



CRISPRi高通量的鉴定肺炎链球菌中的必需基因

汇报人：黄媛媛





β -内酰胺类



结合青霉素结合蛋白（是参与细菌细胞壁肽聚糖生物合成的酶,包括转肽酶、羧肽酶、内肽酶）



抑制肺炎链球菌生长

但大多菌株对于 β -内酰胺类的抗性都很高，而且抗药性和毒力因子能在不同菌株中传递。因此，了解如何去调控与鉴定一些新的必需基因与通路就至关重要了。



CRISPR全称为成簇有规律间隔的短回文重复序列，是细菌和古细菌进化出的一种的RNA介导的适应性防御系统来保护有机体免受病毒和质粒的入侵。

CRISPRi：在sgRNA指引下，dCas9（dead Cas9，Cas9蛋白失去DNA剪切活性，但其与sgRNA形成的核糖核蛋白复合物保留了与靶位点特异性结合的能力）能与靶基因结合形成dCas9-sgRNA-DNA复合物，特异性阻止RNA聚合酶与该启动子序列结合或作为转录终止子阻断RNA聚合酶的继续运行。



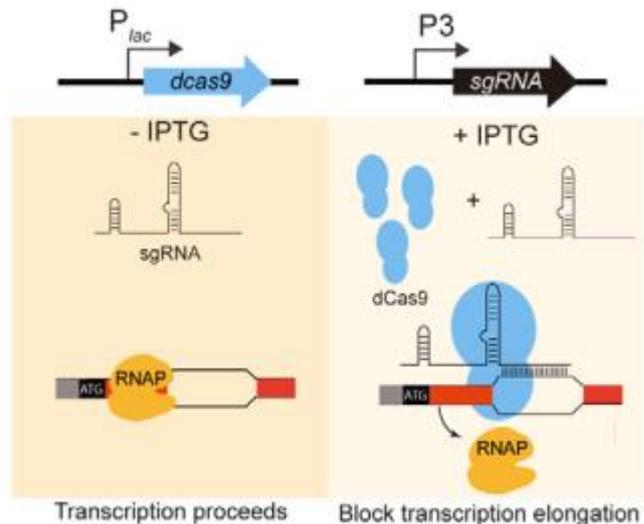
2.1

鉴定肺炎链球菌中的必需基因

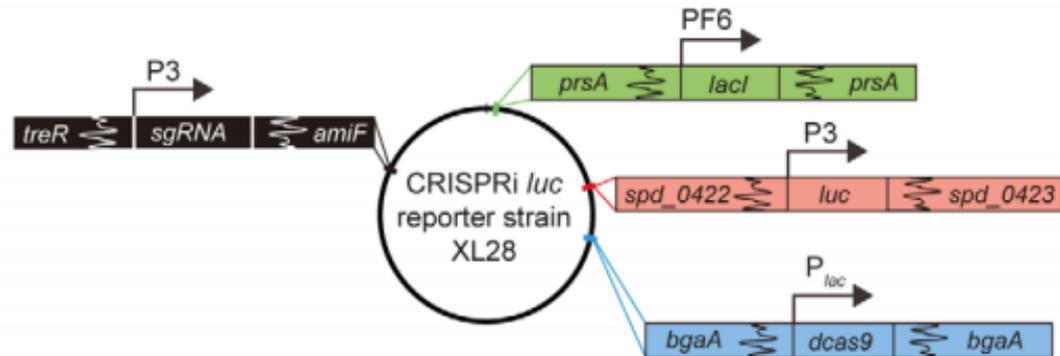
此研究中的必需基因，不仅包括通过Tn-seq发现肺炎链球菌D39中的必需基因，还包括此前TIGR4菌株CRISPRi库中的部分基因。此过程中，得到391个潜在的必需基因。

