

CRISPR-Cas1 对鲍曼不动杆菌耐药性与毒力的抑制作用

张鹏宇¹, 李金月², 郭婷婷^{1,3}, 包广宇⁴, 胡健⁵, 李国才^{1,3,4*}

1 扬州大学 医学院, 江苏 扬州

2 河南省疾病预防控制中心, 河南 郑州

3 核酸与细胞命运调控省高校重点实验室(扬州大学), 江苏 扬州

4 扬州大学附属医院, 江苏 扬州

5 宜兴市中医医院, 江苏 无锡

张鹏宇, 李金月, 郭婷婷, 包广宇, 胡健, 李国才. CRISPR-Cas1 对鲍曼不动杆菌耐药性与毒力的抑制作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 671-682.

ZHANG Pengyu, LI Jinyue, GUO Tingting, BAO Guangyu, HU Jian, LI Guocai. CRISPR-Cas1 attenuates antibiotic resistance and virulence of *Acinetobacter baumannii*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 671-682.

摘要: 鲍曼不动杆菌的耐药性和毒力与日俱增。研究表明, 鲍曼不动杆菌中 CRISPR-Cas 系统的存在可以降低细菌的耐药性并减弱细菌毒力。然而, CRISPR-Cas 系统中各组分对鲍曼不动杆菌的具体影响尚不明晰。【目的】探究 CRISPR-Cas 系统的组分在鲍曼不动杆菌中对细菌耐药性和毒力的调控作用。【方法】通过构建 *cas1* 基因鲍曼不动杆菌过表达株, 并与之对应检测相应过表达株与原始菌株的细菌生长情况、血清抗性、细菌耐药性、生物膜形成能力、细菌感染小鼠模型小鼠的存活率等变化。【结果】使用纸片扩散法对临床常用的 22 种抗生素的耐药性进行检测, 结果显示, 过表达株 AB26::*cas1* 对 6 种抗生素的耐药性由耐药变为敏感。使用结晶紫染色法检测细菌生物膜形成能力, AB26::*cas1* 株生物膜形成能力较 AB26 株降低。腹腔注射感染小鼠模型显示, 相较于 AB26 株体内感染组小鼠, AB26::*cas1* 株体内感染组小鼠未发生死亡。荧光定量 PCR 检测结果显示, 大部分耐药/毒力基因 mRNA 的表达量下降。人血清与灭活血清孵育后进行存活性检测, 野生株与过表达株的血清抗性差异无统计学意义。【结论】来源于 AB43 株的 *cas1* 基因对鲍曼不动杆菌的耐药性及生物膜形成能力具有抑制作用, 同时细菌对小鼠的致病性也有抑制效果。

关键词: 鲍曼不动杆菌; CRISPR 相关蛋白 1; 耐药性; 毒力

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)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82373637, 82073611, 82002186) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20231241).

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

Received: 2024-09-19; Accepted: 2024-11-17; Published online: 2024-12-20

CRISPR-Cas1 attenuates antibiotic resistance and virulence of *Acinetobacter baumannii*

ZHANG Pengyu¹, LI Jinyue², GUO Tingting^{1,3}, BAO Guangyu⁴, HU Jian⁵, LI Guocai^{1,3,4*}

1 School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

2 Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou, Henan, China

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

4 Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

5 Yixing Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: The antibiotic resistance and virulence of *Acinetobacter baumannii* are increasingly serious. Studies have shown that the CRISPR-Cas system in *A. baumannii* attenuates the antibiotic resistance and virulence, while the effects of CRISPR-Cas system components on *A. baumannii* remain unclear. **[Objective]** Investigation of the role of components of the CRISPR-Cas system in the modulation of bacterial drug resistance and virulence in *A. baumannii*. **[Methods]** The impact of *cas1* overexpression on bacterial growth, serum resistance, bacterial drug resistance, biofilm formation ability, and survival rate of mice in a mouse model of bacterial infection was investigated by constructing *cas1* overexpression strains and corresponding with them to detect the aforementioned changes. **[Results]** The resistance of the bacterial strain AB26::*cas1* to 22 commonly used antibiotics was determined using the paper diffusion method. Of these antibiotics, six were found to have an effect on the strain, causing it to change from resistant to sensitive. The capacity of the bacterial strain AB26::*cas1* to form biofilms was evaluated through the use of crystal violet staining, which revealed a reduction in biofilm formation ability when compared to the AB26 strain. The intraperitoneal injection of the infected mice model demonstrated that no mortality occurred in the AB26::*cas1* strain *in vivo* infected group in comparison to the AB26 strain *in vivo* infected group. The fluorescence quantitative PCR assay demonstrated a reduction in mRNA expression of the majority of resistance and toxicity genes. The survival assay, which involved incubating normal human serum with inactivated serum, revealed no statistically significant difference in serum resistance between the wild strains and the overexpression strains. **[Conclusion]** The *cas1* gene, derived from strain AB43, was observed to exert an inhibitory effect on the drug resistance and biofilm-forming ability of *A. baumannii*, as well as the pathogenicity of the bacteria in mice.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; CRISPR-Cas1; antibiotic resistance; virulence

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, AB), 也称鲍氏不动杆菌, 是一种革兰阴性、非发酵型细菌, 常引发医院获得性肺炎、泌尿系

统感染乃至菌血症等严重疾病, 尤其易感染重症监护病房(intensive care unit, ICU)内免疫力低下危重病人, 导致严重后果^[1-2]。近年来, 鲍

曼不动杆菌对常用抗生素的耐药率逐年攀升, 多重耐药乃至泛耐药鲍曼不动杆菌已成为全球性的公共卫生挑战, 也被视为我国最重要的“超级细菌”之一^[3-4]。我们前期的研究揭示, 鲍曼不动杆菌耐药性的提高伴随着其毒力的增强^[5], 但这一过程可显著受到其 CRISPR-Cas 系统的抑制^[6-7]。

