



空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统的研究进展

吕泓玥¹, 臧筱琦¹, 黄萍瑜¹, 焦新安², 黄金林^{1,2*}

1 扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏 扬州 225009

2 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏 扬州 225009

吕泓玥, 臧筱琦, 黄萍瑜, 焦新安, 黄金林. 空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统的研究进展. 微生物学报, 2022, 62(7): 2455–2465.

Lv Hongyue, Zang Xiaoqi, Huang Pingyu, Jiao Xin'an, Huang Jinlin. Research progress of CRISPR/Cas system in *Campylobacter jejuni*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2455–2465.

摘要: 多数细菌都存在发挥免疫防御机制作用的 CRISPR/Cas 系统, 在不同种属间呈现多态性。空肠弯曲菌是全球范围内重要的食源性病原菌, 所致疾病也是典型的自限性疾病, 其复杂的致病机制并未得到明确的解析, 而空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统的结构呈现多态性, 研究两者关系仍存在诸多限制。本文从 CRISPR/Cas 系统在空肠弯曲菌中的结构、机制及技术应用等方面的研究进展进行综述, 为探索空肠弯曲菌致病机制提供新思路。

关键词: 空肠弯曲菌; CRISPR/Cas 系统; 结构; 免疫防御

Research progress of CRISPR/Cas system in *Campylobacter jejuni*

LV Hongyue¹, ZANG Xiaoqi¹, HUANG Pingyu¹, JIAO Xin'an², HUANG Jinlin^{1,2*}

1 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: CRISPR/Cas system is distributed in most bacteria, with immune defense mechanisms and showing polymorphisms among different species. *Campylobacter jejuni* is an important foodborne

基金项目: 国家自然科学基金(32172939, 31872493); 山东省泰山产业领军人才项目(tscy20190113)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32172939, 31872493) and by the Taishan Industry Leading Talents Project in Shandong Province (tscy20190113)

*Corresponding author. E-mail: jinlin@yzu.edu.cn

Received: 31 October 2021; Revised: 21 February 2022; Published online: 15 March 2022

pathogen worldwide, and the disease caused by infection with it is also a typical self-limiting disease. Its pathogenic mechanism is complex, which has not been clearly clarified, and together with the polymorphisms of CRISPR/Cas system in *C. jejuni*, there exist many limitations in analyzing the relationship between CRISPR/Cas system and *C. jejuni*. In this paper, the structure, mechanism and technical application of CRISPR/Cas system in *C. jejuni* were reviewed, which provided new ideas for exploring the pathogenic mechanism of *C. jejuni*.

Keywords: *Campylobacter jejuni*; CRISPR/Cas system; structure; immune defense

为抵抗各种外源生物的侵袭以及入侵宿主后的大量繁殖, 细菌不断进化出多种与抗性和毒力相关的机制, 如针对抗生素的耐药系统、提供动力的鞭毛系统和通过基因水平转移(horizontal gene transfer, HGT)方式来整合入侵的噬菌体等各种遗传元件。近年的研究表明, CRISPR/Cas 系统也是作为一种免疫防御系统而存在于多数的细菌和古菌中, 通过整合酶捕获入侵外源基因并储存, 赋予此系统“记忆作用”, 凭借记忆片段能够再次抵抗相同病原体的入侵, 是细菌中一种高度多态性的遗传元件^[1]。

1978 年 Ishino 等首次发现大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) K12 染色体中存在一段由 29 bp 成簇的、规律性重复出现的短序列^[2]。序列的生物学机制探索多年, 直至 2002 年, 对 40 种细菌和古细菌基因组中有此特征的序列进行表征分析, 终被命名为成簇有规律的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), 并发现了编码相关功能蛋白的 *cas* 基因^[3]。而后于 2007 年 Barrangou 等^[4]证实 CRISPR/Cas 系统发挥免疫防御作用而存在于细菌中。从此, 多种细菌开始被探索和证实与 CRISPR 的关联性, 研究发现在不同种菌株中, CRISPR/Cas 系统的结构组成及生物机理并不相同。

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是全球范围内一种通过“粪-口”方式传播的食源性病原

菌, 可引起人类腹泻和细菌性肠胃炎, 严重可导致患神经性疾病格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome, GBS)^[5]。在不同研究中都证实空肠弯曲菌仅含有一个 CRISPR 位点并且都属同一亚型, 但并非所有菌株都含有完整的 CRISPR/Cas 结构, 结合细菌致病机制仍在研究阶段, 探求 CRISPR/Cas 系统在空肠弯曲菌中的存在价值, 对研究空肠弯曲菌的致病机制具有重大意义。

1 空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统的结构

一个完整的 CRISPR/Cas 系统由 CRISPR 及 Cas 相关功能蛋白(CRISPR associated proteins)组成, 此系统多存在于微生物的染色体上。根据 Cas 蛋白的组成结构和功能差异, 2011 年 Makarova 等^[6]建议按照发挥主要作用的效应蛋白将不同的 CRISPR/Cas 系统分为 3 种主要类型, 分别为基于 Cas3 的 I 型、基于 Cas9 的 II 型和基于 Cas10 的 III 型系统。每个类型的系统又根据含有的其他辅助蛋白分为不同亚型, 2019 年, Makarova 等^[7]又根据 *cas* 基因进化及变异体的发现, 将 CRISPR/Cas 系统细分为 17 种亚型。如 II 型系统分为 II-A 型、II-B 型和 II-C 型, 3 种亚型含有相同的 Cas 效应蛋白及反式激活 CRISPR RNA (trans-CRISPR RNA, tracrRNA), 不同亚型差别在于辅助蛋白不同。组成不同类型系统的核心 Cas 蛋白, 在相同种类上具有高

