

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 32620141150591

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**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**

**CRISPR-Cas9 System-based Gene Editing in the  
*Escherichia coli* Genome and Bacterial Drug-resistant**

**Reversal**

**姚文晔**

指导教师姓名: 廖逸群 助理教授

赵西林 教授

专 业 名 称: 转化医学

论文提交日期: 2017 年 04 月

论文答辩日期: 2017 年 05 月

学位授予日期: 2017 年 05 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2017 年 05 月

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

姚文晔

指导教师 廖逸群 助理教授

厦门大学

---

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(病原微生物与抗感染治疗)课题(组)的研究成果,获得(病原微生物与抗感染治疗)课题(组)经费或实验室的资助,在(病原微生物与抗感染治疗)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):姚文琴

2017年5月23日

---

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

( ) 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于      年      月      日解密，解密后适用上述授权。

( ) 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：姚文举

2017年5月23日

## 摘要

抗生素的发现是人类对抗病原菌感染的重大里程碑，但是传统抗生素是通过阻断细菌中共有的信号通路或新陈代谢途径来起作用的，往往无法区分杀菌对象，长期使用会导致菌群失调及耐药性的产生，因此我们需要找出一种新型抗菌药物能特异针对病原菌或耐药菌。CRISPR-Cas9 系统来源于细菌的获得性免疫，能够利用 RNA 与 Cas 相关蛋白识别特异 DNA 序列并对其进行切割。与传统基因编辑工具如锌指核酸内切酶 (ZFNs) 和类转录激活因子 (TALENs) 相比具有简单，高效的优点。因此作为一种新型的基因编辑工具被广泛的应用于各个领域对基因进行改造如敲除，插入和点突变。另一方面，研究人员利用其对基因的特异性识别，从基因水平上识别病原菌或耐药菌，对其进行特异性的清除。

因此，我们利用来源于上海生科院的 pCas 和 pTarget 质粒来表达 CRISPR-Cas9 系统，成功的在大肠杆菌 (*E.coli*) 基因组上将编码铁储存蛋白的 *ftnA* 和 *ftnB* 基因进行单基因和双基因同时敲除，以及 *kdpD* 基因的点突变，在所检测的菌落中，都达到了近 100% 的成功率。在针对特异性清除耐药菌方面，我们构建含碳青霉烯酶的耐药质粒转入菌中，形成耐药菌。利用 CRISPR-Cas9 系统针对  $\beta$ -内酰胺酶类中的碳青霉烯酶基因设计相应的 N20-sgRNA，对含耐药基因菌进行特异的清除。接下来对已有的双质粒系统进行改造，构建新的 IPTG 诱导 sgRNA 表达的单质粒系统。观察 IPTG 诱导下 CRISPR 系统对耐药基因消除的动力学变化。为了进一步增加 CRISPR 系统对耐药质粒的消除效率，我们还做了不同的尝试如对耐药质粒上进行双位点识别切割以及使用重组修复缺陷型菌株等方法。最后为了进一步扩大 CRISPR 系统对耐药菌消除的范围，我们还尝试了针对临床分离的多粘菌素耐药质粒。实验结果表明，利用 CRISPR 系统可以特异的清除含有靶标的耐药基因，恢复细菌对抗生素的敏感性，最大效率可以达到  $10^6$  倍。最后，为了进一步缩短使用 CRISPR 系统时的步骤和时间，我们尝试了利用 T7 启动子转录体系构建 Cloning-free CRISPR 系统，来简化质粒构建部分，结果显示：T7 启动子的转录体系能使 CRISPR 系统发挥正常功能，但是由于 sgRNA 片段在胞内存在的不稳定，导致效果并不理想，因此需要继

