

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 片段处未检测出条带，成功构建单质粒系统；黏菌素 MIC 从 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ 降至 $0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ ；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 $4\mu\text{g}/\text{mL}$ to $0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P<0.01$). 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）。

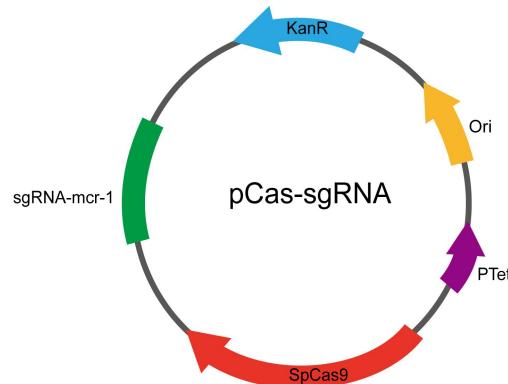


图 1：pCas9-sgRNA 载体构建。

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。

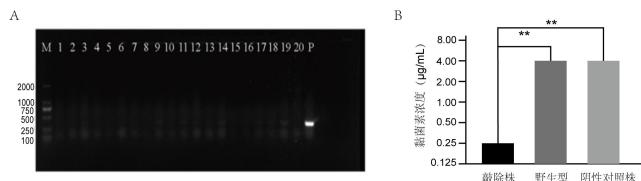


图 2. mcr-1 特异性消除及黏菌素耐药性恢复。A. mcr-1 的特异性消除。M: Marker ; 1~20: pCas9-sgRNA 转化；P: pUC19 转化。B. 黏菌素 MIC 测定。

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。

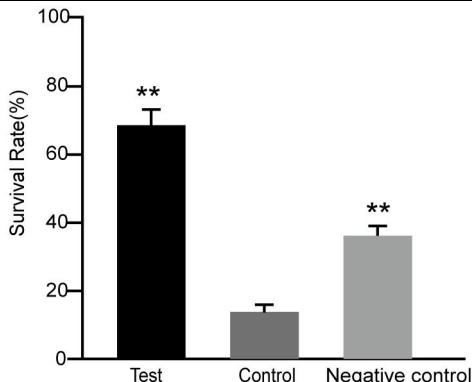


图3：抗T7噬菌体实验存活率统计（n=3，误差线为±SD，

**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。

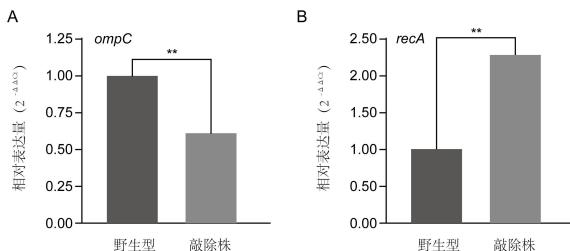


图4：宿主基因表达分析。A. ompC 相对表达量；B. recA 相对表达量，**表示P<0.05。

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] 丁奔丹, 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。