

CRISPR/Cas 系统在抗细菌感染领域的应用现状与进展

孙宗偶, 孙 琅*, 游雪甫*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 抗感染药物研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: CRISPR/Cas 基因编辑技术是 21 世纪分子生物学领域的一次重大突破, 该技术的便捷性、通用性、靶向性将其应用的范围推向各个领域。在目前细菌耐药形势严峻、耐药菌检测手段局限、抗感染药物研发缓慢的全球大背景下, CRISPR/Cas 基因编辑技术为抗细菌感染领域的发展提供了一些新的思路。一方面, CRISPR/Cas 基因编辑技术有助于对细菌功能研究的展开, 起到工具箱的作用, 如利用 Cas 蛋白和外源修复系统实现高效、精准的基因编辑, nCas 蛋白和脱氨酶系统实现无模板、单碱基精准编辑, dCas 蛋白和反转录酶实现免修复基因编辑, 以及 dCas 蛋白和改造后的 sgRNA 实现基因表达水平调控、基因功能解析。另一方面, 它特异性识别基因、靶向切割 DNA 的特点可用于病原体检测、消除耐药菌及耐药基因, 有望成为临床诊断和治疗的新策略。

关键词: CRISPR/Cas 系统; 基因编辑; 细菌; 耐药; 治疗

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)09-2560-09

Current advances of CRISPR/Cas system in antibacterial field

SUN Zong-ti, SUN Lang*, YOU Xue-fu*

(Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Agents, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: A breakthrough in molecular biology for the twenty-first century is CRISPR/Cas gene editing, which has been used in a variety of fields due to its simplicity, adaptability, and targeting. Given the current global challenge of severe bacterial resistance, difficulties in detecting antimicrobial resistance, and slow development of antimicrobial drugs, CRISPR/Cas gene-editing technology offers a promising avenue for the development of antibacterial treatments. On the one hand, CRISPR/Cas gene editing technology helps advance the study of bacterial functions and serves as a toolbox. For instance, Cas proteins and exogenous repair systems enable efficient and precise gene editing, nCas proteins and deaminase systems facilitate template-free and single base precision editing, dCas proteins and reverse transcriptase allow for repair-free gene editing, and dCas proteins and modified sgRNA enable gene expression level regulation and gene function analysis. On the other hand, its specific gene recognition and targeted DNA cleavage characteristics can be used for pathogen detection, elimination of drug-resistant bacteria and genes, and hold promise as a new strategy for clinical diagnosis and treatment.

Key words: CRISPR/Cas system; gene editing; bacteria; drug resistance; treatment

规律成簇间隔短回文序列 (clustered regularly interspaced short-palindromic repeat, CRISPR)/CRISPR

收稿日期: 2023-02-28; 修回日期: 2023-04-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32141003, 82104249); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2022-I2M-2-002, 2021-1-I2M-030).

*通讯作者 Tel: 86-10-67061033, E-mail: sunlang@imb.pumc.edu.cn;

Tel: 86-10-67010489, E-mail: xuefuyou@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0235

相关核酸内切酶 (CRISPR-associated endonuclease, Cas) 系统是细菌和古细菌的一种适应性免疫系统, 在大约 50% 的细菌和几乎所有的古菌, 甚至在 0.4% 的噬菌体中都有发现^[1,2]。CRISPR/Cas 系统是由相邻的两部分组成, 一部分是含有多个 Cas 基因的操纵子, 另一部分是一段非编码的 CRISPR RNA (crRNA)^[3]。CRISPR/Cas 系统可以靶向切割外源侵入的 DNA, 保

护微生物免受噬菌体和外来质粒的侵袭,保护遗传物质的完整性。

下面将对 CRISPR/Cas 系统的发现史、分类、作用机制及应用领域进行阐述。

1 CRISPR/Cas 系统的历史、分类、作用机制

1.1 CRISPR/Cas 系统的历史

CRISPR 序列的报道最早在 1987 年, Nakata 研究组在大肠杆菌中发现一组有规律间隔的重复序列,此后相似结构的重复序列陆续被报道发现,但具体的功能仍不清楚^[4]。直到 2005 年, CRISPR 序列中的间隔序列被 Mojica 研究组和 Pourcel 研究组^[5,6]发现可匹配上噬菌体序列且携带有噬菌体同源间隔序列的菌株不会被对应的噬菌体感染, CRISPR/Cas 系统逐渐与细菌免疫功能产生了联系。在随后的 2007 年,嗜热链球菌 CRISPR 序列中特定间隔序列改变影响细菌对噬菌体的抗性,证实 CRISPR 序列参与细菌的获得性免疫^[7]。2008 年, CRISPR/Cas 系统切割 DNA 的分子作用机制被报道—Cas 蛋白复合体 Cascade 在 crRNA 的引导下切割 DNA^[8]。自此, CRISPR 系统的神秘面纱被逐渐揭露,细菌的特异性免疫功能颠覆了人们对微生物的传统认知。

CRISPR/Cas 系统时代的到来是在实现体内外基因编辑之后。Emmanuelle 与 Jennife 的研究组^[9]合作在 2012 年首先实现了 CRISPR/Cas 系统的体外编辑,利用 Cas9 蛋白和反式激活 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)、crRNA 组成的向导 RNA (guide RNA, gRNA),成功靶向切割体外 DNA,两人因此获得了 2020 年诺贝尔化学奖。而张峰团队^[10]在 2013 年利用化脓性链球菌的 CRISPR/Cas9 系统首次完成了体内基因编辑,此后 CRISPR/Cas 基因编辑技术风靡全球。

