

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090290 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.14

(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.12

(54) ПРИМЕНЕНИЕ БЕЛКА Cas, СПОСОБ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЦЕЛЕВОЙ МОЛЕКУЛЫ
НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И НАБОР

(31) 201710573752.0

(32) 2017.07.14

(33) CN

(86) PCT/CN2018/082769

(87) WO 2019/011022 2019.01.17

(71) Заявитель:
ШАНХАЙ ТОЛО
БАЙОТЕКНОЛОДЖИ КОМПАНИ
ЛИМИТЕД (CN)

(72) Изобретатель:
Ван Цзинь, Чэн Цюсян, Ли Шиюань,
Ли Сяоянь, Ли Линьсянь (CN)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Данное изобретение обеспечивает применение белка Cas, способ обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты и набор. Указанный способ для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты включает в себя добавление направляющей РНК, Cas12a и нуклеиновой кислоты-зонда в реакционную систему, содержащую целевую молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена, и обнаружение целевой нуклеиновой кислоты после завершения реакции.

A1

202090290

202090290

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560973ЕА/032

ПРИМЕНЕНИЕ БЕЛКА CAS, СПОСОБ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЦЕЛЕВОЙ МОЛЕКУЛЫ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, И НАБОР

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Специальный способ обнаружения нуклеиновых кислот имеет важное практическое применение, например, в обнаружении патогенов, обнаружении генетических заболеваний и т. д. В аспекте обнаружения патогенов, поскольку каждый микроорганизм-патоген имеет свою уникальную характерную последовательность молекулы нуклеиновой кислоты, возможно разработать способ обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты для конкретных видов, также известный как диагностика по нуклеиновым кислотам (NAD - nucleic acid diagnostic), который имеет большое значение в области безопасности пищевых продуктов, обнаружения загрязнения окружающей среды микроорганизмами, заражения человека патогенами и др. Другой аспект представляет собой обнаружение однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) у человека или других видов. Понимание взаимосвязи между генетической изменчивостью и биологической функцией на геномном уровне открывает новые перспективы для современной молекулярной биологии. ОНП тесно связан с биологическими функциями, эволюцией и болезнями, поэтому разработка технологий обнаружения и анализа ОНП является особенно важной.

В настоящее время разработано много способов NAD, главным образом для обнаружения конкретной молекулы ДНК, и также существуют некоторые способы для молекул РНК. В общем случае, молекула ДНК очень стабильна, поэтому исследуемый образец может быть получен из ряда сложных биологических образцов; в то время как РНК очень легко разрушается, поэтому с ней нужно обращаться с большой осторожностью. В 1970-х годах был разработан способ обнаружения с использованием расщепления эндонуклеазами рестрикции. Позже, такие способы, как саузерн-, нозерн- и дот-блот гибридизация были разработаны для специфического обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты. В 1985 году, когда ПЦР стала обычным экспериментальным способом, она дала толчок экспоненциальному улучшению в области молекулярной биологии. Принятое в настоящее время обнаружение специфической молекулы нуклеиновой кислоты обычно необходимо проводить в два этапа, причем первым этапом является амплификация целевой нуклеиновой кислоты, а вторым этапом - обнаружение целевой нуклеиновой кислоты. Технология ПЦР - это способ амплификации, который стал впервые принятым и наиболее широко используемым в настоящее время. В настоящее время, на основе способа ПЦР внедрен флуоресцентно-меченный зонд, так что амплификация цели может быть обнаружена в режиме реального времени, что называется

ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени - это не только быстрый и высокочувствительный способ обнаружения, но и способ количественного анализа. В дополнение к способу амплификации ПЦР было создано множество альтернативных способов, таких как лигазная цепная реакция, амплификация разветвленной ДНК, NASBA, SDA, транскрипционно-опосредованная амплификация, изотермическая амплификация с формированием петель (LAMP - Loop-mediated isothermal amplification), амплификация по типу катящегося кольца (RCA), рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA - Recombinase Polymerase Amplification) и др. Преимущество многих из этих альтернативных способов заключается в изотермичности. То есть, для осуществления реакции необходима только одна температура, без необходимости использования прибора для циклической смены температуры, подобного тому, который используется в ПЦР. Среди способов обнаружения нуклеиновых кислот, помимо ПЦР в реальном времени, которая может непосредственно осуществлять амплификацию и обнаружение, технология FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*) является наиболее часто используемым способом обнаружения - способом, в котором меченый молекулярный зонд гибридизируется *in situ* с комплементарной целевой последовательностью. Кроме того, также были разработаны способы обнаружения, такие как технологии секвенирования следующего поколения и оксфордские технологии секвенирования с помощью нанопор, но эти способы обычно требуют дорогого исследовательского оборудования.

Обнаружение ОНП также сначала требует амплификации с помощью такого способа, как ПЦР и т. п., чтобы получить достаточное количество фрагментов, содержащих сайт ОНП, для дальнейшего обнаружения. Обычно используемые способы включают в себя: удлинение праймера, гибридизацию, лигирование и ферментативное расщепление. Когда выполняются вышеуказанные способы, для обнаружения необходимо использовать специальный способ, такой как обнаружение с помощью масс-спектрометрии, обнаружение флуоресценции, обнаружение хемилюминесценции и т. д.

Хотя для обнаружения нуклеиновых кислот было разработано множество способов обнаружения, как описано выше, в некоторых случаях, до сих пор важным направлением разработки является как можно более быстрое, простое и дешевое обнаружение, например, быстрое обнаружение патогенных бактерий в полевых условиях, быстрое обнаружение чувствительных к лекарствам ОНП и т. д. В 2016, Collins et al. разработали быстрый и недорогой способ обнаружения вируса Зика, основанный на свойстве CRISPR-Cas9 специфично распознавать и расщеплять целевые последовательности. В 2017, Feng Zhang et al. внедрили способ быстрого обнаружения нуклеиновых кислот с использованием свойства «сопутствующего действия» CRISPR-Cas13a. «Сопутствующее действие» означает, что Cas13a связывается со специфической целевой РНК, а затем случайным образом расщепляет другие нецелевые РНК (здесь молекулы РНК проектировали как РНК-репортерную систему флуоресценции); быстрое обнаружение целевой РНК осуществляется путем объединения с технологией изотермической

амплификации RPA; и команда Фэн Чжана назвали этот способ обнаружения «SHERLOCK» (Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing - специфическая высокочувствительная энзиматическая разблокировка репортера). Способ SHERLOCK включает в себя связывание с РНК-матрицей, поэтому, если требуется обнаружение ДНК, ДНК необходимо сначала транскрибировать в РНК-матрицу для обнаружения; и учитывая нестабильность РНК, этот способ, несомненно, увеличит сложность операции.

