

GFP tesztorganizmusok élelmiszer- mikrobiológiai alkalmazási lehetőségei és korlátai*

Farkas József¹ és Mohácsiné Farkas Csilla²

Szent István Egyetem Élelmiszer-tudományi Kara

¹ Hűtő- és Állatitermék-technológiai Tanszék és

² Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Budapest

Érkezett: 2003. június 10.

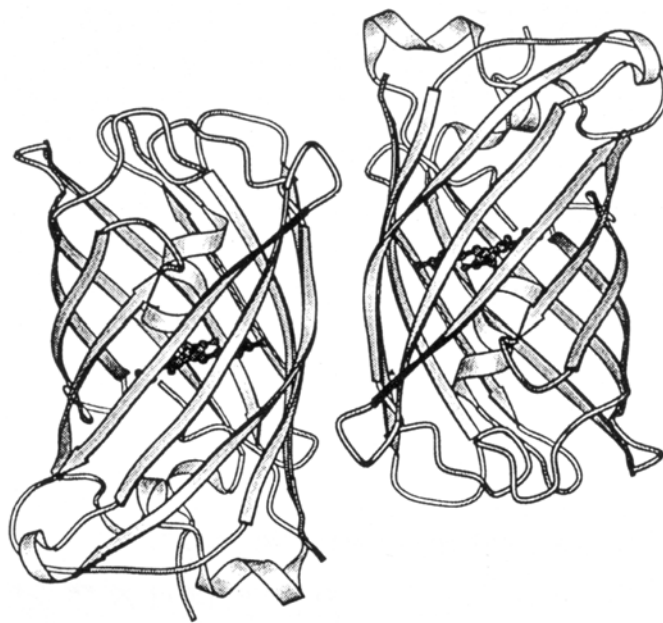
Egy korábbi Hungalimentaria rendezvényen már beszámoltunk a bakteriális luciferáz szintézisét kódoló lux gént tartalmazó baktériumok használatának lehetőségeiről biolumineszcenciájuk érzékeny, specifikus és egyszerű detektálása alapján. A luxAB biolumineszcens marker gén használatakor a luciferáz által katalizált fénykibocsátási reakció specifikus szubsztrát adagolását igényli és a fénykibocsátás intenzitása függvénye a sejtek anyagcsere aktivitásának. Ismeretessé vált azonban egy fluoreszcenciára képes fehérje (green fluorescent protein, GFP), amelyet első ízben az *Aequorea victoria* csendes-óceáni medúzából izoláltak az 1960-as években. A biotechnikai és molekulár-biológiai módszerek fejlődésének köszönhetően ezt a fehérjét szintetizáló képességet kódoló gént is sikerült plazmid vektorok segítségével átvinni számos más szervezetbe, így különféle rekombináns mikroorganizmusokba is. A GFP a gén-expresszáció nem-invazív markereként ily módon ugyancsak új utakat nyitott számos sejtbiológiai jelenség és folyamat *in situ* tanulmányozására. A GFP rekombinánsok biokémiai és immunológiai sajátágaikban nem különböznek az anyatorzsektől és a vizsgálatok többsége szerint - ha nem túlzott a GFP-képzés - a szaporodási kinetikájuk sem különbözik számottevően (OSCAR, 2003).

A GFP szerkezete és a GFP-transzformáns mikroorganizmusok

Megállapítást nyert, hogy e zölden fluoreszkáló, kisméretű, 27 kDa molekulatömegű fehérje 238 aminosavból épül fel. Fluorofor (kromofor) része a lampion-, ill. hordó-alakú, hengeres térszerkezetű fehérjemolekula belsejében van. A fluorofor kialakulása levegő (oxigén)-igényes folyamat.

* „Hungalimentaria 2003” konferencián, Budapesten 2003. április 23-án tartott előadás alapján.

A GFP szerkezete (1. ábra) olyan, hogy a szétgombolyodását előidéző, denaturáló ágenseknek meglehetősen ellenálló (WU et al., 1997). Úgy látszik, hogy a fluoroforjának a képződését a hőmérséklet befolyásolja és 30-37 °C-nál nagyobb hőmérséklet nem kedvez a kialakulásának, ha azonban kialakult, már magasabb hőmérsékleten is stabilis (TAKEUCHI & FRANK, 2001). Denaturálódáskor a GFP elveszti a jellegzetes zöld fluoreszcenciáját. Bizonyos körülmények között azonban a denaturálódás reverzibilis és a fluoreszcencia újra megjelenik. A fluoreszcencia gerjesztési spektrumának a maximuma 390-396 nm-nél van, de 475 nm-nél is van egy kisebb gerjesztési sáv. Az emittált fény spektrumának maximuma 395 nm-es gerjesztéskor 508-511 nm-nél van. A fluoreszcencia előidézése nem igényel semmilyen kofaktort. A luciferázzal ellentétben a GFP ugyanis nem enzim, a fluoreszcencia megnyilvánulásához a GFP-rekombináns mikroorganizmusokban a luciferázt képező biolumineszcens transzformánsokkal ellentétben nincs szükség (exogén) szubsztrátra, vagy kémiai energiára, csak ultraibolya vagy kék fény használatára. Ultraibolya lámpával és CCD (charge-coupled device)-kamerás képanalizátorral felszerelt „sötét-kamrát” használva megoldották a GFP baktériumtelepek automatikus számlálását egyéb, nem fluoreszkáló baktériumtelepek között.



