



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108546685 A

(43)申请公布日 2018.09.18

(21)申请号 201810364267.7

A23C 3/08(2006.01)

(22)申请日 2018.04.20

C12R 1/92(2006.01)

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:M2018120 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 张丹丹 邱宁 周洋

董星星 尹平 邱煜鑫 雷思杰

刘坤

(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 5/16(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

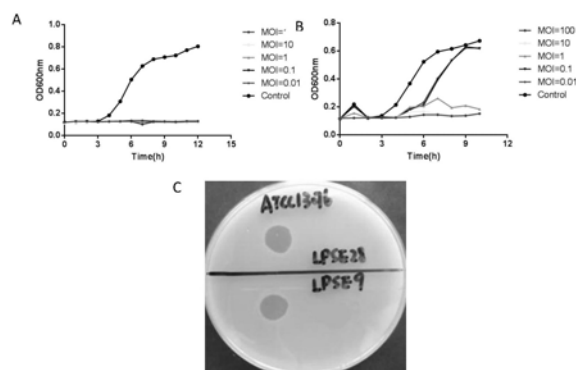
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28及其在食品中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28,其保藏编号为:CCTCC NO.2018120,该噬菌体为宽谱型且能够裂解沙门氏菌耐菌株,经鉴定,该噬菌体为有尾噬菌体目肌尾噬菌体科T4样噬菌体属,将其命名为LPSE28,噬菌体LPSE28在pH为4-12之间,40-60℃效价稳定。本发明还公开了一种肠炎沙门氏菌噬菌体在食品中的应用,利用本发明提供的噬菌体可以有效控制食品,特别是液蛋、牛奶体系中的肠炎沙门氏菌,与抗生素和化学防腐剂相比较,具有特异性高、无残留和安全的特點。



1. 一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28,其特征在于:保藏编号为:CCTCC NO. 2018120。
2. 根据权利要求1所述的一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28,其特征在于,所述的噬菌体含有如SEQ ID NO:1所示核苷酸序列。
3. 权利要求1所述的一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在食品中的应用。
4. 根据权利要求3所述的一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在食品中的应用,其特征在于,所述的肠炎沙门氏菌噬菌体在食品中的添加量为1000-10000 pfu/mL。
5. 权利要求3所述的一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在液蛋中的应用。
6. 权利要求3所述的一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在牛奶中的应用。

一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28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,具体涉及一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28,还涉及一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在食品中的应用,该噬菌体特别适用于液蛋、牛奶体系。

背景技术

[0002] 沙门氏菌,特别是肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*),极易污染蛋类、奶类、肉类食品,是引起食物中毒最常见的病原菌之一。在世界范围内的细菌引起的食物中毒案例中,沙门氏菌位于引起的食物中毒事件总数的第二位。在中国食源性疾病中由沙门氏菌引起的食物中毒比例高达70%-80%。而肠炎沙门氏菌的活力又比较强,是禽蛋和奶制品中最常见的病原菌。

[0003] 上世纪80年代末开始,肠炎沙门氏菌开始成为主要的食源性病原菌之一。肠炎沙门氏菌可以定植于母鸡的生殖器官中,并随带菌生殖器官分泌物造成鸡蛋产出前内容物的直接污染。虽然鸡蛋内存在着溶菌酶、卵铁蛋白等多种抗菌成分,但是肠炎沙门氏菌可以凭借其独特的分子机制成功躲避抗菌分子的攻击,在鸡蛋内增殖,而又不引起鸡蛋表观品质及新鲜度的变化,很难被消费者察觉,因此肠炎沙门氏菌成为危害公共健康的较大隐患。经过调查,发现鸡蛋和蛋制品是引发人类肠炎沙门氏菌病流行的主要媒介之一。尤其是食用生的或未经充分加热的鸡蛋,具有高感染风险。调查结果显示,导致公众食品发生安全问题的案例中,有60%~80%是由于食用肠炎沙门氏菌污染的鸡蛋所导致的。

[0004] 液蛋是指液体鲜蛋,是禽蛋经打蛋去壳,将蛋液经一定处理后包装冷藏(或冷冻),代替鲜蛋消费的产品。液蛋加工技术1938年在欧洲就完全具备商品化生产的能力,巴氏杀菌液蛋制品在澳大利亚、欧洲、日本和美国已经占鸡蛋产量的30%~40%,而早在1976年美国生产的去壳蛋中约42%制成冷冻蛋,约8%制成干燥蛋,约47%制成液蛋,其余约3%为不可食用蛋。我国的液蛋生产刚刚起步,近年已有液蛋专业厂家开始了生产,另有企业正在上此项目,说明液蛋的生产正日益引起重视。2003年我国禽蛋产量为2560.7万吨,占世界总产量的43%,如果将其中的10%制成液蛋,我国的液蛋的日需要量能达到7000吨。液蛋具有十分广阔的市场前景。但是液蛋经打蛋去壳后即失去了一部分防御体制,因此在生产、加工、贮存过程中,液蛋极易受肠炎沙门氏菌等微生物的污染,即使生产中采用巴氏杀菌技术也会有一定量微生物残留,加上运输和保藏过程中温度也容易发生变化,这就严重影响了液蛋的品质和保藏期限,所以液蛋必须经杀菌后方可保证卫生安全。目前常采用的杀菌方法有巴氏杀菌、超高压杀菌、高压脉冲电场杀菌、高密度二氧化碳杀菌等方法。但是这些方法都有自身的局限性,因此研究一种新的方法对液蛋进行杀菌就显得尤为重要。

[0005] 目前已经被应用的抑菌剂主要有溶菌酶、抗菌肽、乳铁蛋白、中草药提取物、特异性噬菌体等。溶菌酶虽然对一些细菌有很好的杀菌效果,但对肠炎沙门氏菌的抑制效果并不是很好。噬菌体是近年来被认为杀菌效果良好且相对安全的一种抗菌剂。噬菌体(bacteriophages)是感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒的总称,因部分能引起宿主菌的裂解,故称为噬菌体。噬菌体具有体积小,专一裂解性强,自我增殖快,安全性

高,分布广泛的特点。目前国际上已有应用于食品的噬菌体产品,其中具有标志性的是:2006年,美国食品药品监督管理局(FDA)批准ListShield™噬菌体产品可作为食品添加剂,用于即食食品和禽肉制品中控制单核细胞增生李斯特菌污染。

[0006] 沙门氏菌噬菌体在控制液蛋领域鲜少报道,本研究数据说明了沙门氏菌噬菌体可有效应用于液蛋领域。虽然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谱(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。

发明内容

[0007] 本发明的目的是在于提供了一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28,该噬菌体为宽谱型且能够裂解沙门氏菌耐菌株,作为一种对沙门氏菌具有强有效裂解作用的抑菌剂,它能够有效抑制肠炎沙门氏菌ATCC13076, SJTUF10978, SJTUF10984, LK5-3820, SGSC4901;鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028, ATCC1331, CT18, Ty2, ST-8, UK-1, 490, 1344;鸡白痢沙门氏菌CVCC534, C79-3;大肠杆菌D41, H10417, K12, DH5 α 和乙型副伤寒沙门氏菌CMCC50094, 18株沙门氏菌耐药菌株等38株细菌。

