

CRISPR-Cas 系统调控细菌生理功能的机制研究进展

张博¹ 姚学萍^{1,2*} 王印^{1,2} 杨泽晓^{1,2} 曹随忠^{1,2} 张鹏飞¹

(1. 四川农业大学动物医学院 四川 成都 611130)

(2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川 成都 611130)

摘要: CRISPR-Cas 系统是存在于部分细菌和绝大部分古细菌中的一种获得性免疫防御系统,使细菌在外源性基因入侵时具有免疫防御能力。此外, CRISPR-Cas 系统对细菌自身生物膜的形成、耐药性、毒力等生理功能都有调控作用,这对于研究人员进行相关研究有着重要意义。本文以细菌 CRISPR-Cas 系统及其发挥免疫防御作用的相关研究为基础展开论述,重点阐述该系统对细菌生理功能的调控作用,并对其应用前景进行了展望,以期为进一步研究细菌耐药性和致病性提供新思路。

关键词: 细菌, CRISPR-Cas 系统, 免疫防御, 生理功能, 调控作用

Advances in the mechanism of CRISPR-Cas system for regulating bacterial physiological function

ZHANG Bo¹ YAO Xue-Ping^{1,2*} WANG Yin^{1,2} YANG Ze-Xiao^{1,2}
CAO Sui-Zhong^{1,2} ZHANG Peng-Fei¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: CRISPR-Cas system is an acquired immune defense system that is found in some bacteria and most of the ancient bacteria. It makes the bacteria immune defense against the invasion of exogenous genes. In addition, CRISPR-Cas system plays a regulatory role in the formation of bacterial biofilm, drug resistance, virulence and other physiological functions, as well as in scientific research. According to this, we discussed the bacterial CRISPR-Cas system and its related research on the immune defense. Moreover, we described the regulatory function of this system in physiological function of bacterial and its future application, to provide a new idea for further study on bacterial resistance and pathogenicity.

Keywords: Bacteria, CRISPR-Cas system, Immune defense, Physiological function, Regulatory effect

Foundation item: Double Project Plan of Discipline Construction of Sichuan Agricultural University (No. 3572070); New Technology Extension Project of Chongqing Higher Vocational and Technical College (No. GZTG201610)

*Corresponding author: E-mail: yaoxueping74@126.com

Received: July 07, 2017; **Accepted:** September 04, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 07, 2017

基金项目: 四川农业大学学科建设双支计划资助项目(No. 3572070); 重庆市高等职业院校新技术推广项目(No. GZTG201610)

*通讯作者: E-mail: yaoxueping74@126.com

收稿日期: 2017-07-07; **接受日期:** 2017-09-04; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-09-07

细菌基因组中规律成簇的间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及附属的蛋白质(Cas)组成了CRISPR-Cas系统^[1]。它的发现,最初源于人们对大肠杆菌 K-12 的酸性磷酸酶基因(*AphA*)进行研究时,发现一段存在于 *AphA* 的编码区附近且由简单重复序列(24–37 bp)组成的特殊 DNA 序列,但当时并没有得到研究者的广泛重视^[2]。随后,相似且广泛存在于细菌和古细菌基因组的结构序列也被研究者们发现,除此之外发现在单个重复序列之间还插入了其他序列,被称之为间隔序列。这种间隔序列片段的长度相似且具有回文结构,这样规律成簇的间隔短回文重复序列被命名为 CRISPR 序列^[3]。该序列及相关的 Cas 蛋白共同组成了存在于细菌和古细菌中的 CRISPR-Cas 系统。当外源 DNA 入侵细菌时,细菌和古细菌识别入侵的 DNA 后,以 CRISPR 序列为模板转录出 RNA 来阻止外源 DNA 的入侵。间隔序列可以识别并结合特定的噬菌体 DNA 序列,Cas 核酸酶将入侵的 DNA 进行切割使其降解,因此称为细菌的获得性免疫防御^[4]。

1 细菌 CRISPR-Cas 系统的基本结构

CRISPR-Cas 系统是一段特殊的 DNA 重复序列,主要由用于切割目的基因的 *cas* 基因组成,其中 *cas* 基因又分为 *cas1*、*cas2*、*cas9* 等多种基因类型以及用于识别特异序列的识别序列组成。识别序列中包含了前导序列(Leader)、重复序列(Direct repeats)、间隔序列(Spacers) (图 1)。CRISPR 序列中,间隔序列将重复序列分割开来形成许多不连续的重复序列,并且大部分的重复序列都有回文结构和稳定的二级结构。因物种之间的差异,CRISPR 序列中重复序列的数量也有所不同^[5]。细菌 CRISPR-Cas 系统广泛分布于基因组的不同区域,但大多数情况下存在于染色体上,仅少数存在于质粒中^[6]。

