

食源性致病菌耐药性与成簇的规律间隔短回文 重复序列系统关联性研究进展

金姗姗, 王义哲, 赵喜红*

(武汉工程大学环境生态与生物工程学院, 武汉 430205)

摘 要: 近年来, 随着对抗生素的滥用, 食源性致病菌的耐药性问题日趋严重。目前除了从管理上规范抗生素的使用, 对规律间隔短回文重复序列系统(clusterd regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)与耐药性相关研究也在持续进行。CRISPR-Cas 作为一种天然免疫机制, 因为其独特的免疫作用机理, 目前常被用以基因编辑、耐药性等方面研究。本文对 CRISPR-Cas 系统进行简要介绍, 从其结构、原理以及目前的研究趋势对不同菌株间 CRISPR 系统与耐药性、毒力因素进行相关总结, 为防治食源性致病菌引起的食品安全问题提供新思路。

关键词: 成簇的规律间隔短回文重复序列系统; 耐药性; 毒力因素; 食源性致病菌; 食品安全

Research progress on the relationship between the drug resistance of food-borne pathogens and the clusterd regularly interspaced short palindromic repeats system

JIN Shan-Shan, WANG Yi-Zhe, ZHAO Xi-Hong*

(School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China)

ABSTRACT: In recent years, with the abuse of antibiotics, the drug resistance of food-borne pathogens has become increasingly serious. At present, in addition to regulating the use of antibiotics in management, research on clusterd regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and drug resistance is also continuing. As a natural immune mechanism, CRISPR-Cas is often used for research on gene editing, drug resistance, etc. because of its unique immune mechanism. This paper gave a preliminary introduction to the CRISPR-Cas system, and summarized the CRISPR system, drug resistance and virulence factors among different strains from its structure, principle and current research trends, which was beneficial to provide new ideas for preventing food safety problems caused by foodborne pathogenic bacteria.

KEY WORDS: clusterd regularly interspaced short palindromic repeats; drug resistance; virulence factor; foodborne pathogens; food safety

基金项目: 省级大学生创新创业训练项目(S201910490071)

Fund: Supported by National Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship (S201910490071)

*通讯作者: 赵喜红, 博士, 教授, 主要研究方向为食源性致病菌检测。E-mail: Xhzhao2006@gmail.com

*Corresponding author: ZHAO Xi-Hong, Ph.D, Professor, School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China. E-mail: Xhzhao2006@gmail.com

1 引言

自从 1928 年抗生素被发现以来,它已经彻底改变了现代人类医学。广泛使用和滥用抗生素的一个直接后果就是,微生物对大多数抗生素产生复杂的耐药机制。目前食源性致病菌引起的食品安全问题日益严重,大部分食源性致病菌出现了程度不等的耐药情况,使得食源性致病菌有关的食品安全问题趋于严峻态势^[1]。由于主要制药公司的部门投资减少,正在开发的新抗生素药物数量急剧下降,现在比以往任何时候都更迫切需要替代抗生素药物,以克服耐药性的全球卫生危机^[2]。

食源性致病菌通过被污染的食品、水源等进入人体,通过克服胃酸、胆汁、粘膜进入生理屏障从而对人体产生感染,使得人或动物患病。并且抗生素从原理上来讲,无法完全分辨有益微生物与食源性致病微生物,导致体内菌群失调,这也在一定程度上会出现大量耐药基因^[3]。

研究发现细菌和古细菌中存在一种抵抗外源遗传物质入侵的序列,其被命名为成簇的规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR),直到目前,CRISPR-Cas 系统已经发展到在众多学科中拥有多种应用,包括在基因编辑、基因组工程和治疗遗传疾病方面的应用^[4]。70%的细菌、古细菌(表 1)^[5]拥有这种抵御外来入侵噬菌体、病毒、质粒的机制,成簇的规律间隔短回文重复序列由相同的重复序列(direct repeats, DR)与间隔序列(spacer, S)交替构成;除此以外,还包括前导序列(proto-spacer adjacent motifs, PAMs)和 *cas* 基因组(图 1),作用分别为引导核酸剪切酶进入指定剪切位置和核酸

