



등록특허 10-2822761



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월19일
(11) 등록번호 10-2822761
(24) 등록일자 2025년06월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6816 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6816 (2018.05)
C12Q 2563/107 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7003220
(22) 출원일자(국제) 2018년04월12일
심사청구일자 2021년04월08일
(85) 번역문제출일자 2020년02월03일
(65) 공개번호 10-2020-0035956
(43) 공개일자 2020년04월06일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/082769
(87) 국제공개번호 WO 2019/011022
국제공개일자 2019년01월17일
(30) 우선권주장
201710573752.0 2017년07월14일 중국(CN)

- (56) 선행기술조사문헌
WO2016123243 A1
WO2017066588 A2
Jonathan S. Gootenberg et al., Science, 356,
p.438-442, 2017.*
Shi-Yuan Li et al., Cell Research 28,
p.491-493, 2018년3월12일.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

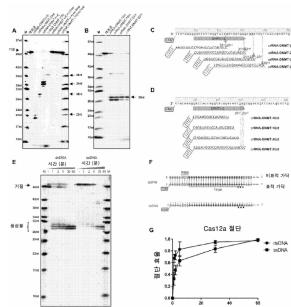
전체 청구항 수 : 총 45 항

심사관 : 이재영

- (54) 발명의 명칭 CAS 단백질의 용도, 표적 핵산 분자를 검출하는 방법, 및 키트

(57) 요 약

본 발명은 Cas 단백질의 용도, 표적 핵산 분자를 검출하는 방법 및 키트를 제공한다. 표적 핵산 분자를 검출하는 방법은 검출될 표적 핵산 분자를 함유하는 반응 시스템에 가이드 RNA, Cas12a 및 핵산 프로브를 첨가하는 단계, 및 반응이 완료된 후 핵산 프로브를 검출하는 단계를 포함한다.

대 표 도

(72) 발명자

리 시유안

중국, 상하이 200031, 쑤후이 디스트릭트, 320 위
양 로드

리 샤오안

중국, 상하이 201899, 지아딩 디스트릭트, 주유안
뉴 에어리어, 레인 588 슈핑 로드, 넘버 51, 룸
3012

리 린시안

중국, 상하이 200031, 쑤후이 디스트릭트, 320 위
양 로드

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

표적 핵산 분자를 포함하는 시스템에, 가이드 RNA, Cas 단백질, 핵산 프로브 및 완충 용액을 첨가하는 단계; 및 이어서 핵산 프로브의 절단을 검출하는 단계를 포함하는, 표적 핵산 분자의 검출 방법으로서,

상기 Cas 단백질이 Cas12 단백질이고, 상기 핵산 프로브가 단일 가닥 DNA를 포함하고, 상기 표적 핵산 분자가 표적 DNA이고, 상기 Cas 단백질이 부차적인(collateral) 단일 가닥 DNA 절단 활성을 가지는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Cas 단백질이 RuvC 도메인을 갖는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 가이드 RNA는 Cas 단백질이 표적 핵산 분자에 특이적으로 결합하도록 안내하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 검출 가능한 표지를 운반하는 단일 가닥 DNA를 포함하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 증폭되는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 Cas12 단백질이 FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a 및 Cas12b(즉, C2c1)로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 핵산 프로브를 검출하는 단계는 형광 검출 방법을 포함하는 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 형광 표지를 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 5' 말단에 형광 그룹 HEX 및 3' 말단에 렌칭 그룹 BHQ1을 포함하는 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 표적 핵산 분자를 증폭하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자를 증폭하는 단계가 PCR 증폭, LAMP 증폭, RPA 증폭, 리가아제 연쇄 반응, 분자 DNA 증폭, NASBA(Nucleic acid sequence based amplification), SDA(Strand displacement amplification), 전사 매개 증폭, 롤링 서클 증폭, HDA(Helicase-dependent amplification), SPIA(Single primer isothermal amplification), NEAR(Nicking and extension amplification reaction), TMA(Transcription-mediated amplification) 또는 SMAP2(Smart amplification process version 2)를 포함하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 프라이머를 사용하여 증폭되고, 적어도 하나의 프라이머가 프로토스페이서-인접 모티프(PAM) 서열을 포함하는 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 병원체에서만 발견되는 서열을 포함하는 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 인간 또는 다른 종의 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 부위를 포함하는 방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 유전자 변이를 포함하는 방법.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 15 nt, 16 nt 또는 17 nt 길이의 crRNA를 포함하는 방법.

청구항 17

- (a) Cas 단백질;
 - (b) 표적 핵산 분자;
 - (c) Cas 단백질이 표적 핵산 분자에 특이적으로 결합하도록 안내하는 가이드 RNA; 및
 - (d) 단일 가닥 DNA를 포함하는 핵산 프로브
- 를 포함하는 검출 시스템으로서,

상기 Cas 단백질이 Cas12 단백질이고, 상기 표적 핵산 분자가 표적 DNA이고, 상기 Cas 단백질이 부차적인 (collateral) 단일 가닥 DNA 절단 활성을 가지는, 검출 시스템.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 Cas 단백질이 RuvC 도메인을 갖는 검출 시스템.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 검출 가능한 표지를 포함하는 검출 시스템.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 Cas12 단백질이 FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a 및 Cas12b(즉, C2c1)로 이루어진 군에서 선택되는 검출 시스템.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 Cas12 단백질이 LbCas12a인 검출 시스템.

청구항 22

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 형광 표지를 포함하는 검출 시스템.

청구항 23

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 5' 말단에 형광 그룹 HEX 및 3' 말단에 퀸치 그룹 BHQ1을 포함하는 검출 시스템.

청구항 24

제17항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 증폭되는 검출 시스템.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 PCR 증폭, LAMP 증폭, RPA 증폭, 리가아제 연쇄 반응, 분지 DNA 증폭, NASBA(Nucleic acid sequence based amplification), SDA(Strand displacement amplification), 전사 매개 증폭, 룰링 서클 증폭, HDA(Helicase-dependent amplification), SPIA(Single primer isothermal amplification), NEAR(Nicking and extension amplification reaction), TMA(Transcription-mediated amplification) 및 SMAP2(Smart amplification process version 2)로 이루어진 군에서 선택되는 방법에 의해 증폭되는 검출 시스템.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 프라이머를 사용하여 증폭되고, 적어도 하나의 프라이머가 프로토스페이서-인접 모티프(PAM) 서열을 포함하는 검출 시스템.

청구항 27

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 가이드 RNA의 결합 부위의 업스트림 또는 다운스트림에 프로토스페이서-인접 모티프(PAM) 서열을 포함하는 검출 시스템.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 PAM 서열이 가이드 RNA의 표적 부위의 -20 nt 내지 +20 nt의 업스트림 또는 다운스트림에 있는 검출 시스템.

청구항 29

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 병원체에서만 발견되는 서열을 포함하는 검출 시스템.

청구항 30

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 인간 또는 다른 종의 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 부위를 포함하는 검출 시스템.

청구항 31

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 유전자 변이를 포함하는 검출 시스템.

청구항 32

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 15 nt, 16 nt 또는 17 nt 길이의 crRNA를 포함하는 검출 시스템.

청구항 33

제17항 또는 제18항에 있어서, 완충제를 추가로 포함하는 검출 시스템.

청구항 34

- i) 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성을 갖는 Cas 단백질을 포함하는 제1 용기;
- ii) 선택적인 제2 용기로서, Cas 단백질이 표적 핵산 분자에 특이적으로 결합하도록 안내하는 가이드 RNA를 포함하는 제2 용기;
- iii) 핵산 프로브를 포함하는 제3 용기; 및
- iv) 선택적인 제4 용기로서, 완충제를 포함하는 제4 용기

를 포함하는 키트로서, 상기 Cas 단백질이 Cas12 단백질이고, 상기 표적 핵산 분자가 표적 DNA이고, 상기 핵산

프로브가 단일 가닥 DNA를 포함하는 키트.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 Cas12 단백질이 FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a 및 Cas12b(즉, C2c1)로 이루어진 군에서 선택되는 키트.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 Cas12 단백질이 LbCas12a인 키트.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 형광 표지를 포함하는 키트.

청구항 38

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 프로브가 5' 말단에 형광 그룹 HEX 및 3' 말단에 펜칭 그룹 BHQ1을 포함하는 키트.

청구항 39

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가이드 RNA가 15 nt, 16 nt 또는 17 nt 길이의 crRNA를 포함하는 키트.

청구항 40

Cas 단백질, 가이드 RNA, 및 핵산 프로브를 포함하는, 표적 핵산 분자 검출용 검출 시약 또는 키트의 제조를 위한 조성물로서, 상기 Cas 단백질은 Cas12 단백질이고, 상기 핵산 프로브는 단일 가닥 DNA를 포함하고, 상기 Cas 단백질은 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성을 가지고, 상기 표적 핵산 분자는 표적 DNA인, 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 Cas12 단백질이 FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a 및 Cas12b(즉, C2c1)로 이루어진 군에서 선택되는 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 Cas12 단백질이 LbCas12a인 조성물.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 병원체에서만 발견되는 서열을 포함하는 조성물.

청구항 44

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 인간 또는 다른 종의 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP) 부위를 포함하는 조성물.

청구항 45

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 핵산 분자가 유전자 변이를 포함하는 조성물.

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 생명 공학 분야, 특히 표적 핵산 분자를 검출하는 방법에 속한다.

배경 기술

[0002]

특정 핵산 검출 방법은 병원체 검출, 유전자 질환 검출 등과 같은 중요한 응용 가치를 갖는다. 병원체 검출의 측면에서, 각각의 병원체 미생물은 고유한 특징적인 핵산 분자 서열을 가지므로, 식품 안전, 환경 미생물 오염 검출, 인간 병원체 감염 등의 분야에서 큰 의미를 갖는, 핵산 진단 (NAD)이라고도 하는 특정 종에 대한 핵산 분자 검출을 개발할 수 있다. 다른 측면은 인간 또는 다른 종에서 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)의 검출이다. 계놈 수준에서 유전자 변이와 생물학적 기능 사이의 관계를 이해하는 것은 현대 분자 생물학에 대한 새로운 관점을 제공한다. SNP는 생물학적 기능, 진화 및 질환과 밀접한 관련이 있으므로, SNP 검출 및 분석 기술의 개발이 특히 중요하다.

[0003]

현재, 주로 특정 DNA 분자의 검출을 위한, 많은 NAD 방법이 확립되었으며, 또한 RNA 분자에 대한 여러 방법이 있다. 일반적으로, DNA 분자는 매우 안정적이므로, 시험 샘플은 일련의 복잡한 생물학적 샘플로부터 나올 수 있는 반면; RNA는 매우 분해되기 쉬우므로, 주의해서 다루어야 한다. 1970년대에, 제한 엔도뉴클레아제 소화를 이용한 검출 방법이 확립되었다. 이후, 핵산 분자의 특이적 검출을 위해 서던, 노던 및 점 블롯 혼성화와 같은 방법이 개발되었다. 1985년에, PCR이 관습적인 실험 방법이 되었을 때, 분자 생물학의 기하 급수적 개선으로 유도하였다. 현재 확립된 특이적 핵산 분자 검출은 대개 두 단계로 수행될 필요가 있으며, 첫 번째 단계는 표적 핵산의 증폭이고, 두 번째 단계는 표적 핵산의 검출이다. PCR 기술은 처음으로 확립되어 현재 가장 일반적으로 사용되는 증폭 방법이다. 현재, PCR 방법에 기초하여, 형광 표지된 프로브가 도입되어, 표적의 증폭 상황을 실시간으로 검출할 수 있으며, 이를 실시간 PCR이라 한다. 실시간 PCR은 빠르고 민감한 검출 방법 일뿐만 아니라 정량 분석 방법이기도 하다. PCR 증폭 방법에 더하여, 리가아제 연쇄 반응, 분지 DNA 증폭, NASBA, SDA, 전사 매개 증폭, 루프 매개 증폭 (LAMP), 롤링 서클 증폭 (RCA), 재조합 효소 증폭 효소 증폭 (RPA) 등과 같은 다수의 대안적인 방법이 확립되어 있다. 이러한 많은 대안적 방법의 이점은 등온성이다. 즉, PCR에 사용된 것과 같은 열 순환 기구가 필요하지 않고, 반응을 완료하기 위해 단지 하나의 온도만 필요하다. 핵산 검출 방법 중, 증폭 및 검출을 직접 완료할 수 있는 실시간 PCR 외에, FISH (제자리 형광 혼성화(Fluorescence in situ hybridization)) 기술이 가장 일반적으로 사용되는 검출 방법 - 표지된 분자 프로브가 상보적인 표적 서열과 제자리 혼성화되는 방법이다. 또한, 차세대 서열 분석 기술 및 옥스포드 나노포어 서열 분석 기술과 같은 검출 방법도 개발되었지만, 이러한 방법은 일반적으로 고가의 실험 장비를 필요로 한다.

[0004]

SNP의 검출은 또한 추가 검출을 위한 충분한 SNP 부위-함유 영역 단편을 수득하기 위해, 먼저 PCR 등과 같은 방법에 의한 증폭을 필요로 한다. 일반적으로 사용되는 방법에는 프라이머 연장, 혼성화, 결찰 및 효소 절단이 포함된다. 상기 방법이 완료되면, 질량 분석 검출, 형광 검출, 화학 발광 검출 등과 같은 특정 방법이 검출에 이

용될 필요가 있다.

[0005] 전술한 바와 같이 핵산 검출을 위해 많은 검출 방법이 개발되어 왔지만, 특정 경우에, 보다 신속하고 간단하게 및 더욱 저렴하게 검출하는 방법이 현장에서 병원성 박테리아의 신속한 검출, 약물에 민감한 SNP 등의 신속한 검출과 같은 여전히 중요한 개발 방향이다. 2016년에 Collins 등은 표적 서열을 특이적으로 인식하고 절단하는 CRISPR-Cas9의 특성에 기초하여 지카 바이러스를 검출하는 신속하고 저렴한 방법을 개발하였다. 2017년에, Feng Zhang 등은 CRISPR-Cas13a의 "부차적인 효과"의 특징을 이용하여 신속한 핵산 검출 방법을 확립하였다. "부차적인 효과"는 Cas13a가 특정 표적 RNA에 결합한 후 다른 비표적 RNA를 무작위로 절단한다는 것을 의미하고 (여기서 RNA 문자는 RNA 형광 보고 시스템으로 설계됨); 신속한 표적 RNA 검출은 등온 증폭 기술 RPA와 결합하여 실현되며: 그리고 Feng Zhang 팀은 이 탐지 방법을 SHERLOCK (특이적 고감도 효소 리포터 추적 해제 (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing)이라고 칭하였다. SHERLOCK 방법은 RNA 주형에 대한 결합을 포함하므로, DNA 검출이 필요한 경우, DNA는 우선 검출을 위해 RNA 주형으로 전사되어야 하며; 그리고 RNA의 불안정성을 고려할 때, 이 방법은 의심할 여지없이 작동의 어려움을 증가시킬 것이다.

[0006] 2015년에, Feng Zhang 등은 일반적으로 사용되는 Cas9 단백질과 같이, RNA 유도 특이적 DNA 엔도뉴클레아제인, 새로운 CRISPR 관련 엔도프로테이나제 Cas12a (이전에 Cpf1로 공지됨)를 발견하였으며; 그러나, Cas9a와 비교하여, Cas12a는 그 자체의 특성을 가지며, 예를 들어, 이중 가닥 DNA의 특이적 절단을 안내하기 위해 crRNA만이 필요하고 끈적한 말단이 생성된다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 목적은 표적 핵산 분자를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 표적 핵산 분자를 검출하기 위한 방법에서 Cas 단백질의 용도를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 제 1 측면에서, 가이드 RNA, Cas 단백질, 핵산 프로브, 및 완충 용액을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0010] 표적 핵산 분자를 검출하는 방법은 검출하고자 하는 표적 핵산 분자를 함유하는 반응 시스템에 가이드 RNA, Cas 단백질, 핵산 프로브 및 완충 용액을 첨가한 후, 표적 핵산 (특히 형광 강도를 검출하는 방법에 의해)을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0011] 바람직하게는, Cas 단백질은 Cas12a인 또는 Cas12a의 것과 유사한 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성을 갖는 Cas 단백질이다.
- [0012] 바람직하게는, Cas 단백질은 Cas12a이다.
- [0013] Cas12a는 바람직하게는 FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, 또는 Lb4Cas12a 중 하나이다.
- [0014] 바람직하게는, Cas12a는 LbCas12a이다.
- [0015] 바람직하게는, 가이드 RNA는 Cas 단백질이 표적 DNA에 특이적으로 결합하도록 안내하는 RNA를 지칭한다.
- [0016] 다른 바람직한 양태에서, 핵산 프로브는 단일 가닥 DNA이고; 단일 가닥 DNA는 바람직하게는 형광 표지된 단일 가닥 DNA이고; 단일 가닥 DNA는 바람직하게는 5' 말단에서 형광 그룹 HEX로 표지되고 3' 말단에서 퀸치 그룹 BHQ1로 표지된 형광 프로브이다.
- [0017] 다른 바람직한 양태에서, 핵산 프로브를 검출하는 방법은 바람직하게는 형광 검출 방법이고; 형광 검출 방법은 바람직하게는 마이크로플레이트 리더 또는 형광 분광 광도계를 사용한 검출 방법이다.
- [0018] 바람직하게는, 검출된 표적 핵산 분자의 반응 시스템에서 검출된 표적 핵산 분자는 증폭 후에 수득된다.
- [0019] 바람직하게는, 본 발명의 검출 방법은 병원성 미생물, 유전자 돌연변이 또는 특정 표적 DNA를 검출하는데 사용될 수 있다.
- [0020] 다른 바람직한 양태에서, Cas 단백질은 Cas12b (C2c1)를 포함한다.
- [0021] 본 발명의 제 2 측면에서, 표적 핵산 분자를 검출하는 방법, 또는 표적 핵산 분자를 검출하기 위한 제제의 제조에서 Cas 단백질의 용도가 제공된다.

- [0022] 다른 바람직한 양태에서, 표적 DNA, 가이드 RNA 및 Cas 단백질이 3원 복합체를 형성할 때, 복합체는 시스템에서 다른 단일 가닥 DNA 분자를 절단할 것이다.
- [0023] 바람직하게는, 가이드 RNA는 Cas 단백질이 표적 DNA에 특이적으로 결합하도록 안내하는 RNA를 지칭한다.
- [0024] 본 발명의 제 3 측면에서, 가이드 RNA, Cas 단백질 및 핵산 프로브를 포함하는 키트가 제공된다.
- [0025] 다른 바람직한 양태에서, 키트는 완충 용액을 추가로 포함한다.
- [0026] 본 발명의 제 4 측면에서, 표적 핵산 분자를 검출하기 위한 검출 시스템이 제공되며, 시스템은 하기를 포함한다:
- (a) Cas12a인 또는 Cas12a의 것과 유사한 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성을 갖는 Cas 단백질인, Cas 단백질;
 - (b) Cas 단백질이 표적 핵산 분자에 특이적으로 결합하도록 안내하는 가이드 RNA; 및
 - (c) 단일 가닥 DNA인 핵산 프로브;
- [0030] 표적 핵산 분자는 표적 DNA임.
- [0031] 다른 바람직한 양태에서, 검출 시스템은 (d) 완충 용액을 추가로 포함한다.
- [0032] 다른 바람직한 양태에서, 검출 시스템은 검출될 표적 핵산 분자를 추가로 포함한다.
- [0033] 다른 바람직한 양태에서, 검출 시스템에서 검출될 표적 핵산 분자의 농도는 1 내지 100 카페/마이크로리터 또는 10^{15} 카페/마이크로리터, 바람직하게는 1 내지 10 카페/마이크로리터고, 및 더욱 바람직하게는 1 내지 5 카페/마이크로리터이다.
- [0034] 다른 바람직한 양태에서, 검출 시스템에서, 핵산 프로브 대 표적 핵산 분자의 몰 비는 $10^3:1$ 내지 $10^{14}:1$, 및 바람직하게는 $10^4:1$ 내지 $10^7:1$.
- [0035] 다른 바람직한 양태에서, 표적 핵산 분자의 검출 부위는 가이드 RNA의 PAM 서열의 1 내지 12 다운스트림 위치에 위치한다.
- [0036] 다른 바람직한 양태에서, 가이드 RNA의 길이는 15 내지 30 nt, 및 바람직하게는 15 내지 18 nt이다.
- [0037] 다른 바람직한 양태에서, 표적 DNA는 cDNA를 포함한다.
- [0038] 다른 바람직한 양태에서, 표적 DNA는 단일 가닥 DNA, 이중 가닥 DNA 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0039] 다른 바람직한 양태에서, 핵산 프로브는 형광 그룹 및 웜칭 그룹을 운반한다.
- [0040] 다른 바람직한 양태에서, 형광 그룹 및 웜칭 그룹은 각각 독립적으로 핵산 프로브의 5' 말단, 3' 말단 및 중간 부분에 위치한다.
- [0041] 다른 바람직한 양태에서, 핵산 프로브의 길이는 3 내지 300 nt, 바람직하게는 5 내지 100 nt, 보다 바람직하게는 6 내지 50 nt, 가장 바람직하게는 8 내지 20 nt이다.
- [0042] 다른 바람직한 양태에서, 표적 핵산 분자는 식물, 동물, 곤충, 미생물, 바이러스 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 유래된 표적 핵산 분자를 포함한다.
- [0043] 다른 바람직한 양태에서, 표적 DNA는 인공적으로 합성되거나 자연적으로 발생하는 DNA이다.
- [0044] 다른 바람직한 양태에서, 표적 DNA는 야생형 또는 돌연변이 DNA를 포함한다.
- [0045] 다른 바람직한 양태에서, 표적 DNA는 RNA의 역전사 또는 증폭에 의해 수득된 DNA, 예를 들어 cDNA 등을 포함한다.
- [0046] 다른 바람직한 양태에서, Cas12a는 FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 더욱 바람직하게는, Cas12a는 LbCas12a이다.
- [0047] 다른 바람직한 양태에서, Cas12a와 유사한 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성을 갖는 Cas 단백질은 Cas12b (즉,

C2c1)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0048] 다른 바람직한 양태에서, Cas12b 단백질은 AacCas12b (알리시클로바실루스 애시도테레스트리스 (*Alicyclobacillus acidoterrestris*)), Aac2Cas12b (알리시클로바실루스 애시도필루스 (*Alicyclobacillus acidiphilus*)), AkCas12b (알리시클로바실루스 카케가웬시스(*Alicyclobacillus kakegawensis*)), AmCas12b (알리시클로바실루스 매크로스포랑기두스(*Alicyclobacillus macrosporangioides*)), AhCas12b (알리시클로바실루스 헤르바리우스(*Alicyclobacillus herbarius*)), 및 AcCas12b (알리시클로바실루스 컨테미너스(*Alicyclobacillus contaminans*))로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0049] 다른 바람직한 양태에서, 핵산 프로브는 검출 가능한 표지를 운반하는 단일 가닥 DNA를 포함한다.

[0050] 다른 바람직한 양태에서, 단일 가닥 DNA는 형광 표지 및 비오틴 표지 단일 가닥 DNA이다.

[0051] 다른 바람직한 양태에서, 단일 가닥 DNA는 형광 표지된 단일 가닥 DNA이다.

[0052] 다른 바람직한 양태에서, 단일 가닥 DNA는 5' 말단에서 형광 그룹 HEX로 표지되고 3' 말단에서 퀸칭 그룹 BHQ1로 표지된 형광 프로브이다.

[0053] 본 발명의 제 5 측면에서, 표적 핵산 분자를 검출하기 위한 키트가 제공되며, 키트는 하기를 포함한다:

i) 제 1 용기 및 제 1 용기 내의 Cas 단백질, Cas12a이거나 Cas12a의 것과 유사한 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성을 갖는 Cas 단백질;

ii) 선택적인 제 2 용기 및 제 2 용기 내의 가이드 RNA, 표적 핵산 분자에 특이적으로 결합하도록 Cas 단백질을 유도하는 가이드 RNA;

iii) 제 3 용기 및 제 3 용기 내의 핵산 프로브; 및

iv) 선택적인 제 4 용기 및 제 4 용기에 위치한 완충 용액;

[0055] 표적 핵산 분자는 표적 DNA임.

[0056] 다른 바람직한 양태에서, 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 용기 중 임의의 2 개, 3 개 또는 4 개 (또는 모두)는 동일하거나 상이한 용기일 수 있다.

[0057] 다른 바람직한 양태에서, 핵산 프로브는 형광 그룹 및 퀸칭 그룹을 운반한다.

[0058] 본 발명의 제 6 측면에서, 다음 단계를 포함하는, 샘플에 표적 핵산 분자가 존재하는지 여부를 검출하는 방법이 제공된다:

[0059] (a) 본 발명의 제 4 측면에 따른 표적 핵산 분자를 검출하기 위한 검출 시스템을 제공하는 단계, 여기서 상기 검출 시스템은 검출될 샘플을 추가로 포함하고; 및

[0060] (b) 검출 시스템에서 핵산 프로브가 Cas 단백질에 의해 절단되는지를 검출하는 단계, 여기서 상기 절단은 부차적인 단일 가닥 DNA의 트랜스-절단이고;

[0061] 핵산 프로브가 Cas 단백질에 의해 절단되면, 이는 샘플에서 표적 핵산 분자의 존재를 나타내고; 핵산 프로브가 Cas 단백질에 의해 절단되지 않으면, 이는 샘플에서 표적 핵산 분자의 부재를 나타냄.

[0062] 다른 바람직한 양태에서, 검출될 샘플은 증폭되지 않은 샘플 및 증폭된 (또는 핵산 증폭된) 샘플을 포함한다.

[0063] 다른 바람직한 양태에서, 검출될 샘플은 증폭에 의해 얻어진 샘플이다.

[0064] 다른 바람직한 양태에서, 핵산 증폭 방법은 PCR 증폭, LAMP 증폭, RPA 증폭, 리가아제 연쇄 반응, 분지 DNA 증폭, NASBA, SDA, 전사 매개 증폭, 롤링 서클 증폭, HAD, SPIA, NEAR, TMA 및 SMAP2로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0065] 다른 바람직한 양태에서, PCR은 고온 PCR, 상온 PCR 및 저온 PCR을 포함한다.

[0066] 다른 바람직한 양태에서, 방법은 SNP, 점 돌연변이, 결실 및/또는 삽입이 표적 부위에서 핵산에 존재하는지 여부를 검출하는데 사용된다.

[0067] 다른 바람직한 양태에서, 표적 부위의 업스트림 및 다운스트림 (-20 nt 내지 +20 nt 범위, 바람직하게는 -15 nt 내지 +15 nt 범위, 더욱 바람직하게는 -10 nt 내지 +10 nt 범위)이 PAM 서열이 결여된 경우, 핵산 증폭은 PAM-

도입 프라이머를 사용하여 수행된다.

[0071] 다른 바람직한 양태에서, PAM 도입 프라이머는 5'-3'에서 식 I의 구조를 갖는다:

[0072] P1-P2-P3 (I)

[0073] 식 중,

[0074] P1은 5' 말단에 위치하며 표적 핵산 분자의 서열에 상보적이거나 비-상보적인 5' 세그먼트 서열이고;

[0075] P2는 PAM 서열이며;

[0076] P3은 3' 말단에 위치하며 표적 핵산 분자의 서열에 상보적인 3' 세그먼트 서열임.

[0077] 다른 바람직한 양태에서, PAM 프라이머는 표적 핵산 분자의 업스트림 또는 다운스트림에 특이적으로 결합한다.

[0078] 다른 바람직한 양태에서, P1은 0 내지 20 nt의 길이를 갖는다.

[0079] 다른 바람직한 양태에서, P3는 5 내지 20 nt의 길이를 갖는다.

[0080] 다른 바람직한 양태에서, PAM 프라이머는 18 내지 50 nt, 바람직하게는 20 내지 35 nt의 길이를 갖는다.

[0081] 다른 바람직한 양태에서, 보충성은 완전한 보충성 및 부분적 보충성을 포함한다.

[0082] 다른 바람직한 양태에서, PAM 서열을 함유하는 적어도 하나의 프라이머가 핵산 증폭에 사용된다.

