



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108588037 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810376234.4

A23B 4/10(2006.01)

(22)申请日 2018.04.20

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:M2018121 2018.03.11

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72)发明人 李锦铨 尹平 邱宁 周洋

张丹丹 董星星 晏婷 李子齐

王宇杰

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51)Int.Cl.

C12N 7/00(2006.01)

A23B 4/22(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表1页 附图5页

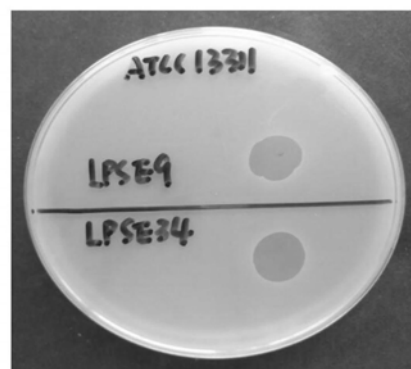
(54)发明名称

一种沙门氏菌噬菌体LPSE34及其在食品中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种沙门氏菌噬菌体LPSE34,其保藏编号是:CCTCC NO 2018121,该噬菌体为广谱型沙门氏菌噬菌体,能裂解耐药性沙门氏菌,经鉴定,该噬菌体为肌尾噬菌体科,将其命名为LPSE34;该噬菌体LPSE34在pH4-12,30-60℃效价稳定。本发明还公开了一种沙门氏菌噬菌体在食品中的应用,特别是在鸡肉、火腿体系中;此外,本发明还公开了将噬菌体作为抑菌物质和海藻酸钠结合形成复合可食用涂膜,与抗生素和化学防腐剂相比较,噬菌体不会影响食品的质地和风味,具有特异性高、无残留和安全的特点。本发明公开的噬菌体LPSE34可以作为一种杀菌/抑菌的物质来控制食源性病原菌对食品的污染,是一种很有前途的保障食品安全的生物制剂。

C



1. 一种沙门氏菌噬菌体LPSE34,其特征在于:保藏编号为:CCTCC NO 2018121。
2. 根据权利要求1所述的一种沙门氏菌噬菌体LPSE34,其特征在于,所述的噬菌体LPSE34含有如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。
3. 权利要求1所述的一种沙门氏菌噬菌体LPSE34在鸡肉或火腿中的应用。
4. 权利要求1所述的一种沙门氏菌噬菌体LPSE34和海藻酸钠-CaCl<sub>2</sub>体系结合形成复合可食用涂膜材料在鸡肉或火腿中的应用。

## 一种沙门氏菌噬菌体LPSE34及其在食品中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全领域,具体涉及一种沙门氏菌噬菌体LPSE34,还涉及一种沙门氏菌噬菌体LPSE34在食品中的应用,该噬菌体特别适用于鸡肉、火腿。

### 背景技术

[0002] 食品安全已成为全球重要的公共卫生问题,食品中的致病菌对健康引起的危害越来越受到人们的关注。尽管现代食品安全控制技术和食品加工技术取得了巨大进步,食品工业仍然面临微生物污染的威胁。作为人类接触沙门氏菌的重要媒介:禽肉,以及由其他食品如牛奶、生鲜蔬菜、水果中的沙门氏菌引起的人类感染都在警示,预防和控制沙门氏菌的污染已经刻不容缓。

[0003] 近年来,由于化学防腐剂在食品 and 食品加工表面的使用,导致超级细菌的出现和食品中药物残留的问题引起世界的广泛关注。人们对天然抗菌化合物的兴趣有所增加。噬菌体作为一种广谱、高效、低毒、实用性广、天然的抑菌物质正在逐渐成为食品科学研究热点之一。目前噬菌体在食品领域中的应用主要有:(1) 在农业生产的产前中应用,以达到从源头上减少和消除活体动植物中食源性病原菌的污染或定植的效果。(2) 在食品加工过程中对食品接触面和生产设备的消毒。(3) 在最终产品储存和销售期间防止食品污染和病原体扩散。本发明研发了一种噬菌体在食品安全领域中由沙门氏菌引起的食品污染的防控作用。

[0004] 目前只有少数公司,包括Microcos、Omnilytics、Novolytics和Intralytix等在噬菌体的商业化应用方面获得了美国FDA的批准。其中沙门氏菌噬菌体用于控制食品、宠物食品和动物饲料中的沙门氏菌。FDA最近还批准了沙门氏菌特异性噬菌体的混合物作为抑菌剂,可直接应用于家禽、鱼类、贝类、新鲜的水果和加工的蔬菜。然而,我国目前既没有具有知识产权的噬菌体相关产品生产公司,也没有获批使用的产品。尽管目前在我国已有沙门氏菌噬菌体相关研究,但是研究噬菌体宿主谱时通过传统的“点斑法”而不是“裂解曲线法”进行,导致错误判断噬菌体的宿主谱和裂解能力(见图4)。这也是已有噬菌体在我国依然无法真正进入生产环节的重要原因之一,本研究克服了“点斑法”的缺陷,获得真正高裂解性能的噬菌体。

[0005] 近年来,无论是在包装领域还是食品保鲜领域,可食用膜都受到了国内外学者的极大关注。随着对其研究的深入,更多形式的可食用膜用于肉制品和蛋制品保鲜。目前研究的热点主要集中于功能性可食用膜,但对于这种可食用膜的研究主要集中于果蔬制品上,其在肉制品和蛋制品上的应用研究比较零散。

[0006] 海藻酸钠成膜剂是一种很有开发前途的涂剂。它主要以海藻酸钠为复合成膜材料,也可以和其它纯天然防腐杀菌物质结合应用,具有以下一些特点:(1) 涂膜无毒无副作用,可直接食用。(2) 采用海藻酸钠膜可以显著降低肉的解冻汁液流失;对于保持冻结肉制品的功能特性非常有用。(3) 海藻酸钠涂膜能明显减少干耗,这是因为海藻酸钠膜自身是亲水性的,它作为一种自我牺牲剂,在保藏过程中膜中的水分先蒸发出来,从而保护了被包裹

的物质中的水分。(4)海藻酸钠涂膜可以明显延缓脂肪氧化。

[0007] 综上,将噬菌体作为抑菌物质和海藻酸钠结合形成复合可食用膜,使可食用膜发挥双重作用,使其既能从物理化学方面延缓肉制品的腐败变质,又能从抑制细菌的生长繁殖等微生物方面减慢肉制品的腐败变质。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的是在于提供了一种沙门氏菌噬菌体LPSE34,该噬菌体为广谱型沙门氏菌噬菌体,它不仅对鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028,ATCC1331,ATCCST-8, UK-1,SGSC4903,SL1344,X12341,肠炎沙门氏菌ATCC13076,SJTUF10978, SJTUF10984,LK5-3820,SGSC4901,伤寒沙门氏菌Ty2,CT18,Ty21a,鸡白痢沙门氏菌C79-3,CVCC534和大肠杆菌D41,H10417,DH5 $\alpha$ 具有较强的杀菌效果,而且对8株耐药性鼠伤寒沙门氏菌893,1893,2238,2459,2088,2359,2069, 2511同样具有很强的杀菌效果,因此,噬菌体也可以作为控制耐药性沙门氏菌的一种天然安全的理想工具。噬菌体LPSE34的活性较高,效价 $\geq 10^{10}$ pfu/mL,并且噬菌体LPSE34具有很好的温度耐受性和pH耐受性,在实际生产中使用时有较宽的适用范围。

