

成簇的规律间隔的短回文重复序列 CRISPR 的研究进展

王丽丽, 何进, 王阶平*

华中农业大学生命科学技术学院农业微生物学国家重点实验室, 微生物农药国家工程研究中心, 武汉 430070

摘要: 最近发现, 在细菌和古菌中广泛存在的成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白是针对噬菌体、质粒等外源 DNA 的获得性和可遗传的免疫系统。本文综述了 CRISPR 系统的基本结构、多样性、作用机理及其区分自我与非我的机制, 并对 CRISPR 研究和应用前景进行了展望。

关键词: 成簇的规律间隔的短回文重复序列, 多样性, 作用机理, RNA 干扰

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 08-1007-07

在自然界, 噬菌体、转座子和结合转移质粒等可移动遗传元件与原核生物的关系是错综复杂的, 一方面, 这些可移动遗传元件介导的水平基因转移 (horizontal gene transfer, HGT) 是细菌和古菌基因组进化的重要推动力^[1], 另一方面, 在中性选择的驱动下, 细菌和古菌进化出多种抵抗水平基因转移的机制。成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白是最近发现的在细菌和古菌中广泛存在的针对噬菌体、质粒等外源 DNA 入侵的免疫系统^[2]。

CRISPR 是一类独特的正向重复序列家族, 最早 (1987 年) 在大肠杆菌中发现, 后来在其他原核生物 (特别是古菌) 中发现了大量的类似重复序列。2002 年 Jansen 等将其命名为 CRISPR^[3–4]。根据不同的研究结果, 人们对 CRISPR 系统的生物学功能曾有过种种推测, 例如, 与复制子分离有关; 可能是可移动元件; 可能参与 DNA 修复等^[2]。2005 年, 3 个研究小组分别发现一些 CRISPR 的间

区序列是来自噬菌体或质粒等染色体外的序列, 据此推断 CRISPR 系统能使宿主获得抵抗噬菌体、质粒等外来 DNA 入侵的免疫能力^[5–7]。2007 年, Barrangou 等^[8]通过实验证实了 CRISPR 系统的这一生物学功能。

1 CRISPR 系统的基本结构

CRISPR 系统通常包括: 由不连续的重复序列 (repeats, R) 与长度相似的间区序列 (spacers, S) 间隔排列而成的 CRISPR 簇, 前导序列 (leader, L) 以及一系列 CRISPR 相关蛋白基因 (cas) (图 1-A)。在噬菌体、质粒等入侵后, 新的 R-S 片段会插入到前导序列和原来第一个重复序列之间 (图 1-B), 从而使宿主获得抵抗相应噬菌体、质粒等再次入侵的免疫能力^[2,4]。

重复序列 (R) 的长度为 23–50 bp, 平均 31 bp, 且具有 5–7 bp 的回文序列, 通常能形成稳定的茎-环结构。许多 R 区还具有保守的 GAAA (C/G) 3'-

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30930004)

* 通信作者。Tel: +86-27-87280670; E-mail: wangjieping2011@163.com

作者简介: 王丽丽 (1984–), 女, 内蒙古扎赉特旗人, 硕士研究生, 研究方向为细菌基因组学。E-mail: wangli12271227@163.com

收稿日期: 2011-01-19; 修回日期: 2011-03-04

端基序 (motif), 该保守基序可能是 CAS 蛋白的结合位点^[9]。例如, 重复序列 GTCGCACCTCATATA GGTGCCTGG ATTGAAAT 在苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) YBT-4520 和 CT-43 菌株 (由本室完成全基因组测序) 均存在, 其中, 下划线部分为 7 bp 的回文序列, 3'-端保守基序为 GAAA (T)。间区序列 (S) 的长度为 17 - 84 bp, 平均为

36 bp, 可能来自噬菌体、质粒、染色体的部分序列。前导序列 (L) 位于 CRISPR 簇的上游且紧邻第一个 R 区, 是一段不保守的长约为 550 bp 的通常富含 AT 的序列。在 CAS 蛋白中已鉴定出核酸内切酶、核酸外切酶、螺旋酶、RNA 和 DNA 结合等结构域, 因此, 认为 CAS 蛋白参与 CRISPR 的转录、加工和外来基因序列的降解等过程^[4]。

