

◇技术与方法◇

含有 CRISPR 序列的噬菌体耐受菌的筛选

滑玉会^{1,2}, 黄 勇², 张志毅², 安小平², 米志强², 尹秀云³, 陈建魁³, 童贻刚^{1,2}

摘要 人工设计合成规律成簇的间隔短回文重复 (CRISPR) 序列特异性引物, 将从临床分离的大肠埃希菌株作为模板, 采用 PCR 扩增方法筛选含有 CRISPR 系统的大肠埃希菌; 利用噬菌斑法从医院未经消毒处理的污水中分离大肠埃希菌噬菌体, 经过 PEG 沉淀的方法浓缩得到高滴度的噬菌体, 再用该筛选噬菌体感染上述含有 CRISPR 的大肠埃希菌以筛选耐受该噬菌体的大肠埃希菌株。最后从 70 株大肠埃希菌中筛选到 42 株含有 CRISPR 序列的菌株, 然后采用噬菌斑法分离到 1 株大肠埃希菌 *E. coli* 147-30 的裂解性噬菌体 IME-EC1, 在此基础上利用 *E. coli* 147-30 筛选到 1 株耐受噬菌体 IME-EC1 的大肠埃希菌菌株, 命名为 *E. coli* 147-30R1。
关键词 CRISPR 系统; 大肠埃希菌; 噬菌体; 噬菌体耐受
中图分类号 R 378.2+1
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)06-0833-04

规律成簇的间隔短回文重复 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 是细菌内存在的专门针对噬菌体及质粒等外源基因的获得性免疫系统^[1], 这种抗性作用的发挥类似于真核生物中的 RNA 干扰作用。在噬菌体治疗过程中, 细菌往往会对噬菌体产生耐受, 导致耐受噬菌体的菌株出现。关于噬菌体耐受菌株的筛选, 国内外已有较多的研究^[1-2], 如通过筛选嗜热链球菌抗噬菌体突变株来提高发酵酸奶的生产性能, 以及通过筛选噬菌体耐受菌来研究细菌耐受噬菌体的机制。该研

究通过 PCR 方法筛选含有 CRISPR 系统的大肠埃希菌, 以含有 CRISPR 系统的大肠埃希菌为指示菌分离噬菌体, 进而在人为条件下筛选出耐受噬菌体的大肠埃希菌, 拟利用这些细菌分析噬菌体和 CRISPR 系统之间的关系, 为进一步了解 CRISPR 的作用特点和提高噬菌体治疗效果提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 临床分离的 70 株致病性大肠埃希菌来自于军事医学科学院附属 307 医院检验科, 用于分离噬菌体以及筛选噬菌体耐受株; PCR 试剂盒购自北京金全生物技术有限公司; 胶回收试剂盒购自天津宝瑞生物技术有限公司; LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 用蒸馏水定容至 1 L, 调至 pH 7.0, 121 °C 下高压灭菌 20 min。固体 LB 培养基需添加 1.5% 琼脂粉, 半固体 LB 培养基需添加 0.75% 琼脂粉。SM 缓冲液: 氯化钠 5.8 g, 硫酸镁 2.0 g, pH 7.5, 1 mol/L Tris-HCl 50 ml, 2% 明胶 5 ml, 加水至 1 L; 化学试剂均为国产分析纯; 2720 型 PCR 仪 (ABI 公司); DYY-6C 电泳仪 (北京六一仪器厂); BIO-RAD Gel Doc XR 凝胶成像系统。

1.2 含有 CRISPR 系统大肠埃希菌的筛选 根据 CRISPR database (<http://crispr.u-psud.fr/crispr/>) 公布的 *E. coli* 菌株的 CRISPR 序列特征, 利用网站中 FlankAlign 选项的 Flanking sequence Alignment Tool, 分别选取 200 bp 长度的大肠埃希菌 CRISPR 序列 right flanking sequence 和 left flanking sequence, 按照同源性比对结果将其分为 15 个组, 将每组对应的序列导入到 CLC 软件里, 分别得到一个 consensus 序列, 利用 NCBI 网站上的 primer-blast 功能, 设置各种参数, 经过引物特异性检测, 只有 4 对引物符合要求。P10 (F: TACCGTTGGTGAAGGAGCTG, R: TTC-CGGTGGATTTGGATGGG)、P13 (F: TTGAGTTTCAGACCTGGGGC, R: TGCTACCGTTGCTGAAGGAG)、P14 (F: CTGGGAGTTCTACCGCAGAG, R: CCCCAGGAG-TATTTGGATGGT)、P15 (F: GGAAAATGGGAGCTGGGTGT, R: ACCTGGGGAGAAAACAGACG)。采用 PCR 法对供试菌株进行 CRISPR 序列扩增, 反应体

