

谢龙飞, 肖丹瑜, 常依, 等. CRISPR/Cas 系统对金黄色葡萄球菌耐药及毒力基因的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(2): 179-186.
XIE Longfei, XIAO Danyu, CHANG Yi, et al. Effect of CRISPR/Cas system on drug resistance and virulence genes of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(2): 179-186.

CRISPR/Cas 系统对金黄色葡萄球菌 耐药及毒力基因的影响

谢龙飞✉, 肖丹瑜, 常依, 张旭财, 李小申, 熊文广✉

(广东省兽药研制与安全评价重点实验室/国家兽药安全评价(环境评估)实验室/国家兽医微生物耐药性风险评估实验室/
华南农业大学 兽医学院/岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】了解金黄色葡萄球菌(以下简称“金葡菌”) *Staphylococcus aureus* 中成簇的规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)的分布情况, 分析其对抗生素耐药基因和毒力基因水平转移的影响。【方法】从公共数据库获取组装完整的金葡菌基因组 575 个, 利用生物信息学方法, 统计 CRISPR 结构的携带情况, 菌株多位点序列分型(Multi-locus sequence typing, MLST)型别分布和菌株耐药基因、毒力基因的分布情况; 对 CRISPR 结构阳性(CRISPR+)和 CRISPR 结构阴性(CRISPR-)的金葡菌耐药基因和毒力基因携带数目进行差异显著性分析。同时对实验室 60 株金葡菌二代测序数据进行分析, 验证公共数据库分析结果。对实验室 60 株金葡菌中原噬菌体、接合质粒的携带情况进行统计, 讨论 CRISPR 结构对菌株原噬菌体和接合质粒的影响。【结果】基因组组装完整的 575 株金葡菌中, 有 62 株携带 CRISPR 结构(CRISPR+), 513 株不携带 CRISPR 结构(CRISPR-); CRISPR+金葡菌携带耐药基因、毒力基因的数目显著小于 CRISPR-金葡菌。实验室 60 株金葡菌中, 有 14 株为 CRISPR+, 46 株为 CRISPR-; CRISPR+金葡菌携带更少的耐药基因和毒力基因, 与公共数据库分析结果一致。对原噬菌体和接合质粒的分析结果显示, CRISPR-菌株携带更多的原噬菌体序列, 与 CRISPR+菌株之间差异显著($P<0.05$); 接合质粒方面, CRISPR-和 CRISPR+菌株无显著性差异。【结论】CRISPR 结构可能限制了金葡菌中耐药基因和毒力基因的水平转移, CRISPR-菌株更容易受到噬菌体和可移动质粒的干扰。本研究为进一步研究金葡菌耐药基因和毒力基因的传播提供了参考。

关键词: 金黄色葡萄球菌; CRISPR/Cas 系统; 耐药基因; 毒力基因

中图分类号: S852; S859

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)02-0179-08

Effect of CRISPR/Cas system on drug resistance and virulence genes of *Staphylococcus aureus*

XIE Longfei✉, XIAO Danyu, CHANG Yi, ZHANG Xucai, LI Xiaoshen, XIONG Wenguang✉

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation/National Laboratory of Safety Evaluation (Environmental Assessment) of Veterinary Drugs/National Risk Assessment Laboratory for Antimicrobial Resistance of Animal Original Bacteria/College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/
Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To understand the distribution of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) in *Staphylococcus aureus* and analyze their effects on the horizontal transfer of antibiotic resistance gene and virulence gene. 【Method】Total 575 complete *S. aureus* genomes were obtained from

收稿日期: 2021-11-21 网络首发时间: 2022-06-23 15:56:20

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220622.1454.002.html>

作者简介: 谢龙飞, 硕士研究生, 主要从事畜禽病原菌耐药性传播机制研究, E-mail: 2911922454@stu.scau.edu.cn; 通信作者: 熊文广, 副教授, 博士, 主要从事畜禽病原菌耐药性传播机制与控制研究, E-mail: xiongw@scu.edu.cn

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金(2020A1515010917); 广东省珠江人才计划本土创新科研团队项目(2019BT02N054)

