

说明书

发明名称: Cas12蛋白及其应用

[0001] 本申请要求申请日为2023/9/19的中国专利申请2023112143306和申请日为2024/4/1的中国专利申请2024103885922的优先权。本申请引用上述中国专利申请全文。

技术领域

[0002] 本披露涉及CRISPR基因编辑领域，具体涉及一种Cas12蛋白及其应用。

背景技术

[0003] CRISPR-Cas系统是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御，可用来对抗入侵的病毒及外源DNA。成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR相关蛋白系统(CRISPR-Cas系统)可直接在细胞中对基因序列进行更改，是一种快速、有效的方法。

[0004] 本领域的很多研究人员都在致力于寻找新的Cas12蛋白及CRISPR-Cas12基因编辑系统。

[0005] 发明内容

[0006] 本披露提供了Cas12蛋白及其应用。

[0007] 在一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种Cas12蛋白，所述Cas12蛋白为CLUSTER1蛋白、CLUSTER2蛋白、CLUSTER3蛋白、CLUSTER4蛋白、CLUSTER5蛋白、CLUSTER6蛋白、CLUSTER7蛋白、CLUSTER8蛋白、CLUSTER9蛋白、CLUSTER10蛋白、CLUSTER11蛋白、CLUSTER12蛋白或CLUSTER13蛋白。

[0008] 在另一方面，本披露提供一种Cas12蛋白，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少50%序列同一性的氨基酸序列。

[0009] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少

92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0010] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%序列同一性的氨基酸序列。

[0011] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少80%同一性的氨基酸序列。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少85%同一性的氨基酸序列。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少90%同一性的氨基酸序列。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少95%同一性的氨基酸序列。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少97%同一性的氨基酸序列。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少98%同一性的氨基酸序列。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少99%同一性的氨基酸序列。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少99.5%同一性的氨基酸序列。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少99.7%同一性的氨基酸序列。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有至少99.8%同一性的氨基酸序列。在本披露的

具体实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:1-53、696、728中任一项相比具有100%同一性的氨基酸序列。

[0012] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白保留如SEQ ID NO:1-53、696、728中任一序列所示蛋白的功能。

[0013] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物。
在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸特异性结合至靶核酸。

[0014] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述复合物可特异性结合至靶核酸。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述复合物可特异性结合至靶DNA。

[0015] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸特异性结合并切割靶核酸。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸特异性结合并切割靶DNA。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述复合物可特异性结合并切割靶核酸。在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述复合物可特异性结合并切割靶DNA。

[0016] 本披露中，所述保留如SEQ ID NO:1-53、696、728中任一序列所示蛋白的功能指的是保留与指导多核苷酸形成复合物的能力、保留结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶核酸的能力、保留与指导多核苷酸靶向切割靶核酸的能力，和/或保留将包含指导序列的RNA转录物加工成指导多核苷酸分子的能力。

[0017] 在本披露的具体实施方案中，所述保留如SEQ ID NO:1-53、696、728中任一序列所示蛋白的功能是保留与指导多核苷酸形成复合物的能力。

[0018] 在本披露的具体实施方案中，所述保留如SEQ ID NO:1-53、696、728中任一序列所示蛋白的功能是保留结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶核酸的能力。

[0019] 在本披露的具体实施方案中，所述保留如SEQ ID NO:1-53、696、728中任一序列所示蛋白的功能是保留与指导多核苷酸靶向切割靶核酸的能力。

- [0020] 在本披露的具体实施方案中，所述保留如SEQ ID NO:1-53、696、728中任一序列所示蛋白的功能是保留将包含指导序列的RNA转录物加工成指导多核苷酸分子的能力。
- [0021] 在本披露的优选实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为如SEQ ID NO:1-53、696、728中任一所示的氨基酸序列。
- [0022] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别的PAM序列(5'→3')任选自以下的任一种或几种：
- [0023] A、C、T、G、
- [0024] TA、TC、GN、AA、AG、TG、AN、GG、CG、TN、NT、NG、GT、N
A、CC、AC、GC、AT、CT、GA、TT、CN、NC、CA、
- [0025] NTN、ANN、TTN、ATC、NAC、AGA、TGC、TCT、NGN、CGC、NT
C、GCA、TCG、TTT、CCG、GGG、NAG、ACA、CGG、CNG、ACN、GT
G、CNT、TTG、TCN、GGT、TNC、CCN、CGT、TGG、CGA、NGG、T
CC、AGT、NCA、CAN、TCA、NNG、TAC、CCT、NTG、CGN、TGN、
CAT、NGC、GNG、GNC、NNA、GAA、TTC、CTT、ATA、TAT、GCT、
NCC、TTA、AGN、GNN、CAA、CAC、AGG、NTT、ANG、GNA、GT
T、NGA、TAA、GTA、GGN、GNT、NCG、ATT、CCA、CNN、AAA、AA
C、ATN、GAG、CTG、ACG、NAA、TAN、NAT、CNA、GCN、GTC、NC
N、CTN、CNC、ANT、NNC、CAG、NAN、ATG、NCT、CCC、AAN、T
GT、TNA、ACC、GAT、ACT、AAT、GGA、GAN、ANC、GAC、NNT、C
TA、TNN、GCG、GTN、TNT、AAG、TAG、NGT、NTA、ANA、CTC、G
CC、TGA、GGC、AGC、TNG、
- [0026] NGAA、GANC、GCNC、NTNT、TGGG、AAGG、AAGN、NTNN、TCG
T、CNTG、NTGG、CCGN、ATAT、TGCA、NGGT、TGNT、NNTG、NC
CG、ACAT、GNTG、CGCG、GACN、NTCG、TCNG、CTGC、TNNC、G
GTN、CGNN、TCCA、AGCN、TNAG、GGAC、GATC、AANA、NATG、
CCAG、NAAT、TCNT、CACT、CGGC、CGAN、CNCA、ATNT、NNN
G、NGCT、CTGG、GGAN、NTNC、ATTC、AATG、CNTC、TGGN、NA

TC, GTCG, ACNC, GCNN, GACT, CTNT, NCTT, NAGG, NANC, C
TTA, GTCT, ANAG, NGCN, CNNA, TCAG, ACAC, NCGG, TNNT,
CAAG, ACCT, CCCA, GTNC, ANTC, GACC, AACG, TTAA, TCCG,
CGCC, NCCN, TTNA, NCNT, NGCA, AGNN, AATC, GGGA, GNA
N, NAGA, CGNA, GTAT, GTNA, ATNC, ACNA, GGAA, NTCC, GG
CG, AATN, CNNT, AGGC, GCGN, GTGC, TTGA, AAGC, GAAG, AT
NG, TGCT, TACT, CTAN, GGCT, GNGC, GTCN, CGAA, CNAC, G
CCT, TAGG, ANGC, TNAA, GANT, NCNA, NCCT, AGAN, GTAA, T
TTN, ATGA, TGNA, CANC, ACGA, CCAC, CCGG, CTNG, CNGN,
GGTA, NGNC, GTTT, CTAA, TNCT, CTGN, NGAC, TGTA, TANN,
GCNT, GCTC, CNCG, AAAN, CCNT, GANA, CACA, CTNA, ANT
N, TTNT, CCTG, TNTT, CANA, NTAN, CACG, GGAT, TTTC, GNC
G, TACA, GTAC, GAGC, ACNN, ATGG, AANT, ATCC, ACCG, AGN
C, TGTT, NCAT, ATTA, GNTT, GAGN, TNAC, GCCG, NTNG, GTG
G, GNGN, ACCA, NTAA, ACTN, NCTG, NCTA, TTTT, GCNG, NT
AG, CAAA, GGNA, CNTN, TTAG, TCTG, NCTN, TATG, GCGT, TA
NT, GGGT, NACN, ACTG, CCNG, GNNT, CCAT, GNTA, NANT, T
ACN, TGTN, ATCT, NCAN, TNGG, CNNN, AAGT, ATTN, GGNN,
CAGC, CGTN, GCCC, GCTT, CNAT, NANA, CCNN, GNGA, TNG
N, GCAG, CGNG, CCTT, NGAG, NCNG, AANG, GGTC, ACTC, TG
AA, NAGN, NNCA, ACGG, TGAC, TCCN, ANNN, TCGN, TAAN, C
AGG, TTAN, NGAN, NTGC, CCNC, TNTN, ATGN, GTGN, GCAT,
NNGN, NNCC, CCNA, CNAG, GNAC, CGNT, TTCN, TAGN, ANC
T, NATN, GTGA, TNGT, CTAT, CCCG, TNCA, NGTA, NNGA, CG
TG, TAAT, CGCA, NNCG, NGTC, NAGT, GNAT, TNTC, NCGC,
NNGN, CATN, GTTN, AGTA, GNNG, TTNN, TGNC, NAAA, TNC
C, CACC, CTCT, TTGN, GCTA, NTTT, TGAN, TNAN, NGAT, CC
TN, GAAT, GTCA, NTCN, GCCA, ANTG, TGGC, CAAC, TTAA, TG

TC, CGGA, NCGN, AGNT, NCGA, ANCG, ACAA, TAGT, CGAG, N
CAA, AATA, AGGG, GNGT, CAGA, AGGT, GGGG, ANAC, TGGT, G
TGT, GNCA, GTTA, NGTT, TNNG, NCAG, CACN, GCAN, GAAC,
NCCA, TTCC, NCNN, GNNN, ANGT, NTNA, CCCT, GNAA, TTN
G, GTNN, GGNG, TCTA, NCAC, GANG, TTCG, CCTC, CNGG, AN
NA, TCAN, ATCG, NTGA, CGTA, TTAC, GCTN, GCTG, NGTG, T
CCC, CANN, NNNA, TAGA, ACGT, AGAT, GATG, GCCN, TGNG,
GCGC, CCGA, GNCN, NTTG, NNAT, TNCG, NANG, GGTG, NCC
C, GNCC, CAAT, CGCN, CNGA, NTTC, TTCT, NGGA, AGTC, CN
NC, NACG, AGTN, NANN, ACAG, GNCT, TACC, CNTA, TGTG,
CATC, GACA, TCTT, NTCT, CTGA, AGGA, GATA, TNAT, CCTA,
GGAG, ANCC, AANC, GTAN, GCNA, TGNN, TANC, GNTN, AGC
G, CTAG, NNAA, AGTT, CTAC, TACG, TTNC, TNTA, ANTT, ATA
C, TCCT, TCAC, NGGC, NTTN, NNCT, CANT, ATAA, TGCC, CTC
C, TNNA, GTNG, ACGN, GGCA, AAAG, TTGT, NGNA, NAAN, TA
TN, CGGG, CATA, ATGC, ACGC, ACCN, ATTT, TCNA, TNGC, NA
CA, NACC, CTCN, GGCC, TANG, AGAA, TNGA, TAGC, CAGN, G
GCN, ANNT, NNNC, TCAT, CATT, TAAA, ATGT, TGAG, CGCT, T
CGG, GCAC, GTAG, NTCA, NATT, ANTA, CCCN, ACTA, AAAA, G
AAN, TATT, NNAC, TGAT, GGGN, CCAA, GNGG, CCAN, GTCC,
NNCT, AGNG, CNNT, CNCT, GANN, GGTT, AGCT, CATG, NTA
C, TNCN, NNTN, TGGA, GATT, AGCA, TAAG, GCGA, ACTT, ANG
N, NTGN, AACN, AACT, TCAA, NTAT, TCGA, NCTC, NNGG, AN
GG, NNTT, GTNT, CTNN, CGGN, TAAC, GGNC, GAAA, ACNG, G
NAG, TTGG, CTTC, CNGT, TNNN, TNTG, GTTG, TCNN, CGGT,
GAGA, CNNG, NCNC, GAGG, AGCC, ATNN, NNNT, AGAC, AAC
C, ANNC, ANNG, ACAN, GTTC, TATA, GNTC, NCGT, NGNT, CG
TC, CCGC, CGAC, GACG, ATTG, GNNC, CNAA, TATC, AGNA, C

TNC、TTCA、ANCA、ACCC、AGTG、CCGT、ANAT、CTGT、GGGC、NTTA、NAAG、AANN、CNAN、NNCN、ANAA、ANAN、CTTG、NGNN、AGAG、TANA、TCNC、GCAA、NGNG、NAGC、NATA、ATCN、CGTT、CNGC、GATN、NNTA、AAGA、CTTT、AAAC、AGGN、ACNT、NTGT、CTTN、ATCA、NACT、NNAG、NGTN、NAAC、TGCG、GGNT、ATAN、TTGC、ANCN、CCCC、ANGA、NGCG、TCTC、CTCG、ATNA、AATT、NNAN、NNGT、TCGC、ATAG、CAAN、AACA、TTAT、CAGT、GNNA、TGCN、GCGG、NGGG、CANG、TTTG、GAGT、AAAT、CTCA、CNCN、CNCC、TCTN、CGNC、NGCC、CGAT、NNGC；

[0027] 所述N为A、T、C或G。

[0028] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-T-3'的PAM。

[0029] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-G-3'的PAM。

[0030] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-A-3'的PAM。

[0031] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-C-3'的PAM。

[0032] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TA-3'的PAM。

[0033] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TC-3'的PAM。

[0034] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TG-3'的PAM。

[0035] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TT-3'的PAM。

[0036] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TN-3'的PAM。

[0037] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TTN-3'的PAM。

[0038] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TTT-3'的PAM。

[0039] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TTG-3'的PAM。

[0040] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TTC-3'的PAM。

[0041] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-TTA-3'的PAM。

- [0042] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-WTN-3'的PAM。
- [0043] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白可识别序列为5'-ATN-3'的PAM。
- [0044] 所述N可以为A、T、C和G中的任一种。所述W为：A或T。
- [0045] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白为Cas12失活变体。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白为核酸酶活性失活的变体。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白为dead Cas12失活变体或nickase Cas12失活变体。可选地，所述Cas12蛋白的RuvC结构域失活。
- [0046] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白选自构成本披露任一项所述Cas12蛋白的活性片段。
- [0047] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:46、696、52、728中任一项相比具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0048] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；进一步地，所述复合物可特异性结合至靶核酸；更进一步地，所述复合物可切割靶核酸、修饰靶核酸和/或调控靶核酸的表达。
- [0049] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列；进一步地，所述指导多核苷酸包含骨架序列，所述骨架序列可与所述Cas12蛋白相互作用；更进一步地，所述骨架序列包含或为同向重复序列；再进一步地，所述同向重复序列包含或为与SEQ ID NO:704、529、534中任一项相比具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的序列。

- [0050] 可选地，所述骨架序列不包括tracrRNA序列。
- [0051] 可选地，所述Cas12蛋白可识别序列为5' -TTN-3' 和/或5' -TTNC-3' 的PAM。所述N可以为A、T、C和G中的任一种。
- [0052] 在本披露的一些实施方案中，提供一种Cas12蛋白，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:46相比具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0053] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；进一步地，所述复合物可特异性结合至靶核酸；更进一步地，所述复合物可切割靶核酸、修饰靶核酸和/或调控靶核酸的表达；
- [0054] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列；进一步地，所述指导多核苷酸包含骨架序列，所述骨架序列可与所述Cas12蛋白相互作用；更进一步地，所述骨架序列包含或为同向重复序列；再进一步地，所述骨架序列包含与SEQ ID NO:704所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%或至少97%序列同一性的序列。
- [0055] 在本披露的一些实施方案中，提供一种Cas12蛋白，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:696相比具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0056] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；进一步地，所述复合物可特异性结合至靶核酸；更进一步地，所述复合物可切割靶核酸、修饰靶核酸和/或调控靶核酸的表达。

- [0057] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列；进一步地，所述指导多核苷酸包含骨架序列，所述骨架序列可与所述Cas12蛋白相互作用；更进一步地，所述骨架序列包含或为同向重复序列；再进一步地，所述骨架序列包含与SEQ ID NO:704所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%或至少97%序列同一性的序列。
- [0058] 在本披露的一些实施方案中，提供一种Cas12蛋白，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:52相比具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0059] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；进一步地，所述复合物可特异性结合至靶核酸；更进一步地，所述复合物可切割靶核酸、修饰靶核酸和/或调控靶核酸的表达。
- [0060] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列；进一步地，所述指导多核苷酸包含骨架序列，所述骨架序列可与所述Cas12蛋白相互作用；更进一步地，所述骨架序列包含或为同向重复序列；再进一步地，所述骨架序列包含与SEQ ID NO:534所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%或至少97%序列同一性的序列。
- [0061] 在本披露的一些实施方案中，提供一种Cas12蛋白，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:728相比具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。

- [0062] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；进一步地，所述复合物可特异性结合至靶核酸；更进一步地，所述复合物可切割靶核酸、修饰靶核酸和/或调控靶核酸的表达。
- [0063] 可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列；进一步地，所述指导多核苷酸包含骨架序列，所述骨架序列可与所述Cas12蛋白相互作用；更进一步地，所述骨架序列包含或为同向重复序列；再进一步地，所述骨架序列包含与SEQ ID NO:534所示序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%或至少97%序列同一性的序列。
- [0064] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:46相比具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0065] 所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列以及同向重复序列。
- [0066] 可选地，所述同向重复序列包含或为与SEQ ID NO:704相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%同一性的核苷酸序列。
- [0067] 可选地，所述复合物在所述指导序列的引导下结合至靶核酸。
- [0068] 可选地，所述Cas12蛋白可识别序列为5' -TTN-3' 的PAM；
- [0069] 所述N可以为A、T、C和G中的任一种。
- [0070] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:696相比具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。

- [0071] 所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列以及同向重复序列。
- [0072] 可选地，所述同向重复序列包含或为与SEQ ID NO:704相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的核苷酸序列。
- [0073] 可选地，所述复合物在所述指导序列的引导下结合至靶核酸；
- [0074] 可选地，所述Cas12蛋白可识别序列为5' -TTN-3' 的PAM。
- [0075] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:52相比具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0076] 所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列以及同向重复序列。
- [0077] 可选地，所述同向重复序列包含或为与SEQ ID NO:534相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的核苷酸序列。
- [0078] 可选地，所述复合物在所述指导序列的引导下结合至靶核酸；
- [0079] 可选地，所述Cas12蛋白可识别序列为5' -TTN-3' 的PAM。
- [0080] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或为与SEQ ID NO:728相比具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性的氨基酸序列。
- [0081] 所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列以及同向重复序列。

- [0082] 可选地，所述同向重复序列包含或为与SEQ ID NO:534相比具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的核苷酸序列。
- [0083] 可选地，所述复合物在所述指导序列的引导下结合至靶核酸。
- [0084] 可选地，所述Cas12蛋白可识别序列为5' -TTN-3' 的PAM；
- [0085] 所述N可以为A、T、C和G中的任一种。
- [0086] 可选地，所述反向互补为部分互补或完全互补。在一些实施方案中，所述指导序列与所述靶核酸杂交。
- [0087] 在一些实施方案中，所述Cas12蛋白为SEQ ID NO:1-53、696、728任一序列所示的Cas蛋白的突变体。
- [0088] 在一些实施方案中，所述Cas12蛋白为SEQ ID NO:1-53、696、728任一序列所示的Cas蛋白的失活变体。
- [0089] 在一些实施方案中，与SEQ ID NO:1-53、696、728任一序列所示的Cas12蛋白相比，本文提供的Cas12蛋白包含一个、两个或多个突变，例如单个氨基酸插入、单个氨基酸缺失、单个氨基酸取代，或其组合。在一些实例中，与SEQ ID NO:1-53、696、728任一序列所示的Cas12蛋白相比所述Cas12蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129或130个氨基酸变化(例如插入、缺失或取代)，但保留结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶核酸分子的能力，和/或保留将包含指导序列的RNA转录物加工成指导多核苷酸分子的能力。在一些实例中，与SEQ ID NO:1-53、696、728任一序列所示的Cas12蛋白相

比所述Cas12蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129或130个氨基酸变化(例如插入、缺失或取代),但保留结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶核酸分子的能力。

- [0090] 在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的任一氨基酸残基具有突变。可选地,所述突变是突变为其他任意天然氨基酸残基。进一步可选地,所述突变是突变为残基R、H、K或A。一些实施方案中,所述突变是突变为残基R。一些实施方案中,所述突变是突变为残基A。一些实施方案中,所述突变是突变为残基H。一些实施方案中,所述突变是突变为残基K。
- [0091] 在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1-41位、第42-195位、第196-290位、第291-358位、第359-479位、第480-636位、第637-689位、第690-846位、第847-884位、第885-959位、第960-1080位或第1081-1139位氨基酸残基具有突变。
- [0092] 在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于SEQ ID NO:696所示序列的RuvC结构域存在突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第637-689位、第885-959位或第1081-1139位氨基酸残基具有突变。
- [0093] 在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于SEQ ID NO:696所示序列的helical结构域存在突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第42-195位、第291-479位或第690-846位氨基酸残基具有突变。

- [0094] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1-41位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第42-195位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第196-290位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第291-358位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第359-479位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第480-636位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第637-689位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第690-846位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第847-884位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第885-959位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第960-1080位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1081-1139位氨基酸残基具有突变。
- [0095] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1-41位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第42-195位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少8

0%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第196–290位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第291–358位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第359–479位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第480–636位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。

性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第637–689位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第690–846位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第847–884位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第885–959位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第960–1080位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、

至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1081-1139位氨基酸残基的位置具有与SEQ ID NO:696所示序列相比至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。

[0096] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、19、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、46、47、48、49、50、51、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、101、102、103、104、105、106、108、109、110、111、112、114、115、116、117、118、119、120、121、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、169、170、171、172、174、175、176、177、178、179、180、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、194、195、196、197、198、199、200、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、242、243、244、245、247、248、249、250、251、252、253、255、256、257、258、259、260、261、262、263、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、278、279、2

81、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、2
95、296、297、298、299、300、301、302、303、305、306、308、309、310、3
13、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、327、328、3
29、330、331、332、333、334、335、336、337、339、340、341、342、343、3
44、345、346、347、348、350、351、352、353、354、355、356、357、358、3
59、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、3
73、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、3
87、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399、400、4
01、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、4
15、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、4
29、431、432、433、435、436、437、439、440、441、442、443、444、446、4
47、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、4
61、462、463、464、467、469、470、471、472、473、474、475、476、477、4
78、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、4
92、493、494、496、497、499、500、501、502、503、504、506、507、508、5
09、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、5
23、524、525、526、527、528、529、531、532、533、534、535、536、537、5
38、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、552、5
53、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、5
68、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、5
82、583、584、585、586、587、589、590、592、593、594、595、596、597、5
98、599、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、6
13、614、615、616、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、6
28、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、6
43、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654、655、656、6
57、658、659、660、661、662、663、664、665、666、667、668、669、670、6
71、672、673、674、675、676、678、679、680、681、683、684、685、686、6
88、689、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、7

03、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、715、716、717、7
19、720、721、722、723、724、725、727、728、729、730、731、732、733、7
34、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、7
49、751、752、753、754、755、756、758、759、760、761、762、764、765、7
66、767、768、769、771、772、773、774、775、776、779、780、781、782、7
83、784、785、786、787、789、790、791、792、794、795、797、798、800、8
01、802、804、805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、8
17、818、819、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、831、8
32、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、844、845、846、8
47、848、849、850、851、852、853、854、855、856、857、858、859、860、8
62、863、864、865、866、867、868、870、872、873、874、875、876、877、8
79、880、881、882、883、884、885、886、887、888、890、891、892、893、8
94、895、896、897、898、899、900、901、902、903、904、905、906、909、9
10、911、912、913、914、916、917、918、919、920、921、922、923、924、9
25、926、927、928、930、931、932、933、934、935、936、937、938、939、9
40、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、9
54、955、956、957、958、959、960、961、963、964、965、966、967、968、9
69、970、971、972、973、974、975、976、977、979、980、981、982、983、9
85、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、9
99、1000、1001、1002、1003、1004、1005、1006、1007、1008、1009、1010、
1011、1012、1013、1014、1015、1016、1017、1018、1021、1023、1024、102
5、1026、1027、1028、1029、1030、1031、1032、1033、1035、1036、1037、10
38、1039、1040、1041、1042、1043、1044、1045、1046、1047、1048、1049、1
050、1052、1053、1055、1056、1057、1058、1059、1060、1061、1062、1063、
1064、1065、1066、1067、1068、1069、1070、1071、1072、1073、1074、107
5、1076、1077、1078、1079、1080、1081、1082、1083、1084、1085、1086、10
87、1088、1089、1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、1097、1098、1
100、1101、1102、1103、1104、1105、1107、1108、1109、1110、1111、1112、

1113、1115、1116、1117、1120、1122、1123、1124、1125、1128、1129、1130、1131、1132、1133、1134和1135位氨基酸残基中的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个或至少12个具有突变。可选地，所述突变是突变为其他任意天然氨基酸残基。进一步可选地，所述突变是突变为残基R、H、K或A。一些实施方案中，所述突变是突变为残基R。一些实施方案中，所述突变是突变为残基A。一些实施方案中，所述突变是突变为残基H。一些实施方案中，所述突变是突变为残基K。

[0097] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1、2、3、4、5、7、10、24、30、48、51、55、58、59、66、108、118、138、141、175、178、185、186、257、333、352、356、375、376、378、379、383、397、400、416、426、443、449、456、459、462、469、484、485、509、561、597、607、609、623、638、639、640、697、722、731、733、755、758、771、773、779、781、784、785、786、789、792、794、798、822、823、825、826、829、830、833、834、836、842、845、846、847、850、851、853、855、856、858、859、860、866、884、892、893、900、904、926、956、985、988、989、992、993、996、1016、1033、1045、1050、1073、1074、1095、1100、1124、1129和1132位氨基酸残基中的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个或至少12个具有突变。可选地，所述突变是突变为残基R、H或K。进一步可选地，所述突变是突变为残基R。

[0098] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第12、29、35、36、40、53、57、60、64、71、72、73、75、94、95、96、97、99、137、148、149、153、164、167、171、172、174、177、190、192、194、199、204、207、208、211、215、228、232、236、238、244、248、253、256、258、261、262、275、282、286、292、298、300、302、320、324、328、332、336、339、366、373、374、384、389、393、395、415、432、436、440、453、458、460、471、472、474、506、508、510、519、523、526、528、

531、534、544、550、570、571、573、592、594、596、613、615、616、619、622、624、626、648、650、651、652、658、661、663、684、686、689、693、704、744、783、787、800、849、854、876、888、890、891、894、912、940、941、942、945、946、948、961、971、979、987、998、1000、1002、1006、1013、1015、1035、1042、1048、1049、1052、1053、1057、1058、1063、1079、1081、1082、1083、1084、1085、1086、1087、1088、1089、1090和1091位氨基酸残基中的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个或至少12个具有突变。可选地，所述突变是突变为残基A。

[0099] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的以下任意1个、任意2个、任意3个、任意4个、任意5个、任意6个、任意7个、任意8个、任意9个、任意10个、任意11个、任意12个、任意13个、任意14个、任意15个、任意16个或更多个位置的氨基酸残基具有突变：

[0100] I33、G184、S185、Q186、G194、N195、G196、G197、N245、G256、L260、Y278、S285、Y316、H350、D352、A355、A356、C385、P386、H387、G390、K391、N392、D429、Q461、Q462、Q469、E485、S491、K521、P525、L611、K629、K631、N633、D841、N898、K987、A988、G989、Q990、T991、D1010、E1013、A1136、K1138、T1139。

[0101] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在与SEQ ID NO:696所示序列的对应位置发生了如SEQ ID NO:696所示序列的以下任意1个、任意2个、任意3个、任意4个、任意5个、任意6个、任意7个、任意8个、任意9个、任意10个、任意11个、任意12个、任意13个、任意14个、任意15个、任意16个或更多个氨基酸突变：

[0102] I33R、G184R、S185R、Q186R、G194R、N195R、G196R、G197R、N245R、G256R、L260R、Y278R、S285R、Y316R、H350R、D352R、A355R、A356R、C385R、P386R、H387R、G390R、K391R、N392R、D429R、Q461R、Q462R、Q469R、E485R、S491R、K521R、P525R、L611R、K629R、K631

R、N633R、D841R、N898R、K987R、A988R、G989R、Q990R、T991R、D1010R、E1013R、A1136R、K1138R、T1139R。

[0103] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在与SEQ ID NO:696所示序列的对应位置发生了如SEQ ID NO:696所示序列的以下任意1种、任意2种、任意3种、任意4种、任意5种、或更多种氨基酸突变组合(各种突变组合之间以顿号隔开)：186+352+1+426+846+858+860、186+352+1+426+846+860、186+352+1+5+426+858+860、186+352+1+3+426+858+860、186+352+3+426+860、186+352+1+1+333+426+858+860、186+352+1+426+485+858+860、186+352+1+5+426+860、186+352+3+426+858+860、186+352+5+426+858+860、186+352+333+426+858+860、186+352+333+426+860、186+352+426+846+860、186+352+5+426+860、186+352+1+3+426+860、5+426+860、186+352+426+846+858+860、186+352+1+426+485+860、426+858+860、7+426+858、186+352+426+860、186+352+426+485+858+860、186+352+426+485+860、426+846+858+860、7+426+846、186+352+860、184+186+352+376+1132、5+333+426、5+426+858、186+352+1+333+426+860、184+186+352+3+107+426、186+352+5+426、333+376+426、186+352+5、2+5+846+858、186+352+3+426、5+846+858、186+352+426+846、186+352+7、186+352+3+376+426、186+352+376+426+860+865、186+352+376+426、3+846+860、846+858+988、3+426+858、3+846+858、3+858+860、186+352+858、184+186+352+860、333+426、184+186+352+3+376、3+426+860、846+860+988、3+860、184+186+352+3+639、186+352+333+426、846+585+860、186+352+426、333+426+846、333+426+485、5+846+860、3+846+988、184+186+352+376、3+333+426、186+352+426+485、333+426+858、333+426+1132、428+485、186+352+333+352+376+426、858+860、186+352+376+426+485+860、184+186+352+426、186+352+639、5+858+988、3+858+988、5+858、3+858、184+186+352+846、184+186+352+639、858+988、184+186+352+426+1132、186+352+1132、184+186+352+5、184+186+352+858、858+860+1132、3+5、426+649、186+352+426+485+860、186+352+333、184+186+352、186+376、846+860、858+988+1132、846+858、333+376、376+426、184+186+352+3、3+846+1

132、5+846+1132、186+352+426+1132、376+426+485+660、426、5+846、846+860+1132、333+376+485、184+186+352+639+1132、352+426、333+485、184+186+352+333、846+858+1132、333+426+860、186+352+988、5+860、846+988、186+352、3+846、846+1132、184+186+352+1132、186+485、988+1132、184+186+352+485、376+485、5+1132、3+7、186+352+485、184+186+352+7、184+186+352+333+336、3+1132、426+858+988、186+352+376、186+352+3和186+352+333+336+352+376+426。进一步可选地，所述突变是突变为残基R或A。

[0104] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在与SEQ ID NO:696所示序列的对应位置具有如SEQ ID NO:696所示序列的以下任意1种氨基酸突变组合(各种突变组合之间以顿号隔开)：186+352+1+426+846+858+860、186+352+1+426+846+860、186+352+1+5+426+858+860、186+352+1+3+426+858+860、186+352+3+426+860、186+352+1+333+426+858+860、186+352+1+426+485+858+860、186+352+1+5+426+860、186+352+3+426+858+860、186+352+5+426+858+860、186+352+333+426+858+860、186+352+333+426+860、186+352+426+846+860、186+352+5+426+860、186+352+1+3+426+860、5+426+860、186+352+426+846+858+860、186+352+1+426+485+860、426+858+860、7+426+858、186+352+426+860、186+352+426+485+858+860、186+352+426+485+860、426+846+858+860、7+426+846、186+352+860；进一步可选地，所述突变是突变为残基R或A。

[0105] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在与SEQ ID NO:696所示序列的对应位置发生了如SEQ ID NO:696所示序列的以下任意1种、任意2种、任意3种、任意4种、任意5种、或更多种氨基酸突变：

[0106] D352R+Q186R、D352R+L260R、D352R+A355R、A355R+L260R、P386R+C385R、E485R+Q462R、D352R+Q186R、A355R+L260R、G184R+R186Q、D352R+Q186R+I33R、D352R+Q186R+G184R、D352R+Q186R+S185R、D352R+Q186R+G256R、D352R+Q186R+Y278R、D352R+Q186R+S285R、D352R+Q186R+Y316R、D352R+Q186R+H350R、D352R+Q186R+A356R、D352R+Q186R+Q469R、D352R+Q186R+S491R、D352R+Q186R+K521R、D352R

+Q186R+P525R、D352R+Q186R+K629R、D352R+Q186R+N633R、D352R+Q186R+D841R、D352R+Q186R+N898R、D352R+Q186R+K987R、D352R+Q186R+T991R、D352R+Q186R+D1010R、D352R+Q186R+E1013R。

[0107] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第2位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第3位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第4位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第5位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第7位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第10位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第24位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第30位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第48位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第51位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第55位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第58位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第59位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第66位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第108位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第118位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID

NO:696所示序列的第138位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第141位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第175位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第178位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第185位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第186位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第257位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第333位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第352位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第356位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第375位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第376位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第378位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第379位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第383位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第397位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第400位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第416位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第426位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第443位氨基酸残基具有突变。在本

披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第449位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第456位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第459位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第462位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第469位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第484位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第485位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第509位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第561位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第597位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第607位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第609位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第623位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第638位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第639位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第640位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第697位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第722位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第731位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SE

Q ID NO:696所示序列的第733位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第755位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第758位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第771位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第773位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第779位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第781位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第784位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第785位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第786位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第789位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第792位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第794位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第798位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第822位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第823位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第825位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第826位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第829位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第830位氨基酸残基具有突变。

在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第833位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第834位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第836位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第842位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第845位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第846位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第847位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第850位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第851位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第853位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第855位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第856位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第858位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第859位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第860位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第866位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第884位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第892位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第893位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于

如SEQ ID NO:696所示序列的第900位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第904位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第926位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第956位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第985位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第988位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第989位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第992位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第993位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第996位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1016位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1033位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1045位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1050位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1073位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1074位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1095位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1100位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1124位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中,所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1129位氨

基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1132位氨基酸残基具有突变。进一步可选地，所述突变是突变为残基R。

[0108] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第651位氨基酸残基具有突变。进一步可选地，所述突变是突变为残基A。

[0109] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第891位氨基酸残基具有突变。进一步可选地，所述突变是突变为残基A。

[0110] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1082位氨基酸残基具有突变。进一步可选地，所述突变是突变为残基A。

[0111] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的以下任意1个、任意2个、任意3个、任意4个、任意5个、任意6个、任意7个、任意8个、任意9个、任意10个、任意11个、任意12个、任意13个、任意14个、任意15个、任意16个或更多个位置的氨基酸残基具有突变：

[0112] V15、Q172、A173、G182、E183、G184、K185、K186、G239、V243、D264、E271、Y295、L297、N317、T329、E331、I335、K339、K339、N347、E363、H366、V426、K429、S430、L433、S452、S455、S465、E493、P497、K587、E768、T825、A911、G914、K915、I916、K918、T919、T920、A922、E940。

[0113] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在与SEQ ID NO:52所示序列的对应位置发生了如SEQ ID NO:696所示序列的以下任意1个、任意2个、任意3个、任意4个、任意5个、任意6个、任意7个、任意8个、任意9个、任意10个、任意11个、任意12个、任意13个、任意14个、任意15个、任意16个或更多个氨基酸突变：

[0114] V15R、Q172R、A173W、G182R、E183R、G184R、K185R、K186R、G239R、V243R、D264R、E271R、Y295R、L297R、N317R、T329R、E331R、I335R、H366R、V426R、K429R、S430R、L433R、S452R、S455R、S465R、E493R、P497R、K587R、E768R、T825R、A911R、G914R、K915R、I916R、K918R、T919R、T920R、A922R、E940R。

5R、K339R、K339R、N347E、E363R、H366R、V426R、K429R、S430R、L433R、S452R、S455R、S465R、E493R、P497R、K587R、E768R、T825R、A911R、G914R、K915R、I916R、K918R、T919R、T920R、A922R、E940R。

[0115] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在与SEQ ID NO:52所示序列的对应位置发生了如SEQ ID NO:696所示序列的以下任意1种、任意2种、任意3种、任意4种、任意5种、或更多种氨基酸突变：

[0116] N347E+K339R、Q172R+S452R、Q172R+T920R、Q172R+V426R、S452R+T920R、V426R+S452R、V426R+T920R。

[0117] 在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第15位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第172位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第173位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第182位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第183位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第184位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第185位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第186位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第239位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第243位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第264位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第271位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第295位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第297位氨基酸残基具有突变。

在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第317位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第329位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第331位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第335位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第339位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第339位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第347位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第363位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第366位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第426位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第429位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第430位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第433位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第452位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第455位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第465位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第493位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第497位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第587位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52

所示序列的第768位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第825位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第911位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第914位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第915位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第916位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第918位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第919位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第920位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第922位氨基酸残基具有突变。在本披露的一些实施方案中，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:52所示序列的第940位氨基酸残基具有突变。进一步可选地，所述突变是突变为残基R。

[0118] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种指导多核苷酸，其包含(i)同向重复序列，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583、704任一项相比具有至少50%同一性，(ii)工程化以与靶核酸杂交的指导序列；所述同向重复序列与所述指导序列连接，所述指导多核苷酸能够与Cas12蛋白形成复合物并指导所述复合物与所述靶核酸的序列特异性结合。

[0119] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

[0120] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少60%的序列同一性。

- [0121] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少65%的序列同一性。
- [0122] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少70%的序列同一性。
- [0123] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少75%的序列同一性。
- [0124] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少80%的序列同一性。
- [0125] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少85%的序列同一性。
- [0126] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少90%的序列同一性。
- [0127] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少95%的序列同一性。
- [0128] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少96%的序列同一性。
- [0129] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少97%的序列同一性。
- [0130] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有至少98%的序列同一性。
- [0131] 在本披露的一些实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一项相比具有100%的序列同一性。
- [0132] 在优选的实施方案中，所述Cas12蛋白为本披露所述的Cas12蛋白。
- [0133] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-60个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-50个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-40个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-35个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-30个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-25个核苷酸。

在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含18–25个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含20–25个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含18–22个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个或60个核苷酸。

[0134] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列与所述靶核酸杂交，所述指导序列与所述靶核酸为90%–100%互补。

[0135] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列与所述靶核酸杂交。

[0136] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列与所述靶核酸杂交，所述指导序列与所述靶核酸错配不超过一个核苷酸。

[0137] 在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15–100个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15–90个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15–80个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15–70个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15–60个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15–50个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15–40个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含20–40个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含20–30个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个或60个核苷酸。

[0138] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列位于所述同向重复序列的3'端。

[0139] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列位于所述同向重复序列的5'端。

- [0140] 在本披露的具体实施方案中，所述指导多核苷酸进一步包含tracrRNA。
- [0141] 在本披露的一些实施方案中，所述tracrRNA序列与SEQ ID NO:584-695任一项相比具有至少50%同一性。在本披露的一些实施方案中，所述tracrRNA序列与SEQ ID NO:584-695任一项相比具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。
- [0142] 在本披露的一些实施方案中，所述tracrRNA序列任选自SEQ ID NO:584-695任一项所示序列。
- [0143] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA可与所述同向重复序列互补配对。在通常情况下，所述互补配对是部分碱基的互补配对。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA可与所述同向重复序列相互作用。
- [0144] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过核苷酸序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过1-10个核苷酸组成的核苷酸序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸组成的核苷酸序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过4个核苷酸组成的核苷酸序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过5'-GAAA-3'序列连接。
- [0145] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列位于所述同向重复序列的3'端。
- [0146] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列位于所述同向重复序列的5'端。
- [0147] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA包含10-200个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA包含10-190个、10-180个、10-170个、10-160个、10-150个、10-140个、10-130个、10-120个、10-110个、10-100个、1

0-90个、10-80个、10-70个、10-60个、10-50个、10-40个、10-30个、10-20个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、20-100个、30-100个、40-100个、20-90个、20-80个、20-70个、20-60个、20-50个或30-50个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA包含15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个或100个核苷酸。

[0148] SEQ ID NO:1-53示出了Cas蛋白的氨基酸序列。

[0149] SEQ ID NO:54-583示出了Cas蛋白对应的同向重复序列(DR)。当某一特定Cas蛋白对应的DR序列列出了多个时，可择一使用。

[0150] SEQ ID NO:584-695示出了Cas蛋白对应的tracrRNA序列。当SEQ ID NO:584-695未列出某一特定Cas蛋白对应的tracrRNA序列时，则gRNA可仅含指导序列和DR序列、不含tracrRNA序列。当SEQ ID NO:584-695列出某一特定Cas蛋白对应的tracrRNA序列时，则gRNA除了含指导序列和DR序列外，可含或不含tracrRNA序列。当某一特定Cas蛋白对应的tracrRNA序列列出了多个时，可择一使用。

[0151] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种Cas12失活变体，其特征在于，所述Cas12失活变体为如本披露所述的Cas12蛋白的核酸酶活性失活变体。

[0152] 在本文中，根据上下文语境，所述Cas12蛋白的指代范围可囊括所述Cas12失活变体。但鉴于Cas12失活变体的重要性(非限制性示例例如所述Cas12失活变体与脱氨酶融合进行单碱基编辑，与转录激活域或转录抑制域融合进行转录调控等等)，本文会对其单独进行着重的描述；这并不意味着所述Cas12蛋白的指代范围一定不包括所述Cas12失活变体。

- [0153] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12失活变体为核酸酶活性完全失活的变体，即dead Cas12失活变体(dCas12)。所述dCas12只能在指导多核苷酸的介导下结合靶核酸，而不具备或几乎不具备切割靶核酸的功能。例如，所述dCas12的靶核酸切割效率为失活突变前的Cas12蛋白的靶核酸切割效率的 $\leq 20\%$ 、 $\leq 15\%$ 、 $\leq 10\%$ 、 $\leq 5\%$ 、 $\leq 4\%$ 、 $\leq 3\%$ 、 $\leq 2\%$ 或 $\leq 1\%$ 。
- [0154] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12失活变体为核酸酶活性部分失活的变体。进一步地，所述核酸酶活性部分失活的变体为Cas12切口酶(nickase Cas12, nCas12)，其在指导多核苷酸的介导下结合靶核酸，然后切割双链靶核酸中的其中一条单链，而不切割另一条单链。
- [0155] 在本披露的优选实施方案中，所述Cas12失活变体为所述Cas12蛋白的Ruvc结构域失活。
- [0156] 在本披露的优选实施方案中，所述Cas12失活变体为所述Cas12蛋白的Ruvc-I、Ruvc-II或Ruvc-III结构域失活。
- [0157] 在本披露的优选实施方案中，所述Cas12失活变体通过在所述Cas12蛋白的Ruvc-I、Ruvc-II或Ruvc-III结构域引入失活突变而得到。
- [0158] 在本披露的具体实施方案中，所述失活突变选自对应于如SEQ ID NO:696所示的氨基酸序列的D651A、E891A和D1082A中的一种或多种。
- [0159] 在本披露的具体实施方案中，所述失活突变为对应于如SEQ ID NO:696所示的氨基酸序列的D651A、E891A和D1082A。
- [0160] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12失活变体可识别的PAM序列与所述Cas12蛋白可识别的PAM序列相同。
- [0161] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12失活变体可识别的PAM序列(5'→3')任选自以下的任一种或几种：
- [0162] A、C、T、G、
- [0163] TA、TC、GN、AA、AG、TG、AN、GG、CG、TN、NT、NG、GT、NA、CC、AC、GC、AT、CT、GA、TT、CN、NC、CA、
- [0164] NTN、ANN、TTN、ATC、NAC、AGA、TGC、TCT、NGN、CGC、NTC、GCA、TCG、TTT、CCG、GGG、NAG、ACA、CGG、CNG、ACN、GT

G、CNT、TTG、TCN、GGT、TNC、CCN、CGT、TGG、CGA、NGG、TCC、AGT、NCA、CAN、TCA、NNG、TAC、CCT、NTG、CGN、TGN、CAT、NGC、GNG、GNC、NNA、GAA、TTC、CTT、ATA、TAT、GCT、NCC、TTA、AGN、GNN、CAA、CAC、AGG、NTT、ANG、GNA、GT
T、NGA、TAA、GTA、GGN、GNT、NCG、ATT、CCA、CNN、AAA、AAC、ATN、GAG、CTG、ACG、NAA、TAN、NAT、CNA、GCN、GTC、NC
N、CTN、CNC、ANT、NNC、CAG、NAN、ATG、NCT、CCC、AAN、TGT、TNA、ACC、GAT、ACT、AAT、GGA、GAN、ANC、GAC、NNT、CTA、TNN、GCG、GTN、TNT、AAG、TAG、NGT、NTA、ANA、CTC、GCC、TGA、GGC、AGC、TNG、

[0165] NGAA、GANC、GCNC、NTNT、TGGG、AAGG、AAGN、NTNN、TCGT、CNTG、NTGG、CCGN、ATAT、TGCA、NGGT、TGNT、NNTG、NCCG、ACAT、GNTG、CGCG、GACN、NTCG、TCNG、CTGC、TNNC、GGTN、CGNN、TCCA、AGCN、TNAG、GGAC、GATC、AANA、NATG、CCAG、NAAT、TCNT、CACT、CGGC、CGAN、CNCA、ATNT、NNNG、NGCT、CTGG、GGAN、NTNC、ATTC、AATG、CNTC、TGGN、NATC、GTCG、ACNC、GCNN、GACT、CTNT、NCTT、NAGG、NANC、CTTA、GTCT、ANAG、NGCN、CNNA、TCAG、ACAC、NCGG、TNNT、CAAG、ACCT、CCCA、GTNC、ANTC、GACC、AACG、TTAA、TCCG、CGCC、NCCN、TTNA、NCNT、NGCA、AGNN、AATC、GGGA、GNAN、NAGA、CGNA、GTAT、GTNA、ATNC、ACNA、GGAA、NTCC、GGCG、AATN、CNNT、AGGC、GCGN、GTGC、TTGA、AAGC、GAAG、ATNG、TGCT、TACT、CTAN、GGCT、GNGC、GTCN、CGAA、CNAC、GCCCT、TAGG、ANGC、TNAA、GANT、NCNA、NCCT、AGAN、GTAA、TTTN、ATGA、TGNA、CANC、ACGA、CCAC、CCGG、CTNG、CNGN、GGTA、NGNC、GTTT、CTAA、TNCT、CTGN、NGAC、TGTA、TANN、GCNT、GCTC、CNCG、AAAN、CCNT、GANA、CACA、CTNA、ANTN、TTNT、CCTG、TNTT、CANA、NTAN、CACG、GGAT、TTTC、GNC

G、TACA、GTAC、GAGC、ACNN、ATGG、AANT、ATCC、ACCG、AGN
C、TGTT、NCAT、ATTA、GNTT、GAGN、TNAC、GCCG、NTNG、GTG
G、GNGN、ACCA、NTAA、ACTN、NCTG、NCTA、TTTT、GCNG、NT
AG、CAAA、GGNA、CNTN、TTAG、TCTG、NCTN、TATG、GCGT、TA
NT、GGGT、NACN、ACTG、CCNG、GNNT、CCAT、GNTA、NANT、T
ACN、TGTN、ATCT、NCAN、TNGG、CNNN、AAGT、ATTN、GGNN、
CAGC、CGTN、GCCC、GCTT、CNAT、NANA、CCNN、GNGA、TNG
N、GCAG、CGNG、CCTT、NGAG、NCNG、AANG、GGTC、ACTC、TG
AA、NAGN、NNCA、ACGG、TGAC、TCCN、ANNN、TCGN、TAAN、C
AGG、TTAN、NGAN、NTGC、CCNC、TNTN、ATGN、GTGN、GCAT、
NNGN、NNCC、CCNA、CNAG、GNAC、CGNT、TTCN、TAGN、ANC
T、NATN、GTGA、TNGT、CTAT、CCCG、TNCA、NGTA、NNGA、CG
TG、TAAT、CGCA、NNCG、NGTC、NAGT、GNAT、TNTC、NCGC、
NNGN、CATN、GTTN、AGTA、GNNG、TTNN、TGNC、NAAA、TNC
C、CACC、CTCT、TTGN、GCTA、NTTT、TGAN、TNAN、NGAT、CC
TN、GAAT、GTCA、NTCN、GCCA、ANTG、TGGC、CAAC、TTTA、TG
TC、CGGA、NCGN、AGNT、NCGA、ANCG、ACAA、TAGT、CGAG、N
CAA、AATA、AGGG、GNGT、CAGA、AGGT、GGGG、ANAC、TGGT、G
TGT、GNCA、GTTA、NGTT、TNNG、NCAG、CACN、GCAN、GAAC、
NCCA、TTCC、NCNN、GNNN、ANGT、NTNA、CCCT、GNAA、TTN
G、GTNN、GGNG、TCTA、NCAC、GANG、TTCG、CCTC、CNGG、AN
NA、TCAN、ATCG、NTGA、CGTA、TTAC、GCTN、GCTG、NGTG、T
CCC、CANN、NNNA、TAGA、ACGT、AGAT、GATG、GCCN、TGNG、
GCGC、CCGA、GNCN、NTTG、NNAT、TNCG、NANG、GGTG、NCC
C、GNCC、CAAT、CGCN、CNGA、NTTC、TTCT、NGGA、AGTC、CN
NC、NACG、AGTN、NANN、ACAG、GNCT、TACC、CNTA、TGTG、
CATC、GACA、TCTT、NTCT、CTGA、AGGA、GATA、TNAT、CCTA、
GGAG、ANCC、AANC、GTAN、GCNA、TGNN、TANC、GNTN、AGC

G、CTAG、NNAA、AGTT、CTAC、TACG、TTNC、TNTA、ANTT、ATAC、TCCT、TCAC、NGGC、NTTN、NNTC、CANT、ATAA、TGCC、CTCC、TNNA、GTNG、ACGN、GGCA、AAAG、TTGT、NGNA、NAAN、TATN、CGGG、CATA、ATGC、ACGC、ACCN、ATTT、TCNA、TNGC、NACA、NACC、CTCN、GGCC、TANG、AGAA、TNGA、TAGC、CAGN、GGCN、ANNT、NNNC、TCAT、CATT、TAAA、ATGT、TGAG、CGCT、TCGG、GCAC、GTAG、NTCA、NATT、ANTA、CCCN、ACTA、AAAA、GAAN、TATT、NNAC、TGAT、GGGN、CCAA、GNNG、CCAN、GTCC、NNCT、AGNG、CNTT、CNCT、GANN、GGTT、AGCT、CATG、NTAC、TNCN、NNTN、TGGA、GATT、AGCA、TAAG、GCGA、ACTT、ANGN、NTGN、AACN、AACT、TCAA、NTAT、TCGA、NCTC、NNGG、ANGG、NNTT、GTNT、CTNN、CGGN、TAAC、GGNC、GAAA、ACNG、GNAG、TTGG、CTTC、CNGT、TNNN、TNTG、GTTG、TCNN、CGGT、GAGA、CNNG、NCNC、GAGG、AGCC、ATNN、NNNT、AGAC、AAC C、ANNC、ANNG、ACAN、GTTC、TATA、GNTC、NCGT、NGNT、CGTC、CCGC、CGAC、GACG、ATTG、GNNC、CNAA、TATC、AGNA、CTNC、TTCA、ANCA、ACCC、AGTG、CCGT、ANAT、CTGT、GGGC、NTTA、NAAG、AANN、CNAN、NNCN、ANAA、ANAN、CTTG、NGNN、AGAG、TANA、TCNC、GCAA、NGNG、NAGC、NATA、ATCN、CGTT、CNGC、GATN、NNTA、AAGA、CTTT、AAAC、AGGN、ACNT、NTGT、CTTN、ATCA、NACT、NNAG、NGTN、NAAC、TGCG、GGNT、ATAN、TTGC、ANCN、CCCC、ANGA、NGCG、TCTC、CTCG、ATNA、AATT、NNAN、NNGT、TCGC、ATAG、CAAN、AACA、TTAT、CAGT、GNNA、TGCN、GCGG、NGGG、CANG、TTTG、GAGT、AAAT、CTCA、CNCN、CNCC、TCTN、CGNC、NGCC、CGAT、NNGC；

[0166] 所述N为A、T、C或G。

- [0167] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种融合蛋白或缀合物，所述融合蛋白或缀合物包含以下元件：(1)如本披露所述的Cas12蛋白，或如本披露所述的Cas12失活变体；和(2)同源或异源功能结构域。
- [0168] 在本文中，根据上下文语境，所述Cas12蛋白的指代范围可囊括所述Cas12失活变体。但鉴于Cas12失活变体的重要性(非限制性示例例如所述Cas12失活变体与脱氨酶融合进行单碱基编辑，与转录激活域或转录抑制域融合进行转录调控等等)，本文会对其单独进行着重的描述；这并不意味着所述Cas12蛋白的指代范围一定不包括所述Cas12失活变体。在本披露的一些实施方案中，提供一种融合蛋白，所述融合蛋白包含：(1)如本披露所述的Cas12蛋白，或如本披露所述的Cas12失活变体；和(2)同源或异源功能结构域。
- [0169] 在本披露的一些实施方案中，提供一种融合蛋白，所述融合蛋白包含：(1)如本披露所述的Cas12蛋白；和(2)同源或异源功能结构域。
- [0170] 在本披露的具体实施方案中，提供一种缀合物，所述缀合物包含：(1)如本披露所述的Cas12蛋白，或如本披露所述的Cas12失活变体；和(2)同源或异源功能结构域。
- [0171] 在本披露的具体实施方案中，提供一种缀合物，所述缀合物包含：(1)如本披露所述的Cas12蛋白；和(2)同源或异源功能结构域。
- [0172] 在一些实施方案中，所述功能结构域具有修饰靶核酸序列的酶活性；例如核酸酶活性、甲基转移酶活性、去甲基化酶活性、DNA修复活性、DNA损伤活性、脱氨活性、歧化酶活性、烷基化活性、脱嘌呤活性、氧化活性、嘧啶二聚体形成活性、整合酶活性、转座酶活性、重组酶活性、聚合酶活性、连接酶活性、解旋酶活性、光解酶活性、糖基化酶活性、去糖基化活性、乙酰转移酶活性、去乙酰化酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、去泛素化活性、腺苷酰化活性、去腺苷化活性、SUMOylating活性、deSUMOylating活性、豆蔻酰化活性和/或去豆蔻酰化活性。
- [0173] 在本披露的具体实施方案中，所述失活突变选自对应于如SEQ ID NO:696所示的氨基酸序列的D651A、E891A和D1082A中的一种或多种。

- [0174] 在本披露的具体实施方案中，所述失活突变为对应于如SEQ ID NO:696所示的氨基酸序列的D651A、E891A和D1082A。
- [0175] 在一些实施方案中，所述功能结构域任选自以下的一种或更多种：核酸酶(例如FokI)、甲基转移酶、去甲基化酶、DNA修复酶、DNA损伤酶、脱氨酶、歧化酶、烷基化酶、脱嘌呤酶、氧化酶、嘧啶二聚体形成酶、整合酶、转座酶、重组酶、聚合酶、连接酶、解旋酶、光解酶、糖基化酶、去糖基化酶、乙酰转移酶、去乙酰化酶、激酶、磷酸酶、泛素连接酶、去泛素化酶、腺苷酰化酶、去腺苷酶、SUMOylating酶、deSUMOylating酶、豆蔻酰化酶和/或去豆蔻酰化酶。
- [0176] 在本披露的具体实施方案中，所述同源或异源功能结构域任选自以下的一种、两种、三种、四种或更多种：亚细胞定位信号、DNA结合域、蛋白酶结构域、转录激活域、转录抑制域、核酸酶结构域、脱氨酶结构域、尿嘧啶DNA糖基化酶结构域(UDG)、尿嘧啶DNA糖基化酶抑制结构域(UGI)、甲基化酶、去甲基化酶、转录释放因子、组蛋白乙酰化酶结构域、组蛋白脱乙酰化酶结构域、DNA连接酶、亲和标签、报告标签、亲和域和报告域。
- [0177] 在本披露的一些实施方案中，所述亚细胞定位信号任选自：核定位信号、核输出信号、线粒体定位信号、叶绿体定位信号。
- [0178] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白或缀合物包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或更多个所述同源或异源功能结构域；所述功能结构域相同或不同。
- [0179] 在一些实施方案中，所述融合蛋白或缀合物在所述Cas12蛋白的N-端和/或C-端任意连接0个、1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个所述功能结构域。
- [0180] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含1个、2个、3个、4个或更多个核定位信号。
- [0181] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白可用于实现碱基编辑，例如与指导多核苷酸联合用于实现碱基编辑。在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含核定位信号、脱氨酶结构域。

- [0182] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含核定位信号、胞苷脱氨酶结构域，以及可选的1个或2个UGI结构域。所述融合蛋白可用于实现靶核酸的C→T碱基编辑。
- [0183] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含核定位信号、腺苷脱氨酶结构域。所述融合蛋白可用于实现靶核酸的A→G碱基编辑。
- [0184] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含核定位信号、胞苷脱氨酶结构域、腺苷脱氨酶结构域。在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含1个、2个或3个核定位信号，以及脱氨酶结构域。在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含UGI结构域。在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含1个、2个或3个核定位信号，脱氨酶结构域，以及1个或2个UGI结构域。
- [0185] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白可用于实现特定靶基因的转录激活，例如与指导多核苷酸联合用于实现特定靶基因的转录激活。在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含核定位信号、转录激活域。
- [0186] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白可用于实现特定靶基因的转录抑制，例如与指导多核苷酸联合用于实现特定靶基因的转录抑制。在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含核定位信号、转录抑制域。
- [0187] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白可用于实现特定靶序列的甲基化，例如与指导多核苷酸联合用于实现特定靶序列的甲基化。在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含核定位信号、DNA甲基化域。
- [0188] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白可用于实现特定靶序列的去甲基化，例如与指导多核苷酸联合用于实现特定靶序列的去甲基化。在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白包含核定位信号、DNA去甲基化域。
- [0189] 在本披露的优选实施方案中，所述核酸酶结构域包括具有ssDNA切割活性的多肽和/或具有dsDNA切割活性的多肽。
- [0190] 在本披露的优选实施方案中，所述核酸酶结构域包括具有ssDNA切割活性的多肽。
- [0191] 在本披露的优选实施方案中，所述核酸酶结构域包括具有dsDNA切割活性的多肽。

- [0192] 在本披露的具体实施方案中，所述Cas12蛋白或失活变体与所述同源或异源功能结构域直接或间接连接。
- [0193] 在本披露的较佳实施方案中，所述直接连接为共价连接，所述间接连接为通过氨基酸连接子或非氨基酸连接子连接。
- [0194] 在本披露的更佳实施方案中，所述同源或异源功能结构域相对于所述Cas12蛋白或失活变体在N-末端、C-末端或内部融合或缀合。
- [0195] 本披露中，所述融合蛋白指的是所述元件(1)与所述元件(2)之间通过肽段连接，或者直接连接；所述缀合物指的是所述元件(1)与所述元件(2)之间通过非肽段的化学键连接。
- [0196] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白或缀合物可识别的PAM序列与所述Cas12蛋白可识别的PAM序列相同。
- [0197] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白或缀合物可识别的PAM序列(5'→3')任选自以下的任一种或几种：
- [0198] A、C、T、G、
- [0199] TA、TC、GN、AA、AG、TG、AN、GG、CG、TN、NT、NG、GT、N
A、CC、AC、GC、AT、CT、GA、TT、CN、NC、CA、
- [0200] NTN、ANN、TTN、ATC、NAC、AGA、TGC、TCT、NGN、CGC、NT
C、GCA、TCG、TTT、CCG、GGG、NAG、ACA、CGG、CNG、ACN、GT
G、CNT、TTG、TCN、GGT、TNC、CCN、CGT、TGG、CGA、NGG、T
CC、AGT、NCA、CAN、TCA、NNG、TAC、CCT、NTG、CGN、TGN、
CAT、NGC、GNG、GNC、NNA、GAA、TTC、CTT、ATA、TAT、GCT、
NCC、TTA、AGN、GNN、CAA、CAC、AGG、NTT、ANG、GNA、GT
T、NGA、TAA、GTA、GGN、GNT、NCG、ATT、CCA、CNN、AAA、AA
C、ATN、GAG、CTG、ACG、NAA、TAN、NAT、CNA、GCN、GTC、NC
N、CTN、CNC、ANT、NNC、CAG、NAN、ATG、NCT、CCC、AAN、T
GT、TNA、ACC、GAT、ACT、AAT、GGA、GAN、ANC、GAC、NNT、C
TA、TNN、GCG、GTN、TNT、AAG、TAG、NGT、NTA、ANA、CTC、G
CC、TGA、GGC、AGC、TNG、