2 细菌 CRISPR-Cas 系统的结构分型及主要成分的功能

根据 CRISPR-Cas 系统中 *cas* 基因种类的多样性(表 1)以及 Cas 蛋白作用机理的不同,通常将该系统划分为 3 种不同的类型: Type I、Type II 和 Type III。

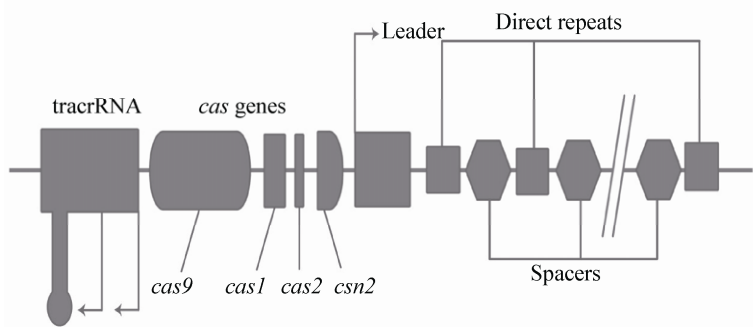


图 1 细菌 CRISPR-Cas 系统结构^[5-6]
Figure 1 Bacteria CRISPR-Cas system structure^[5-6]

表 1 细菌 CRISPR-Cas 系统 Cas 家族分类		
Table 1 The classification of Cas family in bacteria CRISPR-Cas system		
类型 Type	Cas 家族种类 Cas family type	标志基因 Marker gene
I 型 Type I ^[7]	Cse1、Cse2、Cas3、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas6e、Cas6f、Cas8c、Cas8b	<i>cas3</i>
II 型 Type II ^[8-9]	Cas1、Cas2、Csn2、Cas4、Cas9	<i>cas9</i>
III 型 Type III ^[10-11]	Cas6、Cas10、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6	<i>cas6</i> 、 <i>cas10</i>

其中 Type II (CRISPR-Cas9)结构最为简单, 研究最为深入^[12]。

三种类型中, I 型系统比较复杂, 存在于大部分的细菌和古细菌中, 该系统发生作用时需要多种 Cas 蛋白, 其中 Cas3 蛋白在 CRISPR 系统的功能作用中起至关重要的作用。Caseade (CRISPR-associated complex for antiviral defense)-crRNA 复合物在 ATP、二价镁离子的参与下, 外源 DNA 被结合在特定的靶位点, 随后 Cas3 核酸酶将外源 DNA 进行切割, 使其降解^[7]。

III 型 CRISPR 系统主要存在于古细菌中, 系统较为复杂, 主要有 A、B 两种类型, 两种类型均需要多个 Cas 核酸酶才能切割目的 DNA, 此类型 CRISPR 系统中 Cas6 蛋白有重要的作用, 主要参与 crRNA 的成熟, Cas6 核酸酶与 crRNA 结合并识别入侵的 DNA, 将目标 DNA 降解^[10]。

相比 I、III 型 CRISPR-Cas 系统, II 型 CRISPR-Cas 系统发挥免疫防御作用仅需 Cas9 蛋白参与即可, 且易与 I、II 型免疫防御系统区分, *cas9* 基因作为该系统的一个标志性元件, 专一性地与 CRISPR 位点相联系。基于 *cas* 基因的多样性, II 型 CRISPR-Cas 系统又可以进一步细分为 A、B、C 三种类型^[8]。在 C 型 CRISPR 系统中主要有 *cas9*、*cas1* 和 *cas2* 基因以及 CRISPR RNA