public databases, and bioinformatics methods were used to count the CRISPR carriage, multi-locus sequence typing (MLST) types distribution of strains and the distribution of strain drug resistance genes and virulence genes. The significance analysis of the difference in the number of drug resistance genes and virulence genes was carried out between CRISPR structure-positive (CRISPR+) and CRISPR structure-negative (CRISPR-) *S. aureus*. The data of 60 strains of *S. aureus* were also analyzed by second-generation sequencing to verify the results of public database analysis. We also counted the carriage of prophages and conjugative plasmids in 60 strains of *S. aureus* in the laboratory, and discussed the effect of CRISPR structure on the prophages and conjugative plasmids of the strains. 【Result】 Among the 575 strains with complete genome assembly, there were 62 strains with CRISPR structure (CRISPR+) and 513 strains without (CRISPR-). The number of drug resistance genes and virulence genes of CRISPR+ *S. aureus* was less than that of CRISPR- *S. aureus*, and the difference was significant. Among 60 strains of *S. aureus* in the laboratory, there were 14 strains of CRISPR+ and 46 strains of CRISPR-. CRISPR+ *S. aureus* carried fewer drug resistance genes and virulence genes, which was consistent with the results of the public database analysis. Analysis of prophages and conjugative plasmids showed that CRISPR- strains carried more prophage sequences, which were significantly different from CRISPR+ strains ($P<0.05$). For conjugative plasmids, CRISPR- and CRISPR+ strains were largely consistent with no significant difference. 【Conclusion】 CRISPR structure may limit the horizontal transfer of drug resistance and virulence genes in *S. aureus*, and CRISPR- strains are more susceptible to be interfered by phage and removable plasmids. This study provides a reference for further research on transmission of drug resistance and virulence genes in *S. aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*; CRISPR/Cas system; Drug resistance gene; Virulence gene

金黄色葡萄球菌 (以下简称“金葡菌”) *Staphylococcus aureus* 是一种革兰阳性球菌, 可引起肺和皮肤组织感染, 甚至危及生命。作为一种机会致病菌, 金葡菌已成为外科手术感染及医疗器械污染中最常见的病原体^[1-3]。近年来, 随着抗生素的大量使用, 金葡菌耐药性逐渐增强, 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 的出现引起了全球的广泛关注。有研究表明, 金葡菌可通过噬菌体、质粒、转座子及葡萄球菌盒式染色体 (*Staphylococcal cassette chromosome mec*, SCCmec) 等方式进行耐药基因的水平转移^[4-6]。*mecA* 作为 MRSA 菌株携带的耐药基因, 已有研究表明 *mecA* 主要通过 SCCmec 元件进行水平转移^[7-8]。

SCCmec 是一种具有高度多样性的移动遗传因子。1999 年首次测定了 1982 年分离的日本金葡菌 N315 菌株的 *mec* 整体结构及 DNA 序列。1 年后, *mec* DNA 被发现是由 2 个位点特异性重组酶基因 *ccrA* 和 *ccrB* 驱动的新基因元件, 命名为 SCCmec^[9]。SCCmec (SCC 家族的主要成员) 是一种携带 *mec* 基因 (*mecA*、*mecB* 和 *mecC*) 以及控制其表达的基因 *mecR1* (编码信号转导蛋白 *mecR1*) 和 *mecI* (编码抑制蛋白 *mecI*) 的移动遗传元件, 并作为葡萄球菌菌株间基因信息交换的载体。SCCmec 位于葡萄球菌染色体复制起点附近, 插入在插入位点

attB (*orfX* 的 3'端)。SCCmec 有 3 个基本的遗传因素: *ccr* 基因复合体 (由 *ccrAB* 或 *ccrC* 及其周围的 ORFs 组成)、*mec* 基因复合体 (由 *mec* 基因、插入序列和周围的 ORFs 组成) 和连接区 (J 区)。在 *ccr* 基因复合体中, 通过 *ccrAB* 或 *ccrC* 位点特异性重组, 可以将多个耐药和耐重金属基因插入 SCCmec 中, SCCmec 可通过 *ccrAB* 或 *ccrC* 的精确切除和整合, 整合到葡萄球菌菌株的染色体上; 因此, 不同的葡萄球菌菌株交换遗传信息, 以适应不同的环境和抗生素选择的压力^[10]。SCCmec 编码一种新的特异性青霉素结合蛋白 (PBP2a), 与金葡菌内源性青霉素结合蛋白相比, PBP2a 与 β -内酰胺的结合亲和力降低, 导致抗生素失活。与其他对 β -内酰胺类抗生素的抑制机制不同, MRSA 还能够通过 PBP2a 持续合成独特的细胞壁成分。由于获得了 SCCmec 元件, 甲氧西林敏感金葡菌 (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, MSSA) 进化为 MRSA^[11]。根据各类型 SCCmec 在 J 区域的差异, 将 SCCmec 分为不同的型和亚型。III 型 SCCmec 在巴西、波兰、伊朗、土耳其、马来西亚、泰国、中国和中国台湾等国家或地区为主要检出类型^[12]。本研究通过对实验室 60 株二代测序金葡菌基因组序列 SCCmec 元件进行比对分析, 发现 CRISPR 阳性 (CRISPR+) 和 CRISPR 阴性 (CRISPR-) 不同菌株中都携带 SCCmec 元件, SCCmec 元件的主要类型为 III 型, 另外有

