

文章编号 1672-6634(2023)06-0086-08

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2023050005

噬菌体保藏方法研究综述

吴亚迪,常嘉琪,金何雨洁,王子函,张迪,樊祥宇

(济南大学 生物科学与技术学院,山东 济南 250024)

摘 要 全面减抗、限抗后,噬菌体凭借自身对环境影响小、安全性高等优点被广泛应用,但应用需注意如何进行保藏,若保藏不当则会导致噬菌体效价及活性程度降低,使用效果差。目前噬菌体的保藏方法根据制剂大致分为干燥法、悬液法及冻液法等几类,干燥法效果好,但流程繁琐,价格高,难以脱离实验室广泛使用;悬液法及冻液法价格低,但效果差,易污染,难运输。本文总结各类保藏方法的工艺流程及优缺点,并提出更有效的优化设想方向,期望有助于推动噬菌体扩大应用。

关键词 噬菌体保藏;赋形剂;喷雾干燥

中图分类号 R965

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



A Brief Review about Phage Storage Methods

WU Yadi, CHANG Jiaqi, JIN-HE Yujie, WANG Zihan,

ZHANG Di, FAN Xiangyu

(School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan 250024, China)

Abstract After the comprehensive restriction and reduction of the application of antibiotics, phage has been widely used by virtue of its advantages of low impact on the environment and high safety. However, the application needs to pay attention to how to store. If the storage is improper, the titer and activity degree of phage will be reduced, and the use effect will be poor. At present, the storage methods of phages can be roughly divided into drying method, suspension method and freezing method according to the preparation. Drying method has good effect, but the process is complicated and the price is high, so it is difficult to use outside the laboratory on a large scale. Suspension method and freeze method are low in price, but poor in effect, easy to pollute and difficult to transport. In this paper, the technological processes, advantages, and disadvantages of various storage methods are summarized, and more effective optimization ideas are proposed, hoping to promote the expansion of phage application.

Key words Phage preservation; excipient; spray drying

收稿日期: 2023-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31600148); 山东省自然科学基金项目(ZR2021MC018); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程项目(2022TSGC2305)资助

通讯作者: 樊祥宇, 男, 汉族, 博士, 副教授, 研究方向: 噬菌体学、病毒组学, E-mail: fxsynd@126.com。

1 引言

由于抗生素滥用,耐药细菌不断增多,超级细菌感染层出不穷,现有抗生素杀菌效果大大降低。针对超级细菌感染,人类可能面临无药可治的局面。抗生素替代品成为科学家的研究焦点。噬菌体是感染细菌、真菌、藻类、放线菌或螺旋体等微生物的病毒的总称,因部分能引起宿主菌的裂解,故称为噬菌体。由核酸和蛋白质构成,蛋白质起着保护核酸的作用,并决定噬菌体的外形和表面特征;核酸只有一种类型,DNA 或 RNA,双链或单链,环状或线状。噬菌体对紫外线和 X 射线敏感并且能耐受的低温度大约在 -20°C 。相较于抗生素所具有的广谱性,噬菌体由于其蛋白质外壳上的蛋白可以与细菌特异性结合,特异识别特定的某种细菌,可专门杀伤细菌而不损伤其他细胞。且噬菌体与细菌结合位点蛋白不易发生突变且具有特异性,安全性高,可以避免抗生素自身缺陷^[1]。即噬菌体其特异性强、安全性高、杀菌残留少、对环境污染低^[2],正因此,在诸多抗生素的代替物中,噬菌体表现出可以代替抗生素的巨大优势。在未来噬菌体类替抗产品必将在人畜细菌性传染病的治疗方面被广泛应用。噬菌体的生产及运输需要选择合适的保藏方法。不当的保藏方法会导致噬菌体产品效价降低甚至死亡,影响噬菌体产品的使用效果。噬菌体保藏时添加适当的赋形剂可降低损伤,做到抵抗不适温度影响、提高保质期限、方便运输等^[3]。本文总结较常用的几类噬菌体保藏方法的具体步骤、优缺点以及其适用的赋形剂,并分析了赋形剂自身的可降低保藏中滴度损失的物质结构特点,为噬菌体类产品合适保藏方法的选择提供借鉴。

2 保藏方法综述

2.1 干燥法

2.1.1 喷雾干燥。喷雾干燥是最为常用的生物制剂制备方法,王道军等人^[4]便应用此法法制备 I 型糖尿病反义肽噬菌体壳聚糖微球疫苗。喷雾干燥的工艺步骤大致分为四步(1)干燥气体的加热;(2)液滴的产生;(3)液滴的干燥;(4)颗粒收集。首先,液体进料在喷嘴中雾化。液滴尺寸的减小导致表面积的大幅增加。在干燥室中,通过热干燥气体的连续流动快速去除喷雾液滴中的溶剂,进而形成一个由非挥发性成分包括噬菌体、辅料和少量水分组成的颗粒。干燥颗粒形成并从气流中分离,并收集在收集容器中^[5,6],其基本的流程如图 1 所示。