2014-01-15 接收

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863 计划”(编号: 2012AA022-003); “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项“十二五”实施计划(编号: 2013ZX10004-605、2013ZX10004-217、2013ZX10004-607、2011ZX10004-001); “重大新药创制”科技重大专项“十二五”实施计划(编号: 2011ZX09401-023); 国家自然科学基金(编号: 81072350); 病原微生物生物安全国家重点实验室开放课题(编号: SKLPBS1113)

作者单位: ¹安徽医科大学, 合肥 230032

²军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

³军事医学科学院附属医院临床检验科, 北京 100071

作者简介: 滑玉会, 女, 硕士研究生;

童贻刚, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: tong62035@gmail.com

系参照 PCR 试剂盒使用说明,回收 PCR 产物并测序。

1.3 相关噬菌体的分离 以含有 CRISPR 的菌株 *E. coli* 147-30 为指示菌,于军事医学科学院附属 307 医院污水处理处收集未经消毒处理的污水,12 209 r/min 离心 2 次,每次 10 min 以除去固体杂质,收集上清液;用 0.22 μm 滤器过滤除菌,取 4 ml 滤液加入 2 ml 经高压灭菌的 $3 \times \text{LB}$ 培养基中,接种 500 μl 过夜培养的宿主菌 *E. coli* 147-30,混合均匀后置于摇床内,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。12 209 r/min 离心 10 min 收集上清液,0.22 μm 滤器过滤,滤液即为含有噬菌体的原液。

将噬菌体原液 10 倍梯度稀释,分别取各梯度噬菌体稀释液 100 μl 和 500 μl 对数期的宿主菌混合均匀后,室温放置 10 min 以使其充分吸附后加入 45 $^{\circ}\text{C}$ 上层半固体培养基 5 ml,混合均匀,然后倾倒入固体培养基平板上,凝固后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,观察噬菌斑的出现。用无菌枪头从噬菌斑分布均匀的平板上挑取单个噬菌斑,加入到对数期的宿主菌中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 6 h,12 209 r/min 离心 10 min,0.22 μm 滤器过滤,滤液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。重复以上步骤 3~4 次,以得到大小和形态保持一致的噬菌斑。

噬菌体形态的电镜观察: 将保存在 SM 缓冲液中的噬菌体滴在覆有碳膜的铜网上,室温晾干后用滤纸吸去未经吸附的溶液;滴一滴磷钨酸(PTA)染色 2 min,用滤纸吸去多余的液体;室温干燥后用 HITACHI HT7700 型透射电子显微镜进行观察,记录噬菌体颗粒的形态和大小。

1.4 大肠埃希菌噬菌体耐受株的筛选 采用 PEG 沉淀的方法^[3] 浓缩噬菌体 IME-EC1 以使其达到一个较高的滴度(约 10^{10} PFU/ml),大肠埃希菌噬菌体耐受株的筛选参照文献^[4-5] 报道,具体方法简述如下:将过夜培养的宿主菌进行 10 倍梯度稀释,然后分别取各梯度稀释液 100 μl 分别与 100 μl 噬菌体悬液(10^{10} PFU/ml)混合均匀,吸附 10 min 后加入到 45 $^{\circ}\text{C}$ 上层半固体培养基中,混合均匀,然后倾倒入固体培养基平板上,凝固后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 至单克隆出现。

随机挑取平板上产生的单克隆,加入到 5 ml 经高压灭菌的 LB 液体培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 中过夜培养,采用点滴法^[6] 来鉴定单克隆对噬菌体是否产生了真正的耐受以及耐受能否稳定的保持到下一代细菌,具体步骤为:将培养至对数期的敏感菌和耐受菌

分别加入到融化的半固体 LB 培养基中,待凝固后,取 2 μl 的噬菌体原液滴在双层平板上,待平板晾干后倒置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养观察噬菌斑的有无。敏感菌的平板上能够产生比较透亮的噬菌斑,而耐受菌的平板上,由于耐受菌对噬菌体不再敏感,则不会产生噬菌斑。

