

# 鲍曼不动杆菌 CRP 蛋白通过调控 *cas3* 基因表达增强细菌毒力的机制

黄佳媛<sup>1</sup>, 黄心悦<sup>1</sup>, 於亭<sup>2</sup>, 袁文杰<sup>2</sup>, 陈平<sup>3</sup>, 胡健<sup>4</sup>, 谢军<sup>3</sup>, 李国才<sup>1,5,6\*</sup>

1 扬州大学 医学部 基础医学院·公共卫生学院, 江苏 扬州

2 扬州大学 医学部 第一临床医学院, 江苏 扬州

3 盱眙县人民医院(扬州大学医学部附属盱眙临床学院), 江苏 盱眙

4 宜兴市中医医院(扬州大学医学部附属宜兴市中医医院), 江苏 宜兴

5 扬州大学广陵学院, 江苏 扬州

6 扬州大学, 核酸与细胞命运调控省高校重点实验室, 江苏 扬州

黄佳媛, 黄心悦, 於亭, 袁文杰, 陈平, 胡健, 谢军, 李国才. 鲍曼不动杆菌 CRP 蛋白通过调控 *cas3* 基因表达增强细菌毒力的机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(2): 867-880.

HUANG Jiayuan, HUANG Xinyue, YU Ting, YUAN Wenjie, CHEN Ping, HU Jian, XIE Jun, LI Guocai. cAMP receptor protein enhances *Acinetobacter baumannii* virulence by regulating *cas3* expression[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(2): 867-880.

**摘要:** 【目的】探究鲍曼不动杆菌转录调控因子 cAMP 受体结合蛋白(cAMP receptor protein, CRP)对 *cas3* 基因的功能调控作用。【方法】利用原核表达系统表达并纯化 CRP 蛋白, 采用电泳迁移率变动分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实验探究 CRP 对 *cas3* 启动子的结合作用, 并通过 qPCR 明确 CRP 对 *cas3* 基因的调控作用。为进一步确认 CRP 对 *cas3* 的功能调控作用, 构建  $\Delta crp$  突变株, 通过生物被膜实验、黏附侵袭实验、大蜡螟毒力实验以及小鼠细菌感染模型分析 *crp* 对鲍曼不动杆菌毒力的影响。【结果】EMSA 实验表明 CRP 蛋白可与 *cas3* 基因启动子特异性结合; qPCR 结果表明,  $\Delta crp$  突变株 *cas3* 转录水平显著下降( $P<0.001$ )。与野生株相比,  $\Delta crp$  突变株在生长能力方面无明显差异, 但生物被膜形成能力显著增强( $P<0.001$ ), 对 A549 细胞的黏附( $P=0.003<0.050$ )和侵袭( $P<0.001$ )能力也明显增强。 $\Delta crp$  突变株在 72 h 内对大蜡螟的致死率显著提高, 且小鼠感染实验结果表明,  $\Delta crp$  突变株在肺部的定殖能力显著高于野生株( $P<0.001$ )。【结论】CRP 作为一种转录激活因子, 可直接结合 *cas3* 启动子并激活其转录表达, 进而降低鲍曼

资助项目: 国家自然科学基金(82373637, 82073611, 82002186); 江苏省自然科学基金(BK20231241); 江苏省卫生健康委科研项目(ZQ2024025); 扬州市科技局社会发展项目(YZ2023104); 无锡市卫生健康委科研项目(M202424)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82373637, 82073611, 82002186), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20231241), the Jiangsu Commission of Health Science Foundation (ZQ2024025), the Yangzhou City Key Research and Development Project (YZ2023104), and the Wuxi Commission of Health Science Foundation (M202424).

\*Corresponding author. Tel: +86-514-87978860, E-mail: gcli@yzu.edu.cn

Received: 2025-09-08; Accepted: 2025-10-22; Published online: 2025-11-13

不动杆菌的毒力和致病性。

关键词：鲍曼不动杆菌；cAMP受体结合蛋白；*cas3*；毒力

## cAMP receptor protein enhances *Acinetobacter baumannii* virulence by regulating *cas3* expression

HUANG Jiayuan<sup>1</sup>, HUANG Xinyue<sup>1</sup>, YU Ting<sup>2</sup>, YUAN Wenjie<sup>2</sup>, CHEN Ping<sup>3</sup>, HU Jian<sup>4</sup>, XIE Jun<sup>3</sup>, LI Guocai<sup>1,5,6\*</sup>

1 School of Basic Medical Sciences & School of Public Health, Faculty of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

2 The First School of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

3 Xuyi People's Hospital (Xuyi Clinical College Affiliated to Faculty of Medicine, Yangzhou University), Xuyi, Jiangsu, China

4 Yixing Traditional Chinese Medicine Hospital (Yixing Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Faculty of Medicine, Yangzhou University), Yixing, Jiangsu, China

5 Guangling College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

6 The Key Laboratory of the Jiangsu Higher Education Institutions for Nucleic Acid & Cell Fate Regulation, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

**Abstract:** **[Objective]** To investigate the regulatory effect of the cAMP receptor protein (CRP), a transcription factor in *Acinetobacter baumannii*, on the *cas3* gene. **[Methods]** CRP was expressed and purified *via* a prokaryotic expression system. EMSA was employed to examine CRP binding to the *cas3* promoter. qPCR was conducted to evaluate the regulatory effect of CRP on *cas3* expression. To further confirm the regulatory function of CRP, we constructed a mutant strain  $\Delta crp$ . The impact of *crp* deletion on *A. baumannii* virulence was then analyzed *via* the biofilm formation assay, adhesion and invasion assays with A549 cells, a *Galleria mellonella* model, and a murine model of bacterial infection. **[Results]** EMSA demonstrated that CRP specifically bound to the *cas3* promoter. The qPCR results showed that *cas3* transcription was downregulated ( $P < 0.001$ ) in  $\Delta crp$ . Compared with the wild-type strain,  $\Delta crp$  exhibited no significant difference in growth capacity but enhanced biofilm formation ( $P < 0.001$ ) as well as strengthened adhesion ( $P = 0.003 < 0.050$ ) and invasion ( $P < 0.001$ ) in A549 cells. Furthermore,  $\Delta crp$  demonstrated a markedly increased lethality rate in *G. mellonella* within 72 h. Furthermore, the murine infection experiment revealed that  $\Delta crp$  possessed higher colonization capacity in the lungs than the wild-type strain ( $P < 0.001$ ). **[Conclusion]** CRP acts as a transcriptional activator that directly binds to the *cas3* promoter to activate its transcription, thereby attenuating the virulence and pathogenicity of *A. baumannii*.

**Keywords:** *Acinetobacter baumannii*; cAMP receptor protein; *cas3*; virulence

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)是一种非发酵型革兰氏阴性杆菌, 具有极强的环境适应能力, 可广泛存在于自然界和医院环境中, 进而增加患者感染风险<sup>[1-2]</sup>。该菌能引发肺炎、菌血症、脑膜炎、伤口感染以及泌尿系统感染等多种人类疾病<sup>[3]</sup>, 其中菌血症和肺炎最为常见, 且其并发症发生率和死亡率较高<sup>[4]</sup>。在全球范围内约 45% 的鲍曼不动杆菌分离株呈现多重耐药特性<sup>[2]</sup>, 拉丁美洲和中东地区的情况更为严峻, 多重耐药感染率高达 70%<sup>[5]</sup>。鲍曼不动杆菌如此高的多重耐药率给全球公共卫生安全带来了巨大挑战<sup>[6-7]</sup>。