1 株为 VIII 型, 1 株为 XII 型, 与报道结果一致。

成簇的规律间隔短回文重复序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 是存在于原核生物中的一种适应性免疫系统。有研究表明, 约 50% 的细菌携带 CRISPR/Cas 系统^[13]。它能够靶向切割核酸序列, 从而抵御噬菌体、质粒等外源基因的入侵, 保持细菌自身遗传结构的稳定^[14]。CRISPR/Cas 系统能否限制细菌耐药基因和毒力基因的水平转移, 目前还没有明确的结论。Marraffini 等^[15]发现表皮葡萄球菌 RP62a 菌株的 CRISPR/Cas 系统可以阻止质粒的结合转移。张蒙蒙等^[16]发现葡萄球菌中 CRISPR/Cas 系统可以限制 *mecA* 等耐药基因的转移。目前, 金葡菌中 CRISPR/Cas 系统对细菌耐药基因和毒力基因的影响还不清楚。本研究以 NCBI 数据库 575 株金葡菌的基因组序列为研究对象, 探讨 CRISPR 结构对其耐药基因和毒力基因的影响, 并通过对实验室分离菌株二代测序基因组序列进行分析, 做进一步验证。

1 材料与方法

1.1 材料

575 株金葡菌基因组序列下载自 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/154>), 60 株金葡菌基因组为本研究前期临床分离菌株的二代测序数据。

1.2 方法

1.2.1 CRISPR 位点的识别与提取 通过 CRISPRs finder (<https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/>) 在线进行, 统计具有 CRISPR 位点的金葡菌, 将金葡菌基因组分为 CRISPR+和 CRISPR- 2 大类。

1.2.2 金葡菌多位点序列分型及系统发育树的构建 对 575 株金葡菌通过 Center for Genomic Epidemiology 在线网站 (<http://www.genomicepidemiology.org/>) 进行多位点序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST), 构建系统发育树。对 CRISPR+和 CRISPR-菌株 ST 型别进行韦恩图的绘制, 分析二者的相关性。

1.2.3 耐药基因、毒力基因的统计 通过 Center for Genomic Epidemiology 网站下载整理耐药基因和毒力基因数据库, 预测金葡菌基因组的 ORF, 利用 blastn 软件进行耐药基因和毒力基因的比对 (序列一致率>80%, 覆盖率>70%)。

1.2.4 原噬菌体和接合质粒的比对分析 实验室 60 株金葡菌基因组通过 PHASTER 在线网站

(<http://phaster.ca/>) 比对原噬菌体的携带情况, 统计结果为完整噬菌体序列。通过 Center for Genomic Epidemiology 在线网站比对接合质粒存在情况 (序列一致率>95%)。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析, CRISPR+和 CRISPR-与耐药基因和毒力基因之间的关系采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 金葡菌基因组中 CRISPR 结构分布概况

公共数据库 575 株金葡菌中有 62 株 (11%) 含有确证的 CRISPR 位点 (CRISPR+), 513 株 (89%) 无或仅含有可疑的 CRISPR 结构 (CRISPR-)。实验室 60 株金葡菌中有 14 株 (23%) 含有确证的 CRISPR 位点 (CRISPR+), 46 株 (77%) 无或仅含有可疑的 CRISPR 结构 (CRISPR-)。

2.2 金葡菌 MLST 型别及相关性分析

对 575 株金葡菌基因组进行 MLST 分型, 536 株可以进行 ST 分型, 共得到 81 个 ST 型别。对基因组进行系统发育树的构建, 如图 1A 所示。我们将 ST 型别数量 ≥ 10 的菌株标注不同的颜色, 其他型别菌株以白色显示, 同时将新 ST 型菌株以黑色标注。系统发育树显示, ST8 型别的菌株所占的比例最高, 为 19%(111/575); 其次是 ST5, 占比达到 13%(77/575)。在 CRISPR+菌株中, 最具有代表性的型别是 ST398; CRISPR-菌株中, 最具有代表性的型别是 ST8。通过绘制韦恩图来分析 CRISPR+与 CRISPR-菌株的关系, 如图 1B 所示, CRISPR+与 CRISPR-之间有 11 个共同的 ST 型, 菌株之间具有相关性。

2.3 金葡菌耐药基因的分析

2.3.1 金葡菌耐药基因分布 公共数据库基因组中, 62 株 CRISPR+金葡菌中阳性率最高的耐药基因是 *tet*(38), 占比高达 90%(56/62); 其次是 *blaZ*, 占比 60%(37/62)。与 CRISPR+菌株相比, 513 株 CRISPR-菌株中 *ant*(4')-Ib、*aph*(3')-IIIa、*aad*(6) 和 *msr*(A) 的阳性率高 ($P<0.05$)。CRISPR-菌株耐药基因的种类多于 CRISPR+菌株 (表 1)。

实验室菌株基因组中, 14 株 CRISPR+金葡菌中阳性率最高的耐药基因是 *blaZ*, 占比 57% (8/14)。与 CRISPR+菌株相比, 46 株 CRISPR-菌株中 *ant*(6)-Ia、*cfr*、*mecA* 的阳性率高 ($P<0.05$)。CRISPR+菌株的耐药基因种类少于 CRISPR-菌株 (表 2)。

