

一种 Cas 蛋白的用途及靶标核酸分子的检测方法和试剂盒

技术领域

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

背景技术

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

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

最常用的检测方法——通过标记分子探针，原位与互补的靶标序列杂交。除此之外，目前还开发了下一代测序技术(next-generation sequencing technologies)和 Oxford Nanopore 测序技术等检测方法，但这些方法通常需要昂贵的实验设备。

对 SNPs 的检测首先同样需要进行 PCR 等方法的扩增，从而获得足量的含 SNP 位点区域片段进行进一步的检测。比较常用的方法有：引物延伸(primer extension)，杂交(hybridization)，连接(ligation)和酶切(enzymatic cleavage)。当完成上述方法之后，需要利用特定的方法进行检测，比如质谱检测、荧光检测、化学发光检测等。

核酸检测虽然如上文所述已开发出了不少检测方法，但是在某些情况下，如何更加快速、简便、廉价的检测仍是重要的发展方向，比如在野外的病原菌快速检测、药物敏感 SNP 快速检测等。在 2016 年，Collins 等基于 CRISPR-Cas9 特异性识别并切割靶标序列的特点，开发了快速廉价检测寨卡病毒(Zika)的方法。2017 年，张锋等利用 CRISPR-Cas13a 具有“旁路活性”(collateral effect)的特点建立了快速核酸探测的方法。“旁路活性”即 Cas13a 结合特异性靶标 RNA 后随机切割其他非靶标 RNA(这里将 RNA 分子设计成 RNA 荧光报告系统)；通过与等温扩增技术 RPA 相结合，以实现快速靶标 RNA 的检测；张锋团队把这种检测方法称为 SHERLOCK(Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing)。SHERLOCK 方法涉及到 RNA 模板的结合，因此如果需要针对 DNA 进行检测，则需要先将 DNA 转录为 RNA 模板以用于检测；鉴于 RNA 的不稳定性，该方法无疑会增加操作的困难程度。

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

发明内容

本发明的目的在于提供一种靶标核酸分子的检测方法。

本发明的另一目的是提供一种 Cas 蛋白在靶标核酸分子的检测方法中的用途。

在本发明第一方面，提供了一种试剂盒，包括向导 RNA、Cas 蛋白、核酸探针、缓冲液。

一种靶标核酸分子的检测方法，将含有待检靶标核酸分子的反应体系中，加入向导 RNA、Cas 蛋白、核酸探针、缓冲液，然后对其进行检测(尤其是通过检测荧光强度的方法进行检测)。

优选地，所述 Cas 蛋白为 Cas12a 或者具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白。

优选地，所述 Cas 蛋白为 Cas12a。

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

优选地，所述的 Cas12a 为 LbCas12a。

优选地，向导 RNA 是指引导 Cas 蛋白特异性结合靶标 DNA 的 RNA。

在另一优选例中，所述核酸探针为单链 DNA；所述的单链 DNA 优选为荧光标记的单链 DNA；所述的单链 DNA 优选为在 5' 端标记荧光基团 HEX 并在 3' 端标记淬灭基团 BHQ1 后的荧光探针。
10

在另一优选例中，所述核酸探针的检测方法优选为荧光检测法；所述的荧光检测方法优选为使用酶标仪或者荧光分光光度计进行检测的方法。

优选地，待检靶标核酸分子的反应体系中的待检靶标核酸分子经过扩增后得到。

15 优选地，本发明的检测方法可检测病原微生物、基因突变或特异靶标 DNA
在另一优选例中，所述的 Cas 蛋白包括 Cas12b (C2c1)。

在本发明的第二方面，提供了一种 Cas 蛋白在靶标核酸分子的检测方法中的用途，或用于制备一制剂，所述制剂用于检测靶标核酸分子。

在另一优选例中，靶标 DNA、向导 RNA 和 Cas 蛋白形成三元复合体时，该复
20 合物会切割体系中其它的单链 DNA 分子。

优选地，向导 RNA 是指引导 Cas 蛋白特异性结合靶标 DNA 的 RNA。

在本发明的第三方面，提供了一种试剂盒，包括向导 RNA、Cas 蛋白、核酸探针。
针。

25 在另一优选例中，所述试剂盒还包括缓冲液。

在本发明的第四方面，提供了一种用于检测靶标核酸分子的检测体系，该体系包含：

- (a) Cas 蛋白，所述 Cas 蛋白是 Cas12a 或者具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白；
- 30 (b) 向导 RNA，所述向导 RNA 引导 Cas 蛋白特异性结合于靶标核酸分子；和
- (c) 核酸探针，所述核酸探针为单链 DNA；

其中,所述的靶标核酸分子为靶标 DNA。

在另一优选例中,所述的检测体系还含有(d)缓冲液。

在另一优选例中,所述的检测体系还含有待检测的靶标核酸分子。

在另一优选例中,所述的待检测的靶标核酸分子在所述检测体系中的浓度为 1-100

- 5 拷贝/微升或 10^{15} 拷贝/微升, 较佳地 1-10 拷贝/微升, 更佳地 1-5 拷贝/微升。

在另一优选例中,所述的检测体系中,所述核酸探针与所述靶标核酸分子的摩尔比为 10^3 : 1 至 10^{14} : 1, 较佳地 10^4 : 1 至 10^7 : 1。

在另一优选例中,所述的靶标核酸分子的检测位点位于所述向导 RNA 的 PAM 序列下游第 1-12 位。

- 10 在另一优选例中,所述的向导 RNA 的长度为 15-30nt, 较佳地 15-18nt。

在另一优选例中,所述的靶标 DNA 包括 cDNA。

在另一优选例中,所述的靶标 DNA 选自下组: 单链 DNA、双链 DNA、或其组合。

在另一优选例中,所述的核酸探针带有荧光基团和淬灭基团。

在另一优选例中,所述的荧光基团和淬灭基团各自独立地位于所述核酸探针的 5'

- 15 端、3' 端和中部。

在另一优选例中,所述的核酸探针的长度为 3-300nt, 较佳地 5-100nt, 更佳地 6-50nt, 最佳地 8-20nt。

在另一优选例中,所述靶标核酸分子包括来源于选自下组的靶标核酸分子: 植物、动物、昆虫、微生物、病毒、或其组合。

- 20 在另一优选例中,所述的靶标 DNA 是人工合成或天然存在的 DNA。

在另一优选例中,所述的靶标 DNA 包括野生型或突变型的 DNA。

在另一优选例中,所述的靶标 DNA 包括由 RNA 逆转录或扩增而获得的 DNA, 如 cDNA 等。

在另一优选例中,所述的 Cas12a 选自下组: FnCas12a、AsCas12a、LbCas12a、

- 25 Lb5Cas12a、HkCas12a、OsCas12a、TsCas12a、BbCas12a、BoCas12a、Lb4Cas12a 或其组合; 更佳地,所述的 Cas12a 为 LbCas12a。

在另一优选例中,所述的具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白选自下组: Cas12b (即 C2c1)。

- 30 在另一优选例中,所述的 Cas12b 蛋白选自下组: AacCas12b (Alicyclobacillus acidoterrestris)、Aac2Cas12b (Alicyclobacillus acidiphilus)、AkCas12b (Alicyclobacillus kakegawensis)、AmCas12b (Alicyclobacillus

macrosporangioidus)、AhCas12b(*Alicyclobacillus herbarius*)、
AcCas12b(*Alicyclobacillus contaminans*)。

在另一优选例中，所述的核酸探针包括带有可检测标记的单链 DNA。

在另一优选例中，所述的单链 DNA 为荧光和生物素标记的单链 DNA。

5 在另一优选例中，所述的单链 DNA 为荧光标记的单链 DNA。

在另一优选例中，所述的单链 DNA 为在 5' 端标记荧光基团 HEX 并在 3' 端标记淬灭基团 BHQ1 后的荧光探针。

在本发明的第五方面，提供了一种用于检测靶标核酸分子的试剂盒，所述试剂盒包括：

10 i) 第一容器以及位于第一容器内的 Cas 蛋白，所述 Cas 蛋白是 Cas12a 或者具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白；

ii) 任意的第二容器以及位于第二容器内的向导 RNA，所述向导 RNA 引导所述 Cas 蛋白特异性结合于靶标核酸分子；

iii) 第三容器以及位于第三容器内的核酸探针；

15 iv) 任意的第四容器以及位于第四容器内的缓冲液；

其中，所述的靶标核酸分子为靶标 DNA。

在另一优选例中，所述的第一容器、第二容器、第三容器和第四容器中的任何二个、三个、或四个(或全部)可以是相同或不同容器。

在另一优选例中，所述的核酸探针带有荧光基团和淬灭基团。

20 在本发明的第六方面，提供了一种检测样本中是否存在靶标核酸分子的方法，其特征在于，包括以下步骤：

(a) 提供本发明第四方面所述的用于检测靶标核酸分子的检测体系，并且所述的检测体系还具有待检测的样本；和

25 (b) 检测所述检测体系中的核酸探针是否被 Cas 蛋白进行切割，所述的切割为旁路单链 DNA 的反式切割；

其中，所述核酸探针被 Cas 蛋白切割，则表示所述样本中存在靶标核酸分子；而所述核酸探针不被 Cas 蛋白切割，则表示所述样本中不存在靶标核酸分子。

在另一优选例中，所述的待检测的样本包括未经扩增的样本以及经过扩增(或核酸扩增)的样本。

30 在另一优选例中，所述的待检测的样本是经过扩增而获得的样本。

在另一优选例中，所述核酸扩增的方法选自下组：PCR 扩增、LAMP 扩增、RPA 扩

增、连接酶链式反应、分支 DNA 扩增、NASBA、SDA、转录介导扩增、滚环扩增、HDA, SPIA, NEAR, TMA 和 SMAP2。

在另一优选例中,所述的 PCR 包括高温 PCR、常温 PCR、低温 PCR。

在另一优选例中,所述方法用于检测靶位点处的核酸是否在 SNP、点突变、缺失、
5 和/或插入。

在另一优选例中,当所述的靶位点的上下游(-20nt 至+20nt 范围内,较佳地-15nt 至+15nt 范围内,更佳地-10nt 至+10nt 范围内)缺乏 PAM 序列时,采用引入 PAM 的引物进行核酸扩增。

在另一优选例中,所述的引入 PAM 的引物具有从 5' -3' 的式 I 结构:

10 P1-P2-P3 (I)

式中,

P1 为位于 5' 端的与靶标核酸分子的序列互补或非互补的 5' 区段序列;

P2 为 PAM 序列;

P3 为位于 3' 端的与靶标核酸分子的序列互补 3' 区段序列。

15 在另一优选例中,所述的 PAM 引物特异性结合于靶标核酸分子的上游或下游。

在另一优选例中,P1 的长度为 0-20nt。

在另一优选例中,P3 的长度为 5-20nt。

在另一优选例中,所述的 PAM 引物的长度为 18-50nt,较佳地 20-35nt。

在另一优选例中,所述的互补包括完全互补和部分互补。

20 在另一优选例中,所述的核酸扩增中使用至少一条引物含有 PAM 序列。

在另一优选例中,当所述的靶位点的上下游(-20nt 至+20nt 范围内,较佳地-15nt 至+15nt 范围内,更佳地-10nt 至+10nt 范围内)含有 PAM 序列时,则可采用含有或不含有 PAM 序列的引物,并且扩增出的扩增产物含有所述 PAM 序列。

在另一优选例中,在步骤(b)中的检测包括荧光检测法。

25 在另一优选例中,所述荧光检测法采用酶标仪或者荧光分光光度计进行检测。

在本发明的第七方面,提供了一种 Cas 蛋白的用途,它被用于制备基于旁路单链 DNA 切割检测靶标核酸分子的检测试剂或试剂盒,其中所述 Cas 蛋白是 Cas12a 或者具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白。

