



CRISPR-Cas9 技术在细菌耐药性防控研究进展

李培思^{1,2,3}, 万鹏^{1,2,3}, 李小申^{1,2,3}, 崔世云^{1,2,3}, 曾振灵^{1,2,3*}

¹华南农业大学/广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642

²岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东 广州 510642

³国家兽医微生物耐药性风险评估实验室, 广东 广州 510642

摘要:近年来,多种新型耐药基因的出现和全球性流行,严重威胁了全球公众健康。CRISPR-Cas9 系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated protein 9 system)是细菌的一种适应性免疫系统,可切割耐药基因、抵御外来核酸入侵,现已作为一种新型基因编辑工具应用于防控细菌耐药性研究。本团队已建立了一种单质粒介导靶向 *mcr-1* 基因的 CRISPR-Cas9 系统,能有效并特异性消除黏菌素耐药大肠杆菌中的 *mcr-1*,恢复其对黏菌素的敏感性。同时也发现在临床中应用还需要优化其递送方式。本文对近几年该技术在细菌耐药性防控方面的研究进展进行了综述,包括 CRISPR-Cas9 系统的发现过程、作用机制、递送方式、在体外检测实验结果的进展以及当前存在的问题等方面,以期防控细菌耐药性提供新思路。

关键词: CRISPR-Cas9 系统, 细菌耐药性, 基因定向编辑, 细菌基因组, 质粒

抗菌药是天然的、合成的或半合成的具有抗菌活性的化合物,由于其良好的抗菌活性而广泛使用,抗菌药的过度使用造成了严重的污染,如医院、养殖场等废水中存在大量的抗菌药^[1]。由于抗菌药的不合理使用导致产生多种耐药机制,这些耐药机制主要是产生灭活酶、改变作用靶标、改变膜通透性和泵作用等^[2]。针对这些耐药

机制,科研人员试图开发抗菌活性更高的新型化合物,例如 SCH-79797、新型线性短链广谱抗菌增效剂(short linear antibacterial peptide-S25, SLAP-S25)、corbomycin 和已知的糖肽抗生素补全他汀(complestatin)等^[3-5]。SCH-79797 作用于二氢叶酸还原酶和细菌膜,能杀死革兰阴性细菌和革兰阳性细菌^[3]。SLAP-S25 可以提高多种临

基金项目: 国家自然科学基金(31872524)

*通信作者。Tel: +86-20-85281204; Fax: +86-20-85284896; E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

收稿日期: 2020-08-13; 修回日期: 2020-9-14; 网络出版日期: 2020-09-23

床常用抗菌药物的抗菌效果^[4]。corbomycin 和 complestatin 是通过阻断细胞壁杀灭细菌^[5]。但是, 这些新型抗菌化合物通过阻断细菌中共有的信号通路或新陈代谢途径来起作用, 无法区分杀菌对象, 并且应用到临床中还需较长时间, 这表明需要寻找新技术防控细菌耐药性。靶向耐药基因的 CRISPR-Cas9 系统能从根源上清除耐药基因, 阻断耐药基因的传播, 对防控细菌耐药性产生展现出巨大的潜力。

耐药菌获得耐药基因很大程度上归因于可移动基因元件(MGE)的作用, 包括插入序列(IS)、转座子(Tn)、整合子(In)、质粒和整合接合元件(ICE)^[6]。这些 MGE 导致多重耐药甚至全耐药菌感染的不断增加, 并且临床治疗时用药选择余地有限, 因此非抗生素类防控细菌耐药性技术成为各国生物医疗领域的研究热点。CRISPR-Cas9 系统具有靶标基因序列特异性与可编程性, 目前已被广泛应用于防控细菌耐药性。本综述旨在根据 CRISPR-Cas9 系统作为一种防控细菌耐药性的手段, 简述其作用机制, 总结其递送方式, 整理其在防控细菌耐药性方面的研究进展。

1 CRISPR-Cas9 系统的发现过程及作用机制

1.1 发现过程

1987 年, Ishino 等^[7]在对大肠埃希菌 *iap* (isozymes of alkaline phosphatase)基因的研究中发现一段串联重复序列。2002 年, Jansen 等^[8]在对硅的分析中, 发现了一个新的重复的 DNA 序列家族, 它存在于原核细胞中。由大小相似的非重复序列间隔(spacer)组成, 大小从 21 对碱基对

(base pair, bp)到 37 bp 不等, 随后将该家族称为有规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)。2005 年, Bolotin 等^[9]发现 PAM。2011 年, Sapranaukas 等^[10]发现, 活跃的 CRISPR-Cas 系统可以跨远属转移, 并在宿主菌内干扰侵入的核酸。2012 年, Jinek 等^[11]在对 Cas9 及其 CRISPR RNA (crRNA)的研究中发现, cas9 蛋白在成熟的 crRNA 的牵引下能单独切割 DNA, 具有核酸内切酶活性, CRISPR 技术可以用于基因组编辑。2013 年, Jiang 等^[12]利用 CRISPR-Cas9 系统在肺炎链球菌和大肠埃希菌的基因组中引入精确的突变。肺炎链球菌接近 100%的细胞含有期望的突变, 大肠埃希菌有 65%含有突变。基于前人的这些研究, CRISPR-Cas9 系统作为新型基因编辑工具开始大放异彩。