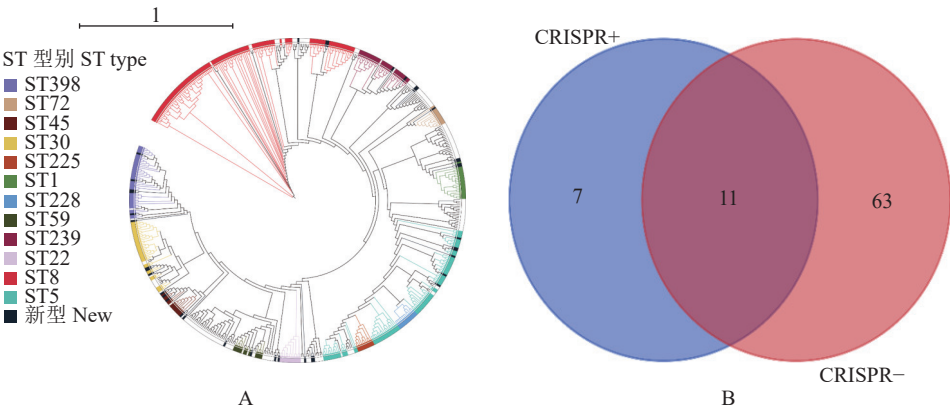


图 1 公共数据库基因组 CRISPR+和 CRISPR-金葡菌 MLST 型别系统发育树 (A) 和 ST 型别交叉情况 (B)

Fig. 1 Phylogenetic tree (A) and ST type crossover (B) of CRISPR+ and CRISPR- *Staphylococcus aureus* MLST types in public database genome

表 1 公共数据库基因组 CRISPR+与 CRISPR-菌株耐药基因比较¹⁾

Table 1 Comparison of drug resistance genes between CRISPR+ and CRISPR- strains for the public database genome

耐药基因 Drug resistance gene	CRISPR+		CRISPR-		P
	数量	占比/%	数量	占比/%	
	Quantity	Proportion	Quantity	Proportion	
<i>ant(4')-I b</i>	2	3	72	14	0.014
<i>ant(9)-I a</i>	9	15	126	25	0.078
<i>aac(6')-Ie-</i>	5	8	82	16	0.100
<i>aph(2'')-I a</i>					
<i>aph(3')-IIIa</i>	—	—	102	20	0.000
<i>aad(6)</i>	1	2	58	11	0.013
<i>ant(6)-I a</i>	2	3	3	1	0.164
<i>mecA</i>	33	53	285	56	0.727
<i>mecR1</i>	4	6	99	19	0.013
<i>mec I</i>	2	3	74	14	0.009
<i>blaZ</i>	37	60	292	57	0.679
<i>mecC</i>	3	5	4	1	0.032
<i>cfr(A)</i>	—	—	2	0	1.000
<i>erm(A)</i>	10	16	135	26	0.081
<i>erm(B)</i>	1	2	12	2	1.000
<i>erm(C)</i>	4	6	29	6	0.772
<i>erm(T)</i>	1	2	—	—	0.206
<i>I sa(E)</i>	2	3	4	1	0.259
<i>I sa(B)</i>	—	—	1	0	1.000
<i>msr(A)</i>	—	—	60	12	0.009
<i>msr(F)</i>	—	—	1	0	1.000
<i>optr(A)</i>	—	—	1	0	1.000
<i>vga(A)LC</i>	3	5	3	1	0.014
<i>vga(E)</i>	3	5	4	1	0.032
<i>vga(A)v</i>	1	2	—	—	0.206
<i>tet(38)</i>	56	90	491	96	0.063
<i>tet(K)</i>	16	26	50	10	0.000
<i>tet(L)</i>	3	5	6	1	0.063
<i>tet(M)</i>	19	31	71	14	0.001

1) “—” 表示未检测到
1) “—” is not detected

表 2 实验室基因组 CRISPR+与 CRISPR-菌株耐药基因比较¹⁾

Table 2 Comparison of drug resistance genes between CRISPR+ and CRISPR- strains for the laboratory genome

