2018 年 第 13 卷
第 3 期,1-8

生 态 毒 理 学 报
Asian Journal of Ecotoxicology

Vol. 13, 2018
No.3 1-8

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170804001
徐艳, 崔玉晓, 杨洋, 等. CRISPR/Cas 系统抵御细菌耐药[J]. 生态毒理学报,2018, 13(3): 1-8
Xu Y, Cui Y X, Yang Y, et al. CRISPR/Cas system resist to bacterial resistance [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(3): 1-8 (in Chinese)

CRISPR/Cas 系统抵御细菌耐药

徐艳[2], 崔玉晓[3], 杨洋[1], 罗义[3], 郑向群[2], 毛大庆[1,*]

1. 南开大学医学院,天津 300071
2. 农业部环境保护科研监测所,天津 300191
3. 南开大学环境科学与工程学院 教育部环境污染过程与基准重点实验室,天津 300071

收稿日期:2017-08-04 **录用日期**:2017-09-14

摘要: 近年来,细菌耐药性问题在全球范围内日益严重,世界各地不断出现各种新型耐药基因及“超级细菌”,以此形成的细菌耐药性污染已成为威胁全球公共卫生与环境安全的重大问题。目前除了在管理上规范合理用药和限制抗生素排放,应探讨抵御细菌耐药的分子机制,有效地从根本上遏制细菌耐药的产生。CRISPR 系统作为一种天然免疫系统,可用来对抗入侵的外源性遗传物质,其结构和功能与细菌耐药及毒力因素密切相关,深入分析两者的关系有助于更好地理解细菌耐药机制,为防治细菌耐药提供了新的方向。

关键词: 抗生素;CRISPR 免疫系统;细菌耐药;水平转移;毒力基因
文章编号: 1673-5897(2018)3-001-08 **中图分类号**: X171.5 **文献标识码**: A

CRISPR/Cas System Resist to Bacterial Resistance

Xu Yan[2], Cui Yuxiao[3], Yang Yang[1], Luo Yi[3], Zheng Xiangqun[2], Mao Daqing[1,*]

1. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China
2. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China
3. College of Environmental Sciences and Engineering, Ministry of Education Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Nankai University, Tianjin 300071, China

Received 4 August 2017 **accepted** 14 September 2017

Abstract: In recent years, the global problem of bacterial resistance is growing. The propagation and proliferation of the bacterial drug resistance has become a major problem in a serious threat to global public health and environmental safety, and meanwhile new types of resistance genes and “Super Bacteria” are continuously worldwide emerging. In addition to regulating the rational use of drugs and limiting antibiotic discharge policies, the stepwise entry on the way of fundamental prevention of bacterial resistance is understanding the mechanism of bacterial resistance. CRISPR system is a kind of natural immune system in bacteria, which can be used against exogenous DNA, and therefore, the structure and function of CRISPR is closely related to bacterial resistance. The in-depth analysis of the relationship between CRISPR and bacterial resistance will contribute to a significative understanding of the mechanisms of bacterial resistance, and will provide a new strategy to prevent bacterial resistance.

Keywords: antibiotics; CRISPR/Cas; bacterial resistance; horizontal transfer; virulence gene

基金项目:国家自然科学基金杰出青年科学基金项目(41525013);国家自然科学基金面上项目(31470440)
作者简介:徐艳(1988-),女,助理研究员,研究方向为污染生态化学、分子生态学,E- mail: xuyan@aepi.org.cn
* **通讯作者**(Corresponding author), E-mail: daqingm@126.com

目前环境中耐药细菌及基因普遍传播,引起细菌耐药污染问题受高度重视,各界学者对环境中细菌耐药的研究也日益增多。细菌耐药主要由质粒、整合子等可移动遗传元件转移获得进而传播扩散,且毒力或耐药基因可能通过水平转移到致病菌上,甚至会引起新型传染病的暴发和流行,由此产生的“超级”耐药菌时刻威胁着人类健康。面对外源遗传物质(如噬菌体和质粒)的侵入,细菌自身进行抵御形成一个针对这些外源遗传物质入侵的免疫系统,成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及相关基因(CRISPR-associated, Cas)组成的系统(CRISPR/Cas)具有一类独特的结构,大多分布于细菌和古细菌基因组中[1]。早期 Moineau 教授在 Nature 期刊上发文提到,一些细菌将携带抗性基因的核酸片段重组到基因组中,导致细菌丧失接受质粒嵌入的特性,意味着细菌获得了对耐药基因的免疫能力,可以抵御细菌耐药性。总言之,CRISPR 系统建立了一套特异性的防御体系,能够有效防御外源遗传物质的侵入,确保本身遗传信息的完整性。

