



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109825479 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910153365.0

(22)申请日 2019.02.28

(83)生物保藏信息

CCTCC NO:M 2019049 2019.01.15

(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 周洋 刘坤 李锦铨

穆罕默德·沙利弗 叶响 董星星
晏婷

(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 3/3571(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图7页

(54)发明名称

一种宽谱沙门氏菌噬菌体LPSTLL及应用

(57)摘要

本发明涉及食品安全领域,具体公开了一种宽谱沙门氏菌噬菌体LPSTLL及应用。本发明提供了的沙门氏菌噬菌体LPSTLL,其保藏编号是:CCTCC NO:M 2019049。本发明中的沙门氏菌噬菌体LPSTLL为烈性噬菌体,具有很广的宿主谱,能裂解鼠伤寒、肠炎、都柏林等13种血清型的沙门氏菌,且还能裂解多株具有耐药性的沙门氏菌。本发明还公开了该噬菌体作为生物控制剂在食品贮藏中的抑菌应用,尤其是能够抑制牛奶和鸡肉中由沙门氏菌增殖引起的污染,从而保证食品的安全卫生。

1. 一种分离的沙门氏菌噬菌体,所述的噬菌体的保藏编号为CCTCC NO:M 2019049。
2. 权利要求1所述的沙门氏菌噬菌体在制备沙门氏菌抑菌剂中的应用。
3. 权利要求1所述的沙门氏菌噬菌体在制备食品沙门氏菌抑菌剂中的应用。
4. 根据权利要求2所述的应用,所述的沙门氏菌包括:鼠伤寒沙门氏菌,耐药性的鼠伤寒沙门氏菌,肠炎沙门氏菌,耐药性的肠炎沙门氏菌,都柏林沙门氏菌,猪霍乱沙门氏菌,新港沙门氏菌,乙型副伤寒沙门氏菌,鸭沙门氏菌,鸡白痢沙门氏菌,爪哇沙门氏菌,肯塔基沙门氏菌,亚利桑那沙门氏菌,伤寒沙门氏菌和海德堡沙门氏菌。

一种宽谱沙门氏菌噬菌体LPSTLL及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全领域,具体涉及一种宽谱沙门氏菌噬菌体LPSTLL及应用,特别 是在控制食品源沙门氏菌中的应用。

背景技术

[0002] 沙门氏菌 (*Salmonella*) 是一种重要的人畜共患病原菌,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。沙门氏菌不仅能引起鼠类、禽类和家畜等动物的疾病,还可 以通过食物传播感染人类。大部分感染是由于饮用被污染的水或食用被污染的食物,如肉类、鸡蛋、乳制品和新鲜农产品等,从而引起食物中毒。人们感染沙门氏菌后最常引起急性胃肠 炎,其症状包括腹泻、腹部绞痛和发烧,其他临床表现包括肠热、尿路感染和严重的粪便感 染等,严重者甚至会危及生命。据统计,在2011年至2016年,在中国由沙门氏菌引起的食 源性爆发案例多达13219例,占总数的34.2%,在食源性致病菌中位列首位。沙门氏菌亚种 及血清型有很多,但与食源性爆发相关的通常是沙门氏菌肠道亚种的部分血清型,并且在各 个国家和地区中沙门氏菌的优势血清型都有所不同。尹德凤等人对中国不同地区不同种类食 品中沙门氏菌的污染情况进行了统计,结果表明我国食品和相关环境中沙 门氏菌检出率排名 前5位的血清型分别为德尔卑沙门氏菌 (*S. derby*)、肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*)、鸭沙门氏 菌 (*S. anatum*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、阿贡纳沙 门氏菌 (*S. agona*),另外,乙 型副伤寒沙门氏菌 (*S. paratyphi B*)、猪霍乱沙门氏菌 (*S. choleraesuls*),鸡白痢沙门氏菌 (*S. pullorum*) 等沙门氏菌也在部分种类的食品中常被检出。基于沙门氏菌对我国食品安全 的威胁程度以及防控难度,解决食品中的沙门氏菌 污染问题已经迫在眉睫。

[0003] 目前预防和控制食品中沙门氏菌的主要方法是抗生素以及其他化学消毒剂的,但是 各类 消毒剂在使用过程中对人体、畜禽、环境存在不同程度的副作用,同时耐药沙门氏 菌菌株的 出现也导致消毒效果下降或失效,所以急需开发新型生物抑菌剂以应对常见的 沙门氏菌以及 耐药沙门氏菌对食品安全的威胁。

[0004] 噬菌体是一种可以感染细菌的病毒,它广泛存在于各种环境中,如土壤、水、动物、 农 产品以及海洋中等。自从上个世纪噬菌体被发现以来,科学家们就对其表现了强烈的兴 趣,做了大量的关于利用噬菌体治疗人的细菌性感染的研究。进入21世纪后,有许多的商 业化 噬菌体产品得到了上市许可,用于预防和控制食品中的大肠杆菌0157:H7、沙门氏菌、 单 增李斯特菌等食源性病原菌。特别是在2006年,美国FDA批准了第一个基于噬菌体的产 品 (*ListShield™*) 来控制肉类和家禽产品中的单核细胞增生李斯特菌,实现了西方世界噬 菌 体历史上的一个重要里程碑。从那时起,其他的噬菌体产品也陆陆续续地被批准用于食 品中 的生物防治。

[0005] CN201710488325.2公开了一株具有鼠伤寒沙门氏菌防治效果的噬菌体ΦSa-1及 其应用,该噬菌体对收集的18株细菌(包括大肠杆菌、沙门氏菌、志贺氏菌)中10株具有裂 解作用。CN201410508239.X公开了一种宽裂解谱沙门氏菌噬菌体STP4-a及其抑菌应用,该

噬菌体 能高效地裂解5株不同血清型的沙门氏菌。本发明中的噬菌体LPSTLL为宽谱型噬菌体，对肠炎、鼠伤寒、都柏林等13个不同血清型的共42株沙门氏菌都有裂解作用，并且LPSTLL 还可以裂解具有耐药性的沙门氏菌。

发明内容

[0006] 本发明的目的是在于，针对目前食品中沙门氏菌引起的食品安全事件，提供了一种对多种血清型的沙门氏菌都有很好的杀菌效果的宽谱型沙门氏菌噬菌体LPSTLL，所述的噬菌体 的保藏编号为CCTCC NO:M 2019049。

