

网络出版时间:2018-01-26 10:32

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.05.005

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180126.0952.010.html>

鸡源大肠杆菌 CRISPR 特征及其与耐药性的关系

李琳,赵霞,王磊,王文静,张瑞良,代兴杨,杨艳菲,徐园园

(安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036)

【摘要】【目的】研究鸡源大肠杆菌成簇间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPR)与耐药性的关系,并对 CRISPR 进行生物信息学分析,为进一步研究 CRISPR 功能及其对细菌耐药的影响奠定基础。【方法】对从安徽省合肥地区养鸡场分离鉴定的 130 株鸡源大肠杆菌进行耐药性(16 种抗菌药物)和 CRISPR 检测,分析 CRISPR 与鸡源大肠杆菌多重耐药的关系。挑选扩增出片段长度不同的 12 株大肠杆菌,对其 CRISPR PCR 产物进行测序,通过 BLAST 进行二级结构预测,用 CRISPRTarget 等对其重复序列和间隔序列进行生物信息学分析。【结果】130 株鸡源大肠杆菌对 16 种抗菌药物的耐药率为 2.3%~97.7%,118 株大肠杆菌对 3 种及 3 种以上药物耐药;共有 39 株菌检测到 CRISPR,阳性率为 30%;CRISPR 阳性菌株均为多重耐药菌株,其耐药率(100%)显著高于 CRISPR 阴性菌株(87%),CRISPR 序列差异性与耐药性之间无直接相关性。CRISPR 序列同源性较低的 12 株大肠杆菌均包含 2 条(11 号菌除外)长度为 29 bp 的重复序列,这些序列可分为 5 类,其 RNA 二级结构都能形成回文结构,但茎环大小有差异。从这 12 株大肠杆菌中共发现间隔序列 168 条,其中 77 条为新发现序列;同源性比对发现,在 112 条有比对结果的间隔序列中,72.3%来源于质粒,25.0%来源于噬菌体,2.7%来源于细菌和病毒。【结论】携带 CRISPR 的鸡源大肠杆菌广泛存在,CRISPR 可能与大肠杆菌耐药表型相关,明确了 CRISPR 的结构特征。

【关键词】 大肠杆菌;CRISPR;耐药性;重复序列;间隔序列

【中图分类号】 R37

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2018)05-0030-07

Relationship of CRISPR in *Escherichia coli* isolates from chickens with drug resistance and its characteristics

LI Lin,ZHAO Xia,WANG Lei,WANG Wenjing,ZHANG Ruiliang,

DAI Xingyang,YANG Yanfei,XU Yuanyuan

(College of Animal Science and Technology,Anhui Agricultural University,Hefei,Anhui 230036,China)

Abstract:【Objective】The relationship between clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) in *Escherichia coli* isolates from chickens and drug resistance was analyzed,and bioinformatics analysis of CRISPR was conducted to provide basis for further study of CRISPR functions and its effect on bacterial resistance.【Method】The relationship between CRISPR and multidrug resistance in chicken-derived *Escherichia coli* was analyzed through drug resistance (16 antimicrobials) and CRISPR detection in 130 *Escherichia coli* strains isolated from chicken farms in Hefei,Anhui. Twelve isolates with different lengths were selected and their PCR products were sequenced. The bioinformatics analysis of CRISPR was carried out by BLAST,RNA secondary structure prediction and CRISPRTarget.【Result】The resistance rates of 130 strains of chicken-derived *Escherichia coli* to 16 antimicrobial agents were 2.3%—

【收稿日期】 2017-02-23

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31772802);安徽高校自然科学基金重点项目(KJ2017A132);安徽省优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016041)

【作者简介】 李琳(1978—),女,安徽界首人,副教授,硕士生导师,主要从事细菌耐药性研究。E-mail:lilinah@126.com

97.7% and 118 strains were resistant to 3 and more drugs. CRISPR was detected in 39 strains with positive rate of 30%. CRISPR positive strains were multidrug-resistant strains, with resistance rate (100%) significantly higher than the CRISPR negative strains (87%). There was no direct correlation between CRISPR sequence difference and drug resistance. Twelve *Escherichia coli* strains (except 11 strain) contained two types 29 bp long repeat sequences, and they were divided into five groups. The RNA secondary structure can form a palindromic structure with different stem ring sizes. A total of 168 isolates were found, of which 77 were new. The homology comparison showed that 72.3% of the spacer sequences were homologous to the genomic sequence of plasmid, 25.0% were homologous to phage, and 2.7% were from bacteria and virus. **【Conclusion】** Chicken-derived *Escherichia coli* carrying CRISPR were widespread, and CRISPR may be associated with drug resistance phenotypes. The biological information of CRISPR structure was also identified.