1.2 作用机制

CRISPR-Cas9 系统广泛存在于细菌中, 是细菌的一种适应性免疫系统^[13-14] (图 1)。单链引导 RNA (single-guide RNA, sgRNA)结合 DNA 核酸内切酶 Cas9 形成功能复合物, sgRNA 由反式激活 CRISPR RNA (Trans-activating CRISPR RNA, tracrRNA)和 crRNA 组成。然后 Cas9-sgRNA 识别目的 DNA 的 PAM 序列, 解开目的 DNA 双链。与此同时, sgRNA 与目的 DNA 配对, R 环形成, Cas9 切断 DNA 双链, 造成双链断裂(double-strand break, DSB)而破坏外源核酸, 实现基因编辑。其中 DSB 主要通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)和同源重组(homologous repair, HR)两条途径进行修复。真核生物有自我修复机制, 通过 NHEJ 修复。原核生物通过同源重组修复途径或外源加入 NHEJ 相关蛋白修复。

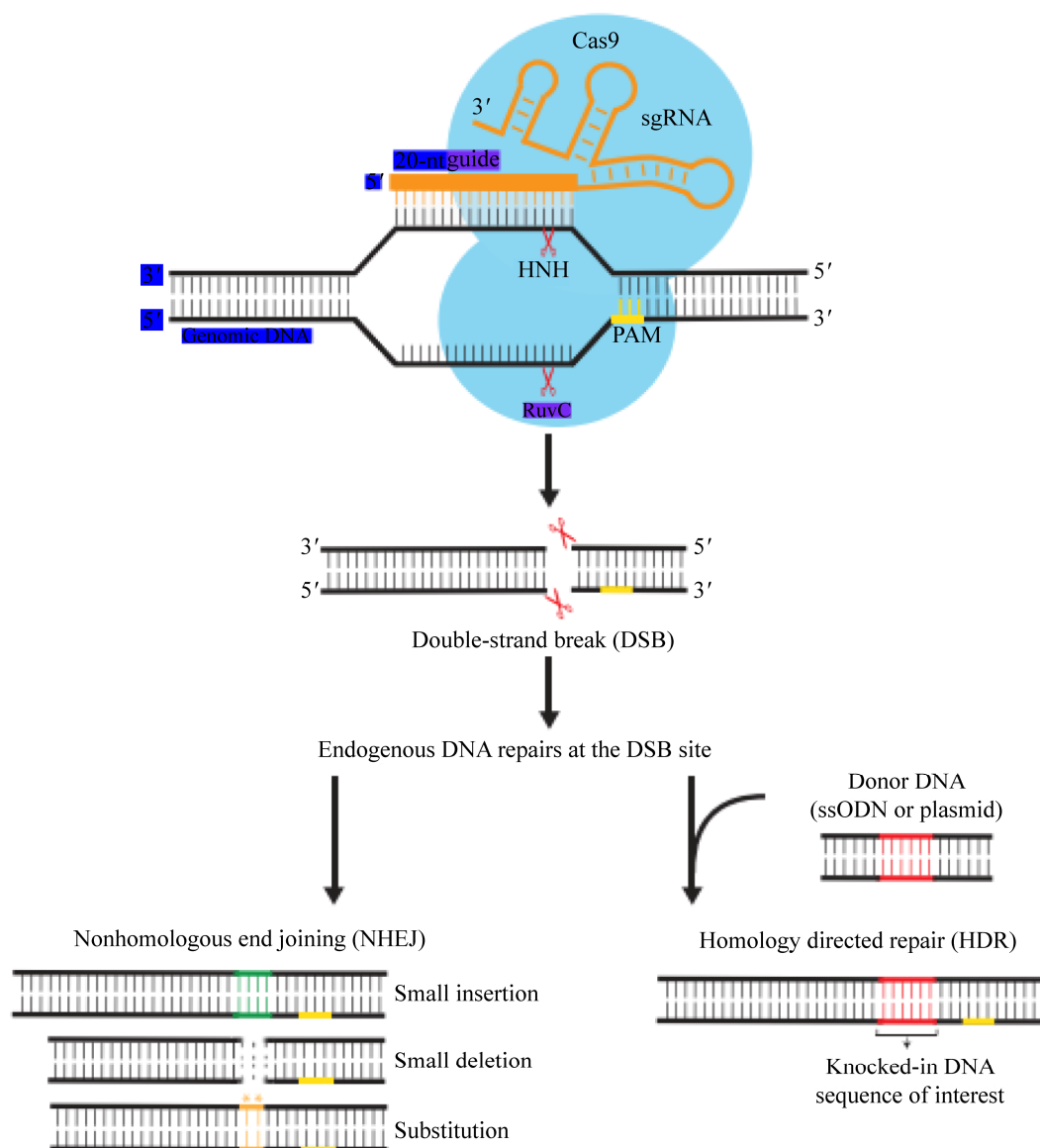


图 1. CRISPR-Cas9 系统作用机制^[14]

Figure. 1 mechanisms involved CRISPR-Cas9 system^[14].

