

• 生物技术与方法 •

# 一株新型广谱肠侵袭性大肠杆菌噬菌体 $\Phi$ EP1 生物学特性及基因组分析

何继玮<sup>1</sup>, 李宇行<sup>1</sup>, 宗帅州<sup>1</sup>, 钱敏<sup>1</sup>, 张亚茹<sup>1</sup>, 张章晟<sup>1</sup>, 禹海杰<sup>2\*</sup>, 曲道峰<sup>1\*</sup>

1 浙江工商大学 食品与生物工程学院 浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310018

2 嘉兴职业技术学院, 浙江 嘉兴 314036

何继玮, 李宇行, 宗帅州, 钱敏, 张亚茹, 张章晟, 禹海杰, 曲道峰. 一株新型广谱肠侵袭性大肠杆菌噬菌体  $\Phi$ EP1 生物学特性及基因组分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3216-3232.

HE Jiwei, LI Yuxing, ZONG Shuaizhou, QIAN Min, ZHANG Yaru, ZHANG Zhangsheng, YU Haijie, QU Daofeng. Biological and genome characteristics of a novel broad host-range phage  $\Phi$ EP1 infecting enteroinvasive *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3216-3232.

**摘要:** 为了给肠侵袭性大肠杆菌(*enteroinvasive Escherichia coli*, EIEC)的预防与治疗提供资源和参考, 对 EIEC 噬菌体进行生物学特性和基因组分析。以实验室冻存的 EIEC 为宿主菌, 从浙江湖州某养鸡场的环境污水样品中分离得到一株噬菌体, 命名为  $\Phi$ EP1。采用双层琼脂平板法测定噬菌体的效价以及最佳感染复数、一步生长曲线、温度、pH 值、氯仿和胆盐敏感性等生物学特性, 对噬菌体进行透射电镜检查以观察其形态, 测试其在不同食品基质中的生物防治效果以及对 Caco-2 细胞的保护作用。结果表明,  $\Phi$ EP1 的最佳感染复数为 0.1, 效价为  $1.3 \times 10^{10}$  PFU/mL。噬菌体对温度、pH、氯仿以及胆盐的耐受性均较强, 具有较广的裂解谱, 对多株不同血清型的多重耐药致病大肠杆菌和志贺氏菌均表现出裂解活性。噬菌体的潜伏期为 10 min, 爆发期为 80 min, 爆发量为 48 PFU/cell。透射电镜观察显示噬菌体  $\Phi$ EP1 属于尾病毒目, 同时对 Caco-2 细胞有良好的保护作用。噬菌体  $\Phi$ EP1 的基因组大小为 87 182 bp, GC 含量为 39.80%, 含有 128 个推定的开放阅读框(open reading frame, ORF), 不含耐药基因和毒力因子。 $\Phi$ EP1 能显著抑制人工污染牛奶和牛肉中 EIEC 的增长, 在细胞保护性实验中能有效消杀 EIEC, 显著提高 Caco-2 细胞的存活率, 减少细胞因子白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)和白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )的表达, 使得炎症水平下调。本研究所得的肠侵袭性大肠杆菌噬菌体效价较高, 对环境的耐受性较强, 为噬菌体在食品保鲜等领域应用提供依据。

**关键词:** 大肠杆菌; 噬菌体; 生物学特性; 基因组分析; Caco-2 细胞; 细胞因子

资助项目: 浙江省“三农九方”科技协作计划(2023SNJF051); 嘉兴市科技计划(2021AY10050); 现代食品安全与营养协同创新中心(3090JYN9922001G-018)

This work was supported by the Zhejiang Province's "Three Rural Areas and Nine Parties" Scientific and Technological Cooperation Plan (2023SNJF051), the Jiaying Science and Technology Project (2021AY10050), and the Center for Collaborative Innovation in Modern Food Safety and Nutrition (3090JYN9922001G-018).

\*Corresponding authors. E-mail: QU Daofeng, daofeng@mail.zjgsu.edu.cn; YU Haijie, haijieyblz@163.com

Received: 2024-02-02; Accepted: 2024-05-10

# Biological and genome characteristics of a novel broad host-range phage $\Phi$ EP1 infecting enteroinvasive *Escherichia coli*

HE Jiwei<sup>1</sup>, LI Yuxing<sup>1</sup>, ZONG Shuaizhou<sup>1</sup>, QIAN Min<sup>1</sup>, ZHANG Yaru<sup>1</sup>, ZHANG Zhangsheng<sup>1</sup>, YU Haijie<sup>2\*</sup>, QU Daofeng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Food Safety Key Laboratory of Zhejiang Province, School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China  
<sup>2</sup> Jiaxing Vocational & Technical College, Jiaxing 314036, Zhejiang, China

**Abstract:** We analyzed the biological and genome characteristics of a phage infecting enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), aiming to provide resources and a reference for the prevention and treatment of EIEC. With the EIEC preserved in our laboratory as the host bacterium, one strain of phage was isolated from the effluent sample from a chicken farm in Huzhou, Zhejiang and named  $\Phi$ EP1. The titer, optimal multiplicity of infection, one-step growth curve, temperature, pH value, chloroform and bile salt sensitivity of  $\Phi$ EP1 were determined by the double-layer agar plate method. The morphology of the phage was observed by transmission electron microscopy. The biocontrol effects of  $\Phi$ EP1 in different food matrixes and the protective effect of this phage on Caco-2 cells were tested. The phage  $\Phi$ EP1 showed the optimal multiplicity of infection of 0.1, the titer of  $1.3 \times 10^{10}$  PFU/mL, strong tolerance to temperature, pH, chloroform, and bile salt, and a broad host spectrum. Furthermore, it expressed lysis activity against multiple strains of multiple antibiotic-resistant pathogenic *E. coli* and *Shigella* with different serotypes. Phage  $\Phi$ EP1 had an incubation period of 10 min, an outbreak period of 80 min, and an outbreak volume of 48 PFU/cell. According to the morphology observed by transmission electron microscopy, phage  $\Phi$ EP1 belonged to the order of *Caudovirales*, and it had a good protective effect on Caco-2 cells. Phage  $\Phi$ EP1 had a genome of 87 182 bp with the GC content of 39.80%, 128 putative open reading frames, and no antibiotic resistance genes or virulence genes.  $\Phi$ EP1 inhibited the growth of EIEC in artificially contaminated milk and beef and eliminated EIEC in cell protection experiments. It significantly increased the survival rate of Caco-2 cells and down-regulated the expression of interleukin (IL)-6 and IL-1 $\beta$  to reduce inflammation. We obtained an EIEC-targeting phage  $\Phi$ EP1 with a high titer and strong tolerance to the environment, which provided a basis for the application of phages in food preservation and other fields.

**Keywords:** *Escherichia coli*; phage; biological characteristics; genome analysis; Caco-2 cells; cytokines

大肠杆菌(*Escherichia coli*)作为一种革兰氏阴性菌,广泛分布于人和动物的肠道中,根据其致病性可分为肠内致病型和肠外致病型大

肠杆菌<sup>[1]</sup>。肠侵袭性大肠杆菌(enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC)是一种能够侵袭感染结肠上皮细胞的胞内致病菌,其致病机制与志贺

氏菌类似,二者皆能引发细菌性痢疾<sup>[2-5]</sup>。市售食品被致病性大肠杆菌污染后可能经销售链最终感染消费者,给我国人民的健康安全造成极大的不良影响<sup>[6-12]</sup>。

噬菌体具有极高的宿主裂解活性、高度的宿主特异性、稳定的安全性以及控制抗生素耐药细菌的有效性<sup>[13-15]</sup>。无论是在临床医学还是食品应用方面,噬菌体皆有广阔的前景<sup>[16-18]</sup>。

本研究以实验室冻存的肠侵袭性大肠杆菌为宿主菌,从浙江湖州某养鸡场的环境污水样品中分离得到一株大肠杆菌噬菌体  $\Phi$ EP1,对噬菌体的生物学表型和基因组特征进行了系统性研究,检验了其不同食品基质中 EIEC 的抗菌效果,并使用  $\Phi$ EP1 对 Caco-2 细胞进行保护性实验,为后续噬菌体制剂的开发及实际应用于动物体内等提供一定参考依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

样品来源于浙江湖州某养鸡场的环境污水;宿主菌为实验室保存的肠侵袭性大肠杆菌菌株。DMEM 高糖培养液、Anti-Anti 100 $\times$ 、胎牛血清均购自吉诺生物医药技术有限公司;噬啞蓝溴化四啞购自默克 Sigma Aldrich 试剂公司;胰蛋白酶购自 HyClone 公司;Tris 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。透射电子显微镜 JEM-1230,购自 Gatan 公司;细胞培养箱 FORMA、酶标仪,购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.2 噬菌体的富集和分离纯化

取多份来自浙江湖州某养鸡场的环境污水样品,用纱布粗过滤后分装于 50 mL 离心管中,8 000 r/min 离心 5 min。取 50 mL 上清液于无菌锥形瓶内,加入 1 mL 对数生长期宿主菌悬液 ( $OD_{600}=0.4-0.5$ )和 50 mL LB 液体培养基,放入