Key words: *Escherichia coli*; CRISPR; drug resistance; direct repeats; spacers

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是肠道内的共生菌,也是导致畜牧业细菌性疾病最常见的病原菌,大肠杆菌在抗菌药物压力下易产生耐药性,且可通过菌毛传播耐药质粒,这给大肠杆菌病的免疫预防带来了极大挑战。

近年来研究发现,成簇间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)广泛分布于40%细菌和90%古细菌的基因组中^[1-3]。CRISPR位点由一个前导区(Leader)、多个长度为22~47 bp的重复序列(Repeat sequence)及数个与重复序列长度相近的间隔序列(Spacers sequence)组成,这些重复序列与间隔序列相互交替串联形成一个完整的CRISPR位点^[4]。富含AT的前导序列由相邻的蛋白基因(CRISPR associated, CAS)组成,与第1个重复序列连接,在种内比较保守,在种间存在差异^[5]。CRISPR与其CRISPR/CAS系统具有识别和处理质粒等外源基因并产生获得性免疫的能力,能够有效地抵御外源基因的水平转移^[6]。当外源噬菌体、质粒首次侵袭原核生物时,CRISPR系统会选择性地截取并保留某些外源基因片段,并将外源基因片段整合到CRISPR中形成新的间隔序列,使宿主获得抵抗相应噬菌体、质粒的能力^[5]。不同菌种中CRISPR与耐药性的关系并不一致。目前CRISPR系统的应用主要有细菌分型^[7]、细菌进化分析^[8]、抵御噬菌体^[9]和CRISPR/CAS9介导的基因组定点编辑技术^[10-11]等,尚未见对鸡源大肠杆菌CRISPR与耐药性关系的相关研究。为此,本研究检测了合肥地区鸡源大肠杆菌中的CRISPR,分析其与耐药性的关系,并对CRISPR的结构和功能进行生物信息学分析,旨在为进一步研究CRISPR的功能及其对细菌耐药的影响奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 2012年3—5月,从合肥地区4个养鸡场鸡肛拭子中分离大肠杆菌,经大肠杆菌显色培养基和鸡肠杆菌科细菌生化鉴定,共鉴定出130株大肠杆菌(编号1~130);大肠杆菌ATCC25922由安徽农业大学兽医药理与毒理研究室保存。

1.1.2 药品 阿莫西林、土霉素、氧氟沙星、头孢噻唑、头孢曲松、庆大霉素、安普霉素、沙拉沙星、阿米卡星、氟苯尼考、恩诺沙星、头孢唑诺、强力霉素、洛美沙星、利福平和磺胺-6-甲氧嘧啶等16种抗菌药物,购自中国药品生物制品鉴定所。

1.1.3 试剂 PCR相关试剂(Premix Taq、Loading Buffer、DNA Marker),购自日本TaKaRa公司;沙门菌基因组DNA提取试剂盒,购自OMEGA Bio-tek公司;脑心浸液(BHI)培养基,购自杭州微生物试剂有限公司;琼脂粉,购自BIOWEST公司;50×TAE,购自上海生工生物工程股份有限公司。其余常规试剂均为国产分析纯级试剂。

1.2 耐药性测定

根据CLSI(2015版)指导原则和执行标准,用微量肉汤稀释法,测定130株分离菌对16种抗菌药物的敏感性,以大肠杆菌ATCC25922作为质控菌株。

1.3 CRISPR序列的PCR扩增

1.3.1 引物设计 根据CRISPR database公布的大肠杆菌CRISPR结构序列,运用Oligo软件设计引物序列^[12],交由上海生工生物工程股份有限公司进行合成。CRISPR基因的上游引物序列为:5'-TACCGTTGGTGAAGGAGCTG-3',下游引物序列为:5'-TTCCGGTGGATTTGGATGGG-3',引物退火温度为53℃,预期扩增片段为1 000 bp左右。

