

Cas-16S-seq: 利用 CRISPR/Cas9 靶向消除 16S-seq 中高丰度植物序列的方法

Cas-16S-seq: Using CRISPR/Cas9 to Eliminate Abundant Plant Sequences in 16S-seq

宋露洋, 谢卡斌*

作物遗传改良国家重点实验室, 作物病害监测和安全控制湖北省重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: kabinxie@mail.hzau.edu.cn

摘要: 16S rRNA 基因高通量测序 (16S-seq) 是研究微生物组的常用方法之一。在分析植物或其他高等生物的样品时, 线粒体和质体 16S rRNA 基因也被通用引物扩增, 造成测序结果中宿主序列的污染最高达 99% 以上, 不仅提高了成本, 而且极大地限制了 16S-seq 方法分析植物微生物群落结构的灵敏度。Cas-16S-seq 的方法是一种利用 CRISPR/Cas9 靶向切割植物 16S rRNA 基因序列从而富集扩增产物中细菌序列的方法 (图 1) (Song 和 Xie, 2020)。该方法操作简单, 可以方便地整合到已有的 16S-seq 流程中, 能高效率地消除共扩增的高丰度植物序列。我们的分析也表明 Cas9 具有高特异性, 通过使用我们开发的生物信息学平台设计的植物特异的 gRNA, 未检测到脱靶切割细菌 16S rRNA 的现象。本文以水稻为例, 描述了 Cas-16S-seq 的详细步骤和实验要点, 为科研人员使用该方法分析植物微生物组提供参考。

关键词: 16S rRNA 基因高通量测序 (16S-seq), CRISPR-Cas, 宿主污染, 微生物组, 植物

材料和试剂

1. 50 ml 离心管 (Corning, catalog number: 430829)
2. RNase-free 0.2 ml PCR 管 (Axygen, catalog number: PCR-02D-C)
3. RNase-free 1.5 ml 离心管 (Axygen, catalog number: MCT-150-C)
4. 丁腈手套 (AMMEX, catalog number: APFNCHD50)
5. Alkaline phosphatase, calf intestinal (CIP) (New England Biolabs, catalog number: M0290S)

6. *Bsa* I (New England Biolabs, catalog number: R0535S)
7. Cas9 (New England Biolabs, catalog number: M0386S)
8. DH5 α (Vazym, catalog number: C502-03)
9. Protease K (New England Biolabs, catalog number: P8107S)
10. T4 DNA ligase (New England Biolabs, catalog number: M0202S)
11. T4 polynucleotide kinase (T4 PNK) (New England Biolabs, catalog number: M0201S)
12. pUC19-gRNA (Addgene plasmid #137776, 质粒图谱见图1)

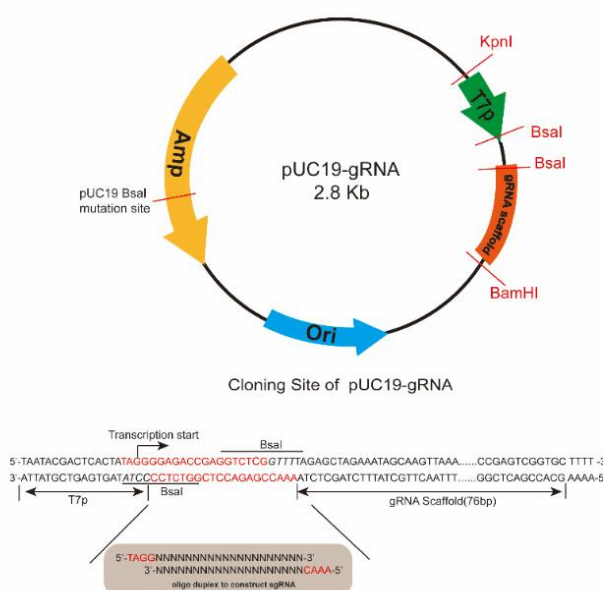


图1. pUC19-gRNA载体示意图

13. 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (TaKaRa, catalog number: RR176)
14. Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, catalog number: A63880)
15. DNeasy Powersoil Kit (QIAGEN, catalog number: 12888-50)
16. Gel Extraction Kit (OMEGA, catalog number: D2500-02)
17. HiScribe Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs, catalog number: E2050)
18. I-5 2 \times High-Fidelity Master Mix (Molecular Cloning Laboratories, catalog number: I5HM-200)
19. QIAGEN plasmid mini kit (QIAGEN, catalog number: 12123)
20. RNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, catalog number: R1017)
21. Double-distilled H₂O (ddH₂O)