度的同源性, 不同种类具有高度的遗传多样性。

2003 年研究人员首次对空肠弯曲菌进行 CRISPR/Cas 系统的研究, 揭示了空肠弯曲菌的 CRISPR/Cas 系统结构亚型, 并分析了菌株之间的系统发育关系^[8]。2007 年 Grissa 等^[9]在 CRISPRdb 数据库中公布了空肠弯曲菌 CRISPR 位点信息, 为后续探索提供数据信息。

空肠弯曲菌的 CRISPR/Cas 系统是结构最简单的 II-C 型^[6], CRISPR/Cas 系统成分多样性最低, Cas 蛋白组成及排列顺序为 Cas9、Cas1 和 Cas2^[10-11](图 1)。其中, Cas9 为主要效应蛋白, 是可引导 RNA 的双链 DNA 酶, 介导(CRISPR RNA, crRNA)处理和干扰阶段, 参与间隔序列的剪切及采集。具有一个 HNH (His-Asn-His) 内核酸酶结构域, 还包括 RuvC-I、II 和 III 3 种 RuvC 内核酸酶结构域, HNH 和 RuvC 分别负责切割目标双链 DNA 的识别链和互补链^[12-13]。存在于目标序列的间隔序列临近基序 (protospacer adjacent motif, PAM)负责与 Cas9 进行对接, 通过与 PAM 的准确结合, 使得 CRISPR/Cas 系统区分自我和非自我 DNA, 从而保护细菌自身, PAM 序列越短 Cas 蛋白可巡视区域更广^[14], 空肠弯曲菌 Cas9 对应的 PAM 序列为 5'-NNNVRYAC-3'^[15]。Cas1 和 Cas2 为泛表达蛋白, 在其他系统类型上普遍存在。张博等^[16]

对国内外 25 株不同背景的空肠弯曲菌进行 CRISPR/Cas 系统检测并对 Cas 蛋白进行同源性分析, 结果表明 Cas9 蛋白氨基酸同源性较高, 可达 97.2%–100.0%, Cas1、Cas2 蛋白的同源性为 96.8%–100.0%, 且 *cas* 基因间的突变为同义突变, 证实了空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统的 *cas* 基因具有高保守性、低变异性的特点。

CRISPR 阵列由上游的前导序列(leader)、重复序列(repeat)和间隔序列(spacer)构成。Leader 由 100–500 bp 碱基构成, 富含 AT 碱基, 位于 CRISPR 阵列中第一条 repeat 上游, 起到指引插入序列定位到相应位点的作用, 并作为启动子启动系统转录。Repeat 长度通常为 21–48 bp, 多数细菌中的 repeat 存在 5–7 bp 的回文序列, 能够转录出稳定的 RNA 二级茎结构。Repeat 在不同种间呈现高度多态性, 种间及同阵列中呈现高度保守性或存在少数突变。Spacer 通常为 28–37 bp, 起源于可移动的遗传元件, 入侵到细菌中的病毒、质粒和噬菌体等被识别、切割后产生的基因片段被加工成 spacer, 定位穿插到 repeat 间。在不同种属间 CRISPR 阵列结构不相同, 同种菌株之间所处环境的不同阵列的长度也处于动态变化中。如 2017 年吴瑜凡等^[17]对中国江苏禽类的空肠弯曲菌菌株进行检测, CRISPR 阵列长度范围为 92–366 bp, spacer

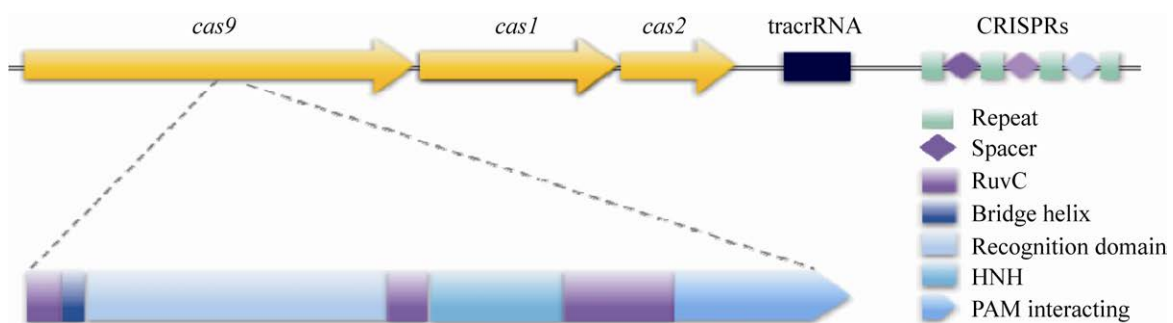


图 1 空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统结构示意图

Figure 1 CRISPR/Cas system structure of *Campylobacter jejuni*.

