

敲除 *PaLoc* 毒力岛的无毒性艰难梭菌菌株的构建*

饶凤琴¹, 程玉梅², 吴昌学¹, 王义³, 崔古贞⁴, 齐晓岚^{1**}, 洪伟^{1**}

(1. 贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室 & 贵州省分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属医院综合 ICU, 贵州 贵阳 550004; 3. 美国奥本大学 系统生物学系, 美国 奥本 阿拉巴马 36849; 4. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 使用 CRISPR-Cpf1 系统敲除艰难梭菌毒性 (*PaLoc*) 毒力基因岛, 构建无毒性艰难梭菌菌株。方法: 使用分子克隆方法, 构建针对 *PaLoc* 毒力岛的基因打靶质粒 pWH53; 将 pWH53 质粒转化艰难梭菌 630 菌株后, 诱导 Cpf1 蛋白表达, PCR 筛选发生双交换的 *PaLoc* 敲除突变株, 测序验证设计位点是否发生等位双交换。结果: PCR 结果显示, 获得的 16 株转化子中有 8 株为敲除 *PaLoc* 突变株, 阳性率为 50%; 测序结果显示, 获得的 8 株敲除 *PaLoc* 突变株均在设计位点发生了等位双交换。结论: 成功构建艰难梭菌毒性毒力岛敲除 *PaLoc* 突变株。

[关键词] 艰难梭菌; CRISPR-Cpf1 系统; *PaLoc* 毒力岛; 基因敲除; 活菌疫苗; 毒性基因; 梭菌感染; 载体; 质粒

[中图分类号] R378.8 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2019)10-1128-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.10.003

Knockout of *PaLoc* Toxicity Loci to Construct Non-toxic *C. difficile* Strain

RAO Fengqin¹, CHENG Yumei², WU Changxue¹, WANG Yi³, CUI Guzhen⁴, QI Xiaolan¹, HONG Wei¹
(1. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases (Ministry of Education), Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Critical Care Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Biosystems Engineering, Auburn University, Auburn 36849, Alabama, United States; 4. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To construct a *PaLoc* loci deleted mutant of *C. difficile* based on the CRISPR-Cpf1 system and obtain a non-toxic *C. difficile* strain. Methods: The standard molecular cloning method was used to construct the gene targeting pWH53 against *PaLoc* loci (virulence island). After conjugation of the pWH53 plasmid into *C. difficile* 630 strain, Cpf1 protein expression was induced, and a double-exchanged *PaLoc* knockout mutant strain was screened by colony PCR, allelic double exchange at the design site was verified by sequencing. Results: The results of clony PCR showed that 8 of the 16 transformants were *PaLoc* knockout mutants with a positive rate of 50%. The sequencing results showed that the $\Delta PaLoc$ mutant had an allelic double exchange at the design site. Conclusion: The *C. difficile* $\Delta PaLoc$ mutant was successfully constructed.

[Key words] *Clostridioides difficile*; CRISPR-Cpf1 system; *PaLoc* loci; gene knockout; live vaccine; toxic gene; *Clostridium difficile* infection; vector; plasmid

*[基金项目] 国家自然科学基金(31560318;31601012;31760318); 贵州省科技计划项目[黔科合平台人才(2017)5652]
** 通信作者 E-mail: hongwei_gmu@foxmail.com; 154981793@qq.com
网络出版时间: 2019-10-22 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191022.2308.003.html

艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)是一种革兰阳性、产芽孢、专性厌氧棒状杆菌,在1935年首次由Hall和O'Toole^[1]从新生儿粪便样品中分离得到。艰难梭菌感染(*Clostridioides difficile* infection, CDI)的主要症状有腹泻、腹痛、发烧、中毒性巨结肠及肠道穿孔等。2002年*C. difficile*强毒株的出现(核糖体BI/NAP1/027型,同时产生毒素A、毒素B和二元毒素CDT),导致CDI的致病率与致死率显著提高^[2-4],成为医院获得性感染中的首要疾病。大约有4%~10%的患者在住院前就携带了产毒素艰难梭菌菌株,艰难梭菌表达的毒素A(Toxin A,肠毒素)和毒素B(Toxin B,细胞毒素)是艰难梭菌的主要毒力因子。*PaLoc*毒力基因岛(pathogenicity locus, *PaLoc*)编码了2个毒力基因*tcdA*及*tcdB*和3个调控基因(*tcdR*、*tcdE*及*tcdC*),3个调控基因共同调控*tcdA*及*tcdB*基因的表达。目前发现的毒力艰难梭菌菌株都表达*tcdB*基因,*tcdA*基因在某些毒株中选择性表达。串联规律间隔短回文序列(cluster regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)和CRISPR相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)组成的CRISPR-Cas9系统是一种RNA介导的细菌和古菌免疫系统^[5]。在最近几年,来源于*Streptococcus pyogenes*的CRISPR-Cas9元件被广泛应用于原核生物和真核生物的精确基因编辑^[5-19]。与CRISPR-CAS9系统相似,CRISPR-Cpf1系统是基于Cpf1核酸内切酶的免疫系统,该系统最初在*Francisella novicida* U112菌株中被发现^[17],后经改造后成为高效的艰难梭菌基因编辑工具^[20-21]。本研究使用CRISPR-Cpf1系统成功敲除了艰难梭菌菌株*PaLoc*毒力岛(包含*tcdR*、*tcdB*、*tcdE*、*tcdA*及*tcdC*基因),成功构建了去除毒素表达能力的*C. difficile*菌株,报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要菌株、仪器及试剂

菌株 NEB express 大肠杆菌购于 New England BioLabs 公司,艰难梭菌 630 菌株从美国典型菌种保藏中心(ATCC)购买。仪器及试剂为基因导入仪(Bio-Rad, 美国)、厌氧产气袋(MGC AnaeroPack, 日本)、厌氧培养盒(MGC Anaero Pack, 日本)、限制性核酸内切酶 *BtgZI* (New England Labs)、NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix 试剂盒(New England Labs)、脑心浸出液(brain

heart infusion, BHI, Solarbio)、酵母粉(Oxoid, 英国)、琼脂粉(Solarbio)。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养条件 艰难梭菌放于厌氧培养盒中,并放入厌氧产气袋,厌氧培养盒置于恒温培养箱内,37℃静置培养(液体培养8~12h,固体平板培养18~24h)。大肠杆菌菌株培养于LB培养基中,必要时添加氯霉素(6 mg/L)及卡那霉素(50 mg/L)。*C. difficile* 培养于补充了5 g/L 酵母提取物和1 g/L 半胱氨酸脑心浸出液培养基中,37℃厌氧培养。适当时候补充以下抗生素/诱导物:甲砒霉素(15 mg/L)、D 环丝氨酸(250 mg/L)、头孢西丁(8 mg/L)及乳糖(40 mmol/L)。

1.2.2 质粒构建 本研究中使用的所有质粒及引物见表1。分别用引物扩增*PaLoc*毒力岛上下游同源臂和sRNAP::crRNA,电泳检测后,胶回收目的条带。*BtgZI*酶切载体pWH34,使其线性化。用NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix 试剂盒将*PaLoc*毒力岛上下游同源臂、sRNAP::crRNA及线性化pWH34载体重组连接,产物电转化至大肠杆菌,菌落PCR检测阳性克隆,并计算阳性率(阳性转化子数与挑取的转化子数的比值)。将阳性转化子扩大培养,收取转化子提取质粒,即为所构建的目的载体。

1.2.3 接合转化艰难梭菌及突变体的筛选 取1 mL含有pWH34质粒的大肠杆菌CA434,6 000 r/min离心3 min,然后用无菌LB液体培养基洗涤2次。细胞沉淀转移至厌氧箱与200 μL 新鲜的艰难梭菌混合。混匀后点至无抗性BHIS琼脂平板,置于37℃厌氧培养10 h,培养平板加入0.5 mL BHIS液体培养基,刮下混合菌液,取100 μL涂布至含有15 mg/L甲砒霉素、250 mg/L D 环丝氨酸及8 mg/L头孢西丁的BHIS琼脂平板;37℃厌氧培养36 h,将菌落挑取并接种到含有15 mg/L甲砒霉素的BHIS培养基中,培养12 h,将细胞进行连续稀释,取100 μL稀释涂到包含15 mg/L甲砒霉素及40 mmol/L乳糖的BHIS培养基,37℃厌氧培养36 h,随机挑选菌落并利用菌落PCR筛选。基因组编辑效率为突变体的数量与抗性菌落的比值×100%。

