

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (11):1362–1368; 4 November 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.014

炭疽芽胞杆菌中 CRISPR 位点

高志奇^{1#}, 王东澍^{1#}, 冯尔玲¹, 王秉翔², 惠一鸣², 韩少波², 焦磊², 刘先凯^{1*},
王恒樑^{1*}

¹军事医学科学院生物工程研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

²兰州生物制品研究所有限责任公司, 甘肃 兰州 730046

摘要:【目的】考察炭疽芽胞杆菌中规律成簇的间隔短回文序列 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 位点多态性情况及基于 CRISPR 位点多态性的分子分型方法是否在炭疽芽胞杆菌分型中适用。【方法】下载 NCBI 数据库中 6 株炭疽芽胞杆菌基因组并截取其中 CRISPR 位点片段序列。根据炭疽芽胞杆菌内 CRISPR 位点信息, 设计相关引物, 以 193 株炭疽芽胞杆菌基因组为模板 PCR 扩增 CRISPR 位点片段, 测序。本地 Blast 比对截取序列及测序结果, 查看 CRISPR 位点在炭疽芽胞杆菌中的多态性情况, 并比较炭疽芽胞杆菌与蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌内 CRISPR 位点情况。【结果】炭疽芽胞杆菌内 CRISPR 位点不存在多态性。【结论】基于 CRISPR 位点多态性的分子分型方法不适用于炭疽芽胞杆菌分型, 但可以用于区分炭疽芽胞杆菌与蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌。

关键词: 规律成簇间隔短回文重复序列, 炭疽芽胞杆菌, 分子分型

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2014) 11-1362-07

炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) 是一种古老的病原菌, 其引起的炭疽病是一种人畜共患的急性传染病, 炭疽芽胞对高温、射线、氧化剂等理化因子都具有很强的抗逆性^[1]。由于其强致病性和芽胞的强抗逆性, 且炭疽芽胞易于制备和存储, 炭疽芽胞杆菌成为生物战剂的首选。因此, 炭疽芽胞杆菌的分型分析对于炭疽芽胞杆菌溯源和应对生物恐怖都具有重要意义。

自然界中的细菌在进化过程中, 对噬菌体感染、质粒接合和转化等形成了一系列防御机制来抵抗外源 DNA 的干扰, 如吸附抑制、DNA 注入抑制等^[2]。

CRISPR 是近年来在细菌和古细菌中发现的能够对外源 DNA 提供免疫的重复结构^[3-4]。在 1987 年, Ishino 等就在大肠杆菌 K12 染色体上发现一段包含重复序列和非重复间隔序列的特殊序列^[5], 这种序列在结核分枝杆菌等细菌和古细菌中也相继被发现, Jansen 等在 2002 年将其命名为 CRISPR^[6]。

CRISPR 系统包括 CRISPR 相关蛋白 (CRISPR-associated, Cas) 基因、前导序列 (leader sequence) 和同向重复序列 (direct repeat, DR) 与间隔序列 (spacer)。

在同一物种中, 重复序列一般很保守^[6-7], 但是

基金项目: 传染病重大专项 (2012ZX10004215); 国家自然科学基金 (81271785, 81125012)

* 通信作者。Tel: +86-40-66948836; E-mail: wanghl@nic.bmi.ac.cn, liuxk007@163.com

作者简介: #并列第一作者。高志奇 (1987-), 男, 辽宁省海城市人, 博士研究生, 从事病原细菌学研究, E-mail: gzhiqi@163.com; 王东澍 (1989-), 男, 四川省绵竹市人, 博士研究生, 从事病原细菌学研究, E-mail: wangdongshu@foxmail.com

收稿日期: 2014-05-12; 修回日期: 2014-07-14

重复序列的长度在不同物种间差别较大^[8],一般在 21–48bp,重复序列的重复数在不同微生物中也存在差异,较低的重复数只有 2,而高重复数可达 250 左右^[3]。重复序列中存在 5–7bp 的回文序列,可以形成发卡结构^[7]。

