

腾冲嗜热厌氧杆菌 Cas2 原核表达及生物信息学分析

王 川^{1*}, 刘原子², 魏亚琴^{3*}, 毛 婷³, 杨宇泽⁴, 俞海山¹, 张 钊¹, 万学瑞¹

(1. 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 陕西梅里众诚动物保健有限公司 陕西 西安 712034;

3. 甘肃省微生物资源开发利用重点实验室, 甘肃省科学院生物研究所厌氧微生物中心, 甘肃 兰州 730000;

4. 北京市畜牧总站, 北京 100101)

摘 要 为研究 CRISPR/Cas 系统及其相关蛋白 Cas2 (TTE2657) 在腾冲嗜热厌氧杆菌热适应中的作用, 应用 PCR 技术构建了原核重组质粒 pET-28a::cas2, 并在大肠埃希菌 BL21 表达 Cas2 蛋白; 结合生物信息学软件对 cas2 编码蛋白的基本理化性质、氨基酸同源性、空间结构及蛋白质相互作用网络进行预测和分析。结果显示, 成功构建了原核表达载体 pET-28a::cas2 并在大肠埃希菌 BL21 中得到表达, Cas2 分子质量大小为 9.9 ku, 主要以可溶性形式存在; qRT-PCR 显示 cas2 mRNA 在 60 °C 和 75 °C 高表达; 生物信息学分析显示 cas2 基因其完整的 ORF 全长 264 bp, 编码 88 个氨基酸, 其中 Ile (14)、Ser (14)、Phe (12) 含量较高, 等电点为 9.31, 不存在跨膜结构。其蛋白质二级空间结构以 α -螺旋、无规则卷曲、 β -折叠为主, 蛋白互作预测网络显示 Cas2 与 Cas3、Cas5、Cas7 等其家族大部分蛋白存在相互作用。进化树分析显示腾冲嗜热厌氧杆菌 cas2 基因与厌氧菌芽胞杆菌 B7M1 同源性最高 (39.5%)。腾冲嗜热厌氧杆菌 cas2 编码蛋白是一种亲水性蛋白, 在原核系统能高效表达。本研究为嗜热蛋白质的热稳定性机制的研究提供参考。

关键词 腾冲嗜热厌氧杆菌; cas2 基因; qRT-PCR; 原核表达; 生物信息学分析

中图分类号 Q939.11 文献标识码 A 文章编号 1005-7021(2021)02-0010-07

doi: 10.3969/j.issn.1005-7021.2021.02.002

Prokaryotic Expression and Bioinformatics Analysis of Cas2 in *Thermoanaerobacter tengcongensis*

WANG Chuan^{1*}, LIU Yuan-zi², WEI Ya-qin^{3*}, MAO Ting³, YANG Yu-ze⁴,
YU Hai-shan¹, ZHANG Zhao¹, WAN Xue-rui¹

(1. Coll. of Vet. Med., Gansu Agric. Uni., Lanzhou 730070; 2. Shaanxi Meili Zhongcheng Animal Health Care Co. Ltd., Xi'an 712034;

3. Key Lab. of Microb. Res. Exploit. & Appl. of Gansu Prov. Inst. of Biol., Gansu Prov. Acad. of Sci.,

Ctr. for Anaerob. Microbes, Lanzhou 730000; 4. Beijing Anim. Husbandry Sta., Beijing 100101)

Abstract In order to study the role of CRISPR/Cas system and its related protein Cas2 (TTE2657) in thermal adaptation of *Thermoanaerobacter tengcongensis*, a prokaryotic recombinant plasmid pET-28a::cas2 was constructed and Cas2 protein was expressed in *E. coli* BL21. Cas2 was used to predict and analyze the basic physicochemical properties, amino acid homology, spatial structure and protein interaction network combined with bioinformatics software. The results showed that the prokaryotic expression vector pET-28a::cas2 was successfully constructed and Cas2 was expressed in *E. coli* BL21. The molecular mass of Cas2 was 9.9 ku, mainly in soluble form. qRT-PCR showed that cas2 mRNA was highly expressed at 60 °C and 75 °C; and bioinformatics analysis showed that the complete ORF of

