

• 综 述 •

高通量测序技术在 B 族链球菌鉴别分型中的研究进展*

易乐晖^{1,2}, 王飞玲²综述, 吴丽娟^{1,2,3△}审校

1. 遵义医科大学珠海校区, 广东珠海 519000; 2. 深圳市宝安区妇幼保健院检验科, 广东深圳 518106;

3. 深圳市宝安区妇幼保健院母胎医学研究所, 广东深圳 518106

摘 要:近年来, 多种基于高通量测序技术建立的测序方法如 16S 核糖体 RNA(16S rRNA)测序、宏基因组测序(mNGS)、全基因组测序(WGS)、RNA 测序(RNA-seq)和转座子测序(Tn-seq)逐步被应用于病原学研究。B 族链球菌(GBS)是导致围生期母婴感染的首位病原菌, 其流行病学分型及相关毒力基因不仅与其致病和防控密切相关, 而且具备应用于筛查和诊断的潜力。该文着重综述高通量测序技术应用于 GBS 的鉴别分型的相关研究进展。

关键词: B 族链球菌; 高通量测序; 鉴别; 分型; 毒力基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.10.021 **中图法分类号:** R542.2

文章编号:1673-4130(2023)10-1255-05

文献标志码: A

**Application progress of multiple high-throughput sequencing technologies
in identification and typing of group B Streptococcus***

YI Lehui^{1,2}, WANG Feiling², WU Lijuan^{1,2,3△}

1. Zunyi Medical University Zhuhai Campus, Zhuhai, Guangdong 519000, China; 2. Department

of Clinical Laboratory, Shenzhen Bao'an Women's and Children's Hospital, Shenzhen,

Guangdong 518106, China; 3. Maternal-Fetal Medicine Institute, Shenzhen

Bao'an Women's and Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518106, China

Abstract: In recent years, a variety of sequencing methods based on high-throughput sequencing technologies have been gradually used in etiological research, such as 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing, metagenomic next-generation sequencing (mNGS), whole genome sequencing (WGS), RNA sequencing (RNA-seq) and transposon sequencing (Tn-seq). Group B Streptococcus (GBS) is the leading cause of perinatal maternal infection. Its epidemiological typing and related virulence genes are not only closely related to its pathogenicity and prevention, but also have the potential to be applied in screening and diagnosis. This review focuses on the important application progress in identification and typing of GBS by above-mentioned high-throughput sequencing methods.

Key words: group B Streptococcus; high-throughput sequencing; identification; typing; virulence gene

B 族链球菌(GBS)是围生期母婴感染首位病原菌, 可导致严重的新生儿侵袭性 GBS 感染^[1]。孕产妇阴道和直肠的 GBS 定植率可达 15%~30%, 约 50% GBS 定植孕产妇在分娩时会经产道传播 GBS 给新生儿, 1%~2% 新生儿表现为侵袭性感染^[2]。当前, 新生儿 GBS 感染防控主要基于产妇阴道定植 GBS 菌株的筛查模式^[3], 对 GBS 定植母亲分娩时使用抗菌药物, 可显著减少新生儿侵袭性 GBS 感染的发生率^[4]; 但也有研究者质疑普遍筛查的有效性和获益^[5], 认为 99.8% 的 GBS 筛查阳性产妇及其新生儿被不必要地使用了抗菌药物, 探索更精准的预防筛查手段是临床检验的重要方向^[6-7]。近 10 年, 国内外多个研究团队利用高通量测序技术对 GBS 菌株进行毒

力基因筛选、鉴别分型及分子进化等研究, 并取得了积极进展。本文着重探索不同类型的高通量测序技术在 GBS 鉴别分型中的应用价值, 以加深和拓宽对 GBS 致病机制和分子流行病学的认识, 为围生期 GBS 感染从菌株模式广泛筛查到分子模式精准诊断奠定基础。