[0083] 다른 바람직한 양태에서, 표적 부위의 업스트림 및 다운스트림 (-20 nt 내지 +20 nt 범위, 바람직하게는 -15 nt 내지 +15 nt 범위, 더욱 바람직하게는 -10 nt 내지 +10 nt 범위)가 PAM 서열을 함유하는 경우, PAM 서열을 함유하거나 함유하지 않는 프라이머가 사용될 수 있으며, 증폭된 증폭 생성물은 PAM 서열을 함유한다.

[0084] 다른 바람직한 양태에서, 단계 (b)에서의 검출은 형광 검출 방법을 포함한다.

[0085] 다른 바람직한 양태에서, 형광 검출 방법은 검출을 위해 마이크로플레이트 리더 또는 형광 분광 광도계를 사용한다.

[0086] 본 발명의 제 7 측면에서, 부차적인 단일 가닥 DNA 절단에 기초하여 표적 핵산 분자를 검출하기 위한 검출 시약 또는 키트의 제조에서 Cas 단백질의 용도가 제공되며, 여기서 Cas 단백질은 Cas12a이거나 Cas12a의 것과 유사한 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성을 갖는 Cas 단백질이다.

[0087] 다른 바람직한 양태에서, Cas12a는 FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 더욱 바람직하게는, Cas12a는 LbCas12a이다.

[0088] 다른 바람직한 양태에서, Cas12a와 유사한 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성을 갖는 Cas 단백질은 Cas12b (또는 C2c1)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0089] 다른 바람직한 양태에서, Cas12b 단백질은 AacCas12b로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0090] 본 발명의 범위 내에서, 본 발명의 상기 언급된 기술적 특징 및 하기에 (예를 들어, 실시예에서) 상세하게 기술된 기술적 특징은 서로 조합되어 새로운 또는 바람직한 기술 해결책을 형성할 수 있음을 이해해야 한다. 길이에 의해 제한되므로, 여기서 더 이상 반복되지 않을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0091] 도 1은 표적 단일 가닥 DNA를 절단할 때 Cas12a의 시스 절단 특징을 나타낸다.

도 2는 표적 단일 가닥 DNA를 절단할 때, Cas12a가 이중 가닥을 절단하는데 필요한 PAM 서열에 의존하지 않음을 보여준다.

도 3은 단일 가닥 DNA를 절단할 때, Cas12a의 트랜스 절단 특징을 나타낸다.

도 4는 10 개의 상이한 공급원으로부터의 시험 Cas12a를 나타내며, 이를 Cas12a 모두 단일 가닥 DNA 상에서 시스-절단 및 트랜스-절단 활성을 갖는다.

도 5는 Cas12a의 단일-부위 돌연변이 실험을 통해 Cas12a의 단일 가닥 DNA 상에서 시스-절단 및 트랜스-절단 활

성과 관련이 있을 수 있는 부위를 확인한다.

도 6은 Cas12a 및 Cas12b (즉, C2c1) 단량체의 구조 및 가이드 RNA 및 표적 DNA와의 복합체를 나타낸다.

도 7은 형광 검출 프로브로서 특정 이중 가닥 DNA 기질 및 단일 가닥 DNA (HEX-N12-BHQ1)를 사용하여 상이한 Cas12a에 의해 수득된 형광 값을 나타낸다. 음성 대조군은 특정 기질이 첨가되지 않았다.

도 8은 부차적인 단일 가닥 DNA상에서 표적 DNA 증폭 및 Cas12a의 트랜스-절단 활성에 기초하여 표적 DNA를 검출하기 위한 HOLMES 방법의 개략적인 흐름도를 나타낸다.

도 9는 FnCas12a 또는 LbCas12a를 직접적으로, 또는 HOLMES 방법과 조합하여 사용함으로써 표적 DNA의 감도시험을 보여준다.

도 10은 FnCas12a 또는 LbCas12a와 조합된 상이한 길이의 가이드 서열의 crRNA를 사용하여 HOLMES 방법에 의해 검출된 바와 같은 상이한 단일 점 돌연변이를 갖는 표적 서열의 형광 검출 값을 나타낸다.

도 11은 FAM-표지된 형광 프로브 및 10 개의 Cas12a 단백질을 이용하여 표적 단일-가닥 DNA를 첨가한 후 FAM-표지된 단일-가닥 DNA 프로브가 트랜스-절단되는지 여부를 시험한다.

도 12는 프로브로서 HEX-N12-BHQ1 및 10 개의 Cas12a 단백질을 사용하여 표적 단일-가닥 DNA를 첨가한 후 형광 값을 시험한다.

도 13 (a)는 gyrB 유전자 단편이 표적 서열로 사용되고 상이한 농도의 순수한 배양된 대장균 MG1655가 이의 두 말단에서 HEX 및 BHQ1로 표지된 단일 가닥 DNA 형광 프로브를 사용하여 양성 대조군 주형으로서 사용될 때 HOLMES 검출 값을 나타낸다. 대장균 MG1655의 형광 반응 값은 그 농도가 감소함에 따라 감소하는 것으로 나타난다. (b) 다른 장소의 환경에서 물 샘플의 검출 값.

도 14는 SNP를 검출하기 위한 HOLMES 방법의 개략적인 흐름도, 및 5 개의 SNP 부위의 형광 검출 값을 나타낸다.

도 15는 HOLMES 방법에 의해 검출된 TP53 유전자 (암 관련 유전자)에서 주요 부위의 형광 검출 값을 나타낸다.

도 16은 HOLMES 방법에 의해 검출된 바와 같은 5 개의 SNP 부위 (통풍 관련)의 검출 값을 나타낸다.

도 17은 HOLMES 방법에 의해 검출된 바와 같은 하나의 SNP 부위 (통풍 관련)의 검출 값을 나타내며, 여기서 샘플은 21 명의 지원자로부터의 샘플이다.

도 18은 임의의 위치에서 SNP의 HOLMES 검출에 사용될 수 있는, 본 발명의 하나의 예시의 프라이머 설계 계획을 나타낸다.

도 19는 시스템에서 대장균을 검출하기 위해 LAMP와 HOLMES의 조합을 사용한다. (a) LAMP에 의해 증폭된 대장균의 gyrB 유전자의 전기영동 맵. 증폭을 위해 총 2 세트의 프라이머 gyrB-1 및 gyrB-2가 사용된다. gyrB는 대장균의 특징적인 유전자이다. (b) HOLMES 검출 시스템은 LAMP의 증폭 생성물을 검출하는데 사용된다. 음성 대조군: 샘플은 멸균 수이고, gyrB-1 증폭 프라이머는 gyrB 유전자의 결과를 증폭 또는 검출하는데 사용되며; gyrB-1: 샘플은 검출될 대장균이고, gyrB 유전자 증폭 프라이머의 제 1 세트는 gyrB 유전자의 결과를 증폭 또는 검출하는데 사용되며; 및 gyrB-2: 샘플은 검출될 대장균이고, 제 2 세트의 gyrB 유전자 증폭 프라이머는 gyrB 유전자의 결과를 증폭 또는 검출하기 위해 사용된다.

도 20은 LAMP와 HOLMES의 조합을 사용하여 인간 HEK293T 세포의 유전자형을 검출한다. (a) LAMP에 의해 증폭된 인간 HEK293T 세포의 상응하는 SNP 검출 주형의 전기영동 맵. 음성 대조군: 샘플은 멸균 수이고, 결과는 rs5082 증폭 프라이머를 사용한 증폭의 결과이고; rs5082: 샘플은 인간 HEK293T 세포의 총 게놈이며, 결과는 rs5082 증폭 프라이머를 사용한 증폭 결과이고; 및 rs1467558: 샘플은 인간 HEK293T 세포의 총 게놈이고, 결과는 rs1467558 증폭 프라이머를 사용한 증폭의 결과이다. (b) HOLMES 검출 시스템은 LAMP의 증폭 생성물을 검출하는데 사용된다. rs5082 부위는 각각 crRNA-G 및 crRNA-T의 2 개의 crRNA를 사용하여 검출되었다 (서열 목록 5); 및 rs1467558 부위는 각각 crRNA-C 및 crRNA-T의 2 개의 crRNA를 사용하여 검출되었다 (서열 목록 5).

도 21은 시스템에서 대장균을 검출하기 위해 RPA 및 HOLMES의 조합을 사용한다. (a) RPA에 의한 대장균의 gyrB 유전자 증폭. 증폭을 위해 총 2 세트의 프라이머 gyrB-1 및 gyrB-2가 사용된다. gyrB는 대장균의 특징적인 유전자이다. (b) HOLMES 검출 시스템은 RPA의 증폭 생성물을 검출하는데 사용된다. 음성 대조군: 샘플은 멸균 수이고, gyrB-1 증폭 프라이머는 gyrB 유전자의 결과를 증폭 또는 검출하는데 사용되며; gyrB-1: 샘플은 검출될 대장균이고, gyrB 유전자의 결과를 증폭 또는 검출하기 위해 제 1 세트의 gyrB 증폭 프라이머가 사용되며; 및

gyrB-2: 샘플은 검출될 대장균이고, 제 2 세트의 gyrB 증폭 프라이머는 gyrB 유전자의 결과를 증폭 또는 검출하기 위해 사용된다.

도 22는 단일 가닥 DNA가 표적 DNA로서 사용될 때 Cas12b의 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성의 검출을 보여준다. 부차적인 분열 반응이 완료된 후, 반응물을 12% 우레아 변성 겔 전기영동에 의해 분리하고, 형광 이미징 시스템에 의해 검출한다. 팔호 안의 숫자는 nM 단위의 반응물의 최종 농도를 나타내며; 표적 DNA는 50 nM의 용량에서 66 nt 길이의 단일 가닥 DNA이고; 단일 가닥 DNA 프로브는 50 nM의 용량에서 5' 말단에서 FAM 표지를 운반하는 단일 가닥 DNA이다. 도면에서 확인될 수 있듯이, Cas12b, 가이드 RNA 및 표적 DNA가 함유된 후, FAM-표지된 단일 가닥 DNA는 단편으로 절단되며, 즉 Cas12b는 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성을 갖는다.

도 23은 단일 가닥 DNA 및 이중 가닥 DNA가 표적 DNA로서 사용될 때 Cas12b의 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성의 검출을 보여준다. 부차적인 절단 반응이 완료된 후, 반응물은 형광 마이크로플레이트 리더를 사용하여 검출된다. Cas12b 및 가이드 RNA의 용량은 모두 500 nM이고; 표적 DNA는 50 nM의 용량에서 66 nt 길이의 단일 가닥 DNA 또는 이중 가닥 DNA이고; 단일 가닥 DNA 프로브는 500 nM의 용량에서 형광 보고 그룹 및 퀸치 그룹을 함유하는 단일 가닥 DNA 프로브 (HEX-N12-BHQ1)이다. 도면에서 확인될 수 있듯이, 단일 가닥 DNA 주형 또는 이중 가닥 DNA 주형이 사용되는지 여부에 관계없이, Cas12b 및 가이드 RNA가 첨가된 후 부차적인 단일 가닥 DNA 절단 활성이 검출될 수 있다.

도 24는 LAMP 증폭과의 조합 후 낮은 농도에서 표적 DNA에 대한 Cas12b의 부차적인 단일 가닥 DNA 트랜스-절단 활성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0092]

본 발명의 양태의 목적, 기술적 해결책 및 이점을 보다 명확하게 하기 위해, 하기에서 본 발명의 양태에서의 첨부 도면을 참조하여 본 발명의 양태에서의 기술적 해결책을 명확하고 완전하게 설명한다. 기술된 양태는 본 발명의 모든 양태가 아닌 일부이다. 창조적 노력없이 본 발명의 양태에 기초하여 당업자에 의해 획득된 다른 모든 양태는 본 발명의 보호 범위 내에 속한다.

[0093]

본 발명자는 광범위하고 심층적인 연구 및 Cas 효소 (예를 들어 Cas12a 및 Cas12b 효소)의 절단 특성에 대한 연구를 통해 표적 핵산 검출을 위한 기술적 해결책을 개발했다. 실험 결과는 예를 들어, 물에 대장균과 같은 특정 농도의 미생물이 있는지 여부의 확인, 및 SNP 유전자형의 신속한 확인을 위해 상기 언급된 기술적 해결책을 사용함으로써 핵산이 성공적으로 신속하게 검출됨을 보여준다. 본 발명은 이를 기초로 완성된다.

[0094]

용어

[0095]

용어 "가이드 RNA"는 Cas 단백질이 표적 DNA 서열에 특이적으로 결합하도록 안내하는 RNA를 지칭한다.

[0096]

용어 "crRNA"는 Cas12a가 표적 DNA 서열에 결합하도록 안내하는 짧은 RNA인, CRISPR RNA를 지칭한다.

[0097]

용어 "CRISPR"는 다수의 원핵 생물의 면역 시스템인, 주기적 간격으로 분포하는 짧은 회문구조의 반복서열을 의미한다.

[0098]

용어 "Cas 단백질"은 CRISPR 시스템에서 관련 단백질인, CRISPR 관련 단백질을 지칭한다.

[0099]

용어 "Cas12a" (이전에 "Cpf1"로 지칭됨)는 CRISPR 시스템 분류에서 유형 V-A 효소인 crRNA-의존성 엔도뉴클레아제를 지칭한다.

[0100]

용어 "Cas12b" 및 "C2c1"은 상호 교환적으로 사용되며, CRISPR 시스템 분류에서 유형 V-B 효소인 crRNA-의존성 엔도뉴클레아제를 지칭한다.

[0101]

용어 "LAMP"는 루프 매개 등온 증폭 기술이며, 이는 유전자 진단에 적합한 등온 핵산 증폭 기술이다.

[0102]

용어 "PAM"은 Cas12a 절단에 필요한, 프로토스페이서-인접 모티프를 지칭한다. FnCas12a의 PAM은 TTN 서열이고, LbCas12a의 PAM은 TTTN 서열이며, AacCas12b의 PAM은 TTN이다.

[0103]

본 발명은 표적 핵산 분자를 검출하는 방법을 기술하며, 이는 하기 단계를 포함한다: 검출하고자 하는 표적 핵산 분자를 함유하는 반응 시스템에 가이드 RNA, Cas 단백질, 핵산 프로브 및 완충 용액을 첨가하는 단계, 및 그 후 표적 핵산 분자의 형광 검출을 수행하는 단계.

[0104]

Cas 단백질은 Cas12a 또는 Cas12b이다.

- [0105] Cas12a는 바람직하게는 FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a 또는 Lb4Cas12a 중 하나이고; Cas12a는 바람직하게는 LbCas12a이다.
- [0106] Cas12b는 바람직하게는 AacCas12b, Aac2Cas12b, AkCas12b, AmCas12b, AhCas12b 또는 AcCas12b이다.
- [0107] 가이드 RNA는 DNA 단백질을 특이적으로 표적화하도록 Cas 단백질을 안내하는 RNA를 지칭한다.
- [0108] 검출될 표적 핵산 분자의 반응 시스템에서 검출될 표적 핵산 분자는 증폭에 의해 수득된다.
- [0109] 검출 방법은 병원성 미생물, 유전자 돌연변이, 또는 특정 표적 DNA를 검출할 수 있다.
- [0110] 표적 핵산 분자를 검출하기 위한 방법에서 Cas 단백질의 용도.
- [0111] 표적 DNA, 가이드 RNA 및 Cas 단백질이 3원 복합체를 형성할 때, 복합체는 시스템에서 다른 단일 가닥 DNA 분자를 절단할 것이다.
- [0112] 가이드 RNA는 DNA 단백질을 특이적으로 표적화하도록 Cas 단백질을 안내하는 RNA를 지칭한다.
- [0113] 본 발명은 또한 가이드 RNA, Cas 단백질, 및 핵산 프로브를 포함하는 키트를 제공한다. 또한, 본 발명의 키트는 완충 용액을 포함할 수도 있다.
- [0114] 본 발명은 특이성이 높은 표적 핵산 분자를 신속하게 검출하기 위한 검출 방법을 제공한다. 일단 (단일 가닥 또는 이중 가닥) 표적 DNA, crRNA 및 Cas12a 단백질이 3원 복합체를 형성하면, 복합체는 시스템에서 다른 단일 가닥 DNA 분자를 절단할 것이다. 설계를 통해, crRNA는 표적 DNA (검출될 DNA 서열의 세그먼트)를 표적으로 하고; crRNA 및 Cas12a 단백질이 검출 시스템에 첨가되고; 표적 DNA가 존재하는 경우, Cas12a는 crRNA 및 표적 DNA와 3원 복합체를 형성하고, 한편, 복합체는 그의 부차적인 절단 활성을 발휘하고 형광 신호로 표지된 단일 가닥 DNA를 절단한다 (단일 가닥 DNA의 2 개의 말단은 각각 발광 그룹 및 퀸칭 그룹과 연결되고, 발광 그룹은 절단 후 광을 방출할 수 있으며), 이에 의해 형광을 방출한다. 따라서, 검출될 시스템이 표적 DNA 분자를 함유하는지 여부는 형광 검출에 의해 알 수 있다. 본 발명의 방법을 사용함으로써, 샘플에 특정 DNA 서열이 함유되어 있는지 여부를 신속하게 검출할 수 있다. 검출 방법의 감도는 PCR 기술과 결합하여 크게 향상시킬 수 있다. 본 발명의 핵산 프로브는 바람직하게는 형광 프로브이다.
- [0115] **HOLMES 조건 시험:**
- [0116] 본 발명은 핵산 검출에서 Cas12a 및 Cas12b와 같은 Cas12 효소의 용도를 제공한다. 하기 설명은 Cas12a를 예시로 들 것이다.
- [0117] **Cas12a의 선택:** 연구에 따르면 Cas12a는 트랜스-절단 활성을 가지며, 즉, 표적 DNA, crRNA 및 Cas12a 단백질이 3 차 복합체를 형성하면, 시스템의 다른 단일 가닥 DNA (부차적인 단일 가닥 DNA)가 절단될 것이다. 이 원리에 따라, 특정 DNA 검출 방법이 설계된다. 먼저, 부차적인 DNA는 형광 프로브로 설계되었으며, 이는 12 nt의 무작위 서열로 이루어지고, 5' 말단에 형광 그룹 HEX, 3' 말단에 퀸칭 그룹 BHQ1 (HEX-N12-BHQ1)로 표지된다. 표적 DNA 단편이 시스템에 함유될 때, 표적 DNA, crRNA 및 Cas12a 단백질의 3원 복합체가 형성될 것이다. 이때, 프로브가 절단될 것이고, 한편, HEX 형광 그룹은 형광 검출기에 의해 검출된 바와 같이 형광 (535 nM의 여기 광 및 556 nM의 방출 광으로)을 방출할 것이다. 다음으로, 10 개의 상이한 Cas12a가 시험되고, 표적 서열은 도 7에 나타낸 바와 같이 이중 가닥 DNA이다. 표적 이중 가닥 DNA 및 각각의 Cas12a 단백질로 구성된 복합체는 트랜스 절단 활성을 실현할 수 있음을 알 수 있다.
- [0118] **HOLMES 반응 감도:** 그런 다음, 표적 DNA에 대한 FnCas12a 및 LbCas12a의 반응 감도를 시험하며, 즉 반응이 발생 할 수 있는 표적 DNA의 최저 농도를 조사한다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 시험 표적이 직접 첨가되면, 0.1nM 이상의 농도로 표적 DNA에 반응할 수 있고, 농도가 1nM 이상이면 반응이 현저하다. PCR 기술 (HOLMES 방법)이 결합된 경우, 도 8에 나타낸 바와 같이, 즉, PCR을 통한 관심 단편의 증폭 후 Cas12a 절단 반응이 이어지는 경우, 반응 감도는 도 9에 나타낸 바와 같이 10 aM만큼 낮을 수 있다.
- [0119] **SNP 시험:** 다음으로, HOLMES 방법으로 SNP 유전자형을 검출할 수 있는지 여부를 시험한다. T1을 표적 서열로 취하고, 이 부위에서의 PAM은 돌연변이되거나 표적 서열의 1-18 위치는 각각 단일 점 돌연변이를 겪고, 상이한 길이의 crRNA에 의한 비돌연변이 서열과 돌연변이 서열 사이의 검출 차이를 비교한다.
- [0120] 도 10에 나타낸 바와 같이, 표적의 상보적 서열이 24nt의 crRNA (crRNA-24nt)인 경우, 8-18 위치에서의 단일 점 돌연변이는 야생형과 크게 다르지 않지만, 형광 값은 PAM 돌연변이 및 위치 1-7의 돌연변이 후 명백하게 감소한

다. crRNA가 절단되고 쌍을 이룬 표적 서열의 길이가 18nt인 경우, 8-16nt의 돌연변이 위치의 형광 값은 24nt의 길이를 갖는 표적 서열의 형광 값과 비교하여 분명히 감소하고; crRNA의 길이가 16 nt 또는 17 nt로 계속 단축될 때, 돌연변이된 표적 서열의 형광 값은 보다 현저히 감소하고; 15nt로 더 단축되면, 돌연변이된 표적 서열의 형광 값은 이 표적 서열의 형광 값과 비교하여 약하지만, 돌연변이된 표적 서열의 형광 강도는 다른 표적 서열의 형광 강도와 비교하여 여전히 더 높을 수 있고, 따라서 검출에 사용될 수 있다. 종합하면, 15 nt, 16 nt 및 17 nt의 crRNA가 SNP 검출에 가장 적합하다.

[0121] 본 발명에서, Cas12a는 단일 가닥 DNA를 PAM 서열 독립적 프로그램된 절단 방식으로 절단하며, 이를 시스 절단이라고 하고; 그러나 3원 복합체 Cas12a/crRNA/표적 DNA가 일단 형성되면, 이는 트랜스 절단 활성, 즉 시스템에서 임의의 비표적 단일 가닥 DNA를 절단하는 활성을 나타내는 것을 보여줄 것이다.

[0122] Cas12a의 특성에 기초하여, 특정 핵산 분자 검출 방법이 개발되었고, 이를 HOLMES (1시간 저비용 다목적 효율적인 간단 분석(one Hour Low-cost Multipurpose Efficient Simple assay))라 칭한다. 기술명처럼, 이는 빠른 속도 (1 시간), 낮은 가격, 다중 채널, 고효율 및 간단한 시험 방법으로 특징지어진다. 이 방법은 신속한 병원체 검출, SNP 검출 등의 분야에서 사용될 수 있다.

부차적인 절단 활성에 기초한 핵산 검출

[0124] 본 발명은 또한 Cas12 효소 (Cas12a 또는 Cas12b를 포함)의 부차적인 절단 활성에 기초한 핵산 검출 방법을 제공한다.

[0125] 바람직하게는, 본 발명의 검출은 SNP에 대해 수행될 수 있으며, 특히 PCR 증폭이 먼저 수행된 후 검출된다.

[0126] 도 18을 참조하여, 프라이머 설계 계획이 제공된다.

[0127] 사례 1. SNP 부위 근처에 PAM 부위가 있을 때, PAM 부위에 따라 설계된 가이드 서열에 기초하여 합성된 crRNA가 HOLMES 검출에 사용될 수 있다. HOLMES 방법을 검출에 사용하면, 이는 비교적 낮은 배경 신호를 나타내며; 동일한 가이드 서열에 대해, 서로 다른 SNP 주형 간의 신호 차이가 상당히 크다.

[0128] 사례 2. SNP 부위 근처에 PAM 부위가 없거나 적절한 PAM 부위가 없을 때, PAM 부위는 상기 실험 계획에 따라 도입될 수 있다.

[0129] 전형적인 단계는 SNP 부위 근처에 프라이머를 설계하고, 프라이머 상에 PAM 부위를 운반하는 것을 포함하며, 여기서 PAM 부위의 3' 말단에 위치한 서열은 주형 DNA와 쌍을 이루어야 한다. 프라이머가 주형 DNA와 쌍을 이룰 수 있고 PCR 증폭에 사용될 수 있는 한, 다른 말단에서 프라이머에 대한 특별한 요구 사항은 없다. 도 18에 나타낸 바와 같이, PCR 증폭 후 PAM 부위가 성공적으로 도입될 수 있다.

[0130] 도 10을 참조하여, 본 발명에서, PAM 부위의 도입을 설계할 때, SNP 부위는 일반적으로 crRNA 가이드 서열의 5' 말단의 처음 16 개 염기, 바람직하게는 1-14 위치, 보다 바람직하게는 1-12 위치, 더욱 바람직하게는 위치 1-11 또는 1-10, 가장 바람직하게는 위치 1-8 또는 1-7에 위치한다.

[0131] 본 발명은 다음과 같은 주요 장점을 갖는다:

[0132] (1) 고속: 시험 조건이 준비되면, 샘플을 얻은 시간부터 시험 결과를 얻는 시간까지 약 1 시간만 걸린다.

[0133] (2) 저비용: 실험에 특수 재료나 효소가 없으며, 소량의 재료와 시약이 포함되어, 미량 분석에 사용할 수 있다.

[0134] (3) 고효율: 본 발명은 매우 높은 감도를 가지며 10 aM의 농도에서 DNA를 검출할 수 있다.

[0135] (4) 다용도: DNA 샘플 및 RNA 샘플을 포함한 상이한 핵산 샘플을 검출할 수 있다.

[0136] (5) 단순성: 특별하거나 복잡한 단계가 없으며, 키트를 준비하고 프로그램을 설정한 경우, 샘플 첨가와 같은 간단한 작업만 필요하다.

[0137] 본 발명은 특정 실시예와 관련하여 하기에서 상세하게 설명될 것이다. 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하기보다는, 본 발명을 예시하기 위한 것으로 이해되어야 한다. 특정 조건으로 특정되지 않은 하기 실시예에서의 실험 방법은 일반적으로 통상적인 조건, 예를 들어 하기 Sambrook 등, Molecular Cloning:Laboratory Manual (New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 또는 제조업체에서 권장하는 것에 기술된 것에 따라 수행된다. 달리 언급되지 않는 한, 백분율 및 부품은 중량 백분율 및 중량 부이다.

[0138] 구체적으로 언급되지 않는 한, 본 발명에 관련된 실험 재료는 상업적 경로로 얻을 수 있다.

[0139]

재료

[0140]

1. RNA 분해효소 억제제는 TaKaRa로부터 구입하고, 고성능 DNA 중합효소 KOD FX는 ToYoBo로부터 구입하고; 프라이머 (올리고뉴클레오티드)는 Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.에 의해 합성되고; T7 RNA 중합효소는 Thermo로부터 구입하고; RNA 정제 및 농축 키트 (RNA Clean&ConcentratorTM_5)는 Zymo Research로부터 구입하고; Wizard® SV 젤 및 PCR 정화 시스템은 Promega로부터 구입하고; 배지 (예를 들어, 트립톤, 효모 추출물 등)는 모두 OXOID로부터 구입한다.

[0141]

2. 배지 식: 액체 LB (1% 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 1% NaCl), 및 고체 LB가 제조될 때 액체 LB에 2% 한천만 첨가할 필요가 있다.

[0142]

실시예 1 단일 가닥 DNA 표적을 검출할 수 있는 Cas12a 단백질 검출 (프로브는 FAM으로 표지됨)

[0143]

단일 가닥 DNA (표적-T1-R)를 상이한 Cas12a 단백질에 의한 검출의 반응 값을 시험하기 위해 표적 서열로서 선택하였다.

[0144]

1. crRNA의 제조: 먼저, 표 5에 나타낸 바와 같이 T7-crRNA-F를 합성된 올리고뉴클레오티드 T7-T1-24-R에 어닐링(annealing)하여 전사 주형을 제조하였다. 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu M$)를 총 부피 $50 \mu L$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 $95^{\circ}C$ 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 $1^{\circ}C$ 의 속도로 $95^{\circ}C$ 에서 $20^{\circ}C$ 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. 이어서, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C (Thermo Fisher Scientific)로 정량화하고, $10 \mu M$ 의 농도로 희석하고, $-80^{\circ}C$ 의 냉장고에 저장하였다.