[0007] 本发明的另一个目的是提供一株沙门氏菌噬菌体LPSTLL在制备沙门氏菌抑菌剂中的应用。

[0008] 为了达到上述目的，本发明采取以下技术措施：

[0009] 申请人自武汉市协和医院水样中筛选出一株对鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、都柏林 沙门氏菌等13种不同血清型的42株沙门氏菌都有裂解活性的宽谱型噬菌体，该噬菌体已于 2019年1月15日将该沙门氏菌噬菌体LPSTLL保藏于中国典型培养物保藏中心，分类命名：沙门氏菌噬菌体 (*Salmonella* phage) LPSTLL，保藏编号为CCTCC NO:M 2019049，地址：中国武汉武汉大学。

[0010] 本发明中的噬菌体LPSTLL属于长尾噬菌体科，具有呈多面体的头部结构和长的非收缩性的尾部，头部直径约40nm，尾部长约136nm；该噬菌体在双层琼脂平板上可以形成圆形、透明、清晰的噬菌斑，直径约0.5-1mm；本发明中的噬菌体LPSTLL在pH 3-12，30℃-60℃活性稳定。

[0011] 一株沙门氏菌噬菌体LPSTLL在制备沙门氏菌抑菌剂中的应用，包括利用该噬菌体制 备成食品沙门氏菌抑菌剂；

[0012] 以上所述的应用中，所述的沙门氏菌包括：鼠伤寒沙门氏菌，耐药性的鼠伤寒沙门氏菌，肠炎沙门氏菌，耐药性的肠炎沙门氏菌，都柏林沙门氏菌，猪霍乱沙门氏菌，新港沙门氏菌，乙型副伤寒沙门氏菌，鸭沙门氏菌，鸡白痢沙门氏菌，爪哇沙门氏菌，肯塔基沙门氏菌，亚 利桑那沙门氏菌、伤寒沙门氏菌和海德堡沙门氏菌。

[0013] 与现有技术相比，本发明具有以下优点和有益效果：

[0014] (1) 经固体增殖后的噬菌体原液效价高，在本发明中，沙门氏菌噬菌体LPSTLL的效价 $\geq 10^{10}$ pfu/mL。

[0015] (2) 在噬菌体LPSTLL能裂解的这13种沙门氏菌血清型中，大部分血清型都是我国食品源沙门氏菌血清型中的优势血清型。

[0016] (3) 噬菌体LPSTLL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。

[0017] (4) 在本发明中，噬菌体在MOI为100、10、1、0.1、0.01的条件下对沙门氏菌均有 很好的抑菌效果。

[0018] (5) 在本发明中，通过对LPSTLL和沙门氏菌噬菌体LPST10（申请号201610924016.0）的宿主谱和在相同MOI下的杀菌能力对比，可以看出LPSTLL对沙门氏菌的裂解效果更好。

[0019] (6) 噬菌体LPSTLL可以应用于食品中，安全有效地针对沙门氏菌污染进行生物防

控。

附图说明

- [0020] 图1为沙门氏菌噬菌体LPSTLL在双层琼脂平板上的噬菌斑照片示意图。
- [0021] 图2为沙门氏菌噬菌体LPSTLL的电镜照片示意图。
- [0022] 图3为沙门氏菌噬菌体LPSTLL的核酸序列比对结果图。
- [0023] 图4为不同感染复数下噬菌体LPSTLL对其宿主菌鼠伤寒沙门氏菌UK-1的抑菌作用图；
- [0024] 图5为不同感染复数下噬菌体LPSTLL和LPST10对4株不同沙门氏菌的抑菌作用示意图；
- [0025] 其中：A为在MOI=10和100时沙门氏菌噬菌体LPSTLL和LPST10对沙门氏菌UK-1 的抑菌作用图；
- [0026] B为在MOI=10和100时沙门氏菌噬菌体LPSTLL和LPST10对沙门氏菌ATCC 14028的抑菌作用图；
- [0027] C为在MOI=10和100时沙门氏菌噬菌体LPSTLL和LPST10对沙门氏菌ATCC 13311的抑菌作用图；
- [0028] D为在MOI=10和100时沙门氏菌噬菌体LPSTLL和LPST10对沙门氏菌ATCC ST-8 的抑菌作用图。
- [0029] 图6为沙门氏菌噬菌体LPSTLL的温度耐受性图。
- [0030] 图7为沙门氏菌噬菌体LPSTLL的pH耐受性图。
- [0031] 图8为沙门氏菌噬菌体LPSTLL的一步生长曲线图。

具体实施方式

[0032] 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。

[0033] 实施例1：

[0034] 沙门氏菌噬菌体LPSTLL的分离制备

[0035] (1) 噬菌体的分离：

[0036] 水样品来自湖北省武汉市协和医院。

[0037] 将水样品于4℃下10000×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℃下10000×g离心10min，用0.22μm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℃下保存。在5mL TSB液体培养基中接种宿主菌（鼠伤寒沙门氏菌UK-1），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 TSB培养基混合，在37℃的条件下，200r/min震荡培养12-18h，使噬菌体增殖。将培养结束后的悬液10000×g离心10min，取上清液，用0.22μm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TSA固体培养基倒下层平板，然后取100μL宿主菌液和4mL 0.7%TSB半固体培养基混匀倒上层，待上层琼脂凝固后，滴加5μL上述滤液，37℃下培养，观察是否有噬菌斑。

[0038] (2)噬菌体的增殖和纯化:

[0039] 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 μ L UK-1菌液的TSB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200r/min震荡培养8h至12h左右。4 $^{\circ}$ C下10000 \times g离心10min,用0.22 μ m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 μ L一定稀释度的噬菌体稀释液、100 μ L宿主菌液以及4mL 0.7% TSB半固体培养基混匀,迅速倾倒下层琼脂(TSA)平皿上,37 $^{\circ}$ C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 μ L UK-1菌液的10mL的TSB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200r/min震荡培养8h至12h左右。4 $^{\circ}$ C下10000 \times g离心10min,用0.22 μ m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。

[0040] 申请人于2019年1月15日将该沙门氏菌噬菌体LPSTLL保藏于中国典型培养物保藏中心,分类命名:沙门氏菌噬菌体(*Salmonella* phage)LPSTLL,保藏编号为CCTCC NO:M 2019049,地址:中国武汉武汉大学。

[0041] 实施例2:

