

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

薛泽润 王颖芳 段广才

【关键词】 成簇规律间隔短回文重复序列; 耐药

Progress on the studies of association between clustered regularly interspaced short palindromic repeat and antibiotic resistance Xue Zerun¹, Wang Yingfang², Duan Guangcai³. 1 Xi'an Center for Disease Control and Prevention, Xi'an 710054, China; 2 Henan University of Science and Technology; 3 School of Public Health, Zhengzhou University
Corresponding author: Duan Guangcai, Email: gceduan@zhu.edu.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2013ZX10004-607).

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

成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)与细菌横向基因转移密切相关,能够识别和处理噬菌体、质粒等外源遗传物质,并防御基因水平转移^[1]。CRISPR发现于大肠埃希菌基因组中^[2],接着在其他原核生物中也发现了类似结构,2002年Jansen等^[3]将此类基因序列命名为CRISPR。CRISPR及其相关蛋白(Cas蛋白)一起发挥免疫抑制作用,近年来CRISPR/Cas系统的结构特征及其功能和作用机制引起了人们的高度重视。

抗生素有效地控制了细菌感染,但是随着抗生素滥用和细菌适应,细菌耐药日益严重,已成为严重的公共卫生问题。2014年4月30日WHO发布《Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014》,报告收集了全球细菌耐药情况,强调目前细菌耐药已经对公共卫生构成重大威胁,不再是一种预测。2013年美国疾病预防控制中心(CDC)发布了《Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013》。我国耐药现状同样不容乐观,2013年的细菌耐药监测中发现,耐药性持续增长,多重耐药和广泛耐药菌株在某些地区已经严重威胁大众健康^[4]。

除了制定公共卫生政策和规范合理用药,探讨细菌耐药机制能更好地揭示耐药形成原因,从根本上解决耐药。CRISPR系统的结构和功能与细菌耐药密切相关,深入分析

两者的关系有助于更好地理解细菌耐药机制。

1. CRISPR的结构特点:CRISPR由重复、间隔和前导序列组成。重复序列由20~50 bp组成,具有回文结构。同一个物种内相同CRISPR位点的重复序列相对保守,不同细菌具有相似的重复序列,推测重复序列能在不同微生物间转移^[5]。间隔序列与重复序列大小相近,将重复序列隔开。研究发现,有的间隔序列与噬菌体、质粒等外源基因具有同源性^[1],间隔序列处在动态变化中,呈现多态性,能反映曾经入侵细菌的噬菌体、质粒等外源遗传物质,甚至包含微生物生态学和地理学信息^[6]。重复序列和间隔序列组成CRISPR的基序,CRISPR以基序为单位转录成RNA发挥作用^[7]。前导序列位于CRISPR的5'端,与重复序列相连,富含AT碱基,长约300~500 bp,在同一物种内相对保守,新的间隔序列一般加在前导序列与第一个重复序列之间^[1]。Cas蛋白基因位于CRISPR序列附近,是一类较大的多态性家族,目前发现有cas1~cas10等多种类型^[8],其中cas1和cas2基因存在于每个CRISPR位点中,被认为是CRISPR系统鉴定的分子标记^[9]。研究发现,Cas蛋白在CRISPR介导的免疫干扰中起到重要作用,它可能具有核糖核酸酶、解旋酶、聚合酶等功能,与DNA重组和修复、插入序列获得、重复序列维持等有关^[10-11]。Makarova等^[12]发现在不同菌种间存在着相似的cas基因,预测cas基因能发生水平转移。根据Cas蛋白可以将CRISPR分为I、II、III 3种类型,其各自的标志Cas蛋白分别是Cas3^[13]、Cas9^[14]和Cas10^[15]。

2. CRISPR的作用机制:CRISPR具有免疫记忆功能,能抵抗噬菌体、质粒等外源遗传物质入侵^[16]。现有研究推测CRISPR的作用机制分为3个阶段:获得新的间隔序列、表达crRNA、免疫干扰^[17]。当噬菌体、质粒首次侵袭细菌时,CRISPR有选择地截取和保留前间隔序列(proto-spacer)^[18],并将其整合到CRISPR形成新的间隔序列,当噬菌体、质粒再次侵袭时,间隔序列和部分重复序列被转录成crRNA^[19],与trans-activating crRNA(tracrRNA)、Cas蛋白结合在一起形成复合体,识别外源DNA并进行切割,破坏入侵的噬菌体和质粒。

3. CRISPR/Cas9基因编辑技术:基于CRISPR系统的功能和作用机制,CRISPR/Cas9已经发展为一种全新的人工核酸内切酶,可以进行基因编辑。相对于一、二代人工核酸内切酶,CRISPR/Cas9价格更低,制作更简便,效果更显著,且能对任何包含PAM(proto-spacer adjacent motifs)的NGG位点进行编辑^[20]。Jinek等^[21]最先利用CRISPR/Cas9作用外源目

