

研究报告

临床分离志贺菌中 CRISPR/Cas 系统的分布及其与毒力基因的关系

郭向娇¹ 王颖芳² 段广才^{1,3*} 王琳琳¹ 王鹏飞¹ 杨海燕¹ 郝园林¹

(1. 郑州大学 公共卫生学院流行病与卫生统计学系 河南 郑州 450001)

(2. 河南科技大学 预防医学教研室 河南 洛阳 471023)

(3. 新乡医学院分子诊断与医学检验技术河南省协同创新中心 河南 新乡 453003)

摘要:【目的】了解临床分离志贺菌中 CRISPR/Cas 系统的分布特征并分析其与毒力基因的关系。【方法】以聚合酶链式反应(PCR)方法,采用 10 对引物分别对 57 株临床分离志贺菌中 CRISPR1、*cas2-cas1*、*cas6e-cas5*、*cas7*、*cse2*、*cse1-cas3* 基因和毒力基因 *ipaH*、*ial*、*ipaBCD*、*virA* 进行检测。对 CRISPR1 的 PCR 结果进行测序,并用 CRISPR finder 在线软件对 CRISPR1 基因座进行分析。通过卡方检验初步分析 CRISPR/Cas 系统与毒力基因的关系。【结果】测序结果显示,CRISPR1 基因座中间隔序列数目较少且在不同菌株间一致性较高;57 株志贺菌中,84.2% (48/57)的志贺菌中可检测到 CRISPR/Cas 系统,其中 68.8% (33/48)的志贺菌中 *cas6e-cas5* 基因或(和) *cse2* 基因中发现插入序列;毒力基因 *ipaH*、*ial*、*virA*、*ipaBCD* 的检出率依次为 100%、100%、98.2%和 87.7%;毒力基因 *ipaBCD* 的阳性率与活性 CRISPR/Cas 系统的分布无关($P>0.05$)。【结论】CRISPR/Cas 系统广泛存在于临床分离志贺菌中;部分 *cas* 基因中有插入序列;并未发现志贺菌中活性 CRISPR/Cas 系统与毒力基因的分布有关。

关键词: 志贺菌, CRISPR/Cas 系统, 聚合酶链式反应, 插入序列, 毒力基因

Distribution of CRISPR/Cas system in *Shigella* clinical strains and its relationship with virulence genesGUO Xiang-Jiao¹ WANG Ying-Fang² DUAN Guang-Cai^{1,3*} WANG Lin-Lin¹
WANG Peng-Fei¹ YANG Hai-Yan¹ XI Yuan-Lin¹

(1. Department of Epidemiology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China)

(2. Department of Preventive Medicine, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

(3. Henan Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: [Objective] To detect the distribution of CRISPR/Cas system in *Shigella* clinical strains and to analyze the relationship between CRISPR/Cas system and virulence genes. [Methods] We

基金项目: 国家科技重大专项项目(No. 2013ZX10004607)

*通讯作者: Tel: 86-371-67781964; 信箱: gcduan@zzu.edu.cn

收稿日期: 2014-07-07; 接受日期: 2014-09-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-09-23

used 10 pairs of primers of PCR assay for detection of the CRISPR/Cas system including CRISPR1, *cas2-cas1* genes, *cas6e-cas5* genes, *cas7* gene, *cse2* gene, *cse1-cas3* genes and virulence genes including *ipaH*, *ial*, *ipaBCD*, *virA* in 57 *Shigella* strains. The CRISPR sequences were analyzed using CRISPR finder. The relativity between the presence of CRISPR/Cas system and virulence gene was analyzed by χ^2 -test. **[Results]** Among the 57 strains of *Shigella*, the number of spacers is little and its sequences have similarity among different strains. The positive rate of CRISPR/Cas system is 84.2%. However, 68.8% of *Shigella* strains analyzed contained insertion sequences in *cse2* gene or *cas6e-cas5* gene. The positive rates of *ipaH*, *ial*, *virA* and *ipaBCD* is 100%, 100%, 98.2% and 87.7%, respectively. No statistical difference was found between the distribution of active-CRISPR/Cas system and the *ipaBCD* gene. **[Conclusion]** CRISPR/Cas system was widely distributed in *Shigella* clinical strains. Insertion sequences were presented in some strains. Our analysis of CRISPR/Cas system did not reveal a potential link between its presence and the virulence genes in *Shigella* clinical isolates.

