



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107384926 B

(45)授权公告日 2020.06.26

(21)申请号 201710688895.6

(22)申请日 2017.08.13

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107384926 A

(43)申请公布日 2017.11.24

(73)专利权人 中国人民解放军疾病预防控制中心  
地址 100071 北京市丰台区东大街20号

(72)发明人 宋宏彬 邱少富 刘鸿博 李浩  
梁媛 杨超杰 赵荣涛 贾雷立  
李鹏 王立贵

(74)专利代理机构 北京市众天律师事务所  
11478  
代理人 李新军

(51)Int.Cl.  
C12N 15/113(2010.01)  
C12N 9/22(2006.01)  
C12N 15/90(2006.01)  
A61K 48/00(2006.01)  
A61K 31/7105(2006.01)  
A61P 31/04(2006.01)

(56)对比文件  
Ido Yosef et al.,.Temperate and lytic

bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria.《PNAS》.2015,第112卷(第23期),第7268页左栏第2段及图1.

Lichang Sun et al.,.Generation of Newly Discovered Resistance Gene mcr-1 Knockout in Escherichia coli Using the CRISPR/Cas9 System.《Journal of Microbiology and Biotechnology》.2017,第27卷(第7期),1277页右栏第2-3段,1279页左栏第一段及图1A,图2B-D.

F.Ann Ran et al..In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9.《Nature》.2015,第520卷(第7546期),第189页第2段及图4a.

Robert J. Citorik et al.,.Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases.《Nature Biotechnology》.2014,第32卷(第11期),1141页右栏第一段,第1142页左栏第2段及补充图4,1142页右栏第2-3段,.

审查员 王小玉

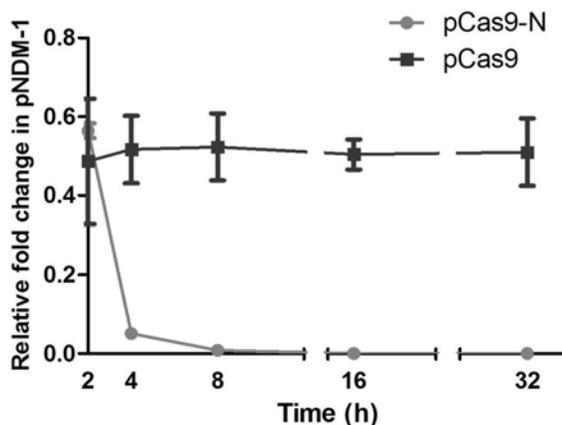
权利要求书1页 说明书10页  
序列表1页 附图9页

(54)发明名称

一种靶向清除细菌耐药性质粒的CRISPR-Cas9系统及应用

(57)摘要

本发明公开了一种gRNA序列,所述序列在CRISPR-Cas9系统中能够以细菌中的耐药性质粒特定位点为靶序列进行DNA序列的编辑,所述gRNA序列如SEQ ID NO:1和/或2所示。本发明还公开了所述gRNA序列的CRISPR-Cas9系统,以及所述CRISPR-Cas9系统在制备治疗耐药性细菌感染药物中的应用。本发明提供的CRISPR-Cas9系统能够靶向NDM-1和MCR-1两种超级耐药基因,使所述两种耐药基因能够同时被消除,保证了碳青霉烯类和粘菌素类抗生素的使用效果。



CN 107384926 B

1. 一种gRNA分子,所述分子在CRISPR-Cas9系统中能够以细菌中的耐药性质粒特定位点为靶序列进行DNA序列的编辑,其特征在于,所述gRNA序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 一种含有权利要求1所述的gRNA分子的CRISPR-Cas9构建体,其特征在于,所述gRNA分子与能表达SaCas9蛋白的表达载体相连接。
3. 根据权利要求2所述的CRISPR-Cas9构建体,其特征在于,所述载体为质粒pCas9。
4. 根据权利要求2所述的CRISPR-Cas9构建体,其特征在于,所述载体为大肠杆菌λ样温和噬菌体。
5. 根据权利要求3或4所述CRISPR-Cas9构建体在制备治疗碳青霉烯类抗生素耐药性细菌感染药物中的应用。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述药物还含有抗生素。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述抗生素为碳青霉烯类抗生素。

## 一种靶向清除细菌耐药性质粒的CRISPR-Cas9系统及应用

### 技术领域

[0001] 本发明公开了一种靶向清除细菌耐药性质粒的CRISPR-Cas9系统。

### 背景技术

[0002] 在世界范围内,每年有70万人死于细菌抗生素耐药问题,死亡病例主要来自亚洲和非洲。而在中国,每年就有超过8万人死于耐药菌感染。据英国抗菌药物耐药评估委员会估计,如果目前的情况不能得到改善,到2050年,全球将有1000万人遭遇抗菌素耐药问题,多于目前癌症死亡人数。细菌耐药问题不仅严重影响人类健康,也会导致经济损失。最近世界银行和联合国粮农组织的报告指出,如果2050年仍未解决抗生素耐药性问题,全球年度GDP将下降约1.1%-3.8%,等同于2008年金融危机的影响。更为严重的是,细菌耐药基因造成的抗生素失效不仅仅带来临床上感染治疗的困难,细菌耐药性的快速流行和传播使得局面更加难以控制。随着交通工具的进步和不同地区之间交流的增加,细菌耐药基因可以在全球范围扩散。以介导肠道阴性菌耐受碳青霉烯类抗生素的blaNDM基因为例,这种基因在2010年首次从印度治疗的病人身上分离出来,短短几年内变蔓延至全球多个国家和地区。截止2014年,至少66个国家和地区报告检出有NDM家族耐药基因。另外,blaNDM不仅在地区间扩散,生物层面上还能在不同菌种间扩散。到2014年,超过40种细菌中检测出了blaNDM基因,大部分属于肠道菌群,也在致病菌中检出。

[0003] 耐药基因流行的最主要原因是其往往能定位于细菌的转移性质粒。质粒是细菌细胞里除了染色质以外能够储存遗传信息环状DNA分子,它能够自主进行复制并且在同一生活环境中的菌株和菌种间通过转化、接合等方式进行转移。再以blaNDM-1为例,从不动杆菌检出的blaNDM-1主要定位质粒。而基因周围结构分析结果显示该基因定位在具有转移功能的大片段转座结构Tn125上,使得该基因可以转座至多种细菌质粒,极易在不同菌株和菌种间发生水平转移。近年来耐药基因不断向烈性病原菌扩散,导致了超级耐药烈性病原菌的出现。发表在《自然·遗传学》杂志的一项大型国际研究发现,多重耐药的伤寒“超级细菌”已经在全球传播。《柳叶刀·传染病》发表文章表明blaNDM-1超级耐药基因可以在多种细菌间转移,已发现11种新的含有blaNDM-1基因的细菌,其中包括常见的烈性病原菌霍乱弧菌、志贺菌和沙门菌。

[0004] 在耐药危机局面下,新型抗生素的研发远远落后于耐药基因进化的速度,目前主要的策略包括合理使用抗生素、循环用药以及策略性更换抗生素等方法。然而广谱耐药细菌的出现以及抗生素的肝肾副作用等因素使得现有的抗生素种类难以应对目前的局面。亟需新的治疗方案来解决愈演愈烈的细菌耐药问题,并且需要新的技术来阻断耐药基因的水平转移。因而直接针对病原菌携带的耐药基因进行清除以消除细菌耐药性显得至关重要。

[0005] CRISPR-Cas系统是原核生物获得性免疫机制,以核酸序列的形式存在于细菌基因组。2012年Matthew等在II型CRISPR系统中发现了一种双链RNA,并将这种双链RNA改造为一种能指导Cas9蛋白对几乎所有DNA序列进行剪切的工具,即CRISPR-Cas9基因编辑技术。CRISPR-Cas9技术仅需设计sgRNA,即将任意一段PAM(Protospacer Adjacent Motif)序列

上游22-30bp的靶序列作为CRISPR位点中的spacer,就可实现对含有该靶序列的DNA进行敲除、插入与定点突变等修饰。该技术可以用于靶向清除细菌耐药质粒,使细菌直接丧失耐药能力。CRISPR-Cas9系统的核酸序列可以包装至质粒或噬菌体等可移动基因元件(Mobile Genetic Elements,MGEs)上,或者以表达产物sgRNA/Cas9复合体的形式包装至纳米材料载体上,实现CRISPR-Cas9系统的递呈。

