

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00213

CRISPR-Cas 系统与细菌和噬菌体的共进化

李铁民, 杜波

辽宁大学生命科学院, 沈阳 110036

摘要: 细菌在适应噬菌体攻击的过程中, 进化了多种防御系统, 噬菌体在细菌的选择压力下, 也在不断进化反防御策略, 双方的这种进化关系与发生机制一直尚不完全清楚。近年在细菌和古细菌中发现一种新的免疫防御系统, 即 CRISPR-Cas(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated system)系统。在对其功能和作用机制深入研究的同时, 也不断地揭示了细菌和噬菌体之间的共进化关系。为此, 文章在介绍原核细胞中 CRISPR-Cas 系统介导的免疫机制基础上, 重点综述了 CRISPR 系统在细菌和噬菌体进化中的作用。

关键词: CRISPR; CRISPR-Cas 系统; 噬菌体; 共进化; 免疫防御

CRISPR-Cas system and coevolution of bacteria and phages

LI Tie-Min, DU Bo

College of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China

Abstract: In response to the challenge from phages, bacteria evolve a number of defense systems against phage invasion. Meanwhile, the phages evolve multiple counter-defense mechanism as well under the selection pressure from bacteria. The evolution relationship between bacteria and phages, as well as the functional mechanism, still remains to be uncovered. A novel immune system, CRISPR-Cas system, has been found in bacteria and archaea recently. With deeply research of the function and mechanism of CRISPR-Cas system, the coevolution relationship between bacteria and phages is becoming clear. In this review, the mechanism of CRISPR-Cas system-mediated immunity in prokaryotes is introduced. In particular, the progress on the role of CRISPR in the coevolution of bacteria and phage is reviewed.

Keywords: CRISPR; CRISPR-Cas system; phage; coevolution; immune defense

众所周知, 烈性噬菌体不感染细菌, 它就不能繁殖, 如果细菌成功地被烈性噬菌体感染, 细菌则不能存活。在生物圈中, 细菌与噬菌体的相互作用是一种捕食与被捕食关系, 细菌的生存显然是对噬菌体选择压力的反应。细菌对来自噬菌体的攻击已进化了多种防御机制, 如吸附抑制, DNA 注入抑制和流产感染, 以及限制-修饰系统等^[1]。从进化角度来看, 细菌通过这些机制防御噬菌体的攻击, 而噬菌体也进化其相应策略以逃避宿主的防御, 这样就

产生了细菌和噬菌体之间永不休止的战争, 其结果是双方得到了共进化, 然而, 双方的这种进化关系与其发生机制一直未得到清楚阐明。

最近, 在原核细胞中发现的 CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats), 从先期的利用生物信息学对 CRISPR 系统的分析预测, 到实验证实此系统的防御外来 DNA 功能, CRISPR 系统引起了科学工作者的极大关注。最新的研究资料表明, CRISPR 系统在参与原核细胞适应性免疫同

收稿日期: 2010-05-18; 修回日期: 2010-07-28

基金项目: 沈阳市科技局计划项目(编号: 1091187-1-00)资助

作者简介: 李铁民, 博士, 教授, 研究方向: 噬菌体-细菌相互作用。Tel: 024-62202232; E-mail: tieminli@lnu.edu.cn

时,在细菌和噬菌体之间的进化中起着重要作用。为此,本文就 CRISPR 系统在细菌和噬菌体进化中的作用研究现状做以综述。

1 CRISPR-Cas 系统

1.1 CRISPR 结构

CRISPR 是一个特殊的 DNA 重复序列家族,广泛分布于细菌和古细菌基因组中^[2-6]。CRISPR 位点通常由短的高度保守的重复序列(repeats)组成,重复序列的长度通常 21~48 bp,由于具有回文序列,可以形成发卡结构,重复次数最高可达 250 次^[6]。重复序列之间被 26~72 bp 间隔序列(spacer)隔开,间隔序列长度与细菌种类和 CRISPR 位点有关^[7](图 1)。在一个原核细胞基因组中通常存在 1 至几个 CRISPR 位点^[5],例如在 *Methanocaldococcus jannaschii* 的染色体上已鉴定出 18 个不同的 CRISPR 位点,差不多占整个染色体的 1%^[8]。CRISPR 位点通常定位在原核细胞染色体上,个别出现在质粒中^[9]。CRISPR 的间隔序列与噬菌体或质粒序列存在有同源性^[10-12],甚至有一些间隔序列与噬菌体基因组序列同源性为 100%^[13],这表明间隔序列来源于噬菌体基因组。