(crRNA)和反式激活 crRNA (tracrRNA)。然而在 A 型和 B 型的 CRISPR 系统中还分别有相关的附加信号基因 *csn2* 或是 *cas4*。C 型 CRISPR 系统中的 *cas9* 核酸内切酶行使 DNA 的切割功能; tracrRNA 是一段非蛋白编码 RNA, 作为 CRISPR-Cas9 系统的第二个重要组成成分, crRNA 的成熟以及随后 DNA 的剪切就依靠该结构发挥作用^[9]; crRNA 用于捕获外源 DNA 序列, CRISPR-Cas9 系统中的间隔序列就存在于该结构中。当外源 DNA 进入细菌或古细菌机体内时, 它们会特异性地识别并将外源 DNA 插入到前导序列和重复序列之间。当然外源 DNA 的插入也并不多是随机插入的, 需要间隔序列随后的一段保守核苷酸序列即间隔序列临近基序——PAM (Protospacer adjacent motif)结构帮助 Cas9 确定切割位点, 以便随后的 Cas9 蛋白行使切割、剪切的功能(各成分及功能如表 2 所示), 因此研究中将其改造为人工核酸内切酶基因编辑系统^[13]。

基于此, 我们课题组以广西巴马小型猪为研究载体, 利用 CRISPR-Cas9 为研究工具开展引导 RNA 的筛选, 进行瓦登伯格氏综合症(Waardenburg syndrome, WS)小型猪 MITF (Microphthalmia-associated transcription factor)小眼相关转录基因缺失模型的构建, 构建了一个高效引导 RNA 快

表 2 细菌 CRISPR-Cas 系统主要成分及其功能
Table 2 Main components and their functions of bacteria CRISPR-Cas system

主要成分 Main ingredients	结构特点 Structural features	功能 Functions
Cas3 蛋白 Cas3 Protein	HD 功能域	切割 DNA ^[7]
Cas6 蛋白 Cas6 Protein	PDB、2XLJ	参与 crRNA 的成熟 ^[10,14]
Cas9 蛋白 Cas9 Protein	含 4 种 RuvC 核酸酶和一种 HNH 核酸酶	识别、切割、产生 crRNA ^[15-16]
Cas10 蛋白 Cas10 Protein	聚合酶和环化酶类功能域	切割 ssDNA ^[14]
反式激活 RNA tracrRNA	非蛋白编码的 RNA	促进 crRNA 的成熟 ^[9]
CRISPR 成熟 RNA crRNA	含前导区和一系列重复-间隔-重复序列	捕获外源 DNA ^[9,17]
间隔序列临近基序 PAM	紧随间隔序列后的 NGG 序列	帮助 Cas9 核酸酶确定切割位点 ^[13]
前导序列 Leader	长度 100–500 bp, 不保守, 含转录起始位点	启动 CRISPR 重复序列转录 ^[11]
重复序列 Direct repeats	位于两重复序列间, 来自于噬菌体或质粒	使细菌获得对应噬菌体或质粒的免疫防御能力 ^[18]
间隔序列 Spacers	位于 23–55 bp 之间, 序列多样性呈部分回文对称结构	识别并结合特定的噬菌体 DNA 序列 ^[19-20]

速筛选的平台,实现了大动物中利用 CRISPR-Cas9 进行基因组定点插入进行基因编辑的可行性^[21]。该研究成果也体现了利用 II 型 CRISPR-Cas 系统实现了目的基因特定位点的基因断裂,为该系统用于基因组的定点编辑奠定了基础。

3 细菌 CRISPR-Cas 系统的免疫识别及防御机理

细菌 CRISPR-Cas 系统发挥免疫防御时以 II 型防御系统最为广泛,该系统中 Cas9 核酸酶以向导 RNA 为靶标,然后通过碱基互补配对的方式去识别外源 DNA^[22]。当外源基因进入细菌后,细菌通过识别特异的 PAM 序列,将外源 DNA 加工成大小合适的间隔序列,插入到 CRISPR 序列中。此时 CRISPR 介导免疫需要 crRNA 和 tracrRNA 互补配对,激活 RNase III 和 Csn I,对 CRISPR RNA 进行剪切,使之成为成熟的 crRNA^[17]。Cas9 蛋白包含 4 种 RuvC 核酸酶(RuvC I-IV)和一种 HNH 核酸

酶。RuvC I 和 HNH 核酸酶主要降解目标 DNA。随后 Cas9 识别目标基因中的 PAM 序列,crRNA 识别与 PAM 互补的 DNA 序列。继而,Cas9 蛋白中的核酸酶行使切割功能,导致靶位点的切割,基因组双链断裂^[15-16](图 2)。