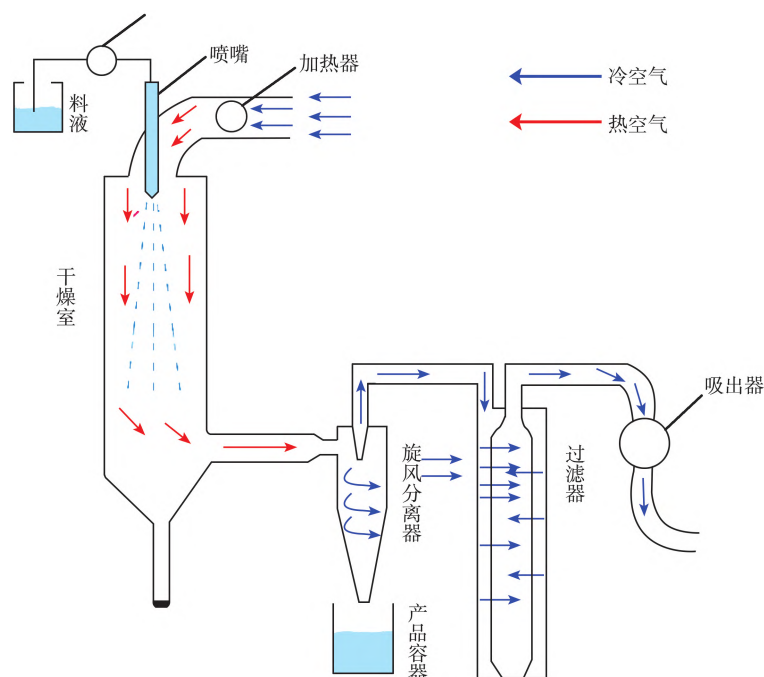


图 1 喷雾干燥流程图

喷雾干燥法需注意以下两个方面。一是出口温度和进风温度会对噬菌体滴度造成一定的损失。有研究

表明当出口温度高于 60 ℃ 时,噬菌体可能失去活性^[7],当温度低至 40 ℃,可减轻温度对噬菌体活性造成的影响^[8]。另一研究表明,当进风温度 85 ℃ 时,假单胞菌噬菌体 LUZ19 和葡萄球菌噬菌体的滴度损失小于 100 ℃ 进风温度,故而在选择喷雾干燥前需测定得出适合该种噬菌体的出口温度和进风温度,降低噬菌体滴度的损失。二是喷嘴喷射液体进料并将其雾化成小液滴时产生的剪切应力影响噬菌体颗粒的完整性,可通过使用超声波喷嘴应用温和的雾化技术来减少有害的剪切应力^[9]。

此外,为了避免喷雾干燥过程中噬菌体生物活性的丧失以及维持噬菌体粉剂在储存过程中的稳定性,赋形剂的选择显得极其重要。在喷雾干燥过程中,赋形剂的主要作用是代替水与噬菌体中蛋白质形成氢键。由于氢键的丧失或减弱以及水蒸发过程中疏水相互作用的增加可能会造成蒸发液滴中的蛋白质经历可逆或不可逆的变性^[10],进而引起噬菌体失活。因此需要在喷雾干燥的过程中添加合适的赋形剂。糖类可提供较多氢键的供体,所以它们与噬菌体中蛋白质可形成氢键以维持蛋白质构象的稳定而成为喷雾干燥中常用的赋形剂^[11,12]。

在储存过程中,赋形剂还能够降低温度和高湿度对喷雾干燥噬菌体制剂造成的影响。较高的储存温度(25 ℃)可能导致噬菌体热不稳定。赋形剂降低温度影响的原理是提高玻璃化转变温度。由于喷雾干燥制剂常温储存温度必须远低于玻璃化转变温度才能降低温度的影响,因此需要选择高玻璃转变温度的赋形剂如海藻糖(玻璃化转变温度 115 ℃)、乳糖(玻璃化转变温度 108 ℃)等。研究表明,在由各种量的海藻糖,甘露醇和亮氨酸的多组分赋形剂系统中,含有高海藻糖含量(>40%)的喷雾干燥粉末基质在 4 ℃ 下以 22% 相对湿度储存 12 个月后具有良好稳定性^[13]。赋形剂降低湿度影响的原理是减少水分吸附以防止重结晶。研究表明喷雾干燥噬菌体制剂的重结晶往往发生在高湿条件下,比如在相对湿度高时,即使储存温度低于海藻糖玻璃转化温度,基质中依然会产生结晶^[14]。而这种结晶则容易使噬菌体病毒粒子失活。为了改善这一问题,可以引入具有防潮特性的赋形剂,例如亮氨酸。亮氨酸(L-异构体)是一种支链 α -氨基酸,具有四碳脂肪族非极性侧链,有一定的疏水特性。已有研究表明当疏水性亮氨酸存在于噬菌体颗粒表面时减少了水的吸附,并防止了颗粒之间毛细管桥的形成,并减少了颗粒间毛细管力,而且较高的亮氨酸浓度还可以增强海藻糖喷雾干燥粉末在高湿环境时的稳定性,能够在储存过程中保护其免受湿度的影响^[15]。目前亮氨酸主要与糖类协同作为噬菌体喷雾干燥的赋形剂。Nicholas B. Carrigy 等人以亮氨酸和海藻糖为赋形剂制做喷雾干燥的抗弯曲杆菌噬菌体 CP30A 粉末,无论是室温储存 3 周还是长期的运输过程中噬菌体都保持良好的生物活性^[16]。

