

文章编号: 1674-7054(2018)03-0295-07

CRISPR/Cas9 的外膜囊泡转运与无乳链球菌清除

侯国锋¹, 曾家伟¹, 羊熙春¹, 王爱媛¹, 刘亚欣¹, 曾纪锋¹,
郭桂英², 杨 诺¹, 李 迁³, 郑继平¹

(1. 海南大学 热带农林学院 海口 570228; 2. 海南大学 教务处 海口 570228;
3. 海南大学 网络与教育技术中心, 海口 570228)

摘 要: 人工核酸内切酶技术 CRISPR(Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats) /Cas9 是当前最有效的基因编辑工具。外膜囊泡(Outer membrane vesicles, OMVs) 是细菌主动分泌和吸收的双层膜结构, 具有运载 DNA、蛋白等多种物质的能力。为探究以 OMVs 为 CRISPR 编辑工具的转载体、用于病原菌清除的可行性, 本研究以高致病性无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae* or Group B *Streptococcus* GBS) 为材料, 在原有 CRISPR 质粒 pCas9 的基础上, 通过分子克隆, 构建穿梭质粒 pCas9-2.0 和具有靶向剪切无乳链球菌 *cbf* 基因的毒性质粒 pCas9-*cbf*, 将质粒 pCas9-*cbf* 转入 *asd* 缺陷型大肠杆菌 X6097 后, 一方面进行重组菌的 OMVs 制备、电镜观察和 DNA 分析, 另一方面与 GBS 混合培养, 最后在选择平板上对 GBS 菌落计数。结果显示, 重组了质粒 pCas9-*cbf* 的 X6097 能够分泌 OMVs 且内含质粒; 实验组平板上没有 GBS 菌落产生; 对照组平板上菌落经鉴定皆为含 pCas9-2.0 的 GBS, 且菌落数量随共培养时间的延长和卡那霉素(Kan) 的浓度升高而增多。综上所述, OMVs 可以运载 CRISPR 为染色体剪切工具, 并实现对靶向病原菌的定向清除, 但受 OMVs 分泌量的限制清除效率较低。同传统的预防性疫苗相比, 本研究为病原菌清除提供了一个新的研究方向; 同当前以噬菌体为载体的研究思路相比, 本方法更简便、成本更低。另外, 本研究也为难以进行电击转化的菌株提供了一个更简单的质粒转化方法。

关键词: CRISPR; OMVs; 无乳链球菌; 病原菌清除; 质粒转化

中图分类号: Q 819

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.03.005

外膜囊泡(Outer membrane vesicles, OMVs) 是细菌特有的一种球形双层膜结构, 以出芽方式从细菌表面分泌, 直径为 20~200 nm, 是细菌分泌胞外因子的重要机制^[1]。一方面, OMVs 可以携带细菌的多种成分, 如细菌脂多糖、表面蛋白以及细菌的 DNA^[2], 因此, 致病菌产生的 OMVs 往往具有一定的毒性, 并参与细菌的致病过程; 另一方面, OMVs 还可携带细菌的抗原, 能够刺激机体产生免疫保护反应^[3]。近年来, OMVs 已逐渐成为新型的疫苗传递载体, 受到科研人员的广泛关注。2017 年 Kim 等以外泌体即 OMVs 为 CRISPR/Cas9 载体用于癌细胞治疗的应用研究^[4], 笔者从中受到很大启发。CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 人工核酸内切酶技术(主要是指 CRISPR/Cas9 系统) 是近年出现的一种全新的基因编辑方法^[5], 该系统的工作原理是, CRISPR 序列首先转录成 pre-crRNA (CRISPR-derived RNA), 进而与 tracrRNA (trans-activating RNA) 配对融合而成 tracrRNA/crRNA 复合物。cas9 (cas, CRISPR-associated) 基因转录翻译 Cas9 核酸酶, 在 tracrRNA/crRNA 复合物的引导下, Cas9 蛋白在与 crRNA 互补配对的 DNA 序列 PAM 位点附近发挥双链酶切作用, 断裂目标 DNA^[6]。整个过程可大致分为三步: 外源 DNA 的俘获, crRNA: tracrRNA: Cas9 复合物的形成, 目标 DNA 序列的识别并剪切。

收稿日期: 2018-03-16

修回日期: 2018-07-03

基金项目: 国家自然科学基金(31460699); 海南自然科学基金创新研究团队项目(2017CXTD005); 海南自然科学基金面上项目(317071)

