特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-070

工程噬菌体的合成生物学“智造”

陈青黎，童贻刚
（北京化工大学生命科学与技术学院　北京　100029）

摘要：噬菌体，以杀菌特性而闻名的天然病毒，是地球上多样性和丰度最高的生物体。在过去100多年中，噬菌体的研究极大地推动了遗传学、分子生物学和合成生物学的发展。随着耐药超级细菌的流行，噬菌体疗法引人入胜的科学历史也被广为传颂。然而，相对于自然环境中丰富的噬菌体数量（总数为10^{31}，比所有其他生物的总和还要多），目前只有少数噬菌体成功应用于对抗耐药性细菌感染及其他工程领域。当前，急需践行合成生物学从“造物致知”到“造物致用”理念，采用高通量测序和基因组精准编辑等先进生物技术来创建具有独特属性的增强变体，提高噬菌体治疗的疗效和可编程性。本文综述了近年来噬菌体基因工程改造方法的技术进展以及合成生物学助力噬菌体应用技术发展的研究动态，如按照实际需求改造噬菌体宿主范围、借助宏基因组挖掘自然界中噬菌体的广泛资源、结合多组学技术揭示噬菌体与宿主互作的分子机制、调控肠道噬菌体组维持肠道稳态以促进人体健康及利用大数据和新型人工智能指导噬菌体理性设计。总之，合成生物学正在跨时代驱动传统实验研究范式转变，结合“设计—构建—测试—学习（DBTL）循环”理性设计目标噬菌体，无论是自上而下的体系优化，还是自下而上的生命体重构，工程噬菌体的合成生物学“智造”都大有可为。

关键词：噬菌体；合成生物学；工程噬菌体；可编程基因组；理性设计；噬菌体治疗

中图分类号：Q816　　**文献标志码：**A

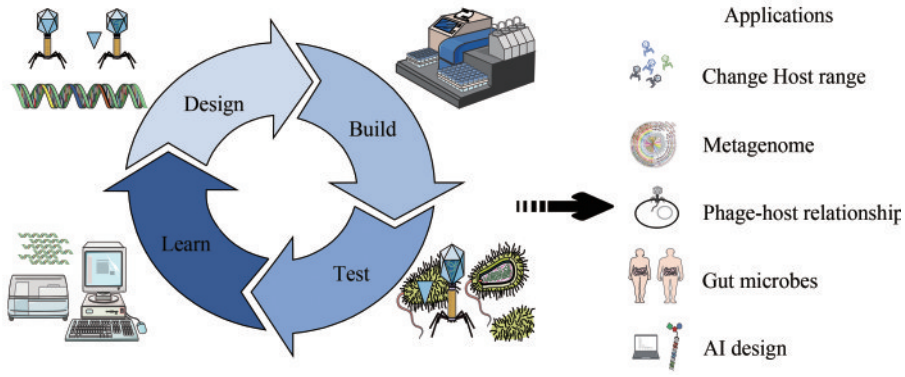
Merging the frontiers: synthetic biology for advanced bacteriophage design

CHEN Qingli，TONG Yigang
（*College of Life Science and Technology*，*Beijing University of Chemical Technology*，*Beijing 100029*，*China*）

Abstract: Bacteriophages (phages), natural viruses known for infecting and killing bacteria, are the most diverse and abundant organisms on Earth. Within the past 100 years of research on phages, breakthroughs in genetics, molecular biology, and synthetic biology have been successfully achieved. The fascinating scientific history of phage therapy has been repeatedly reported, as drug-resistant bacteria are becoming increasingly prevalent. Although phages outnumber other species combined in nature (10^{31} in total), only a small fraction of them have been successfully exploited for fighting infections caused by drug-resistant bacteria. Therefore, there is an urgent need for implementing the motto of

收稿日期：2022-12-06 修回日期：2022-12-30
基金项目：国家自然科学基金（32001834）；国家重点研发计划（2018Y FA 0903000）；军事生物安全研究计划（20SWAQX27）
引用本文：陈青黎，童贻刚. 工程噬菌体的合成生物学“智造”[J]. 合成生物学，2023，4(2)：283-300
Citation：CHEN Qingli，TONG Yigang. Merging the frontiers：synthetic biology for advanced bacteriophage design[J]. Synthetic Biology Journal，2023，4(2)：283-300

synthetic biology, “build to learn, build to use”, and also using methods such as high-throughput sequencing and precise genome editing to create enhanced variants with unique features, improving efficacy and programmability for phage therapy. In the review, we discuss recent technological advances in phage genome engineering approaches and the potential applications of synthetic biology to engineer phages, such as modifying the host range of phages for practical needs, mining the extensive resources of phages in nature with the help of macro genomes, combining multi-omics technologies to reveal molecular mechanisms underlying phage-host interactions, regulating intestinal phages to maintain intestinal homeostasis for human health, and using big data and artificial intelligence to guide rational phage design. Synthetic biology is driving a paradigm shift in traditional experimental research by combining “Design-Build-Test-Learn (DBTL) cycles” to rational design for phages, making synthetically designed phages promising for both top-down system optimization and bottom-up life-form reconstruction.



Keywords: phage; synthetic biology; engineered phage; reprogramming genome; rational design; phage therapy

噬菌体约100年前被发现[1-2]，是特异性感染细菌和古菌的病毒，结构简单，主要由蛋白质外壳和遗传物质核酸组成。从噬菌体进入宿主开始到引起细菌裂解并释放出子代噬菌体为止，为一个增殖周期，一般为15～20 min。根据是否进入裂解期，可将噬菌体分为烈性噬菌体和温和噬菌体，其中烈性噬菌体应用场景更广泛[3]。烈性噬菌体的繁殖周期一般分为吸附、入侵、增殖、组装和裂解5个阶段。噬菌体通过吸附蛋白与宿主细菌表面的受体特异性结合，将其遗传物质注入宿主细胞，并在宿主细胞内进行核酸复制、蛋白质合成和子代噬菌体的组装，实现子代增殖。噬菌体与细菌的相互抵抗防御可发生在噬菌体繁殖周期的不同阶段。

人们对噬菌体的研究更新了生命科学的基础研究和本质认知。噬菌体对建立信息传递方向为“DNA—RNA—蛋白质”的分子生物学中心法则[4]、揭示遗传密码的三联子性质[5]至关重要，人们基于此建立了基因调控的全新范式；细菌编码限制性内切酶[6]并通过切割特定的DNA序列来防止噬菌体感染这一现象启发研究人员利用限制性内切酶与T4连接酶实现了DNA片段的重组和克隆构建，标志着重组DNA黄金时代的开始[7]；而噬菌体DNA聚合酶[8]推动了测序技术的发展[9]；CRISPR-Cas系统的发现[10-11]更是引领了一场重大的基因编辑技术革命并摘取了2020年诺贝尔奖。

在过去的几十年里，世界范围内爆发了数次大型流行病，包括寄生虫、真菌、细菌和病毒感染。传染病的出现速度与对抗它们的新战略的发展速度不成比例，急需开发新颖、特异、灵敏、有效的传染病诊断和治疗方法[12]。抗生素耐药性危机的出现使得人们对噬菌体疗法重燃兴趣[13]，已有多个成功的噬菌体治疗案例有力论证了噬菌体治疗的巨大潜力[14]，但使用天然噬菌体可能受到诸如宿主范围窄、细菌产生噬菌体耐受性或噬菌体颗粒不稳定等诸多问题的限制[15]。此外，用于临床治疗的噬菌体有着严格的筛选标准[14, 16-17]，

至少要满足如下条件：噬菌体具备高效裂解能力和广泛的宿主范围；不存在噬菌体基因组意外转移细菌DNA片段的风险；噬菌体不编码任何毒素、毒力因子或抗生素抗性基因；不会引起人体不良免疫反应等。

合成生物学的进步使科学家们能够设计出用于预防和治疗目的的活体工程微生物[18]。随着人们在分子水平对病毒组装过程的理解不断加深[19]，合成生物学可用作解锁不同微生物生态系统中未知生命规则的关键钥匙，揭示病毒的组装、多样性、结构和规模等法则[20]。借助合成生物学，我们可以开发应用于临床的工程噬菌体[21-23]。首次证实工程噬菌体巨大潜力的例子是一名青少年在双侧肺移植后因脓肿分枝杆菌感染接受了三噬菌体鸡尾酒治疗（包含两种经过改造后具有有效裂解活性的温和噬菌体）[24]，在持续32周的静脉注射噬菌体治疗中耐受性良好，且没有重大副作用及器官损伤，患者被成功治愈。

本文总结了近年来噬菌体合成生物学领域内突破性进展[25]，将工程噬菌体视为有机整体，结合Biology Technology（BT）和Information Technology（IT）的视角，利用合成生物学中的“设计—构建—测试—学习（DBTL）循环”，思考如何“智造”噬菌体以显著提高其功效和可编程性，应用于按需改变宿主范围，利用宏基因组挖掘自然界中丰富的噬菌体资源，结合多组学技术揭示噬菌体与宿主互作机制，精准调控肠道菌群生态，并利用大数据和新型人工智能指导噬菌体设计，在临床实践中使用噬菌体作为治疗或预防药物[26-27]，为落实“One Health”降本增效[28-29]。

1 噬菌体的裂解类型及生物学特性

1.1 温和噬菌体

侵入细菌后，其核酸附着并整合在宿主染色体上，和宿主细菌的核酸同步复制，这种不引起宿主细菌裂解的噬菌体称作温和噬菌体[30]。

温和噬菌体对细菌有三大进化益处：作为水平基因转移（horizontal gene transfer， HGT）的中介、作为全新的进化遗传变异来源、作为细菌竞争的武器[31]。通常认为温和噬菌体通过传递毒力基因在增加细菌致病性中起重要作用，Chen等[32]报告了温和噬菌体vB_BbrS_PHB09（PHB09）的迅速进化可减轻细菌毒力。Sousa等[33]通过评估两个噬菌体群体中基因流动频率证实温和噬菌体的宿主范围比烈性噬菌体窄，推测感染远亲细菌宿主的温和噬菌体之间的基因流动可能是通过与更广泛的宿主烈性噬菌体的重组介导的，并在随后工作中确定了远亲噬菌体之间许多基因的转移频率、结果和有利转移发生因素[34]。