1.3.2 PCR 扩增 以大肠杆菌菌液为模板,进行 CRISPR 扩增。扩增体系为 25 μ L,其中 ddH₂O 11 μ L,上、下游引物各 0.5 μ L,菌液 0.5 μ L,2 $\times$ Taq PCR Premix 12.5 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,53 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶电泳的反应条件为:电压 100 V、电流 80 mA、时间 35 min,用凝胶成像仪观察并记录结果。根据 PCR 结果,挑选扩增片段长度不同的 12 株大肠杆菌(即 3,11,27,31,40,65,78,87,105,117,128,129 号菌株),切胶回收 CRISPR 扩增产物,送上海英潍捷基贸易有限公司测序。

1.4 CRISPR 序列分析

将 12 株大肠杆菌 CRISPR 的测序结果按片段长度相同或相近分成 4 组,分别为:片段长度约 850 bp(40 号菌(874 bp),87 号菌(851 bp),129 号菌(822 bp))、910 bp(27 号菌(913 bp),105 号菌(913b p),117 号菌(913 bp),128 号菌(917 bp))、1 150 bp(3 号菌(1 121 bp),11 号菌(1 243 bp))和

1 650 bp(31 号菌(1 760 bp),78 号菌(1 610 bp),65 号菌(1 614 bp))。运用 CRISPR web server 网站中的 CRISPR Finder 工具查找每个菌株的重复序列和间隔序列并进行序列比对^[13]。采用 RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) 预测序列的二级结构^[14],通过 CRISPRTarget 分析间隔序列的同源性^[15]。

2 结果与分析

2.1 大肠杆菌的耐药性

由表 1 可知,130 株大肠杆菌菌株对 16 种抗菌药物的耐药率在 2.3%~97.7%,130 株大肠杆菌中有 118 株是 3 耐及 3 耐以上菌株(下称多重耐药菌株)。其中对土霉素和磺胺-6-甲氧嘧啶的耐药率在 95.0%以上,对强力霉素、阿莫西林、头孢曲松、氧氟沙星、洛美沙星、利福平、氟苯尼考和恩诺沙星这 8 种药的耐药率均在 50.0%以上,对庆大霉素、安普霉素、头孢噻呋、阿米卡星、头孢喹诺和沙拉沙星这 6 种药的耐药率较低。

表 1 130 株鸡源大肠杆菌耐药性的测定结果

Table 1 Drug resistance test of 130 isolates

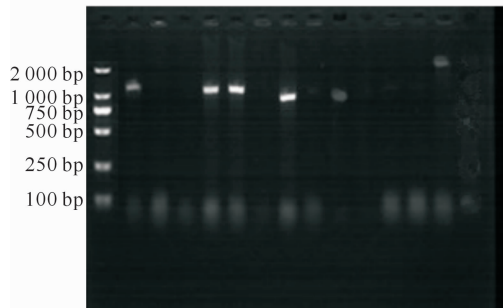
药品 Drugs	敏感菌 株数 Sensitivity	中敏菌 株数 Insensitivity	耐药菌 株数 Resistance	耐药率/% Resistance rate	药品 Drugs	敏感菌 株数 Sensitivity	中敏菌 株数 Insensitivity	耐药菌 株数 Resistance	耐药率/% Resistance rate
阿莫西林 Amoxicillin	8	14	108	83.1	土霉素 Oxytetracycline	0	3	127	97.7
头孢曲松 Ceftriaxone	29	10	91	70.0	氟苯尼考 Florfenicol	59	2	69	53.1
磺胺-6-甲氧嘧啶 Sulfamono methoxine	3	1	126	96.9	恩诺沙星 Enrofloxacin	53	5	72	55.4
阿米卡星 Amikacin	102	16	12	9.2	沙拉沙星 Sarafloxacin	111	16	3	2.3
头孢喹诺 Cefquinome	112	11	7	5.4	氧氟沙星 Ofloxacin	28	14	88	67.7
庆大霉素 Gentamycin	67	9	54	41.5	洛美沙星 Lomefloxacin	24	5	101	77.7
安普霉素 Apramycin	82	9	39	30.0	强力霉素 Doxycycline	9	4	117	90.0
头孢噻呋 Ceftiofur	81	27	22	16.9	利福平 Rifampicin	10	11	109	83.8