Tn-Seq是一种通过对复杂的随机转座子插入库的构造，来探索基因功能的实验方法；通过使用新一代的测序技术，对每一个突变的度进行量化。

A

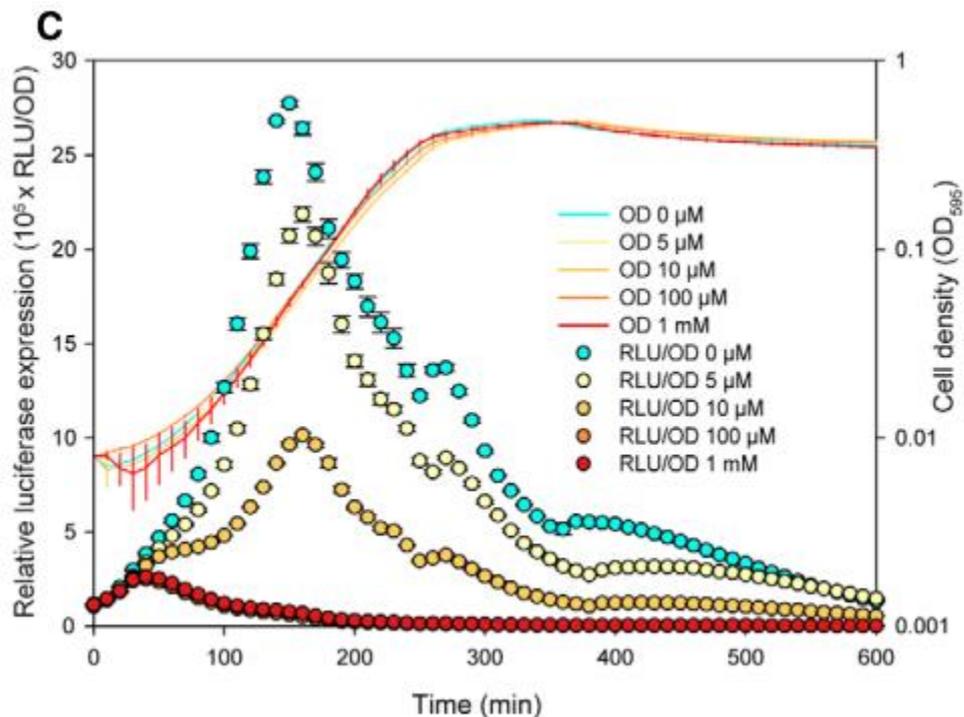


B

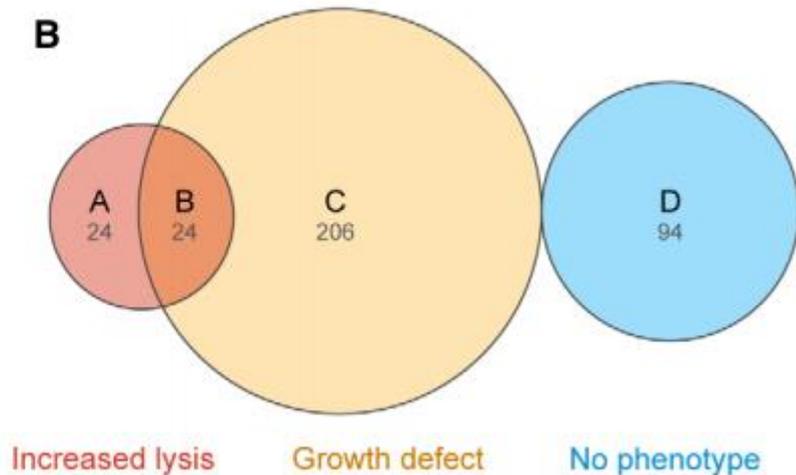
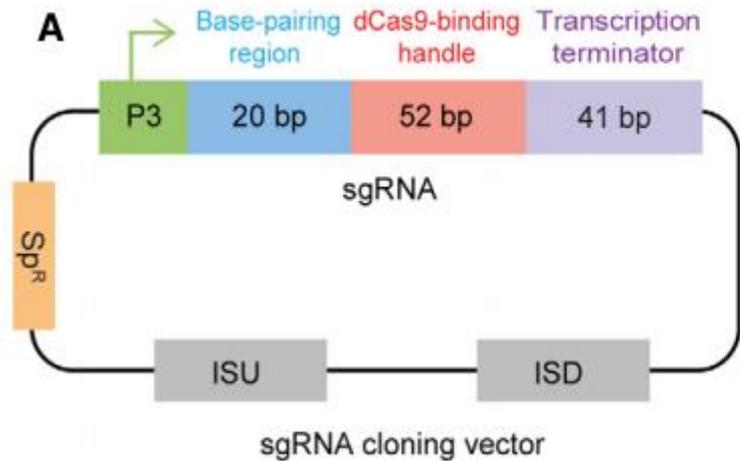