- 53 22. KCl (Fisher Scientific, catalog number: P217-500)
- 54 23. KH_2PO_4 (Fisher Scientific, catalog number: P285-500)
- 55 24. LE Agarose (Hydragene, catalog number: R9012LE-100g)
- 56 25. NaCl (Fisher Scientific, catalog number: S271-1)
- 57 26. Na_2HPO_4 (Fisher Scientific, catalog number: S374-500)
- 58 27. TWEEN 20 (Fisher Scientific, catalog number: BP337-100)
- 59 28. 75%乙醇, 80%乙醇 (用95%乙醇和0.1% DEPC处理水配制)
- 60 29. 75%医用酒精 (国药试剂)
- 61 30. 氨苄青霉素 (国药试剂)
- 62 31. 苯酚 (国药试剂)
- 63 32. 焦碳酸二乙酯 (DEPC, Sigma, catalog number: D5758)
- 64 33. 氯仿 (国药试剂)
- 65 34. 无核酸酶水 (Zymo Research, catalog number: W1001-4)
- 66 35. 无水乙醇或95%乙醇 (国药试剂, 分析纯)
- 67 36. 无水乙酸钠 (国药试剂, 分析纯)
- 68 37. 液氮
- 69 38. 磷酸盐缓冲溶液 (见溶液配方)
- 70 39. 0.1% DEPC处理水 (见溶液配方)
- 71 40. 3 M 醋酸钠 (pH 5.2) (见溶液配方)

72

73 仪器设备

- 74 1. 96孔磁铁架 (BORHEE, catalog number: MAG-96-11)
- 75 2. 剪刀和镊子
- 76 3. 研磨钵和研磨棒
- 77 4. 移液器 (2.5, 20, 200, 1,000 μl) (Labnet, catalog numbers: 540910296,
- 78 340930114, 240750135, 440960631)
- 79 5. NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, catalog number: ND-ONE-W)
- 80 6. DNA 电泳装置
- 81 7. 超净工作台
- 82 8. 小型离心机 (Eppendorf, catalog number: 022620498)

9. 台式离心机 (Cence, catalog number: TDZ5-WS)
10. 涡旋振荡器 (Scientific Industries, catalog number: G560E)
11. 水浴锅
12. 37 °C恒温培养箱
13. PCR热循环仪 (Bio-Rad Laboratories, S1000™ Thermal Cycler, catalog number: 1852148)
14. 研钵和研磨棒
15. -20 °C冰箱
16. pH计 (METTLER TOLEDO, catalog number: FE20K)

软件和数据库

1. VSEARCH软件 (version 2.8.1)

实验步骤

Cas-16S-seq 是将 CRISPR/Cas9 系统与现有的 16S rRNA 基因高通量测序 (16S-seq) 进行结合, 利用 CRISPR/Cas9 靶向切割特定序列的能力, 从而在 16S rRNA 基因扩增子文库构建过程中去除大量共扩增的宿主序列(图 2) (Song 和 Xie, 2020)。其中 CRISPR 是“成簇和规律间隔的短回文序列”的简称, 而 Cas 是指与 CRISPR RNA 结合的蛋白。在不同的 CRISPR-Cas 系统中, 化脓性链球菌 Cas9 (*Streptococcus pyogenes* Cas9) 被广泛应用于基因组编辑中, 而本文提到的 Cas9 均表示来自化脓性链球菌的 Cas9。本文以 799F-1193R 扩增 16S rRNA 基因 V5-V7 片段为例, 介绍了 Cas-16S-seq 中 gRNA 设计、体外合成、植物根系 DNA 纯化、Cas9 处理和 PCR 扩增的详细步骤, 该方法也适用于其他 16S rRNA 通用引物的扩增子测序分析。