CRISPR-Cas 系统是细菌的一种获得性免疫系统, 广泛存在于 40% 的真细菌和 90% 的古细菌中^[8-9]。该系统由成簇规律间隔短回文重复 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 簇 (21–50 bp 的重复序列 R 与 17–84 bp 的间隔序列 S 交替排列而成)、前导序列 (leader, L) 及一系列 CRISPR 相关基因 (CRISPR-associated gene, Cas gene) 家族等 3 部分组成^[10-11]。CRISPR-Cas 系统的经典功能是抵御质粒、噬菌体等外源核酸的再次入侵^[10-13]。越来越多的研究证明, CRISPR-Cas 系统对细菌的生物学行为发挥着至关重要的作用, 如调控细菌自身基因的转录、维护基因组的稳定性、促进 DNA 修复以及推动基因组进化等^[14-18]。此外, 已有研究发现个别 I 型 CRISPR-Cas 系统具有抑制细菌毒力的现象^[15,18]。例如, 铜绿假单胞菌 I-F 型 CRISPR-Cas 系统敲除株对小鼠的感染能力显著增强, 细菌能够更广泛地播散至小鼠的肺、血液、肝和脾等器官^[19]。

鲍曼不动杆菌中主要存在的 CRISPR-Cas 系统是 I 型, 其中 I-Fb 亚型分布最为广泛, 该系统的特征蛋白为 Cas1 与 Cas2-3^[20-22]。近年来, 有研究发现某些细菌的 Cas1 蛋白能够作用于自身基因, 从而影响细菌的生物学特性^[23]。在我们前期收集临床鲍曼不动杆菌分离株的过程中, 仅发现一株临床分离株 AB43 含有完整的 CRISPR-Cas 系统, 而在多药耐药及泛耐药菌株中, 未能发现部分组分或完整的 CRISPR-Cas 系

统。为了探究鲍曼不动杆菌 CRISPR-Cas 系统是否参与细菌耐药性和毒力基因的表达调控, 构建了 AB43 株的 CRISPR-Cas 系统敲除突变株。结果显示, 突变株由抗生素敏感株转变为广泛耐药菌株, 且生物膜形成能力增强, 对大蜡螟的致死率也显著提高^[7]。对 AB43 株进行全基因组分析后发现, 尽管 CRISPR-Cas 系统的存在并未导致毒力及耐药抗性基因的明显减少, 但 AB43 株本身的耐药性和毒力均较低。我们推测, 这可能是由于其 CRISPR-Cas 系统通过抑制耐药/毒力基因的表达所致^[6-7]。这些前期研究发现, 鲍曼不动杆菌 AB43 株的 CRISPR-Cas 系统或组分可能对细菌的耐药性和毒力具有抑制作用^[24]。

为了探索 AB43 株 CRISPR-Cas 系统作为抑制剂在防控强耐药、高毒力菌株感染中的应用价值, 本研究进一步探究其 *cas1* 基因过表达对同期收集的鲍曼不动杆菌多药耐药菌株及泛耐药菌株抗生素敏感性的影响, 期望为鲍曼不动杆菌感染的精准防控提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 菌株和动物

鲍曼不动杆菌耐药株 AB26、AB29 均来自扬州大学临床医学院; BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心。动物实验按照《实验动物护理和使用指南》提供的说明进行, 扬州大学医学院动物管理委员会进行伦理审查(编号: YXYLL-2023-061)。

1.2 主要试剂和仪器

PCR 引物合成及目的基因测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成; MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、相关限制性核酸内切酶、pET-30a 质粒、PCR 及电泳试剂等, 宝

生物工程(大连)有限公司; 抗生素药敏纸片、MH 液体培养基和 MH 固体培养基, 杭州滨和微生物试剂有限公司。

生物安全柜, ThermoFisher Scientific 公司; 恒温摇床, NBS 公司; 全自动凝胶成像分析仪, Syngene 公司; 核酸蛋白检测仪, 奥林巴斯公司; PCR 仪、电转仪与 0.2 mm 电击杯, Bio-Rad 公司。

1.3 构建 *cas1* 基因过表达菌株

使用前期研究结果中对鲍曼不动杆菌 AB43 株测序结果中的 *cas1* 基因序列^[6]设计 *cas1* 基因引物 *cas1*-F (5'-CGCGAATTCTAAATGGAACAAC TTAACC-3') 和 *cas1*-R (5'-CGCAAGCTTTCTTT CACTCTCCAAATT-3')。上游添加 *EcoR* I 酶切位点 GAATTC, 下游添加 *Hind* III 酶切位点 AAGCTT。细菌 DNA 提取试剂盒提取鲍曼不动杆菌 AB43 株基因组 DNA, 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μ L): 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 10 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。凝胶电泳检测扩增产物, 将符合预期的约 1 000 bp 的 PCR 产物进行 DNA 测序。通过序列分析确认扩增结果为 *cas1* 基因产物后, 对扩增产物进行回收, 回收后的产物进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 之后进行胶回收, 回收后的酶切产物与经相同酶切回收的 pET-30a 载体, 在 16 $^{\circ}$ C 条件下使用 T4 DNA 连接酶连接过夜。连接产物涂布在含有卡那霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 长出的单菌落用接种针挑取至无菌 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜后, 提取重组质粒 pET-30a-*cas1*, 通过电转化的方式将其导入鲍曼不动杆菌 AB26 株和 AB29 株的感受态细胞中。

1.4 抗生素敏感性试验

参照 2016 年临床实验室标准化协会^[24]中“不动杆菌属抑菌圈直径和最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 解释标准”, 以临床常用的 22 种抗生素对鲍曼不动杆菌进行药物敏感性检测。细菌接种于 5 mL MH 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至菌液 OD₆₀₀ 为 0.5。用无菌棉拭子充分浸取菌液, 划线接种于 MH 固体培养基, 旋转培养皿 60 $^{\circ}$ 重复划线共 3 次。药敏纸片贴于培养基表面, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 16 h 后, 测量培养基表面抑菌圈直径, 以判读菌株对抗生素的敏感性, 具体分为敏感 (sensitivity, S)、中介 (intermediate, I) 或耐药 (resistance, R) 3 类。