当前针对 CRISPR/Cas 系统如何防御细菌耐药的研究尚少,Marraffini 等[2-3]发现通过靶向 DNA CRISPR 系统干扰某特定葡萄球菌耐药基因水平转移,限制耐药致病菌的传播扩散,但其机制尚不清楚,现 CRISPR/Cas 进化对水平基因转移有抑制作用的直接证据尚且缺乏[4]。值得关注的是研究发现为了在环境压力影响下生存的一些缺少 CRISPR 系统的菌株更容易获得耐药基因,并且缺少 CRISPR 系统会导致细菌更容易受到噬菌体的攻击,这一矛盾体现在不同种类的细菌中 CRISPR 系统与细菌耐药性的关系千差万别。

1 CRISPR/Cas 系统简介及作用机制

CRISPR/Cas 系统大致由 CRISPR、前导序列以及 Cas 蛋白三部分共同构成(图 1)。CRISPR 由多个重复序列(Repeat)和间隔序列(Spacer)组成。其中前导序列与重复序列相连,可以识别新的间隔序列,启动前-crRNA(CRISPR RNAs)的转录。*Cas* 基因家族具有多种基因亚型,位于 CRISPR 位点附近,用于编码 CRISPR 的相关蛋白质,且通过 tracrRNA(trans-activating crRNA)将 crRNA 前体修饰为成熟的 crRNA 并与 crRNA 协同作用,共同构筑细菌的免疫屏障。CRISPR 的间隔序列在相同或者不同菌种间都会存在差异,并且多样性较高[5-6]。

Cas 基因作为 CRISPR 相关蛋白基因,一般来说每种 CRISPR/Cas 系统包含 4~10 个 *cas* 基因,串联排列成 *cas* 基因簇[7]。由于不同的获取形式、来源等使间隔序列具有多态性,CRISPR/Cas 系统由多个 *Cas* 蛋白串联构成的复合体来产生免疫性。由于 *Cas* 基因数量和序列的不同,*Cas* 蛋白具有多种差异类型。CRISPR/Cas 一般分为 3 个类型:系统 I、II 及 III [8-10]。截止 2016 年的统计,在古细菌和细菌中发

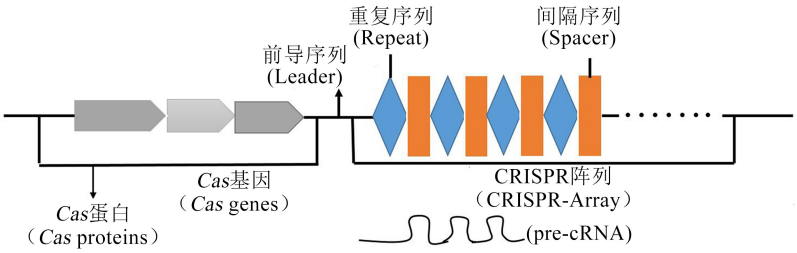

图 1 CRISPR/Cas 的组成结构

Fig. 1 The composition structure of CRISPR/Cas

表 1 CRISPR 系统在微生物中的分布

Table 1 Distribution of CRISPR system in microorganisms

	菌株 (Strains)	CRISPRs	携带 CRISPRs 的菌株 (Strains with CRISPRs)	未检测到 CRISPRs 的菌株 (Not detected CRISPRs strains)
古细菌 (Archaea)	232	870	202	30
细菌 (Bavteria)	6 782	8 069	3 059	2 065
总共 (Total)	7 014	8 939	3 261	2 095

现 8 939 种不同的 CRISPR 系统,约 45.1% 的细菌内含有 CRISRP 系统(表 1)。CRISPR/Cas 系统作为抵御外界的免疫系统,可从侵入的外源遗传物质中插入新的间隔序列,当同一外源基因再次入侵时,会靶向裂解外源基因,从而抵抗噬菌体感染、限制质粒的接合转移等,为细菌提供特异性的免疫屏障[11-13]。