间隔序列长度与细菌的种类以及 CRISPR 位点有关,一般在 26–72bp 左右^[9],这些间隔序列来源于噬菌体基因组^[10],具有很高的多态性,甚至在同一物种的不同菌株之间也会存在差异,因而可以利用 CRISPR 位点的多态性来对细菌进行分型分析^[8-11]。

前导序列位于第一个重复序列的上游,其在种内相对保守但是在种间存在差异。新的重复序列、间隔序列总是会插入到前导序列与第一个重复序列之间^[7, 12],这说明前导序列很可能对新序列的插入位点起到识别作用^[8]。

Cas 蛋白由位于 CRISPR 结构 5'端的 *cas* 基因编码,已经发现的 45 个 *cas* 基因可以分为 8 个亚型,每个亚型包含 2–6 个基因^[13]。Cas 蛋白与重复序列的获得和保持相关^[13-14]。

CRISPR 系统在对噬菌体感染等外源基因干扰的防御的过程中将与噬菌体基因同源的片段插入到前导序列和第一个重复序列之间^[15],这种片段插入活动还伴随着重复序列的复制。因此,CRISPR 位点多态性很高,且记录了进化过程中遇到的外源 DNA 的干扰情况,在细菌分型和进化分析中都起到重要作用。目前,以 CRISPR 位点多态性为靶标的间区寡核苷酸分型已经广泛应用于结核分枝杆菌的分型研究^[16]。

由于炭疽芽胞杆菌基因组很保守,适用于炭疽芽胞杆菌分子分型的方法有限。目前,多位点可变量串联重复序列分析(multiple loci variable number tandem repeats analysis, MLVA)和单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)分析可以应用于炭疽芽胞杆菌的分子分型。MLVA 分型方法具有较好的重复性且检测效率较高。SNP 分型对细菌基因组水平的 SNP 位点进行分型分析,其优点是准确性较高,同时具有高通量等特点,不过 SNP 分型成本相对较高。若能找到新的适用于炭疽芽胞杆菌分型的方法,对于炭疽芽胞杆菌的溯源和进化研究等具有重要意义。我们通过网站上查询炭疽芽胞杆菌的 CRISPR 位点信息,设计相关引物、PCR 扩增和测序得到 193 株炭疽芽胞杆菌的 CRISPR 位点序列,并对测序结果以及 NCBI 数据库中 6 株炭疽

芽胞杆菌基因组序列比对分析,以考察 CRISPR 位点分型在炭疽芽胞杆菌分型中的适用情况。

1 材料和方法

1.1 材料

191 株炭疽芽胞杆菌的基因组以及我国人用炭疽芽胞杆菌疫苗株 A16R 及其野生株 A16 基因组。191 个基因组来自于新疆、甘肃、内蒙古、山东、河南、河北、辽宁等省和自治区,分离年代自 1952–1998 年,分离自病人、病畜、土壤、毛皮等。

美国国立生物技术信息中心(the national center for biotechnology information, NCBI)网络数据库中的 6 株炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis* str. Ames, GI: 30260195; *B. anthracis* str. ‘Ames Ancestor’, GI: 50196905; *B. anthracis* str. A0248, GI: 229599883; *B. anthracis* str. CDC684, GI: 227812678; *B. anthracis* str. Sterne, GI: 49183039; *B. anthracis* str. H9401, GI: 386733873)基因组序列。

NCBI 网络数据库中的 12 株蜡样芽胞杆菌(*B. cereus* 03BB102, GI: 225862057; *B. cereus* str. AH187, GI: 217957581; *B. cereus* AH820, GI: 218901206; *B. cereus* ATCC10987, GI: 42779081; *B. cereus* ATCC14579, GI: 30018278; *B. cereus* B4264, GI: 218230750; *B. cereus* biovar anthracis CI, GI: 301051741; *B. cereus* G9842, GI: 218895141; *B. cereus* Q1, GI: 222093774; *B. cereus* NC7401, GI: 375282101; *B. cereus* F837_76, GI: 376264031; *B. cereus* FRI_35, GI: 402552844)基因组序列。