相关研究不仅剖析了是否该防御系统会将自身内部基因剪切而降解,还对它是如何识别自己和异己成分的机制进行了研究与分析。Marraffini 等^[23]通过构建表皮葡萄球菌 CRISPR 位点的间隔重复序列以及该序列上下游各 200 个碱基对的 pC194 重组质粒 pCRISPR (wt),而后再转染 CRISPR 缺失型及野生型细胞,结果表明 crRNA 的非间隔序列成分与重复序列的碱基配对不完全或特定位点个别碱基配对失配,可导致 crRNA 干扰细菌自身的基因组。由此可见,crRNA 和 CRISPR DNA 重复序列之间的碱基配对可阻止自身免疫的发生,同时也证明了 crRNAs 介导了细菌对于自己和异己成分的免疫^[24]。

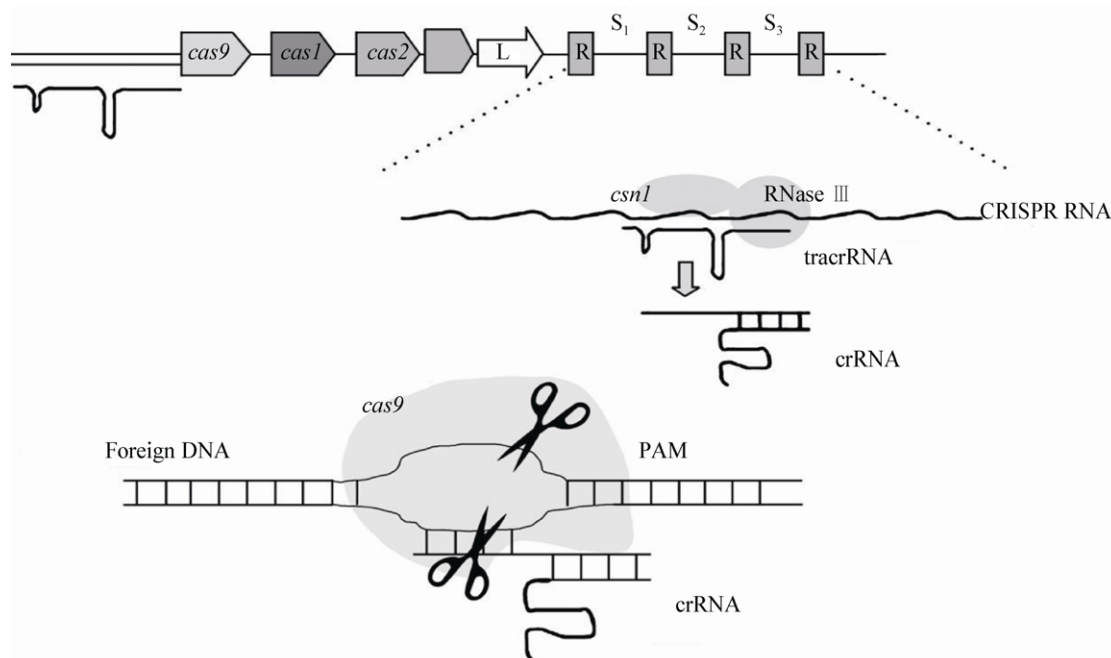


图 2 II 型 CRISPR-Cas 系统免疫防御机制^[15-16]

Figure 2 The immune prevention mechanism of type II CRISPR-Cas system^[15-16]

4 细菌 CRISPR-Cas 系统对细菌生理功能的调控

4.1 细菌 CRISPR-Cas 系统对细菌耐药性的调控作用

细菌耐药性(Resistance to drug)又称抗药性,指细菌对于抗菌药物作用的耐受性,耐药性一旦产生,药物的杀菌作用就明显下降。细菌耐药性的产生大多是由像转座子、质粒等可移动元件的转移获得,编码这些可移动元件的基因作为耐药基因。耐药基因的水平转移(Horizontal gene transfer, HGT)使细菌产生耐药性,也是细菌产生耐药性的主要原因^[25]。细菌 CRISPR 系统赋予了它们对外源入侵基因的获得性免疫防御能力,这种获得性免疫防御作用限制了耐药基因的水平转移,从而使细菌对抗菌药物产生一定的抵抗作用^[26]。

