



刘月环, 动物遗传学博士, 研究员, 硕士生导师, 浙江省实验动物与安全性研究重点实验室后备带头人, 浙江省级检验机构CMA资质认定评审专家, 中国实验动物学会动物生物安全委员会委员, 中国兽医协会实验动物分会委员, 《实验动物与比较医学》青年编委, 《中国比较医学杂志》、《中国实验动物学报》通信编委, *Eur J Gastroenterol Hepatol*等十余本中外学术期刊的审稿人。首次发现G蛋白偶联受体激动剂逆转肝纤维化显效, 为肝(肺)纤维化治疗提供了一线药的新选择, 获得发明专利2项; 首次用自行设计的小肽建立了多黏菌素耐药的大肠埃希菌2种间接检测方法, 申请5项专利; 首次用微卫星遗传标记研究并探明了Z:ZCLA长爪沙鼠2个等级种群的群体遗传结构, 同时建立了动态观察非酒精性脂肪性肝病的长爪沙鼠模型, 获得发明专利1项。参与国家实验动物标准化体系建设, 参与强制性国家标准GB14923的修订, 起草了2项推荐性行业标准, 先后获得浙江省医药卫生科技创新奖、中国实验动物科学技术奖和浙江省科学技术奖。目前从事的研究工作: 1) 耐药性检测技术与微生物组基因编辑; 2) 消化道疾病研究(Notch信号通路); 3) 杭州医学院高等级动物生物安全实验室建设、实验动物新品系研发、标准化体系建设与质量控制技术研究。先后主持或参与省部级以上科研项目46项, 发表论文百余篇, 培养(联培)研究生十余名。

## 两株CRISPR工程大肠埃希菌在小鼠体内的定植实验研究

任晨吟<sup>1</sup>, 高思琦<sup>1</sup>, 李浩<sup>2</sup>, 唐标<sup>3</sup>, 杨华<sup>3</sup>, 刘月环<sup>4</sup>

(1. 杭州医学院临床医学院, 杭州 310053; 2. 杭州医学院护理学院, 杭州 310053; 3. 浙江省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 杭州 310021; 4. 杭州医学院浙江省实验动物与安全性研究重点实验室, 杭州 310013)

**[摘要]** **目的** 利用小鼠对2株大肠埃希菌工程菌Nissle1917和BW25113在肠道的定植能力与定植效率进行评价, 以筛选出肠道定植效率高的菌株, 为后续利用成簇的规律性间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR associated protein, Cas)系统的工程菌消减体内耐药菌的研究奠定基础。**方法** 每株工程菌的实验共取70只18~20g的ICR小鼠, 雌雄各半, 操作时小鼠区分性别并随机分为7个处理组, 每组10只(6只实验, 4只对照)。实验组灌胃 $2 \times 10^{10}$ 个工程菌共200  $\mu$ L, 对照组灌胃等体积的PBS。灌胃后1、3、6、12、24、48、72 h分别取小鼠的肠系膜淋巴结、胃、回盲部、结肠组织及内容物, 分别采用平板划线、荧光镜检和PCR法检测工程菌, 比较Nissle1917和BW25113这2菌株在小鼠体内的定植能力与效率。**结果** 灌胃后前6个时段(1、3、6、12、24、48 h)中, 3种方法检测到2株菌在胃、回盲部、结肠组织有定植, 淋巴结未检测到目标菌株; 而72 h有且仅有Nissle1917菌定植于回盲部和结肠组织, Nissle1917和BW25113两株菌的定植效率分别为100%和0。**结论** Nissle1917菌定植效率高于BW25113菌, 且能较长时间定植于回盲部和结肠组织, 提示其可作为防控耐药基因传播用CRISPR系统的备选载体菌。

**[关键词]** CRISPR工程大肠埃希菌; 肠道定植能力; 定植效率; ICR小鼠

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2022)06-0541-10

## *In Vivo* Colonization Test of Two CRISPR-Engineered *Escherichia coli* in Mice

REN Chenyin<sup>1</sup>, GAO Siqi<sup>1</sup>, LI Hao<sup>2</sup>, TANG Biao<sup>3</sup>, YANG Hua<sup>3</sup>, LIU Yuehuan<sup>4</sup>

(1. School of Clinical Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; 2. School of Nursing,

**[基金项目]** 浙江省重点研发计划项目“CRISPR工程菌消减动物源耐药基因研究”(2020C02031)

**[第一作者]** 任晨吟(2001—), 女, 本科在读, 研究方向: 微生物耐药机制。E-mail: 2490394878@qq.com

**[通信作者]** 刘月环(1974—), 女, 医学博士, 研究员, 研究方向: 微生物组基因编辑与耐药性防控技术的研究。E-mail: 215193122@qq.com。

ORCID: 0000-0003-3961-1362

Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China; 3. Institute of Agro-product Safety and Nutrition, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 4. Zhejiang Key Laboratory of Experimental Animals and Safety Research, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China)

Correspondence to: LIU Yuehuan (ORCID: 0000-0003-3961-1362), E-mail: 215193122@qq.com

**[ABSTRACT] Objective** The colonization ability and efficiency of two *Escherichia coli* (*E. coli*)-engineered strains, Nissle1917 and BW25113, in the intestine were evaluated in mice, we aimed to screen out strains for subsequent research on clustered regularly interspersed short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) system-engineered bacteria to eliminate drug-resistant bacteria via high intestinal colonization efficiency. **Methods** Seventy ICR mice (18–20 g), half male and half female, were randomly divided into 7 treatment groups by gender, with 10 mice in each group (6 for experiment and 4 for control). The experimental group was gavaged with  $2 \times 10^{10}$  of the engineered strains at a final volume of 200  $\mu\text{L}$ , and the control group was gavaged with an equal volume of PBS. At 1, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 hours after gavage, the mesenteric lymph nodes, stomach, ileocecal and colonic tissues, and intestinal contents of the mice were removed. The two *E. coli* strains were detected using plate inoculation, fluorescence microscopy, and PCR amplification to compare their *in vivo* colonization ability and efficiency. **Results** At 1, 3, 6, 12, 24, and 48 hours after gavage, both *E. coli* strains had colonized in the stomach, ileocecal and colonic tissues as detected using the three methods, and no leakage of *E. coli* fluid from the lymph nodes was observed; at 72 hours, only Nissle1917 colonized in the ileocecal and colonic tissues, comparing the colonization efficiency of the two *E. coli* strains, that of Nissle1917 was 100% and that of BW25113 was 0 at 72 hours. **Conclusion** Nissle1917 has a higher colonization efficiency than BW25113 and can colonize in the mucosal surface of ileocecal and colonic tissues for a long time, suggesting that it can be used as a carrier for the CRISPR system to prevent and control drug resistance gene transmission.

