

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (4) :476 - 483; 4 April 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140322

志贺菌 CRISPR 的检测及其与耐药的关系

王琳琳¹, 王颖芳², 段广才^{1,3*}, 薛泽润¹, 郭向娇¹, 王鹏飞¹, 郝园林¹, 杨海燕¹

¹ 郑州大学公共卫生学院流行病教研室, 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】检测志贺菌成簇规律间隔的短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR), 并分析其与志贺菌耐药的关系。【方法】根据 CRISPR DB 数据库公布的志贺菌确定的 CRISPR 结构序列 CRISPR-S2、CRISPR-S4 和可能的 CRISPR 结构序列 CRISPR-S1、CRISPR-S3 设计四对引物, 对 60 株志贺菌进行 PCR 扩增。采用 CRISPR Finder 分析 CRISPR, 采用改良 K-B 药敏纸片法检测志贺菌耐药情况, 并分析 CRISPR-S4 与耐药的关系。【结果】确定的 CRISPR 结构的总阳性率为 95%, 四个 CRISPR 位点组成 12 种 CRISPR 谱型 (A-L), 除 K 型外均含确定的 CRISPR 结构, 新发现 1 种重复序列和 12 种间隔序列。60 株志贺菌的多重耐药率为 53.33%。CRISPR-S4 阳性菌株与阴性菌株之间, 耐药的分布差异无统计学意义, 但多重耐药菌株和耐 TE 菌株 CRISPR-S4 的重复序列多为 R4.1, 其 3' 末端缺失碱基 AC; 多重耐药菌株 CRISPR-S4 的间隔序列多为 Sp5.1、Sp6.1 和 Sp7。【结论】CRISPR 在志贺菌中广泛分布。CRISPR 重复序列的变异和间隔序列的多样性可能与志贺菌耐药有关。

关键词: 志贺菌, 多重耐药, CRISPR

中图分类号: R37 **文章编号:** 0001-6209(2015)04-0476-08

志贺菌属是细菌性痢疾 (简称菌痢) 的病原体, 菌痢是全球流行的传染病, 至今仍是影响人类健康的主要肠道传染病之一, 是全球所面临的重要公共卫生问题^[1]。随着抗生素的广泛使用甚至滥用, 志贺菌频繁变异产生耐药株, 多重耐药志贺菌株不断出现, 给细菌性痢疾的防治带来新的挑战^[2]。

近来研究发现成簇规律间隔的短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 广泛分布于细菌和古细菌中,

CRISPR 主要由重复序列 (repeat) 和间隔序列 (spacer) 间隔排列构成的 R-S 结构组成, 其与 CRISPR 相关蛋白基因 (CRISPR associated, cas) 组成 CRISPR/cas 系统, 为原核生物提供对噬菌体、质粒等外源基因的获得性免疫能力, 从而抵抗噬菌体感染, 限制基因的水平转移 (HGT)^[3-4]。耐药基因的水平转移是细菌耐药性产生的主要原因^[5], 目前有关 CRISPR 在原核生物中的功能及应用受到广泛关注, 如细菌分型^[6]、细菌进化分析^[7]、抵御噬菌

基金项目: 国家科技重大专项 (2013ZX10004607)

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

作者简介: 王琳琳 (1990 -), 女, 河南省开封人, 硕士研究生, 研究方向为分子流行病学。

收稿日期: 2014-06-22; 修回日期: 2014-10-13

体^[8]及 Cas9 介导的基因定点编辑技术^[9]等,但其与细菌耐药关系的研究较少,且不同细菌中 CRISPR 与耐药的关系不一致,研究表明 CRISPR/cas 系统与肠球菌获得性耐药关系相反^[10-11],即使 CRISPR 存在,耐药质粒仍可在大肠杆菌间传播^[12]。本研究通过检测志贺菌中的 CRISPR 及各菌株的耐药情况,探讨志贺菌 CRISPR 的结构及分布与耐药的关系,为进一步阐明 CRISPR 的功能以及其对细菌耐药的影响提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

