



(21) 申请号 202011092324.4

(22) 申请日 2017.07.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112501254 A

(43) 申请公布日 2021.03.16

(62) 分案原申请数据
201710573752.0 2017.07.14

(73) 专利权人 上海吐露港生物科技有限公司
地址 200032 上海市徐汇区枫林路420号2楼A区246室

(72) 发明人 请求不公布姓名 请求不公布姓名
请求不公布姓名 请求不公布姓名

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
专利代理师 张璐 徐迅

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6816 (2018.01)

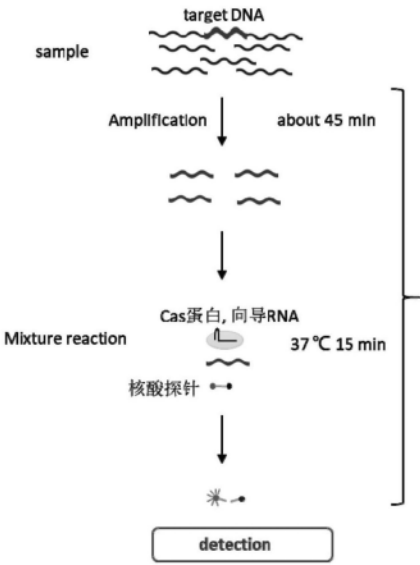
(56) 对比文件
Jonathan S. Gootenberg 等. “Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2”. Science. 2017, 第356卷卷 (第6336期期), 第438-442页.

审查员 温鹏

权利要求书1页 说明书17页
序列表18页 附图11页

(54) 发明名称
一种Cas蛋白的用途及靶标核酸分子的检测方法和试剂盒

(57) 摘要
本发明提供了一种Cas蛋白的用途及靶标核酸分子的检测方法和试剂盒,靶标核酸分子的检测方法包括向含有待检靶标核酸分子的反应体系中加入向导RNA、Cas12a、核酸探针,反应完成后对其进行检测。使用本发明的方法可快速检测样品中是否含有靶标核酸序列。通过与核酸扩增技术的结合,该检测方法的灵敏度可以得到大幅度提高。根据该方法的特点,将其命名为HOLMES (one HOur Low-cost Multiplex Efficient Simple assay),即一小时、低成本、多通道、高效、简单的分析方法,该方法可用于快速检测病原微生物、基因突变和特异靶标DNA等。



1. 一种用于检测靶标核酸分子的检测体系,其特征在于,该体系包含:
 - (a) Cas蛋白,所述Cas蛋白是Cas12a或者具有与Cas12a的旁路单链DNA切割活性类似的Cas蛋白;
 - (b) 向导RNA,所述向导RNA引导Cas蛋白特异性结合于靶标核酸分子;和
 - (c) 核酸探针,所述核酸探针为单链DNA;其中,所述的靶标核酸分子为靶标DNA。
2. 如权利要求1所述的检测体系,其特征在于,所述的具有与Cas12a的旁路单链DNA切割活性类似的Cas蛋白是Cas12b。
3. 如权利要求1所述的检测体系,其特征在于,所述的Cas12a为FnCas 12a、AsCas12a、LbCas12a、Lb5Cas12a、HkCas12a、OsCas12a、TsCas12a、BbCas 12a、BoCas12a或Lb4Cas12a中一种。
4. 如权利要求1所述的检测体系,其特征在于,所述的Cas12a为LbCas12a或FnCas12a。
5. 如权利要求1所述的检测体系,其特征在于,所述的核酸探针包括带有可检测标记的单链DNA。
6. 如权利要求1所述的检测体系,其特征在于,所述靶标核酸分子是病原微生物、基因突变或特异靶标DNA。
7. 如权利要求1所述的检测体系,其特征在于,所述的单链DNA为荧光标记的单链DNA。
8. 一种Cas蛋白在靶标核酸分子的非诊断目的的检测方法中的用途,所述Cas蛋白是Cas12a或者具有与Cas12a的旁路单链DNA切割活性类似的Cas蛋白。

一种Cas蛋白的用途及靶标核酸分子的检测方法和试剂盒

[0001] 本案是申请日为2017年7月14日、申请号为CN201710573752.0、发明名称为“一种Cas蛋白的用途及靶标核酸分子的检测方法和试剂盒”的中国发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明属于生物技术领域,具体地说,本发明涉及一种用于靶标核酸分子检测的方法。

背景技术

[0003] 特异性检测核酸分子(Nucleic acid detection)方法具有重要的应用价值,例如病原体的检测,遗传病检测等。在病原体检测方面,由于每种病原体微生物都有其独一无二的特征核酸分子序列,因此可以开发出针对特定物种的核酸分子检测,也称为核酸诊断(NADs,nucleic acid diagnostics),在食品安全、环境微生物污染检测,人体病原菌感染等领域具有重要意义(O'Connor and Glynn 2010,Scheler,Glynn et al.2014)。另一个方面是对人或物种的单核苷酸多态性(SNPs,single nucleotide polymorphisms)的检测。在基因组水平上去理解遗传变异和生物学功能之间的关系为现代分子生物学提供了新视角,而其中SNPs对生物学的功能、进化和疾病等密切相关,因此SNPs的检测与分析技术的发展尤为重要。

[0004] 目前已建立了不少NADs的方法,主要是针对特异性DNA分子的检测,也有部分方法针对RNA分子。通常来说,DNA分子非常稳定,因此检测样品可来源于一系列复杂的生物样本;而RNA则非常容易降解,因此处理时需要非常小心。在上世纪70年代,建立了限制性内切酶酶切检测的方法,后来又发展了Southern、Northern和斑点杂交等方法进行特异性检测核酸分子检测。1985年,当PCR方法成为常规实验方法后,导致了分子生物学指数级的进步。目前建立的特异性核酸分子检测通常需要分为两步,第一步是目的核酸的扩增,第二步是目的核酸检测。PCR技术是最先建立也是目前最常用的扩增方法,目前在PCR方法基础上,引入了荧光标记的探针,可以实时检测靶标的扩增情况,称为Realtime PCR.Realtime PCR不仅是快速、高灵敏的检测方法,同时这种方法也可以进行定量分析。除了PCR的扩增方法,还建立了许多替代方法,比如ligase chain reaction,branched DNA amplification,NASBA,SDA,transcription-mediated amplification,loop mediated amplification,rolling circle amplification and TwistAmpTM等。许多这些替代方法的优势在于等温性,也就是说只需要一个温度即可以完成反应,而不需要像PCR那样的热循环仪器。核酸检测的方法除了Realtime PCR可以直接完成扩增和检测之外,FISH杂交技术(Fluorescence in situ hybridization)是最常用的检测方法,通过标记分子探针,原位与互补的靶标序列杂交。除此之外,目前还开发了biosensors,nanopores和next-generation sequencing technologies等检测方法,但这些方法通常需要昂贵的实验设备。

[0005] 对SNPs的检测首先同样需要进行PCR等方法的扩增,从而获得足量的含SNP位点区域片段进行进一步的检测。比较常用的方法有:引物延伸(primer extension),杂交

(hybridization), 连接(ligation)和酶切(enzymatic cleavage)。当完成上述方法之后, 需要进行特定的方法检测, 比如质谱检测、荧光检测、化学发光检测等。

[0006] 核酸检测虽然如上文所述已开发出了不少检测方法, 但是在某些情况下, 如何更加快速、简便、廉价的检测是重要的发展方向, 比如在野外的病原菌快速检测、药物敏感SNP快速检测等。在2016年, Collins等基于CRISPR-Cas9特异性识别并切割靶标序列的特点, 开发了快速廉价检测寨卡病毒(Zika)的方法。2017年, 张锋等利用CRISPR-Cas13a具有“旁路活性”(collateral effect)的特点建立了快速核酸探测的方法, 即Cas13a结合特异性靶标RNA后随即切割其他RNA(这里设计成RNA荧光报告系统), 与等温扩增技术recombinase polymerase amplification(RPA)相结合, 把这种检测方法称为SHERLOCK (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing)。上述方法涉及到RNA的检测, 如果只需针对DNA的检测, 鉴于RNA的不稳定性, 可能会增加了操作难度。

[0007] 2015年, 张锋等人发现了新的CRISPR相关蛋白内切酶Cas12a(之前称为Cpf1), 它与常用的Cas9蛋白一样是RNA引导的特异性DNA核酸内切酶, 但与相比Cas9, Cas12a又有它自身特点, 比如仅需要crRNA即可引导特异性切割双链DNA, 并产生粘性末端等。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种靶标核酸分子的检测方法。

[0009] 本发明的另一目的是提供一种Cas蛋白在靶标核酸分子的检测方法中的用途。

[0010] 本发明还公开了一种试剂盒, 包括向导RNA、Cas蛋白、核酸探针、缓冲液。

[0011] 一种靶标核酸分子的检测方法, 将含有待检靶标核酸分子的反应体系中, 向导RNA、Cas蛋白、核酸探针、缓冲液, 然后对其进行荧光检测。

[0012] 所述Cas蛋白为Cas12a。

[0013] 所述的Cas12a优选为FnCas12a、AsCas12a、LbCas12a、Lb5Cas12a、HkCas12a、OsCas12a、TsCas12a、BbCas12a、BoCas12a或Lb4Cas12a中一种。

[0014] 所述的Cas12a优选为LbCas12a。

[0015] 向导RNA是指引导Cas蛋白特异性结合靶标DNA的RNA。

[0016] 待检靶标核酸分子的反应体系中的待检靶标核酸分子经过扩增后得到。

[0017] 该检测方法可检测病原微生物、基因突变或特异靶标DNA。

[0018] 一种Cas蛋白在靶标核酸分子的检测方法中的用途。

[0019] 靶标DNA、向导RNA和Cas蛋白形成三元复合体时, 该复合物会切割体系中其它的单链DNA分子。

[0020] 向导RNA是指引导Cas蛋白特异性结合靶标DNA的RNA。

[0021] 一种试剂盒, 包括向导RNA、Cas蛋白、核酸探针。

[0022] 还包括缓冲液。

[0023] 本发明的主要优点在于:

[0024] (1) 快速: 在测试条件准备好的情况下, 从拿到样品, 到拿到检测结果只需约1小时。

[0025] (2) 低成本: 实验中没有特殊的材料或酶, 而且涉及到的材料、试剂等较少, 可以进行微量化的测试分析。

- [0026] (3) 高效:本发明具有极高的灵敏度,可以检测到10aM浓度的DNA。
- [0027] (4) 多通道:可制成多通道检测形式,比如在96孔板或384孔板反应并检测。
- [0028] (5) 简单:没有特殊复杂的步骤,如果制成试剂盒以及设定好程序,只需简单的加入样品等操作。

附图说明

- [0029] 图1显示了Cas12a切割单链DNA的cis特性。
- [0030] 图2显示了Cas12a对单链DNA切割不依赖切割双链时的PAM序列。
- [0031] 图3显示了Cas12a切割单链DNA的trans特性。
- [0032] 图4显示了测试的10种不同来源的Cas12a,这些Cas12a都具有cis与trans活力。
- [0033] 图5通过单位点突变实验,测试了cis和trans活力可能相关的位点。
- [0034] 图6显示了C2c1与Cas12a单体及复合体的结构。
- [0035] 图7显示了不同Cas12a利用特异性底物(dsDNA),以HEX-N12-BHQ1作为荧光检测探针,得到的荧光数值。对照不加特异性底物。
- [0036] 图8显示了HOLMES检测DNA的流程示意图。
- [0037] 图9显示了直接利用FnCas12a或LbCas12a,或结合HOLMES方法进行灵敏度测试。
- [0038] 图10显示了不同长度的crRNA结合FnCas12a或LbCas12a对不同位点单位点突变的响应值。
- [0039] 图11利用FAM标记的荧光探针,选用10种Cas12a蛋白测试加入ssDNA之后,探针是否被切开。
- [0040] 图12利用HEX、BHQ1标记的荧光探针显示了以gyrB基因片段为靶标序列,以不同浓度的纯培养大肠杆菌MG1655为正对照模板的HOLMES检测值,以及不同地点环境中水的检测值。
- [0041] 图13显示了随着大肠杆菌MG1655浓度的减少,其荧光响应值逐渐减少。
- [0042] 图14显示了HOMLES方法检测SNP的流程示意图,以及5个SNP位点检测值。
- [0043] 图15显示了HOMLES方法检测TP53基因(癌症相关基因)中关键位点的检测值。
- [0044] 图16显示了HOMLES方法检测5个SNP位点(痛风相关)的检测值。
- [0045] 图17显示了HOMLES方法检测1个SNP位点(痛风相关)的检测值,其中样本为21名志愿者样本。

具体实施方式

[0046] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0047] 本发明人通过广泛而深入的研究,通过对Cas12a酶切割特性的研究,开发了一种靶标核酸检测的技术方案。实验结果表明,采用上述技术方案成功地快速鉴定了水体中是否含有一定浓度的大肠杆菌等微生物,以及SNP基因型的快速鉴定。

[0048] 术语

- [0049] 术语“向导RNA”是指引导Cas蛋白特异性结合靶标DNA序列的RNA。
- [0050] 术语“crRNA”是指CRISPR RNA,是短的引导Cas12a到结合到靶标DNA序列的RNA。
- [0051] 术语“CRISPR”是指成簇的、规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats),该序列是许多原核生物的免疫系统。
- [0052] 术语“Cas蛋白”是指CRISPR-associated蛋白,它是CRISPR系统中的相关蛋白。
- [0053] 术语“Cas12a”(旧称“Cpf1”)是指crRNA依赖的内切酶,它是CRISPR系统分类中V型(type V)的酶。
- [0054] 术语“PAM”是指前间区序列邻近基序(protospacer-adjacent motif),是Cas12a切割所必须,FnCas12a的PAM为TTN序列,LbCas12a的PAM为TTTN序列。
- [0055] 本发明公开了一种靶标核酸分子的检测方法,将含有待检靶标核酸分子的反应体系中,向导RNA、Cas蛋白、核酸探针、缓冲液,然后对其进行荧光检测。
- [0056] 所述Cas蛋白为Cas12a;
- [0057] 所述的Cas12a优选为FnCas12a、AsCas12a、LbCas12a、Lb5Cas12a、HkCas12a、OsCas12a、TsCas12a、BbCas12a、BoCas12a或Lb4Cas12a中一种;所述的Cas12a优选为LbCas12a。
- [0058] 向导RNA是指引导Cas蛋白特异性靶向DNA序列的RNA。
- [0059] 待检靶标核酸分子的反应体系中的待检靶标核酸分子经过扩增后得到。
- [0060] 该检测方法可检测病原微生物、基因突变或特异靶标DNA。
- [0061] 一种Cas蛋白在靶标核酸分子的检测方法中的用途。
- [0062] 靶标DNA、向导RNA和Cas蛋白形成三元复合体时,该复合物会切割体系中其他的单链DNA分子。
- [0063] 向导RNA是指引导Cas蛋白特异性靶向DNA序列的RNA。
- [0064] 一种试剂盒,包括向导RNA、Cas蛋白、核酸探针。
- [0065] 还包括缓冲液。
- [0066] 本发明提供了一种高特异性地快速检测靶标核酸分子的检测方法。一旦靶标DNA(单链或者双链)、crRNA和Cas12a蛋白形成三元复合体时,该复合物会切割体系中其他的单链DNA分子。通过设计crRNA靶向靶标DNA(需要检测的一段DNA序列);向检测体系中加入crRNA和Cas12a蛋白;当靶标DNA存在时,Cas12a与crRNA以及靶标DNA形成三元复合体,同时该复合物行使其trans切割的活性并切割带荧光信号标记的单链DNA(两头分别连有发光基团和淬灭基团,被切断后发光基团可以发光),从而发出荧光。因此,通过检测荧光即可得知待检测体系中是否含有靶标DNA分子。使用本发明的方法可快速检测样品中是否含有特异DNA序列。通过与PCR技术的结合,该检测方法的灵敏度可以得到大幅度提高。本发明中的核算探针优选为荧光探针。
- [0067] HOLMES条件测试:
- [0068] Cas12a的选择:根据研究,Cas12a具有trans切割的活力,即一旦靶标DNA、crRNA和Cas12a蛋白形成三元复合体时,会切割体系中其他的单链DNA(旁路DNA)。根据这一原理设计了特异性DNA检测方法。首先,将旁路DNA设计成荧光探针,其组成是12nt的随机序列,并在5'端标记荧光基团HEX在3'端标记淬灭基团BHQ1(HEX-N12-BHQ1)。当体系中含有靶标DNA片段时,将形成靶标DNA、crRNA和Cas12a蛋白的三元复合体,此时该探针即被切割,同时通