Sampson 等^[27]对弗朗西斯菌所含的 CRISPR-Cas9 系统研究发现,该系统可通过调节该菌的胞膜渗透性使其产生相应耐药性。其他种属细菌中也有很多关于细菌耐药性与 CRISPR-Cas 系统关系的研究,例如对于金黄色葡萄球菌的研究中发现,CRISPR-Cas 系统能够限制细菌耐药基因的水平转移,且有阻止耐药基因在葡萄球菌之间传播的作用^[28];Burley 等^[29]对于粪肠球菌中的 CRISPR 相关的蛋白基因 *cas3*、*cas1* 检测发现,*cas3* 或 *cas1* 的存在与该菌多重耐药的获得关系相反。

不难发现,CRISPR-Cas 系统与某些细菌维持耐药性且稳定存在或遗传有潜在相关性,对细菌耐药性有重要影响作用。基于 CRISPR-Cas 系统耐药性方面的研究,研究者可构建出能表达细菌 CRISPR-Cas 免疫系统的活性质粒,以深入研究细菌耐药基因水平转移。除此之外,若能将表达细菌 CRISPR-Cas 免疫系统的活性质粒通过载体转入细菌中特异性地剪切致病性和耐药性基因,从而选择性地失活细菌的有害基因,一定能对细菌的耐药性研究提供崭新平台^[30]。不仅如此,细菌耐药性研究也应从细菌耐药基因的水平转移方面入

手。刘五高等^[31]基于嗜热链球菌 LMD-9 菌株上有完整的 CRISPR-Cas 系统组件,并有阻止噬菌体和质粒入侵自身系统的功能。利用 PCR 技术分三段扩增嗜热链球菌 LMD-9 的 CRISPR-Cas 基因序列,并依次接入 pACYCDuet-1 质粒,成功构建了细菌 CRISPR-Cas 免疫系统质粒,将该质粒再转入嗜热链球菌,质粒中的 gRNA 就可特异性地剪切致病性和耐药性基因,为今后用于细菌耐药基因水平转移打下了基础。

4.2 细菌 CRISPR-Cas 系统对细菌毒力的调控作用

细菌的毒力是细菌的重要生物学特性,在细菌致病过程中发挥非常重要的作用。细菌的毒力基因可以编码在质粒、致病岛或噬菌体上,如化脓性链球菌、棒状杆菌、肉毒梭菌、霍乱弧菌、链球菌和金黄色葡萄球菌等均含有编码毒力因子的基因^[32]。CRISPR-Cas 系统与细菌的毒力密切相关,且对细菌的毒力有调控作用,相关研究近年来层出不穷。

Nozawa 等^[33]研究发现化脓性链球菌中的 CRISPR-Cas 系统可以使噬菌体毒力基因转入,从而使这些菌株有了相应的致病性。空肠弯曲菌编码 II 型 CRISPR-Cas 系统,在缺失 CRISPR 位点的菌株中表达 Cas9 蛋白能增强细菌毒力,这表明 Cas9 蛋白能独立于 CRISPR 转录子发挥功能。此外,空肠弯曲菌的 Cas9 突变株在感染人源细胞时其运动能力增强,而细胞毒性减弱^[34]。Bikard 等^[35]研究发现 CRISPR-Cas 系统的干扰作用可以阻断人肺炎链球菌体内毒力的获得。因干扰作用的存在导致含有荚膜基因(肺炎链球菌的毒力基因)的质粒进入无毒菌株而受阻,不含荚膜基因的无毒菌株因此不能变为含荚膜基因的有毒菌株,最终抑制了毒力株的出现。CRISPR-Cas 系统也可干扰细菌获取毒力基因,对细菌毒力有双重调控作用,原噬菌体序列与细菌的 CRISPR 间隔序列存在着不兼容性,会相互排斥,CRISPR-Cas 系统此时可在抵

抗毒性噬菌体过程中干扰毒力因子在致病菌之间的传播。噬菌体之间的相互作用也是构成细菌毒力的一个重要因素,噬菌体的感染同时也是细菌具有毒力的重要因素^[36]。

大多数致病菌均含有 CRISPR-Cas 系统,通过对多种致病菌 CRISPR 序列及毒力编码基因的研究,表明尤其以 Type II CRISPR-Cas 系统中的 *cas9* 基因在细菌毒力调节过程中起至关重要的作用^[36]。

目前关于 CRISPR-Cas 系统与致病菌的毒力基因共同进化关系的探究仍有欠缺。因而,本课题组预以四川多地区的弯曲菌分离株为研究对象,针对其所含 CRISPR-Cas 系统、毒力基因的检测并聚类分析与比对,以探究弯曲菌中 CRISPR-Cas 系统与其毒力基因的共同进化关系。相信结合相关研究及实验条件的不断优化能为弯曲菌所含毒力基因与 CRISPR-Cas 系统的共同进化及调控关系提供基础数据。