[0201] NGAA, GANC, GCNC, NTNT, TGGG, AAGG, AAGN, NTNN, TCGT, CNTG, NTGG, CCGN, ATAT, TGCA, NGGT, TGNT, NNTG, NCCG, ACAT, GNTG, CGCG, GACN, NTCG, TCNG, CTGC, TNNC, GGTN, CGNN, TCCA, AGCN, TNAG, GGAC, GATC, AANA, NATG, CCAG, NAAT, TCNT, CACT, CGGC, CGAN, CNCA, ATNT, NNNG, NGCT, CTGG, GGAN, NTNC, ATTC, AATG, CNTC, TGGN, NATC, GTCG, ACNC, GCNN, GACT, CTNT, NCTT, NAGG, NANC, CTTA, GTCT, ANAG, NGCN, CNNA, TCAG, ACAC, NCGG, TNNT, CAAG, ACCT, CCCA, GTNC, ANTC, GACC, AACG, TTAA, TCCG, CGCC, NCCN, TTNA, NCNT, NGCA, AGNN, AATC, GGGA, GNAAN, NAGA, CGNA, GTAT, GTNA, ATNC, ACNA, GGAA, NTCC, GGCG, AATN, CNNT, AGGC, GCGN, GTGC, TTGA, AAGC, GAAG, ATNG, TGCT, TACT, CTAN, GGCT, GNGC, GTCN, CGAA, CNAC, G CCT, TAGG, ANGC, TNAA, GANT, NCNA, NCCT, AGAN, GTAA, TTTN, ATGA, TGNA, CANC, ACGA, CCAC, CCGG, CTNG, CNGN, GGTA, NGNC, GTTT, CTAA, TNCT, CTGN, NGAC, TGTA, TANN, GCNT, GCTC, CNCG, AAAN, CCNT, GANA, CACA, CTNA, ANTAN, TTNT, CCTG, TNTT, CANA, NTAN, CACG, GGAT, TTTC, GNCG, TACA, GTAC, GAGC, ACNN, ATGG, AANT, ATCC, ACCG, AGNC, TGTT, NCAT, ATTA, GNTT, GAGN, TNAC, GCCG, NTNG, GTGG, GNGN, ACCA, NTAA, ACTN, NCTG, NCTA, TTTT, GCNG, NTAG, CAAA, GGNA, CNTN, TTAG, TCTG, NCTN, TATG, GCGT, TANT, GGGT, NACN, ACTG, CCNG, GNNT, CCAT, GNTA, NANT, TACN, TGTN, ATCT, NCAN, TNGG, CNNN, AAGT, ATTN, GGNN, CAGC, CGTN, GCCC, GCTT, CNAT, NANA, CCNN, GNGA, TNGN, GCAG, CGNG, CCTT, NGAG, NCNG, AANG, GGTC, ACTC, TGAA, NAGN, NNCA, ACGG, TGAC, TCCN, ANNN, TCGN, TAAN, CAGG, TTAN, NGAN, NTGC, CCNC, TNTN, ATGN, GTGN, GCAT,

NNGN, NNCC, CCNA, CNAG, GNAC, CGNT, TTCN, TAGN, ANCT, NATN, GTGA, TNGT, CTAT, CCCG, TNCA, NGTA, NNGA, CGTG, TAAT, CGCA, NNCG, NGTC, NAGT, GNAT, TNTC, NCGC, NNGN, CATN, GTTN, AGTA, GNNG, TTNN, TGNC, NAAA, TNC C, CACC, CTCT, TTGN, GCTA, NTTT, TGAN, TNAN, NGAT, CCTN, GAAT, GTCA, NTCN, GCCA, ANTG, TGGC, CAAC, TTTA, TGTC, CGGA, NCGN, AGNT, NCGA, ANCG, ACAA, TAGT, CGAG, NCAA, AATA, AGGG, GNGT, CAGA, AGGT, GGGG, ANAC, TGGT, GTGT, GNCA, GTTA, NGTT, TNNG, NCAG, CACN, GCAN, GAAC, NCCA, TTCC, NCNN, GNNN, ANGT, NTNA, CCCT, GNAA, TTNG, GTNN, GGNG, TCTA, NCAC, GANG, TTCG, CCTC, CNGG, ANNA, TCAN, ATCG, NTGA, CGTA, TTAC, GCTN, GCTG, NGTG, TCCC, CANN, NNNA, TAGA, ACGT, AGAT, GATG, GCCN, TGNG, GCGC, CCGA, GNCN, NTTG, NNAT, TNCG, NANG, GGTG, NCCC, GNCC, CAAT, CGCN, CNGA, NTTC, TTCT, NGGA, AGTC, CNNC, NACG, AGTN, NANN, ACAG, GNCT, TACC, CNTA, TGTG, CATC, GACA, TCTT, NTCT, CTGA, AGGA, GATA, TNAT, CCTA, GGAG, ANCC, AANC, GTAN, GCNA, TGNN, TANC, GNTN, AGCG, CTAG, NNAA, AGTT, CTAC, TACG, TTNC, TNAT, ANTT, ATACC, TCCT, TCAC, NGGC, NTTN, NNTC, CANT, ATAA, TGCC, CTC C, TNNA, GTNG, ACGN, GGCA, AAAG, TTGT, NGNA, NAAN, TANTN, CGGG, CATA, ATGC, ACGC, ACCN, ATTT, TCNA, TNGC, NACA, NACC, CTCN, GGCC, TANG, AGAA, TNGA, TAGC, CAGN, GGCN, ANNT, NNNC, TCAT, CATT, TAAA, ATGT, TGAG, CGCT, TCGG, GCAC, GTAG, NTCA, NATT, ANTA, CCCN, ACTA, AAAA, GAAN, TATT, NNAC, TGAT, GGGN, CCAA, GNNG, CCAN, GTCC, NNCT, AGNG, CNNT, CNCT, GANN, GGTT, AGCT, CATG, NTACC, TNCN, NNTN, TGGA, GATT, AGCA, TAAG, GCGA, ACTT, ANG

N、NTGN、AACN、AACT、TCAA、NTAT、TCGA、NCTC、NNGG、ANGG、NNTT、GTNT、CTNN、CGGN、TAAC、GGNC、GAAA、ACNG、GNAG、TTGG、CTTC、CNGT、TNNN、TNTG、GTTG、TCNN、CGGT、GAGA、CNNG、NCNC、GAGG、AGCC、ATNN、NNNT、AGAC、AAC C、ANNC、ANNG、ACAN、GTTC、TATA、GNTC、NCGT、NGNT、CGTC、CCGC、CGAC、GACG、ATTG、GNNC、CNAA、TATC、AGNA、CTNC、TTCA、ANCA、ACCC、AGTG、CCGT、ANAT、CTGT、GGGC、NTTA、NAAG、AANN、CNAN、NNCN、ANAA、ANAN、CTTG、NGNN、AGAG、TANA、TCNC、GCAA、NGNG、NAGC、NATA、ATCN、CGTT、CNGC、GATN、NNTA、AAGA、CTTT、AAAC、AGGN、ACNT、NTGT、CTTN、ATCA、NACT、NNAG、NGTN、NAAC、TGCG、GGNT、ATAN、TTGC、ANCN、CCCC、ANGA、NGCG、TCTC、CTCG、ATNA、AATT、NNAN、NNGT、TCGC、ATAG、CAAN、AACA、TTAT、CAGT、GNN A、TGCN、GCGG、NGGG、CANG、TTTG、GAGT、AAAT、CTCA、CNCN、CNCC、TCTN、CGNC、NGCC、CGAT、NNGC；

- [0202] 所述N为A、T、C或G。
- [0203] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白可识别序列为5'-TTN-3'的PAM。
- [0204] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白可识别序列为5'-TTNC-3'的PAM。
- [0205] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白可识别序列为5'-WTN-3'的PAM。
- [0206] 在本披露的具体实施方案中，所述融合蛋白可识别序列为5'-ATN-3'的PAM。
- [0207] 在本披露的具体实施方案中，所述缀合物可识别序列为5'-TTN-3'的PAM。
- [0208] 在本披露的具体实施方案中，所述缀合物可识别序列为5'-TTNC-3'的PAM。
- [0209] 在本披露的具体实施方案中，所述缀合物可识别序列为5'-WTN-3'的PAM。
- [0210] 在本披露的具体实施方案中，所述缀合物可识别序列为5'-ATN-3'的PAM。

- [0211] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种分离的核酸，所述核酸编码如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的Cas12失活变体或如本披露所述的融合蛋白或缀合物。
- [0212] 在本披露的一些实施方案中，所述核酸编码如本披露所述的Cas12蛋白或如本披露所述的融合蛋白。
- [0213] 在本披露的较佳实施方案中，所述核酸经密码子优化以在细胞中表达。
- [0214] 在本披露的更佳实施方案中，所述核酸经密码子优化以在真核生物、哺乳动物如人或非人哺乳动物、植物、昆虫、鸟、爬行动物、啮齿动物(例如，小鼠、大鼠)、鱼、蠕虫/线虫或酵母中表达。
- [0215] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种CRISPR-Cas12系统，所述CRISPR-Cas12系统包含：
- [0216] a.如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物或如本披露所述的分离的核酸；以及
- [0217] b.指导多核苷酸，或编码所述指导多核苷酸的多核苷酸序列；
- [0218] 所述Cas12蛋白、所述Cas12失活变体或所述融合蛋白或缀合物与所述指导多核苷酸形成复合物；所述指导多核苷酸包含指导序列，所述指导序列被工程化以指导所述复合物与靶核酸的序列特异性结合。
- [0219] 所述分离的核酸编码如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的Cas12失活变体或如本披露所述的融合蛋白或缀合物。
- [0220] 在本披露的具体实施方案中，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列。
- [0221] 在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583、704任一项相比具有至少50%同一性。
- [0222] 在本披露的具体实施方案中，所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列。进一步地，在一些具体实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583、704任一项相比具有至少50%同一性。在一些具体实施方案中，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583、704任一项所示序列具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少9

1%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%的序列同一性。再进一步地，在一些具体实施方案中，所述同向重复序列包含或为SEQ ID NO:54-583、704任一项所示序列。

- [0223] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-60个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-50个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-40个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-35个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-30个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-25个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含18-25个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含20-25个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含18-22个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含20-22个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个或40个核苷酸。
- [0224] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列与所述靶核酸杂交，所述指导序列与所述靶核酸为90%-100%互补。
- [0225] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列与所述靶核酸杂交。
- [0226] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列与所述靶核酸杂交，所述指导序列与所述靶核酸错配不超过一个核苷酸。
- [0227] 在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15-100个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15-90个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15-80个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15-70个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述同向重复序列包含15-60个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-50个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15-40个

核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含20–40个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含20–30个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述指导序列包含15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个或60个核苷酸。

[0228] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列位于所述同向重复序列的3'端。

[0229] 在本披露的具体实施方案中，所述指导序列位于所述同向重复序列的5'端。

[0230] 在本披露的具体实施方案中，所述指导多核苷酸进一步包含tracrRNA。

[0231] 在本披露的一些实施方案中，所述tracrRNA序列与SEQ ID NO:584–695任一项相比具有至少50%同一性。在本披露的一些实施方案中，所述tracrRNA序列与SEQ ID NO:584–695任一项相比具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%同一性。

[0232] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA可与所述同向重复序列互补配对。在通常情况下，所述互补配对是部分碱基的互补配对。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA可与所述同向重复序列相互作用。

[0233] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过核苷酸序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过1–10个核苷酸组成的核苷酸序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸组成的核苷酸序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过4个核苷酸组成的核苷酸序列连

接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过5' -GAAA-3' 序列连接。

[0234] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列位于所述同向重复序列的3'端。

[0235] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列位于所述同向重复序列的5'端。

[0236] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA包含10-200个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA包含10-190个、10-180个、10-170个、10-160个、10-150个、10-140个、10-130个、10-120个、10-110个、10-100个、10-90个、10-80个、10-70个、10-60个、10-50个、10-40个、10-30个、10-20个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、10-100个、20-100个、30-100个、40-100个、20-90个、20-80个、20-70个、20-60个、20-50个或30-50个核苷酸。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA包含15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个、45个、46个、47个、48个、49个、50个、51个、52个、53个、54个、55个、56个、57个、58个、59个、60个、61个、62个、63个、64个、65个、66个、67个、68个、69个、70个、71个、72个、73个、74个、75个、76个、77个、78个、79个、80个、81个、82个、83个、84个、85个、86个、87个、88个、89个、90个、91个、92个、93个、94个、95个、96个、97个、98个、99个或100个核苷酸。

[0237] 在本披露的较佳实施方案中，所述指导多核苷酸为如本披露所述的指导多核苷酸。

[0238] 在本披露的具体实施方案中，所述靶核酸为DNA或RNA，优选dsDNA或ssDNA。

[0239] 在本披露的较佳实施方案中，所述DNA为真核DNA；优选所述真核DNA是非人哺乳动物DNA、非人灵长类动物DNA、人DNA、植物DNA、昆虫DNA、鸟DNA、爬行动物DNA、啮齿动物DNA、鱼DNA、蠕虫/线虫DNA或酵母DNA。

- [0240] 在本披露的具体实施方案中，所述靶核酸为疾病或病症相关基因或信号传导生化途径相关基因，或所述靶核酸为报告基因；例如，所述疾病或病症为血液系统疾病或病症、眼科疾病或病症、神经系统疾病或病症、呼吸系统疾病或病症、肝脏疾病或病症、代谢系统疾病或病症、癌症或感染性疾病。
- [0241] 在一些实施方案中，所述靶核酸为如表27中所列的基因。
- [0242] 在一些实施方案中，所述靶核酸为疾病或病症相关基因，所述疾病或病症任选自：A型血友病、Best卵黄样黄斑营养不良、B细胞急性淋巴细胞白血病、B型血友病、CDKL5缺乏症、CLN2 disease、C型尼曼匹克氏病、Dravet综合征、FOXG1综合征、GM1神经节苷脂贮积症、GM2神经节苷脂沉积症、HIV感染、HSV感染、IB型乌谢尔综合征、IIA型乌谢尔综合征、IIIA型黏多糖贮积症、IIIB型黏多糖贮积症、III型戈谢病、II型黏多糖贮积症、II型糖尿病、IV型黏多糖贮积症、I型戈谢病、I型黏多糖贮积症、I型糖尿病、I型乌谢尔综合征、KCNQ2癫痫脑病、Leber遗传性视神经病变、Leigh syndrome、Prader-Willi综合征、S LC13A5缺陷、X连锁肌小管肌病、X连锁视网膜劈裂症、X连锁视网膜色素变性、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、 α -甘露糖苷贮积症、 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、阿尔茨海默病、巴德-毕德氏症候群、白点状视网膜变性、白细胞黏附缺陷症I型、半乳糖血症、膀胱癌、膀胱过度活动症、苯丙酮尿症、鼻咽癌、比埃蒂晶体营养不良、丙酮酸激酶缺乏症、勃起功能障碍、常染色体隐性遗传先天性鱼鳞病、成人葡聚糖体疾病、创伤性关节炎、纯合子型家族性高胆固醇血症、脆性X染色体综合征、地中海贫血、低磷酸酯酶症、癫痫、多发性骨髓瘤、多系统萎缩、额颞叶痴呆、儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速、法布瑞氏症、范可尼贫血、芳香族氨基酸脱羧酶缺乏症、放射引起的口腔干燥、非霍奇金淋巴瘤、非肌层浸润性膀胱癌、非酒精性脂肪性肝病、非小细胞肺癌、肥厚性心肌病、肥厚性疤痕、肥胖、腓骨肌萎缩症1A型、腓骨肌萎缩症2A型、肺高压、弗立特里希氏共济失调、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、干性年龄相关性黄斑变性、干燥综合征、高尿酸血症、高血脂症、戈谢病、孤独症谱系障碍、骨关节炎、骨髓衰竭综合征、瓜氨酸血症I型、冠心病、胱氨酸病、黑素瘤、亨廷顿氏病、肌萎缩侧索硬化症、急迫性尿失禁、急性间歇性卟啉病、急性淋巴细胞

胞白血病、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩伴呼吸窘迫1型、脊髓性肌萎缩症、家族黑蒙性痴呆症、甲基丙二酸血症、甲状腺癌、假肥大性肌营养不良、间变性星形细胞瘤、间歇性跛行、交界性大疱性表皮松解症、胶质瘤、胶质母细胞瘤、角膜移植排斥、结直肠癌、进行性多病灶脑白质病、进行性家族性肝内胆汁淤积症、巨轴索神经病、卡纳万病、可卡因成瘾、克拉伯病、克里格勒-纳贾尔综合征、口腔癌、快乐木偶综合症、扩散型内因性脑桥神经胶质瘤、拉福拉病、类风湿性关节炎、镰状细胞病、淋巴水肿、卵巢癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性肉芽肿病、慢性肾病贫血、慢性疼痛、慢性乙肝、门克斯病、囊性纤维化、内瑟顿综合征、鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症、帕金森病、庞贝氏症、葡萄膜炎、前列腺癌、前庭神经鞘瘤、强直性肌营养不良、强直性脊柱炎、去势抵抗前列腺癌、青光眼、全色盲、缺血性心力衰竭、溶酶体贮积病、肉瘤、乳腺癌、瑞特综合征、三阴性乳腺癌、桑德霍夫病、色盲、射血分数降低的心力衰竭、神经元蜡样脂褐质沉积症、肾上腺脑白质失养症、肾细胞癌、湿性年龄相关性黄斑变性、湿疹、血小板减少伴免疫缺陷综合征、食管癌、视神经病变、视神经萎缩、视网膜静脉阻塞、视网膜色素变性、视紫红质介导的常染色体显性遗传视网膜色素变性、室管膜瘤、输卵管癌、双侧前庭病、斯特格氏病、糖尿病黄斑水肿、糖尿病神经病变、糖尿病视网膜病变、糖尿病周围神经痛、糖尿病足、糖原贮积病、糖原贮积病Ia型、糖原贮积病IIb型、特应性皮炎、听力损失、听力障碍、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、威尔逊病、稳定性心绞痛、乌谢尔综合征、无脉络膜症、先天性黑蒙症、先天性肾上腺皮质增生症、心肌病、心绞痛、心力衰竭、新型冠状病毒感染、胸膜间皮瘤、寻常性痤疮、严重联合免疫缺陷病、严重肢体缺血、眼咽型肌营养不良、胰腺癌、移植物抗宿主病、遗传性视网膜营养不良、遗传性血管性水肿、乙型肝炎、异染性脑白质营养不良、银屑病关节炎、隐性遗传营养不良型大疱性表皮松解症、婴儿恶性骨硬化病、营养不良性大疱性表皮松解、硬斑病、原发性免疫缺陷、杂合子型家族性高胆固醇血症、肢带型肌营养不良2B型、肢带型肌营养不良2C型、肢带型肌营养不良2D型、肢带型肌营养不良2E型、肢带型肌营养不良2I型、肢带型肌营养不良2L型、肢体缺血性疾病、脂蛋白脂酶缺乏症、重症先天性中性粒

细胞缺乏症、皱纹、卒中、坐骨神经痛、精神分裂症、抑郁症、药物成瘾、自闭症、特发性肺纤维化、高血脂、甲状腺素运载蛋白(ATTR)淀粉样变性、AATD肝病和AATD肺病。

- [0243] 在一些实施方案中,所述甲状腺素运载蛋白(ATTR)淀粉样变性的相关基因包括但不限于ATTR;
- [0244] 所述Leber遗传性视神经病变的相关基因包括但不限于MT-ND4;
- [0245] 所述AATD肝病的相关基因包括但不限于AATD;
- [0246] 所述AATD肺病的相关基因包括但不限于AATD;
- [0247] 所述移植抗宿主病的相关基因包括但不限于胸苷激酶基因;
- [0248] 所述遗传性视网膜营养不良的相关基因包括但不限于RPE65;
- [0249] 所述的脊髓性肌萎缩症相关基因包括但不限于SMN1;
- [0250] 所述骨关节炎的相关基因包括但不限于TGF- β 1;
- [0251] 所述A型血友病的相关基因包括但不限于factor VIII;
- [0252] 所述B型血友病的相关基因包括但不限于factor IX;
- [0253] 所述囊性纤维化的相关基因包括但不限于CFTR;
- [0254] 所述帕金森病的相关基因包括但不限于Gad1、Gad2、PTBP1、KEAP1、RE1、Amigo1、Gprc5c、Let-7a、Pnky、LRRK2、SNCA基因、GBA基因、miR-92b基因、miR-9基因、miR-124基因、miR-181基因、HMGB1、TRIM72、GPNMB和REST;
- [0255] 所述乌谢尔综合征的相关基因包括但不限于USH2A;
- [0256] 所述 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、镰状细胞病的相关基因包括但不限于BCL11A、HBG、HBA和HBB;
- [0257] 所述肺高压的相关基因包括但不限于eNOS;
- [0258] 所述斯特格氏病的相关基因包括但不限于ABCA4;
- [0259] 所述年龄相关性黄斑变性的相关基因包括但不限于VEGFA、VEGFR、IL17、Kir7.1、LCN-2、IRAK-M、CD59、LTA4H、GPX4、GLS1、PAPP-A、cGAS、STING、mTOR、GCN2、Nrf2、Ang 2、CTGF、补体C3、补体C5、CHFR4b、DOCK6、CTSS基因、ELN基因和FGF2;

- [0260] 所述青光眼的相关基因包括但不限于AQP1、ADRB2、NMNTA2、NRP1、Hrh1、Anxa2、OPA1、Cx43、ANGPTL7、MYOC、ROCK1、ROCK2、TIMP1、TIMP2、TIMP3、TIMP4、碳酸酐酶CA2、碳酸酐酶CA4和碳酸酐酶CA12；
- [0261] 所述特发性肺纤维化的相关基因包括但不限于CTGF；
- [0262] 所述高血脂的相关基因包括但不限于PCSK9；
- [0263] 所述阿尔茨海默病的相关基因包括但不限于NGF；
- [0264] 所述冠心病的相关基因包括但不限于VEGFA和bFGF；
- [0265] 所述慢性肾病贫血的相关基因包括但不限于EPO；
- [0266] 所述先天性黑蒙症的相关基因包括但不限于RPE65；
- [0267] 所述视网膜色素变性的相关基因包括但不限于PDE6B；
- [0268] 所述苯丙酮尿症的相关基因包括但不限于PAH；和/或
- [0269] 所述癫痫的相关基因包括但不限于GAT1。
- [0270] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种载体系统，所述载体系统包含一个或多个重组载体，所述重组载体包含如本披露所述的分离的核酸，或如本披露所述的CRISPR-Cas12系统。
- [0271] 在本披露的具体实施方案中，所述重组载体还包含调控序列。
- [0272] 在本披露的具体实施方案中，所述载体系统包含一个或多个重组载体，所述重组载体包含编码本披露所述Cas12蛋白、Cas12失活变体或融合蛋白或缀合物的多核苷酸序列，以及编码所述指导多核苷酸的多核苷酸序列。
- [0273] 在本披露的具体实施方案中，编码所述Cas12蛋白、Cas12失活变体或融合蛋白或缀合物的多核苷酸序列与调控序列1可操作地连接。
- [0274] 在本披露的具体实施方案中，编码所述指导多核苷酸的多核苷酸序列与调控序列2可操作地连接。
- [0275] 进一步地，在本披露的具体实施方案中，所述调控序列1与调控序列2为相同的或不同的序列。
- [0276] 在本披露的较佳实施方案中，所述调控序列任选自：启动子、增强子、内部核糖体进入位点和转录终止信号中的一种或更多种；所述启动子例如组成型启动

子、诱导型启动子、广谱启动子或组织特异性启动子，和/或，所述转录终止信号例如多聚腺苷酸化信号或多聚U序列。

[0277] 在本披露的具体实施方案中，所述重组载体的骨架为腺相关病毒载体、慢病毒载体或病毒样颗粒。

[0278] 在本披露的优选实施方案中：

[0279] 当所述骨架为腺相关病毒载体时，所述腺相关病毒载体为血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12或AAV13的重组腺相关病毒载体；

[0280] 当所述骨架为慢病毒载体时，所述慢病毒载体是用包膜蛋白假型化的；优选地，所述分离的核酸与适体序列连接；

[0281] 当所述骨架为病毒样颗粒时，所述分离的核酸与编码gag蛋白的基因连接。

[0282] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种递送系统，所述递送系统包含：(1)递送工具，和(2)如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统或如本披露所述的载体系统。

[0283] 在本披露的较佳实施方案中，所述递送工具为病毒、脂质纳米粒、纳米颗粒、脂质体、外泌体、微泡或基因枪。

[0284] 在本披露的更佳实施方案中，所述递送工具为脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含所述指导多核苷酸和编码所述Cas12蛋白、所述Cas12失活变体、或所述融合蛋白或缀合物的mRNA。

[0285] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种细胞，所述细胞包含如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统或如本披露所述的载体系统。

[0286] 在本披露的一些实施方案中，所述细胞为原核细胞。

[0287] 在本披露的一些实施方案中，所述细胞为真核细胞。

[0288] 在本披露的一些实施方案中，所述真核细胞为哺乳动物细胞。

- [0289] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种药物组合物，所述药物组合物包含如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统或如本披露所述的细胞。
- [0290] 优选地，所述药物组合物包含药学上可接受的辅料。
- [0291] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种试剂盒，所述试剂盒包含如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统或如本披露所述的细胞。
- [0292] 在本披露的较佳实施方案中，所述试剂盒还包含切割缓冲液(Cut Buffer)。所述切割缓冲液可以为本领域已知的任何适合Cas12蛋白切割靶核酸的缓冲液。
- [0293] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒在制备诊断、治疗和/或预防与靶核酸相关的疾病或病症的试剂或药物中的用途。
- [0294] 在本披露的具体实施方案中，所述疾病或病症为血液系统疾病或病症、眼科疾病或病症、神经系统疾病或病症、呼吸系统疾病或病症、肝脏疾病或病症、代谢系统疾病或病症、癌症或感染性疾病；和/或，所述试剂或药物用于：切割一种或更多种靶核酸分子或使一种或更多种靶核酸分子产生切口，激活或上调一种或更多种靶核酸分子的表达，激活或抑制一种或更多种靶核酸分子的转录，使一种或更多种靶核酸分子失活，可视化、标记或检测一种或更多种靶核酸分子，结合一种或更多种靶核酸分子，运输一种或更多种靶核酸分子，以及掩蔽一种或更多种靶核酸分子。

- [0295] 在本披露的具体实施方案中，所述靶核酸任选自如表27中所列的基因，所述疾病或病症为如表27中所列的疾病或病症。
- [0296] 在本披露的具体实施方案中，所述疾病或病症任选自：A型血友病、Best卵黄样黄斑营养不良、B细胞急性淋巴细胞白血病、B型血友病、CDKL5缺乏症、CLN2 disease、C型尼曼匹克氏病、Dravet综合征、FOXG1综合征、GM1神经节苷脂贮积症、GM2神经节苷脂沉积症、HIV感染、HSV感染、IB型乌谢尔综合征、IIA型乌谢尔综合征、IIIA型黏多糖贮积症、IIIB型黏多糖贮积症、III型戈谢病、II型黏多糖贮积症、II型糖尿病、IV型黏多糖贮积症、I型戈谢病、I型黏多糖贮积症、I型糖尿病、I型乌谢尔综合征、KCNQ2癫痫脑病、Leber遗传性视神经病变、Leigh syndrome、Prader-Willi综合征、SLC13A5缺陷、X连锁肌小管肌病、X连锁视网膜劈裂症、X连锁视网膜色素变性、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、 α -甘露糖苷贮积症、 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、阿尔茨海默病、巴德-毕德氏症候群、白点状视网膜变性、白细胞黏附缺陷症I型、半乳糖血症、膀胱癌、膀胱过度活动症、苯丙酮尿症、鼻咽癌、比埃蒂晶体营养不良、丙酮酸激酶缺乏症、勃起功能障碍、常染色体隐性遗传先天性鱼鳞病、成人葡聚糖体疾病、创伤性关节炎、纯合子型家族性高胆固醇血症、脆性X染色体综合征、地中海贫血、低磷酸酯酶症、癫痫、多发性骨髓瘤、多系统萎缩、额颞叶痴呆、儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速、法布瑞氏症、范可尼贫血、芳香族氨基酸脱羧酶缺乏症、放射引起的口腔干燥、非霍奇金淋巴瘤、非肌层浸润性膀胱癌、非酒精性脂肪性肝病、非小细胞肺癌、肥厚型心肌病、肥厚性疤痕、肥胖、腓骨肌萎缩症1A型、腓骨肌萎缩症2A型、肺高压、弗立特里希氏共济失调、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、干性年龄相关性黄斑变性、干燥综合征、高尿酸血症、高血脂症、戈谢病、孤独症谱系障碍、骨关节炎、骨髓衰竭综合征、瓜氨酸血症I型、冠心病、胱氨酸病、黑素瘤、亨廷顿氏病、肌萎缩侧索硬化症、急迫性尿失禁、急性间歇性卟啉病、急性淋巴细胞白血病、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩伴呼吸窘迫1型、脊髓性肌萎缩症、家族黑蒙性痴呆症、甲基丙二酸血症、甲状腺癌、假肥大性肌营养不良、间变性星形细胞瘤、间歇性跛行、交界性大疱性表皮松解症、胶质瘤、胶质母细胞瘤、角膜移植排斥、结直肠癌、

进行性多病灶脑白质病、进行性家族性肝内胆汁淤积症、巨轴索神经病、卡纳万病、可卡因成瘾、克拉伯病、克里格勒-纳贾尔综合征、口腔癌、快乐木偶综合症、扩散型内因性脑桥神经胶质瘤、拉福拉病、类风湿性关节炎、镰状细胞病、淋巴水肿、卵巢癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性肉芽肿病、慢性肾病贫血、慢性疼痛、慢性乙肝、门克斯病、囊性纤维化、内瑟顿综合征、鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症、帕金森病、庞贝氏症、葡萄膜炎、前列腺癌、前庭神经鞘瘤、强直性肌营养不良、强直性脊柱炎、去势抵抗前列腺癌、青光眼、全色盲、缺血性心力衰竭、溶酶体贮积病、肉瘤、乳腺癌、瑞特综合征、三阴性乳腺癌、桑德霍夫病、色盲、射血分数降低的心力衰竭、神经元蜡样脂褐质沉积症、肾上腺脑白质失养症、肾细胞癌、湿性年龄相关性黄斑变性、湿疹、血小板减少伴免疫缺陷综合征、食管癌、视神经病变、视神经萎缩、视网膜静脉阻塞、视网膜色素变性、视紫红质介导的常染色体显性遗传视网膜色素变性、室管膜瘤、输卵管癌、双侧前庭病、斯特格氏病、糖尿病黄斑水肿、糖尿病神经病变、糖尿病视网膜病变、糖尿病周围神经痛、糖尿病足、糖原贮积病、糖原贮积病Ia型、糖原贮积病IIb型、特应性皮炎、听力损失、听力障碍、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、威尔逊病、稳定性心绞痛、乌谢尔综合征、无脉络膜症、先天性黑蒙症、先天性肾上腺皮质增生症、心肌病、心绞痛、心力衰竭、新型冠状病毒感染、胸膜间皮瘤、寻常性痤疮、严重联合免疫缺陷病、严重肢体缺血、眼咽型肌营养不良、胰腺癌、移植物抗宿主病、遗传性视网膜营养不良、遗传性血管性水肿、乙型肝炎、异染性脑白质营养不良、银屑病关节炎、隐性遗传营养不良型大疱性表皮松解症、婴儿恶性骨硬化病、营养不良性大疱性表皮松解、硬斑病、原发性免疫缺陷、杂合子型家族性高胆固醇血症、肢带型肌营养不良2B型、肢带型肌营养不良2C型、肢带型肌营养不良2D型、肢带型肌营养不良2E型、肢带型肌营养不良2I型、肢带型肌营养不良2L型、肢体缺血性疾病、脂蛋白脂酶缺乏症、重症先天性中性粒细胞缺乏症、皱纹、卒中、坐骨神经痛、精神分裂症、抑郁症、药物成瘾、自闭症、特发性肺纤维化、高血脂、甲状腺素运载蛋白(ATTR)淀粉样变性、AATD肝病和AATD肺病。

- [0297] 在本披露的具体实施方案中,所述甲状腺素运载蛋白(ATTR)淀粉样变性的相关基因包括但不限于ATTR;
- [0298] 所述Leber遗传性视神经病变的相关基因包括但不限于MT-ND4;
- [0299] 所述AATD肝病的相关基因包括但不限于AATD;
- [0300] 所述AATD肺病的相关基因包括但不限于AATD;
- [0301] 所述移植物抗宿主病的相关基因包括但不限于胸苷激酶基因;
- [0302] 所述遗传性视网膜营养不良的相关基因包括但不限于RPE65;
- [0303] 所述的脊髓性肌萎缩症相关基因包括但不限于SMN1;
- [0304] 所述骨关节炎的相关基因包括但不限于TGF- β 1;
- [0305] 所述A型血友病的相关基因包括但不限于factor VIII;
- [0306] 所述B型血友病的相关基因包括但不限于factor IX;
- [0307] 所述囊性纤维化的相关基因包括但不限于CFTR;
- [0308] 所述帕金森病的相关基因包括但不限于Gad1、Gad2、PTBP1、KEAP1、RE1、Amigo1、Gprc5c、Let-7a、Pnky、LRRK2、SNCA基因、GBA基因、miR-92b基因、miR-9基因、miR-124基因、miR-181基因、HMGB1、TRIM72、GPNMB和REST;
- [0309] 所述乌谢尔综合征的相关基因包括但不限于USH2A;
- [0310] 所述 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、镰状细胞病的相关基因包括但不限于BCL11A、HBG、HBA和HBB;
- [0311] 所述肺高压的相关基因包括但不限于eNOS;
- [0312] 所述斯特格氏病的相关基因包括但不限于ABCA4;
- [0313] 所述年龄相关性黄斑变性的相关基因包括但不限于VEGFA、VEGFR、IL17、Kir7.1、LCN-2、IRAK-M、CD59、LTA4H、GPX4、GLS1、PAPP-A、cGAS、STING、mTOR、GCN2、Nrf2、Ang 2、CTGF、补体C3、补体C5、CHFR4b、DOCK6、CTSS基因、ELN基因和FGF2;
- [0314] 所述青光眼的相关基因包括但不限于AQP1、ADRB2、NMNTA2、NRP1、Hrh1、Anxa2、OPA1、Cx43、ANGPTL7、MYOC、ROCK1、ROCK2、TIMP1、TIMP2、TIMP3、TIMP4、碳酸酐酶CA2、碳酸酐酶CA4和碳酸酐酶CA12;

- [0315] 所述特发性肺纤维化的相关基因包括但不限于CTGF;
- [0316] 所述高血脂的相关基因包括但不限于PCSK9;
- [0317] 所述阿尔茨海默病的相关基因包括但不限于NGF;
- [0318] 所述冠心病的相关基因包括但不限于VEGFA和bFGF;
- [0319] 所述慢性肾病贫血的相关基因包括但不限于EPO;
- [0320] 所述先天性黑蒙症的相关基因包括但不限于RPE65;
- [0321] 所述视网膜色素变性的相关基因包括但不限于PDE6B;
- [0322] 所述苯丙酮尿症的相关基因包括但不限于PAH; 和/或
- [0323] 所述癫痫的相关基因包括但不限于GAT1。
- [0324] 在另一方面, 本披露提供的一个技术方案为: 一种检测、结合或切割靶核酸的方法, 所述方法包括使用如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒与靶核酸接触。
- [0325] 在本披露的较佳实施方案中, 所述方法为非诊断和/或治疗目的的方法; 和/或所述融合蛋白或缀合物包含可检测标记, 例如可通过荧光、DNA印迹或FISH检测的标记。
- [0326] 在本披露的更佳实施方案中, 当所述方法为切割靶核酸时, 所述方法还包括使用切割缓冲液(Cut Buffer)进行切割反应。所述切割缓冲液可以为本领域已知的任何适合Cas12蛋白切割靶核酸的缓冲液。
- [0327] 在另一方面, 本披露提供的一个技术方案为: 一种改变细胞状态的方法, 所述方法包括使用如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒与细胞接触, 从而改变细胞状态。

- [0328] 在本披露的一些实施方案中，所述方法导致以下中的一项或多项：特定基因的表达的提高或降低，体外或体内诱导细胞衰老，体外或体内细胞周期停滞，体外或体内细胞生长促进和/或细胞生长抑制，体外或体内诱导无反应性，体外或体内诱导细胞凋亡，以及体外或体内诱导坏死。
- [0329] 在本披露的更佳实施方案中，所述方法为非诊断和/或治疗目的的方法。
- [0330] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：一种诊断、治疗或预防与靶核酸相关的疾病或病症的方法，包括向有需要的受试者的样品或向有需要的受试者施用如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒。
- [0331] 在本披露的具体实施方案中，所述靶核酸任选自如表27中所列的基因，所述疾病或病症为如表27中所列的疾病或病症。
- [0332] 在本披露的具体实施方案中，所述疾病或病症为血液系统疾病或病症、眼科疾病或病症、神经系统疾病或病症、呼吸系统疾病或病症、肝脏疾病或病症、代谢系统疾病或病症、癌症或感染性疾病。
- [0333] 在另一方面，本披露提供的一个技术方案为：如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒，其用于诊断、治疗或预防与靶核酸相关的疾病或病症。
- [0334] 在本披露的具体实施方案中，所述靶核酸任选自如表27中所列的基因，所述疾病或病症为如表27中所列的疾病或病症。
- [0335] 在本披露的具体实施方案中，所述疾病或病症为血液系统疾病或病症、眼科疾病或病症、神经系统疾病或病症、呼吸系统疾病或病症、肝脏疾病或病症、代谢系统疾病或病症、癌症或感染性疾病。

[0336] 在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本披露各较佳实例。

附图说明

[0337] 图1A示出了本披露Cas蛋白与已知的Cas12亚型蛋白质的进化关系图(使用MAFFT进行序列比对，然后用FastTree构建进化树)。

[0338] 在进化树中，本披露部分蛋白质与已知的Cas12亚型蛋白质相比，形成一个独立的、明显分开的分支(不同的簇[CLUSTER])，即与已知Cas12的亚型不混在一起；并且本披露的这些蛋白(图1B)和现有的Cas12 HMM Profile模型比对的evaluate大于 $1e-5$ 。本披露的这部分蛋白包括图1中所示的CLUSTER1-CLUSTER13蛋白。综合来看，这表明这些Cas蛋白可能是新的亚群，例如有可能是新的Cas12亚型。

[0339] 图2示出了C12-279重组蛋白的SDS-PAGE电泳图。

[0340] 图3示出了Cas12蛋白体外切割的PAM文库。图中的序列如SEQ ID NO:878-881所示。

[0341] 图4示出了C12-279-sgRNA靶向7nt随机序列后抓取的基序。

[0342] 图5示出了C12-279-sgRNA-Rev靶向7nt随机序列后抓取的基序。

[0343] 图6示出了质粒消除实验中含7nt随机序列的质粒的片段。图中的序列如SEQ ID NO:720、882-886所示。

[0344] 图7示出了C12-279的质粒消除实验中抓取的基序。

[0345] 图8示出了C12-279编辑TTR基因后产生的部分indel结果。图中的序列如SEQ ID NO:722、887-916所示。

[0346] 图9示出了C12-279蛋白(SEQ ID NO:696)的N-端缺失数十个氨基酸残基的CI1062732(SEQ ID NO:46)蛋白，与含DR序列GTAATGCGTCTCCCATTTGACGCC(SEQ ID NO:529)的gRNA组合，在细菌中靶向7nt随机序列质粒文库，抓取到的“假”PAM基序为5'-TTNC-3'。

[0347] 图10示出了发明人分析“假”DR序列的二级结构，猜测抓取的“假”PAM基序TTNC的3'端C碱基可能是由于DR 3'端多出的C导致。图中的序列如SEQ ID NO:917和918所示。

- [0348] 图11示出了C12-101-07重组蛋白(126KDa)的SDS-PAGE电泳图。
- [0349] 图12示出了C12-101-07-sgRNA靶向7nt随机序列后抓取的基序。
- [0350] 图13示出了C12-101-07-sgRNA-Rev靶向7nt随机序列后抓取的基序。
- [0351] 图14示出了C12-101-09质粒消除实验中抓取的基序。
- [0352] 图15A示出了pCDH-CMV-EGFP-reporter3-EF1-Puro质粒的片段。图中的序列如SEQ ID NO:919-921所示。图15B示出了PAM序列组成为NAAN的文库质粒Plasmid Lib的片段。图中的序列如SEQ ID NO:922-924所示。
- [0353] 图16示出了不同C12-279突变体NAAN细胞中编辑效率，以相比于C12-279的编辑效率的倍数表示。
- [0354] 图17示出了不同C12-279突变体NAAN细胞中编辑效率，以相比于C12-279的编辑效率的倍数表示。
- [0355] 图18示出了不同突变体靶向报告系统的编辑效率检测结果，Wt表示野生型C12-279(绿点)；标记的数字n表示第n位的氨基酸残基突变为精氨酸R；Mut-01为突变体C12-279-pCDH-05(Q186R变体)，Mut-02为突变体C12-279-pCDH-28(Q186R和D352R双点突变)，Mut-03为突变体C12-279-pCDH-35(G184R、Q186R和D352R三点突变)；绿色线条(较下方的虚线)表示相比野生型的编辑效率提高50%；红色线条(较上方的虚线)表示与Mut-02效率持平。
- [0356] 图19示出了不同的多点突变体在报告系统中的编辑效率检测结果。Mut-02-1-5-426-858-860表示在Mut-02突变体的基础上额外引入第1、5、426、858和860位点突变(全部突变为精氨酸R)后得到的多点突变体，即该多点突变体包含以下突变：第1、5、186、352、426、858和860位氨基酸残基全部突变为R。本文中其他突变体以此类推。
- [0357] 图20A示出了多点突变体与不同gRNA组合后编辑TTR基因的效率。图20B示出了多点突变体与不同gRNA组合后编辑HBG基因的效率。Mut-02-1-5-426-858-860表示在Mut-02突变体的基础上额外引入第1、5、426、858和860位点突变(全部突变为精氨酸R)后得到的多点突变体，即该多点突变体包含以下突变：第1、5、186、352、426、858和860位氨基酸残基全部突变为R。其他突变体以此类推。

- [0358] 图21示出了dCas12-279编辑活性测试结果。Mut-02-426-860表示在Mut-02突变体的基础上额外引入426R和860R突变后得到的多点突变体。Mut-02-426-860-D651A表示在Mut-02突变体的基础上额外引入426R、860R和651A突变后得到的多点突变体。本文中其他突变体以此类推。
- [0359] 图22示出了突变体Mut-02-1-5-426-858-860的编码mRNA与修饰的gRNA(C279-dmTTR01-02)组合电转HEK293细胞、编辑TTR基因后的NGS测序结果，测得的编辑效率高达92.18%。图中的序列如SEQ ID NO:925-974所示。
- [0360] 图23示出了C12-279突变体Mut-02-1-426-846-858-860识别的PAM。
- [0361] 图24示出了推测的C12-279结构示意图。

具体实施方式

- [0362] 在本披露中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的分子遗传学、核酸化学、化学、分子生物学、生物化学、细胞培养、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组DNA等操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本披露，下面提供相关术语的定义和解释。
- [0363] 在本披露中，“几”指代大于等于2。在本披露中，“多”指代大于等于2。
- [0364] 在本披露中，根据上下文语境，“切割”可指代对多核苷酸链的主链进行了切割；非限制性示例例如使单链DNA完全断裂、使双链DNA的其中一条单链断裂，或，使双链DNA的2条单链都断裂。
- [0365] 在本披露中，根据上下文语境，“修饰”可指代除“切割”以外的其他形式的核酸链化学反应；包括但不限于碱基替换、增加和/或删除，以及核酸链的甲基化、去甲基化。非限制性示例例如通过单碱基编辑(本披露的Cas12与脱氨酶结构域融合，并联合gRNA)使得靶核酸链上的碱基发生替换，例如A→G、C→T、T→C或G→A核苷酸突变，以及其他类型的核苷酸突变(如A→T、C→G、T→A、G→C等等)；还比如通过Prime editing技术(本披露的Cas12与逆转录酶融合，并联合PegRNA)实现碱基替换、增加或删除，或者通过HDR同源重组(例如本披露的Cas12联合gRNA和供体模板)的方式实现碱基替换、增加或删除；也可将本披露的Cas12与DNA甲基化酶或DNA去甲基化酶融合，联合gRNA进行靶向。

- [0366] 在本披露中，根据上下文语境，“调控靶核酸的表达”可指代对靶核酸的转录的调控；非限制性示例例如通过CRISPRa、CRISPRi技术，借助于Cas12融合转录激活或抑制结构域对靶核酸的转录进行增强或抑制。
- [0367] 在本披露中，氨基酸序列中的字母表示本领域公知的氨基酸的单字母缩写，例如J.Biol.Chem,243,p3558(1968)中所述：丙氨酸：Ala-A、精氨酸：Arg-R、天冬氨酸：Asp-D、半胱氨酸：Cys-C、谷氨酰胺：Gln-Q、谷氨酸：Glu-E、组氨酸：His-H、甘氨酸：Gly-G、天冬酰胺：Asn-N、酪氨酸：Tyr-Y、脯氨酸：Pro-P、丝氨酸：Ser-S、甲硫氨酸：Met-M、赖氨酸：Lys-K、缬氨酸：Val-V、异亮氨酸：Ile-I、苯丙氨酸：Phe-F、亮氨酸：Leu-L、色氨酸：Trp-W、苏氨酸：Thr-T。
- [0368] 在本披露中，“氨基酸差异”指的是蛋白的氨基酸序列上特定位点的氨基酸残基的差异，包括取代、增加或减少。
- [0369] 在本披露中，特定位点的氨基酸残基的突变指的是此位点的氨基酸残基的取代、增加或减少。
- [0370] 本领域技术人员皆知，在蛋白或肽中，相邻的两个氨基酸各脱去一个OH或H、脱水缩合形成肽键，每一个氨基酸实际上是以氨基酸残基的形式存在的。因此本披露中，术语“氨基酸”和“氨基酸残基”通常代表同一意思。此外，为了简化表达，本披露中在氨基酸残基所处的位点前保留了取代前的氨基酸残基，位点前的字母表示原氨基酸残基，位点后的字母表示取代后的氨基酸残基。例如S211代表在211位点上原有的氨基酸残基为S，当它被R取代时，则可以表示为S211R。
- [0371] 本文有时用符号“+”在其前后各连接1个氨基酸突变，表示的是在一个突变体中同时存在这两个点突变；若通过2个或更多个符号“+”连接多个点突变，则旨在表示同时存在这多个点突变。
- [0372] 在本披露中，如果氨基酸被取代，则意指其被不同于原氨基酸残基的另一氨基酸残基取代。如果原氨基酸原属于带正电的氨基酸，其被取代为带正电的氨基酸，则意指其被另一不同于原氨基酸残基的带正电的氨基酸残基所取代。例

如，原氨基酸残基为R，其被取代为带正电的氨基酸，则意指其被取代为H或K。

[0373] 在本文中，当提及RNA序列时，序列中的“T”可与“U”互换使用。当提及“指导序列”时，序列中的“T”可与“U”互换使用。当提及“同向重复序列”时，序列中的“T”可与“U”互换使用。当提及“同向重复序列”时，序列中的“T”可与“U”互换使用。

[0374] 在本文中，当涉及Cas蛋白编号时，C12-n与Cas12-n旨在指代相同的蛋白。例如Cas12-279与C12-279可互换使用。

[0375] 序列同一性

[0376] 如本文中所使用的，术语“同一性”(identity)用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。“同一性”、“百分比同一性”(percent identity)和“序列同一性”(sequence identity)可互换使用。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如，两个DNA分子中的每一个的某个位置都被腺嘌呤占据，或两个多肽中的每一个的某个位置都被赖氨酸占据)，那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分比同一性”(percent identity)是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100\%$ 的函数。例如，如果两个序列的10个位置中有6个匹配，那么这两个序列具有60%的序列同一性。通常，在将两个序列比对以产生最大序列同一性时进行比较。这样的比对可通过使用已公开和可商购的比对算法和程序，诸如但不限于CLUSTERAL Ω 、MAFFT、Probcons、T-Coffee、Probalign、BLAST，本领域的普通技术人员可合理选择使用。本领域技术人员能确定用于比对序列的适宜参数，例如包括对所比较序列全长实现较优比对或最佳对比所需要的任何算法，以及对所比较序列的局部实现较优比对或最佳对比所需要的任何算法。

[0377] CRISPR-Cas12系统

[0378] 如本文中所使用的，术语“规律成簇的间隔短回文重复(CRISPR)-CRISPR-相关(Cas)(CRISPR-Cas)系统”或“CRISPR系统”可互换地使用并且具有本领域技术人员通常理解的含义，其通常包含与CRISPR相关(“Cas”)基因的表达有关的转录产物或其他元件，或者能够指导所述Cas基因活性的转录产物或其他

元件。此类转录产物或其他元件可以包含编码Cas效应蛋白的序列和指导多核苷酸。

- [0379] Zhang Feng课题组于2015年发现Cas12a，归类于Class IICRISPR-Cas系统中的V型，在对V-A亚型(Cas12a)进行了详细的研究之后，2015年Zhang Feng课题组又报道了Cas12b(C2C1)。2017年，Burstein等人报道了Cas12e(CasX)核酸酶。2019年Winston X.Yan等人通过生物信息学分析详细报道了新发现的V型Cas效应蛋白Cas12c、Cas12h、Cas12i和Cas12g。
- [0380] 在一些实施方案中，本文所述的Cas12蛋白指的是氨基酸序列包括或为与SEQ ID NO:1-53、696、728任一项相比具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%序列同一性的蛋白。当所述CRISPR-Cas12系统包括包含所述Cas12蛋白与功能结构域的融合蛋白或缀合物时，计算融合蛋白或缀合物的Cas12部分与参考序列之间的序列同一性百分比。
- [0381] 本披露中，CRISPR-Cas12系统包含与SEQ ID NO:1-53、696、728任一项相比具有至少50%序列同一性的Cas12蛋白，或编码所述Cas12蛋白的核酸；以及指导多核苷酸或编码所述指导多核苷酸的核酸；所述指导多核苷酸包含与指导序列连接的同向重复序列，所述指导序列被工程化以与靶核酸杂交，所述指导多核苷酸能够与所述Cas12蛋白形成复合物并指导所述复合物与所述靶核酸的序列特异性结合。
- [0382] 指导多核苷酸
- [0383] 如本文中所使用的，术语“指导多核苷酸”用于指CRISPR-Cas系统中与Cas蛋白形成复合物并将复合物引导至靶序列的分子。通常情况下，指导多核苷酸包含与指导序列连接的骨架序列，指导序列可以与靶序列杂交。骨架序列通常包含同向重复序列，有时还可包含tracrRNA序列。在一些实施方案中，所述指导多核苷酸不包含tracrRNA序列。在一些实施方案中，所述指导多核苷酸包含tracrRNA序列。

- [0384] 在一些实施方案中，所述CRISPR-Cas12系统的所述指导多核苷酸是指导RNA。在一些实施方案中，所述指导多核苷酸是化学修饰的指导多核苷酸。在一些实施方案中，所述指导多核苷酸包含至少一个化学修饰的核苷酸。
- [0385] 在一些实施方案中，所述化学修饰的核苷酸包括碱基修饰的核苷酸、磷酸酯修饰的核苷酸和核糖修饰的核苷酸。
- [0386] 在一些优选实施方案中，所述碱基修饰的核苷酸选自非天然碱基的核苷酸。
- [0387] 在一些优选实施方案中，所述磷酸酯修饰的核苷酸选自氨基磷酸酯核苷酸、硫代磷酸酯基的核苷酸、二硫代磷酸酯基的核苷酸、甲基磷酸酯基的核苷酸、5'-磷酸酯的核苷酸、烷基磷酸酯基的核苷酸和硼烷磷酸酯基的核苷酸。
- [0388] 在一些优选实施方案中，所述核糖修饰的核苷酸选自脱氧核苷酸、3'末端脱氧胸腺嘧啶(dT)核苷酸、2'-O-甲基修饰的核苷酸、2'-氟修饰的核苷酸、2'-脱氧修饰的核苷酸、2'-氨基修饰的核苷酸、2'-O-烯丙基修饰的核苷酸、2'-C-烷基修饰的核苷酸、2'-羟基修饰的核苷酸、2'-甲氧基乙基修饰的核苷酸、2'-O-烷基修饰的核苷酸和吗啉代核苷酸。
- [0389] 在一些优选实施方案中，所述指导核苷酸在5'端和/或3'端包含化学修饰的核苷酸。
- [0390] 在一些具体实施方案中，所述指导核苷酸在5'端包含脱氧核苷酸；所述脱氧核苷酸的长度为10-25nt，例如14或25nt。
- [0391] 在一些具体实施方案中，所述指导核苷酸在5'端或3'端包含硫代磷酸酯基并且2'-OMe修饰的核苷酸。
- [0392] 在一些实施方案中，所述指导多核苷酸包含与至少一个同向重复序列(direct repeat, DR)连接的至少一个指导序列(guide sequence, 也称为间隔序列spacer sequence)。在一些实施方案中，所述指导序列位于同向重复序列的3'端。在一些实施方案中，所述指导序列位于同向重复序列的5'端。
- [0393] 在一些实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列连接。
- [0394] 在一些实施方案中，所述tracrRNA序列位于所述同向重复序列的5'或3'端。在一些实施方案中，所述tracrRNA序列位于所述同向重复序列的5'端。在一些实施方案中，所述tracrRNA序列位于所述同向重复序列的3'端。

细则 91,
03.01.2025

细则 91,
03.01.2025

- [0395] 在一些实施方案中，所述指导多核苷酸的核苷酸序列从5'到3'依次包含：tracrRNA、同向重复序列、指导序列。
- [0396] 在一些实施方案中，所述指导多核苷酸的核苷酸序列从5'到3'依次包含：tracrRNA、连接序列、同向重复序列、指导序列。
- [0397] 在一些实施方案中，所述指导多核苷酸的核苷酸序列从5'到3'依次包含：tracrRNA、loop序列、同向重复序列、指导序列。
- [0398] 在一些实施方案中，所述指导多核苷酸的结构为5'-tracrRNA-loop-同向重复序列-指导序列-3'。
- [0399] 在一些实施方案中，所述指导多核苷酸的tracrRNA和同向重复序列通过核苷酸序列连接。
- [0400] 在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个核苷酸组成的核苷酸序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过4个核苷酸组成的核苷酸序列连接。在本披露的具体实施方案中，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列通过5'-GAAA-3'序列连接。
- [0401] 在一些实施方案中，所述指导序列与所述靶核酸序列具有足够的互补性以与所述靶核酸杂交并指导所述CRISPR-Cas12复合物与所述靶核酸的序列特异性结合。在一些实施方案中，所述指导序列与所述靶核酸具有100%的互补性，但所述指导序列可以与所述靶核酸具有小于100%的互补性，例如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的互补性。
- [0402] 在一些实施方案中，所述指导序列被工程化以与所述靶核酸杂交，错配不超过两个核苷酸。在一些实施方案中，所述指导序列被工程化以与所述靶核酸杂交，且错配不超过一个核苷酸。在一些实施方案中，所述指导序列被工程化以与所述靶核酸杂交，有或没有错配。
- [0403] 在本披露一些具体实施方案中，所述指导序列如SEQ ID NO:783-805、775、825-877中任一所示序列具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少

99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%序列同一性。在本披露一些具体实施方案中，所述指导序列如SEQ ID NO:783-805、775、825-877中任一序列所示。

[0404] 在一些实施方案中，所述CRISPR-Cas12系统包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个或至少20个不同的指导多核苷酸。在一些实施方案中，所述指导多核苷酸靶向至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个或至少20个不同的靶核酸分子，或靶向一个或多个靶核酸分子的至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个或至少20个不同区域。

[0405] 在一些实施方案中，所述指导多核苷酸包括位于可变指导序列上游的恒定同向重复序列。在一些实施方案中，多个指导多核苷酸是阵列的一部分(其可以是载体的一部分，例如病毒载体或质粒)。例如，包括序列DR-间隔区-DR-间隔区-DR-间隔区-.....-DR-间隔区的指导阵列可以包括多个独特的未加工指导多核苷酸(每个DR-间隔区或间隔区-DR序列一个)。一旦被引入细胞或无细胞系统，阵列就会被所述Cas12蛋白加工成数个单独的成熟指导多核苷酸。这允许多路复用，例如将多个指导多核苷酸递送至细胞或系统以靶向多个靶核酸或单个靶核酸内的多个区域。

[0406] 指导多核苷酸指导复合物(CRISPR复合物)与靶核酸的序列特异性结合的能力可以通过任何合适的测定来评估。例如，可以将足以形成复合物(CRISPR复合物)的CRISPR系统的组分，包括待测试的指导多核苷酸，提供给具有相应靶核酸分子的宿主细胞，例如通过编码CRISPR复合物的组分的载体的转染，然后评估靶序列内的优先切割。类似地，可以在试管中评估靶核酸序列的切割，方法是提供靶核酸、CRISPR复合物的组分，包括待测试的指导多核苷酸和不同于测试指导多核苷酸的对照指导多核苷酸，并比较待测试和对照指导多核苷酸之间结合靶核酸的能力或切割靶核酸的速率。CRISPR复合物切割靶核酸或靶核酸的能力也可以通过上述的测定来评估。

[0407] Cas12突变体

[0408] 如本文所述，在提及“与SEQ ID NO:XX所示序列的对应位置”或使用类似的文字描述时，所述对应位置可通过氨基酸序列比对来确定。通常，在将两个序

列比对以产生最大序列同一性时进行比较。这样的比对可通过使用已公开和可商购的比对算法和程序，诸如但不限于ClustalΩ、MAFFT、Probcons、T-Coffee、Probalign、BLAST，本领域的普通技术人员可合理选择使用。本领域技术人员能确定用于比对序列的适宜参数，例如包括对所比较序列全长实现较优比对或最佳对比所需要的任何算法，以及对所比较序列的局部实现较优比对或最佳对比所需要的任何算法。

- [0409] 可选地，所述对应位置通过将所述Cas12蛋白的氨基酸与如SEQ ID NO:1-53、696、728中任一所示序列使用MAFFT version 7工具来进行在线的(<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>)序列比对，选择以下参数：G-INS-i(Very slow; recommended for<200sequences with global homology; 2iterative cycles only), Try to align gappy regions anyway, Scoring matrix for amino acid sequences--BLOSUM62, Gap opening penalty 1.53, Offset value 0.0, Mafft-homologs--Use UniRef50(more comprehensive and requires longer search time)。
- [0410] 可选地，所述对应位置通过将所述Cas12蛋白的氨基酸与SEQ ID NO:696所示序列使用MAFFT version 7工具来进行在线的(<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>)序列比对，选择以下参数：G-INS-i(Very slow; recommended for<200sequences with global homology; 2iterative cycles only), Try to align gappy regions anyway, Scoring matrix for amino acid sequences--BLOSUM62, Gap opening penalty1.53, Offset value 0.0, Mafft-homologs--Use UniRef50(more comprehensive and requires longer search time)。
- [0411] 在一些实施方案中，与SEQ ID NO:1-53、696、728任一序列所示的Cas12蛋白相比，本文提供的Cas12蛋白包含一个或多个突变，例如单个氨基酸插入、单个氨基酸缺失、单个氨基酸取代，或其组合。在一些实例中，与SEQ ID NO:1-53、696、728任一序列所示的Cas12蛋白相比所述Cas12蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、

