

噬菌体基因工程技术与应用研究进展

焦耀萱, 李敏, 屈昕雅, 刘恬伶, 生秀梅, 周晓祥*

江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013

摘要: 抗生素耐药性已成为全球人类健康面临的重大威胁,医药、工业、农业生产以及生态等领域均受到多重耐药菌的严重威胁。多重耐药菌感染逐渐呈现高发病率、高死亡率的趋势。噬菌体可以特异性裂解多重耐药病原菌,然而由于噬菌体宿主谱狭窄、基因组中含有不利基因等因素的制约,当前只有部分噬菌体成功应用于防治多重耐药菌感染等领域。噬菌体基因工程具有可编辑、高效等优势,为拓宽噬菌体宿主谱、设计“安全、绿色、高效”的新型噬菌体提供了理论基础。综述了噬菌体基因工程技术的最新研究进展,以及噬菌体在临床抗耐药菌感染、农业生产和生态环境等方面的实际应用,为噬菌体的定向改造及其在各领域中的有效应用提供了理论支持和参考。

关键词: 噬菌体; 基因重组; 基因编辑; 多重耐药; 噬菌体疗法

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2024.0138

中图分类号: Q939.48

文献标志码: A

Advances on Phage Genetic Engineering Technology and Applications

JIAO Yaoxuan, LI Min, QU Xinya, LIU Tianling, SHENG Xiumei, ZHOU Xiaoxiang*

School of Medicine, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China

Abstract: Antibiotic resistance has become one of the most critical threats to global health. The emergence of multi-drug resistant bacterial infections has led to increasingly high morbidity and mortality rates across medical, industrial, agricultural, and ecological domains. Phages can specifically lyse multi-drug resistant pathogens. However, due to their narrow host range, the presence of unfavorable genes in their genomes, and other limitations, only a limited number of phages have been successfully applied to combat multidrug-resistant bacterial infections. With editable and efficient features, phage genetic engineering provides a promising approach for expanding phage host ranges and designing "safe, green, and efficient" novel phages. This review systematically summarized recent advances in phage genetic engineering technologies while highlighting their practical applications in clinical therapies against drug-resistant infections, agricultural production, and ecological remediation. These insights established theoretical foundations for phage modification and their effective utilization in diverse fields.

Key words: bacteriophage; genetic recombination; genome editing; multidrug resistance; phage therapy

自20世纪40年代开始广泛使用抗生素,但由于抗生素在医学和农业等领域的使用和监管不力,导致抗生素耐药性的威胁不断加剧^[1]。目前,多重耐药菌株已经对人类的身体健康构成严重威胁,成为21世纪全球公共卫生领域亟待解决的关键问题^[2]。因此,人们将目光投向了潜在的新型抗菌剂——噬菌体^[3]。近年来,噬菌体抗菌治疗的临床实践不断涌现,表明噬菌体可以作为防控

多重耐药菌感染的一种重要手段^[4]。噬菌体是一类能够在细菌细胞内感染并自我复制的微小生物(大小通常为20~200 nm),具有宿主特异性高、易于获取以及安全性高等特点^[5-6]。目前,噬菌体已成功应用于医疗保健、疫苗开发、生物传感装置以及抗菌药物的靶向递送等多个领域^[7-8]。

噬菌体在作为抗菌剂进行临床治疗时仍面临诸多挑战,如噬菌体宿主谱较窄以及致病菌对噬

收稿日期: 2024-08-22; 接受日期: 2024-12-27

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目(2023M731366); 江苏省自然科学基金项目(BK20230527)。

联系方式: 李敏 E-mail: limin@ujs.edu.cn; *通信作者 周晓祥 E-mail: zhoux23@ujs.edu.cn

菌体的耐受性^[9]。为了应对这些挑战,人们制备了噬菌体“鸡尾酒”疗法用于治疗超级细菌感染。然而,跟踪评估所制作的噬菌体“鸡尾酒”的药效学和免疫原性过程既昂贵又复杂。此外,噬菌体基因组中包含大量未表征的基因,这导致由不同噬菌体组成的“鸡尾酒”的制作、评估和维护体系尚不完善,进而限制了“鸡尾酒”疗法的临床应用与发展。在此情况下,噬菌体基因工程为拓宽噬菌体宿主谱以及噬菌体的直接应用开辟了一系列新的可能性。

1 噬菌体基因工程技术

为了推动噬菌体的大规模应用,一系列的噬菌体基因工程技术被开发出来(图1),用于天然噬菌体基因组的改造(表1)。目前,常用的噬菌体基因改造方法有成簇规律间隔短回文重复序列及CRISPR关联蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas)、经典同源重组(homologous recombination, HR)、电转化DNA的噬菌体重组策略(bacteriophage recombineering of electroporated DNA, BRED)、噬菌体重新启动(phage genome reboot)、平行寡核苷酸重组和靶向多重基因组编辑技术(parallel oligonucleotide recombineering and targeted multiplex genome editing, pORTMAGE)。

1.1 CRISPR/Cas:噬菌体工程中最通用的反选择系统

CRISPR/Cas 系统是一种对抗噬菌体攻击或

外源DNA入侵的适应性免疫防御系统,它由两个主要部分组成:CRISPR和Cas,这些部分可用于改造噬菌体基因组^[26]。目前,CRISPR系统有5种类型,其中包括:I-E型(CRISPR/Cas3)、II-A型(CRISPR/Cas9)、III-A型(CRISPR/Cas10)、V型(CRISPR/Cas12a)和VI-A型(CRISPR/Cas13a)。其中,II-A型(CRISPR/Cas9)和I-E型(CRISPR/Cas3)是最早用于噬菌体基因编辑的CRISPR系统。Aurelija等^[27]的研究发现,II型CRISPR/Cas系统对T7噬菌体基因组的编辑比I型系统具有更高的基因靶向效率和易用性,这为T7噬菌体的未来工程化奠定了基础。CRISPR/Cas9系统在噬菌体基因编辑中最为常用^[28],并已成功引入多种宿主细菌中,如大肠杆菌^[29]、李斯特菌^[30]、枯草芽孢杆菌^[31]、肺炎克雷伯菌^[32]以及某些弧菌属细菌^[33]等,用于噬菌体的基因工程改造。在CRISPR/Cas9系统对某些噬菌体无效的情况下,可使用CRISPR/Cas12a替代。Dong等^[13]将外源性V型CRISPR和II型CRISPR/Cas9分别引入大肠杆菌中,以改造T4噬菌体。T4噬菌体基因组被ghmc改造,使其对II型CRISPR/Cas9系统具有抗性。而Cas12a系统可以有效地切割ghmc改造的基因组,产生双链DNA断裂,从而促进噬菌体DNA和供体质粒之间的有效重组。在Cas12a的参与下,实验中实现的基因编辑效率为100%。此外,CRISPR/Cas13a可以作为一种序列特异性的反选择系统,可以通过单密码子替换等最小编辑来恢复噬菌体变体^[18]。