[0042] 噬菌体LPSTLL和LPST10宿主谱的比较

[0043] 实验选择沙门氏菌噬菌体LPSTLL和LPST10对包括沙门氏菌在内的等50株菌株进行宿主谱测定。其中,13个血清型共42株沙门氏菌具体为:

[0044] 1) 10株鼠伤寒沙门氏菌ATCC 14028,ATCC 13311,UK-1,ATCC ST-8,SGSC 4903,SL 1344,X12341,LT2,CMCC (B) 50115,IQCC 10503;

[0045] 2) 5株具有耐药性的鼠伤寒沙门氏菌:LST10 (893),LST11 (1893),LST12 (2069),LST13 (2088),LST14 (2238);

[0046] 3) 7株肠炎沙门氏菌ATCC 13076,SJTUF10978,SJTUF10984,LK5-3820,SGSC 4901,IQCC 10512,IQCC 10528;

[0047] 4) 5株具有耐药性的肠炎沙门氏菌:LSE6 (C1490),LSE7 (C2194),LSE8 (C2195),LSE9 (C2211),LSE10 (C2247);

[0048] 5) 2株都柏林沙门氏菌3710,3723;

[0049] 6) 2株猪霍乱沙门氏菌ATCC 10708,CICC 21493;

[0050] 7) 1株新港沙门氏菌E20002725;

[0051] 8) 3株乙型副伤寒沙门氏菌CMCC 50094,CICC 21495,IQCC 10504;

[0052] 9) 1株鸭沙门氏菌ATCC 9270;

[0053] 10) 1株鸡白痢沙门氏菌CVCC 519;

[0054] 11) 1株爪哇沙门氏菌CVM 35943;

[0055] 12) 1株肯塔基沙门氏菌CVM 29188;

[0056] 13) 1株亚利桑那沙门氏菌CDC346-86;

[0057] 14) 1株伤寒沙门氏菌CMCC (B) 50071;

[0058] 15) 1株海德堡沙门氏菌IQCC 10531;

[0059] 其余8株菌株为:

[0060] 2株大肠杆菌*E.coli* BL21,*E.coli* DH5 α ;2株嗜水气单胞菌*A.hydrophila* J1,

A.hydrophila ZYAH72;3株金黄色葡萄球菌S.aureus ATCC 6538,S.aureus ATCC 8095,S.aureus ATCC 29213;1株李斯特菌Listeria ATCC 19114。

[0061] 分别培养上述菌株至对数期,取100μL培养至对数期的菌液与4mL 0.7%TSA半固体培养基混合,混匀后倒入预先制备好的TSA固体琼脂平板上,待凝固且表面干燥后,取5μL 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。

[0062] 如表一所示,沙门氏菌噬菌体LPSTLL能裂解13个不同血清型的共32株沙门氏菌,LPST10能裂解12个不同血清型的共31株沙门氏菌,且LPSTLL对这些沙门氏菌的裂解程度要普遍大于LPST10(申请号2016109240160)。

[0063] 如表二所示,LPSTLL能裂解10株耐药性沙门氏菌,LPST10能裂解9株耐药性沙门氏菌,且噬菌体LPSTLL对这些耐药性沙门氏菌的裂解程度要普遍大于LPST10。

[0064] 表一:噬菌体LPSTLL和LPST10对40株菌株的宿主谱

菌株名称	属	噬菌体	噬菌体
		LPSTLL	LPST10
		对菌株的	对菌株的
		裂解程度	裂解程度
ATCC 14028	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	+++
ATCC 13311	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	++
UK-1	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	++
ATCC ST-8	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	++
SGSC 4903	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	++
SL 1344	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	+
[0065] X12341	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	++
LT2	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	+
CMCC(B) 50115	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	++++
IQCC 10503	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	++++
ATCC 13076	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++	+++
SJTUF10978	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++	+++
SJTUF10984	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+++	+++
LK5-3820	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+++	+++
SGSC 4901	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+++	++
IQCC 10512	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++	++
IQCC 10528	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++	+++

	3710	<i>Salmonella</i> Dublin	++++	++
	3723	<i>Salmonella</i> Dublin	+++	+
	ATCC 10708	<i>Salmonella</i> Choleraesuis	+++	+
	CICC 21493	<i>Salmonella</i> Choleraesuis	++++	++++
	E20002725	<i>Salmonella</i> Newport	++	++
	CMCC 50094	<i>Salmonella</i> Paratyphi B	++++	++++
	CICC 21495	<i>Salmonella</i> paratyphi B	+++	++++
	IQCC 10504	<i>Salmonella</i> paratyphi B	+++	++++
	ATCC 9270	<i>Salmonella</i> Anatum	+++	-
	CVCC 519	<i>Salmonella</i> Pullorum	++++	+++
	CVM 35943	<i>Salmonella</i> Javiana	+++	++
[0066]	CVM 29188	<i>Salmonella</i> Kentucky	+++	++
	CDC346-86	<i>Salmonella</i> arizonae	+++	++
	CMCC(B) 50071	<i>Salmonella</i> typhi	++	+++
	IQCC 10531	<i>Salmonella</i> Heidelberg	++	+++
	<i>E. coli</i> BL21	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>Escherichia coli</i>	-	-
	<i>A. hydrophila</i> J1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-
	<i>A. hydrophila</i> ZYAH72	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 8095	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
	<i>Listeria</i> ATCC 19114	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-

[0067] 注：“+”表示噬菌体LPSTLL对菌株的裂解程度，“+”越多，表示裂解程度越高。

[0068] 表二：噬菌体LPSTLL和LPST10对10株沙门氏菌耐药菌株的的宿主谱

	菌株名称	属	噬菌体	噬菌体
			LPSTLL	LPST10
[0069]			对菌株的	对菌株的
			裂解程度	裂解程度

[0070]	LST10 (893)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++	+
	LST11 (1893)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	++
	LST12 (2069)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	++
	LST13 (2088)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	++++	+
	LST14 (2238)	<i>Salmonella</i> Typhimurium	+++	++
	LSE6 (C1490)	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++	+++
	LSE7 (C2194)	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+++	++
	LSE8 (C2195)	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+++	+
	LSE9 (C2211)	<i>Salmonella</i> Enteritidis	++++	+++
	LSE10 (C2247)	<i>Salmonella</i> Enteritidis	+	-

