



基于内源 III-B 型 CRISPR-Cas 系统构建超嗜热火球菌 *Pyrococcus yayanosii* A1 的基因敲降系统

陈柔珂^{1,2}, 吕永新^{1,2}, 张欢欢^{1,2}, 宋庆浩^{1,2}, 徐俊^{1,2*}

¹上海交通大学微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

²上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

摘要: 【目的】亚氏火球菌(*Pyrococcus yayanosii*) A1菌株的最适生长温度为98 °C, 最适生长压力为 5.2×10^4 Pa, 是研究此类严格厌氧、超嗜热和兼性嗜压古菌的环境适应性机制的良好材料。本研究基于*P. yayanosii* A1基因组中III-B型CRISPR-Cas系统, 旨在建立可应用于此类古菌的基因表达敲降系统(gene knock-down system)。【方法】人工构建的mini-CRISPR簇, 由内源性CRISPR簇Group 1的重复序列(repeats)和待敲降的淀粉酶基因(PYCH_13690)中的原间隔序列(protospacer)组成。将该mini-CRISPR簇插入到具有辛伐他汀抗性的穿梭载体pLMOSHhp中, 使之转录与目的基因mRNA匹配的crRNA, 引导Cmr复合物对其进行切割。【结果】使用高静水压(HHP)诱导型启动子 P_{hhp} 诱导mini-CRISPR簇表达时, 淀粉酶基因的mRNA数量在 5.2×10^4 Pa静水压时下调到原来的67.05%, 在 1.0×10^2 Pa静水压时下调为原来的49.69%; 而使用组成型启动子 P_{hmtb} 诱导mini-CRISPR簇表达时, 淀粉酶基因的mRNA数量在 5.2×10^4 Pa静水压时下调为原来的58.48%, 在 1.0×10^2 Pa静水压时下调为原来的23.97%。使用鲁戈氏碘液显色法对这两类基因表达敲降突变菌株的培养物中残留的淀粉含量进行分析, 结果显示突变菌株的淀粉降解能力明显降低。【结论】在*P. yayanosii* A1中建立了基于内源III-B型CRISPR-Cas系统的基因敲降系统, 可以用于抑制此类超嗜热嗜压古菌体内基因的表达。

关键词: 超嗜热古菌, 嗜压微生物, *Pyrococcus yayanosii*, CRISPR-Cas, 基因敲降

超嗜热微生物的最适生长温度通常高于80 °C^[1]。迄今为止, 人们已经从热液、火山口和其他地热环境中, 分离培养出超过70个科的超嗜

热微生物, 其中古菌有20科^[2]。严格厌氧的超嗜热古菌热球菌科(*Thermococcaceae*)是热液环境中的优势微生物, 可以适应多种极端环境^[3]。热球菌

基金项目: 国家自然科学基金(41676121, 41976085)

*通信作者。Tel: +86-21-34207208; E-mail: xujunn@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-12; 修回日期: 2020-07-24; 网络出版日期: 2020-08-05

科在高静水压(HHP)和高温(HT)下具有较高的生长速率, 对其适应性机制的解析逐渐成为研究的热点^[4-6]。

亚氏火球菌(*Pyrococcus yayanosii*) CH1 菌株是从大西洋 4100 m 深的“Ashadze”热液区域样本中分离获得的热球菌科中第一株专性嗜压古菌, 在最适生长温度 98 °C 下, 其耐受的压力范围为 $2.0 \times 10^3 - 1.2 \times 10^5$ Pa^[7]。亚氏火球菌 CH1 的基因组大小为 1.72 Mb, 共编码 1930 个基因^[8]。在实验室获得的兼性嗜压菌株亚氏火球菌 A1 耐受压力的范围扩大为 $1.0 \times 10^2 - 1.2 \times 10^5$ Pa^[9]。已经构建成功的亚氏火球菌的遗传操作系统包括: 尿嘧啶营养缺陷型菌株 A2 和 As1^[10-11], 携带有辛伐他汀抗性基因的穿梭质粒 (pLMO12103) 和整合质粒 (pLMO033)^[12-13], 以及利用高静水压(HHP)诱导启动子 P_{hhp} 控制的毒素作为新型反向筛选标记等^[11]。

对亚氏火球菌在非最适生长压力下的转录组和蛋白质组分析结果显示, 非最适压力下的基因差异表达涉及翻译、运动和 CRISPR-Cas 系统(基因表达量上调), 以及能量代谢中的 Mbh 氢化酶、Mbx 硫化氢酶和甲酸代谢等基因(表达显著下调)^[14]。由于这些基因多为负责古菌的基础生命过程的必需基因, 必须发展基因表达敲降工具才能对其功能进行遗传分析研究。

CRISPR-Cas 系统通过 crRNA 特异性识别并结合来自病毒和质粒的外源 DNA 或 RNA, 引导 crRNP (CRISPR ribonucleoprotein) 复合物对外源核酸序列进行剪切^[15]。古菌中主要存在的是 I 型和 III 型 CRISPR-Cas 系统^[16]。其中 I 型仅能剪切 DNA, 而 III 型可以剪切 DNA 和 RNA^[17-19]。目前, 古菌中敲降基因表达可通过 CRISPRi 和剪切目的基因 mRNA 来实现。CRISPRi 通过 Cascade 蛋白

和 crRNA 的复合体结合在特异性位点阻止转录的起始。如, 在 *Haloferax volcani* 中一个基于 I-B 型系统的 CRISPRi 工具抑制编码 β 半乳糖苷酶的基因 *bgaHa* 的转录并降低了操纵子 HVO_2526-HVO_2528 的转录^[20]。而在 *Sulfolobus solfataricus* 和 *S. islandicus* 中可直接利用该菌内源的 III-B 型 CRISPR-Cas 系统的 Cmr 蛋白与 mini-CRISPR 簇转录的 crRNA 形成 crRNP 复合物, 结合靶标 mRNA 并进行剪切^[21-25]。

III-B 型 CRISPR-Cas 系统有两个亚型, α -亚型系统有 6 个 Cmr 蛋白, β -亚型有 7 个 Cmr 蛋白^[26-28]。在 *P. furiosus* 中, III-B- α Cmr 蛋白复合物呈“海马”结构^[27-28]。III-B 型 CRISPR-Cas 系统的标志蛋白是 Cmr 复合物中最大的亚基 Cmr2, 它具有 HD 结构域, 发挥 ssDNase 的作用^[29-30]。CRISPR 核糖核蛋白(crRNPs)由 Cmr 蛋白复合物和 crRNA 组成, 该复合物与外源 RNA 结合, 然后在外源核苷酸链中进行固定间隔 6 nt 的剪切^[30-32]。在 *P. furiosus* 中的 crRNA 产物有长度为 39 nt 和 45 nt 两种长度, crRNA 的 5' 末端具有长度为 8 nt 的 5'-tag 序列, 即 Repeats 的 3' 末端区域上的 5'-handle 标签^[32-33]。与 I 型和 III-A 型 CRISPR 系统中使用 PAM 序列识别目的 DNA 不同, III-B 型 CRISPR-Cas 系统不具有 PAM 序列, 仅 crRNA 匹配目的 mRNA 即可进行切割, 其 5'-tag 标签可以控制 RNA 和 DNA 的剪切, 当序列匹配时, 仅切割 RNA 并保护 DNA^[19,26]。

基于 III-B 型 CRISPR 系统独特的切割 RNA 和 DNA 的机制, 我们在超嗜热古菌亚氏火球菌 A1 中构建了一个高效率的基因表达敲降系统。通过在穿梭质粒上导入人工构建的 mini-CRISPR 簇, 成功抑制了 1 个淀粉酶基因的表达。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