过荧光检测仪的检测HEX荧光基团会发出荧光(激发光535nm,发射光556nm)。接着,测试了10种不同的Cas12a,靶标序列为双链DNA如图7所示。可以看出,靶标dsDNA与各个Cas12a蛋白组成的复合体都能够实现trans切割活力。

[0069] HOLMES响应灵敏度:接着,测试了FnCas12a与LbCas12a对靶标DNA的响应灵敏度,也就是说考察能响应的最低靶标DNA的浓度。如图9所示,当直接加入测试靶标时,0.1nM浓度以上的靶标DNA都能够响应,而且浓度1nM以上时响应显著。如果结合PCR技术(HOLMES方法),如图8所示,即先通过PCR扩增目的片段再进行Cas12a切割反应,此时,响应灵敏度可以低至10aM,如图9所示。

[0070] SNP测试:接着,测试HOLMES方法是否可以检测SNP基因型。将T1作为靶标序列,将该位点的PAM突变或1-18位靶标序列分别进行单位点突变,比较不同长度的crRNA对非突变序列和突变序列之间测差异。如图10所示,当靶标互补序列为24nt的crRNA(crRNA-24nt)时,8-18位的单位点突变与野生型差异不大,而PAM突变和1-7位点突变后,荧光值有明显的下降。当截短crRNA长度,配对靶标序列长度为18nt时,突变位置8-16nt的荧光值相比24nt有明显下降,当16nt或17nt时,突变后的靶标序列荧光值下降更加明显,而15nt时,靶标序列和突变的荧光值则都已很弱。综合来看,16nt和17nt的crRNA对SNP的检测最为合适。

[0071] 本发明对Cas12a切割单链DNA,Cas12a对单链DNA的切割是不依赖于PAM序列的程序化切割方式,称之为cis切割;而一旦三元复合体Cas12a/crRNA/target DNA形成,就会显示出trans切割的活性,即会表现出切割体系中非靶标的任意单链DNA。

[0072] 利用Cas12a的特性,开发了特异性检测核酸分子的方法,称之为HOLMES(one Hour Low-cost Multiplex Efficient Simple assay)。正如该技术的名称一样,其特点是快速(1小时)、低价、多通路、高效、简便测试法。该方法可用于快速病原菌检测,SNP检测等领域。

[0073] 材料

[0074] 1.RNA酶抑制剂,高保真DNA聚合酶KOD FX购自TaKaRa公司;引物(寡核苷酸)由上海生工合成;T7 RNA聚合酶购自Thermo公司;RNA纯化与浓缩试剂盒(RNA Clean&ConcentratorTM-5)购自Zymo Research;Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System购自Promega公司;培养基(如,Tryptone,Yeast Extract等)均购自OXOID公司。

[0075] 2.培养基配方:液体LB(1%Tryptone,0.5%Yeast extract,1%NaCl),配置固体LB时,只需要在液体LB中添加1%的琼脂即可。

[0076] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。本发明中所涉及的实验材料如无特殊说明均可从市售渠道获得。

[0077] 实施例1 Cas12a蛋白检测单链DNA(ssDNA)的靶标(探针FAM标记)

[0078] 选用单链DNA(target-T1-R)作为靶标序列,测试不同Cas12a蛋白对其检测的响应值。

[0079] 1、crRNA制备:首先,通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸T7-T1-24-R,如表5所示,进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4 μ M)在1 \times PCR缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为50 μ L,然后进行退火程序:在95 $^{\circ}$ C初始变性5分钟,然后从95 $^{\circ}$ C冷却至20 $^{\circ}$ C,使用热循环仪每分钟降低1 $^{\circ}$ C。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA,并且反应在37 $^{\circ}$ C下进行过夜(约16h)。然后使用RNA纯化与浓缩试剂盒纯化RNA,并用NanoDrop2000C

(Thermo Fisher Scientific) 定量, 稀释为 $10\mu\text{M}$ 浓度并保存到 -80°C 冰箱中。

[0080] 2、Cas12a反应: $20\mu\text{L}$ 反应体系中, 加入步骤1中纯化的crRNA ($0.5\mu\text{M}$), Cas12a ($0.25\mu\text{M}$), 靶标单链DNA (target-T1-R) ($0.01\mu\text{M}$), 核酸探针 (N25-5' FAM) ($0.01\mu\text{M}$), 缓冲液为NEB buffer 3.1, $0.5\mu\text{L}$ RNA酶抑制剂。对照反应其他成分都加, 仅不加ssDNA靶标序列。在 37°C 反应15min, 然后 98°C 2min终止反应。

[0081] 3、荧光检测: 通过尿素-丙烯酰胺凝胶电泳 (Urea-PAGE) 电泳, 然后用荧光发光成像仪检测。如图11所示, 不同Cas12a对靶标检测效果不同。如HkCas12a等, 不加靶标ssDNA也会造成探针的切割。而LbCas12a等, 只在加入靶标ssDNA时, 发生探针的切割, 是较好的候选Cas12a蛋白。

[0082] 实施例2 Cas12a蛋白检测单链DNA (ssDNA) 的靶标 (探针有HEX、BHQ1双标记)

[0083] 选用单链DNA (target-T1-R) 作为靶标序列, 测试不同Cas12a蛋白对其检测的响应值。

[0084] 1、crRNA制备: 首先, 通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸T7-T1-24-R (表5) 进行退火来制备转录模板。具体是, 将配对的寡核苷酸 ($4\mu\text{M}$) 在 $1\times\text{PCR}$ 缓冲液 (Transgen Biotech) 中退火, 总体积为 $50\mu\text{L}$, 然后进行退火程序: 在 95°C 初始变性5分钟, 然后从 95°C 冷却至 20°C , 使用热循环仪每分钟降低 1°C 。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA, 并且反应在 37°C 下进行过夜 (约16h)。然后使用RNA纯化与浓缩试剂盒纯化RNA, 并用NanoDrop 2000C定量, 稀释为 $10\mu\text{M}$ 浓度并保存到 -80°C 冰箱中。

[0085] 2、Cas12a反应: $20\mu\text{L}$ 反应体系中, 加入步骤1中纯化的crRNA ($0.5\mu\text{M}$), Cas12a ($0.25\mu\text{M}$), 靶标单链DNA (target-T1-R) ($0.01\mu\text{M}$), 荧光探针 (HEX-N12-BHQ1, 即12nt的单链DNA, 其5'端为HEX标记, 3'端为BHQ1标记) ($0.5\mu\text{M}$), 缓冲液为NEB buffer 3.1, $0.5\mu\text{L}$ RNA酶抑制剂。对照反应其他成分都加, 仅不加ssDNA靶标序列。在 37°C 反应15min, 然后 98°C 2min终止反应。

[0086] 3、荧光检测: 将灭活的 $20\mu\text{L}$ 反应液加入96孔板中, 然后用酶标仪检测 (激发光535nm, 发射光556nm)。如图12所示, 不同Cas12a对靶标检测效果不同。如HkCas12a等, 不加靶标ssDNA也会造成探针的切割。而FnCas12a等, 只在加入靶标ssDNA时, 发生探针的切割, 是较好的候选Cas12a蛋白。

[0087] 实施例3 Cas12a蛋白检测双链DNA (dsDNA) 的靶标

[0088] 选用双链DNA (target-T1) 作为靶标序列, 测试不同Cas12a蛋白对其检测的响应值。

[0089] 1、crRNA制备: 首先, 通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸T7-T1-24-R (表5) 进行退火来制备转录模板。具体是, 将配对的寡核苷酸 ($4\mu\text{M}$) 在 $1\times\text{PCR}$ 缓冲液 (Transgen Biotech) 中退火, 总体积为 $50\mu\text{L}$, 然后进行退火程序: 在 95°C 初始变性5分钟, 然后从 95°C 冷却至 20°C , 使用热循环仪每分钟降低 1°C 。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA, 并且反应在 37°C 下进行过夜 (约16h)。然后使用RNA纯化与浓缩试剂盒纯化RNA, 并用NanoDrop 2000C定量, 稀释为 $10\mu\text{M}$ 浓度并保存到 -80°C 冰箱中。

[0090] 2、Cas12a反应: $20\mu\text{L}$ 反应体系中, 加入步骤1中纯化的crRNA ($0.5\mu\text{M}$), Cas12a ($0.25\mu\text{M}$), 靶标双链DNA (target-T1, 由引物target-T1-F与引物target-T1-R退火后获得) ($0.01\mu\text{M}$), 荧光探针 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5\mu\text{M}$), 缓冲液为NEB buffer 3.1, $0.5\mu\text{L}$ RNA酶抑制剂。在

37℃反应15min,然后98℃2min终止反应。

[0091] 3、荧光检测:将灭活的20μL反应液加入96孔板中,然后用酶标仪检测(激发光535nm,发射光556nm)。如图7所示,不同Cas12a对靶标检测效果不同。而LbCas12a,只在加入靶标ssDNA时,发生探针的切割,是较好的候选Cas12a蛋白。

[0092] 实施例4 FnCas12a与LbCas12a测试不同浓度靶标

[0093] 选用target-T1作为靶标DNA,然后梯度稀释成不同浓度,测试FnCas12a与LbCas12a对其响应灵敏度。为了增加灵敏度,加入了PCR扩增步骤。

[0094] 1、crRNA制备:首先,通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸T7-T1-24-R(表5)进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4μM)在1×PCR缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为50μL,然后进行退火程序:在95℃初始变性5分钟,然后从95℃冷却至20℃,使用热循环仪每分钟降低1℃。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA,并且反应在37℃下进行过夜(约16h)。然后使用RNA纯化与浓缩试剂盒纯化RNA,并用NanoDrop 2000C定量,稀释为10μM浓度并保存到-80℃冰箱中。

[0095] 2、PCR扩增(可选):以含target-T1靶标的质粒(pUC18-T1)作为模板,梯度稀释,进行PCR反应。每个反应体系总体积为20μL,用0.25μM的M13F-47、M13R-48为引物(表4),PCR反应用高保真酶KOD FX(TaKaRa)。PCR反应程序为,95℃2min,然后开始35个循环98℃10s,60℃15s,68℃10s。PCR完成后,直接用于Cas12a反应。

[0096] 3、Cas12a反应:20μL反应体系中,加入步骤1中纯化的crRNA(0.5μM),FnCas12a或LbCas12a(0.25μM),PCR产物1μL(或直接稀释成不同浓度的靶标DNA),荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5μM),缓冲液为NEB buffer 3.1,0.5μL RNA酶抑制剂。在37℃反应15min,然后98℃2min终止反应。

[0097] 4、荧光检测:将灭活的20μL反应液加入96孔板中,然后用酶标仪检测(激发光535nm,发射光556nm)。如图9所示,当直接加入测试靶标时,0.1nM浓度以上的靶标DNA都能够响应,而且浓度1nM以上时响应显著。如果结合PCR技术,即先通过PCR扩增目的片段再进行Cas12a切割反应,此时,响应灵敏度可以低至10aM。

[0098] 实施例5 FnCas12a与LbCas12a测试单位点突变靶标

[0099] 选用target-T1作为靶标,将其在PAM区与1-18位分别进行单位点突变,测试几种不同长度的crRNA,对野生型与单位点突变后的响应值。

[0100] 1、crRNA制备:首先,通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸T7-T1-24-R、T7-T1-15-R、T7-T1-16-R、T7-T1-17-R、T7-T1-18-R(表5)分别进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4μM)在1×PCR缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为50μL,然后进行退火程序:在95℃初始变性5分钟,然后从95℃冷却至20℃,使用热循环仪每分钟降低1℃。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA,并且反应在37℃下进行过夜(约16h)。然后使用RNA纯化与浓缩试剂盒纯化RNA,并用NanoDrop 2000C定量,稀释为10μM浓度并保存到-80℃冰箱中。

[0101] PCR扩增:以含target-T1靶标的质粒(pUC18-T1)作为模板。每个反应体系总体积为20μL,用0.25μM的引物M13R-48与Target-T1-F的各个突变引物(表4),PCR反应用高保真酶KOD FX(TaKaRa)。PCR反应程序为,95℃2min,然后开始35个循环98℃10s,60℃15s,68℃10s。PCR完成后,直接用于Cas12a反应。

[0102] 3、Cas12a反应:20 μ L反应体系中,加入步骤1中纯化的crRNA(0.5 μ M),FnCas12a或LbCas12a(0.25 μ M),PCR产物1 μ L,荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5 μ M),缓冲液为NEB buffer 3.1,0.5 μ L RNA酶抑制剂。在37 $^{\circ}$ C反应15min,然后98 $^{\circ}$ C2min终止反应。

[0103] 4、荧光检测:将灭活的20 μ L反应液加入96孔板中,然后用酶标仪检测(激发光535nm,发射光556nm)。如图10所示,当靶标互补序列为24nt的crRNA(crRNA-24nt)时,8-18位的单位点突变与野生型差异不大,而PAM突变和1-7位点突变后,荧光值有明显的下降。当截短crRNA长度,配对靶标序列长度为18nt时,突变位置8-16nt的荧光值相比24nt有明显下降,当16nt或17nt时,突变后的靶标序列荧光值下降更加明显,而15nt时,靶标序列和突变的荧光值则都已很弱。

[0104] 实施例6环境水体中大肠杆菌等微生物测试

[0105] 选用大肠杆菌gyrB基因作为检测目标,间接测试水体中大肠杆菌等微生物的浓度。以大肠杆菌MG1655作为正对照,测定环境中的水(如污水与自来水)中微生物的含量。

[0106] 1、crRNA制备:首先,通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸T7-crRNA-gyrB(表5)进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4 μ M)在1 \times PCR缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为50 μ L,然后进行退火程序:在95 $^{\circ}$ C初始变性5分钟,然后从95 $^{\circ}$ C冷却至20 $^{\circ}$ C,使用热循环仪每分钟降低1 $^{\circ}$ C。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA,并且反应在37 $^{\circ}$ C下进行过夜(约16h)。然后使用RNA纯化与浓缩试剂盒纯化RNA,并用NanoDrop 2000C定量,稀释为10 μ M浓度并保存到-80 $^{\circ}$ C冰箱中。

