



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110317793 A

(43)申请公布日 2019.10.11

(21)申请号 201910565092.0

C12R 1/92(2006.01)

(22)申请日 2019.06.27

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:M 2019300 2019.04.26

CCTCC NO:M 2019301 2019.04.26

(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 刘坤 周洋 杨甜

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 龚莹莹

(51)Int.Cl.

C12N 7/00(2006.01)

A23L 5/20(2016.01)

A23C 7/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表3页 附图5页

(54)发明名称

一种主效成分为噬菌体LPEE17和LPEK22的混合制剂及应用

(57)摘要

本发明涉及食品安全领域,具体公开了一种主效成分为噬菌体LPEE17和LPEK22的混合制剂及应用。本发明提供了两株大肠杆菌噬菌体LPEE17和LPEK22,均为烈性噬菌体,都可以裂解具有耐药性的大肠杆菌,其中LPEE17能够裂解大肠杆菌0157:H7,LPEK22既可以裂解大肠杆菌0157:H7,也可以裂解鼠伤寒和肠炎两种血清型的沙门氏菌。本发明中比较了LPEE17和LPEK22在牛奶和火腿肠这两种食品中单独和混合条件下对大肠杆菌EDL933的抑菌效果,其中混合噬菌体在食品中具有更好的抑菌效果,且具有显著的协同作用。

1. 一种噬菌体混合制剂,包括噬菌体LPEE17和噬菌体LPEK22,所述的噬菌体LPEE17的保藏编号为CCTCC NO:M 2019300,噬菌体LPEK22的保藏编号为CCTCC NO:M 2019301。
2. 权利要求1所述的噬菌体混合制剂在制备大肠杆菌抑菌剂中的应用。
3. 权利要求1所述的噬菌体混合制剂在制备沙门氏菌抑菌剂中的应用。
4. 权利要求1所述的噬菌体混合制剂在制备大肠杆菌和沙门氏菌抑菌剂中的应用。
5. 根据权利要求2或3或4中的应用,所述的抑菌剂用于食品。

一种主效成分为噬菌体LPEE17和LPEK22的混合制剂及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全领域,具体涉及一种主效成分为噬菌体LPEE17和LPEK22的混合制剂及应用,特别是在控制食品中大肠杆菌0157:H7和沙门氏菌中的应用。

背景技术

[0002] 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 常存在于温血动物 (也称为恒温动物) 的肠道和粪便中,其中部分大肠杆菌是致病性的,对食品安全具有较大的威胁。如大肠杆菌0157:H7,是一种常见的食源性病原菌,可以感染人类引起腹泻和出血性结肠炎等临床症状,在能引起人类患病的大肠杆菌中属于最常见的一种血清型。沙门氏菌 (*Salmonella*) 也是食品中常见的食源性病原菌,主要来源于家畜和野生动物的肠道以及动物源、植物源食品,可以通过畜肉、禽肉、蛋类、奶类及其制品等动物性食品媒介进行传播,引起人类感染患病,人们感染沙门氏菌后最常引起急性胃肠炎等疾病。近年来,耐药性问题加重了由细菌引起的疾病的预防和治疗难度,给全球公共健康和社会经济带来负担,引发了世界各国和地区的广泛关注和担忧。食源性致病菌是食品生产链中的关键危害因素之一,而抗菌药物的不正确使用和滥用则会导致食源性致病菌产生耐药性,具有耐药性的这些食源性病原菌会随着食品生产链进行传播,这样不仅提高了食品安全防控的难度,更增加了食源性致病菌对食品安全的危害程度。基于大肠杆菌和沙门氏菌对我国食品安全的威胁程度以及防控难度的不断加深,寻找一种更加合适的生物防控技术用于控制食品链中的大肠杆菌和沙门氏菌是很有必要的。噬菌体是一种侵染细菌的病毒,大量的研究表明,噬菌体可以用于食品中的生物防控,具有很好的发展前景。由于单一的噬菌体在应用时具有局限性,比如容易引起细菌产生抗性等,而混合噬菌体可以克服单一的噬菌体在应用时的缺点,因此,混合噬菌体的研究是当前噬菌体应用的一个发展趋势。

发明内容

[0003] 本发明的目的是在于,针对大肠杆菌0157:H7和沙门氏菌引起的食品安全事件,提供了一种噬菌体混合制剂,包括噬菌体LPEE17和噬菌体LPEK22,噬菌体LPEE17的保藏编号为CCTCC NO:M 2019300,噬菌体LPEK22的保藏编号为CCTCC NO:M 2019301。

[0004] 本发明的另一个目的是提供了一种噬菌体混合制剂的应用,该混合制剂可用于制备大肠杆菌和/或沙门氏菌的抑菌剂。

[0005] 为了达到上述目的,本发明采取以下技术措施:

[0006] 申请人从湖北省武汉市环境中筛选出两株大肠杆菌,分别为噬菌体LPEE17和噬菌体LPEK22,已于2019年4月26日保藏于中国典型培养物保藏中心,所述的LPEE17的分类命名为:大肠杆菌噬菌体LPEE17,其保藏编号为CCTCC NO:M 2019300;所述的LPEK22的分类命名为:大肠杆菌噬菌体LPEK22,其保藏编号为:CCTCC NO:M 2019301;地址:中国武汉武汉大学。

[0007] 本发明中的噬菌体LPEE17属于肌尾科噬菌体,具有长的收缩性尾部以及呈拉长的

二十面体结构的头部。尾部长度为 $81 \pm 2\text{nm}$ 、宽度为 $19 \pm 1\text{nm}$ ，头部长度为 $86 \pm 1\text{nm}$ 、宽度为 $68 \pm 5\text{nm}$ 。在 30°C 至 60°C 之间，pH 3至12之间保持活性。

[0008] 本发明中的噬菌体LPEK22属于肌尾科噬菌体，具有长的收缩性尾部和呈对称的二十面体结构的头部。尾部长度为 $74 \pm 2\text{nm}$ 、宽度为 $12 \pm 1\text{nm}$ ，头部直径为 $71 \pm 2\text{nm}$ 。在 30°C 至 60°C 之间，pH 4至12之间保持活性。

[0009] 一种由LPEE17和LPEK22组成的混合噬菌体在食品中的安全防控应用，包括在制备大肠杆菌0157:H7和/或沙门氏菌抑菌剂中的应用，优选的，用于食品中的大肠杆菌0157:H7和/或沙门氏菌的抑菌剂。

[0010] 与现有技术相比，本发明具有以下优点和有益效果：

[0011] (1) 噬菌体LPEE17和LPEK22具有很好的温度耐受性和pH耐受性，能够在多种不同的温度和pH条件下发挥抑菌作用。

[0012] (2) 在本发明中，噬菌体LPEE17和LPEK22在MOI为100、10、1、0.1、0.01、0.001的条件下对大肠杆菌0157:H7均有很好的抑菌效果。