温和噬菌体因其高丰度和基因组多样性[35]，具有广泛的改造潜力，可用于研究细菌毒力机制[36]，搭建改造细菌和清除耐药质粒的平台，我们也可以通过从温和噬菌体的基因组中去除溶原性必需的基因模块，以及编码毒素、毒力因子或抗生素抗性基因，获得安全可靠的特异性烈性噬菌体。

1.2 烈性噬菌体

烈性噬菌体，是指侵入宿主细菌后，随即引起宿主细菌裂解，是目前解决耐药问题最常用的工程噬菌体类型，其基因组具有高度可塑性。Labrie等[37]证明了烈性乳球菌噬菌体基因组的显著可塑性，使它们能够快速适应动态的乳腺环境。

常见的工程思路为：选取有潜力的烈性噬菌体，如对全耐药和多耐药菌株表现出很强的裂解活性的新型噬菌体phiLLS[38]、对可形成生物膜的尿路致病性多耐药和泛耐药大肠杆菌具有活性的新型噬菌体vB_EcoA_RDN8.1[39]，分析注释其基因组学特征[40]，并通过基因工程强化改造得到应用于临床的新型噬菌体重组体，如Masuda等[41]通过基因工程将*LLB*结构基因引入烈性噬菌体基因组中得到一种应对耐药问题的新型抗菌剂。Nick等[42]成功使用经过工程改造的噬菌体治疗分枝杆菌引发的难治性肺部感染，他们根据患者肺部的脓肿分枝杆菌样本，筛选了几十种候选噬菌体，最终确定了两种能有效杀死感染患者体内分枝杆菌的候选噬菌体，通过对这些噬菌体进行基因工程改造来增强其裂解细菌的能力，为患有囊性纤维化症的年轻患者接受挽救生命的肺移植手术扫清了障碍。Jin等[43]采用基因编辑技术设计了一种

可以特异性靶向肠出血性大肠杆菌的工程噬菌体，该工程噬菌体在体外和体内实验条件下，显示出对肠出血性大肠杆菌的高效杀菌作用。

2 噬菌体基因工程改造技术

图1示出了“智造”工程噬菌体流程及噬菌体基因工程改造方法。

2.1 温和噬菌体改造

温和噬菌体具有稳定存在于宿主基因组的特点，可以采用编辑宿主细菌基因组的通用方法对其进行改造[44-46]。

如Ababi等[47]使用λ Red重组系统促进外源ssDNA在宿主基因组复制过程中结合到噬菌体基因组上，并通过失活错配修复系统蛋白来抑制DNA修复。在不额外引入筛选标记的基础上，高重组频率可保证在6个循环后获取超过40%的重组噬菌体。这种基于无痕重组的方法，可在4～5天内将多点突变引入温和噬菌体的基因组中。Tridgett等[48]同样使用λ Red重组系统来编辑温和噬菌体的基因组，并引入抗生素作为重组体的筛选标记，能够在3～5天内完成重组体构建。

本文仅列举部分改造温和噬菌体的代表案例，此外还可以采用CRISPR-Cas系统等多种方式编辑温和噬菌体，下文着重讨论针对烈性噬菌体的改造案例。

2.2 烈性噬菌体改造

2.2.1 随机诱变

随机诱变是改变整个代谢途径或获得具有所需特性的酶、蛋白质甚至整个基因组的强大工具。该技术通过施加选择性压力，结合高通量迭代筛选目标重组体，可获得具有所需表型的噬菌体。

常用紫外线[49-50]、化学诱变剂（例如烷基化剂）提高突变频率，借助全基因组测序确认是否获取目标突变体，或采用引入标记基因方式进行表型筛选。Favor等[51]开发了化学加速病毒进化平台（chemically accelerated viral evolution， CAVE），成功改造大肠杆菌噬菌体T3噬菌体、T7噬菌体以

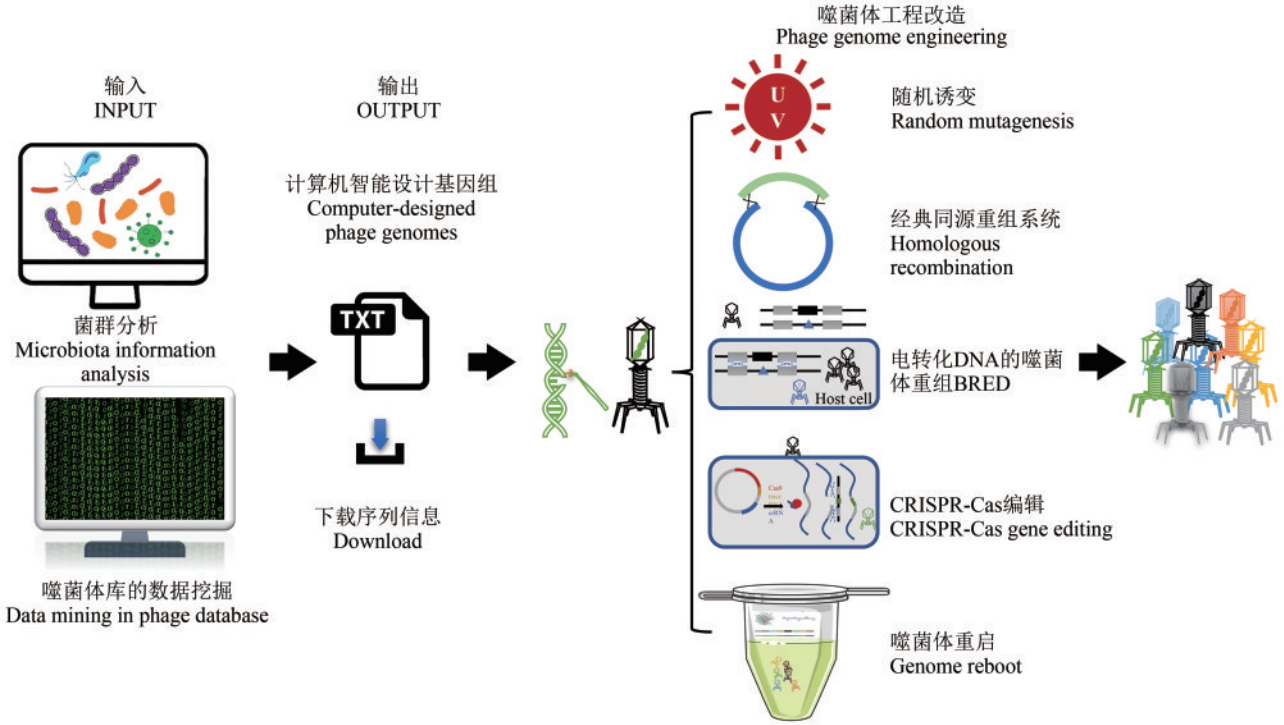


图1 “智造”工程噬菌体流程及噬菌体基因工程改造方法

Fig. 1 Advanced bacteriophages design pipelines and the approaches of phage engineering

及肠道沙门氏菌噬菌体NBSal001和NBSal002，证明了该平台能显著改善噬菌体的热稳定性。随机诱变可快速获取多种突变株，操作简单，但需要注意随机诱变也可能导致噬菌体基因组中其他部位产生额外的未知突变。

2.2.2 经典同源重组系统

同源重组策略是基因工程最常用的方法之一[52-53]，有助于快速获取不同功能的新噬菌体突变体。

Pouillot等[54]开发了基于同源重组工程的噬菌体编辑技术，成功实现：同时修改一个基因编码序列中的多个区域并保持基因的其余部分完整；可逆性地干扰宿主内特异性噬菌体T4噬菌体的裂解周期；通过同源重组将任意数量的工程基因有效地插入到T4天然噬菌体的失活基因组；通过重新激活噬菌体产生工程噬菌体的重组子代，构建了庞大的基因工程烈性噬菌体库，理论上可实现快速分离具有检测（即诊断）、感染和破坏革兰氏阴性菌株功能的重组T4噬菌体颗粒。

Jensen等[55]开发了基于λ Red重组系统实现T7噬菌体的体内重组，可以在T7噬菌体基因组上进行单碱基改变和全基因替换，并将T7噬菌体基因组DNA转化细胞的效率提高了100倍，同时实现使另外两种通常在大肠杆菌中不繁殖的T7样噬菌体能够在基因组转化后重启。

基于同源重组策略的局限性是：对于许多非模式菌的宿主（尤其是革兰氏阳性菌），没有有效的转化方案；重组效率低（约1%）；而通用筛选标记（例如抗性基因）的缺失带来了更多挑战，通常需要对重组噬菌体进行劳动密集型的筛选。目前常用两种方式设计和选择目标噬菌体基因组，提高重组体的收率，即额外引入特异性筛选标记（如荧光蛋白）的正向选择和消除天然噬菌体的反向选择[56]。在某些情况下，可以借助表型选择突变噬菌体，例如改变宿主范围的工程噬菌体或引入对某种细菌防御系统具抗性的噬菌体。重组噬菌体的检测还可以通过设计特异性引物，进行PCR扩增反应完成[57]，并对PCR条带为阳性的产物进一步纯化和富集。引入正向筛选标记、表型筛选和基于PCR的筛选方案均有助于得到所需的噬菌体突变体。

2.2.3 BRED系统

电转化DNA的噬菌体重组策略[58-59]（bacteriophage recombineering of electroporated DNA， BRED），是一种简单有效的对噬菌体基因组进行直接编辑的方法，它是将噬菌体基因组和重组模板共同电转化到宿主菌株中来改造噬菌体，电转化后可通过PCR筛选出平板中发生重组的噬菌斑。

Marinelli等[58]利用BRED在分枝杆菌噬菌体Giles中实现了非必需基因缺失、读码框内缺失、点突变、无义突变、基因标签的添加和外源基因的精确插入。Fehér等[60]首次在肠杆菌科噬菌体中应用BERD技术，从肠杆菌基因工程中最常用的转导载体噬菌体P1vir的基因组中去除了移动元件IS1。不携带IS元件的基因工程载体P1virdeltaIS，其噬斑形态、病毒滴度、爆发量及转导能力均与野生型噬菌体相当。Marinelli等[59]总结了BRED技术的主要特征，回顾了首例应用工程噬菌体疗法治疗人类分枝杆菌感染的案例（即BRED技术实现将治疗性温和噬菌体转化为烈性噬菌体），并指出用于治疗目的的工程型噬菌体相较天然噬菌体的优势以及BRED进行此类修饰的未来前景。