[0107] 2、PCR扩增:正对样品品为大肠杆菌MG1655培养至OD₆₀₀约为0.5时,分别以10倍为梯度稀释后作为模板,样品为环境水(包括自来水和环境中的泥水)。每个反应体系总体积为20 μ L,用0.25 μ M的引物gyrB-F与gyrB-R(表4),PCR反应用高保真酶KOD FX(TaKaRa)。PCR反应程序为,95 $^{\circ}$ C2min,然后开始35个循环98 $^{\circ}$ C10s,60 $^{\circ}$ C15s,68 $^{\circ}$ C10s。PCR完成后,直接用于Cas12a反应。

[0108] 3、Cas12a反应:20 μ L反应体系中,加入步骤1中纯化的crRNA(0.5 μ M),LbCas12a(0.25 μ M),PCR产物1 μ L,荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5 μ M),缓冲液为NEB buffer 3.1,0.5 μ L RNA酶抑制剂。在37 $^{\circ}$ C反应15min,然后98 $^{\circ}$ C2min终止反应。

[0109] 4、荧光检测:将灭活的20 μ L反应液加入96孔板中,然后用酶标仪检测(激发光535nm,发射光556nm)。如图13所示,随着大肠杆菌MG1655浓度的减少,其荧光响应值逐渐减少。其中,样品2,4,5,6较明显的检测出了微生物。

[0110] 实施例7人SNP测试

[0111] SNP测试选用了人SNP的5个位点,分别为rs5028,rs1467558,rs2952768,rs4363657,rs601338,测试HOLMES方法的可行性。

[0112] 1、crRNA制备:首先,通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸(表5)进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4 μ M)在1 \times PCR缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为50 μ L,然后进行退火程序:在95 $^{\circ}$ C初始变性5分钟,然后从95 $^{\circ}$ C冷却至20 $^{\circ}$ C,使用热循环仪每分钟降低1 $^{\circ}$ C。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA,并且反应在37 $^{\circ}$ C下进行过夜(约16h)。使用RNA Clean&ConcentratorTM-5(Zymo Research)纯化RNA,并用NanoDrop2000C定量,稀释为10 μ M浓度并保存到-80 $^{\circ}$ C冰箱中。

[0113] 2、PCR扩增:反应体系总体积为20 μ L,用0.25 μ M的引物(表4),1ng的人基因组

(293T) 或直接刮取口腔上皮粘膜作为模板,PCR反应应用高保真酶KOD FX(TaKaRa)。PCR反应程序为,95℃2min,然后开始35个循环98℃10s,60℃15s,68℃10s。PCR完成后,直接用于Cas12a反应。(其中引物1-rs5028-F-T,2-rs1467558-F-T,3-rs2952768-R-C直接引入SNP的相应突变产物)

[0114] 3、Cas12a反应:20μL反应体系中,加入相应的crRNA(1μM),LbCas12a(0.5μM),PCR产物1μL,荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5μM)。37℃反应15min,然后98℃2min终止反应。

[0115] 4、荧光检测:将灭活的20μL反应液加入96孔板中,然后用酶标仪检测(激发光535nm,发射光556nm)。如图14,仅当crRNA对应相应的靶标序列时,才有较高的荧光响应值,如果有一个位点的突变,其响应值就会大大降低。通过荧光值得大小即可判断对应SNP的基因型,这些结果也得到了测序结果的确认。

[0116] 实施例8癌症相关基因测试

[0117] 选用了TP53基因作为测试基因,其中在人T24细胞中,TP53基因有一个无义突变,导致该基因失活。分别测试了该位点基因正常的细胞(293T),个人的基因测试,以及突变细胞T24。

[0118] 1、crRNA制备:首先,通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸T7-crRNA-34-TP53-T24-C-16nt与T7-crRNA-34-TP53-T24-G-16nt(表5)进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4μM)在1×PCR缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为50μL,然后进行退火程序:在95℃初始变性5分钟,然后从95℃冷却至20℃,使用热循环仪每分钟降低1℃。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA,并且反应在37℃下进行过夜(约16h)。使用RNA Clean&Concentrator™-5(Zymo Research)纯化RNA,并用NanoDrop 2000C定量,稀释为10μM浓度并保存到-80℃冰箱中。

[0119] 2、PCR扩增:反应体系总体积为20μL,用0.25μM的引物34-TP53-T24-F,34-TP53-T24-R(表4),1ng的人基因组(293T,T24)或直接刮取口腔上皮粘膜作为模板,PCR反应应用高保真酶KOD FX(TaKaRa)。PCR反应程序为,95℃2min,然后开始35个循环98℃10s,60℃15s,68℃10s。PCR完成后,直接用于Cas12a反应。

[0120] 3、Cas12a反应:20μL反应体系中,加入相应的crRNA(1μM),LbCas12a(0.5μM),PCR产物1μL,荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5μM)。37℃反应15min,然后98℃2min终止反应。

[0121] 4、荧光检测:将灭活的20μL反应液加入96孔板中,然后用酶标仪检测(激发光535nm,发射光556nm)。如图15,当该位点正常的TP53基因为模板检测到的crRNA-C的数值明显高于crRNA-G,而突变的细胞T24的crRNA-G则明显升高。

[0122] 实施例9人SNP测试(痛风相关基因)

[0123] SNP测试选用了人SNP的5个位点,这些与痛风的风险相关,分别为rs1014290,rs6449213,rs737267,rs1260326,rs642803,测试HOLMES方法。

[0124] 1、crRNA制备:首先,通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸(表5)进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4μM)在1×PCR缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为50μL,然后进行退火程序:在95℃初始变性5分钟,然后从95℃冷却至20℃,使用热循环仪每分钟降低1℃。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA,并且反应在37℃下进行过夜(约16h)。使用RNA Clean&Concentrator™-5(Zymo Research)纯化RNA,并用NanoDrop2000C定量,稀释为10μM浓度并保存到-80℃冰箱中。

[0125] 2、PCR扩增:反应体系总体积为20 μ L,用0.25 μ M的引物(表4),1ng的人基因组(293T)或直接刮取口腔上皮粘膜作为模板,PCR反应用高保真酶KOD FX (TaKaRa)。PCR反应程序为,95 $^{\circ}$ C2min,然后开始35个循环98 $^{\circ}$ C10s,60 $^{\circ}$ C15s,68 $^{\circ}$ C10s。PCR完成后,直接用于Cas12a反应。(其中引物1-rs5028-F-T,2-rs1467558-F-T,3-rs2952768-R-C直接引入SNP的相应突变产物)

[0126] 3、Cas12a反应:20 μ L反应体系中,加入相应的crRNA(1 μ M),LbCas12a(0.5 μ M),PCR产物1 μ L,荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5 μ M)。37 $^{\circ}$ C反应15min,然后98 $^{\circ}$ C2min终止反应。

[0127] 4、荧光检测:将灭活的20 μ L反应液加入96孔板中,然后用酶标仪检测(激发光535nm,发射光556nm)。如图16,仅当crRNA对应相应的靶标序列时,才有较高的荧光响应值,如果有一个位点的突变,其响应值就会大大降低。通过荧光值得大小即可判断对应SNP的基因型,这些结果也得到了测序结果的确认。

[0128] 实施例10试剂盒SNP测试志愿者临床样本(痛风相关基因)

[0129] 将预混液加入到96孔板中,制备成试剂盒,然后加入21名志愿者的基因组DNA,测试rs1014290位点,该位点与痛风的风险相关。

[0130] 1、试剂盒制备:首先,通过用T7-crRNA-F与合成的寡核苷酸(表5)进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4 μ M)在1 \times PCR缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为50 μ L,然后进行退火程序:在95 $^{\circ}$ C初始变性5分钟,然后从95 $^{\circ}$ C冷却至20 $^{\circ}$ C,使用热循环仪每分钟降低1 $^{\circ}$ C。使用T7高产量转录试剂盒合成crRNA,并且反应在37 $^{\circ}$ C下进行过夜(约16h)。使用RNA Clean&ConcentratorTM-5 (Zymo Research)纯化RNA,并用NanoDrop2000C定量,稀释为10 μ M浓度。

[0131] 2、96孔板PCR预混:在19 μ L体系中,加入PCR反应所需试剂,引物用41-rs1014290-F与41-rs1014290-R。

[0132] 3、荧光检测96孔板预混:在19 μ L体系中,加入crRNA(1 μ M),LbCas12a(0.5 μ M),荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5 μ M),加入到96孔板中。

[0133] 4、PCR扩增:在PCR预混的96孔板中加入志愿者基因组DNA,然后进行PCR反应。PCR反应程序为,95 $^{\circ}$ C2min,然后开始35个循环98 $^{\circ}$ C10s,60 $^{\circ}$ C15s,68 $^{\circ}$ C10s。

[0134] 5、Cas12a反应:取1 μ L PCR反应液,加入到已预混的荧光检测96孔板中,37 $^{\circ}$ C反应15min,然后98 $^{\circ}$ C2min终止反应。

[0135] 6、荧光检测:用酶标仪检测(激发光535nm,发射光556nm)。如图17,由于基因型A的人群具有更高的痛风风险,因此除了5,7,9号志愿者外,其他人需更加注意痛风的风险。

[0136] Cas12a切割ssDNA的cis切割特性:

[0137] 首先,Cas12a的ssDNA切割特征,设计了几个靶向短ssDNA(DNMT1-3)的crRNA(表1),其在3'末端用5(6)-羧基荧光素(FAM)标记。在FnCas12a切割后,通过变性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳(尿素PAGE)分析反应产物。发现通过Cas12a的ssDNA切割是程序化的,即切割位点为从第一个3'-碱基与crRNA引导序列配对的第22个碱基附近(第21至第23个),如图1A和1C所示。Cas12a的dsDNA需要PAM序列,而ssDNA切割不需要PAM序列(图1A,1B与图2),这与Cas9介导的ssDNA切割相似。然而,Cas12a介导的ssDNA切割活性依赖于crRNA中的茎环结构,如图1A所示,而Cas9仍然表现出对仅具有20-nt互补RNA序列的ssDNA的仍有弱切割活性。crRNA的茎环结构对于稳定Cas12a的结构是重要的,其为crRNA环结构对Cas12a的ssDNA

切割的必要性的原因。进一步测试Cas12a的ssDNA切割位点是否可以通过更短的引导序列crRNA,从而使得切割在识别位点之外。在引导序列长度为16nt,18nt和20nt时,所有这些crRNA都导致在靠近第22个碱基处通过Cpf1切割,如图1B与1D所示,意味着切割位点是识别位点之外的4nt,2nt或0nt。接着,测试了Cas12a对不同底物的切割效率,分别用了dsDNA和ssDNA底物,如图1F所示。类似于Cas9切割情况,ssDNA切割比dsDNA切割更慢,如图1E和1G所示。这些结果表明Cas12a的ssDNA识别与切割的机制可能不同于dsDNA,是一种效率较低的不依赖于PAM的识别切割方式;PAM序列为Cas12a对靶标的识别和/或切割起到加速的作用。

[0138] Cas12a切割ssDNA的trans切割特性:

[0139] 当ssDNA靶标在3'末端标记时,Cas12a切割第22个碱基附近,如图1所示。然而,当标记在5'末端时,在预测的大小处没有观察到条带,但是产生短(<6nt)FAM标记的产物,如图3B所示。通过详细的实验,一旦三元复合体Cas12a/crRNA/target ssDNA形成,5'-末端标记的靶标ssDNA(DNMT1-3)(表1)被切割并产生短FAM标记的产物,如图3C所示。此外,三元复合体还切割任何其他反应体系中与crRNA没有互补性序列的ssDNAs,如图3C和图3D所示。将这种切割现象为trans切割,区别于可程序化的cis切割。当靶标ssDNA在3'-末端标记时,也观察到了trans切割,但留下了许多cis切割产物,如图3B所示,这可能是由Cas12a/crRNA/target ssDNA的形成的复合物,保护了靶标ssDNA的标记的3'-末端免于暴露于核酸酶活性位点,这些切割过程可以用图3A显示。

[0140] 除了上面测试的FnCas12a,还测试了来自其他物种来源的9种Cas12a(表2和图4A)。除了Lb4Cas12a以外,所有的Cas12a都对质粒DNA具有较好的核酸内切酶活性,如图4B所示,并且所有的Cas12a三元复合体都显示出对单链的cis和trans切割活性,如图4C和4D所示。这说明Cas12a的对单链DNA的cis和trans活力是普遍现象。

[0141] Cas12a切割ssDNA的cis和trans关键位点与机理

[0142] 为了测定Cas12a中有关对单链cis和trans活性的关键氨基酸残基,突变了Cas12a的几个候选残基进行活力测试。首先,纯化并测试FnCas12a(H843A,K852A和K869A)的三个单氨基酸突变体,其残基与RNase活性相关。对于ssDNA的trans活性研究结果显示,野生型FnCas12a和三个突变体在cis和trans切割活力上没有发现明显的差异,如图5A和5C所示。

[0143] 接着,当FnCas12a中的核酸内切酶活性位点突变时,即RuvC结构域(D917A,E1006A或D1255A)与Nuc结构域(R1218A)位点,这些突变Cas12a的cis和trans活性都受到了影响,如图5B和5D所示。这些结果表明dsDNA切割的关键位点与cis和trans活性密切相关。

[0144] 最近对C2c1的结构研究(包括与延伸的靶DNA或延伸的非靶DNA复合体)显示两条链均位于RuvC口袋内,如图6A和6B所示。通过比较C2c1和Cas12a的核酸内切酶催化残基,这些位点最可能在C2c1和Cas12a的切割和功能中发挥类似的作用。体外单氨基酸突变实验的结果表明,与上述假设是一致的,也即是说Cas12a很可能通过只通过一个RuvC催化口袋切割两条链。

[0145] Cas12a复合体的trans活性:在C2c1复合体与额外ssDNA的结构中,序列非依赖性ssDNA也位于催化口袋的表面,如图6C所示,这类似于Cas12a中的trans ssDNA底物。结合单个氨基酸突变实验,提出靶DNA,非靶DNA和trans ssDNA都在Cas12a中的单个RuvC口袋切割,如图6D,6E和6F所示。三元Cas12a复合体具有trans活性,而单体或二元复合体没有trans活性的原因可以通过比较单体、二元和三元复合体的结构来解释。单体Cas12a结构是

无序的,二元复合体Cas12a/crRNA是三角形结构,如图6G所示,而三元复合物Cas12a/crRNA/target DNA转变为双叶结构,从而暴露催化口袋,如图6H所示。

[0146] 核酸探测方法的建立

[0147] 利用Cas12a的特性,开发了特异性检测核酸分子的方法,称之为HOLMES (one H0ur Low-cost Multiplex Efficient Simple assay)。正如该技术的名称一样,其特点是快速(1小时)、低价、多通路、高效、简便测试法。

[0148] 在整个反应体系中,可分为两个大的步骤,一个是对模板核酸的扩增,另一个是Cas12a蛋白的特异性核酸检测。这里,对于核酸的扩增运用了PCR的方法,但实际上,任何的扩增方法都可结合第二步的核酸检测,例如等温扩增方法RPA等。初始的核酸不限于双链DNA,也可以是单链DNA;即使是RNA,也可以通过反转录后实现检测,因此本方法适用于多种类型的核酸分子。对于核酸检测阶段,其中3个组分是实验的关键,分别为Cas12a,crRNA和核酸探针。除了实施例中提到的10种Cas12a(这10种蛋白是随机选择的),其他Cas12a蛋白同样适用于该方法。此外,其它类型的Cas蛋白(如C2c1蛋白)也适用于本发明保护的范畴:根据实验结果显示,Alicyclobacillus acidoterrestris C2c1也具有与Cas12a类似的trans活力,其与crRNA/靶标DNA的复合物也可以切割旁路单链DNA。