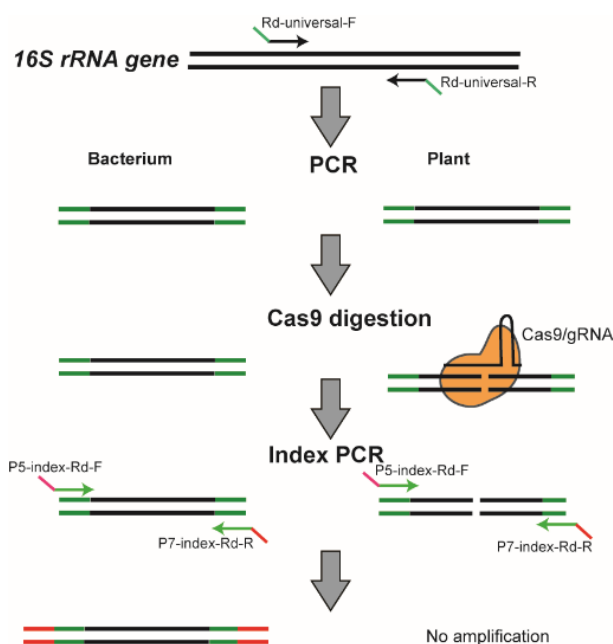


图 2. Cas-16S-seq 实验流程示意图

一、gRNA设计

Cas9 核酸酶可以在一个人造的小 RNA 分子 (称为 gRNA, 即 Guide RNA) 的引导下去靶向切割 DNA 双链 (Jinek 等, 2012)。其中利用 Cas9/gRNA 靶向特定的 DNA 位点只需满足 2 个条件: (1) gRNA 的 5'端 20nt (Nucleotides) 的向导序列 (称为 Spacer 或 Guide sequence) 与靶 DNA 位点的序列 (称为 Protospacer) 互补匹配; (2) 靶位点必需存在 PAM (Protospacer-adjacent motif), 其中使用最广的化脓链球菌 Cas9 的 PAM 序列为 5'-NGG-3'。根据 Cas9/gRNA 靶向切割 DNA 双链的条件, 因此可以通过替换 gRNA 5'端 20nt (Nucleotides) 的向导序列, 从而使 Cas9 能被重编程去切割任何的包含有 5'-N₂₀-NGG-3' (N 代表任何核苷酸) DNA 序列, 其中 N₂₀ 与 gRNA 向导序列相同的 20 个碱基, NGG 是 Cas9 发挥活性必需的 PAM。近年来对 Cas9 介导的基因组编辑的广泛研究, 也阐明了 CRISPR/Cas9 的靶向规律 (Hsu 等, 2013; Pattanayak 等, 2013; Kucsu 等, 2014), Cas9/gRNA 不仅能有效的剪切与 gRNA 完全匹配的 DNA 片段, 而且也能脱靶到与 gRNA 部分匹配的 DNA 片段, 因此 Cas-16S-seq 方法的关键步骤是设计能够区分宿主和细菌 16S rRNA 基因的高特异性 gRNA。本文以水稻 16S rRNA 基因为例, 简要地介绍了 Cas-16S-seq 所需 gRNA 的设计流程 (图 3)。