1 高通量测序技术概述

基于二代测序(NGS)和三代测序的高通量测序技术, 结合不同的应用需求, 衍生出多种测序方法, 本文涉及的多种测序技术的原理简介及应用场景见表 1。

2 高通量测序技术在 GBS 鉴别分型中的研究进展

2.1 基于样本的直接 GBS 鉴别和分型

16S 核糖体 RNA(16S rRNA)测序和宏基因组测序(mNGS)技术

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81902121); 深圳市科技创新委员会项目(JCYJ20180228163744684); 科技基础资源调查专项(2019FY101200); 深圳市医学重点学科建设经费资助项目(SZXX028)。 △ 通信作者, E-mail: 6345650@qq.com。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230318.1737.002.html\(2023-03-20\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230318.1737.002.html(2023-03-20))

均在非培养方法检出及鉴定 GBS 中有潜在的应用价值。妊娠期阴道微生物生态菌群相关研究发现, mNGS 或 16S rRNA 测序可鉴别 GBS, 但尚未统计检出率, 也未进一步对 GBS 进行分型^[12]; 有研究发现, 16S rRNA 测序相较于巢式 PCR 和定量 PCR (qPCR) 方法对胎盘中的 GBS 检出率更高, 研究认为与胎盘中 GBS 的菌量有关, 当菌量较少时用 16S rRNA 检测可

能更灵敏, 通过对另一组去除污染菌影响的胎盘样本进行 2 次 16S rRNA 测序, 在 5% 分娩前孕产妇的胎盘中鉴别出了 GBS^[13]。已有研究证实, mNGS 可在脑脊液中检出包括 GBS 在内的多种病原菌, 对儿童细菌性脑膜炎具有早期诊断价值^[14-15]。另外, 在培养阴性的感染性心内膜炎患者血液样本和心脏瓣膜样本中, 采用 mNGS 均鉴定出了 GBS^[16]。

表 1 基于高通量测序技术的多种测序方法的原理简介及应用场景

方法	原理简介	应用场景
NGS	包括短片段大规模平行测序的 NGS 技术和长读长不扩增的单分子测序的三代测序技术。	广泛应用于物种鉴定、大规模基因组测序、基因表达调控、基因筛选和功能研究等领域。
16S rRNA 测序	细菌的 16S rRNA 由保守区域和可变区域 (V1~V9) 组成, 根据可变区域的多样性和独特性可对细菌进行分类, 常作为细菌鉴别分型的靶标。基于 NGS 技术的 16S rRNA 测序可将细菌鉴定到种甚至株的水平 ^[8] 。	对复杂且非培养的样本中的细菌菌群进行鉴别和定量检测。
mNGS	对样本中所有微生物基因组进行 NGS ^[9] 。	适用于复杂且非培养的样本中所有 (特别是难以分离的) 微生物物种鉴定。
全基因组测序 (WGS)	结合 NGS 和三代测序技术完成对物种全部基因组测序、验证和组装, 可全面分析其流行病学信息、进化发育特点、耐药性和毒力机制。	目前细菌、真菌等物种 WGS 的主流应用技术。
RNA 测序 (RNA-seq)	将基因组中全部或者部分 RNA 转化为一端或两端连有接头的 cDNA 短片段, 进行 NGS 时利用单碱基分辨率明确转录区域及转录边界序列变化, 从整体上研究基因转录和调控规律 ^[10] 。	用于检测样本中基因转录组的表达调控情况并对差异基因进行筛选。
转座子测序 (Tn-seq)	转座子是基因组中可自主复制和转位的一段 DNA 序列, 通过转座酶识别和插入目标基因组序列, 在基因组间或组内移动, Tn-seq 对不同实验条件下饱和转座子文库进行 NGS, 利用转座子的插入位点和频率变化反应特定基因的适应性, 验证基因功能 ^[11] 。	既可用于筛选物种生存所需的必需基因, 也可用于研究基因功能及基因间相互作用。