临床分离的志贺菌 60 株,1996 年分离自江西 6 株,1999 - 2001、2003 - 2013 年分离自河南 48 株,2013 年分离自北京市 5 株,2004 年购于中国药检所 1 株,其中,45 株为福氏志贺菌,13 株为宋内志贺菌,2 株为痢疾志贺菌;药敏试验标准控制菌:大肠埃希菌 ATCC 25922,购自中国普通微生物菌种管理保藏中心。

1.2 药品和试剂

药敏纸片氨苄西林 (Ampicillin, AM)、头孢噻吩 (Cephalothin, CF)、四环素 (Tetracycline, TE)、复方新诺明 (Trimethoprim/sulfamethoxazole, SXT)、氯霉素 (Chloramphenicol, Cl) 及诺氟沙星 (Norfloxacin, NOR) 购自杭州天和微生物试剂有限公司,聚合酶链反应 (PCR) 相关试剂、100 bp DNA

Ladder 购自上海生工生物工程股份有限公司,细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于上海莱枫生物科技有限公司, MH (A) 培养基购于北京奥博星生物技术有限责任公司,酵母浸粉、胰蛋白胨购自英国 Oxoid 公司,琼脂粉购自 Sigma 公司。其余常规试剂均为国产分析纯级。

1.3 CRISPR 检测

根据 CRISPR DB 数据库公布的志贺菌确定的 CRISPR 结构序列 CRISPR-S2、CRISPR-S4 和可能的 CRISPR 结构序列 CRISPR-S1、CRISPR-S3 设计引物 (引物序列见表 1),其中,CRISPR-S4 与 cas 基因组成 CRISPR/cas 系统,CRISPR-S1、CRISPR-S2 和 CRISPR-S3 均为孤立位点。

以试剂盒提取的志贺菌基因组 DNA 为模板,对志贺菌的 CRISPR 进行扩增和序列测定。扩增体系为 50 μ L,其中 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 19 μ L, 5 pmol/ μ L 正、反向引物各 1 μ L, 200 - 300 μ g/mL 模板 DNA 4 μ L。CRISPR 反应条件均为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 60 s,51 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像仪观察并记录结果。CRISPR 的扩增产物送上海生物工程股份有限公司测序,利用 CRISPR Finder,分析 CRISPR 的重复和间隔序列,确认 CRISPR 的存在和结构,并利用序列比对软件 ClustalX 2.1 比较各 CRISPR 位点的重复序列和间隔序列。

表 1. CRISPR 的引物序列

Table 1. Primers of CRISPR for PCR Amplification

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	PCR products /bp	Annealing temperature / $^{\circ}$ C
CRISPR-S1	S1F	ATTAGTCGGCGTAAGAAAGA	609	56
	S1R	GAACAGCGTGATTATGGATGC		
CRISPR-S2	S2F	TTGTYAGGTAGGTTGGTGAAG	715	56
	S2R	GCGAAGAGAAAGAACGAGTA		
CRISPR-S3	S3F	ATCTCTGCTAACACCAACTAC	711	56
	S3R	CTACGACCTGAATGGAATC		
CRISPR-S4	S4F	AGCGACTAACTGGAAT CTTG	651	56
	S4R	CAATCTG GCTACTGGAAGTG		

1.4 药敏试验

采用改良 Kirby-Bauer (K-B) 法进行药敏试验,参照临床和实验室标准化研究所 (CLSI) 指南进行^[13],质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922。分析

志贺菌对不同药物的耐药分布情况,对 3 种及以上不同种类抗生素耐药的细菌为多重耐药菌。

1.5 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件处理数据,CRISPR 与

耐药的分布采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 60 株志贺菌 CRISPR 的分布和结构

2.1.1 CRISPR 的检测结果: 以 60 株志贺菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 CRISPR-S1、CRISPR-S2、CRISPR-S3 和 CRISPR-S4, 采用 CRISPR Finder 查找分析 CRISPR, 结果见表 2, 含 3 个及以上 spacer 的 CRISPR 位点检出率为 31.67%。

