

# 噬菌体Pu29特性分析及其在沙门氏菌磁分离富集中的应用

丁一峰, 张 宇, 刘 茜, 黄晨曦, 邵彦春, 王小红\*  
(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 以1株鸡白痢沙门氏菌噬菌体Pu29为研究对象, 全面分析其生物学及基因组特性, 将其作为识别元件, 建立基于噬菌体Pu29的沙门氏菌磁分离富集技术。该噬菌体属于轮状病毒属 (*Roufivirus*), 具有二十面体的头部和不可收缩的长尾部。Pu29具有较宽的宿主谱, 15 min时对宿主细胞的吸附率为88.67%, 潜伏期为30 min, 裂解期为180 min, 裂解量为115.74 PFU/cell。同时Pu29具有较好的耐热性 (30~60 °C) 和pH值耐受性 (pH 4~11)。Pu29基因组由45 715 bp (GC含量46.08%) 和81个开放阅读框组成, 包括18个具有已知功能的阅读框, 不携带编码毒性或抗性因子的基因。通过酰胺反应将噬菌体Pu29与羧基化的纳米磁珠偶联制备探针PhagePu29-MBs。使用25 μg探针与沙门氏菌在37 °C孵育20 min时, 对沙门氏菌的捕获效率最高可达到83.93%, 最低捕获细菌浓度为45 CFU/mL。采用透射电镜观察到PhagePu29-MBs能够特异性地捕获沙门氏菌。在加标样品中, PhagePu29-MBs分离富集沙门氏菌的捕获效率最高能达到92.92%。该方法分离富集沙门氏菌的时间大约为30 min。因此, 本研究基于噬菌体Pu29建立了一种快速、特异性强的沙门氏菌磁分离方法, 可为基于噬菌体快速分离富集食源性病原菌奠定研究基础。

**关键词:** 沙门氏菌; 噬菌体; 生物学特性; 磁分离技术; 快速分离富集

## Characteristic Analysis of *Salmonella* Phage Pu29 and Its Application in Magnetic Separation and Enrichment of *Salmonella*

DING Yifeng, ZHANG Yu, LIU Xi, HUANG Chenxi, SHAO Yanchun, WANG Xiaohong\*  
(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** *Salmonella pullorum* phage Pu29 was comprehensively analyzed for its biological and genomic characteristics. A magnetic separation and enrichment technique for *Salmonella* was established using the phage Pu29 as a recognition element. The phage belonged to the genus *Roufivirus* and had an icosahedron head and an irreducible long tail. Pu29 had a wide host spectrum with an adsorption rate of 88.67% on host cells in 15 min, a latent period of 30 min, a rise period of 180 min, and a burst size of 115.74 PFU/cell. Meanwhile, Pu29 had good heat resistance (30–60 °C) and pH tolerance (pH 4–11). Its genome was composed of 45 715 bp (GC content 46.08%) and 81 open reading frames (ORFs), including 18 ORFs with known functions that did not carry genes encoding toxicity or resistance factors. PhagePu29-MBs were prepared as a probe by coupling the phage with carboxylated nano-magnetic beads (MBs) through amide reaction. When 25 μg of the probe was incubated with *Salmonella* at 37 °C for 20 min, the highest capture rate of *Salmonella* of 83.93% and the lowest captured bacterial concentration of 45 CFU/mL were obtained. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe that PhagePu29-MBs could specifically capture *Salmonella*. In spiked samples, the highest capture rate of *Salmonella* separated and enriched by the probe reached 92.92%. The separation and enrichment process took approximately 30 min. Therefore, this study established a fast and highly specific magnetic separation method for *Salmonella* based on phage Pu29, which may lay the foundation for the development of a phage-based method for the rapid separation and enrichment of foodborne pathogens in food samples.

**Keywords:** *Salmonella*; phage; biological characteristics; magnetic separation technology; rapid separation and enrichment  
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230504-017

中图分类号: Q939.48

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 02-0163-09

收稿日期: 2023-05-04

基金项目: 湖北省重点研发计划项目 (2022BBA0057-02);

“十三五”国家重点研发计划重点专项 (2017YFC1600100; 2019YFC1606001); 国家自然科学基金面上项目 (31772054)

第一作者简介: 丁一峰 (1996—) (ORCID: 0000-0001-9926-1398), 男, 博士研究生, 研究方向为食品安全。

E-mail: yifengding@webmail.hzau.edu.cn

\*通信作者简介: 王小红 (1970—) (ORCID: 0000-0002-2638-1820), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品安全。

E-mail: wxh@mail.hzau.edu.cn

引文格式:

丁一峰, 张宇, 刘茜, 等. 噬菌体Pu29特性分析及其在沙门氏菌磁分离富集中的应用[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 163-171. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230504-017. <http://www.spkx.net.cn>

DING Yifeng, ZHANG Yu, LIU Xi, et al. Characteristic analysis of *Salmonella* phage Pu29 and its application in magnetic separation and enrichment of *Salmonella*[J]. Food Science, 2024, 45(2): 163-171. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230504-017. <http://www.spkx.net.cn>

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是一种定植于人类和动物肠道的病原体, 是导致人类食物中毒、伤寒、急性胃肠炎和败血症的主要病原体之一<sup>[1]</sup>, 对其进行快速检测可有效控制沙门氏菌的感染和爆发。在日常生活中引起沙门氏菌感染的食物主要包括受污染的肉品、水果、牛奶和鸡蛋等<sup>[2]</sup>。由于沙门氏菌在食品样品中的丰度通常比较低且分布不均匀, 因而需要通过样品中的沙门氏菌进行预富集, 例如预增菌培养等, 提高检测的灵敏度和检出限<sup>[3-4]</sup>。但预增菌耗时长, 无法满足快速检测的要求<sup>[5]</sup>, 因此, 亟待研究开发新型快速样品前处理方法, 提高检测效率。

磁性纳米颗粒因其具有独特的磁性引起了许多领域的关注与研究, 如生物医学、药物输送和诊断学<sup>[6]</sup>。免疫磁性分离是一种有效的分离技术, 它将标记有目标分析物特异性抗体的磁珠与样品进行孵育; 在样品管附近的磁铁吸引与分析物结合的磁珠, 随后移除剩余的液体<sup>[7]</sup>。抗体标记的磁性纳米颗粒已被证明能有效地从牛肉、牛奶和水样品中分离出大肠杆菌O157:H7<sup>[8]</sup>, 以及从鸡、鱼、牛奶和奶酪样品中分离出单核细胞性李斯特菌<sup>[9]</sup>。然而, 这一方法在捕获效率和成本方面还有待改进<sup>[5]</sup>。其中, 作为识别元件的高亲和力抗体有着昂贵、难以获得、不能区分活细胞和死细胞等缺陷, 从而限制了免疫标记磁珠使用范围<sup>[10-11]</sup>。因此, 有待进一步发掘新型的识别元件, 用于食源性病原菌的特异性识别。