1.5 生物膜形成实验

制备 1 \times 10⁶ CFU/mL 的鲍曼不动杆菌悬液, 并将其接种于无菌 96 孔聚苯乙烯板中, 每板设置 3 个复孔, 每孔 200 μ L 悬液, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h。吸出上清后每孔加入 200 μ L 1 \times PBS 清洗 2 次, 随后避光染色 (0.5% 结晶紫) 30 min。再次吸出染液后, 每孔继续加入 200 μ L 1 \times PBS 清洗 2 次。之后, 向每孔加入 200 μ L 95% 乙醇, 待结晶紫完全溶解后, 用酶标仪测 OD₅₇₀ 处吸光度 (A), 阴性对照为空白培养基的吸光度 (A_c)。判定标准如下: 弱阳性为 A_c<A \leq 2A_c; 阳性为 2A_c<A \leq 4A_c; 强阳性为 A>4A_c。

1.6 血清抗性试验

参考文献[19], 取 1 \times 10⁴ CFU/mL 鲍曼不动杆菌悬液 10 μ L 与 90 μ L 正常人血清充分混合, 之后在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中孵育。于 0、1、2、3 h 分别取 10 μ L 混合液, 无菌 LB 固体培养基上培养计数。每株菌每次试验 3 个复孔, 进行 3 次试验, 56 $^{\circ}$ C、30 min 热灭活血清组作为对照组。

1.7 小鼠感染

鲍曼不动杆菌菌血症模型造模, 使用雄性 6 周龄 BALB/c 小鼠(约 20 g)用于实验, 每组小鼠数量为 6 只。小鼠腹腔注射 7×10^7 CFU/mL 菌液, 观察并记录小鼠死亡率, 分析菌株与小鼠死亡率之间的关系。

1.8 耐药和毒力基因的差异表达检测

提取细菌总 RNA, 按照 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司)说明书进行操作, 使用核酸蛋白检测仪检测浓度与质量, 并通过凝胶电泳进行复核。利用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 反转录成单链 cDNA, 采用 qPCR 检测各耐药和毒力基因的差异表达。

1.9 数据分析

实验数据均以 SPSS 20 进行分析, 使用 *t* 检验处理分析数据间差异性, 其中 $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 *casI* 基因抑制多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性

从前期实验研究中获得的鲍曼不动杆菌 AB43 菌株, 具有完整的 CRISPR-Cas 系统。从 AB43 菌株中扩增出 *casI* 基因, 并将其与原核表达载体 pET-30a 进行连接, 将构建好的重组载体分别导入多重耐药菌株 AB26 和广泛耐药菌株 AB29 中。PCR 鉴定结果确认了重组菌的成功构建(图 1)。针对 22 种临床常用抗生素的药敏试验结果显示, 与野生株 AB26 相比, AB26::*casI* 重组株对广谱青霉素类抗生素哌拉西林、碳青霉烯类抗生素亚胺培南和美罗培南、青霉素/ β -内酰胺酶抑制剂复合物类抗生素哌拉西林/他唑巴坦、替卡西林/棒酸, 以及头孢菌素类抗生素头孢吡肟 6 种抗生素的耐药性发生了显著变化,

由耐药转为敏感。相比之下, 其余 16 种抗生素对 AB26::*casI* 重组株的耐药性保持不变。另一方面, AB29::*casI* 重组株对这 22 种抗生素的耐药性并未发生改变。值得注意的是, 四环素类抗生素米诺环素对 AB26::*casI* 和 AB29::*casI* 重组株的抑菌圈相较于其对应的野生株均有所增大, 这表明 *casI* 的过表达可能增强了细菌对米诺环素的敏感性。此外, 头孢吡肟对 AB29::*casI* 重组株的抑菌圈从 0 mm 增大到 10 mm, 抑菌圈直径的增大虽然未达到对头孢吡肟敏感的范围, 但在较大程度上降低了广泛耐药菌株 AB29 对头孢吡肟的耐受水平(图 2, 表 1)。

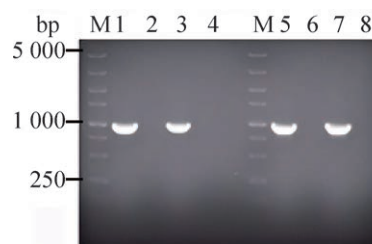


图1 鲍曼不动杆菌*casI*基因过表达株构建的PCR鉴定

Figure 1 Identification of the *casI* over-expression strain of *Acinetobacter baumannii* by PCR. Lane M: DL5000 DNA Marker; Lane 1, 5: AB26, AB29::*casI*; Lane 2, 6: AB26, AB29; Lane 3, 7: pET-30a-*casI*; Lane 4, 8: H₂O.

2.2 Cas1 降低了鲍曼不动杆菌多重耐药株的生物膜形成水平

生物膜的形成与细菌的耐药性之间存在着紧密的联系。为了探究 *casI* 过表达菌株耐药性下降是否与其生物膜形成能力的改变有关, 采用了结晶紫染色法检测 AB26 和 AB29 野生株及其 *casI* 重组株的生物膜形成能力。相较于野生株 AB26, 重组株 AB26::*casI* 的生物膜形成能力显著降低(图 3)。

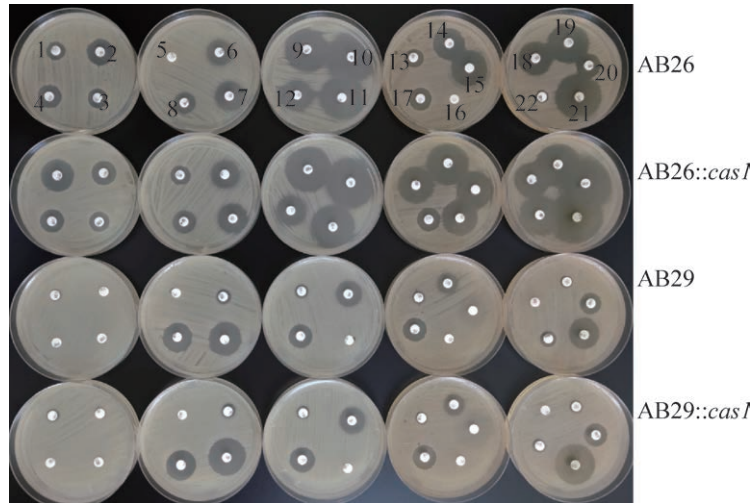


图2 *casI*基因过表达后AB26、AB29株药物敏感性变化的纸片扩散法检测。1: 头孢吡肟; 2: 头孢噻肟; 3: 头孢曲松; 4: 头孢他啶; 5: 哌拉西林; 6: 庆大霉素; 7: 妥布霉素; 8: 阿米卡星; 9: 环丙沙星; 10: 加替沙星; 11: 左氧氟沙星; 12: 奈替米星; 13: 哌拉西林/他唑巴坦; 14: 氨苄西林/舒巴坦; 15: 磺胺异恶唑; 16: 替卡西林/棒酸; 17: 多黏菌素B; 18: 四环素; 19: 多西环素; 20: 亚胺培南; 21: 米诺环素; 22: 美罗培南。