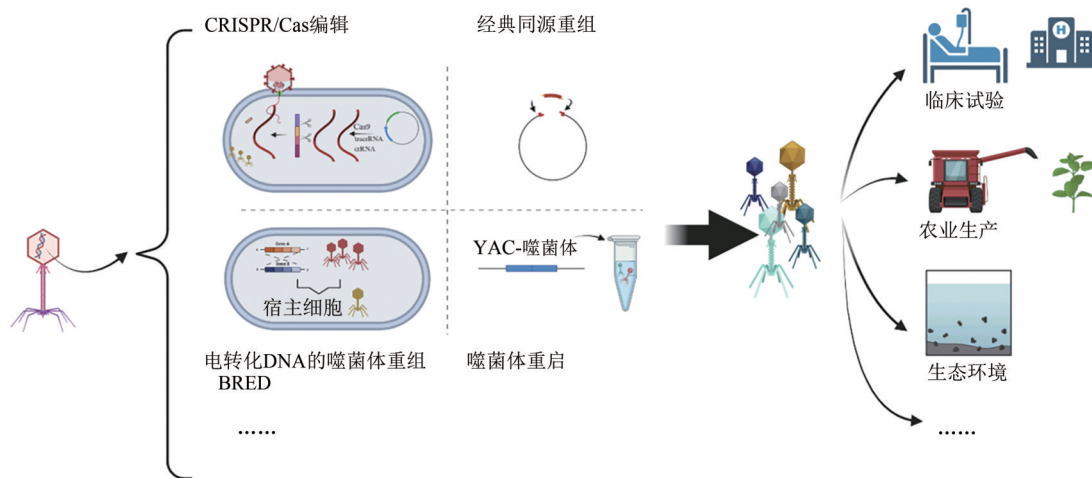


图1 噬菌体基因工程方法与应用

Fig. 1 Phage genetic engineering method and application

表1 噬菌体基因工程技术的经典应用

Table 1 Classic applications of phage genetic engineering technology

方式	噬菌体	具体策略	参考文献	年份
经典同源重组	T4	通过基因片段重组配对修复被 CRISPR 切割破坏的基因组	[10]	2021
	T2	改造尾丝蛋白 Gp38 的结构	[11]	2004
	T7	与相应质粒的同源重组构建工程化的 T7 噬菌体	[12]	2020
	T7	特异性改造 RBP	[12]	2021
CRISPR/Cas	T4	V 型 CRISPR/Cas12a 系统编辑 T4 噬菌体基因组	[13]	2021
	T5	由 Retron 介导的诱变方案	[14]	2021
	T7	I-E 型 CRISPR/Cas 系统编辑 T7 噬菌体基因组	[15]	2014
	需钠弧菌噬菌体 TT4	CRISPR/Cas9 系统编辑 TT4 噬菌体基因组	[16]	2022
	大肠杆菌噬菌体	CRISPR/Cas13a+抗 CRISPR 基因(acrVIA1)	[17]	2022
	φKZ、OMKO1 和 PaMx41 噬菌体	CRISPR/Cas13a+正向选择基因 acrVIA1	[18]	2022
BRED	分枝杆菌噬菌体 BPs、ZoeJ	使温和噬菌体改造为烈性噬菌体	[19]	2019
	T7	基因组进行单碱基改变和整个基因替换	[20]	2020
	温和沙门氏菌噬菌体	进行裂解转换和溶原转换	[21]	2014
	克雷伯氏菌噬菌体	建立了克雷伯氏菌噬菌体基因组的重组系统	[22]	2017
YAC	铜绿假单胞菌噬菌体	噬菌体基因组的基因敲除	[23]	2020
	PICIs	快速编辑酿酒酵母中的 PICIs	[24]	2020
pORTMAGE	T5、T7、P1 和 λ 噬菌体	噬菌体基因组单碱基替换、插入	[25]	2023

尽管 CRISPR/Cas 系统在多种噬菌体基因编辑中起到了重要作用,具有多样性和普适性。然而,该系统仍存在没有解决的问题:在某些情况下,噬菌体脱靶突变频率高于所需的突变率,在未来设计出受外界各种因素影响更小的变体是解决脱靶问题的关键。此外,Cas 蛋白和 DNA 修复酶之间的相互作用还需要进一步研究和明确。

1.2 经典同源重组

同源重组(HR)^[34]是噬菌体基因组编辑的一种流行方法。HR 技术通常用于交换和组合已知功能的噬菌体基因,从而实现噬菌体基因的精确突变以及噬菌体宿主谱的改变。在这一过程中,供体质粒两侧通常编码与噬菌体同源的基因组序列,随后将质粒转入宿主细菌中。当噬菌体感染并复制于宿主细菌内时,噬菌体基因组和供体质粒之间会发生同源重组,使得供体基因被整合到噬菌体基因组中。重组后的噬菌体在完成组装后被释放。通过此方法,可以改造线性双链 DNA(dsDNA)噬菌体。例如 Le 等^[35]通过将铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 中的 *ORF69* 替换为 JG004 噬菌体的相应基因 *ORF84*,成功构建了具有 JG004 噬

菌体宿主范围的嵌合噬菌体 PaP1-rec1。此外,这种方法也可被用于改造线性 dsDNA 包皮垢分枝杆菌噬菌体 L5^[36]。然而,只有当宿主菌株对供体 DNA 具有复制能力且无限制性缺陷时,HR 方法才可行。HR 的重组效率相对较低(约 1%),而异源重组蛋白,如 λ-Red 系统(Exo、Gam 和 Beta)以及 RecE/RecT 样蛋白在宿主中的过表达可以提高重组效率。Jensen 等^[20]开发了用于改造 T7 噬菌体的 λ-Red 重组系统,可以在 T7 噬菌体基因组上进行单碱基突变和基因替换,使 T7 噬菌体基因组 DNA 转染的效率提高至 100 倍。此外,抗性基因等标记无法用于噬菌体筛选对于 HR 的实现也是一种挑战。当前,可引入外源荧光基因标记噬菌体并运用 CRISPR/Cas 技术选择荧光噬菌体,以提高 HR 的成功率和工程噬菌体的筛选效率^[37]。

总而言之,HR 的重组效率很低,且对宿主细菌的类型有一定要求(通常不适用于革兰氏阳性噬菌体),这些特点限制了其在基因编辑中的广泛应用。当前,如何有效提升 HR 的重组效率仍是需要进一步探索和研究的方

1.3 电转化 DNA 的噬菌体重组工程

电转化 DNA 的噬菌体重组策略^[38](bacteriophage recombineering of electroporated DNA, BRED)最初由 Marinelli 等^[39]应用于分枝杆菌噬菌体的改造,成功实现了非必需基因的缺失、读码框内的缺失、点突变、无义突变、标记基因的添加以及外源基因的精确插入。目前,该策略已成功应用于包皮垢分枝杆菌^[39]、沙门氏菌^[40]和克雷伯氏菌^[22]噬菌体基因组的精确改造(敲除、插入和替换基因)。BRED 的特点在于,它将噬菌体 DNA 与重组模板一同电转化至携带重组酶质粒的宿主细菌中。随后,可以通过 PCR 扩增来筛选含有正确突变的噬菌体基因组。然而,BRED 也存在一定的局限性:由于重组模板与噬菌体 DNA 共转化至同一细胞中的效率通常很低,因此该技术对宿主菌的要求很高,如将其应用于转化效率低的革兰氏阳性菌尤其具有挑战性^[41]。为了克服这一缺陷,将 BRED 技术与 CRISPR/Cas 技术相结合,形成了新的技术——成簇规律间隔短回文重复序列/CRISPR 关联蛋白 9—电转化 DNA 的噬菌体重组技术(CRISPR/Cas9-bacteriophage recombineering of electroporated DNA, CRISPY-BRED)。在这一结合技术中,BRED 或重组技术负责进行基因重组,而 CRISPR 技术则用于选择重组成功的噬菌体。相较于单一使用 BRED,CRISPY-BRED 的主要优势在于它能够简化筛选过程,并显著提高基因重组的效率和精确度。目前,该技术已被成功应用于多种分枝杆菌噬菌体的改造^[28]。此外,成簇规律间隔短回文重复序列/CRISPR 关联蛋白 9—感染性颗粒的噬菌体重组技术(CRISPR/Cas9-bacteriophage recombineering with infectious particles, CRISPY-BRIP)是噬菌体基因工程的另一种方式,该技术可以很容易用于编辑具有更大基因组大小且无法有效转染其宿主细菌的噬菌体。CRISPY-BRIP 与 CRISPY-BRED 相似,但 CRISPY-BRIP 还可以靶向噬菌体 DNA 序列和人工 DNA 底物进行共电穿孔。

1.4 噬菌体重新启动

噬菌体重新启动(phage genome reboot)的本质是通过人工合成或扩增获得噬菌体基因组 DNA,在体外或酵母重组中将人工噬菌体基因组 DNA 重新组装并转化至天然宿主或无细胞表达体系重启为有活性的噬菌体颗粒。最终使用有机溶剂裂

解释放噬菌体颗粒,使用裂解液重新侵染天然宿主菌进行增殖与富集,获取大量工程化噬菌体。噬菌体基因组的组装有多种方案,如 Gibson 组装策略^[42]、转化相关重组、优化体外 DNA 组装^[43]、酵母重组等。当前,在酵母细胞中实现噬菌体基因组的重组是首选方案^[44]。可以利用酵母细胞实现高效同源重组,通过重组技术将具有同源末端的线性 dsDNA 片段组装成单个分子^[45]。