BRED技术可做到在噬菌体基因组中进行点突变等精确突变，重组效率提高到10%～15%，可用于删除、插入和替换基因，能够以比经典同源重组更高的效率精确修饰噬菌体基因组，目前已经在分枝杆菌、大肠杆菌、沙门氏菌[61]和克雷伯氏菌噬菌体[62]的基因组中成功应用，并具有扩展到更多噬菌体种属的潜力。但该技术也有局限性，即必须获得转化效率高的宿主感受态细胞。为了克服这种限制，许多BRED的变体逐渐出现，如Wetzel等[63]将BRED技术与CRISPR-Cas9相结合，以促进高效和精确的噬菌体基因组工程。

2.2.4 CRISPR-Cas系统

CRISPR-Cas是细菌和古细菌在长期的演化过程中出现的一种对抗噬菌体感染或外源DNA入侵的适应性免疫防御系统，CRISPR-Cas系统的出现加速了基因编辑技术的发展，并被广泛应用于生命科学。人们建立了一种将同源重组与CRISPR-Cas结合进行噬菌体基因编辑的技术，可用于编辑原本难以处理的烈性噬菌体的基因组，并帮助人

们进一步了解噬菌体与宿主相互作用[52-53]。

Martel等[64]通过使用嗜热链球菌CRISPR-Cas Ⅱ-A系统提高重组效率，在烈性噬菌体2972的基因组中实现特异性点突变和大片段的删除编辑。Kiro等[65]基于Ⅰ-E型CRISPR-Cas系统开发将大肠杆菌噬菌体T7噬菌体基因工程化的方法，通过同源重组编辑的T7噬菌体基因组的DNA序列两侧会携带同源序列，而未被成功编辑的基因组会被CRISPR-Cas系统清除，从而分离所需的重组噬菌体，并将使用的CRISPR-Cas类型在人们原来认知的Ⅱ型基础上扩展，该方法可应用到任何噬菌体基因工程。

Lemay等[66-67]成功地将化脓性链球菌Ⅱ-A型CRISPR-Cas系统用于编辑乳酸乳球菌的烈性噬菌体P2的基因组，实现了ORF47的单碱基突变、插入及ORF24、ORF42和ORF49的删除。Shen等[68]应用化脓链球菌的CRISPR-Cas系统在肺炎克雷伯氏菌噬菌体phiKpS2中，仅需30～60 bp的同源臂即可完成点突变、基因缺失和交换，成功删除了1个启动子和9个基因。Nayeemul等[69]使用Ⅲ-A型CRISPR-Cas系统的CRISPR-Cas10改造金黄色葡萄球菌噬菌体，以100%的效率分离出目标噬菌体突变体，证明CRISPR-Cas10是一种噬菌体基因工程的强大工具。Tao等[70]发现Ⅴ型CRISPR-Cas12a系统与Ⅱ型CRISPR-Cas9系统相比，显示出对葡萄糖羟甲基胞嘧啶（glucosyl hydroxymethyl cytosine，GhmC）修饰基因组的更高效切割，可解决因T4噬菌体的GhmC基因组对CRISPR-Cas系统表现出不同程度的抗性带来的编辑难题，并基于此开发了使用Ⅴ型CRISPR-Cas12a系统的T4噬菌体基因组中创建插入和缺失的编辑技术，应用此技术改变T4噬菌体衣壳蛋白Hoc和Soc在体内将外源肽和蛋白质连接到T4噬菌体衣壳的能力。Zhang等[71]设计了基于异源CRISPR-Cas9系统的噬菌体基因组编辑平台，在宿主细菌*Vibrio natriegens* TT4体内进行了*Natriegens phage* TT4P2基因组编辑实验，实现了噬菌体基因的缺失和替换。

Joseph Bondy-Denomy[72]和Jennifer A. Doudna[73]两个课题组利用新挖掘的CRISPR-Cas13a作为反筛工具，构建表达Cas13a和靶向噬菌体内源基因crRNA的反筛菌株和含同源模板质粒的编辑菌株，将裂解液滴在反筛菌株上即可消除天然噬菌体，实现了高效的噬菌体基因组编辑。两项工作也有各自的别出心裁之处，即利用的Cas13a来源及目标噬菌体不同：Jennifer A. Doudna等通过生物信息学分析及实验证明筛选出来源于*Leptotrichia buccalis*的Cas13a具有强抗噬菌体能力，并对9个大肠杆菌噬菌体都有效，得到应用于广谱噬菌体编辑的*Lbu*Cas13a；而Joseph Bondy-Denomy等选取生化表征最充分的来源于*Listeria seeligeri*的Cas13a靶向噬菌体ΦKZ、OMKO1和PaMx41，并增加了正向筛选步骤，在噬菌体ΦKZ ORF120下游整合anti-CRISPR基因*acrVIA1*，重组噬菌体在表达针对其他转录物的crRNA的宿主中也可以高效工作。

基于CRISPR-Cas系统的噬菌体工程的局限性在于仅限于编码表征的天然CRISPR-Cas系统或能够进行转化以表达活性异源CRISPR-Cas系统的细菌宿主，可能会受到天然噬菌体携带的Acr系统的限制干扰。DNA靶向和RNA靶向CRISPR-Cas系统都可提供有效的反选择筛选重组体，但它们在噬菌体工程中的适用性可能会受到宿主基因组上天然spacer存在的限制，通常可以通过预先分析宿主基因组上的spacer序列，筛选出合适的宿主体系来克服这一点。此外，研究表明Ⅱ型CRISPR-Cas系统在T7噬菌体中比Ⅰ型系统更易于使用，且通常更有效[74]，这一研究成果为未来更有效的T7噬菌体工程化奠定了基础。

Ramirez-Chamorro等[75]指出依赖于CRISPR-Cas核酸酶靶向消除天然噬菌体的同源重组的策略在基因组较大的烈性噬菌体中往往效果不稳定，如Ⅱ-A型CRISPR-Cas9系统对T5的编辑效率低下，因此设计了基于Retron的重组替换方案，不需要较长的同源臂，降低了克隆难度，但对插入片段的长度有一定限制。

基于CRISPR-Cas系统的噬菌体基因组编辑平台的建设是体内体系中最具普适性的策略，有望解决噬菌体基因多样性研究不足的问题，推动噬菌体合成生物学和纳米技术的发展，甚至加速发现新的分子生物学工具。

2.2.5 Genome reboot

合成噬菌体基因组的DNA，并在酵母或体外

组装后的适当宿主细胞中将其重新组装激活为完整的基因组，这个过程称为噬菌体重新启动（phage genome reboot），可分为4个步骤：①通过从头合成或PCR扩增产生大量较短的、重叠的片段；②在酵母重组平台或体外将人工噬菌体基因组片段组装成完整的人工噬菌体基因组[76]；③将组装好的噬菌体基因组转化至大肠杆菌、L型细菌等天然宿主或无细胞表达体系重启为有活性的噬菌体颗粒；④使用氯仿等裂解释放重启的噬菌体，使用裂解液重新侵染天然宿主菌进行增殖富集，获取大量工程化噬菌体。

噬菌体DNA被用作模板来生成覆盖整个噬菌体基因组的重叠PCR产物，或者通过直接合成的方式获取较短的、重叠的片段，而其基因组的组装有多种可选方案。

首选是在酵母平台实现噬菌体基因组的高效重组。在酵母人工染色体重组技术[77]中，通过PCR扩增噬菌体基因组得到长约4～12 kb的多个片段，第一个和最后一个片段具有与线性酵母人工染色体（yeast artificial chromosomes， YAC）重叠的同源臂。将所有片段共转化进酿酒酵母，凭借天然酵母强大的重组能力有效地组装噬菌体基因组和YAC载体[78]。随后从酵母细胞中提取含有组装完整的噬菌体基因组的YAC载体，将其转化到细菌宿主细胞即可重新启动功能性噬菌体。对获得的噬菌体斑块扩增并测序以确认噬菌体基因组改造是否成功。到目前为止，基于酵母的噬菌体工程已成功用于改造大肠杆菌[78]、克雷伯氏菌[78]和铜绿假单胞菌[79]对应的噬菌体，重新启动首先发生在大肠杆菌中或噬菌体的天然宿主中，此策略还适用于工程噬菌体诱导的染色体岛（phage-inducible chromosomal islands， PICIs）[80]。YAC辅助的基因组组装非常高效，但噬菌体基因组的重启仅依赖于宿主细菌的转化，这限制了该工程策略对高度可转化细菌的适用性。

Pryor等[81]通过优化体外DNA组装方法Golden Gate assembly（GGA）成功组装了多达52个部分的40 kb T7噬菌体基因组，并且在细胞转化后重启噬菌体颗粒。也可以通过Gibson组装策略[82]拼接完整噬菌体基因组，Pulkkinen等[83]使用这种简单有效的体外装配反应制造出一种携带荧光素酶的报告型T7噬菌体。

将组装完整的噬菌体基因组转入宿主或其他合适体系，是决定能否重启成功的关键步骤。

电穿孔已成为将DNA递送到原核细胞和真核细胞中的成熟工具，将噬菌体基因组电转入宿主细胞即可直接实现噬菌体重启。最常见的是在大肠杆菌中实现电转噬菌体基因组[84]。Milho等[85]使用电穿孔DNA的噬菌体重组来评估功能未知的单个基因缺失对沙门氏菌噬菌体PVP-SE2的影响。但电穿孔重启DNA的成功率受限于DNA转导效率。

无细胞转录翻译（transcription and translation，TXTL）系统是利用细胞提取物（而不是细胞）进行基因转录和翻译的系统，最大优势是避开了细胞内环境对细胞表达的影响，可以人为控制反应条件和进程，可用于测试调节元件和电路、生物制造生物制剂或构建合成细胞。Rustad等[86]展示了在无细胞平台中完整合成基因组长达169 kb的T4噬菌体。最大的大肠杆菌噬菌体之一的成功重启，展示了无细胞体系对复杂基因调控、代谢和自组装的整合强大的调控能力，将生物系统的自下而上合成提升到了一个新的水平。Garenne等[87]利用无细胞平台成功重启40 kb的T7噬菌体并提供了更优化便捷的系统配方。Emslander等[88]通过将枯草芽孢杆菌的RNA聚合酶Σ-igA因子SigA加入无细胞系统，将无细胞生产扩展到靶向革兰氏阳性细菌的噬菌体，仅几微升的体系中即可产生有效剂量的对抗多耐药大肠杆菌、鼠疫耶尔森氏菌和肺炎克雷伯氏菌的噬菌体。TXTL系统已发展到体外可行的、复杂的、自我组装的核酸编程生物体的体外构建，目前已经实现重启MS2[89]、ΦX174[90]、T7[91]、T4[86]、鼠疫耶尔森氏菌噬菌体[88]、肺炎克雷伯氏菌噬菌体[88]和抗酸性分枝杆菌噬菌体[92]，未来有希望扩展到更多种属的噬菌体。无细胞系统局限性在于使用突变文库时，在重启期间难以保留基因型-表型关联，使用微流控液滴模拟单分子系统[93]将是一个很好的解决方案。