75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129或130个氨基酸变化(例如插入、缺失或取代),但保留结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶核酸分子的能力,和/或保留将包含指导序列的RNA转录物加工成指导多核苷酸分子的能力。在一些实例中,与SEQ ID NO:1-53、696、728任一序列所示的Cas12蛋白相比所述Cas12蛋白包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129或130个氨基酸变化(例如插入、缺失或取代),但保留结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶核酸分子的能力。

[0412] 一种类型的修饰或突变包括用氨基酸取代具有相似生化性质的氨基酸残基,即保守取代。通常,保守取代对所得蛋白或肽的活性影响很小或没有影响。例如,保守取代是Cas12蛋白中的氨基酸取代,其基本上不影响Cas12蛋白和与gRNA分子指导序列互补的靶核酸分子的结合,和/或加工指导阵列RNA转录物成gRNA分子的过程。

[0413] 可以通过使用保守性较低的取代来进行更实质性的改变,例如,选择在维持以下效果方面差异更大的残基:(a)取代发生区域中多肽骨架的结构,例如,作为一个螺旋或折叠构象;(b)与靶位点相互作用的区域的电荷或疏水性;或(c)侧链的体积。通常预期会在多肽功能中产生最大变化的取代是(a):亲水残基(例如丝氨酸或苏氨酸)与疏水残基(例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸)之间的取代;(b)半胱氨酸或脯氨酸与任何其他残基之间的取代;(c)带正电侧链

的残基(例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)与带负电残基(例如谷氨酸或天冬氨酸)之间的取代;或(d)具有庞大侧链的残基(例如苯丙氨酸)与不具有侧链的残基(例如甘氨酸)之间的取代。

[0414] Cas12活性片段

[0415] 本披露中,所述Cas12蛋白可以仅包含WED-I结构域、Helical-I1结构域、PI结构域、Helical-I2结构域、Helical-II结构域、WED-II结构域、RuvC-I结构域、Helical-III结构域、BH结构域、RuvC-II结构域、Nuc结构域和/或RuvC-III结构域。

[0416] 本披露所述的Cas12蛋白,除了包含所述结构域,还可以包含其他现有技术中的Cas12蛋白的结构域,共同组合成Cas12蛋白的完整结构,以实现本披露所述的Cas12蛋白的功能,包括但不限于保留Cas12蛋白与gRNA形成复合物的能力、保留Cas12蛋白与gRNA形成复合物并靶向靶核酸的能力、保留Cas12蛋白与gRNA形成的复合物靶向调控靶核酸的表达的能力、保留Cas12蛋白与gRNA形成的复合物靶向切割靶核酸的单链或双链的能力、保留Cas12蛋白结合与指导多核苷酸的指导序列互补的靶核酸分子的能力,和/或保留将包含指导序列的RNA转录物加工成指导多核苷酸分子的能力。

[0417] Cas12失活变体

[0418] 通过点突变的方式使Cas12的结构域RuvC失去活性,Cas12蛋白将失去核酸内切酶活性,形成的dCas12(dead Cas12)只能在指导多核苷酸的介导下结合靶基因,而不具备剪切DNA的功能。

[0419] 也可以通过点突变的方式使Cas12的结构域RuvC失去部分活性,形成Cas12切口酶(nickase Cas12, nCas12),其在指导多核苷酸的介导下结合靶基因,切割双链核酸中的其中一条单链,而不切割另一条单链。

[0420] 因此,可将dCas12或nCas12与其他结构域(包括但不限于脱氨酶结构域、转录激活结构域、转录抑制结构域、甲基化结构域、去甲基化结构域、组蛋白乙酰化结构域、组蛋白去乙酰化结构域)融合或缀合,通过指导多核苷酸引导至靶核酸的靶序列处,然后借助所述其他结构域行使相应的功能;例如,通过对胞嘧啶碱基脱氨基实现靶核酸碱基C→T的转换、通过对腺嘌呤碱基脱氨基实现靶核酸

碱基A→G的转换、通过转录抑制结构域KRAB实现靶核酸的转录抑制、通过转录激活结构域VP64促进靶核酸的转录。

[0421] 功能结构域

[0422] 在一些实施方案中，所述Cas12蛋白或Cas12失活变体与同源或异源功能结构域共价连接或融合。

[0423] 在一些实施方案中，所述功能结构域具有修饰靶核酸序列的酶活性；例如核酸酶活性、甲基转移酶活性、去甲基化酶活性、DNA修复活性、DNA损伤活性、脱氨活性、歧化酶活性、烷基化活性、脱嘌呤活性、氧化活性、嘧啶二聚体形成活性、整合酶活性、转座酶活性、重组酶活性、聚合酶活性、连接酶活性、解旋酶活性、光解酶活性、糖基化酶活性、去糖基化活性、乙酰转移酶活性、去乙酰化酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、去泛素化活性、腺苷酰化活性、去腺苷化活性、SUMOylating活性、deSUMOylating活性、豆蔻酰化活性和/或去豆蔻酰化活性。

[0424] 在一些实施方案中，所述功能结构域任选自以下的一种或更多种：核酸酶(例如FokI)、甲基转移酶、去甲基化酶、DNA修复酶、DNA损伤酶、脱氨酶、歧化酶、烷基化酶、脱嘌呤酶、氧化酶、嘧啶二聚体形成酶、整合酶、转座酶、重组酶、聚合酶、连接酶、解旋酶、光解酶、糖基化酶、去糖基化酶、乙酰转移酶、去乙酰化酶、激酶、磷酸酶、泛素连接酶、去泛素化酶、腺苷酰化酶、去腺苷酶、SUMOylating酶、deSUMOylating酶、豆蔻酰化酶和/或去豆蔻酰化酶。

[0425] 在一些实施方案中，所述功能结构域任选自以下的一种、两种、三种、四种或更多种：亚细胞定位信号、DNA结合域、蛋白酶结构域、转录激活域、转录抑制域、核酸酶结构域、脱氨酶结构域、尿嘧啶DNA糖基化酶结构域(UDG)、尿嘧啶DNA糖基化酶抑制结构域(UGI)、甲基化酶、去甲基化酶、转录释放因子、组蛋白乙酰化酶结构域、组蛋白脱乙酰化酶结构域、DNA连接酶、表位标签和/或报告域。

[0426] 在本披露的一些实施方案中，脱氨酶结构域任选自：APOBEC1、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3D、APOBEC3F、活化诱导的胞苷脱

氨酶(AID)、来自七鳃鳗的CDA、经工程改造以作用于DNA的腺苷脱氨酶(TadA)的突变体。

- [0427] 在一些实施方案中,所述转录激活结构域任选自:P65、VPR、VP16、VP64、VTR1、VTR2、VTR3、p65、MyoD1、HSF1、RTA、SET7/9和组蛋白乙酰转移酶。在一些实施方案中,所述转录激活结构域任选自:来自p53 TAD1的序列ETFSDLWKL、来自p53 TAD2的序列DDIEQWFTE、来自MLL的序列SDIMDFVLK、来自E2A的序列DLLDFSMMF、来自Rtg3的序列ETLDFSLVT、来自CREB的序列RKILNDLSS、来自CREBaB6的序列EAILAELKK、来自Gli3的序列DDVVQYLNS、来自Gal4的序列DDVYNYLFD、来自Oaf1的序列DLFDYDFLV、来自Pip2的序列DFFDYDLLF、来自Pdr1的序列EDLYSILWS、来自Pdr3的序列TDLYHTLWN。
- [0428] 在一些实施方案中,所述转录抑制结构域任选自:KOX1、KAP-1、MAD、FKHR、EGR-1、ERD、SID、SID的串联体(例如SID4X)、TIEG、v-ERB-A、MBD2、MBD3、TRa、组蛋白甲基转移酶、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)、核激素受体(例如,雌激素受体或甲状腺激素受体)、DNMT家族成员(例如DNMT1、DNMT3A、DNMT3B)、MeCP2的KRAB结构域、ROM2和AtHD2A。
- [0429] 在一些实施方案中,所述转录抑制结构域为来自KOX1蛋白的KRAB结构域。
- [0430] 在一些实施方案中,所述核酸酶结构域任选自FokI、具有ssDNA切割活性的多肽、具有dsDNA切割活性的多肽。
- [0431] 在一些实施方案中,所述甲基化酶结构域选自DNA甲基化酶,包括但不限于DNMT1、DNMT3a、DNMT3b。
- [0432] 在一些实施方案中,所述脱甲基酶选自TET1CD、TET1、ROS1、DME、DML2和DML3。
- [0433] 甲基化和脱甲基化在本领域中公认为表观遗传性基因调节的重要方式。
- [0434] 在一些实施方案中,所述同源或异源功能结构域为对于所述融合蛋白或缀合物的溶解、纯化或检测有用的序列标签。本文提供了适合的蛋白标签序列,这些序列包括但不限于生物素羧化酶载体蛋白(BCCP)标签、myc标签、钙调素标签、FLAG标签、血凝素(HA)标签、多组氨酸标签(也被称为His标签)、麦芽糖结合蛋

白(MBP)标签、nus标签、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)标签、绿色荧光蛋白(GFP)标签、硫氧还蛋白标签、S-标签、Softag(例如, Softag 1、Softag 3)、strep-标签、生物素连接酶标签、FlAsH标签、V5标签和SBP标签。另外的适合的序列对本领域的普通技术人员而言将是显而易见的。

[0435] 在本披露的一些实施方案中, 通过将Mut-02-1-426-846-858-860-D651A-E891A-D1082A突变体与脱氨酶结构域、核定位信号融合构建得到单碱基编辑器。在本披露的一些实施方案中, 通过将Mut-02-1-426-846-858-860-D651A-E891A-D1082A突变体与APOBEC3A结构域、SV40 NLS融合构建得到单碱基编辑器。

[0436] 在本披露的一些实施方案中, 通过将Mut-02-1-426-846-858-860-D651A-E891A-D1082A突变体与KRAB、SV40 NLS融合构建得到转录抑制表观编辑器。在本披露的一些实施方案中, 通过将Mut-02-1-426-846-858-860-D651A-E891A-D1082A突变体与VP64结构域、SV40 NLS融合构建得到转录激活表观编辑器。

[0437] 亚细胞定位信号

[0438] 在一些实施方案中, 所述Cas12蛋白与至少一种同源或异源亚细胞定位信号融合。在一些实施方案中, 所述Cas12蛋白与至少一个同源或异源亚细胞定位信号融合。示例性的亚细胞定位信号包括细胞器定位信号, 例如核定位信号(NLS)、核输出信号(NES)或线粒体定位信号。

[0439] NLS的非限制性实例包括来源于以下项的NLS序列: SV40病毒大T抗原的NLS, 其具有氨基酸序列PKKKRKV(SEQ ID NO:738); 来自核质蛋白的NLS(例如序列KRPAATKKAGQAKKKK, SEQ ID NO:739); c-myc NLS, 其具有氨基酸序列PAAKRVKLD(SEQ ID NO:740)或RQRRNELKRSP(SEQ ID NO:741); hRNP A1 M9 NLS, 其具有序列NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRN QGGY(SEQ ID NO:742); 来自IBB结构域的序列RMRIZFKNKGKDTAELRRR RVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV(SEQ ID NO:743); 肌瘤T蛋白的序列VSRK RPRP(SEQ ID NO:744)和PPKKARED(SEQ ID NO:745); 人p53的序列PQPKKK PL(SEQ ID NO:746); 小鼠c-ablIV的序列SALIKKKKKMAP(SEQ ID NO:747);

流感病毒NS1的序列DRLRR(SEQ ID NO:748)和PKQKKRK(SEQ ID NO:749); 肝炎病毒 δ 抗原的序列RKLKKIKKL(SEQ ID NO:750); 小鼠Mx1蛋白的序列REKKKFLKRR(SEQ ID NO:751); 人PARP酶的序列KRKGDEV DGVDEVAKKSKK(SEQ ID NO:752); 以及类固醇激素受体的序列RKCLQAGMNLEARKTKK(SEQ ID NO:753)。在一些实施例中, 所述核定位序列具有足够强度以实现在真核细胞的细胞核中驱动本披露所述的融合蛋白或缀合物以可检测到的量积聚。总的来说, 核定位活性的强度可以来源于NLS数目、使用的一个或更多个特定NLS、或这些因素的组合。可以通过任何合适的技术进行核中积累的检测。例如, 可检测标记可以融合至Cas蛋白, 使得细胞内的位置可以被可视化, 诸如与检测核的位置的手段(例如, 对核具有特异性的染料, 诸如DAPI)相组合。还可以将细胞核从细胞中分离出来, 然后通过任何适合的用于检测蛋白质的方法分析其内容物, 诸如免疫组织化学、蛋白质印迹或酶活性测定。还可以通过以下方式间接地确定核中的积累: 诸如通过测定核酸靶向复合物形成的作用(例如, 测定在靶序列处的DNA或RNA切割或突变、或测定由于DNA或RNA靶向复合物形成和/或DNA或RNA靶向Cas蛋白活性的影响而改变的基因表达活性), 与没有暴露于核酸靶向Cas蛋白或核酸靶向复合物、或暴露于缺乏一个或多个NLS的核酸靶向Cas蛋白的对照进行比较。

[0440] 载体系统

[0441] 本披露的另一方面涉及包含本文所述的CRISPR-Cas12系统的载体系统, 所述载体系统包含一个或多个重组载体, 所述重组载体包含编码所述Cas12蛋白的多核苷酸序列和编码所述指导多核苷酸的多核苷酸序列。

[0442] 在一些实施方案中, 所述载体系统包含至少一个质粒或病毒重组载体(例如, 逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒或单纯疱疹病毒)。在一些实施方案中, 所述编码Cas12蛋白的多核苷酸序列和所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列位于同一重组载体上。在一些实施方案中, 所述编码Cas12蛋白的多核苷酸序列和所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列位于多个重组载体上。

[0443] 在一些实施方案中, 所述编码Cas12蛋白的多核苷酸序列和/或所述编码指导多核苷酸的多核苷酸序列可操作地连接至调控序列(也称调节元件)。所述调节元件

包括启动子、增强子、内部核糖体进入位点(IRES)和其他表达控制元件(例如, 转录终止信号, 如多腺苷酸化信号和poly-U序列)。调节元件包括使核苷酸序列在许多类型的宿主细胞中组成型表达的调节元件, 以及使核苷酸序列仅在某些宿主细胞中表达的调节元件(例如, 组织特异性调节序列)。组织特异性启动子可以主要在所需的感兴趣组织中直接表达, 例如肌肉、神经元、骨、皮肤、血液、特定器官(例如肝脏、胰腺)、或特定的细胞类型(例如淋巴细胞)。调节元件还可以以时间依赖性方式指导表达, 例如以细胞周期依赖性 or 发育阶段依赖性方式, 其也可能是或可能不是组织或细胞类型特异性的。在一些实施例中, 所述调节元件是增强子元件, 例如WPPE、CMV增强子、HTLV-1的LTR中的R-U5区段、SV40增强子、或兔 β -珠蛋白外显子2和3之间的内含子序列。

- [0444] 在一些实施方案中, 所述重组载体包含pol III启动子(例如, U6和H1启动子)、pol II启动子(例如, 逆转录病毒Rous肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地带有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地带有CMV增强子)、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、 β -肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子、或EF1 α 启动子), 或pol III启动子和pol II启动子。
- [0445] 在一些实施方案中, 所述启动子是组成型启动子, 其是连续活性的并且不受外部信号或分子的调节。合适的组成型启动子包括但不限于CMV、RSV、SV40、EF1 α 、CAG和 β -肌动蛋白启动子。在一些实施方案中, 所述启动子是受外部信号或分子(例如, 转录因子)调节的诱导型启动子。
- [0446] 在一些实施方案中, 所述启动子是组织特异性启动子, 其可用于驱动Cas12蛋白的组织特异性表达。合适的肌肉特异性启动子包括但不限于CK8、MHCK7、肌红蛋白启动子(Mb)、结蛋白(Desmin)启动子、肌肉肌酸激酶启动子(MCK)及其变体, 以及SPc5-12合成启动子。合适的免疫细胞特异性启动子包括但不限于B29启动子(B细胞)、CD14启动子(单核细胞)、CD43启动子(白细胞和血小板)、CD68(巨噬细胞)和SV40/CD43启动子(白细胞和血小板)。合适的血细胞特异性启动子包括但不限于CD43启动子(白细胞和血小板)、CD45启动子(造血细胞)、INF- β (造血细胞)、WASP启动子(造血细胞)、SV40/CD43启动子(白细胞和血小板), 和SV40/CD45启动子(造血细胞)。合适的胰腺特异性启动子包括但不限于弹性蛋白

酶-1启动子。合适的内皮细胞特异性启动子包括但不限于Fit-1启动子和ICAM-2启动子。合适的神经元组织/细胞特异性启动子包括但不限于GFAP启动子(星形胶质细胞)、SYN1启动子(神经元)和NSE/RU5'(成熟神经元)。合适的肾特异性启动子包括但不限于Nphs1启动子(足细胞)。合适的骨特异性启动子包括但不限于OG-2启动子(成骨细胞、成牙本质细胞)。合适的肺特异性启动子包括但不限于SP-B启动子(肺)。合适的肝脏特异性启动子包括但不限于SV40/Alb启动子。合适的心脏特异性启动子包括但不限于 α -MHC。

[0447] AAV载体

[0448] 本披露的另一方面涉及包含本文所述的CRISPR-Cas12系统的腺相关病毒(AAV)载体,其中所述腺相关病毒(AAV)载体包含编码本文所述的Cas12蛋白和指导多核苷酸的DNA。

[0449] 通过AAV载体递送CRISPR-Cas系统在Maeder et al.,Nature Medicine 25:229-233 (2019)中进行了描述,经临床证明视网膜下递送AAV安全性和有效性,通过视网膜下注射的局部递送、AAV5对光感受器细胞的自然嗜性以及光感受体特异性GRK1启动子的使用都用于将CRISPR/Cas系统的表达仅限于治疗靶组织和细胞类型,其通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,所述AAV载体包含ssDNA基因组,该基因组包含Cas12蛋白和侧接ITR的指导多核苷酸的编码序列。

[0450] 在一些实施方案中,本文所述的CRISPR-Cas12系统被包装在AAV载体中,例如AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAVrh74。在一些实施方案中,本文所述的CRISPR-Cas12系统被包装在AAV载体中,该AAV载体包含具有组织嗜性的工程化衣壳,例如工程化肌肉嗜性衣壳。Tabebordbar et al.,Cell 184:4919-4938(2021)中描述了通过定向进化对具有组织趋向性的AAV衣壳进行工程改造,鉴定了一类含RGD基序的衣壳,全身注射MyoAAV可高效转导灵长类动物肌肉,该文献通过引用整体并入本文。

[0451] 脂质纳米粒

[0452] 本披露的另一方面涉及脂质纳米粒(LNP),其包含本文所述的CRISPR-Cas12系统,其中所述LNP包含本文所述的指导多核苷酸和编码本文所述的Cas12蛋白的mRNA。

- [0453] Gillmore et al., N. Engl. J. Med., 385:493–502(2021)中描述了CRISPR–Cas系统的LNP递送，脂质纳米颗粒(LNP)由4种脂质组成，所述4种脂质包括专有的可离子化脂质LP000001；DSPC；胆固醇和DMG–PEG2k，LNP悬浮液配制在Tris、NaCl和蔗糖的水性缓冲液中，pH 7.4，其全文以引用方式并入本文。在一些实施方案中，除了RNA有效负载(Cas12 mRNA和指导多核苷酸)之外，脂质纳米粒(LNP)还包含四种组分：阳离子或可电离脂质、胆固醇、辅助脂质和PEG–脂质。在一些实施方案中，所述阳离子或可电离脂质包括cKK–E12、C12–200、ALC–0315、DLin–MC3–DMA、DLin–KC2–DMA、FTT5、Moderna SM–102和Intellia LP 01。在一些实施方案中，所述PEG–脂质包含PEG–2000–C–DMG、PEG–2000–DMG或ALC–0159。在一些实施方案中，所述辅助脂质包括DSPC。LNP的组分在Paunovska et al., Nature Reviews Genetics 23:265–280(2022)中进行了描述，FDA批准的LNP含有四种基本成分的变体：阳离子或可电离脂质、胆固醇、辅助脂质和聚乙二醇(PEG)脂质，该文献通过引用整体并入本文。
- [0454] 慢病毒载体
- [0455] 本披露的另一方面涉及包含本文所述CRISPR–Cas12系统的慢病毒载体，其中所述慢病毒载体包含本文所述的指导多核苷酸和编码本文所述的Cas12蛋白的mRNA。在一些实施方案中，所述慢病毒载体是用同源或异源包膜蛋白如VSV–G假型化的。在一些实施方案中，所述编码Cas12蛋白的mRNA与适体序列连接。
- [0456] RNP复合物
- [0457] 本披露的另一方面涉及包含本文所述的CRISPR–Cas12系统的核糖核蛋白复合物，其中所述核糖核蛋白复合物由本文所述的指导多核苷酸和Cas12蛋白形成。在一些实施方案中，可以通过显微注射或电穿孔将所述核糖核蛋白复合物递送至真核细胞、哺乳动物细胞或人类细胞。在一些实施方案中，所述核糖核蛋白复合物可以包装在病毒样颗粒中并在体内递送至哺乳动物或人类受试者。
- [0458] 病毒样颗粒
- [0459] 本披露的另一方面涉及包含本文所述的CRISPR–Cas12系统的病毒样颗粒(VLP)，其中所述病毒样颗粒包含本文所述的指导多核苷酸和Cas12蛋白或由所述指导多核苷酸和Cas12蛋白组成的核糖核蛋白复合物。

- [0460] Banskota et al. Cell 185(2):250–265(2022)报道了高效包装和递送碱基编辑器或Cas9核糖核蛋白的无DNA病毒样颗粒(eVLPs)的开发和应用；Mangeot et al., Nature Communications 10(1):1–15(2019)使用负载Cas9–sgRNA核糖核蛋白的经过工程改造的小鼠白血病病毒样颗粒(Nanoblades)在细胞系和原代细胞(包括人诱导多能干细胞、人造血干细胞和小鼠骨髓细胞)中诱导高效的基因组编辑；Campbell, et al., Molecular Therapy 27:151–163(2019)利用一种被称为“gesicle”的特化细胞外囊泡，以核糖核蛋白形式有效但短暂地递送靶向HIV长末端重复序列(LTR)的Cas9，Gesicles是通过表达水疱性口炎病毒糖蛋白和包装蛋白(作为其货物)来产生，因此无需进行转基因递送，从而可以更精细地控制Cas9表达和Mangeot et al. Molecular Therapy, 19(9):1656–1666(2011)报道了水泡性口腔炎病毒(VSV-G)的刺突糖蛋白在人类细胞中的过表达诱导了名为gesicles的融合性小泡的释放，生物化学和功能研究表明，神经胶质细胞结合了来自生产细胞的蛋白质，并可以将其输送到受体细胞，这种蛋白质转导方法允许靶细胞中细胞质、细胞核或表面蛋白质的直接转运。这些文献均描述了工程化VLP，其全文以引用方式并入本文。
- [0461] 在一些实施方案中，工程化的病毒样颗粒(VLP)是用同源或异源包膜蛋白例如VSV-G假型化的。在一些实施方案中，所述Cas12蛋白通过可切割连接子与gag蛋白(例如MLVgag)融合，其中靶细胞中接头的切割暴露了位于连接子和Cas12蛋白之间的NLS。在一些实施方案中，所述融合蛋白或缀合物包含(例如，从5'到3')gag蛋白(例如，MLVgag)、一种或更多种NES、可切割连接子、一种或更多种NLS、和Cas12，如Banskota et al. Cell 185(2):250–265(2022)所述。
- [0462] 在一些实施方案中，所述Cas12蛋白与第一二聚化结构域融合，所述第一二聚化结构域能够与融合至膜蛋白的第二二聚化结构域二聚化或异二聚化，其中配体的存在促进所述二聚化并富集Cas12蛋白或融合蛋白或缀合物至VLP中，如Campbell, et al., Molecular Therapy 27:151–163(2019)中所述。
- [0463] 细胞
- [0464] 本披露的另一方面涉及包含本文所述的CRISPR–Cas12系统的细胞。细胞(例如，其可用于产生无细胞系统)可以是真核或原核的。此类细胞的实例包括但不限于细菌、古细菌、植物、真菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞，例如乳杆菌、

乳球菌、芽孢杆菌(例如枯草芽孢杆菌)、埃希氏菌属(例如大肠杆菌)、梭菌属、酵母菌属或毕赤酵母属(如酿酒酵母或巴斯德毕赤酵母), 乳酸克鲁维酵母、鼠伤寒沙门氏菌、果蝇细胞、秀丽隐杆线虫细胞、非洲爪蟾细胞、SF9细胞、C129细胞、293细胞、脉孢菌和永生化哺乳动物细胞系(例如, HeLa细胞、骨髓细胞系和淋巴样细胞系)。

- [0465] 在一些实施方案中, 所述细胞是原核细胞, 例如细菌细胞, 例如大肠杆菌。
- 在一些实施方案中, 细胞是真核细胞, 例如哺乳动物细胞或人类细胞。在一些实施方案中, 细胞是原代真核细胞、干细胞、肿瘤/癌细胞、循环肿瘤细胞(CTC)、血细胞(例如, T细胞、B细胞、NK细胞、Tregs等)、造血干细胞、特化免疫细胞(如肿瘤浸润淋巴细胞或肿瘤抑制淋巴细胞)、肿瘤微环境中的基质细胞(如癌症相关成纤维细胞等)。在一些实施方案中, 细胞是中枢或外周神经系统的脑或神经元细胞(例如, 神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞、视网膜神经节细胞、视杆/视锥细胞等)。

- [0466] 靶核酸或靶DNA

- [0467] 在本披露的一些实施方案中, 所述靶核酸为靶DNA。

- [0468] 本文所述的CRISPR-Cas12系统可用于靶向一种或更多种靶核酸分子, 例如存在于生物样品、环境样品(例如土壤、空气或水样品)等中的靶核酸分子。

- [0469] 在本披露的一些实施方案中, 所述靶核酸为疾病或病症相关基因。在本披露的一些实施方案中, 所述靶核酸为疾病相关基因。在本披露的一些实施方案中, 所述疾病相关基因是直接导致所述疾病的致病基因。在本披露的一些实施方案中, 所述疾病相关基因是直接导致所述疾病的异常基因或其表达出现异常的基因。例如, 所述基因出现了不利的突变, 导致疾病的发生。再例如, 所述基因表达过高或过低, 导致疾病的发生。在本披露的一些实施方案中, 所述基因表达过高时导致疾病的发生。在本披露的一些实施方案中, 所述基因表达过低时导致疾病的发生。在本披露的一些实施方案中, 所述基因表达过高与疾病的发生有关。在本披露的一些实施方案中, 所述基因表达过低与疾病的发生有关。

- [0470] 在本披露的一些实施方案中，所述疾病或病症为血液系统疾病或病症、眼科疾病或病症、神经系统疾病或病症、呼吸系统疾病或病症、肝脏疾病或病症、代谢系统疾病或病症、癌症或感染性疾病。
- [0471] 在本披露的一些实施方案中，所述靶核酸任选自如表27中所列的基因，所述疾病或病症为如表27中所列的疾病或病症。表27示出了靶核酸及每种靶核酸对应的疾病或病症。
- [0472] 在本披露的一些实施方案中，所述疾病或病症任选自：A型血友病、Best卵黄样黄斑营养不良、B细胞急性淋巴细胞白血病、B型血友病、CDKL5缺乏症、C LN2 disease、C型尼曼匹克氏病、Dravet综合征、FOXG1综合征、GM1神经节苷脂贮积症、GM2神经节苷脂沉积症、HIV感染、HSV感染、IB型乌谢尔综合征、IIA型乌谢尔综合征、IIIA型黏多糖贮积症、IIIB型黏多糖贮积症、III型戈谢病、II型黏多糖贮积症、II型糖尿病、IV型黏多糖贮积症、I型戈谢病、I型黏多糖贮积症、I型糖尿病、I型乌谢尔综合征、KCNQ2癫痫脑病、Leber遗传性视神经病变、Leigh syndrome、Prader-Willi综合征、SLC13A5缺陷、X连锁肌小管肌病、X连锁视网膜劈裂症、X连锁视网膜色素变性、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、 α -甘露糖苷贮积症、 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、阿尔茨海默病、巴德-毕德氏症候群、白点状视网膜变性、白细胞黏附缺陷症I型、半乳糖血症、膀胱癌、膀胱过度活动症、苯丙酮尿症、鼻咽癌、比埃蒂晶体营养不良、丙酮酸激酶缺乏症、勃起功能障碍、常染色体隐性遗传先天性鱼鳞病、成人葡聚糖体疾病、创伤性关节炎、纯合子型家族性高胆固醇血症、脆性X染色体综合征、地中海贫血、低磷酸酯酶症、癫痫、多发性骨髓瘤、多系统萎缩、额颞叶痴呆、儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速、法布瑞氏症、范可尼贫血、芳香族氨基酸脱羧酶缺乏症、放射引起的口腔干燥、非霍奇金淋巴瘤、非肌层浸润性膀胱癌、非酒精性脂肪性肝病、非小细胞肺癌、肥厚型心肌病、肥厚性疤痕、肥胖、腓骨肌萎缩症1A型、腓骨肌萎缩症2A型、肺高压、弗立特里希氏共济失调、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、干性年龄相关性黄斑变性、干燥综合征、高尿酸血症、高血脂症、戈谢病、孤独症谱系障碍、骨关节炎、骨髓衰竭综合征、瓜氨酸血症I型、冠心病、胱氨酸病、黑素瘤、亨廷顿氏病、肌萎缩侧索硬化症、急迫性

尿失禁、急性间歇性卟啉病、急性淋巴细胞白血病、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩伴呼吸窘迫1型、脊髓性肌萎缩症、家族黑蒙性痴呆症、甲基丙二酸血症、甲状腺癌、假肥大性肌营养不良、间变性星形细胞瘤、间歇性跛行、交界性大疱性表皮松解症、胶质瘤、胶质母细胞瘤、角膜移植排斥、结直肠癌、进行性多灶灶脑白质病、进行性家族性肝内胆汁淤积症、巨轴索神经病、卡纳万病、可卡因成瘾、克拉伯病、克里格勒-纳贾尔综合征、口腔癌、快乐木偶综合症、扩散型内因性脑桥神经胶质瘤、拉福拉病、类风湿性关节炎、镰状细胞病、淋巴水肿、卵巢癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性肉芽肿病、慢性肾病贫血、慢性疼痛、慢性乙肝、门克斯病、囊性纤维化、内瑟顿综合征、鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症、帕金森病、庞贝氏症、葡萄膜炎、前列腺癌、前庭神经鞘瘤、强直性肌营养不良、强直性脊柱炎、去势抵抗前列腺癌、青光眼、全色盲、缺血性心力衰竭、溶酶体贮积病、肉瘤、乳腺癌、瑞特综合征、三阴性乳腺癌、桑德霍夫病、色盲、射血分数降低的心力衰竭、神经元蜡样脂褐质沉积症、肾上腺脑白质失养症、肾细胞癌、湿性年龄相关性黄斑变性、湿疹、血小板减少伴免疫缺陷综合征、食管癌、视神经病变、视神经萎缩、视网膜静脉阻塞、视网膜色素变性、视紫红质介导的常染色体显性遗传视网膜色素变性、室管膜瘤、输卵管癌、双侧前庭病、斯特格氏病、糖尿病黄斑水肿、糖尿病神经病变、糖尿病视网膜病变、糖尿病周围神经痛、糖尿病足、糖原贮积病、糖原贮积病Ia型、糖原贮积病IIb型、特应性皮炎、听力损失、听力障碍、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、威尔逊病、稳定性心绞痛、乌谢尔综合征、无脉络膜症、先天性黑蒙症、先天性肾上腺皮质增生症、心肌病、心绞痛、心力衰竭、新型冠状病毒感染、胸膜间皮瘤、寻常性痤疮、严重联合免疫缺陷病、严重肢体缺血、眼咽型肌营养不良、胰腺癌、移植物抗宿主病、遗传性视网膜营养不良、遗传性血管性水肿、乙型肝炎、异染性脑白质营养不良、银屑病关节炎、隐性遗传营养不良型大疱性表皮松解症、婴儿恶性骨硬化病、营养不良性大疱性表皮松解、硬斑病、原发性免疫缺陷、杂合子型家族性高胆固醇血症、肢带型肌营养不良2B型、肢带型肌营养不良2C型、肢带型肌营养不良2D型、肢带型肌营养不良2E型、肢带型肌营养不良2I型、肢带型肌营养不良2L型、肢体缺血性疾病

病、脂蛋白脂酶缺乏症、重症先天性中性粒细胞缺乏症、皱纹、卒中、坐骨神经痛、精神分裂症、抑郁症、药物成瘾、自闭症、特发性肺纤维化、高血脂、甲状腺素运载蛋白(ATTR)淀粉样变性、AATD肝病和AATD肺病。

- [0473] 所述甲状腺素运载蛋白(ATTR)淀粉样变性的相关基因包括但不限于ATTR;
- [0474] 所述Leber遗传性视神经病变的相关基因包括但不限于MT-ND4;
- [0475] 所述AATD肝病的相关基因包括但不限于AATD;
- [0476] 所述AATD肺病的相关基因包括但不限于AATD;
- [0477] 所述移植物抗宿主病的相关基因包括但不限于胸苷激酶基因;
- [0478] 所述遗传性视网膜营养不良的相关基因包括但不限于RPE65;
- [0479] 所述的脊髓性肌萎缩症相关基因包括但不限于SMN1;
- [0480] 所述骨关节炎的相关基因包括但不限于TGF- β 1;
- [0481] 所述A型血友病的相关基因包括但不限于factor VIII;
- [0482] 所述B型血友病的相关基因包括但不限于factor IX;
- [0483] 所述囊性纤维化的相关基因包括但不限于CFTR;
- [0484] 所述帕金森病的相关基因包括但不限于Gad1、Gad2、PTBP1、KEAP1、RE1、Amigo1、Gprc5c、Let-7a、Pnky、LRRK2、SNCA基因、GBA基因、miR-92b基因、miR-9基因、miR-124基因、miR-181基因、HMGB1、TRIM72、GPNMB和REST;
- [0485] 所述乌谢尔综合征的相关基因包括但不限于USH2A;
- [0486] 所述 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、镰状细胞病的相关基因包括但不限于BCL11A、HBG、HBA和HBB;
- [0487] 所述肺高压的相关基因包括但不限于eNOS;
- [0488] 所述斯特格氏病的相关基因包括但不限于ABCA4;
- [0489] 所述年龄相关性黄斑变性的相关基因包括但不限于VEGFA、VEGFR、IL17、Kir7.1、LCN-2、IRAK-M、CD59、LTA4H、GPX4、GLS1、PAPP-A、cGAS、STING、mTOR、GCN2、Nrf2、Ang 2、CTGF、补体C3、补体C5、CHFR4b、DOCK6、CTSS基因、ELN基因和FGF2;

- [0490] 所述青光眼的相关基因包括但不限于AQP1、ADRB2、NMNTA2、NRP1、Hrh1、Anxa2、OPA1、Cx43、ANGPTL7、MYOC、ROCK1、ROCK2、TIMP1、TIMP2、TIMP3、TIMP4、碳酸酐酶CA2、碳酸酐酶CA4和碳酸酐酶CA12；
- [0491] 所述特发性肺纤维化的相关基因包括但不限于CTGF；
- [0492] 所述高血脂的相关基因包括但不限于PCSK9；
- [0493] 所述阿尔茨海默病的相关基因包括但不限于NGF；
- [0494] 所述冠心病的相关基因包括但不限于VEGFA和bFGF；
- [0495] 所述慢性肾病贫血的相关基因包括但不限于EPO；
- [0496] 所述先天性黑蒙症的相关基因包括但不限于RPE65；
- [0497] 所述视网膜色素变性的相关基因包括但不限于PDE6B；
- [0498] 所述苯丙酮尿症的相关基因包括但不限于PAH；和/或
- [0499] 所述癫痫的相关基因包括但不限于GAT1。
- [0500] 本披露一些具体实施方案中，所述靶核酸的序列如SEQ ID NO:761-782任一序列所示。
- [0501] 此类靶核酸的非限制性实例，还包括分别提交于2012年12月12日和2013年1月2日的美国临时专利申请61/736,527和61/748,427、提交于2013年12月12日的国际申请PCT/US2013/074667中所列举的那些，其全部通过引用并入本文。
- [0502] 在一些实施方案中，所述靶核酸为报告基因。报告基因的实例包括但不限于，谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶、萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、HcRed、DsRed、青荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、以包括蓝色荧光蛋白(BFP)的自发荧光蛋白。
- [0503] 治疗或预防疾病的应用
- [0504] 本披露的另一方面涉及一种药物组合物，其包含如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统或如本披露所述的细胞。所述药物组合物可以包含例如编码本文所述的Cas12蛋白或Cas12失活变体和

指导多核苷酸的AAV载体。所述药物组合物可以包含例如脂质纳米粒，该脂质纳米粒包含本文所述的指导多核苷酸和编码Cas12蛋白的mRNA。所述药物组合物可以包含例如包含本文所述的指导多核苷酸和编码Cas12蛋白的mRNA的慢病毒载体。所述药物组合物可以包含例如包含本文所述的指导多核苷酸和Cas12蛋白的病毒样颗粒或由所述指导多核苷酸和Cas12蛋白形成的核糖核蛋白复合物。

[0505] 本披露的另一方面涉及如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒在切割或编辑哺乳动物细胞中的靶核酸中的用途。

[0506] 本披露的另一方面涉及如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒在以下任一项的用途：切割一种或更多种靶核酸分子或使一种或更多种靶核酸分子产生切口，激活或上调一种或更多种靶核酸分子的表达，激活或抑制一种或更多种靶核酸分子的转录，使一种或更多种靶核酸分子失活，可视化、标记或检测一种或更多种靶核酸分子，结合一种或更多种靶核酸分子，运输一种或更多种靶核酸分子，以及掩蔽一种或更多种靶核酸分子。

[0507] 本披露的另一方面涉及如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒修饰一种或更多种靶核酸分子的用途，所述修饰一种或更多种靶核酸分子包括以下中的一种或更多种：核酸碱基取代、核酸碱基缺失、核酸碱基插入、靶核酸的断裂、核酸甲基化和核酸去甲基化。

- [0508] 本披露的另一方面涉及如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒在诊断、治疗或预防与靶核酸相关的疾病或病症中的用途。
- [0509] 本披露的另一方面涉及涉及如本披露所述的Cas12蛋白、如本披露所述的指导多核苷酸、如本披露所述的Cas12失活变体、如本披露所述的融合蛋白或缀合物、如本披露所述的核酸、如本披露所述的CRISPR-Cas12系统、如本披露所述的载体系统、如本披露所述的递送系统、如本披露所述的细胞、如本披露所述的药物组合物或如本披露所述的试剂盒在制备用于诊断、治疗或预防与靶核酸相关的疾病或病症的药物中的用途。
- [0510] 在本披露的一些实施方案中，所述靶核酸任选自如表27中所列的基因，所述疾病或病症为如表27中所列的疾病或病症。表27示出了靶核酸及每种靶核酸对应的疾病或病症。
- [0511] 在本披露的一些实施方案中，通过本文所述的CRISPR-Cas12系统靶向切割如表27中所列的特定基因，从而预防、诊断或治疗所述基因在表27中对应的疾病或病症。例如，靶向切割后通过细胞修复形成indel，靶基因被敲除，从而抑制其功能。
- [0512] 在本披露的一些实施方案中，通过本文所述的CRISPR-Cas12系统靶向修饰如表27中所列的特定基因，从而预防、诊断或治疗所述基因在表27中对应的疾病或病症。
- [0513] 在本披露的一些实施方案中，通过本文所述的CRISPR-Cas12系统靶向调控如表27中所列的特定基因的表达，从而预防、诊断或治疗所述基因在表27中对应的疾病或病症。
- [0514] 在一些实施方案中，将药物组合物体内递送至人类受试者。所述药物组合物可以通过任何有效途径递送。示例性给药途径包括但不限于静脉内输注、静脉内注射、腹膜内注射、肌肉内注射、瘤内注射、皮下注射、皮内注射、心室内注

射、血管内注射、小脑内注射、眼内注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、前房内注射、鼓室内注射、鼻内给药和吸入。

[0515] 诊断应用

[0516] 本披露的另一方面涉及一种体外组合物，其包含本文所述的CRISPR-Cas12系统和不能与本文所述的指导多核苷酸杂交的标记的detector DNA。

[0517] 本披露的另一方面涉及本文所述的CRISPR-Cas12系统在检测疑似包含靶核酸的核酸样品中的靶核酸的用途。

[0518] 本披露的另一方面涉及本文所述的CRISPR-Cas12系统在检测包含靶核酸的核酸样品中的靶核酸的用途。

[0519] 在一些实施方案中，检测的靶核酸为靶RNA。

[0520] 在一些实施方案中，检测的靶核酸为靶DNA。在一些实施方案中，检测靶DNA的方法包括与荧光蛋白或其他可检测标记融合的Cas12蛋白以及包含对靶DNA特异的指导序列的指导多核苷酸。Cas12与靶DNA的结合可以通过显微镜或其他成像方法进行可视化。

[0521] 在一些实施方案中，在无细胞系统中检测靶核酸的方法导致产生可检测的标记或酶活性。例如，通过使用Cas12蛋白、包含对靶核酸特异的指导序列的指导多核苷酸、和可检测标记，靶核酸将被Cas12识别。Cas12与靶核酸的结合会触发其DNase活性，这会导致靶核酸以及可检测标记的切割。

[0522] 在一些实施方案中，可检测标记是与荧光探针和淬灭剂连接的DNA。完整的可检测DNA连接荧光探针和淬灭剂，抑制荧光。在可检测DNA被Cas12切割后，荧光探针从淬灭剂中释放出来并显示出荧光活性。这种方法可用于确定靶DNA是否存在于裂解的细胞样品、裂解的组织样品、血液样品、唾液样品、环境样品(例如水、土壤或空气样品)、或其他裂解的细胞或无细胞样品中。这种方法还可用于检测病原体，例如病毒或细菌，或诊断疾病状态，例如癌症。

[0523] 在一些实施方案中，靶核酸的检测有助于诊断疾病和/或病理状态，或病毒或细菌感染存在。

[0524] 表27：靶核酸/靶基因与对应疾病或病症(特定单元格中有2个或更多个靶点时，表示同时靶向这两个或更多个靶基因；非限制性地，所述靶向可以是靶向敲除、单碱基编辑、同源重组、靶向增强其转录、靶向抑制其转录等等)：

靶点（基因）	疾病名称	靶点（基因）	疾病名称
17β-HSD13	非酒精性脂肪性肝炎	HLA	头颈部肿瘤
17β-HSD13	代谢相关脂肪性肝病	HLA	噬血细胞性淋巴组织细胞增多症
17β-HSD5、PSMA	去势抵抗性前列腺癌	HLA	乳腺癌
23S rRNA	肺炎克雷伯菌感染	HLA	前列腺癌
4-1BB、BCMA	浆细胞骨髓瘤难治	HLA	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
4-1BB、BCMA	复发性多发性骨髓瘤	HLA	卵巢癌

4-1BB、 BCMA	多发性骨髓瘤	HLA	结直肠癌
4-1BB、CD19	重症肌无力	HLA	浆细胞骨髓瘤难治
4-1BB、CD19	小淋巴细胞淋巴瘤	HLA	获得性免疫缺陷综合征
4-1BB、CD19	系统性硬皮病	HLA	黑色素瘤
4-1BB、CD19	系统性红斑狼疮	HLA	复发性多发性骨髓瘤
4-1BB、CD19	特发性炎症性肌病	HLA	肺癌
4-1BB、CD19	皮炎炎	HLA	膀胱癌
4-1BB、CD19	慢性淋巴细胞白血病	HLA	爱泼斯坦-巴尔病毒感染
4-1BB、CD19	淋巴细胞白血病	HLA class II 抗原、 MAGEA3	肿瘤
4-1BB、CD19	狼疮性肾炎	HLA class II 抗原、TERT	实体瘤
4-1BB、CD19	非霍奇金淋巴瘤	HLA class I 抗原	粘液样脂肪肉瘤
4-1BB、 CD19、 CD3ζ、EGFR	慢性淋巴细胞白血病	HLA class I 抗原	滑膜肉瘤
4-1BB、 CD19、 CD3ζ、EGFR	急性淋巴细胞白血病	HLA class I 抗原	非小细胞肺癌
4-1BB、 CD19、 CD3ζ、EGFR	非霍奇金淋巴瘤	HLA class I 抗原、HLA class II 抗原	1 型糖尿病
4-1BB、CD40	胆道肿瘤	HLA class I 抗原、 KKLC1	实体瘤
4-1BB、 CD40L、 CTLA4	转移性肝细胞癌	HLA、 MAGEA3	恶性上皮肿瘤
4-1BB、 CD40L、 CTLA4	微卫星稳定型结直肠癌	HLA、NY- ESO-1、转 化生长因子 β 受体	肿瘤
4-1BB、 CD40L、 CTLA4	晚期恶性实体瘤	HLA、 TGFB2	肿瘤

4-1BB、 CD40L、 CTLA4	实体瘤	HLA-A2	肾移植排斥反应
4-1BB、 CD40L、 CTLA4	局部晚期头颈部鳞状细胞癌	HLA-A2	肝移植排斥反应
4-1BB、 CD40L、 CTLA4	局部晚期肝细胞癌	HLA-A2	肝功能衰竭
4-1BB、 CD40L、 CTLA4	复发性头颈部鳞状细胞癌	HLA-A2、 NY-ESO-1	三阴性乳腺癌
4-1BB、EBV 蛋白	鼻咽癌	HLA-A2、 NY-ESO-1	肉瘤
4-1BB、EBV 蛋白	C 型尼曼匹克病	HLA-G	转移性透明细胞性肾细胞癌
4-1BB、HPV E7、IL2RA	晚期癌症	HLA-G	血液肿瘤
4-1BB、HPV E7、IL2RA	头颈部肿瘤	HLA-G	实体瘤
4-1BB、HPV E7、IL2RA	人乳头瘤病毒 16 阳性	HLA-G	肾细胞癌
4-1BB、HPV E7、IL2RA	宫颈癌	HLA-G	卵巢癌
4-1BB、HPV E7、IL2RA	肛门肿瘤	HLA-G	局部晚期透明细胞肾细胞癌
4-1BB、HPV E7、IL2RA	HPV16 感染	HLA-G	急性髓性白血病
4-1BB、IL- 12R	晚期恶性实体瘤	HMGB1	纤维化
4-1BB、IL- 12R	头颈部鳞状细胞癌	HMGB1	疼痛
4-1BB、IL- 12R	三阴性乳腺癌	HMGB1	脓毒症
4-1BB、IL- 12R	皮肤黑色素瘤	HMGB1	肺纤维化
4-1BB、IL- 12R	尿路上皮癌	HP-NAP	乳腺癌

4-1BB、IL-12R	黑色素瘤	HPV E6	宫颈癌
4-1BB、IL-12R	非小细胞肺癌	HPV E6、HPV E7	HPV16 阳性实体瘤
4-1BB、IL-12R	膀胱尿路上皮癌	HPV E7	子宫颈发育不良
4-1BBL、CD19、PSCA	肿瘤	HPV E7	肿瘤转移
4-1BBL、IL15R	实体瘤	HPV E7	阴道腺癌
5T4	实体瘤	HPV E7	新型冠状病毒感染
5T4	局部晚期恶性实体瘤	HPV E7	外阴肿瘤
5T4	急性髓性白血病	HPV E7	外阴上皮内瘤变
5T4	不可切除的恶性实体瘤	HPV E7	头颈部肿瘤
A1AT	肝纤维化	HPV E7	乳头状瘤病毒感染
A1AT	肝病	HPV E7	人乳头瘤病毒相关外阴鳞状细胞癌
A1AT	瘢痕	HPV E7	人乳头瘤病毒相关的阴茎鳞状细胞癌
A1AT	α 1-抗胰蛋白酶缺乏症	HPV E7	人瘤病毒相关性宫颈癌
A1R	哮喘	HPV E7	鳞状细胞肿瘤
ABCA4	黏多糖贮积症 I 型	HPV E7	鳞状上皮内病变
ABCA4	囊性纤维化	HPV E7	口咽肿瘤
ABCA4	亨廷顿舞蹈病	HPV E7	胶质母细胞瘤
ABCA4	阿尔茨海默病	HPV E7	脊髓损伤
ABCA4	Stargardt 病 4 型	HPV E7	黄斑变性
ABCA4	Friedreich 共济失调	HPV E7	喉肿瘤
ABCD1	肾上腺脑白质营养不良	HPV E7	宫颈上皮内瘤样病变
ABCD1	高甘油三酯血症	HPV E7	宫颈癌
AC	心脏衰竭	HPV E7	多瘤病毒感染
ACE2	原发性硬化性胆管炎	HPV E7	HPV 相关鳞状细胞癌
ACE2	冠状病毒感染	HPV E7	HPV16 阳性实体瘤
AChE	重症肌无力	HS	黏多醣贮积症 III 型
AChE	炎症性肠病	Hsp27	胰腺癌
AChE	肌萎缩侧索硬化	Hsp27	前列腺癌
ACTG2	巨膀胱-细小结肠-肠蠕动不良综合征	Hsp27	非小细胞肺癌
ACVR2B	恶病质	Hsp27	膀胱癌
ADA	重症联合型免疫缺陷	Hsp47	纤维化

ADA	腺苷脱氨酶缺乏	Hsp47	系统性硬皮病
ADAM8	肿瘤	Hsp47	特发性肺纤维化
ADAMTS5	骨关节炎	HSP70 heat-shock proteins	非小细胞肺癌
ADAMTS5、TNF	类风湿关节炎	HSPA1A、p53	肿瘤
ADAMTS5、TNF	骨关节炎	HSPA9	卵巢癌
ADAR	新型冠状病毒感染	HSPGs、MMPs、TGF-β1	肿瘤
ADAR	失代偿性肝硬化	HSPGs、MMPs、TGF-β1	创伤和损伤
ADAR	免疫球蛋白 a 肾病	HTATIP2	补体紊乱
ADARB1	肌萎缩侧索硬化	HTT	霍奇金淋巴瘤
ADP	肿瘤	HTT	亨廷顿舞蹈病
ADP、thymidine kinase	胰腺癌	Hyaluronic acid	转移性胰腺腺癌
aFGF	外周动脉闭塞性疾病	Hyaluronic acid	胰腺继发性恶性肿瘤
aFGF	湿疹	Hyaluronic acid	视网膜母细胞瘤
aFGF	慢性肢体威胁性缺血	Hyaluronic acid	脑瘤
aFGF	间歇性跛行	Hyaluronic acid	黑色素瘤
aFGF	动脉闭塞性疾病	Hypoxia-inducible factor 1	心肌缺血
AFP	肝癌	Hypoxia-inducible factor 1	外周血管疾病
AGER	炎症	Hypoxia-inducible factor 1	外周动脉疾病

AGER	哮喘	Hypoxia-inducible factor 1	间歇性跛行
AGL	糖原贮积病III型	Hypoxia-inducible factor 1	动脉粥样硬化
AGRE2、CLL-1	复发性急性髓细胞白血病	ICAM-1	炎症性肠病
AGT	先兆子痫	ICAM-1	炎症
AGT	射血分数降低的慢性心力衰竭	ICAM-1	溃疡性结肠炎
AGT	慢性心力衰竭	ICAM-1	甲状腺未分化癌
AGT	高血压	ICAM-1	甲状腺低分化癌
AGT	阿尔茨海默病	ICAM-1	甲状腺癌复发
AGT、ANGPTL3	心血管疾病	ICAM-1	非小细胞肺癌
AGT、APOC3	高血压	ICE1、caspase	神经瘤
AGT、APOC3	高甘油三酯血症	ID1	肿瘤
AIPL1	锥体营养不良	IDS	黏多糖贮积症 II 型
AIPL1	视网膜色素变性	IDUA	黏多糖贮积症 I 型
AIPL1	莱伯先天性黑蒙	IFN α	头颈部肿瘤
Akt、PTEN	肿瘤	IFN α	黑色素瘤
Akt-1	转移性肾细胞癌	IFNAR	胸腔积液
Akt-1	胰腺继发性恶性肿瘤	IFNAR	类风湿关节炎
Akt-1	胰腺癌	IFNAR	结直肠癌
Akt-1	晚期肾细胞癌	IFNAR	胶质母细胞瘤
Akt-1	晚期肝细胞癌	IFNAR	非肌层浸润性膀胱肿瘤
Akt-1	晚期恶性实体瘤	IFNAR	恶性胸膜间皮瘤
Akt-1	肾细胞癌	IFNAR	多形性胶质母细胞瘤
ALAS1	急性肝卟啉症	IFNAR	丙型肝炎
ALAS1	肝性卟啉症	IFNAR	膀胱癌
ALDH2	食管癌	IFNAR	膀胱癌
ALDH2	酒精使用障碍	IFNGR	肿瘤
ALDH2	胶质母细胞瘤	IFNGR	心脏衰竭
ALDH2	胶质瘤	IFNGR	围手术期缺血
ALDH2	骨质疏松症	IFNGR	外周血管疾病
ALK5	眼部疾病	IFNGR	神经系统变性病
ALPP	子宫内膜癌	IFNGR	皮肤 T 细胞淋巴瘤
ALPP	卵巢癌	IFNGR	念珠菌血症

ALPPL2	实体瘤	IFNGR	脑损伤
AMHR2	肿瘤	IFNGR	基底细胞癌综合征
AML1-ETO 融合蛋白	急性髓性白血病	IFNGR	黑色素瘤
Ang2	视网膜疾患	IFNGR	肺部疾病
Ang2	前列腺癌	IFNGR	1 型糖尿病
Ang2	脓毒症	IFN α 2	黑色素瘤
Ang2	急性肺损伤	IFN β	子宫内膜癌
Ang2	急性肺损伤	IFN β	胶质瘤
Ang2、VEGF	湿性年龄相关性黄斑变性	IFN β	急性髓性白血病
Angiostatin	角膜移植排斥反应	IFN β	多发性硬化症
ANGPTL3	原发性高胆固醇血症	IFN β	多发性骨髓瘤
ANGPTL3	高甘油三酯血症	IFN β	T 细胞淋巴瘤
ANGPTL3	纯合子家族性高胆固醇血症	IFN β 、NIS	神经内分泌癌
ANGPTL3	II 型高脂蛋白血症	IFN β 、NIS	难治恶性实体肿瘤
ANO5	肢带型肌营养不良	IFN β 、NIS	结直肠癌
AP4M1	50 型常染色体隐性遗传性痉挛性截瘫	IFN β 、NIS	急性髓性白血病
APN	B 细胞淋巴瘤	IFN β 、NIS	肝癌
APN、DPP-4	器官移植排斥	IFN β 、NIS	恶性实体肿瘤
APOA1	高胆固醇血症	IFN β 、NIS	多发性骨髓瘤
APOB	杂合子家族性高胆固醇血症	IFN β 、NIS	T 细胞淋巴瘤
APOB	新生儿疾病	IFN β 、TLR9	炎症
APOB	先天性畸形	IFN γ	去势抵抗性前列腺癌
APOB	冠状动脉疾病	IFN γ 、TERT	肿瘤
APOB	冠心病	IgE	免疫系统疾病
APOB	高低密度脂蛋白胆固醇血症	IgE	过敏反应
APOB	高胆固醇血症	IgE receptors	哮喘
APOB	纯合子家族性高胆固醇血症	IGF-1	肿瘤
APOB	II 型高脂蛋白血症	IGF-1	阿尔茨海默病
APOB	II a 型高脂蛋白血症	IGF-1	1 型糖尿病
APOC3	脂肪酶缺乏症合并	IGF-1R	银屑病
APOC3	血脂障碍	IGF-1R	纤维化
APOC3	血友病 B	IGF-1R	头颈部肿瘤
APOC3	家族性乳糜微粒血症综合征	IGF-1R	青光眼
APOC3	高脂血症	IGF-1R	前列腺癌
APOC3	高甘油三酯血症	IGF-1R	卵巢癌
APOC3	非酒精性脂肪性肝炎	IGF-1R	胶质母细胞瘤
APOC3	动脉粥样硬化	IGF-1R	肌萎缩侧索硬化

APOC3	I 型高脂蛋白血症	IGF-1R	格雷夫斯眼病
APOC3、 PCSK9	血脂障碍	IGF-1R	肝细胞癌
APOC3、 PCSK9	代谢性疾病	IGF-1R	Laron 综合征
APOC3、 TMPRSS6	血色素沉着症	IGFBP2、 IGFBP5	乳腺癌
APOC3、 TMPRSS6	高甘油三酯血症	IGHMBP2	腓骨肌萎缩症 2S 型
ApoE2	阿尔茨海默病	IKK γ 、NF- κ B	肿瘤
APP	唐氏综合征	IL-10R	自身免疫性肝炎
APP	脑淀粉样血管病	IL-10R	炎症
APP	阿尔茨海默病	IL-10R	实体瘤
APRIL	浆细胞骨髓瘤难治	IL-10R	肌萎缩侧索硬化
APRIL	复发性多发性骨髓瘤	IL-10R	肌肉骨骼疼痛
AQP1	腮腺疾病	IL-10R	关节痛
AQP1	口干症	IL-10R	多发性硬化症
AR	雄激素脱发	IL-10R	背痛
AR	去势抵抗性前列腺癌	IL-12	转移性黑色素瘤
AR	前列腺癌	IL-12	肿瘤
AR	前列腺癌	IL-12	胰腺癌
AR	骨癌	IL-12	药物不良反应
AR、mTOR	前列腺增生症	IL-12	新型冠状病毒感染
AR、mTOR	前列腺癌	IL-12	头颈部肿瘤
AR、PRLR、 aromatase	肿瘤	IL-12	头颈部肿瘤
ARHGAP45	原发性骨髓纤维化	IL-12	三阴性乳腺癌
ARHGAP45	血液肿瘤	IL-12	乳腺癌
ARHGAP45	实体瘤	IL-12	前列腺癌
ARHGAP45	慢性粒细胞性白血病	IL-12	皮肤肿瘤
ARHGAP45	淋巴瘤	IL-12	皮肤 T 细胞淋巴瘤
ARHGAP45	急性髓性白血病	IL-12	弥漫内生性脑桥神经胶质瘤
ARHGAP45	急性淋巴细胞白血病	IL-12	梅克尔细胞癌
ARHGAP45	骨髓增生异常综合征	IL-12	卵巢癌
ARHGAP45	骨髓纤维化	IL-12	鳞状细胞癌
ARHGAP45	多发性骨髓瘤	IL-12	局部晚期黑色素瘤
ASA	异染性脑白质病变	IL-12	胶质母细胞瘤
ASC2	炎症	IL-12	急性髓性白血病

ASGR1、L-lactate dehydrogenase	终末期肾脏病	IL-12	黑色素瘤
ASGR1、L-lactate dehydrogenase	原发性高草酸尿症 2 型	IL-12	肺癌
ASGR1、L-lactate dehydrogenase	原发性高草酸尿症 1 型	IL-12	HPV 相关癌症
ASGR1、L-lactate dehydrogenase	原发性高草酸尿症	IL-12、IL-15	晚期恶性实体瘤
ASN	转移性胰腺导管腺癌	IL-12、IL-15、PDL1	实体瘤
ASN	晚期胰腺导管腺癌	IL-12、IL-2	黑色素瘤
ASS	瓜氨酸血症	IL-12、MUC16	卵巢癌
ASXL1、RUNX1、p53	急性髓性白血病	IL-12、PD-1	胶质母细胞瘤
AT III	血友病 B	IL-12、PD-1	胶质瘤
AT III	血友病 A	IL-12、PD-1	复发性胶质母细胞瘤
AT III	静脉血栓栓塞	IL-12、PD-1	多形性胶质母细胞瘤
AT III	动脉粥样硬化	IL-12、thymidine kinase	星形细胞瘤
AT III	出血	IL-12、thymidine kinase	复发性前列腺癌
ATM	共济失调毛细血管扩张	IL-12R	转移性乳腺癌
ATOH1	听力损失	IL-12R	转移性结直肠癌
ATP7A	Menkes 综合征	IL-12R	原发性腹膜癌
ATP7B	肝豆状核变性	IL-12R	小儿小脑星形细胞瘤
ATXN1	脊髓小脑性共济失调	IL-12R	晚期恶性实体瘤
ATXN2	肌萎缩侧索硬化	IL-12R	头颈部肿瘤
ATXN3	马查多-约瑟夫病	IL-12R	输卵管癌
ATXN7	共济失调	IL-12R	神经胶质肉瘤
autotaxin	特发性肺纤维化	IL-12R	黏脂贮积症II型
AXL	肉瘤	IL-12R	弥漫内生性脑桥神经胶质瘤
AXL	卵巢癌	IL-12R	卵巢上皮癌