[0009] 本发明还有一个目的是在于提供了一种沙门氏菌噬菌体LPSE34在食品中的应用,将噬菌体用于抑制食品,特别是鸡肉、火腿体系中的沙门氏菌的污染以及将噬菌体作为抑菌物质和海藻酸钠结合形成复合可食用涂膜,使可食用涂膜发挥双重作用,海藻酸钠涂膜能够从物理化学方面延缓肉制品的腐败变质,延缓脂肪氧化,在涂膜液中加入噬菌体LPSE34后,又能够抑制或杀灭食品中的沙门氏菌,而且与抗生素和化学防腐剂相比较,噬菌体不会影响食品的质地和风味,具有特异性高、无残留和安全的特点。

[0010] 为了实现上述技术的目的,本发明采用以下技术措施:

[0011] 一种沙门氏菌噬菌体(肠炎沙门氏菌噬菌体Salmonella enteritidis phage LPSE34)LPSE34,保藏编号为:CCTCC NO:M2018121,保藏日期为:2018年 3月11日,噬菌体LPSE34为广谱裂解性噬菌体,且能裂解耐药性沙门氏菌。经鉴定,该噬菌体LPSE34为肌尾噬菌体科;该噬菌体LPSE34在pH4-12,与许多食品的pH在5.5-7.0相兼容,便于噬菌体在实际生产中的应用,在30-60℃效价稳定,具有较好的温度耐受性。

[0012] 所述的噬菌体LPSE34含有如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0013] 在4℃和常温25℃条件下,噬菌体LPSE34对食品中的沙门氏菌的抑菌实验表明,噬菌体能快速高效地防控由沙门氏菌引起的食品污染。

[0014] 一种沙门氏菌噬菌体LPSE34在鸡肉中的应用,其步骤是:

[0015] (1) 冷冻鸡胸肉采购于当地超市,解冻后放于4℃冰箱备用。24h内用于实验。对肉样进行预处理,用灭菌刀在无菌砧板上将鸡肉切成表面积为1cm<sup>2</sup>的肉块,并确保试验表面平整,肉块样重约1.5g。用75%的酒精擦拭一遍,用灭菌的培养皿装好肉样,置于超净台紫外灯下照灭菌处理20min,得到无菌肉样。

[0016] (2) 将肉样置于无菌培养皿中央,平放,平整的试验切面朝上,用移液枪取10<sup>5</sup>cfu/mL的宿主菌10 $\mu$ L随机滴加于肉表面,得到肉样上人工污染的宿主菌,为了使宿主菌充分吸附到样品表面,将肉样置于超净台中风干。

[0017] (3) 用噬菌体对肉样进行处理,取MOI=1000和MOI=10000的比例的噬菌体滴加于样品上,尽量覆盖住滴加宿主菌的位置。对照组为不加噬菌体液,滴加相同体积的PBS (pH=

7.2-7.4) 缓冲液。将装有样品的培养皿盖好,将样品分别置于4℃冰箱和25℃恒温箱中进行培养。试验重复2次,每次设2次平行。分别于 0、1、2、4、6h取样,加入1mL的PBS (pH=7.2-7.4) 缓冲液,将样品用无菌研磨棒研磨破碎,然后13000r/min离心10min。得到含有噬菌体的上清液和含有宿主菌的沉淀,分别稀释到合适的浓度进行双层平板计数和琼脂板涂布计数。

[0018] 一种沙门氏菌噬菌体LPSE34在火腿中的应用,其步骤是:

[0019] (1) 火腿肉采购于当地超市,放于4℃冰箱备用。42h内用于实验。对火腿进行预处理,用灭菌刀在无菌站板上将切成直径1.5cm,厚度2mm大小,并确保试验表面平整,火腿样重约1.5g。用75%的酒精擦拭一遍,用灭菌的培养皿装好样品,置于超净台紫外灯下照灭菌处理20min,得到无菌火腿样。

[0020] (2) 将样品置于无菌培养皿中央,平放,平整的试验切面朝上,用移液枪取 $10^3$ cfu/mL的宿主菌10μL随机滴加于火腿表面,得到样品上人工污染的宿主菌,为了使宿主菌充分吸附到样品表面,将火腿样置于超净台中风干。

[0021] (3) 用噬菌体对火腿进行处理,取MOI=1000和MOI=10000的比例的噬菌体滴加于样品上,尽量覆盖住滴加宿主菌的位置。对照组为不加噬菌体液,滴加相同体积的PBS (pH=7.2-7.4) 缓冲液。将装有样品的培养皿盖好,将样品分别置于4℃冰箱和25℃恒温箱中进行储藏。试验重复2次,每次设2次平行。分别于 0、1、2、4、6h取样,加入1mL的PBS (pH=7.2-7.4) 缓冲液,将样品用无菌研磨棒研磨破碎,然后13000r/min离心10min。得到含有噬菌体的上清液和含有宿主菌的沉淀,分别稀释到合适的浓度进行双层平板计数和琼脂板涂布计数。

[0022] 一种沙门氏菌噬菌体LPSE34和海藻酸钠-CaCl<sub>2</sub>体系结合形成复合可食用涂膜材料在鸡肉和火腿中的应用,其步骤是:

[0023] 将海藻酸钠粉末溶于效价为 $10^8$ pfu/mL的噬菌体溶液中(海藻酸钠终浓度比为2%,即将2g海藻酸钠粉末溶于100mL效价为 $10^8$ pfu/mL的噬菌体溶液中),静置放置过夜,除气泡。将直径2cm,厚度2mm大小的肉块或者火腿(含有 $10^3$ cfu/g的沙门氏菌,此时的含有人工污染的沙门氏菌的肉块或火腿已经完全风干)放到溶液中2min,然后取出沥去多余的海藻酸钠溶液,再放入氯化钙溶液中30s,然后取出放入无菌培养皿中。阳性对照组为不含有噬菌体的海藻酸钠溶液和用沙门氏菌处理过的样品,实验步骤如上。空白对照组只加菌液,不做其他处理。按照0、1、2、4、6h取样测菌数。

[0024] 与现有技术相比,本发明具有以下优点和有益效果:

[0025] (1) 噬菌体LPSE34为广谱型噬菌体,对20株沙门氏菌具有较强的杀菌效果,克服了噬菌体具有种型特异性的缺点,其灭菌应用范围更大。

[0026] (2) 噬菌体LPSE34具有良好的温度耐受性和pH耐受性,在实际生产中使用具有较宽的适用范围。

[0027] (3) 噬菌体LPSE34对8株耐药性沙门氏菌具有很好的裂解效果,随着抗生素的滥用导致超级细菌的出现,其可作为一种杀菌/抑菌的生物制剂来控制耐药性食源性病原菌对食品的污染。

[0028] (4) 经固体富集后的噬菌体原液效价高,在本发明中,噬菌体LPSE34的效价 $\geq 10^{10}$ pfu/mL。

[0029] (5)噬菌体LPSE34作为抑菌物质应用在食品中,既不会影响食品的质量和风味,又能快速高效地防控由沙门氏菌引起的食品污染。

[0030] (6)将噬菌体LPSE34作为抑菌物质和海藻酸钠结合形成复合可食用膜材料可以有效防控由沙门氏菌造成的肉制品的污染,使可食用涂膜发挥双重作用,使其既能从物理化学方面延缓肉制品的腐败变质,又能从抑制细菌的生长繁殖等微生物方面减慢肉制品的腐败变质。