[0145]

2. Cas12a 반응: 단계 1에서 정제된 crRNA ($0.5 \mu M$), Cas12a ($0.25 \mu M$), 표적 단일 가닥 DNA (표적-T1-R) ($0.01 \mu M$), 혼산 프로브 (N25-5' FAM) ($0.01 \mu M$), NEB 완충액 3.1의 완충 용액, 및 $0.5 \mu L$ 의 RNA 분해효소 억제제를 $20 \mu L$ 반응 시스템에 첨가하였다. 블랭크 대조군 반응은 단일 가닥 DNA 표적 서열을 제외한 다른 모든 성분이 첨가된 반응이었다. 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 15 분 동안 수행한 다음, $98^{\circ}C$ 에서 2 분 동안 종결시켰다.

[0146]

3. 형광 검출: 반응물을 우레아-아크릴아미드 젤 전기영동 (Urea-PAGE)에 적용한 후, 형광 발광 이미저로 검출하였다. 도 11에 나타낸 바와 같이, 상이한 Cas12a는 표적에 대한 상이한 검출 효과를 갖는다. 예를 들어, HkCas12a 등의 경우, 표적 단일 가닥 DNA가 첨가되지 않은 경우에도 프로브의 절단이 야기되었다. 표적 단일 가닥 DNA가 첨가된 경우에만 프로브의 절단이 발생했기 때문에 LbCas12a 등은 Cas12a 단백질의 더 나은 후보이다.

[0147]

실시예 2 단일 가닥 DNA 표적을 검출할 수 있는 Cas12a 단백질 검출 (프로브는 2 개의 표지의 HEX 및 BHQ1로 표지됨)

[0148]

단일 가닥 DNA (표적-T1-R)를 상이한 Cas12a 단백질에 의한 검출의 반응 값을 시험하기 위해 표적 서열로서 선택하였다.

[0149]

1. crRNA의 제조: 먼저, 합성된 올리고뉴클레오티드 T7-T1-24-R에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu M$)를 총 부피 $50 \mu L$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 $95^{\circ}C$ 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 $1^{\circ}C$ 의 속도로 $95^{\circ}C$ 에서 $20^{\circ}C$ 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. 이어서, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, $10 \mu M$ 의 농도로 희석하고, $-80^{\circ}C$ 의 냉장고에 저장하였다.

[0150]

2. Cas12a 반응: 단계 1에서 정제된 crRNA ($0.5 \mu M$), Cas12a ($0.25 \mu M$), 표적 단일 가닥 DNA (표적-T1-R) ($0.01 \mu M$), 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1, 즉 5' 말단에서 HEX 및 3' 말단에서 BHQ1로 표지된 12 nt 단일 가닥 DNA) ($0.5 \mu M$), NEB 완충액 3.1의 완충액, 및 RNA 분해효소 억제제 $0.5 \mu L$ 을 $20 \mu L$ 반응 시스템에 첨가하였다. 대조군 반응은 단일 가닥 DNA 표적 서열을 제외한 다른 모든 성분이 첨가된 반응이었다. 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 15 분 동안 수행한 다음, $98^{\circ}C$ 에서 2 분 동안 종결시켰다.

[0151]

3. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 $20 \mu L$ 을 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 ($535 nm$ 에서 여기 광 및 $556 nm$ 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 상이한 Cas12a는 표적에 대한 상이한 검출 효과를 갖는다. 예를 들어, HkCas12a 등의 경우, 표적 단일 가닥 DNA가 첨가되지 않은 경우에도 프로브의 절단이 야기되었다. 표적 단일 가닥 DNA가 첨가되었을 때만 프로브의 절단이 발생했기 때문

에 FnCas12a 등은 Cas12a 단백질의 더 나은 후보이다.

[0152] 실시예 3 Cas12a 이중 가닥 DNA 표적을 검출할 수 있는 단백질 검출

상이한 Cas12a 단백질에 의한 검출의 반응 값을 시험하기 위해 이중 가닥 DNA (표적-T1)를 표적 서열로서 선택하였다.

1. crRNA의 제조: 먼저, 합성된 올리고뉴클레오티드 T7-T1-24-R에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu M$)를 총 부피 $50 \mu L$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 $95^{\circ}C$ 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 $1^{\circ}C$ 의 속도로 $95^{\circ}C$ 에서 $20^{\circ}C$ 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. 이어서, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, $10 \mu M$ 의 농도로 희석하고, $-80^{\circ}C$ 의 냉장고에 저장하였다.

2. Cas12a 반응: 단계 1에서 정제된 crRNA ($0.5 \mu M$), Cas12a ($0.25 \mu M$) 표적 이중 가닥 DNA (표적-T1, 프라이머 표적 T1-F를 표적-T1-R에 어닐링시켜 수득됨) ($0.01 \mu M$), 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu M$), NEB 완충액 3.1의 완충액, 및 RNA 분해효소억제제 $0.5 \mu L$ 를 $20 \mu L$ 반응 시스템에 첨가하였다. 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 15 분 동안 수행한 다음, $98^{\circ}C$ 에서 2 분 동안 종결시켰다.

3. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 $20 \mu L$ 를 $96\text{-}\mu$ 웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 ($535 nm$ 에서 여기 광 및 $556 nm$ 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 상이한 Cas12a는 표적에 대해 상이한 검출 효과를 갖는다. 표적 이중 가닥 DNA가 첨가되었을 때만 프로브의 절단이 발생했기 때문에 LbCas12a 등은 Cas12a 단백질의 더 나은 후보이다.

[0157] 실시예 4 FnCas12a 및 LbCas12a를 이용한 상이한 농도의 표적 시험

표적-T1을 표적 DNA로 선택한 후, FnCas12a 및 LbCas12a의 반응 감도를 시험하기 위해 구배에서 상이한 농도로 희석하였다. 감도를 높이기 위해 PCR 증폭 단계를 추가했다.

1. crRNA의 제조: 먼저, 합성된 올리고뉴클레오티드 T7-T1-24-R에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu M$)를 총 부피 $50 \mu L$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 $95^{\circ}C$ 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 $1^{\circ}C$ 의 속도로 $95^{\circ}C$ 에서 $20^{\circ}C$ 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. 이어서, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, $10 \mu M$ 의 농도로 희석하고, $-80^{\circ}C$ 의 냉장고에 저장하였다.

2. PCR 증폭 (선택): 표적 표적-T1 (pUC18-T1)을 함유하는 플라스미드를 주형으로 사용하고, 구배에서 희석한 다음, PCR 반응에 사용하였다. 각각의 반응 시스템의 총 부피는 $20 \mu L$ 였고, $0.25 \mu M$ 의 M13F-47 및 M13R-48 각각을 프라이머로 사용하였고 (표 4), 고성능 효소 KOD FX (ToYoBo)를 PCR 반응에 사용하였다. PCR 반응 절차는 2 분 동안 $95^{\circ}C$ 였고, 이어서 10 초 동안 $98^{\circ}C$, 15 초 동안 $60^{\circ}C$ 및 10 초 동안 $68^{\circ}C$ 의 35 사이클을 시작하였다. PCR 완료 후, PCR 증폭 생성물을 Cas12a 반응에 직접 사용하였다.

3. Cas12a 반응: 단계 1에서 정제된 crRNA ($0.5 \mu M$), FnCas12a 또는 LbCas12a ($0.25 \mu M$), $1 \mu L$ 의 PCR 생성물 (또는 다른 농도로 직접 희석된 표적 DNA), 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu M$), NEB 완충액 3.1의 완충용액, 및 $0.5 \mu L$ 의 RNA 분해효소억제제를 $20 \mu L$ 반응 시스템에 첨가하였다. 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 15 분 동안 수행한 다음, $98^{\circ}C$ 에서 2 분 동안 종결시켰다.

4. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 $20 \mu L$ 를 $96\text{-}\mu$ 웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 ($535 nm$ 에서 여기 광 및 $556 nm$ 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 시험 표적을 직접 첨가한 경우, $0.1 nM$ 이상의 농도를 갖는 모든 표적 DNA가 반응할 수 있었고, 농도가 $1 nM$ 을 초과하면 반응이 저하하였다. PCR 기술이 결합된 경우, 즉 PCR을 통한 관심 단편의 증폭 후 Cas12a 절단 반응이 수행되는 경우, 반응 감도는 $10 aM$ 만큼 낮을 수 있다.

[0163] 실시예 5 FnCas12a 및 LbCas12a를 이용한 단일 점 돌연변이 표적 시험

표적-T1을 표적으로서 선택하고, 야생형에 대해 상이한 길이의 단일 점 돌연변이 후의 동일한 crRNA의 반응 값을 시험하기 위해, 각각 PAM 영역 및 1-18 위치에서 단일-점 돌연변이를 적용하였다.

1. crRNA의 제조: 먼저, 합성된 올리고뉴클레오티드 T7-T1-24-R, T7-T1-15-R, T7-T1-16-R, T7-T1-17-R, 및 T7

-T1-18-R에 T7-crRNA-F를 각각 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu\text{M}$)를 총 부피 $50 \mu\text{L}$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 95°C 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 1°C 의 속도로 95°C 에서 20°C 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 37°C 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. 이어서, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, $10 \mu\text{M}$ 의 농도로 희석하고, -80°C 의 냉장고에 저장하였다.

[0166] 2. PCR 증폭: 표적 표적-T1 (pUC18-T1)을 함유하는 플라스미드를 주형으로 사용하였다. 각각의 반응 시스템의 총 부피는 $20 \mu\text{L}$ 이었고, $0.25 \mu\text{M}$ 의 프라이머 M13R-48 및 각각 표적-T1-F에 대한 각각의 돌연변이 프라이머를 사용하였고 (표 4), 고성능 효소 KOD FX (ToYoBo)를 PCR 반응에 대해 사용하였다. PCR 반응 절차는 2 분 동안 95°C 였으며, 이어서 10 초 동안 98°C , 15 초 동안 60°C 및 10 초 동안 68°C 의 35 사이클을 시작하였다. PCR 완료 후, 생성물을 Cas12a 반응에 직접 사용하였다.

[0167] 3. Cas12a 반응: 단계 1에서 정제된 crRNA ($0.5 \mu\text{M}$), FnCas12a 또는 LbCas12a ($0.25 \mu\text{M}$), PCR 생성물 $1 \mu\text{L}$, 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu\text{M}$), NEB 완충액 3.1의 완충액, 및 RNA 분해효소억제제 $0.5 \mu\text{L}$ 를 $20 \mu\text{L}$ 반응 시스템에 첨가하였다. 반응을 37°C 에서 15 분 동안 수행한 다음, 98°C 에서 2 분 동안 종결시켰다.

[0168] 4. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 $20 \mu\text{L}$ 를 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 (535 nm 에서 여기 광 및 556 nm 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 표적의 상보적 서열이 24 nt (crRNA-24nt)의 crRNA인 경우, 8-18 위치에서의 단일-점 돌연변이는 야생형과 크게 다르지 않지만, 형광 값은 PAM 돌연변이 및 1-7 위치의 점 돌연변이 후 명백히 감소하였다. crRNA가 절단되고 쌍을 이룬 표적 서열의 길이가 18 nt 일 때, 8-16 nt의 돌연변이 위치의 형광 값은 24 nt의 것에 비해 명백하게 감소하였다; 길이가 16 nt 또는 17 nt 일 때, 돌연변이된 표적 서열의 형광 값의 감소가 보다 명백하다; 길이가 15 nt 일 때, 표적 서열 및 돌연변이된 표적 서열 둘 모두의 형광 값은 매우 약했지만, 돌연변이된 표적 서열의 형광 강도는 다른 표적 서열의 형광 강도에 비해 여전히 더 높을 수 있고, 따라서 검출에 사용될 수 있다. 종합하면, 15 nt, 16 nt 및 17 nt의 crRNA가 SNP 검출에 가장 적합하다.

실시예 6 환경 수에서의 대장균 등의 미생물의 시험

[0169] 대장균의 gyrB 유전자를 물에서 대장균 등 미생물의 농도를 간접적으로 시험하기 위한 검출 표적으로 선택하였다. 대장균 MG1655를 양성 대조군으로 하여, 환경에서 물 (하수 및 수돗물 등)의 미생물 함량을 측정하였다.

[0170] 1. crRNA의 제조: 우선, 합성된 올리고뉴클레오티드 T7-crRNA-gyrB에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu\text{M}$)를 총 부피 $50 \mu\text{L}$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 95°C 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 1°C 의 속도로 95°C 에서 20°C 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 37°C 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. 이어서, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, $10 \mu\text{M}$ 의 농도로 희석하고, -80°C 의 냉장고에 저장하였다.

[0171] 2. PCR 증폭: 양성 대조군 시료 대장균 MG1655를 OD_{600} 이 약 0.5가 될 때까지 배양한 후, 각각 10 배 구배로 희석한 후 주형으로 사용하였고, 샘플은 주변 수 (환경의 수돗물 및 탁한 물을 포함)였다. 각각의 반응 시스템의 총 부피는 $20 \mu\text{L}$ 였고, 프라이머 gyrB-F 및 gyrB-R 각각 $0.25 \mu\text{M}$ 을 사용하였고 (표 4), 고성능 효소 KOD FX (ToYoBo)를 PCR 반응에 사용하였다. PCR 반응 절차는 2 분 동안 95°C 였고, 이어서 10 초 동안 98°C , 15 초 동안 60°C 및 10 초 동안 68°C 의 35 사이클을 시작하였다. PCR 완료 후, PCR 생성물을 Cas12a 반응에 직접 사용하였다.

[0172] 3. Cas12a 반응: $20 \mu\text{L}$ 반응 시스템에 단계 1에서 정제된 하기 crRNA ($0.5 \mu\text{M}$), LbCas12a ($0.25 \mu\text{M}$), $1 \mu\text{L}$ 의 PCR 생성물, 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu\text{M}$), NEB 완충액 3.1의 완충액, 및 $0.5 \mu\text{L}$ 의 RNA 분해효소 억제제를 첨가하였다. 반응을 37°C 에서 15 분 동안 수행한 다음, 98°C 에서 2 분 동안 종결시켰다.

[0173] 4. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 $20 \mu\text{L}$ 를 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 (535 nm 에서 여기 광 및 556 nm 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 도 13에 나타낸 바와 같이, 대장균 MG1655의 형광 반응 값은 농도 감소에 따라 감소한다. 그 중에서도, 샘플 2, 4, 5 및 6에서 미생물이 더 분명하게 검출되었다.

[0175] 실시예 7 인간 SNP의 시험

[0176] SNP 시험은 HOLMES 방법의 타당성을 시험하기 위해, 인간 SNP의 5 개 부위, 즉 rs5082, rs1467558, rs2952768, rs4363657 및 rs601338을 선택하였다.

[0177] 1. crRNA의 제조: 먼저, 합성된 올리고뉴클레오티드에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu\text{M}$)를 총 부피 $50 \mu\text{L}$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 95°C 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 1°C 의 속도로 95°C 에서 20°C 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 37°C 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research)를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, $10 \mu\text{M}$ 의 농도로 희석하고, -80°C 의 냉장고에 저장하였다.

[0178] 2. PCR 증폭: 반응 시스템의 총 부피는 $20 \mu\text{L}$ 였고, $0.25 \mu\text{M}$ 의 프라이머 각각이 사용되었고 (표 4), 1ng 의 인간 게놈 (HEK293T) 또는 직접 긁어낸 경구 상피 점막을 주형으로 사용하였고, 고성능 효소 KOD FX (ToYoBo)를 PCR 반응에 사용하였다. PCR 반응 절차는 2 분 동안 95°C 였고, 이어서 10 초 동안 98°C , 15 초 동안 60°C 및 10 초 동안 68°C 의 35 사이클을 시작하였다. PCR 완료 후, 생성물을 Cas12a 반응에 직접 사용하였다. (프라이머 1-rs5082-F-T, 2-rs1467558-F-T 및 3-rs2952768-RC는 SNP의 해당 돌연변이 생성물에 직접 도입됨)

[0179] 3. Cas12a 반응: 상응하는 crRNA ($1 \mu\text{M}$), LbCas12a ($0.5 \mu\text{M}$), $1 \mu\text{L}$ 의 PCR 생성물, 및 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu\text{M}$)를 $20 \mu\text{L}$ 반응 시스템에 첨가하였다. 반응을 37°C 에서 15 분 동안 수행한 다음, 98°C 에서 2 분 동안 종결시켰다.

[0180] 4. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 $20 \mu\text{L}$ 를 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 (535 nm 에서 여기 광 및 556 nm 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 도 14에 나타낸 바와 같이, crRNA가 상응하는 표적 서열에 해당하는 경우에만, 더 높은 형광 반응 값이 있을 것이고, 1 점 돌연변이가 존재하는 경우, 그 반응 값이 크게 감소될 것이다. 상응하는 SNP의 유전자형은 형광 값에 의해 결정될 수 있고, 이들 결과는 서열 분석 결과에 의해 확인되었다.

[0181] 실시예 8 암 관련 유전자의 시험

[0182] 시험 유전자로서 TP53 유전자를 선택하였다. TP53 유전자는 인간 T24 세포에서 넌센스 돌연변이를 가져서, 유전자의 불활성화를 초래한다. 이 부위에서 정상 유전자를 갖는 세포 (HEK293T), 개별 유전자 및 돌연변이 세포 T24를 각각 시험하였다.

[0183] 1. crRNA의 제조: 먼저, 합성 올리고뉴클레오티드 T7-crRNA-34-TP53-T24-C-16nt 및 T7-crRNA-34-TP53-T24-G-16nt에 T7-crRNA-F를 어닐링함으로써 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu\text{M}$)를 총 부피 $50 \mu\text{L}$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 95°C 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 1°C 의 속도로 95°C 에서 20°C 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 37°C 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research)를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, $10 \mu\text{M}$ 의 농도로 희석하고, -80°C 의 냉장고에 저장하였다.

[0184] 2. PCR 증폭: 반응 시스템의 총 부피는 $20 \mu\text{L}$ 였고, $0.25 \mu\text{M}$ 의 프라이머 34-TP53-T24-F 및 34-TP53-T24-R이 각각 사용되었고 (표 4), 1ng 의 인간 게놈 (HEK293T, T24) 또는 직접 긁어낸 구강 상피 점막을 주형으로서 사용하였고, PCR 반응을 위해 고성능 효소 KOD FX (ToYoBo)를 사용하였다. PCR 반응 절차는 2 분 동안 95°C 였고, 이어서 10 초 동안 98°C , 15 초 동안 60°C 및 10 초 동안 68°C 의 35 사이클을 시작하였다. PCR 완료 후, 생성물을 Cas12a 반응에 직접 사용하였다.

[0185] 3. Cas12a 반응: 상응하는 crRNA ($1 \mu\text{M}$), LbCas12a ($0.5 \mu\text{M}$), $1 \mu\text{L}$ 의 PCR 생성물, 및 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu\text{M}$)를 $20 \mu\text{L}$ 반응 시스템에 첨가하였다. 반응을 37°C 에서 15 분 동안 수행한 다음, 98°C 에서 2 분 동안 종결시켰다.

[0186] 4. 형광 검출: $20 \mu\text{L}$ 의 불활성화된 반응 용액을 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 (535 nM 의 여기 광 및 556 nM 의 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 도 15에 나타낸 바와 같이, 이 부위에서 정상인 TP53 유전자가 주형일 때, crRNA-C의 검출된 값은 crRNA-G의 것보다 유의적으로 더 높았으며, 돌연변이 세포 T24의 crRNA-G는 상당히 증가되었다.

[0187] **실시예 9 인간 SNP (통풍 관련 유전자)의 시험**

[0188] SNP 시험은 HOLMES 방법을 시험하기 위해, 통풍 위험과 관련된 인간 SNP의 5 개 부위, 즉 rs1014290, rs6449213, rs737267, rs1260326 및 rs642803을 선택하였다.

[0189] 1. crRNA의 제조: 먼저, 합성된 올리고뉴클레오티드에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu M$)를 총 부피 $50 \mu L$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 $95^{\circ}C$ 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 $1^{\circ}C$ 의 속도로 $95^{\circ}C$ 에서 $20^{\circ}C$ 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. RNA Clean & ConcentratorTM-5 (Zymo Research)를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, $10 \mu M$ 의 농도로 희석하고, $-80^{\circ}C$ 의 냉장고에 저장하였다.

[0190] 2. PCR 증폭: 반응 시스템의 총 부피는 각각 $20 \mu L$ 였고, $0.25 \mu M$ 의 프라이머가 각각 사용되었고 (표 4), 1ng의 인간 게놈 (HEK293T) 또는 직접 긁어낸 경구 상피 점막을 주형으로 사용하였고, 고성능 효소 KOD FX (ToYoBo)를 PCR 반응에 사용하였다. PCR 반응 절차는 2 분 동안 $95^{\circ}C$ 였고, 이어서 10 초 동안 $98^{\circ}C$, 15 초 동안 $60^{\circ}C$ 및 10 초 동안 $68^{\circ}C$ 의 35 사이클을 시작하였다. PCR 완료 후, 생성물을 Cas12a 반응에 직접 사용하였다. (프라이머 1-rs5082-FT, 2-rs1467558-FT 및 3-rs2952768-RC는 SNP의 해당 돌연변이 생성물에 직접 도입됨)

[0191] 3. Cas12a 반응: $20 \mu L$ 반응 시스템에 상응하는 crRNA ($1 \mu M$), LbCas12a ($0.5 \mu M$), $1 \mu L$ 의 PCR 생성물 및 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu M$)를 첨가하였다. 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 15 분 동안 수행한 다음, $98^{\circ}C$ 에서 2 분 동안 종결시켰다.

[0192] 4. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 $20 \mu L$ 를 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 ($535 nm$ 에서 여기 광 및 $556 nm$ 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 도 16에 나타낸 바와 같이, crRNA가 상응하는 표적 서열에 해당하는 경우에만, 더 높은 형광 반응 값이 있을 것이고, 1 점 돌연변이가 있다면, 그 반응 값이 크게 감소될 것이다. 상응하는 SNP의 유전자형은 형광 값에 의해 결정될 수 있고, 이를 결과는 서열 분석 결과에 의해 확인되었다.

[0193] **실시예 10 키트에 의한 지원자의 임상 샘플 (통풍 관련 유전자)의 SNP 시험**

[0194] 사전 혼합된 용액을 96-웰 플레이트에 첨가하여 키트를 준비한 다음, 키트에 21 명의 지원자 게놈 DNA를 첨가하여 통풍 위험과 관련된, rs1014290 부위를 시험하였다.

[0195] 1. 키트의 제조: 먼저, 합성된 올리고뉴클레오티드에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu M$)를 총 부피 $50 \mu L$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 $95^{\circ}C$ 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 $1^{\circ}C$ 의 속도로 $95^{\circ}C$ 에서 $20^{\circ}C$ 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 $37^{\circ}C$ 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. RNA Clean & ConcentratorTM-5 (Zymo Research)를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고 $10 \mu M$ 의 농도로 희석하였다.

[0196] 2. PCR을 위한 96-웰 플레이트에서의 사전 혼합: $19 \mu L$ 시스템에 PCR 반응에 필요한 시약을 첨가하였으며, 프라이머는 41-rs1014290-F 및 41-rs1014290-R이다.

[0197] 3. 형광 검출을 위한 96-웰 플레이트에서의 사전 혼합: $19 \mu L$ 시스템에 crRNA ($1 \mu M$), LbCas12a ($0.5 \mu M$) 및 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu M$)를 첨가하고 96-웰 플레이트에 첨가하였다.

[0198] 4. PCR 증폭: PCR을 위해 사전 혼합된 96-웰 플레이트를 지원자의 게놈 DNA와 함께 첨가한 후, PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응 절차는 2 분 동안 $95^{\circ}C$ 였으며, 이어서 10 초 동안 $98^{\circ}C$, 15 초 동안 $60^{\circ}C$ 및 10 초 동안 $68^{\circ}C$ 의 35 사이클을 시작하였다.

[0199] 5. Cas12a 반응: $1 \mu L$ 의 PCR 반응 용액을 취하여 형광 검출을 위해 사전 혼합된 96-웰 플레이트에 첨가하고, $37^{\circ}C$ 에서 15 분 동안 반응시킨 후, 반응을 $98^{\circ}C$ 에서 2 분 동안 종결시켰다.

[0200] 6. 형광 검출: 마이크로플레이트 리더 ($535 nm$ 에서의 여기 광 및 $556 nm$ 의 방출 광)에 의해 검출하였다. 도 17에 나타낸 바와 같이, 유전자형 A:A를 가진 집단은 통풍의 위험이 높기 때문에, 지원자 번호 5, 7 및 9 이외의 사람들은 유전자형 A:G 또는 G:G에 속하므로, 통풍의 위험에 더 주의를 기울여야 한다.

[0201] **실시예 11 Cas 단백질과 조합된 LAMP에 의해 환경 수에서 대장균 등 미생물의 검출**

- [0202] 대장균의 *gyrB* 유전자를 대장균 등 미생물이 물에 존재하는지 간접적으로 시험하기 위한 검출 표적으로 선택하였다.
- [0203] 1. crRNA의 제조: 우선, 합성된 올리고뉴클레오티드 T7-crRNA-*gyrB*에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu\text{M}$)를 총 부피 $50 \mu\text{L}$ 에서 1X Taq DNA 중합 효소 반응 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 95°C 에서 5 분 동안 변성, 그런 다음 열 순환기를 사용하여 분당 1°C 의 속도로 95°C 에서 20°C 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 37°C 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. 이어서, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, 최종적으로 $10 \mu\text{M}$ 의 농도로 희석하고, 나중에 사용하기 위해 -80°C 에서 냉장고에 저장하였다.
- [0204] 2. LAMP 증폭: 멸균 수 및 대장균을 함유한 오염된 액체를 각각 음성 대조군 및 검출할 샘플로 사용하였다. 각각의 반응 시스템의 총 부피는 $25 \mu\text{L}$ 였고, 각각 $1.6 \mu\text{M}$ 의 LAMP-FIP 및 LAMP-BIP의 프라이머, 각각 $0.2 \mu\text{M}$ 의 LAMP-F3 및 LAMP-B3, 각각 $0.4 \mu\text{M}$ 의 LAMP-LoopF 및 LAMP-LoopB를 사용하였고, LAMP 반응에 사용된 키트는 WarmStart® LAMP 키트 (NEB)였다. LAMP 반응 절차는 30 분 동안 65°C 였다. LAMP가 완료된 후, 80°C 에서 10 분 동안 어닐링을 수행한 후, 생성물을 Cas12a 반응에 직접 사용하였다.
- [0205] 3. Cas12a 반응: 단계 1에서 정제된 crRNA ($0.5 \mu\text{M}$), Cas12a ($0.25 \mu\text{M}$), LAMP 생성물 $1 \mu\text{L}$, 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu\text{M}$), NEB 완충액 3.1의 완충액, 및 RNA 분해효소억제제 $0.5 \mu\text{L}$ 를 $20 \mu\text{L}$ 반응 시스템에 첨가하였다. 37°C 에서 15 분 동안 반응을 수행하였다.
- [0206] 4. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 $20 \mu\text{L}$ 를 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 (535 nm 에서 여기 광 및 556 nm 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 결과는 도 19에 나타낸 바와 같다.
- [0207] **실시예 12 Cas 단백질과 조합된 LAMP 증폭을 사용한 SNP 검출**
- [0208] 1. crRNA의 제조: 우선, 합성된 올리고뉴클레오티드 T7-crRNA-rs5082-T/T7-crRNA-rs5082-G/T7-crRNA-rs1467558-T/T7-crRNA-rs14 67558-C에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다. (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu\text{M}$)를 총 부피 $50 \mu\text{L}$ 에서 1X Taq DNA 중합 효소 반응 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 95°C 에서 5 분 동안 변성, 그런 다음 열 순환기를 사용하여 분당 1°C 의 속도로 95°C 에서 20°C 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여 crRNA를 합성하고, 반응을 37°C 에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. 이어서, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, 최종적으로 $10 \mu\text{M}$ 의 농도로 희석하고, 나중에 사용하기 위해 -80°C 에서 냉장고에 저장하였다.
- [0209] 2. LAMP 증폭: 인간 계놈 HEK293T를 샘플로 취했다. 각각의 반응 시스템의 총 부피는 $25 \mu\text{L}$ 였고, 각각 $1.6 \mu\text{M}$ 의 LAMP-FIP 및 LAMP-BIP의 프라이머, 각각 $0.2 \mu\text{M}$ 의 LAMP-F3 및 LAMP-B3, 각각 $0.4 \mu\text{M}$ 의 LAMP-LoopF 및 LAMP-LoopB를 사용하였고, LAMP 반응을 위해 WarmStart® LAMP 키트 (NEB)를 사용하였다. LAMP 반응 절차는 30 분 동안 65°C 였다. LAMP가 완료된 후, 80°C 에서 10 분 동안 어닐링을 수행한 후, 생성물을 Cas12a 반응에 직접 사용하였다.
- [0210] 3. Cas12a 반응: 단계 1에서 정제된 crRNA ($0.5 \mu\text{M}$), Cas12a ($0.25 \mu\text{M}$), LAMP 생성물 $1 \mu\text{L}$, 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) ($0.5 \mu\text{M}$), NEB 완충액 3.1의 완충액, 및 RNA 분해효소억제제 $0.5 \mu\text{L}$ 를 $20 \mu\text{L}$ 반응 시스템에 첨가하였다. 37°C 에서 15 분 동안 반응을 수행하였다.
- [0211] 4. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 $20 \mu\text{L}$ 를 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 (535 nm 에서 여기 광 및 556 nm 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 결과는 도 20에 나타낸 바와 같다.
- [0212] **실시예 13 Cas 단백질과 조합된 RPA 증폭에 의한 환경 수에서 대장균 등 미생물의 검출**
- [0213] 대장균의 *gyrB* 유전자를 대장균 등 미생물이 물에 존재하는지 간접적으로 시험하기 위한 검출 표적으로 선택하였다.
- [0214] 1. crRNA의 제조: 우선, 합성된 올리고뉴클레오티드 T7-crRNA-*gyrB*에 T7-crRNA-F를 어닐링하여 전사 주형을 제조하였다 (표 5). 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 ($4 \mu\text{M}$)를 총 부피 $50 \mu\text{L}$ 의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 95°C 에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 1°C 의 속도로 95°C 에서 20°C 로 냉각하였다. T7 고속 처리 전사 키트를 사용하여

crRNA를 합성하고, 반응을 37°C에서 밤새 (약 16 시간 동안) 수행하였다. 이어서, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, NanoDrop2000C로 정량화하고, 최종적으로 10 μ M의 농도로 희석하고, 나중에 사용하기 위해 -80°C에서 냉장고에 저장하였다.

