



CRISPR/Cas系统与志贺菌毒力和耐药的关系及插入序列IS600对*cse2*表达水平的影响

洪丽娟¹, 张冰¹, 段广才^{1,3*}, 梁文娟^{1,3}, 王颖芳², 陈帅印¹, 杨海燕¹, 郝园林¹

¹ 郑州大学公共卫生学院流行病学教研室, 河南 郑州 450001

² 河南科技大学预防医学教研室, 河南 洛阳 471003

³ 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, 河南 新乡 453003

摘要: 【目的】了解志贺菌中成簇的规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)的分布及其与毒力和耐药的关系, 并分析志贺菌中插入序列IS600对CRISPR相关蛋白基因*cse2* mRNA表达水平的影响。【方法】利用课题组前期设计的引物PCR扩增志贺菌的3个CRISPR位点、CRISPR相关蛋白基因*cse2*、耐药基因和毒力基因; 改良Kirby-Bauer (K-B)纸片法进行药敏试验; 台盼蓝计数试验检测细菌毒力; Real-time PCR检测志贺菌中*cse2*基因mRNA表达水平。分别分析志贺菌中CRISPR/Cas系统与耐药基因、耐药表型、毒力基因、毒力表型的关系; 了解IS600对CRISPR相关蛋白基因*cse2* mRNA表达水平的影响。【结果】志贺菌中CRISPR1位点阴性细菌的毒力强; 插入序列IS600使*cse2* mRNA表达水平降低。【结论】志贺菌中存在CRISPR1、2、3位点; CRISPR1位点与毒力有关; 插入序列IS600对*cse2* mRNA表达水平有影响。

关键词: 志贺菌, CRISPR/Cas系统, 插入序列, 耐药, 毒力

志贺菌属是人类细菌性痢疾(简称菌痢)的病原体, 菌痢是全球最严重的肠道感染性疾病之一, 主要流行地区为发展中国家^[1]。在自然界中, 细菌可通过基因水平转移(Horizontal gene transfer, HGT)的方式获取外源基因, 从而更好地适应外界环境压力^[2]。随着抗生素的广泛应用, 志贺菌中出现耐药菌甚至多耐药菌, 细菌的毒力

也有所增强, 对人类健康的威胁也随之增大。

成簇的规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和CRISPR相关蛋白(CRISPR-associated, Cas)一同构成的CRISPR/Cas系统是细菌抵御质粒和噬菌体等其他外源基因元件入侵、限制基因水平转移的免疫系统, 分布于大多数古细菌和超过

基金项目: 国家科技重大专项(2013ZX10004607)

*通信作者。Tel/Fax: +86-371-67781964; E-mail: gcduan@zzu.edu.cn

收稿日期: 2016-04-05; 修回日期: 2016-06-02; 网络出版日期: 2016-07-01

一半的细菌基因组中^[3]。细菌耐药性的获得和致病力的增强可通过HGT介导^[4], 且已知参与HGT的基因大多数与细菌的耐药和致病性有关。因此我们猜测CRISPR/Cas系统可通过某种机制与细菌的耐药性和致病力之间建立联系。插入序列(insertion sequence, IS)是染色体的特殊组成部分, 是最简单的转座子^[5], 可在染色体上转移, 或在不同染色体间跳跃。IS可携带耐药基因发生HGT, IS的插入能使基因产生突变从而影响基因的表达。本课题组郭向娇^[6]发现部分志贺菌CRISPR相关蛋白基因*cse2*中存在IS600, 在此基础上本研究欲进一步分析IS600对CRISPR相关蛋白基因*cse2* mRNA表达的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株和细胞

临床分离志贺菌33株, 其中福氏志贺菌21株, 宋内志贺菌10株, 痢疾杆菌2株。药敏试验标准质控菌: 大肠杆菌ATCC 25922, 购于中国普通微生物菌种管理保藏中心。Hela细胞为本实验室保存。

1.2 试剂

药敏纸片购自杭州天和微生物生物试剂有限公司; PCR所需试剂均购自上海生工生物工程有限公司; 细菌DNA小量提取试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司; 细菌基因组RNA提取试剂盒购自北京康为世纪有限公司; PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR[®] Premix Ex TaqTM II和DL2000 DNA Marker购自日本TaKaRa; 无支原体优级胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司; RPMI 1640培养基购自美国GIBCO公司; MH (A)培养基和琼脂粉购自德国Sigma公司; 胰蛋白胨和酵母浸粉购自英国Oxoid公司; 琼脂糖为BIOWEST公司进口分装; 其余常规试剂均为国产分析纯级别。

1.3 主要仪器和设备

德国SensoQuest公司LabcyCler basic PCR仪; 美国应用生物系统公司ABI Fast7500实时荧光定量PCR系统; 上海Heal Force公司CO₂恒温培养箱; 日本Nikon公司ECLIPSE TS100-F倒置显微镜。

1.4 CRISPR位点、耐药基因、毒力基因和CRISPR相关蛋白基因*cse2*检测

以试剂盒提取的志贺菌基因组DNA为模板, PCR扩增CRISPR位点、耐药基因、毒力基因和CRISPR相关蛋白基因*cse2*。引物为本课题组前期设计并保存, 引物序列见表1。扩增体系为25 μL, 其中12.5 μL 2×Taq PCR Master Mix, 8.5 μL ddH₂O, 浓度为5 pmol/μL的上、下游引物各1 μL, DNA模板2 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 退火60 s (退火温度见表1), 72 °C 45 s, 32个循环; 72 °C 10 min。取5 μL PCR扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪观察并记录结果。CRISPR位点扩增产物送上海生工生物工程股份有限公司测序, 测序结果经CRISPR Finder软件分析CRISPR位点的重复序列和间隔序列。

