

李星辰, 李俊, 包红朵, 等. 沙门氏菌噬菌体多克隆抗体制备及其检测方法[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(6): 1233-1239.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.06.020

沙门氏菌噬菌体多克隆抗体制备及其检测方法

李星辰^{1,2}, 李俊², 包红朵², 何涛², 王冉^{1,2}

(1. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 噬菌体主要由蛋白质和核酸组成, 进入动物体内后可能会被机体认为是抗原, 进而激发机体产生抗体。为深入研究噬菌体进入动物体内后抗体产生情况, 本研究采用纯化后的广谱裂解性沙门氏菌噬菌体 SCBS 作为抗原, 用新西兰大白兔开展多克隆抗体制备, 最后成功获得了该噬菌体的多克隆抗体, 并建立了 SCBS 噬菌体血清抗体的间接 ELISA 检测方法。抗原包被含量为 1×10^9 PFU/mL, 用 2% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 3 h, 血清稀释度 1 : 500, 血清反应时间 60 min, 酶标二抗稀释至 1 : 12 000 后作用 45 min, TMB 显色液反应 15 min 后测定吸光度 (OD_{450})。该检测方法特异性良好, 阳性临界值为 0.372, 阴性临界值为 0.310; 批内变异系数为 2.30% ~ 7.11%, 批间变异系数为 1.37% ~ 9.25%。

关键词: 沙门氏菌; 噬菌体; 抗体; 间接 ELISA

中图分类号: R378.2⁺2; Q939.48 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2025)06-1233-07

Preparation of polyclonal antibodies against *Salmonella* phage and establishment of their detection methods

LI Xingchen^{1,2}, LI Jun², BAO Hongduo², HE Tao², WANG Ran^{1,2}

(1. College of Animal Science & Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Phages are mainly composed of proteins and nucleic acids. When a bacteriophage enters an animal's body, it may be recognized as an antigen, thereby triggering the production of antibodies. In order to further study the production of antibodies in the animal body after oral administration of phages, purified broad-spectrum lytic *Salmonella* phage SCBS was used as the antigen to challenge the New Zealand Great White Rabbit. The polyclonal antibodies against the phage SCBS were prepared, and the indirect ELISA method was established. The phage antibodies were detected as follows: phages were coated at a concentration of 1×10^9 PFU/mL, blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) for 3 h, the hyperimmune serum (1 : 500) was incubated for 60 min, then enzyme-labeled secondary antibody (1 : 12 000) was incubated for 45 min, the absorbance (OD_{450}) was measured after the substrate solution containing TMB reacted for 15 min. The established ELISA method demonstrated good specificity. The positive and negative threshold values were 0.372 and 0.310. The intra-assay coefficient of variation ranged from 2.30% to 7.11%, and the inter-assay coefficient of variation ranged from 1.37% to 9.25%.

Key words: *Salmonella*; phage; antibody; indirect ELISA

收稿日期: 2024-10-24

基金项目: “十四五”国家重点研发计划课题项目(2023YFD1800303)

作者简介: 李星辰(2000-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事农产品质量安全研究。(E-mail)lixingchen2000@163.com

通讯作者: 王冉, (E-mail)ranwang@jaas.ac.cn; 何涛, (E-mail)vethetao@163.com

随着噬菌体的广泛使用, 噬菌体治疗的安全性和免疫原性也广受关注。研究表明, 噬菌体的特异性抗体能够中和动物体内的噬菌体。Srivastava 等^[1]研究发现, 免疫 B 细胞可能在噬菌体中和过程中起重要作用, 其原理可能是由于噬菌体刺激了 B 细胞产生

免疫球蛋白,导致噬菌体活性丧失。Wang 等^[2]通过噬菌体体内治疗的动力学发现,15 min 时活性噬菌体的剩余比例为 $50.43\% \pm 9.68\%$,并且其失活速度很快,12 h 已经无法在血液中检测到活性噬菌体。本研究以 1 株广谱沙门氏菌噬菌体 SCBS 为对象,制备了其免源多克隆抗体,并将噬菌体作为包被抗原建立一种检测动物血清中该类型噬菌体抗体的间接 ELISA 方法,为后续研究噬菌体治疗过程中动物血清抗体的产生规律提供一种快速检测手段。

