



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020000809-5 A2



(22) Data do Depósito: 12/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 08/09/2020

(54) Título: USO DA PROTEÍNA CAS, MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO, E KIT

(51) Int. Cl.: C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 14/07/2017 CN 201710573752.0.

(71) Depositante(es): SHANGHAI TOLO BIOTECHNOLOGY COMPANY LIMITED.

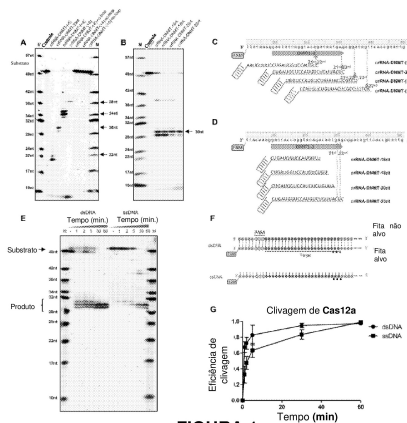
(72) Inventor(es): JIN WANG; QIUXIANG CHENG; SHIYUAN LI; XIAOYAN LI; LINXIAN LI.

(86) Pedido PCT: PCT CN2018082769 de 12/04/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/011022 de 17/01/2019

(85) Data da Fase Nacional: 14/01/2020

(57) Resumo: A presente invenção fornece o uso de uma proteína Cas, um método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo e um kit. O método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo inclui a adição de um RNA guia, Cas12a e uma sonda de ácido nucleico em um sistema de reação contendo uma molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada e a detecção da sonda de ácido nucleico após a conclusão da reação.



**USO DA PROTEÍNA CAS, MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MOLÉCULA
DE ÁCIDO NUCLEICO, E KIT
CAMPO TÉCNICO**

[0001] A presente invenção pertence ao campo da biotecnologia e, em particular, a um método para detecção de molécula de ácido nucleico alvo.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] Um método específico de detecção de ácido nucleico tem um importante valor de aplicação, como detecção de patógenos, detecção de doenças genéticas etc. Em um aspecto da detecção de patógenos, uma vez que cada microrganismo patogênico tem sua sequência molecular de ácidos nucleicos característica única, é possível desenvolver a detecção molecular de ácidos nucleicos para espécies específicas, também conhecidas como diagnóstico de ácido nucleico (NAD), que é de grande importância na áreas de segurança alimentar, detecção de poluição por micro-organismos ambientais, infecção por patógenos humanos, etc. Outro aspecto é a detecção do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) em humanos ou outras espécies. Compreender a relação entre uma variação genética e uma função biológica a nível genômico fornece uma nova perspectiva para a biologia molecular moderna. O SNP está intimamente relacionado a funções biológicas, evolução e doenças; portanto, o desenvolvimento de tecnologias de detecção e análise de SNP é particularmente importante.

[0003] Atualmente, muitos métodos NAD foram estabelecidos, principalmente para a detecção de uma molécula de DNA específica, e também existem alguns métodos para moléculas de RNA. De um modo geral, uma molécula de DNA é muito estável; portanto, uma amostra de teste pode vir de uma série de amostras biológicas complexas; pois o RNA se degrada muito facilmente, portanto precisa ser manuseado com muito cuidado. Na década de 1970, foi estabelecido um método de detecção usando digestão com endonuclease de restrição. Posteriormente, métodos como *Southern*, *Northern* e hibridização *dot blot* foram desenvolvidos para detecção específica de uma molécula de ácido nucleico. Em 1985, quando PCR se tornou um método experimental convencional, isso levou a uma melhora exponencial na biologia molecular. A detecção de molécula de ácido nucleico específica estabelecida atualmente geralmente precisa ser realizada em duas etapas, sendo a primeira etapa a amplificação de um ácido nucleico alvo e a

segunda etapa a detecção do ácido nucleico alvo. A tecnologia de PCR é um método de amplificação que é primeiro estabelecido e mais comumente utilizado atualmente. Atualmente, com base no método PCR, é introduzida uma sonda marcada com fluorescência, de forma que a situação de amplificação de um alvo possa ser detectada em tempo real, denominada PCR em tempo real. PCR em tempo real não é apenas um método de detecção rápido e altamente sensível, mas também um método para análise quantitativa. Além do método de amplificação por PCR, muitos métodos alternativos foram estabelecidos, como reação em cadeia da ligase, amplificação de DNA ramificado, NASBA, SDA, amplificação mediada por transcrição, amplificação isotérmica mediada por Loop (LAMP), amplificação por círculo rolante (RCA), Amplificação da Polimerase Recombinase (RPA), etc. A vantagem de muitos desses métodos alternativos é a isothermalidade. Ou seja, apenas uma temperatura é necessária para completar a reação, sem a necessidade de um instrumento de ciclagem térmica como o usado em PCR. Entre os métodos de detecção de ácidos nucleicos, além da PCR em tempo real que pode concluir diretamente a amplificação e detecção, a tecnologia FISH (hibridização *in situ* por fluorescência) é o método de detecção mais comumente usado - um método no qual uma sonda molecular marcada é hibridizada *in situ* com uma sequência alvo complementar. Além disso, métodos de detecção como as tecnologias de sequenciamento de última geração e as tecnologias de sequenciamento Oxford Nanopore também foram desenvolvidas, mas esses métodos geralmente exigem equipamentos experimentais caros.

[0004] A detecção de SNPs também requer primeiro amplificação por um método como PCR e similares, de modo a obter fragmentos de região contendo sítio de SNP suficientes para detecção adicional. Métodos comumente usados incluem: extensão do primer, hibridização, ligação e clivagem enzimática. Quando os métodos acima são concluídos, um método específico precisa ser utilizado para a detecção, como detecção por espectrometria de massa, detecção de fluorescência, detecção por quimiluminescência etc.

[0005] Embora muitos métodos de detecção tenham sido desenvolvidos para a detecção de ácidos nucleicos, como descrito acima, em certos casos, como para detectar de maneira mais rápida, simples e econômica é ainda um importante sentido de desenvolvimento, como a detecção rápida de bactérias patogênicas em

campo, a detecção rápida de SNPs sensíveis a fármacos, etc. Em 2016, Collins *et al.* desenvolveu um método rápido e barato para detectar o vírus da Zika com base na característica do CRISPR-Cas9 de reconhecer e clivar especificamente uma sequência alvo. Em 2017, Feng Zhang *et al.* estabeleceu um método rápido de detecção de ácido nucleico utilizando um recurso de "efeito colateral" do CRISPR-Cas13a. O "efeito colateral" significa que Cas13a se liga a um RNA alvo específico e cliva aleatoriamente outros RNAs não alvo (aqui as moléculas de RNA são projetadas como um sistema de notificação de fluorescência de RNA); detecção rápida de RNA-alvo é realizada combinando-se com uma tecnologia de amplificação isotérmica por RPA e a equipe de Feng Zhang batizou esse método de detecção de SHERLOCK (Desbloqueio por Repórter Enzimático Específico de Alta Sensibilidade; *Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing* em inglês). O método SHERLOCK envolve a ligação a um modelo de RNA; portanto, se for necessária a detecção de DNA, o DNA precisa ser primeiramente transcrito em um modelo de RNA para detecção; e dada a instabilidade do RNA, esse método sem dúvida aumentará o grau de dificuldade de operação.

[0006] Em 2015, Feng Zhang *et al.* descobriu uma nova endoproteínase Cas12a relacionada ao CRISPR (anteriormente conhecida como Cpf1), que, como uma proteína Cas9 comumente usada, é uma endonuclease de DNA específica guiada por RNA; no entanto, comparada à Cas9, a Cas12a tem suas próprias características, por exemplo, apenas um crRNA é necessário para orientar a clivagem específica de um DNA de fita dupla e uma extremidade pegajosa é produzida.

SUMÁRIO

[0007] Um objetivo da presente invenção é fornecer um método para detectar uma molécula alvo de ácido nucleico.

[0008] Outro objetivo da presente invenção é proporcionar o uso de uma proteína Cas em um método para detectar uma molécula alvo de ácido nucleico.

[0009] Em um primeiro aspecto da presente invenção, é fornecido um kit que inclui um RNA guia, uma proteína Cas, uma sonda de ácido nucleico e uma solução tampão.

[0010] Um método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo inclui adicionar um RNA guia, uma proteína Cas, uma sonda de ácido nucleico e uma

solução tampão em um sistema de reação contendo uma molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada e, em seguida, detectar o ácido nucleico alvo (especialmente por um método de detecção de intensidade da fluorescência).

[0011] De preferência, a proteína Cas é Cas12a ou proteína Cas com uma atividade colateral de clivagem de DNA de fita simples semelhante à da Cas12a.

[0012] De preferência, a proteína Cas é Cas12a.

[0013] A Cas12a é preferencialmente uma dentre FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a ou Lb4Cas12a.

[0014] De preferência, a Cas12a é LbCas12a.

[0015] De preferência, o RNA guia se refere a um RNA que guia a proteína Cas para se ligar especificamente a um DNA alvo.

[0016] Em outra modalidade preferencial, a sonda de ácido nucleico é um DNA de fita simples; o DNA de fita simples é preferencialmente um DNA de fita simples marcado com fluorescência; o DNA de fita simples é preferencialmente uma sonda fluorescente que é marcada com um grupo fluorescente HEX em um terminal 5' e marcada com um grupo supressor BHQ1 em um terminal 3'.

[0017] Em outra modalidade preferencial, o método para detectar a sonda de ácido nucleico é preferencialmente um método de detecção de fluorescência; e o método de detecção de fluorescência é preferencialmente um método de detecção que usa um leitor de microplacas ou um espectrofotômetro de fluorescência.

[0018] Preferencialmente, a molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada no sistema de reação da molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada é obtida após amplificação.

[0019] Preferencialmente, o método de detecção da presente invenção pode ser utilizado para detectar um micro-organismo patogênico, mutação genética ou um DNA alvo específico.

[0020] Em outra modalidade preferencial, a proteína Cas inclui Cas12b (C2c1).

[0021] Em um segundo aspecto da presente invenção, é fornecido uso de uma proteína Cas em um método para detectar uma molécula de ácido nucleico

alvo ou na preparação de uma formulação para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo.

[0022] Em outra modalidade preferencial, quando um DNA alvo, um RNA guia e uma proteína Cas formam um complexo ternário, o complexo cliva outras moléculas de DNA de fita simples no sistema.

[0023] Preferencialmente, o RNA guia se refere a um RNA que guia a proteína Cas para se ligar especificamente a um DNA alvo.

[0024] Em um terceiro aspecto da presente invenção, é fornecido um kit que inclui um RNA guia, uma proteína Cas e uma sonda de ácido nucleico.

[0025] Em outra modalidade preferencial, o kit inclui ainda uma solução tampão.

[0026] Em um quarto aspecto da presente invenção, é fornecido um sistema de detecção para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, em que o sistema inclui:

- (a) uma proteína Cas, que é Cas12a ou uma proteína Cas com uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à da Cas12a;
 - (b) um RNA guia que guia a proteína Cas para se ligar especificamente à molécula de ácido nucleico alvo; e
 - (c) uma sonda de ácido nucleico que é um DNA de fita simples;
- em que a molécula de ácido nucleico alvo é um DNA alvo.

[0027] Em outra modalidade preferencial, o sistema de detecção inclui ainda (d) uma solução tampão.

[0028] Em outra modalidade preferencial, o sistema de detecção inclui ainda uma molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada.

[0029] Em outra modalidade preferencial, a concentração da molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada no sistema de detecção é de 1-100 cópias/microlitro ou 10^{15} cópias/microlitro, preferencialmente 1-10 cópias/microlitro, e mais preferencialmente 1-5 cópias/microlitro.

[0030] Em outra modalidade preferencial, no sistema de detecção, a razão molar da sonda de ácido nucleico para a molécula de ácido nucleico alvo é 10^3 : 1 a 10^{14} : 1 e, preferencialmente, 10^4 : 1 a 10^7 : 1.

[0031] Em outra modalidade preferencial, o sítio de detecção da molécula de ácido nucleico alvo está localizado nas posições 1-12 a jusante da sequência de

PAM do RNA guia.

[0032] Em outra modalidade preferencial, o comprimento do RNA guia é de 15-30 nt e, de preferência, de 15-18 nt.

[0033] Em outra modalidade preferencial, o DNA alvo inclui um cDNA.

[0034] Em outra modalidade preferencial, o DNA alvo é selecionado a partir de um grupo que consiste em um DNA de fita simples, um DNA de fita dupla ou uma combinação dos mesmos.

[0035] Em outra modalidade preferencial, a sonda de ácido nucleico carrega um grupo fluorescente e um grupo supressor.

[0036] Em outra modalidade preferencial, o grupo fluorescente e o grupo supressor estão localizados independentemente no terminal 5', no terminal 3' e na porção média da sonda de ácido nucleico.

[0037] Em outra modalidade preferencial, o comprimento da sonda de ácido nucleico é 3-300 nt, preferencialmente 5-100 nt, mais preferencialmente 6-50 nt, e ainda mais preferencialmente 8-20 nt.

[0038] Em outra modalidade preferencial, a molécula de ácido nucleico alvo inclui uma molécula de ácido nucleico alvo derivada de um grupo que consiste em plantas, animais, insetos, micro-organismos, vírus ou uma combinação dos mesmos.

[0039] Em outra modalidade preferencial, o DNA alvo é um DNA sintetizado artificialmente ou de ocorrência natural.

[0040] Em outra modalidade preferencial, o DNA alvo inclui um DNA do tipo selvagem ou mutante.

[0041] Em outra modalidade preferencial, o DNA alvo inclui um DNA obtido por transcrição reversa de RNA ou amplificação, como um cDNA etc.

[0042] Em outra modalidade preferencial, a Cas12a é selecionada a partir de um grupo que consiste em FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a ou uma combinação dos mesmos; e mais preferencialmente, a Cas12a é LbCas12a.

[0043] Em outra modalidade preferencial, a proteína Cas com uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à de Cas12a é selecionada a partir de um grupo que consiste em Cas12b (isto é, C2c1).

[0044] Em outra modalidade preferencial, a proteína Cas12b é selecionada a partir de um grupo que consiste em AacCas12b (*Alicyclobacillus acidoterrestris*), Aac2Cas12b (*Alicyclobacillus acidiphilus*), AkCas12b (*Alicyclobacillus kakegawensis*), AmCas12b (*Alicyclobacillus macrosporangiidus*), AhCas12b (*Alicyclobacillus herbarius*), e AcCas12b (*Alicyclobacillus contaminans*).

[0045] Em outra modalidade preferencial, a sonda de ácido nucleico compreende um DNA de fita simples que carrega um marcador detectável.

[0046] Em outra modalidade preferencial, o DNA de fita simples é um DNA de fita simples marcado com fluorescência e marcado com biotina.

[0047] Em outra modalidade preferencial, o DNA de fita simples é um DNA de fita simples marcado com fluorescência.

[0048] Em outra modalidade preferencial, o DNA de fita simples é uma sonda fluorescente que é marcada com um grupo fluorescente HEX em um terminal 5' e é marcada com um grupo supressor BHQ1 em um terminal 3'.

[0049] Em um quinto aspecto da presente invenção, é fornecido um kit para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, em que o kit inclui:

- i) um primeiro recipiente e uma proteína Cas no primeiro recipiente, a proteína Cas sendo Cas12a ou proteína Cas tendo uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à da Cas12a;
- ii) um segundo recipiente opcional e um RNA guia no segundo recipiente, o RNA guia guiando a proteína Cas para se ligar especificamente à molécula de ácido nucleico alvo;
- iii) um terceiro recipiente e uma sonda de ácido nucleico no terceiro recipiente; e
- iv) um quarto recipiente opcional e uma solução tampão localizada no quarto recipiente;

em que a molécula de ácido nucleico alvo é um DNA alvo.

[0050] Em outra modalidade preferencial, quaisquer dois, três ou quatro (ou todos) do primeiro, segundo, terceiro e quarto recipientes podem ser o mesmo ou diferentes recipientes.

[0051] Em outra modalidade preferencial, a sonda de ácido nucleico carrega um grupo fluorescente e um grupo supressor.

[0052] Em um sexto aspecto da presente invenção, é fornecido um método

para detectar se uma molécula de ácido nucleico alvo existe em uma amostra, incluindo as seguintes etapas:

[0053] (a) fornecer o sistema de detecção para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo de acordo com o quarto aspecto da presente invenção, em que o sistema de detecção tem ainda uma amostra a ser detectada; e

[0054] (b) detectar se a sonda de ácido nucleico no sistema de detecção é clivada por uma proteína Cas, em que a clivagem é uma transclivagem de um DNA de fita simples colateral;

[0055] em que se a sonda de ácido nucleico é clivada pela proteína Cas, então isto indica a presença da molécula de ácido nucleico alvo na amostra; e se a sonda de ácido nucleico não for clivada pela proteína Cas, isto indica a ausência da molécula de ácido nucleico alvo na amostra.

[0056] Em outra modalidade preferencial, a amostra a ser detectada inclui uma amostra não amplificada e uma amostra amplificada (ou amplificada por ácido nucleico).

[0057] Em outra modalidade preferencial, a amostra a ser detectada é uma amostra obtida por amplificação.

[0058] Em outra modalidade preferencial, um método para amplificar o ácido nucleico é selecionado de um grupo consistindo em amplificação por PCR, amplificação LAMP, amplificação da RPA, reação em cadeia da ligase, amplificação de DNA ramificado, NASBA, SDA, amplificação mediada por transcrição, amplificação por círculo rolante, HDA, SPIA, NEAR, TMA e SMAP2.

[0059] Em outra modalidade preferencial, PCR inclui PCR de alta temperatura, PCR de temperatura normal e PCR de baixa temperatura.

[0060] Em outra modalidade preferencial, o método é usado para detectar se SNP, mutação pontual, deleção e/ou inserção existem em um ácido nucleico em um sítio alvo.

[0061] Em outra modalidade preferencial, quando as regiões a montante e a jusante (no intervalo de -20 nt a +20 nt, preferencialmente em um intervalo de -15 nt a +15 nt, e mais preferencialmente em um intervalo de -10 nt a +10 nt) de um sítio alvo não possuem uma sequência PAM, a amplificação do ácido nucleico é realizada usando um primer introdutor de PAM.

[0062] Em outra modalidade preferencial, o primer introdutor de PAM tem

uma estrutura de fórmula I em 5'-3':

[0063] P1-P2-P3 (I)

[0064] em que,

[0065] P1 é uma sequência de segmento 5' localizada no terminal 5' e é complementar ou não complementar à sequência da molécula de ácido nucleico alvo;

[0066] P2 é uma sequência PAM;

[0067] P3 é uma sequência de segmento 3' localizada no terminal 3' e é complementar à sequência da molécula de ácido nucleico alvo.

[0068] Em outra modalidade preferencial, o primer PAM liga-se especificamente a montante ou a jusante da molécula de ácido nucleico alvo.

[0069] Em outra modalidade preferencial, P1 tem um comprimento de 0-20 nt.

[0070] Em outra modalidade preferencial, P3 tem um comprimento de 5-20 nt.

[0071] Em outra modalidade preferencial, o primer PAM tem um comprimento de 18-50 nt, e preferencialmente 20-35 nt.

[0072] Em outra modalidade preferencial, a complementação inclui complementação completa e complementação parcial.

[0073] Em outra modalidade preferencial, pelo menos um primer contendo a sequência PAM é utilizado na amplificação de ácido nucleico.

[0074] Em outra modalidade preferencial, quando a região a montante e a jusante (no intervalo de -20 nt a +20 nt, preferencialmente no intervalo de -15 nt a +15 nt, e mais preferencialmente no intervalo de -10 nt a +10 nt) do sítio alvo contém uma sequência PAM, um primer contendo ou não a sequência PAM pode ser usado e o produto de amplificação amplificado contém a sequência PAM.

[0075] Em outra modalidade preferencial, a detecção na etapa (b) inclui um método de detecção de fluorescência.

[0076] Em outra modalidade preferencial, o método de detecção de fluorescência utiliza um leitor de microplacas ou um espectrofotômetro de fluorescência para detecção.

[0077] Em um sétimo aspecto da presente invenção, é fornecido uso de

uma proteína Cas na preparação de um reagente ou kit de detecção para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo com base na clivagem de DNA de fita simples colateral, em que a proteína Cas é uma proteína Cas12a ou Cas com uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à de Cas12a.

[0078] Em outra modalidade preferencial, a Cas12a é selecionada a partir de um grupo que consiste em FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a ou uma combinação dos mesmos; e mais preferencialmente, a Cas12a é LbCas12a.

[0079] Em outra modalidade preferencial, a proteína Cas com uma atividade de clivagem colateral de DNA de fita simples semelhante à de Cas12a é selecionada a partir de um grupo que consiste em Cas12b (ou C2c1).

[0080] Em outra modalidade preferencial, a proteína Cas12b é selecionada a partir de um grupo que consiste em AacCas12b.

[0081] Deve ser entendido que, dentro do escopo da presente invenção, as características técnicas acima mencionadas da presente invenção e as características técnicas descritas em detalhes adiante (por exemplo, em exemplos) podem ser combinadas entre si para formar uma solução técnica nova ou preferencial. Devido ao limite de comprimento, não será mais repetido aqui.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0082] A FIGURA 1 mostra uma característica de clivagem *cis* de Cas12a na clivagem de um DNA de fita simples alvo.

[0083] A FIGURA 2 mostra que ao clivar um DNA de fita simples alvo, Cas12a não depende de uma sequência PAM necessária para a clivagem de fitas duplas.

[0084] A FIGURA 3 mostra uma característica de transclivagem de Cas12a na clivagem de um DNA de fita simples alvo.

[0085] A FIGURA 4 mostra Cas12as de teste de 10 fontes diferentes, em que todas essas Cas12as têm atividades de clivagem *cis* e de transclivagem em um DNA de fita simples.

[0086] A FIGURA 5 identifica sítios possivelmente relacionados a atividades de clivagem *cis* e transclivagem no DNA de fita simples em Cas12a através de um experimento de mutação de sítio único da Cas12a.

[0087] A FIGURA 6 mostra as estruturas dos monômeros de Cas12a e

Cas12b (isto é, C2c1) e seus complexos com um RNA guia e um DNA alvo.

[0088] A FIGURA 7 mostra os valores de fluorescência obtidos por diferentes Cas12as usando um substrato específico de DNA de fita dupla e um DNA de fita simples (HEX-N12-BHQ1) como uma sonda de detecção de fluorescência. O grupo de controle negativo não é adicionado com o substrato específico.

[0089] A FIGURA 8 mostra um fluxograma esquemático de um método HOLMES para detectar um DNA alvo com base na amplificação do DNA alvo e na atividade de transclivagem da Cas12a em um DNA de fita simples colateral.

[0090] A FIGURA 9 mostra um teste de sensibilidade de um DNA alvo usando FnCas12a ou LbCas12a diretamente, ou em combinação com o método HOLMES.

[0091] A FIGURA 10 mostra valores de detecção de fluorescência de sequências alvo com diferentes mutações de ponto único, conforme detectado pelo método HOLMES, usando crRNAs de diferentes comprimentos de sequências guia em combinação com FnCas12a ou LbCas12a.

[0092] A FIGURA 11 testa se uma sonda de DNA de fita simples marcada com FAM é transclivada após a adição do DNA de fita simples alvo utilizando uma sonda fluorescente marcada com FAM e 10 proteínas Cas12a.

[0093] A FIGURA 12 testa valores de fluorescência após a adição do DNA de fita simples alvo usando HEX-N12-BHQ1 como sonda e 10 proteínas Cas12a.

[0094] A FIGURA 13 (A) mostra os valores de detecção de HOLMES quando um fragmento do gene *gyrB* é usado como uma sequência alvo e diferentes concentrações de *Escherichia coli* MG1655 de cultura pura são usadas como modelos de controle positivo usando uma sonda fluorescente de DNA de fita simples marcada com HEX e BHQ1 em duas extremidades dos mesmos. É mostrado que o valor da resposta de fluorescência de *Escherichia coli* MG1655 diminui com a diminuição de sua concentração. (B) Valores de detecção de amostras de água em ambientes em diferentes locais.

[0095] A FIGURA 14 mostra um fluxograma esquemático de um método HOLMES para detectar SNP e valores de detecção de fluorescência de 5 sítios de SNP.

[0096] A FIGURA 15 mostra os valores de detecção de fluorescência dos sítios chave em um gene TP53 (um gene relacionado ao câncer), conforme

detectado pelo método HOLMES.

[0097] A FIGURA 16 mostra os valores de detecção de 5 sítios de SNP (relacionados à gota), conforme detectados pelo método HOLMES.

[0098] A FIGURA 17 mostra os valores de detecção de um sítio de SNP (relacionado à gota), conforme detectado pelo método HOLMES, em que as amostras são amostras de 21 voluntários.