酶的表达基因,对复合体实行免疫作用^[6-8]。*cas* 基因目前也是作为划分 CRISPR 类型的一大标准,CRISPR-Cas 系统存在 I 型、II 型、III 型,而这 3 种类型的系统依赖于 *cas1* 与 *cas2* 2 个基因,它们功能在于将外源基因整合至自身间隔序列中发挥剪切效应^[9,10]。这 3 种类型的特征基因分别是 *cas3*、*cas9*、*cas10*,目前 II 型 CRISPR-Cas9 系统凭借操作简单、成本低的剪切结合方式,其基因编辑效率远远高于锌指核酸内切酶(zinc finger nucleases, ZFN)和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription-like activator effector nuclease, TALEN)编辑手段,成为运用范围最广的第三代基因编辑手段^[11]。另外,基于 CRISPR-Cas12 与 CRISPR-Cas13 为基础的检测手段,可以快速检测新型冠状病毒(COVID-19)^[12],若是将此技术应用于食源性致病菌的检测中,具有良好的应用前景。目前耐药基因广泛存在于不同食源性致病菌中,基于 CRISPR-Cas 系统溯源性情况,验证存在阻碍基因水平转移(horizontal gene transfer, HGT)的现象^[13,14]。尽管具有阻遏效应,但是相同的耐药基因还是会出现不同菌种的基因序列中^[15],对于不同菌种间相同耐药基因溯源问题,目前也值得进行深入研究。

目前,有实验证明,CRISPR-Cas 系统能够产生细菌对噬菌体的抗性,阻止自身自然转化和一些外源毒力基因的获取^[16]。说明 CRISPR-Cas 系统对毒力和耐药性存在一定情况的干扰,阻碍耐药基因的获取。本文通过对耐药性与 CRISPR 系统初步探索,总结了解食源性致病菌耐药性与 CRISPR-Cas 系统之间的关系,有助于解决食源性致病菌引起的食品安全问题,对于研究食品安全快速检测技术也提供了一定的研究思路。

表 1 CRISPR 系统在微生物中的分布情况
Table 1 Distribution of CRISPR system in microorganisms

	菌株/个	CRISPRs/个	携带 CRISPRs 的菌株/个	未检测到 CRISPRs 的菌株/个
细菌	232	870	202	30
古细菌	6782	8069	3059	2065
总共	7014	8939	3261	2095

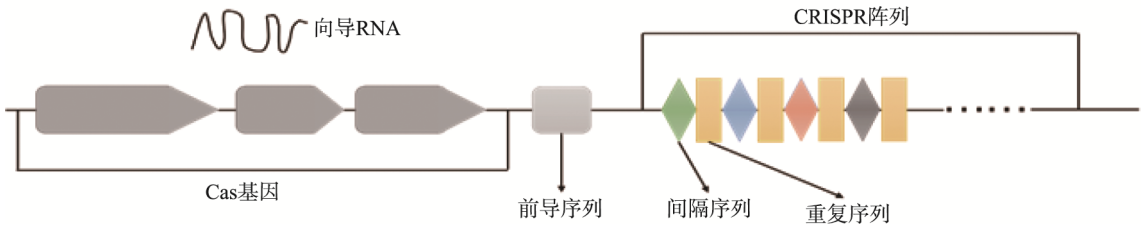


图 1 CRISPR-Cas 系统结构
Fig.1 CRISPR-Cas system structure

2 食源性致病菌 CRISPR-Cas 系统与耐药性的研究

2.1 食源性致病菌耐药原理

食源性致病菌在不同抗生素药物胁迫下,会产生不同的耐药机制,从目前研究来讲,大部分食源性致病菌主要的耐药机制在于靶点突变、主动外排系统、细胞膜通透性改变和质粒介导耐药等^[17-19]。从耐药机制出发,探讨致病菌制毒原理也是一条重要的分析途径。

首先是药物靶位改变,每类药物都有特异性的作用靶点,以达到抑菌作用。例如氟喹诺酮类抗生素对革兰氏阳性阴性菌的靶位是不同的,革兰氏阳性细菌靶点为回旋酶(gyrase),其次革兰氏阴性靶点为拓扑异构酶IV(topoisomerase IV)。例如金黄色葡萄球菌对甲氧西林产生耐药,通常是金黄色葡萄球菌获得了葡萄球菌染色体 *mec* 基因盒原件(staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC-*mec*)从而产生了对甲氧西林的耐药,并且目前研究发现,与 *mecA* 具有 70%同源性的 *mecC* 基因也对甲氧西林耐药。而且相比含有 *mecA* 的金黄色葡萄球菌,其含有 *mecC* 的金黄葡萄菌株对苯甲异噁唑青霉素敏感性要高,但是对头孢西丁的耐受性更强^[20]。

