

• 综 述 •

# 利用 CRISPR-Cas 系统防控细菌耐药性的研究进展

王晨羽<sup>1</sup>, 刘芝芝<sup>1</sup>, 唐标<sup>2</sup>, 杨华<sup>2</sup>, 孙东昌<sup>1</sup>

1 浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

2 浙江省农业科学院, 浙江 杭州 310021

王晨羽, 刘芝芝, 唐标, 杨华, 孙东昌. 利用 CRISPR-Cas 系统防控细菌耐药性的研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(4): 1432-1445.

WANG CY, LIU ZZ, TANG B, YANG H, SUN DC. Prevention and control of antimicrobial resistance using CRISPR-Cas system: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(4): 1432-1445.

**摘 要:** 细菌多重耐药是医药健康、农林牧渔、生态环境等多领域共同面临的全球性挑战。抗生素耐药基因跨物种跨区域传播是导致细菌多重耐药形成的重要原因。然而, 目前尚无有效方案解决日益严峻的细菌多重耐药问题。由规律成簇间隔短回文重复序列和与之相关的蛋白组成的 CRISPR-Cas 系统, 可靶向切割进入细菌的外源核酸, 具有防控耐药基因转移导致细菌多重耐药的应用潜力。文中在简要介绍 CRISPR-Cas 系统作用机制的基础上, 着重讨论近年来以质粒、噬菌体、纳米粒子等载体传递 CRISPR-Cas 工具消减耐药基因的研究进展, 进而展望该研究领域的发展趋势, 为防控细菌多重耐药性提供新的思考方向。

**关键词:** 多重耐药性; 耐药基因; 水平基因转移; CRISPR-Cas 系统

**Received:** May 10, 2021; **Accepted:** November 17, 2021; **Published online:** March 18, 2022

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (32170083, 31670084); Key Research and Development Program of Zhejiang Province, China (2020C02031); Open Foundation of State Key Laboratory Cultivation Base of Hazard Factors and Risk Control of Quality and Safety of Agricultural Products, China (2021DG700024-KF202105); New-Shoot Talents Program of Zhejiang Province, China (2021R403034)

**Corresponding author:** SUN Dongchang. Tel: +86-159-67198628; E-mail: sundch@zjut.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金 (32170083, 31670084); 浙江省重点研发计划 (2020C02031); 省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室开放基金 (2021DG700024-KF202105); 浙江省新苗计划 (2021R403034)

# Prevention and control of antimicrobial resistance using CRISPR-Cas system: a review

WANG Chenyu<sup>1</sup>, LIU Zhizhi<sup>1</sup>, TANG Biao<sup>2</sup>, YANG Hua<sup>2</sup>, SUN Dongchang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

<sup>2</sup> Institute of Quality and Standard for Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China

**Abstract:** Bacterial multi-drug resistance (MDR) is a global challenge in the fields of medicine and health, agriculture and fishery, ecology and environment. The cross-region spread of antibiotic resistance genes (ARGs) among different species is one of the main cause of bacterial MDR. However, there is no effective strategies for addressing the intensifying bacterial MDR. The CRISPR-Cas system, consisting of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR associated proteins, can targetedly degrade exogenous nucleic acids, thus exhibiting high application potential in preventing and controlling bacterial MDR caused by ARGs. This review briefly introduced the working mechanism of CRISPR-Cas systems, followed by discussing recent advances in reducing ARGs by CRISPR-Cas systems delivered through mediators (e.g. plasmids, bacteriophages and nanoparticle). Moreover, the trends of this research field were envisioned, providing a new perspective on preventing and controlling MDR.

**Keywords:** multi-drug resistance; antibiotic resistance genes; horizontal gene transfer; CRISPR-Cas system

细菌多重耐药性 (multi-drug resistance, MDR) 是指细菌对多种作用机制不同的抗菌药物产生的耐药性<sup>[1-2]</sup>。部分多重耐药细菌能耐受几乎所有的抗生素, 被称为“超级细菌”。多重耐药菌的快速传播给全球公共卫生和临床医学带来巨大挑战。水平基因转移 (horizontal gene transfer, HGT) 可促进遗传物质在不同细菌之间的交流, 是细菌形成多重耐药性的重要原因<sup>[3]</sup>。临床医学、畜禽养殖和生态环境的调查结果均表明抗生素耐药基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 水平转移 (尤其是质粒介导的耐药基因水平转移) 促进了多重耐药性跨区域跨种群传播<sup>[3]</sup>。例如, 从全球不同区域的人、动物和环境分离的多种耐药菌中均鉴定出含降解所有  $\beta$ -内酰胺类抗生素的 *bla*<sub>NDM-1</sub> 基因的耐药

基因簇, 序列分析表明不同来源的含 *bla*<sub>NDM-1</sub> 的耐药基因簇高度同源, 提示耐药基因通过水平基因转移在不同宿主中传播<sup>[3-4]</sup>。环脂肽类抗生素多粘菌素被称为抵御多重耐药菌的“最后一道防线”<sup>[5]</sup>, 然而, 近年来研究表明多粘菌素耐药基因 *mcr-1* 已在全球范围内扩散<sup>[6]</sup>。转化、接合和转导是水平基因转移的主要方式<sup>[7]</sup>。自然条件下, 具备自然转化能力的细菌在膜蛋白的介导下可主动摄取裸露的外源 DNA<sup>[8]</sup>。在接合过程中, 性伞毛介导供体细菌将接合质粒 DNA 导入受体细菌。在转导过程中, 噬菌体吸附宿主细菌后将自身遗传物质注入细菌体内。

虽然细菌多重耐药问题日益突显, 但是应对该问题的有效方法仍十分缺乏。新抗生素开发曾是应对细菌耐药问题的主要手段, 然而新

抗生素开发存在研发周期长、成本高、成功率低等问题,难以应对细菌多重耐药性发展速度过快的挑战。质粒是耐药基因转移的重要载体,一些自然环境因素(如高盐度、高温、厌氧环境等)和理化因子(如溴化乙锭、十二烷基硫酸钠、结晶紫等)通过影响质粒的稳定性限制耐药基因的传播<sup>[9-11]</sup>。但自然环境因素或理化因子抑制耐药性传播存在质粒消除率低、生物毒性等问题,难以应用于医学临床和畜禽养殖业。细菌中广泛存在由规律成簇间隔短回文重复序列(*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, CRISPR 序列)和与之相关的蛋白(CRISPR-associated protein, Cas 蛋白)组成的 CRISPR-Cas 系统,它在细菌免疫防御的过程中发挥重要作用,可靶向切割外源 DNA 或 RNA<sup>[12-13]</sup>。经改造的 CRISPR-Cas 系统已广泛应用于微生物和动植物基因组编辑。作为一种新型基因编辑工具,近年来人们将 CRISPR-Cas 系统应用于防控多重耐药菌<sup>[14-24]</sup>。本文在简要介绍 CRISPR-Cas 系统作用机制的基础上,阐述以质粒、噬菌体和纳米脂质体为载体利用 CRISPR-Cas 系统消减耐药基因和耐药质粒的研究进展,并结合笔者自身的研究探讨今后利用 CRISPR-Cas 系统防控细菌多重耐药的研究思路。