Figure 2 Drug susceptibility variations of *casI* overexpressed AB26/29 strains detected by paper disk-agar diffusion assay. 1: Cefepime; 2: Cefotaxime; 3: Ceftriaxone; 4: Ceftazidime; 5: Piperacillin; 6: Gentamicin; 7: Tobramycin; 8: Amikacin; 9: Ciprofloxacin; 10: Gatifloxacin; 11: Levofloxacin; 12: Nertilmicin; 13: Piperacillin/Tazobactam; 14: Ampicillin/Sulbactam; 15: Sulfamethoxazole; 16: Ticarcillin/Baric acid; 17: Polymyxin B; 18: Tetracycline; 19: Doxycycline; 20: Imipenem; 21: Minocycline; 22: Meropenem.

2.3 重组株血清抗性无变化

血清中含有补系统等具有杀菌作用的物质，而细菌的抗血清杀伤能力是其毒力因子之一。为了研究 *casI* 过表达菌株的血清抗性变化，将细菌与血清以 1:9 (体积比) 充分混合后，在 37 °C 条件下进行孵育，并在 0、1、2、3 h 时分别计算正常血清(N)组与热灭活血清(H-N)组中细菌的存活量。在 0 h 时，野生株 AB26 和 AB29 与其重组株在 N 组与 H-N 组中初始菌量一致，原始菌液细菌含量相同。1、2 和 3 h 孵育后，野生株与重组株，在 N 组与 H-N 组中的细菌数量无显著差异(图 4)。*casI* 基因的过表达并未能抑制鲍曼不动杆菌的血清抗性。

2.4 AB26::*casI* 株小鼠致死率下降

与野生株相比，AB29::*casI* 并未表现出明

显变化，但重组株 AB26::*casI* 却展现出了对多种抗生素耐药性减低和生物膜形成能力下降。鉴于生物膜形成能力与细菌的体内侵袭力之间存在紧密的联系，进一步利用重组株 AB26::*casI* 进行了小鼠感染实验。结果显示，在野生株 AB26 感染组中，小鼠在第 12、14、16 h 分别有 1 只死亡，到了第 18 h 则有 2 只死亡；然而，在重组株 AB26::*casI* 感染组中，小鼠并未出现死亡情况(图 5)。这表明重组株 AB26::*casI* 在小鼠体内的致病性减弱。

2.5 AB26::*casI* 株耐药/毒力基因转录 mRNA 的变化

为了进一步研究重组株耐药性减低以及毒力减弱可能的分子机制，进行了 qRT-PCR 检测，分别以 AB26 和 AB26::*casI* 菌株的 cDNA 为模

表1 鲍曼不动杆菌*casI*基因过表达株耐药性变化Table 1 Variations in drug resistances of *Acinetobacter baumannii* mediated by *casI* gene over expression

抗生素 Antibiotic	抑菌圈 Inhibition zone (mm)				耐药性折点 Antibiotic resistance	药物敏感性 Drug susceptibility			
	AB26	AB26:: <i>casI</i>	AB29	AB29:: <i>casI</i>		AB26	AB26:: <i>casI</i>	AB29	AB29:: <i>casI</i>
广谱青霉素 Broad-spectrum penicillin									
哌拉西林 Piperacillin	0	18	0	0	≤17	R	S	R	R
磺胺类 Sulphonamide antibiotics									
磺胺异恶唑 Sulfamethoxazole	27	25	0	0	≤12	S	S	R	R
多黏菌素类 Polymyxin antibiotics									
多黏菌素 B Polymyxin B	18	17	17	18	≤14	S	S	S	S
碳青霉烯类 Carbapenem antibiotics									
亚胺培南 Imipenem	18	38	17	18	≤18	R	S	R	R
美罗培南 Meropenem	11	29	12	11	≤14	R	S	R	R
四环素类 Tetracycline antibiotics									
四环素 Tetracycline	26	26	0	0	≤11	S	S	R	R
多西环素 Doxycycline	31	33	10	10	≤12	S	S	R	R
米诺环素 Minocycline	34	38	23	29	≤12	S	S	S	S
氟喹诺酮 Fluoroquinolone antibiotics									
环丙沙星 Ciprofloxacin	34	32	0	0	≤15	S	S	R	R
左氧氟沙星 Levofloxacin	32	34	11	11	≤13	S	S	R	R
加替沙星 Gatifloxacin	38	38	20	20	≤14	S	S	S	S
青霉素/β-内酰胺酶抑制剂复合物 Penicillin/β-lactamase inhibitor complexes									
哌拉西林/他唑巴坦 Piperacillin/Tazobactam	15	26	11	8	≤17	R	S	R	R
氨苄西林/舒巴坦 Ampicillin/Sulbactam	25	29	17	18	≤11	S	S	S	S
替卡西林/棒酸 Ticarcillin/Clavulanic acid	0	26	0	0	≤14	R	S	R	R
氨基糖苷类 Aminoglycoside antibiotics									
阿米卡星 Amikacin	17	18	22	23	≤14	S	S	S	S
奈替米星 Netilmicin	25	23	18	19	≤12	S	S	S	S
庆大霉素 Gentamicin	21	20	11	12	≤12	S	S	R	R
妥布霉素 Tobramycin	23	23	25	28	≤12	S	S	S	S
头孢菌素类 Cephalosporin antibiotics									
头孢吡肟 Cefepime	14	24	0	10	≤14	R	S	R	R
头孢噻肟 Cefotaxime	21	18	0	0	≤14	S	S	R	R
头孢曲松 Ceftriaxone	16	16	0	0	≤13	S	S	R	R
头孢他啶 Ceftazidime	18	17	0	0	≤14	S	S	R	R

S: 敏感; R: 耐药。

S: Susceptible, R: Resistant.

