

志贺菌成簇规律间隔短回文重复序列 相关蛋白基因 *cas1* 和 *cas2* 研究

薛泽润 王颖芳 段广才 王鹏飞 王琳琳 郭向娇 郝园林

【摘要】 目的 研究成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关蛋白基因 *cas1* 和 *cas2* 在志贺菌中的分布,并分析 *cas1* 和 *cas2* 基因突变与细菌耐药的关系。方法 采用PCR扩增196株志贺菌 *cas1* 和 *cas2* 基因。对3株志贺菌(Z23、2003135、2008113)的 *cas2*、*cas1*(a)和 *cas1*(b)基因进行测序,分析其突变与耐药之间的关系。结果 196株志贺菌均检出CRISPR相关蛋白基因 *cas1* 和 *cas2*。测序结果显示,*cas2*的一致性为96.44%,*cas1*(a)的一致性为97.61%,*cas1*(b)的一致性为96.97%。菌株2003135的 *cas1*(b)基因有2个突变位点:3177129位点(C→G)及3177126位点(G→C),Z23、2008113对应位置没有突变。药敏结果显示菌株2003135的耐抗生素种类和耐抗生素数目均大于菌株Z23、2008113。结论 志贺菌中CRISPR基因广泛存在。*cas1*(b)基因突变菌株与未突变株比较,耐药性增强。*cas1*(b)基因突变可能是引起耐药程度不同的原因之一。

【关键词】 志贺菌;成簇规律间隔短回文重复序列;耐药

Clustered regularly interspaced short palindromic repeat associated protein genes *cas1* and *cas2* in *Shigella* Xue Zerun¹, Wang Yingfang^{1, 2}, Duan Guangcai¹, Wang Pengfei¹, Wang Linlin¹, Guo Xiangjiao¹, Xi Yuanlin¹. 1 School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2 Henan University of Science and Technology

Corresponding author: Duan Guangcai, Email: gcduan@zzu.edu.cn

This work was supported by a grant from the Mega-projects of Science and Technology Research of China (No. 2013ZX10004607).

【Abstract】 **Objective** To detect the distribution of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) associated protein genes *cas1* and *cas2* in *Shigella* and to understand the characteristics of CRISPR with relationship between CRISPR and related characteristics on drug resistance. **Methods** CRISPR associated protein genes *cas1* and *cas2* in *Shigella* were detected by PCR, with its products sequenced and compared. **Results** The CRISPR-associated protein genes *cas1* and *cas2* were found in all the 196 *Shigella* isolates which were isolated at different times and locations in China. Consistencies showed through related sequencing appeared as follows: *cas2*, *cas1*(a) and *cas1*(b) were 96.44%, 97.61% and 96.97%, respectively. There were two mutations including 3177129 site (C→G) and 3177126 site (G→C) of *cas1*(b) gene in 2003135 strain which were not found in the corresponding sites of Z23 and 2008113. Results showed that in terms of both susceptibility and antibiotic-resistance, strain 2003135 was stronger than Z23 and 2008113. **Conclusion** CRISPR system widely existed in *Shigella*, with the level of drug resistance in *cas1*(b) gene mutant strains higher than in wild strains. *Cas1*(b) gene mutation might be one of the reasons causing the different levels of resistance.

【Key words】 *Shigella*; Clustered regularly interspaced short palindromic repeat; Resistance

成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)是近年发现的与细菌横向基因转移具有密切关系的一个遗传结构,能够有效地防御基因水平转移^[1]。耐药基因水平转移是临床耐药菌株产生的主要途径之一^[2]。

研究表明 *cas1* 和 *cas2* 家族基因存在于每个CRISPR位点中,常作为鉴定CRISPR系统的分子标记。本实验采用PCR对不同年代、不同地点分离的志贺菌进行CRISPR相关蛋白基因 *cas1* 和 *cas2* 的检测,并对扩增出来的基因片段进行测序,分析其特征。

材料与方法

1. 菌株:196株志贺菌均为河南省分子医学重点实验室收集保存。1996年江西分离株9株,2001、

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.025

基金项目:国家科技重大专项(2013ZX10004607)

作者单位:450001 郑州,郑州大学公共卫生学院(薛泽润、王颖芳、段广才、王鹏飞、王琳琳、郭向娇、郝园林);河南科技大学(王颖芳)

通信作者:段广才, Email: gcduan@zzu.edu.cn

2004、2007、2008年河南分离株176株,2013年北京分离株5株,2004年购于中国药品生物制品检定所6株。

2. 试剂:细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR相关试剂、100 bp DNA Ladder购于上海莱枫生物科技有限公司。胰蛋白胨、酵母浸粉购于英国Oxoid公司。志贺菌属诊断血清购自兰州生物制品研究所。药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。其余常规试剂均为国产分析纯级。

