

DOI:10.13350/j.cjpb.221004

• 论著 •

艰难梭菌 CRISPR-Cas 系统的基因组结构 及其与噬菌体的关系^{*}

王雪婷¹, 辛晓妮², 刘兴雨³, 王梦园⁴, 巩致远¹, 毕春霞^{2**}, 闫志勇^{1**}

(1. 青岛大学医学部, 山东青岛 266071; 2. 青岛大学附属青岛市立医院; 3. 青岛大学附属医院; 4. 济南市儿童医院)

【摘要】 目的 CRISPR-Cas 系统是细菌和古生菌基因组中的一种适应性免疫防御系统, 可保护其免受噬菌体、质粒等外源 DNA 的入侵, 阻止基因的水平转移, 从而维护自身基因组的稳定。本研究旨在分析艰难梭菌基因组中 CRISPR-Cas 系统的基因结构, 以探讨其在防御噬菌体感染等方面的作用。 **方法** 从 Nucleotide 数据库中下载艰难梭菌全基因组信息, 利用 CRISPR-CasFinder 软件鉴定基因组中的 CRISPR-Cas 系统, 通过 MEGA、BLAST 等软件进行 cas1 基因及重复序列分析并确定间隔序列同源信息; 采用 PHASTER 软件预测基因组中的前噬菌体含量, 分析其与间隔序列数量之间的关系。 **结果** 100 株艰难梭菌中有 96 株 (96%) 含有完整的 CRISPR-Cas 系统, 共含 703 个确定 CRISPR 阵列和 204 个 cas 基因簇, CRISPR-Cas 系统全部为 I-B 型; 重复序列共 26 种, 保守性较高, 19 种可形成茎环结构, 32.3% 的间隔序列与噬菌体、质粒同源, 间隔序列与前噬菌体数量之间存在负相关关系 ($r = -0.4759, P < 0.01$)。 **结论** 艰难梭菌 CRISPR-Cas 系统的携带率和株均携带数量均高于多数其他临床常见病原菌, 且系统基因结构完整; 该菌的 CRISPR-Cas 系统中靶向噬菌体的间隔序列数量多, 有助于抵御噬菌体的侵袭, 从而对开发噬菌体治疗带来一定困难。

【关键词】 艰难梭菌; CRISPR-Cas; 基因结构; 噬菌体

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)10-1130-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Oct.; 17(10): 1130–1135.]

Genome structure of the *Clostridioides difficile* CRISPR-Cas system and its relationship with phages

WANG Xue-ting¹, XIN Xiao-ni², LIU Xing-yu³, WANG Meng-yuan⁴, GONG Zhi-yuan¹, BI Chun-xia², YAN Zhi-yong¹ (1. Department of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. Qingdao Municipal Hospital Affiliated to Qingdao University; 3. Qingdao University Affiliated Hospital; 4. Jinan Children's Hospital) ***

【Abstract】 Objective The CRISPR-Cas system is an adaptive immune defense system in the bacterial and archaeal genomes that protects it from the invasion of exogenous DNA such as phages and plasmids, preventing the horizontal transfer of genes, and thus maintaining the stability of its own genome. The aim of this study is to analyze the gene structural features of the CRISPR-Cas system in the *C. difficile* genome and explore its role in the defense against phage infection.

Methods The genomic sequence of 100 *C. difficile* strains was downloaded from the Nucleotide database, CRISPR-CasFinder was used to identify CRISPR-Cas system distribution in the genome, and cas1 gene, repeat sequence and spacer homology information were analyzed through MEGA, BLAST and RNAfold softwares; PHASTER was used to predict prophage content in the genome, and the relationship between the number of prophages and spacers was analyzed. **Re-**

sults Among the 100 strains of *C. difficile*, 96 strains (96%) contained the complete CRISPR-Cas system, 3 strains (3%) only contained “orphan CRISPR arrays”, 1 strains (1%) only contained questionable CRISPR arrays. A total of 703 confirmed CRISPR arrays, 872 questionable CRISPR arrays and 204 cas gene clusters were found. Some CRISPR arrays were located in prophage regions. The CRISPR-Cas systems were all of type I-B. The phylogenetic classification of the cas1 gene was consistent with the CRISPR-Cas system typing. There were 26 unique repeats, highly conserved, and 19 species could form stem-loop structures. Thirty-two-point-three percent of spacers targeted phages and plasmids, and some spacers could match both multiple phages or plasmids. There was a negative correlation between the number of spacers and prophages ($r = -0.4759, P < 0.0001$). **Conclusion** Both the carrying rate of the *C. difficile* CRISPR-Cas system and the average number of carriers per strain were much higher than those in most other clinically common pathogens, and the system gene structure is complete. The large number of spacer sequences targeting phages in its CRISPR-