[0006] 利用CRISPR-Cas9基因编辑技术在原核生物中进行基因组编辑的研究在2013年CRISPR技术刚刚兴起的时候就已经开始。Nature Biotechnology上一篇研究利用CRISPR-Cas9系统靶向大肠杆菌基因组,导致了大肠杆菌基因组的大片段删除。在利用CRISPR-Cas9系统对抗耐药细菌方面,近年已有研究人员利用CRISPR系统靶向破坏细菌基因组,作为新型抗生素。2014年,mBio杂志上发表了一篇利用I型CRISPR系统靶向细菌染色体基因以杀死细菌的研究。研究显示CRISPR剪切了细菌基因组后,细菌因无法及时进行修复而死亡,杀菌效率极高。2014年9月和10月,Nature Biotechnology刊登了两篇利用II型CRISPR系统进行杀菌的研究。两组研究人员分别结合CRISPR技术和噬菌体载体技术有效杀灭了耐药菌,并且在动物模型上验证了抗菌的效果优于抗生素。PNAS杂志上发表研究在CRISPR技术的基础上,开发了一个双噬菌体系统,能够使耐药菌敏感化,并且有选择的杀死耐药菌并保留下整合了CRISPR系统的细菌。

[0007] 这些研究都验证了新型基因编辑技术CRISPR-Cas9在对抗耐药菌方面有巨大优势,通过改造噬菌体使其成为一种针对原核细胞的核酸递呈载体,可以将CRISPR-Cas9技术发展成一种耐药菌感染基因治疗的新方法。然而这些研究遗留了大量问题,首先,虽然原核细胞内sgRNA的效率普遍较高,但是上述研究并未关注不同sgRNA对NDM-1基因的剪切效率,没有对靶向NDM-1基因的sgRNA进行评价和筛选。对于最新报道的MCR-1超级耐药基因目前未做靶点的设计研究。基于现有技术存在的问题,本发明的目的就是提供能够高效清除细菌中的天然NDM-1和MCR-1两种超级耐药质粒的CRISPR-Cas9系统,能够使耐药菌敏感化,并且有选择的杀死耐药菌,以解决细菌耐药性造成的技术难题。

## 发明内容

[0008] 基于上述发明目的,本发明首先提供了一种gRNA序列,所述序列在CRISPR-Cas9系统中能够以细菌中的耐药性质粒特定位点为靶序列进行DNA序列的编辑,所述gRNA序列如SEQ ID NO:1和/或2所示。其中,SEQ ID NO:1为靶向耐药性质粒NDM-1的gRNA序列,SEQ ID NO:2为靶向耐药性质粒MCR-1的gRNA序列

[0009] 在一个优选的实施方案中,所述gRNA序列为SEQ ID NO:1或2所示,并且所述gRNA序列与SEQ ID NO:3串联连接。

[0010] 在另一个优选的实施方案中,所述gRNA序列为SEQ ID NO:1和2,两者中间以SEQ ID NO:3串联连接。

[0011] 更为优选地,所述SEQ ID NO:1位于串联序列的5'端,所述序列如SEQ ID NO:4所示。

[0012] 其次,本发明还提供了一种含有上述任一所述的gRNA序列的CRISPR-Cas9系统,所述gRNA序列与能表达Cas9蛋白的表达载体相连接。

[0013] 在一个优选的实施方案中,所述载体为质粒pCas9。

- [0014] 在另一个优选的实施方案中,所述载体为大肠杆菌 $\lambda$ 样温和噬菌体。
- [0015] 第三,本发明提供了上述CRISPR-Cas9系统在制备治疗耐药性细菌感染药物中的应用。
- [0016] 在一个优选的实施方案中,所述药物还含有抗生素。
- [0017] 更为优选地,所述抗生素为碳青霉烯类抗生素和/或粘菌素类抗生素。
- [0018] 设计并从多个NDM-1靶点中筛选出一个特异性靶点,能够高效清除细菌中的天然NDM-1大质粒以及高拷贝NDM-1质粒。通过CRISPR-Cas9系统的定向剪切作用,消除细菌耐药质粒,进而消除细菌耐药性,恢复抗生素的效果。由于碳青霉烯类抗生素和粘菌素类抗生素是肠道阴性杆菌抗生素治疗的最后防线,一旦细菌同时获取了这两种耐药基因则极有可能会临床导致抗生素治疗彻底失效。本发明提供的CRISPR-Cas9系统同时靶向NDM-1和MCR-1两种超级耐药基因,使这两种耐药基因能够同时被消除,保证了碳青霉烯类和粘菌素类抗生素的使用效果,在对抗耐药菌感染导致的临床治疗困难提供了新思路,也为基于质粒删除的细菌耐药质粒相关的机制研究提供了新方法。
- [0019] 利用温和噬菌体载体技术,将靶向耐药质粒的CRISPR-Cas9系统的基因序列包装至噬菌体基因组中,进而实现向细菌递呈这种核酸酶系统。该策略一方面能够使耐药菌重新对抗生素敏感化,进而结合传统抗生素应用于耐药菌感染的治疗。另一方面,在环境菌群中应用该技术可以在菌群中清除耐药基因,降低菌群的耐药性,同时阻断细菌耐药质粒的水平转移,减缓细菌耐药性的传播速度,使得该技术在对抗细菌耐药危机中能够发挥潜力。比如在一些细菌富集的环境中采取该技术更具有良好的预防耐药菌意义,例如医疗环境和设备的表面“消毒”,疫源地污水的处理,生活污水和畜牧养殖场的耐药菌控制等等。

## 附图说明

- [0020] 图1.pCas9-N结构示意图;
- [0021] 图2.pCas9-NM结构示意图;
- [0022] 图3.pCas9-N对天然NDM-1质粒清除率的时间曲线图;
- [0023] 图4.NDM-1重组EGFP高拷贝质粒清除效果共聚焦扫描照片;
- [0024] 图5.NDM-1质粒清除率荧光强度柱状对照图;
- [0025] 图6.pCas9-NM靶向两种耐药质粒后PCR电泳图谱;
- [0026] 图7.被pCas9-N靶向清除NDM-1的模型菌药敏定量检测对照图;
- [0027] 图8.pCas9-NM剪切MCR-1质粒后粘菌素耐药性变化涂板培养对照图;
- [0028] 图9.pST<sub>K</sub>质粒结构示意图;
- [0029] 图10.携带噬菌体同源臂的CRISPR-Cas9序列双链DNA重组模板结构示意图;
- [0030] 图11.温和噬菌体包装CRISPR-Cas9系统操作流程图;
- [0031] 图12.重组噬菌体中的Cas9特异性位点PCR验证电泳图谱;
- [0032] 图13.重组噬菌体VB-Cas9清除靶质粒的细菌占总菌数百分比对照图;
- [0033] 图14.重组噬菌体VB-Cas9在单个菌落中靶质粒清除率对照图;
- [0034] 图15.不同MOI条件下残存耐药菌数量的变化对照图;
- [0035] 图16.VB-Cas9对细菌生长环境中耐药质粒累积的抑制作用对照图;
- [0036] 图17.小鼠模型中耐药菌质粒清除效果及联合抗生素治疗效果对照图;

[0037] 图18.小鼠肠道中重组噬菌体对耐药靶质粒的清除效果对照图

### 具体实施方式

[0038] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚.但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的保护范围构成任何限制。

[0039] 试剂材料:

[0040] pCas9质粒(美国Addgene公司负责储存和销售,由中国代理公司中原公司代理购买);用于组成特异性spacer序列的单链核苷酸片段(华大基因公司合成);BsaI核酸内切酶;质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司);T4多聚核苷酸激酶(T4PNK,NEB),10×T4PNK缓冲液(NEB),T4连接酶(NEB),10×T4连接酶缓冲液(NEB)。DNA纯化回收试剂盒(Promega);DH5 $\alpha$ 感受态细胞;TaqDNA聚合酶;LB培养基;spacer退火引物(华大基因);spacer检测引物(华大基因);普通测序分析(华大基因)。

[0041] 大肠杆菌 $\lambda$ 样温和噬菌体vB\_Eco\_MG65;PrimeSTAR Max DNA聚合酶(TAKARA);pUC18质粒;SacB基因;Kana<sup>r</sup>基因;基因扩增引物;LB半固体培养基;丝裂霉素C;大肠杆菌MG1655;BA1b/c小鼠。