板进行实验。结果显示, 与 AB26 株相比, AB26::*casI* 株中大部分耐药/毒力基因的表达水

平均有所下降(图 6)。表达差异较大的基因有 *soxR*、*adeB*、*adeC*、*adeG*、*adeF*、*basH*、

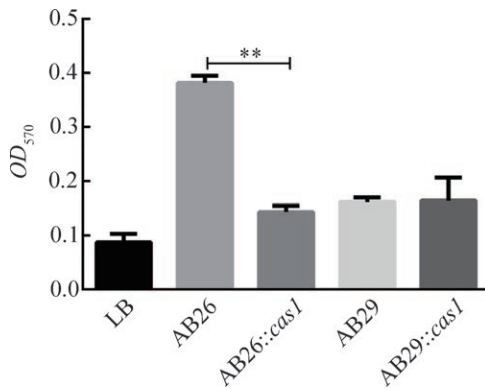


图3 *cas1*基因过表达菌株生物膜形成能力

Figure 3 Biofilm formation ability variations of the recombinant strains. **: $P < 0.01$.

bauA、*abaI*。相较于 *cas1* 基因过表达菌株表达差异较大的基因，野生株基因表达量是 *cas1* 基因过表达菌株基因表达量的 11.72、8.55、11.24、10.66、11.48、8.39、13.41、8.94 倍。

3 讨论

CRISPR-Cas 系统对耐药性和毒力的调控展现出多样性和复杂性,不同种类的细菌,CRISPR-Cas 系统对耐药性和毒力的影响存在差异。Shabbir 等^[25]发现空肠弯曲菌的 CRISPR-Cas9 系统被发现能够调节多个基因的表达,从而增强细菌的耐药性。相比之下,弗朗西斯菌的 CRISPR-Cas9 复合物则通过抑制细菌膜脂蛋白抗原的表达,来逃避宿主的免疫应答,进而加重感染症状并提升细菌的耐药性^[26-27]。无乳链球菌的 CRISPR-Cas 系统则具有促进透明质酸酶过表达的能力,这使得细菌能够突破血脑屏障,引发脑膜炎^[28]。变异链球菌 *cas3* 对 *vicR*、*gtfC*、*smu0630*、*comDE* 等毒力基因的表达非常重要^[29]。脑膜炎奈瑟菌、嗜肺军团菌的 Cas 蛋

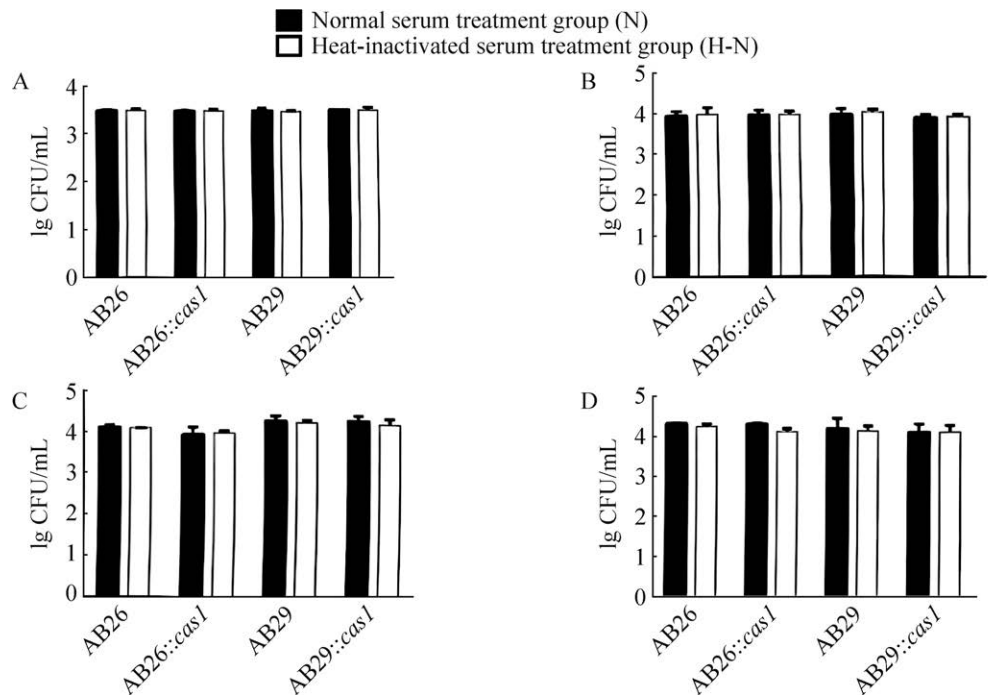


图4 野生株和重组株的血清抗性。A: 各菌株0 h菌液细菌含量; B: 各菌株1 h菌液细菌含量; C: 各菌株2 h菌液细菌含量; D: 各菌株3 h菌液细菌含量。

Figure 4 Serum resistance of the recombinant strains and wild strains. A: The bacterial content of each strain 0 h; B: The bacterial content of each strain 1 h; C: The bacterial content of each strain 2 h; D: The bacterial content of each strain 3 h.

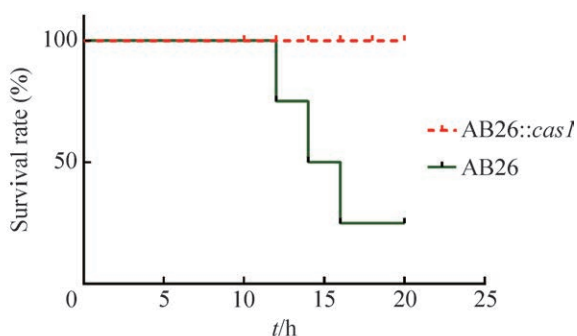


图5 野生株和重组株感染小鼠的生存率

Figure 5 Survival rate in mice of the recombinant strain and wild strains.