* **【基金项目】** 山东省优秀中青年科学家科研奖励项目 (No. BS2011SW0005)。

** **【通讯作者】** 闫志勇, E-mail: yanzhiyong@qdu.edu.cn; 毕春霞, E-mail: bichunxia@126.com

【作者简介】 王雪婷 (1997-), 女, 山东日照人, 在读硕士研究生, 主要从事临床微生物学方面研究。E-mail: wangxueting971106@163.com

Cas system, which helps to resist phage invasion, and thus brings some difficulties in developing phage therapy strategies.

【Key words】 *Clostridioides difficile*; CRISPR-Cas; genetic structure; phage

艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)属于梭状芽孢杆菌属,为严格厌氧革兰阳性杆菌,广泛分布于环境、人体和动物肠道中,过去曾误认为该菌为人肠道正常菌群成员,现公认为是医源性腹泻重要的病原体。肠道正常菌群可抑制艰难梭菌的芽胞发芽和繁殖体形成,当机体免疫力下降或大量使用抗生素导致菌群失调时,艰难梭菌会大量增殖,引起腹泻、伪膜性肠炎等疾病(*Clostridioides difficile* infection, CDI),甚至危及生命^[1-2]。

成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)是一种适应性免疫防御系统,广泛分布于古生菌和细菌的基因组中,可保护原核生物免受噬菌体等外来可移动遗传元件的入侵^[3]。CRISPR-Cas系统的免疫防御过程分为适应、表达和干扰3个阶段。完整的系统的基因结构由CRISPR阵列、cas基因簇和前导序列三部分组成。CRISPR阵列由直接重复序列(direct repeats, DR)和间隔序列(spacers)组成间隔排列而成,其侧翼或两翼一般存在由多个CAS蛋白相关基因组成的cas基因簇;前导序列(Leader sequence, LS)位于阵列上游,可能具有启动子的功能^[4]。

肠道中存在大量的噬菌体,与肠道菌群相互作用维持肠道的微生态平衡,其中多种噬菌体可感染艰难梭菌。资料表明,噬菌体可以介导艰难梭菌基因表达的改变,影响毒力等相关表型,尤其是毒素的产生^[5]。肠道细菌在噬菌体长期选择性压力作用下,能够进化出多种机制抵御噬菌体的侵袭,如DNA注入阻滞、吸附抑制、限制-修饰系统、CRISPR-Cas系统以及流产感染等^[6]。艰难梭菌对多种抗生素耐药,故常导致抗生素相关性腹泻(antibiotic-associated diarrhea),在全球艰难梭菌耐药越来越严重的情况下,其治疗更加困难。Meador等^[7]试图通过噬菌体代替抗生素治疗CDI,但如上所述,如果艰难梭菌进化出抵御外源DNA入侵的机制,则会给该方案带来一定的阻碍。

本研究拟对艰难梭菌CRISPR-Cas系统的基因结构组成及其与前噬菌体的关系进行分析,以期了解该菌的特性及感染机制,为噬菌体抗菌治疗的可行性提供参考。

材料与方法

1 材料

100株艰难梭菌的全基因组序列及基因注释等信息下载自Nucleotide数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)。

2 方法

2.1 CRISPR-Cas系统的查找 艰难梭菌中CRISPR-Cas系统的查找通过CRISPRCasFinder(<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>)在线软件完成,收集CRISPR基因座,cas基因簇的位点、方向及分型等信息。

2.2 cas基因的分析 根据鉴定出的cas基因位点信息,利用DNASTar软件中的EditSeq截取相应cas基因序列,通过MEGA7.0软件以ClustalW算法对所得序列进行比对分析并构建系统发育树。

2.3 重复序列的分析 使用BlastN将确定CRISPR基因座中完全相同的重复序列去除,通过MEGA7.0软件以ClustalW算法对不同类型的重复序列进行序列比对,利用RNAfold在线软件预测其二级结构和最小自由能(MFE)。

2.4 间隔序列的分析 收集所有确定CRISPR基因座中的间隔序列,间隔序列的靶向分析通过BlastN完成,同源标准是覆盖率(Cover)和一致率(Identity)均>85%,分类整理其靶向的噬菌体、质粒等来源信息。