[0215] 2. RPA 증폭: 멀균 수 및 대장균을 함유하는 오염된 액체를 각각 음성 대조군 및 검출할 샘플로 사용하였다. 각 반응 시스템의 총 부피는 25 μ L였고, 0.5 μ M의 프라이머 RPA-gyrB-F (또는 RPA-gyrB-F2) 및 RPA-gyrB-R2를 각각 사용하였고, TwistAmp® 기본 키트 (TwistDX)를 RPA 반응에 사용하였다. RPA 반응 절차는 30 분 동안 37°C 였다. RPA가 완료된 후, 80°C에서 10 분 동안 어닐링을 수행한 후, 생성물을 Cas12a 반응에 직접 사용하였다.

[0216] 3. Cas12a 반응: 단계 1에서 정제된 crRNA (0.5 μ M), Cas12a (0.25 μ M), RPA 생성물 1 μ L, 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) (0.5 μ M), NEB 완충액 3.1의 완충액, 및 RNA 분해효소 억제제 0.5 μ L를 20 μ L 반응 시스템에 첨가하였다. 37°C에서 15 분 동안 반응을 수행하였다.

[0217] 4. 형광 검출: 불활성화된 반응 용액 20 μ L를 96-웰 플레이트에 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기 (535 nm에서 여기 광 및 556 nm에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 결과는 도 21에 나타낸 바와 같다.

실시예 14: 부차적인 절단 활성을 가지는 Cas12b

1. 가이드 RNA (sgRNA)의 제조

먼저, 플라스미드의 골격으로서 pUC18을 사용하여 플라스미드 pUC18-가이드 RNA-T1을 구축하였다. 플라스미드에서, 가이드 RNA의 전사를 위한 T7 프로모터 및 주형 DNA 서열을 pUC18에 삽입하였다 (주: 이러한 주형으로부터 전사된 가이드 RNA는 본 연구에서 T1이라는 서열을 표적으로 함). 상기 방법은 먼저 pUC18 플라스미드를 주형으로서 및 PUC18-1-F 및 pUC18-1-R을 프라이머로 사용하여 PCR 라운드를 수행하였으며; PCR 생성물을 T4 DNA 리가아제와 연결시키고, 생성물을 DH10b로 형질 전환시키고, 정확한 클론을 수득하기 위해 서열 분석하여, 이를 pUC18-가이드 RNA-T1-프리로 칭하였다. 이어서, 최종적으로 서열 분석된 정확한 플라스미드 pUC18-가이드 RNA-T1을 수득하기 위해, pUC18-가이드 RNA-T1-프리를 주형으로서 및 pUC18-2-F 및 pUC18-2-R을 프라이머로 사용하고, PCR 생성물을 동일한 방식으로 연결 및 형질 전환함으로써 PCR 2 차 라운드를 수행하였다.

[0221] 다음으로, 플라스미드 pUC18-가이드 RNA-T1을 주형으로 사용하여, T7 고속 처리 전사 키트 (Thermo)를 사용하여 가이드 RNA를 합성하고, 반응을 37°C에서 밤새 (12 내지 16 시간 동안) 수행하였다.

[0222] 마지막으로, 전사 시스템에 DNA 분해효소 I (전사 시스템 50 μ L 당 2 μ L의 DNA 분해효소 I을 첨가함)을 첨가하고, 플라스미드 DNA를 제거하기 위해 37°C에서 30 분 동안 수조를 두고, RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 RNA를 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, 10 μ M의 농도로 희석하고, 나중에 사용하기 위해 -80°C에서 냉장고에 저장하였다.

2. 표적 DNA의 제조

[0224] (1) 표적 DNA가 단일 가닥인 경우, 66 bp 길이의 올리고뉴클레오티드를 표적 DNA (표적-T1-R)로서 직접 합성하였고, 이는 가이드 RNA에 의해 인식된 20 bp 표적 서열 (T1)을 함유하였다.

[0225] (2) 표적 DNA가 이중 가닥인 경우, 2 개의 66 bp 길이 상보성 올리고뉴클레오티드 (표적-T1-F; 표적-T1-R)를 직접 합성하였고, 이는 가이드 RNA에 의해 인식된 20 bp 표적 서열 (T1)을 함유하였다. 2 개의 올리고뉴클레오티드를 어닐링하여 짧은 표적 DNA를 수득하였다. 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 (1 μ M)를 총 부피 20 μ L의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 초기에 95 °C에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 1 °C의 속도로 95 °C에서 20 °C로 냉각하였다.

3. Cas12b 반응

[0227] (1) 가이드 RNA의 어닐링: 가이드 RNA를 적절한 농도 (10 μ M)로 희석하고, PCR 기구에서 어닐링하였다. 어닐링 절차: 75°C에서 5 분 동안 변성한 후, 분당 1°C의 감소율로 75°C에서 20°C로 냉각하였다.

[0228] (2) 가이드 RNA와 C2c1의 배양: 어닐링된 가이드 RNA를 동일한 물 농도에서 C2c1과 혼합하고, 30°C에서 20 내지 30 분 동안 방치하였다.

[0229] (3) Cas12b 반응: 단계 (2)에서 배양된 가이드 RNA 및 C2c1의 혼합물 (최종 농도는 둘 다 250 μ M 또는 500 M mM), 표적 DNA (최종 농도 50nM), FAM-표지된 올리고뉴클레오티드 (표적-DNMT1-3-R-FAM-5') 또는 형광 웜칭 프로브 (최종 농도는 500nM인 HEX-N12-BHQ1), 2 μ L의 10 X NEB 완충제 3.1, 및 0.5 μ L의 RNA 분해효소 억제제

제 (40 U/ μ L)를 20 μ L 반응 시스템을 첨가하였다. 균일하게 혼합한 후, 반응을 48°C에서 30 분 동안 수행하였다. 그 후, PCR 기기에서 98°C에서 5 분 동안 가열하여 불활성화시켰다.

[0230] 4. 우레아 변성 겔 전기영동에 의한 Cas12b의 트랜스-절단 활성의 검출: 불활성화된 반응 용액 20 μ L를 우레아 변성 겔 전기영동법에 의해 분리한 다음, 형광 이미징 시스템 ImageQuant LAS 4000 미니 (GE Healthcare)에 의해 이미지화하였다. 결과는 도 22에 나타낸 바와 같다.

[0231] 5. 형광 마이크로플레이트 리더 방법에 의한 Cas12b의 트랜스-절단 활성의 검출: 불활성화된 반응 용액 20 μ L를 96-웰 플레이트에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기 (535 nm에서 여기 광 및 556 nm에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. 결과는 도 23에 나타낸 바와 같다.

실시예 15: Cas12b 반응의 민감도 시험 (트랜스-절단)

[0233] 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1)의 여기된 형광 강도를 검출함으로써, Cas12b가 트랜스 절단 활성, 즉 Cas12b 트랜스 절단 반응의 감도를 발휘하는 데 필요한, 표적 DNA 농도를 측정하였다.

1. 가이드 RNA의 제조

[0235] 먼저, pUC18-guide RNA-T1을 주형으로서 및 가이드 RNA-DNMT1-3-F 및 가이드 RNA-DNMT1-3-R을 프라이머로 사용하여, 다른 플라스미드 pUC18-가이드 RNA-DNMT1-3을 얻기 위해, T1의 표적 DNA를 표적으로 하는 가이드 RNA의 20 개 염기를 PCR을 통해 DNMT1-3을 표적화하는 가이드 RNA에 의해 교체하였다.

[0236] 이어서, 플라스미드 pUC18-가이드 RNA-DNMT1-3을 주형으로 사용하여, T7 고속 처리 전사 키트 (Thermo)를 사용하여 가이드 RNA를 합성하고, 반응을 37°C에서 밤새 수행하였다 (12 내지 16 시간).

[0237] 마지막으로, 전사 시스템에 DNA 분해효소 I (50 μ L의 전사 시스템 당 2 μ L의 DNA 분해효소 I이 첨가됨)을 첨가하고, 37°C에서 30 분 동안 수조에 두어 플라스미드 DNA를 제거하고, RNA는 RNA 정제 및 농축 키트를 사용하여 정제하고, 나노드롭 2000C로 정량화하고, 나중에 사용하기 위해 -80°C에서 냉장고에 저장하였다.

2. 표적 DNA의 제조

[0239] 표적 DNA의 경우, 첫 번째는 표적 DNA를 증폭없이 Cas12b 반응 시스템에 직접 첨가하는 것이다. 방법은 하기와 같다:

[0240] (1) 표적 DNA가 단일 가닥인 경우, 표적 DNA (DNMT1-3 (TTC PAM)-R)로서 50bp 길이의 올리고뉴클레오티드를 직접 합성하였고, 이는 가이드 RNA에 의해 인식되는 20bp 표적 서열 (DNMT1-3)을 함유하였다.

[0241] (2) 표적 DNA가 이중 가닥인 경우, 2 개의 50 bp 길이 상보성 올리고뉴클레오티드 (DNMT1-3 (TTC PAM)-F; DNMT1-3 (TTC PAM)-R)를 직접 합성하였으며, 이는 가이드 RNA에 의해 인식되는 20 bp 표적 서열 (DNMT1-3)을 함유하였다. 2 개의 올리고뉴클레오티드를 어닐링하여 짧은 표적 DNA를 수득하였다. 구체적으로, 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 (2 μ M)를 총 부피 20 μ L의 1X PCR 완충액 (Transgen Biotech)에서 어닐링한 후, 어닐링 절차를 수행하였다: 95 °C에서 5 분 동안 변성한 후, 열 순환기를 사용하여 분당 1 °C의 속도로 95 °C에서 20 °C로 냉각하였다.

[0242] (3) 단일 가닥 또는 이중 가닥 표적 DNA를 2 μ M, 0.2 μ M, 0.02 μ M, 0.002 μ M 및 0.0002 μ M로 나중에 사용하기 위해 구배로 희석하였다.

[0243] 두 번째는 LAMP 반응에 의한 증폭을 위해 표적 서열 (DNMT1-3)을 함유하는 단편을 플라스미드 벡터에 삽입하는 것이었다.

[0244] (1) 정확한 클론을 수득하기 위해 서열 분석에 의해 검증한 후, 표적 서열 (DNMT1-3)을 함유하는 단편을 Transgen의 pEasy-Blunt Zero 클로닝 키트를 사용하여 pEasy-Blunt Zero 클로닝 벡터에 삽입하였다.

(2) LAMP 확장 반응

[0246] 상기 플라스미드를 주형으로 사용하여, LAMP 증폭 반응을 수행하였다. 주형을 각각 0 nM, 1 nM 및 0.1 nM에서 첨가하였고, 10⁻¹¹ nM로 10-배 구배로 희석하였다. 각 반응 시스템의 총 부피는 각각 25 μ L였고, 각각 1.6 μ M의 LAMP-DNM-FIP 및 LAMP-DNM-BIP의 프라이머, 각각 0.2 μ M의 LAMP-DNM-F3 및 LAMP-DNM-B3, 각각 0.4 μ M의 LAMP-DNM-LoopF 및 LAMP-DNM-LoopB를 각각 사용하였고, LAMP 반응에 사용된 키트는 WarmStart[®] LAMP Kit (NEB)였다. LAMP 반응 절차는 30 분 동안 65°C였다. LAMP가 완료된 후, 80°C에서 10 분 동안 불활성화를 수행

한 후, 생성물을 Cas12b 반응에 직접 사용하였다.

[0247] 3. Cas12b 반응

(1) 가이드 RNA의 어닐링: 가이드 RNA를 적절한 농도 ($5 \mu\text{M}$)로 희석하고, PCR 기구에서 어닐링하였다. 어닐링 절차: 75°C 에서 5 분 동안 변성한 후, 분당 1°C 의 감소율로 75°C 에서 20°C 로 냉각하였다.

(2) 가이드 RNA와 Cas12b의 배양: 어닐링된 가이드 RNA를 동일한 물 농도에서 Cas12b와 혼합하고, 30°C 에서 20 내지 30 분 동안 방치하였다.

(3) Cas12b 반응: 단계 (2)에서 배양된 가이드 RNA 및 Cas12b의 혼합물 (가이드 RNA 및 Cas12b의 최종 농도는 모두 $250 \mu\text{M}$ 임), $1 \mu\text{L}$ 의 표적 DNA 또는 $1 \mu\text{L}$ 의 LAMP 생성물, 형광 프로브 (HEX-N12-BHQ1) (최종 농도 500nM), $2 \mu\text{L}$ 의 10X NEB 완충제 3.1, 및 $0.5 \mu\text{L}$ 의 RNA 분해효소억제제 ($40 \text{U}/\mu\text{L}$)를 $20 \mu\text{L}$ 반응 시스템을 첨가하였다. 균일하게 혼합한 후, 반응을 48°C 에서 30 분 동안 수행하였다. 그 후, PCR 기구에서 98°C 에서 5 분간 불 가열 불활성화시켰다.

[0251] 4. 형광 마이크로플레이트 리더 방법에 의한 Cas12b의 트랜스-절단 활성의 검출:

불활성화된 반응 용액 $20 \mu\text{L}$ 를 $96\text{-}\mu\text{L}$ 플레이트에 첨가하고, 마이크로플레이트 판독기 (535 nm 에서 여기 광 및 556 nm 에서 방출 광으로)에 의해 검출하였다. LAMP 증폭과 결합하여, Cas12b는 10 aM 만큼 낮은 표적 DNA 농도에 대해 유의한 부차적인 단일 가닥 DNA 트랜스-절단 활성을 생성할 수 있다. 결과는 도 24에 나타낸 바와 같다.

표적 단일 가닥 DNA 절단 시 Cas12a의 시스-절단 특징:

먼저, Cas12a의 단일 가닥 DNA 절단 특징을 시험하기 위해, 짧은 단일 가닥 DNA (DNMT1-3)를 표적으로 하는 여러 crRNA (표 1)가 설계되었으며, 이는 3' 말단에서 5(6)-카르복시플루오레세인 (FAM)으로 표지된다. FnCas12a에 의한 절단 후, 변성 우레아-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(우레아-PAGE)에 의해 반응 생성물을 분석한다. Cas12a에 의한 단일 가닥 DNA 절단이 프로그램된 것으로 밝혀졌다. 즉, 절단 부위는 하기 도면에 나타낸 바와 같이, crRNA 가이드 서열과 쌍을 이루는 제 1 표적 서열의 3' 말단 염기로부터 5' 말단으로 계수된 표적 서열의 22 염기 (21 내지 23 염기) 근처이다. 도 1a 및 1c. Cas12a에 의한 이중 가닥 DNA의 절단에는 PAM 서열이 필요하지만, Cas12a에 의한 단일 가닥 DNA의 절단에는 PAM 서열이 필요하지 않고 (하기 도 1a, 1b 및 2), 이는 Cas9에 의해 매개되는 단일 가닥 DNA 절단과 유사하다. 그러나, Cas12a에 의해 매개되는 단일 가닥 DNA 절단 활성은 도 1a에 나타낸 바와 같이, crRNA에서 스템-루프 구조에 의존하는 반면, Cas9는 여전히 단지 20-nt 상보적 RNA 서열을 갖는 단일 가닥 DNA에 대해 약한 절단 활성을 나타낸다. crRNA의 스템-루프 구조는 Cas12a의 구조를 안정화시키는 데 중요하며, 이는 Cas12a에 의한 단일 가닥 DNA의 절단에 crRNA의 고리 구조가 필요한 이유이다. 더 짧은 선도 서열 crRNA가 절단이 인식 부위 밖에 있는 방식으로 Cas12a의 단일 가닥 DNA 절단 부위를 통과할 수 있는지 여부를 추가로 시험한다. 가이드 서열의 길이가 16 nt, 18 nt 및 20 nt 일 때, 이들 crRNA 모두는 도 1b 및 1d에 나타낸 바와 같이 22 번째 염기 근처의 Cpf1에 의한 절단을 초래하며, 이는 절단 부위가 인식 부위 외부에서 4nt, 2nt 또는 0nt임을 의미한다. 다음으로, 상이한 기질상에서의 Cas12a의 절단 효율을 도 1f에 나타낸 바와 같이, 이중 가닥 DNA 및 단일 가닥 DNA의 기질을 각각 사용하여 시험한다. Cas9 절단의 상황과 유사하게, 단일 가닥 DNA의 절단은 하기 도면에 나타낸 바와 같이, 이중 가닥 DNA의 절단보다 느리다 1e 내지 1g. 이러한 결과는 Cas12a에 의해 단일 가닥 DNA를 인식하고 절단하는 메카니즘이 PAM과 독립적인 저효율 인식 및 절단 방식인 이중 가닥 DNA와 상이할 수 있고; PAM 서열은 Cas12a에 의한 표적 이중 가닥 DNA의 인식 및/또는 절단을 가속화한다는 것을 나타낸다.

[0255] 단일 가닥 DNA 절단에서 Cas12a의 트랜스 절단 특징:

표적 단일 가닥 DNA가 3' 말단에 표지될 때, Cas12a는 도 1에 나타낸 바와 같이, 22 번째 염기 부근에서 절단된다. 그러나, 5' 말단에서 표지될 때, 예측된 크기의 절단 생성물 밴드는 관찰되지 않지만, 도 3b에 나타낸 바와 같이, 짧은 (< 6 nt) FAM 표지된 생성물이 생성된다. 상세한 실험을 통해, 일단 3원 복합체 Cas12a/crRNA/표적 단일 가닥 DNA가 형성되면, 5'-말단에 표지된 표적 단일 가닥 DNA (DNMT1-3) (표 1)가 절단되고, 도 3c에 나타낸 바와 같이, 짧은 FAM 표지 생성물이 생성된다. 또한, 3원 복합체는 또한 하기 도면에 나타낸 바와 같이, 임의의 다른 반응 시스템에서 crRNA 와 상보적인 서열을 갖지 않는 단일 가닥 DNA (즉, 부차적인 단일 가닥 DNA)를 절단한다 3c 및 3d. 이 절단 현상을 트랜스-절단이라고 하며, 이는 프로그램 가능한 시스-절단과 상이하다. 표적 단일 가닥 DNA가 3' 말단에 표지될 때, 트랜스-절단도 관찰되지만, 많은 시스-절단 생성물이 도 3b에 나타낸 바와 같이, 남아 있다. 이는 Cas12a/crRNA/표적 단일 가닥 DNA에 의해 형성된 복합체에 기인할 수 있고, 표지된 3' 말단이 3원 복합체의 뉴클레아제 활성 부위에 노출되지 않도록 보호되어, 표적 단일 가닥

DNA가 보호된다. 이러한 절단 과정은 도 3a에 나타낸 바와 같을 수 있다.

[0257] 상기 시험된 FnCas12a 이외에, 다른 종 공급원으로부터의 9 개의 Cas12a를 또한 시험한다 (표 2 및 도 4a). Lb4Cas12a를 제외하고, 모든 Cas12a는 플라스미드 DNA에 대한 엔도뉴클레아제 활성이 우수하고 (도 4b에 나타낸 바와 같음), 모든 Cas12a 3원 복합체는 단일 가닥에서 시스 및 트랜스 절단 활성을 나타낸다 (하기 도4c 및 4d에 나타낸 바와 같음). 이는 단일 가닥 DNA에서 Cas12a의 시스 및 트랜스 활성이 일반적인 현상임을 보여준다.

[0258] Cas12a에 의해 단일 가닥 DNA를 절단하기 위한 시스 및 트랜스 중요 부위 및 메커니즘.

[0259] Cas12a에서 단일 가닥 DNA에 대한 시스 및 트랜스 활성과 관련된 주요 아미노산 잔기를 결정하기 위해, Cas12a의 여러 후보 잔기를 돌연변이시켜 활성 시험을 수행한다. 먼저, FnCas12a의 3 개의 단일 아미노산 돌연변이체 (H843A, K852A 및 K869A)를 정제 및 시험하고, 이들의 잔기는 RNA 분해효소활성과 관련이 있다. 단일 가닥 DNA에 대한 트랜스-활성의 연구 결과는 하기 도면에 나타낸 바와 같이, 야생형 FnCas12a와 3 개의 돌연변이체 사이에서 단일 가닥 DNA에 대한 시스- 및 트랜스-절단 활성에서의 명백한 차이가 발견되지 않는 것을 보여준다5a 및 5c.

[0260] 다음으로, FnCas12a의 엔도뉴클레아제 활성 부위, 즉 RuvC 도메인 (D917A, E1006A 또는 D1255A) 및 Nuc 도메인 (R1218A) 부위가 돌연변이될 때, 단일 가닥 DNA에서 이들 돌연변이된 Cas12a의 시스 및 트랜스 절단 활성을 하기 도면에 나타낸 바와 같이, 둘 다 영향을 받았다5b 및 5d. 이러한 결과는 표적 이중 가닥 DNA의 절단을 위한 Cas12a의 주요 부위가 단일 가닥 DNA 상의 시스 및 트랜스 절단 활성과 밀접한 관련이 있음을 나타낸다.

[0261] Cas12b (즉, C2c1) (확장된 표적 DNA 또는 연장된 비-표적 DNA와의 복합체 포함)의 최근 구조 연구는 하기 도면에 나타낸 바와 같이, 두 가닥 모두가 RuvC 포켓에 위치함을 보여준다. 6a 및 6b. Cas12b (즉, C2c1) 및 Cas12a의 엔도뉴클레아제 촉매 잔기를 비교함으로써, 이들 부위는 Cas12b (즉, C2c1) 및 Cas12a의 절단 및 기능에서 유사한 역할을 할 가능성이 가장 높다. 시험관내 단일 아미노산 돌연변이 실험의 결과는 상기 가설과 일치함을 보여준다. 즉, Cas12a는 오직 하나의 RuvC 촉매 포켓을 통해 2 개의 가닥을 절단할 가능성이 있다.

[0262] Cas12a 복합체의 트랜스-절단 활성: 추가적인 단일 가닥 DNA를 갖는 Cas12b (즉, C2c1) 복합체의 구조에서, 서열 독립적 단일 가닥 DNA는 또한 촉매 포켓의 표면에 위치하며, 도 6c에 나타낸 바와 같이, 이는 Cas12a의 부차적인 단일 가닥 DNA 기질의 그것과 유사하다. 단일-아미노산 돌연변이 실험과 결합하여, 하기 도면에 나타낸 바와 같이, 표적 DNA, 비-표적 DNA 및 부차적인 단일 가닥 DNA는 모두 Cas12a의 단일 RuvC 포켓에서 모두 절단되는 것으로 제안되었다. 6d, 6e 및 6f. 3원 Cas12a 복합체는 부차적인 단일 가닥 DNA 트랜스-절단 활성을 갖는 반면, 단량체 또는 2원 복합체가 부차적인 단일 가닥 DNA 트랜스-절단 활성을 갖지 않는 이유는 단량체, 2원 및 3원 복합체의 구조를 비교함으로써 설명될 수 있다. 단량체 Cas12a의 구조는 무질서하고, 2원 복합체 Cas12a/crRNA는 도 6g에 나타낸 바와 같이 삼각형 구조를 갖는 반면, 3원 복합체 Cas12a/crRNA/표적 DNA는 이 중 일 구조로 전환되어, (도 6h에 나타낸 바와 같이) 부차적인 단일 가닥 DNA의 전사를 실현하기 위해 촉매 포켓을 노출시킨다.

[0263] 핵산 검출 방법의 확립

[0264] Cas12a의 특성에 기초하여, HOLMES (one HOur Low-cost Multipurpose Efficient Simple assay)라고 하는, 특정 핵산 분자 검출 방법이 개발되었다. 기술명과 마찬가지로, 1 시간이며 비용이 저렴하고 다용도이며 효율성이 높은 간단한 시험 방법에 의해 특징지어진다.

[0265] 전체 반응 시스템에서, 방법은 2 가지 주요 단계로 나눌 수 있는데, 하나는 주형 핵산의 증폭이고, 다른 하나는 Cas12a 단백질에 의한 특이적 핵산 검출이다. 여기서, PCR 방법은 핵산 증폭에 사용되지만, 실제로는 임의의 증폭 방법은 제 2 단계에서 등온 증폭 방법 RPA 등과 같은, 핵산 검출과 조합될 수 있다. 초기 핵산은 이중 가닥 DNA로 제한되지 않고, 단일 가닥 DNA 일 수도 있으며; 또는 역전사 후에도 여전히 RNA가 검출될 수 있으므로, 이 방법은 다양한 유형의 핵산 분자에 적합하다. 핵산 검출 단계의 경우, 3 가지 구성성분, 즉 Cas12a, crRNA 및 핵산 프로브가 실험의 핵심이다. 실시예에서 언급된 10 개의 Cas12a (이들 10 개의 단백질은 무작위로 선택됨) 외에, 다른 Cas12a 단백질도 이 방법에 적합하다. 또한, 다른 유형의 Cas 단백질 (예를 들어, C2c1 단백질)이 또한 본 발명의 청구된 범위에 적합하다: 실험 결과에 의해 나타낸 바와 같이, 알리시클로바실루스 애시도테레스트리스 Cas12b (즉, C2c1)는 또한 Cas12a의 것과 유사한 부차적인 단일 가닥 DNA 트랜스-절단 활성을 가지며, crRNA/표적 DNA와의 복합체는 또한 부차적인 단일 가닥 DNA를 절단할 수 있다.

[0266] 가이드 역할을 하는 crRNA의 경우, 엔지니어링, 예를 들어 수동으로 수정된 후 시스템에서 보다 안정적일 것이다. 핵산 프로브의 선택과 관련하여, 본 발명은 HEX 및 BHQ1로 표지된 짧은 단일 가닥 DNA를 선택하고, 핵산 프

로브가 검출 가능한 차이를 생성하도록 절단되는 한, 다른 검출 가능한 표지 방법이 이론적으로 적용 가능하다. 대안적으로, 핵산 프로브는 또한 프로브가 절단되는지 여부를 검출하기 위해, 화합물에 결합한 후에 형광을 내도록 설계될 수 있다.