数量为 1–5 条, 识别到的 repeat 为 5'-GTTTAA GTCCCTTTTAAATTTCTTTATGGTAAAAT-3', 长度为 37 bp 并呈现种间高度保守性, 与 CRISPRdb 数据库和 2020 年 Yeh 等^[18]对美国禽类检测结果一致。

空肠弯曲菌中含有完整 CRISPR/Cas 系统的检测率在不同研究结果中不同, 张博等^[16]实验菌株中的检测率仅为 56.1%, 其余菌株缺少部分结构或完全缺失。而 Pearson 等^[19]对与农业和非农业相关的 3 746 株空肠弯曲菌的 CRISPR/Cas 系统的检测率高达 98%, 与空肠弯曲菌同为弯曲菌属的结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)含有相同的 CRISPR/Cas 系统, 但 486 株中检测率仅为 9.6%。这种 CRISPR/Cas 系统的不均分布与弯曲菌复杂的致病机制或许存在关联^[20]。目前, 弯曲菌属的 CRISPR/Cas 系统研究还不足, 需要更多的实验及数据分析。

2 空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统的免疫防御工作机制

CRISPR/Cas 系统对入侵的核酸片段进行识别、切割, 再整合到 CRISPR 阵列中, 以防再次入侵。不同亚型系统的工作机制并不相同, 空肠弯曲菌的 II-C 型 CRISPR/Cas 系统结构简单, 因此其工作机制的研究也较清晰, 主要分 3 个工作步骤: 适应、表达和干扰(图 2)。

适应——获取间隔区^[21–22]: 通过泛表达核心蛋白 Cas1–Cas2 整合酶的两个酪氨酸准确捕捉并固定入侵核酸序列的双链, 同时整合宿主因子(integration host factor, IHF)在 repeat 的上游产生一个“U”型弯为插入序列预留空间, Cas9 参与下通过构象改变使 Cas1–Cas2 整合酶识别

目的序列, 并结合插入到目的单链 PAM 序列的 3'端, 由 Cas1 在目的序列双链两端的 3'端切割出 5nt 碱基, 随后生成一段 30 nt 左右的 DNA 片段, 插入到 CRISPR 序列中紧靠 leader 区的第一条 repeat 的下游区。

表达——CRISPR 阵列的表达^[23]: 新合成的 spacer 起始产物是为约 30–65 nt 的 pre-crRNA, 随后被复合蛋白酶系统转录加工为成熟的 crRNA, 互补配对形成“R”环结构。随后, Cas9 蛋白、crRNA 和 tracrRNA 三者形成效应复合物, 即 RNA-Cas 蛋白复合物。

干扰——crRNA 靶向裂解: 成熟的 crRNA 引导 RNA-Cas 蛋白复合物识别携带与该段序列互补的入侵的外源序列, 复合物构象改变后即开始对外源序列切割并降解。

空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统是否起到免疫防御作用? Hooton 等^[25]研究发现, 存在 Cas4 样蛋白质的噬菌体环境下, 能够激活 spacer 的捕获。但实验结果仅是将特定条件下的菌株进行深度测序而得出的结论, 并不能反映细菌存活状态的情况。另一种含有 II-C 型系统的鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA), He 等^[26]采用质粒转染探究 RA 是否能够通过免疫防御机制插入新的 spacer, 发现 RA 的 CRISPR/Cas 系统能够在引入外源质粒后获得新的 spacer, 并且都为非我 DNA 序列, 证实了在 II-C 型致病菌中 CRISPR/Cas 系统免疫防御作用的有效性, 这对研究空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统具有参考价值。

Hooton 等^[27]将空肠弯曲菌噬菌体 DA10 基因组中注释的 59 个 ORF 与 CRISPRdb 数据库进行匹配, 确定有 75% (43 个)的 ORF 可与已检测的 spacer 进行匹配。而近期一项研究发现, 部