[0099] A FIGURA 18 mostra um esquema de projeto de primer de um exemplo da presente invenção, que pode ser usado para a detecção de SNP por HOLMES em qualquer sítio.

[0100] A FIGURA 19 usa uma combinação de LAMP e HOLMES para detectar *Escherichia coli* no sistema. (A) Um mapa de electroforese de um gene *gyrB* de *Escherichia coli* amplificado por LAMP. Um total de dois conjuntos de primers *gyrB*-1 e *gyrB*-2 é utilizado para amplificação. *gyrB* é o gene característico de *Escherichia coli*. (B) Um sistema de detecção HOLMES é usado para detectar um produto de amplificação de LAMP. Controle negativo: a amostra é água estéril e um primer de amplificação *gyrB*-1 é usado para amplificar ou detectar o resultado do gene *gyrB*; *gyrB*-1: a amostra é *Escherichia coli* a ser detectada e um primeiro conjunto de primers de amplificação do gene *gyrB* é usado para amplificar ou detectar o resultado do gene *gyrB*; e *gyrB*-2: a amostra é *Escherichia coli* a ser detectada, e um segundo conjunto de primers de amplificação do gene *gyrB* é usado para amplificar ou detectar o resultado do gene *gyrB*.

[0101] A FIGURA 20 detecta o genótipo de uma célula HEK293T humana usando uma combinação de LAMP e HOLMES. (A) Um mapa de electroforese de um modelo de detecção de SNP correspondente da célula HEK293T humana, conforme amplificado por LAMP. Controle negativo: a amostra é água estéril e o resultado é o resultado da amplificação usando um primer de amplificação rs5082; rs5082: a amostra é um genoma total da célula humana HEK293T e o resultado é o resultado da amplificação usando o primer de amplificação rs5082; e rs1467558: a amostra é o genoma total da célula humana HEK293T e o resultado é o resultado da amplificação usando um primer de amplificação rs1467558. (B) Um sistema de detecção HOLMES é usado para detectar um produto de amplificação LAMP. O sítio rs5082 foi detectado usando dois crRNAs de crRNA-G e crRNA-T, respectivamente (Listagem de Sequência 5); e o sítio rs1467558 foi detectado

usando dois crRNAs de crRNA-C e crRNA-T, respectivamente, (Listagem de Sequência 5).

[0102] A FIGURA 21 usa uma combinação de RPA e HOLMES para detectar *Escherichia coli* no sistema. (A) Amplificação do gene *gyrB* de *Escherichia coli* por RPA. Um total de dois conjuntos de primers *gyrB*-1 e *gyrB*-2 é utilizado para amplificação. *gyrB* é um gene característico de *Escherichia coli*. (B) Um sistema de detecção HOLMES é usado para detectar um produto de amplificação da RPA. Controle negativo: a amostra é água estéril e um primer de amplificação *gyrB*-1 é usado para amplificar ou detectar o resultado do gene *gyrB*; *gyrB*-1: a amostra é *Escherichia coli* a ser detectada e um primeiro conjunto de primers de amplificação de *gyrB* é usado para amplificar ou detectar o resultado do gene *gyrB*; e *gyrB*-2: a amostra é *Escherichia coli* a ser detectada, e um segundo conjunto de primers de amplificação de *gyrB* é usado para amplificar ou detectar o resultado do gene *gyrB*.

[0103] A FIGURA 22 mostra a detecção da atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral de Cas12b quando um DNA de fita simples é usado como o DNA alvo. Após a conclusão da reação de clivagem colateral, os reagentes são separados por electroforese em gel desnaturado de ureia a 12% e detectados por um sistema de geração de imagens por fluorescência. Os números entre parênteses representam as concentrações finais dos reagentes em nM; o DNA alvo é um DNA de fita simples de 66 nt de comprimento na dosagem de 50 nM; e a sonda de DNA de fita simples é um DNA de fita simples que carrega um marcador FAM no terminal 5' a uma dosagem de 50 nM. Como pode ser visto na figura, após Cas12b, o RNA guia e o DNA alvo estão contidos, o DNA de fita simples marcado com FAM é cortado em fragmentos, ou seja, Cas12b tem uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral.

[0104] A FIGURA 23 mostra a detecção de atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral de Cas12b quando um DNA de fita simples e um DNA de fita dupla são usados como DNAs alvo. Após a conclusão da reação de clivagem, os reagentes são detectados usando um leitor de microplacas por fluorescência. Ambas as dosagens de Cas12b e do RNA guia são 500 nM; o DNA alvo é um DNA de fita simples de 66 nt de comprimento ou DNA de fita dupla na dosagem de 50 nM; e a sonda de DNA de fita simples é uma sonda de DNA de fita simples (HEX-N12-BHQ1) contendo um grupo repórter de fluorescência e um grupo supressor na

dosagem de 500 nM. Como pode ser visto na figura, independentemente de ser usado um modelo de DNA de fita simples ou um modelo de DNA de fita dupla, a atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral pode ser detectada após a adição de Cas12b e do RNA guia.

[0105] A FIGURA 24 mostra a atividade de transclivagem de DNA de fita simples colateral de Cas12b em um DNA alvo em baixa concentração após a combinação com amplificação LAMP.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0106] A fim de tornar mais claros os objetivos, soluções técnicas e vantagens das modalidades da presente invenção, o seguinte descreve clara e completamente as soluções técnicas nas modalidades da presente invenção com referência aos desenhos que acompanham as modalidades da presente invenção. As modalidades descritas são uma parte e não todas as modalidades da presente invenção. Todas as outras modalidades obtidas por uma pessoa de competência comum na técnica com base nas modalidades da presente invenção sem esforços criativos se enquadram no escopo de proteção da presente invenção.

[0107] O inventor desenvolveu uma solução técnica para a detecção de ácido nucleico alvo por meio de pesquisa extensa e aprofundada e pesquisa sobre as características de clivagem de uma enzima Cas (como as enzimas Cas12a e Cas12b). Os resultados experimentais mostram que um ácido nucleico é detectado com sucesso e rapidez ao se empregar a solução técnica acima mencionada, por exemplo, para identificar se existe uma certa concentração de microrganismos como *Escherichia coli* na água e para identificar rapidamente um genótipo de SNP. A presente invenção é concluída com base nisto.

Termos

[0108] O termo "RNA guia" refere-se a um RNA que guia uma proteína Cas para se ligar especificamente a uma sequência de DNA alvo.

[0109] O termo "crRNA" refere-se a um RNA CRISPR, que é um RNA curto que guia Cas12a para se ligar a uma sequência de DNA alvo.

[0110] O termo "CRISPR" refere-se a uma repetição palindrômica curta regularmente inter espaçada agrupada, que é o sistema imunológico de muitos procariotas.

[0111] O termo "proteína Cas" refere-se a uma proteína associada a

CRISPR, que é uma proteína relacionada em um sistema CRISPR.

[0112] O termo "Cas12a" (anteriormente denominado "Cpf1") refere-se a uma endonuclease dependente de crRNA, que é uma enzima do tipo V-A na classificação do sistema CRISPR.

[0113] Os termos "Cas12b" e "C2c1" são usados indistintamente e referem-se a uma endonuclease dependente de crRNA, que é uma enzima do tipo V-B na classificação do sistema CRISPR.

[0114] O termo "LAMP" é uma tecnologia de amplificação isotérmica mediada por loop, que é uma tecnologia de amplificação isotérmica de ácido nucleico adequada para o diagnóstico de genes.

[0115] O termo "PAM" refere-se a um motivo adjacente ao protoespaçador, necessário para a clivagem de Cas12a. O PAM de FnCas12a é uma sequência TTN, o PAM de LbCas12a é uma sequência TTTN e o PAM de AacCas12b é TTN.

[0116] A presente invenção divulga um método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, que inclui: adicionar um RNA guia, uma proteína Cas, uma sonda de ácido nucleico e uma solução tampão em um sistema de reação contendo uma molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada e, em seguida, realizar detecção de fluorescência da molécula de ácido nucleico alvo.

[0117] A proteína Cas é Cas12a ou Cas12b.

[0118] A Cas12a é preferencialmente uma dentre FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a ou Lb4Cas12a; e a Cas12a é preferencialmente LbCas12a.

[0119] A Cas12b é preferencialmente AacCas12b, Aac2Cas12b, AkCas12b, AmCas12b, AhCas12b ou AcCas12b.

[0120] RNA guia refere-se a um RNA que guia uma proteína Cas para se direcionar especificamente a uma sequência de DNA.

[0121] A molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada no sistema de reação da molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada é obtida por amplificação.

[0122] O método de detecção pode detectar um micro-organismo patogênico, mutação genética ou um DNA alvo específico.

[0123] Uso de uma proteína Cas em um método para detectar uma

molécula de ácido nucleico alvo.

[0124] Quando um DNA alvo, um RNA guia e uma proteína Cas formam um complexo ternário, o complexo cliva outras moléculas de DNA de fita simples no sistema.

[0125] RNA guia refere-se a um RNA que guia uma proteína Cas para se direcionar especificamente a uma sequência de DNA.

[0126] A presente invenção também fornece um kit que inclui um RNA guia, uma proteína Cas e uma sonda de ácido nucleico. Além disso, o kit da presente invenção também pode incluir uma solução tampão.

[0127] A presente invenção fornece um método de detecção para detectar rapidamente uma molécula de ácido nucleico alvo com alta especificidade. Quando o DNA alvo (fita simples ou fita dupla), o crRNA e a proteína Cas12a formam um complexo ternário, o complexo cliva outras moléculas de DNA de fita simples no sistema. Através do projeto, o crRNA se direciona para o DNA alvo (um segmento da sequência de DNA a ser detectada); o crRNA e a proteína Cas12a são adicionados ao sistema de detecção; quando o DNA alvo está presente, a Cas12a forma um complexo ternário com a crRNA e o DNA alvo e, enquanto isso, o complexo exerce sua atividade de clivagem colateral e cliva um DNA de fita simples marcado com um sinal fluorescente (duas extremidades do DNA de fita simples são respectivamente conectadas a um grupo luminescente e um grupo supressor, e o grupo luminescente pode emitir luz após ser clivado), emitindo assim fluorescência. Portanto, pode-se determinar se o sistema a ser detectado contém a molécula de DNA alvo através de detecção de fluorescência. Utilizando o método da presente invenção, é possível detectar rapidamente se uma sequência de DNA específica está contida em uma amostra. A sensibilidade do método de detecção pode ser bastante aprimorada através de combinação com uma tecnologia de PCR. A sonda de ácido nucleico da presente invenção é preferencialmente uma sonda fluorescente.

Teste de condição HOLMES:

[0128] A presente invenção fornece o uso de enzimas Cas12, como Cas12a e Cas12b, na detecção de ácidos nucleicos. A descrição a seguir usa Cas12a como exemplo.

[0129] Seleção de **Cas12a**: de acordo com a pesquisa, Cas12a tem uma

atividade de transclivagem, ou seja, uma vez que o DNA alvo, o crRNA e a proteína Cas12a formam um complexo ternário, outros DNAs de fita simples (DNAs de fita simples colaterais) no sistema serão clivados. De acordo com esse princípio, um método de detecção de DNA específico é projetado. Primeiro, o DNA colateral é projetado como uma sonda fluorescente, que consiste em uma sequência aleatória de 12 nt, e é marcado com um grupo fluorescente HEX no terminal 5' e um grupo supressor BHQ1 (HEX-N12-BHQ1) no terminal 3'. Quando o fragmento de DNA alvo está contido no sistema, um complexo ternário do DNA alvo, crRNA e a proteína Cas12a serão formados. Nesse momento, a sonda será clivada e, enquanto isso, o grupo fluorescente HEX emitirá fluorescência (com uma luz de excitação a 535 nM e uma luz de emissão a 556 nM), conforme detectado por um detector de fluorescência. A seguir, 10 Cas12as diferentes são testadas e a sequência alvo é um DNA de fita dupla, como mostrado na FIGURA 7. É possível observar que o complexo composto pelo DNA de fita dupla alvo e cada proteína Cas12a pode realizar a atividade de transclivagem.

[0130] Sensibilidade da resposta HOLMES : em seguida, as sensibilidades de resposta de FnCas12a e LbCas12a ao DNA alvo são testadas, isto é, a menor concentração do DNA alvo na qual a resposta pode ocorrer é investigada. Como mostrado na FIGURA 9, quando o alvo de teste é adicionado diretamente, eles podem responder ao DNA alvo com uma concentração acima de 0,1 nM, e a resposta é notável quando a concentração está acima de 1 nM. Se uma tecnologia de PCR (o método HOLMES) for combinada, como mostrado na FIGURA 8, isto é, amplificação do fragmento de interesse através de PCR seguida por uma reação de clivagem de Cas12a, a sensibilidade da resposta pode ser tão baixa quanto 10 aM, como mostrado na FIGURA 9.

[0131] Teste de SNP: a seguir, é testado se o método HOLMES pode detectar um genótipo de SNP. T1 é usado como uma sequência alvo, PAM neste sítio é mutado ou as posições 1-18 da sequência alvo são respectivamente sujeitas a mutação de ponto único, e as diferenças de detecção entre uma sequência não mutada e uma sequência mutada por crRNAs de diferentes comprimentos são comparadas.

[0132] Como mostrado na FIGURA 10, quando a sequência complementar do alvo é um crRNA de 24 nt (crRNA-24nt), a mutação de ponto único nas posições

8-18 não é muito diferente do tipo selvagem, enquanto o valor da fluorescência diminui obviamente após mutação de PAM e a mutação das posições 1-7. Quando o crRNA é truncado e o comprimento de uma sequência alvo emparelhada é de 18 nt, o valor de fluorescência das posições de mutação de 8-16 nt é obviamente diminuído em comparação com o de uma sequência alvo com um comprimento de 24 nt; quando o comprimento do crRNA continua a ser reduzido para 16 nt ou 17 nt, o valor de fluorescência da sequência alvo mutada diminui mais significativamente; e quando é reduzido ainda mais para 15 nt, o valor de fluorescência da sequência alvo mutada é mais fraco em comparação com o dessa sequência alvo, mas a intensidade de fluorescência da sequência alvo mutada ainda pode ser maior em comparação com os de outras sequências alvo e, portanto, pode ser usado para detecção. Considerados conjuntamente, os crRNAs de 15 nt, 16 nt e 17 nt são os mais adequados para detecção de SNP.

[0133] Na presente invenção, Cas12a cliva o DNA de fita simples através de uma forma de clivagem programada independente da sequência PAM, que é chamada de clivagem cis; mas uma vez formado o complexo ternário Cas12a/crRNA/DNA alvo, ele exibirá uma atividade de transclivagem, ou seja, exibirá uma atividade de clivagem de qualquer DNA de fita simples não alvo no sistema.

[0134] Com base nas características de Cas12a, é desenvolvido um método para detecção específica de moléculas de ácido nucleico, chamado HOLMES (um ensaio Simples, Eficiente, de Baixo Custo, Multiuso, de uma Hora; *one Hour Low-cost Multipurpose Efficient Simple* em inglês). Como diz o nome a tecnologia é caracterizada por método de teste de velocidade rápida (1 hora), preço baixo, múltiplos canais, alta eficiência e simples. O método pode ser usado nos campos de detecção rápida de patógenos, detecção de SNP e similares.

Detecção de ácido nucleico com base na atividade de clivagem colateral

[0135] A presente invenção também fornece um método de detecção de ácido nucleico com base na atividade de clivagem colateral da enzima Cas12 (incluindo Cas12a ou Cas12b).

[0136] Preferencialmente, a detecção da presente invenção pode ser realizada para SNP e, em particular, a amplificação por PCR é realizada primeiro,

seguida pela detecção.

[0137] Com referência à FIGURA 18, é fornecido um esquema de projeto de primer.

[0138] Caso 1. Quando existe um sítio PAM próximo ao sítio de SNP, um crRNA sintetizado com base em uma sequência guia projetada de acordo com o sítio PAM pode ser usado para a detecção HOLMES. Quando o método HOLMES é usado para detecção, ele mostra um sinal de fundo relativamente baixo; e para a mesma sequência guia, as diferenças de sinal entre os diferentes modelos de SNP são bastante grandes.

[0139] Caso 2. Quando não há sítio PAM ou um sítio PAM adequado próximo ao sítio de SNP, um sítio PAM pode ser introduzido de acordo com o esquema experimental acima.

[0140] Uma etapa típica inclui projetar um primer próximo ao sítio de SNP e transportar um sítio PAM no primer, em que a sequência localizada no terminal 3' do sítio PAM deve ser emparelhada com o DNA modelo. Não há requisito especial para o primer no outro terminal, desde que o primer possa ser emparelhado com o DNA modelo e possa ser usado para amplificação por PCR. Como mostrado na FIGURA 18, os sítios PAM podem ser introduzidos com sucesso após a amplificação por PCR.

[0141] Com referência à FIGURA 10, na presente invenção, ao projetar a introdução do sítio PAM, o sítio de SNP geralmente está localizado nas primeiras 16 bases do terminal 5' da sequência guia do crRNA, preferencialmente nas posições 1-14, mais preferencialmente nas posições 1-12, ainda mais preferencialmente nas posições 1-11 ou 1-10, e muito mais preferencialmente nas posições 1-8 ou 1-7.

[0142] A presente invenção tem as seguintes vantagens principais:

[0143] (1) Velocidade rápida: quando as condições de teste estão prontas, leva apenas 1 hora entre a obtenção da amostra e a obtenção dos resultados do teste.

[0144] (2) Baixo custo: não há materiais ou enzimas especiais no experimento e envolve uma pequena quantidade de materiais e reagentes e, portanto, pode ser usado para análise de traços.

[0145] (3) Alta eficiência: a presente invenção tem sensibilidade

extremamente alta e pode detectar DNA a uma concentração de 10 aM.

[0146] (4) Múltiplos usos: pode detectar diferentes amostras de ácido nucleico, incluindo amostras de DNA e RNA.

[0147] (5) Simplicidade: não há etapas especiais ou complicadas e, se um kit for preparado e um programa for definido, são necessárias apenas operações simples, como adicionar uma amostra.

[0148] A presente invenção será descrita em detalhes abaixo em relação a exemplos específicos. Deve ser entendido que os exemplos a seguir se destinam apenas a ilustrar a presente invenção, em vez de limitar o escopo da presente invenção. Os métodos experimentais nos exemplos a seguir, que não são especificados com condições específicas, geralmente são realizados de acordo com condições convencionais, como as descritas em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: Laboratory Manual (Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), ou as recomendadas pelos fabricantes. Salvo indicação em contrário, porcentagens e partes são porcentagens em peso e partes por peso.

[0149] Salvo indicação específica em contrário, os materiais experimentais envolvidos na presente invenção podem ser obtidos a partir de canais comerciais.

Materiais

[0150] 1. O inibidor da RNase é adquirido da TaKaRa e a DNA polimerase de alta fidelidade KOD FX é adquirida da ToYoBo; os primers (oligonucleotídeos) são sintetizados pela Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.; a RNA polimerase T7 é adquirida da Thermo; o kit de purificação e concentração de RNA (RNA Clean & ConcentratorTM_5) é adquirido da Zymo Research; o sistema de limpeza de gel e PCR Wizard[®] SV é adquirido da Promega; e todos os meios (por exemplo, triptona, extrato de levedura, etc.) são adquiridos na OXOID.

[0151] 2. Fórmula de meio: um LB líquido (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) e apenas 2% de ágar precisam ser adicionados ao LB líquido quando um LB sólido é preparado.

Exemplo 1 proteína de detecção Cas12a capaz de detectar um DNA de fita simples alvo (a sonda sendo marcada com FAM)

[0152] Um DNA de fita simples (T1-R alvo) foi selecionado como sequência alvo para testar os valores de resposta de sua detecção por diferentes proteínas Cas12a.

[0153] 1. Preparação de crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado T7-T1-24-R, como mostrado na Tabela 5. Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 μM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 μL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 $^{\circ}\text{C}$ para 20 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 1 $^{\circ}\text{C}$ por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 $^{\circ}\text{C}$ (por cerca de 16 h). Em seguida, o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific), diluído para uma concentração de 10 μM e armazenado em uma geladeira a -80 $^{\circ}\text{C}$.

[0154] 2. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 μL foi adicionado com o crRNA (0,5 μM) purificado na etapa 1, uma Cas12a (0,25 μM), um DNA de fita simples alvo (T1-R alvo) (0,01 μM), um sonda de ácido nucleico (N25-5 'FAM) (0,01 μM), uma solução tampão do tampão NEB 3,1 e 0,5 μL de um inibidor de RNase. A reação de controle em branco foi uma reação na qual todos os outros componentes foram adicionados, exceto a sequência de DNA de fita simples alvo. A reação foi realizada a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min e depois encerrada a 98 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos.

[0155] 3. Detecção de fluorescência: a reação foi submetida a electroforese em gel de ureia-acrilamida (Urea-PAGE) e, em seguida, detectada com um gerador de imagens de luminescência de fluorescência. Como mostrado na FIGURA 11, Cas12as diferentes têm efeitos de detecção diferentes no alvo. Por exemplo, para HkCas12a etc., a clivagem da sonda foi causada mesmo quando nenhum DNA de fita simples alvo foi adicionado. LbCas12a e similares são melhores candidatas às proteínas Cas12a porque a clivagem da sonda ocorreu apenas quando o DNA de fita simples alvo foi adicionado.

Exemplo 2 detecção de proteína Cas12a capaz de detectar um DNA de fita simples alvo (a sonda sendo marcada com dois marcadores de HEX e BHQ1)

[0156] Um DNA de fita simples (T1-R alvo) foi selecionado como sequência alvo para testar os valores de resposta de sua detecção por diferentes proteínas Cas12a.

[0157] 1. Preparação de crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado T7-T1-24-R (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 μM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 μL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). Em seguida, o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C, diluído para uma concentração de 10 μM e armazenado em uma geladeira a -80 °C.

[0158] 2. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 μL foi adicionado com o crRNA (0,5 μM) purificado na etapa 1, uma Cas12a (0,25 μM), um DNA de fita simples alvo (T1-R alvo) (0,01 μM), uma sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1, ou seja, um DNA de fita simples de 12 nt marcado com HEX no terminal 5' e com BHQ1 no terminal 3') (0,5 μM), uma solução tampão do tampão NEB 3,1 e 0,5 μL de um inibidor de RNase. A reação de controle foi uma reação na qual todos os outros componentes foram adicionados, exceto a sequência de DNA de fita simples alvo. A reação foi realizada a 37 °C por 15 min e depois encerrada a 98 °C por 2 minutos.

[0159] 3. Detecção de fluorescência: 20 μL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Como mostrado na FIGURA 12, Cas12as diferentes têm efeitos de detecção diferentes no alvo. Por exemplo, para HkCas12a etc., a clivagem da sonda foi causada mesmo quando nenhum DNA de fita simples alvo foi adicionado. FnCas12a e similares são melhores candidatas às proteínas Cas12a porque a clivagem da sonda ocorreu apenas quando o DNA de fita simples alvo foi adicionado.

Exemplo 3 detecção de proteína Cas12a capaz de detectar um DNA de fita dupla alvo

[0160] Um DNA de fita dupla (T1 alvo) foi selecionado como sequência alvo para testar os valores de resposta de sua detecção por diferentes proteínas

Cas12a.

[0161] 1. Preparação de crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado T7-T1-24-R (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 μM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 μL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). Em seguida, o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C, diluído para uma concentração de 10 μM e armazenado em uma geladeira a -80 °C.

[0162] 2. Reação Cas12a: um sistema de reação de 20 μL foi adicionado com o crRNA (0,5 μM) purificado na etapa 1, uma Cas12a (0,25 μM), um DNA de fita dupla alvo (T1 alvo, obtido por recozimento de primers T1-F alvo ao T1-R alvo) (0,01 μM), uma sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1) (0,5 μM), uma solução tampão do tampão NEB 3,1 e 0,5 μL de um inibidor de RNase. A reação foi realizada a 37 °C por 15 min e depois encerrada a 98 °C por 2 minutos.

[0163] 3. Detecção de fluorescência: 20 μL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Como mostrado na FIGURA 7, Cas12as diferentes têm efeitos de detecção diferentes no alvo. LbCas12a e similares são melhores candidatas às proteínas Cas12a porque a clivagem da sonda ocorreu apenas quando o DNA de fita dupla alvo foi adicionado.

Exemplo 4 Teste de diferentes concentrações do alvo com FnCas12a e LbCas12a

[0164] o T1 alvo foi selecionado como o DNA alvo e depois diluído em diferentes concentrações em um gradiente para testar a sensibilidade da resposta de FnCas12a e LbCas12a ao mesmo. Para aumentar a sensibilidade, foi adicionada uma etapa de amplificação por PCR.

[0165] 1. Preparação de crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado T7-

T1-24-R (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 μM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 μL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). Em seguida, o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C, diluído para uma concentração de 10 μM e armazenado em uma geladeira a -80 °C.