在另一优选例中,所述的 Cas12a 选自下组:FnCas12a、AsCas12a、LbCas12a、
30 Lb5Cas12a、HkCas12a、OsCas12a、TsCas12a、BbCas12a、BoCas12a、Lb4Cas12a 或其组合;更佳地,所述的 Cas12a 为 LbCas12a。

在另一优选例中，所述的具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白选自下组：Cas12b (or C2c1)。

在另一优选例中，所述的 Cas12b 蛋白选自下组：AacCas12b。

- 5 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

- 10 图 1 显示了 Cas12a 切割靶标单链 DNA 的 *cis* 切割（顺式切割）特性。
图 2 显示了 Cas12a 对靶标单链 DNA 切割时不依赖于切割双链时所需的 PAM 序列。
- 图 3 显示了 Cas12a 切割单链 DNA 的 *trans* 切割（反式切割）特性。
- 图 4 显示了测试的 10 种不同来源的 Cas12a，这些 Cas12a 都具有单链 DNA 的
15 顺式切割和反式切割活性。
- 图 5 通过 Cas12a 的单位点突变实验，鉴定了 Cas12a 中与单链 DNA 的顺式切割和反式切割活性可能相关的位点。
- 图 6 显示了 Cas12a 与 Cas12b（即 C2c1）单体及其与向导 RNA、靶标 DNA 的复合体的结构。
- 20 图 7 显示了不同 Cas12a 利用特异性双链 DNA 底物，以单链 DNA(HEX-N12-BHQ1)作为荧光检测探针，得到的荧光数值。阴性对照组不加特异性底物。
- 图 8 显示了基于靶标 DNA 扩增和 Cas12a 针对旁路单链 DNA 反式切割活性的 HOLMES 方法用于检测靶标 DNA 的流程示意图。
- 图 9 显示了直接利用 FnCas12a 或 LbCas12a，或结合 HOLMES 方法的靶标 DNA
25 的灵敏度测试。
- 图 10 显示了不同长度向导序列的 crRNA 结合 FnCas12a 或 LbCas12a 对不同单位点突变的靶标序列的 HOLMES 法荧光检测值。
- 图 11 利用 FAM 标记的荧光探针，选用 10 种 Cas12a 蛋白测试加入靶标单链 DNA 之后，FAM 标记的单链 DNA 探针是否被反式切割。
- 30 图 12 利用 HEX-N12-BHQ1 为探针，选用 10 种 Cas12a 蛋白测试加入靶标单链 DNA 之后，测试荧光值。
- 图 13 (A)利用 HEX、BHQ1 进行两端标记的单链 DNA 荧光探针显示了以 *gyrB* 基因片段为靶标序列，以不同浓度的纯培养大肠杆菌 MG1655 为正对照模板的 HOLMES 检测值。显示了随着大肠杆菌 MG1655 浓度的减少，其荧光响应值逐渐减少。(B)

不同地点环境中水样的检测值。

图 14 显示了 HOLMES 方法检测 SNP 的流程示意图, 以及 5 个 SNP 位点的荧光检测值。

图 15 显示了 HOLMES 方法检测 TP53 基因(癌症相关基因)中关键位点的荧光检测值。

图 16 显示了 HOLMES 方法检测 5 个 SNP 位点(痛风相关)的检测值。

图 17 显示了 HOLMES 方法检测 1 个 SNP 位点(痛风相关)的检测值, 其中样本为 21 名志愿者样本。

图 18 显示了本发明一个实例中的引物设计的方案, 可用于针对任意位点的 SNP 进行 HOLMES 检测。

图 19 利用 LAMP 和 HOLMES 联合检测体系中大肠杆菌。(A) 利用 LAMP 扩增大肠杆菌 *gyrB* 基因的电泳图。总共使用了两组引物 *gyrB*-1 和 *gyrB*-2 来进行扩增。*gyrB* 为大肠杆菌的特征基因。(B) 利用 HOLMES 检测体系来检测 LAMP 的扩增产物。阴性对照: 样本为无菌水, 使用 *gyrB*-1 扩增引物来扩增或检测 *gyrB* 基因的结果; *gyrB*-1: 样本为待检测大肠杆菌, 使用第一组 *gyrB* 基因扩增引物来扩增或检测 *gyrB* 基因的结果; *gyrB*-2: 样本为待检测大肠杆菌, 使用第二组 *gyrB* 基因扩增引物来扩增或检测 *gyrB* 基因的结果。

图 20 利用 LAMP 和 HOLMES 联合检测人 HEK293T 细胞的基因型。(A) 利用 LAMP 扩增人 HEK293T 细胞相应 SNP 检测模板的电泳图。阴性对照: 样本为无菌水, 使用 rs5082 扩增引物的扩增结果; rs5082: 样本为人 HEK293T 细胞的总基因组, 使用 rs5082 扩增引物的扩增结果; rs1467558: 样本为人 HEK293T 细胞的总基因组, 使用 rs1467558 扩增引物的扩增结果。(B) 利用 HOLMES 检测体系来检测 LAMP 的扩增产物。rs5082 位点的检测分别使用了 crRNA-G 和 crRNA-T 两种 crRNA 来进行检测(序列表 5); rs1467558 位点的检测分别使用了 crRNA-C 和 crRNA-T 两种 crRNA 来进行检测(序列表 5)。

图 21 利用 RPA 和 HOLMES 联合检测体系中大肠杆菌。(A) 利用 RPA 扩增大肠杆菌 *gyrB* 基因。总共使用了两组引物 *gyrB*-1 和 *gyrB*-2 来进行扩增。*gyrB* 为大肠杆菌的特征基因。(B) 利用 HOLMES 检测体系来检测 RPA 扩增的产物。阴性对照: 样本为无菌水, 使用 *gyrB*-1 扩增引物来扩增或检测 *gyrB* 基因的结果; *gyrB*-1: 样本为待检测大肠杆菌, 使用第一组 *gyrB* 扩增引物来扩增或检测 *gyrB* 基因的结果; *gyrB*-2: 样本为待检测大肠杆菌, 使用第二组 *gyrB* 扩增引物来扩增或检测 *gyrB* 基因的结果。

图 22 Cas12b 以单链 DNA 作靶标 DNA 的旁路单链 DNA 切割活力检测。在旁路切割反应完成后, 反应物经过 12% 尿素变性凝胶电泳分离, 并使用荧光成像系统进行检测。括号内的数字代表反应物的终浓度, 单位为 nM; 靶标 DNA 为 66nt 长度

的单链 DNA，用量为 50nM；单链 DNA 探针为 5' 端带有 FAM 标记的单链 DNA，用量为 50nM。从图中可以看出，在含有 Cas12b、向导 RNA、靶标 DNA 之后，FAM 标记的单链 DNA 被切成碎片，即 Cas12b 具有旁路单链 DNA 切割活力。

- 图 23 Cas12b 以单链 DNA 和双链 DNA 作靶标 DNA 的旁路单链 DNA 切割活力检测。
- 5 在旁路切割反应完成后，反应物利用荧光酶标仪进行检测。Cas12b 和向导 RNA 的用量均为 500nM；target DNA 为长 66nt 的单链 DNA 或双链 DNA，用量为 50nM；单链 DNA 探针为含荧光报告基团和淬灭基团的单链 DNA 探针（HEX-N12-BHQ1），用量为 500nM。从图中可以看出，无论是单链 DNA 模板还是双链 DNA 模板，在添加了 Cas12b 和向导 RNA 之后，均可以检测出旁路单链 DNA 切割的活力。
- 10 图 24 显示了 Cas12b 在结合了 LAMP 扩增之后针对低浓度的靶标 DNA 产生的旁路单链 DNA 反式切割活力。

具体实施方式

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

20

本发明人通过广泛而深入的研究，通过对 Cas 酶（如 Cas12a 和 Cas12b 酶）的切割特性的研究，开发了一种靶标核酸检测的技术方案。实验结果表明，采用上述技术方案成功地快速检测核酸，例如鉴定了水体中是否含有一定浓度的大肠杆菌等微生物，以及 SNP 基因型的快速鉴定。在此基础上完成了本发明。

25

术语

术语“向导 RNA”是指引导 Cas 蛋白特异性结合靶标 DNA 序列的 RNA。

术语“crRNA”是指 CRISPR RNA，是短的引导 Cas12a 到结合到靶标 DNA 序列的 RNA。

- 30 术语“CRISPR”是指成簇的、规律间隔的短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats），该序列是许多原核生物的免疫系统。

术语“Cas 蛋白”是指 CRISPR-associated 蛋白，它是 CRISPR 系统中的相关蛋白。

术语“Cas12a”（旧称“Cpf1”）是指 crRNA 依赖的内切酶，它是 CRISPR 系统分类中 V-A 型 (type V-A) 的酶。

- 5 术语“Cas12b”，“C2c1”可互换使用，是指 crRNA 依赖的内切酶，它是 CRISPR 系统分类中 V-B 型 (type V-B) 的酶。

术语“LAMP”是环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification)，是一种适用于基因诊断的恒温核酸扩增技术。

- 10 术语“PAM”是指前间区序列邻近基序 (protospacer-adjacent motif)，是 Cas12a 切割所必须，FnCas12a 的 PAM 为 TTN 序列，LbCas12a 的 PAM 为 TTTN 序列，AacCas12b 的 PAM 为 TTN。

本发明公开了一种靶标核酸分子的检测方法，将含有待检靶标核酸分子的反应体系中，向导 RNA、Cas 蛋白、核酸探针、缓冲液，然后对其进行荧光检测。

所述 Cas 蛋白为 Cas12a 或者 Cas12b；

- 15 所述的 Cas12a 优选为 FnCas12a、AsCas12a、LbCas12a、Lb5Cas12a、HkCas12a、OsCas12a、TsCas12a、BbCas12a、BoCas12a 或 Lb4Cas12a 中一种；所述的 Cas12a 优选为 LbCas12a。

所述的 Cas12b 优选为 AacCas12b、Aac2Cas12b、AkCas12b、AmCas12b、AhCas12b、AcCas12b。

- 20 向导 RNA 是指引导 Cas 蛋白特异性靶向 DNA 序列的 RNA。

待检靶标核酸分子的反应体系中的待检靶标核酸分子经过扩增后得到。

该检测方法可检测病原微生物、基因突变或特异靶标 DNA。

一种 Cas 蛋白在靶标核酸分子的检测方法中的用途。

- 25 靶标 DNA、向导 RNA 和 Cas 蛋白形成三元复合体时，该复合物会切割体系中其他的单链 DNA 分子。

向导 RNA 是指引导 Cas 蛋白特异性靶向 DNA 序列的 RNA。

本发明还提供了一种试剂盒，包括向导 RNA、Cas 蛋白、核酸探针。此外，本发明试剂盒还可包括缓冲液。

- 30 本发明提供了一种高特异性地快速检测靶标核酸分子的检测方法。一旦靶标 DNA (单链或者双链)、crRNA 和 Cas12a 蛋白形成三元复合体时，该复合物会切割

体系中其他的单链 DNA 分子。通过设计 crRNA 靶向靶标 DNA(需要检测的一段 DNA 序列);向检测体系中加入 crRNA 和 Cas12a 蛋白;当靶标 DNA 存在时, Cas12a 与 crRNA 以及靶标 DNA 形成三元复合体,同时该复合物行使其旁路切割的活性并切割带荧光信号标记的单链 DNA(两头分别连有发光基团和淬灭基团,被切断后发光基团可以发光),从而发出荧光。因此,通过检测荧光即可得知待检测体系中是否含有靶标 DNA 分子。使用本发明的方法可快速检测样品中是否含有特异 DNA 序列。通过与 PCR 技术的结合,该检测方法的灵敏度可以得到大幅度提高。本发明中的核酸探针优选为荧光探针。