NCBI 网络数据库中的 12 株苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis* serovar konkukian str. 97–27, GI: 49476684; *B. thuringiensis* YBT-4518, GI: 558678294; *B. thuringiensis* serovar chinensis CT-43, GI: 384184088; *B. thuringiensis* HD-789, GI: 434373506; *B. thuringiensis* serovar kurstaki str. HD73, GI: 449086670; *B. thuringiensis* serovar thuringiensis str. IS5056, GI: 452196381; *B. thuringiensis* Bt407, GI: 409187965; *B. thuringiensis* MC28, GI: 407703236; *B. thuringiensis* HD-771, GI: 402558824; *B. thuringiensis* serovar finitimus YBT-020, GI: 384177910; *B. thuringiensis* BMB171, GI: 296500838; *B. thuringiensis* str. Al Hakam, GI: 118475778)基因组序列。

1.2 炭疽芽胞杆菌中 CRISPR 位点查找

从网站 (<http://www.u-psud.fr/fr/index.html>) 查询到炭疽芽胞杆菌 (*B. anthracis* str. Ames, GI: 30260195) 中存在 1 个明确 CRISPR 位点: CRISPR_2 (DR: TGTATGATTACCTTCCGCATGAGAA) 以及 2 个疑似 CRISPR 位点: CRISPR_3 (DR: TTTCCGAATGAATATTCATTCT) 和 CRISPR_5 (DR: GTTGATTCTCTCTCTTTTGA) (图 1)。

1.3 6 株炭疽芽胞杆菌基因组生物信息学分析

考察已下载的炭疽芽胞杆菌的全基因组序列, 进行本地 blast 查找并截取其中的 CRISPR 位点片段, 对

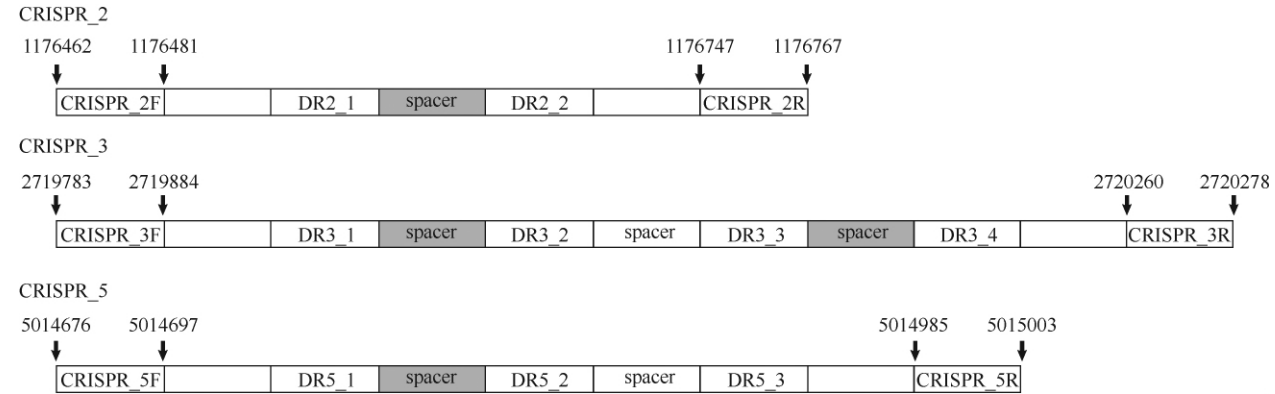


图 1. 炭疽芽胞杆菌中 CRISPR 位点及引物位置情况
Figure 1. CRISPR site and primer information in *B. anthracis*.