AXL	骨肉瘤	IL-12R	卵巢癌
B2M、HLA-B	头颈部肿瘤	IL-12R	局部晚期乳腺癌
B2M、HLA-B	肾肿瘤	IL-12R	结直肠癌肝转移
B2M、HLA-B	乳腺癌	IL-12R	结直肠癌
B2M、HLA-B	淋巴瘤	IL-12R	胶质母细胞瘤
B2M、HLA-B	结直肠癌	IL-12R	胶质瘤
B2M、HLA-B	黑色素瘤	IL-12R	黑色素瘤
B4GALT1	心血管疾病	IL-12R	腹膜继发性恶性肿瘤
B7-H4	实体瘤	IL-12R	腹膜癌
BAFF	自身免疫性疾病	IL-12R	复发性乳腺癌
BAFF	系统性红斑狼疮	IL-12R	复发性胶质母细胞瘤
BAFF	难治性非霍奇金淋巴瘤	IL-12R	复发性恶性胶质瘤
BAFF	浆细胞骨髓瘤难治	IL-12R	多形性胶质母细胞瘤
BAFF	干燥综合征	IL-12R	代谢性骨病
BAFF	复发性非霍奇金淋巴瘤	IL-12R	不可切除的黑色素瘤
BAFF	复发性多发性骨髓瘤	IL-12R	WHO III 级混合胶质瘤
BAFF	B 细胞淋巴瘤	IL-12R、decorin	胃肠道肿瘤
BAFF	B 细胞恶性肿瘤	IL-12R、decorin	骨髓增生性疾病
BAFF、CD19	自身免疫性疾病	IL-12R、decorin	多发性骨髓瘤
BAFF-R	难治性转化慢性淋巴细胞白血病	IL-12R、IL15R	实体瘤
BAFF-R	难治性小淋巴细胞淋巴瘤	IL-12R、IL15R	肾细胞癌
BAFF-R	难治性套细胞淋巴瘤	IL-12R、IL15R	乳腺癌
BAFF-R	难治性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	IL-12R、IL15R	卵巢癌
BAFF-R	难治性慢性淋巴细胞白血病	IL-12R、IL-15R α	血液肿瘤
BAFF-R	难治性滤泡性淋巴瘤	IL-12R、IL-15R α	实体瘤
BAFF-R	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	转移性胃腺癌
BAFF-R	复发性转化慢性淋巴细胞白血病	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	转移性胃食管腺癌

BAFF-R	复发性套细胞淋巴瘤	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	转移性胃食管结合部腺癌
BAFF-R	复发性慢性淋巴细胞白血病	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	晚期胰腺腺癌
BAFF-R	复发性滤泡性淋巴瘤	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	晚期肝细胞癌
BAFF-R	复发性边缘区淋巴瘤	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	晚期恶性实体瘤
BAFF-R	边缘区淋巴瘤难治	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	骨肉瘤
BAFF-R	B 细胞恶性肿瘤	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	肝细胞癌
BAG3	扩张型心肌病	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	肝内胆管癌
BCL11A	镰状细胞血症	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	肝癌
BCL11A	β 地中海贫血	IL-12R、IL-15R α 、PDL1	胆管上皮癌
BCL11A、Hemoglobins	镰状细胞血症	IL-12R、IL-7R α	转移性实体瘤
BCL11A、 β -globin	输血依赖性 β 地中海贫血	IL-12R、IL-7R α	晚期癌症
BCL11A、 β -globin	镰状细胞血症	IL-12R、NY-ESO-1	肿瘤
BCL11A、 β -globin	β 地中海贫血	IL-12R、PD-1	子宫内膜癌
Bcl-2	转移性肾细胞癌	IL-12R、PD-1	转移性结直肠癌
Bcl-2	转移性乳腺癌	IL-12R、PD-1	晚期恶性实体瘤
Bcl-2	眼内淋巴瘤	IL-12R、PD-1	头颈部鳞状细胞癌
Bcl-2	小细胞肺癌复发	IL-12R、PD-1	食管癌
Bcl-2	小淋巴细胞淋巴瘤	IL-12R、PD-1	乳腺癌
Bcl-2	小肠癌	IL-12R、PD-1	肉瘤

Bcl-2	胃肠道间质瘤	IL-12R、PD-1	皮肤肿瘤
Bcl-2	晚期恶性实体瘤	IL-12R、PD-1	卵巢癌
Bcl-2	外周 T 细胞淋巴瘤	IL-12R、PD-1	淋巴瘤
Bcl-2	套细胞淋巴瘤	IL-12R、PD-1	结直肠癌肝转移
Bcl-2	乳腺癌	IL-12R、PD-1	结直肠癌
Bcl-2	前列腺癌	IL-12R、PD-1	黑色素瘤
Bcl-2	皮肤 T 细胞淋巴瘤	IL-12R、PD-1	肝癌
Bcl-2	难治性急性髓细胞白血病	IL-12R、PD-1	非小细胞肺癌
Bcl-2	难治性非霍奇金淋巴瘤	IL-12R、PD-1	恶性胸膜间皮瘤
Bcl-2	男性乳腺肿瘤	IL-12R、PD-1	膀胱癌
Bcl-2	免疫母细胞大细胞淋巴瘤	IL-12R、RIG-I	非肌层浸润性膀胱肿瘤
Bcl-2	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	IL-12R、STEAP1	前列腺癌
Bcl-2	梅克尔细胞癌	IL-13R、IL-4R α	哮喘
Bcl-2	慢性淋巴细胞白血病	IL-13R、IL-4R α	过敏性哮喘
Bcl-2	滤泡性淋巴瘤	IL-13R、IL-4R α	鼻炎
Bcl-2	淋巴细胞白血病	IL-13R α 2	脑转移瘤
Bcl-2	淋巴瘤母细胞淋巴瘤	IL-13R α 2	胶质母细胞瘤
Bcl-2	里氏综合症	IL-13R α 2	胶质瘤
Bcl-2	巨球蛋白血症	IL-13R α 2	黑色素瘤
Bcl-2	局部晚期乳腺癌	IL-13R α 2	高级别星形细胞瘤
Bcl-2	胶质母细胞瘤	IL-13R α 2	复发性胶质母细胞瘤
Bcl-2	浆细胞瘤	IL-13R α 2	复发性恶性胶质瘤
Bcl-2	急性髓性白血病	IL-13R α 2	多形性胶质母细胞瘤
Bcl-2	急性淋巴细胞白血病	IL-15	转移性黑色素瘤

Bcl-2	霍奇金淋巴瘤	IL-15	转移性非小细胞肺癌
Bcl-2	华氏巨球蛋白血症难治	IL-15	肿瘤
Bcl-2	黑色素瘤	IL-15	胃癌
Bcl-2	广泛期小细胞肺癌	IL-15	实体瘤
Bcl-2	睾丸疾病	IL-15	淋巴瘤
Bcl-2	肝癌	IL-15	结直肠癌
Bcl-2	复发性套细胞淋巴瘤	IL-15	继发性肺恶性肿瘤
Bcl-2	复发性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	IL-15	黑色素瘤
Bcl-2	复发性急性髓细胞白血病	IL-15	非小细胞肺癌
Bcl-2	复发性霍奇金淋巴瘤	IL-15、IL-2	肿瘤
Bcl-2	复发性非霍奇金淋巴瘤	IL-15、PDL1	非小细胞肺癌
Bcl-2	复发性成人 III 级淋巴肉芽肿	IL-15、PSCA	胰腺腺泡癌
Bcl-2	复发性边缘区淋巴瘤	IL-15、PSCA	胃癌
Bcl-2	复发性 B 细胞淋巴瘤	IL-15、PSCA	前列腺癌
Bcl-2	复发性 3a 级滤泡性淋巴瘤	IL-15、PSCA	膀胱癌
Bcl-2	肺癌	IL15R、MUC16	输卵管癌
Bcl-2	非小细胞肺癌	IL15R、MUC16	难治性卵巢癌
Bcl-2	非霍奇金淋巴瘤	IL15R、MUC16	卵巢癌
Bcl-2	多发性骨髓瘤	IL15R、MUC16	腹膜癌
Bcl-2	成人 T 细胞白血病/淋巴瘤	IL15R、MUC16	复发性原发性腹膜癌
Bcl-2	伯基特淋巴瘤	IL15R、MUC16	复发性卵巢癌
Bcl-2	边缘区 B 细胞淋巴瘤	IL15R、MUC16	复发性铂耐药性原发性腹膜癌
Bcl-2	3 型乳腺癌	IL15R、MUC16	铂耐药性输卵管癌
Bcl-2	1 型糖尿病	IL15R、MUC16	铂耐药性卵巢癌
Bcl-2、c-Myc	卵巢癌	IL15R、PD-1	肺癌

Bcl-2、c-Myc	肺癌	IL15R、PD-1	非小细胞癌
Bcl-xl	肿瘤	IL-15R α 、NKG2D	转移性结直肠癌
Bcl-xl	结直肠癌	IL-15R α 、NKG2D	骨肉瘤
Bcl-xl、Mcl-1	头颈部肿瘤	IL-15R α 、NKG2D	肝细胞癌
Bcl-xl、Mcl-1	膀胱癌	IL-15R α 、NKG2D	肝内胆管癌
BCMA	自身免疫性疾病	IL-17RA	银屑病
BCMA	重症肌无力	IL-17RA	先天性鳞癣样红皮病
BCMA	终末期肾脏病	IL-17RA	脱发
BCMA	阴燃多发性骨髓瘤	IL-18	血液肿瘤
BCMA	系统性红斑狼疮	IL-18	实体瘤
BCMA	外周 T 细胞淋巴瘤	IL-18	肾细胞癌
BCMA	水通道蛋白 4 抗体阳性视神经脊髓炎谱系疾病	IL-18	神经痛
BCMA	视神经脊髓炎	IL-1R、MMPs	肝硬化
BCMA	前体 T 淋巴细胞白血病淋巴瘤	IL1R1	痛风
BCMA	免疫母细胞性淋巴结病	IL1R1	关节炎
BCMA	慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病	IL-1RA	膝关节炎
BCMA	结外 NK-T 细胞淋巴瘤	IL-1RA、PRG4	骨关节炎
BCMA	浆细胞骨髓瘤难治	IL-1 α	骨关节炎
BCMA	浆细胞白血病	IL-2	原发性腹膜腺癌
BCMA	间变性大细胞淋巴瘤	IL-2	原发性腹膜癌
BCMA	坏死性肌病	IL-2	腺癌
BCMA	多发性骨髓瘤	IL-2	头颈部肿瘤
BCMA	肠病相关的 T 细胞淋巴瘤	IL-2	输卵管癌
BCMA	CD7 阳性血液肿瘤	IL-2	肾细胞癌
BCMA、CD138、CD19、CD38	多发性骨髓瘤	IL-2	神经母细胞瘤
BCMA、CD16a、IL-15R α	浆细胞骨髓瘤难治	IL-2	乳腺癌

BCMA、 CD16a、IL- 15R α	复发性多发性骨髓瘤	IL-2	前列腺癌
BCMA、 CD16a、 NKp46	免疫球蛋白轻链淀粉样变性	IL-2	皮肤肿瘤
BCMA、 CD16a、 NKp46	浆细胞骨髓瘤难治	IL-2	卵巢腺癌
BCMA、 CD16a、 NKp46	骨髓增生异常综合征	IL-2	卵巢浆液性腺癌
BCMA、 CD16a、 NKp46	复发性多发性骨髓瘤	IL-2	结肠癌
BCMA、CD19	自身免疫性溶血性贫血	IL-2	浆液性囊腺癌
BCMA、CD19	血管炎	IL-2	间皮瘤
BCMA、CD19	系统性红斑狼疮	IL-2	黑色素瘤
BCMA、CD19	前体 B 细胞成淋巴细胞白血病 淋巴瘤	IL-2	黑色素瘤
BCMA、CD19	前体 B 细胞成淋巴细胞白血病 淋巴瘤	IL-2	肝细胞癌
BCMA、CD19	干燥综合征	IL-2	肺癌
BCMA、CD19	非霍奇金淋巴瘤	IL-2、TNF	肾细胞癌
BCMA、CD19	多发性骨髓瘤	IL-2、TNF	结肠癌
BCMA、CD19	多发性骨髓瘤	IL-2、TNF	黑色素瘤
BCMA、CD19	淀粉样变性	IL-2、TNF- α	转移性黑色素瘤
BCMA、CD19	T 细胞急性淋巴细胞白血病复 发	IL-2、TNF- α	头颈部鳞状细胞癌
BCMA、CD19	POEMS 综合征	IL-2、TNF- α	实体瘤
BCMA、CD19	Crouzon 综合征伴黑棘皮症	IL-2、TNF- α	卵巢癌
BCMA、CD19	B 细胞淋巴瘤	IL-2、TNF- α	黑色素瘤
BCMA、 CD19、 HER2、Trop-2	肿瘤	IL-2、TNF- α	非小细胞肺癌
BCMA、CD20	自身免疫性疾病	IL-21	胰腺癌
BCMA、CD3	肿瘤	IL-21	肺动脉高压
BCMA、CD38	肿瘤	IL-21R	痘病毒科感染
BCMA、CD4	肿瘤	IL-23	肿瘤

BCMA、CD5	肿瘤	IL-24	胰腺癌
BCMA、CD7	多发性骨髓瘤	IL-24	头颈部肿瘤
BCMA、CD70	肾细胞癌	IL-24	乳腺癌
BCMA、CD70	浆细胞骨髓瘤难治	IL-24	黑色素瘤
BCMA、CD70	多发性骨髓瘤	IL-24	肝细胞癌
BCMA、CD8	肿瘤	IL-24	肺癌
BCMA、GPRC5D	多发性骨髓瘤	IL-24、THBS1	白血病
BCMA、GPRC5D、NKG2D	髓系白血病	IL-24、TRAIL	肝细胞癌
BCMA、HPK1	骨髓增生性疾病	IL-27	肿瘤
BCMA、SLAMF7	多发性骨髓瘤	IL-2R	转移性黑色素瘤
BCMA、TACI	浆细胞骨髓瘤难治	IL-2R	胃肠道肿瘤
BCMA、TACI	复发性多发性骨髓瘤	IL-2R	肾肿瘤
BCMA、TGF-β	难治性 B 型急性淋巴细胞白血病	IL-2R	肾肿瘤
BCMA、TGF-β	多发性骨髓瘤	IL-2R	肾细胞癌
BCMA、TGF-β	T 细胞急性淋巴细胞白血病复发	IL-2R	前列腺癌
BCMA、VISTA	多发性骨髓瘤	IL-2R	间皮瘤
BDNF	青光眼	IL-2R	黑色素瘤
BDNF	阿尔茨海默病	IL-2R	复发性前列腺癌
beclin-1	多发性骨髓瘤	IL-2R	肺癌
BEST1	卵黄状黄斑营养不良	IL-2R、LMP2	癌症
BET、RPE65	双等位基因 RPE65 突变相关的视网膜变性疾病	IL2RA	肿瘤
bFGF	围手术期缺血	IL2RA	血液肿瘤
bFGF	软骨发育不全	IL-2Rγ	免疫缺陷综合征
BMP4	胶质母细胞瘤	IL-2Rγ	X 连锁联合免疫缺陷疾病
BMP6	干燥综合征	IL-3	CD123 阳性急性髓性白血病
BMPR2、VEGF	骨折	IL-33R	哮喘
BRAF	肿瘤	IL-4Ra	哮喘
BRCA1	卵巢癌	IL-6R	炎症

BRD4	实体瘤	IL-6R	关节炎
BSG	肝癌	IL-6RA	类风湿关节炎
BSG	复发性胶质母细胞瘤	IL-7	肿瘤
BSG	复发性恶性胶质瘤	IL-7	黑色素瘤
BSG、IL-24	肝细胞癌	IL-7R α	头颈部肿瘤
BTK	Bruton 型无丙种球蛋白血症	IL-7R α	宫颈癌
BTN3A1	急性髓性白血病	IL-8	病理性新生血管
BTN3A1	骨髓增生异常综合征	influenza virus M1	流感病毒感染
BTN3A1	多发性骨髓瘤	influenza virus M1	甲型流感病毒感染
C1-INH	遗传性血管性水肿	ING4	复发性急性髓细胞白血病
C1-INH	肝病	INHBE	腹部肥胖
C3	阵发性睡眠性血红蛋白尿症	INSR	糖尿病性黄斑水肿
C3	神经系统变性病	INSR	糖尿病
C3	免疫系统疾病	INSR	湿性年龄相关性黄斑变性
C3	免疫球蛋白 a 肾病	INSR	缺血型视网膜中央静脉阻塞
C3	肝病	INSR	脉络膜新生血管
C3	补体紊乱	INSR	角膜移植排斥反应
C3	C3 肾小球病	INSR	黄斑变性
C3、C5	地图样萎缩	INSR	膀胱癌
C5	重症肌无力	INSR	1 型糖尿病
C5	阵发性睡眠性血红蛋白尿症	insulin	1 型糖尿病
C5	斯塔加特病	Integrin	肿瘤
C5	年龄相关性黄斑变性	Integrin	前列腺腺癌
C5	免疫系统疾病	Integrin	局限性前列腺癌
C5	免疫球蛋白 a 肾病	Ion channels	特发性肺纤维化
C5	黄斑变性	Ion channels	三叉神经痛
C5	地图样萎缩	Ion channels	癫痫部分性发作
C5、CSAR1	脓毒症	IRAK1	肝细胞癌
C5、CFB	遗传病	IRAK1	创伤和损伤
C5a	社区获得性肺炎	IRF4	浆细胞骨髓瘤难治
C5a	肺癌	IRF4	复发性多发性骨髓瘤
C9orf72	皮克病性痴呆	IRF5	类风湿关节炎
C9orf72	肌萎缩侧索硬化	ISG15	丙型肝炎
C9orf72	额颞痴呆	ITGB7	多发性骨髓瘤
CA4	高眼压症	JAK1	自身免疫性疾病
CA8	膝关节炎	JAK1	炎症
CA8	红斑性肢痛症	KHK	肥胖

CADM1	肝细胞癌	KHK	2 型糖尿病
CADM1	非小细胞肺癌	Kir7.1	莱伯先天性黑蒙
CAG repeat expansion	马查多-约瑟夫病	KKLC1	胰腺腺泡癌
CAG repeat expansion	脊髓小脑性共济失调	KKLC1	胃癌
CAG repeat expansion	霍奇金淋巴瘤	KKLC1	乳腺癌
CAG repeat expansion	亨廷顿舞蹈病	KKLC1	宫颈癌
CAIX	晚期肾细胞癌	KKLC1	肝癌
CAIX	实体瘤	KKLC1	肺癌
CAIX、PDL1	肿瘤	KKLC1	非小细胞肺癌
CAIX、PSMA	肾细胞癌	KLB	阿尔茨海默病
CAIX、PSMA	肾透明细胞肉瘤	KLK2	转移性去势抵抗性前列腺癌
CaN	肝移植排斥反应	KLK3	前列腺癌
CAPN2	肌萎缩侧索硬化	KLK5	Netherton 综合征
CAPN3	肢带型肌营养不良	KLKB1	遗传性血管性水肿
CAPN3	2A 型肢带型肌营养不良症	KMA	多发性骨髓瘤
caspase 2	视神经损伤	KRAS	肿瘤
caspase 2	缺血性视神经病变	KRAS	胰腺癌
caspase 2	青光眼	KRAS	免疫系统疾病
caspase 2	闭角型青光眼	KRAS	结直肠癌
CASQ2	室性心动过速	KRAS	肌肉疾患
CAV1	肌萎缩侧索硬化	KRAS	肺癌
caveolin	湿性年龄相关性黄斑变性	KRAS	非小细胞肺癌
Cbl-b	子宫内膜癌	KRAS	KRAS 突变肿瘤
Cbl-b	胰腺癌	KRAS G12A	肺癌
Cbl-b	晚期癌症	KRAS G12C	肿瘤
Cbl-b	肾细胞癌	KRAS G12C	肺癌
Cbl-b	胶质母细胞瘤	KRAS G12C	非小细胞肺癌
Cbl-b	宫颈癌	KRAS G12C、KRAS G12D	胰腺导管腺癌
Cbl-b	复发性黑色素瘤	KRAS G12C、KRAS G12D	结直肠癌
Cbl-b	铂耐药性卵巢癌	KRAS G12C、	肿瘤

		KRAS G12D、 KRAS G12V	
Cbl-b	IIB 期黑色素瘤	KRAS G12C、 KRAS G12D、 KRAS G12V	胰腺癌
cccDNA	乙型肝炎	KRAS G12C、 KRAS G12D、 KRAS G12V	结肠癌
CCL19、 CD19、IL-7R α	大 B 细胞淋巴瘤	KRAS G12C、 KRAS G12D、 KRAS G12V	肺癌
CCL19、IL- 7、MAGEA4	实体瘤	KRAS G12C、 KRAS G12D、 PI3K α 、p53 R175H	肿瘤
CCL2	糖尿病肾病	KRAS G12D	子宫内膜癌
CCL21	肺癌	KRAS G12D	转移性胰腺导管腺癌
CCL4、 CTLA4、 FIt3L、IL- 12、PD-1	晚期恶性实体瘤	KRAS G12D	直肠癌
CCL4、 CTLA4、 FIt3L、IL- 12、PD-1	头颈部鳞状细胞癌	KRAS G12D	胰腺腺泡癌
CCL4、 CTLA4、 FIt3L、IL- 12、PD-1	三阴性乳腺癌	KRAS G12D	胰腺导管腺癌

CCL4、 CTLA4、 Flt3L、IL- 12、PD-1	结直肠癌	KRAS G12D	胰腺癌
CCL4、 CTLA4、 Flt3L、IL- 12、PD-1	黑色素瘤	KRAS G12D	胃癌
CCL4、 CTLA4、 Flt3L、IL- 12、PD-1	肝转移	KRAS G12D	实体瘤
CCL4、 CTLA4、 Flt3L、IL- 12、PD-1	肝癌	KRAS G12D	局部晚期胰腺腺癌
CCL4、 CXCL10、IL- 12	肿瘤	KRAS G12D	结直肠癌
CCL5	肝细胞癌	KRAS G12D	结肠癌
CCL5、 CD19、IL- 12、PD-1、 Trop-2	实体瘤	KRAS G12D	肺癌
CCNB1、WT1	乳腺癌	KRAS G12D	非小细胞肺癌
CCND1、 ITGB7、 MAdCAM-1、 $\alpha 4 \beta 7$	炎症性肠病	KRAS G12D、 KRAS G12V	实体瘤
CCND1、Raf kinase	肿瘤	KRAS G12V	转移性胰腺腺癌
CCR1、EGFR	胶质母细胞瘤	KRAS G12V	转移性非小细胞肺癌
CCR2、IL-2、 leptin	实体瘤	KRAS G12V	肿瘤
CCR3、IL- 3R、IL-3R β	哮喘	KRAS G12V	胰腺导管腺癌
CCR3、IL- 3R、IL-3R β	过敏性哮喘	KRAS G12V	胰腺癌
CCR5	乳腺癌	KRAS G12V	实体瘤

CCR5	淋巴瘤	KRAS G12V	结直肠癌
CCR5	HIV 感染	KRAS G12V	肺癌
CCR5、CD4	HIV 感染	KRAS G12V	非小细胞肺癌
CCR5、TRIM5	全血细胞减少	KRAS G12V	大肠腺癌
CCR5、TRIM5	X 连锁联合免疫缺陷疾病	KRAS G12V	肠肿瘤
CD103、CD39、CD8	肿瘤	KRAS G13D	胰腺癌
CD123	急性髓性白血病	KRAS、c-Myc	肺癌
CD123	急性淋巴细胞白血病	KRT6A	先天性甲肥厚
CD123	骨髓增生异常综合征	Ku70/80、MRN、PARP1	转移性实体瘤
CD123	Blastic 浆细胞样树突状细胞肿瘤	Ku70/80、MRN、PARP1	乳腺癌
CD123、CD33	肿瘤	Ku70/80、MRN、PARP1	前列腺癌
CD123、CD33、CD38、CD56、CLL-1、MUC1	肿瘤	Ku70/80、MRN、PARP1	复发性卵巢癌
CD123、CD33、CLL-1	肿瘤	Kv7.2	癫痫
CD123、TIM3	急性髓性白血病	L1CAM	神经内分泌前列腺癌
CD133	视网膜疾患	L1CAM	神经母细胞瘤
CD133	胶质母细胞瘤	L1CAM	白血病
CD133、EGFR	胶质母细胞瘤	L1CAM	CD22 阳性急性淋巴细胞白血病
CD138	肿瘤	L1CAM	CD19 表达恶性肿瘤
CD138、NY-ESO-1、SLAMF7、WT1	多发性骨髓瘤	LAG3	肿瘤

CD16a	胰腺癌	LAGE-1a、 NY-ESO-1	实体瘤
CD16a	新型冠状病毒感染	LAMA1	肌营养不良
CD16a	晚期恶性实体瘤	LAMP-1、 TERT	急性髓性白血病
CD16a	输卵管癌	LAMP-2	糖原贮积病 IIb 型
CD16a	乳腺癌	LAMP-2	憩室疾病
CD16a	缺氧	LAMP-2	亨廷顿舞蹈病
CD16a	卵巢上皮癌	LCA5	视网膜变性
CD16a	结直肠癌	LCA5	莱伯先天性黑蒙症 5 型
CD16a	急性髓性白血病	LCN2	胰腺癌
CD16a	肝癌	LDLR	高胆固醇血症
CD16a	腹膜癌	LECT2	淀粉样变性
CD16a	肺癌	LEKTI	Netherton 综合征
CD16a	多形性胶质母细胞瘤	lepB	铜绿假单胞菌感染
CD16a	B 细胞淋巴瘤	Lewis-Y antigen	晚期癌症
CD16a、 CD19、IL- 15R α	套细胞淋巴瘤	Lewis-Y antigen	急性髓性白血病
CD16a、 CD19、IL- 15R α	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	LGR5	转移性结直肠癌
CD16a、 CD19、IL- 15R α	慢性淋巴细胞白血病	LGR5	血液肿瘤
CD16a、 CD19、IL- 15R α	滤泡性淋巴瘤	LGR5	卵巢癌
CD16a、 CD19、IL- 15R α	髓性非霍奇金淋巴瘤	LGR5	结直肠癌
CD16a、 CD19、IL- 15R α	边缘区 B 细胞淋巴瘤	L-HBsAg	乙型肝炎
CD16a、 CD19、IL- 15R α	B 细胞淋巴瘤	L-HBsAg	纤维化

CD16a、 CD276、IL-7	实体瘤	L-HBsAg	慢性乙型肝炎
CD16a、HER2	HER2 阳性乳腺癌	L-HBsAg	慢性丁型肝炎
CD16a、IL-15	晚期恶性实体瘤	LIGHT	胶质母细胞瘤
CD16a、IL-15	浆细胞骨髓瘤难治	LILRB4	难治性急性髓细胞白血病
CD16a、IL-15	急性髓性白血病	LILRB4	慢性粒单核细胞白血病
CD16a、IL-15	复发性多发性骨髓瘤	LILRB4	急性髓性白血病
CD16a、IL-15	多发性骨髓瘤	LILRB4	急性髓单核细胞白血病
CD16a、IL- 15、MICA、 MICB	胰腺癌	LILRB4	急性单核细胞白血病
CD16a、IL- 15、MICA、 MICB	胃食管交界处癌	LILRB4	复发性急性髓细胞白血病
CD16a、IL- 15、MICA、 MICB	晚期恶性实体瘤	LILRB4	多发性骨髓瘤
CD16a、IL- 15、MICA、 MICB	头颈部肿瘤	LIN28B	胰腺癌
CD16a、IL- 15、MICA、 MICB	乳腺癌	LIPG	冠心病
CD16a、IL- 15、MICA、 MICB	卵巢癌	lipoprotein(a)	主动脉瓣狭窄
CD16a、IL- 15、MICA、 MICB	结直肠癌	lipoprotein(a)	心血管疾病
CD16a、IL- 15、MICA、 MICB	非小细胞肺癌	lipoprotein(a)	神经系统变性病
CD18	白细胞粘附缺陷病 1 型	lipoprotein(a)	高脂蛋白血症
CD19	自身免疫性疾病	lipoprotein(a)	肝病
CD19	重症肌无力	lipoprotein(a)	动脉粥样硬化
CD19	终末期肾脏病	lipoprotein(a)	低 β 脂蛋白血症
CD19	原发性进行性多发性硬化	LIV-1	乳腺癌
CD19	移植抗宿主病	LMNA	早衰
CD19	胰腺癌	LMNA	心肌疾病

CD19	炎症	LMNA	扩张型心肌病
CD19	小淋巴细胞淋巴瘤	LMP1	血液肿瘤
CD19	显微镜下多血管炎	LMP1	鼻咽癌
CD19	系统性硬皮病	LMP1、 LMP2	平滑肌肉瘤
CD19	系统性红斑狼疮	LMP1、 LMP2	霍奇金淋巴瘤
CD19	胃癌	LMP1、 LMP2	非霍奇金淋巴瘤
CD19	特发性炎症性肌病	LMP1、 LMP2	鼻咽癌
CD19	套细胞淋巴瘤	LMP1、 MAVS	接种疫苗
CD19	肉芽肿伴多血管炎	LMP1、 MAVS	HIV 感染
CD19	前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病	LMP2	头颈癌转移
CD19	前体 B 细胞成淋巴细胞白血病淋巴瘤	LMP2	复发性鼻咽癌
CD19	皮炎炎	LPL	V 型高脂蛋白血症
CD19	难治性急性白血病	LPL	I 型高脂蛋白血症
CD19	难治性非霍奇金淋巴瘤	LptD	铜绿假单胞菌感染
CD19	难治性 B 细胞淋巴瘤	LpxC	铜绿假单胞菌感染
CD19	难治性 B 型急性淋巴细胞白血病	LRRC15	肿瘤
CD19	弥漫性硬皮病	LRRK2	帕金森病
CD19	毛细胞白血病	L-sel	炎症
CD19	慢性淋巴细胞白血病	LXR	非酒精性脂肪性肝炎
CD19	慢性粒细胞性白血病	LXR	II 型高脂蛋白血症
CD19	淋巴瘤样肉芽肿病	LY86	杜氏肌营养不良症
CD19	淋巴瘤	LZTS1、 LZTS2	肿瘤
CD19	狼疮性肾炎	MAFA、 PDX1	1 型糖尿病
CD19	抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎	MAGEA1	肿瘤
CD19	继发进展型多发性硬化	MAGEA1	头颈部肿瘤
CD19	急性淋巴细胞白血病	MAGEA1	实体瘤
CD19	黄斑变性	MAGEA1	三阴性乳腺癌

CD19	费城染色体阴性急性淋巴细胞白血病	MAGEA1	尿路上皮癌
CD19	非霍奇金淋巴瘤	MAGEA1	卵巢癌
CD19	范可尼贫血	MAGEA1	黑色素瘤
CD19	多发性硬化症	MAGEA1	黑色素瘤
CD19	残留肿瘤	MAGEA1	宫颈癌
CD19	艾滋病相关性淋巴瘤	MAGEA1	肝细胞癌
CD19	CD19 阳性 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MAGEA1	肝癌
CD19	CD19 阳性 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MAGEA1	非小细胞肺癌
CD19	B 细胞淋巴瘤	MAGEA1	HPV 相关癌症
CD19	2 型糖尿病	MAGEA1、PRAME	实体瘤
CD19、CD20	紫癜肝病	MAGEA10	头颈部肿瘤
CD19、CD20	前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MAGEA10	尿路上皮癌
CD19、CD20	慢性淋巴细胞白血病	MAGEA10	黑色素瘤
CD19、CD20	费城染色体阴性急性淋巴细胞白血病	MAGEA10	非小细胞肺癌
CD19、CD20、CD22	难治性非霍奇金淋巴瘤	MAGEA10	恶性上皮肿瘤
CD19、CD20、CD22	难治性惰性非霍奇金淋巴瘤	MAGEA12、MAGEA3	转移性黑色素瘤
CD19、CD20、CD22	慢性淋巴细胞白血病	MAGEA12、MAGEA3	肿瘤转移
CD19、CD20、CD22	急性淋巴细胞白血病	MAGEA12、MAGEA3	肾肿瘤
CD19、CD20、CD22	复发性转化慢性淋巴细胞白血病	MAGEA3	肾肿瘤
CD19、CD20、CD22	复发性慢性淋巴细胞白血病	MAGEA3	乳腺癌
CD19、CD20、CD22	复发性急性淋巴细胞白血病	MAGEA3	黑色素瘤
CD19、CD20、CD22	复发性非霍奇金淋巴瘤	MAGEA3	宫颈癌
CD19、CD20、CD22	复发性惰性非霍奇金淋巴瘤	MAGEA3	肺癌

CD19、 CD20、CD22	复发性 B 型急性淋巴细胞白血病	MAGEA3、 MAGEA6	肿瘤
CD19、 CD20、CD22	B 细胞淋巴瘤	MAGEA3、 MAGEA6	实体瘤
CD19、CD22	自身免疫性疾病	MAGEA4	子宫内膜癌
CD19、CD22	紫癜肝病	MAGEA4	脂肪肉瘤
CD19、CD22	血液肿瘤	MAGEA4	粘液样脂肪肉瘤
CD19、CD22	血液疾病	MAGEA4	胃食管交界处恶性肿瘤
CD19、CD22	前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	胃癌
CD19、CD22	前体 B 细胞成淋巴细胞白血病淋巴瘤	MAGEA4	胃癌
CD19、CD22	难治性 B 型急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	食管癌
CD19、CD22	复发性 B 型急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	实体瘤
CD19、CD22	费城染色体阴性急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	实体瘤
CD19、CD22	费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	神经纤维肉瘤
CD19、CD22	非霍奇金淋巴瘤	MAGEA4	神经母细胞瘤
CD19、CD22	残留肿瘤	MAGEA4	肉瘤
CD19、CD22	Ph 样急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	尿路上皮癌
CD19、CD22	CD22 阳性前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	卵巢癌
CD19、CD22	CD22 阳性急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	卵巢癌
CD19、CD22	CD22 阳性 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	滑膜肉瘤
CD19、CD22	CD19 阳性前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	黑色素瘤
CD19、CD22	CD19 阳性 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	骨肉瘤
CD19、CD22	B 细胞淋巴瘤	MAGEA4	复发性实体肿瘤
CD19、 CD22、CD8	慢性淋巴细胞白血病	MAGEA4	非小细胞肺癌
CD19、 CD22、CD8	急性淋巴细胞白血病	MAGEA4	膀胱癌
CD19、 CD22、CD8	非霍奇金淋巴瘤	MAGEA4、 MAGEA8	实体瘤

CD19、CD276	尤文肉瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 survivin	血液肿瘤
CD19、CD276	透明细胞肉瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 survivin	急性髓性白血病
CD19、CD276	视网膜母细胞瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 survivin	霍奇金淋巴瘤
CD19、CD276	肾母细胞瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 survivin	非霍奇金淋巴瘤
CD19、CD276	神经纤维肉瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 WT1、 survivin	胰腺癌
CD19、CD276	神经母细胞瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 WT1、 survivin	难治性淋巴瘤
CD19、CD276	肉瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 WT1、 survivin	难治性非霍奇金淋巴瘤

CD19、CD276	滑膜肉瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 WT1、 survivin	霍奇金淋巴瘤
CD19、CD276	横纹样瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 WT1、 survivin	复发性淋巴瘤
CD19、CD276	横纹肌肉瘤	MAGEA4、 NY-ESO-1、 PRAME、 SSX2、 WT1、 survivin	复发性非霍奇金淋巴瘤
CD19、CD276	黑色素瘤	MAGEC2	头颈部肿瘤
CD19、CD276	肝母细胞瘤	MAGEC2	实体瘤
CD19、CD276	复发性实体肿瘤	MAGEC2	卵巢癌
CD19、CD276	恶性上皮肿瘤	MAGEC2	黑色素瘤
CD19、CD276	促纤维增生性小圆细胞瘤	MAGEC2	肝细胞癌
CD19、CD3	重症联合型免疫缺陷	MAGEC2	非小细胞肺癌
CD19、CD3	普通可变性免疫缺陷	MALAT1	肿瘤
CD19、CD3	难治性 B 细胞淋巴瘤	MALAT1	乳腺癌
CD19、CD3	免疫缺陷综合征	MAX、c- Myc	肿瘤
CD19、CD3	孟德尔对分枝杆菌病的易感性	MBP	多发性硬化症
CD19、CD3	慢性肉芽肿病	MCM7	肿瘤
CD19、CD3	淋巴瘤	M-CSF	肿瘤
CD19、CD3	复发性 B 细胞淋巴瘤	MDA5、 RIG-I、 TLR3	粘液样 MFH
CD19、CD3	Wiskott-Aldrich 综合征	MDA5、 RIG-I、 TLR3	头颈部鳞状细胞癌

CD19、CD3	Job 综合征	MDA5、 RIG-I、 TLR3	神经纤维肉瘤
CD19、CD3	B 细胞淋巴瘤	MDA5、 RIG-I、 TLR3	乳腺癌
CD19、CD4	慢性淋巴细胞白血病	MDA5、 RIG-I、 TLR3	肉瘤
CD19、CD4	非霍奇金淋巴瘤	MDA5、 RIG-I、 TLR3	去分化脂肪肉瘤
CD19、CD7	前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MDA5、 RIG-I、 TLR3	平滑肌肉瘤
CD19、CD7	急性淋巴细胞白血病	MDA5、 RIG-I、 TLR3	滑膜肉瘤
CD19、CD7	B 细胞白血病	MDA5、 RIG-I、 TLR3	横纹肌肉瘤
CD19、CD70	难治性 B 细胞淋巴瘤	MDA5、 RIG-I、 TLR3	肝胚胎肉瘤
CD19、CD70	淋巴瘤	MDA5、 RIG-I、 TLR3	腹膜后肉瘤
CD19、CD70	急性髓性白血病	MDA5、 RIG-I、 TLR3	非小细胞肺癌
CD19、CD70	复发性 B 细胞淋巴瘤	MDA5、 RIG-I、 TLR3	恶性纤维组织细胞瘤
CD19、CD70	非霍奇金淋巴瘤	MDH1、 MDH2	非小细胞肺癌
CD19、CD70	B 细胞淋巴瘤	MECOM	卵巢癌
CD19、CD79B	非霍奇金淋巴瘤	MECOM	肺癌
CD19、CD8	前体 B 细胞成淋巴细胞白血病淋巴瘤	MECP2	卢布斯特性联遗传智力迟钝综合征

CD19、CD8	慢性淋巴细胞白血病	MECP2	脊髓性肌萎缩伴呼吸窘迫 1 型
CD19、CD8	非霍奇金淋巴瘤	MECP2	腓骨肌萎缩症 2S 型
CD19、 CLDN18.2	胃癌	MECP2	Rett 综合征
CD19、DR5	B 细胞淋巴瘤	melan-A	转移性黑色素瘤
CD19、EBV 蛋白	急性淋巴细胞白血病	melan-A	黑色素瘤
CD19、EBV 蛋白	B 细胞淋巴瘤	mclan-A	黑色素瘤
CD19、EGFR	肿瘤	MerTK	视网膜色素变性
CD19、HPK1	急性淋巴细胞白血病	MEX3B	重度哮喘
CD19、HPK1	B 细胞淋巴瘤	MFN2	腓骨肌萎缩症
CD19、IL15R	小淋巴细胞淋巴瘤	MFSD8	神经元蜡样质脂褐质沉积症
CD19、IL15R	套细胞淋巴瘤	MFSD8	溶酶体贮积病
CD19、IL15R	前体 B 细胞急性淋巴细胞白血病	MGMT	胶质母细胞瘤
CD19、IL15R	慢性淋巴细胞白血病	MICA	肝细胞癌
CD19、IL15R	狼疮性肾炎	MICA、 MICB	肿瘤
CD19、IL15R	巨球蛋白血症	MICA、 MICB、 ULBP1	实体瘤
CD19、IL15R	大 B 细胞淋巴瘤	micro- dystrophin	杜氏肌营养不良症
CD19、IL15R	B 细胞恶性肿瘤	microRNA let-7i-5p	肝细胞癌
CD19、IL-18	急性淋巴细胞白血病	MicroRNAs	阿尔茨海默病
CD19、IL-18	B 细胞淋巴瘤	Microtubule- associated proteins	心肌梗塞
CD19、 IL18R1	难治性 B 型急性淋巴细胞白血病	Microtubule- associated proteins	神经损伤
CD19、 IL18R1	慢性淋巴细胞白血病	Microtubule- associated proteins	烧伤
CD19、 IL18R1	急性淋巴细胞白血病	miHAs	造血干细胞移植

CD19、IL18R1	复发性急性淋巴细胞白血病	miHAs	血液肿瘤
CD19、IL18R1	复发难治性急性淋巴细胞白血病	miHAs	血液肿瘤
CD19、IL18R1	非霍奇金淋巴瘤	miHAs	急性髓性白血病
CD19、IL18R1	CD19 表达恶性肿瘤	miHAs	急性淋巴细胞白血病
CD19、IL-2Rβ	肿瘤	miHAs	骨髓增生异常综合征
CD19、IL-2Rβ	小淋巴细胞淋巴瘤	miHAs	白血病
CD19、IL-2Rβ	套细胞淋巴瘤	mini-dystrophin	杜氏肌营养不良症
CD19、IL-2Rβ	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	MIR103A1、miR-107	非酒精性脂肪性肝炎
CD19、IL-2Rβ	慢性淋巴细胞白血病	miR-10b	胰腺癌
CD19、IL-2Rβ	滤泡性淋巴瘤	miR-10b	小细胞肺癌
CD19、IL-2Rβ	髓性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤	miR-10b	晚期恶性实体瘤
CD19、IL-2Rβ	大 B 细胞淋巴瘤	miR-10b	乳腺癌
CD19、IL-2Rβ	CD19 表达恶性肿瘤	miR-10b	卵巢癌
CD19、MUC1	肿瘤	miR-10b	结肠癌
CD19、PD-1	实体瘤	miR-10b	胶质母细胞瘤
CD19、PD-1	难治性癌症	miR-10b	骨肉瘤
CD19、PD-1	难治性 B 细胞淋巴瘤	miR-10b、miR-21	胶质母细胞瘤
CD19、PD-1	复发性非霍奇金淋巴瘤	miR-122	丙型肝炎
CD19、PD-1	非霍奇金淋巴瘤	miR-126	慢性粒细胞性白血病
CD19、PD-1	Mesothelin 阳性肿瘤	miR-126	成人急性髓性白血病
CD19、PD-1	CD19 表达恶性肿瘤	miR-132	心脏衰竭
CD19、PD-1	Carney 复合症	miR-132	心脏肥大
CD19、PD-1	B 细胞淋巴瘤	miR-132	射血分数保留型心力衰竭
CD19、PD-1、TIGIT	纵隔大 b 细胞淋巴瘤	miR-132	扩张型心肌病
CD19、PD-1、TIGIT	滤泡性淋巴瘤	miR-132	急性心肌梗塞
CD19、PD-1、TIGIT	高级别 B 细胞淋巴瘤	MIR135A1	抑郁症
CD19、PD-1、TIGIT	大 B 细胞淋巴瘤	miR-143	结直肠癌
CD19、STING	实体瘤	miR-145	肺动脉高压

CD19、TGF-β2	非霍奇金淋巴瘤	miR-150	直肠癌
CD19、TGF-β2	CD19 阳性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	miR-150	结直肠癌
CD19、TGF-β2	CD19 阳性 B 细胞急性淋巴细胞白血病	miR-155	湿性黄斑变性
CD1A	前体 T 淋巴细胞白血病淋巴瘤	miR-155	皮肤 T 细胞淋巴瘤
CD1A	前体 T 淋巴细胞白血病淋巴瘤	miR-17	常染色体显性多囊肾病
CD1A	淋巴瘤	MIR181A2	软组织瘤
CD1A	T 细胞急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤	miR-193a-3p	晚期恶性实体瘤
CD2	塞扎里综合征	miR-193a-3p	黑色素瘤
CD20	纵隔大 b 细胞淋巴瘤	miR-193a-3p	肝癌
CD20	自身免疫性疾病	miR-195	肝癌
CD20	转移性黑色素瘤	miR-195	胆管肿瘤
CD20	血液肿瘤	miR-21	新冠肺炎后遗症
CD20	小淋巴细胞淋巴瘤	miR-21	肾炎
CD20	皮肤黑色素瘤	miR-21	三阴性乳腺癌
CD20	难治性套细胞淋巴瘤	miR-21	肺癌
CD20	难治性 B 细胞淋巴瘤	miR-21	非小细胞肺癌
CD20	慢性淋巴细胞白血病	miR-21	膀胱癌
CD20	滤泡性淋巴瘤	miR-21、miR-34a	三阴性乳腺癌
CD20	华氏巨球蛋白血症难治	miR-22	脂肪肝
CD20	黑色素瘤	miR-22	视神经疾病
CD20	复发性套细胞淋巴瘤	miR-22	肥胖
CD20	复发性慢性淋巴细胞白血病	miR-22	非酒精性脂肪性肝炎
CD20	复发性巨球蛋白血症	miR-22	代谢性疾病
CD20	复发性 B 细胞淋巴瘤	miR-22	代谢相关脂肪性肝病
CD20	边缘区 B 细胞淋巴瘤	miR-22	2 型糖尿病
CD20	CD20 阳性 B 细胞淋巴瘤	miR-23b	骨关节炎
CD20、CD22	前体 B 细胞成淋巴细胞白血病淋巴瘤	miR-29	纤维化
CD20、CD22	难治性 B 细胞淋巴瘤	miR-29	特发性肺纤维化
CD20、CD22	非霍奇金淋巴瘤	miR-328	近视
CD20、CD22、CD38	乳腺癌	miR-33a	特发性肺纤维化
CD20、CD23、TLR9	血液肿瘤	miR-34a	小细胞癌

CD20、 CD79A	非霍奇金淋巴瘤	miR-34a	肾细胞癌
CD200R	免疫系统疾病	miR-34a	淋巴瘤
CD22	自身免疫性疾病	miR-34a	黑色素瘤
CD22	毛细胞白血病	miR-34a	肝癌
CD22	急性淋巴细胞白血病	miR-34a	非小细胞肺癌
CD22	非霍奇金淋巴瘤	miR-34a	多发性骨髓瘤
CD22	B 细胞白血病	MIR449A	呼吸障碍
CD22、CD37	血液肿瘤	MIR92A1	心脏衰竭
CD22、PDL1	肉瘤	miR-96	糖尿病肾病
CD22、PDL1	宫颈癌	MIRN122 microRNA	帕金森病
CD22、PDL1	非小细胞肺癌	MIRN122 microRNA	肌萎缩侧索硬化
CD24	肿瘤	MIRN122 microRNA	胆汁淤积
CD276	组蛋白 H3 中 K27M 点突变的 弥漫性中线胶质瘤	MIRN122 microRNA	丙型肝炎
CD276	胰腺导管腺癌	MIRN122 microRNA	阿尔茨海默病
CD276	胰腺癌	Mitochondria l proteins	肉瘤
CD276	髓母细胞瘤	Mitochondria l proteins	皮肤肿瘤
CD276	室管膜瘤	Mitochondria l proteins	基底细胞癌
CD276	神经母细胞瘤	Mitochondria l proteins	黑色素瘤
CD276	脑恶性胶质瘤	MKI67	膀胱癌
CD276	难治性急性髓细胞白血病	MLC	脑白质病
CD276	弥漫内生性脑桥神经胶质瘤	MMP1	肿瘤
CD276	卵巢上皮癌	MMP1	系统性硬皮病
CD276	结直肠癌	MMP1	皮肤松弛症
CD276	结直肠癌	MMP1	面部皱纹
CD276	胶质母细胞瘤	MMP1	老化
CD276	胶质瘤	MMP1	创伤和损伤
CD276	急性髓性白血病	MMP2	前列腺癌
CD276	黑色素瘤	MMP2	结直肠癌
CD276	肝癌	MMP2	胶质母细胞瘤

CD276	复发性铂耐药性卵巢癌	MMP2	黑色素瘤
CD276	肺癌	MMP2	MMP2 阳性胶质母细胞瘤
CD276	非典型畸胎瘤	MMP-7	特发性肺纤维化
CD276	低恶性潜能的复发性卵巢肿瘤	MNK1	非小细胞肺癌
CD276	CD276 阳性实体瘤	MnSOD	结直肠癌
CD276、 FGFR4	横纹肌肉瘤	MnSOD、 TRAIL	非小细胞肺癌
CD276、HER2	肿瘤	MnSOD、转 录因子及相 关调节因子	运动神经元疾病
CD276、IL- 13Rα2	实体瘤	MnSOD、转 录因子及相 关调节因子	创伤性脑损伤
CD28、 CD80、p53	肿瘤	MnSOD、转 录因子及相 关调节因子	阿尔茨海默病
CD28、CSF- 2R、CTLA4	肿瘤	MSH3	脊髓小脑性共济失调
CD29、 EGFR、 LAMA4	转移性非小细胞肺癌	MSH3	肌强直性营养不良
CD29、 EGFR、 LAMA4	乳腺癌	MSH3	亨廷顿舞蹈病
CD29、 EGFR、 LAMA4	胶质瘤	MSLN	纵隔大 b 细胞淋巴瘤
CD3	肿瘤	MSLN	转移性非小细胞肺癌
CD3、CD7	急性淋巴细胞白血病	MSLN	肿瘤
CD3、CD80	肿瘤	MSLN	原发性腹膜癌
CD3、CD86、 PD-1	子宫内膜癌	MSLN	胰腺腺泡癌
CD3、CD86、 PD-1	支气管癌	MSLN	胰腺腺癌
CD3、CD86、 PD-1	胰腺癌	MSLN	胰腺癌
CD3、CD86、 PD-1	咽肿瘤	MSLN	腺癌

CD3、CD86、PD-1	小细胞肺癌	MSLN	胃癌
CD3、CD86、PD-1	胃肠道肿瘤	MSLN	晚期癌症
CD3、CD86、PD-1	胃癌	MSLN	输卵管癌
CD3、CD86、PD-1	晚期恶性实体瘤	MSLN	实体瘤
CD3、CD86、PD-1	晚期癌症	MSLN	三阴性乳腺癌
CD3、CD86、PD-1	头颈部肿瘤	MSLN	乳腺癌
CD3、CD86、PD-1	输卵管癌	MSLN	难治性 B 细胞淋巴瘤
CD3、CD86、PD-1	食管癌	MSLN	滤泡性淋巴瘤
CD3、CD86、PD-1	肾肿瘤	MSLN	卵巢腺癌
CD3、CD86、PD-1	软组织肉瘤	MSLN	卵巢上皮癌
CD3、CD86、PD-1	乳腺癌	MSLN	卵巢上皮癌
CD3、CD86、PD-1	肉瘤	MSLN	卵巢浆液性腺癌
CD3、CD86、PD-1	女性生殖器官肿瘤	MSLN	卵巢高级别浆液性腺癌
CD3、CD86、PD-1	脑癌	MSLN	卵巢癌
CD3、CD86、PD-1	卵巢癌	MSLN	卵巢癌
CD3、CD86、PD-1	结直肠癌	MSLN	结直肠癌
CD3、CD86、PD-1	喉肿瘤	MSLN	间皮瘤
CD3、CD86、PD-1	黑色素瘤	MSLN	间皮瘤
CD3、CD86、PD-1	骨肉瘤	MSLN	腹膜恶性间皮瘤

CD3、CD86、PD-1	骨癌	MSLN	肺癌
CD3、CD86、PD-1	宫颈癌	MSLN	非小细胞肺癌
CD3、CD86、PD-1	肝癌	MSLN	恶性胸膜间皮瘤
CD3、CD86、PD-1	腹膜癌	MSLN	胆管上皮癌
CD3、CD86、PD-1	复发性头颈癌	MSLN	胆管上皮癌
CD3、CD86、PD-1	复发性卵巢癌	MSLN	大 B 细胞淋巴瘤
CD3、CD86、PD-1	肺癌	MSLN	Mesothelin 阳性肿瘤
CD3、CD86、PD-1	非小细胞肺癌	MSLN	Mesothelin 阳性实体瘤
CD3、CD86、PD-1	耳肿瘤	MSLN、MUC16	胰腺腺泡癌
CD3、CD86、PD-1	恶性上皮肿瘤	MSLN、MUC16	卵巢上皮癌
CD3、CD86、PD-1	鼻肿瘤	MSLN、PD-1	晚期恶性实体瘤
CD3、EGFR	胰腺腺癌	MSLN、PD-1	乳腺癌
CD3、EGFR	胰腺癌	MSLN、PD-1	间皮瘤
CD3、EGFR	胶质母细胞瘤	MSLN、PD-1	间皮瘤
CD3、EGFRvIII、IL-13R α 2	胶质母细胞瘤	MSLN、PD-1	Mesothelin 阳性实体瘤
CD3、EpCAM	肿瘤	MSLN、PDL1	卵巢癌
CD3、EphA2	肿瘤	MSP-1	疟疾
CD3、FAP	肿瘤转移	MSTN	肌肉萎缩
CD3、FAP	腺上皮肿瘤	MSTN	杜氏肌营养不良症
CD3、FAP	恶性上皮肿瘤	MSTN	包涵体肌炎
CD3、gp100	葡萄膜黑色素瘤	MTM1	先天性肌病
CD3、gp100	皮肤黑色素瘤	MTM1	类风湿关节炎

CD3、gp100	残留肿瘤	MTM1	肌肉疾患
CD3、GPC3	实体瘤	MT-ND1	ND1 突变 Leber 遗传性视神经病变
CD3、GPRC5D	肿瘤	MT-ND4	ND4 突变 Leber 氏遗传性视神经萎缩
CD3、HER2	乳腺癌	mTOR	肿瘤
CD3、IL-13Rα2、PDL1	胶质母细胞瘤	mTOR	血友病 A
CD3、IL-13Rα2、PDL1	胶质瘤	mTOR	糖尿病性视网膜病变
CD3、MUC1	晚期胰腺腺癌	mTOR	视网膜疾患
CD3、MUC1	晚期胃癌	mTOR	甲基丙二酸血症
CD3、MUC1	晚期乳腺癌	MUC1	转移性实体瘤
CD3、MUC1	肾肿瘤	MUC1	转移性乳腺癌
CD3、MUC1	结直肠癌	MUC1	胰腺腺泡癌
CD3、MUC1	肝癌	MUC1	胰腺导管癌
CD3、MUC1	肺癌	MUC1	胰腺癌
CD3、PDL1	实体瘤	MUC1	胃癌
CD3、PDL1	复发性宫颈癌	MUC1	晚期胃癌
CD3、PRAME	晚期恶性实体瘤	MUC1	晚期恶性实体瘤
CD3、PRAME	皮肤黑色素瘤	MUC1	头颈部鳞状细胞癌
CD3、PRAME	黑色素瘤	MUC1	输卵管癌
CD3、SLAMF7	浆细胞骨髓瘤难治	MUC1	食管癌
CD3、SLAMF7	复发性多发性骨髓瘤	MUC1	肾细胞癌
CD30	外周 T 细胞淋巴瘤	MUC1	乳腺癌
CD30	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	MUC1	前列腺癌
CD30	间变性大细胞淋巴瘤	MUC1	脑恶性胶质瘤
CD30	间变性大细胞淋巴瘤	MUC1	卵巢上皮癌
CD30	霍奇金淋巴瘤	MUC1	卵巢癌
CD30	T 细胞淋巴瘤	MUC1	结直肠癌
CD30	CD30 阳性淋巴瘤	MUC1	胶质瘤
CD30	CD30 阳性霍奇金淋巴瘤	MUC1	肝细胞癌
CD30	CD30 阳性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	MUC1	肝内胆管癌
CD30	CD19 阳性淋巴瘤	MUC1	肺癌
CD30	CD19 表达恶性肿瘤	MUC1	非小细胞肺癌
CD30	B 细胞淋巴瘤	MUC1	非小细胞肺癌

CD30	B 细胞白血病	MUC1	多发性骨髓瘤
CD33	移植抗宿主病	MUC1	鼻咽肿瘤
CD33	急性髓性白血病	MUC1	MUC1 阳性实体瘤
CD33	阿尔茨海默病	MUC16	乳腺癌
CD33、CLL-1	血液肿瘤	MUC16	卵巢上皮癌
CD33、CLL-1	慢性粒细胞性白血病	Mucin	肿瘤
CD33、CLL-1	慢性粒单核细胞白血病	Mucin	哮喘
CD33、CLL-1	急性髓性白血病	Mucin	慢性阻塞性肺疾病
CD33、CLL-1	急性髓性白血病	MUSK	重症肌无力
CD33、CLL-1	骨髓增生异常综合征	MUT	甲基丙二酸血症
CD33、FLT3	血液肿瘤	MUT、 mTOR	间皮瘤
CD33、FLT3	难治性急性髓细胞白血病	MYB	血液肿瘤
CD33、FLT3	骨髓增生异常综合征	MYB	慢性粒细胞性白血病
CD33、FLT3	复发性急性髓细胞白血病	MYB	白血病
CD33、IL- 15Rα、 NKG2C	急性髓性白血病	MYBPC3	肥大型心肌病
CD33、 NKG2A	成人急性髓性白血病	MYO6	听力障碍
CD34	重症联合型免疫缺陷	MYO7A	Usher 综合征
CD34	肿瘤	MYO7A	1B 型 Usher 综合征
CD34	血液肿瘤	NaCT	癫痫
CD34	腺苷脱氨酶缺乏	NAGA	法布里病
CD34	髓系肿瘤	NAGLU	下尿路症状
CD34	急性白血病	NAGLU	黏多糖贮积症 III 型
CD34	骨髓增生异常综合征	Nav1.1	黏多糖贮积症 I 型
CD34	多发性骨髓瘤	Nav1.1	Rett 综合征
CD34	Wiskott-Aldrich 综合征	Nav1.1	Dravet 综合征
CD37	慢性淋巴细胞白血病	Nav1.1	CDKL5 缺乏症
CD37	T 细胞淋巴瘤	Nav1.2	遗传病
CD37	B 细胞淋巴瘤	Nav1.2	性早熟
CD38	难治性急性髓细胞白血病	Nav1.2	癫痫性脑病
CD38	肝细胞癌	Nav1.2	SCN2A 突变脑病
CD38	复发性急性髓细胞白血病	Nav1.6	发育性癫痫性脑病
CD38	多发性骨髓瘤	Nav1.6	CDKL5 缺乏症
CD38、CLL-1	癌症	Nav1.7	小纤维神经病变
CD38、DR5	多发性骨髓瘤	Nav1.7	疼痛