1 材料和方法

1.1 试验材料

沙门氏菌噬菌体 SCBS 由江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所畜产品安全与营养研究室保存。PBS 缓冲液购自上海源叶生物科技公司,Tween-20 购自北京普利莱基因技术有限公司,将 500 μL Tween-20 加入 1 L PBS 缓冲液中,摇匀,制成 PBST 缓冲液(PBS 的 pH 为 7.4,Tween-20 体积分数为 0.05%);牛血清白蛋白(BSA)购自上海源叶生物科技公司;TMB 单组分显色液购自北京索莱宝科技有限公司;多功能酶标仪为德国赛默飞世尔科技公司产品。3~4 月龄新西兰大白兔购自江苏青龙山生物科技有限公司,AA 肉仔鸡购自南京特给力种植专业合作社,饲养于江苏省农业科学院实验动物房。

1.2 试验方法

1.2.1 噬菌体 SCBS 的纯化 利用 CsCl 密度梯度离心法纯化噬菌体 SCBS。将噬菌体 SCBS 扩增至 1×10^{10} PFU/mL 后加入胰 DNase I 和 RNase 进行酶解,终质量浓度均为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,室温孵育 30 min。在离心管底部先缓慢加入 3 mL 质量浓度为 1.6 g/cm^3 的 CsCl,再依次加入 3 mL 质量浓度为 1.4 g/cm^3 的 CsCl,1.5 mL 的 25% 蔗糖溶液,3.0 mL 的噬菌体裂解液,以 30 000 r/min 超速离心 2 h。离心管下端(即 1.4 g/cm^3 与 1.6 g/cm^3 之间)可见一层白色条带,即为纯化的噬菌体层,用 1 mL 注射器从侧面插入离心管吸取。将吸取的噬菌体样品置于透析袋中,用 SM 缓冲液进行透析,透析过程中采用磁力搅拌器搅拌,2 h 后结束,更换新的 SM 缓冲液,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜,将透析过的样品取出,加入等体积的氯仿提纯,上下颠倒混匀,5 000 r/min 离心 15 min 分离有机相和亲水相,回收含噬菌体颗粒的亲水相(上层),重复氯仿提纯操作 2 次。

1.2.2 噬菌体 SCBS 多克隆抗体的制备 选用 3~4 月龄的新西兰大白兔进行多克隆抗体的制备,首次免疫原为纯化的噬菌体(500 μL)与弗氏完全佐剂按 1:1 体积比混合乳化,采用背部皮下多点注射法进行免疫。2 周后以同样的方法进行二免,二免后 2 周进行三免,二免和三免的免疫原为噬菌体(500 μL)与弗氏不完全佐剂按 1:1 体积比混合乳化。3 次免疫结束后 7 d 对兔进行心脏采血,分离血清,检测血清中抗体效价。

1.2.3 间接 ELISA 方法的初步建立 以噬菌体 SCBS 为抗原包被 ELISA 平板,包被含量为 1×10^9 PFU/mL,每孔 100 μL ,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置过夜,用 PBST 缓冲液洗涤 4 次,每次洗涤 5 min。用 200 μL 含 1% BSA 的 PBS 缓冲液封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1.5 h,用 PBST 缓冲液洗涤 4 次。用含 1% BSA 的 PBS 缓冲液分别按 1:500,1:1 000,1:2 000,1:4 000,1:8 000 稀释免源高免血清,每孔加入 100 μL ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h,用 PBST 缓冲液洗涤 4 次。按 1:10 000 比例稀释用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG,每孔 100 μL 添加至包被板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后,用 PBST 缓冲液洗涤 4 次,包被板中每孔添加 TMB 显色液 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min,每孔加入 50 μL 终止液终止,酶标仪检测 OD_{450} 。设置未进行免疫的兔血清为阴性对照,PBS 缓冲液为空白对照。