## 1 CRISPR-Cas 系统的结构与作用机制

CRISPR-Cas 系统由 CRISPR 阵列和编码 Cas 蛋白的一组基因组成<sup>[12]</sup>。其中,CRISPR 阵列由前导序列、重复序列和间隔序列组成,其转录产物在相关蛋白加工后形成成熟 crRNA,与 Cas 蛋白结合形成的核酸-蛋白复合体识别并降解 DNA 或 RNA<sup>[25]</sup>。

根据效应蛋白的数量,CRISPR-Cas 系统可分为 Class 1 和 Class 2 两大类。Class 1 利用多蛋白效应复合物降解核酸,可进一步分为 I 型、III 型和 IV 型;Class 2 则利用单蛋白效应复合物降解核酸,可进一步分为 II 型、V 型和 VI 型<sup>[13]</sup>。CRISPR-Cas 系统作用机制可分为 3 个阶段:新的间隔序列的获得与整合(适应, *adaptation*)、crRNA 和 Cas 蛋白的生成(表达, *expression*)及 crRNA 引导的核酸靶向切割(干扰, *interference*)<sup>[26]</sup>。在干扰阶段,CRISPR 阵列转录加工后的产物(成熟 crRNA)与 Cas 蛋白结合成核酸-蛋白复合体,该复合体寻找核酸中与 crRNA 互补的序列,导致识别位点附近核酸被降解<sup>[27]</sup>,这种特异性使得 CRISPR 系统逐渐被开发应用于消除特定耐药基因,从而防控耐药基因转移导致的耐药问题<sup>[28]</sup>。目前,人们已利用 I 型、II 型和 VI 型 CRISPR-Cas 系统开发消除耐药基因的遗传操作工具<sup>[18,29-30]</sup>。

I 型 CRISPR-Cas 系统是 Class 1 类的典型代表,其标志蛋白为含有磷酸水解酶结构域和解旋酶结构域的 Cas3 蛋白<sup>[31]</sup>。I 型 CRISPR-Cas 系统编码的蛋白 Cas1 和 Cas2 介导适应过程,它们将外源 DNA 片段整合至自身前导序列和 CRISPR 第一个重复序列之间,从而形成一个新的间隔区(*spacer*);在表达阶段,CasE 蛋白将前体 crRNA (*pre-crRNA*) 加工成成熟 crRNA 并与一组 Cas 蛋白(*cascade*)结合成复合体,该复合体引导 Cas3 蛋白切割外源靶序列<sup>[32]</sup>(图 1A)。

Class 2 类的 II 型 CRISPR-Cas9 系统广泛应用于包括动植物在内的生命体基因编辑中,其标志蛋白为含有 2 个结构域 HNH 和 RuvC 的 Cas9 蛋白<sup>[33]</sup>。在 II 型系统中,前 crRNA 与反式 crRNA (*tracrRNA*) 部分互补形成双链,被称为小导向 RNA (*small guide RNA*, sgRNA),通过 Cas9 蛋白维持该结构的稳定性,宿主 RNase III

将前 crRNA 加工成包含单个间隔序列的单元 (crRNA)<sup>[34]</sup>。这种 sgRNA 与 Cas9 形成的复合物在 DNA 上寻找相应候选识别位点的毗邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM), 并在其附近的靶序列上切割核苷酸引起双链断裂 (double strand break, DSB)<sup>[34]</sup> (图 1B)。通过引入同源重组修复模板修复双链断裂, 可实现编辑目标基因的目的<sup>[35]</sup>。

相较于同为 Class 2 类的 II 型 CRISPR-Cas 系统, VI 型 CRISPR-Cas 系统则更为简单。以 CRISPR-Cas13 为例, 效应蛋白 Cas13 既可将前 crRNA 加工为成熟 crRNA, 又可携带单个 crRNA 寻找互补的靶标位点<sup>[36]</sup>。不同的是, Cas13 存在 2 个 HEPN (higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding) 结构域, 由 RNA 引导并发挥非特异核酸酶的作用降解单链 RNA (single stranded RNA, ssRNA)<sup>[37]</sup> (图 1C)。

CRISPR-Cas 系统可通过靶向消除耐药基因恢复宿主菌对抗生素的敏感性, 因此在防控由耐药基因导致细菌耐药方面具有应用潜力<sup>[25,38]</sup>。将 CRISPR-Cas 系统高效地运输至微生物体内是利用该系统防控细菌耐药性需解决的主要问题<sup>[39]</sup>。目前主要的递送载体包括质粒、噬菌体和纳米粒子等。本文将分别介绍近年来基于上述载体开发的用于防控耐药基因转移的 CRISPR-Cas 系统 (表 1)。

## 2 基于质粒载体的 CRISPR-Cas 系统防控耐药基因转移研究

根据水平转移的特性, 质粒可分为非接合型和接合型质粒。非接合型质粒无需供体菌引导, 可通过自然转化的方式进入宿主菌。在自然条件下, 接合型质粒通过自身编码的 IV 型分