耐药基因 Drug resistance gene	CRISPR+		CRISPR-		P
	数量	占比/%	数量	占比/%	
	Quantity	Proportion	Quantity	Proportion	
<i>l nu(A)</i>	2	14	5	11	0.660
<i>l nu(B)</i>	—	—	9	20	0.100
<i>l sa(E)</i>	—	—	9	20	0.100
<i>erm(A)</i>	1	7	1	2	0.955
<i>erm(B)</i>	4	29	20	43	0.368
<i>erm(C)</i>	6	43	28	61	0.234
<i>erm(T)</i>	1	7	4	9	1.000
<i>f exA</i>	2	14	35	76	0.000
<i>f exB</i>	1	7	1	2	0.955
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	—	—	16	35	0.013
<i>aph(2'')-Ia</i>	4	29	18	39	0.542
<i>aadD</i>	2	14	32	70	0.000
<i>ant(6)-Ia</i>	3	21	25	54	0.004
<i>ant(9)-Ia</i>	1	7	1	2	0.955
<i>tet(K)</i>	3	21	14	30	0.737
<i>tet(L)</i>	3	21	25	54	0.004
<i>tet(M)</i>	1	7	7	15	0.667
<i>tet(S)</i>	2	14	14	30	0.314
<i>tet(T)</i>	—	—	1	2	1.000
<i>blaZ</i>	8	57	17	37	0.180
<i>str</i>	—	—	3	7	0.779
<i>cfr</i>	2	14	23	50	0.028
<i>mecA1</i>	2	14	17	37	0.189
<i>sal(A)</i>	2	14	17	37	0.189
<i>optrA</i>	2	14	17	37	0.189
<i>mecA</i>	3	21	25	54	0.004
<i>msr(A)</i>	—	—	1	2	1.000
<i>dfrG</i>	1	7	15	33	0.086
<i>qacG</i>	2	14	—	—	0.079
<i>fosD</i>	1	7	13	28	0.154
<i>fosB5</i>	—	—	2	4	1.000
<i>fosB4</i>	1	7	0	0	0.525

1) “—” 表示未检测到
1) “—” is not detected

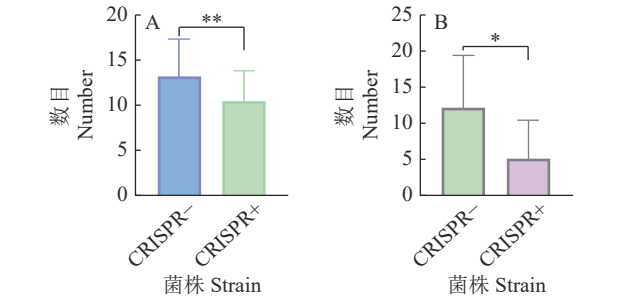
2.3.2 金葡萄耐药基因数目 在菌株携带耐药基因的数量方面, CRISPR+菌株携带的耐药基因数量更少。公共数据库基因组 CRISPR+菌株中, 有 58%(36/62) 的菌株携带耐药基因的数量 ≥ 10 个, 低于 CRISPR-菌株 (77%, 395/513); 实验室菌株基因组 CRISPR+菌株中, 有 29%(4/14) 的菌株携带耐药基因的数量 ≥ 10 个, 低于 CRISPR-菌株 (74%, 34/46)(表 3)。

表 3 公共数据库与实验室基因组 CRISPR+与 CRISPR-菌株耐药基因数目比较

Table 3 Comparison of the number of drug resistance genes between CRISPR+ and CRISPR- strains for the public database and the laboratory genomes

基因组 Genome	耐药基因数目 Number of drug resistance gene	占比/% Proportion	
		CRISPR+	CRISPR-
公共数据库 Public database	≥ 5	95	100
	≥ 10	58	77
	≥ 15	11	38
	≥ 20	0	6
实验室 Laboratory	≥ 5	36	76
	≥ 10	29	74
	≥ 15	7	50
	≥ 20	0	17

同时, 我们分别对 2 组数据中 CRISPR+和 CRISPR-菌株携带耐药基因数目进行箱线图绘制。公共数据库基因组中, CRISPR+菌株整体携带耐药基因数量的平均值低于 CRISPR-菌株, 差异极显著 ($P<0.01$)(图 2A)。实验室基因组中, CRISPR+菌株整体携带耐药基因数量的平均值低于 CRISPR-



“*” 和 “**” 分别表示在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著 (χ^2 检验)
“*” and “**” indicates significant differences at $P<0.05$ and $P<0.01$ respectively (χ^2 test)

图 2 公共数据库 (A) 和实验室 (B) 基因组 CRISPR+与 CRISPR-菌株整体携带耐药基因数目平均值比较

Fig. 2 Comparison of the average number of drug resistance genes between all CRISPR+ and CRISPR- strains for the public database (A) and the laboratory (B) genomes

菌株, 差异显著 ($P<0.05$)(图 2B)。

2.4 金葡萄毒力基因的分析

2.4.1 金葡萄毒力基因分布 由表 4 可知, 公共数据库基因组中, CRISPR+金葡萄阳性率最高的毒力基因是 *hlgB*、*hlgC*, 占比高达 100%(62/62); 其

表 4 公共数据库基因组 CRISPR+与 CRISPR-菌株毒力基因比较¹⁾

Table 4 Comparison of virulence genes between CRISPR+ and CRISPR- strains for the public database genome