[0267] 또한, 본 발명의 상기 교시를 읽은 후, 당업자는 본 발명에 대해 다양한 변경 또는 수정을 수행할 수 있으며, 이러한 동등한 형태는 또한 본 출원의 첨부된 청구 범위에 의해 정의된 범위 내에 속한다는 것이 이해되어야 한다.

표 1 Cas12a 특징 실험 관련 절단의 기질 서열

올리고머 명칭	서열 (5'-3')	서열번호:
표적-DNMT1-3-F	aatgttcttgatggccatgtctgttactcgcc ctgtcaagtggcggtgac	1
표적-DNMT1-3-R	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatgg gaccatcaggaaacatt	2
표적-DNMT1-3-R-FA M-3'	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatgg gaccatcaggaaacatt-FAM	3
표적-DNMT1-3-R-FA M-5'	FAM-gtcacgccacttgacaggcgagtaacaga catggaccatcaggaaacatt	4
표적-T1-F	tttctgttttatcgcaactttctactgaatt caagcttactctagaaagaggagaaaggatcc	5
표적-T1-R	ggatccttctcttttagagtaaagcttg aattcagtagaaagttgcgataacaaacagaaa	6
표적-T1-F-FAM	FAM-tttctgttttatcgcaactttctactg aattcaagcttactctagaaagaggagaaagg atcc	7
표적-T1-R-FAM	ggatccttctcttttagagtaaagcttg aattcagtagaaagttgcgataacaaacagaaa -FAM	8
표적-T1-FAM-3' -F	tttctgttttatcgcaactttctactgaatt caagcttactctagaaagaggagaaaggatcc -FAM	9
표적-T1-FAM-5' -R	FAM-ggatccttctcttttagagtaaag cttgaattcagtagaaagttgcgataacaaaca	10

[0269]

	gaaa	
표적-DNMT1-3-R-TT T-FAM-3'	gtcacgccacttgcacaggcgagtaacagacatg gaccatcaggTTTcatt-FAM	11
표적-DNMT1-3-R-CC C-FAM-3'	gtcacgccacttgcacaggcgagtaacagacatg gaccatcaggCCCcatt-FAM	12
표적-DNMT1-3-R-GG G-FAM-3'	gtcacgccacttgcacaggcgagtaacagacatg gaccatcaggGGGcatt-FAM	13
표적-DNMT1-3-F-AA A	aatgAAAcctgatggccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	14
표적-DNMT1-3-F-GG G	aatgGGGcctgatggccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	15
표적-DNMT1-3-F-CC C	aatgCCCcctgatggccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	16
표적-T1-1-R	acaaacagaaaa	17
표적-T1-6-R	cgataacaaacagaaaa	18
표적-T1-12-R	aagttgcgataacaaacagaaaa	19
표적-T1-18-R	agtagaaaagttgcgataacaaacagaaaa	20
표적-T1-24-R	gaattcagtagaaaagttgcgataacaaacagaa a	21
표적-T1-24-only-R	gaattcagtagaaaagttgcgataaa	22
표적-T1-18-only-R	agtagaaaagttgcgataaa	23
표적-T1-12-only-R	aagttgcgataaa	24
표적-T1-6-only-R	cgataaa	25
N25-5' FAM	FAM-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	26
N25-3' FAM	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-FAM	27

[0270]

표 2. Cas12a 단백질 및 Cas12b (즉, C2c1) 단백질의 명칭 및 GI 번호

명칭	GI 번호	종
FnCas12a	489130501	Francisella tularensis
AsCas12a	545612232	Acidaminococcus sp. BV3L6
LbCas12a	917059416	Lachnospiraceae bacterium ND2006
Lb5Cas12a	652820612	Lachnospiraceae bacterium NC2008
HkCas12a	491540987	Helcoccoccus kunzii ATCC 51366
OsCas12a	909652572	Oribacterium sp. NK2B42
TsCas12a	972924080	Thiomicrospira sp. XS5
BbCas12a	987324269	Bacteroidales bacterium KA00251
BoCas12a	496509559	Bacteroidetes oral taxon 274 str. F0058
Lb4Cas12a	769130406	Lachnospiraceae bacterium MC2017
C2c1	1076761101	Alicyclobacillus acidoterrestris

[0272]

[0273]

표 3 플라스미드 정보

플라스미드 또는 균주	관련 특성 또는 유전자형	출처
플라스미드		
pET28a-TEV	TEV 단백질 분해 효소 절단 부위로 변경된 트롬빈 절단 부위를 갖는 pET28a	(Carneiro, Silva et al. 2006)
pET28a-TEV-FnCas12a	pET28a-TEV 운반 FnCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
pET28a-TEV-AsCas12a	pET28a-TEV 운반 AsCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
pET28a-TEV-LbCas12a	pET28a-TEV 운반 LbCas12a	(Lei, Li et al. 2017)
pET28a-TEV-Lb5Cas12a	pET28a-TEV 운반 Lb5Cas12a	본 발명
pET28a-TEV-HkCas12a	pET28a-TEV 운반 HkCas12a	본 발명
pET28a-TEV-OsCas12a	pET28a-TEV 운반 OsCas12a	본 발명
pET28a-TEV-TsCas12a	pET28a-TEV 운반 TsCas12a	본 발명
pET28a-TEV-BbCas12a	pET28a-TEV 운반 BbCas12a	본 발명
pET28a-TEV-BoCas12a	pET28a-TEV 운반 BoCas12a	본 발명
pET28a-TEV-Lb4Cas12a	pET28a-TEV 운반 Lb4Cas12a	본 발명

[0274]

pET28a-TEV-FnCas12a-K869A	pET28a-TEV 운반 FnCas12a-K869A	본 발명
pET28a-TEV-FnCas12a-K852A	pET28a-TEV 운반 FnCas12a-K852A	본 발명
pET28a-TEV-FnCas12a-H843A	pET28a-TEV 운반 FnCas12a-H843A	본 발명
pET28a-TEV-FnCas12a-R1218A	pET28a-TEV 운반 FnCas12a-R1218A	본 발명
pET28a-TEV-FnCas12a-E1006A	pET28a-TEV 운반 FnCas12a-E1006A	본 발명
pET28a-TEV-FnCas12a-D917A	pET28a-TEV 운반 FnCas12a-D917A	본 발명
pET28a-TEV-FnCas12a-D1255A	pET28a-TEV 운반 FnCas12a-D1255A	본 발명
pET28a-TEV-C2c1	pET28a-TEV 운반 C2c1	본 발명

[0275]

[0276]

표 4 HOLMES 방법의 시험에 사용된 프라이머

율리고 명칭	서열 (5'-3')	서열 번호:
표적 -T1-R	ggatecttttccttttagatcaaaggcttgaat ttcagtagaaagtgcataacaaacagaaa	28
M13F-47	cacaattccacacaacatacgagccgga	29
M13R-48	tgttagccgtatggccaccacttca	30
표적 -T1-F	agttttgttatcgcaacttttactgaattc	31
표적 -T1-F-1A	agttttgttatcgcaacttttactgaattc	32
표적 -T1-F-2A	agttttgttatcgcaacttttactgaattc	33
표적 -T1-F-3T	agttttgttatcgcaacttttactgaattc	34
표적 -T1-F-4A	agttttgttatcgcaacttttactgaattc	35
표적 -T1-F-5G	agttttgttatGgcacacttttactgaattc	36
표적 -T1-F-6C	agttttgttatCcacacttttactgaattc	37
표적 -T1-F-7G	agttttgttatcgGaacttttactgaattc	38

[0277]

표적 -T1-F-8T	agttttgttatacgcaTTTctactgaattc	39
표적 -T1-F-9T	agttttgttatacgcaTtttctactgaattc	40
표적 -T1-F-10G	agttttgttatacgcaaGtttctactgaattc	41
표적 -T1-AAAN-F	aaaaggtaatcgcaactttctactgaattc	42
표적 -T1-F-11A	agttttgttatacgcaacAtttctactgaattcggtc atag	43
표적 -T1-F-12A	agttttgttatacgcaactAtttctactgaattcggtc atag	44
표적 -T1-F-13A	agttttgttatacgcaacttActactgaattcggtc atag	45
표적 -T1-F-14G	agttttgttatacgcaactttGtactgaattcggtc atag	46
표적 -T1-F-15A	agttttgttatacgcaactttcAactgaattcggtc atag	47
표적 -T1-F-16T	agttttgttatacgcaacttttctTctgaattcggtc atag	48
표적 -T1-F-17G	agttttgttatacgcaactttctaGtgaattcggtc atag	49
표적 -T1-F-18A	agttttgttatacgcaacttttacAgaattcggtc atag	50
표적 -T1-PAM1A-F	agtttAgttatacgcaacttttactgaattc	51
표적 -T1-PAM2A-F	agttAtgttatcgcaacttttactgaattc	52
표적 -T1-PAM3A-F	agtAtgttatcgcaacttttactgaattc	53
gyrB-F	AGTTGTCGTTCTCAACTCCGGCGTTTC	54
gyrB-R	TCGACGCCAATACCGTCTTTTCAGTGG	55
1-5082-F	CTGCCTTGCTTCTACCTTGCCCTGTTCTGG	56
1-5082-F-T	TTGCTTCTACCTTGCCCTGTTCTGG	57
1-5082-R	TTTCTGGCTGGGATGCCGATGG	58
2-rs1467558-F	AGCAATAACACTAATATTGATTCCCTCAGATATGG ACTCCTTCATAGTA	59

[0278]

2-rs1467558-F-T	TTGATTCTTCAGATATGGACTCCTTCATAGTAT AACG	60
2-rs1467558-R	TGAGCATCGTTATTCTTACGCCTGTCATTGAAAG AG	61
3-rs2952768-F	AGCCTGGCAACGAGTGAAACTCTG	62
3-rs2952768-R	ACAGGAGGGACAAAGGCCAAGTGTCC	63
3-rs2952768-R-C	CATCATAGGATTGGAAAAGGACATTCAAGTCATT CAG	64
4-rs4363657-F	AGAGTCCTCTTCTCAATTTTCAGAATAATTAA GTACTTGGTAC	65
4-rs4363657-R	CAGTACTGAAAAAACCTGCCTATCAATAAAAGCCC TAGAC	66
5-rs601338-F	GCTTCACCGGCTACCTTGCTCCT	67
5-rs601338-R	TTCACCTGCAGGCCCCGCAGG	68
34-TP53-T24-F	CCTGACTTCAACTCTGTCCTCCCTTTTAC AGTA	69
34-TP53-T24-R	TGCTGTGACTGTTGAGATGGCCATGG	70
41-rs1014290-F	AGTTCCAGACCTCAGTCACAAGATACTTTCTA C	71
41-rs1014290-F-G	ACCTCAGTGCACAAGATACTTTCTACGTCA C	72
41-rs1014290-R	AGCTCCAGTGGATGGAAGATCTTGAGATCCAG	73
42-rs6449213-F	AGTCAAAGAGATTCATGCCTGGACTTTAAC TTTAT	74
42-rs6449213-F-C	ATGCCTGGACTTTAACATCACATTATCGGAAGG	75
42-rs6449213-R	CAAATCTGTCCTCACCTCTCAGCTCACCTG	76
43-rs737267-F	TTCTGAACCCAAACTCACCTGGCATTTAACTG	77
43-rs737267-F-A	AAACTCACCTGGCATTTAAACTGACTCTGTAAG	78
43-rs737267-F-T	AAACTCACCTGGCATTTAAACTGACTCTGTAAG	79
43-rs737267-R	TGCCGAGGCTGAGTCAGCTACTCTCC	80

[0279]

44-rs1260326-F	ACACAGCACCGTGGGTCAAGACCTTG	81
44-rs1260326-F-C	TGGGTCAGACTTGCCTGGTGAGAGTC	82
44-rs1260326-F-T	TGGGTCAGACTTGCCTGGTGAGAGTC	83
44-rs1260326-R	AGCAGTGGCCATGTGATGCTGATG	84
45-rs642803-F	CCCCGGCTGTGGCTTGAGAATTG	85
45-rs642803-F-C	CTCTGTTGGCTTGAGAATTGCTGTC	86
45-rs642803-F-T	CTCTGTTGGCTTGAGAATTGCTGTC	87
45-rs642803-R	ACCGATAACCTGGCAGCCCTGGATG	88
HEX-N12-BHQ1	HEX-NNNNNNNNNNNN-BHQ1	89

[0280]

[0281]

표 5 crRNA의 전사를 위한 주형 서열

オリゴ 명칭	서열 (5'-3')	서열 번호:
T7-crRNA-F	GAAATTAATACGACTCACTATAAGGG	90
T7-T1-24-R	gaattcagtagaaagtgcgataaATCTACAACAGTAGA AATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	91
T7-T1-15-R	agaaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTC	92
T7-T1-16-R	tagaaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	93
T7-T1-17-R	gtagaaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCC TATAGTGAGTCGTATTAATTTC	94
T7-T1-18-R	agttagaaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCC CTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	95
T7-crRNA-DNM T-23nt-R	GAGTAACAGACATGGACCACATCAGATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	96
T7-crRNA-DNM T-(-8)-R	gacatggaccatcaggaaacattATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	97
T7-crRNA-DNM T-(+4)-R	aggcgagtaacagacatggaccaATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	98
T7-crRNA-DNM	tgacaggcgagtaacagacatggATCTACAACAGTAGAA	99

[0282]

T-(+8)-R	ATTCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	
T7-crRNA-DNM T-16nt-R	agacatggaccatcatcgATCTACAAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	100
T7-crRNA-DNM T-18nt-R	acagacatggaccatcatcgATCTACAAACAGTAGAAATTCC CTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	101
T7-crRNA-DNM T-20nt-R	taacagacatggaccatcatcgATCTACAAACAGTAGAAATT CCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	102
T7-DNMT-(-8) -무 루프-R	gacatggaccatcaggaaacattCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTC	103
T7-DNMT-(+4) -무 루프-R	aggcgagtaacagacatggaccaCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTC	104
T7-DNMT-(+8) -무 루프-R	tgacaggcgagtaacagacatggCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTC	105
T7-crRNA-rs50 82-T	CCTCTTCCCAGAACAGGATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	106
T7-crRNA-rs50 82-G	CCTCTTCCCAGCACAGGATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	107
T7-crRNA- rs1467558-T	CTGAAGCGTTATACTATATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	108
T7-crRNA- rs1467558-C	CTGAAGCGTTACTATATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	109
T7-crRNA-rs29 52768-T-16nt	TTTTATCTGAATGATTATCTACAACAGTAGAAATTCCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTC	110
T7-crRNA-rs29 52768-C-16nt	TTTTATCTGAATGACTATCTACAACAGTAGAAATTCCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTC	111
T7-crRNA- rs4363657-T	AAAAAAGAGTGAGTACCATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	112
T7-crRNA- rs4363657-C	AAAAAAGAGTGGGTACCATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	113
T7-crRNA-rs60	GGTAGAAGGTCCAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCCT	114

[0283]

1338-G	ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	
T7-crRNA-rs60	GGTAGAAGGTCTAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCCT	115
1338-A	ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	
T7-crRNA-34-T	GGGCAGGGGAGTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCCTA	
P53-T24-C-16n t	TAGTGAGTCGTATTAATTTC	116
T7-crRNA-34-T	GGGCAGGGGACTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCCTA	
P53-T24-G-16n t	TAGTGAGTCGTATTAATTTC	117
T7-crRNA-41-r s1014290-A-15 nt	TCAGTGGATGATGTAATCTACAACAGTAGAAATTCCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTC	118
T7-crRNA-41-r s1014290-G-15 nt	TCAGTGGATGACGTAATCTACAACAGTAGAAATTCCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTC	119
T7-crRNA-42-r s6449213-C	GGAAATTCTCCTTCCGAATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	120
T7-crRNA-42-r s6449213-T	GGAAATTCTCCTTCCAATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	121
T7-crRNA-43-r s737267-A-16n t	TCTTACAGAGTCAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTC	122
T7-crRNA-43-r s737267-G-16n t	TCTTACAGAGCCAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTC	123
T7-crRNA-43-r s737267-T	GTCTTACAGAGACAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	124
T7-crRNA-44-r s1260326-C-15 nt	CTGGACTCTCACCAAGATCTACAACAGTAGAAATTCCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTC	125

[0284]

T7-crRNA-44-r s1260326-T-15 nt	CTGGACTCTCACCAAGATCTACAACAGTAGAAATTCCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTC	126
T7-crRNA-45-r s642803-C	CACAGACAGGCAATTCTATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	127
T7-crRNA-45-r s642803-T	CACAGACAGACAATTCTATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	128
T7-crRNA-gyrB	TCGCGCTTGTGCCGACAGCAATGATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	129

[0285]

[0286] Cas12a와 결합된 LAMP를 통한 DNA 증폭에 의한 검출에 사용되는 프라이머:

[0287] 표 6 gyrB-1 증폭에 사용되는 프라이머

명칭	서열	서열 번호:
LAMP-gyrB-1-F3	CATGGTGCCTTCTGGCC	130
LAMP-gyrB-1-B3	CGGCGTTTGTCTTGTCA	131
LAMP-gyrB-1-FIP	ACAACTCACGCAGACGTTCGAACCTCA CCAATGTGACCG	132
LAMP-gyrB-1-BIP	GTTCCTCAACTCCGGCGTTCCGATGCCGC CTTCATAGTGG	133
LAMP-gyrB-1-루프F	CAGAATTTCATATTGAACT	134
LAMP-gyrB-1-루프B	GACGGCAAAGAAGACCACCT	135

[0288]

[0289] 표 7 gyrB-2 증폭에 사용되는 프라이머

명칭	서열	서열 번호:
LAMP-gyrB-2-F3	CGACGGCAAAGAAGACCA	136
LAMP-gyrB-2-B3	AGCCTGCCAGGTGAGTC	137
LAMP-gyrB-2-FIP	CGGGTGGATCGCGTTTGTTCACTATGAA GGCGGCATCA	138
LAMP-gyrB-2-BIP	GTATTGGCGTCGAAGTGGCGTTCGCTGCG AATGTTGTTG	139
LAMP-gyrB-2-루프F	TTGTTCAGATATTCAACGAACG	140
LAMP-gyrB-2-루프B	GTGGAACGATGGCTCCAGG	141

[0290]

[0291] 표 8 rs1467558 부위 증폭에 사용되는 프라이머

명칭	서열	서열 번호:
LAMP-rs1467558-F3	CAGCTGTAGACCATAAGCC	142
LAMP-rs1467558-B3	GTGGCTGAGCATCGTTAT	143
LAMP-rs1467558-FI P	ACTATGAAAGGAGTCCATATCTGAAGGAAT TCAGGTAGTGGTTGGGA	144
LAMP-rs1467558-BI P	GCTTCAGCCTACTGCAAATCCTACGCGTTG TCATTGAAAG	145
LAMP-rs1467558- 루프F	TCAATATTAGTGTATTGCTTG	146
LAMP-rs1467558- 루프B	TGGTGGAAGATTGGACAGGAC	147

[0292]

[0293]

표 9 rs5082 부위 증폭에 사용되는 프라이머

명칭	서열	서열 번호:
LAMP-rs5082-F3	GCTGGAAAGGTCAAGGGAC	148
LAMP-rs5082-B3	GGGGTTGTTGCACAGTCC	149
LAMP-rs5082-FIP	CAAAGGTAGAAGCAAAGGCAGGAGGTTGC CCAAGGTCACACAG	150
LAMP-rs5082-BIP	CTGGGAAGAGGGAGGGCTCAGTGTGCCAC ACTTTCACTGG	151
LAMP-rs5082-루프F	GTGAGCGGGTGGGGTGCT	152
LAMP-rs5082-루프B	TCTAAGTCTTCCAGCACGGGATC	153

[0294]

표 10 Cas12와 결합된 RPA 증폭에 의한 검출에 사용되는 프라이머

명칭	서열	서열 번호:
RPA-gyrB-1-F	ATATGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTG	154
RPA-gyrB-2-F	AAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCCCTCAACTCC	155
RPA-gyrB-R	ACTTCGACGCCAATACCGTCTTTTCAGTGGAG	156

[0296]

[0297] 표 11 트랜스-절단 활성을 갖는 Cas12b를 측정에 사용되는 프라이머:

율리고 명칭	서열 (5'-3')	서열 번호:
pUC18-1-F	ATCTGAGAAGTGGCACTTATCGCAACTTCTACTGAGGTC ATAGCTGTTCTGTGTGA	157
pUC18-1-R	GTCCTCTAGACCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTCAT GATTACGAATTGAGCTCGGT	158
pUC18-2-F	CCACTTCCAGGTGGCAAAGCCCGTTGAGCTTCTCAA TCTGAGAAGTGGCACTTATC	159
pUC18-2-R	TGGAAAGTGGCCATTGGCACACCCGTTGAAAAATTCTG TCCTCTAGACCCCTATAGTG	160
T7-crRNA-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	161
ZL-sgRNA-T1-R	TCAGTAGAAAGTTGCGATAAGTGC	162
ZLsgRNA-DNMT1- 3-R	AACAGACATGGACCATCAGGGTG	163
표적-T1-F	TTTCTGTTGTTATCGCAACTTCTACTGAATTCAAGC TTTACTCTAGAAAGAGGGAGAAAGGATCC	164
표적-T1-R	GGATCCTTCTCCTCTTCTAGAGTAAAGCTTGAATT AGTAGAAAGTTGCGATAACAAACAGAAA	165
표적-DNMT1-3 -R-FAM-5'	GTCACGCCACTTGACAGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGAAACATT	166
표적-T1-R	GGATCCTTCTCCTCTTCTAGAGTAAAGCTTGAATT AGTAGAAAGTTGCGATAACAAACAGAAA	167
표적-T1-F	TTTCTGTTGTTATCGCAACTTCTACTGAATTCAAGC TTTACTCTAGAAAGAGGGAGAAAGGATCC	168

[0298]

[0299] 표 12 Cas12b의 트랜스 반응의 감도 시험에 사용되는 프라이머

オリゴ 명칭	서열 (5'-3')	서열 번호:
sgRNA-DNMT1-3-F	CCTGATGGTCATGTCTGTTGGCATAGCTTTCCCTGTG TG	169
sgRNA-DNMT1-3-R	TGGACCATCAGGGTGCCACTCTCAGATTGAGAAG	170
T7-crRNA-F	GAAATTAAATACGACTCACTATAAGGG	171
ZLsgRNA-DNMT1-3-R	AACAGACATGGACCATCAGGGTG	172
DNMT1-3 (TTC PAM)-F	AATGTTCCCTGATGGTCCATGTCTGTTACTCGCCTGTC AAGTGGCGTGAC	173
DNMT1-3 (TTC PAM)-R	GTCACGCCACTTGACAGGGGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGGAACATT	174
LAMP-DNM-F3	gtgaacgttcccttagact	175
LAMP-DNM-B3	gggagggcagaactagtcc	176
LAMP-DNM-FIP	cgcacattgacaggcgagtaactgccacttattgggtc agc	177
LAMP-DNM-BTP	gcgtgtccccagagtgacttagcagtttccttcct t	178
LAMP-DNM-루프F	aggaaacattaacgtactgatg	179
LAMP-DNM-루프B	ttcctttatcccttcagc	180
DNMT1-3 (TTC PAM)-R	GTCACGCCACTTGACAGGGGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGGAACATT	181
DNMT1-3 (TTC PAM)-F	AATGTTCCCTGATGGTCCATGTCTGTTACTCGCCTGTC AAGTGGCGTGAC	182

[0300]

[0301]

표 13 본 발명에 관련된 다른 서열

명칭	서열	서열 번호:
AacCas12b sgRNA 서열	GTCTAGAGGACAGAATTTCAACGGGTGCGCAATGG CCACTTCCAGGTGGCAAAGCCCGTTGAGCTCTCAA TCTGAGAAGTGGCACccatgtggccatgtctgtt	183
표적 DNMT-13을 표적화하는 가이드 서열	cctgatggtccatgtctgtt	184
단일 가닥 표적 서열	gtcacgcacattgacaggcgagtaacagacatggacca tcagggAACATT	185
이중 가닥 표적 서열:	gtcacgcacattgacaggcgagtaacagacatggacca tcagggAACATT	186
AaCas12b 단백질의 아미노산 서열	MAVKSIKVKLRLDDMPEIRAGLWKLHKEVNAGVRYYTE WLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECDKTAEECKAELLERL RARQVENGHRGPAGSDDELLQLARQLYELLVPQAIGAK GDAQQIARKFLSPLADKDAVGLGIAKAGNKP RWVRMR EAGEPGWEEEKEKAETRKSADRTADVLRALADFGLKPL MRVYTDSSEMSSVEWKPLRGKGQAVRTWDRDMFQQA1ERM MSWESWNQRVGQEYAKLVEQKNRFEQKNFVGQEHLVHL VNQLQQDMKEASPGLESKEQTAHYVTGRALRGSDKVFE KWGKLAPDAPFDLYDAEIKNVQRRNTRRGSHDLFAKL AEPEYQALWREDASFLTRYAVYNSTLRKLNHAKMFATF TLPDATAHP1WTRFDKLGGNLHQYTFLNEFGERRHAI RFHKLLKVENGVAREVDDTVPIISMSEQLDNLLPRDPN EPIALYFRDYGAEQHFTGEFGGAKIQCRRDQLAHMHRR RGARDVYLNNSVRVQSQSEARGERRPPYAAVFRLVGDN HRAFVHF DKLSDYLAEPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVD LGLRTSASISVFRVARKDELKPNSKGRVPFFFPIKND	187

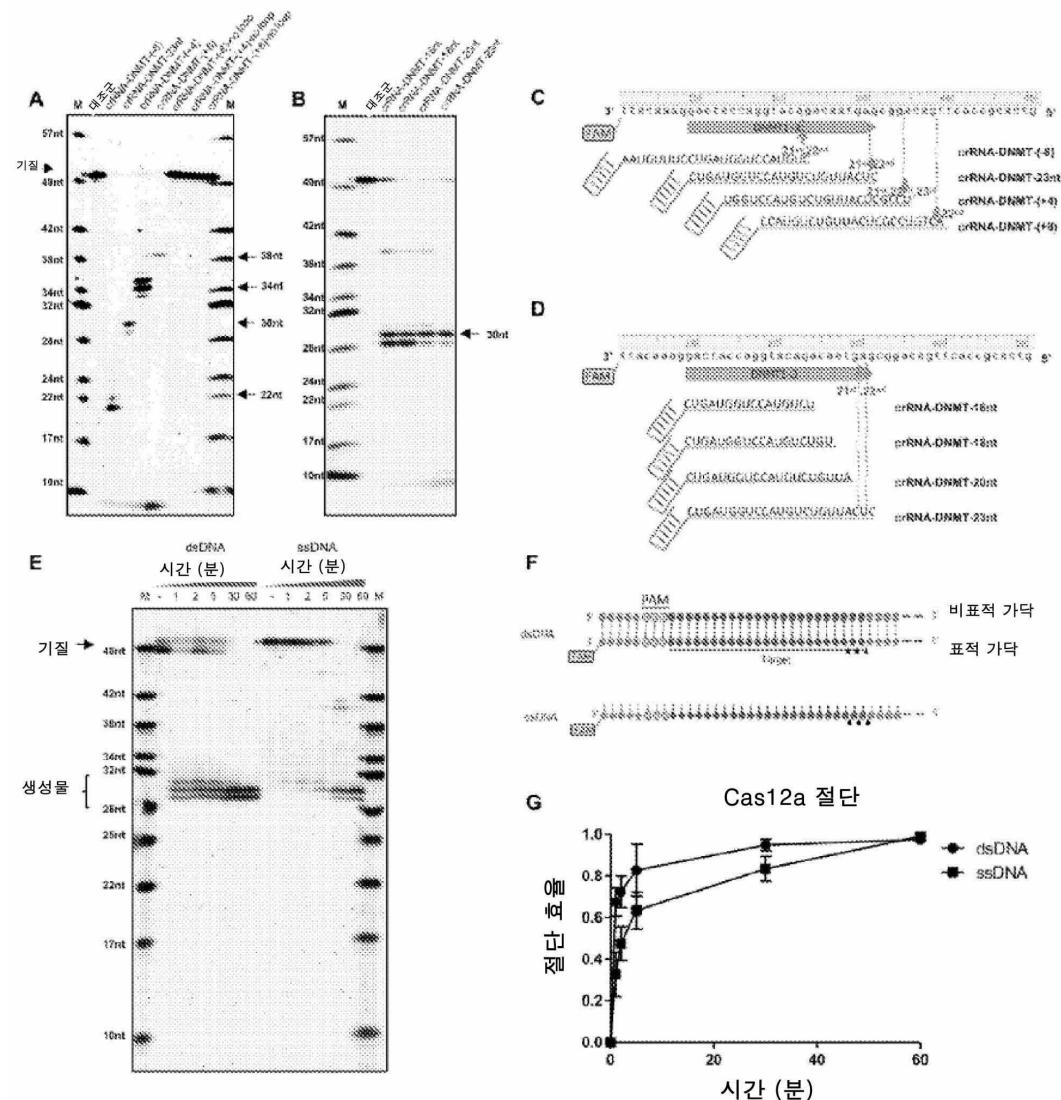
[0302]

[0303]

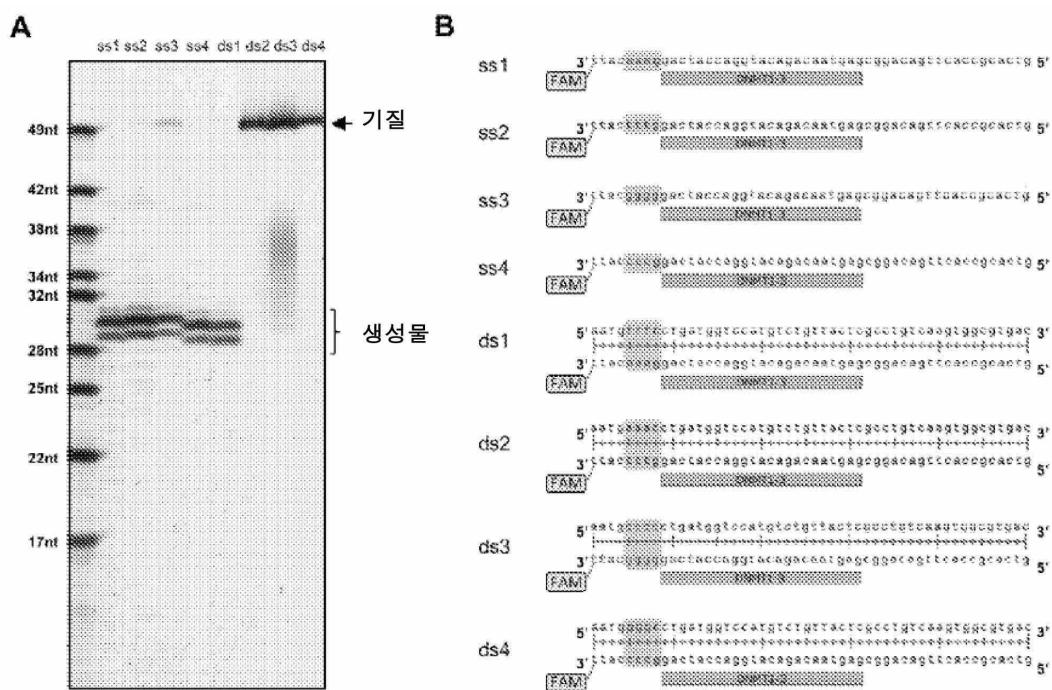
본 발명에서 언급된 모든 문서는 각각의 문서가 개별적으로 참조로 통합된 것처럼 본원에 참조로 포함된다. 또한, 본 발명의 상기 교시를 읽은 후, 당업자는 본 발명에 대해 다양한 변경 또는 수정을 수행할 수 있으며, 이러한 동등한 형태는 또한 본 출원의 첨부된 청구 범위에 의해 정의된 범위 내에 속한다는 것이 이해되어야 한다.