2.2 基于菌株的 WGS 与 GBS 分型 基于 GBS 全基因组信息, WGS 既可分析传统的分子流行病学信息, 如血清型和基因型, 也可进一步分析其克隆传播特点并挖掘潜在未知信息。荚膜多糖 (CPS) 是 GBS 导致侵袭性疾病的重要毒力因素和疫苗靶标, 据其不同可将 GBS 分为 I a、I b、II~IX 10 种血清型^[17], 正处于临床实验阶段的六价 CPS 结合疫苗可覆盖 I a、I b、II~V 6 种主要荚膜血清型。美国各年龄段来源的 6 340 株和英国 410 株新生儿侵袭性菌株的 WGS 测序结果均显示 I a、I b、II、III/IV 和 V 这 5~6 种血清型占比超过 98%^[18-19], 导致新生儿早发和晚发型疾病的 III 型菌株分别占 27.2% 和 69%, 成人 I a 型菌株占比 20.36%^[18]。早期基因分型通常是基于 7 个管家基因的扩增和测序进行的多种序列分型 (MLST) 方法, 按照等位基因的相似性将各种序列型 (ST) 进行克隆复合体 (CC) 归类^[18]。core genome MLST (cgMLST) 是根据 GBS 核心基因组序列进行分型, 比 MLST 分辨率更高^[20]。全球 198 项关于 GBS 的研究中, 有 1/4 的研究包含了 MLST, 但 WGS 相关研究不足 5%^[21], 基于 WGS 可以完成 MLST 和

cgMLST 分型^[18,22]。有研究已证实, 相较于传统检测方法, WGS 不仅能更准确对 GBS 血清型和基因型进行分型, 还可以分析荚膜置换和不可分型的原因, 并具有发现新的血清型或基因型及其相关突变的优势^[22]。根据 GBS 群体的 WGS 发现, 单核苷酸多态性 (SNP) 差异不仅可以完成系统进化发育分析, 也可用于比较 GBS 菌株之间的克隆传播特点及关系, 有研究认为, SNP 差异为 0 的菌株遗传上相同, SNP 差异 ≤ 5 的菌株遗传上高度相似, 可判断为克隆传播^[19]。

2.3 基于 WGS 分析 GBS 菌株的耐药性 GORI 等^[23]通过 WGS 首次发现并证实四环素的广泛使用可导致携带四环素耐药基因整合元件 (ICE) 的 CC17 菌株在全球流行, 新生儿 GBS 感染率升高, 大环内酯类抗菌药物的耐药导致 CC1 型菌株增加。WGS 还检测到青霉素结合蛋白 (PBP) 2X 突变菌株、携带万古霉素耐药基因 vanY 的 CC23 菌株和 vanG 的 II/ST22、V/ST1 GBS 菌株, 使得 GBS 对 β 内酰胺酶类抗菌药物和万古霉素敏感性下降^[18,24-25]。我国也有研究基于 WGS 获取 GBS 全部耐药信息并检出多种多重耐

药簇^[26-27]。

2.4 WGS 鉴别与筛选 GBS 侵袭性相关毒力基因

目前 GBS 确切致病的分子机制尚不明确,多数研究表明,GBS 的高致病性与多种毒力基因有关,利用 WGS 检测并鉴别与 GBS 侵袭致病相关的毒力基因,可进一步分析并预测基因功能。WGS 检测全球 901 株不同宿主的侵袭性 GBS 菌株,发现其可通过快速获得或缺失基因适应新宿主或生态位环境,几乎所有的菌株有一或多个遗传移动元件(MGE)和致病菌毛岛(PI),如 PI-1、PI-2a 和 PI-2b^[28]。WGS 在美国最大样本量的侵袭性 GBS 菌株中几乎都检测到与毒力相关的 PI、 α 蛋白家族基因以及 *srr1* 和 *srr2* 基因^[18]。利用泛基因组关联研究分析 1 988 株侵袭和定植 GBS 菌株基因序列的多样性,最终在 279 个致病特异基因聚集的 5 种不同功能的 CC 中检测到与 GBS 代谢及人类患病相关基因多见于 CC17(*gcc1732*、*lepB*、*inLA_2*、*gcc1733*)和 CC23(*mntH*),其中参与 GBS 定植、GBS 与其他微生物竞争特定生态位和代谢等多种途径的基因存在差异,并发现 CC17 菌株的 16 个特异基因的等位变异在侵袭和定植菌株中显著不同^[24]。有研究进一步证实了 CC17 型定植和侵袭 GBS 菌株有 14 个基因突变存在 SNP 差异,确定侵袭菌株致病的关键且特异的基因 *srr2* 存在 SNP 差异,侵袭菌株通过交换染色体片段以适应不同宿主环境,在人类宿主中显示出较强的传播力,并在欧洲、北美、非洲及亚洲地区广泛传播^[29]。