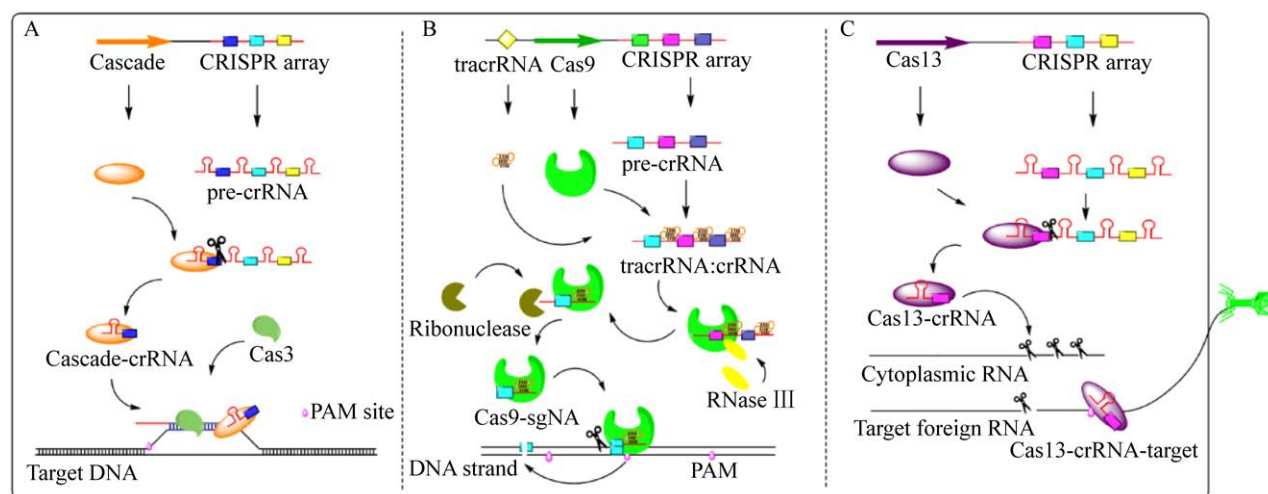


图 1 I 型、II 型和 VI 型 CRISPR-Cas 系统作用机制<sup>[32,35]</sup>

Figure 1 The mechanism of type I, II and VI CRISPR-Cas systems<sup>[32,35]</sup>. (A) In type I system, the crRNA bound by cascade complex guides Cas3 to degrade target DNA. (B) In type II system, the pre-crRNA and tracrRNA are partially complementary to form a double-stranded structure, whose the stability is maintained by Cas9 protein. The complex formed by Cas9 and sgRNA processed by RNase III searches for the PAM site on the DNA, and cuts the nucleotide on the nearby target sequence to cause a DSB. (C) In type VI system, the Cas13 not only processes the pre-crRNA into a mature crRNA, but also guides a single crRNA to find complementary target sites, then plays the role of non-specific RNase to degrade ssRNA.

泌系统从供体菌进入受体菌<sup>[40]</sup>。人们通过在质粒载体上整合编码 CRISPR-Cas 系统或其部分组件的序列,使得 CRISPR-Cas 系统靶向并切割耐药基因,从而降低耐药菌对抗生素的抗性。

## 2.1 非接合质粒介导的 CRISPR-Cas 系统防控耐药基因转移研究

CRISPR-Cas9 系统最先被应用于耐药菌中耐药基因的消除。Bikard 等利用非接合质粒 pCEP 将化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) SF370 的 CRISPR01 序列转入肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) R6,该序列包含可转录 tracrRNA 的 DNA、包括 *cas9* 在内的 4 个 *cas* 基因以及若干重复-间隔单元,该间隔序列生成的 crRNA 能够靶向至 *S. pneumoniae* 染色体上的耐药基因,杀死携带该耐药基因的宿主菌<sup>[30]</sup> (图 2A-i)。此后有研究者利用一种只包含可转录 Cas9 和 tracrRNA 序列的简化质粒抵抗首次发现含 *mcr-1* 耐药基因的 IncI2 类质粒 pHNSHP45 对受体菌的接合过程<sup>[5]</sup>。接合是细菌基因转移的重要方式,临床环境中耐药基因的传播主要通过接合发生<sup>[41]</sup>。当受体菌含有该质粒时,其转录形成的靶向 *mcr-1* 的 sgRNA 即可引导 Cas9 蛋白切割靶位点,降低 pHNSHP45 对受体菌的接合效率<sup>[5]</sup> (图 2A-v)。由质粒介导的耐碳青霉烯类肠杆菌是临床上常见的耐药菌,而这些质粒上通常还携带着其他耐药基因 (如 *mcr-1*)<sup>[42-43]</sup>,治疗这类耐药菌引起的感染性疾病十分困难。pCasCure 系统可被用于去除含碳青霉烯酶等耐药基因的质粒,从而恢复耐药菌的对碳青霉烯等抗生素的敏感性。将携带 pCasCure 系统的质粒载体导入耐碳青霉烯类肠杆菌中,利用阿拉伯糖诱导 Cas9 表达并使其靶向至耐药质粒的复制子序列,可以有效去除携带 *bla<sub>KPC</sub>* 的 IncN 质粒、携带 *bla<sub>OXA-48</sub>* 的 pOXA-48 质粒、携带 *bla<sub>NDM</sub>* 的 IncX3 质粒等,提高了利用

CRISPR-Cas 系统防控耐药的广谱性,对临床分离的包括克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*) 在内的耐碳青霉烯类肠杆菌有较好的治疗效果<sup>[16]</sup> (图 2A-iv)。

导向 RNA (gRNA) 赋予 CRISPR-Cas 系统序列靶向特异性的重要特点,增加 gRNA 的拷贝数可以显著提高 CRISPR-Cas 系统的活性。Valderrama 等在表达 gRNA 的 DNA 片段两侧添加靶位点上下游同源臂序列,当另一个质粒上诱导表达的 Cas9 切断靶标耐药基因后,含有同源臂的表达 gRNA 的 DNA 片段将作为模板修复这一缺口,实现表达 gRNA 的 DNA 片段拷贝数的指数增加<sup>[20]</sup>。体外实验表明,这种驱动 gRNA 表达的系统 (Pro-AG) 能更有效地破坏含有抗性基因的高拷贝质粒,不仅能消除目标序列或携带耐药基因的质粒,而且具有精确编辑目标基因的潜力<sup>[20]</sup> (图 2A-iii)。

原核生物中普遍存在 CRISPR-Cas 系统,可利用其内源性 CRISPR-Cas 系统防控耐药基因转移。临床上引起下呼吸道感染的重要病原菌铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的耐药水平普遍较高,在该菌中导入含有靶向抗性基因的间隔序列与编辑模板的质粒,其转录形成的 crRNA 引导 *P. aeruginosa* 内源性 I-F CRISPR-Cas 系统去除抗性基因或质粒,降低了该菌对抗生素的耐受水平<sup>[22]</sup> (图 2A-ii)。该技术不仅在降低临床上病原菌的耐药性方面具有应用前景,而且在临床分离获得的病原菌的遗传操作、关键耐药基因鉴定等方面具有重要应用价值<sup>[22]</sup>。