1.5 药敏试验

采用改良Kirby-Bauer (K-B)纸片法进行药敏试验, 每株细菌重复3次, 取平均值。参照CLSI指南^[9]进行判断。大肠杆菌ATCC25922为药敏试验标准质控菌。根据抗生素的分子结构及作用机制将其分类, 将3类及3类以上抗生素耐药的细菌定义为多重耐药菌(Multi-drug resistance, MDR)。

1.6 台盼蓝计数试验

细菌过夜培养至适宜浓度与Hela细胞共培养^[10]。分别吸取30 μL细胞悬液与台盼蓝染液混匀, 染色2-5 min, 将20 mL混合液体注入血细胞计数板, 活细胞无法被染色, 死亡细胞由于细胞膜破裂被染成蓝色。计算200个细胞中死亡细胞数(公式1)。

表1. CRISPR位点、耐药基因和毒力基因的PCR引物序列及信息
Table 1. Primers of CRISPR loci, drug resistance genes and virulence genes for PCR amplification

Genes	Sequence (5'→3')	Size/kb	$T_m/^{\circ}\text{C}$	Reference
CRISPR1	F: AGCGACTAACTGGAATCTTG	0.7	56	[6]
	R: CAATCTGGCTACTGGAAGTG			
CRISPR2	F: CGATCCAGAGCTGGTCAATG	1.0	56	
	R: AGTGCTCTTTAACATAATGGGATG			
CRISPR3	F: TTGTYAGGTAGGTTGGTGAAG	0.7	56	
	R: GCGAAGAGAAAGAACGAGTA			
<i>cse2</i>	F: GCCCAGCGGATACGGATAAA	1.6/0.4	55	
	R: ACGGATGGATTTTCGCTGTT			
<i>cat</i>	F: CAATGAAAGACGGTGAGC	0.3	52	[7]
	R: ACAAACGGCATGATGAAC			
<i>sμL2</i>	F: CCTGTTTCGTCCGACACAGA	0.4	55	
	R: GAAGCGCAGCCGCAATTCAT			
<i>bla_{CTX}</i>	F: GGTAAAAAATCACTGCGTC	0.8	56	
	R: TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
<i>ipaH</i>	F: TGGAAAACTCAGTGCCTCT	0.4	55	[8]
	R: CCAGTCCGTAAATTCATTCT			
<i>ial</i>	F: CTG GAT GGT ATG GTG AGG	0.3	52	
	R: GGAGGCCAACAATTATTTCC			
<i>virA</i>	F: CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACATC	0.2	58	
	R: TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC			
<i>icsA</i>	F: GTTCGTCAAATGTCGGTCAG	1.0	55	
	R: TCCAGCGTATGGTTGGGTAG			
<i>icsP</i>	F: TTCTTTGTA CTTGCAC TTTG	0.8	52	
	R: TGTAATTTCTGGAGCCTTCT			
<i>ipaBCD</i>	F: GCTATAGCAGTGACATGG	0.6	52	
	R: ACGAGTTCGAAGCACTC			

Hela细胞死亡率=(死亡细胞数/200)×100% 公式(1)

1.7 Real-time PCR检测*cse2* mRNA表达水平

按照康为世纪细菌RNA提取试剂盒说明书提取细菌RNA, 根据TaKaRa PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒说明书将基因组RNA逆转录成cDNA。委托

上海生工生物工程有限公司根据NCBI中*Shigella sonnei* Ss046基因组中*cse2*序列设计引物, 设计目的基因*cse2*引物, 以16S rRNA为内参基因, 序列如表2所示。按照TaKaRa SYBR® Premix Ex TaqTMII试剂盒说明书配制反应体系, 设置ABI Fast7500仪器参数后进行Real-time PCR实验。

表2. RT-PCR引物设计
Table 2. Primers of RT-PCR

Genes	Sequence (5'→3')	Size/kb
16S rRNA	F: TGATCCTGGCTCAGATTGA	0.8
	R: TTTACGGCGTGGACTACC	
<i>cse2</i>	F: GAGGAATTGCAGGAGAAACG	0.2
	R: TGATACGCCACTCAGGTTCA	

2 结果和分析

2.1 基因扩增结果

2.1.1 CRISPR位点的分布: 以33株志贺菌的基因组DNA为模板, PCR扩增CRISPR1、CRISPR2和CRISPR3位点, 目的基因电泳条带大小依次为700、1000、700 bp, 见图1。由于菌株间隔序列数目差异可能会导致扩增产物长度有差异。33株细菌中CRISPR1、CRISPR2、CRISPR3位点阳性率分别为93.94% (31/33)、90.91% (30/33)、78.8% (26/33)。

将PCR产物送上海生工生物工程有限公司测序, 结果通过CRISPR Finder软件分析。志贺菌中CRISPR1和CRISPR2位点拥有相同的重复序列5'-CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAAC-3'; CRISPR3位点的重复序列为5'-GTTCACTGCCGTACAGGCAGCTTAAAAAT-3'。部分细菌的重复

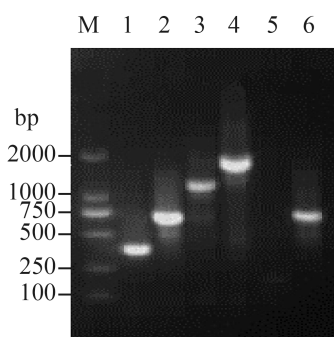


图1. CRISPR位点的PCR鉴定

Figure 1. PCR amplification of CRISPR loci. M: DL2000 marker; 1-2: CRISPR1; 3-4: CRISPR2; 5-6: CRISPR3.