[0042] 实施例1:构建和筛选靶向NDM-1和MCR-1耐药基因的以pCas9为载体的CRISPR-Cas9系统

[0043] 1.靶点序列的设计

[0044] (1)NDM-1靶点序列的设计,根据sgRNA的设计要求中的PAM原则,选取blaNDM-1序列中NGG三核苷酸上游的30bp碱基序列作为靶点序列,即CRISPR序列中的spacer序列,在细菌细胞内可转录为sgRNA。

[0045] 从初步设计的二十个靶点序列中筛选出一个高效特异的靶点T1序列:SEQ ID NO:1(5'-ACCGCATTAGCCGCTGCATTGATGCTGAGC-3')。

[0046] (2)MCR-1耐药基因序列靶点的设计

[0047] 根据粘菌素耐药基因MCR-1序列,按照PAM原则,选取一段30bp的碱基序列作为该基因的靶点,SEQ ID NO.2(5'-atgccctacagaccgaccaagccgagacca-3')。

[0048] (3)同时靶向NDM-1和MCR-1的CRISPR-Cas9系统的设计和构建

[0049] 为了同时表达针对NDM-1和MCR-1的两种sgRNA,在NDM-1靶点spacer序列SEQ ID NO.1和MCR-1靶点spacer序列SEQ ID NO.2之间插入一段repeat序列,SEQ ID NO.3(5'-GTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAAC-3'),使二者串联起来,其序列如SEQ ID NO.4所示。

[0050] 2.合成用于CRISPR系统构建的spacer退火引物和spacer检测引物

[0051] 构建针对NDM-1基因spacer的退火引物:

[0052] T1F:5'-AAACACCGCATTAGCCGCTGCATTGATGCTGAGCG-3'

[0053] T1R:5'-TGGCGTAATCGGCGACGTAAGTACGACTCGCAAAA-3'

[0054] 构建同时针对NDM-1基因和MCR-1基因spacer的退火引物:

[0055] NM-F:

[0056] 5'-AAACACCGCATTAGCCGCTGCATTGATGCTGAGCGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAACatgccctacagaccgaccaagccgagaccag-3'

[0057] NM-R:

[0058] 5' -TGGCGTAATCGGCGACGTAAGTACGACTCGCCAAAATCTCGATACGACAAAACCTACCAGGGTTT  
TGtacgggatgtcttgctggcttggttcggctctggtcAAAA-3'

[0059] spacer检测引物:

[0060] pCas9-F, 5' -AACACGCATTGATTTGAG-3'

[0061] pCas9-R, 5' -ATAGGAAGGTATCCGACT-3'

[0062] 3. 转化pCas9质粒至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,次日,摇菌提质粒。用BsaI酶切:

10  $\times$  NEB 缓冲液 4 $\mu$ L

pCas9 (0.5ug/ $\mu$ L) 6 $\mu$ L

[0063] BsaI (NEB) 2 $\mu$ L

ddH<sub>2</sub>O 28  $\mu$ L

总体积 40 $\mu$ L

[0064] 37 $^{\circ}$ C酶切2小时,然后补加160 $\mu$ L TE缓冲液和200 $\mu$ L酚/氯仿混合物,振荡器震荡15秒,12000rpm离心5分钟,乙醇沉淀DNA。然后用分光光度计定量酶切产物。

[0065] 4. 退火

[0066] PCR反应管中加入

10 $\times$ 退火缓冲液 10  $\mu$ L

T1F (100  $\mu$ M) 10  $\mu$ L

[0067] T1R (100  $\mu$ M) 10  $\mu$ L

ddH<sub>2</sub>O 70  $\mu$ L

总体积 100 $\mu$ L

[0068] (10 $\times$ 退火缓冲液:1M NaCl,20mM TrisHCl,10mM EDTA,pH8.0)

[0069] 混合后,离心,放在PCR仪上退火,设计循环为:

[0070] 94 $^{\circ}$ C 10分钟

[0071] 70 $^{\circ}$ C 15分钟

[0072] 然后放在室温10分钟,置于冰上5分钟

[0073] 退火产物补加200 $\mu$ L TE buffer 200 $\mu$ L酚/氯仿混合物,振荡器震荡15秒,12000rpm离心5分钟,乙醇沉淀DNA。然后用分光光度计定量退火的DNA片段。获得退火成功的T1DNA片段。

[0074] 5. 连接

[0075] 建立连接体系

	10× T4 连接缓冲液	1.0μL
	pCas9/ BsaI	2.0μL ( 50ng )
	T1 DNA 片段	2.0μL ( 100ng )
[0076]	T4 DNA 连接酶 (5U/μL)	1.0ul
	ddH2O	4μL
	总体积	10μL

[0077] 混合后,离心,放在PCR仪中,25℃连接6分钟。

[0078] 6. 常规方法转化DH5α大肠杆菌感受态细胞。

[0079] 7. 次日挑取克隆,摇菌,提取质粒,用引物pCas9-F和引物pCas9-R确定阳性克隆。

[0080] 8. 测序鉴定阳性克隆。

[0081] 共获得三种靶向耐药性质粒的CRISPR-Cas9系统,分别为:

[0082] 靶向NDM-1的CRISPR-Cas9系统:pCas9-N(结构图谱见图1);

[0083] 靶向MCR-1的CRISPR-Cas9系统:pCas9-M;

[0084] 同时靶向NDM-1和MCR-1的CRISPR-Cas9系统:pCas9-NM(结构图谱见图2)。

[0085] 实施例2:CRISPR-Cas9系统靶向清除NDM-1耐药质粒

[0086] 靶向NDM-1的CRISPR-Cas9系统质粒pCas9-N转化含pNDM-1质粒的耐药菌模型,与对照组pCas9进行相比,pCas9-N能够高效清除天然大质粒pNDM-1,也能高效清除高拷贝的NDM-1克隆质粒(见图3)。清除效率均大于99.9%。图4为NDM-1重组EGFP高拷贝质粒清除效果共聚焦扫描照片,NDM-1质粒上含有能够表达增强绿色荧光蛋白(EGFP)的基因,从图4中可见,pCas9-N对NDM-1的高效清除导致了EGFP的极度降低甚至消失。图5是NDM-1质粒清除率荧光强度柱状对照图;由图5可以看出,经过pCas9-N的质粒清除,荧光强度下降600倍以上。

[0087] 实施例3:CRISPR-Cas9系统pCas9-NM同时靶向清除NDM-1和MCR-1耐药质粒

[0088] 利用pCas9-NM分别清除NDM-1和MCR-1耐药质粒,检测转化了pCas9-NM质粒的两种耐药细菌模型的耐药质粒。经pCas9-NM剪切后,两种耐药质粒均被清除,无法用PCR检出(参见图6)。

[0089] 检测经pCas9-NM作用后,细菌抗生素敏感性变化。Etest药敏纸条定量检测NDM-1耐药菌模型对亚胺培南(具有碳青霉烯环的硫霉素类抗生素)的MIC值,经pCas9-NM清除耐药质粒后MIC均值由8ug/ml降为0.38ug/ml(见图7)。

[0090] 采用涂板法定性分析经pCas9-NM清除MCR-1质粒后细菌的药敏结果变化。在含0.5ug/ml粘菌素的LB平板上,几乎没有pCas9-NM转化子,表明MCR-1模型菌耐药性被清除,而对照组pCas9转化子则生长菌落数较多(见图8)。

[0091] 实施例4:噬菌体载体递呈的CRISPR-Cas9系统的构建

[0092] 1. 设计了携带自杀基因和NDM-1基因靶点序列的质粒pST<sub>K</sub>,作为无痕包装CRISPR-Cas9系统至噬菌体基因组的阳性筛选系统,pST<sub>K</sub>质粒结构示意图如图9所示。

[0093] 2. 设计了基于阳性筛选系统pST<sub>K</sub>质粒的无痕包装CRISPR-Cas9系统至大肠杆菌λ样温和噬菌体的方法(具体流程参照图11),并利用该技方法将pCas9-N质粒上的CRISPR-

Cas9序列包装至噬菌体基因组中,具体步骤如下:

[0094] (1) 采用大肠杆菌 $\lambda$ 样温和噬菌体vB\_Eco\_MG65感染大肠杆菌标准株*E. coli* MG1655,并将细菌多次传代培养。挑选传代后单菌落至5ml液体培养基中37℃、200rpm培养至OD $\approx$ 0.6,将0.5mL菌液、5mLLB半固体和1 $\mu$ L丝裂霉素C( $\mu$ g/mL)混合并平铺至LB固体平板培养基上。6小时后,该双层LB平板上出现大量噬菌斑,说明噬菌体已经稳定整合到*E. coli* MG1655的染色体上,原传代菌落即为噬菌体稳定整合株,命名为*E. coli* MG1655-vB\_Eco\_MG65;

[0095] (2) 将表达同源重组相关酶类的质粒pKD46转化至*E. coli* MG1655-vB\_Eco\_MG65细胞中,具体步骤如下:

[0096] 1) 将纯化后的*E. coli* MG1655-vB\_Eco\_MG65接种至5mL的LB液体培养基中,过夜震荡培养。将5mL菌液转接至含150mL的LB培养基的锥形瓶中,220rpm、37℃培养至OD $\approx$ 0.6后终止培养;

[0097] 2) 4℃6000rpm 5分钟两次收集细菌至50mL离心管中。弃上清,加入15ml冰中预冷的高压无菌纯水,轻轻悬浮混匀菌沉淀,4℃6000rpm 5分钟,弃上清;

[0098] 3) 再加入15ml冰中预冷的高压无菌纯水,轻轻悬浮混匀菌沉淀,4℃6000rpm 5分钟,弃上清;

[0099] 4) 加入15ml冰中预冷的高压无菌15%甘油(纯)水,轻轻悬浮混匀菌沉淀,4℃6500rpm 5分钟,弃上清;

[0100] 5) 再加入15ml冰中预冷的高压无菌15%甘油(纯)水,轻轻悬浮混匀菌沉淀,4℃6500rpm 5分钟,弃上清;

[0101] 6) 加入1~1.5ml/管冰中预冷的高压无菌15%甘油(纯)水(连上次未弃干净的,终体积1.5~2.0ml/管),使成牛奶滴状,分装100 $\mu$ l/管,一小部分用于当次电转用,其余于-80℃保存备用;

[0102] 7) 将质粒pKD46与感受态细胞充分混匀,预冷20分钟;

[0103] 8) 于25kV/cm、200 $\Omega$ 条件下进行电击;

[0104] 9) 电击后立即加入1mL的LB培养基重悬细菌,转入1.5mL离心管中30℃复苏1小时;

[0105] 10) 复苏后的转化产物经系列稀释后涂布抗性筛选LB平板,30℃培养12小时以上,筛选抗性克隆。得到*E. coli* MG1655-vB\_Eco\_MG65pKD46细胞;

[0106] (3) 将蔗糖诱导表达的自杀基因SacB和NDM-1基因中与特异性sgRNA结合的靶点序列连同下游的PAM序列(GGG)构建到pUC18质粒上,并将质粒添加Kana抗性基因,得到pST<sub>K</sub>质粒。采用与(2)中相同的感受态制备步骤和转化方法将pST<sub>K</sub>质粒转化至*E. coli* MG1655-vB\_Eco\_MG65pKD46细胞得到*E. coli* MG1655-vB\_Eco\_MG65pKD46pST<sub>K</sub>细胞;

[0107] (4) 采用融合PCR的方法,构建两端携带噬菌体序列同源臂的CRISPR-Cas9序列重组模板双链DNA线性片段,同源臂各500bp,CRISPR序列长约5kb,重组片段长约6kb(参见图10的携带噬菌体同源臂的CRISPR-Cas9序列双链DNA重组模板结构示意图,其中,1:上游同源臂,2:为先导RNA(tracrRNA),3:Cas9序列,4:CRISPR位点(repeat/spacer-NDM/repeat),5:下游同源臂)。首先设计用于融合PCR的扩增噬菌体上游同源臂、CRISPR-Cas9序列、噬菌体下游同源臂的引物:

[0108] 上游同源臂扩增引物

- [0109] phageup-F:CGCTCAGGAAAGAAGTGGC
- [0110] phageup-R:CTCCACAGGATGATTTTCGTATCATCGCCATTGCTCCCCA
- [0111] spCas9-F:AATGGCGATGATACGAAATCATCCTGTGGA
- [0112] spCas9-R:AACCATTACGAACTGTGAACACACTACTCTTCTTTTGC
- [0113] phagedown-F:AGAGTAGTGTGTTACAGTTCGTAATGGTT
- [0114] phagedown-R:TGCTGGGAGAAACGGGAAG
- [0115] 采用上述引物分别扩增上游噬菌体同源臂片段 (upstream fragment), CRISPR-Cas9 序列片段 (CRISPR fragment), 下游噬菌体同源臂片段 (downstream fragment)。扩增产物用 Promega DNA 纯化回收试剂盒进行回收;
- [0116] 采用融合 PCR 的方法, 构建两端携带噬菌体序列同源臂的 CRISPR-Cas9 序列重组模板双链 DNA 线性片段, 同源臂各 500bp, CRISPR 序列长约 5kb, 重组片段长约 6kb;
- [0117] 第一次融合 PCR 反应 (两步法) 制备上游同源臂片段和 CRISPR-Cas9 序列片段的融合产物, 即 up-Cas9 fragment;
- [0118] 第一步进行两个融合片段搭桥, 反应体系:
- |        |                       |              |  |
|--------|-----------------------|--------------|--|
|        | 上游片段                  | 3 $\mu$ L    |  |
|        | CRISPR 片段             | 3 $\mu$ L    |  |
| [0119] | PrimeSTAR Max DNA 聚合酶 | 12.5 $\mu$ L |  |
|        | ddH <sub>2</sub> O    | 6.5 $\mu$ L  |  |
|        | 总体积                   | 25 $\mu$ L   |  |
- [0120] 第一步反应条件:
- |        |     |                 |      |         |
|--------|-----|-----------------|------|---------|
|        | 预变性 | 98 $^{\circ}$ C | 1 分钟 |         |
| [0121] | 变性  | 98 $^{\circ}$ C | 15 秒 | } 15 循环 |
|        | 退火  | 58 $^{\circ}$ C | 20 秒 |         |
|        | 延伸  | 72 $^{\circ}$ C | 3 分钟 |         |
- [0122] 反应产物作为 PCR 模板进入第二步反应
- [0123] 第二步进行产物扩增, 反应体系:
- |        |                       |            |
|--------|-----------------------|------------|
|        | phageup-F             | 1 $\mu$ L  |
|        | spCas9-R              | 1 $\mu$ L  |
| [0124] | PrimeSTAR Max DNA 聚合酶 | 25 $\mu$ L |
|        | 模板                    | 5 $\mu$ L  |
|        | ddH <sub>2</sub> O    | 18 $\mu$ L |
|        | 总体积                   | 50 $\mu$ L |
- [0125] 第二步反应条件
- |        |     |                 |      |
|--------|-----|-----------------|------|
| [0126] | 预变性 | 98 $^{\circ}$ C | 1 分钟 |
|--------|-----|-----------------|------|

	变性	98℃	15 秒	} 35 循环
[0127]	退火	58℃	20 秒	
	延伸	72℃	3 分钟	
	终延伸	72℃	10 分钟;	

[0128] 采用Promega DNA纯化回收试剂盒收集融合产物up-Cas9fragment;

[0129] 以up-Cas9fragment和downstream fragment为两个搭桥片段再次采用上述步骤进行融合PCR,扩增引物更换为phageup-F和phageup-R,其他反应条件相同,不再赘述,获得线性DNA重组模板;

[0130] (5) 制作E.coli MG1655-vB\_Eco\_MG65pKD46pST<sub>K</sub>感受态细胞,感受态制备总体方法与(2)相同,其中增加一步,即当锥形瓶中菌液振荡培养至OD≈0.1时加入阿拉伯糖(0.1mM)诱导pKD46表达重组相关酶类,电转线性重组片段至感受态细胞中。若重组成功,则CRISPR-Cas9系统表达后清除pST<sub>K</sub>质粒,若未发生重组,则线性片段随细菌分裂生长逐渐降解,pST<sub>K</sub>继续存在;