[0008] 本发明还有一个目的是在于提供了一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在食品中的应用,利用本发明提供的噬菌体可以有效控制食品,特别是液蛋、牛奶体系中的肠炎沙门氏菌,与抗生素和化学防腐剂相比较,具有特异性高、无残留和安全的特点。

[0009] 为了实现上述技术目的,本发明采用以下技术措施:

[0010] 一种肠炎沙门氏菌噬菌体(*Salmonella enteritidis* phage)LPSE28,保藏编号为: CCTCC NO:M2018120,保藏日期为:2018年3月11日,该噬菌体具有广谱性、能够裂解沙门氏菌耐药菌株。经鉴定,该噬菌体为有尾噬菌体目肌尾噬菌体科T4样噬菌体属,发明人将其命名为LPSE28;噬菌体LPSE28在pH为4-12之间,40-60℃效价稳定;噬菌体LPSE28可裂解的宿主菌包括肠炎沙门氏菌ATCC13076, SJTUF10978, SJTUF10984, LK5-3820, SGSC4901;鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028, ATCC1331, CT18, Ty2, ST-8, UK-1, 490, 1344;鸡白痢沙门氏菌CVCC534, C79-3;大肠杆菌D41, H10417, K12, DH5 α 和乙型副伤寒沙门氏菌CMCC50094, 18株沙门氏菌耐药菌株。

[0011] 所述的噬菌体LPSE28具有多条特异性序列,其中一条特异性核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0012] 一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在食品中的应用,将噬菌体LPSE28培养液混合于含菌食品中,用于抑制食品中的肠炎沙门氏菌。

[0013] 所述的噬菌体LPSE28在食品中的添加量为1000-10000pfu/mL。

[0014] 一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在液蛋中的应用,其步骤是:

[0015] (1) 将培养至对数期的肠炎沙门氏菌ATCC13076,用PBS缓冲液将其浓度调整为 1×10^4 cfu/mL。将实验分为十二组进行,分别取100 μ L菌液加入到9.8mL无菌的蛋黄、蛋清中,将六组蛋黄样品分别放置在25℃、4℃的培养箱中20min,让菌液充分适应该环境;将六组蛋清样品分别放置在25℃、4℃的培养箱中20min,让菌液充分适应该环境。

[0016] (2) 在每个温度下的六组实验组中,四组为实验组:取100 μ L纯化的噬菌体 LPSE28

液(效价分别为 1×10^8 pfu/mL、 1×10^7 pfu/mL)加入已加菌液的蛋黄、蛋清中,将其充分混匀;另两组为对照组:取100 μ L PBS缓冲液(pH7.2-7.4)加入已加菌液的蛋黄、蛋清中,将其充分混匀。

[0017] (3) 将步骤(2)经过两种处理的蛋黄、蛋清静置于4℃、25℃培养箱中,分别于0、1、3、6、12、24h取出,按照GB-4789.4-2010(国标沙门氏菌检验方法)平板计数法检测蛋黄、蛋清中肠炎沙门氏菌的数量,进而计算噬菌体的抑菌效果。

[0018] 一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在牛奶中的应用,其步骤是:

[0019] (1) 培养至对数期的肠炎沙门氏菌ATCC13076,用PBS缓冲液将其浓度调整为 1×10^4 CFU/mL。将实验分为六组进行,分别取100 μ L菌液加入到9.8mL经过灭菌的脱脂牛奶中,将三组牛奶样品放置在25℃的培养箱中20min,将另外三组牛奶样品放置在4℃的培养箱中20min,让菌液充分适应该环境。

[0020] (2) 在每个温度下的三组实验组中,两组为实验组:取100 μ L纯化的噬菌体 LPSE28液(效价分别为 1×10^8 pfu/mL、 1×10^7 pfu/mL)加入已加菌液的牛奶中,将其充分混匀;另一组为对照组:取100 μ L的PBS缓冲液加入已加菌液的牛奶中,将其充分混匀。

[0021] (3) 将步骤(2)经过两种处理的牛奶分别静置于4℃和25℃的培养箱中,分别于0、1、3、6、12、24、48h取出,按照GB-4789.4-2010(国标沙门氏菌检验方法)平板计数法检测牛奶中肠炎沙门氏菌的数量,进而计算噬菌体的抑菌效果。

[0022] 与现有技术相比,本发明具有以下优点和有益效果:

[0023] (1) 经固体富集后的噬菌体原液效价高,在本发明中,噬菌体LPSE28的效价 $\geq 10^{10}$ pfu/mL。

[0024] (2) 在不同的条件下,裂菌能力强。在本发明中,比较了噬菌体LPSE28在MOI=10、MOI=1、MOI=0.1、MOI=0.01、MOI=0.001的条件下对肠炎沙门氏菌的抑菌作用,并发现在不同的MOI条件下均具有很好的抑菌效果。

[0025] (3) 热稳定性好。本发明提供的噬菌体LPSE28与专利201010508259.9中的肠炎沙门氏菌噬菌体的热稳定性(30℃—60℃稳定)、专利201080042733.1中的肠炎沙门氏菌噬菌体的热稳定性(37℃—70℃)相比类似,都具有较好的稳定性。

[0026] (4) pH范围更广。本发明提供的噬菌体LPSE28的pH稳定性(4-12)优于专利201010508259.9中的肠炎沙门氏菌噬菌体的pH稳定性(5—10)、专利201080042733.1中的肠炎沙门氏菌噬菌体的pH稳定性(3—11)。

[0027] (5) 宿主谱宽。本发明提供的噬菌体LPSE28对8株沙门氏菌标准菌株和18株沙门氏菌耐药菌株以及大肠杆菌工程菌株DH5 α 均具有较好的裂解效果。

[0028] (6) 据统计,目前的专利在液体食品牛奶及固体食品火腿上的应用较多,鲜少有噬菌体应用在液蛋中;本发明旨在提供一种新型的抑菌剂能够抑制液蛋中肠炎沙门氏菌的生长。

附图说明

[0029] 图1为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28双层平板噬菌斑图;

[0030] 图2为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28的电镜观察图;

[0031] 图3为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28的特殊序列图;

- [0032] 图4:A为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在不同MOI值条件下对肠炎沙门氏菌ATCC13076裂菌能力结果图;
- [0033] B为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE9对肠炎沙门氏菌ATCC13076裂菌能力结果图;
- [0034] C为肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28和LPSE9对肠炎沙门氏菌ATCC13076的宿主谱图;
- [0035] 图5为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28的一步生长曲线;
- [0036] 图6为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28的pH稳定性结果图;
- [0037] 图7为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28的热稳定性结果图;
- [0038] 图8为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在低温4℃及室温25℃对蛋黄中肠炎沙门氏菌的控制效果;
- [0039] 图9为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在低温4℃及室温5℃对蛋清中肠炎沙门氏菌的控制效果;
- [0040] 图10为一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28在低温4℃及室温25℃对牛奶中肠炎沙门氏菌的控制效果。