2.5 RNA-seq 鉴别 GBS 毒力基因 RNA-seq 筛选 GBS 如何在转录组层面调节基因表达适应新的宿主环境和致病,常通过比较分析突变菌株和野生菌株的转录组或不同环境下的菌株转录组来实现。我国在鱼类 GBS 中发现并鉴定了一种新型 XRE 家族转录调节因子(XtgS),动物实验发现斑马鱼感染缺失 XtgS 因子的菌株较野生型菌株死亡率低,可能其是 GBS 致病的负性调节因子,RNA-seq 发现缺失 XtgS 的菌株有 74 和 21 个基因分别参与上调和下调,这些基因与噬菌体、膜蛋白、转运蛋白、酶、代谢和转运 RNA(tRNA)生物合成等有关^[30]。Cas9 是规律成簇的间隔短回文重复序列及其相关蛋白(CRISPR/Cas)中的核酸内切酶之一,通过降解 DNA 对 GBS 毒力基因起调节作用,小鼠模型实验显示 Cas9 突变菌株较野生型菌株毒力弱,RNA 测序发现参与代谢、毒力、细胞壁形成有关的基因以及双组分调节系统(TCS)中的 *CiaR* 因子显著失调,证实 *CiaR* 因子可促进 GBS 在阴道定植,对 *CiaR* 突变菌株 RNA-seq 显示有 25 和 33 个基因分别参与上调和下调,这些基因包括了 Cas9 突变体中的上调和下调基因,说明 Cas9 可以通过其他因子调节 GBS 基因表达^[31]。研究表明,高浓度锌离子不利于野生 III/ST17 型 GBS 菌株生存,对生存在不同浓度锌离子环境的菌株进行 RNA

测序发现,包括 *czcD*、*nikABCD*、*mntH2* 和 *mtsABC* 基因在内的 229 个基因和 *adcA* 基因在内的 238 个基因分别参与上调和下调,与 GBS 抵抗宿主来源蛋白的活性有关^[32]。值得注意的是,RNA 测序往往需要 RT-qPCR 来验证测序结果的准确性。

2.6 Tn-seq 鉴别筛选 GBS 必需基因 Tn-seq 可筛选 GBS 在某种特定生长环境中生存所需的基因,研究 WGS 中单个基因的适应度,以及基因之间的相互作用关系,还可识别潜在抗体靶标。HOOVEN 等^[33]首先建立并初步评估了一种基于 GBS 菌株 A909 的转座子文库,对其应用 Tn-seq 筛选出 A909 生存的必需基因占基因组比例为 13.5%,关键基因占比为 1.2%。目前该团队还应用该文库和 Tn-seq 对 A909 在血液和羊水中生存的必需基因进行筛选,并进一步完成对筛选出的个别必需基因进行基因敲除及 RNA 测序等功能验证^[34-35]。ZHU 等^[36-37]利用 Tn-seq 筛选 V 型 GBS 菌株在全血和血浆中存活的重要基因 *aroA*、*metP* 和 *mtsA*,其中 *aroA* 基因是必需基因,W903_1820 是该 GBS 菌株在全血中生长的必需基因;另外,对 GBS 细胞壁肽聚糖生物合成起催化作用的青霉素结合蛋白(PBP)进行研究,构建野生型菌株和 4 种 *pbp*(*pbp1A*、*pbp1B*、*pbp2A*、*pbp2B*)突变菌株文库,经 Tn-seq 筛查 5 种菌株中共有 350 个必需基因,并发现某种 *pbp* 突变菌株需要其他 *pbp* 作为必需基因。Tn-seq 在 GBS 基因组中的基因饱和度不够高(39%~46%),近期有研究对肺炎链球菌进行 CRISPR 测序,体现出比 Tn-seq 更大的优势,可检测所有基因的适应度,但目前尚未将这一技术应用于 GBS 相关研究^[33,38]。