[0131] (6) 转化细菌用LB平板(10%蔗糖)筛选,30℃静止培养24小时,pST<sub>K</sub>质粒在蔗糖诱导下表达SacB自杀基因杀死未包装CRISPR-Cas9系统的细菌,成功重组CRISPR的细菌成为转化子;

[0132] (7) PCR验证转化子单菌落是否为CRISPR序列阳性,挑取阳性转化子接种至LB试管中,当菌液培养至OD≈0.6时,加入丝裂霉素C(0.1μg/mL)诱导重组噬菌体裂解细菌。收集上清获得含有重组型噬菌体vB\_Eco\_Cas9(简称为VB-Cas9)的溶液。经PCR验证,重组噬菌体包装有CRISPR-Cas9序列(参见图12)。

[0133] 实施例5:CRISPR-Cas9系统重组噬菌体靶向清除NDM-1耐药质粒的特异性

[0134] 利用重组噬菌体递呈靶向NDM-1基因的CRISPR-Cas9系统,清除细菌携带的耐药质粒。图13为携带靶质粒的细菌占总菌数百分比,携带CRISPR-Cas9系统的噬菌体(VB-Cas9)能够选择性清除超过99%的细菌内靶标耐药质粒(pUCtarget<sub>K</sub>),不清除无靶点序列的质粒pUC<sub>K</sub>。对单个菌落内耐药质粒的清除率进行检测,靶质粒的清除率大于99.9%,对照组野生型噬菌体(WT)对耐药质粒拷贝数无明显影响。图14为单个菌落中靶质粒清除率,可见VB-Cas9能够完全清除靶标耐药质粒(pUCtarget<sub>K</sub>),而野生型则没有变化,且非靶标耐药质粒pUC<sub>K</sub>也没有变化。

[0135] 实施例6:CRISPR-Cas9噬菌体清除细菌耐药质粒的量效关系

[0136] 采用不同感染复数(MOI)的噬菌体侵染耐药细菌,并在培养基中加入由耐药质粒介导抗性的抗生素。随着噬菌体MOI的增加,存活的耐药菌越来越少,表明被清除耐药质粒的细菌比例随MOI增加而提升。对照组中,耐药菌的数量无明显变化(参见图15)。

[0137] 实施例7:包装CRISPR-Cas9噬菌体对细菌环境中耐药质粒的抑制效果

[0138] 与一株杀菌的烈性噬菌体(VB253)和空白对照作比较,重组噬菌体加入后,随着细菌的生长,实验组细菌上清中的质粒浓度累积不明显,而另外两个对照组中,质粒浓度随时间变化快速增加,表明溶原型噬菌体包装CRISPR-Cas9系统在不杀伤细菌菌体的同时能够有效阻断细菌生长环境中耐药质粒的累积(参见图16)。

[0139] 实施例8:动物实验验证包装CRISPR-Cas9系统的噬菌体在治疗上的作用。

[0140] 首先在小鼠皮肤感染模型上,重组噬菌体能够有效清除细菌携带的靶质粒(pUCtarget<sub>K</sub>),清除比细菌耐药质粒后联合抗生素治疗,普通抗生素卡那霉素恢复对细菌感染的治疗效果。而生理盐水对照组中,卡那霉素无法降低小鼠感染皮肤的细菌载量(参见图17)。

[0141] 此外,在小鼠肠道感染模型中,利用包装CRISPR-Cas9系统的噬菌体清除肠道中大肠杆菌携带的靶质粒,降低了粪便中的耐药靶质粒的DNA浓度(参见图18)。

- [0001] 序 列 表
- [0002] <110> 中国人民解放军疾病预防控制中心
- [0003] <120> 一种靶向清除细菌耐药性质粒的CRISPR-Cas9系统及应用
- [0004] <160> 4
- [0005] <170> PatentIn version 3.3
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 30
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> Plasmid NDM-1
- [0010] <400> 1
- [0011] accgcattag ccgctgcatt gatgctgagc 30
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 30
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> Plasmid MCR-1
- [0016] <400> 2
- [0017] atgccctaca gaccgaccaa gccgagacca 30
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 36
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> Artificial
- [0022] <220>
- [0023] <223> repeat sequence
- [0024] <400> 3
- [0025] gttttagagc tatgctgttt tgaatggtcc caaaac 36
- [0026] <210> 4
- [0027] <211> 99
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> Artificial
- [0030] <220>
- [0031] <223> artificial construct
- [0032] <400> 4
- [0033] accgcattag ccgctgcatt gatgctgagc gtttttagag ctatgctgtt ttgaaatggtc 60
- [0034] ccaaaacatg ccctacagac cgaccaagcc gagaccagg 99

