



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118974248 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 15

(21) 申请号 202380026471.7

约翰·范德欧斯特

(22) 申请日 2023.01.20

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

(30) 优先权数据

22152542.1 2022.01.20 EP

专利代理师 张铮铮 李雪

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.09

(51) Int. Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

C12Q 1/6816 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2023/050024 2023.01.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/140731 EN 2023.07.27

(71) 申请人 瓦赫宁恩大学

地址 荷兰瓦赫宁恩

(72) 发明人 艾高·宇勒·斯特恩斯

雷蒙德·休伯特·约瑟夫·斯塔勒
斯

权利要求书1页 说明书19页 附图5页

(54) 发明名称

耐热性RNA聚合酶

(57) 摘要

本发明涉及与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质,及其在体外转录方法中的用途。本发明进一步涉及编码该蛋白质的核酸分子和表达该蛋白质的宿主细胞。

1. 一种方法, 包括:

在核糖核酸核苷酸 (rNTP) 和合适的缓冲液的存在下, 将模板核酸分子和与SEQ ID NO: 1具有至少50%序列一致性的蛋白质一起孵育; 和

通过在30°C和80°C之间的温度下进行转录反应, 将至少部分所述模板核酸分子转录成RNA分子。

2. 根据权利要求所述1的方法, 其中, 所述模板核酸分子为脱氧核糖核酸 (DNA) 模板分子。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中, 所述缓冲液包括25mM至200mM的NaCl。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法, 其中, 所述转录反应在45°C和75°C之间的温度下进行。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法, 其中, 所述模板核酸分子通过预扩增反应产生。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中, 经转录的RNA分子进一步与基于成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) -CRISPR相关 (Cas) 蛋白的核酸检测系统一起孵育。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中, 所述CRISPR-Cas核酸检测系统包括:

a) 包括III型Cas蛋白质和至少一种与靶RNA分子结合的CRISPR RNA (crRNA) 的效应复合物;

b) 用于直接或间接确定环状寡聚腺苷酸 (cOA) 水平的装置。

8. 根据权利要求6或7所述的方法, 其中, 所述预扩增反应、转录反应以及与核酸检测系统的孵育均在一锅反应中进行。

9. 一种与SEQ ID NO: 1具有至少50%序列一致性的蛋白质。

10. 根据权利要求9所述的蛋白质, 所述蛋白质包括合适的标签。

11. 一种编码权利要求9或10所述的蛋白质的核酸分子。

12. 根据权利要求11所述的核酸分子, 所述核酸分子进行密码子优化, 以在合适的宿主细胞中表达所述蛋白质。

13. 一种表达权利要求9或10所述的蛋白质的宿主细胞。

14. 根据权利要求9或10所述的蛋白质在进行转录反应以将至少部分模板核酸分子转录成RNA分子中的用途。

15. 根据权利要求14所述的用途, 其中, 所述转录反应在30°C和80°C之间的温度下进行, 优选在45°C和75°C之间的温度下进行。

耐热性RNA聚合酶

技术领域

[0001] 本发明涉及新的耐热性RNA聚合酶,及其用于体外转录和在诊断方法中的用途。

背景技术

[0002] 体外转录 (IVT) 反应通常需要包括启动子的模板核酸分子、三磷酸核糖核苷酸、含有DTT和镁离子的缓冲体系以及合适的核糖核酸 (RNA) 聚合酶。所述RNA聚合酶通常选自单亚基噬菌体来源的RNA聚合酶,诸如SP6、T3和T7。转录起始于RNA聚合酶与其启动子序列的结合,然后模板链进入活性位点,产生RNA转录物,并终止转录反应。

[0003] 除了用于IVT外,RNA聚合酶常用于核酸扩增方法,特别是用于诊断目的。例如,基于核酸序列的扩增 (NASBA;US5654142A) 和转录介导的扩增 (TMA;W01991001384A1) 涉及交替循环 (alternating cycli),其中RNA聚合酶和逆转录酶在等温条件下连续地产生彼此的模板。扩增后,通过例如在定量PCR (也称为定量实时PCR) 中采用的可检测的标记可检测互补寡核苷酸探针的杂交。此外,某些基于成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) -CRISPR相关 (Cas) 蛋白质的核酸检测系统利用了RNA中间体 (Steens et al.,2021,Nature Comm 12: 1-12)。

[0004] 如果能提高反应温度以提高反应速率将是有利的。例如,如果提高等温扩增的反应温度,就可能扩增出具有二级结构的RNA。然而,尽管鉴定了比野生型噬菌体来源的RNA聚合酶表现出更高的热稳定性的RNA聚合酶变体 (Boulain et al.,2013,Protein Eng Des Sel,26 (11):725-734),但目前没有市售的RNA聚合酶在65℃下孵育超过5分钟后仍保持活性。

[0005] 因此,需要在较高的反应温度下具有改善的稳定性和活性的RNA聚合酶。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种方法,包括:在核糖核酸核苷酸 (rNTR) 和合适的缓冲液的存在下,将模板核酸分子和与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质一起孵育;以及通过在30℃和80℃之间的温度下进行转录反应,将至少部分所述模板核酸分子转录成RNA分子。所述模板核酸分子优选为脱氧核糖核酸 (DNA) 模板分子,为单链或双链DNA模板分子。所述缓冲液优选包括25mM至200mM的NaCl。所述转录反应优选在45℃至75℃的温度下进行。模板核酸分子可以通过包括预扩增反应在内的任何方式产生。

[0007] 经转录的RNA分子可进一步与基于成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) -CRISPR相关 (Cas) 蛋白的核酸检测系统一起孵育。所述CRISPR-Cas核酸检测系统优选地包括:a) 包括III型Cas蛋白质和至少一种与靶RNA分子结合的CRISPR RNA (crRNA) 的效应复合物;b) 用于直接或间接确定环状寡聚腺苷酸 (cOA) 水平的装置。在本发明的优选方法中,预扩增反应、转录反应,以及与核酸检测系统的孵育均在一锅反应中进行。

[0008] 本发明进一步提供与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质。所述蛋白质优选地包括合适的标签。

[0009] 本发明进一步提供编码本发明的蛋白质的核酸分子。所述核酸分子优选进行密码子优化,以在合适的宿主细胞中表达所述蛋白质。

[0010] 本发明进一步提供了表达本发明的蛋白质的宿主细胞。

[0011] 本发明进一步提供了本发明的蛋白质在进行转录反应以将至少部分模板核酸分子转录成RNA分子中的用途。所述转录反应优选在30℃和80℃之间的温度下进行,优选在45℃和75℃之间的温度下进行。

附图说明

[0012] 图1:PhiFa_44对IVT的底物特异性。使用的标志物为NEB低范围ssRNA (NEB#N0364S)。

[0013] 图2:不同NaCl浓度和温度下,phiPa_44IVT性能的分析。A:只有模板,没有DNase。B:只有模板,具有DNase。C:只有PhiFa,具有DNase。

[0014] 图3:SARS-COV-2一锅反应。

[0015] 图4:使用单链(ss)DNA模板A和B的体外转录反应。“+”表示存在,而“-”表示不存在phiFa蛋白。

[0016] 图5:体外PhiFa-44 RNA转录测定,采用5' 荧光标记的(Cy3)单链DNA(50个核苷酸)作为模板。使一个反应经过RNase H处理。在天然4-20% (w/v) 聚丙烯酰胺凝胶中分析所有产物。使用荧光凝胶扫描来选择性地可视化核酸。Cy3过滤器仅显示经Cy3标记的反应产物(左),而SYBR Gold染色和随后通过Cy2过滤器的可视化显示所有核酸(右)。

具体实施方式

[0017] 定义

[0018] 如本文使用的术语“phiFa_44”,是指具有SEQ ID NO:1的蛋白质。所述蛋白质来源于噬菌体phiFa (GenBank:MH673672.2;分类学ID:1400796),其是在意大利西西里岛的埃特纳火山附近分离出来的(Severinov et al.,2014,Bacteriophage4:e29399,DOI:10.4161/bact.29399)。

[0019] 如本文中使用的与phiFa_44相关的术语“RNA聚合酶”,是指催化从DNA模板合成RNA互补链的DNA依赖性RNA聚合酶。

[0020] 如本文使用的术语“启动子”,是指基因5'端的核苷酸序列,转录起始机制(包括RNA聚合酶,例如DNA依赖性RNA聚合酶)结合于其上并启动转录,所述启动子通常位于基因的起始密码子上游5-100bp。

[0021] 如本文使用的术语“成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)”,是指原核微生物基因组中DNA的一个或多个特定区域。这些区域的特征在于存在由间隔序列穿插的核苷酸重复,通常为~25-至~38bp的直接DNA重复,由长度相似的独特间隔序列分隔(Grissa et al.,2007,BMC Bioinformatics 8:172),其来源于之前与入侵者的接触。它们作为记忆,在下次感染时迅速攻击这些入侵者。基因组区域含有一个或多个位于CRISPR基因座附近的编码CRISPR相关(Cas)效应蛋白的基因。

[0022] 如本文使用的术语“CRISPR RNA或crRNA”,是指包括间隔序列和至少5'重复序列来源末端的衍生自CRISPR的RNA分子。所述crRNA优选具有至少30个核苷酸的长度,更优选

至少34个核苷酸,更优选至少40个核苷酸,更优选至少46个核苷酸。所述crRNA优选小于1000个核苷酸,优选小于200个核苷酸,优选小于100个核苷酸。所述crRNA分子可含有核糖核酸核苷酸类似物,例如基于肌苷、尿苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、2,6-二氨基嘌呤和6,8-二氨基嘌呤的核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸。

[0023] 如本文使用的术语“CRISPR相关(Cas)效应蛋白”是指与crRNA相关的蛋白质。CRISPR/Cas系统目前分为两类。1类系统利用多亚基Cas复合物,而2类系统使用单Cas蛋白来调节其活性。1类,III型CRISPR-Cas系统已经发展到特别地靶向RNA序列。这些系统中的独特蛋白质是:1类中的Cas3,I型系统;2类中的Cas9,II型系统;1类中的Cas10,III型系统;2类中的Cas12,V型系统;以及2类中的Cas13,VI型系统。

[0024] 如本文使用的术语“效应复合物”是指具有(核糖)核酸酶活性并可切割和灭活入侵核酸序列的CRISPR-Cas核糖核蛋白复合物,其中入侵核酸序列包括crRNA中间隔序列的互补序列。所述复合物包括至少一种crRNA和至少一种Cas效应蛋白。

[0025] 如本文使用的术语“逆转录”,是指从RNA模板产生互补DNA(cDNA)。逆转录病毒和一些逆转录转座子编码被称为逆转录酶的酶,以复制它们的基因组。逆转录病毒逆转录酶具有三种贯序的生化活性:RNA依赖性DNA聚合酶活性、核糖核酸酶H(RNase H)活性和DNA依赖性DNA聚合酶活性。通常用于逆转录RNA的酶是Moloney小鼠白血病病毒逆转录酶和禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶及其变体,包括耐热性变体。