1.2 Cas 家族

在 CRISPR 位点附近,存在一系列 CRISPR 相关(CRISPR-associated, Cas)基因(图 1)。*cas* 基因根据其保守程度可分为核心 *cas* 基因,亚型特异性 *cas* 基因^[3],和 RAMP (repeat-associated mysterious proteins)组件基因^[14, 15]。*cas* 基因定位在 CRISPR 位点附近,是一个较大的多态性家族,编码的蛋白具有核酸相关的功能域^[3, 4, 16]。目前发现有 6 个核心 *cas* 基因^[17, 18]。另外,在 CRISPR 位点的第一个重复序列的上游定位有 CRISPR 前导序列(leader sequence),其功能作为启动子^[5]。最新研究表明,与高度可变的间隔序列不同的是,重复序列,前导序列和 *cas* 基因之间共进化的,从而构成一套保守且完整的系统^[7],而且,

CRISPR 的重复序列,前导序列,以及 *cas* 基因共同决定 CRISPR 的亚型^[3]。基于 CRISPR 间隔序列与噬菌体或质粒序列的同源性^[10-12],已证实 CRISPR 和 *cas* 基因赋予宿主细胞针对外源 DNA 免疫^[19, 20]。

1.3 CRISPR-Cas 系统的生物学功能

CRISPR-Cas 系统的生物学功能开始是通过计算机分析细菌和古细菌的基因组序列被发现的,之后得到了实验证实。对 CRISPR 间隔序列的多样性分析发现,一些间隔序列明显来自于染色体外 DNA 组分^[10-12]。Mojica 和他的同事分析了众多细菌和古细菌的 4 500 个间隔序列发现,有 88 个间隔序列与已知的噬菌体和质粒序列相同^[11]。实验发现在嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)中产生的自发抗噬菌体突变株(BIM)通常在前导序列的下游掺入间隔序列,改变 CRISPR 位点,掺入的序列明显与挑战宿主菌的噬菌体序列相同,进而证实了间隔序列起源于原核细胞染色体外噬菌体 DNA^[19, 20]。为了证实 CRISPR 是否影响菌株的噬菌体抗性, Barrangou 等^[19]通过基因工程手段改变间隔序列的碱基序列,证实了间隔序列的掺入能够提供宿主新的噬菌体抗性,相反,删除间隔序列能使噬菌体抗性丢失,同时发现 Cas 蛋白也与噬菌体抗性的获得有关。间隔序列干扰质粒结合和转化的证据在表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)实验中得到了证实^[21]。由此可见,CRISPR-Cas 系统赋予原核细胞针对外源 DNA 免疫,其中,间隔序列提供该系统的特异性。

1.4 CRISPR-Cas 系统作用机制

到目前为止,虽然对 CRISPR-Cas 系统的详细作用机制尚未得到完全阐明,但已基本明确了它的作用机制的整个过程。CRISPR-Cas 系统的作用机制大体可分为 3 个不同阶段^[22]:在噬菌体侵入的起始阶段, Cas 蛋白复合物靶向并裂解噬菌体基因组中短的原型间隔序列(proto-spacer), (与 CRISPR 间隔序列同源的噬菌体基因序列^[20, 23]), 这些原型间隔序