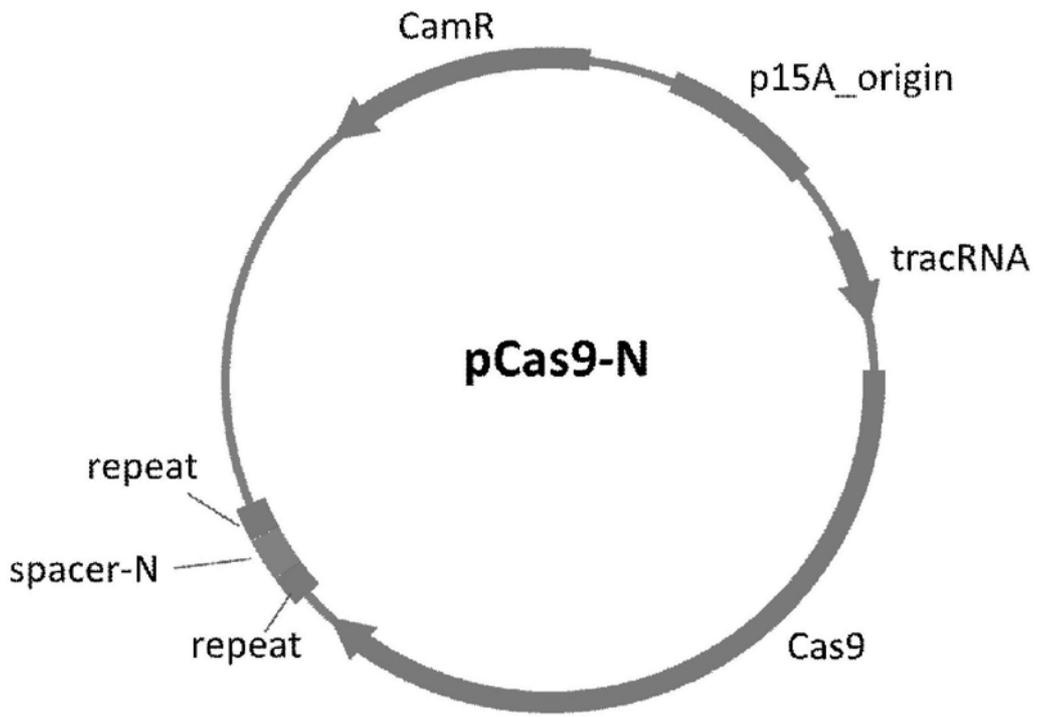


图1

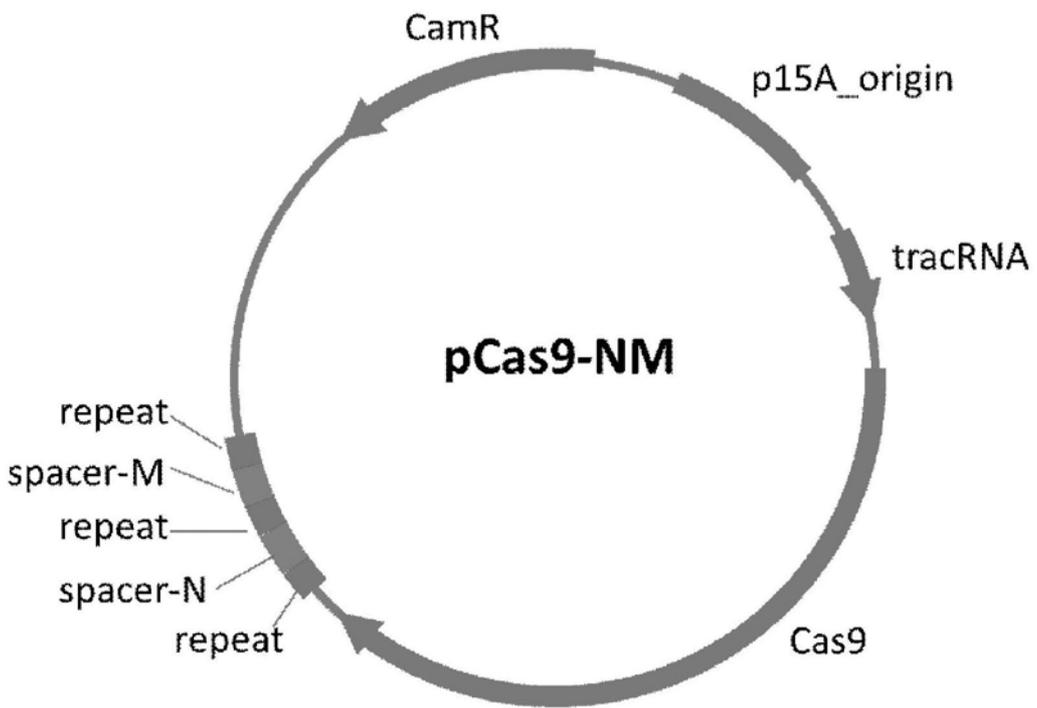


图2

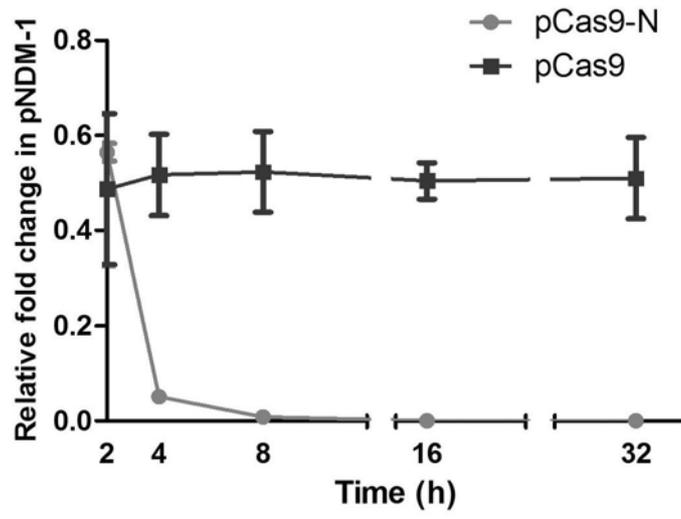


图3

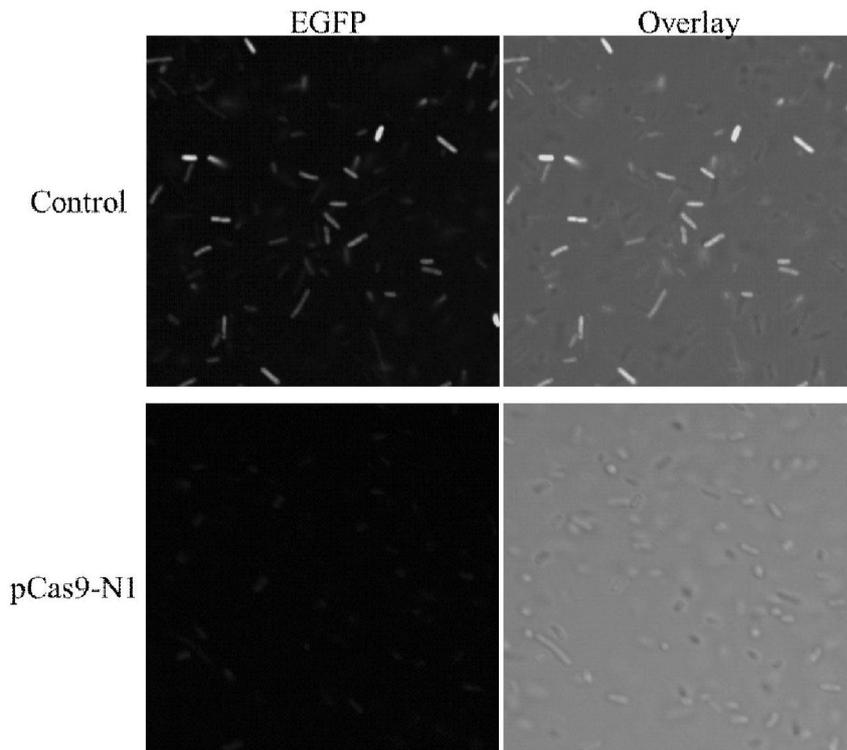


图4

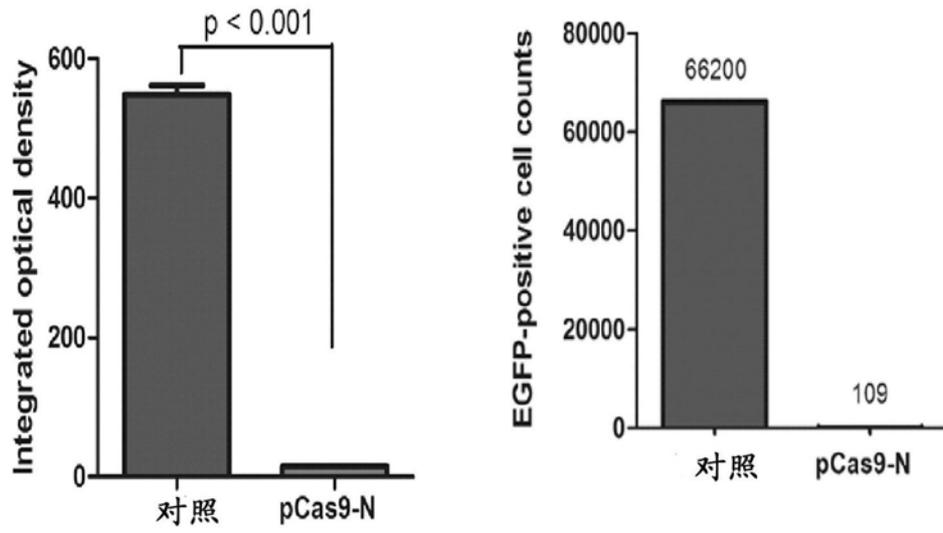


图5

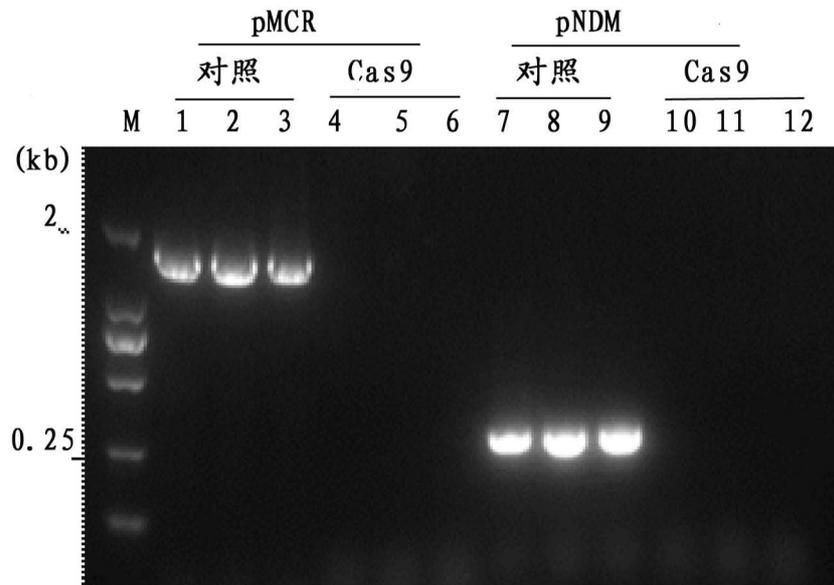


图6