CRISPR/Cas 免疫系统作用机制分三步(图 2):(1)适应阶段,主要获取 CRISPR 间隔序列。CRISPR 系统会在前导序列与第一段重复序列之间插入一段与外源性基因片段(原间隔序列 protospacer)同源的短 DNA 片段,每一次插入都会伴随重复序列的复制,形成新的重复间隔单元[14-15]。(2)表达阶段,主要是 crRNA 前体的转录与 crDNA 的加工阶段。CRISPR 将会被转录成一段长链的 CRISPR RNA (crRNA)前体(pre-),并且这一前体在重复序列处将会被剪切,随后被 *Cas* 内切酶加工成小 crRNA。与 *Cas* 蛋白结合形成 Cas/crRNA 作用复合体[16]。(3)干扰阶段,最后阶段靶向定位与裂解外源性基因。crRNA 作为 Cas/crRNA 作用复合体的导向,配合寻找同源的外源 DNA 靶标,如果 crRNA 与前间区序列完成互补配对,靶标将被作用的复合体降解。

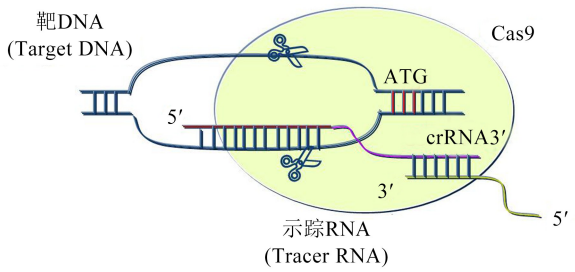

图 2　CRISPR/Cas 免疫系统的作用机制

Fig. 2　The mechanism of CRISPR/Cas immune system

基因组编辑技术用于编辑已知的 DNA 序列,通过增加、删除基因来实现基因功能的激活或者抑制,其中 CRISPR/Cas 技术是继锌指核酸酶(ZFN)、ES 细胞打靶和 TALEN 等技术后用于定点构建基因敲除的最新基因编辑技术方法,且有效率高、速度快及定位精确的特点,目前该技术成功应用于人类细胞、斑马鱼、小鼠以及细菌的基因组精确修饰。在医疗方面主要以 CRISPR/Cas9 作为“基因剪刀”用于基因编辑。目前有学者研究发现 CRISPR 系统能够限制质粒的接合转移从而抑制耐药的产生及传播扩散。然而对于 CRISPR 系统与细菌耐药及毒力的调节机制方面的研究尚少,且研究结论也不尽相同。

2　CRISPR/Cas 与细菌耐药的关联

目前,CRISPR 系统已广泛应用在细菌、斑马鱼、鼠和人等基因组的修饰编辑中,尤其对 CRISPR/Cas 与耐药的关系的研究逐渐深入。近几年来,抗生素的残留作为环境压力影响环境中耐药基因的产生、传播与扩散,微生物为了利于生存通过水平转移等方式获得耐药性,从而增加细菌的生存优势,这些耐压基因在环境菌群中的进一步传播对公众健康造成了严重的威胁,并且研究发现这些环境中大多数耐药细菌缺少 CRISPR/Cas 系统。少数耐药菌株含有 CRISPR/Cas 系统,这可能是由于间隔序列相应靶序列即原间隔序列发生突变,或者基因重组导致间隔序列丢失,导致 CRISPR/Cas 系统失效,该失效的系统与耐药基因得以共存。研究推测在抗生素选择长期压力下,细菌为了平衡适合度代价,细菌优先获得耐药基因,保证其生存。然而无外界环境压力或压力较低时,CRISPR/Cas 系统可抵抗外源基因的侵入进行免疫防御,保证细菌自身遗传物质的完整及稳定性。