2.5 前噬菌体的查找 通过PHASTER在线软件进行艰难梭菌基因组中前噬菌体的预测,采纳所有得分>90的结果。

2.6 统计学分析 利用GraphPad Prism 8.0.2软件进行统计学分析。间隔序列与前噬菌体数量之间的相关性分析采用Spearman秩相关检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 艰难梭菌CRISPR-Cas系统的分布情况

本研究纳入分析的艰难梭菌共计100株,均具有完整的基因组结构信息。结果显示96株艰难梭菌(96%)含有完整CRISPR-Cas系统,99株(99%)至少含有1个确定CRISPR阵列。菌株Z31、Cd8和Cd11仅含“孤儿CRISPR阵列”,即无cas基因簇。在艰难梭菌的染色体中共检测出确定CRISPR阵列703个,可疑CRISPR阵列872个,cas基因簇204套,所有cas基因簇皆为I-B型。单个菌株中确定CRISPR阵列最多达11个,可疑CRISPR阵列可达18个。大多数菌株含2套或3套cas基因簇。艰难梭菌CRISPR-Cas系统的整体携带率高。大多数质粒中无或仅含有1个可疑CRISPR阵列,无cas基因簇。在艰难梭菌BI1 plasmid2中发现了5个确定CRISPR阵列,13个可疑

CRISPR 阵列和 1 套 I-B 型 cas 基因簇。本研究仅针对染色体中的确定 CRISPR-Cas 系统进行分析。

2 cas 基因簇的结构及 cas1 基因系统进化分析

100 株艰难梭菌中 96 株含有 cas 基因簇,所有 cas 基因簇皆为 I-B 型。本研究中艰难梭菌完整的 CRISPR-Cas 系统有 43 种不同的基因排列方式,基因结构图如图 1 所示。

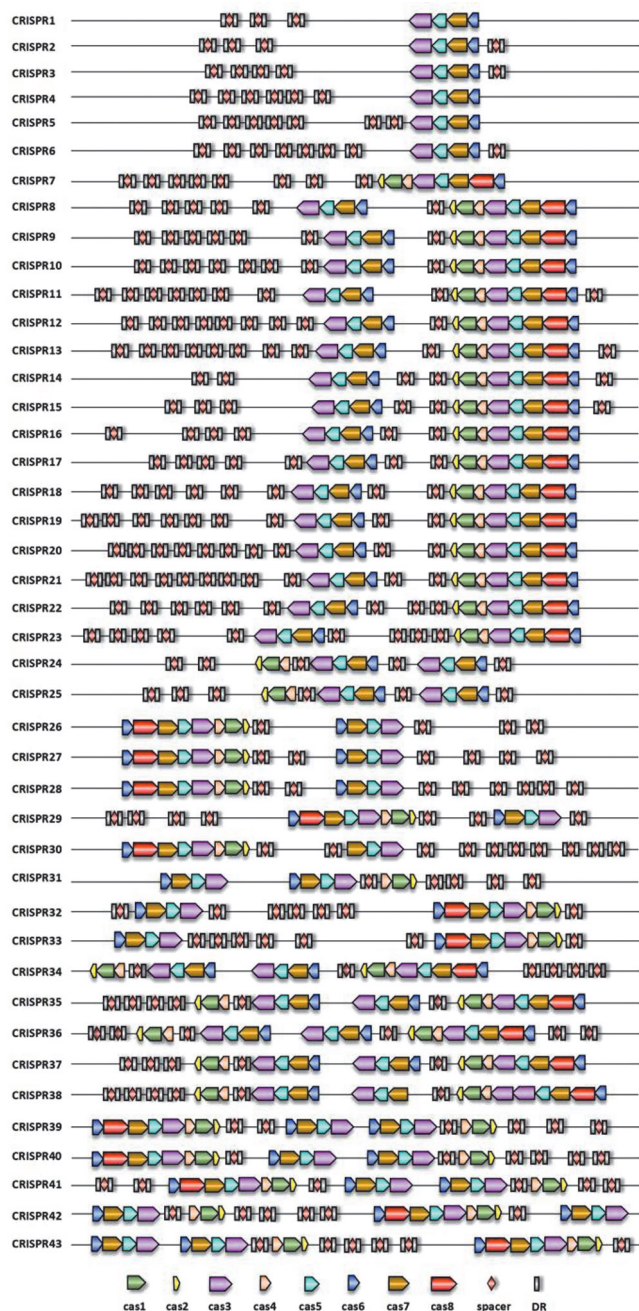


图 1 艰难梭菌 I-B 型 CRISPR-Cas 系统基因结构图
Fig. 1 The genetic structure of *C. difficile* Type I-B CRISPR-Cas system