本研究用到的菌株和质粒如表 1 所示。

1.2 合成序列和引物

本文中所用到的合成序列和引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 如表 2 所示。

1.3 试剂

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)中使用 3 种 DNA 聚合酶, 序列长度大于 1000 bp 时, 使用 PrimerSTAR Max DNA 聚合酶(TaKaRa)扩增; 序列长度小于 1000 bp 时, 使用 Pfu DNA 聚合酶(Tiangen)扩增; 验证重组质粒时, 使用 Taq PCR Master Mix (Lifefeng)扩增。DNA 片段回收使用 Gel Extraction Kit (Omega)。无缝克隆使用 ClonExpress II 单步克隆试剂盒(Vazyme)。重组质粒在 Trans5 α Chemically Competent *E. coli* (Transgene)中复制, 使用 Plasmid DNA Minikit I (Omega)进行提取。总 RNA 提取中的 Trizol、DEPC 水和乙醇购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 三氯甲烷和异戊醇为国产分析纯。DNase I 购自 Thermo Scientific, RNA 反转录试剂盒为 Revertaid

1st cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), qPCR 中使用染料 SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific)。鲁戈氏碘液配方为碘 5 g, 碘化钾 10 g, 去离子水 100 mL。

1.4 生物信息学分析

热球菌科及进化树的外群(*Methanococcus voltae* A3 and *S. islandicus* REY15A)的基因组序列来自 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。通过 BLASTp 将基因与 COG 数据库比对, 统计每个物种中的 III-B 型 CRISPR-Cas 系统的 Cmr 基因^[33]。将这些 Cmr 基因的串联序列构建进化树。首先使用全局模式 MAFFT-linsi 将每个 Cmr 基因的序列(见附表 1), 进行比对, 然后按照 Cmr1 至 Cmr6 的顺序将多序列比对结果串联^[34]。随后使用 trimAL 的 atomated1 模式对串联序列进行修剪^[35], 删除 gap 过多的位置。最后使用 IQTREE (TPM3u+F+I+G4 模型, 1000 次快速重复)构建进化树^[36]。

1.5 基因表达敲降质粒的构建

该质粒在穿梭质粒骨架上插入不同启动子控制的 mini-CRISPR 簇元件组成。在目的基因 PYCH_13690 的非编码链上选取 5'-tag 序列(或替

表 1. 本研究中所用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used and constructed in this study

Strains and plasmids	Genotype and features	References
<i>P. yayanosii</i> A1		Li <i>et al.</i> ^[10]
kdp-1369	PYCH_13690 gene knockdown mutant generated using pLMOkdp-1369	This work
kdm-1369	PYCH_13690 gene knockdown mutant generated using pLMOkdm-1369	This work
Δ 1369-	PYCH_13690 gene deletion mutant of A1	Song <i>et al.</i> ^[11]
pLMOS776TA	pLMO12102::HMG-CoA-Pgdh-PhmbB-PF0775-PF0776-Phhp1	Song <i>et al.</i> ^[11]
pLMOS01	pLMO12102::HMG-CoA-Pgdh	Song <i>et al.</i> ^[11]
pLMOSHhp	pLMO12102::HMG-CoA-Pgdh- Phhp	This work
pLMOkdp-1369	pLMOSHhp1::Phhp-mini-CRISPR array	This work
pLMOkdm-1369	pLMOSHhp1::Phmtb-mini-CRSIPR array	This work

表 2. 本研究中所用合成序列和引物

Table 2. Oligonucleotides and primers used and constructed in this study

Oligonucleotides	Sequences (5'→3')
1369-hhp	CCTGTCATGAAAGAAGGTGATAAAGGTTCCAATAAGACTCAAAGAGAATTGAAAGCATCAAGT TGATCCGCTCGTCGCTGGATACCCTCTCGGTTCCAATAAGACTCAAAGAGAATTGAAAGGACAC GGGCCCCGTCGACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTGCCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCC
1369-hmtb	TAGAGTCGACCTGCAGATTTTCGGGTGAGCAAAATGCGCGTTGCGGCAGCTGGACCTGCAGAG CGATATATTTATATAGGGATATAGTAATAGATAATATCACGGAGGTGATGCATGTTCCAATAAGACT <u>CAAAGAGAATTGAAAG</u> CATCAAGTTGATCCGCTCGTCGCTGGATACCCTCTCGGTTCCAATAAG <u>ACTCAAAGAGAATTGAAAG</u> GACACGGGCCCGTCGACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTGCC GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC
pLMOhhp-F	CTTTATCACCTTCTTTTCATGACAGG
pLMOhhp-R	TCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC
CRISPR-hhp-F	CCTGTCATGAAAGAAGGTGATAAAGGTTCCAATAAGACTCAA
CRISPR-hmtb-F	TAGAGTCGACCTGCAGATTTTCGG
CRISPR-R	GAAACAGCTATGACCATGATTACGA
pLMOS3-F	ATGGAAATAGAGGAGATTATAGAGA
pLMOS3-R	TCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC
Phmtb-R	CTATGACCATGATTACGAATGCATCACCTCCGTGATATTATCT
Phmtb-F	TCTCCTCTATTTCCATGTTTCATCCCTCCAAATTAGGTGATT
test1-F	CAAAGTTGCGGTCTTCCAC
test1-R	AAGGGACCACTCGCTCA
test2-F	TTCGTTGTCGATTATAGGGTGA
test2-R	TGCGATAGTGTCTTTATGGGAT
sim-F	ATGGAAATAGAGGAGATTATAGAGA
sim-R	TCATCTCCCAAGCATTATGAGCC
Cmr1-qF	GGGCACCATCAATCAA
Cmr1-qR	ACTCTGCTCCTCCTTGC
Cmr2-qF	AACCGCAGTTCTCCCT
Cmr2-qR	TTTGTCTTACCTCGTCATC
Cmr3-qF	ATGGCGGTAATGTTTCG
Cmr3-qR	CTTCCGTCGCTTTCG
Cmr4-qF	GATAGAGCCCACGAACA
Cmr4-qR	CCTTTGGCACTCCTTAC
Cmr5-qF	GCCTACGCTTACGAGTG
Cmr5-qR	TATCTTCCTTGGGTCTTC
Cmr6-qF	CGCTGGCGTTCTACTTG
Cmr6-qR	TTTGTGGCACCTATGT
16S-qF	GCCGATTAGGTAGTTGGTGG
16S-qR	CCGTGTCTCAGTGTCCATC
Promoterdw-F	CGGAAGCATAAAGTGTAAG
Promoterdw-R	C GACTGGAAAGCGGGC

Repeats sequences are underline.

代序列)下游长度为 37 nt 的 Protospacer, 作为特异性间隔序列(spacer)插入重复序列(repeats)中, 使得人工构建的 mini-CRISPR 簇可以转录出与 PYCH_13690 基因转录出的 mRNA 配对的 crRNA。同时, crRNA 上的特定 5'-tag 序列与 PYCH_13690 的 mRNA 结合, 不激活 crRNP 复合体的 DNA 酶活性, 使内源 CRISPR 系统只剪切 mRNA, 避免切割 DNA。

mini-CRISPR 簇中需要人工合成序列 (1369-hhp 和 1369-hmtb)见表 2, 其两端具有与质粒重叠的区域。Repeats 序列为 CRISPR Finder 数据库中公告的亚氏火球菌基因组中 5'-CTTT CAATTCTCTTTGAGTCTTATTGGAAC-3'^[37]。