## 附图说明

[0031] 图1为一种沙门氏菌噬菌体LPSE34双层平板噬菌斑图。

[0032] 图2为一种沙门氏菌噬菌体LPSE34的电镜观察图。

[0033] 图3为一种沙门氏菌噬菌体LPSE34的全基因组特殊序列图。

[0034] 图4:A为一种沙门氏菌噬菌体LPSE34对鼠伤寒沙门氏菌ATCC13311的裂菌图,

[0035] B为一种沙门氏菌噬菌体LPSE9对鼠伤寒沙门氏菌ATCC13311的裂菌图,

[0036] C为沙门氏菌噬菌体LPSE34和LPSE9对鼠伤寒沙门氏菌ATCC13311的宿主谱图。

[0037] 图5为一种沙门氏菌噬菌体LPSE34的温度耐受性图。

[0038] 图6为一种沙门氏菌噬菌体LPSE34的pH耐受性图。

[0039] 图7为一种沙门氏菌噬菌体LPSE34的吸附速率图。

[0040] 图8为一种沙门氏菌噬菌体LPSE34的一步生长曲线图。

[0041] 图9:在MOI=1000,10000时,一种沙门氏菌噬菌体LPSE34对鸡肉应用的杀菌结果图。

[0042] 图10:在MOI=1000,10000时,一种沙门氏菌噬菌体LPSE34对火腿应用的杀菌结果图。

[0043] 图11为一种噬菌体LPSE34与海藻酸钠-CaCl<sub>2</sub>体系相结合对鸡肉应用的杀菌效果图。

[0044] 图12为一种噬菌体LPSE34与海藻酸钠-CaCl<sub>2</sub>体系相结合对火腿应用的杀菌效果图。

## 具体实施方式

[0045] 下面结合实施案例来进一步说明本发明,但本发明要求保护的范围并不局限于实施例表述的范围。

[0046] 实施例1:

[0047] 一种沙门氏菌噬菌体LPSE34的分离筛选方法,其步骤是:

[0048] (1)样品采集:

[0049] 污水样品来自湖北省养猪场。

[0050] (2)噬菌体的分离:

[0051] 取污水样品10mL,用0.22μm微孔滤器过滤,分别放入装有20mL灭菌的TSB培养基(胰蛋白胨大豆肉汤培养基,该培养基的成分为:胰蛋白胨17.0g/L、大豆胨3.0g/L、氯化钠5.0g/L、磷酸氢二钾2.5g/L、葡萄糖2.5g/L、pH值7.3±0.2;该培养基的使用方法是:称取上述成分的TSB培养基30.0g,搅拌溶解于1000mL蒸馏水中,分装于试管或其它合适的容器

中,121℃高压灭菌20分钟备用)的 50mL灭菌离心管中,另加入对数生长期(培养6-8小时)的敏感指示菌菌液5mL。37℃振荡培养12-18h,使噬菌体增殖。

[0052] 所述的敏感指示菌为肠炎沙门氏菌ATCC13076。

[0053] 将上述培养液于50mL离心管中,以4℃下,10000×g离心10min,取上清液用0.22μm的滤膜过滤。按照上述方法反复富集三次,即加入灭菌的TSB培养基、加入对数生长期宿主菌菌液(敏感指示菌)培养6-8小时。

[0054] 采用点样法步验证:有明显空斑样品进一步采用双层平板法,经梯度稀释,观察噬菌斑形态。

[0055] (3)噬菌体的扩增培养和纯化:

[0056] 采用固体增殖法,在双层平板上观察噬菌斑的大小形态,挑选噬菌斑形态,大小均匀的单斑,接种于1mL的TSB液体培养基中,37℃,200r/min震荡培养 8h左右。4℃下,11000×g离心10min,0.22μm滤膜过滤除菌,得到澄清的TSB 液体培养基,即为纯化的噬菌体原液。然后再将纯化的噬菌体原液按照细菌平板划线的方法分离,重复上述步骤3~5次反复纯化噬菌体,直至得到大小较均一的噬菌斑,即为纯化的噬菌体。并利用双层平板法测定所分离噬菌体的效价。

[0057] (4)菌株的鉴定:

[0058] 噬菌体在固体平板上可形成较大透亮空斑,边缘清晰规则,直径大小为 0.1mm。

[0059] 经纯化的沙门氏菌噬菌体命名为:LPSE34,其形态特征为:头部呈二十面体,头部长度约为85nm×45nm,尾长约75nm,尾部直径约12.5nm,经鉴定该噬菌体为肌尾噬菌体科。

[0060] (5)噬菌体LPSE34的保藏:

[0061] 采用液体增殖法,以MOI值为1的比例分别加入效价为 $10^9$ pfu/mL噬菌体液10μL及菌数为 $10^8$ cfu/mL对应培养至对数期的宿主菌(ATCC13076)100μL,接种于5mL的TSB培养基中,37℃充分震荡过夜培养。在4℃条件下,11000×g 离心10min。取上清,用0.22μm滤膜过滤后分装至无菌EP管,此时噬菌体LPSE34 的效价 $\geq 10^9$ pfu/mL,采用-80℃(含18%甘油)保藏。

[0062] 发明人于2018年3月12日将该噬菌体LPSE34保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为湖北省武汉市武汉大学,保藏编号为CCTCC NO.M 2018121。

[0063] 该噬菌体LPSE34属于有尾噬菌体目,肌尾噬菌体科,头部呈二十面体,噬菌斑透亮清晰且无浑浊的晕环,裂解斑特征明显,纯化的噬菌体颗粒4℃保藏于 TSB培养基中效价稳定。其温度和pH耐受性均较高,能有效裂解沙门氏菌和耐药性沙门氏菌,并且在食品中的抑菌应用实验中也表明,其可作为一种生物制剂有效抑制裂解沙门氏菌。

[0064] 实施例2:噬菌体LPSE34宿主谱的测定

[0065] 实验选择沙门氏菌噬菌体LPSE34对20株沙门氏菌(鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028, ATCC1331, ATCCST-8, UK-1, SGSC4903, SL1344, X12341, 肠炎沙门氏菌ATCC13076, SJTUF10978, SJTUF10984, LK5-3820, SGSC4901, 伤寒沙门氏菌Ty2, CT18, Ty21a, 鸡白痢沙门氏菌C79-3, CVCC534和大肠杆菌D41, H10417, DH5α)做宿主谱分析。

[0066] 分别培养上述菌株(20株沙门氏菌)至对数期。待上层琼脂(0.7%TSA) 温度降至45℃时,取3mL上层琼脂与100μL对数期上述菌液混匀,倒入15mL 下层琼脂培养基(TSA)上。静置晾干约10min,待上层培养基凝固后,滴加 5μLLPSE34噬菌体液(LPSE34噬菌体液的制

备方法:取肠炎沙门氏菌 ATCC13076菌落接种于含有5mLTSB液体培养基的细菌瓶中,37℃培养8h,取100μL上述菌液于10mL新鲜TSB液体培养基中,再加入100μL于4℃保存的噬菌体LPSE34,混匀后37℃振荡培养箱中培养12-18h使噬菌体增殖;将增殖液于离心管中,11000×g离心10min去除细菌碎片,上清液用0.22μm滤膜过滤得噬菌体原液,效价约为10<sup>9</sup>pfu/mL),隔夜观察,隔夜观察是否有噬菌斑。

[0067] 结果如表一所示,噬菌体LPSE34具有较广的宿主范围,能裂解鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028,ATCC1331,ATCCST-8,UK-1,SGSC4903,SL1344,X12341,肠炎沙门氏菌 ATCC13076,SJTUF10978,SJTUF10984,LK5-3820,SGSC4901,伤寒沙门氏菌Ty2,CT18,Ty21a,鸡白痢沙门氏菌C79-3,CVCC534和大肠杆菌D41, H10417,DH5α等20株沙门氏菌。

