

ICS 65.020.30

B 43

团体标准

T/SDAA 017—2021

噬菌体筛选技术规程

Technical Regulations for Phage Screen

2021—06—22 发布

2021—07—23 实施

山东省畜牧协会 发布

T/SDAA 017-2021

全国团体标准信息平台

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2020 给出的规则起草。

本标准由山东省畜牧协会提出并归口。

本文件起草单位：青岛农业大学，山东益生种畜禽股份有限公司，山东鲁丰集团有限公司。

本文件主要起草人：张灿，尹燕博，郭龙宗，刘海燕，李忠晓。

本标准为首次发布。

全国团体标准信息平台

噬菌体筛选技术规程

1 范围

本文件规定了噬菌体株的生物学特征测定方法及噬菌体株筛选的方法，用于从建立的噬菌体库中筛选能够裂解目标致病菌的噬菌体。

本文件适用于针对环境中的大肠杆菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌，从建立的噬菌体库中筛选适宜的噬菌体株。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

噬菌体 bacteriophage, phage

一类能感染细菌、真菌、藻类、放线菌、支原体及螺旋体等微生物的一类病毒的总称，亦称细菌病毒。

3.2

噬菌斑 plaque

噬菌体侵染细菌，导致宿主细胞溶解死亡，在琼脂培养基生长的菌苔上形成的空斑。

3.3

效价 titer

噬菌体的浓度，即每毫升样品含噬菌体的个数。通常是在含敏感菌的平板上形成噬菌斑进行噬菌体的计数，以每毫升中含有的噬菌斑形成单位（PFU/mL）表示其效价。

3.4

裂解效率 lysis efficiency

在检测的所有细菌菌株中，对噬菌体敏感的细菌所占比例。

4 噬菌体生物学活性特征测定

4.1 噬菌体样品制备与稀释

取-80℃低温冻存的噬菌体样品100 μL，加入带有100 μL敏感宿主菌的5 mL培养液中，在37℃条件下培养4 h~12 h，获得噬菌体增殖液。将噬菌体增殖液置于离心管中，12 000 r/min 离心15 min，取上清液，用0.22 μm 滤器过滤除菌，获得噬菌体悬液。用无菌生理盐水依次将噬菌体悬液进行10倍比稀释，获得不同稀释度的噬菌体稀释液。

4.2 噬菌体效价测定

按照附录A.4选择3个适宜稀释梯度的噬菌体稀释液样品，每个稀释梯度做三个平行，分别取100 μL，加入至100 μL敏感宿主菌的增殖液中，混匀，于37℃条件下孵育5 min，加入5 mL上层半固体培养基，混匀后，倾倒入下层固体培养基上，室温静置至上层半固体培养基凝固。于37℃条件下倒置培养3 h~8 h。统计单独、均一的噬菌斑个数，按照4.4要求，选取噬菌斑数量适宜的稀释度平板，根据公式(1)计算每毫升噬菌体原液中的噬菌体数（噬菌体效价），计算结果取该稀释度下三个平行结果的算术平均值。该试验重复三次，报告结果取三次噬菌体效价的算术平均值，结果保留2位有效数字。

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

4.3 噬菌体裂解效率测定

4.3.1 宿主菌稀释

选择待稀释的宿主菌，取1 mL 新鲜制备的宿主菌增殖液，加入9 mL生理盐水中，涡旋混匀，重复上述操作，根据宿主菌增殖液的初始效价直至将宿主菌效价稀释到 1×10^5 CFU/mL。

4.3.2 裂解效率测定

取1 mL待测定的噬菌体样品，加入1 mL效价为 1×10^5 CFU/mL的宿主菌稀释液中，室温静置孵育30 min，轻轻混匀后用无菌生理盐水将混合液稀释到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三个梯度，每个梯度分别取100 μL加到宿主菌适宜的固体培养基平板上，用无菌涂布器涂布均匀，每个梯

度做三个平行，在37℃条件下倒置培养12 h~48 h。同时，吸取1 mL效价为 1×10^5 CFU/mL的宿主菌稀释液，加入1 mL无菌生理盐水作为空白对照处理，重复上述操作步骤。按照 GB 4789.2 中6.3的规定进行平板上菌落计数，按照公式(2)计算噬菌体的裂解效率。该试验重复3次，报告结果取平均值。

$$\text{噬菌体裂解效率(\%)} = 1 - \frac{\text{处理组菌落数}}{\text{对照组菌落数}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