[0149] 对于作为引导作用的crRNA,经过人工修饰等改造后,在体系中会更加稳定。在核酸探针的选择上,本发明选用了HEX和BHQ1标记的短ssDNA,其他可检测的任何标记方式理论上都是适用的,只要该核酸探针被切割后产生可检测的差异。或者,核酸探针也可以设计成可以跟化合物结合后发荧光,从而探测是否该探针被切断。

[0150] 此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0151] 表1 Cas12a特性实验相关切割底物

Oligo names	Sequences (5' -3')
target-DNMT1-3-F	aatgtttcctgatggtccatgtctgttactcgccgtgtcaagtggcgtgac
target-DNMT1-3-R	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatggaccatcaggaaacatt
target-DNMT1-3-R-FAM-3	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatggaccatcaggaaacatt-FAM
target-DNMT1-3-R-FAM-5	FAM-gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatggaccatcaggaaacatt
target-T1-F	tttctgtttgttatcgcaactttctactgaattcaagctttactctagaaagag
target-T1-R	gagaaaggatcc
target-T1-R	ggatcctttctcctcttttctagagtaaagcttgattcagtagaaagttgcgat

	aacaaacagaaa
target-T1-F-FAM	FAM-tttctgtttgttatcgcaactttctactgaattcaagctttactctagaa agaggagaaaggatcc
target-T1-R-FAM	ggatcctttctcctctttctagagtaaagcttgaattcagtagaaagttgcgat aacaaacagaaa-FAM
target-T1-FAM-3' -F	tttctgtttgttatcgcaactttctactgaattcaagctttactctagaaagag gagaaaggatcc-FAM
target-T1-FAM-5' -R	FAM-ggatcctttctcctctttctagagtaaagcttgaattcagtagaaagttg cgataacaaacagaaa
target-DNMT1-3-R-TTT-F AM-3'	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatggaccatcaggTTTcatt-FAM
target-DNMT1-3-R-CCC-F AM-3'	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatggaccatcaggCCCcatt-FAM
target-DNMT1-3-R-GGG-F AM-3'	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatggaccatcaggGGGcatt-FAM
[0153] target-DNMT1-3-F-AAA	aatgAAAcctgatggtccatgtctgttactcgctgtcaagtggcgtgac
target-DNMT1-3-F-GGG	aatgGGGcctgatggtccatgtctgttactcgctgtcaagtggcgtgac
target-DNMT1-3-F-CCC	aatgCCCcctgatggtccatgtctgttactcgctgtcaagtggcgtgac
target-T1-1-R	acaaacagaaa
target-T1-6-R	cgataacaaacagaaa
target-T1-12-R	aagttgcgataacaaacagaaa
target-T1-18-R	agtagaaagttgcgataacaaacagaaa
target-T1-24-R	gaattcagtagaaagttgcgataacaaacagaaa
target-T1-24-only-R	gaattcagtagaaagttgcgataa
target-T1-18-only-R	agtagaaagttgcgataa
target-T1-12-only-R	aagttgcgataa
target-T1-6-only-R	cgataa
N25-5' FAM	FAM-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
N25-3' FAM	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-FAM

[0154] 表2.本专利中涉及到的Cas12a蛋白和C2c1蛋白的名称与GI号

Name	GI number	Species
FnCas12a	489130501	<i>Francisella tularensis</i>
AsCas12a	545612232	<i>Acidaminococcus</i> sp. BV3L6
LbCas12a	917059416	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> ND2006
Lb5Cas12a	652820612	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> NC2008
[0155] HkCas12a	491540987	<i>Helcococcus kunzii</i> ATCC 51366
OsCas12a	909652572	<i>Oribacterium</i> sp. NK2B42
TsCas12a	972924080	<i>Thiomicrospira</i> sp. XS5
BbCas12a	987324269	<i>Bacteroidales bacterium</i> KA00251
BoCas12a	496509559	<i>Bacteroidetes oral taxon</i> 274 str. F0058
Lb4Cas12a	769130406	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> MC2017
C2c1	1076761101	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>

[0156] 表3本专利中用到的质粒

Plasmids or Strains	Relevant properties or genotypes	Sources
[0157] Plasmids		

	pET28a-TEV	pET28a with the thrombin cleavage site changed to the TEV protease cleavage site	(Carneiro, Silva et al. 2006)
	pET28a-TEV-FnCas12a	pET28a-TEV carrying FnCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
	pET28a-TEV-AsCas12a	pET28a-TEV carrying AsCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
	pET28a-TEV-LbCas12a	pET28a-TEV carrying LbCas12a	(Lei, Li et al. 2017)
[0158]	pET28a-TEV-Lb5Cas12a	pET28a-TEV carrying Lb5Cas12a	This study
	pET28a-TEV-HkCas12a	pET28a-TEV carrying HkCas12a	This study
	pET28a-TEV-0sCas12a	pET28a-TEV carrying 0sCas12a	This study
	pET28a-TEV-TsCas12a	pET28a-TEV carrying TsCas12a	This study
	pET28a-TEV-BbCas12a	pET28a-TEV carrying BbCas12a	This study
	pET28a-TEV-BoCas12a	pET28a-TEV carrying BoCas12a	This study
	pET28a-TEV-Lb4Cas12a	pET28a-TEV carrying Lb4Cas12a	This study
	pET28a-TEV-FnCas12a-K869A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-K869A	This study
	pET28a-TEV-FnCas12a-K852A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-K852A	This study
	pET28a-TEV-FnCas12a-H843A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-H843A	This study
	pET28a-TEV-FnCas12a-R1218A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-R1218A	This study
	pET28a-TEV-FnCas12a-E1006A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-E1006A	This study
	pET28a-TEV-FnCas12a-D917A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-D917A	This study
	pET28a-TEV-FnCas12a-D1255A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-D1255A	This study

[0159] 表4 HOLMES方法测试中用到的引物

Oligo names	Sequences (5' -3')
target-T1-R	ggatcctttctcctctttctagagtaaagcttgaattcagtagaaagttgcgataac aaacagaaa
M13F-47	cacaattccacacaacatacgagccgga
M13R-48	tgtagccgtagtttaggccaccacttca
Target-T1-F	agttttgttatcgcaactttctactgaattc
Target-T1-F-1A	agttttgAtatcgcaactttctactgaattc
Target-T1-F-2A	agttttgtAatcgcaactttctactgaattc
Target-T1-F-3T	agttttgtTtcgcaactttctactgaattc
Target-T1-F-4A	agttttgttAacgcaactttctactgaattc
Target-T1-F-5G	agttttgttatGcgcaactttctactgaattc
Target-T1-F-6C	agttttgttatCcaactttctactgaattc
Target-T1-F-7G	agttttgttatcgGaaactttctactgaattc
Target-T1-F-8T	agttttgttatcgTactttctactgaattc
Target-T1-F-9T	agttttgttatcgTctttctactgaattc
Target-T1-F-10G	agttttgttatcgcaaGtttctactgaattc
Target-T1-AAAN-F	aaaagttatcgcaactttctactgaattc
Target-T1-F-11A	agttttgttatcgcaacAttctactgaattcgggtcatag
Target-T1-F-12A	agttttgttatcgcaactAtctactgaattcgggtcatag
Target-T1-F-13A	agttttgttatcgcaacttActactgaattcgggtcatag
Target-T1-F-14G	agttttgttatcgcaactttGtactgaattcgggtcatag
Target-T1-F-15A	agttttgttatcgcaactttcAactgaattcgggtcatag

[0160]

Target-T1-F-16T	agttttgttatcgcaactttctTctgaattcggtcatag
Target-T1-F-17G	agttttgttatcgcaactttctaGtgaattcggtcatag
Target-T1-F-18A	agttttgttatcgcaactttctacAgaattcggtcatag
Target-T1-PAM1A-F	agtttAgttatcgcaactttctactgaattc
Target-T1-PAM2A-F	agttAtgttatcgcaactttctactgaattc
Target-T1-PAM3A-F	agtAttgttatcgcaactttctactgaattc
gyrB-F	AGTTGTCGTTCCCTCAACTCCGGCGTTTC
gyrB-R	TCGACGCCAATACCGTCTTTTTCAGTGG
1-rs5028-F	CTGCCTTTGCTTCTACCTTTGCCTGT
1-rs5028-F-T	TTGCTTCTACCTTTGCCTGTTCTGG
1-rs5028-R	TTTTCTGGCTGGGGATGGCCGATGG
2-rs1467558-F	AGCAATAACACTAATATTGATTCCTTCAGATATGGACTCCTTTCATAGTA
2-rs1467558-F-T	TTGATTCCTTCAGATATGGACTCCTTTCATAGTATAACG
2-rs1467558-R	TGAGCATCGTTATTCTTACGCGTTGTCATTGAAAGAG
3-rs2952768-F	AGCCTGGGCAACGAGTGAAACTCTG
3-rs2952768-R	ACAGGAGGGACAAAGGCCTAAGTGTCC
3-rs2952768-R-C	CATCATAGGATTGGGAAAAGGACATTTTCAGTCATTAG
4-rs4363657-F	AGAGTCCTTCTTTCTCAATTTTTCAGAATAATTTAGTACTTTGGGTAC
4-rs4363657-R	CAGTACTGAAAAAACCTGCCTATCAATAAAAGCCCTAGAC
5-rs601338-F	GCTTCACCGGCTACCTTTGCTCCT
5-rs601338-R	TTCACCTGCAGGCCCCGAGG
[0161] 34-TP53-T24-F	CCTGACTTTCAACTCTGTCTCCTTCTCTTTTACAGTA
34-TP53-T24-R	TGCTGTGACTGCTTGTAGATGGCCATGG
41-rs1014290-F	AGTTTCCAGACCTCAGTGCACAAGATACTTTTCTAC
41-rs1014290-F-G	ACCTCAGTGCACAAGATACTTTTCTACGTCATCCAC
41-rs1014290-R	AGCTCCAGTGGATGGAAGATCTTTGAGATCCAG
42-rs6449213-F	AGTCAAAGAGATTATGCCTGGGACTTTAATCACATTAT
42-rs6449213-F-C	ATGCCTGGGACTTTAATCACATTATCGGAAGG
42-rs6449213-R	CAAATCTGTCTCCACCTCTCAGCTCACCTTG
43-rs737267-F	TTCTTGAACCCAAACTCACCTGGCATTAAACTG
43-rs737267-F-A	AAACTCACCTGGCATTAAACTGACTCTGTAAG
43-rs737267-F-T	AAACTCACCTGGCATTAAACTGTCTCTGTAAG
43-rs737267-R	TGCCGAGGCTGAGTTCAGCTACTCTCC
44-rs1260326-F	ACACAGCACCGTGGGTCAGACCTTGC
44-rs1260326-F-C	TGGGTCAGACTTTGCCGGTGAGAGTC
44-rs1260326-F-T	TGGGTCAGACTTTGCTGGTGAGAGTC
44-rs1260326-R	AGCAGTGGCCATGTGATGCTGATGATG
45-rs642803-F	CCCCGGCTCTGTTGGCTTTGAGAATTG
45-rs642803-F-C	CTCTGTTGGCTTTGAGAATTGCCTGTCTGTGTC
45-rs642803-F-T	CTCTGTTGGCTTTGAGAATTGTCTGTCTGTGTC
45-rs642803-R	ACCGATACCTGGCAGCCCTTGGATG
HEX-N12-BHQ1	HEX-NNNNNNNNNN-BHQ1

[0162] 表5用于转录crRNA的模板序列

Oligo names	Sequences (5' -3')
T7-crRNA-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG
[0163] T7-T1-24-R	gaattcagtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAG TGAGTCGTATTAATTTTC
T7-T1-15-R	agaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCGTA

	TTAATTTTC
T7-T1-16-R	tagaaagtttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC
T7-T1-17-R	gtagaaagtttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTTC
T7-T1-18-R	agtagaaagtttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTC GTATTAATTTTC
T7-crRNA-DNMT-23nt-R	GAGTAACAGACATGGACCATCAGATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGT GAGTCGTATTAATTTTC
T7-crRNA-DNMT-(-8)-R	gacatggaccatcaggaaacattATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGT GAGTCGTATTAATTTTC
T7-crRNA-DNMT-(+4)-R	aggcgagtaacagacatggaccaATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGT GAGTCGTATTAATTTTC
T7-crRNA-DNMT-(+8)-R	tgacaggcgagtaacagacatggATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGT GAGTCGTATTAATTTTC
T7-crRNA-DNMT-16nt-R	agacatggaccatcagATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC
T7-crRNA-DNMT-18nt-R	acagacatggaccatcagATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTC GTATTAATTTTC
T7-crRNA-DNMT-20nt-R	taacagacatggaccatcagATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAG TCGTATTAATTTTC
T7-DNMT-(-8)-no loop-R	gacatggaccatcaggaaacattCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC
T7-DNMT-(+4)-no loop-R	aggcgagtaacagacatggaccaCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC
T7-DNMT-(+8)-no loop-R	tgacaggcgagtaacagacatggCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC
T7-crRNA-rs5028-T	CCTCTTCCCAGAACAGGATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTTC
T7-crRNA-rs5028-G	CCTCTTCCCAGCACAGGATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTTC
T7-crRNA- rs1467558-T	CTGAAGCGTTATACTATATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTTC
T7-crRNA- rs1467558-C	CTGAAGCGTTGTACTATATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTTC
T7-crRNA-rs2952768-T-16nt	TTTTATCTGAATGATTATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC
T7-crRNA-rs2952768-C-16nt	TTTTATCTGAATGACTATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC
T7-crRNA- rs4363657-T	AAAAAAGAGTGAGTACCATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTTC
T7-crRNA- rs4363657-C	AAAAAAGAGTGGGTACCATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTTC
T7-crRNA-rs601338-G	GGTAGAAGGTCCAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTTC
T7-crRNA-rs601338-A	GGTAGAAGGTCTAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTTC
T7-crRNA-34-TP53-T24-C-16 nt	GGGCAGGGGAGTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC
T7-crRNA-34-TP53-T24-G-16 nt	GGGCAGGGGACTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC
T7-crRNA-41-rs1014290-A-1 5nt	TCAGTGGATGATGTAATCTACAACAGTAGAAATTCCTATAGTGAGTCGTA TTAATTTTC

[0164]

[0165]	T7-crRNA-41-rs1014290-G-1 5nt	TCAGTGGATGACGTAATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCGTA TTAATTTC
	T7-crRNA-42-rs6449213-C	GGAAATTCTCCTTCCGAATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTC
	T7-crRNA-42-rs6449213-T	GGAAATTCTCCTTCCAAATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTC
	T7-crRNA-43-rs737267-A-16 nt	TCTTACAGAGTCAGTTATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTC
	T7-crRNA-43-rs737267-G-16 nt	TCTTACAGAGCCAGTTATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTC
	T7-crRNA-43-rs737267-T	GTCTTACAGAGACAGTTATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTC
	T7-crRNA-44-rs1260326-C-1 5nt	CTGGACTCTACCGGATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCGTA TTAATTTC
	T7-crRNA-44-rs1260326-T-1 5nt	CTGGACTCTACCGATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCGTA TTAATTTC
	T7-crRNA-45-rs642803-C	CACAGACAGGCAATTCTATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTC
	T7-crRNA-45-rs642803-T	CACAGACAGACAATTCTATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAGTGAGTCG TATTAATTTC
	T7-crRNA- gyrB	TCGCGCTTGTCGCGCAGACGAATGATCTACAACAGTAGAAATCCCTATAG TGAGTCGTATTAATTTC