В 2015, Feng Zhang et al. обнаружили новую, родственную CRISPR, эндонуклеазу Cas12a (ранее известную как Cpf1), которая, как и широко используемый белок Cas9, представляет собой РНК-направляемую специфичную ДНК-эндонуклеазу; однако, по сравнению с Cas9, Cas12a обладает уникальными свойствами, например, для направления специфического расщепления двухцепочечной ДНК необходима только рргРНК (рргРНК - регулярно расположенные группы (короткие палиндромные повторы)), и она создает липкий конец.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью данного изобретения является обеспечение способа обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

Другой целью данного изобретения является обеспечение использования белка Cas в способе обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

В первом аспекте данного изобретения предложен набор, содержащий направляющую РНК, белок Cas, нуклеиновую кислоту-зонд и буферный раствор.

Способ обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты включает в себя добавление направляющей РНК, белка Cas, нуклеиновой кислоты-зонда и буферного раствора в реакционную систему, содержащую целевую молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена, и последующее обнаружение целевой нуклеиновой кислоты (в частности способом обнаружения интенсивности флуоресценции).

Предпочтительно, белок Cas представляет собой белок Cas12a или белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a.

Предпочтительно, белок Cas представляет собой Cas12a.

Cas12a предпочтительно представляет собой один из: FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a или Lb4Cas12a.

Предпочтительно, Cas12a представляет собой LbCas12a.

Предпочтительно, «направляющая РНК» относится к РНК, которая направляет белок Cas для специфического связывания с целевой ДНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, нуклеиновая кислота-зонд представляет собой одноцепочечную ДНК; одноцепочечная ДНК предпочтительно представляет собой флуоресцентно меченную одноцепочечную ДНК; одноцепочечная ДНК предпочтительно представляет собой флуоресцентный зонд, который метят флуоресцентной группой HEX на 5'-конце, и метят гасящей группой BHQ1 на 3'-конце.

В другом предпочтительном варианте осуществления, способ обнаружения нуклеиновой кислоты-зонда предпочтительно представляет собой способ обнаружения флуоресценции; и способ обнаружения флуоресценции предпочтительно представляет собой способ обнаружения с использованием считывающего устройства для микроплашек или флуоресцентного спектрофотометра.

Предпочтительно, целевую молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена в реакционной системе целевой молекулы нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена, получают после амплификации.

Предпочтительно, способ обнаружения согласно данному изобретению может быть использован для обнаружения патогенного микроорганизма, мутации гена или специфической целевой ДНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, белок Cas включает в себя Cas12b (C2c1).

Во втором аспекте данного изобретения, предложено применение белка Cas в способе обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, или в приготовлении состава для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом предпочтительном варианте осуществления, когда целевая ДНК, направляющая РНК и белок Cas образуют тройной комплекс, комплекс будет расщеплять другие одноцепочечные ДНК-молекулы в системе.

Предпочтительно, «направляющая РНК» относится к РНК, которая направляет белок Cas для специфического связывания с целевой ДНК.

В третьем аспекте данного изобретения предложен набор, содержащий направляющую РНК, белок Cas, и нуклеиновую кислоту-зонд.

В другом предпочтительном варианте осуществления, набор дополнительно содержит буферный раствор.

В четвертом аспекте данного изобретения, предложена система обнаружения для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, содержащая:

(a) белок Cas, который представляет собой белок Cas12a или белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a;

(b) направляющая РНК, которая направляет белок Cas для специфического связывания с целевой молекулой нуклеиновой кислоты; и

(c) нуклеиновая кислота-зонд, который является одноцепочечной ДНК;
при этом целевая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой целевую ДНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, система обнаружения дополнительно содержит (d) буферный раствор.

В другом предпочтительном варианте осуществления, система обнаружения дополнительно содержит целевую молекулу нуклеиновой кислоты, подлежащую обнаружению.

В другом предпочтительном варианте осуществления, концентрация целевой молекулы нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена в системе обнаружения, составляет 1-100 копий/микролитр или 10^{15} копий/микролитр, предпочтительно 1-10 копий/микролитр, и более предпочтительно 1-5 копий/микролитр.

В другом предпочтительном варианте осуществления, в системе обнаружения молярное соотношение нуклеиновой кислоты-зонда к целевой молекуле нуклеиновой кислоты составляет от $10^3:1$ до $10^{14}:1$, и предпочтительно от $10^4:1$ до $10^7:1$.

В другом предпочтительном варианте осуществления, сайт обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты расположен в позициях 1-12 ниже последовательности РАМ направляющей РНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, длина направляющей РНК составляет 15-30 нуклеотидов, и предпочтительно 15-18 нуклеотидов.

В другом предпочтительном варианте осуществления, целевая ДНК включает в себя кДНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, целевую ДНК выбирают из группы, состоящей из одноцепочечной ДНК, двухцепочечной ДНК или их комбинации.

В другом предпочтительном варианте осуществления, нуклеиновая кислота-зонд содержит флуоресцентную группу и гасящую группу.

В другом предпочтительном варианте осуществления, флуоресцентная группа и гасящая группа, каждая отдельно, расположены на 5' конце, 3' конце и в средней части нуклеиновой кислоты-зонда.

В другом предпочтительном варианте осуществления, длина нуклеиновой кислоты-зонда составляет 3-300 нуклеотидов, предпочтительно 5-100 нуклеотидов, более предпочтительно 6-50 нуклеотидов, и наиболее предпочтительно 8-20 нуклеотидов.

В другом предпочтительном варианте осуществления, целевая молекула нуклеиновой кислоты включает в себя целевую молекулу нуклеиновой кислоты, полученную из группы, состоящей из растений, животных, насекомых, микроорганизмов, вирусов или их комбинации.