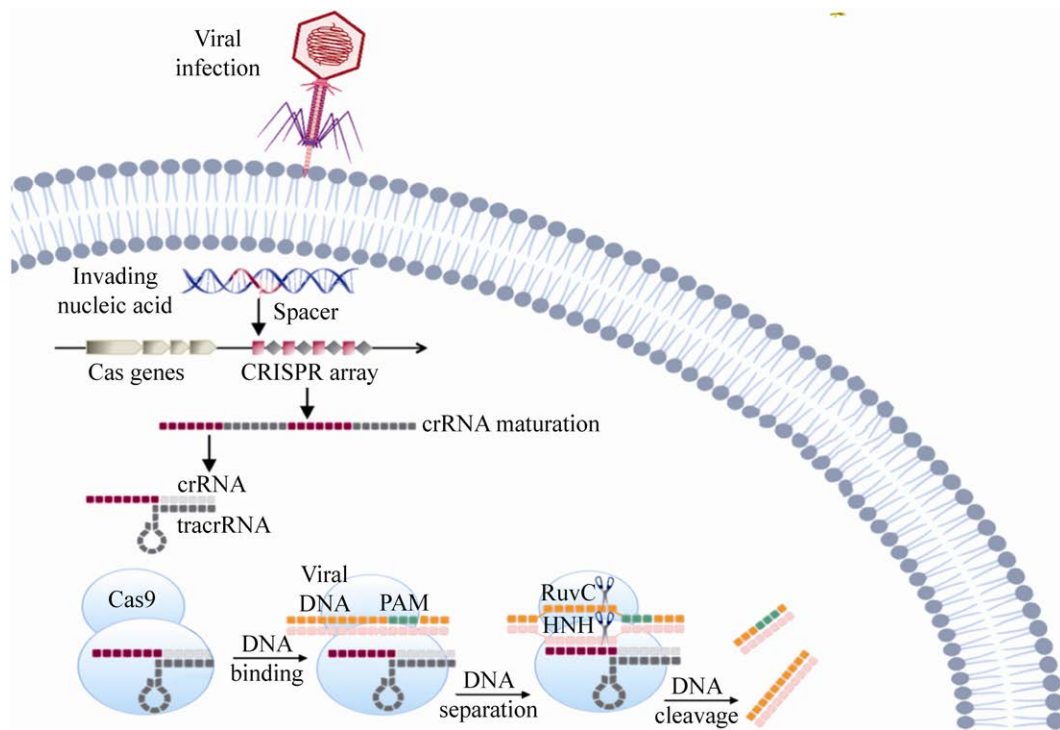


图 2 CRISPR-Cas9 免疫防御示意图^[24]

Figure 2 CRISPR-Cas9 immune defense mechanism^[24]. After the bacteria are infected, some of the invading nucleic acid fragments are integrated into the CRISPR array and subsequently transcribed into the guide RNA containing crRNA and tracrRNA. The Cas9 protein binds to the guide RNA, which recognizes the complementary exogenous DNA sequence and performs accurate binding with the PAM sequence. The two nuclease domains of the Cas9, RuvC and HNH, play a role in cleaving the exogenous sequence to achieve the purpose of destruction.

分弯曲菌中 CRISPR/Cas 系统仅含有一个变异的 Cas9 蛋白, 其余功能蛋白缺失, 但仍然有 CRISPR 阵列存在, 研究人员将此种 CRISPR/Cas 系统命名为 CampyICE1, 在 134/5 829 (2.3%) 的空肠弯曲菌和 92/1 347 (6.8%) 的结肠弯曲菌中均出现此类结果^[28]。CampyICE1 中近 63.7% 的 spacer 能与质粒进行匹配, 而近 87.9% 的菌株中 pVir、pTet 和 pCC42 质粒缺失。弯曲菌 CRISPR/Cas 的 spacer 与噬菌体和质粒的较高匹配关系及 CRISPR/Cas 系统与质粒在菌株中竞争存在的关系, 说明 CRISPR/Cas 系统在弯曲菌中在对抗外源入侵时确实起到了免疫防御作用。

3 CRISPR/Cas 系统对空肠弯曲菌生物机制的影响

细菌不断进化, 通过缺失、获得新基因来产生新表型以适应逆环境。有科学家指出 HGT 是原核生物遗传物质发生改变的主要方式, 基于上述 spacer 是整合酶作用下获取的外界基因片段, 猜测 CRISPR/Cas 系统参与了 HGT, 起到屏障作用, 对细菌的抗性、毒力及致病机制产生影响^[29]。

在不同物种间关于 CRISPR/Cas 系统与细菌生物机制关系的研究结果并不相同。E. coli 中, 携带更多毒力基因和移动遗传元件的菌株

中 CRISPR/Cas 系统更活跃,完整性更高^[30]。相反,历史上暴发严重的产志贺毒素大肠杆菌(*Shiga toxin-producing Escherichia coli*, STEC)菌株,其 CRISPR 阵列丰度较未暴发即毒力较弱的菌株的丰度更少,且与血清型密切相关^[31]。CRISPR 阵列丰度与毒力基因之间的关系可能与细菌的属性有关,然而在空肠弯曲菌中,尚未报道有类似系统性的研究。

关于 CRISPR/Cas 系统是否对空肠弯曲菌的毒力和耐药机制产生影响,有相关实验对此进行了分析。针对 Cas 蛋白,有研究者使用人源标准株 NCTC 11168 构建 $\Delta cas9$ 缺失株,测定的耐药表型、毒力表型和转录组分析的结果表明,空肠弯曲菌 Cas9 通过调控编码毒力和耐药的相关基因,来增强空肠弯曲菌的毒力作用以及对抗生素的耐药性。并且缺失 Cas9 蛋白的菌株生物膜形成能力弱于野生株,即菌株运动力降低,说明 CRISPR/Cas 系统促进了空肠弯曲菌的生物膜形成^[32-33]。针对 CRISPR 阵列,Adiguzel 等^[34]检测了 100 株的耐氟喹诺酮空肠弯曲菌菌株,其中 86%的菌株 CRISPR 阵列呈阳性,spacer 中 70%与弯曲菌噬菌体 D10 存在核苷酸同源性,15%与弯曲菌噬菌体 CP39 存在核苷酸同源性。这种在耐药菌株中,CRISPR 阵列较高的检测率(大于 56.1%),且 spacer 与噬菌体的高度同源性,推测耐药的空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统较活跃,也同样证实了 CRISPR/Cas 系统在空肠弯曲菌中的免疫防御作用。以上对空肠弯曲菌中 Cas9 和 CRISPR 阵列作用的研究结果表明,在空肠弯曲菌中 CRISPR/Cas 系统的存在增强了菌株的毒力作用和耐药水平。