在长期演变过程中,细菌为了更好地适应外界条件,自然而然演变进化出一系列主动外排系统,用来排出体内各种有害物质,降低和消除药物对自身的影响。主动外排系统,其是细菌主要的多重耐药调控机制,可细分为 5 个家族:易化子超家族(major facilitator super family, MFS)、ATP 结合盒超家族(ATP-binding cassette, ABC)、小多重耐药家族(small multidrug resistance, SMR)、多药和有毒化合物外排泵超家族(multidrug and toxic compound extrusion, MATE)^[21]、耐药结节细胞分化超家族(resistance -nodulation-divisi-on, RND)^[22-25],除了 ABC 超家族可以以水解 ATP 作为能量,其余家族以质子驱动能力作为能量,并且 SMR 家族仅仅存在于部分革兰氏阳性菌种。例如在家族的 AcrAB-TolC 是主要的外排泵之一,它由周质蛋白 AcrA、外转运蛋白 AcrB 和外膜通道蛋白 TolC 构成^[26]。

细胞膜通透性降低,通常细胞膜膜外通透性控制蛋白(outer membrane protein, Omp)表达异常出现细菌耐药性^[27]。部分沙门氏菌对氟喹诺酮类药物产生抗性,原因在于 *MarA* 或 *SoxS* 基因的表达,激活 *micF* 的转录,阻断了 *ompF* 药物通道 mRNA 的表达,减缓其翻译并使其降解,从而使沙门氏菌产生一定耐药性^[17]。在大肠杆菌中, *ompF* 基因缺失菌株相比于标准菌株,前者耐药性显著高于普通标准菌株^[28]。

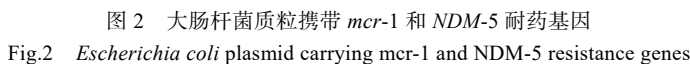
最后一个为质粒介导耐药。目前对于质粒介导耐药已

经广泛发生在链球菌属中,导致耐药性大幅度提升,并且使问题变得越来越棘手,并且携带 *mcr-1* 和 *NDM-5* 耐药基因的大肠杆菌质粒已经在临床感染中出现(图 2)^[29]。目前已经发现氨基糖苷类转移酶变异基因可以使得诺氟沙星和环丙沙星发生一定程度的乙酰化^[30],从而导致抗生素的失效,并且目前也发现部分肠杆菌属的食源性致病菌的质粒中存在乙酰化基因。

2.2 CRISPR-Cas 系统与耐药性的相关研究

自从 CRISPR 系统相关研究发展以来,对其延展性的研究从未停歇,就像现在 CRISPR-Cas 系统与耐药性相关研究也成为一研究热点。针对这一系列问题的研究,目前国内外实验室均对其进行了很多相关性实验,也得出了很多关键性的结果。例如,徐桐桐等^[31]通过向导 RNA(sgRNA)对 II 型 CRISPR-Cas9 系统介导,使得其对 *Kan* 耐药基因水平转移完全抑制,抑制耐药基因转移效率最低限度可达 88.08%,通过对 sgRNA 的相关介导,可以对食源性致病菌耐药基因水平转移进行抑制。