[0166] 2. Amplificação por PCR (opcional): um plasmídeo contendo o alvo T1 alvo (pUC18-T1) foi usado como modelo, diluído em um gradiente e depois usado para a reação de PCR. O volume total de cada sistema de reação foi 20 μL , 0,25 μM de M13F-47 e M13R-48 foram usados como primers (Tabela 4) e uma enzima de alta fidelidade KOD FX (ToYoBo) foi usada para a reação de PCR. O procedimento de reação de PCR foi a 95 °C por 2 min e, em seguida, iniciou 35 ciclos a 98 °C por 10 s, 60 °C por 15 s e 68 °C por 10 s. Após a conclusão da PCR, o produto de amplificação por PCR foi usado diretamente para uma reação de Cas12a.

[0167] 3. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 μL foi adicionado com o crRNA (0,5 μM) purificado na etapa 1, FnCas12a ou LbCas12a (0,25 μM), 1 μL de um produto de PCR (ou DNAs alvo que são diretamente diluídos a diferentes concentrações), uma sonda fluorescente (HEX-N12-BHQ1) (0,5 μM), uma solução tampão do tampão NEB 3,1 e 0,5 μL de um inibidor da RNase. A reação foi realizada a 37 °C por 15 min e depois encerrada a 98 °C por 2 minutos.

[0168] 4. Detecção de fluorescência: 20 μL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Como mostrado na FIGURA 9, quando o alvo de teste foi adicionado diretamente, todos os DNAs alvo com uma concentração acima de 0,1 nM puderam responder, e a resposta foi notável quando a concentração estava acima de 1 nM. Se uma tecnologia de PCR fosse combinada, isto é, amplificação do fragmento de interesse por meio de PCR seguido de uma reação de clivagem de Cas12a, a sensibilidade da resposta poderia ser tão baixa quanto 10 aM.

Exemplo 5 Teste do alvo mutante de ponto único com FnCas12a e LbCas12a

[0169] o alvo-T1 foi selecionado como alvo e foi sujeito a mutação de ponto único em uma região PAM e nas posições 1-18, respectivamente, de modo a testar os valores de resposta de vários crRNAs de diferentes comprimentos para o tipo selvagem e o mesmo após mutação de ponto único.

[0170] 1. Preparação do crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento respectivo de T7-crRNA-F com os oligonucleotídeos sintetizados T7-T1-24-R, T7-T1-15-R, T7-T1-16-R, T7-T1-17-R e T7-T1-18-R (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 μ M) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 μ L e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). Em seguida, o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C, diluído para uma concentração de 10 μ M e armazenado em uma geladeira a -80 °C.

[0171] 2. Amplificação por PCR: um plasmídeo contendo o alvo T1 alvo (pUC18-T1) foi usado como modelo. O volume total de cada sistema de reação foi 20 μ L, 0,25 μ M do primer M13R-48 e cada respectivo primer de mutação para T1-F alvo foi usado (Tabela 4), e uma enzima de alta fidelidade KOD FX (ToYoBo) foi usada para a reação de PCR. O procedimento de reação de PCR ocorreu a 95 °C por 2 minutos e, em seguida, iniciou 35 ciclos de 98 °C por 10 s, 60 °C por 15 s e 68 °C por 10 s. Após a conclusão de PCR, o produto foi usado diretamente para uma reação de Cas12a.

[0172] 3. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 μ L foi adicionado com o crRNA (0,5 μ M) purificado na etapa 1, FnCas12a ou LbCas12a (0,25 μ M), 1 μ L de um produto de PCR, uma sonda fluorescente (HEX-N12-BHQ1) (0,5 μ M), uma solução tampão do tampão NEB 3,1 e 0,5 μ L de um inibidor da RNase. A reação foi realizada a 37 °C por 15 min e depois encerrada a 98 °C por 2 minutos.

[0173] 4. Detecção de fluorescência: 20 μ L da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor

de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Como mostrado na FIGURA 10, quando a sequência complementar do alvo foi um crRNA de 24 nt (crRNA-24nt), as mutações de ponto único nas posições 8-18 não foram muito diferentes do tipo selvagem, enquanto o valor da fluorescência diminuiu obviamente após mutação de PAM e a mutação de ponto das posições 1-7. Quando o crRNA foi truncado e o comprimento de uma sequência alvo emparelhada era de 18 nt, o valor de fluorescência das posições de mutação de 8-16 nt diminuiu obviamente em comparação com a de 24 nt; quando o comprimento era de 16 nt ou 17 nt, a diminuição do valor de fluorescência da sequência alvo mutada foi mais óbvia; e quando o comprimento era de 15 nt, os valores de fluorescência da sequência alvo e da sequência alvo mutada eram muito fracos, mas a intensidade de fluorescência da sequência alvo mutada ainda poderia ser maior em comparação com as de outras sequências alvo e, portanto, poderia ser usado para detecção. Considerados conjuntamente, os crRNAs de 15 nt, 16 nt e 17 nt são os mais adequados para detecção de SNP.

Exemplo 6 Teste de *Escherichia coli* e micro-organismos similares em água do ambiente

[0174] O gene *gyrB* de *Escherichia coli* foi selecionado como alvo de detecção para testar indiretamente as concentrações de *Escherichia coli* e micro-organismos semelhantes na água. Considerando *Escherichia coli* MG1655 como controle positivo, foi determinado o teor de microrganismos na água (como esgoto e água da torneira) no ambiente.

[0175] 1. Preparação de crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado T7-crRNA-*gyrB* (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 µM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 µL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). Em seguida, o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C, diluído para uma concentração de 10 µM e armazenado em uma geladeira a -80 °C.

[0176] 2. Amplificação por PCR: quando a amostra de controle positivo *Escherichia coli* MG1655 foi cultivada até OD₆₀₀ atingir cerca de 0,5, foi diluída em um gradiente de 10 vezes, respectivamente, e depois usada como modelo, e a amostra foi água ambiente (incluindo água da torneira e água barrenta no ambiente). O volume total de cada sistema de reação foi 20 µL, 0,25 µM de cada um dos primers gyrB-F e gyrB-R que foram usados (Tabela 4) e uma enzima de alta fidelidade KOD FX (ToYoBo) foi usada para a reação de PCR. O procedimento de reação de PCR ocorreu a 95 °C por 2 minutos e, em seguida, iniciou 35 ciclos de 98 °C por 10 s, 60 °C por 15 s e 68 °C por 10 s. Após a conclusão de PCR, o produto de PCR foi usado diretamente para uma reação de Cas12a.

[0177] 3. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 µL foi adicionado com o crRNA (0,5 µM) purificado na etapa 1, LbCas12a (0,25 µM), 1 µL de um produto de PCR, uma sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1) (0,5 µM), uma solução tampão do tampão NEB 3,1 e 0,5 µL de um inibidor da RNase. A reação foi realizada a 37 °C por 15 min e depois encerrada a 98 °C por 2 minutos.

[0178] 4. Detecção de fluorescência: 20 µL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Como mostrado na FIGURA 13, o valor da resposta de fluorescência de *Escherichia coli* MG1655 diminui com a diminuição da concentração. Entre eles, os micro-organismos foram detectados mais obviamente nas amostras 2, 4, 5 e 6.

Exemplo 7 Teste de SNP humano

[0179] O teste de SNP selecionou 5 sítios de SNP humano, a saber, rs5082, rs1467558, rs2952768, rs4363657 e rs601338, para testar a viabilidade do método HOLMES.

[0180] 1. Preparação de crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 µM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 µL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C

(por cerca de 16 h). O RNA foi purificado usando o RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research), quantificado com NanoDrop 2000C, diluído a uma concentração de 10 µM e armazenado em uma geladeira a -80 °C.

[0181] 2. Amplificação por PCR: o volume total do sistema de reação foi de 20 µL, foram usados 0,25 µM de cada primer (tabela 4), 1 ng de um genoma humano (HEK293T) ou mucosa epitelial oral raspada diretamente como modelo, e uma enzima de alta fidelidade KOD FX (ToYoBo) foi usada para a reação de PCR. O procedimento de reação de PCR ocorreu a 95 °C por 2 minutos e, em seguida, iniciou 35 ciclos de 98 °C por 10 s, 60 °C por 15 s e 68 °C por 10 s. Após a conclusão de PCR, o produto foi usado diretamente para uma reação de Cas12a. (Os primers 1-rs5082-F-T, 2-rs1467558-F-T e 3-rs2952768-R-C foram introduzidos diretamente nos produtos de mutação correspondentes de SNP)

[0182] 3. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 µL foi adicionado com o crRNA (1 µM), LbCas12a (0,5 µM) correspondente, 1 µL de um produto de PCR e uma sonda fluorescente (HEX-N12-BHQ1) (0,5 µM). A reação foi realizada a 37 °C por 15 min e depois encerrada a 98 °C por 2 minutos.

[0183] 4. Detecção de fluorescência: 20 µL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Como mostrado na FIGURA 14, somente quando o crRNA correspondesse à sequência alvo correspondente, haveria um valor de resposta de fluorescência mais alto e, se houvesse mutação de ponto único, seu valor de resposta seria bastante reduzido. O genótipo de SNP correspondente pode ser determinado pelo valor de fluorescência, e estes resultados foram confirmados pelos resultados de sequenciamento.

Exemplo 8 Teste de um gene relacionado ao câncer

[0184] Um gene TP53 foi selecionado como o gene de teste. O gene TP53 possui uma mutação nonsense em uma célula T24 humana, o que leva à inativação do gene. Uma célula com gene normal neste sítio (HEK293T), um gene individual e uma célula mutante T24 foram testados, respectivamente.

[0185] 1. Preparação do crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F aos oligonucleotídeos sintetizados T7-crRNA-34-TP53-T24-C-16nt e T7-crRNA-34-TP53-T24-G-16nt (Tabela 5).

Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 μM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 μL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). O RNA foi purificado usando o RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research), quantificado com NanoDrop 2000C, diluído a uma concentração de 10 μM e armazenado em uma geladeira a -80 °C.

[0186] 2. Amplificação por PCR: o volume total do sistema de reação foi de 20 μL , foram usados 0,25 μM de cada primer 34-TP53-T24-F e 34-TP53-T24-R (tabela 4), 1 ng de um genoma humano (HEK293T, T24) ou mucosa epitelial oral raspada diretamente como modelo, e uma enzima de alta fidelidade KOD FX (ToYoBo) foi usada para a reação de PCR. O procedimento de reação de PCR ocorreu a 95 °C por 2 minutos e, em seguida, iniciou 35 ciclos de 98 °C por 10 s, 60 °C por 15 s e 68 °C por 10 s. Após a conclusão de PCR, o produto foi usado diretamente para uma reação de Cas12a.

[0187] 3. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 μL foi adicionado com o crRNA (1 μM), LbCas12a (0,5 μM) correspondente, 1 μL de um produto de PCR e uma sonda fluorescente (HEX-N12-BHQ1) (0,5 μM). A reação foi realizada a 37 °C por 15 min e depois encerrada a 98 °C por 2 minutos.

[0188] 4. Detecção de fluorescência: 20 μL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nM e uma luz de emissão a 556 nM). Como mostrado na FIGURA 15, quando o gene TP53 que era normal nesse sítio era o modelo, o valor detectado do crRNA-C era significativamente maior que o do crRNA-G, enquanto o crRNA-G da célula mutante T24 foi significativamente aumentado.

Exemplo 9 Teste de SNP humano (genes relacionados à gota)

[0189] O teste de SNP selecionou 5 sítios de SNP humano que estavam relacionados a risco de gota, como rs1014290, rs6449213, rs737267, rs1260326 e rs642803, para testar o método HOLMES.

[0190] 1. Preparação de crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi

preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 μM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 μL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 $^{\circ}\text{C}$ para 20 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 1 $^{\circ}\text{C}$ por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 $^{\circ}\text{C}$ (por cerca de 16 h). O RNA foi purificado usando o RNA Clean & ConcentratorTM-5 (Zymo Research), quantificado com NanoDrop 2000C, diluído a uma concentração de 10 μM e armazenado em uma geladeira a -80 $^{\circ}\text{C}$.

[0191] 2. Amplificação por PCR: o volume total do sistema de reação foi de 20 μL , foram usados 0,25 μM de cada primer (Tabela 4), 1 ng de um genoma humano (HEK293T) ou mucosa epitelial oral raspada diretamente foi usada como modelo, e uma enzima de alta fidelidade KOD FX (ToYoBo) foi usada para a reação de PCR. O procedimento de reação de PCR ocorreu a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos e, em seguida, iniciou 35 ciclos de 98 $^{\circ}\text{C}$ por 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ por 15 s e 68 $^{\circ}\text{C}$ por 10 s. Após a conclusão de PCR, o produto foi usado diretamente para uma reação de Cas12a. (Os primers 1-rs5082-F-T, 2-rs1467558-F-T e 3-rs2952768-R-C foram introduzidos diretamente nos produtos de mutação correspondentes do SNP)

[0192] 3. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 μL foi adicionado com o crRNA (1 μM), LbCas12a (0,5 μM) correspondente, 1 μL de um produto de PCR e uma sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1) (0,5 μM). A reação foi realizada a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min e depois encerrada a 98 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos.

[0193] 4. Detecção de fluorescência: 20 μL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Como mostrado na FIGURA 16, somente quando o crRNA correspondesse à sequência alvo correspondente, haveria um valor de resposta de fluorescência mais alto e, se houvesse mutação de ponto único, seu valor de resposta seria bastante reduzido. O genótipo de SNP correspondente pode ser determinado pelo valor de fluorescência, e estes resultados foram confirmados pelos resultados de sequenciamento.

Exemplo 10 Teste de SNP de amostras clínicas de voluntários (um gene

relacionado à gota) através de um kit

[0194] Uma solução pré-misturada foi adicionada a uma placa de 96 poços para preparar um kit e, em seguida, DNAs genômicos de 21 voluntários foram adicionados ao kit para testar o sítio rs1014290, que estava relacionado a risco de gota.

[0195] 1. Preparação de um kit: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 µM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 µL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). O RNA foi purificado usando o RNA Clean & ConcentratorTM-5 (Zymo Research), quantificado com NanoDrop 2000C e diluído a uma concentração de 10 µM.

[0196] 2. Pré-mistura em uma placa de 96 poços para PCR: um sistema de 19 µL foi adicionado com os reagentes necessários para uma reação de PCR, sendo os primers 41-rs1014290-F e 41-rs1014290-R.

[0197] 3. Pré-mistura em uma placa de 96 poços para detecção de fluorescência: ao sistema de 19 µL foi adicionado um crRNA (1 µM), LbCas12a (0,5 µM) e uma sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1) (0,5 µM) e ele foi adicionado na placa de 96 poços.

[0198] 4. Amplificação por PCR: à placa de 96 poços pré-misturada para PCR foram adicionados os DNAs genômicos dos voluntários e depois ela foi submetida à reação de PCR. O procedimento de reação de PCR ocorreu a 95 °C por 2 minutos e, em seguida, iniciou 35 ciclos a 98 °C por 10 s, 60 °C por 15 s e 68 °C por 10 s.

[0199] 5. Reação de Cas12a: 1 µL de uma solução de reação PCR foi tirado e adicionado à placa de 96 poços pré-misturada para detecção de fluorescência, reagida a 37 °C por 15 minutos e, em seguida, a reação foi encerrada a 98 °C por 2 minutos.

[0200] 6. Detecção de fluorescência: foi detectada por um leitor de

microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Como mostrado na FIGURA 17, como a população com o genótipo A:A tinha maior risco de ter gota, outras pessoas que não os voluntários n.ºs. 5, 7 e 9 são do genótipo A:G ou G:G; portanto, mais atenção deve ser dada ao risco de gota.

Exemplo 11 Detecção de *Escherichia coli* e micro-organismos similares em água do ambiente por LAMP combinada com uma proteína Cas

[0201] O gene *gyrB* de *Escherichia coli* foi selecionado como alvo de detecção para testar indiretamente se existiam concentrações de *Escherichia coli* e micro-organismos similares na água.

[0202] 1. Preparação de crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado T7-crRNA-*gyrB* (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 µM) foi recozido em um tampão de reação de DNA polimerase 1 X Taq (Transgen Biotech) a um volume total de 50 µL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). Em seguida, o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C, por fim diluído para uma concentração de 10 µM e armazenado em uma geladeira a -80 °C para uso posterior.

[0203] 2. Amplificação LAMP: água estéril e um líquido contaminado contendo *Escherichia coli* foram usados como controle negativo e como amostra a ser detectada, respectivamente. O volume total de cada sistema de reação foi de 25 µL, foram utilizados primers de 1,6 µM de LAMP-FIP e LAMP-BIP cada, 0,2 µM de LAMP-F3 e LAMP-B3 cada, 0,4 µM de LAMP-LoopF e LAMP-LoopB cada e o kit usado para a reação LAMP foi o WarmStart® LAMP Kit (NEB). O procedimento de reação LAMP foi a 65 °C por 30 minutos. Após a conclusão de LAMP, o recozimento foi realizado a 80 °C por 10 minutos e, em seguida, o produto foi usado diretamente para uma reação de Cas12a.

[0204] 3. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 µL foi adicionado com o crRNA (0,5 µM) purificado na etapa 1, Cas12a (0,25 µM), 1 µL de um produto de LAMP, uma sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1) (0,5 µM), uma solução

tampão do tampão NEB 3,1 e 0,5 µL de um inibidor da RNase. A reação foi conduzida a 37 °C por 15 minutos.

[0205] 4. Detecção de fluorescência: 20 µL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Os resultados foram os mostrados na FIGURA 19.

Exemplo 12 Detectando SNP usando amplificação LAMP combinada a uma proteína Cas

[0206] 1. Preparação do crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento do T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado T7-crRNA-rs5082-T/T7-crRNA-rs5082-G/T7-crRNA-rs1467558-T/T7-crRNA-rs1467558-C (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 µM) foi recozido em um tampão de reação de DNA polimerase 1 X Taq (Transgen Biotech) a um volume total de 50 µL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). Em seguida, o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C, por fim diluído para uma concentração de 10 µM e armazenado em uma geladeira a -80 °C para uso posterior.

[0207] 2. Amplificação LAMP: um genoma humano HEK293T foi usado como amostra. O volume total de cada sistema de reação foi de 25 µL, foram utilizados primers de 1,6 µM de LAMP-FIP e LAMP-BIP cada, 0,2 µM de LAMP-F3 e LAMP-B3 cada, 0,4 µM de LAMP-LoopF e LAMP-LoopB cada e o kit WarmStart® LAMP Kit (NEB) foi usado para reação LAMP. O procedimento de reação LAMP foi a 65 °C por 30 minutos. Após a conclusão de LAMP, o recozimento foi realizado a 80 °C por 10 minutos e, em seguida, o produto foi usado diretamente para uma reação de Cas12a.

[0208] 3. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 µL foi adicionado com o crRNA (0,5 µM) purificado na etapa 1, Cas12a (0,25 µM), 1 µL de um produto de LAMP, uma sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1) (0,5 µM), uma solução tampão do tampão NEB 3,1 e 0,5 µL de um inibidor da RNase. A reação foi

conduzida a 37 °C por 15 minutos.

[0209] 4. Detecção de fluorescência: 20 µL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Os resultados foram os mostrados na FIGURA 20.

Exemplo 13 Detecção de *Escherichia coli* e micro-organismos similares em água do ambiente por amplificação da RPA combinada com uma proteína Cas

[0210] O gene *gyrB* de *Escherichia coli* foi selecionado como alvo de detecção para testar indiretamente se existiam concentrações de *Escherichia coli* e micro-organismos similares na água.

[0211] 1. Preparação de crRNA: primeiro, um modelo de transcrição foi preparado por recozimento de T7-crRNA-F a um oligonucleotídeo sintetizado T7-crRNA-*gyrB* (Tabela 5). Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (4 µM) foi recozido em um tampão de PCR 1X (Transgen Biotech) a um volume total de 50 µL e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador. O crRNA foi sintetizado usando um kit de transcrição de alto rendimento T7, e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por cerca de 16 h). Em seguida, o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop2000C, por fim diluído para uma concentração de 10 µM e armazenado em uma geladeira a -80 °C para uso posterior.

[0212] 2. Amplificação de RPA: água estéril e um líquido contaminado contendo *Escherichia coli* foram usados como controle negativo e como amostra a ser detectada, respectivamente. O volume total de cada sistema de reação foi de 25 µL, 0,5 µM de cada primer RPA-*gyrB*-F (ou RPA-*gyrB*-F2) e RPA-*gyrB*-R2 foi usado e um kit TwistAmp® Basic (TwistDX) foi usado para a reação de RPA. O procedimento de reação de RPA ocorreu a 37 °C por 30 minutos. Após a conclusão de RPA, o recozimento foi realizado a 80 °C por 10 minutos e, em seguida, o produto foi usado diretamente para uma reação de Cas12a.

[0213] 3. Reação de Cas12a: um sistema de reação de 20 µL foi adicionado com o crRNA (0,5 µM) purificado na etapa 1, Cas12a (0,25 µM), 1 µL de um produto

de RPA, uma sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1) (0,5 μ M), uma solução tampão do tampão NEB 3,1 e 0,5 μ L de um inibidor da RNase. A reação foi conduzida a 37 °C por 15 minutos.

[0214] 4. Detecção de fluorescência: 20 μ L da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e, em seguida, detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Os resultados foram os mostrados na FIGURA 21.

Exemplo 14: Cas12b tendo uma atividade de clivagem colateral

[0215] 1. Preparação de um RNA guia (sgRNA)

[0216] Primeiro, um plasmídeo pUC18 guia RNA-T1 foi construído usando pUC18 como esqueleto do plasmídeo. No plasmídeo, um promotor T7 e uma sequência de DNA modelo para a transcrição do RNA guia foram inseridos no pUC18 (Nota: o RNA guia transcrito a partir deste modelo foi direcionado a uma sequência chamada de T1 neste estudo). O método realizou primeiramente uma rodada de PCR usando o plasmídeo pUC18 como molde e PUC18-1-F e pUC18-1-R como primers; ligando produtos de PCR a uma DNA ligase T4, transformando o produto em DH10b e sequenciando para obter o clone correto, que foi chamado de RNA-T1-pre de pUC18 guia. Em seguida, uma segunda rodada de PCR foi realizada usando pUC18 guia RNA-T1-pre como modelo e pUC18-2-F e pUC18-2-R como primers, ligando e transformando os produtos de PCR da mesma maneira, para finalmente obter o plasmídeo pUC18 guia RNA-T1 que estava correto como sequenciado.

[0217] Em seguida, usando o plasmídeo pUC18 guia RNA-T1 como modelo, um RNA guia foi sintetizado usando um kit de transcrição T7 de alto rendimento (Thermo), e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por 12-16 horas).

[0218] Por fim, uma DNase I (foram adicionados 2 μ L da DNase I por 50 μ L do sistema de transcrição) foi adicionada ao sistema de transcrição, o sistema foi colocado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para eliminar um DNA plasmidial e o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C, diluído para uma concentração de 10 μ M e armazenado em uma geladeira a -80 °C para uso posterior.

[0219] 2. Preparação de um DNA alvo

[0220] (1) Se o DNA alvo for de fita simples, um oligonucleotídeo de 66 pb

de comprimento é diretamente sintetizado como o DNA alvo (T1-R alvo), que continha a sequência alvo de 20 pb (T1) reconhecida pelo RNA guia.

[0221] (2) Se o DNA alvo for de fita dupla, dois oligonucleotídeos complementares de 66 pb de comprimento (T1-F alvo; -T1-R alvo) são diretamente sintetizados, contendo a sequência alvo de 20 pb (T1) identificada pelo RNA guia. Os dois oligonucleotídeos foram recozidos para obter um DNA alvo curto. Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (1 μ M) foi recozido em um tampão de 1X PCR (Transgen Biotech) a um volume total de 20 μ L e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador.

[0222] 3. Reação de Cas12b

[0223] (1) recozimento do RNA guia: o RNA guia foi diluído para uma concentração apropriada (10 μ M) e recozido no instrumento de PCR. Procedimento de recozimento: desnaturação a 75 °C por 5 minutos e depois resfriamento de 75 °C para 20 °C a uma taxa decrescente de 1 °C por minuto.

[0224] (2) incubação do RNA guia com C2c1: o RNA guia recozido foi misturado com C2c1 em uma concentração molar igual e deixado repousar a 30 °C por 20-30 minutos.

[0225] (3) Reação de Cas12b: um sistema de reação de 20 μ L foi adicionado com uma mistura do RNA guia e C2c1 incubado na etapa (2) (ambas as concentrações finais foram de 250 μ M ou 500 μ M), um DNA alvo (com concentração final de 50 nM), um oligonucleotídeo marcado com FAM (DNMT1-3-R-FAM-5' alvo) ou uma sonda de fluorescência de supressão (HEX-N12-BHQ1 com a concentração final de 500 nM), 2 μ L do tampão 10 X NEB 3,1 e 0,5 μ L de um inibidor de RNase (40 U/ μ L). Após misturar de forma homogênea, a reação foi conduzida a 48 °C por 30 minutos. Depois disso, foi inativado por aquecimento a 98 °C por 5 minutos em um instrumento de PCR.