将其在酵母细胞中转化后,可获得插入线性酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC)的完整噬菌体基因组。这些通过 PCR 扩增得到的噬菌体 DNA 片段,在末端具有多达 11 kb 大小的重叠区域,并且携带与待组装的噬菌体 DNA 末端同源的序列。随后,在酵母中分离出包含噬菌体基因组的线性 YAC,再将其转化到宿主菌中,从而产生特异性噬菌体。截至目前,基于酵母的噬菌体工程技术已成功应用于捕获和改造大肠杆菌噬菌体 T3 和 T7^[44]、克雷伯氏菌噬菌体 K11^[44]、铜绿假单胞菌^[23],以及噬菌体 X174^[46]的基因组。虽然基于酵母的噬菌体基因组组装技术具有允许在体外进行噬菌体基因组的组装、改造或完全整合的显著优势,但其操作过程相对复杂,并且在组装巨型噬菌体基因组时面临一定挑战。同时,尽管 YAC 辅助的基因组组装非常高效,但其整体效率仍然受细菌转化效率的限制。将组装完整的噬菌体基因组成功转入合适的体系中,是决定重启噬菌体能否成功的关键步骤。目前,有两种方式受到了广泛关注。为了重启革兰氏阳性菌的噬菌体,可使用有细胞壁缺陷的 L 型李斯特氏菌。这种细菌很容易摄取需改造的噬菌体基因 DNA,并在转染后成功重启,从而获得有活性的噬菌体颗粒。这些噬菌体颗粒随后可以通过增殖和富集大量生产。目前,该项技术已用于李斯特菌、芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌噬菌体的重新启动^[47]。此外,无细胞转录翻译(transcription and translation, TXTL)系统可以在宿主细胞外人为控制反应进程,从而实现噬菌体重启。目前,该系统已经成功实现了 Φ X174^[48]、T7^[49]和 T4^[50]等噬菌体的重启。TXTL 系统可以用于转化能力较弱的细菌,并可用于改造其对应的噬菌体。

1.5 平行寡核苷酸重组和靶向多重基因组编辑

平行寡核苷酸重组和靶向多重基因组编辑技术^[25](parallel oligonucleotide recombineering and

targeted multiplex genome editing, pORTMAGE)是一种通过引用突变的寡核苷酸,高效地进行基因组多个位点的基因点突变、插入和敲除,最终实现基因组同源定向修复且无需反向选择的噬菌体基因工程技术。pORTMAGE技术本身的操作简便性以及高效性赋予了其巨大吸引力。通过一些调整,该系统可以很容易地适应操纵许多宿主菌株中的噬菌体基因组,如T5、T7、P1和 λ 噬菌体。该技术可操作性强,仅需一个携带单个质粒的细菌宿主,以及经过5'和3'修饰的寡核苷酸。此外,pORTMAGE技术以其重组效率高、成本低廉的特点,以及简单易行的筛选过程,展现了其在未来应用于多种噬菌体改造领域的巨大潜力。

2 噬菌体基因工程技术的应用

噬菌体基因工程技术在医药、工业、农业生产和生态安全等领域具有高效和广泛的应用(图1)。

2.1 噬菌体及其基因工程技术在医疗卫生领域的应用

2.1.1 噬菌体疗法与临床应用 2014年,世界卫生组织宣布抗生素耐药性是对医疗进步、粮食安全和全球公共卫生构成的最大威胁之一^[51]。由于新型抗生素的开发既昂贵又耗时,因此噬菌体作为替代或辅助治疗手段重新受到了人们的重视,并在临床应用中展现出了巨大的潜力^[9]。目前,噬菌体临床治疗试验主要采取两种策略:一种是个性化干预治疗,即针对特定患者的感染情况制定个性化的噬菌体治疗方案^[52];另一种是进行大规模的临床试验。当耐药菌感染危及生命,或当前国家批准的药物无法有效控制严重感染时,噬菌体个性化干预有望成为一项极具潜力的治疗选择。在过去的20世纪里,噬菌体已经在临床治疗中多次发挥效用。例如,1958年,上海市第二医学院利用特异噬菌体治疗创面绿脓杆菌感染,取得了理想的治疗效果^[53]。2018年,复旦大学附属上海市公共卫生临床中心报道了一例利用天然噬菌体联合抗生素成功治愈膀胱肿瘤术后多重耐药肺炎克雷伯菌导致的复杂性、反复性尿路感染(urinary tract infection, UTI)的患者^[54]。由此可见,抗生素和噬菌体的联合使用为解决常见的噬菌体体外耐药性^[55]提供了有效方案。2019年,一名脓肿分枝杆菌感染的患者在接受由3种噬菌体

组成的“鸡尾酒”制剂(其中两种源自温和噬菌体并经基因工程改造的工程噬菌体)的静脉注射治疗后,展现出良好的耐受性,并表现出明显的临床改善,具体表现为胸骨伤口闭合、肝功能的恢复以及感染皮肤结节的实质性消退^[19]。这一案例标志着基因工程噬菌体在临床上的首次成功应用。随后,在2022年,Jerry团队^[56]也报道了利用工程噬菌体成功治疗脓肿分枝杆菌感染相关的晚期肺病的案例。此外,2018年发表的一项针对烧伤创面铜绿假单胞菌感染的临床试验表明,与标准治疗组相比,噬菌体鸡尾酒治疗组的患者产生的严重不良事件更少,并展现出良好的临床效果^[57]。然而,我们也必须认识到,噬菌体临床试验也存在失败的案例^[58]。尽管目前其实际应用还相对有限,噬菌体基因工程技术在临床治疗中的应用前景仍然广阔。

总而言之,噬菌体基因工程技术在临床系统应用中光明前景的实现,需要积累多个噬菌体治疗的成功经验。目前,已经有一些成功的案例,但噬菌体的制备成本仍然高昂且过程复杂,大规模生产能力有限。随着技术的不断进步和优化,大规模的临床使用将逐渐成为可能。通过大型临床试验,人们可以更加全面地获得噬菌体治疗的药代动力学、药效学参数,以及抗生素联合使用的最佳剂量和联合治疗的最佳效价等关键信息,从而更深入地了解 and 掌握工程噬菌体的临床特性。

2.1.2 工程噬菌体与纳米医学 噬菌体可以单独使用,也可以与非生物纳米材料结合,共同用于开发新型的纳米医学材料。与合成纳米颗粒相比,噬菌体具有一系列独特的优势,包括天然的自组装结构特征、定义明确的外壳蛋白、基因编辑的简便性,以及可呈现不同特性和尺寸、形状的多样性^[59],使其成为纳米技术领域的理想选择。

噬菌体通过不同的基因工程改造方法,可以获得靶向能力,并促进DNA递送到细胞中,从而应用于多种疾病的治疗。例如,对M13噬菌体进行基因工程改造,在其体外壳蛋白pIII上融合表达精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)基序,这种经RGD修饰的噬菌体可以成功地将转基因递送到哺乳动物细胞中,甚至能够穿过肠道屏障^[60]。然而,目前,使用噬菌体作为递送系统进行基因递送时,关键在于如何提高转导效率^[61]。为此,研究者们进行了诸多探索,如Larroca等^[62]曾使用多

价噬菌体颗粒提升转导效率。2023年,Kao等^[61]发现PrimPol的上调或DMBT1的下调可以显著提高噬菌体转导效率,并据此设计了具有最小长度和最佳转导效率的TransPhage,将转导效率提升至95%。除了基因递送,噬菌体表面的氨基、羧基和酚类基团等化学基团可用作改造药物的连接桥梁,使工程噬菌体能够递送细胞毒性药物^[63]。总而言之,噬菌体展示技术衍生的肽或蛋白质可以作为靶向配体^[64]克服药物和基因递送过程中遇到的障碍,从而用于制备药物制剂和功能性纳米载体^[65],这些应用不仅拓宽了噬菌体的治疗潜力,还有望进一步增强疾病的治疗效果。

此外,纳米医学的发展为癌症治疗开辟了一条新的、更具特异性和高效性的途径,即噬菌体展示技术和纳米技术相整合。有效的纳米递送系统可使药物精准靶向肿瘤组织,显著提升药物的细胞与组织特异性,从而大幅降低药物的毒性和副作用^[66]。研究表明,从噬菌体文库中筛选出的针对MCF-7乳腺癌细胞的特异性肽,将该肽与噬菌体pVIII蛋白融合后直接整合到脂质体中,能够成功实现载药脂质体对MCF-7细胞的靶向递送^[67]。类似地,也可以使用血管生成素结合噬菌体靶向治疗乳腺癌^[68]。与非靶向制剂相比,该治疗方式显著增强了抗肿瘤活性,减少了肿瘤体积,且没有明显的细胞毒性。目前,噬菌体基因工程技术在乳腺癌、结直肠癌^[69]、脑癌^[70]、肝癌^[71]、肺癌^[72]、胃癌^[73]以及黑色素瘤^[74]等多种癌症的治疗方面已取得了一定的进展。综上所述,相较于传统的化疗制剂,噬菌体介导的药物递送载体,能够将这些治疗药物与纳米颗粒联合使用,可以实现药物的精准靶向递送,发挥治疗效果,同时减少毒副作用。