Vosik 等^[32]通过对美国本土沙门氏菌进行 CRISPR 和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)比对,耐药分析发现分离株对四环素类抗生素(占分离株的 58%),氨基青霉素(50%),链霉素(占 43%)和对增强素的中度或完全耐药(占 45%)表现出抗药性,说明食源性致病菌耐药率逐渐上升,但是市面上抗生素有限,所以耐药趋势目前来说十分严峻。对志贺菌株进行 CRISPR 系统筛查,发现 95%的志贺氏菌包含可信的 CRISPR 结构,对于包含这些结构的志贺氏菌,它们的多重耐药率可达到 53.33%,并且其间隔序列的多样性与重复序列的保守状态与耐药性之间存在一定关联^[33]。张冰^[34]在实验研究中发现,通过电转导入耐药基因的志贺菌 CRISPR 系统并没有产生较大变化,或者是单核苷酸多动态性变化,并且发现在高浓度氯霉素作用下,会激活志贺氏菌外排泵蛋白使其出现耐药性,但这种变化并不会影响志贺氏菌的 CRISPR 系统。拥有 CRISPR 系统的大肠杆菌耐药性相对来说也比较高,实验发现,包含 CRISPR 系统的大肠杆菌对土霉素(97.7%)、磺胺-6-甲氧嘧啶(96.9%)、强力霉素(90.0%)、阿莫西林(83.1%)和利福平(83.8%)均体现出较强的耐药性^[35]。CRISPR 阳性的大肠杆菌菌株的多重耐药率明显高于阴性菌株,侧面反映出,在大肠杆菌中可能频繁出现不同菌株间的耐药基因水平转移现象,并且这一转移过程并没有被 CRISPR-Cas 系统干扰,所以才会出现多重耐药的 CRISPR 阳性菌株^[36]。总体来说,存在 CRISPR 序列的菌株,基本都会出现较高的多重耐药性的情况,对于此类多重耐药菌株的出现原因与 CRISPR 之间关系也值得深入研究探讨。



黄色葡萄球菌实验发现, 当 CRISPR 系统完整并且存在 *cas* 基因簇时, 耐药基因 *mecA* 的水平转移现象会大幅度受到抑制, 可以有效降低金黄色葡萄球菌的耐药率问题^[37], 说明 *cas* 基因在金黄色葡萄球菌中对降低耐药性有一定影响。但是在大肠杆菌中, *cas* 基因在 CRISPR 阳性和阴性菌株中并无明显差异, 并且耐药质粒可以在 CRISPR 阳性菌种中传

播^[38]。对于志贺氏菌来讲,其耐药性与毒力作用,在一定情况中与 CRISPR 在统计学研究方面存在一定关系^[39],并且发现是由多个 CRISPR 系统协同作用而发生的,相比于肺炎链球菌的 CRISPR 系统阻止毒力因子摄入,目前志贺氏菌 CRISPR 与毒力作用之间的关系还需要进一步深入研究。

关于降低食源性致病菌耐药性相关研究,业内也做了相当多的努力。例如姚文晔^[40]构建异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导 sgRNA 单质粒表达系统,进行一些优化使得大肠杆菌重新对抗生素出现了敏感性反应,最大特异性清除耐药基因效率可达倍。虽然利用 CRISPR-Cas9 进行耐药基因修正具有高效率,但是 sgRNA 的不稳定性也增加了基因敲除成功的困难,如果可以克服 sgRNA 不稳定因素,可以更为有效地降低食源性致病菌的耐药率,从而降低致病微生物所带来的耐药风险。此外,当 CRISPR 系统对食源性致病菌造成压力时,细菌也会自我进化突变,逃避来自 CRISPR 的切割压力,通常是来自原间隔序列 20 bp 和前导序列的突变使得核酸切割酶无法正确识别剪切位点,从而产生耐药基因逃避现象^[41]。而且还发现含有 CRISPR 的温和噬菌体与裂解性噬菌体共同注入至食源性致病菌 CRISPR 中,会恢复耐药株对抗生素的敏感性。运用噬菌体降低食源性致病菌耐药率的手段,目前也值得深入研究。

2.3 CRISPR-Cas 对致病性毒力基因的控制

食源性致病菌通常获得毒力基因来源于外源噬菌体和病毒等方式,例如在致病性金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌基因组中会发现毒力因子编码基因和温和噬菌体的基

