

引文格式:

张和, 张新宇, 安文林, 等. 工程化噬菌体在解决细菌耐受性问题中的应用策略 [J]. 集成技术, 2021, 10(4): 17-32.

Zhang H, Zhang XY, An WL, et al. Strategies for the application of engineered phages in solving bacterial tolerance problems [J]. Journal of Integration Technology, 2021, 10(4): 17-32.

工程化噬菌体在解决细菌耐受性问题中的应用策略

张 和[#] 张新宇[#] 安文林^{*} 童贻刚^{*}

(北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029)

摘 要 细菌对抗菌药的强耐受性是临床治疗感染性疾病的一大难题, 也因此受到人们的广泛关注。细菌通过多种机制获得耐药性, 从而逃避抗菌类药物的杀灭。噬菌体是一类特异性侵染细菌等微生物的病毒群体, 近年来其在临床上耐药菌感染性疾病治疗的应用中取得了一些成效, 但随之出现的噬菌体耐受性问题使其应用受到一定的限制。该文综述了细菌耐受性, 即细菌对抗菌药的耐药性和对噬菌体的耐受性的主要机制, 以及当前合成生物学在解决细菌耐受抗生素和耐受天然噬菌体中的主要进展。

关键词 合成生物学; 噬菌体; 耐受性; 抗菌类药物

中图分类号 Q 81; Q 939.48 **文献标志码** A **doi:** 10.12146/j.issn.2095-3135.20210427014

Strategies for the Application of Engineered Phages in Solving Bacterial Tolerance Problems

ZHANG He[#] ZHANG Xinyu[#] AN Wenlin^{*} TONG Yigang^{*}

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

^{*}Corresponding Author: anwlin@163.com; tongyigang@mail.buct.edu.cn

[#]Equal Contribution

Abstract The development of bacterial resistance to antimicrobial drugs is a major challenge in the clinical treatment of infectious diseases and has received widespread attention. Bacteria acquire resistance through a variety of mechanisms to evade killing by antimicrobial drugs. Phage is a generic term for bacteriophage that infects microorganisms such as bacteria, fungi, actinomycetes or spirochetes. Its application in the treatment of infectious diseases with drug-resistant bacteria in clinical settings has achieved some success

收稿日期: 2021-04-27 修回日期: 2021-05-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFA0903000); 国家自然科学基金项目(81572045, 81672001, 81621005, 31900489); 中央高校基础研究经费和中日友好医院生物医学转化研究项目(PYBZ1820); 国家科技重大专项项目(2018ZX10201001)

作者简介: 张和(共同第一作者), 学士; 张新宇(共同第一作者), 学士; 安文林(通讯作者), 特聘研究员, 研究方向为合成生物学、病毒学和外泌体工程, E-mail: anwlin@163.com; 童贻刚(通讯作者), 教授, 博士研究生导师, 研究方向为合成生物学、病毒学和生物安全, E-mail: tongyigang@mail.buct.edu.cn.

in recent years, but the ensuing problem of phage resistance has limited its application. This paper reviews the main mechanisms of bacterial drug resistance and phage resistance, and the main current advances in synthetic biology in addressing bacterial resistance to antibiotics and resistance to natural phages.

Keywords synthetic biology; bacteriophage; tolerance; antibacterial drug

Funding This work is supported by National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903000), National Natural Science Foundation of China (81572045, 81672001, 81621005, 31900489), Fundamental Research Funds for the Central Universities and Research Projects on Biomedical Transformation of China-Japan Friendship Hospital (PYBZ1820), National Science and Technology Major Project (2018ZX10201001)

1 引 言

由于抗菌类药物的长期使用, 细菌进化出多种对抗药物作用的机制, 甚至部分细菌产生多重耐药现象, 这大大降低了抗菌类药物的药效, 使得细菌感染性疾病的治疗变得愈发困难, 同时也增加了治疗成本。随着细菌耐药性问题的日趋严重, 噬菌体凭借其生理学特性可考虑作为对抗耐药病原菌的方法之一。噬菌体是感染细菌、真菌等微生物的病毒总称, 在土壤、水体、空气及生物体内广泛存在, 因其部分能引起宿主菌的裂解, 故称其为噬菌体。自噬菌体被发现以来, 其凭借基因组较小、繁殖速度快等^[1-2]优点, 成为遗传调控等方面的生物学基础研究和基因工程中的重要材料或工具, 推动着生物学众多领域的发展。合成生物学是一门新兴学科, 它通过对现有生命体进行人工改造, 使其产生预定的功能, 甚至能够创造出全新的生命体^[3]。

但由于噬菌体与细菌相互作用产生共同进化, 针对噬菌体的感染进化出多种抗感染机制, 即产生抗噬菌体致病菌, 进而限制了噬菌体疗法的应用; 同时, 噬菌体对宿主菌识别和裂解的特异性限制了其作为抗菌药物的应用, 因此寻找或改造得到广谱裂解性噬菌体十分有必要。其中, 可以利用人工改造噬菌体获得特定裂解谱的人工

噬菌体。利用逐渐兴起的合成生物学方法和技术改造现有噬菌体, 或合成全新的噬菌体, 可以对现有噬菌体优势特性进行加强, 同时对其不足之处进行弥补, 从而解决目前噬菌体应用过程中存在的一些难题^[4-5], 进一步推动噬菌体工程化及应用化的进程。

2 合成生物学用于噬菌体改造的方法

2.1 基因组编辑

基因编辑是一种能够较为精准地对不同生物体内基因组特定位置进行改造和修饰的新兴基因工程技术。随着该技术的不断发展, 锌指核酸酶(Zinc-Finger Nucleases, ZFN)^[6]、类转录激活因子效应物核酸酶(Transcription Activator-Like Effector Nuclease, TALEN)^[7]、成簇的规律间隔的短回文重复序列(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)^[8]、单碱基编辑(Base Editor, BE)^[9]和先导编辑(PE)^[10]等技术相继被发现, 不仅为基因功能研究提供了有力的工具, 而且还为医学领域提供了新的治疗思路。尤其是近年来逐渐兴起的 CRISPR 技术, 其由于具有操作简单方便、打靶精确等众多优点, 被广泛应用于生物学领域。

CRISPR-Cas 系统是由负责识别靶序列

的 CRISPR 元件和切割靶序列的 Cas (CRISPR-Associated Proteins) 蛋白组成。CRISPR 序列经转录和加工变为成熟的 crRNA, 接着其主动靶向目的片段, 与目的片段结合后, Cas 蛋白便行使切割功能, 切断目的 DNA 双链, 使基因产生特定的双链缺口 (Double-Strand Breaks, DSBs)。此时, 生物体内在应激状态下会开启两种主要修复机制, 即同源重组 (Homology-Directed Repair, HDR)^[11] 和非同源末端连接 (non-Homologous End Joining, NHEJ)^[12], 可利用修复过程中插入片段或定点突变实现基因编辑。

噬菌体中存在大量未知功能的基因, 使得相应的基础研究与合成新噬菌体存在很多难题, 而使用上述技术则可以在一定程度上解决这些问题。目前在噬菌体基因组编辑方面也取得了一些成果。例如: 2017 年, Tao 等^[13] 将含有 CRISPR 序列和 Cas 蛋白对应的基因序列的重组质粒导入大肠杆菌中, 达到了对 T4 噬菌体基因组进行编辑的目的; 2019 年, Hoshiga 等^[14] 利用 CRISPR 基因编辑技术对 T2 噬菌体尾部负责吸附宿主菌的受体结构进行改造, 成功修饰后使 T2 噬菌体对大肠杆菌 O157:H7 的侵染能力得到很大提升,

这有利于治疗由该种大肠杆菌感染导致的疾病。

2.2 人工合成

由于野生型噬菌体存在未知基因、易使细菌耐受、宿主范围变窄等问题, 所以其大规模应用受限。而采用近年来逐渐兴起的合成生物学方法理性设计并合成人工噬菌体, 可以在一定程度上解决该问题^[4-5, 15]。

