



大肠杆菌抗噬菌体基因的挖掘及其抗噬菌体菌株的构建

崔晓媛, 尤甲甲, 潘学玮, 张恒维, 张显, 高敏杰*, 饶志明*

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

崔晓媛, 尤甲甲, 潘学玮, 张恒维, 张显, 高敏杰, 饶志明. 大肠杆菌抗噬菌体基因的挖掘及其抗噬菌体菌株的构建[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4167-4184.

CUI Xiaoyuan, YOU Jiajia, PAN Xuewei, ZHANG Hengwei, ZHANG Xian, GAO Minjie, RAO Zhiming. Mining of phage resistance genes and construction of phage-resistant strains in *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4167-4184.

摘要: 【目的】噬菌体是工业发酵污染底盘细胞的专一性病毒, 由于其广泛存在以及难以根除, 极大影响了发酵生产, 从基因水平进行抗噬菌体基因的挖掘以及功能验证可以显著增强底盘细胞的抗噬菌体的能力, 从而达到从源头上抵御噬菌体污染的目的。为了选育具有噬菌体抗性的工程菌株, 本研究旨在分析选取抗噬菌体的基因以及构建抗噬菌体的工程菌株。【方法】采用共进化筛选、重测序手段、重组菌株构建以及噬菌体侵染的敏感验证实验等方法, 获得具有抗噬菌体属性的工程菌株。【结果】实验通过共进化共筛选得到 7 株抗噬菌体驯化菌株, 基因组重测序以及 Annovar 软件分析, 发现了 12 个基因发生位点突变, 选取位点突变频率较高的 *dnaE* (DNA 聚合酶 III 亚基 α)、*yhjH* (环状二 GMP 磷酸二酯酶)及 *rzoD* (假定的噬菌体裂解脂蛋白) 3 个基因分析对噬菌体的抗性, 突变基因过表达菌株对噬菌体 BL21 Virus 01、BL21 Virus 02、BL21 Virus 06、T1 和 T7 具有明显的抗性; 吸附率测定结果表明, 基因 *dnaE* 和 *yhjH* 影响噬菌体复制, 而基因 *rzoD* 突变影响噬菌体吸附过程。使用定量 PCR 进一步分析突变基因 *dnaE* 和 *yhjH* 对噬菌体的抗性作用, 结果表明基因 *dnaE*、*yhjH* 突变影响噬菌体基因组 BL21 Virus 01 的复制过程, 而 *rzoD* 突变影响噬菌体 BL21 Virus 01 的吸附过程。【结论】基因 *dnaE*、*yhjH*、*rzoD* 的位点突变能够有效抵御噬菌体的侵染, 同时含有 3 个位点突变的工程菌株 BC11 具有较广范围内的噬菌体抗性, 是潜在的抗噬菌体底盘细胞。本研究为抗噬菌体基因挖掘与初步解析以及开

资助项目: 国家自然科学基金(32071470); 江苏省自然科学基金青年项目(BK20221080)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071470) and the Jiangsu Provincial Natural Science Foundation Youth Project (BK20221080).

*Corresponding authors. GAO Minjie, Tel/Fax: +86-510-85918299, E-mail: jmgao@jiangnan.edu.cn;

RAO Zhiming, Tel/Fax: +86-510-85916881, E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-03-14; Accepted: 2023-06-19; Published online: 2023-07-20

发抗噬菌体工程菌株提供借鉴。

关键词：抗噬菌体；进化筛选；重测序；工程菌株

Mining of phage resistance genes and construction of phage-resistant strains in *Escherichia coli*

CUI Xiaoyuan, YOU Jiajia, PAN Xuewei, ZHANG Hengwei, ZHANG Xian, GAO Minjie*, RAO Zhiming*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Phages are specific viruses that infect chassis cells in industrial fermentation. Due to the widespread existence and difficult eradication, phages greatly affect the yield of fermentation. The mining and functional verification of phage resistance genes can significantly enhance the anti-phage ability of chassis cells, so as to prevent phage pollution at the source. This study aims to mine the genes conferring the resistance to phages and construct phage-resistant strains. [Methods] Co-evolutionary screening, resequencing, recombinant strain construction, and phage infection experiments were carried out for the screening of the strains with phage resistance. [Results] Seven strains domesticated for resistance to phages were obtained through co-evolutionary screening. The genome resequencing and Annovar analysis identified mutations in 12 genes. Three genes with high mutation frequency, *dnaE* (DNA polymerase III subunit α): *yhjH* (cyclic diGMP phosphodiesterase): and *rzoD* (putative phage-lysed lipoprotein), were selected, and then the strains overexpressing the genes and the strains with knockout of the genes were constructed. The strains overexpressing the selected genes demonstrated obvious resistance to BL21 Virus 01, BL21 Virus 02, BL21 Virus 06, T1, and T7. The adsorption rates showed that *dnaE* and *yhjH* affected phage replication, while *rzoD* affected phage adsorption. Quantitative PCR was employed to further analyze the resistance of the strains with mutations of *dnaE* and *yhjH* to phages. The results showed that the mutations of *dnaE* and *yhjH* affected the replication process of BL21 Virus 01, while that of *rzoD* affected the adsorption process of BL21 Virus 01. [Conclusion] The mutations of *dnaE*, *yhjH*, and *rzoD* can resist phage infections, and the engineered strain BC11 with the mutations of all the three genes demonstrates a wide range of phage resistance. The findings provide a basis for the mining of phage resistance genes and references for the construction of strains with phage resistance.

Keywords: anti-phage; evolutionary screening; resequencing; engineered strain

噬菌体作为众所周知的侵袭细菌的专一性病毒，其主要侵染细菌的过程包括：噬菌体吸附

到细胞表面，将噬菌体的遗传物质注入细胞内，噬菌体的 DNA 进行繁殖，组装蛋白质外壳，进

而进行噬菌体的释放过程以裂解细胞。由于其存在具有广泛性,且在工业生产中难以根除,在发酵工业中给工业生产带来严重危害,引起学者们的重视。工业发酵涉及到医药、食品、化妆品以及其他相关科研领域,是微生物在适宜的温度、pH 以及其他环境条件下进行有氧或者无氧,将发酵原料转化为人类所需要工业产品的过程^[1]。工业发酵常用的发酵菌种有大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等多种细菌,而噬菌体病毒是一种依附于细菌存在的特异性病毒,由于其对工业发酵生产造成极大的经济损失,因此是一直被致力于解决的问题^[1]。在工业发酵中,噬菌体对工业发酵有着巨大的生产影响,噬菌体的污染可能会造成“倒罐”“废罐”等现象,在工业中会造成严重的经济损失^[2]。

防治噬菌体污染的传统措施包括生产环境的净化、菌种轮换、噬菌体抑制剂的使用等方法^[3],由于其存在成本高、污染大以及噬菌体无法根除的特点,21 世纪以来,随着生物技术以及合成生物学的发展,噬菌体的防治手段逐渐从传统的物理化学防治转至生物防治,在生物防治方向,抗噬菌体菌株的选育成为研究的重点。2018 年刘颖以乳杆菌烈性噬菌体 P1 及其宿主菌植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)为研究对象,采用次级感染的方法筛选抗噬菌体植物乳杆菌自发突变的驯化菌株,该菌株对噬菌体 P1 具有耐受能力^[4];2019 年 Li 等构建噬菌体受体缺失突变体,通过混合噬菌体培养进行抗性驯化菌株的筛选,实验构建的多价噬菌体抗性驯化菌株被证明对 23 种测试的噬菌体体现抗性^[5];2022 年齐蕊名等通过共进化手段,筛选出 6 株对噬菌体 Lpla 具有稳定抗性的植物乳杆菌(自发突变株)^[6]。

本研究从基本的工业菌株大肠杆菌 BL21 出发,进行抗噬菌体菌株的进化筛选,获得遗传稳

定性较高的驯化菌株 BL21 A1–A7。通过基因组重测序以及基因功能分析,挖掘具有噬菌体抗性的基因,进行过表达菌株 BC1、BC2、BC3 和位点突变菌株 BC4、BC5、BC6、BC7 的构建,以及利用 CRISPR/Cas9 手段进行 BC10 敲除菌株的构建,在噬菌体侵染实验中以 BL21 为对照,发现过表达菌株与敲除菌株分别对测试的 6 株噬菌体表现不同范围的抗性。同时,基于吸附率以及逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)的实验验证,推测 *dnaE*、*yhjH* 的表达影响噬菌体的复制过程,*rzoD* 的表达影响噬菌体的吸附以及其他过程。同时对抗噬菌体的关键基因进行了进一步的表征与验证,构建具有较广范围的含有 *dnaE*_{H171L}、*yhjH*_{A151V}、*rzoD*_{A2V} 位点突变基因的过表达工程菌株 BC11,经实验验证,其具有较为广泛的噬菌体抗性。本研究挖掘的抗性基因为抗性噬菌体菌株的开发提供基础,同时抗性噬菌体菌株作为工业中的底盘细胞,在发酵工业中具有潜在的应用价值,RT-PCR 的实验验证以及结论推测为解析基因抗性机制提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 主要实验材料、菌株以及培养基成分

1.1.1 实验所需菌株

本研究所用到的菌株如表 1 所示。

1.1.2 实验所需噬菌体

实验所使用模式噬菌体:噬菌体 T1、T7 (来自 American Type Culture Collection, ATCC);通过实验纯化获得单一噬菌体:BL21 Virus 01、BL21 Virus 02、BL21 Virus 03 和 BL21 Virus 06 4 株噬菌体。