噬菌体是能特异性感染宿主细菌的病毒, 结构简单, 由蛋白质外壳和遗传物质核酸组成<sup>[12]</sup>。它们广泛分布于土壤、地面、水质和食物中, 能够高特异性识别宿主菌, 与抗体相比, 噬菌体对恶劣环境的耐受性强, 还可以区分死细菌和活细菌<sup>[13]</sup>。由于噬菌体高度特异性的识别能力以及只能结合活细菌宿主, 可将其用作快速细菌筛选中的检测探针。He Yong等<sup>[14]</sup>将噬菌体PAP1与功能化磁珠偶联制备生物探针, 结合生物发光法在2 h内实现铜绿假单胞菌的快速检测, 检测限达到 $2.0 \times 10^2$  CFU/mL。Yan Chenghui等<sup>[15]</sup>利用金黄色葡萄球菌噬菌体与磁珠偶联形成的生物探针, 结合辣根过氧化物酶标记的抗体识别金黄色葡萄球菌, 在90 min内实现对食品样品中金黄色葡萄球菌的快速检测, 检测限为 $2.47 \times 10^3$  CFU/mL。但是噬菌体在食源性病原菌检测方面的研究仍显不足, 有待进一步扩展噬菌体的应用范围。

本研究以筛选得到的1株鸡白痢沙门氏菌噬菌体Pu29 (NCBI GenBank登录号为OQ267695) 为研究对象, 全面分析其生物学及基因组特性, 并将其作为特异性识别沙门氏菌的识别元件, 利用酰胺反应与羧基化的磁珠偶联形成噬菌体-磁珠探针PhagePu29-MBs, 同时优化实验条件, 建立一种快速、准确的噬菌体磁分离技术, 用于样品中沙门氏菌的快速分离富集, 旨在为快速分离富集食品样品中的致病微生物提供新方法思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

鸡白痢沙门氏菌C519以及其他测定噬菌体宿主谱的细菌菌株均为实验室保存菌种。本实验所用污水样品于2018年采集自湖北武汉市家庭小区周边的某下水道。

LB培养基、LB琼脂 (LA) 培养基、琼脂 青岛高科园海博生物技术有限公司; 0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜 美国Millipore公司; 双层琼脂培养基平板: 下层培养基为LA培养基、上层培养基为含0.7%琼脂粉的LB半固体培养基。

### 1.2 仪器与设备

Allegra X-30R台式高速冷冻离心机 美国贝克曼公司; 5417R小型台式冷冻离心机 德国艾本德公司; M200 PRO酶标仪 瑞士Tecan公司; 7000FA100 kV透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 日本日立高新技术公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 噬菌体分离与纯化

参照聂若男等<sup>[16]</sup>的方法, 采用双层平板法对单一噬菌斑反复纯化4~6次直至噬菌斑大小基本一致, 即得到纯化的鸡白痢沙门氏菌噬菌体。

#### 1.3.2 噬菌体特性分析<sup>[17-18]</sup>

##### 1.3.2.1 噬菌体宿主谱

采用点样法测定鸡白痢沙门氏菌噬菌体Pu29的宿主范围。取100  $\mu\text{L}$ 培养至对数期的测试菌株加入到温热半固体培养基中, 混匀后倒入预先准备的LA平板上, 待其凝固后, 取5  $\mu\text{L}$ 效价 $10^9$  PFU/mL噬菌体Pu29滴加至上层平板表面, 自然晾干后置于37  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养5~8 h, 观察其裂解菌株情况。

### 1.3.2.2 噬菌体形态观察

使用磷钨酸负染法, 取20  $\mu\text{L}$ 噬菌体液和2%磷钨酸 (pH 7) 分别滴于封口膜上, 轻取铜网置于噬菌体液中, 浸泡10 min之后用滤纸吸去多余液体, 再将铜网置于磷钨酸染料中染色10 min后, 用滤纸从铜网边缘缓慢吸去多余液体, 自然晾干至完全干燥, 制备好的铜网在TEM下观察噬菌体形态, 并用软件Digital Micrograph Demo 3.9.1测量其大小。

### 1.3.2.3 生物学特性

采用双层平板法测定噬菌体Pu29的最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI)、吸附速率、一步生长曲线。各实验重复3次, 每次设2个平行。吸附速率及裂解量分别按式(1)、(2)计算:

$$\text{吸附速率}/\% = \frac{\text{初始噬菌体效价} - \text{噬菌体效价}}{\text{初始噬菌体效价}} \quad (1)$$

$$\text{裂解量}/(\text{PFU}/\text{CFU}) = \frac{\text{暴发末期噬菌体效价}}{\text{感染初期宿主菌浓度}} \quad (2)$$

### 1.3.2.4 噬菌体稳定性评估

将 $10^9$  PFU/mL噬菌体置于恒温水浴锅中, 分别于30~90  $^{\circ}\text{C}$ 保温0、30 min和60 min, 采用双层平板法测定噬菌体的效价。每个温度设3个重复, 每次设2个平行。

取 $10^9$  PFU/mL噬菌体悬液分别加入到不同pH值(2~13)的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中, 放于37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中2 h。采用双层平板法测定噬菌体效价。实验重复3次, 每次设2个平行。

### 1.3.2.5 噬菌体基因组测序及分析

取1 mL高效价的噬菌体样品( $10^{10}$  PFU/mL), 参考Czajkowski等<sup>[19]</sup>的氯化锌沉淀法提取DNA, 利用超微量分光光度计定量浓度。采用Illumina MiSeq测序平台进行噬菌体全基因组测序。应用软件SPAdes v3.9.0对原始测序数据进行从头拼装, 构建scaffold和conting。使用GeneMarkS (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>)和RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>)网站对全基因组序列进行基因预测。使用在线BLASTp工具进行蛋白编码基因的功能注释。将基因组上传至NCBI获得序列号。基因组图用软件BRIG (0.95)生成。分别在毒力因子数据库(The Virulence Factor Database, VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)和耐药基因数据库(Antibiotic Resistance Genes Database, ARDB) (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>)中查找可能的毒力基因和耐药基因。依据国际病毒分类委员会(The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)的病毒分类和NCBI数据库的BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 选择末端酶大亚基相似度较高的噬菌体。利用MEGA 7.0软件分别建立基于末端酶大亚基的进化树, 分析噬菌体Pu29的亲缘关系。