[0071] 注：“+”表示噬菌体LPSTLL对菌株的裂解程度，“+”越多，表示裂解程度越高。

[0072] 实施例3：

[0073] 噬菌体LPSTLL的生物学特性

[0074] (1) 噬菌体在透射电子显微镜下的形态

[0075] 首先对噬菌体进行浓缩，具体步骤为：将噬菌体LPSTLL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TSB液体培养基中，37℃、200r/min 震荡培养3h。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75k V下观察。用图像处理软件ImageJ进行长度测量。

[0076] 结果如图1所示，发明人将该沙门氏菌噬菌体命名为：LPSTLL，其形态特征为：头部呈多面体结构，头部直径约为40nm，尾长约136nm，经鉴定该噬菌体为长尾噬菌体科。

[0077] (2) 噬菌体LPSTLL在双层平板上的形态

[0078] 如图2所示，噬菌体LPSTLL为裂性噬菌体，形成了圆形、透明、清晰的噬菌斑，直径大小为0.5-1mm。

[0079] 实施例4：

[0080] 噬菌体基因组测序

[0081] 取1mL噬菌体原液，加入20μL DNA酶和RNA酶，涡旋2min，37℃温育40min；加入20μL 2M氯化锌溶液，37℃温育7min；10000rpm离心1min；弃上清，加入500μL TES buffer，吹吸。65℃温育15min，加入10μL蛋白酶k。50℃温育1h，每隔10min上下颠倒一下。温育后冷却，加入60μL预冷的3M CH₃COOK (提前放4℃，用醋酸调pH至5.2)，冰上放置 15min。12000rpm离心10min，4℃。取上清，加入600μL苯酚/氯仿/异戊醇，上下轻柔反复颠倒，12000rpm离心10min；取上清，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。4℃下12000rpm离心10min，弃上清。加入1mL预冷的 70%乙醇洗一

次,在12000rpm离心10min,弃上清,待乙醇挥发后,再加20 μ L无菌水在常温下溶解DNA,置于-20 $^{\circ}$ C下保存。将DNA样品交于测序公司完成。

[0082] 将该噬菌体LPSTLL的基因组在NCBI上进行核酸序列比对,结果如图3所示,噬菌体LPSTLL与数据库中已经公布的噬菌体Salmonella phage E1比对结果为Query cover 58%, Ident 92%;与噬菌体Salmonella LPST10的比对结果为Query cover 67%, Ident 99%;与Salmonella IME207的比对结果为Query cover 56%, Ident 88%。另外,LPSTLL与除了这三个以外的其他噬菌体的序列相似性也比较低,说明该噬菌体是一种新型噬菌体。

[0083] 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,结果表明将该噬菌体应用于食品中沙门氏菌的防控中没有潜在的安全风险。尅俚

[0084] 实施例5:

[0085] 在MOI=100,10,1,0.1,0.01时,沙门氏菌噬菌体LPSTLL对其宿主菌鼠伤寒沙门氏菌UK-1的裂解效果

[0086] 接种UK-1于TSB培养基中8h,然后取100 μ L菌液转接至新鲜的TSB培养基中,37 $^{\circ}$ C下培养3h,取1mL菌液在4 $^{\circ}$ C下12000rpm离心10min,用PBS重悬菌体后采用平板计数法测量菌数,并将菌液梯度稀释至10⁶CFU/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加入不同稀释度的噬菌体100 μ L,并与100 μ L菌数为10⁶CFU/mL的菌液混匀。另设对照组:加入200 μ L TSB培养基;阳性对照组:加入100 μ L对数期沙门菌菌液和100 μ L TSB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 $^{\circ}$ C,每隔1h测定OD值。

[0087] 结果如图4所示,与不加噬菌体的阳性对照组相比,在2h后,不同MOI下的所测的OD值都相对稳定在较低水平,表明UK-1的生长受到了抑制,噬菌体LPSTLL在不同MOI值下均表现出较好的抑菌能力。

[0088] 实施例6:

[0089] 沙门氏菌噬菌体LPSTLL和LPST10对四株不同的沙门氏菌的裂解能力的比较

[0090] 本实例中的实验方法参照实施例5。选择的MOI为10和100,实验中的四株沙门氏菌分别为UK-1、ATCC 13311、ATCC 14028、ATCC ST-8。

[0091] 上述实验结果如图5所示,在8h以内,LPSTLL可以完全抑制四株沙门氏菌的生长,而LPST10不能完全抑制四株沙门氏菌的生长,只能在4至6h以内抑制住细菌的生长。另外,在每个MOI下,LPSTLL对沙门氏菌的抑制效果也要比LSPT10更好。综上所述,LPSTLL的对这四株沙门氏菌抑菌效果要优于LPST10。

[0092] 实施例7:

[0093] 噬菌体LPSTLL的温度耐受性的测定

[0094] 将噬菌体原液稀释至10⁸pfu/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 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C的恒温水浴锅中,分别在30min和60min后测效价。

[0095] 结果如图6所示,噬菌体LPSTLL在30-60 $^{\circ}$ C效价稳定于10⁸pfu/mL,在70 $^{\circ}$ C处理30min和60min后,效价分别降低至10⁴pfu/mL左右和10²pfu/mL左右,80 $^{\circ}$ C处理30min和

60min 后效价都下降至为0。以上结果表明噬菌体LPSTLL在30-60℃内稳定,表现出良好的稳定性。

[0096] 实施例8:

[0097] 噬菌体LPSTLL的pH耐受性的测定

[0098] 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LPSTLL效价为 10^8 pfu/mL)的噬菌体原液100 μ L,加入到900 μ L不同pH值的TSB液体培养基中,37℃水浴1h后测定各离心管中噬菌体的效价。

[0099] 结果如图7所示,噬菌体LPSTLL的效价在pH 3-12的范围内相对稳定,具有很好的耐酸耐碱性。

[0100] 实施例9:

[0101] 噬菌体LPSTLL的最适感染复数(MOI)测定

[0102] 按一定的MOI值(0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000)将100 μ L噬菌体与100 μ L培养至对数期的宿主菌液混合,再加入800 μ L TSB培养基,37℃下1.5mL离心管中培养3.5h,10000 \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,效价高的代表最适MOI。

[0103] 结果如表三所示,当MOI为0.01时,效价最高,为 6.7×10^9 pfu/mL,即LPSTLL的最适MOI为0.01。

[0104] 表三:噬菌体LPSTLL的最适感染复数测定

[0105]	MOI	LPSTLL (pfu/mL)
	0.001	7.2×10^8
	0.01	6.7×10^9
	0.1	3.6×10^8
	1	2.8×10^8
	10	4.5×10^7
	100	1.3×10^7
	1000	1.1×10^7

