

艰难梭菌 *sigB* 基因簇 CRISPR-Cas9 敲除载体的构建及验证^{*}

陈相好^{1,2,3}, 蔡梦迪¹, 陈峥宏^{1,2}, 谷俊莹³, 文学琴^{1,2,3}, 洪伟^{4**}, 崔古贞^{1,2**}

(1. 贵州省普通高等学校病原生物学特色重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学 医学检验学院, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州省分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 构建艰难梭菌 *rsbV* (编码 anti-anti-sigma 因子)、*rsbW* (编码 anti-sigma 因子) 及 *sigB* 基因 (编码 sigma-B 因子) 的 CRISPR-Cas9 敲除载体。方法: 利用重叠延伸 PCR 技术分别扩增针对艰难梭菌 *rsbV*、*rsbW* 及 *sigB* 基因的 gRNA 序列及同源臂序列, 并分别将其克隆到 pJZ23 载体上, 采用菌落 PCR 结合 DNA 测序验证所构建的基因敲除载体。结果: 扩增获得艰难梭菌 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的 gRNA 序列及同源臂序列, 菌落 PCR 及测序均表明成功构建了艰难梭菌 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的敲除载体。结论: 成功构建了艰难梭菌 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因 CRISPR-Cas9 敲除载体。

[关键词] 艰难梭菌; CRISPR-Cas9; sigma-B 因子; *rsbW*; *rsbV*

[中图分类号] R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)07-0751-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.07.002

Construction of CRISPR-Cas9 Knockout Vectors against *sigB* Gene Cluster of *Clostridium Difficile*

CHEN Xianghao^{1,2,3}, CAI Mengdi¹, CHEN Zhenghong^{1,2}, GU Junying³,
WEN Xueqin^{1,2,3}, HONG Wei⁴, CUI Guzhen^{1,2}

(1. Key Laboratory of Medical Microbiology and Parasitology of Education Department of Guizhou, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Key Laboratory of Molecular Biology of Guizhou Province, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To construct CRISPR-Cas9 vectors to knockout *sigB* gene cluster including *rsbV* (encoding anti-anti-sigma factor), *rsbW* (encoding anti-sigma factor) and *sigB* gene (encoding sigma-B factor) of *Clostridium difficile* (*C. difficile*). **Methods:** The gRNA sequences against *rsbV*, *rsbW* and *sigB* genes and homologous arm sequences of *C. difficile* were amplified by overlap extension PCR, and cloned into pJZ23 vector of CRISPR-Cas9 system, respectively. The recombinant pJZ23 vectors were verified by colony PCR and DNA sequencing. **Results:** The gRNA sequences against *rsbV*, *rsbW* and *sigB* genes and homologous arm sequences of *C. difficile* were amplified. Colony PCR and DNA sequencing showed that *rsbV*, *rsbW* and *sigB* genes were correctly amplified and successfully cloned into pJZ23 vector. **Conclusion:** The CRISPR-Cas9 knockout vectors against *rsbV*, *rsbW* and *sigB* genes of *C. difficile* was successfully constructed.

[Key words] *Clostridium difficile*; CRISPR-Cas9; sigma-B factor; *rsbW*; *rsbV*

^{*}[基金项目] 国家自然科学基金(31760318, 31500078, 31601012); 贵州省科技计划项目[黔科合基础(2018)1132, 2019(1441)]; 贵州医科大学培育项目[黔科合平台人才(2018)5779-17]; 贵州省大学生创新创业训练计划项目(201710660022)

^{**}通信作者 E-mail: cuiguzhen@hotmail.com; hongwei@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2019-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190718.0039.002.html>