2.1.2 60 株志贺菌 CRISPR 的分布: 60 株志贺菌中, 每株至少含有 1 个 CRISPR 位点, 组成了 12 种 CRISPR 谱型 (A-L, 表 3), 最常见的是 B 型, 其次为 F 型。3 株志贺菌的 CRISPR 谱型为 K 型, 只含一个

可能的 CRISPR 结构 CRISPR-S3, 其余 57 株志贺菌的 CRISPR 谱型均含确定的 CRISPR 结构 CRISPR-S2 或 CRISPR-S4, 确定的 CRISPR 结构的总阳性率为 95%。

表 2.60 株志贺菌 CRISPR 的检出率和间隔序列数目

Table 2. The positive rate and spacer number of CRISPR in 60 *Shigella* strains

Gene	Spacer number	Strain number	Percentage /%
CRISPR-S1	1	20	33.33
CRISPR-S2	1	1	51.67
	2	30	
CRISPR-S3	1	48	80
CRISPR-S4	2	25	73.33
	3	18	
	9	1	

表 3.60 株志贺菌 CRISPR 的分布

Table 3. Distribution of CRISPR in 60 *Shigella* strains

Type	CRISPR spectral pattern	Strain number	Percentage /%
A	CRISPR-S1 + CRISPR-S2 + CRISPR-S3 + CRISPR-S4	4	6.67
B	CRISPR-S2 + CRISPR-S3 + CRISPR-S4	12	20
C	CRISPR-S1 + CRISPR-S3 + CRISPR-S4	9	15
D	CRISPR-S1 + CRISPR-S2 + CRISPR-S3	1	1.67
E	CRISPR-S1 + CRISPR-S2 + CRISPR-S4	1	1.67
F	CRISPR-S2 + CRISPR-S3	11	18.34
G	CRISPR-S2 + CRISPR-S4	1	1.67
H	CRISPR-S3 + CRISPR-S4	8	13.32
I	CRISPR-S1 + CRISPR-S4	5	8.32
J	CRISPR-S2	1	1.67
K	CRISPR-S3	3	5
L	CRISPR-S4	4	6.67

2.1.3 CRISPR 的重复序列: CRISPR Finder 识别到的重复序列共 9 种, R3.2 为新发现的重复序列, 其他 8 种重复序列与 CRISPR DB 数据库中公布的一致, 部分存在变异 (图 1)。3 株志贺菌 CRISPR-S1 的重复序列为 R1.2, 其 3' 末端缺失碱基 AGC; 1 株志贺菌 CRISPR-S2 的重复序列为 R2.2, 其 5' 末端缺失碱基 GTTCA, 并发生一个 A 到 G 的突变, 1 株志贺菌 CRISPR-S2 的重复序列为 R2.3, 其 3' 末端缺失碱基 TAAAAAT; 2 株志贺菌 CRISPR-S3 的重复序列为 R3.2, 它与 R3.1 的同源性很低; 25 株志贺菌 CRISPR-S4 的重复序列为 R4.1, 其 3' 末端缺失碱基 AC。

2.1.4 CRISPR 的间隔序列: CRISPR Finder 识别到的间隔序列共 242 条, 包括 23 种不同类型的间隔序列, 其中 12 种为新发现的间隔序列, 共 30 条, 11 种为 CRISPR DB 数据库中已公布的, 共 212 条。同

一 CRISPR 位点的间隔序列存在差异 (图 2)。可能的 CRISPR 结构 CRISPR-S1 和 CRISPR-S3 的间隔序列比较单一, 3 株志贺菌 CRISPR-S1 的间隔序列为 Sp1.2, 其 5' 端缺失碱基 GGC, 2 株志贺菌 CRISPR-S3 的间隔序列为 Sp4.2, 其与 Sp4.1 同源性较低, 为新发现的间隔序列; 孤立的 CRISPR 位点 CRISPR-S2 的间隔序列亦比较单一, 1 株志贺菌 CRISPR-S2 的间隔序列为 Sp2.2 和 Sp3.2, 均在 3' 末端缺失碱基 GTTCA, 1 株中发现新的间隔序列 Sp2.3; 与 *cas* 基因连接形成 CRISPR/cas 系统的 CRISPR-S4, 其间隔序列比较丰富, 间隔序列之间的同源性较低, Sp7.1 为新发现的间隔序列, 1 株志贺菌的 CRISPR-S4 含 9 个间隔序列 Sp5.3、Sp6.3、Sp7.2、Sp8、Sp9、Sp10、Sp11、Sp12 和 Sp13, 均为新发现的间隔序列。



图 1. CRISPR 的重复序列比对

Figure 1. Sequence alignment of CRISPR repeats. Figures in bracket represented the number of strains with corresponding repeat. “* ” represented perfect match, “:” represented strong similarity “.” represented weak similarity.