细胞壁缺陷的李斯特氏菌L型细菌（bacterial L-forms）[94-95]代表了一类用于生产重组蛋白和合成生命体的独特表达系统，同样可以在转染后重新

启动合成噬菌体基因组，即从裸露的合成DNA中产生病毒颗粒。Kilcher等[96]证实L型细菌不仅支持天然和合成的李斯特氏菌噬菌体基因组的重新启动，还能够跨属重新激活芽孢杆菌和葡萄球菌噬菌体。L型细菌中的噬菌体重启工程不受噬菌体的生活方式、形态、DNA包装策略以及基因组大小和末端特征等因素影响，为各种噬菌体提供了工程平台，但目前尚无研究表明是否可以成功使所有细菌生成L型细菌。

Cheng等[97]开发了一种全新的“跳板”宿主辅助的噬菌体基因组工程技术（stepping-stone host assisted phage engineering， SHAPE），使用Red同源重组系统重组天然噬菌体基因组与目的DNA片段，实现对天然噬菌体基因组的精准编辑。为提高同源重组效率，借助CRISPR-Cas系统精准靶向识别并只切割原始噬菌体基因组的特性，可从同时存在原始的天然噬菌体与成功改造的噬菌体基因组的“跳板”宿主菌中保留筛选得到目标突变体，最后利用天然宿主菌的激活系统重启得到有活性的目标噬菌体。SHAPE技术也属于利用同源重组与CRISPR-Cas结合进行噬菌体基因改造的范畴，避免了体内外组装等耗时的工作。

合成重启噬菌体基因组的方式既降低了生物安全风险，又能以简便、经济的方式实现基因组组装、编辑和激活，有效地提高产生工程噬菌体的效率。目前，体外技术通常需要扩增或合成随后组装的DNA片段，未来可能合成整个噬菌体基因组，甚至建立完整噬菌体基因组的文库；重新启动合成噬菌体基因组需要宿主细胞或L型细菌的转化，但重新启动过大的合成基因组仍有难度。L型细菌可以帮助将较大的基因组转化进可进行常规编辑的革兰氏阴性菌株，而无细胞系统因其消除了细胞膜的屏障，允许各种任意大小的噬菌体基因组不受限制地重新启动，且不依赖于细菌菌株的生长，有效缩短了DBTL周期，更可能成为首选方法。虽然无细胞系统目前仍然局限于少数物种和菌株，未来此策略有望扩展到其他物种。

表1列出了应用基因工程成功改造噬菌体的案例。

3 合成生物学助力噬菌体疗法的前沿方向

3.1 改变噬菌体宿主范围

以噬菌体为基础应用的主要限制是其宿主范围狭窄[101]。噬菌体的受体结合蛋白（receptor binding protein， RBP）是宿主特异性的首要决定因素，对RBP进行特异性修饰可以改变或扩展噬菌体的宿主范围。此外，噬菌体与宿主之间相互作用的特异性还取决于宿主受体的类型和结构，受体的定位以及在细胞表面的数量、密度也会影响吸附的特异性[102]。

Yoichi等[103]通过构建携带PP01 *gp*37、*gp*38的重组T2噬菌体T2ppD1，证实其可感染异质宿主细胞大肠杆菌O157:H7和相关物种，改变了噬菌体感染的特异性。Mahichi等[98]尝试将T2噬菌体长尾纤维基因*gp*37、*gp*38特异性同源重组以产生嵌合噬菌体，在保持T2噬菌体原始裂解活性的同时获得更广的IP008宿主范围。Ando等[78]通过在酵母菌体内工程化噬菌体基因组来调节噬菌体宿主范围的合成生物学策略，改造大肠杆菌噬菌体支架可靶向致病性耶尔森氏菌和克雷伯氏菌，同样，加上模块化噬菌体尾部元件的克雷伯氏菌噬菌体支架也可以靶向大肠杆菌。Chen等[99]以宿主菌DE017为介导，确定了可能用于同源序列重组的区域，构建了包含QL01不同*gp*37基因片段的WG01子代嵌合噬菌体，通过对*gp*37基因片段的测序分析，确定了导致宿主范围扩大的两种不同的机制：第一代WG01形成的没有突变的嵌合体；由嵌合体形成的第二代WG01突变体。部分子代噬菌体宿主范围的扩大表明，C末端以外的区域可能通过改变对结合位点的亲和性间接改变受体特异性。Yosef等[104]设计了各种噬菌体尾丝蛋白的杂交颗粒，并将这些模块化的颗粒程序化包装并转导到限制T7噬菌体传播的宿主体内，证明了杂合颗粒能将所期望的DNA转导入目标宿主。这项研究通过人为选择能高效转导DNA的尾丝蛋白，大大扩展了新的宿主范围。Yehl等[105]通过对噬菌体尾丝蛋白突变改造噬菌体宿主范围，实现了对细菌抗性的抑制。他们确定了T3噬菌体尾丝蛋白中

表1 应用基因工程成功改造噬菌体的案例

Table 1 Applications of engineered phages through genetic modifications

策略	菌株	具体方法	年份	出处
随机诱变	T4噬菌体	紫外线诱变获取突变体	1966	[49]
	T3、T7、肠道沙门氏菌噬菌体	改善噬菌体的热稳定性	2020	[51]
经典同源重组	T2噬菌体	改造尾丝蛋白结构	2009	[98].
	T4噬菌体	改变或扩大宿主T4样噬菌体宿主范围	2017	[99]
	T7噬菌体	T7噬菌体基因组的单碱基替换和全基因替换	2020	[55]
	T7噬菌体	获得新的RBP结构	2021	[100]
BRED	分歧杆菌噬菌体Giles	非必需基因缺失、读码框内缺失、点突变、无义突变、外源基因精确插入	2008	[58]
	肠杆菌科噬菌体P1	去除IS元件	2012	[60]
	沙门氏菌噬菌体	实现溶原和裂解性质转换	2014	[61]
	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	2017	[62]
	分枝杆菌噬菌体BPs、ZoeJ	将治疗性温和噬菌体转化为烈性噬菌体	2019	[24]
CRISPR-Cas	链球菌噬菌体2972	Ⅱ-A型CRISPR-Cas实现特定点突变和大片段删除	2014	[64]
	T7噬菌体	Ⅰ-E型CRISPR-Cas系统编辑T7基因组	2014	[65]
	乳酸乳球菌烈性噬菌体P2	点突变，基因缺失和替换	2017	[66]
	克雷伯氏菌噬菌体	点突变，基因缺失和替换	2018	[68]
	金黄色葡萄球菌噬菌体	Ⅲ-A型CRISPR-Cas系统CRISPR-Cas10	2019	[69]
	T4噬菌体	Ⅴ型CRISPR-Cas12a系统构建包含缺失和插入的重组T4	2021	[70]
	T5噬菌体	Ⅱ-A型CRISPR-Cas9系统效果不稳定，提出基于Retron的重组方案	2021	[75]
	需钠弧菌噬菌体TT4	使用CRISPR-Cas9基因的缺失和替换	2022	[71]
	大肠杆菌噬菌体	CRISPR-Cas13a	2022	[72]
	ΦKZ、OMKO1和PaMx41噬菌体	CRISPR-Cas13a+正向选择基因*acrVIA1*	2022	[73]
Genome Reboot	大肠杆菌、克雷伯氏菌噬菌体	YAC	2015	[78]
	PICIs	YAC	2020	[80]
	铜绿假单胞菌噬菌体	YAC	2021	[79]
	大肠杆菌噬菌体	电转重启	2019	[84]
	沙门氏菌噬菌体	电转重启	2022	[85]
	MS2噬菌体	无细胞体系	1996	[89]
	T7噬菌体	无细胞体系	2012	[91]
	T4噬菌体	无细胞体系	2018	[86]
	耶尔森氏菌噬菌体	无细胞体系	2022	[88]
	克雷伯氏菌噬菌体	无细胞体系	2022	[88]
	抗酸性分枝杆菌噬菌体	无细胞体系	2022	[92]
	李斯特氏菌、芽孢杆菌、葡萄球菌噬菌体	L-forms	2018	[96]

的宿主范围决定区（host-range-determining regions，HRDRs），并借助定向诱变发展出一种高通量基因工程技术。结果显示HRDRs突变的噬菌体成功改变其宿主范围，并在小鼠模型中进行体内验证。这种方法可以将对尾部结构的破坏降到最低并产生功能多样性的工程噬菌体。Avramucz等[100]采用基于质粒的同源重组和BRED重编程通常感染共生K12大肠杆菌菌株的T7噬菌体，以感染病原体相关的表达K1胶囊的菌株实现两种基因替换的构建：一种取代T7噬菌体的*gp*17基因；另一种用K1F对应物替换T7噬菌体的*gp*11、*gp*12和*gp*17。两种方法均成功地将K1F序列整合到T7噬菌体基因组中，并应用包括标记基因*trxA*、宿主特异性和CRISPR-Cas选择的多种方法来选择或富集结合K1F *gp*17的嵌合体噬菌体。该研究表明BRED可作为快速获得新的RBP结构的高效工具，而无需