目前,研究人员把靶向特定耐药基因(例如编码抗 β-内酰胺类抗生素的 NDM-1、SHV-18 基因)序列的 gRNA,通过构建的 2 种载体(如携带 CRISPR 元件的基因工程菌或注入 CRISPR 基因的噬菌体颗粒)将其导入细菌中,对含有的耐药性和致病性的基因进行定位剪切,使其失活,进而使携带有害基因的细菌死亡。Bikard 等[17]构建了以受体菌上一段耐药基因为靶标的 CRIPSR 元件,将携带此元件的质粒转入受体菌后导致了细菌的死亡。近期,有学者通过利用 CRISPR 系统的免疫抵御机制,能够特异性地去除几乎所有携带 NDM-1 的细菌,并且成功地靶向了另一种编码 SHV-18 的抗性基因和肠道出血性大肠杆菌中的一个毒力因子[18]。此外,基于遗传标记技术,有研究已经证实利用 CRISPR 系统可以从混合菌群中特异性去除某种细菌,由此为“微生物组编辑”的应用开辟了一种新思路和方法。Alex 等[19]对铜绿假单胞菌中 CRISPR/Cas 系统发育分布的研究发现,CRISPR/Cas 系统能够获取耐药基因,在重塑辅助基因组分布方面具有重要作用。我国学者薛泽润[20]对志贺菌中 CRISPR 的分布及结构分析发现,CRISPR 系统在志贺菌中是普遍存在的;不同时间分离出的志贺菌中 CRISPR 位点间隔序列分布存在一定差异,且发现 *Cas2* 基因的这种差异与志贺

菌的耐药程度具有一定相关性。王琳琳等[21]对志贺菌 CRISPR/Cas 系统的研究发现,多重耐药的志贺菌中,CRISPR 系统中的间隔序列数目均较少,且 CRISPR/Cas 系统中发现多种插入序列,同时发现 CRISPR 间隔序列数目较少而相应携带耐药基因的数量却较多,经过接合转移诱导细菌耐药后,相关的 *Cas* 基因碱基发生突变,充分证明志贺菌的耐药性与 CRISPR 系统中重复序列的变异和间隔序列的多样性有关。此外,蔡银强等[22]对沙门菌中的 CRISPR 系统与耐药性的研究发现,该菌种存在 2 个稳定的 CRISPR 位点,沙门菌利用它们能够抵御外源遗传物质的入侵,同时还可介导本身表型改变及基因亚类的进化。Zhang 等[23]经无抗生素压力传代 90 次后,多数志贺菌 CRISPR3 位点的结构发生改变,CRISPR3 位点与 *cas* 基因可能存在共进化,其中部分志贺菌对抗生素的敏感表型有不同程度的增加。近期 Kang 等[24]利用基因编辑手段将基于聚合衍生化的 CRISPR 纳米复合物用于靶向细菌病原体和抗生素抗性,取得了一定效果。Müller 等[25]利用 CRISPR/Cas9 与 DNA 图谱结合的手段鉴定单质粒上的抗生素抗性基因。综上所述,CRISPR 系统与细菌耐药间存在直接关系,为以后防止细菌耐药提供了重要参考。

2.1 CRISPR/Cas 对耐药转移传播的影响

细菌耐药以水平转移方式为主的基因相互传递,导致细菌耐药性的传播扩散[26-27]。之前有研究对强毒的 MRSA USA300 菌株进行测序分析,发现细菌 CRISPR 位点中的间隔序列是由基因的水平转移获得的,外源遗传物质如质粒 DNA 的基因序列整合到 CRISPR 位点,重新获得新的间隔序列从而产生耐药性。此外,Palmer 和 Gilmore[28]对多重耐药的肠球菌的 CRISPR 系统分析发现,多耐药肠球菌均缺乏 CRISPR/Cas 系统元件,暗示细菌中的 CRISPR/Cas 系统可能对阻碍耐药传递具有重要作用。另外对非致病的表皮葡萄球菌的研究发现,大多数菌株缺乏 CRISPR 序列,而从临床环境分离的 RP62a 表皮葡萄球菌株含有 CRISPR 序列,可在一定程度上抵御外源性基因的入侵[29]。进一步研究间隔序列是否能阻止质粒向 RP62a 表皮葡萄球菌转移,Marraffini 等[2]研究者将金黄色葡萄球菌中携带 β-内酰胺质粒 pG0400 的相关核苷酸内切酶位点基因沉默,产生突变型 pG0,之后将野生型及突变型 pG0 均转入 2 种表皮葡萄球菌,结果发现转到没有 CRISPR 结构的菌株中的这 2 种质粒的接合效率相近,这说明 CRISPR 系统可以限制从金黄色葡萄球菌转移至表皮葡萄球菌的抗性质粒接合转移,该影响机制由靶 DNA 直接介导,其特异性取决于间隔序列与质粒序列的一致性,表明细菌中 CRISPR 序列可通过阻碍水平转移来抵御细菌耐药性的传播扩散。这种平衡发生于 CRISPR/Cas 系统的免疫抵御机制与耐药基因水平转移之间,基于 CRISPR 系统主要抑制基因在细菌间转移的功能,CRISPR 系统可以更清楚了解细菌耐药谱型,明确细菌基因的水平转移情况,通过对其结构的修饰了解限制耐药菌株传播的分子响应,为有效防控耐药细菌的传播扩散提供新的思路。