### 1.3.3 噬菌体-磁珠PhagePu29-MBs的制备及富集沙门氏菌分离

#### 1.3.3.1 PhagePu29-MBs的制备

取10 mg/mL经超声分散充分混匀的羧基化磁珠(MBs), 利用磁性分离架进行磁分离, 待固液分离后去除上清液, 保留MBs。加入吗啉乙磺酸溶液(50 mmol/L, pH 5.0)清洗磁珠。随后, 迅速加入*N*-羧基琥珀酰亚胺溶液(终质量浓度为10 mg/mL)和碳化二亚胺溶液(终质量浓度为10 mg/mL), 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$ 活化30 min。活化结束后用PBS清洗磁珠3次。加入噬菌体Pu29( $10^9$  PFU/mL)到磁珠中, 在37  $^{\circ}\text{C}$ 振荡混匀30 min。使用PBS清洗3次以去除未偶联的噬菌体。用含0.5 g/100 mL BSA的PBS封闭剩余结合位点, 于37  $^{\circ}\text{C}$ 振荡混匀30 min, 得到PhagePu29-MBs。该探针保存于含0.25 g/100 mL BSA的PBS (pH 7.4)中, 4  $^{\circ}\text{C}$ 存放待用。

#### 1.3.3.2 PhagePu29-MBs分离富集沙门氏菌的条件优化

将100  $\mu\text{L}$ 的 $10^6$  CFU/mL沙门氏菌与制备的PhagePu29-MBs在37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min。使用磁性分离器分离细菌磁性复合物, 用PBS洗涤3次。然后, 通过平板计数法确定上清液中细菌细胞的数量( $N_a/(\text{CFU}/\text{mL})$ )。为了确定未用噬菌体PhagePu29-MBs( $N_0/(\text{CFU}/\text{mL})$ )处理的沙门氏菌细胞总数, 将细菌样品直接涂布在LA板上。使用式(3)计算PhagePu29-MBs的捕获效率:

$$\text{捕获效率}/\% = \left(1 - \frac{N_a}{N_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

为了进一步提高PhagePu29-MBs捕获沙门氏菌的效率, 对噬菌体磁分离的应用参数进行改进。

参照1.3.3.1节的方法, 选取粒径为200 nm的磁珠作为对象, 将其与噬菌体偶联, 分别在4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 37  $^{\circ}\text{C}$ 偶联0.5、2、4、6 h。采用点样法测定PhagePu29-MBs上偶联的噬菌体效价。选取噬菌体效价高的制备条件作为最优条件制备PhagePu29-MBs。

依据上述探针分离富集沙门氏菌的步骤, 分别优化下述条件: 1) 分别将不同量的PhagePu29-MBs(10~200  $\mu\text{g}$ )与沙门氏菌混合; 2) PhagePu29-MBs与沙门氏菌混合液在37  $^{\circ}\text{C}$ 振荡分别孵育5~30 min; 3) PhagePu29-MBs与沙门氏菌混合液分别在4、25、37  $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育20 min。测定PhagePu29-MBs对沙门氏菌的捕获效率, 以最高捕获效率对应的参数作为最佳探针使用量、最佳捕获时间和最佳孵育温度。

### 1.3.4 PhagePu29-MBs捕获沙门氏菌的能力评估

#### 1.3.4.1 PhagePu29-MBs的灵敏度

参考1.3.3节步骤, PhagePu29-MBs与不同浓度的鸡白痢沙门氏菌C519( $10^0$ ~ $10^8$  CFU/mL)混合, 测定PhagePu29-MBs对不同浓度沙门氏菌的捕获效率。

#### 1.3.4.2 PhagePu29-MBs的特异性

依据1.3.3节步骤, PhagePu29-MBs分别与 $10^6$  CFU/mL不同种属细菌(鸡白痢沙门氏菌C519、鼠伤寒沙门氏菌

ATCC 14028、肠炎沙门氏菌ATCC 13076、猪霍乱沙门氏菌ATCC 10708、大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌BL21、单核细胞性李斯特菌ATCC 19114、单核细胞性李斯特菌ATCC 19115、副溶血性弧菌ATCC 33846、副溶血性弧菌ATCC 17802)混合,测定PhagePu29-MBs对不同种属细菌的捕获效率。

#### 1.3.4.3 PhagePu29-MBs捕获沙门氏菌的透射电镜观察

按照1.3.3.2节步骤,获得PhagePu29-MBs捕获沙门氏菌的复合物,加入2.5%戊二醛固定液。采用负染法,铜网碳面扣在样品上,吸附样品5 min。用滤纸垂直吸掉多余液体直至看不到残留液体。将铜网碳面扣在磷酸钨液滴上染色20~30 s,用滤纸吸干,放在滤纸上,在阴凉处自然干燥,随即进行TEM观察。同时采用TEM观察200 nm的羧基磁珠。

#### 1.3.5 PhagePu29-MBs在加标样品中富集沙门氏菌的应用

LB培养基采用高压蒸汽灭菌法灭菌(121  $^{\circ}$ C, 20 min),5%和15%的全脂牛奶(市售)或脱脂牛奶,通过巴氏杀菌法灭菌。分别将 $10^3$  CFU/mL和 $10^6$  CFU/mL沙门氏菌C519加入到上述样品中,按照1.3.4节的步骤,测定PhagePu29-MBs对样品中沙门氏菌的捕获效率。

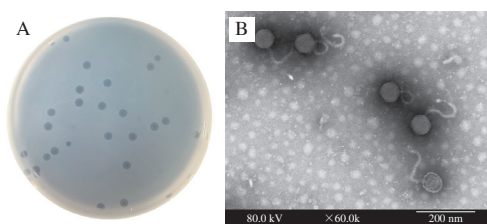
#### 1.4 数据统计及图表绘制

使用平均值和标准差表示数据,并使用Student's *t*-test确定差异显著性( $P < 0.05$ ,差异显著),运用GraphPad软件进行绘图与分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体Pu29分离纯化及形态观察

如图1A所示,经过5次纯化后,噬菌体Pu29的噬菌斑形态大小一致,直径约为3.5~4.2 mm,效价可以达到 $3.4 \times 10^9$  PFU/mL。经过超速离心沉淀噬菌体颗粒后,通过TEM观察噬菌体形态,如图1B所示,噬菌体Pu29有一个二十面体的头部,尾部较长且弯曲,不可收缩。用软件Digital Micrograph Demo 3.9.1测量其大小可知,Pu29头部直径为( $68.63 \pm 1.68$ ) nm,尾部长度为( $179.91 \pm 3.50$ ) nm,尾部直径为( $9.23 \pm 0.21$ ) nm。根据噬菌体的形态学分类标准,Pu29属于长尾噬菌体。



A.噬菌体Pu29形成的噬菌斑; B.噬菌体Pu29的TEM观察图。

图1 噬菌体Pu29分离纯化及形态观察

Fig. 1 Plaques and morphological observation of phage Pu29

### 2.2 噬菌体Pu29宿主谱

如表1所示,噬菌体Pu29可以裂解30株沙门氏菌( $30/36 = 83.33\%$ ),且出现较清晰透明的噬菌斑,特别是对两株鸡白痢沙门氏菌的裂解效果最佳。噬菌体Pu29还可以裂解5株大肠杆菌( $5/10 = 50.00\%$ ),对单核细胞性李斯特菌、金黄色葡萄球菌和副溶血性弧菌无裂解效果。结果表明噬菌体Pu29是1株宽谱的烈性噬菌体。