1. ábra: GFP dimer szalag-ábrája (WU et al., 1996)

A GFP olyan mutánsai is előállíthatók, ill. izolálhatók voltak, amelyek fokozottabb fluoreszcenciát mutatnak megfelelően megválasztandó gerjesztési hullámhossz esetén (enhanced, EGFP variánsok) (HELM et al., 1995; CORMACK et al., 1997). Ezek a rekombinánsok még szélesebb körű és innovatívabb alkalmazásokat tesznek lehetővé, mint az eredeti GFP szerkezetek.

Példák GFP-tesztorganizmusok alkalmazásaira

Nyilvánvaló, hogy a GFP és a GFP-t kódoló gént tartalmazó tesztorganizmusok a fluoreszcenciájuk előidézése révén a környezetükből specifikusan kimutathatóvá válnak, ami élelmiszervizsgálati, ill. élelmiszer-mikrobiológiai szempontból is figyelmet érdemel. Ezért először a témakör irodalmából néhány alkalmazási példát írunk le röviden, majd beszámolunk saját kezdeti kísérletes tapasztalatainkról, amelyek a lehetőségeket és a korlátokat is illusztrálják.

Folyadék-tenyészetben áramlási citometriát, talaj-szuszenziók vizsgálatakor pedig a CCD-erősítésű mikroszkópot, illetve gyökérszet felületét vizsgálva konfokális lézer mikroszkópot használtak „GFP jelzett” baktériumok kimutatására (UNGE et al., 1997). Az epifluoreszcens és/vagy a konfokális lézer mikroszkóp új lehetőséget nyújt a "fluoreszcensen jelzett" tesztorganizmus és az esetleges gén-transzfer érzékeny, szelektív észlelésére és a tesztorganizmus elhelyezkedésének tanulmányozására egy biofilmet alkotó mikrobaközösségben (STERNBERG et al., 1997). Ily módon élő állapotú biofilmben, festés nélkül vizsgálható a tisztítás, a biofilm-eltávolítás hatékonysága is (ARRAGE & WHITE, 1997). SKILLMAN és munkatársai (1998) *Enterobacter agglomerans* és *Escherichia coli* GFP-rekombinánsok biofilm képzését és más biofilm képző baktériumokkal kölcsönhatásait tanulmányozták. Hasonló módszerekkel vizsgálták GFP transzformánsok megkötődését gyümölcsök, zöldségek (BURNETT et al., 2000; TAKEUCHI & FRANK, 2001) és állati eredetű élelmiszer-nyersanyagok (LING et al., 2000; PRACHAIYO & McLANDSBOROUGH, 2000) felületein, ill. kölcsönhatásukat ezek szöveteivel.

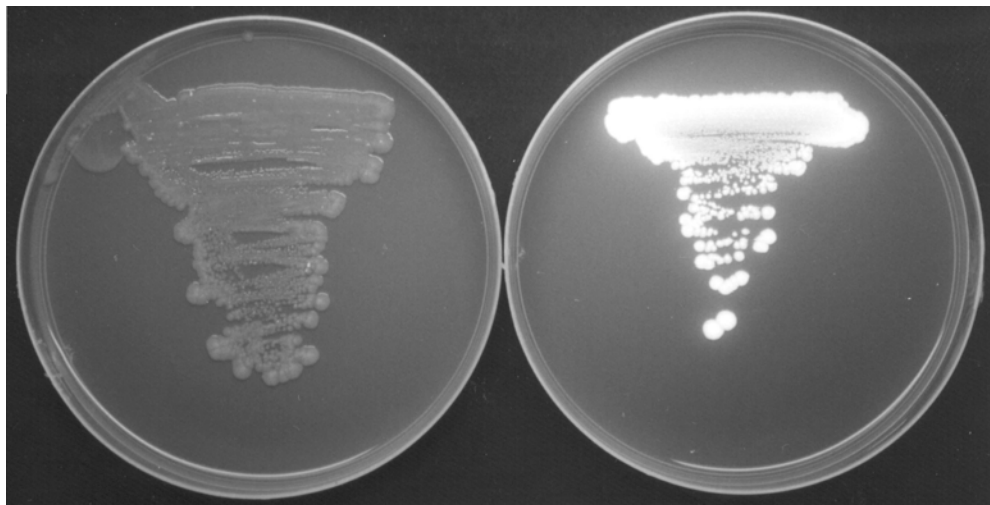
GFP-rekombináns törzsével vizsgálták az *E. coli* 0157:H7 túlélési képességét almaborban és narancslében (FRATAMICO et al., 1997) a szélesztéses leoltásokból fejlődő kolóniákat ultraibolya megvilágítás mellett számlálva. Elvileg a GFP rekombinánsok fluoreszcencián alapuló szelektív kimutatása megbízhatóbb lehet túlélési vizsgálatokban, mint a vizsgálandó mikroorganizmusnak szelektív tápagárokkal való kitenyésztése, mert a GFP mikroorganizmus kimutatásához nem kell szelektív táptalajt használni, ilyen módon lehetséges azoknak a szubletálisan károsodott baktériumoknak az észlelése is, amelyek szelektív táptalajon kolóniaképzésre képtelenek volnának. Ugyanakkor azt is mérlegelni kell, hogy a GFP hosszabb-rövidebb ideig fluoreszcens maradhat életképességét már elveszített sejtben is, így a fluoreszcencia észlelése és a sejt életképessége közötti kapcsolat nem biztos, hogy minden