艰难梭菌是一种产芽孢、革兰阳性厌氧梭菌,在土壤、水以及哺乳动物肠道等环境中广泛分布^[1],是引起抗生素相关腹泻、假膜性结肠炎的主要肠道病原体^[1-3]。近年来,由于高致病性产毒菌株的出现(如 *Clostridium difficile* BI/NAP1/027 等),艰难梭菌感染率持续增高^[4-5]。研究表明,艰难梭菌株毒力与多种因素有关,包括 TcdA、TcdB 和 ADP-核糖基化二元毒素;此外,黏附素 Cwp66、鞭毛、纤维粘连 FbpA、表面层蛋白 SlpA 等也参与了艰难梭菌的定植过程^[6-8],但是对其他毒力、定植因子以及调控其产生的分子机制缺乏深入了解。sigma 因子与 RNA 聚合酶核酶协同作用,协助 RNA 聚合酶识别 DNA 靶位点的启动子序列,从而调控靶基因的转录^[9-10]。在艰难梭菌中,有多个 sigma 因子参与多种代谢反应,可对多种环境变化做出应激反应,如饥饿、氧刺激、酸碱度、渗透压、乙醇、抗生素、温度、胆汁酸等,这些因素帮助细菌适应不同的环境^[10-14]。*sigB* 基因(Gene ID: 4916093)编码的 sigma-B 因子是一种重要的全局调控因子,其活性受到严格的调控;*sigB* 基因与 *rsbV*(Gene ID: 4916091)、*rsbW*(Gene ID: 4916092)基因位于一个基因簇,前后依次相邻;*rsbW*(anti-sigma)与 *rsbV*(anti-anti-sigma)和 *sigB*(sigma-B)基因共同作用,调控 sigma-B 因子与 RNA 核心酶的结合,从而调控靶基因的转录^[10]。CRISPR-Cas9 技术是一种广泛应用于细菌遗传改造的基因编辑技术,在艰难梭菌的其他因子得到成功应用^[15-16]。为了研究艰难梭菌 sigma-B 因子的功能,本研究尝试构建 *rsbV*、*rsbW* 及 *sigB* 基因的 CRISPR-Cas9 敲除载体,为研究 sigma-B 因子在艰难梭菌毒力中的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 大肠杆菌 DH5 α 购自 Takara 公司,艰难梭菌(*Clostridium difficile* 630, CD630)及拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052, Cbei)由美国奥本大学 Wang Yi 教授馈赠。

1.1.2 试剂和仪器 细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京天根公司,蛋白胨、酵母膏、琼脂粉、琼脂糖、脑心浸液琼脂(BHI)、Goldview I 型核酸染料购自北京索莱宝公司,8000

Marker、2 \times Taq Master Mix、Trans Start FastPfu DNA polymerase 购自北京全式金生物技术有限公司,限制性内切酶购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物有限公司,引物由上海生物工程有限公司合成。仪器为 SimpliAmpTM Thermal Cycler PCR 仪、DYY-7C 型电泳仪、WD-9413B 凝胶成像分析仪、BTH-100 双控温干式恒温仪。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养 大肠杆菌 DH5 α 在 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养,需要时加入 30 mg/L 的氯霉素;艰难梭菌在 BHIS 培养基于厌氧管中 37 $^{\circ}$ C 培养(BHIS 培养基为 BHI 加入 5 g/L 的酵母膏和 0.1% 的 L-半胱氨酸)^[15]。

1.2.2 敲除载体引物的设计及构建质粒 利用基于 Python 语言设计的程序^[17],检索 *rsbV*、*rsbW* 和 *sigB* 基因的潜在打靶位点,并获得扩增 gRNA 及同源臂的引物序列(表 1)。本研究所构建的质粒特征及来源见表 2。