37  $^{\circ}$ C 摇床,160 r/min 振荡 16 h,进行噬菌体的初次培养。

将培养液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.22  $\mu$ m 过滤器过滤。在 5 mL 滤液中加入 5 mL LB 液体培养基与 200  $\mu$ L 宿主菌,振荡培养,多次富集,得到噬菌体原液。将原液梯度稀释后,通过双层平板法分离噬菌体。蘸取单个圆形、透明且清晰的噬菌斑至装有 0.5 mL SM 缓冲液的 EP 管中,4  $^{\circ}$ C 存放过夜后使用 0.22  $\mu$ m 过滤器过滤,滤液梯度稀释并重复上述实验,纯化过程需重复 3-5 次<sup>[19]</sup>,直至平板上出现大小、形态皆均一的噬菌斑。最终得到单一噬菌体。

### 1.3 噬菌体相关性质测定

#### 1.3.1 噬菌体效价测定

噬菌体效价是指每 mL 样品中的噬菌体数。采用双层平板法测定梯度稀释后的噬菌体效价,各梯度做 3 组平行,进行噬菌斑计数,计数时,以噬菌斑数为 30-300 之间的稀释度为准。噬菌体效价计算如公式(1)所示:

$$\text{噬菌体效价(PFU/mL)} = \text{平均噬菌斑数} \times \text{稀释倍数} \times 10 \quad (1)$$

#### 1.3.2 噬菌体最佳感染复数的测定

感染宿主的初始阶段噬菌体与宿主菌的数量比称为感染复数(multiplicity of infection, MOI)。将  $OD_{600}=0.4$  的宿主菌梯度稀释,取 100  $\mu$ L 涂布于 LB 平板上,37  $^{\circ}$ C 恒温培养 12 h 后进行菌落计数。按照 MOI 值分别为 100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1 加入噬菌体,于 37  $^{\circ}$ C 摇床中 160 r/min 振荡培养 4 h 后取出,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100  $\mu$ L,用 LB 肉汤连续进行 10 倍倍比稀释,各取 100  $\mu$ L 与宿主菌液 100  $\mu$ L 混合孵育 10 min 后测定噬菌体效价。

#### 1.3.3 噬菌体一步生长曲线的测定

取  $OD_{600}=0.4$  的菌液按最佳感染复数的比例加入噬菌体,于 37  $^{\circ}$ C 培养箱内温育 10 min,进

行噬菌体的吸附,随后 12 000 r/min 离心 1 min, 除去上清液。将沉淀用 LB 肉汤洗涤 2 次, 加入 LB 肉汤混匀, 将菌液置于 37 °C 摇床中振荡培养, 每隔 10 min 取样, 并在 4 °C 条件下 8 000 r/min 离心 2 min, 过滤后取上清液稀释, 测定噬菌体效价。绘制噬菌体一步生长曲线, 横坐标为感染时间, 纵坐标为噬菌体效价的对数值。

#### 1.3.4 噬菌体裂解谱的测定

取实验室冻存的菌株复壮至对数生长期, 采用点板法测定噬菌体的裂解范围。

#### 1.3.5 噬菌体热稳定性的测定

各取 500  $\mu$ L 噬菌体液分装于 1 mL 离心管中, 在 30、40、50、60、70、80 °C 的恒温水浴锅中每 15 min 取 1 次样, 将样液冷却至室温后, 梯度稀释测定效价。

#### 1.3.6 噬菌体 pH 稳定性的测定

取 900  $\mu$ L 不同 pH 值(1.0–14.0)的 LB 液体培养基于无菌试管中, 将其置于 37 °C 摇床中预热后, 加入 100  $\mu$ L 噬菌体悬液, 混匀后于 37 °C 摇床, 160 r/min 振荡培养 2 h, 再将其梯度稀释, 测定各样品效价。

#### 1.3.7 噬菌体对氯仿敏感性实验

取 950  $\mu$ L 噬菌体悬液, 加入 50  $\mu$ L 氯仿, 最终混合液氯仿浓度为 5%。设置不添加氯仿的对照组, 对照组使用等量 PBS 缓冲液代替氯仿。混匀后于 4 °C 过夜, 次日对其进行梯度稀释, 测定各样品效价。

#### 1.3.8 噬菌体对胆盐敏感性实验

取 900  $\mu$ L 噬菌体悬液, 加入 100  $\mu$ L 的 50 mmol/L 胆盐溶液。对照组使用等量 PBS 缓冲液代替胆盐溶液。混匀后于 37 °C 水浴锅中水浴 2 h, 梯度稀释后, 测定各样品效价。

### 1.4 噬菌体的透射电镜观察

采用磷钨酸负染法对噬菌体进行染色: 用枪头吸取少许纯化的噬菌体液滴在铜网上, 静

置 2–3 min 后用滤纸吸去侧边多余液体。再滴加一滴 2% 磷钨酸水溶液于铜网上, 静置几分钟后, 吸去侧边多余染色液, 在红外灯下烘干铜网后用透射电镜观察。

### 1.5 噬菌体全基因组测序及分析

利用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台对噬菌体进行全基因组测序(广东美格基因科技有限公司)。DNA 样品检测合格后构建文库, 采用软件 Soapnuke 对测序的数据进行质量评估以及去除低质量数据。使用 Megahit 软件对 clean data 进行 *de novo* 组装。

基于 NCBI 在线工具 BLASTn 进行噬菌体全基因组序列比对, 采用 Prokka 预测病毒重叠群上的基因序列, 统计预测出来的基因数目、长度等, 利用 BLASTp ( $e < 10^{-3}$ ) 将所预测基因蛋白序列与 UniProtKB/Swiss-Prot/NR 数据库的病毒序列比对, 获取病毒的功能信息。利用综合抗生素研究数据库(the comprehensive antibiotic research database, CARD)进行分析, 预测是否携带耐药基因; 下载毒力因子数据库(virulence factors database, VFDB)的 set A 核心数据库, 通过 BLAST 比对预测噬菌体是否携带毒力因子。对噬菌体全基因组、内溶素序列和主要衣壳蛋白序列进行比对, 利用 MEGA 11.0 绘制系统发育树。

### 1.6 噬菌体对不同食品基质中 EIEC 的抗菌效果

将 100  $\mu$ L  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL 菌液接种至 800  $\mu$ L 无菌牛奶中, 充分混匀; 用无菌刀将新鲜牛肉切成 1 cm $\times$ 1 cm 的方块, 紫外灭菌 1 h 后, 接种 200  $\mu$ L  $1.0 \times 10^5$  CFU/mL 菌液。分别取噬菌体  $\Phi$ EP1 以 MOI 为 1 000 和 10 000 加至食品基质中, 样品分别于 4 °C 和 25 °C 培养 12 h, 对照组加入等量的 PBS 缓冲液。每 3 h 取 1 次样, 牛

肉样品转入含 5 mL 生理盐水离心管中,梯度稀释进行菌落计数。

## 1.7 噬菌体对 Caco-2 细胞的保护性实验

### 1.7.1 MTT 法检测 Caco-2 细胞存活率

将培养至可传代的 Caco-2 细胞用胰酶消化后计数,加入适量 DMEM 培养液吹打混匀接种于 96 孔板中。仅添加 100  $\mu$ L 不含细胞的 DMEM 培养液为空白对照组。

转入 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,于显微镜下观察可视 Caco-2 细胞贴壁并形成一层致密的细胞膜状结构后,随即向 E-P 组(治疗组)与 E 组(攻毒组)细胞内各加入 10  $\mu$ L 浓度为 10<sup>8</sup> CFU/mL 的 EIEC 菌液,培养一段时间后,向 E-P 组与 P 组(噬菌体组)分别加入噬菌体悬液,同时向 C 组(对照组)中加入等量的 PBS 缓冲液。

继续培养 4 h 后,向 E-P 组与 E 组加入适量抗生素,培养一段时间后吸弃孔中混合液,用 PBS 缓冲液清洗后加入等量 DMEM 培养液。然后每孔加入 20  $\mu$ L 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)溶液(5mg/mL),转入培养箱中培养 4 h。吸弃孔中 MTT 与培养基的混合液, PBS 缓冲液清洗后,每孔加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)。将 96 孔板置于培养板振荡仪上 10 min,直至将甲贍完全溶出,再使用酶标仪检测波长 490 nm 处各孔的吸光值。每组实验重复 3 次。以空白对照组调零,计算 Caco-2 细胞存活率,反映噬菌体对大肠杆菌的裂解作用及是否能对 Caco-2 细胞进行保护。

### 1.7.2 Caco-2 细胞凋亡作用的观察及检测

Hoechst 33342/碘化丙啶(propidium iodide, PI)双染观察 Caco-2 细胞死亡情况:不同试剂处理结束培养 4 h 后(同 1.7.1),每孔加入 50  $\mu$ L 膜通透性染色液,随后转入 37  $^{\circ}$ C 培养箱孵育

30 min,移去培养液,加入 10  $\mu$ L Hoechst 和 PI 的混合液,37  $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后用荧光显微镜观察。