10 HOLMES 条件测试:

本发明提供了基于 Cas12a、Cas12b 等 Cas12 酶在核酸检测中的应用。以下以 Cas12a 为例进行描述。

Cas12a 的选择: 根据研究, Cas12a 具有 *trans* 切割(反式切割)的活力,即一旦靶标 DNA、crRNA 和 Cas12a 蛋白形成三元复合体时,会切割体系中其他的单链 DNA(旁路单链 DNA)。根据这一原理设计了特异性 DNA 检测方法。首先,将旁路 DNA 设计成荧光探针,其组成是 12 nt 的随机序列,并在 5' 端标记荧光基团 HEX 在 3' 端标记淬灭基团 BHQ1 (HEX-N12-BHQ1)。当体系中含有靶标 DNA 片段时,将形成靶标 DNA、crRNA 和 Cas12a 蛋白的三元复合体,此时该探针即被切割,同时通过荧光检测仪的检测 HEX 荧光基团会发出荧光(激发光 535nm,发射光 556nm)。接着,测试了 10 种不同的 Cas12a,靶标序列为双链 DNA 如图 7 所示。可以看出,靶标双链 DNA 与各个 Cas12a 蛋白组成的复合体都能够实现 *trans* 切割活力。

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

SNP 测试: 接着,测试 HOLMES 方法是否可以检测 SNP 基因型。将 T1 作为靶标序列,将该位点的 PAM 突变或 1-18 位靶标序列分别进行单位点突变,比较不同长度的 crRNA 对非突变序列和突变序列之间测差异。

30 如图 10 所示,当靶标互补序列为 24nt 的 crRNA(crRNA-24nt)时,8-18 位的单位点突变与野生型差异不大,而 PAM 突变和 1-7 位点突变后,荧光值有明显的

下降。当截短 crRNA 长度，配对靶标序列长度为 18nt 时，突变位置 8-16nt 的荧光值相比靶标序列长度为 24nt 时有明显下降；当继续缩短为 16nt 或 17nt 时，突变后的靶标序列荧光值的下降幅度更加明显；而再缩短为 15nt 时，靶标序列和突变的荧光值针对该靶标序列比较弱，但是针对其他的靶标序列时其强度可能仍会较高，可以用于检测。综合来看，15nt、16nt 和 17nt 的 crRNA 对 SNP 的检测最为合适。

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

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

15

基于旁路切割活性进行核酸检测

本发明还提供了基于 Cas12 酶 (包括 Cas12a 或 Cas12b) 的旁路切割活性进行核酸检测的方法。

优选地，本发明的检测可针对 SNP 进行，尤其是先进行 PCR 扩增，然后进行检测。

参见图 18，其中给出了引物的设计方案。

情形 1. 当 SNP 位点附近有 PAM 位点，且依据该 PAM 位点设计的 guide 序列基础上合成的 crRNA 能够用于 HOLMES 检测。当用 HOLMES 方法进行检测时，其表现为背景信号比较低；针对同一条 guide 序列，不同 SNP 模板之间的信号差异比较大。

情形 2. 当 SNP 位点附近没有 PAM 位点，或者没有合适的 PAM 位点时，可以依据以上实验方案进行 PAM 位点的引入。

一种典型的步骤包括：在 SNP 位点附近设计引物，在引物上携带 PAM 位点，在 PAM 位点的 3' 端序列需要与模板 DNA 配对。另一端的引物没有特殊要求，只需要能够与模板 DNA 进行配对并能够进行 PCR 扩增即可。如图 18 所示，在进行 PCR 扩增之后，PAM 位点便能够被成功引入。

参见图 10,在本发明中,在设计引入PAM位点时,通常SNP位点位于crRNA guide序列5'端的前16个碱基的位置,较佳地1-14位,更佳地1-12位,更优选为1-11位或1-10位,最佳地1-8位或1-7位。

5 本发明的主要优点在于:

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

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

10 (3) 高效:本发明具有极高的灵敏度,可以检测到10aM浓度的DNA。

(4) 多用途:可检测不同的核酸样本,包括DNA样本和RNA样本。

(5) 简单:没有特殊复杂的步骤,如果制成试剂盒以及设定好程序,只需简单的加入样品等操作。

15 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人, 分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

20 本发明中所涉及的实验材料如无特殊说明均可从市售渠道获得。

材料

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

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

30

实施例1 Cas12a 蛋白检测可探测单链DNA靶标(探针FAM标记)

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

- 1、crRNA 制备:首先,通过用 T7-crRNA-F 与合成的寡核苷酸 T7-T1-24-R,如表 5 所示,进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4 μ M)在 1 $\times$ PCR 缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为 50 μ L,然后进行退火程序:在 95 $^{\circ}$ C 初始变性 5 分钟,然后从 95 $^{\circ}$ C 冷却至 20 $^{\circ}$ C,使用热循环仪每分钟降低 1 $^{\circ}$ C。使用 T7 高产量转录试剂盒合成 crRNA,并且反应在 37 $^{\circ}$ C 下进行过夜(约 16 h)。然后使用 RNA 纯化与浓缩试剂盒纯化 RNA,并用 NanoDrop 2000C(Thermo Fisher Scientific)定量,稀释为 10 μ M 浓度并保存到-80 $^{\circ}$ C 冰箱中。
- 2、Cas12a 反应:20 μ L 反应体系中,加入步骤 1 中纯化的 crRNA(0.5 μ M),Cas12a(0.25 μ M),靶标单链 DNA(target-T1-R)(0.01 μ M),核酸探针(N25-5' FAM)(0.01 μ M),缓冲液为 NEB buffer 3.1,0.5 μ LRNA 酶抑制剂。空白对照反应为其他成分都加,仅不加单链 DNA 靶标序列。在 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min,然后 98 $^{\circ}$ C 2 min 终止反应。
- 3、荧光检测:通过尿素-丙烯酰胺凝胶电泳(Urea-PAGE)电泳,然后用荧光发光成像仪检测。如图 11 所示,不同 Cas12a 对靶标检测效果不同。如 HkCas12a 等,不加靶标单链 DNA 也会造成探针的切割。而 LbCas12a 等,只在加入靶标单链 DNA 时,发生探针的切割,是较好的候选 Cas12a 蛋白。

20 实施例 2 Cas12a 蛋白检测可探测单链 DNA 靶标(探针有 HEX、BHQ1 双标记)

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

- 1、crRNA 制备:首先,通过用 T7-crRNA-F 与合成的寡核苷酸 T7-T1-24-R(表 5)进行退火来制备转录模板。具体是,将配对的寡核苷酸(4 μ M)在 1 $\times$ PCR 缓冲液(Transgen Biotech)中退火,总体积为 50 μ L,然后进行退火程序:在 95 $^{\circ}$ C 初始变性 5 分钟,然后从 95 $^{\circ}$ C 冷却至 20 $^{\circ}$ C,使用热循环仪每分钟降低 1 $^{\circ}$ C。使用 T7 高产量转录试剂盒合成 crRNA,并且反应在 37 $^{\circ}$ C 下进行过夜(约 16 h)。然后使用 RNA 纯化与浓缩试剂盒纯化 RNA,并用 NanoDrop 2000C 定量,稀释为 10 μ M 浓度并保存到-80 $^{\circ}$ C 冰箱中。
- 2、Cas12a 反应:20 μ L 反应体系中,加入步骤 1 中纯化的 crRNA(0.5 μ M),Cas12a(0.25 μ M),靶标单链 DNA(target-T1-R)(0.01 μ M),荧光探针

(HEX-N12-BHQ1, 即 12nt 的单链 DNA, 其 5' 端为 HEX 标记, 3' 端为 BHQ1 标记) (0.5 μ M), 缓冲液为 NEB buffer 3.1, 0.5 μ L RNA 酶抑制剂。对照反应其他成分都加, 仅不加单链 DNA 靶标序列。在 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 然后 98 $^{\circ}$ C 2 min 终止反应。

- 5 3、荧光检测: 将灭活的 20 μ L 反应液加入 96 孔板中, 然后用酶标仪检测(激发光 535 nm, 发射光 556 nm)。如图 12 所示, 不同 Cas12a 对靶标检测效果不同。如 HkCas12a 等, 不加靶标单链 DNA 也会造成探针的切割。而 FnCas12a 等, 只在加入靶标单链 DNA 时, 发生探针的切割, 是较好的候选 Cas12a 蛋白。

10 实施例 3 Cas12a 蛋白检测可探测双链 DNA 靶标

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

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

- 20 2、Cas12a 反应: 20 μ L 反应体系中, 加入步骤 1 中纯化的 crRNA(0.5 μ M), Cas12a(0.25 μ M), 靶标双链 DNA(target-T1, 由引物 target-T1-F 与引物 target-T1-R 退火后获得)(0.01 μ M), 荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5 μ M), 缓冲液为 NEB buffer 3.1, 0.5 μ L RNA 酶抑制剂。在 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 然后 98 $^{\circ}$ C 2 min 终止反应。

- 25 3、荧光检测: 将灭活的 20 μ L 反应液加入 96 孔板中, 然后用酶标仪检测(激发光 535 nm, 发射光 556 nm)。如图 7 所示, 不同 Cas12a 对靶标检测效果不同。而 LbCas12a 等, 只在加入靶标双链 DNA 时, 发生探针的切割, 是较好的候选 Cas12a 蛋白。

30 实施例 4 FnCas12a 与 LbCas12a 测试不同浓度靶标

选用 target-T1 作为靶标 DNA, 然后梯度稀释成不同浓度, 测试 FnCas12a 与

LbCas12a 对其响应灵敏度。为了增加灵敏度，加入了 PCR 扩增步骤。

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

2、PCR 扩增(可选)：以含 target-T1 靶标的质粒(pUC18-T1)作为模板，梯度稀释，进行 PCR 反应。每个反应体系总体积为 20 μ L，用 0.25 μ M 的 M13F-47、M13R-48 为引物(表 4)，PCR 反应用高保真酶 KOD FX (ToYoBo)。PCR 反应程序为，95 $^{\circ}$ C 2 min，然后开始 35 个循环 98 $^{\circ}$ C 10 s，60 $^{\circ}$ C 15 s，68 $^{\circ}$ C 10 s。PCR 完成后，PCR 扩增产物直接用于 Cas12a 反应。

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

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

实施例 5 FnCas12a 与 LbCas12a 测试单位点突变靶标

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

1、crRNA 制备：首先，通过用 T7-crRNA-F 与合成的寡核苷酸 T7-T1-24-R、T7-T1-15-R、T7-T1-16-R、T7-T1-17-R、T7-T1-18-R(表 5)分别进行退火来制备转录模板。具体是，将配对的寡核苷酸(4 μ M)在 1 $\times$ PCR 缓冲液(Transgen Biotech)中退火，总体积为 50 μ L，然后进行退火程序：在 95 $^{\circ}$ C 初始变性 5 分钟，然后从 95 $^{\circ}$ C 冷却至 20 $^{\circ}$ C，使用热循环仪每分钟降低 1 $^{\circ}$ C。使用 T7 高产量转录试剂

盒合成 crRNA，并且反应在 37 °C 下进行过夜(约 16 h)。然后使用 RNA 纯化与浓缩试剂盒纯化 RNA，并用 NanoDrop 2000C 定量，稀释为 10 μM 浓度并保存到-80 °C 冰箱中。

