

DOI:10.13350/j.cjpb.221207

• 论著 •

铜绿假单胞菌 CRISPR/Cas 系统的基因结构及其与耐药基因的关系

刘兴雨¹, 毕春霞², 韩璐¹, 迟媛媛³, 王梦园⁴, 兰蕾⁴, 闫志勇^{4*}

(1. 青岛大学附属医院检验科, 山东青岛 266000; 2. 青岛市市立医院; 3. 青岛市妇女儿童医院; 4. 青岛大学基础医学院)

【摘要】 目的 研究铜绿假单胞菌 CRISPR/Cas 系统基因结构及其与耐药基因的关系。方法 收集 95 株铜绿假单胞菌的全基因组序列信息, 通过 CRISPRs web server 获取 CRISPR 系统的信息。通过 ClustalW 进行重复序列和 cas 基因的比对分析, 采用 MEGA7 构建 cas1 和 cas3 的系统发育树, 通过 RNAfold 预测重复序列 RNA 的二级结构。通过 GenBank 数据库对间隔序列进行 BLAST 比对, 并进行同源性分析。通过基因注释查找耐药相关基因, 并分析其与 CRISPR 系统之间的关系。结果 95 株铜绿假单胞菌中, 共发现 130 个确定的 CRISPR 位点, 分布于 58 个菌株中, 其中 47 个具有结构完整的 CRISPR 系统, 30 个 I-F 型, 7 个 I-C 型, 6 个 I-E 型, I-F 型可以和 I-C 型或 I-E 型共存于同一菌株中; CRISPR 位点共有 18 种重复序列, 具有一定的保守性, 基本均可形成保守的哑铃状 RNA 二级结构。不同类型 CRISPR 系统的 cas 基因组成不同, 但均有 cas1 和 cas3。cas1 和 cas3 比较保守, 可作为分型的依据。不同位点中间隔序列的长度和数量不同, 2 132 个间隔序列中 526 个与噬菌体序列同源, 32 个与质粒序列同源。耐药基因分析显示, 含 CRISPR 系统的菌株 Int11 和 OXA-10 的携带率高于不含该系统菌株的携带率。结论 铜绿假单胞菌基因组中 CRISPR 系统主要为 -F 型, 其次为 -E 和 -F 型; 同种类型 CRISPR 系统中的 cas1 和 cas3 基因高度保守; 与间隔序列同源的外源基因主要为噬菌体, 少数是质粒。CRISPR 系统的存在与某些抗生素耐药相关基因的携带率有关。

【关键词】 铜绿假单胞菌; 基因结构; CRISPR 系统; 耐药相关基因

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)12-1399-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Dec;17(12):1399-1403.]

Analysis of the gene structure of *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR/Cas system and its relationship with antibiotic resistance-related genes

LIU Xing-yu¹, BI Chun-xia², CHI Yuan-yuan³, Han Lu¹, WANG Meng-yuan⁴, LAN Lei⁴, YAN Zhi-yong^{4*} (1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong, China; 2. Qingdao Municipal Hospital; 3. Women and Children's Hospital, Qingdao University; 4. Medical College of Qingdao University)*

【Abstract】 **Objective** To explore the gene structure of CRISPR/Cas system in *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship with drug resistance genes. **Methods** Collect the complete genome sequences of 95 *P. aeruginosa* strains from NCBI and obtain the information of the CRISPR system through the CRISPRs web server. The comparison and analysis of the repetitive sequence and the cas gene is completed by Clustal W in DNASTar, the phylogenetic tree of cas1 and cas3 is completed by MEGA7, and the secondary structure of the repetitive RNA is predicted by RNAfold. Blast the spacer sequence with the help of GenBank database to find the homologous gene sequence, and analyze its homologous sequence. Resistance-related genes is found by gene annotation. The relationship between CRISPR system and antibiotic resistance genes is tested by chi-square test, $P < 0.05$ indicates that the difference is statistically significant. **Results** Among 95 strains of *P. aeruginosa*, we found 130 identified CRISPR locus distributed in 58 strains. 43 strains are able to find the cas gene, with a structurally complete CRISPR system, among these 30 are I-F type, and 7 are I-C type, 6 are I-E type, others cannot be typed. I-F type can exist in the same strain with I-C type or I-E type at the same time. There are 18 types of repetitive sequences found in 130 CRISPR locus, which are conservative and can basically form a conservative dumbbell-shaped RNA secondary structure. Different types of CRISPR systems have different cas proteins, but they all have cas1 and cas3. The phylogenetic tree indicates that the branches of cas1 and cas3 in the three CRISPR systems are independent of each other. cas1 and cas3 are relatively conservative and can be used as a basis for typing. The length and number of spacer sequences in different sites are different. Among the spacer sequencer, 526 are homologous to the phage

