

4株志贺菌无抗生素压力下连续传代90次的耐药表型及CRISPR/Cas系统变化

张冰 洪丽娟 段广才 梁文娟 杨海燕 郝园林

450001 郑州大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室(张冰、洪丽娟、段广才、梁文娟、杨海燕、郝园林); 453003 新乡医学院分子诊断与医学检验技术河南省协同创新中心(段广才)

通信作者:段广才, Email:gcduan@zzu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.02.020

【摘要】 目的 分析无抗生素压力下连续传代90次的4株志贺菌耐药表型及成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关蛋白(Cas)基因变化。**方法** 对临床分离的4株耐药谱不同的志贺菌进行无抗生素压力连续传代90次,传代结束后用琼脂稀释法检测传代前、后志贺菌最小抑菌浓度;用PCR对CRISPR位点进行扩增并测序,CRISPR Finder和Clustal X 2.1分析CRISPR位点的变化。**结果** 经无抗生素压力传代90次后,4株志贺菌对某些抗生素的敏感性有不同程度的增加:mel-sf1998024/zz对氨苄西林、头孢氨苄、头孢噻肟、氯霉素的耐药性降低, mel-s2014026/sx对诺氟沙星、甲氧苄啶的耐药性降低, mel-sf2004004/sx对氨苄西林、头孢吡辛、头孢噻肟、氯霉素、甲氧苄啶的耐药性降低, mel-sf2013004/bj对氯霉素的耐药性降低;志贺菌 mel-sf1998024/zz和 mel-sf2013004/bj经无抗生素压力传代后,CRISPR3位点3'的重复-间隔序列丢失,其中间隔序列匹配基因的编码产物是Cas蛋白。**结论** 志贺菌在无抗生素压力下,可降低或丢失对某些抗生素的耐药性。部分志贺菌CRISPR3位点的结构发生了变化,CRISPR3位点与cas基因可能存在共进化。

【关键词】 志贺菌属; 抗药性; 无抗生素压力; 连续传代; CRISPR/Cas系统

基金项目: 国家科技重大专项(2013ZX10004607)

Changes of resistant phenotype and CRISPR/Cas system of four *Shigella* strains passaged for 90 times without antibiotics Zhang Bing, Hong Lijuan, Duan Guangcai, Liang Wenjuan, Yang Haiyan, Xi Yuanlin

Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China (Zhang B, Hong LJ, Duan GC, Liang WJ, Yang HY, Xi YL); Henan Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China (Duan GC)

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

【Abstract】 Objective To explore the stability of resistant phenotypes and changes of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) gene system on four *Shigella* strains in the absence of antibiotics. **Methods** Four clinical isolated *Shigella* strains that resistant to different antibiotics were consecutive passaged for 90 times without antibiotics. Agar dilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration of *Shigella* strains. After sequence analysis with PCR, CRISPR Finder and Clustal X 2.1 were applied to identify the changes of CRISPR loci in the *Shigella* strains. **Results** After the consecutive transfer of 90 generations, sensitivity to certain antibiotics of four *Shigella* strains with different drug resistant spectrums increased. Mel-sf1998024/zz resistance to ampicillin, cephalexin, cefotaxime, chloramphenicol decreased, mel-s2014026/sx resistance to norfloxacin, trimethoprim decreased, mel-sf2004004/sx drug resistance to ampicillin, cefuroxime, cefotaxime, chloramphenicol, trimethoprim decreased and mel-sf2013004/bj resistance to chloramphenicol decreased. The spacer of which matched gene codes Cas and its upstream repeat in 3' end of CRISPR3 got lost in mel-sf1998024/zz and mel-sf2013004/bj. **Conclusions** *Shigella* strains could reduce or lose their resistance to some antibiotics after consecutive transfers, without the interference of antibiotics. CRISPR3 locus had dynamic spacers in *Shigella* strains while CRISPR3 locus and cas genes might have been co-evolved.