设计可持续复制噬菌体。此外，在某些情况下，单纯的交换RBP不足以产生有活力的嵌合噬菌体。

利用RBP协助噬菌体识别宿主的特性，同样可以人工缩小噬菌体宿主谱，开发高特异性噬菌体制剂杀灭特定病原体，保障生物安全性。Holtzman等[106]通过监测同时存在多个宿主的情况下T7噬菌体宿主范围的变化，在95 h内进行100次噬菌体传代，发现T7噬菌体可以通过尾丝蛋白基因*gp*17的自发突变，丧失对有完整吸附受体（lipopolysaccharide， LPS）的K12的有效吸附。T7噬菌体在两种宿主菌K12Δ*trxA*（噬菌体可吸附但无法生物合成）与K12Δ*waaC*（LPS部分缺失）中多次传代驯化后，对K12Δ*waaC*的吸附率增高，而对K12Δ*trxA*的吸附率降低，也不再识别表面保留完整的LPS的K12Δ*trxA*。这种方式有效缩小噬菌体RBP的受体识别范围，帮助构建高宿主特异性的噬菌体生物制剂，应用于通过噬菌体检测或消除特定血清型的细菌。

对噬菌体受体的功能和位置的深入了解为改进和创新的噬菌体治疗方法打开大门，我们可以设计出智能的噬菌体“鸡尾酒”，发现新的噬菌体源性抗菌剂，并引导噬菌体抗性进化为临床可利用的表型。

3.2 宏基因组挖掘自然界噬菌体资源

噬菌体是地球上丰度和多样性最高的生物学实体，全球宏基因组数据的比对分析揭示了病毒噬菌体的多样性和进化规律，加深了人们对噬菌体的认知：噬菌体的形态特征以及蛋白结构；噬菌体基因组的多样性以及较低的基因组相似性；群落水平噬菌体的多样性及其在不同生态系统里的丰度与群落组成；不同噬菌体的基因交换、基因组镶嵌性与多样性、噬菌体谱系呈现出的复杂网络结构[107]。Chevallereau等[108]探讨了当前关于噬菌体群的组成、进化以及它们在控制细菌群的数量和进化动力学中的作用的知识，指出实验室研究需要更符合现实中自然环境的生态性，以揭示自然环境中复杂的微生物群落。

Kavagutti等[109]在水生生态环境进行超深度宏基因组测序，从宏基因组数据中恢复了超过2000个噬菌体的完整基因组并研究了噬菌体在淡水系统中的物种分类和时空分布特征。研究者从人工系统的Římov水库和自然系统的Jiřická池塘分别采样，产生共计23个样本的宏基因组测序结果，并进一步分析病毒的分布、种类和功能。结果显示在淡水系统中发现了775个未在数据库中发现的基因组，同时新发现553个海洋噬菌体独特基因组。

Al-Shayeb等[110]通过搜索将近30种不同的地球环境（从早产儿和孕妇的肠道到西藏温泉、病房、海洋、湖泊和深层地下）产生的DNA数据库，从而发现全新的巨型噬菌体（huge phage，也称为megaphage），总共鉴定出351种不同的巨大噬菌体，它们的基因组比常见噬菌体的平均基因组大4倍或更多。在它们当中，存在迄今为止发现的一种最大的噬菌体，其基因组长达735 kb，比噬菌体的平均基因组大近15倍，甚至比许多细菌的基因组大得多。此外，他们发现一些噬菌体可能利用细菌CRISPR-Cas系统消除竞争性噬菌体。

由于测序技术和研究方法的限制，目前研究最多的是DNA噬菌体，而高通量RNA测序为探索地球上的RNA病毒组提供了广泛的机会。

Neri等[111]挖掘了5150个不同的元转录组，并发现了超过250万个RNA病毒等位点。对超过33万个依赖RNA的RNA聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase， RdRP）的分析表明，这一扩展相当于已知RNA病毒多样性的5倍。基因内容分析揭示了以前在RNA病毒中没有发现的、与病毒和宿主相互作用有关的多个蛋白质结构域。扩展的RdRP系统发育支持五个已建立分类门的单系性，并揭示了两个假定的新增的噬菌体门和许多假定的新增的纲和目。急剧扩张的Lenarviricota门，由细菌和相关的真核生物病毒组成，现占据RNA病毒群的1/3。CRISPR间隔和溶菌蛋白的鉴定表明，以前与真核生物有关的Picobirnaviruses和Partitiviruses的亚群可感染原核生物宿主。该研究结果拓宽了已知的RNA多样性，指出RNA病毒在全球范围内具有普遍性并且大多数RNA病毒类别在不同数据集类型和环境中显示出清晰的分布模式。

Kauffman等[112]以海洋噬菌体和沿海海洋异养弧菌科细菌为模型，针对2010年为期3个月内于

3个时间点（第222、261和286天）分离的1440个菌株，研究其噬菌体-宿主互作关系。在1287个能够在诱饵试验中生长且具有*hsp60*基因的菌株中，285个（22%）对噬菌体侵染表现出敏感性，环境相互作用网络中的裂解性互作较少，大多数细菌菌株的噬菌体-捕食者负载较低，而且噬菌体具有宿主菌株的特异性。研究通过高通量的交互侵染及基因组测序等分析，表明了重组主要在共同侵染中产生，且同源重组比突变对序列变异的贡献更高，表明隐性共侵染中重组是微生物群落中噬菌体进化的一种重要模式，揭示了基因重组对全球和局部噬菌体多样性的贡献。

病毒宏基因组学通过阐明环境病毒的遗传潜力和群落结构，提供了对病毒生态学的分析，辅助挖掘自然界中的未知噬菌体，揭示病毒以全新方式操纵宿主的基因，扩展人们当前对噬菌体与宿主相互作用的认知，可以广泛推动包括进化生物学、病原体监测和生物技术在内的学科进展。

3.3 多组学技术揭示噬菌体与宿主互作机制

随着高通量测序技术的发展，组学研究也在不断深入，通过对各组学进行高通量测序并对数据整合研究，可以全面和系统地了解噬菌体与宿主之间的互作机制，如噬菌体基因表达调控，噬菌体如何克服细菌免疫防御机制等。

噬菌体通常会劫持宿主细菌的转录机制来调节自身和宿主细菌的基因表达，但尚不清楚噬菌体蛋白介导的转录调控特别是转录抑制的结构基础。You等[113]揭示了噬菌体蛋白P7通读转录终止信号，开启噬菌体后期基因转录的分子机制，也解释了噬菌体蛋白P7抑制宿主细菌转录的分子机制。Shi等[114-115]系统地研究了T4噬菌体中期和晚期基因转录激活的分子机制，揭示了噬菌体蛋白MotA和AsiA劫持细菌RNA聚合酶激活中期基因转录的分子机制，利用冷冻电镜分别解析了T4噬菌体晚期基因的基础转录复合物和转录激活复合物的结构，揭示T4噬菌体依赖滑动夹激活晚期基因转录的机制。噬菌体蛋白gp55和细菌RNA聚合酶可以共同起始晚期基因的基础转录，而转录的激活还需要环状三聚体蛋白滑动夹gp45以及辅助激活蛋白gp33的参与，为了解σ适配和转录激活提供了基础。

TIR结构域是识别细菌、植物和动物中病原体入侵的免疫受体的关键组分，对感染外源物质的识别会刺激TIR结构域产生一种免疫信号分子，结合并激活Thoeris免疫效应器，执行免疫功能，但其分子结构仍不清楚。Leavitt等[116]确定了一个命名为Thoeris抗防御系统1（Thoeris anti-defence 1，Tad1）的大型噬菌体编码蛋白家族，它可以抑制Thoeris免疫。Tad1蛋白能结合并封存由TIR结构域蛋白产生的免疫信号分子，从而使噬菌体感应与免疫效应器激活脱钩，从而失活Thoeris系统。Tad1也能有效地封存来自植物TIR结构域蛋白的分子，Tad1与植物衍生分子结合的高分辨率晶体结构显示了1″-2′糖环ADPR（glycocyclic ADPR，gcADPR）的独特化学结构。该研究确定了一个核心免疫信号分子的化学结构，并揭示了噬菌体抑制宿主免疫的一种全新模式，即病毒抑制TIR gcADPR信号传递来克服细菌防御。

这些研究通过组学方式从分子层面阐明了噬菌体基因表达调控的结构基础和分子机制，为人工噬菌体的构建提供了理论基础。

3.4 调节肠道菌群生态

人肠道是已知最密集的微生物群落之一，肠道菌群包括细菌、古菌、病毒、真菌和其他微生物[117]。尽管肠道中的噬菌体有调节细菌群落和人类健康的作用，但我们并不清楚具体的作用机制。结合先进的序列组装方法和功能强大的序列分析算法，近年来不断涌现针对肠道噬菌体组的优秀研究成果。

Lawley等[118]通过挖掘全球范围内28 060个人类肠道宏基因组和可培养的2898个肠道细菌参考基因组数据，建立了包含142 000个非冗余病毒基因组（大于10 kb）的肠道噬菌体数据库。宿主分组显示Firmicutes菌系的病毒多样性最高，约36%的病毒簇不局限于单一菌种。这种高质量、大规模的噬菌体基因组数据库将推进未来的肠道病毒组、人类肠道噬菌体组的生态学和进化分析相关研究。Koonin等[119]通过检索人类肠道中的宏基因

组数据，并借助环形contigs来推断其为完整的噬菌体基因组，鉴定出代表了451个假定属的3738个明显完整的噬菌体基因组，验证了人类肠道中噬菌体与宿主相互作用的多种假设机制。将这些已分类好的高多样性的噬菌体添加到公共数据库中，将有力促进对人类肠道病毒分类和功能表征的研究。其中两个候选科Flandersviridae和Quimbyviridae是包括感染*Bacteroides*、*Parabacteroides*和*Prevotella*的最常见和最丰富的人类肠道噬菌体成员。第三个提出的新科Gratiaviridae噬菌体成员较少，与Autographiviridae、Drexlerviridae和Chaseviridae有远缘关系。对CRISPR spacer的分析表明，所有三个假定家族的噬菌体都可以感染*Bacteroides*。对三个候选噬菌体家族的比较基因组分析找到了在噬菌体基因组中没有先例的特征。一些Quimbyviridae噬菌体具有多样性的逆转录因子（diversity-generating retroelements， DGRs），可产生嵌套在防御相关基因中的高可变靶基因，而先前已知的噬菌体编码DGR的靶点是结构基因。该研究首次报道了几种Flandersviridae噬菌体编码参与脂质生物合成中异戊二烯类途径的酶。Gratiaviridae噬菌体编码一个HipA家族蛋白激酶和糖基转移酶，表明这些噬菌体可以改变宿主的细胞壁，防止其他噬菌体的超感染。这三个家族和其他家族的数百个噬菌体被证明编码过氧化氢酶和铁螯合酶，预测这可以增强细胞对活性氧的耐受性。