4.3 细菌 CRISPR-Cas 系统对细菌生物膜形成的调控作用

在生物膜形成方面,CRISPR-Cas 系统通过部分碱基互补配对机制进行基因调控,这一结论在铜绿假单胞菌生物膜形成的研究中得到证实^[37]。Zegans 等^[38]发现噬菌体 DMS3 感染铜绿假单胞菌产生的溶原性细菌无法形成完整的生物膜,还发现其生物膜形成受抑制需要宿主体内 CRISPR 的存在。此外,另有研究表明,CRISPR 特异性插入序列是抑制铜绿假单胞菌生物膜形成所必需的,因该特异性插入序列转录形成反义 RNA,沉默铜绿假单胞菌的生物膜形成基因,从而也就抑制了生物膜的形成^[39]。

生物膜性能的改变会导致细菌膜的渗透性改变,从而会使细菌的毒力、耐药性、致病性都有所改变。可见,CRISPR-Cas 系统对细菌生物膜的形成方面有重要的调节作用。基于此,可以构建表达细菌 CRISPR-Cas 免疫系统的活性质粒转入细菌,特异性地插入参与生物膜形成的序列中而抑制细菌生物膜的形成,以影响其多种性能。

5 结语与展望

综上所述,细菌 CRISPR-Cas 系统在细菌耐药基因水平转移、生物膜形成、致病性调控等方面均具有调控作用。从近几年相关研究成果来看,主要研究方向趋向于 CRISPR-Cas 系统与细菌生理功能的相关性、基于该系统改造的 CRISPR-Cas9 基因组编辑技术的应用与研究。实际上,基于细菌 CRISPR-Cas 系统衍生的基因组编辑技术及生理功能探究,均源于对细菌基因组中 CRISPR 基因(如间隔序列的溯源、CRISPR 序列的插入或缺失)与其毒力、耐药、生物膜形成基因的相关性研究分析,以及人为构建的具有活性的 CRISPR-Cas 质粒转入真核细胞或原核基因组中而实现的基因组定点插入、缺失等。

目前,多数研究所涉及的仍是 CRISPR-Cas 系统衍生的基因组编辑技术在真核细胞领域的研究,如基因治疗、疾病模型构建、植物学研究、昆虫学研究等方面,而在细菌领域内的应用略显匮乏,这或因与细菌所含内源 CRISPR-Cas9 系统的活性不同、外源引入的 CRISPR-Cas9 系统对其宿主的天然免疫防御能力的干扰作用有差异,以及许多细菌本身缺乏 NHEJ (Nonhomologous end joining) 机制或虽存在该机制但不能有效地将经 Cas9 蛋白诱导下断裂的 DNA 双链修复,进而影响到对细菌基因组的编辑等因素有关。但真核细胞领域的研究策略同样能指引研究者在细菌学领域开展相关研究,如进行 CRISPR 抗菌剂、基因抑制、缺失等方面的研究^[40-41]。

随着生物信息学的不断发展,研究者在更多的生物基因组中寻找到了 CRISPR-Cas 系统的存在,而且还做了大量的相关研究。如 Burstein 等^[42]通过对酸性矿井废水中的纳米古生菌的基因组分析发现了新的 CRISPR 系统,该新系统中含有两种新的蛋白 CasY 以及 CasX,研究结果扩充了研究者对于 CRISPR 系统的认知领域;贺金荣等^[43]对鼠疫菌菌株中 CRISPR 位点间遗传多态性进行分析,为鼠疫菌

的起源、传播、进化研究奠定了基础; Zhang 等^[44]利用 CRISPR-Cas9 技术激活链霉菌中沉默的基因簇, 促使细菌细胞制造这些基因簇编码的天然产物, 为实现新型抗菌药物的研发打下基础; 程希等^[45]基于沙门氏菌中的 CRISPR 而建立的一种新型鉴定及显示细菌基因组 CRISPR 的方法, 为搜寻致病菌中 CRISPR 及其它重复序列的相关研究提供了支持。回首诸多研究, 而今研究者可以预见的是随着细菌 CRISPR-Cas 系统研究的不断深入, 必将给研究病原微生物的分类、生物学功能、基因溯源带来新的启发, 以便为更好地应用于筛选与控制耐药菌株、生物医药的研发奠定基础, 应用前景将是大放异彩。