1.1.3 实验所需引物

本研究所需引物如表 2 所示。

表 1 实验所需菌株

Table 1 Strains required for the experiment

Strains	Description	Sources
<i>Escherichia coli</i> BL21	<i>E. coli</i> BL21	Laboratory preservation
<i>E. coli</i> BL21/Cas9	<i>E. coli</i> BL21 contains plasmid Cas9	Laboratory preservation
BC0	<i>E. coli</i> BL21 contains plasmid pET28a	Laboratory preservation
BC1	<i>E. coli</i> BL21 contains recombinant plasmid pET28a- <i>dnaE</i>	Construction of this study
BC2	<i>E. coli</i> BL21 contains recombinant plasmid pET28a- <i>yhjH</i>	Construction of this study
BC3	<i>E. coli</i> BL21 contains recombinant plasmid pET28a- <i>rzoD</i>	Construction of this study
BC4	<i>E. coli</i> BL21 contains recombinant plasmid pET28a- <i>dnaE</i> _{1171L}	Construction of this study
BC5	<i>E. coli</i> BL21 contains recombinant plasmid pET28a- <i>yhjH</i> _{A151V}	Construction of this study
BC6	<i>E. coli</i> BL21 contains recombinant plasmid pET28a- <i>rzoD</i> _{A2V}	Construction of this study
BC7	<i>E. coli</i> BL21 site mutation <i>dnaE</i> _{1171L}	Construction of this study
BC8	<i>E. coli</i> BL21 site mutation <i>yhjH</i> _{A151V}	Construction of this study
BC9	<i>E. coli</i> BL21 site mutation <i>rzoD</i> _{A2V}	Construction of this study
BC10	<i>E. coli</i> BL21 knockout gene <i>rzoD</i>	Construction of this study
<i>E. coli</i> BL21-A1	Acclimated strain	Construction of this study
<i>E. coli</i> BL21-A2	Acclimated strain	Construction of this study
<i>E. coli</i> BL21-A3	Acclimated strain	Construction of this study
<i>E. coli</i> BL21-A4	Acclimated strain	Construction of this study
<i>E. coli</i> BL21-A5	Acclimated strain	Construction of this study
<i>E. coli</i> BL21-A6	Acclimated strain	Construction of this study
<i>E. coli</i> BL21-A7	Acclimated strain	Construction of this study
BC11	<i>E. coli</i> BL21 contains recombinant plasmid pET28a- <i>dnaE</i> _{1171L} <i>yhjH</i> _{A151V} <i>rzoD</i> _{A2V}	Construction of this study

1.1.4 培养基及配方

实验所用培养基为 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 (tryptone) 10, 酵母提取物(yeast extract) 5, 氯化钠(NaCl) 10。

1.2 主要仪器设备及试剂

本研究用到的主要仪器设备与试剂及生产厂家如表 3 所示。

1.3 噬菌体的分离及纯化

本研究从发酵污水厂分离筛选裂解性噬菌体。将含有噬菌体的发酵液在转速 10 000 r/min 下离心 10 min 去杂质, 使用 0.22 μm 无菌滤膜过滤上清除菌, 吸取 500 μL 澄清滤液与等体积对数期大肠杆菌 BL21 混合, 转接 10 mL LB 培养基, 37 °C、220 r/min 培养 4–6 h^[7]。

实验采用双层平板法分离纯化噬菌体^[8], 对噬菌体液体进行 10 倍梯度稀释, 将 100 μL 噬菌体与等体积对数期大肠杆菌混合, 加入 5 mL 上层培养基混匀后倒入下层平板中^[9]。37 °C、220 r/min 培养, 3–4 h 后选取 4 个大小不同、单一透明的噬菌斑, 挑取至 LB 培养基中进行培养, 获得浓度较高的 4 种单一噬菌体溶液, 将其命名为 BL21 Virus 01、BL21 Virus 02、BL21 Virus 03、BL21 Virus 06, 保存于–80 °C 用于后续实验研究^[9]。

1.4 驯化菌株的筛选

根据先前报道的方法^[10], 对大肠杆菌进行共进化的培养。将大肠杆菌 BL21 培养至对数生长期, 吸取 200 μL 的混合噬菌体溶液(BL21 Virus

表 2 本研究所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Primer sequences (5'→3')
pET28a-F	GAATTCGGATCCGCGACCCATTG
pET28a-F	AAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACC
<i>dnaE</i> -F	GGGTCGCGGATCCGAATTCATGTCTGAACCACGTTTCGTAC
<i>dnaE</i> -R	GAGTGGCGCCGCAAGCTTTTAGTCAAACCTCCAGTTCC
<i>dnaE</i> _{1171L} -F	GCAACCTTCGTTTAATTCTGA
<i>dnaE</i> _{1171L} -R	GCAACCTTCGTTTAATTCTGA
<i>yjhH</i> -F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGATAAGGCAGGTTATCCAGC
<i>yjhH</i> -R	TTATAGCGCCAGAACCACCGTATTCA
<i>yjhH</i> _{A151V} -F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGATAAGGCAGGTTATCCAGC
<i>yjhH</i> _{A151V} -R	TATAGCGCCAGAACCACCGTATTACGCGTTTCT
<i>rzoD</i> -F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGCTAAAGCTGAAAATGATG
<i>rzoD</i> -R	TCGAGTGGCGCCGCAAGCTTTCAGCCTCTCTCTGAGGGTGAA
<i>rzoD</i> _{A2V} -F	GGGTCGCGGATCCGAATTCATGCGAAAGCTGAAAATGATGC
<i>rzoD</i> _{A2V} -R	CGAGTGGCGCCGCAAGCTTTCAGCCTCTCGCTGAGGGTGA
BC7-F1	ATGATCGAATTTGTTTATCCGCACACGCAC
BC7-R1	CGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGCTTCAGATTCCGGTTTACTTAATCTCGACAC
BC7-F2	CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGC
BC7-R2	GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA
BC7-F3	CAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCATGTCTGAACCACGTTTCGT
BC7-R3	GCAACCTTCGTTTAATTCTGA
BC8-F1	TTAAACGTCCAGTTATTGTTCTTTTCAGAG
BC8-R1	CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCG
BC8-F2	CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGGCTGCCTCATTTTCCGCCTGGCTGGAC
BC8-R2	AGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCATGATAAGGCAGGTTATCCAGCGAATAA
BC8-F3	GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA
BC8-R3	TTATAGCGCCAGAACCACCGTATTACGCGTTT
BC11-R2	TTATAGCGCCAGAACCACCG
BC11-F3	GGTGGTTCTGGCGCTATAAAAAGGAGGGAAATCATGCTAAAGCTGAAAATG
BC11-R3	TCGAGTGGCGCCGCAAGCTTTCAGCCTCTCTCTGAGGGTGAA
RT-PCR-F	AAGTGATTCAAGTTCAGCGCCT
RT-PCR-R	GTCTCGTTGGGACTACCTAAAGGT
BC9-F1	GATAAAAGATGGTGGGCGCGATTGCCG
BC9-R1	CAGCTAACTCCTTCGTGTATTTTGCATCGA
BC9-F2	CGATGCAAAAATACACGAAGGAGTTAGCTGGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG
BC9-R2	CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGC
BC9-F3	CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGATGCGAAAGCTGAAAATGATGCTC
BC9-R3	TTACCAGTCGTTCCCGGAGGGTGAAAT
BC7-sgRNA	GAAAGCGTTGAGCTGGAGTCTGG
BC8-sgRNA	GAAAGCCCCTGAAATCGCAGCGG
BC9-sgRNA	CATCATCGTCTGCCTGTCATGGG
BC10-F1	AAGCCCTCCTGAATAAAGACCTTGC
BC10-R1	CTTCCAGTTGTTTTTGCATAGTGATAGCTAACTCCTTCGTGTATTTTTCATCCAG
BC10-F2	AAAAATACACGAAGGAGTTAGCTATCACTATGCAAAAACAACCTGGAAGGAAC
BCF0-R2	TCCTCCAATAGGCTGAGCATCC
BC10-sgRNA	AGCCACCACCGCCTCCGGCGTGG
BC11-F1	ATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGTCTGAACCACGTTTCGTACACCTG
BC11-R1	ACCTGCCTTATCATGATTTCCCTCCTTTTAGTCAAACCTCCAGTTCCAC

01、BL21 Virus 03、T1、T7)与等体积对数期菌液混合,接种至新鲜 LB 培养基,37 °C、220 r/min 摇床过夜培养,通过噬菌体侵染实验验证驯化菌株敏感性,获得具有抗性的驯化菌株。

1.5 驯化菌株基因组重测序

将驯化菌株进行活化,37 °C、220 r/min 摇床培养 12 h 后进行样品保存,委托苏州金唯智生物科技有限公司进行全基因组重测序^[11]。实验对测序结果进行初步分析,并对原始图像数据利用软件 Bcl2fastq (v2.17.1.14)进行图像碱基识别 (base calling)。

1.6 过表达菌株的构建

分别利用引物 *dnaE*-F、*dnaE*-R、*yhjH*-F、*yhjH*-R、*rzoD*-F、*rzoD*-R 扩增目的基因 *dnaE*、*yhjH*、*rzoD*, 利用引物 *dnaE*_{H171L}-F、*dnaE*_{H171L}-R、*yhjH*_{A151V}-F、*yhjH*_{A151V}-R、*rzoD*_{A2V}-F、*rzoD*_{A2V}-R 在目的基因 *dnaE*、*yhjH*、*rzoD* 的基础上分别扩增目的基因 *dnaE*_{H171L}、*yhjH*_{A151V}、*rzoD*_{A2V}, 利用 pET28a-F、pET28a-R 采用反向 PCR 技术进行线性化质粒 pET28a 的构建,根据南京诺唯赞生物科技股份有限公司胶回收试剂盒进行目的基因以及线性化质粒 pET28a 的回收,以及根据同源重组酶试剂盒说明书进行体系的计算与添加。同源重组体系置于 37 °C 金属浴连接 0.5–1.0 h, 获