* **【通讯作者】** 闫志勇, E-mail: yanzhiyong@qdu.edu.cn

【作者简介】 刘兴雨(1991-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生。研究方向: 临床微生物学。E-mail: 18764209709@163.com

sequence and 32 are homologous to the plasmid sequence. The analysis of drug resistance genes shows that the OXA-10 carrier rate of strains with CRISPR system (13.95%) was higher than that strains without this system (0%) ($P=0.018 < 0.05$). The *IntI1* carrier rate of the strain with the CRISPR system was also higher than that strains without the system ($P=0.023 < 0.05$). **Conclusion** The CRISPR system in the genome of *P. aeruginosa* is mainly I-F type, and I-E and I-F CRISPR systems have also been found; *Cas1* and *cas3* genes are highly conserved in the same type of CRISPR system; Foreign genes homologous to the spacer sequence mainly phages, a few are plasmids; Resistance analysis found that the CRISPR system is related to the carrying rate of certain antibiotic resistance-related genes.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa*; gene structure; CRISPR/Cas system; antibiotic resistance-related genes

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)属于革兰阴性非发酵菌,是医院感染常见的条件致病菌之一,广泛分布于水、空气和土壤及人体和动物体内。该菌对外界环境的耐受性强,能在潮湿的环境中长时间存活,也具有较强的抗干燥能力^[1]。铜绿假单胞菌对多种抗生素具有天然抗药性,随着广谱抗菌药物的广泛应用,其获得性耐药增强^[2],已成为医院防治的重点病原菌之一,并引起了广泛关注^[3]。

规律成簇间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)是在原核生物中新发现的1种特殊序列,广泛存在于细菌和古生菌中,被认为是细菌的1种可以抵御质粒、噬菌体等外来基因元件侵袭的适应性免疫系统^[4]。CRISPR/Cas系统由cas基因簇和CRISPR阵列组成,后者又包括同向重复序列、间隔序列、前导序列^[5]。CRISPR/Cas系统分为I、II、III型3大类型,其免疫防御过程主要包括适应、表达和干扰3个阶段。其中,在适应阶段系统编码的Cas蛋白将外源基因的部分片段插入到CRISPR阵列中从而获得1个新的间隔序列,而当细菌再次受到同样外来入侵时,该间隔序列引导系统识别并与Cas蛋白靶向清除外来基因^[6]。CRISPR系统是细菌水平基因转移(Horizontal gene transfer, HGT)的屏障。CRISPR系统能够提供对噬菌体的抗性,并且可阻止自然转化和毒力获取^[7]。利用铜绿假单胞菌CRISPR相关RNA(crRNA)能干扰其耐药基因的表达,可降低泛耐药菌株的耐药性^[8]。本研究拟检测分析铜绿假单胞菌CRISPR/Cas系统的分布及基因结构,并探讨其与耐药相关基因的关系。

材料与方法

1 材料

95株铜绿假单胞菌的全基因组序列取自NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)网站。其中82株菌已被收录在CRISPRs web server (<http://crispr.u-psud.fr/>) CRISPR数据库CRISPRdb中。

2 方法

2.1 CRISPR基因座与cas基因序列的鉴定与分析

CRISPR基因座的鉴定通过CRISPRs web server完成,包括位置、长度和内容。通过CRISPR-Cas Finder在线查找Cas基因序列^[9],利用DNASTar软件的EditSeq截取cas基因序列,所得序列采用MEGA7软件构建系统发育树。