CRISPR-Cas 系统是细菌的一种获得性免疫系统<sup>[8]</sup>, 其主要功能是抵御噬菌体、质粒等外源遗传物质的入侵<sup>[9]</sup>。该系统由 CRISPR 序列、前导序列和 CRISPR 相关基因组成。CRISPR 序列由一系列短的重序列和间隔序列交替排列形成, 重序列长度一般在 20-50 bp 之间, 具有特定的二级结构, 能够被 Cas 蛋白识别和结合; 间隔序列来源于曾入侵过细菌的外源 DNA 片段, 这些片段如同“记忆标签”, 记录着细菌所遭遇的外源威胁。当外源遗传物质再次入侵时 CRISPR-Cas 系统会被激活, CRISPR 序列转录生成 CRISPR RNA (crRNA), crRNA 与 Cas 蛋白结合形成复合物, 凭借间隔序列与外源 DNA 的互补配对, 引导复合物准确识别并切割外源 DNA, 从而保护细菌免受感染<sup>[10]</sup>。

根据 Cas 蛋白的组成, 目前 CRISPR-Cas 系统分为两大类: Class 1 和 Class 2, Class 1 包括 I、III、IV 型, Class 2 包含 II、V、VI 型<sup>[11]</sup>。I 型 CRISPR-Cas 系统在细菌中分布最为广泛, I-F 型 CRISPR-Cas 系统是鲍曼不动杆菌中存在的主要类型, 其中 I-Fb 亚型分布最为广泛<sup>[12]</sup>, 由 *csy1*、*csy2*、*csy3*、*csy4*、*cas1*、*cas3* 基因组成。其中, *cas3* 基因是 I 型 CRISPR-Cas 系统中的关键基因, 它编码一种具有独立解旋酶和脱氧核糖核酸酶活性的蛋白, 负责对外源 DNA 进行切割降解<sup>[13]</sup>。

在鲍曼不动杆菌中, 尽管 CRISPR-Cas 系统可抵御外源核酸入侵并限制耐药基因获取, 但其活性受多重因素制约。近年来研究发现, CRISPR-Cas 系统的稳定性受到调控因子的精密调控。其中, CRP 是一种广泛存在于细菌中的全局调节因子, 参与细菌多种生理过程的调控, 如碳源代谢、生物被膜形成、毒力因子表达等<sup>[14]</sup>。然而, 关于 CRP 在鲍曼不动杆菌中的具体功能, 尤其是对 CRISPR-Cas 系统的调控作用目前尚不清楚。因此, 本研究旨在深入探究转录调控因子 CRP 在鲍曼不动杆菌中对 *cas3* 基因的调控作用及其对细菌毒力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细菌、质粒、细胞和实验动物

鲍曼不动杆菌 AB43 野生株<sup>[15]</sup> (NCBI 登录号为 CP083181.1), pET-30a 质粒(卡那霉素抗性, 携带 His 标签的蛋白表达载体)、pAT03 质粒(氨苄青霉素抗性, 带有 FLP 位点的 PMMB67 EH 质粒, 用于消除卡那抗性基因)、pAT04 质粒(四环素抗性, 带有 *Rec<sub>AB</sub>* 重组系统的 PMMB67 EH 质粒, 用于同源重组)、pKD4 质粒(卡那霉素抗性, 用于扩增含有 FRT 位点的卡那片段)<sup>[16]</sup>、pBRAB 质粒(氨苄青霉素抗性, 携带含有质粒 pWH1266 复制起点的 pBR322-Tac 质粒, 用于回补载体构建)均为实验室保存。肺癌人类肺泡基底上皮细胞 A549 为本实验室保存。18 只 8 周龄 SPF 级 BALB/c 雌鼠由扬州大学比较医学中心提供。40 只大蜡螟(300 mg)购自天津惠裕德生物科技有限公司。本研究所有动物实验均获得扬州大学动物伦理委员会的批准, 编号为 YXYLL-2023-061。

### 1.2 主要试剂和仪器

2×KeyPo SE Master Mix、FastPure Plasmid Mini Kit、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *Bam*H I、*Xho* I、*Eco*R I、*Hind* III 限制性核酸内切酶、TaKaRa

MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit v3.0、Cy5 标记的引物，TaKaRa 公司；Seamless Cloning Kit，上海碧云天生物技术股份有限公司；SteadyPure RNA 提取试剂盒、Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒、SYBR Green SupTaq HS 预混型 qPCR 试剂盒，湖南艾科瑞生物工程有限公司；1640 细胞培养基、胰酶、胎牛血清，镇江维根生物科技有限公司；NaCl、胰蛋白酶、酵母粉、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、imidazde、HEPES、DTT、Tween-20、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、KCl、EDTA，北京索莱宝科技有限公司；6×His Tag Recombinant Mouse Monoclonal Antibody [A5D1-R]，杭州华安生物技术有限公司。

### 1.3 培养基与缓冲液配制

LB 液体培养基(g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白酶 10.0, 酵母粉 5.0。非变性裂解液 (mmol/L): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50, NaCl 300, pH 8.0。非变性洗涤液 (mmol/L): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50, NaCl 300, imidazde

25, pH 8.0。非变性洗脱液 (mmol/L): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 500, NaCl 300, imidazde 250, pH 8.0。5×EMSA 结合缓冲液 (mmol/L): HEPES 100, DTT 5, Tween-20 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50, KCl 150, EDTA 5。

### 1.4 引物

本研究所使用的引物序列见表 1。

### 1.5 鲍曼不动杆菌 AB43 基因组提取

将 AB43 野生株四区划线于无抗的 LB 平板上，37 °C 培养过夜，挑取单菌落接至无抗的 LB 液体培养基中，37 °C、200 r/min 培养 12 h，按照 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit v3.0 提取 AB43 基因组 DNA。

### 1.6 CRP 蛋白的制备

#### 1.6.1 CRP 蛋白的原核表达及纯化

使用 Seamless Cloning Kit (无缝克隆试剂盒) 构建 pET30a-CRP 重组质粒，鉴定正确后将质粒转化进 *E. coli* BL21(DE3) 感受态中，将 CRP 蛋白表达菌培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6–0.8 时加入 IPTG

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Product length (bp)
Pcas3-F	GTACAAGTAATTTTTGAATTCCAATTATTTGGCCTATGGCC	297
Pcas3-R	GTAGACGGTATCGATAAGCTTCTTTCACTCTCCAAATTTGG	
cas3-F	GTACAAGTAATTTTTGAATTCCAATTATTTGGCCTATGGCC	297
cas3-R	GTAGACGGTATCGATAAGCTTCTTTCACTCTCCAAATTTGG	
CRP-protein-F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGACTTCAAATTTTTCACAACCTC	708
CRP-protein-R	GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTATTTCTCGTCATCATAGTC	
CRP-up-F	AATGCCAGTGTGACCAAG	171
CRP-up-R	GAGCAAACCTTCGGTTTGC	
CRP-down-F	CACACAAGCTCGAGATGA	215
CRP-down-R	GCGCAAGGCCAGATTTTT	
CRP-k-F	GCAAACCGAAGTTTGTCTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	1 518
CRP-k-R	TCATCTCGAGCTTGTGTGGTCCATATGAATATCCTCCTTAG	
CRP-com-F	CCCTTTCGTCTTCAAGAATTCAATTTAAGCAGGGTCTGTTG	1 122
CRP-com-R	TAAACTACCGCATTAAAGCTTTATTCTTCGTTCATCATAGTC	
16S-RNA-F	GTTGTGGCTTTAGGTTTATTATAACG	
16S-RNA-R	AAGTTACTCGACGCAATTCG	
q-cas3-F	GAATCAAACCTTGGGACGAGG	
q-cas3-R	AACCAAGCAGCTAATTGAGC	

使其终浓度为 1 mmol/L, 诱导 6 h 后 4 °C、8 000 r/min 离心 6 min 收集菌沉淀。加入非变性裂解液重悬菌体, 4 °C 超声破碎, 超声功率为 350 W, 超声时间为 40 min (超 5 s 停 5 s)。超声结束后, 分离上清和沉淀, 使用 SDS-PAGE 检测 CRP 蛋白的表达情况。