得重组质粒 pET28a-*dnaE*、pET28a-*yhjH*、pET28a-*rzoD*、pET28a-*dnaE*_{H171L}、pET28a-*yhjH*_{A151V} 和 pET28a-*rzoD*_{A2V}。将获得的重组质粒采用化学转化法导入大肠杆菌 BL21 感受态。含有 Kan 抗生素的平板涂布后 PCR 验证筛选阳性单菌落^[12], 获得菌株 BC4-BC9。同时将获取的目的基因 *dnaE*_{H171L}、*yhjH*_{A151V}、*rzoD*_{A2V} 利用引物 BC11-F1、BC11-R1、BC11-F2、BC11-R2、BC11-F3、BC11-R3 进行序列的进一步扩增, 获得目的基因 BC11-*dnaE*_{H171L}、BC11-*yhjH*_{A151V}、BC11-*rzoD*_{A2V}, 以同样的同源重组方式与线性化 28a 质粒进行连接, 获得重组质粒 pET28a-*dnaE*_{H171L}*yhjH*_{A151V}*rzoD*_{A2V}, 将获得的重组质粒采用化学转化法导入大肠杆菌 BL21 感受态。于含有 Kan 抗生素的平板涂布, PCR 验证筛选阳性单菌落^[13], 获得菌株 BC11。

1.7 过表达菌株 SDS-PAGE 分析

挑取过表达菌株阳性单菌落接种于 10 mL LB 液体培养基, 37 °C 过夜培养, 按照 1% 的接种量转接至 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C 培养 1–2 h, 待菌液 *OD*₆₀₀ 增至 0.8 左右, 加入 25 μL 1 mmol/mL 异丙基 -1 硫代 -β-D-半乳糖苷 (isopropyl-1 thio-β-D-galactoside, IPTG), 16 °C 培养 10–12 h, 诱导蛋白表达。

表 3 主要仪器设备及试剂

Table 3 Main instruments and reagents

Instruments and reagents	Manufacturer
0.22 μm sterile microporous filter membrane	Hengkang Co., Ltd.
H-7650 transmission electron microscopy	Hitachi, Ltd.
G154DWS high temperature autoclave	Zealway Instrument Inc.
Ultra cold storage freezer	China Haier Group, Co.
Thermostat water bath	Shanghai Jing Hong Laboratory Instrument Co., Ltd.
Sigma centrifugal machine	Sigma Company Limited
Yeast powder, peptone, AGAR powder	Oxoid Company Limited
Electronic analytical balance	Mettler-Toledo group
Glue recovery kit	Novizan Bioengineering Co., Ltd.
Plasmid extraction kit	Shanghai Generay Biotech Co., Ltd.
Genome extraction kit	Shanghai Generay Biotech Co., Ltd.
RNAiso plus kit	TaKaRa Bio Inc.

1.8 CRISPR/CAS9 技术构建敲除菌株及位点突变菌株

研究采用 CRISPR/CAS9 技术进行大肠杆菌敲除菌株与位点突变菌株的构建。采用引物 BC10-F1、BC10-R1、BC10-F2、BCF0-R2 分别构建 *rzoD* 基因的上下游同源臂, 利用引物 BC10-F1、BCF0-R2 构建同源臂的融合片段 BC10-F1R2, 采用引物 BC10-sgRNA 搭建双链 sgRNA, 同时构建重组质粒 PGRB-sgRNA^[14]。制备大肠杆菌 BL21/Cas9 的感受态, 将重组质粒 PGRB-sgRNA、融合片段 BC10-F1R2 利用电化学转化法(1.8 kV-5 ms)导入感受态细胞。30 °C、220 r/min 摇床培养 2 h, 吸取混合溶液 100 μ L, 进行平板涂布(终浓度 100 μ g/mL 氨苄霉素、50 μ g/mL 壮观霉素), 30 °C 培养箱过夜培养, 采用引物 BC10-F1、BC10-R2 进行 PCR 验证筛选阳性单菌落, 获得菌株 BC10。

在目的基因 *dnaE*、*yhjH*、*rzoD* 的上游分别根据引物 BC7-F2、BC7-R2、BC8-F2、BC8-R2、BC9-F2、BC9-R2 添加 Kan 抗性基因获得片段 BC7-F2R2、BC8-F2R2、BC9-F2R2, 同时根据引物 BC7-F1、BC7-R1、BC8-F1、BC8-R1、BC9-F1、BC9-R1, 在添加 Kan 抗性基因的上游扩增一定长度的同源臂 BC7-F1R1、BC8-F1R1、BC9-F1R1。分别根据 BC7-F1、BC7-R2、BC8-F1、BC8-R2、BC9-F1、BC9-R2 将对应的 BC7-F1R1/BC7-F2R2、BC8-F1R1/BC8-F2R2、BC9-F1R1/BC9-F2R2 片段进行融合, 获得融合片段 BC7-Kan1、BC8-Kan1、BC9-Kan1。根据引物 BC7-F3、BC7-R3、BC8-F3、BC8-R3、BC9-F3、BC9-R3 分别扩增位点突变基因 BC7-*dnaE*_{I171L}、BC8-*yhjH*_{A151V} 和 BC9-*rzoD*_{A2V}, 根据引物 BC7-F1、BC7-R3、BC8-F1、BC8-R3、BC9-F1、BC9-R3 将片段 BC7-Kan1、BC8-Kan1、BC9-Kan1 与片段 BC7-*dnaE*_{I171L}、BC8-*yhjH*_{A151V}、

BC9-*rzoD*_{A2V} 分别进行融合, 获得融合片段 BC7-Kan1-*dnaE*_{I171L}、BC8-Kan1-*yhjH*_{A151V}、BC9-Kan1-*rzoD*_{A2V}。将 BC7-sgRNA、BC8-sgRNA、BC9-sgRNA 与线性化 PGRB 进行同源重组连接, 构建 PGRB 重组质粒 BC7PGRB-sgRNA、BC8PGRB-sgRNA、BC9PGRB-sgRNA, 将重组质粒 BC7PGRB-sgRNA、BC8PGRB-sgRNA、BC9PGRB-sgRNA 分别与融合片段 BC7-Kan1-*dnaE*_{I171L}、BC8-Kan1-*yhjH*_{A151V}、BC9-Kan1-*rzoD*_{A2V} 利用电化学转化法(1.8 kV-5 ms)导入大肠杆菌 BL21/Cas9 感受态细胞。在含有 Kan 抗生素的平板涂布后采用引物 BC7-F1、BC7-R3、BC8-F1、BC8-R3、BC9-F1、BC9-R3 分别验证 *dnaE*、*yhjH*、*rzoD* 位点突变基因, PCR 验证筛选阳性单菌落^[12], 获得菌株 BC7-BC9。

1.9 生长曲线测定

将构建的过表达菌株 BC4-BC6 进行活化培养, 挑取单菌落菌株至 10 mL LB 培养基, 37 °C 过夜培养。按 1%量转接量接种至含 50 mL LB 培养基中, 进行 37 °C 摇床培养 12 h, 培养期间每隔 1 h 测定 OD_{600} ^[15]。

1.10 噬菌体滴度的测定

采用双层平板法测定噬菌体滴度。将活化后的噬菌体进行 10 倍梯度稀释, 取不同梯度的噬菌体稀释液与等体积对数期的 BL21 菌液相混合, 加入 5 mL 半固体培养基, 混合均匀后倾倒入下层平板上, 凝固后于 37 °C 培养 3-4 h。通过平板上形成的噬菌斑数量计算噬菌体的滴度 (PFU/mL)^[16]。噬菌体滴度计算公式为:

$$\text{滴度(PFU / mL)} =$$

$$\text{噬菌斑数} \times \text{稀释倍数} \times \text{取样量折算数}$$

1.11 噬菌体吸附率的测定

双层平板法测定噬菌体吸附率, 根据吸附前后噬菌体的滴度测定吸附率的大小^[16]。噬菌体吸附率计算公式如下:

$$\text{吸附率(\%)} = \frac{\text{起始噬菌体滴度} - \text{未吸附噬菌体滴度}}{\text{起始噬菌体滴度}}$$

1.12 噬菌体的电镜观察

本研究采用 H-7650 透射电子显微镜观察噬菌体的形态。选取纯化后 PFU 在 10^7 左右的噬菌体，取 20 μL 滴于铜网上，等待其自然晾干。大概 15 min 后，用滤纸从侧面吸收多余液体，加入 1 滴 2% 磷钨酸(phosphotungstic acid, PTA)，染色 10 min。用滤纸从侧面吸去染液，干燥后于透射电子显微镜下进行观察^[16]。

1.13 噬菌体侵染实验

在菌体生长的对数期吸取一定的菌液进行噬菌体侵染实验验证敏感性，噬菌体滴度范围在 10^9 左右，同时在板中添加 1 μL 1 mmol/mL IPTG 诱导蛋白表达。3–4 h 后观察噬菌斑的形成状态。

1.14 RT-PCR 实验

提取噬菌体 BL21 Virus 01 DNA，将其用 *Sam* I 内切酶进行酶切，同时将质粒 pET28a 也进行 *Sam* I 内切酶的酶切处理，将酶切后的噬菌体 DNA 与线性化 pET28a 进行同源重组的连接。送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序处理。根据测序的序列设计定量 PCR 引物 RT-PCR-F、RT-PCR-R，用于分析噬菌体 BL21 Virus 01 DNA 的含量。具体实验方法为：以菌株 BL21、BC7 和 BC8 为宿主，加入原液感染复数(multiplicity of infection, MOI)=0.1 的噬菌体 BL21 Virus 01，37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养，以刚加入噬菌体为 0 min，每 5 min 取 1 mL 样品离心收集菌体，使用 RNAiso Plus 试剂盒(TaKaRa)对收集的细胞进行总 RNA 提取，使用 GoScript 逆转录系统对总 RNA (每次反应 1 μg) 进行逆转录，并使用 GoTaq™ 对互补 DNA (cDNA) 进行实时定量 PCR 分析。以吸附前 0 时刻细胞内 DNA 含量为标准，在加入噬菌体后 5、10、15、20 min 分别获取数