2.2 重复序列的比对分析 CRISPR重复序列的比对分析通过ClustalW完成,采用CRISPRmap在线软件进行类别分析。通过RNAfold预测RNA二级结构及最小自由能(Minimum free energy, MFE)。

2.3 间隔序列的同源性分析 通过GenBank数据库对间隔序列进行BLAST比对,查找与其同源的基因序列(一致率和覆盖率>85%),并分析其同源序列。

2.4 CRISPR系统与耐药基因的关系分析 通过全基因组序列中的基因注释查找95株铜绿假单胞菌的耐药相关基因,包括 β -内酰胺酶基因、氨基糖苷修饰酶基因、外膜通道蛋白基因和整合子基因。

2.5 统计学分析 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析。CRISPR系统与抗生素耐药基因之间的关系采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 铜绿假单胞菌基因组CRISPR系统的数量及分布

95株铜绿假单胞菌CRISPR系统的分析显示,78株菌中至少有1个CRISPR基因座,达82.1%。其中58株(74.36%)含至少1个确定的CRISPR基因座,共计130个确定的基因座。20株(25.64%)仅含可疑基因座。不同菌株中CRISPR基因座的数目不同, ≥ 2 个的43株,占74.1%,单个菌株含有CRISPR基因座数较多的达5个(PA SCV20265)。95株铜绿假单胞菌的基因组中能找到cas基因(簇)的有43株,均含有确定的CRISPR基因座,即有结构完整的CRISPR系统,共47个。本文研究主要对58个含确定CRISPR基因座的菌株进行分析。

2 铜绿假单胞菌基因组中CRISPR系统的基因结构与分型

47个完整的CRISPR系统中,43个属于I型,其中30个为I-F型,7个为I-C型,6个为I-E型。其他的因部分cas基因缺失不能分型。未发现II型和III

型等其他 CRISPR 系统。菌株 PA VA-134 中同时存在 I-F 型和 I-C 型 CRISPR 系统,菌株 PA SCVFeb、PA SCVJan 和 PA NHmuc 中同时存在 I-F 型和 I-E 型 CRISPR 系统(图 1)。

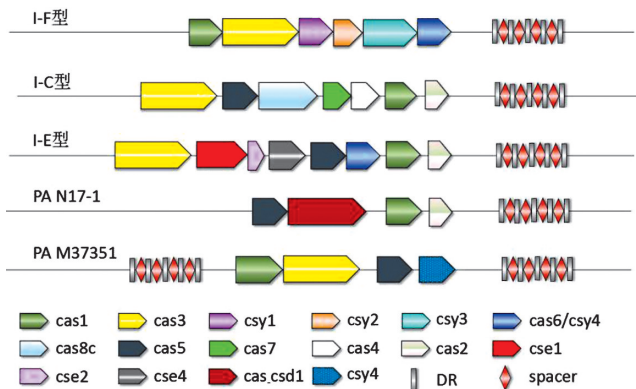


图 1 铜绿假单胞菌 CRISPR 系统结构示意图

Fig. 1 The genetic structure of *Pseudomonas aeruginosa* CRISPR system

3 cas 基因的序列分析

在铜绿假单胞菌中,CRISPR/Cas 系统均有 cas1 和 cas3 基因。在 CRISPR 系统获得新的间隔区需要 Cas1 蛋白参与,Cas1 蛋白为核心蛋白,而 Cas3 蛋白则是 I 型系统的核心蛋白。为观察铜绿假单胞菌 cas 基因序列的多样性和保守性,对 cas1 基因序列进行了比对分析,并构建了系统发育树(图 2)。结果显示,3 种类型 CRISPR 系统中 cas1 的分枝彼此独立,是进化相对独立的分枝。对 cas3 进行的分析和系统发育树(图 3)显示,除了 PA 19BR 的 cas3,cas3 也出现了同样的结果,即各类型的分枝间彼此独立。