2.2 CRISPR/Cas 对致病性毒力基因的控制

CRISPR 系统在免疫防御过程中遇到外源性基因产生新间隔序列可能导致细菌毒力的改变。其中细菌获得毒力和产生致病性一般主要通过噬菌体感染引起,如具有致病性的菌株霍乱弧菌、链球菌和金黄色葡萄球菌等均含有编码毒力因子的温和噬菌体基因,同时发现这些细菌的 CRISPR 间隔序列与噬菌体序列之间产生相互排斥,表明细菌中的 CRISPR 免疫系统可以通过抵御具有毒性的噬菌体入侵,干扰毒力因子在细菌间传播。最近,Yang 等[30]对 32 株金黄色葡萄球菌中确定的 CRISPR 位点分析发现,CRISPR/Cas 系统可限制细菌毒力因素的传播扩散。之前有研究构建了靶标为荚膜基因的肺炎链球菌 CRISPR 系统的感染模型,荚膜基因是肺炎链球菌的毒力基因,结果发现,CRISPR 系统防御干扰有效抑制了携带荚膜基因的质粒进入无毒菌株,从而避免携带有毒力基因的菌株向无毒菌株的水平转移,抑制了毒力株的产生[17]。而 Nozawa 等[31]对链球菌中 CRISPR/Cas 系统的分析发现,CRISPR 通过使噬菌体介导的毒力基因的转入,导致了这些菌株产生致病性,进一步对 13 株化脓性链球菌基因组测序,发现部分菌株 CRISPR/Cas 系统中缺失 *cas* 基因,部分 CRISPR 位点的间隔序列与其他研究菌株间存在差异,暗示了噬菌体基因的高感染率可能与 CRISPR/Cas 系统的特异性有关。Yosef 等[32]研究空肠弯曲菌强毒株的 CRISPR 系统,分析发现其 CRISPR 序列较短或完全缺失与细菌毒力增强息息相关,可导致严重肠道炎和感染后严重的并发症。同样,对肠球菌 CRISPR 结构的研究发现 *cas*1 基因的缺失会导致致病岛的增多[32]。此外,有

研究发现 CRISPR/Cas 系统可以降低细菌的毒力,其主要利用反义 RNA 作用影响免疫原性膜蛋白的表达,只是该毒力调节作用所需的 RNA 分子在不同细菌间千差万别[33]。

通过对多种致病菌 CRISPR 序列及毒力编码基因的大量研究发现,Cas9 基因是 CRISPR/CAS 系统中细菌毒力调控的关键因子[8,34]。鉴于之前的研究启示,原理上如果生产一种 CRISPR 元件以毒力或抗性基因作为靶标的基因药物,它不仅能杀灭携带靶标的耐药菌株或者致病菌,还能防止耐药或毒力基因的传播扩散,从而预防致病菌的大规模感染,同时也能治疗被致病菌感染的人群。基于假设,研究者们构建了 2 种不同的载体保证 CRISPR 元件进到细菌中,即基因工程菌质粒上携带着 CRISPR 基因,以及噬菌体颗粒结合细菌并具有 CRISPR 基因,研究成功将携带 CRISPR 基因的这 2 种载体转移到耐药菌群中,并随后将 CRISPR 元件转移到一种受感染的大蜡螟(waxworm)幼虫体内,结果促进了幼虫的生存。目前研究人员正在将此方法用于小鼠测试,预想这一方法可治疗感染或是有针对性地除去患者体内有害的细菌[18]。目前这种设想还存在着诸多需要解决的问题,但如果设计成功,那么这种药物所具有的高度特异性可完全替代其他抗菌剂[35]。

