

DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20230167

(研究报告)

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

摘要：【目的】噬菌体是工业发酵感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感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、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也为开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*

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

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

*Corresponding author. 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;

**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在内，

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 年刘颖等人以乳杆菌烈性噬菌体 P1 及其宿主菌 *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 Ping Li 等人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 年齐蕊名等人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 以及位点突变菌株 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 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*_{I1171L}、*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。

表 1 实验所需菌株

Table 1 Strains required for the experiment

Strains	description	Sources
<i>E. 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> _{I171L}	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> _{I171L}	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> _{I171L} <i>yhjH</i> _{A151V} <i>rzoD</i> _{A2V}	Construction of this study

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 ATCC)；通过实验纯化获得单一噬菌体：BL21 Virus

01、BL21 Virus 02、BL21 Virus 03、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 2 本研究所使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Primers sequences (5' →3')
pET28a -F	GAATTCGGATCCGCGACCCATTTG
pET28a -F	AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACC
<i>dnaE</i> -F	GGGTCGCGGATCCGAATTCATGTCTGAACCACGTTTCGTAC
<i>dnaE</i> -R	GAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAGTCAAACCTCCAGTTCC
<i>dnaE</i> _{1171L} -F	GCAACCCTTCGTTTAATTCGA
<i>dnaE</i> _{1171L} -R	GCAACCCTTCGTTTAATTCGA
<i>yhjH</i> -F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGATAAGGCAGGTTATCCAGC
<i>yhjH</i> -R	TTATAGCGCCAGAACCACCGTATTCA
<i>yhjH</i> _{A151V} -F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGATAAGGCAGGTTATCCAGC
<i>yhjH</i> _{A151V} -R	TATAGCGCCAGAACCACCGTATTCAGCGTTTCT
<i>rzoD</i> -F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGCTAAAGCTGAAAATGATG
<i>rzoD</i> -R	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCAGCCTCTCTCTGAGGGTGAA
<i>rzoD</i> _{A2V} -F	GGGTCGCGGATCCGAATTCATGCGAAAGCTGAAAATGATGC
<i>rzoD</i> _{A2V} -R	CGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCAGCCTCTCGCTGAGGGTGA
BC7-F1	ATGATCGAATTTGTTTATCCGCACACGCAC
BC7-R1	CGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGCTTCAGATTCCGGTTTACTTAATCTCGACAC
BC7-F2	CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAAATGTGCGC
BC7-R2	GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA
BC7-F3	CAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCATGTCTGAACCACGTTTCGT
BC7-R3	GCAACCCTTCGTTTAATTCGA
BC8-F1	TTAAACGTCCAGTTATTGTTCTTTTCAGAG
BC8-R1	CAGGTGGCACTTTTCGGGGAAAATGTGCGCG
BC8-F2	CGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGGCTGCCTCATTTTCCGCCTGGCTGGAC
BC8-R2	AGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCATGATAAGGCAGGTTATCCAGCGAATAA
BC8-F3	GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA
BC8-R3	TTATAGCGCCAGAACCACCGTATTCAGCGTTT
BC11-R2	TTATAGCGCCAGAACCACCG
BC11-F3	GGTGGTTCTGGCGCTATAAAAAGGAGGGAAATCATGCTAAAGCTGAAAATG
BC11-R3	TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCAGCCTCTCTCTGAGGGTGAA
RT-PCR-F	AAGTGATTCAAGTTCAGCGCCT

RT-PCR -R	GTCTCGTTGGGACTACCTAAAGGT
BC9-F1	GATAAAAGATGGTGGGCGCGATTGCCG
BC9-R1	CAGCTAACTCCTTCGTGTATTTTGCATCGA
BC9-F2	CGATGCAAAATACACGAAGGAGTTAGCTGGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG

(续表 2)

Primers	Primers sequences (5' →3')
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	ACCTGCCTTATCATGATTTCCCTCCTTTTATGTCAAAACCTCCAGTTCCAC

1.1.4 培养基及配方

实验所用培养基为 LB 培养基，配方组成为：蛋白胨(Tryptone) 10 g/L；酵母提取物(Yeast extract) 5 g/L；氯化钠(NaCl) 10 g/L。

1.2 主要仪器设备与试剂

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。

表 3 主要仪器设备与试剂

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
GI54DWS 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

1.3 噬菌体的分离与纯化

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 1 0000 r/min 下离心 10 min 去杂质，使用 0.22 μ m 无菌滤膜过滤上清除菌，吸取 500 μ L 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 $^{\circ}$ 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 μ L 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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培养。将大肠杆菌 BL21 培养至对数生长期，吸取 200 μ L 的混合噬菌体溶液(BL21 Virus 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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*_{I171L}-F、*dnaE*_{I171L}-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*_{I171L}，*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，根据诺唯赞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 h, 获得重组质粒 pET28a-*dnaE*、pET28a-*yhjH*、pET28a-*rzoD*、pET28a-*dnaE*_{I171L}、pET28a-*yhjH*_{A151V}、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*_{I171L}, *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*_{I171L}, 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*_{I171L}*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 IPTG, 16 °C 培养 10-12 h, 诱导蛋白表达。