1.2.3 敲除载体的构建 (1)利用细菌基因组提取试剂盒提取拜氏梭菌 *Cbei* 基因组,以 gRNA-TY/gRNA-*rsbV*、gRNA-TY/gRNA-*rsbW*、gRNA-TY/gRNA-*sigB* 为引物, *Cbei* 基因组为模板进行 gRNA 序列的扩增,扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环,PCR 结束后进行琼脂糖凝胶电泳,并回收特异性条带。由于识别艰难梭菌 CD630 相应 DNA 靶位点的特异性序列已设计在相应的 gRNA 引物中(gRNA-*rsbV*、gRNA-*rsbW*、gRNA-*sigB*),因此以拜氏梭菌 *Cbei* 为模板进行 PCR 扩增的主要目的是获得其内源性启动子用于 gRNA 的转录。利用 *BtgZI* 限制性内切酶酶切 pJZ23、PCR 产物纯化试剂盒纯化后,用克隆试剂盒与扩增的 gRNA 序列进行无缝组装,50 $^{\circ}$ C 反应 15 min,通过转化及菌落 PCR 获得质粒 pgRNA-*rsbV*、pgRNA-*rsbW*、pgRNA-*sigB*。(2)使用细菌基因组提取试剂盒提取艰难梭菌 CD630 基因组,并以其为模板,以 *rsbV*-UF/*rsbV*-UR、*rsbV*-UF/*rsbV*-UR、*sigB*-UF/*sigB*-UR 为引物分别扩增 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的上游同源臂,再以 *rsbV*-DF/*rsbV*-DR、*rsbW*-DF/*rsbW*-DR、*sigB*-DF/*sigB*-DR 为引物扩增 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的下游同源臂,琼脂糖 DNA 回收试剂盒回收特异性条带。(3)以 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的上下游同源臂为模板, *rsbV*-UF/*rsbV*-DR、*rsbW*-UF/*rsbW*-DR、*sigB*-

表 1 gRNA 及同源臂的引物序列
Tab. 1 gRNA sequences and primer sequences

引物名称	序列(5'→3')	描述
gRNA-TY	AAAGTTAAAAGAAGAAAATAGAAATATAATCTTTAATTGAAAA GATTTAAG	gRNA 扩增通用引物
gRNA-rsbV	TGCTATTTCTAGCTCTAAAACATCATAGCTCCTAAGCCTGTATGG TGGAATGATAAGGG	<i>rsbV</i> 基因 gRNA 扩增引物
gRNA-rsbW	TGCTATTTCTAGCTCTAAAACCTTTTATAGTCTCACAAGCCA TGCTGGAATGATAAGGG	<i>rsbW</i> 基因 gRNA 扩增引物
gRNA-sigB	TGCTATTTCTAGCTCTAAAACGTATTCT- TCTTGGGACTCTAATGGTGGAATGATAAGGG	<i>sigB</i> 基因 gRNA 扩增引物
rsbV-UF	TTGTGATATGACTAATAATTAGCGATGTGCAATAAAAGAAGTTG	<i>rsbV</i> 基因同源臂扩增引物
rsbV-UR	CTTAGGATTTACTATGTATATCTCGAATCTAAATTTGAATCAATATTC	
rsbV-DF	GAATATTGATTCAAATTTAGATTGAGATATACATAGTAAATCCTAAG	
rsvV-DR	CCACTAGTAACCATCACACTGGCTAAATAGCTCTTTTGTATCC.	<i>rsbW</i> 基因同源臂扩增引物
rsbW-UF	TTGTGATATGACTAATAATTAGCCTAATGAATGCATGGGGGTGGC	
rsbW-UR	AATTATAAAACAATCCAAGACCACTCGTAATTTCCATCTTTATAGTCTCA	
rsbW-DF	TGAGACTATAAAGATGGAAATTACGAGTGGTCTTGGATTGTTTATAATT	<i>sigB</i> 基因同源臂扩增引物
rsvW-DR	CCACTAGTAACCATCACACTGGCCATCTTCTTCACTAACGCCTAT	
sigB-UF	TTGTGATATGACTAATAATTAGCGTTAGATGTAAAGATTAATC	
sigB-UR	GAATCATCATTACTTGATGAATCCGTATCCATATTTAGGTAATGTG	
sigB-DF	CACATTACCTAAATATGGATACGGATTCATCAAGTAATGATGATTC	
sigB-DR	CCACTAGTAACCATCACACTGGCATCCCCGTATTAGCATACCTTTTCG	