具体实施方式

[0041] 下面结合实施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。

[0042] 实施例1:

[0043] 一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28的分离筛选方法,其步骤是:

[0044] (1) 样品采集

[0045] 污水样品来自湖北省武汉市九峰山养鸡场。

[0046] (2) 沙门氏菌噬菌体的筛选

[0047] 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为:称取上述成分的TSB培养基30.0g,加热搅拌溶解于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。

[0048] 所述的敏感指示菌为肠炎沙门氏菌ATCC13076。

[0049] 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。

[0050] 采用点样法初步验证: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。

[0051] (3) 噬菌体的扩增培养和纯化

[0052] 在培养噬菌体原液的双层平板中挑取相对独立、大而边缘光滑的噬菌斑,接种于1mL液体培养基中,37℃、200r/min振荡培养12-18h左右。4℃下,10000×g离心10min,0.22μm滤膜过滤除菌,将噬菌体原液按照细菌平板划线的方法分离,按从稀释倍数高向稀释倍数低的方向加入混有200μL菌液的上层培养基。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,本发明人将该菌株编号为LPSE28。并利用双层平板法测定所分离噬菌体的效价。

[0053] 经测定,该噬菌体LPSE28的效价为 4.4×10^{10} pfu/mL。

[0054] (4) 菌株鉴定

[0055] 经纯化后的噬菌体LPSE28头部呈二十面体结构,头部直径约83.3nm,噬菌体含收缩性尾,尾长116.7nm,尾部直径17nm,经鉴定该噬菌体为有尾噬菌体目肌尾噬菌体科T4样噬菌体属。

[0056] (5) 噬菌体LPSE28的保藏

[0057] 用10 μ L移液枪挑取同一大小,模糊度相同,形态一致的单个噬菌斑,接种于5mL 灭菌的TSB培养基中,37 $^{\circ}$ C充分振荡培养12-18小时。之后,4 $^{\circ}$ C,10000 \times g离心10 min。小心取上清,用0.22 μ m滤膜过滤后分装至无菌小管。采用-80 $^{\circ}$ C(含18%甘油) 保藏。

[0058] 发明人于2018年3月11日将该噬菌体LPSE28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.M2018120

[0059] 噬菌体LPSE28形成的噬菌斑呈圆形透明状,直径2mm左右(培养12h),边界清楚无晕环,头部呈正二十面体结构,头部直径约83.3nm,噬菌体含收缩性尾,尾长116.7nm,尾部直径17nm,属肌尾噬菌体科T4样噬菌体属。

[0060] 实施例2:噬菌体LPSE28宿主谱的测定

[0061] 试验选择8种沙门氏菌标准菌株(肠炎沙门氏菌ATCC13076, SJTUF10978, SJTUF10984, SGSC4901;鼠伤寒沙门氏菌ATCC14028, ATCC13311;鸡白痢沙门氏菌 CVCC534;乙型副伤寒沙门氏菌CMCC50094和30种其他种属菌株(肠炎沙门氏菌 LK5-3820;鼠伤寒沙门氏菌CT18, Ty2, ST-8, UK-1, 490, 1344;鸡白痢沙门氏菌C79-3;大肠杆菌D41, H10417, K12, DH5 α 和肠炎沙门氏菌耐药菌株1490、2194、2195、2324、2211、2247、2302、2428;鼠伤寒沙门氏菌耐药菌株893、1893、2069、2088、2238、2395、2459、2511;奥雷宁堡沙门氏菌耐药菌株4835;科瓦利斯沙门氏菌耐药菌株2031)来做噬菌体LPSE28的宿主谱分析,具体步骤如下:

[0062] 分别培养上述菌株(8种沙门氏菌标准菌株和30种其他种属菌株)至对数期。取100 μ L对数期上述菌液,待上层琼脂(向100mL实施例1步骤(2)中的TSB培养基中加入0.7g琼脂糖,121 $^{\circ}$ C灭菌20分钟备用)温度降至42或43或44或45或46 或47或48 $^{\circ}$ C时,取3mL上层琼脂与上述菌液混匀,之后倒入15mL下层TSA培养基(胰蛋白胨大豆琼脂,该培养基的成分为:胰蛋白胨15.0g/L、大豆胨5.0g/L、氯化钠5.0g/L、琼脂15.0g/L、pH7.3 \pm 0.2;该培养基的使用方法是:称取上述成分的TSA 培养基40.0g,加热搅拌溶解于1000mL蒸馏水中,分装于试管或其它合适的容器中,121 $^{\circ}$ C高压灭菌20分钟备用)上;静置晾干约10min,待上层培养基凝固后,滴加5 μ L 噬菌体LPSE28原液(噬菌体LPSE28液的制备方法为:取肠炎沙门氏菌ATCC13076接种于3mL液体TSB细菌瓶中,37 $^{\circ}$ C培养6h左右,取100 μ L上述菌液于10mL新鲜TSB中,再加入100 μ L,4 $^{\circ}$ C保存的噬菌体LPSE28,混匀后37 $^{\circ}$ C振荡培养箱中培养12-18h 使噬菌体增殖;取5mL增殖液于离心管中,1000g离心10min去除细菌碎片,上清液用0.22 μ m滤膜过滤得噬菌体原液),隔夜观察。

[0063] 结果如表1所示,噬菌体可裂解多种不同血清型的沙门氏菌、大肠杆菌,表现出广谱性;而且噬菌体LPSE28可以裂解大肠杆菌工程菌株DH5 α ,为今后噬菌体LPSE28 的工业化生产提供安全的生产条件。噬菌体还可以裂解18株沙门氏菌耐药菌株,肠炎沙门氏菌:1490

耐头孢菌素类、青霉素类、氨基糖苷类、喹诺酮类,2194、2195、2324耐呋喃妥因,2211、2428耐头孢菌素类、青霉素类、氨基糖苷类,2247、2302耐头孢菌素类、青霉素类;鼠伤寒沙门氏菌:893、2238、2459耐头孢菌素类、青霉素类、氨基糖苷类,1893耐头孢菌素类、青霉素类、喹诺酮类,2069耐头孢菌素类,2088、2395耐青霉素类,2511耐头孢菌素类、青霉素类、单环 β 内酰胺类;奥雷宁堡沙门氏菌4835耐头孢菌素类、青霉素类、氨基糖苷类、喹诺酮类;科瓦利斯沙门氏菌2031耐头孢菌素类、氨基糖苷类、喹诺酮类。

[0064] 由于广谱抗生素的大量使用,导致沙门氏菌耐药菌株逐年增多,多重耐药沙门氏菌引起的食源性疾病严重危害人类健康和生命。噬菌体LPSE28能有效地裂解这些耐药菌株,不仅拓宽了噬菌体的宿主谱,还为杀灭耐药沙门氏菌提供了一种新杀菌剂。

[0065] 表1噬菌体LPSE28宿主谱的测定

[0066]