表 1. CRISPR 位点序列扩增引物

Table 1. List of PCR primers

Primer	Sequence (5'→3')
CRISPR_2F	5'-CCATTATGAGCAAGCCACTT-3'
CRISPR_2R	5'-AACGAAAGCAACTGGACATAG-3'
CRISPR_3F	5'-ATCCATATTAGGCATCGTTACG-3'
CRISPR_3R	5'-CTCCGTCCATTACCACCAA-3'
CRISPR_5F	5'-GCTCTCTAGTGAGAACTGATT-3'
CRISPR_5R	5'-AGACAACGTGGCTGTGAAC-3'

1.5 测序结果分析

对测序结果序列进行软件比对分析, 分析软件采用 DNASTAR 软件包下的 SeqMan (Version 5.00) 软件。比对参数设定为匹配百分比为 80% 以上时输出匹配结果。

1.6 蜡样芽胞杆菌菌群 (*B. cereus sensulato group*)^[17] 中 CRISPR 位点分布情况分析

对下载的蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌基因组进行全基因组比对, 截取与 CRISPR 位点序列匹配的片段并将截取的片段连接, 连同炭疽芽胞杆菌中的 CRISPR 位点序列一起利用 MEGA 软件 (version 6.0) 进行聚类分析, 构建 UPGMA 系统发生树。

截取的 CRISPR 位点片段进行生物信息学比对分析。

1.4 PCR 扩增 CRISPR 位点序列

在炭疽芽胞杆菌 Ames 株基因组中 CRISPR 位点上下游至少 50bp 以上的位置 (图 1), 利用软件 (Primer 5, Version 5.00) 分别设计 CRISPR 位点对应的引物 (表 1), 以 193 个炭疽芽胞杆菌基因组为模板, 对 CRISPR 位点进行 PCR 扩增。

PCR 扩增条件为: 94℃ 10 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 扩增所用酶为高保真 DNA 聚合酶。对 PCR 产物纯化后进行测序。

2 结果

所考察的 CRISPR 位点的分析结果显示, 在所有炭疽芽胞杆菌中, 包括实验分析的 193 个国内分离株和 NCBI 数据库中的 6 个菌株基因组内的 CRISPR 位点及疑似 CRISPR 位点均相同 (图 1), 不存在重复序列重复数的差异和 spacer 的差异, 也不存在单核苷酸多态性。3 个位点的重复序列 DR 均存在基因突变情况 (表 2)。

在炭疽芽胞杆菌中存在的 CRISPR 位点 CRISPR_2 和疑似位点 CRISPR_3、CRISPR_5 的 DR 序列重复数均不高, CRISPR_2 中 DR 重复数为 2, 有 1 个 spacer; CRISPR_3 中 DR 重复数为 4, 有 3 个 spacer; CRISPR_5 中的 DR 重复数为 3, 有 2 个 spacer。3 个位点中的 DR 序列均存在个别碱基的突变 (表 2 中阴影标记部分)。在 CRISPR_3 中存在比较典型的回文序列, CRISPR_2 和 CRISPR_5 中也存在不同程度的回文结构 (表 2 中下划线标记部分)。

表 2. 炭疽芽胞杆菌中 CRISPR 位点的序列

Table 2. Sequences of CRISPR site in *B. anthracis*

Name	Component	Sequence (5'→3')
CRISPR_2	DR	TGTATGATTACCTTCGCGCATGAGAA
	spacer	GAGAATCCGTTAGCGATAGTCGCGGTTCTTCTGCATGTGCTGCTTCGCGCTAAAGCGAT
	DR	TGTATGTTTACCTTCGCGCATGAGAA
CRISPR_3	DR	ACGGAATGAATATTCATTCCT
	spacer	ATTATTTTGAAAACACCT
	DR	TTTCGGAATGAACATTCATTCCT
	spacer	CTCGTTCTATTAATTTACTTTTTAGCTCTATTAAACTATGGA
	DR	TTTCGGAATGAATATTCATTCCT
	spacer	TTAATTGTACAGATTGATCATCTCCTACTTTTCTTTTTCACACCCCT
CRISPR_5	DR	CATCGGAATGAATGTTTCATTCCT
	DR	GTTGATTTTCTTCTTTCTTCGG
	spacer	TTCTTCTTTTTTGTCACTAGTCGAACCGCTT
	DR	GTTGATTCTCTTCTTTTTGAGA
	spacer	CTTATCTTCTGTGTTACTTTCTGGTGTGCTGCTC
	DR	GTTGACTTCTCTTCTTTTTGAGA