[0068] 由噬菌体的宿主谱实验可以看出,该噬菌体为广谱性噬菌体,其克服了噬菌体具有种型特异性的缺点,其灭菌应用范围更大,可用于治疗多细菌的混合感染。

[0069] 表一:沙门氏菌噬菌体LPSE34的宿主谱表

宿主菌菌株名称	属	噬菌体 LPSE34 对宿主菌的裂解程度
Ty2	<i>Salmonella Typhi</i>	+++
CT18	<i>Salmonella Typhi</i>	+++
ATCC 13076	<i>Salmonella Enteritidis</i>	+++
SJTUF 10978	<i>Salmonella Enteritidis</i>	+++
SJTUF 10984	<i>Salmonella Enteritidis</i>	++
LK5-3820	<i>Salmonella Enteritidis</i>	++
SGSC4901	<i>Salmonella Enteritidis</i>	++
ATCC 14028	<i>Salmonella Typhimurium</i>	++
ATCC 13311	<i>Salmonella Typhimurium</i>	++
[0070] ATCC ST-8	<i>Salmonella Typhimurium</i>	++
SL1344	<i>Salmonella Typhimurium</i>	++
UK-1	<i>Salmonella Typhimurium</i>	++
SGSC 4903	<i>Salmonella Typhimurium</i>	+
H10417	<i>Escherichia coli</i>	+++
D41	<i>Escherichia coli</i>	+++
C79-3	<i>Salmonella pullorum</i>	+
CVCC534	<i>Salmonella pullorum</i>	++++
X12341	<i>Salmonella Typhimurium</i>	++
Ty21a	<i>Salmonella Typhi</i>	+++
DH5α	<i>Escherichia coli</i>	+++



[0071] 注：“+”表示噬菌体LPSE34对宿主菌的裂解程度，“+”越多，表示裂解程度越高。

[0072] 实施例3：噬菌体LPSE34在透射电子显微镜下的形态

[0073] 取保存的噬菌体做连续十倍梯度稀释，利用双层琼脂培养，选取长满噬菌斑的平板，将上层培养基用无菌棉棒刮取到15mL的TSB液体培养基中，37℃充分震荡培养3h。在4℃条件下，11000×g离心10min。取上清，用0.22μm滤膜过滤后分装至无菌EP管。超速离心1h，即得到效价 $\geq 10^9$  pfu/mL的噬菌体液。将铜网经过10-30s的等离子清洗，碳面朝上，将一块封口膜铺在冰盒上冷却，将铜网放在封口膜上冷却1-2min。将铜网碳面扣在样品液滴上吸附样品1min，用滤纸与铜网垂直接触吸掉多余液体，直至看不到残留液体，持续吸水10s。再将铜网碳面扣在PTA液滴上染色10min，用滤纸吸干，放在阴凉处自然干燥，即可电镜观察，平时保存也在阴凉处。在透射电镜下观察噬菌体形态，并用软件 Digital Micrograph Demo 3.9.1测量其大小。

[0074] 结果如图2所示，在电镜下观察，噬菌体LPSE34有六边形长头部，颈部，可收缩尾梢和尾丝，属于肌尾科病毒，T4噬菌体属。

[0075] 实施例4：噬菌体基因组的提取与全基因组denovo测序

[0076] 取1mL噬菌体LPSE34原液，加入脱氧核糖核酸酶DNase I (1mg/mL) 20μL，核糖核酸酶RNase A (10mg/mL) 20μL，用小型涡旋仪涡旋2min，37℃温育40min；加入20μL 2M ZnCl<sub>2</sub>，37℃温育7min，离心，10000rpm，1min；弃上清，加入 500μL TES buffer，吹吸后澄清透明的状态，无白色颗粒物，65℃15min（打散），加入10μL蛋白酶k (20mg/mL)，用枪头轻轻吹吸，上下颠倒，50℃温育1h，每隔10min上下颠倒一下，此时溶液是澄清的。温育后冷却，加入60μL预冷的3M CH<sub>3</sub>COOK（提前放4℃，用醋酸调pH至5.2），冰上放置15min。离心12000rpm，10min，4℃。取上清，加入600μL苯酚/氯仿/异戊醇（体积比为：25:24:1），上下轻柔反复颠倒200次，离心12000rpm，10min，常温，取上层液体，加入1 倍体积（约600μL）的异丙醇在-20℃沉淀DNA，上下颠倒后，有絮状物即是 DNA，放置过夜。冷冻离心，4℃，12000rpm，10min，弃上清。加入1mL 70%（体积比）乙醇洗一次，吹吸，在12000rpm，10min离心，弃上清，再离心一分钟，管子要按同一个方向，用白枪头小心吸取剩余乙醇，放在37℃培养箱至少风干40min，再加20μLTE在常温下溶解DNA，静置30min。测序工作交于测序公司完成。

[0077] 噬菌体LPSE34含有一条特异性核苷酸序列，如SEQ ID NO:1所示。

[0078] 在NCBI中通过BLAST进行全数据库比对不能发现高度相似的序列（scores  $\geq$  200），如图3所示。说明该噬菌体是一种新型噬菌体。

[0079] 实施例5：在MOI=100,10,1,0.1,0.01时，沙门氏菌噬菌体LPSE34和噬菌体LPSE9对鼠伤寒沙门氏菌ATCC13311的裂菌效果

[0080] 取对数期沙门氏菌ATCC13311菌液，梯度稀释至菌数在 $10^6$  cfu/mL。取噬菌体原液（LPSE34噬菌体液的制备方法：取肠炎沙门氏菌ATCC13076菌落接种于含有5mL TSB液体培养基的细菌瓶中，37℃培养8h，取100μL上述菌液于10mL 新鲜TSB液体培养基中，再加入100μL于4℃保存的噬菌体LPSE34，混匀后37℃振荡培养箱中培养12-18h使噬菌体增殖；将增殖液于离心管中，11000×g离心 10min去除细菌碎片，上清液用0.22μm滤膜过滤得噬菌体原液，效价约为 $10^9$  pfu/mL，噬菌体LPSE9的制备方法同噬菌体LPSE34一样）梯度稀释至  $10^8$  pfu/mL，分别按照MOI=100,10,1,0.1,0.01加入对应的实验组，并加入 100μL菌数为 $10^7$  cfu/mL对数期沙门氏菌菌液混匀。另设对照组（Control）加入 200μL TSB培养基；阳性对照组

(Positive Control):100 $\mu$ L对数期沙门菌菌液和 100 $\mu$ L TSB培养基;酶标仪设定: $\lambda=600\text{nm}$ ,Settle time:20ms,T=37.0 $^{\circ}\text{C}$ ,开机后至少稳定5分钟,每间隔1h测定OD600值的变化。

[0081] 结果如图4所示,3h后,与不加噬菌体的阳性对照组(Positive Control)相比,噬菌体LPSE34在不同MOI值下均表现出较好的抑菌能力。

[0082] 此处特别加入LPSE9进行对照说明以往的点斑法无法客观反映噬菌体的真实情况,需要通过裂解曲线的方法来测定噬菌体的真实裂解能力。如图4中的C图,噬菌体LPSE9对ATCC13311的宿主谱实验中,其噬菌斑较清澈透亮。而噬菌体LPSE9在不同的MOI值下对沙门氏菌ATCC13311均无抑菌能力。所以,在以往的专利中通过宿主谱/裂解谱的方法获得的噬菌体的裂解能力并不完全可靠,这也是已有噬菌体在我国依然无法真正进入生产环节的重要原因之一。

[0083] 实施例6:噬菌体热稳定性的测定

[0084] 将噬菌体原液稀释至 $10^7\text{pfu/mL}$ ,并分装于2个1mL无菌离心管中,每管各 500 $\mu$ L,将离心管分别放置于30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴锅中,每隔30min测定各管中噬菌体的效价,直至第60min。

[0085] 所述的噬菌体原液的培养方法如实施例4。

[0086] 结果如图5所示,噬菌体LPSE34在30-60 $^{\circ}\text{C}$ 效价稳定于 $10^7\text{pfu/mL}$ ,在70 $^{\circ}\text{C}$ 处理30min后,效价开始降低至 $10^4\text{pfu/mL}$ ,80 $^{\circ}\text{C}$ 处理60min后效价下降至为0,表明噬菌体LPSE34在30-60 $^{\circ}\text{C}$ 内稳定,表现出良好的稳定性。