宿主菌菌株名称	属	噬菌体 LPSE28 对宿主菌的裂解程度
ATCC 13076	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++
SJTUF 10978	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+++
SJTUF 10984	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++
LK5-3820	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++
SGSC4901	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++
C79-3	<i>Salmonella</i> pullorum	++++
CVCC534	<i>Salmonella</i> pullorum	++++
CMCC50094	<i>Salmonella paratyphi B</i>	++++
CT18	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++
Ty2	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
ATCC 14028	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++
ATCC 13311	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+
ST-8	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++
UK-1	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
490	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+
1344	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+
H10417	<i>Escherichia coli</i>	+++
D41	<i>Escherichia coli</i>	+
K12	<i>Escherichia coli</i>	+
DH5α	<i>Escherichia coli</i>	+++
1490	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++
2194	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++
2195	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++
2211	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++
2247	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+++
2302	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+
2324	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++
2428	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++
893	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++
1893	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++
2069	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++
2088	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
2238	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++
2395	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++
2459	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++
2511	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++
4835	<i>Salmonella</i> Oranienburg	+++
2031	<i>Salmonella</i> Corvallis	+++

[0067] 注：“+”表示噬菌体LPSE28对宿主菌的裂解程度，“+”越多，表示裂解程度越高。

[0068] 实施例3：噬菌体LPSE28的电镜观察

[0069] 噬菌体LPSE28原液(噬菌体LPSE28原液的制备方法为：取肠炎沙门氏菌ATCC13076接种于3mL液体TSB细菌瓶中，37℃培养6h左右，取100μL上述菌液于10mL新鲜TSB 中，再加

入100 μ L 4 $^{\circ}$ C保存的噬菌体LPSE28,混匀后37 $^{\circ}$ C振荡培养箱中培养12-18h使噬菌体增殖。取5mL增殖液于离心管中,1000g离心10min去除细菌碎片,上清液用0.22 μ m滤膜过滤得噬菌体原液)经50000 \times g,4 $^{\circ}$ C超速离心后,于1mL,0.1M醋酸铵缓冲液重悬,冰浴,得到样品。分别取20 μ L样品 (10^{10} - 10^{11} pfu/mL)和20 μ L体积分数2%、pH 7.0的磷钨酸(phosphotungstic acid,PTA)滴加在封口膜上。轻取铜网,置于样品液滴中静置沉淀5-10min,用滤纸吸去多余液体。用镊子将铜网置于磷钨酸(PTA)染料中染色 5-10min后吸去多余液体,自然晾干至完全干燥,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。

[0070] 结果如图2所示,经纯化后的噬菌体LPSE28头部呈二十面体结构,头部直径约83.3nm,噬菌体含收缩性尾,尾长116.7nm,尾部直径17nm。噬菌体符合肌尾病毒科(Myoviridae)特征。

[0071] 实施例4:噬菌体基因组的提取与全基因组denovo测序

[0072] 取1mL噬菌体LPSE28原液,加入脱氧核糖核酸酶DNase I (1mg/mL) 20 μ L,核糖核酸酶RNase A (10mg/mL) 20 μ L,用小型涡旋仪涡旋2min,37 $^{\circ}$ C温育40min;加入20 μ L 2M ZnCl₂,37 $^{\circ}$ C温育7min,离心,10000rpm,1min;弃上清,加入500 μ L TES buffer,吹吸后至澄清透明的状态,无白色颗粒物,65 $^{\circ}$ C,15min(打散),加入10 μ L蛋白酶k (20mg/mL),用枪头轻轻吹吸,上下颠倒,50 $^{\circ}$ C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60 μ L预冷的3M CH₃COOK(提前放4 $^{\circ}$ C,用醋酸调pH至5.2),冰上放置15min,离心12000rpm,10min,4 $^{\circ}$ C,取上清,加入600 μ L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600 μ L)的异丙醇在-20 $^{\circ}$ C沉淀DNA,上下颠倒后,有絮状物即是DNA,放置过夜。之后冷冻离心,4 $^{\circ}$ C,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1min,管子要按同一个方向,用白枪头小心吸取剩余乙醇,放在37 $^{\circ}$ C培养箱至少风干40min,再加20 μ L TE在常温下溶解DNA,静置30min。测序工作交于测序公司完成。

[0073] 噬菌体LPSE28的全基因组测序结果,由结果来看,噬菌体基因组为双链DNA,全长为157689bp,通过BLAST比对分析发现噬菌体LPSE28具有多条特异性序列,其中一条特异性核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0074] 在NCBI中通过BLAST进行全数据库比对不能发现完全相似的序列,如图3所示,说明该噬菌体是一种新型噬菌体。

[0075] 实施例5:噬菌体LPSE28和LPSE9裂菌能力的评价

[0076] 1、取对数期沙门菌液(培养8h左右)100 μ L。

[0077] 2、取噬菌体LPSE28、LPSE9原液(噬菌体LPSE28、LPSE9原液的制备方法为:取肠炎沙门氏菌ATCC13076接种于3mL液体TSB细菌瓶中,37 $^{\circ}$ C培养6h左右,取100 μ L上述菌液于10mL新鲜TSB中,再加入100 μ L 4 $^{\circ}$ C保存的噬菌体LPSE28,混匀后37 $^{\circ}$ C振荡培养箱中培养12-18h使噬菌体增殖。取5mL增殖液于离心管中,1000g离心10min去除细菌碎片,上清液用0.22 μ m滤膜过滤得噬菌体原液)梯度稀释 10^5 pfu/mL,分别按照 MOI=10、1、0.1、0.01、0.001加入对应的实验组,并加入100 μ L对数期沙门氏菌菌液混匀。另设空白组(Blank)加入200 μ L TSB培养基;对照组(negative control):100 μ L 对数期沙门氏菌菌液和100 μ L培养基。

[0078] 3、酶标仪设定: λ =600nm,T=37.0 $^{\circ}$ C,每间隔1h测定OD600值的变化。

[0079] 结果如图4中的A所示,在3h后,与不加噬菌体的对照组相比,噬菌体LPSE28 在不同MOI值下均表现出较好的抑菌能力。在5h后,不同的MOI值沙门氏菌数量均降低明显,5小时后达到最低值。在所测MOI值范围内,MOI值越大,沙门氏菌数量下降越多,抑菌作用效果越好。但是噬菌体LPSE9在MOI值为0.1和0.01时对沙门氏菌ATCC13076无抑菌能力,结果如图4中的B,即使噬菌体LPSE9对ATCC13076的宿主谱实验中,其噬菌斑较清澈透亮,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对肠炎沙门氏菌ATCC13076的宿主谱实验中,其噬菌斑较清澈透亮,但是噬菌体LPSE9在不同的MOI值为0.1和0.01时对肠炎沙门氏菌ATCC13076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。

[0080] 实施例6:噬菌体LPSE28一步生长曲线的测定

[0081] 1、制备对数生长期的宿主菌菌液,调整宿主菌的浓度为 10^7 cfu/mL。

[0082] 2、取上述经稀释的宿主菌菌液500 μ L,按最佳感染复数(MOI=0.01)的比例加入 10^5 pfu/mL 噬菌体500 μ L,混匀,37 $^{\circ}$ C温育20min后于4 $^{\circ}$ C下,7000 \times g离心2min,弃去上清,用1mL TSB液洗涤2次,弃上清,用预热的10mL的TSB培养基重悬。