2.2 CRISPR 的 PCR 扩增

试验发现,130 株菌中有 39 株能够扩增出 CRISPR,阳性检出率为 30%,部分凝胶成像结果如

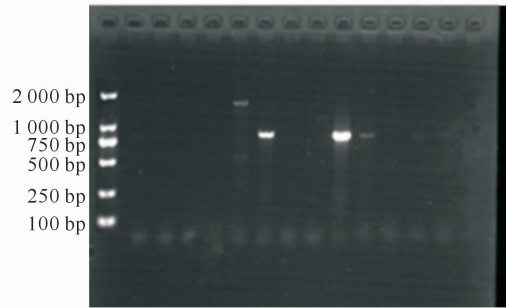
图 1 所示。对 39 株阳性菌株的 CRISPR 再次进行扩增,结果如图 2 所示。

M 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86



M. DNA Marker;74~100. 分离菌株编号,其中 74,77,78,80,82,86,91,92,95,96 号菌为阳性菌,其余菌株为阴性菌

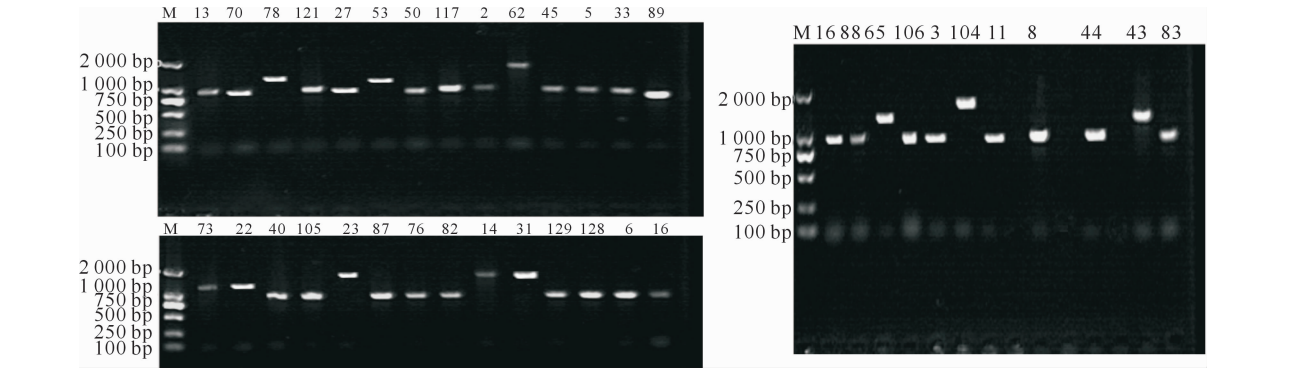
M 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100



M. DNA Marker;74—100. Isolates,74,77,78,80,82,86,91,92,95 and 96 bacteria are positive and the other strains are negative

图 1 部分鸡源大肠杆菌 CRISPR 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR results of some chicken-derived *Escherichia coli* CRISPR



M. DNA Marker; 泳道上数据为阳性菌株编号

M. DNA Marker; Data on the lane are numbers of positive strains

图 2 39 株 CRISPR 阳性菌株的 PCR 扩增

Fig.2 PCR results of 39 CRISPR positive strains

2.3 CRISPR 与耐药性的关系分析

由表 2 可知,CRISPR 阳性菌株的多重耐药率显著高于 CRISPR 阴性菌株,推测大肠杆菌的多重耐药性可能与 CRISPR 具有相关性。

由 CRISPR 比对结果可知,27,105,117,128 号菌株 CRISPR 的同源性较高(99.6%),其余菌株 CRISPR 之间的同源性都较低,有 12 株多重耐药大肠杆菌 CRISPR 之间的同源性仅有 42.49%(图 3),提示这 12 株多重耐药大肠杆菌 CRISPR 的差异性与耐药性之间无直接相关性。

表 2 CRISPR 与鸡源大肠杆菌多重耐药性的相关性分析

CRISPR	耐药种类 Number of drug resistance		多重耐药率/% Multidrug-resistance rate
	≥3	<3	
阳性 Positive	39	0	100 a
阴性 Negative	79	12	87 b

注:同列数据后标不同小写字母表示 χ^2 分析差异显著 ($P<0.05$)。

Note: Differernt lowercase superscripts in each column mean significant by chi-squared test ($P<0.05$).