[0106] 实施例10:

[0107] 噬菌体的一步生长曲线测定

[0108] 将宿主菌培养至对数生长期。将噬菌体和宿主菌(UK-1)按最适MOI值(MOI=0.01),即1mL宿主菌(UK-1)悬液 10^8 CFU/mL,10 μ L 10^7 pfu/mL的沙门氏菌噬菌体LPSTLL。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100 μ L混匀液加到10mL TSB液体培养基中,每隔10min中取样100 μ L,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。

[0109] 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20min,爆发期约100min,平均裂解量约为71.42pfu/cell。

[0110] 实施例11:

[0111] 在4℃和25℃条件下,噬菌体LPSTLL对牛奶中沙门氏菌的抑菌实验。

[0112] 在2mL的离心管中加入900μL的已灭过菌的牛奶,然后加入100μL 10^5 CFU/mL的UK-1 菌液,在4℃和25℃下放置10min至20min。对照组中加入100μL的PBS缓冲液,在实验组中按照MOI=1000和MOI=10000加入100μL不同滴度的噬菌体。以加入噬菌体的时刻为起始时刻,分别于1h、3h、6h、12h取样,5000r/min离心5min,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效价测定和菌落计数。

[0113] 在4℃条件下,MOI=1000和MOI=10000时,与对照组相比,实验组中菌数一直呈下降趋势,12h后分别下降了3212.5CFU/mL(下降了86.47%) 和3242.5CFU/mL(下降了87.28%)。

[0114] 在25℃条件下,MOI=1000时,在6h前,对照组中菌数持续上升,而实验组中菌数基本不变。12h时,与对照组相比,实验组中菌数下降了2.605Log10CFU/mL(下降了69.15%)。

[0115] 在25℃条件下,MOI=10000时,在3h前,对照组中菌落数持续上升,实验组中菌落数基本不变。12h时,与对照组相比,实验组中菌数下降了2.8Log10CFU/mL(下降了66.84%)。

[0116] 综合4℃和25℃下的实验结果,说明在两个不同温度下噬菌体LPSTLL对牛奶中的沙门氏菌UK-1都有良好的抑菌效果。

[0117] 实施例12:

[0118] 在4℃和25℃条件下,噬菌体LPSTLL对鸡肉中沙门氏菌的抑菌实验。

[0119] 将1.5cm²的方形肉块肉样置于无菌培养皿中央,取 10^6 CFU/mL的UK-1菌液10μL滴加在肉的表面,在4℃和25℃下分别放置10至20min。取MOI=1000和MOI=10000的比例的噬菌体滴加于样品上。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1h、3h、6h、12h取样,加入5mL的PBS(pH=7.2-7.4)缓冲液,将样品用无菌研磨棒研碎,然后超声5min,涡旋。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效价测定和菌落计数。

[0120] 在4℃条件下,MOI=1000时,与对照组相比,实验组中菌数在1h内明显下降,为3795 CFU/mL(下降了69.63%)。3h后,与对照组相比,实验组中菌数下降4130CFU/mL(下降了83.43%)。在3h后,实验组的菌数逐渐上升,在12h时菌数达到最大值2920CFU/mL,相对于对照组(此时为4975CFU/mL),菌数下降2055CFU/mL(下降了41.31%)。

[0121] 在4℃条件下,MOI为10000时,与对照组相比,实验组中菌数在1h内下降显著,下降了4970CFU/mL(下降了91.19%)。在12h内,相比于对照组(5000CFU/mL)左右,实验组中菌数一直维持在较低的水平,菌数都在1000CFU/mL以下。

[0122] 在25℃条件下,MOI=1000和MOI=10000时,与对照组相比实验组中菌数在1h下降显著,分别下降了5465CFU/mL(下降了79.20%) 和6425CFU/mL(下降了93.12%)。在12h内,相比于对照组(菌数在6000CFU/mL至7000CFU/mL左右),实验组中菌数一直维持在较低的水平,菌数都在1500CFU/mL以下。