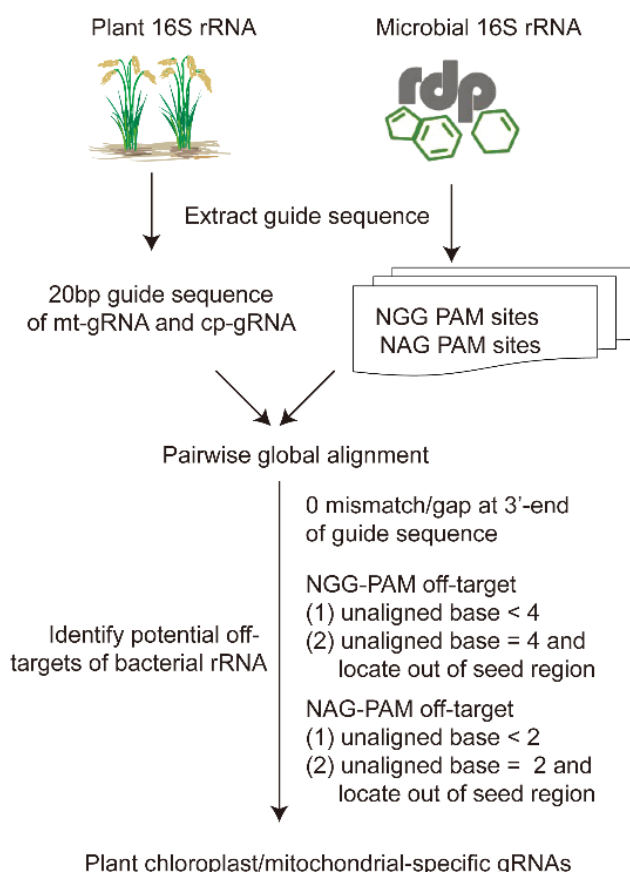


图3. CRISPR/Cas9靶位点 (即gRNA设计) 分析流程图

1. 从公共数据库下载高质量的原核生物16S rRNA基因序列。这些数据库包括RDP (Cole 等, 2014), SILVA (Quast 等, 2013), 和GreenGenes (McDonald 等, 2012) 等。本研究使用RDP数据库 (RDP release 11, update 5, <https://rdp.cme.msu.edu/>, release 11)的细菌16S rRNA序列作为参考。
2. 从NCBI数据库中查找和下载水稻栽培品种Nipponbare参考基因组叶绿体和线粒体16S rRNA基因序列 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gen-ome/10/>)。
3. 提取水稻线粒体和叶绿体16S rRNA基因序列中PAM (5'-NGG-3') 前的所有的20 bp序列作为mt-gRNA (靶向线粒体序列) 和cp-gRNA (靶向叶绿体序列) 的向导序列。
4. 从RDP数据库的3,356,809个原核16S rRNA基因序列中提取5'-NGG-3'和5'-NAG-3' PAMs (Cas9也能低效率的识别和切割含NAG序列PAM的靶位点) 前的所有20 bp序列。
5. 将步骤3和步骤4挑选出的20 bp序列利用VSEARCH软件 (version 2.8.1) 进行序列

比对，此处使用的是全局比对算法。

6. 根据图3的标准鉴定脱靶到RDP-rRNA中原核生物16S rRNA基因序列的cp-gRNA和mt-gRNA。计算每个gRNA脱靶到的RDP-rRNA中原核生物16S rRNA基因序列的数量，并根据脱靶的数量对gRNA特异性进行排序。

注：在分析cp-gRNAs特异性时，需要注意RDP数据库中含有叶绿体序列，可分析过程中可以把RDP中叶绿体序列排除在外。具体的设计靶向宿主16s rDNA特异性的gRNA的生物信息学代码流程存储在Github (<https://github.com/KabinXie/Cas-16S-seq/tree/master/gRNA-design>)。

二、gRNA的合成

使用含有T7启动子和gRNA scaffold序列的质粒载体 (如图2)，然后通过PCR获得仅含有T7启动子gRNA的DNA模板用来体外转录合成gRNAs, gRNA的克隆方法参考(Xie 等, 2014)。

1. 引物设计和合成。根据图2所示，对每一个gRNA合成两条互补的引物：

Forward oligo (正向引物):

5'-TAGG-N₁N₂N₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁N₁₂N₁₃N₁₄N₁₅N₁₆N₁₇N₁₈N₁₉N₂₀-3'

Reverse oligo (反向引物):

5'-AAAC-N₁N₂N₃N₄N₅N₆N₇N₈N₉N₁₀N₁₁N₁₂N₁₃N₁₄N₁₅N₁₆N₁₇N₁₈N₁₉N₂₀-3'

注：引物中TAGG和AAAC是和pUC19-gRNA匹配的接头序列，N代表任意碱基，正向引物中第3个G是T7聚合酶的转录起始位点。正向引物中20个N表示与靶位点相同的引导序列；反向引物中N表示与靶位点互补的碱基序列。

2. 利用Bsa I对pUC19-gRNA载体进行酶切，反应体系如下。

pUC19-gRNA	2 µg
10x NEB Buffer 4	2 µl
10x BSA	2 µl
Bsa I (10 U/µl)	1 µl
Add ddH ₂ O to	20 µl

3. 37 °C孵育2~4小时。
4. (可选步骤) 加入0.5 µl的CIP (5 U/µl) 对步骤1酶切的质粒进行去磷酸化，37 °C孵育30分钟。

5. 利用QIAquick PCR purification kit纯化酶切的质粒载体, 纯化操作按照说明书进行, 最后一步加入30 µl Elution buffer溶剂进行DNA的洗脱。

6. 利用NanoDrop测定DNA浓度。

7. 对于每个gRNA, 将合成的单链DNA寡核苷酸 (如步骤1所示) 退火为双链DNA寡核苷酸。

Forward oligo (100 µM)	1 µl
Reverse oligo (100 µM)	1 µl
10× T4 DNA ligase Buffer	1 µl
T4 PNK (10 U/µl)	0.5 µl
Add ddH ₂ O to	10 µl