1.2 CRISPR/Cas 系统分类

近年来,随着在各类细菌、古细菌、噬菌体中的 CRISPR/Cas 系统的研究, CRISPR/Cas 系统的数量和种类大幅增加,根据 Cas 蛋白组成差异、效应器中蛋白组合序列可将 CRISPR/Cas 系统分为两大类,第一大类的特点是由多个 Cas 蛋白复合物组成的生物效应器,其中能够发挥 DNA 切割功能的是 Cas 蛋白与 crRNA 复合物,目前第一大类有 I、III、IV 型,可细分为 16 个亚型^[11]。而第二大类系统所涵盖的 II、V、VI 型可分为 17 个亚型,不同于第一大类的是,第二大类的效应器是单一的多结合域的蛋白质,目前在基因编辑领域广泛应用的 Cas9、Cas12、Cas13 都属于第二大类^[11]。

1.3 CRISPR/Cas 系统的作用机制

CRISPR/Cas 系统特异性免疫机制包括 3 个阶段,分别是适应 (adaption)、合成 (biogenesis) 和干扰

(interference)。以现在应用最多的嗜热链球菌 CRISPR/Cas9 系统为例,它包括 CRISPR 序列、编码 Cas 蛋白的操纵子、编码 tracrRNA 的序列 (图 1)。CRISPR 序列包括重复的短回文序列 (repeats) 和重复序列之间的特异间隔序列 (spacer); 编码 Cas 蛋白的操纵子可表达 Cas9、Cas1、Cas2、Csn2 四个 Cas 蛋白。当病毒激活细菌适应性免疫后,细菌通过 Cas 蛋白 Cas1、Cas2、Csn2 识别入侵病毒 DNA 中的 protospacer 序列并将这一段序列整合到 CRISPR 序列中形成 spacer,获得该入侵核酸的识别码;在 crRNA 识别过程中, CRISPR 序列和 tracrRNA 序列被转录成相应的 crRNA 前体 (precursor CRISPR RNA, pre-crRNA) 和 tracrRNA,这两种 RNA 序列通过互补杂交后再被 Cas9 和 RNase III 修饰成含有特异性 spacer 的 crRNA,从而形成 crRNA、tracrRNA、Cas9 的复合物,当病毒再次入侵时, crRNA 通过序列互补识别入侵核酸的 protospacer,将复合物引导至目标靶点。最后, Cas9 蛋白与 protospacer 下游的 PAM (proto-spacer adjacent motifs) 序列结合,在 PAM 序列上游 3 个碱基的位置切割 DNA,达到消灭入侵核酸的目的^[9]。

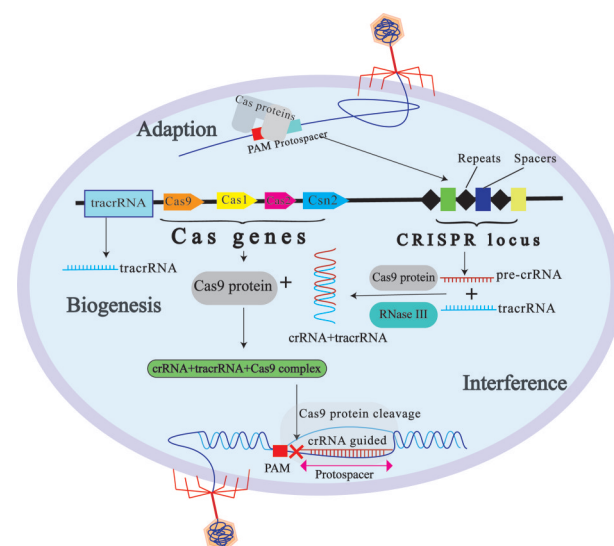


Figure 1 Specific immunity mechanism of *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system. CRISPR: Clustered regularly interspaced short-palindromic repeat; Cas: CRISPR-associated endonuclease

Cas9 蛋白在 crRNA 的引导下能特异性靶向切割外来的 DNA 序列,这种特性让 CRISPR/Cas9 系统在 crRNA 引导下,切割任意目标位点实现基因编辑。目前基因编辑的 CRISPR/Cas9 系统主要包括 Cas9 蛋白和单向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA), sgRNA 由 tracrRNA 和 crRNA 两部分组成。sgRNA 通过序列互

补识别 protospacer, 引导 Cas9 蛋白精准定位至下游的 PAM 序列, 切割目的核酸造成双链断裂 (double-strand break, DSB), 宿主通过非同源末端连接或同源修复模板的方式修复 DSB, 实现基因插入或敲除^[10]。

2 CRISPR/Cas 系统在细菌领域的应用

2.1 CRISPR/Cas 基因编辑工具箱在细菌中的应用

2012 年 CRISPR/Cas 系统被证明可以进行基因编辑后, 分子生物学开启了 CRISPR/Cas 系统基因编辑时代。CRISPR/Cas 技术如同一个基因编辑工具箱, 包含多种基因编辑工具, 可应用于细菌领域的各个方面。基于 Cas 蛋白切割特性的 CRISPR/Cas 基因编辑技术可实现细菌基因的敲除、插入、点突变; 基于 Cas 蛋白的变体 nCas (nickase Cas, partially dead) 蛋白的 CRISPR/Cas 基因编辑技术可实现无模板、单碱基精准编辑; 基于失去核酸酶活性的 dCas (dead Cas) 蛋白的 CRISPR/Cas 基因编辑技术可实现无模板基因编辑、基因表达水平调控、基因功能解析等。