目前研究发现通过利用 CRISPR/Cas9 在细胞 DNA 中的突变抑制病毒复制,仍会有些突变会促进病毒产生耐药性,因此 CRISPR/Cas9 抗病毒疗法靶向多个病毒 DNA 区域显得非常重要。Wang 等[36]研究发现当通过靶向疗法杀灭许多病毒时,总会有一些病毒逃脱 CRISPR/Cas9 的杀灭作用产生耐性,对逃脱的病毒 RNA 进行测序,意外发现大部分的病毒突变都位于 Cas9 促进 DNA 断裂的位点附近,导致 *cas9* 无法进行序列的识别,因此面对这些耐药性病毒的持续复制,CRISPR/Cas9 技术用于抵御病毒的感染,仍需克服一些限制,如利用 CRISPR/Cas9 或除 Cas9 以外的其他酶类来靶向作用多个位点。另外,有研究表明 CRISPR/Cas 系统可以专门针对和切割保守区域的乙肝病毒基因组,从而导致病毒基因表达和复制的鲁棒抑制[37]。Van Diemen 等[38]研究人员发现 CRISPR/Cas9 编辑能够高效地破坏人巨细胞病毒 HCMV 复制,并且研究组设计出多种 gRNA 能够降低导致唇疱疹和疱疹性角膜炎的 1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)的复制,当将其中的 2 种 gRNA 组合使用,同时靶向 2 种必需基因时,能够完全抑制 HSV-1 复制。基于目前的研究成果,CRISPR/Cas9 技术应用于人类疾病的治愈指日可待。

2.3　CRISPR/Cas 对细菌生物膜的影响

无论是工业、临床还是生态环境系统中,细菌生物膜作为细菌的主要生长型,常常导致一些顽固的细菌感染。其中细菌群体感应是生物膜表型的主要表达方式。狭小的细胞间隙,为基因在细菌间的水平转移提供了理想的环境。一般自然条件下,微生物有 2 种生长状态:浮游和生物膜,细菌形成生物膜,细菌群体感应会提高抗生素的耐受性[39]。研究表明抗生素的外界压力下细菌易形成生物膜,增加胞外多糖的含量,同时影响稳定细菌生物膜的三维结构[40]。Zegans 等[41]发现宿主体内 CRISPR 系统的存在对生物膜形成具有抑制作用,同时降低了细菌群聚运动能力,且 *cas* 基因的亚类,如 *cas1* 可编码整合酶,可能参与新噬菌体 DNA 序列入侵细菌 CRISPR 系统的过程,因此影响了细菌生物膜的形成及群聚运动等生理反应。CRISPR 介导的细菌生物膜的形成和群聚运动能力是限制噬菌体在细菌间传播的重要机制,即被噬菌体感染的细菌将自己从生物膜及其他群体行为中隔离,这在防预细菌致病性大范围感染方面起重要作用。Palmer 等[42]的研究表明,铜绿假单胞菌生物膜的形成与 CRISPR 特异性插入序列有关,CRISPR/Cas 系统的存在抑制了细菌生物膜的形成,推测该特异性插入序列转录形成反义 RNA,从而导致其生物膜的形成受到抑制,这说明 CRISPR/Cas 系统可调节细菌生物膜形成。

另外,细菌被巨噬细胞吞噬后,吞噬体中的多种抗菌物质及固有免疫反应对其均具有杀伤作用,而该菌株 CRISPR/Cas 系统中的 *cas9*、tracrRNA 等作为调节因子,使其逃避宿主的抗菌作用。之前研究人上皮细胞模型发现 *cas9* 基因在脑膜炎奈瑟菌吸附于宿主细胞表面并侵入宿主细胞的过程中承担重要角色[43]。另外,*cas9* 基因的存在对空肠弯曲菌吸附入侵宿主结肠上皮细胞也同样关键,表明 CRISPR/Cas 系统在细菌感染宿主过程中发挥重要作用。

3　展望

CRISPR/Cas 系统更新了对细菌功能调节的认识,为防治细菌耐药的提供了新的方向,为医疗行业有效免疫治疗提供手段。目前针对 CRISPR 系统的应用正如火如荼地进行中:间隔序列显现了细菌与噬菌体等外源 DNA 的相互过程,根据 CRISPR 位点