## 2.2 接合质粒介导的 CRISPR-Cas 系统防控耐药基因转移研究

自然条件下,非接合质粒仅能通过自然转化的方式进入细菌。然而非接合质粒的自然转化效率通常较低,极大地限制了以非接合质粒为载体

表 1 利用 CRISPR-Cas 系统消减耐药基因的策略

Table 1 Strategies to reduce drug resistance genes by CRISPR-Cas system

Vector type	CRISPR system	Main feature	Disadvantage	<i>In vitro/in vivo</i>	References
Non-conjugative plasmids	Type II	Kill the identified host	Lack of host competitiveness	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> (mouse gut)	[30]
		Simple plasmid construction	Spacer mutation	<i>In vitro</i>	[5]
		Targeting on replicon; wide range of therapeutic strains		<i>In vitro</i>	[16]
		High editing efficiency	Delivery system to be developed	<i>In vitro</i>	[20]
	Type I-F	Single editing plasmid; identify key resistance genes	Limited application host	<i>In vitro</i>	[22]
Conjugated plasmids	Type II	Eliminate various <i>mcr-1</i> -harbouring plasmids	Low transformation efficiency	<i>In vitro</i>	[44]
		Repair dsDNA break, reduce survival stress	Narrow repair range	<i>In vitro</i>	[21]
		High conjugation efficiency with <i>Enterococcus faecalis in vitro</i> , stable transmission	Low frequency of <i>in vivo</i> conjugation	<i>In vivo</i> (mouse intestine)	[19]
		Inhibit the transcription of ARGs; wide transferred hosts	Editing efficiency depends on transfer efficiency	<i>In vitro</i>	[45]
Phage	Type II	Kill ARG-carrying host selectively; no phage copies after infection	Large demand for phages; hosts easy to mutate under phage selective pressure	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> (mouse skin)	[14]
		High selectivity; activation of plasmid toxin-antitoxin systems to kill bacteria	Narrow host range	<i>In vivo</i> (large wax moth experiment)	[15]
		Curing ESBL mutants	Excluding CTX-M type	<i>In vitro</i>	[46]
		Increased host range	Reduced cutting effect	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> (mouse skin)	[47]
	Type I	Targeting multiple sites simultaneously and reducing off-target	Narrow host range of single phage	<i>In vitro</i>	[29]
	Type VI	Targeting RNA and activating Cas13a to degrade mRNA nonspecifically and efficiently	Restricted by phage host range and phage capsid packaging efficiency	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> (large wax moth experiment)	[18]
Nanoparticle	Type II	Cas9 persistence leads to delivery and targeting efficiency	Delayed release of Cas9 and sgRNA	<i>In vitro</i>	[17]

递送 CRISPR-Cas 系统消减耐药基因的应用。接合质粒能通过细胞接触将 CRISPR-Cas 系统从供体菌传递给受体菌, 获得接合质粒的受体菌可进一步将 CRISPR-Cas 系统传递至其他受体菌, 极大地拓展了利用 CRISPR-Cas 系统消减耐药基因的应用范围。例如, Wang 等将可表达 Cas9 与 sgRNA 的 DNA 片段构建至接合质粒 pMBLcas9, 并以约  $10^{-1}$  的接合效率转移至临床分离的携带不

同 *mcr-1* 质粒的大肠杆菌中, 成功消除了多种耐药质粒<sup>[44]</sup> (图 2B-iii)。

传递效率是限制 CRISPR-Cas 系统临床应用的主要因素, 提高质粒接合效率可拓展 CRISPR-Cas 系统防控耐药基因转移的应用前景。粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 是哺乳动物肠道内的主要菌群, 信息素应答质粒 (pheromone-responsive plasmids, PRPs) 是 *E. faecalis* 中普遍

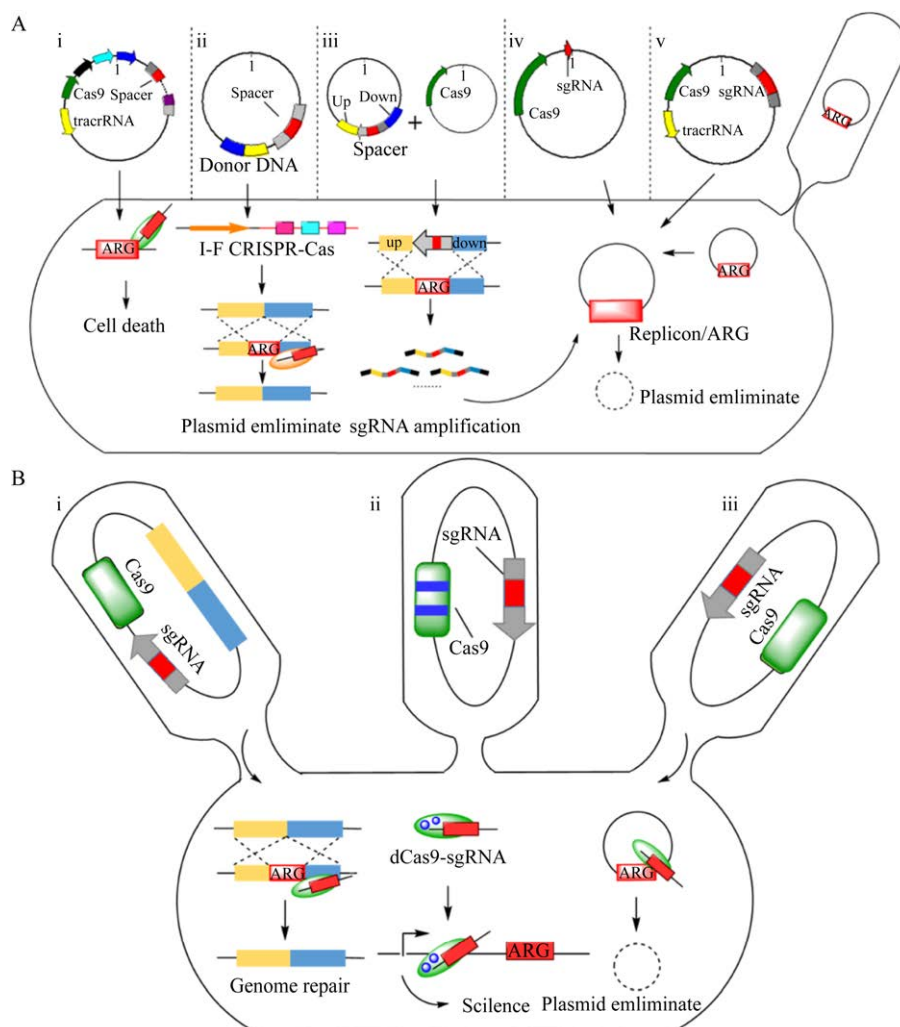


图2 利用质粒载体传递 CRISPR-Cas 系统防控耐药的策略

Figure 2 Strategies for preventing and controlling ARGs by using plasmid vectors to deliver CRISPR-Cas systems. (A) Using non-conjugating plasmid vectors to deliver the CRISPR-Cas system. (i) Using a non-conjugating plasmid pCEP to transfer the CRISPR01 sequence containing *Streptococcus pyogenes* SF370 to *Streptococcus pneumoniae* R6, Cas9 targets the ARG on the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*, causing host cell death. (ii) The non-conjugating plasmid containing the spacer sequence of the targeted ARG and the editing template are introduced into pathogenic *Pseudomonas aeruginosa*, and the mature crRNA guides the endogenous I-F CRISPR-Cas system to remove the ARG to reduce the level of antibiotic resistance. (iii) The pro-AG system inserts gRNA and its upstream and downstream fragments into the target position while destroying ARG, so that the number of gRNAs increases exponentially and improves the editing efficiency. (iv) The pCasCure plasmid can be targeted to the replicon region of carbapenem-resistant plasmids, which improves the broad spectrum of the CRISPR system. (v) The recipient bacteria containing the CRISPR-Cas9 plasmid that can target the *mcr-1* gene can resist the conjugation process of pHNSHP45 from the donor bacteria. (B) Using conjugative plasmid vectors to deliver the CRISPR-Cas system. (i) The CRISPR-Cas9 system and repair template are fused into the same conjugative plasmid to reverse the carbapenem resistance of the pathogen *Shewanella*. (ii) Using conjugative plasmid to deliver CRISPRi, dCas9 loses DNA cleavage activity and is guided by sgRNA to the ARG promoter to block its transcription. (iii) The conjugative plasmid pMBLcas9 that expresses Cas9 and sgRNA can eliminate a variety of *mcr-1* carrying plasmids in clinically isolated *E. coli*.