도면

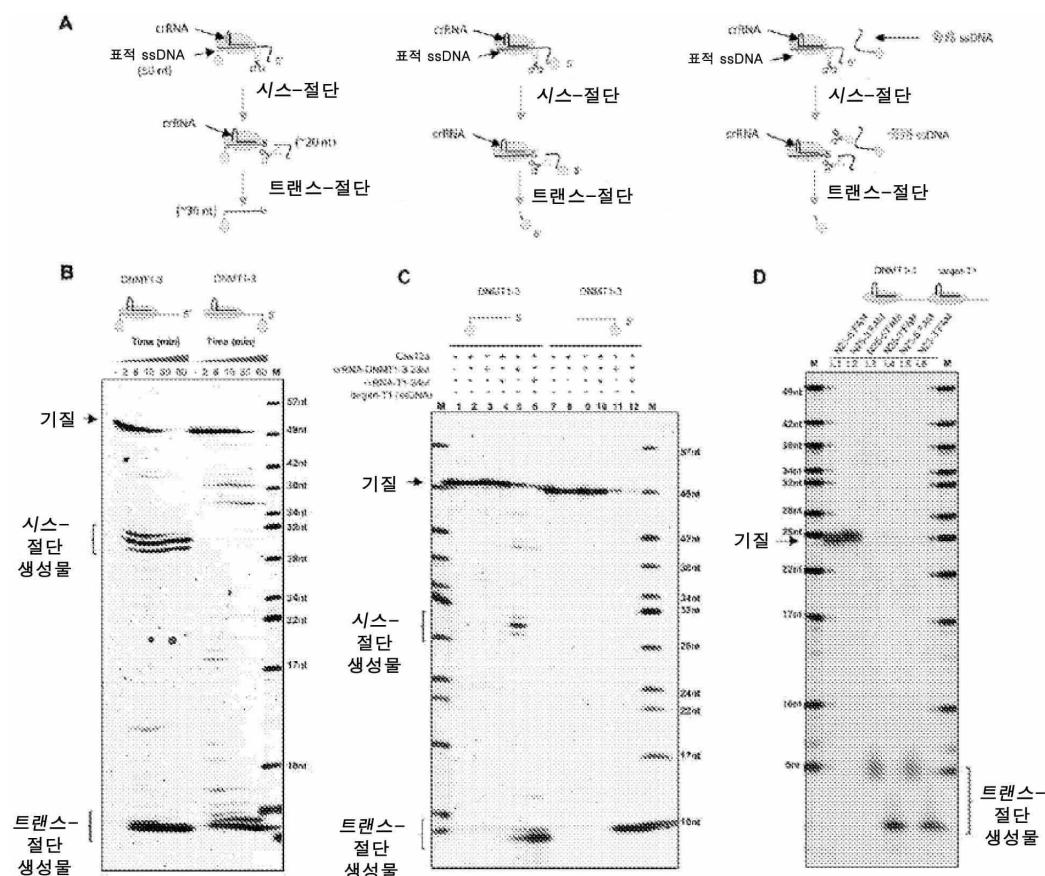
도면1



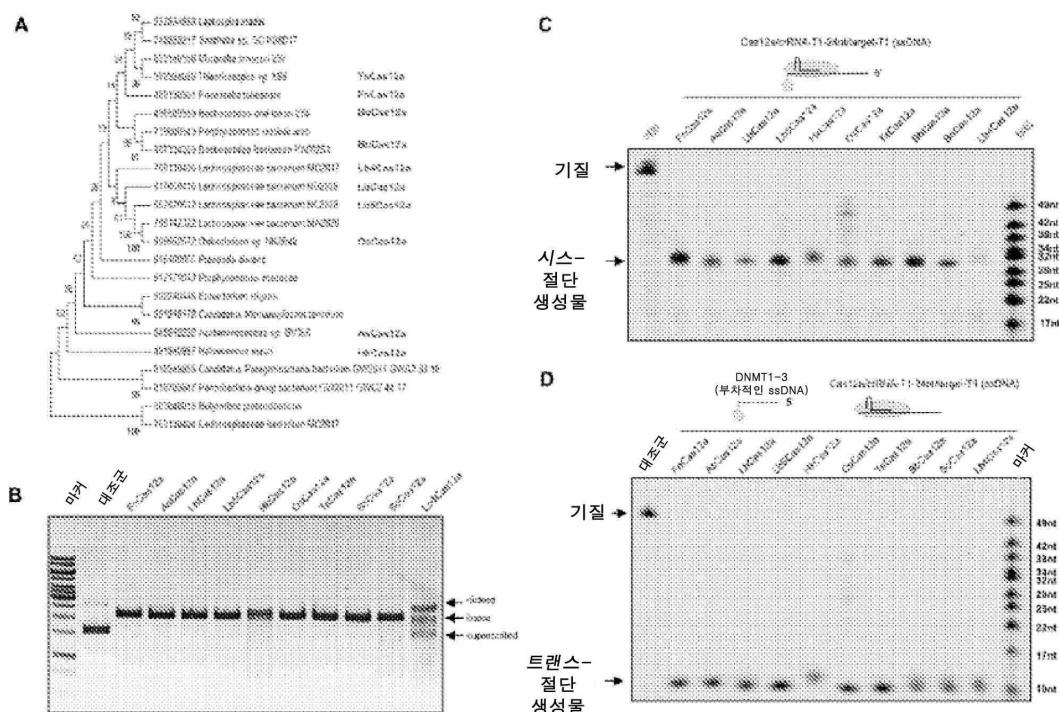
도면2



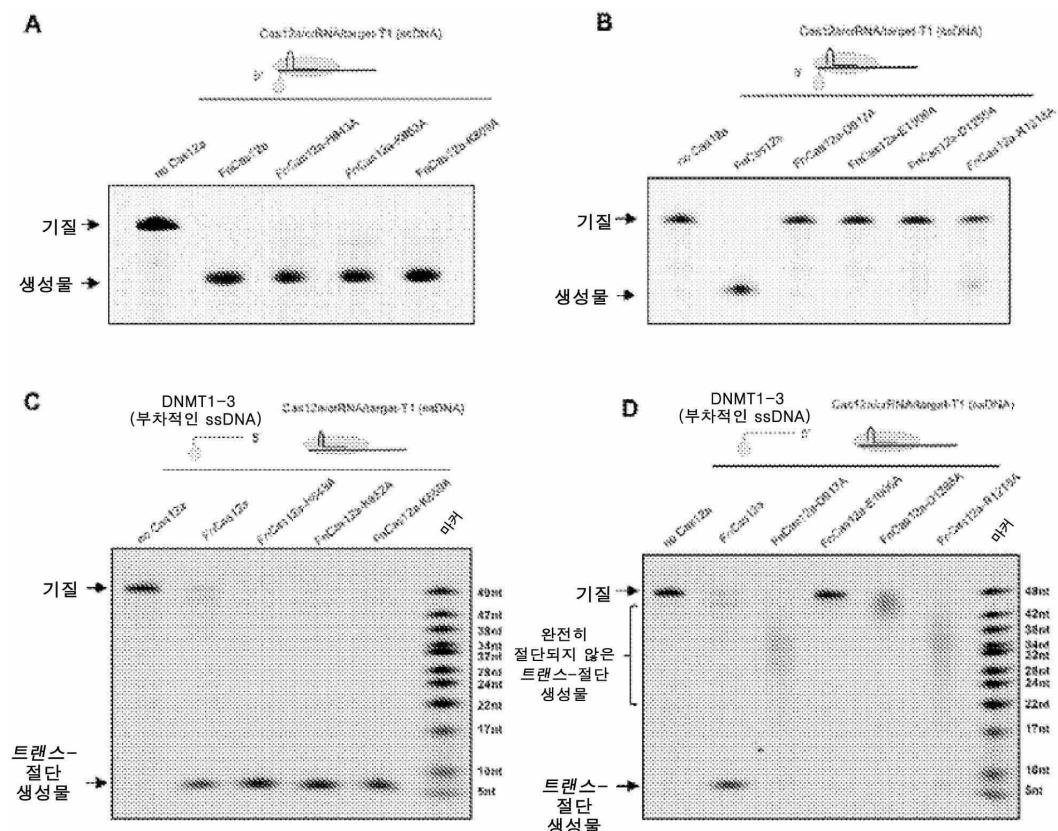
도면3



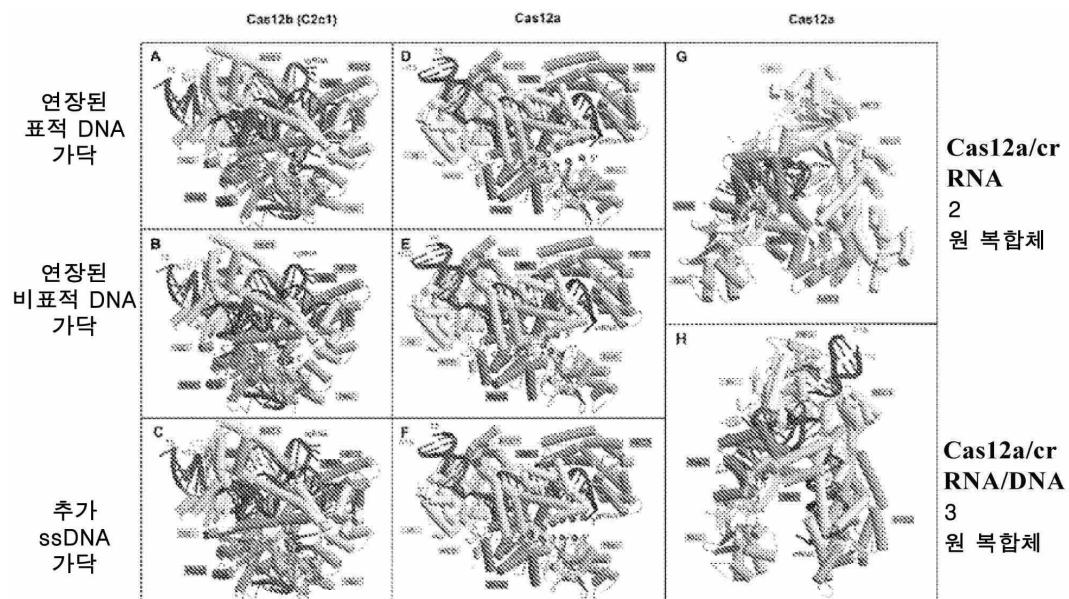
도면4



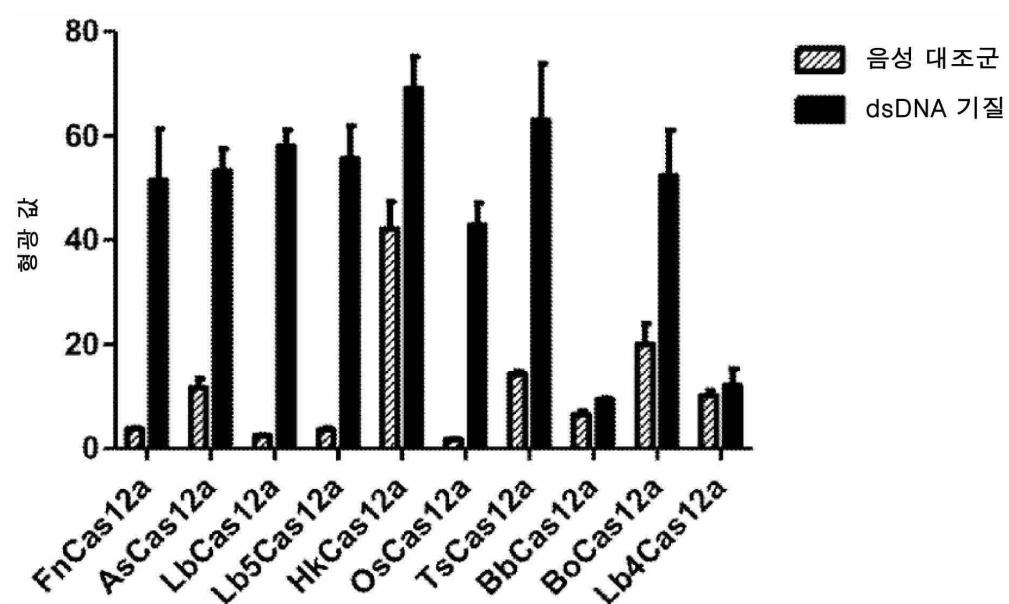
도면5



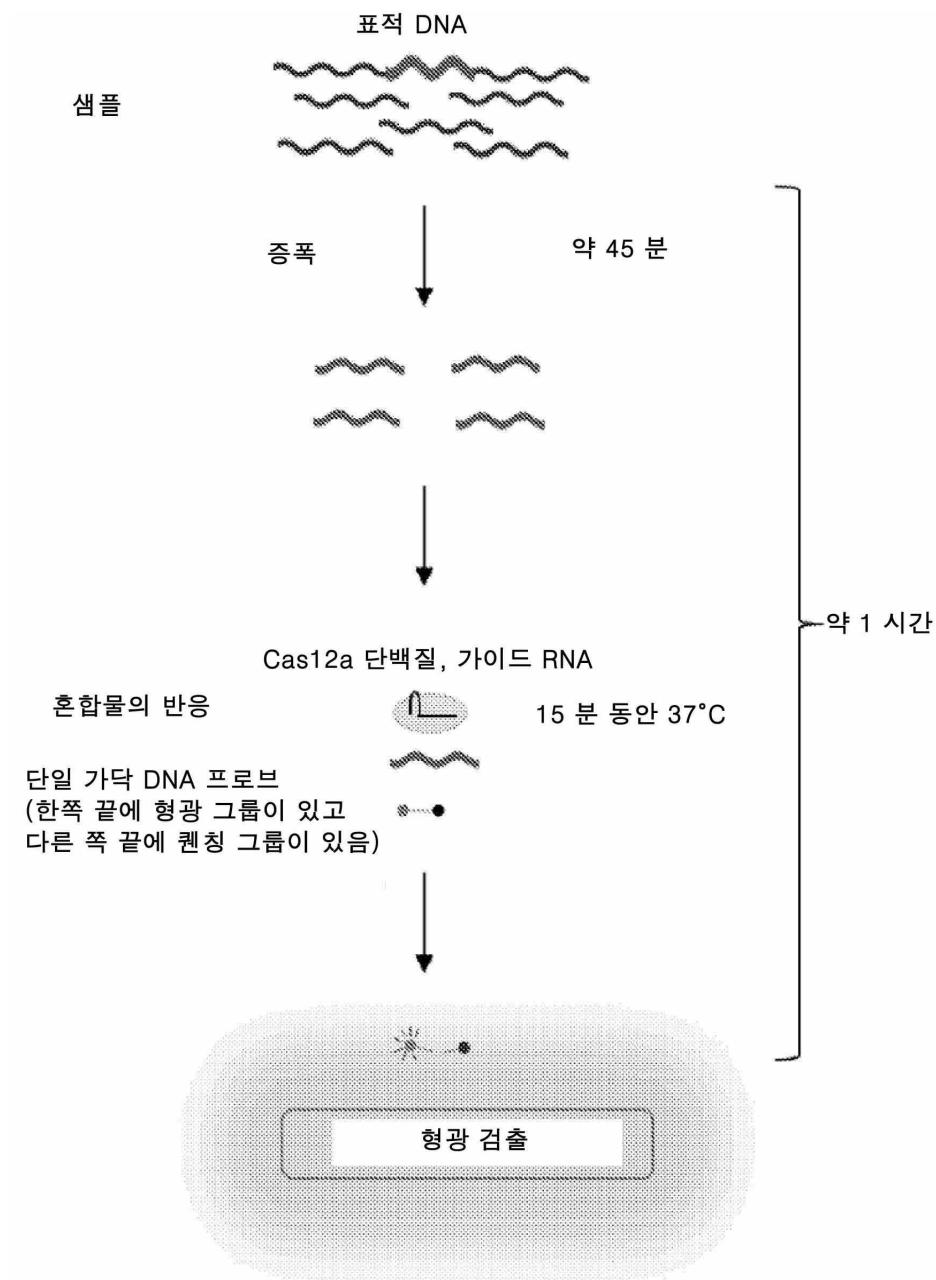
도면6



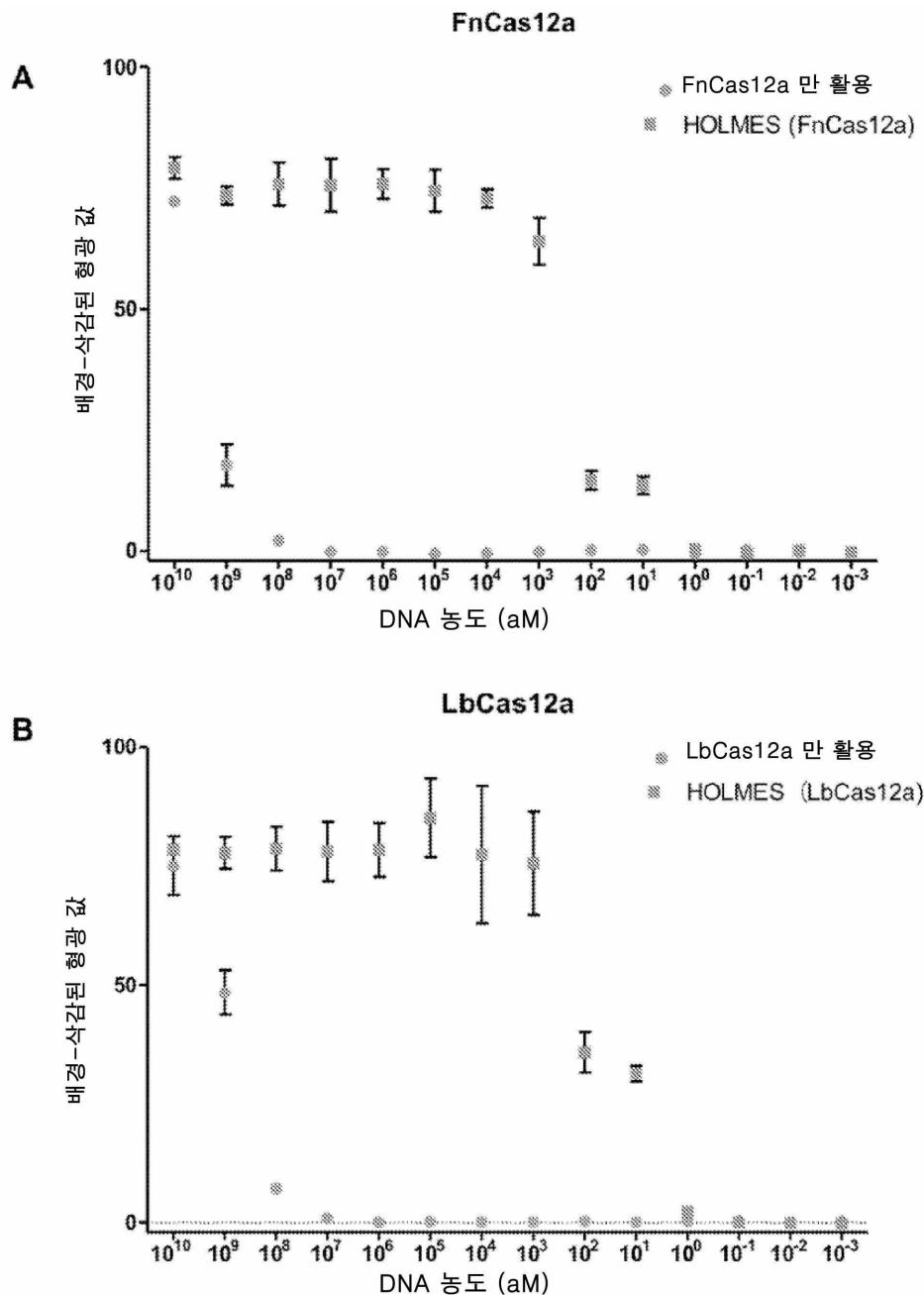
도면7



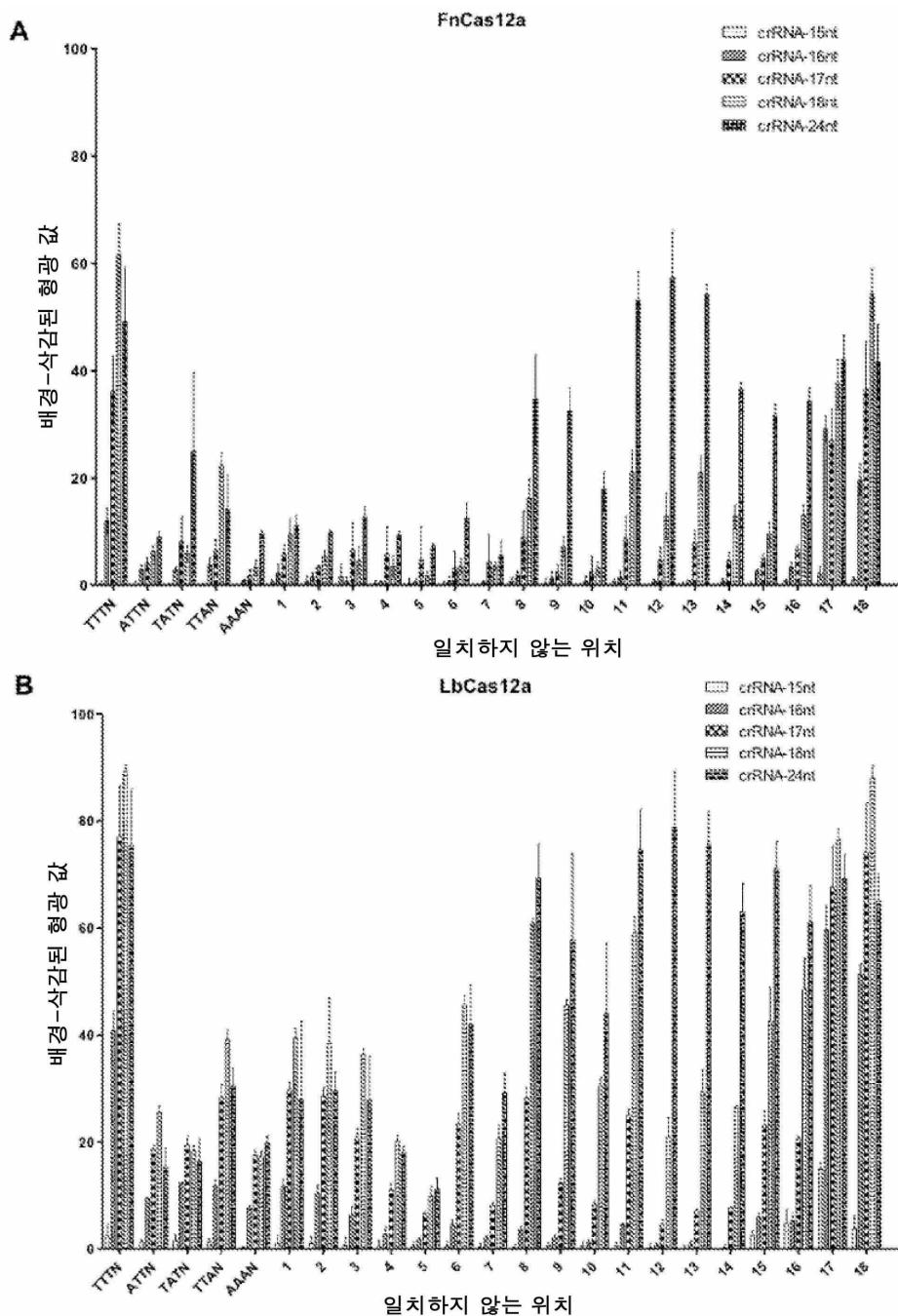
도면8



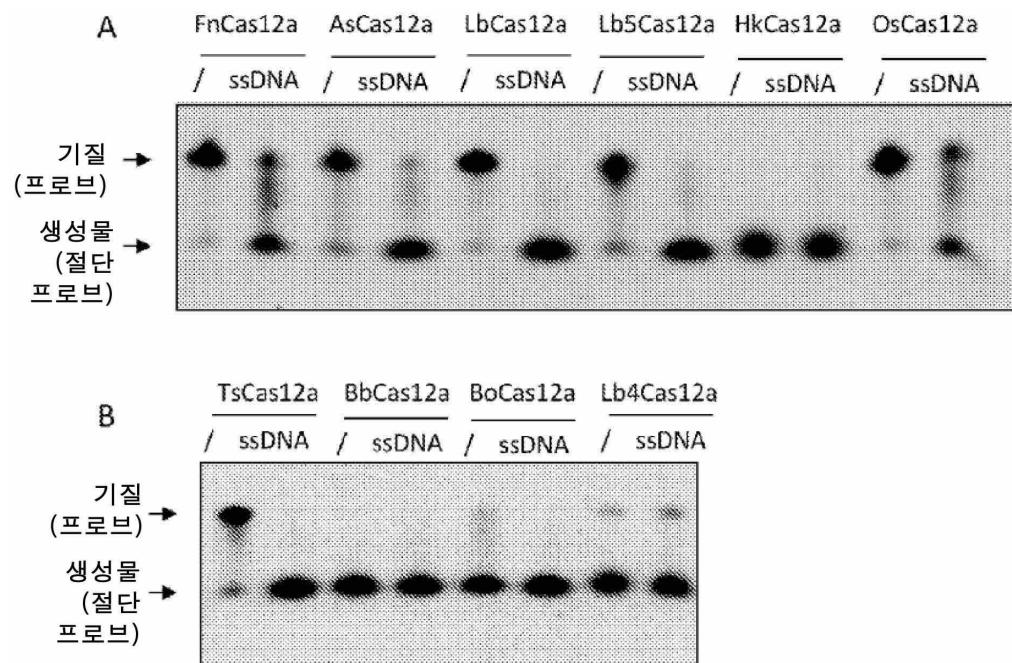
도면9



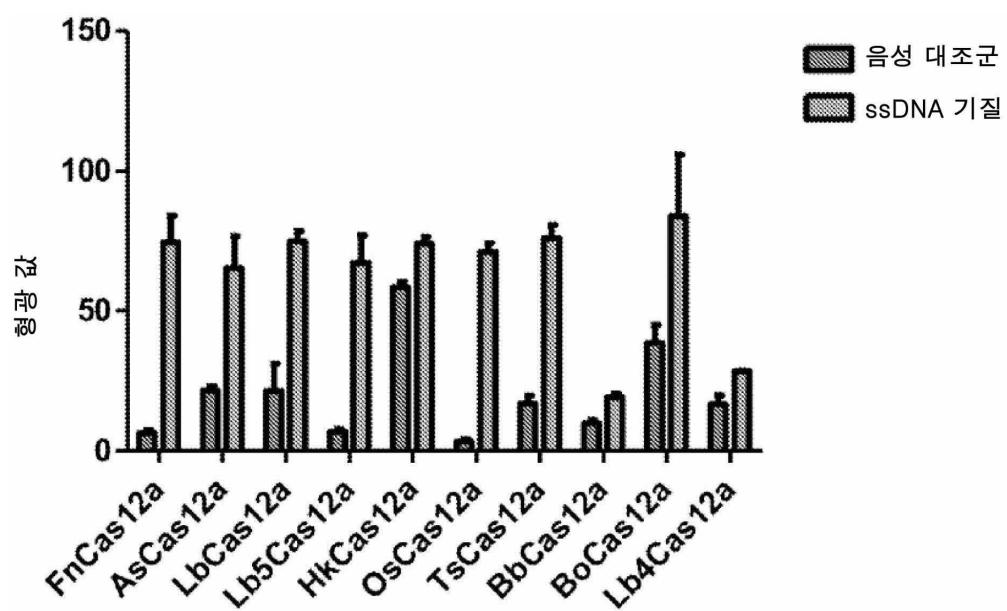
도면10



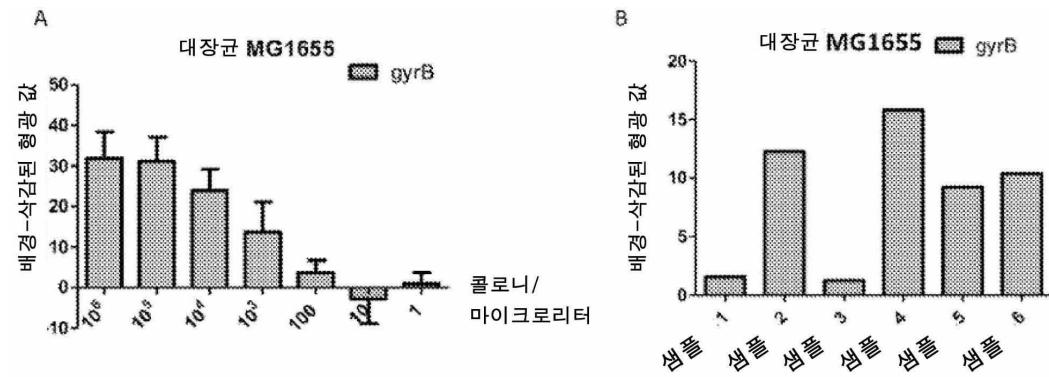
도면11



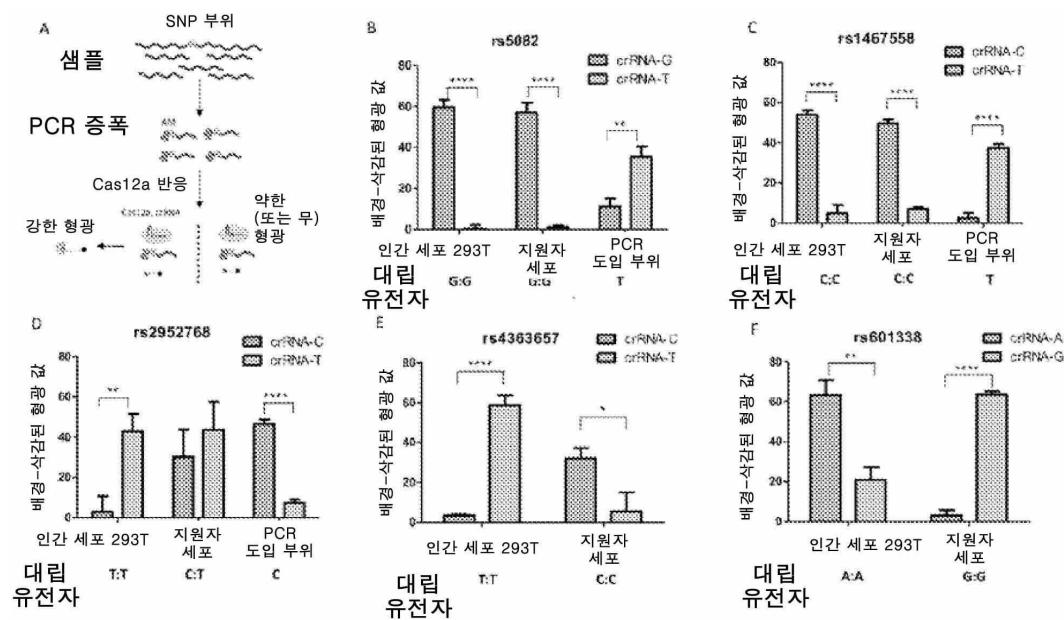
도면12



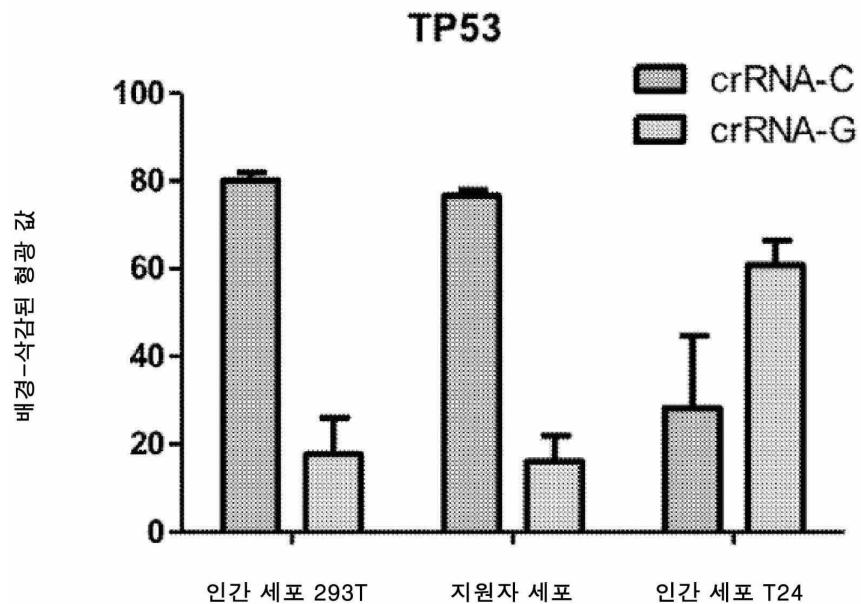
도면13



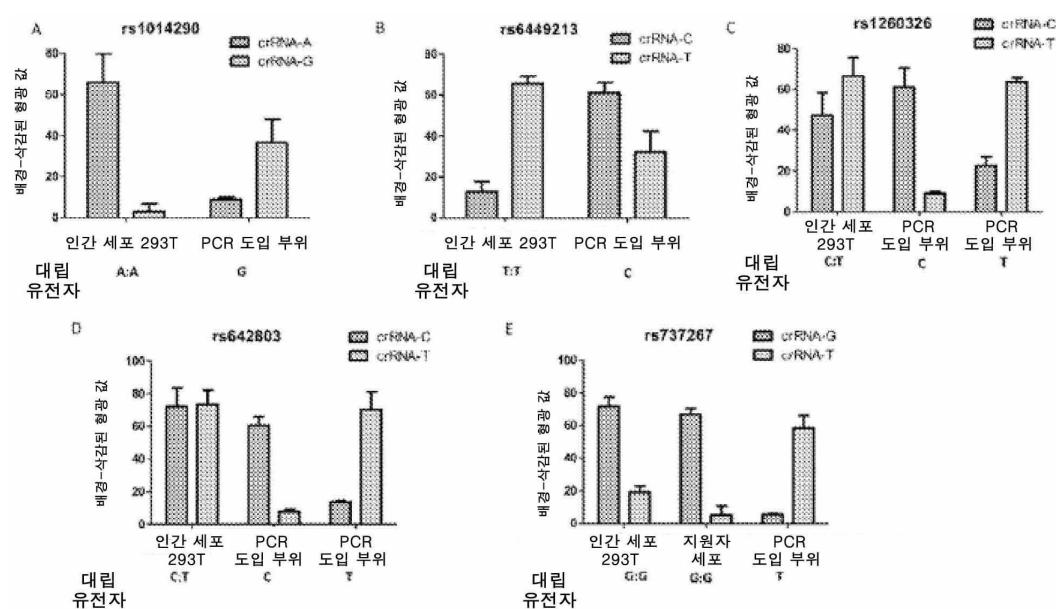
도면14



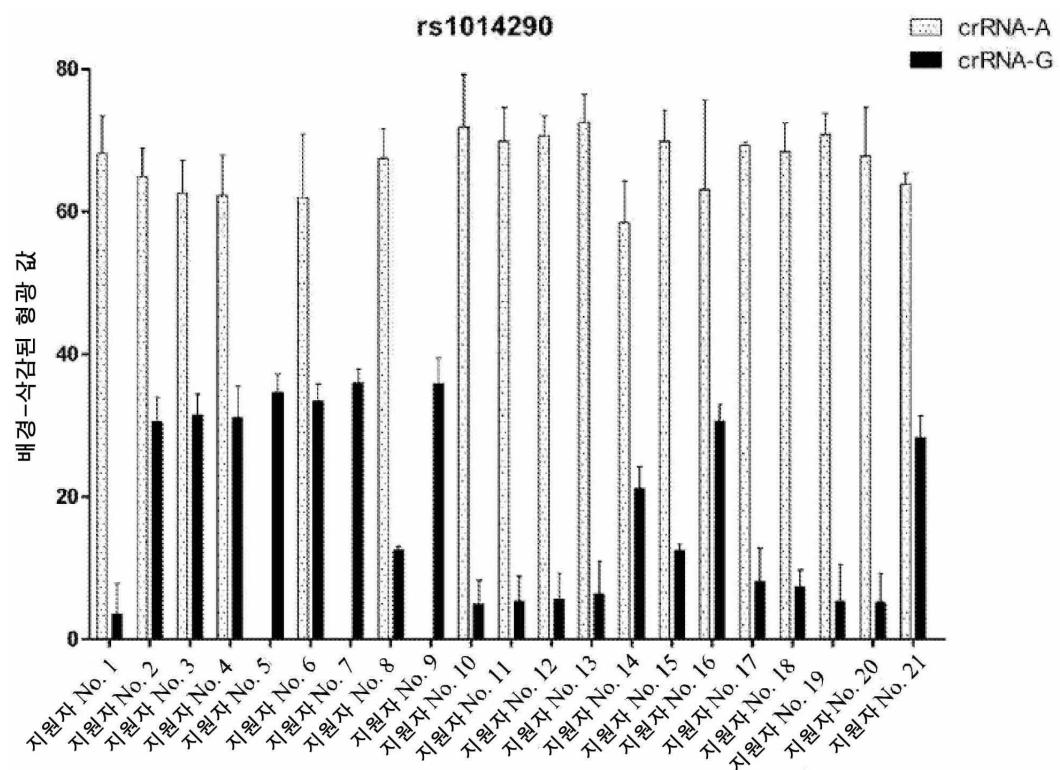
도면15



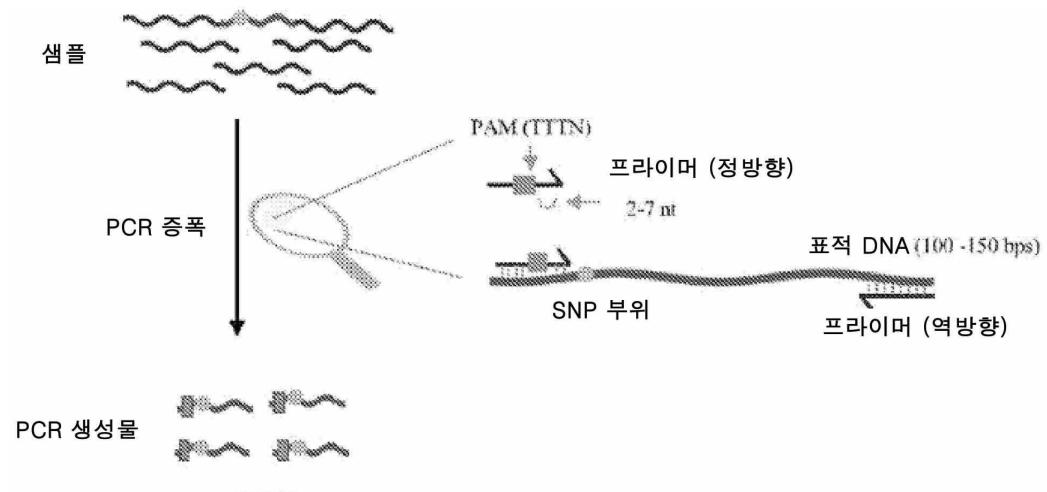
도면16



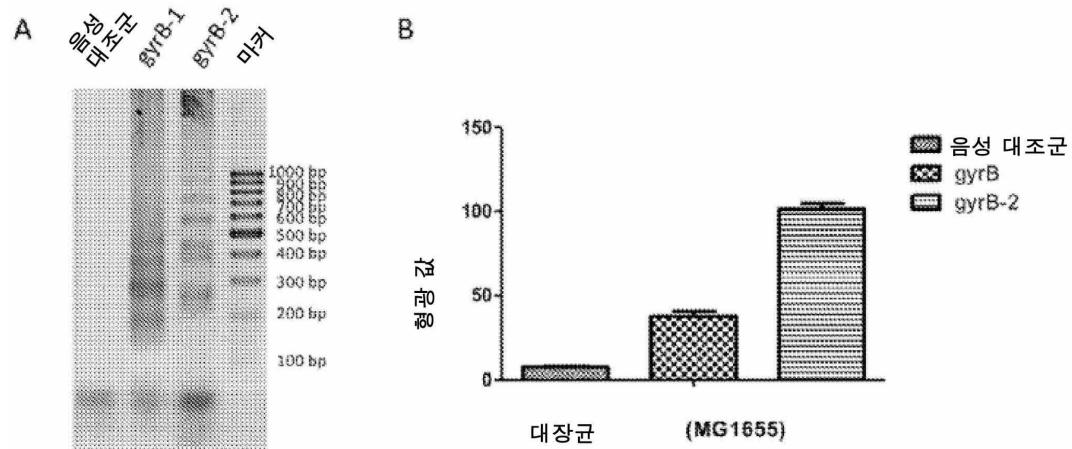
도면17



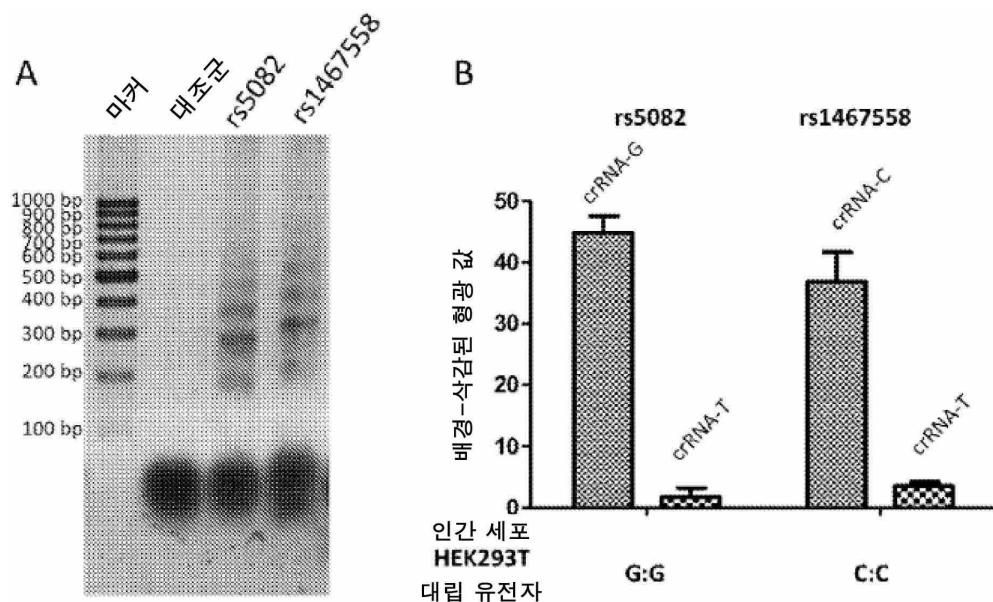
도면18