序列存在个别碱基的差异。33株志贺菌的3个CRISPR位点所携带的间隔序列数目均较少, CRISPR1位点携带的间隔序列最多3条; CRISPR2和CRISPR3位点最多2条, 结果如表3所示。

2.1.2 毒力基因和耐药基因的分布: 以33株志贺菌的DNA为模板, PCR扩增*ipaH*、*ial*、*ipaBCD*、*virA*、*icsA*、*icsP*等6种毒力基因和耐药基因*cat*、*sul2*、*bla_{CTX}*。结果如表4所示, 耐药基因检出率由高到低为*sul2* (66.7%), *bla_{CTX}* (57.6%), *cat* (54.5%)。毒力基因*ipaH*和*ial*阳性率最高, 均为100%; 其次为*icsA*、*virA*、*icsP*、*ipaBCD*, 阳性率依次为87.88%、84.85%、84.85%、75.76%。

2.1.3 CRISPR相关蛋白基因*cse2*的分布: 33株志贺菌中, 未检出*cse2*的细菌有2株, 31株志贺菌中存在*cse2*基因, 其中无IS600的有12株, 有IS600的有19株。

2.2 药敏试验结果

采用改良Kirby-Bauer(K-B)纸片法进行5种抗生素药敏试验。抗生素类别为β-内酰胺类、四环素类、氯霉素类、喹诺酮类和磺胺类。检测结果如表5所示, 复方新诺明耐药率最高, 达81.82%; 其次为四环素(72.73%)、氨苄西林(42.42%)、氯霉

表3. 33株志贺菌中CRISPR位点检出率及间隔序列数目

Table 3. Positive rate and spacer number of CRISPR loci in 33 *Shigella* strains

CRISPR	Spacer number	Strain number	Positive rate/%
CRISPR1	0	2	93.94
	2	19	
	3	12	
CRISPR2	0	15	90.91
	1	10	
	2	8	
CRISPR3	0	7	78.80
	1	2	
	2	24	

表4. 志贺菌耐药基因和毒力基因检测结果

Table 4. Distribution of drug resistance genes and virulence genes in *Shigella*

Genes	Drug resistance genes			Virulence genes					
	<i>cat</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> _{CTX}	<i>ipaH</i>	<i>ial</i>	<i>ipaBCD</i>	<i>virA</i>	<i>icsA</i>	<i>icsP</i>
Positive number	18	22	19	33	33	25	28	29	28
Positive rate/%	54.5	66.7	57.6	100.0	100.0	75.8	84.8	87.8	84.8

表5. 33株志贺菌药敏试验结果

Table 5. Antimicrobial susceptibility test of 33 *Shigella* strains

Antibiotics/%	AM	TE	SXT	NOR	CL
R	42.42	72.73	81.82	12.12	30.30
I	6.06	3.03	0.00	6.06	0.00
S	51.52	24.24	18.18	81.82	69.70
Total/%	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

R%: resistance; I%: intermediate; S%: susceptible; AM: ampicillin; TE: tetracycline; SXT: sulfamethoxazole; NOR: norfloxacin; CL: chloramphenicol.

素(30.30%)、诺氟沙星(12.12%)。

2.3 台盼蓝计数试验

本研究建立Hela细胞模型以分析志贺菌毒力。用志贺菌侵袭Hela细胞,通过台盼蓝细胞计数实验观察志贺菌对Hela细胞的致死作用。33株志贺菌台盼蓝计数实验结果显示Hela细胞的死亡率范围为3.0%–42.5%。

2.4 CRISPR位点与耐药的关系

2.4.1 CRISPR位点与耐药表型的关系:多耐药MDR的判定标准为细菌对3类或3类以上抗生素耐药。分析CRISPR位点与多耐药表型的关系。CRISPR1、CRISPR2、CRISPR3位点、IS600和多耐药表型之间的分布差异无统计学意义。

2.4.2 CRISPR位点与耐药基因的关系:分析CRISPR位点与耐药基因*cat*、*sul2*、*bla*_{CTX}的关联性。未发现CRISPR位点与耐药基因相关。

2.5 CRISPR位点与毒力的关系

2.5.1 CRISPR位点与Hela细胞死亡率的关系:分析CRISPR位点与Hela细胞死亡率关系。结果如表6

所示:CRISPR1位点阴性细菌的死亡率高于该位点阳性细菌,差异有统计学意义($P < 0.05$)。未发现CRISPR2和CRISPR3位点与Hela细胞死亡率有关。

2.5.2 CRISPR位点与毒力基因的关系:分别分析CRISPR1、CRISPR2、CRISPR3位点与毒力基因*ipaBCD*、*virA*、*icsA*、*icsP*的关系,未发现相关。

2.6 IS600对*cse2* mRNA表达水平的影响

志贺菌的目的基因*cse2*和内参基因16S rRNA的扩增曲线如图2所示,从左至右,前一簇是内参基因16S rRNA扩增曲线,曲线走向一致,有重合现象,说明不同菌株或同一菌株中16S rRNA mRNA表达量很稳定,内参基因选择正确。后面是目的基因*cse2*的扩增曲线,曲线走向一致,却很少重合,说明不同细菌或同一细菌中*cse2* mRNA表达量有差异。从扩增曲线可知,目的基因*cse2* mRNA表达量低于内参基因16S rRNA。