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31500067); 甘肃省科技计划项目重点研发计划项目 (18YF1NA077); 甘肃农业大学 2018 年学生科研训练计划项目 (SRTP 20180327 20180328); 甘肃省科学院应用研究与开发项目 (2018JK-07 2019HZ-03 2020JK-03)

作者简介: 王川 男, 副教授, 博士, 硕士生导师。研究方向为微生物功能基因组学。E-mail: wangchuan@gsau.edu.cn

* 通讯作者: 王川。并列通讯作者魏亚琴, 女, 副研究员, 博士。研究方向为厌氧微生物功能基因组学及厌氧微生物的应用研究。

E-mail: weiyq11@lzu.edu.cn

收稿日期: 2020-09-09

cas2 was 264 bp in length and encoded 88 amino acids. Among them the contents of Ile(14) ,Ser(14) and Phe(12) were higher ,and the isoelectric point was at 9.31 ,and there was no transmembrane structure. The secondary spatial structure of the protein was mainly α -helix ,irregular coil ,and β -folded. The protein interaction prediction network showed that Cas2 interacted with the most of the family proteins Cas3 ,Cas5 ,Cas7 ,and others. Phylogenetic tree analysis showed that the gene *cas2* of *T. tengcongensis* had the highest homology with *Bacillus anaerobic* B7M1. And the *cas2* coded protein of *T. tengcongensis* was a hydrophilic protein that could efficiently express in prokaryotic systems. This study has some instructive for the study on thermal stability mechanism of thermophilic proteins.

Keywords *Thermoanaerobacter tengcongensis*; *cas2* gene; qRT-PCR; prokaryotic expression; bioinformatics analysis

嗜热菌是生活在环境温度 50 °C 以上的一类微生物。腾冲嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*) MB4 株是科学家在中国云南腾冲地区热泉分离得到的 1 株嗜热厌氧菌 ,其最适生长温度为 75 °C^[1] ,我国自主对其全基因组进行了测序^[2]。CRISPR/Cas 系统是一种细菌抵抗外源噬菌体的免疫机制 ,长期研究发现在 90% 的古生菌及 40% 的细菌基因组中都存在这种系统^[3-4]。CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 系统由重复间隔序列、前导序列和 *cas* 基因组成 ,其最明显的结构特征是由一段不连续的重复序列(Direct repeat ,DR) 和插入其中的间隔序列(Spacer sequence) 构成的重复间隔序列^[5-6]。相比常温菌 ,这些系统和短的重复序列在嗜热菌种中更丰富 ,数目更多。CRISPR/Cas 系统根据 Cas 蛋白分为 3 种类型即 I 型、II 型和 III 型 ,这 3 种类型又可以分为 I-A 到 I-F、II-A 和 II-B、III-B 几种亚型^[7]。Cas1、Cas2 蛋白在各类型和亚型的 CRISPR/Cas 系统中普遍存在且高度保守 ,被视为探究 CRISPR/Cas 系统进化关系的支架^[8]。不同的 CRISPR/Cas 系统中其 Cas 蛋白的功能各不相同 ,例如核糖核酸酶、解旋酶、聚合酶等^[9]。最近有研究证明 ,CRISPR 位点具有基因表达调控的功能^[10]。Cas2 是一种保守的核酸内切酶 ,并且发挥着重要的作用^[11-12] ,其广泛分布于所有含有 CRISPR 序列的微生物基因组中^[13-16]。前期进行了腾冲嗜热厌氧杆菌在不同温度条件下的转录组分析 ,全局性分析了该菌的嗜热机制^[17]。发现腾冲嗜热厌氧杆菌基因组上有 3 个短的重复序列 CRISPR ,分别为 C65、C25 和 C216(数字表示重复数) 。腾冲嗜热厌氧杆菌 CRISPR/Cas 系统属于 I-A 和 III-B 亚型 ,*cas2* 基因属于 I-A 亚型^[18]。本研究通过生物信息学方法研究 Cas2 在腾冲嗜热厌氧菌热适应过程的

作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 腾冲嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*) 由谭华荣研究员惠赠; 质粒 pET-28a 和 pBluescript II KS(+) ,菌株 *E. coli* DH5 α 和表达菌株 *E. coli* BL21 为本实验室保藏。