[0166] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 上海吐露港生物科技有限公司
- [0003] <120> 一种Cas蛋白的用途及靶标核酸分子的检测方法和试剂盒
- [0004] <130> P2020-1655
- [0005] <160> 111
- [0006] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 50
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0011] <400> 1
- [0012] aatgtttcct gatggtccat gtctgttact cgctgtcaa gtggcgtgac 50
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 50
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0017] <400> 2
- [0018] gtcacgccac ttgacaggcg agtaacagac atggaccatc aggaaacatt 50
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 66
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0023] <400> 3
- [0024] tttctgtttg ttatcgcaac tttctactga attcaagctt tactctagaa agaggagaaa 60
- [0025] ggatcc 66
- [0026] <210> 4
- [0027] <211> 66
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0030] <400> 4
- [0031] ggatcctttc tcctctttct agagtaaagc ttgaattcag tagaaagttg cgataacaaa 60
- [0032] cagaaa 66
- [0033] <210> 5
- [0034] <211> 11
- [0035] <212> DNA
- [0036] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0037] <400> 5
- [0038] acaaacagaa a 11

[0039]	<210> 6
[0040]	<211> 16
[0041]	<212> DNA
[0042]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0043]	<400> 6
[0044]	cgataacaaa cagaaa 16
[0045]	<210> 7
[0046]	<211> 22
[0047]	<212> DNA
[0048]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0049]	<400> 7
[0050]	aagttgcgat aacaaacaga aa 22
[0051]	<210> 8
[0052]	<211> 28
[0053]	<212> DNA
[0054]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0055]	<400> 8
[0056]	agtagaaagt tgcgataaca aacagaaa 28
[0057]	<210> 9
[0058]	<211> 34
[0059]	<212> DNA
[0060]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0061]	<400> 9
[0062]	gaattcagta gaaagttgcg ataacaaca gaaa 34
[0063]	<210> 10
[0064]	<211> 24
[0065]	<212> DNA
[0066]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0067]	<400> 10
[0068]	gaattcagta gaaagttgcg ataa 24
[0069]	<210> 11
[0070]	<211> 18
[0071]	<212> DNA
[0072]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0073]	<400> 11
[0074]	agtagaaagt tgcgataa 18
[0075]	<210> 12
[0076]	<211> 12
[0077]	<212> DNA

[0078] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0079] <400> 12
[0080] aagttgcat aa 12
[0081] <210> 13
[0082] <211> 28
[0083] <212> DNA
[0084] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0085] <400> 13
[0086] cacaattcca cacaacatac gagccgga 28
[0087] <210> 14
[0088] <211> 27
[0089] <212> DNA
[0090] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0091] <400> 14
[0092] tgtagccgta gttaggccac cacttca 27
[0093] <210> 15
[0094] <211> 31
[0095] <212> DNA
[0096] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0097] <400> 15
[0098] agttttgtta tcgcaacttt ctactgaatt c 31
[0099] <210> 16
[0100] <211> 31
[0101] <212> DNA
[0102] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0103] <400> 16
[0104] agttttgata tcgcaacttt ctactgaatt c 31
[0105] <210> 17
[0106] <211> 31
[0107] <212> DNA
[0108] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0109] <400> 17
[0110] agttttgtaa tcgcaacttt ctactgaatt c 31
[0111] <210> 18
[0112] <211> 31
[0113] <212> DNA
[0114] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0115] <400> 18
[0116] agttttgttt tcgcaacttt ctactgaatt c 31

[0117] <210> 19
[0118] <211> 31
[0119] <212> DNA
[0120] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0121] <400> 19
[0122] agttttgtta acgcaacttt ctactgaatt c 31
[0123] <210> 20
[0124] <211> 31
[0125] <212> DNA
[0126] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0127] <400> 20
[0128] agttttgtta tggcaacttt ctactgaatt c 31
[0129] <210> 21
[0130] <211> 31
[0131] <212> DNA
[0132] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0133] <400> 21
[0134] agttttgtta tcccaacttt ctactgaatt c 31
[0135] <210> 22
[0136] <211> 31
[0137] <212> DNA
[0138] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0139] <400> 22
[0140] agttttgtta tcggaacttt ctactgaatt c 31
[0141] <210> 23
[0142] <211> 31
[0143] <212> DNA
[0144] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0145] <400> 23
[0146] agttttgtta tcgctacttt ctactgaatt c 31
[0147] <210> 24
[0148] <211> 31
[0149] <212> DNA
[0150] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0151] <400> 24
[0152] agttttgtta tcgcactttt ctactgaatt c 31
[0153] <210> 25
[0154] <211> 31
[0155] <212> DNA

- [0156] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0157] <400> 25
[0158] agttttgtta tcgcaagttt ctactgaatt c 31
[0159] <210> 26
[0160] <211> 29
[0161] <212> DNA
[0162] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0163] <400> 26
[0164] aaaagttatc gcaactttct actgaattc 29
[0165] <210> 27
[0166] <211> 39
[0167] <212> DNA
[0168] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0169] <400> 27
[0170] agttttgtta tcgcaacatt ctactgaatt cggtcatag 39
[0171] <210> 28
[0172] <211> 39
[0173] <212> DNA
[0174] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0175] <400> 28
[0176] agttttgtta tcgcaactat ctactgaatt cggtcatag 39
[0177] <210> 29
[0178] <211> 39
[0179] <212> DNA
[0180] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0181] <400> 29
[0182] agttttgtta tcgcaactta ctactgaatt cggtcatag 39
[0183] <210> 30
[0184] <211> 39
[0185] <212> DNA
[0186] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0187] <400> 30
[0188] agttttgtta tcgcaacttt gtactgaatt cggtcatag 39
[0189] <210> 31
[0190] <211> 39
[0191] <212> DNA
[0192] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0193] <400> 31
[0194] agttttgtta tcgcaacttt caactgaatt cggtcatag 39

[0195]	<210> 32
[0196]	<211> 39
[0197]	<212> DNA
[0198]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0199]	<400> 32
[0200]	agttttgtta tcgcaacttt cttctgaatt cggtcatag 39
[0201]	<210> 33
[0202]	<211> 39
[0203]	<212> DNA
[0204]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0205]	<400> 33
[0206]	agttttgtta tcgcaacttt ctagtgaatt cggtcatag 39
[0207]	<210> 34
[0208]	<211> 39
[0209]	<212> DNA
[0210]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0211]	<400> 34
[0212]	agttttgtta tcgcaacttt ctacagaatt cggtcatag 39
[0213]	<210> 35
[0214]	<211> 31
[0215]	<212> DNA
[0216]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0217]	<400> 35
[0218]	agtttagtta tcgcaacttt ctactgaatt c 31
[0219]	<210> 36
[0220]	<211> 31
[0221]	<212> DNA
[0222]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0223]	<400> 36
[0224]	agttatgtta tcgcaacttt ctactgaatt c 31
[0225]	<210> 37
[0226]	<211> 31
[0227]	<212> DNA
[0228]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0229]	<400> 37
[0230]	agtattgtta tcgcaacttt ctactgaatt c 31
[0231]	<210> 38
[0232]	<211> 28
[0233]	<212> DNA

- [0234] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0235] <400> 38
[0236] agttgtcggt cctcaactcc ggcgtttc 28
[0237] <210> 39
[0238] <211> 28
[0239] <212> DNA
[0240] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0241] <400> 39
[0242] tcgacgcaa taccgtcttt ttcagtgg 28
[0243] <210> 40
[0244] <211> 26
[0245] <212> DNA
[0246] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0247] <400> 40
[0248] ctgcctttgc ttctaccttt gcctgt 26
[0249] <210> 41
[0250] <211> 25
[0251] <212> DNA
[0252] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0253] <400> 41
[0254] ttgcttctac ctttgcctgt tctgg 25
[0255] <210> 42
[0256] <211> 25
[0257] <212> DNA
[0258] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0259] <400> 42
[0260] ttttctggct ggggatggcc gatgg 25
[0261] <210> 43
[0262] <211> 50
[0263] <212> DNA
[0264] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0265] <400> 43
[0266] agcaataaca ctaatattga ttccttcaga tatggactcc tttcatagta 50
[0267] <210> 44
[0268] <211> 39
[0269] <212> DNA
[0270] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0271] <400> 44
[0272] ttgattcctt cagatatgga ctcctttcat agtataacg 39

[0273]	<210> 45
[0274]	<211> 37
[0275]	<212> DNA
[0276]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0277]	<400> 45
[0278]	tgagcatcgt tattcttacg cgttgtcatt gaaagag 37
[0279]	<210> 46
[0280]	<211> 25
[0281]	<212> DNA
[0282]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0283]	<400> 46
[0284]	agcctgggca acgagtgaac ctctg 25
[0285]	<210> 47
[0286]	<211> 27
[0287]	<212> DNA
[0288]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0289]	<400> 47
[0290]	acaggaggga caaaggccta agtgtcc 27
[0291]	<210> 48
[0292]	<211> 38
[0293]	<212> DNA
[0294]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0295]	<400> 48
[0296]	catcatagga ttgggaaaag gacatttcag tcattcag 38
[0297]	<210> 49
[0298]	<211> 48
[0299]	<212> DNA
[0300]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0301]	<400> 49
[0302]	agagtccttc tttctcaatt tttcagaata atttagtact ttgggtac 48
[0303]	<210> 50
[0304]	<211> 40
[0305]	<212> DNA
[0306]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0307]	<400> 50
[0308]	cagtactgaa aaaacctgcc tatcaataaa agccctagac 40
[0309]	<210> 51
[0310]	<211> 24
[0311]	<212> DNA

- [0312] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0313] <400> 51
[0314] gcttcaccgg ctacctttgc tcct 24
[0315] <210> 52
[0316] <211> 21
[0317] <212> DNA
[0318] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0319] <400> 52
[0320] ttcacctgca ggccccgcag g 21
[0321] <210> 53
[0322] <211> 39
[0323] <212> DNA
[0324] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0325] <400> 53
[0326] cctgactttc aactctgtct ccttcctctt tttacagta 39
[0327] <210> 54
[0328] <211> 28
[0329] <212> DNA
[0330] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0331] <400> 54
[0332] tgctgtgact gctttagat ggccatgg 28
[0333] <210> 55
[0334] <211> 36
[0335] <212> DNA
[0336] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0337] <400> 55
[0338] agtttccaga cctcagtgc caagatactt ttctac 36
[0339] <210> 56
[0340] <211> 36
[0341] <212> DNA
[0342] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0343] <400> 56
[0344] acctcagtgc acaagatact tttctacgtc atccac 36
[0345] <210> 57
[0346] <211> 33
[0347] <212> DNA
[0348] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0349] <400> 57
[0350] agctccagtg gatggaagat ctttgagatc cag 33

- [0351] <210> 58
[0352] <211> 40
[0353] <212> DNA
[0354] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0355] <400> 58
[0356] agtcaaagag attcatgcct gggactttaa tcacatttat 40
[0357] <210> 59
[0358] <211> 33
[0359] <212> DNA
[0360] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0361] <400> 59
[0362] atgcctggga ctttaatcac atttatcgga agg 33
[0363] <210> 60
[0364] <211> 31
[0365] <212> DNA
[0366] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0367] <400> 60
[0368] caaatctgtc tccacctctc agctcacctt g 31
[0369] <210> 61
[0370] <211> 34
[0371] <212> DNA
[0372] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0373] <400> 61
[0374] ttcttgaacc caaactcacc tggcatttaa actg 34
[0375] <210> 62
[0376] <211> 33
[0377] <212> DNA
[0378] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0379] <400> 62
[0380] aaactcacct ggcatttaaa ctgactctgt aag 33
[0381] <210> 63
[0382] <211> 33
[0383] <212> DNA
[0384] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0385] <400> 63
[0386] aaactcacct ggcatttaaa ctgtctctgt aag 33
[0387] <210> 64
[0388] <211> 27
[0389] <212> DNA

[0390] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0391] <400> 64
[0392] tgccgaggct gagttcagct actctcc 27
[0393] <210> 65
[0394] <211> 26
[0395] <212> DNA
[0396] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0397] <400> 65
[0398] acacagcacc gtgggtcaga ccttgc 26
[0399] <210> 66
[0400] <211> 26
[0401] <212> DNA
[0402] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0403] <400> 66
[0404] tgggtcagac tttgccggtg agagtc 26
[0405] <210> 67
[0406] <211> 26
[0407] <212> DNA
[0408] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0409] <400> 67
[0410] tgggtcagac tttgctggtg agagtc 26
[0411] <210> 68
[0412] <211> 27
[0413] <212> DNA
[0414] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0415] <400> 68
[0416] agcagtggcc atgtgatgct gatgatg 27
[0417] <210> 69
[0418] <211> 27
[0419] <212> DNA
[0420] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0421] <400> 69
[0422] ccccggtctt gttggctttg agaattg 27
[0423] <210> 70
[0424] <211> 33
[0425] <212> DNA
[0426] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0427] <400> 70
[0428] ctctgttggc tttgagaatt gcctgtctgt gtc 33

[0429]	<210> 71
[0430]	<211> 33
[0431]	<212> DNA
[0432]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0433]	<400> 71
[0434]	ctctgttggc tttgagaatt gtctgtctgt gtc 33
[0435]	<210> 72
[0436]	<211> 25
[0437]	<212> DNA
[0438]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0439]	<400> 72
[0440]	accgatacct ggcagccctt ggatg 25
[0441]	<210> 73
[0442]	<211> 25
[0443]	<212> DNA
[0444]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0445]	<400> 73
[0446]	gaaattaata cgactcacta taggg 25
[0447]	<210> 74
[0448]	<211> 68
[0449]	<212> DNA
[0450]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0451]	<400> 74
[0452]	gaattcagta gaaagttgcg ataaatctac aacagtagaa attccctata gtgagtcgta 60
[0453]	ttaatttc 68
[0454]	<210> 75
[0455]	<211> 59
[0456]	<212> DNA
[0457]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0458]	<400> 75
[0459]	agaaagttgc gataaatcta caacagtaga aattccctat agtgagtcgt attaatttc 59
[0460]	<210> 76
[0461]	<211> 60
[0462]	<212> DNA
[0463]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0464]	<400> 76
[0465]	tagaaagttg cgataaatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaatttc 60
[0466]	<210> 77
[0467]	<211> 61

- [0468] <212> DNA
[0469] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0470] <400> 77
[0471] gtagaaagtt gcgataaatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0472] c 61
[0473] <210> 78
[0474] <211> 62
[0475] <212> DNA
[0476] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0477] <400> 78
[0478] agtagaaagt tgcgataaat ctacaacagt agaaattccc tatagtgagt cgtattaatt 60
[0479] tc 62
[0480] <210> 79
[0481] <211> 67
[0482] <212> DNA
[0483] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0484] <400> 79
[0485] gagtaacaga catggaccat cagatctaca acagtagaaa ttccctatag tgagtcgtat 60
[0486] taatttc 67
[0487] <210> 80
[0488] <211> 67
[0489] <212> DNA
[0490] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0491] <400> 80
[0492] gacatggacc atcaggaaac attatctaca acagtagaaa ttccctatag tgagtcgtat 60
[0493] taatttc 67
[0494] <210> 81
[0495] <211> 67
[0496] <212> DNA
[0497] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0498] <400> 81
[0499] aggcgagtaa cagacatgga ccaatctaca acagtagaaa ttccctatag tgagtcgtat 60
[0500] taatttc 67
[0501] <210> 82
[0502] <211> 67
[0503] <212> DNA
[0504] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0505] <400> 82
[0506] tgacaggcga gtaacagaca tggatctaca acagtagaaa ttccctatag tgagtcgtat 60