因^[42]。间隔序列可以防御外来遗传物质的入侵,所以在一定程度上会阻止毒力因子的获取,干扰毒力因子在致病菌之间进行传播。Yang 等^[43]研究中,揭露了金黄色葡萄球菌 08BA02176 和 MSHR1132 的 5 个间隔序列与来自噬菌体或质粒的外源遗传序列同源,甚至含有与某些噬菌体含有编码 PVL 毒素的 *lukPV* 基因的部分基因组相同的间隔序列。除此以外,Ido 等^[44]发现空肠弯曲菌强毒性菌株如果缺失 CRISPR 序列或是存在较短 CRISPR 序列,其自身则会增强毒性,另外发现如果 CRISPR 系统中缺失 *cas1* 基因簇,则肠球菌毒性会增强,导致致病岛增多。CRISPR 降低食源性致病菌毒力的原因在于可以利用反义 RNA 作用影响免疫原蛋白膜的表达,不过此原理中的 RNA 在不同食源性致病菌中千差万别,并没有统一的反义 RNA^[45,46]。通过对 CRISPR-Cas9 的了解,发现了 *cas9* 基因簇是食源性致病菌降低毒力因素的关键, *cas9* 在毒力方面的独特作用已经被提出^[47],并且 *cas9* 如何共同决定毒力的分子基础已经被揭示。*cas* 操纵子包含至少 3 个基因(*cas9*、*cas1*、*cas2*)(图 3A),基于 *csn2* 和 *cas4* 基因型分别出现在 II-A 和 II-B 型中;其中处理过的 crRNA 和较短版本的 tracrRNA,很可能是由处理较长 tracrRNA 或来自第 2 个启动子的转录而产生的(图 3B),最终负责与目标 DNA 的相互作用;tracrRNA 与转录目标有很多相似的同源性,导致转录 RNA 出现被降解的可能(图 3C)^[48]。总的来说,CRISPR-Cas9 应用范围十分广泛,对于降低食源性致病菌毒力因素,降低致病菌耐药性至关重要。对于耐药基因和毒力基因溯源性问题进行研究,可以从根本上抑制致病菌带来的食品安全健康问题。

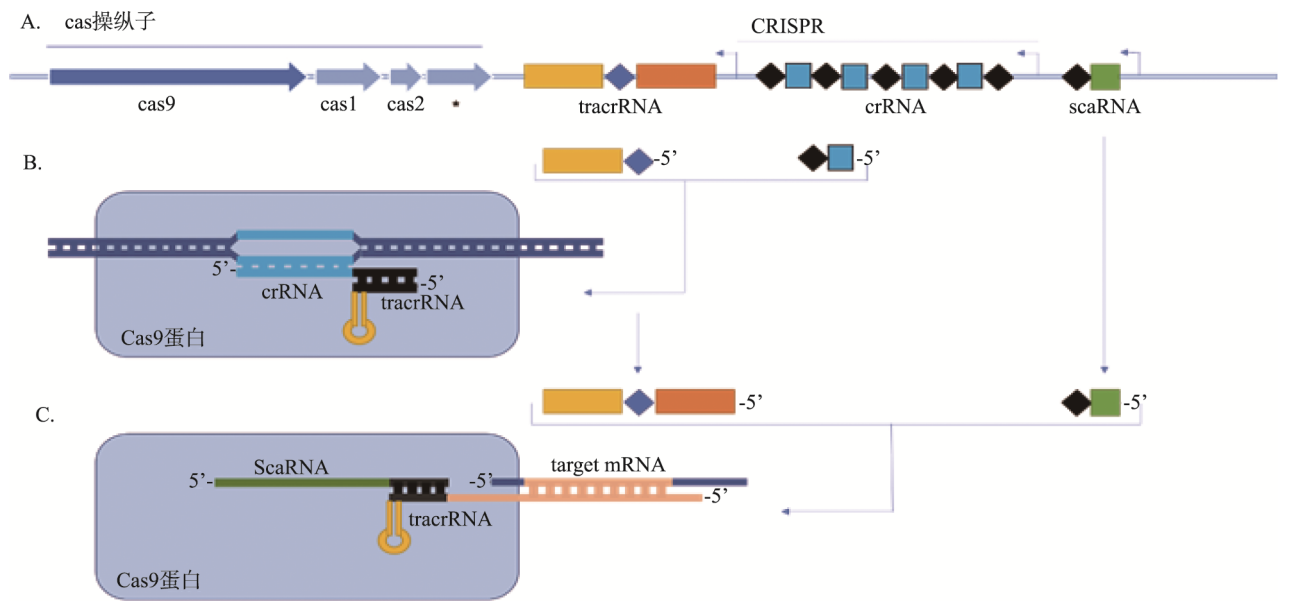


图 3 II 型 CRISPR-Cas 系统的双重功能
Fig.3 The dual functions of Type II CRISPR-Cas system