据后进行倍数比较^[17]。

1.15 抑菌曲线的测定

将过夜培养的大肠杆菌按 1% 接种量转接于 50 mL LB 培养基中，培养 1.5 h 后加入 10 μL 1 mmol/mL 的 IPTG。2 h 时按照 3 个感染复数 (MOI=0.1、1、10) 加入不同浓度的噬菌体，37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养 10 h 左右，每隔 1 h 测定 OD_{600} ^[18-19]。原液感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 计算公式如下：

$$\text{MOI} = \frac{\text{PFU (每毫升溶液中的噬菌体数量)}}{\text{CFU (每毫升溶液中的细胞数量)}}$$

2 结果与分析

2.1 噬菌体的筛选及鉴定

为了鉴定噬菌体的形态与种类，使用电子透射显微镜观察噬菌体形态特征。如图 1A 所示，BL21 Virus 01 头部为二十面体，直径在 40–50 nm，具有非收缩性细长尾部；BL21 Virus 02 头部为二十面体，直径在 30–40 nm，具有非收缩性细长尾部；BL21 Virus 03 头部为二十面体，直径在 30–40 nm，具有非收缩性细长尾部；BL21 Virus 06 头部为典型的二十面体，直径在 20–30 nm，具有非收缩性细长尾部。根据国际病毒分类委员会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 的最新标准，BL21 Virus 01、02、03、06 属于长尾噬菌体^[20]。实验测得 6 株噬菌体的滴度，滴度数据如图 1B 所示，BL21 Virus 01: 2.2×10^{13} PFU; BL21 Virus 02: 9.6×10^{13} PFU; BL21 Virus 03: 4.2×10^{13} PFU; BL21 Virus 06: 6.0×10^{13} PFU; T1: 5.2×10^{13} PFU; T7: 2.0×10^{13} PFU。

2.2 驯化菌株的分离及鉴定

如图 2A 所示，进行混合噬菌体与大肠杆菌的共进化培养实验。如图 2B 所示，平板涂布后获得 7 株驯化菌株，将其命名为 *Escherichia coli* BL21 A1–A7。对驯化菌株 *E. coli* BL21 A1–A7

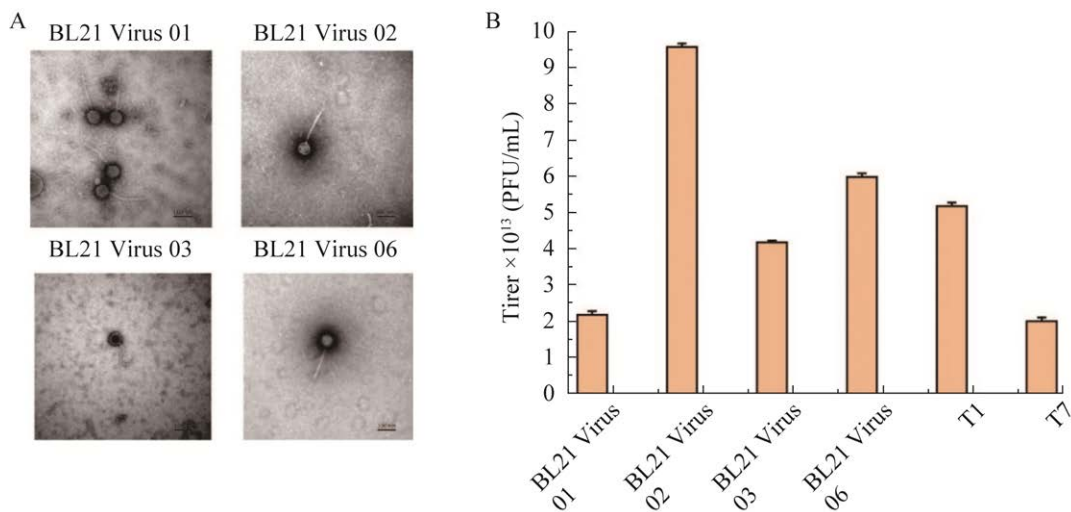


图 1 噬菌体的透射电子显微镜图片(A, 10 000×)与滴度显示(B)

Figure 1 Transmission electron microscope image of phages (A, 10 000×) and titer display of phages (B). Error bar: Represent bias analysis, with data from three data duplications.

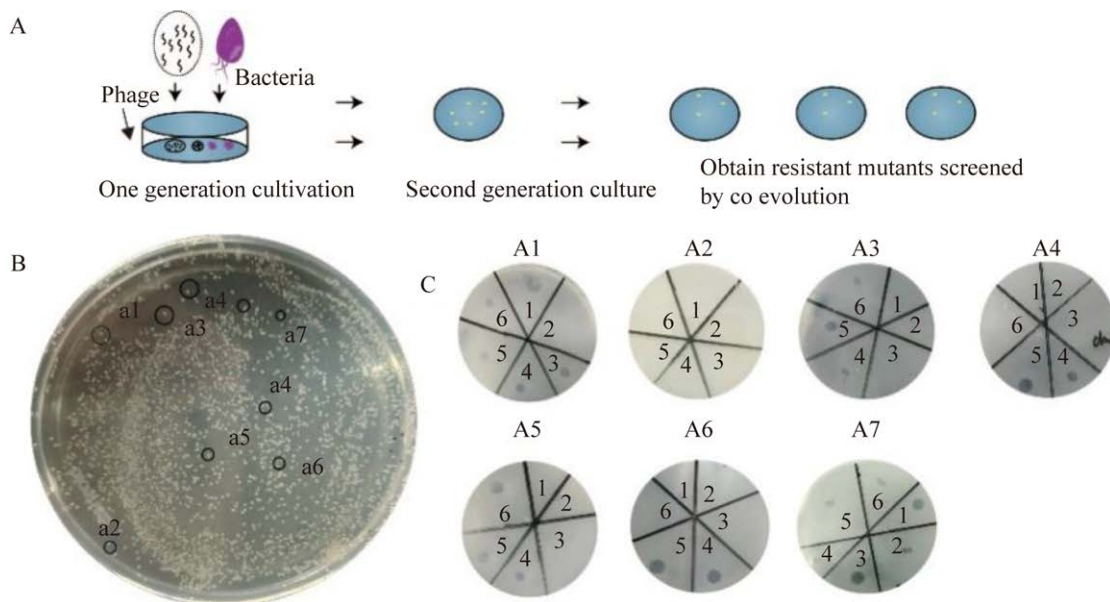


图 2 驯化菌株的筛选以及敏感性验证

Figure 2 Screening and sensitivity verification of acclimated strains. A: *Escherichia coli* and phages are co-cultured. B: Plate coating of *Escherichia coli* BL21 A1–A7 mutant strains. C: Sensitivity verification experiment of *E. coli* BL21 A1–A7 acclimated strains.

进行噬菌体侵染实验验证菌株敏感性，如图 2C 所示，噬菌体侵染实验发现驯化菌株 *E. coli* BL21 A1–A7 具有不同范围的抗噬菌体能力。

2.3 驯化菌株基因组重测序及基因功能分析

为了进一步筛选驯化菌株中的抗性基因，对 *E. coli* BL21 A1–A7 7 株驯化菌株进行基因组

重测序。如表 4 所示，测序平均深度≥200X，Q20 (%)平均值在 97%以上，Q30 (%)平均值在 94%左右。对照大肠杆菌 BL21，参考基因组的覆盖度达到 100%，GC 含量达到 50%，这与已报道的大肠杆菌基因组几乎无异^[21]。将驯化菌株的测序结果与对照大肠杆菌 BL21 基因组进行

比对, 使用 Samtools (version 1.1)软件以及 GATK 的 Unified Genotyper 模块进行单碱基突变(single-base mutations, SNV)/插入或缺失突变(insertion or deletion of mutations, InDel)的检测, 对参考基因组每个位点进行检测, 并用 Annovar 软件对检测到的突变位点进行功能注释, 发现基因位点突变的种类共有 6 种, 位点

突变类型中转换数目小于颠换数目(图 3A)。

如图 3B 所示, 重测序发现 *E. coli* BL21 A1–A7 这 7 株驯化菌株中有多个相同的位点突变基因, 如图 3C 所示, 它们在基因组上的功能区共有 16 种, 在 16 种功能区中, 发生位点突变的类型占下游功能区与编码功能区的比重大于其他功能区。

表 4 驯化菌株重测序结果

Table 4 Mutant weight sequencing results

Domestication strains	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	SNV	CDS	IGS	Depth ($\geq 200X$)
A1	50.73	97.79	94.42	25	14	1	99.43
A2	50.76	97.68	94.17	28	15	3	99.41
A3	50.76	97.81	94.48	23	13	1	99.41
A4	50.75	97.74	94.42	26	15	3	99.48
A5	50.76	97.47	93.74	23	12	1	99.47
A6	50.94	97.57	93.99	27	10	1	99.40
A7	50.76	97.76	94.38	23	12	1	99.45