12 株(12.5%)含 1 套 cas 基因簇,60 株(62.5%)含 2 套 cas 基因簇,24 株(25%)含 3 套 cas 基因簇。所有 cas 基因簇的排列组合方式有 5 种,分别为:cas3-cas5-cas7, cas3-cas5-cas7-cas6, cas2-cas1-cas4-cas3-

cas3-cas5-cas7-cas8b-cas6, cas2-cas1-cas4-cas3-cas5-cas7-cas8b-cas6 和 cas2-cas1-cas4-cas3-cas5-cas7-cas6。在 cas2-cas1-cas4-cas3-cas5-cas7-cas6 中,cas4 和 cas3 中间被一个 CRISPR 阵列分隔开。多数 cas 基因簇附近有 CRISPR 阵列。在仅含有可疑 CRISPR 阵列的菌株 MAR286 中也发现有 cas 基因的存在。对所有 cas1 基因进行序列比对分析,cas1 基因可被分为两种类型,长度分别为 981 bp 和 999 bp,每种类型内基因高度保守,序列一致性达 100%。基于 cas1 基因构建的系统发育树如图 2 所示,cas1 基因位于两个进化枝上,与 CRISPR-Cas 系统的型别一致。

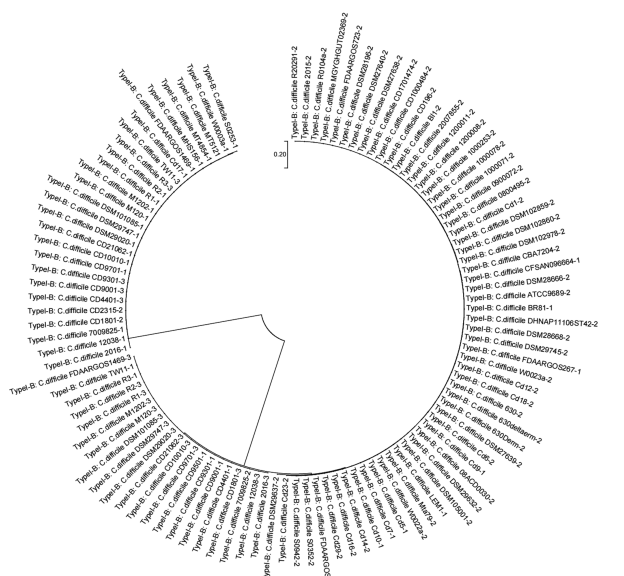


图 2 基于艰难梭菌 cas1 基因构建的系统发育树
Fig. 2 The phylogenetic tree of *C. difficile* base on cas1 gene

3 重复序列的分析

100 株艰难梭菌中共发现确定 CRISPR 阵列 703 个,去掉相同的重复序列后共计 26 种,长度为 28~31 bp,多数为 29 bp,序列比对结果如图 3 所示。多数重复序列在 5' 端和 3' 端具有保守区。重复序列在同一型别内保守性较高。同一 CRISPR 阵列内重复序列高度保守,序列间仅有 1~3 个碱基的差异。在干扰阶段,重复序列转录成 RNA 并形成二级结构发挥作用,使用 RNAfold 在线软件预测 26 种重复序列的 RNA 二级结构和最小自由能,其中 19 种重复序列能够形成稳定的茎环结构(图 4)。最小自由能最高为 -0.1 kcal/mol,最低为 -4.5 kcal/mol。

4 间隔序列的分析

703 个确定 CRISPR 阵列中含有的间隔序列数量共计 9711 条,单个 CRISPR 阵列含有的间隔序列数量最高为 45 个,最低为 4 个,平均 14 个。剔除其中完全相同的序列后共有 2 127 种,序列长度在 24~61 bp

之间,且多为 37 bp。结构完整的 cas 基因簇附近的 CRISPR 阵列含有较高数量的间隔序列(图 5)。为了确定间隔序列的来源信息,对上述 2 127 种间隔序列进行 BlastN 检索,结果显示有 108 种(5%)靶向噬菌体,215 种(10.1%)可同时靶向噬菌体和非自身细菌基因组,113 种(5.3%)靶向质粒,30 种(1.4%)可同时靶向质粒和非自身细菌基因组,135 种(6.3%)同时靶向噬菌体和质粒,83 种(3.9%)可同时靶向噬菌体、质粒和非自身细菌基因组,3 种(0.1%)靶向噬菌体或质粒,247 种(11.6%)靶向非自身细菌基因组,35 种(1.6%)靶向自身细菌基因组的非 CRISPR 阵列。此外,在所设的同源标准下,有 1 158 种(54.4%)间隔序列未检索到任何与之同源的序列。其中,部分间隔序列可同时与多个噬菌体或质粒同源,例如间隔序列 AGAGCAGATGTCTGGTGT TTTGGATTCCCATG TCAAG 靶向 12 种噬菌体,CTA ACTTGTTTC- CCTCTAAAGCGTGT TTAGTAGG 靶向 16 种质粒。与间隔序列同源的噬菌体和质粒多与梭菌属有关,也有部分噬菌体来源于大肠埃希菌。