### 1.7.3 qPCR 方法检测 Caco-2 细胞中细胞因子的表达

RNA 提取及引物设计:取对数生长期的 Caco-2 细胞接种至细胞培养瓶中,接种密度为 10<sup>5</sup> 个/mL,分为空白对照组、攻毒组(E 组)和治疗组(E-P 组),使得 EIEC 每瓶终浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL,噬菌体每瓶终浓度为 10<sup>8</sup> PFU/mL、每瓶终体积为 5 mL。放置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养后,收集经 EIEC 和噬菌体处理后的细胞,用 PBS 洗涤 3 次后,参照 Trizol RNA 提取方法提取 Caco-2 细胞总 RNA。在 NCBI 上查询待测免疫相关基因引物的完整序列,序列信息见表 1。每组实验重复 3 次。根据待测免疫相关基因的 C<sub>t</sub> 值,以人源 GAPDH 基因作为内参,利用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup> 法计算各组样品相关基因 mRNA 的相对表达量。实验数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计和方差分析。所有实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  来表示,  $P < 0.05$ , 表示差异显著。

qPCR 反应条件:对所提取的 Caco-2 细胞总 RNA 反转录获得 cDNA,反应条件为:37  $^{\circ}$ C, 15 min; 85  $^{\circ}$ C, 5 s。然后进行 qPCR 反应,反应条件为; 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 34 s, 40 个循环。

表 1 荧光定量 PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for qPCR

Primer name	Sequence of primer (5'→3')
IL-6-F	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG
IL-6-R	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
IL-1 $\beta$ -F	GCTTGGTGATGTCTGGTCCA
IL-1 $\beta$ -R	AACACGCAGGACAGGTACAG
GAPDH-F	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
GAPDH-R	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体的最佳感染复数及其一步生长曲线

从养鸡场的环境污水样品中分离得到一株肠侵袭性大肠杆菌噬菌体, 命名为  $\Phi$ EP1。在双层平板上呈现为 1–2 mm 的噬菌斑。挑取单个噬菌斑经 3–5 次纯化后<sup>[19]</sup>, 噬菌斑透明且清晰, 形态均一, 效价提升至  $10^9$ – $10^{10}$  PFU 数量级, 如图 1A、1B 所示。

按照不同的比例将噬菌体与宿主菌混合, 噬菌体最佳感染复数测定结果见表 2。 $\Phi$ EP1 的最佳感染复数是 0.1, 效价为  $1.3 \times 10^{10}$  PFU/mL。

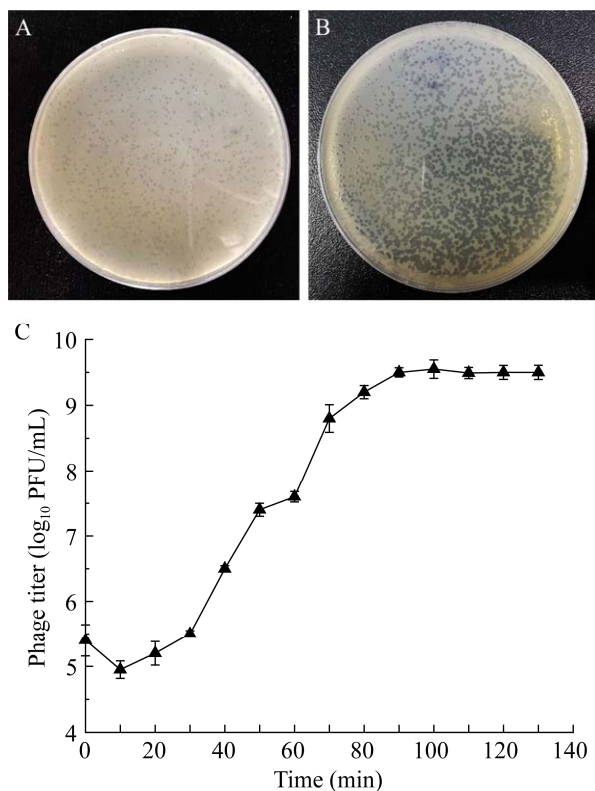


图 1  $\Phi$ EP1 纯化前(A)后(B)的噬菌斑以及一步生长曲线(C)

Figure 1 The plaque of  $\Phi$ EP1 before (A) and after (B) purification. C: One-step growth curve of phage.

表 2 噬菌体最佳感染复数测定

Table 2 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI) for phage

Number of phages (PFU/mL)	Number of bacteria (CFU/mL)	MOI	$\Phi$ EP1 (PFU/mL)
$1 \times 10^9$	$1 \times 10^7$	$10^2$	$1.5 \times 10^8$
$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$10^1$	$2.6 \times 10^9$
$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$10^0$	$9.2 \times 10^9$
$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$10^{-1}$	$1.3 \times 10^{10}$
$1 \times 10^5$	$1 \times 10^7$	$10^{-2}$	$1.0 \times 10^{10}$
$1 \times 10^4$	$1 \times 10^7$	$10^{-3}$	$7.0 \times 10^9$
$1 \times 10^3$	$1 \times 10^7$	$10^{-4}$	$8.4 \times 10^8$

将噬菌体和宿主菌按最佳感染复数的比例混合培养。绘制一步生长曲线, 横坐标为感染时间, 纵坐标为噬菌体效价的对数值。从一步生长曲线中体现的是噬菌体从侵染宿主到裂解、释放子代噬菌体的整个生命周期, 所得指标包括潜伏期、裂解期、爆发量。噬菌体潜伏期越短, 意味着可以更快地裂解宿主菌。在较短的潜伏期后, 噬菌体的爆发量越大, 则代表该噬菌体的裂解能力越强, 可以更好地应用于控制细菌的增殖。

由图 1C 可知  $\Phi$ EP1 的潜伏期约为 10 min, 裂解期约为 80 min, 爆发量为 48 PFU/cell。按公式(2)计算爆发量:

爆发量 = 爆发末期噬菌体效价 / 感染初期宿主菌浓度 (2)

### 2.2 噬菌体的裂解谱

点板法观察到噬菌体  $\Phi$ EP1 可以有效裂解 81.25% (26/32) 的大肠杆菌, 其中包含不同的血清型与多株多重耐药致病菌, 并可以有效消杀 21 株 EIEC 中的 18 株。同时  $\Phi$ EP1 对部分志贺氏菌也表达了裂解活性, 展现了较广的裂解宿主谱(表 3)。

### 2.3 噬菌体的热稳定性和 pH 稳定性

噬菌体在其应用过程中, 不可避免地面临诸多不同理化因素的环境及加工方式。温度为

表3 噬菌体宿主谱

Table 3 Host range of the bacteriophage

Number	Bacterial strain	Source	Drug resistance <sup>c</sup>	Plaque formation <sup>f</sup>
1	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> HZZ5	ZJSU <sup>a</sup>	Y <sup>d</sup> (AM, AMX, CL, FOS, GM, K, NA, S, SIZ, TE, TMP)	++
2	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> HZZ8	ZJSU	Y (AM, AMX, CL, FOS, GM, K, S, SIZ, TE, TMP)	-
3	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> HZZ10	ZJSU	Y (AMX, CL, FOS, K, SIZ, TE)	++
4	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> LAZ1	ZJSU	Y (AM, FOS, GM, K, S, SIZ, TE)	+
5	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> LAZ2	ZJSU	Y (AM, AMX, CT, ENR, FOS, S, SIZ, TE, TMP)	-
6	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> LAZ5	ZJSU	Y (AM, AMX, GM, K, S, SIZ, TE, TMP)	++
7	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> LAZ6	ZJSU	Y (AMX, CL, K, SIZ, TE, TMP)	+
8	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> LAZ7	ZJSU	Y (GM, K, S, SIZ, TE)	+
9	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> LAZ13	ZJSU	Y (AM, AMX, GM, K, TE)	++
10	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> LAZ16	ZJSU	Y (AMX, CL, FOS, K, OFX, S, SIZ, TE, TMP)	+
11	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JDJ1	ZJSU	Y (AM, AMX, CIP, K, S, TE, TMP)	++
12	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JDJ2	ZJSU	Y (AM, AMX, ENR, FOS, S, SIZ, TMP)	++
13	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JDJ8	ZJSU	Y (AMX, FOS, K, S, SIZ, TE)	+
14	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JDJ9	ZJSU	Y (CIP, FOS, GM, K, S, SIZ, TE, TMP)	++
15	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JDJ11	ZJSU	Y (AM, AMX, FOS, OFX)	++
16	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JDJ12	ZJSU	Y (AMX, CL, K, S, TE)	+
17	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JZ8	ZJSU	Y (AM, FOS, GM, K, S, SIZ, TE, TMP)	+
18	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JZ10	ZJSU	Y (AM, AMX, K, S, SIZ, TE, TMP)	++
19	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JZ11	ZJSU	Y (FOS, GM, S, TE, TMP)	-
20	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JZ16	ZJSU	Y (AM, OFX, TE, TMP)	+
21	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> JZ19	ZJSU	Y (AM, AMX, FOS, GM, K, S, SIZ, TE, TMP)	+
22	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> NBZ2	ZJSU	Y (AM, AMX, GM, K, S, SIZ)	-
23	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> NBZ3	ZJSU	Y (AM, AMX, SIZ, TE, TMP)	++
24	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> NHZ1	ZJSU	Y (CT, MD, S, TE)	+
25	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> NHZ2	ZJSU	Y (AMX, FOS, S, TE, TMP)	+
26	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> NHZ6	ZJSU	Y (AMX, FOS, OFX)	+
27	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> JW	ZJSU	Y (AMX, AT, CL, FOS, GM, K, MEM, S, SIZ, TE, TMP)	-
28	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> NW	ZJSU	Y (AM, CL, GM, K, S, SIZ, TE)	++
29	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ZSZ3	ZJSU	Y (AM, AMX, CT, ENR, S, SIZ, TE, TMP)	-
30	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ZSZ5	ZJSU	Y (AM, AMX, CIP, GM, K, OFX, S, SIZ, TE, TMP)	+
31	Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ZSZ7	ZJSU	Y (AMX, CIP, K, S, TE, TMP)	+
32	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ATCC <sup>b</sup>	N <sup>e</sup>	+
33	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	ATCC	N	-