**[Key words] CRISPR engineered *Escherichia coli*; Intestinal colonization capacity; Colonization efficiency; ICR mouse**

近十多年来抗生素的滥用使环境、动物及人体内出现大量耐药基因，造就了多重耐药菌甚至超级细菌，这一方面使抗生素的选择越来越受限，另一方面也导致宿主和环境之间作用模式发生改变<sup>[1-2]</sup>。成簇的规律性间隔的短回文重复序列（clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR）及其相关蛋白（CRISPR-associated protein, Cas）系统原本是细菌中的一种适应性免疫系统，由CRISPR序列及多样化的Cas蛋白组成，主要通过Cas蛋白特异性识别切割外源基因获得免疫能力，进而阻止外源基因水平转移<sup>[3-4]</sup>。基于这种能力，CRISPR/Cas系统在后基因组时代成为了基因编辑和基因治疗的通用工具。对细菌的基因工程而言，引入外源性CRISPR/Cas系统可以在实现细菌自身基因组编辑的同时，催生出各种优良性状的细菌并进行高效地工程菌育种<sup>[5]</sup>。其主要机制是利用质粒转染（类似遭受外源DNA入侵）时，CRISPR/Cas系统启动转录表达，CRISPR转录为前体crRNA，再经核酸酶CasE加工后形成成熟的crRNA，

此时crRNA/CasE复合体中的CasE招募CasA-D形成Cascade复合体。在Cas3的介导下，Cascade与外源DNA上原型间隔区相结合，并在PAM位点附近切割靶标DNA，从而导致靶标DNA降解，这种作用的结果是CRISPR/Cas系统可以通过限制质粒的接合和转移而抑制耐药菌的产生和扩散<sup>[6]</sup>，以及通过识别切割靶标即抗生素耐药基因/毒力基因而恢复细菌对抗生素的敏感性<sup>[7]</sup>。因此，CRISPR/Cas系统可以通过沉默耐药基因抑制细菌耐药性，这可能成为一种有前景的根除耐药菌的方法<sup>[8]</sup>。

大肠埃希菌（*Escherichia coli*, *E. coli*）作为一种构造简单的原核生物，以其遗传背景清晰、易于培养、生长繁殖快速、在肠道中易成为优势菌等优点成为如今肠杆菌科原核工程菌的代表性菌株<sup>[9]</sup>。目前，将CRISPR/Cas系统整合到大肠埃希菌的基因组上具有可行性，而且用CRISPR/Cas系统靶向切割耐药基因的体外实验已有较多报告，但体内实验的研究仍然是空白。因此，如果能制备出CRISPR工程菌，在解决定植能力

和定植效率的基础上, 利用其能生长成优势菌的特性来消减体内耐药菌, 那么 CRISPR/Cas 系统将可能成为未来耐药性生物防治的最佳选择。在评价 CRISPR/Cas 系统的体内切割编辑与消减耐药基因的作用之前, 本课题组自行构建了带有 CRISPR/Cas 系统的大肠埃希菌工程菌 Nissle1917 和 BW25113, 然后以小鼠作为研究对象, 通过灌胃的方式建立 2 种工程菌定植的实验模型, 最后以肠道内容物 (粪便) 及组织标本为检测样本, 参考文献 [10-12], 分别采用平板培养法、实时荧光定量 PCR 法、绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记法来观察工程菌在体内的黏附定植情况 (这既是检测细菌在小鼠体内的定植能力与定植效率的方法, 也是工程菌种筛选的关键环节<sup>[13]</sup>), 通过评价定植效率为该工程菌的临床应用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂、仪器

试剂包括 Green Taq Mix DNA 聚合酶 (Vazyme, 货号 7E49010), DNA Marker DL2000 (TaKaRa, 货号 AJG1332A), LB 培养基 (青岛海博, 肉汤货号 20200102, 琼脂货号 20201218), 氨苄青霉素 (ampicillin, AMP) (上海泽衡, 货号 A818BA0026), 50×TAE Buffer (上海生化, 货号 B548101-0500), PBS (浙江吉诺, 货号 B2004Y-25), 葡萄糖 (国药集团, 分析纯, 货号 20201105)。仪器包括荧光显微镜 (Leica DM2500), PCR 仪 (EasyCycler Gradient 96), 分析天平 (Sartorius, MSE2258-00TU), 电泳仪 (BIO-RAD SD), 凝胶成像系统 (BIO-RAD XRS)。

### 1.2 实验菌株的来源、遗传改造的过程

用于本实验的大肠埃希菌 BW25113 的亲本菌来自 *E. coli* K12 株, 保留了 K12 中的 I 型 CRISPR/Cas 系统<sup>[14]</sup>, 即含有 CRISPR 阵列和 8 个 Cas 蛋白, 其所携带的 pGLO 质粒本身带有编码 GFP 的基因和 Amp 抗性基因, 以及参与 GFP 表达的基因调控系统, 这是本实验所用工程菌的基本组成元件。其中, pGLO 质粒上的 GFP 基因经钙转化后在阿拉伯糖诱导下方能启动表达, 由于体内环境中阿拉伯糖启动子可能存在泄露表达, 进而影响功能基因的表达, 因此将原阿拉伯糖启动子 (pGLO-araC-GFP) 替换成 J23100 组成型启动子, 该启动子与 pGLO 载体通过连接酶作用后得到 pGLO-J23100-GFP 新质粒, 钙转化后该质粒成为 Nissle1917 菌株的部分元件。2 株菌的质粒图谱如图

1 所示。Nissle1917 菌株亲本虽自身没有自然携带 CRISPR 系统, 但它是一株能定植于宿主肠道, 对免疫疾病和胃肠道功能障碍有很好的治疗作用, 并能繁殖成为肠道优势菌的益生菌。因此本研究选用 BW25113 和 Nissle1917 作为载体菌, 构建出 pGLO-J23100-GFP 质粒, 通过钙转化实验得到工程菌, 作为评价体内定植能力与效率的工具, 由此结果来评价带有 CRISPR/Cas 系统的优势大肠埃希菌工程菌在体内消减耐药性的可能性。