1.2.4 间接 ELISA 方法的优化 最佳抗原包被含量和血清稀释度的确定:利用棋盘法确定最佳抗原包被含量和最佳血清稀释度。横排为噬菌体不同包被含量,依次为 1×10^{10} PFU/mL、 1×10^9 PFU/mL、 1×10^8 PFU/mL、 1×10^7 PFU/mL、 1×10^6 PFU/mL,竖列为血清不同稀释度,从上到下做 2 倍稀释,依次为 1:500、1:1 000、1:2 000、1:4 000,其余步骤同方法 1.2.3。以 P/N 值(P 表示阳性孔平均 OD_{450} ; N 表示阴性孔平均 OD_{450})最大且抗原包被含量最小时作为最佳。最佳封闭液的确定:在上述已确定的最佳条件的基础上,将封闭液替换为 1% BSA、2% BSA、5% 脱脂奶粉,计算此条件下的 P/N 值,确定 P/N 值最大时为最佳。最佳封闭时间的确定:在上述已确定的最佳条件的基础上,分别选择封闭时间为 1 h、2 h、3 h,计算不同封闭时间下的 P/N 值,确定 P/N 值最大时的封闭时间为最佳。最佳血清作用时间的确定:在上述已确定的最佳条件的基础上,分别选择血清反应时间为 45 min、60 min、75 min、90

min, 计算不同血清反应时间下的 P/N 值, 确定 P/N 值最大时的血清反应时间为最佳。最佳酶标二抗体积比: 在上述已确定的最佳条件的基础上, 分别将酶标二抗按照 1: 6 000、1: 8 000、1: 10 000、1: 12 000 的比例进行稀释, 计算不同酶标二抗体积比下的 P/N 值, 确定 P/N 值最大时为最佳酶标二抗体积比。最佳酶标二抗反应时间: 在上述已确定的最佳条件的基础上, 分别选择酶标二抗反应时间为 30 min、45 min、60 min、75 min, 计算不同反应时间下的 P/N 值, 确定 P/N 值最大的为最佳反应时间。最佳显色液反应时间的确定: 在上述已确定的最佳条件的基础上, 将 TMB 显色液的反应时间设置为 37 °C 10 min、37 °C 15 min、37 °C 20 min, 计算不同 TMB 显色液反应时间下的 P/N 值, 选择 P/N 值最大为最佳 TMB 显色液反应时间。

1.2.5 临界值的确定 在上述优化条件的基础上, 对 25 份阴性血清进行检测, 测定其 OD_{450} 值, 计算其平均值(\bar{x})与标准差(s); 根据统计学原理计算阳性临界值(CP)= $\bar{x}+3s$, 阴性临界值(CN)= $\bar{x}+2s$ 。

1.2.6 特异性检测 以肺炎克雷伯菌噬菌体、金黄色葡萄球菌噬菌体、弧菌噬菌体、大肠杆菌噬菌体为抗原, 按照上述优化反应程序进行间接 ELISA 检测, 鉴定该检测方法的特异性。

1.2.7 灵敏度检测 取 3 份噬菌体阳性血清分别进行 1: 100、1: 300、1: 500、1: 1 000、1: 2 000、1: 4 000、1: 8 000、1: 16 000 和 1: 32 000 稀释, 利用上述优化的 ELISA 方法对稀释后的阳性血清进

行检测, 评价此方法的灵敏度。

1.2.8 重复性试验 批内重复性试验: 随机取 3 份阳性血清和 3 份阴性血清, 用同一批次包被的酶标板, 采用上述优化步骤进行间接 ELISA 检测, 计算该方法的批内变异系数。批间重复性试验: 仍利用上述选出的阳性血清和阴性血清各 3 份, 用不同批次包被的酶标板, 采用上述优化步骤进行检测, 计算该方法的批间变异系数。变异系数(CV)= $\frac{\text{标准差}}{\text{平均值}} \times 100\%$ 。

1.2.9 动物试验 选取 1 日龄健康 AA 肉仔鸡 144 只, 根据单因素完全随机试验设计, 随机分为 4 组, 每组 6 个重复, 每个重复 6 只仔鸡。对照组饲喂基础日粮, 其他 3 个试验组分别在基础日粮中添加噬菌体 SCBS, 效价分别为 1×10^3 PFU/kg、 1×10^4 PFU/kg、 1×10^5 PFU/kg。在试验第 21 d 和第 35 d, 从每个重复中随机抽取 1 只肉鸡称重, 采集静脉血 10 mL, 静置 30 min 后, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上层血清, 通过本研究建立的间接 ELISA 检测方法检测肉鸡血清中噬菌体 SCBS 特异性抗体水平。

2 结果与分析

2.1 间接 ELISA 方法的建立与优化

当噬菌体包被含量为 1×10^9 PFU/mL, 血清稀释度为 1: 500 时, P/N 值最大且抗原包被浓度较小, 所以 1×10^9 PFU/mL 和 1: 500 为最佳噬菌体包被含量和最佳血清稀释度(表 1)。