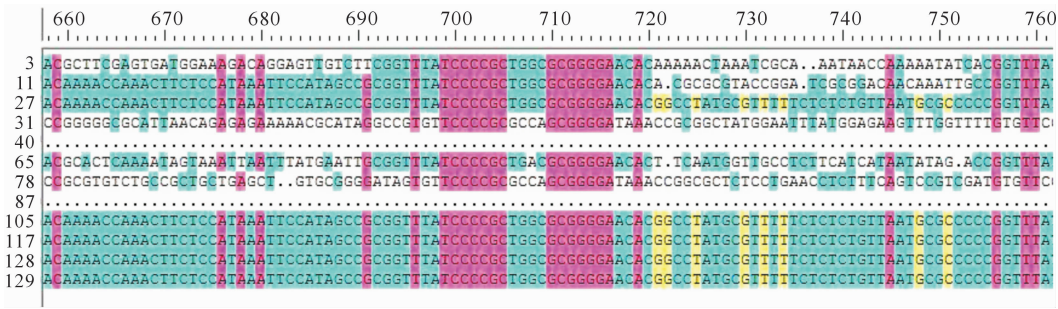


图 3 12 株鸡源大肠杆菌的 CRISPR 比对(部分结果)

Fig.3 CRISPR sequence alignment of 12 strains of chicken-derived *Escherichia coli* (partial result)

2.4 大肠杆菌 CRISPR 的特征分析

2.4.1 重复序列 同源性较低的 12 株大肠杆菌均包含 2 条(11 号菌株除外)长度为 29 bp 的重复序列,且这 2 条序列反向互补形成短回文序列,分为 a、b、c、d、e 5 类,具体见表 3。其中,a 和 b 为 31,78,87,40 号菌共有重复序列;c 为 65,128,27,105,117,129 号菌共有重复序列;d 为 65,128,27,105,117,129,11 和 3 号菌共有重复序列;e 为 3 号大肠杆菌重复序列。a 和 b 这 2 类重复序列从 5'到 3'端的第 13 个碱基不同;c 和 d 这 2 类重复序列从 5'到

3'端的第 17 个碱基不同;d 和 e 这 2 类重复序列从 5'端到 3'端的前 2 个碱基和最后 1 个碱基不同。

在古细菌中的试验证实,CRISPR 结构中的重复序列可以转录为 RNA 并形成茎环结构,这种结构在 CRISPR 发挥免疫功能的过程中是一种结构标识物,CAS 蛋白通过识别该茎环结构而发挥剪切作用,并使得长链的 pro-crRNA 形成短链的 crRNA,从而发挥免疫功能^[16]。本研究对 12 株大肠杆菌 CRISPR 重复序列的二级结构进行预测,结果(图 4)显示,根据茎环特征,12 株菌株的二级结构可以分

为 2 类:一类以图 4 中 a、b、c、d 序列为代表,在整个结构中间含有唯一的茎部分,一大一小 2 个环分布在茎的两端,该类结构以“环”为主;另一类以图 4 中的 e 序列为代表,形成多个茎、环结构,该结构特征是茎环依次形成。图 4 中 a、b、c、d 序列茎环结构的头部环都由 6 个碱基组成,茎区都是 5 个碱基长度, a、b 序列中间部分还有 9 个碱基组成的环;图 4 中 e 序列头部环由 6 个碱基组成,中间环由 7 个碱基

组成,两环间的茎区是 5 个碱基长度,尾部茎长 3 个碱基。各重复序列茎环结构的尾部差异较大,图 4 中 a、b 序列尾部较短,仅 2 个碱基,而 c、d 序列尾部长达 13 碱基, e 序列按照最小自由能原则,尾部没有游离的碱基。a 和 b 序列的最小自由能都为 -15.20 kJ/mol , c 和 d 序列的最小自由能都为 -14.20 kJ/mol , e 序列的最小自由能为 -14.90 kJ/mol 。