在没有IPTG时，*dcas9*的表达被*lacI*严格压抑；

但在加入了1mM的IPTG后，*dcas9*表达量上调了600倍之多。



在luc指示菌株XL28中测试CRISPRi系统。



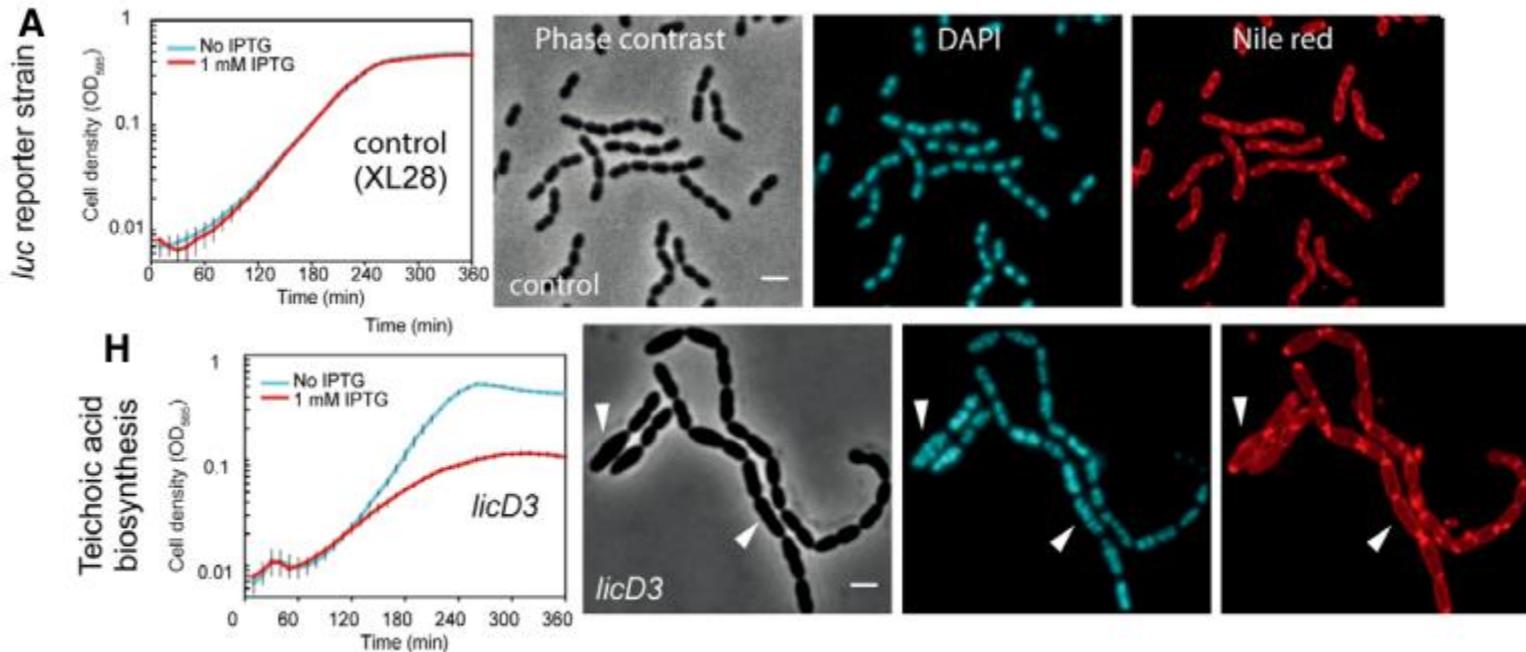
构建了348个基因的sgRNA克隆载体



2.4

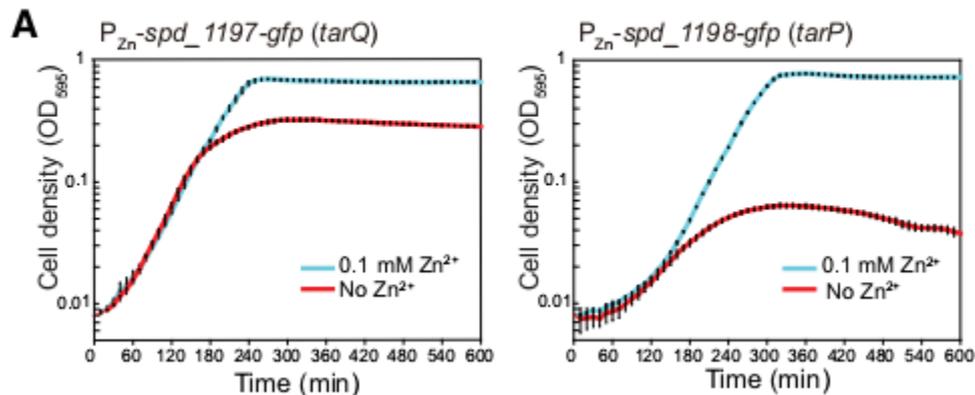
通过CRISPRi结合高通量的显微观察

途径	表型	基因
染色体复制	无核细胞；更长的细胞链；染色体分布不均匀；细胞形态各异	dnaA (SPD_0001), gyrB (SPD_0709) 等
转录	无明显的形态变化	rpoA (SPD_0218) 等
翻译	染色质凝结；短细胞；细胞形态各异	rpsJ (SPD_0192), rplD (SPD_0194) 等
细胞膜合成	膜斑点着色；细胞大小，形态各异	cdsA (SPD_0244), fabK (SPD_0382) 等
细胞分裂	细胞隔膜缺损；细胞链扭曲	ftsZ (SPD_1479) 等
