

综述

CRISPR-Cas技术在抗菌剂中的开发、机遇和挑战

杨慧君¹, 韩燕玲¹, 匡明杰², 刘飞^{2*}(¹济南市疾病预防控制中心, 济南 250021; ²山东省药学科学院, 济南 250098)

摘要: 抗菌剂耐药是临床一线面临的重要问题, 目前尚无有效控制的治疗方式。临床中每年因抗菌剂耐药造成的死亡逐年增加。尽管新型抗菌剂不断更新换代, 然而近年来抗菌剂针对耐药菌的疗效显著下降, 大大增加了医疗负担, 亟需开发靶向性强、精确度高、价格合适的新型抗菌剂。CRISPR-Cas技术作为基因编辑的新星, 为新型抗菌剂的开发提供了技术保障, CRISPR-Cas技术具有高度可编辑性, 可针对不同耐药菌的不同作用机制设计特异性、个性化的基因探针, 实现耐药菌的高精确度的靶向杀伤, 而不影响体内正常菌群, 从而实现靶向杀菌的效果。本文就CRISPR-Cas技术在新型抗菌剂中的作用和机制进行综述, 为新型抗菌剂的研发提供参考和理论依据。

关键词: 抗菌剂; CRISPR; 细菌耐药; 基因编辑

CRISPR-Cas technology in antimicrobials: designs, opportunities and challenges

YANG Huijun¹, HAN Yanling¹, KUANG Mingjie², LIU Fei^{2*}(¹Ji'nan Center for Disease Control and Prevention, Ji'nan 250021, China;²Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Ji'nan 250098, China)

Abstract: Antimicrobial resistance (AMR) is an important crisis in the frontline of clinical practice. Currently, no effective treatment can control the AMR. The number of deaths caused by AMR in clinical practice is increasing year by year. Although new antibacterial agents are constantly updated, the efficacy of antibacterial agents against drug-resistant bacteria has declined significantly in recent years, greatly increasing the medical burden. Therefore, there is an urgent need to develop new antibacterial agents with precise targeting, high accuracy, and affordable prices. As a rising star in gene editing, CRISPR-Cas provides technical support for the development of new antibacterial agents. The CRISPR-Cas system is highly editable and can design specific and personalized gene probes for different mechanisms of action in drug-resistant bacteria. High-precision targeted killing of drug-resistant bacteria without affecting the normal flora in the body is the main purpose to achieve targeted sterilization effects. This review mainly focused on the role and mechanism of CRISPR technology in new antibacterial agents, providing reference and theoretical basis for the development of new antibacterial agents.

Key Words: antimicrobials; CRISPR; bacterial resistance; gene editing

收稿日期: 2024-04-30

基金项目: 山东省重点研发计划科技示范工程项目(2022SFGC0105); 山东省自然科学基金项目(ZR2021MH219)

第一作者: E-mail: yhuijun507@163.com

*通信作者: E-mail: liufei@sdaps.cn

抗菌剂耐药(antimicrobial resistance, AMR)是现代医学的重要议题^[1]。粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和肠杆菌等是最易导致AMR和医院获得性感染的细菌种属^[2]。然而由于广谱抗菌剂的滥用引起的AMR加大了院内感染治疗的难度。AMR的感染途径分为内源性感染、获得性感染和适应性感染。耐药菌可以通过降低细胞间抗菌剂的浓度达到耐药, 另外也有耐药菌可以在抗菌剂的作用下通过改变基因表达来实现耐药^[3]。质粒、转座子等可移动基因元件可以有效募集耐药相关基因, 从而实现耐药菌在易感人群中的快速传播导致获得性耐药^[4]。因此, 从生物医学的角度研发具有治疗潜力的新型抗菌剂来预防、控制和治疗AMR受到广泛关注。

然而针对AMR的新型抗菌剂的研发也面临着重重困难。首先, 长期抗菌剂的应用对人体正常的菌群环境造成巨大影响, 在杀死致病菌的同时正常菌群也会受到破坏, 从而破坏人体内环境稳态; 其次, 新型抗菌剂的研发和应用需要前期大量的经济投入, 然而其使用场景较少; 另外, AMR往往是多重耐药菌的感染, 很难通过单一的抗菌剂治疗。因此, 寻找性价比高、治疗效果好、靶向性强的新型抗菌剂是目前亟需解决的问题。

1 CRISPR-Cas技术的出现及背景

CRISPR-Cas技术是原核生物为适应外界环境而产生的一种基因组防御机制, 其通过识别并靶向消灭外源病毒、噬菌体或其他可移动基因元件相关的核酸序列来抵御外来基因的入侵^[5]。