2 结果

2.1 含有 CRISPR 系统大肠埃希菌的筛选 采用菌落 PCR 的方法,分别采用 4 对人工设计的 CRISPR 特异性引物对 70 株大肠埃希菌的 CRISPR 序列进行扩增,结果从 70 株供试菌株中检测到 42 株大肠埃希菌中含有 CRISPR 序列,见表 1。选择其中 1 株大肠埃希菌(*E. coli* 147-30)用于后续相关噬菌体的分离以及噬菌体耐受菌筛选实验。见图 1。设计的 4 对特异性引物中,有 3 对引物(10、13、15)扩增出 CRISPR 序列。将 *E. coli* 147-30 的 PCR 产物直接进行序列分析,结果显示该 3 对引物扩增的序列互相重叠,可以拼接成一个较长的 contig 序列,用 CRISPR database 网站(<http://crispr.u-psud.fr/crispr/>)中 CRISPR Finder 功能分析该 CRISPR 序列结构特征,显示该位点共有 18 个重复单元,其中重复序列长为 29 bp,序列为 CGGTTTATCCCCGCTG-GCGCGGGGAACAC,间隔序列长为 32 bp,见表 2。

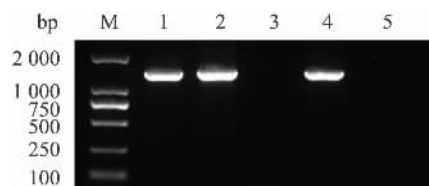


图1 *E. coli* 147-30 的 CRISPR 序列扩增结果

M: Trans2K Marker; 1、2、3、4 分别为引物 10、13、14、15; 5: 阴性对照

2.2 相关噬菌体的分离 以含有 CRISPR 的菌株 *E. coli* 147-30 为指示菌,于军事医学科学院附属医院未经消毒处理的污水分离到 1 株噬菌体,命名为 IME-EC1,噬菌斑的大小不均一,如针孔状并且透明,见图 2。纯化后的噬菌体 IME-EC1 经负染后在透射电镜下的形态见图 3。该噬菌体呈蝌蚪形,具有典型的二十面体结构,头部宽约 70 nm,长约 100 nm,尾部长约 115 nm,尾部底端具有数根尾丝,属于肌尾噬菌体科。

2.3 大肠埃希菌噬菌体耐受株的筛选 采用 PEG 沉淀的方法浓缩噬菌体 IME-EC1,滴度约为 10^{10} PFU/ml。用浓缩得到的高滴度噬菌体筛选得到了

表1 CRISPR 序列在大肠埃希菌中的分布情况

菌株编号	引物				菌株编号	引物			
	10	13	14	15		10	13	14	15
<i>E. coli</i> 147-1					<i>E. coli</i> 147-37			+	
<i>E. coli</i> 147-2	+	+			<i>E. coli</i> 147-38				
<i>E. coli</i> 147-3	+				<i>E. coli</i> 147-39				+
<i>E. coli</i> 147-4					<i>E. coli</i> 147-40				
<i>E. coli</i> 147-5					<i>E. coli</i> 147-41				+
<i>E. coli</i> 147-6					<i>E. coli</i> 147-42	+		+	
<i>E. coli</i> 147-7					<i>E. coli</i> 147-43			+	
<i>E. coli</i> 147-8					<i>E. coli</i> 147-44				
<i>E. coli</i> 147-9					<i>E. coli</i> 147-45	+	+		+
<i>E. coli</i> 147-10					<i>E. coli</i> 147-46	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 147-11			+		<i>E. coli</i> 147-47	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 147-12	+	+			<i>E. coli</i> 147-48	+	+		
<i>E. coli</i> 147-13					<i>E. coli</i> 147-49	+	+		
<i>E. coli</i> 147-14					<i>E. coli</i> 147-50			+	
<i>E. coli</i> 147-15	+	+		+	<i>E. coli</i> 147-51	+	+		+
<i>E. coli</i> 147-16					<i>E. coli</i> 147-52			+	
<i>E. coli</i> 147-17					<i>E. coli</i> 147-53				
<i>E. coli</i> 147-18	+	+			<i>E. coli</i> 147-54	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 147-19					<i>E. coli</i> 147-55	+	+		
<i>E. coli</i> 147-20	+	+			<i>E. coli</i> 147-56	+	+		
<i>E. coli</i> 147-21			+		<i>E. coli</i> 147-57			+	
<i>E. coli</i> 147-22					<i>E. coli</i> 147-58	+	+		
<i>E. coli</i> 147-23					<i>E. coli</i> 147-59	+	+		
<i>E. coli</i> 147-25	+	+		+	<i>E. coli</i> 147-60				
<i>E. coli</i> 147-26	+	+			<i>E. coli</i> 147-61		+	+	
<i>E. coli</i> 147-27					<i>E. coli</i> 147-62	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 147-28					<i>E. coli</i> 147-63	+	+		
<i>E. coli</i> 147-29	+		+		<i>E. coli</i> 147-64	+	+		+
<i>E. coli</i> 147-30	+	+		+	<i>E. coli</i> 147-65	+	+		
<i>E. coli</i> 147-31					<i>E. coli</i> 147-66			+	
<i>E. coli</i> 147-32					<i>E. coli</i> 147-67				
<i>E. coli</i> 147-33	+	+		+	<i>E. coli</i> 147-68	+	+	+	+
<i>E. coli</i> 147-34					<i>E. coli</i> 147-69	+		+	+
<i>E. coli</i> 147-35					<i>E. coli</i> 147-70	+	+		
<i>E. coli</i> 147-36					<i>E. coli</i> 147-71	+	+		