[0507]	taatttc 67
[0508]	<210> 83
[0509]	<211> 60
[0510]	<212> DNA
[0511]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0512]	<400> 83
[0513]	agacatggac catcagatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaatttc 60
[0514]	<210> 84
[0515]	<211> 62
[0516]	<212> DNA
[0517]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0518]	<400> 84
[0519]	acagacatgg accatcagat ctacaacagt agaaattccc tatagtgagt cgtattaatt 60
[0520]	tc 62
[0521]	<210> 85
[0522]	<211> 64
[0523]	<212> DNA
[0524]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0525]	<400> 85
[0526]	taacagacat ggaccatcag atctacaaca gtagaaattc cctatagtga gtcgtattaa 60
[0527]	tttc 64
[0528]	<210> 86
[0529]	<211> 48
[0530]	<212> DNA
[0531]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0532]	<400> 86
[0533]	gacatggacc atcaggaaac attccctata gtgagtcgta ttaatttc 48
[0534]	<210> 87
[0535]	<211> 48
[0536]	<212> DNA
[0537]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0538]	<400> 87
[0539]	aggcgagtaa cagacatgga ccaccctata gtgagtcgta ttaatttc 48
[0540]	<210> 88
[0541]	<211> 48
[0542]	<212> DNA
[0543]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0544]	<400> 88
[0545]	tgacaggcga gtaacagaca tggccctata gtgagtcgta ttaatttc 48

[0546]	<210> 89
[0547]	<211> 61
[0548]	<212> DNA
[0549]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0550]	<400> 89
[0551]	cctcttccca gaacaggatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0552]	c 61
[0553]	<210> 90
[0554]	<211> 61
[0555]	<212> DNA
[0556]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0557]	<400> 90
[0558]	cctcttccca gcacaggatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0559]	c 61
[0560]	<210> 91
[0561]	<211> 61
[0562]	<212> DNA
[0563]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0564]	<400> 91
[0565]	ctgaagcggtt atactatatac tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0566]	c 61
[0567]	<210> 92
[0568]	<211> 61
[0569]	<212> DNA
[0570]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0571]	<400> 92
[0572]	ctgaagcggtt gtactatatac tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0573]	c 61
[0574]	<210> 93
[0575]	<211> 60
[0576]	<212> DNA
[0577]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0578]	<400> 93
[0579]	ttttatctga atgattatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaatttc 60
[0580]	<210> 94
[0581]	<211> 60
[0582]	<212> DNA
[0583]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0584]	<400> 94

[0585] ttttatctga atgactatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaatttc 60
[0586] <210> 95
[0587] <211> 61
[0588] <212> DNA
[0589] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0590] <400> 95
[0591] aaaaaagagt gaggaccatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0592] c 61
[0593] <210> 96
[0594] <211> 61
[0595] <212> DNA
[0596] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0597] <400> 96
[0598] aaaaaagagt gggtaccatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0599] c 61
[0600] <210> 97
[0601] <211> 61
[0602] <212> DNA
[0603] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0604] <400> 97
[0605] ggtagaaggt ccaggagatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0606] c 61
[0607] <210> 98
[0608] <211> 61
[0609] <212> DNA
[0610] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0611] <400> 98
[0612] ggtagaaggt ctaggagatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0613] c 61
[0614] <210> 99
[0615] <211> 60
[0616] <212> DNA
[0617] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0618] <400> 99
[0619] gggcagggga gtactgatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaatttc 60
[0620] <210> 100
[0621] <211> 60
[0622] <212> DNA
[0623] <213> 人工序列(artificial sequence)

[0624]	<400> 100
[0625]	gggcagggga ctactgatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaatttc 60
[0626]	<210> 101
[0627]	<211> 59
[0628]	<212> DNA
[0629]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0630]	<400> 101
[0631]	tcagtggatg atgtaatcta caacagtaga aattccctat agtgagtcgt attaatttc 59
[0632]	<210> 102
[0633]	<211> 59
[0634]	<212> DNA
[0635]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0636]	<400> 102
[0637]	tcagtggatg acgtaatcta caacagtaga aattccctat agtgagtcgt attaatttc 59
[0638]	<210> 103
[0639]	<211> 61
[0640]	<212> DNA
[0641]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0642]	<400> 103
[0643]	ggaaattctc cttccgaatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0644]	c 61
[0645]	<210> 104
[0646]	<211> 61
[0647]	<212> DNA
[0648]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0649]	<400> 104
[0650]	ggaaattctc cttccaaatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0651]	c 61
[0652]	<210> 105
[0653]	<211> 60
[0654]	<212> DNA
[0655]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0656]	<400> 105
[0657]	tcttacagag tcagttatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaatttc 60
[0658]	<210> 106
[0659]	<211> 60
[0660]	<212> DNA
[0661]	<213> 人工序列(artificial sequence)
[0662]	<400> 106

[0663] tcttacagag ccagttatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaatttc 60
[0664] <210> 107
[0665] <211> 61
[0666] <212> DNA
[0667] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0668] <400> 107
[0669] gtcttacaga gacagttatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0670] c 61
[0671] <210> 108
[0672] <211> 59
[0673] <212> DNA
[0674] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0675] <400> 108
[0676] ctggactctc accagatcta caacagtaga aattccctat agtgagtcgt attaatttc 59
[0677] <210> 109
[0678] <211> 61
[0679] <212> DNA
[0680] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0681] <400> 109
[0682] cacagacagg caattctatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0683] c 61
[0684] <210> 110
[0685] <211> 61
[0686] <212> DNA
[0687] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0688] <400> 110
[0689] cacagacaga caattctatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt 60
[0690] c 61
[0691] <210> 111
[0692] <211> 68
[0693] <212> DNA
[0694] <213> 人工序列(artificial sequence)
[0695] <400> 111
[0696] tcgcgcttgt cgcgcagacg aatgatctac aacagtagaa attccctata gtgagtcgta 60
[0697] ttaatttc 68