将离心后的上清(可溶性 CRP 蛋白表达于上清中)加入混合均匀的 50% BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐还原螯合剂), 放置于 4 °C 混匀仪上混匀 30 min。将混合液体倒入亲和层析柱, 在重力作用下使柱内液体流出, 连续反复过柱 3 次后, 加入 10 倍柱体积的非变性洗涤液洗去杂蛋白; 最后加入非变性洗脱液洗脱目的蛋白。将洗脱液加入至透析袋中置于 PBS 中进行透析去除咪唑, 最后浓缩置于 -80 °C 保存。

### 1.6.2 CRP 重组蛋白 Western blotting 鉴定

纯化后的 CRP 蛋白与 4×loading buffer 混合均匀后上样进行电泳分离, 然后转印至 NC 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次。与稀释的一抗 His 标签抗体(1:5 000)于 4 °C 过夜孵育, TBST 洗膜 3 次, 1:5 000 稀释的 HRP 标记的鼠二抗室温孵育 2 h, 洗膜 3 次后滴加显影液, 使用成像仪显影。

### 1.7 EMSA

以 AB43 基因组为模板, 使用 Cy5 标记的引物 Pcas3-F/R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μL): 2×KeyPo SE Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 10 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环。切胶纯化后获得 Cy5 荧光标记的 *cas3* 启动子探针。以 AB43 为模板, 使用不带 Cy5 标记的引物 *cas3*-F/R 扩增获得冷探针。将 CRP 蛋白、EMSA 结合缓冲液与探针于 25 °C 条件下温浴 30 min 后, 加入上样缓冲液, 并在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳 (4 °C、100 V 电泳 2 h), 使用光谱成像系统可视化结合带。

## 1.8 缺失株及回补菌株的构建

以 AB43 全基因组为模板, 分别对目的基因上、下游同源臂进行扩增。以 pKD4 质粒为模板对卡那片段进行扩增。胶回收目的片段后, 以上、下游同源臂以及卡那片段为模板, 利用引物 CRP-up-F 和 CRP-down-R 进行 PCR 扩增, 并切胶回收以获得融合片段。

使用 RecA 同源重组技术将目的基因从鲍曼不动杆菌 AB43 中敲除。将已有的 AB43-pAT04 感受态与融合片段混合, 冰上孵育 15 min 后使用电转仪进行电击, 立即加入至 LB 培养基中, 并加入 IPTG, 37 °C、200 r/min 培养 4 h, 菌液离心重悬后涂布至含卡那抗性的 LB 平板上静置培养 24 h, 使用 PCR 筛选阳性菌落。将 pAT03 质粒电转至 AB43Δ*crp*::Kan 感受态中, 筛选阳性菌落, 在 LB 平板上传代直至 pAT03、pAT04 质粒以及卡那片段完全消除。

使用无缝克隆法构建回补质粒 pBRAB-*crp*, 将回补质粒电转至 Δ*crp* 缺失株中, PCR 鉴定的阳性菌株即为回补菌株 Δ*crp*/p*crp*。

## 1.9 qPCR

使用 SteadyPure RNA 提取试剂盒提取细菌总 RNA, 并利用 Evo M-MLV Plus cDNA 合成试剂盒获得细菌 cDNA。使用实时荧光定量 PCR 仪进行 qPCR。以 16S rRNA 基因为内参基因, 并使用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的转录水平。

## 1.10 *crp* 基因缺失对鲍曼不动杆菌表型的影响

### 1.10.1 生长曲线测定

分别挑取 AB43、Δ*crp* 及 Δ*crp*/p*crp* 单克隆接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养, 将菌液 OD<sub>600</sub> 调至 0.5 后, 按 1:100 稀释, 取 200 μL 菌液加入 96 孔板中, 使用酶标仪前 12 h 每隔 1 h 测定 OD<sub>595</sub> 值, 后 12 h 每隔 2 h 检测, 持续检测 24 h。以时间为横坐标, OD<sub>595</sub> 为纵坐标绘制生长曲线。

### 1.10.2 生物被膜形成能力测定

分别挑取 AB43、 $\Delta crp$  及  $\Delta crp/pcrp$  单克隆接种于 LB 液体培养基中 37 °C、200 r/min 培养，将菌液  $OD_{600}$  调至 0.5 后，按 1:100 稀释后取 200  $\mu$ L 菌液加入 96 孔板中，于 37 °C 静置培养 24 h。24 h 后，弃掉菌液，每孔加入 0.4% 的多聚甲醛固定 30 min，随后使用 PBS 洗涤 3 遍并加入 200  $\mu$ L 1% 结晶紫染色 10 min，弃掉滤液，使用 PBS 洗涤 3 遍后晾干，最后加入 95% 乙醇洗脱 30 min，使用酶标仪检测 570 nm 处的吸光值。

### 1.10.3 黏附和侵袭能力测定

参考文献[17]，将 A549 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔均匀铺于 24 孔细胞培养板中，培养至细胞贴壁。将 AB43、 $\Delta crp$  及  $\Delta crp/pcrp$  新鲜菌液以 MOI 值为 100:1 感染细胞 3 h，使细菌充分黏附和侵袭。弃掉上清液，使用无菌 PBS 清洗 3 遍洗去胞外未结合细菌，再加入 1 mL 含 0.1% Triton X-100 的 PBS 裂解细胞 15 min 以释放胞内细菌，倍比稀释利用 LB 平板进行活菌计数，获得细菌黏附和侵袭总数(total)。

将 AB43、 $\Delta crp$  及  $\Delta crp/pcrp$  新鲜菌液以 MOI 值为 100:1 感染细胞培养 3 h 后，PBS 清洗 3 遍，每孔加入 1 mL 含有 50  $\mu$ g/mL 多黏菌素 B 的 PBS，在 37 °C 细胞培养箱中共同孵育 15 min 以杀灭细胞外结合的细菌，随后再加入 1 mL 含 0.1% Triton X-100 的 PBS 裂解细胞 15 min 以释放胞内细菌，倍比稀释利用 LB 平板进行活菌计数获得细菌侵袭数(invasion)，计算如公式(1)所示。

$$\text{黏附数} = \text{侵袭总数} - \text{侵袭数} \quad (1)$$

### 1.10.4 CCK8

将 A549 细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔均匀铺于 96 孔细胞培养板中，加入 AB43、 $\Delta crp$  及  $\Delta crp/pcrp$  新鲜菌液以 MOI 值为 10:1 感染细胞培养 24 h 后，弃去上清，对应孔板中加入 10  $\mu$ L CCK8 溶液，37 °C 孵育 1 h，使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光值。

### 1.10.5 大蜡螟毒力实验

将 40 只大蜡螟分为 4 组，每组 10 只，分别为 PBS 组、AB43 组、 $\Delta crp$  组及  $\Delta crp/pcrp$  组。使用 PBS 将新鲜菌液稀释至  $1 \times 10^8$  CFU/mL，使用胰岛素注射器取 10  $\mu$ L 稀释好的菌液，以大蜡螟第二对后足为注射点进行注射，将注射后的大蜡螟置于 37 °C 培养箱，每 12 h 记录大蜡螟的死亡情况，采用 Kaplan-Meier 法绘制大蜡螟生存曲线<sup>[18]</sup>。

### 1.10.6 小鼠肺部感染模型

将 18 只小鼠分成 3 组，每组 6 只，分别为 AB43 组、 $\Delta crp$  组及  $\Delta crp/pcrp$  组。参考文献[19]，选用 8 周龄 BALB/c 雌性小鼠，在感染前 3 d 每只小鼠腹腔注射 150 mg/kg 的环磷酰胺，感染前 1 d 每只小鼠腹腔注射 100 mg/kg 的环磷酰胺。使用气管插管的方法给麻醉后的小鼠灌入细菌，每只小鼠的细菌接种量为  $3.0 \times 10^8$  CFU/mL。感染 24 h 后，取肺泡灌洗液以及小鼠肺部进行载菌量计数。