CRISPR-Cas9 系统干扰细菌适应性免疫分为 3 个过程^[14](图 2): ①适应: 当噬菌体感染时, 从侵入性遗传因子中获得的一种新的间隔物并且整合到 CRISPR 阵列中。②表达: 新的间隔与其他所有间隔共同转录成一个较长前体 CRISPR RNA (pre-crRNA), 包含重复序列和间隔。

tracrRNA 被单独转录, 然后通过核糖核酸酶 III (ribonuclease III, RNase III) 裂解退火到 pre-crRNA 重复序列, 使 crRNA 成熟。③干涉: 再次受到干扰后, 成熟 crRNA-tracrRNA 结构牵引 Cas9, 识别外源 DNA 的 PAM 序列后, Cas9 发挥核酸内切酶的功能, 活性切割、降解外来的 DNA。

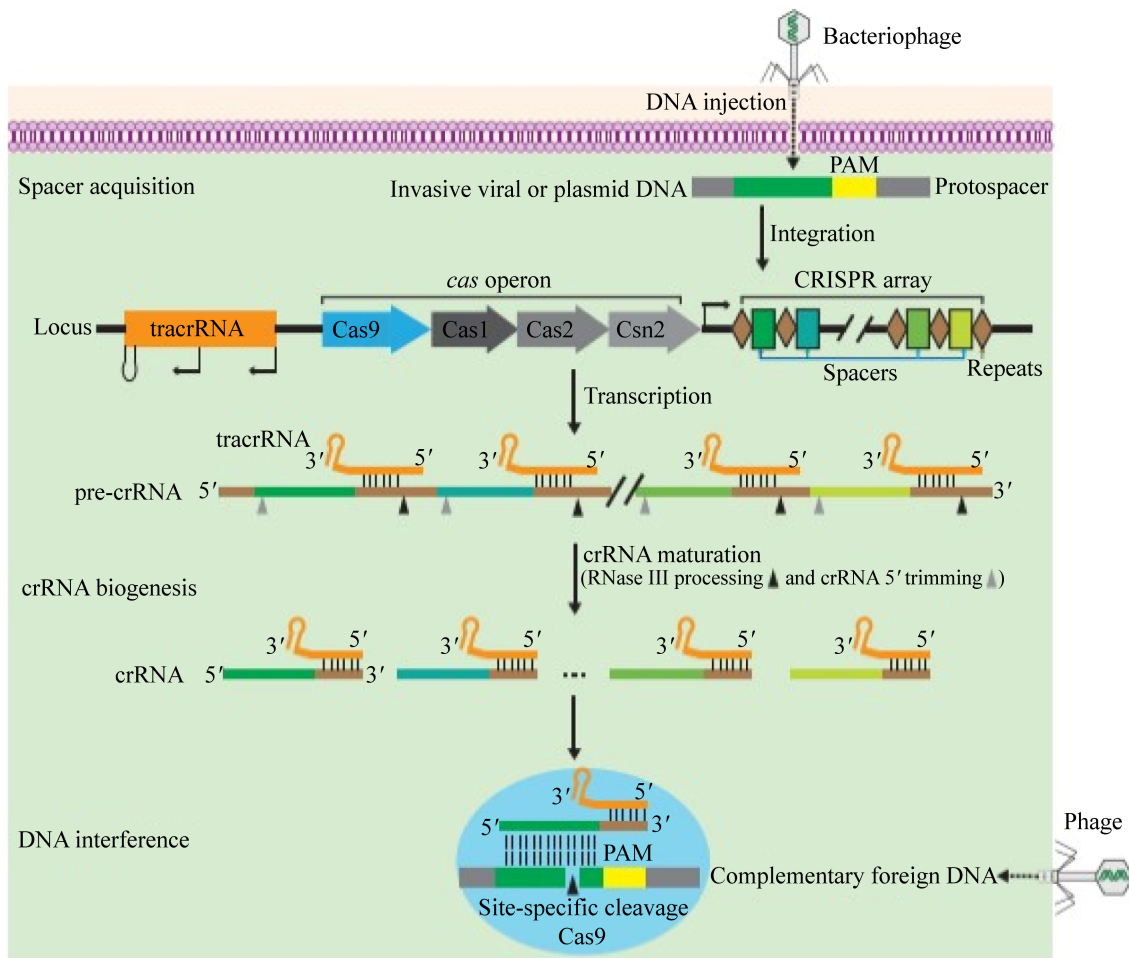


图 2. CRISPR-Cas9 系统干扰细菌适应性免疫过程^[14]

Figure 2. CRISPR-Cas9 system interferes with the adaptive immune process in bacteria^[14].

2 递送方式

CRISPR-Cas9 系统的递送方式较多, 本文将分为物理方法、化学方法和生物方法^[15-16]。物理方法是在细胞膜磷脂双分子层产生短暂的缺口或直接注射进入细胞, 包括电穿孔、显微注射、水动力注射、膜变形、超声、激光照射和渗透作用等。物理方法操作简便, 但损伤细胞, 造成细胞膜不可逆的生理损伤等。化学方法是对复合物进行化学修饰然后递送到细胞中, 如无机溶剂处理后递送, 或者用有机或复合材料组装 Cas9-sgRNA