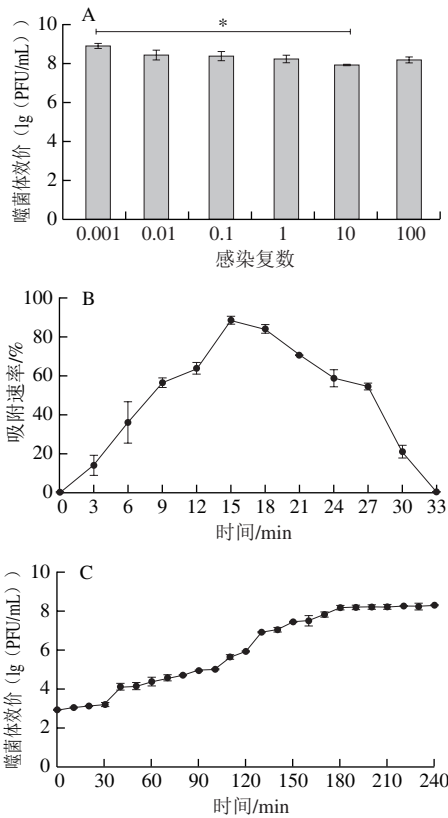
表1 噬菌体Pu29宿主谱  
Table 1 Host spectrum of phage Pu29

排序	G <sup>+</sup> /G <sup>-</sup>	菌株编号	菌株种属类型	裂解程度
1	G <sup>-</sup>	ATCC 13076	肠炎沙门氏菌	+2
2		10978	肠炎沙门氏菌	+2
3		10984	肠炎沙门氏菌	+2
4		ATCC 14028	鼠伤寒沙门氏菌	+2
5		ST-8	鼠伤寒沙门氏菌	+2
6		ATCC 13311	鼠伤寒沙门氏菌	+2
7		CMCC 50094	乙型副伤寒沙门氏菌	+2
8		ATCC 9270	鸭沙门氏菌	+2
9		ATCC 10708	猪霍乱沙门氏菌	+2
10		CVCC 534	鸡白痢沙门氏菌	+4
11		CVCC 519	鸡白痢沙门氏菌	+4
12		3710	都柏林沙门氏菌	+3
13		3723	都柏林沙门氏菌	+3
14		17	阿贡纳沙门氏菌	+2
15		19	阿贡纳沙门氏菌	0
16		21	阿贡纳沙门氏菌	+1
17		30	鼠伤寒沙门氏菌	0
18		36	鼠伤寒沙门氏菌	0
19		114	鼠伤寒沙门氏菌	+3
20		172	鼠伤寒沙门氏菌	0
21		206	鼠伤寒沙门氏菌	+3
22		38	肠炎沙门氏菌	+3
23		39	肠炎沙门氏菌	+2
24		42	肠炎沙门氏菌	+3
25		201	肠炎沙门氏菌	0
26		211	肠炎沙门氏菌	+1
27		13500	印第安纳沙门氏菌	+3
28		13520	印第安纳沙门氏菌	0
29		10960	肠炎沙门氏菌	+3
30		11561	肠炎沙门氏菌	+3
31		10855	鼠伤寒沙门氏菌	+3
32		13306	鼠伤寒沙门氏菌	+3
33		13277	鼠伤寒沙门氏菌	+2
34		13336	鼠伤寒沙门氏菌	+3
35		13337	鼠伤寒沙门氏菌	+3
36		13350	鼠伤寒沙门氏菌	+3
37	DH5 $\alpha$	大肠杆菌	0	
38	BL21	大肠杆菌	0	
39	83715	大肠杆菌	+2	
40	T10	大肠杆菌	+4	
41	F18ac	大肠杆菌	+3	
42	NCTC 12900	大肠杆菌	+3	
43	CICC 10664	大肠杆菌	0	
44	CICC 10662	大肠杆菌	0	
45	CICC 10669	大肠杆菌	+1	
46	CICC 10667	大肠杆菌	0	
47	ATCC 33864	副溶血性弧菌	0	
48	ATCC 17802	副溶血性弧菌	0	
49	G <sup>+</sup>	ATCC 19114	单核细胞性李斯特菌	0
50		ATCC 29213	金黄色葡萄球菌	0
51		ATCC 6538	金黄色葡萄球菌	0

注: +4、+3、+2、+1、0表示噬菌体对细菌不同程度的侵染能力,+4表示噬菌斑非常透明且清晰,+3表示噬菌斑较澄清且较透明,+2表示噬菌斑有朦胧的背景,+1表示噬菌斑不易观察且非常模糊,0表示毫无噬菌斑现象。

2.3 噬菌体生物学特性

如图2A所示,当噬菌体Pu29的MOI为0.001时,噬菌体效价最高,达到 $9.33 \times 10^8$  PFU/mL,而当MOI为10时,噬菌体吸附、侵染效果最差,效价为 $9.00 \times 10^7$  PFU/mL。结果表明当噬菌体效价与宿主菌量以MOI为0.001侵染时,噬菌体宿主菌内能够增殖更多的子代噬菌体并裂解释放。后续实验均采用最佳MOI培养噬菌体。图2B为噬菌体Pu29对宿主菌C519的吸附速率,噬菌体Pu29的吸附速率在0~15 min呈上升趋势,15 min时达到峰值,最佳吸附速率可达88.67%,表明噬菌体Pu29在15 min能够最大量地吸附在宿主细菌上。在15 min后,吸附速率逐步下降,直到33 min后完成吸附过程。如图2C所示,噬菌体Pu29的潜伏期为30 min,裂解期为180 min,裂解量大约为115.74 PFU/cell。



A.噬菌体最佳MOI; B.噬菌体Pu29的吸附速率; C.噬菌体Pu29的一步生长曲线。\*差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

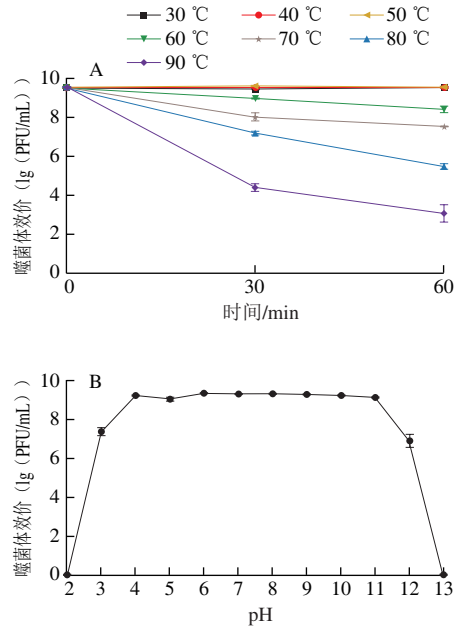
图2 噬菌体Pu29生物学特性分析

Fig. 2 Biological characteristic analysis of phage Pu29

2.4 噬菌体稳定性

噬菌体Pu29的原始效价为 $3.65 \times 10^9$  PFU/mL,其热稳定性结果如图3A所示,噬菌体Pu29温度耐受力较强,在30~50 °C温度范围内,Pu29与原始效价几乎一致,在60 °C的环境下孵育1 h之后,其效价下降到 $3.25 \times 10^8$  PFU/mL。在70~90 °C之间,随着温度的升高,噬菌体的效价急剧降低。