## 1.11 数据处理与分析

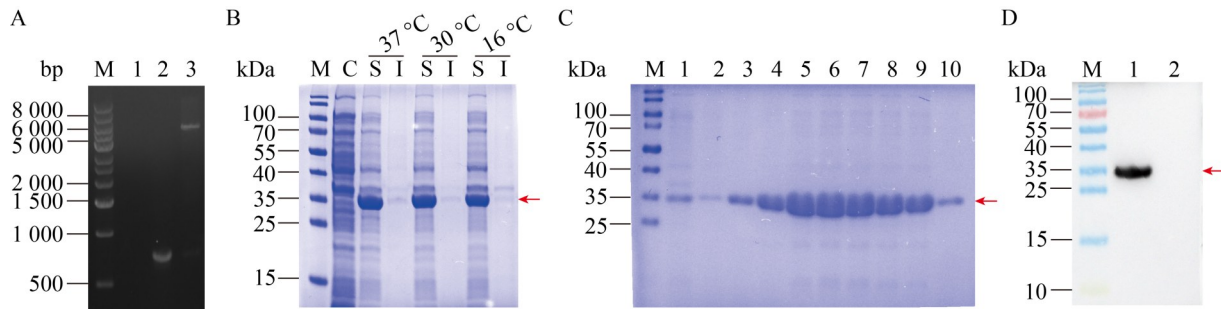
利用 GraphPad Prism 9.5 中的单因素方差分析(one-way ANOVA)对数据进行分析，采用 log-rank 检验对生长曲线进行分析。实验结果以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)格式表示(ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 CRP 蛋白的原核表达

#### 2.1.1 重组质粒 pET30a-CRP 的 PCR 及双酶切鉴定

重组质粒 pET30a-CRP 经 PCR 鉴定可得到与目的片段大小一致的片段，使用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切可得到约 5 400 bp 和 708 bp 的 2 个片段(图 1A)，且测序结果与目的片段一致，表明重组质粒构建正确。



**图1 CRP蛋白的表达纯化及Western blotting验证。** A: 重组质粒pET30a-CRP的PCR及双酶切鉴定(泳道M: DL12000 DNA marker; 泳道1: PCR阴性对照; 泳道2: 重组质粒PCR鉴定结果; 泳道3: 重组质粒双酶切鉴定结果); B: CRP蛋白的表达鉴定(泳道M: 蛋白marker; 泳道C: 未诱导重组菌; 泳道S: 诱导后的上清; 泳道I: 诱导后的沉淀); C: CRP蛋白的纯化(泳道M: 蛋白marker; 泳道1: 流穿液; 泳道2: 裂解液; 泳道3: 洗涤液; 泳道4-9: 洗脱液; 泳道10: 裂解液); D: CRP蛋白的Western blotting (泳道M: 蛋白marker; 泳道1: 纯化后的蛋白; 泳道2: 阴性对照)。

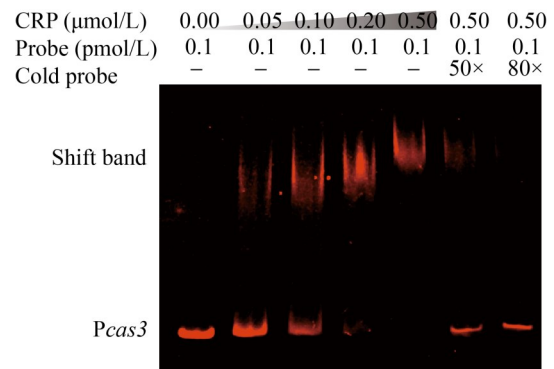
Figure 1 Expression, purification and Western blotting verification of CRP protein. A: PCR and double enzyme digestion identification of pET30a-CRP (Lane M: DL12000 DNA marker; Lane 1: PCR negative control; Lane 2: PCR identification result of recombinant plasmid; Lane 3: Double enzyme digestion identification result of recombinant plasmid); B: Expression identification of CRP protein (Lane M: Protein marker; Lane C: Uninduced recombinant bacteria; Lane S: Supernatant after induction; Lane I: Precipitate after induction); C: Purification of CRP protein (Lane M: Protein marker; Lane 1: Flow-through; Lane 2: Lysate; Lane 3: Wash solution; Lanes 4-9: Elution solution; Lane 10: Lysate); D: Western blotting of CRP protein (Lane M: Protein marker; Lane 1: Purified protein; Lane 2: Negative control).

### 2.1.2 CRP 蛋白的表达纯化及 Western blotting 验证

使用 IPTG 诱导 CRP 蛋白表达，诱导产物经 SDS-PAGE 结果显示，约在 35 kDa 处出现目的条带，与预期大小一致。该蛋白主要在上清中表达，且在不同温度诱导下表达量并无明显变化(图 1B)。破碎后的上清通过镍柱进行纯化，经镍柱纯化后的蛋白纯度明显升高(图 1C)。取浓度较高的蛋白进行透析浓缩，经 Western blotting 鉴定，其与预期蛋白大小一致(图 1D)。

### 2.2 CRP 蛋白与 cas3 启动子结合

使用波长为 650 nm 的激发光激发荧光，结果(图 2)显示在泳道 1 中只加入带有 Cy5 荧光探针标记的 cas3 启动子片段并未有阻滞条带，泳道 2-5 中随着 CRP 蛋白加入量不断增加，阻滞现象逐渐增强。泳道 6-7 在泳道 5 体系的基础上分别加入荧光探针 50 倍和 80 倍的冷探针以竞争结合蛋白，发现阻滞条带消失，排除了探



**图2 EMSA检测CRP蛋白与cas3启动子的结合情况。** cas3探针为Cy5标记的荧光探针，各个泳道加入量均为0.1 pmol/L; 泳道1-5: CRP蛋白上样量分别为0、0.05、0.1、0.2、0.5 μmol/L; 泳道6、7: 在泳道5的基础上加入50倍、80倍的冷探针。

Figure 2 EMSA was used to detect the binding of CRP protein to the cas3 promoter. The cas3 probe was a Cy5-labeled fluorescent probe, and the amount added to each lane was 0.1 pmol/L; Lanes 1-5: The loading amounts of CRP protein were 0, 0.05, 0.1, 0.2, and 0.5 μmol/L; Lanes 6 and 7: 50-fold and 80-fold cold probes were added on the basis of lane 5.

针与蛋白的非特异性结合的可能。上述表明 CRP 蛋白可以直接结合于 *cas3* 启动子区域。

## 2.3 鲍曼不动杆菌 $\Delta crp$ 突变株及 $\Delta crp/pcrp$ 回补株的构建

### 2.3.1 $\Delta crp$ 突变株的构建

以 AB43 基因组为模板扩增 *crp* 基因上、下游同源臂, 分别为 171 bp 和 215 bp。以 pKD4 质粒扩增卡那抗性片段, 为 1 518 bp。融合后获得约 1 868 bp 片段(图 3A)。利用 RecA 同源重组技术, 用卡那抗性基因替换 AB43 的 *crp* 基因, 使用引物 CRP-up-F/CRP-down-R 进行 PCR 鉴定证实替换成功(图 3B)。随后消除卡那抗性片段及辅助质粒 pAT03/pAT04 (图 3C), 成功获得 AB43 $\Delta crp$  突变株。

### 2.3.2 $\Delta crp/pcrp$ 回补株的构建

使用无缝克隆试剂盒构建 pBRAB-*crp* 回补质粒。使用 PCR 及双酶切鉴定, PCR 扩增片段大小为 1 122 bp, 使用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切可以得到约 8 000 bp、1 122 bp 的 2 个片段(图 3D)。将回补质粒电转入 AB43 $\Delta crp$  突变株中获得  $\Delta crp/pcrp$  回补株。

## 2.4 qPCR 检测 *crp* 及 *cas3* 转录水平

使用 qPCR 技术检测 AB43 野生株、 $\Delta crp$  突变株及  $\Delta crp/pcrp$  回补株中 *crp* 基因的转录情况(图 4A), 在  $\Delta crp$  突变株中 *crp* 基因不转录而在  $\Delta crp/pcrp$  回补株中 *crp* 基因的转录情况已恢复至野生株水平, 两者之间差异无统计学意义。这表明  $\Delta crp$  突变株及  $\Delta crp/pcrp$  回补株已成功构建。