[0013] (3) 由LPEE17和LPEK22组成的混合噬菌体可以用于食品中大肠杆菌0157:H7和沙门氏菌的生物防控。

[0014] (4) 由LPEE17和LPEK22组成的混合噬菌体对牛奶和火腿肠中的大肠杆菌0157:H7具有显著的协同抑菌作用。

附图说明

[0015] 图1为噬菌体LPEE17在双层琼脂平板上的噬菌斑照片和电镜照片。

[0016] 图2为噬菌体LPEK22在双层琼脂平板上的噬菌斑照片和电镜照片。

[0017] 图3为不同感染复数下LPEE17和LPEK22对大肠杆菌EDL933的裂解曲线以及LPEK22对肠炎沙门氏菌ATCC 13076的裂解曲线。

[0018] 图4为噬菌体LPEE17和LPEK22的温度耐受性结果。

[0019] 图5为噬菌体LPEE17和LPEK22的pH耐受性结果。

具体实施方式

[0020] 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。本发明所述技术方案，如未特别说明，均为常规技术；所述试剂或材料，如未特别说明，均来源于商业渠道。

[0021] 实施例1：

[0022] 大肠杆菌噬菌体的分离制备

[0023] (1) 噬菌体的分离：

[0024] 水样品取自湖北省武汉市华中农业大学校医院和湖北省武汉市洪山区洪山街道先建村。以*Escherichia coli* EDL933和*Escherichia coli* KCJ4201这2株大肠杆菌分别作为宿主菌分离噬菌体。

[0025] 将水样品于 4°C 下 $10000 \times g$ 离心10min，用滤纸进行初过滤，以除去采集的水样品中颗粒较大的杂质；然后将滤液于 4°C 下 $10000 \times g$ 离心10min，用 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜对上清液再次过滤，此滤液为初始水样品经过预处理后分离噬菌体时要用到的样品，放在 4°C 下保存。

在5mL LB液体培养基中接种宿主菌,37℃下培养使其达到对数期;取5mL水样品、2.5mL宿主菌液以及10mL LB培养基混合,在37℃的条件下,200r/min震荡培养12h至18h,使噬菌体增殖。将培养结束后的悬液 $10000\times g$ 离心10min,取上清液,用0.22 μm 的滤膜过滤,收集滤液。然后用点斑法确定上述步骤是否分离到噬菌体,具体步骤为:先用LA固体培养基倒下层平板,然后取100 μL 宿主菌液和4mL 0.7%LB半固体培养基混匀倒上层,待上层琼脂凝固后,滴加5 μL 上述滤液,37℃下培养,观察是否有噬菌斑。

[0026] (2) 噬菌体的增殖和纯化:

[0027] 在形成噬菌斑的双层平板的上层琼脂上用无菌的枪头挑取单个噬菌斑置于10mL含有100 μL 宿主菌液的LB液体培养基中,37℃,200r/min震荡培养8h至12h左右。4℃下 $10000\times g$ 离心10min,用0.22 μm 滤膜过滤,收集滤液,这一步得到的滤液即为增殖后的噬菌体原液。然后采取双层平板法,再次获得长有噬菌体的双层平板,具体步骤为:将噬菌体原液进行10倍梯度稀释,取100 μL 一定稀释度的噬菌体稀释液、100 μL 宿主菌液以及4mL 0.7%LB半固体培养基混匀,迅速倾倒下层琼脂(LA)平皿上,37℃下培养8h左右,再次获得长有噬菌体的双层平板。然后用无菌的枪头挑取单个噬菌斑置于含有100 μL 宿主菌液的10mL的LB液体培养基中,37℃,200r/min震荡培养8h至12h左右。4℃下 $10000\times g$ 离心10min,用0.22 μm 滤膜过滤,收集滤液,即为纯化一次后的噬菌体原液。重复上述纯化步骤3至4次。

[0028] 通过上述步骤,利用宿主菌*Escherichia coli* EDL933分离出了噬菌体LPEE17,利用*Escherichia coli* KCJ4201分离出了噬菌体LPEK22。

[0029] 申请人于2019年4月26日将这两株大肠杆菌噬菌体保藏于中国典型培养物保藏中心。LPEE17的分类命名:大肠杆菌噬菌体LPEE17,保藏编号为CCTCC NO:M 2019300;LPEK22的分类命名:大肠杆菌噬菌体LPEK22,保藏编号为CCTCC NO:M 2019301;地址:中国武汉武汉大学。

[0030] 实施例2:

[0031] 噬菌体裂解谱测定

[0032] 实验选择大肠杆菌噬菌体LPEE17和LPEK22对30株大肠杆菌和4株沙门氏菌共34株菌株进行裂解谱测定。

[0033] 其中,30株大肠杆菌具体为:

[0034] 1) 14株大肠杆菌0157:H7为:EDL933,KCJ4201,LEC12,LEC13,LEC14,LEC15,LEC16,LEC17,LEC18,LEC19,LEC20,LEC21,LEC25,LEC30;

[0035] 2) 其他的16株大肠杆菌为:Trans 10,DH5 α ,BL21 (DE3),F18ac,c83715,E97,K12,D41,H10417,LEC22,LEC23,LEC24,LEC26,LEC27,LEC28,LEC29;

[0036] 4株沙门氏菌为:

[0037] 1) 2株肠炎沙门氏菌ATCC 13076,SJTUF 10984;

[0038] 1) 2株鼠伤寒沙门氏菌ATCC 14028,ATCC13311。

[0039] 分别培养上述菌株至对数期,取100 μL 培养至对数期的菌液与4mL 0.7%LA半固体培养基混合,混匀后倒入预先制备好的LA固体琼脂平板上,待凝固且表面干燥后,取5 μL 增殖至约 10^9 PFU/mL的噬菌体滴加至下层琼脂表面,在室温下放置一段时间后置于37℃下,6-8h后观察噬菌体对受试菌株的裂解情况。

[0040] 如表一所示,噬菌体LPEK22既能裂解22株大肠杆菌(22/30,73.3%),其中包括12

株大肠杆菌0157:H7 (12/14, 85.71%), 也能裂解4株沙门氏菌 (4/4, 100%)。噬菌体LPEE17只能够裂解30株大肠杆菌中的24株 (24/30, 80.00%), 其中包括11株大肠杆菌0157:H7 (11/14, 78.57%), 不能裂解沙门氏菌。且两个噬菌体都可以裂解耐药大肠杆菌。12株大肠杆菌0157:H7的药敏实验结果如表二所示。