Keywords: *Shigella*, CRISPR/Cas system, PCR, Insertion sequence, Virulence gene

由志贺菌引起的细菌性痢疾是发展中国家的常见病和多发病, 严重危害人类尤其是儿童的健康。志贺菌的致病性主要取决于毒力基因的编码产物对肠粘膜上皮细胞的侵袭及毒性作用, 所以毒力基因的存在与否是决定细菌致病性高低的关键因素。志贺菌的多个毒力因子与细菌的基因水平转移有关。因此如果能够阐明志贺菌毒力基因水平转移的方式和机制, 对于志贺菌毒力变异的检测 and 有效控制将具有重要意义。

成簇的规律间隔的短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)与 CRISPR 相关蛋白(CRISPR-associated, Cas)一起是近年来发现的细菌处理噬菌体等外源遗传物质的原核生物免疫系统^[1-3]。由于 CRISPR/Cas 系统对于细菌遗传物质的获得和整合具有重要作用, 因此受到学者们的极大关注。目前已在很多细菌基因组中发现 CRISPR 基因座(Locus), 其中古菌詹氏甲烷球菌(*Methanocaldococcus jannaschii*)所含的 CRISPR 基因座数目高达 18 个, 而且不同 CRISPR 基因座其重复序列并不是保守的^[4-5]。目前学者通过对基因库中已进行全基因组测序的志贺菌分析发现 志贺菌最多存在 3 个 CRISPR 基因座, 根据其所在位置的不同将其分别命名为 CRISPR1-3, 其中 CRISPR1 和 CRISPR2 含有相同的重复序列, CRISPR3 含有与其不同的重复序列, 但仅有 CRISPR1 临近 *cas* 基因簇, 可形成完整的

CRISPR/Cas 系统, 即 I-E 型 CRISPR/Cas 系统^[6]。本课题组前期已进行 CRISPR/Cas 系统的检测^[7], 在此基础上, 本研究探讨 CRISPR/Cas 系统在志贺菌中的分布情况, 并初步分析该系统与毒力基因的关系, 或许能为高毒力志贺菌的防控提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 菌株

所选 57 株志贺菌均为本实验室采集, 于 1996-2008 年分离于河南及江西临床病人。所有菌株均经过生化与血清学鉴定: 包括 43 株福氏志贺菌、12 株宋内志贺菌株及 2 株痢疾志贺菌。

NCBI 公布的全基因组测序的志贺菌 CRISPR/Cas 系统的简要介绍^[6]: 宋内志贺菌 *Ss046* 含有 CRISPR1 基因座和 *cas* 基因簇(*cas3-cse1-cse2-cas7-cas5-cas6e-cas1-cas2*), 但其 *cas6e-cas5* 基因及 *cse2* 基因中存在插入序列 ISSf12 和 IS600; 痢疾杆菌 *sd197* 虽然含有 CRISPR1, 但所含 *cas* 基因不完整; 鲍氏志贺菌 *sb227* 只可检测到不完整的 *cas* 基因簇; 4 株福氏志贺菌 *sf301*、*sf8401*、*sf2002017* 和 *sf2457T* 中仅可检测到部分 *cas3* 基因和一条重复序列。这为我们分析 CRISPR/Cas 系统提供依据。

1.2 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自上海莱峰生

物有限公司, *Taq* DNA 聚合酶以及 DNA Marker 购自上海生工生物工程技术有限公司, 琼脂糖为 BOWEST 公司进口分装。

1.3 主要设备

PTC-100 型基因体外扩增仪, MJRESEARCH 公司; DYY-8C 型稳压稳流定时电泳仪, 北京六一仪器厂; Genesnap 图像扫描仪, 美国 Syngene 公司。