[0083] 3、重悬液迅速置于37 $^{\circ}$ C摇床中160rpm/min振荡培养,同时开始计时,在0min和每隔10min取样300 μ L,4 $^{\circ}$ C、7000 \times g离心30s,立刻吸取上清液100 μ L于900 μ L的 TSB培养基中作梯度稀释。

[0084] 按上述操作每间隔10min,选择合适的稀释梯度,采用双层平板法测定噬菌体效价。

[0085] 结果如图5所示,噬菌体LPSE28的潜伏期约为10min,10~140min处于裂解期,裂解时间约为130min。裂解量为50pfu/cfu。

[0086] 实施例7:噬菌体LPSE28的pH稳定性的测定

[0087] 用HCl和NaOH调节TSB液体培养基pH值,在pH为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12时,取0.9mL的TSB液体分装于无菌EP管中,置于37 $^{\circ}$ C水浴锅中,待温度稳定后加入100 μ L噬菌体裂解液(约 10^8 pfu/mL),37 $^{\circ}$ C水浴2h后,采用双层平板法测定效价;待作用时间结束,根据预实验结果将样品做适当稀释后采用双层平板法测定噬菌体效价。

[0088] 结果如图6所示,噬菌体LPSE28在pH为4-12之间稳定,在pH \leq 3时噬菌体效价降为0,在pH \geq 13时,噬菌体效价降为0。表明噬菌体LPSE28的pH稳定性好,在pH4-12 的体系中能表现出较高活性。

[0089] 实施例8:噬菌体LPSE28的热稳定性的测定

[0090] 各取1mL噬菌体裂解液(约 10^8 pfu/mL)分装于无菌EP管中,将EP管分别置于 40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C恒温水浴锅中,在水浴锅中静置80min,分别在 30、60min这两个时间点从EP管中取100 μ L噬菌体裂解液,先冷却至室温,之后用双层平板法测定噬菌体效价。

[0091] 结果如图7所示,噬菌体LPSE28在40-60 $^{\circ}$ C效价稳定,70 $^{\circ}$ C时处理30min内效价开始降低,80 $^{\circ}$ C处理60min后下降了50%。表明噬菌体在30-60 $^{\circ}$ C内较为稳定。

[0092] 实施例9:低温4 $^{\circ}$ C及室温25 $^{\circ}$ C条件下,噬菌体以不同MOI值(MOI=10000,MOI=1000) 加入蛋黄、蛋清中的抑菌效果实验

[0093] 将培养至对数期的肠炎沙门氏菌ATCC13076,用PBS缓冲液(pH7.2-7.4)将其浓度调整为 1×10^4 cfu/mL。将实验分为十二组进行,分别取100 μ L菌液加入到9.8mL无菌的蛋黄、蛋清中,将六组蛋黄样品分别放置在25℃、4℃的培养箱中20min,让菌液充分适应该环境;将六组蛋清样品分别放置在25℃、4℃的培养箱中20min,让菌液充分适应该环境。

[0094] 在每个温度下的六组实验组中,四组为实验组:取100 μ L纯化的噬菌体LPSE28液(效价分别为 1×10^8 pfu/mL、 1×10^7 pfu/mL)加入已加菌液的蛋黄、蛋清中,将其充分混匀;另两组为对照组:取100 μ L PBS缓冲液(pH7.2-7.4)加入已加菌液的蛋黄、蛋清中,将其充分混匀。

[0095] 将以上经过两种处理的蛋黄、蛋清静置于4℃、25℃培养箱中,分别于0、1、3、6、12、24h取出,按照GB-4789.4-2010(国标沙门氏菌检验方法)平板计数法检测蛋黄、蛋清中肠炎沙门氏菌的数量,进而计算噬菌体的抑菌效果。

[0096] 如图7、图8所示,25℃、MOI=10000(噬菌体LPSE28效价为 1×10^8 pfu/mL)时,在加入噬菌体的蛋黄、蛋清(实验组)中,6h后肠炎沙门氏菌菌数相比对照组分别降低了3.09log cfu/mL、1.82log cfu/mL,杀菌效率分别达到42.6%、36.5%;25℃、MOI=1000(噬菌体LPSE28效价为 1×10^7 pfu/mL)时,在加入噬菌体的蛋黄、蛋清中,6h后菌数相比对照组分别降低了3.14log cfu/mL、1.72log cfu/mL,杀菌效率分别达到43.3%、34.5%。

[0097] 如图8、图9所示,4℃、MOI=10000时,在加入噬菌体的蛋黄、蛋清中,6h后菌数相比对照组分别降低了0.70log cfu/mL、0.17log cfu/mL,杀菌效率分别达到了15.5%、4.1%;4℃、MOI=1000时,在加入噬菌体的蛋黄、蛋清中,6h后菌数相比对照组分别降低了0.38log cfu/mL、1.51log cfu/mL,杀菌效率分别达到了8.4%、36.1%。

[0098] 实施例10:低温4℃及室温25℃条件下,噬菌体以不同MOI值加入牛奶中的抑菌效果实验

[0099] 将培养至对数期的肠炎沙门氏菌ATCC13076,用PBS缓冲液(pH 7.2-7.4)将其浓度调整为 1×10^4 CFU/mL。将实验分为六组进行,分别取100 μ L菌液加入到9.8mL经过灭菌的脱脂牛奶中,将三组牛奶样品放置在25℃的培养箱中20min,将另外三组牛奶样品放置在4℃的培养箱中20min,让菌液充分适应该环境。

[0100] 在每个温度下的三组实验组中,两组为实验组:取100 μ L纯化的噬菌体LPSE28液(效价分别为 1×10^8 pfu/mL、 1×10^7 pfu/mL)加入已加菌液的牛奶中,将其充分混匀;另一组为对照组:取100 μ L的PBS缓冲液(pH 7.2-7.4)加入已加菌液的牛奶中,将其充分混匀。

[0101] 将以上经过两种处理的牛奶分别静置于4℃和25℃的培养箱中,分别于0、1、3、6、12、24、48h取出,按照GB-4789.4-2010(国标沙门氏菌检验方法)平板计数法检测牛奶中肠炎沙门氏菌的数量,进而计算噬菌体的抑菌效果。

[0102] 如图10所示,25℃、MOI=10000(噬菌体LPSE28效价为 1×10^8 pfu/mL)时,在加入噬菌体的牛奶中,6h后菌数相比对照组降低了3.41log cfu/mL,杀菌效率达到了75.9%;25℃、MOI=1000(噬菌体LPSE28效价为 1×10^7 pfu/mL)时,在加入噬菌体的牛奶中,6h后菌数相比对照组降低了1.92log cfu/mL,杀菌效率达到了42.9%。

[0103] 如图10所示,4℃、MOI=10000(噬菌体LPSE28效价为 1×10^8 pfu/mL)时,在加入噬菌体的牛奶中,6h后菌数相比对照组降低了3.31log cfu/mL,此时噬菌体LPSE28在牛奶中的杀菌效率达到100%;4℃、MOI=1000(噬菌体LPSE28效价为 1×10^7 pfu/mL)时,在加入噬菌