1.2.4 质粒丢失 将含有质粒的突变体接种到BHIS培养基中进行再培养(5 d内约转接10次),然后划线至固体培养基,挑取单菌落点于BHIS及含有15 mg/L甲砒霉素的BHIS固体培养基(平板

影印法)。选择对甲砒霉素敏感的菌落,在 BHIS 培养基中进行培养。通过 PCR 进一步证实这些突变体是否为质粒丢失的突变株。

1.2.5 突变株的基因型鉴定 为了验证突变株基因型的正确性,以表 1 中的 6、7 为检测引物,突变

株基因组为模板,进行 PCR 验证,反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 20 s、55 ℃ 退火 30 s、68 ℃ 延伸 2 min,30 个循环,68 ℃ 彻底延伸 10 min。电泳鉴定后送至上海生工生物工程有限公司进行测序验证。

表 1 质粒、引物序列及来源

Tab.1 Plasmid, primer sequence and source

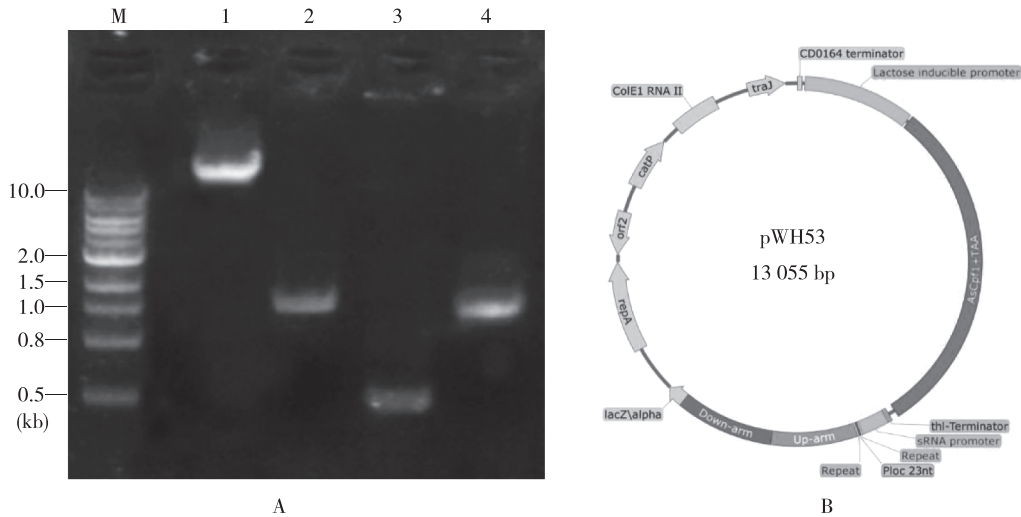
名称	序列或特征	来源
pWH34	pMTL82151 骨架,iLacP::Cpf1, <i>BtgZI</i> × 2	文献[22]
pWH53	pWH53 骨架,sRNAP:: <i>PaLoc</i> crRNA, <i>PaLoc</i> 上游同源臂, <i>PaLoc</i> 下游同源臂	本研究
crRNA	TTTAcggacaagcagttgaatatagtg	本研究
1	ATTAcactatattcaactgcttgctcgATCTACAAGAGTAGAAATTA atggtggaatgataagggtT	本研究
2	AGATcggacaagcagttgaatatagtgTAATTTCTACTCTTGTAGAT gtgtatgtattatacagttgcaata	本研究
3	ATCTAATAAAAAGGGAGATTGTATTAacaacattggaattaaatcagtcatt	本研究
4	atgactgatttaattccaatgttgtTAATACAATCTCCCTTTTATTAGAT	本研究
5	CTCCATGGACGCGTGTACGCTCGACTCtgtgaaagtaaggaaactaatcatt	本研究
6	tgttcaagaaacaggcaagtg	本研究
7	gtttggttattcgatggaaggc	本研究