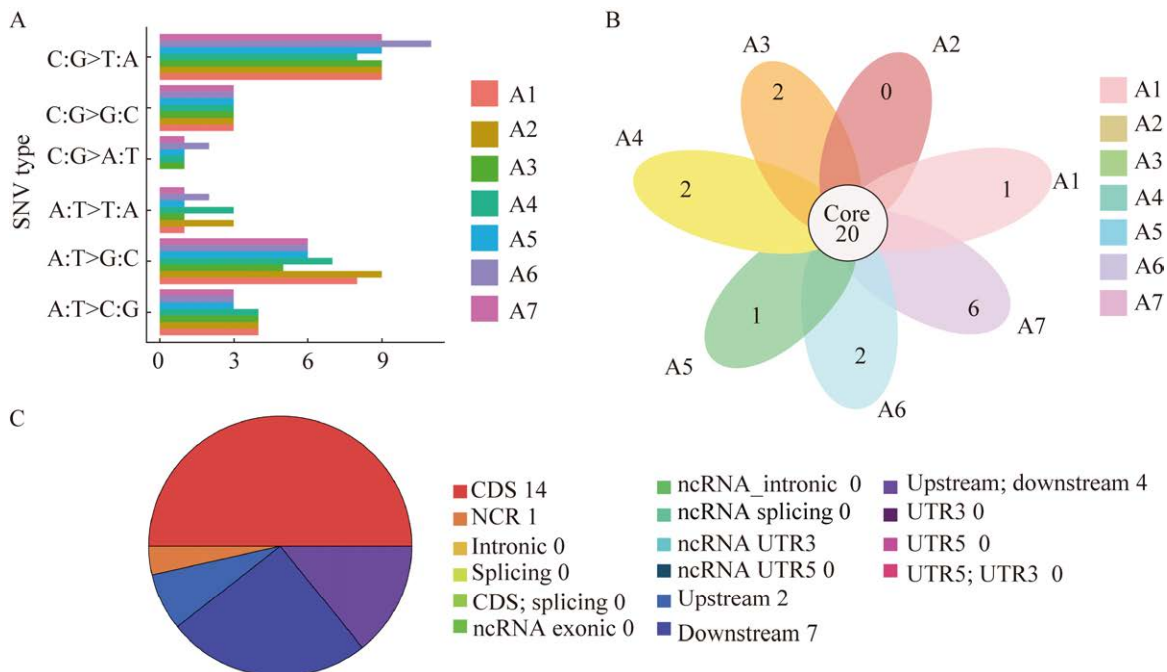


图 3 驯化菌株 *Escherichia coli* BL21 A1–A7 的基因组重测序

Figure 3 Genome resequencing of domesticated strain *Escherichia coli* BL21 A1–A7. A: The horizontal coordinate is the number of SNV sites of different mutation types. Six mutation types were classified on the ordinate axis. B: The pie chart reflects the proportion of functional regions distribution of mutation sites on the genome. Different colors represent different functional regions of the genome, which can be divided into 16 functional regions. C: Different circles in the Venn diagram represent different samples, and the numbers in the diagram represent the number of mutations unique to each sample or shared between samples.

如表 4 所示, 重测序菌株单核酸位点变异在变异菌株平均值达到 23–28 个, 位于编码区的突变基因达到 11 个。在 7 个驯化菌株中, 共鉴定出 175 处单核酸位点差异(SNV), 其中 31 处变异为非同义突变, 44 处为同义突变。对突变基因进行功能分析, 在 16 个不同的基因中发现了 74 处无义突变, 其中无义突变的基因包括谷氨酸脱羧酶、转座酶、延伸因子以及 VI 型分泌系统分泌蛋白等。同时在所有位点突变的基因中发现 *dnaE*、*yhjH*、*rzoD* 这 3 个基因出现的频率较高, 推测这 3 个基因很有可能为抗噬菌体的关键基因。

dnaE 负责复制和修复所有基于生物体中发现的外源 DNA, *dnaE* 的远端突变会破坏 DNA 链定向合成, 并影响外切酶活性^[22], 先前已有的文献指出 *dnaE* 与多个噬菌体的复制相关联, 研究者们对此进行了实验论证^[23]; 基因 *yhjH* (编码磷酸二酯酶)环磷酸二酯酶, *yhjH* 与细菌生物膜的形成有关^[24], 生物膜中存在各种生物大分子如脂多糖、脂蛋白, 它们是噬菌体的主要受体蛋白^[21]; *rzoD* 与少数大肠杆菌生物膜的形成有关^[25]。发生位点突变的基因名称、基因功能以及氨基酸突变位点信息如表 5 所示。

表 5 位点突变相关基因信息

Table 5 Locus mutation-related gene information

Gene	Name	Function	Mutant amino acid
<i>dnaE</i>	DNA polymerase III subunit alpha	A protein composed of multiple subunits that is the primary replicase for the synthesis of new DNA strands	I171L
<i>yhjH</i>	Cyclic phosphodiesterase	Hydrolyzed intracellular second messenger cGMP	A151V
<i>rzoD</i>	A putative prophage protein	Binding to recessive phage mRNA via CRISPR-Cas	A2V
<i>tuF</i>	Elongation factor	Protein factor that promotes polypeptide chain extension during mRNA translation	G318G
<i>vgrG</i>	The type VI secretory system secretes proteins	Multi-function, multi-component transmembrane channel structure	T47T
<i>gadB, gadA</i>	Glutamic acid decarboxylase	Glutamic acid is converted to aminobutyric acid	D71D, T166T
<i>insB</i>	IS1 family proteins	Adenine-related proteins	M48L
<i>mpaA</i>	Specific zinc carboxypeptidase	As part of the catabolic pathway of peptidoglycan-derived peptides in gamma-protein bacteria	T208T
<i>nuoE</i>	Quinone oxidoreductase subunit	The main sodium pump in aerobic pathogens	C27T
<i>InI1</i>	Transposase	DNA binding	Q45Q
<i>mobB</i>	Molybdenum protein guanine dinucleotide biosynthetic protein	GTP binding	S23R
<i>secA</i>	Iron complex transport system ATP-binding protein	ATP binding	Q65X

2.4 菌株构建及生长曲线的测定

为了验证突变基因的功能，构建过表达菌株、位点突变菌株及敲除菌株。如图 4 所示，根据引物的设计以及基因的长度，表明 BC1–BC11 菌株的成功构建。同时对过表达菌株进行 SDS-PAGE 分析，如图 5 所示，不同分子量的蛋白表明过表达菌株 BC1–BC6 以及

BC11 的成功表达。

对过表达菌株 BC4–BC6 进行生长曲线的测定，结果如图 6 所示，过表达菌株与对照菌株 BL21 的生长曲线大致相似，表明突变基因的表达并不影响大肠杆菌的生长状态。与对照菌株相比，过表达菌株 BC4–BC6 的延迟期、对数期、稳定期在时间上相差无异，BC5 生长速度

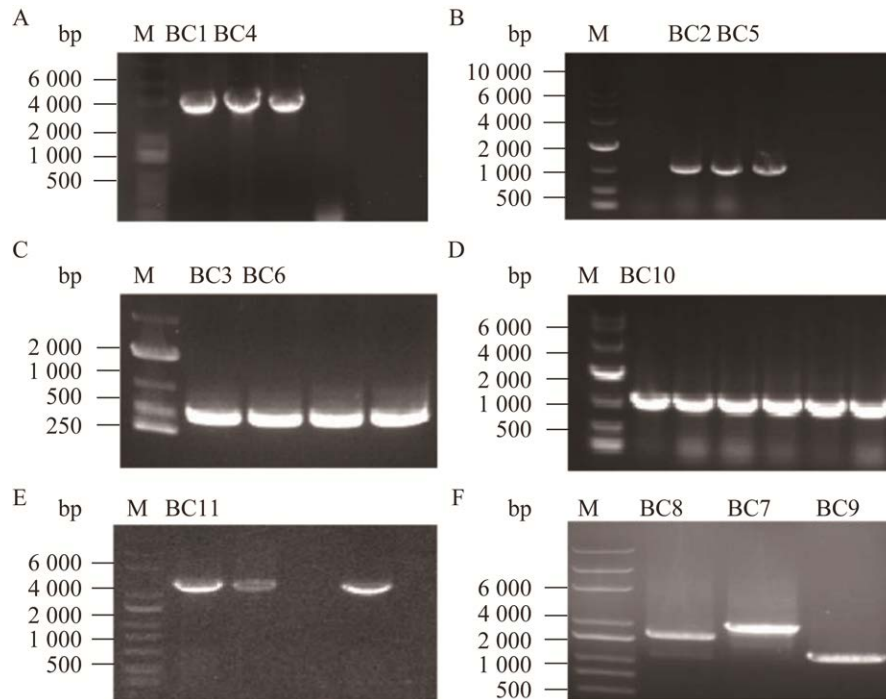


图 4 菌株构建图

Figure 4 Strain construction map.

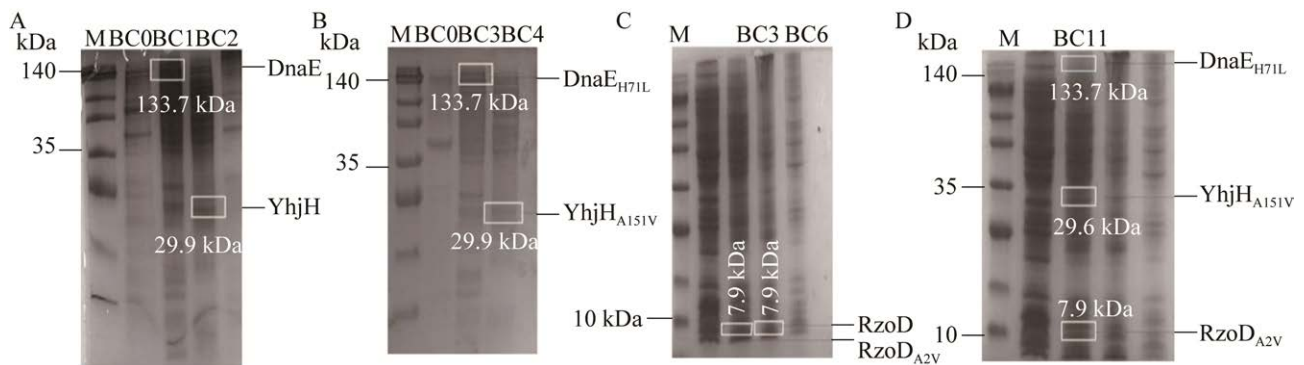


图 5 过表达菌株 SDS-PAGE 分析

Figure 5 SDS-PAGE analysis of overexpressed strains.

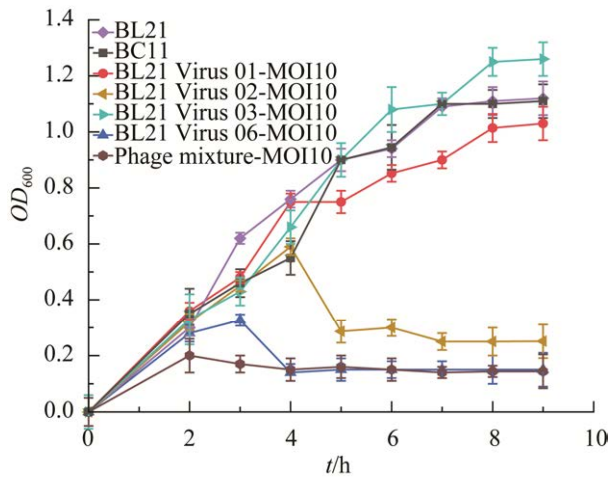


图 6 敏感菌株与抗性菌株的生长曲线对照图
 Figure 6 Growth curves of sensitive and resistant strains. Error bar: Represent bias analysis, with data from three data duplications.