为了明确 *crp* 对 *cas3* 的调控作用, 使用 qPCR 技术检测 AB43 野生株、 $\Delta crp$  突变株及  $\Delta crp/pcrp$  回补株中 *cas3* 基因的转录情况。结果显示(图 4B), *crp* 基因敲除后, *cas3* 基因表达明显下降( $P < 0.001$ ), 将 *crp* 基因回补至敲除株后, *cas3* 基因转录水平与 AB43 野生株一致。因此, *crp* 基因可以激活 *cas3* 的转录表达。

## 2.5 *crp* 基因缺失对鲍曼不动杆菌表型的影响

### 2.5.1 *crp* 基因缺失不会影响鲍曼不动杆菌的生长

在 LB 培养基中测定 AB43 野生株、 $\Delta crp$  突变株以及  $\Delta crp/pcrp$  回补株的 24 h 生长曲线。与野生株相比,  $\Delta crp$  突变株的生长无明显差异(图 5), 表明 *crp* 基因的缺失不影响 AB43 菌株的正常生长。

### 2.5.2 *crp* 基因缺失增强鲍曼不动杆菌生物被膜形成能力

利用结晶紫染色法对 AB43 野生株、 $\Delta crp$  突变株以及  $\Delta crp/pcrp$  回补株的生物被膜形成能力进行检测。结果显示(图 6),  $\Delta crp$  突变株生物被膜形成能力增强( $P < 0.001$ ), AB43 野生株以及  $\Delta crp/pcrp$  回补株之间无明显差异。

### 2.5.3 *crp* 基因缺失增强了鲍曼不动杆菌的黏附侵袭能力

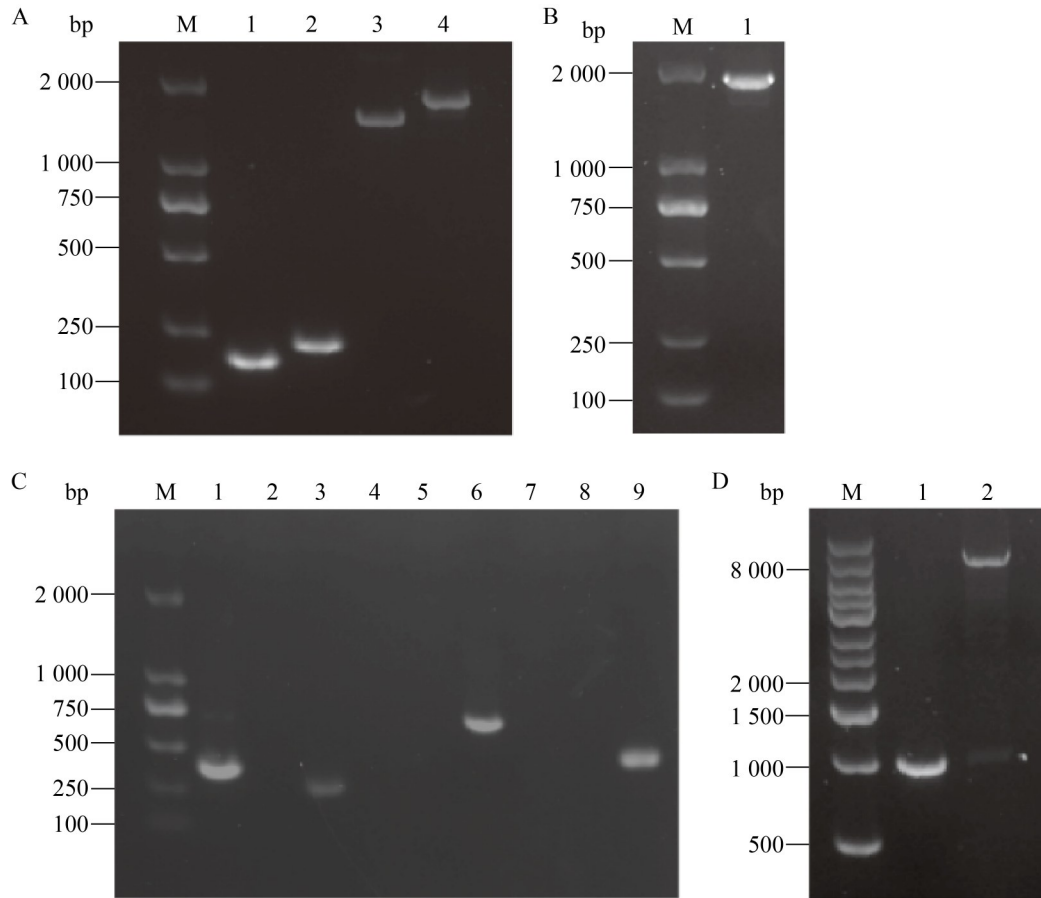
细菌黏附侵袭能力是判断细菌致病性强弱的重要指标, 以 A549 细胞为模型, 评估 *crp* 基因缺失对鲍曼不动杆菌黏附侵袭能力的影响。结果表明,  $\Delta crp$  突变株侵袭力和黏附能力明显升高,  $\Delta crp/pcrp$  回补株的侵袭黏附能力也恢复至野生株的水平(图 7)。上述结果表明, *crp* 基因缺失增强了鲍曼不动杆菌的黏附侵袭能力。

### 2.5.4 *crp* 基因缺失增强了对 A549 细胞的杀伤作用

为了探究 *crp* 基因对细胞增殖的影响, 使用 AB43 野生株、 $\Delta crp$  突变株以及  $\Delta crp/pcrp$  回补株感染 A549 细胞, 利用 CCK8 法检测细胞活力。结果表明(图 8),  $\Delta crp$  突变株感染细胞后细胞活力下降( $P < 0.05$ )。这表明 *crp* 基因缺失对 A549 细胞的杀伤作用增强。

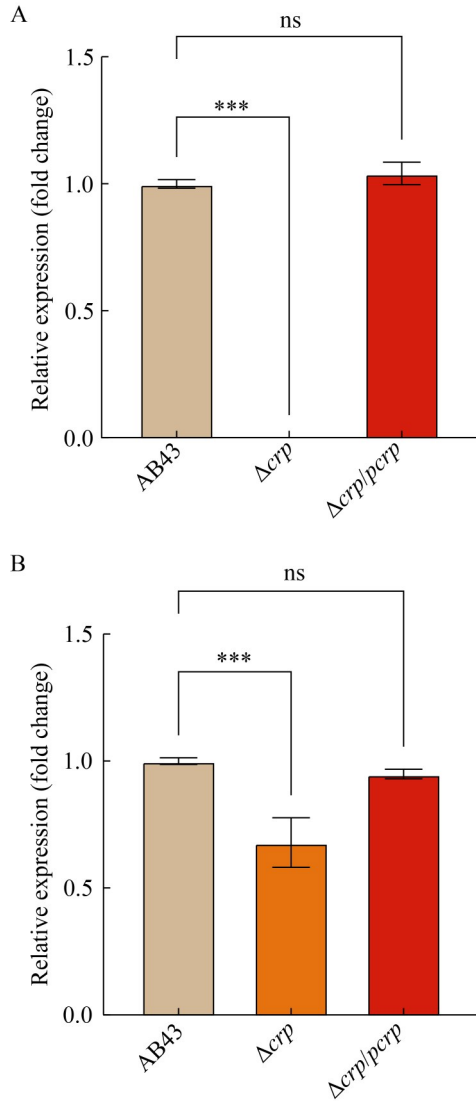
### 2.5.5 *crp* 基因缺失增强了鲍曼不动杆菌的毒力

大蜡螟感染细菌模型是一种成本较低、重复性较好的体内感染模型。以大蜡螟为模型,



**图3**  $\Delta crp$ 突变株及 $\Delta crp/pcrp$ 回补株的鉴定。A: *crp*基因上、下游同源臂、卡那抗性基因片段及融合片段扩增(泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1: 上游同源臂; 泳道2: 下游同源臂; 泳道3: 卡那抗性片段; 泳道4: 融合片段); B: AB43 $\Delta crp::Kan$ 的鉴定(泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1: AB43 $\Delta crp::Kan$  PCR鉴定); C: AB43 $\Delta crp$ 的鉴定(泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1: 卡那抗性消除; 泳道2: 阴性对照; 泳道3: pAT03质粒阳性对照; 泳道4: pAT03质粒消除; 泳道5: 阴性对照; 泳道6: *crp*原基因; 泳道7: *crp*基因消除; 泳道8: pAT04质粒消除; 泳道9: pAT04质粒阳性对照); D: 回补质粒的鉴定(泳道M: DL12000 DNA marker; 泳道1: 重组回补质粒PCR鉴定结果; 泳道2: 重组回补质粒双酶切鉴定结果)。