1.1.2 培养基 TTE 培养基用于腾冲嗜热厌氧杆菌培养^[19] ; 培养大肠埃希菌 DH5 α 、BL21 的培养基为 LB 培养基 ,2 \times YT 培养基用于重组菌的诱导。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA Ligase 购自 Thermo fisher 公司; 镍柱购自 GE 公司; 氨苄青霉素、卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-4-thiogalactopyranoside , IPTG) 、EasyPfu DNA polymerase 购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒 DNA 小提试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 利用 primer5 参照 GenBank 中腾冲嗜热菌 MB4(AE008691. 1) *cas2* 的序列设计引物 ,克隆引物见表 1。

1.2.2 腾冲嗜热厌氧杆菌基因组 DNA 的提取 腾冲嗜热厌氧杆菌在 TTE 培养基中 75 °C 培养 12 h ,使用 CTAB 法提取嗜热菌基因组 DNA。

1.2.3 *cas2* 基因的扩增 以提取的基因组 DNA 为模板进行扩增。反应条件: 95 °C 预变性 6 min; 95 °C 35 s; 50.7 °C 45 s; 72 °C 2 min; 共 35 个循环。将 *cas2* 和 pET-28a 双酶切 ,16 °C 连接 ,将其转化到 DH5 α 中 ,提取质粒后酶切鉴定并送至生物公司测序。

表 1 试验分析所用引物
Table 1 Primers used in this test

引物名称	核苷酸序列(5'~3')	用途
<i>cas2</i> -F	CGGGATCCATGTATGTGATTTTG- GTGTATGA	基因克隆
<i>cas2</i> -R	CCGCTCGAGATATATCCATTCT- TCTCCTCCCTTTT	基因克隆
<i>cas2</i> -F'	CCGAATCTTCTTCAGGGTCA	荧光定量 PCR
<i>cas2</i> -R'	TTTAAAAACCGCTCGTCGTT	荧光定量 PCR
16S RNA-F	CGTAGGCGGTTTAGCAAGTC	荧光定量 PCR
16S RNA-R	CTACGCATTTACCGCTACA	荧光定量 PCR

1.2.4 重组蛋白的表达及纯化 将测序正确的重组质粒转化至大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞中,挑取单菌落过夜培养后按 1:100 比例转接入 100 mL 2 × YT(Kan +) 培养基中,37 °C 培养 2.5 h 至菌液 OD 值(600 nm) 达到 0.4~0.6,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 在 26 °C 诱导表达 7 h,7 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,PBS 缓冲液洗涤 2 次后超声波破碎 30 min(40% 功率,工作 5 s,间歇 5 s),7 000 r/min 离心 10 min^[20]。收集上清并用 GE 公司的 Ni-NTA 柱进行蛋白纯化,以诱导前的重组菌株为对照进行 SDS-PAGE 电泳,分析重组蛋白表达情况。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 在 50、60、75 和 80 °C 条件下培养嗜热厌氧杆菌。RNA 提取及 RT-PCR 方法参照 Liu 等^[19] 的文章。引物序列见表 1,以 16S RNA 作为内参基因,用相对定量的方法检测不同温度下 *cas2* 基因的表达量变化^[21]。荧光定量数据的计算方法以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方式计算^[22],采用 SPSS 软件进行 ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

1.2.6 *cas2* 及编码蛋白的生物信息学分析 选取嗜热厌氧杆菌(AAM25776.1)、沙门氏菌(AEB71782.1)、嗜酸革兰杆菌(KJE29018.1)、单核细胞增生李斯特氏菌(KFL19553.1)、嗜盐杆菌(AXH10449.1) *cas2* 基因,利用在线软件 Prot-Param(<http://www.expasy.org/tools>) 分析该基因序列编码蛋白 Cas2 氨基酸序列组成与理化性质;应用软件 ProtScale(<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) 分析其氨基酸

残基疏水性;应用软件 TMHMM Server v.2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 预测跨膜区;利用软件 SignalP 3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0>) 预测蛋白信号肽;利用软件 PredictProtein(<https://www.predictprotein.org/home>) 预测蛋白质二级结构;运用 STRING 数据库(<http://string-db.org>) ,设置为高置信度 0.7,不限制数量,构建与 Cas2 相互作用的蛋白网络。