注: 如果步骤4没有使用CIP处理, T4 PNK在此处可以忽略, 而且下一步中37°C孵育步骤也可忽略。

8. 使用以下程序在PCR热循环仪中孵育。

37 °C	60 min
95 °C	10 min
Cool down to 25 °C at 0.1 °C/s	约 12 min
25 °C	5 min

9. 将退火形成的双链DNA寡核苷酸按照1:200的比例进行稀释。

10. 将稀释的双链DNA寡核苷酸与载体进行连接反应, 反应体系如下:

Bsa I digested vector	<i>n</i> µl (~50 ng)
Oligo-duplex (diluted)	1 µl
10× T4 DNA ligase Buffer	0.5 µl
T4 DNA ligase (400 U/µl)	1 µl
Add ddH ₂ O to	5 µl

11. 室温 (25 °C) 孵育2~4小时, 或者4 °C连接过夜。

12. 取1 µl连接产物加入到大肠杆菌DH5α细胞进行转化。

13. 挑取2~4个单克隆在添加有氨苄青霉素 (50 µg/ml) 的LB培养基中进行培养。

14. 使用QIAGEN plasmid mini kit提取质粒。

15. 使用M13R (-48)引物进行Sanger测序, 确认gRNA靶序列正确。

16. 使用正向引物M13F (5'-GGTAACGCCAGGGTTTTCC-3')和反向引物gRNA-R (5'-

AAAAGCACCGACTCGG-3')从构建的质粒载体上扩增带有T7启动子和靶序列的gRNA片段，扩增体系如下所示。

Plasmid (步骤 15 测序正确)	1 ng
I-5 2x High-Fidelity Master Mix	25 μ l
M13F (10 μ M)	2 μ l
gRNA-R (10 μ M)	2 μ l
Add ddH ₂ O to	50 μ l

17. 运行如下PCR程序：

98 °C预变性2分钟；扩增35个循环：98 °C变性10秒，
55 °C退火30秒，72 °C延伸10秒；循环完成后72 °C放置5分钟。

18. 利用1.5%琼脂糖凝胶进行PCR产物凝胶纯化。利用OMEGA凝胶提取试剂盒回收正确大小(~190 bp)的DNA条带，操作步骤按试剂盒说明书进行，最后使用25 μ l Elution buffer溶剂进行DNA的洗脱。

19. 将凝胶回收产物用苯酚：氯仿进行抽提纯化，去除RNA酶（以下步骤需使用RNase-free的试剂和耗材）。

19.1 DNA溶液中加入等体积（25 μ l）的1:1苯酚：氯仿混合液，涡旋混合30秒；
10,000 \times g室温离心5 min，吸取上清到新离心管中。

19.2 用等量的氯仿抽提两次去除残留的苯酚（同步骤19.1）。

19.3 加入1/10体积（5 μ l）醋酸钠（pH 5.2，3 M）（DEPC处理水配制）和两倍体积的无水乙醇。 -20 °C放置至少30分钟。

19.4 12,000 \times g离心15分钟沉淀收集DNA，并去除上清液。

19.5 加入500 μ l的75%乙醇（DEPC处理水配制），12,000 \times g离心15分钟，移去上清液。

19.6 晾干并加入10~15 μ l无核酸酶水溶解DNA。

19.7 利用NanoDrop测定DNA浓度。

注：为防止经过切胶回收和苯酚氯仿抽提纯化后浓度可能会过低，建议步骤16同时配制2~3个PCR扩增体系（总体积100 μ l以上），保证最终纯化后DNA浓度在10 ng/ μ l以上。

20. 将苯酚:氯仿抽提纯化的DNA片段作为模板，利用HiScribe Quick T7 High Yield RNA Synthesis kit进行体外转录。在离心管中加入以下试剂：

Nuclease-free H ₂ O	18-n μ l
NTP Buffer Mix	10 μ l (6.7 mM each NTP final)
Template DNA	n μ l (75 ng)
T7 RNA Polymerase Mix	2 μ l
Total reaction volume	30 μ l

注：本体外转录反应适合小RNA分子 (gRNA) 的体外转录，反应需使用无核酸酶的试剂和耗材，避免RNA核酸酶的污染。

21. 37 °C孵育16个小时。

22. gRNA转录体系中加入20 μ l无核酸酶水，吸打混匀后再加入1 μ l DNase I (2 U/ μ l)，37 °C继续孵育15分钟，酶解DNA模板。