1.8 CRISPR/CAS9 技术构建敲除菌株与位点突变菌株

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 μL, 进行平板涂布(终浓度 100 μg/mL 氨苄霉素、50 μg/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}，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(1.8kv-5ms)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：滴度(PFU/mL) = 噬菌斑数 × 稀释倍数 × 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：

$$\text{吸附率}/\% = \frac{\text{起始噬菌体滴度} - \text{未吸附噬菌体滴度}}{\text{起始噬菌体滴度}} \times 100$$

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 10⁷ 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(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 10⁹ 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。送至上海生工进行测序处理。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 MOI=0.1 的噬菌体 BL21 Virus 01，37 °C 振荡培养，以刚加入噬菌体为 0 min，每 5 分钟取 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 min、10 min、15 min、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 μ L 1 mmol/mL 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(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 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养 10 h 左右, 每隔 1 h 测定 OD_{600} ^[18, 19]。MOI 计算公式如下:

MOI=PFU(每毫升溶液中的噬菌体数量)/CFU(每毫升溶液中的细胞数量)。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的筛选与鉴定

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的最新标准(ICTV), 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: 6.01×10^{13} PFU; T1: 5.2×10^{13} PFU; T7: 2.02×10^{13} PFU。

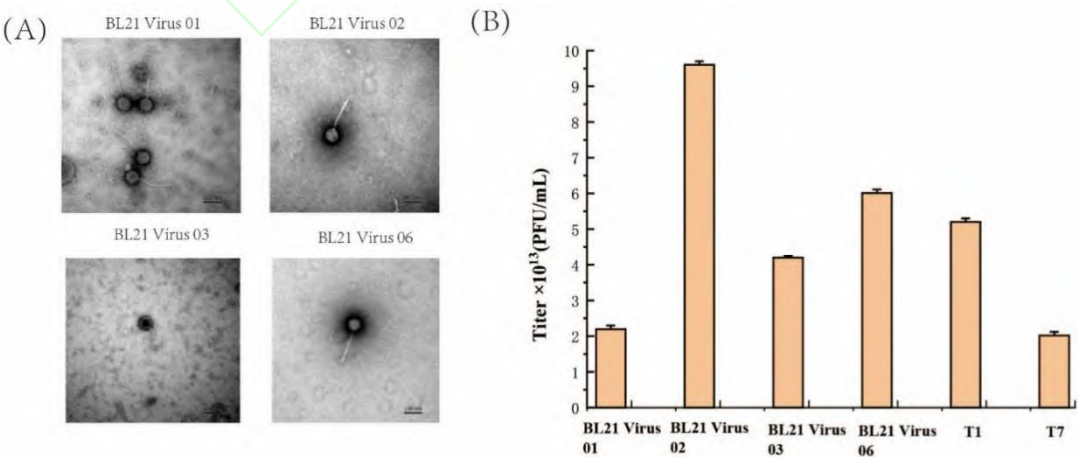


图 1 噬菌体的透射电子显微镜图片(1 0000×)与滴度显示

Figure 1 Transmission electron microscope image of phages (1 0000×) and titer display. (Error bar: represent bias analysis, with data from three data duplications)

2.2 驯化菌株的分离与鉴定

如图 2A 示意图所示,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 *E. coli* BL21 A1-A7。对驯化菌株 *E. coli* BL21 A1-A7 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。

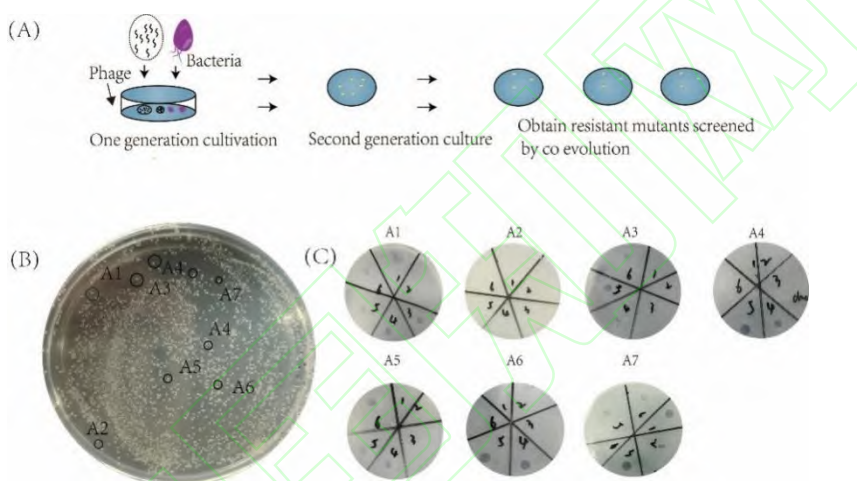


图 2 驯化菌株的筛选以及敏感性验证

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

2.3 驯化菌株基因组重测序与基因功能分析

为了进一步筛选驯化菌株中的抗性基因,对 *E. coli* BL21A1-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 $\geq 200X$, 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 UnifiedGenotyper 模块进行 SNV(单碱基突变)/InDel(插入或缺失突变)的检测,

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/985124001240011113>