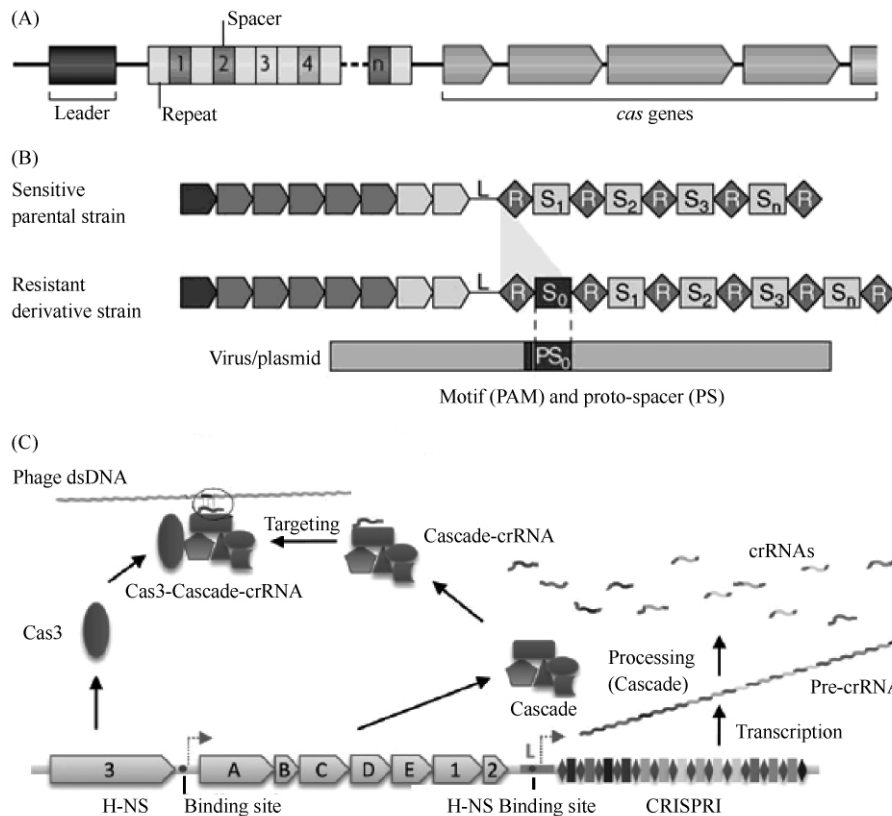


图 1 CRISPR 系统的结构及其作用机理

Fig. 1 The structure and mechanism of action of CRISPR system^[4, 22]. A: Features of CRISPR loci; B: Acquisition of new repeat-spacer units; C: Mechanism of interference by the CRISPR systems.

2 CRISPR 系统的广泛分布和多样性

在已测序的约 40% 细菌和 90% 古菌基因组中至少存在 1 个 CRISPR 座位 (locus), 古菌詹氏甲烷球菌 (*Methanocaldococcus jannaschii*) 中存在 18 个 CRISPR 座位, 是目前已研究的原核生物中最多的^[4]。每个 CRISPR 座位具有几个到几百个 R-S 重复单位 (图 1-A), 平均为 66 个, 目前记录最高的是 *Chloroflexus* sp. Y400fl (4 个 CRISPR 座位中的 1 个具有 374 个 R-S 重复单位) 和 *Verminephrobacter*

eiseniae (249 个)^[2, 4]。cas 基因多达 45 个家族^[10], 根据 CAS 蛋白的序列同源性、组成情况和功能, 可将 CRISPR 系统分为 8 个亚型: Ecoli、Ypest、Nmeni、Dvulg、Tneap、Hmari、Apern 和 Mtube, 各亚型通常具有 2 - 6 个亚型特异的 cas 基因, 在没有 CRISPR 系统的基因组中则不存在相关基因^[4]。cas1 - cas6 这 6 个家族广泛存在于不同的 CRISPR 亚型, 被认为是核心 cas 基因, 其中只有 cas1 和 cas2 家族存在于所有的 CRISPR 亚型, 因此 cas1 和 cas2 家族基因也被用作鉴定 CRISPR 系统的分子标记^[11]。