[0226] 4. Detecção da atividade de transclivagem de Cas12b por eletroforese em gel de ureia desnaturado: 20 μ L da solução de reação inativada foram separados por um método de eletroforese em gel de ureia desnaturado e, em seguida, transformado em imagem por um sistema de geração de imagens por fluorescência ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare). Os resultados foram os

mostrados na FIGURA 22.

[0227] 5. Detecção da atividade de transclivagem de Cas12b por um método de leitor de microplacas por fluorescência: 20 µL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma emissão luz a 556 nm). Os resultados foram os mostrados na FIGURA 23.

Exemplo 15: Teste de sensibilidade de uma reação Cas12b (transclivagem)

[0228] Ao detectar a intensidade de fluorescência excitada da sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1), foi determinada a concentração de DNA alvo necessária para Cas12b exercer a atividade de transclivagem, isto é, a sensibilidade de uma reação de transclivagem de Cas12b.

[0229] 1. Preparação de um RNA guia

[0230] Primeiramente, usando o pUC18 guia RNA-T1 como modelo e o RNA- guia DNMT1-3-F e o RNA guia DNMT1-3-R como primers, 20 bases do RNA guia que se direciona para o DNA alvo de T1 foram substituídas por um RNA guia direcionado para DNMT1-3 por PCR, de modo a obter outro plasmídeo pUC18 guia RNA-DNMT1-3.

[0231] Em seguida, usando o plasmídeo pUC18 guia RNA-DNMT1-3 como modelo, um RNA guia foi sintetizado usando um kit de transcrição T7 de alto rendimento (Thermo), e a reação foi realizada durante a noite a 37 °C (por 12-16 horas).

[0232] Por fim, uma DNase I (foram adicionados 2 µL da DNase I por 50 µL do sistema de transcrição) foi adicionada ao sistema de transcrição, o sistema foi colocado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos para eliminar um DNA plasmidial e o RNA foi purificado usando o kit de purificação e concentração de RNA, quantificado com NanoDrop 2000C e armazenado em uma geladeira a -80 °C para uso posterior.

[0233] 2. Preparação de um DNA alvo

[0234] Para o DNA alvo, primeiro o DNA alvo foi adicionado diretamente ao sistema de reação Cas12b sem amplificação. O método foi o seguinte:

[0235] (1) Se o DNA alvo for de fita simples, um oligonucleotídeo de 50 pb de comprimento é diretamente sintetizado como o DNA alvo (DNMT1-3 (TTC PAM)-

R), que continha a sequência alvo de 20 pb (DNMT1-3) reconhecida pelo RNA guia.

[0236] (2) Se o DNA alvo for de fita dupla, dois oligonucleotídeos complementares de 50 pb de comprimento (DNMT1-3 (TTC PAM) -F; DNMT1-3 (TTC PAM)-R) são diretamente sintetizados, contendo a sequência alvo de 20 pb (DNMT1-3) reconhecida pelo RNA guia. Os dois oligonucleotídeos foram recozidos para obter um DNA alvo curto. Especificamente, o oligonucleotídeo emparelhado (2 μ M) foi recozido em um tampão de 1X PCR (Transgen Biotech) a um volume total de 20 μ L e, em seguida, submetido a um procedimento de recozimento: desnaturação a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, resfriamento de 95 °C para 20 °C a uma taxa de 1 °C por minuto usando um termociclador.

[0237] (3) O DNA alvo de fita simples ou dupla foi diluído gradualmente para 2 μ M, 0,2 μ M, 0,02 μ M, 0,002 μ M e 0,0002 μ M para uso posterior.

[0238] O segundo passo foi inserir um fragmento contendo a sequência alvo (DNMT1-3) em um vetor plasmidial para amplificação pela reação LAMP.

[0239] (1) O fragmento contendo a sequência alvo (DNMT1-3) foi inserido em um vetor de clonagem zero pEasy-Blunt usando o kit de clonagem zero pEasy-Blunt da Transgen, de modo a obter o clone correto após a verificação por sequenciamento.

[0240] (2) Uma reação de expansão LAMP

[0241] Utilizando o plasmídeo acima como modelo, foi realizada a reação de amplificação de LAMP. Os modelos foram adicionados respectivamente a 0 nM, 1 nM e 0,1 nM e diluídos com um gradiente de 10 vezes a 10^{-11} nM. O volume total de cada sistema de reação foi de 25 μ L, foram utilizados primers de 1,6 μ M de LAMP-DNM-FIP e LAMP-DNM-BIP cada, 0,2 μ M de LAMP-DNM-F3 e LAMP-DNM-B3 cada, 0,4 μ M de LAMP-DNM-LoopF e LAMP-DNM-LoopB cada e o kit usado para a reação LAMP foi o WarmStart® LAMP Kit (NEB). O procedimento de reação LAMP foi a 65 °C por 30 minutos. Após a conclusão de LAMP, a inativação foi realizada a 80 °C por 10 minutos e, em seguida, o produto foi usado diretamente para uma reação de Cas12b.

[0242] 3. Reação de Cas12b

[0243] (1) Recozimento do RNA guia: o RNA guia foi diluído para uma concentração apropriada (5 μ M) e recozido no instrumento de PCR. O procedimento de recozimento: desnaturação a 75 °C por 5 minutos e depois

resfriamento de 75 °C para 20 °C a uma taxa decrescente de 1 °C por minuto.

[0244] (2) incubação do RNA guia com Cas12b: o RNA guia recozido foi misturado com Cas12b em uma concentração molar igual e deixado repousar a 30 °C por 20-30 minutos.

[0245] (3) Reação de Cas12b: um sistema de reação de 20 µL foi adicionado com a mistura do RNA guia e Cas12b incubado na etapa (2) (ambas as concentrações finais do RNA guia e Cas12b foram 250 µM), 1 µL de um DNA alvo ou 1 µL de um produto LAMP, uma sonda de fluorescência (HEX-N12-BHQ1) (com uma concentração final de 500 nM), 2 µL de um tampão NEB 10X 3,1 e 0,5 µL de um inibidor de RNase (40 U / µL). Após misturar de forma homogênea, a reação foi conduzida a 48 °C por 30 minutos. Depois disso, foi inativado por aquecimento no fogo a 98 °C por 5 minutos em um instrumento de PCR.

[0246] 4. Detecção da atividade de transclivagem de Cas12b por um método de leitor de microplacas por fluorescência:

[0247] 20 µL da solução de reação inativada foram adicionados a uma placa de 96 poços e detectados por um leitor de microplacas (com uma luz de excitação a 535 nm e uma luz de emissão a 556 nm). Combinado com a amplificação LAMP, Cas12b poderia produzir uma atividade de transclivagem de DNA de fita simples colateral significativa para uma concentração de DNA alvo tão baixa quanto 10 aM. Os resultados foram os mostrados na FIGURA 24.

Características de clivagem cis de Cas12a na clivagem de um DNA de fita simples alvo:

[0248] Primeiro, para testar as características de clivagem de DNA de fita simples de Cas12a, vários crRNAs direcionados a um DNA de fita simples curto (DNMT1-3) (Tabela 1) são projetados, marcados com 5(6)-carboxifluoresceína (FAM) no terminal 3'. Após a clivagem por FnCas12a, o produto da reação é analisado por eletroforese em gel de ureia-poliacrilamida desnaturado (urea-PAGE). Verifica-se que a clivagem de DNA de fita simples por Cas12a é programada. Ou seja, o sítio de clivagem está próximo da 22^a base (21^a a 23^a bases) da sequência alvo contando da base da extremidade 3' até a extremidade 5' da primeira sequência alvo emparelhada com a sequência guia do crRNA, como mostrado nas FIGURAS 1A e 1C. A clivagem de um DNA de fita dupla por Cas12a requer uma sequência PAM, enquanto a clivagem de um DNA de fita simples por

Cas12a não requer a sequência PAM (FIGURAS 1A, 1B e 2), que é semelhante à clivagem de DNA de fita simples mediada por Cas9. No entanto, a atividade de clivagem de DNA de fita simples mediada por Cas12a depende de uma estrutura em stem-loop no crRNA, como mostrado na FIGURA 1A, enquanto Cas9 ainda apresenta fraca atividade de clivagem para um DNA de fita simples com apenas uma sequência de RNA complementar de 20 nt. A estrutura em *stem-loop* do crRNA é importante para estabilizar a estrutura de Cas12a, razão pela qual a estrutura em anel do crRNA é necessária para a clivagem do DNA de fita simples por Cas12a. É ainda testado se um crRNA de sequência condutora mais curto pode passar através do sítio de clivagem de DNA de fita simples de Cas12a de tal maneira que a clivagem esteja fora do sítio de reconhecimento. Quando o comprimento da sequência guia é 16 nt, 18 nt e 20 nt, todos esses crRNAs levam à clivagem por Cpf1 próximo à 22^a base, como mostrado nas FIGURAS 1B e 1D, significando que o sítio de clivagem está 4 nt, 2 nt ou 0 nt fora do sítio de reconhecimento. Em seguida, a eficiência de clivagem de Cas12a em diferentes substratos é testada usando substratos de um DNA de fita dupla e um DNA de fita simples, respectivamente, como mostrado na FIGURA 1F. Semelhante à situação da clivagem de Cas9, a clivagem do DNA de fita simples é mais lenta que a do DNA de fita dupla, como mostrado nas FIGURAS 1E a 1G. Estes resultados indicam que o mecanismo de reconhecimento e clivagem de um DNA de fita simples por Cas12a pode ser diferente daquele de um DNA de fita dupla, que é uma maneira de reconhecimento e clivagem de baixa eficiência independente de PAM; e a sequência PAM acelera o reconhecimento e/ou clivagem do DNA de fita dupla alvo por Cas12a.

Características de transclivagem de Cas12a na clivagem de um DNA de fita simples:

[0249] Quando o DNA de fita simples alvo é marcado no terminal 3', Cas12a cliva perto da 22^a base, como mostrado na FIGURA 1. No entanto, quando é marcado no terminal 5', nenhuma faixa de produto de clivagem de tamanho previsto é observada, mas um produto curto (<6 nt) marcado com FAM é produzido, como mostrado na FIGURA 3B. Por meio de experimentos detalhados, uma vez formado o complexo ternário Cas12a/crRNA/DNA de fita simples alvo, o DNA de fita simples alvo (DNMT1-3) (Tabela 1) marcado no terminal 5' é clivado e um produto marcado

com FAM é produzido, como mostrado na FIGURA 3C. Além disso, o complexo ternário também cliva um DNA de fita simples que não possui sequência que seja complementar ao crRNA (isto é, um DNA de fita simples colateral) em qualquer outro sistema de reação, como mostrado nas FIGURAS 3C e 3D. Esse fenômeno de clivagem é chamado de transclivagem, que é diferente da clivagem cis programável. Quando o DNA de fita simples alvo é marcado no terminal 3', também é observada transclivagem, porém restam muitos produtos de clivagem cis, como mostrado na FIGURA 3B. Isso pode ser devido ao complexo formado por Cas12a/crRNA/DNA de fita simples alvo e o DNA de fita simples alvo é protegido, de modo que seu terminal 3' marcado seja protegido da exposição a um sítio ativo de nuclease do complexo ternário. Estes processos de clivagem podem ser como os mostrados na FIGURA 3A.

[0250] Além da FnCas12a testada acima, 9 Cas12as de outras fontes de espécies também são testadas (Tabela 2 e FIGURA 4A). Exceto por Lb4Cas12a, todas as Cas12as têm boa atividade de endonuclease no DNA plasmidial (como mostrado na FIGURA 4B), e todos os complexos ternários de Cas12a apresentam atividades de clivagem cis e trans na fita simples (como mostrado nas FIGURAS 4C e 4D). Isso mostra que a atividade cis e trans de Cas12a no DNA de fita simples é um fenômeno comum.

Os sítios chave cis e trans e mecanismo para clivar um DNA de fita simples por Cas12a.

[0251] Para determinar os resíduos de aminoácidos chave relacionados às atividades cis e trans no DNA de fita simples em Cas12a, vários resíduos candidatos de Cas12a são mutados para realizar o teste de atividade. Primeiro, três mutantes de aminoácido único de FnCas12a (H843A, K852A e K869A) são purificados e testados, e seus resíduos são relacionados a uma atividade de RNase. Os resultados do estudo da atividade trans no DNA de fita simples mostram que não é encontrada nenhuma diferença óbvia nas atividades de clivagem cis e trans no DNA de fita simples entre o FnCas12a de tipo selvagem e os três mutantes, como mostrado nas FIGURAS 5A e 5C.

[0252] Em seguida, quando os sítios ativos de endonuclease no FnCas12a, ou seja, os sítios do domínio RuvC (D917A, E1006A ou D1255A) e do domínio Nuc (R1218A) são mutados, as duas atividades de clivagem cis e trans desse Cas12a

mutado no DNA de fita simples são afetadas, como mostrado nas FIGURAS 5B e 5D. Estes resultados indicam que o sítio chave de Cas12a para a clivagem de um DNA de fita dupla alvo está intimamente relacionado às atividades de clivagem cis e trans no DNA de fita simples.

[0253] Estudos estruturais recentes de Cas12b (isto é, C2c1) (incluindo complexos com um DNA alvo estendido ou um DNA não alvo estendido) mostram que ambas as fitas estão localizadas em uma cavidade RuvC, como mostrado nas FIGURAS 6A e 6B. Ao comparar os resíduos catalíticos de endonuclease de Cas12b (ou seja, C2c1) e Cas12a, é mais provável que esses sítios desempenhem papéis semelhantes na clivagem e nas funções de Cas12b (ou seja, C2c1) e Cas12a. Os resultados de um experimento de mutação de aminoácido único in vitro mostram que ele é consistente com a hipótese acima. Ou seja, é provável que Cas12a clive duas fitas através de apenas uma cavidade catalítica RuvC.

[0254] A atividade de transclivagem de um complexo Cas12a: na estrutura de um complexo de Cas12b (ou seja, C2c1) com um DNA de fita simples adicional, um DNA de fita simples independente de sequência também está localizado na superfície de uma cavidade catalítica, como mostrado na FIGURA 6C, que é semelhante ao de um substrato de DNA de fita simples colateral em Cas12a. Combinado com um experimento de mutação de aminoácido único, propõe-se que o DNA alvo, o DNA não alvo e o DNA de fita simples colateral sejam todos clivados na única cavidade RuvC em Cas12a, como mostrado nas FIGURAS 6D, 6E e 6F. O complexo ternário Cas12a tem uma atividade de transclivagem de DNA de fita simples colateral, enquanto a razão pela qual um complexo monômero ou binário não possui a atividade de transclivagem de DNA de fita simples colateral pode ser explicada pela comparação das estruturas dos complexos monômero, binário e ternário. A estrutura de um monômero Cas12a é desordenada, o complexo binário Cas12a/crRNA tem uma estrutura triangular, como mostrado na FIGURA 6G, enquanto o complexo ternário Cas12a/crRNA/DNA alvo é convertido em uma estrutura de folha dupla, expondo assim a cavidade catalítica para realizar a transclivagem do DNA de fita simples colateral (como mostrado na FIGURA 6H).

Estabelecimento de um método de detecção de ácido nucleico

[0255] Com base nas características de Cas12a, foi desenvolvido um método para detecção específica de moléculas de ácido nucleico, chamado

HOLMES (um ensaio Simples, Eficiente, de Baixo Custo, Multiuso, de uma Hora; *one Hour Low-cost Multipurpose Efficient Simple* em inglês). Assim como o nome da tecnologia, ela foi caracterizada por um método de teste simples, que dura uma hora e é de baixo custo, usos múltiplos e alta eficiência.

[0256] Em todo o sistema de reação, o método pode ser dividido em duas etapas principais, uma é a amplificação de um ácido nucleico modelo e a outra é a detecção específica de ácido nucleico por uma proteína Cas12a. Aqui, um método de PCR é usado para amplificação de ácido nucleico, mas, de fato, qualquer método de amplificação pode ser combinado com a detecção de ácido nucleico na segunda etapa, como o método de amplificação isotérmica da RPA, etc. O ácido nucleico inicial não está limitado a um DNA de fita dupla, mas também pode ser um DNA de fita simples; ou mesmo um RNA ainda pode ser detectado após a transcrição reversa, portanto esse método é adequado para vários tipos de moléculas de ácido nucleico. Para a fase de detecção de ácido nucleico, três componentes são as chaves do experimento, a saber, Cas12a, crRNA e uma sonda de ácido nucleico. Além das 10 Cas12as mencionadas no exemplo (essas 10 proteínas são selecionadas aleatoriamente), outras proteínas Cas12a também são adequadas para esse método. Além disso, outros tipos de proteínas Cas (por exemplo, uma proteína C2c1) também são adequados para o escopo reivindicado da presente invenção: como mostrado pelos resultados experimentais, *Alicyclobacillus acidoterrestris* Cas12b (ou seja, C2c1) também possui atividade de transclivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à de Cas12a e seu complexo com crRNA/DNA alvo também pode clivar um DNA de fita simples colateral.

[0257] Para o crRNA que serve como guia, ele será mais estável no sistema após ser projetado, por exemplo, sendo modificado manualmente. No que diz respeito à seleção de sondas de ácido nucleico, a presente invenção seleciona um DNA de fita simples curto marcado com HEX e BHQ1, e qualquer outro método de marcação detectável é teoricamente aplicável, desde que a sonda de ácido nucleico seja clivada para produzir diferenças detectáveis. Alternativamente, a sonda de ácido nucleico também pode ser projetada para ficar fluorescente após ligação a um composto, de modo a detectar se a sonda está clivada.

[0258] Além disso, deve ser entendido que, depois de ler os ensinamentos

acima da presente invenção, os versados na técnica podem fazer várias alterações ou modificações na presente invenção, e essas formas equivalentes também se enquadram no escopo definido pelas reivindicações anexas ao presente pedido.

Tabela 1 Sequências de substrato da clivagem característica relacionada ao experimento de Cas12a

Nome Oligo	Sequência (5'-3')	SEQ ID NO.:
DNMT 1-3-F alvo	aatgtttcctgatgggccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	1
DNMT 1-3-R alvo	gtcacgccacttgacagggcagtaacagacatg gaccatcaggaaacatt	2
DNMT 1-3-R-FAM-3' alvo	gtcacgccacttgacagggcagtaacagacatg gaccatcaggaaacatt-FAM	3
DNMT 1-3-R-FAM-5' alvo	FAM-gtcacgccacttgacagggcagtaacaga catggaccatcaggaaacatt	4
T1-F alvo	tttctgtttgttategcaactttctactgaatt caagctttactctagaaaggagaaaaggatcc	5
T1-R alvo	ggatcctttctctcttttctagagtaaagcttg aattcagtagaaagttgcgataaacaacagaaa	6
T1-F-FAM alvo	FAM-tttctgtttgttategcaactttctactg aattcaagctttactctagaaaggagaaaagg atcc	7
T1-R-FAM alvo	ggatcctttctctcttttctagagtaaagcttg aattcagtagaaagttgcgataaacaacagaaa -FAM	8
T1-FAM-3' -F alvo	tttctgtttgttategcaactttctactgaatt caagctttactctagaaaggagaaaaggatcc -FAM	9
T1-FAM-5' -R alvo	FAM-ggatcctttctctcttttctagagtaaag cttgaattcagtagaaagttgcgataaacaaca	10

	gaaa	
DNMT1-3-R-TTT-FAM-3' alvo	gtcacgccacttgacagggcgagtaacagacatg gaccatcaggTTTcatt-FAM	11
DNMT1-3-R-CCC-FAM-3' alvo	gtcacgccacttgacagggcgagtaacagacatg gaccatcaggCCCcatt-FAM	12
DNMT1-3-R-GGG-FAM-3' alvo	gtcacgccacttgacagggcgagtaacagacatg gaccatcaggGGGcatt-FAM	13
DNMT1-3-F-AAA alvo	aatgAAAcctgatgggccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtagac	14
DNMT1-3-F-GGG alvo	aatgGGGcctgatgggccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtagac	15
DNMT1-3-F-CCC alvo	aatgCCCcctgatgggccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtagac	16
T1-1-R alvo	acaaacagaaa	17
T1-6-R alvo	cgataacaaacagaaa	18
T1-12-R alvo	aagttgcgataacaaacagaaa	19
T1-18-R alvo	agtagaaagttgcgataacaaacagaaa	20
T1-24-R alvo	gaattcagtagaaagttgcgataacaaacagaaa a	21
T1-24-somente-R alvo	gaattcagtagaaagttgcgataa	22
T1-18-somente-R alvo	agtagaaagttgcgataa	23
T1-12-somente-R alvo	aagttgcgataa	24
T1-6-somente-R alvo	cgataa	25
N25-5' FAM	FAM-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	26
N25-3' FAM	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-FAM	27

Tabela 2. Nomes e números GI da proteína Cas12a e da proteína Cas12b (isto é, C2c1)

Nome	Número GI	Espécie
FnCas12a	489130501	Francisella tularensis
AsCas12a	545612232	Acidaminococcus sp. BV3L6
LbCas12a	917059416	Lachnospiraceae bacterium ND2006
Lb5Cas12a	652820612	Lachnospiraceae bacterium NC2008
HkCas12a	491540987	Helcococcus 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

Tabela 3 Informações sobre plasmídeos

Plasmídeos ou Cepas	Propriedades relevantes ou genótipos	Fontes
Plasmídeos		
pET28a-TEV	pET28a com o sítio de clivagem de trombina modificado para o sítio de clivagem da protease TEV	(Carneiro, Silva et al. 2006)
pET28a-TEV-FnCas12a	pET28a-TEV transportando FnCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
pET28a-TEV-AsCas12a	pET28a-TEV transportando AsCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
pET28a-TEV-LbCas12a	pET28a-TEV transportando LbCas12a	(Lei, Li et al. 2017)
pET28a-TEV-Lb5Cas12a	pET28a-TEV transportando Lb5Cas12a	A presente invenção
pET28a-TEV-HkCas12a	pET28a-TEV transportando HkCas12a	A presente invenção
pET28a-TEV-OsCas12a	pET28a-TEV transportando OsCas12a	A presente invenção
pET28a-TEV-TsCas12a	pET28a-TEV transportando TsCas12a	A presente invenção
pET28a-TEV-BbCas12a	pET28a-TEV transportando BbCas12a	A presente invenção
pET28a-TEV-BoCas12a	pET28a-TEV transportando BoCas12a	A presente invenção
pET28a-TEV-Lb4Cas12a	pET28a-TEV transportando Lb4Cas12a	A presente invenção

pET28a-TEV-FnCas12a-K869 A	pET28a-TEV transportando FnCas12a-K869A	A presente invenção
pET28a-TEV-FnCas12a-K852 A	pET28a-TEV transportando FnCas12a-K852A	A presente invenção
pET28a-TEV-FnCas12a-H843 A	pET28a-TEV transportando FnCas12a-H843A	A presente invenção
pET28a-TEV-FnCas12a-R121 8A	pET28a-TEV transportando FnCas12a-R1218A	A presente invenção
pET28a-TEV-FnCas12a-E100 6A	pET28a-TEV transportando FnCas12a-E1006A	A presente invenção
pET28a-TEV-FnCas12a-D917 A	pET28a-TEV transportando FnCas12a-D917A	A presente invenção
pET28a-TEV-FnCas12a-D125 5A	pET28a-TEV transportando FnCas12a-D1255A	A presente invenção
pET28a-TEV-C2c1	pET28a-TEV transportando C2c1	A presente invenção

Tabela 4 Primers utilizados no teste do método HOLMES

Nome Oligo	Sequência (5'-3')	SEQ ID NO.:
T1-R alvo	ggatcctttctcctctttctagagtaaagcttgaa ttcagtagaaagttgcgataacaaacagaaa	28
M13F-47	cacaattccacacaacatacgageccgga	29
M13R-48	tgtagecgtagttaggccaccacttca	30
T1-F alvo	agttttgttatcgcaactttctactgaattc	31
T1-F-1A alvo	agttttgAtatcgcaactttctactgaattc	32
T1-F-2A alvo	agttttgtAatcgcaactttctactgaattc	33
T1-F-3T alvo	agttttgTtTcgcaactttctactgaattc	34
T1-F-4A alvo	agttttgttAacgcaactttctactgaattc	35
T1-F-5G alvo	agttttgTtatGgcaactttctactgaattc	36
T1-F-6C alvo	agttttgTtatCcaactttctactgaattc	37
T1-F-7G alvo	agttttgTtatcgGaaactttctactgaattc	38