目的基因和内参基因的溶解曲线均呈单峰,未检测到引物二聚体和其他非特异性扩增的荧光信号,表明引物特异性较好。如图3所示:目的基因*cse2* (右)的熔点峰出现在(81.0±0.5) °C,内参基

表6. 志贺氏菌CRISPR位点与Hela细胞死亡率分析
Table 6. Relationship of CRISPR loci and Hela cell death rate in *Shigella*

Genes	Death Rate/%		<i>t</i> value	<i>P</i>
	Positive	Negative		
CRISPR1	13.94±9.13	28.00±5.66	2.132	0.041
CRISPR2	14.15±9.21	21.16±12.49	1.225	0.230
CRISPR3	13.63±7.98	19.07±13.86	1.357	0.184
IS600	12.84±7.60	17.43±11.42	1.386	0.176

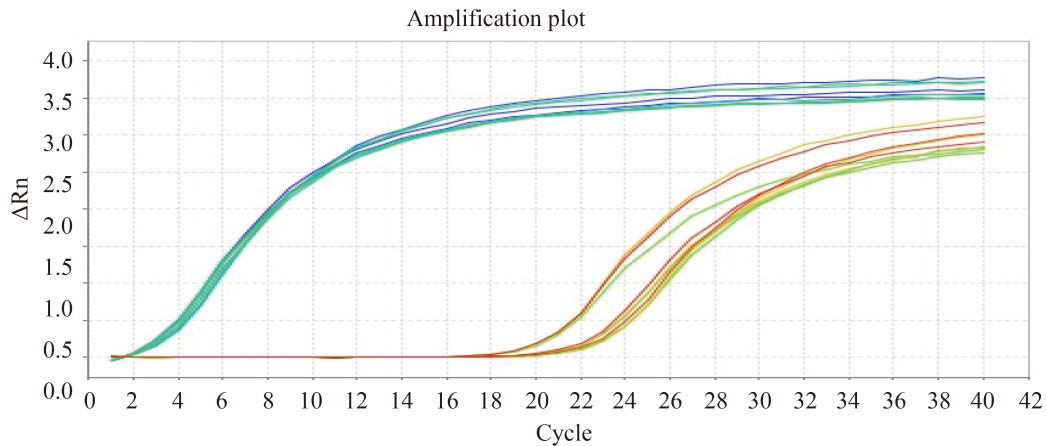


图 2. 内参基因和目的基因扩增曲线

Figure 2. Amplification curve of housekeeping gene and target gene.

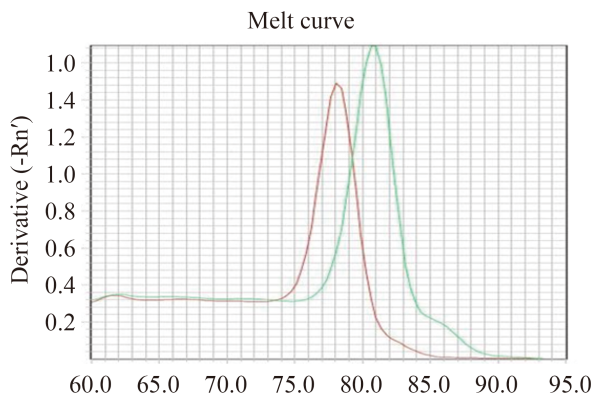


图 3. 内参基因和目的基因溶解曲线

Figure 3. Melt curve of housekeeping gene and target gene.

因16S rRNA熔点峰范围为(78.0±0.5) °C, 与理论值相符, 表明目的基因*cse2*和内参基因16S rRNA扩增正常。

通过实时荧光定量RT-PCR获得志贺菌目的基因和内参基因的 C_t 值。采用相对定量的方法, 按公式(2)计算*cse2*的相对表达量 F 。

$F=2^{-[\text{目的基因平均}C_t\text{值}-\text{内参基因平均}C_t\text{值}]}$ 公式(2)

每1株细菌的目的基因*cse2*和内参基因16S rRNA的平均 C_t 值由ABI Fast7500仪器自动给出, 每个基因的 C_t 值均为15–36, 符合扩增规律。依据分组情况分析*cse2*的mRNA相对表达水平, 总结

如表7所示, 统计量 $t'=-3.551$, $P=0.004$, 小于检验水准 $\alpha=0.05$ 。有IS600组*cse2*的mRNA相对表达水平为 1.76×10^1 , 无IS600组*cse2*的mRNA相对表达水平为 1.07×10^6 。IS600的插入使CRISPR相关蛋白基因*cse2* mRNA相对表达水平下降。

表7. *cse2*的mRNA相对表达水平
Table 7. Relative expression of *cse2* mRNA

Group	Relative expression of <i>cse2</i> mRNA($\bar{x}\pm s$)
<i>cse2</i> =400 bp (n=12)	$1.07\times 10^6\pm 1.41\times 10^6$
<i>cse2</i> =1600 bp (n=19)	$1.76\times 10\pm 3.75\times 10$
t' value	-3.551
P	0.004

3 讨论

3.1 志贺菌中CRISPR分布

CRISPR/Cas系统存在于46%细菌和84%古细菌基因组中。一个基因组中可存在多个CRISPR位点, 詹氏甲烷球菌的CRISPR位点多达18个^[11]。由于所含重复序列和间隔序列数目不同, CRISPR位点的大小会有差异, 至今发现间隔序列数目最多的菌株是赭黄嗜盐囊菌DSM 14365, 有587个重复序列^[12]。根据CRISPR Database及以往的研究^[13],