3. 引物:从GenBank中查找志贺菌*cas2*、*casI(a)*和*casI(b)*基因的序列,利用Primer 5.0设计引物,由北京赛百盛基因技术有限公司合成。*cas2*基因:FP: 5'-TCG CAA TCT GGC TAC TGG-3', RP: 5'-AAC CCA TCC AAA TCC ACC-3',产物长度为202 bp。*casI(a)*基因:FP: 5'-AAT GGA ATG GTC GCA AAT AC-3', RP: 5'-CGA CAG GCT AAT CTG ACT TC-3',产物长度为280 bp。*casI(b)*:FP: 5'-GCA CTT CCA TGA TCT TCC TC-3', RP: 5'-CCG CTT CAC CGA CCC AGA-3',产物长度为204 bp。

4. PCR反应:用试剂盒提取细菌基因组DNA为模板,进行PCR扩增,扩增体系参照文献[3]。*cas2*和*casI(a)*基因PCR反应条件:94℃ 5 min;94℃ 60 s, 51℃ 45 s,72℃ 60 s,32个循环;72℃ 10 min。*casI(b)*基因PCR反应条件:94℃ 5 min;94℃ 60 s, 61℃ 45 s,72℃ 60 s,40个循环;72℃ 10 min。取5 μl PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像仪观察结果并照相。PCR产物送上海生物工程股份有限公司进行测序。

5. 药敏试验:采用改良Kirby-Bauer(K-B)法,按文献[4]进行。

结 果

1. PCR扩增:对196株志贺菌株的*cas2*、*casI(a)*和*casI(b)*基因进行PCR扩增,均扩增出相应大小目的条带。

2. 核酸序列分析:随机选取3株志贺菌(Z23、2003135、2008113),进行*cas2*、*casI(a)*和*casI(b)*基因测序,结果显示,*cas2*基因的一致性为96.44%,

*casI(a)*基因的一致性为97.61%,*casI(b)*基因的一致性为96.97%。

3. *cas2*、*casI(a)*和*casI(b)*基因序列比对和突变位点分析:将*cas2*、*casI(a)*和*casI(b)*基因的序列与GenBank数据库进行比对,结果显示,含有*cas2*基因的细菌共253株,其中志贺菌4株,大肠埃希菌249株。含有*casI(a)*基因的细菌有30株,志贺菌4株,大肠埃希菌26株。含有*casI(b)*基因的细菌共30株,其中志贺菌4株,大肠埃希菌26株,一致性和评分均较高,一致性均>90%。

cas2、*casI(a)*和*casI(b)*基因测序结果与GenBank上公布的*Shigella sonnei* 53G进行比较,结果显示,*cas2*、*casI(a)*和*casI(b)*基因均有不同程度的差别。

*cas2*基因:Z23、2003135、2008113均检出176189位点的碱基T、3176183位点的碱基A缺失。Z23、2008113的3176187位点碱基C缺失;2008113的3176131位点出现点突变(G→T),3176131和3176132位点之间插入了碱基T,见图1。

*casI(a)*基因:3株菌均出现3176681位点的碱基A、3176467位点的碱基A缺失,Z23还出现317668位点突变(G→A),见图2。

*casI(b)*基因:菌株Z23和2008113没有突变位点,菌株2003135的3177129位点突变(C→G)及3177126位点的突变(G→C),见图3。

4. 药敏试验和突变位点分析:利用K-B法对3株菌分别进行β内酰胺类、四环素类、磺胺类、氯霉素类、喹诺酮类共12种抗菌药物的药敏试验。菌株2003135的耐抗生素种类和耐抗生素数目大于菌株Z23、2008113(见表1、2)。

表1 突变位点与耐药水平分析

菌株	血清型	分离年代	突变位点个数			耐抗生素种类	耐抗生素数目
			<i>cas2</i>	<i>casI(a)</i>	<i>casI(b)</i>		
Z23	F3	1998	3	3	0	3	3
2003135	F2a	2003	2	2	2	5	7
2008113	Fx	2008	5	2	0	2	4

讨 论

本研究采用PCR扩增研究实验室保存的志贺菌中*casI*和*cas2*基因的分布情况,在每株志贺菌中均

表2 测序菌株药敏试验

菌株	β内酰胺类							四环素类	磺胺类	氯霉素类	喹诺酮类	
	CXM	FEP	CTX	CAI	CI	CF	AM	TE	SXT	CL	NA	NOR
Z23	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
2003135	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
2008113	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R