2 结果

2.1 *PaLoc* 毒力岛敲除质粒的构建

图 1 A 所示为构建 pWH53 质粒所需基因元件的克隆,其中 1、2 泳道为 *PaLoc* 毒力岛上下游同源臂(长度分别为 1 048 bp,1 036 bp),3 泳道为 sRNAP::crRNA 片段,4 泳道为 *BtgZI* 酶切后的线性化 pWH34 质粒。以上 4 个片段使用 NEBuilder®

HiFi DNA Assembly Master Mix 试剂盒一步重组连接,转化大肠杆菌 NEB Express 感受态细胞。转化子挑取 16 个克隆 PCR 检测,其中 10/16 为阳性克隆,这些克隆扩增后提取质粒获得 *PaLoc* 打靶质粒 pWH53(图 1B)。该质粒包含可在大肠杆菌-艰难梭菌中穿梭复制的复制子、traJ 接合转化元件、甲砒霉素抗性基因(*catP*)、iLacP::Cpf1 和 sRNAP::crRNA 表达框,质粒大小为 13 055 bp(图 1B)。



注:A 为构建 pWH53 质粒所需基因元件的克隆,B 为克隆扩增后提取质粒获得 *PaLoc* 打靶质粒 pWH53。

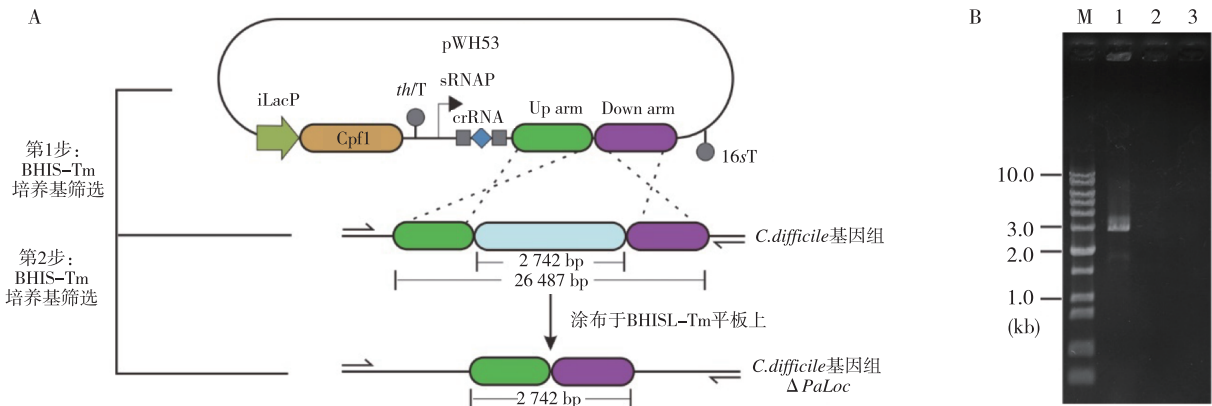
图 1 *PaLoc* 毒力岛敲除质粒 pWH53 的构建

Fig.1 Construction of *PaLoc* virulence island knockout plasmid pWH53

2.2 pWH53 质粒转化及突变株筛选

包含 pWH53 质粒的大肠杆菌 CA434 细胞与艰难梭菌 630 细胞进行接合转化,转化效率为 0.25×10^3 CFU/L。获得 pWH53 质粒转化子后,首先挑取艰难梭菌 630 转化子接入具有甲矾霉素抗性的 BHIS 培养基中,以维持 pWH53 质粒在艰难梭菌 630 菌株中的稳定传代(图 2A);再将艰难梭菌 630 转化子菌液稀释 100 ~ 1 000 倍后涂布于含有乳糖的 BHIS-甲矾霉素培养基中,以诱导 CpfI 蛋白的表达(图 2A)。 $\Delta PaLoc$ 基因敲除菌株经在无