复合物递送, 该方法具有灵活性和多样性。生物方法包括噬菌体、病毒和细胞外囊泡递送等, 生物递送方法是当前较为常见的递送方式。

2.1 物理方法

电穿孔和显微注射, 主要对细胞进行操作, 过程较简单, 但仅限于实验室使用。电穿孔或显微注射可将 sgRNA-Cas9 复合物直接递送到人细胞、小鼠和斑马鱼中^[10]。电穿孔方法操作简单, 产生大量转化子, 但引入的 DNA 很少整合到基因组中。Lin 等开发了一种电穿孔瞬移 CRISPR-Cas9 系统, (transient CRISPR-Cas9 coupled with

electroporation system, TRACE), 转化新生隐球菌, 以避免不必要的转化子基因组中 Cas9 的整合问题^[17]。

2.2 化学方法

化学转化介导的 CRISPR-Cas9 系统(chemical transformation mediated CRISPR-Cas9, CT-CRISPR-Cas9)利用 CaCl₂ 溶液通过化学转化对细菌基因组进行精确编辑(替换、删除、插入或点突变靶基因)^[18]。与电穿孔介导的 CRISPR-Cas9 系统(ET-CRISPR-Cas9)相比,CT-CRISPR-Cas9 系统的基因组编辑更便宜、更简单。

阳离子脂质介导的转染是将天然阳离子 Cas9 核酸酶与聚阴离子 gRNA 融合,使 gRNA 有效地与阳离子脂质相互作用。当添加阳离子脂质颗粒时,其在 gRNA 复合物周围形成脂双层,其在进入细胞时保护复合物,具有较高递送率和低脱靶效应的优势^[19]。

环境安全的纳米材料,显示出杀菌的希望。其主要设计思路有:仿生菌膜物理抗菌、纳米颗粒产生活性氧和活性氮抗菌、光热疗法杀菌、光动力疗法抗菌、阳光介导的抗菌处理和基于纳米材料的天然抗菌化合物递送系统等^[20]。例如硒纳米粒子有抑制大肠杆菌、铜绿假单胞菌、MRSA 和金黄色葡萄球菌等细菌生长的能力^[21]。不仅如此,由于纳米材料的物理化学性质可以被调整,纳米材料包裹 CRISPR-Cas9 系统后,CRISPR-Cas9 不容易被人体细胞降解,能有效和有针对性地运输 CRISPR-Cas9 系统。例如,有些特殊的聚合物纳米颗粒,比如两性离子氨基脂类(ZALs)纳米颗粒、外泌体-脂质体混合纳米颗粒、阳离子类脂纳米颗粒等,能安全有效地传递 CRISPR-Cas9 系统组件^[22]。

2.3 生物方法

噬菌体天然靶向细菌,备受青睐。但缺点是宿主谱较窄。噬菌体传递 CRISPR-Cas9 系统分为两种形式。一种是噬菌粒形式,即 CRISPR-Cas9 系统以质粒的形式设计,由噬菌体衣壳包裹,再运输至目标细菌。例如 Bikard 等^[23]利用包裹靶向金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)的抗性基因或毒力基因的 CRISPR-Cas 系统的噬菌粒作用 SA。另一种则是将 CRISPR-Cas9 系统整合至噬菌体基因组上,再随基因组一同被注射至细菌内部。刘鸿博^[24]建立了新型温和噬菌体包装 CRISPR-Cas9 系统,重组噬菌体将用于递呈 CRISPR-Cas9 系统并靶向细菌耐药质粒。

病毒载体的传递效率更高,表达稳定,但它们具有高度的免疫原性,有突变和致癌的高风险。常用的病毒载体包括腺病毒、腺相关病毒和慢病毒。Palmer 等^[25]开发出一体化依赖腺病毒递送工具(helper-dependent adenovirus, HDAd),将所需的 3 个组分(供体 DNA、Cas9 和 gRNA)导入细胞核,在染色体靶标处产生 DSB,实现高效基因靶向。与依赖自发 HR 的 HDAd 相比,基因靶向性提高了 117 倍。

对于细胞外囊泡运载,革兰氏阴性菌分泌的囊泡为外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs),革兰氏阳性菌分泌的为膜泡(membrane vesicles, MVs),而由真核细胞分泌的为外泌体(exosome)。囊泡可携带细胞的多种成分,将癌细胞分泌的 MVs 作为 CRISPR-Cas9 系统的载体,实现了体内靶向清除癌细胞^[26]。侯国锋等^[27]利用大肠埃希菌分泌的 OMVs 作为靶向无乳链球菌的 CRISPR-Cas9 系统的载体,以混合培养的方式实现了低效特异地清除无乳链球菌。

3 应用于细菌耐药性方面的进展

3.1 革兰阴性菌

革兰阴性菌具有高度限制性的通透性屏障,其外膜是多种抗生素产生耐药性的主要原因^[28]。耐药基因如 *bla*_{KPC}、*bla*_{NDM}、*mcr-1* 和 chloramphenicol-florfenicol-resistance (*cf*)等的出现和流行,防控革兰氏阴性菌耐药性刻不容缓。鉴于此,有研究表明 CRISPR-Cas9 系统已用于肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌等的碱基编辑^[29-31]。简单、高效的 CRISPR-Cas9 系统基因编辑技术已用于防控革兰氏阴性菌耐药性的研究。