毒力基因 Virulence gene	CRISPR+		CRISPR-		<i>P</i>
	数量 Quantity	占比/% Proportion	数量 Quantity	占比/% Proportion	
<i>aur</i>	61	98	503	98	0.855
<i>splA</i>	18	29	368	72	0.000
<i>splB</i>	21	34	381	74	0.000
<i>splE</i>	19	31	66	13	0.000
<i>sak</i>	4	6	—	—	0.000
<i>scn</i>	4	6	—	—	0.000
<i>sea</i>	4	6	103	20	0.009
<i>seb</i>	1	2	44	9	0.074
<i>sec</i>	10	16	58	11	0.267
<i>sed</i>	—	—	28	5	0.061
<i>seg</i>	15	24	221	43	0.004
<i>seh</i>	—	—	23	4	0.159
<i>sei</i>	15	24	227	44	0.003
<i>sej</i>	—	—	39	8	0.015
<i>sek</i>	4	6	137	27	0.000
<i>sel</i>	10	16	54	11	0.185
<i>sem</i>	15	24	229	45	0.002
<i>sen</i>	14	23	225	44	0.001
<i>seo</i>	15	24	229	45	0.002
<i>sep</i>	2	3	62	12	0.033
<i>seq</i>	5	8	131	26	0.002
<i>ser</i>	—	—	38	7	0.025
<i>seu</i>	15	24	115	22	0.752
<i>tst</i>	4	6	67	13	0.135
<i>hlgA</i>	60	97	507	99	0.192
<i>hlgB</i>	62	100	512	100	0.728
<i>hlgC</i>	62	100	512	100	0.728
<i>lukD</i>	24	39	386	75	0.000
<i>lukE</i>	25	40	378	74	0.000
<i>lukF</i>	7	11	124	24	0.022
<i>lukS</i>	—	—	28	5	0.061
<i>lukF-PV</i>	7	11	124	24	0.022
<i>lukS-PV</i>	—	—	28	5	0.061

1) “—” 表示未检测到
1) “—” is not detected

次是 *aur*, 占比 98%(61/62)。与 CRISPR+菌株相比, CRISPR-菌株中 *splA*、*splB* 的阳性率高 ($P<0.05$)。CRISPR-菌株毒力基因的种类多于 CRISPR+菌株。

实验室菌株基因组中, CRISPR+金葡菌阳性率最高的毒力基因是 *aur*、*hlgA*、*hlgB* 和 *hlgC*, 占比 71%(10/14)。与 CRISPR+菌株相比, CRISPR-菌株中 *sei*、*sem*、*sen*、*seo* 和 *seu* 的阳性率高。CRISPR+菌株的毒力基因种类少于 CRISPR-菌株 (表 5)。

表 5 实验室基因组 CRISPR+与 CRISPR-菌株毒力基因比较

Table 5 Comparison of virulence genes between CRISPR+ and CRISPR- strains for the laboratory genome

毒力基因 Virulence gene	CRISPR+ ¹⁾		CRISPR-		<i>P</i>
	数量	占比%	数量	占比%	
	Quantity	Proportion	Quantity	Proportion	
<i>aur</i>	10	71	22	48	0.121
<i>splA</i>	1	7	12	26	0.264
<i>splB</i>	2	14	10	22	0.713
<i>splE</i>	2	14	9	20	1.000
<i>sak</i>	6	43	9	20	0.078
<i>scn</i>	7	50	14	30	0.179
<i>hlgA</i>	10	71	22	48	0.121
<i>hlgB</i>	10	71	22	48	0.121
<i>hlgC</i>	10	71	22	48	0.121
<i>lukD</i>	1	7	12	26	0.264
<i>lukE</i>	1	7	12	26	0.264
<i>sea</i>	—	—	1	2	1.000
<i>seg</i>	—	—	9	20	0.100
<i>seh</i>	—	—	2	4	1.000
<i>sei</i>	—	—	10	22	0.098
<i>sem</i>	—	—	10	22	0.098
<i>sen</i>	—	—	10	22	0.098
<i>seo</i>	—	—	10	22	0.098
<i>seu</i>	—	—	10	22	0.098
<i>edinA</i>	—	—	1	2	1.000

1) “—” 表示未检测到

1) “—” is not detected

2.4.2 金葡菌毒力基因数目 在菌株携带毒力基因的数量方面, CRISPR+菌株携带的毒力基因更少。公共数据库基因组 CRISPR+菌株中, 有 35%(22/62) 的菌株携带毒力基因的数量 ≥ 10 个, 低于 CRISPR-菌株 (73%, 374/513); 实验室菌株基因组 CRISPR+菌株中, 有 7%(1/14) 的菌株携带毒力基因的数量 ≥ 10 个, 低于 CRISPR-菌株 (41%, 19/46)(表 6)。

同时, 我们分别对 2 组数据中 CRISPR+和 CRISPR-菌株携带毒力基因数目进行箱线图绘制。公共数据库基因组中, CRISPR+菌株整体携带毒力基因数目的平均值低于 CRISPR-菌株, 差异极显著 ($P<0.01$)(图 3A)。实验室基因组中, CRISPR+菌株整体携带毒力基因数目的平均值低于 CRISPR-菌株, 差异显著 ($P<0.05$)(图 3B)。