作者简介: 侯国锋(1990-), 男, 海南大学热带农林学院 2015 级硕士研究生. E-mail: 2232739029@qq.com

通信作者: 郑继平(1973-), 男, 教授. 研究方向: 细菌遗传学. E-mail: jiping.zheng@hainu.edu.cn

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae* 或 Group B *Streptococcus* ,GBS) ,可引起多种陆生、水生动物产生脑膜炎、肺炎、败血症等多种疾病 ,并具有较高的致死率。GBS 是我国南方罗非鱼养殖危害最严重的病原菌之一^[7] ,但由于该菌的致病机制至今仍未明确且其耐药性不断增强 ,导致防治困难^[8]。笔者发现 ,由于无乳链球菌属于革兰氏阳性菌 ,其细胞壁较厚且存在荚膜 ,依照已有的制备方法^[9] ,该菌感受态细胞电击转化效率极低 ,难以达到对该菌基因改造的目的。

因此 ,针对当前无乳链球菌的高危难防 ,为探究能否利用 OMVs 的体外分泌功能 ,携带特异靶向剪切的 CRISPR 质粒进入并实现对无乳链球菌的清除 ,笔者以天冬氨酸 β - 半乳糖脱氢酶基因 (aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase gene *asd*) 缺陷型大肠杆菌所分泌的 OMVs 作为运输载体 ,通过构建和转入具有靶向无乳链球菌染色体剪切的 pCas9-*cfb* 质粒 ,经与高致病性无乳链球菌混合培养 ,检测混合培养后无乳链球菌的清除水平。OMVs 与 CRISPR 结合杀死无乳链球菌的原理见图 1。大肠杆菌中含有改造过的

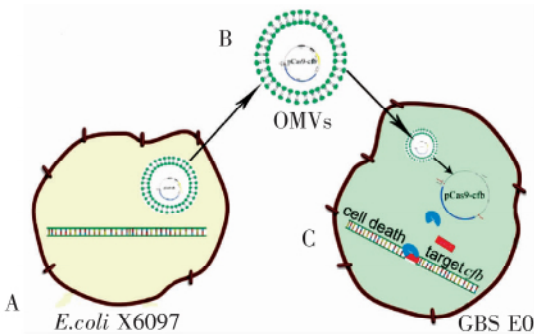


图 1 OMVs 传递与 CRISPR 技术结合的实验原理图

Fig.1 The schematic diagram of CRISPR/Cas9 transportation from *E.coli* to GBS by OMVs as carrie and GBS death by genome cutting

pCas9-*cfb* 质粒(图 1 - A) ,在其与无乳链球菌共培养的过程中 ,大肠杆菌分泌 OMVs ,其中有部分 OMVs 携带 pCas9-*cfb* 质粒(图 1 - B) ,随后 ,pCas9-*cfb* 通过 OMVs 进入无乳链球菌中 ,所表达的 sgRNA 识别无乳链球菌的 *cfb* 基因 ,在 Cas9 蛋白的作用下完成对无乳链球菌的双链剪切并杀死无乳链球菌(图 1 - C) 。实验结果显示 ,以 OMVs 为运载体的确能够实现 CRISPR 质粒转运并对无乳链球菌的杀灭。本研究对于感受态制备困难、电击效率过低的菌株改造和对于缺少电击设备实验室的质粒转化、以及用于环境病原菌的消除都具有一定的借鉴和应用价值。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与质粒及引物 本实验所用菌株与质粒见表 1 ,所用引物见表 2。

表 1 实验所用菌株与质粒
Tab. 1 Stain and Plasmids

菌株/质粒 Stains / Plasmids	特征 Characteristics	来源 Sources
菌株 Strains	X6097 <i>E. coli</i> , Δasd	实验室保存 Laboratory stock
	E0 <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>kan^r</i>	实验室保存 Laboratory stock
质粒 Plasmids	pCas9 <i>tracRNA</i> , <i>crRNA</i> , <i>cas9</i> , <i>CMR</i> , <i>p15A ori</i>	实验室保存 Laboratory stock
	pDG148 <i>pUB110 ori</i>	实验室保存 Laboratory stock
	pCas9-2.0 Shuttle plasmid(<i>tracRNA</i> , <i>crRNA</i> , <i>cas9</i> , <i>CMR</i> , <i>p15A ori</i> , <i>pUB110 ori</i>)	本研究 This study
	pCas9- <i>cfb</i> Derived from pCas9-2.0 , target to <i>cfb</i> gene	本研究 This study