参 考 文 献

- [1] Marchfelder A. Special focus CRISPR-Cas[J]. RNA Biology, 2013, 10(5): 655-658
- [2] Guo SC, Lv Y, Lin YX, et al. CRISPR/Cas9 systems: the next generation gene targeted editing tool[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2015, 85(2): 377-387
- [3] Liu L, Fan XD. CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering[J]. Plant Molecular Biology, 2014, 85(3): 209-218
- [4] Wiedenheft B. In defense of phage: viral suppressors of CRISPR-mediated adaptive immunity in bacteria[J]. RNA Biology, 2013, 10(5): 886-890
- [5] Wei CX, Liu JY, Yu ZS, et al. TALEN or Cas9—rapid, efficient and specific choices for genome modifications[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2013, 40(6): 281-289
- [6] Koonin EV, Makarova KS. CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes[J]. RNA Biology, 2013, 10(5): 679-686
- [7] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096): 816-821
- [8] Banfield JF. CRISPRs in the microbial community context[A]//Barrangou R, van der Oost J. CRISPR-Cas Systems[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013: 287-291
- [9] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. Science, 2014, 343(6166): 84-87
- [10] Staals RHJ, Brouns SJJ. Distribution and mechanism of the type I CRISPR-Cas systems[A]//Barrangou R, van der Oost J. CRISPR-Cas Systems[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013: 145-169
- [11] Pougach KS, Lopatina AV, Severinov KV. CRISPR adaptive immunity systems of prokaryotes[J]. Molecular Biology, 2012, 46(2): 175-182
- [12] Chen YL, Huang HR, Tang PP, et al. Genome editing techniques—CRISPR/Cas system[J]. Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition), 2015, 14(1): 60-65 (in Chinese)
陈勇龙, 黄华荣, 唐平平, 等. 基因组编辑技术——CRISPR/Cas 系统[J]. 杭州师范大学学报: 自然科学版, 2015, 14(1): 60-65
- [13] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. Cell, 2014, 157(6): 1262-1278
- [14] Niewoehner O, Jinek M, Doudna JA. Evolution of CRISPR RNA recognition and processing by Cas6 endonucleases[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(2): 1341-1353
- [15] Sampson TR, Saroj SD, Llewellyn AC, et al. A CRISPR/Cas system mediates bacterial innate immune evasion and virulence[J]. Nature, 2013, 497(7448): 254-257
- [16] Yin LJ, Hu SQ, Guo F. The application of CRISPR-Cas9 gene editing technology in viral infection diseases[J]. Hereditas (Beijing), 2015, 37(5): 412-418 (in Chinese)
殷利春, 胡斯奇, 郭斐. CRISPR-Cas9 基因编辑技术在病毒感染疾病治疗中的应用[J]. 遗传, 2015, 37(5): 412-418
- [17] Heidrich N, Vogel J. CRISPRs extending their reach: prokaryotic RNAi protein Cas9 recruited for gene regulation[J]. The EMBO Journal, 2013, 32(13): 1802-1804
- [18] Feng H, Dong G, Yong B, et al. Function and organization of CRISPR-Cas systems and application in biotechnology[J]. Journal of Sichuan Normal University (Natural Science), 2014, 37(2): 268-281 (in Chinese)
冯红, 董阁, 雍彬, 等. 原核 CRISPR-Cas 系统的结构功能及应用[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2014, 37(2): 268-281
- [19] Davison M, Bhaya D. Creation and analysis of a virome: using CRISPR spacers[A]//Lundgren M, Charpentier E, Fineran P. CRISPR[M]. New York, NY: Humana Press, 2015: 307-316
- [20] Deng KB, Liu F, Gu CT, et al. Networking clusters and sequence characteristics of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) direct repeats and their evolutionary comparison with *cas1* genes in lactic acid bacteria[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(23): 5062-5073
- [21] Wang XL, Zhou JW, Cao CW, et al. Efficient CRISPR/Cas9-mediated biallelic gene disruption and site-specific knockin after rapid selection of highly active sgRNAs in pigs[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13348
- [22] Zhang Y, Heidrich N, Ampattu BJ, et al. Processing-independent CRISPR RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*[J]. Molecular Cell, 2013, 50(4): 488-503