3 讨论与展望

食源性致病菌所带来的食品安全健康问题,轻则腹泻呕吐,重则危及到生命。食品安全一直是我国民生问题中的重中之重,随着对 CRISPR-Cas 系统的不断深入了解,也对食源性致病菌的耐药性和毒力因素有了清晰的认识和研究。通过 *Cas9* 相关基因手段可以从根本上解决毒性问题,降低伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌所带来的食品安全问题。目前来讲,国内外对 CRISPR 分型相关研究并没有一个标准的研究结构和数据分析库,所以急需一种基于 CRISPR-Cas 分型的基因数据库,依靠这个数据库可以分析统计致病菌相关耐药性关系和致病毒力岛等,并且相关致病菌耐药基因数据库的建立也逐渐提上议程。借助于 CRISPR-Cas9 等相关编辑手段可以完成对耐药基因和毒力基因的敲除改造,并且随着对 CRISPR 系统不断深入探究,目前也新发现了基于 CRISPR-Cas12^[49]和 Cas13^[50]为基础的快速检测手段,目前也应用于对新冠病毒检测研究,这也为食源性致病菌快速检测技术提供了新思路,为食品安全相关研究奠定了基础。

总的来说,CRISPR 系统作为一种细菌自身必要系统,在食源性致病菌中起着关键作用。在不同食源性致病菌中,CRISPR-Cas 系统有着不一样的耐药性、毒力因素结果。所以需要充分探究 CRISPR 系统在进化中起到的关键性影响,就目前研究表明,在不同菌株中,CRISPR-Cas 系统或多或少会起到一些积极和消极的影响,最主要的是 CRISPR-Cas 系统对基因水平转移的影响,抑制或促进耐药基因在同菌株间的水平转移。目前对于 CRISPR 与耐药性关系方面也具有一定研究潜力,还有许多未知领域需要发掘,相信随着对 CRISPR-Cas 系统的逐渐研究,其应用领域也会越来越广。

参考文献

- [1] Liu Y, Cao Y, Wang T, *et al.* Detection of 12 common food-borne bacterial pathogens by TaqMan real-time PCR using a single set of reaction conditions [J]. 2019.
- [2] Findings from Sichuan university provide new insights into microbiology detection of Tn7-Like transposons and antibiotic resistance in enterobacterales from animals used for food production with identification of three novel transposons [N]. Food Weekly News, 2020.
- [3] 冯莹颖, 张晓莉, 罗勤, 等. Sigma B 因子活性的调节及其在几种革兰氏阳性食源性致病菌中的作用[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 839-843.
Feng YY, Zhang XL, Luo Q, *et al.* Regulation of Sigma B factor activity and its role in several Gram-positive foodborne pathogens [J]. J Microbiol, 2008, 48(6): 839-843.
- [4] Adesanya OA, Oniyide SA. CRISPR-Cas systems: A review of their role as non-canonical antimicrobials to combat drug resistance [J]. J Adv Microbiol, 2020: 22-34.
- [5] 徐艳, 崔玉晓, 杨洋, 等. CRISPR/Cas 系统抵御细菌耐药[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3): 1-8.
Xu Y, Cui YX, Yang Y, *et al.* CRISPR/Cas system against bacterial resistance [J]. J Ecotoxicol, 2018, 13(3): 1-8.
- [6] 曾家伟, 侯国锋, 郑继平, 等. CRISPR/Cas 系统作为抗菌药的现状及展望[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(11): 59-65.
Zeng JW, Hou GF, Zheng JP, *et al.* Current situation and prospect of CRISPR/Cas system as antimicrobial drugs [J]. Chin J Bioeng, 2018, 38(11): 59-65.
- [7] 谢晓蕾, 李求春. CRISPR 结构及作用机理研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(31): 10845-10847, 10895.
Xie XL, Li QC. Research progress on the structure and mechanism of action of CRISPR [J]. Anhui Agric Sci, 2014, 42(31): 10845-10847, 10895.
- [8] 龙金照. 基于 CRISPR 的大肠杆菌分子分型方法的建立[D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