噬菌体作为纳米材料在疫苗开发中也展现出巨大潜力。与传统的疫苗开发方式相比,噬菌体疫苗具有潜在优势,如副作用小、生产效率高、易于生产、运输和储存,对人体安全友好,以及具有靶向递送特性等^[75-77]。除了用于预防真菌、病毒、细菌感染,以及癌症和寄生虫病疫苗之外^[78],噬菌体还在COVID-19疫苗的开发中发挥了重要作用。例如,Staquicini等^[79]在丝状噬菌体的pVIII和pIII蛋白上分别展示了严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)刺突(S)蛋白和配体肽(CAKSMGDIVC),这种“双展示噬菌体”通过雾化

方式递送到小鼠的肺部后,能够产生系统性和特异性的抗体反应,且未观察到任何不良反应。

在医学领域,工程噬菌体可作为生物材料,用于调节细胞行为和促进组织再生。组织再生就是修复受损组织的形态与功能,使其恢复正常^[80]。利用噬菌体展示技术,可以筛选并鉴定出对间充质干细胞具有特异性亲和力的噬菌体P11。P11不仅可以促进间充质干细胞的增殖和迁移,还可以将巨噬细胞极化为M1表型,并显著改变其形态,从而进一步增强间充质干细胞的趋化性。此外,P11可通过TPL2-MEK-ERK信号通路促进间充质干细胞中成骨相关标志物的分泌,进而促进骨组织再生^[81]。将基因工程噬菌体与生物相容性材料相结合,可以克服单一使用工程噬菌体的局限性,提高组织再生的效率。目前,基因工程噬菌体已被研究应用于骨再生^[81]、皮肤再生和伤口愈合^[82]、心血管再生^[83]以及神经再生^[84]。然而,由于噬菌体易于被吸收,且在体内具有较短的半衰期等生物学特性,其作为临床材料应用的安全性还需要大量积累性研究和稳定可靠的实验数据加以证明。

2.2 噬菌体基因工程技术在工业方面的应用

2.2.1 工程噬菌体与高阶材料结构

丝状噬菌体是一类包裹着环状基因组DNA、呈高纵横比的蛋白质纳米丝,常见类型包括f1、fd和M13^[64,85]。其中,丝状噬菌体M13已被广泛用于自下而上的功能材料合成^[86]。在低浓度下,M13噬菌体保持无序状态;而在高浓度下,其棒状分子呈现取向排列,浓度越高,排列越有序,最终形成液晶结构^[87-88]。这种特性使得M13噬菌体能够自组装形成一维结构、二维结构和三维结构,为形成分层有序的水凝胶结构奠定了基础^[89]。

利用M13噬菌体,通过模仿蜘蛛丝的纺纱过程,并使用戊二醛作为交联剂,可以制备出一维M13噬菌体微纤维,其直径为10~20 μm。此外,还可以将1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇(HFP)作为静电纺丝溶剂,通过电纺技术制备M13噬菌体纤维。随后,将这些纤维与适当浓度的聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)混合,最终获得连续均匀的静电纺丝材料。值得注意的是,通过这种方式获得的一维纤维结构仍然保留了噬菌体感染细菌宿主的能力^[90]。关于二维结构,噬菌体可以在各种不同的基材上自组装成二维薄膜材料。

增强基于噬菌体纳米材料的稳定性、提高质量评价标准对于开发纳米生物技术至关重要。然而,目前这方面的研究相对有限。在过去的研究中,周宁云等^[91]利用丝状噬菌体,通过浸渍法,在微脊(NiM)结构中产生了前所未有的有序纳米到微米级纳米脊结构。对于三维结构,丝状噬菌体表面可插入非天然功能的基团,从而增加化学交联的选择性,进而开发出新型的三维材料。

近年来,在生物医学领域中,水凝胶因其卓越的生物相容性和结构多功能性受到了广泛关注^[92]。研究人员通过化学交联的方法,开发了一种基于M13噬菌体的生物活性凝胶系统。在这个系统中,M13噬菌体分别与戊二醛和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺进行交联,从而使噬菌体水悬浮液凝胶化。此外,将烈性噬菌体嵌入到凝胶中,可以进一步增强凝胶的杀菌能力,这为未来对抗多重耐药性细菌感染提供了新的可能^[93]。然而,尽管丝状噬菌体水凝胶系统具有易于推进基因工程改造和实现规模化生产的优点,但是要想浓缩和纯化到溶液自组装所需的浓度,需要投入大量的人力和时间。有研究表明,杂化水凝胶有望克服噬菌体的浓度问题^[94-95]。

2.2.2 工程噬菌体与能量储存和产生 工程噬菌体在电极材料电池、燃料电池、太阳能电池以及压电材料研发和改进方面也取得了显著的成效。

工程噬菌体为开发更小、更灵活的高容量电极材料电池提供了一条新的思路。转基因M13噬菌体和银纳米颗粒(AgNPs)的组合显著提升了 α -FePO材料的电导率,克服了 α -FePO固有电导率低的缺陷,使电池容量提升至 $134 \text{ mAh} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[96-97]。此外,基于噬菌体生物模板的催化剂材料可以有效增强催化活性,进而提高了燃料电池的性能。Belcher等^[98]通过利用M13噬菌体与水溶液中的Au离子之间的选择性相互作用,在室温下合成了直径均匀的Au纳米线,且产率大于98%。得益于噬菌体的模板效应,Au纳米线的直径被精确控制在10~50 nm范围内,这提升了Au颗粒催化的效率。在太阳能电池的改进中,噬菌体与纳米颗粒的复合可以优化太阳能电池的光伏性能^[99]。从工程学的角度来看,M13噬菌体在开发新型压电能量收集装置方面展现出四大优势:其一,可通过细菌感染实现大规模生产;其二,可通过基因工程进行表面修饰;其三,能够自组装形成高度有序的结构;

其四,具有较高的压电系数。近年来,人们努力尝试制造基于M13噬菌体的压电能量收集装置。在这些装置中,垂直排列的噬菌体膜表现出最高的性能,其峰值电压为2.8 V,峰值电流为120 nA^[100]。

2.2.3 工程噬菌体与生物传感器 M13噬菌体已被公认为生物传感器制造中的一种有价值的材料^[101]。M13噬菌体的高度可工程化特性、具有多种可用于化学反应的官能化位点,以及无毒且能自组装的能力,是其作为传感器材料的独特优势^[102]。它也存在一些缺点:工程噬菌体的转导效率低和生长速度较慢。然而,这些问题通过控制转导因子和引入基于噬菌粒载体的展示系统得到了部分改善^[61,102]。

Mohammed等^[103]开发了一种基于M13噬菌体的电化学阻抗谱(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)细胞传感器,用于检测粪大肠菌群。该生物传感器成功捕获了大肠杆菌XL1-Blue和K12菌株,检测限低至 $14 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。这是已有报道中基于EIS的噬菌体传感器的最低检测灵敏限,并且该传感器对测试的大肠菌群表现出高度的选择性。目前,基于M13噬菌体的生物传感器已被开发用于检测金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、霍乱弧菌等多种致病菌。除了细菌检测,基于M13噬菌体的生物传感器还被应用于生物标志物的检测和疾病的诊断中。酪氨酸蛋白激酶Met(c-Met)是结肠癌的一种生物标志物。一种结合二硫钨量子点和AuNP(金纳米颗粒)的基于M13噬菌体的生物传感器可用于检测c-Met蛋白。该生物传感器在检测临床样本中的c-Met蛋白时表现出极高的灵敏度,其检测限低至 $1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结肠癌血清样本中一些无法通过酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)确定的低浓度c-Met蛋白,可以通过此装置进行分析^[104]。在金属离子检测方面,Manivanan等^[105]将工程化的M13噬菌体与AgNP结合,构建了一种高效的检测金属离子的生物传感器,其检测限低至 $10.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外,该团队于2020年利用表达金结合肽的M13噬菌体,开发了一种由金纳米线(AuNW)构成的比色生物传感器。特别是,银包覆的M13噬菌体-AuNW复合物可提供多个Hg(II)结合位点,并展现出高度的灵活性,因此与球形Au纳米颗粒相比,该复合物在实现卓越的传感性能的同时,避免了聚集现象的发生^[106]。