续尝试通过不同的方式增加 DNA 片段在胞内的稳定性，以便达到 Cloning-free 的效果。

**关键词：**基因编辑；CRISPR-Cas9 系统；抗生素耐药

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

The discovery of antibiotic is the great milestone for fighting against the bacterial infection. However, the traditional antibiotic works by blocking conserved bacterial signaling or metabolic pathways, therefore it is unable to distinguish between the pathogen needed to be killed and the bacteria being good for us, Long-termed usage will lead to dysbacteriosis and drug-resistance. We need to find new antibacterial drugs that can target pathogens or drug-resistant bacteria specifically. CRISPR-Cas9 system is originated from bacterial adaptive immunity, which utilize the RNA and Cas-related protein to recognize the special DNA sequence and cut it. Compared with the traditional gene editing tools such as ZFNs and TALENs, it is more simple and effective. Thus CRISPR-Cas9 system, as a new gene editing tool, is applied in many fields for gene knock out, knock in or point mutant. On the other hand, researchers make use of it ability to recognizing gene sequence specially to distinguish pathogen or drug-resistant bacteria from normal bacterial flora in genetic level and to selectively eliminate pathogen and drug-resisant mutant.

We utilized pCas and pTargetF, obtained from Shanghai Research Center of Industrial Biotechnology to expressed CRISPR-Cas9 system and successfully performed single gene (*ftnA*) deletion, simultaneous two-gene (*ftnA* and *ftnB*) deletion, and single base point mutation (in the *kdpD* gene) in *E.coli* genome. *ftnA* and *ftnB* encode iron storage related protein in *E.coli* genome. The efficiency for gene editing is almost 100% in the strains we test. For the purpose of eliminating drug-resistant bacteria, we constructed drug-resistant plasmids containing genes encoding carbapenemase, which confers resistance to  $\beta$ -lactams, and transformed it into WT (BW25113) to form drug-resistant bacteria. And then we designed N20-sgRNA targeting drug-resistant genes to clear drug-resistant bacteria specifically. Then, we reconstructed the two plasmid system into one plasmid system that only contains a new pCas-m plasmid to experss sgRNA under IPTP induced promoter. We used the new IPTG-induced system to observe the kinetic changes of clearing efficiency of drug-resistant genes. In order to improve the resistant gene elimination efficiency, we also made different tries, such as designing two different

recognition and cut sites in the plasmid or using recombination repair-deficient strain. In order to expand the drug-resistant gene range that the CRISPR system could target, we tried to cleave clinically-isolated colistin-resistant plasmid. The result showed that we can eliminate drug-resistant plasmid containing target region specifically and resensitize bacteria to antibiotic. The maximal resistant gene removal efficiency can be as high as 6 orders of magnitude. Finally, in order to shorten the step and time when using CRISPR system, we tried to rebuild cloning-free CRISPR by using T7-promoter transcriptional system to simplify the plasmid construct process. We showed that the T7-promoter transcriptional system allow CRISPR system to function, but the result is not ideal because the segment sgRNA is not stable in the cell. So we need more ways to improve the stability of DNA fragment to achieve cloning-free's aim.