esetben fennáll (TAKEUCHI & FRANK, 2001). Ilyen eredményre vezetett BURNETT & BEUCHAT (2002) közlése szerint olyan vizsgálat is, ami már arra is kiterjedt, hogy dezinficiáló szerek hatásait tanulmányozták EGFPjelzett *E. coli* 0157:H7 sejtjein. Megállapították, hogy vizes szuszpenzióban vagy alma felületére oltva az EGFP *E. coli* sejtek élőcsíraszámának csökkenését hipoklorit oldattal végzett dezinficiálás esetén követte a relatív fluoreszcencia intenzitás csökkenése és az életben maradt sejtek a fluoreszcenciájukat megtartották. Ecetsav oldattal végzett „dezinficiáláskor” azonban a túlélő sejtek is elvesztették a fluoreszcenciájukat, hidrogén-peroxid oldattal végzett kezelés után viszont fluoreszcens EGFP maradt az elpusztult sejtekben is. Ezek a tapasztalatok azt mutatják, hogy a dezinficiálószer hatásának kitett GFP transzformánsok populációi fluoreszcenciájának a vizsgálata nem megfelelő sem az élő-, sem az összes sejtszám meghatározásának a helyettesítésére.

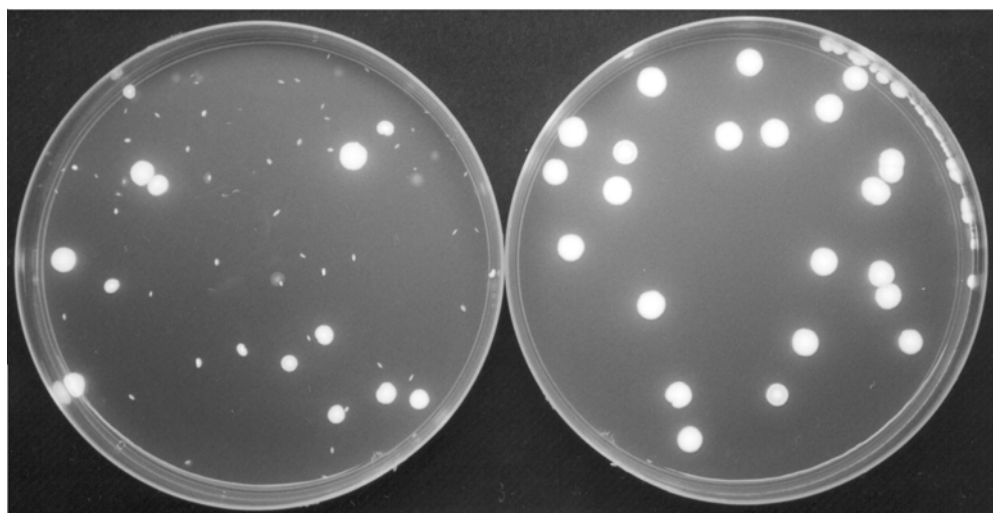
Vizsgálataink GFP rekombináns baktériumokkal

Miután brit kollégáktól, ill. az MTA Növényvédelmi Kutató Intézetéből néhány GFP rekombináns baktériumtörzset kaptunk, először azt kívántuk megállapítani, hogy spektrofluoriméterrel milyen élőcsíraszámú GFP baktériumszuszenziók fluoreszcenciáját tudjuk értékelni, és azt, hogy a hőkezelés, a gamma sugárkezelés vagy a nagy hidrosztatikus nyomáskezelés hatására bekövetkező élőcsíraszám-csökkenés követhető-e a fluoreszcenciájuk mérésével.

A Nagy-Britanniából származó GFP rekombináns *Listeria monocytogenes* törzsünk „vörös eltolású” GFP variáns, amely 488 nm-s kék fényel gerjesztve fluoreszkál. A plazmidja megőrzéséhez 7 mg/l klóramfenikolt tartalmazó táptalajon tartandó fenn. Az egyrészt Nagy-Britanniából, másrészt az MTA Növényvédelmi Kutató Intézetéből származó, többféle *E. coli* GFP transzformánsok ml-enként 100 µg ampicillin-t igényelnek a plazmidok fenntartásához. A 2. ábra az utóbbi törzsek közül az Ec-1 jelzésű törzs ampicillin mentesen, ill. ampicillin-t tartalmazó BHI táptalajon, 37 °C-on, 48 óra alatt kifejlődött vonalkultúráit mutatja ultraibolya lámpával (súlyponti hullámhossz kb. 366 nm) történt megvilágítás esetén. A 3. ábrán ugyanennek a törzsnek ampicillint is tartalmazó BHI táptalajjal képzett lemezöntéses (bal oldal), ill. szélesztéses (jobb oldal) kolóniái vethetők össze.