[0041] 表一:噬菌体LPEE17和LPEK22对34株菌株的裂解谱

[0042]	菌株名称	属	噬菌体对细菌的裂解程度	
			LPEE17	LPEK22

[0043]	Trans 10	<i>Escherichia coli</i>	++++	+++
	DH5 α	<i>Escherichia coli</i>	++++	++++
	BL21 (DE3)	<i>Escherichia coli</i>	++++	+++
	F18ac	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	c83715	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	E97	<i>Escherichia coli</i>	++	-
	EDL933	<i>Escherichia coli</i> ¹	++++	+++
	KCJ4201	<i>Escherichia coli</i> ¹	++++	++++
	K12	<i>Escherichia coli</i>	++++	+++
	D41	<i>Escherichia coli</i>	++	-
	H10417	<i>Escherichia coli</i>	++	-
	LEC12	<i>Escherichia coli</i> ^{1,2}	++	-
	LEC13	<i>Escherichia coli</i> ^{1,2}	+++	++++
	LEC14	<i>Escherichia coli</i> ^{1,2}	++++	++++
	LEC15	<i>Escherichia coli</i> ^{1,2}	+++	++++
	LEC16	<i>Escherichia coli</i> ¹	-	-
	LEC17	<i>Escherichia coli</i> ¹	++++	+++
	LEC18	<i>Escherichia coli</i> ¹	++++	++++
	LEC19	<i>Escherichia coli</i> ¹	+++	++++
	LEC20	<i>Escherichia coli</i> ¹	++++	+++
	LEC21	<i>Escherichia coli</i> ^{1,2}	++++	++++
	LEC22	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	LEC23	<i>Escherichia coli</i>	++++	++
	LEC24	<i>Escherichia coli</i>	++	+++
	LEC25	<i>Escherichia coli</i> ^{1,2}	-	+++
	LEC26	<i>Escherichia coli</i>	++	++++
	LEC27	<i>Escherichia coli</i>	++++	++++
	LEC28	<i>Escherichia coli</i>	++++	++
	LEC29	<i>Escherichia coli</i>	++++	++++
	LEC30	<i>Escherichia coli</i> ^{1,2}	-	+++
	ATCC 13076	<i>Salmonella Enteritidis</i>	-	++++
	SJTUF 10984	<i>Salmonella Enteritidis</i>	-	++++

[0044]	ATCC14028	<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	++++
	ATCC13311	<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	++++

[0045] 注:1.“+”表示噬菌体对菌株的裂解程度,“+”越多,表示噬菌体对细菌的裂解程度越高。

[0046] 2.*Escherichia coli*¹指该大肠杆菌的血清型为0157:H7;*Escherichia coli*^{1,2}指该大肠杆菌血清型为0157:H7,且为耐药菌株。

[0047] 表二:12株大肠杆菌0157:H7的药敏实验结果

[0048]

抗生素	大肠杆菌					
	LEC12	LEC13	LEC14	LEC15	LEC16	LEC17
氨苄西林	-	R	R	R	-	-
环丙沙星	R	R	R	R	-	-
左氧氟沙星	R	R	R	-	-	-
复方新诺明	-	R	R	R	-	-
氨苄西林/舒巴坦	-	-	-	-	-	-
哌拉西林/他唑巴坦	-	-	-	-	-	-
头孢唑林	-	-	-	-	-	-
头孢替坦	-	-	-	-	-	-
头孢他啶	-	-	-	-	-	-
头孢曲松	-	-	-	-	-	-
头孢吡肟	-	-	-	-	-	-
氨曲南	-	-	-	-	-	-
厄他培南	-	-	-	-	-	-
亚胺培南	-	-	-	-	-	-
阿米卡星	-	-	-	-	-	-
庆大霉素	-	-	-	-	-	-
妥布霉素	-	-	-	-	-	-
呋喃妥因	-	-	-	-	-	-

[0049] 备注:表格中“R”是指细菌对该抗生素具有抗性,“-”指细菌对抗生素没有抗性

	抗生素	大肠杆菌					
		LEC18	LEC19	LEC20	LEC21	LEC25	LEC30
[0050]	氨苄西林	-	-	-	R	-	R
	环丙沙星	-	-	-	-	R	-
	左氧氟沙星	-	-	-	-	-	-
	复方新诺明	-	-	-	-	-	R
	氨苄西林/舒巴坦	-	-	-	-	-	-
	哌拉西林/他唑巴坦	-	-	-	-	-	-
	头孢唑林	-	-	-	-	-	-
[0051]	头孢替坦	-	-	-	-	-	-
	头孢他啶	-	-	-	-	-	-
	头孢曲松	-	-	-	-	-	-
	头孢吡肟	-	-	-	-	-	-
	氨曲南	-	-	-	-	-	-
	厄他培南	-	-	-	-	-	-
	亚胺培南	-	-	-	-	-	-
	阿米卡星	-	-	-	-	-	-
	庆大霉素	-	-	-	-	-	-
	妥布霉素	-	-	-	-	-	-
	呋喃妥因	-	-	-	-	-	-

[0052] 备注:表格中“R”是指细菌对该抗生素具有抗性,“-”值细菌对抗生素没有抗性

[0053] 实施例3:

[0054] 噬菌体的形态观察

[0055] (1) 噬菌体在双层琼脂平板上的形态

[0056] 噬菌体LP EE17和噬菌体LP EK22为烈性噬菌体,在双层琼脂平板上形成了圆形的,透明的噬菌斑,其形状如图1中A和图2中A所示。

[0057] (2) 噬菌体在透射电子显微镜下的形态

[0058] 首先对噬菌体进行浓缩,具体步骤为:将噬菌体进行固体增殖,挑选长满噬菌斑的平板,用无菌棉棒将上层琼脂刮取到15mL的LB液体培养基中,37℃、200r/min震荡培养3h。培养结束后4℃下10000×g离心10min。取上清,用0.22μm滤膜过滤。在真空环境下40000r/min超速离心1h,弃上清,加入500μL醋酸铵溶液,得到效价 $\geq 10^{10}$ PFU/mL的噬菌体原液。在制备好高效价的噬菌体原液后,开始进行制样,具体步骤为:用无菌水清洗铜网,然后将铜网浸入高效价的噬菌体原液中,在冰上放置5min,用滤纸吸去多余的液体,用2%的PTA染液染色10min,待其自然干燥后采用透射电镜在75kV下观察。用图像处理软件ImageJ进行长度测量。

[0059] LP EE17在透射电子显微镜下的形态如图1中B所示,噬菌体LP EE17具有长的收缩性尾部以及呈拉长的二十面体结构的头部。尾部长度为 81 ± 2 nm、宽度为 19 ± 1 nm,头部长度为 86 ± 1 nm、宽度为 68 ± 5 nm。根据国际病毒分类委员会ICTV发布的第九次病毒分类报告,噬菌

体LPEE17属于有尾噬菌体目肌尾科。

[0060] LPEK22在透射电子显微镜下的形态如图2中B所示,噬菌体LPEK22具有长的收缩性尾部和呈对称的二十面体结构的头部。尾部长度为 $74\pm 2\text{nm}$ 、宽度为 $12\pm 1\text{nm}$,头部直径为 $71\pm 2\text{nm}$ 。根据国际病毒分类委员会ICTV发布的第九次病毒分类报告,噬菌体LPEK22属于有尾噬菌体目肌尾科。

[0061] 实施例4:

[0062] 噬菌体基因组测序

[0063] 利用Illumina公司生产的Miseq测序仪对噬菌体进行高通量测序。

[0064] 将LPEE17和LPEK22的基因组在NCBI上进行核酸序列比对,结果表明,LPEE17与Escherichia phage vB_EcoM_PhAPEC2、Shigella phage Shf125875、Escherichia phage SF、Escherichia phage p000v比对的覆盖率分别为94%、95%、95%、90%,一致性分别为97.60%、98.20%、96.82%。LPEE17基因组具有如SEQ ID NO:1所示的特异性核酸序列。