表 2 实验设计的引物
Tab.2 The primers designed in the experiment

引物	序列	应用
Primer	Nucleotide sequence	Application
pUB110 Primers	F: CCATCGATGGATCCGCCTCCATCCAGTCT	Construction of pCas9-2.0
	R: CCATCGATGGCCCATCTATTTAGTTATTT	
	F: ATGGATCCGCCTCCATCCAGTCT	
Detection primers	R: GATGGCCCATCTATTTAGTTATTT	Detection of pCas9-2.0 or pCas9- <i>cfb</i>
	F: TCCAACAGCATGTGTGATTGC	
<i>cfb</i> Primers	R: TCAAAGATAATGTTTCAGGGAACAGA	Detection of GBS
	OligoI: AAACGGCCACTGAATCCGTAATCAG	
sgRNA- <i>cfb</i>	OligoII: AAAACTGATTACGGATTCACTGGCC	Targeting <i>cfb</i> gene of GBS

1.2 生化与分子生物学试剂 牛脑心浸出液培养基(Brain heart infusion medium ,BHI)、二氨基庚二酸(Di-aminopimelic acid ,DAP) (OXOID 公司生产); *Cla*I ,FastAP 热敏感碱性磷酸酶(Thermo 公司生产); T_4 ligase , T_4 PNK ,Pfu ,TaqTM DNA 聚合酶(NEB 公司生产)。

1.3 质粒构建 参照枯草杆菌—大肠杆菌多功能穿梭质粒的构建方法^[10],利用 pCas9 与 pDG148 质粒构建穿梭质粒 pCas9-2.0。步骤为,先对 pCas9 质粒进行 *Cla*I 酶切处理并进行胶回收,将回收得到的片段进行去磷酸化处理;同时以 pDG148 为模板扩增含 pUB110 复制原点的片段,经酶切处理后,将含 pUB110 复制原点的片段与单酶切处理的 pCas9 质粒片段进行连接,经测序验证后,获得穿梭质粒 pCas9-2.0。

设计携带靶向无乳链球菌基因 *cfb* 的 crRNA DNA 片段,该基因编码蛋白为 CAMP(Christie-Atkins-Munch-Petersen) 致病因子,经 95℃,5 min 水浴处理,然后缓慢冷却 3 h,并进行磷酸化处理,得到 *cfb* 靶序列。将以 *Bsa*I 酶切的 pCas9-2.0 质粒纯化后与 *cfb* 靶序列连接,经测序验证后,获得质粒 pCas9-*cfb*。

1.4 OMVs 制备与电镜分析 通过梯度离心的方法对 OMVs 进行收集与纯化^[11]。DH5a 接种到 5 mL 的 LB(Luria-Bertani medium) 液体培养基中,在 150 r·min⁻¹,37℃ 的条件下振荡培养 8 h。然后按 1:100 的比例接种到 500 mL 的 LB 液体培养基中,37℃,150 r·min⁻¹振荡培养 8 h,再将菌液 6 000 ×g 离心 15 min 后,用 0.45 μm 的细菌过滤器对上清液进行过滤,最终用 100 kDa 中空纤维滤膜浓缩 50 倍。浓缩 50 倍的菌液再次经 6 000 g 离心 10 min,上清用 0.45 μm 真空过滤器去除残留的细胞,产生的滤液在 4℃ 下进行依次离心(20 000 g 离心 35 min,40 000 g 离心 1 h 和 100 000 g 离心 3 h)。将依次离心得到的沉淀保存到 1.25 mL 的 1 ×PBS(Phosphate buffer saline) 悬浮液中,并保存到 -80℃ 冰箱中备用。

OMVs 用 0.5% 磷酸钨水溶液进行负染的方法为,取 10 μL 的 OMVs 样品滴在铜网格上,用超纯水漂洗网格,经磷酸钨染色后,再次冲洗铜网格,经空气干燥后进行透射电子显微镜(TEM) 观察。

1.5 质粒的 OMVs 转运与菌株消除 以 pCas9-2.0 质粒为对照,将含有 pCas9-*cfb* 的 *asd* 缺陷型 *E. coli* X6097 与 GBS 菌株 E0 分别接到 BHI 的液体培养基中,37℃,200 r·min⁻¹培养 12 h,然后各取 250 μL 的 *E. coli* X6097 和 GBS E0 菌液进行混合,再加入 1 mL 新鲜 BHI 培养液,在 150 r·min⁻¹,30℃ 条件下振荡培养约 12 h,最后,取 500 μL 菌液涂布在含有氯霉素的 BHI 平板上培养并统计菌落数目。