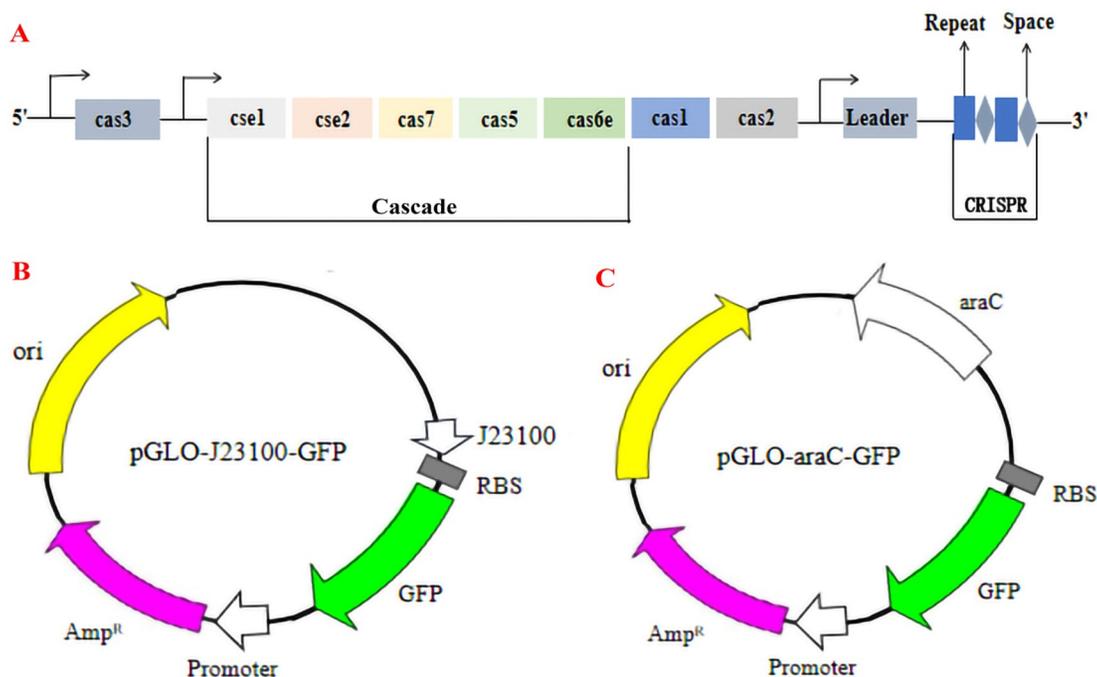
2 株工程菌均由浙江工业大学孙东昌课题组构建完成, 构建成功后进行了体外荧光检测, 检测过程如下: 在处于对数生长期、 $5 \times 10^{10}$  CFU/mL 的工程菌原液中加入 PBS (pH 7.0), 稀释至  $2 \times 10^{10}$  CFU/mL 后, 将原液及稀释液制片置于荧光显微镜下观察。体外测试合格后的菌株进入体内试验阶段, 根据研究目的最终筛选出定植能力强的菌株。

### 1.3 实验动物与分组

SPF 级 ICR 小鼠, 6~8 周龄, 雌雄各半, 体质量为 18~20 g, 购自浙江省实验动物中心 [SCXK (浙) 2019-0002], 质量合格证号为 20220609Abzz0100018587 和 20220720Abzz0100018329。将上述 2 株工程菌 Nissle1917、BW25113 分别给小鼠灌胃, 依据 GFP 发光特性及 Amp 抗性特征, 分别采用平板划线、荧光镜检和 PCR 法检测工程菌定植情况, 从而比较 2 株工程菌在小鼠体内的定植能力和定植效率。每一株工程菌定植实验均需使用 70 只小鼠, 按 1、3、6、12、24、48 和 72 h 等 7 个时间点进行灌胃的实验方案将它们随机分为 7 组, 每组 10 只, 其中实验组 6 只, 对照组 4 只, 每组雌雄数相等, 每次单性别 7 组小鼠经过 2 d 的适应期后进入正式实验阶段。动物实验在浙江省实验动物中心 (杭州医学院实验动物中心) 屏障系统动物房 [SYXK (浙) 2019-0011] 进行, 饲养环境温度 (23±3) °C, 相对湿度维持在 40%~70%, 光照保持明/暗 12 h 交替, 用<sup>60</sup>Co 辐照的全价营养饲料喂养, 自由进食饮水。动物实验方案经浙江省实验动物中心实验动物福利伦理委员会批准 (No. ZJCLA-IACUC-20130001), 取样前采用 CO<sub>2</sub> 麻醉, 动物实验全程及相关措施符合动物伦理。

### 1.4 大肠埃希菌选择性培养基制备

配制 Amp 溶液: 称取 1 g 氨苄青霉素粉末置于 15 mL 塑料离心管中, 加入 10 mL 去离子水充分混合使其溶解; 用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌后, 将等份试样装于



注: J23100, 组成型启动子; RBS, 核糖体结合位点; GFP, 绿色荧光蛋白表达基因 (荧光报告系统元件); Promoter, 基因启动子; Amp<sup>R</sup>, 氨苄青霉素抗性筛选标记基因; araC, ara操纵子调节蛋白。

Note: J23100, constitutive promoter; RBS, ribosome binding site; GFP, green fluorescent protein expression gene (fluorescent reporter system element); Promoter, gene promoter; Amp<sup>R</sup>, ampicillin resistance selection marker gene; araC, ara operon regulatory protein.

图1 大肠埃希菌I型CRISPR-Cas系统结构示意图(A)以及 Nissle1917 菌株中 pGLO-J23100-GFP 质粒图谱(B)和 BW25113 菌株中 pGLO-araC-GFP 质粒图谱(C)

Figure 1 Structure of the *E. coli* I CRISPR-Cas system (A), plasmid profile of pGLO-J23100-GFP in Nissle1917 (B), and plasmid profile of pGLO-araC-GFP in BW25113 (C)

EP管内, 在 $-20^{\circ}\text{C}$ 条件储存。Amp<sup>+</sup> LB 固体培养基: 依照培养基说明书 (胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母浸粉 5.0 g/L, 氯化钠 10.0 g/L, 琼脂 15.0 g/L) 称取适量 LB 营养琼脂培养基倒入锥形瓶, 加入对应量蒸馏水, 置于高温高压灭菌锅中  $121^{\circ}\text{C}$  20 min。灭菌后待冷却至  $60^{\circ}\text{C}$  以下加入 Amp 母液, 使用质量浓度为 100 mg/L, 倒入无菌平皿, 待凝固后将平板置于  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.5 饲料荧光干扰的排除

选取依照国家标准生产的商品化的小鼠饲料, 研磨至粉末状后取少量, 滴加 PBS 后制片; 同时用纯净水配制 10% 葡萄糖水, 在荧光显微镜下观察饲料和葡萄糖水的荧光情况, 以此检验饲料是否会对本实验工程菌的荧光观察造成干扰。

### 1.6 大肠埃希菌工程菌在小鼠体内定植方法的建立

实验前小鼠禁食 48 h (给予 10% 葡萄糖水代替饲料供能), 然后将用于定植研究的处于对数生长期的大肠埃希菌  $5 \times 10^{10}$  CFU/mL 用 PBS 稀释至  $2 \times 10^{10}$  CFU/mL,

以  $200 \mu\text{L}$  剂量灌胃于实验组小鼠; 对照组小鼠同时灌胃相同体积的 PBS。以灌胃后 1、3、6、12、24、48、72 h 为时间节点对小鼠进行  $\text{CO}_2$  麻醉后断颈处死, 切开腹部皮肤及肌层后, 自胃起到结肠止, 按顺序进行取样。分别用灭菌手术剪、镊子、牙签等取出小鼠的肠系膜淋巴结及胃、回盲部、结肠组织和内容物, 用作后续检测定植的样品。

### 1.7 平板划线法检测工程菌定植

肠系膜淋巴结及胃、回盲部、结肠内容物称重后加入少量灭菌 PBS 稀释, 淋巴结需匀浆处理。在酒精灯下用已灭菌处理的接种环蘸取稀释液, 划线接种至 Amp<sup>+</sup> LB 固体培养基中, 将平板置于  $37^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中培养过夜, 观察平板上菌落生长情况。于不同时间节点, 比较工程菌 Nissle1917 和 BW25113 在小鼠体内各部位的存在状况。

