

CRISPR-Cas9 系统介导的大肠杆菌抗 T7 噬菌体基因编辑策略及抗性机制研究

张展搏 范正伟

山东省实验中学国际部, 山东济南, 250000;

摘要: 设计靶向 *mcr-1* 基因的 sgRNA, 构建 pCas9-sgRNA 单质粒载体, 结果显示, 敲除株在 *mcr-1* 片段处未检出条带, 成功构建单质粒系统; 黏菌素 MIC 从 4 μ g/mL 降至 0.25 μ g/mL; 感染 T7 噬菌体 2h 后, 敲除株存活率为 67.6%, 显著高于对照组和阴性对照株; *ompC* 表达量下调 42%, *recA* 表达量上调 2.3 倍。单质粒介导系统可高效清除 *mcr-1* 并恢复黏菌素耐药性, 其抗 T7 噬菌体机制可能与宿主受体修饰及应激通路相关, 为耐药菌治理和抗噬菌体菌株构建提供了新策略。

关键词: CRISPR-Cas9; 大肠杆菌; *mcr-1* 基因; T7 噬菌体

Research on the CRISPR-Cas9 System-Mediated Gene Editing Strategy for Bacterial Resistance to T7 Phage and Its Resistance Mechanism

Zhang Zhanbo Fan Zhengwei

International Department of Shandong Experimental High School, Jinan, Shandong, 250000:

Abstract: Design sgRNA targeting the *mcr-1* gene and construct the pCas9-sgRNA plasmid vector. The results showed that no band was detected at the *mcr-1* fragment in the knockout strain, and the single plasmid system was successfully constructed. The MIC of colistin decreased from 4 μ g/mL to 0.25 μ g/mL ($P < 0.01$). After 2 hours of infection with T7 phage, the survival rate of the knockout strain was 67.6%, significantly higher than that of the control group and the negative control strain ($P < 0.001$). The expression level of *ompC* was down-regulated by 42%, and the expression level of *recA* was up-regulated by 2.3 times ($P < 0.05$). The single plasmid-mediated system can efficiently eliminate *mcr-1* and restore colistin resistance. Its anti-T7 phage mechanism may be related to host receptor modification and stress pathways, providing a new strategy for the treatment of drug-resistant bacteria and the construction of anti-phage strains.

Keywords: CRISPR-Cas9; *Escherichia coli*; *mcr-1* gene; T7 phage

DOI: 10.69979/3029-2808.25.11.035

大大肠杆菌是重要的模式菌株和工业底盘细胞, 面临两大挑战: 一是黏菌素耐药性基因 *mcr-1* 全球传播引发严重公共卫生危机^[1]。二是 T7 噬菌体烈性感染导致宿主裂解, 使产量骤降^[2]。CRISPR-Cas9 系统是第三代基因编辑技术, 具有编辑效率高及载体构建易等特点^[3]。单质粒介导系统通过整合 Cas9 基因与 sgRNA 表达盒, 避免了多质粒共转化兼容性问题, 更适用于工业菌株改造^[4]。CRISPR-Cas9 系统作为原核生物的适应性免疫系统, 既能靶向敲除耐药基因, 也可识别外源噬菌体 DNA, 成为解决上述问题的理想工具^[5]。

本研究整合 *mcr-1* 基因与抗 T7 噬菌体, 通过设计靶向噬菌体关键功能基因的 sgRNA, 构建兼具黏菌素耐药性与 T7 噬菌体抗性的工程菌, 实现耐药性逆转与噬菌体抗性的协同调控, 解析单质粒介导的双重抗性机制, 揭示单质粒介导系统在原核生物中抵御多重威胁的潜在功能, 为肠道微生物工程提供新的技术路径。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株和质粒

本研究所使用或构建的菌株及质粒列于表 1 中。

表 1: 本研究使用的菌株和质粒.

菌株和质粒	特征	来源
菌株		
大肠杆菌 DH5α	大肠杆菌克隆菌株	实验室储存
大肠杆菌 ST131-mcr-1	临床分离株携带 mcr-1 耐药基因	实验室储存
大肠杆菌 ATCC25922	大肠杆菌野生型菌株	ATCC
T7 噬菌体	ATCC 编号: 11303-B1	ATCC
质粒		
pUC19	Ampr, 克隆载体	实验室储存
pCas9-sgRNA	Kanr, 携带 SpCas9 基因, sgRNA 表达盒	本研究构建