Gerber等[120]研究了噬菌体对模型菌群的动态影响。已知的人类肠道共生细菌在无菌小鼠中定植并受到对应的烈性噬菌体的侵染。他们发现噬菌体侵染不仅直接影响敏感细菌，还通过细菌间的相互作用对其他细菌物种产生级联效应。代谢组学分析还显示，噬菌体侵染引起的菌群变化对肠道代谢组产生了直接的影响。该类研究证明了噬菌体作为肠道细菌定植调节剂的重要的生态学意义，还表明了肠道噬菌体可以靶向调控细菌，在哺乳动物治疗方面存在潜在的应用价值。

对肠道细菌和噬菌体群落的前瞻性生态学研究将帮助我们理解肠道内稳态及这种微生物系统的功能。例如，分别在健康和疾病期间，对肠道中的细菌、噬菌体和宿主免疫细胞的动态变化研究可以提供有关疾病发展的关键信息和指导治疗方法；了解噬菌体复制周期的调节可以帮助利用肠道微生物群来改善疾病。我们应当在使用个性化治疗时考虑噬菌体在肠道内发挥的作用。

3.5 大数据和新型人工智能指导噬菌体设计

合成生物学领域正在展望可靠的设计创新生物功能的工程框架。计算机辅助设计（computer aided design， CAD）应在促进设计方面发挥核心作用，但在合成生物学中的应用仍处于起步阶段[121]。

Molina等[122]提出并详细解释了两种根据给定的噬菌体与细菌感染网络设计噬菌体“鸡尾酒”的新型计算方法。其中一种方法ExhaustiveSearch总是产生最好的噬菌体“鸡尾酒”配方，另一种方法Network Metrics总是使用最短的运行时间（几毫秒）。两种方法都包含在可供任何用户使用的应用程序中。作者还进行了一项完整的实验性研究，在“鸡尾酒”中加入其他噬菌体，评估并比较其生物学质量、运行时间和影响。Rebollo等[123]通过对35个宿主范围矩阵进行了宏基因组分析，包括最近发表的研究和包含了在乳酪奶制品中分离的大肠杆菌和从羊粪中分离的大肠杆菌的新数据集，构建噬菌体与细菌感染网络后分析由宿主范围矩阵提供的信息，通过使用Nestedness Temperature Calculator和遗传算法BinMatNest，构建了自动设计“鸡尾酒”的新途径。Díaz-Galián等[124]开发了一个名为PhageCocktail的R包，可自动设计出来自噬菌体与细菌感染网络的高效的噬菌体“鸡尾酒”，其原理为通过13种经验性噬菌体与细菌感染网络，对ExhaustiveSearch、ExhaustivePhi、ClusteringSearch和ClusteringPhi这4种方法进行了详细的解释和评估。对运行时间和预期成功率（裂解细菌的百分比）的分析结果显示，4种方法在运行时间和结果的质量上存在差异。ExhaustiveSearch总是提供最好的噬菌体“鸡尾酒”，但运行时间可能很长。ExhaustivePhi只关注一种“鸡尾酒”，它的运行时间小于ExhaustiveSearch，但可以产生“鸡尾酒”的噬菌体较多，该方法是相对最好的。ClusteringSearch和ClusteringPhi都非常迅速（一般来说不到1 ms），能提供最即时的结

果，但准确性有一定下降，产生“鸡尾酒”的预期成功会更低。作者同样进行了完整的实验研究来评估运行时间和生物质量。总之，聚类方法很快，穷举方法具有最高的精度；噬菌体与细菌感染网络越大，分析就越复杂。用户可以根据速度和结果的准确性，选择不同方法辅助设计高质量噬菌体“鸡尾酒”。

此外，合成生物学家开发了合成生物学开放语言（synthetic biology open language， SBOL）[125]，让科学家能够交换生物组件和系统的设计思路，允许用户定义合成部件和设计作为服务的文库，与合作者共享SBOL数据，并储存局部生物系统设计。Voigt课题组[126-127]设计出Cello程序，用于指导基因回路自动化设计，传统生物实验室正在越来越多地与计算机结合联动，加速推进合成生物学“智造”生物进程。

4 总结与展望

尽管噬菌体研究已经延续了一个多世纪，但针对噬菌体的高效基因组编辑技术直到最近才出现。噬菌体基因工程技术仍处于早期阶段，随着DNA测序、合成和基因编辑技术的迭代发展以及我们对天然噬菌体的多样性、进化模式和宿主互作关系的认知的不断加深，未来噬菌体疗法将发挥其巨大潜力[128]。最重要的是提供可在实验室和医院中实施的、简单有效的、针对来自自然界的不同种类细菌的基因编辑技术方案。笔者认为噬菌体基因组从头合成方法将凭借其快速和便捷性很快会取代基于重组的基因编辑方法，成为工程噬菌体的主流研究技术。从头合成噬菌体的主要限制是大基因组的组装和噬菌体重启效率，而随着基因合成成本的进一步下降、廉价高保真聚合酶的开发以及通用体外重启系统的建立，这些限制将很快被突破。

通过对全球204个国家和地区2019年抗生素耐药相关数据进行分析发现，保守估计2019年有127万人直接死于抗生素耐药，另有495万人的死亡与抗生素耐药相关，意味着2019年抗生素耐药直接导致的死亡人数约等同于艾滋病和疟疾导致死亡人数的总和，而抗生素耐药相关死亡是仅次于缺血性心脏病和中风的全球第三大死亡病因[129]。随着抗生素耐药性感染的患病率上升，对噬菌体的需求将持续增加。

此外，天然噬菌体分离物因其相对容易分离，不需要创新步骤，通常不能申请专利。而具有改进的特定功能（如提高杀菌效率、扩宽宿主谱、增强安全性或新功能）的基因工程噬菌体可以用于申请专利，有望引导制药公司投资这一令人振奋的新领域。到目前为止，商业化的工程噬菌体产品已有用于检测的噬菌体产品和用于养殖业的噬菌体制剂。全球噬菌体市场预计将在未来几年以3.5%的显著复合年增长率增长。2021年，全球噬菌体市场价值为11.7亿美元，预计到2028年将达到14.4亿美元。预计未来几年噬菌体的需求将大幅增加，亚太地区凭借其对创造性研发投资增加、医疗保健基础设施的扩张和政府努力的加强，将成为增长最快的地区[130]。

未来噬菌体技术的发展趋势，包括围绕常见的模式细菌不断优化开发精准的基因编辑方式，借助生信分析手段挖掘高效的CRISPR基因编辑系统，搭建标准化工程噬菌体改造流程，通过模块化基因组工程搭建确保安全性和通用性的噬菌体“骨架”，在此基础上根据需求引入有效的外源功能基因、删除非必需基因或其他修饰；通过模块化工程，使噬菌体成为极其通用的生物制剂；未来更加便捷、高效、安全的噬菌体基因工程技术会被开发出来，针对患者的个性化噬菌体基因组设计并在体外重启噬菌体可能会变得越来越容易，结合计算机辅助技术可以进一步优化噬菌体“鸡尾酒”组成，实现高效低成本设计、合成、制备和运用人工噬菌体，噬菌体的大规模临床应用也将成为现实[131]。

参 考 文 献

[1] TWORT F W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses[J]. The Lancet, 1915, 186(4814): 1241-1243.

[2] D'HERELLE F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917[J]. Research in Microbiology, 2007, 158(7): 553-554.

[3] OLSZAK T, LATKA A, ROSZNIOWSKI B, et al. Phage life

cycles behind bacterial biodiversity[J]. Current Medicinal Chemistry, 2017, 24(36): 3987-4001.

[4] JACOB F, MONOD J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 1961, 3(3): 318-356.

[5] CRICK F H C, BARNETT L, BRENNER S, et al. General nature of the genetic code for proteins[J]. Nature, 1961,192(4809):1227-1232.

[6] ANDERSON J E. Restriction endonucleases and modification methylases[J]. Current Opinion in Structural Biology, 1993, 3(1): 24-30.

[7] PINGOUD A, WILSON G G, WENDE W. Type Ⅱ restriction endonucleases—a historical perspective and more[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(12): 7489-7527.

[8] BORKOTOKY S, MURALI A. The highly efficient T7 RNA polymerase: a wonder macromolecule in biological realm[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118(Pt A): 49-56.

[9] KORLACH J, BJORNSON K P, CHAUDHURI B P, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. Methods in Enzymology, 2010, 472: 431-455.

[10] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. Science, 2007, 315(5819): 1709-1712.

[11] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.

[12] KHAN A, OSTAKU J, ARAS E, et al. Combating infectious diseases with synthetic biology[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(2): 528-537.

[13] KORTRIGHT K E, CHAN B K, KOFF J L, et al. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria[J]. Cell Host & Microbe, 2019, 25(2): 219-232.

[14] UYTTEBROEK S, CHEN B X, ONSEA J, et al. Safety and efficacy of phage therapy in difficult-to-treat infections: a systematic review[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2022, 22(8): e208-e220.

[15] WEI J W, PENG N, LIANG Y X, et al. Phage Therapy: consider the Past, Embrace the Future[J]. 2020, 10(21), 7654.

[16] LUONG T, SALABARRIA A C, EDWARDS R A, et al. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy[J]. Nature Protocols, 2020, 15(9): 2867-2890.

[17] LIU D, VAN BELLEGHEM J D, DE VRIES C R, et al. The safety and toxicity of phage therapy: a review of animal and clinical studies[J]. Viruses, 2021, 13(7): 1268.

[18] TAN Y, SHEN J T, SI T, et al. Engineered live biotherapeutics: progress and challenges[J]. Biotechnology Journal, 2020, 15(10): e2000155.

[19] SUN X Y, ILCA S L, HUISKONEN J T, et al. Dual role of a viral polymerase in viral genome replication and particle self-assembly[J]. mBio, 2018, 9(5): e01242-e01218.

[20] VENTER J C, GLASS J I, HUTCHISON C A III, et al. Synthetic chromosomes, genomes, viruses, and cells[J]. Cell, 2022, 185(15): 2708-2724.

[21] WHITE R A Ⅲ. The future of virology is synthetic[J]. mSystems, 2021, 6(4): e0077021.

[22] WEYNBERG K D, JASCHKE P R. Building better bacteriophage with biofoundries to combat antibiotic-resistant bacteria[J]. PHAGE, 2020, 1(1): 23-26.