В другом предпочтительном варианте осуществления, целевая ДНК представляет собой искусственно синтезированную или природную ДНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, целевая ДНК включает в себя ДНК дикого типа или мутантную ДНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, целевая ДНК включает в себя ДНК, полученную обратной транскрипцией РНК или амплификацией, такую как кДНК и т. д.

В другом предпочтительном варианте осуществления, Cas12a выбирают из группы, состоящей из: FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a или их комбинации; и более предпочтительно, Cas12a представляет собой LbCas12a.

В другом предпочтительном варианте осуществления, белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a, выбирают из группы, состоящей из Cas12b (т. е. C2c1).

В другом предпочтительном варианте осуществления, белок Cas12b выбирают из группы, состоящей из: AacCas12b (*Alicyclobacillus acidoterrestris*), Aac2Cas12b (*Alicyclobacillus acidiphilus*), AkCas12b (*Alicyclobacillus kakegawensis*), AmCas12b (*Alicyclobacillus macrosporangiidus*), AhCas12b (*Alicyclobacillus herbarius*), и AcCas12b (*Alicyclobacillus contaminans*).

В другом предпочтительном варианте осуществления, нуклеиновая кислота-зонд содержит одноцепочечную ДНК, содержащую детектируемую метку.

В другом предпочтительном варианте осуществления, одноцепочечная ДНК представляет собой меченную флуорофором или меченную биотином одноцепочечную ДНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, одноцепочечная ДНК представляет собой меченную флуорофором одноцепочечную ДНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, одноцепочечная ДНК представляет собой флуоресцентный зонд, который метят флуоресцентной группой HEX на 5'-конце, и метят гасящей группой BHQ1 на 3'-конце.

В пятом аспекте данного изобретения, предложен набор для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, содержащий:

i) первый контейнер и белок Cas в первом контейнере, причем белок Cas представляет собой Cas12a или белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходную с таковой Cas12a;

ii) необязательный второй контейнер и направляющую РНК во втором контейнере, причем направляющая РНК направляет белок Cas для специфического связывания с целевой молекулой нуклеиновой кислоты;

iii) третий контейнер и нуклеиновую кислоту-зонд в третьем контейнере; и

iv) необязательный четвертый контейнер и буферный раствор, находящийся в четвертом контейнере;

при этом целевая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой целевую ДНК.

В другом предпочтительном варианте осуществления, любые два, три или четыре (или все) из первого, второго, третьего и четвертого контейнеров могут быть одинаковыми или разными контейнерами.

В другом предпочтительном варианте осуществления, нуклеиновая кислота-зонд содержит флуоресцентную группу и гасящую группу.

В шестом аспекте данного изобретения, предложен способ обнаружения того, находится ли целевая молекула нуклеиновой кислоты в образце, включающий в себя следующие этапы:

(a) предоставление системы обнаружения для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с четвертым аспектом данного изобретения, при этом система обнаружения дополнительно содержит образец для обнаружения; и

(b) обнаружение того, расщепляется ли нуклеиновая кислота-зонд белком Cas в системе обнаружения, причем расщепление представляет собой сопутствующее транс-расщепление одноцепочечной ДНК;

при этом, если нуклеиновая кислота-зонд расщепляется белком Cas, то это указывает на присутствие целевой молекулы нуклеиновой кислоты в образце; и если нуклеиновая кислота-зонд не расщепляется белком Cas, то это указывает на отсутствие целевой молекулы нуклеиновой кислоты в образце.

В другом предпочтительном варианте осуществления, образец для обнаружения включает в себя неамплифицированный образец и амплифицированный (или нуклеиновая кислота-амплифицированный) образец.

В другом предпочтительном варианте осуществления, образец для обнаружения представляет собой образец, полученный с помощью амплификации.

В другом предпочтительном варианте осуществления, способ амплификации нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из: амплификации ПЦР, амплификации LAMP, амплификации RPA, лигазной цепной реакции, амплификации разветвленной ДНК, NASBA, SDA, транскрипционно-опосредованной амплификации, амплификации по типу катящегося кольца, HDA, SPIA, NEAR, TMA, и SMAP2.

В другом предпочтительном варианте осуществления, ПЦР включает в себя высокотемпературную ПЦР, ПЦР с стандартной температурой, и низкотемпературную ПЦР.

В другом предпочтительном варианте осуществления, способ используется для обнаружения того, присутствует ли ОНП, точечная мутация, делеция и/или инсерция в нуклеиновой кислоте в целевом сайте.

В другом предпочтительном варианте осуществления, когда выше и ниже (в диапазоне от -20 нуклеотидов до +20 нуклеотидов, предпочтительно в диапазоне от -15 нуклеотидов до +15 нуклеотидов, и более предпочтительно в диапазоне от -10 нуклеотидов до +10 нуклеотидов) целевого сайта отсутствует последовательность РАМ, амплификацию нуклеиновой кислоты проводят с использованием РАМ-вводящего праймера.

В другом предпочтительном варианте осуществления, РАМ-вводящий праймер имеет структуру по формуле I в 5'-3':

P1-P2-P3 (I)

при этом,

P1 представляет собой последовательность 5'-сегмента, которая расположена на 5'-конце и является комплементарной или некомплементарной последовательности целевой молекулы нуклеиновой кислоты;

P2 представляет собой последовательность РАМ;

P3 представляет собой последовательность 3'-сегмента, которая расположена на 3'-конце и является комплементарной последовательности целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом предпочтительном варианте осуществления, РАМ-праймер специфически связывается с областью выше или ниже целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом предпочтительном варианте осуществления, P1 имеет длину 0-20 нуклеотидов.

В другом предпочтительном варианте осуществления, P3 имеет длину 5-20 нуклеотидов.

В другом предпочтительном варианте осуществления, РАМ-праймер имеет длину 18-50 нуклеотидов, и предпочтительно 20-35 нуклеотидов.

В другом предпочтительном варианте осуществления, комплементарность включает в себя полную комплементарность и частичную комплементарность.

В другом предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере один праймер, содержащий последовательность РАМ, используется для амплификации нуклеиновой кислоты.