[Key words] *Shigella*; Drug resistance; Without antibiotics; Serial passage; CRISPR/Cas system

Fund program: Major National Science and Technology Projects of China (2013ZX10004607)

由志贺菌引起的细菌性痢疾是一类具有高度传染性且危害较严重的肠道传染病, 抗生素滥用导致志贺菌不断产生多重耐药, 为临床有效治疗细菌性痢疾带来挑战。成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 和 CRISPR 相关蛋白 (Cas) 组成的 CRISPR/Cas 系统广泛存在于原核生物中, 可有效处理外源遗传物质、限制耐药基因等水平转移^[1-2]。CRISPR 作为该系统重要的结构基础, 主要由重复序列 (repeat) 和间隔序列 (spacer) 构成的 R-S 单元排列组成。其中重复序列长 28 ~ 47 bp, 在同一个 CRISPR 位点高度保守; 间隔序列长 17 ~ 84 bp, 高度可变^[3-4], 是外源遗传物质入侵的“记录器”, 使得 CRISPR 基因座存在不同噬菌体或质粒的信息, 是细菌发挥防护作用的基础^[5]。CRISPR/Cas 系统的进化速度十分缓慢^[6], CRISPR 序列可在 10³ ~ 10⁵ 年间保持不变^[7], 但也有研究发现, CRISPR 位点 3' 端的重复和间隔序列构成的 R-S 单元经常被删除^[8-9]。本研究在无抗生素压力下连续传代 90 次, 检测志贺菌耐药表型及 CRISPR/Cas 系统的变化, 以期志贺菌耐药及 CRISPR/Cas 系统的研究提供资料。

材料与方法

1. 材料:

(1) 菌株: 临床分离的 4 株志贺菌 mel-sf1998024/

zz、mel-sf2013004/bj、mel-sf2004004/sx、mel-s2014026/sx 间隔序列信息及耐药表型信息见表 1。大肠埃希菌 ATCC25922 购自中国普通微生物菌种管理保藏中心。

(2) 培养基及主要试剂: 胰蛋白胨、酵母浸粉购自英国 Oxoid 公司, M-H(A) 培养基购自北京索莱宝科技有限公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于上海莱枫生物科技有限公司。PCR 相关试剂: 2 × Taq PCR Master Mix master mix、ddH₂O、MgCl₂ 购自上海生工生物工程有限公司。氨苄西林、头孢氨苄、头孢噻肟、头孢呋辛、四环素、氯霉素、链霉素、诺氟沙星、甲氧苄啶等抗菌药物标准品购自中国药品生物制品检定所。

2. 研究方法:

(1) 多耐药志贺菌的无抗生素压力连续传代: 分别挑取 4 株耐药谱不同的志贺菌单克隆菌落, 经 LB 肉汤过夜增菌, 以 LB 肉汤 1 : 500 倍稀释, 37 °C、200 r/min 振荡培养 6 ~ 7 h, 至 A₆₀₀ 值为 0.08 ~ 0.12 后, 继续以 LB 肉汤 1 : 500 倍稀释后再次按照上述条件进行培养, 3 次/d, 连续培养 30 d。

(2) 志贺菌药物敏感性测定: 对无抗生素压力连续传代前后的志贺菌使用琼脂稀释法测定不同抗生素的最低抑菌浓度 (MIC), 以大肠埃希菌标准株 ATCC25922 作为质控菌株。根据美国临床实验室

表 1 4 株志贺菌间隔序列的分布及耐药表型

菌株	间隔序列			耐药表型
	CRISPR1	CRISPR2	CRISPR3	
mel-sf1998024/zz	CRISPR1-mel-22	CRISPR2-mel-1	CRISPR3-mel-31	四环素、氨苄西林
	CRISPR1-mel-23	CRISPR2-mel-2	CRISPR3-mel-32	
	CRISPR1-mel-24	CRISPR2-mel-3		
	CRISPR1-mel-25	CRISPR2-mel-4		
	CRISPR1-mel-26	CRISPR2-mel-5		
	CRISPR1-mel-27	CRISPR2-mel-6		
	CRISPR1-mel-28			
	CRISPR1-mel-29			
	CRISPR1-mel-30			
	mel-sf2013004/bj	CRISPR1-mel-22	CRISPR2-mel-1	
CRISPR1-mel-23		CRISPR2-mel-2	CRISPR3-mel-32	
CRISPR1-mel-24		CRISPR2-mel-3		
CRISPR1-mel-25		CRISPR2-mel-4		
CRISPR1-mel-26		CRISPR2-mel-5		
CRISPR1-mel-27		CRISPR2-mel-6		
CRISPR1-mel-28				
CRISPR1-mel-29				
CRISPR1-mel-30				
mel-sf2004004/sx		CRISPR1-mel-13	CRISPR2-mel-15	CRISPR3-mel-31
	CRISPR1-mel-14		CRISPR3-mel-32	
mel-s2014026/sx	CRISPR1-mel-13	-	CRISPR3-mel-31	氨苄西林、头孢呋辛、头孢噻肟、庆大霉素、甲氧苄啶、四环素
	CRISPR1-mel-14		CRISPR3-mel-32	