3 小结与展望

对各种类型的人体样本采用非培养方法直接 16S rRNA 测序或 mNGS,数据处理时即可完善 GBS 鉴别及分型分析,可初步鉴别出临床重要分型的 GBS,更有望全面了解 GBS 的微生态分布特点。基于 GBS 菌株的 WGS 已筛选鉴别出较多的与致病性和流行传播相关的毒力基因或分型靶标,可进一步应用于疫苗及诊断方法的设计。应用 RNA-seq、Tn-seq 筛查 GBS 可能的毒力调控基因及必需基因等可更全面了解其致病机制。高通量测序技术支撑和推动了 GBS 鉴别分型的精准分子诊断,我国目前仍较缺乏高通量测序技术在 GBS 的致病机制或分子流行病学中的应用研究数据,期待未来更快速、简洁的高通量测序技术的发展和标准化、可视化的生物信息学分析的普及,为临床防治 GBS 感染做出新贡献,也对未来微生物检验的发展提供新思路。

参考文献

- [1] NANDURI S A, PETIT S, SMELSER C, et al. Epidemiology of invasive early-onset and late-onset group B

- Streptococcal disease in the United States, 2006 to 2015; multistate laboratory and population-based surveillance [J]. *JAMA Pediatr*, 2019, 173(3): 224-233.
- [2] KWATRA G, CUNNINGTON M C, MERRALL E, et al. Prevalence of maternal colonisation with group B streptococcus: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(9): 1076-1084.
- [3] VERANI J R, MCGEE L, SCHRAG S J. Prevention of perinatal group B Streptococcal disease; revised guidelines from CDC, 2010 [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2010, 59(Rr-10): 1-36.
- [4] 中华医学会儿科学分会, 中华医学会儿科学分会产科学组. 预防围产期 B 族链球菌病 (中国) 专家共识 [J]. *中华围产医学杂志*, 2021, 24(8): 561-566.
- [5] SEEDAT F, GEPPERT J, STINTON C, et al. Universal antenatal screening for group B Streptococcus may cause more harm than good [J]. *BMJ*, 2019, 364: l463.
- [6] VORNHAGEN J, ADAMS WALDORF K M, RAJAGOPAL L. Perinatal group B Streptococcal infections; virulence factors, immunity, and prevention strategies [J]. *Trends Microbiol*, 2017, 25(11): 919-931.
- [7] 黄江庆, 李彬. 高通量测序在细菌进化分析中的应用与展望 [J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(2): 171-174.
- [8] CHAKRAVORTY S, HELB D, BURDAY M, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 69(2): 330-339.
- [9] MARCHESI J R, RAVEL J. The vocabulary of microbiome research: a proposal [J]. *Microbiome*, 2015, 3: 31.
- [10] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 57-63.
- [11] VAN OPIJNEN T, CAMILLI A. Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(7): 435-442.
- [12] LIM S, RAJAGOPAL S, JEONG Y R, et al. Group B Streptococcus and the vaginal microbiome among pregnant women: a systematic review [J]. *Peer J*, 2021, 9: e11437.
- [13] DE GOFFAU M C, LAGER S, SOVIO U, et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens [J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 329-334.
- [14] 王子璇, 吴霞, 徐君, 等. 宏基因组二代测序技术在儿童细菌性脑膜炎病原诊断中的价值 [J]. *中华儿科杂志*, 2022, 60(8): 769-773.
- [15] 王彩云, 许红梅, 田姣, 等. 儿童急性细菌性脑膜炎多中心流行病学研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2022, 60(10): 1045-1053.
- [16] RUOXIN W, XUEJIE C, FANG W, et al. Infectious native valve endocarditis by Streptococcus agalactiae species: case report of pathogen identification only through metagenomic sequencing technology [J]. *Medicine*, 2022, 101(27): e29360.
- [17] CHEN S L. Genomic insights into the distribution and evolution of group B Streptococcus [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1447.