存在的接合质粒, 不含接合质粒的受体菌可分泌信息素, 诱导携带接合质粒的供体菌合成一种蛋白质粘附素, 促进供体菌和受体菌的聚集, 从而提高信息素应答质粒的接合效率<sup>[48]</sup>。在信息素应答质粒上整合靶向红霉素抗性基因的 CRISPR-Cas9 系统, 可有效消除小鼠肠道内多重耐药 *E. faecalis* 的红霉素抗性基因<sup>[19]</sup>。

靶向基因组上抗性基因的 CRISPR-Cas 系统会造成染色体双链 DNA 断裂, 诱发细菌应激反应, 从而增强其抗逆性<sup>[49]</sup>。为了避免消减耐药基因时诱发耐药菌应激反应, 可在 CRISPR-Cas 系统切割靶标基因的同时引入修复模板, 从而降低耐药菌的生存胁迫。基于该策略, 人们通过接合质粒载体导入 CRISPR-Cas 系统, 成功逆转希瓦氏病原菌基因组上的碳青霉烯类基因的抗药性<sup>[21]</sup> (图 2B-i)。CRISPR 干扰 (CRISPR interference, CRISPRi) 是一种将丧失 DNA 切割活性的 dCas9 引导至靶标 DNA 序列, 从而沉默基因转录的技术<sup>[50]</sup>。利用 CRISPRi 技术降低耐药基因的表达, 也可实现在降低耐药基因表达水平的同时不对宿主菌产生生存胁迫。例如, 通过 sgRNA 将 dCas9 引导至耐药基因的启动子区, 可阻遏 RNA 聚合酶与启动子的结合, 干扰耐药基因转录<sup>[51]</sup> (图 2B-ii)。在 CRISPR-Cas 系统编辑精确性的研究中发现, 单链 RNA 容易识别基因组上与靶标序列相似的序列, 导致严重的脱靶效应, 在靶标序列以外切割 DNA 造成基因组损伤<sup>[52-53]</sup>。利用携带转座子的接合质粒, Peters 等将组成 CRISPRi 系统的遗传元件整合至不同细菌 (特别是缺乏遗传操作工具的耐药菌) 的基因组上, 从而在不损伤基因组的前提下干扰耐药基因的表达<sup>[45]</sup>。此外, CRISPRi 技术还可用于分析微生物抗药性与敏感性。

### 3 基于噬菌体载体的 CRISPR-Cas 防控耐药遗传元件研究

相比质粒载体, 噬菌体载体不仅具有较强的侵染宿主菌的能力, 而且可以携带更大的 DNA 片段, 可导入编码多蛋白的 CRISPR-Cas 系统。此外, 经噬菌体蛋白包裹的核酸较稳定, 不易被降解。因此, 噬菌体载体也被应用于利用 CRISPR-Cas 系统防控耐药基因转移。

#### 3.1 噬菌体介导的利用 II 型 CRISPR-Cas 系统防控耐药研究

噬菌体是替代抗生素进行抗菌治疗的重要手段<sup>[52]</sup>。但是噬菌体疗法同样可能引起宿主对噬菌体的耐受性。为了提高噬菌体疗法的有效性, 人们将 CRISPR-Cas 系统整合至噬菌体基因组, 以噬菌体为载体递送靶向耐药基因的 CRISPR-Cas 系统, 拓展噬菌体的应用范围<sup>[54]</sup>。用噬菌体衣壳包裹携带 CRISPR-Cas9 的 DNA 片段, 经改造的噬菌体可以在混合菌群中仅消除病原菌或耐药质粒, 但不影响其他种群, 从而达到选择性调节细菌种群的目的<sup>[14-15]</sup> (图 3-i)。携带超广谱  $\beta$ -内酰胺酶 (ESBL) 的耐药质粒可在细菌群落中广泛传播, 该耐药基因的突变体数量多达 1 000 种<sup>[46]</sup>。因此, 防控该类耐药基因转移十分困难。以噬菌体为载体, 将基于  $\beta$ -内酰胺酶突变体保守序列设计的 sgRNA 和 Cas9 导入目标菌株, 成功实现病原菌中 200 多种  $\beta$ -内酰胺酶基因突变体均丧失活性, 使得耐药菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素恢复敏感性<sup>[46]</sup>。

传统噬菌体载体的有效性和安全性仍存在不足, 近年来开发的新一代噬菌体载体可增加其侵染宿主的范围 and 安全性。噬菌体编码的尾部纤维蛋白与宿主细胞上的受体发生反应而使噬菌体产生宿主特异性, 因此将溶原噬菌体的尾部纤维蛋白延长即可扩大侵染宿主的范围<sup>[47]</sup>。



细菌体内某些毒力基因通常位于可移动元件中,这些基因能整合到溶原噬菌体基因组上,进而转移到其他宿主菌中,毒力基因簇所产生的毒素会对人和动物的健康产生危害<sup>[56]</sup>;因此,去除细菌的毒力基因可避免这些基因水平转移从而提高噬菌体载体的安全性<sup>[57]</sup>。

### 3.2 噬菌体介导的利用 I 型和 VI 型 CRISPR-Cas 系统防控耐药研究

因为噬菌体能携带更大的 DNA 片段,所以它不仅可整合单效应蛋白介导的 CRISPR-Cas 系统,而且适用于导入多效应蛋白介导的 CRISPR-Cas 系统。Yosef 等利用溶原噬菌体包裹含 6 个 *cas* 基因和多个靶向至 *ndm-1* 和 *ctx-M-15* 抗性基因间隔区的 I 型 CRISPR-Cas3 系统,此溶原噬菌体可选择性地破坏耐药质粒,使宿主菌恢复对多种抗生素的敏感性(图 3-ii);随后用携带相同 CRISPR-Cas3 系统的裂解噬菌体侵染并裂解仍携带耐药质粒的病原菌。该技