CD38、 GPRC5D	肿瘤	Nav1.7	神经痛
CD39、CD73	类风湿关节炎	Nav1.7	红斑性肢痛症
CD4	造血干细胞移植	Nav1.7、 Nav1.8	疼痛
CD4	移植抗宿主病	Nav1.7、 Voltage-gated sodium channels	神经痛
CD4	前体 T 淋巴细胞白血病淋巴瘤	Nav1.8	疼痛
CD4	慢性粒单核细胞白血病	Nav1.8、 TRKA	神经系统疾病
CD4	T 细胞淋巴瘤	NCALD	脊髓性肌萎缩
CD4	T 细胞白血病	NCF1	慢性肉芽肿病
CD4	HIV 感染	NCL	肿瘤
CD4、CD8	结直肠癌	NCL	肿瘤
CD4、CD8	HIV 感染	NCL	三阴性乳腺癌
CD40	自身免疫性疾病	NCL	骨髓增生异常综合征
CD40	肿瘤转移	NCOR2	肿瘤
CD40	腺上皮肿瘤	NCR2、 NKG2D	晚期恶性实体瘤
CD40	神经系统自身免疫性疾病	NCR3LG1	肿瘤
CD40	器官移植排斥	NCR3LG1	实体瘤
CD40	过敏反应	NECTIN2	肿瘤
CD40L	转移性肾细胞癌	nectin-4	肿瘤
CD40L	肿瘤	NEGF2	肿瘤
CD40L	慢性淋巴细胞白血病	NEK2	胰腺癌
CD40L	接种疫苗	NEK2	胆管上皮癌
CD40L	胶质瘤	NF-κB	特应性皮炎
CD40L	黑色素瘤	NF-κB	脓毒症
CD40L	复发性非小细胞肺癌	NF-κB	急性肾损伤
CD40L	非肌层浸润性膀胱肿瘤	NF-κB	产科分娩（早产）
CD40L	膀胱尿路上皮癌	NGF	听力损失
CD40L	膀胱癌	NGF	视网膜色素变性
CD40L	IV 期肺恶性非小细胞肿瘤	NGF	视网膜疾患
CD40L、 CD70、TLR4	肿瘤	NGF	神经痛
CD40L、 CD70、TLR4	黑色素瘤	NGF	青光眼

CD40L、 CD70、TLR4	恶性黑色素瘤 IV 期	NGF	帕金森病
CD40L、 CD70、TLR4	不可切除的黑色素瘤	NGF	脑卒中
CD40L、IFN β	肿瘤	NGF	角膜炎
CD40L、 OX40L	肿瘤	NGF	脊髓损伤
CD40L、 OX40L	三阴性乳腺癌	NGF	黄斑变性
CD40L、 OX40L	肉瘤	NGF	亨廷顿舞蹈病
CD40L、 OX40L	黑色素瘤	NGF	骨质疏松症
CD40L、 OX40L	非小细胞肺癌	NGF	骨关节炎
CD43	T 细胞淋巴瘤	NGF	阿尔茨海默病
CD43	T 细胞白血病	NGLY1	遗传病
CD44	血液肿瘤	NGLY1	NGLY1 缺陷
CD44v6	实体瘤	Nicotine	烟草依赖
CD44v6	急性髓性白血病	NIS	胰腺导管癌
CD44v6	多发性骨髓瘤	NIS	输卵管癌
CD45	血液肿瘤	NIS	乳腺癌
CD45	骨髓肿瘤	NIS	前列腺癌
CD46	直肠癌	NIS	卵巢癌
CD46	头颈部肿瘤	NIS	鳞状细胞癌
CD46	肾细胞癌	NIS	间皮瘤
CD46	卵巢癌	NIS	横纹肌肉瘤
CD46	结直肠癌	NIS	腹膜癌
CD46	非小细胞肺癌	NIS	多发性骨髓瘤
CD46	膀胱癌	NIS	膀胱癌
CD46、PEDF	地图样萎缩	NK1	肌张力亢进
CD47	血液肿瘤	NK2R、 mGluRs	重度抑郁症
CD47	实体瘤	NKG2D	转移性实体瘤
CD47	镰状细胞血症	NKG2D	直肠癌
CD47	地中海贫血	NKG2D	血液肿瘤
CD47、PHD2	肿瘤	NKG2D	新型冠状病毒感染
CD47、PHD2	血液肿瘤	NKG2D	髓母细胞瘤
CD47、PHD2	实体瘤	NKG2D	髓母细胞瘤

CD47、SIRP α	肿瘤	NKG2D	难治性急性髓细胞白血病
CD47、SIRP α	晚期恶性实体瘤	NKG2D	结直肠癌
CD47、SIRP α	实体瘤	NKG2D	结肠癌肝转移
CD47、SIRP α	难治性非霍奇金淋巴瘤	NKG2D	结肠癌
CD47、SIRP α	复发性非霍奇金淋巴瘤	NKG2D	胶质母细胞瘤
CD47、SIRP α	动脉粥样硬化	NKG2D	胶质母细胞瘤
CD49d	多发性硬化症	NKG2D	急性髓性白血病
CD49d	杜氏肌营养不良症	NKG2D	急性髓性白血病
CD5	蕈样真菌病	NKG2D	骨髓增生异常综合征
CD5	血液肿瘤	NKG2D	肝细胞癌
CD5	外周 T 细胞淋巴瘤	NKG2D	复发性急性髓细胞白血病
CD5	前体 T 淋巴细胞白血病淋巴瘤	NKG2D	不能切除的大肠癌
CD5	前体 B 细胞成淋巴细胞白血病淋巴瘤	NKG2D	NKG2DL 阳性实体瘤
CD5	难治性 T 急性淋巴细胞白血病	NLGase	戈谢病
CD5	难治性 B 型急性淋巴细胞白血病	NLRP1、 NLRP3	神经系统变性病
CD5	淋巴瘤	NLRP3	炎症性肠病
CD5	急性淋巴细胞白血病	NLRP3	炎症
CD5	复发性急性淋巴细胞白血病	NMNAT1	莱伯先天性黑蒙
CD5	复发性 T 细胞淋巴瘤	N-Myc	小细胞肺癌
CD5	非霍奇金淋巴瘤	N-Myc	神经母细胞瘤
CD5	T 细胞淋巴瘤	N-Myc	软组织肉瘤
CD5	T 细胞急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤	NOD2	克罗恩病
CD5、IL15R	血液肿瘤	NOS	头颈部肿瘤
CD56	结外 NK-T 细胞淋巴瘤	NOS	前列腺癌
CD56	复发性鼻咽癌	NOS	肝癌
CD59	年龄相关性黄斑变性	NOS	肺性高血压
CD59	地图样萎缩	NOS	肺动脉高压
CD7	幼年型关节炎	NOS2	血管再狭窄
CD7	蕈样真菌病	NOS2	肺动脉高压
CD7	外周 T 细胞淋巴瘤	NOX	慢性肉芽肿病
CD7	塞扎里综合征	NOX1	慢性肉芽肿病
CD7	前体 T 淋巴细胞白血病淋巴瘤	NPC1	C 型尼曼匹克病
CD7	皮炎炎	NPRA	肿瘤
CD7	难治性 T 淋巴细胞淋巴瘤	NPRA	免疫系统疾病
CD7	难治性 T 急性淋巴细胞白血病	NPY receptor	癫痫
CD7	免疫母细胞性淋巴结病	NR2E3	视网膜色素变性

CD7	淋巴瘤母细胞淋巴瘤	NR2E3	莱伯先天性黑蒙
CD7	溃疡性结肠炎	NR2F6	肿瘤
CD7	克罗恩病	NR2F6	实体瘤
CD7	结外 NK-T 细胞淋巴瘤	NR2F6	骨髓增生异常综合征
CD7	间变性大细胞淋巴瘤	NR2F6	白血病
CD7	急性髓性白血病	NRARP	湿性年龄相关性黄斑变性
CD7	急性淋巴细胞白血病	NRARP	湿性黄斑变性
CD7	肝脾 T 细胞淋巴瘤	NRARP	脉络膜新生血管
CD7	复发性 T 细胞淋巴瘤	NRARP	黄斑变性
CD7	非霍奇金淋巴瘤	NRAS	肿瘤
CD7	大颗粒淋巴细胞白血病	NRAS	血液肿瘤
CD7	成人 T 细胞淋巴瘤/难治性白血病	NRAS	实体瘤
CD7	成人 T 细胞白血病/淋巴瘤	Nrf2	非酒精性脂肪性肝炎
CD7	肠病相关的 T 细胞淋巴瘤	Nrf2	动脉硬化
CD7	肠病相关的 T 细胞淋巴瘤	NRP-1	肿瘤
CD7	T 细胞幼淋巴细胞白血病	NRP-2	转移性黑色素瘤
CD7	T 细胞淋巴瘤	NRP-2	肿瘤转移
CD7	T 细胞淋巴瘤	NRP-2	肿瘤
CD7	T 细胞急性淋巴细胞白血病复发	NRP-2	肾肿瘤
CD7	T 细胞急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤	NRTN	眼部疾病
CD7	T 细胞急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤	NRTN	帕金森病
CD7	NK 细胞淋巴瘤	NRTN	亨廷顿舞蹈病
CD7	CD7 阳性肿瘤	NT-4	运动神经元疾病
CD7	CD7 阳性急性髓性白血病	NT-4	听力障碍
CD70	转移性透明细胞性肾细胞癌	NT-4	糖尿病性视网膜病变
CD70	肿瘤转移	NT-4	青光眼
CD70	胰腺腺癌	NT-4	葡萄膜炎
CD70	血液肿瘤	NT-4	帕金森病
CD70	晚期肾细胞癌	NT-4	亨廷顿舞蹈病
CD70	晚期恶性实体瘤	NTCP	肝病
CD70	晚期癌症	NTCP	胆汁淤积
CD70	食管癌	NTF3	腓骨肌萎缩症
CD70	实体瘤	Nucleic acids	杜氏肌营养不良症
CD70	实体瘤	NXNL1	视锥-视杆营养不良
CD70	肾细胞癌	NXNL1	视网膜色素变性

CD70	泌尿系统肿瘤	NY-ESO-1	转移性实体瘤
CD70	卵巢癌	NY-ESO-1	肿瘤
CD70	淋巴瘤	NY-ESO-1	粘液样脂肪肉瘤
CD70	急性髓性白血病	NY-ESO-1	晚期恶性实体瘤
CD70	急性髓性白血病	NY-ESO-1	食管鳞状细胞癌
CD70	宫颈癌	NY-ESO-1	食管癌
CD70	非霍奇金淋巴瘤	NY-ESO-1	食管癌
CD70	非霍奇金淋巴瘤	NY-ESO-1	实体瘤
CD70	恶性胸膜间皮瘤	NY-ESO-1	实体瘤
CD70	多发性骨髓瘤	NY-ESO-1	神经母细胞瘤
CD70	T 细胞淋巴瘤	NY-ESO-1	三阴性乳腺癌
CD70	CD70 阳性肿瘤	NY-ESO-1	软组织肉瘤
CD70	CD70 阳性女性生殖器官肿瘤	NY-ESO-1	乳腺癌
CD70、IL-15、TGF-β	肾细胞癌	NY-ESO-1	乳腺癌
CD70、IL15R	晚期肾细胞癌	NY-ESO-1	肉瘤
CD70、IL15R	间皮瘤	NY-ESO-1	脑膜瘤
CD70、IL15R	骨肉瘤	NY-ESO-1	难治性卵巢癌
CD72	急性淋巴细胞白血病	NY-ESO-1	卵巢上皮癌
CD74	阿尔茨海默病	NY-ESO-1	卵巢癌
CD79B	难治性 B 型急性淋巴细胞白血病	NY-ESO-1	滑膜肉瘤
CD79B	急性淋巴细胞白血病	NY-ESO-1	滑膜肉瘤
CD79B	B 细胞淋巴瘤	NY-ESO-1	黑色素瘤
CD79B	B 细胞淋巴瘤	NY-ESO-1	肝细胞癌
CD8	晚期头颈癌	NY-ESO-1	肝癌
CD8	头颈部肿瘤	NY-ESO-1	复发性原发性腹膜癌
CD80、CD86、PDL1	非小细胞肺癌	NY-ESO-1	肺癌
CD80、GM-CSF	肿瘤	NY-ESO-1	非小细胞肺癌
CD80、IFN α、MIP-1α	实体瘤	NY-ESO-1	多发性骨髓瘤
CD83	肿瘤	NY-ESO-1	铂耐药性输卵管癌
CD84	成人急性髓性白血病	NY-ESO-1	铂耐药性卵巢癌
CD86	胶质瘤	NY-ESO-1	铂敏感性原发性腹膜癌
CD86	黑色素瘤	NY-ESO-1	铂敏感性输卵管癌
CD86、HPV E6、HPV	实体瘤	NY-ESO-1	铂类耐药性原发性腹膜癌

E7、IL-12、IL-2			
CD86、HPV E6、HPV E7、IL-12、IL-2	HPV16 阳性实体瘤	NY-ESO-1	膀胱尿路上皮癌
CD8A、NY-ESO-1	实体瘤	NY-ESO-1	膀胱癌
CD94	浆细胞白血病	NY-ESO-1	FGF19 阳性实体瘤
CD99	血液肿瘤	NY-ESO-1、PD-1	粘液样脂肪肉瘤
CD99	髓系白血病	NY-ESO-1、PD-1	滑膜肉瘤
CD99	肉瘤	NY-ESO-1、PD-1	黑色素瘤
CDA	胃肠道肿瘤	NY-ESO-1、PD-1	多发性骨髓瘤
CDA	胶质母细胞瘤	NY-ESO-1、PRAME、WT1	急性髓性白血病
CDA	高级别胶质瘤	NY-ESO-1、PRAME、WT1	急性淋巴细胞白血病
CDA	复发性胶质母细胞瘤	NY-ESO-1、TCR	实体瘤
CDCP1	胰腺导管腺癌	NY-ESO-1、TGF-β	粘液样脂肪肉瘤
CDH17	转移性结直肠癌	NY-ESO-1、TGF-β	滑膜肉瘤
CDH17	胰腺癌	OPA1	视神经萎缩
CDH17	神经内分泌肿瘤	OPA1	常染色体显性视神经萎缩
CDH17	结直肠癌	OPCML	卵巢癌
CDH5	糖尿病性视网膜病变	OTCase	尿素循环障碍
CDKL5	神经系统疾病	OTCase	鸟氨酸氨基甲酰基转移酶缺乏症
CDKL5	X 连锁遗传病	OTOF	听力损失
CDKL5	CDKL5 缺乏症	OTOF	耳聋
CDKN1A	非肌层浸润性膀胱肿瘤	OX40	转移性结直肠癌
CDKs	肿瘤	OX40	胃肠道间质瘤

CDKs	神经性听力损失	OX40	胃癌
CEA	肿瘤转移	OX40	肾肿瘤
CEA	直肠癌	OX40	乳腺癌
CEA	胰腺腺泡癌	OX40	肉瘤
CEA	胰腺癌	OX40	鳞状细胞癌
CEA	胃癌	OX40	结直肠癌肝转移
CEA	晚期恶性实体瘤	OX40	黑色素瘤
CEA	食管癌	OX40	肝转移
CEA	少突神经胶质瘤	OX40	腹部肿瘤
CEA	乳腺癌	OX40L	淋巴瘤
CEA	卵巢癌	p24 antigen	HIV 感染
CEA	结直肠癌	p53	移植物功能延迟恢复
CEA	结直肠癌	p53	移植并发症
CEA	结肠癌	p53	胰腺癌
CEA	结肠癌	p53	小淋巴细胞淋巴瘤
CEA	肝转移	p53	晚期恶性实体瘤
CEA	肝癌	p53	晚期胆管癌
CEA	腹膜癌	p53	头颈部肿瘤
CEA	复发癌	p53	输卵管癌
CEA	肺癌	p53	黏膜白斑
CEA	胆管上皮癌	p53	慢性淋巴细胞白血病
CEA	胆道肿瘤	p53	卵巢癌
CEA、IL-15R α 、IL-21R	结直肠癌	p53	胶质母细胞瘤
CEACAM5	胰腺腺泡癌	p53	急性髓性白血病
CEACAM5	胰腺腺癌	p53	急性肾损伤
CEACAM5	胰腺癌	p53	骨髓增生异常综合征
CEACAM5	腺癌	p53	肝癌
CEACAM5	胃癌	p53	腹膜癌
CEACAM5	胃癌	p53	非小细胞肺癌
CEACAM5	乳腺癌	p53	恶性腹水
CEACAM5	乳腺癌	p53	鼻咽癌
CEACAM5	卵巢癌	p53	膀胱癌
CEACAM5	鳞状非小细胞肺癌	p53	白癜风
CEACAM5	结直肠癌	p53 R175H	转移性实体瘤
CEACAM5	结直肠癌	p53 R175H	胰腺腺癌
CEACAM5	肝转移	p53 R175H	头颈部鳞状细胞癌
CEACAM5	肝癌	p53 R175H	乳腺癌
CEACAM5	肺癌	p53 R175H	结直肠癌

CEACAM5	恶性腹水	p53 R175H	非小细胞肺癌
CEACAM5、 CEACAM6	肿瘤	p75NTR	阿尔茨海默病
CEACAM7	胰腺癌	PA protein、 influenza virus M1	流感病毒感染
CEBPA	乙型肝炎	PABPN1	眼咽型肌营养不良症
CEBPA	肝细胞癌	PABPN1	吞咽障碍
CEBPA	肝癌	PAH	苯丙酮尿症
CEBPA	丙型肝炎	PAI-1、 tPA、vWF	血栓性微血管病
CEBPB	乳腺癌	PAI-1、 tPA、vWF	新型冠状病毒感染
CEBPB	黑色素瘤	PAI-1、 tPA、vWF	静脉闭塞性疾病
CEBPB	肝细胞癌	PAI-1、 tPA、vWF	高风险神经母细胞瘤
CEBPB	膀胱癌	PAI-1、 tPA、vWF	肝静脉闭塞性疾病
Cell adhesion molecules、 NF-κB、eIF5A	套细胞淋巴瘤	PAK4	非肌层浸润性膀胱肿瘤
Cell adhesion molecules、 NF-κB、eIF5A	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	PAK4	膀胱癌
Cell adhesion molecules、 NF-κB、eIF5A	浆细胞白血病	PARP	肿瘤
Cell adhesion molecules、 NF-κB、eIF5A	复发性套细胞淋巴瘤	PARP	实体瘤
Cell adhesion molecules、 NF-κB、eIF5A	复发性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	PARP1	肿瘤
Cell adhesion molecules、 NF-κB、eIF5A	复发性多发性骨髓瘤	PAX4	1 型糖尿病

Cell adhesion molecules、NF-κB、eIF5A	复发性 B 细胞淋巴瘤	PBGD	急性间歇性卟啉病
Cell adhesion molecules、NF-κB、eIF5A	多发性骨髓瘤	PCSK9	脂质代谢紊乱
Cep290	视网膜变性疾病	PCSK9	杂合子家族性高胆固醇血症
Cep290	莱伯先天性黑内障 10 型	PCSK9	原发性高胆固醇血症
Cep290、核酸酶 Cas9	遗传性视网膜营养不良	PCSK9	遗传性平滑肌瘤病和肾细胞癌
Cep290、核酸酶 Cas9	眼畸形	PCSK9	外周动脉疾病
Cep290、核酸酶 Cas9	视网膜变性	PCSK9	脑卒中
Cep290、核酸酶 Cas9	视觉障碍	PCSK9	家族性混合型高脂血症
CFB	年龄相关性黄斑变性	PCSK9	冠状动脉疾病
CFB	免疫系统疾病	PCSK9	高脂血症
CFB	免疫球蛋白 a 肾病	PCSK9	高血压
CFB	地图样萎缩	PCSK9	高胆固醇血症
CFH	黄斑变性	PCSK9	肝病
CFI	皮肤松垂	PCSK9	动脉粥样硬化
CFI	年龄相关性黄斑变性	PCSK9	纯合子家族性高胆固醇血症
CFI	黄斑变性	PCSK9	II a 型高脂蛋白血症
CFI	干性年龄相关性黄斑病变	PD-1	转移性黑色素瘤
CFI	地图样萎缩	PD-1	转移性非小细胞肺癌
CFI	II 型糖原贮积病	PD-1	晚期非小细胞肺癌
CFLAR	肿瘤	PD-1	晚期恶性实体瘤
CFTR	视网膜疾患	PD-1	食管癌
CFTR	囊性纤维化	PD-1	三阴性乳腺癌
cGMP-PDE	视网膜色素变性	PD-1	皮肤肿瘤
Chk1	脑转移瘤	PD-1	皮肤鳞状细胞癌
Chk1	胶质母细胞瘤	PD-1	皮肤黑色素瘤
chloride channel	囊性纤维化	PD-1	脑转移瘤
CHOP	糖尿病肾病	PD-1	难治性癌症
CHST15	溃疡性结肠炎	PD-1	泌尿系统肿瘤
CHST15	克罗恩病	PD-1	梅克尔细胞癌
chymase	心脏衰竭	PD-1	卵巢癌

CIDEB	非酒精性脂肪性肝炎	PD-1	结直肠癌
CISH	胃肠道肿瘤	PD-1	胶质瘤
CISH、IL-15	血液肿瘤	PD-1	间皮瘤
CISH、IL-15	实体瘤	PD-1	黑色素瘤
CISH、TGFR2	实体瘤	PD-1	肝细胞癌
c-Jun	基底细胞癌	PD-1	非小细胞肺癌 III 期
c-Jun	黑色素瘤	PD-1	非小细胞肺癌
c-Kit	心肌缺血	PD-1	多形性胶质母细胞瘤
c-Kit	系统性肥大细胞增多症	PD-1	不可切除的黑色素瘤
c-Kit	过敏	PD-1	Mesothelin 阳性肿瘤
CLCN7	常染色体显性遗传骨硬化症 II 型	PD-1	Mesothelin 阳性实体瘤
CLDN18.2	自身免疫性疾病	PD-1	IV 期肺恶性非小细胞肿瘤
CLDN18.2	胰腺癌	PD-1	III 期结肠癌
CLDN18.2	胃腺癌	PD-1	IIA 期非小细胞肺癌
CLDN18.2	胃食管交界处腺癌	PD-1	Carney 复合症
CLDN18.2	胃肠道肿瘤	PD-1、PSCA、PSMA	前列腺癌
CLDN18.2	胃癌	PDCD5	白血病
CLDN18.2	晚期恶性实体瘤	PDE4B、PDE4D、PDE7A	慢性阻塞性肺疾病
CLDN18.2	实体瘤	PDGFB	糖尿病足
CLDN18.2	卵巢上皮癌	PDGFB、VEGFR	黄斑变性
CLDN18.2	卵巢癌	PDGFR	肿瘤
CLDN18.2	进展期胃腺癌	PDGFR	眼部疾病
CLDN18.2	CLDN18.2 阳性胰腺癌	PDGFR	纤维化
CLDN18.2	CLDN18.2 阳性胃食管交界处腺癌	PDGFR	希佩尔-林道综合征
CLDN18.2	CLDN18.2 阳性胃肠道肿瘤	PDGFR	视网膜母细胞瘤
CLDN18.2、CXCR4	胰腺导管腺癌	PDGFR	湿性年龄相关性黄斑变性
CLDN18.2、GluN2B、NAMPT、NKG2D、	胰腺癌	PDGFR	湿性黄斑变性

NMDA receptor			
CLDN18.2、GluN2B、NAMPT、NKG2D、NMDA receptor	胃癌	PDGFR	黄斑变性
CLDN18.2、GluN2B、NAMPT、NKG2D、NMDA receptor	NKG2DL 阳性实体瘤	PDGFR、VEGFR1	湿性年龄相关性黄斑变性
CLDN18.2、GluN2B、NAMPT、NKG2D、NMDA receptor	CLDN18.2 阳性实体瘤	PDGFR α	胶质瘤
CLDN18.2、IL-15	胰腺癌	PDGFR β	肝硬化
CLDN18.2、IL-15	黑色素瘤	PDHK1	变应性结膜炎
CLDN18.2、PD-1	胃癌	PDL1	自身免疫性肝炎
CLDN18.2、PDL1	CLDN18.2 阳性实体瘤	PDL1	转移性头颈部鳞状细胞癌
CLDN6	实体瘤	PDL1	肿瘤转移
CLDN6	卵巢癌	PDL1	肿瘤
CLDN6	睾丸肿瘤	PDL1	乙型肝炎
CLEC4K	郎格罕细胞组织细胞增生症	PDL1	移植物抗宿主病
CLL-1	慢性淋巴细胞白血病	PDL1	胰腺导管腺癌
CLL-1	急性髓性白血病	PDL1	胰腺癌
CLL-1	复发性急性髓细胞白血病	PDL1	胃癌
CLN3	神经元蜡样质脂褐质沉积症	PDL1	三阴性乳腺癌
CLN5	神经元蜡样质脂褐质沉积症 5	PDL1	卵巢上皮癌
CLN6	神经元蜡样质脂褐质沉积症	PDL1	局部晚期恶性实体瘤
CLN8	神经元蜡样质脂褐质沉积症	PDL1	胶质母细胞瘤

CLRN1	Usher 综合征	PDL1	霍奇金淋巴瘤
CLU	转移性去势抵抗性前列腺癌	PDL1	黑色素瘤
CLU	转移性非小细胞肺癌	PDL1	腹膜癌
CLU	疼痛	PDL1	复发性头颈部鳞状细胞癌
CLU	去势抵抗性前列腺癌	PDL1、 TLR9	肿瘤
CLU	非小细胞肺癌	PDL1、 VEGFR1	肿瘤
c-Met	足溃疡	PDL1、 VEGFR1	恶性腹水
c-Met	围手术期缺血	PECAM1	实体瘤
c-Met	实体瘤	PECAM1	肺损伤
c-Met	溃疡	PEDF	视网膜色素变性
c-Met	肝硬化	PfCSP	恶性疟
c-Met	动脉硬化闭塞症	PGF、 VEGF-A、 VEGF-B、 VEGF-C	糖尿病性黄斑水肿
c-Met	I 型高脂蛋白血症	PGF、 VEGF-A、 VEGF-B、 VEGF-C	湿性年龄相关性黄斑变性
CMV IE2	巨细胞病毒视网膜炎	P-gp	乳腺癌
CMV IE2	巨细胞病毒感染	P-gp	非霍奇金淋巴瘤
CMV IE2	HIV 感染	P-gp	膀胱癌
CMV pp65、 LAMP-1	胶质母细胞瘤	PGRN	额颞痴呆
CMV protein	腺病毒科感染	PHD2	贫血
CMV protein	器官移植排斥	PHD2	急性肾损伤
CMV protein	巨细胞病毒感染	Phosphotrans ferases	血管再狭窄
CMV protein	多瘤病毒感染	Phosphotrans ferases、 p38α	肿瘤
CMV protein	爱泼斯坦-巴尔病毒感染	Phosphotrans ferases、 p38α	血管再狭窄
CMV protein、 EBV 蛋白	感染	PI3K family、	实体瘤

		mTORC1、 mTORC2	
c-Myc	再灌注损伤	PI3K α	肿瘤
c-Myc	原始神经外胚层肿瘤	PI3K α H1047R	肿瘤
c-Myc	胰岛细胞腺瘤	PI3K α H1047R	晚期乳腺癌
c-Myc	实体瘤	PI3K α H1047R	晚期恶性实体瘤
c-Myc	淋巴瘤	PI3K α H1047R	晚期癌症
c-Myc	结直肠癌	PI3K α H1047R	乳腺癌
c-Myc	亨廷顿舞蹈病	PIGF、 VEGF-A、 VEGF-B	湿性黄斑变性
c-Myc	冠状动脉再狭窄	PIKFYVE	肌萎缩侧索硬化
c-Myc	肝细胞癌	PIKFYVE	额颞痴呆
c-Myc	非小细胞肺癌	PIWIL1	胰腺癌
c-Myc	非霍奇金淋巴瘤	PIWIL1	胃肠道肿瘤
c-Myc	多发性骨髓瘤	PIWIL1	结直肠癌
c-Myc	C-Myc 阳性实体瘤	PKA	肿瘤
CNGA3	色觉障碍	PKA	实体瘤
CNGA3	全色盲 1 型	PKA	乳腺癌
CNGB1	视网膜色素变性	PKA	卵巢癌
CNGB3	色觉障碍	PKA	结肠癌
CNGB3	色觉障碍	PKA	肺癌
CNGB3	全色盲 1 型	PKC α	肺癌
CNTF	视网膜色素变性	PKC α	非小细胞肺癌
CNTFR	自闭症谱系障碍	PKLR	红细胞丙酮酸激酶缺乏症
CNTFR	自闭症	PKN3	胰腺癌
CNTFR	周围神经损伤	PKN3	晚期恶性实体瘤
CNTFR	视网膜色素变性	PKN3	头颈部肿瘤
CNTFR	视网膜毛细血管扩张	PLA2	肿瘤
CNTFR	视神经疾病	PLA2G6	神经轴索营养不良
CNTFR	色觉障碍	PLA2R	膜性肾小球肾炎
CNTFR	青光眼	plakophilin-2	心律失常性右心室发育不良
CNTFR	帕金森病	plakophilin-2	心肌疾病
CNTFR	急性肺损伤	PLK1	晚期肝细胞癌

CNTFR	肌萎缩侧索硬化	PLK1	晚期恶性实体瘤
CNTFR	亨廷顿舞蹈病	PLK1	肾上腺皮质癌
CNTFR	多发性硬化症	PLK1	神经内分泌肿瘤
CNTFR	地图样萎缩	PLK1	淋巴瘤
CNTFR	Usher 综合征	PLK1	肝癌
Coagulation factor	凝血障碍	PLK4	实体瘤
COL1A1	皮肤老化	PLK4	乳腺癌
COL3A1	Ehlers-Danlos 综合征	PLP1	Pelizaeus-Merzbacher 病
COL3A1、elastin	皮肤疾病	PMP22	腓骨肌萎缩症 1a 型
COL5A1	Ehlers-Danlos 综合征	PMVK	胰腺癌
COL6A3	实体瘤	PMVK	非小细胞肺癌
COL7A1	营养不良性大疱性表皮松解	PNP	咽肿瘤
COL7A1	移植物抗宿主病	PNP	晚期头颈癌
COL7A1	烧伤	PNP	头颈部肿瘤
COL7A1 外显子 80	大疱性表皮松解	PNP	前列腺癌
Collagen	营养不良性大疱性表皮松解	PNP	鳞状细胞癌
Collagen	阴茎硬结	PNPLA3	脂肪肝
Collagen	下肢溃疡	PNPLA3	心血管疾病
Collagen	膝盖受伤	PNPLA3	纤维化
Collagen	网球肘	PNPLA3	肝炎
Collagen	软骨疾病	PNPLA3	非酒精性脂肪性肝炎
Collagen	肌腱损伤	PNPLA3	代谢性疾病
Collagen	肌腱病	PNPLA3	代谢相关脂肪性肝病
Collagen	骨关节炎	POSTN	糖尿病性视网膜病变
Collagen	大疱性表皮松解	Potassium channel	急迫性尿失禁
COP1	肝癌	Potassium channel	膀胱过度活动症
COPS5、WEE1	乙型肝炎	PPAR	寻常痤疮
COX-2	前列腺癌	PPT1	神经节蜡样质脂褐质沉积症
COX-2	基底细胞癌	PR1	成人急性髓性白血病
COX-2、PGE2	结肠癌	PRAME	子宫内膜癌
COX-2、PGE2	肝癌	PRAME	肿瘤
COX-2、TGF-β1	原位癌	PRAME	头颈部肿瘤

COX-2、TGF-β1	原发性硬化性胆管炎	PRAME	实体瘤
COX-2、TGF-β1	实体瘤	PRAME	葡萄膜黑色素瘤
COX-2、TGF-β1	乳腺癌	PRAME	皮肤黑色素瘤
COX-2、TGF-β1	前列腺癌	PRAME	卵巢癌
COX-2、TGF-β1	皮肤增生性瘢痕	PRAME	急性髓性白血病
COX-2、TGF-β1	皮肤鳞状细胞癌	PRAME	滑膜肉瘤
COX-2、TGF-β1	局部肥胖	PRAME	黑色素瘤
COX-2、TGF-β1	基底细胞癌	PRAME	骨髓增生异常综合征
COX-2、TGF-β1	肝转移	PRAME	骨髓增生异常综合征
COX-2、TGF-β1	肝硬化	PRAME	非小细胞肺癌
COX-2、TGF-β1	肝细胞癌	PRAME、WT1	前列腺癌
COX-2、TGF-β1	肥胖	PRAME、WT1、cyclin A1	急性髓性白血病
COX-2、TGF-β1	胆管上皮癌	PRAME、WT1、cyclin A1	骨髓增生异常综合征
COX-2、TGF-β1	瘢痕疙瘩	PRDM2	前列腺癌
CRAF	肿瘤	PRDM2	肝癌
CRAF	胰腺癌	PRDM2	非小细胞肺癌
CRAF	小细胞肺癌	PRG4	骨关节炎
CRAF	糖尿病性黄斑水肿	PRNP	朊病毒疾病
CRAF	实体瘤	Protein kinases	肿瘤
CRAF	肾细胞癌	PRPF31	双等位基因 RPE65 突变相关的视网膜变性性疾病
CRAF	乳腺癌	PRPF31	视网膜色素变性 11 型

CRAF	前列腺癌	PSCA	食管腺癌
CRAF	卵巢癌	PSCA	膀胱癌
CRAF	结直肠癌	P-sel	镰状细胞血症
CRAF	黄斑变性	PSMA	自身免疫性疾病
CRAF	非小细胞肺癌	PSMA	转移性去势抵抗性前列腺癌
CRP	炎症	PSMA	肿瘤
CRP	心房颤动	PSMA	粘液表皮样癌
CRP	肾脏疾病	PSMA	腺样囊性癌
CRP	类风湿关节炎	PSMA	腺泡细胞癌
CRP	克罗恩病	PSMA	涎腺癌
CRX	视锥-视杆营养不良	PSMA	唾液腺肿瘤
CRX	视网膜色素变性	PSMA	肾细胞癌
CRX	视网膜疾患	PSMA	乳腺癌
CRX	莱伯先天性黑蒙	PSMA	去势抵抗性前列腺癌
CSF-2R	转移性实体瘤	PSMA	去势抵抗性前列腺癌
CSF-2R	转移性乳腺癌	PSMA	前列腺癌
CSF-2R	转移性胆道癌	PSMA	前列腺癌
CSF-2R	肿瘤	PSMA	结直肠癌
CSF-2R	中枢神经系统肿瘤	PSMA	非小细胞肺癌
CSF-2R	粘液腺癌	PSMA	多发性骨髓瘤
CSF-2R	尤文肉瘤	PSMA	导管癌
CSF-2R	印戒细胞癌	PSMA	PSMA 阳性肿瘤
CSF-2R	胰腺继发性恶性肿瘤	PSMA、TCRDV2	转移性去势抵抗性前列腺癌
CSF-2R	蕈样真菌病	PSMA、TGF-β	去势抵抗性前列腺癌
CSF-2R	小汗腺汗孔癌	PSMA、TGF-β	前列腺癌
CSF-2R	胃癌	PSMA、Trop-2	前列腺癌
CSF-2R	微囊性附件癌	PTEN	严重急性呼吸综合征
CSF-2R	晚期结直肠癌	PTEN	脊髓损伤
CSF-2R	外阴鳞状细胞癌	PTEN	急性脊髓损伤
CSF-2R	头颈部肿瘤	PTH	绝经期后骨质疏松
CSF-2R	视网膜母细胞瘤	PTK7	结直肠癌
CSF-2R	食管癌	PTP1B	肥胖
CSF-2R	实体瘤	PTP1B	2 型糖尿病
CSF-2R	肾母细胞瘤	PYK2	卵巢癌
CSF-2R	神经母细胞瘤	PYK2	结直肠癌

CSF-2R	塞扎里综合征	PYK2	甲状腺癌
CSF-2R	乳腺外佩吉特病	Raf kinase	头颈部肿瘤
CSF-2R	乳腺导管癌	Raf kinase	乳腺癌
CSF-2R	乳头状腺癌	RAG-1	胶质母细胞瘤
CSF-2R	前列腺癌	RANGRF	Brugada 综合征
CSF-2R	皮脂腺瘤	Ras	肿瘤
CSF-2R	皮肤肿瘤	Ras	肿瘤
CSF-2R	皮肤鳞状细胞癌	Ras	胰腺腺泡癌
CSF-2R	皮肤黑色素瘤	Ras	胰腺继发性恶性肿瘤
CSF-2R	皮肤附件病	Ras	晚期结直肠癌癌
CSF-2R	脑恶性胶质瘤	Ras	实体瘤
CSF-2R	难治性淋巴瘤	Ras	乳腺癌
CSF-2R	难治性间变性大细胞淋巴瘤	Ras	局部晚期胰腺腺癌
CSF-2R	难治性 T 细胞淋巴瘤	Ras	结直肠癌
CSF-2R	梅克尔细胞癌	Ras	复发性结直肠癌
CSF-2R	螺旋腺癌	Ras	非小细胞肺癌
CSF-2R	淋巴瘤	RB1	胰腺癌
CSF-2R	局部晚期软组织肉瘤	RB1	头颈部肿瘤
CSF-2R	局部晚期膀胱癌	RB1	间皮瘤
CSF-2R	浸润性乳腺癌	RB1	肺癌
CSF-2R	结直肠癌肝转移	RDH12	莱伯先天性黑蒙
CSF-2R	结直肠癌	RdRp	新型冠状病毒感染
CSF-2R	角化棘皮瘤	Redd1	糖尿病性黄斑水肿
CSF-2R	胶质母细胞瘤	Redd1	黄斑变性
CSF-2R	间皮瘤	regnase-1	纤维化
CSF-2R	基底细胞癌	regnase-1	成人呼吸窘迫综合征
CSF-2R	基底鳞状细胞癌	RELA	类风湿关节炎
CSF-2R	肌层浸润性膀胱癌	RELA	骨关节炎
CSF-2R	横纹肌肉瘤	renin receptor	糖尿病性视网膜病变
CSF-2R	黑色素瘤	renin receptor	葡萄膜炎
CSF-2R	汗腺肿瘤	renin receptor	黄斑变性
CSF-2R	肝细胞癌	REP1	无脉络膜症
CSF-2R	肝癌	REP1	视网膜发育不良
CSF-2R	复发性乳腺癌	REP1	X 连锁视网膜色素变性
CSF-2R	复发性 T 细胞淋巴瘤	REV	HIV 感染
CSF-2R	复发性 HER2 阴性乳腺癌	RHO	视网膜色素变性 4 型
CSF-2R	复发型外周 T 细胞淋巴瘤	RHO	视网膜色素变性
CSF-2R	非肌层浸润性膀胱肿瘤	RHO	色觉障碍
CSF-2R	恶性圆柱瘤	RHO	黄斑变性

CSF-2R	恶性实体肿瘤	RHO	地图样萎缩
CSF-2R	导管癌	RHOK	视网膜疾患
CSF-2R	不可切除的黑色素瘤	RIG-I	肿瘤
CSF-2R	膀胱转移癌	RIG-I	黑色素瘤
CSF-2R	膀胱癌	RIG-I	冠状病毒感染
CSF-2R	NK 细胞淋巴瘤	RIG-I、TLR3	病毒感染
CSF-2R、CTLA4	肿瘤	RLBP1	视网膜色素变性
CSF-2R、CTLA4、GALV-GP R-	微卫星稳定型结直肠癌	RNAP	乙型肝炎
CSF-2R、CTLA4、GALV-GP R-	实体瘤	RNA 结合蛋白	转移性乳腺癌
CSF-2R、GALV-GP R-	实体瘤	RNR	转移性实体瘤
CSF-2R、GALV-GP R-	三阴性乳腺癌	RNR	肿瘤
CSF-2R、GALV-GP R-	皮肤鳞状细胞癌	RNR	直肠癌
CSF-2R、GALV-GP R-	皮肤黑色素瘤	RNR	原始神经外胚层肿瘤
CSF-2R、GALV-GP R-	黑色素瘤	RNR	实体瘤
CSF-2R、GALV-GP R-	非小细胞肺癌	RNR	肾肿瘤
CSF-2R、GALV-GP R-	MSI-H 癌症	RNR	肾细胞癌
CSF-2R、PDL1	实体瘤	RNR	乳腺癌
CSF-3R	中性粒细胞减少	RNR	前列腺癌
CSF-3R	细胞因子释放综合征	RNR	前列腺癌
CSF-3R	膝关节炎	RNR	难治性急性未分化白血病
CSF-3R	晚期恶性实体瘤	RNR	幕上肿瘤
CSF-3R	社区获得性肺炎	RNR	慢性粒细胞性白血病
CSF-3R	脓毒症	RNR	淋巴瘤
CSF-3R	泌尿道感染	RNR	局部晚期非小细胞肺癌
CSF-3R	间皮瘤	RNR	结直肠癌

CSF-3R	急性胆囊炎	RNR	胶质母细胞瘤
CSF-3R	腹腔感染	RNR	继发性骨髓增生异常综合征
CSF-3R	腹膜继发性恶性肿瘤	RNR	急性转化期慢性粒细胞性白血病
CSF-3R	腹膜癌	RNR	急性早幼粒细胞白血病
CSF-3R	胆管炎	RNR	急性白血病
CTCFL	乳腺癌	RNR	骨髓增生异常综合征
CTGF	头颈部肿瘤	RNR	复发性前列腺癌
CTGF	特发性肺纤维化	RNR	复发性结肠癌
CTGF	皮肤增生性瘢痕	RNR	复发性急性髓细胞白血病
CTGF	卵巢癌	RNR	复发性非小细胞肺癌
CTGF	黑色素瘤	RNR	复发性成人急性淋巴细胞白血病
CTGF	肝硬化	RNR	非小细胞肺癌 IIIB 期
CTGF	创伤和损伤	RNR	非小细胞肺癌 IIIA 期
CTGF	瘢痕	RNR	非小细胞肺癌
CTGF、NF-κB	杜氏肌营养不良症	RNR	成人急性髓性白血病
CTLA4	肿瘤	RNR	成人急性淋巴细胞白血病
CTLA4	干燥综合征	RNR	膀胱癌
CTLA4、FLT3、IL-12R	实体瘤	RNR	伴有 11q23 异常的急性髓系白血病
CTLA4、IL-12	转移性非小细胞肺癌	RNR	IV 期肺恶性非小细胞肿瘤
CTLA4、MSLN、PD-1	实体瘤	ROBO1	肿瘤
CTLA4、PD-1	晚期恶性实体瘤	ROBO1	胰腺癌
CTLA4、PD-1	结肠癌	ROBO1	实体瘤
CTLA4、STAT3	肿瘤	ROCK	肿瘤
CTNNB1	肿瘤	ROCK	视网膜色素变性
CTNNB1	2 型糖尿病	ROCK	角膜水肿
CTNS	胱氨酸贮积症	ROCK	角膜内皮炎
CXCR2、GPC3	肝癌	ROCK	大疱性角膜病变
CXCR3、IL-12、TGF-β	肿瘤	ROCK	Fuchs 内皮营养不良
CXCR4	原发性骨髓纤维化	ROR1	转移性非小细胞肺癌
CXCR4	心脏衰竭	ROR1	血液肿瘤
CXCR4	围手术期缺血	ROR1	晚期乳腺癌
CXCR4	外周动脉疾病	ROR1	套细胞淋巴瘤

CXCR4	手术伤口	ROR1	实体瘤
CXCR4	骨髓纤维化	ROR1	三阴性乳腺癌
CXCR5、EGFR	非小细胞肺癌	ROR1	乳腺癌
CYB5R3	肿瘤	ROR1	乳腺癌
CYBB	慢性肉芽肿病	ROR1	难治恶性实体肿瘤
cyclin G1	胰腺癌	ROR1	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
cyclin G1	实体瘤	ROR1	慢性淋巴细胞白血病
cyclin G1	乳腺癌	ROR1	卵巢癌
cyclin G1	肉瘤	ROR1	急性淋巴细胞白血病
cyclin G1	结直肠癌	ROR1	复发性乳腺癌
cyclin G1	骨肉瘤	ROR1	复发性非小细胞肺癌
CYP21A2	先天性肾上腺增生	ROR1	非霍奇金淋巴瘤
CYP27A1	脑腱黄瘤病	ROR1	白血病
CYP3A4	肿瘤	ROR1	B 细胞恶性肿瘤
CYP4V2	视网膜变性	ROR2	胰腺癌
CYP4V2	Bietti 晶体营养不良	ROR2	胃癌
CYPs	胰腺癌	ROR2	肾肿瘤
CYPs	结直肠癌	ROR2	肾细胞癌
Cytokines	肉瘤	ROR2	肉瘤
Cytokines	黑色素瘤	ROR2	复发性实体肿瘤
Cytokines	恶性实体肿瘤	ROR2	膀胱癌
C-型凝集素结构域蛋白	睾丸肿瘤	RORG	免疫系统疾病
DAF	黄斑变性	RORα	斯塔加特病
DAF、ICAM-1	实体瘤	RORα	视网膜色素变性 19 型
DAF、ICAM-1	非小细胞肺癌	RORα	干性年龄相关性黄斑病变
DAG1	肌营养不良	RORα	地图样萎缩
DAG1	杜氏肌营养不良症	RORα	3 型锥杆营养不良
DAT	帕金森病	RPE65	莱伯先天性黑蒙
DDC	帕金森病	RPE65	Leber 氏遗传性视神经萎缩
DDC	芳香族氨基酸脱羧酶缺乏症	RPGR	无脉络膜症
DGAT2	非酒精性脂肪性肝炎	RPGR	视网膜劈裂
DGAT2	2 型糖尿病	RPGR	X 连锁视网膜色素变性
DGKK	脆性 X 综合征	RPN2	乳腺癌
DKK3	间皮瘤	RRM2	肿瘤
DKK3	恶性胸膜间皮瘤	RRM2	实体瘤
DLL3	小细胞肺癌复发	RT	淋巴瘤
DLL3	小细胞肺癌	RT	HIV 感染

DLL3	大细胞神经内分泌癌	RTK	卵巢癌
DMD exon 055	肌营养不良	RUNX3	肿瘤
DMD exon 44	肌营养不良	RYR2	儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速
DMD exon 44	杜氏肌营养不良症	SANS	Usher 综合征
DMD exon 45	杜氏肌营养不良症	SARM1	周围神经系统疾病
DMD exon 45、DMD exon 44	杜氏肌营养不良症	SARS-CoV-2 3CLpro	新型冠状病毒感染
DMD exon 50	杜氏肌营养不良症	SARS-CoV-2 N protein、SARS-CoV-2 ORF1Ab	新型冠状病毒感染
DMD exon 51	杜氏肌营养不良症	SARS-CoV-2 S protein	新型冠状病毒感染
DMD exon 52	肌营养不良	SARS-CoV-2 S protein	冠状病毒感染
DMD exon 52	杜氏肌营养不良症	SATB1	前列腺癌
DMD exon 53	杜氏肌营养不良症	SCAP	血脂障碍
DMD exon 53	杜氏肌营养不良症	SCAP	代谢相关脂肪性肝病
DMD exon 55	杜氏肌营养不良症	SDF-1	造血干细胞移植
Dm-dNK	乳腺癌	SDF-1	胰腺癌
Dm-dNK	结直肠癌	SDF-1	心脏损伤
DMPK	肌强直性营养不良	SDF-1	糖尿病性视网膜病变
DNA	胰腺癌	SDF-1	慢性淋巴细胞白血病
DNA polymerase、RT	巨细胞病毒感染	SDF-1	结直肠癌
DNA polymerase、RT	单纯疱疹	SDF-1	复发性慢性淋巴细胞白血病
DNA polymerase、RT	爱泼斯坦-巴尔病毒感染	SDF-1	多发性骨髓瘤
DNA polymerase、RT	HIV 感染	Selectins	炎症
DNA polymerase、	肿瘤	Selectins	结肠癌

thymidine kinase			
DNA-directed DNA polymerase	自身免疫性疾病	Selectins	黑色素瘤
DNA-directed DNA polymerase	肿瘤	SEMA4A	多发性骨髓瘤
DNA-directed DNA polymerase	炎症	SERCA2	心脏衰竭
DNA-directed DNA polymerase	甲型流感病毒感染	SERCA2	舒张期心力衰竭
DNA-directed DNA polymerase	肌张力失调	SERCA2	射血分数保留型心力衰竭
DNAJC15	急性肾损伤	SERCA2	缺血性心脏病
DNAJC15	多囊肾	SERCA2	尿失禁
DNase I	胰腺腺泡癌	SERCA2	扩张型心脏病
DNase I	结直肠癌	SERCA2	肺动脉高压
DNA 修复蛋白	晚期癌症	SERCA2	非缺血性心脏病
DNA 修复蛋白	黑色素瘤	SERCA2	杜氏肌营养不良症
DNA 指导的 RNA 聚合酶	细菌感染	SERCA2	DMD 相关的扩张型心脏病
DNM2	肌肉萎缩	SGCA	肢带型肌营养不良
DNMT1	头颈部肿瘤	SGCA	肌聚糖病
DNMT1	肾肿瘤	SGCB	肢带型肌营养不良
DNMT1	肾细胞癌	SGCB	2 e 型肢节型肌营养不良症
DNMT1	急性髓性白血病	SGCG	肢带型肌营养不良 R5 型
DNMT1	骨髓增生异常综合征	SGCG	2C 型肢带型肌营养不良症
DOK7	运动神经元疾病	SGLT2	2 型糖尿病
DOK7	先天性肌无力综合征	SGSH	黏多糖贮积症 III 型
DR4、TRAIL	肾肿瘤	SGSH、SUMF1	黏多糖贮积症 III 型
DR5	肝癌	SHANK3	自闭症谱系障碍
DRDs	帕金森障碍	SHANK3	Phelan-McDermid 综合征
DSG1、DSG3	天疱疮	SIRPα	肿瘤
DSG3	天疱疮	SIRT6	非酒精性脂肪性肝炎

DSG3	家族性寻常型天疱疮	SLAMF7	血液肿瘤
DUSP1	心脏衰竭	SLAMF7	多发性骨髓瘤
DUSP1	心律失常	SLC6A8	杜氏肌营养不良症
DUSP1	心力衰竭 NYHA III 级	SMAC	胰腺癌
DUSP1	心肌缺血	SMAC、 TRAIL	肝细胞癌
DUSP1	舒张期心力衰竭	SMAD2、 TGFB2、 VEGF-A	脉络膜新生血管
DUSP1	收缩性心力衰竭	SMAD4	结直肠癌
DUSP1	并发症	SMAD7	克罗恩病
DUX4	面肩肱型肌营养不良	SMAD7	恶病质
DUX4	1a 型面肩肱型肌营养不良症	SMAD7	杜氏肌营养不良症
DWRF	射血分数降低的心力衰竭	SMAD7	包涵体肌炎
DWRF	扩张型心肌病	SMN1	脊髓性肌萎缩
DYSF	肢带型肌营养不良	SMN1	肌营养不良
DYSF	三好氏肌肉病变	SMN1	I 型脊髓性肌萎缩症
DYSF	肌原纤维肌病	SMN2	婴儿发作性脊髓小脑共济失调
DYSF	dysferlin 肌病	SMN2	脊髓性肌萎缩
DYSF	2 b 型肢带型肌营养不良症	SMN2 exon 7	脊髓性肌萎缩
dystrophin	天使综合征	SMPD1	尼曼匹克症
dystrophin	肌营养不良	SNAP25	原发性腋窝多汗症
dystrophin	杜氏肌营养不良症	SOCS1	晚期恶性实体瘤
E2F1	终末期肾脏病	SOCS1	头颈部肿瘤
E2F1	增生	SOCS1	头颈部鳞状细胞癌
E2F1	血管移植阻塞	SOCS1	黑色素瘤
E2F1	围手术期缺血	SOCS1	肺癌
E2F1	外周血管疾病	SOCS1	非小细胞肺癌
E2F1	冠状动脉再狭窄	SOCS3	肝细胞癌
E2F1	冠心病	SOD1	运动神经元疾病
E2F1	动脉闭塞性疾病	SOD1	运动神经元疾病
E6	阴茎肿瘤	SOD1	肌萎缩侧索硬化
E6	阴道肿瘤	SOD1	1 型肌萎缩侧索硬化
E6	外阴肿瘤	SOS1	肺癌
E6	乳头状瘤病毒感染	SOST	肿瘤
E6	鳞状上皮内病变	SOST	三阴性乳腺癌
E6	口咽肿瘤	SOST	家族性低磷酸盐血症性佝偻病
E6	宫颈癌	SOST	骨质疏松症
E6	宫颈癌	SOST	成骨不全

E6	肛门肿瘤	SOST	2 型糖尿病
E6	多瘤病毒感染	SPAG9	前列腺癌
E6	HPV16 感染	SPAT	原发性高草酸尿症
E6、HPV E7	头颈部肿瘤	SPHK1	肝细胞癌
E6、HPV E7	宫颈癌	SPSB1	非小细胞肺癌
E6、PD-1	转移性宫颈癌	SRY	帕金森病
E6、PD-1	宫颈癌	SSTR、 thymidine kinase	卵巢癌
EBNA1、 LMP1、 BARF1 蛋白	霍奇金淋巴瘤	SSTR、 thymidine kinase	复发性卵巢癌
EBNA1、 LMP1、 BARF1 蛋白	非霍奇金淋巴瘤	SSTR2	黑色素瘤
EBV 蛋白	造血干细胞移植	ST13	结直肠癌
EBV 蛋白	移植并发症	ST13、 TRAIL	胰腺导管癌
EBV 蛋白	血液肿瘤	STAT1	哮喘
EBV 蛋白	胃癌	STAT3	转移性头颈部鳞状细胞癌
EBV 蛋白	平滑肌肉瘤	STAT3	遗传性非息肉病性结直肠癌 1 型
EBV 蛋白	鼻咽癌	STAT3	胰腺腺泡癌
EBV 蛋白	爱泼斯坦-巴尔病毒阳性淋巴瘤	STAT3	晚期结直肠腺癌
EBV 蛋白	爱泼斯坦-巴尔病毒相关淋巴组织增生性疾病	STAT3	晚期非小细胞肺癌
EBV 蛋白	爱泼斯坦-巴尔病毒相关鼻咽癌	STAT3	晚期恶性实体瘤
EBV 蛋白	埃博拉病毒性疾病	STAT3	头颈部肿瘤
EBV 蛋白	EBV 相关的移植后淋巴增殖性疾病	STAT3	肾肿瘤
EGF	HER2 阳性乳腺癌	STAT3	肾上腺脑白质营养不良
EGFR	转移性头颈部鳞状细胞癌	STAT3	乳腺癌
EGFR	尤文肉瘤	STAT3	前列腺癌转移
EGFR	晚期恶性实体瘤	STAT3	难治性结直肠癌
EGFR	透明细胞肉瘤	STAT3	难治性肺癌
EGFR	头颈部肿瘤	STAT3	卵巢囊肿
EGFR	视网膜母细胞瘤	STAT3	胶质瘤
EGFR	实体瘤	STAT3	急性髓性白血病
EGFR	肾母细胞瘤	STAT3	骨髓增生异常综合征

EGFR	神经纤维肉瘤	STAT3	肝细胞癌
EGFR	神经母细胞瘤	STAT3	复发性头颈部鳞状细胞癌
EGFR	三阴性乳腺癌	STAT3	非小细胞肺癌
EGFR	鳞状细胞癌	STAT3	膀胱癌
EGFR	胶质母细胞瘤	STAT3	MSI-H 结直肠癌
EGFR	滑膜肉瘤	STAT3、 mTOR	胰腺癌
EGFR	横纹样瘤	STAT3、 mTOR	膀胱癌
EGFR	横纹肌肉瘤	STAT3、 TLR9	肿瘤
EGFR	肝细胞癌	STAT3、 TLR9	急性髓性白血病
EGFR	肝母细胞瘤	STAT3、 TLR9	B 细胞淋巴瘤
EGFR	复发性实体肿瘤	STAT5 transcription factor	乳腺癌
EGFR	非小细胞肺癌	STAT6	胰腺腺泡癌
EGFR	恶性上皮肿瘤	STAT6	胃癌
EGFR	促纤维增生性小圆细胞瘤	STAT6	晚期肝细胞癌
EGFR	创伤和损伤	STAT6	乳腺癌
EGFR	HER2 阳性乳腺癌	STAT6	葡萄膜黑色素瘤
EGFR	EGFR 突变实体瘤	STAT6	卵巢上皮癌
EGFR	EGFR 突变实体瘤	STAT6	结直肠癌
EGFR、c-Met	非酒精性脂肪性肝炎	STAT6	胶质瘤
EGFR、 EGFRvIII	胶质母细胞瘤	STAT6	甲状腺癌
EGFR、 EGFRvIII、 HER2、IL- 13Rα2	复发性胶质母细胞瘤	STAT6	肝转移
EGFR、IL-12	结直肠癌	STAT6	肝癌
EGFR、IL- 13Rα2	胶质母细胞瘤	STAT6	肺癌
EGFR、IL- 13Rα2	复发性胶质母细胞瘤	STEAPI	转移性去势抵抗性前列腺癌
EGFR、IL- 13Rα2	EGFR 突变胶质母细胞瘤	STEAPI	前列腺癌转移

EGFR、IL-21R	白血病	STEAP2、TGFB2	前列腺癌转移
EGFR、SSTR	胰腺癌	STEAP2、TGFB2	前列腺癌
EGFR、SSTR	头颈部鳞状细胞癌	STING	肝癌
EGFR、SSTR	乳腺癌	STMN1	实体瘤
EGFR、SSTR	结直肠癌	STMN2	肌萎缩侧索硬化
EGFR、SSTR	黑色素瘤	STMN2	额颞痴呆
EGFR、SSTR	肝癌	STRC	听力障碍
EGFR、TCRDV2	胰腺导管腺癌	STRIP1	实体瘤
EGFR、TCRDV2	头颈部鳞状细胞癌	STRIP1	胶质瘤
EGFR、TCRDV2	实体瘤	STXBP1	STXBP1 相关癫痫性脑病
EGFR、TCRDV2	结直肠癌	SULF2、TGF-β1	胰腺腺泡癌
EGFR、TCRDV2	非小细胞肺癌	SULF2、TGF-β1	肝癌
EGFR、TGF-β	肿瘤	SULF2、TGF-β1	肺癌
EGFRvIII	脑膜肿瘤	SUMO1	心脏衰竭
EGFRvIII	胶质母细胞瘤	SURF1	Leigh 病
EGFRvIII	肝癌	survivin	转移性非小细胞肺癌
EGFRvIII	肺癌	survivin	肿瘤
EGFRvIII	多形性胶质母细胞瘤	survivin	晚期肝细胞癌
EGFRvIII、EphA2、HER2、IL-13Rα2	胶质母细胞瘤	survivin	实体瘤
EGR1	肿瘤	survivin	去势抵抗性前列腺癌
EGR1	术后疼痛	survivin	前体 T 淋巴细胞白血病淋巴瘤
EHMT2	普拉德-威利综合征	survivin	前列腺癌
EIF2AK4	肿瘤	survivin	淋巴瘤
EIF2AK4	免疫系统疾病	survivin	局部晚期非小细胞肺癌
EIF4E	肿瘤	survivin	胶质母细胞瘤
EIF4E	晚期癌症	survivin	急性髓性白血病
EIF4E	去势抵抗性前列腺癌	survivin	急性淋巴细胞白血病
EIF4E	前列腺癌	survivin	肝细胞癌

EIF4E	非小细胞肺癌	survivin	复发性成人急性淋巴细胞白血病
ELA2	肿瘤	survivin	非小细胞肺癌
ELA2	杜氏肌营养不良症	SYF2	肌萎缩侧索硬化
elastin	皮肤疾病	SYF2	额颞痴呆
ELAVL1	胰腺癌	Syk	炎症
ELAVL1	卵巢癌	Syk	哮喘
ELF3	结核	SYT11	胃癌
ELOVL2	干性年龄相关性黄斑病变	SYT11	结直肠癌
ELP1、splicing factor	家族性自主神经功能异常	SYT11	肺癌
EMR1	白血病	TAG-72	卵巢癌
ENaC	囊性纤维化	TAG-72	铂耐药上皮性卵巢癌
enkephalinase	B 细胞白血病	TAG-72	T 细胞淋巴瘤
eNOS	心肌梗塞	TAU	轻度认知障碍
eNOS	外周血管疾病	TAU	皮克病性痴呆
eNOS	肺性高血压	TAU	进行性核上性麻痹
cnv	慢性乙型肝炎	TAU	阿尔茨海默病引起的痴呆症
EpCAM	消化系统肿瘤	TAU	阿尔茨海默病
EpCAM	胃癌	TAU、 α -synuclein	神经系统变性病
EpCAM	晚期胃癌	TBX21	银屑病
EpCAM	实体瘤	TBX21	慢性阻塞性肺疾病
EpCAM	肝癌	TBXA2R	肿瘤
EphA2	胰腺癌	TBXA2R	心血管疾病
EphA2	实体瘤	TCF7L2	肿瘤
EphA2	卵巢癌	TCR	B 细胞淋巴瘤
EphA2	淋巴瘤	TCR、VCAM1	神经母细胞瘤
EphA2	局部晚期恶性实体瘤	TDP43	肌萎缩侧索硬化
EphA2	胶质母细胞瘤	TDP43	额颞痴呆
EphA2	胶质瘤	TECPR2	痉挛性截瘫
EphA2	肺癌	Telomerase	胃食管交界处腺癌
EphA2、IL-13R α 2	EGFR 突变胶质母细胞瘤	Telomerase	胃癌
EphA3	实体瘤	Telomerase	围手术期缺血
EPO receptor	终末期肾脏病	Telomerase	食管癌
EPO receptor	肾性贫血	Telomerase	胶质母细胞瘤
EPO receptor	神经系统变性病	Telomerase	黑色素瘤