T1-F-8T alvo	agttttgttatcgctactttctactgaattc	39
T1-F-9T alvo	agttttgttatcgcaTctttctactgaattc	40
T1-F-10G alvo	agttttgttatcgcaaGtttctactgaattc	41
T1-AAAN-F alvo	aaaagttatcgcaactttctactgaattc	42
T1-F-11A alvo	agttttgttatcgcaacAttctactgaattcggtc atag	43
T1-F-12A alvo	agttttgttatcgcaactAtctactgaattcggtc atag	44
T1-F-13A alvo	agttttgttatcgcaacttActactgaattcggtc atag	45
T1-F-14G alvo	agttttgttatcgcaactttGtactgaattcggtc atag	46
T1-F-15A alvo	agttttgttatcgcaactttcAactgaattcggtc atag	47
T1-F-16T alvo	agttttgttatcgcaactttctTctgaattcggtc atag	48
T1-F-17G alvo	agttttgttatcgcaactttctaGtgaattcggtc atag	49
T1-F-18A alvo	agttttgttatcgcaactttctacAgaattcggtc atag	50
T1-PAM1A-F alvo	agtttAgttatcgcaactttctactgaattc	51
T1-PAM2A-F alvo	agttAtgttatcgcaactttctactgaattc	52
T1-PAM3A-F alvo	agtAttgttatcgcaactttctactgaattc	53
gyrB-F	AGTTGTCGTTCCCTCAACTCCGGCGTTTC	54
gyrB-R	TCGACGCCAATACCGTCTTTTTTCAGTGG	55
1-5082-F	CTGCCTTTGCTTCTACCTTTGCCTGT	56
1-5082-F-T	TTGCTTCTACCTTTGCCTGTTCTGG	57
1-5082-R	TTTTCTGGCTGGGGATGGCCGATGG	58
2-rs1467558-F	AGCAATAACACTAATATTGATTCCTTCAGATATGG ACTCCTTTCATAGTA	59

2-rs1467558-F-T	TTGATTCCTTCAGATATGGACTCCTTTCATAGTAT AACG	60
2-rs1467558-R	TGAGCATCGTTATTCTTACGCGTTGTCATTGAAAG AG	61
3-rs2952768-F	AGCCTGGGCAACGAGTGAAACTCTG	62
3-rs2952768-R	ACAGGAGGGACAAAAGCCTAAGTGTC	63
3-rs2952768-R-C	CATCATAGGATTGGGAAAAGGACATTTTCAGTCATT CAG	64
4-rs4363657-F	AGAGTCCTTCTTTCTCAATTTTTTCAGAATAATTTA GTA	65
4-rs4363657-R	CAGTACTGAAAAACCTGCCTATCAATAAAAAGCCC TAGAC	66
5-rs601338-F	GCTTCACCGGCTACCTTTGCTCCT	67
5-rs601338-R	TTCACCTGCAGGCCCGCAGG	68
34-TP53-T24-F	CCTGACTTTCAACTCTGTCTCCTTCTTTTTTAC AGTA	69
34-TP53-T24-R	TGCTGTGACTGCTTGTAGATGGCCATGG	70
41-rs1014290-F	AGTTTCCAGACCTCAGTGCACAAGATACTTTTCTA C	71
41-rs1014290-F-G	ACCTCAGTGCACAAGATACTTTTCTACGTCATCCA C	72
41-rs1014290-R	AGCTCCAGTGGATGGAAGATCTTTGAGATCCAG	73
42-rs6449213-F	AGTCAAAGAGATTCATGCCTGGGACTTTAATCACA TTTAT	74
42-rs6449213-F-C	ATGCCTGGGACTTTAATCACATTTATCGGAAGG	75
42-rs6449213-R	CAAATCTGTCTCCACCTCTCAGCTCACCTTG	76
43-rs737267-F	TTCTTGAACCCAAACTCACCTGGCATTAAACTG	77
43-rs737267-F-A	AAACTCACCTGGCATTAAACTGACTCTGTAAG	78
43-rs737267-F-T	AAACTCACCTGGCATTAAACTGTCTCTGTAAG	79
43-rs737267-R	TGCCGAGGCTGAGTTCAGCTACTCTCC	80

44-rs1260326-F	ACACAGCACCGTGGGTCAGACCTTGC	81
44-rs1260326-F-C	TGGGTCAGACTTTGCCGGTGAGAGTC	82
44-rs1260326-F-T	TGGGTCAGACTTTGCTGGTGAGAGTC	83
44-rs1260326-R	AGCAGTGGCCATGTGATGCTGATGATG	84
45-rs642803-F	CCCCGGCTCTGTTGGCTTTGAGAATTG	85
45-rs642803-F-C	CTCTGTTGGCTTTGAGAATTGCCTGTCTGTGTC	86
45-rs642803-F-T	CTCTGTTGGCTTTGAGAATTGTCTGTCTGTGTC	87
45-rs642803-R	ACCGATACCTGGCAGCCCTTGGATG	88
HEX-N12-BHQ1	HEX-NNNNNNNNNNN-BHQ1	89

Tabela 5 Sequências modelo para transcrição de crRNA

Nome Oligo	Sequência (5'-3')	SEQ ID NO.:
T7-crRNA-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	90
T7-T1-24-R	gaattcagtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGA AATCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTC	91
T7-T1-15-R	agaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATCCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTC	92
T7-T1-16-R	tagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTC	93
T7-T1-17-R	gtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATCCC TATAGTGAGTCGTATTAATTC	94
T7-T1-18-R	agtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATCC CTATAGTGAGTCGTATTAATTC	95
T7-crRNA-DNM T-23nt-R	GAGTAACAGACATGGACCATCAGATCTACAACAGTAGAA ATCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTC	96
T7-crRNA-DNM T-(-8)-R	gacatggaccatcaggaaacattATCTACAACAGTAGAA ATCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTC	97
T7-crRNA-DNM T-(+4)-R	aggcgagtaacagacatggaccaATCTACAACAGTAGAA ATCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTC	98
T7-crRNA-DNM	tgacaggcgagtaacagacatggATCTACAACAGTAGAA	99

T-(+8)-R	ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	
T7-crRNA-DNM T-16nt-R	agacatggaccatcagATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	100
T7-crRNA-DNM T-18nt-R	acagacatggaccatcagATCTACAACAGTAGAAATTC CTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	101
T7-crRNA-DNM T-20nt-R	taacagacatggaccatcagATCTACAACAGTAGAAATT CCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	102
T7-DNMT-(-8)- sem loop-R	gacatggaccatcaggaaacattCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC	103
T7-DNMT- (+4)-sem loop- R	agcgagtaacagacatggaccaCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC	104
T7-DNMT- (+8)-sem loop- R	tgacaggcgagtaacagacatggCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC	105
T7-crRNA-rs50 82-T	CCTCTTCCCAGAACAGGATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	106
T7-crRNA-rs50 82-G	CCTCTTCCCAGCACAGGATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	107
T7-crRNA- rs1467558-T	CTGAAGCGTTATACTATATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	108
T7-crRNA- rs1467558-C	CTGAAGCGTTGTACTATATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	109
T7-crRNA-rs29 52768-T-16nt	TTTTATCTGAATGATTATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	110
T7-crRNA-rs29 52768-C-16nt	TTTTATCTGAATGACTATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	111
T7-crRNA- rs4363657-T	AAAAAAGAGTGAGTACCATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	112
T7-crRNA- rs4363657-C	AAAAAAGAGTGGTACCATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	113
T7-crRNA-rs60	GGTAGAAGGTCCAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCT	114

1338-G	ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	
T7-crRNA-rs60 1338-A	GGTAGAAGGTCTAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	115
T7-crRNA-34-T P53-T24-C-16n t	GGGCAGGGGAGTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	116
T7-crRNA-34-T P53-T24-G-16n t	GGGCAGGGGACTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	117
T7-crRNA-41-r s1014290-A-15 nt	TCAGTGGATGATGTAATCTACAACAGTAGAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	118
T7-crRNA-41-r s1014290-G-15 nt	TCAGTGGATGACGTAATCTACAACAGTAGAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	119
T7-crRNA-42-r s6449213-C	GGAAATTCCTTCCGAATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	120
T7-crRNA-42-r s6449213-T	GGAAATTCCTTCCAAATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	121
T7-crRNA-43-r s737267-A-16n t	TCTTACAGAGTCAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	122
T7-crRNA-43-r s737267-G-16n t	TCTTACAGAGCCAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	123
T7-crRNA-43-r s737267-T	GTCTTACAGAGACAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	124
T7-crRNA-44-r s1260326-C-15 nt	CTGGACTCTACCGGATCTACAACAGTAGAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	125

T7-crRNA-44-r s1260326-T-15 nt	CTGGACTCTCACCAGATCTACAACAGTAGAAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	126
T7-crRNA-45-r s642803-C	CACAGACAGGCAATTCTATCTACAACAGTAGAAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	127
T7-crRNA-45-r s642803-T	CACAGACAGACAATTCTATCTACAACAGTAGAAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	128
T7-crRNA- gyrB	TCGCGCTTGTCGCGCAGACGAATGATCTACAACAGTAGAA ATTCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	129

[0259] Primers utilizados para detecção por amplificação de DNA através de LAMP combinada com Cas12a:

Tabela 6 Primers usados para amplificar gyrB-1

Nome	Sequência	SEQ ID NO.:
LAMP-gyrB-1-F3	CATGGTGCGTTTCTGGCC	130
LAMP-gyrB-1-B3	CGGCGTTTTGTTCTTGTTCA	131
LAMP-gyrB-1-FIP	ACAACACACGCAGACGTTTCGCAACCTTCA CCAATGTGACCG	132
LAMP-gyrB-1-BIP	G TTCCTCAACTCCGGCGTTTCCGATGCCGC CTTCATAGTGG	133
LAMP-gyrB-1-LoopF	CAGAATTTTCATATTCGAACT	134
LAMP-gyrB-1-LoopB	GACGGCAAAGAAGACCACTT	135

Tabela 7 Primers usados para amplificar gyrB-2

Nome	Sequência	SEQ ID NO.:
LAMP-gyrB-2-F3	CGACGGCAAAGAAGACCA	136
LAMP-gyrB-2-B3	AGCCTGCCAGGTGAGTAC	137
LAMP-gyrB-2-FIP	CGGGTGGATCGGCGTTTTGTTCACTATGAA GGCGGCATCA	138
LAMP-gyrB-2-BIP	GTATTGGCGTCGAAGTGGCGTTCGCTGCGG AATGTTGTTG	139
LAMP-gyrB-2-LoopF	TTGTTCAAGATATTCAACGAACG	140
LAMP-gyrB-2-LoopB	GTGGAACGATGGCTTCCAGG	141

Tabela 8 Primers usados para amplificar um sítio rs1467558

Nome	Sequência	SEQ ID NO.:
LAMP-rs1467558-F3	CAGCTGTAGACCATAAGCC	142
LAMP-rs1467558-B3	GTGGCTGAGCATCGTTAT	143
LAMP-rs1467558-FIP	ACTATGAAAGGAGTCCATATCTGAAGGAAT TCAGGTAGTGGTTTGGGA	144
LAMP-rs1467558-BIP	GCTTCAGCCTACTGCAAATCCTACGCGTTG TCATTGAAAG	145
LAMP-rs1467558-LoopF	TCAATATTAGTGTTATTGCTTG	146
LAMP-rs1467558-LoopB	TGGTGAAGATTTGGACAGGAC	147

Tabela 9 Primers usados para amplificar um sítio rs5082

Nome	Sequência	SEQ ID NO.:
LAMP-rs5082-F3	GCTGGAAAGGTCAAGGGAC	148
LAMP-rs5082-B3	GGGGTTTGTTCACAGTCC	149
LAMP-rs5082-FIP	CAAAGGTAGAAGCAAAGGCAGGAGGTTTGC CCAAGGTCACACAG	150
LAMP-rs5082-BIP	CTGGGAAGAGGGAGGGCTCAGTGTGCCAC ACTTTCCTGG	151
LAMP-rs5082-LoopF	GTGAGCGGGTGGGGTGCT	152
LAMP-rs5082-LoopB	TCTAAGTCTTCCAGCACGGGATC	153

Tabela 10 Primers usados para detecção por amplificação da RPA combinada a Cas12

Nome	Sequência	SEQ ID NO.:
RPA-gyrB-1-F	ATATGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTG	154
RPA-gyrB-2-F	AAACGTCTGCGTGAGTTGTTCCTCAACTCC	155
RPA-gyrB-R	ACTTCGACGCCAATACCGTCTTTTCAGTGGAG	156

Tabela 11 Primers usados para determinar Cas12b com uma atividade de transclivagem:

Nome Oligo	Sequência (5'-3')	SEQ ID NO.:
pUC18-1-F	ATCTGAGAAGTGGCACTTATCGCAACTTTCTACTGAGGTC ATAGCTGTTTCCTGTGTGA	157
pUC18-1-R	GTCTCTAGACCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCAT GATTACGAATTCGAGCTCGGT	158
pUC18-2-F	CCACTTCCAGGTGGCAAAGCCCCGTTGAGCTTCTCAA TCTGAGAAGTGGCACTTATC	159
pUC18-2-R	TGGAAAGTGGCCATTGGCACACCCGTTGAAAAATTCTG TCCTCTAGACCCCTATAGTGA	160
T7-crRNA-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	161
ZL-sgRNA-T1-R	TCAGTAGAAAAGTTGCGATAAGTGC	162
ZLsgRNA-DNMT1-3-R	AACAGACATGGACCATCAGGGTG	163
T1-F alvo	TTTCTGTTTGTATCGCAACTTTCTACTGAATTCAAGC TTTACTCTAGAAAGAGGAGAAAGGATCC	164
T1-R alvo	GGATCCTTTCTCCTCTTTCTAGAGTAAAGCTTGAATTC AGTAGAAAAGTTGCGATAACAAACAGAAA	165
DNMT1-3-R-FAM-5' alvo	GTCACGCCCACTTGACAGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGAAACATT	166
T1-R alvo	GGATCCTTTCTCCTCTTTCTAGAGTAAAGCTTGAATTC AGTAGAAAAGTTGCGATAACAAACAGAAA	167
T1-F alvo	TTTCTGTTTGTATCGCAACTTTCTACTGAATTCAAGC TTTACTCTAGAAAGAGGAGAAAGGATCC	168

Tabela 12 Primers usados para teste de sensibilidade da reação trans de Cas12b

Nome Oligo	Sequência (5'-3')	SEQ ID NO.:
sgRNA-DNMT1-3-F	CCTGATGGTCCATGTCTGTTGGTCATAGCTGTTTCCTGTG TG	169
sgRNA-DNMT1-3-R	TGGACCATCAGGGTGCCACTTCTCAGATTTGAGAAG	170
T7-crRNA-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	171
ZLsgRNA-DNMT1-3-R	AACAGACATGGACCATCAGGGTG	172
DNMT1-3 (TTC PAM) -F	AATGTTCCCTGATGGTCCATGTCTGTTACTCGCCTGTC AAGTGGCGTGAC	173
DNMT1-3 (TTC PAM) -R	GTCACGCCACTTGACAGGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGGAACATT	174
LAMP-DNM-F3	gtgaacgttcccttagcact	175
LAMP-DNM-B3	gggagggcagaactagtcc	176
LAMP-DNM-FIP	cgccacttgacagggcagtaactgccacttattgggtc agc	177
LAMP-DNM-BIP	gcgtgttccccagagtgacttagcagcttccctcctcct t	178
LAMP-DNM-LoopF	aggaaacattaacgtactgatg	179
LAMP-DNM-LoopB	ttccttttatttcccttcage	180
DNMT1-3 (TTC PAM) -R	GTCACGCCACTTGACAGGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGGAACATT	181
DNMT1-3 (TTC PAM) -F	AATGTTCCCTGATGGTCCATGTCTGTTACTCGCCTGTC AAGTGGCGTGAC	182

Tabela 13 Outras sequências envolvidas na presente invenção

Nome	Sequência	SEQ ID NO.:
Sequência de sgRNA AacCas12b	GTCTAGAGGACAGAATTTTTCAACGGGTGTCCAATGG CCACTTCCAGGTGGCAAAGCCCGTTGAGCTTCTCAA TCTGAGAAGTGGCACcctgatggtccatgtctgtt	183
Sequência guia direcionada para um DNMT-1-3 alvo	cctgatggtccatgtctgtt	184
Sequência alvo de fita simples	gtcacgccacttgacagggcagtaacagacatggacca tcagggaacatt	185
Sequência alvo de fita dupla:	gtcacgccacttgacagggcagtaacagacatggacca tcagggaacatt	186
Sequência de aminoácidos da proteína AacCas12b	MAVKS IKVKLRLLDDMPEIRAGLWKLHKEVNAGVRYYTE WLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECDKTAECKAELLERL RARQVENGHRGPAGSDDELLQLARQLYELLVPQAIGAK GDAQQIARKFLSPLADKDAVGGGLIAKAGNKPRWVRMR EAGEPGWEEKEKAETRKSADRTADVLRALADFGLKPL MRVYTDSEMSSVEWKPLRKGQAVRTWDRDMFQQA IERM MSWESWNQRVGQEYAKLVEQKNRFEQKNFVGQEHVHL VNQLQQDMKEASPGLESKEQTAHYVTGRALRGSDKVFE KWGKLAPDAPFDLYDAEIKNVQRRNTRRFSGHDLFAKL AEPEYQALWREDASFLTRYAVYNSILRKLNHAKMFATF TLPDATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGERRHAI RFHKLLKVENGVAREVDDVTVPISMSEQLDNLLPRDPN EPIALYFRDYGAEQHFTGEFGGAKIQCRRDQLAHMHRR RGARDVYLVNVSVRVQSQSEARGERRPPYA AVFRLVGDN HRAFVHFDKLSDYLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVD LGLRTSASISVFRVARKDELKPN SKGRVPFFFP IKGND	187

	NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQRTLRLR TQLAYLRLLVRCGSEDEVGRRERSWAKLIEQPVDAANHM TPDWREAFENELQKLKSLHGICSDKEWMDAVYESVRRV WRHMGKQVRDWRKDVRSGERPKIRGYAKDVVGGNSIEQ IEYLERQYKFLKSWFFGKVSQVIRAEEKSRFAITLR EHIDHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDERGKWKWV AKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSENNQLMQWSHRG VFQELINQAQVHDLVGTMYAAFSSRFDARTGAPGIRC RRVPARCTQEHNPEFPWWLNKFVVEHTLDACPLRADD LIPTGEGEIFVSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQQRL WSDFDISQIRLRCDWGEVDGELVLIPRLTGKRTADSYS NKVFYTNVTGYTYERERGGKRRKVFQAQKLSSEEAELL VEADEAREKSVVLMRDPSGIINRGNWTRQKEFWSMVNQ RIEGLVKQIRSRVPLQDSACENTGDI*	
--	--	--

[0260] Todos os documentos mencionados na presente invenção são incorporados a este instrumento por referência como se cada documento fosse incorporado individualmente por referência. Além disso, deve ser entendido que, depois de ler os ensinamentos acima da presente invenção, os versados na técnica podem fazer várias alterações ou modificações na presente invenção, e essas formas equivalentes também se enquadram no escopo definido pelas reivindicações anexas ao presente pedido.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, **caracterizado** pelo fato de que compreende a adição de um RNA guia, uma proteína Cas, uma sonda de ácido nucleico e uma solução tampão em um sistema contendo a molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada e, em seguida, detecção da sonda de ácido nucleico.

2. Método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a proteína Cas é Cas12a ou uma proteína Cas que possui uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à da Cas12a;

a Cas12a é preferencialmente uma dentre FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a ou Lb4Cas12a; e a Cas12a é preferencialmente LbCas12a.

3. Método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o RNA guia se refere a um RNA que guia a proteína Cas para se ligar especificamente a um DNA alvo.

4. Método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a sonda de ácido nucleico é um DNA de fita simples; o DNA de fita simples é preferencialmente um DNA de fita simples marcado com fluorescência; o DNA de fita simples é preferencialmente uma sonda fluorescente que é marcada com um grupo HEX fluorescente em um terminal 5' e marcado com um grupo supressor BHQ1 em um terminal 3'; preferencialmente,

o método para detectar a sonda de ácido nucleico é preferencialmente um método de detecção de fluorescência; e o método de detecção de fluorescência é preferencialmente um método de detecção que usa um leitor de microplacas ou um espectrofotômetro de fluorescência.

5. Método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada no sistema de reação da molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada é obtida por amplificação.

6. Método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, de acordo com

a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o método de detecção pode detectar um micro-organismo patogênico, mutação genética ou um DNA alvo específico.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a proteína Cas compreende Cas12b (isto é, C2c1).

8. Uso de uma proteína Cas em um método **caracterizado** pelo fato de que é para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que, quando um DNA alvo, um RNA guia e uma proteína Cas formam um complexo ternário, o complexo cliva outras moléculas de DNA de fita simples no sistema; e, preferencialmente, o RNA guia se refere a um RNA que guia a proteína Cas para se ligar especificamente ao DNA alvo.

10. Kit para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, **caracterizado** pelo fato de que compreende um RNA guia, uma proteína Cas e uma sonda de ácido nucleico.

11. Sistema de detecção para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) uma proteína Cas, que é Cas12a ou uma proteína Cas com uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à da Cas12a;

(b) um RNA guia que guia a proteína Cas para se ligar especificamente à molécula de ácido nucleico alvo; e

(c) uma sonda de ácido nucleico que é um DNA de fita simples;

em que a molécula de ácido nucleico alvo é um DNA alvo.

12. Sistema de detecção, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a proteína Cas que tem uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à da Cas12a é selecionada de um grupo consistindo em Cas12b (isto é, C2c1).

13. Sistema de detecção, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a sonda de ácido nucleico compreende um DNA de fita simples que carrega um marcador detectável.

14. Kit para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

i) um primeiro recipiente e uma proteína Cas no primeiro recipiente, a proteína Cas sendo Cas12a ou proteína Cas tendo uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à da Cas12a;

ii) um segundo recipiente opcional e um RNA guia no segundo recipiente, o RNA guia guiando a proteína Cas para se ligar especificamente à molécula de ácido nucleico alvo;

iii) um terceiro recipiente e uma sonda de ácido nucleico no terceiro recipiente;

iv) um quarto recipiente opcional e uma solução tampão no quarto recipiente; em que a molécula de ácido nucleico alvo é um DNA alvo.

15. Método para detectar se uma molécula de ácido nucleico alvo existe em uma amostra, **caracterizado** pelo fato de que compreende as seguintes etapas:

(a) suprir o sistema de detecção para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo, de acordo com a reivindicação 11, em que o sistema de detecção compreende ainda uma amostra a ser detectada; e

(b) detectar se a sonda de ácido nucleico no sistema de detecção é clivada por uma proteína Cas, em que a clivagem é uma transclivagem de um DNA de fita simples colateral;

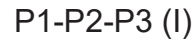
em que se a sonda de ácido nucleico é clivada pela proteína Cas, então isto indica a presença da molécula de ácido nucleico alvo na amostra; e se a sonda de ácido nucleico não for clivada pela proteína Cas, isto indica a ausência da molécula de ácido nucleico alvo na amostra.

16. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que um método para amplificar o ácido nucleico é selecionado de um grupo consistindo em amplificação por PCR, amplificação LAMP, amplificação RPA, reação em cadeia da ligase, amplificação de DNA ramificado, NASBA, SDA, amplificação mediada por transcrição, amplificação por círculo rolante, HDA, SPIA, NEAR, TMA e SMAP2.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que, quando as regiões a montante e a jusante (no intervalo de -20 nt a +20 nt, preferencialmente em um intervalo de -15 nt a +15 nt, e mais preferencialmente em um intervalo de -10 nt a +10 nt) de um sítio alvo não possuem uma sequência PAM,

a amplificação do ácido nucleico é realizada usando um primer introdutor de PAM.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o primer introdutor de PAM tem uma estrutura da fórmula I em 5'-3':



em que,

P1 é uma sequência de segmento 5' que está localizada no terminal 5' e é complementar ou não complementar à sequência da molécula de ácido nucleico alvo;

P2 é uma sequência PAM; e

P3 é uma sequência de segmento 3' que está localizada no terminal 3' e é complementar à sequência da molécula de ácido nucleico alvo.

19. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que, quando as regiões a montante e a jusante (no intervalo de -20 nt a +20 nt, preferencialmente no intervalo de -15 nt a +15 nt, e mais preferencialmente no intervalo de -10 nt a +10 nt) do sítio alvo contêm a sequência PAM, então um primer contendo ou não a sequência PAM pode ser usado e o produto de amplificação amplificado conterá a sequência PAM.

20. Uso de uma proteína Cas na preparação de um reagente de detecção ou de um kit para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo com base na clivagem de DNA de fita simples colateral, **caracterizado** pelo fato de que a proteína Cas é Cas12a ou uma proteína Cas tendo uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à da Cas12a.