[0123] 综合4℃和25℃下的实验结果,说明在两个不同温度下噬菌体LPSTLL对鸡肉中的沙门氏菌UK-1都有良好的抑菌效果。

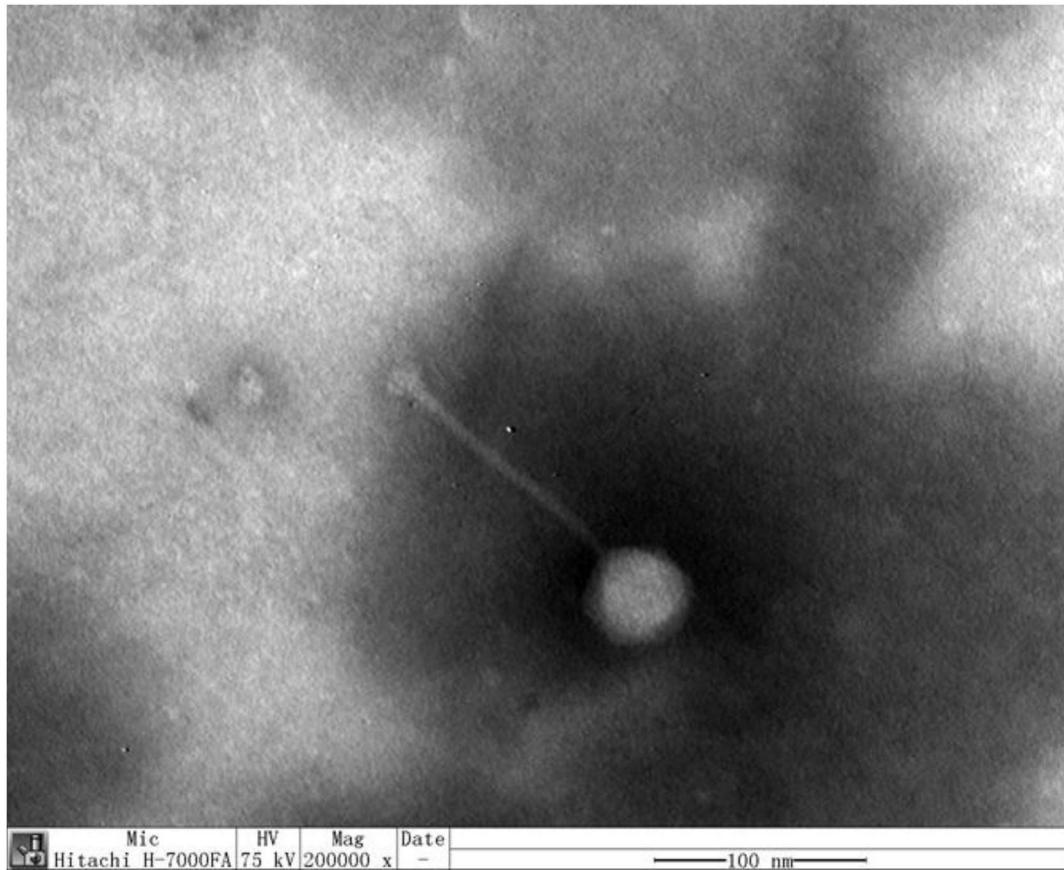


图1

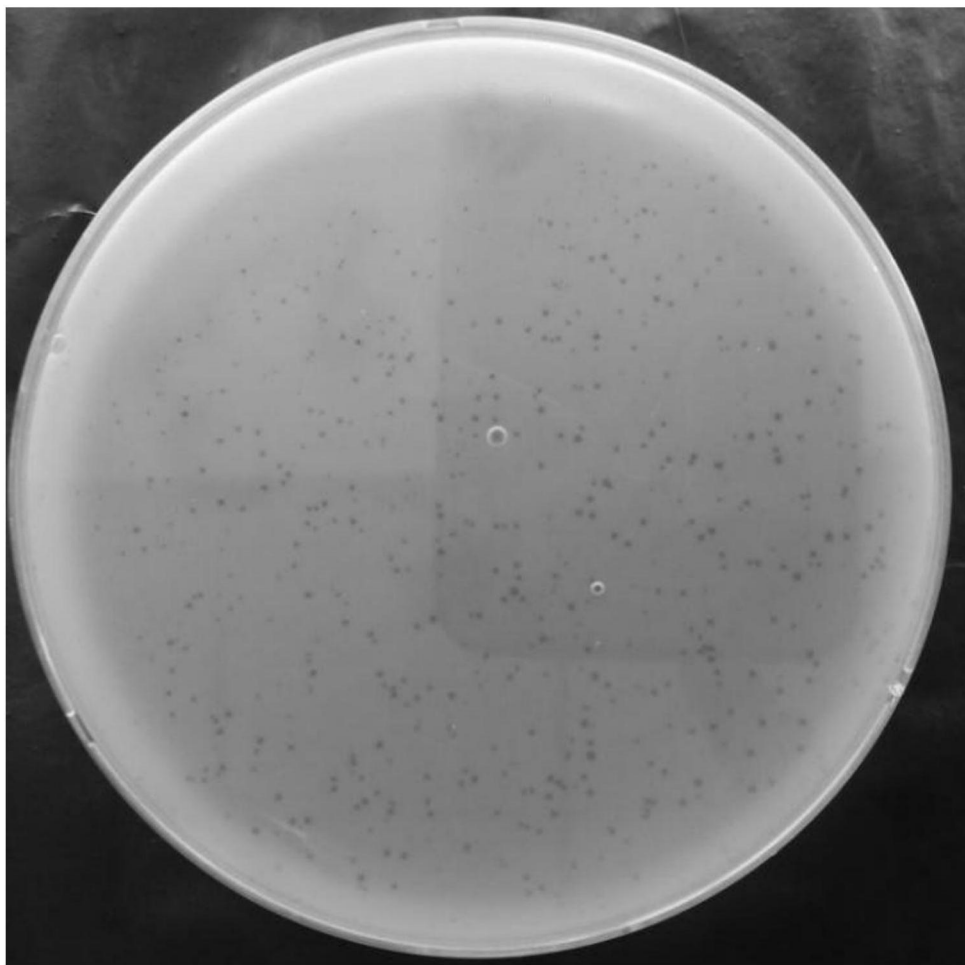