- [23] Marraffini LA, Sontheimer EJ. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 568-571
- [24] Ma YB, Chang HY. A review on immune system of the bacteria and its self versus non-self discrimination[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012, 42(6): 657-660 (in Chinese)
马延滨, 常惠芸. 细菌的 CRISPR/cas 免疫及免疫识别[J]. *中国兽医科学*, 2012, 42(6): 657-660
- [25] Esvelt KM, Mali P, Braff JL, et al. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(11): 1116-1121
- [26] Datsenko KA, Pougach K, Tikhonov A, et al. Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 945
- [27] Sampson TR, Napier BA, Schroeder MR, et al. A CRISPR-Cas system enhances envelope integrity mediating antibiotic resistance and inflammasome evasion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(30): 11163-11168
- [28] Toro M, Cao GJ, Ju WT, et al. Association of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) elements with specific serotypes and virulence potential of shiga toxin-producing *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(4): 1411-1420
- [29] Burley KM, Sedgley CM. CRISPR-Cas, a prokaryotic adaptive immune system, in endodontic, oral, and multidrug-resistant hospital-acquired *Enterococcus faecalis*[J]. *Journal of Endodontics*, 2012, 38(11): 1511-1515
- [30] Li H, Shi ZD. Research progress of gene targeting technology of CRISPR/Cas9 system[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(4): 907-911 (in Chinese)
李辉, 施振旦. CRISPR/Cas9 新型基因打靶系统的研究进展[J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(4): 907-911
- [31] Liu WG, Ding YF, Liu AX, et al. Recombinant plasmid construction and functional identification of Bacterial CRISPR/Cas9 system[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2015, 27(9): 1031-1033 (in Chinese)
刘五高, 丁友法, 刘爱霞, 等. 细菌 CRISPR/Cas 免疫系统的构建及功能鉴定[J]. *中国微生态学杂志*, 2015, 27(9): 1031-1033
- [32] Ilyina TS. Filamentous bacteriophages and their role in the virulence and evolution of pathogenic bacteria[J]. *Molecular Genetics Microbiology and Virology*, 2015, 30(1): 1-9
- [33] Nozawa T, Furukawa N, Aikawa C, et al. CRISPR inhibition of prophage acquisition in *Streptococcus pyogenes*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19543
- [34] Louwen R, Horst-Kreft D, de Boer AG, et al. A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2013, 32(2): 207-226
- [35] 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
- [36] Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(11): 722-736
- [37] Wietz M, Millán-Aguíñaga N, Jensen PR. CRISPR-Cas systems in the marine actinomycete *Salinispora*: linkages with phage defense, microdiversity and biogeography[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 936
- [38] Zegans ME, Wagner JC, Cady KC, et al. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(1): 210-219
- [39] Palmer KL, Whiteley M. DMS3-42: the secret to CRISPR-dependent biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(14): 3431-3432
- [40] Xiao J, Zhang ZD. Progress of harnessing CRISPR-Cas9 system in bacteria[J]. *International Journal of Respiration*, 2017, 37(6): 450-456 (in Chinese)
肖婧, 张宗德. CRISPR-Cas9 系统在细菌学领域内的应用研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(6): 450-456
- [41] Gomaa AA, Klumpe HE, Luo ML, et al. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems[J]. *mBio*, 2014, 5(1): e00928-13
- [42] Burstein D, Harrington LB, Strutt SC, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes[J]. *Nature*, 2017, 542(7640): 237-241
- [43] He JR, Zhang YJ, Wang YM, et al. Polymorphism analysis of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) loci of 58 *Yersinia pestis* strains isolated from Xinjiang, China[J]. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 2017, 28(3): 233-237 (in Chinese)
贺金荣, 张渝疆, 王宇萌, 等. 新疆地区 58 株鼠疫耶尔森菌规律聚集的间隔短回文重复位点多态性分析[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2017, 28(3): 233-237
- [44] Zhang MM, Wong FT, Wang YJ, et al. CRISPR-Cas9 strategy for activation of silent *Streptomyces* biosynthetic gene clusters[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13: 607-609
- [45] Cheng X, Guo ZR, Hu YM, et al. A method to predict clustered repeats in *Salmonella* genomes[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2017, 37(2): 150-155 (in Chinese)
程希, 郭志荣, 胡跃明, 等. 一种新的沙门氏菌成簇重复序列的预测方法[J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(2): 150-155