В другом предпочтительном варианте осуществления, когда области выше и ниже (в диапазоне от -20 нуклеотидов до +20 нуклеотидов, предпочтительно в диапазоне от -15 нуклеотидов до +15 нуклеотидов, и более предпочтительно в диапазоне от -10 нуклеотидов до +10 нуклеотидов) целевого сайта содержат последовательность РАМ, тогда может быть использован праймер, содержащий или не содержащий последовательность РАМ, и амплифицированный продукт амплификации содержит последовательность РАМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления, обнаружение на этапе (b) включает в себя способ обнаружения флуоресценции.

В другом предпочтительном варианте осуществления, способ обнаружения флуоресценции для обнаружения использует считывающее устройство для микроплашек или флуоресцентный спектрофотометр.

В седьмом аспекте данного изобретения, предложено использование белка Cas для приготовления реагента обнаружения или набора для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, на основе сопутствующего расщепления одноцепочечной ДНК, при этом белок Cas представляет собой Cas12a или белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a.

В другом предпочтительном варианте осуществления, Cas12a выбирают из группы, состоящей из: FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a, Lb4Cas12a или их комбинации; и более предпочтительно, Cas12a представляет собой LbCas12a.

В другом предпочтительном варианте осуществления, белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a, выбирают из группы, состоящей из Cas12b (или C2c1).

В другом предпочтительном варианте осуществления, белок Cas12b выбирают из группы, состоящей из AacCas12b.

Следует понимать, что в пределах объема данного изобретения вышеупомянутые технические признаки данного изобретения и технические характеристики, подробно описанные ниже (например, в примерах), могут быть объединены друг с другом, чтобы сформировать новое или предпочтительное техническое решение. Из-за ограничения объема документа, это больше не будет повторяться в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 демонстрирует цис-расщепление, характерное для Cas12a при расщеплении целевой одноцепочечной ДНК.

Фиг. 2 демонстрирует то, что при расщеплении целевой одноцепочечной ДНК Cas12a не зависит от последовательности РАМ, необходимой для расщепления двух цепей.

Фиг. 3 демонстрирует особенность транс-расщепления Cas12a при расщеплении одноцепочечной ДНК.

Фиг. 4 демонстрирует исследование Cas12as из 10 различных источников, где все эти Cas12as обладают цис-расщепляющей и транс-расщепляющей активностями в отношении одноцепочечной ДНК.

Фиг. 5 указывает на сайты, возможно, связанные с цис-расщепляющей и транс-расщепляющей активностями в отношении одноцепочечной ДНК в Cas12a посредством исследования Cas12a с помощью точечного мутагенеза.

Фиг. 6 демонстрирует структуры мономеров Cas12a и Cas12b (т. е. C2c1) и их комплексов с направляющей РНК и целевой ДНК.

Фиг. 7 демонстрирует значения флуоресценции, полученные для различных Cas12a, используя специфический субстрата в виде двухцепочечной ДНК и одноцепочечную ДНК (HEX-N12-BHQ1) в качестве зонда обнаружения флуоресценции. Группу отрицательного контроля не добавляют с специфическим субстратом.

Фиг. 8 демонстрирует схему этапов способа HOLMES для обнаружения целевой ДНК на основе амплификации целевой ДНК и сопутствующей транс-расщепляющей активности Cas12a в отношении одноцепочечной ДНК.

Фиг. 9 демонстрирует исследование чувствительности целевой ДНК с использованием FnCas12a или LbCas12a напрямую, или в комбинации с способом HOLMES.

Фиг. 10 демонстрирует значения обнаруженной флуоресценции целевых последовательностей, имеющих разные точечные мутации, как определено способом HOLMES с использованием ррgРНК различной длины направляющих последовательностей в комбинации с FnCas12a или LbCas12a.

Фиг. 11 демонстрирует исследование того, происходит ли транс-расщепление FAM-меченного одноцепочечного ДНК-зонда после добавления целевой одноцепочечной ДНК, используя FAM-меченный флуоресцентный зонд и 10 белков Cas12a.

Фиг. 12 демонстрирует значения флуоресценции после добавления целевой одноцепочечной ДНК, используя HEX-N12-BHQ1 в качестве зонда и 10 белков Cas12a.

Фиг. 13 (А) демонстрирует значения, обнаруженные HOLMES, когда фрагмент гена *gyrB* используется в качестве целевой последовательности, а различные концентрации чистой культивируемой MG1655 *Escherichia coli* используются в качестве матриц положительного контроля, с использованием одноцепочечного флуоресцентного ДНК-зонда, меченного HEX и BHQ1 на его двух концах. Показано, что значение флуоресцентного отклика MG1655 *Escherichia coli* уменьшается с уменьшением ее концентрации. (В) Обнаруженные значения для проб воды окружающей среды из различных мест.

Фиг. 14 демонстрирует схему этапов способа HOLMES для обнаружения ОНП, и обнаруженные значения флуоресценции 5 сайтов ОНП.

Фиг. 15 демонстрирует обнаруженные значения флуоресценции ключевых сайтов в гене TP53 (гене, связанном с раком), как определено способом HOLMES.

Фиг. 16 демонстрирует обнаруженные значения 5 сайтов ОНП (связанных с подагрой), как определено способом HOLMES.

Фиг. 17 демонстрирует обнаруженные значения одного сайта ОНП (относящегося к подагре), как определено способом HOLMES, где образцы представляют собой образцы из 21-ного добровольца.

Фиг. 18 демонстрирует схему создания праймера из одного примера данного изобретения, который можно использовать для HOLMES-обнаружения ОНП в любом сайте.