4.4 计算要求及允许误差范围

噬菌斑数量根据 GB 4789.2 中6.3规定的菌落计数原则进行计数。从接种后的三个稀释度中，选择一个适宜的稀释度，进行噬菌斑计数或菌落计数，同一稀释度三个重复的菌数或噬菌斑数相近。三次重复试验测定结果的绝对差值≤20%，以三次测定结果的算术平均值为最终测定结果。

5 噬菌体株筛选及标准

将待测细菌于37℃条件下震荡培养8 h~12 h，获得新鲜的细菌增殖液。取1 mL细菌增殖液，加入5 mL上层半固体培养基，混匀后，倾倒入下层固体培养基上，室温静置至上层半固体培养基凝固。用微量移液器分别取噬菌体样品2 μL，滴加到双层平板上，室温静置，直至平板上的噬菌体样品完全吸收。同时，滴加等量的噬菌体样品冻存液（附录A.5）作为空白对照。在37℃条件下倒置培养12 h~48 h，形成菌苔，观察菌苔上空斑形成情况。对照无空斑形成，能够裂解该细菌的噬菌体株能够在菌苔上形成清晰透明的空斑。

附录 A

(资料性)

A.1 仪器设备

A.1.1 恒温培养箱： $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

A.1.2 离心机：转速12000转

A.1.3 超净工作台

A.1.4 高压蒸汽灭菌锅

A.1.5 恒温振荡培养器： $36 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 42 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

A.1.6 电子分析天平：感量0.01 g

A.1.7 电热恒温鼓风干燥箱： $10\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 200\text{ }^{\circ}\text{C}$

A.1.8 冰箱： $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下和 $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$

A.1.9 无菌培养皿： $\Phi 90\text{ mm}$ 。

A.1.10 微量移液器： $0.5\text{ }\mu\text{L} \sim 10\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{L} \sim 200\text{ }\mu\text{L}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L} \sim 1000\text{ }\mu\text{L}$

A.1.11 漩涡混合仪

A.1.12 细菌涂布器

A.2 试剂和材料

A.2.1 LB培养基

A.2.2 LB固体培养基

A.2.3 氢氧化钠

A.2.4 盐酸

A.2.5 宿主菌（增殖对应的噬菌体）

A.3 双层琼脂培养基制备

A.3.1 上层固体培养基配置：

LB固体培养基 2.5% (g/100 mL)

琼脂粉 0.75% (g/100 mL)

pH值调节到7.2~7.4。

A.3.2 下层固体培养基配置：

LB固体培养基 2.5% (g/100 mL)

琼脂粉 1.5% (g/100 mL)

pH值调节到7.2~7.4。

A.3.3 液体培养基配置：

LB培养基 2.5% (g/100 mL)

琼脂粉 1.5% (g/100 mL)

pH值调节到7.2~7.4。

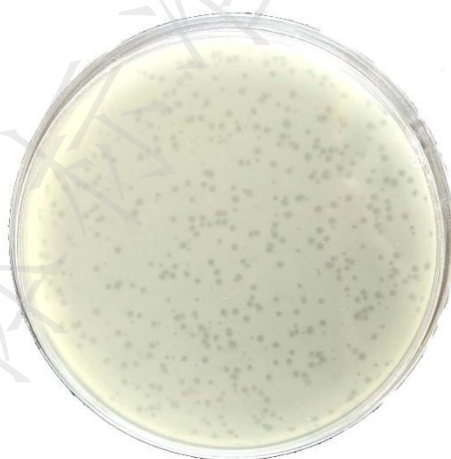
A.3.4 灭菌

配制的培养基于121℃高压灭菌20 min。

除非另有说明，在试验中使用确认为分析纯的试剂和符合GB/T 6682规定的三级水。

A.4 噬菌体稀释梯度的选择

根据保存的噬菌体样品的效价选择噬菌体适宜的稀释梯度。用无菌生理盐水依次将噬菌体悬液进行10倍比稀释，将噬菌体样本稀释到 10^2 PFU/mL ~ 10^4 PFU/mL，选择这三个稀释度进行噬菌斑计数（图A.4.1），测定噬菌体的效价。



图A.4.1 噬菌体在菌苔上形成的噬菌斑

A.5 噬菌体冻存液的配置

按照相应宿主菌的培养液各成分比例配置冻存液，含终浓度为30% (v/v) 的甘油，121℃高压灭菌20 min。