(待续)

(续表 3)

Number	Bacterial strain	Source	Drug resistance <sup>c</sup>	Plaque formation <sup>f</sup>
34	<i>Shigella flexneri</i> NBDJ10	ZJSU	Y (AM, CIP, CL, GM, K, OFX, S, SIZ, TE, TMP)	-
35	<i>Shigella flexneri</i> QZDJ5	ZJSU	Y (AM, AMX, CIP, CL, FOS, GM, S, SIZ, TE)	-
36	<i>Shigella sonnei</i> NBDJ20	ZJSU	Y (AM, AMX, CIP, CL, FOS, GM, K, NA, S, SIZ, TE, TMP)	-
37	<i>Shigella sonnei</i> HZDJ6	ZJSU	Y (AM, AMX, S, TE)	+
38	<i>Shigella sonnei</i> HZDJ9	ZJSU	Y (AMX, CL, FOS, K, OFX, S, SIZ, TE)	+
39	<i>Shigella sonnei</i> QZDJ2	ZJSU	Y (AM, AMX, FOS, GM, K, S, SIZ, TE, TMP)	-
40	<i>Shigella sonnei</i> QZDJ3	ZJSU	Y (AMX, CIP, K, OFX, SIZ, TE, TMP)	+
41	<i>Shigella Dysenteriae</i> NBDJ24	ZJSU	Y (AM, OFX, TE, TMP)	-
42	<i>Salmonella Typhimurium</i> LT2 ATCC 700720	ATCC	N	-
43	<i>Salmonella Typhimurium</i> NBDJ1	ZJSU	Y (AM, AT, NA, TE, TMP)	-
44	<i>Salmonella Typhimurium</i> ZSDJ9	ZJSU	Y (AT, CIP, GM, K, NA, OFX, S, SIZ, TE)	-
45	<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076	ATCC	N	-
46	<i>Salmonella Enteritidis</i> HZZ1	ZJSU	Y (AM, AZM, FOS, OFX)	-
47	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	ATCC	N	-

<sup>a</sup>: ZJSU: Zhejiang Gongshang University. <sup>b</sup>: ATCC: American Type Culture Collection. <sup>c</sup>: AM, ampicillin; AMX, amoxicillin; AT, aztreonam; AZM, azithromycin; CIP, ciprofloxacin; CL, chloramphenicol; CT, colistin; ENR, enrofloxacin; FOS, fosfomycin; GM, gentamicin; K, kanamycin; MD, mequindox; MEM, meropenem; NA, nalidixic acid; OFX, ofloxacin; S, streptomycin; SIZ, sulfaisoxazole; TE, tetracycline; TMP, trimethoprim. <sup>d</sup>: Y: Yes. <sup>e</sup> N: No. <sup>f</sup>: ++: Clear plaque; +: Opaque plaque; -: No plaque.

30–50 °C时,对  $\Phi$ EP1 的活性影响并不大,当温度达到 60 °C及以上时,尽管只作用 15 min,  $\Phi$ EP1 的活性便会大幅度下降直至完全消失(图 2A)。

噬菌体在 pH 4.0–12.0 之间能够稳定保持其活性,在 pH $\leq$ 3.0 和 pH $\geq$ 13.0 的环境中,噬菌体的活性大幅度降低,甚至完全失活(图 2B)。

#### 2.4 噬菌体对氯仿及胆盐的敏感性

噬菌体经过氯仿或胆盐处理后,其效价与 C 组均无显著性差异( $P>0.05$ ),C 组为用 PBS 处理的对照组,说明  $\Phi$ EP1 对氯仿及胆盐并不敏感,衣壳表面没有囊膜或脂类(图 3)。

#### 2.5 噬菌体的形态观察

采用磷钨酸法对  $\Phi$ EP1 进行负染,用透射

电子显微镜观察  $\Phi$ EP1 的形态。 $\Phi$ EP1 为尾病毒目,头部长约 60 nm,横径约为 60 nm,呈六边形,为典型的正二十面体结构,尾部约为 80 nm (图 4)。

#### 2.6 噬菌体全基因组测序及结果分析

对噬菌体  $\Phi$ EP1 进行全基因组测序,结果表明,  $\Phi$ EP1 的基因组是一条环状双链 DNA 分子,大小为 87 182 bp, G+C 含量为 39.80%。通过 BLAST 进行数据分析,  $\Phi$ EP1 含有 128 个推定的开放阅读框(open reading frame, ORF),其中 42 个 ORF 的功能已被注释,注释率约为 32.81% (42/128),有 86 个 ORF 的功能被注释为假定蛋白(hypothetical protein)。



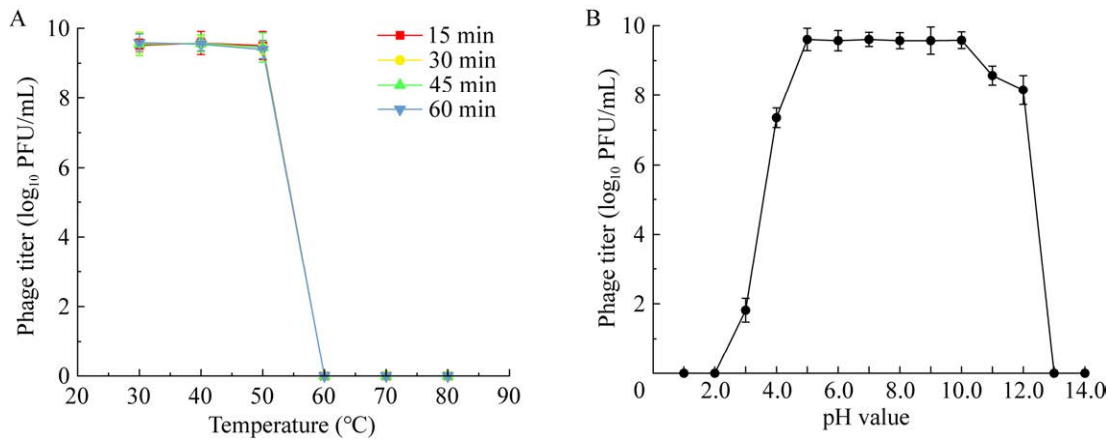


图2 噬菌体的热稳定性及 pH 稳定性 A: 噬菌体的热稳定性. B: pH 对噬菌体效价的影响

Figure 2 Thermal and pH stability of phage. A: Thermostability of phage. B: Effect of pH on bacteriophage viability.

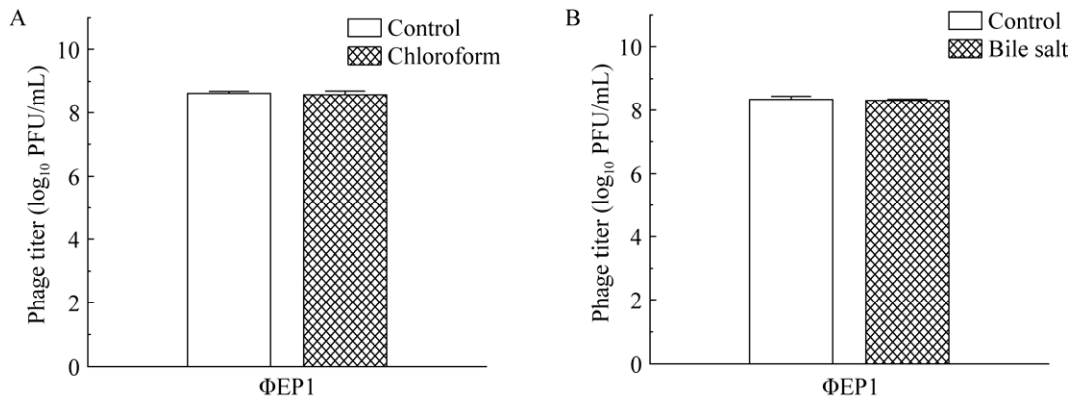


图3 噬菌体对氯仿及胆盐的敏感性 A: 噬菌体对氯仿的敏感性. B: 噬菌体对胆盐的敏感性

Figure 3 Sensitivity of phage to chloroform and bile salt. A: Chloroform sensitivity of phage. B: Bile salt sensitivity of phage.

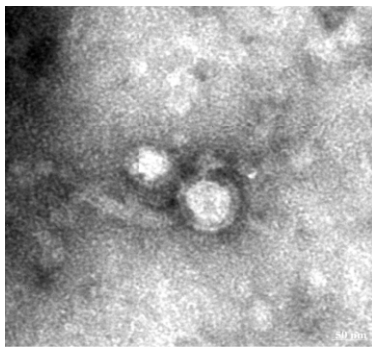


图4 噬菌体 ΦEP1 的透射电镜图

Figure 4 Transmission electron microscopy of phage ΦEP1.