Type	Direct repeats
DR1-IB	- G T T T T A G A T T A A C - T A T A T G G A A T G T A A A T T -
DR2-IB	- G T T G A A G A A T A A C A T G A G A T G T T T T T A A A T -
DR3-IB	- G T T T T A T A T T A A C - T A A G T G G T A T G T A A A G -
DR4-IB	- G T T T T A T A T T A A C - T A A G T G G T A T G T A A A T -
DR5-IB	- G T T T T A T A T T A A C - T A T A T G G A A T G T A A A T -
DR6-IB	- G T T T T A T A T T A A C - T A T G T G G T A T G T A A A T -
DR7-IB	- T T T T A C A T T C C A T A T A - G T T A A T C T A A A A C -
DR8-IB	- G T T T T A G A T T A A C - T A T A T G G A A T G T A A A T -
DR9-IB	- C T T T A C A T A C C A C A T A - G T T A A T A T A A A A C -
DR10-IB	- A T T T A A A T A C A T C T C A T G T T A C T G T T T A A C -
DR11-IB	- C T T T A C A T T C C A T A T A - G T T A A T A T A A A A C -
DR12-IB	- A T T T A A A C T A A C - T T A G T G T A A T T T A A A C -
DR13-IB	- G T T T T A T A T T A A C - T A T A T G G A A T G T A A A T C -
DR14-IB	- - T T T T A G A T T A A C - T A T A T G G A A T G T A A A T -
DR15-IB	- C T T T A C A T A C C A C T T A - G T T A A T A T A A A A C -
DR16-IB	- C T T T A C A T A C C A C A T A - G T T G A T A T A A A A C -
DR17-IB	- - T T T T A T A T T A A C - T A T G T G G T A T G T A A A T -
DR18-IB	- G T T T T A T A T T A A C - T A T G T G G T A T G T A A A T T T
DR19-IB	A G T T T T A T A T T A A C - T A A G T G G T A T G T A A A G -
DR20-IB	- A T T T A C A T T C C A T A T A - G T T A A T A T A A A A C G -
DR21-IB	- A T T T T A T A T T A A C - T A T G T G G T A T G T A A A T -
DR22-IB	- A T T T T A T A T T A A C - T A T G T G G T A T G T A A A G -
DR23-IB	- G T T T T A T A T T A A C - T A A T T G G T A T G T A A A -
DR24-IB	- G T A T T A T A T T A A C - T A T G T G G T A T G T A A A G -
DR25-IB	A C T T T A C A T T C C A T A T A - G T T A A T A T A A A A C -
DR26-IB	- G T A T T A T A T T A A C - T A A G T G G T A T G T A A A G T -

图 3 26 种重复序列的比对结果
Fig. 3 Alignment results of 26 repeat sequences

5 间隔序列与前噬菌体数量的相关性分析

对 100 株艰难梭菌通过 PHASTER 软件进行前噬菌体预测,共预测到 115 个前噬菌体,每株细菌前噬菌体数量在 0~4 个不等,菌株 DSM29688 含量最高,为 4 个。用 Spearman 秩相关检验进行间隔序列数量与前噬菌体数量之间的相关性分析,两者之间存在负相关关系($r = -0.4759, P < 0.01$)(图 6)。表明 CRISPR-Cas 系统在一定程度上可限制噬菌体侵袭细菌。

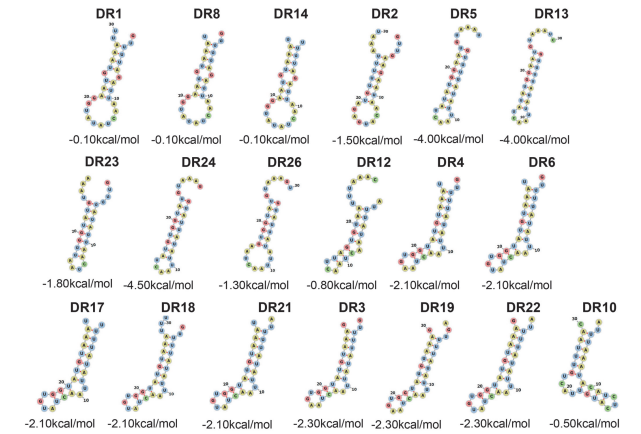


图 4 部分重复序列的二级结构模型及最小自由能(MFE)
Fig. 4 Secondary structure and MFE of partial repeats