[23] KILCHER S, LOESSNER M J. Engineering bacteriophages as versatile biologics[J]. Trends in Microbiology, 2019, 27(4): 355-367.

[24] 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]. Nature Medicine, 2019, 25(5): 730-733.

[25] CHEN Y B, BATRA H, DONG J H, et al. Genetic engineering of bacteriophages against infectious diseases[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 954.

[26] VIERTEL T M, RITTER K, HORZ H P. Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(9): 2326-2336.

[27] MEILE S, DU J M, DUNNE M, et al. Engineering therapeutic phages for enhanced antibacterial efficacy[J]. Current Opinion in Virology, 2022, 52: 182-191.

[28] MCEWEN S A, COLLIGNON P J. Antimicrobial resistance: a one health perspective[J]. Microbiology Spectrum, 2018, 6(2): 6.2.10.

[29] ASLAM B, KHURSHID M, ARSHAD M I, et al. Antibiotic resistance: one health one world outlook[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 771510.

[30] HOWARD-VARONA C, HARGREAVES K R, ABEDON S T, et al. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages[J]. The ISME Journal, 2017, 11(7): 1511-1520.

[31] HARRISON E, BROCKHURST M A. Ecological and evolutionary benefits of temperate phage: what does or doesn't kill you makes you stronger[J]. BioEssays, 2017, 39(12): 1700112.

[32] CHEN Y B, YANG L, YANG D, et al. Specific integration of temperate phage decreases the pathogenicity of host bacteria[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2020, 10: 14.

[33] SOUSA J A M, PFEIFER E, TOUCHON M, et al. Genome diversification *via* genetic exchanges between temperate and virulent bacteriophages[EB/OL]. bioRxiv, 2020[2020-04]. http://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.14.041137v1.

[34] DE SOUSA J A M, PFEIFER E, TOUCHON M, et al. Causes and consequences of bacteriophage diversification *via* genetic exchanges across lifestyles and bacterial taxa[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(6): 2497-2512.

[35] AL-ANANY A M, FATIMA R, HYNES A P. Temperate phage-antibiotic synergy eradicates bacteria through depletion of lysogens[J]. Cell Reports, 2021, 35(8): 109172.

[36] SCHROVEN K, AERTSEN A, LAVIGNE R. Bacteriophages as drivers of bacterial virulence and their potential for biotechnological exploitation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2021, 45(1): fuaa041.

[37] LABRIE S J, MOINEAU S. Abortive infection mechanisms and prophage sequences significantly influence the genetic makeup of emerging lytic lactococcal phages[J].Journal of Bacteriology, 2007,189(4):1482-1487.

[38] AMARILLAS L, RUBÍ-RANGEL L, CHAIDEZ C, et al. Isolation and characterization of phiLLS, a novel phage with potential biocontrol agent against multidrug-resistant *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1355.

[39] CHAUDHARY N, MOHAN B, MAVUDURU R S, et al. Characterization, genome analysis and *in vitro* activity of a novel phage vB_EcoA_RDN8.1 active against multi-drug resistant and extensively drug-resistant biofilm-forming uropathogenic *Escherichia coli* isolates, India[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(4): 3387-3404.

[40] BAO H D, SHAHIN K, ZHANG Q Y, et al. Morphologic and genomic characterization of a broad host range *Salmonella enterica* serovar Pullorum lytic phage vB_SPuM_SP116[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 136: 103659.

[41] MASUDA Y, KAWABATA S, UEDOI T, et al. Construction of leaderless-bacteriocin-producing bacteriophage targeting *E. coli* and neighboring gram-positive pathogens[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(1): e0014121.

[42] 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.e12.

[43] JIN M L, CHEN J C, ZHAO X Y, et al. An engineered λ phage enables enhanced and strain-specific killing of enterohemorrhagic *Escherichia coli*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e01271-e01222.

[44] LIU G W, LIN Q P, JIN S, et al. The CRISPR-Cas toolbox and gene editing technologies[J]. Molecular Cell, 2022, 82(2): 333-347.

[45] YADAV R, KUMAR V, BAWEJA M, et al. Gene editing and genetic engineering approaches for advanced probiotics: a review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(10): 1735-1746.

[46] ARROYO-OLARTE R D, BRAVO RODRÍGUEZ R, MORALES-RÍOS E. Genome editing in bacteria: CRISPR-cas and beyond[J]. Microorganisms, 2021, 9(4): 844.

[47] ABABI M, TRIDGETT M, OSGERBY A, et al. Scarless recombineering of phage in lysogenic state[J]. Methods in Molecular Biology, 2022, 2479: 1-9.

[48] TRIDGETT M, ABABI M, JARAMILLO A. Lambda red recombineering of bacteriophage in the lysogenic state[J]. Methods in Molecular Biology, 2022, 2479: 11-19.

[49] DRAKE J W. Ultraviolet mutagenesis in bacteriophage T-4. I. Irradiation of extracellular phage particles[J]. Journal of Bacteriology, 1966, 91(5): 1775-1780.

[50] MEISTRICH M L, SHULMAN R G. Mutagenic effect of sensitized irradiation of bacteriophage T4[J]. Journal of Molecular Biology, 1969, 46(1): 157-167.

[51] FAVOR A H, LLANOS C D, YOUNGBLUT M D, et al. Optimizing bacteriophage engineering through an accelerated evolution platform[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 13981.

[52] LANIGAN T M, KOPERA H C, SAUNDERS T L. Principles of genetic engineering[J]. Genes, 2020, 11(3): 291.

[53] MAHLER M, COSTA A R, VAN BELJOUW S P B, et al. Approaches for bacteriophage genome engineering[J/OL]. Trends in Biotechnology, 2022[2022-12-01]. https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(22)00226-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779922002268%3Fshowall%3Dtrue.

[54] POUILLOT F, BLOIS H, IRIS F. Genetically engineered virulent phage banks in the detection and control of emergent pathogenic bacteria[J]. Biosecurity and Bioterrorism: biodefense Strategy, Practice, and Science, 2010, 8(2): 155-169.

[55] JENSEN J D, PARKS A R, ADHYA S, et al. λ Recombineering used to engineer the genome of phage T7[J]. Antibiotics, 2020, 9(11): 805.

[56] MØLLER-OLSEN C, STANLEY HO S F, DEV SHUKLA R, et al. Engineered K1F bacteriophages kill intracellular *Escherichia coli* K1 in human epithelial cells[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 17559.

[57] SHITRIT D, HACKL T, LAURENCEAU R, et al. Genetic engineering of marine cyanophages reveals integration but not lysogeny in T7-like cyanophages[J]. The ISME Journal, 2022, 16(2): 488-499.

[58] MARINELLI L J, PIURI M, SWIGONOVÁ Z, et al. BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes[J]. PLoS One, 2008, 3(12): e3957.

[59] MARINELLI L J, PIURI M, HATFULL G F. Genetic manipulation of lytic bacteriophages with BRED: bacteriophage recombineering of electroporated DNA[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1898: 69-80.

[60] FEHÉR T, KARCAGI I, BLATTNER F R, et al. Bacteriophage recombineering in the lytic state using the lambda red recombinases[J]. Microbial Biotechnology, 2012, 5(4): 466-476.

[61] 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]. Applied and Environ-

mental Microbiology, 2014, 80(1): 374-384.

[62] PAN Y J, LIN T L, CHEN C C, et al. Klebsiella phage ΦK64-1 encodes multiple depolymerases for multiple host capsular types[J]. Journal of Virology, 2017, 91(6): e02457-e02416.

[63] WETZEL K S, GUERRERO-BUSTAMANTE C A, DEDRICK R M, et al. CRISPY-BRED and CRISPY-BRIP: efficient bacteriophage engineering[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 6796.

[64] MARTEL B, MOINEAU S. CRISPR-Cas: an efficient tool for genome engineering of virulent bacteriophages[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(14): 9504-9513.

[65] KIRO R, SHITRIT D, QIMRON U. Efficient engineering of a bacteriophage genome using the type Ⅰ-E CRISPR-Cas system [J]. RNA Biology, 2014, 11(1): 42-44.

[66] LEMAY M L, TREMBLAY D M, MOINEAU S. Genome engineering of virulent lactococcal phages using CRISPR-Cas9[J]. ACS Synthetic Biology, 2017, 6(7): 1351-1358.

[67] LEMAY M L, RENAUD A C, ROUSSEAU G M, et al. Targeted genome editing of virulent phages using CRISPR-Cas9[J]. Bio-protocol, 2018, 8(1): e2674.

[68] SHEN J T, ZHOU J J, CHEN G Q, et al. Efficient genome engineering of a virulent klebsiella bacteriophage using CRISPR-Cas9[J]. Journal of Virology, 2018, 92(17): e00534-e00518.

[69] NAYEEMUL BARI S M, HATOUM-ASLAN A. CRISPR-Cas10 assisted editing of virulent staphylococcal phages[J]. Methods in Enzymology, 2019, 616: 385-409.

[70] DONG J H, CHEN C, LIU Y P, et al. Engineering T4 bacteriophage for *in vivo* display by type Ⅴ CRISPR-Cas genome editing[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(10): 2639-2648.

[71] ZHANG X L, ZHANG C H, LIANG C J, et al. CRISPR-Cas9 based bacteriophage genome editing[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(4): e0082022.

[72] GUAN J W, OROMÍ-BOSCH A, MENDOZA S D, et al. Bacteriophage genome engineering with CRISPR-Cas13a[J]. Nature Microbiology, 2022, 7(12): 1956-1966.

[73] ADLER B A, HESSLER T, CRESS B F, et al. Broad-spectrum CRISPR-Cas13a enables efficient phage genome editing[J]. Nature Microbiology, 2022, 7(12): 1967-1979.

[74] GRIGONYTE A M, HARRISON C, MACDONALD P R, et al. Comparison of CRISPR and marker-based methods for the engineering of phage T7[J]. Viruses, 2020, 12(2): 193.

[75] RAMIREZ-CHAMORRO L, BOULANGER P, ROSSIER O. Strategies for bacteriophage T5 mutagenesis: expanding the toolbox for phage genome engineering[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 667332.

[76] MERRYMAN C, GIBSON D G. Methods and applications for assembling large DNA constructs[J]. Metabolic Engineering, 2012, 14(3): 196-204.