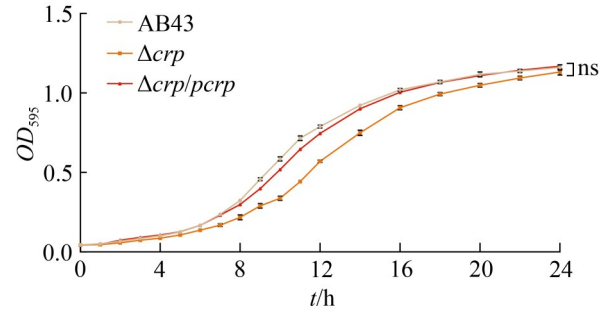
Figure 3 Identification of the  $\Delta crp$  mutant strain and the  $\Delta crp/pcrp$  complemented strain. A: Amplification of the upstream and downstream homologous arms of the *crp* gene, the kanamycin resistance gene fragment, and the fusion fragment (Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Upstream homologous arm; Lane 2: Downstream homologous arm; Lane 3: Kanamycin resistance fragment; Lane 4: Fusion fragment); B: Identification of AB43 $\Delta crp::Kan$  (Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: PCR identification of AB43 $\Delta crp::Kan$ ); C: Identification of AB43 $\Delta crp$  (Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Elimination of kanamycin resistance; Lane 2: Negative control; Lane 3: Positive control of pAT03 plasmid; Lane 4: Elimination of pAT03 plasmid; Lane 5: Negative control; Lane 6: Original *crp* gene; Lane 7: Elimination of *crp* gene; Lane 8: Elimination of pAT04 plasmid; Lane 9: Positive control of pAT04 plasmid); D: Identification of the complemented plasmid (Lane M: DL12000 DNA marker; Lane 1: PCR identification result of the recombinant complemented plasmid; Lane 2: Double enzyme digestion identification result of the recombinant complemented plasmid).



**图4** qPCR检测AB43、 $\Delta crp$ 突变株及 $\Delta crp/pcrp$ 回补株中 $crp$ 及 $cas3$ 基因的转录水平。A:  $crp$ 基因的转录水平；B:  $cas3$ 基因的转录水平。

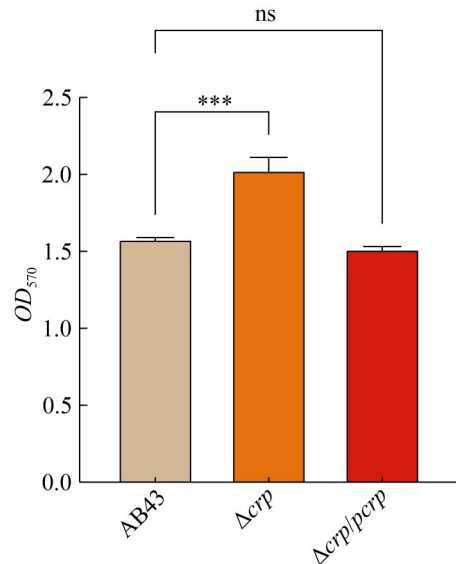
Figure 4 qPCR detection of the transcription levels of the  $crp$  and  $cas3$  gene in the AB43,  $\Delta crp$  mutant, and  $\Delta crp/pcrp$  complemented strain. A: Transcription level of the  $crp$  gene; B: Transcription level of the  $cas3$  gene.

评估  $crp$  基因对鲍曼不动杆菌毒力的影响。结果表明,  $\Delta crp$  感染以后大蜡螟死亡较快, 36 h 时已全部死亡, 而 AB43 野生株及  $\Delta crp/pcrp$  回补株 72 h 时仍旧有约 25% 的大蜡螟存活(图 9)。



**图5** AB43野生株、 $\Delta crp$ 突变株以及 $\Delta crp/pcrp$ 回补株的生长曲线

Figure 5 Growth curves of the AB43 wild-type strain, the  $\Delta crp$  mutant strain, and the  $\Delta crp/pcrp$  complemented strain.



**图6** AB43野生株、 $\Delta crp$ 突变株以及 $\Delta crp/pcrp$ 回补株生物被膜形成能力检测( $n=3$ )

Figure 6 Detection of biofilm formation ability of the AB43 wild-type strain,  $\Delta crp$  mutant strain, and  $\Delta crp/pcrp$  complemented strain ( $n=3$ ).

综上所述,  $crp$  基因缺失增加对大蜡螟的致死率。

### 2.5.6 $crp$ 基因缺失增强了鲍曼不动杆菌在小鼠肺部的定殖能力

为了评估 AB43 野生株、 $\Delta crp$  突变株以及  $\Delta crp/pcrp$  回补株在小鼠体内的定殖情况, 对小

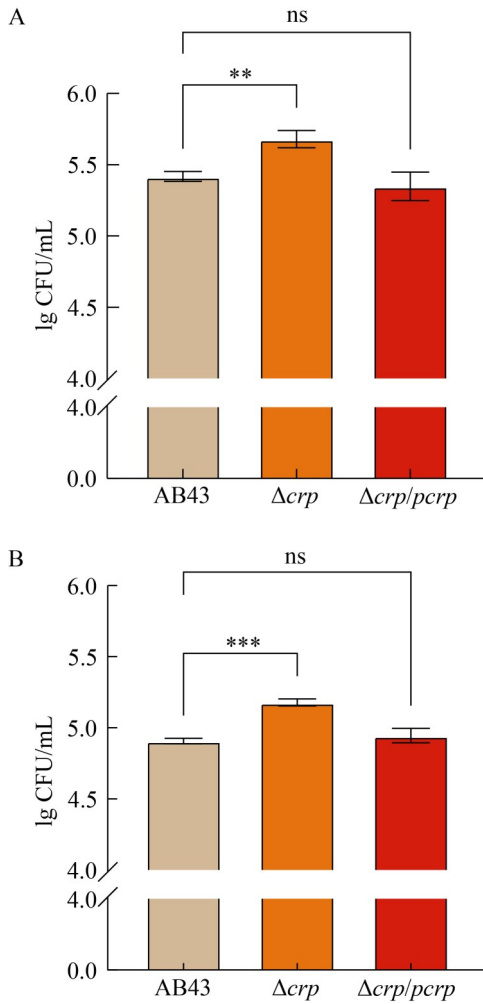


图7 AB43野生株、 $\Delta crp$ 突变株以及 $\Delta crp/pcrp$ 回补株黏附侵袭能力检测( $n=3$ )。A: 各菌株在A549细胞上的黏附能力测定; B: 各菌株在A549细胞上的侵袭能力测定。

Figure 7 Detection of adhesion and invasion abilities of the AB43 wild-type strain,  $\Delta crp$  mutant strain, and  $\Delta crp/pcrp$  complemented strain ( $n=3$ ). A: Determination of the adhesion ability of each strain to A549 cells; B: Determination of the invasion ability of each strain to A549 cells.