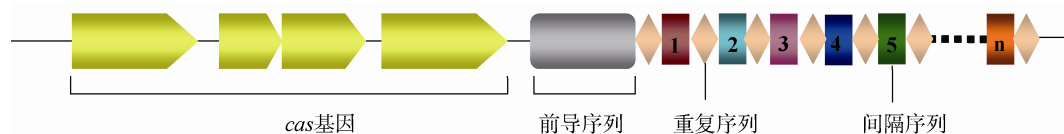


图 1 CRISPR 位点结构

列接下来整合到宿主基因组中的 CRISPR 位点的 5' 端^[19]。然后这些短的掺入的间隔序列被转录成 crRNAs (CRISPR RNAs), crRNAs 中除含有间隔序列转录物外, 还含有间隔序列两侧部分重复序列的转录产物^[24]。在此过程中, 是所有的间隔序列被转录, 还是最近新掺入的间隔序列被转录至今尚不清楚。最后阶段是靶向和干扰侵入的噬菌体 DNA 序列, 这个过程仍需 Cas 蛋白复合物参与^[25]。当宿主再被噬菌体感染时, crRNAs 作为模板靶向噬菌体的原型间隔序列^[24]。在此过程中, 因为 CRISPR 结构中也含有噬菌体起源的间隔序列, 那么这个系统是如何避免靶向、降解 CRISPR 中的间隔序列呢? 事实上, 这取决于靶向的 DNA 序列中是否含有 CRISPR 的部分重复序列, 如果含有这部分序列, crRNAs 与之通过碱基配对结合后, 将被保护, 反之, 被干扰降解^[26]。

CRISPR-Cas 系统作为原核细胞的适应性免疫系统^[27], 不但具有真核细胞的特异性^[22]和记忆性^[26], 而且还具有原核细胞特有的可遗传性^[17]。

2 噬菌体促使细菌 CRISPR 位点高度变异

在宿主防御噬菌体攻击中, 针对自然界中庞大的噬菌体种群, 细菌进化了 CRISPR 介导的适应性免疫。这种免疫功能的发挥恰是源于 CRISPR 位点的动态性变化。

2.1 CRISPR 位点插入新的间隔序列

CRISPR 的间隔序列是高度可变的区域, 即使在亲缘关系很近的菌株中也高度可变, 迅速进化^[13, 28]。生物信息学和实验证据都表明, 当噬菌体挑战宿主菌后, 新的间隔序列加到 CRISPR 位点最靠近前导序列的一端, 在菌株间具有特异性, 而对于远离 CRISPR 前导序列的下游端保留的间隔序列, 在同一种的不同菌株间通常是相同的^[12, 13, 20]。可见细菌通过插入新的间隔序列得以迅速进化, 从而抵抗局部噬菌体感染和外来 DNA 的水平转移。这一假设已得到了充分的实验证实^[18, 20]。

2.2 重复序列-间隔序列单元被删除

研究发现, 在宿主 CRISPR 位点中重复序列与间隔序列构成的单元经常被删除^[6, 12, 13, 20], 删除的单元主要是处在 CRISPR 3'端相对保守的间隔序列,

已证实那是宿主以前曾被感染的噬菌体的基因组序列^[20]。这样的删除可能是在 CRISPR 的重复序列间发生了同源重组所致^[29]。重复序列-间隔序列单元的删除可能有助于限制 CRISPR 位点的大小, 限制转录长度^[13, 20], 可以使 CRISPR 位点得到迅速进化。人们也偶尔发现重复序列-间隔序列单元能复制^[6]。

2.3 CRISPR 重复序列的转移

在分类地位上相距较远的一些菌株中, 它们的 CRISPR 含有非常相似的重复序列, 可能是在它们之间发生了横向基因转移^[3, 4, 15, 16], 并且这些横向基因转移主要由质粒, 巨大质粒(megaplasms)和前噬菌体介导^[4, 30]。Sebaihia 等^[31]在 *Clostridium difficile* 的前噬菌体中也发现有 CRISPR 结构, 由此推断噬菌体可能利用 CRISPR 限制竞争噬菌体的传播。

3 噬菌体在 CRISPR 抗性压力下突变

虽然 CRISPR 位点提供有效的噬菌体抗性, 但一些噬菌体可以继续感染已获得免疫的宿主细胞。研究发现这一现象的产生, 主要与噬菌体基因组的特定位点突变有关。

3.1 原型间隔序列突变

CRISPR 选择压力能够导致噬菌体基因组中原型间隔序列特异性突变^[20]。事实上, 在原型间隔序列中, 单一核苷酸改变就能使噬菌体逃避 CRISPR 编码的抗性^[19]。另一方面, 噬菌体也可以通过删除单一核苷酸而改变被靶向的序列, 这些突变经常影响氨基酸序列, 但不影响噬菌体的增殖^[20]。在自然环境中, 噬菌体种群广泛存在有基因组重组现象, 这可能是宿主的 CRISPR 抗性影响了噬菌体突变^[25]。