此外,基于M13噬菌体的生物传感器还可用于湿度监测^[107]、抗生素检测^[108]、病毒检测^[109]等各个方面。

2.3 噬菌体基因工程技术在农业生产和废水处理中的应用

2.3.1 工程噬菌体与农业生产 由于抗生素耐药性问题日益严重,农业生产正在朝着减量化使用抗生素的方向发展。噬菌体在畜牧业、渔业和种植业等领域,对于预防和控制严重的细菌感染以及食品保存等方面,发挥着重要作用。在畜禽养殖方面,抗生素耐药性问题尤为突出,如金黄色葡萄球菌出现多重耐药性。冀亚路等^[110]使用牛源金黄色葡萄球菌SA.1545从污水中分离得到一株具有高效裂解活性和宽宿主谱的烈性噬菌体VB-SavM-JYL02。该噬菌体为奶牛乳腺炎的预防和控制提供了新的可能性,展现了其在治疗奶牛乳腺炎方面的巨大潜力。尽管在利用基因工程技术制备工程噬菌体方面已取得重要进展,但是噬菌体在水产养殖等方面的应用还停留在天然噬菌体阶段^[111]。噬菌体在预防和控制农作物细菌感染方面,已证明其有效性,是抗生素治疗的替代方案之一^[112]。在食品保存方面,为满足人们对高质量食品的需求,除防腐剂外,正着力研究基于噬菌体的新型抗菌剂。目前噬菌体在食品方面的生物防控研究主要涉及某些沙门氏菌^[113](如鸡白痢沙门氏菌^[114]、鼠伤寒沙门氏菌^[115]、肠炎沙门氏菌^[116-117]等)、志贺氏菌^[118]、大肠杆菌^[119]、李斯特菌^[120]以及副溶血弧菌^[121]等。

尽管工程噬菌体作为抗菌剂在农业生产中发挥着重要作用,但是其抗菌效果得以保障的前提是维持其生物活性。实际上,pH、温度和湿度都会在不同程度上影响噬菌体的生物活性。因此,基因工程噬菌体作为抗菌剂在开发使用时,应充分考虑到具体场景下的特定环境因素,以保持噬菌体的生物活性,使其抗菌效果发挥到最佳。

2.3.2 工程噬菌体与废水处理 生态环境安全是维系人类可持续发展的重要影响因素之一。水污染作为生态环境安全中的重大问题,对人类的健康和生活环境构成了严重威胁。噬菌体与细菌之间的相互作用在保障水安全方面发挥着重要作用,尤其对于解决由饮用受污染水引起的多重耐药大肠杆菌感染这一全球公共健康卫生问题具有重要意义^[122]。李敏等^[123]通过同源重组技术获得

了工程化T4样噬菌体(命名为WGqlae)。该噬菌体具有裂解4种不同大肠杆菌菌株的潜力,并在不同的pH和高温下表现出良好的稳定性。研究还发现,工程噬菌体WGqlae对浮游态和生物膜态的大肠杆菌均具有显著的抗菌效果,这表明工程噬菌体在防止大肠杆菌感染方面具有巨大的应用潜力。在另一项研究中,研究者利用特异性噬菌体处理废水处理厂的污水中的粪便指示菌——大肠杆菌和肠球菌。与单独暴露于紫外线相比,结合噬菌体处理的方法成功减少了肠道粪便指标病原体的数量^[124]。然而,基因工程噬菌体在废水处理中的应用仍存在问题。由于对病毒基因组多样性的了解非常有限,噬菌体对废水处理厂细菌群落的影响仍然知之甚少。现实生活场景中复杂的微生物群落和复杂综合的环境因素也可能影响工程噬菌体的性能。同时,工程噬菌体在废水处理的过程中可能会产生有害的副产物,并且需要大规模的试验对其经济可行性进行评估。

3 展望

噬菌体基因工程技术的快速发展使得对噬菌体基因组的靶向改造成为可能,进而催生了工程化噬菌体这一新型抗菌剂来源,为精准防治耐药菌感染提供了有力工具。然而,不可否认的是,噬菌体疗法也存在其自身的局限性^[125]。例如,目标工程噬菌体的筛选效率有待提高,工程噬菌体在临床应用中存在安全方面的不确定问题^[126]。为了充分解决这些问题并挖掘噬菌体治疗的潜力,未来需要将基因组工程、合成生物学、结构导向设计、机器学习等前沿领域相结合,设计出“安全、绿色、高效”的新型噬菌体,从而加强其在医疗、工业、农业及生态等方面的应用。由此可见,噬菌体基因工程技术与应用是一个具有巨大潜力和广阔应用前景的研究方向,值得深入探究。

参考文献

- [1] BANDY A. Ringing bells: *Morganella morganii* fights for recognition[J]. Public Health, 2020, 182: 45-50.
- [2] XIONG L Y, HU X L, WEI Y L. Advances in non-antibiotic therapy for drug-resistant bacteria[J]. China Biotechnol., 2023, 43(1): 50-58.
- [3] HESSE S, ADHYA S. Phage therapy in the twenty-first century: facing the decline of the antibiotic era; is it finally time for the age of the phage?[J]. Annu. Rev. Microbiol., 2019, 73: 155-174.