### 1.8 荧光镜检法检测工程菌定植

肠系膜淋巴结加入灭菌 PBS 匀浆, 胃、回盲部、

结肠部位组织用PBS稍稍冲洗, 除去黏附在组织壁上的残留内容物, 减少组织上的干扰荧光。用眼科镊、眼科剪取下相应的组织, 手术刀刮取黏膜黏液后, 平铺在载玻片上, 平均厚度 $50\ \mu\text{m}\sim 1\ \text{mm}$ , 置于具有适当滤光片的荧光显微镜下, 在波长 $470\ \text{nm}$ 的激发光下观察组织部位GFP标记的工程菌, 利用LAS Core图像分析软件处理保存图片。根据灌胃时长, 比较组织黏膜表面工程菌 Nissle1917 和 BW25113 的黏附情况, 初步判断工程菌在体内的定植时长及部位, 以此评价菌株定植能力。

### 1.9 PCR法检测工程菌的存在

组织样品通过加热煮沸法使得细菌细胞破裂, 蛋白质热变性沉淀释放出DNA, 以此作为DNA模板; 由于2株工程菌的质粒都携带GFP基因, 因此根据GenBank (登录号U55763) 中报告质粒GFP基因序列设计出能扩增其条带的特异性上下游引物序列: GFP-F为 $5'\text{-TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGAT-}3'$ , GFP-R为 $5'\text{-TTATTTGTAGAGCTCATCCAT-}3'$ , 扩增片段长度为 $750\ \text{bp}$ , 引物由上海生工合成。PCR反应体系

( $10\ \mu\text{L}$ ):  $2\times\text{Green Taq Mix } 5\ \mu\text{L}$ , 上下游引物各 $0.5\ \mu\text{L}$  ( $10\ \mu\text{mol/L}$ ), DNA模板 $0.5\ \mu\text{L}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O } 3\ \mu\text{L}$ 。PCR扩增条件:  $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $5\ \text{min}$ ;  $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$ ,  $55\ ^\circ\text{C}$ 退火 $15\ \text{s}$ ,  $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $2\ \text{min}$ , 30个循环;  $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $7\ \text{min}$ 。通过1%琼脂糖凝胶电泳分析PCR产物。

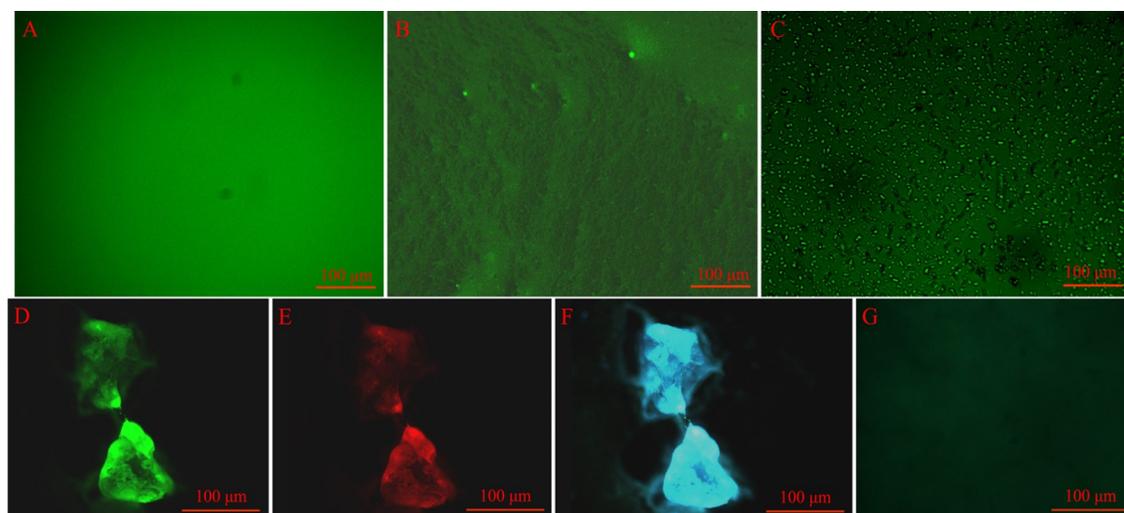
## 2 结果

### 2.1 灌胃前工程菌的检测与鉴定

体外检测结果发现: 构建的2株工程菌原液与稀释液均能在荧光镜检下发出绿色荧光(图2A、2B), 稀释液在荧光显微镜下放大一定比例后能看见绿色短杆状菌体(图2C), 这表明工程菌体外测试合格, 之后可进入体内实验阶段。

### 2.2 饲料荧光排除及替代方法确定

对饲料及10%葡萄糖水进行荧光镜检, 发现饲料均存在明显的绿色、红色和蓝色荧光(图2D~F), 而配制的10%葡萄糖水未发现任何荧光(图2G), 因此在实验禁食过程中选用10%葡萄糖水代替饲料给小鼠供能, 维持小鼠正常生理活动。



注: A, 工程菌原液( $\times 100$ ); B~C, 工程菌稀释液(B,  $\times 100$ ; C,  $\times 1000$ ); D~F, 饲料(D, 绿荧光; E, 红荧光; F, 蓝荧光)( $\times 200$ ); G, 10%葡萄糖水( $\times 200$ )。

Note: A, Stock solution of engineered bacteria ( $100\times$ ); B-C, Dilution solution of engineered bacteria (B,  $\times 100$ ; C,  $\times 1000$ ); D-F, Green, red and blue fluorescence in diet ( $\times 200$ ); G, Fluorescence in 10% glucose water ( $\times 200$ )

图2 工程菌原液和稀释液以及饲料和10%葡萄糖水的荧光检测结果

Figure 2 Fluorescence in stock solution and dilution solution of *E. coli* engineered bacteria as well the diet and 10% glucose water