CRISPR-Cas技术的防御机制通常由以下部分组成。(1)适应阶段: 宿主捕获入侵的核酸片段并将其整合到CRISPR序列中。(2) crRNAs(CRISPR RNAs)的加工和成熟: 当相同的核酸片段再次入侵宿主, CRISPR序列被激活并产生大量前体crRNA(pre-crRNA), pre-crRNA被RNA酶切割形成成熟的crRNA。(3)干预阶段: 成熟的crRNA引导并募集Cas蛋白形成复合体并介导靶向切割入侵的核酸^[6]。CRISPR-Cas技术分为两大类、六种亚型, 其中一类(包括Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ型)结构更复杂, 含有多

个Cas蛋白参与外源DNA的识别和切割过程; 而二类(包括Ⅱ、Ⅴ和Ⅵ型)结构更简单, 由单个多结构域酶进行识别和切割^[7]。随着技术的进步, 研究发现, Ⅱ型CRISPR-Cas技术可以进行位点特异性的切割噬菌体DNA, 其切割过程依赖于Cas9蛋白, 且反式激活crRNA(tracrRNA)是crRNA成熟的必要条件^[8]。有研究表明, Cas9是一种DNA内切酶且其特异性由crRNA和tracrRNA组成的双RNA引导结构决定^[9]。因此, 只需依据需要切割的核酸序列设计特定的向导RNA即可实现有效的基因编辑。这种只需要设计特异性的sgRNA靶向Cas9蛋白即可实现基因编辑的手段大大丰富了基因编辑的可操作性, Cas9也因此成为最受欢迎的基因编辑工具。

CRISPR-Cas具有高度的可编辑性, 可以切割位点特异性双链DNA, 使其能够快速适应各种基因编辑过程^[10]。源自化脓性链球菌的典型Cas9蛋白是第一个被用于基因编辑的Cas核酸酶, 由于其具有高度特异性和酶切活性, 是目前使用最广泛的基因编辑工具^[11]。Cas9与crRNA-tracrRNA复合物或sgRNA结合形成具有识别和切割活性的核酸酶, 通过修饰crRNA的5'端20 nt的引导序列, 能够与DNA靶点进行标准碱基配对。而靶向结合还依赖于位于DNA非靶标链上的PAM序列, PAM位于靶标位点的下游, PAM被识别后导致靶DNA的局部解旋, 并引导gRNA与DNA的目标链以5'-3'方向的方式从目标位点的PAM近端开始碱基配对, 从而引起Cas9的构象变化并激活核酸酶结构域。Cas9随后在PAM序列上游3个核苷酸处切割双链DNA, 将Cas9核酸酶引导至目的基因的切割位点, 从而实现靶向、精确和特异性的基因编辑。

2 CRISPR-Cas技术的分类

随着CRISPR-Cas技术的发展, 一些其他的基因编辑工具也陆续被开发并在基因编辑领域大放异彩。Cas12a是一类由RNA导向的Ⅴ型核酸内切酶, 是继Cas9之后被发现的同样具有强大基因编辑功能的工具酶。与Cas9不同的是, Cas12a不需要通过tracrRNA发挥作用, 而是通过识别crRNA中特定的TTTV(V=G、C、A) PAM模序发挥作用^[12]。Cas12a产生的交错末端较Cas9切割产生的钝端在整

合特定DNA序列至特异靶点中更具优势。更重要的是, Cas12a可以分离crRNA的序列来产生其自身需要的crRNA, 这种能力使其在复杂的基因编辑过程中更具优势^[13]。此外, 有研究发现, 由于Cas12a具有横向切割活性, 不论其靶向的目标是什么, 均可以任意切割周围的单链DNA, Li等^[14]依据该特性开发了一种HOLMES工具用于快速检测感染。Cas12a已经被证明是一种高效的核酸内切酶, 可以有效地与Cas9的功能互补^[15]。

Cas13是一种基于RNA编辑的新型基因编辑技术, 是目前已知的特定靶向RNA的CRISPR基因编辑技术^[16]。作为一种RNA引导的RNA核酸内切酶, Cas13由两个HEPN结构域组成, 它们共同形成RNA核酸内切酶的活性中心, 负责与靶RNA结合后催化RNA裂解^[17]。目前, Cas13的亚型包括Cas13a^[18,19]、Cas13b^[20]、Cas13c^[21]、Cas13d^[1]、Cas13X^[22]和Cas13Y^[22]。Cas13在体外有一个奇异的特性, 一旦与靶RNA结合被激活, 它不仅能通过其HEPN结构域特异性切割靶RNA, 还可以无差别地切割周围存在的RNA, 这种效应被称为反式切割, 且已经被用来开发快速、高灵敏度的核酸检测方法, 2019年冠状病毒病大流行进一步推动了这种方法的发展^[23-28]。相对于传统的RNAi技术, Cas13介导的RNA降解和基因敲除具有更高的敲除效率和特异性, 从而实现了在各种生理和病理情况下均可应用Cas13干预的潜在治疗方法^[29,30]。