[0026] 如本文使用的术语“等温扩增”,是指核酸分子进行指数扩增,而不进行聚合酶链式反应(PCR)所需要的热循环。在等温方法中通常使用具有链置换活性的聚合酶。优选单管的等温反应包括基于核酸序列的扩增(NASBA)、环介导等温扩增(LAMP)、解旋酶依赖性扩增(HDA)、重组酶聚合酶扩增(RPA)反应和切刻酶扩增反应(NEAR)。优选单管的等温反应为环介导等温扩增(LAMP)。

[0027] 如本文使用的术语“V型效应蛋白”,是指2类效应蛋白,其特征在于切割非靶脱氧核糖核酸分子所需的特定核酸酶结构域。目前已知至少有13种亚型:V-A、V-B到V-M。V型Cas蛋白可以从新凶手弗朗西斯菌(*Francisella novicida*)、氨基酸球菌属(*Acidaminococcus* sp.)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae* sp.)、普雷沃氏菌属(*Prevotella* sp)和一些古细菌中分离出来。总引导长度优选为42-44个核苷酸。Cas12 V型效应蛋白的gRNA优选包括二核苷酸TT作为gRNA中的原间隔相邻基序(PAM),更优选5'-TTTN基序。示例性的V型效应蛋白为Cpf1(V-A型)和C2c1(V-B型)。Cas12和Cas14是原型V型效应蛋白。

[0028] 如本文使用的术语“VI型效应蛋白”,是指具有非特异性RNase活性的2类效应蛋白。目前已知的亚型有4种:亚型VI-A、VI-B、VI-C和VI-D。VI型Cas蛋白可以从例如颊纤毛菌(*Leptotrichia buccalis*)、沙希纤毛菌(*Leptotrichia shahii*)、黄色瘤胃球菌(*Ruminococcus flavefaciens*)、动物溃疡伯杰氏菌(*Bergeyella zoohelcum*)、颊普雷沃氏菌(*Prevotella buccae*)和斯氏李斯特氏菌(*Listeria seeligeri*)等生物中分离出来。总引导长度优选为52-66个核苷酸。如本领域技术人员所知,VI型效应蛋白的PAM基序是可变的,并且可以包括LshCas13a的3'非G、5'非C和3' NAN或NNA(BzCas13b),或无(RfCas13d)。Cas13是原型VI型效应蛋白。

[0029] 如本文使用的术语“III型Cas蛋白”,是指包括至少Cas10蛋白的RNA靶向、多亚基CRISPR相关复合物。

[0030] 如本文使用的术语“IIIA型Cas蛋白”,是指RNA靶向的III型CRISPR/Cas蛋白复合物,其在与靶RNA分子结合时具有非特异性DNase活性。例如,IIIA型Cas蛋白包括来自嗜热葡萄球菌(*Staphylococcus thermophilus*)、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermis*)的IIIA型Csm蛋白复合物。

[0031] 如本文使用的术语“III-B型Cas蛋白”,是指RNA靶向的III型CRISPR-Cas蛋白复合物,除了来自*Thermus*物种的III-B型Cas蛋白外,也具有非特异性DNase活性。所述III-B型Cas复合物由6至7种单独的蛋白质组成。例如,III-B型Cas蛋白包括来自强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*)、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)和硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)的III-B型Cmr蛋白复合物。

[0032] 如本文使用的术语“淬灭(quenched)、淬灭(quencher)和淬灭(quenching)”,是指降低给定物质的信号强度,优选荧光强度的过程。荧光淬灭是吸收荧光分子发出的光的物理化学过程。荧光淬灭可用作核酸诊断中的指示剂,其中荧光团和淬灭剂分子附着在单链核酸分子的末端并彼此靠近。当核酸分子与其靶杂交,或者被核酸酶切割时,荧光团-淬灭剂复合物被拉开,使荧光团产生光。

[0033] 如本文使用的术语“暗淬灭剂”,是指从荧光团吸收激发能量并将该能量作为热量耗散的淬灭剂。因此,暗淬灭剂本身不发射光。暗淬灭剂与荧光分子一起用于分子生物学。

[0034] 如本文使用的术语“环状寡聚腺苷酸(cOA)”,是指包括3-6分子单磷酸腺苷(AMP)的环状结构。cOA的形成由Cas10的环化酶结构域催化,其中Cas10是III型CRISPR/Cas效应系统的一部分。

[0035] 如本文使用的术语“PPi”或焦磷酸盐/酯是指焦磷酸的盐或酯。别名为二磷酸盐/酯和二聚磷酸盐/酯。

[0036] 如本文使用的术语“无机焦磷酸酶”或无机二磷酸酶是指催化一个焦磷酸盐/酯的离子转化为两个磷酸盐/酯离子的酶。该酶属于EC 3.6.1.1酶类。

[0037] 如本文使用的术语“cOA依赖性效应蛋白”是指其活性依赖于cOA的量的蛋白质。示例为核糖核酸酶(例如核糖核酸内切酶),其使用HEPN(高等真核生物和原核生物,核苷酸结合)活性位点非特异性地降解RNA。这些核酸酶通过使用其CRISPR相关的Rossmann折叠(CARF)结构域与一个或多个cOA分子结合而被激活。这种非特异性效应子核糖核酸内切酶的示例是激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)的Cas辅助蛋白Csx1和结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的Csm6。

[0038] 如本文使用的术语“非天然存在的蛋白质”是指具有与天然状态下的蛋白质不同的氨基酸序列和/或翻译后修饰模式的蛋白质。例如,非天然存在的蛋白质可以在蛋白质的N端、C端和/或N端和C端之间具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入。“非天然存在”的蛋白质可以具有与天然存在的氨基酸序列不同但与天然存在的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列。在某些情况下,非天然存在的蛋白质如果由不同的(例如细菌)细胞产生,则可以含有N端蛋氨酸或可能缺乏一种或多种翻译后修饰(例如糖基化、磷酸化等)。此外,非天然存在的蛋白质为经标签化的蛋白质,通过基因工程包括一个或多个特定的标签。所述标签包括但不限于c-myc结构域、血凝素标签、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、FLAG标签肽、生物素受体肽、链霉素和素结合肽和钙调素结合肽,例如Chatterjee, 2006 (Chatterjee, 2006 Cur Opin

Biotech17:53-358) 中所示出的。

[0039] 如本文使用的术语“非天然存在的核酸”是指包含以下的核酸：(1) 与天然状态下的核酸不同的核苷酸序列；(2) 一种或多种非天然存在的核苷酸单体；和/或 (3) 一种或多种其他修饰，例如添加的标记或其他部分。

[0040] 术语“非天然存在的组合物”是指包含以下的组合物：(1) 不是天然结合的组分的组合，例如，因为它们位于不同的位置、不同的细胞或不同的细胞区室中；(2) 具有天然中未发现的相对浓度的组分的组合；(3) 缺乏通常与某一天然组分有关的某种物质的组分的组合；(4) 天然未发现的形式的组分的组合，例如干燥的、冻干的、结晶的、水性的；和/或 (5) 含有天然不存在的组分的组合。例如，制剂可含有非天然存在的缓冲剂、洗涤剂、染料、溶剂或防腐剂。组合物可以是任何形式，例如，水性的或冻干的，并且可以是任何状态，例如，冷冻的或含水形式的。

[0041] 如本文使用的术语“引物”是指长度优选为15-50个核苷酸的寡核苷酸，其能有效地与模板核酸分子退火并引发转录（包括逆转录），或通过聚合酶复制所述模板核酸分子。所述寡核苷酸可包括脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或其组合或变体。所述变体包括合成的寡核苷酸类似物，例如硫代磷酸酯、磷酸三酯、2-烷基化硫代磷酸酯和磷酰胺类似物、在核苷糖环的2'-位置具有修饰的类似物，例如2'-氟、0-甲基或甲氧基乙基、肽核酸、桥接核酸和/或锁定 (locked) 核酸分子。

[0042] PhiFa_44蛋白质

[0043] 目前，还没有商业可获得的DNA依赖性RNA聚合酶可在65℃下保持活性超过5分钟。为了寻找耐热性的DNA依赖性RNA聚合酶，分析了可能感染嗜热细菌，例如嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) 的噬菌体。噬菌体phiFa (GenBank:MH673672.2; 分类学ID: 1400796) 被鉴定为候选噬菌体。PhiFa是尚未分类的Oshima病毒，属于长尾噬菌体科 (Siphoviridae) 噬菌体，具有长且不可收缩的尾巴。PhiFa编码被预测为“RNA聚合酶” (GenBank:QKE11339.1; SEQ ID NO:1) 的假设蛋白“phiFa_44”。

[0044] BlastP检索鉴定了来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的假设蛋白WP_164703602.1，其在phiFa_44蛋白质约90%的长度上具有56.79%的相对较高的一致性。然而，经过较仔细检查，WP_164703602.1在测序分析中似乎是污染物，因为不可能与大肠杆菌 (*E.coli*) 基因组进行比对。此外，编码序列作为单独的重叠群 (contig) 上传到数据库。WP_164703602.1的真正来源尚不清楚。发现phiFa_44与噬菌体来源的RNA聚合酶SP6、T3和T7没有同源性。

[0045] 一个进一步比对的序列是来自浮霉菌门细菌 (*Planctomycetes bacterium*) (MBI5851759.1) 的假设蛋白，其在phiFa_44蛋白质长度的56%以上得分约30%。最终的比对序列也是来自大肠杆菌的假设蛋白 (WP_206306715.1)，其在phiFa_44蛋白质长度的仅10%上得分约47%。

[0046] 用PhiFa_44氨基酸序列在Pfam数据库中检索 (Mistry et al., 2021, *Nucleic Acids Res* 49:D412-D419)，只鉴定出一个257个氨基酸残基长度的结果，得分仅为0.019。该得分并不显著。鉴定出的一个结果 (RdRP; PF05183) 属于真核生物RNA依赖性RNA聚合酶家族。这些蛋白质参与转录后基因沉默，它们被认为是扩增dsRNA模板。

[0047] 使用Teubingen toolkit (可获自于 toolkit.tuebingen.mpg.de/) 中的HHpred工

具进行检索,鉴定了两个序列,5FSW_C和2J7N_B,其具有非常低的序列相似性(分别为25.8%和17.5%)。这两种被鉴定的蛋白质被预测为RNA依赖性RNA聚合酶。序列相似性甚至更低(<8%)的序列被鉴定为多亚基DNA依赖性RNA聚合酶。

[0048] RNA依赖性RNA聚合酶和多亚基RNA聚合酶这两种类型的不显著得分在phiFa_44的情况下被认为是不可可能的。

[0049] 在计算机上(in silico)进行结构分析以获得对phiFa_44蛋白的更多了解。初步结果显示与QDE1 RNA依赖性RNA聚合酶有一定的相似性,该相似性在只有207个氨基酸残基的区域内最多为22%。然而,该结构域类似于镁(Mg)结合结构域。预测的3D结构(数据未示出)证实了这些相似性,并指出氨基酸残基D366、D368和D370是phiFa_44中可能负责用于Mg结合的残基。