表 6 公共数据库基因组 CRISPR+与 CRISPR-菌株毒力基因数目比较

Table 6 Comparison of the number of virulence genes between CRISPR+ and CRISPR- strains for the public database genome

基因组 Genome	毒力基因数目 Number of virulence gene	占比/% Proportion	
		CRISPR+	CRISPR-
公共数据库 Public database	≥ 5	68	96
	≥ 10	35	73
	≥ 15	6	15
	≥ 20	3	0
实验室 Laboratory	≥ 5	50	48
	≥ 10	7	41
	≥ 15	0	13
	≥ 20	0	7

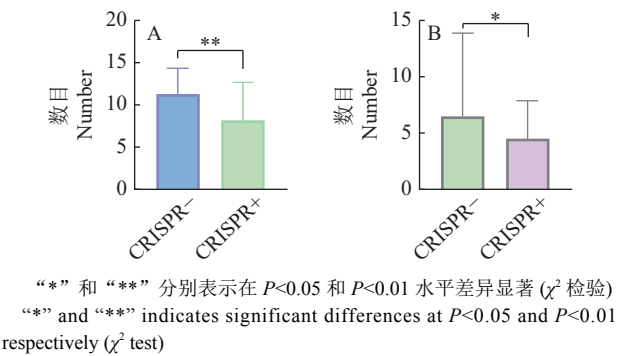


图 3 公共数据库 (A) 和实验室 (B) 基因组 CRISPR+和 CRISPR-菌株整体携带毒力基因数目平均值比较

Fig. 3 Comparison of the average number of virulence genes between all CRISPR+ and CRISPR- strains for the public database genome (A) and the laboratory genome (B)

2.5 原噬菌体和接合质粒的比对分析

实验室 60 株金葡菌基因组原噬菌体比对结果显示, CRISPR+金葡菌中原噬菌体的携带率为 29%(4/14), CRISPR-金葡菌中原噬菌体的携带率为 67%(31/46)。CRISPR-菌株携带更多的原噬菌体序列, 与 CRISPR+菌株之间差异显著 ($P<0.05$)。接合质粒的分析结果显示, CRISPR+金葡菌中接合质粒的携带率为 86%(12/14), CRISPR-金葡菌中接合质粒的携带率为 80%(37/46)。CRISPR-和

CRISPR+菌株基本一致, 无显著差异 ($P>0.05$)。

3 讨论与结论

3.1 讨论

CRISPR/Cas 系统作为原核生物的一种适应性免疫系统, 能抵御外来基因元件如噬菌体、质粒的入侵, 保持细菌自身遗传结构的稳定。日本学者于 1987 年首次在大肠埃希菌中发现该结构^[17], Barrangou 等^[13]首次用试验证明 CRISPR/Cas 系统具有抵御外来噬菌体干扰的功能。本研究结果显示, CRISPR+金葡萄菌株大多含有较少的耐药基因和毒力基因, CRISPR 结构能够限制耐药基因、毒力基因的水平转移, 使细菌的遗传结构保持稳定^[18]。

但是, 从进化的角度看, 基因的水平转移可以使细菌获取新的遗传物质, 有利于细菌在复杂的环境中生存^[19-20]。本研究在对毒力基因进行分析的过程中发现, 极少数 CRISPR+金葡萄携带的毒力基因数目高于 CRISPR-菌株, 这与 Palmer 等^[21]的研究一致, 说明在外源基因获取压力下, CRISPR/Cas 系统往往处于失活状态。

细菌耐药性的产生主要依赖于耐药基因的水平转移, CRISPR/Cas 系统是否能够限制耐药、毒力基因的水平转移, 不同研究有不同的报道。有研究表明, 一些种类的细菌几乎不携带 CRISPR/Cas 系统^[22]; 同时, 也有相关研究表明, 宿主菌可以通过丢失 CRISPR 结构来获得高度有益的外源 DNA^[23]。Touchon 等^[24]分析了 263 株大肠埃希菌的 CRISPR/Cas 系统, 对 CRISPR 结构与耐药性的关系进行了分析, 结果表明, CRISPR 结构的存在并不能阻止耐药基因和质粒的水平转移。洪丽娟等^[25]发现志贺菌中 CRISPR 结构对菌株耐药基因和耐药表型均无影响。然而, 张蒙蒙等^[16]发现葡萄球菌基因组中 CRISPR/Cas 系统携带率低, 且基因座、Cas 基因的结构和功能均不完善, 仅较少的菌株中含有完整的 CRISPR/Cas 系统, 完整的葡萄球菌 CRISPR/Cas 系统可能限制 *mecA* 基因的水平转移。Palmer 等^[21]发现 CRISPR/Cas 系统的存在限制了粪肠球菌中来自可移动元件的耐药基因间的水平传播。Marraffini 等^[15]通过试验证明葡萄球菌 RP62a 的 CRISPR/Cas 系统能够抵御噬菌体的入侵。同时, Watson 等^[26]研究表明 CRISPR/Cas 系统可以通过转导增强基因的水平转移。对于 CRISPR 结构与毒力基因的关系, Wiedenheft 等^[27]研究表明铜绿假单胞菌 CRISPR/Cas 系统的存在与小鼠中某些毒力基因的表达密切相关。