3.2 原型间隔序列毗邻基序突变

在噬菌体基因组的原型间隔序列的附近存在有保守序列, 被称之为原型间隔序列毗邻基序(Protospacer adjacent motif, PAM)。当 PAM 产生突变时, 即使原型间隔序列中存在与 CRISPR 中相同的序列, 它们也可以逃避 CRISPR 产生的抗性^[20]。如在嗜热链球菌(*S. thermophilus*)中分析原型间隔序列附近的噬菌体序列发现, 在原型间隔序列附近存在有基序 AGAAW^[13, 20]。AGAAW 基序定位在原型间隔序列下游, 碱基数量通常不超过 10 个核苷酸^[13]。

Horvath 和 Barrangou 推断, 噬菌体逃避 CRISPR-Cas 系统的限制可能还存在其它策略, 如噬菌体编码产生抑制物, 干扰宿主产生干扰 RNA 或干扰 Cas 蛋白的功能^[27]。

4 CRISPR 与细菌和噬菌体动态相互作用关系

噬菌体和宿主之间的群落动态关系比较复杂。用常规研究方法探索其本质关系存在较大困难, 其原因主要是由于自然界中的微生物种类比较复杂, 而且多数种类未能在实验室中得到培养。近年发展起来的宏基因组技术为研究微生物的群落动态关系提供了一种有效方法, 并有力地促进了细菌和噬菌体动态相互作用关系的研究, 进而使我们对 CRISPR 在细菌和噬菌体的种群进化中的作用有了一些了解。

4.1 CRISPR 与细菌-噬菌体相互作用史

Kunin 等^[32]分别采集得到美国和澳大利亚的生物反应器中的活性污泥样品, 重点考查了其中的优势微生物种群 CAP(*Candidatus Accumulibacter phosphatis*) 的基因组序列变化。对其完整基因组的测序分析结果表明, 测序的 48 个位点序列变化都非常小, 而 CRISPR 位点的序列变化却非常大。而且, 在 CRISPR 位点中, 来自两个样品中的两个 CAP 种群之间不存在有共同的间隔序列。他们认为 CAP 基因组中的多数序列差异非常小, 使他们在遗传上具有相同性, 这是由于 CAP 的广泛传播的缘故, 而 CRISPR 位点的迅速变化则是 CAP 暴露到局部噬菌体所致, 因为他们测序来自美国生物反应器中的噬菌体宏基因组发现, 在 CAP 的 CRISPR 中有 11 个间隔序列与噬菌体基因组片段相匹配。在对 *Sulfolobus islandicus* 的 CRISPR 和纺锤形病毒(SSV)基因组的比较分析中也发现了类似结果, 即宿主 CRISPR 中的间隔序列明显来自于局部环境中的噬菌体基因组序列^[33]。

在 *Leptospirillum* 与噬菌体共存的自然环境中, 分析来自 *Leptospirillum* 基因组中 CRISPR 位点的间隔序列时发现, 在 37 个不同的 CRISPR 中含有 6 044 个间隔序列, 其中 2 348 个是完全不同的, 而且多数间隔序列能与噬菌体的基因片段相匹配^[34], 这表明 *Leptospirillum* 种群曾受到多种噬菌体的攻击。新近,

Sorokin 等^[35]在分析海洋宏基因组数据库中的 CRISPR 时发现, CRISPR 位点保留记录了特定海洋区域中的噬菌体种群。总之, 这些研究均表明, CRISPR 位点在参与宿主噬菌体抗性的同时, 也留下了细菌和噬菌体在自然环境中曾经斗争痕迹。

4.2 CRISPR 与细菌-噬菌体相互作用的群落动力学

Tyson 和 Banfield 采用宏基因组技术, 测序了两个分别得到的生物膜群落样品中的基因组序列, 并将每个样品的序列数据组装成优势种 *Leptospirillum* 的基因组^[36]。通过比对分析多个相近的基因组发现, CRISPR 位点呈现广泛的多样性。在两个群落的 CRISPR 位点中, 远离前导序列端有相同的间隔序列。在位点的中部, 每个群落内的相近个体含有共同的间隔序列, 但在两个群落中却不同。而靠近前导序列端的间隔序列对于每个群落不仅特有, 而且在每个群落内的不同个体中也具有多态性。