图 2. CRISPR 的间隔序列比对

Figure 2. Sequence alignment of CRISPR spacers. Figures in bracket represented the number of strains with corresponding spacer. “* ” represented perfect match, “:” represented strong similarity “.” represented weak similarity.

2.1.5 CRISPR 的结构: 重复序列的变化引起相邻间隔序列的变化, 9 种重复序列和 23 种间隔序列组成的 CRISPR 及可能的 CRISPR 结构在 60 株志贺菌中的分布见图 3。在 12 种 CRISPR 谱型 A 到 L 中, 由于同一 CRISPR 位点的重复和间隔序列在不同菌株间的差异, A、B、C、H、I 及 L 型又包括不同的亚型。3 株志贺菌的 CRISPR-S1 为 CRISPR-S1.2, 组

成 A-2、C-3 和 I-2 亚型; 1 株志贺菌的 CRISPR-S2 为 CRISPR-S2.2, 组成 B-4 亚型, 另 1 株志贺菌的为 CRISPR-S2.3, 组成 B-3 亚型; 2 株志贺菌的 CRISPR-S3 为 CRISPR-S3.2, 组成 B-4 和 B-5 亚型; 18 株志贺菌的 CRISPR-S4 为 CRISPR-S4.2, 组成 A-2、B-2、B-4、B-5、C-2、C-3、H-2、I-1、I-2 和 L-2 亚型, 1 株志贺菌的为 CRISPR-S4.3, 组成 B-6 亚型。