体的牛奶中,6h后菌数相比对照组降低了1.26log cfu/mL,杀菌效率38.2%,24h后,噬菌体LPSE28在牛奶中的杀菌效率达到65.6%。

[0104] 所述的实施例9和实施例10中的杀菌效率的计算公式是:(对照组肠炎沙门氏菌数量-实验组肠炎沙门氏菌数量)÷对照组肠炎沙门氏菌数量×100%。

[0105] 实施例9和实施例10的牛奶、蛋黄中抑菌应用实验表明,噬菌体LPSE28对食品中肠炎沙门氏菌的生长具有良好的抑制作用。

序列表

<110> 华中农业大学

<120> 一种肠炎沙门氏菌噬菌体LPSE28及其在食品中的应用

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1048

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
aagagttgaa cttagttcaa gtgtagatgg taaaggcagt tcactaattg ctcacggaag 60
cgggactggt tttgatgagc taaattcgcg tcttccaata tcgcggtttg ttgatactac 120
cggagtttta cctgcagatg atgggttgat gaggcgttgg catattcggc agctcatggg 180
ctgacactgg atattaccgg aaaagtgaga ataacaaaaa ccgttaaaca accaccaaac 240
agttcagtag actgccgaaa tgggtgctgt ttttgtgaag acccgtcagg gcttgagaac 300
ggcctgatgt ggtctgttga tgaccccgga attgttaacg agaaaacaac ccgcattggg 360
acgctaattt tatccactag tcctgaaatc gaagaagggt tagttgttga ccgtaatgtc 420
tttggcttac agattacaac tccaaagggt attgtagaaa atctgtatac atatggttgt 480
cgtttgggtg gattaaagac tggacccaaa gggtatgaga taaccataaa gactgccact 540
tgttggatta caagttggac agataaaact aaatggggga tagacttata tgctgctgat 600
ggaataaacg gctcgcttgt ttgtgttggg tatgctcgcg gtatcagatc ttcagggacg 660
aatcacattg actttatgca tccatgggga ttccctgcaa cgtcaggaaa tgaatatcaa 720
aacagacagc tacttactgc gcttagtctc gatagtaata cccacgtcac gcactgctat 780
ttagatagcg ttgatactga aggttatgat gtagcacaat caggtaatga tggggtgaat 840