术不仅选择性地消除了耐药菌携带的耐药基因,而且显著增强了抗生素敏感菌的生长优势,从而达到富集敏感菌的目的<sup>[29]</sup>。

与靶向 DNA 的 I 型和 II 型 CRISPR-Cas 系统不同,VI 型 CRISPR-Cas 系统可以靶向切割 RNA<sup>[36]</sup>。利用噬菌体载体,可将靶向至 RNA 的 Cas13a 蛋白应用于防控耐药菌。经噬菌体衣壳包裹的靶向至碳青霉烯酶基因的表达 CRISPR-Cas13a 的 M13 噬菌体侵入宿主后,crRNA-Cas13a 蛋白复合物与被靶向的 RNA 序列结合后发生构象变化,crRNA 和靶 RNA 形成的双链结构促使 Cas13a 蛋白的 HEPN1 结构域转变成 HEPN2 结构域,从而激活 Cas13a 的催化活性切割靶 RNA,这种切割活性将非特异性裂解任何 ssRNA<sup>[58]</sup>,最终导致宿主细胞死亡,从而选择性地杀死含有目标耐药基因的细菌<sup>[18]</sup>(图 3-iii)。当 ARG 位于质粒上时,由噬菌体包裹的 CRISPR-Cas9 只能介导质粒 DNA 的降解,

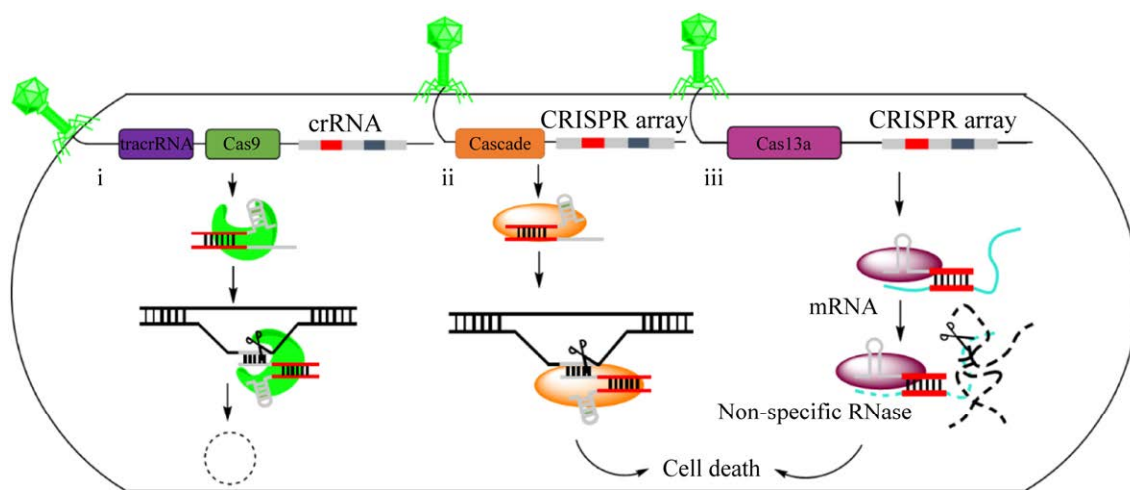


图3 利用噬菌体载体传递 CRISPR-Cas 系统防控耐药的策略<sup>[15,18]</sup>

Figure 3 Strategies for preventing and controlling ARGs by using phage vectors to deliver CRISPR-Cas systems<sup>[15,18]</sup>. (i) The phage capsid wraps up the CRISPR-Cas9 DNA fragments, which only eliminates pathogenic bacteria or ARG-carrying plasmids in the mixed flora, but does not affect other populations. (ii) Type I CRISPR-Cas3 system is encapsulated by lysogenic bacteriophages, which selectively destroys ARG-carrying plasmids and restores host sensitivity to multiple antibiotics. (iii) After the M13 phage expressing CRISPR-Cas13a invades the host, crRNA recognizes the target RNA, activates the non-specific RNase activity of Cas13a and finally leads to the death of the host cell.

不会导致细胞死亡；而由噬菌体包裹的 CRISPR-Cas13a 在识别到质粒上的目标 ARG 后则表现出很强的杀菌活性<sup>[18]</sup>。

#### 4 基于纳米粒子载体的 CRISPR-Cas 防控耐药研究

纳米粒子 (nanoparticle) 载体一般是指由高分子聚合物或无机材料制备而成的处于纳米尺度的载体，其体积极小，具有极强的生物膜穿透能力。抗菌药物能被纳米颗粒包裹至聚合物载体中，在体内以较高溶解度释放并发挥杀菌作用<sup>[59]</sup>。DNA 经无机纳米粒子 (如脂质体和阳离子聚合物等) 包裹或吸附后可克服细胞外界的屏障，通过胞吞进入细胞内并释放，这种方法为治疗药物传输至体内提供了新的思路<sup>[60]</sup>。例如，利用脂质体纳米粒子包裹 CRISPR-Cas9 的技术可

在动物模型中明显抑制肿瘤细胞的生长<sup>[61]</sup>。聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 是一种阳离子聚合物，它能有效地将 DNA 分子凝聚成带正电荷的纳米粒子，不仅具有较高的转染效率，而且能保护 DNA 免受核酸酶降解<sup>[62]</sup>。CRISPR-Cas 系统靶向细菌耐药基因的纳米粒子递送系统目前报道较少。Kang 等将 *S. pyogenes* 的 Cas9 蛋白与分支式 PEI (branched PEI, bPEI) 共价修饰，并与靶向至 *mecA* 的 sgRNA 组装成纳米大小的复合物，从而实现靶向切割耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) 基因组上耐药基因 (图 4)，被 bPEI 修饰后的 Cas9 蛋白能较长时间保持其核酸酶活性，进一步提高对双链 DNA 的裂解效率<sup>[17]</sup>。