2 结果与分析

2.1 *cas2* 的克隆和表达载体的构建

通过 PCR 方法克隆得到了嗜热厌氧杆菌 *cas2* 基因,测序结果表明 *cas2* 大小为 264 bp。所得 *cas2* 基因序列比对同源性为 100%,将 *cas2* 连接到 pET-28a,转化大肠埃希菌 DH5 α ,构建的重组质粒 pET-28a:*cas2* 经 BamH I 和 Xho I 酶切验证无误后转化大肠埃希菌 BL21,*cas2* PCR 结果和质粒双酶切验证图谱见图 1。

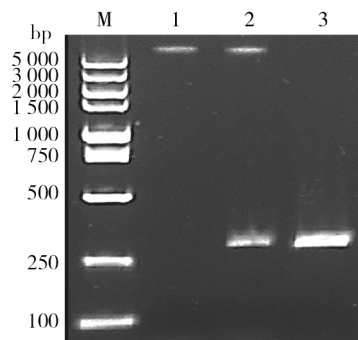


图 1 *cas2* 基因的 PCR 扩增产物及重组质粒双酶切

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products of *cas2* gene and recombinant plasmid digested

M: DNA 分子质量标准 DL5000; 1: pET-28a 载体; 2: pET-28a:*cas2* 重组质粒双酶切; 3: *cas2* per 产物

M: DL5000 DNA Marker; 1: pET-28a vector; 2: Double endonuclease digestion product of pET-28a:*cas2*; 3: PCR products of *cas2* gene

2.2 Cas2 蛋白诱导表达及 SDS-PAGE 电泳

pET-28a:*cas2* 重组菌株经 IPTG 诱导,超声波破碎后进行纯化,得到蛋白 Cas2 并进行 SDS-PAGE 电泳检测。SDS-PAGE 分析表明,诱导前无特异条带,诱导后出现特异条带,纯化后在 10 ku 附近出现单一条带(图 2)。

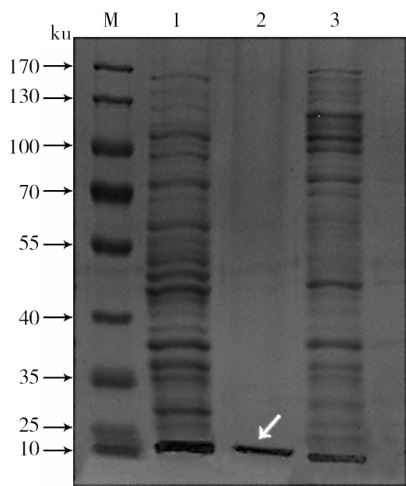


图2 Cas2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the Cas2 expressed product
M: 蛋白分子质量标准; 1: 诱导后的 pET-28a:: cas2 菌液;
2: 纯化后的 pET-28a:: Cas2 蛋白; 3: 未诱导的 pET28a:: cas2 菌液
M: Protein molecular weight Marker; 1: pET-28a:: cas2 induced with IPTG; 2: Purification recombinant expressed protein of Cas2; 3: pET-28a:: cas2 not induced with IPTG

2.3 cas2 在不同温度下的转录分析

将 50 ℃ 的表达量定义为 1 ,结果显示在 60、75 和 80 ℃ 表达量是相对于 50 ℃ 表达量的 22.2、39.3 和 12.8 倍(图 3) 。可以看出在 50 到 75 ℃ , cas2 表达量随温度升高而升高 ,cas2 基因在 60 ℃ 和 75 ℃ 高表达 ,说明 cas2 表达量与温度有关。

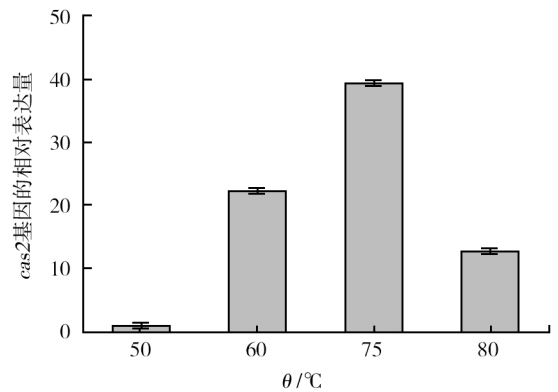


图3 cas2 在 50、60、75 和 80 ℃ 下的表达分析

Fig.3 The expression analysis of cas2 under 50 , 60 , 75 and 80 ℃

16S RNA 作为内参基因 50 ℃ 时表达量作为 1
16S RNA was used as internal control , and the transcription at 50 ℃ was arbitrary assigned as relative 1