此外, 间区序列 (S) 也具有极其丰富的多样性,

Horvath 等^[12] 在嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 的 124 个菌株中发现了 3626 个间区序列,分布在 3 个 CRISPR 座位,其中,77%、16% 和 7% 的 S 序列分别与噬菌体、质粒和嗜热链球菌基因组序列具有同源性。在 Bt 菌 YBT-1520 和 CT-43 菌株的染色体上均没有鉴定出 CRISPR 系统,而在 YBT-1520 菌株的大质粒 pBMB293 和 CT-43 菌株的大质粒 pCT283 上各存在 2 个 CRISPR 座位。pBMB293 的 CRISPR-1 座位包含 10 个间区序列,其中的 5 个分别与已知噬菌体 GIL16c 和 Bam35c、质粒 pGIL01 和 pAH187、*Halothermothrix orenii* H 168 的染色体有很高的序列同源性;CRISPR-2 座位包含 5 个间区序列,只有 1 个与已知的质粒序列 (pAH187) 具有同源性。

目前,被普遍接受的导致 CRISPR 系统在细菌和古菌中如此广泛分布的进化机制是水平基因转移,在细菌和古菌中都找到了大量有关证据^[4,13-14]。有趣的是,通过水平基因转移而获得的 CRISPR 系统却为各宿主菌提供了抵抗水平基因转移的免疫能力。例如,临床致病菌表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 的 1 个 CRISPR 间区序列与存在于几乎所有葡萄球菌的结合转移质粒上的切口酶 (nickase) 具有同源性,从而阻止了质粒在该菌中的结合转移和转化,并能防止药物抗性在菌株间扩散^[15]。另一个反面的例子是,在多药物抗性的肠球菌基因组中缺失 CRISPR 系统^[16]。这不仅体现了 CRISPR 系统的“自私性”,也体现了进化上的矛盾性。

3 CRISPR 的作用机理

3.1 新间区序列的获得

在噬菌体等入侵宿主菌后,CRISPR 系统会从外来序列中选取一段序列作为新的间区序列,加工成新的 R-S 序列后以非同源重组的方式增加到 CRISPR 簇内,从而使宿主获得抵抗相应噬菌体等再次入侵的免疫能力^[1,4],这一现象也得到实验证实^[8]。新的 R-S 序列几乎总插入到前导序列和原来的第一个 R 区之间(图 1-B),因此,前导序列中可能存在相关蛋白(可能是 CAS 蛋白)的识别位点,在增加新 R-S 序列过程中起定位的功能。

CRISPR 系统从噬菌体等基因组中选取新的间

区序列并不是随机的。事实上,多个研究小组已经在噬菌体、质粒中发现了一些称为前间区序列 (protospacer) 的序列,并且在其附近鉴定出一些小的前间区序列邻近基序 (protospacer adjacent motifs, PAMs),如嗜热链球菌的 NNAGAAW 基序^[17] 和 NGGNG 基序^[12]。PAM 基序位于前间区序列的 5'-端或 3'-端^[14,18],不同 CRISPR 亚型识别的 PAM 基序具有亚型特异性^[19]。目前,有哪些蛋白质参与 PAM 基序的识别、前间区序列的选取、间区序列长度如何确定等方面的具体机制尚不清楚,是未来的重点研究方向之一。

3.2 CRISPR 的转录与加工

研究表明,CRISPR 簇首先转录为长的转录体,即前 crRNA,然后逐步被加工成小的 crRNA。多数情况下,只有 CRISPR 簇的编码链被转录和加工^[15,20],但在古菌 *Sulfolobus* 属^[14] 和嗜热链球菌^[8] 中,CRISPR 簇的 2 条链都可以被转录。在大肠杆菌 K12 菌株中,CRISPR 簇的前 crRNA 与 CAS 蛋白 CasABCDE(即 Cse1-Cse2-Cse4-Cas5e-Cse3)形成的 Cascade 复合物结合,其中,CasE 的功能是将前 crRNA 切割加工成 crRNA,成熟的 crRNA 分子一般包含 5'-端为 8-9 nt 的 R 区、S 区和 3'-端稍长且更多样化的 R 区^[20](图 1-C)。在超嗜热菌强烈耐热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 中,Cas6 的功能与 CasE 相同,Cas6 是金属离子依赖型的核酸内切酶,与 CRISPR 的重复序列 5'-端特定基序结合并在重复序列的 3'-端将其切开^[21]。