2.1.1 基于 CRISPR/Cas 系统的细菌基因编辑技术

细菌作为生物生产的重要平台, 如生产次级代谢产物^[12]、重组蛋白^[13]和生物燃料^[14]等, 对细菌基因进行改造有助于释放生产潜力, 因此设计合适的 CRISPR/Cas 基因编辑工具尤为重要。基于 CRISPR/Cas 系统的细菌基因编辑技术通常将 Cas 蛋白、sgRNA、重组酶系统构建到外源的质粒上, 将外源质粒导入细菌, 通过 sgRNA 上的 spacer 靶向切割目的基因造成双链断裂, 然后重组酶系统利用外源模板实现同源重组, 最终达到敲除、敲入的目的。在被发现的 CRISPR/Cas 系统中, 应用最广泛的是化脓链球菌的 CRISPR/Cas9 系统, 研究人员将它和外源性的 DSB 修复方式进行组合, 同时又对 Cas9 蛋白结构进行改造, 以获得更高效、更精准、更简洁的基因编辑工具。目前, 常用的修复方式是利用噬菌体衍生的重组酶系统提高基因编辑的成功率, 最早使用的重组酶是 λ Red 噬菌体重组酶系统^[15], 后来又筛选出谷氨酸棒状杆菌的 RecT (recombinase T) 重组酶系统^[16]。此外, 化脓链球菌的 Cas9 蛋白 (*Streptococcus pyogenes* Cas9, SpCas9) 的变体 SpG, 消除了 PAM 位点的要求, 提高了基因编辑的灵活性^[17]。除了 Cas9 蛋白, 后来发现的 Cas12a 蛋白也有基因编辑的能力, 它通过识别富含 T 的序列 5'-TTTV, 在 PAM 的远端位点发挥切割作用, 虽然只有一个核酸酶结构域 RuvC, 但是具有独立的 RNase 活性, 并且在发挥切割功能时只需要 crRNA 引导, 在靶点处形成交错的双链断裂, 更利于修复^[18], 但它的切割活性较弱^[19]。所以, 研究者可以在系统评估 Cas9 和 Cas12a 的特点后, 根据不同菌株特点使用不同类型的 CRISPR/Cas 系统, 来实

现基因编辑的目的。

2.1.2 基于 CRISPR/Cas 系统的免修复编辑技术

由于 CRISPR/Cas 技术对细菌必要基因进行编辑可能会影响细菌基本的生理功能, 甚至无法存活。在修复 DSB 时使用的 DNA 模板可能会在基因编辑过程中导致细菌基因组中某些序列被意外改变。为了细菌的基因能够在完成编辑后稳定表达且其他基本生理功能不受影响, 研究人员在 CRISPR/Cas 系统基础上研发了不需要使用外源性模板的 DNA 免修复编辑技术, 碱基编辑器 (base editing, BE) 是其中之一, 该技术提出的初衷是在不造成目标基因组受损的情况下, 利用改造后的脱氨酶完成精准的基因编辑^[20]。

目前的研究主要有胞苷碱基编辑系统 (cytidine deaminase-mediated base editing, CBE) 和腺苷碱基编辑系统 (adenine deaminase-mediated base editing, ABE), 它们设计思路是诱导外源性质粒在细菌内表达 nCas 蛋白、脱氨酶和 sgRNA, 缺乏核酸酶活性的 nCas 蛋白在 sgRNA 的引导下结合在 DNA 靶点处解离局部双链, 在没有外源性 DNA 模板、不造成 DNA 双链断裂的情况下, 通过脱氨酶在靶点将一对碱基转换成另一对碱基—CBE 系统实现碱基 C 到 T 的替换, ABE 系统实现 A 到 G 的替换^[21,22]。CBE 系统已经广泛应用在真核生物和一部分细菌的基因编辑, 但是 ABE 系统应用主要还是在真核生物中。在链霉菌中, Tong 和 Christopher 的团队^[23]开发了 Cas9n:sgRNA 为递送系统的 CRISPR-BEST 基因编辑平台, 其中包含胞苷脱氨酶 rAPOBEC1 的 CRISPR-cBEST 和腺苷脱氨酶 ecTadA 的 CRISPR-aBEST 两个系统, 在实验中表现出了很低的脱靶率。在大肠杆菌中, Banno 等^[24]把胞苷脱氨酶 PmCDA1 融合到核酸酶缺陷型 CRISPR/Cas9 系统中, 实现了将 C 转化为 T 的特异性点突变。季泉江团队^[25-27]不仅利用胞苷脱氨酶 rAPOBEC1 开发了鲍曼不动杆菌、假单胞菌、肺炎克雷伯菌的 CBE 系统, 他们还将腺嘌呤脱氨酶 ABE7.10 和 spCas9 D10A 蛋白结合, 开发出大肠杆菌和金葡菌的 ABE 系统^[28]。除了作用在 DNA, 张峰团队^[29]将部分失活的 CRISPR/Cas13 系统和腺嘌呤脱氨酶 ADAR2 结合, 开发出 RNA 碱基编辑工具—用于 C 到 U 的转换 (RNA editing for specific C to U exchange, RESCUE)。

随着 Cas 蛋白和脱氨酶的新组合不断被开发, 可编辑目标从 DNA 拓展到 RNA, CRISPR/Cas 碱基编辑技术在细菌中的适用范围不断扩大, 但是细菌的生理代谢活动是受到多基因控制的, 因此开发一个能有效、系统地对多个基因同时进行原位编辑的工具是必要的。最近有一款乳酸乳球菌的多位点碱基编辑器—