23. 利用RNA Clean & Concentrator Kit进行纯化体外转录的gRNA。操作步骤按试剂盒说明书进行。最后一步加入15 μ l无核酸酶水洗脱后，利用NanoDrop进行RNA的浓度测量 (浓度约为4,000 ng/ μ l)。

注：为了评估所合成gRNA的长度和完整性，可通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析转录产物。

三、植物根系样品的分离和基因组DNA纯化

1. 水稻根系取样方法。戴上丁腈手套并利用75%医用酒精进行消毒，握住水稻嫩枝直接拔取种植在田间水稻全株根系，避免对根系组织造成损伤。利用75%医用酒精对剪刀和镊子进行消毒，剪取根系后利用镊子将根系置于含有25 ml TWEEN 20 (0.1%) 的磷酸盐缓冲溶液的50 ml无菌管中。每取一次样品时，需利用75%医用酒精对镊子和剪刀进行消毒，并利用无菌滤纸擦拭干净。将取得样品迅速置于冰上运回实验室，样品不得置于冰上超过24小时。运回实验室的根系样品应迅速置于-20 °C (最好置于-80 °C)，且样品不得反复冻融。

2. 将冻存在-20 °C 的根系样品取出之后置于4 °C解冻样品，在超净工作台进行根系的清洗。首先，将解冻的根系取出放置在装有25 ml 无菌双蒸水的50 ml 无菌离心管中，漂洗去除表面附着的土壤颗粒，然后利用75%医用酒精消毒的镊子将根系取出后置于装有25 ml 含有TWEEN 20 (0.1%) 的磷酸盐缓冲溶液的50 ml 无菌的离心管中，置于涡旋仪上涡旋30秒，重复涡旋清洗水稻根系3次以上，直到根系表

面无清晰可见的土壤颗粒，台式离心机离心 (1,000 × g, 15 分钟)，用 75%医用酒精消毒的镊子取出根系，最后在无菌的滤纸上将水稻根系擦干。将根系样品装入空的 50 ml 无菌的离心管中，置于-20 °C 保存至 DNA 提取。

3. 在提取水稻根系样品DNA之前，需要用液氮冷冻处理，然后再在研磨钵中充分研磨均匀。

注：研磨钵和研磨棒以及液氮是主要污染来源，需要经过多次双蒸水清洗以及高温高压灭菌处理 (或酒精灼烧)，防止细菌或残留植物组织污染，同时在整个取样，根系清洗以及研磨的过程中均要设置空白对照组，监测试验过程中是否带入细菌污染。

4. 按照DNeasy Powersoil Kit的使用说明进行DNA的提取。DNA的浓度使用NanoDrop进行测量。

注：如样品量少，在最后一步加入30 μl的C6溶液进行DNA的洗脱。

四、16S rRNA一轮扩增

Cas-16S-seq文库构建采用两步PCR法。

1. 第一步PCR，利用16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit扩增16S rRNA的V5-V6-V7区，本研究使用含接头序列的通用引物为Rd1+799F和Rd2+1193R，引物的全长序列见下表。

Primer Name	Sequence (5'>3')
Rd1+799F	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u>
	AACMGGATTAGATACCKG
Rd2+1193R	<u>GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG</u>
	CGTCATCCMCACCTTCCTC

注：下划线标注的分别为Read1测序引物序列 (Rd1) 和Read2测序引物序列 (Rd2)，其中合成的引物需ULTRAPAGE方法进行纯化，需用16S-free的水稀释引物。

2. 按照下表准备扩增体系 (此步需要在超净工作台中进行)：

Template DNA	50~100 ng
PCR Premix	12.5 μl
Forward Primer (Rd1+799F) (10 μM)	0.25 μl
Reverse Primer (Rd2+1193R) (10 μM)	0.25 μl
Add 16S-free H ₂ O to	25 μl

注：使用灭菌处理的RNase-free枪头和PCR管，阴性对照使用16S-free的水为模板。

3. 运行以下降落式PCR程序：

94 °C变性3分钟；扩增34个循环：94 °C变性1分钟，退火1分钟，72 °C延伸45秒；循环完成后72 °C放置10分钟。退火的温度被设定为60 °C进行4个循环，58 °C进行6个循环，56 °C进行8个循环，54 °C进行8个循环，52 °C进行8个循环。

4. 取5 μl的PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶进行电泳。其中共扩增的水稻线粒体PCR产物条带大小比细菌大约84 bp，阴性对照无条带（图4）。