注:S为敏感,R为耐药;CXM:头孢吡辛;FEP:头孢吡肟;CTX:头孢噻肟;CAI:头孢他啶;CI:头孢唑啉;CF:头孢噻吩;AM:氨苄西林;TE:四环素;SXT:复方新诺明;CL:氯霉素;NA:萘啶酸;NOR:诺氟沙星

Z23	Query 11	TGGTGA-A-ATC-AAACGTATTCGGGAGATGATCTGGCAGCAAATTACCCAACCTGGCTGG	67
	Sbjct 3176195	TGGTGATACATCAAAAACGTATTCGGGAGATGATCTGGCAGCAAATTACCCAACCTGGCTGG	3176136
	Query 68	TTGCGGAAATGTGGTGTATGGCCCTGGGCGACCAATA TCGAGTCGGGTTTTGAATTCAGAC	127
	Sbjct 3176135	TTGCGGAAATGTGGTGTATGGCCCTGGGCGACCAATA TCGAGTCGGGTTTTGAATTCAGAC	3176076
	Query 128	CTGGGGAGAAAACAGACGTATTCGGGTGGATTTGGATGGGTTA	170
	Sbjct 3176075	CTGGGGAGAAAACAGACGTATTCGGGTGGATTTGGATGGGTTA	3176033
2003135	Query 12	GTTGGTGA-ACATC-AAACGTATTCGGGAGATGATCTGGCAGCAAATTACCCAACCTGGCT	69
	Sbjct 3176197	GTTGGTGTATACATCAAAAACGTATTCGGGAGATGATCTGGCAGCAAATTACCCAACCTGGCT	3176138
	Query 70	GGTTGCGGAAATGTGGTGTATGGCCCTGGGCGACCAATA TCGAGTCGGGTTTTGAATTCAG	129
	Sbjct 3176137	GGTTGCGGAAATGTGGTGTATGGCCCTGGGCGACCAATA TCGAGTCGGGTTTTGAATTCAG	3176078
	Query 130	ACCTGGGGAGAAAACAGACGTATTCGGGTGGATTTGGATGGGTTA	174
	Sbjct 3176077	ACCTGGGGAGAAAACAGACGTATTCGGGTGGATTTGGATGGGTTA	3176033
2008113	Query 15	TGTTGGTGA-A-ATC-AAACGTATTCGGGAGATGATCTGGCAGCAAATTACCCAACCTGGC	71
	Sbjct 3176198	TGTTGGTGTATACATCAAAAACGTATTCGGGAGATGATCTGGCAGCAAATTACCCAACCTGGC	3176139
	Query 72	TGGTTGCTTGAAATGTGGTGTATGGCCCTGGGCGACCAATA TCGAGTCGGGTTTTGAATTC	131
	Sbjct 3176138	TGGTTGCG-GAAATGTGGTGTATGGCCCTGGGCGACCAATA TCGAGTCGGGTTTTGAATTC	3176080
	Query 132	AGACCTGGGGAGAAAACAGACGTATTCGGGTGGATTTGGATGGGTTA	178
	Sbjct 3176079	AGACCTGGGGAGAAAACAGACGTATTCGGGTGGATTTGGATGGGTTA	3176033