表2 *E. coli* 147-30 的 CRISPR 序列相关信息

重复单元编号	间隔序列
1	ACGCGCGTACCGGATCGCGGACAACAAATTGC
2	TTGCTGAAAAAGAAGGCTCCGGCGTTATCAGT
3	TAGTTAACTTTTAGACAGAATATCCGTGTACC
4	GGTTTTACAAGCTTAAATGATTTTAAATTTTG
5	AACTGGATTCTGCTCTAATTATTACATCATCG
6	TTTGCTACCCGCTCAAAACCGCCGATTGCGGT
7	TCGGCCAGCGTCCAGGCTGGCACCCGATATTC
8	CTGCCGACTGACCGCCGACGCTTTCGCGTTAA
9	CGTTTTTGCCGGGTTTATTTTAAACCGGAGC
10	GGAATATCGTTGCGCTAAAAGAGATTCTGGGC
11	CCTGGTGTGTCTGTTTCGTGACGCTCGGTAA
12	CTATAATTTGTTTTTGCACCACTGTACCTCGT
13	TCTTCGGGCGCGCGTTTTTCGCAGACCAGCGAT
14	GTTACGCTGCCTGAATATCGCAATTCCCTCGA
15	TGCATATCAGATGGGCACTGCTGATTGGAGAA
16	ATTAAATTTGCAAGGTAGCTGTTATCCGTGTC
17	CGATTCTCTAGCTGCCACTCGACTGAAAGC
18	GTCGCTGTTCAACTTTAAACGGCTCAAACCA

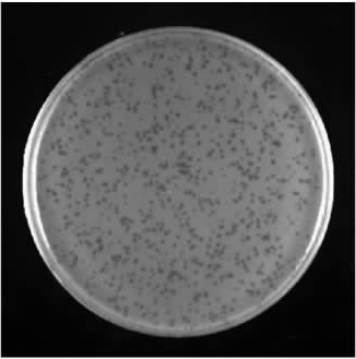


图2 噬菌斑的形态

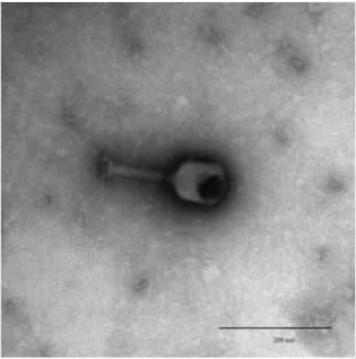


图3 噬菌体在电镜下的形态 ×40 000

大肠埃希菌噬菌体耐受菌,采用点滴法鉴定筛选得到的耐受菌,见图4。由于147-30R1对噬菌体产生了耐受性,所以平板上没有发现透亮的噬菌斑。选用其中1株噬菌体耐受菌(命名为147-30R1)用于后续实验的研究。147-30R1在连续培养数代以后能够继续稳定保持对噬菌体IME-EC1的耐受。

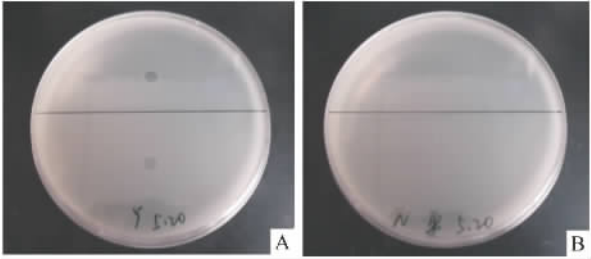


图4 点滴法鉴定噬菌体耐受菌

A: 敏感菌 *E. coli* 147-30; B: 耐受菌 *E. coli* 147-30R1

3 讨论

在细菌和古细菌中广泛存在CRISPR-Cas获得性免疫系统是新发现的一个机制,该机制能够限制相应噬菌体、质粒等外源DNA的入侵。研究^[1]表明CRISPR系统能够为 *Streptococcus thermophiles* 提供抵抗噬菌体感染的获得性免疫,显示了间隔序列和