ΦEP1 的全基因组圈图见图 5, 最内侧黑圈显示基因组大小和标识; 带有波峰的黑圈表示 G+C 含量, 峰值向内(外)表示该区域 G+C 含量低(高)于全基因组平均 G+C 含量, 峰值越高, 与平均 G+C 含量差值越大; 带有波峰的紫绿色圆圈表示 G+C-skew [G+C 偏移,  $G+C \text{ skew} = (G-C)/(G+C)$ ], 绿色(紫色)代表 GC-skew 大于(小于) 0, 可用于判断环状 DNA 的复制起点; 蓝色圆圈代表 ΦEP1 基因组序列; 中间 5 个圆圈代表 5 株相似噬菌体基因组序列(颜色深浅表

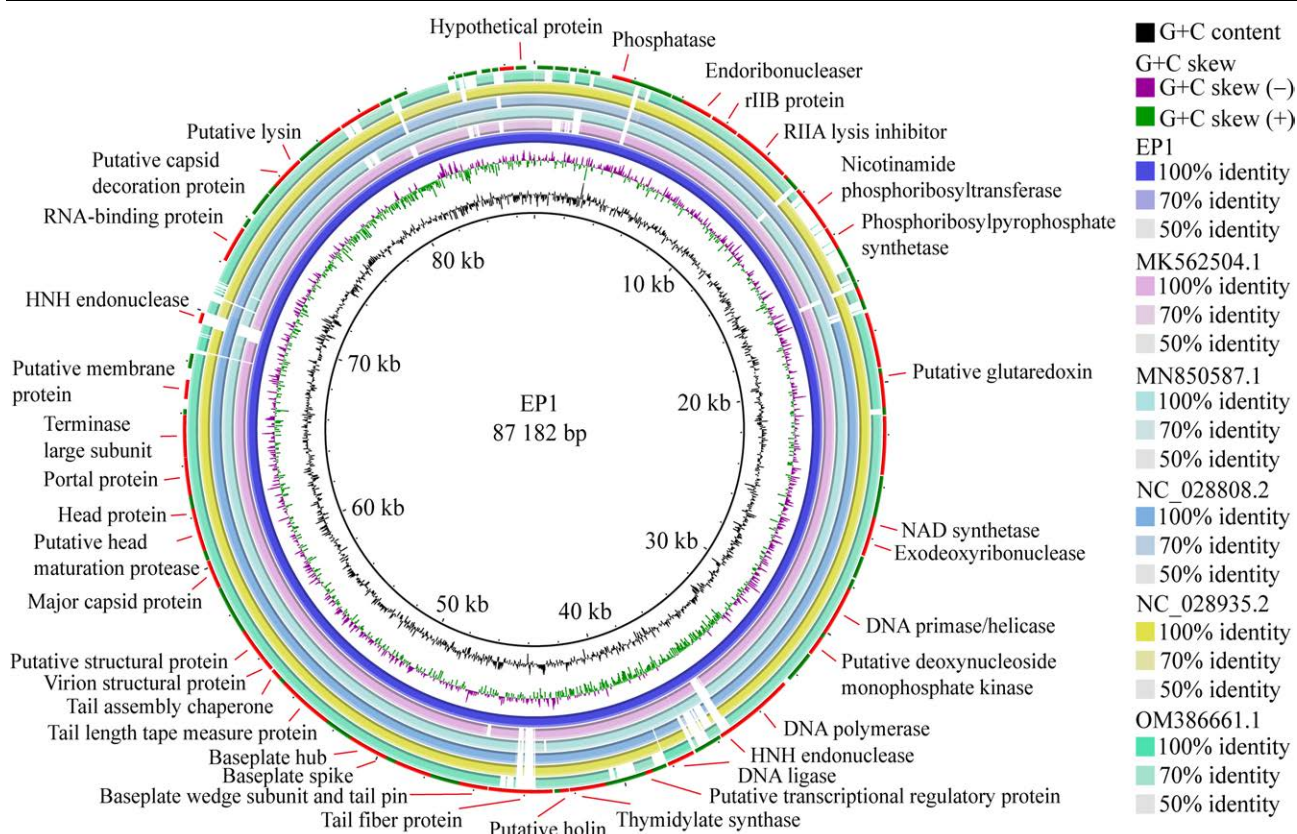


图 5 噬菌体  $\Phi$ EP1 的全基因组分析

Figure 5 Whole genome analysis of phage  $\Phi$ EP1.

示基因的一致性程度); 最外侧圆圈为基因注释(红色为已注释蛋白, 绿色为假定蛋白)。

## 2.7 开放阅读框功能预测

通过BLASTp进行蛋白序列分析, 噬菌体 $\Phi$ EP1的128个ORFs(附表1, 国家微生物科学数据中心登录号: NMDC60154049)中具有与噬菌体复制、代谢、包装、结构和裂解等相关的基因, 且不含耐药基因和毒力因子, 并不会造成物种间的基因转移, 进一步说明该噬菌体应用的安全性。

噬菌体复制、修饰和代谢等有关的蛋白有: ORF31 (厌氧核糖核苷-三磷酸还原酶激活蛋白); ORF33 (厌氧核糖核苷三磷酸还原酶); ORF36 (核糖核苷二磷酸还原酶亚基  $\beta$ ); ORF38 (核糖核苷二磷酸还原酶亚基  $\alpha$ ); ORF48 (DNA解旋酶), 其作用于DNA双链的氢键上; ORF50

(脱氧核苷酸单磷酸激酶); ORF53 (DNA聚合酶), 是细胞复制DNA的重要作用酶; ORF54 (内切酶); ORF60 (DNA连接酶), 其所催化的反应在DNA的复制和修复过程中起着重要的作用; ORF68 (二氢叶酸还原酶); ORF69 (胸苷酸合成酶)。

噬菌体结构蛋白有: ORF72 (长尾纤维蛋白); ORF73 (尾纤维蛋白); ORF82 (卷尺蛋白), 卷尺蛋白(tape measure protein, TMP)具有协助和控制噬菌体尾巴装配的功能, 是噬菌体侵染期间协助其吸附宿主的一种必需蛋白质; ORF85 (结构蛋白); ORF91 (主要衣壳蛋白); ORF93 (头尾连接蛋白); ORF108 (装饰蛋白)。

噬菌体裂解相关蛋白有: ORF109 (内溶素), 噬菌体通过表达此蛋白来裂解宿主菌, 释

放子代噬菌体。

## 2.8 系统发育树分析

如图 6A 所示, 基于全基因组序列构建的进化树结果表明,  $\Phi$ EP1 与 *Escherichia phage vB\_EcoM\_ESCO45* (GenBank 登录号: OM386661.1) 具有最近的亲缘关系。 $\Phi$ EP1 的内溶素和 *Escherichia phage mistaenkt* (GenBank 登录号: MN850587.1)、*Enterobacteria phage CHB7* (GenBank 登录号: MK562504.1) 两株噬菌体的内溶素相似度较高(图 6B); 主要衣壳蛋白与噬菌体 *Escherichia phage SUSP1* (GenBank 登录号: NC 028808.2) 较相近(图 6C)。图 6 中标尺代表遗传距离, 遗传距离越短, 亲缘关系越近, 因此说明噬菌体  $\Phi$ EP1 是一株新型的肠侵袭性大肠杆菌噬菌体。

## 2.9 噬菌体在食品基质中的生物防治应用

在 25 °C 的条件下培养噬菌体 12 h, 实验组牛奶中的 EIEC 含量较 C 组均降低超过 4 log<sub>10</sub> CFU/mL。对于牛肉样品, MOI 为 1 000 的实验组在 25 °C 下培养 12 h, 使 EIEC 减少了 3.21 log<sub>10</sub> CFU/mL, MOI 为 10 000 的实验组则减少了 3.43 log<sub>10</sub> CFU/mL。这些结果表明,  $\Phi$ EP1 对无菌牛奶和牛肉样品中的 EIEC 都有相当的抑制作用, 在 MOI 为 10 000 的实验组中的效果略好于在 MOI 为 1 000 的实验组中(图 7)。

然而在 4 °C 的条件下, 虽然噬菌体仍能显著降低食品基质中 EIEC 的含量, 但消杀效率远不如 25 °C 条件下时, 这可能是因为 4 °C 时 EIEC 的扩增受到了明显的限制, 宿主菌的活性大大降低, 甚至部分细菌转入休眠状态, 休眠中的致病菌难以被侵袭, 而噬菌体  $\Phi$ EP1 依赖宿主菌进行生长与增殖, 因此效价降低(图 7)。

## 2.10 噬菌体对 EIEC 诱导 Caco-2 细胞凋亡的影响

由图 8A 可知, C 组与 P 组并不存在显著性

差异, 说明单独添加噬菌体并不会引起细胞的凋亡。EIEC 的加入使得约 69.6% 的细胞死亡, 但是根据 E-P 组的细胞存活率可知, 加入 EIEC 一段时间后再添加噬菌体即可显著提高 Caco-2 细胞的存活率。

Hoechst 是一种可以穿透细胞膜对细胞核进行染色的蓝色荧光染料; PI 则无法通过完整的细胞膜, 但可以穿透处于凋亡晚期或已死亡的细胞, 在荧光显微镜下呈现红色。染色结果显示(图 8B), 对照组及噬菌体组的细胞活性强, 死亡率低; EIEC 侵染后的细胞死亡, 被大量激发发出红色, 图中橙色圆圈标注的细胞可见明显的马蹄状、半月形的细胞核, 染色质呈现边缘化。在 EIEC 侵染后使用噬菌体保护细胞, 虽仍有部分细胞出现核异固缩现象, 伴随着少许凋亡小体, 但整体上显著降低了细胞的死亡率, 起到了对 Caco-2 细胞的保护作用。