[0050] 鉴于与已知RNA聚合酶(例如噬菌体来源的RNA聚合酶SP6、T3和T7)没有显著的序列相似性,确定了不将phiFa_44作为潜在的热稳定RNA聚合酶。然而,最终进行的IVT实验(参见实施例1)表明,尽管序列一致性低,phiFa_44可能作为热稳定的RNA聚合酶发挥作用。

[0051] 可从合适的表达系统中表达和纯化本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质。

[0052] 用于异源蛋白质生产的常用表达系统包括大肠杆菌、芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)、杆状病毒(baculovirus)、酵母、真菌、丝状真菌(filamentous fungi)或酵母类(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*))、真核细胞(例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、人胚胎肾细胞(HEK)和PER.C6®细胞(Thermo Fisher Scientific, MA, USA),和植物。重组蛋白在异源系统中的表达效率取决于许多因素,包括转录水平和翻译水平。

[0053] 根据本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质优选在原核细胞,优选在大肠杆菌(*E. coli*)中生产。所述蛋白质优选通过在感兴趣的细胞,优选大肠杆菌中表达蛋白质的克隆来生产。所述表达构建体,优选DNA,优选通过重组技术生产,包括使用聚合酶、限制性内切酶和连接酶,如本领域技术人员所已知的。可替代地,所述表达构建体通过人工基因合成提供,例如通过合成部分或完全重叠的寡核苷酸,或者通过有机化学和重组技术的组合提供,如本技术人员所已知的。

[0054] 作为替代或补充,可通过在所述嗜热生物中表达根据本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的标签化的蛋白,并基于该标签分离所述蛋白质来从该嗜热生物中分离出来根据本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质。

[0055] 所述表达构建体优选地是密码子优化的,以增强本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质在感兴趣的细胞,优选大肠杆菌中的表达。进一步的优化可包括去除隐蔽剪接位点、去除隐蔽聚A尾部和/或去除导致mRNA不利折叠的序列。此外,表达构建体优选编码蛋白质输出信号,其用于将本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质从细胞分泌到原核生物的周质中,从而能够对本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质进行有效纯化。

[0056] 用于纯化本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质的方法是本领域已知的,并且通常基于例如亲和层析和离子交换层析等层析方法,以去除污染物。除污染物外,可能还需要去除产品本身的不期望的衍生物,例如降解产物和聚集体。Berthold和

Walter,1994(Berthold and Walter,1994.Biologicals 22:135-150)提供了合适的纯化工工艺步骤。

[0057] 作为替代或补充,本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的重组蛋白可通过基因工程用一个或多个特异性标签进行标签化,以使该蛋白质附着至该标签具有特异性的柱上,从而与杂质分离。然后用解偶联试剂将经纯化的蛋白质从亲和柱交换出来。该方法已越来越多地应用于纯化重组蛋白。蛋白质的传统标签,如组氨酸标签,可以与特异性捕获该标签的亲和柱(例如用于组氨酸标签的Ni-IDA柱)一起使用,以将蛋白质与其他杂质分离。然后根据特异性标签(例如用于组氨酸标签的咪唑)使用解偶联试剂从柱上交换蛋白质。与传统的纯化方法相比,这种方法更具特异性。

[0058] 合适的其他标签包括c-myc结构域、血凝素标签、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、FLAG标签肽、生物素受体肽、链霉亲和素结合肽和钙调素结合肽,如Chatterjee,2006(Chatterjee,2006,Cur Opin Biotech 17,353-358)所提及的。使用这些标签的方法是本领域已知的,并且可用于纯化本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质。

[0059] 在大肠杆菌中表达蛋白质的方法是本领域已知的,并且可用于表达和纯化本发明的与SEQ ID NO:1具有至少50%序列一致性的蛋白质。

[0060] 转录核酸模板的方法

[0061] 本发明提供了耐热性DNA依赖性RNA聚合酶,其能够在高温(elevated temperature)下进行体外转录反应,而不会丧失催化活性。所述高温可能会增加特定活性,并可能有助于减轻所产生的RNA分子的二级结构。此外,耐热性RNA聚合酶的可用性使得能够进行涉及在高温下扩增的核酸检测策略的一锅反应,例如LAMP扩增和RNA链的合成,特别是涉及III型CRISPR-Cas系统的检测系统。

[0062] 本发明的所述耐热性RNA聚合酶与SEQ ID NO:1具有至少50%的序列一致性,与SEQ ID NO:1具有优选至少60%的序列一致性,优选至少70%的序列一致性,优选至少80%的序列一致性,优选至少90%的序列一致性,优选至少91%的序列一致性,优选至少92%的序列一致性,优选至少93%的序列一致性,优选至少94%的序列一致性,优选至少95%的序列一致性,优选至少96%的序列一致性,优选至少97%的序列一致性,优选至少98%的序列一致性,优选至少99%的序列一致性,优选至少99.5%的序列一致性。与SEQ ID NO:1具有至少99.5%的序列一致性意味着在所述耐热性RNA聚合酶和SEQ ID NO:1之间可能有一个氨基酸残基不同。

[0063] 合适的模板核酸分子为脱氧核酸核苷酸或包括脱氧核酸核苷酸,并且包括单链(ss)DNA分子、双链(ds)DNA分子或杂交ss-ds分子。发现,本发明的耐热性RNA聚合酶通常可以将单链或双链DNA分子转录成RNA分子。总的来说,低转录活性显然不需要特定的启动子区域。如图1所示,耐热性RNA聚合酶(例如phiFA_44)启动ds DNA模板的转录似乎是随机发生的,导致RNA产物的梯度(ladder)。

[0064] 进一步发现,本发明的耐热性RNA聚合酶(例如phiFA_44)特异性地将单链DNA分子转录成RNA分子,其中模板链包括共识序列GGGGCGG,优选AGGGGCGG,更优选TAGGGGCGG,更优选TAGGGGGGM,更优选TAGGGGCGGTA,其可作为phiFA_44启动子序列,其中M表示C或A。序列CAGGGGCGGCAA,包括共识序列GGGGCGG,存在于用于IVT反应的ssDNA模板A中,如图4所示。所述序列CAGGGGCGGCAA可起到启动子序列的作用,产生约70个核苷酸的RNA转录物,如图4所

示。相关序列可能驱动从离散的转录起始位点的转录,得约300nt的更明确的RNA产物,如图1所示。

[0065] 涉及本发明的耐热性RNA聚合酶的体外转录反应在合适的缓冲液中进行,以使pH保持在几乎恒定的值。所述缓冲液可包括磷酸盐、硼酸盐、N-环己基-2-氨基乙磺酸(CHES)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、甘氨酸,和/或[三(羟甲基)甲氨基]丙磺酸(TAPS)。RNA聚合酶的优选反应pH在6和10之间,优选在7和9之间,例如7.2、7.5、7.8、8.0、8.1、8.5、8.6或8.8。

[0066] 转录反应的优选缓冲液为或包括Tris,优选10-100mM Tris。所述Tris优选通过添加酸(例如醋酸和/或氯化氢)来设定在所需的pH。

[0067] 用于转录反应的合适缓冲液可进一步包括一种或多种二价金属离子,例如 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 。二价金属离子可以以其盐的形式,例如氯化镁、硫酸镁和/或醋酸镁来提供。所述浓度优选在0.5和20mM之间,例如在1和10mM之间,优选约2mM、约3mM、约5mM或约7mM。

[0068] 所述缓冲液的额外组分可包括:钾离子,例如氯化钾;其他盐,例如硫酸铵;和/或甜菜碱、乙二醇、1,2-丙二醇和/或亚精胺,如本领域已知的增强模板核酸分子转录的组分,例如2-10% DMSO或2-10%甘油(Cheng et al., 1994, Proc Natl Acad Sci 91:5695-5699)。

[0069] 优选地,在反应缓冲液中包括额外的成分以稳定酶活性,包括明胶、白蛋白、还原剂(例如 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇(DTT)和/或三(2-羧乙基)膦(TCEP)中的一种或多种),和/或温和的洗涤剂(例如TWEEN 20或Triton-X100)。

[0070] 所述转录反应在核糖核苷酸(NTP)的存在下进行,NTP包括核碱基和与三磷酸基团偶联的核糖基团。所述核碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶及其任何修饰。术语核糖核苷酸包括参考核糖核苷酸的类似物,例如荧光分子,例如1,3-二氮杂-2-氧代吩噻嗪-核糖-5'-三磷酸(tCTP),和/或其他类似物,例如肌苷、黄嘌呤、N4-羟基胞嘧啶、N4-甲氧基胞嘧啶和6H,8H-3,4-二氢嘧啶[4,5-c][1,2]噻嗪-7-酮(Suzuki et al., 2005, Nucleic Acids Symp Series 49:97-98)。

[0071] 所述转录反应在30℃和80℃之间,优选在45℃和75℃之间,例如50℃和70℃之间,包括55℃、60℃、65℃的温度下进行。

[0072] 所述转录反应优选在10-50mM(优选20mM)的Tris-HCl pH 8.8,100-1000nM(nM)(优选约500nM)的本发明的耐热性RNA聚合酶,1-5mM(优选约2.5mM)的NTP混合物(NEB#N0466S),1-10mM(优选约2mM)的MgCl₂,10-250mM(优选约50mM)的NaCl和DNA模板,优选1-100ng(例如约为25ng)的dsDNA模板的存在下,于45℃-75℃的温度下,例如50℃和70℃之间,包括55℃、60℃和65℃的温度下,以20微升的总体积进行。

[0073] 所述IVT反应进行合适的时间以转录DNA模板,优选所述双链DNA模板。所述时间量优选为0.01至1小时,更优选为0.1至0.5小时,更优选为0.2至0.4小时。

[0074] 诊断试验

[0075] 本发明的方法能够检测特定核酸序列,其可特别用于人类保健和兽医诊断。为此目的,优选从样品中分离包括DNA和/或RNA在内的核酸材料。为此,所述核酸材料可使用例如物理和化学方法的组合来纯化。优选使用商购可获得的核酸分离系统,例如NucliSENS® easyMAG®或 NucliSENS® miniMAG®核酸提取系统(bioMérieux, Marcy l'Etoile, 法国)

或MagNA Pure 96系统(Roche Diagnostics,Almere,The Netherlands)。

[0076] 所述样品可包括生物流体,例如唾液、上呼吸道样本(例如鼻咽拭子)、下呼吸道样本(例如痰)、鼻咽分泌物、口咽分泌物、汗液、尿液、粪便或血液。术语“血液”包括血浆和血清,其中血浆是通过例如离心去除红细胞和白细胞来制备的,血清是通过形成血凝块并使用例如离心机去除血凝块来制备的。用于从生物流体,特别是拭子中分离核酸物质的方法和组合物,优选地使用水性溶剂,而不使用有机溶剂和离液盐 chaotropic salts)。