喷雾干燥噬菌体的优势主要体现在以下两个方面:一是与液体制剂相比,喷雾干燥产生的粉末大大降低了水分含量,从而能够保证噬菌体在长期保存中的稳定性;二是与传统干燥技术如冷冻干燥相比,喷雾干燥的优势在于不涉及冷冻或者真空条件,且是一步完成干燥,能缩短再水化的时间,因此其效率高,制作成本低。但全过程所需费用明显高于其他,在制作流程上如能进行改进会更有优势。

2.1.2 冷冻干燥。冷冻干燥法的原理是先将富集液冻结,然后在负压下进行升华、除水后形成粉末状,冻干后可在不同温度下保藏。冷冻干燥主要由三个阶段组成:冻结(凝固)阶段,初级干燥(冰升华)阶段,水分解吸的二次干燥阶段。在冻结过程中,溶剂从溶液中分离出来并转化为冰。在第二阶段初级干燥过程中,凝固的液体样品不通过液相直接转化为气相。在二次干燥过程中,未被冻结的吸附水和结合水通过解吸从溶质相中除去^[17]。基本流程如图 2 所示。

冷冻干燥需要在冷冻和脱水过程中保持噬菌体的完整性和感染性。为了防止冻伤噬菌体,需要添加各种冻干保护剂。通常,冻干保护剂需要具备四个特征,即玻璃化转变温度(T_g)高、吸水性差、结晶率低和不含还原基。常见的冻干保护剂包括糖类(蔗糖、海藻糖、乳糖)、氨基酸(谷氨酸、精氨酸)、多羟基化合物(甘露醇)等。

在生物药品的冷冻干燥过程中,最常用的保护剂是糖类。实验证明单糖在蛋白质的冻干过程中不起到保护作用。与单糖相比,二糖既能在冷冻过程中充当低温保护剂,也能在干燥脱水过程中充当脱水保护剂,并且二糖不含还原基不会使生物药品发生蛋白质褐变反应变性失活。例如 Prasanth Manohar 等人^[18]将三种裂解噬菌体(大肠杆菌噬菌体 ECP311、大肠杆菌噬菌体 ELP140 和克雷伯菌噬菌体 KPP235)用六种不同

的辅料(葡萄糖、蔗糖、明胶、甘露醇、聚乙二醇和山梨醇)作保护剂冻干噬菌体,并测试其生存能力,结果表明,噬菌体冻干后4℃储存时,它们的存活时间维持了20个月;37℃储存时,它们的活性在10个月后才开始降低。而与蔗糖相比,海藻糖和乳糖具有更高的玻璃化转变温度和更低的引湿性,且不具有还原性。荣蓉等人在副溶血弧菌噬菌体VPp1中加入0.3 mol/L的海藻糖冻干,发现噬菌体在4℃能够保藏4个月^[19]。

氨基酸是常见的蛋白质冻干保护剂。噬菌体作为一种含有蛋白质外壳的生物体,也可以选用氨基酸作为冻干保护剂。氨基酸的玻璃化转变温度相对高于非氨基酸缓冲剂,因此可起到一定保护作用。H. W. B. Engel 等人^[20]在分枝杆菌噬菌体中加入5%谷氨酸钠和0.5%明胶作为保护剂冻干,发现噬菌体可以在室温、黑暗条件下储存2.5年。

甘露醇也是一种很好的噬菌体冻干保护剂。甘露醇上的羟基能代替部分结构水,与蛋白中的羰基和氨基结合形成氢键,使蛋白质在缺水的条件下仍能保持其原有结构而不丧失活性。将噬菌体溶液冷冻干燥后加入甘露醇,可以提高噬菌体的保藏活性。

与其它保存方法相比,冷冻干燥噬菌体的优势主要体现在以下几个方面:一是冷冻干燥法将噬菌体富集液转化为粉末形式,粉末形式具有较长的保质期;二是冷冻干燥法对噬菌体的伤害较小。由于加工温度低及水分快速升华使得加入保护剂制成的冻干粉可在不同温度下长期保藏,工厂应用时可快速溶解冻干粉使用,但冷冻干燥的较高成本限制了其应用范围。