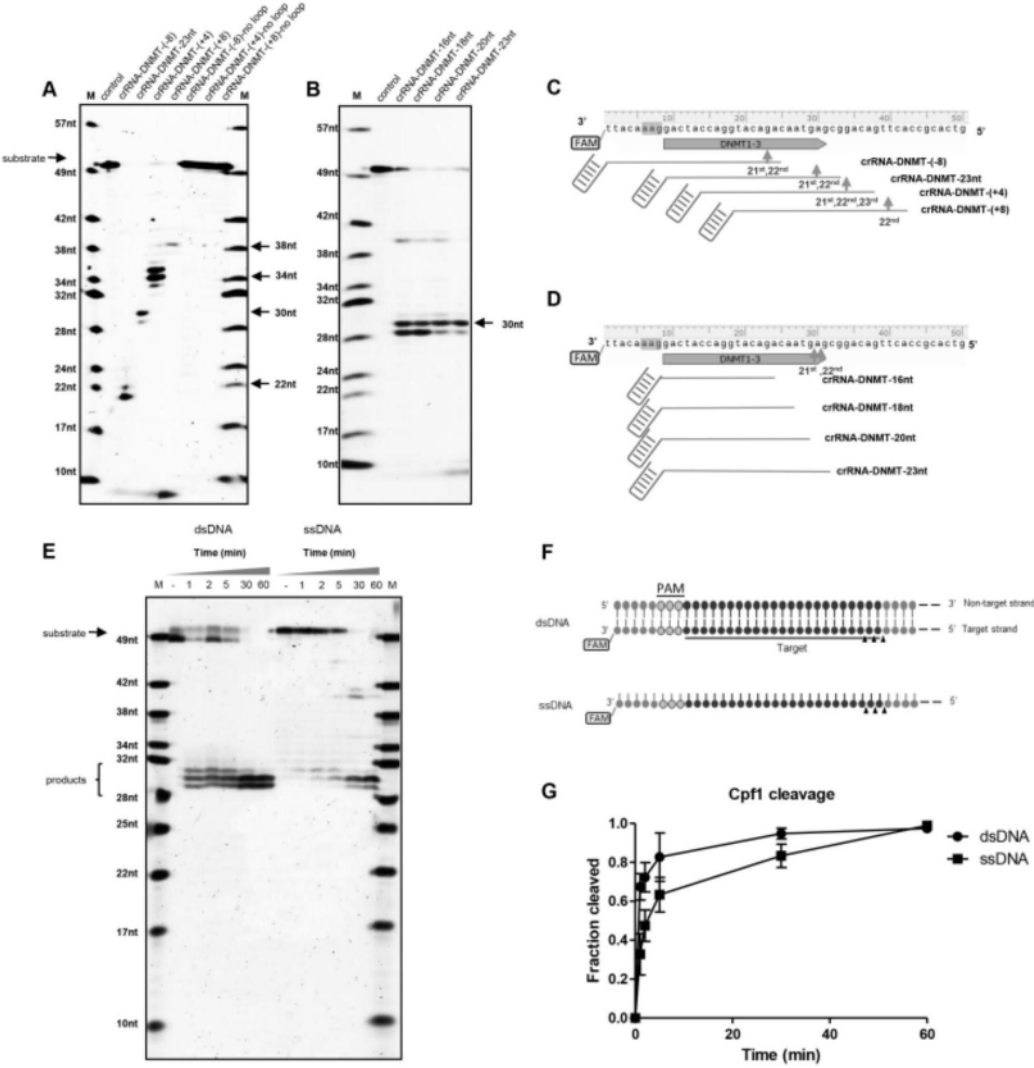


图1

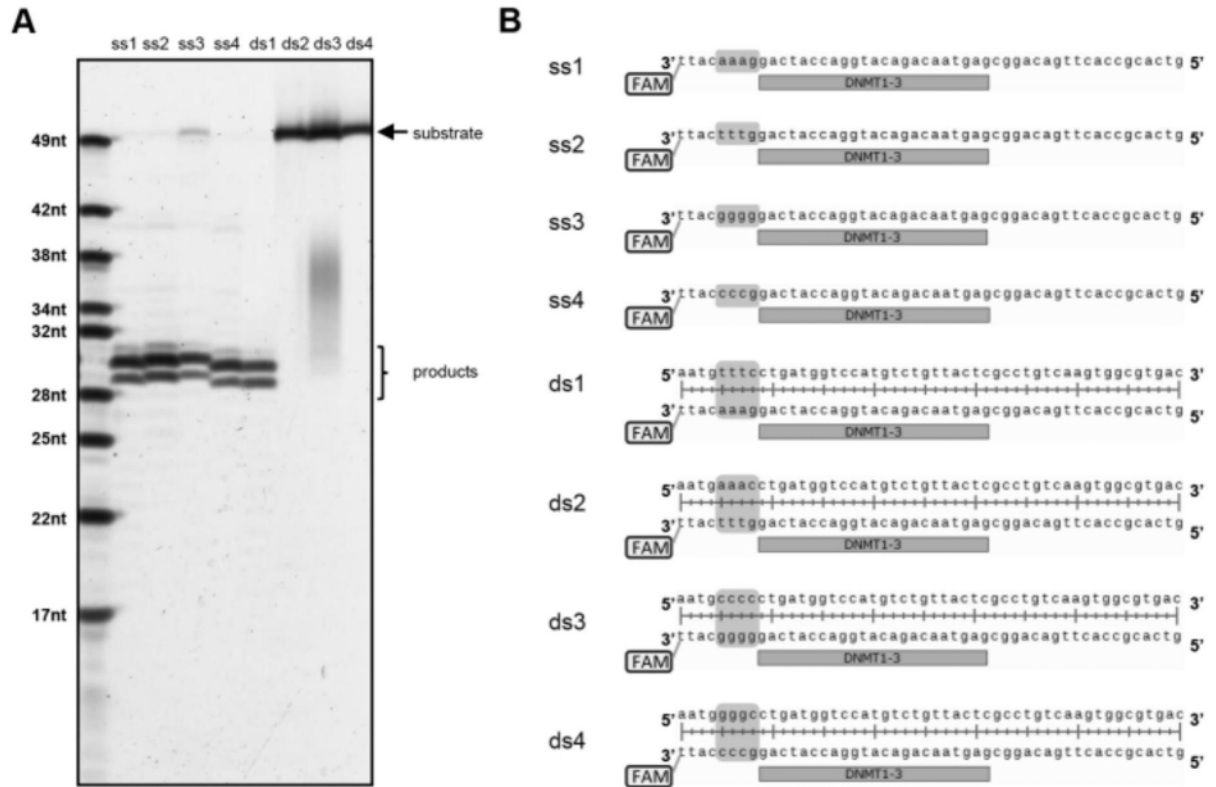


图2

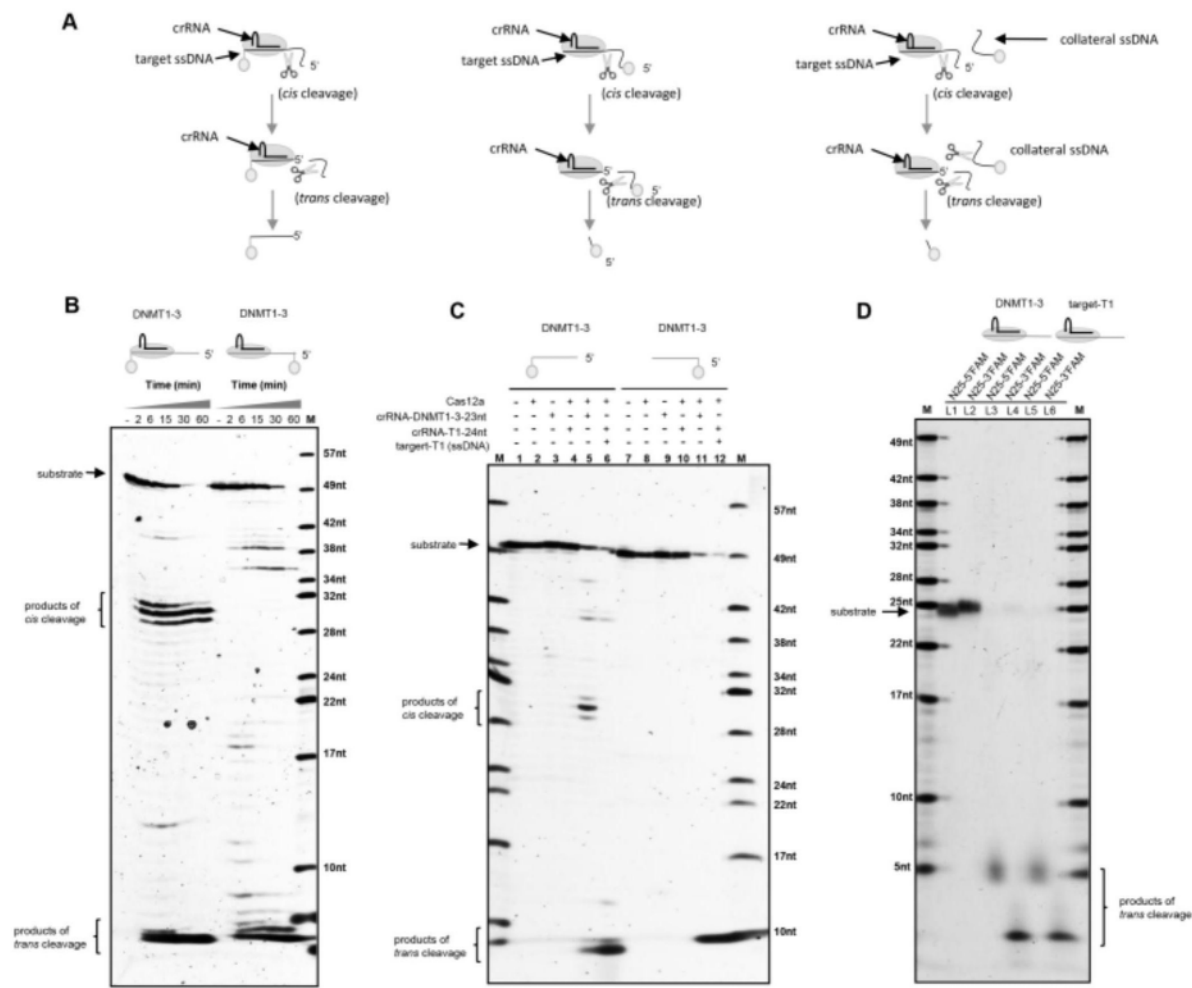


图3

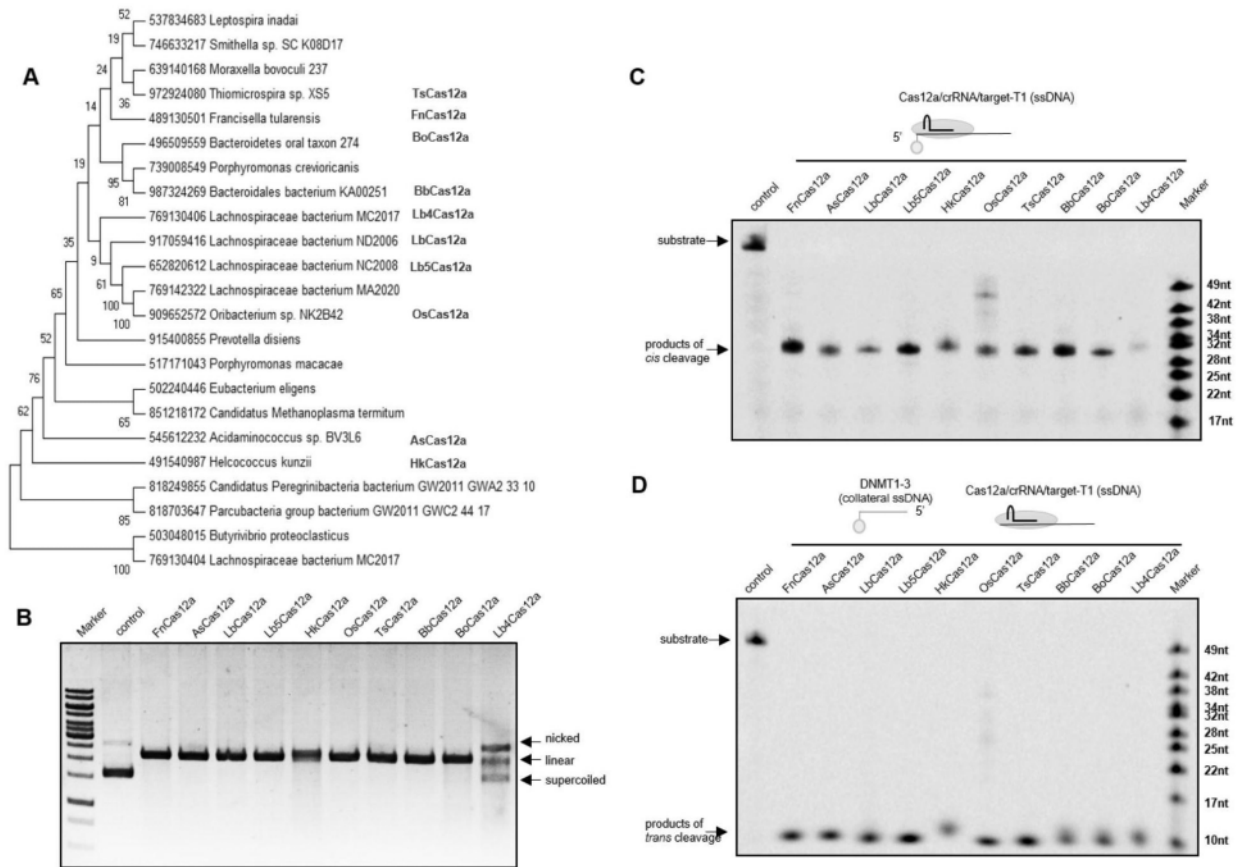


图4

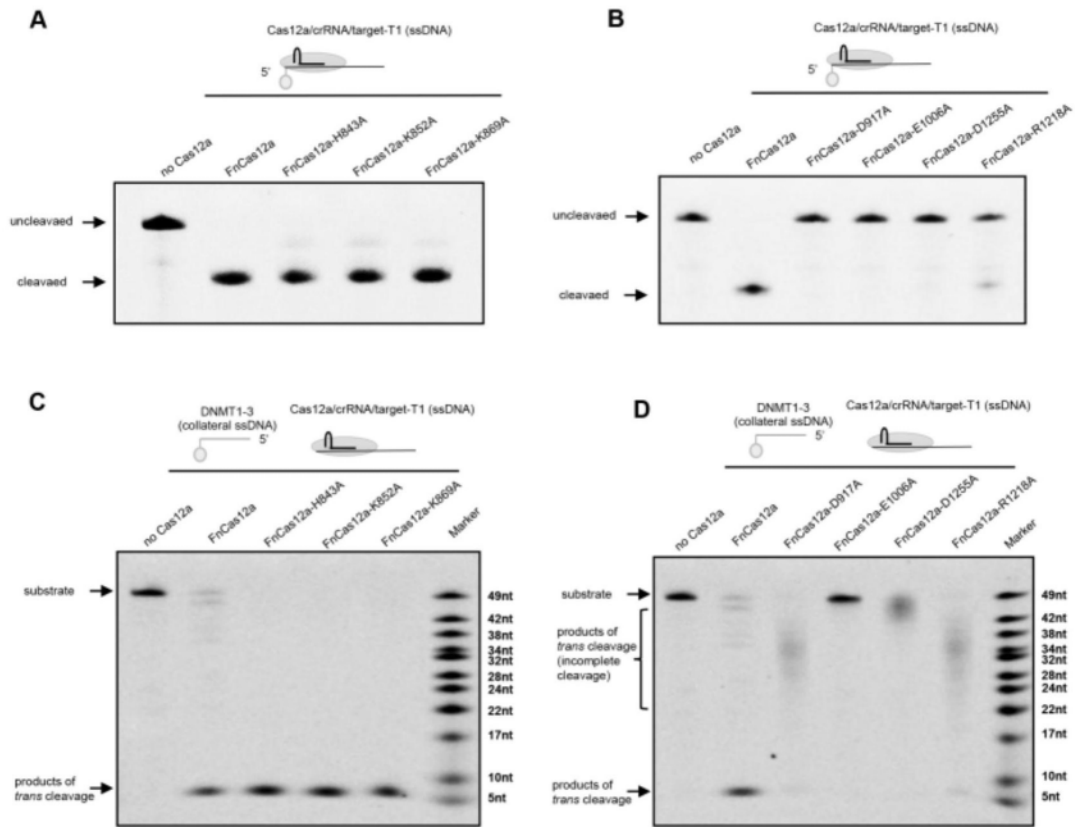


图5

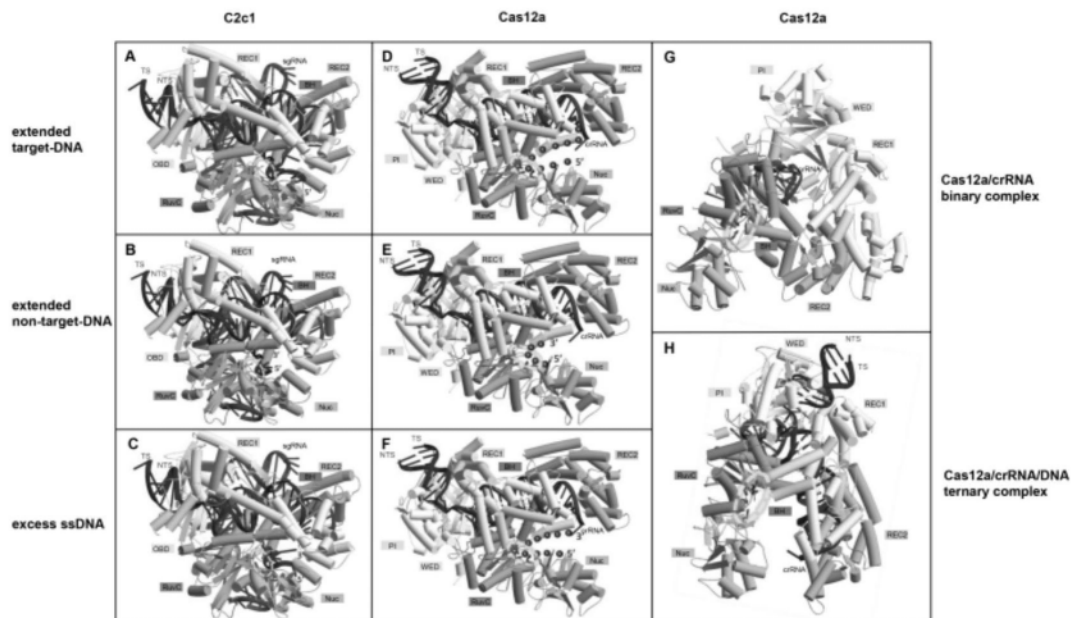


图6

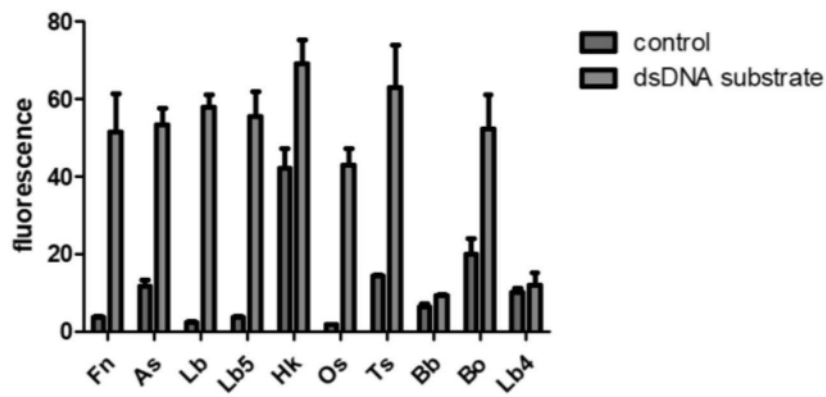


图7

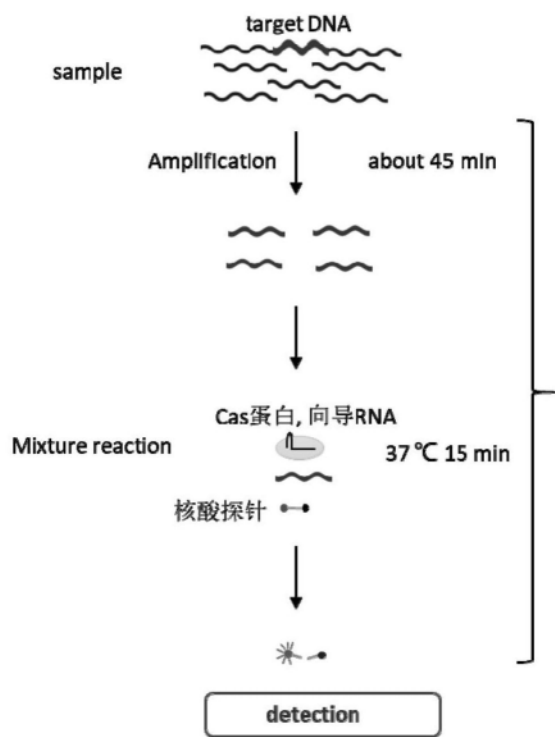


图8

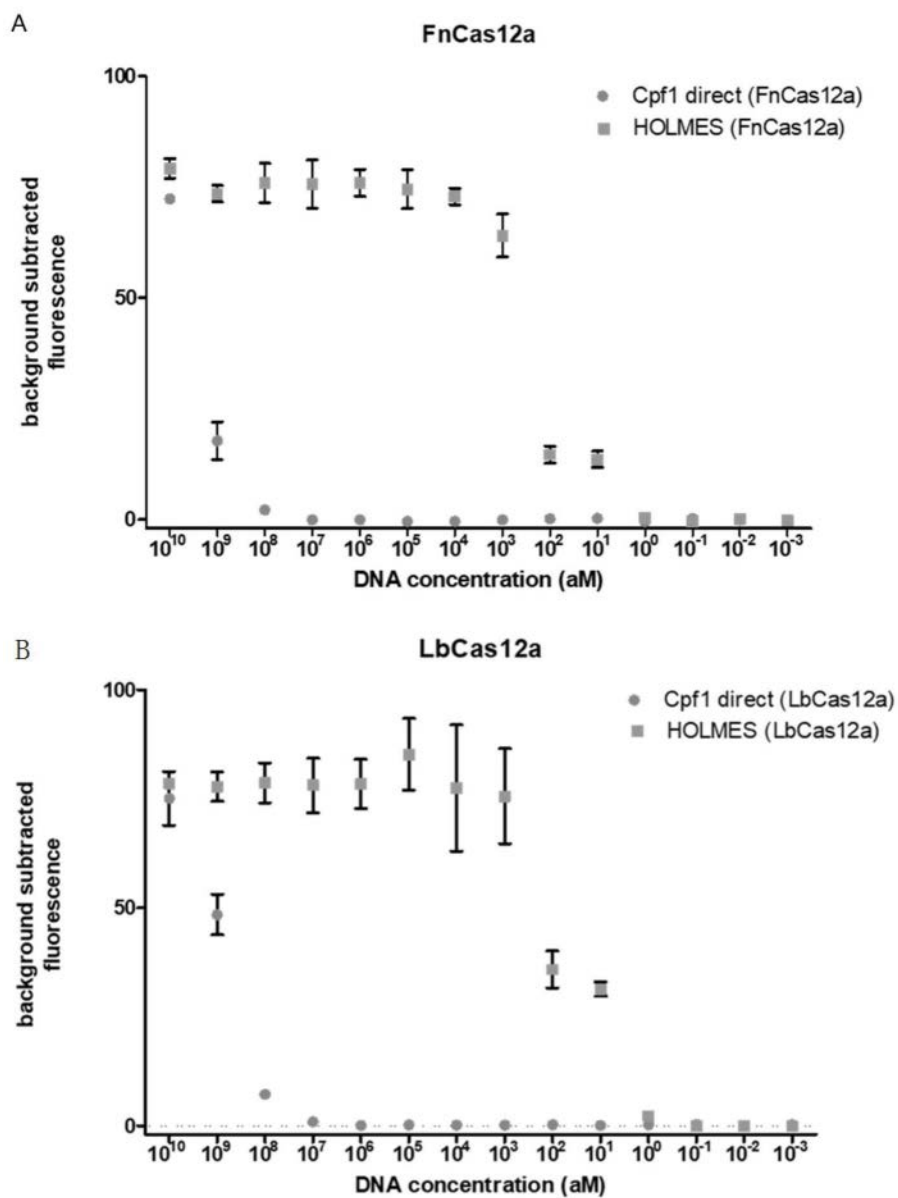