荚膜合成	细胞聚集；细胞形态各异	cps2E (SPD_0319) 等
肽聚糖合成	菌棒转变；细胞加长或增大；隔膜缺陷	pbp2X (SPD_0306) 等
磷壁酸合成	更长的细胞链；细胞更长或更大	licD3 (SPD_1201) 等

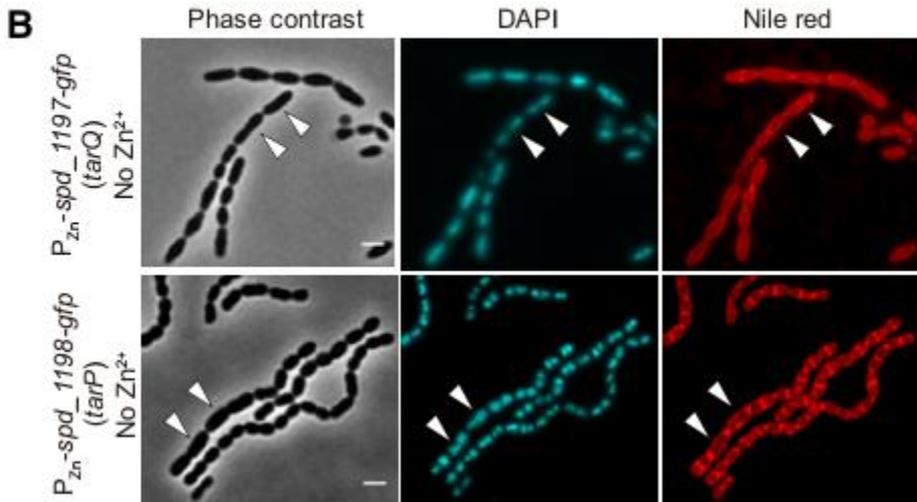




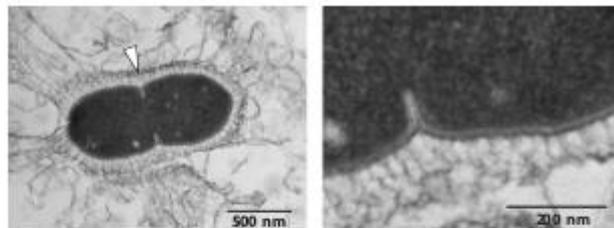
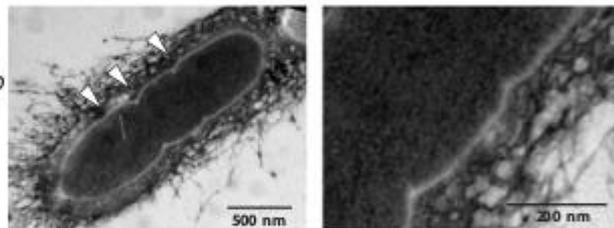
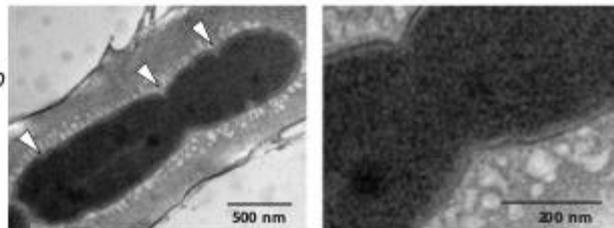
spd_0827与枯草芽孢杆菌中的起始控制蛋白YabA的序列相似性为33% (YabA与DnaN, DnaA一同作用, 是复制起始的负调节因子) 我们将spd_0827命名为YabA。研究发现与野生型相比, yabA缺失的生长率明显降低, 且细胞链更长, 无核的频率更高。为了测试肺炎链球菌中的YabA是否是DNA复制起始的负调节因子, 我们做了一个实时定量PCR (qPCR) 测定DyabA的oriC-ter比。结果表明它与枯草芽孢杆菌中YabA的功能类似。