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.03.022

基金项目:国家科技重大专项(2013ZX10004-607)

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(段广才)

通信作者:段广才, Email: gceduan@zhu.edu.cn

标DNA,为后来CRISPR/Cas9介导的基因编辑提供了理论基础。2013年初,Cong等^[22]第一次报道了CRISPR/Cas9基因编辑技术在人293T细胞的应用,目前改造的CRISPR/Cas9基因编辑技术已经成功应用于人类、动物、寄生虫、细菌和植物等多种细胞研究。

4. CRISPR与细菌耐药的关系:细菌耐药形成的机制主要包括基因水平和蛋白水平的改变^[23]。在基因水平,细菌可以通过自身染色体突变、质粒转移、整合子介导等方式增强对抗生素的抵抗。染色体突变是细菌在高耐药环境下进行调整,具有种属特异性,可代代相传;耐药质粒可以在不同细菌之间转移,使细菌快速获得耐药基因;整合子能捕获外源耐药基因,通过转座子和结合质粒传播耐药基因。在蛋白质水平,细菌产生水解酶、修饰酶、灭活酶和钝化酶,改变抗生素靶位、调节主动外排系统、降低抗菌药物渗透性、产生拮抗剂等方式增强细菌耐药性。

CRISPR对于了解细菌耐药谱型尤其是细菌横向基因转移情况具有重要意义。有趣的是缺少CRISPR的菌株更易获得耐药基因,从而有利于其在临床环境中生存,但是缺少CRISPR使其更易受到噬菌体攻击。

(1) Cas蛋白与耐药: Cas蛋白是CRISPR发挥作用的关键所在,CRISPR只有转录出RNA与Cas蛋白结合才能发挥作用; Cas蛋白具有核糖核酸酶、解旋酶、聚合酶的功能,与DNA重组和修复、插入序列获得、重复序列维持等有关^[10-11]。

宋春花等^[24]第一次提出了Cas蛋白和细菌耐药存在联系,通过敏感志贺菌和耐多药大肠埃希菌结合转移实验,将敏感志贺菌诱导成耐多药株,敏感株与耐多药株双向电泳图谱分析发现7个差异蛋白,其中Cas蛋白为耐多药株新出现的蛋白,推测其在耐多药机制中起调节作用,能调控耐药基因的表达,从而导致细菌出现耐多药。其课题组随后对196株志贺菌的*cas1*和*cas2*基因进行PCR扩增,均出现目的条带;测序显示,序列有一定程度的差异,并且其差异和志贺菌的耐药程度存在关联,志贺菌的*cas1*(b)基因突变菌株与未突变株相比,耐药性增强,提示*cas1*(b)基因突变可能是引起耐药程度不同的原因之一^[25]。Cas1蛋白作为CRISPR系统的通用标记蛋白,具有DNA特异性核酸内切酶的功能,Cas2蛋白作为第二标记蛋白,是金属离子依赖性的核酸内切酶,Cas1和Cas2对外源遗传物质进行加工,形成间隔序列并整合到CRISPR位点,与耐药基因在细菌间的转移密切相关。

最近Sampson等^[26]关于弗朗西丝菌的研究显示,Cas9蛋白能增强细菌的耐药性,通过调控脂蛋白以保护细菌包膜的通透性和完整性,减少抗生素危害。当编码Cas9蛋白的基因发生突变时,弗朗西丝菌的耐药性降低,对多粘菌素B等抗生素的敏感性增强,不利于细菌存活。Cas9蛋白通过调节细菌包膜,增强细菌耐药和毒力水平,逃避宿主的非特异免疫。Cas9是CRISPR人工核酸内切酶的关键所在,破坏外源遗传物质,保护细菌不受噬菌体侵害,Cas9蛋白能增强细菌耐药性也验证了其在细菌中的重要作用。

目前关于Cas蛋白和细菌耐药的研究均从单个Cas蛋白

出发,未考虑整个CRISPR系统,故进一步的研究应将重点放在整个CRISPR系统上。

(2) CRISPR的生物学功能与耐药:上述研究是基于Cas蛋白对耐药的调控,提出Cas蛋白能帮助细菌抵御抗生素破坏,有利于细菌耐药形成;但另外一些基于CRISPR抵御基因的生物学功能研究却得出相反的结论。