[0065] LPEK22与噬菌体Salmonella phage BSP101、Salmonella phage S117、Escherichia virus CBA120、Salmonella phage S8比对的覆盖率分别为94%、96%、94%、96%,一致性分别为98.22%、99.04%、97.08%、98.63%。LPEK22编码的尾丝蛋白和尾刺蛋白的基因与这几个相似性较高的噬菌体具有较大的差异,其中一个编码尾丝蛋白的基因ORF41的核酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0066] 两株噬菌体的基因组注释结果和比较基因组分析结果表明,两株噬菌体均与对应的基因组相似性较高的噬菌体在编码与结构组装、DNA复制以及调控等功能上的基因有一定的差异,特别是编码尾丝蛋白和尾刺蛋白的基因不同。表明两株噬菌体均为新的噬菌体。

[0067] 另外,对其基因组进行毒力因子和耐药基因的分析,没有发现编码与毒力或耐药性相关的基因,结果表明将该混合噬菌体应用于食品中的生物安全防控中没有潜在的安全风险。灶

[0068] 实施例5:

[0069] 在MOI=100,10,1,0.1,0.01,0.001时两株噬菌体对大肠杆菌EDL933以及肠炎沙门氏菌ATCC 13076的裂解曲线

[0070] 调整宿主菌EDL933的菌浓度为 10^6CFU/mL 。将噬菌体原液梯度稀释至不同的稀释度,备用。在96孔板中,分别按照MOI=100、10、1、0.1、0.01、0.001加入不同稀释度的噬菌体100 μL ,并与100 μL 菌数为 10^6CFU/mL 的菌液混匀。阳性对照组:加入100 μL 对数期沙门菌菌液和100 μL LB培养基;酶标仪参数设定:测定波长设置为600nm,温度设置为37.0 $^{\circ}\text{C}$,每隔1h测定OD值。

[0071] 噬菌体LPEE17和LPEK22对大肠杆菌EDL933的裂解曲线如图3所示,与不加噬菌体的阳性对照组相比,在8h以内,不同MOI下的所测的OD值都相对稳定在较低水平,表明噬菌体LPEE17和LPEK22对大肠杆菌EDL933的生长具有抑制作用;

[0072] 噬菌体LPEK22对肠炎沙门氏菌ATCC 13076的裂解曲线如图3所示,与不加噬菌体的阳性对照组相比在5h以内,不同MOI下所测的OD值都稳定在较低水平,表明LPEK22对肠炎沙门氏菌ATCC 13076的生长具有抑制作用。

[0073] 实施例6:

[0074] 噬菌体的温度耐受性的测定

[0075] 将噬菌体原液稀释至 10^8 PFU/mL,并分装于2个无菌离心管中,每管各500 μ L,将离心管分别放置于30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃的恒温水浴锅中,分别在30min和60min后测效价。

[0076] 噬菌体LPEE17的温度耐受性测定结果如图4中A所示。结果表明,噬菌体LPEE17具有很好的温度耐受性,在30℃至60℃时保持活性。

[0077] 噬菌体LPEK22的温度耐受性测定结果如图4中B所示。结果表明,噬菌体LPEK22具有很好的温度耐受性,在30℃至60℃时保持活性。

[0078] 实施例7:

[0079] 噬菌体的pH耐受性的测定

[0080] 以LB液体培养基为介质,用NaOH和HCl调节pH值(2-13)。取已知效价的噬菌体原液100 μ L,加入到900 μ L不同pH值的LB液体培养基中,37℃水浴1h后测定各离心管中噬菌体的效价。

[0081] 噬菌体LPEE17的pH耐受性测定结果如图5中A所示,噬菌体LPEE17的具有较好的酸碱耐受性,在pH为3至12时保持活性。

[0082] 噬菌体LPEK22的pH耐受性测定结果如图5中B所示,噬菌体LPEK22的具有较好的酸碱耐受性,在pH为4至12时保持活性。

[0083] 实施例8:

[0084] 两株噬菌体单独和混合时在牛奶中对大肠杆菌EDL933的抑菌效果探究。

[0085] 取脱脂奶粉10g溶于100mL蒸馏水中,115℃高压灭菌15min,备用。在2mL的EP管中加入900 μ L的已灭过菌的牛奶,然后加入10 μ L浓度为 10^6 CFU/mL的EDL933菌液。对照组中不加噬菌体,加入100 μ L的PBS缓冲液,实验组按照MOI=100和MOI=1000的比例加入100 μ L对应效价的单个噬菌体或者混合噬菌体(将效价均在8次方左右的LPEE17和LPEK22进行等体积混合)。将样品分别置于4℃和25℃中进行培养。以加入噬菌体的时刻为起始时刻,分别于0h、1h、3h、6h、9h、12h取样,离心后取上清液稀释到合适的浓度,采用平板计数法测细菌的数量。

[0086] LPEE17在牛奶中的应用试验结果:与对照组相比,在12h时,MOI=100和MOI=1000两个实验组在25℃下活菌数分别下降了5.385Log₁₀CFU/mL和5.67Log₁₀CFU/mL,下降幅度分别为71.47%和75.25%。在4℃下活菌数分别下降了0.55Log₁₀CFU/mL和1.265Log₁₀CFU/mL,下降幅度分别为15.80%和36.35%。

[0087] LPEK22在牛奶中的应用试验结果:与对照组相比,在12h时,MOI=100和MOI=1000两个实验组在25℃下活菌数分别下降了4.745Log₁₀CFU/mL和5.915Log₁₀CFU/mL,下降幅度分别为60.33%和75.21%;在4℃下活菌数分别下降了0.265Log₁₀CFU/mL和1.525Log₁₀CFU/mL,下降幅度分别为0.07%和39.77%。

[0088] 混合噬菌体在牛奶中的应用试验结果:与对照组相比,在25℃下MOI=1000时1h内活菌数从3.73Log₁₀CFU/mL降低至0,下降幅度为100%;在12h时,MOI=100实验组中活菌数下降了5.685Log₁₀CFU/mL,下降幅度为71.42%。在4℃下MOI=100和MOI=1000实验组活菌数分别下降了0.41Log₁₀CFU/mL和2.59Log₁₀CFU/mL,下降幅度分别为10.96%和69.25%。

[0089] 以上结果表明,在4℃和25℃下,混合噬菌体在牛奶中的抑菌效果比单一的噬菌体的抑菌效果更好,具有显著的协同作用。

[0090] 实施例9:

[0091] 两株噬菌体单独和混合时在火腿肠中对大肠杆菌EDL933的抑菌效果探究。

[0092] 用无菌的刀将火腿肠肠切成边长为1cm的方片。取等体积的效价为 10^9 PFU/mL噬菌体LPEE17和LPEK22进行混合,涡旋混匀后置于4℃下备用。将样品置于无菌培养皿中央,取 10^6 CFU/mL的EDL933菌液10μL滴加在样品的表面,放置10min。对照组中不滴加噬菌体,滴加10μL的PBS缓冲液,实验组按照MOI=100和MOI=1000的比例取10μL对应效价的单个噬菌体或混合噬菌体(将效价均在8次方左右的LPEE17和LPEK22进行等体积混合)滴加在样品表面。将样品分别置于4℃和25℃中进行培养。以加入噬菌体的时刻为起始时刻,分别于0h、1h、3h、6h、9h、12h取样,加入1mL的PBS缓冲液,将样品用无菌研磨棒研磨,涡旋。离心后取上清液稀释到合适的浓度,采用平板计数法测细菌的数量。

[0093] LPEE17在火腿肠中的应用试验结果:与对照组相比,在12h时,MOI=100和MOI=1000两个实验组在25℃下活菌数均下降 $2.355\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度都为30.22%;在4℃下活菌数分别下降 $0.505\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 和 $0.865\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度分别为14.45%和24.75%。

[0094] LPEK22在火腿肠中的应用试验结果:与对照组相比,在12h时MOI=100和MOI=1000两个实验组在25℃下活菌数分别下降了 $0.475\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 和 $1.095\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度分别14.77%和34.06%;在4℃下活菌数分别下降了 $1.255\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 和 $1.075\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度分别为33.07%和28.33%。

[0095] 混合噬菌体在火腿肠中的应用试验结果:与对照组相比,在12h时,MOI=100和MOI=1000两个实验组在25℃下活菌数分别下降了 $1.19\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 和 $2.005\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度分别26.95%和45.41%;在4℃下活菌数分别下降 $0.975\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 和 $2.045\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度分别为24.47%和51.32%。

[0096] 以上结果表明,在4℃和25℃下,混合噬菌体在火腿肠中的抑菌效果比单一的噬菌体的抑菌效果更好,具有显著的协同作用。

[0097] 实施例10:

[0098] LPEK22单独或者与LPEE17混合在牛奶中对肠炎沙门氏菌ATCC 13076的抑菌效果探究。

[0099] 具体方法见实施例8。

[0100] LPEK22单独在牛奶中的应用试验结果:与对照组相比,在12h时,MOI=1000和MOI=10000两个实验组在25℃下活菌数分别下降了 $1.295\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 和 $1.38\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度分别18.21%和19.41%;在4℃下活菌数分别下降 $1.33\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 和 $1.355\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度分别为30.79%和31.37%。

[0101] LPEK22与LPEE17混合时在牛奶中的应用试验结果:与对照组相比,在12h时,MOI=1000和MOI=10000两个实验组在25℃下活菌数分别下降了 $1.445\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 和 $1.385\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度分别20.28%和19.44%;在4℃下活菌数分别下降 $1.38\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ 和 $1.315\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$,下降幅度分别为32.59%和31.05%。

[0102] 以上结果表明,在4℃和25℃下,噬菌体LPEK22单独或者混合时在牛奶中对肠炎沙门氏菌ATCC 13076均有较好的抑菌效果。

序列表

<110> 华中农业大学

<120> 一种由噬菌体LPEE17和LPEK22组成的混合制剂及应用

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 850

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 1

```

agcgagaaat aatatgaaag acctacctgc cataacatat ccaggtgcaa aacataagta 60
tatgccatTT attagacaat tttcaaaccg ctttgacaac gataagcctg ttttggatgc 120
tttttTgtTgt ggtcttggat tttctatgaa ttgtcagaga gatgttatat gtaatgatat 180
taatactcct cttatagata tgtataacaa gatgaaatta tcttcaatta atgatatagt 240
tcaaattatt gaagacttta atttgaatga caaagattca gcaccttttt ataactctgtc 300
aaaagaatac gataaaacca aaaacggatt atatctttat gttttacatt tattttcatt 360
cagttcgtta atccgatttt ctagtaatgg aaattataac gcggcttttcg ccaatagagc 420
caagtattcc agaacttctt ttaacaagtc tcaacaggat aaattttctg aattttaaaaa 480
tagacagcac cgattttacat ttagtaataa atcattcaga gatttggatt ttgaaaacaa 540
aaattttattc attgaccacac catatctttc tactaaattt aaatattcag gctgggaaga 600
aaaggatgaa ttagaattat tagacaaaat taaacaatca aagtctaaat ttattatcac 660
taataatcta tcagacgata ttaacaatta tattttaaaa gattgggcac tttctaataa 720
tttcaaaaatt gaatatTTTg aaaccatgta taggaagcaa aagaaaggTg catcatttca 780
gactgaagtG cttatacaca atatgtgatt aaataattta aatctataat aagcgagaat 840
aatatgtcta 850

```

<210> 2

<211> 3504

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<400> 2

```

atggccaaca aaccaacaca gcctcttttc ctttgggtt tagaaacttc tgagtcttcg 60
aacataaaaag gtttcaacaa ctccggcact attgagcatt cccctggTgc cgtaatgaca 120
tttcctgaag atactgaagt tacaggtctt ccatcttctg tacgttacia tcctgatagt 180
gatgaattTg aaggttatta cgaaaacggT ggttggTgt ctttgggggg cggtggaata 240
cgctgggaaa cgctccctta cgctccctct agcaattTgt tagaaggTcg tggttatctc 300
attaataata ccacaggGac atctacagtG gttctccctt cccctacGcg tattggggat 360
tccgttacta tttgtgatgc ttatgggaaa tttgccactt acccattgac cgtgtctcct 420
tctggaaata atttgtatgg ctccactgaa gacatggcta taacaactga taacgtatca 480