2.4 cas2 基因及其编码蛋白氨基酸的生物信息学分析分子特征

cas2 基因序列及编码蛋白序列的分子特征:
通过在线软件 EXPASY 分析得到腾冲嗜热厌氧杆菌 cas2 完整 ORF 全长 264 bp ,编码 84 个氨基酸 ,蛋白分子质量约为 9.9 ku ,等电点为 9.31 ,分子式为 C₄₇₃H₆₉₁N₁₁₅O₁₂₀S₁ 。通过生物信息学分析比较了 cas2 基因在腾冲嗜热厌氧杆菌、沙门氏菌、嗜酸革兰杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌和嗜盐杆菌所编码氨基酸的基本理化性质(表 2) 。

表2 cas2 基因及编码蛋白的生物学特征

Table 2 Biological characteristics of cas2 gene and encoded protein

菌株	核苷酸数/个	GC 含量/ %	氨基酸数/个	等电点(pI)	偏好氨基酸
腾冲嗜热厌氧杆菌 (<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>)	264	35	88	9.31	Ile(14) 、Ser(14) 、Phe (12)
肠沙门氏菌亚种 (<i>Salmonella enterica</i> subsp.)	294	47	98	4.99	Leu(10) 、Val(10) 、Val(16)
嗜酸革兰杆菌 (<i>Geobacillus kaustophilus</i>)	291	43	97	5.64	Leu (11) 、Val (9) 、Asp (8)
单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	342	35	114	9.82	Leu (13) 、Arg (9) 、Lys (9)
嗜盐杆菌 (<i>Archaeobacter halophilus</i>)	318	23	106	10.00	Phe (18) 、Ile (14) 、Asn (10)

2.5 cas2 基因编码蛋白质的疏水性分析

结果显示 ,Cas2 蛋白的最大疏水性为 1.733 ,最小为 -1.233; 不稳定系数为 40.16 ,

脂肪系数为 96.31 ,最终亲水性的平均值 (GRAVY) 为 0.280(见图 4A) ,且不存在跨膜区域(见图 4B) 。

2.6 腾冲嗜热厌氧杆菌 Cas2 蛋白二级结构分析

使用 SOPMA 软件对 Cas2 蛋白的二级结构进行预测,发现该蛋白主要由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲 4 种常见的蛋白质二级结

构组成。其中 β -折叠所占比例最高,为 34.52%;其次是 α -螺旋,所占比例为 28.57%; β -转角和无规则卷曲所占比例分别为 13.10% 和 23.81% (图 5)。

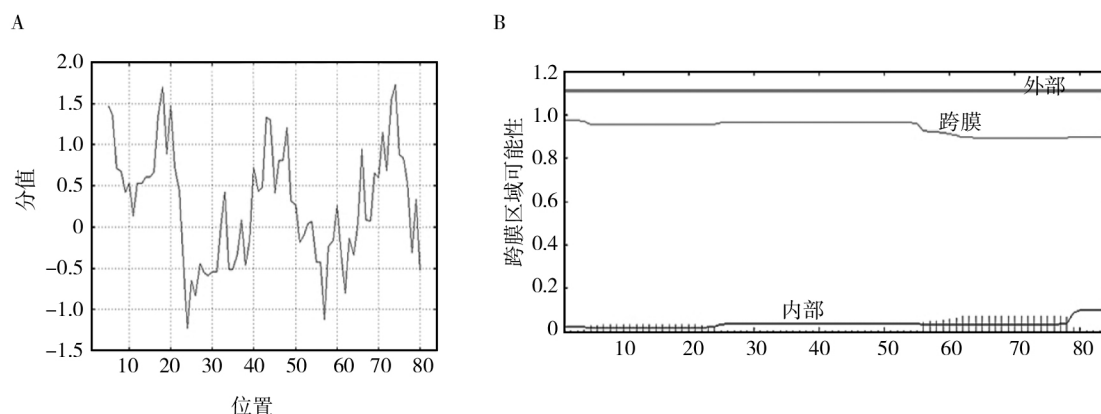


图 4 腾冲嗜热厌氧杆菌 Cas2 蛋白疏水性分析和跨膜结构预测

Fig. 4 Hydrophobicity analysis and prediction of transmembrane structures of Cas2 protein of *Thermoanaerobacter tengcongensis*