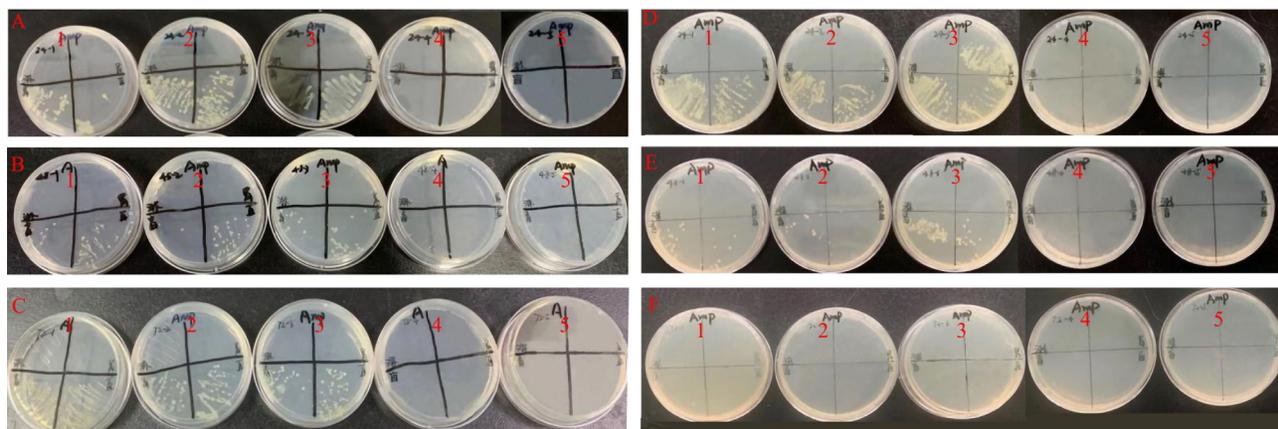
### 2.3 平板划线法检测工程菌定植

将提取的肠系膜淋巴结、胃、回盲部、结肠内容物稀释液划线接种至  $\text{Amp}^+$  LB 固体培养基并培养

24 h, 平板上出现了圆形的乳白色菌落, 表面光滑、湿润且带光泽, 边缘干净整齐<sup>[15]</sup>。1、3、6、12 h 这4个时段下, Nissle1917 与 BW25113 这2株菌主要

在平板上标记的胃、回盲部和结肠部位有菌落生长,且长菌现象差异不明显。但2株菌在24、48、72 h这3个时间段中,平板上菌落生长现象出现变化(图3):灌胃24 h时BW25113菌在胃、回盲部和结肠部位长菌,而Nissle1917菌仅在回盲部和结肠部位

长菌;灌胃48 h时2株菌均在回盲部和结肠部位长菌,胃部已无菌落生长;灌胃72 h时有且仅有Nissle1917菌在回盲部和结肠部位长菌;除此之外,肠系膜淋巴结匀浆后在Amp<sup>+</sup>平板划线,均没有出现细菌生长。



注: A~C依次为灌胃后24 h、48 h、72 h的Nissle1917菌; D~F分别为灌胃后24 h、48 h、72 h的BW25113菌; 1、2、3为工程菌实验组, 4、5为PBS对照组; 同一平板左上、右上、左下、右下依次为肠系膜淋巴结、胃、回盲部、结肠。

Note: A-C, Nissle1917 at 24, 48, and 72 h after gavage, respectively; D-F, BW25113 at 24, 48, and 72 h after gavage, respectively; 1, 2, and 3 are engineered *E. coli* experimental groups; 4 and 5 are the PBS control groups; from the left to the right, and from the top to the bottom on the same plate: mesenteric lymph nodes, stomach, ileocecal and colon tissues.

图3 Amp<sup>+</sup>平板检测2株工程菌在小鼠体内各部位的定植情况

Figure 3 Amp<sup>+</sup> plate detection of the colonization of two *E. coli* strains in mouse tissues

## 2.4 荧光镜检法检测肠道组织工程菌黏附

为了更直接寻找工程菌,用荧光显微镜观察胃肠道组织标本,发现灌胃后1、3、6、12 h前4个时段下Nissle1917与BW25113菌均能在胃、回盲部和结肠组织上观察到细菌黏附且差异不明显。但2株菌在24、48、72 h后3个时间段下细菌黏附现象出现变化(图4):灌胃24 h,2株菌在回盲部、结肠组织上都能看到明显的细菌黏附;灌胃48 h,虽然2株菌在回盲部及结肠组织均观察到细菌黏附,但相同视野下Nissle1917菌能看到90%左右的菌呈点状连片密集地黏附在组织上,而BW25113菌仅出现1~2个零星黏附菌点,反映出当下BW25113菌在盲结肠段存在情况已不明朗;灌胃72 h,仅观察到Nissle1917菌在回盲部、结肠组织上有片状、密集细菌黏附,而BW25113菌未发现在任何组织上有细菌黏附现象。

## 2.5 PCR法验证工程菌的定植

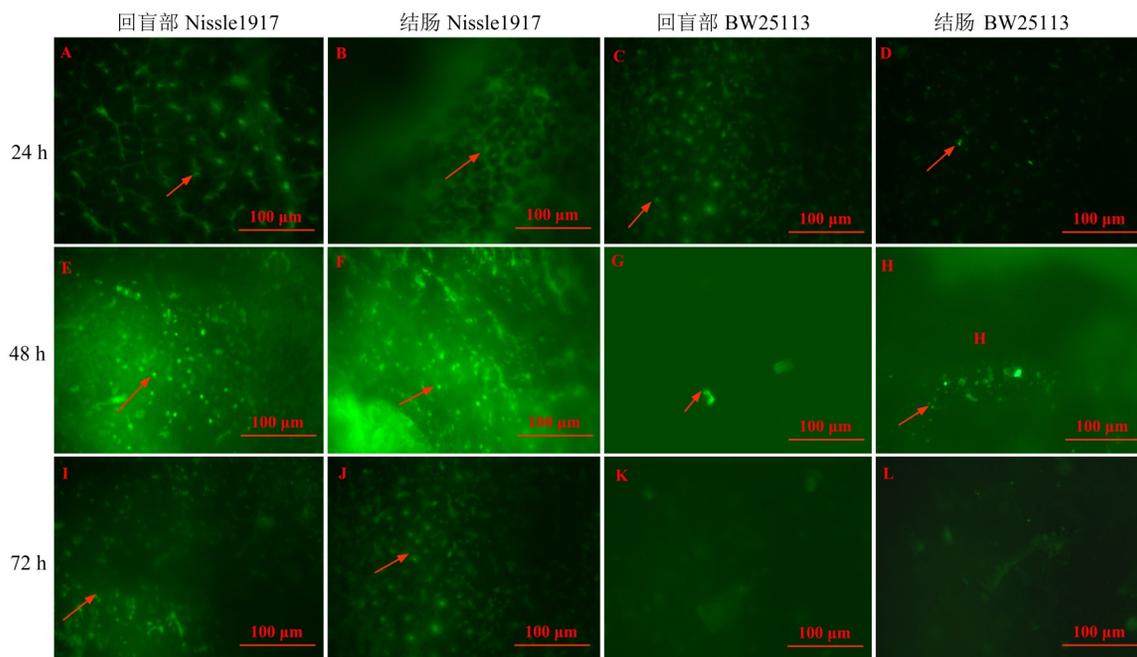
组织样品经沸水裂解后直接用作DNA模板;利用特异性引物扩增GFP基因,以灌胃前的工程菌菌液作

为PCR结果的阳性对照。为比较2株工程菌在灌胃较长时段后盲结肠组织中是否仍有存在,选取了24 h、48 h、72 h这3个时段的实验小鼠回盲部及结肠组织进行PCR。PCR产物的电泳结果如图5所示:实验组DNA电泳出现目的条带(750 bp处)且较为清晰,阴性对照组无条带显示。