白增强了细菌对宿主细胞的黏附感染^[30-31]。然而,铜绿假单胞菌 I-F 型 CRISPR-Cas 系统则抑制了细菌对小鼠的感染和体内播散水平^[19],这与我们在鲍曼不动杆菌中的研究发现具有相似性。

为了深入探究 *cas1* 基因在鲍曼不动杆菌耐药株防控中的潜在价值,我们成功地将 *cas1* 基因在多重耐药株 AB26 和广泛耐药株 AB29 中进行了过表达,并对比了重组株与野生株在药物敏感性、生物膜形成能力、血清抗性以及小鼠感染后生存率等方面的差异。研究结果显示,重组株 AB26::*cas1* 对多种抗生素的敏感性显著提升,生物膜形成能力明显减弱,且在小鼠感染模型中,其致病性也显著降低。这些变化可能与 *cas1* 基因过表达后,抑制了多种耐药/毒力基因的表达有关。我们未对 *cas1* 基因的过表达程度进行定量研究,本研究中表达 *cas1* 基因的质粒是常规原核表达载体 pET-30a,这个载体是多拷贝质粒,对目的基因的表达量相对稳定和丰富。在未来研究中开展目的基因过表达水平与作用效果相关性的考察,可能会为细菌耐药性防治研究提供更完整的实验数据。细菌对碳青霉烯类、 β 内酰胺类、青霉素类、头孢类抗生素的耐药机制主要包括产生各种水解酶[碳青霉

烯酶、AmpC 酶、超广谱 β 内酰胺酶(extended-spectrum- β -lactamases, ESBL)]; 改变青霉素结合蛋白(penicillin binding proteins, PBPs); 细胞膜渗透性发生变化; 通过外排泵将药物泵出胞外; 外膜孔蛋白(outer membrane pore protein, Omp)缺失; 产生氨基糖苷类钝化酶以及靶位点的改变等^[32-33]。研究发现,铜绿假单胞菌中 CRISPR-Cas 系统能够获取耐药基因且辅助重塑基因组分布^[34]。然而,CRISPR-Cas 在农业粪肠球菌中则可有效防止含耐药基因质粒的转移^[35]。进一步的研究还揭示,细菌的 CRISPR-Cas 系统不仅可能具有阻碍抗生素耐药基因转移的能力,还可能影响细菌质粒的接合转移过程^[36]。因此,CRISPR-Cas 系统有望成为抑制细菌耐药性和质粒传播的新型工具^[37]。

本研究中发现,重组株的生物膜形成能力显著降低,提示可能是其耐药性变弱的原因,也可能是重组株细菌体内致病性减弱的机制。因此,希望通过小鼠菌血症模型进行体内的验证,比较重组株 AB26::*cas1* 与野生株 AB26 的毒力差异。研究结果表明,野生株 AB26 较重组株 AB26::*cas1* 感染小鼠的死亡率高、毒力强,与体外生物膜形成的结果相呼应。同时,使用荧光定量 PCR 对基因表达量进行检测,发现野生株中大部分基因(如 *adeA*、*adeB*)的 mRNA 表达量较重组株 AB26::*cas1* 呈现倍数降低,提示 *cas1* 基因过表达可抑制多种耐药/毒力基因的表达,进而抑制细菌的耐药性和毒力。

综上所述,本研究不仅揭示了 *cas1* 基因在鲍曼不动杆菌多重耐药株中的潜在应用价值,还为细菌耐药性防治提供了新的研究思路和方向。CRISPR-Cas 基因组件在多重耐药鲍曼不动杆菌防治中具有较强的潜在应用价值^[6-9,38],然