Shaded parts stand for the base mutation; Underline parts stand for the palindrome structure.

对蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌考察分析发现,12 株蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌中均存在 CRISPR_2 和 CRISPR_5 位点,少数菌株 (*B. cereus* biovar anthracis str. CI, *B. cereus* AH820, *B. cereus* F837/76, *B. cereus* 03BB102; *B. thuringiensis* str. Al Hakam, *B. thuringiensis* serovar konkukian str. 97-27, *B. thuringiensis* serovar chinensis CT-43, *B. thuringiensis* Bt407, *B. thuringiensis* serovar thuringiensis str. IS5056, *B. thuringiensis* serovar finitimus YBT-020) 中存在 CRISPR_3 位点。2 种菌中的 CRISPR 位点中存在碱基突变,除序列中个别点突变情况外,菌株在 CRISPR 的 DR 和 spacer 中的一些位置的碱基突变呈现一定的一致性,即在某碱基位置,有多株菌发生突变且突变后的碱基相同,这种位置在 CRISPR_2 中有 11 个(DR 中 5 个,spacer 中 6 个),在 CRISPR_5 中有 7 个(DR 中 1 个,spacer 中 6 个)。

以 CRISPR_2 和 CRISPR_5 位点序列(CRISPR_2_5)构建的系统发生树如图 2。以分析考察的 CRISPR_2 和 CRISPR_5 位点序列的简单处理及以此构建的 UPGMA 系统发生树(图 2)显示,系统发生树不能将蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌完全分开,2 种菌互有混杂。部分蜡样芽胞杆菌(BC_AH187/NC7401/Q1; BC_ATCC 10987/FRI-35)和苏云金芽胞杆菌(BT_Bt407/serovar_chinensis_CT_43/serovar_IS5056/YBT_1518)具有完全相同的 CRISPR_2_5 序列;同时也有少数蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌菌株具有完全相同的 CRISPR_2_5 序列(BT_

AI_Hakam/BC_F837 - 76; BT_HD_789/BC_G9842),而炭疽芽胞杆菌的 CRISPR_2_5 序列型与蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌都完全不同,具有自己独特的序列型。

3 讨论

CRISPR 位点多态性分型近年来应用越来越广泛,已经成为结核分枝杆菌分型的标准方法之一,其在白喉杆菌、空肠弯曲杆菌等也有很好的应用。

我们对炭疽芽胞杆菌中 CRISPR 位点情况进行了考察。通过下载 NCBI 数据库中已有的 6 株炭疽芽胞杆菌(*B. anthracis* str. Ames, *B. anthracis* str. ‘Ames Ancestor’, *B. anthracis* str. A0248, *B. anthracis* str. CDC684, *B. anthracis* str. Sterne 和 *B. anthracis* str. H9401)的全基因组序列并对其中的 CRISPR 位点进行生物信息学分析。我们发现,6 株炭疽芽胞杆菌中存在的 CRISPR 位点 CRISPR_2 及疑似 CRISPR 位点 CRISPR_3 和 CRISPR_5 均相同,不存在序列上的差异,CRISPR 位点显示出高度的保守性。为了探求这些 CRISPR 位点在我国炭疽芽胞杆菌中的分布情况,之后,我们以实验室现有的 193 株炭疽芽胞杆菌基因组为模板,通过引物设计、PCR 扩增及产物测序,获得了该 193 株炭疽芽胞杆菌的 CRISPR 位点序列情况,分析结果同样显示了 CRISPR 位点的高度一致性,且与 NCBI 数据库中 6 株炭疽芽胞杆菌的生物信息学分析结果相同。炭疽