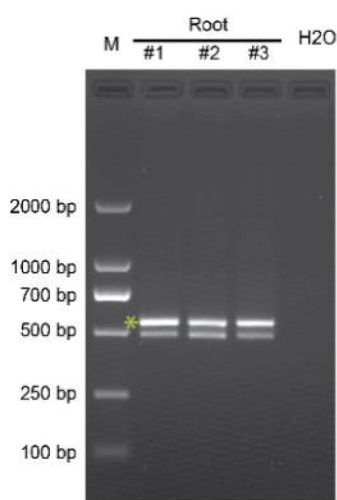


图4. 16S rRNA第一轮PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果。

#1-#3代表生物学重复，H₂O表示16S-free水为模板的对照，*代表的是水稻线粒体Rd1+799F-Rd2+1193R扩增条带。

5. 利用AMPure XP磁珠纯化PCR产物（此步骤需使用RNase-free的试剂和耗材）

5.1 将纯化磁珠从4 °C取出放置在室温（~25 °C），约30分钟使其恢复到室温，并在涡旋仪上进行充分混匀30秒。

5.2 加入0.8倍PCR产物体积的Ampure XP磁珠于PCR产物中，利用移液器轻柔的混匀（远离磁铁架），室温孵育15分钟。

5.3 将其放置在磁铁架上5分钟。

5.4 小心移除上清液，不要吸取到磁珠。

5.5 向PCR管中加入200 μl新配的80%乙醇（DEPC水配制），并且保持其在磁铁架上，室温孵育30秒，利用移液器小心移除上清液。重复此操作一次，并将残留

的乙醇完全移除。

5.6 晾干两分钟，此过程一直保持PCR管放置在磁铁架上。

5.7 将PCR管从磁铁架上取下，加入20 µl的无核酸酶水，然后利用移液器上下轻柔吸打重悬磁珠，并在室温孵育5分钟。

5.8 将PCR管重新放回到磁铁架上放置约2分钟，直到上清液无可见磁珠。

5.9 将洗脱液18 µl取出放置到新PCR管中。

6. 利用NanoDrop测定纯化后的DNA浓度。

五、利用Cas9和gRNA体外酶切 (此步骤需使用RNase-free的试剂和耗材)

为了消除共扩增的高丰度植物序列，利用Cas9/gRNA剪切第一轮扩增纯化产物中的共扩增的线粒体16S rRNA基因序列。

1. 将“gRNA的合成”步骤体外转录合成的gRNA利用无核酸酶水稀释至60 (ng/µl)，然后90 °C热变性5分钟迅速置于冰上冷却。

2. 在RNase-free 1.5 ml离心管中准备酶切体系：

Nuclease-free H ₂ O	22 µl
NEBuffer 3.1	3 µl
1 µM Cas9 (M0386S)	2 µl (60nM final)
gRNA (denatured)	1 µl (60 ng)
Total reaction volume	28 µl

注：为了获得最佳的剪切效率，要将Cas9和gRNA以及剪切底物DNA的摩尔比保持在10:10:1或更高比例。分子量可通过 (<http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) 进行换算。如果所用通用引物能扩增线粒体和叶绿体16S rRNA基因，该反应中需两种不同的gRNA (cp-gRNA和mt-gRNA)来去除宿主序列。

3. 将准备的酶切体系室温 (25 °C)静置10分钟，然后加入磁珠纯化的一轮PCR产物2 µl (60 ng)，轻弹离心管混匀。

4. 37 °C孵育12个小时。

5. 将1 µl (0.8 U/µl) 的蛋白酶K加入到酶切反应中，并继续在37 °C孵育10分钟，然后65 °C水浴锅中孵育10分钟将蛋白酶K进行变性处理。

6. 如“gRNA的合成”步骤20所述方法利用苯酚/氯仿抽提纯化酶切产物，最后加入10

μl 无菌双蒸水溶解DNA，利用NanoDrop测定DNA浓度。

六、16S rRNA二轮扩增

为了加入Illumina平台兼容的测序接头序列，以及区分不同样品的index序列。利用酶切纯化产物为模板进行二轮扩增，PCR体系为25 μl，全长的引物序列见下表。

Primer Name	Sequence (5'>3')
P5-index-Rd-F	<u>AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC</u> XXXXXXTCGTC GGCAGCGTCAG
P7-index-Rd-R	<u>CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT</u> XXXXXXGTCTCGTGGG CTCGGAG

