

# 志贺菌中成簇规律间隔短回文重复序列的分子分布特征

薛泽润 王颖芳 段广才 杨海燕 郝园林 王鹏飞 王琳琳 郭向娇

**【摘要】** 目的 探索志贺菌中成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)的分布。方法 共选择志贺菌分离株 52 株,其中河南 41 株,江西 6 株,北京 5 株。利用 PCR 扩增志贺菌的 4 个 CRISPR 位点(S1、S2、S3、S4),产物送测序,分析 CRISPR 的重复序列和间隔序列。结果 志贺菌的 4 个 CRISPR 位点阳性率分别为 33.69%(S1)、50.00%(S2)、82.69%(S3)和 73.08%(S4);S1 和 S3 包括 2 种亚型,S2 有 3 种亚型,S4 包括 4 种亚型。2004 年前分离的河南分离株中检出 S1 位点,2004 年后分离的菌株中均未检出该位点;S2、S3 和 S4 在两组分布没有差异。结论 志贺菌各 CRISPR 位点含有不同亚型,河南分离株 S1 的分布与细菌分离时间有关,而 S2、S3 及 S4 和分离时间无关。

**【关键词】** 志贺菌;成簇规律间隔短回文重复序列;分子流行病学

**Molecular characteristics of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat in *Shigella*** Xue Zerun<sup>1,3</sup>, Wang Yingfang<sup>2</sup>, Duan Guangcai<sup>3,4</sup>, Yang Haiyan<sup>3</sup>, Xi Yuanlin<sup>3</sup>, Wang Pengfei<sup>3</sup>, Wang Linlin<sup>3</sup>, Guo Xiangjiao<sup>3</sup>. 1 Xi'an Municipal Center for Disease Control and Prevention, Xi'an 710054, China; 2 Henan University of Science and Technology; 3 School of Public Health, Zhengzhou University; 4 Henan Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University

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

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2013ZX10004607).

**【Abstract】** **Objective** To detect the molecular characteristics of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) in *Shigella* and to analyze the distribution of CRISPR related to the time of isolation. **Methods** Of the 52 *Shigella* strains, 41 were isolated from Henan, 6 from Jiangxi and 5 isolated from Beijing. Both CRISPR locus of S1, S2, S3 and S4 in *Shigella* were detected by polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were sequenced and compared. **Results** The positive rates of CRISPR locus in *Shigella* were 33.69% (S1), 50.00% (S2), 82.69% (S3) and 73.08% (S4), respectively. Two subtypes were discovered in S1 and S3 locus. Three subtypes were discovered in S2 locus. Four different subtypes were discovered in S4 locus. The isolates from Henan strains were divided into two groups by the time of isolation. Distributions of S1 were different, before or after 2004, on *Shigella*. S1 could not be detected after 2004. There were no statistical differences of S2, S3 and S4 in two groups. **Conclusion** Different CRISPR subtypes or *Shigella* were discovered. A significant correlation was noticed between the CRISPR S1 related to the time of isolation but not between S2, S3 or S4 on the time of isolation.

**【Key words】** *Shigella*; Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat; Molecular epidemiology

近年来在细菌中发现的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)能抵御外源遗传物质入侵<sup>[1]</sup>。CRISPR 系统包括重复序列、间隔序列和前导序列,

间隔序列是核心,呈现多态性,能反映曾经入侵细菌的外源遗传物质,在不同菌株间分布不同<sup>[2]</sup>。CRISPR 有免疫记忆和防御功能,当外源基因第一次入侵细菌时,CRISPR 识别和整合前间隔序列(proto-spacer),形成新的间隔序列,当外源基因再次侵袭时,CRISPR 识别外源基因、转录间隔序列和部分重复序列,crRNA 与 trans-activating crRNA (tracrRNA)、Cas 蛋白结合形成复合体,破坏入侵的外源基因<sup>[3]</sup>,细菌 CRISPR 可识别与间隔序列相同的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.08.023

基金项目:国家科技重大专项(2013ZX10004607)

作者单位:710054 西安市疾病预防控制中心(薛泽润);河南科技大学(王颖芳);郑州大学公共卫生学院(薛泽润、段广才、杨海燕、郝园林、王鹏飞、王琳琳、郭向娇);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

外源遗传物质,并启动免疫防御。志贺菌能导致细菌性痢疾(菌痢)<sup>[4]</sup>。菌痢是全球都存在的公共卫生问题,尤其对发展中国家造成重大危害,在我国属于乙类传染病,发病率居我国甲乙类传染病第3位,是传染病控制的重点<sup>[5]</sup>。按血清分型志贺菌分为4群:福氏、宋内、痢疾和鲍氏。发达国家流行的主要是宋内志贺菌,而我国以福氏志贺菌为主<sup>[6]</sup>。我国 CRISPR 相关研究较少<sup>[7]</sup>,探索志贺菌中 CRISPR 的分子流行病学特征具有重要意义。