表 1 噬菌体 SCBS 最佳包被含量和血清最佳稀释度的确定

Table 1 Determination of the optimal coating concentration of phage SCBS and the optimal dilution of serum

稀释度	项目	噬菌体包被含量 (PFU/mL)				
		1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6
1: 500	阳性孔 OD_{450}	2.544 6	1.984 1	1.727 8	1.705 6	1.757 9
	阴性孔 OD_{450}	0.459 9	0.317 7	0.291 9	0.278 9	0.395 4
	P/N 值	5.532 9	6.245 2	5.919 2	6.115 5	4.445 9
1: 1 000	阳性孔 OD_{450}	1.742 9	1.121 2	1.006 5	0.916 4	0.855 9
	阴性孔 OD_{450}	0.308 6	0.204 4	0.201 9	0.213 3	0.178 5
	P/N 值	5.647 8	5.485 3	4.985 1	4.296 3	4.794 9
1: 2 000	阳性孔 OD_{450}	1.130 6	0.720 4	0.575 8	0.488 2	0.522 7
	阴性孔 OD_{450}	0.210 8	0.152 2	0.139 3	0.133 5	0.120 5
	P/N 值	5.363 4	4.733 2	4.133 5	3.656 9	4.337 7
1: 4 000	阳性孔 OD_{450}	0.743 8	0.395 9	0.329 8	0.306 4	0.258 0
	阴性孔 OD_{450}	0.131 3	0.115 1	0.102 1	0.109 0	0.109 7
	P/N 值	5.664 9	3.439 6	3.230 2	2.811 0	2.351 9

噬菌体 SCBS 在用 2% BSA 作为封闭液时 P/N 值最大,其最佳封闭液为 2% BSA(表 2)。

表 2 噬菌体 SCBS 最佳封闭液的确定

Table 2 Determination of the optimal blocking solution for phage SCBS

封闭液	阳性孔 OD_{450}	阴性孔 OD_{450}	P/N 值
1% BSA	3.383 0	0.809 5	4.179 1
2% BSA	3.216 2	0.717 9	4.480 0
5% 脱脂奶粉	3.400 0	1.020 0	3.333 3

噬菌体 SCBS 在用 2% BSA 为封闭液封闭 3 h 时 P/N 值最大,所以确定最佳封闭时间为 3 h(表 3)。

表 3 噬菌体 SCBS 最佳封闭时间的确定

Table 3 Determination of the optimal blocking time for phage SCBS

封闭时间	阳性孔 OD_{450}	阴性孔 OD_{450}	P/N 值
1 h	0.812 8	0.191 5	4.244 4
2 h	1.297 0	0.348 3	3.723 8
3 h	1.233 9	0.263 5	4.682 7

噬菌体 SCBS 在血清反应时间为 60 min 时 P/N 值最大,因此噬菌体 SCBS ELISA 检测的最佳血清反应时间为 60 min(表 4)。

表 4 噬菌体 SCBS 最佳血清反应时间的确定

Table 4 Determination of the optimal serum reaction time for phage SCBS

血清反应时间	阳性孔 OD_{450}	阴性孔 OD_{450}	P/N 值
45 min	1.094 2	0.232 9	4.698 2
60 min	1.449 9	0.265 8	5.454 9
75 min	1.588 8	0.349 2	4.549 8
90 min	2.091 4	0.442 3	4.728 5

噬菌体 SCBS 在选择 1 : 12 000 的酶标二抗体积比时 P/N 值最大,因此确定最佳酶标二抗体积比为 1 : 12 000(表 5)。

噬菌体 SCBS 在酶标二抗反应 45 min 时 P/N 值最大,因此最佳酶标二抗反应时间为 45 min(表 6)。

噬菌体 SCBS 在 TMB 显色反应 15 min 时 P/N 值最大,因此噬菌体 SCBS ELISA 检测的最佳显色反应时间为 15 min(表 7)。

表 5 噬菌体 SCBS 最佳酶标二抗体积比的确定

Table 5 Determination of the optimal enzyme-labeled secondary antibody volume ratio for phage SCBS

酶标二抗体积比	阳性孔 OD_{450}	阴性孔 OD_{450}	P/N 值
1 : 6 000	1.478 4	1.596 0	0.926 3
1 : 8 000	1.783 3	1.353 0	1.318 0
1 : 10 000	2.001 1	0.997 6	2.005 9
1 : 12 000	1.757 1	0.860 6	2.041 7