碳青霉烯类抗生素的抗菌活性强、抗菌谱较广,对细菌具有良好的抗菌作用。特别是多重耐药革兰阴性杆菌,如产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌。该菌由于具有很强抗菌活性而被广泛使用,这致使产生了耐碳青霉烯类细菌,耐碳青霉烯类病原菌是医院的主要病原菌之一。以患者体内分离的产 ESBLs 的肺炎克雷伯菌为质粒供体,大肠埃希菌为质粒受体,通过转化,挑选出产 ESBLs 的大肠埃希菌。寻找耐药基因保守序列,将保守序列作为靶向基因构建的 CRISPR-Cas9 系统导入到产 ESBLs 的大肠埃希菌,结果表明该系统能以清除 ESBLs 耐药性质粒的形式恢复对抗菌药的敏感性^[32]。姚文晔^[33]根据靶向碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC} 和 *bla*_{NDM} 设计出相应的 sgRNA,结果表明耐药质粒转化效率降低。进一步利用不同类型的耐药质粒基因设计 sgRNA,都造成了不同程度耐药质粒的断裂和丢失,对药物的敏感性恢复,与阴性对照组有 1000-10000 倍的差距。刘鸿博^[24]构建靶向 *bla*_{NDM-1} 的 CRISPR-Cas9 系统,利用温和噬菌体递送该体系,该体系通过对耐

药质粒的高效清除实现耐药菌的敏感化。杨勇^[31]以靶向耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB)苯唑西林酶(oxacillinases 23, *bla*_{OXA-23})基因成功构建 CRISPR-Cas9 载体。以上研究表明,CRISPR-Cas9 技术能高效靶向消除病原菌中耐碳青霉烯类耐药质粒,恢复病原菌对碳青霉烯类敏感性。

mcr-1 是位于质粒上的可水平转移的黏菌素耐药基因,有研究表明利用 CRISPR-Cas9 系统可敲除 *mcr-1* 耐药基因^[33-34]。Dong 等^[35]利用 CRISPR-Cas9 系统构建了一个靶向 *mcr-1* 接合质粒,发现这种结合质粒不仅可以清除耐药质粒,而且还可以使受体细胞对 *mcr-1* 免疫。Wang 等^[36]将质粒 pMBCas9-sgRNA 结合转移到两株大肠埃希菌中,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)和 DNA 测序来检测质粒中 *mcr-1* 清除效率,结果表明 *mcr-1* 耐药基因能够被有效清除。

cf 基因是一种多重耐药基因,能同时介导氯霉素类、恶唑烷酮类、林可酰胺类、链阳菌素 A 类和截短侧耳素类等五类化学结构不同的抗菌药物耐药。应用 CRISPR-Cas9 技术,董海思^[37]建立了高效特异清除大肠埃希菌中多重耐药基因 *cf* 的方法。

在喹诺酮类药物耐药性方面,利用 CRISPR-Cas9 系统对大肠杆菌 ATCC25922 的回旋酶(*gyraseA*, *gyrA*)基因进行突变及对大肠杆菌临床株进行反向突变,对突变菌株进行生长曲线、最小抑菌浓度和药敏实验等,实验结果表明 *gyrA* 基因突变与喹诺酮类耐药有因果关系^[38]。

大部分耐药基因位于质粒上,根据相关报导,CRISPR-Cas9 系统和 DNA 图谱相结合可直

接鉴定单个质粒上的抗菌药耐药基因^[39]。综上所述, 针对耐药革兰氏阴性菌造成的细菌耐药性, CRISPR-Cas9 系统能以消除耐药质粒的形式清除耐药基因, 使耐药菌恢复对抗菌药的敏感性, 缓解细菌耐药性的传播。

本团队已利用 CRISPR-Cas9 系统靶向消除大肠杆菌中 *mcr-1* 阳性质粒, 恢复其对黏菌素的敏感性, 该系统具有很大的潜力来抵抗外源 *mcr-1* 基因的水平传播。并且我们发现 sgRNA 序列的长度并不能显著影响消除效率, 质粒骨架结构是影响消除效率的重要因素。

3.2 革兰阳性菌

革兰阳性菌细胞壁较厚, 临床上会造成多种疾病感染, 常见的病原菌有金黄色葡萄球菌、肠球菌、链球菌和结核分枝杆菌等。SA 是革兰氏阳性菌中的主要病原菌之一, 尤其是 MRSA, 能够引起严重感染^[40]。鉴于此, 科研人员利用 CRISPR-Cas9 系统来对 SA 的基因组进行编辑^[41-42], 该技术有望缓解 SA 导致的感染。

MRSA 具有致病性强、传播途径广的特点^[43]。万古霉素作为 MRSA 感染最后一道防线, 受到了青睐。但随着万古霉素使用量的逐步增加, 临床上已经出现了耐万古霉素金黄色葡萄球菌。为此, 赵长隆^[44]探究了 MRSA 菌株 N315 中的敲除能力, 选择了甲氧西林耐药基因(*mecA*)作为靶标基因。*mecA* 基因编码的青霉素结合蛋白(PbP2a)赋予了 MRSA 菌株对 β -内酰胺类抗生素的抗性, 抑制其表达将使 N315 菌株对苯唑西林(oxacillin)等 β -内酰胺类抗生素的敏感度增加。通过滤纸片扩散抑菌实验发现苯唑西林对敲除菌株的抑菌圈要明显大于对照菌株, 这说明 CRISPR-Cas9 系