Karginov 和 Hannon^[7]对上述研究做了进一步分析, 他们认为在一个群落中远离前导序列端普遍存在的旧的间隔序列, 可能是通过周期选择(periodic selection)将其固定下来。而在群落内的每个个体中, 靠近前导序列端的间隔序列具有广泛的多样性, 说明宿主细胞可能对某种噬菌体具有不同的易感性。当一个新的基因型噬菌体感染宿主噬菌体会导致多数个体裂解, 但能够捕获并掺入相应间隔序列的那些个体便会获得抗性, 也会迅速得到一种选择优势存活下来。CRISPR 位点在紧密相关个体中具有的高度可变性, 可能是宿主应答不断迅速进化的众多噬菌体挑战的结果。

5 结 语

如上所述, 从 CRISPR 系统在细菌中分布的广泛性和多样性可以看出, CRISPR 位点是细菌在漫长的进化中不断形成的, 也说明 CRISPR 免疫防御系统在原核细胞中可能是最原始的免疫系统之一^[15]。另一方面, 新的间隔序列插入到 CRISPR 序列中, 不但记录了宿主曾遭遇噬菌体攻击的历史, 更重要的是增加了 CRISPR 的多样性和防御系统的特异性。由此可见, 宿主细菌产生的这种特异性防御功能, 是在适应噬菌体攻击过程中形成的, 也就是说, 噬菌体是驱使细菌进化的有效动力。然而, CRISPR 免疫

防御系统同时也促进了噬菌体的进化,即噬菌体通过原型间隔序列和 PAM 的突变,逃避 CRISPR 免疫防御系统的限制。

尽管对细菌与噬菌体的种群动态关系有了一些了解,但由于可用的噬菌体基因组数据还不充分^[37],而且,噬菌体的基因组呈现典型的模块化和镶嵌化,在自然环境中的变异迅速^[38-40],环境中的整个噬菌体种群大约每隔几天就要更新一次^[41],这就大大地增加了人们对两者种群动态关系的研究难度。

CRISPR 位点除了它的防御功能外,在一些细菌中似乎具有其它功能。如,在鉴定的两个相关的 *Thermotoga* 菌的基因组中,有许多大的转位发生在 CRISPR 位点^[42]。最近实验表明,在嗜热链球菌中,原来可产生表面多糖(EPS)的敏感菌株经过噬菌体感染形成的噬菌体不敏感突变株(BIM)失去了 EPS 产生能力^[43],在 *P. aeruginosa* 中,当 *P. aeruginosa* 被噬菌体 DM33 感染产生溶源性后,便失去形成生物膜和集群移动(Swarming motility)行为,研究发现这两种行为的丢失与 CRISPR 位点有关,因为干预 CRISPR 或几个 cas 基因可恢复这两种行为^[44]。这些现象与 CRISPR 系统介导的防御功能的联系有待进一步研究证实。

参考文献(References):

- [1] Sturino JM, Klaenhammer TR. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(5): 395-404.
- [2] Jansen R, Van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565-1575.
- [3] 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 Comput Biol*, 2005, 1(6): e60.
- [4] Godde JS, Bickerton A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J Mol Evol*, 2006, 62(6): 718-729.
- [5] Lillestøl R, Redder P, Garrett RA, Brügger K. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea*, 2006, 2(1): 59-72.
- [6] 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: 172.
- [7] Karginov FV, Hannon GJ. The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell*, 2010, 37(1): 7-19.
- [8] Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NS, Venter JC. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, 1996, 273(5278): 1058-1073.
- [9] Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(3): 181-186.
- [10] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 8): 2551-2561.
- [11] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol*, 2005, 60(2): 174-182.
- [12] 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(Pt 3): 653-663.
- [13] Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, Boyaval P, Fremaux C, Barrangou R. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 2008, 190(4): 1401-1412.
- [14] Makarova KS, Aravind L, Grishin NV, Rogozin IB, Koonin EV. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(2): 482-496.
- [15] 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. *Biol Direct*, 2006, 1(1): 7.
- [16] Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. *OMICS*, 2002, 6(1): 23-33.
- [17] Carte J, Wang RY, Li H, Terns RM, Terns MP. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev*, 2008, 22(24): 3489-3496.
- [18] van der Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, Brouns SJJ. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34(8): 401-407.
- [19] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides ac-