志贺菌中存在3个确定的CRISPR位点, 分别为CRISPR1、CRISPR2和CRISPR3。CRISPR1位点位于基因*iap/cysD-cysH*之间, 其后紧连着*cas2-cas1-cas6e-cas5-cas7-cse2-cse1-cas3*基因簇, 属于I-E型CRISPR/Cas系统。距CRISPR1位点10 kb左右、位于基因*ygcE-ygcF*之间的CRISPR2与CRISPR1位点拥有相同的重复序列, CRISPR3位点则有一套单独重复序列, 该位点位于*clpA*和*infA*基因之间, 附近未发现*cas*基因。

本研究33株临床分离志贺菌中均能检出CRISPR1、2、3位点, 检出率依次为93.94%、90.91%、78.8%。志贺菌CRISPR位点测序结果经CRISPR Finder软件分析均为CRISPR位点。33株志贺菌的两类重复序列均有部分碱基差异, 存在重复序列退化现象。不同的CRISPR位点携带的间隔序列数目可能不同; 相同CRISPR位点携带的间隔序列数目也可能不同。Horvath等^[14]在嗜热链球菌发现CRISPR1位点携带的间隔序列数目为2–51个, 本研究所检测的志贺菌中CRISPR1位点携带的间隔序列数目仅为1–3个; 且CRISPR2和CRISPR3中间隔序列也较少。已有学者对不同细菌的间隔序列数目进行探究: Qiu等^[15]指出一些细菌为了获取编码抗生素或毒力因子有利基因而沉默CRISPR/Cas系统, 这样细菌所携带的毒力因子将增多; Garcia等^[16]从另一个角度探讨毒力因子与重复序列的关系, 肠共生大肠杆菌携带的重复序列数目较肠致病大肠杆菌多, 且毒力因子多的细菌携带的重复序列少。重复序列与间隔序列组成的R-S单元是CRISPR位点的重要组成成分, 重复序列的数目与间隔序列数目相关。基于前人的研究结果可以推论属于病原菌的志贺菌的毒力因子较其他共生菌多, 其携带的间隔序列数目少。也可从进化的角度考虑, 志贺菌是普通大肠杆菌通过获得毒力质粒后逐渐进化发展为病原菌^[17],

且大肠杆菌的间隔序列周转较其他细菌低^[18], 有生物信息学的分析结果表明, 相对于其他快速进化的CRISPR/Cas系统, I-E型的CRISPR/Cas系统进化速度十分地缓慢^[19], CRISPR序列可在 10^3 – 10^5 年间保持不变, 且在漫长的进化过程中CRISPR序列不是逐渐改变, 而是罕见地会有间隔序列的变化^[20], 这与快速连续进化的免疫防御系统的功能不相符, 志贺菌中可能也存在此现象, 因此间隔序列数目较少。同时*cas*基因编码产物Cas蛋白是CRISPR/Cas系统发挥作用的关键成分, 大肠杆菌中IS在移动或者失活*cas*基因中发挥作用^[21], IS600插入*cse2*基因可使其表达水平降低, 进一步可能使CRISPR/Cas系统功能减弱甚至沉默。

3.2 志贺菌中CRISPR位点与毒力

本研究选择了6种毒力基因, 侵袭性质粒抗原*ipaH*基因, 同时位于细菌质粒或染色体基因组中, 常被用于志贺菌分子诊断^[22], 可以避免志贺菌大质粒或部分基因丢失而产生细菌鉴定假阳性结果。本研究33株志贺菌中*ipaH*基因和*ial*基因携带率均为100%, 间接反映*ipaH*基因用于志贺菌分子诊断的可靠性。其余*ipaBCD*、*icsP*、*virA*、*icsA*检出率也较高, 与文献报道的*ipaH* (100%)^[23]、*ial* (99.1%)、*virA*^[24] (73.3%)结果相近。除*ipaH*位于基因组和质粒上外, 其余*ipaBCD*、*virA*、*icsP*、*ial*、*icsA*均是位于质粒上的毒力基因, 属于可移动的遗传元件, 可在细菌间移动, 位于质粒上的毒力基因也随之移动, 当细菌接受新的质粒时可能会将外源片段上的某些毒力基因整合到自身基因组中, 使细菌毒力增强。

本研究分析毒力基因与Hela细胞死亡率未发现相关性, 这与其他学者的结果不同, Bikard等^[25]指出CRISPR/Cas系统可干扰细菌获取毒力基因。对肺炎链球菌荚膜编码基因的研究发现CRISPR干