3.2 结论

本研究通过对公共数据库金葡萄基因组中 CRISPR/Cas 系统、耐药基因和毒力基因进行比对分析, 并利用实验室金葡萄基因组进行验证, 发现金葡萄中 CRISPR 结构的存在可能影响金葡萄耐药、毒力基因的水平转移。CRISPR-菌株携带更多的原噬菌体序列, 表明 CRISPR-菌株更容易受到噬菌体和可移动质粒的干扰。本研究结果对进一步研究金葡萄耐药基因和毒力基因的传播有参考意义。

参考文献:

[1] CHEN L, TANG Z Y, CUI S Y, et al. Biofilm production ability, virulence and antimicrobial resistance genes in *Staphylococcus aureus* from various veterinary hospitals[J]. *Pathogens*, 2020, 9(4): 264. doi: 10.3390/pathogens9040264.

[2] SHOPSIN B, KREISWIRTH B N. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2001, 7(2): 323-326.

[3] KRISHNA S, MILLER L S. Host-pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*[J]. *Current Opinion Microbiology*, 2012, 15(1): 28-35.

[4] 毛婷婷. 金黄色葡萄球菌 CRISPR 结构及耐药毒力分子特征[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.

[5] LINDSAY J A. *Staphylococcus aureus* genomics and the impact of horizontal gene transfer[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2014, 304(2): 103-109.

[6] ANITHA P, ANBARASU A, RAMAIAH S. Gene network analysis reveals the association of important functional partners involved in anti-biotic resistance: A report on an important pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus*[J]. *Gene*, 2016, 575(2): 253-263.

[7] 左祥, 查艳景, 王征. 金黄色葡萄球菌的临床分布及耐药基因研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(6): 566-569.

[8] ITO T, OKUMA K, MA X X, et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: Genomic island SCC[J]. *Drug Resistance Updates*, 2003, 6(1): 41-52.

[9] ITO T, KATAYAMA Y, HIRAMATSU K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(6): 1449-1458.

[10] KATAYAMA Y, ITO T, HIRAMATSU K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(6): 1549-1555.

[11] LIU J, CHEN D, PETERS B M. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2016, 101: 56-67.

[12] SZCZEPANIK A, KOZIOL-MONTEWKA M, ALDOORI Z, et al. Spread of a single multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone carrying a variant of staphylococcal cassette chromosome *mec* type III isolated in a university hospital[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2007, 26(1): 29-35.

[13] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712.

[14] SOREK R, KUNIN V, HUGENHOLTZ P. CRISPR: A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 181-186.

[15] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1843-1845.

[16] 张蒙蒙, 毕春霞, 王梦圆, 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.

[17] 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]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-5433.

[18] LUO K, SHAO F, KAMARA K N, et al. Molecular characteristics of antimicrobial resistance and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* isolates derived from clinical infection and food[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2018, 32(7): e22456.

[19] GOPHNA U, KRISTENSEN D M, WOLF Y I, et al. No evidence of inhibition of horizontal gene transfer by CRISPR-Cas on evolutionary timescales[J]. *ISME Journal*, 2015, 9(9): 2021-2027.

[20] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A, et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology-SGM*, 2005, 151(8): 2551-2561.

[21] PALMER K L, GILMORE M S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas[J]. *mBio*, 2010, 1(4): e00227-10.

[22] BURSTEIN D, SUN C L, BROWN C T, et al. Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10613. doi: 10.1038/ncomms10613.

[23] JIANG W, MANIV I, ARAIN F, et al. Dealing with the evolutionary downside of CRISPR immunity: Bacteria and beneficial plasmids[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(9): e1003844.

[24] 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(Pt 12): 2997-3004.

[25] 洪丽娟, 张冰, 段广才, 等. CRISPR/Cas 系统与志贺菌毒力和耐药的关系及插入序列 IS600 对 *cse2* 表达水平的影响[J]. *微生物学报*, 2016, 56(12): 1912-1923.

[26] WATSON B N J, STAALS R H J, FINERAN P C. CRISPR-Cas-mediated phage resistance enhances horizontal gene transfer by transduction[J]. *mBio*, 2018, 9(1): e02406-17.

[27] WIEDENHEFT B, BONDY-DENOMY J. CRISPR control of virulence in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Cell Research*, 2017, 27(2): 163-164.

【责任编辑 李庆玲】