感染空肠弯曲菌可导致细菌性肠胃炎,严重可致神经性疾病 GBS。空肠弯曲菌中的脂低聚糖(lipooligosaccharid, LOS)是一种神经节苷脂类似的结构,可以混淆免疫防御系统的识别,

从而引发周围神经性疾病 GBS,其中唾液酸转移酶(sialyltransferase, Cst- II)是合成 LOS 的必须基因。Louwen 等^[35]对患有 GBS 疾病患者体内分离出的空肠弯曲菌进行了 Cst- II 和 CRISPR/Cas 系统的检测分析发现,在 GBS 菌株细胞膜上的唾液酸化的 LOS 结构中能够分离出与致病性相关的 Cst- II,但 CRISPR 相关的 cas 基因缺失部分或系统结构完全缺失。实验还发现,CRISPR 系统同 LOS 结构一样,在空肠弯曲菌内发挥有效的噬菌体抗性作用,推测在空肠弯曲菌中,CRISPR/Cas 系统和 LOS 结构具有双重功能,彼此协调,共同调节细菌机能。与 GBS 菌株检测结果相同,在引起严重胃肠炎感染并发症的菌株中也检测出含有较短或完全缺乏 CRISPR 阵列。致病菌株反而缺乏 CRISPR/Cas 系统结构,类似的结果出现在加拿大最近的一项研究中,耐氨苄青霉素药的屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)的 CRISPR 序列的完全缺失^[36]。CRISPR/Cas 系统与空肠弯曲菌治病机制是否有关联,需要进一步的探讨。

目前研究说明,CRISPR/Cas 系统对空肠弯曲菌的生物机制会产生影响,但具体通过何种机制影响哪些功能还未得到明确的证实。

4 CRISPR/Cas 系统的应用

CRISPR/Cas 系统是近年研究分析的一大热点,基于其结构、分子和遗传等特性,此系统已被利用探索出多种应用技术,如利用 CRISPR 阵列进行分子分型的技术,利用整合酶识别、切割的原理,利用 Cas 蛋白进行病原菌检测的技术等。

4.1 利用 CRISPR/Cas 系统进行分子分型

分子分型是一种在分子水平上对同种微生物进行分类的方法,如多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)。利用细菌

种间 CRISPR 阵列组成的多样性, 研究人员将 CRISPR/Cas 系统用于种间分型的工具^[37-38], I 型系统的沙门氏菌(*Salmonella*)^[39-40]和 *E. coli*^[41]已经有较完善的分型研究。通过比对 CRISPR 阵列中的 spacer, 可对样本中的微生物进行追溯其进化史, 深入了解其共同起源, 为探索生态种群和确定复杂系统中宿主源和病毒种群的多样性提供了基础^[42]。

利用 Cas 蛋白的多样性可将不同组分系统进行分类, 然而利用 CRISPR 阵列进行分型存在局限性, 在空肠弯曲菌中即是。如上文所述, Louwen 等^[35]分析的可致 GBS 菌株中 CRISPR/Cas 系统呈现多样化, 如部分缺失或完全缺失 3 种效应蛋白, 且 CRISPR 阵列较短。2015 年农业与非农业相关的空肠弯曲菌完整的 CRISPR/Cas 系统检测率高达 98%^[19], 而 2020 年来自家禽的空肠弯曲菌仅 49% 的菌株含有 CRISPR 阵列^[18]。由于遗传进化的多样性, CRISPR/Cas 系统在空肠弯曲菌中呈现种间多态性^[43], 因此不能单独作为对空肠弯曲菌进行基因分型的方法。但是, 当 CRISPR/Cas 系统与限制性片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术、血清型分型、MLST 技术或与其他分型方法联合使用时, 可提高对菌株的分型能力。如在 ST 型分析后, 发现空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统在 ST-50、ST-3272、ST-21、ST-45 和 ST-48 中聚集^[19,44]。克罗诺杆菌(*Cronobacter*)适用的囊膜分析法与 MLST 和 CRISPR/Cas 系统共同对克罗诺杆菌进行基因型分析, 提高了对细菌的流行病学、遗传进化、毒性和抗生素耐药性等方面的鉴别能力^[45]。

另外, 利用 CRISPR/Cas 系统可对系统发育关系进行分析, 如 Van Doorn 等^[46]将含有 CRISPR/Cas 的空肠弯曲菌分离株与 GBS 相关

的产生神经节苷脂样 LOS 的空肠弯曲菌分离株进行系统发育分析发现, 后者起源更晚, 说明 LOS 这种抗性结构是菌株后获得的。这为研究物种的系统发育关系提供了新思路。

4.2 利用 CRISPR-Cas9 技术进行基因编辑

根据遗传学中心法则, 科学家利用 DNA 转录为 RNA 或 RNA 翻译为蛋白质的过程中涉及的生物元件, 对生命体进行可遗传性的编辑手段称为基因编辑, 有一代的锌指核酸酶技术(zinc finger nuclease, ZFN)、二代的转录激活样效应因子核酸酶技术(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和三代的 CRISPR/Cas 技术。作为最流行的 CRISPR/Cas 技术, 其原理是利用存在特异性的 DNA 识别结构域、核酸内切酶的蛋白质, 以及利用 DNA 双链断裂修复机制(DNA double strand break, DSB), 来达到人工进行 DNA 断裂又重组的目的^[47]。从 CRISPR/Cas 系统被发现至今, 因其巨大的开发潜力, CRISPR 技术取得了飞跃进步, 从最初开发基础的基因编辑工具用于动物模型研究, 治疗各种遗传疾病, 如今成功迈入临床应用^[48-49]。