表 2 本研究所构建质粒的特征及来源
Tab. 2 The features and sources of constructed plasmids

质粒名称	特征	来源
pJZ23	Contains Cas9 sequence, lactose promoter, Amp ^r , Cm ^r	美国奥本大学 Wang Yi 教授馈赠
pgRNA-rsbV	Derived from pJZ23, contains gRNA-rsbV, lactose promoter, Amp ^r , Cm ^r	This study
pgRNA-rsbW	Derived from pJZ23, contains gRNA-rsbW, lactose promoter, Amp ^r , Cm ^r	This study
pgRNA-sigB	Derived from pJZ23, contains gRNA-sigB, lactose promoter, Amp ^r , Cm ^r	This study
prsbV	Derived from pgRNA-rsbV, contains <i>rsbV</i> homologous sequences, targeting the <i>rsbV</i> of CD630, lactose promoter, Amp ^r , Cm ^r	This study
prsbW	Derived from pgRNA-rsbW, contains <i>rsbW</i> homologous sequences, targeting the <i>rsbW</i> of CD630, lactose promoter, Amp ^r , Cm ^r	This study
psigB	Derived from pgRNA-sigB, contains <i>sigB</i> homologous sequences, targeting the <i>sigB</i> of CD630, lactose promoter, Amp ^r , Cm ^r	This study

UF/sigB-DR 为引物进行重叠延伸 PCR, 扩增条件为 95 ℃ 预变性 3 min, 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 琼脂糖 DNA 回收试剂盒回收特异性条带, 与经过 *NotI* 酶切的 pgRNA-rsbV、pgRNA-rsbW、pgRNA-sigB 进行无缝组装, 通过菌落 PCR 鉴定得到敲除载体 prsbV、prsbW、psigB。

1.2.4 质粒的转化 取无缝组装的连接产物 2 μL 转入 50 μL 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 冰上放

置 30 min, 42 ℃ 热激 1 min, 冰上冷却 5 min 后加入 LB 液体培养基 900 μL, 于 37 ℃ 180 r/min 复苏 1 h, 离心后取细胞沉淀涂布于 LB 固体培养基平板 (含 30 mg/L 氯霉素), 37 ℃ 过夜培养, 菌落 PCR 进行鉴定获得质粒 pgRNA-rsbV、pgRNA-rsbW、pgRNA-sigB、prsbV、prsbW、psigB。

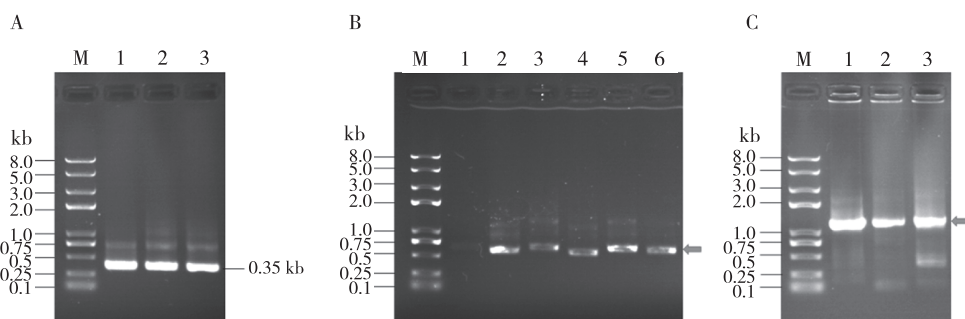
1.2.5 敲除载体的验证 以获得的敲除载体 prsbV、prsbW、psigB 为模板, 通过 PCR 及测序进一步验证所构建的质粒。

2 结果

2.1 gRNA 序列及同源臂的扩增

利用提取的拜氏梭菌 *Cbei* 基因组为模板,以设计的 gRNA-TY/gRNA-rsbV、gRNA-TY/gRNA-rsbW、gRNA-TY/gRNA-sigB 为引物进行 PCR,如图 1A 所示的 PCR 扩增结果表明成功扩增获得 gRNA-rsbV、gRNA-rsbW、gRNA-sigB 序列。利用提