3 CRISPR-Cas技术在耐药菌基因编辑中的作用机制

明确耐药菌的发病机制对开发新型抗菌剂至关重要。有研究证实, 细菌耐受抗生素的杀伤作用主要有以下几种方式: 使用外排泵从细胞中消耗抗生素; 使用特定的酶来降解或使抗生素失活; 修饰细胞功能来抑制细胞与抗生素的互作^[31]。有研究报道, 遗传物质变异可能是细菌耐药的重要机制, 并以铜绿假单胞菌为例提出了基于其遗传信息设计CRISPR抗菌剂的可行性和临床治疗潜能^[32]。通常来说, 质粒通过独有募集耐药基因的方式启动复制过程。这种方式可以有效地在宿主基因组DNA的复制过程中插入耐药基因片段, 从而实现细菌株的广泛耐药; 而噬菌体在细菌感染

生命周期中可以通过直接感染细菌病转移含有耐药基因的遗传信息。研究表明, 非人类相关的病毒基因组是抗生素耐药基因的巨大储存库^[33]。另外, 转座子可以通过转座酶或重组酶整合并移动到细胞内不同的基因组位点^[34]。以上研究表明, 耐药基因具有变异率高、传播快速、宿主易感性的特点。因此, 使用CRISPR-Cas技术靶向识别并切割细菌DNA或抑制关键耐药基因的表达是攻克细菌耐药的重要手段。

目前, 文献报道了CRISPR-Cas技术在耐药菌基因编辑中的三种主要机制, 包括双链染色体切割、全长RNA降解和靶向抑制目标细菌中耐药基因表达^[35,36]。Gomaa等^[37]尝试使用CRISPR-Cas9核酸酶技术通过靶向整个基因组的不同位置来诱导特异性染色体DNA双链断裂的方式有效杀死细菌。值得注意的是, 诱导质粒DNA断裂不会导致宿主细菌死亡, 但可以特异地消除目标菌群的耐药性。另外, 也有学者提出使用CRISPR-Cas13技术靶向细菌的RNA来调控细菌耐药的问题, 由于具有ssRNA反式切割活性, CRISPR-Cas13可以在靶向细菌耐药RNA片段的同时降解周围的非靶向RNA来达到抑制细菌生长的效果^[38]。另外, CRISPR-Cas抗菌剂相关的研究也表明, 相较于传统的RNAi技术, 优化的CRISPR干扰技术的抗菌效果更加优异、高效^[39]。CRISPR干扰技术最初来源于一种催化活性不高的Cas9蛋白, 该蛋白质的作用机制是通过转录阻断的方式抑制RNA的转录过程。该方法可以用于抑制抗菌剂耐药基因和致病性相关基因的表达^[40]。这些有关抗菌剂耐药的研究大多数倾向于CRISPR-Cas技术在耐药菌的抗菌剂开发中更具研究与应用价值。有研究表明, 基于CRISPR-Cas技术可以通过两种途径实现抗菌效果: 诱导细菌死亡或开发靶向抗菌素耐药基因的质粒^[41]。CRISPR-Cas技术的抗菌结局由目标DNA的位置决定, 如果CRISPR-Cas技术靶向切割染色质DNA序列可导致目标细菌死亡, 则靶向质粒结合序列会导致质粒从宿主细胞中消除^[42,43]。因此, 研究CRISPR-Cas技术抗菌剂的传递机制是至关重要的, 因为CRISPR-Cas技术能够干预目标人群中的几乎所有病原微生物。

4 基于CRISPR-Cas技术新型抗菌剂的开发与应用

CRISPR-Cas技术新型抗菌剂的开发依赖于载体的介导。具有良好生物学相容性和低免疫原性的载体是构建CRISPR-Cas技术新型抗菌剂的基础。噬菌体、生物纳米材料和质粒是针对耐药菌设计的三种主流CRISPR-Cas载体。