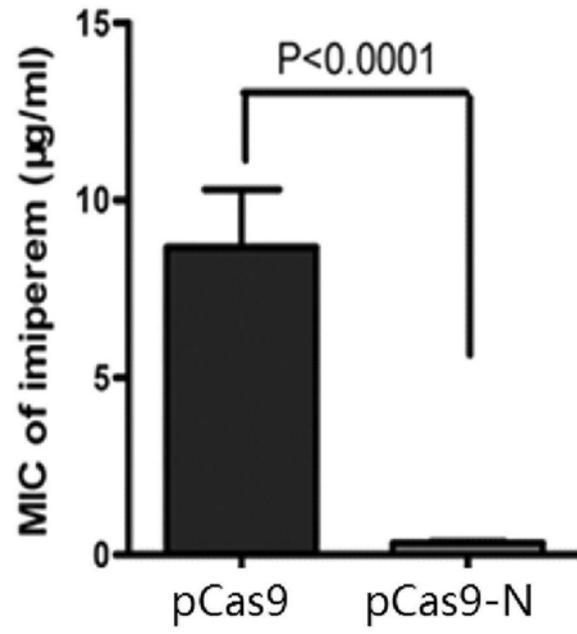


图7

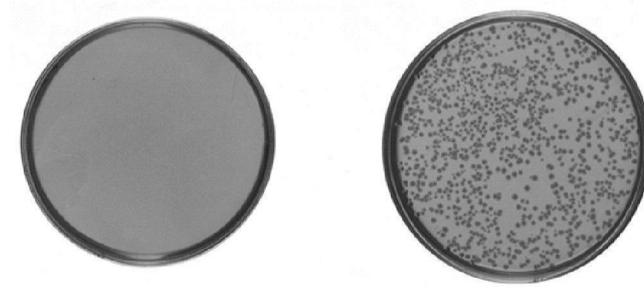


图8

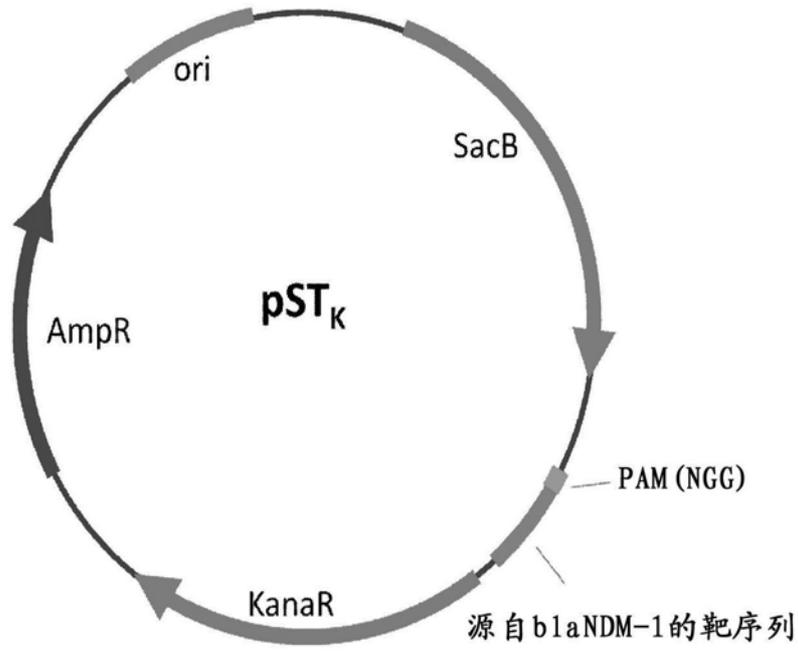


图9

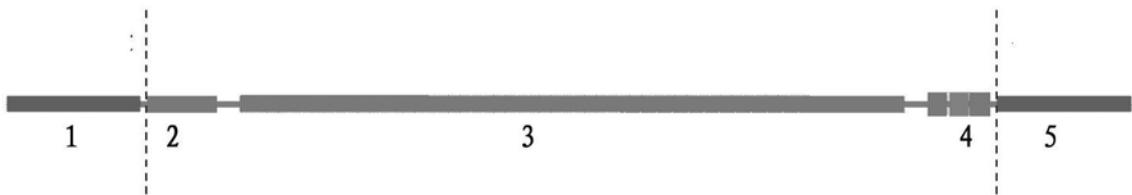


图10

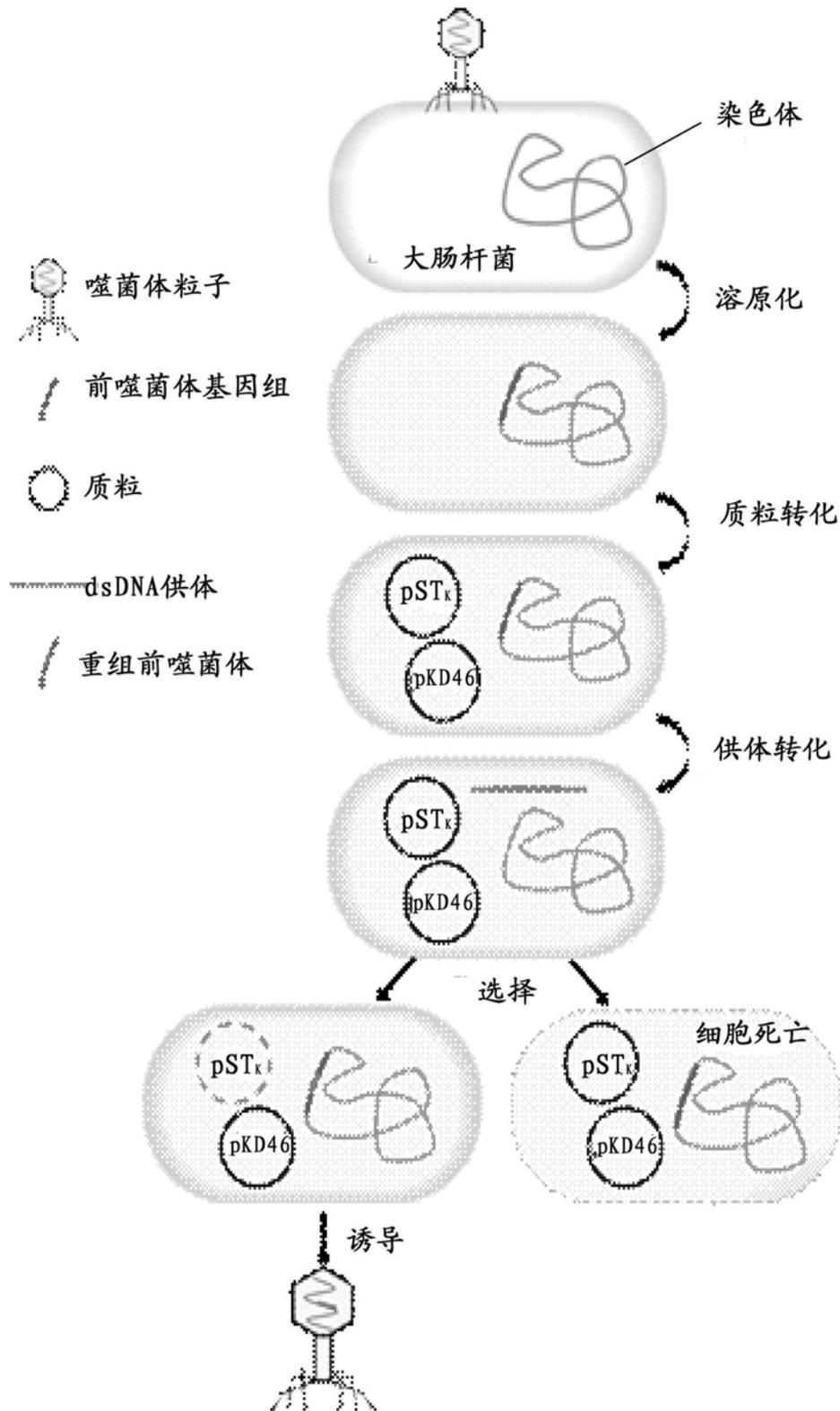


图11

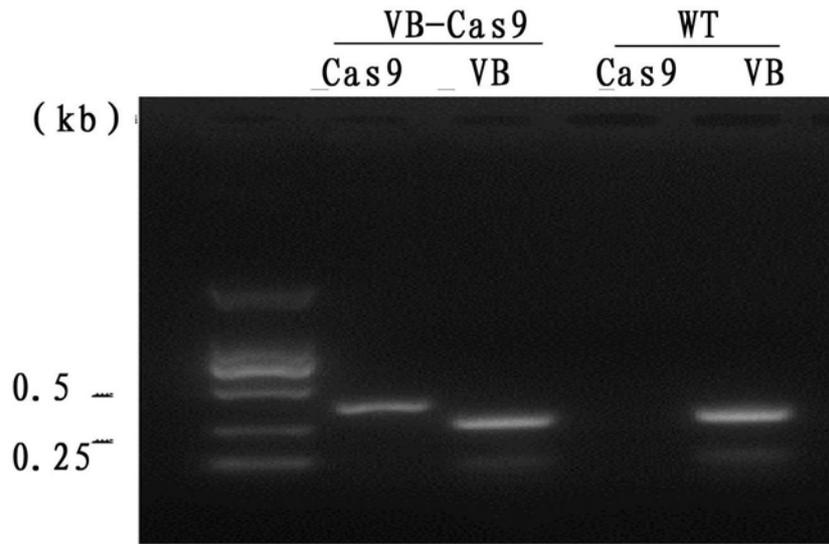


图12