较快于 BC4、BC6，猜测由于 *yhjH* 基因参与调节细菌运动与生物膜的形成有关^[26]。过表达菌株在 6–8 h 后进入稳定期生长。但敲除基因 *rzoD* 的菌株 BC10 的生长速度迟滞于对照菌株，可能是 *rzoD* 基因缺失影响细胞生物膜活性，进而降低细胞的生长速度^[27]。

2.5 抗噬菌体关键基因的验证

为了验证突变的基因是否具有抗性功能，研究通过原核基因的克隆表达以及构建位点突变菌株，在菌体生长的对数期进行噬菌体侵染实验验证菌株敏感性。如图 7 噬菌体侵染实验结果所示，对照菌株大肠杆菌 BL21、BC1、BC2、BC3 形成清晰透明的噬菌斑，BL21 Virus 01 侵染 BC4–BC9 无清晰透明噬菌斑的出现，表明 *dnaE*_{H171L}、*yhjH*_{A151V}、*rzoD*_{A2V} 基因的突变能抵御噬菌体 BL21 Virus 01 的侵染。BL21 Virus 02 侵染 BC1–BC9 形成清晰可见的噬菌斑，表明 *dnaE*_{H171L}、*yhjH*_{A151V}、*rzoD*_{A2V} 基因的突变不能抵御噬菌体 BL21 Virus 02 的侵染。BL21 Virus 03 侵染 BC6、BC9 形成清晰可见噬菌斑，表明 *rzoD*_{A2V} 基因的突变不能抵御噬菌体

BL21 Virus 03 的侵染。BL21 Virus 06 侵染 BC6 形成模糊透明圈，推测模糊噬菌斑的形成与噬菌体的浓度/裂解能力有关。T1 侵染菌株 BC4、BC7 未形成清晰可见的噬菌斑，表明 *yhjH* 基因的突变可以抵御噬菌体 T1 的侵染，T7 侵染 BC5、BC8 未形成清晰可见的噬菌斑，表明 *dnaE* 基因的突变可以抵御噬菌体 T7 的侵染。综上所述，BC4、BC7 对 BL21 Virus 01、BL21 Virus 03、T7 噬菌体具有一定抗性，BC5、BC8 对 BL21 Virus 01、BL21 Virus 03、T1 具有一定抗性，而敲除菌株 BC10 同时对检测的多株噬菌体具有相应抗性，无明显透明圈的出现，抗性范围较为明显。图 7 为抗噬菌体关键基因的噬菌体侵染实验结果图。

2.6 突变基因影响噬菌体感染的机理分析

由于构建的过表达菌株 BC4–BC6 以及基因位点突变菌株 BC7–BC9 对 BL21 Virus 01 均具有抗性，因此研究测定了噬菌体 BL21 Virus 01 对于 BC4–BC9 菌株的吸附率。结果如图 8A 所

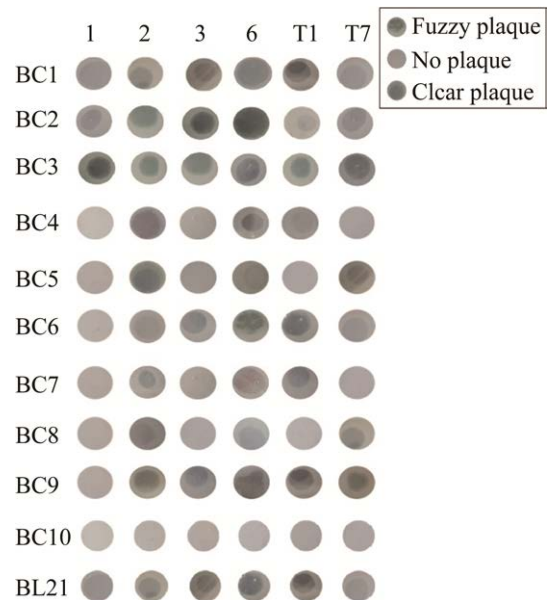


图 7 噬菌体侵染实验验证关键基因
 Figure 7 The key genes were verified by phage infection.

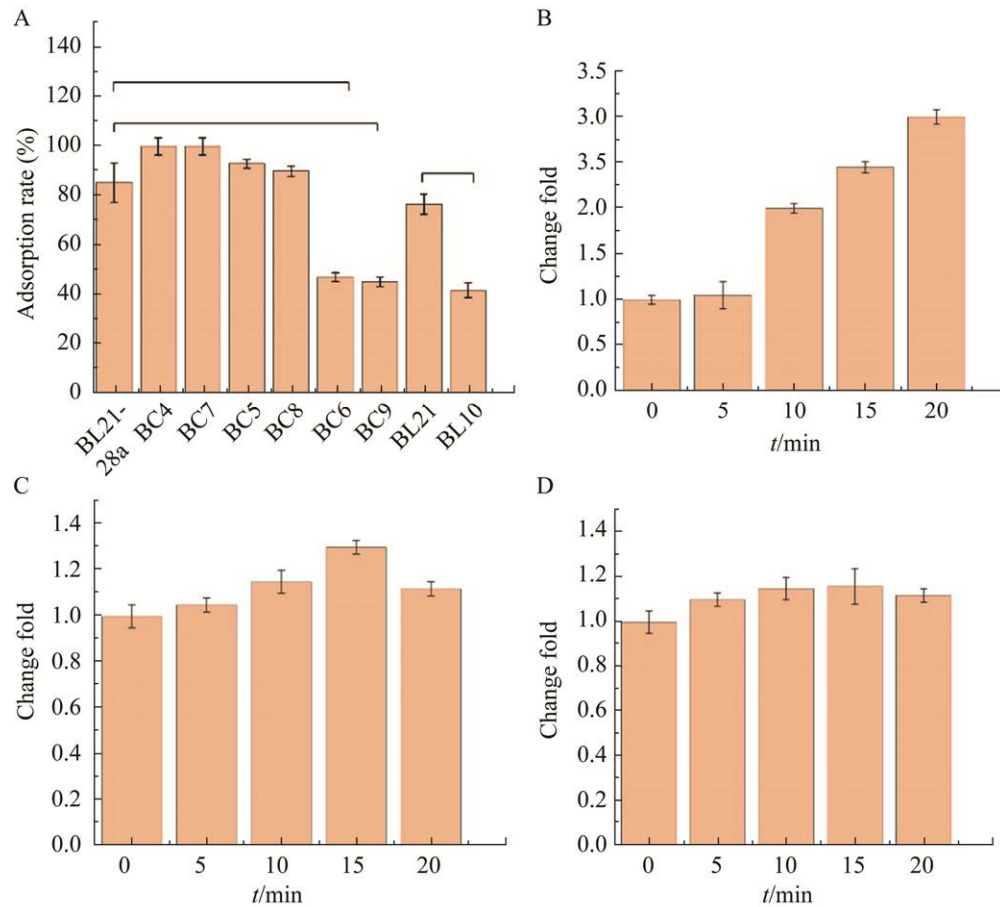


图 8 吸附率测定以及 RT-PCR 实验验证

Figure 8 The adsorption rate was determined and verified by RT-PCR. A: Determination of adsorption rates of different strains infected by BL21 Virus 01. B: Changes of DNA content in BL21 cells at different time. C: Changes of DNA content in BC7 cells at different time. D: Changes of DNA content in BC8 cells at different time. Error bar: Represent bias analysis, with data from three data duplications. *: The difference is significant at $P \leq 0.05$.

示，噬菌体 BL21 Virus 01 对大肠杆菌 BL21 吸附率达到 85%，对大肠杆菌 BL21/pET28a 吸附率达到 80%。BC4、BC5、BC7、BC8 与大肠杆菌 BL21/pET28a 相比，吸附率无明显变化，表明 *dnaE* 和 *yhjH* 的位点突变不影响噬菌体 BL21 Virus 01 的吸附。而菌株 BC6、BC9、BC10 吸附率分别为 45%、43%、41%，与对照组相比，吸附率显著下降，表明 *rzoD* 基因的突变影响噬菌体的吸附，进而影响噬菌体的侵染。

为了进一步确定基因 *dnaE* 和 *yhjH* 突变对噬

菌体侵染的影响，使用逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 实验验证噬菌体 BL21 Virus 01 基因组的复制。对照组结果如图 8A 显示，与 0 时相比，噬菌体 BL21 Virus 01 侵染大肠杆菌 BL21 在 10、15 和 20 min 时 DNA 的含量显著上升。实验组结果如图 8C、8D 显示，与 0 时相比，噬菌体 BL21 Virus 01 侵染菌株 BC7、BC8 在 5、10、15 和 20 min 时间点 DNA 的含量几乎无明显差异，表明 *dnaE* 和 *yhjH* 位点突变影响噬菌体 BL21 Virus 01 DNA 的复制过程，进而影响噬菌

体的侵染。Guinta D 和 Hay N 的研究结果表明, 大肠杆菌噬菌体 N4 和 P1 的复制过程需要宿主细胞的 *dnaE* 参与^[23-28], 与 *dnaE* 位点突变菌株影响噬菌体 BL21 Virus 01 复制结果一致。因此推测 *dnaE* 位点突变使其丧失了复制噬菌体 DNA 的功能, 进而影响噬菌体的 DNA 复制过程。