[0087] 实施例7:噬菌体pH稳定性的测定

[0088] 以TSB液体培养基为介质,用NaOH和HCl调节pH值(2-13)。取已知效价(噬菌体LPSE34效价为 $10^7\text{pfu/mL}$ )的噬菌体原液100 $\mu$ L,加入到900 $\mu$ L不同 pH值的TSB液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1h后测定各离心管中噬菌体的效价。

[0089] 所述的噬菌体原液的培养方法如实施例4。

[0090] 结果如图6所示,LPSE34的活力在pH4-12的范围内相对稳定,具有较好的耐酸耐碱性。

[0091] 实施例8:噬菌体最佳感染复数

[0092] 按一定的MOI值(0.001,0.01,0.1,1,10,100)将噬菌体液与宿主菌悬液ATCC13076混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养3.5h。11000 $\times$ g离心10min,弃沉淀,用双层平板法测定不同MOI值样品中上清液的噬菌体的效价。同时以不加噬菌体液的纯培养的宿主菌(ATCC13076)和不加宿主菌(ATCC13076)的纯噬菌体液作为对照。

[0093] 结果如表二所示,表明噬菌体LPSE34的最适MOI值为0.001。

[0094] 表二:沙门氏菌噬菌体LPSE34的最佳感染复数

[0095]

LPSE34 MOI 值	宿主菌效价	噬菌体效价	3.5 h 后噬菌体效价
/	(CFU/mL)	(PFU/mL)	(PFU/mL)
100	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^8$	$1.00 \times 10^8$
10	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	$1.00 \times 10^9$
1	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$3.10 \times 10^7$
0.1	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$4.10 \times 10^8$
0.01	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^6$	$3.35 \times 10^8$
0.001	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^5$	$2.34 \times 10^9$

[0096] 实施例9:噬菌体的吸附速率

[0097] 按最适MOI值(0.001)将新鲜噬菌体液与宿主菌液(ATCC13076)各4mL混合于灭菌离心管中,置于37℃摇床培养。每隔5min中吸取100μL液体,12000r/min 离心2min后,做连续十倍梯度稀释,用双层平板法测定上清液中噬菌体的效价。

[0098] 结果如图7所示,噬菌体LPSE34在37℃温育5min后就有99%的噬菌体颗粒吸附到宿主菌,温育10min后,几乎所有的噬菌体都已吸附到宿主菌。

[0099] 实施例10:噬菌体的一步生长曲线

[0100] 将宿主菌(ATCC13076)培养至对数生长期。将噬菌体和宿主菌(ATCC13076)按最适MOI值(MOI=0.001),即1mL宿主菌(ATCC13076)悬液 $10^8$ cfu/mL, 10μL $10^7$ pfu/mL的沙门氏菌噬菌体LPSE34。37℃温育20min,在4℃的条件下,7000g/min离心2min,弃上清,用TSB液体培养基等体积重悬2次,弃上清。然后加入等体积TSB液体培养基。取100μL混匀液体加到10mLTSB液体培养基中,每隔10min中取样100μL,13000r/min离心30s。噬菌体做连续十倍梯度稀释,取合适的稀释梯度,用双层平板法测定上清液中噬菌体的效价。

[0101] 结果如图8所示,一步生长曲线结果显示噬菌体感染宿主菌的潜伏期约为10min,爆发期约50min,平均裂解量约为35.7pfu/cell。

[0102] 实施例11:噬菌体LPSE34对耐药性沙门氏菌宿主谱的测定

[0103] 实验选择沙门氏菌噬菌体LPSE34对8株耐药性鼠伤寒沙门氏菌893,1893,2238,2459,2088,2359,2069,2511,做宿主谱分析。将实验所用沙门氏菌增殖培养至对数期,纯化好的噬菌体备用。待上层琼脂温度降至46℃左右时,取3mL 上层琼脂与100μL对数期上述菌液混匀,倒入15mL下层琼脂培养基上。静置晾干约10min,待上层培养基凝固后,滴加5μL噬菌体液,隔夜观察是否有噬菌斑。

[0104] 结果如表三所示,实验中所用的耐药性鼠伤寒沙门氏菌对青霉素、青霉素类抗生素、头孢菌素、喹诺酮类等抗菌药耐药,而噬菌体LPSE34对多重耐药性鼠伤寒沙门氏菌具有较强的裂解能力,因此,噬菌体可以作为控制耐药性沙门氏菌的一种天然安全的理想工具。

[0105] 表三:沙门氏菌噬菌体LPSE34对耐药性鼠伤寒沙门氏菌的宿主谱表

[0106]

菌株名称	属	噬菌体 LPSE34 对宿主菌的裂解程度
893	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++
1893	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
2238	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
2459	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
2088	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
2359	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
2069	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
2511	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++

[0107] 注：“+”表示噬菌体LPSE34对宿主菌的裂解程度，“+”越多，表示裂解程度越高。

[0108] 实施例12：在4℃和常温25℃条件下，噬菌体LPSE34对鸡肉中的沙门氏菌的抑菌实验。

[0109] 冷冻鸡胸肉采购于当地超市，解冻后放于4℃冰箱备用。24h内用于实验。

[0110] 对肉样进行预处理，用灭菌刀在无菌砧板上将鸡肉切成表面积为1cm<sup>2</sup>的肉块，并确保试验表面平整，肉块样重约1.5g。用75%的酒精擦拭一遍，用灭菌的培养皿装好肉样，置于超净台紫外灯下照灭菌处理20min，得到无菌肉样。

[0111] 将肉样置于无菌培养皿中央，平放，平整的试验切面朝上，用移液枪取10<sup>5</sup>cfu/mL的宿主菌(ATCC13311) 10μL随机滴加于肉表面，得到肉样上人工污染的宿主菌，为了使宿主菌充分吸附到样品表面，将肉样置于超净台中风干。

[0112] 用噬菌体对肉样进行处理，取MOI=1000和MOI=10000的比例的噬菌体滴加于样品上，尽量覆盖住滴加宿主菌的位置。对照组为不加噬菌体液，滴加相同体积的PBS(pH=7.2-7.4)缓冲液。将装有样品的培养皿盖好，将样品分别置于4℃冰箱和25℃恒温箱中进行培养。试验重复2次，每次设2次平行。分别于0、1、2、4、6h取样，加入1mL的PBS(pH=7.2-7.4)缓冲液，将样品用无菌研磨棒研磨破碎，然后13000r/min离心10min。得到含有噬菌体的上清液和含有宿主菌(ATCC13311)的沉淀，分别稀释到合适的浓度进行双层平板计数和琼脂板涂布计数。

[0113] 由图9可知，当初始宿主菌数量为10<sup>3</sup>cfu/g时，4℃条件下，MOI=1000或MOI=10000时，实验组宿主菌数量呈现明显地下降趋势，作用4h后，实验组中宿主菌的数量下降都约为1.11(lg(cfu/g))，作用6h后，与对照组相比宿主菌数量下降约1.38(lg(cfu/g))，表明在4℃条件下，噬菌体对鸡肉中的沙门氏菌的抑菌效果较好。

[0114] 25℃条件下，MOI=1000或MOI=10000时，实验组宿主菌数量呈现明显地下降趋势，作用4h实验组中宿主菌的数量下降分别约为0.71(lg(cfu/g))和0.79(lg(cfu/g))，作用6h后，与对照组相比宿主菌数量下降分别约1.30(lg(cfu/g))和1.34(lg(cfu/g))，表明在25℃条件下，噬菌体对鸡肉中的沙门氏菌的抑菌效果较好。