EPO receptor	青光眼	Telomerase	肝癌
EPO receptor	贫血	Telomerase	非小细胞肺癌
EPO receptor	帕金森病	TERC	中性粒细胞减少
ERVE-1	肾肿瘤	TERC	幼年型骨髓单核细胞白血病
ERα	肿瘤	TERC	输血依赖性贫血
E-sel	血栓闭塞性血管炎	TERC	急性髓性白血病
E-sel	血管疾病	TERC	骨髓增生异常综合征
E-sel	外周动脉疾病	TERC	骨髓纤维化
EWS-FLI1	尤文肉瘤	TERT	晚期非小细胞肺癌
EZH2	实体瘤	TERT	头颈部肿瘤
F10	血友病 A	TERT	胶质母细胞瘤
F10、F8	血友病 A	TERT	黑色素瘤
F11	终末期肾脏病	TERT	肝细胞癌
F11	血栓栓塞	TERT	非小细胞肺癌
F11	心血管疾病	TERT、c-Myc	肿瘤
F11	心肌梗塞	TERT、αvβ3、αvβ5	肿瘤
F11	上肢深静脉血栓形成	TERT、αvβ5	肿瘤
F11	凝血障碍	TFDP3	肿瘤
F11	脑卒中	TFPI	血友病 B
F11	静脉血栓形成	TFPI	血友病 A
F11	动脉血栓形成	TFPI	血友病
F11R	雄激素脱发	TfR1	神经肌肉疾病
F12	血栓栓塞	TfR1	杜氏肌营养不良症
F12	心血管疾病	TG	脑转移瘤
F12	代谢性疾病	TGFBI	遗传性角膜营养不良
F8	血友病 A	TGFR2	肿瘤
F8	抗中性粒细胞胞浆抗体相关性血管炎	TGFR2	肺纤维化
F8	X 连锁遗传病	TGF-β	心脏衰竭
F8、factor IX	血友病 B	TGF-β	胃癌
F8、factor IX	血友病 A	TGF-β	实体瘤
factor IX	血友病 B	TGF-β	软组织瘤
factor IX	静脉血栓形成	TGF-β	复发性浆细胞骨髓瘤
factor IX	急性冠状动脉综合征	TGF-β	多发性骨髓瘤
factor IX	急性冠状动脉综合征	TGF-β	传染性单核细胞增多症
factor IX	冠心病	TGF-β	鼻咽癌
factor IX	非酒精性脂肪性肝炎	TGF-β	C 型尼曼匹克病

factor VII	血栓形成	TGF-β1	新型冠状病毒感染
factor VII	凝血因子VII缺乏症	TGF-β1	特发性肺纤维化
FANCA	酪氨酸血症	TGF-β1	角膜疾病
FANCA	范可尼贫血	TGF-β1	基底细胞癌
FANCC	范可尼贫血	TGF-β1	骨关节炎
FAP	肿瘤	TGF-β1	肝癌
FAP、PDL1	实体瘤	TGF-β1、VEGFR2	肿瘤
FasL	肉瘤	TGF-β1、α-Klotho	关节疾病
FasL	淋巴瘤	TGF-β2	转移性实体瘤
FasL	恶性上皮肿瘤	TGF-β2	转移性非小细胞肺癌
FASN、MSLN	输卵管癌	TGF-β2	肿瘤
FASN、MSLN	卵巢癌	TGF-β2	支气管癌
FASN、MSLN	腹膜癌	TGF-β2	胰腺癌
FasR	肝炎	TGF-β2	晚期非小细胞肺癌
FasR	肝功能衰竭	TGF-β2	糖尿病性黄斑水肿
FasR、TNFR1	转移性结直肠癌	TGF-β2	实体瘤
FasR、TNFR1	结直肠癌肝转移	TGF-β2	湿性黄斑变性
FasR、TNFR1	复发性铂耐药性卵巢癌	TGF-β2	肾细胞癌
FasR、TNFR1	多形性胶质母细胞瘤	TGF-β2	弥漫性中线胶质瘤
FGF19	非酒精性脂肪性肝炎	TGF-β2	弥漫内生性脑桥神经胶质瘤
FGF21	心脏衰竭	TGF-β2	胶质母细胞瘤
FGF21	心肌疾病	TGF-β2	胶质瘤
FGF21	家族局部性脂质营养不良	TGF-β2	黑色素瘤
FGF21	肥胖	TGF-β2	非小细胞肺癌
FGF21	代谢相关脂肪性肝病	TGF-β2	恶性胸膜间皮瘤
FGF21、FGF21R	非酒精性脂肪性肝炎	TGM1	常染色体隐性鱼鳞病
FGF21、TGF-β1	心脏病	TGM2	肿瘤
FGF21、TGF-β1	衰老	TGM2	免疫系统疾病
FGF21、TGF-β1	肾脏疾病	THBS1	胰腺癌
FGF21、TGF-β1	代谢性疾病	THBS1	肺癌
FGF4	稳定型心绞痛	THPO	血小板减少症
FGF4	难治性心绞痛	thrombin	血栓形成

FGF4	冠心病	thrombin	心脏病
FGFR3	软骨发育不良	thymidine kinase	肿瘤
FGFR4	横纹肌肉瘤	thymidine kinase	移植物抗宿主病
FGFR4	肝细胞癌	thymidine kinase	胰腺腺癌
FGFR4	肥胖	thymidine kinase	血液肿瘤
FGFRs	脱发	thymidine kinase	胃癌
FGFRs	多发性硬化症	thymidine kinase	输卵管癌
FGL1	肿瘤	thymidine kinase	卵巢癌
FKRP	肢带型肌营养不良	thymidine kinase	局限性前列腺癌
FKRP	三好氏肌肉病变	thymidine kinase	结直肠癌
FLAP	变应性结膜炎	thymidine kinase	胶质瘤
FLT3	难治性急性髓细胞白血病	thymidine kinase	黑色素瘤
FLT3	急性髓性白血病	thymidine kinase	肝癌
FLT3	复发性急性髓细胞白血病	thymidine kinase	铂敏感性原发性腹膜癌
FLT3	白血病	thymidine kinase	白血病
FLT3	FLT3 阳性急性髓性白血病	Tic-2	糖尿病性视网膜病变
FMRP	脆性 X 综合征	TIGIT	肿瘤
FOLR1	粘液性囊腺癌	TLR	肝细胞癌
FOLR1	原发性腹膜浆液性腺癌	TLR2	帕金森病
FOLR1	未分化卵巢癌	TLR3	乳腺癌
FOLR1	晚期恶性实体瘤	TLR3	免疫系统疾病
FOLR1	输卵管透明细胞腺癌	TLR3	卵巢癌
FOLR1	输卵管癌	TLR4	脑卒中
FOLR1	肾细胞癌	TLR4	淋巴管畸形
FOLR1	尿路上皮癌	TLR4	感染

FOLR1	尿路上皮癌	TLR4	非肌层浸润性膀胱肿瘤
FOLR1	黏液瘤	TLR7	特发性肺纤维化
FOLR1	卵巢子宫内膜样癌	TLR7	非小细胞肺癌
FOLR1	卵巢上皮癌	TLR7、 TLR8	肿瘤
FOLR1	卵巢上皮癌	TLR7、 TLR8	感染
FOLR1	卵巢混合上皮癌	TLR7、 TLR8、 TLR9	银屑病
FOLR1	卵巢癌	TLR7、 TLR8、 TLR9	皮炎
FOLR1	浆液性囊腺癌	TLR7、 TLR8、 TLR9	难治性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
FOLR1	骨肉瘤	TLR7、 TLR8、 TLR9	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
FOLR1	腹膜癌	TLR7、 TLR8、 TLR9	巨球蛋白血症
FOLR1	腹膜癌	TLR7、 TLR8、 TLR9	肌营养不良
FOLR1	复发性原发性腹膜癌	TLR7、 TLR8、 TLR9	华氏巨球蛋白血症难治
FOLR1	复发性卵巢癌	TLR7、 TLR8、 TLR9	复发性弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
FOLR1	非小细胞肺癌	TLR7、 TLR8、 TLR9	斑块状银屑病
FOXG1	神经系统疾病	TLR7、 TLR9	肿瘤
FOXO1	实体瘤	TLR7、 TLR9	炎症性肠病

FSHR	卵巢癌	TLR7、 TLR9	系统性红斑狼疮
FtsZ	鲍氏不动杆菌感染	TLR7、 TLR9	类风湿关节炎
FUS	肌萎缩侧索硬化	TLR7、 TLR9	高脂血症
FUS	肌萎缩侧索硬化	TLR7、 TLR9	多发性硬化症
FXN	Friedreich 共济失调	TLR7、 TLR9	斑块状银屑病
G6PC1	糖原贮积病	TLR9	自身免疫性肝炎
G6PC1	I 型糖原贮积病	TLR9	转移性头颈部鳞状细胞癌
GABA receptor	颞叶癫痫	TLR9	转移性乳腺癌
GABA receptor	耐药性癫痫	TLR9	转移性黑色素瘤
GABA receptor	癫痫	TLR9	转移性非小细胞肺癌
GAD	帕金森病	TLR9	重症肌无力
GAD2、 GDNF、IL-10	坐骨神经痛	TLR9	原发性恶性肝肿瘤
GAD2、 GDNF、IL-10	腰骶神经根病变	TLR9	银屑病
GAD2、 GDNF、IL-10	神经痛	TLR9	胰腺导管腺癌
GAG	黏多糖贮积症 II 型	TLR9	胰腺癌
GAG	HIV 感染	TLR9	蕈样真菌病
GALC	球样细胞脑白质营养不良	TLR9	哮喘
galectin-3	骨肉瘤	TLR9	小淋巴细胞淋巴瘤
GALGT2	杜氏肌营养不良症	TLR9	晚期胰腺导管腺癌
GALT	半乳糖血症	TLR9	晚期肺非小细胞鳞癌
GATA3	哮喘	TLR9	晚期非小细胞肺癌
GATA3	慢性阻塞性肺疾病	TLR9	头颈部肿瘤
GATA3	溃疡性结肠炎	TLR9	头颈部鳞状细胞癌
GBA	帕金森病	TLR9	嗜酸性粒细胞性哮喘
GBA	戈谢病	TLR9	肾细胞癌
GBA	法布里病	TLR9	乳腺导管癌
GBA	II 型戈谢病	TLR9	乳腺癌
GBA、 Phosphotransfe rases	戈谢病	TLR9	葡萄膜黑色素瘤
GC-C	胰腺癌	TLR9	皮肤黑色素瘤

GC-C	结直肠癌	TLR9	皮肤 T 细胞淋巴瘤
GCDH	戊二酸血症	TLR9	难治性非霍奇金淋巴瘤
GCGR	2 型糖尿病	TLR9	难治恶性实体肿瘤
GCGR	2 型糖尿病	TLR9	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤
GD2	叶状瘤	TLR9	梅克尔细胞癌
GD2	小细胞肺癌	TLR9	慢性阻塞性肺疾病
GD2	室管膜瘤	TLR9	慢性淋巴细胞白血病
GD2	神经母细胞瘤	TLR9	慢性丙型肝炎基因型 1
GD2	肉瘤	TLR9	滤泡性淋巴瘤
GD2	葡萄膜黑色素瘤	TLR9	流感病毒感染
GD2	脑癌	TLR9	鳞状细胞癌
GD2	难治性神经母细胞瘤	TLR9	溃疡性结肠炎
GD2	弥漫内生性脑桥神经胶质瘤	TLR9	巨球蛋白血症
GD2	胶质瘤	TLR9	局部晚期胰腺腺癌
GD2	横纹肌肉瘤	TLR9	局部晚期乳腺癌
GD2	黑色素瘤	TLR9	结直肠癌肝转移
GD2	骨肉瘤	TLR9	结直肠癌
GD2	高级别胶质瘤	TLR9	结膜肿瘤
GD2	复发性尤文肉瘤	TLR9	肝细胞癌
GD2	复发性神经母细胞瘤	TLR9	肝内胆管癌
GD2	复发性骨肉瘤	TLR9	复发性套细胞淋巴瘤
GD2	多形性胶质母细胞瘤	TLR9	复发性边缘区淋巴瘤
GD2	II 型戈谢病	TLR9	复发性 3a 级滤泡性淋巴瘤
GD2、IL15R	小细胞肺癌	TLR9	非小细胞肺癌
GD2、IL15R	非小细胞肺癌	TLR9	非酒精性脂肪性肝炎
GDNF	帕金森病	TLR9	惰性 B 细胞非霍奇金淋巴瘤
GDNF	肌萎缩侧索硬化	TLR9	多发性硬化症
GFAP	亚历山大病	TLR9	丙型肝炎
GFRA4	甲状腺髓样癌	TLR9	T 细胞淋巴瘤
GHR	肢端肥大症	TLR9	EGFR 阳性非小细胞肺癌
GHR	肢端肥大症	TLR9	CD20 阳性非霍奇金淋巴瘤
GHRH	贫血	TM4SF1	消化系统肿瘤
GHRH	恶病质	TMC1	听力损失
GITRL	胶质瘤	TMPRSS6	真性红细胞增多症
GJA1	心律失常	TMPRSS6	高危骨髓增生异常综合征
GJA1	心肌疾病	TMPRSS6	地中海贫血
GJA1	糖尿病足	TNF	银屑病
GJA1	角膜损伤	TNF	肾细胞癌
GJB2	听力损失	TNF	前列腺癌

GLA	法布里病	TNF	脑瘤
GLA	II 型糖原贮积病	TNF	亨廷顿舞蹈病
GLA	Chagas 心肌病	TNF	黑色素瘤
GlcCcr	神经系统变性病	TNF	阿尔茨海默病
GlcCcr	戈谢病	TNF- α	肿瘤
GlcCcr	I 型戈谢病	TNF- α	直肠癌
GLI2	肿瘤	TNF- α	银屑病
GLI2	前列腺癌	TNF- α	胰腺癌
GLIPRI	前列腺癌	TNF- α	炎症
Globo H	胃癌	TNF- α	牙周疾病
GLP-1R	体重下降	TNF- α	视网膜色素变性
GLP-1R	肥胖	TNF- α	食管癌
GLP-1R	2 型糖尿病	TNF- α	肉瘤
glucokinase	2 型糖尿病	TNF- α	前列腺癌
glucokinase、 insulin	糖尿病	TNF- α	类风湿关节炎
GluK2、Kainic acid receptor	颞叶癫痫	TNF- α	克罗恩病
GluK2、Kainic acid receptor	癫痫	TNF- α	局部晚期前列腺癌
Glycogen	II 型糖原贮积病	TNF- α	结直肠癌
GM2(ganglioside de M2)	实体瘤	TNF- α	黑色素瘤
GM-CSF	膀胱癌	TNF- α	黑色素瘤
GM-CSF、 decorin	结直肠癌	TNF- α	骨肉瘤
GM-CSF、 IFN α 2、IL- 12、IL-15	晚期恶性实体瘤	TNSALP	低碱性磷酸酶血症
GM-CSF、 IFN α 2、IL- 12、IL-15	实体瘤	TOP1	肿瘤
GM-CSF、 IFN α 2、IL- 12、IL-15	黑色素瘤	TP63	结直肠癌
GM-CSF、 RYBP	肿瘤	TPP1	神经元蜡样脂褐质沉积症
GNE	远端性肌病	TPP1	神经元蜡样脂褐质沉积症 2
GNE	遗传性包涵体肌病	TRAIL	转移性非鳞状非小细胞肺癌

GOPC	肿瘤	TRAIL	胰腺癌
GOX	原发性高草酸尿症 1 型	TRAIL	肝细胞癌
GOX	原发性高草酸尿症	TRAIL	肺腺癌
GOX	肾石病	TRBC1	免疫母细胞性淋巴瘤
gp100	黑色素瘤	TRBC1	复发性 T 细胞淋巴瘤
GPC1	胰腺癌	TRBC1	TRBC1 阳性 T 细胞淋巴瘤
GPC2	小细胞肺癌	TRBC2	外周 T 细胞淋巴瘤
GPC2	神经母细胞瘤	TRKA	疼痛
GPC2	难治性神经母细胞瘤	Trop-2	乳腺癌
GPC2	高风险神经母细胞瘤	Trop-2	结肠癌
GPC2	复发性神经母细胞瘤	Trop-2	肺癌
GPC2	膀胱癌	Trop-2	恶性上皮肿瘤
GPC3	卵巢癌	TRPV1	眼睛疼痛
GPC3	鳞状细胞肺癌	TRPV1	干眼综合征
GPC3	肝细胞癌	TRPV1	复杂性局部疼痛综合征
GPC3	肺癌	Trypsin	囊性纤维化
GPC3	胆管上皮癌	Trypsin	慢性阻塞性肺疾病
GPC3、IL-15	实体瘤	Trypsin	呼吸道合胞体病毒感染
GPC3、IL-15	肝细胞癌	Trypsin	肺气肿
GPC3、IL15R	肝癌	Trypsin	α 1-抗胰蛋白酶缺乏症
GPC3、IL-2R β	实体瘤	TSHR	甲状腺癌
GPC3、NKp46	肝细胞癌	TSLPR	B 细胞白血病
GPCR	视网膜色素变性	TTK	角膜疾病
GPCR、 β -adrenoceptors	新型冠状病毒感染	TTR	转甲状腺素运载蛋白淀粉样变性
GPCR、 β -adrenoceptors	心脏衰竭	TTR	转甲状腺素蛋白心脏淀粉样变
GPCR、 β -adrenoceptors	慢性疲劳综合征	TTR	转甲状腺素蛋白相关家族性淀粉样多神经病变
GPCR、 β -adrenoceptors	扩张型心肌病	TTR	造血干细胞移植
GPRC5D	浆细胞骨髓瘤难治	TTR	斯塔加特病
GPRC5D	浆细胞白血病	TTR	老年性心脏淀粉样变性
GPRC5D	浆细胞白血病	TTR	甲状腺素运载蛋白淀粉样变心肌病
GPRC5D	复发性多发性骨髓瘤	TTR	家族性淀粉样神经病
GPRC5D	多发性骨髓瘤	TTR	多发性神经病

GPVI	血管疾病	TTR	淀粉样变性
GR	库欣综合征	TUBB4A	6 型髓鞘减少脑白质营养不良
GR	代谢性疾病	TUSC2	乳腺癌
GR	2 型糖尿病	TUSC2	肺癌
GRB2	子宫内膜癌	TUSC2	非小细胞肺癌
GRB2	输卵管癌	TYK2	自身免疫性疾病
GRB2	卵巢上皮癌	TYK2	新型冠状病毒感染
GRB2	腹膜癌	TYMP	线粒体脑肌病
GRB2	复发性实体肿瘤	TYMS	胰腺癌
GSTP1	胰腺癌	TYMS	胃癌
GSTP1	结直肠癌	TYMS	前列腺癌
GSTP1	非小细胞肺癌	TYMS	卵巢癌
GSTP1	KRAS 突变非小细胞肺癌	TYMS	胶质母细胞瘤
GTPCH1	免疫系统疾病	TYMS	骨癌
GUCY2D	莱伯先天性黑蒙症 1 型	TYR	色素沉着过多
GUCY2D	莱伯先天性黑蒙	TYR	黑色素瘤
GYS1	糖原贮积病Ⅲ型	UBE3A	天使综合征
GYS1	Lafora 病	UCN2	心脏衰竭
GYS1	Ⅱ型糖原贮积病	UCN2	腹型肥胖及代谢综合征
GYS1	Ⅱ型糖原贮积病	UCN2	肥胖
H1 receptor、 Opioid receptors	上呼吸道过敏	UCN2	非酒精性脂肪性肝炎
H1 receptor、 Opioid receptors	普通感冒	UCN2	2 型糖尿病
H1 receptor、 Opioid receptors	咳嗽	UGT1A1	非酒精性脂肪性肝炎
HAAH	血液肿瘤	UGT1A1	Crigler-Najjar 综合征
HAAH	实体瘤	ULBP1	血液肿瘤
HAAH	胶质母细胞瘤	ULBP1	晚期恶性实体瘤
harmonin	Usher 综合征	ULBP1	晚期病症
HBA1	β 地中海贫血	ULBP1	难治性癌症
HBG1	镰状细胞血症	UNC13A	肌萎缩侧索硬化
HBG1	β 地中海贫血	UNC13A	额颞痴呆
HBG1、HBG2	镰状细胞血症	UPF1	肌萎缩侧索硬化
HBG1、HBG2	β 地中海贫血	USH2A	Usher 综合征
HBG2	镰状细胞血症	UTRN	杜氏肌营养不良症

HBG2	β 地中海贫血	VAMP1+VAMP2	鼻咽肿瘤
HBsAg	乙型肝炎病毒相关肝细胞癌	VCAM1	炎症性肠病
HBsAg	乙型肝炎	VDR	多发性硬化症
HBsAg	糖尿病足	VEGF	糖尿病性视网膜病变
HBsAg	肝细胞癌	VEGF	湿性年龄相关性黄斑变性
HBsAg	丁型肝炎	VEGF	黄斑变性
HBV pol	乙型肝炎	VEGF-A	心肌缺血
HBV RNA	乙型肝炎	VEGF-A	外周动脉疾病
HBV-X	乙型肝炎	VEGF-A	糖尿病性黄斑水肿
HBV-X	慢性乙型肝炎	VEGF-A	视网膜静脉阻塞
HBV-X	丁型肝炎	VEGF-A	湿性年龄相关性黄斑变性
HBX	乙型肝炎	VEGF-A	乳腺癌
HCCS1	肝细胞癌	VEGF-A	结直肠癌
HDAC6	肿瘤	VEGF-A	黄斑变性
HDGFL3	肿瘤	VEGF-A	肝癌
hemagglutinin	C2 型尼曼匹克症	VEGF-A	恶性腹水
Hemoglobin HbA	α 地中海贫血	VEGF-A、VEGFR	心绞痛
Hemoglobins	输血依赖性 β 地中海贫血	VEGF-A、VEGFR	缺血
Hemoglobins	镰状细胞血症	VEGF-A、VEGFR	冠心病
Hemoglobins	地中海贫血	VEGF-C	淋巴水肿
Hemoglobins、KLKB1、TTR	镰状细胞血症	VEGF-D	外周血管疾病
Hemoglobins、KLKB1、TTR	β 地中海贫血	VEGFR	肿瘤
Hepc	肿瘤	VEGFR	头颈部鳞状细胞癌
Hepc	终末期肾脏病	VEGFR	视网膜疾患
Hepc	炎症	VEGFR	黄斑变性
Hepc	贫血	VEGFR	鼻咽癌
Hepc	内毒素血症	VEGFR1	先兆子痫
Hepc	慢性病	VEGFR1	年龄相关性黄斑变性
Hepc	伴随慢性肾病的贫血	VEGFR1	脉络膜新生血管
Hepc、IL-10、TGF-β	肾脏疾病	VEGFR1	黄斑变性

HER2	子宫内膜癌	VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3	间皮瘤
HER2	子宫内膜癌	VEGFR2	肿瘤
HER2	肿瘤转移	VEGFR2	湿性年龄相关性黄斑变性
HER2	肿瘤	VEGFR2	肝细胞癌
HER2	肿瘤	Viral proteins	乙型肝炎
HER2	胰腺癌	Viral proteins	慢性乙型肝炎
HER2	炎症性乳腺肿瘤	Viral proteins	马尔堡病毒病
HER2	小细胞肺癌	VP24	马尔堡病毒病
HER2	胃食管交界处癌	VP24、Viral RNA	埃博拉病毒性疾病
HER2	胃癌	VP35、Viral RNA	埃博拉病毒性疾病
HER2	头颈部肿瘤	VSTM1	肿瘤
HER2	乳腺癌	vWF	血友病 A
HER2	前列腺癌	vWF	血栓性血小板减少性紫癜
HER2	尿路上皮癌	vWF	血栓性微血管病
HER2	脑转移瘤	vWF	血栓形成
HER2	卵巢上皮癌	vWF	溶血性尿毒症综合征
HER2	卵巢癌	vWF	颅内栓塞
HER2	鳞状细胞癌	vWF	颈动脉狭窄
HER2	结直肠癌	vWF	急性缺血性卒中
HER2	胶质瘤	vWF	获得性血栓性血小板减少性紫癜
HER2	间皮瘤	vWF	冠状动脉血栓形成
HER2	化疗引起的恶心和呕吐	vWF	冯·维勒布兰德病
HER2	骨肉瘤	vWF	2 型血管性血友病
HER2	宫颈癌	WASp	心绞痛
HER2	肝细胞癌	WASp	Wiskott-Aldrich 综合征
HER2	肺癌	WT1	急性髓性白血病
HER2	肥胖	WT1	骨髓增生异常综合征
HER2	非小细胞肺癌	WT1	多发性骨髓瘤
HER2	导管癌	XIAP	胰腺癌
HER2	胆管肿瘤	XIAP	乳腺癌
HER2	膀胱癌	XIAP	慢性淋巴细胞白血病
HER2	HER2 阳性胃癌	XIAP	急性髓性白血病
HER2	HER2 阳性乳腺癌	XIAP	急性髓单核细胞白血病
HER2	2 型糖尿病	XIAP	肝细胞癌

HER2、HER3	三阴性乳腺癌	XIAP	非小细胞肺癌
HER2、HER3	脑膜肿瘤	XIAP	恶性上皮肿瘤
HER2、HER3	HER2 阳性乳腺癌	XIAP	多发性硬化症
HER2、HER3	HER2 阴性乳腺癌	XIAP	B 细胞淋巴瘤
HER2、IL-13R α 2	卵巢癌	XKR8	胰腺癌
HER2、IL15R	胃癌	XKR8	结肠癌
HER2、IL15R	乳腺癌	XLRS1	视网膜劈裂
HER2、NKG2D	实体瘤	XO	痛风
HER2、PD-1	实体瘤	YAP1	晚期恶性实体瘤
HER3	肿瘤	ZSCAN4	先天性角化不良
HER3	乳腺癌	ZSCAN4	全血细胞减少
HER3	结肠癌	ZSCAN4	骨髓衰竭疾病
HER3	肺癌	α -glucosidase	II 型糖原贮积病
hERG	心房颤动	α -Klotho	肌萎缩侧索硬化
HEXA、HEXB	泰-萨克斯病	α -synuclein	帕金森障碍
HEXA、HEXB	山德霍大病	α -synuclein	帕金森病
HEXA、HEXB	GM2 神经节苷脂贮积症	α -synuclein	多系统萎缩
HGF	自身免疫性疾病	α v β 3	乳腺癌
HGF	肿瘤	α v β 3	黑色素瘤
HGF	心肌缺血	α v β 6	肿瘤
HGF	下肢缺血	α v β 6	胰腺癌
HGF	外周动脉疾病	α v β 6	肌萎缩侧索硬化
HGF	糖尿病周围神经病变	β 2-adrenergic receptor	青光眼
HGF	糖尿病血管病变	β 2-adrenergic receptor	高血压症
HGF	糖尿病性神经病变	β -galactosidase	神经节苷脂病
HGF	糖尿病肾病	β -galactosidase	GM1 神经节苷脂贮积病
HGF	乳腺癌	β -珠蛋白	镰状细胞性贫血
HGF	缺血	β -珠蛋白	β 地中海贫血
HGF	慢性肢体威胁性缺血	氨苯喋啶敏感性钠通道	囊性纤维化

HGF	溃疡	氨苯喋啶敏感钠通道	慢性支气管炎
HGF	肌萎缩侧索硬化	胞间黏附分子	炎症
HGF	冠心病	病毒 RNA	假性高钾血症 Cardiff 型
HGF	1 型糖尿病	病毒 RNA	丙型肝炎
HIF-1 α	外周动脉疾病	病毒蛋白	梅克尔细胞癌
HIF-1 α	淋巴瘤	病毒蛋白	可切除 Merkel 细胞癌
HIF-1 α	肝细胞癌	胶原蛋白 I	跟腱炎
HIF-1 α	肝癌	免疫球蛋白轻链 κ	淋巴瘤
HIF-1 α	肝癌	免疫球蛋白轻链 κ	多发性骨髓瘤
HIF-1 α	恶性上皮肿瘤	免疫球蛋白轻链 κ	白血病
HIF-1 α 、转录因子及相关调节因子	肿瘤	内毒素 A	前列腺癌
HIF-2 α	肾细胞癌	凝血因子 VIII	血友病 A
HIF-2 α	神经母细胞瘤	人类内源性逆转录病毒元件	实体瘤
Histone H3	组蛋白 H3 中 K27M 点突变的弥漫性中线胶质瘤	生长因子受体	神经系统变性病
HIV envelope protein gp120	获得性免疫缺陷综合征	细胞黏附分子	炎症
HIV gag	获得性免疫缺陷综合征	细胞黏附分子	脓毒性休克
HIV gag	HIV 感染	新冠病毒抗原	新型冠状病毒感染
HIV-1 integrase	获得性免疫缺陷综合征	叶酸受体	肿瘤
HIV-1 integrase	HIV 感染	载脂蛋白	阿尔茨海默病
HIV-1 pol	机会致病菌感染	肿瘤抗原 MG7	肝癌
HIV-1 pol	获得性免疫缺陷综合征	转化生长因子 β 受体	肿瘤

HIV-1 pol	丙型肝炎	转录因子及 相关调节因 子	Larsen 综合征
HIV-1 tat	HIV 感染	转录因子及 相关调节因 子	Fuchs 内皮角膜营养不良 3
HIV 核糖核酸 酶 H	HIV 感染	转录因子及 相关调节因 子、c-Jun	肿瘤
HJV、Hepc	贫血		

- [0525] 实施例
- [0526] 下面通过实施例的方式进一步说明本披露，但并不因此将本披露限制在所述的实施例范围之内。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。
- [0527] 实验例1：C12-279蛋白的筛选
- [0528] 如图1A和图1B所示，通过复杂的生物信息学方法进行筛选、分析、设计，最终得到Cas12i蛋白C12-279。
- [0529] C12-279蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:696)为：

IFVVLSVNQFRCNPNAFRQASMKTDDDEKKDTAISKSYTSWLLPNDRKEKDMVRSFLALDQGSREF
FDLMQAWYGGTLPDIKSVTKERDLVDLWCAIYWFRPMKKELASHPIDRVDLAKTFQRYYGGPASDV
VQEYLSASIGEDCCWNDRCRQKYQEFCKNLGVDFTPDLKTLVREKLIIVALNDGSQAAISNLFNGGK
EDRNVKVNICKKILIALEKAGKSVKYVRDVQSIILKCANAKDREDFNRIYADKNGRPGTLLLLLDRKG
ENTYDAEVLKRYLRKTIKSKNAPLVWNYNQKLFEYIERGIRNLLRRTINYDAWAWGEMWRVGHPTPLQ
TKATRNYHFAQEQLKRHSDIAAASQSSHAIAVALNEFFESPFFDGENPFTICPHHLGKNLEKLFKAWAD
EKNQTDEEDAGETAITDYCAEFKDGFDREPIRNLLRYVYASLRSKYSAKELIQAAYNQQFERYQRQK
AHPVTPDNQGYTWPEAVIKPSKAERKNRENSLDTRIWVSVKLLQKDGTTWEKHHPFYNLRFFEEVYA
AASIAEDMPSPTRNSRFGFKLPKLLNTHAKINKKKKDGKKDKKAVNAAKREARIYLAKEGRLPAPS
VPLDKLSAVIARVNGKFQVTPVKFKVKNQPKYPLPQLGQIILGYDQNLTAHAWALFEVVTEDTPGA
HFCRNQYLRVLKTGQVRSITKTKDGQEIDQLSYDGLLEYKEYGEWRKQAKKFASQWYITTKVRKGKE
TTLSQPALERFESIEKYKPALYRFNKEYARLLLAVIRRKTLNELEEIRPEIFRLVEQFGICRFGSLSLSSF
EAIRAAKAVIYGYFSTALKHDHNTPTDDERQAFDPELFGLLNKLETLRQNKGEEKINRAANALIRIAL
ENKADFIRGEGDLPTTNKSVKKGQNSRSMDWLARGLFNKICQLAVMHNIPTAANPHSTSHQDPFEHN
KDFDDPQPAMKCRYAEFKIEDIGDSVLERLGTSLRNAKAGQTGAYYYKGAQDFLAHYGLQDIEEELK
KCRRGKCANMPCWELQKRLIQKLGSKDAVVYIPMRGGRIYLATHSVTTGAKPIIFNGEEVWVSNADI
AAVNIGLTIPTSKKDEEHPDRENDKAIKRSVRRPRKSGERRSGDKMPATARKT (SEQ ID NO: 696)。

细则 91,
03.01.2025

- [0530] 推测的C12-279蛋白的结构如图24所示。

- [0531] 实验例2: C12-279蛋白的制备与纯化
- [0532] 1.载体构建
- [0533] pET28a载体质粒经BamHI和XhoI双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳切胶回收线性化的载体。以制备得到的pXC12-279-GFP-PAM-DR5质粒(SEQ ID NO:697)为模板, 使用引物ChkCas-pET28-PF1(SEQ ID NO:699)以及ChkCas-pET28-PR1(SEQ ID NO:700)通过PCR扩增获得含C12-279蛋白的编码序列的DNA片段, 利用同源重组的方式(NEB, Gibson Assembly® Master Mix)插入到载体pET28a的克隆区, 构建重组载体C12-279-pET28a-01(SEQ ID NO:698)。反应液转化Stbl3感受态, 涂布含硫酸卡那霉素的LB平板, 37℃过夜培养后, 挑取克隆测序鉴定。
- [0534] 挑取序列正确的阳性克隆过夜培养, 提取质粒后转化表达菌株Rosetta(DE3), 涂布含硫酸卡那霉素的LB平板, 37℃过夜培养。
- [0535] 2.蛋白表达
- [0536] 挑取单克隆接种至5mL含硫酸卡那霉素的LB培养液, 37℃过夜培养。
- [0537] 以1:100比例转接种500mL含硫酸卡那霉素的LB培养液中, 以220rpm的转速, 37℃培养至OD 0.6, 加IPTG至终浓度0.2mM, 16℃诱导24h。
- [0538] 15ml PBS漂洗, 离心收集菌体, 加裂解缓冲液超声破碎, 10000g离心30min获得含重组蛋白的上清液, 上清经过0.45 μm滤膜过滤后即可上柱纯化。
- [0539] 3.蛋白纯化
- [0540] 表达的重组蛋白氨基酸数目1240aa, 结构为His tag-NLS-C12-279-SV40 NLS-nucleoplasmin NLS。以N端的6个His作为纯化标签, 通过IMAC(Ni Sepharose 6 Fast Flow, Cytiva)纯化, 再通过肝素亲和(POROS™ 肝素50 μm色谱柱, Thermo Scientific™)纯化得到C12-279重组蛋白。纯化的重组蛋白经过SDS-PAGE电泳检测, 结果如图2所示。
- [0541] 实验例3: C12-279蛋白体外切割PAM文库, 抓取PAM
- [0542] 本实验例中, 将包含有特异指导序列的sgRNA以及如实验例2所述方法制备纯化得到的C12-279重组蛋白混合, 对体外切割底物(包含间隔序列和7nt随机序列)进行切割(如图3所示), 37℃孵育后纯化, 建库, 进行NGS测序、分析确定C12-279的PAM序列。具体步骤如下:

[0543] A.体外切割底物

[0544] 设计的体外切割底物序列如下：

ggagttcagacgtgtgctcttccgatctcagcacaaaaggaaacacccctaactgtaaagtaattgtgtgtttgagactataaatatgcagcgagaaaag
cctgtttgccaccatGGAACGGCTCGGAGATCATTCATTGCGNNNNNNgtgagcaaggcgaggagctgttcaccgggtgtgt
gcccatacctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcagatcggaagagcacacgtctgaactcc (SEQ ID NO:
701)。

[0545] 序列中N代表A、T、C、G任意一种。

[0546] 使用PCR扩增方法制备得到含上述序列的双链DNA，作为体外切割底物。

[0547] 取切割底物至测序公司进行PCR-Free文库构建及NGS测序，针对7nt随机序列组成的PAM库进行复杂度和丰度的分析，结果如下：

[0548] A、T、G、C 4种碱基组成基本一致；同时7nt随机序列组成的PAM库包含不同组合数为 $4^7=16384$ 种，100%被检测到。PAM库复杂度和丰度合格。

[0549] B.sgRNA的制备

[0550] 在含有T7 RNA转录酶、四种三磷酸核糖核苷酸以及带T7启动子的DNA模板体系中37℃体外转录合成包含特异指导序列的sgRNA(C12-279-sgRNA)，转录产物用LiCl进行沉淀、纯化。sgRNA序列如下：

[0551] >C12-279-sgRNA

5'-gtaatgcgtctccattgacgcGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC-3' (SEQ ID NO: 702)。

[0552] >C12-279-sgRNA-Rev

5'-gtaatgcgtctccattgacgcCGCAATGATGATCTCCGAGCCGTTCC-3' (SEQ ID NO: 703)。

[0553] sgRNA骨架序列(同向重复序列，DR序列)为：5'-gtaatgcgtctccattgacgc-3' (SEQ ID NO:704)。

[0554] 大写碱基即为sgRNA的指导序列。

[0555] C.NGS建库及PAM分析

[0556] 1)PAM库切割以及T4 DNA Polymerase处理

[0557] 分别配制包含C12-279蛋白、2个不同sgRNA、体外切割底物和缓冲液的反应体系(如表1所示)，37℃反应3h，75℃ 15min)。

[0558] 表1.体外切割反应的反应体系

组分	添加量(μL)
10xCut Buffer(500 mM Tris-HCl PH8.0, 2M NaCl, 100mM MgCl ₂ , 10 mM DTT)	5
切割底物(59.5 ng/μL)	36.5
C12-279-sgRNA 或 C12-279-sgRNA-Rev	2.8 μg
C12-279 蛋白(10mg/mL)	0.5

- [0559] 2)T4 DNA Polymerase处理、将切割产物补平
- [0560] 向完成切割的产物中添加T4 DNA Polymerase(Thermo Scientific)，具体反应体系如表2所示，完成添加后37℃反应20min，85℃ 10min。
- [0561] 表2.C12-279切割产物补平的反应体系

组分	添加量(μL)
C12-279 切割产物	50
5xT4 DNA Polymerase Buffer	13
T4 DNA Polymerase	1
dNTP(10mM)	0.65
ddH ₂ O	0.35

- [0562] 3)3’末端加A以及添加生物素标记接头
- [0563] a.向T4 DNA Polymerase反应产物中添加78ul SPRISelect Beads(Beckman COULTER)混匀，室温放置5min，将产物移至磁力架吸附5min,移取上清至新的1.5mL管；再添加39 μ L SPRISelect Beads(Beckman COULTER)混匀，室温放置5min，将产物移至磁力架吸附5min，弃去上清，利用85 %乙醇洗涤2次，室温放置10min风干，添加50ul ddH₂O洗脱。
- [0564] b.利用SynplSeq DNA Library Prep Kit for Illumina建库Kit按照表3体系对a中产物进行3’加A，37℃ 10min，65℃ 20min，4℃备用。
- [0565] 表3.C12-279切割产物3’加A

组分	添加量(μL)
C12-279 不同 sgRNA 切割产物	49
Enhancer	1.5
End Prep Mix	6

End Prep Buffer 1	3
ddH ₂ O	0.5
Total	60

[0566] c.按照表4体系添加Adapter 1(由上游引物：5’ Biosg/gttgacatgctggattgagacttcctacac
tctttccctacacgacgctcttcgac★t(SEQ ID NO:705)和下游引物： gatcggagagcgtcgtgtaggg
aaaga gtgtaggaagtctcaatccagcatgtcaac(SEQ ID NO:706)退火获得)等，20℃ 30min，16
℃过夜反应。反应产物利用SPRISelect Beads进行纯化。

[0567] 其中，Biosg为生物素修饰，“★”表示硫代。

[0568] 表4.添加Adapter 1的反应体系

组分	添加量(μL)
b 中反应产物	60
Adapter 1	2
DNA Ligase	1.2
3x Ligation Buffer 1	33
ddH ₂ O	3.8
Total	100

[0569] d.利用链霉亲和素标记的磁珠Dynabeads®M-280 Streptavidin(Invitrogen)对反应产
物进行纯化。

[0570] e.Recover PCR

[0571] 设计表5的引物，按照表6体系以及表7的反应程序利用Q5®Hot Start High-Fidelt
y 2x Master Mix(NEB)进行Recover PCR反应。

[0572] 表5.Recover PCR引物

引物 ID	序列
Recovery PCR Forward	ggagtcagacgtgtgctc(SEQ ID NO: 707)
Recovery PCR Reverse	gttgacatgctggattgagacttc(SEQ ID NO: 708)

[0573] 表6.Recover PCR反应体系

组分	添加量(μL)
链霉亲和素标记磁珠纯化产物	22.5
Recovery PCR Forward(10 uM)	2.5
Recovery PCR Reverse(10 uM)	2.5
Q5 Hot-Start 2x Master Mix	22.5
ddH ₂ O	Up to 50

[0574] 表7.Recover PCR反应程序

反应温度	时长	循环数
98 °C	2 min	1
98 °C	10 sec	12
61 °C	30 sec	
72 °C	2 min	
72 °C	2 min	1
4°C	∞	

[0575] f.Recover PCR产物移至磁力架，吸附5min，将上清移至新的1.5ml离心管，取3 μ L Recovery PCR产物，添加148.5 μ L ddH₂O稀释。

[0576] g.Index PCR

[0577] 选用表8的引物，按照表9体系以及表10的反应程序进行Index PCR。

[0578] 表8.Index PCR引物

引物	序列
IF501	aatgatacggcgaccaccgagatctacactatagcctacacttttcctacacgacg(SEQ ID NO:709)
IR701	caagcagaagacggcatacagatcgagtaatgtgactggagttcagacgtgtgctc(SEQ ID NO: 710)

[0579] 表9.Index PCR反应体系

组分	添加量(μL)
Recovery PCR 稀释产物	12
IF501(10 uM)	4
IR701(10 uM)	4
Q5 Hot-Start 2x Master Mix	20
Total	40

[0580] 表10.Index PCR反应程序

反应温度	时长	循环数
98 °C	2 min	1
98 °C	10 sec	12
60 °C	30 sec	
72 °C	2 min	
72 °C	2 min	1
4°C	∞	

- [0581] h.Index PCR产物添加0.7x SPRISelect Beads进行产物纯化，添加38ul ddH₂O进行洗脱，利用Qubit进行浓度测定后送NGS测序；
- [0582] i.对NGS结果进行分析：通过NGS测序，参考文献(A compact Cas9 ortholog from *Staphylococcus Auricularis*(SauriCas9)expands the DNA targeting scope.PLoS biology,2020,18(3),e3000686.)方法用WebLogo软件分析，得到如图4和图5所示的所抓取的基序。图4和图5都证明C12-279可识别序列为5’-TTN-3’的PAM。
- [0583] 实验例4：基于C12-279蛋白的细菌体内编辑活性，验证PAM
- [0584] 本实验例中，首先构建了一个含有7nt随机序列的质粒文库，然后构建了包含C12-279蛋白编码序列的细菌表达质粒。该表达质粒转化细菌制备好感受态后，将7nt随机序列质粒文库进行电转，如果7nt随机序列文库中的质粒能够被C12-279识别且靶向，则会被从文库中清除，相应细菌无法生长。如图6所示。
- [0585] 具体步骤如下：
- [0586] 1. 7nt随机序列质粒文库构建
- [0587] pLVX-EF1a-BSD载体质粒(SEQ ID NO:711)经EcoRV和XhoI双酶切后，琼脂糖凝胶电泳切胶回收线性化的载体。以制备得到的pCDH-CMV-EGFP-reporter 3-EF1-Puro质粒(SEQ ID NO:712)为模板，使用引物Puro-PF1(SEQ ID NO:714)以及Puro-PR1(SEQ ID NO:715)通过PCR扩增获得含Puro抗性基因的编码序列的DNA片段，利用同源重组的方式(NEB,Gibson Assembly® Master Mix)插入到酶切的pLVX-EF1a-BSD载体中，构建包含7NN随机序列的重组载体pLVX-7NN-Puro文库质粒(SEQ ID NO:713)。反应液转化Stbl3感受态，涂布含氨苄青霉素的LB平板，37°C过夜培养后，刮取所有的菌落，进行质粒提取。

- [0588] 2.C12-279蛋白的细菌表达质粒P15A-C12-279的构建, 以及含有该质粒的感受态细胞的制备
- [0589] a.C12-279蛋白细菌表达质粒构建
- [0590] P15A-Cas-NC03载体质粒(SEQ ID NO:716)经SalI酶切后, 琼脂糖凝胶电泳切胶回收线性化的载体。以制备得到的pXC12-279-GFP-PAM-DR5质粒(SEQ ID NO:697)为模板, 引物ChkNLS-PF1(SEQ ID NO:718)以及合成的C12-279-sgRNA片段(SEQ ID NO:717)通过PCR扩增获得编码C12-279蛋白的DNA片段以及表达sgRNA的融合片段, 利用同源重组的方式(NEB, Gibson Assembly® Master Mix)插入到酶切的P15A-Cas-NC03载体中, 构建得到重组载体P15A-C12-279(SEQ ID NO:719)。反应液转化Stbl3感受态, 涂布含氯霉素的LB平板, 37℃过夜培养后, 挑取单克隆测序验证。
- [0591] b.包含细菌表达质粒P15A-C12-279的感受态的制备
- [0592] 测序验证正确的P15A-C12-279质粒转化DH5a感受态(唯地生物, CAT#:DL1001), 挑取单克隆接种至含有氯霉素的LB培养基中, 37℃过夜培养。
- [0593] 按照如下步骤制备电转感受态:
- [0594] 培养菌液按照1:100比例接种至100mL新鲜的含有氯霉素的LB培养基中37℃ 220rpm进行放大培养;
- [0595] 培养至OD₆₀₀=0.5, 将菌液转移至50mL离心管, 冰上预冷30min;
- [0596] 4000rpm, 4℃离心10min, 收集细胞, 等体积预冷的灭菌水重悬;
- [0597] 重复上述步骤;
- [0598] 1/10体积包含10%甘油的预冷灭菌水重悬细胞, 按照50uL/管进行分装, -80℃保存获得P15A-C12-279感受态细胞。
- [0599] c.质粒消除以鉴定C12-279蛋白PAM序列
- [0600] pLVX-7NN-Puro文库质粒100ng分别电转制备的P15A-C12-279感受态细胞以及DH5a电转细胞, 分别标记为Lib1(电转P15A-C12-279感受态)和Lib2(电转DH5a感受态);
- [0601] 电转完成后添加10mL LB培养基, 37℃ 220rpm复苏培养2h;

- [0602] 复苏后的菌液4000rpm离心2min收集菌体，400ul LB重悬后涂布LB平板，其中电转DH5a的菌液涂布含有氨苄青霉素的LB平板，电转P15A-C12-279感受态细胞涂布含有氯霉素以及氨苄青霉素的LB平板，37℃过夜培养；
- [0603] 分别从培养板上刮取菌体，碱裂解法提取质粒DNA；
- [0604] 提取的2个质粒DNA样品各取100ng作为PCR模板，利用引物SiteSeq-PF1(SEQ ID NO:720)和SiteSeqPuro-PR(SEQ ID NO:721)进行PCR扩增，获得的片段利用NGS建库试剂盒(讯识生物，SynplSeq DNA Library Prep Kit for Illumina)进行扩增子建库，完成建库后的文库进行NGS测序。
- [0605] 对比转化Lib1和Lib2细胞后的NGS测序差异，进行分析，如图7所示。证明C12-279可识别序列为5’-TTN-3’的PAM。
- [0606] 实验例5：C12-279蛋白在293T细胞中对靶核酸的切割活性
- [0607] 本实验例中，首先设计一个靶向HEK293T细胞内TTR基因的sgRNA，构建至pXC12-279-GFP-PAM-DR5质粒(SEQ ID NO:697)中，获得靶向TTR基因的质粒pXC12-279-TTR01，转染HEK293T细胞后通过NGS验证indel比例，验证C12-279蛋白在293T细胞中的切割活性，具体步骤如下：
- [0608] 1.sgRNA质粒构建
- [0609] 根据HEK293T细胞系中TTR基因序列信息，设计1个sgRNA靶点catgagcatgcagagtgagtat(SEQ ID NO:722)。
- [0610] 表11.sgRNA退火引物

质粒名称	引物名称	引物序列
pXC12-279-TTR01	TTR01-PF1	catgagccatgagcatgcagagtgagtatTTTTTG (SEQ ID NO: 723)
	TTR01-PR1	gtaccAAAAAatactcacctctgcagctcatggcgte (SEQ ID NO: 724)

- [0611] 根据sgRNA靶点信息设计退火引物，质粒pXC12-279-GFP-PAM-DR5(SEQ ID NO:697)利用BsmBI(Thermo Scientific™,ER0451)和Acc65I(Thermo Scientific™,ER0901)酶切，引物(表11)退火后与载体进行连接，获得pXC12-279-TTR01表达克隆。

- [0612] 2.TTR基因编辑效率检测
- [0613] 铺板：293T细胞系融合度至70–80%进行铺板，24孔板中接种细胞数为 5×10^5 细胞/孔。
- [0614] 转染：铺板12–14h后进行转染，在24孔板中每孔加入100 μ L Opti-MEM、1.5 μ L PEI(翌圣生物，Polyethylenimine Linear(PEI)MW25000)、500ng pXC12–279–TTR01质粒，混匀，室温放置20分钟后添加至293T细胞中进行细胞转染，转染过夜后更换新鲜的培养基继续培养。
- [0615] 提DNA、PCR扩增、NGS建库：培养72h后PBS清洗细胞，然后添加100 μ L细胞裂解液(Viagen，DirectPCR®Lysis Reagent(Cell))进行裂解，获得包含基因组DNA的裂解液，对基因组DNA扩增靶序列附近区域，PCR产物进行NGS建库，测序，分析测序结果。indel高于14%。如图8所示。
- [0616] 实验例6：CI1062732的PAM识别
- [0617] 蛋白CI1062732(SEQ ID NO:46)相比于C12–279蛋白(SEQ ID NO:696)的N–端缺失数十个氨基酸残基。
- [0618] 发明人曾采用与实验例4基本相同的方法对CI1062732识别的PAM序列进行识别。使用含“假”DR序列GTAATGCGTCTCCCATTTGACGCC(SEQ ID NO:529)的gRNA与CI1062732组合，在细菌中靶向7nt随机序列质粒文库。测序分析(如图9所示)显示CI1062732抓取到的“假”PAM基序为5'–TTNC–3'。
- [0619] 随后，发明人分析“假”DR序列二级结构，猜测抓取的“假”PAM基序TTNC的3'端C碱基可能是由于DR 3'端多出的C导致(图10)。因此，在后续的CI1062732测试以及C12–279测试中，DR序列均使用GTAATGCGTCTCCCATTTGACGC(SEQ ID NO:704)。
- [0620] 实验例7：C12–101–07蛋白的筛选与设计、制备、测试
- [0621] (1)通过复杂的生物信息学方法进行筛选、设计，最终得到C12–101–07蛋白。
- [0622] C12–101–07蛋白的氨基酸序列为：

IFPTQRRNTMSGNVVRSYKSVLRPNIRKRELLDATFNWFDRAVKKFFDVVCLYGGVEHDTVHS
ALLKETTDPDLCATMWFRVVPKSSCDGISAQEMIRRFVYAGHEPSAVAMSYLTGNFDDKKNHWID
CREKFVALARDMVVKPESLSIDIKSMIEHKILPICSQDNWQAWNAISQLFGEGKKENKAQIFVDV
VSMLSNNSVQTWEDYKEVISKATGCRTAGEINSKFGGRPGILSVDFSKDDTGLPKDFIERRIKDLSQK
AKEKSAAYELPNRMRLRELIASVIGPYRLETWSSVAQRACGDIRSKNSNNLLYASERFNRTKEIEEILSA
KGDVARAQNILGQFRSGEFNEFAVEKRHLGNLESLYNIWSKSDMDTGIEEYSSIHKDEYDRDPVDLYR
HIYPHREVISAKNFIDAAVLNKLRLNLSRHHVHPTVFGKTVISFSPKSSAYGRITPPSEIVRGRPAGSHG
MIWLTMEFDDGKWIEHHLPHNSRYEEVYCYQEGLPVKDEPRSPMFGYRVGNALADTSKIDNRRR
KASKQFLRAQQNITHNVSFDETAFSVVRNGEDFSITISSRIKASNAKSLMTIGDRIMGIDQNQTAANT
YSIWEVVGDDAGSIQHGNLSLKRIEDGHITSIRGRGGNFDQLNYGGLSYAKFSEWRSARLGFISLN
AELASKMNWDWCCLYEWNARYASALRKIYSHKGIDIERVFRREIEDFVEGVLRIGSLSSDALQCLTNA
KSLISSYFFLNGKKEPEEQRKFDQGLFDLSAKIDKKRVNKRQKQTKRIMSSIMQLARDRGVSFIVVEGK
LSTATKDNKSKANQKIDWCARAVVENLEHSCSLVGKLVADPMNTSHLDPFVYVLKTSLGKEARFA
SVVPAKINARHMKNFKSWSSLLAGNGKIKKTTDAIYVGAQDFCREYGFVAEDISKMSQSEIQDKLSS
HQFVLVPQRGGRVYMSTHPVSSEAKKIVYAGRERWYNNADVVAVNITLRGCERLSASRKTASTR
(SEQ ID NO: 52)。

[0623] 采用与实验例2基本相同的方法构建重组载体C12-101-07-pET28a-01(SEQ ID NO:725)，表达、纯化得到C12-101-07重组蛋白，氨基酸数目1122aa，结构为His tag-NLS-C12-101-07-SV40 NLS-nucleoplasmin NLS。纯化的重组蛋白经过SDS-PAGE电泳检测，结果如图11所示。

[0624] (2)采用与实验例3基本相同的方法制备C12-101-07蛋白体外切割PAM文库，抓取PAM。

[0625] 体外转录合成包含特异指导序列的sgRNA，序列如下：

[0626] >C12-101-07-sgRNA

5'-atcgcaacatctcagaaacccgtcctaagttgacggGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC-3'(SEQ ID NO: 726)。

[0627] >C12-101-07-sgRNA-Rev

5'-atcgcaacatctcagaaacccgtcctaagttgacggCGCAATGATGATCTCCGAGCCGTTCC-3' (SEQ ID NO: 727)。

[0628] sgRNA骨架序列为：5' -atcgcaacatctcagaaacccgtcctaagttgacgg-3' (SEQ ID NO: 534)。

[0629] 将C12-101-07蛋白与正反向gRNA分别组合进行编辑。

[0630] 实验中抓取到如图12和图13所示的PAM基序。

[0631] 证明C12-101-07可识别序列为5' -TTN-3' 的PAM。

[0632] 实验例8：C12-101-09蛋白的细菌体内编辑活性，验证PAM

[0633] 基于C12-101-07设计了相似蛋白C12-101-09, 序列为:

[0634] >C12-101-09

```
IFPTQRRNTMSGNVVRSYKSVLRPNIRKRELLDATFNWFDRAVKKFFDVFCVLYGGVEHDTVHS
ALLKETDTPDLVCATMWFRVVPKSSCDGISAQEMIRRFVYAGHEPSAVAMSYLTGNFDDKKNHWID

CREKFVALARDMVVKPESLSIDIKSMIEHKILPICSQDNWQAWNAISQLFGEGKKENKAEKAQIFVDV
VSMLSNNNSVQTWEDYKEVISKATGCRTAGEINSKFGGRPGILSVDFSKDDTGSLPKDFIERRIKDLSQK
AKEKSAAYELPNRMRLRELIASVIGPYRLETWSSVAQRACGDIRSKNSNNLLYASERFNRTKEIEEILSA
KGDVARAQSLGQFRSGEFNEFAVEKRHLGNLESLYNIWSKSDMDTGIEEYSSIHKDEYDRDPIVDLYR
HIYPHREVISAKNFIDA AVLNLKLLRLNASRHVHPTVFGKTVISFSPKSSAYGRITPPSEIVRGRPAGSHG
MIWLTMELFDDGKWIEHLPFHNSRYEEVYCYQEGLPVKDEPRSPMFGYRVGNALADTSKIDNRRR
KASKQFLRAQQNITHNVSFDETAFSVVRNGEDFSITISSRIKASNAKSLMTIGDRIMGIDQNQTAANT
YSIWEVVGDDAGSIQHGNLSLKRIEDGHITSIRGRGGNFDQLNYGGLSYAKFSEWRSARLGFISLN
AELASKMNWDWCCLYEWNARYASALRKIYSHKGIDIERVFRREIEDFVEGVLRIIGSLSSDALQCLTNA
KSLISSYFFLNGKKEPEEQRKFDQGLFDLSAKIDKKRVNKRQKTKRIMSSIMQIARDRGVSFIVVEGK
LSTATKDNKSKANQKAIDWCARAVVENLEHSCSLVGIKLVAIDPMNTSHLDPFVYVLKTSLGKEARFA
SVVPAKINARHMKNFKSWSSLLAGNGKIKKTTDAIYVGAQDFCREYGFVAEDISKMSQSEIQDKLSS
HQFVLVPQRGGRVYMSTHPVSSEAKKIVYAGRERWYNNADVVAVNITLRGCERLSASRKTASTR
(SEQ ID NO: 728)。
```

[0635] 常规方法构建得到重组载体质粒P15A-C12-101-09(SEQ ID NO:729)。然后采用与实验例4基本相同的方法进行测试。

[0636] 抓取到C12-101-09识别的基序, 如图14所示。

[0637] 证明C12-101-09可识别序列为5' -TTN-3' 的PAM。

[0638] 实验例9: 包含不同PAM报告系统的细胞系的构建

[0639] 用慢病毒感染方法制备稳转细胞株。我们通过构建包含不同PAM序列组成的慢病毒表达质粒, 进行病毒包装后感染293T细胞, 构建包含不同PAM序列组成的GFP报告系统的细胞系, 用于后续的突变体筛选。

[0640] (1)不同PAM序列组成的GFP报告系统慢病毒表达质粒构建

[0641] 除制备好的质粒pCDH-CMV-EGFP-reporter3-EF1-Puro(SEQ ID NO:712)外, 同步构建了PAM组成为NAAN的质粒文库, 具体构建方案如下:

[0642] 基因合成包含检测系统的EGFP片段混合文库, 利用XbaI+NotI酶切合成片段, 然后与质粒pCDH-CMV-EGFP-reporter3-EF1-Puro的XbaI+NotI酶切载体利用T4 DNA连接酶进行连接, 转化Stbl3, 在含氨苄青霉素平板上37℃过夜培养。