2.1.3 真空干燥。真空干燥法也称减压干燥或负压干燥,是在密闭的空间中抽去空气,形成负压而进行干燥的一种方法。真空干燥法属于低温干燥,为了避免真空干燥过程中噬菌体活性的丧失,需要添加各种保护剂。目前常用的保护剂包括脱脂奶粉、糖类、乳清粉和明胶等。其中,糖类是最常用的一种保护剂。例如许维素等将不同的噬菌体混合后加入糖类作分散剂,真空干燥后可以在2~7℃保存较长时间^[21]。脱脂奶粉因其可采用加热法除菌,且易获得均质的粉状制品而成为一种常用的保护剂。例如金晓琳等在铜绿假单胞菌噬菌体PaP1中加入脱脂牛奶后真空干燥,4℃时保存时间长达六个月^[22]。此外,将不同保护剂混合后进行真空干燥也是一种噬菌体保藏的方法。

真空干燥的优点主要体现在以三个方面:一是与普通干燥相比,真空干燥噬菌体时,粉末状噬菌体不会被流动空气吹动,减少了不必要的损失;二是若密封保存得当,噬菌体将会长期保持原始的效价和遗传性状;三是能防止发生试料的自动冻结,真空干燥噬菌体时,噬菌体可以保持不冻结而在高度真空下减压干燥。但其制作成本较高,工厂应用时需要权衡考虑。

喷雾干燥法制备的噬菌体固体制剂,粒径小,能通过干粉吸入器(DPI)直接输送到肺部,应用于治疗肺部的细菌感染或其他细菌性呼吸道感染。Mengyu Li 等人^[23]的研究,利用喷雾干燥法制备了含三种铜绿假蛋白噬菌体的鸡尾酒固体粉末制剂,并通过体外模拟实验,利用两种吸入器模拟人体气道,证明该固体粉末制剂的分散性及可吸入性。喷雾干燥法制备的噬菌体固体制剂,除了能够直接输送到肺部进行肺部给药之外,还可通过压缩制成片剂应用于肠道给药,但有研究将喷雾干燥制备的PEV20噬菌体粉末压缩后进行肠溶包衣制成口服片剂,临床试验后并未发挥良好效果,分析原因可能为胃液pH影响而失活,后研究改进,将大肠杆菌噬菌体喷雾干燥后,用pH响应性甲基丙烯酸酯聚合物进行封装,使聚合物包封与喷雾干燥技术的结合,为噬菌体口服给药的应用提供了发展方向。

冷冻干燥法制备的噬菌体固体制剂与喷雾干燥法制备的噬菌体固体制剂类似,也可通过干粉吸入器输

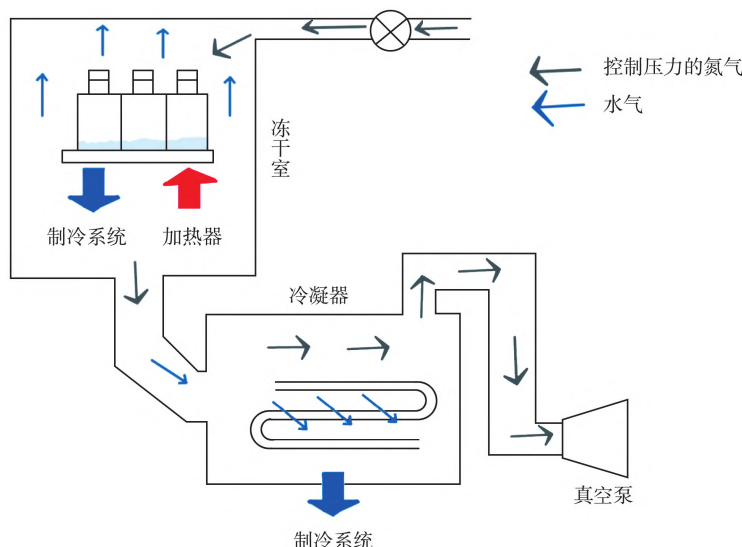


图2 冷冻干燥流程图

送到肺部^[24],但该固体制剂由于颗粒较大一般需要研磨,且冷冻干燥法制备的噬菌体固体制剂还可通过再水化后雾化的形式输送到肺部。除此之外,冷冻干燥法还可将微胶囊化的噬菌体制备成固体粉剂,例如 Kantiya 等人^[25]利用冷冻干燥技术,制备以乳清蛋白分离物与海藻糖(比例 3:1)为微胶囊的壁材料的固体噬菌体制剂,用于食品防腐。