A: Cas2 蛋白的疏水性分析; B: Cas2 蛋白的跨膜结构预测

A: Analysis of hydrophilic/hydrophobic properties of Cas2; B: Prediction of transmembrane structures of Cas2

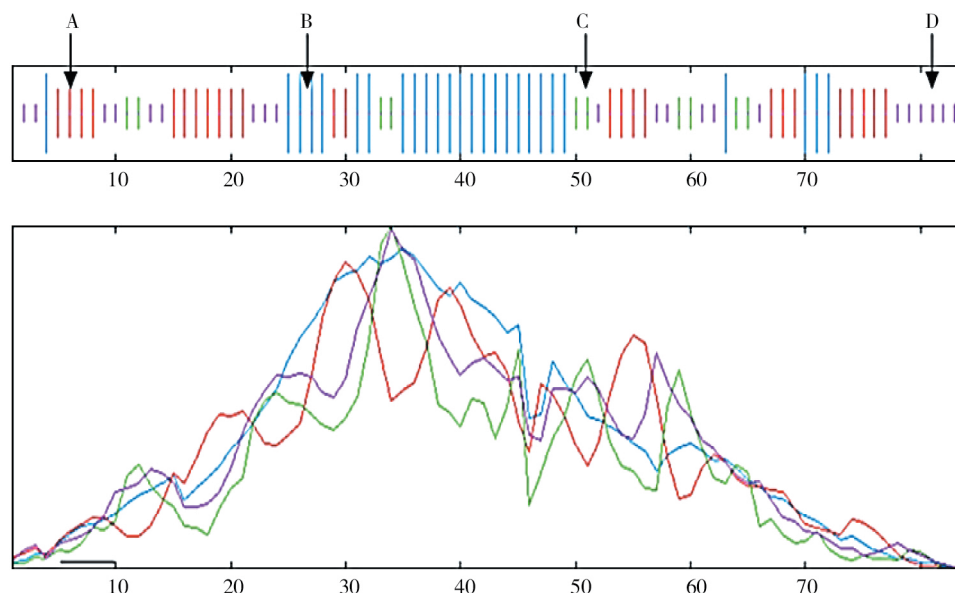


图 5 腾冲嗜热厌氧杆菌 Cas2 蛋白二级结构预测

Fig. 5 Prediction of secondary structure of Cas2 protein in *Thermoanaerobacter tengcongensis*

A: α -螺旋; B: β -折叠; C: β -转角; D: 无规则卷曲

A: represents the alpha helix; B: represents beta fold; C: represents beta turn; D: represents the Random curls

2.7 腾冲嗜热厌氧杆菌 Cas2 蛋白质相互作用分析

使用 STRING 数据库搜索与 Cas2 (TTE2659)

相互作用的蛋白质信息,设置为高置信度 0.7,不限制数量,构建 Cas2 蛋白相互作用网络,结果显示 Cas2 (TTE 2657) 与 Cas1 (TTE 2658)、Cas4

(TTE 2659)、Cas3 (TTE 2660)、Cas5 (TTE 2661)、Cas7 (TTE 2662)、Cas6 (TTE 2664)、Cas8a (TTE 2666) 和 Cas6a (TTE 2667) 等存在互作关系(图 6)。

2.8 cas2 基因的遗传进化分析

选取不同嗜性的菌株包括肠炎沙门菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、嗜盐杆菌(*Arcobacter halophilus*)、嗜酸菌(*Delftia acidovorans*)、嗜热芽胞杆菌(*Geobacillus kaustophilus*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) 和腾冲嗜热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*)；嗜热芽胞杆菌(*Anoxybacillus* sp. B7M1) 和单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes* FSL F6-684) 等菌株,以这些菌株的 *cas2* 基因建立系统进化树,菌株信息结果腾冲嗜热厌氧杆菌 *cas2* 基因与嗜热芽胞杆菌(*An-*