扰作用可以阻碍菌体获得毒力。考虑由于本实验室采集保存的菌株均为临床分离, 毒力较高, 毒力基因携带率高; 所选择的毒力基因种类少, 因此未能发现二者关联。

基因水平转移可使细菌获得外源基因, 但并不是所有的外源基因都会对细菌的生存有利, 因此细菌在进化过程中发展了一系列防御机制以抵御外源基因入侵, 维持自身基因结构的稳定, CRISPR/Cas系统就是其中重要的防御机制之一。Jiang等^[26]发现当细菌中转入有益的外源基因时, CRISPR基因功能会缺失, 使细菌通过基因水平转移获得某些新性状; 而当转入基因对细菌的生存构成威胁时, 细菌会上调表达CRISPR, 将不利基因拒之门外。本研究发现携带CRISPR1位点的志贺菌感染Hela细胞, 细胞死亡率较无该位点的低, 即无CRISPR/Cas系统的菌株毒力较强。考虑CRISPR/Cas系统是细菌抵御外源遗传物质入侵的机制之一, 该位点缺失时, 外源基因易于整合入细菌基因组, 使细菌获得可移动遗传元件所携带的例如耐药基因、毒力基因或者其他一些可获得的细菌表观性状。CRISPR/Cas系统的存在使毒力基因不能进入细菌, 从而影响细菌的毒力, 对Hela细胞的致死能力弱。这与Louwen等^[27]的研究结果相似, CRISPR序列较短或完全缺失的空肠弯曲菌强毒株可造成严重的胃肠炎和感染后严重并发症, 说明CRISPR的缺失导致细菌毒力增强。CRISPR/Cas系统除了通过直接影响毒力因子的获得而提高细菌毒力; 还可以通过Cas蛋白调节宿主自身基因功能而影响细菌毒力。Westra等^[28]在研究CRISPR/Cas系统与空肠弯曲菌毒性关系时发现, 在缺失CRISPR位点的情况下, 只要Cas9能表达就可以与tracrRNA和scaRNA形成蛋白复合物, 该复合物与*blp*基因的mRNA互补结合后, 激活Cas9或其他核酶降解该mRNA, 进而*blp*基因产

物、位于细菌表面的BLP蛋白减少, 宿主TLR2样受体识别位点减少从而降低宿主免疫反应, 即细菌毒力增强。因此, 除了CRISPR位点外, *cas*基因对于细菌毒性增强也具有重要作用, 本研究未发现CRISPR2、CRISPR3位点对Hela细胞死亡有影响, 考虑为CRISPR1位点较其他CRISPR位点而言, 距离*cas*基因簇近, 易于发挥生物学功能。

3.3 志贺菌中CRISPR位点与耐药

本研究通过改良Kirby-Bauer (K-B)纸片法检测33株志贺菌对氨苄西林、四环素、复方新诺明、诺氟沙星和氯霉素的耐药率分别为42.42%、72.73%、81.82%、12.12%和30.30%。与夏昕等^[29]2015年报道的湖南省福氏志贺菌对氨苄西林、四环素、复方新诺明、诺氟沙星耐药率有异, 考虑为分离地点和分离时间差异所造成。细菌耐药性的产生主要通过2种方式: 一是自身耐药性的产生, 即在抗生素的选择压力下, 带有耐药基因的突变株才能生存下来; 二是HGT, 不同的物种或同一物种的不同菌株通过可移动遗传元件例如质粒、噬菌体等获得耐药基因、耐药性。耐药基因的HGT是细菌产生耐药的主要方式之一, CRISPR/Cas系统作为细菌抵御外源基因入侵的免疫系统, 二者之间是否存在关联? 目前对于二者的关系尚不明确, Palmer等^[30]对粪肠球菌研究发现CRISPR/Cas系统缺失的细菌多为多耐药菌。Touchon等^[31]研究结果与Kelli相反, 即使CRISPR/Cas系统存在, 大肠杆菌也能发展成为MDR。本课题组王琳琳等^[7]检测59株志贺菌的CRISPR/Cas系统并分析该系统与耐药基因和耐药表型的关系, 发现均无统计学意义。本研究对33株志贺菌的CRISPR/Cas系统和耐药基因的分布进行研究, 尚未发现CRISPR/Cas系统与耐药基因有关; 分析CRISPR/Cas系统与志贺菌多耐药表型关系, 也未发现二者相关。临床分离细菌面临巨大的抗生素选择压力, 细菌为了

生存通过多种方式使CRISPR/Cas系统失活^[32]例如丢失了完整的CRISPR系统、*cas*基因中含有转座元件、缺失或替换了单核苷酸使*cas*基因功能丧失、丢失与接合质粒匹配的间隔序列。本研究中志贺菌CRISPR1位点中存在插入序列IS600使该系统功能缺失，且细菌能在抗生素选择压力下存活，那么志贺菌中检测出的CRISPR位点可能是功能不完整的。

3.4 基因与表型不一致

本研究分别分析了CRISPR位点与毒力基因、毒力表型、耐药基因、耐药表型的关系，结果发现CRISPR1位点与毒力表型相关，与毒力基因无关，出现了基因与表型结果不一致的现象。这与高旭等^[33]研究结核分枝杆菌结果相似，80株氧氟沙星耐药菌中有15株未发现已知*gyrA*或*gyrB*耐药决定区的基因突变。考虑为基因检测敏感度较低，达不到表型检测的敏感度，例如表现为表型耐而未检测出该耐药基因，即出现导致表型与基因检测结果不一致。另一个可能的机制是表型是一个复杂过程，由多基因、多蛋白参与，只检测某一个环节中的某一个基因不具有很好的代表性。

3.5 IS600对*cse2* mRNA表达水平的影响

*cse2*属于亚型特异性Cas蛋白，属于I型CRISPR/Cas系统，是Cascade蛋白复合物的的重要组成部分。大肠杆菌中的Cascade蛋白复合物大小为405 kDa，外形类似“海马”^[34]，是由*Cse1*、*Cse2*、*Cas7*、*Cas5*、*Cas6e*按1:2:6:1:1的比例组成的。*Cse2*位于该复合物中间，*Cse2*的功能就是稳定靶标DNA，增加Cascade与靶标DNA的亲合力，在外源DNA降解阶段起作用。本课题组前期发现相同的引物扩增志贺菌基因组*cse2*基因出现2种不同的电泳条带^[6]，一类为400 bp，另一类为1600 bp。将PCR产物进行测序分析，1600 bp较400 bp多的1200 bp为插入序列IS600，通过与全基因组测序细菌