[77] RAMSAY M. Yeast artificial chromosome cloning[J]. Molecular Biotechnology, 1994, 1(2): 181-201.

[78] ANDO H, LEMIRE S, PIRES D P, et al. Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing[J]. Cell Systems, 2015, 1(3): 187-196.

[79] PIRES D P, MONTEIRO R, MIL-HOMENS D, et al. Designing *P. aeruginosa* synthetic phages with reduced genomes[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 2164.

[80] RODRIGO I C, HAAG ANDREAS F, PEDRO D M, et al. Rebooting synthetic phage-inducible chromosomal islands: one method to forge them all[J]. BioDesign Research, 2020, 2020: 5783064.

[81] PRYOR J M, POTAPOV V, BILOTTI K, et al. Rapid 40 kb genome construction from 52 parts through data-optimized assembly design[J]. ACS Synthetic Biology, 2022, 11(6): 2036-2042.

[82] GIBSON D G, YOUNG L, CHUANG R Y, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases[J]. Nature Methods, 2009, 6(5): 343-345.

[83] PULKKINEN E M, HINKLEY T C, NUGEN S R. Utilizing *in vitro* DNA assembly to engineer a synthetic T7 Nanoluc reporter phage for *Escherichia coli* detection[J]. Integrative Biology, 2019, 11(3): 63-68.

[84] JANEŽ N, MEGLIČ S H, FLISAR K, et al. Introduction of phage genome into *Escherichia coli* by electroporation[J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1898: 51-56.

[85] MILHO C, SILLANKORVA S. Implication of a gene deletion on a *Salmonella* Enteritidis phage growth parameters[J]. Virus Research, 2022, 308: 198654.

[86] RUSTAD M, EASTLUND A, JARDINE P, et al. Cell-free TX-TL synthesis of infectious bacteriophage T4 in a single test tube reaction[J]. Synthetic Biology, 2018, 3(1): ysy002.

[87] GARENNE D, THOMPSON S, BRISSON A, et al. The all-E. coliTXTL toolbox 3.0: new capabilities of a cell-free synthetic biology platform[J]. Synthetic Biology, 2021, 6(1): ysab017.

[88] EMSLANDER Q, VOGELE K, BRAUN P, et al. Cell-free production of personalized therapeutic phagestargeting multidrug-resistant bacteria[J]. Cell Chemical Biology, 2022, 29(9): 1434-1445.e7.

[89] KATANAEV V L, SPIRIN A S, REUSS M, et al. Formation of bacteriophage MS2 infectious units in a cell-free translation system[J]. FEBS Letters, 1996, 397(2/3): 143-148.

[90] SMITH H O, HUTCHISON C A III, PFANNKOCH C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ΦX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(26): 15440-15445.

[91] SHIN J, JARDINE P, NOIREAUX V. Genome replication, synthesis, and assembly of the bacteriophage T7 in a single cell-free reaction[J]. ACS Synthetic Biology, 2012, 1(9): 408-413.

[92] MITSUNAKA S, YAMAZAKI K, PRAMONO A K, et al. Syn-

thetic engineering and biological containment of bacteriophages[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(48): e2206739119.

[93] SPENCER A C, TORRE P, MANSY S S. The encapsulation of cell-free transcription and translation machinery in vesicles for the construction of cellular mimics[J]. Journal of Visualized Experiments: JoVE, 2013(80): e51304.

[94] ALLAN E J, HOISCHEN C, GUMPERT J. Bacterial L-forms[J]. Advances in Applied Microbiology, 2009, 68: 1-39.

[95] ERRINGTON J. Cell wall-deficient, L-form bacteria in the 21st century: a personal perspective[J]. Biochemical Society Transactions, 2017, 45(2): 287-295.

[96] 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.

[97] CHENG L, DENG Z Q, TAO H R, et al. Harnessing stepping-stone hosts to engineer, select, and reboot synthetic bacteriophages in one pot[J]. Cell Reports Methods, 2022, 2(5): 100217.

[98] MAHICHI F, SYNNOTT A J, YAMAMICHI K, et al. Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 295(2): 211-217.

[99] CHEN M M, ZHANG L, ABDELGADER S A, et al. Alterations in gp37 expand the host range of a T4-like phage[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(23): e01576-e01517.

[100] AVRAMUCZ Á, MØLLER-OLSEN C, GRIGONYTE A M, et al. Analysing parallel strategies to alter the host specificity of bacteriophage T7[J]. Biology, 2021, 10(6): 556.

[101] HYMAN P, ABEDON S T. Bacteriophage host range and bacterial resistance[J]. Advances in Applied Microbiology, 2010, 70: 217-248.

[102] GORDILLO ALTAMIRANO F L, BARR J J. Unlocking the next generation of phage therapy: the key is in the receptors[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 68: 115-123.

[103] YOICHI M, ABE M, MIYANAGA K, et al. Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* O157: H7[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 115(1): 101-107.

[104] YOSEF I, GOREN M G, GLOBUS R, et al. Extending the host range of bacteriophage particles for DNA transduction[J]. Molecular Cell, 2017, 66(5): 721-728.e3.

[105] 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.e9.

[106] HOLTZMAN T, GLOBUS R, MOLSHANSKI-MOR S, et al. A continuous evolution system for contracting the host range of bacteriophage T7[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 307.

[107] DION M B, OECHSLIN F, MOINEAU S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(3): 125-138.

[108] CHEVALLEREAU A, PONS B J, VAN HOUTE S, et al. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20(1): 49-62.

[109] KAVAGUTTI V S, ANDREI A Ş, MEHRSHAD M, et al. Phage-centric ecological interactions in aquatic ecosystems revealed through ultra-deep metagenomics[J]. Microbiome, 2019, 7(1): 135.

[110] AL-SHAYEB B, SACHDEVA R, CHEN L X, et al. Clades of huge phages from across Earth's ecosystems[J]. Nature, 2020, 578(7795): 425-431.

[111] NERI U, WOLF Y I, ROUX S, et al. Expansion of the global RNA virome reveals diverse clades of bacteriophages[J]. Cell, 2022, 185(21): 4023-4037.e18.

[112] KAUFFMAN K M, CHANG W K, BROWN J M, et al. Resolving the structure of phage-bacteria interactions in the context of natural diversity[J]. Nature Communications, 2022, 13(1): 372.

[113] YOU L L, SHI J, SHEN L Q, et al. Structural basis for transcription antitermination at bacterial intrinsic terminator[J]. Nature Communications, 2019, 10: 3048.

[114] SHI J, WEN A J, ZHAO M X, et al. Structural basis of σ appropriation[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(17): 9423-9432.

[115] SHI J, WEN A J, JIN S, et al. Transcription activation by a sliding clamp[J]. Nature Communications, 2021, 12: 1131.

[116] LEAVITT A, YIRMIYA E, AMITAI G, et al. Viruses inhibit TIR gcADPR signalling to overcome bacterial defence[J]. Nature, 2022, 611(7935): 326-331.

[117] MIRZAEI M K, MAURICE C F. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages[J]. Nature Reviews Microbiology, 2017, 15(7): 397-408.

[118] CAMARILLO-GUERRERO L F, ALMEIDA A, RANGEL-PINEROS G, et al. Massive expansion of human gut bacteriophage diversity[J]. Cell, 2021, 184(4): 1098-1109.e9.

[119] BENLER S, YUTIN N, ANTIPOV D, et al. Thousands of previously unknown phages discovered in whole-community human gut metagenomes[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 78.

[120] HSU B B, GIBSON T E, YELISEYEV V, et al. Dynamic modulation of the gut microbiota and metabolome by bacteriophages in a mouse model[J]. Cell Host & Microbe, 2019, 25(6): 803-814.e5.

[121] BASSO-BLANDIN A, DELAPLACE F. Towards a behavioral-matching based compilation of synthetic biology functions[J]. Acta Biotheoretica, 2015, 63(3): 325-339.

[122] MENOR-FLORES M, VEGA-RODRÍGUEZ M A, MOLINA F. Computational design of phage cocktails based on phage-bacteria infection networks[J]. Computers in Biology and Medicine, 2022, 142: 105186.

[123] MOLINA F, SIMANCAS A, RAMÍREZ M, et al. A new pipeline for designing phage cocktails based on phage-bacteria infection networks[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 564532.

[124] DÍAZ-GALIÁN M V, VEGA-RODRÍGUEZ M A, MOLINA F. PhageCocktail: An R package to design phage cocktails from experimental phage-bacteria infection networks[J]. Computer Methods and Programs in Biomedicine, 2022, 221: 106865.

[125] MADSEN C, MCLAUGHLIN J A, MıSıRLı G, et al. The SBOL stack: a platform for storing, publishing, and sharing synthetic biology designs[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(6): 487-497.

[126] NIELSEN A A K, DER B S, SHIN J, et al. Genetic circuit design automation[J]. Science, 2016, 352(6281): aac7341.

[127] JONES T S, OLIVEIRA S M D, MYERS C J, et al. Genetic circuit design automation with Cello 2.0[J]. Nature Protocols, 2022, 17(4): 1097-1113.

[128] 袁盛建, 马迎飞. 噬菌体合成生物学研究进展和应用[J]. 合成生物学, 2020, 1(6): 635-655.
YUAN S J, MA Y F. Advances and applications of phage synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2020, 1(6): 635-655.

[129] Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. The Lancet, 2022, 399(10325): 629-655.

[130] CREDENCE R C O. Bacteriosphage Market By Product (Phage Probiotics, Phage Therapeutics) By Route of Administration (Oral, Topical, Others) By Application (Gastroenterology, Respiratory Infection Treatment, Skin Infection Treatment, Wound Prophylaxis, Urogenital Infection Treatment, Others) By Distribution Channel (Retail Pharmacies, Hospital Pharmacies, Online Pharmacies)-Growth, Future Prospects & Competitive Analysis, 2016-2028[R]. India: 2022.

[131] PIRNAY J P. Phage therapy in the year 2035[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1171.

通讯作者： 童贻刚（1966—），男，研究员，博士生导师。研究方向为噬菌体学、微生物学、高通量测序、生物信息学研究、合成生物学等。

E-mail：tongyigang@mail.buct.edu.cn

第一作者： 陈青黎（2000—），女，硕士研究生。研究方向为合成生物学改造工程噬菌体。

E-mail：ql.chen@buct.edu.cn