表 3 鸡源大肠杆菌 CRISPR 序列分析

Table 3 Information of chicken-derived *E. coli* CRISPR sequences

菌株编号 No. of strain	重复序列编号 Repeat sequence number	重复序列(5'→3') Repeat sequence(5'→3')	间隔序列数 Number of spacer sequence
31	a	GTGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG	20(6)
	b	GTGTTCCCCGCGTCAGCGGGGATAAACCG	
65	c	CGGTTTATCCCCGCTGACGCGGGGAACAC	23(17)
	d	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	
78	a	GTGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG	23(17)
	b	GTGTTCCCCGCGTCAGCGGGGATAAACCG	
128	c	CGGTTTATCCCCGCTGACGCGGGGAACAC	10(3)
	d	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	
27	c	CGGTTTATCCCCGCTGACGCGGGGAACAC	10(3)
	d	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	
105	c	CGGTTTATCCCCGCTGACGCGGGGAACAC	10(3)
	d	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	
117	c	CGGTTTATCCCCGCTGACGCGGGGAACAC	10(3)
	d	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	
129	c	CGGTTTATCCCCGCTGACGCGGGGAACAC	10(3)
	d	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	
87	a	GTGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG	9(2)
	b	GTGTTCCCCGCGTCAGCGGGGATAAACCG	
40	a	GTGTTCCCCGCGCCAGCGGGGATAAACCG	10(3)
	b	GTGTTCCCCGCGTCAGCGGGGATAAACCG	
11	d	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	17(4)
3	e	GTGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAT	16(13)
	d	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	

注:括号中数据为新的间隔序列。
Note:Data in parentheses represent new spacers.

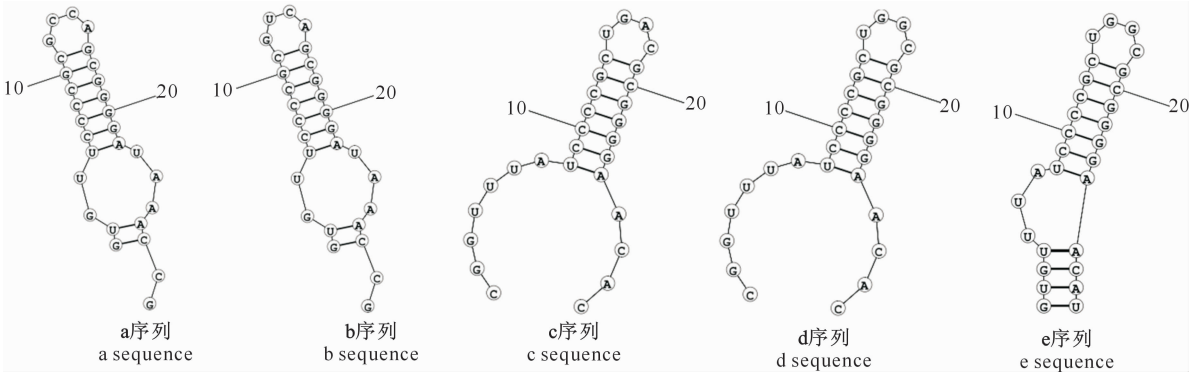


图 4 鸡源大肠杆菌 CRISPR 重复序列的二级结构预测

Fig. 4 Prediction of secondary structure of chicken-derived *E. coli* CRISPR repeat sequence

以 5 类重复序列构建系统进化树,结果(图 5)显示共形成了 2 大聚类分支,但同一种属大肠杆菌的重复序列并不完全聚集于同一聚类分支中。

2.4.2 间隔序列 CRISPR Finder 软件从同源性

较低的 12 株大肠杆菌 CRISPR 中共识别出间隔序列 168 条,将其与 CRISPR 数据库中大肠杆菌的间隔序列进行比对发现,其中 91 条为 CRISPR 数据库中已有序列,77 条为新发现间隔序列(表 3)。本研

究对 12 株大肠杆菌的间隔序列进行 BLAST 同源性比对(比对数据库包括 GenBank-Phage、RefSeq-Plasmid),结果发现有 56 条无比对结果,有比对结果的 112 条间隔序列中,72.3%来源于质粒,25.0%来源于噬菌体,2.7%来源于细菌和病毒。