atagtcttta atgggttaca ttctactatt gataagtgtc tcctcctggg tcatggacaa 900
actaaacccg gtaagggtta gctgtataat gctattggta cgcagaatac tattagtaac 960
ttaatgggtta ataattgattc tgccttgggt actcctgctg taatctaccc ctctgctgta 1020
cgtaaattggc agaaccacgt gttagggg 1048
```

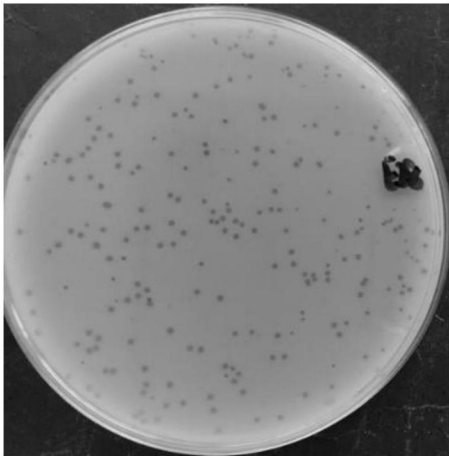


图1

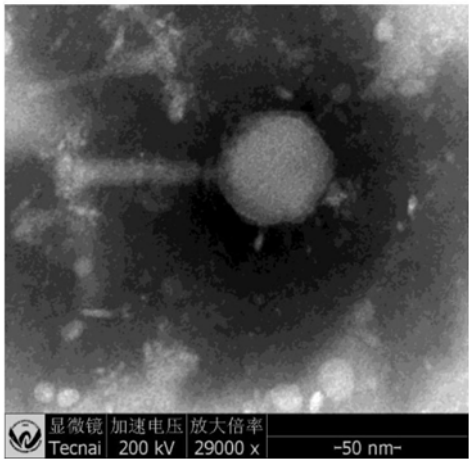


图2

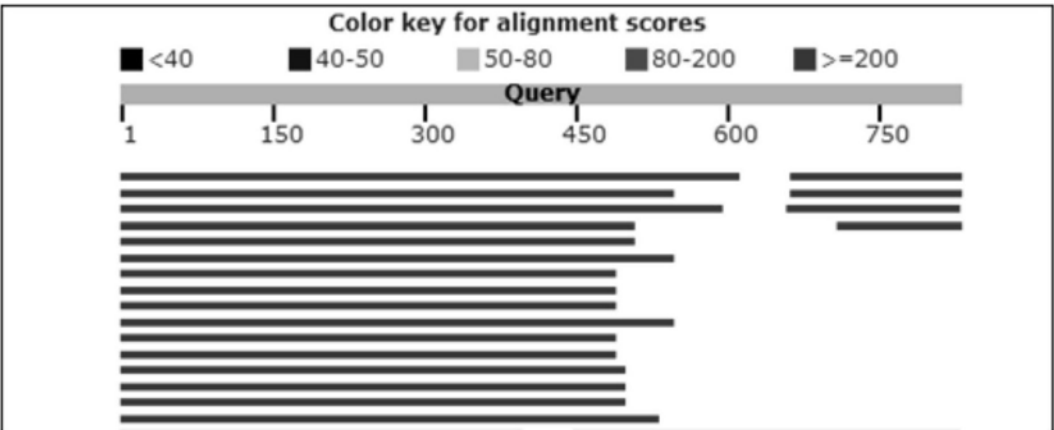


图3

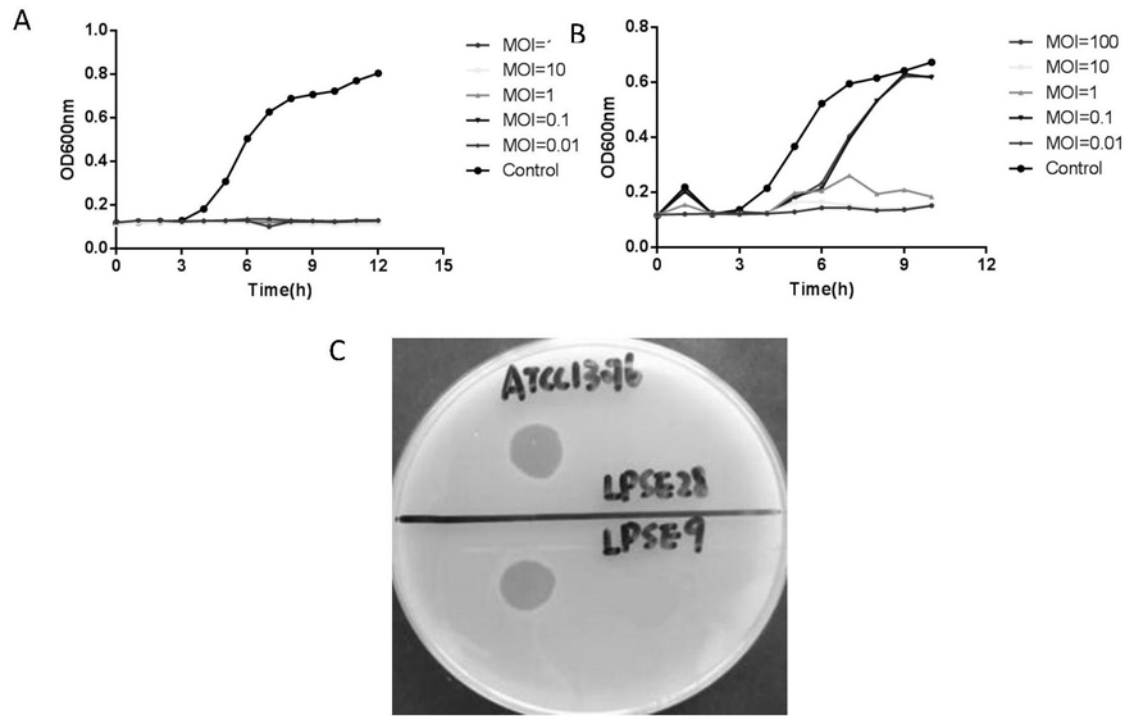


图4

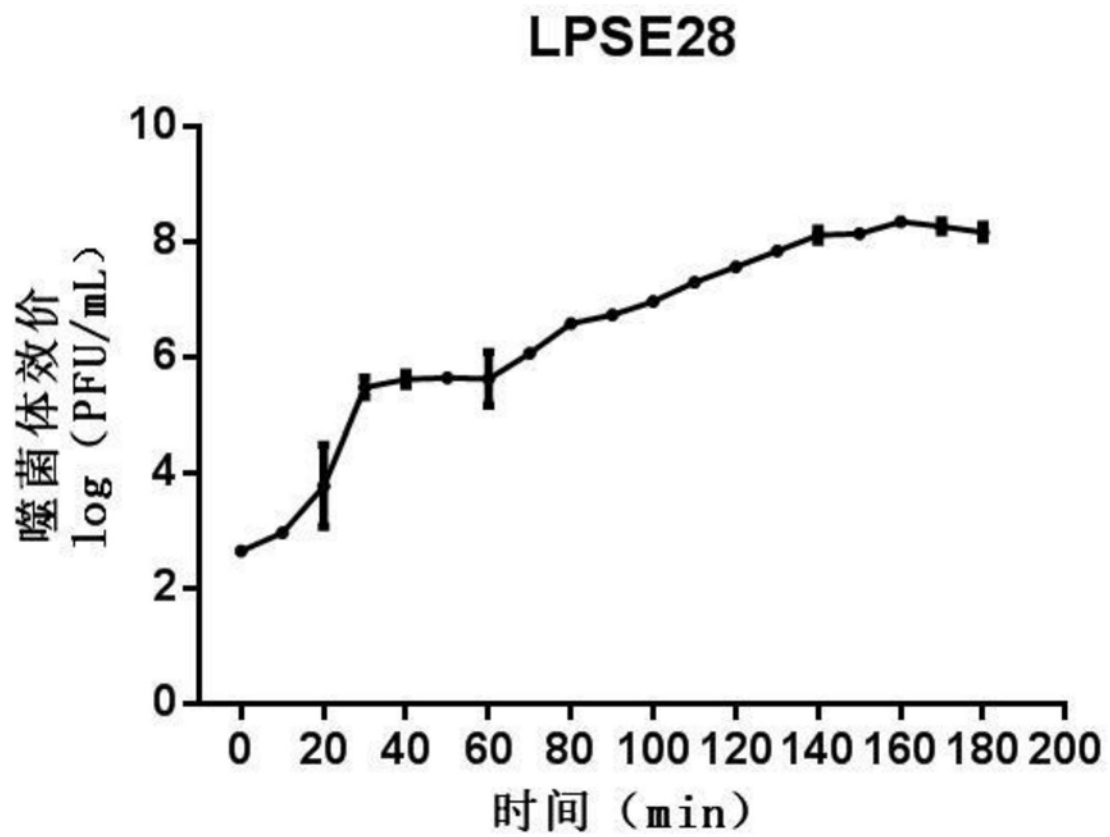


图5

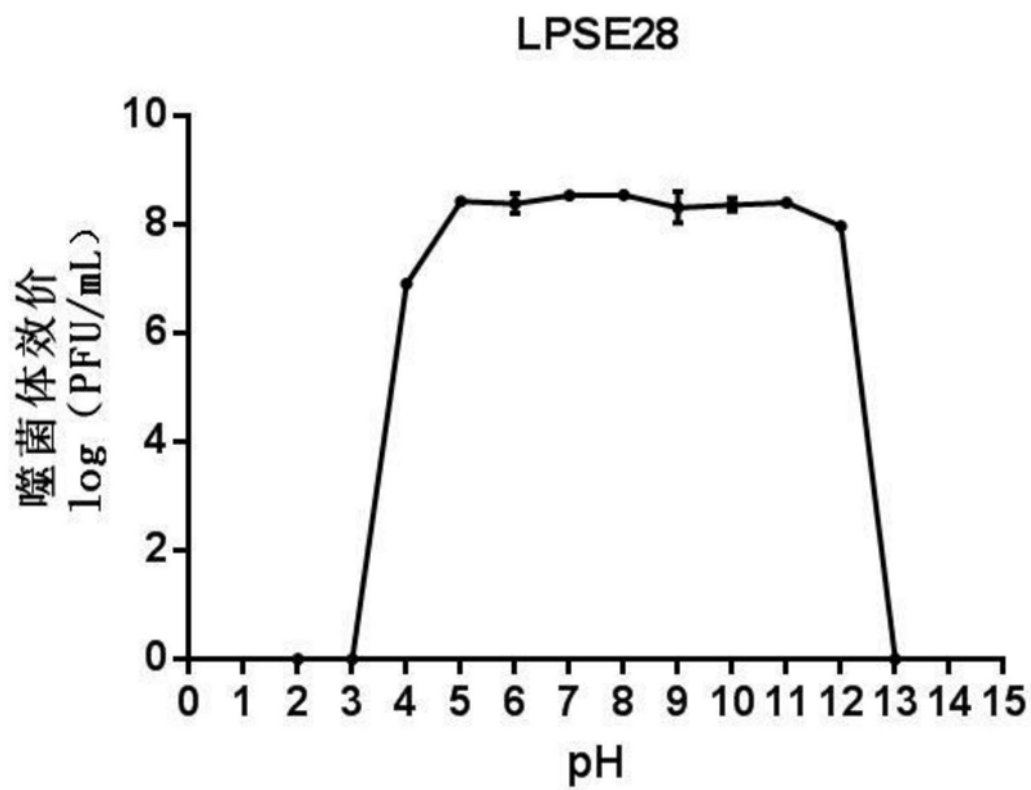


图6

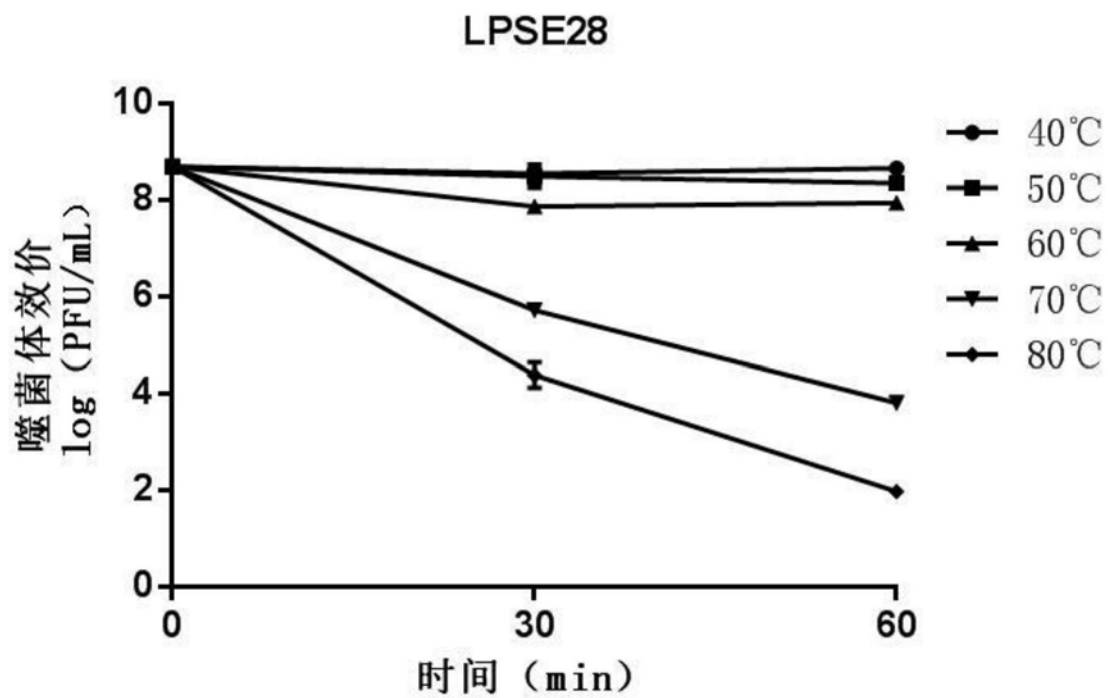


图7

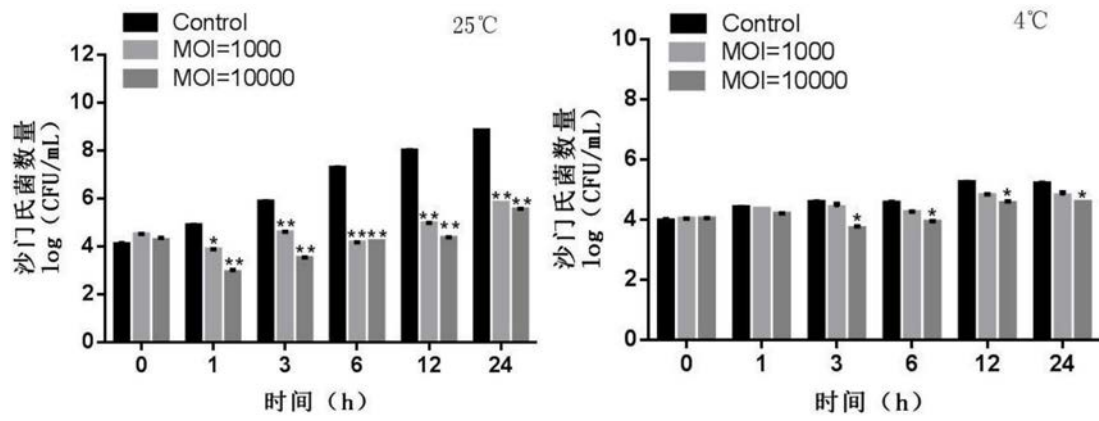


图8

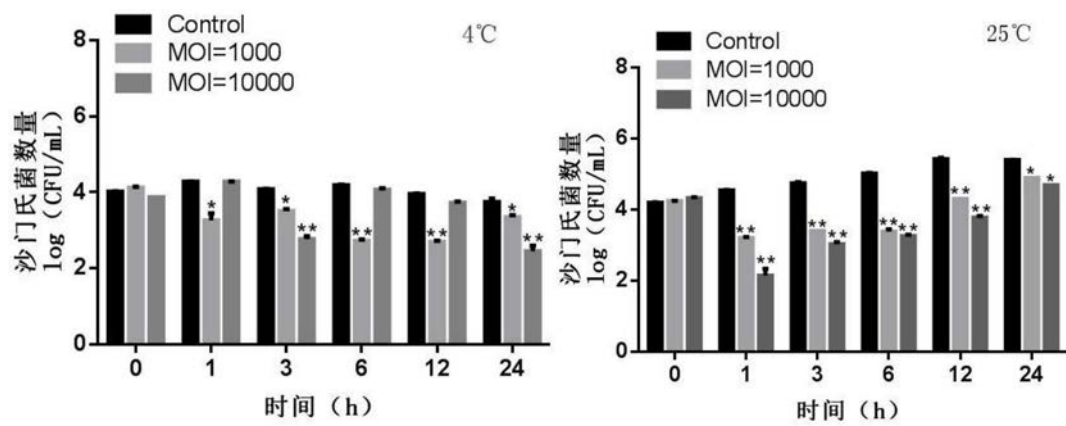


图9

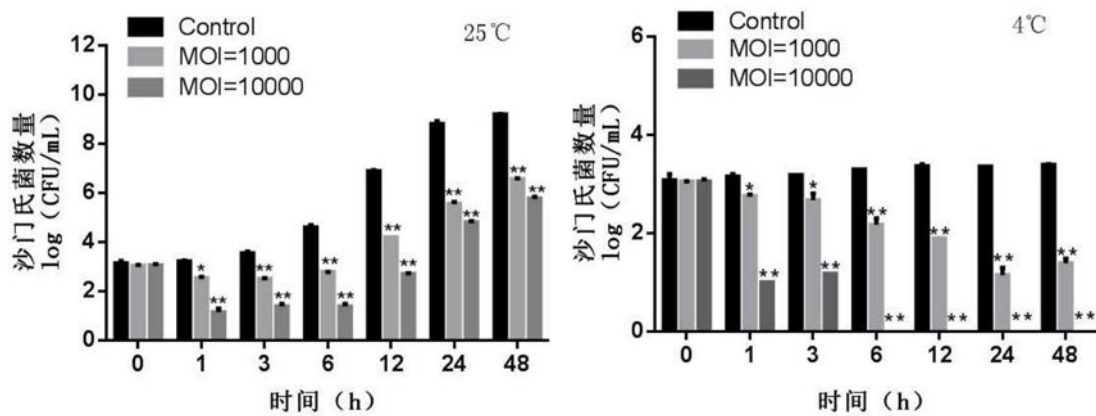


图10