[0115] 因此，噬菌体对鸡肉中两个不同温度的沙门氏菌的都有良好的抑菌效果。

[0116] 实施例13：在4℃和常温25℃条件下，噬菌体LPSE34对火腿中的沙门氏菌的抑菌实验。

[0117] 火腿肉采购于当地超市，放于4℃冰箱备用。42h内用于实验。对火腿进行预处理，

用灭菌刀在无菌站板上将切成直径1.5cm,厚度2mm大小,并确保试验表面平整,火腿样重约1.5g。用75%的酒精擦拭一遍,用灭菌的培养皿装好样品,置于超净台紫外灯下照灭菌处理20min,得到无菌火腿样。

[0118] 将样品置于无菌培养皿中央,平放,平整的试验切面朝上,用移液枪取 $10^5$ cfu/mL的宿主菌(ATCC13311)10 $\mu$ L随机滴加于火腿表面,得到样品上人工污染的宿主菌,为了使宿主菌充分吸附到样品表面,将火腿样置于超净台中风干。

[0119] 用噬菌体对火腿进行处理,取MOI=1000和MOI=10000的比例的噬菌体滴加于样品上,尽量覆盖住滴加宿主菌的位置。对照组为不加噬菌体液,滴加相同体积的PBS(pH=7.2-7.4)缓冲液。将装有样品的培养皿盖好,将样品分别置于4℃冰箱和25℃恒温箱中进行储藏。试验重复2次,每次设2次平行。分别于0、1、2、4、6h取样,加入1mL的PBS(pH=7.2-7.4)缓冲液,将样品用无菌研磨棒研磨破碎,然后13000r/min离心10min。得到含有噬菌体的上清液和含有宿主菌的沉淀,分别稀释到合适的浓度进行双层平板计数和琼脂板涂布计数。

[0120] 由图10可知,在4℃条件下,当初始宿主菌为 $10^3$ cfu/g,对照组宿主菌数量呈现上升趋势,在6h之后基本保持稳定;4℃条件下,MOI=1000或MOI=10000时,作用6h,与对照组相比宿主菌数量下降分别约为1.28(lg(cfu/g))和1.63(lg(cfu/g))。

[0121] 25℃条件下,MOI=1000时,作用6h,实验组中宿主菌数量下降0.865(lg(cfu/g))左右,与对照组相比宿主菌数量下降约1.27(lg(cfu/g))。

[0122] 25℃条件下,MOI=10000时,作用6h,实验组中宿主菌数量下降1.04(lg(cfu/g))左右,与对照组相比宿主菌数量下降约1.56(lg(cfu/g))。

[0123] 因此,噬菌体对火腿中两个不同温度的沙门氏菌的都有良好的抑菌效果。

[0124] 实施例14:在4℃和常温25℃条件下,噬菌体LPSE34和海藻酸钠-CaCl<sub>2</sub>体系结合形成复合可食用涂膜材料对鸡肉和火腿中的沙门氏菌的抑菌实验。

[0125] 将海藻酸钠粉末溶于效价为 $10^8$ pfu/mL的噬菌体溶液中(海藻酸钠终浓度为2%,即将2g海藻酸钠粉末溶于100mL效价为 $10^8$ pfu/mL的噬菌体溶液中),静置放置过夜,除气泡。将直径2cm,厚度2mm大小的肉块或者火腿(含有 $10^3$ cfu/g的沙门氏菌,此时含有人工污染的沙门氏菌的肉块或火腿已经完全风干)放到溶液中2min,然后取出沥去多余的海藻酸钠溶液,再放入氯化钙溶液中30s,然后取出放入无菌培养皿中。

[0126] 阳性对照组为不含有噬菌体的海藻酸钠溶液和用沙门氏菌处理过的样品,实验步骤如上。

[0127] 空白对照组只加菌液,不做其他处理。按照0、1、2、4、6h取样测菌数。

[0128] 由图11可以看出,在4℃条件下,MOI=10000时,单独使用噬菌体的和含有噬菌体的海藻酸钠溶液表现出相同的杀菌效果。作用6h,实验组中宿主菌数量下降0.70(lg(cfu/g))左右,与单独使用海藻酸钠的阴性对照组相比宿主菌数量下降约0.71(lg(cfu/g)),单独使用噬菌体组的菌量下降约为0.64(lg(cfu/g))。25℃条件下,含有噬菌体的海藻酸钠组的杀菌效果明显高于单独使用噬菌体组的杀菌效果。MOI=10000时,作用12h,实验组中宿主菌数量下降1.38(lg(cfu/g))左右,与空白对照组相比宿主菌数量下降约5.1(lg(cfu/g)),与单独使用海藻酸钠的阴性对照组相比宿主菌数量下降约4.95(lg(cfu/g))。实验证明,25℃条件下的杀菌效果要优于4℃条件下的杀菌效果。