1.6 OMVs 分泌量条件分析 笔者希望通过改变大肠杆菌与无乳链球菌共培养的时间来探究时间对 OMVs 穿梭的影响。文献[11]提到,添加氨基糖苷类抗生素,OMVs 的分泌量会成倍增加,在已知的抗生素中,卡那霉素(Kan ,Kanamycin) 抗生素属于这种类型的抗生素,为此,实验设计在共培养时加入低浓度的 Kan,旨在通过添加 Kan 的处理与没添加 Kan 的对照作比较,探究氨基糖苷类抗生素对 OMVs 分泌量的影响。

1.7 统计分析 采用 *Excell* 2010 对不同实验平板上的菌落数进行整理与数据处理,计算无乳链球菌死亡率 P。将死亡率 P 数据代入 *GraphPad Prism* 6 进行处理得到统计图。

GBS 死亡率 P 计算公式: $P = n/N$ 。其中 N : 在平板上生长出来的携带 pCas9-2.0 的 GBS E0 菌落数; n : 在平板上生长出来的携带 pCas9-*cfb* 的 GBS E0 菌落数。

2 结果与分析

2.1 收集 OMVs 与 PCR 验证 通过对 pCas9 质粒改造, 在原有 pCas9 质粒的基础上添加复制原点 pUB *ori*, 得到穿梭质粒 pCas9-2.0, 最后, 添加 *cfb* 基因靶点后得到 pCas9-*cfb*。新构建的质粒能够在无乳链球菌中复制并发挥基因编辑功能, 具体结构如图 2-A。为验证细菌是否分泌 OMVs 以及 OMVs 中质粒的存在, 将构建好的 pCas9-*cfb* 质粒导入大肠杆菌当中, 对重组大肠杆菌进行 OMVs 的收集、纯化以及电镜观察。电镜观察的结果(图 2-B) 证明了细菌可以分泌 OMVs。用检测引物(Detection Primers) (表 2) 对 OMVs 进行 PCR 扩增, 电泳结果(图 2-C) 显示, 大肠杆菌分泌的 OMVs 中含有 pCas9-*cfb*。