21. Uso, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que a proteína Cas que tem uma atividade de clivagem de DNA de fita simples colateral semelhante à da Cas12a é selecionada de um grupo consistindo em Cas12b (ou C2c1).

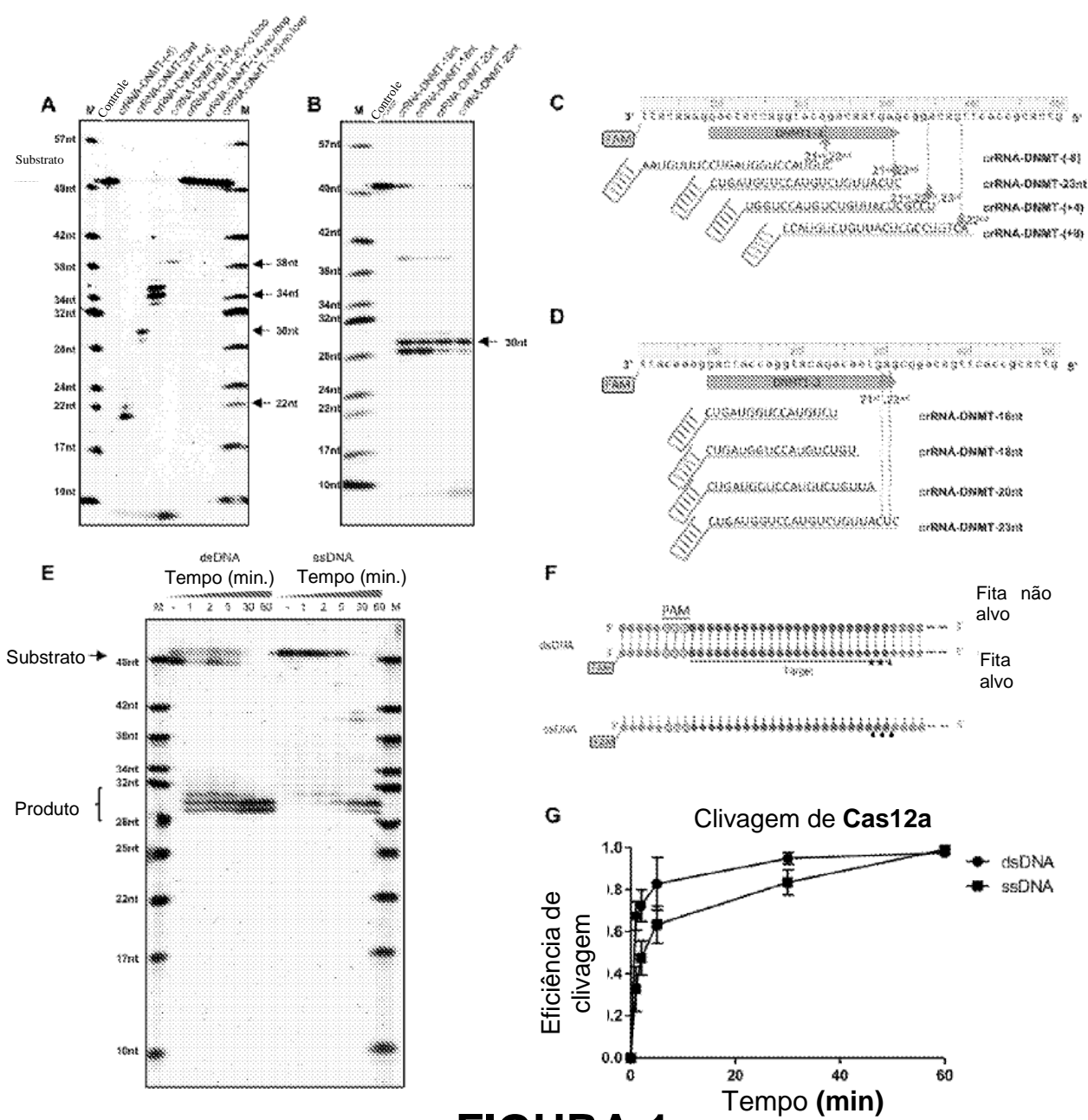


FIGURA 1

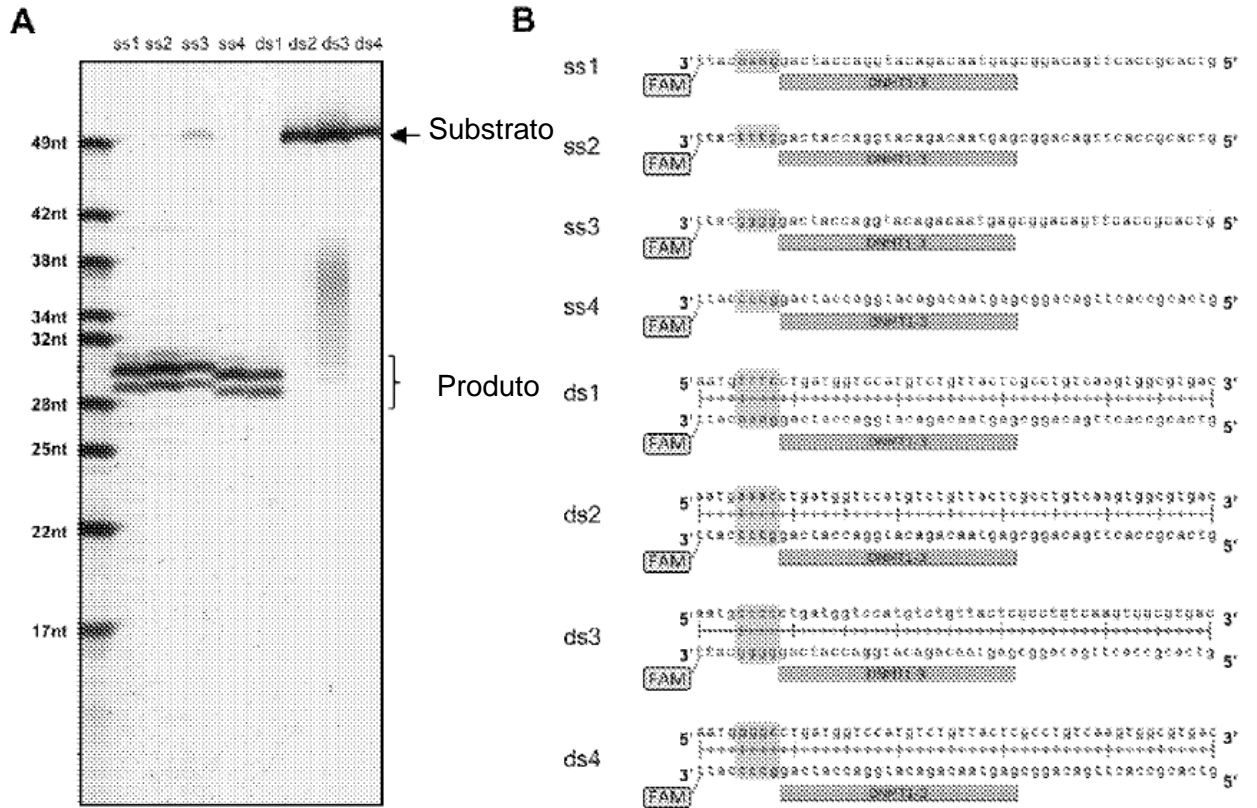
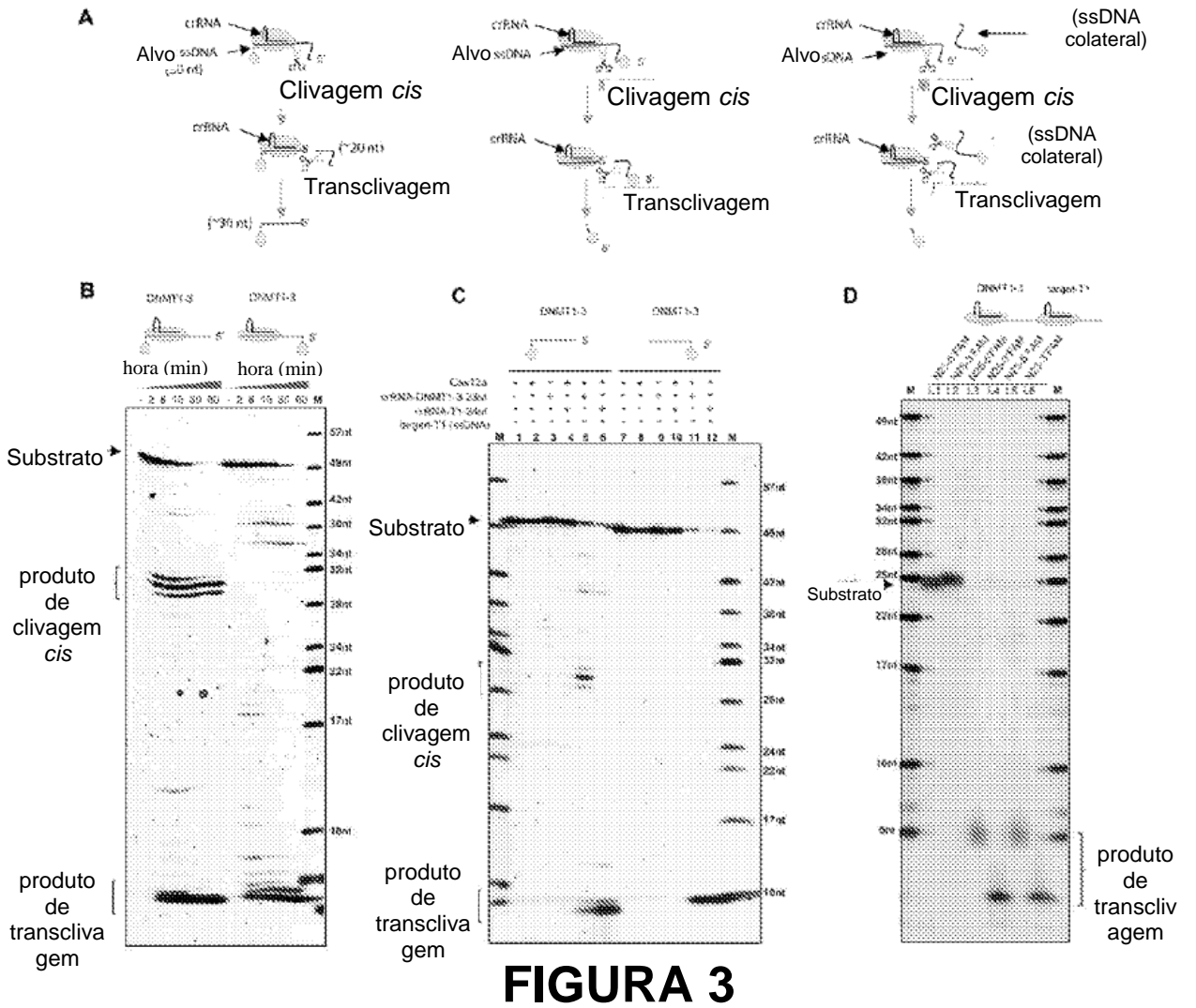