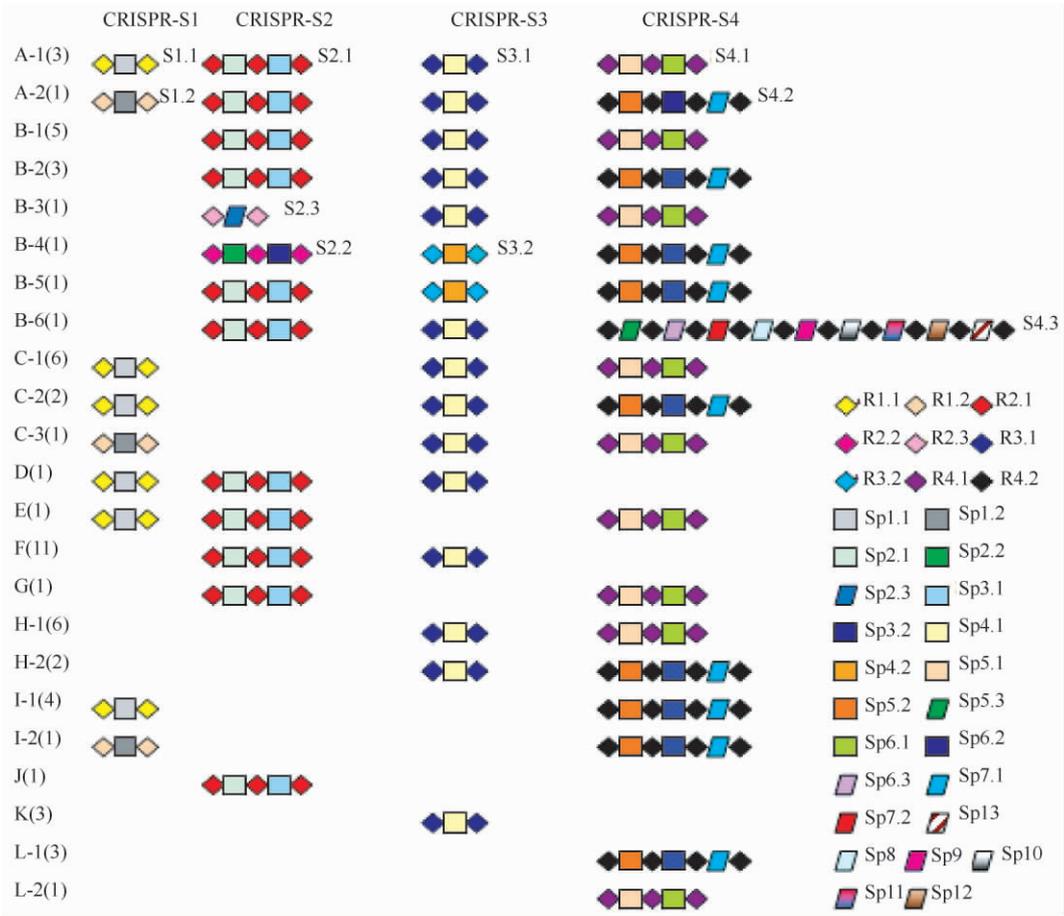


图 3. 60 株志贺菌 CRISPR 的结构

Figure 3. The CRISPR structures in the 60 *Shigella* strains A→L represented the 12 CRISPR spectral patterns. Figures in bracket represented the number of strains with corresponding CRISPR spectral pattern. Rhombus represented new spacers found in this study. Two different layouts of repeat and spacer sequences existed in CRISPR-S1 (S1.1, S1.2) and CRISPR-S3 (S3.1, 3.2) respectively, three different layouts in CRISPR-S2 (S2.1, S2.2, S2.3) and CRISPR-S4 (S4.1, S4.2, S4.3) respectively.

2.2 60 株志贺菌的耐药性

60 株志贺菌对所检测的 6 种抗生素的耐药率如下:AM 为 56.67%,CF 为 26.67%,TE 为 66.67%,SXT 为 65%,C 为 48.33%,NOR 为 16.67%。其中,对 6 种抗生素均不耐药的志贺菌 8 株,仅耐 1 种抗生素的志

贺菌 11 株,耐 2 种抗生素的志贺菌 9 株,3 种及以上耐药的多重耐药菌 32 株,多重耐药率为 53.33%。

对 6 种抗生素均不耐药的志贺菌株的 CRISPR 谱型多为 C 型,多重耐药志贺菌株的 CRISPR 谱型多为 B 型、F 型和 H 型(表 4)。

表 4.60 株志贺菌 CRISPR 及耐药的分布

Table 4. Distribution of CRISPR and drug resistance in 60 *Shigella* strains

Drug resistance	CRISPR spectral pattern												Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
none	0	2	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	8
single	1	2	0	0	0	2	0	2	3	0	1	0	11
two	2	1	2	0	0	0	0	0	2	1	0	1	9
multi	1	7	2	1	1	9	1	6	0	0	1	3	32
total	4	12	9	1	1	11	1	8	5	1	3	4	60

2.3 CRISPR-S4 与耐药的关系

CRISPR-S4 阳性志贺菌株与阴性志贺菌株之

间,多重耐药的分布差异无统计学意义,TE 耐药性的分布差异亦无统计学意义,见表 5。

CRISPR-S4 的重复序列与多重耐药的分布差异有统计学意义,与 TE 耐药性的分布差异亦有统计学意义。多重耐药志贺菌株和耐 TE 志贺菌株 CRISPR-S4 的重复序列多为 R4.1。

CRISPR-S4 的间隔序列 Sp5、Sp6、Sp7 与多重耐药的分布差异有统计学意义,Sp7 与 TE 耐药性的分布差异亦有统计学意义。多重耐药志贺菌株 CRISPR-S4 的间隔序列多为 Sp5.1 和 Sp6.1,多重耐药志贺菌株和耐 TE 志贺菌株大多无 Sp7。CRISPR-