利用纳米粒子传递 CRISPR-Cas 复合物仍需解决如何精准定位和高效组装两个关键问题。在哺乳动物细胞中，由纳米材料组装的

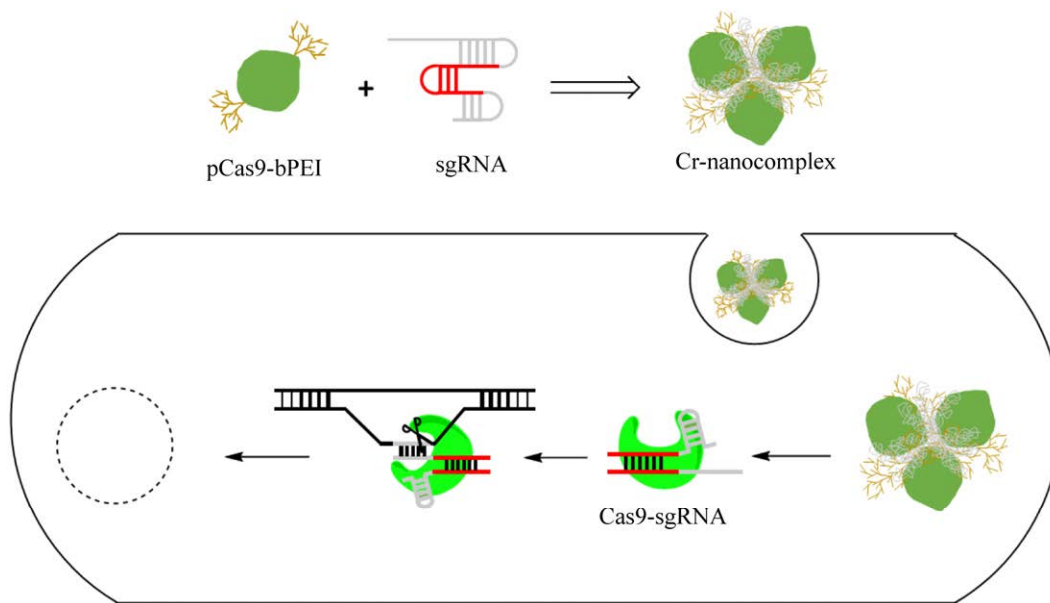


图 4 利用纳米粒子载体传递 CRISPR-Cas 系统防控耐药的策略<sup>[17]</sup>

Figure 4 Strategies for preventing and controlling ARGs by using nanoparticle vectors to deliver CRISPR-Cas systems<sup>[17]</sup>. Cas9 protein of *Streptococcus pyogenes* was covalently modified with bPEI and assembled into nano-scale sized complexes with sgRNA targeting *mecA*, thus achieving the function of cutting ARGs from the MRSA genome.

CRISPR系统可能会将质粒DNA随机整合到宿主基因组上,增加了脱靶效应和插入突变的风险<sup>[63]</sup>。传递 Cas9/sgRNA 核糖核蛋白复合物 (ribonucleoprotein complexes, RNPs) 可直接进行基因编辑,脱靶效应减弱和免疫原性降低<sup>[64]</sup>;然而 Cas9 蛋白体积大,sgRNA 的负电荷较高,在组装和递送的过程中难以保护 RNPs 免受退化或变性的干扰,因此使用这种非病毒载体传递 RNPs 的方法仍然具有挑战性<sup>[65]</sup>。虽然以纳米粒子优化 CRISPR-Cas 系统进行细菌耐药性治疗的方法已取得巨大进展,但实现其安全性和高效性还需进一步研究<sup>[65]</sup>。

## 5 总结与展望

耐药基因导致的细菌多重耐药问题日趋严重,遏制细菌多重耐药的技术仍十分匮乏。CRISPR-Cas 系统能特异识别并靶向切割携带耐药基因或其转录产物的遗传元件,具有防控细菌多重耐药的应用前景。近年来,人们以质粒、噬菌体、纳米粒子等载体将不同类型的 CRISPR-Cas 系统导入耐药菌中,通过靶向消减耐药菌中耐药质粒、耐药基因或其转录产物等方式降低细菌耐药水平,在利用 CRISPR-Cas 系统防控细菌多重耐药方面取得了长足的进展。然而,上述方法均需将生物大分子(核酸或蛋白与核酸的复合物)递送至细菌体内,不仅存在导入困难的问题,而且进入的生物大分子易被细菌胞内蛋白酶或核酸酶降解。因此,将这些技术应用于医学临床、畜禽养殖或生态环境仍存在较大挑战。

细菌中普遍存在内源 CRISPR-Cas 系统,利用小分子化合物或理化因子激活细菌内源性 CRISPR-Cas 系统可能为防控耐药基因转移导致的细菌多重耐药问题提供新的思考方向。

明确 CRISPR-Cas 系统的调控机制并鉴定相关的调控靶标蛋白是开展上述工作的基础和前提。在大肠杆菌中,类似组蛋白的拟核结构蛋白 H-NS 沉默 CRISPR-Cas 系统,转录因子 LeuO 可通过拮抗 H-NS 的转录沉默作用激活 CRISPR-Cas 系统<sup>[66-67]</sup>。近年来,笔者团队揭示了大肠杆菌 CRISPR-Cas 系统新的调控机制,H-NS的同源蛋白 StpA 可激活内源 CRISPR-Cas 系统防御经自然转化进入大肠杆菌的耐药质粒<sup>[68]</sup>。以 H-NS、LeuO 或 StpA 为分子靶标筛选可激活 CRISPR-Cas 系统的小分子或理化因子,将不仅为解决大肠杆菌多重耐药问题提供新的防治手段,而且为其他细菌中防控多重耐药提供新的研究范式。

## REFERENCES

- [1] McManus MC. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Am J Heal-Syst Pharm*, 1997, 54(12): 1420-1433.
- [2] Pang Z, Raudonis R, Glick BR, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 177-192.
- [3] Sun DC, Jeannot K, Xiao YH, et al. Editorial: horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1933.
- [4] Wang B, Sun DC. Detection of NDM-1 carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter junii* in environmental samples from livestock farms. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(2): 611-613.
- [5] Wan P, Cui SY, Ma ZB, et al. Reversal of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* by CRISPR-Cas9 system. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 1171-1178.
- [6] Wang R, van Dorp L, Shaw LP, et al. The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1179.
- [7] Bello-López JM, Cabrero-Martínez OA, Ibáñez-Cervantes G, et al. Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *Aeromonas* spp. *Microorganisms*, 2019, 7(9): 363.