表 6 噬菌体 SCBS 最佳酶标二抗反应时间的确定

Table 6 Determination of the optimal enzyme-labeled secondary antibody reaction time for phage SCBS

酶标二抗反应时间	阳性孔 OD_{450}	阴性孔 OD_{450}	P/N 值
30 min	0.918 6	0.226 0	4.064 6
45 min	1.298 5	0.237 2	5.474 3
60 min	1.278 7	0.328 0	3.898 5
75 min	1.813 7	0.364 8	4.971 7

表 7 噬菌体 SCBS 最佳 TMB 显色反应时间的确定

Table 7 Determination of the optimal TMB substrate incubation time for phage SCBS

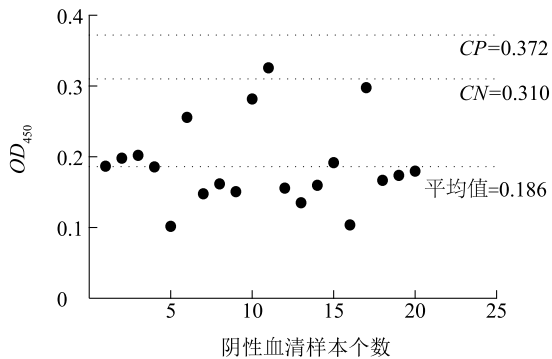
酶标二抗反应时间	阳性孔 OD_{450}	阴性孔 OD_{450}	P/N 值
10 min	0.972 7	0.253 7	3.834 1
15 min	1.169 2	0.292 0	4.004 1
20 min	1.006 6	0.317 9	3.166 4

2.2 噬菌体 SCBS 间接 ELISA 方法的临界值

应用优化后的间接 ELISA 方法对 25 份阴性血清进行试验(图 1)。计算得到噬菌体 SCBS 特异性抗体的平均值为 0.186,标准差为 0.062,根据统计学原理确定阳性临界值 $CP = \bar{x} + 3s = 0.186 + 3 \times 0.062 = 0.372$,阴性临界值 $CN = \bar{x} + 2s = 0.186 + 2 \times 0.062 = 0.310$ 。结果表明,本研究建立的 ELISA 方法检测动物血清中噬菌体 SCBS 的抗体时,待测样品的检测值 ≥ 0.372 的为阳性, < 0.310 的为阴性,介于两者之间的为可疑。

2.3 间接 ELISA 方法的特异性

采用肺炎克雷伯菌噬菌体、金黄色葡萄球菌噬菌体、大肠杆菌噬菌体、弧菌噬菌体作为抗原包被,测试 ELISA 方法的特异性(表 8)。结果显示,肺炎克雷伯菌噬菌体、金黄色葡萄球菌噬菌体、弧菌噬菌体均为阴性,表明该检测方法特异性良好。仅与大肠杆菌噬菌体有较弱的交叉反应,有待进一步研究。



CP:阳性临界值;CN:阴性临界值。

图1 噬菌体 SCBS 间接 ELISA 方法的临界值

Fig.1 The threshold values of the indirect ELISA method for the phage SCBS

表8 间接 ELISA 方法的特异性

Table 8 The specificity of the indirect ELISA method

项目	沙门氏菌噬菌体	肺炎克雷伯菌噬菌体	金黄色葡萄球菌噬菌体	大肠杆菌噬菌体	弧菌噬菌体	阴性
OD ₄₅₀	0.608 9	0.154 7	0.104 5	0.432 0	0.117 7	0.133 5
阴阳性	+	-	-	+	-	-

+表示阳性;-表示阴性。

表9 间接 ELISA 方法的灵敏度

Table 9 The sensitivity of the indirect ELISA method

项目	阳性血清稀释度								
	1:100	1:300	1:500	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000
OD ₄₅₀	1.107 6	0.767 7	0.631 9	0.570 2	0.473 0	0.300 6	0.121 0	0.099 8	0.090 6
阴阳性	+	+	+	+	+	+	-	-	-

+表示阳性;-表示阴性。

表10 间接 ELISA 方法的重复性

Table 10 The reproducibility of the indirect ELISA method

噬菌体	样品编号	批内		批间	
		OD ₄₅₀ 平均值	变异系数 (%)	OD ₄₅₀ 平均值	变异系数 (%)
SCBS	1	1.502	3.60	1.684	1.37
	2	1.725	3.29	1.795	3.89
	3	1.830	5.84	1.851	9.25
	4	0.143	7.11	0.102	6.70
	5	0.123	2.30	0.123	5.40
	6	0.118	3.79	0.096	5.53