**Keywords:** gene editing; CRISPR-Cas9 system; antibiotic-resistance



---

# 目 录

|  |           |
|--|-----------|
| 摘 要 .....  | I         |
| Abstract.....  | III       |
| <b>第一章 绪论 .....</b>                                  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 基因编辑与 CRISPR-Cas9 系统.....</b>                 | <b>1</b>  |
| 1.1.1 传统基因编辑技术 .....                                 | 1         |
| 1.1.2 CRISPR-Cas9 系统介绍 .....                         | 2         |
| 1.1.3 CRISPR 系统的应用.....                              | 4         |
| <b>1.2 抗生素杀菌与细菌耐药性的产生 .....</b>                      | <b>6</b>  |
| 1.2.1 传统抗生素的分类与作用机制 .....                            | 6         |
| 1.2.2 细菌耐药性的产生 .....                                 | 7         |
| 1.2.3 针对耐药菌的传统疗法和新型疗法 .....                          | 9         |
| 1.2.3.1 传统治疗方法---抗生素治疗 .....                         | 9         |
| 1.2.3.2 噬菌体及噬菌体裂解酶疗法 .....                           | 10        |
| 1.2.3.3 金属螯合剂 .....                                  | 10        |
| 1.2.3.4 光动力疗法 .....                                  | 11        |
| <b>1.3 研究依据与目的 .....</b>                             | <b>11</b> |
| <b>第二章 材料与方 法 .....</b>                              | <b>13</b> |
| <b>2.1 实验设备与主要试剂及配制 .....</b>                        | <b>13</b> |
| 2.1.1 实验仪器设备 .....                                   | 13        |
| 2.1.2 实验试剂 .....                                     | 14        |
| 2.1.3 主要试剂溶液配制 .....                                 | 15        |
| <b>2.2 实验方法 .....</b>                                | <b>16</b> |
| <b>第三章 CRISPR-Cas9 系统对 <i>E.coli</i> 基因组的编辑.....</b> | <b>23</b> |
| <b>3.1 前言 .....</b>                                  | <b>23</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2 利用 CRISPR-Cas9 进行 <i>ftnA</i> 单基因敲除 .....            | 23        |
| 3.3 利用 CRISPR-Cas9 进行 <i>ftnAftnB</i> 双基因敲除 .....        | 25        |
| 3.4 利用 CRISPR-Cas9 进行 <i>kdpD</i> 点突变 .....              | 27        |
| <b>第四章 CRISPR-Cas9 系统对细菌耐药性的逆转 .....</b>                 | <b>30</b> |
| 4.1 前言 .....   | 30        |
| 4.2 相关耐药质粒, 菌株构建 .....                                   | 31        |
| 4.2.1 KPC, NDM, OXA 耐药质粒的构建 .....                        | 31        |
| 4.2.2 针对耐药质粒的 CRISPR-Cas9 相关质粒的构建 .....                  | 31        |
| 4.3 针对碳青霉烯类抗生素耐药性的逆转 .....                               | 32        |
| 4.3.1 MIC 测定 .....                                       | 32        |
| 4.3.2 CRISPR 系统对耐药质粒传播的影响 .....                          | 33        |
| 4.3.3 非诱导条件下 CRISPR 系统对耐药质粒的消除情况 .....                   | 34        |
| 4.3.3.1 针对耐药基因进行单位点切割 .....                              | 34        |
| 4.3.3.2 针对耐药基因进行双位点切割 .....                              | 36        |
| 4.3.4 IPTG 诱导情况下 CRISPR 系统对耐药质粒的消除情况 .....               | 38        |
| 4.3.4.1 IPTG 诱导 sgRNA 表达对 WT 中耐药质粒消除效率的影响 .....          | 38        |
| 4.3.4.2 IPTG 诱导 sgRNA 表达对同源修复缺陷型菌株中耐药质粒消除效率的影响 .....     | 39        |
| 4.4 针对多粘菌素类耐药性的逆转 .....                                  | 42        |
| 4.4.1 多粘菌素类耐药菌 MIC 的测定及针对耐药基因的 CRISPR-Cas9 相关质粒的构建 ..... | 42        |
| 4.4.2 非诱导情况下 CRISPR 系统对耐药质粒的消除情况 .....                   | 43        |
| 4.4.3 IPTG 诱导情况下 CRISPR 系统对耐药质粒的消除情况 .....               | 44        |
| <b>第五章 Cloning-free CRISPR .....</b>                     | <b>45</b> |
| 5.1 前言 .....   | 45        |
| 5.2 Cloning-free CRISPR 系统质粒构建及对耐药质粒消除 .....             | 45        |
| <b>第六章 讨论与展望 .....</b>                                   | <b>47</b> |
| <b>参 考 文 献 .....</b>                                     | <b>52</b> |
| <b>附录 .....</b>  | <b>57</b> |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