4.1 噬菌体递送

噬菌体是目前最有效的药物递送手段之一,通过基因修饰的手段整合CRISPR靶向的耐药菌基因到噬菌体基因组中,使用噬菌体入侵细菌并将整合基因组注入细菌中,这是噬菌体递送遗传物质的主要方式^[44]。有研究显示,基于CRISPR技术的工程化噬菌体可以有效降低细菌耐药,因此,设计搭载靶向耐药菌的CRISPR抗菌剂工程化噬菌体是治疗AMR的重要研究方向之一^[45]。另外,随着研究的不断深入,噬菌体模型也随之不断改进。有研究证实,fSABov等噬菌体载体能够更好地递送靶向耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant staphylococcus aureus, MRSA)感染的CRISPR-Cas9技术来治疗MRSA^[46]。这种噬菌体载体的成功优化依赖于从噬菌体基因组中去除主要毒力基因,从而显著降低噬菌体对外周血单核细胞的细胞毒性。此外,该研究还进一步证实了可以通过增强噬菌体尾部纤维蛋白有效扩大fSABov载体的宿主范围。此外,一些研究还改进了细菌遗传移动元件的适用性,通过改善两种CRISPR-Cas9抗菌技术(CRISPR-Cas9杀菌技术和CRISPR-dCas9毒力阻断技术)来替换链球菌致病性相关基因,使其衣壳形态发生改变并可以提供额外约30 kb的包装空间,从而可以有效插入具有更强抗菌效应的CRISPR-Cas9片段,来进一步消除细菌可能因变异而引起的耐药性^[47]。然而,噬菌体递送也存在一些问题:首先,噬菌体递送只能入侵相近的宿主细菌;其次,递送CRISPR-Cas较适用于外部和表面细菌感染。因此,如何改进噬菌体载体使其应用范围更广、更安全,具有重要研究意义。

4.2 生物纳米材料递送

生物材料的快速发展为CRISPR-Cas技术新型抗菌剂的开发提供了新的思路。生物纳米材料具

有毒性低、免疫原性低、降解速度可控、可修饰等优点,可依据需求进一步改性使其更加符合临床和实验室相关应用。目前,有关递送CRISPR-Cas的生物纳米材料主要包括:纳米颗粒、脂质体、水凝胶、纳米乳剂、生物纤维素等,其中针对纳米颗粒的相关研究较为深入^[48]。一般来说,基于纳米颗粒制备的抗菌剂通过以下两方面发挥抗菌作用:改变细菌膜电位和完整性或通过纳米颗粒催化产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导细菌死亡^[49]。纳米颗粒体积小而且具有较大的面积/体积比。这一方面增强了其与胞内物质的反应性,使其可以高效地消灭细菌;另一方面,纳米级的尺寸能够深入细菌内部各个细胞器并破坏其成分,从而有助于提高抗菌活性^[50]。另外,纳米颗粒的优势在于可以通过修饰颗粒表面识别分子来改进纳米颗粒的性能,如通过插入相关耐药菌的识别蛋白使它们能够特异性地识别和结合细菌膜上的受体,从而可以设计针对不同种类耐药菌具有高杀伤性 or 高选择性的纳米颗粒,避免多重耐药的产生^[51]。纳米颗粒在免疫原性、表面功能化、生物相容性和安全性方面优于病毒载体。有研究表明,通过纳米颗粒递送pH敏感性的sgRNA-I/L@ZS可以有效靶向杀灭鲍曼不动杆菌,且该纳米递送系统具有良好的生物相容性和不良反应低的优点,具有一定的临床应用前景^[52]。纳米颗粒不仅可以用来递送抗菌药物,也可以用于递送蛋白质、DNA、RNA等遗传物质^[53]。由于内环境中血清蛋白吸附、吞噬细胞的吞噬和摄取、酶类降解等过程的存在,遗传信息的递送在体内十分受限,限制了基因疗法在体内治疗中的应用。而纳米颗粒等递送系统不仅可以为遗传信息的递送提供保护,经过改性的纳米颗粒还具有更强靶向性、穿透血脑屏障、降解时间可控等优点,在递送CRISPR-Cas抗菌剂中发挥重要作用^[54,55]。尽管CRISPR-Cas技术具有靶向敲除耐药基因的潜力,然而由于体内免疫系统的存在十分容易被免疫系统清除或被生物活性酶类降解。目前针对该缺点已经开发了许多基于纳米颗粒介导的CRISPR-Cas9抗菌剂递送技术,其中包括Cas蛋白和sgRNA编码质粒、Cas9 mRNA和sgRNA,以及Cas9蛋白和sgRNA复合物^[56]。纳米

颗粒的修饰和改性对其靶向和释放能力十分重要。有研究报道, 可以通过对纳米颗粒进行化学修饰, 以添加稳定Cas9和gRNA的官能团, 既能保护其不被体内酶类降解并具有高靶向特异性^[57]。此外, 纳米颗粒表面还可以与细胞穿透肽(增强细胞摄取)或核定位信号肽(用于内部递送)偶联。支化聚乙烯亚胺已被用于与spCas9形成纳米复合物, 并促进纳米复合物与耐药菌细胞壁之间的传递和结合^[58]。有研究建立了基于脂质纳米颗粒的CRISPR-Cas抗菌剂递送纳米技术, 通过递送合适的敲除基因并且具有碱基替换性能, 一方面防止细胞内酶切割使其活性丧失, 另一方面大大降低了细胞毒性, 在预防HBV感染中发挥了重要作用^[59]。另外, 基于金属材料的纳米颗粒也被开发用于递送核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物。研究报道, 聚合Cas9和gRNA纳米复合物(Cri-纳米复合物)通过改变*mecA*基因可以有效抑制耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的生长^[58]。尽管纳米颗粒在递送CRISPR-Cas抗菌剂中发挥重要作用, 然而如何提升其靶向性、降低细胞毒性反应和免疫原性仍然面临困难, 需要更多的研究进行探索。