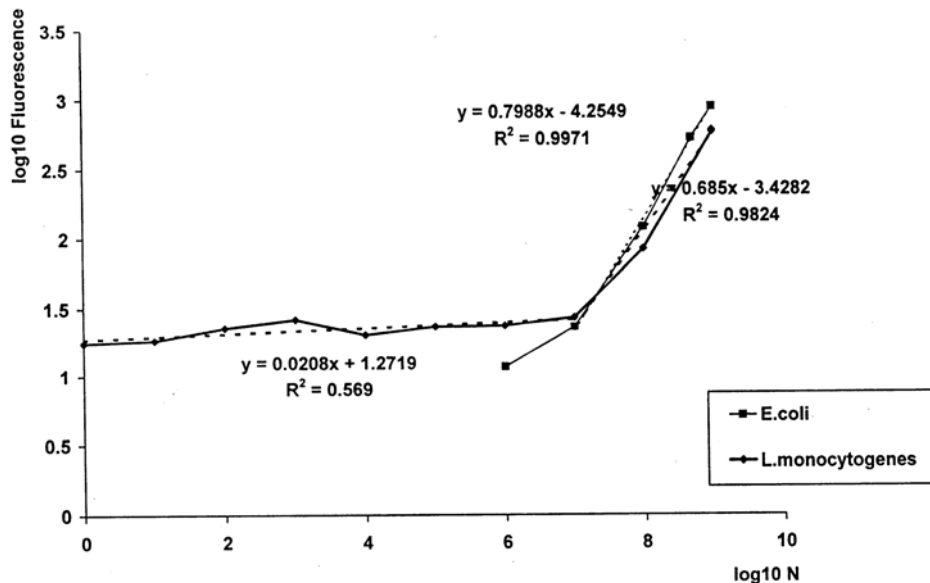
2. ábra: *Escherichia coli* GFP transzformáns ampicillin-mentes (baloldali lemez) és ampicillin-tartalmú (jobboldali lemez)táptalajon kifejlődött vonalkultúrái ultraibolya megvilágításban



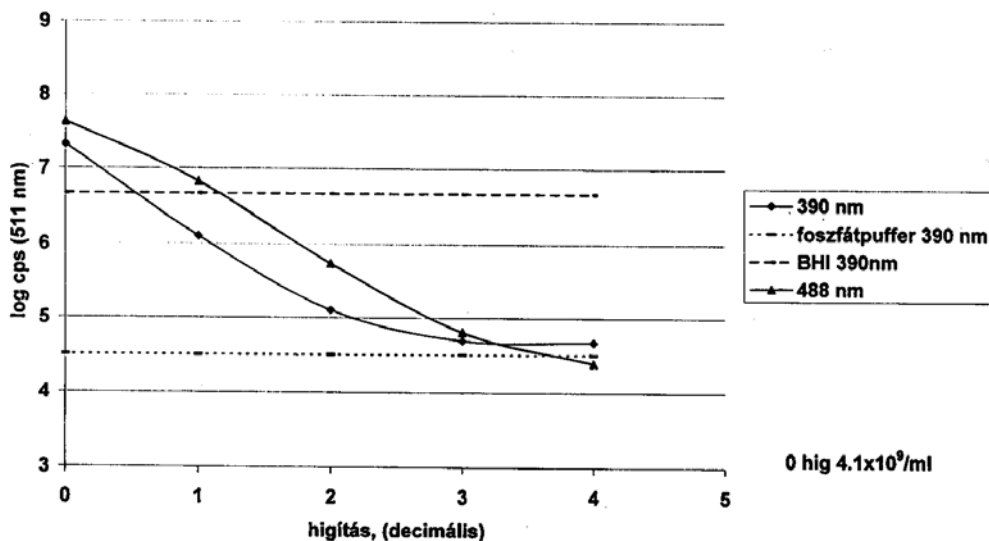
3. ábra: *Escherichia coli* GFP transzformáns lemezöntéses (baloldali lemez) és szélesztéses módszerrel (jobboldali lemez) képzett kolóniái ultraibolya megvilágításban

Kezeletlen foszfát pufferes szuszpenziók élőcsíraszámának logaritmususa és a fluoreszcencia intenzitás logaritmususa közötti kapcsolatot Perkin-Elmer gyártmányú és Jobin-Yvon „Fluoromax” spektrofluoriméterekkel vizsgálva megállapíthattuk, hogy a GFP baktériumok 7,0 pH-jú foszfát pufferes szuszpenzióinak fluoreszcencia intenzitása a háttér (a sejtmentes puffer) fluoreszcencia-szintjét csupán 10^6 - 10^7 /ml sejtszámtól kezdve haladja meg, az ennél nagyobb sejtsűrűségek tartományában azonban lényegében lineáris összefüggés van az élőcsíraszámával (4. ábra). Ez hozzávetőlegesen azonos mérési érzékenység, mint a fotometriás abszorbancia (turbiditás) méréseké. Problémát jelent azonban az is, hogy a fluoreszcens tesztorganizmus tápközege, ill. az az élelmiszer, amelyen vizsgálni akarnánk, autofluoreszcenciával rendelkezhet olyan hullámhossz-viszonyok között,

ami a GFP kimutatásához szükséges, ami tovább csökkenti a spektrofluorometriás GFP-detektálás érzékenységét (5. ábra). Ilyen tekintetben kedvezőbbek voltak a tapasztalataink a *luxAB* (luciferáz-tartalmú) biolumineszcens tesztorganizmussal végzett korábbi vizsgálatainknál (FARKAS et al., 2002), ahol az élőcsíraszám és a luminométerrel mérhető biolumineszcencia intenzitás közötti kapcsolat már kb. 10^3 /ml sejtsűrűségtől lineáris korrelációt mutatott az élőcsíraszámmal.