注：下划线标注的为Illumina测序仪P5/P7端流动槽结合区，xxxxxx代表是index序列，其中合成的引物需ULTRAPAGE方法进行纯化。

1. 设置如下PCR反应体系：

Cas9 digested DNA	10 ng
I-5 2x High-Fidelity Master Mix	12.5 μl
P5-index-Rd-F (10 μM)	1.25 μl
P7-index- Rd-R (10 μM)	1.25 μl
Add ddH ₂ O to	25 μl

2. 运行如下PCR程序：

98 °C预变性1分钟；扩增8个循环：98 °C变性30秒，
58 °C退火10秒，72 °C延伸15秒；循环完成后72 °C放置5分钟。

3. 取5 μl的PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶进行电泳，检测扩增产物 (图5)。

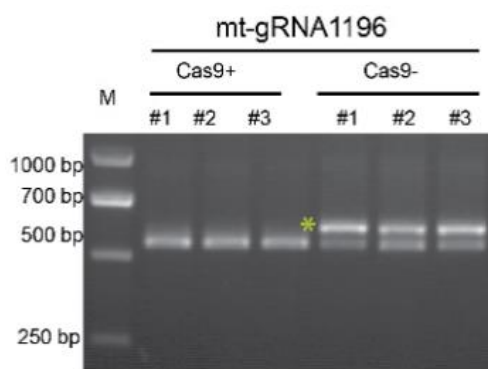


图5. 16S rRNA二轮扩增示意图。

靶向水稻线粒体16S rRNA基因的gRNA序列 (mt-gRNA1196)。Cas-16S-seq建库方法

(Cas9+)和常规16S-seq建库方法 (Cas9-), #1-

#3代表的是三个生物学重复, *代表水稻线粒体799F-1193R的扩增子序列。

4. 二轮扩增产物利用上述“16S rRNA一轮扩增”步骤5磁珠纯化方法进行纯化。

5. 利用NanoDrop进行DNA浓度的测量。

6. 将纯化的产物按照等摩尔比进行混样, 将混合文库再次利用1.8倍的磁珠进行纯化,

然后样品在Illumina HiSeq 2500使用2 × 250 bp进行双端测序。

注: 在整个实验过程中应始终设置包含试剂耗材, 引物的阴性对照组。

溶液配方

1. 磷酸盐缓冲溶液 (1,000 ml)

利用800 ml双蒸水溶解8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g KH₂PO₄, 利用HCl将pH调整到7.4, 最后用双蒸水使体积定容到999 ml, 高温高压灭菌, 待恢复到室温后, 加入1 ml的TWEEN 20并混合均匀后使用。

2. 0.1‰ DEPC处理水

将DEPC按照1:10,000 (体积比) 加入双蒸水, 放置于磁力搅拌器上搅拌超过8小时后高温高压灭菌处理。

3. 3 M醋酸钠, pH 5.2 (100 ml)

将24.61 g的无水乙酸钠溶解于80 ml未灭菌的DEPC处理水中, 加入HCl将pH调整到5.2, 最后加入未灭菌的DEPC处理水定容至100 ml, 高温高压灭菌。

致谢

本研究由国家自然科学基金 (31622047) 和转基因新品种培育重大专项 (2018ZX08010-05B)资助完成。

参考文献

- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R. and Tiedje, J. M. (2014). [Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis](#). *Nucleic Acids Res* 42(Database issue): D633-642.

2. Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G. and Zhang, F. (2013). [DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases](#). *Nat Biotechnol* 31(9): 827-832.
3. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. and Charpentier, E. (2012). [A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity](#). *Science* 337(6096): 816-821.
4. Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J. and Adli, M. (2014). [Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease](#). *Nat Biotechnol* 32(7): 677-683.
5. McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R. and Hugenholtz, P. (2012). [An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea](#). *ISME J* 6(3): 610-618.
6. Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J. P., Ma, E., Doudna, J. A. and Liu, D. R. (2013). [High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity](#). *Nat Biotechnol* 31(9): 839-843.
7. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glockner, F. O. (2013). [The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools](#). *Nucleic Acids Res* 41(Database issue): D590-596.
8. Song, L. and Xie, K. (2020). [Engineering CRISPR/Cas9 to mitigate abundant host contamination for 16S rRNA gene-based amplicon sequencing](#). *Microbiome* 8(1): 80.
9. Xie, K., Minkenberg, B. and Yang, Y. (2014). [Targeted Gene Mutation in Rice Using a CRISPR-Cas9 System](#). *Bio-protocol* 4(17): e1225.