---

# Contents

|  |            |
|--|------------|
| <b>Abstract in Chinese.....</b>  | <b>I</b>   |
| <b>Abstract in English .....</b>   | <b>III</b> |
| <b>Chapter 1 Introduction .....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>1.1 Gene editing and CRISPR-Cas9 system .....</b>                                 | <b>1</b>   |
| 1.1.1 Traditional gene editing tools .....   | 1          |
| 1.1.2 Introduction of CRISPR-Cas system.....   | 2          |
| 1.1.3 The application of CRISPR system .....   | 4          |
| <b>1.2 Bactericidal effect of antibiotic and generation of drug-resistance .....</b> | <b>6</b>   |
| 1.2.1 The classification and mechanism of traditional antibiotics.....               | 6          |
| 1.2.2 Generation of bacteria drug-resistance .....                                   | 7          |
| 1.2.3 Traditional and new therapy target drug-resistant bacteria.....                | 9          |
| 1.2.3.1 Traditional treatment therapy-antibiotics.....                               | 9          |
| 1.2.3.2 The therapy of phage and phage lysins.....                                   | 10         |
| 1.2.3.3 Mental-Chelator.....   | 10         |
| 1.2.3.4 Photodynamic therapy .....   | 11         |
| <b>1.3 The basis and purpose of research .....</b>                                   | <b>11</b>  |
| <b>Chapter 2 Materials and Methods .....</b>   | <b>13</b>  |
| <b>2.1 Experimental instruments reagents and reagent preparation.....</b>            | <b>13</b>  |
| 2.1.1 Experimental instruments .....   | 13         |
| 2.1.2 Reagents.....  | 14         |
| 2.1.3 Preparation of reagent.....  | 15         |
| <b>2.2 Methods .....</b>   | <b>16</b>  |
| <b>Chapter 3 Gene Editing in <i>E.coli</i> genome by CRISPR-Cas9 .....</b>           | <b>23</b>  |
| <b>3.1 Introduction.....</b>   | <b>23</b>  |
| <b>3.2 Single gene knockout in <i>ftnA</i> by CRISPR-Cas9.....</b>                   | <b>23</b>  |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.3 Double genes konckout simultaneously in <i>ftnAftnB</i> by CRISPR-Cas9 .....   | 25        |
| 3.4 Point mutant in gene <i>kdpD</i> by CRISPR-Cas9 .....  | 27        |
| <b>Chapter 4 Reverse Bacterial Drug-resistant via the CRISPR-Cas9.....</b>   | <b>30</b> |
| 4.1 Introduction.....  | 30        |
| 4.2 The construction of relatively drug-resistant plasmids and strains.....  | 31        |
| 4.2.1 The construction of KPC NDM OXA drug-resistant plasmids .....  | 31        |
| 4.2.2 The construction of CRISPR-Cas9 relativel plasmids targeting drug-resistant plasmids .....   | 31        |
| 4.3 The reversion of drug-resistant to carbapenems antibiotics.....  | 32        |
| 4.3.1 Determination of MIC .....   | 32        |
| 4.3.2 The influence for the drug-resistant plasmids spread by CRISPR-Cas9 .....  | 33        |
| 4.3.3The elimination of drug-resistant plasmids under the non-induced CRISPR-Cas9 system .....   | 34        |
| 4.3.3.1 Single cut target drug-resistant gene.....   | 34        |
| 4.3.3.2 Double cuts target drug-resistant gene.....  | 36        |
| 4.3.4 The elimination of drug-resistant plasmids under the IPTG-induced CRISPR-Cas9 system .....   | 38        |
| 4.3.4.1 The influence for the elimination of drug-resistant plasmid by IPTG-induced sgRNA expression in WT.....                                    | 38        |
| 4.3.4.2 The influence for the elimination of drug-resistant plasmid by IPTG-induced sgRNA expression in Homologous recombination defect type ..... | 39        |
| 4.4 The reversion of colistin-resistance strain .....  | 42        |
| 4.4.1 Determination of MIC and the construction of CRISPR-Cas9 system plasmid targeting colistin-resistant gene .....                              | 42        |
| 4.4.2 The elimination of drug-resistant plasmids under the non-induced CRISPR-Cas9 system .....  | 43        |
| 4.4.3The influence for the elimination of drug-resistant plasmid by IPTG-induced CRISPR.....   | 44        |
| <b>第五章 Cloning-free CRISPR.....</b>  | <b>45</b> |
| 5.1 Introduction.....  | 45        |
| 5.2 The construction of Cloning-free CRISPR system and the elimination of drug-resistant plasmids .....  | 45        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Chapter 6 Disscusion and prospect .....</b> | <b>47</b> |
| <b>Reference .....</b>                         | <b>52</b> |
| <b>Appendices.....</b>                         | <b>57</b> |
| <b>Acknowledgement.....</b>                    | <b>68</b> |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