Фиг. 19 демонстрирует использование комбинации LAMP и HOLMES для обнаружения *Escherichia coli* в системе. (А) Электрофоретическая карта гена *gyrB* *Escherichia coli*, амплифицированного с помощью LAMP. Всего для амплификации используются два набора праймеров *gyrB*-1 и *gyrB*-2. *gyrB* является характерным геном *Escherichia coli*. (В) Система обнаружения HOLMES используется для обнаружения продукта амплификации LAMP. Отрицательный контроль: образец представляет собой стерильную воду, и праймер амплификации *gyrB*-1 используется для амплификации или обнаружения результата гена *gyrB*; *gyrB*-1: образец представляет собой *Escherichia coli*, что должен быть обнаружен, и первый набор праймеров для амплификации гена *gyrB* используется для амплификации или обнаружения результата гена *gyrB*; *gyrB*-2: образец представляет собой *Escherichia coli*, что должен быть обнаружен, и второй набор праймеров для амплификации гена *gyrB* используется для амплификации или обнаружения результата гена *gyrB*;

Фиг. 20 демонстрирует обнаружение генотипа клетки HEK293T человека с использованием комбинации LAMP и HOLMES. (А) Электрофоретическая карта соответствующей матрицы обнаружения ОНП клетки HEK293T человека, амплифицированной с помощью LAMP. Отрицательный контроль: образец представляет собой стерильную воду, и результат представляет собой результат амплификации с

использованием праймера rs5082 для амплификации; rs5082: образец является целым геномом клетки НЕК293Т человека, и результат представляет собой результат амплификации с использованием праймера rs5082 для амплификации; и rs1467558: образец представляет собой целый геном клетки НЕК293Т человека, и результат представляет собой результат амплификации с использованием праймера rs1467558 для амплификации. (В) Система обнаружения HOLMES используется для обнаружения продукта амплификации LAMP. Сайт rs5082 был обнаружен с использованием двух рргРНК: рргРНК-G и рргРНК-T соответственно (Перечень последовательностей 5); и сайт rs1467558 был обнаружен с использованием двух рргРНК: рргРНК-C и рргРНК-T соответственно (Перечень последовательностей 5);

Фиг. 21 демонстрирует использование комбинации RPA и HOLMES для обнаружения *Escherichia coli* в системе. (А) Амплификация гена *gyrB* *Escherichia coli* с помощью RPA. Всего для амплификации используют два набора праймеров *gyrB*-1 и *gyrB*-2. *gyrB* является характерным геном *Escherichia coli*. (В) Систему обнаружения HOLMES используют для обнаружения продукта амплификации RPA. Отрицательный контроль: образец представляет собой стерильную воду, и праймер амплификации *gyrB*-1 используется для амплификации или обнаружения результата гена *gyrB*; *gyrB*-1: образец представляет собой *Escherichia coli*, что должен быть обнаружен, и первый набор праймеров для амплификации *gyrB* используется для амплификации или обнаружения результата гена *gyrB*; *gyrB*-2: образец представляет собой *Escherichia coli*, что должен быть обнаружен, и второй набор праймеров для амплификации *gyrB* используется для амплификации или обнаружения результата гена *gyrB*;

Фиг. 22 демонстрирует обнаружение сопутствующей расщепляющей активности одноцепочечной ДНК Cas12b, когда одноцепочечную ДНК используют в качестве целевой ДНК. После завершения сопутствующей реакции расщепления, компоненты реакции разделяют с помощью электрофореза в 12% денатурирующем геле с мочевиной, и их обнаруживают с помощью системы визуализации флуоресценции. Числа в скобках представляют конечные концентрации компонентов реакции в нМ; целевая ДНК представляет собой одноцепочечную ДНК длиной 66 нт в количестве 50 нМ; и одноцепочечный ДНК-зонд представляет собой одноцепочечную ДНК, имеющую метку FAM на 5'-конце в количестве 50 нМ. Как можно видеть из фигуры, после смешивания Cas12b, направляющей РНК и целевой ДНК, FAM-меченая одноцепочечная ДНК разрезается на фрагменты, т. е. Cas12b обладает сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК.

Фиг. 23 демонстрирует обнаружение сопутствующей расщепляющей активности одноцепочечной ДНК Cas12b, когда одноцепочечную ДНК и двухцепочечную ДНК используют в качестве целевых ДНК. После завершения сопутствующей реакции расщепления, компоненты реакции обнаруживают с использованием считывающего флуоресценцию устройства для микроплашек. Количества Cas12b и направляющей РНК составляют 500 нМ; целевая ДНК представляет собой одноцепочечную ДНК или

двухцепочечную ДНК длиной 66 нт в количестве 50 нМ; и одноцепочечный ДНК-зонд представляет собой одноцепочечный ДНК-зонд (HEX-N12-BHQ1), содержащий флуоресцентную репортерную группу и гасящую группу, в количестве 500 нМ. Как видно из фигуры, независимо от того, используется ли одноцепочечная ДНК-матрица или двухцепочечная ДНК-матрица, после добавления Cas12b и направляющей РНК может быть обнаружена сопутствующая расщепляющая активность одноцепочечной ДНК.

Фиг. 24 демонстрирует сопутствующую транс-расщепляющую активность одноцепочечной ДНК Cas12b с целевой ДНК в низких концентрациях после комбинирования с амплификацией LAMP.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Чтобы сделать цели, технические решения и преимущества вариантов осуществления данного изобретения более понятными, нижеследующее четко и полностью описывает технические решения в вариантах осуществления данного изобретения со ссылкой на прилагаемые графические материалы в вариантах осуществления данного изобретения. Описанные варианты осуществления являются скорее частью, а не всеми вариантами осуществления данного изобретения. Все другие варианты осуществления, полученные специалистом в данной области техники на основе вариантов осуществления данного изобретения без творческих усилий, подпадают в объем правовой охраны данного изобретения.

Автор изобретения разработал техническое решение для обнаружения целевой нуклеиновой кислоты путем обширных и углубленных исследований, и путем исследования характеристик расщепляющих активностей фермента Cas (такого как ферменты Cas12a и Cas12b). Экспериментальные результаты показывают, что нуклеиновая кислота успешно и быстро обнаруживается с использованием вышеупомянутого технического решения, например, для выяснения того, есть ли определенная концентрация микроорганизмов, таких как *Escherichia coli* в воде, и для быстрой идентификации ОНП-генотипа. Данное изобретение выполнено на этой основе.

Термины

Термин «направляющая РНК» относится к РНК, которая направляет белок Cas для специфического связывания с целевой ДНК-последовательностью.

Термин «rrgРНК» относится к CRISPR РНК, которая представляет собой короткую РНК, которая направляет Cas12a для связывания с целевой ДНК-последовательностью.

Термин «CRISPR» относится к регулярно расположенному группами короткому палиндромному повтору, который является иммунной системой многих прокариот.