细菌要在外环境中生存就要不断进化,从基因水平上看,细菌从外环境中获得新基因从而出现新表型,以应对环境压力。耐药基因水平转移是细菌增强耐药的主要方式之一,例如质粒、转座子、整合子和基因岛等可移动遗传因子介导的在细菌种内和种间通过转化、转导、接合等方式获得和传播耐药性的方式^[27]。但是仅有少数基因能通过水平转移给细菌提供优势基因,因此细菌也进化了一系列抑制基因水平转移的机制,从而让细菌有选择地进行基因水平转移,CRISPR系统能抑制基因水平转移,避免有害基因入侵。

一项关于粪肠球菌的研究中,在48株粪肠球菌中,16株拥有完整CRISPR位点的粪肠球菌缺少耐药基因;而22株耐多药粪肠球菌中均不含CRISPR位点^[28]。Burley和Sedgley^[29]收集了分离自牙髓、口腔的获得性耐药粪肠球菌,分析其CRISPR位点和耐药性的关系,结果显示,耐药性高的粪肠球菌缺少CRISPR位点,此外他们还发现CRISPR和细菌毒力存在一定关系。

Marraffini和Sontheimer^[16]在金黄色葡萄球菌CRISPR的研究中发现,CRISPR能限制基因水平转移并能阻止耐药基因在致病菌之间传播。但是另一项大肠埃希菌的研究并未发现CRISPR与细菌耐药有关,同时CRISPR并不能阻止耐药基因在大肠埃希菌中的转移^[30]。

国内一项关于粪肠球菌耐药性与CRISPR关系的研究中也发现,兽医临床分离株的粪肠球菌CRISPR位点与耐药表型之间存在负相关,但与耐药基因并不相关^[31]。

CRISPR最主要的功能是在微生物识别和处理噬菌体、质粒等外源遗传物质的作用,有效地防御基因水平转移^[1]。但耐药基因对细菌自身来说是有利基因,现有研究还不能确认CRISPR与耐药的关系。

(3) CRISPR间隔序列与耐药:间隔序列是CRISPR的核心,是区分不同CRISPR的分子靶标,间隔序列与噬菌体、质粒等外源基因具有同源性,当含有与间隔序列相同的外源遗传物质入侵细菌时,可被细菌识别,启动防御体系使之沉默^[1,18,32]。

在肺炎链球菌之中包含特定间隔序列的CRISPR位点能有效阻止毒力基因和耐药基因的转移^[33]。此外,基于间隔序列多态性对沙门菌进行分型已初步完成,有研究表明,不同CRISPR亚型的沙门菌耐药性不同,相同类型CRISPR亚型沙门菌的耐药谱一致^[34]。

Guo等^[35]已经检测并分析了志贺菌CRISPR的间隔序列,目前正在进一步深入研究,分析与耐药相关的间隔序列,同时还探索了间隔序列和细菌毒力的关系。

(4) 高耐药环境对CRISPR的影响:“物竞天择,适者生

存”,达尔文的“进化论”表明了环境对物种的重要作用,自1928年首次发现青霉素,感染性疾病得到了有效治疗与控制。但是近年来由于全世界广泛使用抗生素,在抗生素压力下,细菌的CRISPR也会相应改变,有研究显示,在高毒力和高抗生素的环境下肺炎链球菌会丢失CRISPR位点,同时丢失CRISPR位点的菌株更容易在抗生素压力下生存,耐药基因对于细菌来说是优势基因,在抗生素的压力下,细菌通过丢失CRISPR以减少其抵抗外源基因的作用,使耐药基因能转移至细菌内,有利于细菌存活^[33]。

(5)CRISPR人工核酸内切酶与耐药:目前,基于改造的CRISPR/Cas9基因编辑技术已经成功应用在人类多种细胞、动物、寄生虫、细菌和植物。在对抗耐药基因方面,Citorik等^[36]构建了包含CRISPR靶向序列的 β -内酰胺酶1(NDM-1,帮助细菌对抗 β -内酰胺类抗生素)和超广谱 β -内酰胺酶(SHV-18,与细菌多耐药相关)质粒,同时构建包含CRISPR系统的质粒和噬菌体载体,将其转入细菌。这一改造使得CRISPR能破坏相关耐药基因,使耐药菌重新对抗生素敏感,从而杀死细菌。目前的抗生素一般是广谱药,除了致病菌,对其他有益菌造成一定的损害,并加剧细菌耐药。CRISPR核酸内切酶针对特定的致病菌,能靶向特定的耐药基因,限制有害基因在微生物间的转移和流行。