- [4] ZHONG L, GUO X, YAO Y, *et al.* Phage-specific antibodies impair its antibacterial efficacy[J]. *Acta Microbiol. Sin.*, 2022, 62(7): 2441-2454.
- [5] PRINCIPI N, SILVESTRI E, ESPOSITO S. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections[J/OL]. *Front. Pharmacol.*, 2019, 10: 513[2024-11-25]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00513>.
- [6] YEHL K, LEMIRE S, YANG A C, *et al.* Engineering phage host-range and suppressing bacterial resistance through phage tail fiber mutagenesis[J]. *Cell*, 2019, 179(2): 459-469.
- [7] REHMAN S, ALI Z, KHAN M, *et al.* The dawn of phage therapy[J/OL]. *Rev. Med. Virol.*, 2019, 29(4): e2041[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1002/rmv.2041>.
- [8] GORDILLO ALTAMIRANO F L, BARR J J. Phage therapy in the postantibiotic era[J]. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2019, 32(2): e00066-18.
- [9] HATFULL G F, DEDRICK R M, SCHOOLEY R T. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections[J]. *Annu. Rev. Med.*, 2022, 73: 197-211.
- [10] WU X, ZHU J, TAO P, *et al.* Bacteriophage T4 escapes CRISPR attack by minihomology recombination and repair[J/OL]. *mBio*, 2021, 12(3): e0136121[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1128/mBio.01361-21>.
- [11] YOICHI M, ABE M, MIYANAGA K, *et al.* Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* O157: H7[J]. *J. Biotechnol.*, 2005, 115(1): 101-107.
- [12] LIU Y, HUANG H, WANG H, *et al.* A novel approach for T7 bacteriophage genome integration of exogenous DNA[J/OL]. *J. Biol. Eng.*, 2020, 14: 2[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0224-x>.
- [13] DONG J, CHEN C, LIU Y, *et al.* Engineering T4 bacteriophage for *in vivo* display by type V CRISPR-Cas genome editing[J]. *ACS Synth. Biol.*, 2021, 10(10): 2639-2648.
- [14] RAMIREZ-CHAMORRO L, BOULANGER P, ROSSIER O. Strategies for bacteriophage T5 mutagenesis: expanding the toolbox for phage genome engineering[J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2021, 12: 667332[2024-11-25]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.667332>.
- [15] KIRO R, SHITRIT D, QIMRON U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type I-E CRISPR-Cas system[J]. *RNA Biol.*, 2014, 11(1): 42-44.
- [16] ZHANG X, ZHANG C, LIANG C, *et al.* CRISPR-Cas9 based bacteriophage genome editing[J/OL]. *Microbiol. Spectr.*, 2022, 10(4): e0082022[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00820-22>.
- [17] GUAN J, OROMÍ-BOSCH A, MENDOZA S D, *et al.* Bacteriophage genome engineering with CRISPR-Cas13a[J]. *Nat. Microbiol.*, 2022, 7(12): 1956-1966.
- [18] ADLER B A, HESSLER T, CRESS B F, *et al.* Broad-spectrum CRISPR-Cas13a enables efficient phage genome editing[J]. *Nat. Microbiol.*, 2022, 7(12): 1967-1979.
- [19] DEDRICK R M, GUERRERO-BUSTAMANTE C A, GARLENA R A, *et al.* Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*[J]. *Nat. Med.*, 2019, 25(5): 730-733.
- [20] JENSEN J D, PARKS A R, ADHYA S, *et al.* λ recombineering used to engineer the genome of phage T7[J/OL]. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 9(11): 805[2024-11-25]. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110805>.
- [21] SHIN H, LEE J H, YOON H, *et al.* Genomic investigation of lysogen formation and host lysis systems of the *Salmonella* temperate bacteriophage SPN9CC[J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, 80(1): 374-384.
- [22] PAN Y J, LIN T L, CHEN C C, *et al.* *Klebsiella* phage Φ K64-1 encodes multiple depolymerases for multiple host capsular types[J]. *J. Virol.*, 2017, 91(6): e02457-16.
- [23] PIRES D P, MONTEIRO R, MIL-HOMENS D, *et al.* Designing *P. aeruginosa* synthetic phages with reduced genomes[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2021, 11(1): 2164[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81580-2>.
- [24] IBARRA-CHÁVEZ R, HAAG A F, DORADO-MORALES P, *et al.* Rebooting synthetic phage-inducible chromosomal islands: one method to forge them all[J/OL]. *Biodes. Res.*, 2020, 2020: 5783064[2024-11-25]. <https://doi.org/10.34133/2020/5783064>.
- [25] GOREN M G, MAHATA T, QIMRON U. An efficient, scarless, selection-free technology for phage engineering[J]. *RNA Biol.*, 2023, 20(1): 830-835.
- [26] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNBASHI O S, *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, 13(11): 722-736.
- [27] GRIGONYTE A M, HARRISON C, MACDONALD P R, *et al.* Comparison of CRISPR and marker-based methods for the engineering of phage T7[J/OL]. *Viruses*, 2020, 12(2): 193[2024-11-25]. <https://doi.org/10.3390/v12020193>.
- [28] DOUDNA J A, CHARPENTIER E. Genome editing: the new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J/OL]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.
- [29] TAO P, WU X, TANG W C, *et al.* Engineering of bacteriophage T4 genome using CRISPR-Cas9[J]. *ACS Synth. Biol.*, 2017, 6(10): 1952-1961.
- [30] HUPFELD M, TRASANIDOU D, RAMAZZINI L, *et al.* A functional type II-a CRISPR-Cas system from *Listeria* enables efficient genome editing of large non-integrating bacteriophage[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46(13): 6920-6933.
- [31] SCHILLING T, DIETRICH S, HOPPERT M, *et al.* A CRISPR-Cas9-based toolkit for fast and precise *in vivo* genetic engineering of *Bacillus subtilis* phages[J/OL]. *Viruses*, 2018, 10(5): 241[2024-11-25]. <https://doi.org/10.3390/v10050241>.
- [32] SHEN J, ZHOU J, CHEN G Q, *et al.* Efficient genome engineering of a virulent *Klebsiella* bacteriophage using CRISPR-Cas9[J]. *J. Virol.*, 2018, 92(17): e00534-18.
- [33] ZHANG X, WANG S, LI T, *et al.* Bacteriophage: a useful tool for studying gut bacteria function of housefly larvae, *Musca domestica*[J/OL]. *Microbiol. Spectr.*, 2021, 9(1): e0059921[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00599-21>.
- [34] ŁOBOCKA M, DĄBROWSKA K, GÓRSKI A. Engineered bacteriophage therapeutics: rationale, challenges and future[J]. *BioDrugs*, 2021, 35(3): 255-280.
- [35] LE S, HE X, TAN Y, *et al.* Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68562[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068562>.
- [36] PEARSON R E, JURGENSEN S, SARKIS G J, *et al.* Construc-

- tion of D29 shuttle plasmids and luciferase reporter phages for detection of mycobacteria[J]. *Gene*, 1996, 183(1-2): 129-136.
- [37] MØLLER-OLSEN C, HO S F S, SHUKLA R D, *et al.*. Engineered K1F bacteriophages kill intracellular *Escherichia coli* K1 in human epithelial cells[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2018, 8(1): 17559 [2024-11-25]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35859-6>.
 - [38] MARINELLI L J, PIURI M, SWIGONOVÁ Z, *et al.*. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes[J/OL]. *PLoS One*, 2008, 3(12): e3957 [2024-11-25]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003957>.
 - [39] MARINELLI L J, HATFULL G F, PIURI M. Recombineering: a powerful tool for modification of bacteriophage genomes[J]. *Bacteriophage*, 2012, 2(1): 5-14.
 - [40] MILHO C, SILLANKORVA S. Implication of a gene deletion on a *Salmonella* Enteritidis phage growth parameters[J/OL]. *Virus Res.*, 2022, 308: 198654[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198654>.
 - [41] CHEN Y, BATRA H, DONG J, *et al.*. Genetic engineering of bacteriophages against infectious diseases[J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2019, 10: 954[2024-11-25]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00954>.
 - [42] GIBSON D G, YOUNG L, R-YCHUANG, *et al.*. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. *Nat. Methods*, 2009, 6(5): 343-345.
 - [43] PRYOR J M, POTAPOV V, BILOTTI K, *et al.*. Rapid 40 kb genome construction from 52 parts through data-optimized assembly design[J]. *ACS Synth. Biol.*, 2022, 11(6): 2036-2042.
 - [44] ANDO H, LEMIRE S, PIRES D P, *et al.*. Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing[J]. *Cell Syst.*, 2015, 1(3): 187-196.
 - [45] DEMARINI D J, CREASY C L, LU Q, *et al.*. Oligonucleotide-mediated, PCR-independent cloning by homologous recombination[J]. *Biotechniques*, 2001, 30(3): 520-523.
 - [46] JASCHKE P R, LIEBERMAN E K, RODRIGUEZ J, *et al.*. A fully decompressed synthetic bacteriophage ϕ X174 genome assembled and archived in yeast[J]. *Virology*, 2012, 434(2): 278-284.
 - [47] KILCHER S, STUDER P, MUESSNER C, *et al.*. Cross-genus rebooting of custom-made, synthetic bacteriophage genomes in L-form bacteria[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018, 115(3): 567-572.
 - [48] SMITH H O, HUTCHISON C A, PFANNKUCH C, *et al.*. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100(26): 15440-15445.
 - [49] SHIN J, JARDINE P, NOIREAUX V. Genome replication, synthesis, and assembly of the bacteriophage T7 in a single cell-free reaction[J]. *ACS Synth. Biol.*, 2012, 1(9): 408-413.
 - [50] RUSTAD M, EASTLUND A, JARDINE P, *et al.*. Cell-free TX-TL synthesis of infectious bacteriophage T4 in a single test tube reaction[J/OL]. *Synth. Biol. (Oxf)*, 2018, 3(1): ysy002 [2024-11-25]. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysy002>.
 - [51] SHRIVASTAVA S R, SHRIVASTAVA P S, RAMASAMY J. Responding to the challenge of antibiotic resistance: World Health Organization[J/OL]. *J. Res. Med. Sci.*, 2018, 23: 21 [2024-11-25]. <https://doi.org/10.4103/1735-1995.228593>.
 - [52] J-PIRNAY, DJEBARA S, STEURS G, *et al.*. Personalized bacteriophage therapy outcomes for 100 consecutive cases: a multicentre, multinational, retrospective observational study[J]. *Nat. Microbiol.*, 2024, 9(6): 1434-1453.
 - [53] 刘湧波.“抢救邱财康”成为带动我们一切工作的纲[J]. *科学通报*, 1958(19):595-598.
LIU Y B. “Rescuing Qiu Caikang” becomes the main line that drives all our work[J]. *Chin. Sci. Bull.*, 1958, (19):595-598.
 - [54] BAO J, WU N, ZENG Y, *et al.*. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, 9(1): 771-774.
 - [55] SHEN M, ZHANG H, SHEN W, *et al.*. *Pseudomonas aeruginosa* MutL promotes large chromosomal deletions through non-homologous end joining to prevent bacteriophage predation[J]. *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46(9): 4505-4514.
 - [56] NICK J A, DEDRICK R M, GRAY A L, *et al.*. Host and pathogen response to bacteriophage engineered against *Mycobacterium abscessus* lung infection[J]. *Cell*, 2022, 185(11): 1860-1874.
 - [57] JAULT P, LECLERC T, JENNES S, *et al.*. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial[J]. *Lancet Infect. Dis.*, 2019, 19(1): 35-45.
 - [58] SARKER S A, SULTANA S, REUTELER G, *et al.*. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh[J]. *EBio-Medicine*, 2016, 4: 124-137.
 - [59] JIANG H, LI Y, COSNIER S, *et al.*. Exploring phage engineering to advance nanobiotechnology[J]. *Mater. Today Nano*, 2022, 19:100229.
 - [60] NAMDEE K, KHONGKOW M, BOONRUNGSIMAN S, *et al.*. Thermoresponsive bacteriophage nanocarrier as a gene delivery vector targeted to the gastrointestinal tract[J]. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2018, 12: 33-44.
 - [61] KAO C Y, PAN Y C, HSIAO Y H, *et al.*. Improvement of gene delivery by minimal bacteriophage particles[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(15): 14532-14544.
 - [62] HAJITOU A, TREPEL M, LILLEY C E, *et al.*. A hybrid vector for ligand-directed tumor targeting and molecular imaging[J]. *Cell*, 2006, 125(2): 385-398.
 - [63] ALLEN G L, GRAHN A K, KOURENTZI K, *et al.*. Expanding the chemical diversity of M13 bacteriophage[J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2022, 13: 961093[2024-11-25]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.961093>.
 - [64] WANG Y, ZHANG G, ZHONG L, *et al.*. Filamentous bacteriophages, natural nanoparticles, for viral vaccine strategies[J]. *Nanoscale*, 2022, 14(16): 5942-5959.
 - [65] BEDI D, GILLESPIE J W, PETRENKO V A Jr, *et al.*. Targeted delivery of siRNA into breast cancer cells *via* phage fusion proteins[J]. *Mol. Pharm.*, 2013, 10(2): 551-559.
 - [66] ZHANG Z, ROHWEDER P J, ONGPIATTANAKUL C, *et al.*. A covalent inhibitor of K-Ras(G¹²C) induces MHC class I presentation of haptenated peptide neoepitopes targetable by immunotherapy[J]. *Cancer Cell*, 2022, 40(9): 1060-1069.
 - [67] WANG T, D'SOUZA G G M, BEDI D, *et al.*. Enhanced binding and killing of target tumor cells by drug-loaded liposomes modified with tumor-specific phage fusion coat protein[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2010, 5(4): 563-574.
 - [68] LI Y, QU X, CAO B, *et al.*. Selectively suppressing tumor angiogenesis for targeted breast cancer therapy by genetically en-