结合工程菌Nissle1917、BW25113的PCR电泳结果对比分析发现:24 h时的回盲部及结肠组织中都扩增到2株菌的目的条带;48 h时的回盲部及结肠部位扩增到Nissle1917菌的目的条带,而BW25113菌的目的条带仅在回盲部扩增到;72 h时的回盲部、结肠组织中仍能扩增到Nissle1917菌目的条带,但无法扩增到BW25113菌目的条带。由此说明灌胃72 h后,小鼠回盲部及结肠组织中有Nissle1917菌存在而没有BW25113菌。此外,肠系膜淋巴结及胃组织的PCR结果均未产生2个菌株的目的条带。

## 2.6 2株工程菌定植能力和定植效率的比较

通过在1、3、6、12、24、48、72 h这7个时间节

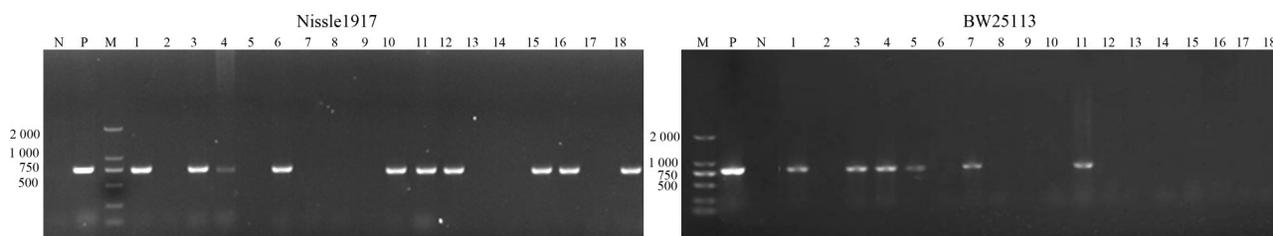


注：A，灌胃后 24 h 回盲部 Nissle1917；B，24 h 结肠 Nissle1917；C，24 h 回盲部 BW25113；D，24 h 结肠 BW25113；E，48 h 回盲部 Nissle1917；F，48 h 结肠 Nissle1917；G，48 h 回盲部 BW25113；H，48 h 结肠 BW25113；I，72 h 回盲部 Nissle1917；J，72 h 结肠 Nissle1917；K，72 h 回盲部 BW25113；L，72 h 结肠 BW25113。箭头示黏附的发光细菌。

Note: A, Nissle1917 in the ileocecal area at 24 h; B, Nissle1917 in the colon at 24 h; C, BW25113 in the ileocecal area at 24 h; D, BW25113 in the colon at 24 h; E, Nissle1917 in the ileocecal area at 48 h; F, Nissle1917 in the colon at 48 h; G, BW25113 in the ileocecal area at 48 h; H, BW25113 in the colon at 48 h; I, Nissle1917 in the ileocecal area at 72 h; J, Nissle1917 in the colon at 72 h; K, BW25113 in the ileocecal area at 72 h; L, BW25113 in the colon at 72 h. Arrows show attached glowing bacteria.

图 4 荧光镜检法检测灌胃后 24 h、48 h 和 72 h 小鼠肠道组织中 2 株工程菌的黏附情况 (×200)

Figure 4 Fluorescence microscopic detection of adhesion of 2 strains of engineered *E. coli* in the intestinal tissue of mice at 24 h, 48 h, and 72 h after gavage (×200)



注：M，DNA marker (DL2 000)；P，阳性对照 (Nissle1917/BW25113)；N，阴性对照 (PBS)；1-6 泳道，灌胃 24 h (1、3、5 泳道为回盲部，2、4、6 泳道为结肠)；7-12 泳道，灌胃 48 h (7、9、11 泳道为回盲部，8、10、12 泳道为结肠)；13-18 泳道，灌胃 72 h (13、15、17 泳道为回盲部，14、16、18 泳道为结肠)。

Note: M, DNA marker (DL2 000); P, Positive control (Nissle1917/BW25113); N, Negative control (PBS). Lanes 1–6: Gavage 24 h (lanes 1, 3 and 5 show ileocecal, lanes 2, 4 and 6 show colon); Lane 7–12: Gavage 48 h (lanes 7, 9 and 11 show ileocecal, lanes 8, 10 and 12 show colon); Lane 13–18: Gavage 72 h (lanes 13, 15 and 17 show ileocecal, lanes 14, 16 and 18 show colon).

图 5 工程菌 Nissle1917 和 BW25113 的 PCR 产物电泳

Figure 5 Electrophoresis of PCR products of Nissle1917 and BW25113

点分别采用以上 3 种方法对胃肠道及肠系膜淋巴结部位 2 株工程菌的定植能力比较，可以看出 Nissle1917 菌在 1~72 h 胃肠道中都有定植，而 BW25113 在 1~48 h 胃肠道有定植，72 h 时胃肠道无定植，提示 Nissle1917 菌

的定植能力强于 BW25113。对肠系膜淋巴结部位进行检测，发现各时段下都不存在工程菌定植，说明实验过程中工程菌并未在该部位造成外漏，表明小鼠肠系膜淋巴结作为肠道免疫系统能起到较好的保护作用。

根据 70 只实验鼠体内工程菌定植结果进行统计, 结果显示: 1~72 h 内 Nissle1917 菌在胃、回盲部和结肠的定植率均为 100%; 而 1~48 h 内 BW25113 仅在回盲部和结肠定植, 且在 48 h 的定植率为 60%, 在 72 h 时 BW25113 已无定植。图 6 示 2 株菌在 24~72 h 的定植效率, 反映出工程菌 Nissle1917 的定植效率高于 BW25113。

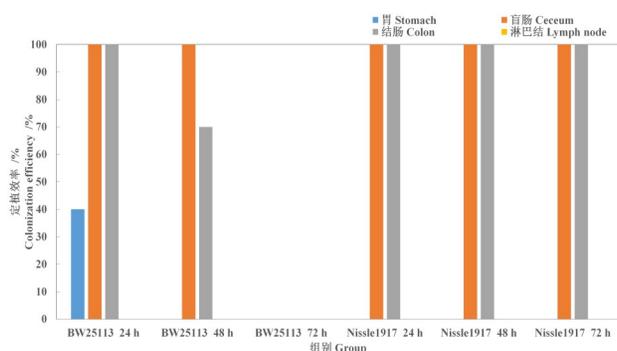


图 6 工程菌 Nissle1917 和 BW25113 灌胃 24~72 h 后在小鼠不同组织中的定植效率比较

Figure 6 Comparison of the colonization efficiency of Nissle1917 and BW25113 (gavage 24–72 h) in different tissues of mice