噬菌体基因组序列之间存在同源性。在噬菌体、质粒等外源性 DNA 入侵的过程中,新的重复序列(repeats, R) – 间区序列(spacers, S) 片段被获得并被插入到前导序列和原来第一个重复序列之间,从而使宿主获得抵抗相应噬菌体、质粒等再次入侵的获得性免疫能力。目前,CRISPR 系统作为一种能够抵御噬菌体感染的防御机制,对其作用的其他分子作用机制并不十分了解。

为了更清楚的研究细菌耐受噬菌体现象和 CRISPR 系统之间的相互关系,根据 CRISPR database 数据库中已经公布的大肠埃希菌的 CRISPR 序列的信息,依据其 Flanking sequence 的同源性比对结果设计了 4 对特异性的引物,对 4 对引物筛选出的 CRISPR 序列进行分析发现,4 对引物所扩增的 CRISPR 序列其实是一个 CRISPR 位点,但是由于菌株自身的差异导致其与每条引物结合的特异性不同,所以才会出现有些引物呈阳性,有些引物为阴性的结果,这与后期序列分析结果吻合。首先从本实验室保存的细菌库中成功筛选到 42 株含有 CRISPR 序列的大肠埃希菌,然后又以含有 CRISPR 序列的大肠埃希菌为指示菌分离得到了相应的噬菌体 IME-EC1,成功筛选了含有 CRISPR 序列的噬菌体耐受菌,为后续研究 CRISPR 系统与细菌耐受噬菌体现象之间的相互关系打下了基础。在噬菌体 IME-EC1 的培养过程中,发现在平板上产生的噬菌斑的大小常不均一,这可能与培养基 pH、琼脂浓度、宿主菌的浓度、培养温度、培养时间有关,即使是在同一培养条件下、同一平板上的噬菌斑大小也常不一致。另外,已经完成了对噬菌体敏感菌 *E. coli* 147-30 和耐受菌 *E. coli* 147-30R1 的全基因组测序,以分析噬

菌体耐受菌中 CRISPR 系统的序列特征,期望从分子机制上解释噬菌体耐受菌出现的原因,相关的生物信息学分析工作正在进行。

总之,成功建立了筛选含有 CRISPR 序列的大肠埃希菌的方法,从 70 株大肠埃希菌中筛选到 42 株含有 CRISPR 序列的细菌,筛选率达到 60%。序列分析显示筛选的 *E. coli* 147-30 大肠埃希菌中所含有的 CRISPR 序列在数据库中是独特的,这也丰富了大肠埃希菌中 CRISPR 序列的信息资源。同时筛选到含有 CRISPR 序列的噬菌体耐受菌,敏感菌和耐受菌中所含有的巨大的序列信息对以后更加深入的研究细菌耐受噬菌体的现象提供了基础数据。

参考文献

- [1] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. Science, 2007, 315(5819): 1709–12.
- [2] 冷一非, 赵述森, 朱辉, 等. 嗜热链球菌抗噬菌体菌株的选育[J]. 中国酿造, 2010, 7(220): 118–20.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 186–7.
- [4] Johnson K, Lory S. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants with altered piliation [J]. J Bacteriol, 1987, 169(12): 5663–7.
- [5] Guerrero-Ferreira R C, Viollier P H, Ely B, et al. Alternative mechanism for bacteriophage adsorption to the motile bacterium *Caulobacter crescentus* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(24): 9963–8.
- [6] Kim M, Ryu S. Characterization of a T5-like coliphage, SPC35, and differential development of resistance to SPC35 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(6): 2042–50.

Screen for the phage-resistant bacteria containing CRISPR sequences

Hua Yuhui^{1,2}, Huang Yong², Zhang Zhiyi², et al

(¹Anhui Medical University, Hefei 230032; ²State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071)

Abstract By using PCR method with primers specific to CRISPR sequences, clinical isolates of pathogenic *Escherichia coli* strains were screened for the presence of CRISPR system. The resultant CRISPR *E. coli* strain was used for screening phages from hospital sewage by plaque methods. The purified phage through PEG precipitation was then used to infect the original CRISPR *E. coli* strain for screening of the phage-resistant *E. coli* strains. As a result, 42 pathogenic *E. coli* strains containing CRISPR were identified from 70 strains and one lytic phage IME-EC1 was isolated. By infecting *E. coli* 147-30 with phage IME-EC1, a phage-resistant *E. coli* strain designated as 147-30R1 was identified.

Key words CRISPR system; *Escherichia coli*; phage; phage resistance