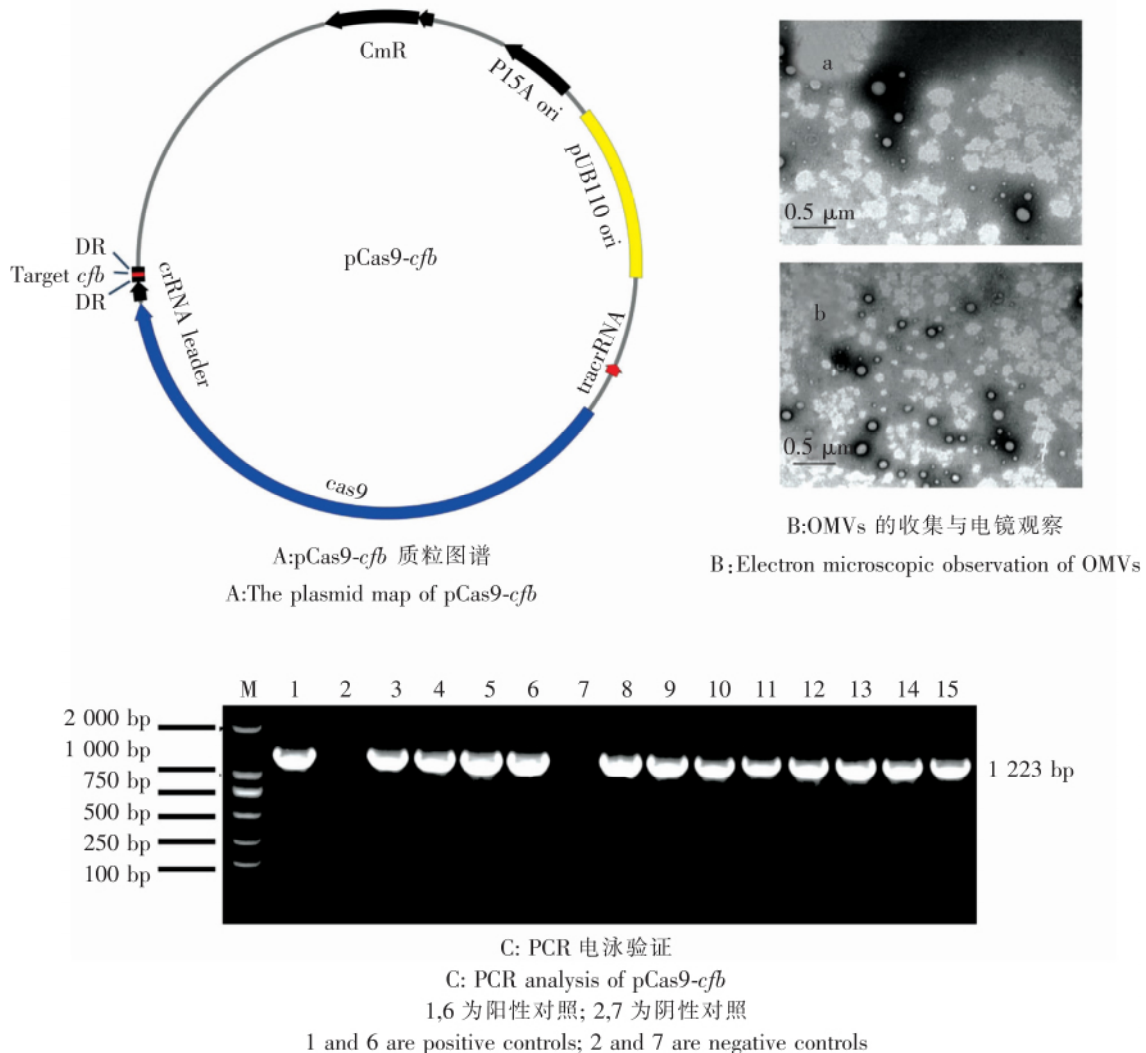
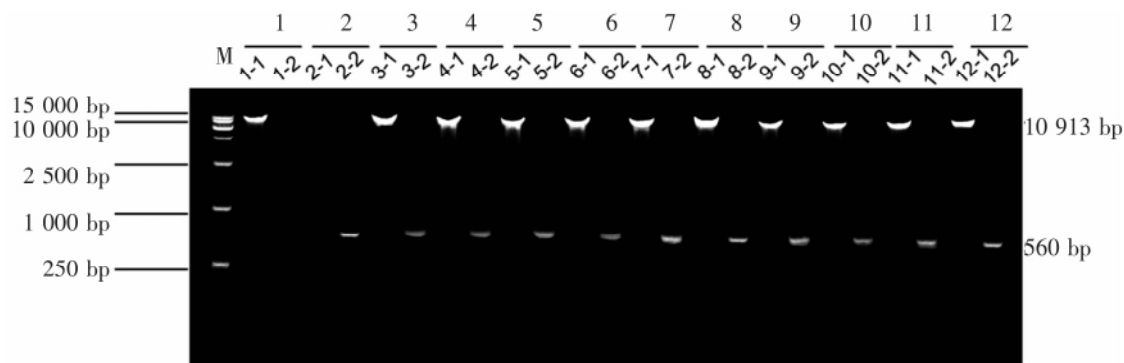


图 2 OMVs 的收集与验证
Fig.2 Collection and Detection of OMVs

2.3 质粒穿梭验证及影响穿梭条件的探索 笔者向供体菌大肠杆菌 X6097 中转入 pCas-2.0 质粒(此时转入的 pCas9-2.0 上没有添加 *cfb* 基因靶点), 该菌因 *asd* 缺陷而无法合成细胞壁肽聚糖组分 DAP, 因此, 只有在添加 DAP 的培养基中 X6097 才能存活。本研究采用的受体菌为具有 Kan 天然抗性的高致病无乳链球菌菌株 E0。供体菌与受体菌的这些特点对后续实验中去除供体菌影响、特异性选择受体菌以及含质粒的重组受体菌提供了方便。

cfb 基因可用于 GBS 的判定。对 BHI 平板上的菌落进行菌落 PCR 提质粒酶切检测, 检测结果(图 3-A) 证明 pCas9-2.0 质粒可以通过大肠杆菌 OMVs 成功进入无乳链球菌中; 平板上生长出来的菌落都含有质粒 pCas9-2.0。笔者设计了探究影响质粒穿梭条件的实验, 实验结果见图 3-B、C。图 3-B 显示, 随着共培养时间的延长, 发生质粒穿梭的无乳链球菌数目逐渐增加。图 3-C 表明, 添加低浓度 Kan 抗生素增加了质粒穿梭的菌落数量, 未添加 Kan 的 GBS 菌落数 23, 添加了低浓度 Kan 的 GBS 菌落数为 42(共培养时间都是 12 h)。