oxybacillus sp. B7M1) 同源性最高(图 7)。

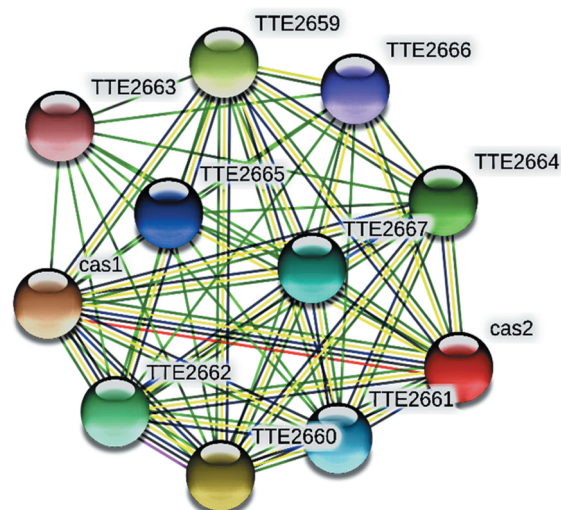


图 6 腾冲嗜热厌氧杆菌 Cas2 蛋白互作蛋白网络

Fig. 6 Cas2 protein interaction protein network of *Thermoanaerobacter tengcongensis*

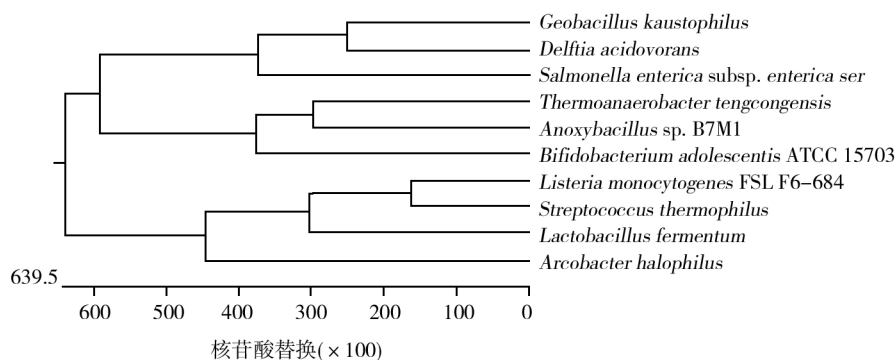


图 7 cas2 基因系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree of *cas2*

3 讨论

CRISPR 系统对外源 DNA 的入侵具有获得性免疫功能,这种免疫功能又被称为干扰作用,其发挥功能分为适应、表达和干扰三个阶段^[23]。除了 III-C 型、III-D 型和 IV 型 CRISPR 系统外,在 CRISPR 系统的适应阶段主要是由 Cas1 和 Cas2 发挥作用^[24]。Cas1 是一种整合酶,Cas2 是 mRNA 干扰素的同源物,两者能识别入侵的外源病毒或质粒 DNA 的 PAM 序列^[25],在 Cas2 蛋白复合物作用下,Cas1 切割识别的 DNA 序列并在其他酶的辅助下整合到 CRISPR 序列中,从而完成外源

DNA 的捕获^[26]。

本研究从生物信息学的角度出发分析腾冲嗜热厌氧杆菌 *cas2* 及其编码蛋白的理化性质,结果显示 Cas2 蛋白为 9.9 ku 左右的亲水性蛋白,不存在跨膜区域,氨基酸组成以 Ile(14)、Ser(14)、Phe(12) 为主,且该蛋白主要由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲 4 种常见的蛋白质二级结构组成。使用 STRING 数据库搜索与 Cas2 相互作用的蛋白质信息结果显示 Cas2 与 Cas1、Cas4、Cas3、Cas5、Cas7、Cas6、Cas8a 和 Cas6a 等存在互作关系,值得注意的是上述 Cas 蛋白构成 CRISPR-Cas I-A 亚型系统,说明 Cas2 发挥作用是一个复杂的

过程。本研究发现腾冲嗜热厌氧杆菌在 50 ~ 75 °C 时 *cas2* 表达量随温度升高而升高 *cas2* 基因在 60 °C 和 75 °C 条件下高表达,暗示 *cas2* 表达量与温度有关。根据 *cas2* 基因建立的进化树显示腾冲嗜热厌氧杆菌与厌氧菌芽胞杆菌同源性高,说明 Cas2 蛋白在嗜热菌中发挥着特殊的作用。本研究结果对腾冲嗜热厌氧杆菌 CRISPR 及其相关蛋白质在热稳定性机制中的研究提供了重要的信息,为今后嗜热菌嗜热机制的研究提供参考。