中间隔序列的组成和排列顺序,可以用来对细菌分型。CRISPR 位点间隔序列的多态性反映出细菌的进化历程,可用于研究不同细菌之间的亲缘关系。目前已有研究者利用这一特性对炭疽芽胞杆菌、一些芽胞杆菌等进行分型与鉴别[44];CRISPR/Cas9 作为“基因剪刀”是目前一种热点的基因组定点编辑技术,该技术成功应用于微生物、斑马鱼和小鼠等动物以及人类细胞的基因组的精确修饰;利用 CRISPR 系统的免疫干扰功能抵御噬菌体,目前已将其利用到抵御噬菌体对嗜热链球菌的破坏。在近期的一项重大研究上已使用 CRISPR/Cas9 工具剪切掉 CD163 基因中与猪蓝耳病病毒感染有关的小部分片段,培育出多头转基因猪。对这些猪细胞的检测发现,其对 2 种能引起猪繁殖与呼吸综合病症的子病毒具有完全抵抗力,从而能阻止感染和传播[45]。利用 CRISPR/Cas 系统控制耐药基因在细菌水平转移、细菌基因组编程应用、细菌的新表型获得,为以后分子生物领域研究提供重要的基因工具。CRISPR 系统越来越受关注成为广大学者的研究对象,并且 CRISPR 系统研究已取得了显著成果,利用 CRISPR 技术对病原微生物的改造,对病毒感染的抑制,对人类感染性疾病的防治有重大意义,未来 CRISPR 系统会在人类健康和医学发展方面将给我们更多惊喜。

通讯作者简介:毛大庆(1970-),男,理学博士,副教授,主要研究方向为耐药基因的人体健康效应,发表学术论文 50 余篇。

参考文献(References):

[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 Bioinformatics, 2007, 8 (1): 172

[2] Marraffini L A, Sontheimer E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA [J]. Science, 2008, 322(5909): 1843-1845

[3] Marraffini L A. Impact of CRIPSR immunity on the emergence of bacterial pathogens [J]. Future Microbiology, 2010, 5(5): 693-695

[4] Gophna U, Kristensen D M, Wolf Y I, et al. No evidence of inhibition of horizontal gene transfer by CRISPR-Cas on evolutionary timescales [J]. ISME Journal, 2015, 9(9): 2021-2027

[5] Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats [J]. Genome Biology, 2007, 8(4): R61

[6] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea [J]. Science, 2010, 327(5962): 167-170

[7] Makarova K S, Grishin N V, Shabalina S A, 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]. Biology Direct, 2006, 1: 7

[8] Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477

[9] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. Nature, 2011, 471(7340): 602-607

[10] Wang R Y, Preamplume G, Terns M P, et al. Interaction of the Cas6 riboendonuclease with CRISPR RNAs: Recognition and cleavage [J]. Structure, 2011, 19(2): 257-264

[11] Terns M P, Terns R M. CRISPR-based adaptive immune systems [J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, 14 (3): 321-327

[12] Wiedenheft B, Sternberg S H, Doudna J A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea [J]. Nature, 2012, 482(7385): 331-338

[13] Marraffini L A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes [J]. Nature, 2015, 526(7571): 55-61

[14] Deveau H, Garneau J E, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in Phage-Bacteria interactions [J]. Annual Review of Microbiology, 2010, 64: 475-493

[15] 陶欢, 高俊, 柏银兰. CRISPR-Cas 系统在细菌生理中的作用[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(5): 733-736
Tao H, Gao J, Bai Y L. Progress of CRISPR-Cas system in bacertial physiology processes [J]. Letters in Biotechnology, 2015, 26(5): 733-736 (in Chinese)

[16] 杨超杰, 邱少富, 宋宏彬. CRISPR 结构与功能研究进展[J]. 军事医学, 2013, 37(2): 155-158
Yang C J, Qiu S F, Song H B. Advances in research on structure and function of CRISPR [J]. Military Medical Sciences, 2013, 37(2): 155-158 (in Chinese)

[17] 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

[18] Citorik R J, Mimee M, Lu T K. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(11): 1141-1145

[19] Alex V B, Soriaga L B, Lafave M C, et al. Phylogenetic

distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Mbio, 2015, 6(6): e01796-15

[20] 薛泽润. 志贺菌中 CRISPR 的分布及其结构特征[D]. 郑州: 郑州大学, 2014: 1-66
Xue Z R. The distribution and characteristic of CRISPR in *Shigella* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2014: 1-66 (in Chinese)