质粒穿梭验证及影响穿梭条件的实验结果(图 3) 表明, 通过延长共培养时间与添加低浓度的 Kan 抗生素可以增加 OMVs 的分泌量与传递量, 但存在质粒传递效率依然很低($10^{-7} \sim 10^{-9}$) 不能从根本上解决 OMVs 分泌量少、传递效率低的困境。

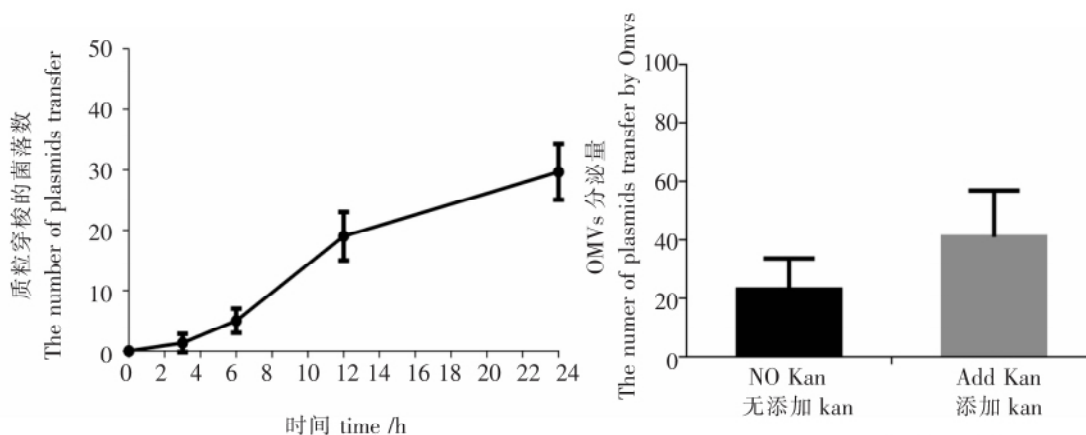


A 质粒穿梭验证

A: PCR analysis

n-1 表示对平板上的菌落提质粒、*Cla*I 酶切得到的条带, 目的是验证细菌当中是否含有 pCas9-2.0 质粒; n-2 表示根据 GBS 的 *cfb* 基因设计引物进行菌落 PCR 得到的结果; 在所有条带当中 1 2 为对照组, 1 是含 pCas9-2.0 的大肠杆菌, 2 为不含 pCas9-2.0 的无乳链球菌

n-1: The 10 913 bp *Cla*I digestion fragment of pCas9-2.0; n-2: The 560 bp PCR fragment of GBS *cfb* gene
The control strains are 1 and 2. 1 is *E. coli* X6097(pCas9-2.0), 2 is GBS E0



B: 质粒穿梭的菌落数随共培养时间的变化曲线

B: The time influence of mixed culture on plasmid transfer

C: Kan 对 OMVs 分泌量的影响

C: The influence of Kan on plasmid transfer

图 3 质粒穿梭验证以及穿梭效率条件探索

Fig.3 Condition analysis of plasmid transfer by Omvs

2.4 CRISPR 与 OMVs 结合对无乳链球菌的致死作用 以 X6097(pCas9-2.0) 为对照, 采用 X6097(pCas9-*cfb*) 与无乳链球菌 E0 混合培养, 比较 OMVs 转运与电击转化下的无乳链球菌 E0 的致死效率。实验结果(图 4) 显示, OMVs 转运与电击转化效率没有显著差异, pCas9-*cfb* 转入对无乳链球菌具有致死性。

图4 是不同情况下的无乳链球菌死亡率的定量分析,通过电击转化携带靶点的 pCas9-*cfb* 质粒对无乳链球菌的致死率是 94.56%; OMVs 传递 pCas9-*cfb* 对 E0 菌株的致死率是 96.44%。

3 讨论

本研究结果表明,采用混合培养的方法,质粒可以通过供体菌的 OMVs 在供-受体细菌间进行转运,从而实现靶向性的 CRISPR 系统对受体菌的杀灭作用;在转化效率上,通过与电击转化效率比较,二者之间并没有显著差异。值得注意的是,尽管已有多篇文献对无乳链球菌电击感受态的制备与电击效率进行了详细报道^[9,12],但实际实验中无论是采用传统的多步