CRISPR 簇及 *cas* 基因的转录受到宿主内多种因素的调控^[22]。在大肠杆菌中,类组蛋白拟核构造蛋白 (histone-like nucleoid structuring protein, H-NS) 能降低 CRISPR 系统抵抗噬菌体的能力^[23],而转录因子 LeuO 能解除 H-NS 的抑制作用^[24]。研究表明,H-NS 能与 CRISPR 簇及 *cas* 基因的启动子区结合,抑制 CRISPR 簇及 *cas* 基因的转录(图 1-C),一方面,CRISPR 簇被转录的前 crRNA 减少了,另一方面,CAS 蛋白特别是 CasE 的减少又导致将半衰期短的前 crRNA 加工成更稳定的 crRNA 的能力降低^[23-24],从而导致 CRISPR 系统抵抗噬菌体的能力降低。

3.3 CRISPR 系统介导的沉默

嗜热链球菌在受噬菌体侵染后,CRISPR 簇新获得的间区序列有的来自噬菌体 DNA 的编码链,有的

来自模板链^[8];无论用 λ 噬菌体的编码链还是用模板链作为人工设计的间区序列,都能有效地使大肠杆菌获得抗 λ 噬菌体的能力^[20];表皮葡萄球菌的1个CRISPR间区序列与结合转移质粒的切口酶(nickase)具有同源性,而切口酶只在结合转移的供体菌中发挥功能,但CRISPR系统能使供体菌和受体菌都失去结合转移能力^[15]。综合这些研究结果,我们不难看出crRNA的作用机理不同于反义RNA,应该是直接作用于DNA。同时,前间区序列邻近基序PAM不仅是选取新间区序列的识别位点,也是crRNA作用于外来DNA的靶标之一^[4]。

强烈炽热球菌的Cascade复合物包括多个Cmr型的CAS蛋白,由Cas6加工成的前导RNA与该复合物结合后继续被加工,即得到成熟的psiRNA(prokaryotic silencing RNA)^[25]。Hale等进行的体外实验表明,单链的psiRNA-Cmr复合物能位点特异地切割RNA而不能作用于DNA,而且切割位点总位于psiRNA的3'-末端往前14 nt^[25]。这种作用机理与真核生物的siRNA极其相似,只是还没有psiRNA作用于天然靶标(来自噬菌体、质粒的转录体)的体内证据^[26]。

因此,前crRNA加工为成熟的crRNA后,是直接作用于DNA还是RNA,至今仍处于争论期^[15, 20, 25-26]。或许二者兼而有之,但谁主谁次尚不清楚。

3.4 区分自我与非我

一般情况下,免疫系统能很好地区分自我与非我,从而快速产生针对外来成分的免疫反应,同时避免产生自身免疫。CRISPR系统的crRNA是如何区分来自噬菌体、质粒DNA上的前间区序列和自身CRISPR簇上的间区序列呢? crRNA-Cascade复合物是如何靶向切割外来DNA而不切割自身CRISPR座位呢?

Marraffini等通过向敲除了CRISPR簇的表皮葡萄球菌菌株中回补不同的CRISPR簇的突变体,并转入带有前间区序列及其邻近基序PAM(进行了个别重要碱基的替换)的外来DNA序列,他们发现成熟crRNA的5'-端重复序列(R区)在保护自身CRISPR簇不被切割时起主要作用,也暗示成熟crRNA 5'-端的均质性(5'-端R区为8-9 nt, 3'-端R区更长且多变)对crRNA发挥功能的重要性(图2);同时,外来DNA中的前间区序列邻近基序

PAM在区分自我与非我的过程中也起关键作用^[27]。

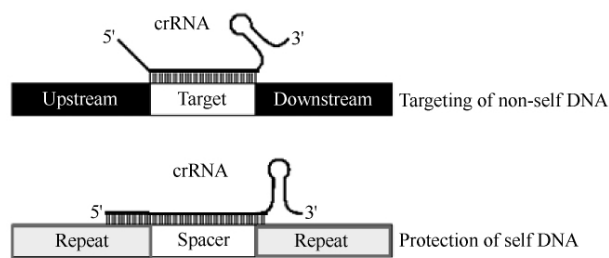


图2 crRNA区分自我与非我的机制^[4]。

Fig. 2 Self versus non-self discrimination during CRISPR immunity^[4].