1.4 CRISPR1 基因座及 *cas* 基因的 PCR 检测

1.4.1 DNA 模板的制备: 采用基因组 DNA 试剂盒从菌液中提取全基因组 DNA。

1.4.2 引物序列: 用于扩增 CRISPR1 基因座及其 *cas* 基因的引物序列见表 1, 所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4.3 PCR 反应体系及反应条件: PCR 反应体系: 共

50 μ L, 10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ L, dNTPs (100 μ mol/L) 1.5 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 DNA (0.2 g/L) 4 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 1 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 60 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 1 kb/min, 共 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。CRISPR 退火温度为 56 $^{\circ}$ C。取 5%扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳并观察记录结果。

1.5 志贺菌 CRISPR1 测序

将 CRISPR1 的 PCR 扩增产物交由上海生工生物工程技术有限公司测序。测序结果通过 CRISPR finder 在线软件进行 CRISPR1 信息的查询。

1.6 志贺菌毒力基因检测

参照文献[8-10]设计毒力基因 *ipaH*、*ial*、*virA* 和 *ipaBCD* 引物, 序列见表 2, 由上海生工生物工程技

表 1 志贺菌中扩增 CRISPR1 基因座及 <i>cas</i> 基因所用引物序列			
Table 1 PCR primers and products for detection of CRISPR1 locus and <i>cas</i> gene of <i>Shigella</i>			
基因	引物	引物序列	PCR 扩增产物长度
Gene	Primer	Primer sequence (5'→3')	The length of PCR product (kb)
CRISPR1	CR1 fw	AGCGACTAACTGGAATCTTG	0.7
	CR1 rev	CAATCTGGCTACTGGAAGTG	
<i>cas2-cas1</i>	<i>cas2</i> fw	CCCATCCAAATCCACCGGAA	~1.0
	<i>cas1</i> rev	CGCCTGCATTATGCTCGAAC	
<i>cas6-cas5</i>	<i>cas6</i> fw	TTGCTGTTGTCGGTAGGCAT	~2.6/1.3
	<i>cas5</i> rev	ATGAACTTCCTTCGCGCTCA	
<i>cas7</i>	<i>cas7</i> fw	CACGTCCTTCATGCTTCCCT	~1.0
	<i>cas7</i> rev	AACTGTGGTGCTGGATGGAG	
<i>cse2</i>	<i>cse2</i> fw	GCCCAGCGGATACGGATAAA	~1.6/0.4
	<i>cse2</i> rev	ACGGATGGATTTCGCCTGTT	
<i>cse1-cas3</i>	<i>cse1</i> fw	TTTCTCCCTGGCGGCTTTAG	~2.6
	<i>cas3</i> rev	GTCATTCCTGCTTCCAGCCT	

表 2 志贺菌中扩增毒力相关基因所用引物序列			
Table 2 PCR primers and products for detection of virulence genes of <i>Shigella</i>			
基因	引物	引物序列	PCR 扩增产物长度
Genes	Primers	Primer sequences (5'→3')	The length of PCR products (bp)
<i>ipaH</i>	<i>ipaH</i> fw	TGGAAAACTCAGTGCCTCT	423
	<i>ipaH</i> rev	CCAGTCCGTAAATTCATTCT	
<i>ial</i>	<i>ial</i> fw	CTGGATGGTATGGTGAGG	320
	<i>ial</i> rev	GGAGGCCAACAATTATTTCC	
<i>virA</i>	<i>virA</i> fw	CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACATC	215
	<i>virA</i> rev	TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC	
<i>ipaBCD</i>	<i>ipaBCD</i> fw	GCTATAGCAGTGACATGG	612
	<i>ipaBCD</i> rev	ACGAGTTCTGAAGCACTC	