使用引物 pLMOhhp-F/R 以质粒 pLMOS776TA 为模板扩增包括 HHP 启动子元件和一个 HMG-CoA 还原酶基因, 获得线性化的载体片段 pLMOSHhp^[11]; 使用引物 CRISPR-hhp-F/CRISPR-R 以合成的 1369-hhp 序列为模板扩增包括 Phhp 启动子重叠区域和 mini-CRISPR 簇基因, 获得片段 hhp-array; 使用 ClonExpress II one-step cloning kits (Vazyme)试剂盒将线性化载体片段 pLMOSHhp 与 DNA 片段 hhp-array 进行连接, 构建敲降质粒 pLMOSkdp-1369。

使用引物 pLMOS3-F/R 以质粒 pLMOSHhp 为模板扩增包含 HMG-CoA 还原酶基因的线性化载体片段 pLMOS01; 使用引物 Phmtb-F/R 以 pLMOS776TA 为模板扩增包括 P_{hmtb} 启动子基因及其上游序列, 获得片段 Phmtb-S1; 使用引物 CRISPR-hmtb-F/CRISPR-R 以合成的 1369-hmtb 序列为模板扩增包括 P_{hmtb} 启动子重叠区域和 mini-CRISPR 簇基因, 获得片段 hmtb-array; 使用

ClonExpress II one-step cloning kits (Vazyme)试剂盒将线性化载体 pLMOS01、片段 Phmtb-S1 与片段 hmtb-array 连接, 构建敲降质粒 pLMOkdm-1369。

以上 2 个重组质粒分别转化至 *E. coli* Trans5 α 中, 在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄霉素(Amp)的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 培养 14 h。通过 PCR 扩增重组质粒中 mini-CRISPR 簇, 并进行 DNA 测序分析确保该基因片段的序列无误。

1.6 亚氏火球菌 A1 菌株培养和转化

亚氏火球菌 A1 的培养基为 TRM 培养基 (pH 6.8), 培养温度为 95 $^{\circ}\text{C}$, 压力为 1.0×10^2 Pa 或 5.2×10^4 Pa。将 TRM 培养基分装在血清瓶中, 密封后抽换气 3 次, 使氮气替换氧气, 并加入脱氧剂 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 以维持厌氧状态。另外需添加单质硫作为电子受体。固体 TRM 培养基中使用了多硫化物溶液替代硫和 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 高温琼脂的浓度为 1%。选择培养基中, 正筛选标记辛伐他汀(ark pharm)的最终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。每组均有 3 个平行样本。使用 Plasmid DNA Minikit I 试剂盒从 *E. coli* Trans5 α 提取重组质粒, 并使用 CaCl_2 方法将质粒转化至亚氏火球菌 A1^[10-11], 转化后从固体培养基中挑取单克隆, 接种在含有 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 辛伐他汀的培养基中置于 1.0×10^2 Pa, 95 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d。使用引物 sim-F/R 对菌体进行菌落 PCR, 验证敲降质粒是否转化成功。

1.7 总 RNA 提取和反转录

亚氏火球菌 A1 及其敲降菌株在 95 $^{\circ}\text{C}$ 、 1.0×10^2 Pa 或 5.2×10^4 Pa 下培养 14 h。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下, 12000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 并迅速冻存在 -70°C 。加入 Trizol 试剂裂解后, 使用三氯甲烷、

异戊醇和 75%乙醇纯化。使用 80 μ L DEPC 水溶解 RNA, 加入 DNase I 在 37 $^{\circ}$ C 下反应 1 h, 降解 DNA 片段, 并用 75%乙醇纯化。重新用 DEPC 水溶解后, 测定 RNA 浓度。取 2 μ g RNA 使用试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) 对总 RNA 进行反转录, PCR 程序为: 25 $^{\circ}$ C 5 min; 42 $^{\circ}$ C 60 min; 70 $^{\circ}$ C 5 min。取 2 μ g RNA 加入 2 \times RNA loading buffer 用于 RNA 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 20 min) 检查 RNA 质量。

1.8 测定 mRNA 剪切效率

使用 ABI 7500/7500 Real-Time PCR System (Thermo Scientific) 和 SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) 进行定量 PCR, 方法为 $\Delta\Delta C_T$ 。每组 qPCR 重复 3 次。PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 40 循环: 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 20 s; 72 $^{\circ}$ C 5 min。两对引物设计在基因 PYCH_13690 上, test 1 (test1-F/R) 扩增区域为 Protospacer 1 剪切区域, test 2 (test2-F/R) 扩增 cDNA 靠近 3' 末端的对照区域。

1.9 培养物中残留淀粉含量分析

在液体 TRM 培养基中加入了 1‰ (W/V) 的可溶性淀粉进行培养。培养 12 h 后, 取 1 mL 细胞悬浮培养液, 加入 10 μ L 的鲁戈氏碘液测定淀粉的残留量。

1.10 测定 Cmr 蛋白的差异表达量

对 Cmr1-6 的 mRNA 进行定量 PCR, qPCR 方法为 $\Delta\Delta C_T$ 。每组 qPCR 重复 3 次。条件及仪器见 1.8。引物 Cmr1-6-qF/R 分别设计在 Cmr1-6 基因序列上, 序列对应编号如下: Cmr1 (PYCH_07990), Cmr2 (PYCH_08000), Cmr3 (PYCH_08010), Cmr4

(PYCH_08030), Cmr5 (PYCH_08040), Cmr6 (PYCH_08050), 引物 16S-qF/R 设计在 16S rRNA 上, 为内参基因。

1.11 测定启动子 P_{hhp} 和 P_{hmtb} 下游序列的转录量

对启动子 P_{hhp} 和 P_{hmtb} 下游序列进行定量 PCR, 方法为 $\Delta\Delta C_T$ 。每组 qPCR 重复 3 次。条件及仪器见 1.8。由于 mini-CRISPR 簇转录后被 Cas6 蛋白剪切成 crRNA, 无法设计 qPCR 引物, 引物 Promoterdw-F/R 设计在 mini-CRISPR 簇下游共转录的序列上(长度为 200 bp)。引物 16S-qF/R 设计在 16S rRNA 上, 为内参基因。

2 结果和分析

2.1 热球菌科中的 III-B 型 CRISPR-Cas 系统

在已公布完整基因组的热球菌科菌株中有 3 株火球菌(*Pyrococcus*)和 7 株热球菌(*Thermococcus*)存在 III-B 型 CRISPR-Cas 系统, 而在古老球菌(*Palaeococcus*)中暂未发现。这些火球菌和热球菌基因组中 III-B 型 CRISPR-Cas 系统均为 α 亚型, 由 6 个 Cmr 蛋白(Cmr1-Cmr6)组成, Cmr2 (Cas10) 是其中的标志蛋白(图 1-A)。

CRISPR 基因簇由重复序列(repeats)和间隔序列(spacer)组成, 可转录出 crRNA。Group 1 型 repeats 长度为 30 bp, 前导序列具有 BRE/TATA box^[38]。统计分析热球菌科中所有对应 I-A/III-B 型 CRISPR-Cas 系统的 repeats 序列的偏好性(图 1-B), 结果表明 Group 1 型 repeats 序列基本保守, 其 3' 末端长度为 8 nt 的 5'-handle 序列基本保守, 转录得到 crRNA 上的 5'-tag 用于保护与之完全匹配的外源 DNA。