### 材料与方 法

1. 菌株:52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6株,均为福氏志贺菌。河南分离株41株(福氏志贺菌28株、宋内志贺菌11株、痢疾志贺菌2株),其中1998年2株,1999年1株,2000年6株,2001年7株,2003年2株,2004年3株,2005年3株,2006年5株,2007年2株,2008年10株。2013年北京分离株5株,均为福氏志贺菌。

2. 试剂:诊断血清购自卫生部兰州生物制品研究所。胰蛋白胨、酵母浸粉(英国Oxoid公司)。细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR相关试剂和100 bp DNA Ladder购于上海莱枫生物科技有限公司。

3. 引物:从GenBank和CRISPR Database数据库中查询志贺菌CRISPR基因相关序列,S1、S2、S3、S4为CRISPR Database数据库中已经发现的志贺菌CRISPR位点,选择保守序列,利用Primer 5.0设计引物,引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成(表1)。

4. PCR反应:以细菌基因组DNA为模板进行PCR扩增,扩增体系:三蒸水19 μl,2×Taq PCR Master Mix 25 μl,上下游引物各1 μl,模板DNA 4 μl,共50 μl。反应条件为94℃ 5 min;94℃ 60 s,56℃ 45 s,72℃ 60 s,32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。

5. 核酸序列分析:PCR产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,用CRISPR Finder对志

贺菌的CRISPR进行比对。

6. 统计学分析:用SPSS 17.0软件进行统计学检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 志贺菌 CRISPR 位点分布:志贺菌4个CRISPR位点的阳性率分别为33.69%(S1)、50.00%(S2)、82.69%(S3)和73.08%(S4);每个CRISPR位点有1~3个间隔序列,S1和S2仅在个别菌株有重复序列退化,在2株志贺菌发现了新的S3重复序列,S4的间隔序列呈现多态性,有4种不同模式(表2)。

2. 志贺菌中CRISPR的重复序列和间隔序列:志贺菌CRISPR按照重复序列和间隔序列分成11组,其中S1包括2种亚型,S2包括3种亚型,S3包括2种亚型,S4包括4种亚型(表3)。

3. 志贺菌CRISPR与菌株分离时间的关系:河南分离株以分离时间M(2004年)作为界点分组,2004年及以前分离株21株,为A组;2004年以后分离株20株,为B组。A组包括14种CRISPR亚型,共获得95个间隔序列;B组包括7种CRISPR亚型,共获得68个间隔序列。6株江西分离株的CRISPR亚型:0110型2株,0111型1株,0011型1株,1111型1株,0002型1株。5株北京分离株的CRISPR亚型:0110型2株,0010型1株,0112型1株,0114型1株。

2004年前后分离的河南志贺菌S1分布差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),2004年后分离的菌株中均未检出该位点;S2、S3和S4在两组中的分布差异无统计学意义(表4)。

### 讨 论

CRISPR偕同Cas蛋白发挥免疫抑制作用,已有研究显示,志贺菌中广泛存在Cas1和Cas2蛋白<sup>[8]</sup>,提示志贺菌中可能存在CRISPR系统。间隔序列与噬菌体、质粒等外源基因具有同源性<sup>[1]</sup>,记录了外源基因入侵细菌的过程,能反映细菌的进化史。本研究在志贺菌中发现了不同的CRISPR亚型,提示曾入侵的外源基因不同,发现志贺菌CRISPR各位点的间隔序列较少,以1~2个为主。相对于大肠埃希

表1 志贺菌CRISPR系统相关引物

引物	上游(5'~3')	下游(5'~3')	扩增产物(bp)	退火温度(℃)
S1	ATTAGTCGGCGTAAGAAAGA	GAACAGCGTGATTATGGATG	609	56
S2	TTGTYAGGTAGGTTGGTGAAG	GCGAAGAGAAAGAACGAGTA	722	56
S3	ATCTCTGCTAACACCAACTAC	CTACGACCCTGAATGGAATC	715	56
S4	AGCGACTAAGTGAATCTTG	CAATCTGGCTACTGGAAGTG	711	56