图2

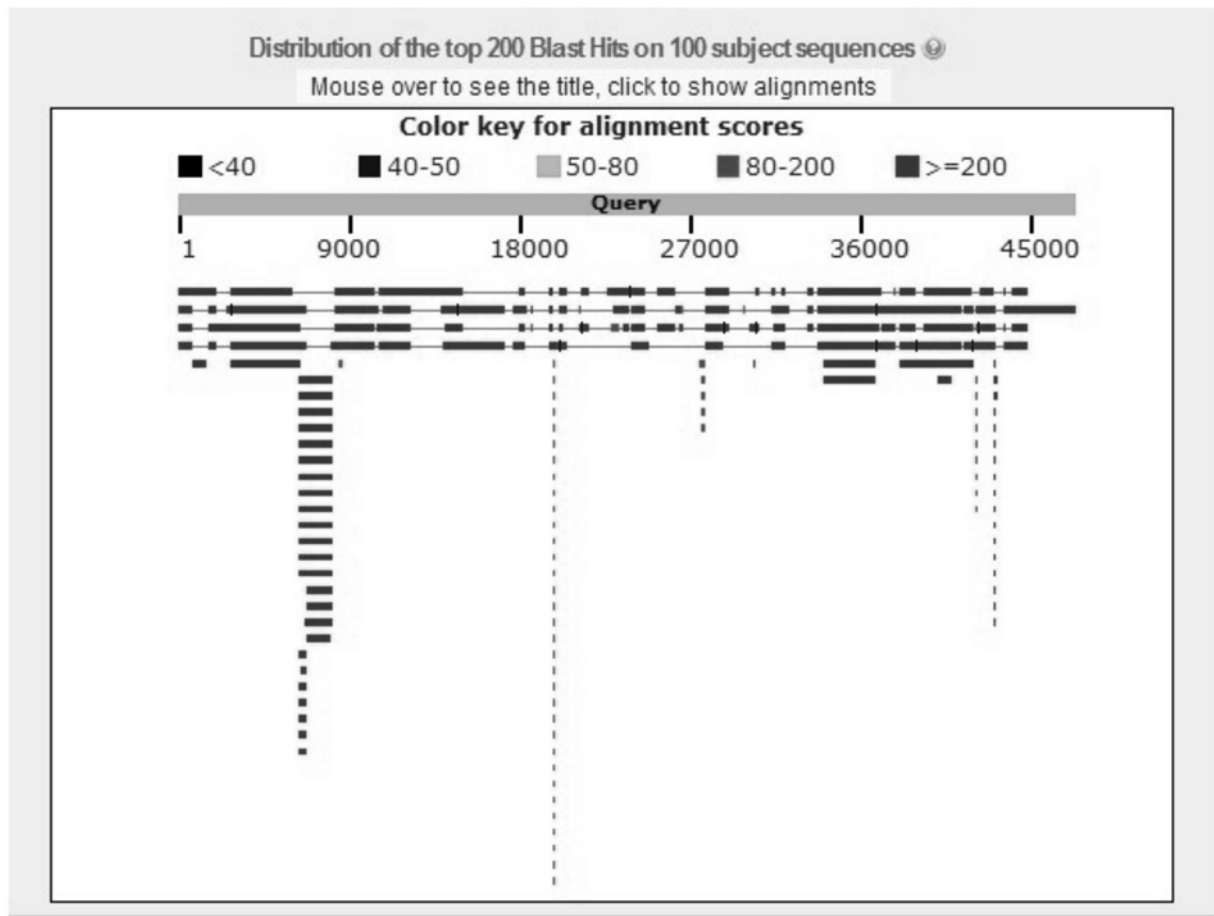


图3

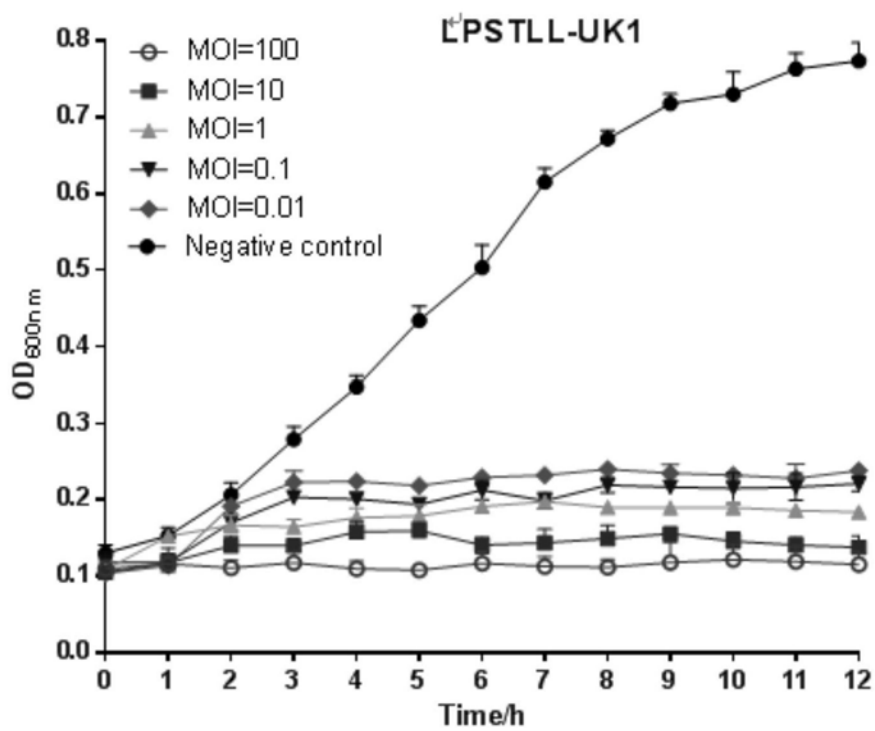


图4

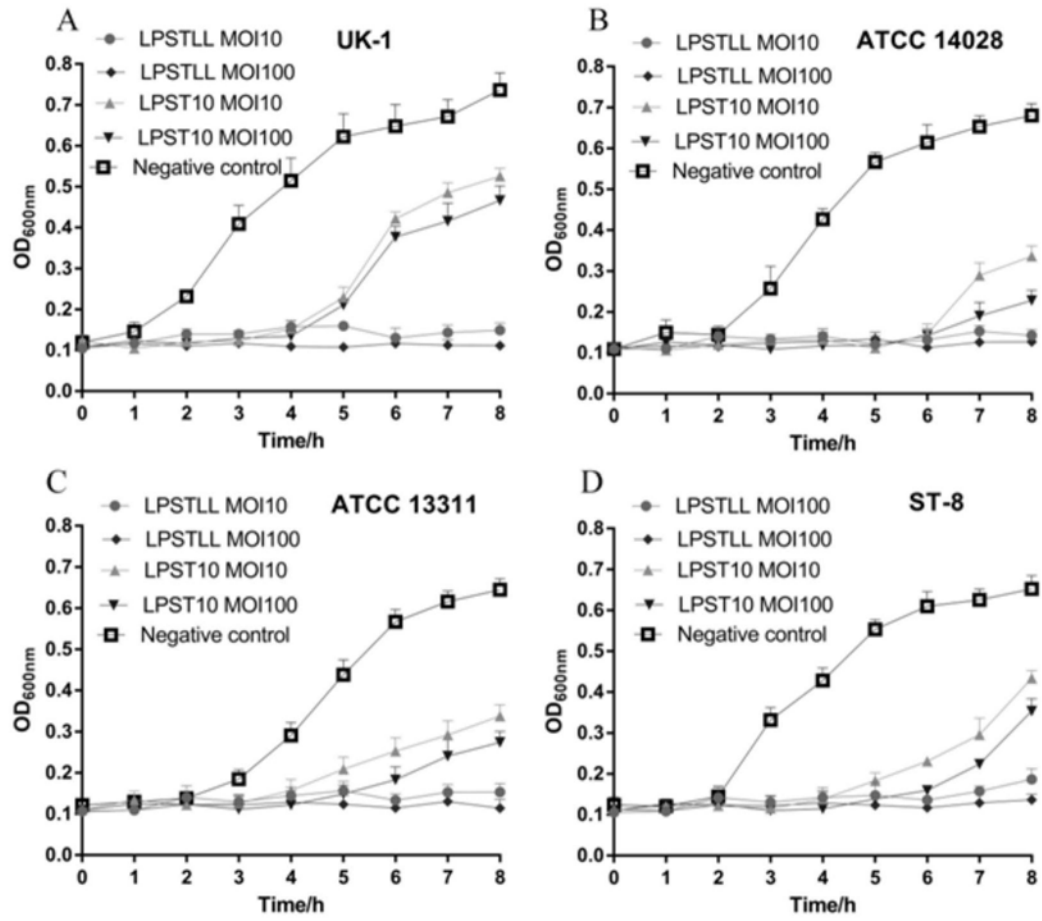