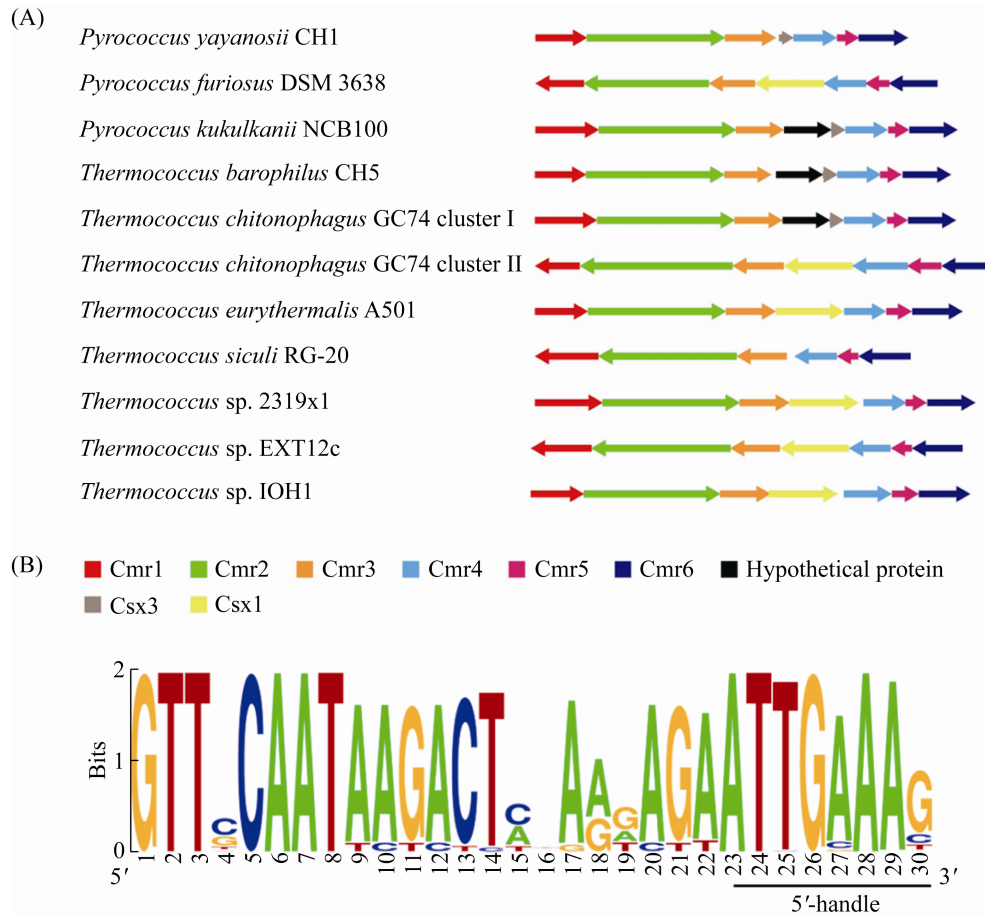


图 1. 热球菌科中的 III-B 型 CRISPR-Cas 编码基因的特征

Figure 1. Characteristics of the gene clusters of Cmr proteins of type III-B CRISPR-Cas and the repeats sequences in Thermococcaceae. A: the gene clusters of Cmr proteins in Thermococcaceae; B: the repeats sequences in Thermococcaceae. The 5'-handle is the 8 nucleotides at the end of repeats.

2.2 构建可敲降淀粉酶编码基因表达的质粒

在亚氏火球菌 A1 基因组中存在的 4 条 CRISPR 簇含有相同的 Group 1 型 repeats 序列, 可诱导 I-A/III-B 型 CRISPR-Cas 系统的剪切。邓岭等^[26]发现 *S. islandicus* 中 5'-tag 序列可以保护 DNA, 并得到 7 个与 5'-tag 作用相似的 6 nt 的序列, 可以应用于其他的菌株中。我们在 PYCH_13690 基因的非编码链上找到 4 处对应的序列, 分别位于起始密码子位点(+1)下游的 750–756、1530–1535、

1616–1621 和 1889–1894 处。我们选取了最靠近起始密码子的“GTAAAG”, 在非编码链 5'-tag 的下游序列选取长度为 37 nt 的寡聚核苷酸构成 protospacer 1 片段(图 2-A)。将此片段插入两个 Group 1 型 repeats 中成为 spacer 1 片段, 构成 mini-CRISPR 簇。选取高压诱导型启动子 P_{hhp} 和组成型启动子 P_{hmb} 分别控制 mini-CRISPR 簇的表达, 进一步研究不同启动子对 CRISPR-Cas 系统剪切效率的影响(图 2-B)。

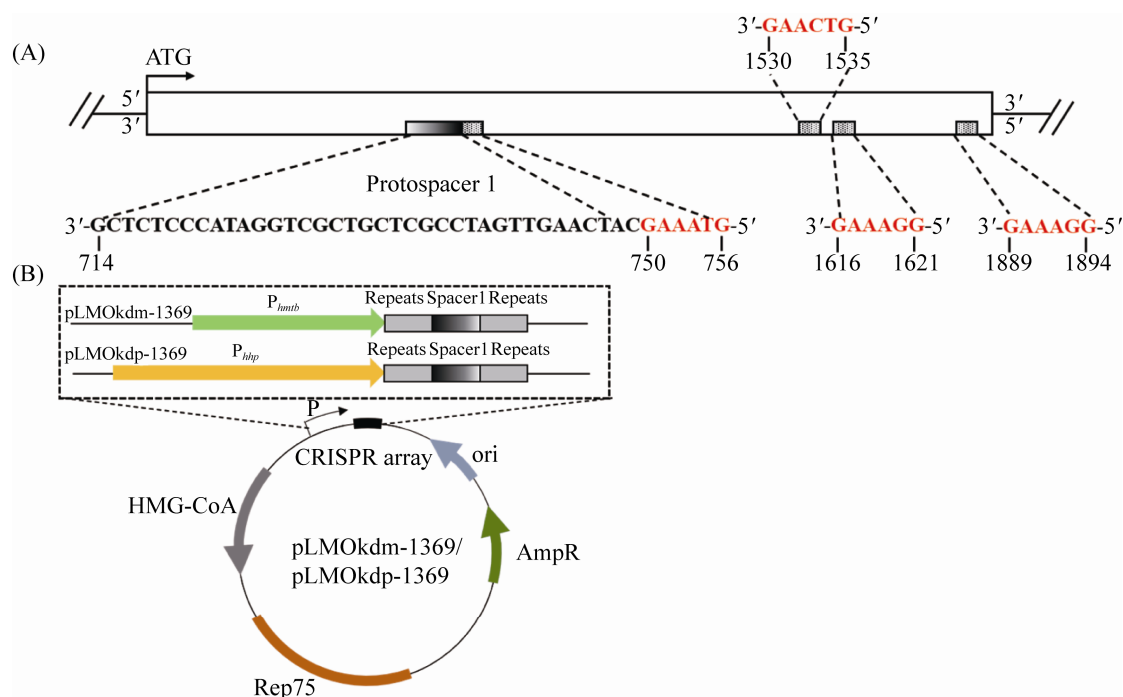


图 2. mini-CRISPR 簇切割位点的设计及敲降质粒的构建

Figure 2. The strategy of cleavage sites and construction of knock down plasmid with artificial mini-CRISPR locus. A: schematic of RNA-tag regions selected for gene silencing of the gene PYCH_13690. The 5'-tag sites were from 750 to 756, 1530 to 1535, 1616 to 1621, and 1889 to 1894 which are red. The protospacer 1 with 37nt from 714 to 750 nt is chosen which is close to the start codon (ATG, +1) of PYCH_13690 in antisense sequence. Then, the spacers 1 was inserted into two repeats. B: the artificial mini-CRISPR locus with an HHP-inducible promoter P_{hhp} and a constitutive promoter P_{hmtb} on the knock down plasmid pLMO-kdp-1369 and pLMO-kdm-1369.