此外,冷冻干燥法和喷雾干燥法在制备噬菌体固体制剂的过程中,都需要用到多种赋形剂,其中以糖类为主,包括蔗糖、海藻糖和乳糖,但目前仅乳糖被批准用于吸入输送^[26],故而在实际应用中要注意赋形剂种类的选择。真空干燥则应用较少。

2.2 悬液法

悬液法是指在噬菌体保藏的过程中,直接使用噬菌体原液保藏,或者在噬菌体原液中添加不同的赋形剂以使其保存的时间更长。悬液法大致分为噬菌体原液或培养液直接使用、加入甘油作为保护剂、加入氯仿作为保护剂或者加入噬菌体保存液等几类。

2.2.1 噬菌体原液。本方法不加入任何试剂,直接使用噬菌体原液或者培养液进行保存。在大多情况下,4℃保存的效果最好,例如彭帆等人^[27]将噬菌体 IME-AB6 在 LB 液体培养基中放于不同温度下保存,发现该噬菌体在 4℃的情况下保存效果最优。此外,科学家们常常将各种噬菌体(例如副溶血弧菌噬菌体或沙门氏菌裂解性噬菌体)在 4℃冰箱中以噬菌体原液形式保存。

2.2.2 甘油。甘油可以作为噬菌体悬液的保护剂。将甘油加入至噬菌体悬浮液或浓缩液中可以提高噬菌体保存效果。有研究表明^[28],在木糖氧化无色杆菌噬菌体(phiAxp-1, phiAxp-2 和 phiAxp-3)中添加甘油到终浓度 15%,将它们在-80℃、-20℃、4℃环境下保存 16 个月后,噬菌体 phiAxp-1 和 phiAxp-2 的效价均无明显降低,噬菌体 phiAxp-3 的效价仅下降了一个数量级。在大肠杆菌噬菌体的研究中发现,与直接使用噬菌体原液相比,加入无菌甘油作为保护剂后噬菌体的效价降低速率减缓,且在 4℃保存 16 个月时,噬菌体的效价几乎未发生变化。

2.2.3 氯仿。氯仿也可以作为噬菌体悬液的保护剂。在黎尔纳等人^[28]的研究发现,当加入氯仿至终浓度为 20%后,4℃保存噬菌体 16 个月后,噬菌体 phiAxp-1、phiAxp-2 的效价稳定在 10^9 PFU/mL,噬菌体 phiAxp-3 的效价稳定在 10^{10} PFU/mL。4℃保存环境比-80℃、-20℃、室温、37℃的保存效果更佳。但是代保英^[29]在大肠杆菌 K88 噬菌体的保存研究中则发现,氯仿并不是一个可以广泛应用的保护剂,仅仅对部分噬菌体具有一定效果。

2.2.4 噬菌体保存液。噬菌体保存液即为 SM 缓冲液,成分为氯化钠、硫酸镁、明胶等,主要用于稀释和保存噬菌体。SM 缓冲液的保存温度和上述的噬菌体悬液保存法类似,也是将噬菌体保存在 4℃的环境中。将出血性大肠杆菌噬菌体 933W 置于 SM 缓冲液中并放于 4℃冷藏是保存 933W 的一种较好方法。谭德猛等人^[30]也在实验中利用 SM 保存液稀释和保存噬菌体。

由于大多数的噬菌体制剂是以液态形式使用,噬菌体悬液保存法不需要将噬菌体原液转化为粉末状等其他状态,操作较为便捷,全程仅需注意温度的把控。故在短期保存中有一定优势,但是若需要更好的保藏效果或者是更方便转移,那就要运用冻干法等其他保藏方法进行保藏。同时,这一噬菌体保存方法同其他方法相比较易产生污染。

2.3 冻液法

冻液法是指在-20℃及以下的低温冷冻条件保藏噬菌体溶液,可以选用干冰、超低温冰箱和液氮等。在金晓琳等人^[22]的研究中,对冻干、室温、4℃、-20℃、液氮这几种保存方法的效果进行对比,液氮和冻干储存效果最好,在-20℃下储存噬菌体滴度降低最快,储存效果最差。-20℃保藏噬菌体 6 个月之后,效价便从 10^9 降到了 10^6 。但是液氮和冻干储存条件苛刻,难以用于大规模使用。在-20℃下,噬菌体效价降低可能是因为在此温度下形成冰晶,损害噬菌体。因此在-20℃条件下加入合适的冷冻保护添加剂(Cryo-protective additives, CPAs)可以减缓冰晶的形成从而延长噬菌体的储存时间。CPAs 主要被分为三类:(1)可穿过细胞壁和细胞膜的 CPAs;(2)可穿透细胞壁而不穿透细胞膜的 CPAs;(3)不能穿过细胞壁和细胞膜的 CPAs。