抗性的 BHIS 培养基中连续转接 10 次后丢失 pWH53 质粒,获得稳定的 $\Delta PaLoc$ 突变株。扩增 $\Delta PaLoc$ 突变株与艰难梭菌 630 WT 基因组 DNA: 第 1 泳道以 $\Delta PaLoc$ 突变株基因组 DNA 为模板,第 2 泳道以艰难梭菌 630 基因组 DNA 为模板,第 3 泳道为以 ddH₂O 为模板的对照。泳道 M 为 DNA 质量标准,由于以艰难梭菌 630 基因组 DNA 为模板时扩增片段太长(26 487 bp)因此无扩增条带(图 2B)。



注:A 为质粒转化及突变株筛选示意图,B 为扩增 $\Delta PaLoc$ 突变株及 630 基因 DNA 电泳结果, M 为 DNA mark,1 为 $\Delta PaLoc$ DNA,2 为 630 DNA,3 为对照。

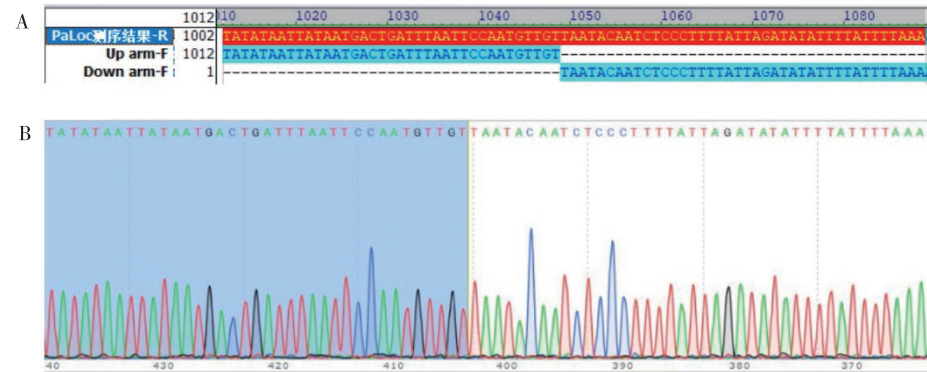
图 2 pWH53 质粒转化及 $\Delta PaLoc$ 突变株筛选

Fig. 2 pWH53 plasmid transformation and $\Delta PaLoc$ mutant screening

2.3 $\Delta PaLoc$ 突变株基因型鉴定

将 $\Delta PaLoc$ 突变株获得扩增片段进行测序,结果如图 4 所示。使用 Vector NTI 软件比对上游同源臂、下游同源臂与 $\Delta PaLoc$ 突变株上下游同源臂重组位点,发现 $\Delta PaLoc$ 突变株相应位点为上下游

同源臂嵌合体序列,说明上下游同源臂之间的 *PaLoc* 毒力岛被完整敲除(图 3A)。并且相应位置(上下游同源臂的连接点)的测序峰图文件(图 3B)测序信号清晰,提示 $\Delta PaLoc$ 构建成功。



注:A 为 Vector NTI 软件化对结果,B 为测序结果。

图 3 $\Delta PaLoc$ 突变株测序结果

Fig. 3 $\Delta PaLoc$ mutant strains sequencing results

3 讨论

艰难梭菌是医院获得性腹泻的主要诱因,摄入抗生素的住院患者是 CDI 的危险人群。艰难梭菌的毒力因子主要由 *PaLoc* 毒力基因岛编码,包括 *tcdR*、*tcdB*、*tcdE*、*tcdA* 及 *tcdC* 5 个基因。本研究使用 CRISPR-Cpf1 技术成功敲除了长达 26 487 bp 的 *PaLoc* 毒力岛。相比于 CRISPR-Cas9 技术^[22],CRISPR-Cpf1 技术因不需要 tracrRNA 的参与,Cpf1 编码基因更小,因此具有更高的接合转化效率,另外,CRISPR-Cpf1 技术更适合于编辑大基因片段。Hong 等^[20]报道,使用该技术成功敲除了接近 50 kb 的基因片段。相比基于反义 RNA^[23]、Clostron^[24-25]、CodA^[26]、ACE^[27] 等技术,CRISPR 系统具有更高的基因编辑效率和更操作等优点。