2.3 高压诱导型启动子和组成型启动子控制 mini-CRISPR 簇进行基因表达敲降的效率差异

CRISPR-Cas 系统的剪切位点是 crRNA 与核酸序列的匹配位点, 所以我们在此位点设计了 1 对 qPCR 引物 test 1, 测定未剪切的 mRNA。而对照引物 test 2 设计在剪切位点的下游(图 3-A)。当 III-B 型 CRISPR-Cas 系统剪切切割位点时, 该切割位点上引物无法扩增, 而下游对照位点可以正常扩增。设定对照位点 test 2 为内参, 采用相对定量的方法, 计算菌株中目标基因 mRNA 的相对剪切量。将野生型菌株 A1 中目的引物和对照引物的扩增数量的比例设定为 100%, 野生型菌株和基因表达敲降菌株之间的比例被定义为剪切效率。

结果表明, 目标基因 PYCH_13690 的 mRNA 在 5.2×10^4 Pa 时降解了 32.95%, 在 1.0×10^2 Pa 下降解了 50.31% (图 3-B)。为了提高该 CRISPR-Cas 系统在嗜热嗜压古菌的最适压力 5.2×10^4 Pa 下的基因表达敲除的效率, 我们尝试使用了一种来自于 *P. furiosus* 的组成型启动子 P_{hmtb} 替代压力诱导型启动子。结果显示, 在不同的生长压力下, 组成型启动子控制的 CRISPR-Cas 系统的敲除效率均更高。以目标基因 PYCH_13690 为例, 其 mRNA 在常压 1.0×10^2 Pa 下的剪切率高达 76.03%、在 5.2×10^4 Pa 下的剪切率为 50.31% (图 3-B)。至此, 我们利用超嗜热嗜压亚氏火球菌内源 III-B 型 CRISPR-Cas 系统, 建立了不同抑制效率的基因沉默遗传工具。

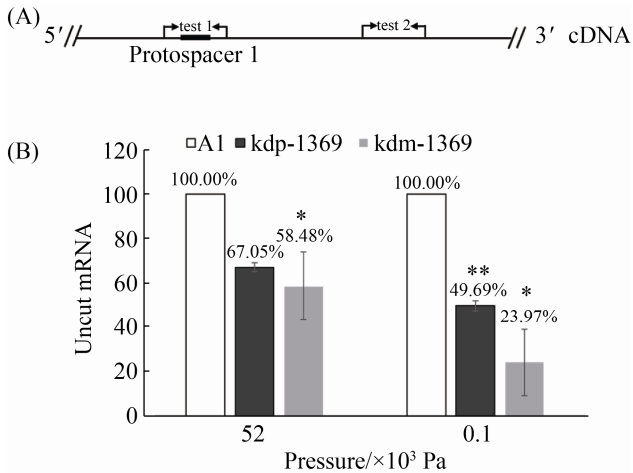


图 3. qPCR 检测淀粉酶编码基因 *PYCH_13690* 的 mRNA 的剪切率

Figure 3. Cleavage analysis of CRISPR-mediated RNA interference of gene *PYCH_13690* by real-time qPCR. A: strategy for detecting RNA cleavage at the spacer 1 in mRNA. Primer test 1 set amplified a region containing the predicted RNA cleavage sites while primer test 2 amplified a region positioned upstream the spacer 1 in mRNA. B: results of qPCR showing the ratio of uncut mRNA over total mRNA after reverse transcription of total RNA into cDNA. The strains A1 (white), kdp-1369 (light gray), and kdm-1369 (dark gray) were cultured at different pressures for 14 hours. The results are from three independent experiments, and the error bars represent the standard deviations. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. The strain kdp-1369 is A1 with plasmid pLMO-kdp-1369 (Figure 2-B, while the strain kdm-1369 is A1 with plasmid pLMO-kdm-1369).

2.4 淀粉酶编码基因表达敲降菌株的表型分析

淀粉酶基因 *PYCH_13690* 是淀粉降解途径中表达量最高的基因。在过去的研究中，敲除该基因的突变菌株 $\Delta 1369$ -在 1.0×10^2 Pa 条件下几乎不降解淀粉^[11]。

将菌体接种到含有 1% (W/V)可溶性淀粉的

TRM 培养基中在 95°C 、 1.0×10^2 Pa 下培养 16 h，比较野生型菌株 A1 和淀粉酶基因表达敲降菌株 (kdp-1369 和 kdm-1369) 的差异。结果显示，在 19 h 时野生型菌株 A1 的培养物中剩余的淀粉含量显著小于敲降菌株，在 23 h 时野生型菌株 A1 的培养物中淀粉基本消耗完，而此时淀粉酶基因表达敲降菌株的培养物中淀粉含量开始下降(图 4)。

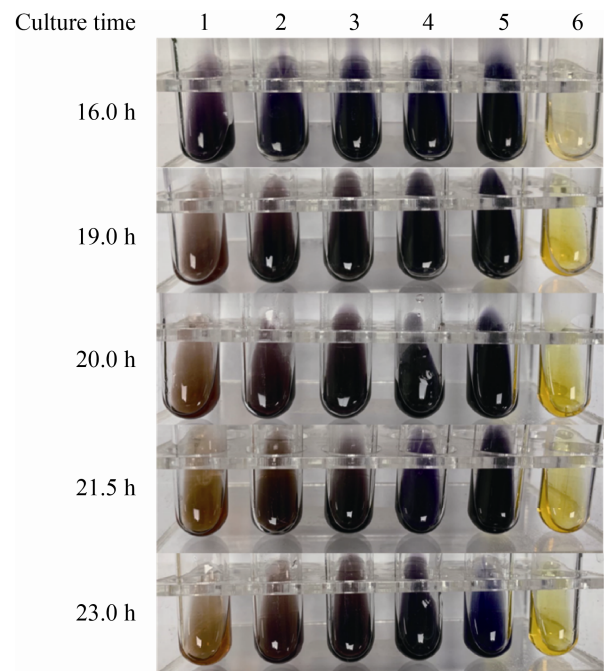


图 4. 淀粉酶编码基因(*PYCH_13690*)表达敲降菌株的表型分析

Figure 4. Phenotypic analysis of the gene silencing strains of *PYCH_13690*. Measurement of the residual starch via Lugol's iodine method after at 95°C under 0.1 MP. 1: strain A1 cultured in TRM with 1% (W/V) soluble starch; 2: strain kdp1369 cultured in TRM with 1% (W/V) soluble starch; 3: strain kdm1369 cultured in TRM with 1% (W/V) soluble starch; 4: mutant $\Delta 1369$ - cultured in TRM with 1% (W/V) soluble starch; 5: TRM with 1% (W/V) soluble starch (negative control); 6: TRM.

3 结论和讨论

Terns 研究小组对嗜嗜热火球菌 *P. furiosus* 中的 III-B 型 CRISPR-Cas 系统的 DNA 和 RNA 剪切的机理进行了深入的研究^[30-32]。亚氏火球菌中存在有和 *P. furiosus* 高度相似的 CRISPR-Cas 系统, 其中 Cmr 蛋白相似度高于 40% (附表 2)。在本研究中, 我们通过构建与目的基因匹配的人工 mini-CRISPR 簇, 在嗜嗜热嗜压亚氏火球菌中实现了基于内源性的 III-B 型 CRISPR-Cas 对一个淀粉酶基因的 mRNA 敲降。