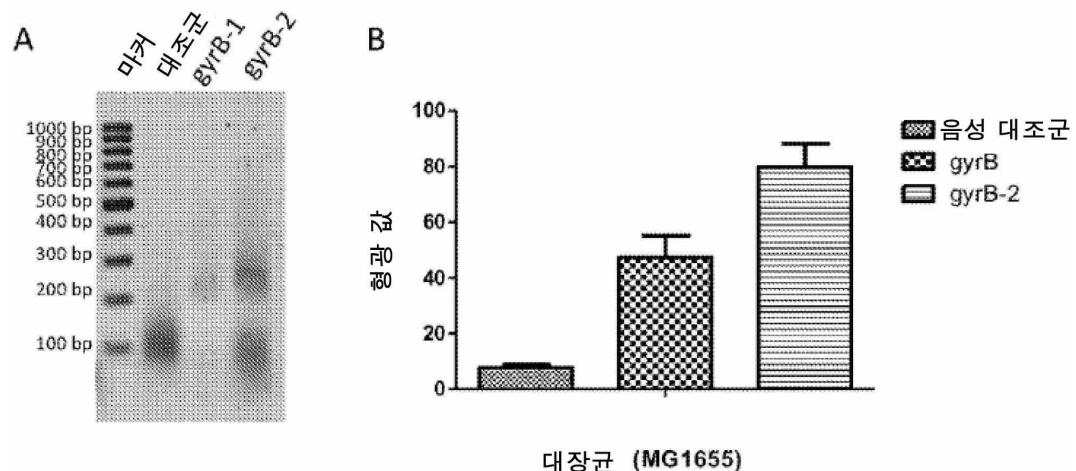
도면19



도면20

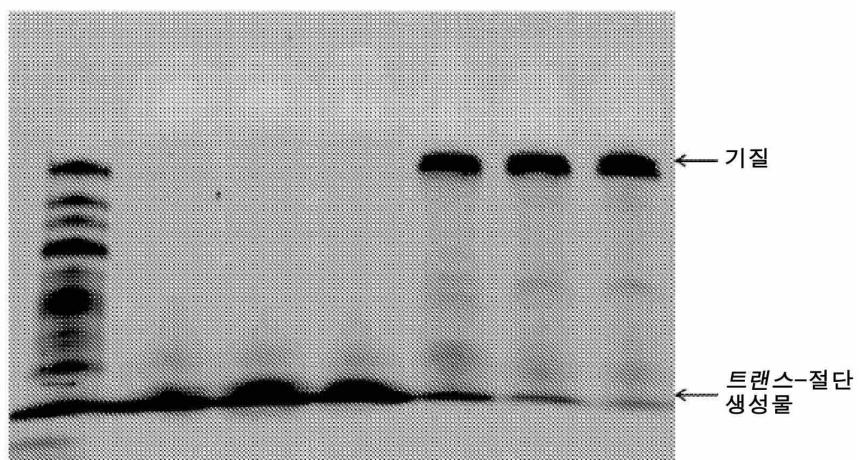


도면21

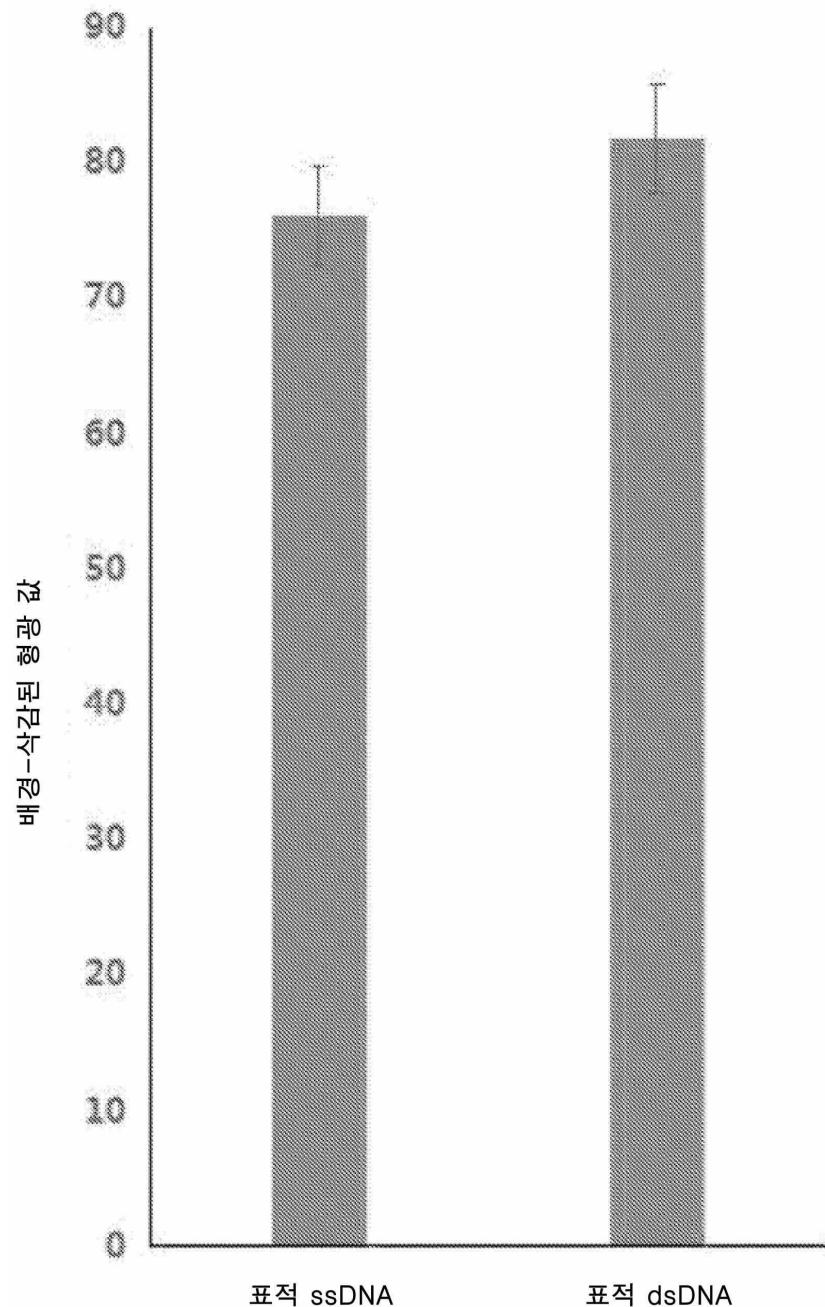


도면22

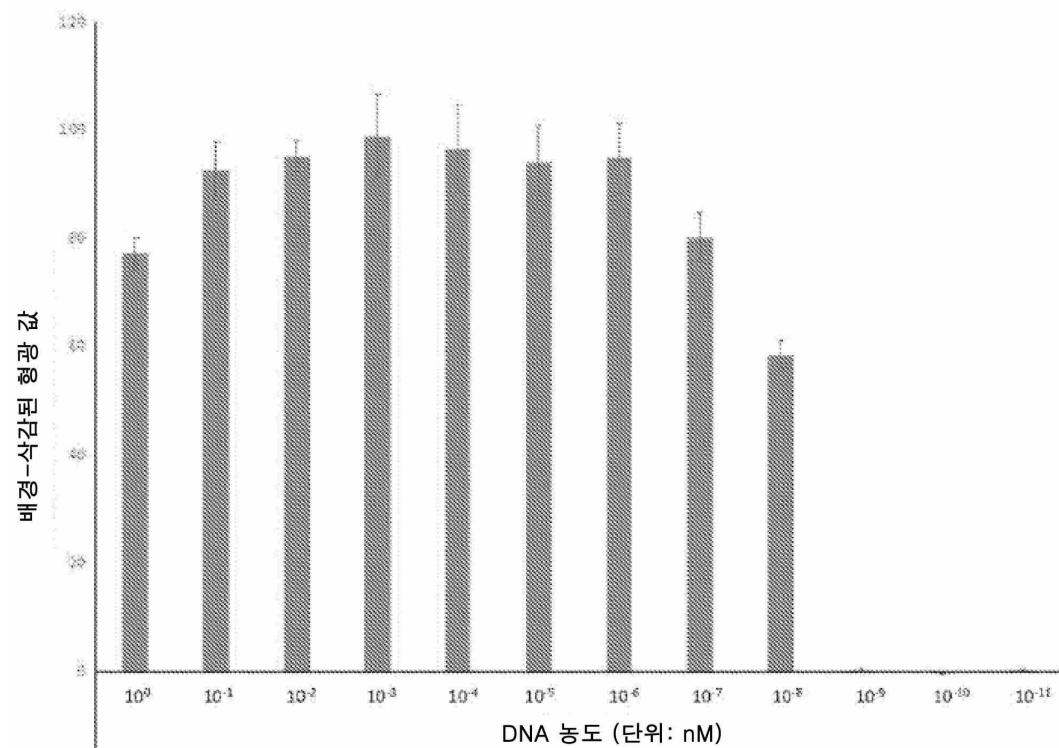
레인	M	1	2	3	4	5	6
Cas12b		+(100)	+(250)	+(500)	+(500)	+(500)	-
sgRNA		+(100)	+(250)	+(500)	+(500)	-	-
표적 DNA (ssDNA:T1)		+	+	+	-	-	-
ssDNA 프로브 (ssDNA:DNMT1-3'-FAM)		+	+	+	+	+	+



도면23



도면24



서 열 목 록

- <110> SHANGHAI TOLO BIOTECHNOLOGY COMPANY LIMITED
SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES
- <120> USE OF CAS PROTEIN, METHOD FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID
MOLECULE, AND KIT
- <130> IPA200006-US
- <150> CN 201710573752.0
- <151> 2017-07-14
- <160> 187
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 50
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic nucleotide
- <400> 1
- aatgtttcct gatggtccat gtctgttact cgcctgtcaa gtggcggtgac 50

