**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](mailto: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. DH5α (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**

1. 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (TaKaRa, catalog number: RR176)
2. Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, catalog number: A63880)
3. DNeasy Powersoil Kit (QIAGEN, catalog number: 12888-50)
4. Gel Extraction Kit (OMEGA, catalog number: D2500-02)
5. HiScribe Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs, catalog number: E2050)
6. I-5 2× High-Fidelity Master Mix (Molecular Cloning Laboratories, catalog number: I5HM-200)
7. QIAGEN plasmid mini kit (QIAGEN, catalog number: 12123)
8. RNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, catalog number: R1017)
9. Double-distilled H2O (ddH2O)
10. KCl (Fisher Scientific, catalog number: P217-500)
11. KH2PO4 (Fisher Scientific, catalog number: P285-500)
12. LE Agarose (Hydragene, catalog number: R9012LE-100g)
13. NaCl (Fisher Scientific, catalog number: S271-1)
14. Na2HPO4 (Fisher Scientific, catalog number: S374-500)
15. TWEEN 20 (Fisher Scientific, catalog number: BP337-100)
16. 75%乙醇，80%乙醇 (用95%乙醇和0.1‰ DEPC处理水配制)
17. 75%医用酒精 (国药试剂)
18. 氨苄青霉素 (国药试剂)
19. 苯酚 (国药试剂)
20. 焦碳酸二乙酯 (DEPC, Sigma, catalog number: D5758)
21. 氯仿 (国药试剂)
22. 无核酸酶水 (Zymo Research, catalog number: W1001-4)
23. 无水乙醇或95%乙醇 (国药试剂，分析纯)
24. 无水乙酸钠 (国药试剂，分析纯)
25. 液氮
26. 磷酸盐缓冲溶液 (见溶液配方)
27. 0.1‰ DEPC处理水 (见溶液配方)
28. 3 M 醋酸钠 (pH 5.2) (见溶液配方)

**仪器设备**

1. 96孔磁铁架 (BORHEE, catalog number: MAG-96-11)
2. 剪刀和镊子
3. 研磨钵和研磨棒
4. 移液器 (2.5，20，200，1,000 μl) (Labnet, catalog numbers: 540910296, 340930114, 240750135, 440960631)
5. NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, catalog number: ND-ONE-W)
6. DNA电泳装置
7. 超净工作台
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, S1000TM 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 (*Strepcococcus 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标靶特定的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；Kuscu*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。*

1. 利用*Bsa* I对pUC19-gRNA载体进行酶切，反应体系如下。

|  |  |
| --- | --- |
| pUC19-gRNA | 2 μg |
| 10× NEB Buffer 4 | 2 μl |
| 10× BSA | 2 μl |
| *Bsa* I (10 U/μl) | 1 μl |
| Add ddH2O to | 20 μl |

1. 37 °C孵育2~4小时。
2. (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。
3. 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。
4. 利用NanoDrop测定DNA浓度。
5. 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 ddH2O 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*。*

1. 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 |

1. 将退火形成的双链DNA寡核苷酸按照1:200的比例进行稀释。
2. 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 | *n* 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 ddH2O to | 5 µl |

1. 室温 (25 °C) 孵育2~4小时，或者4 °C连接过夜。
2. 取1 µl连接产物加入到大肠杆菌DH5α细胞进行转化。
3. 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。
4. 使用QIAGEN plasmid mini kit提取质粒。
5. 使用M13R (-48)引物进行Sanger测序，确认gRNA靶序列正确。
6. 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 2× High-Fidelity Master Mix | 25 μl |
| M13F (10 μM) | 2 μl |
| gRNA-R (10 μM) | 2 μl |
| Add ddH2O to | 50 μl |

1. 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。

1. 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 μl Elution buffer溶剂进行DNA的洗脱。
2. 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)。
   1. DNA溶液中加入等体积 (25 μl)的1:1苯酚：氯仿混合液，涡旋混合30秒；10,000 *× g*室温离心5 min，吸取上清到新离心管中。
   2. 用等量的氯仿抽提两次去除残留的苯酚 (同步骤19.1)。
   3. 加入1/10体积 (5 μl) 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。
   4. 12,000 *× g*离心15分钟沉淀收集DNA，并去除上清液。
   5. 加入500 µl的75%乙醇 (DEPC处理水配制)，12,000 *× g*离心15分钟，移去上清液。
   6. 晾干并加入10~15 µl无核酸酶水溶解DNA。
   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 μl以上)，保证最终纯化后DNA浓度在10 ng/μl以上。*

1. 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 H2O | 18-n µl |
| NTP Buffer Mix | 10 µl (6.7 mM each NTP final) |
| Template DNA | n µl (75 ng) |
| T7 RNA Polymerase Mix | 2 µl |
| Total reaction volume | 30 µl |

*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。*

1. 37 °C孵育16个小时。
2. gRNA转录体系中加入20 µl无核酸酶水，吸打混匀后再加入1 µl DNase I (2 U/µl), 37 °C继续孵育15分钟，酶解DNA模板。
3. 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 µl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/µl)。

*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。*

1. 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 | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG  AACMGGATTAGATACCCKG |
| Rd2+1193R | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG  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。*

1. 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 H2O 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。*

1. 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。

1. 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。

1. 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)
   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。
   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。
   3. 将其放置在磁铁架上5分钟。
   4. 小心移除上清液，不要吸取到磁珠。
   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。
   6. 晾干两分钟，此过程一直保持PCR管放置在磁铁架上。
   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。
   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。
   9. 将洗脱液18 µl取出放置到新PCR管中。
2. 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 H2O | 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*](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。*

1. 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。
2. 37 °C孵育12个小时。
3. 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。
4. 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 | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACXXXXXXTCGTCGGCAGCGTCAG |
| P7-index-Rd-R | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATXXXXXXGTCTCGTGGGCTCGGAG |

*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 2× 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 ddH2O to | 25 μl |

1. 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。

1. 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。

1. 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。
2. 利用NanoDrop进行DNA浓度的测量。
3. 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。

1. 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。

1. 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**

1. 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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24288368) *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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873081) *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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745249) *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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24837660) *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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134646) *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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23934178) *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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193283) *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.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32493511) *Microbiome* 8(1): 80.
9. Xie, K., Minkenberg, B. and Yang, Y. (2014). [Targeted Gene Mutation in Rice Using a CRISPR-Cas9 System.](https://bio-protocol.org/e1225) *Bio-protocol* 4(17): e1225.