- gineered phage[J/OL]. *Adv. Mater.*, 2020, 32(29): e2001260 [2024-11-25]. <https://doi.org/10.1002/adma.202001260>.
- [69] FUKUTA T, ASAI T, KIYOKAWA Y, *et al.*. Targeted delivery of anticancer drugs to tumor vessels by use of liposomes modified with a peptide identified by phage biopanning with human endothelial progenitor cells[J]. *Int. J. Pharm.*, 2017, 524(1-2): 364-372.
- [70] STAQUICINI F I, SMITH T L, TANG F H F, *et al.*. Targeted AAVP-based therapy in a mouse model of human glioblastoma: a comparison of cytotoxic versus suicide gene delivery strategies[J]. *Cancer Gene Ther.*, 2020, 27(5): 301-310.
- [71] LIU J, TANG W, BUDHU A, *et al.*. A viral exposure signature defines early onset of hepatocellular carcinoma[J]. *Cell*, 2020, 182(2): 317-328.
- [72] YUAN N, XIN G H, ZUO X X, *et al.*. Combination of phage display and SEREX for screening early lung cancer associated antigens[J]. *J. Zhejiang Univ. Med. Sci.*, 2014, 43(4): 388-396.
- [73] KHOSRAVI S, AMINI R, ARABESTANI M R, *et al.*. Isolation of a lytic bacteriophage for *Helicobacter pylori*[J/OL]. *Gene Rep.*, 2021, 23: 101107[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101107>.
- [74] ERIKSSON F, CULP W D, MASSEY R, *et al.*. Tumor specific phage particles promote tumor regression in a mouse melanoma model[J]. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007, 56(5): 677-687.
- [75] HUAI Y, DONG S, ZHU Y, *et al.*. Genetically engineered virus nanofibers as an efficient vaccine for preventing fungal infection[J]. *Adv. Healthc. Mater.*, 2016, 5(7): 786-794.
- [76] KESKIN D B, ANANDAPPA A J, SUN J, *et al.*. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial[J]. *Nature*, 2019, 565(7738): 234-239.
- [77] DONG S, SHI H, CAO D, *et al.*. Novel nanoscale bacteriophage-based single-domain antibodies for the therapy of systemic infection caused by *Candida albicans*[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2016, 6: 32256[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1038/srep32256>.
- [78] BAO Q, LI X, HAN G, *et al.*. Phage-based vaccines[J]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2019, 145: 40-56.
- [79] STAQUICINI D I, TANG F H F, MARKOSIAN C, *et al.*. Design and proof-of-concept for targeted phage-based COVID-19 vaccination strategies with a streamlined cold-free supply chain[J/OL]. *bioRxiv*, 2021: 2021.03.15.435496[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1101/2021.03.15.435496>.
- [80] GALLIOT B, CRESCENZI M, JACINTO A, *et al.*. Trends in tissue repair and regeneration[J]. *Development*, 2017, 144(3): 357-364.
- [81] WANG X, ZHU X, WANG D, *et al.*. Identification of a specific phage as growth factor alternative promoting the recruitment and differentiation of MSCs in bone tissue regeneration[J]. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2023, 9(5): 2426-2437.
- [82] PENG H, ROSSETTO D, MANSY S S, *et al.*. Treatment of wound infections in a mouse model using Zn(2+) -releasing phage bound to gold nanorods[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(3): 4756-4774.
- [83] JANG W B, JI S T, PARK J H, *et al.*. Engineered M13 peptide carrier promotes angiogenic potential of patient-derived human cardiac progenitor cells and *in vivo* engraftment[J]. *Tissue Eng. Regen. Med.*, 2020, 17(3): 323-333.
- [84] CHEN Y, LIU X, YANG M, *et al.*. Integration of genetically engineered virus nanofibers and fibrin to form injectable fibrous neuron-rich hydrogels and enable neural differentiation[J]. *J. Mater. Chem. B*, 2023, 11(4): 802-815.
- [85] JU Z, SUN W. Drug delivery vectors based on filamentous bacteriophages and phage-mimetic nanoparticles[J]. *Drug Deliv.*, 2017, 24(1): 1898-1908.
- [86] LEE J H, WARNER C M, JIN H E, *et al.*. Production of tunable nanomaterials using hierarchically assembled bacteriophages[J]. *Nat. Protoc.*, 2017, 12(9): 1999-2013.
- [87] BISOYI H K, LI Q. Liquid crystals: versatile self-organized smart soft materials[J]. *Chem. Rev.*, 2022, 122(5): 4887-4926.
- [88] DOGIC Z, FRADEN S. Cholesteric phase in virus suspensions[J]. *Langmuir*, 2000, 16(20): 7820-7824.
- [89] CAO B, LI Y, YANG T, *et al.*. Bacteriophage-based biomaterials for tissue regeneration[J]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2019, 145: 73-95.
- [90] LEE S W, BELCHER A M. Virus-based fabrication of micro- and nanofibers using electrospinning[J]. *Nano Lett.*, 2004, 4(3): 387-390.
- [91] KIM C, LEE H, DEVARAJ V, *et al.*. Hierarchical cluster analysis of medical chemicals detected by a bacteriophage-based colorimetric sensor array[J/OL]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10(1): 121[2024-11-25]. <https://doi.org/10.3390/nano10010121>.
- [92] LEI F, ZENG F, YU X, *et al.*. Oral hydrogel nanoemulsion co-delivery system treats inflammatory bowel disease *via* anti-inflammatory and promoting intestinal mucosa repair[J/OL]. *J. Nanobiotechnol.*, 2023, 21(1): 275[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02045-4>.
- [93] TIAN L, HE L, JACKSON K, *et al.*. Self-assembling nanofibrous bacteriophage microgels as sprayable antimicrobials targeting multidrug-resistant bacterial[J/OL]. *Nat. Commun.*, 2022, 13(1): 7158[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34803-7>.
- [94] PEIVANDI A, JACKSON K, TIAN L, *et al.*. Inducing microscale structural order in phage nanofilament hydrogels with globular proteins[J]. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2022, 8(1): 340-347.
- [95] LLOYD J A, LIU Y, NG S H, *et al.*. Self-assembly of spherical and rod-shaped nanoparticles with full positional control[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(47): 22841-22848.
- [96] CHUNG S Y, BLOKING J T, Y-MCHIANG. Electronically conductive phospho-olivines as lithium storage electrodes[J]. *Nat. Mater.*, 2002, 1(2): 123-128.
- [97] SHI Z C, ATTIA A, YE W L, *et al.*. Synthesis, characterization and electrochemical performance of mesoporous FePO₄ as cathode material for rechargeable lithium batteries[J]. *Electrochim. Acta*, 2008, 53(6): 2665-2673.
- [98] LEE Y, KIM J, YUN D S, *et al.*. Virus-templated Au and Au/Pt core/shell nanowires and their electrocatalytic activities for fuel cell applications[J]. *Energy Environ. Sci.*, 2012, 5(8): 8328-8334.
- [99] CHOI Y, LEE S Y. Biosynthesis of inorganic nanomaterials using microbial cells and bacteriophages[J]. *Nat. Rev. Chem.*, 2020, 4(12): 638-656.
- [100] LEE J H, LEE J H, XIAO J, *et al.*. Vertical self-assembly of polarized phage nanostructure for energy harvesting[J]. *Nano Lett.*, 2019, 19(4): 2661-2667.
- [101] SMOON J, CHOI E J, N-NJEONG, *et al.*. Research progress of