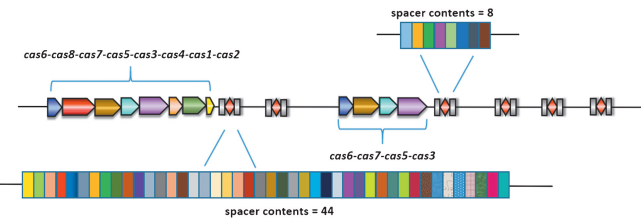


图 5 cas 基因簇附近 CRISPR 阵列中间隔序列的分布
Fig. 5 Distribution of spacer sequences in the CRISPR array near the cas gene cluster

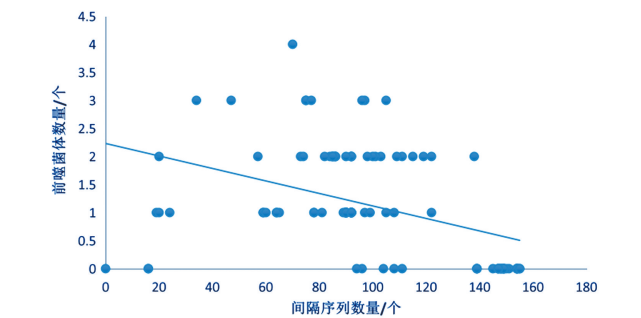


图 6 艰难梭菌间隔序列数量与前噬菌体数量之间的关系
Fig. 6 The relationship between the number of spacer sequences and prophages in *C. difficile*

讨 论

CRISPR-Cas 系统是在细菌和古生菌中发现的一种获得性免疫系统,能特异性地抵御噬菌体、质粒等外来核酸的入侵^[8]。由于 Cas9 等核酸酶作为基因编辑

技术的广泛应用,CRISPR-Cas 系统和 Cas 蛋白的比较基因组学、生化结构和生物学功能等在过去十年中得到了广泛研究。

本研究通过对 100 株艰难梭菌基因组分析发现,99%的菌株携带确定 CRISPR 阵列,携带率显著高于葡萄球菌(44.6%)^[9]、沙雷菌(21.59%)^[10]、铜绿假单胞菌(60.33%)^[11]和不动杆菌(21.3%)^[12]等常见病原菌,也显著高于细菌的平均比例(48%)^[13]。单个艰难梭菌菌株中确定 CRISPR 阵列的数量也非常高,平均达 7 个。本研究共检测出 703 个确定 CRISPR 阵列,其中 115 个位于前噬菌体区域,定位于前噬菌体内的 CRISPR 阵列可能在预防相关竞争性噬菌体感染方面发挥作用^[14]。在不同的菌株中还发现了一些几乎相同的 CRISPR 阵列,这可能是位于前噬菌体的 CRISPR 基因座由于噬菌体的溶源性转换通过水平基因转移在菌株之间传播。艰难梭菌通过 CRISPR 阵列在不同菌株之间的转移不断丰富自身间隔序列的多样性,有利于在富含噬菌体的肠道环境里生存^[15]。

CRISPR-Cas 系统的分型对于确定微生物基因组中 CRISPR 阵列的起源和进化至关重要,目前已发现 2 类 7(I~VII)型,其中 I 型又分为 7 个亚型,I-C、I-E 和 I-F 亚型多存在于细菌基因组,I-A、I-B 和 I-D 亚型则常见于古生菌。本组艰难梭菌的 CRISPR-Cas 系统均为 I-B 型,与 Boudry 等的研究相符^[15]。作为一种真细菌,却富含常见于古生菌中的 CRISPR-Cas 系统,加之 I-B 含有多个独立的 CRISPR 阵列,故推测艰难梭菌 CRISPR-Cas 系统可能是自古生菌中转移并经过独立进化而形成^[16]。