图9

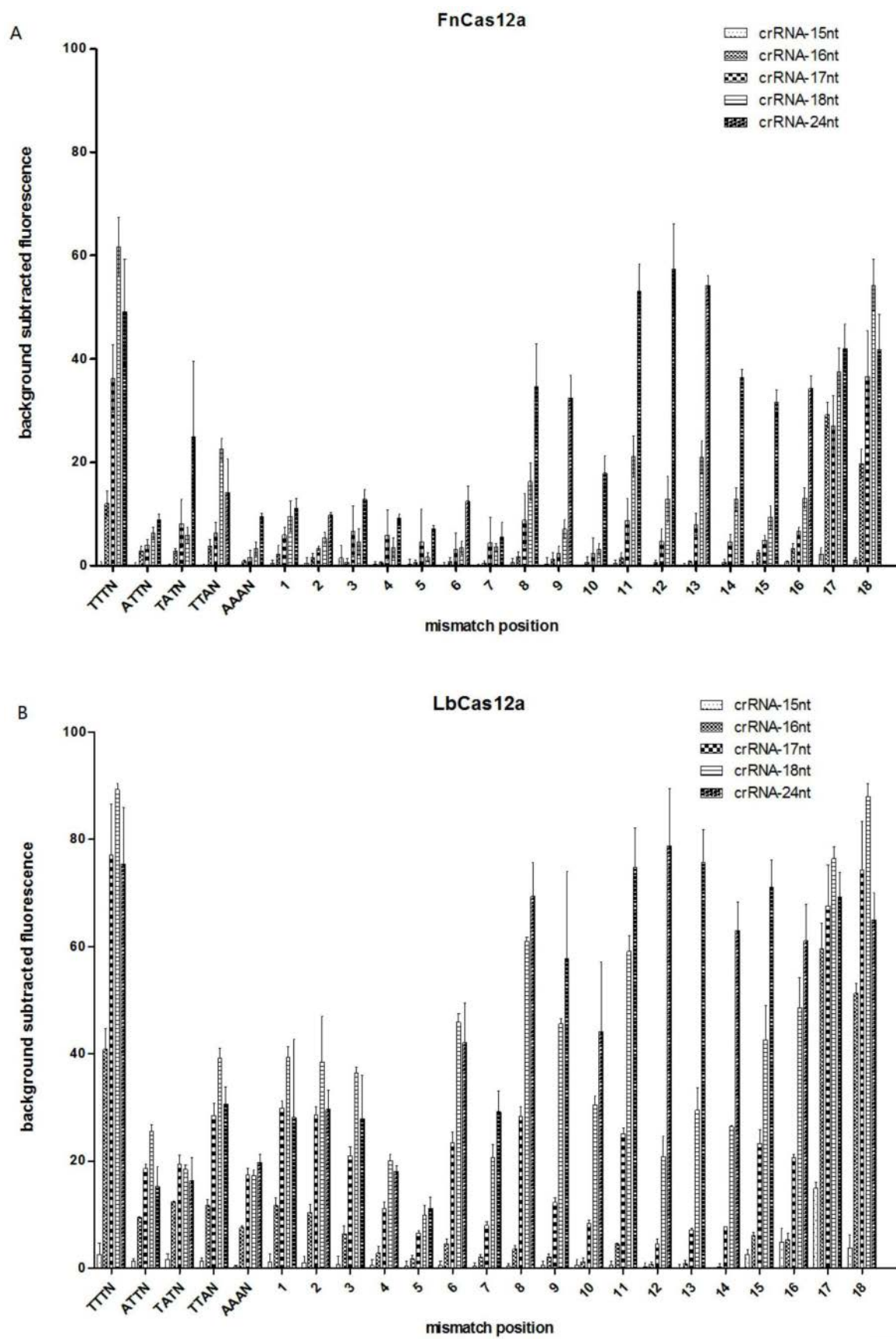


图10

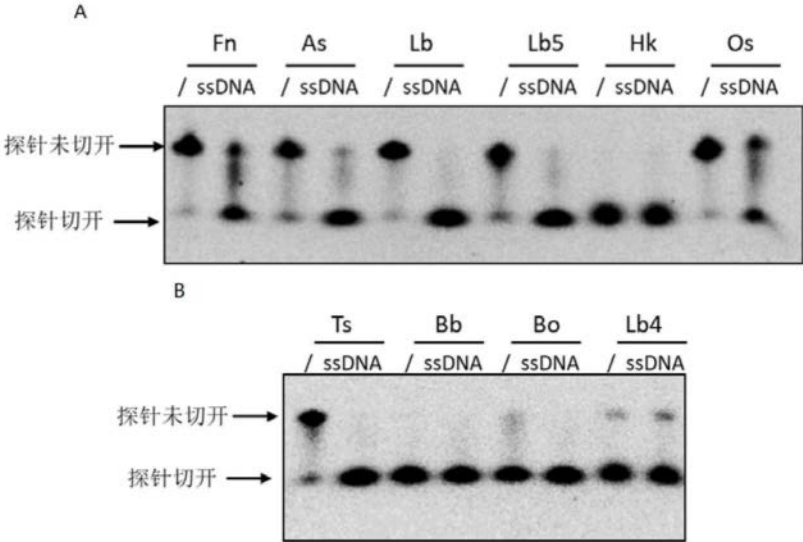


图11

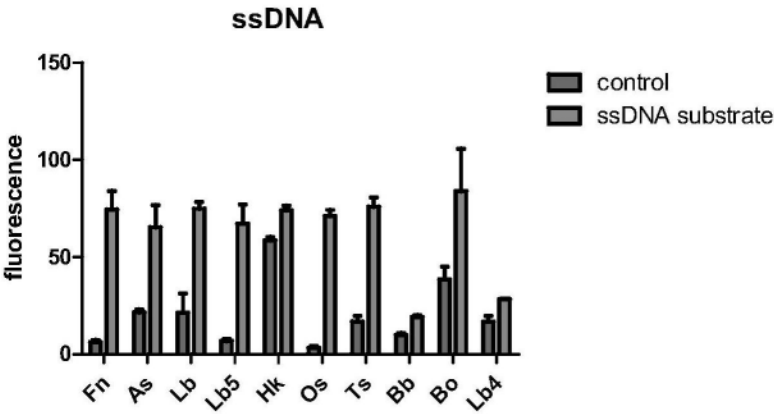


图12

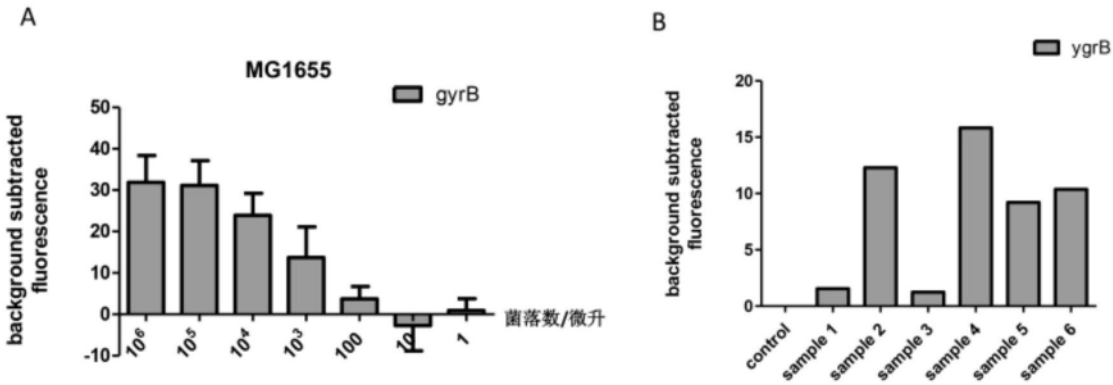


图13

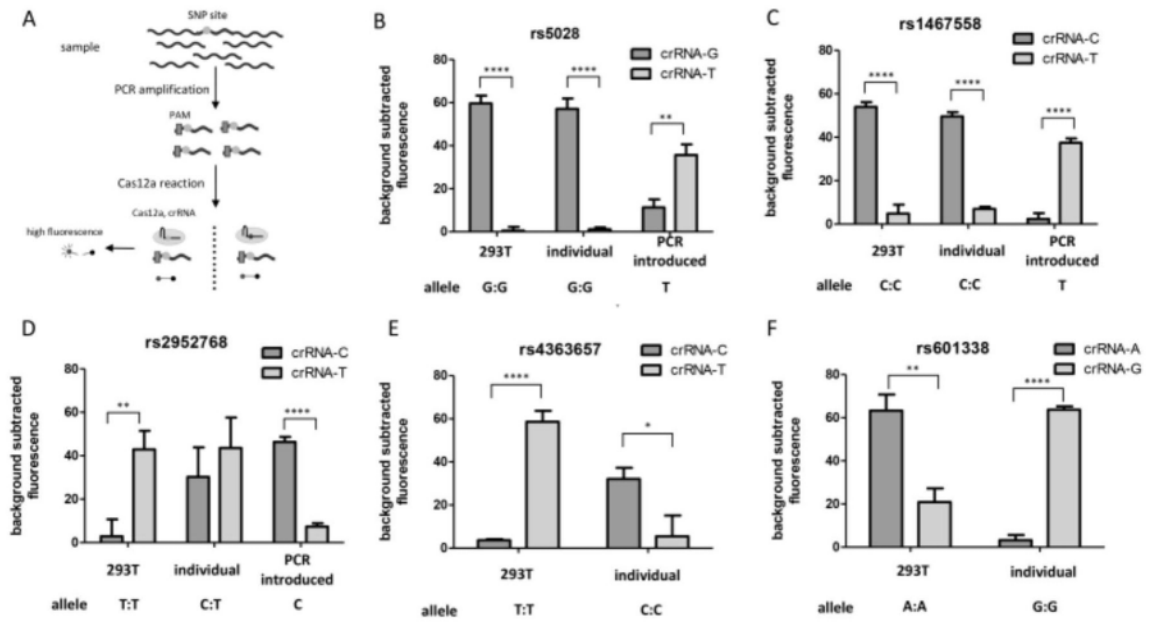


图14

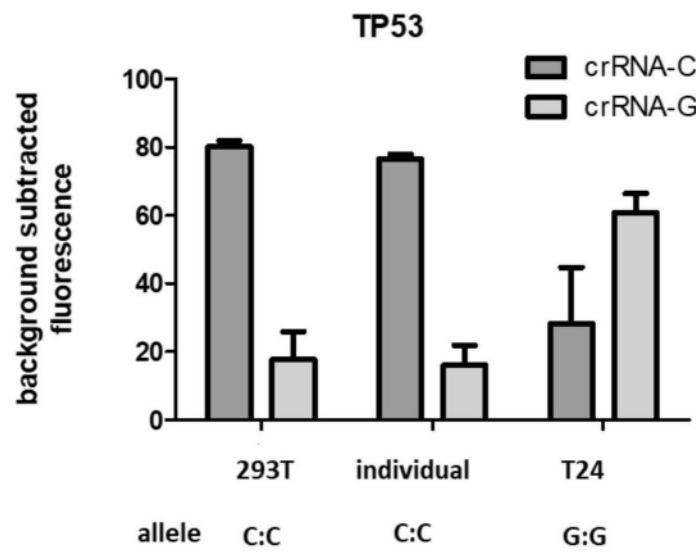


图15

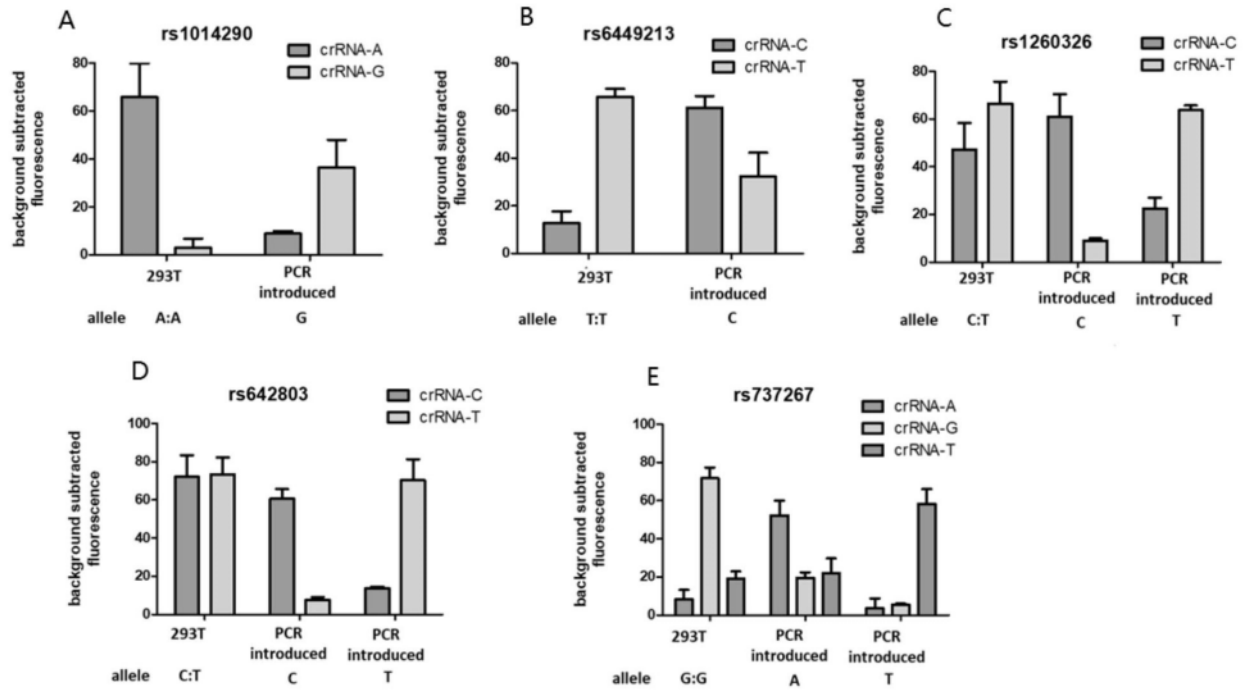


图16

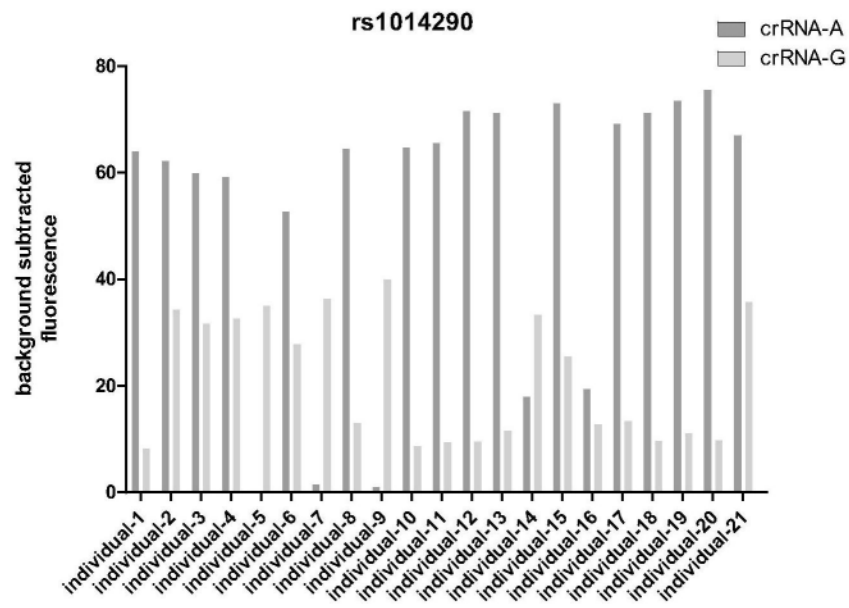


图17