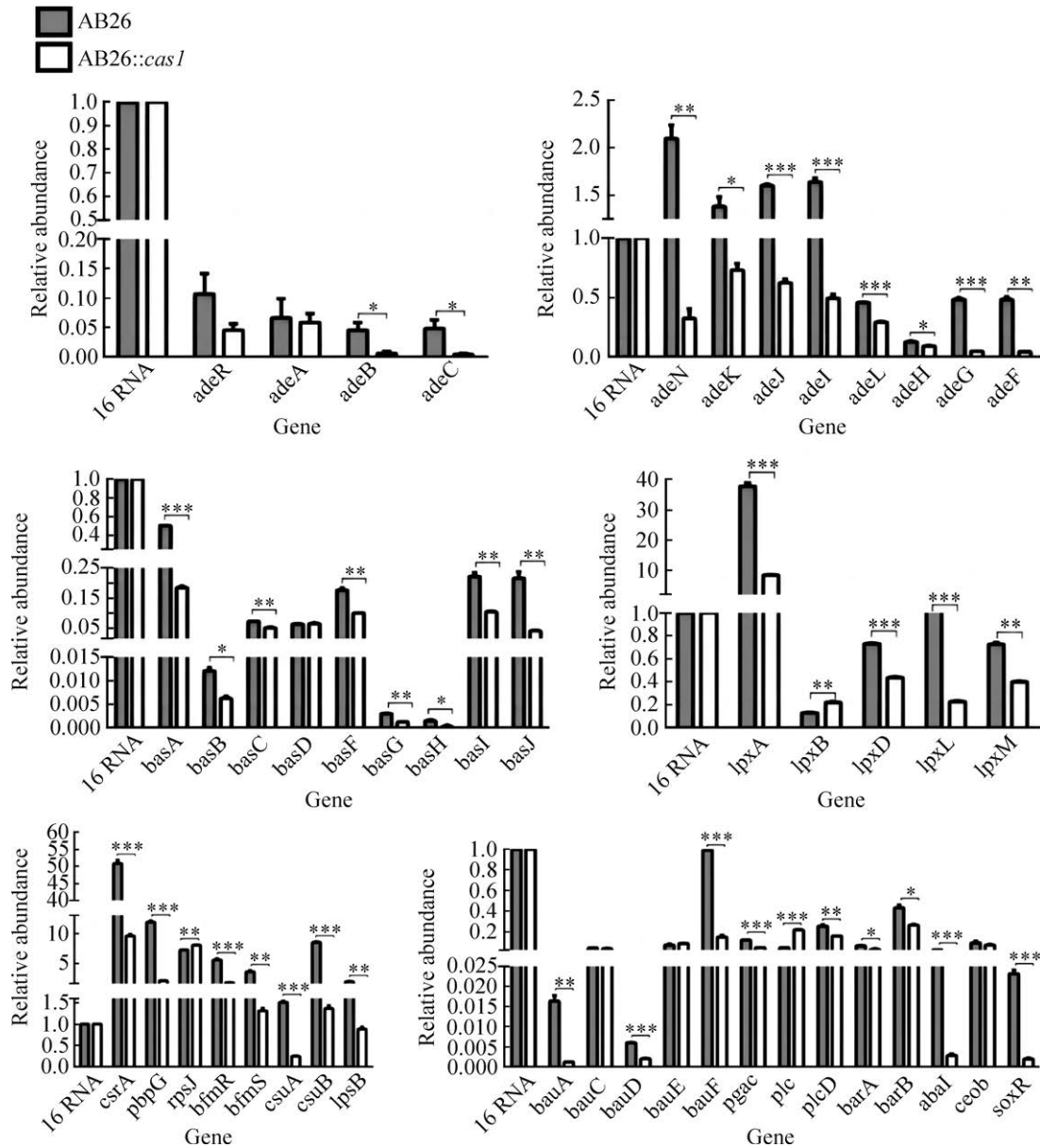


图6 实时荧光定量PCR检测耐药/毒力基因的相对表达量

Figure 6 qRT-PCR detection of resistance and virulence genes expressions. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

而，对于广泛耐药菌株的防治，我们仍需继续探索更为有效的策略。未来的研究可以进一步深入探讨 *casI* 基因过表达水平与作用效果之间的相关性，以及 CRISPR-Cas 系统在其他细菌种类中对耐药性和毒力的调控机制，从而为细菌耐药性防治提供更加全面和深入的实验数据和

理论基础。

4 结论

本研究中使用本团队前期收集分离到的含有完整 CRISPR-Cas 系统的鲍曼不动杆菌 AB43 菌株，扩增并重组质粒后成功构建多重耐药菌

株 AB26 及广泛耐药菌株 AB29 *cas1* 基因过表达菌株。

cas1 基因多重耐药菌株过表达株对 6 类抗生素由耐药变为敏感, 分别为广谱青霉素类、碳青霉烯类、头孢菌素类、青霉素/β-内酰胺酶抑制剂复合物类, 以及生物膜形成能力减低, *cas1* 基因对多重耐药菌株多种抗生素耐药性以及生物膜形成能力具有抑制作用。

cas1 基因多重耐药菌株过表达株小鼠感染模型致死率下降, 多种耐药/毒力基因的表达水平降低, *cas1* 基因对多重耐药菌株通过抑制多种耐药/毒力基因的表达, 从而抑制多重耐药鲍曼不动杆菌的耐药性和毒力。

作者贡献声明

张鹏宇: 结果分析及论文撰写投稿; 李金月: 实验实施; 郭亭亭: 研究设计; 包广宇: 菌株收集; 胡健: 参与论文讨论; 李国才: 研究构思和设计。

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] HUANG L, TANG JY, TIAN G, TAO HL, LI Z. Risk factors, outcomes, and predictions of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections in patients with nervous system diseases[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2023, 16: 7327-7337.
- [2] CHOUDHARY M, SHRIVASTAVA R, VASHIST J. *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: association with antimicrobial resistance and prolonged survival under desiccation[J]. *Current Microbiology*, 2022, 79(12): 361.
- [3] 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.
- [4] 李云云, 刘厚昌, 王海平, 杜廷义, 蒋立. 住院患儿耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的耐药及生物膜特征分析[J]. *中国当代儿科杂志*, 2024, 26(4): 358-364.
- [5] LI YY, LIU HC, WANG HP, DU TY, JIANG L. Characteristics of drug resistance and biofilm formation in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in hospitalized children[J]. *Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 2024, 26(4): 358-364 (in Chinese).
- [6] GUO TT, SHAN CL, LI JY, FENG H, LI MY, ZHENG WH, JIANG QQ, CHEN JH, JIAO HM, LI GC, LIU WJ, BAO G. Correlation between antibiotic resistance and serum resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2019, 12(8): 9804-9814.
- [7] GUO TT, YANG J, SUN XL, WANG YH, YANG LY, KONG GM, JIAO HM, BAO GY, LI GC. Whole-genome analysis of *Acinetobacter baumannii* strain AB43 containing a type I-fb CRISPR/Cas system: insights into the relationship with drug resistance[J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5665.
- [8] 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.
- [9] 李金月. 鲍曼不动杆菌 CRISPR-Cas 系统对耐药性和毒力的抑制作用研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2020. LI JY. Inhibitory effect of CRISPR-Cas system of *Acinetobacter baumannii* on drug resistance and virulence[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2020 (in Chinese).
- [10] 杨洁. I-Fa 和 I-Fb 型 CRISPR-Cas 系统对鲍曼不动杆菌毒力的调控差异及毒力抑制剂的筛选[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2023. YANG J. Differences in virulence control of *Acinetobacter baumannii* by I-Fa and I-Fb CRISPR-Cas systems and screening of virulence inhibitors[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2023 (in Chinese).
- [11] 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): wræ108.
- [12] MARRAFFINI LA. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes[J]. *Nature*, 2015, 526(7571): 55-61.
- [13] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.
- [14] 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[J]. *Nature*, 2010, 468(7320): 67-71.
- [15] BARRANGOU R, HORVATH P. A decade of discovery: CRISPR functions and applications[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17092.
- [16] BARRANGOU R. The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2015, 32: 36-41.
- [17] FAURE G, MAKAROVA KS, KOONIN EV. CRISPR-cas: complex functional networks and multiple roles beyond adaptive immunity[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2019, 431(1): 3-20.
- [18] HILLE F, RICHTER H, WONG SP, BRATOVIČ M,