FIGURA 2



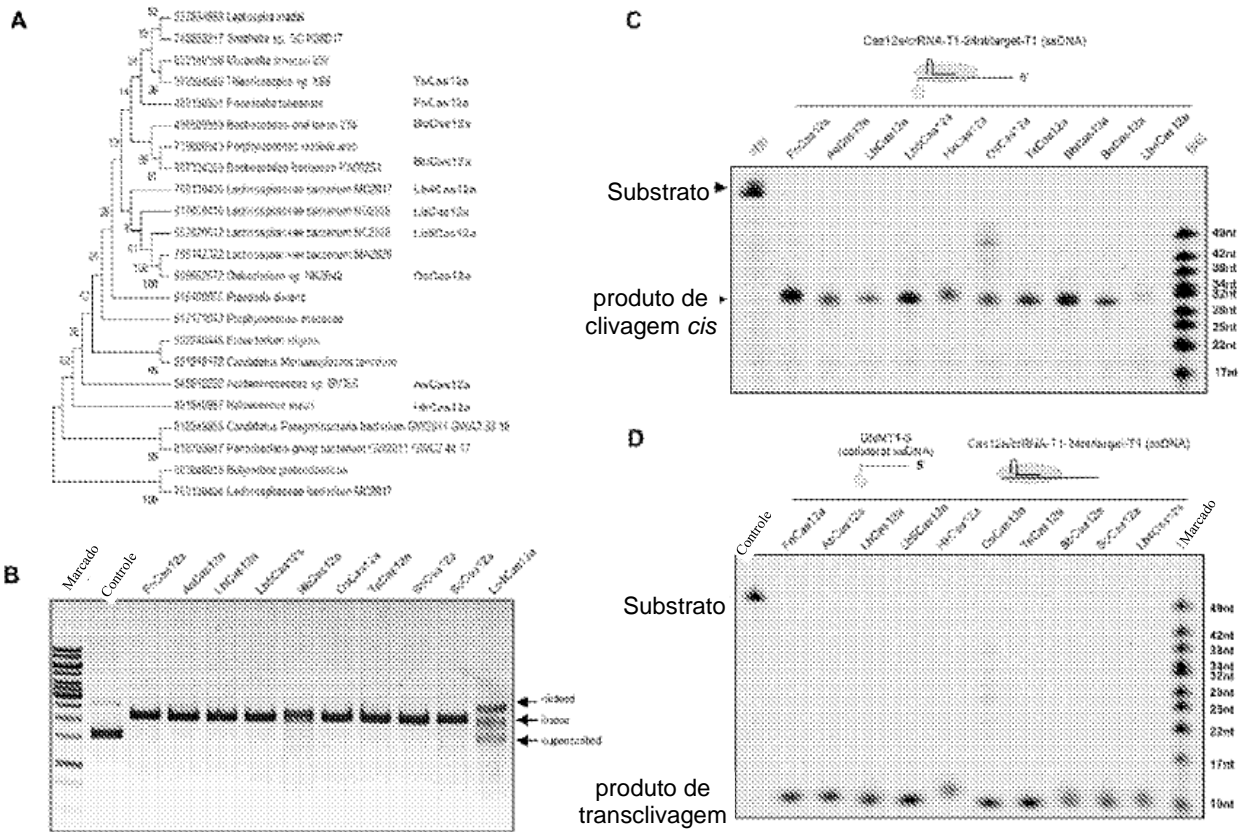


FIGURA 4

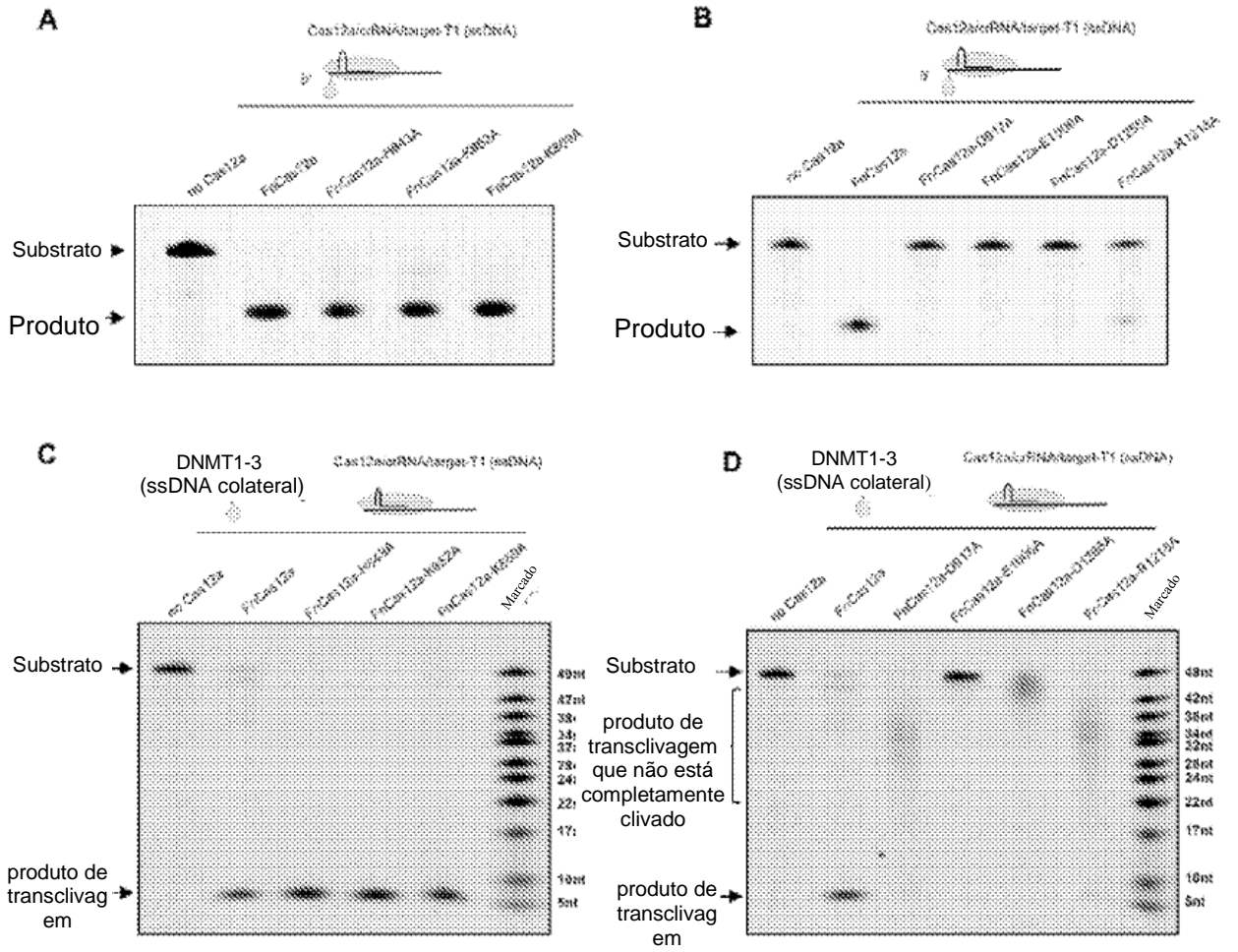


FIGURA 5

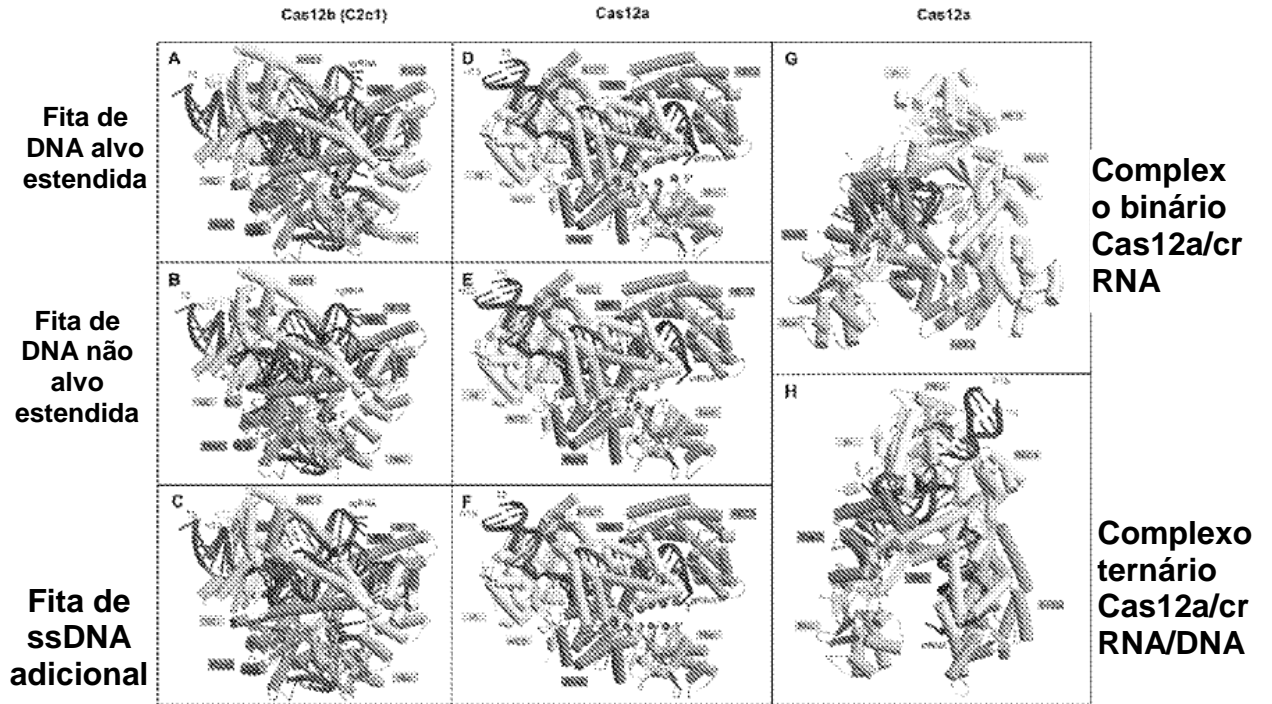


FIGURA 6

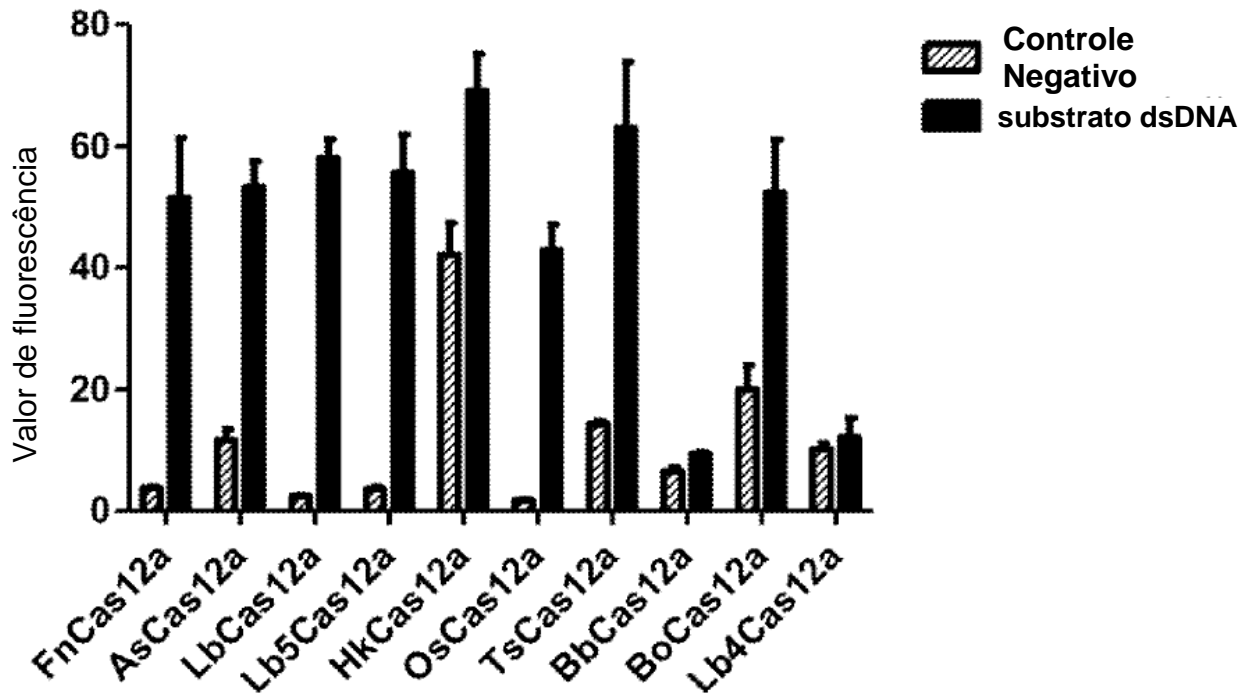
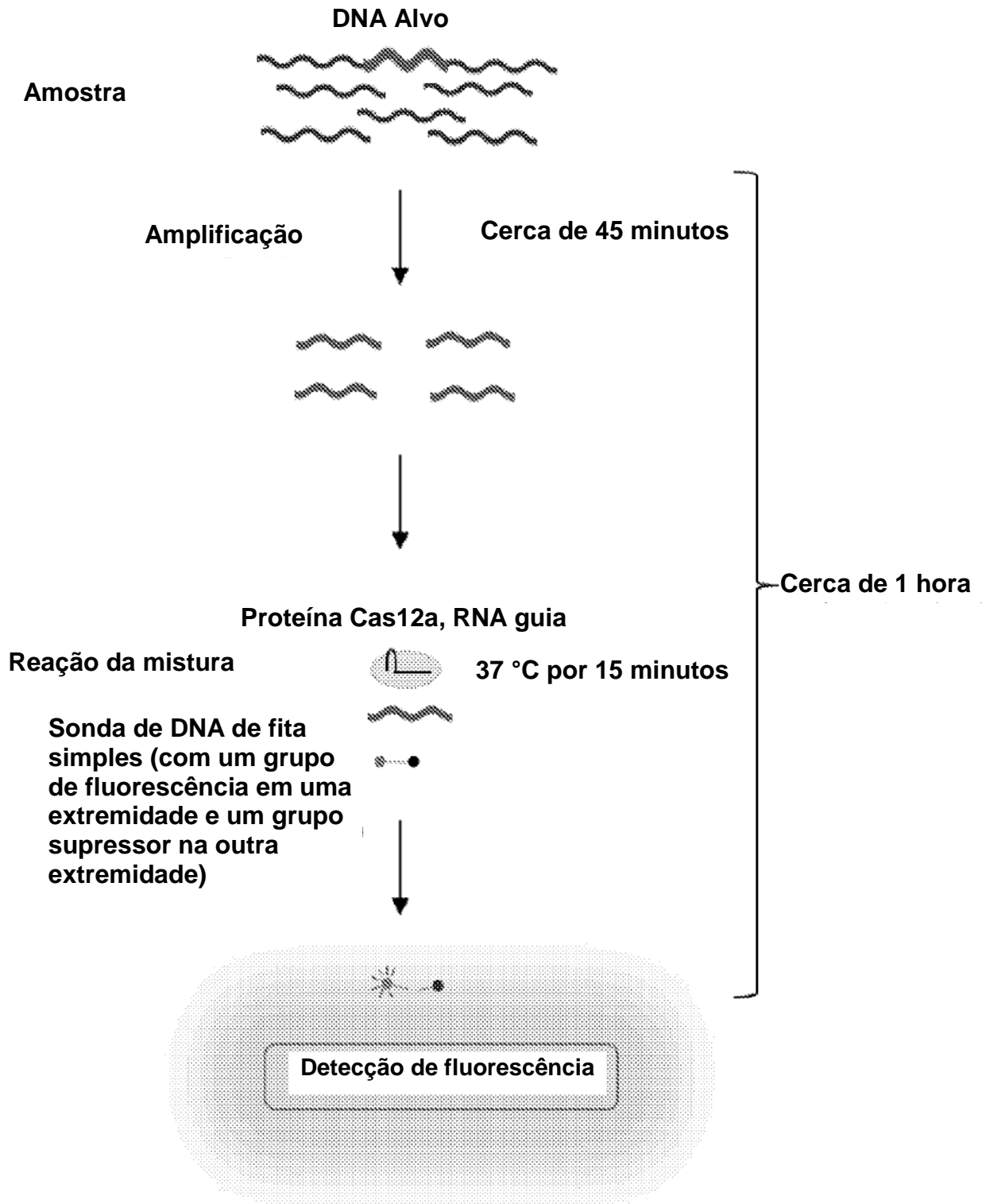
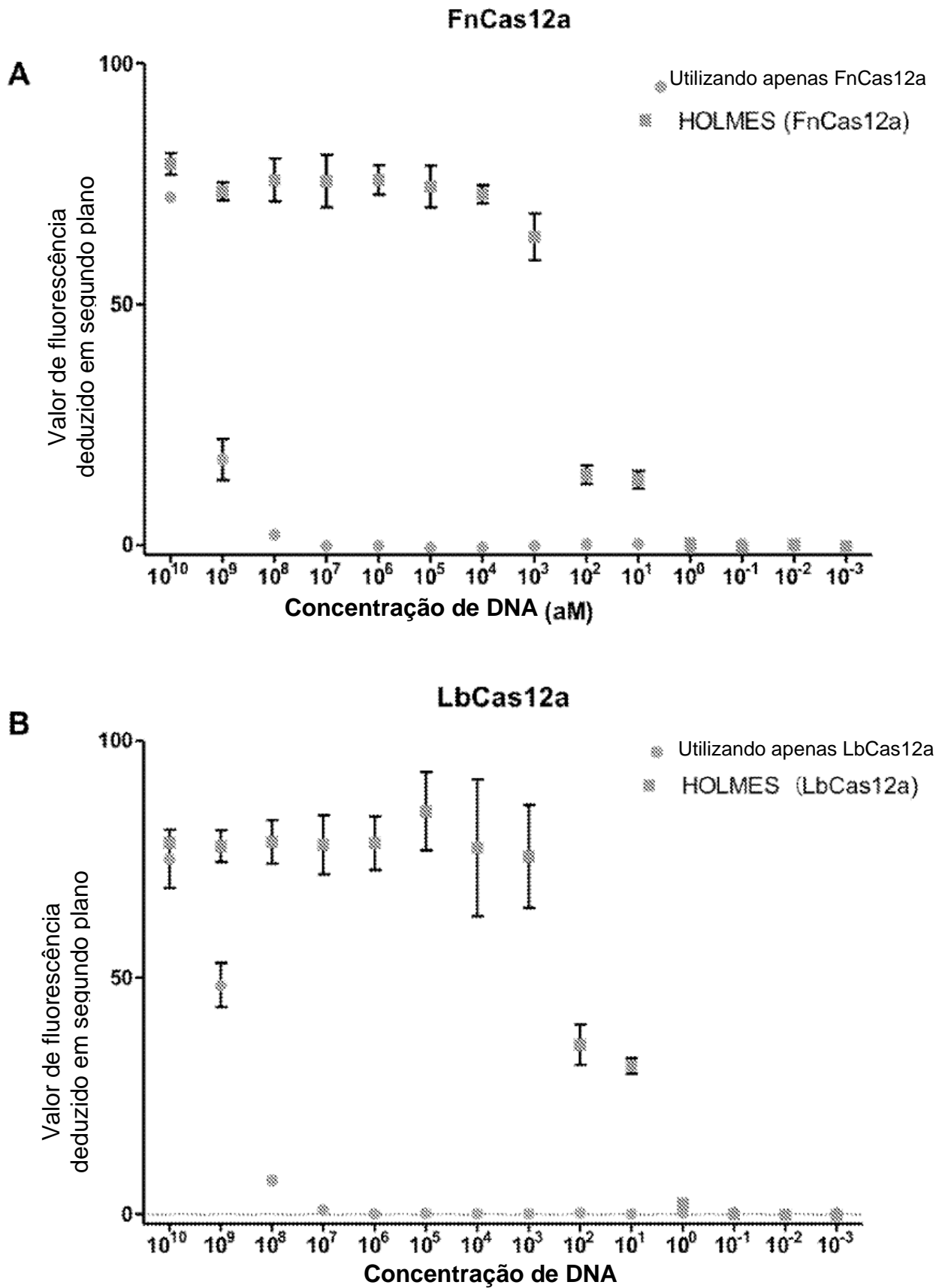