设计、组装、拯救和检测是人工合成噬菌体的 4 个主要步骤, 如图 1 所示。(a) 设计: 在正式合成之前, 需对拟合成的噬菌体基因组进行理性设计, 而由于 DNA 化学合成技术的限制, 整个基因组序列需要分为 100 nt 左右的寡核苷酸序列。(b) 组装: 寡核苷酸序列合成后, 在聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 仪中拼接成长度为 1 000 bp 左右的 DNA 双链, 再进一步利用酵母重组平台技术将其拼接为全基因组。(c) 拯救: 利用合适的方法将全基因组导入细菌中, 使其在细菌体内包装成有活性的成熟噬菌体颗粒, 并释放到体外。(d) 检测: 测定新噬菌体的生长规律和裂解效率并对其进行评价。

利用 PCR 扩增组装 0.1~20 kb 的噬菌体基因组成功率较高。2003 年, Smith 等^[16] 成功合

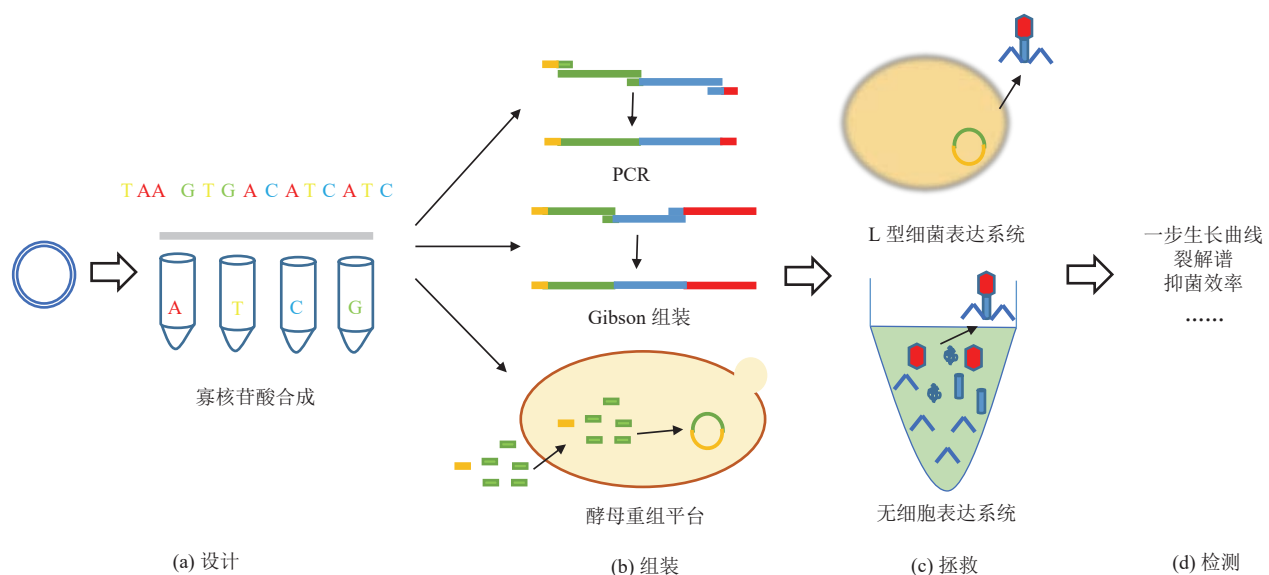


图 1 人工合成噬菌体的基本流程

Fig. 1 Graphical illustration of the basic process of synthesizing artificial phages

成了大肠杆菌 X174 噬菌体, 其基因组全长为 5 386 bp。他们先合成 42 nt 左右的寡核苷酸序列, 进一步利用 PCR 技术拼接得到全基因组, 随后利用电转的方法将全基因组导入对应的大肠杆菌中, 使其在体内包装成有活性的成熟噬菌体颗粒, 并释放到体外。当噬菌体基因组大于 20 kb 时, 在体外操作难度大, 成功率较低^[17], 而研究发现酵母可以摄取外源 DNA 片段且自身重组能力较强, 故其可作为 DNA 大片段的拼接平台^[18]。2015 年, Ando 等^[19]利用合成生物学思想, 将 T7 噬菌体中负责尾部识别的基因模块用 K11 噬菌体相应模块进行替换, 使其能够感染克雷伯菌。2017 年, Oldfield 等^[20]通过分片段合成、多片段同时优化改造的方法从头合成了单纯性疱疹病毒。

3 合成生物学工程化噬菌体的应用

3.1 解决细菌药物耐受性问题

3.1.1 细菌耐药性机制

细菌耐药性是指细菌对抗菌类药物的耐受作用。细菌一旦产生耐药性, 药物的作用效果就会大幅下降。根据发生原因的不同, 可将细菌耐药分为特异性耐药和非特异性耐药^[21]。细菌特异性耐药的主要机制有: 细菌自身产生灭活抗生素的酶, 药物作用靶点发生改变。细菌非特异性耐药主要机制有: 细菌形成生物被膜对自身进行保护, 细菌外排泵对药物的主动外排作用^[22]。

(1) 细菌特异性耐药机制

在细菌体内由某些质粒或染色体表达产生的灭活酶使抗菌类药物失活是耐药性产生的重要原因。例如: 表达产生的 β -内酰胺酶通过破坏 β -内酰胺环的立体结构使其失活^[23]; 细菌体内的氨基苷类抗生素钝化酶可在氨基苷类抗生素的氨基或羟基上接上乙酰基、腺苷酰基或磷酸基等基团, 使它们原有结构发生改变从而失去作用^[24]; 细菌

产生的氯霉素乙酰转移酶可使氯霉素结构改变而失活等^[25]。

抗生素需要与细菌体内的特定位点结合才能发挥作用, 因此这些抗生素结合位点对抗生素治疗而言至关重要。而研究发现, 细菌通过改变与抗生素结合的靶蛋白结构, 使抗生素的结合能力减弱甚至不能结合, 从而使得疗效显著下降。例如, 由于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*, MRSA) 青霉素结合蛋白组成比敏感菌株多一个青霉素结合蛋白 2a (PBP2a)^[26], 使其对青霉素产生严重抗性。

(2) 细菌非特异性耐药机制

细菌生物被膜是指细菌自身分泌多糖、纤维蛋白、脂蛋白等物质, 将其包裹起来形成的菌团膜状物^[27]。由于生物被膜中存在大量多糖物质, 它们带有的一定数量的电荷会形成天然屏障, 使抗生素难以进入细菌体内发挥作用, 同时被膜中还有一些水解酶类会使抗生素失活, 从而对抗生素产生抗性。再加上营养物质、氧气等在生物被膜深处的浓度较低, 使细菌处于一种对抗生素不敏感的状态, 也会使得抗生素作用减弱^[28]。

在细菌细胞膜表面存在一类具有特定结构的主动转运蛋白, 即细菌外排泵。该系统主要由通道蛋白、辅助蛋白和转运子三部分组成, 可将抗生素等物质从细胞内部排出^[29]。最开始是在根瘤菌中发现了外排泵, 后续的研究证明根瘤菌用它来转运营养物质和矿物质, 而随着抗生素的广泛应用, 研究人员在多种细菌中发现外排泵, 进一步研究发现正是外排泵的外排作用使得细菌产生多重耐药性^[30]。

3.1.2 解决方法

(1) 药物外排泵角度

外排泵对多种抗生素的外排作用是细菌产生多重耐药的主要原因之一^[31]。存在于细胞膜表面的外排泵, 能够利用腺嘌呤核苷三磷酸 (5'-Adenylate Triphosphate, ATP) 水解释放的能量或质子跨膜移动产生的能量将胞内的多种抗生