### 3 讨论

前期实验中本课题组摸索了 Nissle1917、BW25113 两株工程菌在 ICR、BALB/c、C57BL/6 三个品种品系小鼠中的定植情况, 发现各品种品系间小鼠体内荧光差异不大。考虑到 2 株菌后期将在农业畜禽及携带耐药菌的人体推广应用, 本研究选用了 ICR 小鼠作为实验动物, 通过灌胃、检测, 完成 2 株工程菌的定植实验。Amp<sup>+</sup>平板划线法检测工程菌的结果显示, 从灌胃这 2 株菌的小鼠中提取的胃肠道内容物在 Amp<sup>+</sup>平板划线培养后都能有菌落生长, 但随着时间延长, 二者在平板上的长菌现象产生差异: Nissle1917 菌灌胃 72 h 后在 Amp<sup>+</sup>平板的回盲部及结肠标记处仍长出菌落, 而此时 BW25113 菌在 Amp<sup>+</sup>平板的回盲肠及结肠标记处无长菌痕迹。结果提示: Nissle1917 菌可以较长时间定植于小鼠盲结肠中; 而 BW25113 菌随着小鼠体内代谢活动的进行逐渐被清除, 直至 72 h 已无法定植, 其定植能力明显弱于 Nissle1917 菌。除此之外, 肠系膜淋巴结匀浆后在 Amp<sup>+</sup>平板划线并没有出现细菌生长, 表明 2 株菌未在肠系膜淋巴结处产生外漏, 肠系膜淋巴结作为

肠道免疫系统可以很好地起到保护作用。

由于 GFP 表达可以直观显示工程菌在体内的代谢过程, 因此本研究利用荧光显微镜对小鼠肠道组织进行了观察, 以寻找工程菌踪迹。结果显示, Nissle1917 菌灌胃 72 h 时能定植于盲结肠黏膜表面; 而 BW25113 菌灌胃 24 h 后在小鼠肠道内, 由于黏附不牢固而慢慢脱落, 从而随着代谢活动被排出体外。因此, Nissle1917 菌在小鼠体内的定植能力比 BW25113 菌更强, Nissle1917 菌在整个过程中逐渐成为小鼠肠道内的一种优势菌, 较稳定地黏附定植于回盲部及结肠组织。此外, 本研究在肠系膜淋巴结上未发现细菌黏附, 再次印证工程菌并未在肠系膜淋巴结处产生外漏, 符合实验预期。需要说明, GFP 发光需激发光激发, 动物饲料及机体很多物质在受到激发光后同样产生荧光, 虽然在本实验中已做优化, 将 10% 葡萄糖水代替饲料给小鼠供能, 但仍有不可避免的非特异性荧光会干扰工程菌检测。因此仅通过 GFP 标记还不能非常精准地示踪到体内的工程菌, 这也是运用此方法检测体内定植的弊端。

PCR 验证结果同样发现, Nissle1917 菌在 72 h 回盲部、结肠扩增到目的条带, 而 BW25113 菌未扩增到, 且肠系膜淋巴结及胃组织 PCR 未产生条带。然而 PCR 结果存在一定缺陷, 不同时段的回盲部及结肠组织 PCR 电泳出目的条带只能在一定程度上说明工程菌的存在, 但无法证明工程菌是黏附于组织的活菌抑或是未被清除残留的死菌, 因此不能准确判断工程菌是否真正定植在盲结肠段。另外, 实验中使用的移液枪可能会在提取样品 DNA 模板过程中被污染, 从而导致标本交叉污染, 存在假阳性问题。鉴于以上, 以培养法为金标准的同时, 辅之其他 2 种方法, 最后将 3 种方法结合起来综合对比与分析, 才能从观察结果得出相对准确的结论。

本实验结果显示 2 株工程菌体内定植能力存在明显差异, 这种差异现象尤其体现在灌胃后 72 h, Nissle1917 菌可以定植, 而 BW25113 菌无法定植。Nissle1917 菌有较强的定植能力, 这与前人的结果相一致<sup>[16-18]</sup>。Nissle1917 菌与 BW25113 菌之间定植能力的不同可能与其基因型差异有关<sup>[19]</sup>, 可以通过优化启动子强度、基因拷贝数、核糖体结合位点和细菌代谢进一步提高菌株定植能力。此外, Conway 等<sup>[20]</sup>的研究也指出, 大肠埃希菌在体内代谢的灵活性及应变性可能是其能成功定植在肠道的关键条件。另外, BW25113 菌的 I 型 CRISPR/Cas 系统仅出于基因调控目

的时, 只需对菌株进行工程改造并表达 CRISPR/Cas 系统即可, 因此可用于内部调控而不会引起代谢负担<sup>[21]</sup>; 而且由于其易于在任何位置插入 CRISPR 元件, 不仅能对单一耐药菌起作用, 也能对多重耐药菌发挥作用。但 CRISPR/Cas 系统在大肠埃希菌中调控较为严格, 导致它们可能被沉默<sup>[22]</sup>, 进而会影响基因编辑效率, 故 CRISPR/Cas 系统需要特定的诱导型启动子进行激活<sup>[23]</sup>。Nissle1917 菌虽然定植能力强, 但在细菌传代过程中 CRISPR 元件容易丢失<sup>[8]</sup>, 且存在稳定引入 CRISPR/Cas 系统的 Nissle1917 工程菌在体外扩繁时生长速度较慢的缺陷。

本研究的不足是没有基于传统的电镜技术去检测工程菌的定植, 没有能提供一张工程菌定植于回盲部及结肠的超显微形态学图片; 另外, 制备肠黏液、黏膜涂片时采用手术刀片刮取后直接贴在载玻片上, 由于经验不足, 贴片不均匀, 摄影时可能存在焦距不一的问题, 以后在制片与摄片技术上还需要加强。

#### [医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验均已通过浙江省实验动物中心实验动物福利伦理委员会审查批准 (No. ZJCLA-IACUC-20130001)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee of Zhejiang Laboratory Animal Center (Approval Letter No. ZJCLA-IACUC-20130001). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including the guidelines such as *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018), and so on.

#### [作者贡献 Author Contribution]

任晨吟和高思琦分别负责完成 3、6、24 h 和 12、48、72 h 各 3 个时间点的检测实验, 一起完成 1 h 时间点的检测实验, 以及论文初稿的写作; 李浩负责实验实施结果的修正与绘图; 唐标负责提供工程菌、亲本及检测方法的培训与核对; 杨华负责实验结果的核对与把关; 刘月环负责实验总体设计及关键性修改, 论文定稿把关。

#### [利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

#### [参考文献 References]

[1] 迟小惠, 冯友军, 郑培文. 耐药菌在人-动物-环境中的传播和遗传机制[J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 311-318. DOI: 10.13344/j.

microbiol.china.180864.

CHI X H, FENG Y J, ZHENG B W. Transmission and genetic mechanism of drug-resistant bacteria in multi-sectors[J]. Microbiol China, 2019, 46(2):311-318. DOI:10.13344/j.microbiol.china.180864.