取的艰难梭菌 *CD630* 基因组为模板,以设计的 rsbV-UF/rsbV-UR、rsbW-UF/rsbV-UR、sigB-UF/sigB-UR、rsbV-DF/rsbV-DR、rsbW-DF/rsbW-DR、sigB-DF/sigB-DR 引物分别扩增 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的上游及下游同源臂,如图 2B 所示的 PCR 扩增结果表明成功获得 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的上游及下游同源臂。以获得的上下游同源臂 PCR 产物为模板进行重叠延伸 PCR,如图 3C 所示的结果表明,成功获得 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的同源臂。



注:M 为 8 000 Marker,A 中泳道 1~3 分别为 gRNA-rsbV、gRNA-rsbW 及 gRNA-sigB,B 中泳道 1~2 为 *rsbV* 基因 0.6 kb 上游同源臂、泳道 2 为 *rsbV* 基因 0.55 kb 下游同源臂、泳道 3 为 *rsbW* 基因 0.62 kb 上游同源臂、泳道 4 为 *rsbW* 基因 0.55 kb 下游同源臂、泳道 5 为 *sigB* 基因 0.64 kb 上游同源臂、泳道 6 为 *sigB* 基因的 0.63 kb 下游同源臂;C 中泳道 1 为 *rsbV* 基因 1.1 kb 同源臂、泳道 2 为 *rsbW* 基因 1.1 kb 同源臂、泳道 3 为 *sigB* 基因 1.2 kb 同源臂

图 1 敲除载体 gRNA 序列及同源臂的扩增结果

Fig. 1 PCR products of gRNAs against *rsbV*, *rsbW* and *sigB* and homologous arms

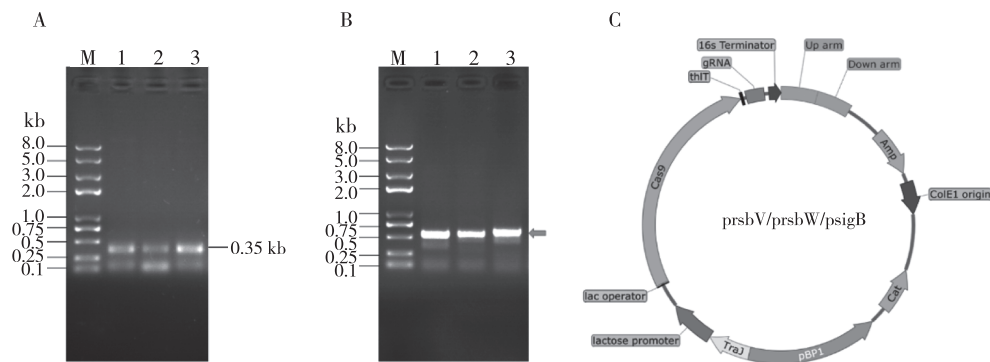
2.2 敲除载体的构建及验证

将扩增获得的 gRNA 序列与 *BtgZI* 酶切的 pJZ23 质粒通过克隆试剂盒进行无缝组装,通过菌落 PCR 验证,获得质粒 pgRNA-rsbV、pgRNA-rsbW、pgRNA-sigB,再将扩增获得的同源臂与 *NotI* 酶切的 pgRNA-rsbV、pgRNA-rsbW、pgRNA-sigB 进行无缝组装,通过菌落 PCR 验证,获得敲除载体 prsbV、prsbW、psigB。图 2A 为以提取的质粒 prsbV、prsbW、psigB 为模板, gRNA-TY/gRNA-rsbV、gRNA-TY/gRNA-rsbW、gRNA-TY/gRNA-sigB 为引物进行 PCR,结合测序结果,证实成功构建了敲除载体的 gRNA 序列;图 2B 同样以 prsbV、prsbW、psigB 为模板, rsbV-DF/rsbV-DR、rsbW-DF/rsbW-DR、sigB-DF/sigB-DR 为引物分别扩增 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的下游同源臂,分别成功扩增出 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因 0.55 kb、0.55 kb、0.63 kb 的下游同源臂,而下游同源臂是通过与上游同源臂融合后再连接到 pgRNA-rsbV、pgRNA-rsbW、pgRNA-sigB 载体上的,因此本研究成功构建了敲除载体的上下游同源臂,测序结果也证实 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 三个基因的上下