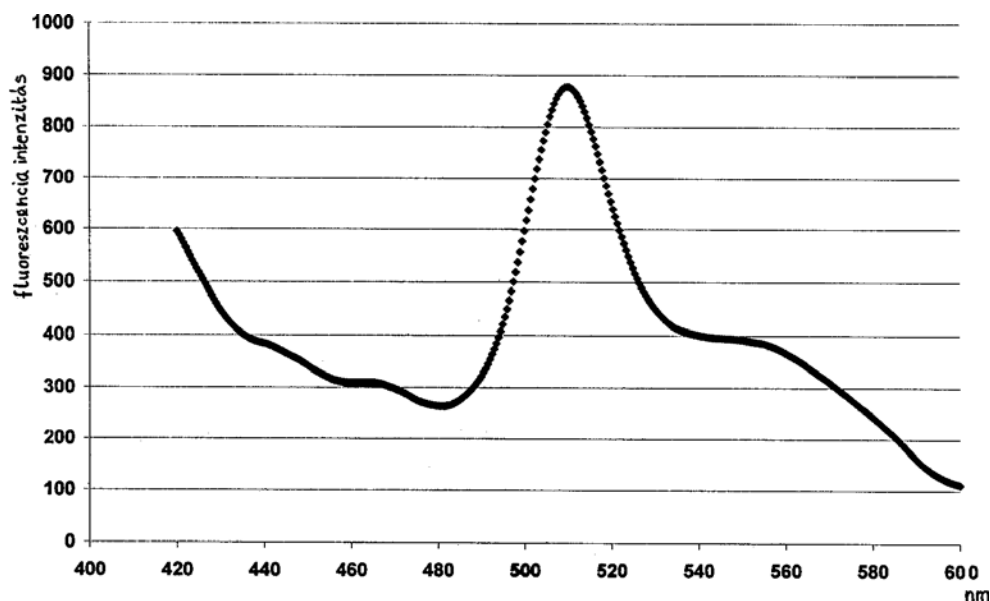


4. ábra: GFP transzformáns baktériumok foszfát pufferes szuszpenzióinak relatív logaritmusos fluoreszcencia intenzitása az élőcsíraszámok logaritmusai függvényében



5. ábra: *Listeria monocytogenes* GFP transzformáns vizes szuszpenzióinak relatív fluoreszcencia intenzitása a gerjesztési hullámhossz (390 nm vagy 488 nm) és a sejtsűrűség függvényében, a BHI tápoldat, ill. foszfát puffer autofluoreszcenciájának mértékével (szaggatott vonalak) összevetve

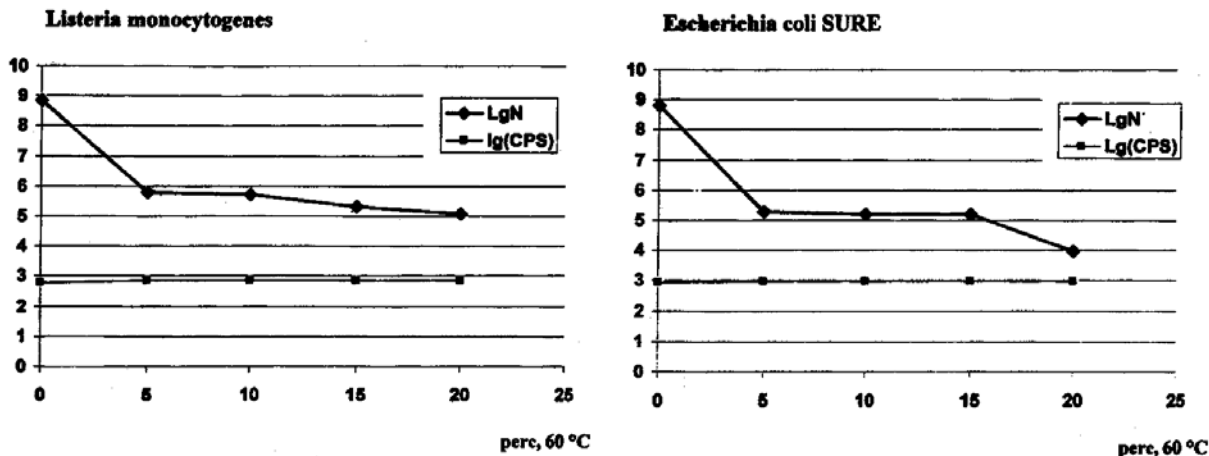
Fizikai mikroba-pusztító hatásoknak a GFP tesztorganizmusok segítségével való követhetősége vizsgálatára az antibiotikummal kiegészített BHI tápoldatban, 30 °C-on végzett rázatás közben előállított biomasszáját ismételt lecentrifugálás és pH 7.0 foszfát pufferes mosás után a foszfát pufferrel felszuszpendáltuk és a szuszpenzió alikvot részeit 0,5, 1,0 és 2,0 kGy gamma sugáradagokkal kezeltük, valamint 60 °C-on 5, 10, 15 és 20 perces hőkezelésnek vetettük alá, kontrollként a kezeletlen szuszpenziót használva. A foszfát pufferes baktérium-szuszpenziók fluoreszkálását Perkin-Elmer gyártmányú spektrofluoriméterrel mértük. Az *E.coli* SURE törzs GFP transzformánsa egy tipikus, 400 és 600 nm hullámhossz-tartományban felvett emissziós spektrumát mutatja a 6. ábra. A 7. és 8. ábrák pedig azt illusztrálják, hogy sem a hőkezelés, sem a besugárzás nem csökkentette sem a *Listeria monocytogenes*, sem az *Escherichia coli* fluoreszcens variánsainak a fluoreszcenciáját, noha például a 2 kGy-s sugáradag mindkét törzs esetén az élőcsíraszámot mintegy 8 nagyságrenddel csökkentette és a 60 °C-on 20 perces hőkezelés hatására is 4-5 nagyságrenddel csökkent az élőcsíraszámuk.