素排出, 使菌体内药物浓度降低, 从而达不到预期的治疗效果^[32]。

Chan 等^[33] 研究报道, 铜绿假单胞菌噬菌体 OMKO1 可以利用药物外排系统 MexAB 和 MexXY 的外膜孔蛋白 M (OprM) 作为受体结合位点, 以此来侵入并裂解宿主菌。长此以往, 铜绿假单胞菌便通过改变细胞膜表面噬菌体结合位点的结构来避免被噬菌体感染, 这样就会进化出对噬菌体 OMKO1 的耐受性。一旦外排泵系统中孔蛋白的结构发生改变, 它对药物的外排功能就会丧失, 对抗生素类药物的敏感性随之增强。因此, 可以再次通过抗生素来治疗铜绿假单胞菌造成的感染。该研究结果表明, 噬菌体 OMKO1 可以迫使铜绿假单胞菌在噬菌体耐受性和抗生素敏感性之间达到理想的遗传平衡, 这有利于噬菌体疗法对抗多重耐药菌。利用噬菌体驱动多重耐药菌进化增强噬菌体的耐受性, 使其对抗生素的敏感性增强。因此, 这种噬菌体疗法效果更加显著: 当噬菌体裂解宿主菌时便达到了杀菌效果; 亦或是细菌进化出噬菌体耐受性, 由于它们对抗生素的敏感性增强, 也能达到杀菌效果。

噬菌体选择在铜绿假单胞菌中产生了一种进化平衡, 细菌对噬菌体感染的耐受性进化改变了外排泵机制, 导致其对几种抗生素类药物的敏感性增强。尽管现代噬菌体治疗仍处于起步阶段, 但我们认为, 类 OMKO1 噬菌体是一种噬菌体治疗的新方法, 噬菌体对多重耐药菌发挥选择作用, 使其对传统抗生素越来越敏感。这种使用噬菌体来改造细菌外排泵的方法可以延长现有抗生素的使用寿命, 并有可能减少抗生素耐药性的产生。

(2) 生物被膜角度

细菌生物被膜可提高细菌对外界理化环境的抵抗力, 使细菌不易被抗生素或常规消毒剂杀死, 给细菌感染疾病的治疗带来极大困难。近年来, 随着对噬菌体研究的深入, 人们发现噬菌体可以有效抑制细菌生物被膜的形成以及破坏已形

成的细菌生物被膜。具体地, 可以通过 4 种方法破坏细菌生物被膜, 从而改善细菌耐药性。

①噬菌体编码的胞外多糖解聚酶降解生物被膜中的多糖成分。现已分离的某些噬菌体能够表达胞外多糖解聚酶, 该酶可以降解构成生物被膜基质的胞外多糖成分, 从而破坏生物被膜之间的连接, 降解生物被膜。Olsen 等^[34] 研究了细胞内溶素 LysK 和聚-N-乙酰葡萄糖胺解聚酶 DA7 在静态和动态模型中对葡萄球菌生物被膜的功效。结果发现, LysK 显示出对多种金黄色葡萄球菌菌株的活性, 并且低微摩尔浓度和纳摩尔浓度的 LysK 和 DA7 便可从聚苯乙烯和玻璃表面除去静态及动态生物被膜。两者组合使用时, 酶起协同作用, 可明显降低活细胞计数。总体而言, 该结果表明无论是单独使用还是组合使用, LysK 和 DA7 都是有效的抗生物被膜剂。商安琪^[35] 观察到克雷伯氏菌 K13 能够产生丰厚的荚膜多糖, 因此其专一性侵染噬菌体 P13 需产生一种多糖解聚酶先将宿主菌胞外的多糖降解, 而后同菌体细胞接触, 开始裂解过程。后续的研究发现, 噬菌体 P13 可在特定位点将胞外多糖水解, 得到大量具有特定结构的寡糖片段, 将寡糖分离纯化后解析其结构, 从而得到 K13 胞外多糖的结构, 为进一步研究胞外多糖的降解奠定了基础。

②噬菌体裂解酶破坏细胞生物被膜。噬菌体裂解酶通过与细菌被膜表面的受体结合, 进而侵染细菌并使其裂解死亡, 从而减少生物被膜的产生。宋军等^[36] 发现 MRSA 能够形成生物被膜, 且其相关感染很难根除。而噬菌体裂解酶 LysGH15 对 MRSA 生物被膜有一定的破坏作用。通过 24 孔板法培养 MRSA 生物被膜, 将裂解酶 LysGH15 作用于生物被膜, 并用结晶紫染色法测定 LysGH15 对生物被膜细菌的作用效果。结果表明, 检测的 22 株 MRSA 中, 有 16 株能够形成生物被膜, LysGH15 能够有效清除和抑制 MRSA 生物被膜。其中, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LysGH15 可以在 1 h 内

有效清除生物被膜。因此, LysGH15 具有作为新型抗菌剂应用于清除 MRSA 生物被膜和治疗相关感染的潜力。Lu 和 Collins^[37]通过基因工程的手段使大肠杆菌噬菌体 T7 在感染菌体的同时表达裂解酶 DspB, 发现其对生物被膜中细菌数量的清除率可达 99.997%, 与未表达 DspB 的噬菌体相比, 清除率有了明显提高。

③噬菌体自身裂解生物被膜内部的细菌。近年来, 随着生物成像技术的发展, 揭示了生物被膜形成的微菌落之间存在着输水通道, 具有运输养料和排泄废物的功能。而噬菌体正好可以利用生物被膜间存在的输水通道进入内部, 进而裂解生物被膜内部的细菌。Briandet 等^[38]在实验中通过使乳酸菌噬菌体 C2 带上荧光标记, 观察到 C2 可以通过输水通道进入生物被膜内部, 裂解乳酸菌, 并使得生物被膜面积减小。

④噬菌体和抗生素联合使用杀灭生物被膜内部的细菌。单独使用噬菌体和抗生素对细菌都有一定的杀灭作用, 二者联合使用则具有协同作用, 可以达到更好的效果, 能有效缓解细菌耐药和噬菌体耐受的问题。Gordillo Altamirano 等^[39]研究发现, 鲍曼不动杆菌产生的一种黏稠的外层可以保护它并阻止抗生素的进入, 从而产生耐药性。研究者们发现, 将鲍曼不动杆菌菌株 AB900 和 A9844 分别与其各自的噬菌体 Φ FG02 和 Φ CO01 共培养, 能够观察到噬菌体耐受型的菌株出现。扫描电子显微镜分析表明, 野生型的菌株表面有生物被膜的存在, 而在突变型菌株表面没有发现。同时, 比较突变型菌株和野生型菌株的基因组发现, 突变型菌株基因组的 K 位点发生单核苷酸缺失, 而鲍曼不动杆菌 K 位点的基因正是调控荚膜多糖的产生、修饰和输出。因此这些对噬菌体产生耐受的鲍曼不动杆菌菌株是不能正常生产荚膜多糖的。进一步的研究证明, 噬菌体 Φ FG02 和 Φ CO01 的受体正是鲍曼不动杆菌的荚膜多糖, 通过改变或丢失这些受体而产生噬

菌体抗性, 从而抑制噬菌体吸附, 避免裂解死亡。为了抵抗噬菌体, 鲍曼不动杆菌不再产生生物被膜, 因此可以使用抗生素进行杀菌。Lu 和 Collins^[40]研究发现, 利用工程噬菌体靶向抑制大肠杆菌中的 SOS 基因网络, 可以在体外提高喹诺酮类药物的杀伤能力, 并显著提高感染小鼠的存活率。此外, 研究还证明工程噬菌体可以增强对耐药细菌、生物被膜细胞的杀伤能力, 减少抗生素治疗后产生的耐药细菌数量, 并可作为其他抗生素(如氨基糖苷类和 β -内酰胺类)的强佐剂。同时研究还发现工程噬菌体靶向非 SOS 基因网络, 同时过表达多个因子, 也可以产生有效的抗生素佐剂。