[0077] 为此,可以通过本领域已知的任何技术从样品中分离RNA,包括但不限于合适的商业RNA分离试剂盒,例如Trizol (Invitrogen;Carlsbad,California)、RNAqueous® (Applied Biosystems/Ambion,Austin,Tx)、Qiazol® (Qiagen,Venlo,The Netherlands)、安捷伦总RNA分离Lits (Agilent;Santa Clara,California)、RNA-Bee® (Tel-Test.Friendswood,Texas)、RNeasy迷你试剂盒 (Qiagen,Venlo,The Netherlands) 和 Maxwell™16总RNA纯化试剂盒 (Promega;Madison,Wisconsin)。

[0078] 利用本领域技术人员已知的方法,借助于RNA依赖性DNA聚合酶,将经分离的RNA优选逆转录成单链或双链互补DNA(cDNA)。逆转录可由通用引物来引发,例如随机六聚体或九聚体,或由一种或多种特异性引物,例如病毒特异性或甚至基因特异性引物来引发。

[0079] DNA,包括基因组DNA,可以通过本领域已知的任何技术从样品中分离出来,包括但不限于合适的商业DNA分离试剂盒,例如Quick-DNA病毒试剂盒 (Zymo Research;Irvine,CA)、NucleoSpin Dx病毒 (Macherey-Nagel,Düren,Germany)、QIAamp DNA血液迷你试剂盒 (Qiagen,Venlo,The Netherlands) 和 EasyPure®病毒DNA/RNA试剂盒 (Transgen Biotech,北京,中国)。

[0080] 所得到的RNA、DNA或cDNA可直接用于本发明的基于CRISPR/Cas效应蛋白的诊断性测定,但优选在检测前进行扩增以提高检测水平。可以通过任何合适的扩增系统进行扩增,例如包括连接酶链式反应(LCR),等温核糖核酸扩增系统如基于核酸序列的扩增(NASBA),基于切割的RNA信号扩增(Zhao et al.,2013,Nature Comm 4:1493),转录介导的扩增,链置换扩增和聚合酶链式反应(PCR)。

[0081] 优选的扩增反应是单管等温反应,例如NASBA、环介导等温扩增(LAMP)、解旋酶依赖性扩增(HAD)、滚环扩增(RCA)、多重置换扩增(MDA)、重组酶聚合酶扩增(RPA)反应和切刻酶扩增反应(NEAR)。优选的单管等温反应是环介导等温扩增(LAMP)或重组酶聚合酶扩增(RPA)反应。

[0082] LAMP通常使用六个引物来识别模板链上不同的靶序列。这些引物中的四个引物是“内部引物”(LF、LB、FIP和BIP),它们被设计用于合成新的DNA链。外部引物(F3和B3)与模板链退火,也产生新的DNA。这些引物伴随着DNA聚合酶,有助于链置换并释放新形成的DNA链。在60℃至65℃的等温条件下,这种扩增在不到1小时,例如不到20分钟的时间内发生。

[0083] RPA过程(TwistDx Ltd.,Cambridge,UK)采用重组酶,单链DNA结合蛋白(SSB)和链置换聚合酶,优选补充逆转录酶,更优选补充逆转录酶和DNA依赖性RNA聚合酶,例如T7聚合酶。该扩增在37℃至42℃的等温条件下于不到1小时的时间内进行。

[0084] 根据本发明的耐热性RNA聚合酶可以在扩增反应,例如NASBA、基于切割的RNA信号扩增(Zhao et al.,2013,Nature Comm 4:1493),转录介导的扩增或RPA中替代DNA依赖性RNA聚合酶,从而允许更高的温度下用于所述扩增反应。

[0085] 基于CRISPR/Cas的检测系统

[0086] 本发明的耐热性RNA聚合酶可进一步用于成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 核酸检测系统,该系统包括CRISPR相关效应蛋白 (Cas) 和至少一种与靶核酸分子结合的CRISPR RNA (crRNA)。

[0087] 所述基于CRISPR/Cas的检测系统优选地以包括本发明的基于CRISPR的核酸系统的感测装置,或者“生物传感器”的形式来提供。当基于CRISPR的核酸系统和互补于crRNA的核酸分子相互作用时产生的信号,例如比色、荧光、荧光或生物发光信号,该信号可以耦合到换能器上,从而允许对信号进行量化。信号可以直接可视化,或者作为替代或补充,凭借合适的换能器将信号转换为可测量的电参数,例如电流或电压。

[0088] crRNA与靶序列的结合可激活Cas效应蛋白。所述Cas效应蛋白的激活可以通过例如Cas12、Cas13和Cas14介导的报告分子的旁系切割 (collateral cleavage) 和/或例如通过Cas10的环化酶结构域催化的环状寡腺苷酸 (cOA) 的产生来检测。

[0089] Crispr/Cas 1类系统利用多蛋白效应复合物 (Koonin et al., 2017, Curr Opin Microbiol 37:67-78), 并包括I型系统、III型 (例如Cas10) 和IV型系统。Crispr/Cas 2类系统利用单蛋白效应物, 并包括II型CRISPR系统 (例如Cas9)、V型系统 (例如Cas12 (也称为cpf1) 和Cas 14 (Harrington et al., 2019, Science 362:839-842)), 以及VI型系统 (例如Cas13 (Makarova et al., 2017, Cell 168:328-328))。

[0090] crRNA与其靶核酸序列的结合激活V型或VI型CRISPR/Cas效应蛋白的旁切反式作用核酸酶 (collateral, trans-acting nuclease) 活性。这种旁切反式作用核酸酶活性使得能够使用单链“报告”分子来对V型或VI型CRISPR/Cas效应蛋白的激活进行评分。

[0091] 激活的V型或VI型Cas的报告分子优选为至少9个核苷酸的单链核酸分子,其被激活的V型或VI型Cas的切割是可以检测到的。所述单链核酸分子优选包括9至50个核苷酸,更优选10至25个核苷酸或甚至11至20个核苷酸,例如12个核苷酸、13个核苷酸、14个核苷酸、15个核苷酸、16个核苷酸、17个核苷酸、18个核苷酸或19个核苷酸。所述报告分子的最佳长度约为12个核苷酸。

[0092] 所述报告分子包括用于检测经激活的Cas12或Cas14效应蛋白的单链DNA,或者包括用于检测经激活的Cas13效应蛋白的单链RNA。所述报告分子可包括脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸类似物,例如基于肌苷、尿苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、2,6-二氨基嘌呤和6,8-二氨基嘌呤的核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸。

[0093] 可通过本领域已知的任何方法进行报告分子切割的检测。例如,检测可以直接通过质谱法进行,例如超高效液相色谱 (UHPLC) 与串联质谱 (LC-MS/MS) 以电喷雾正离子模式联用。LC-MS/MS分析可以通过例如使用与三重四极质谱仪联用的高端UHPLC色谱系统进行。检测可进一步通过液-液相分离 (LLPS; Spoelstra et al., 2018, BioRxiv, CSHL (doi.org/10.1101/471482)), 或通过本领域技术人员已知的比色、荧光、荧光或生物发光检测方法进行。

[0094] 合适的报告分子为单链RNA (Cas13) 或DNA (Cas12和Cas14) 分子,其一端标签化有荧光标记,另一端标签化有淬灭剂。报告分子与淬灭剂的紧密接近 (close proximity) 阻止了对其荧光的检测。在激活V型或VI型CRISPR/Cas效应蛋白的旁切反式作用核酸酶活性后,底物的切割破坏了报告分子-淬灭剂的接近,从而允许未淬灭的荧光发射,这可以在激光激

发后检测到。

[0095] 优选的荧光标记可从选自:Atto425 (ATTO-TEC GmbH,Siegen,Germany),Atto 647N (ATTO-TEC GmbH,Siegen,Germany),YakimaYellow (Epoch Biosciences Inc.,Bothell,WA,USA),Cal610 (BioSearch Technologies,Petaluma,CA,USA),Cal635 (BioSearch Technologies,Petaluma,CA,USA),FAM (Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA),TET (Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA),HEX (Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA),氰基染料例如Cy5、Cy5.5、Cy3、Cy3.5、Cy7 (Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA),Alexa染料 (Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA),Tamra (Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA),ROX (Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA),JOE (Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA),异硫氰酸荧光素 (FITC,Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA),Yakima Yellow® (YY;Epoch Biosciences,Bothell,Washington) 和四甲基罗丹明 (TRITC,Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham,MA USA)。所述底物优选在5'端标记可检测的标记,优选荧光标记。

[0096] 淬灭剂,例如四甲基罗丹明TAMRA,二氢环吡咯并吲哚三肽小沟粘合剂,是本领域已知的。优选的淬灭剂包括Black Hole Quencher®-1 (BHQ1) 和BHQ2 (Biosearch Technologies,Petaluma,CA,USA)。BHQ1暗淬灭剂在480nm至580nm内具有强吸收,其淬灭在此范围内发出荧光的荧光团,例如FAM、TET、CALFluor® Gold 540、JOE、HEX、CAL Fluor Orange560和Quasar®570染料。BHQ2暗淬灭剂在599nm至670nm内具有强吸收,其淬灭在此范围内发出荧光的荧光团,例如Quasar®570、TAMRA、CALFluor® Red 590、CAL Fluor Red610、ROX、CAL Fluor Red 635、Pulsar®650、Quasar 670和Quasar 705染料。BHQ1和BHQ2可通过FRET和静态淬灭机制淬灭荧光。

[0097] 进一步优选的报告分子允许在横向流动测定 (LFA) 中进行检测。LFA的原理是将反应产物,在本案中是未反应的报告分子固定在被称为控制线的第一点,而将经切割的报告分子固定在被称为测试线的第二点。LFA通常由硝化纤维素膜、样品垫、结合垫、吸湿垫或吸收垫,以及衬垫组成 (Jauset-Rubio et al.,2016,Sci Rep 6:37732)。硝化纤维素膜是最常用的,因为它们有助于既能用于反应又能用于检测的载体,其中捕获的生物分子 (例如抗体) 通过静电相互作用、氢键和/或疏水相互作用的组合沉积在硝化纤维素上,形成测试线和控制线 (Jauset-Rubio et al.,2016,Sci Rep 6:37732)。

[0098] 作为替代,crRNA与其靶核酸序列的结合激活III型效应系统的环化酶结构域 (例如Cas10)。基于Cas10的核糖核酸检测系统优选地来源于嗜热生物,例如强烈炽热球菌 (Pyrococcus furiosus)、硫化叶菌 (Sulfolobus solfataricus) 或嗜热栖热菌 (Thermus thermophilus)。对于该系统,靶DNA分子需要转录成靶RNA分子,例如通过本发明的耐热性RNA聚合酶,从而允许在更高的温度进行所述转录反应。进一步优点是,扩增、转录和检测这三个步骤都可以在高温 (例如约65℃) 下进行,使得所有步骤都适合于一锅反应。