服务有限公司合成。所选 4 种毒力基因中除 *ipaH* 基因在质粒和染色体上均有存在外, *ial*、*virA* 以及 *ipaBCD* 基因仅在质粒上存在。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件进行卡方检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 CRISPR1 基因座以及 *cas* 基因的 PCR 扩增结果

对 57 株志贺菌菌株的 CRISPR1、*cas2-cas1*、*cas6-cas5*、*cas7*、*cse2* 和 *cse1-cas3* 基因进行 PCR 扩增, 以菌株 *mel-sf2006242/zz* (A) 和 *mel-sf2008123/zz* (B) 为例 (图 1) 说明 PCR 扩增结果。菌株 *mel-sf2006242/zz* 的 *cas6-cas5* 以及 *cse2* 的基因片

段长度较菌株 *mel-sf2008123/zz* 明显更长, 说明菌株 *mel-sf2006242/zz* 这两个基因片段中含有插入序列。

2.2 志贺菌毒力基因 *ipaH*、*ial*、*virA* 及 *ipaBCD* 的 PCR 扩增结果

志贺菌毒力基因的 PCR 扩增结果见图 2。毒力基因 *ipaH* 以及 *ial* 在所有志贺菌中均可检测到, *virA* 基因的阳性率为 98.2% (56/57); *ipaBCD* 基因的阳性率为 87.7% (50/57)。

2.3 CRISPR1 测序结果分析

对志贺菌 CRISPR1 的 PCR 扩增结果进行测序, 并通过 CRISPR finder 软件对测序结果进行分析, 结果显示有 48 株志贺菌可以检测到重复序列和间隔序列, 其余 9 株细菌仅含有部分 *cas3* 基因和一条重复序列。

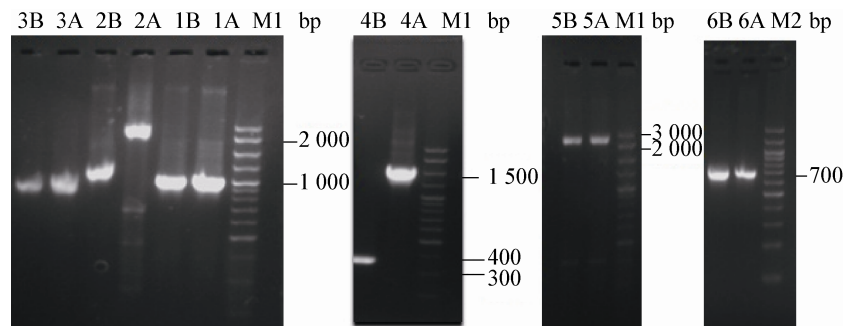


图 1 志贺菌中 CRISPR1 及 *cas* 基因的电泳结果

Figure 1 The electrophoresis results of CRISPR1 and *cas* genes

注: M1: DL3000 marker; M2: 100 bp DNA ladder marker. A 和 B 分别代表菌株 *mel-sf2006242/zz* 和 *mel-sf2008123/zz* 的 PCR 扩增产物。1A, 1B: *cas2-cas1*; 2A, 2B: *cas6-cas5*; 3A, 3B: *cas7*; 4A, 4B: *cse2*; 5A, 5B: *cse1-cas3*; 6A, 6B: CRISPR1。

Note: M1: DL3000 marker; M2: 100 bp DNA ladder marker. A and B represent the PCR product of the strains *mel-sf2006242/zz* and *mel-sf2008123/zz*, respectively. 1A, 1B: *cas2-cas1*; 2A, 2B: *cas6-cas5*; 3A, 3B: *cas7*; 4A, 4B: *cse2*; 5A, 5B: *cse1-cas3*; 6A, 6B: CRISPR1.