综上所述, 在利用噬菌体改造细菌药物外排泵方面, 可通过改变噬菌体的尾丝蛋白使其以细菌外排泵系统相关蛋白作为受体结合位点, 将其与抗生素联用以达到杀菌效果。对于尾丝蛋白的改造有两种思路: 一是特异性设计并构建噬菌体基因模块, 对已知功能的噬菌体基因模块进行替换, 改变其与细菌的结合位点; 二是随机突变现有的尾丝蛋白, 构建数量巨大的噬菌体突变库, 然后进行筛选。开发更加有效的方法来改变噬菌体受体结合位点, 对后续噬菌体治疗的临床应用具有重要作用。在利用噬菌体清除生物被膜方面, 未来可以使用能够产生多糖解聚酶或裂解酶的噬菌体来清除细菌生物被膜, 并且杀灭细菌。利用合成生物学的方法构建噬菌体基因模块, 用多糖解聚酶或裂解酶基因替换已知功能的噬菌体基因模块, 使其表达出特定的酶; 对于自身可以表达这两种酶的噬菌体, 可以考虑构建基因调控开关, 对多糖解聚酶和裂解酶基因的转录及表达进行严格控制, 合成及优化代谢网络, 产生更多的多糖解聚酶及裂解酶。

3.2 解决噬菌体感染耐受性问题

3.2.1 细菌的噬菌体感染耐受性机制

噬菌体侵染细菌的过程包括吸附、注入、合

成、组装和释放 5 个步骤。细菌在与噬菌体长期的共同进化过程中, 针对抑制吸附、阻止注入、干扰 DNA、流产感染等过程^[41]的感染产生了多种机制的耐受性。

(1) 阻止噬菌体吸附

噬菌体通过识别结合受体吸附到细菌上, 受体主要包括细菌表面的结构蛋白、脂多糖^[42]等, 其中受体蛋白有外膜蛋白受体 FhuA、细胞膜蛋白 YueB^[43]等。通过使受体蛋白无法表达、改变受体结构、产生竞争性抑制, 使噬菌体无法识别细菌表面从而抑制侵入。

细菌容易对以多糖为受体的噬菌体产生耐受, 这是由于多糖结构具有多样性且其与多糖合成相关的酶有较多种类。Latino 等^[44]分离出铜绿假单胞的抗噬菌体突变株 PAO1, 并发现该突变株是在脂多糖 (LPS) 合成过程中的基因上发生突变。Tan 等^[45]发现细菌 Kp36 能够利用可移动遗传元件破坏磷酸转移酶 *wcaJ* 的编码区来阻止噬菌体感染; BvgAS 双组分调节系统影响噬菌体吸附效率, 噬菌体 BPP-1 的受体 Pm 只在 Bvg⁺期表达, 因此 Bvg⁺细胞感染噬菌体 BPP-1 的效率比 Bvg⁻细胞高 100 万倍^[46]。T5 噬菌体感染大肠杆菌可以产生一种脂蛋白 (Llp), 从而阻止该噬菌体与大肠杆菌上的识别受体铁氧体外膜转运体 (FhuA) 相互作用^[47]。宿主细胞的脂蛋白也可以干扰吸入, 如 F⁺菌株编码的外膜蛋白 TraT 可以改变多数 T 噬菌体受体外膜蛋白 A (OmpA) 的构象^[48]。

此外, 细菌和噬菌体间可以形成物理屏障以阻止吸附。褐藻酸盐是由假单胞菌、固氮菌产生的胞外多糖^[49], 有研究发现降低胞外多糖有利于噬菌体渗透进入细胞, 这说明产生褐藻酸盐的固氮菌的噬菌体抗性增强^[50]。流感嗜血杆菌利用相变 (PV) 来调节其针对噬菌体感染的防御系统的活性^[51]。

通过产生其他能与宿主受体特异性结合的产

物, 与噬菌体形成竞争抑制作用, 也可以降低噬菌体感染效率从而阻止噬菌体的吸附。例如, T5 噬菌体在其受体蛋白 pb5 与外膜转运蛋白 FhuA 结合后感染大肠杆菌^[52], 抗菌肽 Microcin J25 在营养耗尽的情况下也使用 FhuA 作为受体阻碍噬菌体与该位点结合^[53]。

(2) 阻止噬菌体注入

温和噬菌体侵染细胞是通过将其 DNA 整合到宿主基因组上, 并且在不裂解宿主的前提下随宿主 DNA 进行复制, 其中整合的前噬菌体片段能够编码一些锚定蛋白, 并在该噬菌体下次侵入时产生一定的免疫能力, 该机制称为超免疫 (Sie)。革兰氏阳性菌乳球菌中 Sie₂₀₀₉ 系统存在于 P335 乳球菌噬菌体组中的几个前噬菌体中, 通过抑制噬菌体 DNA 转移到宿主细胞而产生对乳球菌噬菌体抗性^[54]。革兰氏阴性菌中, T4 噬菌体有两套 Sie 系统——分别由 *Imm* 和 *Sp* 编码, 该系统通过阻止其 DNA 进入来抑制噬菌体感染^[55]。其中, 免疫蛋白 *Imm* 通过改变吸附位点构象阻止噬菌体 DNA 转移到细菌细胞质, 膜蛋白 *Sp* 抑制 T4 溶菌酶活性阻止噬菌体 DNA 的注入^[56]。温和噬菌体 HK97 中 Sie 系统通过将 gp15 蛋白插入大肠杆菌的内膜, 其与噬菌体尾部蛋白相互作用, 阻止裂解性噬菌体 HK97 和 HK95 的 DNA 注入^[57]。

(3) 干扰噬菌体 DNA

限制性修饰 (Restriction Modification, R-M) 系统通常由 DNA 甲基转移酶和限制性内切酶构成, 可以保护细菌和古细菌免受外来 DNA 的入侵, 从而保持宿主细胞基因组的完整性^[58]。R-M 系统分为四类 (I~IV), 当未甲基化的噬菌体 DNA 进入具有 R-M 系统的细胞时, 它可以被限制性内切酶识别并迅速降解, 或被细菌甲基化酶甲基化以避免限制性内切, 导致启动噬菌体溶解周期。噬菌体 DNA 是否降解主要取决于这两种酶的处理效率, 但是在细菌中内切酶活性比

其他酶高,因此噬菌体入侵的 DNA 通常会被裂解^[41]。其中, I 型系统编码含有 3 个亚基的复杂蛋白,具有 3 种不同的功能,包括限制性、修饰和特异性。此外,几乎存在于所有的古细菌中的 CRISPR-Cas 系统也是部分细菌的适应性免疫。

(4) 流产噬菌体感染

流产感染是在噬菌体繁殖之前杀死被噬菌体感染的细胞,从而保全其他细胞不被感染,是一种利他行为。该系统存在于噬菌体的全生命周期,可以杀死噬菌体从而降低感染风险,且与流产过程相关的基因通常存在于前噬菌体的序列中^[59]。Abi 系统包括 AbiA-Z,分别可以干扰噬菌体基因组复制、RNA 转录、噬菌体外壳蛋白表达和噬菌体蛋白外壳组装等^[60],如 *AbiZ* 基因可以通过破坏被感染细胞的细胞膜来诱导细胞死亡,保护乳酸乳球菌免受噬菌体 *phi 31* 的感染^[61]。最具特征的 Abi 系统为 Rex 系统,由 lambda 噬菌体表达,包含两个基因 *rexA* 和 *rexB*^[62],该系统可以抑制 T4、T5、T7 噬菌体噬菌斑的形成^[63]。较为常见的一种 Abi 系统是由毒素-抗毒素 (Toxin-Antitoxin, TA) 系统介导的^[64],此系统由两个共表达基因组成,分别编码毒素和抗毒素,二者通过拮抗作用对细菌生长状态进行调节。另外,大肠杆菌中还有两个 Abi 系统,分别是 *Lit* 编码细胞死亡肽酶^[65]和反密码子核酸酶 (PrrC)^[66]通过抑制翻译机制终止噬菌体感染。