Long JZ. Establishment of crisPR-based molecular typing method for *Escherichia coli* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.
- [9] Nuñez JK, Kranzusch PJ, Noeske J, *et al.* Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity [J]. Nat Struct Molec Biol, 2014, 21(6): 528-534.
- [10] Hayun L, Yukti D, Dipali GS. The Cas4-Cas1-Cas2 complex mediates precise pre-spacer processing during CRISPR adaptation [J]. eLife, 2019, 8. DOI: 10.7554/eLife.44248
- [11] Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system [J]. Methods Molec Biol, 2015, 1239: 197.
- [12] Xiang XH, Qian K, Zhang Z, *et al.* CRISPR-cas systems based molecular diagnostic tool for infectious diseases and emerging 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia [J]. J Drug Target, 2020, 28: 7-8.
- [13] 卢大雷, 桓新, 王乐, 等. 红霉素耐药粪肠球菌 *ermB* 基因及水平转移分析[J]. 职业与健康, 2020, 36(6): 745-748.
Lu DL, Huan X, Wang L, *et al.* *ErmB* gene and its horizontal transfer in erythromycin resistant enterococcus faecalis [J]. Occup Health, 202, 36(6): 745-748.
- [14] Filip H, McCutcheon JP. Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(2): 67-79.
- [15] Zhao XH, Yu ZX, Xu ZB. Study the features of 57 confirmed CRISPR Loci in 38 strains of *Staphylococcus aureus* [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1591.
- [16] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. Nature, 2011, 471: 7340.
- [17] 王磊. 沙门菌 CRISPR/Cas 系统与氟喹诺酮类耐药的相关性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
Wang L. Correlation between CRISPR/Cas system and fluoroquinolone resistance [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018.
- [18] Wilson, Daniel N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance [J]. Nat Rev Microbiol, 2014, 12(1): 35-48.
- [19] Lima TB, Pinto MFS, Ribeiro SM, *et al.* Bacterial resistance mechanism: What proteomics can elucidate [J]. Faseb J, 2013, 27(4): 1291-1303.
- [20] Robert S, Rhod LA, Angela K, *et al.* Phenotypic detection of mecC-MRSA: Cefoxitin is more reliable than oxacillin [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, (1): 133-135.
- [21] Kusakizako T, Miyauchi H, Ishitani R, *et al.* Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters [J]. Biochim Et Biophys Acta (BBA)-Biomemb, 2019, 1862(12): 183154.
- [22] Holmes A, Moore LSP, Sundsfjord A, *et al.* Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance [J]. Lancet, 2016, 387: 176-187.
- [23] Locher, Kaspar P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC)