鼠进行气管插管构建小鼠肺部感染模型, 在感染 24 h 以后, 取小鼠肺部组织以及肺泡灌洗液测定载菌量。结果表明(图 10),  $\Delta crp$  突变株在小鼠肺部定殖能力显著高于 AB43 野生株,  $\Delta crp$

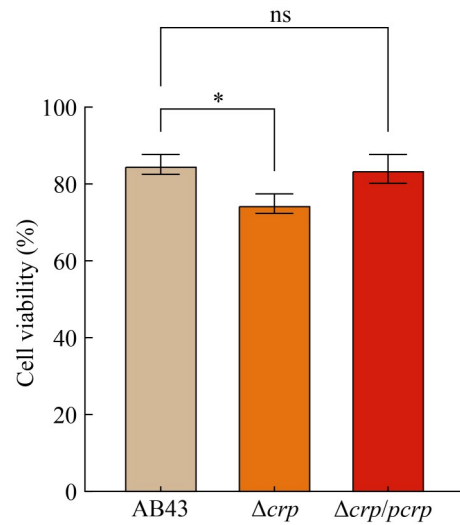


图8 经AB43野生株、 $\Delta crp$ 突变株以及 $\Delta crp/pcrp$ 回补株感染的A549细胞活力检测( $n=3$ )

Figure 8 Detection of the viability of A549 cells infected with the AB43 wild-type strain, the  $\Delta crp$  mutant strain, and the  $\Delta crp/pcrp$  complemented strain ( $n=3$ ).

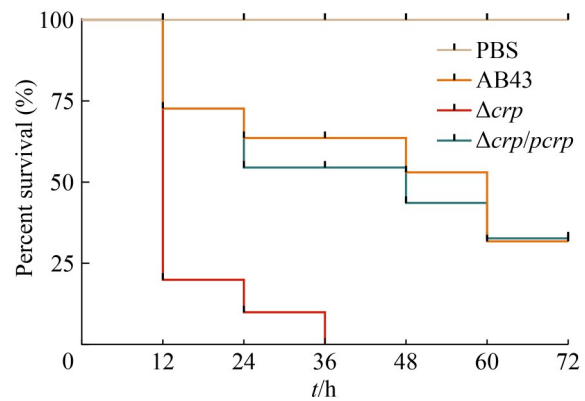


图9 AB43野生株、 $\Delta crp$ 突变株以及 $\Delta crp/pcrp$ 回补株感染大蜡螟幼虫的存活率( $n=10$ )

Figure 9 Survival rates of *Galleria mellonella* larvae infected with the AB43 wild-type strain, the  $\Delta crp$  mutant strain, and the  $\Delta crp/pcrp$  complemented strain ( $n=10$ ).

突变株在肺泡灌洗液中的载菌量也高于 AB43 野生株及  $\Delta crp/pcrp$  回补株, 表明 *crp* 基因缺失增强了鲍曼不动杆菌在小鼠肺部的定殖能力。

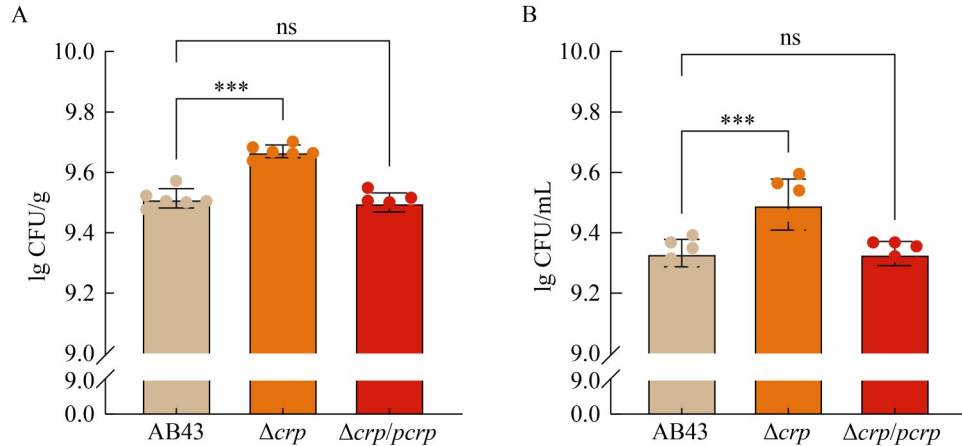


图10 AB43野生株、 $\Delta crp$ 突变株以及 $\Delta crp/pcrp$ 回补株在小鼠肺部以及肺泡灌洗液中荷菌量的检测( $n=6$ )。

A: 细菌在小鼠肺部中的荷菌量检测; B: 细菌在肺泡灌洗液中的荷菌量检测。

Figure 10 Detection of bacterial loads of the AB43 wild-type strain,  $\Delta crp$  mutant strain, and  $\Delta crp/pcrp$  complemented strain in mouse lungs and bronchoalveolar lavage fluid ( $n=6$ ). A: Detection of bacterial loads in mouse lungs; B: Detection of bacterial loads in bronchoalveolar lavage fluid.

### 3 讨论与结论

近年来, 鲍曼不动杆菌的多重耐药率不断攀升, 且能够耐受抗菌药物、氧化压力、营养匮乏等多种不良刺激, 在院内感染中展现出强大的生存优势<sup>[2]</sup>。CRISPR-Cas 系统除执行经典的适应性免疫功能外, 还可调控细菌的其他生理功能, 如生物被膜形成和群体感应信号传导等<sup>[20]</sup>。该系统为细菌耐药治疗构筑了一道屏障<sup>[21]</sup>。因此, 专注于研究 CRISPR-Cas 系统并深入挖掘其调控机制将有助于充分运用该系统的功能, 为抗生素研发提供更多潜在靶点。本研究挖掘了 CRISPR-Cas 系统的上游转录调控因子 CRP, 并阐明了 CRP-Cas3 信号轴对鲍曼不动杆菌毒力的调控作用。

为探索 CRP 对 CRISPR-Cas 系统的调控作用, 本研究首先成功表达并纯化了 CRP 蛋白。EMSA 实验证实, CRP 蛋白能够与 *cas3* 启动子区域特异性结合, 这为 CRP 作为转录因子调控 *cas3* 提供了直接证据。结合 qPCR 结果,  $\Delta crp$  突变株中 *cas3* 基因的转录水平显著下降, 进一步证明 CRP 在鲍曼不动杆菌中作为转录激活因

子正向调控 *cas3* 基因的表达。在嗜热链球菌中 CRP 作为转录激活因子激活 CRISPR-Cas 系统的表达; 而在大肠杆菌中 CRP 则抑制 CRISPR-Cas 系统的表达<sup>[22-24]</sup>。CRP 对 CRISPR-Cas 系统的调控作用具有物种特异性和亚型特异性, 这可能与 CRP 结合的 DNA 位点不同有关<sup>[25-26]</sup>。

为了解 CRP-Cas3 信号轴对鲍曼不动杆菌生物学功能的影响, 本研究比较了 AB43 野生株、 $\Delta crp$  突变株以及  $\Delta crp/pcrp$  回补株在生物被膜形成能力、黏附侵袭能力、大蜡螟感染后的致死率以及小鼠感染后的肺部载菌量等方面的差异。这些结果均表明 *crp* 基因缺失增强了鲍曼不动杆菌的毒力。该现象可归因于两条机制: (1) *crp* 缺失导致 *cas3* 表达下降, 削弱了 CRISPR-Cas 系统对外源基因的清除能力。当 CRP-Cas3 失活后, 外源耐药基因与致病因子更易在基因组中积累, 间接提升细菌的多重耐药率和致病性。(2) CRP-Cas3 信号轴的缺失解除了对生物膜以及毒力相关基因的抑制。完整的 I-Fb 型 CRISPR-Cas 系统在鲍曼不动杆菌中能够调控生物膜形成和毒力基因的表达<sup>[15]</sup>。当 *crp* 缺失导致 *cas3* 表达下降时, 原本由 *cas3* 介导的负向调控