1.2 靶向 mcr-1 基因的单质粒系统构建

通过 CRISPR 工具筛选 mcr-1 基因编码区特异性靶点, 合成含保护性碱基的互补序列。

用 EcoRI/BamHI 双酶切 pCas9 载体, 将 sgRNA 双链与线性化载体连接, 构建成重组质粒。将重组质粒转化至 DH5 α 感受态细胞中, 对阳性克隆进行测序验证。

1.3 mcr-1 基因敲除与黏菌素敏感性检测

制备分离菌株感受态细胞, 将构建质粒转化至感受态细胞, 提取基因组 DNA。根据 mcr-1 基因序列, 运用 Primer Premier5.0 设计引物, 进行 PCR 扩增, 电泳验证。

采用肉汤稀释法测定 MIC, 将敲除株、野生型菌株及空载体对照菌分别接种于含不同浓度黏菌素 (0.0625 ~8 μg/mL) 的 LB 培养基, 37℃振荡培养 18h。

1.4 抗 T7 噬菌体实验设计

对照组、实验组、Cas9 阴性对照株 (携带 pUC19) 感染后 2h 取样, 梯度稀释涂布 LB 平板, 计算活菌数 (CFU/mL), 存活率=(感染组活菌数/对照组活菌数)×100%。

1.5 统计与分析

本研究使用 SPSS26.0 软件对实验数据进行统计与分析, 组间差异用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 单质粒介导系统构建

测序结果显示, 靶向 mcr-1 基因的 sgRNA 序列与设计一致, 没有出现碱基突变或缺失等异常, 证明针对 mcr-1 基因的单质粒介导系统构建成功 (图 1)。

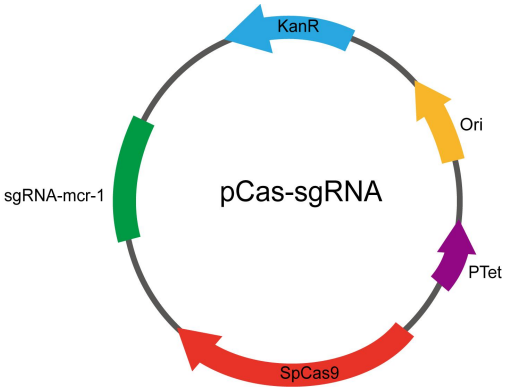


图 1: pCas9-sgRNA 载体构建。

2.2 mcr-1 特异性消除及黏菌素耐药性恢复

电泳图显示, pCas9-sgRNA 转化的 20 个菌落均未扩增出 mcr-1 片段, 而 pUC19 转化的菌落扩增出 mcr-1 片段, 从而实现了 mcr-1 的有效消除 (图 2A)。黏菌素 MIC 检测结果表明, 敲除株对黏菌素的 MIC 值显著低于野生型, 差异具有统计学意义 (P<0.01, 图 2B), 证实 mcr-1 基因消除后, 大肠杆菌对黏菌素耐药性恢复。

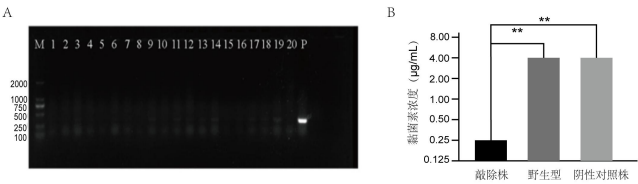


图 2. mcr-1 特异性消除及黏菌素耐药性恢复。A. mcr-1 的特异性消除。M: Marker; 1~20: pCas9-sgRNA 转化; P: pUC19 转化。B. 黏菌素 MIC 测定。

2.3 大肠杆菌抗 T7 噬菌体能力

存活率统计表明, 敲除株感染 T7 噬菌体 2h 后存活率为 67.6%, 显著高于对照组菌株的 13.5%和阴性对照株的 36.1% (P<0.001, 图 3), 表明单质粒介导系统对噬菌体抗性的增强作用具有时间依赖性。

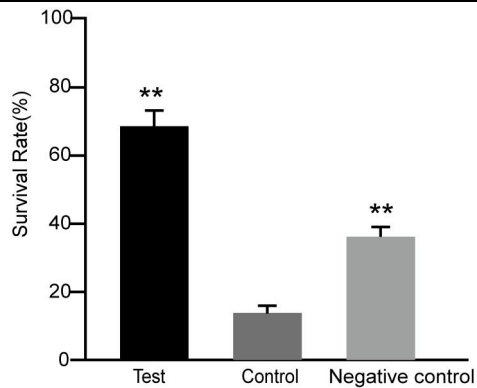


图 3: 抗 T7 噬菌体实验存活率统计 (n=3, 误差线为±SD, **表示 $P<0.001$)。

2.4 抗性相关基因表达分析

本研究选取 *ompC*、*recA* 探究 CRISPR-Cas9 系统介导的大肠杆菌抗 T7 噬菌体的抗性机制, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测基因表达水平。结果显示, 敲除株中 *ompC* 基因表达量较对照组下调 42%, *recA* 基因表达量上调 2.3 倍, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$, 图 4)。CRISPR-Cas9 系统介导的基因编辑对抗性相关基因的表达产生了显著影响。