- quired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [20] Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labont   J, Fremaux C, Boyaval P, Romero DA, Horvath P, Moineau S. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*, 2008, 190(4): 1390–1400.
- [21] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 2008, 322(5909): 1843–1845.
- [22] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat Rev Genet*, 2010, 11(3): 181–190.
- [23] Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 3): 733–740.
- [24] Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 2008, 321(5891): 960–964.
- [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] Marraffini LA, Sontheimer EJ. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, 2009, 463(7280): 568–571.
- [27] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327(5962): 167–170.
- [28] Heidelberg JF, Nelson WC, Schoenfeld T, Bhaya D. Germ warfare in a microbial mat community: CRISPRs provide insights into the co-evolution of host and viral genomes. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4169.
- [29] Wilmes P, Simmons SL, Denef VJ, Banfield JF. The dynamic genetic repertoire of microbial communities. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 33(1): 109–132.
- [30] Greve B, Jensen S, Brügger K, Zillig W, Garrett RA. Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea*, 2004, 1(4): 231–239.
- [31] Sebaihia M, Wren BW, Mullany P, Fairweather NF, Minton N, Stabler R, Thomson NR, Roberts AP, Cerde  o-T  rraga AM, Wang HM, Holden MT, Wright A, Churcher C, Quail MA, Baker S, Bason N, Brooks K, Chillingworth T, Cronin A, Davis P, Dowd L, Fraser A, Feltwell T, Hance Z, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Mungall K, Price C, Rabinowitsch E, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Unwin L, Whithead S, Dupuy B, Dougan G, Barrell B, Parkhill J. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 779–786.
- [32] Kunin V, He SM, Warnecke F, Peterson SB, Garcia Martin H, Haynes M, Ivanova N, Blackall LL, Breitbart M, Rohwer F, McMahon KD, Hugenholtz P. A bacterial metapopulation adapts locally to phage predation despite global dispersal. *Genome Res*, 2008, 18(2): 293–297.
- [33] Held NL, Whitaker RJ. Viral biogeography revealed by signatures in *Sulfolobus islandicus* genomes. *Environ Microbiol*, 2009, 11(2): 457–466.
- [34] Andersson AF, Banfield JF. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science*, 2008, 320(5879): 1047–1050.
- [35] Sorokin VA, Gelfand MS, Artamonova II. Evolutionary dynamics of clustered irregularly interspaced short palindromic repeat systems in the ocean metagenome. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(7): 2136–2144.
- [36] Tyson GW, Banfield JF. Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environ Microbiol*, 2008, 10(1): 200–207.
- [37] Cann AJ, Fandrich SE, Heaphy S. Analysis of the virus population present in equine faeces indicates the presence of hundreds of uncharacterized virus genomes. *Virus Genes*, 2005, 30(2): 151–156.
- [38] Breitbart M, Felts B, Kelley S, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, Rohwer F. Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. *Proc Biol Sci*, 2004, 271(1539): 565–574.
- [39] Breitbart M, Salamon P, Andresen B, Mahaffy JM, Segall AM, Mead D, Azam F, Rohwer F. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(22): 14250–14255.
- [40] Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, Rohwer F. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol*, 2003, 185(20): 6220–6223.
- [41] Wilhelm SW, Suttle CA. Viruses and nutrient cycles in the sea—viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *BioScience* 1999, 49(10): 781–788.
- [42] DeBoy RT, Mongodin EF, Emerson JB, Nelson KE. Chromosome evolution in the *Thermotogales*: large-scale inversions and strain diversification of CRISPR sequences. *J Bacteriol*, 2006, 188(7): 2364–2374.
- [43] Mills S, Griffin C, Coffey A, Meijer WC, Hafkamp B, Ross RP. CRISPR analysis of bacteriophage-insensitive mutants (BIMs) of industrial *Streptococcus thermophilus*—implications for starter design. *J Appl Microbiol*, 2009, 108(3): 945–955.
- [44] Zegans ME, Wagner JC, Cady KC, Murphy DM, Hammond JH, O'Toole GA. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2009, 191(1): 210–219.