本研究显示 96%的艰难梭菌含有 cas 基因簇,显著高于数据库中细菌 cas 基因簇的平均携带率(39.65%)^[17]。大多艰难梭菌含有 2 套以上独立的 cas 基因簇。结构完整的 cas 基因包括 CRISPR 用于干扰的基因(cas6、cas8、cas7、cas5、cas3),以及用于获取间隔序列的基因(cas1、cas2、cas4)。结构不完整的 cas 基因簇由 cas3、cas5、cas7、cas6 基因等组成,结构不完整使其失去了获取间隔序列的能力,仅可能在 CRISPR 发挥功能时起辅助作用^[18]。此外,完整的 cas 基因簇附近的 CRISPR 阵列含有最多间隔序列,表明 CRISPR-Cas 系统结构的完整性对于其发挥防御作用必不可少。

重复序列和间隔序列相间排列组成 CRISPR 阵列。重复序列在同种型别 CRISPR-Cas 系统内具有保守性,具有回文结构,在干扰阶段形成二级结构发挥作用。间隔序列高度多变,一般与噬菌体、质粒等可移动基因元件同源,故认为间隔序列是细菌在过去与外来入侵者相遇后的“免疫记忆”。本研究共发现 26 种重

复序列,序列比对分析显示重复序列之间保守性较高,其中 19 种可形成茎环结构。703 个确定 CRISPR 基因座中共有 2127 种间隔序列,约半数间隔序列与噬菌体、质粒等同源(靶向)。部分间隔序列可同时靶向多种噬菌体或质粒,例如 CTAGAATTAGAACTCAT-TATTAAAACCATTTCTTGCAAG 靶向 5 种不同噬菌体的门户蛋白,而 ATGTTTCACATTGACAGCT-CAAGATAAACATGGAATT 靶向 8 种噬菌体的 DNA 甲基化酶,均导致这些噬菌体无法在艰难梭菌细胞内生存。另有 35 种间隔序列靶向自身细菌基因组,CRISPR-Cas 系统此时则可能发挥基因调控的功能。有研究在产单核细胞李斯特菌中发现了一种 I-A 型 CRISPR 阵列转录产物 rliB,经修饰后可控制与细菌毒力相关的 feoB 基因的表达^[19-20]。对间隔序列数量与前噬菌体数量进行相关性分析显示,两者之间呈负相关关系。Wheatley 等^[21]报道在铜绿假单胞菌中具有活性 CRISPR-Cas 系统的菌株中前噬菌体的含量会相应减少,证明 CRISPR-Cas 系统可限制噬菌体侵袭细菌。

近年来,由于高毒力、耐药菌株的出现,艰难梭菌感染(CDI)已对全球公共卫生造成严重威胁,由于艰难梭菌对大多数抗生素具有天然抗性,目前可用于治疗 CDI 的抗生素仅限于万古霉素和非达霉素等,且抗生素治疗并不能彻底清除细菌,反而会加剧肠道菌群失调导致反复感染,因此迫切需要寻求能够控制和治疗 CDI 的替代疗法。艰难梭菌噬菌体已被证明是一种新的治疗策略,理论上该方法能在不破坏肠道微生物群的情况下能达到预防和控制 CDI 的目的。目前已有单噬菌体、噬菌体混合物和噬菌体衍生品等用于治疗 CDI 的报道^[5]。本研究显示艰难梭菌基因组中存在大量完善的 CRISPR-Cas 系统,这些系统可能有助于其抵御噬菌体侵袭,因此应用噬菌体治疗会存在较大障碍,据此建议在开发噬菌体相关疗法时应充分考虑如何避免艰难梭菌基因组中 CRISPR-Cas 系统的防御机制给治疗带来的干扰,以提高治疗的有效性。

【参考文献】

- [1] Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis[J]. Annu Rev Microbiol, 2011(65):501-521.
- [2] Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 247-263.
- [3] Sorek R, Lawrence CM, Wiedenheft B. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea[J]. Annu Rev Biochem, 2013(82):237-266.
- [4] Kim JG, Garrett S, Wei Y, et al. CRISPR DNA elements controlling site-specific spacer integration and proper repeat length by a