[0099] 来自嗜热生物的基于CRISPR/Cas的核糖核酸检测系统的进一步优点是,检测可以在高温下进行,例如在40℃和80℃之间,优选50℃和70℃之间,例如55℃和65℃之间,优选约65℃下进行。与在较低温度下孵育相比,在此温度下孵育可加速cOA合成反应。此外,所述

高温可能使样品中存在的核酸酶(例如DNase或RNase)或蛋白酶失活。

[0100] 此外,与来自嗜温生物的基于CRISPR/Cas的核糖核酸检测系统相比,来自嗜热生物的基于CRISPR/Cas的核糖核酸检测系统的优点是可以为系统提供增加的稳定性,例如其可以存储更长的时间。

[0101] 最近的研究表明,cOA的存在使得Csm6或Csx1家族成员的RNase活性大幅增加。这些蛋白质通常编码在III型基因座中,但不直接与核糖核蛋白复合物相关。相反,对入侵RNA转录物的识别可能会导致Cas7降解靶向RNA,I类、IIIA型Cas10降解非特异性DNA,以及cOA产生,引起Csm6或Csx1的激活,从而导致附近其他单链RNA分子的旁切。

[0102] 直接确定cOA水平的方法优选包括测定焦磷酸盐/酯或PPi水平的方法。焦磷酸盐/酯的形成与通过CRISPR/Cas相关蛋白(例如Cas10)与ATP形成cOA偶联。由3-6个AMP单元组成的cOA的形成使得同时形成3-6个PPi分子。

[0103] 作为替代,本发明的检测系统可包括无机焦磷酸酶,其可引起PPi的分解,且每个PPi分子形成两个无机磷酸盐/酯分子。因此,通过确定无机磷酸盐/酯的水平,可检测分子的数量从1分子cOA扩增到6-12个分子Pi。

[0104] 优选的无机焦磷酸酶是在与基于III型CRISPR/cas的RNA检测系统相同或相似温度下具有活性的酶。此外,优选地,无机焦磷酸酶在与基于III型CRISPR/Cas的RNA检测系统相同或相似的条件(包括在相同或相似的pH和相同或相似的盐浓度)下具有活性。例如,如果基于III型CRISPR/Cas的RNA检测系统在50℃下具有最佳活性,则优选无机焦磷酸酶在该温度下具有活性。优选地,无机焦磷酸酶在50℃下的活性使得基本上所有PPi分子都被分解成无机磷酸盐分子。所述分解优选是瞬时的。类似地,在选定的pH和盐浓度下,无机焦磷酸酶的活性使得基本上所有PPi分子都被分解成无机磷酸盐/酯分子。所述分解优选是瞬时的。

[0105] 优选的无机焦磷酸酶来自嗜热生物,例如强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*)、硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)和嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*),允许同时等温检测。这种情况下,可以通过确定Pi的水平直接确定cOA的水平。

[0106] PPi和Pi可以使用本领域已知的方法进行检测,包括基于比色、荧光、荧光或生物发光的测定。

[0107] 确定PPi水平的合适方法包括荧光和/或比色焦磷酸盐(PPi)测定试剂盒(Biovision Inc.,Milpitas,CA);荧光EnzChek®焦磷酸盐检测试剂盒(ThermoFisher Scientific;Waltham,MA);荧光焦磷酸盐测定试剂盒(SigmaAldrich,Saint Louis,MO);和发光PPiLight™测定(Lonza Group A.G.,Bazel,Switzerland)。

[0108] 确定无机磷酸盐或Pi水平的合适方法包括比色PiColorLock™测定(Expedeon,Cambridge,UK);比色Malachite磷酸盐测定试剂盒(SigmaAldrich,Saint Louis,MO);荧光磷酸盐传感器(ThermoFisher Scientific;Waltham,MA);ADP转换为ATP后的发光读出器(luminescent readout)(US专利申请US20140273036A);荧光化学传感器(Meng et al.,2015,RSC Advances 5:53189-53197);与铕离子结合的光致发光石墨烯量子点(Bai et al.,2013,Chemistry 19:3822-3826)。

[0109] 用于直接确定环状寡聚腺苷酸(cOA)水平的方法和装置优选包括至少一种底物,并且如果需要,还包括允许用于PPi或Pi的至少一种指示检测方法的酶。

[0110] 优选的方法是比色法,例如Malachite Green磷酸盐测定试剂盒,其允许快速测定PPi或Pi的水平,作为cOA水平的直接确定。

[0111] 间接确定cOA水平的方法优选地包括确定cOA依赖性非特异性效应核酸酶例如CRISPR辅助核酸酶1(Can1)或Can2的活性的方法,以及优选地确定cOA依赖性非特异性效应核糖核酸酶例如Csx1的活性的方法。为此,根据任何本发明的检测系统优选包括cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶,例如Csx1。

[0112] 所述cOA依赖性非特异性效应核酸酶,优选核糖核酸内切酶,优选是在与基于III型CRISPR/Cas的RNA检测系统相同或相似的温度下具有活性的酶。此外,优选地,cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶在与基于III型CRISPR/Cas的RNA检测系统相同或相似的条件(优选包括相同或相似的pH和相同或相似的盐浓度)下具有活性。例如,如果基于III型CRISPR/Cas的RNA检测系统在65°C下具有最佳活性,则优选cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶在该温度下具有活性。优选地,cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶在65°C下的活性使得cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶的cOA诱导的活性导致所述cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶的底物产生可检测量的反应产物。类似地,在选定的pH和盐浓度下,cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶的活性使得cOA诱导的cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶的活性导致所述cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶的底物产生可检测量的反应产物。

[0113] cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶的底物优选为RNA分子,其切割可以被检测到。检测可通过本领域已知的任何方法进行。例如,检测可以通过质谱直接进行,例如,与串联质谱法(LC-MS/MS)联用的超高效液相色谱法(UHPLC)在电喷雾正离子模式下进行。LC-MS/MS分析可以通过使用与三重四极质谱仪联用的高端UHPLC色谱系统来进行。

[0114] 检测可进一步通过液-液相分离进行(LLPS;Spoelstra et al.,2018,BioRxiv,CSHL(doi.org/10.1101/471482))。

[0115] cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶的优选底物是一端标签化有荧光报告分子而另一端标签化有淬灭剂的RNA分子。报告分子与淬灭剂的紧密接近阻止了对其荧光的检测。通过激活cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶来切割底物,破坏了报告分子-淬灭剂的接近,从而允许未淬灭的荧光发射,这可以在激光激发后检测到。因此,由于底物的切割和淬灭荧光报告分子的淬灭剂的去除,cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶活性的增加引起荧光成比例地增加。

[0116] 与非特异性效应核糖核酸内切酶的激活不同,或除此之外,靶识别水平的确定也可以通过使用所述核酸酶的合适底物测定IIIA型CRISPR/Cas效应复合体中存在的非特异性效应DNA酶活性的激活来进行。所述合适的底物优选为一端标签化有荧光标记且另一端标签化有淬灭剂的DNA分子。上文提供了合适的荧光标记和淬灭剂的示例。报告分子与淬灭剂的紧密接近阻止了对其荧光的检测。通过激活cOA依赖性非特异性效应DNA酶来切割底物,破坏了报告分子-淬灭剂的接近,从而允许未淬灭的荧光发射,这可以在激光激发后检测到。由于底物的切割和淬灭荧光报告分子的淬灭剂的去除,cOA依赖性非特异性效应DNA酶的活性增加因此引起荧光成比例地增加。使用非特异性效应核糖核酸内切酶的激活和非特异性效应DNA酶的激活允许在一个单一测定中确定两个独立的靶RNA分子的存在或不存在,只要所使用的两个独立的核糖核蛋白复合物中的一个特异性地激活非特异性效应DNA

酶,另一个特异地允许间接或直接确定cOA水平。本领域技术人员将理解,为此,通过激活cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内酶和非特异性效应DNA酶而存在于底物上的荧光标记必须足够不同,以允许确定每种活性的水平,作为确定cOA水平的测量。

[0117] 合适的商业底物由RNaseAlert® Lab测试试剂盒v2(ThermoFisher Scientific; Waltham,MA)提供。

[0118] 优选的cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内酶来自嗜热生物,例如强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*)、硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)和嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*),允许同时、等温检测cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶的活性。

[0119] 间接确定环状寡聚腺苷酸(cOA)水平的方法和装置优选包括cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶和所述cOA依赖性非特异性效应核糖核酸内切酶的底物。

[0120] 为了清晰和简明描述的目的,本文将特征描述为相同或单独实施方式的一部分,然而,应当理解,本发明的范围可包括具有所描述的所有或一些特征的组合的实施方式。

[0121] 5个实施例

[0122] 实施例1

[0123] 材料和方法

[0124] 蛋白质纯化

[0125] 对研究的蛋白核苷酸序列针对大肠杆菌进行密码子优化(参见表1),并将其置于N端含有Strep-标签的双顺反子表达质粒中(Nieuwkoop et al.,2019,Microbiol Biotechnol 12:173-179)。将表达质粒转化到大肠杆菌菌株B121(DE3)中,并在37°C下以所需的培养提及(2-12L)生长,直至达到约0.6的OD600。将培养物置于冰上1小时,之后加入IPTG至0.5mM的终浓度。然后将培养物在20°C下孵育约16小时(过夜)。收获细胞,并将其在缓冲液A(100mM Tris-HCl,150mM NaCl,pH 8)中通过超声裂解,随后在30,000g下旋转45分钟。过滤(0.45微米)澄清的裂解液,并使用StrepTrap FPLC柱纯化。用缓冲液B(100mM Tris-HCl,150mM NaCl和2.5mM脱硫生物素,pH 8.0)洗脱感兴趣的蛋白。随后,使用缓冲液C(100mM Tris-HCl,125mM NaCl,pH 8)作为结合和洗涤缓冲液进行肝素纯化步骤。随后使用缓冲液D(100mM Tris-HCl,1M NaCl,pH 8)进行梯度洗脱。最后,使用Superdex 200加强型10/300GL柱(Cytiva;Marlborough,MA)在缓冲液A中进行尺寸排阻色谱。

[0126] IVT测定

[0127] 使用1×等温扩增缓冲液(NEB#B0537S),250nM phiFa_44,1.875mM rNTP/dNTP,80ng dsDNA模板的基础组合物以20微升的总体积进行IVT测定。这些反应在65°C下孵育1h,随后在95°C下孵育10min。随后,加入2.3微升DNaseI缓冲液和1微升DNaseI酶(分别为NEB#B0303和#M0303),并且将反应在37°C下孵育30min。将反应混合物在10%UREA-PAGE凝胶上分离,并用SybrGold(Thermo#S11494)染色。