[0129] 同样,由图12可以看出,含有噬菌体的可食用涂膜对火腿中的沙门氏菌的生长也

具有良好的抑制作用。

## 序列表

<110> 华中农业大学

<120> 一种沙门氏菌噬菌体LPSE34及其在食品中的应用

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 265

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
gatttttaaag aagttaatgc tcttggtgat aaactggagt atcatttctg gcaggtaccg 60
aatacaactg taactgtatg tgtggcaaca ctggatggct tccagttagg tgtaggtact 120
tctggttggtg ttgaccctgc agagttcaat gcagacatcg gcaaacaagt agctcaggac 180
aatgcgcttg cacaggctaa agaccaaadc tggttactga agggcgctgc tttacgcgtt 240
gatatgttcc caggcttcct gcagg 265
```

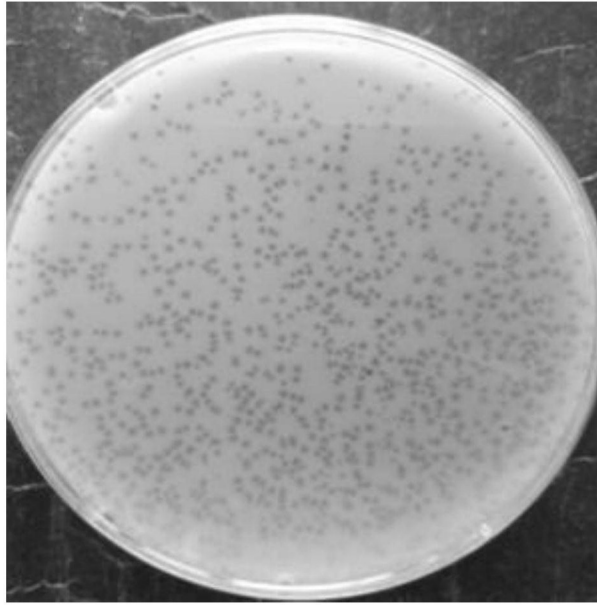