表 2 志贺菌中 CRISPR 位点的分子分布

编号	S1	S2	S3	S4	数量
0110	●	◁▷	◁▷	●	11
0011	●	●	◁▷	◁▷	7
0111	●	◁▷	◁▷	◁▷	6
1011	◁▷	●	◁▷	◁▷	5
1002	◁▷	●	●	◁▷	4
1111	◁▷	◁▷	◁▷	◁▷	3
0002	●	●	●	◁▷	3
0010	●	●	◁▷	●	2
0102	●	◁▷	●	◁▷	1
0222	●	◁▷	◁▷	◁▷	1
0122	●	◁▷	◁▷	◁▷	1
2113	◁▷	◁▷	◁▷	◁▷	1
2002	◁▷	●	●	◁▷	1
1012	◁▷	●	◁▷	◁▷	1
1013	◁▷	●	◁▷	◁▷	1
0112	●	◁▷	◁▷	◁▷	1
1010	◁▷	●	◁▷	●	1
0012	●	●	◁▷	◁▷	1
0114	●	◁▷	◁▷	◁▷	1

注: ●表示没有 CRISPR 位点, ◁▷代表重复序列, □代表间隔序列, 不同颜色代表不同的重复序列和间隔序列

表 3 志贺菌 CRISPR 的重复序列和间隔序列

CRISPR	重复序列		间隔序列	
	核苷酸序列	bp	核苷酸序列	bp
S1-1	ATGCTGGCGCATCTTATCCAGCCTACGGTT GCTCTCC <u>AGC</u>	40	CGGGTTGGATAAGGCGTTTATGCCGCATCCGACAGCTATCGCCGGAT GCG	50
S1-2	ATGCTGGCGCATCTTATCCAGCCTACGGTT GCTCTCC	37	<u>GGC</u> CGGGTTGGATAAGGCGTTGATGCCGCATCCGACAGCTATCGCCG GATGCG	53
S2-1	<u>GTTCA</u> CTGCCGTACAGGCAGCTT <u>AAAAAT</u>	29	1. CGACGGGGTGGCGGTA AAAACCTTTGCGAACGC 2. TCACAGGTAACATACTCCACCCGCCACCAT	31
S2-2	CTGCCGTACAGGCGGCTT <u>AAAAAT</u>	24	1. CGACGGGCTGGCGAAAAACCTTTGCGAACGC <u>GTTCA</u> 2. TCACAGGTAACATACTCCACCCGCCACCAT <u>GTTCA</u>	36
S2-3	<u>AGTTCA</u> CTGCCGTACAGGCAGCT	23	TAAAAATTGCCGGGATCCTGTCTGCCAATAATGACA	37
S3-1	TTTGTAGGCCTGATAAGACGCGCCAGCTC GCATCAGGC	39	TCCGGGTGCCGGATGCGAGCGTGAACGCCTTATCCGGCCTACGGCTCG GA	49
S3-2	GAACGCCTTATCCGGCTACGGCTCGGATT	30	GGAAGGCTGAAAAAACCCCCACCTCCATCCAGGTCCGGGAGGC GGATGCAACGC	57
S4-1	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAAC	27	1. TCTAAGTGATATCCATATCGCATCCAGTGCGCC 2. TCTTACTGCTTGGTATGCGGAATCACACCCTGAA	34
S4-2-1	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAAC <u>AC</u>	29	1. TTACTGCTTGGTATGCGGAATCACACCCTGAA 2. TGTACGCGGCGAGTTTATGCGACAGGTCATCC 3. GGGGCGATCAATTGAGCCGTA CTTTCTGAAA	32
S4-2-2	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAAC <u>AC</u>	29	1. TTACTGCTTGGTATGCGGAATCACACCCTGAA 2. CCTGACGCGCCGAGTATTATCTGTCTGGC 3. GGGTGCCTGTGGCTGCCAGTGCCGGAGAACGG	32
S4-2-3	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAAC <u>AC</u>	29	1. AAAACCAA CTTCTCCATAAATTCATAGCCG 2. GAGTCTATCAGCGACACTACCGCAATAGCGA 3. CTATAGCGCCACGTTCCGAGCGCTGCGAGCTG 4. GCATCCATGCCGACGCCTTTACGTGTGCGGGG 5. GCGCGAATTTGTGCGCATGGGGCGCATT TTTGG 6. ACGATGGCGATGCGTGAGAAAAGGGGGTGCATA 7. AGTTCGCTGAGTAGCCTTTTTTCTGTGCCTAA 8. GAGGTGGCAATACGCGTAGATCATTGGTCTGT 9. CAAAATATTACGAGCTTCGTCAGCCATGGAC	32/33