Термин «белок Cas» относится к белку, связанному с CRISPR, который является установленным белком в системе CRISPR.

Термин «Cas12a» (ранее называемый «Cpf1») относится к rrgРНК-зависимой эндонуклеазе, которая является ферментом типа V-A в системе классификации CRISPR.

Термины «Cas12b» и «C2c1» используются взаимозаменяемо и относятся rrgРНК-зависимой эндонуклеазе, которая является ферментом типа V-B в системе классификации

CRISPR.

Термин «LAMP» обозначает технологию изотермической амплификации на основе петель, которая представляет собой технологию изотермической амплификации нуклеиновых кислот, подходящую для генной диагностики.

Термин «PAM» относится к смежному с прото-спейсером мотиву, который необходим для расщепления Cas12a. PAM FnCas12a представляет собой последовательность TTN, PAM LbCas12a представляет собой последовательность TTTN, а PAM AacCas12b представляет собой TTN.

Данное изобретение раскрывает способ обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, который включает в себя: добавление направляющей РНК, белка Cas, нуклеиновой кислоты-зонда и буферного раствора в реакционную систему, содержащую целевую молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена, и последующее выполнение флуоресцентного обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

Белок Cas представляет собой Cas12a или Cas12b.

Cas12a предпочтительно представляет собой один из FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a или Lb4Cas12a; и Cas12a предпочтительно представляет собой LbCas12a.

Cas12b предпочтительно представляет собой AacCas12b, Aac2Cas12b, AkCas12b, AmCas12b, AhCas12b или AcCas12b.

Направляющая РНК относится к РНК, которая направляет белок Cas для специфического нацеливания на последовательность ДНК.

Целевую молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена, в реакционной системе целевой молекулы нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена, получают путем амплификации.

Способ обнаружения может обнаружить патогенный микроорганизм, генную мутацию или специфическую целевую ДНК.

Использование белка Cas в способе обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

Когда целевая ДНК, направляющая РНК и белок Cas образуют тройной комплекс, комплекс будет расщеплять другие молекулы одноцепочечной ДНК в системе.

Направляющая РНК относится к РНК, которая направляет белок Cas для специфического нацеливания на последовательность ДНК.

Согласно данному изобретению также предлагается набор, содержащий направляющую РНК, белок Cas и нуклеиновую кислоту-зонд. Кроме того, набор согласно данному изобретению также может содержать буферный раствор.

Согласно данному изобретению предложен способ обнаружения для быстрого обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты с высокой специфичностью. Как только целевая ДНК (одноцепочечная или двухцепочечная), пррРНК и белок Cas12a образуют тройной комплекс, комплекс будет расщеплять другие молекулы

одноцепочечной ДНК в системе. Посредством конструирования рргРНК нацеливают на целевую ДНК (сегмент последовательности ДНК, который необходимо обнаружить); рргРНК и белок Cas12a добавляют в систему обнаружения; когда присутствует целевая ДНК, Cas12a формирует тройной комплекс с рргРНК и целевой ДНК, и, в то же время, комплекс проявляет свою сопутствующую расщепляющую активность и расщепляет одноцепочечную ДНК, меченную флуоресцентным сигналом (два конца одноцепочечной ДНК, соответственно, соединены с люминесцентной группой и гасящей группой, и люминесцентная группа может излучать свет после отщепления), тем самым испуская флуоресценцию. Следовательно, узнать то, содержится ли в системе целевая молекула, можно по определению флуоресценции. Используя способ согласно данному изобретению, можно быстро обнаружить, содержится ли специфическая последовательность ДНК в образце. Чувствительность способа обнаружения может быть значительно улучшена путем комбинирования с технологией ПЦР. Нуклеиновая кислота-зонд в данном изобретении предпочтительно представляет собой флуоресцентный зонд.

Условия проверки HOLMES:

Согласно данному изобретению предложено применение ферментов Cas12, таких как Cas12a и Cas12b, для обнаружения нуклеиновых кислот. В следующем описании будет использоваться Cas12a в качестве примера.

Выбор Cas12a: согласно исследованию, Cas12a обладает транс-расщепляющей активностью, т. е., как только целевая ДНК, рргРНК и белок Cas12a образуют тройной комплекс, в системе будут расщеплены другие одноцепочечные ДНК (сопутствующие одноцепочечные ДНК). Согласно этому принципу, разработан специальный способ обнаружения ДНК. Во-первых, сопутствующая ДНК спроектирована в виде флуоресцентного зонда, который состоит из случайной последовательности 12 нт и помечен флуоресцентной группой HEX на 5'-конце и гасящей группой BHQ1 (HEX-N12-BHQ1) на 3'-конце. Когда целевой фрагмент ДНК содержится в системе, образуется тройной комплекс целевой ДНК, рргРНК и белка Cas12a. В этот момент зонд будет расщеплен, и в тоже время флуоресцентная группа HEX будет испускать флуоресценцию (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ), как это определяется флуоресцентным детектором. Затем испытывают 10 различных Cas12as, и целевая последовательность представляет собой двухцепочечную ДНК, как продемонстрировано на Фиг. 7. Можно видеть, что комплекс, состоящий из целевой двухцепочечной ДНК и каждого белка Cas12a, может реализовать транс-расщепляющую активность.

Чувствительность реакции HOLMES: затем анализируют чувствительность реакции FnCas12a и LbCas12a в отношении целевой ДНК, т. е. узнают самую низкую концентрацию целевой ДНК, при которой может возникнуть отклик. Как продемонстрировано на Фиг. 9, когда прямо добавляют проверяемую цель, они могут вступать в реакцию с целевой ДНК с концентрацией выше 0,1 нМ, и отклик является детектируемым, когда концентрация превышает 1 нМ. Если комбинируют с технологией ПЦР (способ HOLMES), как продемонстрировано на Фиг. 8, т. е. за амплификацией

фрагмента интереса посредством ПЦР следует реакция расщепления Cas12a, чувствительность отклика может составлять всего лишь 10 аМ, как продемонстрировано на Фиг. 9.