<210> 2

<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 2
gtcacgccac ttgacaggcg agtaacagac atggaccatc aggaaacatt 50
<210> 3
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 3
gtcacgccac ttgacaggcg agtaacagac atggaccatc aggaaacatt 50
<210> 4
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 4
gtcacgccac ttgacaggcg agtaacagac atggaccatc aggaaacatt 50
<210> 5
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 5
tttctgtttg ttatcgcaac tttctactga attcaagctt tactctagaa agaggagaaa 60
ggatcc 66
<210> 6
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 6

ggatccttc tcctttct agagtaaagg ttgaattcag tagaaagttt cgataacaaa	60
cagaaa	66
<210> 7	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 7	
tttcgtttg ttatcgcaac tttctactga attcaagctt tactctagaa agaggagaaa	60
ggatcc	66
<210> 8	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 8	
ggatccttc tcctttct agagtaaagg ttgaattcag tagaaagttt cgataacaaa	60
cagaaa	66
<210> 9	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 9	
tttcgtttg ttatcgcaac tttctactga attcaagctt tactctagaa agaggagaaa	60
ggatcc	66
<210> 10	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 10	

ggatccttc tcctttct agagtaaagg ttgaattcag tagaaagttt cgataacaaa	60
cagaaaa	66
<210> 11	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 11	
gtcacgccac ttgacaggcg agtaaacagac atggaccatc agtttcatt	50
<210> 12	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 12	
gtcacgccac ttgacaggcg agtaaacagac atggaccatc aggccccatt	50
<210> 13	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 13	
gtcacgccac ttgacaggcg agtaaacagac atggaccatc agggggcatt	50
<210> 14	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 14	
aatgaaacct gatggtccat gtctgttact cgcctgtcaa gtggcgtgac	50
<210> 15	
<211> 50	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 15

aatgggcct gatggtccat gtctgttact cgcctgtcaa gtggcgtgac 50

<210> 16

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 16

aatccccct gatggtccat gtctgttact cgcctgtcaa gtggcgtgac 50

<210> 17

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 17

acaaacagaa a 11

<210> 18

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 18

cgataacaaa cagaaa 16

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 19

aagtgcgat aacaaacaga aa 22

<210> 20

<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	20	
agttagaaagt tgcgataaca aacagaaa		28
<210>	21	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	21	
gaattcagta gaaagt tgcg ataacaaaca gaaa		34
<210>	22	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	22	
gaattcagta gaaagt tgcg ataacaaaca gaaa		24
<210>	23	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	23	
agttagaaagt tgcgataaa		18
<210>	24	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	24	

aagtgcgat aa	12
<210> 25	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<220><221> misc_feature	
<222> (7)..(12)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 25	
cgataannnn nn	12
<210> 26	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 26	
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnn	25
<210> 27	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(25)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 27	
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnn	25
<210> 28	
<211> 66	

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 28

```
ggatccttc tcctttct agagtaagg ttgaattcg tagaaagtgcgataacaaa 60
cagaaa                                         66
```

<210> 29
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 29

```
cacaattcca cacaacatac gagccgga 28
```

<210> 30
<211> 27

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 30

```
tgttagccgtatgttaggccac cacttca 27
```

<210> 31
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 31

```
agttttgtta tcgcaacttt ctactgaattc 31
```

<210> 32
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 32

agttttgata tcgcaactt c	31
<210> 33	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 33	
agttttgtaa tcgcaactt ctactgaatt c	31
<210> 34	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 34	
agttttgtt tcgcaactt ctactgaatt c	31
<210> 35	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 35	
agttttgtta acgcaactt ctactgaatt c	31
<210> 36	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 36	
agttttgtta tggcaactt ctactgaatt c	31
<210> 37	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 37

agtttgtta tcccaacttt ctactgaatt c 31

<210> 38

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 38

agtttgtta tcggaacttt ctactgaatt c 31

<210> 39

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 39

agtttgtta tcgtacttt ctactgaatt c 31

<210> 40

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 40

agtttgtta tcgcatctt ctactgaatt c 31

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 41

agtttgtta tcgcaagttt ctactgaatt c 31

<210> 42

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 42

aaaagttatc gcaacttct actgaattc

29

<210> 43

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 43

agtttgtta tcgcaacatt ctactgaatt cggcatag

39

<210> 44

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 44

agtttgtta tcgcaactat ctactgaatt cggcatag

39

<210> 45

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 45

agtttgtta tcgcaactta ctactgaatt cggcatag

39

<210> 46

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 46

agtttgtta tcgcaactt gtactgaatt cggcatag

39

<210>	47	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	47	
agttttgtta tcgcaactt caactgaatt cggtcatag		39
<210>	48	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	48	
agttttgtta tcgcaactt cttctgaatt cggtcatag		39
<210>	49	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	49	
agttttgtta tcgcaactt ctatgtgaatt cggtcatag		39
<210>	50	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	50	
agttttgtta tcgcaactt ctacagaatt cggtcatag		39
<210>	51	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	

<400>	51	
agttagtta tcgcaactt ctactgaatt c		31
<210>	52	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	52	
agttagtta tcgcaactt ctactgaatt c		31
<210>	53	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	53	
agttagtta tcgcaactt ctactgaatt c		31
<210>	54	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	54	
agttgtcggtt cctcaactcc ggcgttcc		28
<210>	55	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	55	
tcgacgcca taccgtctt ttcatgg		28
<210>	56	
<211>	26	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	56	
ctgccttgc ttctaccc ttgcctgt		26
<210>	57	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	57	
ttgcttctac cttgcctgt tctgg		25
<210>	58	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	58	
ttttctggct gggatggcc gatgg		25
<210>	59	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	59	
agcaataaca ctaatattga ttccttcaga tatggactcc tttcatagta		50
<210>	60	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	60	
ttgattcctt cagatatgga ctccttcat agtataacg		39
<210>	61	
<211>	37	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide

<400> 61

tgagcatgt tattttacg cgttgtcatt gaaagag 37

<210> 62

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 62

agcctggca acgagtgaaa ctctg 25

<210> 63

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 63

acaggaggga caaaggccta agtgtcc 27

<210> 64

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 64

catcatagga ttgggaaaag gacatttcag tcattcag 38

<210> 65

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 65

agagtccttc ttctcaatt ttctagaata atttagtact ttgggtac 48

<210> 66
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 66

cagtaactgaa aaaacctgcc tatcaataaa agccctagac 40

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 67

gcttcaccgg ctaccttgc tcct 24

<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 68

ttcacctgca ggcccccgag g 21

<210> 69
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 69

cctgactttc aactctgtct ctttcctttt tttagatgt 39
<210> 70
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide

<400>	70	
tgctgtgact gcttgttagat ggccatgg		28
<210>	71	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	71	
agttccaga cctcagtgc caagatactt ttctac		36
<210>	72	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	72	
acctcagtgc acaagatact tttctacgtc atccac		36
<210>	73	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	73	
agctccagtg gatggaagat ctttgagatc cag		33
<210>	74	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	74	
agtcaaagag attcatgcct gggacttaa tcacattat		40
<210>	75	
<211>	33	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 75

atgcctggaa cttaatcac atttatcgga agg	33
-------------------------------------	----

<210> 76

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 76

caaatctgtc tccacacctc agctcacctt g	31
------------------------------------	----

<210> 77

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 77

ttcttgaacc caaactcacc tggcattaa actg	34
--------------------------------------	----

<210> 78

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 78

aaactcacct ggcatataaa ctgactctgt aag	33
--------------------------------------	----

<210> 79

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 79

aaactcacct ggcatataaa ctgtctgtgt aag	33
--------------------------------------	----

<210> 80

<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	80	
tgccgaggct gagttcagct actctcc		27
<210>	81	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	81	
acacagcacc gtgggtcaga cttgc		26
<210>	82	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	82	
tgggtcagac ttgccgtg agagtc		26
<210>	83	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	83	
tgggtcagac ttgtgtgt agagtc		26
<210>	84	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	84	

agcagtggcc atgtgatgct gatgatg

27

<210> 85

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 85

ccccggctct gtggctttg agaattt

27

<210> 86

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 86

ctctgttggc ttggagaatt gcctgtctgt gtc

33

<210> 87

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 87

ctctgttggc ttggagaatt gtctgtctgt gtc

33

<210> 88

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 88

accgataacct ggccgcctt ggatg

25

<210> 89

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	Synthetic nucleotide	
<220><221>	misc_feature	
<222>	(1)..(12)	
<223>	n is a, c, g, or t	
<400>	89	
nnnnnnnnnn nn		12
<210>	90	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	90	
gaaatataata cgactcacta taggg		25
<210>	91	
<211>	68	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	91	
gaattcagta gaaagtgcg ataaatctac aacagttagaa attccctata gtgagtcgta		60
ttaatttc		68
<210>	92	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	92	
agaaagtgc gataaatcta caacagttaga aattccctat agtgagtcgt attaatttc		59
<210>	93	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	

<400> 93

tagaaagtt cgataaatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtgc tattaatttc 60
60

<210> 94

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 94

gtagaaagtt gcgataaatc tacaacagta gaaattccct atagtggatc gtattaattt 60
c 61

<210> 95

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 95

agttagaaagt tgcgataaat ctacaacagt agaaattccc tatagtggatc cgtattaattt 60
tc 62

<210> 96

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 96

gagtaacaga catggaccat cagatctaca acagtagaaa ttccctatag tgagtgcgtat 60
taatttc 67

<210> 97

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 97

gacatggacc atcaggaaac attatctaca acagtagaaaa ttccctatag tgagtctat	60
taatttc	67
<210> 98	
<211> 67	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 98	
aggcgagtaa cagacatgga ccaatctaca acagtagaaaa ttccctatag tgagtctat	60
taatttc	67
<210> 99	
<211> 67	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 99	
tgacaggcga gtaacagaca tggatctaca acagtagaaaa ttccctatag tgagtctat	60
taatttc	67
<210> 100	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 100	
agacatggac catcagatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaatttc	60
	60
<210> 101	
<211> 62	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 101	
acagacatgg accatcagat ctacaacagt agaaattccc tatagtgagt cgtattaatt	60

tc

62

<210> 102

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 102

taacagacat ggaccatcg atctacaaca gtagaaattc cctatagtga gtcgtttaa 60

tttc 64

<210> 103

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 103

gacatggacc atcagaaac attccctata gtgagtcgta ttaatttc 48

<210> 104

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 104

aggcgagtaa cagacatgga ccaccctata gtgagtcgta ttaatttc 48

<210> 105

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 105

tgacaggcga gtaacagaca tggccctata gtgagtcgta ttaatttc 48

<210> 106

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 106

cctttccca gaacaggatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt	60
--	----

c	61
---	----

<210> 107

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 107

cctttccca gcacaggatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt	60
--	----

c	61
---	----

<210> 108

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 108

ctgaagcggtt atactataatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt	60
---	----

c	61
---	----

<210> 109

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 109

ctgaagcggtt gtactataatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt	60
---	----

c	61
---	----

<210> 110

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 110

tttatctga atgattatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaattc 60

60

<210> 111

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 111

tttatctga atgactatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaattc 60

60

<210> 112

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 112

aaaaaaagagt gagtaccatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaatt 60

c

61

<210> 113

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 113

aaaaaaagagt gggtaccatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaatt 60

c

61

<210> 114

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400>	114	
ggtagaaggt ccaggagatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt		60
c		61
<210>	115	
<211>	61	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	115	
ggtagaaggt ctaggagatc tacaacagta gaaattccct atagtgagtc gtattaattt		60
c		61
<210>	116	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	116	
ggcagggga gtactgatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaattc		60
		60
<210>	117	
<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	117	
ggcagggga ctactgatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtcg tattaattc		60
		60
<210>	118	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	118	

tcagtggatg atgtaatcta caacagtaga aattccatat agtgagtcgt attaattc 59

<210> 119

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 119

tcagtggatg acgttaatcta caacagtaga aattccatat agtgagtcgt attaattc 59

<210> 120

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 120

gaaattctc ctccgaatc tacaacagta gaaattccct atagtggatc gtattaattt 60

c 61

<210> 121

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 121

gaaattctc ctccaaatc tacaacagta gaaattccct atagtggatc gtattaattt 60

c 61

<210> 122

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 122

tcttacagag tcagttatct acaacagtaga aaattcccta tagtgagtcg tattaattc 60

60

<210> 123
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 123
tcttacagag ccagttatct acaacagtag aaattcccta tagtgagtgc tattaattc 60
60

<210> 124
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 124
gtcttacaga gacagttatc tacaacagta gaaattccct atagtggatc gtattaattt 60
c 61

<210> 125
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 125
ctggactctc accggatcta caacagtaga aattccctat agtgaggcgt attaattc 59

<210> 126
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 126
ctggactctc accagatcta caacagtaga aattccctat agtgaggcgt attaattc 59

<210> 127
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 127

cacagacagg caattctatc tacaacagta gaaattccct atagtggatc gtattaattt 60

c 61

<210> 128

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 128

cacagacaga caattctatc tacaacagta gaaattccct atagtggatc gtattaattt 60

c 61

<210> 129

<211> 68

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 129

tgcgcgttgt cgccgacg aatgatctac aacagtagaa attccctata gtgagtcgta 60

ttaatttc 68

<210> 130

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 130

catggtgcgat ttctggcc 18

<210> 131

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400>	131	
cggcgtttg ttcttggta		20
<210>	132	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	132	
acaactcacg cagacgttgc gcaaccttca ccaatgtgac cg		42
<210>	133	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	133	
gttcctcaac tccggcggtt ccgatgccgc cttcatatgt g		41
<210>	134	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	134	
cagaatttca tattcgaact		20
<210>	135	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	135	
gacggcaaag aagaccactt		20
<210>	136	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic nucleotide

<400>

> 136

cgacggcaaa gaagacca

18

<210> 137

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 137

agcctgccag gtgagtagc

18

<210> 138

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 138

cgggtggatc ggcgttttgt tcactatgaa ggcggcatca

40

<210> 139

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 139

gtattggcgt cgaagtggcg ttgcgtgcgg aatgttgttg

40

<210> 140

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide

<400> 140

ttgttcagat attcaacgaa cg

22

<210> 141

<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>		
>	141	
gtggaacgat ggcttccagg		20
<210>	142	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	142	
cagctgtaga ccataagcc		19
<210>	143	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	143	
gtggctgagc atcgttat		18
<210>	144	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	144	
actatgaaag gagtccatat ctgaaggaat tcaggttagtg gtttggga		48
<210>	145	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	145	
gcttcagcct actgcaaattc ctacgcgttg tcattgaaag		40

<210>	146	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>		
>	146	
tcaatattag ttttattgct tg		22
<210>	147	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	147	
tggtgaaaga ttggacagg ac		22
<210>	148	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	148	
gctggaaagg tcaaggac		19
<210>	149	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	149	
ggggtttgtt gcacagtcc		19
<210>	150	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	

<400>	150	
caaaggtaga agcaaaggca ggagggttgc ccaaggcac acag		44
<210>	151	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>		
>	151	
ctgggaagag ggagggctca gtgttgccac actttactg g		41
<210>	152	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	152	
gtgagcgggt ggggtgct		18
<210>	153	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	153	
tctaagtctt ccagcacggg atc		23
<210>	154	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	154	
atataaaatt ctggcgaaac gtctgcgtga gttg		34
<210>	155	
<211>	33	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 155
aacgtctgc gtgagttgtc gttcctcaac tcc 33
<210> 156
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400>
> 156
acttcgacgc caataccgtc ttttcagtg gag 33
<210> 157
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 157
atctgagaag tggcacttat cgcaacttc tactgaggc atagctgtt cctgtgtga 59
<210> 158
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 158
gtcctctaga cccctatagt gagtcgtatt aattcatga ttacgaattc gagctcggt 59
<210> 159

<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 159
ccactttcca ggtggcaaag cccgttgagc ttctcaaattc tgagaagtgg cacttac 58
<210> 160

<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 160
tggaaagtgg ccattggcac acccggtgaa aaattctgtc ctctagaccc ctagatgtga 59
<210> 161
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400>
> 161
gaaattaata cgactcacta taggg 25
<210> 162
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 162
tcagtagaaaa gttgcgataa gtgc 24
<210> 163
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 163
aacagacatg gaccatcagg gtg 23
<210> 164

<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 164

tttctgttg ttatcgcaac ttctactga attcaagctt tactctagaa agaggagaaa	60
ggatcc	66
<210> 165	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 165	
ggatccttc tcctttct agagtaaagc ttgaattcag tagaaagttg cgataacaaa	60
cagaaa	66
<210> 166	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 166	
gtcacgccac ttgacaggcg agtaaacagac atggaccatc agaaaacatt	50
<210> 167	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 167	
ggatccttc tcctttct agagtaaagc ttgaattcag tagaaagttg cgataacaaa	60
cagaaa	66
<210> 168	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic nucleotide	
<400> 168	
tttctgttg ttatcgcaac ttctactga attcaagctt tactctagaa agaggagaaa	60
ggatcc	66

<210>	169	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	169	
cctgatggtc catgtctgtt ggtcatagct gtttcctgtg tg		42
<210>	170	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	170	
tggaccatca ggggccact tctcagattt gagaag		36
<210>	171	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	171	
gaaattaata cgactcacta taggg		25
<210>	172	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	172	
aacagacatg gaccatcagg gtg		23
<210>	173	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	

<400>	173	
aatgttccct gatggtccat gtctgttact cgcctgtcaa gtggcgtgac		50
<210>	174	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	174	
gtcacgccac ttgacaggcg agtaaacagac atggaccatc aggaaacatt		50
<210>	175	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	175	
gtgaacgttc ccttagcact		20
<210>	176	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	176	
gggagggcag aactagtcc		19
<210>	177	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	177	
cgccacttga caggcgagta actgccactt attgggtcag c		41
<210>	178	
<211>	39	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	178	
gcgttccc cagagtgact tagcagctc ctcccttt		39
<210>	179	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	179	
aggaaacatt aacgtactga tg		22
<210>	180	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>		
>	180	
ttcctttat ttcccttcag c		21
<210>	181	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	181	
gtcacgccac ttgacaggcg agtaacagac atggaccatc aggaaacatt		50
<210>	182	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic nucleotide	
<400>	182	
aatttccct gatggtccat gtctgttact cgccctgtcaa gtggcggtgac		50
<210>	183	

<211> 111
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 183
gtctagagga cagaatttt caacgggtgt gccaatggcc actttcagg tggcaaagcc 60
cgttgagctt ctcaaatctg agaagtggca ccctgatggt ccatgtctgt t 111
<210> 184
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 184
cctgatggtc catgtctgtt 20
<210> 185
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 185
gtcacgccac ttgacaggcg agtaacagac atggaccatc aggaaacatt 50
<210> 186
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide
<400> 186
gtcacgccac ttgacaggcg agtaacagac atggaccatc aggaaacatt 50
<210> 187
<211> 1129
<212> PRT
<213> Alicyclobacillus acidoterrestris
<400> 187

Met Ala Val Lys Ser Ile Lys Val Lys Leu Arg Leu Asp Asp Met Pro

1 5 10 15

Glu Ile Arg Ala Gly Leu Trp Lys Leu His Lys Glu Val Asn Ala Gly

20 25 30

Val Arg Tyr Tyr Thr Glu Trp Leu Ser Leu Leu Arg Gln Glu Asn Leu

35 40 45

Tyr Arg Arg Ser Pro Asn Gly Asp Gly Glu Gln Glu Cys Asp Lys Thr

50 55 60

Ala Glu Glu Cys Lys Ala Glu Leu Leu Glu Arg Leu Arg Ala Arg Gln

65 70 75 80

Val Glu Asn Gly His Arg Gly Pro Ala Gly Ser Asp Asp Glu Leu Leu

85 90 95

Gln Leu Ala Arg Gln Leu Tyr Glu Leu Leu Val Pro Gln Ala Ile Gly

100 105 110

Ala Lys Gly Asp Ala Gln Gln Ile Ala Arg Lys Phe Leu Ser Pro Leu

115 120 125

Ala Asp Lys Asp Ala Val Gly Gly Leu Gly Ile Ala Lys Ala Gly Asn

130 135 140

Lys Pro Arg Trp Val Arg Met Arg Glu Ala Gly Glu Pro Gly Trp Glu

145 150 155 160

Glu Glu Lys Glu Lys Ala Glu Thr Arg Lys Ser Ala Asp Arg Thr Ala

165 170 175

Asp Val Leu Arg Ala Leu Ala Asp Phe Gly Leu Lys Pro Leu Met Arg

180 185 190

Val Tyr Thr Asp Ser Glu Met Ser Ser Val Glu Trp Lys Pro Leu Arg

195 200 205

Lys Gly Gln Ala Val Arg Thr Trp Asp Arg Asp Met Phe Gln Gln Ala

210 215 220

Ile Glu Arg Met Met Ser Trp Glu Ser Trp Asn Gln Arg Val Gly Gln

225 230 235 240

Glu Tyr Ala Lys Leu Val Glu Gln Lys Asn Arg Phe Glu Gln Lys Asn

245	250	255
Phe Val Gly Gln Glu His Leu Val His Leu Val Asn Gln Leu Gln Gln		
260	265	270
Asp Met Lys Glu Ala Ser Pro Gly Leu Glu Ser Lys Glu Gln Thr Ala		
275	280	285
His Tyr Val Thr Gly Arg Ala Leu Arg Gly Ser Asp Lys Val Phe Glu		
290	295	300
Lys Trp Gly Lys Leu Ala Pro Asp Ala Pro Phe Asp Leu Tyr Asp Ala		
305	310	315
Glu Ile Lys Asn Val Gln Arg Arg Asn Thr Arg Arg Phe Gly Ser His		
325	330	335
Asp Leu Phe Ala Lys Leu Ala Glu Pro Glu Tyr Gln Ala Leu Trp Arg		
340	345	350
Glu Asp Ala Ser Phe Leu Thr Arg Tyr Ala Val Tyr Asn Ser Ile Leu		
355	360	365
Arg Lys Leu Asn His Ala Lys Met Phe Ala Thr Phe Thr Leu Pro Asp		
370	375	380
Ala Thr Ala His Pro Ile Trp Thr Arg Phe Asp Lys Leu Gly Gly Asn		
385	390	395
Leu His Gln Tyr Thr Phe Leu Phe Asn Glu Phe Gly Glu Arg Arg His		
405	410	415
Ala Ile Arg Phe His Lys Leu Leu Lys Val Glu Asn Gly Val Ala Arg		
420	425	430
Glu Val Asp Asp Val Thr Val Pro Ile Ser Met Ser Glu Gln Leu Asp		
435	440	445
Asn Leu Leu Pro Arg Asp Pro Asn Glu Pro Ile Ala Leu Tyr Phe Arg		
450	455	460
Asp Tyr Gly Ala Glu Gln His Phe Thr Gly Glu Phe Gly Gly Ala Lys		
465	470	475
Ile Gln Cys Arg Arg Asp Gln Leu Ala His Met His Arg Arg Gly		
485	490	495
Ala Arg Asp Val Tyr Leu Asn Val Ser Val Arg Val Gln Ser Gln Ser		

500 505 510

Glu Ala Arg Gly Glu Arg Arg Pro Pro Tyr Ala Ala Val Phe Arg Leu
 515 520 525
 Val Gly Asp Asn His Arg Ala Phe Val His Phe Asp Lys Leu Ser Asp
 530 535 540
 Tyr Leu Ala Glu His Pro Asp Asp Gly Lys Leu Gly Ser Glu Gly Leu
 545 550 555 560
 Leu Ser Gly Leu Arg Val Met Ser Val Asp Leu Gly Leu Arg Thr Ser
 565 570 575
 Ala Ser Ile Ser Val Phe Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu Lys Pro

580 585 590

Asn Ser Lys Gly Arg Val Pro Phe Phe Pro Ile Lys Gly Asn Asp
 595 600 605
 Asn Leu Val Ala Val His Glu Arg Ser Gln Leu Leu Lys Leu Pro Gly
 610 615 620
 Glu Thr Glu Ser Lys Asp Leu Arg Ala Ile Arg Glu Glu Arg Gln Arg
 625 630 635 640
 Thr Leu Arg Gln Leu Arg Thr Gln Leu Ala Tyr Leu Arg Leu Leu Val
 645 650 655

Arg Cys Gly Ser Glu Asp Val Gly Arg Arg Glu Arg Ser Trp Ala Lys
 660 665 670
 Leu Ile Glu Gln Pro Val Asp Ala Ala Asn His Met Thr Pro Asp Trp
 675 680 685
 Arg Glu Ala Phe Glu Asn Glu Leu Gln Lys Leu Lys Ser Leu His Gly
 690 695 700
 Ile Cys Ser Asp Lys Glu Trp Met Asp Ala Val Tyr Glu Ser Val Arg
 705 710 715 720
 Arg Val Trp Arg His Met Gly Lys Gln Val Arg Asp Trp Arg Lys Asp

725 730 735

Val Arg Ser Gly Glu Arg Pro Lys Ile Arg Gly Tyr Ala Lys Asp Val
 740 745 750

Val Gly Gly Asn Ser Ile Glu Gln Ile Glu Tyr Leu Glu Arg Gln Tyr

755 760 765

Lys Phe Leu Lys Ser Trp Ser Phe Phe Gly Lys Val Ser Gly Gln Val

770 775 780

Ile Arg Ala Glu Lys Gly Ser Arg Phe Ala Ile Thr Leu Arg Glu His

785 790 795 800

Ile Asp His Ala Lys Glu Asp Arg Leu Lys Lys Leu Ala Asp Arg Ile

805 810 815

Ile Met Glu Ala Leu Gly Tyr Val Tyr Ala Leu Asp Glu Arg Gly Lys

820 825 830

Gly Lys Trp Val Ala Lys Tyr Pro Pro Cys Gln Leu Ile Leu Leu Glu

835 840 845

Glu Leu Ser Glu Tyr Gln Phe Asn Asn Asp Arg Pro Pro Ser Glu Asn

850 855 860

Asn Gln Leu Met Gln Trp Ser His Arg Gly Val Phe Gln Glu Leu Ile

865 870 875 880

Asn Gln Ala Gln Val His Asp Leu Leu Val Gly Thr Met Tyr Ala Ala

885 890 895

Phe Ser Ser Arg Phe Asp Ala Arg Thr Gly Ala Pro Gly Ile Arg Cys

900 905 910

Arg Arg Val Pro Ala Arg Cys Thr Gln Glu His Asn Pro Glu Pro Phe

915 920 925

Pro Trp Trp Leu Asn Lys Phe Val Val Glu His Thr Leu Asp Ala Cys

930 935 940

Pro Leu Arg Ala Asp Asp Leu Ile Pro Thr Gly Glu Gly Glu Ile Phe

945 950 955 960

Val Ser Pro Phe Ser Ala Glu Glu Gly Asp Phe His Gln Ile His Ala

965 970 975

Asp Leu Asn Ala Ala Gln Asn Leu Gln Gln Arg Leu Trp Ser Asp Phe

980 985 990

Asp Ile Ser Gln Ile Arg Leu Arg Cys Asp Trp Gly Glu Val Asp Gly

995 1000 1005

Glu Leu Val Leu Ile Pro Arg Leu Thr Gly Lys Arg Thr Ala Asp Ser

1010 1015 1020

Tyr Ser Asn Lys Val Phe Tyr Thr Asn Thr Gly Val Thr Tyr Tyr Glu

1025 1030 1035 1040

Arg Glu Arg Gly Lys Lys Arg Arg Lys Val Phe Ala Gln Glu Lys Leu

1045 1050 1055

Ser Glu Glu Glu Ala Glu Leu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Arg Glu

1060 1065 1070

Lys Ser Val Val Leu Met Arg Asp Pro Ser Gly Ile Ile Asn Arg Gly

1075 1080 1085

Asn Trp Thr Arg Gln Lys Glu Phe Trp Ser Met Val Asn Gln Arg Ile

1090 1095 1100

Glu Gly Tyr Leu Val Lys Gln Ile Arg Ser Arg Val Pro Leu Gln Asp

1105 1110 1115 1120

Ser Ala Cys Glu Asn Thr Gly Asp Ile

1125