FIGURA 7

**FIGURA 8**

**FIGURA 9**

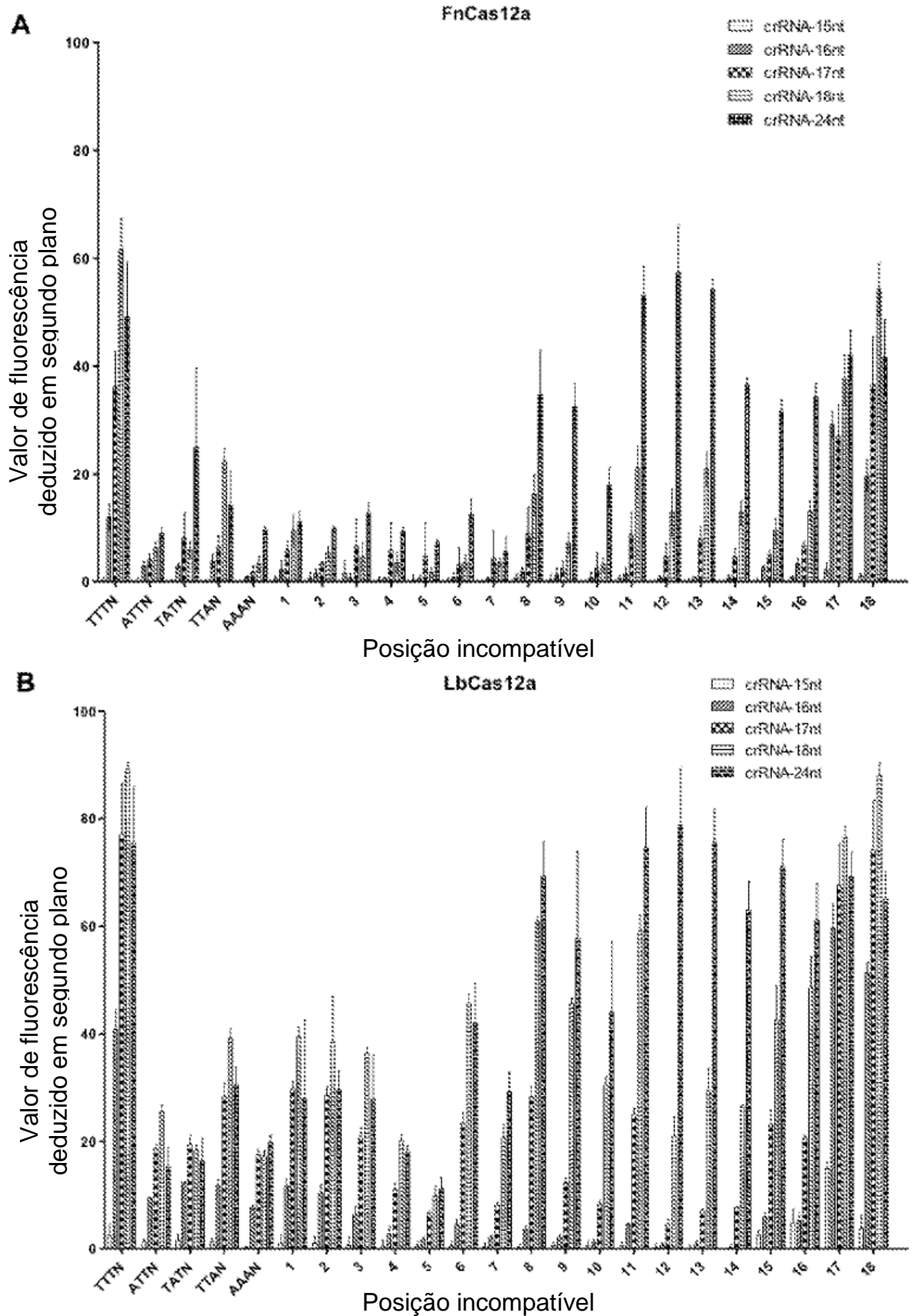


FIGURA 10

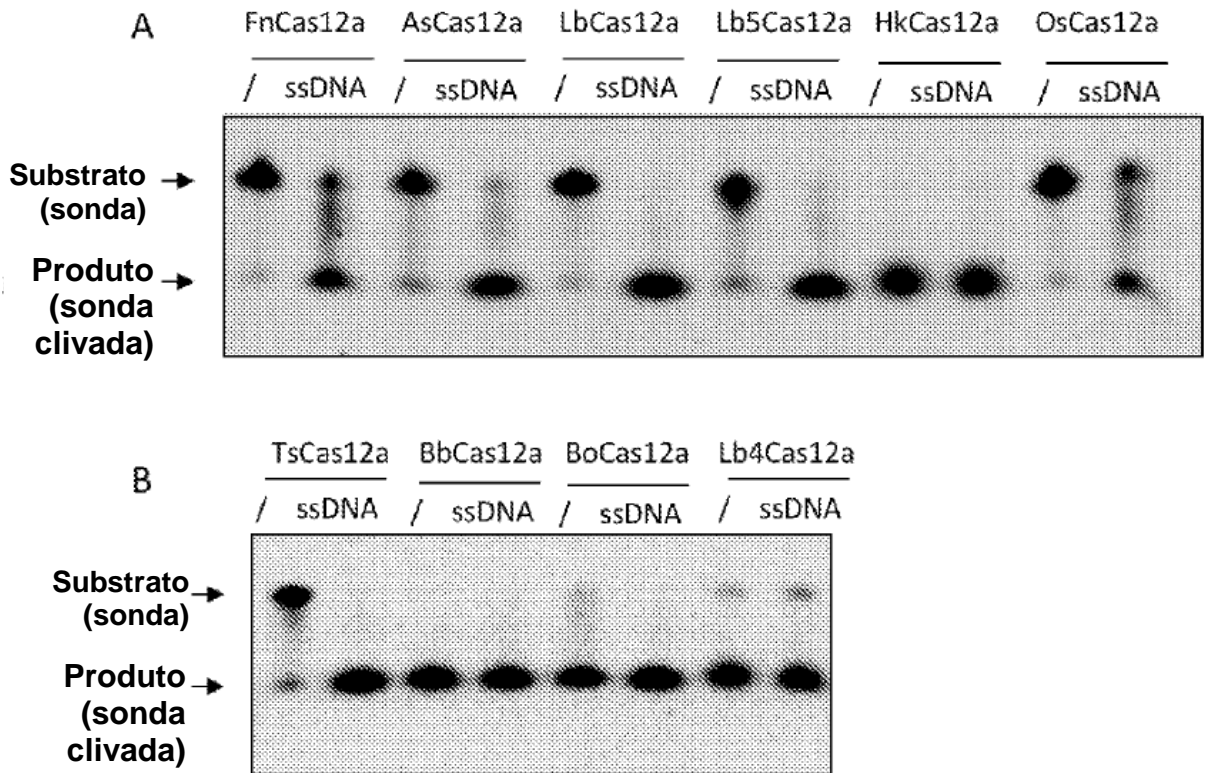


FIGURA 11

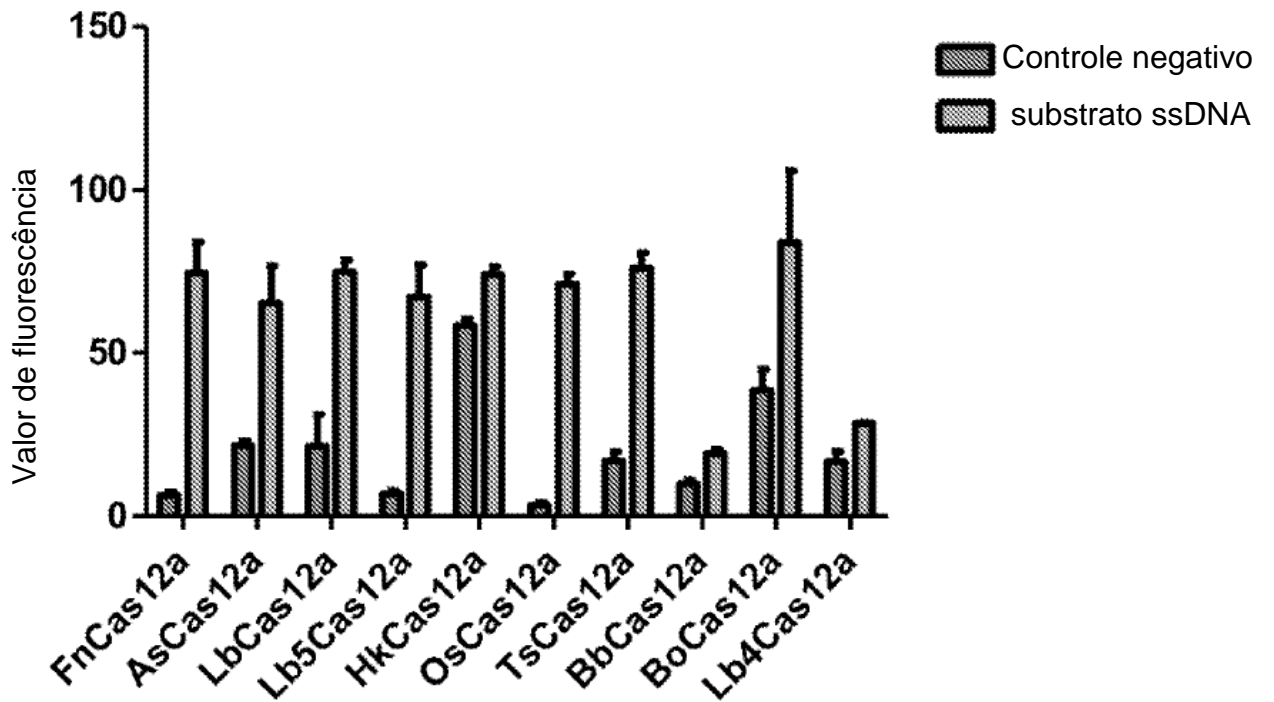


FIGURA 12

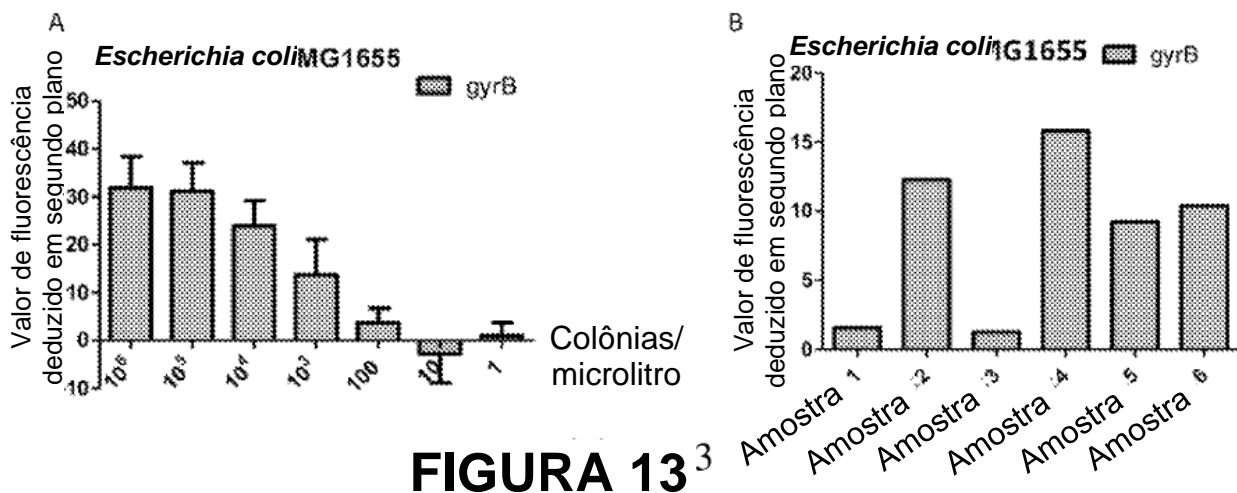


FIGURA 13

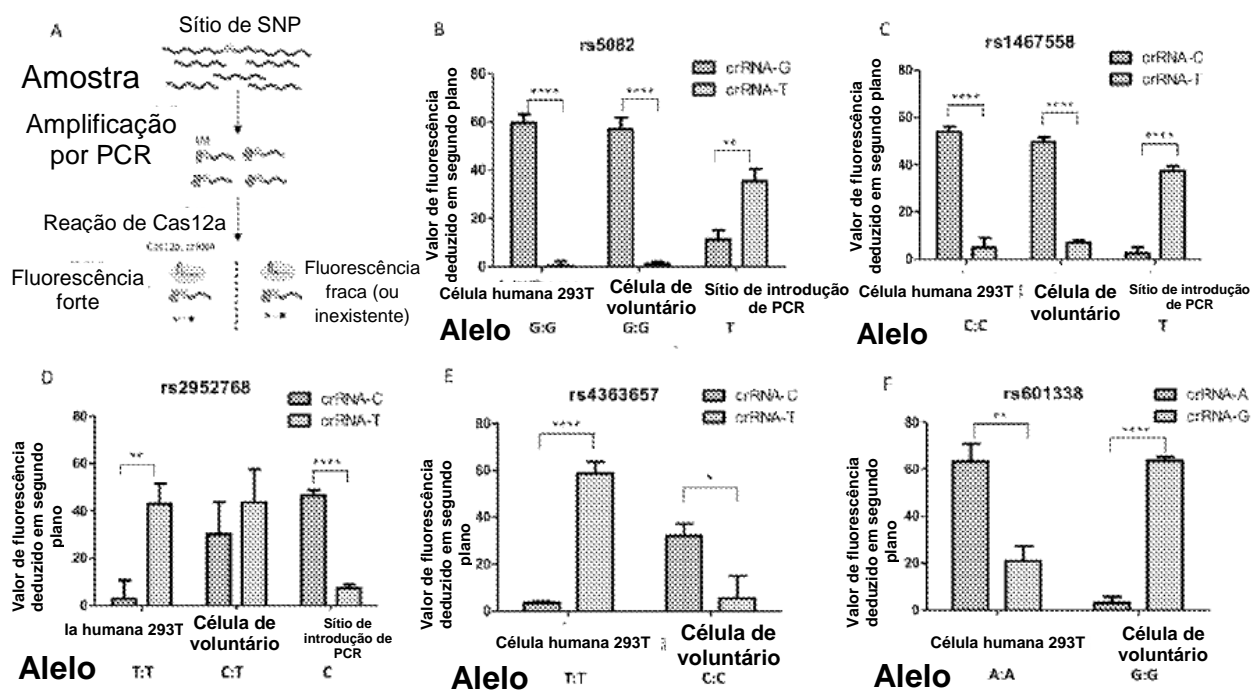


FIGURA 14

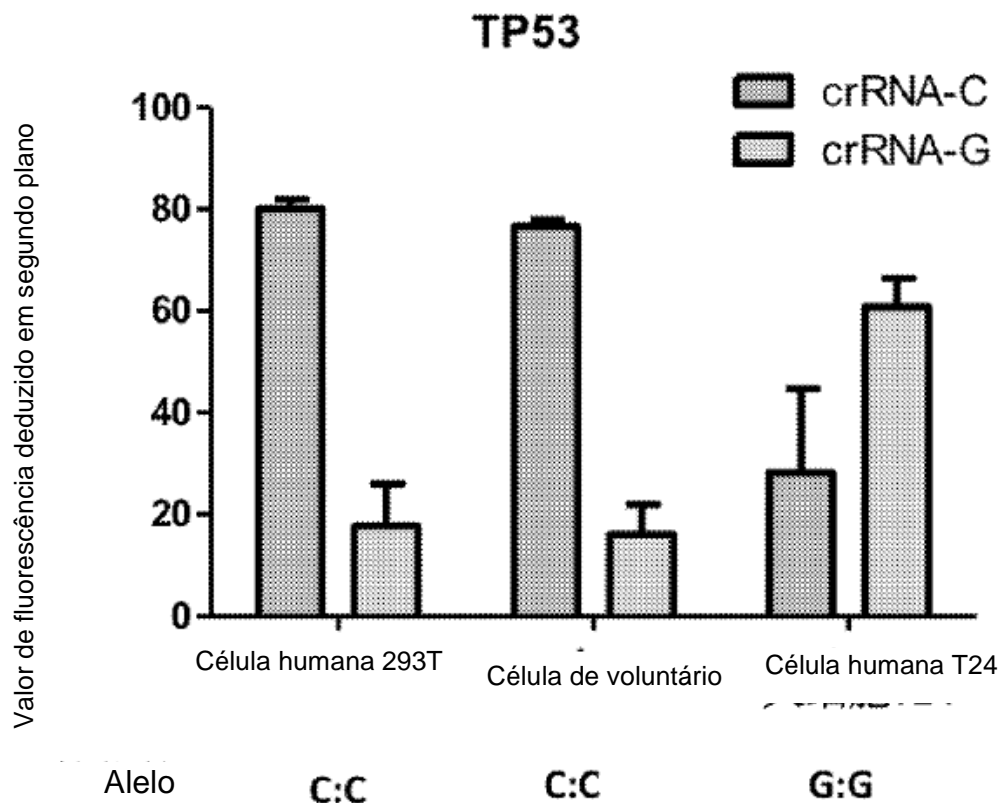


FIGURA 15

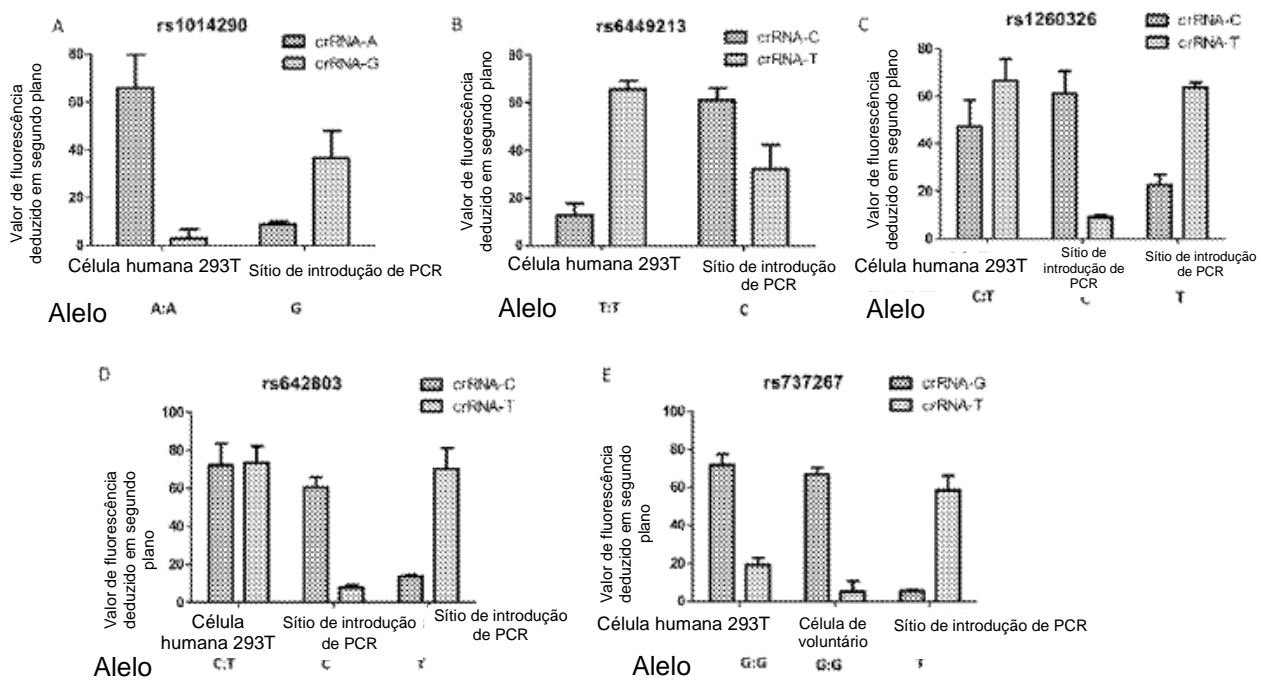


FIGURA 16

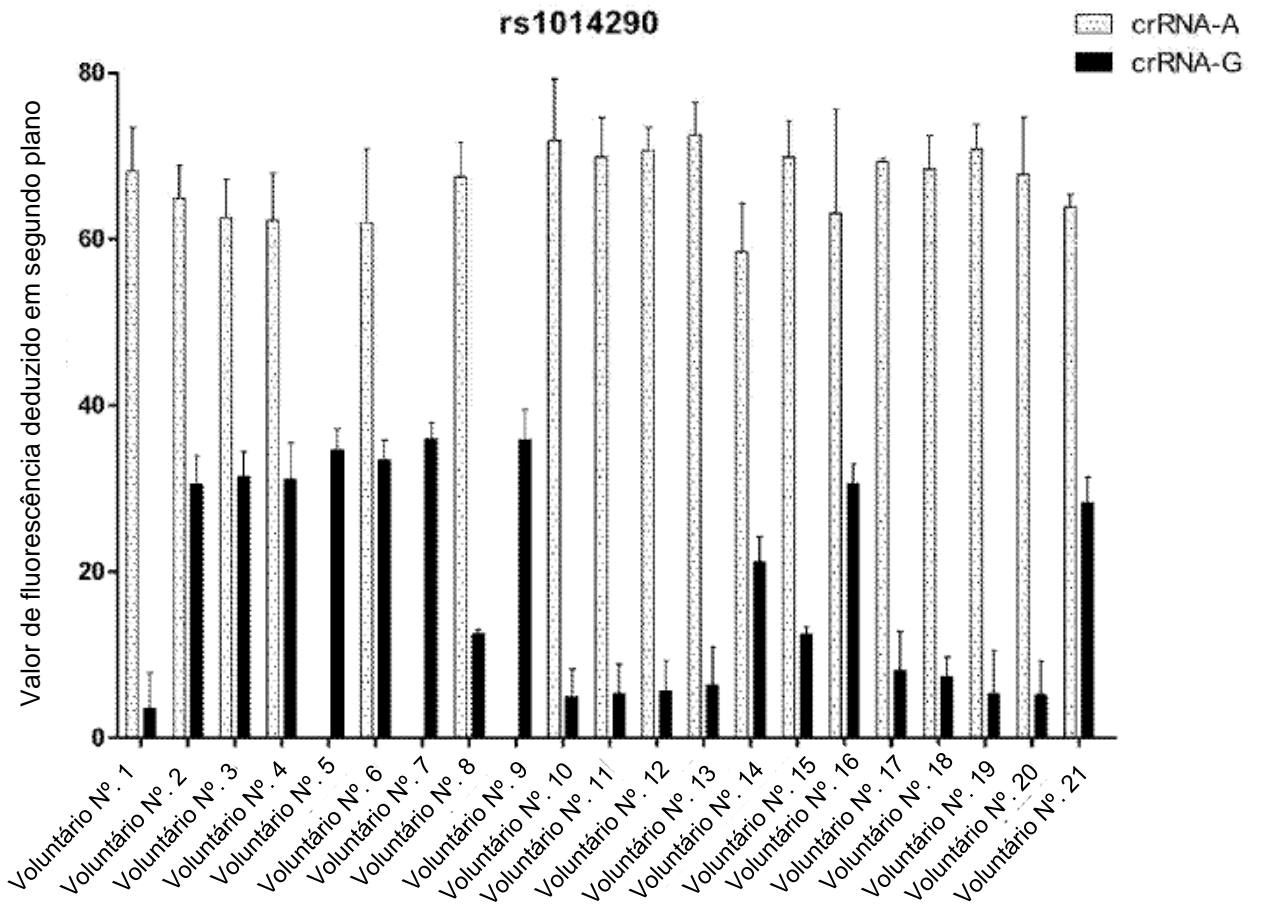


FIGURA 17

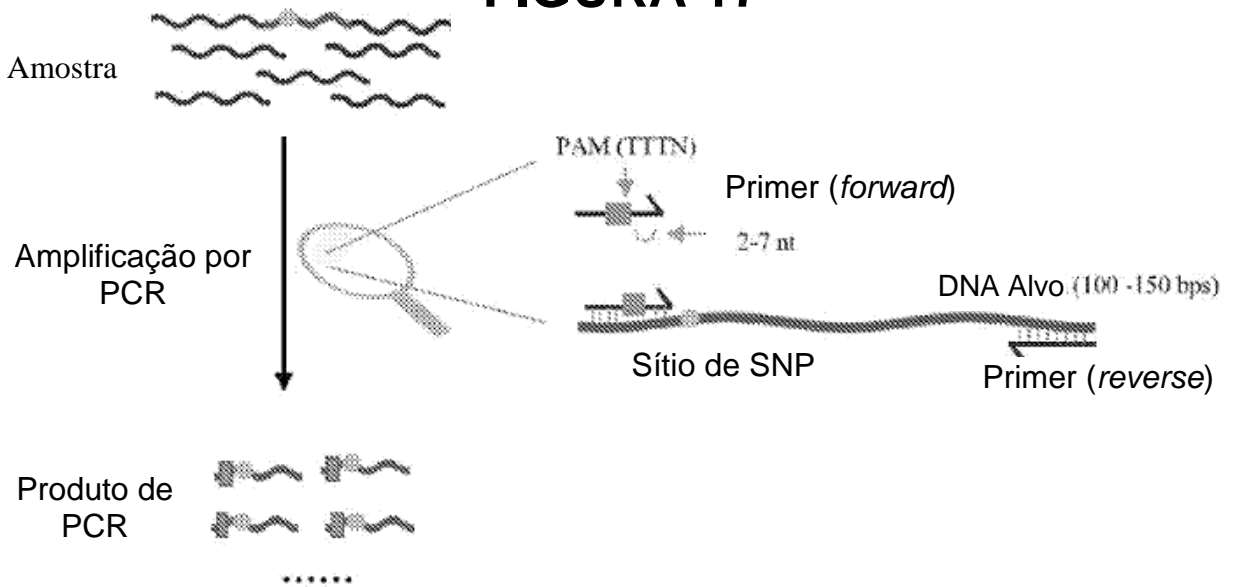


FIGURA 18

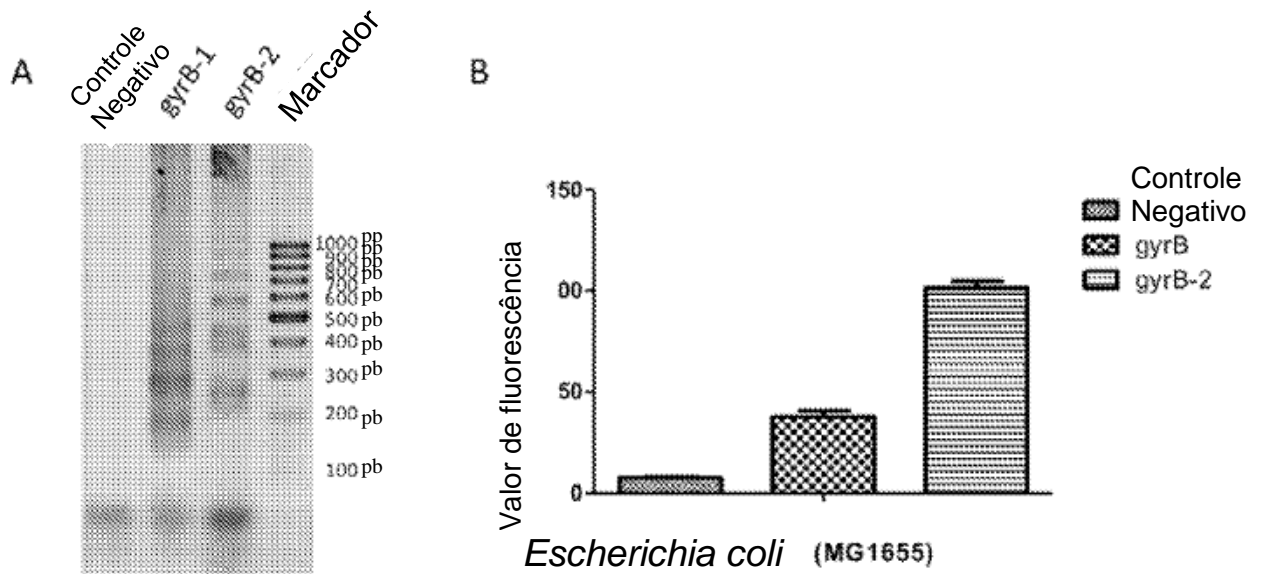


FIGURA 19

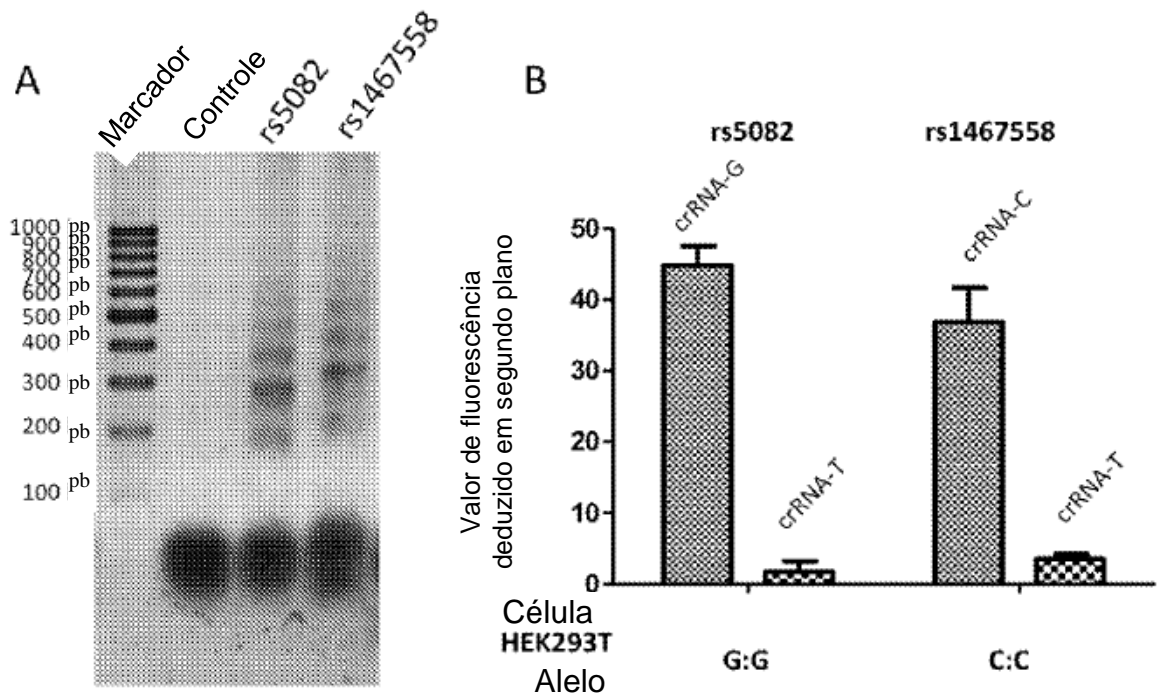


FIGURA 20

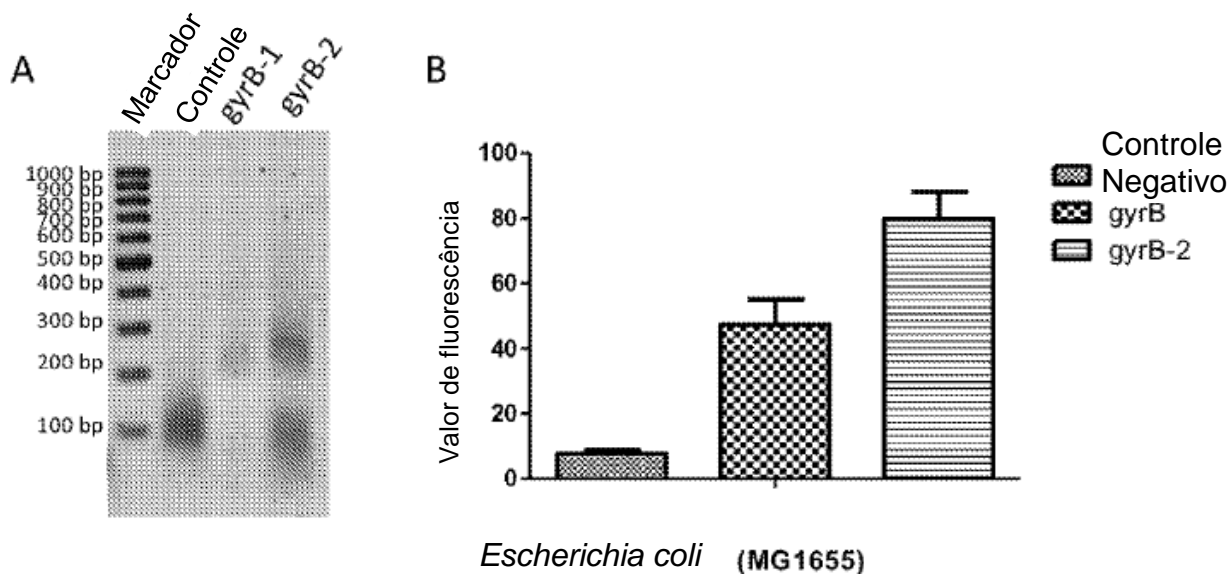


FIGURA 21

Faixa	M	1	2	3	4	5	6
Cas12b		+(100)	+(250)	+(500)	+(500)	+(500)	-
sgRNA		+(100)	+(250)	+(500)	+(500)	-	-
DNA alvo (ssDNA:T1)		+	+	+	-	-	-
sonda ssDNA (ssDNA:DNMT1-3'-5' FAM)		+	+	+	+	+	+

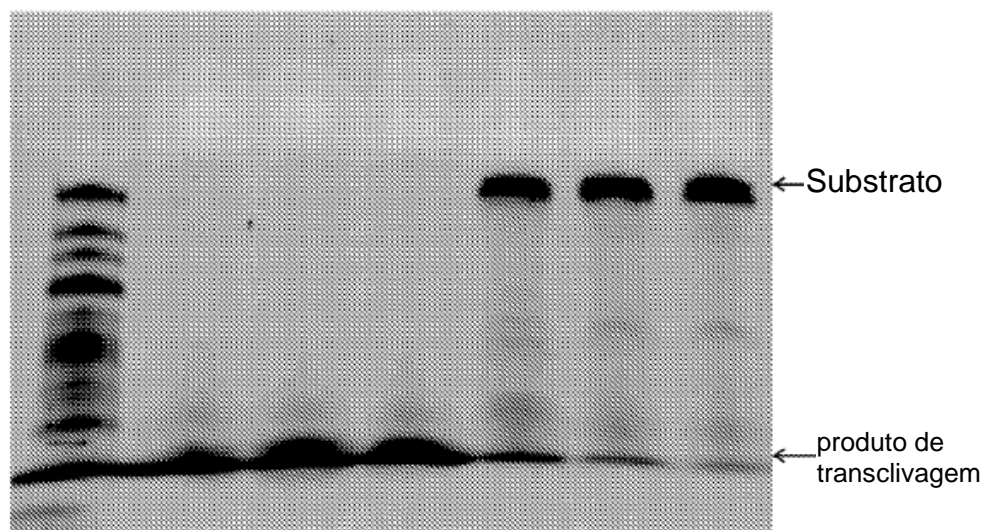
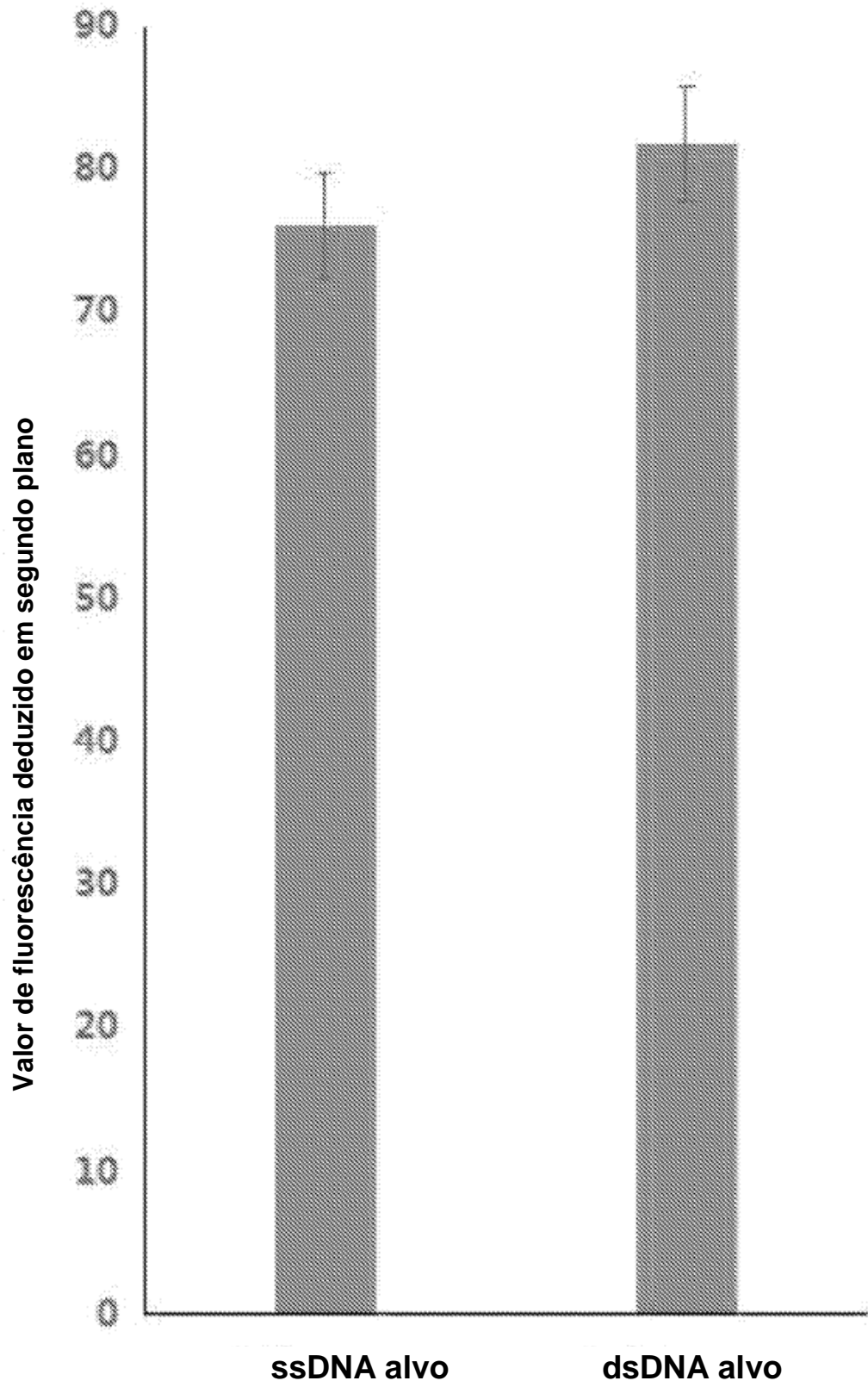
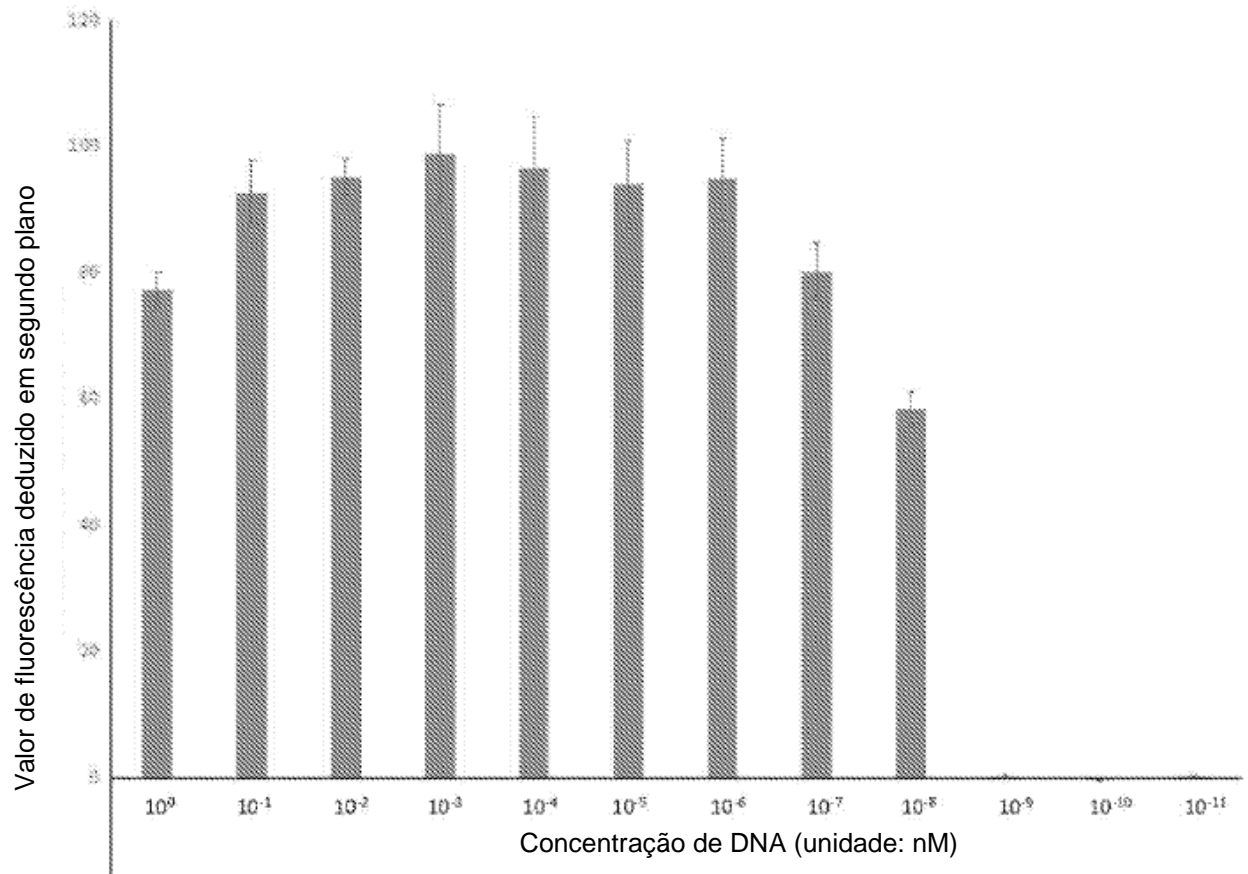


FIGURA 22

**FIGURA 23**

**FIGURA 24**

RESUMO**USO DA PROTEÍNA CAS, MÉTODO PARA DETECÇÃO DE MOLÉCULA DE
ÁCIDO NUCLEICO, E KIT**

A presente invenção fornece o uso de uma proteína Cas, um método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo e um kit. O método para detectar uma molécula de ácido nucleico alvo inclui a adição de um RNA guia, Cas12a e uma sonda de ácido nucleico em um sistema de reação contendo uma molécula de ácido nucleico alvo a ser detectada e a detecção da sonda de ácido nucleico após a conclusão da reação.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202000009 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 19/03/2020
- Hora de Geração do Código: 15:57:06
- Código de Controle:
 - Campo 1: 8986D644B3BBBEFA
 - Campo 2: 1FB3294DA15B153F