```

gcaacgttca cttgggtctgg acctgaacaa ggttgggtta tcacatccgg cgtcggtctt 540
 ggccaaggcc gtgtctacag tcgtgaaatc tttacacaaa ttttggcgtc tgaaacaagt 600
 gctgtcactc tcaatactcc accaacaatc gtggacgtgt atgctgacgg aaaacgtctt 660
 gcggaatcca aatattcact agatgggaat gtaatcactt tcagtccttc tttgccagcc 720
 aacacagaac ttcaggtgat tgaatatact ccgattcaat tgggtaatgg cgggtggttct 780
 ggttcttctc cgattacctg ggtctataat gggggttcag cgattggcgg tgaaaccgaa 840
 atcacgttag acatcgttgt tgatgatgtt ccggccattg atataaacgg aagtcgccag 900
 tataaaaaatc tggggttcac attcgatcca ttaaccagta aatcactct tcgcgaagaa 960
 ctggatgcag aggatgaagt tgttgtaatt atcaatggaa cgccaaacat ctataatcaa 1020
 attgattata ctttgcggga agtggctcgt gtaaccaatg ttaaagatac agaggtcgtt 1080
 tatttttagtg ttggtgctgt gttaagcggg tataaagtta tctacgataa aataacacag 1140
 agatcatatt ttattccaga gttaccgact ggaaccacgg cagtcagcct tagttcttcg 1200
 gctgtgcttg tacattctgc tggtagtggt gatctggcg cattagctgt atctcgtgaa 1260
 gaatatgtta ccttggctgg gacatttgat tctggtgctg tcatcaatac taaaaatgaa 1320
 ttactcacc atactgatgg aaagtatcgt tgggatggta cacttcctaa aactgtagct 1380
 gctggctcaa cacctgcaac aactggaggc gttggttcgg gagcgtggtt gagtgttggt 1440
 gatgccactg cccgccagtg ggtagctaata aattatatca atagtaaatt cgagaagttt 1500
 gggctcttct tgcaaggttc agttttaacc accaacgagc aagctcttgt tgattcaagt 1560
 ggtcttttct ggggttaaata tgggtctata caaagtgggt gttatacagt agcgccggga 1620
 actgttccag actatcccga tttttactgt gttggatatt taacagatta tgattggcag 1680
 tctgttacia actgggggtgc tgataacaac tattctatcg cagataagat cgggtgtagac 1740
 gcggtcgatg ctataaacct cgcaggttat catgcggaga aacgtgcgga actattcgga 1800
 tcccagcaag ttgtcatggt tcctgctggc atttatctgt tggataaaac gactcttggt 1860
 gaaggcacgg cgcattggtt gactatttat cgtaatcagg aagttatgat ttttcttcgc 1920
 aacaacgtta ctttcatcgg cgatggcgac gcaacgttac tgtatgttgc cgatggtgtt 1980
 gttgagcgca ataaggaaaa cgggggcact aaaggcttg tagttttcgg tgatggtatt 2040
 cgtgaaattc agaacgcata tgtccacgat atgctaattg atgaaaatgg tgacaataac 2100
 cttgtccgc cattgaactg gtctggagca caagctcatt gtccagcagt agcttggttac 2160
 gaaggtagta atggtgtgac tgtttctgga gttaacgtca agaattgctc tgggtgcaaac 2220
 gtaatggtat tccaggaagc tcaggcagcg ttcaacagct acaatacgcg tgtagagaat 2280
 tgcaacttct atcgcggtgc tgacgctgtg actggaaaca gtaacctaat agaccactca 2340
 tcaataagaa ttcatccga tggtacgtt ataaataacg ttaaattgat ccagccaacc 2400
 atgtcagaca tgtgtacggt atttgagtgt catggtaatg ggatcgttga tggatgcac 2460
 accaaaaaag ctgctaccc attcctgaag gctaacgac gtgctacac gacatctata 2520
 gtcaccttca caaataacgt ctgtgaggac gcaggtagtg ctttggttct ggataccgta 2580
 cctaactgta caactgttgc cagatttatt ggtaatactg taacgctacg atcagaaaag 2640
 caagttatcg ggtatcctaa tactgcggca ttcacaacac agcagccgct tgttttgtca 2700
 tctgacccaa ccactattaa tgcaattatt tactctgcaa ataataacat attgcaaaaa 2760
 aacagagccg cagattggac aactgaacaa aaagctgcaa acgttgctta tgacctggac 2820

tattttcaaag aagttgtag tgaaaataac actttctcag gtttttgggg gtgtgttcgc 2880
ttgggtaaac aaaaaacagg tgctactttc aacagcaatg actcttttgt ctcttgcggg 2940
accaacgggtt cacctcaatt atcagacaac acagccataa ggtttaccaa taaatttgcc 3000
aacgattatc ttgttcacct tgatgaaatg catattaaat ggaatatgac aaaatgtcag 3060
tttggtgggtg tcctgggttt attgcaacaa gcagcaggag tgactgttgg tgttggtgcaa 3120
ttcactgctg atattaaaac agatagatgg atgcatccag cgcttgggat agctccacta 3180
tccgtacagg attactactt caacattgat gtatacagt atgtgaatac cagtgaacct 3240
ttatacggat acgctggtat tcatgggcaa attaattgtg actcgccaac tcaaccatat 3300
gttaaacaat ttacaaaata caaaccaaac acccagaatg gatggtggtt taaaggcatt 3360
ttagcaactg acacaacttc tgttcctgac aggcttttg gtaatgcgtc tggtgacaga 3420
tatgatgtta ttgctggggc atcaaatatt ttcgggtatc gacataatgg tacaacatgg 3480
gatgcaatga aatttacatc atag 3504