被解除, 导致生物膜相关基因(如 *bap*、*ompA* 等)上调, 细胞更易在侵入宿主组织或在医疗器械表面形成致密的生物膜, 从而使细菌的致病性增强。

尽管本研究揭示了 CRP-Cas3 信号轴在调控鲍曼不动杆菌毒力中的重要作用, 但仍存在一些局限性。首先, 对于该信号轴在其他环境条件(如不同的营养物质浓度、不同的温度和 pH 值等)下的调控机制尚未深入探究。其次, 虽然本研究初步揭示了 *crp* 基因缺失增强鲍曼不动杆菌毒力的机制, 但对于 CRISPR-Cas 系统与其他细菌生理过程之间的复杂网络关系了解还不够全面。

基于上述研究局限性, 未来的研究可从以下几个方面展开。一方面, 深入研究不同环境因素对 CRP-Cas3 信号轴调控作用的影响, 以更全面地了解该信号轴的功能和调控机制。另一方面, 通过多组学技术(如转录组学、蛋白质组学等)系统地分析细菌在不同条件下的基因表达和蛋白质变化, 挖掘更多潜在的调控因子和信号通路, 开发更具针对性的抗菌策略和药物。

综上所述, *crp* 通过激活 *cas3* 基因的转录表达, 从而降低拥有 I-Fb 型 CRISPR-Cas 系统的鲍曼不动杆菌的毒力和致病性。CRP-Cas3 调控轴的发现为降低鲍曼不动杆菌毒力以及开发新型抗菌感染疗法提供了新思路。

## 作者贡献声明

黄佳媛: 设计并执行实验, 分析数据和撰写论文; 黄心悦: 辅助实验操作; 於亭: 参与设计实验; 袁文杰: 参与分析数据; 陈平: 参与图表绘制; 胡健: 参与论文讨论; 谢军: 参与修改论文; 李国才: 指导设计实验, 修改论文。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] LUCIDI M, VISAGGIO D, MIGLIACCIO A, CAPECCHI G, VISCA P, IMPERI F, ZARRILLI R. Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host[J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2289769.
- [2] HARDING CM, HENNON SW, FELDMAN MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 16(2): 91-102.
- [3] WONG D, NIELSEN TB, BONOMO RA, PANTAPALANGKOOR P, LUNA B, SPELLBERG B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017, 30(1): 409-447.
- [4] MORRIS FC, DEXTER C, KOSTOULIAS X, UDDIN MI, PELEG AY. The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1601.
- [5] GIAMMANCO A, CALÀ C, FASCIANA T, DOWZICKY MJ. Global assessment of the activity of tigecycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial[J]. *mSphere*, 2017, 2(1): e00310-16.
- [6] ZHAO JX, ZHU Y, LIN YW, YU HD, WICKREMASINGHE H, HAN JR, VELKOV T, McDONALD MJ, LI J. Polymyxin dose tunes the evolutionary dynamics of resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2022, 28(7): 1026.e1-1026.e5.
- [7] RELLO J, KALWAJE ESHWARA V, LAGUNES L, ALVES J, WUNDERINK RG, CONWAY-MORRIS A, ROJAS JN, ALP E, ZHANG ZH. A global priority list of the TOP TEn resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2019, 38(2): 319-323.
- [8] HILLE F, CHARPENTIER E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2016, 371(1707): 20150496.
- [9] ELLIOTT JFK, McLEOD DV, TAYLOR TB, WESTRA ER, GANDON S, WATSON BNJ. Conditions for the spread of CRISPR-Cas immune systems into bacterial populations[J]. *The ISME Journal*, 2024, 18(1): wrac108.
- [10] KOONIN EV, MAKAROVA KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2019, 374(1772): 20180087.
- [11] MAKAROVA KS, WOLF YI, ALKHNABASHI OS, COSTA F, SHAH SA, SAUNDERS SJ, BARRANGOU R, BROUNS SJJ, CHARPENTIER E, HAFT DH, HORVATH P, MOINEAU S, MOJICA FJM, TERNS RM, TERNS MP, WHITE MF, YAKUNIN AF,

- GARRETT RA, van der OOST J, BACKOFEN R, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(11): 722-736.
- [12] KARAH N, SAMUELSEN Ø, ZARRILLI R, SAHL JW, WAI SN, UHLIN BE. CRISPR-cas subtype I-Fb in *Acinetobacter baumannii*: evolution and utilization for strain subtyping[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118205.
- [13] SINKUNAS T, GASIUNAS G, FREMAUX C, BARRANGOU R, HORVATH P, SIKSNYS V. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system[J]. *EMBO Journal*, 2011, 30(7): 1335-1342.
- [14] YU JC, TANG H, CHEN YN, WANG ZQ, HUANG WQ, ZHOU T, WEN BJ, WANG CY, GU S, NI JJ, TAO J, WANG DN, LU J, XIE Q, YAO YF. *Salmonella* utilizes L-arabinose to silence virulence gene expression for accelerated pathogen growth within the host[J]. *Gut Microbes*, 2025, 17(1): 2467187.
- [15] WANG YH, YANG J, SUN XL, LI MY, ZHANG PY, ZHU ZT, JIAO HM, GUO TT, LI GC. CRISPR-Cas in *Acinetobacter baumannii* contributes to antibiotic susceptibility by targeting endogenous *AbaI*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e0082922.
- [16] TUCKER AT, NOWICKI EM, BOLL JM, KNAUF GA, BURDIS NC, TRENT MS, DAVIES BW. Defining gene-phenotype relationships in *Acinetobacter baumannii* through one-step chromosomal gene inactivation[J]. *mBio*, 2014, 5(4): e01313-14.
- [17] 王宇航. 鲍曼不动杆菌 CRISPR-Cas 系统抑制耐药及黄芩素联合多西环素的抗菌作用与机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2022.  
WANG YH. CRISPR-Cas in *Acinetobacter baumannii* contributes to antibiotic susceptibility and baicalein resensitizes multidrug-resistant Gram-negative pathogens to doxycycline[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2022 (in Chinese).
- [18] OUYANG W, LI XX, WAN QQ, YE QF. The risk factors for mortality and septic shock in liver transplant recipients with ESKAPE bacteremia[J]. *Hepato-Gastroenterology*, 2015, 62(138): 346-349.
- [19] 肖舒心, 赵旭, 郭蓓宁. 采用耳窥镜直视下气管插管法构建小鼠鲍曼不动杆菌肺炎模型[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2015, 15(1): 51-56.  
XIAO SX, ZHAO X, GUO BN. Establishment of a murine model of *Acinetobacter baumannii* pneumonia with a new intubation method[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2015, 15(1): 51-56 (in Chinese).
- [20] WESTRA ER, BUCKLING A, FINERAN PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(5): 317-326.
- [21] SOREK R, LAWRENCE CM, WIEDENHEFT B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82: 237-266.
- [22] SHINKAI A, KIRA S, NAKAGAWA N, KASHIHARA A, KURAMITSU S, YOKOYAMA S. Transcription activation mediated by a cyclic AMP receptor protein from *Thermus thermophilus* HB8[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(10): 3891-3901.
- [23] AGARI Y, SAKAMOTO K, TAMAKOSHI M, OSHIMA T, KURAMITSU S, SHINKAI A. Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 395(2): 270-281.
- [24] YANG CD, CHEN YH, HUANG HY, HUANG HD, TSENG CP. CRP represses the CRISPR/Cas system in *Escherichia coli*: evidence that endogenous CRISPR spacers impede phage P1 replication[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 92(5): 1072-1091.
- [25] SOBERÓN-CHÁVEZ G, ALCARAZ LD, MORALES E, PONCE-SOTO GY, SERVÍN-GONZÁLEZ L. The transcriptional regulators of the CRP family regulate different essential bacterial functions and can be inherited vertically and horizontally[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 959.
- [26] PATTERSON AG, CHANG JT, TAYLOR C, FINERAN PC. Regulation of the Type I-F CRISPR-Cas system by CRP-cAMP and GalM controls spacer acquisition and interference[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(12): 6038-6048.