S4 的间隔序列 Sp8 到 Sp13,与 Sp5.3、Sp6.3 及 Sp7.2 同在 1 株志贺菌中存在,该志贺菌株对 6 种抗生素均不耐药。

CRISPR-S4 阳性志贺菌株与阴性志贺菌株之间,AM、CF、SXT、Cl 和 NOR 耐药性的分布差异均无统计学意义;CRISPR-S4 的重复序列与 AM、CF、SXT、Cl 和 NOR 耐药性的分布差异均无统计学意义;CRISPR-S4 的间隔序列 Sp5、Sp6、Sp7,与 AM, CF, SXT, Cl 和 NOR 耐药性的分布差异均无统计学意义。

表 5. 志贺菌 CRISPR-S4 与耐药性的关系

Table 5. The relationship between CRISPR-S4 and drug resistance in *Shigella*

Drug resistance	CRISPR-S4			Repeat				Sp5			Sp6			Sp7								
	-	+	P	-	R4.1	R4.2	P	-	Sp5.1	Sp5.2	Sp5.3	P	-	Sp6.1	Sp6.2	Sp6.3	P	-	Sp7.1	Sp7.2	P	
Antibiotics Type	none	1	7	0.361	1	4	3	0.034	1	4	2	1	0.022*	1	4	2	1	0.022*	5	2	1	0.008*
	single	3	8		3	1	7		3	1	7	0		3	1	7	0		4	7	0	
	Two	1	8		1	4	4		1	4	4	0		1	4	4	0		5	4	0	
	MDR	11	21		11	16	5		11	16	5	0		11	16	5	0		27	5	0	
TE	S	4	15	0.667*	4	5	10	0.039*	4	5	9	1	0.052*	4	5	9	1	0.052*	9	9	1	0.015*
	I	0	1		0	0	1		0	0	1	0		0	0	1	0		0	1	0	
	R	12	28		12	20	8		12	20	8	0		12	20	8	0		32	8	0	

* Fisher's exact test; S: sensitivity, I: intermediated resistance, R: resistance.

3 讨论

1996 年志贺菌被 WHO 认定为给人类带来巨大威胁、耐药性日渐增长的菌株^[14]。随着抗生素的滥用,志贺菌不断变异产生耐药株,甚至多重耐药株。我们对 60 株志贺菌的耐药情况进行检测,发现志贺菌对 AM、TE、SXT、C 的耐药率较高,而对 CF 和 NOR 的耐药率较低,多重耐药率为 53.33%,与任静朝等^[15]报道结果一致。CRISPR 广泛分布于细菌和古细菌的基因组中,本研究检测了 60 株志贺菌的可能的 CRISPR 结构 CRISPR-S1、CRISPR-S3,及确定的 CRISPR 结构 CRISPR-S2、CRISPR-S4。4 个 CRISPR 位点均被检出,它们形成了 12 种谱型(A-L),除 K 型仅含可能的 CRISPR 结构 CRISPR-S3,其他各型均含确定的 CRISPR 结构,确定的 CRISPR 结构的总阳性率为 95%,与 CRISPR DB 数据库中公布的已测序的基因组中,81.82% 志贺菌 (9/11) 和 87.72% (5/57) 的大肠杆菌中存在确定的 CRISPR 结构一致,与国内邓凯波在 2 株德氏乳杆菌和 8 株嗜热链球菌中均检测出 CRISPR 位点结果一致^[16-17],并且薛泽润等^[18]在志贺菌中检测到