值得关注的是,Stern等^[28]最近发现了自靶向的间区序列(self-targeting spacers)。他们分析了来自330种含CRISPR系统的原核生物的23550个间区序列(S区),发现每250个间区序列中就有1个是自靶向的,所研究的330种原核生物中有18%存在自靶向的间区序列。由于缺乏保守性,而且在自靶向间区序列的附近存在大量已退化的重复序列,因此,他们认为存在自靶向的间区序列不是其他调控机制而是一种自身免疫机制^[28]。

4 展望

综上所述,进化上较古老的抵抗外源DNA入侵的CRISPR系统已成为微生物学的研究热点之一,深入研究CRISPR系统不仅具有重大的理论意义,而且具有广阔的应用前景。CRISPR系统间区序列的多样性和特异性已被广泛应用于基因分型、流行病学研究、分析不同人体内的细菌菌群差异、检测环境中的噬菌体等科学研究^[4, 29-31]。利用其作用机制的独特性,CRISPR系统已用于构建噬菌体抗性的工业生产菌株。此外,CRISPR系统还可能在以下几方面得到广泛应用:作为遗传操作的工具而用于靶向基因沉默;crRNA-Cascade复合物可用于体外DNA、RNA分子的位点特异性切割;在临床上,通过限制质粒结合转移而控制药物抗性基因在致病菌之间扩散等^[4]。

本课题组已完成了Bt菌YBT-4520(序列待公布)、CT-43(序列待公布)和无质粒无晶体突变株BMB171^[32]的基因组测序工作。我们的研究发现,YBT-4520和CT-43均含有10个大小不等的质粒,

在 Bt 菌的染色体上均不含 CRISPR 系统,在 YBT-1520 和 CT-43 的大质粒上各鉴定出 2 个 CRISPR 座位(BMB171 菌株没有)。让我们感兴趣的是:(1)染色体上不含 CRISPR 系统是否与 Bt 菌能同时容纳如此多的质粒有关?(2)野生菌株 YBT-1520 和 CT-43 的电转化效率最高只有 10^3 ,而突变株 BMB171 的电转化效率可高达 $10^{10[33]}$,这是否与野生菌株的质粒上存在 CRISPR 系统有关?目前,我们正在开展相关的工作。

尽管发现 CRISPR 系统已有 20 多年,但直到最近 3-6 年才逐步揭开其神秘面纱。因此,还存在许多值得进一步研究的问题: crRNA 是直接作用于 DNA 还是 RNA; psiRNA 介导的 RNAi 作用在原核生物中是否普遍存在; 间隔区序列的获得机制已得到初步阐明,但间隔区序列的丢失机制尚不清楚; 形成 crRNA-Cascade 复合物的动态过程等。此外,为什么只有约 40% 的已测序细菌基因组中存在该系统?是分析方法的原因,还是大部分测序的细菌在实验室长期培养后,因没有噬菌体等入侵压力的情况下丢失了该系统?

参考文献

- [1] Koonin EV, Wolf YI. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(21): 6688-6719.
- [2] 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.
- [3] Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [4] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(3): 181-190.
- [5] Mojica FJ, Díez-Villasenor C, García-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.
- [6] 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.
- [7] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551-2561.
- [8] 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.
- [9] Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology*, 2007, 8(4): R61.
- [10] 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.
- [11] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology*, 2010, 64: 475-493.
- [12] Horvath P, Romero DA, Coute-Monvoisin A, 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.
- [13] Chakraborty S, Snijders AP, Chakravorty R, Ahmed M, Tarek AM, Hossain MA. Comparative network clustering of direct repeats (DRs) and cas genes confirms the possibility of the horizontal transfer of CRISPR locus among bacteria. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 56(3): 878-887.
- [14] Lillestol RK, Shah SA, Brugger K, Redder P, Phan H, Christiansen J, Garrett RA. CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties. *Molecular Microbiology*, 2009, 72(1): 259-272.
- [15] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science*, 2008, 322(5909): 1843-1845.
- [16] Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *mBio Journal*, 2010, 1(4): e00227-10.
- [17] Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(4): 1390-1400.