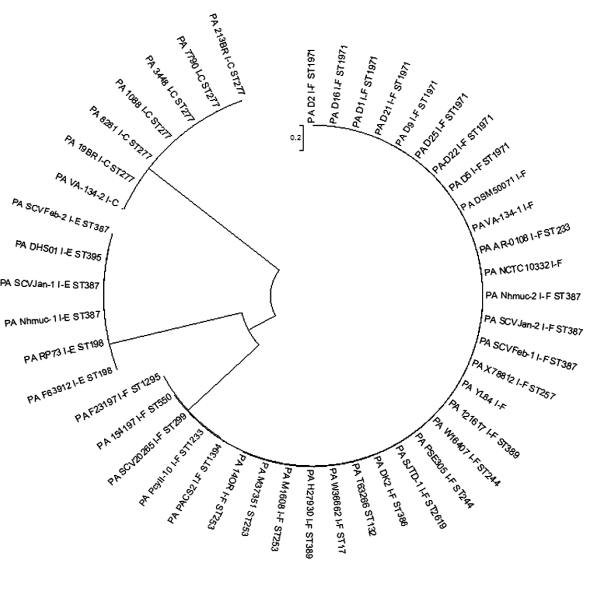


图 2 利用铜绿假单胞菌 cas1 建立的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree of *Pseudomonas aeruginosa* based on cas1 gene

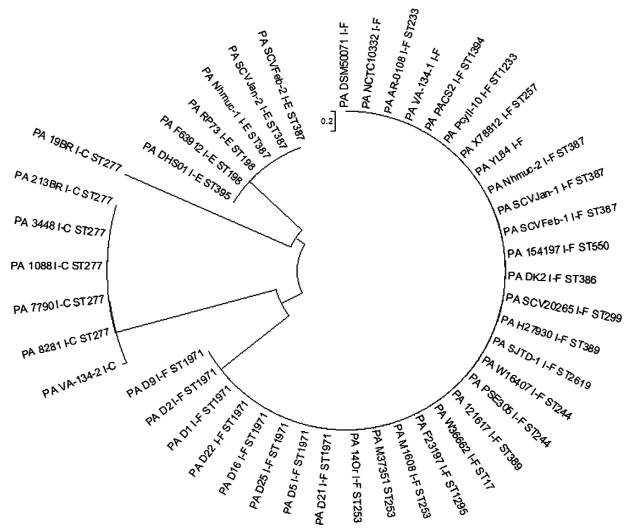


图 3 利用铜绿假单胞菌 cas3 建立的系统发育树

Fig. 3 The phylogenetic tree of *Pseudomonas aeruginosa* based on cas3 gene

4 重复序列及其二级结构的分析

重复序列的分析发现,在同 1 个 CRISPR 位点中,重复序列高度保守。重复序列的长度不同,大部分在 28~32 bp。最短的重复序列 23 bp(菌株 PA BAMC PA07-48),最长 44 bp(菌株 PA NCTC10332)。不同菌株中重复序列的数目也不同。具有最少重复数的 CRISPR 基因座在 PA NCTC10332 中,只有 2 个直接重复序列,而重复序列数量最多的在 PA 19BR、PA 8281、PA 1088、PA 3448 和 PA 7790 中,具有 40 个重复序列。在 130 个位点中共发现了 18 种不同的重复序列(表 1)。相同的重复序列可广泛分布于不同的菌株中,具有一定的保守性。在相同的菌株中,重复序列可以不同。

重复序列转录的 RNA 可形成 RNA 二级结构,并在系统行使功能的过程中发挥作用。应用 RNAfold 预测的 18 种重复序列的二级结构和 MFE 见图 4,18 种重复序列均可形成二级结构。DR1-13 和 DR17 可形成形状相似的保守的哑铃状 RNA 二级结构,中间是 1 个“茎”,在两极各有 1 个“环”,茎在结构中占主导地位;DR14-16 和 DR18 形成的二级结构中,在茎的一端可有 2 个环。茎中的碱基对几乎都是 C-G。“茎”的长度分别为 5、6、7 个碱基对,相应的 MFE 也各不相同,但二级结构的“茎”越长,MFE 值越低,结构越稳定,而稳定的二级结构有利于 CRISPR 系统发挥免疫作用。