CRISPR-脱氨酶辅助碱基编辑器 (CRISPR-deaminase-assisted base editor, CRISPR-DBE) 被开发出来, 并且它的基因编辑效率高于单碱基编辑^[30], 可见多位点碱基编辑器的开发是 CRISPR/Cas 系统基因编辑工具的前进方向之一。

BE 虽然是一种强大的基因编辑工具, 但它只能进行单核苷酸的替换, 不能进行大片段的基因插入与敲除, 这就限制了它在免修复基因编辑中的应用范围。柳暗花明的是, 研究人员根据另一种缺少核酸酶活性的 dCas 蛋白设计了一套新的基因编辑系统——引物编辑器 (prime editing, PE), 该系统通过 dCas9 蛋白与逆转录酶的复合体在引物编辑向导 RNA (prime editing guide RNA, pegRNA) 的引导下, 到达基因靶点处后切割 DNA 的一条链, 然后反转录酶利用 RT 模板 (RT template, RTT) 进行反转录, 实现碱基转换和基因的插入、敲除、突变^[31]。PE 已在动植物细胞中实现了无 DSB、无模板编辑^[32,33], 如在 HEK293T 细胞中, PE 系统可以实现插入、敲除等多碱基编辑和靶向单碱基替换, 并且它脱靶率低于 CRISPR/Cas9 系统, 单碱基编辑效果又优于 BE 系统^[31]。虽然 PE 在真核生物中表现出良好的效果, 但在细菌中的研究进展缓慢, 最近的一项研究表明, PE 系统在大肠杆菌中使用, 在宿主细胞内表现出极高的保真度, 但是编辑效率随着插入或敲除基因片段大小的增加而急剧下降^[34]。PE 提供了一种细菌基因编辑的新方法, 可以用来解决 CRISPR/Cas9 系统造成的细胞毒性和脱靶的问题。

除了 BE/PE 系统外, 2020 年出现了一款基于转座子设计的霍氏双歧蓝细菌 CRISPR 相关转座酶 (*Scytonema hofmanni* CRISPR-associated transposase, ShCAST) 系统, ShCAST 系统由一种来自霍氏双歧蓝细菌 (*Scytonema hofmanni*) 的 Tn7 转座子、一种 V 型 Cas 蛋白 (Cas12k) 和 sgRNA 组成, 该系统通过双质粒系统发挥作用, 一个质粒用于表达由转座子酶、Cas 蛋白和 sgRNA 组成的复合物, 另一个携带有目的基因的转座子序列, 当复合物定位在靶点处时, 转座子酶在 PAM 序列下游 60~66 bp 处插入目的基因, 它成功地将一段 2.5 kb 的片段插入到大肠杆菌基因组中的靶点位置^[35], 2022 年, ShCAST 系统成功将 30 kb 的超长序列插入到奥奈达希瓦氏菌 MR-1 (*Shewanella oneidensis* MR-1) 的基因组中^[36]。虽然现在 ShCAST 系统只能插入不超过 30 kb 的序列, 插入位点受到转座子位点限制, 并且其脱靶率较高等^[36], 但是它也提供了一种无须使用同源重组修复机制的基因编辑的新方法。除了基因编辑之外, ShCAST 系统还可以进行高通量分析细菌的基因型与表型的关系, 在此基础上开

发的特异性位点转座子辅助基因工程 (site-specific transposon-assisted genome engineering, STAGE) 平台, 对临床耐药铜绿假单胞菌的抗性相关基因进行了鉴定, 其中又新发现了 rsmA、dksA、hptB 和 ampDh2 四个与亚胺培南、头孢他啶抗性相关基因^[37]。总之, STAGE 不仅具有基因编辑的潜力, 还是一种高通量筛选鉴别基因型表型可靠、有效的工具。

2.1.3 基于 CRISPR/Cas 工具箱的基因调控技术 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以根据需要敲除或插入目的基因, 对细菌进行基因改造后的应用是一劳永逸, 但是由于 DSB、过表达引起的细胞毒性, 不能适应于大部分细菌中^[38]。由上文得知, BE/PE 系统中的 dCas9 蛋白结合到基因组的靶点位置时, 不能切割 DNA 或者只能切割单链^[39], 在此基础上, 可以利用该特点设计出调控细菌转录水平的工具, 以达了解、运用细菌的目的。

CRISPR/Cas 系统调控细菌转录水平的研究, 主要有抑制基因表达的 CRISPR (CRISPR interference, CRISPRi) 系统和激活基因表达的 CRISPR (CRISPR activation, CRISPRa) 系统。CRISPRi/a 系统构成相对简单, 只需诱导外源性质粒表达 dCas9 蛋白和 sgRNA 两部分, CRISPRi 系统通过 dCas9 蛋白在 sgRNA 引导下靶向结合目的 DNA, 利用物理隔离的方式阻止 RNA 聚合酶的延伸, 起到抑制转录起始或延伸的作用^[40]。而 CRISPRa 系统在 dCas9 蛋白与 sgRNA 组成的复合体的基础上对 sgRNA 进行修饰, 增加 RNA 结合酶 (RNA binding proteins, RBPs) 位点, 通过 RBPs 募集转录激活因子激活 RNA 聚合酶 (RNA polymerase, RNAP) 实现靶向转录激活的作用^[41]。