统能敲除 MRSA 中的耐药基因 *mecA*。

对于结核分枝杆菌而言。Chhotaray 等^[45]探讨了其潜在的发病机制和耐药性, 对比了在结核分枝杆菌中的各种研究方法, 例如转座子诱变、信号标签诱变、基于等位基因替换诱变、条件表达基因沉默和全基因组测序等。由于受到结核分枝杆菌生长缓慢、耐药菌株扩散、细胞壁结构很复杂以及缺乏有效的转化工具等因素的制约, CRISPR 干扰(CRISPR interference, CRISPRi)系统在分枝杆菌研究方面有很大的潜力^[46]。

放线菌, 尤其是链霉菌属, 是发现天然产物和其同源微生物合成途径的重要来源。有研究表明利用一个高效的 CRISPR-Cas9 系统来删除放线菌基因或基因簇, 该系统实现了精确的基因替换, 并可逆地控制放线菌的表达^[47-48]。Mo 等^[49]开发了一种新的 CRISPR-Cas9 系统 pMWCas9, 利用该系统对放线菌基因组进行编辑, 使放线菌合成产物产量是原来的 9 倍。以上说明, CRISPR-Cas9 系统在放线菌中广泛应用。

4 局限和展望

编辑效率高、操作方便和成本低等优点使 CRISPR-Cas9 系统成为最热的基因编辑工具, 然而也存在潜在的安全问题、伦理问题和系统自身的缺陷。CRISPR-Cas9 系统可能导致非靶向基因位点的 DNA 意外改变, 产生基因毒性和染色体易位。应用新型化合物抑制剂对特异型化脓链球菌 Cas9 (specificity *Streptococcus pyogenes* Cas9, SpCas9)进行可逆的、剂量可控的、相对稳定且温和的控制, 对广泛应用的基因编辑、碱基编辑具有重要作用。Maji 等^[50]通过一系列生化和细胞水

平的测定, 筛选出针对 SpCas9 的小分子抑制剂, 这些小分子抑制剂部分可以抑制 SpCas9 结合 DNA 的能力, 部分抑制 SpCas9 切割 DNA 的能力, 这使得 CRISPR-Cas9 基因编辑系统能够较有效的控制。脱靶效应是 CRISPR-Cas9 系统的主要缺陷。研究人员开发了大量有效的方法来检测 CRISPR 系统的编辑效率和脱靶率, 并提出了各种降低脱靶风险的策略, 以提高基因编辑的特异性^[51], 例如, 对 CRISPR-Cas9 系统成分的修改, 使得这些成分可以减轻脱靶效应^[52]。首先是设计和修改 sgRNA。为目标 DNA 序列选择合适的 sgRNA 是避免脱靶至关重要的第一步。sgRNA 被设计成包含 20 个与目标 DNA 序列互补的核苷酸, 然后截断 sgRNA 的 5'端, 使其包含 17-18 个核苷酸, 从而提高 sgRNA 对不匹配的敏感性。为了克服脱靶效应等局限性, Najah 等^[53]设计了一种使用相同的 sgRNA 和 CRISPR-Cas9 系统在不同位点独立进行基因编辑的方法。以上方法都希望尽可能提高基因编辑的效率和精确性, 在使用这一强有力工具的同时尽量减少风险。