标准化协会(CLSI)2012年出版的《抗微生物药物敏感性试验执行标准》第22版信息增刊M100-S22进行结果判断。

(3)志贺菌CRISPR/Cas系统CRISPR位点的扩增:引物序列见表2。PCR扩增体系为25 μl:2×Taq PCR Master Mix 12.5 μl, ddH₂O 8.5 μl, 上、下游引物各1 μl(10 mmol/L), 模板DNA 2 μl, 反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性60 s, 退火温度见表2;45 s, 72℃延伸1 kb/min, 共32个循环;最后72℃延伸10 min。产物送上海生工生物工程有限公司进行测序。

表2 CRISPR/Cas系统的CRISPR位点的引物序列^[10]

基因	引物名称	引物序列(5'~3')	产物长度(kb)	退火温度(℃)
CRISPR1	CR1 fw	AGCGACTAACTGGAATCTTG	~0.7 ^a	56
	CR1 rev	CAATCTGGCTACTGGAAGTG		
CRISPR2	CR2 fw	CGATCCAGAGCTGGTCAATG	~1.0 ^a	56
	CR2 rev	AGTGCTCTTAACATAATGGATG		
CRISPR3	CR3 fw	TTGTYAGGTAGGTTGGTGAAG	~0.7 ^a	56
	CR3 rev	GCGAAGAGAAAGAACGAGTA		

注:^a不同菌株CRISPR的长度因spacer数目不同而不同

结 果

1. 4株志贺菌无抗生素压力传代90次后的耐药表型:传代后, mel-sf1998024/zz对氨苄西林、头孢氨苄、头孢噻肟、氯霉素的敏感性均增加; mel-s2014026/sx对诺氟沙星和甲氧苄啉的敏感性增加; mel-sf2004004/sx对氨苄西林、头孢呋辛、头孢噻肟、氯霉素、甲氧苄啉的敏感性均增加; mel-sf2013004/bj对氯霉素的敏感性增加。且氯霉素对 mel-sf1998024/zz、 mel-sf2004004/sx、 mel-sf2013004/bj的MIC变化为4倍。4株细菌对链霉素、四环素的敏感性未见改变。见表3。

2. CRISPR/Cas系统的变化:经无抗生素压力传代90次后, 2株志贺菌 mel-sf1998024/zz和 mel-sf2013004/bj相同的CRISPR3位点的第2条间隔序列与第2条重复序列(即3'的R-S单元)均丢失, 见图1、2。根据前期CRISPRTarget的分析发现, 丢失的间隔序列的匹配基因编码产物是Cas1蛋白^[11]。其余菌株的CRISPR位点均未见改变。

讨 论

本研究中, 4株志贺菌在无抗生素压力连续传代90次后, 对不同抗生素的敏感性有不同程度的增加, 但对链霉素和四环素的耐药情况均未见改变。朱静媛等^[12]对10株耐药谱不同、携带不同整合子的志贺菌进行无抗生素压力传代30次后, 其中1株志贺菌由整合子介导的耐药性经过多次传代培养后丢失。1株多耐药单核细胞增生李斯特菌的研究显示, 在细菌由质粒介导的氯霉素、红霉素、四环素抗性在连续传代400次后仍然有很高的稳定性, 并没有在频繁传代过程中丢失^[13]。在1株粪肠球菌的无抗生素选择压力传代600次后, 由质粒介导的四环素抗性也十分稳定^[14]。本研究中, 不同志贺菌对某些抗生素的耐药性降低, 可能是因为无抗生素压力的存在情况下, 细菌生存不会受到威胁, 会降低甚至丢失对某些抗生素的耐药性, 但是对链霉素和四环素的耐药性比较稳定。

经多次传代后, 志贺菌 mel-s2014026/sx和 mel-sf2004004/sx的CRISPR/Cas相关位点均未见变化。生物信息学的分析结果表明, 相对于其他快速进化的CRISPR/Cas系统, I-E型的CRISPR/Cas系统进化速度十分缓慢^[6], CRISPR序列可在10³~10⁵年间保持不变, 且在漫长的进化过程中, CRISPR序列不是逐渐改变, 而是罕见地会有间隔序列的变化^[7],