3.2.2 应对噬菌体感染耐受性策略

以噬菌体作为抗菌素的噬菌体疗法正在兴起,可以从侧面解决细菌耐药性的问题,但在噬菌体与细菌的军备竞赛中,细菌发展出一系列抵御噬菌体感染的防御策略,同时噬菌体也进化出不同的机制对抗细菌的先天免疫或适应性免疫。本节主要介绍噬菌体产生的抗耐受性机制并分析利用合成生物学解决噬菌体耐受性的可能方案。

(1) 针对受体

通过改造存在于噬菌体尾部的受体结合蛋

白来改变噬菌体与细菌结合能力、宿主范围、感染效率等。Zeng 和 Salmond^[67]对噬菌体受体蛋白 EcLamB 进行研究并将编码该蛋白的质粒 pMUT13 转导到不同肠杆菌属中,结果发现可以扩大该类噬菌体的宿主范围。Dunne 等^[68]解析了李斯特菌 (*Listeria*) 噬菌体 PSA 受体结合蛋白 (Retinol Binding Proteins, RBPs) 的晶体结构,结合合成生物学和结构导向的方法改变受体蛋白特异性。由于 RBPs 是决定噬菌体宿主范围的关键性因素,因此通过改造 PSA,能够将毒性较弱且宿主范围较小的噬菌体改造成毒性较强且宿主范围明确、特异性强的噬菌体。该研究通过确定噬菌体 PSA 的 RBPs 为 gp15,诱变获得随机序列的 RBPs 构建合成 RBPs 库,筛选宿主范围改变的噬菌体突变体,将上述特征整合成一个广谱性合成噬菌体。此外,该研究利用 PSA 衍生物 (PSA DLCR ply511)^[69]发现 3 种途径可以拓宽噬菌体宿主范围的方法。第一种是基于 RBPs 定向突变,通过易错 PCR (epPCR) 靶向诱导,构建合成 RBPs 基因文库,发现了 6 个单点突变的噬菌体菌株 (S302R、I306K、I306R、A332V、S334R 和 S354T) 可以扩大宿主范围。第二种是合并两种不同 RBPs 的嵌合 PSA 具有扩大宿主范围的特点,获得一种通过参与多个 RBPs 识别多个受体表位的噬菌体;通过构建合成噬菌体,使其能够同时编码野生型和突变型 gp15,表达蛋白嵌合物。第三种是以结构和序列引导设计嵌合 RBPs 获得 PSA 衍生物,生成 5 个具有嵌合 RBP 的合成噬菌体,将宿主范围从 SV 4b 扩展到 SV 4a、SV 4b、SV 4d。

构建尾丝蛋白突变库。例如, Citorik 等^[70]在对 T7 噬菌体拓宽宿主范围的早期研究中利用杂交方式,通过交换两种噬菌体之间的 C 端结构域来交换宿主范围,其中不同的尾丝蛋白使噬菌体能够识别不同的宿主,组装出具有不同噬菌体尾部的杂交 T7 噬菌体衣壳^[19]; Yosef 等^[71]设计质粒编码 15 种不同噬菌体的尾部基因,通过构

建 T7 噬菌体杂交颗粒, 实现 T7 噬菌体 DNA 可以导入多种宿主细胞中。但上述研究无法应对细菌耐噬菌体范围的快速变化, 因此 Yehl 等^[72]通过构建 10^7 容量的噬菌体尾丝蛋白结构突变库, 对噬菌体尾丝蛋白诱变改造噬菌体宿主范围并抑制细菌耐药性, 如图 2 所示。该研究主要改造 T3 噬菌体, 对其尾丝蛋白中决定宿主范围的区域 HRDRs 进行基因工程改造, 类似抗体特异性工程, 通过定点突变、高通量测序技术, 用 NNK 密码子替换编码氨基酸环路的密码子, 在对尾部的蛋白质结构影响最小的情况下对特定的表位结合区域产生大量突变体, 筛选宿主范围改变的合成噬菌体, 缓解细菌的噬菌体感染耐受。结果显示, 改造后的噬菌体不仅能杀死特定的不同大肠杆菌菌株, 还能杀死已对噬菌体产生抗性的细菌^[72]。

改造受体使其特异性识别胞外聚合物。一些噬菌体还进化出能特异性识别甚至降解细胞外聚

合物的机制, 从而阻止细菌对噬菌体产生耐受性。多糖降解酶可分为水解酶和裂解酶两类。其中, 水解酶可以切断糖苷键上的糖基-氧键, 裂解酶可以切断单糖和糖醛酸 C4 之间的键并在糖醛酸 C4 和 C5 之间引入一个双键。例如, 化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 噬菌体 H4489A 编码的透明质酸裂解酶可以特异性切割乙酰透明质酸, 从而使噬菌体进入宿主细胞^[73]; 通过在噬菌体中引入具有多糖降解酶功能的基因特异性降解胞外聚合物, 使噬菌体进入宿主细胞。

(2) 针对限制修饰系统

为应对限制修饰 (R-M) 系统, 噬菌体进化出几种逃逸策略克服细菌 R-M 系统对噬菌体 DNA 的干扰, 分别是通过点突变使噬菌体缺失内切酶识别位点^[74]、宿主或自身对基因进行甲基化、获得同源甲基化酶基因、模仿噬菌体 DNA 刺激修饰酶等方式, 产生降解 R-M 辅助因子、抑制修饰酶等作用, 从而保护噬菌体 DNA 等。对

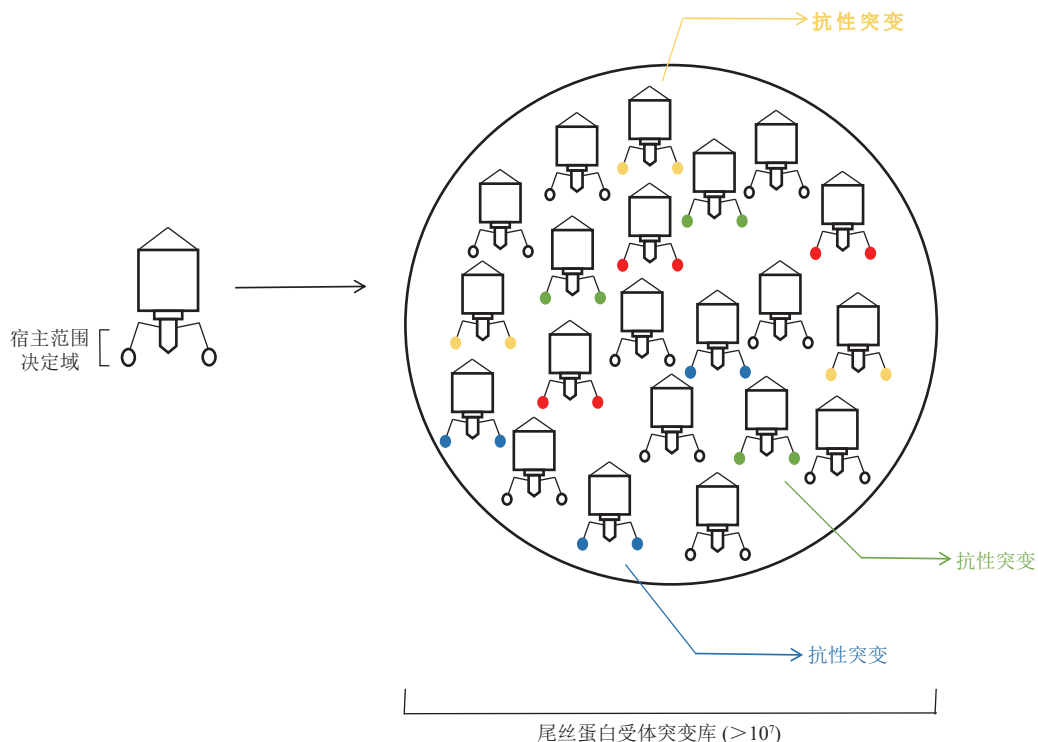


图 2 利用噬菌体尾丝蛋白诱变技术改造噬菌体宿主范围

Fig. 2 Engineering the range of phage hosts via tail fiber mutagenesis

于甲基化作用,如 T7 噬菌体的 Ocr 蛋白模仿噬菌体 DNA 并阻碍甲基化酶和限制性核酸内切酶结合,从而抑制其活性^[75]。对于抑制修饰酶作用, ArdC 是一种 I-R-M 型系统特异性的抗限制蛋白, IncB 质粒 R16 的 ArdA 可以选择性地抑制 EcoKI 的修饰酶活性,在接合过程中保护进入的 T 链^[76]。对于点突变,在芽孢杆菌中,用基因组中的胸腺嘧啶取代尿嘧啶或羟甲基尿嘧啶可防止噬菌体识别和裂解含有胸腺嘧啶的位点^[77]。因此,根据上述合理推测,通过对限制性核酸内切酶识别位点进行人工突变可以使噬菌体抵御部分细菌的耐受性。