CRISPRi 系统在细菌中应用比较广泛, 不仅可以控制生物反应器合成正丁醇、萜类化合物、聚羟基链烷酸酯等工业产品, 同时还可以通过抑制不同基因实现多基因转录水平的控制^[42,43]。除此之外, CRISPRi 系统还可以检测细菌基因功能, 与传统的转座子测序 (transposon sequencing, Tn-seq) 研究相比, CRISPRi-seq 建库简单、靶向基因范围广, 可检测细菌全基因在不同条件下表达情况^[44,45]。而 CRISPRa 由于缺乏有效的基因转录激活因子, 导致它在细菌的应用发展缓慢, 最初是针对 dCas9 蛋白进行改造, 如利用 RNAP 结合 σ 因子启动转录的机制, 将 dCas9 蛋白与 RNAP 酶的 ω 亚基结合来激活转录^[46], 之后又将细菌增强子结合蛋白 (bacterial enhancer binding protein, bEBP) 与 dCas9 复合体结合后, 通过识别 σ 54 增强转录水平^[47]。后来又有针对性对于 sgRNA 的研究, 在 2018 年, sgRNA 被改造成支架 RNA (scaffold RNA, scRNA) 后, 通过识别转录因

子 SoxS 实现基因的转录激活^[41]。最近,一个筛选细菌 CRISPR/Cas 转录激活因子的系统被开发出来^[48],并通过该系统研发出了一种新型 CRISPRa 激活剂—dCas9-AsiA,它在与不同启动子结合后,能够激活基因表达超过 200 倍。总之,随着 CRISPRa/i 技术越来越成熟,可以利用二者选择性激活和抑制的特点实现基因的程序化表达,能帮助研究者更好地控制细菌代谢过程。

至此,CRISPR/Cas 系统像一条线把之前联系甚少的事物连接到了一起,如利用脱氨酶和反转录酶建立起 BE/PE 系统,利用转座子系统建立的 ShCAST 系统,利用 dCas 蛋白建立起调控细菌转录水平的 CRISPRi/a 系统等。CRISPR/Cas 系统不仅是一种基因编辑的新方法,更是一种解决问题的新思路,可以让研究者更充分地运用以往的研究,利用不同的 CRISPR/Cas 系统与不同的组分相结合,开发出更适合了解、改造细菌的工具。

2.2 CRISPR/Cas 作为防治耐药菌的潜力手段

抗生素的不合理使用引起耐药菌种类和耐药机制不断更新,新型有效的抗菌药物研发缓慢,导致细菌耐药已经成为全球的公共卫生安全问题之一。2017 年世界卫生组织发布了新型抗生素研发重点病原体清单,用以指导新的抗菌药物的研发,因为细菌耐药性、毒力特征不同,在临床上以肠杆菌属、金葡菌等为代表的 ESKAPE (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp.) 病原菌最为棘手^[49],因此急需新的有效的治疗方法。除此之外,清楚耐药菌种类、耐药机制对于治疗事半功倍,但是现在如纸片法、肉汤稀释法、PCR 技术、质谱法等诊断方法需要时间、设备成本,不能做到现场快速诊断,尤其在治疗脓毒症时不能及时甄别病原菌常导致病情延误^[50]。

CRISPR/Cas 系统的特异性识别、切割 DNA 的特点提供了一种治疗、诊断耐药菌的新方向,在治疗细菌感染时能做到传统抗生素做不到的靶向消灭目的病原菌不损害原有的微生物群落,还可以破坏耐药基因、恢复细菌对现有抗生素的敏感性,有望缓解目前细菌耐药和新药研发缓慢的问题。此外,在诊断病原菌类型时可以做到又快又准,降低临床检测的时间、经济成本,减少抗生素治疗细菌感染的盲目性,如下文即将提到的 TB-QUICK、SHERLOCK 系统。CRISPR/Cas 系统为基础研发的抗菌剂在消除、抑制细菌方面有着很大潜力,虽大多还停留在实验阶段,但它仍是解决细菌耐药的一个突破点。

2.2.1 耐药基因、耐药菌的消除和治疗 在同一环境

中,耐药基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 往往在细菌之间通过转导、转化或接合等方式传播,从而导致大面积的细菌耐药。2021 年,通过预测已知 ARG 的传播潜力,发现 β -内酰胺类、磺胺类、氨基糖苷类和四环素类耐药基因更容易在革兰阴性菌中进行传播,从而引起细菌高度耐药,其中肠杆菌科的耐药基因交换最为频繁^[51],所以消除耐药基因可以降低耐药菌的产生。CRISPR/Cas 系统要发挥作用,首要解决的是将改造后的 CRISPR/Cas 系统送入细菌内,实验室常用电转化的方式递送,通过高压电脉冲送入细菌内,除此之外,还有将 CRISPR/Cas 系统插入到噬菌体的基因组中,通过病毒感染传递,以及通过细菌的接合转移递送含有 CRISPR/Cas 系统的质粒。下面将结合递送方式阐述 CRISPR/Cas 系统实现耐药基因及耐药菌的消除。

2019 年,细菌作为供体携带能表达 Cas9 基因的质粒—pMBLcas9-sgRNA,成功消除了受体菌中的 mcr-1 质粒^[52]。2020 年,一种质粒介导的新型 CRISPR/Cas9 系统—pCasCure,通过电转化进入到临床分离的耐碳青霉烯的肠杆菌科 (Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) 中,有效地消除几种流行的携带碳青霉烯类耐药基因的质粒,如携带 *bla*_{KPC}、*bla*_{OXA-48}、*bla*_{NDM} 的质粒^[53]。向环境中引入携带 CRISPR/Cas 系统的细菌也可以实现消除耐药基因的作用,接合质粒 TP114 与 CRISPR/Cas9 系统进行组合,以可接合型工程菌 (conjugative probiotic, COP) 作为质粒载体,通过细菌间的接合转移成功消除了小鼠肠道中超过 99.9% 耐氯霉素的菌株^[54]。