## 2.11 噬菌体对 EIEC 作用后的炎症相关基因表达的影响

白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是一种免疫相关的多效性细胞因子, 其能够作为促炎细胞因子和抗炎性肌球蛋白来发挥作用, 同时具有促炎性和抗炎性的性质<sup>[20]</sup>。IL-6 能够对一些疾病引起的不同组织中的炎症反应起到保护效果, 通过调节免疫应答在机体的抗感染免疫反应中发挥着重要作用<sup>[21]</sup>。同时其还能对肠上皮细胞和黏膜层等产生一定的保护作用<sup>[22]</sup>。如图 9A 所示, E 组细胞因子 IL-6 的表达显著上调, 炎症相关基因的表达量接近对照组的 4 倍, E-P 组的表达量远低于 E 组。白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 作为关键的促炎细胞因子, 参与自身多种免疫性炎症反应和诸多细胞活动, 包括细胞的增殖、分化与凋亡等。IL-1 $\beta$  是炎症反应的重要介质之一, 其在各种组织、细胞中的表达, 代表了炎症反应的激活程度<sup>[23]</sup>。

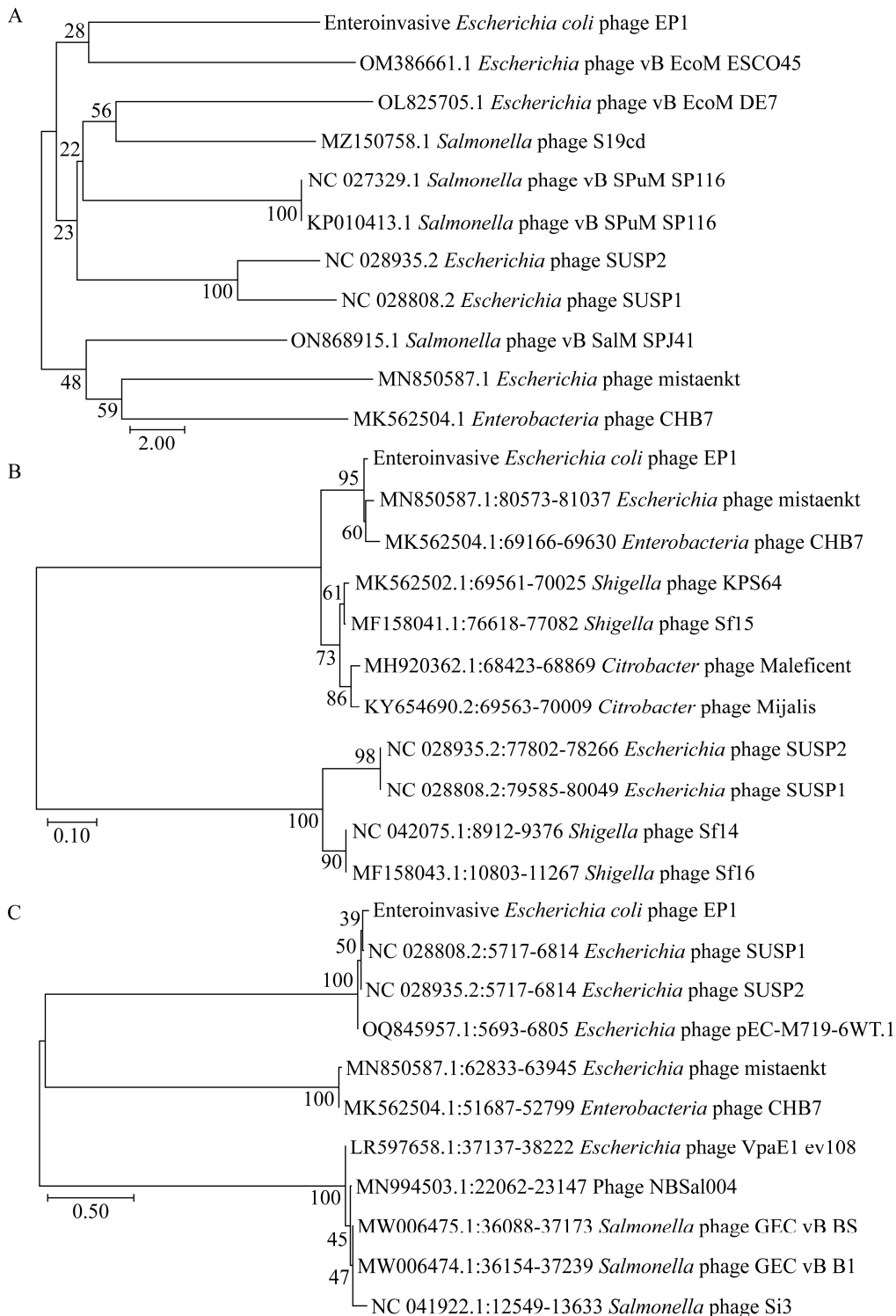


图 6 噬菌体  $\Phi$ EP1 进化关系分析 A: 基于全基因组构建的发育树. B: 基于内容素序列构建的发育树. C: 基于主要衣壳蛋白构建的发育树

Figure 6 Phylogenetic relationships of phage  $\Phi$ EP1. A: Phylogenetic tree based on whole genome sequence. B: Phylogenetic tree based on endolysin sequence. C: Phylogenetic tree based on major capsid protein sequence.