PaLoc 毒力岛 *tcdR*、*tcdB*、*tcdE*、*tcdA* 及 *tcdC* 基因中,其中的 *tcdA* 及 *tcdB* 编码主要的毒力因子 TcdA 及 TcdB。2 种毒素都可以于肠上皮细胞顶端接合,后通过内化作用进入细胞,引起肠细胞骨架变化,导致上皮屏障松动和细胞间连接被破坏。细胞间连接的破坏使得细胞间连接变得松散,TcdA、TcdB 毒素有机会进一步侵入肠上皮细胞。毒素作为远外源物质会导致吞噬细胞、肥大细胞和各种免疫调节介质,导致炎症和中性粒细胞的积累,引发炎症并最终导致 CDI 症状的发生^[28]。敲除 *PaLoc* 毒素岛后突变株不再产生致病毒素,并且该突变株因细胞壁及细胞壁蛋白仍然完整,因此并未丢失免疫原性,因此该 $\Delta PaLoc$ 突变株有望进一步开发为全菌疫苗。

然而,活菌疫苗的构建仅仅敲除 $\Delta PaLoc$ 毒力岛可能还不够。如最近的研究发现,有的强艰难梭菌毒株除了携带 *PaLoc* 毒力岛,表达 TcdA、TcdB 毒素外,还表达二元毒素肌动蛋白特异性 ADP 核糖基转移酶毒素 (actin-specific ADP-ribosyltransferase toxin, CDT; 如强毒株 NAP1/BI/027)。CDT 毒素由 *CdtLoc* 毒力岛编码,通常位于 *PaLoc* 毒力基因岛下游,由 *cdtR*、*cdtA* 及 *cdtB* 基因组成。*cdtA* 及 *cdtB* 基因分别编码 CDTa(酶组分)和 CDTb(黏附组分),亦对 CDI 的发生有贡献。因此在未来的工作中,课题组将进一步编辑 $\Delta PaLoc$ 突变株敲除 *CdtLoc* 毒力岛,并进一步完成表型及动物模型试验。

综上,本研究结果显示,在获得的 16 株转化子

中,有 8 株为敲除 *PaLoc* 突变株,阳性率为 50%;通过测序验证,获得的 8 株敲除 *PaLoc* 突变株均在设计位点发生了等位双交换,成功构建艰难梭菌毒性毒力岛敲除 *PaLoc* 突变株。

4 参考文献

- [1] HALL I C, OTOOLE E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis* [J]. American Journal of Diseases of Children, 1935,49(2):390-402.
- [2] COLLINS D A, ELLIOTT B, RILEY T V. Molecular methods for detecting and typing of *Clostridium difficile* [J]. Pathology, 2015,47(3):211-218.
- [3] FREEMAN J, BAUER M P, BAINES S D, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections [J]. Clin Microbiol Rev, 2010,23(3):529-549.
- [4] He M, MIYAJIMA F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile* [J]. Nat Genet, 2013, 45(1):109-113.
- [5] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. Cell, 2014,157(6):1262-1278.
- [6] WOOLSTON B M, EMERSON D F, CURRIE D H, et al. Redirecting carbon flux in *Clostridium ljungdahlii* using CRISPR interference (CRISPRi) [J]. Metab Eng, 2018,48:243-253.
- [7] XU R, QIN R, LI H, et al. Generation of targeted mutant rice using a CRISPR-Cpf1 system [J]. Plant Biotechnology Journal, 2017,15:713-717.
- [8] WASELS F, JEAN-MARIE J, COLLAS F, et al. A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum* [J]. J Microbiol Methods, 2017,140:5-11.
- [9] WANG S, DONG S, WANG P, et al. Genome editing in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 with the CRISPR-Cas9 system [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83:1-16.
- [10] MORENO-MATEOS M A, FERNANDEZ J P, ROUET R, et al. CRISPR-Cpf1 mediates efficient homology-directed repair and temperature-controlled genome editing [J]. Nature Communications, 2017, 8:2024.
- [11] LIU Q, GAO R, LI J, et al. Development of a genome-editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hyper-cellulase production strain engineering [J]. Biotechnology for Biofuels, 2017,10:1.
- [12] KIM H, KIM S T, RYU J, et al. CRISPR/Cpf1-media-