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

3、Cas12a 反应：20 μL 反应体系中，加入步骤 1 中纯化的 crRNA(0.5 μM)，FnCas12a 或 LbCas12a(0.25 μM)，PCR 产物 1 μL，荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5 μM)，缓冲液为 NEB buffer 3.1，0.5 μL RNA 酶抑制剂。在 37 °C 反应 15 min，然后 98 °C 2 min 终止反应。

4、荧光检测：将灭活的 20 μL 反应液加入 96 孔板中，然后用酶标仪检测(激发光 535 nm，发射光 556 nm)。如图 10 所示，当靶标互补序列为 24nt 的 crRNA(crRNA-24nt)时，8-18 位的单位点突变与野生型差异不大，而 PAM 突变和 1-7 位点突变后，荧光值有明显的下降。当截短 crRNA 长度，配对靶标序列长度为 18nt 时，突变位置 8-16nt 的荧光值相比 24nt 有明显下降，当 16nt 或 17nt 时，突变后的靶标序列荧光值下降更加明显，而 15nt 时，靶标序列和突变的荧光值则都已很弱，但是针对其他的靶标序列时其强度可能仍会较高，可以用于检测。综合来看，15nt、16nt 和 17nt 的 crRNA 对 SNP 的检测最为合适。

实施例 6 环境水体中大肠杆菌等微生物测试

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

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

μM 浓度并保存到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

2、PCR 扩增：正对照样品为大肠杆菌 MG1655 培养至 OD_{600} 约为 0.5 时，分别以 10 倍为梯度稀释后作为模板，样品为环境水(包括自来水和环境中的泥水)。每个反应体系总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ ，用 $0.25\text{ }\mu\text{M}$ 的引物 gyrB-F 与 gyrB-R(表 4)，PCR 反
5 应用高保真酶 KOD FX (ToYoBo)。PCR 反应程序为， $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min，然后开始 35 个循环 $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s， $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s， $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s。PCR 完成后，PCR 产物直接用于 Cas12a 反应。

3、Cas12a 反应： $20\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系中，加入步骤 1 中纯化的 crRNA($0.5\text{ }\mu\text{M}$)，LbCas12a($0.25\text{ }\mu\text{M}$)，PCR 产物 $1\text{ }\mu\text{L}$ ，荧光探针(HEX-N12-BHQ1)($0.5\text{ }\mu\text{M}$)，缓
10 冲液为 NEB buffer 3.1， $0.5\text{ }\mu\text{L}$ RNA 酶抑制剂。在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min，然后 $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min 终止反应。

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

15

实施例 7 人 SNP 测试

SNP 测试选用了人 SNP 的 5 个位点，分别为 rs5082，rs1467558，rs2952768，rs4363657，rs601338，测试 HOLMES 方法的可行性。

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

2、PCR 扩增：反应体系总体积为 $20\text{ }\mu\text{L}$ ，用 $0.25\text{ }\mu\text{M}$ 的引物(表 4)， 1 ng 的人基因组 (HEK293T)或直接刮取口腔上皮粘膜作为模板，PCR 反应用高保真酶 KOD FX (ToYoBo)。PCR 反应程序为， $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min，然后开始 35 个循环 $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s， $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s， $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s。PCR 完成后，直接用于 Cas12a 反应。(其中引物
30 1-rs5082-F-T，2-rs1467558-F-T，3-rs2952768-R-C 直接引入 SNP 的相应突变产物)

3、Cas12a 反应：20 μ L 反应体系中，加入相应的 crRNA (1 μ M)，LbCas12a (0.5 μ M)，PCR 产物 1 μ L，荧光探针 (HEX-N12-BHQ1) (0.5 μ M)。37 $^{\circ}$ C 反应 15 min，然后 98 $^{\circ}$ C 2 min 终止反应。

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

实施例 8 癌症相关基因测试

10 选用了 TP53 基因作为测试基因，其中在人 T24 细胞中，TP53 基因有一个无义突变，导致该基因失活。分别测试了该位点基因正常的细胞 (HEK293T)，个人的基因测试，以及突变细胞 T24。

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

2、PCR 扩增：反应体系总体积为 20 μ L，用 0.25 μ M 的引物 34-TP53-T24-F，34-TP53-T24-R (表 4)，1 ng 的人基因组 (HEK293T，T24) 或直接刮取口腔上皮粘膜作为模板，PCR 反应用高保真酶 KOD FX (ToYoBo)。PCR 反应程序为，95 $^{\circ}$ C 2 min，然后开始 35 个循环 98 $^{\circ}$ C 10 s，60 $^{\circ}$ C 15 s，68 $^{\circ}$ C 10 s。PCR 完成后，直接用于 Cas12a 反应。

3、Cas12a 反应：20 μ L 反应体系中，加入相应的 crRNA (1 μ M)，LbCas12a (0.5 μ M)，PCR 产物 1 μ L，荧光探针 (HEX-N12-BHQ1) (0.5 μ M)。37 $^{\circ}$ C 反应 15 min，然后 98 $^{\circ}$ C 2 min 终止反应。

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

高。

实施例 9 人 SNP 测试(痛风相关基因)

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

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

2、PCR 扩增: 反应体系总体积为 20 μ L, 用 0.25 μ M 的引物(表 4), 1 ng 的人基因组 (HEK293T)或直接刮取口腔上皮粘膜作为模板, PCR 反应用高保真酶 KOD
15 FX (ToYoBo)。PCR 反应程序为, 95 $^{\circ}$ C 2 min, 然后开始 35 个循环 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 10 s。PCR 完成后, 直接用于 Cas12a 反应。(其中引物 1-rs5082-F-T, 2-rs1467558-F-T, 3-rs2952768-R-C 直接引入 SNP 的相应突变产物)

3、Cas12a 反应: 20 μ L 反应体系中, 加入相应的 crRNA(1 μ M), LbCas12a(0.5
20 μ M), PCR 产物 1 μ L, 荧光探针(HEX-N12-BHQ1)(0.5 μ M)。37 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 然后 98 $^{\circ}$ C 2 min 终止反应。

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

实施例 10 试剂盒 SNP 测试志愿者临床样本(痛风相关基因)

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

30 1、试剂盒制备: 首先, 通过用 T7-crRNA-F 与合成的寡核苷酸(表 5)进行退火来制备转录模板。具体是, 将配对的寡核苷酸(4 μ M)在 1 $\times$ PCR 缓冲液(Transgen

- Biotech)中退火,总体积为 50 μ L, 然后进行退火程序: 在 95 $^{\circ}$ C 初始变性 5 分钟, 然后从 95 $^{\circ}$ C 冷却至 20 $^{\circ}$ C, 使用热循环仪每分钟降低 1 $^{\circ}$ C。使用 T7 高产量转录试剂盒合成 crRNA, 并且反应在 37 $^{\circ}$ C 下进行过夜(约 16 h)。使用 RNA Clean & ConcentratorTM-5 (Zymo Research)纯化 RNA, 并用 NanoDrop 2000C 定量, 稀
- 5 释为 10 μ M 浓度。
- 2、96 孔板 PCR 预混: 在 19 μ L 体系中, 加入 PCR 反应所需试剂, 引物用 41-rs1014290-F 与 41-rs1014290-R。
- 3、荧光检测 96 孔板预混: 在 19 μ L 体系中, 加入 crRNA(1 μ M), LbCas12a(0.5 μ M), 荧光探针 (HEX-N12-BHQ1) (0.5 μ M), 加入到 96 孔板中。
- 10 4、PCR 扩增: 在 PCR 预混的 96 孔板中加入志愿者基因组 DNA, 然后进行 PCR 反应。PCR 反应程序为, 95 $^{\circ}$ C 2 min, 然后开始 35 个循环 98 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 10 s。
- 5、Cas12a 反应: 取 1 μ L PCR 反应液, 加入到已预混的荧光检测 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 然后 98 $^{\circ}$ C 2 min 终止反应。
- 15 6、荧光检测: 用酶标仪检测(激发光 535 nm, 发射光 556 nm)。如图 17, 由于基因型 A:A 的人群具有更高的痛风风险, 因此除了 5,7,9 号志愿者外, 其他人为 A:G 或 G:G 基因型, 因此需更加注意痛风的风险。

实施例 11 用 LAMP 结合 Cas 蛋白检测环境水体中大肠杆菌等微生物

- 20 选用大肠杆菌 gyrB 基因作为检测目标, 间接测试水体中是否存在大肠杆菌等微生物。
- 1、crRNA 制备: 首先, 通过用 T7-crRNA-F 与合成的寡核苷酸 T7-crRNA-gyrB(表 5)进行退火来制备转录模板。具体是, 将配对的寡核苷酸(4 μ M)在 1 $\times$ Taq DNA polymerase 反应缓冲液(Transgen Biotech)中退火, 总体积为 50 μ L, 然后进行
- 25 退火程序: 在 95 $^{\circ}$ C 初始变性 5 分钟, 然后从 95 $^{\circ}$ C 冷却至 20 $^{\circ}$ C, 使用热循环仪每分钟降低 1 $^{\circ}$ C。使用 T7 高产量转录试剂盒合成 crRNA, 并且反应在 37 $^{\circ}$ C 下进行过夜(约 16h)。然后使用 RNA 纯化与浓缩试剂盒纯化 RNA, 并用 NanoDrop 2000C 定量, 最终稀释为 10 μ M 浓度并保存到-80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。
- 2、LAMP 扩增: 以无菌水和含大肠杆菌的污染液体分别作为阴性对照和待检测
- 30 样品。每个反应体系总体积为 25 μ L, 用引物 1.6 μ M 的 LAMP-FIP 与 LAMP-BIP、0.2 μ M 的 LAMP-F3 与 LAMP-B3、0.4 μ M 的 LAMP-LoopF 与 LAMP-LoopB, LAMP 反

应所用的试剂盒为 WarmStart® LAMP Kit (NEB)。LAMP 反应程序为, 65 °C 30 min。LAMP 完成后, 80 °C 10 min 灭火, 然后直接用于 Cas12a 反应。

3、Cas12a 反应: 20 μ L 反应体系中, 加入步骤 1 中纯化的 crRNA (0.5 μ M), Cas12a (0.25 μ M), LAMP 产物 1 μ L, 荧光探针 (HEX-N12-BHQ1) (0.5 μ M), 缓冲液为 NEB buffer 3.1, 0.5 μ L RNA 酶抑制剂。在 37°C 反应 15 min。

4、荧光检测: 将灭活的 20 μ L 反应液加入 96 孔板中, 然后用酶标仪检测 (激发光 535nm, 发射光 556nm)。结果如图 19。

实施例 12 用 LAMP 扩增结合 Cas 蛋白检测 SNP

10 1、crRNA 制备: 首先, 通过用 T7-crRNA-F 与合成的寡核苷酸 T7-crRNA-rs5082-T/T7-crRNA-rs5082-G/T7-crRNA-rs1467558-T/T7-crRNA-rs1467558-C (表 5) 进行退火来制备转录模板。具体是, 将配对的寡核苷酸 (4 μ M) 在 1 $\times$ Taq DNA polymerase 反应缓冲液 (Transgen Biotech) 中退火, 总体积为 50 μ L, 然后进行退火程序: 在 95°C 初始变性 5 分钟, 然后从 95°C 冷却至 20°C, 使用热循环仪每分钟降低 1°C。使用 T7 高产量转录试剂盒合成 crRNA, 并且反应在 37°C 15 下进行过夜 (约 16h)。然后使用 RNA 纯化与浓缩试剂盒纯化 RNA, 并用 NanoDrop2000C 定量, 最终稀释为 10 μ M 浓度并保存到 -80°C 冰箱中备用。