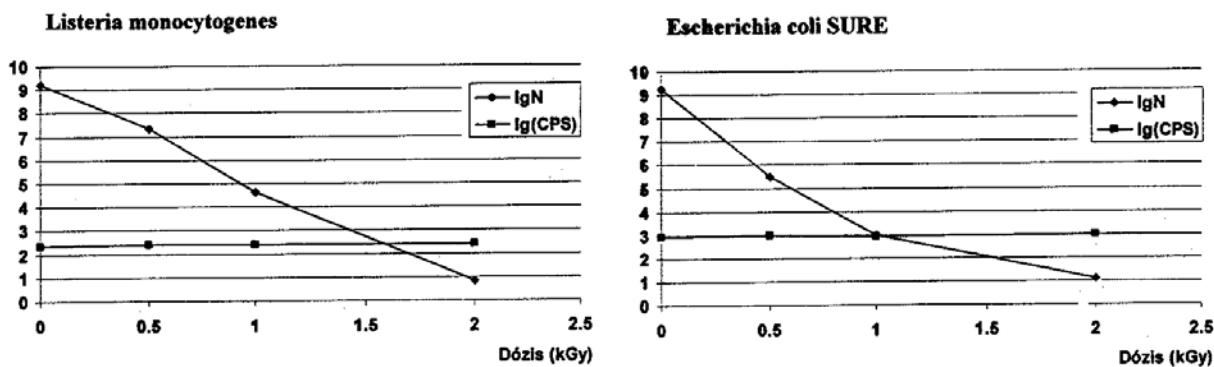
6. ábra: Az *Escherichia coli* SURE GFP transzformáns vizes szuszpenziójának emissziós spektruma.

A nagy hidrosztatikus nyomás hatását vizsgálandó hasonló kísérletet végeztünk, de a fluoreszcencia méréséhez Jobin-Yvon gyártmányú Fluoromax típusú, foton-számláló spektrofluorimétert használtunk. Az eredmények ez esetben is azt mutatták, hogy a nagy hidrosztatikus nyomás által előidézett élőcsíraszám csökkenéssel sem járt együtt a baktériumszuszpenziók fluoreszcenciájának csökkenése, a GFP tehát a nyomáskezelés hatására sem denaturálódott (9. ábra). E tapasztalataink tehát a GFP-nek az élelmiszereket pasztöröző hatású fizikai ágensekkel

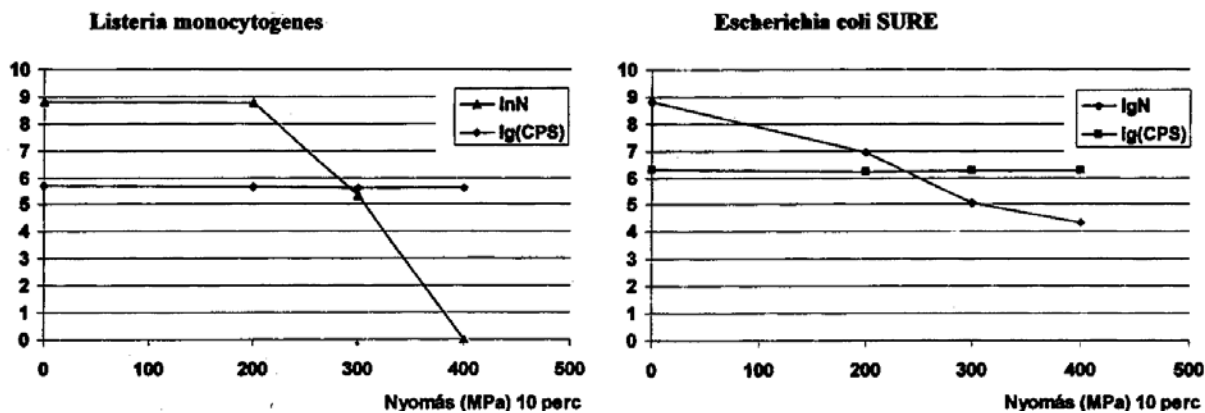
szembeni meglepően nagy rezisztenciáját mutatják, így az antimikrobás, élelmiszertartósító kezelések mikrobiológiai hatásának nyomonkövetésére ilyen tesztorganizmusok fluorimetriás vizsgálata nem használható.