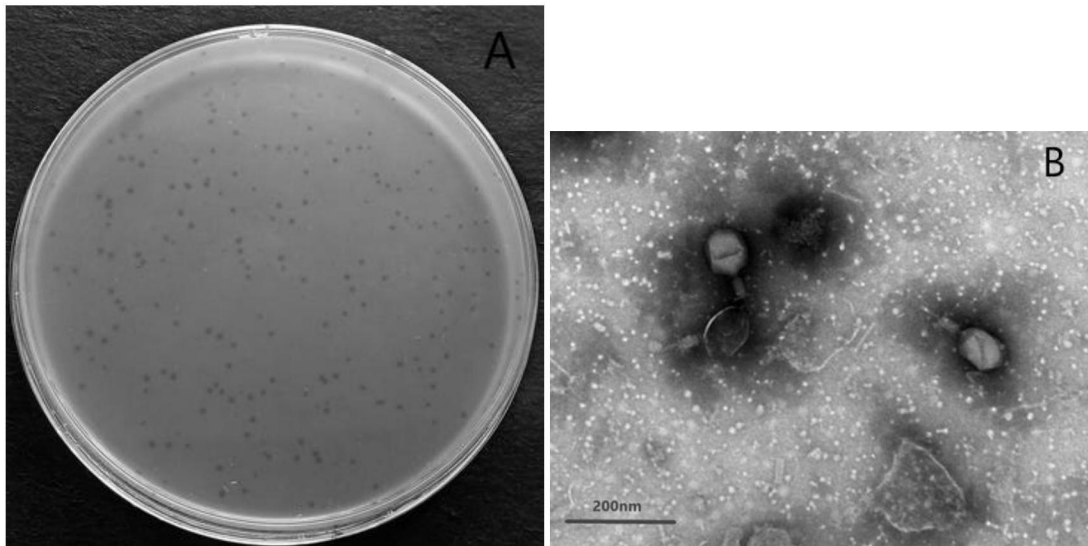


图1

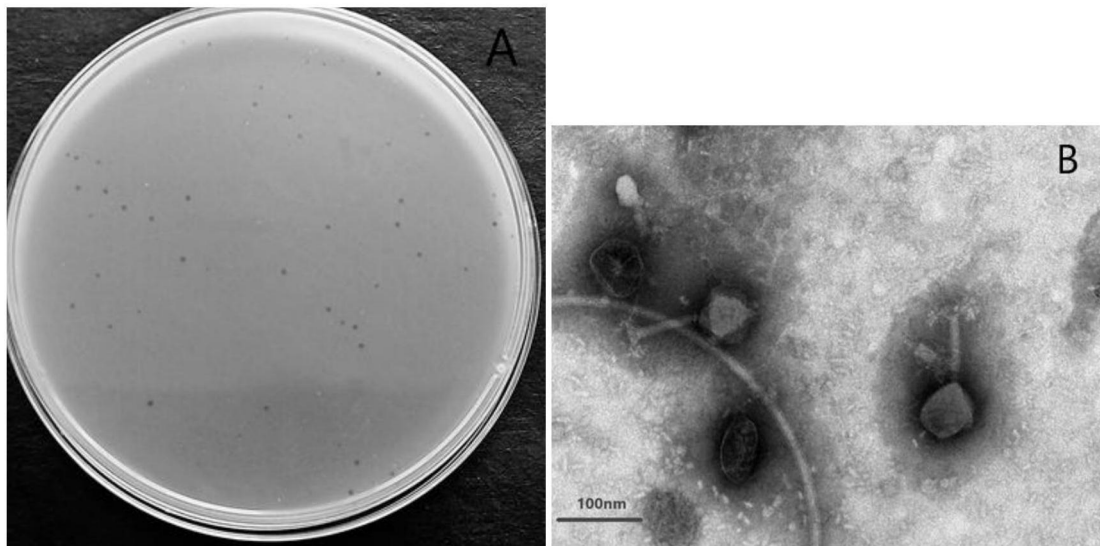
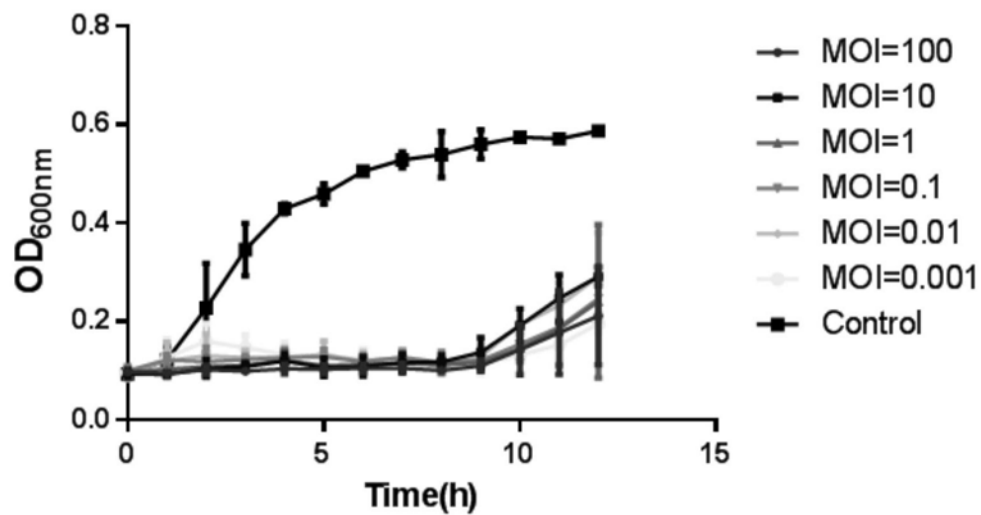
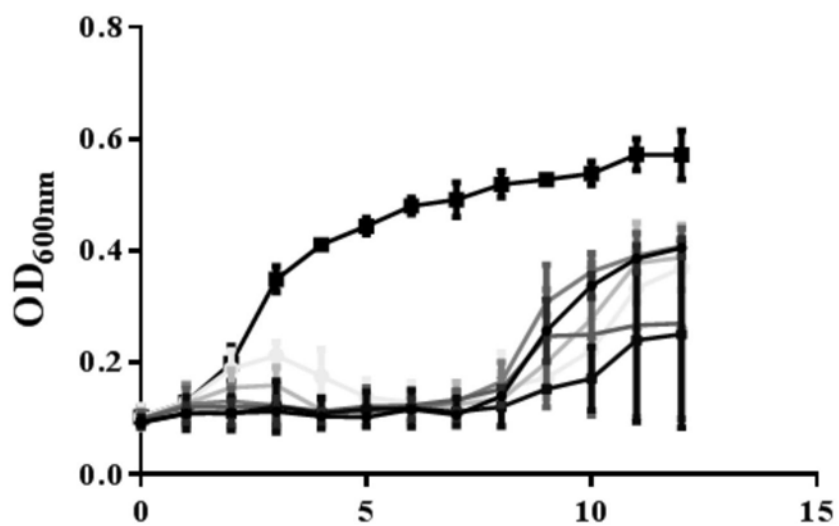


图2

LPEE17-EDL933**LPEK22-EDL933**

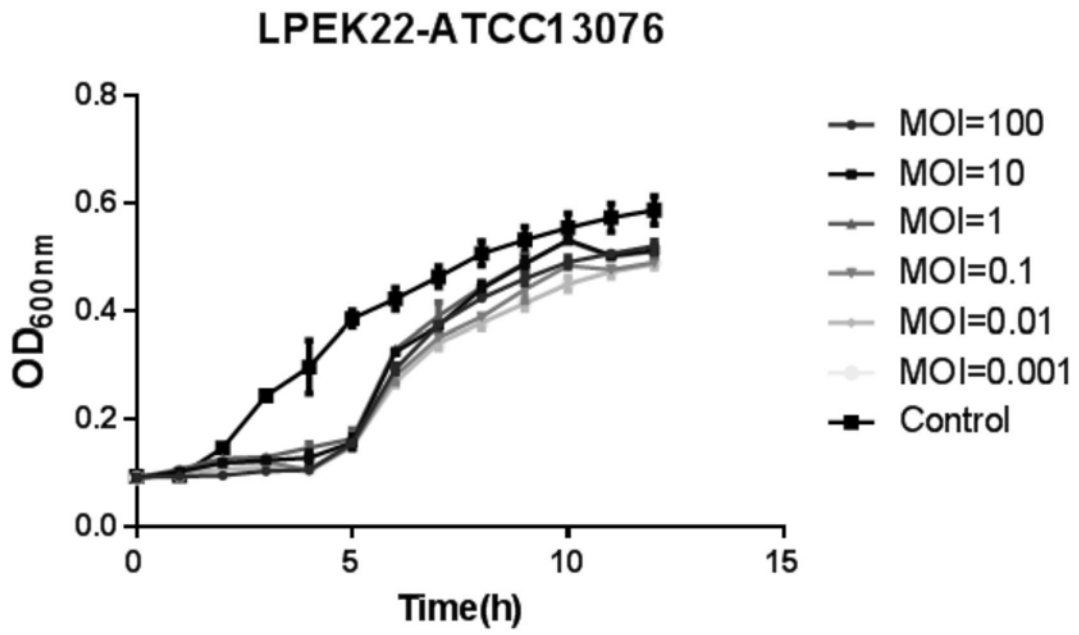
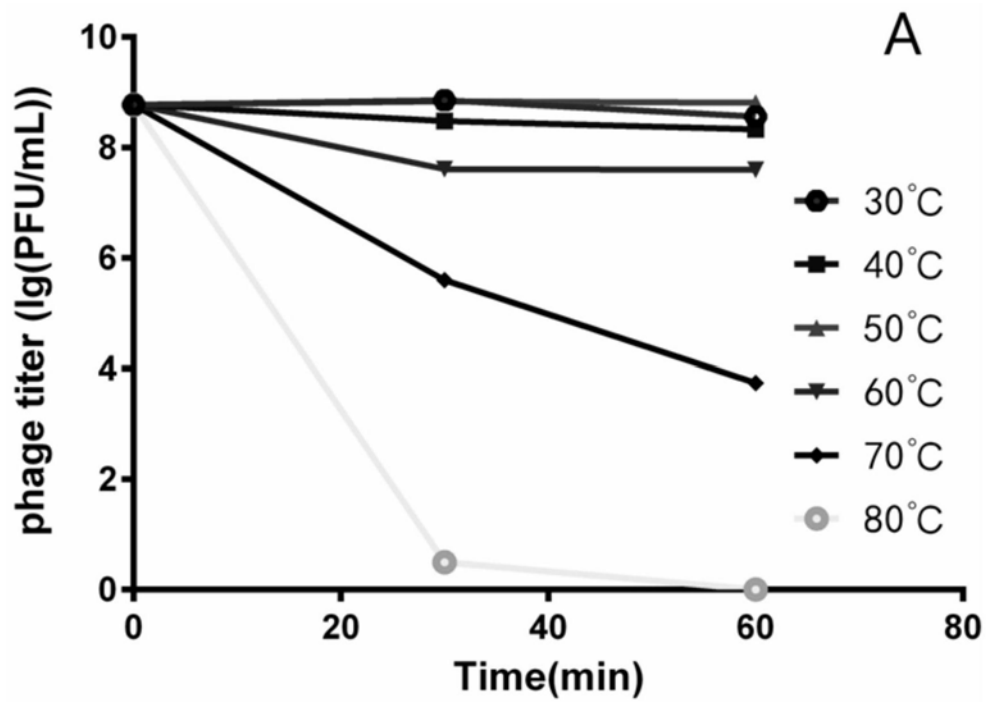