2.3.1 可穿过细胞壁和细胞膜的 CPAs。可穿过细胞壁和细胞膜的 CPAs 主要有甘油和二甲基亚砜。不同浓度的甘油具有不同的保护效果。根据 Wanger 等人^[31]的研究,向乳制品菌株的噬菌体悬液中加入 15% 的甘油, -80 °C 环境可稳定保存四年,效价基本不降低。在沙门菌噬菌体培养液中加入 20% 的甘油,在 -20 °C 条件下可有效保存一年,效价基本不降低。在噬菌体原液中加入二甲基亚砜(Me_2SO)也可以有效提高噬菌体的保存时间。Hubalek 等人^[32]研究发现各浓度二甲基亚砜都可以作为冷冻保护添加剂。在金黄色葡萄球菌噬菌体中混入 7% 的二甲基亚砜,在 -80 °C 的条件下可有效保存 3 个月且效价不变。然而,二甲基亚砜对某些噬菌体可能是有毒的,例如 40% 的二甲基亚砜会使 T4 噬菌体的滴度降到 6%。

2.3.2 可穿透细胞壁而不穿透细胞膜的 CPAs。可穿过细胞壁而不穿透细胞膜的 CPAs 主要有聚乙烯氧化物和酰胺及胺类化合物。聚乙烯氧化物又称聚氧乙烯(PEO),有研究表明 PEO-400 在浓度为 5%~15% 范围内可以作为 CPAs 保护 T4 噬菌体。另一研究发现,浓度为 10% 的乙酰胺、二甲基乙酰胺和二甲基甲酰胺在保护产气肠杆菌冷冻悬浮液方面几乎与甘油和 Me_2SO 一样有效,但甲酰胺(MW 45.04)的保护效果要差得多^[33]。

2.3.3 不能穿过细胞壁和细胞膜的 CPAs。既不能穿过细胞壁也不能穿过细胞膜的 CPAs 主要是葡萄糖和血清白蛋白。葡萄糖已被证实可以作为 CPAs 保护噬菌体。有研究证实,将 10% Me_2SO 和 8% 葡萄糖的混合物加入至噬菌体液中进行 -20 °C 的低温保存,效果优于单独使用 10% Me_2SO ^[32]。0.1%~4% 浓度的血清白蛋白一直被用作病毒和立克次体的 CPAs^[34],其在低温下效果优于二甲基亚砜。

总体来看,冻液法价格低廉但是保存时间和保存效果相较于喷雾干燥等有较大差距。

3 总结与展望

我们按照噬菌体和宿主菌的种类以及它们所应用的保存方法的不同进行了初步统计,结果如表 1 所示。

总体来看,噬菌体保存与细菌和活性蛋白质的保存类似,符合低温保存即可在较长时间保持活性,但温度不可低于 -20 °C,否则产生冰晶使噬菌体滴度下降。而在所有保存方法中最为便宜,简便的即为 4 °C 原液保存,若使用噬菌体限制不高,无其他特殊要求,那么 4 °C 常温保存即为最佳方式^[39]。

表 1 已发表的常见噬菌体保藏方法列表

作者及年份	噬菌体种类	宿主菌	保存方法
阿尔法德尔等人,2011 ^[24]	金黄色葡萄球菌虹吸病毒和铜绿假单胞菌肌病毒	金黄色葡萄球菌 和铜绿假单胞菌	
Anany 等人,2011 ^[35]	大肠杆菌噬菌体 T4	大肠杆菌	
Maia Merabishvili 等人,2013 ^[36]	金黄色葡萄球菌噬菌体 ISP	金黄色葡萄球菌	冷冻干燥法
Petsong K 等人,2021 ^[25]	沙门氏菌噬菌体 SPT 015	沙门氏菌	
C. Dini 等人,2013 ^[37]	鬼臼科大肠杆菌 CA933P	大肠杆菌	
Lynn El Haddad 等人,2018 ^[38]	裂解噬菌体 Team1	金黄色葡萄球菌	
Ke Chen 等人,2018 ^[39]	噬菌体 PEV20	多重耐药(MDR)菌株铜绿 假单胞菌 FADDI-PA001	
Mengyu Li 等人,2021 ^[40]	假单胞菌噬菌体 PEV2(鬼臼病毒), PEV1 和 PEV20(均为肌病毒)	铜绿假单胞菌	
Yu Lin 等人,2020 ^[41]	噬菌体 PEV20	铜绿假单胞菌	喷雾干燥法
Emilie Tabare 等人,2021 ^[42]	噬菌体 LUZ19(鬼臼病毒), 噬菌体 14-1(肌病毒)	铜绿假单胞菌	
Nicholas B Carrigy 等人,2020 ^[10]	抗弯曲杆菌噬菌体 CP30A	空肠弯曲杆菌	
Anisha M Thanki 等人,2022 ^[43]	肌病毒 SPFM10 和 SPFM14 组成的双噬菌体	鼠伤寒沙门氏菌	