CRISPR-Cas9 系统作为一种基于细菌和古生菌对外源核酸入侵的适应性免疫防御机制的革命性基因编辑工具, 比锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFN)、转录激活因子样效应因子核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)等传统基因编辑工具表现出许多显著的特点, 比如编辑效率高、过程简单、操作方便、成本低和细胞毒性小等。由于这些优点, CRISPR-Cas9 系统已广泛用于真核细胞、原核细胞和病毒, 在细菌耐药性方面会有更加高效、便捷和克服该系统自身缺陷的新型 CRISPR-Cas9 系统被开发出来, 这证明该系统有着较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Kumar M, Jaiswal S, Sodhi KK, Shree P, Singh DK, Agrawal PK, Shukla P. Antibiotics bioremediation: perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International*, 2019, 124: 448-461.
- [2] Asenjo A, Oteo-Iglesias J, Alós JI. What's new in mechanisms of antibiotic resistance in bacteria of clinical origin? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2020, DOI: 10.1016/j.eimc.2020.02.031.
- [3] Martin II JK, Sheehan JP, Bratton BP, Moore GM, Mateus A, Li SHJ, Kim H, Rabinowitz JD, Typas A, Savitski MM, Wilson MZ, Gitai Z. A dual-mechanism antibiotic kills gram-negative bacteria and avoids drug resistance. *Cell*, 2020, 181(7): 1518-1532.e14.
- [4] Song MR, Liu Y, Huang XY, Ding SY, Wang Y, Shen JZ, Zhu K. A broad-spectrum antibiotic adjuvant reverses multidrug-resistant gram-negative pathogens. *Nature Microbiology*, 2020, 5(8): 1040-1050.
- [5] Culp EJ, Waglechner N, Wang WL, Fiebig-Comyn AA, Hsu YP, Koteva K, Sychantha D, Coombes BK, Van Nieuwenhze MS, Brun YV, Wright GD. Evolution-guided discovery of antibiotics that inhibit peptidoglycan remodelling. *Nature*, 2020, 578(7796): 582-587.
- [6] Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018, 31(4): e00088-17.
- [7] 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.
- [8] Jansen R, Van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [9] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551-2561.
- [10] Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(21): 9275-9282.
- [11] 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.
- [12] Jiang WY, 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.
- [13] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing: the new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [14] Jiang FG, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 2017, 46: 505–529.
- [15] Wang L, Zheng WF, Liu SQ, Li B, Jiang XY. Delivery of CRISPR/Cas9 by novel strategies for gene therapy. *ChemBioChem*, 2019, 20(5): 634–643.
- [16] Carboni V, Maaliki C, Alyami M, Alsaiani S, Khashab N. Synthetic vehicles for encapsulation and delivery of CRISPR/Cas9 gene editing machinery. *Advanced Therapeutics*, 2019, 2(4): 1800085.
- [17] Lin JF, Fan YM, Lin XR. Transformation of *Cryptococcus neoformans* by electroporation using a transient CRISPR-Cas9 expression (TRACE) system. *Fungal Genetics and Biology*, 2020, 138: 103364.
- [18] Sun DC, Wang L, Mao XD, Fei MY, Chen YY, Shen MJ, Qiu JP. Chemical transformation mediated CRISPR/Cas9 genome editing in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 2019, 41(2): 293–303.
- [19] Zuris JA, Thompson DB, Shu YL, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, Maeder ML, Joung JK, Chen ZY, Liu DR. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(1): 73–80.
- [20] Wang Y, Yang YN, Shi YR, Song H, Yu CZ. Antibiotic-free antibacterial strategies enabled by nanomaterials: progress and perspectives. *Advanced Materials*, 2020, 32(18): 1904106.
- [21] Cruz MD, Mi G, Webster TJ. Synthesis and characterization of biogenic selenium nanoparticles with antimicrobial properties made by *staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, and *pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 2018, 106(5): 1400–1412.
- [22] Verma R, Sahu R, Singh DD, Egbo TE. A CRISPR/Cas9 based polymeric nanoparticles to treat/inhibit microbial infections. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2019, 96: 44–52.
- [23] Bikard D, Euler CW, Jiang WY, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, Fischetti VA, Marraffini LA. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(11): 1146–1150.
- [24] 刘鸿博. 利用温和噬菌体载体递呈 CRISPR-Cas9 系统靶向清除细菌耐药性的研究. 军事科学院博士学位论文, 2019.
- [25] Palmer DJ, Turner DL, Ng P. A single “all-in-one” helper-dependent adenovirus to deliver donor DNA and CRISPR/Cas9 for efficient homology-directed repair. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, 2020, 17: 441–447.
- [26] Kim SM, Yang Y, Oh SJ, Hong Y, Seo M, Jang M. Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting. *Journal of Controlled Release*, 2017, 266: 8–16.
- [27] Hou GF, Zeng JW, Yang XC, Wang AY, Liu YX, Zeng JF, Guo GY, Yang N, Li Q, Zheng JP. Outer membrane vesicles as CRISPR/Cas9 system carrier for elimination of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Tropical Biology*, 2018, 9(3): 295–301. (in Chinese)
侯国锋, 曾家伟, 羊熙春, 王爱媛, 刘亚欣, 曾纪锋, 郭桂英, 杨诺, 李迁, 郑继平. CRISPR/Cas9 的外膜囊泡转运与无乳链球菌清除. 热带生物学报, 2018, 9(3): 295–301.
- [28] Miller SI. Antibiotic resistance and regulation of the gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. *mBio*, 2016, 7(5): e01541-16.
- [29] Wang Y, Wang SS, Chen WZ, Song LQ, Zhang YF, Shen Z, Yu FY, Li M, Ji QJ. CRISPR-Cas9 and CRISPR-assisted cytidine deaminase enable precise and efficient genome editing in *Klebsiella pneumoniae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(23): e01834-18.
- [30] Chen WZ, Zhang Y, Zhang YF, Pi YS, Gu TN, Song LQ, Wang Y, Ji QJ. CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species. *iScience*, 2018, 6: 222–231.
- [31] 杨勇. 靶向 OXA23 基因的 CRISPR-Cas9 载体系统构建. 宁夏医科大学硕士学位论文, 2019.
- [32] Kim JS, Cho DH, Park M, Chung WJ, Shin D, Ko KS, Kweon DH. CRISPR/Cas9-mediated re-sensitization of