4.3 质粒递送

质粒序列是稳定且高度可编辑的, 目前有较多分子生物学基因编辑工具可以将质粒构造为相对简单有效的细菌基因编辑工具。可以有效递送CRISPR-Cas技术的质粒包括共轭质粒、信息素响应质粒和靶向抗菌质粒, 尽管质粒的应用较为广泛, 然而质粒递送仍然存在递送效率较低的问题。共轭质粒具有环状的基因序列, 能够通过结合的过程从一个细菌转移到另一个细菌中^[60]。共轭质粒包含其自身转移所需的遗传信息, 也可以将非共轭质粒与合适的oriT位点共同转移^[61]。研究表明, 利用这种转移机制可以实现CRISPR-Cas技术在不同细菌之间的传递^[62,63]。因此, 基于质粒传递CRISPR-Cas抗菌剂的研究相继开展。信息素响应质粒具有天然高结合频率的特性, 具有无需抗生素选择即可在肠道内渗透和繁殖的能力, 在通过细菌素介导生物活性中具有显著优势^[64,65]。一项研究利用信息素响应质粒pPD1在体内和体外靶向干预多重耐药粪肠杆菌, 研究通过将体外模型与体内肠道小鼠实验进行对比, 发现CRISPR-Cas技

术能够有效阻断目标质粒在肠道小鼠模型中的传播, 同时在体外实验中具有较低的抗质粒活性, 这些差异可能与在体内环境中影响CRISPR-Cas技术活性的几个变量有关, 如浮游生物与生物膜的生活方式、供体与受体比例和取样时间点的不同等^[66]。靶向抗菌质粒可以成功转染与CRISPR-Cas技术密切相关的革兰氏阴性肠杆菌科和大肠杆菌, 靶向抗菌质粒通过识别细菌DNA序列与gRNA序列相匹配的细菌进而发挥杀菌作用^[67]。因此, 使用质粒作为递送CRISPR的工具在基因工程编辑领域具有重要研究意义。在结合过程中供体菌株以单链DNA的形式提供质粒, 随后质粒在受体细菌中以宿主特异性修饰的方式进行互补配对。这种方式有助于将质粒广泛转移和播散到不同的细菌菌种中, 而无须事先明确这些细菌的具体特征。质粒递送的另一个优点是多种细菌兼容, 不像噬菌体那样受受体-配体识别的限制^[68,69]。

5 CRISPR-Cas新型抗菌剂的前景、限制与进展

对于临床医务工作者来说, 由多重耐药或更严重的广泛耐药细菌引起的严重感染尚无可靠治疗方式, 往往只能通过更高级的抗生素治疗, 然而治疗效果差强人意^[70]。抗菌剂耐药可由外在机制或获得性机制引起, 为了解决抗菌素耐药的问题, 耐药机制已经开发了许多方法进行干预, 包括研发一些调节耐药机制的药物, 抑制细菌内部遗传分子的信号转导, 干扰耐药菌的毒力以及改变细菌毒素和毒力蛋白等来扼制抗菌素耐药^[71]。然而, 近年来, 现有抗菌剂针对耐药菌的疗效显著下降, 且新药的研发速度相应放缓^[72]。尽管临床迫切需要新的抗菌剂来治疗日益严重的耐药菌感染, 但由于临床试验费用的增加、审批标准的提高以及低经济回报等多种因素, 许多制药公司已放弃新型抗菌剂的研发^[73]。

CRISPR-Cas技术的高特异性和可重编程性可以通过靶向耐药菌体内特定基因克服抗菌素耐药的问题, 因此基于CRISPR-Cas技术开发新型抗菌剂是解决抗菌剂耐药的重要手段^[74]。尽管基于CRISPR-Cas新型抗菌剂临床应用的监管和伦理问题尚未在相关研究中提出, 但CRISPR-Cas技术的

相关临床使用已经引起了一些关注。在人细胞系的大规模基因组测序中发现CRISPR-Cas脱靶突变的风险会对人类健康造成不利的影响^[75]。另外,考虑到基于CRISPR-Cas的新型抗菌剂在临床中的应用,在抗菌剂设计的早期阶段通过优化gRNA靶向系统和提升递送载体的准确度和靶向细菌的特异性来解决这些潜在影响是至关重要的^[76]。此外,需要重点评估CRISPR-Cas新型抗菌剂释放到外部环境中的潜在风险,并应执行更加严格的使用规范和废弃物处理制度,让医务人员和普通民众参与和接受相关教育,并更新与CRISPR基因编辑工具有关的立法准则,以确保该技术安全地在临床中使用。