如图3B所示,当pH值为4~11时,对噬菌体Pu29的活性几乎无影响,并且在此范围内其效价波动较小。而处于pH 3或12的环境下对Pu29进行2 h孵育后,其效价明显降低。当Pu29经过pH值为2或13的条件处理后,其活性完全丧失。



A.噬菌体Pu29的热稳定性; B.噬菌体Pu29的pH值稳定性。

图3 噬菌体Pu29稳定性

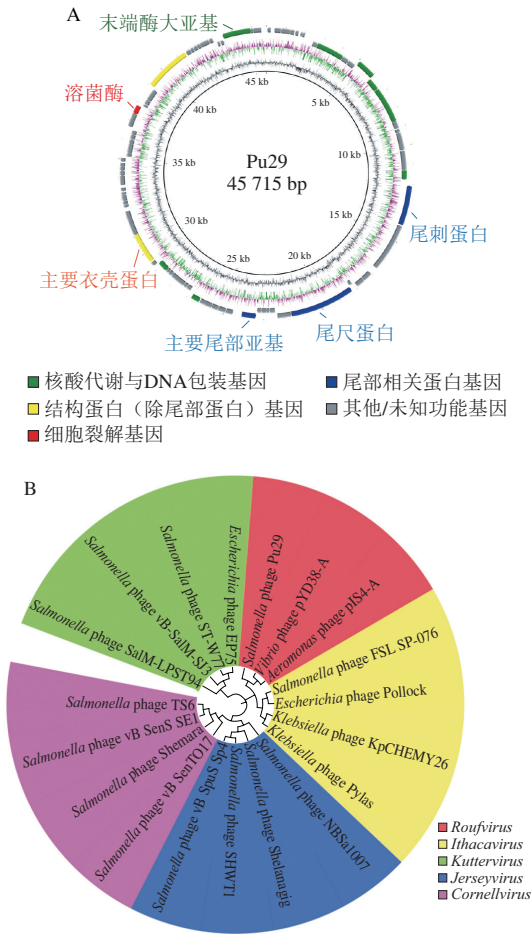
Fig. 3 Stability of phage Pu29

2.5 噬菌体基因组分析

噬菌体Pu29的基因组长度为45 715 bp,碱基分布情况为A 12 145个(26.57%)、T 12 506个(27.36%)、C 10 614个(23.22%)、G 10 450个(22.86%),GC平均含量为21 064个(46.08%)。将噬菌体Pu29全基因组核酸序列提交GenBank,获取的登录号为OQ267695。如图4A所示,使用3种预测蛋白功能工具(RAST、GeneMarkS和ORF Finder),预测出81个编码功能蛋白的基因,其中18个蛋白通过NCBI的在线工具被注释为已知功能,其余为假定功能蛋白。按照功能的不同类型,将其分为4大类:DNA包装与核酸代谢(8个)、除噬菌体尾部外的结构蛋白(4个)、有关裂解的蛋白(1个)、尾部相关的蛋白(3个)。在功能注释的过程中没有发现有关溶原性的基因,如整合酶等。通过VFDB和ARDB在线数据库对噬菌体Pu29的全基因组序列进行预测,并没有预测出可能的毒力因子以及抗生素抗性基因。

使用BLASTn在NCBI数据库进行比对,筛选出18株与噬菌体Pu29基因序列相似度高的噬菌体。以这18株噬菌体和噬菌体Pu29的末端酶大亚基蛋白序列,构建系统发育树,如图4B所示,Pu29的这两个基因都与Vibrio phage pYD38-A和Aeromonas phage pIS4-A形成一

簇。因此,根据上述结果以及ICTV公布的病毒分类,表明Pu29属于轮状病毒属 (*Rouffvirus*) 的一个新物种。



A.噬菌体Pu29基因组图谱:每一圈代表的含义(由内向外):以kb为单位的基因刻度、GC含量、GC偏移(偏移值大于零为绿色,小于零为紫红色)、基因组基因注释;B.噬菌体Pu29的进化关系(以末端酶大亚基序列构建进化树)。

图4 噬菌体Pu29功能基因组学分析

Fig. 4 Functional genomic analysis of phage Pu29

2.6 PhagePu29-MBs条件优化

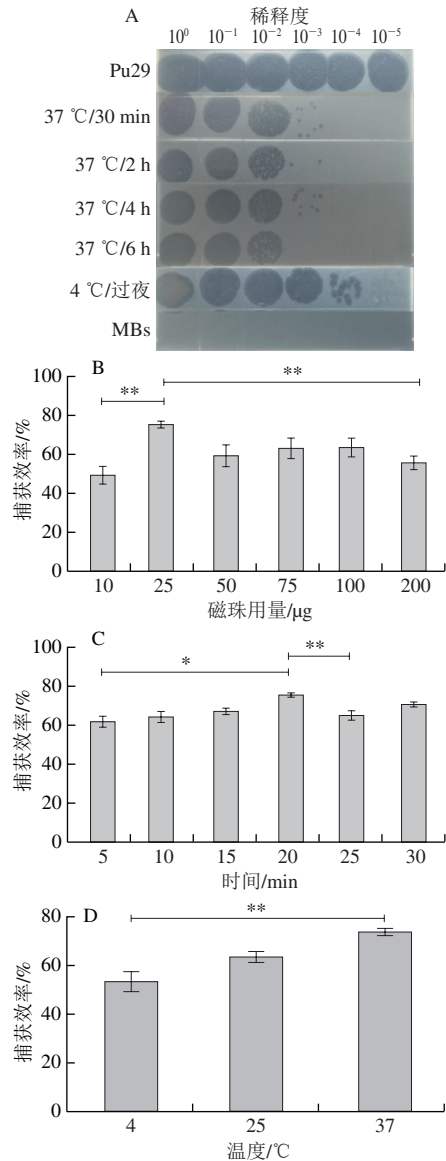
如图5A所示,噬菌体Pu29原液的效价为 $3.4 \times 10^9$  PFU/mL,噬菌体Pu29-200 nm磁珠偶联物在4 °C过夜,PhagePu29-MBs的效价为 $1.5 \times 10^7$  PFU/mL。空白组(MBs)没有出现任何透亮的噬菌斑现象。因此噬菌体Pu29与200 nm粒径的羧基磁珠在4 °C过夜偶联的效果最佳。