2.7 抗性基因的表达

通过测定分析不同感染复数下噬菌体对菌株生长的影响, 实验进行了抑菌曲线的测定。菌株转接后培养 2 h 时加入噬菌体 BL21 Virus 01。如图 9A、9B 所示, 对照组生物量下降, 摇瓶中出现细胞碎片。如图 9C 所示, 菌株 BC4

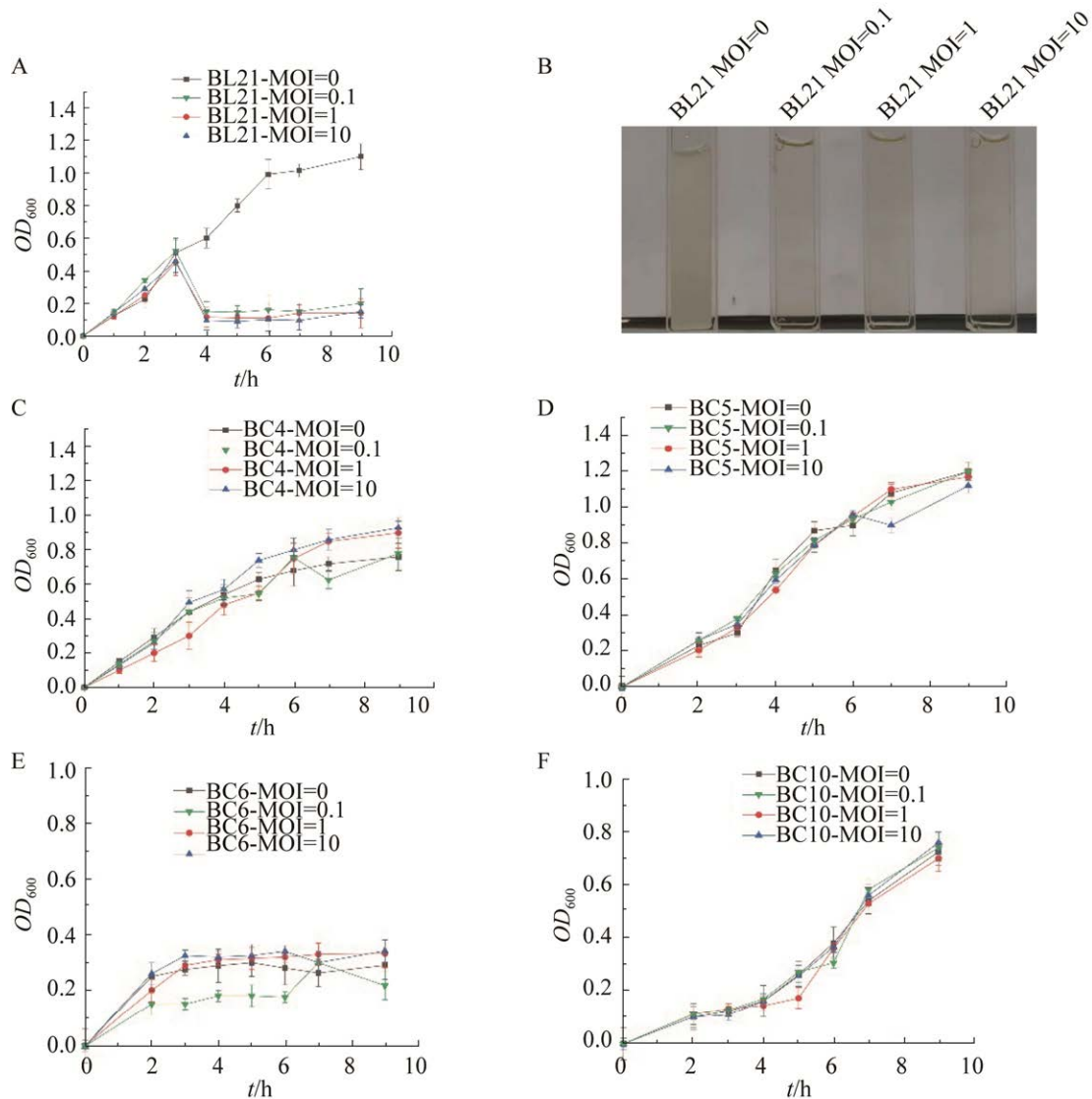


图 9 不同感染复数下菌株生长曲线变化

Figure 9 Variation of strain growth curve under different infection pluralities. A: Growth curves of BL21 with different MOI values under BL21 Virus 01 infection. B: Normal cell biomass and cell lysis. C: Growth curves of BC4 with different MOI values under BL21 Virus 01 infection. D: Growth curves of BC5 with different MOI values under BL21 Virus 01 infection. E: Growth curves of BC6 with different MOI values under BL21 Virus 01 infection. F: Growth curves of BC10 with different MOI values under BL21 Virus 01 infection. Error bar: Represent bias analysis, with data from three data duplications.

在 MOI 为 0.1、1、10 的 3 个条件下，生长曲线整体缓慢上升，生长速度整体低于对照 BL21，菌体未出现裂解状态，表明菌株 BC4 在不同感染复数下对噬菌体 BL21 Virus 01 具有一定的抗性效果。如图 9D 所示，在 3 个不同的感染复数下，菌株 BC5 生长变化未受到明显抑制，表明 BC5 对噬菌体 BL21 Virus 01 具有抗性。如图 9E 所示，在 3 个不同条件的感染复数下，菌株 BC6 与对照组相比，在加入噬菌体后，生物量呈缓慢上升的趋势，一段时间后趋于平稳且不再增长，表明菌株 BC6 对不同浓度的噬菌体 BL21 Virus 01 具有一定的抗性效果。如图 9F 所示，BC10 菌株在噬菌体 BL21 Virus 01 加入后，其生长并未受到噬菌体的抑制，表明 BC10 能在噬菌体 BL21 Virus 01 的感染下正常生长，同时对低感染复数的噬菌体 BL21 Virus 01 具有抗性。

基于上述实验基础，研究进一步构建含有 3 个位点突变基因的过表达工程菌株 BC11，为了测试其对 4 株噬菌体 BL21 Virus 01-06 的抗性能力，选取感染复数为 10 (MOI=10) 的条件进行抑菌曲线的测定。如图 10 所示，在菌株转接 2 h 时分别加入 BL21 Virus 01-06 四种噬菌体，2-8 h 内对照组 BL21 出现裂解状态，生物量下降，工程菌株 BC11 在噬菌体 BL21 Virus 01 (MOI=10)、BL21 Virus 03 (MOI=10) 的感染下生长状态并未受到抑制，生物量呈上升趋势，表明含有 3 个位点突变基因的过表达工程菌株 BC11 对 BL21 Virus 01、BL21 Virus 03 具有抗性作用，且抗性效果显著；加入 BL21 Virus 02、BL21 Virus 06 两种噬菌体的条件下，2-4 h 培养后呈现出不同程度的裂解状态，OD 值呈先上升再下降的趋势，证明 BC11 对 BL21 Virus 02、BL21 Virus 06 没有抗性作用，这与噬菌体侵染实验结果相一致。

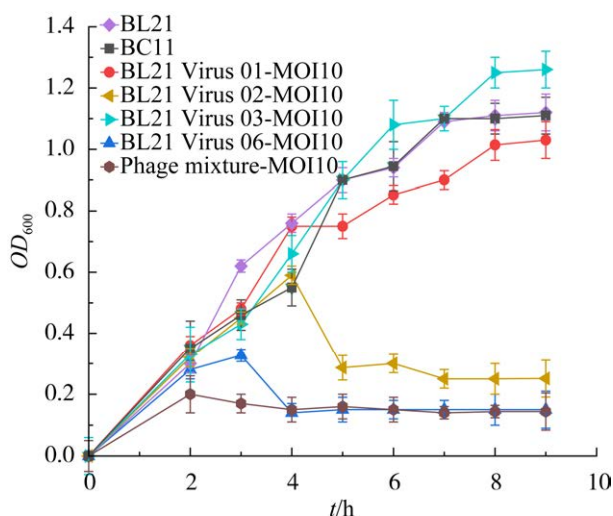


图 10 不同噬菌体在 MOI=10 感染下菌株 BC11 的生长曲线

Figure 10 Growth state of BC11 under different MOI=10 phage infection. Error bar: Represent bias analysis, with data from three data duplications.

综上所述，本研究构建的菌株经实验鉴定，BC4-BC6、BC7-BC10 以及研究后续构建的工程菌株 BC11，具有一定范围的抗噬菌体的能力，经抗性实验表征，BC11 具有抗噬菌体底盘细胞的应用价值，可用于发酵工业中工程菌株的应用。

3 讨论与结论

本研究从基本工业菌株大肠杆菌 BL21 出发，通过共进化筛选获驯化菌株 A1-A7。采用基因组的重测序，基因功能的分析等方法，挖掘了 *dnaE*、*yhjH*、*rzoD* 这 3 个基因作为抗性功能鉴定的基因，构建过表达菌株、位点突变菌株与敲除菌株用于功能鉴定；*dnaE* 在以往的研究中被指出与噬菌体 N4、P1 复制有关^[23,28]；*yhjH* 基因被指出与细菌生物膜的形成有关^[24,29]，而生物膜中存在的脂多糖、脂蛋白等物质，是噬菌体的主要受体蛋白^[21]；*rzoD* 基因的表达被证实与生物膜的活性有关^[27]，同时，敲除 *rzoD* 基因的细菌在培养状态下可能会影响自身的生长。

研究证明构建的菌株具有较广范围的抗噬菌体效果。菌株 BC4、BC5、BC6 和 BC10 对 BL21 Virus 01 具有完全抗性；菌株 BC4、BC7 对 T7 噬菌体、BL21 Virus 03，BC5、BC8 对 T1 噬菌体、BL21 Virus 03 具有完全抗性。BC10 对测试的多株噬菌体具有抗性效果。BC10 敲除菌株对不同范围内的噬菌体均有一定抗性，表明 *rzoD* 基因的敲除对噬菌体的抗性范围较广；通过吸附率实验以及 RT-PCR 推测菌株 BC4、BC5、BC6 和 BC7 干扰噬菌体的复制过程，从而抵御噬菌体的感染，发现菌株 BC9、BC10 干扰噬菌体吸附过程，同时构建的工程菌株 BC11 具有较为广泛的噬菌体抗性，达到抗噬菌体的目的。本研究为抗噬菌体底盘细胞构建提供借鉴，在发酵工业中具有潜在的应用前景。