Испытание на ОНП: затем проверяют, может ли способ HOLMES обнаружить ОНП-генотип. T1 берется в качестве целевой последовательности, РАМ в этом сайте подвергают мутации, или позиции 1-18 целевой последовательности соответственно подвергают точечному мутагенезу, и сравнивают различия в обнаружение между не мутированной последовательностью и мутированной последовательностью с помощью рргРНК различной длины.

Как продемонстрировано на Фиг. 10, когда комплементарная цели последовательность представляет собой 24 нт рргРНК (rrg-24нт), точечная мутация в позициях 8-18 не сильно отличается от дикого типа, в то время как значение флуоресценции явно снижается после мутации РАМ и мутации позиций 1-7. Когда рргРНК является усеченной и длина спаренной целевой последовательности составляет 18 нт, значение флуоресценции мутированных позиций 8-16 нт, очевидно, уменьшается по сравнению с таковой целевой последовательности, имеющей длину 24 нт; когда длина рргРНК продолжает уменьшаться до 16 нт или 17 нт, значение флуоресценции мутированной целевой последовательности уменьшается более значительно; и когда она дополнительно уменьшается до 15 нт, значение флуоресценции мутированной целевой последовательности является более низким по сравнению с таковым этой целевой последовательности, но интенсивность флуоресценции мутированной целевой последовательности все же может быть выше по сравнению с таковыми других целевых последовательностей, и, таким образом, может использоваться для обнаружения. В совокупности, 15 нт, 16 нт и 17 нт рргРНК являются наиболее подходящими для обнаружения ОНП.

В данном изобретении, Cas12a расщепляет одноцепочечную ДНК способом программируемого расщепления, независимого от последовательности РАМ, который называется цис-расщеплением; но как только формируется тройной комплекс Cas12a/rrgРНК/целевая ДНК, он будет демонстрировать транс-расщепляющую активность, т. е. проявлять активность расщепления любой нецелевой одноцепочечной ДНК в системе.

Исходя из свойств Cas12a разработан способ обнаружения специфической молекулы нуклеиновой кислоты, который называется HOLMES (одночасовой недорогой многоцелевой эффективный простой анализ). Как и название технологии, он характеризуется высокой скоростью (1 час), низкой ценой, многопоточностью, высокой эффективностью и простым способом тестирования. Способ может быть использован в областях быстрого обнаружения патогенов, обнаружения ОНП, и т. п.

Обнаружение нуклеиновой кислоты на основе сопутствующей расщепляющей активности

Согласно данному изобретению также предложен способ обнаружения

нуклеиновой кислоты, основанный на сопутствующей расщепляющей активности фермента Cas12 (включая Cas12a или Cas12b).

Предпочтительно, обнаружение согласно данному изобретению может быть выполнено для ОПН, и, в частности, сначала выполняют ПЦР-амплификацию, а затем обнаружение.

С отсылкой к Фиг. 18, дана схема дизайна праймеров.

Случай 1. Когда есть сайт РАМ рядом с сайтом ОПН, и рргРНК синтезирована на основе направляющей последовательности, сконструированной в соответствии с РАМ, сайт может использоваться для обнаружения HOLMES. Когда для обнаружения используется способ HOLMES, он демонстрирует относительно низкий фоновый сигнал; и для одной и той же направляющей последовательности различия сигналов между различными матрицами ОПН довольно велики.

Случай 2. Когда рядом с сайтом ОПН нет сайта РАМ или подходящего сайта РАМ, сайт РАМ может быть введен в соответствии с вышеуказанной экспериментальной схемой.

Типичный этап включает в себя проектирование праймера рядом с сайтом ОПН и перенос сайта РАМ на праймер, где последовательность, расположенная на 3'-конце сайта РАМ, должна быть спарена с ДНК-матрицей. Не существует особых требований к праймеру на другом конце до тех пор, пока праймер способен соединяться с ДНК-матрицей и может использоваться для амплификации ПЦР. Как продемонстрировано на Фиг. 18, сайты РАМ могут быть успешно введены после амплификации ПЦР.

С отсылкой к Фиг. 10, в данном изобретении при разработке введения сайта РАМ, сайт ОПН обычно размещается в первых 16 основаниях 5'-конца направляющей последовательности рргРНК, предпочтительно в позициях 1-14, более предпочтительно в позициях 1-12, еще более предпочтительно в позициях 1-11 или 1-10, и наиболее предпочтительно в позициях 1-8 или 1-7.

Данное изобретение обладает следующими основными преимуществами:

(1) Высокая скорость: когда выполняются условия анализа, от получения образца до момента получения результатов анализа уходит всего около 1 часа.

(2) Низкая стоимость: в эксперименте нет специальных материалов или ферментов, и он требует небольшого количества материалов и реагентов, и, следовательно, его можно использовать для анализа следовых количеств.

(3) Высокая эффективность: данное изобретение обладает чрезвычайно высокой чувствительностью и может обнаруживать ДНК в концентрации 10 аМ.

(4) Многочисленные варианты применения: он может обнаружить различные образцы нуклеиновых кислот, в том числе образцы ДНК и образцы РНК.

(5) Простота: нет специальных или сложных этапов, и если подготовлен набор и составлен план действий, требуются только простые операции, такие как добавление образца.

Данное изобретение будет подробно описано вместе с конкретными примерами.

Следует понимать, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации данного изобретения, а не для ограничения объема данного изобретения. Экспериментальные способы в следующих примерах, для которых не указаны специальные условия, обычно выполняются в соответствии с общепринятыми условиями, такими как описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), или рекомендованные производителями. Если не указано иное, проценты и доли представляют собой массовые проценты и массовые доли.

Если специально не указано иное, экспериментальные материалы, требуемые в данном изобретении, могут быть получены из коммерческих каналов.

Материалы

1. Ингибитор РНКазы приобретен у TaKaRa, а высокоточная ДНК-полимераза KOD FX приобретена у ToYoBo; праймеры (олигонуклеотиды) синтезировали в Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd.; РНК-полимераза T7 приобретена у Thermo; набор для очистки и концентрирования РНК (RNA Clean & Concentrator TM_5) приобретен у Zymo Research; «Система очистки от геля и ПЦР Wizard® SV» (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System) приобретена у Promega; и все питательные среды (например, триптон, дрожжевой экстракт и т. д.) приобретены у OXOID.