图1

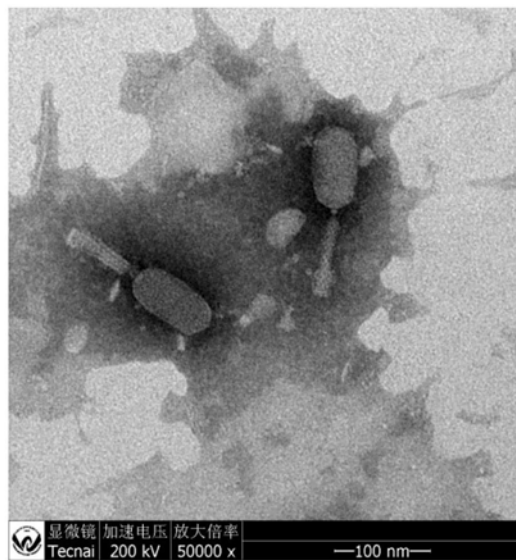


图2



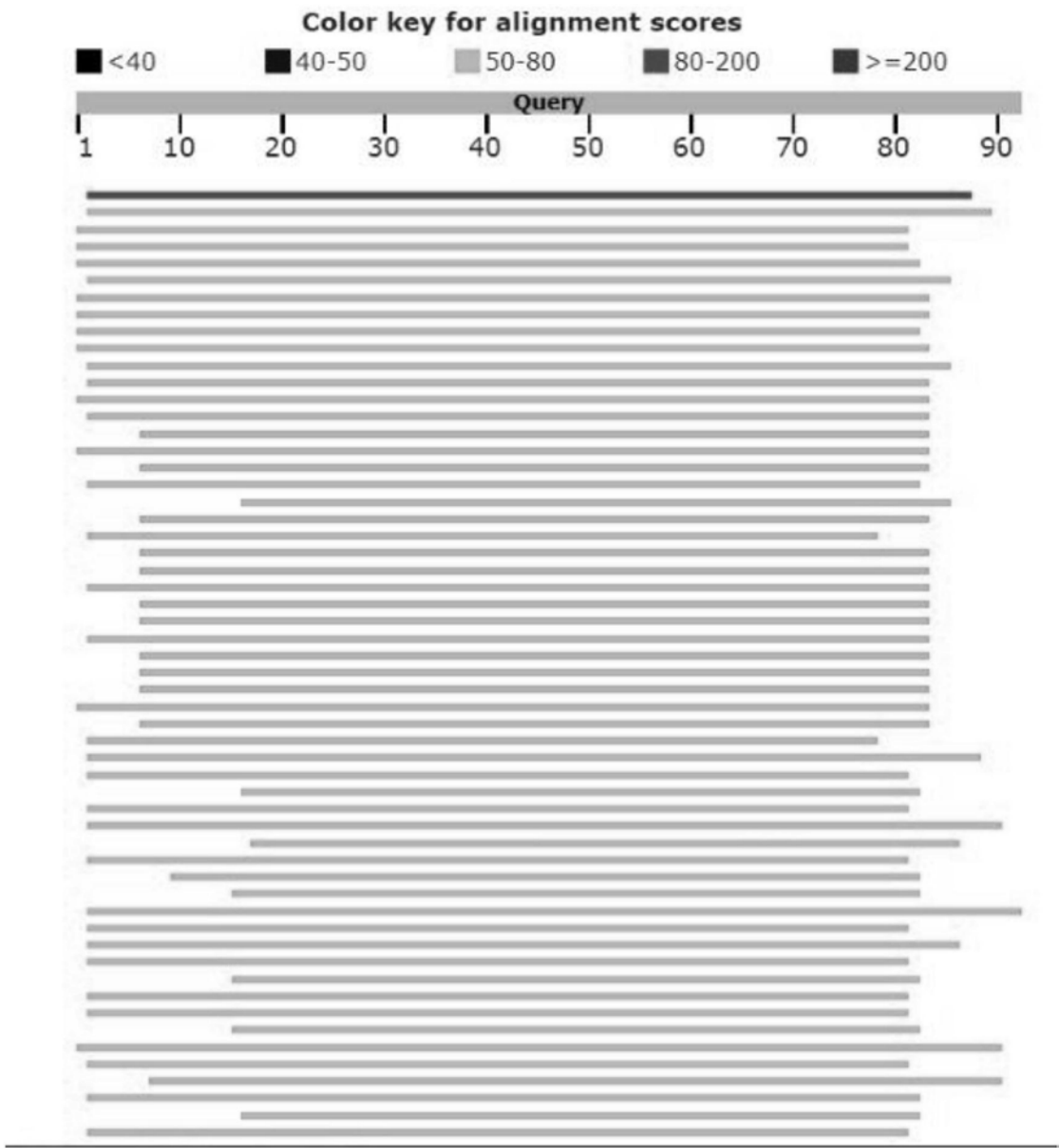
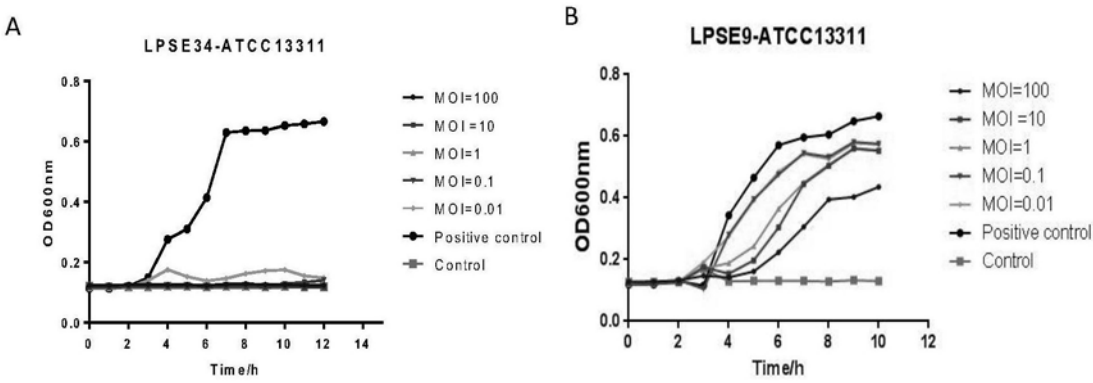


图3



C

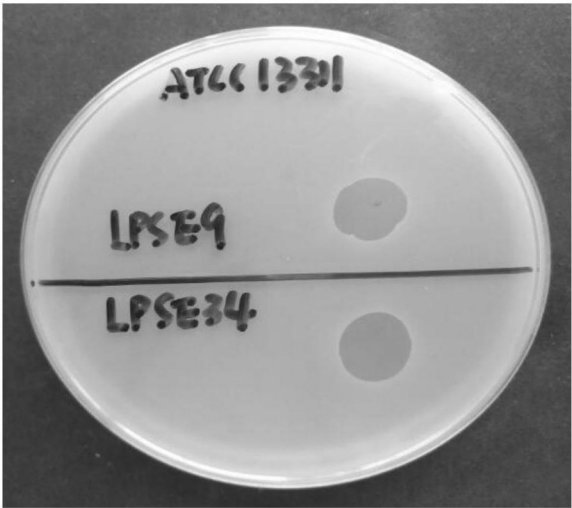


图4

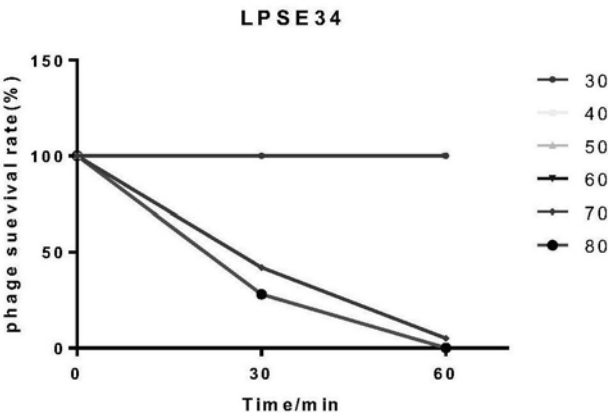


图5

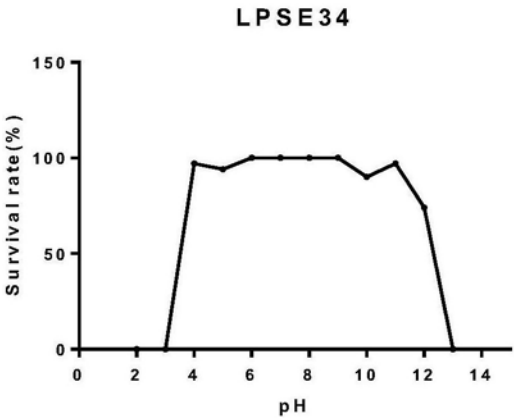


图6

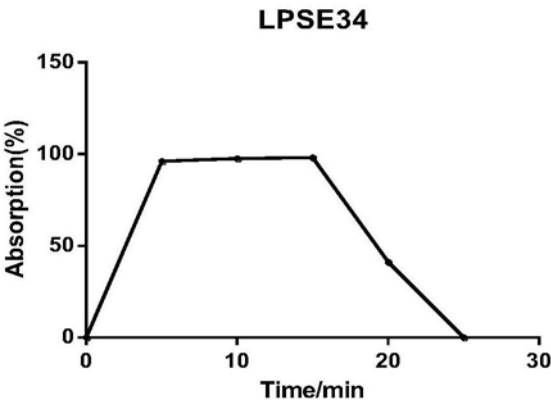


图7

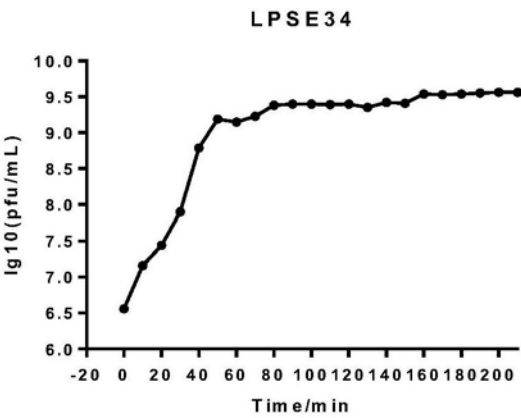


图8

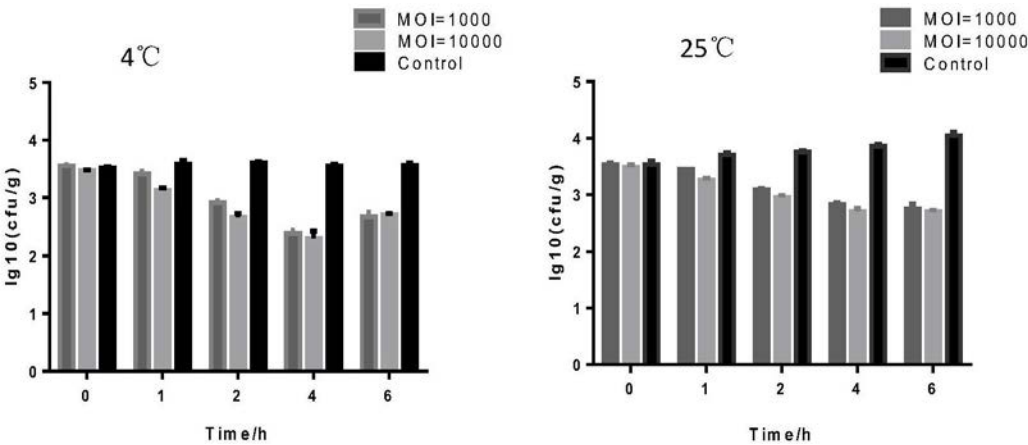


图9

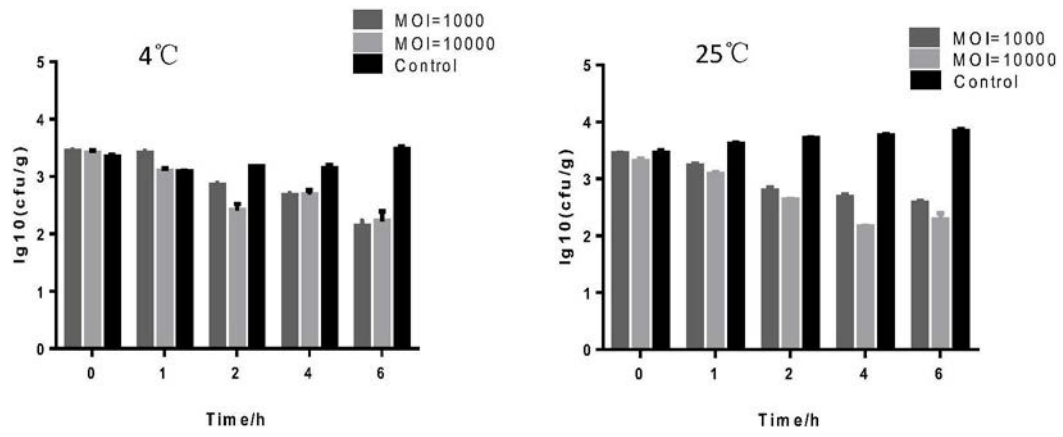


图10

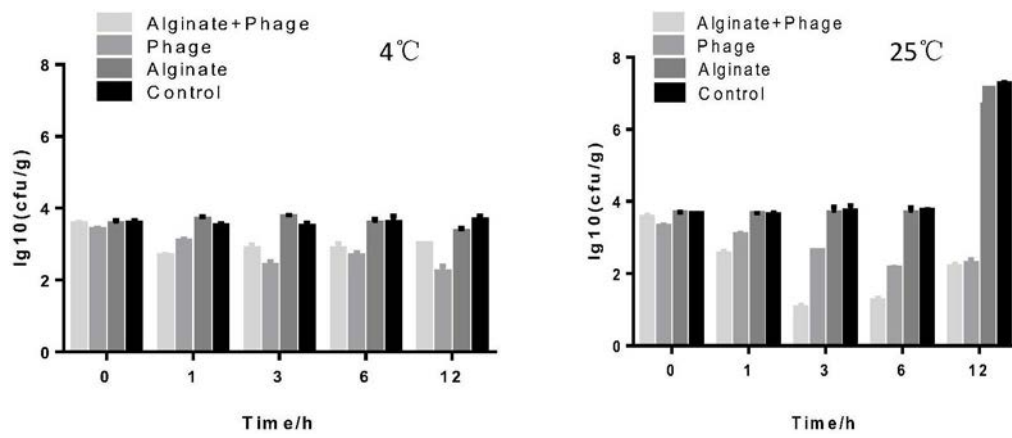


图11

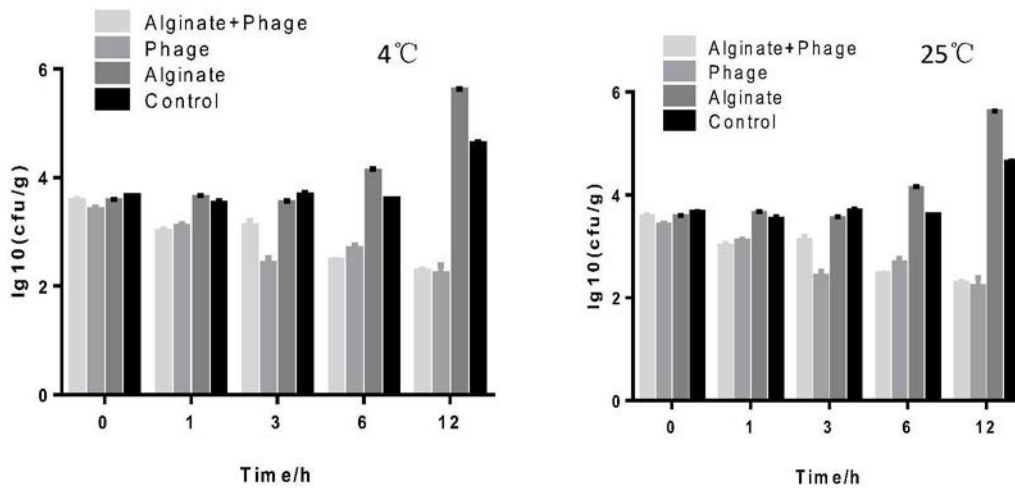


图12