CRISPR-Cas9 技术只需要一个具有核酸酶作用的 Cas9 蛋白, 根据目的序列的 PAM 位点人工设计引导作用的 sgRNA, 对内切酶的靶向性重新编辑, 通过载体将整合的 sgRNA 和 Cas9 运输到目标细胞中即可完成模拟细菌的 CRISPR/Cas 系统适应阶段的工作机制。因此 CRISPR-Cas9 技术是基因编辑中使用率最高的一项技术。而将 Cas 蛋白和 sgRNA 有效输送进目标细胞中, Cas 蛋白分子量的大小及与目标序列结合构象的贴合度是值得考虑的一个问题。

近年, 被发现属 II-C 型系统的空肠弯曲菌的标志蛋白 Cas9 蛋白, 因其分子量较小、单蛋白酶结构域的有效性和灵活性, 在基因编辑方面表现出更大的潜力。2017 年 Yamada 等^[12]使

用结构生物学方法解析了空肠弯曲菌 Cas9 蛋白的晶体结构组成, 结果表明 Cas9 的 crRNA 与其靶 DNA 结合出的有效构象形成了最小 Cas9 晶体结构。同年, 研究人员利用空肠弯曲菌的 Cas9 蛋白设计出了最小的 CRISPR-Cas9 结构, 以腺病毒(AAV)为载体成功运输到肌细胞和小鼠眼部, 证明空肠弯曲菌 Cas9 可用于哺乳动物的基因编辑治疗^[50]。然而, 2020 年一项研究发现空肠弯曲菌可将其 Cas9 分泌到细胞质中, 能够催化金属依赖性的、非特异性 DNA 裂解, 从而导致细胞死亡, 作者认为这种对宿主细胞有攻击性的 Cas9 蛋白, 并不适合作为基因编辑的工具^[51]。CRISPR 系统在空肠弯曲菌中存在的多态性, 使上述的实验结果不能完全作为后续研究的标准参照, 空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统的具体关系仍需进一步探索, 以开发更多的应用技术。

5 总结与展望

CRISPR/Cas 系统研究在数十年内发展迅速, 革新了各个生物领域的发展。然而作为基因编辑的工具, 我们首先需要了解细菌中 CRISPR/Cas 系统存在的具体内容及作用, 才能更有效地对其进行改造和使用。CRISPR/Cas 系统结构中 Cas 效应蛋白呈现高度同源性, 而从外界获取基因片段而组成的 CRISPR 阵列呈现高度多态性, 利用此特点对菌株进行溯源, 结合 16S rRNA 的 DNA 条形码、血清型分型和 MLST 型分型等方法, 可深入了解细菌的系统发育关系^[52-53]。分析 spacer 来鉴定菌株与噬菌体、质粒等的关系, 为菌素耐药性(anti-microbial resistance, AMR)等生物学特性提供分析思路, 以此揭示菌株的致病机理^[37,54]。

基于以上分析方法, 目前空肠弯曲菌

CRISPR/Cas 系统的研究仍停留在初步探索阶段。一方面, 目前已证实 CRISPR/Cas 系统在空肠弯曲菌中属 II-C 系统, 且只有一个位点, 但与其他菌株相比数据分析不够充分, 得出的结论不具有广泛性、整体性。另一方面, 有研究探索了 Cas 蛋白与细菌毒力和抗性的关系, 但结果差异性不明显, 并且 CRISPR/Cas 系统在空肠弯曲菌中是否发挥免疫防御作用未有实验来明确证实。

空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统缓慢的研究进展与菌株自身机制有关。空肠弯曲菌自身机制较为复杂, 其易传播、分布广, 共有粘附、侵袭、产生毒素和分子模拟机制 4 个方面致病因素, 但其生存条件较其他菌株如大肠杆菌更为苛刻、抵抗力弱、生化反应不活泼^[55]。复杂、苛刻的自身条件为菌株的研究带来挑战, 且空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统具有高度多样性, 难以通过整体来分析此系统在空肠弯曲菌中的具体机制。但随着其他同样具有 II-C 系统菌株的研究不断推进, 将为空肠弯曲菌 CRISPR/Cas 系统的分析提供更多有效的新方法。相信随着生物信息学、结构生物学等学科的发展, CRISPR/Cas 系统在空肠弯曲菌中的存在意义必将被揭开面纱。

参考文献

- [1] Koonin EV, Makarova KS. CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. *RNA Biology*, 2013, 10(5): 679-686.
- [2] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [3] Jansen R, Van Embden JDA, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA

- repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [4] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [5] Ueno T, Kon T, Kurihara AI, Tomiyama M. Unilateral oculomotor nerve palsy following *Campylobacter* infection: a mild form of miller fisher syndrome without Ataxia. *Internal Medicine: Tokyo, Japan*, 2017, 56(21): 2929–2932.
- [6] 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.
- [7] Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, Charpentier E, Cheng D, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Scott D, Shah SA, Siksnys V, Terns MP, Venclovas Č, White MF, Yakunin AF, Yan W, Zhang F, Garrett RA, Backofen R, Van Der Oost J, Barrangou R, Koonin EV. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(2): 67–83.
- [8] Schouls LM, Reulen S, Duim B, Wagenaar JA, Willems RJL, Dingle KE, Colles FM, Van Embden JDA. Comparative genotyping of *Campylobacter jejuni* by amplified fragment length polymorphism, multilocus sequence typing, and short repeat sequencing: strain diversity, host range, and recombination. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(1): 15–26.
- [9] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 172.
- [10] 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: MMBR*, 2014, 78(1): 74–88.
- [11] Tang L. Exploring class 1 CRISPR systems. *Nature Methods*, 2019, 16(11): 1079.
- [12] Yamada M, Watanabe Y, Gootenberg JS, Hirano H, Ran FA, Nakane T, Ishitani R, Zhang F, Nishimasu H, Nureki O. Crystal structure of the minimal Cas9 from *Campylobacter jejuni* reveals the molecular diversity in the CRISPR-Cas9 systems. *Molecular Cell*, 2017, 65(6): 1109–1121.
- [13] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [14] Christie KA, Kleinstiver BP. Making the cut with PAMless CRISPR-Cas enzymes. *Trends in Genetics*, 2021, 37(12): 1053–1055.
- [15] Mir A, Edraki A, Lee J, Sontheimer EJ. Type II-C CRISPR-Cas9 biology, mechanism, and application. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13(2): 357–365.
- [16] 张博, 姚学萍, 曹随忠, 王印, 杨泽晓. 空肠弯曲菌 CRISPR-Cas 系统生物信息学分析. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(10): 960–964.
- Zhang B, Yao XP, Cao SZ, Wang Y, Yang ZX. Bioinformatic analysis of CRISPR-Cas system in *Campylobacter jejuni*. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(10): 960–964. (in Chinese)
- [17] 吴瑜凡, 申进玲, 崔思宇, 郭旸, 吴福平, 王翔, 邵景东. 空肠弯曲菌中规律成簇间隔短回文重复序列 (CRISPR) 的检测与结构分析. *食品科学*, 2018, 39(24): 139–144.
- Wu YF, Shen JL, Cui SY, Guo Y, Wu FP, Wang X, Shao JD. Detection and structural analysis of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) regions in *Campylobacter jejuni*. *Food Science*, 2018, 39(24): 139–144. (in Chinese)
- [18] Yeh HY, Awad A. Genotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). *Current Microbiology*, 2020, 77(8): 1647–1652.
- [19] Pearson BM, Louwen R, Van Baarlen P, Van Vliet AH. Differential distribution of type II CRISPR-Cas systems in agricultural and nonagricultural *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolates correlates with lack of shared environments. *Genome Biology and Evolution*, 2015, 7(9): 2663–2679.
- [20] Shmakov SA, Sitnik V, Makarova KS, Wolf YI, Severinov KV, Koonin EV. The CRISPR spacer space is dominated by sequences from species-specific mobilomes. *mBio*, 2017, 8(5): e01397-17.
- [21] Wang JY, Li JZ, Zhao HT, Sheng G, Wang M, Yin ML, Wang YL. Structural and mechanistic basis of PAM-dependent spacer acquisition in CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2015, 163(4): 840–853.