- transporters [J]. Nat Struct Molecul Biol, 2016, 23(6): 487.
- [24] Huang Y, Huang Y, Zhang L, *et al.* Identification of crucial genes and prediction of small molecules for multidrug resistance of Hodgkin's lymphomas [J]. Cancer Biomark, 2018, 23(4): 1–9.
- [25] Yan N. Structural biology of the major facilitator superfamily transporters [J]. Annual Rev Biophys, 2015, 44(1): 257.
- [26] Weston N, Sharma P, Ricci V, *et al.* Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae [J]. Res Microbiol, 2018, 169(7-8): 425–431.
- [27] Rollauer SE, Soreshjani MA, Noinaj N, *et al.* Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria [J]. Philosoph Transact Royal Soc London, 2015, 370(1679): 20150023.
- [28] Ghai, Ishan, Bajaj, *et al.* Ampicillin permeation across *OmpF*, the major outer-membrane channel in *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 2018, 293(18): 7030–7037.
- [29] 刘五高, 刘爱霞, 金晶, 等. 1 株同时携带 *mcr-1* 和 *NDM-5* 质粒介导耐药基因的泛耐药大肠埃希菌研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(5): 52–54.
- Liu WG, Liu AX, Jin J, *et al.* Study on a strain of pan-drug resistant *Escherichia coli* that carries both *McR-1* and *NDM-5* plasmids to mediate drug resistance gene [J]. Chin J Health Inspect, 2020, 30(5): 52–54.
- [30] Bou, German, Oviano, *et al.* Rapid detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant AAC(6')-Ib-cr in Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS analysis [J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(4): 1074–1080.
- [31] 徐桐桐, 卞晓锐, 单彩龙, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统抑制 Kan 耐药基因水平转移研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(4): 281–286.
- Xu TT, Bian XR, Shan CL, *et al.* Suppression of Kan drug resistance gene horizontal transfer using CRISPR/Cas9 system [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2017, 37(4): 281–286.
- [32] Vosik D, Tewari D, Dettinger L, *et al.* CRISPR typing and antibiotic resistance correlates with polyphyletic distribution in human isolates of *Salmonella kentucky* [J]. Foodborne Pathogens Dis, 2018, 15(2): 101–108.
- [33] Wang L, Wang Y, Duan G, *et al.* Detection of CRISPR and its relationship to drug resistance in *Shigella* [J]. Acta Microbiol Sin, 2015, 55(4): 476.
- [34] 张冰. 志贺菌中 CRISPR/Cas 系统与其耐药的关系[D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- Zhang B. Relationship between the CRISPR/Cas system and drug resistance in *Shigella* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016.
- [35] 赵霞. 大肠杆菌 CRISPR/Cas 与耐药性的关系研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2019.
- Zhao X. Relationship between *E. coli* CRISPR/Cas and drug resistance [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2019.
- [36] 董海思. 应用 CRISPR/cas9 技术消除大肠杆菌中多重耐药基因 *cfr* 的法研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- Dong HS. Application of CRISPR/ Cas9 technology to eliminate multiple drug resistant gene *CFR* in *E. coli* [D]. Changchun: Jilin University, 2016.
- [37] 张蒙蒙, 毕春霞, 王梦园, 等. 葡萄球菌 CRISPR-Cas 系统的基因结构及其与耐药基因的关系[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(5): 553–559.
- Zhang M, Bi CX, Wang MY, *et al.* The gene structure of *Staphylococcus* *crispr*-Cas system and its relationship with drug resistance genes [J]. Chin J Pathogen Biol, 2019, 14(5): 553–559.
- [38] Touchon 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(12): 2997–3004.
- [39] 王颖芳, 王鹏飞, 詹煜慧, 等. 志贺菌中成簇的规律间隔短回文重复序列与毒力基因和耐药基因的关系[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2019, 40(1): 71–75.
- Wang YF, Wang PF, Zhan YH, *et al.* Relationship between cluster regular interval short palindromic repeat sequence and virulence genes and drug resistance genes in *Shigella* [J]. J Xi'an Jiaotong Univ (Med Ed), 2019, 40(1): 71–75.
- [40] 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[D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
- Yao WY. The CRISPR-Cas9 system on the editing of *Escherichia coli* genome and the reversal of bacterial resistance [D]. Xiamen: Xiamen University, 2017.
- [41] Dicarlo JE, Norville JE, Prashant M, *et al.* Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems [J]. Nucleic Acids Res, 2013, (7): 4336–4343.
- [42] Manal MAK, Nagwa MAA, Salamah AAA. Phage typing, PCR amplification for *mecA* gene, and antibiotic resistance patterns as epidemiologic markers in nosocomial outbreaks of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Saudi J Biol Sci, 2009, 16(1): 37–49.
- [43] Yang S, Liu J, Shao F, *et al.* Analysis of the features of 45 identified CRISPR loci in 32 *Staphylococcus aureus* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 464(3): 894–900.
- [44] Ido Y, Goren MG, Udi Q. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Res, 2012, (12): 5569–5576.
- [45] Xu JZ, Zhang JL, Zhang WG. Antisense RNA: The new favorite in genetic research [J]. J Zhejiang Univ ENCE B, 2018, 19(10): 739–749.
- [46] Yang YP, Wang J, Zhang RH, *et al.* Antisense RNA elements for downregulating expression [J]. Methods Molecul Biol, 2019, 1927: 23–35.
- [47] Louwen R, Horst-Kreft D, Boer AG, *et al.* A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013, 32(2): 207–226.
- [48] Louwen R, Staals RHJ, Endtz HP, *et al.* The role of CRISPR-Cas systems in virulence of pathogenic bacteria [J]. Microbiol Molecul Biol Rev Mmbr, 2014, 78(1): 74–88.
- [49] Broughton JP, Deng X, Yu G, *et al.* CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2 [J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(7): 870–874.
- [50] Cox DB, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, *et al.* RNA editing with CRISPR-Cas13 [J]. Science, 2017, 358(6366): 1019–1027.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

金姗姗, 主要研究方向为食源性致病菌检测。
E-mail: 1198801345@qq.com

赵喜红, 博士, 教授, 主要研究方向为食源性致病菌检测。
E-mail: Xhzhao2006@gmail.com