CRISPR 相关蛋白基因 *cas1* 和 *cas2*。

CRISPR 与 *cas* 基因组成 CRISPR/*cas* 系统,间隔序列靶向定位入侵的外源性基因,通过 Cas 蛋白将外源性基因裂解,从而限制基因的水平转移,抵抗噬菌体感染及质粒接合转移等^[19]。而耐药基因的水平转移是志贺菌耐药的主要机制之一,目前有关 CRISPR 与耐药关系的报道在不同的细菌中尚不一致,Katie M. 等^[10]检测了粪肠球菌的 CRISPR 相关蛋白基因 *cas1* 和 *cas3*,发现:*cas1* 或 *cas3* 与多重耐药的获得关系相反,Kelli^[11]分析粪肠球菌的 CRISPR/*cas*,亦发现:CRISPR/*cas* 与获得性耐药关系相反。但是,大肠杆菌的 *cas I-E* 在敏感株和耐药株间无差异,并且耐药质粒仍可以在 CRISPR 阳性大肠杆菌之间传播^[12]。本研究中 CRISPR-S1、CRISPR-S2、CRISPR-S3 均为孤立位点,不与 *cas* 基因相连接,而 CRISPR-S4 与 *cas* 基因组成 CRISPR/*cas* 系统。因此,我们分析了 CRISPR-S4 与志贺菌多重耐药的分布,发现:虽然 CRISPR-S4 阳性菌株与阴性菌株之间,多重耐药的分布差异无统计学意义,但多重耐药志贺菌株的重复序列主要为 R4.1,间隔序列主要为 Sp5.1 及 Sp6.1。

同一 CRISPR 位点的重复序列相对保守,在同

种细菌的不同菌株间高度相似,仅在少数菌株中发生变异^[20]。本研究检测到的4个位点,仅3株志贺菌 CRISPR-S1 的重复序列、2株志贺菌 CRISPR-S2 的重复序列、2株志贺菌 CRISPR-S3 的重复序列和部分 CRISPR-S4 的重复序列发生变异。重复序列的变异并不是简单的碱基突变,重复序列的变化会引起紧邻的间隔序列的变化。间隔序列与 CRISPR/cas 系统发生免疫抑制作用密切相关,间隔序列可靶向定位入侵的外源性基因,而 CRISPR/cas 系统可获取入侵的外源基因的一段标志基因为新的间隔序列,从而抵御这一外源基因的再次侵入。本研究中发现多重耐药菌株缺乏 Sp5.2、Sp5.3、Sp6.2、Sp6.3 及 Sp7,TE 耐药菌株缺乏 Sp7,Marraffini LA^[21] 发现 CRISPR/cas 系统的间隔序列与质粒切口酶同源,从而限制耐药基因的水平转移,提示 Sp5.2、Sp5.3、Sp6.2、Sp6.3 及 Sp7 可能与携带相应耐药基因的质粒同源。间隔序列的变异可导致免疫逃逸^[22],有趣的是,Bikard D 等研究发现^[23],通过间隔序列变异甚至 CRISPR 的丢失,连接有耐药基因的前间隔序列 (prospacer, 间隔序列的同源基因序列) 可逃逸 CRISPR 干扰,使肺炎链球菌获得相应的耐药基因。在志贺菌中,我们发现:CRISPR-S4 阳性的多重耐药志贺菌株,其重复序列的3'末端缺失碱基 AC,其后排列的间隔序列为 Sp5.1 和 Sp6.1,而非 Sp5.2、Sp5.3、Sp6.2、Sp6.3 及 Sp7,提示 CRISPR 尽管能限制外源性基因的侵入,在抗生素的选择性生存压力下,细菌的 CRISPR 可能发生变异,使细菌获得外源性耐药基因而存活下来,CRISPR 重复序列的变异和间隔序列的多样性可能与志贺菌耐药有关。