当启动子不同时, 上述 mRNA 敲降系统表现出不同的剪切效率。在最适生长压力(5.2×10^4 Pa)下, 高静水压诱导型启动子 P_{hhp} 和组成型启动子 P_{hmb} 诱导 mini-CRISPR 簇表达将淀粉酶基因的表达下调的程度与 *S. solfataricus* 中 41% 的剪切率相似^[21]。然而, 敲降体系在常压(1.0×10^2 Pa)的剪切率比最适生长压力(5.2×10^4 Pa)更高, 使用 P_{hhp} 时基因表达下调了 50.31%, 使用 P_{hmb} 时基因表达下调了 76.03%。在不同培养压力下的不同的 mRNA 剪切率可能与 Cmr 蛋白的数量和活性有关。有研究表明, CRISPR-Cas 系统中核酸酶表达量在非最适生长条件下会提高^[14]。我们在 1.0×10^2 Pa 和 5.2×10^4 Pa 下测定了亚氏火球菌 A1 菌株中 Cmr 蛋白的 mRNA 差异倍数, 结果表明在 1.0×10^2 Pa 下 Cmr 蛋白的表达量均提高(图 5)。虽然压力诱导型启动子 P_{hhp} 控制的 mini-CRISPR 簇在高压下产生较高的 crRNA (附图 1), 但在 5.2×10^4 Pa 下较低的 Cmr 蛋白表达水平可能影响了 CRISPR-Cas 系统的剪切效率。同时, 使用组成型启动子 P_{hmb} 控制的 mini-CRISPR 簇在常压和高压下产生的 crRNA 没有显著差异(附图 1), 但 Cmr 蛋白的表达量在常压下更高(图 5), 因此对嗜嗜热兼性嗜压的亚氏火球菌使用 P_{hmb} 诱导的基因表达敲降系统

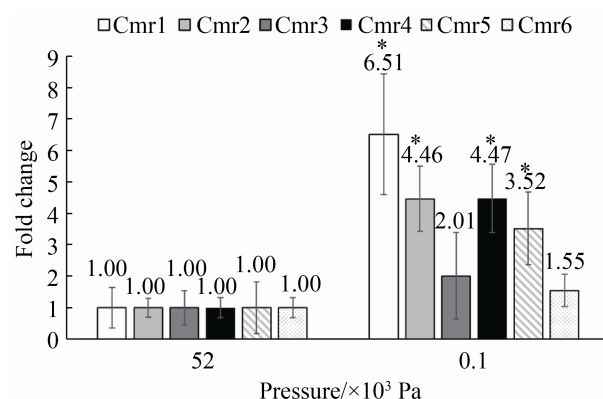


图 5. 亚氏火球菌 A1 中 Cmr1-6 蛋白在 1.0×10^2 Pa 和 5.2×10^4 Pa 下 mRNA 的差异倍数

Figure 5. The fold changes of Cmr1-6 protein in *P. yayanosii* A1 under 1.0×10^2 Pa and 5.2×10^4 Pa.

在常压下进行基因沉默遗传操作的效率更高。

由于最适生长温度和压力的限制, 嗜嗜热嗜压古菌亚氏火球菌 A1 的遗传操作工具有限。本研究显示基于内源性的 III-B 型 CRISPR-Cas 系统只需要导入长度较小的 mini-CRISPR 簇, 可以开展必需基因的功能研究。特别是亚氏火球菌中存在有 7 个 5'-tag 序列可用来设计剪切位点, 可满足构建绝大多数基因表达敲降质粒的需要^[26]。此外, 可以在一个基因中设计多个剪切位点, 进一步提高基因表达的敲降效率; 也可以将多个目标基因的序列的 spacer 连接成 CRISPR 簇, 同时敲降多个基因的表达量。

对已公布基因组的 10 株嗜嗜热的热球菌和火球菌中 Cmr 基因进行系统发育分析, 结果显示亚氏火球菌 A1 基因组中 Cmr 基因与其他热球菌基因组中的 Cmr 基因亲缘关系更近(图 6)。推测该系统也容易移植到其他具有 III-B 型 CRISPR-Cas 系统的菌株中, 如 *T. eurythermalis* A501。在其他不具有 III-B 型系统的热球菌科中(如 *T. kodakarensis* 及 *Palaeococcus pacificus*), 可以使用 dCas3 的 I 型或 dCas9 的 II 型 CRISPR-Cas 系统结合基因启动子区域, 抑制基因表达。

Tree scale: 0.1

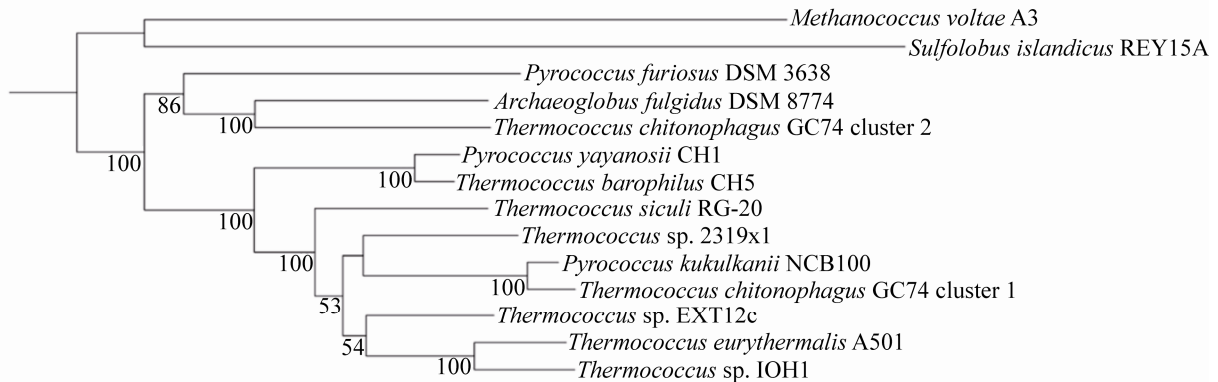


图 6. 具有完整基因组的热球菌中 Cmr 蛋白的系统发育树

Figure 6. The phylogenetic tree of the Cmr proteins in Thermococcaceae with complete genomes. The maximum likelihood tree is constructed by IQTREE with ‘TPM3u+F+I+G4’ model, and 1000 ultrafast bootstraps is used for the last construction. The outgroup are *Methanococcus voltae* A3 and *Sulfolobus islandicus* REY15A. The access No. of the amino acid sequence of Cmr proteins were listed in Table S1.

参考文献

- [1] Fang JS, Zhang L, Bazylinski DA. Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(9): 413–422.
- [2] Zillig W, Reysenbach AL. Thermococcales//Bergey’s manual of systematics of Archaea and Bacteria. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, 2015.
- [3] Takai K, Nakamura K. Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(3): 282–291.
- [4] Cario A, Lormières F, Xiang X, Oger P. High hydrostatic pressure increases amino acid requirements in the piezo-hyperthermophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Research in Microbiology*, 2015, 166(9): 710–716.
- [5] Cario A, Jebbar M, Thiel A, Kervarec N, Oger PM. Molecular chaperone accumulation as a function of stress evidences adaptation to high hydrostatic pressure in the piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Scientific Reports*, 2016(6): 29483.
- [6] Zeng X, Birrien JL, Fouquet Y, Cherkashov G, Jebbar M, Querellou J, Oger P, Cambon-Bonavita MA, Xiao X, Prieur D. *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *The ISME Journal*, 2009, 3(7): 873–876.
- [7] Birrien JL, Zeng X, Jebbar M, Cambon-Bonavita MA, Querellou J, Oger P, Bienvenu N, Xiao X, Prieur D. *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(12): 2827–2881.
- [8] Xu J, Liu LP, Xu MJ, Philippe O, Wang FP, Mohamed J, Xiao X. Complete genome sequence of the obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii* CH1. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(16): 4297–4298.
- [9] 李学恭. 深海超嗜热嗜压古菌 *Pyrococcus yayanosii* 压力适应性机制研究. 中国海洋大学博士学位论文, 2014.
- [10] Li XG, Fu L, Li Z, Ma XP, Xiao X, Xu J. Genetic tools for the piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii*. *Extremophiles*, 2015, 19(1): 59–67.
- [11] Song QH, Li Z, Chen RK, Ma XP, Xiao X, Xu J. Induction of a toxin-antitoxin gene cassette under high hydrostatic pressure enables markerless gene disruption in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(4): e02662-18.
- [12] Li Z, Li XG, Xiao X, Xu J. An integrative genomic island affects the adaptations of the piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii* to high temperature and high hydrostatic pressure. *Frontiers in Microbiology*, 2016(7): 1927.
- [13] 李臻. 深海来源嗜压、超嗜热古菌 *Pyrococcus yayanosii* 基因组岛 PYG1 的特征及生理功能研究. 上海交通大学博士学位论文, 2017.