2、LAMP 扩增: 以人基因组 HEK293T 作为样品。每个反应体系总体积为 25 μ L, 用引物 1.6 μ M 的 LAMP-FIP 与 LAMP-BIP、0.2 μ M 的 LAMP-F3 与 LAMP-B3、0.4 μ M 20 的 LAMP-LoopF 与 LAMP-LoopB, LAMP 反应用 WarmStart® LAMP Kit (NEB)。LAMP 反应程序为, 65 °C 30 min。LAMP 完成后, 80 °C 10 min 灭火, 然后直接用于 Cas12a 反应。

3、Cas12a 反应: 20 μ L 反应体系中, 加入步骤 1 中纯化的 crRNA (0.5 μ M), Cas12a (0.25 μ M), LAMP 产物 1 μ L, 荧光探针 (HEX-N12-BHQ1) (0.5 μ M), 缓冲液为 NEB buffer 3.1, 0.5 μ L RNA 酶抑制剂。在 37°C 反应 15 min。25

4、荧光检测: 将灭活的 20 μ L 反应液加入 96 孔板中, 然后用酶标仪检测 (激发光 535nm, 发射光 556nm)。结果如图 20。

实施例 13 用 RPA 扩增结合 Cas 蛋白检测环境水体中大肠杆菌等微生物

30 选用大肠杆菌 gyrB 基因作为检测目标, 间接测试水体中是否存在大肠杆菌等微生物。

- 1、crRNA 制备: 首先, 通过用 T7-crRNA-F 与合成的寡核苷酸 T7-crRNA-gyrB(表 5) 进行退火来制备转录模板。具体是, 将配对的寡核苷酸(4 μ M) 在 1 $\times$ PCR 缓冲液 (Transgen Biotech) 中退火, 总体积为 50 μ L, 然后进行退火程序: 在 95 $^{\circ}$ C 初始变性 5 分钟, 然后从 95 $^{\circ}$ C 冷却至 20 $^{\circ}$ C, 使用热循环仪每分钟降低 1 $^{\circ}$ C。使用 T7
- 5 高产量转录试剂盒合成 crRNA, 并且反应在 37 $^{\circ}$ C 下进行过夜(约 16h)。然后使用 RNA 纯化与浓缩试剂盒纯化 RNA, 并用 NanoDrop2000C 定量, 最终稀释为 10 μ M 浓度并保存到-80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。
- 2、RPA 扩增: 以无菌水和含大肠杆菌污染液体分别作为阴性对照和待检测样品。每个反应体系总体积为 25 μ L, 用引物 0.5 μ M 的 RPA-gyrB-F(或 RPA-gyrB-F2) 与 RPA-gyrB-R2, RPA 反应用 TwistAmp[®] Basic 试剂盒(TwistDX)。RPA 反应程序为, 37 $^{\circ}$ C 30 min。RPA 完成后, 80 $^{\circ}$ C 10 min 灭火, 然后直接用于 Cas12a 反应。
- 3、Cas12a 反应: 20 μ L 反应体系中, 加入步骤 1 中纯化的 crRNA (0.5 μ M), Cas12a (0.25 μ M), RPA 产物 1 μ L, 荧光探针(HEX-N12-BHQ1) (0.5 μ M), 缓冲液为 NEB buffer 3.1, 0.5 μ L RNA 酶抑制剂。在 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min。
- 15 4、荧光检测: 将灭活的 20 μ L 反应液加入 96 孔板中, 然后用酶标仪检测 (激发光 535nm, 发射光 556nm)。结果如图 21。

实施例 14: Cas12b 具有旁路切割活力

- 1、向导 RNA(sgRNA) 的制备
- 20 首先构建以 pUC18 为质粒骨架构建质粒 pUC18-向导 RNA-T1, 该质粒在 pUC18 上插入了 T7 启动子及用于转录向导 RNA 的模板 DNA 序列(注: 此模板转录出的向导 RNA 靶向一个在本研究中称为 T1 的序列)。方法是以 pUC18 质粒为模板, pUC18-1-F 和 pUC18-1-R 为引物, 先进行一轮 PCR, T4 DNA Ligase 连接 PCR 产物, 转化入 DH10b 中, 经测序得到正确克隆, 称之为 pUC18-向导 RNA-T1-pre。再以
- 25 pUC18-向导 RNA-T1-pre 为模板, pUC18-2-F 和 pUC18-2-R 为引物, 进行第二轮 PCR, 同样地方法连接 PCR 产物并转化, 最终得到测序正确的质粒 pUC18-向导 RNA-T1。
- 接着, 以质粒 pUC18-向导 RNA-T1 为模板, 使用 T7 高产量转录试剂盒(Thermo) 合成向导 RNA, 反应在 37 $^{\circ}$ C 下过夜进行(12-16 h)。
- 最后, 在转录体系中加入 DNase I (每 50 μ L 转录体系加 2 μ L DNase I), 37
- 30 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 消除质粒 DNA, 并使用 RNA 纯化与浓缩试剂盒纯化 RNA, 再用 NanoDrop 2000C 定量, 稀释为 10 μ M 浓度并保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

2、靶标 DNA 的制备

(1)若靶标 DNA 为单链，直接合成一条长 66 bp 的寡核苷酸作 target DNA(target-T1-R)，其中包含向导 RNA 所识别的 20 bp 靶标序列(T1)。

- (2)若靶标 DNA 为双链，直接合成两条互补的长 66 bp 的寡核苷酸 (target-T1-F; target-T1-R)，其中包含向导 RNA 所识别的 20bp 靶标序列(T1)。将两条寡核苷酸退火，得到短的 target DNA。具体是，将配对的寡核苷酸(1 μ M)在 1 $\times$ PCR 缓冲液(Transgen Biotech)中退火，总体积为 20 μ L，然后进行退火程序：初始在 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟，然后从 95 $^{\circ}$ C 冷却至 20 $^{\circ}$ C，使用热循环仪每分钟降低 1 $^{\circ}$ C。

3、Cas12b 反应

(1)向导 RNA 退火：将向导 RNA 稀释至适当浓度(10 μ M)，置 PCR 仪中退火。退火程序：75 $^{\circ}$ C 变性 5 min，然后从 75 $^{\circ}$ C 冷却至 20 $^{\circ}$ C，每分钟降低 1 $^{\circ}$ C。

(2)向导 RNA 与 C2c1 孵育：将退火完成的向导 RNA 与等摩尔浓度的 C2c1 混合，于 30 $^{\circ}$ C 放置 20-30min。

- (3)Cas12b 反应：在 20 μ L 反应体系中，加入步骤(2)孵育的向导 RNA 与 C2c1 的混合物(两者终浓度均为 250 μ M 或 500 μ M)，target DNA(终浓度 50 nM)，FAM 标记的寡核苷酸(target-DNMT1-3-R-FAM-5')或荧光淬灭探针(HEX-N12-BHQ1,终浓度 500 nM)，以及 2 μ L 的 10 $\times$ NEB Buffer 3.1 和 0.5 μ L 的 RNA 酶抑制剂(40 U/ μ L)。混匀后，于 48 $^{\circ}$ C 反应 30 min。之后，置 PCR 仪中 98 $^{\circ}$ C 加热 5 min 灭活。

4、尿素变性凝胶电泳法检测 Cas12b 的 trans 切割（反式切割）活力

将灭活的 20 μ L 反应液利用尿素变性凝胶电泳法进行电泳分离，然后使用荧光成像系统 ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare)进行成像。结果如图 22。

5、荧光酶标仪法检测 Cas12b 的 trans 切割（反式切割）活力

- 将灭活的 20 μ L 反应液加入 96 孔板中，用酶标仪检测（激发光 535nm，发射光 556 nm）。结果如图 23。

实施例 15：Cas12b 的 *trans* 反应（反式切割）的灵敏度测试

- 通过对荧光探针(HEX-N12-BHQ1)被激发的荧光强度进行检测，确定 Cas12b 行使反式切割活力需要的靶标 DNA 浓度，即 Cas12b 反式切割反应的灵敏度。

1、向导 RNA 的制备

首先, 以 pUC18-向导 RNA-T1 为模板, 向导 RNA-DNMT1-3-F 和向导 RNA-DNMT1-3-R 为引物, 通过 PCR 将向导 RNA 中靶向 T1 这一 target DNA 的 20 个碱基替换为靶向 DNMT1-3 的向导 RNA, 得到另一质粒 pUC18-向导 RNA-DNMT1-3。

然后, 以质粒 pUC18-向导 RNA-DNMT1-3 为模板, 使用 T7 高产量转录试剂盒 (Thermo) 合成向导 RNA, 反应在 37 °C 下过夜进行 (12-16h)。

最后, 在转录体系中加入 DNase I (每 50 μ L 转录体系加 2 μ L DNase I), 37 °C 水浴 30 min, 消除质粒 DNA, 并使用 RNA 纯化与浓缩试剂盒纯化 RNA, 再用 NanoDrop 2000C 定量, 于 -80 °C 冰箱中保存备用。

2、靶标 DNA 的制备

对于靶标 DNA, 第一种是直接加入 Cas12b 的反应体系, 不经过扩增。方法如下:

(1) 若靶标 DNA 为单链, 直接合成一条长 50 bp 的寡核苷酸作 target DNA (DNMT1-3 (TTC PAM) -R), 其中包含向导 RNA 所识别的 20bp 靶标序列 (DNMT1-3)。

(2) 若靶标 DNA 为双链, 直接合成两条互补的长 50 bp 的寡核苷酸 (DNMT1-3 (TTC PAM) -F; DNMT1-3 (TTC PAM) -R), 其中包含向导 RNA 所识别的 20 bp 靶标序列 (DNMT1-3)。将两条寡核苷酸退火, 得到短的 target DNA。具体是, 将配对的寡核苷酸 (2 μ M) 在 1 $\times$ PCR 缓冲液 (Transgen Biotech) 中退火, 总体积为 20 μ L, 然后进行退火程序: 初始在 95 °C 变性 5 分钟, 然后从 95 °C 冷却至 20 °C, 使用热循环仪每分钟降低 1 °C。

(3) 将单链或双链靶标 DNA 梯度稀释为 2 μ M, 0.2 μ M, 0.02 μ M, 0.002 μ M, 0.0002 μ M 备用。

第二种是将含靶标序列 (DNMT1-3) 的片段插入一质粒载体中, 通过 LAMP 反应扩增。

(1) 使用 Transgen 公司的 pEasy-Blunt Zero Cloning Kit, 将含靶标序列 (DNMT1-3) 片段插入 pEasy-Blunt Zero Cloning Vector, 经测序验证后获得正确的克隆。

(2) LAMP 扩展反应

以上述质粒作为模板, 进行 LAMP 扩增反应, 模板分别加入 0, 1 nM, 0.1 nM, 10 倍梯度稀释至 10^{-11} nM。每个反应体系总体积为 25 μ L, 用引物 1.6 μ M 的 LAMP-DNM-FIP 与 LAMP-DNM-BIP、0.2 μ M 的 LAMP-DNM-F3 与 LAMP-DNM-B3、0.4 μ M 的 LAMP-DNM-LoopF 与 LAMP-DNM-LoopB, LAMP 反应所用的试剂盒为 WarmStart®

LAMP Kit (NEB)。LAMP 反应程序为, 65 °C 30 min。LAMP 完成后, 80 °C 10 min 灭火, 然后直接用于 Cas12b 反应。