- [0643] 对于片段混合文库需要挑取多个克隆进行测序鉴定获得16个不同序列组成的质粒(即PAM序列为AAAA、AAAT、AAAG、AAAC、TAAA、TAAT、TAAG、TAAC、GAAA、GAAT、GAAG、GAAC、CAAA、CAAT、CAAG、CAAC),然后按照等质量混合,获得PAM序列组成为NAAN的质粒文库Plasmid Lib(Puro-NAAN-eGFP-Lib, SEQ ID NO:730),用于后续的慢病毒包装和稳转细胞系构建。
- [0644] 未编辑的报告系统从起始密码子到GFP正常的读码框中间有非3的倍数的碱基插入(pCDH-CMV-EGFP-reporter3-EF1-Puro有32bp碱基插入,质粒文库Plasmid Lib有29bp碱基插入,如图15所示)从而导致GFP正常的读码框被打断,GFP不表达;将sgRNA靶点设置在GFP表达框内部,通过Cas12的编辑产生indel,有几率恢复GFP正常的读码框,使GFP能够正常表达,且编辑效率越高,产生的indel恢复GFP正确读码框的几率越高,通过流式检测能够正常表达GFP的细胞数进而对Cas12蛋白的编辑效率进行表征。
- [0645] (2)不同PAM序列组成的GFP报告系统质粒慢病毒包装
- [0646] 已完成构建的pCDH-CMV-EGFP-reporter3-EF1-Puro质粒以及文库质粒Plasmid Lib分别与病毒包装辅助质粒pMD2.G(淼灵生物)以及psPAX2(淼灵生物)按照1:1:1的摩尔比进行配比后利用PEI转染293T细胞。转染48h,取培养上清,利用0.45 μm滤膜过滤后获得pCDH-CMV-EGFP-reporter3-EF1-Puro和Plasmid Lib这两个粗病毒。
- [0647] (3)pCDH-CMV-EGFP-reporter3-EF1-Puro和Plasmid Lib粗病毒分别感染293T细胞构建检测细胞系
- [0648] 向培养基中分别添加1/4体积的pCDH-CMV-EGFP-reporter3-EF1-Puro和Plasmid Lib粗病毒对293T细胞进行感染,感染48h后换液,添加2ug/ml的Puromycin进行筛选。
- [0649] 针对pCDH-CMV-EGFP-reporter3-EF1-Puro感染的293T细胞,筛选后的细胞利用有限稀释进行单克隆筛选,筛选到的单克隆即为检测用细胞系(称为Reporter3细胞系);

- [0650] 针对Plasmid Lib感染的293T细胞，药物筛选后获得的细胞pool即为检测用细胞系(称为NAAN细胞系)。
- [0651] 实验例10：C12-279蛋白突变体的设计及编辑效率检测
- [0652] a.突变位点确定
- [0653] 通过生物信息学分析以及AI手段预测和模拟C12-279蛋白的3维结构，结合3维结构分析C12-279可能的DNA结合、识别以及切割的位点，针对这些位点，利用分子克隆点突变方法构建突变克隆。
- [0654] 首先设计了表12所示的突变体。
- [0655] 表12.C12-279不同突变位点在NAAN细胞系中的编辑效率

突变位点	突变体的载体	在 NAAN 细胞系中的编辑效率，以相比于 C12-279 的编辑效率的倍数表示
D352R	C12-279-GFPAM-01	1.45±0.36
K631R	C12-279-GFPAM-02	0.99±0.18
A988R	C12-279-GFPAM-03	1.24±0.14
G989R	C12-279-GFPAM-04	1.23±0.44
Q186R	C12-279-GFPAM-05	1.74±0.38
G194R	C12-279-GFPAM-06	0.01
N195R	C12-279-GFPAM-07	1.64
G196R	C12-279-GFPAM-08	0.31±0.12
G197R	C12-279-GFPAM-09	1.44±0.45
N245R	C12-279-GFPAM-10	0.46±0.06
L260R	C12-279-GFPAM-11	1.56±0.07
A355R	C12-279-GFPAM-12	1.31±0.36
C385R	C12-279-GFPAM-13	1.20±0.37
P386R	C12-279-GFPAM-14	1.40±0.48
H387R	C12-279-GFPAM-15	0.92±0.33

G390R	C12-279-GFPAM-16	0.00
K391R	C12-279-GFPAM-17	1.14±0.34
N392R	C12-279-GFPAM-18	1.39±0.18
D429R	C12-279-GFPAM-19	0.34±0.06
Q461R	C12-279-GFPAM-20	0.99±0.3
Q462R	C12-280-GFPAM-21	1.36±0.39
E485R	C12-280-GFPAM-22	1.57±0.37
L611R	C12-280-GFPAM-23	0.43±0.09
Q990R	C12-280-GFPAM-24	0.94±0.09
A1136R	C12-280-GFPAM-25	未检测
K1138R	C12-280-GFPAM-26	未检测
T1139R	C12-280-GFPAM-27	未检测
N/A	NAAN 细胞系	0.00
N/A	PEI-对照	0.00
N/A	C12-279-GFPAM-DR5	1.00±0.28

- [0656] b.突变克隆构建
- [0657] 确定具体的突变位点后通过引物将突变碱基引入，构建包含不同突变位点的表达克隆。如下以D352R突变克隆构建为例进行说明。
- [0658] 表13.C12-279突变克隆C12-279-GFPAM-01构建引物序列

引物名称	引物序列
ChkCas12-PF1	CCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAG (SEQ ID NO: 731)
ChkCas12-PR1	ATGATCTCCGAGCCGTTTGTGACC (SEQ ID NO: 732)
C279-D352R-PF1	GCTGAAGAGACACAGC <u>aga</u> ATCGCCGCCGCT (SEQ ID NO: 733) (下划线为引入的氨基酸突变)
C279-D352R-PR1	GGGAAGCGGCGCGAT <u>tct</u> GCTGTGTCTCT (SEQ ID NO: 734) (下划线为引入的氨基酸突变)

- [0659] 针对突变位点D352R，设计引物(如表13所示)，通过引物C279-D352R-PF1和C279-D352R-PR1引入突变位点。以pXC12-279-GFPAM-DR5(SEQ NO:1)为模板ChkCas12-PF1+C279-D352R-PR1进行PCR扩增(易锦生物,PC019,Ultra HiPF™DNA Polymerase Kit)获得片段C12-279-D352R-F1，ChkCas12-PR1+C279-D352R-PF1进行PCR扩增获得片段C12-279-D352R-F2，质粒pXC12-279-GFPAM-DR5(SEQ ID NO:697)利用HindIII+KpnI酶切，胶回收(广州美基

生物科技有限公司,D2110,HiPure Gel Pure Micro Kit)5646bp载体片段,与片段C12-279-D352R-F1以及C12-279-D352R-F2进行体外重组(NEB,E2611L,Gibson Assembly®Master Mix),热击转化大肠杆菌获得突变克隆质粒C12-279-GFPPAM-01。

- [0660] c.突变体在NAAN报告系统中编辑效率检测
- [0661] 铺板: NAAN细胞系融合度至70-80%进行铺板,24孔板中接种细胞数为 5×10^5 细胞/孔。
- [0662] 转染: 铺板12-14h后进行转染,按照24孔板每孔100 μ l Opti-MEM中加入1.5u1 PEI(翌圣生物,40815ES03,Polyethylenimine Linear(PEI)MW25000)+500ng突变克隆质粒,混匀,室温放置20分钟后添加至NAAN细胞系中进行细胞转染,转染过夜后更换新鲜的培养基继续培养,培养72h后进行利用流式细胞仪检测,根据GFP阳性细胞比例表征不同突变克隆编辑效率。
- [0663] 结果如表16、图16所示,不同C12-279突变体在NAAN细胞中编辑效率以相比于C12-279的编辑效率的倍数表示。多个突变体提升了编辑效率。
- [0664] d.根据第一轮突变的结果将部分对编辑效率提升明显的突变位点进行组合,尝试多突变位点组合,以期进一步提升编辑效率。设计的突变体如表14所示。
- [0665] 表14.C12-279不同突变位点组合在NAAN细胞系中的编辑效率

突变位点 1	突变位点 2	突变体的载体名称
D352R	Q186R	C12-279-GFPPAM-28
D352R	L260R	C12-279-GFPPAM-29
D352R	A355R	C12-279-GFPPAM-30
A355R	L260R	C12-279-GFPPAM-31
P386R	C385R	C12-279-GFPPAM-32
E485R	Q462R	C12-279-GFPPAM-33

- [0666] 采用与前述基本相同的方法构建载体,在NAAN细胞系中进行编辑效率测试,结果如图17所示。
- [0667] e.靶向固定PAM组合突变体质粒构建
- [0668] 由于NAAN细胞系的PAM为混合文库,理论上对真实的编辑效率可能有一定的影响,为更直观高效地展现突变对编辑效率的影响,基于Reporter3细胞系起始

- 密码子与GFP读码框之间的序列，选择PAM序列组成为TTG，靶序列为CTCACCTCGCGACGCAATGATG(SEQ ID NO:735)的靶点进行后续的编辑效率测试。
- [0669] 靶向Reporter3细胞系突变克隆构建
- [0670] 基于C12-279-GFP-PAM-DR5将sgRNA更改为靶向CTCACCTCGCGACGCAATGATG(SEQ ID NO:735)，合成引物pCDH-PF1: GTACCGAAAAACATCA TTGCGTCGCGAGGTGAGGCGTC(SEQ ID NO:754)以及pCDH-PR1: CATTGACGCCTCACCTCGCGACGCAATGATGTTTTTCG(SEQ ID NO:755)进行退火，质粒C12-279-GFP-PAM-DR5利用Acc65I(Thermo Scientific)和BsmBI(Thermo Scientific)酶切回收载体后与退火产物连接，获得靶向Reporter3细胞系的突变体克隆C12-279-pCDH。靶向Reporter3细胞系的突变体克隆的构建方法同本实施例描述的方案，但需将载体质粒从C12-279-GFP-PAM-DR5更改为C12-279-pCDH，并将引物ChkCas12-PR1更换成ChkCas12-PR2: GCGACGCAATGATGTTTTTCGGTACC(SEQ ID NO:736)，其余方法以及步骤完全一致。
- [0671] 选择部分突变体在Reporter3细胞系中进行编辑效率检测，检测方式同突变体在NAAN报告系统中编辑效率检测方式，仅需将细胞系由NAAN细胞系更换成Reporter3细胞系。
- [0672] 根据第一轮突变结果对整个3维结构进行修正和标记，并将第一轮的数据放置于新的模型中进行预测分析，最终分析预测可能的第二轮突变位点，并进行突变、检测，依次类推，通过多轮突变、选择，累积，确定C12-279最佳的突变组合。表15显示C12-279突变体及在Reporter3细胞系中的编辑效率。其中C12-279-pCDH组即C12-279蛋白的编辑效率绝对值(平均值)为8.55%。
- [0673] 表15.C12-279突变体在Reporter3细胞系中的编辑效率
- [0674] (以相比于C12-279的编辑效率的倍数表示)

突变位点 1	突变位点 2	突变位点 3	分组	相比于 C12-279 的编
--------	--------	--------	----	----------------

				辑效率的倍数
N/A	N/A	N/A	PEI-对照	0.02±0.01
N/A	N/A	N/A	Reporter3 细胞系	0.03±0.02
N/A	N/A	N/A	C12-279-pCDH	1.00±0.18
D352R	N/A	N/A	C12-279-pCDH-01	1.18±0.22
G989R	N/A	N/A	C12-279-pCDH-04	1.27±0.2
Q186R	N/A	N/A	C12-279-pCDH-05	1.60±0.32
L260R	N/A	N/A	C12-279-pCDH-11	0.66±0.14
A355R	N/A	N/A	C12-279-pCDH-12	0.96±0.14
E485R	N/A	N/A	C12-279-pCDH-22	1.15±0.32
D352R	Q186R	N/A	C12-279-pCDH-28	1.39±0.25
A355R	L260R	N/A	C12-279-pCDH-31	0.95±0.22
D352R	Q186R	I33R	C12-279-pCDH-34	1.51±0.31
D352R	Q186R	G184R	C12-279-pCDH-35	2.28
D352R	Q186R	S185R	C12-279-pCDH-36	1.91
D352R	Q186R	G256R	C12-279-pCDH-37	0.06±0.01
D352R	Q186R	Y278R	C12-279-pCDH-38	1.86±0.06
D352R	Q186R	S285R	C12-279-pCDH-39	1.87±0.06
D352R	Q186R	Y316R	C12-279-pCDH-40	1.12±0.2
D352R	Q186R	H350R	C12-279-pCDH-41	2.11
D352R	Q186R	A356R	C12-279-pCDH-42	2.01±0.18
D352R	Q186R	Q469R	C12-279-pCDH-43	1.61±0.22
D352R	Q186R	S491R	C12-279-pCDH-44	1.41±0.48
D352R	Q186R	K521R	C12-279-pCDH-45	1.73±0.07
D352R	Q186R	P525R	C12-279-pCDH-46	1.40±0.09
D352R	Q186R	K629R	C12-279-pCDH-47	1.74±0.09
D352R	Q186R	N633R	C12-279-pCDH-48	1.84±0.06
D352R	Q186R	D841R	C12-279-pCDH-49	1.83±0.00
D352R	Q186R	N898R	C12-279-pCDH-50	1.69±0.05
D352R	Q186R	K987R	C12-279-pCDH-51	1.76±0.07
D352R	Q186R	T991R	C12-279-pCDH-52	1.32
D352R	Q186R	D1010R	C12-279-pCDH-53	1.58±0.29
D352R	Q186R	E1013R	C12-279-pCDH-54	2.00±0.04

- [0675] 实验例11：C12-101-07蛋白突变体设计及编辑效率检测
- [0676] 针对C12-101-07蛋白设计了如表16所示的突变体。
- [0677] 使用与实验例10基本相同的方法构建突变体的载体质粒，进行编辑效率检测。
- [0678] a.基于NAAN报告系统检测单点突变的编辑效率

[0679] 针对选出的突变位点，以C12-101-07-GFPAM(SEQ ID NO:737)作为克隆模板质粒以及转染测试时的对照质粒，利用分子克隆点突变构建突变克隆，进行编辑效率检测。结果如表16所示，不同C12-101-07突变体在NAAN细胞系中的编辑效率以相比于C12-101-07的编辑效率的倍数表示。其中C12-101-07-GFPAM组即C12-101-07蛋白的编辑效率绝对值(平均值)为0.23%。

[0680] 表16.C12-101-07不同突变体

突变位点	突变体的载体	在 NAAN 细胞系中的编辑效率，以相比于 C12-101-07 的编辑效率的倍数表示
Q172R	C12-101-07-GFPAM-01	2.08±1.05
G182R	C12-101-07-GFPAM-02	0.01±0.02
E183R	C12-101-07-GFPAM-03	0.95±0.56
G184R	C12-101-07-GFPAM-04	0.02±0.04
K185R	C12-101-07-GFPAM-05	1.01±0.47
K186R	C12-101-07-GFPAM-06	0.02±0.02
V243R	C12-101-07-GFPAM-07	0.71±0.27
L297R	C12-101-07-GFPAM-08	0.04±0.00
N317R	C12-101-07-GFPAM-09	0.52±0.12
E363R	C12-101-07-GFPAM-10	0.19±0.12
H366R	C12-101-07-GFPAM-11	0.02±0.02
V426R	C12-101-07-GFPAM-12	1.15±0.59
K429R	C12-101-07-GFPAM-13	0.80±0.36
L433R	C12-101-07-GFPAM-14	0.57±0.28
S452R	C12-101-07-GFPAM-15	1.09±0.26
S455R	C12-101-07-GFPAM-16	0.07±0.02
K918R	C12-101-07-GFPAM-17	0.50±0.11
T919R	C12-101-07-GFPAM-18	0.29±0.15
T920R	C12-101-07-GFPAM-19	1.21±0.70
A922R	C12-101-07-GFPAM-20	1.18±0.41
N/A	C12-101-07-GFPAM	1.00±0.67

[0681] b.对上述第一轮突变的结果中编辑效率提升明显的突变位点进行组合，尝试2个点突变。设计了如表17所示的突变体。

- [0682] 利用分子克隆点突变方法构建突变克隆并基于NAAN细胞系进行了编辑效率测定。
- [0683] 结果如表17所示，不同C12-101-07突变体在NAAN细胞系中的编辑效率以相比于C12-101-07的编辑效率的倍数表示。
- [0684] 表17.C12-101-07突变体

突变位点 1	突变位点 2	突变体的载体	在 NAAN 细胞系中的编辑效率，以相比于 C12-101-07 的编辑效率的倍数表示
Q172R	V426R	pXC12-101-07-TwoMut-01	2.15±1.05
Q172R	S452R	pXC12-101-07-TwoMut-02	1.89±0.68
Q172R	T920R	pXC12-101-07-TwoMut-03	4.04±1.00
V426R	S452R	pXC12-101-07-TwoMut-04	1.56±0.52
V426R	T920R	pXC12-101-07-TwoMut-05	2.11±0.79
S452R	T920R	pXC12-101-07-TwoMut-06	1.19±0.21
N/A	N/A	pXC12-101-07-GFPAM	1.00±0.37

- [0685] c.靶向Reporter3细胞系突变克隆构建以及编辑效率检测
- [0686] 使用与前述实验例10基本相同的方法，也将原始C12-101-07-GFPAM载体上靶序列进行了替换，将靶向NAAN细胞系的靶点替换成了靶向Reporter3细胞系的靶点，获得对照质粒101-07-sgRNA02，然后构建突变体的载体，并在Reporter3细胞系中测试了编辑效率。
- [0687] 结果如表18所示，不同C12-101-07突变体在Reporter3细胞系中的编辑效率以相比于C12-101-07的编辑效率的倍数表示。其中101-07-sgRNA02对照组即C12-101-07蛋白的编辑效率绝对值(平均值)为10.32%。
- [0688] 表18.C12-101-07的不同突变体在Reporter3细胞系中的编辑效率
- [0689] (以相比于C12-101-07的编辑效率的倍数表示)

突变位点 1	突变位点 2	载体	编辑效率，以相比于 C12-101-07 的编辑效率的倍数表示
V15R	N/A	pXC12-101-07-21	1.67±0.04
A173W	N/A	pXC12-101-07-22	0.1±0.01
G239R	N/A	pXC12-101-07-23	0.04±0.00
D264R	N/A	pXC12-101-07-24	1.28±0.16
E271R	N/A	pXC12-101-07-25	0.96±0.1
Y295R	N/A	pXC12-101-07-26	0.53±0.03
T329R	N/A	pXC12-101-07-27	1.3±0.17
E331R	N/A	pXC12-101-07-28	1.06±0.01
I335R	N/A	pXC12-101-07-29	1.52±0.16
S430R	N/A	pXC12-101-07-30	0.79±0.15
S465R	N/A	pXC12-101-07-31	1.18±0.37
E493R	N/A	pXC12-101-07-32	1.61±0.02
P497R	N/A	pXC12-101-07-33	0.15±0.04
K587R	N/A	pXC12-101-07-34	0.3±0.01
E768R	N/A	pXC12-101-07-35	1.4±0.07
T825R	N/A	pXC12-101-07-36	0.95±0.04
A911R	N/A	pXC12-101-07-37	1.33±0.21
G914R	N/A	pXC12-101-07-38	0.26±0.05
K915R	N/A	pXC12-101-07-39	1.03±0.26
I916R	N/A	pXC12-101-07-40	0.51±0.12

E940R	N/A	pXC12-101-07-42	1.13±0.11
N347E	N/A	pXC12-101-07-43	0.99±0.13
K339R	N/A	pXC12-101-07-44	1.13±0.01
N347E	K339R	pXC12-101-07-45	1.16±0.08
Q172R	V426R	pXC12-101-07-TwoMut-01	2.02±0.06
Q172R	S452R	pXC12-101-07-TwoMut-02	1.72±0.09
Q172R	T920R	pXC12-101-07-TwoMut-03	2.15±0.12
V426R	S452R	pXC12-101-07-TwoMut-04	1.56±0.12
V426R	T920R	pXC12-101-07-TwoMut-05	未检测
S452R	T920R	pXC12-101-07-TwoMut-06	未检测
N/A	N/A	101-07-sgRNA02 对照	1.00±0.11

- [0690] 实验例12：C12-279蛋白定点突变构建不同突变体
- [0691] C12-279蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO:696。在突变位点设计两条突变引物F/R，通过引物引入需要的突变序列。结合载体两端的通用引物，进行PCR扩增，获得2段突变片段F1、F2，突变片段F1、F2与酶切线性化的载体经过同源重组获得突变质粒。本实验例中以氨基酸426和氨基酸860这2个位点为例构建单点突变(D426R、L860R)和多点突变突变体(D426R&L860R)。具体步骤如下：
- [0692] 位点426和860定点突变的引物如表19所示。
- [0693] 表19.引物

引物名称	引物序列
ChkCas12-PF1	CCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAG (SEQ ID NO: 731)
ChkCas12-PR2	GCGACGCAATGATGTTTTTCGGTACC (SEQ ID NO: 736)
279_426_F	gagttcaagAGAggcttcgacagagagc (下划线为引入的氨基酸突变) (SEQ ID NO: 756)
279_426_R	tcgaagccTCTcttgaactcggcgcagtag (下划线为引入的氨基酸突变) (SEQ ID NO: 757)
279_860_F	aaccAGGagacagaacaagggcgagg (下划线为引入的氨基酸突变) (SEQ ID NO: 758)
279_860_R	ccttgttctgtctCCTggttccagctgttcag (下划线为引入的氨基酸突变) (SEQ ID NO: 759)

- [0694] 426和860位点单点突变克隆构建
- [0695] 以C12-279-pCDH质粒为模板ChkCas12-PF1+279_426_R进行PCR扩增(易锦生物,PC019,UltraHiPF™DNA Polymerase Kit)获得突变片段D426R-F1， ChkCas12-PR2+279_426_F进行PCR扩增获得突变片段D426R-F2， 质粒C12-279-pCDH利用HindIII+KpnI酶切，胶回收(广州美基生物科技有限公司,D2110,HiPure Gel Pure Micro Kit)5647bp载体片段，与片段D426R-F1以及D426R-F2进行体外重组(NEB,E2611L,Gibson^{Assembly®}Master Mix)，热击转化大肠杆菌获得426位点突变体的质粒C12-279-pCDH-426；
- [0696] 同样的步骤和方法，将引物279_426_F替换成279_860_F、279_426_R替换成279_860_R，进行同样的扩增和重组，热击转化大肠杆菌获得860位点突变体的质粒

C12-279-pCDH-860, 其他不同位点的Cas蛋白突变体质粒构建方法除需设计针对各个不同位点的突变引物外, 具体构建方法与上述426和860位点的方法一致。

- [0697] Cas蛋白突变体编辑活性验证
- [0698] 基于前述实验例中构建的Reporter3细胞系进行测试。起始密码子与GFP读码框之间的序列为32个碱基, 非3的整数倍, 导致GFP非正常读码, GFP不表达; 使用Cas蛋白突变体识别PAM为TTG、靶序列为CTCACCTCGCGACGCAATGATG (SEQ ID NO:735)的靶点对Reporter3细胞系进行编辑, 产生indel, 恢复GFP正常读码框, 流式细胞仪检测GFP恢复表达的细胞比例, 以此表征不同突变体的编辑效率。具体步骤如下:
 - [0699] 细胞培养以及铺板: 细胞系培养至融合度70-80%时进行铺板, 24孔板中接种细胞数为 5×10^5 细胞/孔。
 - [0700] 转染: 铺板12-14h后进行转染, 按照24孔板每孔100 μ l Opti-MEM中加入1.5u1 PEI(翌圣生物)+500ng突变体质粒,混匀, 室温放置20分钟后添加至Reporter3细胞系中进行细胞转染, 转染过夜后更换新鲜的培养基继续培养, 培养72h后进行利用流式细胞仪检测, 根据GFP阳性细胞比例表征不同突变克隆编辑效率, 取多批次数据的平均值。具体结果如表20和图18所示。其中野生型C12-279组编辑效率绝对值的均值为9.0%。
 - [0701] 表20.C12-279各突变体在Reporter3细胞系中的编辑效率
 - [0702] (以相比于C12-279的编辑效率的倍数表示)

分组	编辑效率（以 相比于 C12- 279 的编辑效 率的 倍 数 表 示）	分组	编辑效率（以相 比 于 C12-279 的 编 辑 效 率 的 倍 数 表 示）	分组	编辑效率（以 相比于 C12- 279 的编辑效 率的 倍 数 表 示）
野生型 C12-279	1.00	376R	1.60	749R	1.01
Mut-01（Q186R）	1.58	377R	1.20	751R	1.39
Mut-02 （Q186 & D352R）	1.62	378R	1.41	752R	0.95
Mut-03 （G184R & Q186R & D352R）	1.87	379R	1.57	753R	1.01
Cell Line NC 阴性对照	0.05	380R	1.07	754R	1.24
PEI NC 阴性对照	0.08	381R	1.05	755R	1.42
1R	2.07	382R	1.01	756R	1.18
2R	1.79	383R	1.51	758R	1.41

3R	2.05	384R	0.04	759R	1.13
4R	1.53	385R	1.20	760R	1.39
5R	2.00	386R	1.09	761R	0.19
6R	0.98	387R	1.14	762R	0.25
7R	1.91	388R	0.99	764R	0.64
8R	0.81	389R	0.06	765R	0.91
9R	0.82	390R	0.26	766R	1.18
10R	1.60	391R	1.05	767R	1.34
12R	0.10	392R	1.15	768R	1.36
13R	0.91	393R	0.04	769R	0.24
14R	1.13	394R	0.87	771R	1.63
15R	1.32	395R	0.10	772R	0.11
16R	1.37	396R	1.28	773R	1.56
19R	1.26	397R	1.40	774R	1.19
21R	1.29	398R	0.99	775R	1.09
22R	1.19	399R	1.01	776R	1.19
23R	1.07	400R	1.62	779R	1.55
24R	1.56	401R	1.03	780R	1.18
25R	1.05	402R	1.21	781R	1.66
26R	1.18	403R	1.20	782R	1.24
27R	1.33	404R	1.02	783R	0.06
28R	0.51	405R	1.33	784R	1.51
29R	0.08	406R	1.13	785R	1.77
30R	1.59	407R	1.07	786R	1.54
32R	1.30	408R	1.38	787R	0.06
33R	0.80	409R	1.09	789R	1.41
34R	1.08	410R	0.81	790R	1.06
35R	0.03	411R	1.20	791R	0.11
36R	0.07	412R	1.21	792R	1.84
37R	0.94	413R	1.01	794R	1.49
38R	0.17	414R	0.91	795R	0.30
39R	1.23	415R	0.03	797R	1.08
40R	0.08	416R	1.48	798R	1.40
41R	0.52	417R	0.92	800R	0.09
42R	0.45	418R	1.30	801R	0.23
43R	1.14	419R	0.87	802R	1.33
44R	0.93	420R	1.10	804R	0.61
46R	1.10	421R	1.17	805R	0.22
47R	1.34	422R	1.19	806R	0.13

48R	1.43	423R	0.79	807R	0.11
49R	1.17	424R	1.12	808R	0.90
50R	0.20	425R	1.24	809R	0.62
51R	1.46	426R	2.22	810R	1.11
53R	0.05	427R	0.68	811R	0.22
54R	0.42	428R	0.44	812R	0.94
55R	1.40	429R	0.74	813R	0.99
56R	0.28	431R	1.15	814R	0.42
57R	0.07	432R	0.05	815R	0.47
58R	1.42	433R	0.91	817R	1.16
59R	1.51	435R	1.29	818R	0.23
60R	0.05	436R	0.04	819R	1.14
61R	0.84	437R	0.29	821R	0.91
62R	0.71	439R	0.50	822R	1.48
64R	0.06	440R	0.04	823R	1.76
65R	0.19	441R	1.18	824R	0.32
66R	1.42	442R	1.06	825R	1.46
67R	0.47	443R	1.44	826R	1.60
68R	0.12	444R	1.10	827R	0.34
69R	0.65	446R	1.24	828R	1.19
70R	0.98	447R	1.23	829R	1.73
71R	0.06	448R	1.12	830R	1.79
72R	0.08	449R	1.46	831R	0.76
73R	0.03	450R	1.27	832R	1.25
74R	0.44	451R	0.97	833R	1.51
75R	0.05	452R	1.04	834R	1.40
76R	1.12	453R	0.04	835R	1.32
77R	0.72	454R	1.29	836R	1.53
78R	1.28	455R	1.04	837R	1.32
79R	0.64	456R	1.45	838R	1.21
80R	0.20	457R	0.11	839R	1.30
81R	1.19	458R	0.03	840R	1.36
82R	0.99	459R	1.53	841R	0.11
83R	0.89	460R	0.03	842R	1.58
84R	0.97	461R	1.11	844R	1.14
85R	1.35	462R	1.58	845R	1.72
86R	1.01	463R	1.05	846R	1.91
88R	0.13	464R	0.81	847R	1.61
89R	1.34	467R	1.22	848R	1.38

90R	1.30	469R	1.46	849R	0.07
91R	0.84	470R	1.03	850R	1.74
92R	0.81	471R	0.10	851R	1.59
93R	0.27	472R	0.10	852R	1.22
94R	0.07	473R	1.19	853R	1.67
95R	0.10	474R	0.03	854R	0.08
96R	0.05	475R	1.28	855R	1.48
97R	0.09	476R	0.99	856R	1.45
98R	0.12	477R	0.20	857R	1.19
99R	0.07	478R	1.13	858R	1.87
101R	0.39	479R	0.48	859R	1.40
102R	0.98	480R	1.03	860R	1.84
103R	1.25	481R	0.46	862R	1.14
104R	1.00	482R	1.30	863R	1.27
105R	1.13	483R	0.41	864R	0.80
106R	0.33	484R	1.68	865R	1.07
108R	1.41	485R	1.52	866R	1.58
109R	0.81	486R	0.47	867R	0.19
110R	1.03	487R	0.22	868R	0.54
111R	0.61	488R	0.91	870R	0.90
112R	0.78	489R	1.16	872R	0.14
114R	1.25	490R	0.77	873R	1.11
115R	1.06	491R	1.12	874R	0.49
116R	0.95	492R	1.04	875R	1.03
117R	0.98	493R	0.82	876R	0.05
118R	1.41	494R	1.31	877R	0.96
119R	0.80	496R	1.18	879R	1.23
120R	0.29	497R	0.75	880R	0.85
121R	1.35	499R	1.07	881R	1.39
123R	1.34	500R	0.94	882R	0.93
124R	1.29	501R	1.33	883R	1.13
125R	1.33	502R	1.02	884R	1.43
126R	0.93	503R	0.61	885R	0.13
127R	1.20	504R	0.56	886R	1.25
128R	1.31	506R	0.10	887R	1.12
129R	1.30	507R	0.93	888R	0.05
130R	0.97	508R	0.05	890R	0.05
131R	1.00	509R	1.47	891R	0.06
132R	0.43	510R	0.07	892R	1.42

133R	0.92	511R	0.85	893R	1.64
134R	0.98	512R	0.60	894R	0.04
135R	0.12	513R	0.22	895R	0.31
136R	0.39	514R	1.10	896R	0.74
137R	0.09	515R	1.36	897R	0.53
138R	1.43	516R	0.85	898R	1.07
139R	1.37	517R	0.62	899R	1.33
140R	1.26	518R	1.11	900R	1.44
141R	1.60	519R	0.09	901R	1.30
142R	1.02	520R	0.86	902R	0.30
143R	1.20	521R	0.90	903R	1.27
144R	1.11	522R	1.17	904R	1.62
145R	0.95	523R	0.10	905R	1.36
146R	1.16	524R	0.33	906R	0.15
147R	0.92	525R	0.89	909R	1.05
148R	0.10	526R	0.08	910R	1.18
149R	0.10	527R	1.00	911R	0.17
151R	1.06	528R	0.04	912R	0.06
152R	1.20	529R	0.38	913R	1.32
153R	0.08	531R	0.07	914R	0.26
154R	0.97	532R	0.42	916R	1.29
155R	1.20	533R	1.07	917R	0.31
156R	0.16	534R	0.09	918R	0.40
157R	0.99	535R	0.31	919R	1.04
158R	0.85	536R	0.39	920R	0.47
159R	1.09	537R	0.62	921R	0.38
160R	0.12	538R	1.02	922R	1.36
161R	1.23	539R	0.83	923R	0.43
162R	0.57	540R	1.04	924R	1.25
163R	0.31	541R	0.91	925R	0.11
164R	0.09	542R	1.21	926R	1.49
165R	0.92	543R	0.12	927R	0.19
166R	0.95	544R	0.05	928R	0.59
167R	0.08	545R	0.81	930R	0.83
169R	1.15	546R	1.11	931R	1.10
170R	0.47	547R	0.72	932R	1.21
171R	0.07	548R	1.02	933R	0.87
172R	0.10	549R	1.21	934R	0.94
174R	0.09	550R	0.08	935R	0.13

175R	1.40	552R	0.68	936R	0.45
176R	0.16	553R	1.23	937R	0.19
177R	0.10	555R	0.35	938R	0.90
178R	1.60	556R	1.17	939R	0.49
179R	0.19	557R	0.79	940R	0.04
180R	0.34	558R	1.37	941R	0.05
182R	1.09	559R	1.17	942R	0.10
183R	1.08	560R	0.92	943R	0.11
184R	1.22	561R	1.41	944R	0.11
185R	1.41	562R	1.08	945R	0.08
186R	1.23	563R	1.12	946R	0.05
187R	0.30	564R	1.08	947R	0.94
188R	0.39	565R	1.23	948R	0.10
189R	0.11	566R	1.07	949R	1.05
190R	0.08	567R	1.25	950R	0.95
191R	1.01	568R	1.34	951R	0.88
192R	0.04	569R	0.67	952R	0.85
194R	0.10	570R	0.07	953R	1.02
195R	1.22	571R	0.07	954R	1.11
196R	0.40	572R	1.29	955R	0.42
197R	1.34	573R	0.10	956R	1.44
198R	0.19	574R	1.16	957R	0.85
199R	0.07	575R	0.85	958R	1.20
200R	1.06	576R	0.67	959R	0.46
202R	0.19	577R	1.28	960R	1.20
203R	1.31	578R	1.15	961R	0.07
204R	0.03	579R	0.96	963R	0.11
205R	0.60	580R	1.38	964R	1.10
206R	1.07	581R	1.19	965R	1.06
207R	0.06	582R	1.16	966R	0.95
208R	0.04	583R	0.72	967R	1.17
209R	0.89	584R	1.18	968R	0.19
210R	0.91	585R	1.31	969R	0.84
211R	0.05	586R	1.12	970R	0.57
212R	0.49	587R	0.73	971R	0.09
213R	1.24	589R	1.01	972R	0.84
214R	1.02	590R	1.13	973R	0.46
215R	0.06	592R	0.10	974R	0.96
216R	1.08	593R	1.20	975R	0.36

217R	1.10	594R	0.09	976R	0.53
218R	0.94	595R	1.16	977R	0.76
219R	0.97	596R	0.07	979R	0.07
220R	1.07	597R	1.45	980R	0.55
221R	0.95	598R	1.22	981R	1.20
222R	0.67	599R	1.23	982R	0.67
223R	1.27	601R	0.25	983R	0.15
224R	1.06	602R	0.74	985R	1.81
225R	0.72	603R	1.01	986R	0.89
227R	0.45	604R	0.79	987R	0.08
228R	0.06	605R	1.26	988R	1.60
229R	0.70	606R	1.13	989R	1.55
230R	0.47	607R	1.52	990R	1.06
231R	0.39	608R	0.82	991R	0.84
232R	0.05	609R	1.45	992R	1.56
233R	0.59	610R	1.15	993R	1.43
234R	1.38	611R	0.68	994R	0.80
235R	0.51	612R	1.20	995R	0.26
236R	0.06	613R	0.07	996R	1.51
237R	0.99	614R	0.79	997R	1.32
238R	0.05	615R	0.04	998R	0.10
239R	1.10	616R	0.06	999R	0.12
240R	0.36	618R	1.35	1000R	0.08
242R	0.59	619R	0.09	1001R	0.97
243R	0.45	620R	0.77	1002R	0.07
244R	0.05	621R	1.28	1003R	0.17
245R	0.41	622R	0.05	1004R	0.13
247R	0.70	623R	1.44	1005R	0.45
248R	0.04	624R	0.05	1006R	0.09
249R	0.12	625R	1.00	1007R	0.91
250R	1.29	626R	0.07	1008R	0.13
251R	0.86	627R	0.24	1009R	1.39
252R	1.18	628R	0.47	1010R	0.67
253R	0.06	630R	0.55	1011R	0.99
255R	0.30	631R	1.17	1012R	1.06
256R	0.05	632R	1.05	1013R	0.10
257R	1.41	633R	1.19	1014R	1.04
258R	0.06	634R	1.26	1015R	0.09
259R	0.36	635R	1.18	1016R	1.42

260R	0.99	636R	1.38	1017R	1.06
261R	0.07	637R	1.17	1018R	0.77
262R	0.09	638R	1.69	1021R	0.89
263R	0.69	639R	1.55	1023R	1.00
265R	0.87	640R	1.55	1024R	1.12
266R	0.96	641R	0.95	1025R	0.86
267R	0.80	642R	1.30	1026R	0.56
268R	1.18	643R	1.14	1027R	0.98
269R	1.32	644R	0.69	1028R	0.78
270R	0.11	645R	0.44	1029R	1.00
271R	0.93	646R	1.24	1030R	0.90
272R	0.76	647R	0.53	1031R	0.11
273R	0.77	648R	0.04	1032R	1.17
274R	1.14	649R	0.12	1033R	1.40
275R	0.10	650R	0.04	1035R	0.09
276R	1.20	651R	0.04	1036R	1.33
278R	0.60	652R	0.04	1037R	1.17
279R	0.12	653R	0.37	1038R	1.31
281R	1.03	654R	0.56	1039R	1.17
282R	0.09	655R	0.69	1040R	1.10
283R	0.13	656R	0.83	1041R	1.18
284R	0.93	657R	1.10	1042R	0.06
285R	0.93	658R	0.07	1043R	1.09
286R	0.05	659R	0.14	1044R	1.29
287R	1.08	660R	0.54	1045R	1.42
288R	0.87	661R	0.10	1046R	0.11
289R	0.68	662R	0.75	1047R	0.83
290R	0.76	663R	0.09	1048R	0.05
291R	0.83	664R	1.06	1049R	0.05
292R	0.09	665R	1.17	1050R	1.50
293R	0.95	666R	1.04	1052R	0.07
294R	0.11	667R	1.06	1053R	0.05
295R	1.18	668R	1.10	1055R	1.19
296R	1.12	669R	1.09	1056R	0.12
297R	1.07	670R	1.25	1057R	0.08
298R	0.04	671R	1.06	1058R	0.06
299R	1.26	672R	1.16	1059R	1.05
300R	0.04	673R	1.20	1060R	0.84
301R	0.43	674R	1.22	1061R	1.29

302R	0.05	675R	1.21	1062R	0.11
303R	1.21	676R	0.21	1063R	0.07
305R	1.07	678R	1.19	1064R	0.69
306R	0.21	679R	1.20	1065R	1.05
308R	1.22	680R	1.01	1066R	0.43
309R	1.26	681R	0.12	1067R	1.33
310R	0.80	683R	0.46	1068R	1.11
313R	0.94	684R	0.10	1069R	0.84
315R	1.15	685R	1.02	1070R	1.07
316R	0.49	686R	0.05	1071R	1.10
317R	0.38	688R	0.39	1072R	1.10
318R	1.06	689R	0.04	1073R	1.44
319R	0.54	691R	0.13	1074R	1.50
320R	0.05	692R	0.86	1075R	1.16
321R	0.23	693R	0.10	1076R	0.62
322R	1.29	694R	1.20	1077R	0.34
323R	0.55	695R	0.54	1078R	1.05
324R	0.07	696R	1.32	1079R	0.07
325R	0.44	697R	1.70	1080R	0.23
327R	1.19	698R	0.90	1081R	0.09
328R	0.08	699R	1.37	1082R	0.08
329R	1.04	700R	0.84	1083R	0.06
330R	0.29	701R	0.70	1084R	0.06
331R	0.21	702R	0.11	1085R	0.10
332R	0.04	703R	0.12	1086R	0.06
333R	1.67	704R	0.08	1087R	0.06
334R	0.68	705R	0.53	1088R	0.05
335R	0.77	706R	0.35	1089R	0.06
336R	0.04	707R	0.49	1090R	0.03
337R	0.88	708R	0.12	1091R	0.10
339R	0.06	709R	0.51	1092R	0.20
340R	0.91	710R	1.14	1093R	0.27
341R	0.99	711R	0.77	1094R	0.23
342R	0.60	712R	1.35	1095R	1.41
343R	0.12	713R	0.90	1096R	1.16
344R	0.78	715R	1.17	1097R	1.15
345R	0.70	716R	1.19	1098R	1.15
346R	0.92	717R	0.69	1100R	1.59
347R	1.37	719R	1.23	1101R	1.38

348R	1.28	720R	0.86	1102R	1.29
350R	1.19	721R	1.24	1103R	1.32
351R	0.97	722R	1.42	1104R	1.35
352R	1.15	723R	1.08	1105R	1.34
353R	1.15	724R	1.14	1107R	1.39
354R	1.15	725R	1.24	1108R	1.22
355R	1.13	727R	1.32	1109R	0.20
356R	1.56	728R	1.26	1110R	0.44
357R	1.03	729R	1.21	1111R	1.20
358R	1.00	730R	1.20	1112R	1.20
359R	1.03	731R	1.44	1113R	1.02
360R	1.12	732R	1.39	1115R	1.21
361R	1.25	733R	1.49	1116R	1.28
362R	0.96	734R	1.34	1117R	1.06
363R	1.13	736R	0.92	1120R	1.26
364R	0.81	737R	1.22	1122R	1.21
365R	0.84	738R	1.05	1123R	1.22
366R	0.03	739R	1.08	1124R	1.40
367R	0.18	740R	1.17	1125R	1.30
368R	1.00	741R	1.16	1128R	0.78
369R	1.29	742R	1.27	1129R	1.40
370R	0.42	743R	0.99	1130R	1.05
371R	1.18	744R	0.08	1131R	1.34
372R	1.06	745R	1.33	1132R	1.92
373R	0.04	746R	1.16	1133R	1.32
374R	0.02	747R	1.03	1134R	1.29
375R	1.40	748R	1.19	1135R	1.37

- [0703] 表中，nR表示法(n为整数)表示第n位氨基酸残基突变为R。
- [0704] Cas变体蛋白不同突变位点组合的克隆的构建，以及编辑活性验证：
- [0705] 根据上述不同突变位点编辑效率结果，选择不同突变位点进行多突变组合，以426和860双位点Cas突变体的质粒构建为例，进行介绍。
- [0706] 以C12-279-pCDH质粒为模板，ChkCas12-PF1+279_426_R进行PCR扩增获得突变片段D426R-F1，279_426_F+279_860_R进行PCR扩增获得突变片段D426R-L860R-F1，ChkCas12-PR2+279_860_F进行PCR扩增获得突变片段L860R-F2。质粒C12-279-pCDH利用HindIII+KpnI酶切，胶回收5647bp载体片段，与片段D426R-F1、D426R-L860R-F1以及L860R-F2进行体外重组，热击转化大肠

杆菌获得变体质粒C12-279-pCDH-426-860，其他多点突变的质粒构建方式与C12-279-pCDH-426-860一致。

[0707] 其中，Mut-02-1-426-846-858-860突变体的氨基酸序列为：

RFVVLNVNQFRCPNNAFRQASMKTDDEKKDTAIKSYTSWLLPNDRKEKDMVRSFLALDQGSRRFF

FDLMQAWYGGGLTPDIKSVTKERDLVDLWCAIYWFRPMKKELASHPIDRVDLAKTFQRYYYGGPASDV
VQEYLSASIGEDCCWDCRQKYQEFCKNLGVDFTPDLKTLVREKLIIVALNDGSRAAISNLFNGGKE
DRNVKVNICKILIALEKAGKSVKYVRDVQSILKCANAKDREDENRIYADKNGRPGTLLLLDRKGE
NTYDAEVLKRYLRKTIKSKNAPLVWNYNQKLFYIERGIRNLLRRTINYDAWAWGEMWRVGHGHTPLQT
KATRNHYHFAQEQLKRHSRIAAASQSSHAIAVALNEFFESPFFDGENPFTICPHHLGKNLEKLFKAWADE
KNQTDDEEDAGETAITDYCAEFKRGFDREPIRNLRYVYASLSKYSAKELIQAAKYNNQGFERYQRQKA
HPVTPDNQGYTWPEAVIKPSKAERKNRENSLDTRIWVSVKLLQKDGWTKHHIPFYNLRFEEVYAA
ASIAEDMPSPTFRNSRFGKLPKLLNTHAKINKKKKDGKKDKKAVNAAKREARIYLAKEGRLPAPSV
PLDKLSAVIARVNGKFQVTVPVKFKVKNQPKYPLPQLGQIILGYDQNLTAHAWALFEVVTEDETPGAH
FCRNQYLRVLKTGQVRSITKTKDGQEIDQLSYDGLFKEYKEYGEWRKQAKKFASQWYITTKVRKGKET
TLLSQPALERFESIEKYKPALYRFNKEYARLLAVIRRKTLNELEEIRPEIFRLVEQGFICRFGSLSLSSFE
AIRAAKAVIYGYFSTALKHDHNTPTDDERQARDPELFGLLNKLRRQNKGEKINRAANALIRIALE
NKADFIRGEGDLPTTNKSVKKGQNSRSMDWLARGLFNKICQLAVMHNIPTAANPHSTSHQDPFEHN
KDFDDPQPAMKCRYAEFKIEDIGDSVLERLGTSLRNAKAGQTGAYYYKGAQDFLAHYGLQDIEEELK
KCRRGRKANMPCWELQKRLIQKLGSKDAVVYIPMRGGRIYLATHSVTTGAKPIIFNGEEVWVSNADFI
AAVNIGLTIPTSKKDEEHPDRENDKAIKRSVRRPRKSGERRSGDKMPATARKT (SEQ ID NO: 760)。

- [0708] 使用与本实验例前述相同的方法对多点突变体进行编辑活性验证。
- [0709] 结果显示，绝大多数多点突变体的编辑效率相比于野生型都有提高，具体结果如表21和图19所示。其中野生型C12-279组编辑效率绝对值为8.7%。
- [0710] 表21.C12-279各突变体在Reporter3细胞系中的编辑效率
- [0711] (以相比于C12-279的编辑效率的倍数表示)

分组	编辑效率（以相比于 C12-279 的编辑效率的倍数表示）	分组	编辑效率（以相比于 C12-279 的编辑效率的倍数表示）
Wt 野生型	1.00	858+988+1132	1.97
3	1.71	988+1132	1.53
5	1.66	Mut-01	1.58
7	1.48	Mut-01+376	1.99
333	1.57	Mut-01+485	1.59
376	1.59	Mut-02	1.72
426	1.85	Mut-02+1+3+426+858+860	3.70
485	1.48	Mut-02+1+3+426+860	3.35
846	1.61	Mut-02+1+333+426+858+860	3.68
858	1.57	Mut-02+1+333+426+860	2.84
860	1.78	Mut-02+1+426+485+858+860	3.67
988	1.66	Mut-02+1+426+485+860	3.25
1132	1.70	Mut-02+1+426+846+858+860	3.88
2+5+846+858	2.68	Mut-02+1+426+846+860	3.83

3+1132	0.66	Mut-02+1+5+426+858+860	3.77
3+333+426	2.29	Mut-02+1+5+426+860	3.62
3+426+858	2.51	Mut-02+1132	2.10
3+426+860	2.42	Mut-02+3	0.13
3+5	2.06	Mut-02+3+376+426	2.57
3+7	1.38	Mut-02+3+426	2.66
3+846	1.71	Mut-02+3+426+858+860	3.58
3+846+1132	1.92	Mut-02+3+426+860	3.68
3+846+858	2.50	Mut-02+333	2.03
3+846+860	2.53	Mut-02+333+336+352+376+426	0.13
3+846+988	2.32	Mut-02+333+352+376+426	2.24
3+858	2.15	Mut-02+333+426	2.40
3+858+860	2.48	Mut-02+333+426+858+860	3.54
3+858+988	2.18	Mut-02+333+426+860	3.49
3+860	2.41	Mut-02+376	0.14
333+376	1.94	Mut-02+376+426	2.54
333+376+426	2.75	Mut-02+376+426+485+860	2.21
333+376+485	1.83	Mut-02+376+426+860+865	2.57
333+426	2.47	Mut-02+426	2.36
333+426+1132	2.27	Mut-02+426+1132	1.87
333+426+485	2.33	Mut-02+426+485	2.28
333+426+846	2.34	Mut-02+426+485+858+860	3.06
333+426+858	2.28	Mut-02+426+485+860	2.04
333+426+860	1.77	Mut-02+426+485+860	3.04
333+485	1.79	Mut-02+426+846	2.65
352+426	1.79	Mut-02+426+846+858+860	3.29
376+426	1.94	Mut-02+426+846+860	3.48
376+426+485+ 660	1.86	Mut-02+426+860	3.06
376+485	1.51	Mut-02+485	1.31
426+649	2.05	Mut-02+5	2.69
426+846+858+ 860	3.02	Mut-02+5+426	2.77
426+858+860	3.15	Mut-02+5+426+858+860	3.58

426+858+988	0.62	Mut-02+5+426+860	3.38
428+485	2.26	Mut-02+639	2.18
5+1132	1.45	Mut-02+7	2.60
5+333+426	2.97	Mut-02+858	2.48
5+426+858	2.87	Mut-02+860	3.00
5+426+860	3.30	Mut-02+988	1.75
5+846	1.84	Mut-03	2.01
5+846+1132	1.90	Mut-03+1132	1.61
5+846+858	2.65	Mut-03+3	1.94
5+846+860	2.32	Mut-03+3+107+426	2.81
5+858	2.15	Mut-03+3+376	2.44
5+858+988	2.18	Mut-03+3+639	2.40
5+860	1.73	Mut-03+333	1.78
7+426+846	3.02	Mut-03+333+336	0.87
7+426+858	3.09	Mut-03+376	2.30
846+1132	1.66	Mut-03+376+1132	2.99
846+585+860	2.36	Mut-03+426	2.20
846+858	1.96	Mut-03+426+1132	2.11
846+858+1132	1.77	Mut-03+485	1.51
846+858+988	2.51	Mut-03+5	2.08
846+860	1.99	Mut-03+639	2.13
846+860+1132	1.84	Mut-03+639+1132	1.82
846+860+988	2.42	Mut-03+7	1.19
846+988	1.72	Mut-03+846	2.13
858+860	2.23	Mut-03+858	2.06
858+860+1132	2.06	Mut-03+860	2.47
858+988	2.11		

[0712] 表中，整数n表示第n位氨基酸残基突变为R。Mut-01为Q186R变体，Mut-02为Q186R&D352R双点突变体，Mut-03为G184R+Q186R+D352R三点突变体；5+426+860表示第5、426和860位同时突变为R；Mut-02+860表示在Mut-02突变体的基础上额外引入第860位点突变(突变为精氨酸R)后得到的多点突变体；其他多点突变体以此类推(突变为精氨酸R)。

[0713] 实验例13：不同突变体针对TTR和HBG不同靶点的编辑效率检测

[0714] 本实验例中，首先针对TTR基因(GeneBank:NG_009490.1)和HBG基因(GeneBank:NC_000011.10)，选择PAM序列为TTN的靶点，设计和构建靶向不同位置的sgRNA(如表22所示)，用于与不同突变体进行组合，来检测编辑效率。

[0715] 表22.靶向TTR和HBG的sgRNA

sgRNA 名	PAM	靶点	sgRNA 序列
---------	-----	----	----------

称			
C12-279-TTR01	TTC	catgagcatgcagaggtgagtat (SEQ ID NO: 722)	gtaatgcgtctccattgacgccatgagcatgcagaggtgagtat (SEQ ID NO: 783)
C12-279-TTR02	TTT	tcctataaggtgtgaaagtctgg (SEQ ID NO: 761)	gtaatgcgtctccattgacgctcctataaggtgtgaaagtctgg (SEQ ID NO: 784)
C12-279-TTR03	TTC	cagtaagatttgggtgtctat (SEQ ID NO: 762)	gtaatgcgtctccattgacgccagtaagatttgggtgtctat (SEQ ID NO: 785)
C12-279-TTR04	TTG	tatatcccttctacaaattcttc (SEQ ID NO: 763)	gtaatgcgtctccattgacgctatatcccttctacaaattcttc (SEQ ID NO: 786)
C12-279-TTR05	TTT	GTGTCTGAGGCTGGC CCTACGGTG (SEQ ID NO: 764)	gtaatgcgtctccattgacgcGTGTCTGAGGCTGGC CCTACGGTG (SEQ ID NO: 787)
C12-279-TTR06	TTC	AGAAAGGCTGCTGAT GACACCTG (SEQ ID NO: 765)	gtaatgcgtctccattgacgcAGAAAGGCTGCTGAT GACACCTG (SEQ ID NO: 788)
C12-279-TTR07	TTG	GCATCTCCCCATTCCA TGAGCATG (SEQ ID NO: 766)	gtaatgcgtctccattgacgcGCATCTCCCCATTCCA TGAGCATG (SEQ ID NO: 789)
C12-279-TTR08	TTC	ACAGCCAACGACTCC GGCCCCCG (SEQ ID NO: 767)	gtaatgcgtctccattgacgcACAGCCAACGACTCC GGCCCCCG (SEQ ID NO: 790)
C12-279-TTR09	TTG	TAGAAGGGATATACA AAGTGGAA (SEQ ID NO: 768)	gtaatgcgtctccattgacgcTAGAAGGGATATACA AAGTGGAA (SEQ ID NO: 791)
C12-279-TTR10	TTC	TAGATGCTGTCCGAG GCAGTCCTG (SEQ ID NO: 769)	gtaatgcgtctccattgacgcTAGATGCTGTCCGAG GCAGTCCTG (SEQ ID NO: 792)
C12-279-TTR11	TTT	GGTGTCTATTTCCACT TTGTATA (SEQ ID NO: 770)	gtaatgcgtctccattgacgcGGTGTCTATTTCCACT TTGTATA (SEQ ID NO: 793)
C12-279-TTR12	TTT	CTGAACACATGCACG GCCACATTG (SEQ ID NO: 771)	gtaatgcgtctccattgacgcCTGAACACATGCACG GCCACATTG (SEQ ID NO: 794)
C12-279-TTR13	TTA	CCCAGAGGCAAATGG CTCCCAGG (SEQ ID NO: 772)	gtaatgcgtctccattgacgcCCCAGAGGCAAATGG CTCCCAGG (SEQ ID NO: 795)
C12-279-TTR14	TTC	CTCCTCAGTTGTGAG CCCATGCA (SEQ ID NO: 773)	gtaatgcgtctccattgacgcCTCCTCAGTTGTGAG CCCATGCA (SEQ ID NO: 796)

C12-279-HBG01	TTG	GCCAGCCTTGCCTTG ACCAATAG (SEQ ID NO: 774)	gtaatgcgtctccattgacgcGCCAGCCTTGCCTTG ACCAATAG (SEQ ID NO: 797)
C12-279-HBG02	TTG	ACCAATAGTCTTAGA GTATCCAG (SEQ ID NO: 775)	gtaatgcgtctccattgacgcACCAATAGTCTTAGA GTATCCAG (SEQ ID NO: 798)
C12-279-HBG03	TTG	CCTTGTC AAGGCTATT GGTCAAG (SEQ ID NO: 776)	gtaatgcgtctccattgacgcCCTTGTC AAGGCTAT TGGTCAAG (SEQ ID NO: 799)
C12-279-HBG04	TTG	CCTTGACCAATAGCCT TGACAAG (SEQ ID NO: 777)	gtaatgcgtctccattgacgcCCTTGACCAATAGCC TTGACAAG (SEQ ID NO: 800)
C12-279-HBG05	TTG	ACCAATAGCCTTGAC AAGGCAAA (SEQ ID NO: 778)	gtaatgcgtctccattgacgcACCAATAGCCTTGAC AAGGCAAA (SEQ ID NO: 801)
C12-279-HBG06	TTG	GTCAAGGCAAGGCTG GCCAACCC (SEQ ID NO: 779)	gtaatgcgtctccattgacgcGTCAAGGCAAGGCTG GCCAACCC (SEQ ID NO: 802)
C12-279-HBG07	TTG	GTCAAGTTTGCCTTG TCAAGGC (SEQ ID NO: 780)	gtaatgcgtctccattgacgcGTCAAGTTTGCCTTG TCAAGGC (SEQ ID NO: 803)
C12-279-HBG08	TTG	TCAAGGCTATTGGTC AAGGCAAG (SEQ ID NO: 781)	gtaatgcgtctccattgacgcTCAAGGCTATTGGTC AAGGCAAG (SEQ ID NO: 804)
C12-279-HBG09	TTG	ACAAGGCAAACCTGA CCAATAGTC (SEQ ID NO: 782)	gtaatgcgtctccattgacgcACAAGGCAAACCTGA CCAATAGTC (SEQ ID NO: 805)

- [0716] 根据上述表格中sgRNA序列分别构建sgRNA质粒：将载体质粒SpCas9-gRNA-pUC57Kan利用BbsI(Thermofisher)和XhoI(Thermofisher)进行线性化，针对不同的sgRNA序列合成引物，退火后连接至线性化载体中，转化大肠杆菌获得最终sgRNA表达载体质粒。
- [0717] 不同突变体质粒与不同的sgRNA质粒分别进行组合，利用PEI转染HEK293T细胞，48h后收集细胞，使用DirectPCR Lysis Reagent(Cell)(VIAGEN：302-C)裂解细胞，根据不同的靶点选择不同的引物进行PCR扩增，Sanger测序，利用TIDE分析编辑效率。

[0718] 具体扩增和测序引物如表23所示。重复三次实验，编辑效率结果如图20A和图20B所示。各批次实验中各sgRNA组均产生了有效的编辑，在许多个靶点的编辑效率优于野生型C12-297。

[0719] 表23.不同靶点扩增、测序引物

扩增引物名称	引物序列	对应 sgRNA	测序引物
ChkTTR-PF1	GAACGAATGTTCCGATGCTCTAATC (SEQ ID NO: 806)	C12-279-TTR05	ChkTTR-PF1
ChkTTR-PR1	AATGAGGTAGAATGCTCAGAGTTC AAGT (SEQ ID NO: 807)		
ChkTTR-PF2	CAACTGTTCTCAGGGGACCTATTTT C (SEQ ID NO: 808)	C12-279-TTR06、C12-279-TTR10、C12-279-TTR12 、 C12-279-TTR13	ChkTTR-PF2
ChkTTR-PR2	CTCTACTGTCTGCCCCTAAATGATG C (SEQ ID NO: 809)		
ChkTTR-PF3	TGCCATTTAATTTCAGTTAGGAGTT TTC (SEQ ID NO: 810)	C12-279-TTR01、C12-279-TTR02、C12-279-TTR03 、 C12-279-TTR04、 C12-279-TTR07、C12-279-TTR09、C12-279-TTR11 C12-279-TTR14	ChkTTR-PF3
ChkTTR-PR3	CAGACCTCCGAGAAGCCAGATGT (SEQ ID NO: 811)		
ChkTTR-PF4	CAAGACCTGACTCTGTACTCCTGCT CT (SEQ ID NO: 812)	C12-279-TTR08	ChkTTR-PR4
ChkTTR-PR4	AFTTGATCTCTCCTAGCGTTCTGC (SEQ ID NO: 813)		
ChkHBG01-PF1	ACGGCTGACAAAAGAAGTCCTGG (SEQ ID NO: 814)	C12-279-HBG01 至 C12-279-HBG09	ChkHBG01-PR1
ChkHBG01-PR1	CATGGGTAGACAACCAGGAGCC (SEQ ID NO: 815)		

[0720] 实验例14：C12-279突变体失活版本制备与活性检测

[0721] 在前述实验例设计的多点突变体的基础上进一步引入D651A、E891A、D1082A突变中的任1种或更多种，利用与前述实验例10相同的方法，构建突变克隆质粒，在Reporter3细胞系中进行编辑，通过流式细胞仪分析编辑后恢复GFP表达的细胞的比例，判定突变体编辑效率。具体结果见图21。图中各突变体只要包含D

651A、E891A、D1082A突变中的至少1种，编辑效率即降至1.3%以下。引入D651A、E891A、D1082A中任一种都可得到deadCas12(dCas12)。