CRISPR/Cas 系统不仅可以用于消除耐药基因,还能通过靶向染色体和质粒上的基因发挥特异性杀菌作用^[55,56],含有 CRISPR/Cas 系统的质粒通过电转化的方式递送到细菌内,再通过诱导剂诱导外源性 pCasA-E、pCas3 表达,携带目的基因 spacer 的 pCRISPR 质粒合成 gRNA 引导 Cas 蛋白切割目的基因,可以在有大量基因组高度同源不同菌株的菌液中杀死目的菌株^[57]。通常在人体中有大量的共生菌参与生理活动、维持机体稳态,在肠道菌群中耐药基因传播是普遍存在的,由于大多数抗生素缺乏特异性,大剂量的使用一定会破坏正常菌群,从而又引起肠道菌群紊乱^[58]。在住院的患者中,接受长期抗菌治疗导致的艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 感染引起的急性腹泻非常常见,继续使用抗生素治疗又会导致艰难梭菌耐药,引起腹泻反复,所以保护共生菌、消除致病菌是治疗的关键。目前,通过噬菌体携带 CRISPR 序列利用艰难梭菌内源性 CRISPR/Cas 系统,在不影响其他正常菌群的情况下,成功消除了小鼠肠道内艰难梭菌和耐药基因^[59]。除对肠道菌群

的研究外,噬菌体还将化脓链球菌 CRISPR/Cas9 系统和 CRISPR 序列导入细菌内,成功杀死了小鼠皮肤模型中携带耐药基因的金葡萄菌,而正常定植的金葡萄菌没有受到牵连^[60]。

2.2.2 病原菌诊断技术 最初结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 可根据 CRISPR 序列进行分型,在 PCR 技术基础上建立的 Spoligotyping (Spacer OLIGONucleotide TYPING) 平台可以通过 CRISPR 序列,甄别出与牛支原体 (*Mycoplasma bovis*) 混合的结核分枝杆菌,这是传统方法做不到的^[61],此后相继出现了鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*)、化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 种属鉴定的技术模型^[62]。2021 年,报道了一种用于诊断结核分枝杆菌的方法—TB-QUICK,该方法将环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术与 CRISPR/Cas12b 系统进行组合,通过 CRISPR/Cas 系统结合并识别扩增后的靶基因 IS6110,再利用侧流检测 (LFT-lateral flow test) 反馈结果,实现快速精准识别^[63]。Gootenberg 和张峰的团队^[64]在 Cas13a 蛋白可以切割 RNA 的基础上建立了 SHERLOCK (specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking) 检测平台,成功鉴别出具有碳青霉烯酶基因和 NDM-1 基因的肺炎克雷伯菌临床分离株,该平台具有灵敏度高、特异性强、成本低的优点。在第二年, SHERLOCK 平台进行优化升级,将 Cas13 与 Csm6 (一种 CRISPR 系统辅助因子) 结合,得到了 SHERLOCKv2,检测的灵敏度提高了 3.5 倍,新平台的重复利用率高、检测限更低并且可以用试纸观察结果^[65]。此外,还有一款 CRISPR/Cas12a 为基础设计的生物传感器,可以检测食物中的沙门氏菌,检测时间短、迅速、检测线灵敏、结果特异性高,十分有希望发展为临床病原菌新的检测技术^[66]。

由此看来,CRISPR/Cas 系统可塑性极强,具有治疗、预防、检验的潜力,可以根据它的特点改进现在的技术手段,使之更快地实现临床价值。

3 总结与展望

在 CRISPR/Cas 技术出现之前的细菌基因编辑如自杀质粒虽然成本低、可以大范围破坏基因,但是效率很低、假阳性率高、筛选难度高^[67]; λ -red 重组虽然效率高,但是需要外源性重组酶、抗性标记基因难清除^[67]; ClosTron 方法目前只在梭状芽孢杆菌中进行了测试,而且成本高^[67]。CRISPR/Cas9 技术在基因编辑时可以做到精准、高效、便捷,极大节约了时间、经济成本,降低了准入门槛,让基因编辑这项技术实现了“平民”化^[67]。限制 CRISPR/Cas 系统应用的主要问题

有脱靶效应、递送系统和细胞毒性。在基因编辑中,脱靶是必须解决的问题,现在可以通过对 gRNA 的 GC 含量、长度、磷酸骨架进行修饰,或改造 Cas 蛋白,或改良 CRISPR 系统递送方法去降低脱靶的概率^[68]。最近发现的由噬菌体基因编码合成的抗 CRISPR 蛋白可以准确高效地调节 CRISPR/Cas 系统的活性,减少脱靶后的影响,如李斯特菌的噬菌体编码的 AcrIIA2 和 AcrIIA4 蛋白可以降低化脓性链球菌 Cas9 的活性^[69]。2021 年报道了一种基于靶向抗菌质粒 (targeted-antibacterial-plasmids, TAPs) 的抗菌方法,并设计了一种算法—CSTB (Crispr Search Tool for Bacteria, <https://cstb.ibcp.fr>) 可以提高 CRISPR/Cas 系统靶向的精准度^[70]。

CRISPR/Cas 系统起效的关键是设计合适的递送系统,噬菌体作为常见的递送系统,可以将 CRISPR/Cas 系统导入到宿主细菌中,达到杀灭病原微生物及消除耐药基因的目的,但细菌也会对噬菌体产生耐受降低递送效率^[56]。用携带有多质粒系统的细菌植入可以更有效地解决环境中耐药菌,但质粒的不相容性导致细菌不容易携带多个质粒系统,甚至会影响目标质粒进入耐药菌中^[71],因此如何提高递送的效率仍需继续探索。