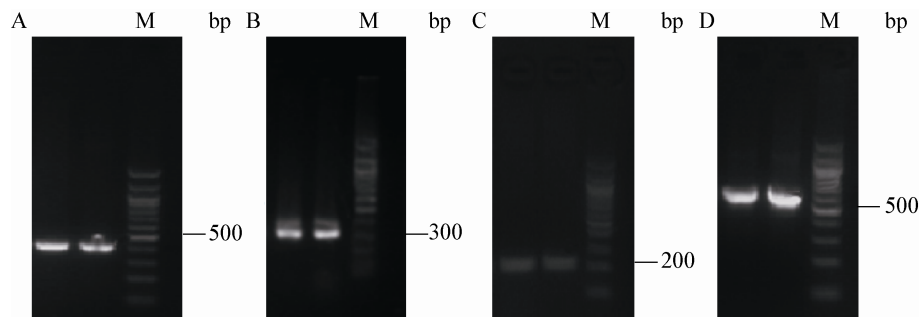


图 2 志贺菌中毒力基因的电泳结果

Figure 2 The electrophoresis results of virulence genes

Note: M: 100 bp DNA ladder marker. A: *ipaH*; B: *ial*; C: *virA*; D: *ipaBCD*.

志贺菌 CRISPR1 基因座中间隔序列数目最多有 9 条，但大部分菌株只含有 2 或 3 条间隔序列。本研究共发现了 15 条特异的间隔序列，将其分别编号为*1-15，通过分析可得到结果如表 3 所示：重复序列数为 1 的全为福氏志贺菌(9 株) ,重复序列序列数目为 3 的 30 株志贺菌，不论其血清型为福氏志贺菌(23 株)还是宋内志贺菌(7 株)其间隔序列(*1 和*2)是完全相同的；在重复序列数目为 4 的 16 株菌株中，有 13 株不论其血清型为福氏志贺菌(10 株)、宋内志贺菌(2 株)还是痢疾志贺菌(1 株)其间隔序列(*1、*3 和*4)是完全相同的，另 3 株包括 2 株宋内志贺菌和 1 株痢疾志贺菌其间隔序列(*1、*5 和*6)也保持一致；仅有 1 株福氏志贺菌可检测到 9 个间隔序列(*7-*15)。

2.4 CRISPR/Cas 系统在志贺菌不同血清型中的分布

根据 *cas* 基因的 PCR 扩增结果及 CRISPR1 的

测序结果，我们将 *cas* 基因中含有插入序列的称为失活 CRISPR/Cas 系统(Inactive-CRISPR/Cas)；*cas* 基因中不含插入序列的为活性 CRISPR/Cas 系统(Active-CRISPR/Cas)；其余则为 CRISPR/Cas 系统缺失(Absent-CRISPR/Cas)。比较分析 CRISPR/Cas 系统在志贺菌不同血清型中的分布显示(表 4)：57 株志贺菌中，CRISPR/Cas 系统总的检出率较高，为 84.2% (48/57)，但活性 CRISPR/Cas 系统的检出率较低，仅为 26.3% (15/57)；只在福氏志贺菌中发现 CRISPR/Cas 系统的缺失。

2.5 志贺菌毒力基因的分布及其与 CRISPR/Cas 系统的关系

由于所检测的 4 种毒力基因中 *ipaH*、*ial* 及 *virA* 的阳性率非常高，因此分析了 CRISPR/Cas 系统与毒力基因 *ipaBCD* 的关系，结果如表 5 所示：志贺菌中活性 CRISPR/Cas 系统的分布与 *ipaBCD* 的检出率无关($P>0.05$)。

表 3 57 株临床分离志贺菌中 CRISPR1 信息					
Table 3 The information of CRISPR1 in 57 clinical strains of <i>Shigella</i>					
重复序列数目 Number of repeats	间隔序列 Spacers	福氏志贺菌 <i>S. flexneri</i>	宋内志贺菌 <i>S. sonnei</i>	痢疾志贺菌 <i>S. dysenteriae</i>	合计 Total
1	—	9	0	0	9
3	*1, *2	23	7	0	30
4	*1, *3, *4	10	3	1	14
4	*1, *5, *6	0	2	1	3
10	*7-*15	1	0	0	1