纯水清洗还是在培养过程中增加甘氨酸以减少被膜(biofilm)含量、添加 Amp 或吐温 80 以减弱细胞壁等多种措施都无法提高致病菌株 E0 的转化效率。因此,本方法采用的混合培养可以对那些难以进行电击转化的菌株实现质粒转化。电击转化需要昂贵的基因导入仪,所用的电击杯造价高、使用寿命短,本研究采用的以混合培养方式实现 OMVs 质粒转运的方法对没有电击转化条件的实验室具有借鉴价值。

OMVs 的发现与细菌间的交流已越来越受到世界各国研究者的重视^[1,13],有望成为病原菌防治的一个新突破口。目前,在水产养殖行业中,没有有效的病原菌防治方法,同时越来越严重的耐药性问题对当前抗生素的过度使用提出了挑战。已有科学家提出用噬菌体作为运载体携带 CRISPR 系统作用于病原菌或耐药基因的清除,但噬菌体专一性过强、插入 DNA 片段大小有限、操作难度大和实验成本高等缺点,极大地限制了该方法的应用^[14-15]。本研究证明 pCas9-*cfb* 质粒可以通过 OMVs 的形式进入 GBS 中,并且发挥双链剪切功能杀死无乳链球菌,这对病原菌的清除提供了一个新的研究方向。若进一步解决了 OMVs 分泌少与质粒穿梭效率低的困境后,将从根本上解决病原菌的危害。本研究几乎是在完全模拟自然环境条件下进行的,因此,在理论上,通过向环境中施加具有靶向特定耐药基因的 CRISPR 重组菌株,通过 OMVs 的作用,该重组菌可以向周围环境菌株转运和传递 CRISPR,从而反向抵消耐药基因在细菌间的水平基因转移。当前的研究虽然还只是在探索阶段,受 OMVs 分泌量的限制而效率低下,但其在病原菌防治方面所具备的优势已不言而喻。CRISPR 系统的引用使病原菌的防治更加准确与高效,同传统的免疫防治相比,本研究已从原来的预防疫苗转向对病原菌的治疗,即向针对病原菌的治疗性疫苗转变。因此,当人们能够掌握 OMVs 分泌的分子机制,开发出高效分泌 OMVs 的工程菌株时,采用本研究方案,将会对环境保护、疾病治疗产生影响。

参考文献:

- [1] Lee E Y, Choi D S, Kim K P, et al. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles [J]. Mass spectrometry reviews, 2008, 27(6): 535-555.
- [2] Kulp A, Kuehn M J. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles [J]. Annual Review of Microbiology, 2010, 64(1): 163-184.
- [3] 易洁, 刘青, 孔庆科. 革兰氏阴性菌外膜囊泡作为亚单位疫苗的研究进展 [J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 911-921.
- [4] Kim S M, Yang Y, Oh S J, et al. Cancer-derived exosomes as a delivery platform of CRISPR/Cas9 confer cancer cell tropism-dependent targeting [J]. Journal of Controlled Release, 2017, 266: 8-16.
- [5] 方锐, 畅飞, 孙照霖, 等. CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(8): 691-702.

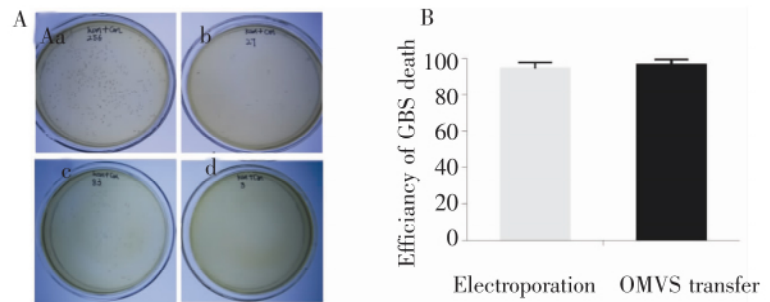


图4 OMVs 与 CRISPR 对 GBS 的作用

A: pCas9-2.0 质粒转化 GBS 效率及 pCas9-*cfb* 致死效率分析; B: 不同方式转入 pCas9-*cfb* 质粒对无乳链球菌的致死率

图 4-A 中, a, b 是通过电击转化的方法将质粒转入的菌落照片, c, d 是 OMVs 传递的结果; a, c 平板上的菌落是不携带 *cfb* 靶点的 pCas9-2.0 质粒, b, d 平板上的菌落是携带 *cfb* 靶点的 pCas9-*cfb* 质粒