- ted DNA-free plant genome editing[J]. Nature Communications, 2017,8:14406.
- [13]JIANG Y, QIAN F, YANG J, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*[J]. Nature Communications, 2017,8:15179.
- [14]NISSIM L, PERLI S D, FRIDKIN A, et al. Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells[J]. Molecular Cell, 2014,54:698 – 710.
- [15]ZETSCHKE B, HEIDENREICH M, MOHANRAJU P, et al. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35: 31 – 34.
- [16]JOUNG J, KONERMANN S, GOOTENBERG J S, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening[J]. Nature protocols, 2017,12:828 – 863.
- [17]ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. Cpf1 is a single RNA-Guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. Cell, 2015,163: 759 – 771.
- [18]SHMAKOV S, ABUDAYYEH O O, MAKAROVA K S, et al. Discovery and functional characterization of diverse class 2 CRISPR-Cas systems[J]. Molecular Cell, 2015, 60: 385 – 397.
- [19]JIANG W, BIKARD D, COX D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31:233 – 239.
- [20]HONG W, ZHANG J, CUI G, et al. Multiplexed CRISPR-Cpf1-Mediated genome editing in *Clostridium difficile* toward the understanding of pathogenesis of *C. difficile* infection[J]. ACS Synth Biol, 2018, 7(6): 1588 – 1600.
- [21]MINTON N, CARTER G, HERBERT M, et al. The development of *Clostridium difficile* genetic systems[J]. Anaerobe, 2004, 10:75 – 84.
- [22]WANG S, HONG W, DONG S, et al. Genome engineering of *Clostridium difficile* using the CRISPR-Cas9 system[J]. Clin Microbiol Infect, 2018,24(10):1095 – 1099.
- [23]ROBERTS A P, HENNEQUIN C, ELMORE M, et al. Development of an integrative vector for the expression of antisense RNA in *Clostridium difficile*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003,55:617 – 624.
- [24]HEAP J T, PENNINGTON O J, CARTMAN S T, et al. The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70:452 – 464.
- [25]HEAP J T, KUEHNE S A, EHSAAN M, et al. The clos tron; mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 80:49 – 55.
- [26]CARTMAN S T, KELLY M L, HEEG D, et al. Precise manipulation of the *Clostridium difficile* chromosome reveals a lack of association between the *tcdC* genotype and toxin production[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012,78:4683 – 4690.
- [27]HEAP J T, EHSAAN M, COOKSLEY C M, et al. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(8):59.
- [28]Janoir C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection[J]. Anaerobe, 2016, 37:13 – 24.

(2019-07-28 收稿,2019-09-30 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:周 凌

(上接第 1127 页)

- [21]HONG W, ZHANG J, CUI G, et al. Multiplexed CRISPR-Cpf1-mediated genome editing in *Clostridium difficile* toward the understanding of pathogenesis of *C. difficile* infection[J]. ACS Synth Biol, 2018, 7(6): 1588 – 1600.
- [22]MURAD Y M, PEREZ J, YBAZETA G, et al. False negative results in *Clostridium difficile* testing[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1): 430.
- [23]HOUSMAN S T, BANEVICIUS M A, LAMB L M, et al. Isolation and quantitation of *Clostridium difficile* in aqueous and fecal matter using two types of selective media[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2016, 49(3): 445 – 447.
- [24]PICKERING D S, VERNON J J, FREEMAN J, et al. Investigating the effect of supplementation on *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* spore recovery in two solid agars[J]. Anaerobe, 2018, 50: 38 – 43.
- [25]CONNOR M C, MCGRATH J W, MCMULLAN G, et al. Development of an optimized broth enrichment culture medium for the isolation of *Clostridium difficile*[J]. Anaerobe, 2018, 54: 92 – 99.

(2019-06-29 收稿,2019-09-30 修回)

中文编辑:严 征;英文编辑:赵 毅