尽管存在使用限制,由于CRISPR-Cas抗菌剂的递送方式广、靶向性强、杀菌效率高、低成本等优势,越来越多基于CRISPR-Cas技术开发的抗菌剂被相继报道,其中有关噬菌体递送和新型生物材料递送受到广泛关注。研究报道,组织工程化噬菌体作为载体递送特异靶向大肠杆菌的CRISPR-Cas抗菌剂具有广泛应用前景,被称为SNIPR001的四种互补噬菌体的组合在小鼠模型和小型猪模型中都表现出良好的抗大肠杆菌的效能。目前SNIPR001正在临床开发中,用于选择性杀死大肠杆菌^[77],该抗菌剂的研发为临床应用提供了新的思路。新型生物材料的研发目前主要聚焦于如何降低材料的免疫原性,提高载药量及递送效率等方面^[78,79]。因此设计更加优秀的工程化载体可能是突破使用限制的关键。目前进入临床应用阶段的CRISPR-Cas抗菌剂相关研究较少。NCT05143593、NCT04535648、NCT04178382、NCT04074369、NCT03342547等几项临床研究都处于募集患者的阶段。总体来说,CRISPR-Cas抗菌剂领域仍处于发展阶段,从临床角度进一步开发安全有效的CRISPR-Cas抗菌剂具有广泛应用前景。

参考文献

- [1] Pursey E, Sünderhauf D, Gaze WH, et al. CRISPR-Cas antimicrobials: challenges and future prospects. *PLoS Pathog*, 2018, 14(6): e1006990
- [2] Glerup JL, Mogensen TH. CRISPR-Cas in diagnostics and therapy of infectious diseases. *J Infect Dis*, 2022, 226(11): 1867-1876
- [3] Martínez M, Rizzuto I, Molina R. Knowing our enemy in the antimicrobial resistance era: dissecting the molecular basis of bacterial defense systems. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(9): 4929
- [4] Engelstädter J, Harms K, Johnsen PJ. The evolutionary dynamics of integrons in changing environments. *ISME J*, 2016, 10(6): 1296-1307
- [5] Wang JY, Doudna JA. CRISPR technology: a decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 2023, 379(6629): eadd8643
- [6] Nussenzweig PM, Marraffini LA. Molecular mechanisms of CRISPR-Cas immunity in bacteria. *Annu Rev Genet*, 2020, 54(1): 93-120
- [7] Li T, Yang Y, Qi H, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 36
- [8] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602-607
- [9] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable Dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821
- [10] Bhatia S, Pooja S, Yadav SK. CRISPR-Cas for genome editing: classification, mechanism, designing and applications. *Int J Biol Macromol*, 2023, 238: 124054
- [11] Tyumentseva M, Tyumentsev A, Akimkin V. CRISPR/Cas9 landscape: current state and future perspectives. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22): 16077
- [12] Huang Z, Lyon CJ, Wang J, et al. CRISPR assays for disease diagnosis: progress to and barriers remaining for clinical applications. *Adv Sci*, 2023, 10(20): e2301697
- [13] Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(1): 31-34
- [14] Li SY, Cheng QX, Wang JM, et al. CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell Discov*, 2018, 4(1): 20
- [15] Wang Y, Yang T, Liu G, et al. Application of CRISPR/Cas12a in the rapid detection of pathogens. *Clinica Chim Acta*, 2023, 548: 117520
- [16] Zhao L, Qiu M, Li X, et al. CRISPR-Cas13a system: a novel tool for molecular diagnostics. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1060947
- [17] Wu S, Tian P, Tan T. CRISPR-Cas13 technology portfolio and alliance with other genetic tools. *Biotechnol Adv*, 2022, 61: 108047
- [18] Yin L, Man S, Ye S, et al. CRISPR-Cas based virus detection: recent advances and perspectives. *Biosens Bioelectron*, 2021, 193: 113541