参考文献

- [1] 孙文敬, 莫秋云, 刘长峰, 崔凤杰, 周延政, 王大明. 发酵工业噬菌体污染的来源、检测与防治[J]. 食品科技, 2013, 38(8): 323-327.
SUN WJ, MO QY, LIU CF, CUI FJ, ZHOU YZ, WANG DM. Bacteriophage in fermentation industry: sources, detection and control actions[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(8): 323-327 (in Chinese).
- [2] 秦秀娟, 雍彬, 马沁沁. 噬菌体在食品工业中的应用与危害防控[J]. 微生物学通报, 2021, 48(9): 3368-3379.
QIN XJ, YONG B, MA QQ. The application and control of bacteriophage in food industry[J]. Microbiology China, 2021, 48(9): 3368-3379 (in Chinese).
- [3] 张高娜, 刘凤芝, 张建梅, 谷巍. 发酵工业中噬菌体的防治[J]. 饲料广角, 2015(12): 34-36.
ZHANG GN, LIU FZ, ZHANG JM, GU W. Prevention and treatment of phage in fermentation industry[J]. Feed China, 2015(12): 34-36 (in Chinese).
- [4] 刘颖. 植物乳杆菌抗噬菌体 P1 菌株的筛选及其特性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2018.
LIU Y. Screening and characterization of *Lactobacillus plantarum* strain resistant to phage P1[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [5] LI P, LIN H, MI ZQ, XING SZ, TONG YG, WANG JX. Screening of polyvalent phage-resistant *Escherichia coli* strains based on phage receptor analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 850.
- [6] 齐蕊名, 于美玲, 姜艳平, 崔文, 张希, 王丽, 徐义刚, 唐丽杰, 李一经, 乔薪媛. 植物乳杆菌噬菌体 Lpla 的分离鉴定及抗噬菌体菌株的筛选[J]. 食品科学, 2019, 40(6): 194-201.
QI RM, YU ML, JIANG YP, CUI W, ZHANG X, WANG L, XU YG, TANG LJ, LI YJ, QIAO XY. Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* phage lpla and screening for phage-resistant mutants[J]. Food Science, 2019, 40(6): 194-201 (in Chinese).
- [7] 唐宁, 殷茵, 任慧英, 张灿, 刘文华. 沙门氏菌高效价宽谱噬菌体的分离纯化及生物学特性测定[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(7): 2577-2583.
TANG N, YIN Y, REN HY, ZHANG C, LIU WH. Isolation, purification and detection of biological characteristics of a high-titer and wide-spectrum *Salmonella* phage[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(7): 2577-2583 (in Chinese).
- [8] 戚家明, 杨娜, 孙彬彬, 明艳超, 郭亮, 张东旭, 徐志文. 一株具有噬菌体抗性的芽孢杆菌 BS-2 的鉴定及葡萄糖流加工艺优化[J]. 生物技术通报, 2019, 35(3): 210-216.
QI JM, YANG N, SUN SS, MING YC, GUO L, ZHANG DX, XU ZW. Identification of a *Bacillus* strain BS-2 with anti-phages and optimization of glucose feeding strategy[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(3): 210-216 (in Chinese).
- [9] 锡林高娃, 梅振宇, 任洪宝, 菅瑞珍. 一株裂解多重耐药性无乳链球菌噬菌体的分离及生物特性分析[J]. 当代畜禽养殖业, 2022(3): 3-6.
XI LGW, MEI ZY, REN HB, JIAN RZ. Isolation and biological characteristics analysis of a phage from *Streptococcus agalactiae* with multi-drug resistance[J]. Modern Livestock and Poultry Breeding Industry, 2022(3): 3-6 (in Chinese).
- [10] DY RL, RICHTER C, SALMOND GPC, FINERAN PC. Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections[J]. Annual Review of Virology, 2014, 1: 307-331.
- [11] 刘盼, 张彤, 郑义, 李庆宾, 梁泉峰, 祁庆生. 一株降解 PET 单体对苯二甲酸的施氏假单胞菌的筛选和基因组分析[J]. 微生物学报, 2022, 62(1): 200-212.
LIU P, ZHANG T, ZHENG Y, LI QB, LIANG QF, QI QS. Screening and genome analysis of a *Pseudomonas stutzeri* that degrades PET monomer terephthalate[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(1): 200-212 (in Chinese).

- [12] 郭新军. 蜂毒前溶血肽原重组质粒 pET-28a(+)-PPMel 的构建及分析[J]. 陕西农业科学, 2020, 66(5): 62-65.
GUO XJ. Construction and analysis of recombinant plasmid pET-28a(+)-PPMel for prohemolytic peptide of bee venom[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2020, 66(5): 62-65 (in Chinese).
- [13] BRYKSIN AV, MATSUMURA I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids[J]. Biotechniques, 2010, 48(6): 463-465.
- [14] CAI M, ZHAO Z, LI X, XU Y, XU M, RAO Z. Development of a nonauxotrophic L-homoserine hyperproducer in *Escherichia coli* by systems metabolic engineering[J]. Metabolic Engineering, 2022, 73: 270-279.
- [15] 张智毅, 梁子俊, 白研. 直接蓝 86 可见分光光度法测定壳聚糖的研究[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(1): 282-290.
ZHANG ZY, LIANG ZJ, BAI Y. Quantitative analysis of chitosan by visible spectrophotometry with direct blue 86 as probe[J]. China Food Additives, 2023, 34(1): 282-290 (in Chinese).
- [16] 包红朵, 朱树娇, 张辉, 周艳, 张旭晖, 庞茂达, 孙利厂, 李维, 王冉. 沙门菌噬菌体抗性菌的筛选鉴定及致病力研究[J]. 微生物学报, 2020, 60(4): 759-768.
BAO HD, ZHU SJ, ZHANG H, ZHOU Y, ZHANG XH, PANG MD, SUN HC, LI W, WANG R. Screening, identification and pathogenicity of phage-resistant strain of *Salmonella*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(4): 759-768 (in Chinese).
- [17] Chen X, Xi Y, Zhang H, Wang Z, Fan M, Liu Y, Wu W. Characterization and adsorption of *Lactobacillus* virulent phage P1[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(9): 6995-7001.
- [18] ZOU X, XIAO X, MO Z, GE Y, JIANG X, HUANG R, LI M, DENG Z, CHEN S, WANG L, LEE S Y. Systematic strategies for developing phage resistant *Escherichia coli* strains[J]. Nature communications, 2022, 13(1): 4491.
- [19] BALTZ RH. Bacteriophage-resistant industrial fermentation strains: from the cradle to CRISPR/Cas9[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 45(11): 1003-1006.
- [20] ZERBINI FM, SIDDELL SG, LEFKOWITZ EJ, MUSHEGIAN AR, ADRIAENSSENS EM, ALFENAS-ZERBINI P, DEMPSEY DM, DUTILH BE, GARCÍA ML, HENDRICKSON RC, JUNGLÉN S, KRUPOVIC M, KUHN JH, LAMBERT AJ, ŁOBOCKA M, OKSANEN HM, ROBERTSON DL, RUBINO L, SABANADZOVIC S, SIMMONDS P, et al. Changes to virus taxonomy and the ICTV Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses[J]. Archives of Virology, 2023, 168(7): 175.
- [21] 李东航. 大肠杆菌噬菌体 phi2013 的分离鉴定、基因组功能注释及受体相关基因的分析[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2021.
LI DH. *Escherichia coli* phage phi2013: Isolation, characterization, genome annotation, and analysis of receptor related genes[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science and Technology, 2021 (in Chinese).
- [22] BERGER MB, CISNEROS GA. Distal mutations in the β -clamp of DNA polymerase III* disrupt DNA orientation and affect exonuclease activity[J]. Journal of the American Chemical Society, 2023, 145(6): 3478-3490.
- [23] GUINTA D, STAMBOULY J, FALCO SC, RIST JK, ROTHMAN-DENES LB. Host and phage-coded functions required for coliphage N4 DNA replication[J]. Virology, 1986, 150(1): 33-44.
- [24] CHRISTENSEN LD, van GENNIP M, RYBTKE MT, WU H, CHIANG WC, ALHEDE M, HØIBY N, NIELSEN TE, GIVSKOV M, TOLKER-NIELSEN T. Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* foreign-body biofilm infections through reduction of the cyclic di-GMP level in the bacteria[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(8): 2705-2713.
- [25] RUEGGEBERG KG, TOBA FA, THOMPSON MG, CAMPBELL BR, HAY AG. A Q-like transcription factor regulates biofilm development in *Escherichia coli* by controlling expression of the DLP12 lysis cassette[J]. Microbiology, 2013, 159(Pt_4): 691-700.
- [26] EL MOUALI Y, KIM H, AHMAD I, BRAUNER A, LIU Y, SKURNIK M, GALPERIN M Y, RÖMLING U. Stand-alone EAL domain proteins form a distinct subclass of EAL proteins involved in regulation of cell motility and biofilm formation in *Enterobacteria*[J]. Journal of Bacteriology, 2017, 199(18): e00179-17.
- [27] RUEGGEBERG KG, TOBA FA, BIRD JG, FRANCK N, THOMPSON MG, HAY AG. The lysis cassette of DLP12 defective prophage is regulated by RpoE[J]. Microbiology, 2015, 161(8): 1683-1693.
- [28] HAY N, COHEN G. Requirement of *E. coli* DNA synthesis functions for the lytic replication of bacteriophage P1[J]. Virology 1983, 131(1): 193-206.
- [29] LI DB, ZHANG L, LIANG JH, DENG WS, WEI QJ, WANG K. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* in a novel septic arthritis model[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 724113.