- [14] Michoud G, Jebbar M. High hydrostatic pressure adaptive strategies in an obligate piezophile *Pyrococcus yayanosii*. *Scientific Reports*, 2016(6): 27289.
- [15] Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E. The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell*, 2018, 172(6): 1239–1259.
- [16] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9(6): 467–477.
- [17] Hochstrasser ML, Taylor DW, Kornfeld JE, Nogales E, Doudna JA. DNA targeting by a minimal CRISPR RNA-guided cascade. *Molecular Cell*, 2016, 63(5): 840–851.
- [18] Samai P, Pyenson N, Jiang WY, Goldberg GW, Hatoum-Aslan A, Marraffini LA. Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-cas immunity. *Cell*, 2015, 161(5): 1164–1174.
- [19] Elmore JR, Sheppard NF, Ramia N, Deighan T, Li H, Terns RM, Terns MP. Bipartite recognition of target RNAs activates DNA cleavage by the type III-B CRISPR–Cas system. *Genes and Development*, 2016(30): 447–459.
- [20] Stachler AE, Schwarz TS, Schreiber S, Marchfelder A. CRISPRi as an efficient tool for gene repression in archaea. *Methods*, 2020(172): 76–85.
- [21] Zebec Z, Manica A, Zhang J, White MF, Schleper C. CRISPR-mediated targeted mRNA degradation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(8): 5280–5288.
- [22] Peng N, Han WY, Li YJ, Liang YX, She QX. Genetic technologies for extremely thermophilic microorganisms of *Sulfolobus*, the only genetically tractable genus of crenarchaea. *Science China Life Sciences*, 2017, 60(4): 370–385.
- [23] Peng WF, Feng MX, Feng X, Liang YX, She QX. An archaeal CRISPR type III-B system exhibiting distinctive RNA targeting features and mediating dual RNA and DNA interference. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(1): 406–417.
- [24] Liu T, Pan SF, Li YJ, Peng N, She QX. Type III CRISPR-Cas system: introduction and its application for genetic manipulations. *Current Issues in Molecular Biology*, 2018(26): 1–14.
- [25] 彭文航. *Sulfolobus islandicus* CRISPR-Cas 病毒防御功能的遗传学分析. 华中农业大学博士学位论文, 2015.
- [26] Deng L, Garrett RA, Shah SA, Peng X, She QX. A novel interference mechanism by a type III-B CRISPR-Cmr module in *Sulfolobus*. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(5): 1088–1099.
- [27] Osawa T, Inanaga H, Sato C, Numata T. Crystal structure of the CRISPR-CAS RNA silencing cmr complex bound to a target analog. *Molecular Cell*, 2015, 58(3): 418–430.
- [28] Ramia NF, Spilman M, Tang L, Shao YM, Elmore J, Hale C, Coczaki A, Bhattacharya N, Terns RM, Terns MP, Li H, Stagg SM. Essential structural and functional roles of the Cmr4 subunit in RNA cleavage by the Cmr CRISPR-Cas complex. *Cell Reports*, 2014, 9(5): 1610–1617.
- [29] Shao YM, Coczaki AI, Ramia NF, Terns RM, Terns MP, Li H. Structure of the Cmr2-Cmr3 subcomplex of the Cmr RNA silencing complex. *Structure*, 2013, 21(3): 376–384.
- [30] Coczaki AI, Ramia NF, Shao YM, Hale CR, Terns RM, Terns MP, Li H. Structure of the Cmr2 subunit of the CRISPR-Cas RNA silencing complex. *Structure*, 2012, 20(3): 545–553.
- [31] Hale C, Kleppe K, Terns RM, Terns MP. Prokaryotic silencing (psi)RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *RNA*, 2008(14): 2572–2579.
- [32] 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.
- [33] Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 33–36.
- [34] Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(14): 3059–3066.
- [35] Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 2009, 25(15): 1972–1973.
- [36] Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(1): 268–274.
- [37] Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. CRISPRfinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(S2): W52–W57.
- [38] Norais C, Moisan A, Gaspin C, Clouet-d’Orval B. Diversity of CRISPR systems in the euryarchaeal Pyrococcales. *RNA Biology*, 2013, 10(5): 659–670.

An endogenous type III-B CRISPR-Cas based gene knockdown system in *Pyrococcus yayanosii* A1

Rouke Chen^{1,2}, Yongxin Lv^{1,2}, Huanhuan Zhang^{1,2}, Qinghao Song^{1,2}, Jun Xu^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

² School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] *Pyrococcus yayanosii* A1, with its optimum growth condition at 98 °C and 5.2×10^4 Pa, was a laboratory mutant strain used in the studies of environmental adaptation mechanisms in a group of piezophilic hyperthermophilic archaea in Thermococcaceae. In this study, we established a new genetic tool for *P. yayanosii* A1, to knock down gene expression based on an endogenous active type III-B CRISPR-Cas system. [Methods] The mini-CRISPR cluster consisted the repeat sequences from endogenous CRISPR arrays Group I and a protospacer from a putative amylase gene (PYCH_13690). We inserted an artificial mini-CRISPR cluster into the shuttle vector pLMOShhp1, with the overexpression of the HMG-CoA (hydroxy methylglutaryl coenzyme A) reductase gene controlled by a constitutive promoter P_{gdh} , which conferred simvastatin resistance. And the mini-CRISPR cluster transformed crRNA, which guided the Cmr complex cut target mRNA. [Results] The ratio of mRNA cleavage of a high hydrostatic pressure inducible promoter P_{hhp} was 33% at 5.2×10^4 Pa and 50% at 1.0×10^2 Pa, while the cleavage of constitutive promoter P_{hmtb} was 42% at 5.2×10^4 Pa and 76% at 1.0×10^2 Pa. As a proof, the gene knockdown mutant degraded less starch than its parental strain A1 *in vivo*. [Conclusion] Thus, we successfully constructed a gene knockdown system based on type III-B CRISPR-Cas system in *P. yayanosii*, which could be used in the genetic studies targeting essential genes in piezophilic hyperthermophiles.

Keywords: hyperthermophilic archaea, piezophile, *Pyrococcus yayanosii*, CRISPR-Cas, gene knock-down

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (41676121, 41976085)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34207208; E-mail: xujunn@sjtu.edu.cn

Received: 12 June 2020; Revised: 24 July 2020; Published online: 5 August 2020

附表 1. 具有完整基因组的热球菌科中的 III-B 型 CRISPR-Cas 系统

Table S1. The putative type III-B CRISPR-Cas systems of Thermococcaceae with complete genomes