Note: *1: TTACTGCTTGGTATGCGGAATCACACCCTGAA; *2: TAAGTGATATCCATCATCGCATCCAGTGCGCC; *3: TGTACGCGGCGAGTTTATAGCGACAGGTCATCC; *4: GGGGCGATCAATTGAGCCGTACTTTTCTGAAA; *5: CCTGACGCGCCGAGTATTTATCTGCTCTGGC; *6: GGGTGCGTGTGGCTGCCAGTGCCGAGAACGG; *7: AAAACCAAACCTCTCCATAAATCCATAGCCG; *8: GAGTCTATCAGCGACACTACCGCAATAGCGA; *9: CTATAGCGCCAC GTTCCGAGCGCTGCGAGCTG; *10: GCATCCATGCCGACGCCTTACGTGTGCGGGG; *11: GCGCAATTTGTGCGCATGGGGCGCATTTTGTG; *12: ACGATGGCGATGCGTGAGAAAGGGGGTCGATA; *13: AGTTCGCTGAGTAGCCTTTTTTCTGTGCCTAA; *14: GAGGTGGCAATACGCGTAGATCATTTGGTCGT; *15: CAAAATATTACGAGCTTTCGTCAGGCCATGGAC.

表 4 CRISPR/Cas 系统在不同血清型志贺菌中的分布(株)				
Table 4 The distribution of CRISPR/Cas system in different serotype of <i>Shigella</i>				
Group	福氏志贺菌 <i>S. flexneri</i>	宋内志贺菌 <i>S. sonnei</i>	痢疾志贺菌 <i>S. dysenteriae</i>	合计 Total
Active-CRISPR/Cas	9	5	1	15
Inactive-CRISPR/Cas	25	7	1	33
Absent-CRISPR/Cas	9	0	0	9
Total	43	12	2	57

表 5 不同组别志贺菌与毒力基因 *ipaBCD* 的关联性分析
Table 5 The relationship between *ipaBCD* and the different group of *Shigella* strains

Group	<i>ipaBCD</i> +	<i>ipaBCD</i> -	Chi-square	<i>P</i> -value
Absent and inactive-CRISPR/Cas	39	3	2.308	0.129
Active-CRISPR/Cas	11	4		
Total	50	7		

3 讨论

CRISPR/Cas 系统是近年来发现的细菌处理噬菌体、质粒等外源遗传物质的原核生物免疫系统^[1-3]。本研究首次分析了临床分离志贺菌中 CRISPR/Cas 系统的分布情况,并初步探讨了该系统与毒力基因的关系。

本研究发现 CRISPR1 基因座中间隔序列的数目较少且一致性较高:重复序列数目为 1 的全为福氏志贺菌(9 株);重复序列数目为 3 的 30 株志贺菌,不论其血清型为福氏志贺菌(23 株)还是宋内志贺菌(7 株)其间隔序列是完全相同的;在重复序列数目为 4 的 16 株菌株中,有 13 株不论其血清型为福氏志贺菌(10 株)、宋内志贺菌(2 株)还是痢疾志贺菌(1 株)其间隔序列是完全相同的,另 3 株包括 2 株宋内志贺菌和 1 株痢疾志贺菌其间隔序列也保持一致,仅有 1 株福氏志贺菌可检测到 9 个间隔序列。部分福氏志贺菌中出现了间隔序列的完全缺失可能是由于福氏志贺菌含有丰富的可移动遗传物质以及假基因^[11],而 CRISPR/Cas 系统的功能之一为阻断可移动遗传物质的转移。间隔序列在不同菌株间的一致性可能是由于本实验所用大部分菌株均分离自河南省,相同的生活环境导致它们的间隔序列较一致。有研究表明 *cas* 基因的活性与间隔序列数目有关^[6],这与本研究一致:*cas* 基因中含有插入序列的大部分菌株其间隔序列数目较少。另外我们推测 *cas* 基因中的插入序列可能晚于 CRISPR/Cas 系统出现,其出现可能是由于高毒力或(和)高耐药环境下志贺菌不得不使 CRISPR/Cas 系统失活的一种方式,这样志贺菌就能获得更多的毒力或耐药特征,从而更利于其生存。