图5

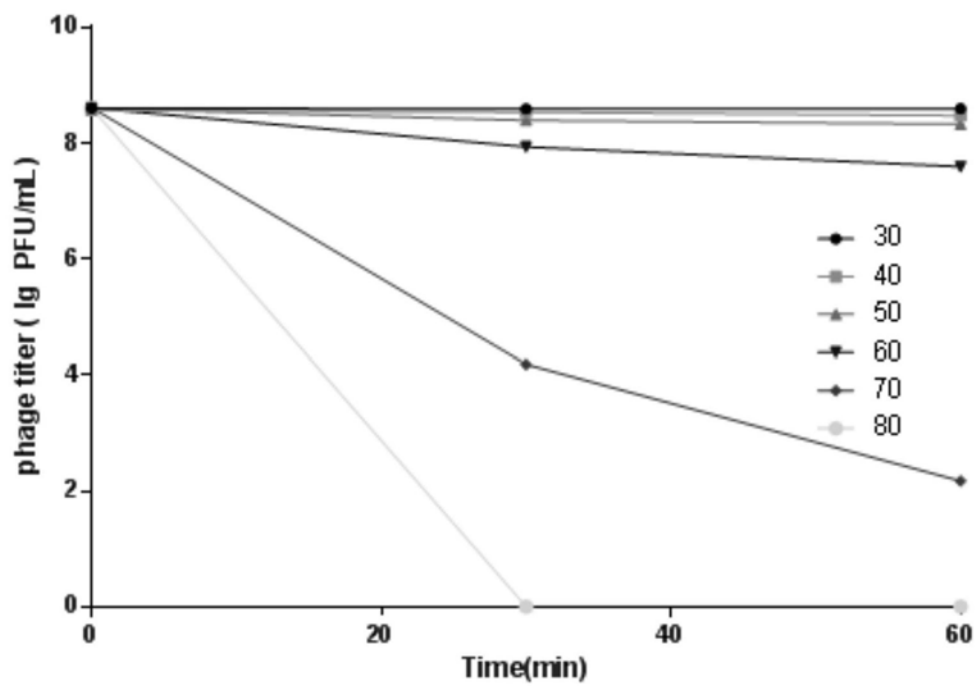


图6

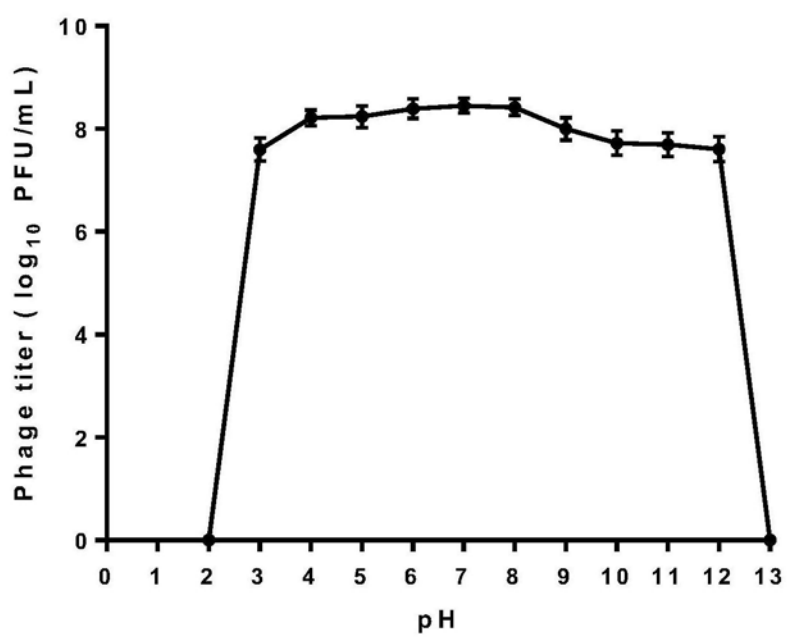


图7

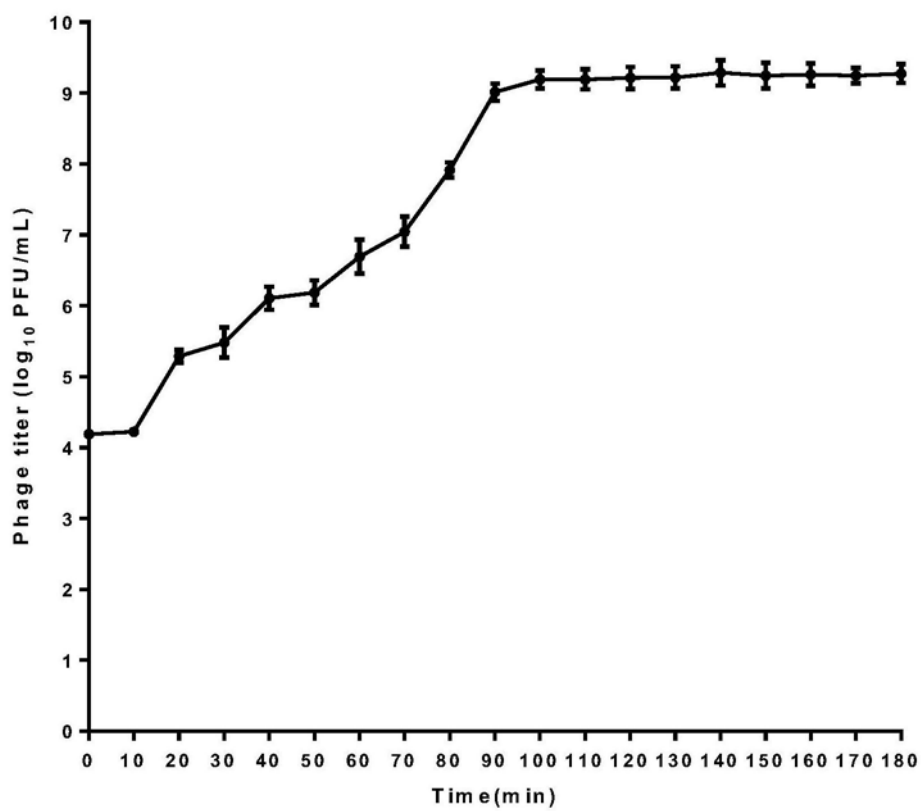


图8