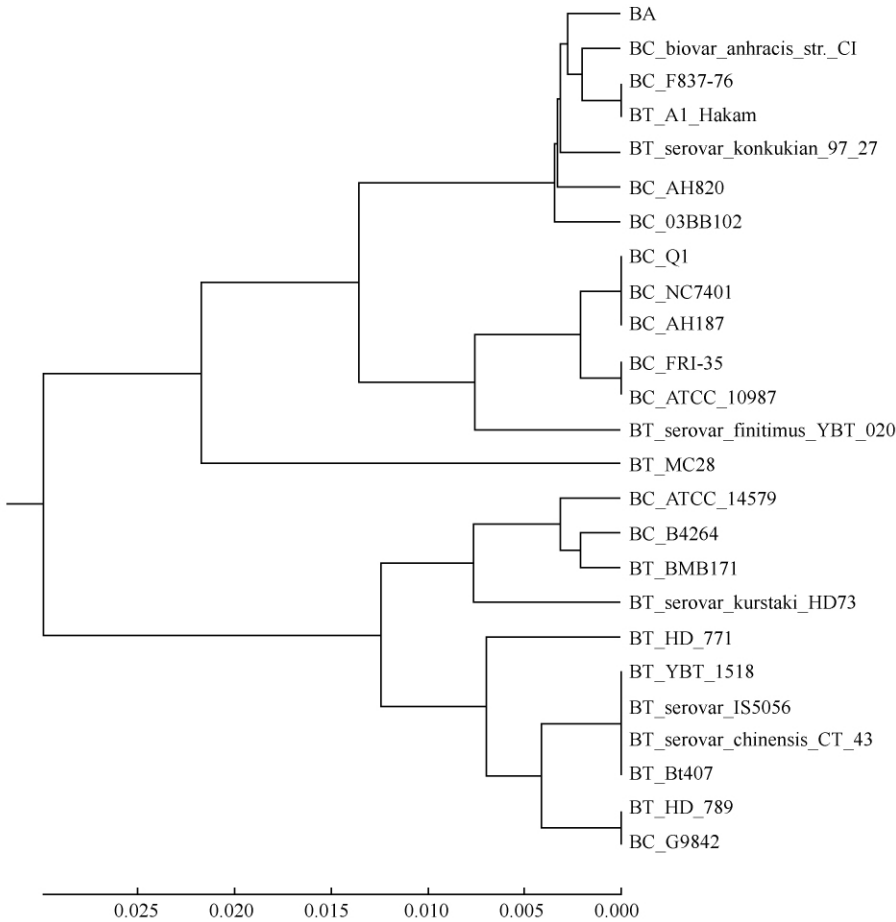


图 2. 利用炭疽 (BA)、蜡样 (BC) 和苏云金 (BT) 芽胞杆菌中的 CRISPR 位点建立系统发生树

Figure 2. Phylogenetic tree based on CRISPR site in *B. anthracis* (BA), *B. cereus* (BC) and *B. thuringiensis* (BT) by UPGMA.

芽胞杆菌中的 CRISPR 位点 CRISPR_2 存在 1 个 spacer, DR 的重复数为 2; 疑似 CRISPR 位点 CRISPR_3 有 3 个 spacer, DR 重复数为 4; CRISPR_5 有 2 个 spacer, DR 重复数为 3。位点中的 DR 序列存在个别碱基的突变且存在回文结构 (表 2)。

我们还对与炭疽芽胞杆菌同属的蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌中的 CRISPR 位点进行了考察。分析方法与 NCBI 数据库中 6 株炭疽芽胞杆菌分析方法相同, 通过下载 NCBI 数据库中现有的 12 株蜡样芽胞杆菌和 12 株苏云金芽胞杆菌基因组来进行分析。