CRISPR/Cas 系统的过表达和造成的 DSB 是引起细胞毒性的主要原因^[67],目前出现了很多的解决方法,如前文讲的 PE/BE 系统、ShCAST 系统、CRISPR/Cas12a 系统、CRISPRi/a 调控等。虽然在一定程度上缓解了细胞毒性,但缺点如无法进行大片段编辑、适应范围窄等依然存在,至今仍缺少一种完美解决的方法。

总之,在大自然长期的进化筛选中,研究者发现了细菌特异性免疫系统—CRISPR/Cas 系统,古人云:“师夷长技以制夷”,它不仅可以用于细菌的基因编辑,还可以用于代谢工程、耐药菌防治等,但缺陷仍是存在的,如脱靶、毒性等,需要继续深入研究,相信终有一天研究者可以灵活应用在每一个领域。

作者贡献: 孙宗侗负责文献收集整理、阅读、文章构思、撰写和审阅;孙琅参与文章构思,并负责内容讨论、审阅和校对;游雪甫参与文章审阅和校对。

利益冲突: 所有作者声明本研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems [J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13: 722-736.
- [2] Al-Shayeb B, Skopintsev P, Soczek KM, et al. Diverse virus-encoded CRISPR-Cas systems include streamlined genome editors [J]. Cell, 2022, 185: 4574-4586.e16.

- [3] Zhang F. Development of CRISPR-Cas systems for genome editing and beyond [J]. *Q Rev Biophys*, 2019, 52: e6.
- [4] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the IAP gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5429-5433.
- [5] Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *J Mol Evol*, 2005, 60: 174-182.
- [6] 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 [J]. *Microbiology*, 2005, 151: 653-663.
- [7] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315: 1709-1712.
- [8] Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, 321: 960-964.
- [9] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337: 816-821.
- [10] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339: 819-823.
- [11] Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18: 67-83.
- [12] Ruiz B, Chávez A, Forero A, et al. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2010, 36: 146-167.
- [13] Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30: 1102-1107.
- [14] Liao JC, Mi L, Pontrelli S, et al. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14: 288-304.
- [15] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 233-239.
- [16] Wang B, Hu Q, Zhang Y, et al. A RecET-assisted CRISPR-Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Microb Cell Fact*, 2018, 17: 63.
- [17] Walton RT, Christie KA, Whittaker MN, et al. Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants [J]. *Science*, 2020, 368: 290-296.
- [18] Meliawati M, Schilling C, Schmid J. Recent advances of Cas12a applications in bacteria [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105: 2981-2990.
- [19] Liu Z, Dong H, Cui Y, et al. Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria [J]. *Microb Cell Fact*, 2020, 19: 172.
- [20] Yang L, Briggs AW, Chew WL, et al. Engineering and optimising deaminase fusions for genome editing [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13330.
- [21] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage [J]. *Nature*, 2017, 551: 464-471.
- [22] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J]. *Nature*, 2016, 533: 420-424.
- [23] Tong Y, Whitford CM, Robertsen HL, et al. Highly efficient DSB-free base editing for streptomycetes with CRISPR-BEST [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116: 20366-20375.
- [24] Banno S, Nishida K, Arazoe T, et al. Deaminase-mediated multiplex genome editing in *Escherichia coli* [J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 423-429.
- [25] Wang Y, Wang Z, Chen Y, et al. A highly efficient CRISPR-Cas9-based genome Engineering platform in *Acinetobacter baumannii* to understand the H₂O₂-sensing mechanism of OxyR [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26: 1732-1742.e5.
- [26] Chen W, Zhang Y, Zhang Y, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species [J]. *iScience*, 2018, 6: 222-231.
- [27] Wang Y, Wang S, Chen W, et al. CRISPR-Cas9 and CRISPR-assisted cytidine deaminase enable precise and efficient genome editing in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2018, 84: e01834-18.
- [28] Zhang Y, Zhang H, Wang Z, et al. Programmable adenine deamination in bacteria using a Cas9-adenine-deaminase fusion [J]. *Chem Sci*, 2020, 11: 1657-1664.
- [29] Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Franklin B, et al. A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing [J]. *Science*, 2019, 365: 382-386.
- [30] Tian K, Hong X, Guo M, et al. Development of base editors for simultaneously editing multiple loci in *Lactococcus lactis* [J]. *ACS Synth Biol*, 2022, 11: 3644-3656.
- [31] Anzalone AV, Randolph PB, Davis JR, et al. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA [J]. *Nature*, 2019, 576: 149-157.
- [32] Liu Y, Li X, He S, et al. Efficient generation of mouse models with the prime editing system [J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 27.
- [33] Lin Q, Zong Y, Xue C, et al. Prime genome editing in rice and wheat [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 582-585.
- [34] Tong Y, Jørgensen TS, Whitford CM, et al. A versatile genetic engineering toolkit for *E. coli* based on CRISPR-prime editing [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 5206.
- [35] Strecker J, Ladha A, Gardner Z, et al. RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases [J]. *Science*, 2019, 365: 48-53.