现在一些企业已经开始进行噬菌体制剂和噬菌体保藏方法的研发,如诺立(上海)生物工程有限公司研发产品“猎弧特工”,利用喷雾干燥法和悬液法进行保藏,该产品可以在对虾养殖中高效裂解弧菌;润达生物

科技有限公司研发出液态的噬菌体产品“常噬”,裂解谱涵盖多种沙门氏菌和大肠杆菌的烈性噬菌体。总体来看,噬菌体使用悬液法进行保藏时,可以直接用原液或者加入不同的赋形剂,只要在适合温度下储存保藏效果均不错。但是悬液法的运输难度大且易造成污染,后续取用也不方便。冻液法中液氮法和冻干法对噬菌体的储存效果好但条件苛刻难达到,−20℃条件且添加赋形剂后噬菌体的储存效果不错但是与喷雾法比较仍有差距。干燥法将噬菌体制成粉末状,解决了运输难这一问题,但具体流程较繁琐、费用高。还有一些应用较少的保藏方法,例如微胶囊法^[44],适量的噬菌体脂质体与海藻酸钠溶液混合,后取注射器加入交联溶液中匀速滴取过滤即得微胶囊。此类方法只要储存得当,保藏效果不错但是制作过程繁琐,花费高,大规模生产投入过大。现阶段研究出流程简单且花费不高的保藏方法是噬菌体产品开发应用中亟待解决的问题,我们设想将较常使用且花费不高的噬菌体悬液法进行改造——将其常用赋形剂进行组合搭配,提升其在常温下的保藏效果。

参 考 文 献

- [1] 李金花,白雨凡,马春兰,等.噬菌体温度适应性的研究进展[J].中国生物工程杂志,2022,42(Z1):139-145.
- [2] 惠潇然,黄振华,刘静,等.噬菌体在食品微生物安全领域中应用的局限性和挑战[J].食品科学,2023,44(13):338-345.
- [3] 王君雁,范秋丽,兰瑞霞,等.噬菌体制剂在家禽生产中的应用及安全性评价[J].动物营养学报,2022,34(12):7555-7563.
- [4] 王道军.喷雾干燥法制备噬菌体展示的1型糖尿病微球疫苗[D].北京:中国协和医科大学,2009.
- [5] ARPAGAU S C, COLLENBERG A, RÜTTI D, et al. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2018, 546(1): 194-214.
- [6] HOE S, IVEY J W, BORA EY M A, et al. Use of a fundamental approach to spray-drying formulation design to facilitate the development of multi-component dry powder aerosols for respiratory drug delivery [J]. Pharmaceutical Research, 2014, 31(2): 449-465.
- [7] MALIK D J. Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy [J]. Curr Issues Mol Biol, 2021, 40: 303-316.
- [8] CHANG R Y K, WALLIN M, KUTTER E, et al. Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2019, 560: 11-18.
- [9] VANDENHEUVEL D, SINGH A, VANDERSTEEGEN K, et al. Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013, 84(3): 578-582.
- [10] KANOJIA G, WILLEMS G-J, FRIJLINK H W, et al. A design of experiment approach to predict product and process parameters for a spray dried influenza vaccine [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2016, 511(2): 1098-1111.
- [11] OHTAKE S, KITA Y, ARAKAWA T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011, 63(13): 1053-1073.
- [12] GRASMEIJER N, STANKOVIC M, DE WAARD H, et al. Unraveling protein stabilization mechanisms: Vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2013, 1834(4): 763-769.
- [13] VANDENHEUVEL D, MEEUS J, LAVIGNE R, et al. Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2014, 472(1): 202-205.
- [14] LEUNG S S Y, PARUMASIVAM T, GAO F G, et al. Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2017, 521(1-2): 141-149.
- [15] WANG Z, WANG H, VEHRING R. Leucine enhances the dispersibility of trehalose-containing spray-dried powders on exposure to a high-humidity environment [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2021, 601: 120561.
- [16] CARRIGY N B, LIANG L, WANG H, et al. Spray-dried anti-Campylobacter bacteriophage CP30A powder suitable for global distribution without cold chain infrastructure [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2019, 569: 118601.
- [17] ABLA K K, MEHANNA M M. Freeze-drying: a flourishing strategy to fabricate stable pharmaceutical and biological products [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 628: 122233.
- [18] MANOHAR P, RAMESH N. Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 15242.
- [19] 荣蓉.副溶血弧菌噬菌体 VPp1 在牡蛎净化中的应用及其规模化制备和保存 [D].青岛:中国海洋大学,2014.
- [20] ENGEL H W, SMITH L, BERWALD L G. The preservation of mycobacteriophages by means of freeze drying [J]. Am Rev Respir Dis, 1974, 109(5): 561-566.