[21] 王琳琳, 王颖芳, 段广才, 等. 志贺菌 CRISPR 的检测及其与耐药的关系[J]. 微生物学报, 2015(4): 476-483
Wang L L, Wang Y F, Duan G C, et al. Detection of CRISPR and its relationship to drug resistance in *Shigella* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015(4): 476-483 (in Chinese)

[22] 蔡银强, 李求春, 陶静, 等. 沙门菌 CRISPR 的结构与功能研究进展[J]. 动物医学进展, 2015(2): 97-100
Cai Y Q, Li Q C, Tao J, et al. Advance in structures and functions of CRISPR in *Salmonella* [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015(2): 97-100 (in Chinese)

[23] Zhang B, Hong L J, Duan G C, et al. Changes of resistant phenotype and CRISPR/Cas system of four *Shigella* strains passaged for 90 times without antibiotics [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2017, 38(2): 235-239

[24] Kang Y K, Kwon K, Ryu J S, et al. Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance [J]. Bioconjugate Chemistry, 2017, 28(4): 957-967

[25] Müller V, Rajer F, Frykholm K, et al. Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37938

[26] Thibault S, Olivier B, Magali C, et al. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance [J]. Frontiers in Microbiology, 2012, 3(119): 119

[27] Wang Q, Qian L, Mao D, et al. The horizontal transfer of antibiotic resistance genes is enhanced by ionic liquid with different structure of varying alkyl chain length [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 864

[28] Palmer K L, Gilmore M S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas [J]. Mbio, 2010, 1(4): 516-524

[29] Gill S R, Fouts D E, Archer G L, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(7): 2426-2438

[30] Yang S Y, Liu J, Shao F Y, et al. Analysis of the features of 45 identified CRISPR loci in 32 *Staphylococcus aureus* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 464(3): 894-900

[31] Nozawa T, Furukawa N, Aikawa C, et al. CRISPR inhibition of prophage acquisition in *Streptococcus pyogenes* [J]. Plos One, 2011, 6(5): e19543

[32] Yosef I, Goren M G, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(12): 5569-5576

[33] Louwen R, Horst-Kreft D, de Boer A G, et al. A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2013, 32(2): 207-226

[34] Chylinski K, Le Rhun A, Charpentier E. The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems [J]. RNA Biology, 2013, 10(5): 726-737

[35] de la Fuente-Nunez C, Lu T K. CRISPR-Cas9 technology: Applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects [J]. Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro, 2017, 9(2): 109-122

[36] Wang Z, Pan Q, Gendron P, et al. CRISPR/Cas9-derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape [J]. Cell Reports, 2016, 15(3): 481

[37] Ramanan V, Shlomai A, Cox D B, et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 10833

[38] van Diemen F R, Kruse E M, Hooykaas M J, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections [J]. Plos Pathogens, 2016, 12(6): e1005701

[39] Koch G, Yepes A, Förstner K U, et al. Evolution of resistance to a last-resort antibiotic in *Staphylococcus aureus* via bacterial competition [J]. Cell, 2014, 158(5): 1060-1071

[40] 张佳奇, 徐艳, 罗义, 等. 重金属协同选择环境细菌抗生素抗性及其机制研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(3): 409-418
Zhang J Q, Xu Y, Luo Y, et al. Co-selection mechanisms of bacterial resistance to heavy metals and antibiotics [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2016, 35(3): 409-418 (in Chinese)

[41] Zegans M E, Wagner J C, Cady K C, et al. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(1): 210-219

[42] Palmer K L, Whiteley M. DMS3-42: The secret to

CRISPR-dependent biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(14): 3431-3432

[43] Sampson T R, Weiss D S. Degeneration of a CRISPR/Cas system and its regulatory target during the evolution of a pathogen [J]. RNA Biology, 2013, 10(10): 1618-1622

[44] 高志奇, 王东澍, 冯尔玲, 等. 炭疽芽胞杆菌中 CRISPR 位点[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1362-1368
Gao Z Q, Wang D S, Feng E L, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) site in *Bacillus anthracis* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11): 1362-1368 (in Chinese)

[45] Burkard C, Lillico S G, Reid E, et al. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function [J]. Plos Pathogens, 2017, 13(2): e1006206 ◆