Shigella sonnei Ss046比对发现，IS600插入位点在*cse2*基因中间，将*cse2*分为2个部分。IS的插入位置不同对基因表达产生不同的影响，大多数情况下IS的插入对基因是无害的。如果IS的靶位点在某个基因的转录子内，将导致转录子的下游基因表达受阻，基因失活^[35]；王颖芳^[5]发现在外界头孢菌素压力下，*ISEcp1*可转座插入到*bla*_{CTX-M}上游，为*bla*_{CTX-M}表达提供所需要的启动子，使其高表达从而导致细菌对各种头孢菌素耐药。本研究通过Real-time PCR技术检测插入序列IS600对CRISPR相关蛋白基因*cse2* mRNA表达的影响。结果表明，插入序列IS600的插入使*cse2*基因相对表达水平降低了5个数量级(10⁵)，推测其进一步可能对CRISPR/Cas系统的功能产生影响。

参考文献

- [1] Wang YF, Song CH, Duan GC, Zhu JY, Yang YL, Fan QT. Transposition of *ISEcp1* modulates *bla*_{CTX-M-55}-mediated *Shigella flexneri* resistance to cefalothin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2013, 42(6): 507–512.
- [2] Sun DC, Qiu JP. Advances in molecular mechanisms of adaptive immunity mediated by type I-E CRISPR/Cas system—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(1): 1–7. (in Chinese)
孙东昌, 裘娟萍. I-E型CRISPR/Cas系统介导适应性免疫分子机制研究进展. *微生物学报*, 2016, 56(1): 1–7.
- [3] Bondy-Denomy J, Davidson AR. To acquire or resist: the complex biological effects of CRISPR-Cas systems. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(4): 218–225.
- [4] Warnes SL, Highmore CJ, Keevil CW. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: implications for public health. *mBio*, 2012, 3(6): e00489–12.
- [5] Wang YF. Study on the molecular basis of *ISEcp1* involved in drug resistance in *Shigella*. Doctoral Dissertation of Zhengzhou University, 2013. (in Chinese)
王颖芳. *ISEcp1*介导志贺菌耐药的分子基础研究. 郑州大学博士学位论文, 2013.
- [6] Guo XJ, Wang YF, Duan GC, Xue ZR, Wang LL, Wang PF,

- Qiu SF, Xi YL, Yang HY. Detection and analysis of CRISPRs of *Shigella*. *Current Microbiology*, 2015, 70(1): 85–90.
- [7] Wang LL, Wang YF, Duan GC, Xue ZR, Guo XJ, Wang PF, Xi YL, Yang HY. Detection of CRISPR and its relationship to drug resistance in *Shigella*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015(4): 476–483. (in Chinese)
王琳琳, 王颖芳, 段广才, 薛泽润, 郭向娇, 王鹏飞, 郝园林, 杨海燕. 志贺菌CRISPR的检测及其与耐药的关系. *微生物学报*, 2015, 55(4): 476–483.
- [8] Guo XJ, Wang YF, Duan GC, Wang LL, Wang PF, Yang HY, XI YL. Distribution of CRISPR/Cas system in *Shigella* clinical strains and its relationship with virulence genes. *Microbiology China*, 2015(3): 543–549. (in Chinese)
郭向娇, 王颖芳, 段广才, 王琳琳, 王鹏飞, 杨海燕, 郝园林. 临床分离志贺菌中CRISPR/Cas系统的分布及其与毒力基因的关系. *微生物学通报*, 2015, 42(3): 543–549.
- [9] MA Wikler. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, M2-A9. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
- [10] Zhou HW. Mechanisms of drug resistance in Enterobacteriaceae and pathogenicity of UPEC to HeLa cell. Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2009. (in Chinese)
周宏伟. 肠杆菌科细菌耐药机制以及UPEC对HeLa细胞的致病性研究. 浙江大学博士学位论文, 2009.
- [11] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 181–186.
- [12] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPR finder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(S2): W52–W57.
- [13] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(6): 467–477.
- [14] Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(4): 1401–1412.
- [15] Qiu Y, Wang SW, Chen Z, Gao YJ, Song Y. An active type I-E CRISPR-Cas system identified in *Streptomyces avermitilis*. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149533.
- [16] García-Gutiérrez E, Almendros C, Mojica FJM, Guzmán NM, García-Martínez J. CRISPR content correlates with the pathogenic potential of *Escherichia coli*. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0134138.
- [17] Jin Q, Yuan ZH, Xu JG, Wang Y, Shen Y, Lu WC, Wang JH, Liu H, Yang J, Yang F, Zhang XB, Zhang JY, Yang GW, Wu HT, Qu D, Dong D, Sun LL, Xue Y, Zhao AL, Gao YS, Zhu JP, Kan B, Ding KY, Chen SX, Cheng HS, Yao ZJ, He BK, Chen RS, Ma DL, Qiang BQ, Wen YM, Hou YD, Yu J. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(20): 4432–4441.
- [18] Pougach K, Semenova E, Bogdanova E, Datsenko KA, Djordjevic M, Wanner BL, Severinov K. Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(6): 1367–1379.
- [19] Andersson AF, Banfield JF. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science*, 2008, 320(5879): 1047–1050.
- [20] Touchon M, Charpentier S, Clermont O, Rocha EPC, Denamur E, Branger C. CRISPR distribution within the *Escherichia coli* species is not suggestive of immunity-associated diversifying selection. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(10): 2460–2467.
- [21] Almendros C, Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Guzmán NM, García-Martínez J. CRISPR-Cas functional module exchange in *Escherichia coli*. *mBio*, 2014, 5(1): e00767–13.
- [22] Casabonne C, González A, Aquili V, Balagué C. Prevalence and virulence factors of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhoea in Rosario, Argentina. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2016, doi: 10.7883/yoken.JIID.2015.459.
- [23] Zhao DY, Huang QY, Zhou JY, Wang M, Xu YL, Hu WF, Hu SK. Study on virulence gene of *Shigella* spp. in Huaibei City. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*. 2008, 18(5): 792–794. (in Chinese)