7. ábra: *Listeria monocytogenes* és *Escherichia coli* GFP transzformánsok szuszpenziói élőcsíraszámának (log N) és fluoreszcencia intenzitásának (log CPS) összevetése a hőkezelés időtartamának függvényében

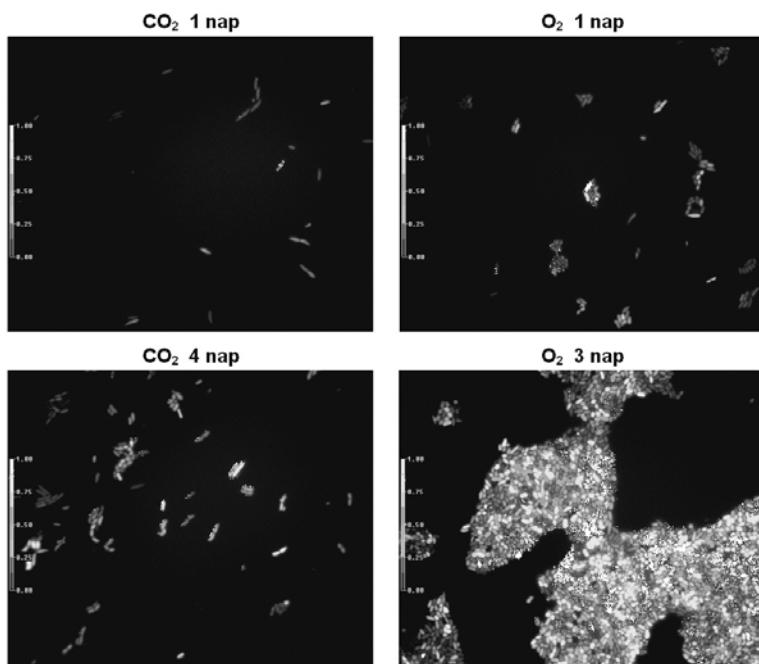


8. ábra: *Listeria monocytogenes* és *Escherichia coli* GFP transzformáns szuszpenziói élőcsíraszámának (log N) és fluoreszcencia intenzitásának (log CPS) összevetése a gamma sugárkezelés dózisának függvényében



9. ábra: *Listeria monocytogenes* és *Escherichia coli* GFP transzformáns szuszpenziói élőcsíraszámának (log N) és fluoreszcencia intenzitásának (log CPS) összevetése a nagy hidrosztatikus nyomás mértékének függvényében

Biztatóbb eredményeket kaptunk egy dán-magyar együttműködési kísérletsorozat keretében, amely során egyikünk (M.-F. Cs.) a koppenhágai Királyi Állatorvos- és Agrártudományi Egyetem Tejgazdaságtani és Élelmiszer-tudományi Intézetében egy, a dán kollégák törzsgyűjteményéből való GFP-transzformáns *Escherichia coli* törzsnek BHI tápagar felületén való szaporodását vizsgálhatta levegő vagy szén-dioxid atmoszféra jelenlétében, speciális epifluorescens mikroszkóp segítségével 15 °C hőmérsékleten végzett tárolás folyamán. A vizsgálati rendszerben a sejtek fluoreszcenciája (az emittált fény színe) a sejtek belső pH-jától függött (GULDTEFELDT et al., 1998). A belső pH változása az ún. fluoreszcencia-arány képanalizátoros mikroszkopizálás (fluorescence ratio-imaging microscopy, FRIM) technikával történt. A látóterek elemzése hűtött CCD kamera és egy speciális szoftver segítségével végzett képanalízis által lehetővé tette nemcsak a mikrokolónia-képződés, hanem a sejtek és környezetük pH-változásának a követését is (SIEGUMFELDT et al., 1999). Megállapítható volt, hogy a sejtek belső pH-ja nem csak a külső pH-nak volt a függvénye, hanem a CO₂-nak is. A tápágár felületi rétegének a pH-ját a szén-dioxid gáztér csupán kismértékben csökkentette ugyanakkor számottevően gátolta a baktérium-szaporodást (10. ábra). Hasonló vizsgálatokat végeztünk a GFP tesztorganizmusnak csirkebőrre való ráoltása után és levegőben vagy szén-dioxid gáztérben végzett tárolása közben is, azonban ez esetben a csirkebőr háttér jellege miatt nehezebb volt a mikrokolóniák képződésének követése.



10. ábra: *Escherichia coli* GFP transzformáns BHI tápágár felületén, 15 °C-on való szaporodásának gátlása CO₂ atmoszférával, az aerob körülmények közötti mikrokolónia képzéshez viszonyítva

Összefoglalóan megállapítható, hogy bár az említett korlátozó tényezők egy része innovatív megközelítéssel a jövőben leküzdhetővé válhat, a publikáció tárgyát képező rekombináns mikroorganizmusok a vizsgálatukhoz többnyire szükséges speciális és költséges technikák miatt egyelőre inkább a kutatólaboratóriumok potenciális fegyvertárát szaporítják, mint a rutin vizsgálatokét.

A hazai kísérletekben való technikai segítséget Andrásy Évának és Szabóné Simon Annának köszönjük. A hidrosztatikus nyomás-kezelésekért Mészáros László egyetemi adjunktusnak tartozunk köszönettel. A GFP tesztorganizmusokat a Cardiff-i Egyetemről, Dr. Julian Wimpenny professzor, ill. a Nottinghami Egyetemről Dr. William Waites professzor, valamint az MTA Növényvédelmi Kutató Intézetéből Dr. Czalleng Arnold bocsátotta rendelkezésünkre. A Perkin-Elmer műszerekkel végzett mérésekre kapott lehetőséget Dr. Balázs Ervin (Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, Gödöllő) és Dr. Tóth Klára (BME Általános és Analitikai Kémiai Tanszék, Budapest) akadémikusoknak köszönjük. Saját Fluoromax műszerünk beérkezése előtt egy azonos típusú műszer használatát Dr. Böddi Béla kandidátus (ELTE Növényélettani Tanszék, Budapest) tette lehetővé. A dániai vizsgálatokhoz a koppenhágai Királyi Állatorvos- és Agrártudományi Egyetem Tejgazdaságtani és Élelmiszer-tudományi Intézetében lévő EU Műszerközpont látogató ösztöndíja nyújtott segítséget. A kísérleteink részét képezik az NKFP-4/0028/2002 sz. OM kutatási projektnek.