游同源臂均构建成功。

3 讨论

CRISPR-Cas 系统是细菌及古细菌在发展进化的过程中抵御外来侵害而建立起来的适应性自身免疫防御系统,基于此原理建立起来的 CRISPR-Cas9 基因编辑系统,属于 II 型 CRISPR-Cas 系统,该技术相比以前的锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)技术和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术,具有方便、简捷及编辑效率高的优点^[18],被广泛应用于多种原核生物及真核生物的遗传改造,为相关生物的功能及机制等研究提供了技术保障,展现了非常广阔的应用前景和潜力。由于抗生素的大量使用及艰难梭菌高毒力株的出现,使得艰难梭菌感染引起的严重程度、耐药率、复发率均呈上升趋势^[19]。探究艰难梭菌的毒力因子、致病和耐药机制及相关的分子调控机制等,有利于加深对艰难梭菌的认识,为艰难梭菌的防治提供基础。



注:M 为 8 000 Marker,A 中泳道 1 为 gRNA-rsbV、泳道 2 为 gRNA-rsbW、泳道 3 为 gRNA-sigB,B 中泳道 1 为 *rsbV* 基因 0.55 kb 下游同源臂、泳道 2 为 *rsbW* 基因 0.55 kb 下游同源臂、泳道 3 为 *sigB* 基因的 0.63 kb 下游同源臂,C 为本研究所构建的敲除载体模式图

图 2 敲除载体的验证

Fig. 2 Verification of constructed knockout vectors

本研究以艰难梭菌中 *sigB* 相关基因(*rsbV*、*rsbW* 和 *sigB*)为靶点,利用提取的拜氏梭菌 *Cbei* 基因组为模板,以设计的 gRNA-TY/gRNA-*rsbV*、gRNA-TY/gRNA-*rsbW*、gRNA-TY/gRNA-*sigB* 为引物进行 PCR,成功扩增获得 gRNA-*rsbV*、gRNA-*rsbW*、gRNA-*sigB* 序列。利用提取的艰难梭菌 *CD630* 基因组为模板,以设计的 *rsbV*-UF/*rsbV*-UR、*rsbW*-UF/*rsbW*-UR、*sigB*-UF/*sigB*-UR、*rsbV*-DF/*rsbV*-DR、*rsbW*-DF/*rsbW*-DR、*sigB*-DF/*sigB*-DR 引物分别扩增 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的上游及下游同源臂,成功获得 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的上游及下游同源臂。以获得的上下游同源臂 PCR 产物为模板进行重叠延伸 PCR,成功获得 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的同源臂。本研究再将扩增获得的 gRNA 序列与 *BtgZI* 酶切的 pJZ23 质粒通过克隆试剂盒进行无缝组装,通过菌落 PCR 验证,获得质粒 pgRNA-*rsbV*、pgRNA-*rsbW*、pgRNA-*sigB*,将扩增获得的同源臂与 *NotI* 酶切的 pgRNA-*rsbV*、pgRNA-*rsbW*、pgRNA-*sigB* 进行无缝组装,通过菌落 PCR 验证,获得敲除载体 prsbV、prsbW、psigB。以提取的质粒 prsbV、prsbW、psigB 为模板,gRNA-TY/gRNA-*rsbV*、gRNA-TY/gRNA-*rsbW*、gRNA-TY/gRNA-*sigB* 为引物进行 PCR,结合测序结果也证实成功构建了敲除载体的 gRNA 序列;同样以 prsbV、prsbW、psigB 为模板,*rsbV*-DF/*rsbV*-DR、*rsbW*-DF/*rsbW*-DR、*sigB*-DF/*sigB*-DR 为引物分别扩增 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因的下游同源臂,分别成功扩增出 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 基因 0.55 kb、0.55 kb、0.63 kb 的下游同源臂,而下游同源臂是通过与上游同源臂融合后再连接到 pgRNA-

rsbV、pgRNA-*rsbW*、pgRNA-*sigB* 载体上的。
综上所述,本研究成功构建 *rsbV*、*rsbW*、*sigB* 三个基因的 CRISPR-Cas9 敲除载体,为后续突变株的构建及其功能研究奠定了基础。