- M13 bacteriophage-based biosensors[J/OL]. *Nanomaterials* (Basel), 2019, 9(10): 1448[2024-11-25]. <https://doi.org/10.3390/nano9101448>.
- [102] LI X, WANG H X, YIN X, *et al.* Screening epitope peptides based on a phage-displayed random peptide and peptide microarrays to contribute to improving the diagnostic efficiency of systemic lupus erythematosus[J]. *Immunol. Lett.*, 2023, 259: 30-36.
- [103] SEDKI M, CHEN X, CHEN C, *et al.* Non-lytic M13 phage-based highly sensitive impedimetric cytosensor for detection of coliforms[J/OL]. *Biosens. Bioelectron.*, 2020, 148: 111794 [2024-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111794>.
- [104] POURAKBARI R, YOUSEFI M, KHALILZADEH B, *et al.* Early stage evaluation of colon cancer using tungsten disulfide quantum dots and bacteriophage nano-biocomposite as an efficient electrochemical platform[J]. *Cancer Nanotechnol.*, 2022, 13(1):7.
- [105] MANIVANNAN S, SEO Y, KANG D, *et al.* Colorimetric and optical Hg(II) ion sensor developed with conjugates of M13 bacteriophage and silver nanoparticles[J]. *New J. Chem.*, 2018, 42(24): 20007-20014.
- [106] MANIVANNAN S, PARK S, JEONG J, *et al.* Aggregation-free optical and colorimetric detection of Hg(II) with M13 bacteriophage-templated Au nanowires[J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2020, 161:112237.
- [107] NGUYEN T M, KIM W G, JAHN H, *et al.* Programmable self-assembly of M13 bacteriophage for micro-color pattern with a tunable colorization[J]. *RSC Adv.*, 2021, 11(51): 32305-32311.
- [108] MOON J S, PARK M, KIM W G, *et al.* M-13 bacteriophage based structural color sensor for detecting antibiotics[J]. *Sens. Actuat. B Chem.*, 2017, 240: 757-762.
- [109] XU H, SHEN J, YANG C T, *et al.* Naked-eye counting of pathogenic viruses by phage-gold nanobiomaterials as probes[J/OL]. *Mater. Today Adv.*, 2021, 10: 100122[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2020.100122>.
- [110] 冀亚路,雷连成,冯新,等.一株牛源金黄色葡萄球菌噬菌体 VB-SavM-JYL02生物学特性及基因组学研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(10): 1003-1008.
- JI Y L, LEI L C, FENG X, *et al.* Biological characteristics and genomics of abovine-derived *Staphylococcus aureus* phage VB-SavM-JYL02[J]. *Chin. J. Prev. Vet. Med.*, 2020, 42(10): 1003-1008.
- [111] 吕可,赵前程,刘婧懿,等.噬菌体在水生动物病害防治中的应用问题和解决策略[J]. *水产科学*, 2020, 39(6): 964-971.
- LYU K, ZHAO Q C, LIU J Y, *et al.* Application of bacteriophage in aquaculture: focusing on problems and solutions[J]. *Fish. Sci.*, 2020, 39(6): 964-971.
- [112] BALOGH B, CANTEROS B I, STALL R E, *et al.* Control of *Citrus* canker and *Citrus* bacterial spot with bacteriophages[J]. *Plant Dis.*, 2008, 92(7): 1048-1052.
- [113] 包红朵,呼圣杰,王冉.沙门氏菌噬菌体在动物和食品中的生物防控研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(2): 605-611.
- BAO H D, HU S J, WANG R. Research progress on biological prevention and control of *Salmonella* phage in animals and foods[J]. *J. Food Saf. Qual.*, 2022, 13(2): 605-611.
- [114] MONK A B, REES C D, BARROW P, *et al.* Bacteriophage applications: where are we now?[J]. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2010, 51(4): 363-369.
- [115] GUENTHER S, HERZIG O, FIESELER L, *et al.* Biocontrol of *Salmonella typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2[J]. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 154(1-2): 66-72.
- [116] BAO H, ZHANG P, ZHANG H, *et al.* Bio-control of *Salmonella enteritidis* in foods using bacteriophages[J]. *Viruses*, 2015, 7(8): 4836-4853.
- [117] DUC H M, SON H M, YI H P S, *et al.* Isolation, characterization and application of a polyvalent phage capable of controlling *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in different food matrices[J/OL]. *Food Res. Int.*, 2020, 131: 108977[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108977>.
- [118] ZHANG H, WANG R, BAO H. Phage inactivation of food-borne *Shigella* on ready-to-eat spiced chicken[J]. *Poult. Sci.*, 2013, 92(1): 211-217.
- [119] MOZAFFARI P, BERIZI E, HOSSEINZADEH S, *et al.* Isolation and characterization of *E. coli* O157: H7 novel bacteriophage for controlling this food-borne pathogen[J/OL]. *Virus Res.*, 2022, 315: 198754[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198754>.
- [120] LASAGABASTER A, JIMÉNEZ E, LEHNHERR T, *et al.* Bacteriophage biocontrol to fight *Listeria outbreaks* in seafood[J/OL]. *Food Chem. Toxicol.*, 2020, 145: 111682[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111682>.
- [121] 刘力萍,王宏华,王峰,等.副溶血弧菌 CHY5-M1M 噬菌体的分离鉴定及生物学特性分析[J]. *生物技术进展*, 2022, 12(6): 900-905.
- LIU L P, WANG H H, WANG F, *et al.* Isolation, identification and biological characterization of *Vibrio parahaemolyticus* CHY5-M1M phage[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2022, 12(6): 900-905.
- [122] SCHMIEGE D, ZACHARIAS N, SIB E, *et al.* Prevalence of multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in urban community wastewater[J/OL]. *Sci. Total Environ.*, 2021, 785: 147269[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147269>.
- [123] LI M, SHI D, LI Y, *et al.* Recombination of T4-like phages and its activity against pathogenic *Escherichia coli* in planktonic and biofilm forms[J]. *Virol. Sin.*, 2020, 35(5): 651-661.
- [124] KORAJKIC A, KELLEHER J, SHANKS O C, *et al.* Effectiveness of two wastewater disinfection strategies for the removal of fecal indicator bacteria, bacteriophage, and enteric viral pathogens concentrated using dead-end hollow fiber ultrafiltration (D-HFUF)[J/OL]. *Sci. Total Environ.*, 2022, 831: 154861 [2024-11-25]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154861>.
- [125] PIRES D P, CLETO S, SILLANKORVA S, *et al.* Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade[J]. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2016, 80(3): 523-543.
- [126] NAIR A, KHAIRNAR K. Genetically engineered phages for therapeutics: proceed with caution[J/OL]. *Nat. Med.*, 2019, 25(7): 1028[2024-11-25]. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0506-3>.