参考文献:

- [1] Xue YF, Xu Y, Liu Y, et al. *Thermoanaerobacter tengcongensis* sp. nov. a novel anaerobic, saccharolytic, thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Tengcong, China [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology 2001, 51(4): 1335-1341.
- [2] Bao QY, Tian YQ, Li W, et al. Yang HMA complete sequence of the *T. tengcongensis* genome [J]. Genome Res, 2002, 12(5): 689-700.
- [3] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats [J]. BMC Bioinformatics 2007, 8(1): 1-10.
- [4] Van der Oost J, Jore MM, Westra ER, et al. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes [J]. Trends in Biochemical Sciences 2009, 34(8): 401-407.
- [5] Reeks J, Naismith JH, White MF. CRISPR interference: a structural perspective [J]. Biochemical Journal 2013, 453(2): 155-166.
- [6] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli* and identification of the gene product [J]. Journal of Bacteriology 1987, 169(12): 5429-5433.
- [7] Fineran PC, Charpentier E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information [J]. Virology 2012, 434(2): 202-209.
- [8] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477.
- [9] Kira S, Makarova, Yuri I, et al. Classification and nomenclature of CRISPR-Cas systems: where from here? [J]. The CRISPR journal, 2018, 1(5): 325-336.
- [10] Hatoum-Aslan A, Marraffini LA. Impact of CRISPR immunity on the emergence and virulence of bacterial pathogens [J]. Current Opinion in Microbiology, 2014, 17(1): 82-90.
- [11] Jung TY, Park KH, Yan A, et al. Structural features of Cas2 from *Thermococcus onnurineus* in CRISPR-cas system type IV [J]. Protein, 2016(25): 1890-1897.
- [12] Beloglazova N, Brown G, Zimmerman MD, et al. A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats [J]. Journal of Biological Chemistry 2008, 283(29): 20361-20371.
- [13] Chen T, Olsen I. Porphyromonas gingivalis and its CRISPR-Cas system [J]. Journal of Oral Microbiology, 2019, 11(1): 1638196.
- [14] Stern A, Keren L, Wurtzel O, et al. Self-targeting by CRISPR: gene regulation or autoimmunity [J]. Trends in Genetics 2010, 26(8): 335-340.
- [15] Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, et al. 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 [J]. Biology Direct 2006(1): 7.
- [16] Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli* [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(12): 5569-5576.
- [17] Wang C, Jin CL, Zhang JH, et al. Transcriptomic analysis of *Thermoanaerobacter tengcongensis* grown at different temperatures by RNA sequencing [J]. Journal of Genetics and Genomics 2015, 42: 335-338.
- [18] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(6): 467-477.
- [19] Liu B, Wang C, Yang HH, et al. Establishment of a genetic transformation system and its application in *Thermoanaerobacter tengcongensis* [J]. Journal of Genetics & Genomics, 2012, 39(10): 561-570.
- [20] 刘原子, 王艳, 王川, 等. 腾冲嗜热厌氧杆菌 *tte0732* 基因的表达及生物信息学分析 [J]. 微生物学杂志, 2018, 38(1): 42-49.
- [21] 郑航辉, 高昇, 杨宇泽, 等. 腾冲嗜热厌氧杆菌 *ahpC* 编码基因的克隆表达及生物信息学分析 [J]. 生物学杂志, 2019, 36(5): 36-40.
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods 2001, 25(4): 402-408.
- [23] Nuñez JK, Lee ASY, Engelman A, et al. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity [J]. Nature 2015, 519(7542): 193-198.
- [24] Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2016, 371(1707): 20150496.
- [25] NuEz JK, Kranzusch PJ, Noeske J, et al. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity [J]. Nature Structural & Molecular Biology, 2014, 21(6): 528-534.
- [26] Xiao Y, Ng S, Nam KH, et al. How type II CRISPR-Cas establish immunity through Cas1-Cas2-mediated spacer integration [J]. Nature, 2017, 550(7674): 137.