[0722] 其中，dCas突变体Mut-02-1-426-846-858-860-D651A-E891A-D1082A的氨基酸序列为：

```
RFVVL SVNQFRCNPNAFRQASMKT DDEKKDTA KSYTSWLLPNDRKEKDMVRSFLALDQGSRRFF
FDLMQAWYGGGLTPDIKSVTKERDLVDLWCAIYWFRPMKKELASHPIDRVDLAKTFQRYYGGPASDV
VQEYLSASIGEDCCWND CRQYQEFCKNLGVDFTPDLKTLVREKLI AVALNDGSRAAISNLFNGGKKE
DRNVKVNICKILIALEKAGKSVKYVRDVQSIILKCANAKDREDFNRIYADKNGRPGTLLLLDRKGE
NTYDAEVLKRYLRKTIKSKNAPLVWNYNQKLFEYIERGIRNLLRRTINYDAWAWGEMWRVGH TPLQT
KATRNYHFAEQQLKRHSRIA AASQSSHAIAVALNEFFESPFFDGENPFTICPHHLGKNLEKLFKAWADE
KNQTDEEDAGETAITDYCAEFKRGFDREPIRNLLRYVYASLRSKYSAKELIQA AKYNQQFERYQRQKA
HPVTPDNQGYTWPEAVIKPSKAERKNRENSLDTRIWVSVKLLQKDGTWEKHHIPFYNLRFEEVYAA
ASIAEDMPSPTFRNSRFGFKLPKLLNTHAKINKKKKDGKKDKKAVNAAKREARIYLA AKEGRLPAPSV
PLDKLSAVIARVNGKFQVTVPVKFKV NKQPKYPLPQLGQIILGYAQNL TANHAWALFEVVTEDTPGAH
FCRNQYLRVLKTGQVRSITKTDGQEIDQLSYD GLEYKEYGEWRKQAKKFASQWYITTKVRKGKET
TLLSQPALERFESIEKYK PALYRFNKEYARLLLAVIRRKTLNELEEIRPEIFRLVEQGFICRFGSLSLSSFE
AIRAAKAVIYGYFSTALKHDHNT PITDDERQARDPELFGLLNKL RTRRQNKGE EKINRAANALIRIALE
NKADFIRGAGDLPTTNKSVKKGQNSRSM DWLARGLFNKICQLAVMHNIPTA ANPHSTSHQDPFEHN
KDFDDPQPAMKCRYAEFKIEDIGDSVLERLGTSLRNAKAGQTGAYYYKGAQDFLAHYGLQDIEEELK
KCRRGRKANMPCWELQKRLIQKLGSKDAVVYIPMRGGRIYLATHSVTTGAKPIIFNGEEVWVSNAAEI
AAVNIGLTIIPTSKKDEEHPDRENDKAI RKSVRRPRKSGERRSGDKMPATARKT (SEQ ID NO: 816)。
```

[0723] 实验例15：mRNA+gRNA递送

[0724] 使用Mut-02-3-426-860突变体的编码mRNA(体外转录获得)与修饰的gRNA(如表24所示)一起对TTR基因进行编辑。

[0725] 表24.修饰的gRNA

gRNA 名称	gRNA 序列（包含修饰）	修饰	Sanger 测序确定的编辑效率
C279-dmTTR01-01	dAdTdGdTdGdTdTdTdTdGdTdCdAdAdAdAdGdAdCdCdTdTdTdTrGrUrArArUrGrCrGrUrCrUrCrCrCrArUrUrGrArCrGrCrCrArUrGrArGrCrArUrGrCrArGrGrUrGrArGrUrA*mU (SEQ ID NO: 817)	5'端增加 25nt 的 DNA 核苷酸序列，3'端最后 1 个核苷酸使用硫代磷酸酯和 2'-氧甲基化修饰	52.0%
C279-mTTR01-01	mG*mU*mA*rArUrGrCrGrUrCrUrCrCrCrArUrUrGrArCrGrCrCrArUrrGrArGrCrArUrGrCrArGrArGrGrUrGrArG*mU*mA*mU (SEQ ID NO: 818)	5'和 3' 各 3 个核苷酸进行硫代磷酸酯和 2'-氧甲基化修饰	29.5%
C279-dmTTR01-02	dGdTdTdGdCdAdAdTdCdCdCdAdAdGrGrUrArArUrGrCrGrUrCrUrCrCrCrArUrUrGrArCrGrCrCrArUrGrArGrCrArUrGrCrArGrArGrUrGrArGrUrA*mU (SEQ ID NO: 819)	5'端增加 14nt 的 DNA 核苷酸序列，3'端最后 1 个核苷酸进行硫代磷酸酯和 2'-氧甲基化修饰	47.5%
C279-mTTR01-02	mG*rUrArArUrGrCrGrUrCrUrCrCrCrArUrUrGrArCrGrCrCrArUrGrArGrCrArUrGrCrArGrGrUrGrArGrUrA*mU (SEQ ID NO: 820)	5'和 3' 各 1 个碱基进行硫代磷酸酯和 2'-氧甲基化修饰	26.8%

- [0726] 表中，“r”表示天然碱基，“d”表示脱氧修饰，“m”表示甲基化修饰，“★”表示硫代磷酸酯修饰。
- [0727] mRNA与gRNA一同电击转化HEK293细胞，48h后收集细胞，使用DirectPCR Lysis Reagent(Cell)(VIAGEN：302-C)裂解细胞，Sanger测序，利用TIDE分析编辑效率。结果如表24所示。
- [0728] 3'端增加DNA核苷酸序列后，编辑活性显著提高。例如增加序列
dAdTdGdTdGdTdTdTdTdTdGdTdCdAdAdAdAdGdAdCdCdTdTdTdT (SEQ ID NO: 821) 或
dGdTdTdGdCdAdAdTdCdCdCdAdAdG(SEQ ID NO: 822)。
- [0729] 另外，还利用引物TTR-NGS-PF2(GCGTAACTTAATCCAGACTTTCACACCTT，SEQ ID NO:823)以及TTR-NGS-PR2(GGTCATTCATCACCTTCCTTAGGACA，SEQ ID NO:824)进行PCR扩增后建库，进行NGS测序，检测编辑效

率。其中突变体Mut-02-3-426-860与C279-dmTTR01-01组合电转编辑效率达到79.64%。

[0730] 随后，又使用C279-dmTTR01-02与不同突变体组合进行测试，具体NGS测序结果如表25、图22所示。

[0731] 表25.修饰的gRNA(C279-dmTTR01-02)与不同突变体组合的编辑效率(NGS测定)

突变体	sgRNA	NGS 确定的编辑效率
Mut-02-426-860	C279-dmTTR01-02	24.63%
Mut-02-5-426-860	C279-dmTTR01-02	63.48%
Mut-02-1-5-426-858-860	C279-dmTTR01-02	92.18%
Mut-02-1-426-846-858-860	C279-dmTTR01-02	88.05%
Mut-02-1-3-426-858-860	C279-dmTTR01-02	89.67%
Mut-02-3-426-860	C279-dmTTR01-02	79.99%

[0732] 实验例16：不同内源靶基因的编辑效率验证

[0733] 根据不同的疾病相关靶点设计了不同的gRNA靶点(表26)，将突变体Mut-02-1-426-846-858-860蛋白与表26中的gRNA组合进行编辑。使用与实施例十三相同的方法，包括质粒构建以及转染、编辑效率检测。结果如表26所示。

[0734] 表26.靶向不同内源基因的编辑效率

名称	靶基因	PAM 位置的序列	gRNA 指导序列	编辑效率
sgRNA-BCL11A-01-CTX-001-PAM-TTC	BCL11A	TTC	ctggagcctgtgataaaagcaac (SEQ ID NO: 825)	27.40%
sgRNA-BCL11A-02-CTX-001-PAM-TGC	BCL11A	TGC	aagctaacagttgctttatcac (SEQ ID NO: 826)	1%
sgRNA-HBG-01-ZBTB7A-binding-site-PAM-TTG	HBG	TTG	cattgagatagtgtggggaagg (SEQ ID NO: 827)	10.40%
sgRNA-HBG-02-ZBTB7A-binding-site-PAM-TTT	HBG	TTT	gcattgagatagtgtggggaagg (SEQ ID NO: 828)	10.90%
sgRNA-HBG-03-ZBTB7A-binding-site-PAM-TTG	HBG	TTG	agatagtgtggggaagggcccc (SEQ ID NO: 829)	23.20%
sgRNA-HBG-04-ZBTB7A-binding-site-PAM-TTG	HBG	TTG	ggggcccttccccacactatct (SEQ ID NO: 830)	18.80%
sgRNA-HBG-05-ZBTB7A-binding-site-PAM-TAT	HBG	TAT	cctcttggggcccttccccac (SEQ ID NO: 831)	1%

sgRNA-HBG-06-ZBTB7A-binding-site-PAM-GTA	HBG	GTA	tcctcttgggggccccctcccca (SEQ ID NO: 832)	1.20%
sgRNA-HBG-07-ZBTB7A-binding-site-PAM-TTA	HBG	TTA	gcagtatcctcttgggggccct (SEQ ID NO: 833)	1.60%
sgRNA-HBG-08-(-175)-PAM-TTC	HBG	TTC	cccacactatctcaatgcaaata (SEQ ID NO: 834)	43.10%
sgRNA-HBG-09-(-175)-PAM-TTT	HBG	TTT	cagacagatatttgattgagat (SEQ ID NO: 835)	39.40%
sgRNA-HBG-10-(-175)-PAM-TTT	HBG	TTT	agccagggaccgttcagacaga (SEQ ID NO: 836)	34.20%
sgRNA-HBG-11-(-88)-PAM-TTG	HBG	TTG	acaaggcaaacitgaccaatagt (SEQ ID NO: 837)	33.20%
sgRNA-HBG-12-(-73)-PAM-TTG	HBG	TTG	accaatagtcttagagtatccag (SEQ ID NO: 775)	14.80%
sgRNA-HBG-13-(-56)-PAM-TTC	HBG	TTC	atccctagccagccgcggccccc (SEQ ID NO: 838)	14.70%
sgRNA-BACH2-01-PAM-TTG	BACH2	TTG	tagggtagccctgtgcaccggg (SEQ ID NO: 839)	9.60%
sgRNA-BACH2-02-PAM-TTC	BACH2	TTC	cgcggcagccactcgtggtatc (SEQ ID NO: 840)	29.70%
sgRNA-BACH2-03-PAM-TTG	BACH2	TTG	gtccttgaggacagaccactg (SEQ ID NO: 841)	7.10%
sgRNA-BACH2-04-PAM-TTC	BACH2	TTC	atcctgtttccagtgggtgtct (SEQ ID NO: 842)	17%
sgRNA-BACH2-05-PAM-TTG	BACH2	TTG	gaagagttgaccatcagttatgg (SEQ ID NO: 843)	28.70%
KLKB1-sgRNA01	KLKB1	TTC	CTCTACTCCTCAAGAAAA CACCA (SEQ ID NO: 844)	19%
KLKB1-sgRNA02	KLKB1	TTG	ACACAGAACCCTGCCATT CTAAG (SEQ ID NO: 845)	27.20%
KLKB1-sgRNA03	KLKB1	TTC	AGTCTGCACAACAAAAA CAAGCA (SEQ ID NO: 846)	24.30%
KLKB1-sgRNA04	KLKB1	TTG	GGGTGATAGGTGCAGATG GTCCG (SEQ ID NO: 847)	21.20%
KLKB1-sgRNA05	KLKB1	TTA	CCCAACAGTTGGTATAAA TTGTG (SEQ ID NO: 848)	未检测
KLKB1-sgRNA06	KLKB1	TTT	CAGTCTGCACAACAAAA ACAAGC (SEQ ID NO: 849)	25.50%
KLKB1-sgRNA07	KLKB1	TTC	AGGTGGTCCCTTAGTTTG	14.60%

			CAAAC (SEQ ID NO: 850)	
KLKB1-sgRNA08	KLKB1	TTT	GGGGTGTACATGGAAGCT ACATC (SEQ ID NO: 851)	23.40%
KLKB1-sgRNA09	KLKB1	TTG	CCTATTAAAGTACAGTCC CGGAG (SEQ ID NO: 852)	1%
KLKB1-sgRNA10	KLKB1	TTA	TAGCGGTAGGTGTTCTC CGGGA (SEQ ID NO: 853)	9.40%
PCSK9-sgRNA01	PCSK9	TTC	CGTGCTCGGGTGCTTCGG CCAGG (SEQ ID NO: 854)	10%
PCSK9-sgRNA02	PCSK9	TTA	CCCCTCCACGGTACCGGG CGGAT (SEQ ID NO: 855)	20.40%
PCSK9-sgRNA03	PCSK9	TTC	ATCCGCCCCGGTACCGTGG AGGGG (SEQ ID NO: 856)	17.60%
PCSK9-sgRNA04	PCSK9	TTG	GCAGTTGAGCACGCGCA GGCTGC (SEQ ID NO: 857)	21%
PCSK9-sgRNA05	PCSK9	TTG	GCCACGCCGGCATCCCGG CCGCT (SEQ ID NO: 858)	4.90%
PCSK9-sgRNA06	PCSK9	TTG	AGGACGCGGCTGTACCCA CCCGC (SEQ ID NO: 859)	8.20%
PCSK9-sgRNA07	PCSK9	TTT	GGCCGCTGTGTGGACCTC TTTGC (SEQ ID NO: 860)	7.80%
PCSK9-sgRNA08	PCSK9	TTG	TCTACGGCGTAGGCCCCC AGGAC (SEQ ID NO: 861)	29.00%
SOD1-sgRNA01	SOD1	TTG	CCCAAGTCTCCAACATGC CTAAT (SEQ ID NO: 862)	35.60%
SOD1-sgRNA02	SOD1	TTC	CCCACACCTTCACTGGTC CATT (SEQ ID NO: 863)	32.10%
SOD1-sgRNA03	SOD1	TTA	ATGCTTCCCCACACCTTC ACTGG (SEQ ID NO: 864)	34.30%
SOD1-sgRNA04	SOD1	TTA	AGCATCTTGTTACCTCTCT TCAT (SEQ ID NO: 865)	未检测
SOD1-sgRNA05	SOD1	TTG	GGCAATGTGACTGCTGAC AAAGA (SEQ ID NO: 866)	38.20%
SOD1-sgRNA06	SOD1	TTC	AGCACGCACACGGCCTTC GTCGC (SEQ ID NO: 867)	21.50%
SOD1-sgRNA07	SOD1	TTA	AAGGACTGACTGAAGGC CTGCAT (SEQ ID NO: 868)	33.20%
BACE1-sgRNA01	BACE1	TTG	AGGGGGAAGCCAGCACC ACAAAG (SEQ ID NO: 869)	28.90%

BACE1-sgRNA02	BACE1	TTC	CCTCTTAGTACAACATGA CAAG (SEQ ID NO: 870)	未检测
BACE1-sgRNA03	BACE1	TTC	CCAGTCATCTCACTCTAC CTAAT (SEQ ID NO: 871)	24.50%
BACE1-sgRNA04	BACE1	TTG	CCCTCTCCCCAGTGCACG ATGAG (SEQ ID NO: 872)	18.90%
BACE1-sgRNA05	BACE1	TTC	AGCAGGGAGATGTCATCA GCAAA (SEQ ID NO: 873)	27.90%
BACE1-sgRNA06	BACE1	TTA	GGTAGAGTGAGATGACTG GGAAA (SEQ ID NO: 874)	10.80%
BACE1-sgRNA07	BACE1	TTC	CCCCTCAACCAGTCTGAA GTGCT (SEQ ID NO: 875)	35.30%
BACE1-sgRNA08	BACE1	TTC	AGATCCTGTCCATTGATCT CCAC (SEQ ID NO: 876)	5.70%
BACE1-sgRNA09	BACE1	TTG	GCACGCACAGTGACGTTG GGGCC (SEQ ID NO: 877)	4.30%

- [0735]实验例17：C12-279突变体Mut-02-1-426-846-858-860的PAM识别
- [0736]采用与前述实施例相同的方法通过细菌体内编辑实验，最终经NGS测序，确定突变体Mut-02-1-426-846-858-860识别的PAM为：5’-WTN-3’（W为A或T）。如图23所示。
- [0737]虽然以上描述了本披露的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本披露的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此，本披露的保护范围由所附权利要求书限定。

细则 91,
03.01.2025

权利要求书

[权利要求 1]

一种Cas12蛋白，其特征在于，

(a)所述Cas12蛋白为CLUSTER1蛋白、CLUSTER2蛋白、CLUSTER3蛋白、CLUSTER4蛋白、CLUSTER5蛋白、CLUSTER6蛋白、CLUSTER7蛋白、CLUSTER8蛋白、CLUSTER9蛋白、CLUSTER10蛋白、CLUSTER11蛋白、CLUSTER12蛋白或CLUSTER13蛋白；

或，

(b)所述Cas12蛋白的氨基酸序列包含或与如SEQ ID NO:1-53、696和728中任一所示的氨基酸序列具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性；

可选地，所述Cas12蛋白保留氨基酸序列如SEQ ID NO:1-53、696和728中任一所示的蛋白的功能；

可选地，所述Cas12蛋白可识别的PAM序列(5'→3')选自以下的任何一种或几种：

A、C、T、G、

TA、TC、GN、AA、AG、TG、AN、GG、CG、TN、NT、NG、GT、NA、CC、AC、GC、AT、CT、GA、TT、CN、NC、CA、

NTN、ANN、TTN、ATC、NAC、AGA、TGC、TCT、NGN、CGC、NTC、GCA、TCG、TTT、CCG、GGG、NAG、ACA、CGG、CNG、ACN、GTG、CNT、TTG、TCN、GGT、TNC、CCN、CGT、TGG、CGA、NGG、TCC、AGT、NCA、CAN、TCA、NNG、TAC、CCT、NTG、CGN、TGN、CAT、NGC、GNG、GNC、NNA、GAA、TTC、CTT、ATA、TAT、GCT、

NCC、TTA、AGN、GNN、CAA、CAC、AGG、NTT、ANG、
GNA、GTT、NGA、TAA、GTA、GGN、GNT、NCG、ATT、
CCA、CNN、AAA、AAC、ATN、GAG、CTG、ACG、NAA、
TAN、NAT、CNA、GCN、GTC、NCN、CTN、CNC、ANT、
NNC、CAG、NAN、ATG、NCT、CCC、AAN、TGT、TNA、
ACC、GAT、ACT、AAT、GGA、GAN、ANC、GAC、NNT、
CTA、TNN、GCG、GTN、TNT、AAG、TAG、NGT、NTA、
ANA、CTC、GCC、TGA、GGC、AGC、TNG、
NGAA、GANC、GCNC、NTNT、TGGG、AAGG、AAGN、N
TNN、TCGT、CNTG、NTGG、CCGN、ATAT、TGCA、NG
GT、TGNT、NNTG、NCCG、ACAT、GNTG、CGCG、GAC
N、NTCG、TCNG、CTGC、TNNC、GGTN、CGNN、TCC
A、AGCN、TNAG、GGAC、GATC、AANA、NATG、CCAG、
NAAT、TCNT、CACT、CGGC、CGAN、CNCA、ATNT、N
NNG、NGCT、CTGG、GGAN、NTNC、ATTC、AATG、C
NTC、TGGN、NATC、GTCG、ACNC、GCNN、GACT、C
TNT、NCTT、NAGG、NANC、CTTA、GTCT、ANAG、NG
CN、CNNA、TCAG、ACAC、NCGG、TNNT、CAAG、ACC
T、CCCA、GTNC、ANTC、GACC、AACG、TTAA、TCCG、
CGCC、NCCN、TTNA、NCNT、NGCA、AGNN、AATC、G
GGA、GNAN、NAGA、CGNA、GTAT、GTNA、ATNC、AC
NA、GGAA、NTCC、GGCG、AATN、CNNT、AGGC、GCG
N、GTGC、TTGA、AAGC、GAAG、ATNG、TGCT、TACT、
CTAN、GGCT、GNGC、GTCN、CGAA、CNAC、GCCT、TA
GG、ANGC、TNAA、GANT、NCNA、NCCT、AGAN、GTA
A、TTTN、ATGA、TGNA、CANC、ACGA、CCAC、CCGG、
CTNG、CNGN、GGTA、NGNC、GTTT、CTAA、TNCT、C
TGN、NGAC、TGTA、TANN、GCNT、GCTC、CNCG、AA

AN、CCNT、GANA、CACA、CTNA、ANTN、TTNT、CCT
G、TNNT、CANA、NTAN、CACG、GGAT、TTTC、G
NCG、TACA、GTAC、GAGC、ACNN、ATGG、AANT、ATC
C、ACCG、AGNC、TGTT、NCAT、ATTA、GNNT、GAGN、
TNAC、GCCG、NTNG、GTGG、GNGN、ACCA、NTAA、A
CTN、NCTG、NCTA、TTTT、GCNG、NTAG、CAAA、GGN
A、CNTN、TTAG、TCTG、NCTN、TATG、GCGT、TANT、
GGGT、NACN、ACTG、CCNG、GNNT、CCAT、GNTA、N
ANT、TACN、TGTN、ATCT、NCAN、TNGG、CNNN、AAG
T、ATTN、GGNN、CAGC、CGTN、GCCC、GCTT、CNAT、
NANA、CCNN、GNGA、TNGN、GCAG、CGNG、CCTT、
NGAG、NCNG、AANG、GGTC、ACTC、TGAA、NAGN、N
NCA、ACGG、TGAC、TCCN、ANNN、TCGN、TAAN、CA
GG、TTAN、NGAN、NTGC、CCNC、TNTN、ATGN、GTG
N、GCAT、NNGN、NNCC、CCNA、CNAG、GNAC、CGN
T、TTCN、TAGN、ANCT、NATN、GTGA、TNGT、CTAT、
CCCG、TNCA、NGTA、NNGA、CGTG、TAAT、CGCA、N
NCG、NGTC、NAGT、GNAT、TNTC、NCGC、NGGN、C
ATN、GTTN、AGTA、GNNG、TTNN、TGNC、NAAA、TN
CC、CACC、CTCT、TTGN、GCTA、NTTT、TGAN、TNA
N、NGAT、CCTN、GAAT、GTCA、NTCN、GCCA、ANTG、
TGGC、CAAC、TTTA、TGTC、CGGA、NCGN、AGNT、N
CGA、ANCG、ACAA、TAGT、CGAG、NCAA、AATA、AGG
G、GNGT、CAGA、AGGT、GGGG、ANAC、TGGT、GTGT、
GNCA、GTTA、NGTT、TNNG、NCAG、CACN、GCAN、G
AAC、NCCA、TTCC、NCNN、GNNN、ANGT、NTNA、C
CCT、GNAA、TTNG、GTNN、GGNG、TCTA、NCAC、GA
NG、TTCG、CCTC、CNGG、ANNA、TCAN、ATCG、NTG

A, CGTA, TTAC, GCTN, GCTG, NGTG, TCCC, CANN, NNNA, TAGA, ACGT, AGAT, GATG, GCCN, TGNG, GCGC, CCGA, GNCN, NTTG, NNAT, TNCG, NANG, GGTG, NCCC, GNCC, CAAT, CGCN, CNGA, NTTC, TTCT, NGGA, AGTC, CNNC, NACG, AGTN, NANN, ACAG, GNCT, TACC, CNTA, TGTG, CATC, GACA, TCTT, NTCT, CTGA, AGGA, GATA, TNAT, CCTA, GGAG, ANCC, AANC, GTAN, GCNA, TGNN, TANC, GNTN, AGCG, CTAG, NNAA, AGTT, CTAC, TACG, TTNC, TNTA, ANTT, ATAC, TCCT, TCAC, NGGC, NTTN, NNTC, CANT, ATAA, TGCC, CTCC, TNNA, GTNG, ACGN, GGCA, AAAG, TTGT, NGNA, NAAN, TATN, CGGG, CATA, ATGC, ACGC, ACCN, ATTT, TCNA, TNGC, NACA, NACC, CTCN, GGCC, TANG, AGAA, TNGA, TAGC, CAGN, GGCN, ANNT, NNNC, TCAT, CATT, TAAA, ATGT, TGAG, CGCT, TCGG, GCAC, GTAG, NTCA, NATT, ANTA, CCCN, ACTA, AAAA, GAAN, TATT, NNAC, TGAT, GGGN, CCAA, GNNG, CCAN, GTCC, NNCT, AGNG, CNTT, CNCT, GANN, GGTT, AGCT, CATG, NTAC, TNCN, NNTN, TGGA, GATT, AGCA, TAAG, GCGA, ACTT, ANGN, NTGN, AACN, AACT, TCAA, NTAT, TC GA, NCTC, NNNG, ANGG, NNTT, GTNT, CTNN, CGGN, TAAC, GGNC, GAAA, ACNG, GNAG, TTGG, CTTC, CNGT, TNNN, TNTG, GTTG, TCNN, CGGT, GAGA, C NNG, NCNC, GAGG, AGCC, ATNN, NNNT, AGAC, AACC, ANNC, ANNG, ACAN, GTTC, TATA, GNTC, NC GT, NGNT, CGTC, CCGC, CGAC, GACG, ATTG, GNNC, CNAA, TATC, AGNA, CTNC, TTCA, ANCA, ACCC,

AGTG、CCGT、ANAT、CTGT、GGGC、NTTA、NAAG、AANN、CNAN、NNCN、ANAA、ANAN、CTTG、NGNN、AGAG、TANA、TCNC、GCAA、NGNG、NAGC、NATA、ATCN、CGTT、CNGC、GATN、NNTA、AAGA、CTTT、AAAC、AGGN、ACNT、NTGT、CTTN、ATCA、NACT、NNAG、NGTN、NAAC、TGCG、GGNT、ATAN、TTGC、ANCN、CCC C、ANGA、NGCG、TCTC、CTCG、ATNA、AATT、NNAN、NNGT、TCGC、ATAG、CAAN、AACA、TTAT、CAGT、GNA、TGCN、GCGG、NGGG、CANG、TTTG、GAGT、AAAT、CTCA、CNCN、CNCC、TCTN、CGNC、NGCC、CGAT和NNGC；

可选地，所述Cas12蛋白在对应于如SEQ ID NO:696所示序列的第1-10、12-16、19、21-30、32-44、46-51、53-62、64-86、88-99、101-106、108-112、114-149、151-167、169-180、182-192、194-200、202-225、227-240、242-245、247-253、255-263、265-276、278-279、281-303、305-306、308-310、313、315-325、327-337、339-348、350-429、431-433、435-437、439-444、446-464、467、469-494、496-497、499-504、506-529、531-550、552-553、555-587、589-590、592-599、601-616、618-628、630-676、678-681、683-686、688-689、691-713、715-717、719-725、727-734、736-749、751-762、764-769、771-776、779-787、789-792、794-795、797-798、800-802、804-815、817-819、821-842、844-860、862-868、870、872-877、879-906、909-914、916-928、930-961、963-977、979-983、985-1018、1021、1023-1033、1035-1050、1052-1053、1055-1105、1107-1113、1115-1117、1120、1122-1125、1128-1135位氨基酸残基中的至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个或至少12个具有突变；可

选地，所述突变是突变为其他任意天然氨基酸残基；进一步可选地，所述突变是突变为残基R、H、K或A；

可选地，所述Cas12蛋白在与SEQ ID NO:696所示序列的对应位置发生了如SEQ ID NO:696所示序列的以下任意1个、任意2个、任意3个、任意4个、任意5个、任意6个、任意7个、任意8个、任意9个、任意10个、任意11个、任意12个、任意13个、任意14个、任意15个、任意16个或更多个氨基酸突变：I33R、G184R、S185R、Q186R、G194R、N195R、G196R、G197R、N245R、G256R、L260R、Y278R、S285R、Y316R、H350R、D352R、A355R、A356R、C385R、P386R、H387R、G390R、K391R、N392R、D429R、Q461R、Q462R、Q469R、E485R、S491R、K521R、P525R、L611R、K629R、K631R、N633R、D841R、N898R、K987R、A988R、G989R、Q990R、T991R、D1010R、E1013R、A1136R、K1138R、T1139R；

可选地，所述Cas12蛋白在与SEQ ID NO:696所示序列的对应位置发生了如SEQ ID NO:696所示序列的以下任意1种、任意2种、任意3种、任意4种、任意5种、或更多种氨基酸突变：D352R+Q186R、D352R+L260R、D352R+A355R、A355R+L260R、P386R+C385R、E485R+Q462R、D352R+Q186R、A355R+L260R、G184R+R186Q、D352R+Q186R+I33R、D352R+Q186R+G184R、D352R+Q186R+S185R、D352R+Q186R+G256R、D352R+Q186R+Y278R、D352R+Q186R+S285R、D352R+Q186R+Y316R、D352R+Q186R+H350R、D352R+Q186R+A356R、D352R+Q186R+Q469R、D352R+Q186R+S491R、D352R+Q186R+K521R、D352R+Q186R+P525R、D352R+Q186R+K629R、D352R+Q186R+N633R、D352R+Q186R+D841R、D352R+Q186R+N898R、D352R+Q186R+K987R、D352R+Q186R+T991R、D352R+Q186R+D1010R、D352R+Q186R+E1013R；

可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物；进一步地，所述复合物可特异性结合至靶核酸；更进一步地，所述复合物可切割靶核酸、修饰靶核酸和/或调控靶核酸的表达；

可选地，所述Cas12蛋白可与指导多核苷酸形成复合物，所述指导多核苷酸包含与靶核酸反向互补的指导序列；进一步地，所述指导多核苷酸包含骨架序列，所述骨架序列可与所述Cas12蛋白相互作用；更进一步地，所述骨架序列包含或为同向重复序列；

可选地，所述骨架序列不包括tracrRNA的骨架序列；

可选地，所述Cas12蛋白可识别的PAM序列为5' -TTN-3' 和/或 5' -TTNC-3' ；

可选地，所述Cas12蛋白为核酸酶活性失活的变体；可选地，所述Cas12蛋白为dead Cas12失活变体或nickase Cas12失活变体；可选地，所述Cas12蛋白的RuvC结构域失活。

[权利要求 2]

一种指导多核苷酸，其特征在于，其包含(i)同向重复序列，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583中任一项相比具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性，和(ii)工程化以与靶核酸杂交的指导序列；所述同向重复序列与所述指导序列连接，所述指导多核苷酸能够与Cas12蛋白形成复合物并通过指导序列指导所述复合物与所述靶核酸的序列特异性结合；

优选地，所述Cas12蛋白为如权利要求1所述的Cas12蛋白；

可选地，所述指导序列包含15-60个核苷酸；

可选地，所述指导序列与所述靶核酸杂交，所述指导序列与所述靶核酸错配不超过一个核苷酸；

可选地，所述指导序列的核苷酸序列如SEQ ID NO:54-583、704任一项所示；

可选地，所述指导多核苷酸进一步包含tracrRNA；可选地，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列连接；可选地，所述tracrRNA包含10–200个核苷酸；
可选地，所述指导序列位于所述同向重复序列的3'端；
可选地，所述指导序列位于所述同向重复序列的5'端；
可选地，所述tracrRNA序列位于所述同向重复序列的5'或3'端；
可选地，所述tracrRNA序列与SEQ ID NO:584–695任一所示序列相比具有至少50%的序列同一性。

[权利要求 3]

一种Cas12失活变体，其特征在于，所述Cas12失活变体为如权利要求1所述的Cas12蛋白的核酸酶活性失活变体；所述核酸酶活性失活是指不能够在靶核酸上产生双链缺口；
可选地，所述Cas12失活变体为dead Cas12失活变体或nickase Cas12失活变体；
可选地，所述Cas12失活变体为所述Cas12蛋白的RuvC结构域失活得到的变体。

[权利要求 4]

一种融合蛋白或缀合物，其特征在于，所述融合蛋白或缀合物包含以下元件：
(1)如权利要求1所述的Cas12蛋白，或如权利要求3所述的Cas12失活变体；和
(2)同源或异源的功能结构域；
可选地，所述功能结构域具有修饰靶核酸序列的酶活性；例如核酸酶活性、甲基转移酶活性、去甲基化酶活性、DNA修复活性、DNA损伤活性、脱氨活性、歧化酶活性、烷基化活性、脱嘌呤活性、氧化活性、嘧啶二聚体形成活性、整合酶活性、转座酶活性、重组酶活性、聚合酶活性、连接酶活性、解旋酶活性、光解酶活性、糖基化酶活性、去糖基化活性、乙酰转移酶活性、去乙酰化酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、去泛素化活性、腺苷

酰化活性、去腺苷化活性、SUMOylating活性、deSUMOylating活性、豆蔻酰化活性和/或去豆蔻酰化活性；

可选地，所述功能结构域选自以下的一种或多种：亚细胞定位信号、DNA结合域、蛋白酶结构域、转录激活域、转录抑制域、核酸酶结构域、脱氨酶结构域、尿嘧啶DNA糖基化酶结构域(UDG)、尿嘧啶DNA糖基化酶抑制结构域(UGI)、甲基化酶、去甲基化酶、转录释放因子、组蛋白乙酰化酶结构域、组蛋白脱乙酰化酶结构域、DNA连接酶、亲和标签、报告标签和亲和域和报告域；

可选地，所述核酸酶结构域包括具有ssDNA切割活性的多肽和/或具有dsDNA切割活性的多肽；

可选地，所述Cas12蛋白或Cas12失活变体与所述同源或异源的功能结构域直接或间接连接；较佳地，所述直接连接为共价连接，所述间接连接为通过氨基酸连接子或非氨基酸连接子连接；

可选地，所述同源或异源的功能结构域相对于所述Cas12蛋白或失活变体在N-末端、C-末端或内部融合或缀合。

[权利要求 5] 一种分离的核酸，其特征在于，所述核酸编码如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求3 所述的Cas12失活变体或如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物；

可选地，所述核酸经密码子优化以在细胞中表达；

可选地，所述核酸经密码子优化以在原核细胞中表达；

可选地，所述核酸经密码子优化以在真核细胞中表达；

可选地，所述核酸经密码子优化以在真核生物、优选地哺乳动物如人或非人哺乳动物、植物、昆虫、鸟、爬行动物、啮齿动物(例如，小鼠、大鼠)、鱼、蠕虫/线虫或酵母中表达。

[权利要求 6] 一种CRISPR-Cas12系统，其特征在于，所述CRISPR-Cas12系统包含：

a.如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物或如权利要求5所述的核酸；以及

b.如权利要求2所述的指导多核苷酸，或编码所述指导多核苷酸的多核苷酸序列；

所述Cas12功能域或所述融合蛋白或缀合物与所述指导多核苷酸形成复合物；所述指导多核苷酸包含指导序列，所述指导序列被工程化以指导所述复合物与靶核酸的序列特异性结合；

可选地，所述指导多核苷酸还包含与指导序列连接的同向重复序列，优选地，所述同向重复序列与SEQ ID NO:54-583和704任一相比具有至少50%的序列同一性；

可选地，所述指导序列包含15-35个核苷酸，和/或，所述指导序列与所述靶核酸杂交，所述指导序列与所述靶核酸为90%-100%互补，优选错配不超过一个核苷酸；

可选地，所述指导序列包含15-60个核苷酸；

可选地，所述指导序列与所述靶核酸杂交；

可选地，所述指导序列与所述靶核酸错配不超过一个核苷酸；

可选地，所述指导多核苷酸进一步包含tracrRNA；可选地，所述tracrRNA序列与所述同向重复序列连接；可选地，所述tracrRNA包含10-200个核苷酸；

可选地，所述指导序列位于所述同向重复序列的3'端；

可选地，所述指导序列位于所述同向重复序列的5'端；

可选地，所述tracrRNA序列位于所述同向重复序列的5'或3'端；

可选地，所述靶核酸为DNA或RNA，优选dsDNA或ssDNA；

可选地，所述DNA为真核DNA；优选所述真核DNA是非人哺乳动物DNA、非人灵长类动物DNA、人DNA、植物DNA、昆虫DNA、鸟DNA、爬行动物DNA、啮齿动物DNA、鱼DNA、蠕虫/线虫DNA或酵母DNA；

可选地，所述靶核酸为疾病或病症相关基因或信号传导生化途径相关基因，或所述靶核酸为报告基因；可选地，所述靶核酸为如表27中所列的基因。

[权利要求 7]

一种载体系统，其特征在于，所述载体系统包含一个或多个重组载体，所述重组载体包含如权利要求5所述的分离的核酸，或如权利要求6所述的CRISPR-Cas12系统；

可选地，所述重组载体还包含调控序列；

可选地，编码所述Cas12蛋白、Cas12失活变体或融合蛋白或缀合物的多核苷酸序列与调控序列可操作地连接，和/或，编码所述指导多核苷酸的多核苷酸序列与调控序列可操作地连接；较佳地，所述调控序列任选自：启动子、增强子、内部核糖体进入位点和转录终止信号中的一种或更多种，所述启动子例如组成型启动子、诱导型启动子、广谱启动子或组织特异性启动子，和/或，所述转录终止信号例如多聚腺苷酸化信号或多聚U序列；

可选地，所述重组载体的骨架为腺相关病毒载体、慢病毒载体或病毒样颗粒；优选地，当所述骨架为腺相关病毒载体时，所述腺相关病毒载体为血清型AAV1、AAV2、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAVrh74、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12或AAV13的重组腺相关病毒载体，当所述骨架为慢病毒载体时，所述慢病毒载体是用包膜蛋白假型化的；

可选地，所述分离的核酸与适体序列连接；

当所述重组载体的骨架为病毒样颗粒时，所述分离的核酸与编码gag蛋白的基因连接。

[权利要求 8]

一种递送系统，其特征在于，所述递送系统包含：

(1)递送工具，和

(2)如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求2所述的指导多核苷酸、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合

蛋白或缀合物、如权利要求5所述的核酸、如权利要求6所述的CRISPR-Cas12系统或如权利要求7所述的载体系统；

可选地，所述递送工具为病毒、脂质纳米粒、纳米颗粒、脂质体、外泌体、微泡或基因枪；

可选地，所述递送工具为脂质纳米粒，所述脂质纳米粒包含所述指导多核苷酸和编码所述Cas12蛋白、所述Cas12失活变体或所述融合蛋白或缀合物的mRNA。

[权利要求 9] 一种细胞，其特征在于，所述细胞包含如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求2所述的指导多核苷酸、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物、如权利要求5所述的核酸、如权利要求6所述的CRISPR-Cas12系统、如权利要求7所述的载体系统或如权利要求8所述的递送系统；
可选地，所述细胞为原核细胞；
可选地，所述细胞为真核细胞；
可选地，所述真核细胞为哺乳动物细胞。

[权利要求 10] 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求2所述的指导多核苷酸、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物、如权利要求5所述的核酸、如权利要求6所述的CRISPR-Cas12系统、如权利要求7所述的载体系统、如权利要求8所述的递送系统或如权利要求9所述的细胞；
优选地，所述药物组合物包含药学上可接受的辅料。

[权利要求 11] 一种试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包含如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求2所述的指导多核苷酸、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物、如权利要求5所述的核酸、如权利要求6所述的CRISPR-Cas12系统、如权利要求7所述的载体系统、如权利要求8所述的递送系统、如权利要求9所述的细胞或如权利要求10所述的药物组合物。

[权利要求 12]

如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求2所述的指导多核苷酸、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物、如权利要求5所述的核酸、如权利要求6所述的CRISPR-Cas12系统、如权利要求7所述的载体系统、如权利要求8所述的递送系统、如权利要求9所述的细胞、如权利要求10所述的药物组合物或如权利要求11所述的试剂盒在制备诊断、治疗和/或预防与靶核酸相关的疾病或病症的试剂或药物中的用途；

可选地，所述疾病或病症为血液系统疾病或病症、眼科疾病或病症、神经系统疾病或病症、呼吸系统疾病或病症、肝脏疾病或病症、代谢系统疾病或病症、癌症或感染性疾病；和/或，所述试剂或药物用于：切割一种或更多种靶核酸分子或使一种或更多种靶核酸分子产生切口，激活或上调一种或更多种靶核酸分子的表达，激活或抑制一种或更多种靶核酸分子的转录，使一种或更多种靶核酸分子失活，可视化、标记或检测一种或更多种靶核酸分子，结合一种或更多种靶核酸分子，运输一种或更多种靶核酸分子，以及掩蔽一种或更多种靶核酸分子；

可选地，所述疾病或病症任选自如表27中所列的疾病或病症；

可选地，所述疾病或病症任选自：A型血友病、Best卵黄样黄斑营养不良、B细胞急性淋巴细胞白血病、B型血友病、CDKL5缺乏症、CLN2 disease、C型尼曼匹克氏病、Dravet综合征、FOXP1综合征、GM1神经节苷脂贮积症、GM2神经节苷脂沉积症、HIV感染、HSV感染、IB型乌谢尔综合征、IIA型乌谢尔综合征、IIIA型黏多糖贮积症、IIIB型黏多糖贮积症、III型戈谢病、II型黏多糖贮积症、II型糖尿病、IV型黏多糖贮积症、I型戈谢病、I型黏多糖贮积症、I型糖尿病、I型乌谢尔综合征、KCNQ2癫痫脑病、Leber遗传性视神经病变、Leigh syndrome、Prader-Willi综合征、SLC13A5缺陷、X连锁肌小管肌病、X连锁视网膜劈裂症、X连锁视网膜色素变性、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、 α -甘露糖苷贮积症、 α -地中海

贫血、 β -地中海贫血、阿尔茨海默病、巴德-毕德氏症候群、白点状视网膜变性、白细胞黏附缺陷症I型、半乳糖血症、膀胱癌、膀胱过度活动症、苯丙酮尿症、鼻咽癌、比埃蒂晶体营养不良、丙酮酸激酶缺乏症、勃起功能障碍、常染色体隐性遗传先天性鱼鳞病、成人葡聚糖体疾病、创伤性关节炎、纯合子型家族性高胆固醇血症、脆性X染色体综合征、地中海贫血、低磷酸酯酶症、癫痫、多发性骨髓瘤、多系统萎缩、额颞叶痴呆、儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速、法布瑞氏症、范可尼贫血、芳香族氨基酸脱羧酶缺乏症、放射引起的口腔干燥、非霍奇金淋巴瘤、非肌层浸润性膀胱癌、非酒精性脂肪性肝病、非小细胞肺癌、肥厚型心肌病、肥厚性疤痕、肥胖、腓骨肌萎缩症1A型、腓骨肌萎缩症2A型、肺高压、弗立特里希氏共济失调、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、干性年龄相关性黄斑变性、干燥综合征、高尿酸血症、高血脂症、戈谢病、孤独症谱系障碍、骨关节炎、骨髓衰竭综合征、瓜氨酸血症I型、冠心病、胱氨酸病、黑素瘤、亨廷顿氏病、肌萎缩侧索硬化症、急迫性尿失禁、急性间歇性卟啉病、急性淋巴细胞白血病、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩伴呼吸窘迫1型、脊髓性肌萎缩症、家族黑蒙性痴呆症、甲基丙二酸血症、甲状腺癌、假肥大性肌营养不良、间变性星形细胞瘤、间歇性跛行、交界性大疱性表皮松解症、胶质瘤、胶质母细胞瘤、角膜移植排斥、结直肠癌、进行性多病灶脑白质病、进行性家族性肝内胆汁淤积症、巨轴索神经病、卡纳万病、可卡因成瘾、克拉伯病、克里格勒-纳贾尔综合征、口腔癌、快乐木偶综合征、扩散型内因性脑桥神经胶质瘤、拉福拉病、类风湿性关节炎、镰状细胞病、淋巴水肿、卵巢癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性肉芽肿病、慢性肾病贫血、慢性疼痛、慢性乙肝、门克斯病、囊性纤维化、内瑟顿综合征、鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症、帕金森病、庞贝氏症、葡萄膜炎、前列腺癌、前庭神经鞘瘤、强直性肌营养不良、强直性脊柱炎、去势抵抗前列腺癌、青光眼、全色盲、缺

血性心力衰竭、溶酶体贮积病、肉瘤、乳腺癌、瑞特综合征、三阴性乳腺癌、桑德霍夫病、色盲、射血分数降低的心力衰竭、神经元蜡样脂褐质沉积症、肾上腺脑白质失养症、肾细胞癌、湿性年龄相关性黄斑变性、湿疹、血小板减少伴免疫缺陷综合征、食管癌、视神经病变、视神经萎缩、视网膜静脉阻塞、视网膜色素变性、视紫红质介导的常染色体显性遗传视网膜色素变性、室管膜瘤、输卵管癌、双侧前庭病、斯特格氏病、糖尿病黄斑水肿、糖尿病神经病变、糖尿病视网膜病变、糖尿病周围神经痛、糖尿病足、糖原贮积病、糖原贮积病Ia型、糖原贮积病IIb型、特应性皮炎、听力损失、听力障碍、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、威尔逊病、稳定性心绞痛、乌谢尔综合征、无脉络膜症、先天性黑蒙症、先天性肾上腺皮质增生症、心肌病、心绞痛、心力衰竭、新型冠状病毒感染、胸膜间皮瘤、寻常性痤疮、严重联合免疫缺陷病、严重肢体缺血、眼咽型肌营养不良、胰腺癌、移植物抗宿主病、遗传性视网膜营养不良、遗传性血管性水肿、乙型肝炎、异染性脑白质营养不良、银屑病关节炎、隐性遗传营养不良型大疱性表皮松解症、婴儿恶性骨硬化病、营养不良性大疱性表皮松解、硬斑病、原发性免疫缺陷、杂合子型家族性高胆固醇血症、肢带型肌营养不良2B型、肢带型肌营养不良2C型、肢带型肌营养不良2D型、肢带型肌营养不良2E型、肢带型肌营养不良2I型、肢带型肌营养不良2L型、肢体缺血性疾病、脂蛋白脂酶缺乏症、重症先天性中性粒细胞缺乏症、皱纹、卒中、坐骨神经痛、精神分裂症、抑郁症、药物成瘾、自闭症、特发性肺纤维化、高血脂、甲状腺素运载蛋白(ATTR)淀粉样变性、AATD肝病和AATD肺病。

[权利要求 13]

一种检测、结合或切割靶核酸的方法，其特征在于，所述方法包括使用如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求2所述的指导多核苷酸、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物、如权利要求5所述的核酸、如权利要求6所述的C

RISPR-Cas12系统、如权利要求7所述的载体系统、如权利要求8所述的递送系统、如权利要求9所述的细胞、如权利要求10所述的药物组合物或如权利要求11所述的试剂盒与靶核酸接触；

可选地，所述方法为非诊断和/或治疗目的的方法；和/或所述融合蛋白或缀合物包含可检测标记，例如可通过荧光、DNA印迹或FISH检测的标记。

[权利要求 14]

一种改变细胞状态的方法，其特征在于，所述方法包括使用如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求2所述的指导多核苷酸、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物、如权利要求5所述的核酸、如权利要求6所述的CRISPR-Cas12系统、如权利要求7所述的载体系统、如权利要求8所述的递送系统、如权利要求9所述的细胞、如权利要求10所述的药物组合物或如权利要求11所述的试剂盒与细胞接触，从而改变细胞状态；

可选地，所述方法导致以下中的一项或多项：特定基因的表达的提高或降低，体外或体内诱导细胞衰老，体外或体内细胞周期停滞，体外或体内细胞生长促进和/或细胞生长抑制，体外或体内诱导无反应性，体外或体内诱导细胞凋亡，以及体外或体内诱导坏死；

可选地，所述方法为非诊断和/或治疗目的的方法。

[权利要求 15]

一种诊断、治疗或预防与靶核酸相关的疾病或病症的方法，其特征在于，向有需要的受试者的样品或向有需要的受试者施用如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求2所述的指导多核苷酸、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物、如权利要求5所述的核酸、如权利要求6所述的CRISPR-Cas12系统、如权利要求7所述的载体系统、如权利要求8所述的递送系统、如权利要求9所述的细胞、如权利要求10所述的药物组合物或如权利要求11所述的试剂盒；

可选地，所述疾病或病症为血液系统疾病或病症、眼科疾病或病症、神经系统疾病或病症、呼吸系统疾病或病症、肝脏疾病或病症、代谢系统疾病或病症、癌症或感染性疾病；

可选地，所述疾病或病症任选自如表27中所列的疾病或病症；

可选地，所述疾病或病症任选自：A型血友病、Best卵黄样黄斑营养不良、B细胞急性淋巴细胞白血病、B型血友病、CDKL5缺乏症、CLN2 disease、C型尼曼匹克氏病、Dravet综合征、FOXG1综合征、GM1神经节苷脂贮积症、GM2神经节苷脂沉积症、HIV感染、HSV感染、IB型乌谢尔综合征、IIA型乌谢尔综合征、IIIA型黏多糖贮积症、IIIB型黏多糖贮积症、III型戈谢病、II型黏多糖贮积症、II型糖尿病、IV型黏多糖贮积症、I型戈谢病、I型黏多糖贮积症、I型糖尿病、I型乌谢尔综合征、KCNQ2癫痫脑病、Leber遗传性视神经病变、Leigh syndrome、Prader-Willi综合征、SLC13A5缺陷、X连锁肌小管肌病、X连锁视网膜劈裂症、X连锁视网膜色素变性、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、 α -甘露糖苷贮积症、 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、阿尔茨海默病、巴德-毕德氏症候群、白点状视网膜变性、白细胞黏附缺陷症I型、半乳糖血症、膀胱癌、膀胱过度活动症、苯丙酮尿症、鼻咽癌、比埃蒂晶体营养不良、丙酮酸激酶缺乏症、勃起功能障碍、常染色体隐性遗传先天性鱼鳞病、成人葡聚糖体疾病、创伤性关节炎、纯合子型家族性高胆固醇血症、脆性X染色体综合征、地中海贫血、低磷酸酯酶症、癫痫、多发性骨髓瘤、多系统萎缩、额颞叶痴呆、儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速、法布瑞氏症、范可尼贫血、芳香族氨基酸脱羧酶缺乏症、放射引起的口腔干燥、非霍奇金淋巴瘤、非肌层浸润性膀胱癌、非酒精性脂肪性肝病、非小细胞肺癌、肥厚型心肌病、肥厚性疤痕、肥胖、腓骨肌萎缩症1A型、腓骨肌萎缩症2A型、肺高压、弗立特里希氏共济失调、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、干性年龄相关性黄斑变性、干燥综合征、高尿酸血症、高血脂

症、戈谢病、孤独症谱系障碍、骨关节炎、骨髓衰竭综合征、瓜氨酸血症I型、冠心病、胱氨酸病、黑素瘤、亨廷顿氏病、肌萎缩侧索硬化症、急迫性尿失禁、急性间歇性卟啉病、急性淋巴细胞白血病、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩伴呼吸窘迫1型、脊髓性肌萎缩症、家族黑蒙性痴呆症、甲基丙二酸血症、甲状腺癌、假肥大型肌营养不良、间变性星形细胞瘤、间歇性跛行、交界性大疱性表皮松解症、胶质瘤、胶质母细胞瘤、角膜移植排斥、结直肠癌、进行性多病灶脑白质病、进行性家族性肝内胆汁淤积症、巨轴索神经病、卡纳万病、可卡因成瘾、克拉伯病、克里格勒-纳贾尔综合征、口腔癌、快乐木偶综合征、扩散型内因性脑桥神经胶质瘤、拉福拉病、类风湿性关节炎、镰状细胞病、淋巴水肿、卵巢癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性肉芽肿病、慢性肾病贫血、慢性疼痛、慢性乙肝、门克斯病、囊性纤维化、内瑟顿综合征、鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症、帕金森病、庞贝氏症、葡萄膜炎、前列腺癌、前庭神经鞘瘤、强直性肌营养不良、强直性脊柱炎、去势抵抗前列腺癌、青光眼、全色盲、缺血性心力衰竭、溶酶体贮积病、肉瘤、乳腺癌、瑞特综合征、三阴性乳腺癌、桑德霍夫病、色盲、射血分数降低的心力衰竭、神经元蜡样脂褐质沉积症、肾上腺脑白质失养症、肾细胞癌、湿性年龄相关性黄斑变性、湿疹、血小板减少伴免疫缺陷综合征、食管癌、视神经病变、视神经萎缩、视网膜静脉阻塞、视网膜色素变性、视紫红质介导的常染色体显性遗传视网膜色素变性、室管膜瘤、输卵管癌、双侧前庭病、斯特格氏病、糖尿病黄斑水肿、糖尿病神经病变、糖尿病视网膜病变、糖尿病周围神经痛、糖尿病足、糖原贮积病、糖原贮积病Ia型、糖原贮积病IIb型、特应性皮炎、听力损失、听力障碍、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、威尔逊病、稳定性心绞痛、乌谢尔综合征、无脉络膜症、先天性黑蒙症、先天性肾上腺皮质增生症、心肌病、心绞痛、心力衰竭、新型冠状病毒感染、胸膜间皮瘤、寻常性痤疮、严重联合免疫缺陷病、严重

肢体缺血、眼咽型肌营养不良、胰腺癌、移植物抗宿主病、遗传性视网膜营养不良、遗传性血管性水肿、乙型肝炎、异染性脑白质营养不良、银屑病关节炎、隐性遗传营养不良型大疱性表皮松解症、婴儿恶性骨硬化病、营养不良性大疱性表皮松解、硬斑病、原发性免疫缺陷、杂合子型家族性高胆固醇血症、肢带型肌营养不良2B型、肢带型肌营养不良2C型、肢带型肌营养不良2D型、肢带型肌营养不良2E型、肢带型肌营养不良2I型、肢带型肌营养不良2L型、肢体缺血性疾病、脂蛋白脂酶缺乏症、重症先天性中性粒细胞缺乏症、皱纹、卒中、坐骨神经痛、精神分裂症、抑郁症、药物成瘾、自闭症、特发性肺纤维化、高血脂、甲状腺素运载蛋白(ATTR)淀粉样变性、AATD肝病和AATD肺病。

[权利要求 16]

如权利要求1所述的Cas12蛋白、如权利要求2所述的指导多核苷酸、如权利要求3所述的Cas12失活变体、如权利要求4所述的融合蛋白或缀合物、如权利要求5所述的核酸、如权利要求6所述的CRISPR-Cas12系统、如权利要求7所述的载体系统、如权利要求8所述的递送系统、如权利要求9所述的细胞、如权利要求10所述的药物组合物或如权利要求11所述的试剂盒，其用于诊断、治疗或预防与靶核酸相关的疾病或病症；

可选地，所述疾病或病症为血液系统疾病或病症、眼科疾病或病症、神经系统疾病或病症、呼吸系统疾病或病症、肝脏疾病或病症、代谢系统疾病或病症、癌症或感染性疾病；

可选地，所述疾病或病症任选自如表27中所列的疾病或病症；

可选地，所述疾病或病症任选自：A型血友病、Best卵黄样黄斑营养不良、B细胞急性淋巴细胞白血病、B型血友病、CDKL5缺乏症、CLN2 disease、C型尼曼匹克氏病、Dravet综合征、FOX G1综合征、GM1神经节苷脂贮积症、GM2神经节苷脂沉积症、HIV感染、HSV感染、IB型乌谢尔综合征、IIA型乌谢尔综合征、IIIA型黏多糖贮积症、IIIB型黏多糖贮积症、III型戈谢病、II型黏多

糖贮积症、II型糖尿病、IV型黏多糖贮积症、I型戈谢病、I型黏多糖贮积症、I型糖尿病、I型乌谢尔综合征、KCNQ2癫痫脑病、Leber遗传性视神经病变、Leigh syndrome、Prader-Willi综合征、SLC13A5缺陷、X连锁肌小管肌病、X连锁视网膜劈裂症、X连锁视网膜色素变性、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症、 α -甘露糖苷贮积症、 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、阿尔茨海默病、巴德-毕德氏症候群、白点状视网膜变性、白细胞黏附缺陷症I型、半乳糖血症、膀胱癌、膀胱过度活动症、苯丙酮尿症、鼻咽癌、比埃蒂晶体营养不良、丙酮酸激酶缺乏症、勃起功能障碍、常染色体隐性遗传先天性鱼鳞病、成人葡聚糖体疾病、创伤性关节炎、纯合子型家族性高胆固醇血症、脆性X染色体综合征、地中海贫血、低磷酸酯酶症、癫痫、多发性骨髓瘤、多系统萎缩、额颞叶痴呆、儿茶酚胺敏感性多形性室性心动过速、法布瑞氏症、范可尼贫血、芳香族氨基酸脱羧酶缺乏症、放射引起的口腔干燥、非霍奇金淋巴瘤、非肌层浸润性膀胱癌、非酒精性脂肪性肝病、非小细胞肺癌、肥厚型心肌病、肥厚性疤痕、肥胖、腓骨肌萎缩症1A型、腓骨肌萎缩症2A型、肺高压、弗立特里希氏共济失调、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、干性年龄相关性黄斑变性、干燥综合征、高尿酸血症、高血脂症、戈谢病、孤独症谱系障碍、骨关节炎、骨髓衰竭综合征、瓜氨酸血症I型、冠心病、胱氨酸病、黑素瘤、亨廷顿氏病、肌萎缩侧索硬化症、急性尿失禁、急性间歇性卟啉病、急性淋巴细胞白血病、脊髓小脑性共济失调、脊髓性肌萎缩伴呼吸窘迫1型、脊髓性肌萎缩症、家族黑蒙性痴呆症、甲基丙二酸血症、甲状腺癌、假肥大性肌营养不良、间变性星形细胞瘤、间歇性跛行、交界性大疱性表皮松解症、胶质瘤、胶质母细胞瘤、角膜移植排斥、结直肠癌、进行性多灶性脑白质病、进行性家族性肝内胆汁淤积症、巨轴索神经病、卡纳万病、可卡因成瘾、克拉伯病、克里格勒-纳贾尔综合征、口腔癌、快乐木偶综合征、扩散型内因性脑桥神经胶质瘤、拉福拉病、类

风湿性关节炎、镰状细胞病、淋巴水肿、卵巢癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性肉芽肿病、慢性肾病贫血、慢性疼痛、慢性乙肝、门克斯病、囊性纤维化、内瑟顿综合征、鸟氨酸氨甲酰转移酶缺乏症、帕金森病、庞贝氏症、葡萄膜炎、前列腺癌、前庭神经鞘瘤、强直性肌营养不良、强直性脊柱炎、去势抵抗前列腺癌、青光眼、全色盲、缺血性心力衰竭、溶酶体贮积病、肉瘤、乳腺癌、瑞特综合征、三阴性乳腺癌、桑德霍夫病、色盲、射血分数降低的心力衰竭、神经元蜡样脂褐质沉积症、肾上腺脑白质失养症、肾细胞癌、湿性年龄相关性黄斑变性、湿疹、血小板减少伴免疫缺陷综合征、食管癌、视神经病变、视神经萎缩、视网膜静脉阻塞、视网膜色素变性、视紫红质介导的常染色体显性遗传视网膜色素变性、室管膜瘤、输卵管癌、双侧前庭病、斯特格氏病、糖尿病黄斑水肿、糖尿病神经病变、糖尿病视网膜病变、糖尿病周围神经痛、糖尿病足、糖原贮积病、糖原贮积病Ia型、糖原贮积病IIb型、特应性皮炎、听力损失、听力障碍、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌、威尔逊病、稳定性心绞痛、乌谢尔综合征、无脉络膜症、先天性黑蒙症、先天性肾上腺皮质增生症、心肌病、心绞痛、心力衰竭、新型冠状病毒感染、胸膜间皮瘤、寻常性痤疮、严重联合免疫缺陷病、严重肢体缺血、眼咽型肌营养不良、胰腺癌、移植物抗宿主病、遗传性视网膜营养不良、遗传性血管性水肿、乙型肝炎、异染性脑白质营养不良、银屑病关节炎、隐性遗传营养不良型大疱性表皮松解症、婴儿恶性骨硬化病、营养不良性大疱性表皮松解、硬斑病、原发性免疫缺陷、杂合子型家族性高胆固醇血症、肢带型肌营养不良2B型、肢带型肌营养不良2C型、肢带型肌营养不良2D型、肢带型肌营养不良2E型、肢带型肌营养不良2I型、肢带型肌营养不良2L型、肢体缺血性疾病、脂蛋白脂酶缺乏症、重症先天性中性粒细胞缺乏症、皱纹、卒中、坐骨神经痛、精神分裂症、抑郁症、药物成瘾、自闭

症、特发性肺纤维化、高血脂、甲状腺素运载蛋白(ATTR)淀粉样变性、AATD肝病和 AATD肺病。