(3) 针对 CRISPR 系统

早前,研究者认为噬菌体逃脱 CRISPR-Cas 系统介导的唯一机制是通过诱导随机点突变,对原间隔区或 PAM 序列突变,使 crRNA 和靶 DNA 无法配对从而致使侵入噬菌体的 CRISPR-Cas 系统失活。但是单靠突变无法使噬菌体长期存活。噬菌体也可以通过修饰碱基来逃避 CRISPR-Cas 系统靶向,如羟甲基胞嘧啶(Hydroxymethyl Cytosine HMC)及其糖基化形式可以保护 T4 噬菌体免受 CRISPR 系统的免疫^[78]。直到 2013 年,在铜绿假单胞菌噬菌体中首次发现了 5 个编码不同 Anti-CRISPR 蛋白的基因可以干扰宿主 CRISPR-Cas 系统^[79]。因此,向某细菌 CRISPR-Cas 系统靶向的噬菌体基因组中添加 Anti-CRISPR 可以使该噬菌体避免适应性免疫反应;噬菌体自身可以编码蛋白抑制剂以抵御 CRISPR-Cas 系统,如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)血清群 O1 中 ICP1 噬菌体编码的 CRISPR-Cas 系统可用来对抗宿主中的抑制噬菌体感染的染色体岛,在没有这种靶向的情况下,噬菌体编码的 CRISPR-Cas 系统可以获得新的间隔区,确保有效靶向染色体岛,恢复噬菌体复制^[80]。因此,定向插入 Anti-CRISPR 能够使噬菌体逃脱细菌适应性免疫反应所造成的噬菌体耐受性。

(4) 针对 Abi 系统

噬菌体可以改变与编码 Abi 系统相关的基因来阻止该系统的激活,通过对特定基因定点突变或产生编码抗毒素的分子抵消毒素活性,从而逃避 Abi 系统。Abi 系统可分为 AbiD1、AbiK、AbiV、AbiT 和 AbiQ 等。其中,乳球菌噬菌体中不同基因的突变可以规避 Abi 系统。有研究表明逃避 AbiK 系统可以利用 P2 ORF35-Sak3 诱导编码 Sak 基因的随机突变来进行^[81];在大肠杆菌噬菌体 T4rII 中,突变 *motA* 可以使噬菌体避免 Rex 介导的排斥^[82];突变 T4 噬菌体编码肽 Gol 的基因阻止 Abi 系统的激活^[65]。编码抗毒素分子的例子有:大肠杆菌 O157:H7 中携带两个开放阅读框(ORF)分别是 *IsoA*(ORF1) 编码毒素、*IsoB*(ORF2) 编码抗毒素,其与大肠杆菌 K-12 编码毒素-抗毒素系统的 RnlA 和 RnlB 具有同源性。研究发现,T4 噬菌体中的 Dmd 通过直接相互作用抑制 RnlA 和 LsoA 的毒性,从而阻止 Abi 系统的激活^[83]。根据上述研究合理推测,可以通过对编码 Abi 系统的基因以及编码 TA 系统的基因进行定点突变,从而使噬菌体逃逸。

综上所述,可以利用合成生物学手段,定向突变获得受体蛋白模块获取 RBP 基因文库、对尾部结构组件进行模块交换、构建尾部组件突变库、利用基因工程设计结构模块、构建 Anti-CRISPR 系统、定向改造功能基因模块,对现有或不存在的生物组件及系统进行重新设计改造,从而对随机突变等常规技术无法解决的问题进行补充完善。此外,需要特别注意的是,针对细菌受体的改造可以选择保守细菌外膜蛋白作为受体,这样的受体较难发生突变,因此不容易形成耐受。

4 噬菌体的合成生物学与生物安全

合成生物学主要面临生物恐怖袭击、公众健

康、实验安全等几个方面的问题与挑战^[84]。公众对合成基因组的担忧主要来源于产生高致病性、强传染性的病毒会对健康带来威胁。

因为噬菌体仅特异性感染细菌, 所以合成噬菌体无需考虑伦理安全以及其他合成基因组学带来的风险, 通过噬菌体的简单模型能够帮助人类更好地理解合成生物学的机制, 并且噬菌体在生态环境、病原体疾病鉴定治疗等方面具有广阔的发展前景。但是, 噬菌体利用其生物学特性可以包装细菌、导入毒性基因和耐药基因等, 增强细菌的致命性和耐药性^[85], 而且其对生态环境也有较大影响, 如果合成噬菌体意外泄漏, 感染其宿主细菌, 则有可能会打破整个菌落的生态平衡^[86]。因此, 噬菌体可能会成为潜在的生物恐怖剂。噬菌体携带未知功能蛋白或毒性蛋白, 其中溶源性噬菌体利用其生物学特性可以作为生物武器, 将致命的毒性基因整合到宿主细胞的染色体上, 使不致命性细菌产生致命性。例如, 2011 年 5 月, 强毒性的大肠杆菌 O104:H4 在德国引起溶血性尿毒症和腹泻的暴发, 至今已有 810 例该综合征和 39 例死亡, 经过调查发现该致病性细菌是通过获得含有志贺毒素的溶源性噬菌体而产生致病性^[87]; 由于以霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 为宿主的溶源性噬菌体 CTXΦ 含有毒性基因 *ctxABT*, 导致霍乱弧菌产生致病性, 可引起食物中毒^[88]。在生物恐怖袭击中, 若将此类噬菌体分散在适当的环境下, 其产生的高致病性细菌能被很好地隐藏起来, 难以预防、检测、控制以及溯源。因此, 需要对合成噬菌体制定严格的法律法规, 从而规避由合成噬菌体引发的生物安全问题。

5 总结和展望

本文主要讨论针对噬菌体的合成技术、合成应用及生物安全, 并根据合成生物学的相关研究重点论述合成噬菌体在应对细菌耐受性的机制及策略, 并分析其运用与解决细菌耐受性的可行

性。结合现有研究可考虑利用合成生物学方法开发噬菌体基因模块、构建基因调控开关、对编码噬菌体尾丝蛋白及细菌受体蛋白相关元件进行改造, 从而快速应对细菌进化产生的适应性免疫, 为抗生素治疗及噬菌体治疗提供新思路。