- [18] MCGEE L, CHOCHUA S, LI Z, et al. Multistate, population-based distributions of candidate vaccine targets, clonal complexes, and resistance features of invasive group B Streptococci within the United States, 2015-2017 [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 72(6): 1004-1013.
- [19] COLLIN S M, GROVES N, O'SULLIVAN C, et al. Uncovering infant group B Streptococcal (GBS) disease clusters in the United Kingdom and Ireland through genomic analysis: a population-based epidemiological study [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 72(9): e296-e302.
- [20] MEEHAN M, EOGAN M, MCCALLION N, et al. Genomic epidemiology of group B Streptococci spanning 10 years in an Irish maternity hospital, 2008-2017 [J]. *J Infect*, 2021, 83(1): 37-45.
- [21] BIANCHI-JASSIR F, PAUL P, TO K N, et al. Systematic review of group B Streptococcal capsular types, sequence types and surface proteins as potential vaccine candidates [J]. *Vaccine*, 2020, 38(43): 6682-6694.
- [22] BELLAIS S, SIX A, FOUET A, et al. Capsular switching in group B Streptococcus CC17 hypervirulent clone: a future challenge for polysaccharide vaccine development [J]. *J Infect Dis*, 2012, 206(11): 1745-1752.
- [23] DA CUNHA V, DAVIES M R, DOUARRE P E, et al. Streptococcus agalactiae clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4544.
- [24] GORI A, HARRISON O B, MLIA E, et al. Pan-GWAS of Streptococcus agalactiae highlights lineage-specific genes associated with virulence and niche adaptation [J]. *mBio*, 2020, 11(3): e00728-20.
- [25] SRINIVASAN V, METCALF B J, KNIPE K M, et al. vanG element insertions within a conserved chromosomal site conferring vancomycin resistance to Streptococcus agalactiae and Streptococcus anginosus [J]. *mBio*, 2014, 5(4): e01386-14.
- [26] ZHOU K, ZHU D, TAO Y, et al. New genetic context of lnu(B) composed of two multi-resistance gene clusters in clinical Streptococcus agalactiae ST-19 strains [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2019, 8: 117.
- [27] XU Z, LU Z, SOTEYOME T, et al. Resistome and virulome study on pathogenic Streptococcus agalactiae Guangzhou-SAG036 [J]. *Microb Pathog*, 2020, 147: 104258.
- [28] RICHARDS V P, VELSKO I M, ALAM T, et al. Population gene introgression and high genome plasticity for the zoonotic pathogen Streptococcus agalactiae [J]. *Mol Biol Evol*, 2019, 36(11): 2572-2590.
- [29] ALMEIDA A, ROSINSKI-CHUPIN I, PLAINVERT C, et al. Parallel evolution of group B Streptococcus hypervirulent clonal complex 17 unveils new pathoadaptive mutations [J]. *mSystems*, 2017, 2(5): e00074-17.
- [30] LIU G, GAO T, ZHONG X, et al. The novel Streptococcal transcriptional regulator XtgS negatively regulates bacterial virulence and directly represses PseP transcription [J]. *Infect Immun*, 2020, 88(10): e00035-20.