Fig.4 Plasmid transfer by OMVs and Cell curing by CRISPR

A: Colony analysis of GBS; B: GBS mortality

4-A: a, Electroporation with pCas9-2.0, b, Electroporation with pCas9-*cfb*, c, pCas9-2.0 transformation by OMVs carrying, d, pCas9-*cfb* transformation by OMVs carrying

- [6] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges [J]. Human Molecular Genetics, 2014, 23(R1): R40 – R46.
- [7] 柯剑, 赵飞, 罗理, 等. 广东省罗非鱼主养区无乳链球菌的分离、鉴定与致病性 [J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(3): 22 – 27.
- [8] 程世亮, 刘新风, 郑文, 等. 鱼类无乳链球菌病 [J]. 动物医学进展, 2016, 37(2): 105 – 109.
- [9] Ricci M L, Manganelli R, Berneri C, et al. Electroporation of streptococcus agalactiae with plasmid DNA [J]. FEMS Microbiology letters, 1994, 119(1/2): 47 – 52.
- [10] 郭兴华, 熊占, 周民, 等. 枯草杆菌 – 大肠杆菌多功能穿梭载体的构建 [J]. 生物工程学报, 1991, 8(1): 224 – 229.
- [11] Kadurugamuwa J L, Beveridge T J. Virulence factors are released from Pseudomonas aeruginosa in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion [J]. Journal of Bacteriology, 1995, 177(14): 3998 – 4008.
- [12] Framson P E, Nittayajarn A, Merry J, et al. New genetic techniques for group B streptococci: high-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids, and mutagenesis with Tn917 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3539 – 3547.
- [13] 梁心琰, 阮海华. 细菌群体感应及其在病原菌防治中的应用 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(1): 33 – 38.
- [14] Jahromi M A M, Zangabad P S, Basri S M M, et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing [J]. Advanced Drug Delivery Reviews 2018, 123: 33 – 64.
- [15] Park J Y, Moon B Y, Park J W, et al. Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against Staphylococcus aureus [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44929

Outer Membrane Vesicles as CRISPR/Cas9 System Carrier for Elimination of *Streptococcus agalactiae*

HOU Guofeng¹, ZENG Jiawei¹, YANG Xichun¹, WANG Aiyuan¹, LIU Yaxin¹, ZENG Jifeng¹,
GUO Guiying², YANG Nuo¹, LI Qian³, ZHENG Jiping¹

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

2. The Academic Affairs Office, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China;

3. Network and Educational Technology Center, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: As bacterial unique immune system, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 is the most effective gene editing tool at present. Outer membrane vesicles (OMVs) are the physiological structures of active secretion and absorption of bacteria, and have the ability to carry DNA, protein and some other substances. To investigate the possibility of OMVs transporting CRISPR/Cas9 and eliminating pathogenic bacteria, the plasmid pCas9 was reconstructed to develop shuttle plasmid pCas9-2.0 (which can be replicated in *E. coli* and *Streptococcus agalactiae* or Group B *Streptococcus*, GBS), and pCas9-cfb (which is derived by inserting crRNA targeting *cfb* gene in GBS E0). The *E. coli* X6097 (Δ asd) was used for harboring pCas9-2.0 or pCas9-cfb. The OMVs of recombinant X6097 were extracted, purified and observed by electron microscope. The pCas9-2.0 or pCas9-cfb was detected from OMVs by PCR. Recombinant X6097 and GBS E0 strains were mixed and co-cultured, and finally counted on BHI medium by using the colony count method. The results showed that the OMVs were secreted by the recombinant X6097 as a carrier for shipping the plasmid from the X6097 to the GBS E0. The secretion and transfer efficiency of OMVs were enhanced by prolonging co-culture time with low-level kanamycin. The GBS E0 was killed by absorbing pCas9-cfb. Compared with the traditional prophylactic vaccine, this study provides a new research strategy for the control of pathogenic bacteria in natural environment. Compared with the current phage delivery systems, this method is more convenient and lower in cost. In addition, this study developed a new plasmid transformation method for some strains that are hard to be electroporated or some labs without electroporation apparatus.

Keywords: CRISPR; outer membrane vesicles (OMVs); *Streptococcus agalactiae*; elimination of pathogenic bacteria; plasmid transformation

(责任编辑: 叶 静)