3、Cas12b 反应

(1) 向导 RNA 退火: 将向导 RNA 稀释至适当浓度 (5 μ M), 置 PCR 仪中退火。退火程序: 75 °C 变性 5 min, 然后从 75 °C 冷却至 20 °C, 每分钟降低 1 °C。

(2) 向导 RNA 与 Cas12b 孵育: 将退火完成的向导 RNA 与等摩尔浓度的 Cas12b 混合, 于 30 °C 放置 20-30min。

(3) Cas12b 反应: 在 20 μ L 反应体系中, 加入步骤 (2) 孵育的向导 RNA 与 Cas12b 的混合物 (两者终浓度均为 250 μ M), 1 μ L 的 target DNA 或 1 μ L 的 LAMP 产物, 荧光探针 (HEX-N12-BHQ1) (终浓度 500nM), 以及 2 μ L 的 10 $\times$ NEB Buffer 3.1 和 0.5 μ L 的 RNA 酶抑制剂 (40 U/ μ L)。混匀后, 于 48°C 反应 30min。之后, 置 PCR 仪中 98 °C 加热 5 min 灭火。

4、荧光酶标仪法检测 Cas12b 的 trans 切割 (反式切割) 活力

将灭活的 20 μ L 反应液加入 96 孔板中, 用酶标仪检测 (激发光 535nm, 发射光 556nm)。结合了 LAMP 扩增之后, Cas12b 可以针对低至 10 aM 浓度的靶标 DNA 产生很显著的旁路单链 DNA 反式切割活力。结果如图 24。

Cas12a 切割靶标单链 DNA 的顺式切割特性:

首先, 为了测试 Cas12a 的单链 DNA 切割特征, 设计了几个靶向短的单链 DNA (DNMT1-3) 的 crRNA (表 1), 其在 3' 末端用 5(6)-羧基荧光素 (FAM) 标记。在 Fncas12a 切割后, 通过变性尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳 (尿素 PAGE) 分析反应产物。发现通过 Cas12a 的单链 DNA 切割是程序化的, 即切割位点为从第一个与 crRNA 引导序列配对的靶标序列的 3' 端碱基开始向 5' 端计数的靶标序列第 22 个碱基附近 (第 21 至第 23 个碱基), 如图 1A 和 1C 所示。Cas12a 的双链 DNA 需要 PAM 序列, 而单链 DNA 切割不需要 PAM 序列 (图 1A, 1B 与图 2), 这与 Cas9 介导的单链 DNA 切割相似。然而, Cas12a 介导的单链 DNA 切割活性依赖于 crRNA 中的茎环结构, 如图 1A 所示, 而 Cas9 仍然表现出对仅具有 20-nt 互补 RNA 序列的单链 DNA 的仍有弱切割活性。crRNA 的茎环结构对于稳定 Cas12a 的结构是重要的, 其为 crRNA 环结构对 Cas12a 的单链 DNA 切割的必要性的原因。进一步测试 Cas12a 的单链 DNA 切割位点是否可以通过更短的引导序列 crRNA, 从而使得切割在识别位点之外。在引导序列长度为 16 nt, 18 nt 和 20 nt 时, 所有这些 crRNA 都导致在靠近第 22 个碱基处通过 Cpf1 切割, 如图 1B 与 1D 所示, 意味着切割位点是识别

位点之外的 4 nt, 2 nt 或 0 nt。接着, 测试了 Cas12a 对不同底物的切割效率, 分别用了双链 DNA 和单链 DNA 底物, 如图 1F 所示。类似于 Cas9 切割情况, 单链 DNA 切割比双链 DNA 切割更慢, 如图 1E 至 1G 所示。这些结果表明 Cas12a 的单链 DNA 识别与切割的机制可能不同于双链 DNA, 是一种效率较低的不依赖于 PAM 的识别切割方式; PAM 序列为 Cas12a 对靶标双链 DNA 的识别和/或切割起到加速的作用。

Cas12a 切割单链 DNA 的反式切割特性:

当靶标单链 DNA 在 3' 末端进行标记时, Cas12a 切割第 22 个碱基附近, 如图 1 所示。然而, 当标记在 5' 末端时, 没有观察到预测大小的切割产物条带, 但是产生短 (< 6 nt) FAM 标记的产物, 如图 3B 所示。通过详细的实验, 一旦三元复合体 Cas12a/crRNA/靶标单链 DNA 形成, 5' -末端标记的靶标单链 DNA (DNMT1-3) (表 1) 被切割并产生短 FAM 标记的产物, 如图 3C 所示。此外, 三元复合体还切割任何其他反应体系中与 crRNA 没有互补性序列的单链 DNA (即旁路单链 DNA), 如图 3C 和图 3D 所示。将这种切割现象为反式切割, 区别于可程序化的顺式切割。当靶标单链 DNA 在 3' -末端标记时, 也观察到了反式切割, 但留下了许多顺式切割产物, 如图 3B 所示, 这可能是由于 Cas12a/crRNA/靶标单链 DNA 形成了复合物, 并保护了靶标单链 DNA, 以使其标记的 3' -末端免于暴露于三元复合物的核酸酶活性位点, 这些切割过程可以用图 3A 显示。

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

Cas12a 切割单链 DNA 的顺式和反式关键位点与机理

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

接着, 当 FnCas12a 中的核酸内切酶活性位点突变时, 即 RuvC 结构域 (D917A, E1006A 或 D1255A) 与 Nuc 结构域 (R1218A) 位点, 这些突变 Cas12a 的单链 DNA 顺式和反式切割活性都受到了影响, 如图 5B 和 5D 所示。这些结果表明 Cas12a 针对靶标双链 DNA 切割的关键位点与单链 DNA 顺式和反式切割活性密切相关。

最近对 Cas12b(即 C2c1)的结构研究(包括与延伸的靶 DNA 或延伸的非靶 DNA 复合体)显示两条链均位于 RuvC 口袋内,如图 6A 和 6B 所示。通过比较 Cas12b(即 C2c1)和 Cas12a 的核酸内切酶催化残基,这些位点最可能在 Cas12b(即 C2c1)和 Cas12a 的切割和功能中发挥类似的作用。体外单氨基酸突变实验的结果表明,与上述假设是一致的,也即是说 Cas12a 很可能通过只通过一个 RuvC 催化口袋切割两条链。

Cas12a 复合体的反式切割活性:在 Cas12b(即 C2c1)复合体与额外单链 DNA 的结构中,序列非依赖性单链 DNA 也位于催化口袋的表面,如图 6C 所示,这类似于 Cas12a 中的旁路单链 DNA 底物。结合单个氨基酸突变实验,提出靶 DNA,非靶标 DNA 和旁路单链 DNA 都在 Cas12a 中的单个 RuvC 口袋切割,如图 6D, 6E 和 6F 所示。三元 Cas12a 复合体具有旁路单链 DNA 反式切割活性,而单体或二元复合体没有旁路单链 DNA 反式切割活性的原因可以通过比较单体、二元和三元复合体的结构来解释。单体 Cas12a 结构是无序的,二元复合体 Cas12a/crRNA 是三角形结构,如图 6G 所示,而三元复合物 Cas12a/crRNA/靶标 DNA 转变为双叶结构,从而暴露出催化口袋,以实现旁路单链 DNA 的反式切割(如图 6H 所示)。

核酸探测方法的建立

利用 Cas12a 的特性,开发了特异性检测核酸分子的方法,称之为 HOLMES(one H0ur Low-cost Multipurpose Efficient Simple assay)。正如该技术的名称一样,其特点是一小时、低成本、多用途、高效率、很简便的测试法。

在整个反应体系中,可分为两个大的步骤,一个是对模板核酸的扩增,另一个是 Cas12a 蛋白的特异性核酸检测。这里,对于核酸的扩增运用了 PCR 的方法,但实际上,任何的扩增方法都可结合第二步的核酸检测,例如等温扩增方法 RPA 等。初始的核酸不限于双链 DNA,也可以是单链 DNA;即使是 RNA,也可以通过反转录后实现检测,因此本方法适用于多种类型的核酸分子。对于核酸检测阶段,其中 3 个组分是实验的关键,分别为 Cas12a, crRNA 和核酸探针。除了实施例中提到的 10 种 Cas12a(这 10 种蛋白是随机选择的),其他 Cas12a 蛋白同样适用于该方法。此外,其它类型的 Cas 蛋白(如 C2c1 蛋白)也适用于本发明保护的范畴:根据实验结果显示, *Alicyclobacillus acidoterrestris* Cas12b(即 C2c1)也具有与 Cas12a 类似的旁路单链 DNA 反式切割活力,其与 crRNA/靶标 DNA 的复合物也可以切割旁路单链 DNA。

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

被切断。

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

5

表 1 Cas12a 特性实验相关切割底物序列

Oligo 名称	序列 (5' -3')	SEQ ID No. :
target-DNMT1-3-F	aatgtttcctgatgggccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	1
target-DNMT1-3-R	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatg gaccatcaggaaacatt	2
target-DNMT1-3-R-FA M-3'	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatg gaccatcaggaaacatt-FAM	3
target-DNMT1-3-R-FA M-5'	FAM-gtcacgccacttgacaggcgagtaacaga catggaccatcaggaaacatt	4
target-T1-F	tttctgtttgttatcgcaactttctactgaatt caagctttactctagaaaggagagaaaggatcc	5
target-T1-R	ggatcctttctcctctttctagagtaaagcttg aattcagtagaaagttgcgataacaaacagaaa	6
target-T1-F-FAM	FAM-tttctgtttgttatcgcaactttctactg aattcaagctttactctagaaaggagagaaagg atcc	7
target-T1-R-FAM	ggatcctttctcctctttctagagtaaagcttg aattcagtagaaagttgcgataacaaacagaaa -FAM	8
target-T1-FAM-3' -F	tttctgtttgttatcgcaactttctactgaatt caagctttactctagaaaggagagaaaggatcc -FAM	9
target-T1-FAM-5' -R	FAM-ggatcctttctcctctttctagagtaaag cttgaattcagtagaaagttgcgataacaaaca	10

	gaaa	
target-DNMT1-3-R-TT T-FAM-3'	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatg gaccatcaggTTTcatt-FAM	11
target-DNMT1-3-R-CC C-FAM-3'	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatg gaccatcaggCCCcatt-FAM	12
target-DNMT1-3-R-GG G-FAM-3'	gtcacgccacttgacaggcgagtaacagacatg gaccatcaggGGGcatt-FAM	13
target-DNMT1-3-F-AA A	aatgAAAcctgatggtccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	14
target-DNMT1-3-F-GG G	aatgGGGcctgatggtccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	15
target-DNMT1-3-F-CC C	aatgCCCcctgatggtccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	16
target-T1-1-R	acaaacagaaa	17
target-T1-6-R	cgataacaaacagaaa	18
target-T1-12-R	aagttgcgataacaaacagaaa	19
target-T1-18-R	agtagaaagttgcgataacaaacagaaa	20
target-T1-24-R	gaattcagtagaaagttgcgataacaaacagaa a	21
target-T1-24-only-R	gaattcagtagaaagttgcgataa	22
target-T1-18-only-R	agtagaaagttgcgataa	23
target-T1-12-only-R	aagttgcgataa	24
target-T1-6-only-R	cgataa	25
N25-5' FAM	FAM-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	26
N25-3' FAM	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-FAM	27