分析结果显示, 在 12 株蜡样芽胞杆菌和 12 株苏云金芽胞杆菌中均存在 CRISPR 位点 CRISPR_2 和疑似 CRISPR 位点 CRISPR_5 且位点情况与炭疽芽胞杆菌中的位点相似度很高。但疑似 CRISPR 位点 CRISPR_3 仅存在于部分蜡样芽胞杆菌 (*B. cereus* biovar anthracis str. CI, *B. cereus* AH820, *B. cereus*

F837/76, *B. cereus* 03BB102) 和苏云金芽胞杆菌 (*B. thuringiensis* str. Al Hakam, *B. thuringiensis* serovar konkukian str. 97 - 27, *B. thuringiensis* serovar chinensis CT-43, *B. thuringiensis* Bt407, *B. thuringiensis* serovar thuringiensis str. IS5056, *B. thuringiensis* serovar finitimus YBT-020) 中。

通过 3 种菌的 CRISPR 位点比较分析发现, 位点间存在部分碱基突变情况, 且个别碱基的突变结果呈现了一定的一致性。

炭疽芽胞杆菌作为一种古老的烈性病原菌, 具有很强的保守性。传统的分子分型技术不适用炭疽芽胞杆菌的分型, 例如, 脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 仅能鉴别种属间的差异, 可以将炭疽芽胞杆菌与蜡样芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌区分开, 而无法区分种属内部的差别。炭疽芽胞杆菌的遗传变异水平很低, MLVA 分析可用于炭疽芽胞杆菌分子分型, SNP 位点分析对炭疽芽

胞杆菌菌株也具有足够的鉴别能力。目前这两种方法是炭疽芽胞杆菌的主要分型方法。

我们实验所考察的 193 株炭疽芽胞杆菌的基因组来自于我国新疆、内蒙、辽宁、甘肃、河南、河北和山东等主要炭疽疫源地,基本涵盖了我国所有炭疽芽胞杆菌类型。从分析结果可以推断,CRISPR 位点分型对于我国境内的炭疽芽胞杆菌分型并不适用。

对于炭疽芽胞杆菌内 CRISPR 位点极端保守的情况,我们分析可能由以下原因造成。炭疽芽胞杆菌在生长环境不适宜时会形成芽胞,芽胞是繁殖体的休眠状态,对于外界环境有很强的抗逆性,在环境适宜时会萌发生长成繁殖体。休眠期的芽胞的强抗逆性导致其不会被噬菌体侵染,而自然界中的炭疽芽胞杆菌几乎都以芽胞的形式存在,因而在漫长的历史过程中,炭疽芽胞杆菌基因组极少受外源 DNA 干扰,导致炭疽芽胞杆菌进化十分缓慢,也正因为这一点,其 CRISPR 多态性受到限制,无法用于炭疽芽胞杆菌的分子分型。

与蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌的 CRISPR 位点比较分析表明,炭疽芽胞杆菌的 CRISPR 位点显示出极高的一致性,而蜡样芽胞杆菌与苏云金芽胞杆菌均存在不同程度的突变,这再一次证明了炭疽芽胞杆菌的保守性很高。虽然 CRISPR 位点不能用来进行炭疽芽胞杆菌分子分型,不过以 CRISPR_2_5 序列构建的系统发生树显示,炭疽芽胞杆菌不与蜡样和苏云金芽胞杆菌聚类到一起,这一结果可以为分辨炭疽与蜡样和苏云金芽胞杆菌菌种间的差别提供方法上的参考。