- [22] Wright AV, Liu JJ, Knott GJ, Doxzen KW, Nogales E, Doudna JA. Structures of the CRISPR genome integration complex. *Science*, 2017, 357(6356): 1113–1118.
- [23] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, Ishitani R, Zhang F, Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156(5): 935–949.
- [24] Nierzwicki Ł, Arantes PR, Saha A, Palermo G. Establishing the allosteric mechanism in CRISPR-Cas9. *WIREs Computational Molecular Science*, 2021, 11(3): e1503.
- [25] Hooton SPT, Connerton IF. *Campylobacter jejuni* acquire new host-derived CRISPR spacers when in association with bacteriophages harboring a CRISPR-like Cas4 protein. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 5: 744.
- [26] He Y, Wang MS, Liu MF, Huang L, Liu CY, Zhang X, Yi HB, Cheng AC, Zhu DK, Yang Q, Wu Y, Zhao XX, Chen S, Jia RY, Zhang SQ, Liu YY, Yu YL, Zhang L. Cas1 and Cas2 from the type II-C CRISPR-Cas system of *Riemerella anatipestifer* are required for spacer acquisition. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 195.
- [27] Hooton S, D'Angelantonio D, Hu Y, Connerton PL, Aprea G, Connerton IF. *Campylobacter* bacteriophage DA10: an excised temperate bacteriophage targeted by CRISPR-Cas. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 400.
- [28] Van Vliet AHM, Charity OJ, Reuter M. A *Campylobacter* integrative and conjugative element with a CRISPR-Cas9 system targeting competing plasmids: a history of plasmid warfare? *Microbial Genomics*, 2021, 7(11): 000729.
- [29] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Magadán AH, Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71.
- [30] Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, Toh H, Asadulghani M, Oshima K, Kodama T, Abe H, Nakayama K, Kurokawa K, Tobe T, Hattori M, Hayashi T. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(42): 17939–17944.
- [31] Toro M, Cao GJ, Ju WT, Allard M, Barrangou R, Zhao SH, Brown E, Meng JH. Association of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) elements with specific serotypes and virulence potential of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(4): 1411–1420.
- [32] Shabbir MAB, Tang YP, Xu ZH, Lin MY, Cheng GY, Dai MH, Wang X, Liu ZL, Yuan ZH, Hao HH. The involvement of the *Cas9* gene in virulence of *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 285.
- [33] Shabbir MA, Wu Q, Shabbir MZ, Sajid A, Ahmed S, Sattar A, Tang YP, Li J, Maan MK, Hao HH, Yuan ZH. The CRISPR-Cas system promotes antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni*. *Future Microbiology*, 2018, 13: 1757–1774.
- [34] Adiguzel MC, Goulart DB, Wu ZW, Pang JJ, Cengiz S, Zhang QJ, Sahin O. Distribution of CRISPR types in fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* isolates. *Pathogens: Basel, Switzerland*, 2021, 10(3): 345.
- [35] Louwen R, Horst-Kreft D, De Boer AG, Van Der Graaf L, De Knecht G, Hamersma M, Heikema AP, Timms AR, Jacobs BC, Wagenaar JA, Endtz HP, Van Der Oost J, Wells JM, Nieuwenhuis EES, Van Vliet AHM, Willemsen PTJ, Van Baarlen P, Van Belkum A. A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 2013, 32(2): 207–226.
- [36] Tremblay CL, Charlebois A, Masson L, Archambault M. Characterization of hospital-associated lineages of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* from clinical cases in dogs and humans. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 245.
- [37] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology: Reading, England*, 2005, 151: 653–663.
- [38] Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, Vergnaud G. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie*, 2008, 90(4): 660–668.
- [39] Shariat N, Dudley E. CRISPR typing of *Salmonella* isolates. *Salmonella*, 2021, 2182: 39–44.
- [40] Xie XL, Hu YC, Xu YH, Yin KQ, Li Y, Chen Y, Xia J, Xu LJ, Liu ZJ, Geng SZ, Li QC, Jiao XN, Chen X, Pan ZM. Genetic analysis of *Salmonella enterica* serovar

- gallinarum* biovar *pullorum* based on characterization and evolution of CRISPR sequence. *Veterinary Microbiology*, 2017, 203: 81–87.
- [41] Yin S, Jensen MA, Bai JW, Debroy C, Barrangou R, Dudley EG. The evolutionary divergence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is reflected in clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) spacer composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(18): 5710–5720.
- [42] Barrangou R, Dudley EG. CRISPR-based typing and next-generation tracking technologies. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2016, 7: 395–411.
- [43] Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7815.
- [44] Kovanen SM, Kivistö RI, Rossi M, Hänninen ML. A combination of MLST and CRISPR typing reveals dominant *Campylobacter jejuni* types in organically farmed laying hens. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(1): 249–257.
- [45] Ogrodzki P, Forsythe SJ. DNA-sequence based typing of the *Cronobacter* genus using MLST, CRISPR-Cas array and capsular profiling. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1875.
- [46] Van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. *The Lancet Neurology*, 2008, 7(10): 939–950.
- [47] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7): 397–405.
- [48] Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(3): 233–239.
- [49] Golkar Z. CRISPR: a journey of gene-editing based medicine. *Genes & Genomics*, 2020, 42(12): 1369–1380.
- [50] Kim E, Koo T, Park SW, Kim D, Kim K, Cho HY, Song DW, Lee KJ, Jung MH, Kim S, Kim JH, Kim JH, Kim JS. *In vivo* genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nature Communications*, 2017, 8: 14500.
- [51] Saha C, Mohanraju P, Stubbs A, Dugar G, Hoogstrate Y, Kremers GJ, Van Cappellen WA, Horst-Kreft D, Laffeber C, Lebbink JHG, Bruens S, Gaskin D, Beerens D, Klunder M, Joosten R, Demmers JAA, Van Gent D, Mouton JW, Van Der Spek PJ, Van Der Oost J, Van Baarlen P, Louwen R. Guide-free Cas9 from pathogenic *Campylobacter jejuni* bacteria causes severe damage to DNA. *Science Advances*, 2020, 6(25): eaaz4849.
- [52] Kushwaha SK, Bhavesh NLS, Abdella B, Lahiri C, Marathe SA. The phylogenomics of CRISPR-Cas system and revelation of its features in *Salmonella*. *Scientific Reports*, 2020, 10: 21156.
- [53] Perez M, Angers B, Young CR, Juniper SK. Shining light on a deep-sea bacterial symbiont population structure with CRISPR. *Microbial Genomics*, 2021, 7(8): 000625.
- [54] Mortensen K, Lam TJ, Ye YZ. Comparison of CRISPR-Cas immune systems in healthcare-related pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 758782.
- [55] Elmi A, Nasher F, Dorrell N, Wren B, Gundogdu O. Revisiting *Campylobacter jejuni* virulence and fitness factors: role in sensing, adapting, and competing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 10: 607704.

(本文责编 张晓丽)