另外我们分析了志贺菌中 CRISPR/Cas 系统与毒力基因的关系,结果显示志贺菌中活性 CRISPR/Cas 系统的存在与所检测毒力基因的分布无关。我们推测原因之一可能是本研究所检测毒力基因的阳性率均较高,其中检出率最低的 *ipaBCD* 基因也达到 87.7%;另外样本量较小可能也是一个重要原因。因为研究者已发现 CRISPR/Cas 系统干扰可以阻挡质粒结合以及转移^[12]。而且在其他致病菌中,学者还发现 CRISPR/Cas 系统与毒力基因或耐药基因的分布呈负相关。例如在肠球菌(*Enterococci*)中,具有多重耐药特征的菌株通常缺失 CRISPR/Cas 系统^[13]。相似的情况出现在粪肠球菌(*E. faecalis*)中,CRISPR/Cas 系统的分布与编码乳糖操纵子(Cytolysin operon)和粘附素(Aggregation substance, AS)的基因呈负相关,由于乳糖操纵子基因以及粘附素基因均位于毒力岛上,因此他们推测该系统在毒力岛的获得中具有重要作用^[14]。更重要的是,在肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中,学者通过实验发现 CRISPR/Cas 系统干扰可以有效阻断含有荚膜基因的质粒进入无毒菌株,从而避免了不含荚膜基因的无毒菌株转化为含荚膜基因的有毒菌株,从而抑制毒力株的出现^[15]。因此,为了更好地理解志贺菌中 CRISPR/Cas 系统与毒力基因的关系,今后应该注重扩大研究所需样本量并且更多的关注存在于质粒上的其他毒力基因。

由于 CRISPR/Cas 系统可以阻挡基因的水平转移,因此该系统或许为今后高毒力志贺菌的防控提供新的思路。本研究探讨了临床分离志贺菌中 CRISPR/Cas 系统的分布特征,但并未发现 CRISPR/Cas 系统与毒力基因的分布有关,为今后志贺菌中 CRISPR/Cas 系统的研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes[J]. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712
- [2] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes[J]. *Science*, 2008, 321(5891): 960-964
- [3] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1843-1845
- [4] Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation[J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45: 273-297
- [5] Wang LL, Wang JP. The research progress of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1007-1013 (in Chinese)
王丽丽, 王阶平. 成簇的规律间隔的短回文重复序列 CRISPR 的研究进展[J]. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1007-1013
- [6] Touchon M, Rocha EP. The small, slow and specialized CRISPR and anti-CRISPR of *Escherichia* and *Salmonella*[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11126
- [7] Guo X, Wang Y, Duan G, et al. Detection and analysis of CRISPRs of *Shigella*[J]. *Current Microbiology*, 2014, DOI: 10.1007/s00284-014-0683-8
- [8] Faruque SM, Khan R, Kamruzzaman M, et al. Isolation of *Shigella dysenteriae* type 1 and *S. flexneri* strains from surface waters in Bangladesh: comparative molecular analysis of environmental *Shigella* isolates versus clinical strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3908-3913
- [9] Villalobo E, Torres A. PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1242-1245
- [10] Vargas M, Gascon J, De Anta MTJ, et al. Prevalence of *Shigella* enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(11): 3608-3611
- [11] Yang F, Yang J, Zhang X, et al. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(19): 6445-6458
- [12] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1843-1845
- [13] Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas[J]. *MBio*, 2010, 1(4): e00227-00210
- [14] Lindenstrauß AG, Pavlovic M, Bringmann A, et al. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34(8): 553-560
- [15] Bikard D, Hatoum-Aslan A, Mucida D, et al. CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during *in vivo* bacterial infection[J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12(2): 177-186