5 间隔序列的比较分析

CRISPR 基因座中新的间隔序列是细菌抵御外源核酸序列侵袭而获得的。BLAST 比对分析铜绿假单胞菌 CRISPR 中的 2 132 个间隔序列的同源性,结果

显示有 526 个 (24.67%) 与噬菌体序列同源, 有 32 个 (1.50%) 与质粒序列同源, 有 1573 个 (73.78%) 与其他细菌基因同源。同源噬菌体基本上均是假单胞菌的噬菌体, 有 *Pseudomonas* phage YMC/01/01/P52_PA_E_BP、*Pseudomonas* phage phi297、Bacteriophage D3 等。同源质粒主要是铜绿假单胞菌的质粒, 其次为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、沙门菌的质粒, 主要与质粒的接合转移蛋白 TrbL 的基因序列同源。

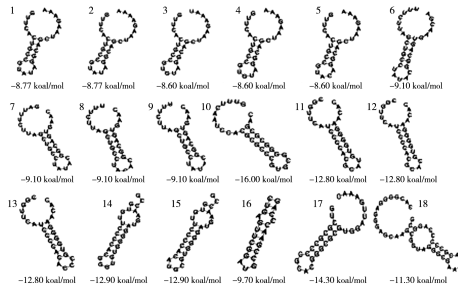


图 4 重复序列的二级结构模型
Fig. 4 Secondary structure of repeats

表 1 铜绿假单胞菌的重复序列
Table 1 The direct repeats of *Pseudomonas aeruginosa*

重复序列 Repeat sequence	长度 Length	数量 Number	CRISPR 类型 Type of CRISPR
GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	28	42	I-F
GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA A	29	1	Uncertain
GTTCACTGCCGTG TAGGCAGCTAAGAAA T	29	1	I-F
GTTCACTGCCGTG TAGGCAGCTAAGAAA	28	11	I-F
GTTCACTGCCGTA AGGCAGCTAAGAAA	28	5	Uncertain
TTTCTTAGCTGCCTATACGGCAGTGAAC GA	30	1	I-F
GA TTTCTTAGCTGCCTATACGGCAGTGAAC	30	1	I-F
TTTCTTAGCTGCCTA CACGGCAGTGAAC	28	25	I-F
TTTCTTAGCTGCCTATACGGCAGTGAAC	28	17	I-F
GTTTCAATCC ACCGCCGTGGGGCC GAC	32	8	I-C
CGGTTATCCCCACG CATGTGGGGAACAC	29	4	I-E
CGGTTATCCCCACG CACGTGGGGAACAC	29	1	Uncertain
CGGTTATCCCCAC ACCGTGGGGAACAC	29	5	I-E
GTGTTCCCCACGGG GTGGGGAT GAACCG	29	2	I-E
GTGTTCCCCACAT GCGTGGGGAT GAACCG	29	2	I-E
CTGAGTTCGGAT GC GAACCCAG	23	2	Uncertain
GTCGGCCCGCACGGGGCGTGGAT TGAAAC	32	1	Uncertain
CACGGGAGGAGC AAGCGG TAGGGGAAT A ACGCCCCAGGCC	44	1	Uncertain

6 铜绿假单胞菌耐药基因分析

对铜绿假单胞菌基因组内的抗生素相关耐药基因进行分析发现, β -内酰胺酶基因广泛分布在 95 株菌的基因组中, 大部分菌株有 C 类和 D 类, 检出率分别为 76.84% 和 81.05%。基因 OXA-50、OXA-10、AAC(6')-Ib、ANT(3'')-Ia (14.74%)、IntI1、oprD 均可检出, 而耐药基因 PDC、APH(3')-II、SPM-1、DIM-1、IMP、VIM、TEM、CARB 可在个别菌株中检出。对 CRISPR 系统和耐药基因关系的分析显示, 含有