如图5B所示,10 μg PhagePu29-MBs对宿主菌液的捕获效率最低,当增加用量至25 μg时,捕获效率最高,达到76.12%。但继续增加探针的用量时,其捕获效率有所降低,并且保持较稳定的富集效果。因此25 μg探针对宿主细胞的富集作用能够达到最佳效率,后续研究将选取25 μg PhagePu29-MBs富集细菌。

如图5C所示,当孵育5 min时,PhagePu29-MBs对宿主菌液的捕获效率为62.61%,孵育时间从5 min逐渐延长

至20 min时,PhagePu29-MBs富集宿主菌液的效率在不断上升,孵育20 min时,捕获效率最高,达到76.09%。但继续延长孵育时间至30 min时,PhagePu29-MBs的捕获效率又有所下降。因此选用20 min的孵育时间对细菌进行富集。

如图5D所示,在4 °C环境下孵育20 min后的PhagePu29-MBs捕获效率较差,仅为53.96%,当环境温度上升时,探针对宿主菌的捕获量也随之增加,在37 °C恒温条件下其能够达到最佳富集效率,捕获效率达到74.15%。经过以上条件的优化,选择使用25 μg PhagePu29-MBs在37 °C与宿主菌C519孵育振荡20 min进行富集实验。



A. PhagePu29-MBs制备条件优化; B. PhagePu29-MBs用于分离富集沙门氏菌的使用量优化; C. PhagePu29-MBs用于分离富集沙门氏菌的时间优化; D. PhagePu29-MBs用于分离富集沙门氏菌的温度优化.\*\*.差异极显著(P<0.01),下同。

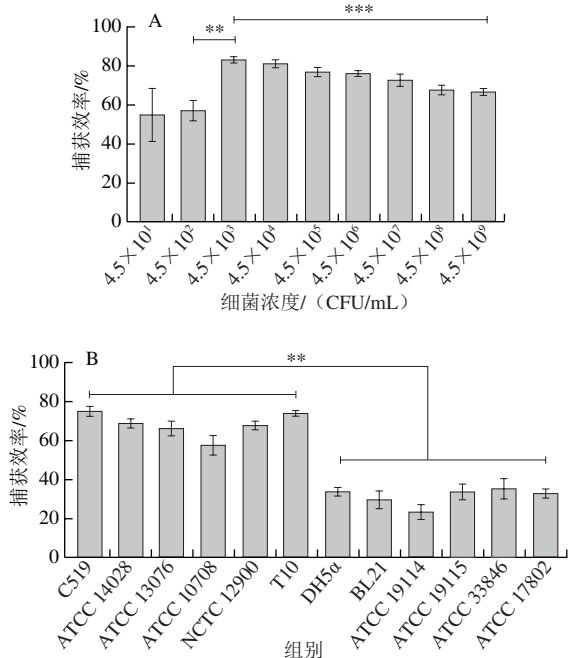
图5 基于噬菌体Pu29磁分离富集沙门氏菌条件优化

Fig. 5 Optimization of magnetic separation and enrichment of *Salmonella* based on phage Pu29

2.7 PhagePu29-MBs分离富集沙门氏菌的能力

2.7.1 PhagePu29-MBs分离富集不同浓度的沙门氏菌

如图6A所示, 当菌液浓度为 $4.5 \times 10^9$  CFU/mL时, 捕获效率为67.41%, 依次加入梯度稀释至 $4.5 \times 10^3$  CFU/mL菌液的过程中, 随着菌液浓度梯度的降低, PhagePu29-MBs捕获效率不断增长, 当加入 $4.5 \times 10^3$  CFU/mL菌液时, 其捕获效率最高, 可达83.93%。在PhagePu29-MBs中加入 $4.5 \times 10^2$  CFU/mL的宿主菌液时, 捕获效率为57.78%。在加入最低菌量45 CFU/mL的条件下, PhagePu29-MBs仍能捕获25 CFU/mL的宿主细菌, 因此噬菌体Pu29与200 nm羧基磁珠偶联物对不同浓度宿主菌C519有良好的前处理分离富集效果。



A. PhagePu29-MBs分离富集不同菌液浓度沙门氏菌的能力评估;  
B. PhagePu29-MBs的特异性。\*\*\*, 差异高度显著 ( $P < 0.001$ )。

图6 PhagePu29-MBs分离富集沙门氏菌的能力

Fig. 6 Ability of PhagePu29-MBs to isolate and enrich *Salmonella*

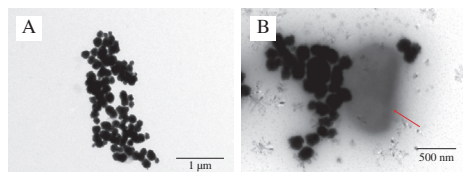
2.7.2 PhagePu29-MBs的特异性

探究噬菌体Pu29与磁珠偶联之后对不同种属细菌富集的特异性, 结果如图6B所示, PhagePu29-MBs对宿主细菌鸡白痢沙门氏菌C519、鼠伤寒沙门氏菌14028、肠炎沙门氏菌13076、猪霍乱沙门氏菌10708、大肠杆菌NCTC 12900和大肠杆菌T10的捕获效率较好, 其中对鸡白痢沙门氏菌C519的捕获效率最高, 可达75.76%, 对猪霍乱沙门氏菌10708的捕获效率较差, 为58.20%。另外, 相对于沙门氏菌属不同血清型的菌株, 对大肠杆菌、单核细胞性李斯特菌及副溶血性弧菌的富集效果较差, 其中对单核细胞性李斯特菌19114的捕获效率最低, 为24.04%。证明噬菌体Pu29与磁珠的结合物能对

不同血清型的沙门氏菌以及大肠杆菌进行富集且捕获效率较理想。而对其他菌株的捕获效率均小于36%, 说明PhagePu29-MBs具有良好的特异性。

2.7.3 PhagePu29-MBs捕获沙门氏菌的TEM

通过TEM对200 nm (10 mg/mL) 羧基磁珠进行观察, 结果如图7A所示, 在2  $\mu$ m视野下观察到大量微球颗粒聚集。PhagePu29-MBs分离富集宿主菌C519, 对复合物进行TEM观察, 结果如图7B所示, 视野中观察到PhagePu29-MBs捕获沙门氏菌 (红色箭头)。因此, PhagePu29-MBs能够对沙门氏菌进行分离富集。



A. 粒径为200 nm的羧基化磁珠; B. PhagePu29-MBs捕获沙门氏菌。

图7 TEM观察PhagePu29-MBs捕获沙门氏菌

Fig. 7 TEM observation of PhagePu29-MBs-captured *Salmonella*

2.8 PhagePu29-MBs对样品中沙门氏菌的分离富集

如图8所示, PhagePu29-MBs对脱脂牛奶的整体富集效果最佳, 当在5%脱脂牛奶中加入 $3.77 \times 10^3$  CFU/mL菌液时, 捕获效率达到最大值, 为92.92%。在LB中富集宿主菌的效率较低, 当对 $3.77 \times 10^3$  CFU/mL的菌液进行富集后, 捕获效率为75.90%, 对 $3.77 \times 10^6$  CFU/mL菌液的捕获效率相比之下有所下降, 为63.98%。然而在全脂奶粉配制成的5%及15%牛奶中, PhagePu29-MBs对宿主菌C519的富集效率明显降低, 在15%全脂牛奶中加入 $3.77 \times 10^6$  CFU/mL的菌液后, 经过37  $^{\circ}$ C振荡20 min的富集, PhagePu29-MBs的捕获效率最低, 仅达到51.69%。