参考文献

- [1] WHO. Shigellosis: disease burden, epidemiology and case management. *Weekly Epidemiological Record*, 2005, 80(11): 94-99.
- [2] Zhang W, Luo Y, Li J, Lin L, Ma Y, Hu C, Jin S, Ran L, Cui S. Wide dissemination of multidrug-resistant Shigella isolates in China. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66(11): 2527-2535.
- [3] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.
- [4] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338.
- [5] Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1657-1669.
- [6] Cain AK, Boinett CJ. A CRISPR view of genome sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 226.
- [7] 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.
- [8] Horvath P, Romero DA, Coute-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.
- [9] Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [10] Burley KM, Sedgley CM. CRISPR-Cas, a prokaryotic adaptive immune system, in endodontic, oral, and multidrug-resistant hospital-acquired Enterococcus faecalis. *Journal of Endodontics*, 2012, 38(11): 1511-1515.
- [11] Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *MBio*, 2010, 1(4): e00227-10.
- [12] 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: 2997-3004.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antibiotic Disk Susceptibility Tests. Eleventh edition: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [14] Davies J. Bacteria on the rampage. *Nature*, 1996, 383(6597): 219-220.
- [15] Ren JC, Duan GC, Song CH, Lv RL, Zhang WD, Xi YL. Relation of acrAB-tolC efflux pump and marOR regulated gene mutation with antimicrobial resistance in Shigella. *Journal of Jilin University*, 2010, 36(1): 45-48. (in Chinese)
- 任静朝, 段广才, 宋春花, 吕锐利, 张卫东, 郗园林. 志贺菌主动外排泵 acrAB-tolC 及调控基因 marOR 突变与耐药的关系. *吉林大学学报*, 2010, 36(1): 45-48.
- [16] Deng KB, Huo GC. Detection and homology analysis of CRISPR in Streptococcus thermophilus. *Food Science*, 2013, 34(3): 153-157. (in Chinese)
- 邓凯波, 霍贵成. 嗜热链球菌中 CRISPR 序列的检测与同源性分析. *食品科学*, 2013, 34(3): 153-157.
- [17] Deng KB, Huo GC, Liu GX. Detection and homology

analysis of CRISPR in *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2011, 42 (11): 19-23. (in Chinese)

邓凯波, 霍贵成, 柳国霞. CRISPR 在德氏乳杆菌中的检测与同源性分析. 东北农业大学学报, 2011, 42 (11): 19-23.

- [18] Xue ZR, Wang YF, Duan GC, Wang PF, Wang LL, Guo XJ, Xi YL. Clustered regularly interspaced short palindromic repeat associated protein genes cas1 and cas2 in *Shigella*. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2014, 5 (35): 105-108. (in Chinese)

薛泽润, 王颖芳, 段广才, 王鹏飞, 王琳琳, 郭向娇, 郝园林. 志贺菌成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白基因 cas1 和 cas2 研究. 中华流行病学杂志, 2014, 5 (35): 105-108.

- [19] Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA

repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43 (6): 1565-1575.

- [20] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 475-493.
- [21] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 2008, 322 (5909): 1843-1845.
- [22] 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.
- [23] 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.

Detection of CRISPR and its relationship to drug resistance in *Shigella*

Linlin Wang¹, Yingfang Wang², Guangcai Duan^{1,3*}, Zerun Xue¹, Xiangjiao Guo¹, Pengfei Wang¹, Yuanlin Xi¹, Haiyan Yang¹

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

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

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

Abstract: [Objective] To detect clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) in *Shigella*, and to analyze its relationship to drug resistance. [Methods] Four pairs of primers were used for the detection of convincing CRISPR structures CRISPR-S2 and CRISPR-S4, questionable CRISPR structures CRISPR-S1 and CRISPR-S3 in 60 *Shigella* strains. All primers were designed using sequences in CRISPR database. CRISPR Finder was used to analyze CRISPR and susceptibilities of *Shigella* strains were tested by agar diffusion method. Furthermore, we analyzed the relationship between drug resistance and CRISPR-S4. [Results] The positive rate of convincing CRISPR structures was 95%. The four CRISPR loci formed 12 spectral patterns (A-L), all of which contained convincing CRISPR structures except type K. We found one new repeat and 12 new spacers. The multi-drug resistance rate was 53.33%. We found no significant difference between CRISPR-S4 and drug resistant. However, the repeat sequence of CRISPR-S4 in multi- or TE-resistance strains was mainly R4.1 with AC deletions in the 3' end, and the spacer sequences of CRISPR-S4 in multi-drug resistance strains were mainly Sp5.1, Sp6.1 and Sp7. [Conclusion] CRISPR was common in *Shigella*. Variations of repeat sequences and diversities of spacer sequences might be related to drug resistance in *Shigella*.

Keywords: *Shigella*, multi-drug resistance, CRISPR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by Important National Science & Technology Major Projects of China (2013ZX10004607)

* Corresponding author. Tel: +86-371-67781964; E-mail: gcdan@zhu.edu.cn

Received: 22 June 2014 / Revised: 13 October 2014