4 参考文献

[1] ZHU D, SORG J A, SUN X. *Clostridioides difficile* biology: sporulation, germination, and corresponding therapies for *c. difficile* infection[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018,8:29.

[2] SCHAFFLER H, BREITRUCK A. *Clostridium difficile* - from colonization to infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018,9:646.

[3] SAMARKOS M, MASTROGIANNI E, KAMPOUROPOULOU O. The role of gut microbiota in *clostridium difficile* infection[J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2018,50:28 - 32.

[4] WIEGAND P N, NATHWANI D, WILCOX M H, et al. Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection[J]. *The Journal of Hospital Infection*, 2012,81(1):1 - 14.

[5] RUPNIK M, WILCOX M H, GERDING D N. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis[J]. *Nature reviews Microbiology*, 2009,7(7):526 - 536.

[6] JANOIR C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection[J]. *Anaerobe*, 2016,37:13 - 24.

[7] JANOIR C, DENEVE C, BOUTTIER S, et al. Adaptive

- strategies and pathogenesis of *Clostridium difficile* from in vivo transcriptomics[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(10):3757–3769.
- [8] STEVENSON E, MINTON N P, KUEHNE S A. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenicity [J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(5):275–282.
- [9] UTRATNA M, COSGRAVE E, BAUSTIAN C, et al. Effects of growth phase and temperature on sigmaB activity within a listeria monocytogenes population: evidence for RsbV-independent activation of sigmaB at refrigeration temperatures[J]. BioMed Research International, 2014, 2014:641647.
- [10] KINT N, JANOIR C, MONOT M, et al. The alternative sigma factor sigma(B) plays a crucial role in adaptive strategies of *Clostridium difficile* during gut infection[J]. Environmental microbiology, 2017, 19(5):1933–1958.
- [11] SAUJET L, PEREIRA F C, HENRIQUES A O, et al. The regulatory network controlling spore formation in *Clostridium difficile* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 358(1):1–10.
- [12] PAREDES-SABJA D, SHEN A, SORG J A. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins [J]. Trends in Microbiology, 2014, 22(7):406–416.
- [13] ANTUNES A, CAMIADE E, MONOT M, et al. Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile* [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(21):10701–10718.
- [14] CARTER G P, DOUCE G R, GOVIND R, et al. The anti-sigma factor TedC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of *Clostridium difficile* [J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(10):e1002317.
- [15] MCALLISTER K N, BOUILLAUT L, KAHN J N, et al. Using CRISPR-Cas9-mediated genome editing to generate *C. difficile* mutants defective in selenoproteins synthesis [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):14672.
- [16] WANG S, HONG W, DONG S, et al. Genome engineering of *Clostridium difficile* using the CRISPR-Cas9 system [J]. Clinical Microbiology and Infection: The official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2018, 24(10):1095–1099.
- [17] HONG W, ZHANG J, CUI G Z, et al. Multiplexed CRISPR-Cpf1-Mediated genome editing in *Clostridium difficile* toward the understanding of pathogenesis of *C. difficile* infection [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(6):1588–1600.
- [18] 程成, 舒鹏程, 彭小忠. CRISPR/Cas9 基因编辑系统研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2018, 38(4):543–547.
- [19] 肖艳艳, 张智洁, 秦晓松. 艰难梭菌研究现状 [J]. 微生物学杂志, 2018, 38(2):105–113.
- (2019-03-21 收稿, 2019-06-28 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