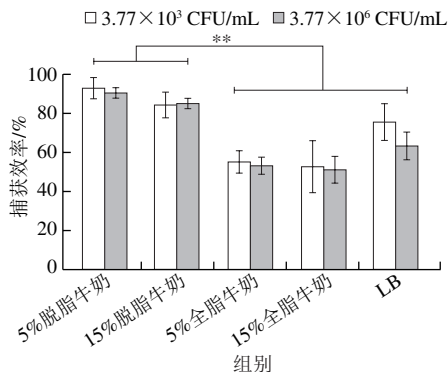


图8 PhagePu29-MBs在不同基质样品中对鸡白痢沙门氏菌的分离富集

Fig. 8 Isolation and enrichment of PhagePu29-MBs for *Salmonella* in different sample matrices

3 讨论

沙门氏菌病是由沙门氏菌引起的第二大食源性疾

病,对公众健康构成巨大威胁,并给许多国家造成经济负担,尤其是食品行业<sup>[20-21]</sup>。沙门氏菌可以在各种食物中检测到,如鸡蛋、蛋制品、肉类、奶酪、新鲜水果和蔬菜<sup>[2,22]</sup>。因此,在整个食品供应链中快速准确地监测和检测沙门氏菌对于早期预防食源性疾病爆发至关重要<sup>[23]</sup>。在食品样品中沙门氏菌通常规定为不得检出<sup>[24]</sup>,但是沙门氏菌在实际样品中的丰度通常比较低且分布不均匀,这对于检测技术提出了更高的要求<sup>[4,21]</sup>。噬菌体作为一种新型的识别元件,在食源性病原菌的预富集以及检测方面有着广阔的应用前景<sup>[25-27]</sup>。例如Zhang Yun等<sup>[28]</sup>将噬菌体O157-IOV-4与功能化磁珠偶联制备生物探针,结合比色法在2 h内实现大肠杆菌O157:H7的快速检测,检测限达到 $4.9 \times 10^4$  CFU/mL。

噬菌体作为是一类专门吸附细菌的生物,具有特异性识别宿主细菌的特点<sup>[29]</sup>。利用这一特点已经开发了一些方法用于细菌的特异性检测,这些方法主要是基于噬菌体尾部中的受体结合蛋白(尾纤蛋白或尾刺蛋白),或者由相关裂解酶的识别区等介导<sup>[30]</sup>。噬菌体的宿主范围可以很宽也可以很窄,因此有可能识别出整个属或物种<sup>[13,31]</sup>。此外,在温度、pH值和离子强度等因素方面,噬菌体比抗体表现出更大的稳定性。噬菌体的低成本、大容量制备和高靶向特异性特点使其有望在病原体控制和检测中应用开发<sup>[32]</sup>。本研究采用的沙门氏菌噬菌体Pu29能够在15 min就能实现对沙门氏菌的最大吸附,为88.67%。将其与羧基化的纳米磁珠偶联,得到PhagePu29-MBs,其捕获效率最高为83.93%,最低捕获量为45 CFU/mL,该方法分离富集沙门氏菌的时间大约为30 min,展现出其特异性捕获沙门氏菌的特点。噬菌体Pu29的潜伏期为30 min,而PhagePu29-MBs在20 min内即可完成对样品中沙门氏菌的分离富集,能够较大程度分离富集沙门氏菌。但长时间的孵育,噬菌体的裂解活性会导致细菌裂解。在后续的研究中,可利用噬菌体受体结合蛋白作为检测食源性病原菌的识别元件,避免操作过程中时间过长噬菌体导致细菌发生裂解作用。

在加入一定菌量宿主菌的5%和15%脱脂牛奶中,PhagePu29-MBs能够高效地富集到大量宿主菌C519,捕获效率达到92.92%左右。而因为全脂牛奶有更多的脂肪和脂溶性维生素等物质,比脱脂牛奶的成分更加复杂,故在5%和15%的全脂牛奶中,PhagePu29-MBs对宿主菌的捕获效率大大降低,为53.86%左右。黄震等<sup>[33]</sup>将抗体与磁珠偶联制备免疫磁分离探针,构建的免疫磁性分离方法能够在35 min内完成牛奶中大肠杆菌O157:H7的高效富集,捕获效率在50%~93%之间。Zhou Yan等<sup>[34]</sup>将噬菌体P100与磁性微粒偶联制备生物探针,该探针在20 min内即可实现单核细胞性李斯特菌的分离富集,捕获效率

为40%左右。因此,本研究基于噬菌体Pu29建立的快速分离富集沙门氏菌方法具有潜在的应用价值。

#### 4 结论

本研究分离纯化得到1株轮状病毒属(*Roufvirus*)的沙门氏菌噬菌体Pu29,其具有二十面体的头部和不可收缩、弯曲的长尾部。该噬菌体的生物学特性和基因组分析表明,其具有吸附时间短、温度和pH值耐受性良好、能够特异性识别沙门氏菌等特点。Pu29基因组不携带编码毒性或抗性因子的基因。利用酰胺反应将其与羧基化的磁性纳米材料偶联得到探针PhagePu29-MBs。在最优化条件下,该探针用于分离富集沙门氏菌,捕获效率最高可达83.93%,最低捕获细菌浓度为45 CFU/mL,孵育时间为20 min,分离富集所需时间为30 min,可有效用于加标样品中沙门氏菌的分离富集。因此,本研究基于噬菌体Pu29建立了一种快速、特异性强的沙门氏菌磁分离方法,可为开发基于噬菌体快速分离富集食品中的病原菌奠定一定的研究基础。