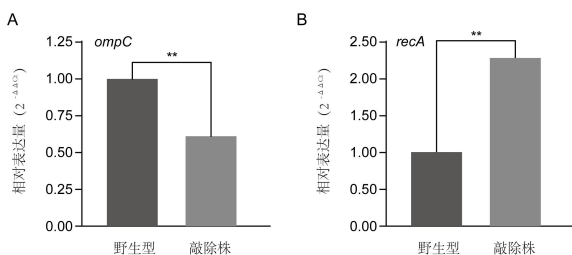


图 4: 宿主基因表达分析。A. *ompC* 相对表达量; B. *recA* 相对表达量, **表示 $P<0.05$ 。

3 讨论

3.1 单质粒介导系统对 *mcr-1* 基因消除的有效性

本研究成功利用 CRISPR-Cas9 系统构建了针对 *mcr-1* 基因的单质粒介导系统, 并有效且特异性地消除了黏菌素耐药大肠杆菌中的 *mcr-1* 基因, 恢复其对黏菌素的耐药性。与双质粒系统相比, 单质粒设计避免了多载体转化的效率瓶颈^[6]。

3.2 抗 T7 噬菌体的潜在机制解析

敲除株抗噬菌体能力的增强与 *ompC* 表达下调和 *recA* 表达上调相关, 可能是受体介导的吸附抑制, *ompC* 表达下降可能减少噬菌体结合位点, 降低感染效率^[7]。还可能是应激通路激活的防御反应, *recA* 基因参与 SOS

应激反应, 其上调可能促进 DNA 修复或抑制噬菌体基因组整合^[8], 协同增强宿主防御能力。

4 结论

本研究成功使用 CRISPR-Cas9 构建针对 *mcr-1* 基因的单质粒介导系统, 特异性消除黏菌素耐药大肠杆菌的耐药基因, 恢复其药物敏感性。该系统可显著增强大肠杆菌对 T7 噬菌体的抗性, 间接证据表明宿主受体基因表达调控是重要抗性机制。研究结果为耐药菌治理和抗噬菌体菌株构建提供了高效工具, 拓宽了 CRISPR-Cas9 系统在肠道微生物工程中的应用。

参考文献

- [1] 刘智慧. 多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 的流行病学调查及不同药敏试验的方法学比较[D]. 福建医科大学, 2021.
- [2] 谢雨虹, 等. 噬菌体治疗耐药菌肺部感染的研究进展[J]. 海南医学, 2024, 35(22): 3340-3344.
- [3] 程洲华. 面向环境微生物的 CRISPR 基因编辑工具的功能拓展和环境应用[D]. 中国科学技术大学, 2023.
- [4] 丁弈丹, 等. CRISPR-Cas9 基因编辑技术在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 激光生物学报, 2022, 31(06): 488-497.
- [5] 唐欣悦, 等. 伴侣动物源细菌质粒介导的黏菌素耐药机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2023, 44(01): 117-121.
- [6] 朱恬仪, 等. CRISPR/Cas9 介导的 *adeG* 基因敲除大肠杆菌细菌模型的建立[J]. 生物技术通报, 2024, 40(02): 55-64.
- [7] 马月龙, 等. 外膜蛋白 *ompC* 过表达提高大肠杆菌对庆大霉素敏感性研究[J]. 福建农业科技, 2022, 53(12): 21-25.
- [8] 黄雁, 等. 嗜水气单胞菌 *RecA* 和 *Gap-2* 作为内参蛋白的评价[J]. 大连工业大学学报, 2021, 40(06): 391-395.

第一作者: 张展博, 2008. 4. 6, 男, 汉族, 山东济南人, 高中, 研究方向: 微生物方向, 山东省实验中学国际部
第二作者: 范正伟, 1987. 11. 14, 女, 汉族, 山东泰安人, 硕士研究生, 中级工程师, 研究方向: 细胞生物学, 山东省实验中学国际部。