表3 4株志贺菌无抗生素压力传代90次前、后志贺菌的最低抑菌浓度(μg/ml)

抗菌素	氨苄西林	头孢氨苄	头孢呋辛	头孢噻肟	链霉素	氯霉素	四环素	诺氟沙星	甲氧苄啉
mel-sf1998024/zz									
传代前	32	16	64	0.031 25	8	8	32	0.031 25	0.5
传代后	16	8	64	<0.031 25	8	2	32	0.031 25	0.5
mel-s2014026/sx									
传代前	256	256	>128	128	128	4	64	1	8
传代后	256	256	>128	64	128	4	64	0.5	4
mel-sf2004004/sx									
传代前	32	8	128	0.062 5	>128	16	64	0.25	4
传代后	16	8	64	<0.031 25	>128	2	64	0.25	2
mel-sf2013004/bj									
传代前	2	8	128	<0.031 25	8	2	32	<0.031 25	4
传代后	2	8	128	<0.031 25	8	0.5	32	<0.031 25	4

```

mel-sf1998024/zz 传代前 TGCTGCAGGAGAATGGGATGGTTTTGCTTTATTAACAACGGGC TAAACGTGTAGTATTTG
mel-sf1998024/zz 传代后 TGCTGCAGGAGAATGGGATGGTTTTGCTTTATTAACAACGGGC TAAACGTGTAGTATTTG
*****

mel-sf1998024/zz 传代前 AGTTCCTGACCGTACAGGCAGCTTAGAAATCGACGGGGTGCGGTAAAACCTTTGCGAACG
mel-sf1998024/zz 传代后 AGTTCCTGACCGTACAGGCAGCTTAGAAATCGACGGGGTGCGGTAAAACCTTTGCGAACG
*****

mel-sf1998024/zz 传代前 CGTTCCTGACCGTACAGGCAGCTTAGAAATCGACGGGGTGCGGTAAAACCTTTGCGAACG
mel-sf1998024/zz 传代后 CGTTCCTGACCGTACAG-----
*****

mel-sf1998024/zz 传代前 TGTTCACTGACCGTACAGACAGATAAAAATGCGAAAAAAAAGCTCGCACTTTCGTACGAGCT
mel-sf1998024/zz 传代后 -----ACAGATAAAAATGCGAAAAAAAAGCTCGCACTTTCGTACGAGCT
*****

```

注：方框中为丢失的重复和间隔序列；*为相同序列

图1 志贺菌 mel-sf1998024/zz 无抗生素压力传代 90 次前、后 CRISPR3 位点比对

```

mel-sf2013004/bj 传代前 TGCTGCAGGAGAATGGGATGGTTTTGCTTTATTAACAACGGGC TAAACGTGTAGTATTTG
mel-sf2013004/bj 传代后 TGCTGCAGGAGAATGGGATGGTTTTGCTTTATTAACAACGGGC TAAACGTGTAGTATTTG
*****

mel-sf2013004/bj 传代前 AGTTCCTGACCGTACAGGCAGCTTAGAAATCGACGGGGTGCGGTAAAACCTTTGCGAACG
mel-sf2013004/bj 传代后 AGTTCCTGACCGTACAGGCAGCTTAGAAATCGACGGGGTGCGGTAAAACCTTTGCGAACG
*****

mel-sf2013004/bj 传代前 CGTTCCTGACCGTACAGGCAGCTTAGAAATCGACGGGGTGCGGTAAAACCTTTGCGAACG
mel-sf2013004/bj 传代后 CGTTCCTGACCGTACAG-----
*****

mel-sf2013004/bj 传代前 TGTTCACTGACCGTACAGACAGATAAAAATGCGAAAAAAAAGCTCGCACTTTCGTACGAGCT
mel-sf2013004/bj 传代后 -----ATAAAAATGCGAAAAAAAAGCTCGCACTTTCGTACGAGCT
*****