图1 *cas2* 基因突变位点分析

Z23	Query 15	GCGATGTTGTG-ATCGCTGCATCAATGCTGCTACATCATGTCTGTACGGTATATCTGAAG	73
	Sbjct 3176693	GCGATGTTGTGAATCGCTGCATCAGTGCTGCTACATCATGTCTGTACGGTATATCTGAAG	3176634
	Query 74	CGGCAGTATTAGCCGCGGGATATGCGCCCGCTATTGGGTTTATCCATAGTGGCAAACCCGC	133
	Sbjct 3176633	CGGCAGTATTAGCCGCGGGATATGCGCCCGCTATTGGGTTTATCCATAGTGGCAAACCCGC	3176574
	Query 134	TTTCATTTGTTTATGACATAGCCGATATCATTAAATTTGATTTCGGTTGTGCCAAAGGCAT	193
	Sbjct 3176573	TTTCATTTGTTTATGACATAGCCGATATCATTAAATTTGATTTCGGTTGTGCCAAAGGCAT	3176514
2003135	Query 194	TTGAAATAGCAGCGAGGCAACCCGAGAACCTGATAAAGAAGTCAG-TTAGCCTGTGC	250
	Sbjct 3176513	TTGAAATAGCAGCGAGGCAACCCGAGAACCTGATAAAGAAGTCAGATTAGCCTGTGC	3176456
	Query 13	GCGATGTTGTG-ATCGCTGCATCAGTGCTGCTACATCATGTCTGTACGGTATATCTGAAG	71
	Sbjct 3176693	GCGATGTTGTGAATCGCTGCATCAGTGCTGCTACATCATGTCTGTACGGTATATCTGAAG	3176634
	Query 72	CGGCAGTATTAGCCGCGGGATATGCGCCCGCTATTGGGTTTATCCATAGTGGCAAACCCGC	131
	Sbjct 3176633	CGGCAGTATTAGCCGCGGGATATGCGCCCGCTATTGGGTTTATCCATAGTGGCAAACCCGC	3176574
2008113	Query 132	TTTCATTTGTTTATGACATAGCCGATATCATTAAATTTGATTTCGGTTGTGCCAAAGGCAT	191
	Sbjct 3176573	TTTCATTTGTTTATGACATAGCCGATATCATTAAATTTGATTTCGGTTGTGCCAAAGGCAT	3176514
	Query 192	TTGAAATAGCAGCGAGGCAACCCGAGAACCTGATAAAGAAGTCAG-TTAGCCTGTGC	248
	Sbjct 3176513	TTGAAATAGCAGCGAGGCAACCCGAGAACCTGATAAAGAAGTCAGATTAGCCTGTGC	3176456
	Query 12	GCGATGTTGTG-ATCGCTGCATCAGTGCTGCTACATCATGTCTGTACGGTATATCTGAAG	70
	Sbjct 3176693	GCGATGTTGTGAATCGCTGCATCAGTGCTGCTACATCATGTCTGTACGGTATATCTGAAG	3176634
2008113	Query 71	CGGCAGTATTAGCCGCGGGATATGCGCCCGCTATTGGGTTTATCCATAGTGGCAAACCCGC	130
	Sbjct 3176633	CGGCAGTATTAGCCGCGGGATATGCGCCCGCTATTGGGTTTATCCATAGTGGCAAACCCGC	3176574
	Query 131	TTTCATTTGTTTATGACATAGCCGATATCATTAAATTTGATTTCGGTTGTGCCAAAGGCAT	190
	Sbjct 3176573	TTTCATTTGTTTATGACATAGCCGATATCATTAAATTTGATTTCGGTTGTGCCAAAGGCAT	3176514
	Query 191	TTGAAATAGCAGCGAGGCAACCCGAGAACCTGATAAAGAAGTCAG-TTAGCCTGTGC	247
	Sbjct 3176513	TTGAAATAGCAGCGAGGCAACCCGAGAACCTGATAAAGAAGTCAGATTAGCCTGTGC	3176456

图2 *cas1(a)* 基因突变位点分析

Z23	Query	18	ACGGCGCTTTCGTGCTGATCGACAAAACCGGGATCCGCACGCATATTCCAGTGGGATCGG	77
	Sbjct	3177125	ACGGCGCTTTCGTGCTGATCGACAAAACCGGGATCCGCACGCATATTCCAGTGGGATCGG	3177066
	Query	78	TCGCCTGCATTATGCTCGAACCGGGAACAAGAGTTTCCACGCGGCAGTCCATCTGGCCG	137
	Sbjct	3177065	TCGCCTGCATTATGCTCGAACCGGGAACAAGAGTTTCCACGCGGCAGTCCATCTGGCCG	3177006
	Query	138	CCACGGTGGGAACACTGCTGGTCTGGGTCGGTGAAGCGG	176
	Sbjct	3177005	CCACGGTGGGAACACTGCTGGTCTGGGTCGGTGAAGCGG	3176967
2003135	Query	10	GTAGTGCACGGCGCTTTCGTGCTGATCGACAAAACCGGGATCCGCACGCATATTCCAGTG	69
	Sbjct	3177132	GTACTGGACGGCGCTTTCGTGCTGATCGACAAAACCGGGATCCGCACGCATATTCCAGTG	3177073
	Query	70	GGATCGGTCGCTGCATTATGCTCGAACCGGGAACAAGAGTTTCCACGCGGCAGTCCAT	129
	Sbjct	3177072	GGATCGGTCGCTGCATTATGCTCGAACCGGGAACAAGAGTTTCCACGCGGCAGTCCAT	3177013
	Query	130	CTGGCCGCCACGGTGGGAACACTGCTGGTCTGGGTCGGTGAAGCGG	175
	Sbjct	3177012	CTGGCCGCCACGGTGGGAACACTGCTGGTCTGGGTCGGTGAAGCGG	3176967
2008113	Query	17	CGGCGCTTTCGTGCTGATCGACAAAACCGGGATCCGCACGCATATTCCAGTGGGATCGGT	76
	Sbjct	3177124	CGGCGCTTTCGTGCTGATCGACAAAACCGGGATCCGCACGCATATTCCAGTGGGATCGGT	3177065
	Query	77	CGCCTGCATTATGCTCGAACCGGGAACAAGAGTTTCCACGCGGCAGTCCATCTGGCCGC	136
	Sbjct	3177064	CGCCTGCATTATGCTCGAACCGGGAACAAGAGTTTCCACGCGGCAGTCCATCTGGCCGC	3177005
	Query	137	CACGGTGGGAACACTGCTGGTCTGGGTCGGTGAAGCG	173
	Sbjct	3177004	CACGGTGGGAACACTGCTGGTCTGGGTCGGTGAAGCG	3176968