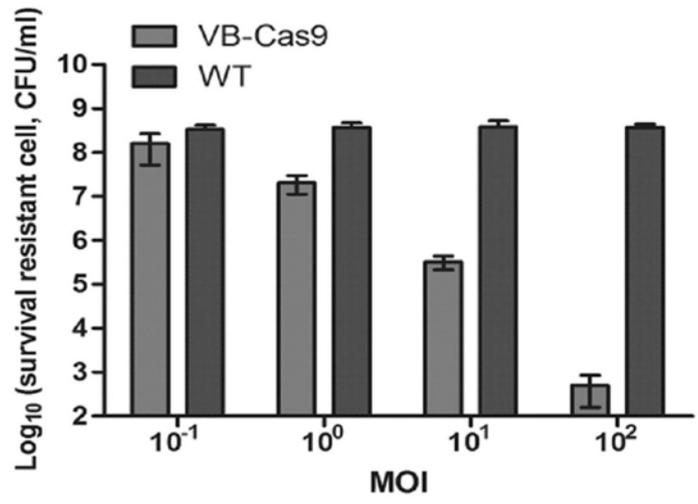


图13

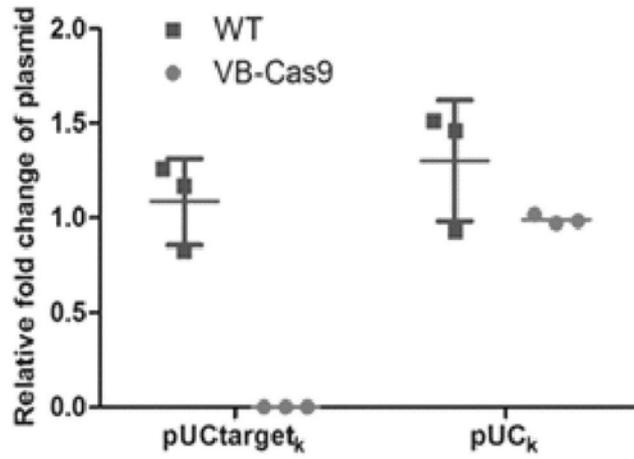


图14

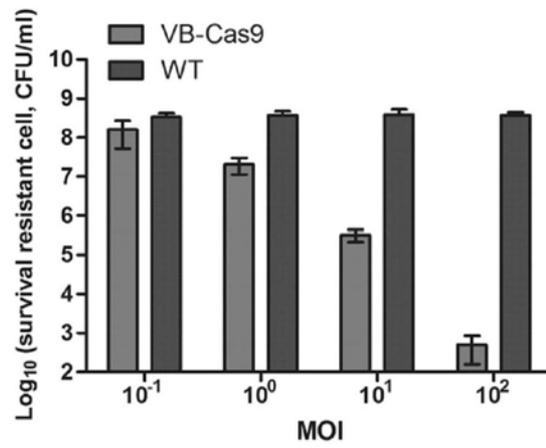


图15

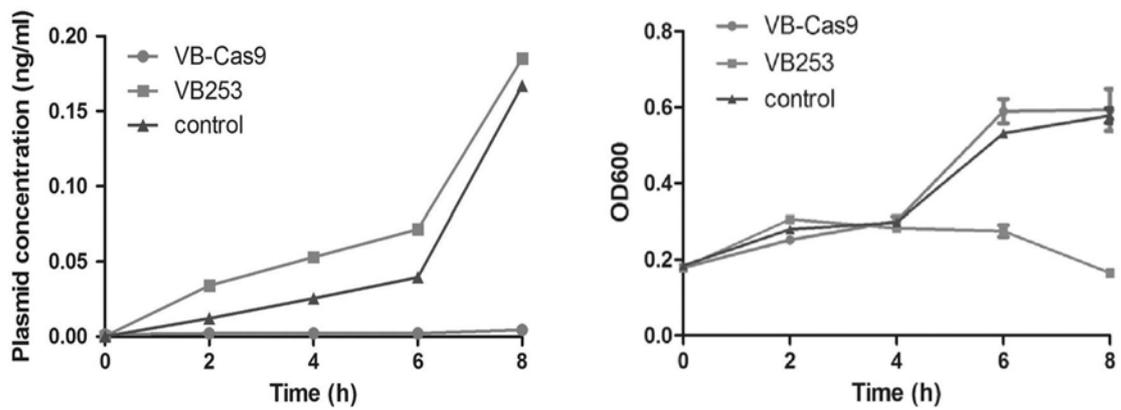


图16

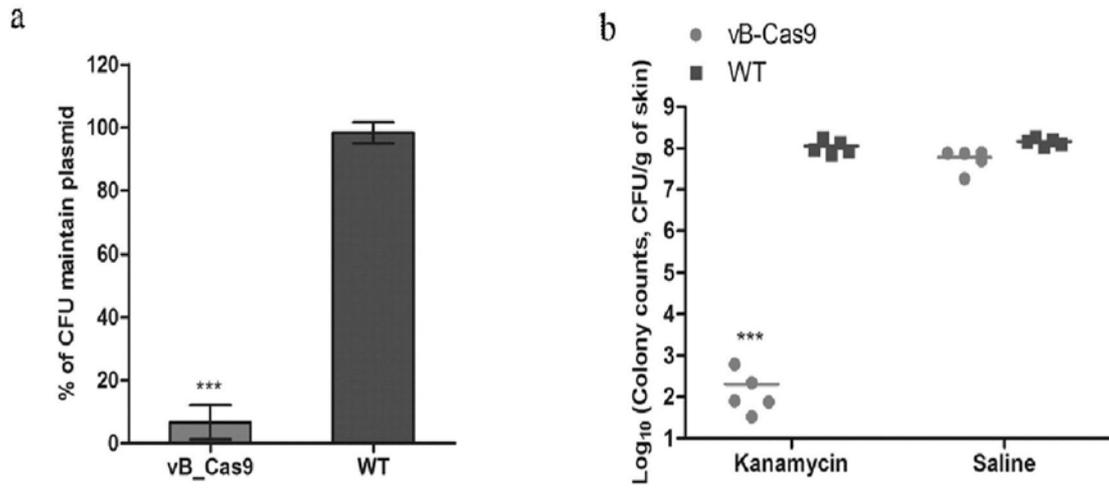


图17

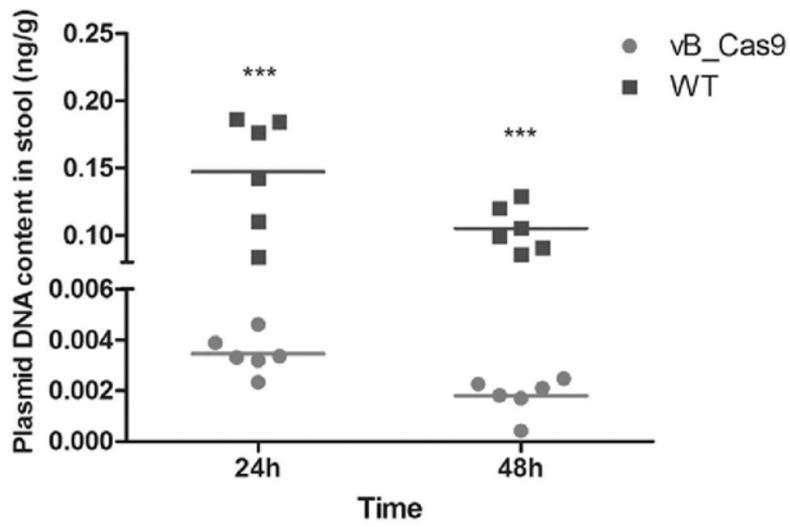


图18