图3



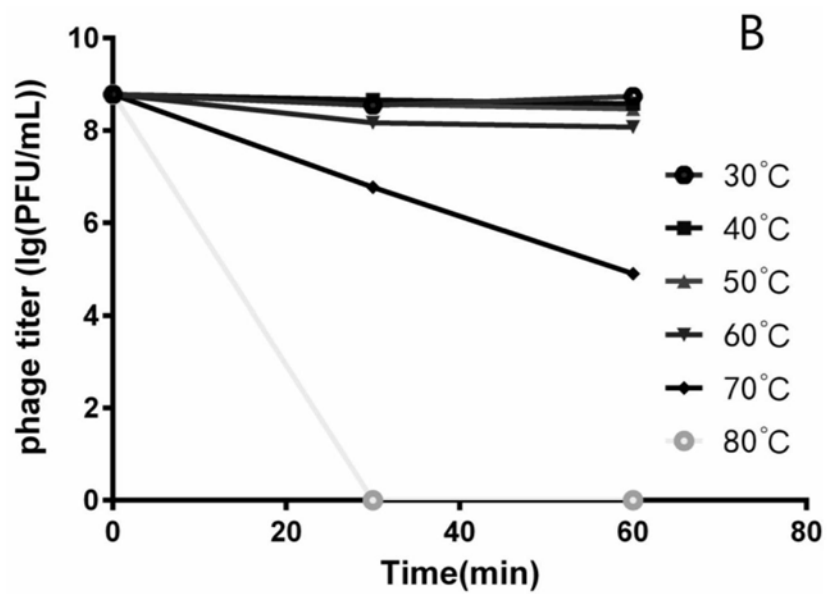
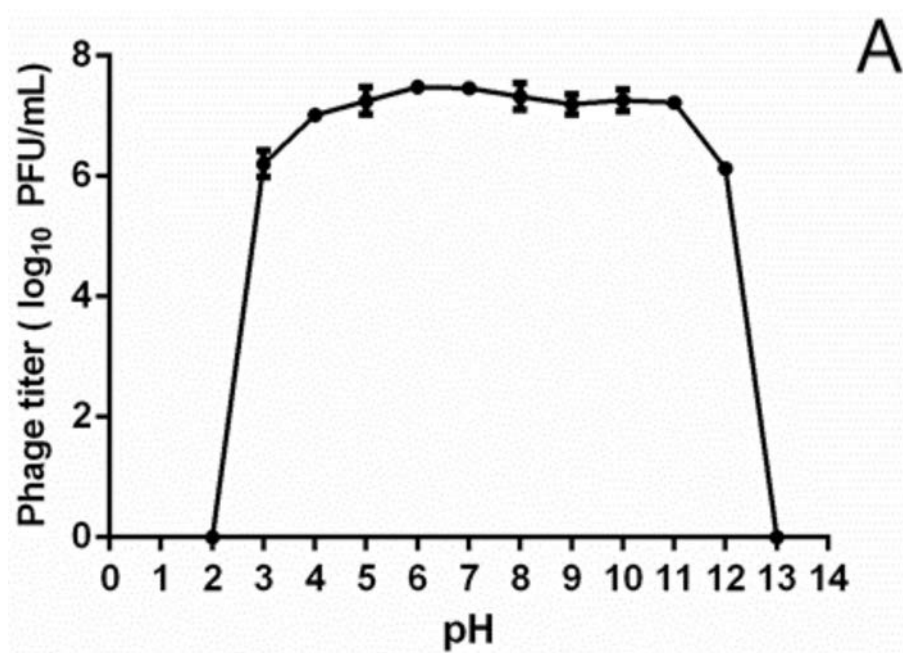


图4



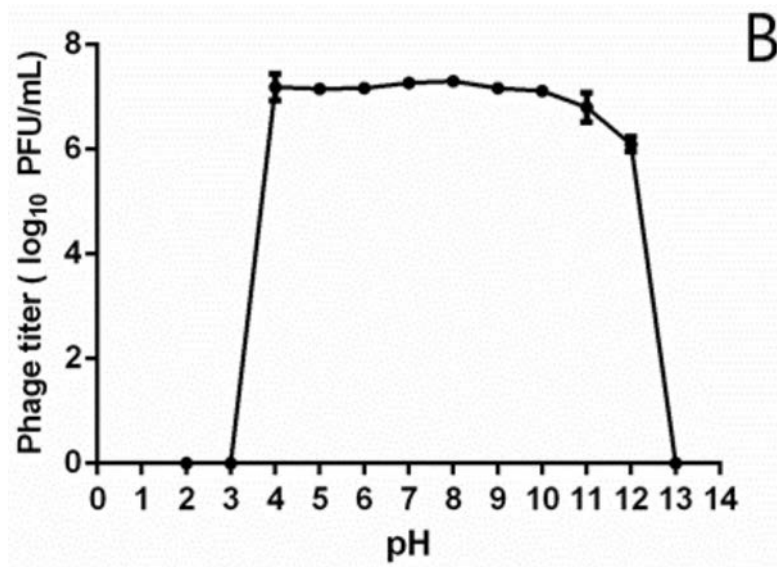


图5