- [31] SPENCER B L, DENG L, PATRAS K A, et al. Cas9 contributes to group B Streptococcal colonization and disease [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1930.
- [32] SULLIVAN M J, GOH K G K, ULETT G C. Cellular management of Zinc in group B Streptococcus supports bacterial resistance against metal intoxication and promotes disseminated infection [J]. mSphere, 2021, 6 (3): e00105-21.
- [33] HOOVEN T A, CATOMERIS A J, AKABAS L H, et al. The essential genome of Streptococcus agalactiae [J]. BMC Genomics, 2016, 17: 406.
- [34] HOOVEN T A, CATOMERIS A J, BONAKDAR M, et al. The Streptococcus agalactiae stringent response enhances virulence and persistence in human blood [J]. Infect Immun, 2018, 86(1): e00612-17.
- [35] DAMMANN A N, CHAMBY A B, CATOMERIS A J, et al. Genome-wide fitness analysis of group B Streptococcus in human amniotic fluid reveals a transcription factor that controls multiple virulence traits [J]. PLoS Pathog, 2021, 17(3): e1009116.
- [36] ZHU L, YERRAMILLI P, PRUITT L, et al. Genome-wide assessment of Streptococcus agalactiae genes required for survival in human whole blood and plasma [J]. Infect Immun, 2020, 88(10): e00357-20.
- [37] ZHU L, YERRAMILLI P, PRUITT L, et al. Functional insights into the high-molecular-mass penicillin-binding proteins of Streptococcus agalactiae revealed by gene deletion and transposon mutagenesis analysis [J]. J Bacteriol, 2021, 203(17): e00234-21.
- [38] LIU X, KIMMEY J M, MATARAZZO L, et al. Exploration of bacterial bottlenecks and Streptococcus pneumoniae pathogenesis by CRISPRi-Seq [J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(1): 107-120. e6.

(收稿日期: 2022-09-10 修回日期: 2023-01-07)

• 综 述 •

CRISPR-Cas 技术在病原体核酸检测中的研究进展*

张咪咪¹综述, 刘家云^{1,2△}审校

1. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西咸阳 712000; 2. 第四军医大学西京医院检验科, 陕西西安 710032

摘 要: 规律成簇的间隔短回文重复序列 (CRISPR) 及其相关蛋白 (Cas) 简称 CRISPR-Cas, 是原核生物的一种适应性免疫系统, 因其强大的基因编辑功能及核酸切割活性成为近年来的研究热点。感染性疾病的传统检测方法虽然特异度高, 但存在灵敏度不够高、操作复杂、检测周期长等不足。随着 CRISPR-Cas 系统的发现及深入研究, 目前依赖特异性识别靶标后所激发的 Cas 蛋白“附带切割”活性, 已经开发出多项基于 CRISPR-Cas 的核酸检测方法, 它们高效、简便、快速的优点弥补了传统诊断方法的不足。该文对 CRISPR-Cas 技术及其在感染性疾病核酸检测中的现状进行综述, 旨在为开发更多基于 CRISPR-Cas 技术的检测新方法提供新思路。

关键词: CRISPR-Cas 系统; Cas 蛋白; 附带切割; 感染性疾病; 核酸检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.10.022

中图法分类号: R542.2; R446.5

文章编号: 1673-4130(2023)10-1259-07

文献标志码: A

Research progress of CRISPR-Cas systems in nucleic acid detection of pathogens*

ZHANG Mimi¹, LIU Jiayun^{1,2△}

1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated proteins (Cas), abbreviated as CRISPR-Cas, is an adaptive immune system of prokaryotes. It has become a research hotspot in recent years due to its powerful gene editing function and nucleic acid cleavage activity. Although the traditional detection methods of infectious diseases have high specificity, they are insufficient in lower sensitivity, complicated operation and long turn around time (TAT). With the discovery and in-depth study of CRISPR-Cas system, a number of nucleic acid detection methods based on CRISPR-Cas have been developed, which rely on the activation of Cas protein collateral cleavage activity after specific recognition of the target. They are efficient, simple and rapid, and make up for the shortcomings of traditional diagnostic meth-

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81972026)。

△ 通信作者, E-mail: jiayun@fmmu.edu.cn。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230426.1526.002.html\(2023-04-27\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230426.1526.002.html(2023-04-27))