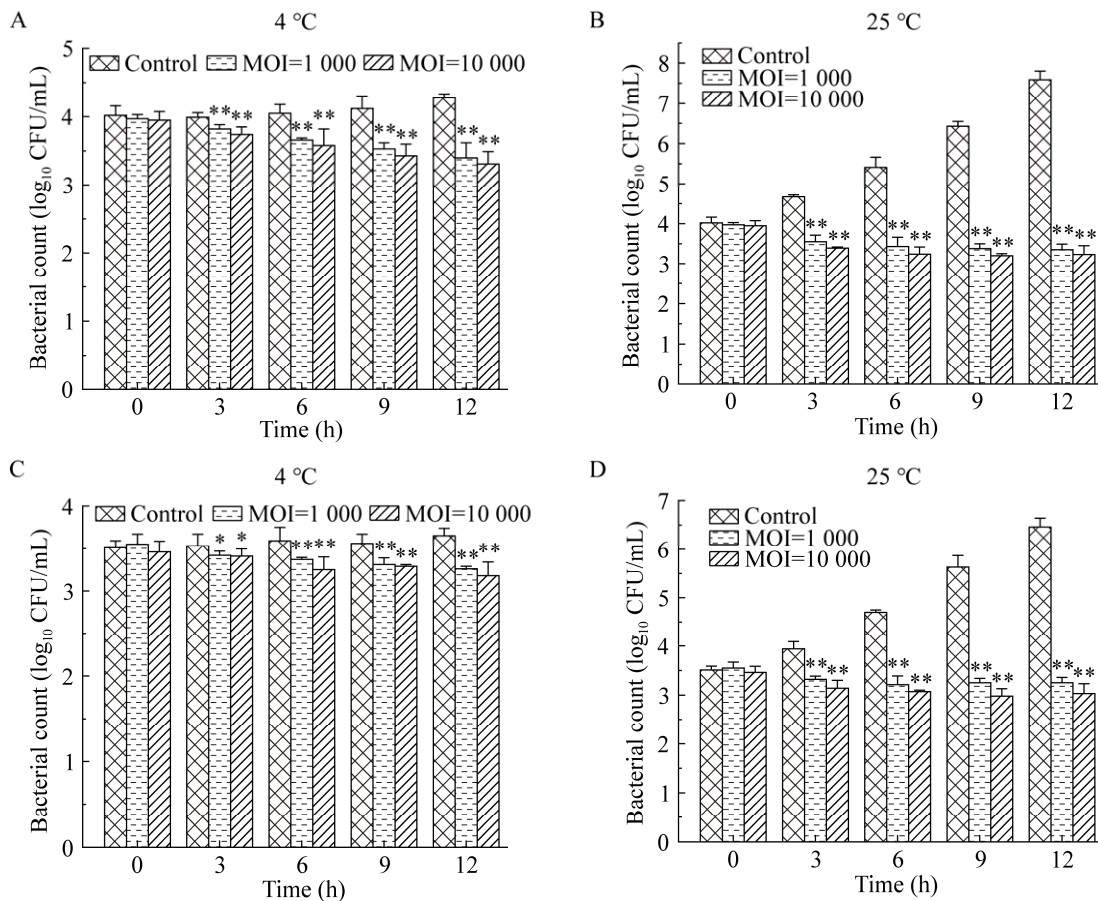


图 7 噬菌体在不同温度下对牛奶(A、B)和牛肉(C、D)中 EIEC 的抗菌作用

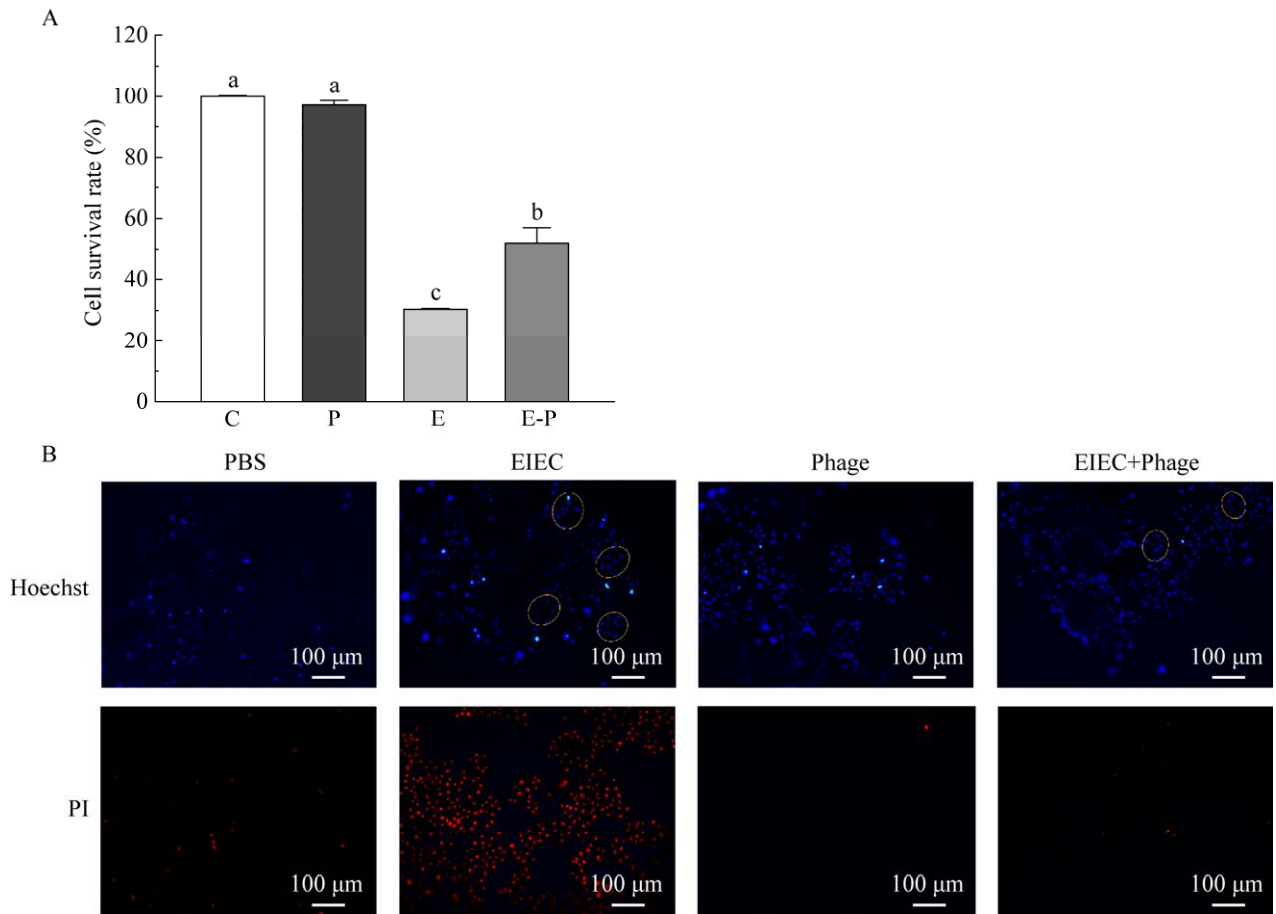
Figure 7 Phage against enteroinvasive *Escherichia coli* in milk (A, B) and beef (C, D) at different temperatures. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

E 组 IL-1 $\beta$  上调明显( $P < 0.05$ ), E-P 组显著降低了该炎症因子的表达(图 9B), 证明  $\Phi$ EP1 能有效裂解 EIEC, 保护 Caco-2 细胞免受细菌的感染与侵袭, 下调其炎症水平。

### 3 讨论与结论

本研究以实验室冻存的肠侵袭性大肠杆菌为宿主菌, 从浙江湖州某养鸡场的环境污水样品中分离得到一株 EIEC 噬菌体, 命名为  $\Phi$ EP1。双层琼脂平板法测定结果表明,  $\Phi$ EP1 的最佳感染复数是 0.1, 效价为  $1.3 \times 10^{10}$  PFU/mL。刘悦等<sup>[24]</sup>分离得到的大肠杆菌噬菌体, 其效价为

$7.2 \times 10^9$  PFU/mL, 相较之下本研究发现的噬菌体具有较高的效价。同时  $\Phi$ EP1 对温度和 pH 的耐受性都较强, 对氯仿及胆盐并不敏感, 说明噬菌体衣壳表面没有囊膜, 并且不含脂类, 这些特质增加了噬菌体  $\Phi$ EP1 在胃肠道或是其他极端环境下应用的可能性。 $\Phi$ EP1 的潜伏期为 10 min, 爆发期为 80 min, 爆发量为 48 PFU/cell。黄倩妮等<sup>[1]</sup>分离得到的噬菌体 TH18 爆发量为 15 PFU/cell, 相比之下噬菌体  $\Phi$ EP1 具有更强的裂解能力, 在实际应用中更具价值。对  $\Phi$ EP1 进行透射电镜观察形态显示其属于尾病毒目。 $\Phi$ EP1 的基因组为环状双链 DNA, 全长 87 182 bp,



**图 8** 噬菌体对 EIEC 诱导 Caco-2 细胞凋亡的影响 A: 噬菌体及 EIEC 等处理后的细胞存活率. B: 噬菌体及 EIEC 等处理后的细胞染色图. C: 对照组; P: 噬菌体组; E: 攻毒组; E-P: 治疗组 相同字母不存在显著性差异, 不同字母存在显著性差异

**Figure 8** Effects of phage on EIEC induced apoptosis of Caco-2 cells. A: Cell viability after treatment of phage and EIEC. B: Staining diagram of cells after treatment with phage and EIEC. C: Control group; P: Phage group; E: Challenge group; E-P: Treatment group. There is no significant difference in the same letter, but there is a significant difference in different letters.

G+C 含量为 39.80%。通过 BLAST 数据分析发现,  $\Phi$ EP1 含 128 个推定的开放阅读框, 其中 42 个 ORF 的功能已被注释, 包含多个尾部结构蛋白。噬菌体尾纤维蛋白等的表达与其裂解范围相关, 噬菌体尾部结构决定其宿主特异性,  $\Phi$ EP1 长尾纤维蛋白和尾纤维蛋白等的表达使得噬菌体特异性地识别磷壁酸与膜孔蛋白等宿主受体, 从而展现出较广的裂解谱。

在食品基质的生物防治中, 噬菌体  $\Phi$ EP1 能有效抑制人工污染牛奶和牛肉中 EIEC 的生长。然而在低温条件下, 噬菌体的消杀效率大打折扣, 原因是低温致使宿主菌活性降低, 进入休眠状态<sup>[25-28]</sup>, 大大提升了致病菌对噬菌体的抗性, 而  $\Phi$ EP1 依赖 EIEC 进行增殖, 所以效价降低。Maffei 等<sup>[29]</sup>分离的铜绿假单胞菌噬菌体 Paecide 能直接裂解消杀处于深度休眠的宿主

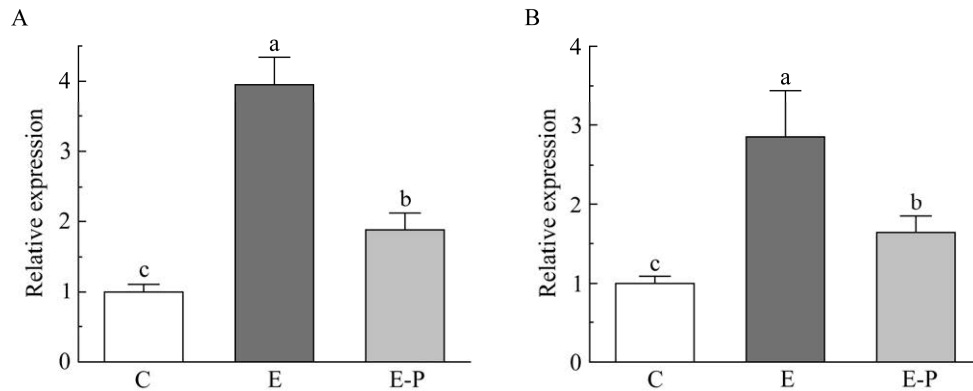


图9 炎症细胞因子 IL-6 (A)和 IL-1 $\beta$  (B)的表达 相同字母不存在显著性差异, 不同字母存在显著性差异

Figure 9 Expression of inflammatory cytokines IL-6 (A) and IL-1 $\beta$  (B). There is no significant difference in the same letter, but there is a significant difference in different letters.

菌, 并结合美罗培南在体外培养中根除休眠细菌。寻找并分离在低温环境中仍能有效裂解宿主菌的噬菌体具有广泛的现实意义。

在保护性实验中单独添加噬菌体并不会引起 Caco-2 细胞的凋亡, 表明  $\Phi$ EP1 不会产生对细胞有毒害作用的物质, 结合全基因组学测序结果可以看出, 噬菌体  $\Phi$ EP1 不携带耐药基因与毒力因子, 使得  $\Phi$ EP1 在后续实验与应用中的安全性得到保障。 $\Phi$ EP1 在 EIEC 对细胞的侵袭过程中能够有效杀灭细菌, 显著提高细胞的存活率, 减少细胞因子 IL-6 和 IL-1 $\beta$  的表达, 下调其炎症水平, 对 Caco-2 细胞具有良好的保护作用。EIEC 作为一种位于结肠的胞内致病菌, 若能在其侵袭结肠上皮细胞前使用噬菌体  $\Phi$ EP1 将其消杀, 可大大降低细菌性痢疾的发病率。本研究为后续噬菌体制剂的开发提供了良好的研究材料, 丰富了噬菌体基因库, 并为噬菌体作为新型抗菌剂的应用提供了理论基础。

## REFERENCES

[1] 黄倩妮, 陶媛美慧, 黄虞远, 濮吉, 罗雪莲, 金东, 杨晶, 徐建国. 一株新型早獭源性宽谱大肠杆菌噬

菌体的分离鉴定及基因组分析[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3503-3517.