- antibiotic-resistant *Escherichia coli* harboring extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(2): 394–401.
- [33] 姚文晔. CRISPR-Cas9 系统对大肠杆菌基因组的编辑和细菌耐药性逆转方面的研究. 厦门大学硕士学位论文, 2017.
- [34] Sun LC, He T, Zhang LL, Pang MD, Zhang QY, Zhou Y, Bao HD, Wang R. Generation of newly discovered resistance gene *mcr-1* knockout in *Escherichia coli* using the CRISPR/Cas9 system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(7): 1276–1280.
- [35] Dong HS, Xiang H, Mu D, Wang DC, Wang TD. Exploiting a conjugative CRISPR/Cas9 system to eliminate plasmid harbouring the *mcr-1* gene from *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 53(1): 1–8.
- [36] Wang PX, He DM, Li BY, Guo YX, Wang WQ, Luo XJ, Zhao XY, Wang XX. Eliminating *mcr-1*-harbouring plasmids in clinical isolates using the CRISPR/Cas9 system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2019, 74(9): 2559–2565.
- [37] 董海思. 应用 CRISPR/Cas9 技术消除大肠杆菌中多重耐药基因 *cfr* 的方法研究. 吉林大学硕士学位论文, 2016.
- [38] 仇海香. 动物源大肠杆菌 *GyrA* 突变与喹诺酮类药物耐药性的因果关系: 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的研究. 扬州大学硕士学位论文, 2017.
- [39] Müller V, Rajer F, Frykholm K, Nyberg LK, Quaderi S, Fritzsche J, Kristiansson E, Ambjörnsson T, Sandegren L, Westerlund F. Direct identification of antibiotic resistance genes on single plasmid molecules using CRISPR/Cas9 in combination with optical DNA mapping. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37938.
- [40] Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler Jr VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28(3): 603–661.
- [41] Chen WZ, Ji QJ. Genetic manipulation of MRSA using CRISPR/Cas9 technology//Ji YD. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) protocols: cutting-edge technologies and advancements. New York: Springer, 2020: 113–124.
- [42] Chen WZ, Zhang YF, Yeo WS, Bae T, Ji QJ. Rapid and efficient genome editing in *staphylococcus aureus* by using an engineered CRISPR/Cas9 system. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(10): 3790–3795.
- [43] Zhang YB, Wang JW. Study on drug resistance and genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Contemporary Medicine Forum*, 2020, 18(4): 120–124. (in Chinese)
- 张亚彬, 王佳伟. 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及耐药基因分型的探讨. 当代医药论丛, 2020, 18(4): 120–124.
- [44] 赵长隆. 金黄色葡萄球菌中基于 dCas9 的基因敲低系统的构建与应用. 中国科学技术大学硕士学位论文, 2016.
- [45] Chhotaray C, Tan YJ, Mugweru J, Islam MM, Hameed HMA, Wang S, Lu ZL, Wang CW, Li XJ, Tan SY, Liu JX, Zhang TY. Advances in the development of molecular genetic tools for *mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Genetics and Genomics*, 2018, 45(6): 281–297.
- [46] 肖婧. CRISPR 干扰系统的建立及其在分枝杆菌重要基因功能研究中的应用. 北京市结核病胸部肿瘤研究所博士学位论文, 2018.
- [47] Tong YJ, Charusanti P, Zhang LX, Weber T, Lee SY. CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes. *ACS Synthetic Biology*, 2015, 4(9): 1020–1029.
- [48] Wang QS, Xie F, Tong YJ, Habisch R, Yang BW, Zhang LX, Müller R, Fu CZ. Dual-function chromogenic screening-based CRISPR/Cas9 genome editing system for actinomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 225–239.
- [49] Mo JJ, Wang SW, Zhang W, Li CY, Deng ZX, Zhang LX, Qu XD. Efficient editing DNA regions with high sequence identity in actinomycetal genomes by a CRISPR-Cas9 system. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2019, 4(2): 86–91.
- [50] Maji B, Gangopadhyay SA, Lee M, Shi MC, Wu P, Heler R, Mok B, Lim D, Siriwardena SU, Paul B, Dančik V, Vetere A, Mesleh MF, Marraffini LA, Liu DR, Clemons PA, Wagner BK, Choudhary A. A high-throughput platform to identify small-molecule inhibitors of CRISPR-Cas9. *Cell*, 2019, 177(4): 1067–1079.
- [51] Chen SM, Yao YF, Zhang YC, Fan GF. CRISPR system: discovery, development and off-target detection. *Cellular Signalling*, 2020, 70: 109577.
- [52] Han HA, Pang JKS, Soh BS. Mitigating off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated *in vivo* gene editing. *Journal of Molecular Medicine*, 2020, 98(5): 615–632.
- [53] Najah S, Saulnier C, Pernodet JL, Bury-Moné S. Design of a generic CRISPR-Cas9 approach using the same sgRNA to perform gene editing at distinct loci. *BMC Biotechnology*, 2019, 19:

CRISPR-Cas9 technology in the prevention and control of antibiotic resistance

Peisi Li^{1,2,3}, Peng Wan^{1,2,3}, Xiaoshen Li^{1,2,3}, Shiyun Cui^{1,2,3}, Zhenling Zeng^{1,2,3*}

¹Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

²Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

³National Risk Assessment Laboratory for Antimicrobial Resistance of Animal Original Bacteria, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

Abstract: Recently, the emergence and global prevalence of many new antibiotic genes have led to a worldwide public health crisis. CRISPR-Cas9 (an adaptive immune system of bacteria) that can be used to cleave specific targets of resistant bacteria and against exogenous nucleic acid, serves a revolutionary gene editing tool to control antimicrobial resistance. Our previous study has established a plasmid-mediated CRISPR-Cas9 system targeting the *mcr-1* gene, to efficiently and specifically eliminate *mcr-1* gene and resensitize colistin resistant *E. coli*. Moreover, it is also necessary to optimize delivery methods of the CRISPR-Cas9 system for clinical treatment. This review focuses on the process of CRISPR-Cas9 technology in the prevention and control of antibiotic resistance in recent years, including the discovery process, mechanism, delivery method, advances in the experimental results *in vitro* and the existing problems, to provide new insights to the prevention and control of antibiotic resistance.

Keywords: CRISPR-Cas9 system, antibiotic resistance, gene targeted editing, bacterial genome, plasmid

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872524)

*Corresponding author. Tel: +86-20-85281204; Fax: +86-20-85284896; E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

Received: 13 August 2020; Revised: 14 September 2020; Published online: 23 September 2020