CRISPR 系统的菌株耐药基因 OXA-10 的携带率为 13.95%, 不含该系统菌株的携带率为 0% ($P=0.018 < 0.05$), 差异有统计学意义。同理含有 CRISPR 系统的菌株 IntI1 的携带率 (30.23%) 高于不含该系统菌株的携带率 (11.54%) ($P=0.023 < 0.05$), 差异有统计学意义。其他耐药基因的携带率与 CRISPR 之间的差异比较无统计学意义 (表 2)。

表 2 铜绿假单胞菌基因组中耐药基因
Table 2 The resistance genes in *P. aeruginosa* genome

耐药基因 resistance gene	CRISPR 基因座 CRISPR locus			CRISPR 系统 CRISPR system		
	有 Yes n=58	无 Non n=37	P 值	有 Yes n=58	无 Non n=37	P 值
OXA-10	6	0	0.078	6	0	0.018 ^a
OXA-50	37	22	0.672	28	31	0.582
AAC(6')-Ib	8	4	0.760	7	5	0.330
ANT(3'')-Ia	8	6	0.745	7	5	0.330
IntI1	14	5	0.207	13	6	0.023 ^a
oprD	37	20	0.345	27	30	0.614

注: 与有 CRISPR 系统组比较 $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the CRISPR system group $P < 0.05$.

讨论

作为细菌的一种新的防御机制, CRISPR 系统的结构组成、开发与应用等备受关注^[10]。CRISPR 系统可以抵抗外源基因元件侵入, 也可能干扰耐药相关基因的水平转移。铜绿假单胞菌分布广泛且致病性强, 在医院感染中较常见, 因此, 对该菌 CRISPR 系统的研究有助于理解其耐药基因的转移与获得。

本研究对 95 株铜绿假单胞菌 CRISPR 系统的基因结构进行生物信息学分析, >61% 的基因组中发现了 130 个 CRISPR 基因座, 比报道的原核生物中的总体比例 (45%) 高, 与其他细菌中的比例也不同^[11-14], 例如克雷伯菌 (35.2%)、乳酸菌 (46.08%)。此外, 本研究表明, 铜绿假单胞菌 CRISPR 系统全部为 I 型, 且主要为 I-F 型, 未发现 II 型和 III 型。在一些菌株中发现同时有两种不同亚类型系统的存在, 不同类型的 CRISPR 系统针对不同的外源基因干扰发挥作用, 其机制尚不清楚。Kunin 等^[15]对微生物 CRISPR 重复序列的分析发现, 在一些细菌中具有稳定和高度保守的 RNA 二级结构, 在外源核酸序列与 Cas 蛋白的相互作用中发挥着重要作用。本研究中的重复序列均可以形成 RNA 二级结构, 而茎环结构均较稳定, 利于 CRISPR 系统发挥免疫作用。

cas 基因分析表明, 并非所有的基因座中均含 cas 相关基因序列, 而不含 cas 基因的位点不具有 CRISPR 系统的相关功能, 可能是因为 cas 基因退化或被删除, 也可能是其自身本来就发育不良, 未进化形成完整的 CRISPR 系统。对 cas1 和 cas3 基因的分析

发现,两基因在同一类型的 CRISPR 中是保守的,不同类型中的 *cas* 基因不同。

在外源基因元件入侵宿主菌后,外来噬菌体或质粒上的一小段 DNA 序列片段(前间隔序列, proto-spacers)被整合到宿主菌的基因组中,成为新的间隔序列^[16]。本研究中的间隔序列,大部分与噬菌体高度同源,与质粒高度同源的只有 32 个,表明铜绿假单胞菌在进化过程中曾捕获过噬菌体、质粒等移动原件。间隔序列与噬菌体同源的个数相对较多,表明该系统的功能主要针对噬菌体,能抵御这些噬菌体,避免其被裂解,促进生物膜的形成及稳定其血清型,有利于细菌的生存。