2.6 噬菌体 SCBS 在肉鸡体内的抗体水平

分别采集饲喂至第 21 d 和第 35 d 的肉鸡血清,用本研究建立的间接 ELISA 方法检测血清中噬菌

2.4 间接 ELISA 方法的灵敏度

根据上述最佳反应条件,将 SCBS 阳性血清按照 1:100、1:300、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000 和 1:32000 稀释,测定 OD₄₅₀。结果如表 9 所示,噬菌体 SCBS 阳性血清稀释到 4000 倍仍为阳性,表明本检测方法的灵敏度良好。

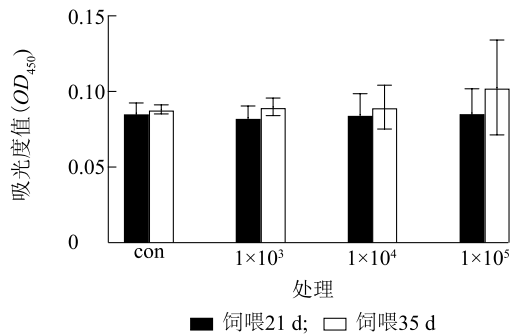
2.5 间接 ELISA 方法的重复性

根据上述最佳反应条件,验证批内和批间的重复性,结果如表 10 所示,噬菌体 SCBS 的批内变异系数为 2.30%~7.11%,批间变系数在 1.37%~9.25%,噬菌体 SCBS 批内和批间变异系数均在 10.00% 以下,表明该检测方法的重复性良好。

体 SCBS 的抗体(图 2),根据本研究确定的临界值(OD₄₅₀<0.310 为阴性)可知,通过在日粮中添加噬菌体饲喂肉鸡并没有引起肉鸡的体液免疫。

3 讨论

致病性细菌感染是全球公共卫生面临的严峻挑战^[3-4],由于抗生素的滥用和耐药细菌的出现,导致抗菌治疗更加困难。噬菌体疗法被认为是治疗多重耐药细菌感染的重要抗生素替代品之一。宿主动物的免疫状态很大程度上决定了宿主体内噬菌体的持续时间及含量^[5-6],已有研究表明,肝脏和脾脏中免疫细胞的吞噬作用能够中和动物体内的噬菌体。因此,吞噬细胞可能是限制体内噬菌体作用的最重要的部分。但同时也有一些试验结果表明,噬菌体可以与吞噬细胞之间通过相互作用来消除细



con: 对照组; 1×10^3 : 日粮 + 1×10^3 PFU/kg 噬菌体组; 1×10^4 : 日粮 + 1×10^4 PFU/kg 噬菌体组; 1×10^5 : 日粮 + 1×10^5 PFU/kg 噬菌体组。

图2 噬菌体 SCBS 在肉鸡体内的抗体水平

Fig.2 Antibody levels of phage SCBS in broilers

菌。Jonczyk-Matysiak 等^[7]通过对 51 名慢性革兰阴性细菌和革兰阳性细菌感染患病动物进行噬菌体治疗,发现噬菌体治疗不会降低患病动物吞噬细胞杀死细菌的能力,并且噬菌体进入吞噬细胞后能够显著减少细菌对吞噬细胞的毒性作用。

有研究人员提出这些免疫反应可能会对噬菌体疗法的疗效产生影响,但不一定会影响噬菌体治疗的成败。Zaczek 等^[8]通过对葡萄球菌噬菌体混合物治疗的患病动物的体液免疫反应进行分析,发现大多数患病动物在噬菌体治疗期间血清中没有表现出明显增高的抗噬菌体抗体水平,并且一些患病动物在治疗前和治疗过程中产生的抗体相对较少,因此在噬菌体治疗过程中产生的噬菌体抗体可能不会影响噬菌体治疗的效果。

间接 ELISA 方法依据抗原与抗体之间特异性结合的原理能够快速准确地进行抗体检测,其灵敏度比直接 ELISA 检测方法更高。并且抗原固定法没有特异性,样本中的一些非特异性蛋白可能会附着在微孔板上影响试验结果^[9]。本研究利用 CsCl 密度梯度离心和氯仿抽提的方法去除了噬菌体扩增液中的宿主细菌残留碎片,从而使试验结果更加准确。

