過濾收集菌體於濾紙上，再行雜交反應，會使得靈敏度降低，故應用於食品中沙門氏菌之檢測時，我們採用點菌法收集菌體。

三、食品中沙門氏菌之檢測

食品中沙門氏菌的增殖易受檢體中高量雜菌的影響。在前報⁽¹²⁾曾探討 biotin 標幟 1.8kb DNA 片段應用於食品中沙門氏菌之檢測，所得結果與使用 FDA 之 BAM 傳統檢測方法比較，結果相符合，使用 Biotin 標幟寡核苷酸探針，應用於食品中沙門氏菌之檢測，所得結果亦與 FDA 之 BAM 傳統檢測方法相符合⁽¹³⁾。受檢食品為傳統市場購得之豬肉、魚及草蝦，其生菌數分別為 4×10^5 ， 3×10^4 或 2×10^4 cfu/g。由表二顯示菌落雜交實驗，這三種食品只要接入 3 cfu/g 菌量，即可檢測出來，且檢測結果與 BAM 相符合。

前報中⁽¹³⁾，我們曾利用生物素標幟寡核苷酸探針進行濾膜之菌落雜交，藉以檢測沙門氏菌。然此應用方法，若菌體水解不完全，生物素與之反應，則易有非特異性干擾現象，影響結果的判定⁽¹³⁾。而本研究採用毛地黃素標幟寡核苷酸片段之 3'端，則無此干擾現象，經雜交作用，以毛地黃素之抗體與之作用，抗體上接有鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase)，再經呈色來檢測沙門氏菌。此法之優點乃在於菌體中不含毛地黃素，且抗體之特異性高，故不易造成背景干擾，由實驗結果顯示，依本實驗流程，所得結果非常清楚且與 BAM 結果相符合。

誌 謝

本研究承[計劃編號：81-1.5 糧 -05(1)]及美國農業部(USDA) (FG-TA-140; TW-FSIS-4)之支持，得以完成，特此誌謝。

參考文獻

1. 張照夫、董明澄、陳聯槍、林哲夫、鄭清木。1969。沙門氏桿菌診斷用血清製造之研究。臺灣省畜牧獸醫學會會報 14:56-73。
2. Food and Drug Administration U.S. 1984. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed., 7.01-7.17. Association of Analytical Chemist, Arlington, Va. USA.
3. Swaminathan, B., Aleixo, J.A.G. and Minnich, S.A. 1985. Enzyme-immunoassays for *Salmonella*: One Day Testing is Now a Reality. Food Technol. 39:83-89.
4. Hill, W.E. 1981. DNA Hybridization Method for Detection Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Human Isolates and Possible Application to Food Samples. J. Food Safety. 3:233-247.
5. Moseley, S.L., Hug, I., Alim, A.R.M.A., So, M., Samadpour-Motalebi, M. and Falkow, S. 1980. Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Hybridization. J. Infect. Dis. 142:892-898.
6. Hill, W.E., Panye, W.L. and Aulisio, C.C.G. 1983. Detection and Enumeration of Virulent *Yersinia enterocolitica* in Food by DNA Hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 46:636-641.
7. Wirth, D. and Pratt, D. M. 1982. Rapid Identification of *Lishmania* species Hybridization of Kinetoplast DNA in Cutaneous Lesions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:6999-7003.
8. Notermans, S., Henvelman K. J. and Wernars, K. 1988. Synthetic Enterotoxigenic *Staphylococcus Aureus* Strains. Appl. Environ. Microbiol. 54:531-533.
9. Fitts, R. 1985. Development of DNA-DNA Hybridization Test for the Presence of *Salmonella* in Foods. Food Technol. 39:95-102.
10. Tsen, H.Y., Chen, M.H., Shieh, J.S., Wang, S.J. and Hu, N.T. 1989. Possible Use of a 1.8kb DNA Fragment for the Specific Detection of *Salmonella* in Foods. J. Ferment.

- Bioeng. 68:1-6.
11. Tsen, H. Y., Wang, S. J., Roe, R. A. and Green, S. S. 1991. DNA Sequence of a *Salmonella* Specific DNA Fragment and the Use of Oligonucleotide Probe for *Salmonella* Detection. Appl. Microbiol. Biotech. 35:339-347.
 12. Tsen, H. Y., Wang, S. J., and Green, S. S. 1991. *Salmonella* Detection in Meat and Fish by Membrane Hybridization with Chromogenic / Phosphatase/Biotin DNA Probe. J. Food Sci. 56:1519-1523.
 13. 曾浩洋、王淑珍、龔賢鳳、謝俊旭。1994。應用三段生物素標幟寡核苷酸探針於食品中沙門氏菌檢測之檢討。中國農業化學會誌 32:457-467。
 14. Denhardt, D. T. 1966. A Membrane-filter Technique for Detection of Complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23:641-646.

The Use of Digoxigenin-labeled Oligonucleotide Probes for the Specific Detection of *Salmonella* in Foods

SHU-JEN WANG^{1*}, SHIEN-FENG GONG² AND HAU-YANG TSEN³

¹Department of Food Hygiene, Chia-Nan College of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan, R.O.C.

²Department of Food Hygiene, Da-Ren Junior College of Pharmacy, Pingtung, Taiwan, R.O.C.

³Department of Food Science, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

Three oligonucleotide fragments TS11, TS21, and TS31 were labeled with digoxigenin, and the hybridization specificities for three oligonucleotides confirmed with *Salmonella* and non-*Salmonella* isolates. Three non-radioactive oligonucleotide probes were used for the specific detection of *Salmonella* in contaminated food samples, including pork, fish and shrimp samples.

It was found that enrichment of *Salmonella* in food samples using lactose combined tetrathionate broth followed by streaking of the culture on *Salmonella*-*Shigella* agar and spotting suspected cells on nitrocellulose paper placed on Luria agar prior to colony hybridization yield unambiguous results. *Salmonella* at 3 cfu per gram of food could be detected.

Key words: *Salmonella*, digoxigenin, oligonucleotide probe.