Irodalmi hivatkozások

- ARRAGE, A. A., WHITE, D.C. (1997) Monitoring biofilm-induced persistence of *Mycobacterium* in drinking water systems using GFP fluorescence. In: HASTINGS, J. W., KRICKA, L. J., STAMLEY, P.E. (szerk.) Bioluminescence and Chemiluminescence. Molecular Reporting with Photons. John Wiley & Sons, Chichester, etc., pp. 383-386.
- BURNETT, S.L., BEUCHAT, L. R. (2002) Comparison of methods for fluorescent detection of viable, dead, and total *Escherichia coli* 0157:H7 cells in suspensions and on apples using confocal scanning laser microscopy following treatment with sanitizers. *Int. J Food Microbiol.* , **74**, 3 7-45.
- BURNETT, S.L., CHEN, J., BEUCHAT, L. R. (2000) Attachment of *Escherichia coli* 0157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 4679-4687.
- CORMACK, B.P., VALDIVIA, R. H., FALKOW, S. (1997) Mutants of green fluorescent protein (GFP) with enhanced fluorescence characteristics. In: HASTINGS, J. W., KRICKA, L.J., STANLEY, P.E. (szerk.) Bioluminescence and Chemiluminescence. Molecular Reporting with Photons. John Wiley & Sons, Chichester, etc., pp. 387-390.

- FARKAS, J., ANDRÁSSY, É., BECZNER, J., VIDÁCS, I., MÉSZÁROS, L. (2002) Utilizing luminometry for monitoring growth of *Listeria monocytogenes* in its liquid or gelified monocultures and co-cultures with 'acid-only' *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.*, **73**, 159-170.
- FRATAMICO, P. M., DENG, M. Y., STROBAUGH, T. P., PALUMBO, S. A. (1997) Construction and characterization of *Escherichia coli* 0157:H7 strains expressing firefly luciferase and green fluorescent protein and their use in survival studies. *J. Food Protect.*, **60**, 1167-1173.
- GULDFELDT, H., RECHINGER, K.B., JAKOBSEN, M. (1998) Measurements of the effects of acetic acid and extracellular pH on intracellular pH of nonfermenting, individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 530-534.
- HELM, R., CUBITT, A. B., TSIEN, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature*, **373**, 663-664.
- LING, S. H. M., WANG, X. H., XIE, L., LIM, T.M., LEUNG, K.Y. (2000) Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in vivo and in vitro fish models. *Microbiology*, **146**, 7 -19.
- OSCAR, T. P. (2003) Comparison of predictive models for growth of parent and green fluorescent protein-producing strains of *Salmonella*. *J. Food Prot.*, **66**, 200-207.
- PRACHAIYO, P., McLANDSBOROUGH, L.A. (2000) A microscopic method to visualize *Escherichia coli* interaction with beef muscle. *J. Food Prot.*, **63**, 427-433.
- SIEGUMFELDT, H., RECHINGER, K. B., JAKOBSEN, M. (1999) Use of fluorescence ratio imaging for intracellular pH determination of individual bacterial cells in mixed cultures. *Microbiology*, **145**, 1703 -1709.
- SKILLMAN, L. C., SUTHERLAND, I. W., JONES, M. V., GOULSBRA, A. (1998) Green fluorescent protein as a novel species-specific marker in enteric dual-species biofilms. *Microbiology*, **144**, 2095-2195.
- STERNBERG, C., CHRISTENSEN, B. B., MÖLLER, S., ANDERSEN, J. B., MOLIN, S. (1997) Localization of cells active in gene expression and gene transfer in intact bacterial biofilms. In: HASTINGS, J. W., KRICKA, L. J., STANLEY, P. E. (szerk.) *Bioluminescence and Chemiluminescence. Molecular Reporting with Photons*. John Wiley & Sons, Chichester, etc., pp. 371-374.
- TAKEUCHI, K., FRANK, J.F. (2001) Expression of red-shifted green fluorescent protein by *Escherichia coli* 0157:H7 as a marker for the detection of cells on fresh produce. *J. Food Prot.* **64**, 147-15 I.
- TAKEUCHI, K., FRANK, J.F. (2001) Confocal microscopy and microbial viability detection for food research. *J Food Prot.*, **64**, 2088-2102.
- UNGE, A., TOMBOLIM, R., MÖLLER, A., JANSSON, J. K. (1997) Optimization of GFP as a marker for detection of bacteria in environmental samples. In: HASTINGS, J.W., KRICKA, L.J., STANLEY, P.E. (szerk.) *Bioluminescence and Chemiluminescence. Molecular Reporting with Photons*. John Wiley & Sons, Chichester, etc., pp. 391- 394.
- WU, C.-K., LIU, Z.-J., ROSE, J. P., INONYL, S., TSUI, F., TSIEN, R. Y., REMINGTON, S.J., WANG, B.-C. (1997) The three-dimensional structure of green fluorescent protein resembles a lantern. In: HASTINGS, J. W., KRICKA, L. J., STAMÉYY, P. E. (szerk.) *Bioluminescence and Chemiluminescence. Molecular Reporting with Photons*. John Wiley & Sons, Chichester, etc., pp. 399 - 402.