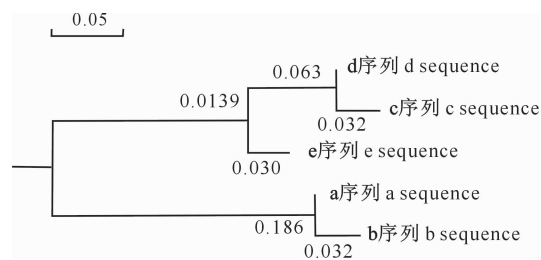


图 5 鸡源大肠杆菌 CRISPR 重复序列系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of chicken-derived *E. coli* CRISPR repeat sequences

3 讨 论

3.1 CRISPR 与大肠杆菌的耐药性

CRISPR 在原核生物中多应用于基因定点编辑技术、细菌分型、细菌进化等方面的研究,而有关 CRISPR 与耐药关系的研究较少。Burley 等^[17]检测了粪肠球菌的 CRISPR 相关蛋白基因,发现其与多重耐药呈负相关,Palmer 等^[18]分析粪肠球菌的 CRISPR/CAS,发现 CRISPR/CAS 与获得性耐药呈负相关。但有研究表明,大肠杆菌的 CAS 基因表达量在敏感株和耐药株间无差异,并且耐药质粒可以在 CRISPR 阳性大肠杆菌之间传播^[19]。王琳琳等^[20]对志贺菌 CRISPR 与耐药性关系进行研究发现,CRISPR 重复序列相对保守,而间隔序列多变且与多重耐药性显著相关。

本研究对合肥地区鸡源大肠杆菌 CRISPR 流行分布情况进行调查,结果发现 130 株大肠杆菌中有 39 株携带 CRISPR,检出率为 30%,这与王琳琳等^[20]“志贺菌 CRISPR 的检出率为 93%”相比较低,这可能是由于菌种差异所导致。本研究通过对大肠杆菌 CRISPR 阳性和阴性菌株的多重耐药率进行比较发现,CRISPR 阳性菌株的多重耐药率显著高于 CRISPR 阴性菌株,可见 CRISPR 阳性菌株比阴性菌株更容易产生多重耐药性,说明合肥地区鸡源大肠杆菌中存在 CRISPR 的流行,且与耐药表型具有相关性。但本研究发现,CRISPR 序列差异性与耐药性之间无相关性,其原因尚需进一步研究。

3.2 CRISPR 的特征

CRISPR 结构是一种抵抗外来遗传物质入侵的

防御系统,近年来对其研究逐步深入。本研究对大肠杆菌 CRISPR 的重复序列和间隔序列进行了系统的生物信息学分析。

有研究指出,大多数 CRISPR 重复序列存在保守序列,如 5'端的 GTT 和 3'端的 GAAA,且重复序列具有回文序列,可以转录并形成 RNA 二级结构,形成茎环结构^[21-22]。茎环结构已经被证明在 CRISPR 系统中发挥着识别功能^[23],本研究对重复序列 RNA 二级结构进行预测,发现 5 类重复序列都能形成回文结构,但茎环大小有差异,表明正向重复序列可能介导外源 DNA 或 RNA 与 CAS 编码蛋白的相互作用。以重复序列构建系统进化树,结果显示共形成了 2 大聚类分支,但同一种属大肠杆菌的重复序列并不一定在同一聚类分支中。

间隔序列是 CRISPR 系统中最重要的部分,现有研究表明,间隔序列与噬菌体、质粒等外源基因有同源性^[24]。间隔序列可靶向定位入侵的外源基因^[25],CRISPR 系统会选择性地截取并保留某些外源基因片段,并将外源基因片段整合到 CRISPR 系统中形成新的间隔序列,从而抵御外源基因的再次侵入。本研究对同源性较低的 12 株大肠杆菌间隔序列进行 BLAST 同源性比对,发现 112 条有比对结果的间隔序列中,72.3%来源于质粒,25.0%来源于噬菌体,2.7%来源于细菌和病毒,进一步证明间隔序列可能来源于外部的可移动遗传因子。

本研究发现,携带 CRISPR 的鸡源大肠杆菌广泛存在,CRISPR 阳性菌株的多重耐药率显著高于 CRISPR 阴性菌株,预测大肠杆菌 CRISPR 的存在可能与多重耐药性具有相关性,而 CRISPR 的序列差异性与耐药性无相关性。本研究进一步对大肠杆菌 CRISPR 结构特征和序列功能进行探讨,发现重复序列有差异性,间隔序列多来源于外源基因,推测在抗生素选择压力下,细菌的 CRISPR 序列可能会发生变异,使细菌获得外源性耐药基因而存活下来,提示 CRISPR 重复序列的变异和间隔序列的多样性可能与大肠杆菌的耐药性有关。