- RESSEL S, CHARPENTIER E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward[J]. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259.
- [18] GHOLIZADEH P, AGHAZADEH M, ASGHARZADEH M, KAFIL HS. Suppressing the CRISPR/Cas adaptive immune system in bacterial infections[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2017, 36(11): 2043-2051.
- [19] WU Q, WANG B, ZHOU CM, LIN P, QIN SG, GAO P, WANG ZH, XIA ZW, WU M. Bacterial Type I CRISPR/Cas systems influence inflammasome activation in mammalian host by promoting autophagy[J]. *Immunology*, 2019, 158(3): 240-251.
- [20] YOGANAND KN, MURALIDHARAN M, NIMKAR S, ANAND B. Fidelity of prespacer capture and processing is governed by the PAM-mediated interactions of Cas1-2 adaptation complex in CRISPR-Cas type I-E system[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(52): 20039-20053.
- [21] TORO N, MESTRE MR, MARTÍNEZ-ABARCA F, GONZÁLEZ-DELGADO A. Recruitment of reverse transcriptase-Cas1 fusion proteins by type VI-a CRISPR/Cas systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2160.
- [22] GOMAA AA, KLUMPE HE, LUO ML, SELLE K, BARRANGOU R, BEISEL CL. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR/Cas systems[J]. *mBio*, 2014, 5(1): e00928-13.
- [23] LI RP, FANG LZ, TAN SR, YU M, LI XF, HE SS, WEI YQ, LI GP, JIANG JX, WU M. Type I CRISPR-Cas targets endogenous genes and regulates virulence to evade mammalian host immunity[J]. *Cell Research*, 2016, 26(12): 1273-1287.
- [24] KARAKONSTANTIS S, ROUSAKI M, VASSILOPOULOU L, KRITSOTAKIS EI. Global prevalence of cefiderocol non-susceptibility in *Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2024, 30(2): 178-188.
- [25] 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*[J]. *Future Microbiology*, 2018, 13: 1757-1774.
- [26] SAMPSON TR, SAROJ SD, LLEWELLYN AC, TZENG YL, WEISS DS. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence[J]. *Nature*, 2013, 497(7448): 254-257.
- [27] 王海蓉, 宁年智, 王慧. 鲍曼不动杆菌VI型分泌系统功能蛋白的研究及应用新进展[J]. *微生物学报*, 2024, 64(2): 391-407.
WANG HR, NING NZ, WANG H. Advances in functional proteins of type VI secretion system of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(2): 391-407 (in Chinese).
- [28] MA K, CAO Q, LUO S, WANG ZF, LIU GJ, LU CP, LIU YJ. *cas9* enhances bacterial virulence by repressing the *regR* transcriptional regulator in *Streptococcus agalactiae*[J]. *Infection and Immunity*, 2018, 86(3): e00552-17.
- [29] TANG BY, GONG T, ZHOU XD, LU M, ZENG JM, PENG X, WANG SD, LI YQ. Deletion of *cas3* gene in *Streptococcus mutans* affects biofilm formation and increases fluoride sensitivity[J]. *Archives of Oral Biology*, 2019, 99: 190-197.
- [30] HEIDRICH N, HAGMANN A, BAURIEDL S, VOGEL J, SCHOEN C. The CRISPR/Cas system in *Neisseria meningitidis* affects bacterial adhesion to human nasopharyngeal epithelial cells[J]. *RNA Biology*, 2019, 16(4): 390-396.
- [31] ZHENG CB, LIANG HQ, DAI LQ, YU J, LONG CH. Dissecting the CRISPR Cas1-Cas2 protospacer binding and selection mechanism by using molecular dynamics simulations[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2024, 128(15): 3563-3574.
- [32] AL HASSINAH S, ALZAYER M, OKDAH L, DOUMITH M, AL JOHANI S, ALARFAJ R, ALRASHIDI E, ALHUSEINAN N, AL ALWAN B, BAKHASHWEEN B, KAAKI M, DOUD M, AL SADAH H, FALNASHMY, BALKHY H, ALGHORIBI M. Prevalence of molecular mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Saudi Arabia[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2020, 13(2): 329.
- [33] McDOUGALL S, CLAUSEN L, HA HJ, GIBSON I, BRYAN M, HADJIRIN N, LAY E, RAISEN C, BA XL, RESTIF O, PARKHILL J, HOLMES MA. Mechanisms of β -lactam resistance of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis cases[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 242: 108592.
- [34] van BELKUM A, SORIAGA LB, LaFAVE MC, AKELLA S, VEYRIERAS JB, BARBU EM, SHORTRIDGE D, BLANC B, HANNUM G, ZAMBARDI G, MILLER K, ENRIGHT MC, MUGNIER N, BRAMI D, SCHICKLIN S, FELDERMAN M, SCHWARTZ AS, RICHARDSON TH, PETERSON TC, Hubby B, Cady KC. Phylogenetic distribution of CRISPR/Cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *mBio*, 2015, 6(6): e01796-15.
- [35] 彭文仪, 吴芷莹, 罗晓萱, 陈思杰, 周诗妍, 邓素萍, 罗湘, 封少龙, 柏琴琴. 鲍曼不动杆菌携带前噬菌体的生物信息学分析[J]. *微生物学报*, 2021, 61(12): 3952-3964.
PENG WY, WU ZY, LUO XX, CHEN SJ, ZHOU SY, DENG SP, LUO X, FENG SL, BAI QQ. Bioinformatic analysis of prophages carried by *Acinetobacter baumannii*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 3952-3964 (in Chinese).
- [36] LI HY, KAO CY, LIN WH, ZHENG PX, YAN JJ, WANG MC, TENG CH, TSENG CC, WU JJ. Characterization of CRISPR/Cas systems in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates uncovers its potential association with antibiotic susceptibility[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1595.
- [37] XIAO YW, ZHANG Y, XIE FJ, OLSEN RH, SHI L, LI LL. Inhibition of plasmid conjugation in *Escherichia coli* by targeting *rbsB* gene using CRISPRi system[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13): 10585.
- [38] 李倩茹, 何涛, 吉星, 魏瑞成, 王冉, 于美玲, 李俊. 抗菌药对鲍曼不动杆菌外膜囊泡产量及主要生物学特性的影响[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(1): 295-305.
LI QR, HE T, JI X, WEI RC, WANG R, YU ML, LI J. Antimicrobials affect the production and characteristics of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(1): 295-305 (in Chinese).