---

## 缩略词表

|        |  |                            |
|--------|--|----------------------------|
| H/h/hr | Hour                                     | 小时                         |
| min    | Minute                                   | 分钟                         |
| Sec/s  | Second                                   | 秒                          |
| Amp    | Ampicilin                                | 氨苄青霉素                      |
| Car    | Carbenicillin                            | 羧苄青霉素                      |
| Mer    | Meropenem                                | 美罗培南                       |
| Kan    | Kanamycin                                | 卡那霉素                       |
| Spec   | Spectinomycin                            | 大观霉素                       |
| Cm     | Chloramphenicol                          | 氯霉素                        |
| Bp     | Base pair                                | 碱基对                        |
| ml     | Milliliter                               | 毫升                         |
| L      | Liter                                    | 升                          |
| U      | Unit                                     | 单位                         |
| IPTG   | Isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactoside    | 异丙基- $\beta$ -d-硫代半乳糖<br>酶 |
| PCR    | Polymerase chain reaction                | 聚合酶链式反应                    |
| OD     | Optical density                          | 光密度                        |
| rpm    | Rotations per minute                     | 转/分                        |
| EB     | Ethidium bromide                         | 溴化乙锭                       |
| MIC    | Minimum Inhibitory<br>Concentration      | 最小抑菌浓度                     |
| DSB    | Double stands break                      | 双链断裂                       |
| HR     | Homologous recombination                 | 同源重组修复                     |
| NHEJ   | Error-prone nonhomologous<br>end joining | 非同源重组修复                    |

# 第一章 绪论

## 1.1 基因编辑与 CRISPR-Cas9 系统

### 1.1.1 传统基因编辑技术

自 DNA 双螺旋结构被发现以来，人类便进入到对 DNA 结构的改造和功能研究中。随着全基因组测序技术的发展，得到了大量的基因序列信息，人们迫切的需要将得到的基因信息转化为功能和表型。通过基因编辑技术改变基因序列或基因表达水平是研究基因功能的方法之一，早期人们利用同源重组的方式进行基因敲除<sup>[1]</sup>，但是其缺点是自然条件下的同源重组效率低，并且在筛选阶段会花费大量的时间和人力。随后，科研人员发现 RNA 干扰技术 (RNAi RNA interference)，在不敲除基因的前提下利用 RNA 干扰其表达，能减少由于基因敲除造成极性效应，并且具有快速和简便的优点<sup>[2]</sup>。但是由于 RNAi 技术造成的基因表达降低是不完全的，很多实验室之间并不能得到有效的重复，脱靶效应 (off-Target) 比较严重，并且其对基因表达的抑制也只是暂时，而且在原核生物中缺乏 RNAi 机制。因此基因编辑技术的限制减缓了研究人员对基因功能的深入研究。

通过对细菌和酵母的 DNA 修复路径的研究表明，当 DNA 链上发生双链断裂 (DSB double stands break) 时会极大的激活细胞中的修复重组系统即同源重组修复系统 (HR homologous recombination) 和非同源重组修复系统 (NHEJ error-prone nonhomologous end joining) 对断裂的 DNA 链进行修复<sup>[3-4]</sup>。因此，研究人员尝试利用位点特异性内切酶对目标基因切割并且通过引入不同的修复模板从而完成对基因的一系列编辑来研究基因的功能。由此引申而出的传统的基因编辑工具包括锌指核酸内切酶 (ZFNs zinc finger nucleases) 与类转录激活因子效应物核酸酶 (TALENs transcription activator-like effector nucleases)。他们都是将能识别特异序列的蛋白质与具有非特异性核酸内切酶活性的 *Fok I* 融合，识别特异基因序列并进行切割，并通过引入不同的修复模板从而达到对基因编辑的目的。

锌指核酸内切酶 (ZFNs) 是由能特异性识别碱基序列的  $Cys_2-His_2$  锌指蛋白与非特异性核酸内切酶 *Fok I* 融合而成，每个锌指蛋白包含 33 个氨基酸，具有保守的  $\beta\alpha$  构象，每个锌指蛋白可以特异性的识别 DNA 序列上 3 个连续的碱基<sup>[5]</sup>。运用锌



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库