- [8] Lorenz MG, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*, 1994, 58(3): 563-602.
- [9] Anjum R, Grohmann E, Krakat N. Anaerobic digestion of nitrogen rich poultry manure: impact of thermophilic biogas process on metal release and microbial resistances. *Chemosphere*, 2017, 168: 1637-1647.
- [10] Na G, Lu Z, Gao H, et al. The effect of environmental factors and migration dynamics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in estuary environments. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1663.
- [11] Tan L, Wang F, Liang M, et al. Antibiotic resistance genes attenuated with salt accumulation in saline soil. *J Hazard Mater*, 2019, 374: 35-42.
- [12] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 273-297.
- [13] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-477.
- [14] Bikard D, Euler CW, Jiang W, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(11): 1146-1150.
- [15] Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(11): 1141-1145.
- [16] Hao MJ, He YZ, Zhang HF, et al. CRISPR-Cas9-mediated carbapenemase gene and plasmid curing in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64(9): e00843-20.
- [17] Kang YK, Kwon K, Ryu JS, et al. Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance. *Bioconjug Chem*, 2017, 28(4): 957-967.
- [18] Kiga K, Tan XE, Ibarra-Chávez R, et al. Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2934.
- [19] Rodrigues M, McBride SW, Hullahalli K, et al. Conjugative delivery of CRISPR-Cas9 for the selective depletion of antibiotic-resistant enterococci. *bioRxiv*, 2019. DOI: 10.1101/678573.
- [20] Valderrama JA, Kulkarni SS, Nizet V, et al. A bacterial gene-drive system efficiently edits and inactivates a high copy number antibiotic resistance locus. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 5726.
- [21] Wu ZY, Huang YT, Chao WC, et al. Reversal of carbapenem-resistance in *Shewanella algae* by CRISPR/Cas9 genome editing. *J Adv Res*, 2019, 18: 61-69.
- [22] Xu Z, Li M, Li Y, et al. Native CRISPR-Cas-mediated genome editing enables dissecting and sensitizing clinical multidrug-resistant *P. aeruginosa*. *Cell Rep*, 2019, 29(6): 1707-1717.e3.
- [23] Zhang H, Cheng QX, Liu AM, et al. A novel and efficient method for bacteria genome editing employing both CRISPR/Cas9 and an antibiotic resistance cassette. *Front Microbiol*, 2017, 8: 812.
- [24] Vrancianu CO, Gheorghe I, Dobre EG, et al. Emerging strategies to combat  $\beta$ -lactamase producing ESKAPE pathogens. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8527.
- [25] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964.
- [26] Hille F, Richter H, Wong SP, et al. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*, 2018, 172(6): 1239-1259.
- [27] Semenova E, Jore MM, Datsenko KA, et al. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *PNAS*, 2011, 108(25): 10098-10103.
- [28] Gholizadeh P, Köse Ş, Dao S, et al. How CRISPR-Cas system could be used to combat antimicrobial resistance. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 1111-1121.
- [29] Yosef I, Manor M, Kiro R, et al. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *PNAS*, 2015, 112(23): 7267-7272.
- [30] Bikard D, Hatoum-Aslan A, Mucida D, et al. CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during *in vivo* bacterial infection. *Cell Host Microbe*, 2012, 12(2): 177-186.
- [31] Zheng Y, Li J, Wang B, et al. Endogenous type I CRISPR-Cas: from foreign DNA defense to prokaryotic engineering. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 62.
- [32] Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: class I

- CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2017, 168(5): 946-946.e1.
- [33] Niewoehner O, Garcia-Doval C, Rostøl JT, et al. Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers. *Nature*, 2017, 548(7669): 543-548.
- [34] Burmistrz M, Krakowski K, Krawczyk-Balska A. RNA-targeting CRISPR-Cas systems and their applications. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1122.
- [35] Makarova KS, Zhang F, Koonin EV. SnapShot: class 2 CRISPR-Cas systems. *Cell*, 2017, 168(1/2): 328-328.e1.
- [36] O'Connell MR. Molecular mechanisms of RNA targeting by Cas13-containing type VI CRISPR-Cas systems. *J Mol Biol*, 2019, 431(1): 66-87.
- [37] Shmakov S, Smargon A, Scott D, et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(3): 169-182.
- [38] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 2008, 322(5909): 1843-1845.
- [39] Glass Z, Lee M, Li Y, et al. Engineering the delivery system for CRISPR-based genome editing. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(2): 173-185.
- [40] Cabezón E, Ripoll-Rozada J, Peña A, et al. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol Rev*, 2015, 39(1): 81-95.
- [41] Lermينياux NA, Cameron ADS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol*, 2019, 65(1): 34-44.
- [42] Hardiman CA, Weingarten RA, Conlan S, et al. Horizontal transfer of carbapenemase-encoding plasmids and comparison with hospital epidemiology data. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(8): 4910-4919.
- [43] Sun J, Zeng X, Li XP, et al. Plasmid-mediated colistin resistance in animals: current status and future directions. *Anim Health Res Rev*, 2017, 18(2): 136-152.
- [44] Wang P, He D, Li B, et al. Eliminating *mcr-1*-harbouring plasmids in clinical isolates using the CRISPR/Cas9 system. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(9): 2559-2565.
- [45] Peters JM, Koo BM, Patino R, et al. Enabling genetic analysis of diverse bacteria with mobile-CRISPRi. *Nat Microbiol*, 2019, 4(2): 244-250.
- [46] Kim JS, Cho DH, Park M, et al. CRISPR/Cas9-mediated re-sensitization of antibiotic-resistant *Escherichia coli* harboring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(2): 394-401.
- [47] Le S, He XS, Tan YL, et al. Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of pseudomonas aeruginosa bacteriophages PaP1 and JG004. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68562.
- [48] Clewell DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*, 1993, 73(1): 9-12.
- [49] Guest RL, Raivio TL. Role of the gram-negative envelope stress response in the presence of antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 2016, 24(5): 377-390.
- [50] Larson MH, Gilbert LA, Wang X, et al. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2180-2196.
- [51] Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, 2013, 152(5): 1173-1183.
- [52] Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 822-826.
- [53] Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 839-843.
- [54] Kortright KE, Chan BK, Koff JL, et al. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(2): 219-232.
- [55] Torres-Barceló C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 168.
- [56] Chen J, Novick RP. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science*, 2009, 323(5910): 139-141.
- [57] Park JY, Moon BY, Park JW, et al. Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*, 2017, 7: 44929.
- [58] Liu L, Li X, Ma J, et al. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a. *Cell*, 2017, 170(4): 714-726.e10.
- [59] Günday C, Anand S, Gencer HB, et al. Ciprofloxacin-loaded polymeric nanoparticles

- incorporated electrospun fibers for drug delivery in tissue engineering applications. *Drug Deliv Transl Res*, 2020, 10(3): 706-720.
- [60] Jin L, Zeng X, Liu M, et al. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics*, 2014, 4(3): 240-255.
- [61] Rosenblum D, Gutkin A, Kedmi R, et al. CRISPR-Cas9 genome editing using targeted lipid nanoparticles for cancer therapy. *Sci Adv*, 2020, 6(47): eabc9450.
- [62] Patnaik S, Gupta KC. Novel polyethylenimine-derived nanoparticles for *in vivo* gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2013, 10(2): 215-228.
- [63] Herai RH. Avoiding the off-target effects of CRISPR/Cas9 system is still a challenging accomplishment for genetic transformation. *Gene*, 2019, 700: 176-178.
- [64] Wei T, Cheng Q, Min YL. Systemic nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins for effective tissue specific genome editing. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3232.
- [65] Wan F, Draz MS, Gu MJ, et al. Novel strategy to combat antibiotic resistance: a sight into the combination of CRISPR/Cas9 and nanoparticles. *Pharmaceutics*, 2021, 13(3): 352.
- [66] Westra ER, Pul U, Heidrich N, et al. H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Mol Microbiol*, 2010, 77(6): 1380-1393.
- [67] Pul U, Wurm R, Arslan Z, et al. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-Cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol Microbiol*, 2010, 75(6): 1495-1512.
- [68] Sun DC, Mao XD, Fei MY, et al. Histone-like nucleoid-structuring protein (H-NS) paralogue StpA activates the type I-E CRISPR-Cas system against natural transformation in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(14): e00731-20.

(本文责编 郝丽芳)