- [36] Cheng ZH, Wu J, Liu JQ, et al. Repurposing CRISPR RNA-guided integrases system for one-step, efficient genomic integration of ultra-long DNA sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: 7739-7750.
- [37] Chen W, Ren ZH, Tang N, et al. Targeted genetic screening in bacteria with a Cas12k-guided transposase [J]. *Cell Rep*, 2021, 36: 109635.
- [38] Cho S, Choe D, Lee E, et al. High-level dCas9 expression induces abnormal cell morphology in *Escherichia coli* [J]. *ACS Synth Biol*, 2018, 7: 1085-1094.
- [39] Cho S, Shin J, Cho BK. Applications of CRISPR/Cas system to bacterial metabolic engineering [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1089.
- [40] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152: 1173-1183.
- [41] Dong C, Fontana J, Patel A, et al. Synthetic CRISPR-Cas gene activators for transcriptional reprogramming in bacteria [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 2489.
- [42] Kim SK, Seong W, Han GH, et al. CRISPR interference-guided multiplex repression of endogenous competing pathway genes for redirecting metabolic flux in *Escherichia coli* [J]. *Microb Cell Fact*, 2017, 16: 188.
- [43] Kim SK, Han GH, Seong W, et al. CRISPR interference-guided balancing of a biosynthetic mevalonate pathway increases terpenoid production [J]. *Metab Eng*, 2016, 38: 228-240.
- [44] Liu X, Kimmey JM, Matarazzo L, et al. Exploration of bacterial bottlenecks and *Streptococcus pneumoniae* pathogenesis by CRISPRi-Seq [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29: 107-120.e6.
- [45] De Bakker V, Liu X, Bravo AM, et al. CRISPRi-seq for genome-wide fitness quantification in bacteria [J]. *Nat Protoc*, 2022, 17: 252-281.
- [46] Bikard D, Jiang W, Samai P, et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 7429-7437.
- [47] Liu Y, Wan X, Wang B. Engineered CRISPRa enables programmable eukaryote-like gene activation in bacteria [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3693.
- [48] Ho HI, Fang JR, Cheung J, et al. Programmable CRISPR-Cas transcriptional activation in bacteria [J]. *Mol Syst Biol*, 2020, 16: e9427.
- [49] González De Aledo M, González-Bardanca M, Blasco L, et al. CRISPR-Cas, a revolution in the treatment and study of ESKAPE infections: pre-clinical studies [J]. *Antibiotics*, 2021, 10: 756.
- [50] Khwannimit B, Bhurayanontachai R. The direct costs of intensive care management and risk factors for financial burden of patients with severe sepsis and septic shock [J]. *J Crit Care*, 2015, 30: 929-934.
- [51] Ellabaan MMH, Munck C, Porse A, et al. Forecasting the dissemination of antibiotic resistance genes across bacterial genomes [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 2435.
- [52] Wang P, He D, Li B, et al. Eliminating mcr-1-harboring plasmids in clinical isolates using the CRISPR/Cas9 system [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74: 2559-2565.
- [53] Hao M, He Y, Zhang H, et al. CRISPR-Cas9-mediated carbapenemase gene and plasmid curing in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64: e00843-20.
- [54] Neil K, Allard N, Roy P, et al. High-efficiency delivery of CRISPR-Cas9 by engineered probiotics enables precise microbiome editing [J]. *Mol Syst Biol*, 2021, 17: e10335.
- [55] Vercoe RB, Chang JT, Dy RL, et al. Cytotoxic chromosomal targeting by CRISPR/Cas systems can reshape bacterial genomes and expel or remodel pathogenicity islands [J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9: e1003454.
- [56] Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1141-1145.
- [57] Goma AA, Klumpe HE, Luo ML, et al. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems [J]. *mBio*, 2014, 5: e00928-13.
- [58] McInnes RS, McCallum GE, Lamberte LE, et al. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2020, 53: 35-43.
- [59] Selle K, Fletcher J R, Tuson H, et al. *In vivo* targeting of *Clostridioides difficile* using phage-delivered CRISPR-Cas3 antimicrobials [J]. *mBio*, 2020, 11: e00019-20.
- [60] Bikard D, Euler CW, Jiang W, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 1146-1150.
- [61] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 907-914.
- [62] Pourcel C, Drevet C. Occurrence, diversity of CRISPR-Cas systems and genotyping implications [M]// Barrangou R, Van Der Oost J. *CRISPR-Cas Systems: RNA-mediated Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 33-59.
- [63] Sam IK, Chen YY, Ma J, et al. TB-QUICK: CRISPR-Cas12b-assisted rapid and sensitive detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Infect*, 2021, 83: 54-60.
- [64] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 [J]. *Science*, 2017, 356: 438-442.
- [65] Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, et al. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6 [J]. *Science*, 2018, 360: 439-444.

- [66] Ma L, Peng L, Yin L, et al. CRISPR-Cas12a-powered dual-mode biosensor for ultrasensitive and cross-validating detection of pathogenic bacteria [J]. *ACS Sens*, 2021, 6: 2920-2927.
- [67] Arroyo-Olarte RD, Bravo Rodríguez R, Morales-Ríos E. Genome editing in bacteria: CRISPR-Cas and beyond [J]. *Microorganisms*, 2021, 9: 844.
- [68] Naeem M, Majeed S, Hoque MZ, et al. Latest developed strategies to minimize the off-target effects in CRISPR-Cas-mediated genome editing [J]. *Cells*, 2020, 9: 1608.
- [69] Yang H, Patel DJ. Inhibition mechanism of an anti-CRISPR suppressor AcrIIA4 targeting SpyCas9 [J]. *Mol Cell*, 2017, 67: 117-127.e5.
- [70] Reuter A, Hilpert C, Dedieu-Berne A, et al. Targeted-antibacterial-plasmids (TAPs) combining conjugation and CRISPR/Cas systems achieve strain-specific antibacterial activity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: 3584-3598.
- [71] Wongpayak P, Meesungnoen O, Saejang S, et al. A highly effective and self-transmissible CRISPR antimicrobial for elimination of target plasmids without antibiotic selection [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e11996.