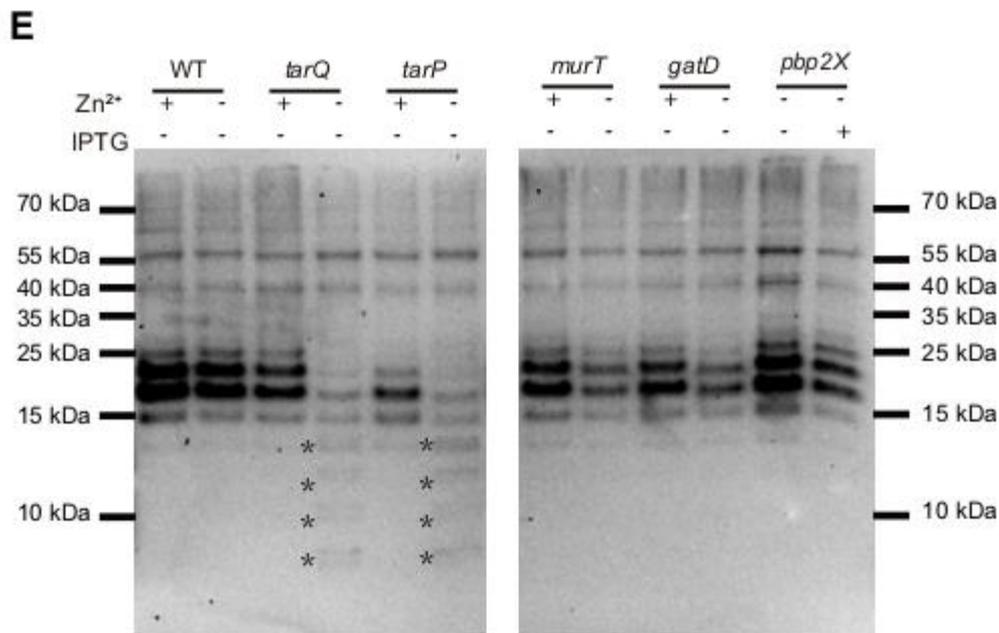


我们制成Zn²⁺-诱导的C末端融合GFP的spd₁₁₉₇和spd₁₁₉₈，并将其整合到bgaA位点上，随之在Zn²⁺的存在时敲除spd₁₁₉₇和spd₁₁₉₈。分析显示Zn²⁺缺乏时会出现强烈地生长障碍，进一步说明其为必需基因。

**C**

wild-type D39

 P_{Zn}^{-} -spd_1197-gfp
(tarQ)
No Zn²⁺ P_{Zn}^{-} -spd_1198-gfp
(tarP)
No Zn²⁺



免疫印迹法检测是否存在磷脂酰胆碱

Zn²⁺不影响D39野生型菌株TA的合成，四个主要TA带清晰可见，相反，*spd_1197*和*spd_1198*的缺失会出现不同的外形，介于15和25 kDa间的4个TA条带缺失或更弱。而聚糖合成的相关基因(*murT*, *gatD*, *pbp2x*)受抑会使得4个TA条带更弱，但并不改变其图形。说明*spd_1197*和*spd_1198*是合成TA所必需的。



主要结论: 利用IPTG诱导的CRISPRi系统研究肺炎链球菌中的必需基因, 对经CRISPRi处理的348个潜在必需基因经生长分析后发现, 其中73%的单个基因受抑会影响其生长。

启发: CRISPRi较更为常见的RNAi来说, 脱靶几率小得多, 在研究转录活动而不是RNA产物时, CRISPRi更有优势。

存在的问题: 某些基因可能未被CRISPRi很好的抑制显示其表型(某些蛋白只要几个分子就能生长)。有以下可能, sgRNA的目标PAM位点距离转录起始位点太远所造成的; sgRNA-dcas9复合物相对目标DNA很少时。



Thank you!