表 4 河南福氏志贺菌 CRISPR 在时间分布上的差异

菌株分离时间	S1		S2		S3		S4	
	有	无	有	无	有	无	有	无
2004 年及以前	6	7	5	8	9	4	9	4
2004 年后	0	15	8	7	13	2	10	5
$\chi^2/P$ 值	-/0.005 <sup>a</sup>		0.619/0.431		-/0.372 <sup>a</sup>		-/1.000 <sup>a</sup>	

注: <sup>a</sup> Fisher 确切检验

菌,志贺菌含有的间隔序列较少,可能与志贺菌的生存环境有关,志贺菌多寄生于人的结肠和直肠黏膜,环境中噬菌体较少<sup>[9]</sup>。4 个 CRISPR 位点在志贺菌中均被检出,但是不同位点的 CRISPR 阳性率不同,提示志贺菌不同的 CRISPR 位点其在获取间隔序列的能力上有差异,其在免疫防御的作用和地位也不同,深入研究间隔序列有助于更深刻地理解细菌的进化机制。

河南分离的福氏志贺菌 S1 在时间分布上有差异,2004 年以后分离的菌株中均未检出该位点,可能是与 S1 的间隔序列同源的外源基因对志贺菌的危险降低,细菌通过删除一些相对古老和无用的间隔序列,保证细菌基因组长度的稳定;此外,志贺菌多寄生于人的结肠和直肠黏膜,其生存环境中噬菌体较少,而抗生素对其的威胁更大,相关研究表明细菌的耐药程度和 CRISPR 位点呈负相关,同时 CRISPR 能限制耐药基因在细菌间的传播<sup>[10]</sup>。随着噬菌体的危害降低和抗生素威胁的增加,志贺菌通过丢失 CRISPR 位点以降低其对外源基因的抑制,从而有利于耐药基因通过水平转移在细菌间扩散。而 S2、S3 和 S4 没有差异,说明志贺菌中 CRISPR 各位点的稳定程度不同,有些 CRISPR 位点的间隔序列相对稳定,而有些进化较快。相对于分离时间较早的志贺菌,分离时间较晚菌株含有的间隔序列更少,提示志贺菌随着时间的推移会丢失一些间隔序列,与其生活的环境密切相关。由于本研究的菌株较少,有一定的局限性。

## 参 考 文 献

- [1] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats[J]. BMC Bioinform, 2007, 8(1): 172.  
 [2] Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of

sequence and secondary structures in CRISPR repeats [J]. Genome Biol, 2007, 8(4): R61.

- [3] Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. Science, 2008, 321 (5891): 960-964.  
 [4] Pupo GM, Lan R, Reeves PR. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(19): 10567-10572.  
 [5] Zhong HJ, Chang ZR, Zhang J. Analysis on bacillary dysentery surveillance data collected from the National Surveillance System in 2007 [J]. Chin J Epidemiol, 2010, 31(3): 304-307. (in Chinese)  
 钟豪杰, 常昭瑞, 张静. 中国 2007 年细菌性痢疾监测分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(3): 304-307.  
 [6] Mu YJ, Zhang BF, Zhao JY, et al. Analysis of distribution and drug resistance of *Shigella* in Henan province during 2010-2013 [J]. Chin J Health Lab Tec, 2014, 24(24): 3616-3618. (in Chinese)  
 穆玉姣, 张白帆, 赵嘉咏, 等. 河南省 2010-2013 年志贺菌群分布及其耐药分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(24): 3616-3618.  
 [7] Bian FN, Li WG, Li XP, et al. Application of GoPubMed in bibliometric analysis of literature on CRISPR [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(12): 1400-1403. (in Chinese)  
 边富宁, 李文革, 李先平, 等. 利用 GoPubMed 对 CRISPR 相关文献的计量学分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(12): 1400-1403.  
 [8] Xue ZR, Wang YF, Duan GC, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeat associated protein genes *cas1* and *cas2* in *Shigella* [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(5): 581-584. (in Chinese)  
 薛泽润, 王颖芳, 段广才, 等. 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 [J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(5): 581-584.  
 [9] Díez-Villaseñor C, Almendros C, García-Martínez J, et al. Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli* [J]. Microbiology, 2010, 156 (Pt 5): 1351-1361.  
 [10] Xue ZR, Wang YF, Duan GC. Progress on the studies of association between clustered regularly interspaced short palindromic repeat and antibiotic resistance [J]. Chin J Epidemiol, 2015, 36(3): 293-296. (in Chinese)  
 薛泽润, 王颖芳, 段广才. 成簇规律间隔短回文重复序列及其与细菌耐药的研究进展 [J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(3): 293-296.

(收稿日期: 2015-01-04)

(本文编辑: 万玉立)