- [18] van der Ploeg JR. Analysis of CRISPR in *Streptococcus mutans* suggests frequent occurrence of acquired immunity against infection by M102-like bacteriophages. *Microbiology*, 2009, 155(6) : 1966-1976.
- [19] Mojica FJ, Díez-Villasenor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 2009, 155(3) : 733-740.
- [20] Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891) : 960-964.
- [21] Carte J, Wang RY, Li H, Terns RM, Terns MP. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes & Development*, 2008, 22(24) : 3489-3496.
- [22] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C. The on-off switch of CRISPR immunity against phages in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(6) : 1341-1345.
- [23] Pul Ü, Wurm R, Arslan Z, Geissen R, Hofmann N, Wagner R. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(6) : 1495-1512.
- [24] Westra ER, Pul ü, Heidrich N, Jore MM, Lundgren M, Stratmann T, Wurm R, Raine A, Mescher M, Van Heereveld L, Mastop M, Wagner EG, Schnetz K, Van Der Oost J, Wagner R, Brouns SJ. H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(6) : 1380-1393.
- [25] Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, Terns RM, Terns MP. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*, 2009, 139(5) : 945-956.
- [26] van der Oostl J, Brouns SJJ. RNAi: prokaryotes get in on the act. *Cell*, 2009, 139(5) : 863-865.
- [27] Marraffini LA, Sontheimer EJ. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 2010, 463(7280) : 568-572.
- [28] Stern A, Keren L, Wurtzel O, Amitai G, Sorek R. Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity? *Trends in Genetics*, 2010, 26(8) : 335-340.
- [29] Zhang J, Abadia E, Refregier G, Tafaj S, Boschirolì ML, Guillard B, Andremont A, Ruimy R, Sola C. *Mycobacterium tuberculosis* complex CRISPR genotyping: improving efficiency, throughput and discriminative power of 'spoligotyping' with new spacers and a microbead-based hybridization assay. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59(3) : 285-294.
- [30] Pride DT, Sun CL, Salzman J, Rao N, Loomer P, Armitage GC, Banfield JF, Relman DA. Analysis of streptococcal CRISPRs from human saliva reveals substantial sequence diversity within and between subjects over time. *Genome Research*, 2011, 21(1) : 126-136.
- [31] Snyder JC, Bateson MM, Lavin M, Young MJ. Use of cellular CRISPR (clusters of regularly interspaced short palindromic repeats) spacer-based microarrays for detection of viruses in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(21) : 7251-7258.
- [32] He J, Shao XH, Zheng HJ, Li MS, Wang JP, Zhang QY, Li L, Liu ZD, Sun M, Wang SY, Yu ZN. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(15) : 4074-4075.
- [33] Peng DH, Luo Y, Guo S, Zeng H, Ju S, Yu ZN, Sun M. Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(6) : 1849-1858.

Advances in clustered regularly interspaced short palindromic repeats—A review

Lili Wang , Jin He , Jieping Wang^{*}

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology and National Engineering , Research Center of Microbial Pesticides , Huazhong Agricultural University , Wuhan 430070 , China

Abstract: The recently discovered Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPRs) can protect bacteria and archaea with adaptive and heritable defense systems against the invasion of phage- and plasmid- associated mobile genetic elements. Here , we review the structure , diversity , mechanism of interference and self versus non-self discrimination of CRISPR systems. We also discuss the potential applications of this novel interference system.

Keywords: clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) , diversity , mechanism of action , RNA interference

(本文责编: 王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30930004)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-27-87280670; E-mail: wangjieping2011@163.com

Received: 19 January 2011/Revised: 4 march 2011

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicroen>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2011 年 8 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 – 1956	半年刊	1 – 4	1 – 2
1957 – 1958	季刊	5 – 6	1 – 4
1959	季刊	7	1 – 2
1959 – 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 – 4
1963 – 1965	季刊	9 – 11	1 – 4
1966	季刊	12	1 – 2
1966 – 1972	停刊 6 年半		
1973 – 1988	季刊	13 – 28	1 – 4
1989 – 2007	双月刊	29 – 47	1 – 6
2008	月刊	48	1 – 12
2009	月刊	49	1 – 12
2010	月刊	50	1 – 12
2011	月刊	51	1 – 8