(6)CRISPR介导的噬菌体治疗细菌感染:噬菌体治疗是很有前景的抗生素治疗替代方案,早在1919人们就开始尝试研究噬菌体治疗细菌感染,近年来随着抗生素的广泛使用,耐药情况越来越严重,科学家重新重视了对噬菌体治疗细菌感染的研究。噬菌体在治疗细菌感染有许多独特的优势,包括“动态”治疗、特异性强、更新较快、副作用小、无残留、周期短、成本低等;但是噬菌体治疗也存在一些劣势,例如给药途径、抗原性、内毒素、体内存活时间、剂量与效果等方面的问题^[37]。虽然CRISPR能抵抗噬菌体感染,但是噬菌体可以通过基因突变进行逃避^[38-39];此外基因组重组在噬菌体中广泛存在,这也会干扰CRISPR的防御功能;噬菌体还可以通过编码抑制物^[40],从而抑制crRNA或Cas蛋白的功能。随着CRISPR作用机制的阐明,噬菌体治疗细菌感染的劣势有可能逐步解决。

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 (Pt 3): 653-663.
- [2] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [3] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [4] Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. CHINET 2013 surveillance of bacterial resistance in China [J]. *Chin J Infect Chemother*, 2014, 14(5): 365-374. (in Chinese)
胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013年中国CHINET细菌耐药性监测 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2014, 14(5): 365-374.
- [5] Kunin V, Sorek R, Hugenoltz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(4): R61.
- [6] Kunin V, He S, Warnecke F, et al. A bacterial metapopulation adapts locally to phage predation despite global dispersal [J]. *Genome Res*, 2008, 18(2): 293-297.
- [7] Lillestol RK, Redder P, Garrett RA, et al. A putative viral defence mechanism in archaeal cells [J]. *Archaea*, 2006, 2(1): 59-72.
- [8] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-477.
- [9] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 475-493.
- [10] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes [J]. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(6): e60.
- [11] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action [J]. *Biol Direct*, 2006, 1: 7.
- [12] Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, et al. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(2): 482-496.
- [13] Haurwitz RE, Jinek M, Wiedenheft B, et al. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease [J]. *Science*, 2010, 329(5997): 1355-1358.
- [14] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): e2579-2586.
- [15] Anantharaman V, Iyer LM, Aravind L. Presence of a classical RRM-fold palm domain in Thg 1-type 3' - 5' nucleic acid polymerases and the origin of the GGDEF and CRISPR polymerase domains [J]. *Biol Direct*, 2010, 5: 43.
- [16] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA [J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1843-1845.
- [17] Masepohl B, Gortitz K, Bohme H. Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1307(1): 26-30.
- [18] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR

- defence system[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 3): 733-740.
- [19] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964.
- [20] Mussolino C, Cathomen T. RNA guides genome engineering[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(3): 208-209.
- [21] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [22] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [23] Li Ke, Zhang DC. The mechanism and removal of bacterial drug resistance: research progress[J]. *Chin J Microecol*, 2014, 26(8): 984-986, 990. (in Chinese)
李科, 张德纯. 细菌耐药机制及耐药性消除的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2014, 26(8): 984-986, 990.
- [24] 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药多药株蛋白组学分析[J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(1): 42-45.
- [25] 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.
- [26] Sampson TR, Napier BA, Schroeder MR, et al. A CRISPR-Cas system enhances envelope integrity mediating antibiotic resistance and inflammasome evasion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(30): 11163-11168.
- [27] 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.
- [28] Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas[J]. *MBio*, 2010, 1(4): e00227-00310.
- [29] 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.
- [30] Touchon M, Charpentier S, Pognard D, et al. Antibiotic resistance plasmids spread among natural isolates of *Escherichia coli* in spite of CRISPR elements[J]. *Microbiology*, 2012, 158(Pt 12): 2997-3004.
- [31] Jiang W. Relationship exploration of mobile element mediated drug-resistance and CRISPR loci [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012. (in Chinese)
蒋伟. 粪肠球菌可移动元件介导的耐药性与CRISPR的关系探索[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [32] Marraffini LA, Sontheimer EJ. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity [J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 568-571.
- [33] 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.
- [34] Dimarzio M, Shariat N, Kariyawasam S, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium* associates with CRISPR sequence type [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(9): 4282-4289.
- [35] Guo X, Wang Y, Duan GC, et al. Detection and Analysis of CRISPRs of *Shigella*[J]. *Curr Microbiol*, 2014, 70(1): 85-90.
- [36] Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(11): 1141-1145.
- [37] Zhao C, Wang L. Bacteriophage therapy, old idea, new stage[J]. *Microbiol Chin*, 2011, 38(11): 1698-1704. (in Chinese)
赵晨, 王辂. 噬菌体治疗——旧概念, 新阶段[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(11): 1698-1704.
- [38] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.
- [39] 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.
- [40] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.

(收稿日期: 2014-09-25)

(本文编辑: 万玉立)