- [21] 许维素,宋增福,陈彪.一种高质量噬菌体保存保护剂及其制备方法和应用[Z].201610416073.8,2016-09-21.
- [22] 金晓琳,张克斌,胡福泉.噬菌体最佳保存方法探讨[J].第三军医大学学报,2001,23(7):863-864.
- [23] LI M,CHANG R Y K,LIN Y,et al. Phage cocktail powder for *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections[J]. International Journal of Pharmaceutics,2021,596: 120200.
- [24] ALFADHEL M,PUAPERMPoonsiri U,FORD S J,et al. Lyophilized inserts for nasal administration harboring bacteriophage selective for *Staphylococcus aureus*: in vitro evaluation[J]. International Journal of Pharmaceutics,2011,416(1): 280-287.
- [25] PETSONG K,BENJAKUL S,VONGKAMJAN K. Optimization of wall material for phage encapsulation via freeze-drying and antimicrobial efficacy of microencapsulated phage against *Salmonella*[J]. Journal of Food Science and Technology,2021,58(5): 1937-1946.
- [26] CHANG R Y K,WALLIN M,LIN Y,et al. Phage therapy for respiratory infections[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2018,133: 76-86.
- [27] 彭帆,童贻刚,柏长青.多耐药鲍曼不动杆菌噬菌体 IME-AB6 的分离、生物特性及保存方法研究[J].生物技术通讯,2013,24(5): 641-644.
- [28] 黎尔纳,马艳艳,程伟伟,等.3株木糖氧化无色杆菌烈性噬菌体的最佳保存方法研究[J].军事医学,2016,40(10): 814-818.
- [29] 代保英.大肠杆菌 K88 噬菌体的分离、分类初步鉴定和生物学特性的测定[D].扬州:扬州大学,2009.
- [30] 谭德猛.刺参腐皮综合症病原菌及其裂解性噬菌体的分离和鉴定[D].大连:大连理工大学,2011.
- [31] WAGNER N,BRINKS E,SAMTLEBE M,et al. Whey powders are a rich source and excellent storage matrix for dairy bacteriophages[J]. International Journal of Food Microbiology,2017,241: 308-317.
- [32] HUBÁLEK Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms[J]. Cryobiology,2003,46(3): 205-229.
- [33] NASH T,POSTGATE J R,HUNTER J R. Similar effects of various neutral solutes on the survival of *aerobacter aerogenes* and of red blood cells after freezing and thawing[J]. Nature,1963,199:0028-0836.
- [34] MR B,JC M,JC S. The influence of certain salts,amino acids,sugars,and proteins on the stability of rickettsiae[J]. Journal of Bacteriology,1950,59(4): 509-522.
- [35] ANANY H,CHEN W,PELTON R,et al. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes[J]. Applied and Environmental Microbiology,2011,77(18): 6379-6387.
- [36] MERABISHVILI M,VERVAET C,PIRNAY J P,et al. Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freeze-drying (lyophilization) [J]. PloS One,2013,8(7): e68797.
- [37] DINI C,DE URRAZA P J. Effect of buffer systems and disaccharides concentration on Podoviridae coliphage stability during freeze drying and storage[J]. Cryobiology,2013,66(3): 339-342.
- [38] EL HADDAD L,LEMAY M-J,KHALIL G E,et al. Microencapsulation of a *Staphylococcus* phage for concentration and long-term storage[J]. Food Microbiology,2018,76: 304-309.
- [39] CHANG RACHEL YOON K,CHEN K,WANG J,et al. Proof-of-principle study in a murine lung infection model of antipseudomonal activity of phage PEV20 in a dry-powder formulation [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2018. DOI: 10.1128/aac.01714-17.
- [40] LI M,CHANG R Y K,LIN Y,et al. Phage cocktail powder for *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections [J]. International Journal of Pharmaceutics,2021,596: 120200.
- [41] LIN Y,YOON KYUNG CHANG R,BRITTON W J,et al. Storage stability of phage-ciprofloxacin combination powders against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections [J]. International Journal of Pharmaceutics,2020,591: 119952.
- [42] TABARE E,GLONTI T,COCHEZ C,et al. A design of experiment approach to optimize spray-dried powders containing pseudomonas aeruginosapodoviridae and myoviridae bacteriophages [J]. Viruses,2021,13(10): V13101926.
- [43] THANKI A M,MIGNARD G,ATTERBURY R J,et al. Prophylactic delivery of a bacteriophage cocktail in feed significantly reduces salmonella colonization in pigs [J]. Microbiology Spectrum,2022,10(3): e0042222.
- [44] PETSONG K,BENJAKUL S,VONGKAMJAN K. Evaluation of storage conditions and efficiency of a novel microencapsulated *Salmonella* phage cocktail for controlling *S. enteritidis* and *S. typhimurium* in-vitro and in fresh foods [J]. Food Microbiology,2019,83: 167-174.

(责任编辑:刘庆松)