近年来, 由于抗生素药物的滥用, 耐药菌大量出现, 这不仅使细菌感染性疾病治疗效果下降, 还会增加新药研发的成本和时间。噬菌体既能杀死对抗生素敏感的细菌, 也能杀死对抗生素有耐药性的细菌, 因此, 可引入噬菌体来解决耐药性的问题。但随之而来也面临着一些潜在的问题及挑战: 第一, 大多数噬菌体基因组大小受衣壳容量的影响, 限制了基因组片段的替换和修饰^[89]; 第二, 噬菌体基因组或组织结构发生任何变化都可能对噬菌体的感染性或生长能力产生负面影响; 第三, 自然环境中尚未发现一种噬菌体具有理想治疗剂所具备的所有特性。最重要的是, 细菌进化产生对噬菌体的耐受性会导致噬菌体感染失效。而合成生物学的快速发展给这些难题带来了新的解决方法, 可以对已知性质的噬菌体进行靶向基因修饰, 从而快速获得符合要求的噬菌体, 通过基因工程扩大噬菌体宿主范围主要是针对编码 RBP 的基因进行改造。Dedrick 等^[90]利用基因工程和正向遗传学的方法开发了噬菌体衍生物, 有效地杀死感染的 *M. abscessus* 菌株, 从而治愈一位 15 岁患者。还可以通过改变宿主细菌胞外聚合物或受体相互作用来影响噬菌体 DNA 注入宿主细胞的能力。此外, 利用噬菌体 Anti-restriction 和 Anti-CRISPR 机制可以解决细菌耐噬菌体的问题。未来, 可利用合成生物学的方法和技术改造噬菌体, 再将改造后的噬菌体和抗菌类药物联合使用, 使细菌恢复对抗生素的敏感性, 达到更好的治疗效果。工程噬菌体不仅可以用于解决细菌耐受性问题, 还可以用于原位修饰人类微生物群, 以减轻某些细菌疾病和代谢、免疫或精神障碍的症状^[91]。

参 考 文 献

- [1] Ma YF, You XY, Mai GQ, et al. A human gut phage catalog correlates the gut phageome with type 2 diabetes [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 24.
- [2] Hendrix RW. Bacteriophage genomics [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(5): 506-511.
- [3] 赵国屏. 合成生物学: 开启生命科学“会聚”研究新时代 [J]. *中国科学院院刊*, 2018, 33(11): 1135-1149.
- Zhao GP. Synthetic biology: unsealing the convergence era of life science research [J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2018, 33(11): 1135-1149.
- [4] Barbu EM, Cady KC, Hubby B. Phage therapy in the era of synthetic biology [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(10): a023879.
- [5] Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(5): 524-531.
- [6] Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases [J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(8): 967-973.
- [7] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(1): 49-55.
- [8] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [9] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533(7603): 420-424.
- [10] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576(7785): 149-157.
- [11] Liang F, Han M, Romanienko PJ, et al. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(9): 5172-5177.
- [12] Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79: 181-211.
- [13] Tao P, Wu X, Tang WC, et al. Engineering of bacteriophage T4 genome using CRISPR-Cas9 [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(10): 1952-1961.
- [14] Hoshiga F, Yoshizaki K, Takao N, et al. Modification of T2 phage infectivity toward *Escherichia coli* O157:H7 via using CRISPR/Cas9 [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2019, 366(4): fnz041.
- [15] Born Y, Fieseler L, Thony V, et al. Engineering of bacteriophages Y2::*dpoLI-C* and Y2::*luxAB* for efficient control and rapid detection of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(12): e00341-17.
- [16] Smith HO, Hutchison CA, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(26): 15440-15445.
- [17] Lemire S, Yehl KM, Lu TK. Phage-based applications in synthetic biology [J]. *Annual Review of Virology*, 2018, 5(1): 453-476.
- [18] Gibson DG. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(20): 6984-6990.
- [19] Ando H, Lemire S, Pires DP, et al. Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing [J]. *Cell Systems*, 2015, 1(3): 187-196.
- [20] Oldfield LM, Grzesik P, Voorhies AA, et al. Genome-wide engineering of an infectious clone of herpes simplex virus type 1 using synthetic genomics assembly methods [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(42): E8885-E8894.
- [21] 饶勇, 曾振灵, 陈杖榴. 抗生素耐药性的主动外

- 排机制 [J]. 国外医药(抗生素分册), 2002, 23(3): 109-114.
- Rao Y, Zeng ZL, Chen ZL. Active efflux mechanisms of antibiotic resistance [J]. World Notes on Antibiotics, 2002, 23(3): 109-114.
- [22] Abreu AC, McBain AJ, Simoes M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents [J]. Natural Product Reports, 2012, 29(9): 1007-1021.
- [23] Hudson LO, Murphy CR, Spratt BG, et al. Differences in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from pediatric and adult patients from hospitals in a large county in California [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 50(3): 573-579.
- [24] Deris JB, Kim M, Zhang Z, et al. The innate growth bistability and fitness landscapes of antibiotic-resistant bacteria [J]. Science, 2013, 342(6162): 1237435.
- [25] 喻华, 杨楠, 黄文方. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌研究进展 [J]. 世界感染杂志, 2006, 6(3): 187-189, 195.
- Yu H, Yang N, Huang WF. Progress in the study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. World Journal of Infection, 2006, 6(3): 187-189, 195.
- [26] Bernal P, Lemaire S, Pinho MG, et al. Insertion of epicatechin gallate into the cytoplasmic membrane of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disrupts penicillin-binding protein (PBP) 2a-mediated beta-lactam resistance by delocalizing PBP2 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(31): 24055-24065.
- [27] Yan J, Bassler BL. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms [J]. Cell Host & Microbe, 2019, 26(1): 15-21.
- [28] Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms [J]. PLoS Biology, 2007, 5(11): 2458-2461.
- [29] Aygul A. The importance of efflux systems in antibiotic resistance and efflux pump inhibitors in the management of resistance [J]. Mikrobiyoloji Bulteni, 2015, 49(2): 278-291.
- [30] Du DJ, van Veen HW, Luisi BF. Assembly and operation of bacterial tripartite multidrug efflux pumps [J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(5): 311-319.
- [31] Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria [J]. Current Opinion in Microbiology, 2001, 4(5): 500-508.
- [32] 王二兵, 马淑涛. 药物耐药性外排泵抑制剂的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2005, 15(3): 188-192.
- Wang EB, Ma ST. Advances in the study of drug-resistant efflux pump inhibitors [J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2005, 15(3): 188-192.
- [33] Chan BK, Siström M, Wertz JE, et al. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26717.
- [34] Olsen NMC, Thiran E, Hasler T, et al. Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase [J]. Viruses, 2018, 10(8): 438.
- [35] 商安琪. *Klebsiella* 噬菌体 P13 多糖解聚酶及相关功能基因的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- Shang AQ. Study of *Klebsiella* phage P13 polysaccharide depolymerase and related functional genes [D]. Qingdao: China Ocean University, 2014.
- [36] 宋军, 顾敬敏, 肖峰, 等. 金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 LysGH15 对 MRSA 生物被膜的降解作用 [C] // 第五届中国兽药大会, 2014: 12.
- Song J, Gu JM, Xiao F, et al. Degradation of MRSA biofilm by *Staphylococcus aureus* phage lytic enzyme LysGH15 [C] // The 5th China Veterinary Conference, 2014: 12.
- [37] Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(27): 11197-11202.
- [38] Briandet R, Lacroix-Gueu P, Renault M, et al. Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages

- inside biofilms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(7): 2135-2143.
- [39] Gordillo Altamirano F, Forsyth JH, Patwa R, et al. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials [J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6(2): 157-161.
- [40] Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(12): 4629-4634.
- [41] Safari F, Sharifi M, Farajnia S. The interaction of phages and bacteria: the co-evolutionary arms race [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(2): 119-137.
- [42] Yokota S, Hayashi T, Matsumoto H. Identification of the lipopolysaccharide core region as the receptor site for a cytotoxin-converting phage, phi CTX, of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(17): 5262-5269.
- [43] Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D, et al. Host receptors for bacteriophage adsorption [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(4): fnw002.
- [44] Latino L, Caroff M, Pourcel C. Fine structure analysis of lipopolysaccharides in bacteriophage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mutants [J]. *Microbiology (Reading)*, 2017, 163(6): 848-855.
- [45] Tan D, Zhang Y, Qin J, et al. A frameshift mutation in *wcaJ* associated with phage resistance in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 378.
- [46] Liu M, Deora R, Doulatov SR, et al. Reverse transcriptase-mediated tropism switching in *Bordetella* bacteriophage [J]. *Science*, 2002, 295(5562): 2091-2094.
- [47] Peduzzi I, Rosenbusch JP, Locher KP. Inactivation *in vitro* of the *Escherichia coli* outer membrane protein FhuA by a phage T5-encoded lipoprotein [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 168(1): 119-125.
- [48] Riede I, Eschbach ML. Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli* [J]. *FEBS Letters*, 1986, 205(2): 241-245.
- [49] Xu F, Dong F, Wang P, et al. Novel molecular insights into the catalytic mechanism of marine bacterial alginate lyase AlyGC from polysaccharide lyase family 6 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(11): 4457-4468.
- [50] Hanlon GW, Denyer SP, Olliff CJ, et al. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2746-2753.
- [51] Zaleski P, Wojciechowski M, Piekarowicz A. The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection [J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2005, 151(Pt 10): 3361-3369.
- [52] Flayhan A, Wien F, Paternostre M, et al. New insights into pb5, the receptor binding protein of bacteriophage T5, and its interaction with its *Escherichia coli* receptor FhuA [J]. *Biochimie*, 2012, 94(9): 1982-1989.
- [53] Destoumieux-Garzón D, Duquesne S, Peduzzi J, et al. The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism [J]. *Biochemical Journal*, 2005, 389(Pt 3): 869-876.
- [54] Mahony J, McGrath S, Fitzgerald GF, et al. Identification and characterization of lactococcal prophage-carried superinfection exclusion genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(20): 6206-6215.
- [55] Shi K, Oakland JT, Kurniawan F, et al. Structural basis of superinfection exclusion by bacteriophage T4 Spackle [J]. *Communications Biology*, 2020, 3(1): 691.
- [56] Lu MJ, Henning U. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages [J]. *Trends in Microbiology*, 1994, 2(4): 137-139.
- [57] Cumby N, Edwards AM, Davidson AR, et al. The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(18): 5012-5019.

- [58] Bower EKM, Cooper LP, Roberts GA, et al. A model for the evolution of prokaryotic DNA restriction-modification systems based upon the structural malleability of Type I restriction-modification enzymes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(17): 9067-9080.
- [59] Lopatina A, Tal N, Sorek R. Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy [J]. *Annual Review of Virology*, 2020, 7(1): 371-384.
- [60] Chopin MC, Chopin A, Bidnenko E. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2005, 8(4): 473-479.
- [61] Durmaz E, Klaenhammer TR. Abortive phage resistance mechanism *AbiZ* speeds the lysis clock to cause premature lysis of phage-infected *Lactococcus lactis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(4): 1417-1425.
- [62] Thomason LC, Morrill K, Murray G, et al. Elements in the lambda immunity region regulate phage development: beyond the 'Genetic Switch' [J]. *Molecular Microbiology*, 2019, 112(6): 1798-1813.
- [63] Casjens SR, Hendrix RW. Bacteriophage lambda: early pioneer and still relevant [J]. *Virology*, 2015, 479-480: 310-330.
- [64] Fraikin N, Goormaghtigh F, van Melderen L. Type II toxin-antitoxin systems: evolution and revolutions [J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 202(7): e00763-19.
- [65] Bergsland KJ, Kao C, Yu YT, et al. A site in the T4 bacteriophage major head protein gene that can promote the inhibition of all translation in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 213(3): 477-494.
- [66] Blanga-Kanfi S, Amitsur M, Azem A, et al. PrrC-anticodon nuclease: functional organization of a prototypical bacterial restriction RNase [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(11): 3209-3219.
- [67] Zeng ZY, Salmond GPC. Bacteriophage host range evolution through engineered enrichment bias, exploiting heterologous surface receptor expression [J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(12): 5207-5221.
- [68] Dunne M, Rupf B, Tala M, et al. Reprogramming bacteriophage host range through structure-guided design of chimeric receptor binding proteins [J]. *Cell Reports*, 2019, 29(5): 1336-1350.
- [69] Kilcher S, Studer P, Muessner C, et al. Cross-genus rebooting of custom-made, synthetic bacteriophage genomes in L-form bacteria [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(3): 567-572.
- [70] Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases [J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(11): 1141-1145.
- [71] Yosef I, Goren MG, Globus R, et al. Extending the host range of bacteriophage particles for DNA transduction [J]. *Molecular Cell*, 2017, 66(5): 721-728.
- [72] Yehl K, Lemire S, Yang AC, et al. Engineering phage host-range and suppressing bacterial resistance through phage tail fiber mutagenesis [J]. *Cell*, 2019, 179(2): 459-469.
- [73] Baker JR, Dong S, Pritchard DG. The hyaluronan lyase of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A [J]. *Biochemical Journal*, 2002, 365(Pt 1): 317-322.
- [74] Pleška M, Guet CC. Effects of mutations in phage restriction sites during escape from restriction-modification [J]. *Biology Letters*, 2017, 13(12): 20170646.
- [75] Walkinshaw MD, Taylor P, Sturrock SS, et al. Structure of Ocr from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form DNA [J]. *Molecular Cell*, 2002, 9(1): 187-194.
- [76] Thomas AT, Brammar WJ, Wilkins BM. Plasmid R16 *ArdA* protein preferentially targets restriction activity of the type I restriction-modification system EcoKI [J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(6): 2022-2025.
- [77] Krüger DH, Bickle TA. Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts [J]. *Microbiological Reviews*, 1983, 47(3): 345-360.

- [78] Bryson AL, Hwang Y, Sherrill-Mix S, et al. Covalent modification of bacteriophage T4 DNA inhibits CRISPR-Cas9 [J]. *mBio*, 2015, 6(3): e00648.
- [79] Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, et al. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system [J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 429-432.
- [80] Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB, et al. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity [J]. *Nature*, 2013, 494(7438): 489-491.
- [81] Scaltriti E, Launay H, Genois MM, et al. Lactococcal phage p2 ORF35-Sak3 is an ATPase involved in DNA recombination and AbiK mechanism [J]. *Molecular Microbiology*, 2011, 80(1): 102-116.
- [82] Shinedling S, Parma D, Gold L. Wild-type bacteriophage T4 is restricted by the lambda rex genes [J]. *Journal of Virology*, 1987, 61(12): 3790-3794.
- [83] Otsuka Y, Yonesaki T. Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins [J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(4): 669-681.
- [84] Schmidt M. Diffusion of synthetic biology: a challenge to biosafety [J]. *Systems and Synthetic Biology*, 2008, 2(1-2): 1-6.
- [85] 范华昊, 童贻刚. 噬菌体: 生物武器和生物防御的双刃剑 [J]. *军事医学*, 2013, 37(3): 165.
- Fan HH, Tong YG. Phages: a double-edged sword for biological weapons and biodefense [J]. *Military Medical Sciences*, 2013, 37(3): 165.
- [86] 赵向娜, 杨瑞馥. 合成噬菌体的贡献与风险 [J]. *生命科学*, 2011, 23(9): 917-920.
- Zhao XN, Yang RF. Contributions and risks of synthetic phages [J]. *Life Sciences*, 2011, 23(9): 917-920.
- [87] Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011, 11(9): 671-676.
- [88] Thomas R. Control of development in temperate bacteriophages: I. Induction of prophage genes following hetero-immune super-infection [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1966, 22(1): 79-95.
- [89] Springman R, Molineux IJ, Duong C, et al. Evolutionary stability of a refactored phage genome [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2012, 1(9): 425-430.
- [90] Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garlena RA, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* [J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(5): 730-733.
- [91] Łobocka M, Dąbrowska K, Górski A. Engineered bacteriophage therapeutics: rationale, challenges and future [J]. *BioDrugs*, 2021, 35(3): 255-280.