目前,CRISPR/Cas 细菌能阻止临床分离株获得抗生素抗性基因元件的假说备受关注^[17]。研究表明,CRISPR/Cas 基因座的存在与粪肠球菌获得性抗生素耐药性之间存在显著负相关性,在屎肠球菌也发现了类似的现象。目前,铜绿假单胞菌 CRISPR/Cas 系统在抗生素获得性耐药的机制尚不清楚。 β -内酰胺酶基因和氨基糖苷类基因广泛分布于铜绿假单胞菌基因组中,CRISPR 系统的存在使铜绿假单胞菌 Int11、OXA-10 基因的携带率升高。

本研究主要对铜绿假单胞菌基因组中的 CRISPR 系统进行了生物信息学分析,了解其结构和保守性,有助于抗噬菌体菌株的构建和 CRISPR 系统介导的基因敲除技术的研究。耐药基因的分析主要为了探索 CRISPR 系统在耐药方面的作用,为了解其在耐药方面的作用机制和耐药菌感染的治疗提供了新思路。

【参考文献】

- [1] Courtois N, Caspar Y, Maurin M. Phenotypic and genetic resistance traits in *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients: a French cohort study[J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 52(3): 358-364.
- [2] 宋文, 孙倩楠, 刘玉梅, 等. 228 株铜绿假单胞菌 β -内酰胺酶的检测及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(2): 165-169.
- [3] Ahmadian L, Haghshenas MR, Mirzaei B, et al. Distribution and molecular characterization of resistance gene cassettes containing class 1 integrons in multi-drug resistant (MDR) clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Infect Drug Resist, 2020, 11(13): 2773-2781.
- [4] Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems[J]. Curr Opin Microbiol, 2017(37): 67-78.
- [5] Patterson AG, Yevstigneyeva MS, Fineran PC. Regulation of CRISPR-Cas adaptive immune systems [J]. Curr Opin in Microbiol, 2017(37): 1-7.
- [6] Yu ZX, Jiang SP, Wang Y, et al. CRISPR-Cas adaptive immune systems in Sulfolobales: genetic studies and molecular mechanisms [J]. Science China(Life Sciences), 2021, 64(5): 678-696.
- [7] Samson JE, Magadan AH, Moineau S. The CRISPR-Cas immune system and genetic transfers: reaching an equilibrium [J]. Microbiol Spectr, 2015, 3(1): Plas-0034-2014.
- [8] Van Belkum A, Soriaga LB, LaFave MC, et al. Phylogenetic distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. mBio, 2015, 6(6): e01796-15.
- [9] Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, et al. CRISPRCasFinder, an update fo CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(W1): W246-W251.
- [10] Jiang Y, Yin S, Dudley EG, et al. Diversity of CRISPR loci and virulence genes in pathogenic *Escherichia coli* isolates from various sources[J]. Int J Food Microbiol, 2015(204): 41-46.
- [11] Zhang M, Bi C, Wang M, et al. Analysis of the structures of confirmed questionable CRISPR loci in 325 *Staphylococcus* genomes [J]. Basic Microbiol, 2019, 59(9): 901-913.
- [12] Shen JT, Lv L, Wang XD, et al. Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in *Klebsiella* genomes[J]. J Basic Microb, 2017, 57(4): 325-336.
- [13] Li W, Bian X, Evvie SE, et al. Comparative analysis of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) of *Streptococcus thermophilus* St-I and its bacteriophage-insensitive mutants (BIM) derivatives[J]. Curre Microbiol, 2016, 73(3): 393-400.
- [14] Li Q, Wang X, Yin K, et al. Genetic analysis and CRISPR typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from different sources revealed potential transmission from poultry and pig to human [J]. Int J Food Microbiol, 2018(266): 119-125.
- [15] Zhu DK, Yang XQ, He Y, et al. Comparative genomic analysis identifies structural features of CRISPR-Cas systems in *Riemerella anatipestifer* [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 689.
- [16] Jiang W, Maniv I, Arain F, et al. Dealing with the evolutionary downsides of CRISPR immunity: bacterial and beneficial plasmids[J]. PLoS Genet, 2013, 9(9): e1003844.
- [17] 徐艳, 崔玉晓, 杨洋, 等. CRISPR/Cas 系统抵御细菌耐药[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3): 1-8.

【收稿日期】 2022-08-12 【修回日期】 2022-10-19