- Type II CRISPR-Cas system[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47 (16):8632-8648.
- [5] Heuler J, Fortier LC, Sun X. *Clostridioides difficile* phage biology and application[J]. FEMS Microbiol Rev, 2021, 45 (5): fuab012.
- [6] Safari F, Sharifi M, Farajnia S, et al. The interaction of phages and bacteria; the co-evolutionary arms race[J]. Crit Rev Biotechnol, 2020, 40(2):119-137.
- [7] Meader E, Mayer MJ, Steverding D, et al. Evaluation of bacteriophage therapy to control *Clostridium difficile* and toxin production in an *in vitro* human colon model system[J]. Anaerobe, 2013 (22):25-30.
- [8] Koonin EV, Makarova KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2019, 374 (1772):20180087.
- [9] Zhang M, Bi C, Wang M, et al. Analysis of the structures of confirmed and questionable CRISPR loci in 325 *Staphylococcus* genomes[J]. J Basic Microbiol, 2019, 59(9):901-913.
- [10] 王梦园, 毕春霞, 兰蕾, 等. 沙雷菌 CRISPR-Cas 系统的基因结构分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(4):396-401.
- [11] Mortensen K, Lam TJ, Ye Y. Comparison of CRISPR-Cas Immune Systems in Healthcare-Related Pathogens[J]. Front Microbiol, 2021(12):758-782.
- [12] 付恒霞, 毕春霞, 张蒙蒙, 等. 不动杆菌 CRISPR 系统基因结构的分析及其与耐药性关系的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(10):1073-1077, 1083.
- [13] Alkhnbashi OS, Meier T, Mitrofanov A, et al. CRISPR-Cas bioinformatics[J]. Methods, 2020(172):3-11.
- [14] Sorek R, Kunin V, Hugenoltz P. CRISPR-a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(3):181-186.
- [15] Boudry P, Semenova E, Monot M, et al. Function of the CRISPR-Cas System of the human pathogen *Clostridium difficile*[J]. mBio, 2015, 6(5):e01112-e1115.
- [16] Peng L, Pei J, Pang H, et al. Whole genome sequencing reveals a novel CRISPR system in industrial *Clostridium acetobutylicum* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(11):1677-1685.
- [17] Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, et al. CRISPRCas-Finder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1):W246-W251.
- [18] Maikova A, Severinov K, Soutourina O. New insights into functions and possible applications of *Clostridium difficile* CRISPR-Cas System[J]. Front Microbiol, 2018(9):1740.
- [19] Mandin P, Repoila F, Vergassola M, et al. Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(3):962-974.
- [20] Sesto N, Touchon M, Andrade JM, et al. A PNPase dependent CRISPR system in *Listeria* [J]. PLoS Genet, 2014, 10 (1): e1004065.
- [21] Wheatley RM, MacLean RC. CRISPR-Cas systems restrict horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. ISME J, 2021, 15(5):1420-1433.
- 【收稿日期】 2022-05-02 【修回日期】 2022-07-20

(上接 1129 页)

- [5] Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy[J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79 (23):7116-7121.
- [6] Fisher R A, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells[J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(8):453-464.
- [7] Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival[J]. Biochemistry (Mosc), 2005, 70(2):267-274.
- [8] Yamasaki R, Song S, Benedik MJ, et al. Persister cells resuscitate using membrane sensors that activate chemotaxis, lower cAMP levels, and revive ribosomes[J]. Science, 2020, 23(1):100792.
- [9] Poddighe D, Vangelista L. *Staphylococcus aureus* infection and persistence in chronic rhinosinusitis: Focus on leukocidin ED[J]. Toxins, 2020, 12(11):678.
- [10] Podlesek Z, Zgur Bertok D. The DNA Damage inducible SOS response is a key player in the generation of bacterial persister cells and population wide tolerance[J]. Front Microbiol, 2020 (11): 1785.
- [11] Wagner EG, Unoson C. The toxin-antitoxin system *tisB-istR1*: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes [J]. RNA Biol, 2012, 9(12):1513-1519.
- [12] Dorr T, Vulic M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the *TisB* toxin in *Escherichia coli* [J]. PLoS Biol, 2010, 8(2):e1000317.
- [13] Shan Y, Brown GA, Rowe SE, et al. ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli* [J]. mBio, 2017, 8(1):e02267-16.
- [14] Svenningsen MS, Veress A, Harms A, et al. Birth and resuscitation of (p)ppGpp induced antibiotic tolerant persister cells[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):6056.
- [15] 崔鹏, 许涛, 张文宏, 等. 细菌持留与抗生素表型耐药机制[J]. 遗传, 2016, 38(10):859-871.
- [16] Wang Y, Bojer MS, George SE, et al. Inactivation of TCA cycle enhances *Staphylococcus aureus* persister cell formation in stationary phase[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):10849.
- [17] Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, et al. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis[J]. J Bacteriol, 2010, 192 (23): 6191-6199.
- [18] 余瑶. 密度对金黄色葡萄球菌持留形成的影响及分子机制初步研究[D]. 兰州:兰州大学, 2020.
- 【收稿日期】 2022-05-07 【修回日期】 2022-07-28