图3 casI(b)基因突变位点分析

发现cas1和cas2基因,提示CRISPR系统在志贺菌中广泛存在。将PCR扩增出来的片段进行测序,在BLAST上检索同源序列,含有cas2基因的细菌共253株,其中志贺菌4株,大肠埃希菌249株;含有cas1(a)基因的细菌有30株,志贺菌4株,大肠埃希菌26株;含有cas1(b)基因的细菌共30株,其中志贺菌4株,大肠埃希菌26株,一致性和评分均较高,一致性均>90%,提示志贺菌和大肠埃希菌具有同源性。

cas2、cas1(a)和cas1(b)基因的突变位点与耐药水平分析发现,菌株2003135的cas1(b)基因有两个突变位点:3177129位点突变,C→G,3177126位点的突变,G→C;而菌株Z23、2008113没有突变。药敏结果显示菌株2003135的耐抗生素种类和耐抗生素数目均大于菌株Z23、2008113。提示cas1(b)基因突变可能是引起耐药程度不同的原因之一,CRISPR相关蛋白的差异表达与耐药水平相关,这与宋春花等^[5]的研究一致,其研究显示,在敏感株与基因转移耐多药株双向电泳图谱分析发现CRISPR相关蛋白为在基因转移耐多药株中新出现蛋白,推测其在耐多药机制中起调节作用,能增强一些耐多药基因的表达,从而导致细菌出现耐多药。基于CRISPR系统和细菌耐药性的研究还比较少,其相关机制还没有阐明。Palmer和Gilmore^[6]在乳酸菌的CRISPR系统与耐药性关系的研究中发现CRISPR位点和耐药性呈负相关。Burley和Sedgley^[7]在研究中发现牙髓

和口腔内的乳酸菌内的CRISPR位点比耐多药菌株的多,验证了缺少CRISPR位点和耐药性之间的关系。Marraffini和Sontheimer^[8]在金黄色葡萄球菌CRISPR系统的研究中发现,CRISPR系统能限制基因水平转移并能阻止耐药基因在致病菌之间的传播。

参 考 文 献

- [1] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies [J]. Microbiology, 2005, 151(3):653-663.
- [2] Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes [J]. Mol Microbiol, 2002, 43(6):1657-1669.
- [3] Wang YF, Song CH, Duan GC, et al. Correlation between drug-resistance of sensitive strain of *Shigella flexneri* and mutation of marOR gene [J]. Chin J Public Health, 2012, 28(3):352-353. (in Chinese)
王颖芳,宋春花,段广才,等.志贺菌敏感株诱导耐药与marOR基因突变关系[J].中国公共卫生,2012,28(3):352-353.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antibiotic disk susceptibility tests. Eleventh edition [S]. CLSI, 2012.
- [5] Song CH, Huang XY, Xi YL, et al. Analysis on proteomics between sensitive strain and gene transferred multi-drug resistant strain of *Shigella flexneri* [J]. Chin J Public Health, 2008, 24(1):42-45. (in Chinese)
宋春花,黄学勇,郝园林,等.志贺菌敏感株与基因转移耐多药株蛋白组学分析[J].中国公共卫生,2008,24(1):42-45.
- [6] Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas [J]. MBio, 2010, 1(4):e00227-210.
- [7] Burley KM, Sedgley CM. CRISPR-Cas, a prokaryotic adaptive immune system, in endodontic, oral, and multidrug-resistant hospital-acquired *Enterococcus faecalis* [J]. J Endod, 2012, 38(11):1511-1515.
- [8] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA [J]. Science, 2008, 322(5909):1843-1845.

(收稿日期:2013-10-23)
(本文编辑:万玉立)