- [19] Zhang Y, Li S, Li R, et al. Advances in application of CRISPR-Cas13a system. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1291557
- [20] Smargon AA, Cox DBT, Pyzocha NK, et al. Cas13b is a type VI-B CRISPR-associated RNA-guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell*, 2017, 65(4): 618-630
- [21] Huang Z, Fang J, Zhou M, et al. CRISPR-Cas13: a new technology for the rapid detection of pathogenic microorganisms. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1011399
- [22] Xu C, Zhou Y, Xiao Q, et al. Programmable RNA editing with compact CRISPR-Cas13 systems from uncultivated microbes. *Nat Methods*, 2021, 18(5): 499-506
- [23] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442
- [24] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, 2018, 360(6387): 439-444
- [25] Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*, 2018, 360(6387): 444-448
- [26] Harrington LB, Burstein D, Chen JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842
- [27] Fozouni P, Son S, Díaz de León Derby M, et al. Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*, 2021, 184(2): 323-333.e9
- [28] Arizti-Sanz J, Freije CA, Stanton AC, et al. Streamlined inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5921
- [29] Blanchard EL, Vanover D, Bawage SS, et al. Treatment of influenza and SARS-CoV-2 infections via mRNA-encoded Cas13a in rodents. *Nat Biotechnol*, 2021, 39(6): 717-726
- [30] Powell JE, Lim CKW, Krishnan R, et al. Targeted gene silencing in the nervous system with CRISPR-Cas13. *Sci Adv*, 2022, 8(3): eabk2485
- [31] Qian Y, Zhou D, Li M, et al. Application of CRISPR-Cas system in the diagnosis and therapy of ESKAPE infections. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1223696
- [32] Qin S, Xiao W, Zhou C, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Sig Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 199
- [33] Lekunberri I, Subirats J, Borrego CM, et al. Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance. *Environ Pollution*, 2017, 220: 981-984
- [34] Siguier P, Gourbeyre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev*, 2014, 38(5): 865-891
- [35] Luo ML, Leenay RT, Beisel CL. Current and future prospects for CRISPR-based tools in bacteria. *Biotech Bioeng*, 2016, 113(5): 930-943
- [36] Kiga K, Tan XE, Ibarra-Chávez R, et al. Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2934
- [37] Goma AA, Klumpe HE, Luo ML, et al. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *mBio*, 2014, 5(1): e00928
- [38] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573
- [39] Kundar R, Gokarn K. CRISPR-Cas system: a tool to eliminate drug-resistant gram-negative bacteria. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(12): 1498
- [40] Yao S, Wei D, Tang N, et al. Efficient suppression of natural plasmid-borne gene expression in carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* using a compact CRISPR interference system. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66(11): e0089022
- [41] Bikard D, Barrangou R. Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Curr Opin Microbiol*, 2017, 37: 155-160
- [42] Cui L, Bikard D. Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(9): 4243-4251
- [43] Dong H, Xiang H, Mu D, et al. Exploiting a conjugative CRISPR/Cas9 system to eliminate plasmid harbouring the MCR-1 gene from *Escherichia coli*. *Int J AntiMicrob Agents*, 2019, 53(1): 1-8
- [44] Santos Apolonio J, Lima de Souza Gonçalves V, Cordeiro Santos ML, et al. Oncolytic virus therapy in cancer: a current review. *World J Virol*, 2021, 10(5): 229-255
- [45] Khambhati K, Bhattacharjee G, Gohil N, et al. Phage engineering and phage-assisted CRISPR-Cas delivery to combat multidrug-resistant pathogens. *Bioeng Transla Med*, 2023, 8(2): e10381
- [46] Park JY, Moon BY, Park JW, et al. Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 44929
- [47] Ram G, Ross HF, Novick RP, et al. Conversion of staphylococcal pathogenicity islands to CRISPR-carrying antibacterial agents that cure infections in mice. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(10): 971-976
- [48] Shen H, Huang X, Min J, et al. Nanoparticle delivery