```

注：方框中为丢失的重复和间隔序列；*为相同序列

图2 志贺菌 mel-sf2013004/bj 无抗生素压力传代 90 次前、后 CRISPR3 位点比对

这与快速连续进化的免疫防御系统功能不符,推测在大肠埃希菌中 CRISPR/Cas 系统可能无活性。有研究表明,在大肠埃希菌中,相差 <25 万年的细菌具有相同的 CRISPR 位点^[15],同样地,与细菌 CRISPR/Cas 系统中间隔序列的多样性和动态性相悖。但是有研究发现,细菌 CRISPR 位点的重复和间隔序列构成的 R-S 单元经常被删除^[8-9],被删除的序列一般是 3' 比较保守的序列^[9],与之相似,本研究结果显示,传代后的志贺菌 mel-sf1998024/C 和 mel-sf2013004/C 的 CRISPR3 位点发生退化,丢失了 3' 的重复-间隔序列单元。有人推测这样的删除可能是在 CRISPR 位点的重复序列间发生了同源重组所致^[16]。本课题组前期发现,被丢失的间隔序列匹配的基因是 *casI*,可能说明 CRISPR 位点与 *cas* 基因存在共进化。间隔序列保留外源遗传物质的信息以

应对相同外源物质的再次入侵,重复序列在 crRNA 识别自身基因与外源基因的过程中发挥重要作用。在细菌的进化过程中,CRISPR/Cas 系统可以通过间隔序列的不断增加和删除限制 CRISPR 位点的大小,限制转录长度,同时有助于细菌更新,以应对外环境的变化。

总之,本研究中获得了耐药性降低且 CRISPR3 位点发生退化的志贺菌株,为志贺菌的耐药及 CRISPR/Cas 系统的研究提供基础资料。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] Bikard D, Hatoum-Aslan A, Mucida D, et al. CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during in vivo bacterial infection [J]. Cell Host Microbe, 2012, 12 (2) : 177-186. DOI: 10.1016/j.chom.2012.

- 06.003.
- [2] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA [J]. *Science*, 2008, 322 (5909) : 1843-1845. DOI: 10.1126/science.1165771.
- [3] Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats [J]. *Genome Biol*, 2007, 8 (4) : R61. DOI: 10.1186/gb-2007-8-4-r61.
- [4] Shah SA, Hansen NR, Garrett RA. Distribution of CRISPR spacer matches in viruses and plasmids of crenarchaeal acidothermophiles and implications for their inhibitory mechanism [J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37 (Pt 1) : 23-28. DOI: 10.1042/BST0370023.
- [5] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819):1709-1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
- [6] Andersson AF, Banfield JF. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities [J]. *Science*, 2008, 320 (5879) : 1047-1050. DOI: 10.1126/science.1157358.
- [7] Touchon M, Charpentier S, Clermont O, et al. CRISPR distribution within the *Escherichia coli* species is not suggestive of immunity-associated diversifying selection [J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(10):2460-2467. DOI: 10.1128/JB.01307-10.
- [8] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8 (1) : 172. DOI: 10.1186/1471-2105-8-172.
- [9] Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus* [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(4):1390-1400. DOI: 10.1128/JB.01412-07.
- [10] 王琳琳. CRISPR/Cas系统与志贺菌耐药的关系[D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
- Wang LL. The relationship between CRISPR/Cas system and drug resistance in *Shigella* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2015.
- [11] 王鹏飞. 志贺菌、大肠杆菌和沙门菌 CRISPR 结构特征生物信息学分析[D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
- Wang PF. Bioinformatics analysis of CRISPR structures and feature in *Shigella*, *Escherichia coli* and *Salmonella* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2015.
- [12] 朱静媛, 段广才, 范清堂, 等. 志贺菌属整合子的耐药贡献与稳定性研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(3):278-281.
- Zhu JY, Duan GC, Fan QT, et al. Drug resistance of *Shigella* integrons and their stability [J]. *Acta Acad Med Milit Tert*, 2011, 33(3):278-281.
- [13] 李丽丽, 石磊, 何建华, 等. 一株食源性多重耐药单核细胞增生李斯特菌的耐药性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(7): 105-110. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.018.
- Li LL, Shi L, He JH, et al. Antibiotic resistance of foodborne multidrug-resistant *Listeria monocytogenes* [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2015, 31 (7) : 105-110. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.07.018.
- [14] Li XH, Alvarez V, Harper WJ, et al. Persistent, toxin-antitoxin system-independent, tetracycline resistance-encoding plasmid from a dairy *Enterococcus faecium* isolate [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77 (20) : 7096-7103. DOI: 10.1128/AEM.05168-11.
- [15] Touchon M, Rocha EPC. The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella* [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (6) : e11126. DOI: 10.1371/journal.pone.0011126.
- [16] Wilmes P, Simmons SL, Deneff VJ, et al. The dynamic genetic repertoire of microbial communities [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 33(1): 109-132. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00144.x.

(收稿日期:2016-08-01)

(本文编辑:万玉立)