作为同一类群下的菌种,炭疽芽胞杆菌比蜡样和苏云金芽胞杆菌具有更高保守性可能与菌种的性质相关。相比于炭疽芽胞杆菌,蜡样芽胞杆菌属于条件致病菌且毒力有限,并不会导致宿主迅速死亡,所以与宿主作用时间比炭疽芽胞杆菌要长,而且宿主环境远比自然环境复杂;苏云金芽胞杆菌主要对昆虫致病,由于昆虫的广泛分布,使其与宿主作用的机会比炭疽芽胞杆菌大得多。因此相比于炭疽芽胞杆菌,两株菌的进化速度要更快一些。所以,炭疽芽胞杆菌是更接近于其“祖先”的菌株。

综上所述,炭疽芽胞杆菌作为一种古老的微生物,其进化过程极其缓慢,基因组相对保守,目前炭疽芽胞杆菌分型方法还是以 MLVA 和 SNP 分析为主,基于 CRISPR 位点多态性的分子分型并不适用于炭疽芽胞杆菌。CRISPR 位点在炭疽芽胞杆菌中

高度保守,与蜡样和苏云金芽胞杆菌都不相同,因而 CRISPR 位点可能为炭疽芽胞杆菌与其它近缘蜡样菌间的鉴别中提供新的分子标记。

参考文献

- [1] Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2000, 64 (3): 548-572.
- [2] Sturino JM, Klaenhammer TR. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nature Reviews: Microbiology*, 2006, 4 (5): 395-404.
- [3] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8 (1): 172.
- [4] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR - a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews: Microbiology*, 2008, 6 (3): 181-186.
- [5] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169 (12): 5429-5433.
- [6] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43 (6): 1565-1575.
- [7] Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology*, 2007, 8 (4): R61.
- [8] Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, 2005, 151 (3): 653-663.
- [9] Karginov FV, Hannon GJ. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Molecular Cell*, 2010, 37 (1): 7-19.
- [10] Horvath P, Romero DA, Coute-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190 (4): 1401-1412.
- [11] Mojica FJ, Díez-Villasenor C, Garcis-Martínez J, Soria E.

- Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 60 (2) : 174-182.
- [12] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 475-493.
- [13] Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Computational Biology*, 2005, 1 (6) : e60.
- [14] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 2006, 1 (1) : 7.
- [15] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315 (5819) : 1709-1712.
- [16] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Aqterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35 (4) : 907-914.
- [17] Kolsto AB, Tourasse NJ, Okstad OA. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 451-476.

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) site in *Bacillus anthracis*

Zhiqi Gao^{1#}, Dongshu Wang^{1#}, Erling Feng¹, Bingxiang Wang², Yiming Hui², Shaobo Han², Lei Jiao², Xiankai Liu^{1*}, Hengliang Wang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

² Lanzhou Institute of Biological Products Co. Ltd., Lanzhou 730046, Gansu Province, China

Abstract: [Objective] To investigate the polymorphism of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) in *Bacillus anthracis* and the application to molecular typing based on the polymorphism of CRISPR in *B. anthracis*. [Methods] We downloaded the whole genome sequence of 6 *B. anthracis* strains and extracted the CRISPR sites. We designed the primers of CRISPR sites and amplified the CRISPR fragments in 193 *B. anthracis* strains by PCR and sequenced these fragments. In order to reveal the polymorphism of CRISPR in *B. anthracis*, we aligned all the extracted sequences and sequenced results by local blasting. At the same time, we also analyzed the CRISPR sites in *B. cereus* and *B. thuringiensis*. [Results] We did not find any polymorphism of CRISPR in *B. anthracis*. [Conclusion] The molecular typing approach based on CRISPR polymorphism is not suitable for *B. anthracis*, but it is possible for us to distinguish *B. anthracis* from *B. cereus* and *B. thuringiensis*.

Keywords: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR), *Bacillus anthracis*, molecular typing

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China Programs for Communicable Diseases (2012ZX10004215) and by the National Natural Science Foundation of China (81271785, 81125012)

* Corresponding author. Tel: +86-10-66948835; E-mail: wanghl@nic.bmi.ac.cn, liuxk007@163.com

These authors contributed equally to this work.

Received: 12 May 2014/Revised: 14 July 2014