- [2] 马瑞芬, 张文羿, 张和平, 等. 细菌抗生素耐药机制研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2014, 26(7):854-857. DOI:10.13381/j.cnki.cjm.201407032.
- MA R F, ZHANG W Y, ZHANG H P, et al. Mechanisms of bacterial antibiotic resistance: progress in studies[J]. Chin J Microbiol, 2014, 26(7): 854-857. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.201407032.
- [3] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. Science, 2014, 346(6213): 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- [4] JIANG F, DOUDNA J A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms[J]. Annu Rev Biophys, 2017, 46: 505-529. DOI: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- [5] WANG Y, ZHANG Z T, SEO S O, et al. Bacterial genome editing with CRISPR-Cas9: deletion, integration, single nucleotide modification, and desirable clean mutant selection in *Clostridium beijerinckii* as an example[J]. ACS Synth Biol, 2016, 5(7):721-732. DOI:10.1021/acssynbio.6b00060.
- [6] 徐艳, 崔玉晓, 杨洋, 等. CRISPR/Cas 系统抵御细菌耐药[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3): 1-8. DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170804001.
- XU Y, CUI Y X, YANG Y, et al. CRISPR/cas system resist to bacterial resistance[J]. Asian J Ecotoxicol, 2018, 13(3):1-8. DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170804001.
- [7] 杨萍, 孙兵兵, 杨俊杰, 等. CRISPR-Cas 系统的抗耐药菌应用[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(8):927-931. DOI:10.13461/j.cnki.cja.006318.
- YANG P, SUN B B, YANG J J, et al. The application of CRISPR-Cas system in antibacterial resistance[J]. Chin J Antibiot, 2018, 43(8):927-931. DOI:10.13461/j.cnki.cja.006318.
- [8] 孙东昌, 裴娟萍. I-E 型 CRISPR/Cas 系统介导适应性免疫分子机制研究进展[J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 1-7. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150132.
- SUN D C, QIU J P. Advances in molecular mechanisms of adaptive immunity mediated by type I-E CRISPR/Cas system -A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(1): 1-7. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150132.
- [9] 张云鹏, 温彤, 姜伟. 大肠杆菌和酵母表达系统的研究进展[J]. 生物技术进展, 2014, 4(6):389-393. DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2014.06.02.
- ZHANG Y P, WEN T, JIANG W. The research progress of *Escherichia coli* expression systems and yeast expression systems[J]. Curr Biotechnol, 2014, 4(6):389-393. DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2014.06.02.
- [10] 徐娜娜, 范文廷, 毕茹茹, 等. 功能性便秘患者肠道菌群分析及肠道菌群调节作用的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(1):34-36. DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2018.01.10.
- XU N N, FAN W T, BI R R, et al. Analysis of intestinal flora in

- patients with functional constipation and research progress on its regulation[J]. *Chin J Clin Lab Sci*, 2018, 36(1):34-36. DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2018.01.10.
- [11] 王梦颖, 赵国忠, 韩俊燕, 等. 食源性乳酸菌的分离及其在小鼠肠道的定植能力[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(5):239-245. DOI:10.16429/j.1009-7848.2018.05.028.
- WANG M Y, ZHAO G Z, HAN J Y, et al. Isolation of foodborne lactic acid bacteria and detection of the colonization ability in mouse intestinal tract[J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2018, 18(5):239-245. DOI:10.16429/j.1009-7848.2018.05.028.
- [12] WANG Y P, WANG J R, DAI W L. Use of GFP to trace the colonization of *Lactococcus lactis* WH-C1 in the gastrointestinal tract of mice[J]. *J Microbiol Methods*, 2011, 86(3): 390-392. DOI:10.1016/j.mimet.2011.06.009.
- [13] O'HARA A M, O'REGAN P, FANNING A, et al. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*[J]. *Immunology*, 2006, 118(2): 202-215. DOI: 10.1111/j. 1365-2567.2006.02358.x.
- [14] KIRO R, GOREN M G, YOSEF I, et al. CRISPR adaptation in *Escherichia coli* subtype I-E system[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(6):1412-1415. DOI:10.1042/BST20130109.
- [15] 常新耀, 谢红兵, 魏刚才, 等. 鸡大肠杆菌的生化特性-致病性及药敏试验研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(11):4536-4538.
- CHANG X Y, XIE H B, WEI G C, et al. Study on the biochemistry characteristic and pathogenicity of *E. coli* and its drug sensitivity test[J]. *J Anhui Agric Sci*, 2008, 36(11):4536-4538.
- [16] BEHNSEN J, DERIU E, SASSONE-CORSI M, et al. Probiotics: properties, examples, and specific applications[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013, 3(3): a010074. DOI:10.1101/cshperspect.a010074.
- [17] KIM D, KIM Y, YOON S H. Development of a genome-scale metabolic model and phenome analysis of the probiotic *Escherichia coli* strain nissle 1917[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 2122. DOI:10.3390/ijms22042122.
- [18] CROOK N, FERREIRO A, GASPARRINI A J, et al. Adaptive strategies of the candidate probiotic *E. coli* nissle in the mammalian gut[J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(4):499-512.e8. DOI:10.1016/j.chom.2019.02.005.
- [19] YU X L, LIN C S, YU J, et al. Bioengineered *Escherichia coli* Nissle 1917 for tumour-targeting therapy[J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(3):629-636. DOI:10.1111/1751-7915.13523.
- [20] CONWAY T, COHEN P S. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut[J]. *Microbiol Spectr*, 2015, 3(3):10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014. DOI:10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014.
- [21] CHANG Y Z, SU T Y, QI Q S, et al. Easy regulation of metabolic flux in *Escherichia coli* using an endogenous type I-E CRISPR-Cas system[J]. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1):195. DOI:10.1186/s12934-016-0594-4.
- [22] WESTRA E R, SWARTS D C, STAALS R H J, et al. The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity[J]. *Annu Rev Genet*, 2012, 46:311-339. DOI:10.1146/annurev-genet-110711-155447.
- [23] LI X T, SOU C, JUN S. Protocol for construction of a tunable CRISPR interference (tCRISPRi) strain for *Escherichia coli*[J]. *Bio-protocol*, 2017, 7(19): e2574. DOI:10.21769/BioProtoc.2574.

(收稿日期:2022-06-17 修回日期:2022-08-31)

(本文编辑:张俊彦,丁宇菁,富群华,周培)

\*\*\*\*\*

## 《实验动物与比较医学》2023年征订启事

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)由上海科学院主管,上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办,是我国实验动物科学及比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊),并被瑞典DOAJ、美国Chemical Abstracts和Ulrichsweb、英国CAB Abstracts和Global Health、波兰ICI World of Journals和ICI Master List数据库,以及中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录,2020年入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录。

本刊兼顾理论与实践、普及与提高,刊登实验动物科学和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究,以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。设置栏目包括专家论坛、研究论著、综述、经验交流、实践与探索、技术与平台、政策与法规、标准与指南、人物、简报、动态与书讯等。读者对象为生物学、医学、药学、动物学和农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测和管理,以及应用实验动物进行比较医学研究的广大科技工作者、教育工作者和医学工作者。欢迎订阅!

本刊为双月刊,大16开,铜版纸,彩色印刷;全年出版6期,每期定价30元/本,全年定价180元/套。读者可在各地邮局订阅,邮发代号为4-789;也可以联系本刊编辑部购买,联系电话:021-50793657。E-mail:bjb50793657@163.com。编辑部地址:上海市浦东新区金科路3577号(邮编201203)。期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部