#### 参考文献:

- [1] ABEBE E, GUGSA G, AHMED M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens[J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2020, 2020: 4674235. DOI:10.1155/2020/4674235.
- [2] PAUDYAL N, ANIHOVI V, HOUNHOUIGAN J, et al. Prevalence of foodborne pathogens in food from selected African countries: a meta-analysis[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, 249: 35-43. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.002.
- [3] HYEON J Y, LI S T, MANN D A, et al. Quasimetagenomics-based and real-time-sequencing-aided detection and subtyping of *Salmonella enterica* from food samples[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(4): e02340-17. DOI:10.1128/AEM.02340-17.
- [4] 康招娣,李红娜,袁飞.快速检测技术在食源性沙门氏菌检测中的应用研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2022, 34(4): 848-855. DOI:10.13590/j.cjfh.2022.04.034.
- [5] SHEN Y F, XU L Z, LI Y B. Biosensors for rapid detection of *Salmonella* in food: a review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(1): 149-197. DOI:10.1111/1541-4337.12662.
- [6] LIU S X, YU B, WANG S, et al. Preparation, surface functionalization and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2020, 281: 102165. DOI:10.1016/j.cis.2020.102165.
- [7] WANG Z L, CAI R, GAO Z P, et al. Immunomagnetic separation: an effective pretreatment technology for isolation and enrichment in food microorganisms detection[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(6): 3802-3824. DOI:10.1111/1541-4337.12656.
- [8] LI Q R, YANG Y X, HU F, et al. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by a fluorescent microsphere-based immunochromatographic assay and immunomagnetic separation[J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 564/565: 32-39. DOI:10.1016/j.ab.2018.10.009.
- [9] GARRIDO-MAESTU A, AZINHEIRO S, CARVALHO J, et al. Evaluation and implementation of commercial antibodies for improved



- nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR for faster detection of *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(11): 4143-4151. DOI:10.1007/s13197-020-04450-1.
- [10] XU L P, BAI X J, BHUNIA A K. Current state of development of biosensors and their application in foodborne pathogen detection[J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(7): 1213-1227. DOI:10.4315/JFP-20-464.
- [11] SINGH J, MEHTA A. Rapid and sensitive detection of mycotoxins by advanced and emerging analytical methods: a review[J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(5): 2183-2204. DOI:10.1002/fsn3.1474.
- [12] OFIR G, SOREK R. Contemporary phage biology: from classic models to new insights[J]. Cell, 2018, 172(6): 1260-1270. DOI:10.1016/j.cell.2017.10.045.
- [13] HUSSAIN W, ULLAH M W, FAROOQ U, et al. Bacteriophage-based advanced bacterial detection: concept, mechanisms, and applications[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 177: 112973. DOI:10.1016/j.bios.2021.112973.
- [14] HE Y, WANG M Y, FAN E, et al. Highly specific bacteriophage-affinity strategy for rapid separation and sensitive detection of viable *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(3): 1916-1921. DOI:10.1021/acs.analchem.6b04389.
- [15] YAN C H, ZHANG Y, YANG H, et al. Combining phagomagnetic separation with immunoassay for specific, fast and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*[J]. Talanta, 2017, 170: 291-297. DOI:10.1016/j.talanta.2017.04.007.
- [16] 聂若男, 李晚宁, 杨其乐, 等. 1 株裂解性短尾沙门氏菌噬菌体T139的生物学特性及其对牛奶和牛肉的抑菌作用[J]. 食品科学, 2019, 40(18): 130-136. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180828-304.
- [17] 李虹娇, 黄梓聪, 吴希阳, 等. 1 株宽宿主谱的阪崎肠杆菌噬菌体生物学特性分析及其在乳制品中的应用[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 164-170. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191209-094.
- [18] 申丹丹, 兰佳鑫, 李诚昊, 等. 食源性致病性大肠杆菌O157:H7和O55:H7特异性噬菌体的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3358-3372. DOI:10.13344/j.microbiol.china.211224.
- [19] CZAJKOWSKI R, OZYMKO Z, LOJKOWSKA E. Application of zinc chloride precipitation method for rapid isolation and concentration of infectious *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. lytic bacteriophages from surface water and plant and soil extracts[J]. Folia Microbiologica, 2016, 61(1): 29-33. DOI:10.1007/s12223-015-0411-1.
- [20] World Health Organization (WHO). Food safety[R]. 2020. <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
- [21] EHUWA O, JAISWAL A K, JAISWAL S. *Salmonella*, food safety and food handling practices[J]. Foods, 2021, 10(5): 907. DOI:10.3390/foods10050907.
- [22] GUERRERO T, BAYAS-REA R, ERAZO E, et al. Nontyphoidal *Salmonella* in food from Latin America: a systematic review[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2022, 19(2): 85-103. DOI:10.1089/fpd.2020.2925.
- [23] JIA X X, LI S, HAN D P, et al. Development and perspectives of rapid detection technology in food and environment[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(17): 4706-4725. DOI:10.1080/10408398.2021.1878101.
- [24] NERI D, ANTOCI S, IANNETTI L, et al. EU and US control measures on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in certain ready-to-eat meat products: an equivalence study[J]. Food Control, 2019, 96: 98-103. DOI:10.1016/j.foodcont.2018.09.001.
- [25] ARYA S K, SINGH A, NAIDOO R, et al. Chemically immobilized T4-bacteriophage for specific *Escherichia coli* detection using surface plasmon resonance[J]. Analyst, 2011, 136(3): 486-492. DOI:10.1039/c0an00697a.
- [26] BAI J, KIM Y, RYU S, et al. Biocontrol and rapid detection of foodborne pathogens using bacteriophages and endolysins[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 474. DOI:10.3389/fmicb.2016.00474.
- [27] WANG J, KANACH A, HAN R, et al. Application of bacteriophage in rapid detection of *Escherichia coli* in foods[J]. Current Opinion in Food Science, 2020, 39: 43-50. DOI:10.1016/j.cofs.2020.12.015.
- [28] ZHANG Y, YAN C H, YANG H, et al. Rapid and selective detection of *E. coli* O157:H7 combining phagomagnetic separation with enzymatic colorimetry[J]. Food Chemistry, 2017, 234: 332-338. DOI:10.1016/j.foodchem.2017.05.013.
- [29] DION M B, OECHSLIN F, MOINEAU S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. Nature Reviews. Microbiology, 2020, 18(3): 125-138. DOI:10.1038/s41579-019-0311-5.
- [30] COSTA S P, NOGUEIRA C L, CUNHA A P, et al. Potential of bacteriophage proteins as recognition molecules for pathogen detection[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2022, 43(5): 787-804. DOI:10.1080/07388551.2022.2071671.
- [31] RICHTER L, JANCZUK-RICHTER M, NIEDZIÓŁKA-JÖNSSON J, et al. Recent advances in bacteriophage-based methods for bacteria detection[J]. Drug Discovery Today, 2018, 23(2): 448-455. DOI:10.1016/j.drudis.2017.11.007.
- [32] SHIELD C G, SWIFT B M C, MCHUGH T D, et al. Application of bacteriophages for *Mycobacterial* infections, from diagnosis to treatment[J]. Microorganisms, 2021, 9(11): 2366. DOI:10.3390/microorganisms9112366.
- [33] 黄震, 罗梅霞, 汪泽祥, 等. 免疫磁分离法高效富集牛奶中大肠杆菌O157:H7[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4492-4497. DOI:10.3969/j.issn.2095-0381.2019.14.009.
- [34] ZHOU Y, RAMASAMY P R. Isolation and separation of *Listeria monocytogenes* using bacteriophage P100-modified magnetic particles[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019, 175: 421-427. DOI:10.1016/j.colsurfb.2018.12.007.