[参考文献]

- [1] Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats [J]. *Genome Biology*, 2007, 8(4): R61.
- [2] Lillesto P K, Redder P, Barrettr A, et al. A putative viral defence mechanism in archaeal cells [J]. *Archaea*, 2006, 2(1): 59-72.
- [3] Mojica F J, Diez-Villasenor C, Soria E, et al. Biological signifi-

- cance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria [J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(1): 244-246.
- [4] Barrangou R, Marraffini L A. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity [J]. *Mol Cell*, 2014, 54(2): 234-244.
 - [5] Jansen R, Van Embden J D, Gastra W, et al. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes [J]. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 2002, 6(1): 23-33.
 - [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(3): 653-663.
 - [7] Cain A K, Boinett C J. A CRISPR view of genome sequences [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(4): 226.
 - [8] Comas I, Homolka S, Niemann S, et al. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7815.
 - [9] Horvath P, Romero D A, Coute-Monvoisin A C, et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus* [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(4): 1401-1412.
 - [10] Li T, Huang S, Zhao X, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(14): 6315-6325.
 - [11] Joung J K, Sandrer J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(1): 49-55.
 - [12] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 172.
 - [13] Bland C, Ramsey T L, Sabree F, et al. CRISPR recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 209.
 - [14] 邓凯波, 霍贵成. 嗜热链球菌中 CRISPR 序列的检测与同源性分析 [J]. *食品科学*, 2013, 34(3): 153-157.
 - Deng K B, Huo G C. Detection and homology analysis of CRISPR in *Streptococcus thermophilus* [J]. *Food Science*, 2013, 34(3): 153-157.
 - [15] Biswas A, Gagnon J N, Brouns S J, et al. CRISPRTarget: bioinformatic prediction and analysis of crRNA targets [J]. *RNA Biol*, 2013, 10(5): 817-827.
 - [16] Brouns S J, Jore M M, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide a antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964.
 - [17] Burley K M, Sedgley C M. CRISPR-Cas, a prokaryotic adaptive immune system, in endodontic, oral, and multidrug-resistant hospital-acquired *Enterococcus faecalis* [J]. *Journal of Endodontics*, 2012, 38(11): 1511-1515.
 - [18] Palmer K L, Gilmore M S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-Cas [J]. *Mbio*, 2010, 1(4): e00227-10.
 - [19] Toucho M, Charpentier S, Pognard D, et al. Antibiotic resistance plasmids spread among natural isolates of *Escherichia coli* in spite of CRISPR elements [J]. *Microbiology*, 2012, 158: 2997-3004.
 - [20] 王琳琳, 王颖芳, 段广才, 等. 志贺菌 CRISPR 的检测及其与耐药的关系 [J]. *微生物学报*, 2015, 55(4): 476-483.
 - Wang L L, Wang Y F, Duan G C, et al. Detection of CRISPR and its relationship to drug resistance in *Shigella* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(4): 476-483.
 - [21] Haft D H, Selengut J, Mongodin E F, et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes [J]. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(6): e60.
 - [22] Makarova K S, Grishin N V, Shabalina S A, et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action [J]. *Biol Direct*, 2006, 1: 7.
 - [23] 王 琰, 喻 婵, 王阶平, 等. 蜡状芽孢杆菌群中规律成簇间隔短回文重复序列的生物信息学分析 [J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(7): 72-78.
 - Wang Y, Yu C, Wang J P, et al. Bioinformatics analysis of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) in the genomes of *Bacillus cereus* group [J]. *China Biotechnology*, 2011, 31(7): 72-78.
 - [24] Kunin V, He S, Wamecke F, et al. A bacterial metapopulation adapts locally to phage predation despite global dispersal [J]. *Genome Res*, 2008, 18(2): 293-297.
 - [25] 王琳琳. CRISPR/Cas 系统与志贺菌耐药的关系 [D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
 - Wang L L. The relationship between CRISPR/Cas system and drug resistance in *Shigella* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2015.