表 2. Cas12a 蛋白和 Cas12b (即 C2c1) 蛋白的名称与 GI 号

Name	GI number	Species
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

表 3 质粒信息

Plasmids or Strains	Relevant properties or genotypes	Sources
Plasmids		
pET28a-TEV	pET28a with the thrombin cleavage site changed to the TEV protease cleavage site	(Carneiro, Silva et al. 2006)
pET28a-TEV-FnCas12a	pET28a-TEV carrying FnCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
pET28a-TEV-AsCas12a	pET28a-TEV carrying AsCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
pET28a-TEV-LbCas12a	pET28a-TEV carrying LbCas12a	(Lei, Li et al. 2017)
pET28a-TEV-Lb5Cas12a	pET28a-TEV carrying Lb5Cas12a	本发明
pET28a-TEV-HkCas12a	pET28a-TEV carrying HkCas12a	本发明
pET28a-TEV-OsCas12a	pET28a-TEV carrying OsCas12a	本发明
pET28a-TEV-TsCas12a	pET28a-TEV carrying TsCas12a	本发明
pET28a-TEV-BbCas12a	pET28a-TEV carrying BbCas12a	本发明
pET28a-TEV-BoCas12a	pET28a-TEV carrying BoCas12a	本发明
pET28a-TEV-Lb4Cas12a	pET28a-TEV carrying Lb4Cas12a	本发明

pET28a-TEV-FnCas12a-K869 A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-K869A	本发明
pET28a-TEV-FnCas12a-K852 A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-K852A	本发明
pET28a-TEV-FnCas12a-H843 A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-H843A	本发明
pET28a-TEV-FnCas12a-R121 8A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-R1218A	本发明
pET28a-TEV-FnCas12a-E100 6A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-E1006A	本发明
pET28a-TEV-FnCas12a-D917 A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-D917A	本发明
pET28a-TEV-FnCas12a-D125 5A	pET28a-TEV carrying FnCas12a-D1255A	本发明
pET28a-TEV-C2c1	pET28a-TEV carrying C2c1	本发明

表 4 HOLMES 方法测试中用到的引物

Oligo 名称	序列(5' -3')	SEQ ID No. :
target-T1-R	ggatcctttctcctcttttctagagtaaagcttgaa ttcagtagaaagttgCGATAACAAACAGAAA	28
M13F-47	cacaattccacacaacatacgagccgga	29
M13R-48	tgtagccgtagttaggccaccacttca	30
Target-T1-F	agttttgttatcgcaactttctactgaattc	31
Target-T1-F-1A	agttttgAtatcgcaactttctactgaattc	32
Target-T1-F-2A	agttttgtAatcgcaactttctactgaattc	33
Target-T1-F-3T	agttttgtTtcgcaactttctactgaattc	34
Target-T1-F-4A	agttttgttaAcgcaactttctactgaattc	35
Target-T1-F-5G	agttttgttatGgcaactttctactgaattc	36
Target-T1-F-6C	agttttgttatCcaactttctactgaattc	37
Target-T1-F-7G	agttttgttatcgGaactttctactgaattc	38

Target-T1-F-8T	agttttggttatcgctactttctactgaattc	39
Target-T1-F-9T	agttttggttatcgcaTctttctactgaattc	40
Target-T1-F-10G	agttttggttatcgcaaGtttctactgaattc	41
Target-T1-AAAN-F	aaaagttatcgcaacttttctactgaattc	42
Target-T1-F-11A	agttttggttatcgcaacAttctactgaattcggtc atag	43
Target-T1-F-12A	agttttggttatcgcaactAtctactgaattcggtc atag	44
Target-T1-F-13A	agttttggttatcgcaacttActactgaattcggtc atag	45
Target-T1-F-14G	agttttggttatcgcaactttGtactgaattcggtc atag	46
Target-T1-F-15A	agttttggttatcgcaactttcAactgaattcggtc atag	47
Target-T1-F-16T	agttttggttatcgcaactttctTctgaattcggtc atag	48
Target-T1-F-17G	agttttggttatcgcaactttctaGtgaattcggtc atag	49
Target-T1-F-18A	agttttggttatcgcaactttctacAgaattcggtc atag	50
Target-T1-PAM1A-F	agtttAgttatcgcaactttctactgaattc	51
Target-T1-PAM2A-F	agttAtggttatcgcaactttctactgaattc	52
Target-T1-PAM3A-F	agtAttggttatcgcaactttctactgaattc	53
gyrB-F	AGTTGTCGTTCCCTCAACTCCGGCGTTTC	54
gyrB-R	TCGACGCCAATACCGTCTTTTTCAGTGG	55
1-5082-F	CTGCCTTTGCTTCTACCTTTGCCTGT	56
1-5082-F-T	TTGCTTCTACCTTTGCCTGTTCTGG	57
1-5082-R	TTTTCTGGCTGGGGATGGCCGATGG	58
2-rs1467558-F	AGCAATAACACTAATATTGATTCCCTCAGATATGG ACTCCTTTCATAGTA	59

2-rs1467558-F-T	TTGATTCCTTCAGATATGGACTCCTTTCATAGTAT AACG	60
2-rs1467558-R	TGAGCATCGTTATTCTTACGCGTTGTCATTGAAAAG AG	61
3-rs2952768-F	AGCCTGGGCAACGAGTGAAACTCTG	62
3-rs2952768-R	ACAGGAGGGACAAAGGCCTAAGTGTCC	63
3-rs2952768-R-C	CATCATAGGATTGGGAAAAGGACATTTTCAGTCATT CAG	64
4-rs4363657-F	AGAGTCCTTCTTTCTCAATTTTTCAGAATAATTTA GTACTTTGGGTAC	65
4-rs4363657-R	CAGTACTGAAAAAACCTGCCTATCAATAAAAGCCC TAGAC	66
5-rs601338-F	GCTTCACCGGCTACCTTTGCTCCT	67
5-rs601338-R	TTCACCTGCAGGCCCCGCAGG	68
34-TP53-T24-F	CCTGACTTTCAACTCTGTCTCCTTCCTCTTTTTAC 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	AGTCAAAGAGATTTCATGCCTGGGACTTTAATCACA TTTAT	74
42-rs6449213-F-C	ATGCCTGGGACTTTAATCACATTTATCGGAAGG	75
42-rs6449213-R	CAAATCTGTCTCCACCTCTCAGCTCACCTTG	76
43-rs737267-F	TTCTTGAACCCAACTCACCTGGCATTTAAACTG	77
43-rs737267-F-A	AAACTCACCTGGCATTTAAACTGACTCTGTAAG	78
43-rs737267-F-T	AAACTCACCTGGCATTTAAACTGTCTCTGTAAG	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-NNNNNNNNNN-BHQ1	89

表 5 用于转录 crRNA 的模板序列

oligo 名称	序列 (5' -3')	SEQ ID No. :
T7-crRNA-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	90
T7-T1-24-R	gaattcagtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGA AATTCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	91
T7-T1-15-R	agaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	92
T7-T1-16-R	tagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	93
T7-T1-17-R	gtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCT TATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	94
T7-T1-18-R	agtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTC CTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	95
T7-crRNA-DNM T-23nt-R	GAGTAACAGACATGGACCATCAGATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	96
T7-crRNA-DNM T-(-8)-R	gacatggaccatcaggaaacattATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	97
T7-crRNA-DNM T-(+4)-R	aggcgagtaacagacatggaccaATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	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) -no loop-R	gacatggaccatcaggaaacattCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC	103
T7-DNMT-(+4) -no loop-R	aggcgagtaacagacatggaccaCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC	104
T7-DNMT-(+8) -no 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	AAAAAAGAGTGGGTACCATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	113
T7-crRNA-rs60	GGTAGAAGGTCCAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCT	114

1338-G	ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	
T7-crRNA-rs60 1338-A	GGTAGAAGGTCTAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCTT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	115
T7-crRNA-34-T P53-T24-C-16n t	GGGCAGGGGAGTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCTTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	116
T7-crRNA-34-T P53-T24-G-16n t	GGGCAGGGGACTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCTTA 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	GGAAATTCTCCTTCCGAATCTACAACAGTAGAAATTCCTT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	120
T7-crRNA-42-r s6449213-T	GGAAATTCTCCTTCCAAATCTACAACAGTAGAAATTCCTT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	121
T7-crRNA-43-r s737267-A-16n t	TCTTACAGAGTCAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCTTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	122
T7-crRNA-43-r s737267-G-16n t	TCTTACAGAGCCAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCTTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	123
T7-crRNA-43-r s737267-T	GTCTTACAGAGACAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCTT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	124
T7-crRNA-44-r s1260326-C-15 nt	CTGGACTCTCACCGGATCTACAACAGTAGAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	125

T7-crRNA-44-r s1260326-T-15 nt	CTGGACTCTCACCAGATCTACAACAGTAGAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	126
T7-crRNA-45-r s642803-C	CACAGACAGGCAATTCTATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	127
T7-crRNA-45-r s642803-T	CACAGACAGACAATTCTATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	128
T7-crRNA- gyrB	TCGCGCTTGTCGCGCAGACGAATGATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	129

LAMP 扩增 DNA 结合 Cas12a 检测所用到的引物：

表 6 扩增 gyrB-1 的引物

名称	序列	SEQ ID No. :
LAMP-gyrB-1-F3	CATGGTGCGTTTCTGGCC	130
LAMP-gyrB-1-B3	CGGCGTTTTGTTCTTGTTCA	131
LAMP-gyrB-1-FIP	ACAACTCACGCAGACGTTTCGCAACCTTCA CCAATGTGACCG	132
LAMP-gyrB-1-BIP	GTTCTCAACTCCGGCGTTTCCGATGCCGC CTTCATAGTGG	133
LAMP-gyrB-1-LoopF	CAGAATTTTCATATTCGAACT	134
LAMP-gyrB-1-LoopB	GACGGCAAAGAAGACCACTT	135

5

表 7 扩增 gyrB-2 的引物

名称	序列	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	TTGTTTCAGATATTCAACGAACG	140
LAMP-gyrB-2-LoopB	GTGGAACGATGGCTTCCAGG	141

表 8 扩增 rs1467558 位点的引物

名称	序列	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	TCAATATTAGTGTATTGCTTG	146
LAMP-rs1467558-LoopB	TGGTGGAAGATTTGGACAGGAC	147

表 9 扩增 rs5082 位点的引物

名称	序列	SEQ ID No. :
LAMP-rs5082-F3	GCTGGAAAGGTCAAGGGAC	148
LAMP-rs5082-B3	GGGGTTTGTTCACAGTCC	149
LAMP-rs5082-FIP	CAAAGGTAGAAGCAAAGGCAGGAGGTTTGC CCAAGGTCACACAG	150
LAMP-rs5082-BIP	CTGGGAAGAGGGAGGGCTCAGTGTGCCCAC ACTTTCAGTGG	151
LAMP-rs5082-LoopF	GTGAGCGGGTGGGGTGCT	152
LAMP-rs5082-LoopB	TCTAAGTCTTCCAGCACGGGATC	153

5

表 10 RPA 扩增结合 Cas12 检测用到的引物

名称	序列	SEQ ID No. :
RPA-gyrB-1-F	ATATGAAATTCTGGCGAAACGCTCTGCGTGAGTTG	154
RPA-gyrB-2-F	AAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCTCAACTCC	155

RPA- <i>gyrB</i> -R	ACTTCGACGCCAATACCGTCTTTTTCAGTGGAG	156
---------------------	-----------------------------------	-----

表 11 测定 Cas12b 具有 trans 切割活性用到的引物:

Oligo 名称	序列 (5' -3')	SEQ ID No. :
pUC18-1-F	ATCTGAGAAGTGGCACTTATCGCAACTTTCTACTGAGGTC ATAGCTGTTTCCTGTGTGA	157
pUC18-1-R	GTCCTCTAGACCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCAT GATTACGAATTCGAGCTCGGT	158
pUC18-2-F	CCACTTTCCAGGTGGCAAAGCCCGTTGAGCTTCTCAAA TCTGAGAAGTGGCACTTATC	159
pUC18-2-R	TGGAAAAGTGGCCATTGGCACACCCGTTGAAAAATTCTG TCCTCTAGACCCCTATAGTGA	160
T7-crRNA-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	161
ZL-sgRNA-T1-R	TCAGTAGAAAAGTTGCGATAAGTGC	162
ZLsgRNA-DNMT1-3-R	AACAGACATGGACCATCAGGGTG	163
target-T1-F	TTTCTGTTTGTTATCGCAACTTTCTACTGAATTCAAGC TTTACTCTAGAAAAGAGGAGAAAAGGATCC	164
target-T1-R	GGATCCTTTCTCCTCTTTCTAGAGTAAAGCTTGAATTC AGTAGAAAAGTTGCGATAACAAACAGAAA	165
target-DNMT1-3-R-FAM-5'	GTCACGCCACTTGACAGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGAAACATT	166
target-T1-R	GGATCCTTTCTCCTCTTTCTAGAGTAAAGCTTGAATTC AGTAGAAAAGTTGCGATAACAAACAGAAA	167
target-T1-F	TTTCTGTTTGTTATCGCAACTTTCTACTGAATTCAAGC TTTACTCTAGAAAAGAGGAGAAAAGGATCC	168

表 12 Cas12b 的 trans 反应的灵敏度测试用到的引物:

Oligo 名称	序列 (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	GTCACGCCACTTGACAGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGGAACATT	174
LAMP-DNM-F3	gtgaacgttcccttagcact	175
LAMP-DNM-B3	gggagggcagaactagtc	176
LAMP-DNM-FIP	cgccacttgacaggcgagtaactgccacttattgggtc agc	177
LAMP-DNM-BIP	gcgtgttccccagagtgacttagcagcttccctcctcct t	178
LAMP-DNM-LoopF	aggaaacattaacgtactgatg	179
LAMP-DNM-LoopB	ttcctttttatttcccttcagc	180
DNMT1-3 (TTC PAM) -R	GTCACGCCACTTGACAGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGGAACATT	181
DNMT1-3 (TTC PAM) -F	AATGTTCCCTGATGGTCCATGTCTGTTACTCGCCTGTC AAGTGGCGTGAC	182

表 13 本发明涉及到的其它序列

名称	序列	SEQ ID No. :
AacCas12b sgRNA 序列	GTCTAGAGGACAGAATTTTCAACGGGTGTGCCAATGG CCACTTTCAGGTGGCAAAGCCCGTTGAGCTTCTCAAA TCTGAGAAGTGGCACcctgatgggtccatgtctgtt	183
靶向靶标 DNMT-1-3 的 guide 序列	cctgatgggtccatgtctgtt	184
单链靶标序列	gtcacgccacttgacagggcgagtaacagacatggacca tcagggaacatt	185
双链靶标序列:	gtcacgccacttgacagggcgagtaacagacatggacca tcagggaacatt	186
AacCas12b 蛋白 的氨基酸序列	MAVKSIKVKLRLDDMPEIRAGLWKLHKEVNAGVRYYTE WLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECDKTAECKAELLERL RARQVENGHRGPAGSDDELLQLARQLYELLVPQAIGAK GDAQQIARKFLSPLADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMR EAGEPGWEEKEKAETRKSADRTADVLRALADFGKPL MRVYTDSEMSSVEWKPLRKQAVRTWDRDMFQQAIERM MSWESWNQRVGQEYAKLVEQKNRFEQKNFVGQEHVHL VNQLQQDMKEASPGLESKEQTAHYVTGRALRGSDKVFE KWGKLAPDAPFDLYDAEIKNVQRRNTRRFGSHDLFAKL AEPEYQALWREDASFLTRYAVYNSILRKLNHAKMFATF TLPDATAHPIWTRFDKLGGNLHQYTFLFNEFGERRHAI RFHKLLKVENGVAEVDVTVPIISMSEQLDNLLPRDPN EPIALYFRDYGAEQHFTGEFGGAKIQCRRDQLAHMHRR RGARDVYLVNVSVRVQSQSEARGERRPPYAAVFRLVGDN HRAFVHFDKLSDYLAEHPDDGKLGSEGLLSGLRVMSVD LGLRTSASISVFRVARKDELKPNKGRVPFFFPIKGND	187

	NLVAVHERSQLLKLPGETESKDLRAIREERQRTLRLQLR TQLAYLRLLVRCGSEDVGRRERSWAKLIEQPVDAAANHM TPDWREAFENELQKLKSLHGICSDKEWMDAVYESVRRV WRHMGKQVRDWRKDVRSGERPKIRGYAKDVVGGNSIEQ IEYLERQYKFLKSWSFFGKVSGQVIRAEKGSRFAITLR EHIDHAKEDRLKKLADRIIMEALGYVYALDERGKGKWW AKYPPCQLILLEELSEYQFNDRPPSENNQLMQWSHRG VFQELINQAQVHDLVGTMYAAFSSRFDARTGAPGIRC RRVPARCTQEHNPEPFPWWLNKFVVEHTLDACPLRADD LIPTGEGEIFVSPFSAEEGDFHQIHADLNAAQNLQQRL WSDFDISQIRLRCDWGEVDGELVLIPRLTGKRTADSYS NKVFYTNLTGVTTYERERGGKRRKVFVFAQEKLSSEEAELL VEADEAREKSVVLMRDPSGIINRGNWTRQKEFWSMVNQ RIEGYLVKQIRSRVPLQDSACENTGDI*	
--	---	--

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附

5 权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

- 1、一种靶标核酸分子的检测方法，其特征在于，向含有待检靶标核酸分子的体系中加入向导 RNA、Cas 蛋白、核酸探针、缓冲液，然后对核酸探针进行检测。
- 5 2、根据权利要求 1 所述的靶标核酸分子的检测方法，其特征在于，所述 Cas 蛋白为 Cas12a 或者具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白；
- 所述的 Cas12a 优选为 FnCas12a、AsCas12a、LbCas12a、Lb5Cas12a、HkCas12a、OsCas12a、TsCas12a、BbCas12a、BoCas12a 或 Lb4Cas12a 中一种；所述的 Cas12a 优选为 LbCas12a。
- 10 3、根据权利要求 1 所述的靶标核酸分子的检测方法，其特征在于，向导 RNA 是指引导 Cas 蛋白特异性结合靶标 DNA 的 RNA。
- 4、根据权利要求 1 所述的靶标核酸分子的检测方法，其特征在于，所述核酸探针为单链 DNA；所述的单链 DNA 优选为荧光标记的单链 DNA；所述的单链 DNA 优选为在 5' 端标记荧光基团 HEX 并在 3' 端标记淬灭基团 BHQ1 后的荧光探针；优选地，
- 15 所述核酸探针的检测方法优选为荧光检测法；所述的荧光检测法优选为使用酶标仪或者荧光分光光度计进行检测的方法。
- 5、根据权利要求 1 至 4 中任意一项所述的靶标核酸分子的检测方法，其特征在于，待检靶标核酸分子的反应体系中的待检靶标核酸分子通过扩增得到。
- 6、根据权利要求 5 所述的靶标核酸分子的检测方法，其特征在于，该检测方法
- 20 可检测病原微生物、基因突变或特异靶标 DNA。
- 7、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的 Cas 蛋白包括 Cas12b(即 C2c1)。
- 8、一种 Cas 蛋白在靶标核酸分子的检测方法中的用途。
- 9、根据权利要求 8 所述的用途，其特征在于，靶标 DNA、向导 RNA 和 Cas 蛋白形成三元复合体时，该复合体会切割体系中其它的单链 DNA 分子；优选地，向导 RNA 是指引导 Cas 蛋白特异性结合靶标 DNA 的 RNA。
- 25 10、一种靶标核酸分子的检测试剂盒，其特征在于，包括向导 RNA、Cas 蛋白、核酸探针。
- 11、一种用于检测靶标核酸分子的检测体系，其特征在于，该体系包含：
- (a) Cas 蛋白，所述 Cas 蛋白是 Cas12a 或者具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割
- 30 活性类似的 Cas 蛋白；
- (b) 向导 RNA，所述向导 RNA 引导 Cas 蛋白特异性结合于靶标核酸分子；和

(c) 核酸探针, 所述核酸探针为单链 DNA;

其中, 所述的靶标核酸分子为靶标 DNA。

12、如权利要求 11 所述的检测体系, 其特征在于, 所述的具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白选自下组: Cas12b (即 C2c1)。

5 13、如权利要求 11 所述的检测体系, 其特征在于, 所述的核酸探针包括带有可检测标记的单链 DNA。

14、一种用于检测靶标核酸分子的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括:

i) 第一容器以及位于第一容器内的 Cas 蛋白, 所述 Cas 蛋白是 Cas12a 或者具有与 Cas12a 的旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白;

10 ii) 任选的第二容器以及位于第二容器内的向导 RNA, 所述向导 RNA 引导所述 Cas 蛋白特异性结合于靶标核酸分子;

iii) 第三容器以及位于第三容器内的核酸探针;

iv) 任选的第四容器以及位于第四容器内的缓冲液;

其中, 所述的靶标核酸分子为靶标 DNA。

15 15、一种检测样本中是否存在靶标核酸分子的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(a) 提供权利要求 11 所述的用于检测靶标核酸分子的检测体系, 并且所述的检测体系还具有待检测的样本; 和

(b) 检测所述检测体系中的核酸探针是否被 Cas 蛋白进行切割, 所述的切割为旁路单链 DNA 的反式切割;

20 其中, 所述核酸探针被 Cas 蛋白切割, 则表示所述样本中存在靶标核酸分子; 而所述核酸探针不被 Cas 蛋白切割, 则表示所述样本中不存在靶标核酸分子。

16、如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述核酸扩增的方法选自下组: PCR 扩增、LAMP 扩增、RPA 扩增、连接酶链式反应、分支 DNA 扩增、NASBA、SDA、转录介导扩增、滚环扩增、HDA, SPIA, NEAR, TMA 和 SMAP2。

25 17、如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 当所述的靶位点的上下游(-20nt 至+20nt 范围内, 较佳地-15nt 至+15nt 范围内, 更佳地-10nt 至+10nt 范围内)缺乏 PAM 序列时, 采用引入 PAM 的引物进行核酸扩增。

18、如权利要求 17 所述的方法, 其特征在于, 所述的引入 PAM 的引物具有从 5' -3' 的式 I 结构:

30 P1-P2-P3 (I)

式中,

P1 为位于 5' 端的与靶标核酸分子的序列互补或非互补的 5' 区段序列；

P2 为 PAM 序列；

P3 为位于 3' 端的与靶标核酸分子的序列互补 3' 区段序列。

- 19、如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，当所述的靶位点的上下游(-20nt
5 至+20nt 范围内，较佳地-15nt 至+15nt 范围内，更佳地-10nt 至+10nt 范围内)含有 PAM 序列时，则可采用含有或不含有 PAM 序列的引物，并且扩增出的扩增产物含有
10 所述 PAM 序列。

- 20、一种 Cas 蛋白的用途，其特征在于，用于制备基于旁路单链 DNA 切割检测靶
标核酸分子的检测试剂或试剂盒，其中所述 Cas 蛋白是 Cas12a 或者具有与 Cas12a 的
10 旁路单链 DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白。

21、如权利要求 20 所述的用途，其特征在于，所述的具有与 Cas12a 的旁路单链
DNA 切割活性类似的 Cas 蛋白选自下组：Cas12b (or C2c1)。