[0128] 温度和NaCl浓度优化分析

[0129] 使用20mM Tris-HCl pH 8.8、500nM phiFa_44、2.5mM rNTP混合物(NEB#N0466S)、2mM MgCl₂、50mM NaCl和25ng的dsDNA模板的基础组合物以20微升的总体积进行IVT测定。为了确定最佳NaCl浓度,反应混合物是相同的,只有NaCl浓度是不同的。反应在65°C下孵育1h后,用Zymo RNA净化和浓缩试剂盒(Zymo#R1017)对反应进行净化。随后以20微升的总反应体积(NEB#M0303S)在37°C下进行DNase处理1h。将反应混合物在10%UREA-PAGE凝胶上分

离,并用SybrGold (Thermo#S11494) 染色。

[0130] ScopeDx测定

[0131] ScopeDx测定混合物由以下项组成:1×Warmstart LAMP Mastermix (NEB#E1700)、引物(FIP/BIP 1.6mM、F3/B3 0.2mM、LoopF/LoopB 0.4mM)、62.5nM重建的含E基因crRNA的TtCmr46复合物(Steens et al.,2021,Nature Comm 12:1-12),1mM TtHB144(Steens et al.,2021,Nature Comm 12:1-12),250nM rNTP mix (NEB#N0466),500nM RNaseAlert V2 (Thermo#4479769) 和175nM phiFa_44。将不同量的Twist SARS-CoV-2合成基因组MN908947.3加入到反应混合物中,并在65℃下孵育,同时在FAM通道上进行时间点测量。

[0132] 结果

[0133] 体外转录测定

[0134] 为了确定dsDNA是否是合适的模板,从phiFa噬菌体基因组中提取了一段作为合成基因。选择包含phiFa-45的末端、基因间区域和phiFa_44基因起始的区域(参见表1)。如图1所示进行体外转录测定,设计用于确定聚合酶是否使用rNTP或dNTP作为底物,以及是否生成DNA或RNA。

[0135] 从这些结果中,我们得出结论,所用的模板是dsDNA,其与rNTP底物一起用于生成RNA产物(参见图1的10-13泳道)。

[0136] 温度和NaCl浓度优化分析

[0137] 使用各种NaCl浓度和温度进行IVT测定,表明最佳NaCl浓度为25至200mM,最佳温度范围为45℃至75℃。

[0138] 一锅ScopeDx

[0139] 在ScopeDx 1.0工具中,如Steens et al.,2021,Nature Comm 12:1-12所记载的,我们能够将LAMP预扩增(65℃)与CRISPR读数(65℃)联系起来。然而,由于使用的商业Hi-T7 RNA聚合酶与65℃的延长孵育不相容,不得不在方案中添加一个步骤。首先在65℃下进行LAMP预扩增30min,然后加入Hi-T7+CRISPR混合物,在65℃下再孵育10-20min。通过这种方式,Hi-T7 RNA聚合酶(具有有限的活性持续时间)能够将预扩增产生的dsDNA转录成RNA,然后可以被CRISPR系统检测到。

[0140] 由于phiFa_44能够在65℃下将DNA转录成RNA,我们决定在一锅一步法ScopeDx 2.0中对其进行测试。该测定在65℃下于合成的SARS-CoV-2RNA基因组上作为单一步骤来进行(图2)。使用这种新的测定法,在不到25分钟的时间内达到了200个拷贝的检测极限,表明了时间信号(time-to-signal)的巨大改善。此外,其现在是一步式方案,这一事实大大降低了污染风险,如果需要在步骤之间打开试管,则可能会发生污染风险,并提高了高通量和自动化能力。

[0141] 计算机上进行的结构分析

[0142] 在计算机上进行结构分析以更深入地了解phiFa_44蛋白。初步结果表明与QDE1聚合酶样酶相似。QDE1的二聚化行为也可能类似于phiFa_44的行为。目前,基于氨基酸比对(参见图4),可以鉴定镁结合结构域。预测的3D结构证实了这些相似性,并指出D366、D368和D370是phiFa_44中负责Mg结合的残基。

[0143] 实施例2

[0144] 材料和方法

[0145] IVT测定

[0146] 使用1×等温扩增缓冲液(NEB#B0537S),250nM PhiFa-44,1.875mM rNTP/dNTP,80ng双链(ds)DNA模板或100nM(终浓度)单链(ss)DNA寡核苷酸的基础组合物以20微升的总体积进行IVT测定。这些反应在65℃下孵育1h,随后在95℃下孵育10min。加入2.3微升DNaseI缓冲液和1微升DNaseI酶(NEB#B0303,#M0303),并且将反应在37℃下孵育30min。将反应混合物在10%UREA-PAGE凝胶上分离,并用SybrGold(Thermo#S11494)染色。

[0147] ssDNA模板A为5'-GCGCTCCAAAAGCAGGGGCGGCAAGTCCAGTCT CCAGACTTGCCGCCGAGTG TACCTGCTTGCTACAGCCCTAATTATACCACAAACGCC3'。

[0148] ssDNA模板B为5'-GGCGTTTGTGGTATAATTAGGGCTGTAGCAAGC AGGTACACTC GGCGGCAA GTCTGGAGACTGGACTTGCCGCCCTGCTTTTGGAGCGC3。

[0149] dsDNA模板由经退火的ssDNA模板A和ssDNA模板B组成。

[0150] 结果

[0151] PhiFa IVT ssDNA模板

[0152] 使用长度为90nt的ssDNA模板、与模板A互补的模板B进行IVT反应(参见图4)。选择PhiFa基因组的该区域是因为它包含潜在的感兴趣的基序。从结果可以清楚地看出,ssDNA模板A产生了约75-80nt的清晰的ssRNA转录物,而ssDNA模板B没有提供清晰的转录物。该结果表明,ssDNA模板A包含PhiFa44聚合酶优选的感兴趣的基序。

[0153] 关于噬菌体PhiFA如何表达其基因知之甚少。通常,噬菌体使用宿主RNA聚合酶来表达它们,但由于噬菌体PhiFA编码其自身的RNA聚合酶,因此可以合理地假设(至少)它的一些基因是由这种特定的聚合酶(由PhiFA_44基因编码)表达的。

[0154] 实施例3

[0155] 材料和方法

[0156] 体外RNA转录测定

[0157] PhiFa-44在50mM NaCl、100mM Tris-HCl pH 8.0中经标签化的(His)-6纯化,并且单链DNA模板(50nt;SEQ ID NO:12)用Cy3荧光染料进行5'标记。使用“ZR Small-RNA PAGE回收试剂盒”(ZymoResearch,R1070)从变性PAGE纯化ssDNA模板。在PhiFa-44反应缓冲液(35mM NaCl,20mM Tris-HCl pH 8.8,2mM MgCl₂和25mM rNTP)中进行体外RNA转录测定,并补充Milli-Q至最终体积为20μl。当需要时,将ssDNA模板和PhiFa-44加入到反应混合物中,最终浓度分别为62μM和1μM。

[0158] 所有反应在65℃下孵育2h,然后使用“RNA清洁浓缩器试剂盒(ZymoResearch,R1017)对RNA/DNA进行净化。在选定的纯化样品中加入RNase H(NEB,5U/μl)后,所有反应在37℃下孵育30min。为了分析反应产物,在所有孵育样品中加入2X RNA装载染料(200mM Tris-HCl pH 8.0,30%甘油,900mM NaCl),然后将它们装载到天然4-20%(w/v)梯度的聚丙烯酰胺凝胶上。使用荧光凝胶扫描(GE Amersham Typhoon)来可视化凝胶。Cy3过滤器(560-580nm)用于显示Cy3标记的反应产物,而用SYBR Gold染色并应用Cy2过滤器(515-535nm)显示凝胶上存在的所有核酸。

[0159] 结果

[0160] 如图5所示,使用PhiFa-44和ssDNA作为模板的体外转录,形成互补RNA,这可由ssDNA模板带的移位来指示。当不添加MgCl且不进行孵育(阴性对照)时,未观察到移位。类

似地,在RNA:DNA双链体中加入RNase H(切割RNA的酶),消除了ssDNA模板带的移位。

[0161] 这些结果表明,PhiFa-44能够将单链模板DNA转录成RNA。

[0162]	SEQ ID NO	名称	序列
	1	QKE11339.1 [Thermus噬	MNKTELVKKLIEEKTAELAVRPVYTGRIDEEGQWTPSLHERYQDKVL VVPAPEEGEPVQTIGEYEFVGGNSNRIVYIHRSIKQWLEVAGGD SHWG

[0163]