目前有研究表明,口服噬菌体在胃中停留时,胃酸作用可能会导致大量噬菌体失活^[10]。并且肠道中存在的消化液也会导致噬菌体失活,因此最终在肠道黏膜中存活的噬菌体可能只占添加量的一小部分。本试验通过在肉鸡日粮中添加 1×10^3 PFU/kg、 1×10^4 PFU/kg 和 1×10^5 PFU/kg 的噬菌体饲

喂一段时间后,检测发现在肉鸡肠道黏膜中存活的噬菌体量大大降低,这与刘燕坤等^[11]的研究结果一致。

随着噬菌体治疗的广泛应用,有研究表明,噬菌体的特异性抗体能够中和体内的噬菌体。Wang 等^[2]通过噬菌体动力学研究发现,15 min 时活性噬菌体的剩余比例为 $50.43\% \pm 9.68\%$,并且其失活速度很快,12 h 时便无法在血液中检测到活性噬菌体。本试验通过在肉鸡日粮中添加一定量的噬菌体,使噬菌体通过口服的方式进入肉鸡体内后,利用本研究建立的检测方法检测肉鸡血清特异性抗体,结果在肉鸡血清中没有检测到噬菌体的特异性抗体,这与 Gembara 等^[12]的研究结果一致。本研究结果为后续进行噬菌体的安全性评价提供了一定的参考依据。

4 结论

本研究以沙门氏菌噬菌体 SCBS 为对象,制备了其兔源高免血清,进而建立了噬菌体 SCBS 血清抗体的间接 ELISA 检测方法。该检测方法特异性好,灵敏度低,阳性临界值为 0.372,阴性临界值为 0.310;重复性好,批内变异系数为 2.30%~7.11%,批间变系数为 1.37%~9.25%。该检测方法的建立为后续评价噬菌体治疗的动物体内血清抗体水平提供了参考依据。

参考文献:

- [1] SRIVASTAVA A S, KAIDO T, CARRIER E. Immunological factors that affect the *in vivo* fate of T7 phage in the mouse[J]. Journal of Virological Methods, 2004, 115(1): 99-104.
- [2] WANG J Y, MENG W X, ZHANG K C, et al. Topically applied bacteriophage to control multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in a New Zealand rabbit model[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1031101.
- [3] AHMED A M, SHIMAMOTO T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 168: 57-62.
- [4] AMARILLAS L, RUBÍ-RANGEL L, CHAIDEZ C, et al. Isolation and characterization of phiLLS, a novel phage with potential biocontrol agent against multidrug-resistant *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1355.
- [5] 李胜, 李广辉, 张晓璐, 等. 2020-2021 年贵德县喜马拉雅旱獭血清中特异性鼠疫噬菌体抗体的检测[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2023, 53(4): 12-14, 72.

- [6] HODYRA-STEFAŃIAK K, MIERNIKIEWICZ P, DRAPAŁA J, et al. Mammalian host-versus-phage immune response determines phage fate *in vivo*[J]. *Scientific Reports*,2015,5:14802.
- [7] JONCZYK-MATYSIAK E, ŁUSIAK-SZELACHOWSKA M, KŁAK M, et al. The effect of bacteriophage preparations on intracellular killing of bacteria by phagocytes[J]. *Journal of Immunology Research*,2015,2015:482863.
- [8] ŻACZEK M, ŁUSIAK-SZELACHOWSKA M, JONCZYK-MATYSIAK E, et al. Antibody production in response to staphylococcal MS-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy[J]. *Frontiers in Microbiology*,2016,7:1681.
- [9] GAN S D, PATEL K R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013,133(9):1-3.
- [10] JOHNSON R P, GYLES C L, HUFF W E, et al. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle,poultry and pigs[J]. *Animal Health Research Reviews*,2008,9(2):201-215.
- [11] 刘燕坤,罗润波,林 焱,等. 噬菌体鸡尾酒对断奶仔猪生长性能、血液参数和粪样菌群的影响[J]. *畜牧兽医学报*,2023,54(4):1555-1567.
- [12] GEMBARA K, DABROWSKA K. Phage-specific antibodies[J]. *Current Opinion in Biotechnology*,2021,68:186-192.

(责任编辑:黄克玲)