HUANG QN, TAO YMH, HUANG YY, PU J, LUO XL, JIN D, YANG J, XU JG. Characterization and complete genomic analysis of a novel broad host-range *Escherichia coli* phage isolated from *Marmota himalayana*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3503-3517 (in Chinese).

[2] FUSCO A, SAVIO V, PERFETTO B, MATTINA R, DONNARUMMA G. Antimicrobial peptide human  $\beta$ -defensin-2 improves *in vitro* cellular viability and reduces pro-inflammatory effects induced by enteroinvasive *Escherichia coli* in Caco-2 cells by inhibiting invasion and virulence factors' expression[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 1009415.

[3] MICHELACCI V, TOZZOLI R, ARANCIA S, D'ANGELO A, BONI A, KNIJN A, PROSSEDA G, GREIG DR, JENKINS C, CAMOU T, SIROK A, NAVARRO A, SCHELOTTO F, VARELA G, MORABITO S. Tracing back the evolutionary route of enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and *Shigella* through the example of the highly pathogenic O96:H19 EIEC clone[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 260.

[4] MILES SL, TORRACA V, DYSON ZA, LÓPEZ-JIMÉNEZ AT, FOSTER-NYARKO E, LOBATO-MÁRQUEZ D, JENKINS C, HOLT KE, MOSTOWY S. Acquisition of a large virulence plasmid (pINV) promoted temperature-dependent

- virulence and global dispersal of O96:H19 enteroinvasive *Escherichia coli*[J]. *mBio*, 2023, 14(4): e0088223.
- [5] PASQUA M, MICHELACCI V, Di MARTINO ML, TOZZOLI R, GROSSI M, COLONNA B, MORABITO S, PROSEDA G. The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2390.
- [6] BYRNE L, KAINDAMA L, BENTLEY M, JENKINS C, AIRD H, OLIVER I, PARANTHAMAN K, TEAM IM. Investigation into a national outbreak of STEC O157:H7 associated with frozen beef burgers, UK, 2017[J]. *Epidemiology and Infection*, 2020, 148: e215.
- [7] CASTELLANO P, BELFIORE C, VIGNOLO G. Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties[J]. *Food Control*, 2011, 22(8): 1461-1465.
- [8] GOBIN M, HAWKER J, CLEARY P, INNS T, GARDINER D, MIKHAIL A, McCORMICK J, ELSON R, READY D, DALLMAN T, RODDICK I, HALL I, WILLIS C, CROOK P, GODBOLE G, TUBIN-DELIC D, OLIVER I. National outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 linked to mixed salad leaves, United Kingdom, 2016[J]. *Euro Surveillance*, 2018, 23(18): 17-00197.
- [9] JENKINS C, DALLMAN TJ, LAUNDERS N, WILLIS C, BYRNE L, JORGENSEN F, EPPINGER M, ADAK GK, AIRD H, ELVISS N, GRANT KA, MORGAN D, McLAUHLIN J. Public health investigation of two outbreaks of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with consumption of watercress[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(12): 3946-3952.
- [10] LAUNDERS N, LOCKING ME, HANSON M, WILLSHAW G, CHARLETT A, SALMON R, COWDEN J, HARKER KS, ADAK GK. A large Great Britain-wide outbreak of STEC O157 phage type 8 linked to handling of raw leeks and potatoes[J]. *Epidemiology and Infection*, 2016, 144(1): 171-181.
- [11] TREACY J, JENKINS C, PARANTHAMAN K, JORGENSEN F, MUELLER-DOBLIES D, ANJUM M, KAINDAMA L, HARTMAN H, KIRCHNER M, CARSON T, KAR-PURKAYASTHA I. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 linked to raw drinking milk resolved by rapid application of advanced pathogen characterisation methods, England, August to October 2017[J]. *Euro Surveillance*, 2019, 24(16): 1800191.
- [12] 张天宁, 李文阳, 董鹏程, 毛衍伟, 杨啸吟, 罗欣, 朱立贤. 市售肉品产志贺毒素大肠杆菌污染情况与耐药性分析: 以泰安市为例[J]. *中国动物传染病学报*, 2022: 1-11.
- ZHANG TN, LI WY, DONG PC, MAO YW, YANG XY, LUO X, ZHU LX. Prevalence and antibiotic resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail meat products sold in Tai'an Shandong Province[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2022: 1-11 (in Chinese).
- [13] KIM HJ, KIM YT, KIM HB, CHOI SH, LEE JH. Characterization of bacteriophage VVP001 and its application for the inhibition of *Vibrio vulnificus* causing seafood-borne diseases[J]. *Food Microbiology*, 2021, 94: 103630.
- [14] 李陇平. 裂解酶对食源性病原菌的生物防治研究及应用[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(12): 142-149.
- LI LP. Research progress of lysins for biocontrol of foodborne pathogens and its applications[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(12): 142-149 (in Chinese).
- [15] 温慧, 刘婷, 陈忠军, 满都拉, 孙子羽. 沙门氏菌噬菌体  $\Phi$ SHDA-1 生物学特性及基因组学初步研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(11): 96-103.
- WEN H, LIU T, CHEN ZJ, MANDLAA, SUN ZY. A preliminary study on the characteristics and genomics analysis of *Salmonella* phage  $\Phi$ SHDA-1[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2020, 39(11): 96-103 (in Chinese).
- [16] LI JJ, LI YM, DING YF, HUANG CX, ZHANG Y, WANG J, WANG XH. Characterization of a novel Siphoviridae *Salmonella* bacteriophage T156 and its microencapsulation application in food matrix[J]. *Food Research International*, 2021, 140: 110004.
- [17] LITTLE JS, DEDRICK RM, FREEMAN KG, CRISTINZIANO M, SMITH BE, BENSON CA, JHAVERI TA, BADEN LR, SOLOMON DA, HATFULL GF. Bacteriophage treatment of disseminated cutaneous *Mycobacterium chelonae* infection[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 2313.
- [18] PETROVIC FABIJAN A, LIN RCY, HO J, MADDOCKS S, BEN ZAKOUR NL, IREDELL JR, KHALID A, VENTURINI C, CHARD R, MORALES S, SANDARADURA I, GILBEY T, TEAM WBT. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5:



- 465-472.
- [19] 宋召军. 空肠弯曲菌噬菌体的分离鉴定及其初步应用[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2018.  
SONG ZJ. Isolation, identification and preliminary application of *Campylobacter jejuni* phage[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2018 (in Chinese)
- [20] PAPANICOLAOU DA, WILDER RL, MANOLAGAS SC, CHROUSOS GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1998, 128(2): 127-137.
- [21] JONES SA, JENKINS BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2018, 18: 773-789.
- [22] REILLY N, POYLIN V, MENCONI M, ONDERDONK A, BENGMARK S, HASSELGREN PO. Probiotics potentiate IL-6 production in IL-1 $\beta$ -treated Caco-2 cells through a heat shock-dependent mechanism[J]. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2007, 293(3): R1169-R1179.
- [23] WEBER A, WASILIEW P, KRACHT M. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) processing pathway[J]. *Science Signaling*, 2010, 3(105): e3105cm2.
- [24] 刘悦, 李菁华, 史红艳, 温剑平, 孙延波. 肠出血性大肠埃希菌 O157 噬菌体的生物学特性[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2012, 38(1): 79-83.  
LIU Y, LI JH, SHI HY, WEN JP, SUN YB. Biological characteristics of enterohemorrhagic *E. coli* O157-specific bacteriophages isolated from raw sewage[J]. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*, 2012, 38(1): 79-83 (in Chinese).
- [25] CHANG C, YU XB, GUO WN, GUO CY, GUO XK, LI QT, ZHU YZ. Bacteriophage-mediated control of biofilm: a promising new dawn for the future[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 825828.
- [26] PU YY, KE YH, BAI F. Active efflux in dormant bacterial cells—new insights into antibiotic persistence[J]. *Drug Resistance Updates*, 2017, 30: 7-14.
- [27] PU YY, ZHAO ZL, LI YX, ZOU J, MA Q, ZHAO YN, KE YH, ZHU Y, CHEN HY, BAKER MAB, GE H, SUN YJ, XIE XS, BAI F. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells[J]. *Molecular Cell*, 2016, 62(2): 284-294.
- [28] ZHENG EJ, VALERI JA, ANDREWS IW, KRISHNAN A, BANDYOPADHYAY P, ANAHTAR MN, HERNEISEN A, SCHULTE F, LINNEHAN B, WONG F, STOKES JM, RENNER LD, LOURIDO S, COLLINS JJ. Discovery of antibiotics that selectively kill metabolically dormant bacteria[J]. *Cell Chemical Biology*, 2024, 31(4): 712-728.e9.
- [29] MAFFEI E, WOISCHNIG AK, BURKOLTER MR, HEYER Y, HUMOLLI D, THÜRKAUF N, BOCK T, SCHMIDT A, MANFREDI P, EGLI A, KHANNA N, JENAL U, HARMS A. Phage Paride can kill dormant, antibiotic-tolerant cells of *Pseudomonas aeruginosa* by direct lytic replication[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 175.

(本文责编 郝丽芳)