	菌株phiFa]	AAVVLRLPGKLASHNAVFSWEGYQLEESDEGLLATMDERDWKVLEAY DLDPEVRLVQVTVFDLEQGVSAKGTLRKVLPGERPVPVFPNSWKKFGNL RTQFMSILTTDVHYNPRASVNLQELTYVQEAPAQWVFDALDEEIERII NLKTSPWLTTGYLTRLGFSPAWNSTLTALKESLCGELKKLLRRIKLSGK YGLRAKSTSSHLLRDGELLPLPAYAKKHVKVGDFTVSRNPALPSQGWA KYRVTGFIDGNMVFVPQGDYAWSAILGGDHDGDDAVVFYRAPVEGYE LPDDTLDLQAIKPVARKLDANTVEARIQRWQNEVSVNIGQFDLAARRLL AANKLHREEAKLLSVAIQTAISLKKRVARLEDQSWWPRVAELLEESKK LAGTTWVDMIRDGREPVGAPDWVLTIIYQKVHEAIKKVQKLEPRLWLTE AKVREFAKGATVPASCEALIQYREKLLKAKAIAVQNEGDGTVARLNKE LKEFIHVEAPKHLLGIDEEDWKQFSRWAIGNTHISEWVFWCHPAILEEL YDRFGKQTIKAIALGGTPNLAESEVIELEDQELIDRVFEVEGVKYALLDE TGYLKAGRLKVTKVRKSVVEFEYA
2	大肠杆菌调 和的 Phifa_44	ATGAACAAAACCGAGTTAGTTAAGAAACTCATAGAGGAAAAAACTG CAGAACTCGCTGTACGTCTGTTTATACCGGGAGGATCGATGAGGAG GGGCAGTGGACTCCTACTTCGCTGCACGAACGTTATCAGGATAAGGT TCTGGTAGTACCTGCACCTGAAGAAGGGGAGCCGGTTCAGACCATCG GTGAGTATGAGTTTGTGGGGGAACTCGAACAGGATCGTTTATATC CATCGTTCGATCATCAAACAATGGCTGGAGGTTGCAGGGGGTGACA GCCACTGGGGGGCAGCAGTAGTACTGCGTCCGGGTAAACTCGCTAG CCATAACGCAGTTTTTCGTGGGAGGGTTATCAGTTAGAGGAATCGG ATGAGGGTCTGCTGGCAACTATGGACGAACGTGATTGGAAAGTACT GCTGGAGGCTTATGATCTGGATCCTGAAGTACGTCTCGTTCAGGTTA CTGTTTTTCGATCTGGAGCAGGGTGTAGCGCAAAAGGTACTCTGCGT AAAGTTCTCCCTGGGGAGCGTCTGTAGTTTTTCCTAACTCGTGGA AAAATTTGGTAACCTCCGTACTCAATTTATGAGCATCCTGACCACGT ACGTTCACTATAACCCCCGTGCTAGCGTTAACCTACAAGAGCTCACC TATTATGTTTCAGGAGGCTCCCGCTCAGTGGGTTTTTGACGCTCTGGAT GAAGAGATCGAACGTATCATAAACCTGAAAACAGCCCTTGCTGA CTACTGGTTATCTGACCCGTCTCGGTTTCAGCCCTGCTTGGAACCTGA CCCTCACCCTCTCAAGGAAAGCCTGTGCGGTGAACCTGAAGAACTA CTGCGTCTGTATAAACTGTGCGGTAAATATGGTCTGCGTGCAAAATC GACTTCGAGCCACCTCCTGCGTGATGGTGAATTACTGTTACCTGCAT ACGCAAAAAAACACGTTAAGGTTGGTGATTTCTGTTACTGTTTCGCGT AACCTGCACTACCTTCGACGGGTGGGCAAAATATCGTGTAACCTG GTTTATAGATGGTAACATGGTAGTTTTTCCTCAGGGGGATTATGCAT GGAGCGCTATCCTGGGTGGTGATCATGATGGTGACGACGCAGTTGTA TTTTATCGTGCTCCGGTTGAAGGTTATGAACTCCCGGACGACACTCT GGATCTGCAGGCAATAAAACCCGTAGCACGTAAACTCGACGCAAAC ACCGTAGAGGCAAGGATACAACGTTGGCAAAACGAGGTAAGCGTTA ACATCGGTCAGTTCGATCTGGCTGCTAGGCGTCTCCTAGCAGCAAAC AAGCTGCATCGTGAGGAGGCAAACTACTGTCGGTAGCAATACAGA CTGCAATCAGCCTCAAAAAACGTGTAGCTCGTCTAGAAGATCAGAGC TGGTGGCCGCGTGATGCTGAGCTGCTCGAAGAGAGCAAAAACTCG CTGGTACCACTTGGGTTGATATGATACGTGATGGTCGTGAGCCGGTA GGGGCACCCGACTGGGTTCTACCATCTATCAGAAAGTTCATGAAGC AATCAAGAAAGTTCAGAAGCTGGAACCCCGTCTGTGGCTCACTGAA GCAAAAGTACGTGAATTCGCAAAAGGGGGCAACTGTACCTGCAAGCT GCGAGGCTCTAATCCAGTATCGTGAAAACTCCTGAAAGCTAAAGC AATCGCAGTTCAGAACGAGGATGGTGATACTGTTGCACGTTTTAAACA AAGAACTGAAGGAGTTTATCCACGTAGAGGCACCGAAACATCTGCT GGGGATAGATGAAGAAGATTGGAACAGTTTAGCAGGTGGGCAATC GGGAACACCCATATCAGCGAATGGGTTTTTGGTGCCACCCCGCTAT CCTAGAAGAACTGTATGATCGTTTCGGGAAACAAACCATCAAAGCTA

[0164]

		TCGCACTGGGTGGGACTCCGAACCTAGCAGAAAGCGAGGTAATCGA GCTGGAAGATCAGGAACATAATAGATCGTGTATTTGAAGTTGAAGGTG TAAAATATGCTCTGTTAGATGAAACCGGTTATCTCAAGGCAGGGCGT CTGAAAGTTACTAAGGTTTCGTAAATCGGTTGTAGAATTTGAATATGC TTGA
3	PhiFa噬菌 体模板	AATTCTAATACGACTCACTATAGtatcegggtgggccagccagcgtaccgtcctcagagctgt ggattgcgcggcttccgccccgcagccgcgcactagtcctccgccaccaccacctctgcaggaagaggtggg cgaagagacgaagagaggtgaaagagagaagaggcgaaggccgggtgtcccgcgcccggctgccttacgg tgccacgccaccccgtcgcgaaggctccgcgcggagcgcggcccttcgggttacggccttgcgtcgcg gggaccccggtgtggcagggctccgccccgagccggcgcgtagaggacacccggctcaaggaggtcaaa gatgaacaagaccgaacttgtcaaaaagtgtgattgaagagaagacggcgaggttggtgttaggccggtgtacac cggtcgaatcgacgaagaaggtcagtggtactccgacttctctg
4	模板	ctgtggacgctgacttcacgactgactggaagatgtcaaaaattgagcgctttgtggtataattaggcgtgtagcaa gcaggtacactcggcgcaagctgtggagactggacttgccgccctgctttggagcgccgggtggtttgggcgc ggctttatgttgcgccatggggggagccacccggctttatcctccccgactggaggttagatgcagcttcgcaa gattgcgccgaacccaacttctccgctccttgaggagaactcagcgcggaactggaagacatggacgctct gccatctaggaggttggatgaacatccgagatgcccccaagctgttctcggagcttccggcttccgacccag ctacgtggctgcgggtggagagcatcgcgaagcggaagctctgagaggtgaagcatggcgaggttcactggatt agcaaggtcttcggctcgcaagacgctggagaaccaccgcatcaagttcttcagctacgctaccgtctagacc gcgtaagggtggggagggggcagctctccccaccacctgttacctggaggtgaacgtgcgagtgcggttgcgt aaggcgggtgtacgtacggcgaactccatgcggcgagggtgtcaaggtgattctggccttgtgtctccgc gtgtgaggtgagagatggcgattttgagctgaacgctggttcgaccttcgctccccaccaggaagga
5	LAMP E-基 因 F3	AGCTGATGAGTACGAACTT
6	LAMP E-基 因 B3	TTCAGATTTTTTAACACGAGAGT
7	LAMP E-基 因 FIP	ACCACGAAAGCAAGAAAAAGAAGTATTCGTTTCGGAAGAGACAG
8	LAMP E-基 因 BIP	TTGCTAGTTACACTAGCCATCCTTAGGTTTTACAAGACTCACGT
9	LAMP E-基 因环	CTGCGCTTCGATTGTGTGCGT
10	LAMP E-基 因 F3	AGCTGATGAGTACGAACTT
11	E-基因 crRNA	AUUGCGACACAAUUAUUGCAGCAGUACGCACACAAUCGAAGCGCAG A
12	模板	5' Cy3-CGATGGCCGTAGATAAGGCGCCCGGGGACGACCACGTCAAGGC GCAGTTC