- systems for DNA/RNA and their potential applications in nanomedicine. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(27): 2507-2523
- [49] Chen F, Alphonse M, Liu Q. Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2020, 12(3): e1609
- [50] Jia H, Draz MS, Ruan Z. Functional nanomaterials for the detection and control of bacterial infections. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(27): 2449-2475
- [51] Chen J, Andler SM, Goddard JM, et al. Integrating recognition elements with nanomaterials for bacteria sensing. *Chem Soc Rev*, 2017, 46(5): 1272-1283
- [52] Li X, Gui S, Gui R, et al. Multifunctional clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9-based nanobomb against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection through cascade reaction and amplification synergistic effect. *ACS Nano*, 2023, 17(24): 24632-24653
- [53] Wan F, Draz MS, Gu M, et al. Novel strategy to combat antibiotic resistance: a sight into the combination of CRISPR/Cas9 and nanoparticles. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3): 352
- [54] Patel S, Ashwanikumar N, Robinson E, et al. Boosting intracellular delivery of lipid nanoparticle-encapsulated mRNA. *Nano Lett*, 2017, 17(9): 5711-5718
- [55] Dubey AK, Kumar Gupta V, Kujawska M, et al. Exploring nano-enabled CRISPR-Cas-powered strategies for efficient diagnostics and treatment of infectious diseases. *J Nanostruct Chem*, 2022, 12(5): 833-864
- [56] Wu Y, Battalapalli D, Hakeem MJ, et al. Engineered CRISPR-Cas systems for the detection and control of antibiotic-resistant infections. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 401
- [57] Luo YL, Xu CF, Li HJ, et al. Macrophage-specific *in vivo* gene editing using cationic lipid-assisted polymeric nanoparticles. *ACS Nano*, 2018, 12(2): 994-1005
- [58] Kang YK, Kwon K, Ryu JS, et al. Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nano-complex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance. *Bioconjugate Chem*, 2017, 28(4): 957-967
- [59] Suzuki Y, Onuma H, Sato R, et al. Lipid nanoparticles loaded with ribonucleoprotein-oligonucleotide complexes synthesized using a microfluidic device exhibit robust genome editing and hepatitis B virus inhibition. *J Control Release*, 2021, 330: 61-71
- [60] Shen Z, Tang CM, Liu GY. Towards a better understanding of antimicrobial resistance dissemination: what can be learnt from studying model conjugative plasmids? *Military Med Res*, 2022, 9(1): 3
- [61] Fraikin N, Couturier A, Lesterlin C. The winding journey of conjugative plasmids toward a novel host cell. *Curr Opin Microbiol*, 2024, 78: 102449
- [62] Ruotsalainen P, Penttinen R, Mattila S, et al. Midbiotics: conjugative plasmids for genetic engineering of natural gut flora. *Gut Microbes*, 2019, 10(6): 643-653
- [63] Hamilton TA, Pellegrino GM, Therrien JA, et al. Efficient inter-species conjugative transfer of a CRISPR nuclease for targeted bacterial killing. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4544
- [64] Hirt H, Greenwood-Quaintance KE, Karau MJ, et al. *Enterococcus faecalis* sex pheromone cCF10 enhances conjugative plasmid transfer *in vivo*. *mBio*, 2018, 9(1): e00037-18
- [65] Zhou H, Yang X, Yang Y, et al. Docosaehaenoic acid inhibits pheromone-responsive-plasmid-mediated conjugative transfer of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *J Hazard Mater*, 2023, 444: 130390
- [66] Price VJ, McBride SW, Hullahalli K, et al. *Enterococcus faecalis* CRISPR-Cas is a robust barrier to conjugative antibiotic resistance dissemination in the murine intestine. *mSphere*, 2019, 4(4): e00464-19
- [67] Reuter A, Hilpert C, Dedieu-Berne A, et al. Targeted-antibacterial-plasmids (TAPs) combining conjugation and CRISPR/Cas systems achieve strain-specific antibacterial activity. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(6): 3584-3598
- [68] Rafiq MS, Shabbir MAB, Raza A, et al. CRISPR-Cas system: a new dawn to combat antibiotic resistance. *BioDrugs*, 2024, 38(3): 387-404
- [69] Neil K, Allard N, Roy P, et al. High-efficiency delivery of CRISPR-Cas9 by engineered probiotics enables precise microbiome editing. *Mol Syst Biol*, 2021, 17(10): e10335
- [70] Saha U, Gondi R, Patil A, et al. CRISPR in modulating antibiotic resistance of ESKAPE pathogens. *Mol Biotechnol*, 2023, 65(1): 1-16
- [71] De Silva PM, Kumar A. Signal transduction proteins in *acinetobacter baumannii*: role in antibiotic resistance, virulence, and potential as drug targets. *Front Microbiol*, 2019, 10: 49
- [72] Sorbara MT, Pamer EG. Microbiome-based therapeutics. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(6): 365-380
- [73] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(3): 318-327
- [74] Allemailem K. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of multidrug resistance and novel approaches of CRISPR/Cas9-based genome-editing to combat this health emergency. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 1125-1143

- [75] Cradick TJ, Fine EJ, Antico CJ, et al. CRISPR/Cas9 systems targeting β -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. [Nucleic Acids Res](#), 2013, 41(20): 9584-9592
- [76] Javed MR, Sadaf M, Ahmed T, et al. CRISPR-Cas system: history and prospects as a genome editing tool in microorganisms. [Curr Microbiol](#), 2018, 75(12): 1675-1683
- [77] Gencay YE, Jasinskytė D, Robert C, et al. Engineered phage with antibacterial CRISPR-Cas selectively reduce *E. coli* burden in mice. [Nat Biotechnol](#), 2024, 42(2): 265-274
- [78] Mayorga-Ramos A, Zúñiga-Miranda J, Carrera-Pacheco SE, et al. CRISPR-cas-based antimicrobials: design, challenges, and bacterial mechanisms of resistance. [ACS Infect Dis](#), 2023, 9(7): 1283-1302
- [79] Abavisani M, Khayami R, Hoseinzadeh M, et al. CRISPR-Cas system as a promising player against bacterial infection and antibiotic resistance. [Drug Resist Updat](#), 2023, 68: 100948