Strains	Genes	Functional annotation
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638 (NC_003413.1)	WP_081481782.1	Cmr1
	WP_011012264.1	Cmr6
	WP_011012265.1	Cmr5
	WP_011012266.1	Cmr4
	WP_011012268.1	Cmr3
	WP_011012269.1	Cmr2
	WP_014835337.1	Cmr1
<i>Pyrococcus kulkarnii</i> NCB100 (NZ_CP010835.1)	WP_068320300.1	Cmr1
	WP_068320302.1	Cmr2
	WP_068320304.1	Cmr3
	WP_068320310.1	Cmr4
	WP_068320312.1	Cmr5
	WP_068320314.1	Cmr6
	WP_068322519.1	Cmr2
<i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1 (NC_015680.1)	WP_013905541.1	Cmr1
	WP_013905542.1	Cmr2
	WP_013905543.1	Cmr3
	WP_013905545.1	Cmr4
	WP_013905546.1	Cmr5
	WP_013905547.1	Cmr6
	WP_013906170.1	Cmr2
<i>Thermococcus barophilus</i> CH5 (NZ_CP013050.1)	WP_056934684.1	Cmr1
	WP_056934685.1	Cmr2
	WP_056934686.1	Cmr3
	WP_056934689.1	Cmr4
	WP_056934690.1	Cmr5
	WP_056934691.1	Cmr6
	WP_068575899.1	Cmr2
<i>Thermococcus chitonophagus</i> GC74 (NZ_CP015193.1)	WP_068576518.1	Cmr1
	WP_068576520.1	Cmr2
	WP_088859102.1	Cmr3
	WP_068576529.1	Cmr4
	WP_068576531.1	Cmr5
	WP_068576532.1	Cmr6
	WP_068577402.1	Cmr6
	WP_068577403.1	Cmr5
	WP_157092417.1	Cmr4
	WP_068577407.1	Cmr3
	WP_068577409.1	Cmr2
WP_157895698.1	Cmr1	

(待续)

(续附表 1)

<i>Thermococcus eurythermalis</i> A501 (NZ_CP008888.1)	WP_050003737.1	Cmr6
	WP_050003738.1	Cmr5
	WP_050003739.1	Cmr4
	WP_050003741.1	Cmr3
	WP_050003742.1	Cmr2
	WP_050003743.1	Cmr1
<i>Thermococcus siculi</i> RG-20 (NZ_CP015103.1)	WP_157727105.1	Cmr6
	WP_088856494.1	Cmr5
	WP_088856495.1	Cmr4
	WP_088856496.1	Cmr3
	WP_157727109.1	Cmr2
	WP_157727111.1	Cmr1
<i>Thermococcus</i> sp. 2319x1 (NZ_CP012200.1)	WP_058947205.1	Cmr1
	WP_058947206.1	Cmr2
	WP_058947207.1	Cmr3
	WP_058947209.1	Cmr4
	WP_058947210.1	Cmr5
	WP_058947211.1	Cmr6
<i>Thermococcus</i> sp. EXT12c (NZ_LT900021.1)	WP_145955410.1	Cmr6
	WP_099211677.1	Cmr5
	WP_099211679.1	Cmr4
	WP_099211683.1	Cmr3
	WP_099211685.1	Cmr2
	WP_099211687.1	Cmr1
<i>Thermococcus</i> sp. IOH1 (NZ_CP040847.1)	WP_139680684.1	Cmr2
	WP_139680987.1	Cmr1
	WP_139680988.1	Cmr2
	WP_139680989.1	Cmr3
	WP_139680991.1	Cmr4
	WP_139681776.1	Cmr5
	WP_139680992.1	Cmr6
<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 (NC_000961.1)	WP_048053047.1	Cmr2
<i>Pyrococcus</i> sp. ST04 (NC_017946.1)	WP_014733238.1	Cmr2
<i>Thermococcus cleftensis</i> CL1 (NC_018015.1)	WP_014789778.1	Cmr2
<i>Thermococcus onnurineus</i> NA1 (NC_011529.1)	WP_012571853.1	Cmr2
<i>Thermococcus piezophilus</i> CDGS (NZ_CP015520.1)	WP_068663804.1	Cmr2
<i>Thermococcus radiotolerans</i> EJ2 (NZ_CP015106.1)	WP_088866078.1	Cmr2
<i>Palaeococcus pacificus</i> DY20341 (NZ_CP006019.1)	-	-
<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5 (NC_001773.1)	-	-
<i>Pyrococcus</i> sp. NA2 (NC_015474.1)	-	-
<i>Thermococcus barophilus</i> MP (NC_015471.1)	-	-
<i>Thermococcus barossii</i> SHCK-94 (NZ_CP015101.1)	-	-
<i>Thermococcus celer</i> Vu 13 (NZ_CP014854.1)	-	-

(待续)

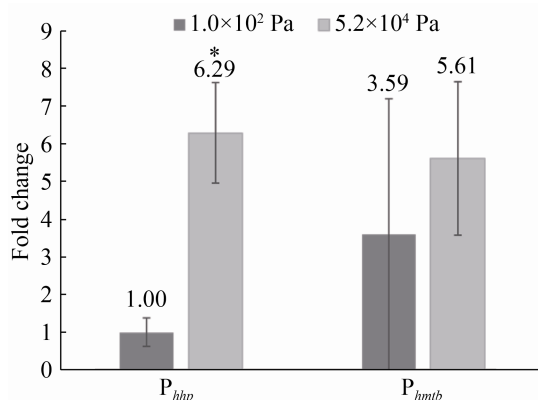
(续附表 1)

<i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3 (NC_012804.1)	-	-
<i>Thermococcus gorgonarius</i> W-12 (NZ_CP014855.1)	-	-
<i>Thermococcus guaymasensis</i> DSM 11113 (NZ_CP007140.1)	-	-
<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1 (NC_006624.1)	-	-
<i>Thermococcus litoralis</i> DSM 5473 (NC_022084.1)	-	-
<i>Thermococcus nautili</i> 30-1 (NZ_CP007264.1)	-	-
<i>Thermococcus pacificus</i> P-4 (NZ_CP015102.1)	-	-
<i>Thermococcus paralvinellae</i> ES1 (NZ_CP006965.1)	-	-
<i>Thermococcus peptonophilus</i> OG-1 (NZ_CP014751.1)	-	-
<i>Thermococcus profundus</i> DT 5432 (NZ_CP014863.1)	-	-
<i>Thermococcus sibiricus</i> MM 739 (NC_012883.1)	-	-
<i>Thermococcus</i> sp. 4557 (NC_015865.1)	-	-
<i>Thermococcus</i> sp. 5-4 (NZ_CP021848.1)	-	-
<i>Thermococcus</i> sp. AM4 (NC_016051.1)	-	-
<i>Thermococcus</i> sp. P6 (NZ_CP015104.1)	-	-
<i>Thermococcus</i> sp. SY113 (NZ_CP041932.1)	-	-
<i>Thermococcus thioreducens</i> OGL-20P (NZ_CP015105.1)	-	-

-: the Cmr proteins which is not found.

附表 2. *P. furiosus* DSM 3638 和 *P. yayanosii* CH1 中 Cmr 蛋白的氨基酸序列相似性Table S2. The amino acid sequence similarity of Cmr proteins from *P. furiosus* DSM 3638 and *P. yayanosii* CH1

Genes	<i>P. furiosus</i> DSM 3638		<i>P. yayanosii</i> CH1		Query cover/%	E value	Identity/%
	Locus	Length	Locus	Length			
Cmr1	WP_014835337.1	337	WP_013905541.1	359	94	3e-60	38.79
Cmr2	WP_011012269.1	871	WP_013905542.1	960	78	2e-98	31.14
Cmr3	WP_011012268.1	322	WP_013905543.1	356	98	4e-46	32.41
Cmr4	WP_011012266.1	295	WP_013905545.1	301	97	2e-101	52.65
Cmr5	WP_011012265.1	169	WP_013905546.1	156	92	7e-32	39.38
Cmr6	WP_011012264.1	340	WP_013905547.1	344	72	2e-72	46.89

附图 1. 启动子 P_{hhp} 和 P_{hmtb} 在 1.0×10² Pa 和 5.2×10⁴ Pa 下驱动 mini-CRISPR 簇转录差异Figure S1. The fold changes of transcription of mini- CRISPR cluster driven by promoter P_{hhp} and P_{hmtb} under 1.0×10² Pa and 5.2×10⁴ Pa.