- 赵冬云, 黄其宇, 周锦英, 王敏, 徐艳丽, 胡万富, 胡守奎. 淮北市志贺菌毒力基因的研究. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(5): 792–794.
- [24] Xi N, Han J, Wu L, Li NY. Virulent genes of *Shigella* from Lanzhou city. *Journal of Lanzhou University (Medical Sciences)*, 2009, 35(2): 36–38. (in Chinese)
郝宁, 韩俭, 吴玲, 李宁荫. 兰州市志贺菌相关毒力基因. *兰州大学学报(医学版)*, 2009, 35(2): 36–38.
- [25] Bikard D, Hatoum-Aslan A, Mucida D, Marraffini LA. CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during *in vivo* bacterial infection. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12(2): 177–186.
- [26] Jiang FG, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, 30: 100–111.
- [27] Louwen R, Staals RHJ, Endtz HP, van Baarlen P, van der Oost J. The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2014, 78(1): 74–88.
- [28] Westra ER, Buckling A, Fineran PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(5): 317–326.
- [29] Xia X, Qin D, Zhan ZF, Cai L, Zhang H. Antibiotic resistance and virulence genotypes of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in Hunan Province. *Practical Preventive Medicine*, 2015, 22(12): 1427–1430. (in Chinese)
夏昕, 覃迪, 湛志飞, 蔡亮, 张红. 湖南省福氏和宋内志贺菌的耐药性及其毒力基因表型分析. *实用预防医学*, 2015, 22(12): 1427–1430.
- [30] Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *mBio*, 2010, 1(4): e00227–10.
- [31] Touchon M, Charpentier S, Pognard D, Picard B, Arlet G, Rocha EPC, Denamur E, Branger C. Antibiotic resistance plasmids spread among natural isolates of *Escherichia coli* in spite of CRISPR elements. *Microbiology*, 2012, 158(12): 2997–3004.
- [32] Hatoum-Aslan A, Marraffini LA. Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 17: 82–90.
- [33] Gao X, Li J, Liu QY, Shen X, Mei J, Gao Q. Heteroresistance in *Mycobacteria tuberculosis* is an important factor for the inconsistency between the results of phenotype and genotype drug susceptibility tests. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 2014, 37(4): 260–265. (in Chinese)
高旭, 李静, 柳清云, 沈鑫, 梅建, 高谦. 异质性耐药对结核分枝杆菌表型和基因型耐药检测结果的影响. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(4): 260–265.
- [34] Heidrich N, Vogel J. Same same but different: new structural insight into CRISPR-Cas complexes. *Molecular Cell*, 2013, 52(1): 4–7.
- [35] Huang ZJ. The Study of insertion sequence on IS₂: I. polarity and inserted direction of IS₂. *Journal of Genetics and Genomics*, 1994, 21(2): 161–168. (in Chinese)
黄占景. 插入序列IS₂的研究: I. IS₂的插入方向与极性效应. *遗传学报*, 1994, 21(2): 161–168.

Role of CRISPR/Cas systems in drug-resistance and virulence and the effect of IS600 on the expression of *cse2* in *Shigella*

Lijuan Hong¹, Bing Zhang¹, Guangcai Duan^{1,3*}, Wenjuan Liang^{1,3}, Yingfang Wang², Shuaiyin Chen¹, Haiyan Yang¹, Yuanlin Xi¹

¹ Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

² Department of Preventive Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China

³ Henan Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China

Abstract: [Objective] To analyze the relationship between CRISPR/Cas system and drug-resistance, virulence. To investigate the effect of IS600 on the expression of CRISPR associated gene *cse2* in *Shigella*. [Methods] CRISPR loci, CRISPR associated gene *cse2*, drug-resistant genes and virulent genes were detected by PCR in 33 *Shigella* strains; Trypan Blue counting test was used to detect bacterial virulence; Real-time PCR was used to detect relative mRNA expression of *cse2*; susceptibilities of *Shigella* strains were tested by agar diffusion method. Furthermore, we analyzed the relationship between CRISPR loci and drug-resistant genes, virulent genes. The effect of the IS600 on the expression of CRISPR associated gene *cse2* was investigated. [Results] The mortality of HeLa cells infected by *Shigella* with CRISPR1 loci was significantly lower ($P < 0.05$) than those infected by *Shigella* without CRISPR1. The mRNA expression level of *cse2* in group with IS600 was significantly ($P < 0.05$) lower than that in group without IS600. [Conclusions] CRISPR loci were widely present in *Shigella*. *Shigella* without CRISPR1 has a higher pathogenicity. Due to the insertion of IS600, the mRNA expression level of *cse2* was decreased in *Shigella*.

Keywords: *Shigella*, CRISPR/Cas system, insertion sequence, drug-resistance, virulence

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Science and Technology Major Project (2013ZX10004607)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-371-67781964; E-mail: gcduan@zzu.edu.cn

Received: 5 April 2016; Revised: 2 June 2016; Published online: 1 July 2016