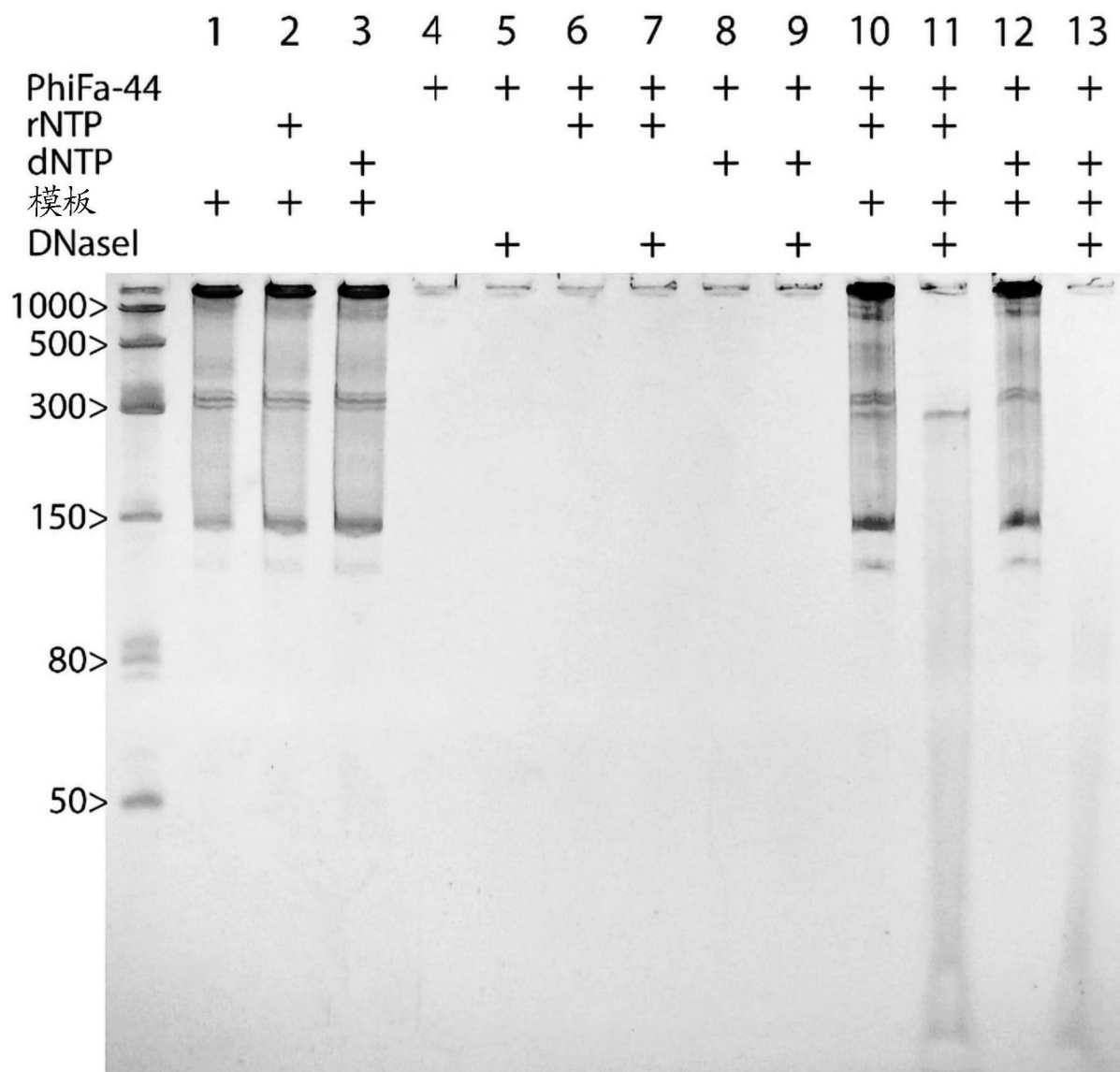


图1

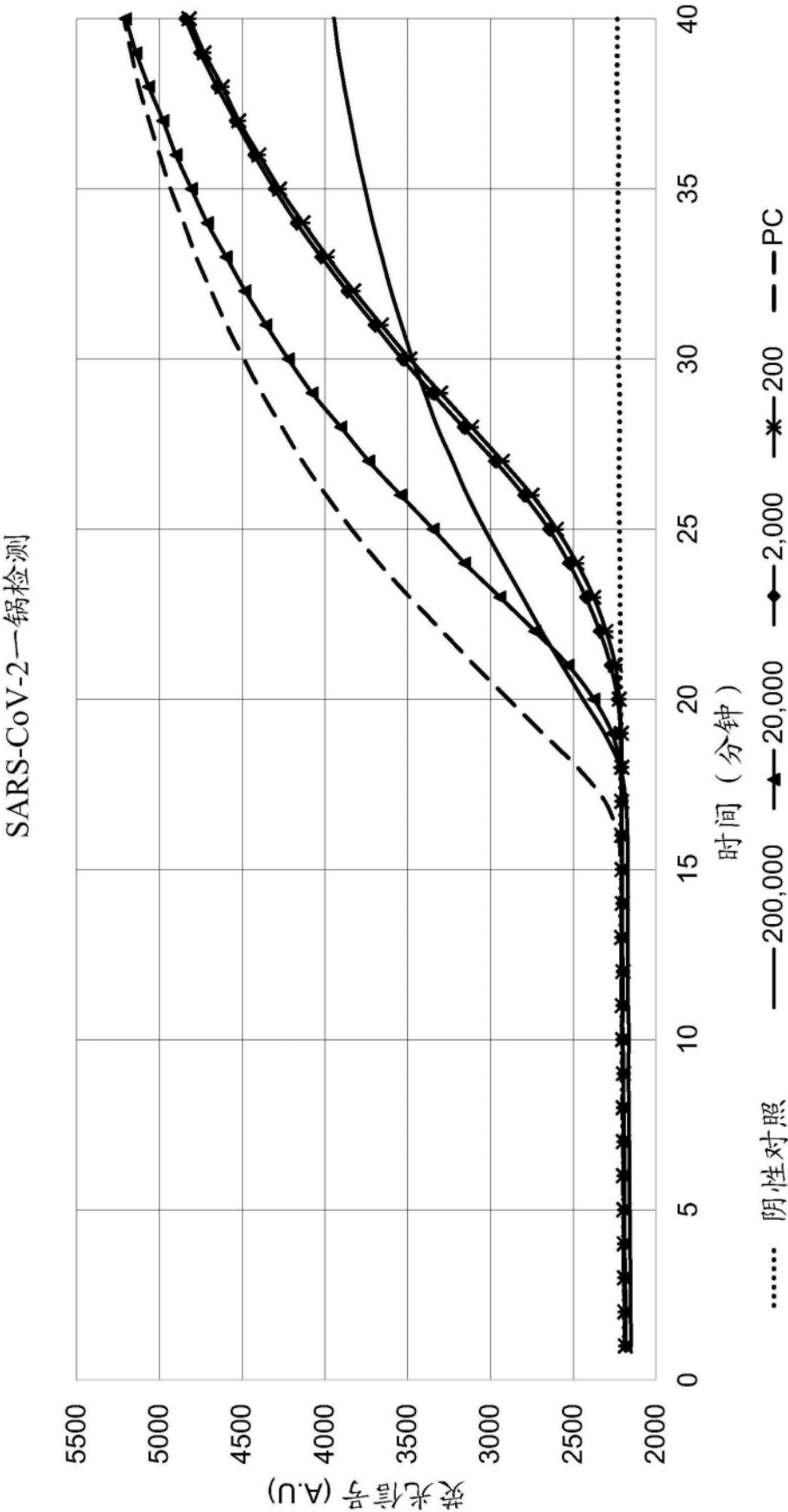


图3

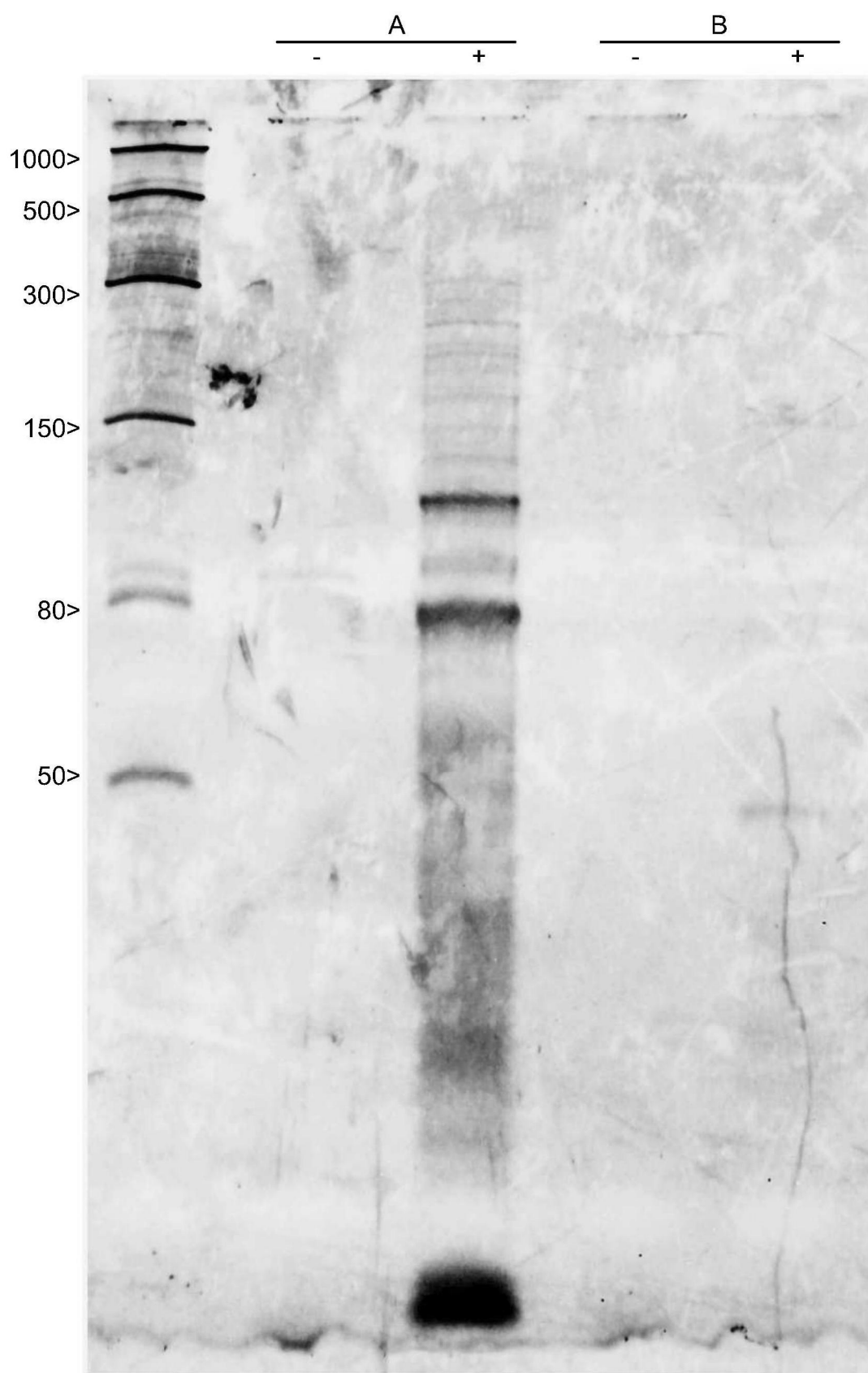


图4

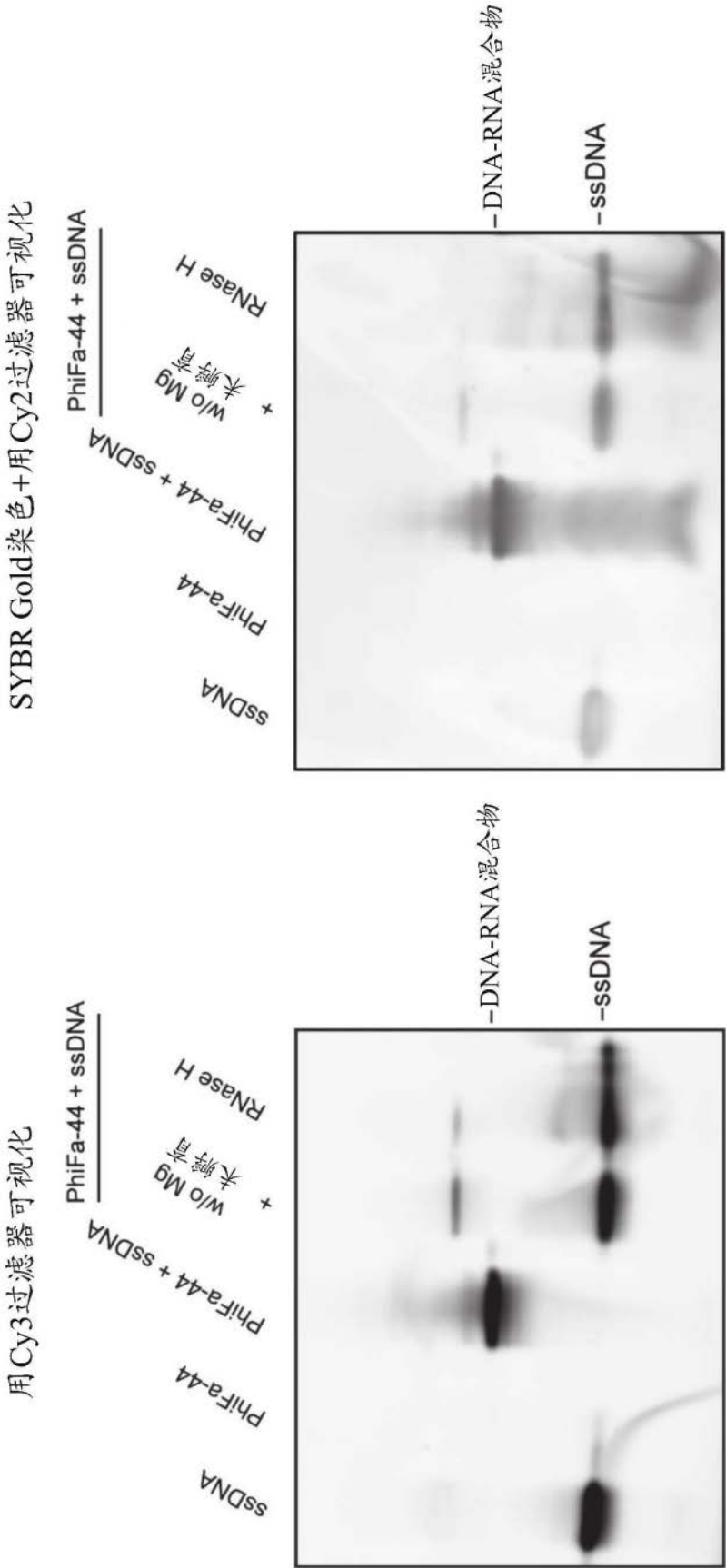


图5