2. Формула среды: жидкий LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl), и только 2% агара необходимо добавлять в жидкий LB для приготовления твердого LB.

Пример 1. Обнаружение белка Cas12a, способного обнаруживать целевую одноцепочечную ДНК (зонд помечен FAM).

Одноцепочечная ДНК (цель-T1-R) была выбрана в качестве целевой последовательности для проверки значений отклика при обнаружении различными белками Cas12a.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-rrгРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом T7-T1-24-R, как продемонстрировано в Таблице 5. В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 16 часов). Затем РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific), разбавляли до концентрации 10 мкМ и хранили в холодильнике при -80 °C.

2. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли очищенную в 1-ом этапе рргРНК (0,5 мкМ), Cas12a (0,25 мкМ), целевую одноцепочечную ДНК (цель-T1-R) (0,01 мкМ), нуклеиновую кислоту-зонд (N25-5' FAM) (0,01 мкМ), буферный раствор в виде буфера NEB 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. Реакция с контрольной пробой

представляла собой реакцию, в которую были добавлены все те же компоненты, кроме одноцепочечной ДНК целевой последовательности. Реакцию проводили при 37 °С в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °С в течение 2 минут.

3. Обнаружение флуоресценции: реакцию смесь подвергали электрофорезу в акриламидном геле с мочевиной (мочевина-ПААГ), и затем обнаруживали с помощью сканера флуоресцентной люминесценции. Как продемонстрировано на Фиг. 11, разные Cas12a имеют разные проявления обнаружения цели. Например, для HkCas12a и т. д., расщепление зонда происходило даже тогда, когда не добавляли целевую одноцепочечную ДНК. LbCas12a и т. п. являются лучшими кандидатами в белки Cas12a, поскольку расщепление зонда происходило только при добавлении целевой одноцепочечной ДНК.

Пример 2. Обнаружение белка Cas12a, способного обнаруживать целевую одноцепочечную ДНК (зонд помечен двумя метками - HEX и BHQ1).

Одноцепочечная ДНК (цель-T1-R) была выбрана в качестве целевой последовательности для проверки значений отклика при обнаружении различными белками Cas12a.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-ppгРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом T7-T1-24-R (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °С (в течение около 16 часов). Затем РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до концентрации 10 мкМ и хранили в холодильнике при -80 °С.

2. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли очищенную в 1-ом этапе рргРНК (0,5 мкМ), Cas12a (0,25 мкМ), целевую одноцепочечную ДНК (цель-T1-R) (0,01 мкМ), флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1, т. е., 12нт одноцепочечную ДНК, меченную HEX на 5' конце и BHQ1 на 3' конце) (0,5 мкл), буферный раствор в виде буфера NEB 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. Реакция с контрольной пробой представляла собой реакцию, в которую были добавлены все те же компоненты, кроме одноцепочечной ДНК целевой последовательности. Реакцию проводили при 37 °С в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °С в течение 2 минут.

3. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Как продемонстрировано на Фиг. 12, разные Cas12a имеют разные проявления обнаружения цели. Например, для HkCas12a и т. д., расщепление зонда происходило даже

тогда, когда не добавляли целевую одноцепочечную ДНК. FnCas12a и т. п. являются лучшими кандидатами в белки Cas12a, поскольку расщепление зонда происходило только при добавлении целевой одноцепочечной ДНК.

Пример 3. Обнаружения белка Cas12a, способного обнаруживать целевую двухцепочечную ДНК.

Двухцепочечная ДНК (цель-T1) была выбрана в качестве целевой последовательности для проверки значений отклика при обнаружении различными белками Cas12a.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-ppгРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом T7-T1-24-R (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 16 часов). Затем РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до концентрации 10 мкМ и хранили в холодильнике при -80 °C.

2. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли очищенную в 1-ом этапе рргРНК (0,5 мкМ), Cas12a (0,25 мкМ), целевую двухцепочечную ДНК (цель-T1-R, полученную отжигом праймеров цель-T1-F до цель-T1-R) (0,01 мкМ), флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ), буферный раствор в виде буфера NEB 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. Реакцию проводили при 37 °C в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °C в течение 2 минут.

3. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Как продемонстрировано на Фиг. 7, разные Cas12as имеют разные проявления обнаружения цели. LbCas12a и т. п. являются лучшими кандидатами в белки Cas12a, поскольку расщепление зонда происходило только при добавлении целевой двухцепочечной ДНК.

Пример 4. Тестирование различных концентраций цели с FnCas12a и LbCas12a.

Цель-T1 выбирали в качестве целевой ДНК, и затем ее разбавляли до различных концентраций с градиентом, чтобы на них проверить чувствительность реакции с FnCas12a и LbCas12a. Для повышения чувствительности был добавлен этап амплификации ПЦР.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-ppгРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом T7-T1-24-R (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen

Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 16 часов). Затем РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до концентрации 10 мкМ и хранили в холодильнике при -80 °C.

2. ПЦР-амплификация (необязательно): в качестве матрицы использовали плазмиду, содержащую цель-Т1 (pUC18-T1), разбавленную в виде градиента, и затем использовали для реакции ПЦР. Полный объем каждой реакционной системы составлял 20 мкл, 0,25 мкМ M13F-47 и M13R-48 каждой использовали в качестве праймеров (Таблица 4), а для реакции ПЦР использовали фермент KOD FX высокой точности (ToYoBo). Условия реакции ПЦР были: 95 °C в течение 2 минут, и затем начинались 35 циклов с 98 °C в течение 10 с, 60 °C в течение 15 с, и 68 °C в течение 10 с. После завершения ПЦР продукт амплификации ПЦР прямо использовали для реакции Cas12a.

3. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли очищенную в 1-ом этапе рргРНК (0,5 мкМ), FnCas12a или LbCas12a (0,25 мкМ), 1 мкл ПЦР-продукта (или целевых ДНК, которые прямо разводят до различных концентраций), флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ), буферный раствор в виде буфера NEB 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. Реакцию проводили при 37 °C в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °C в течение 2 минут.

4. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Как продемонстрировано на Фиг. 9, когда прямо добавляют проверяемую цель, все целевые ДНК с концентрацией выше 0,1 нМ могут давать сигнал, и сигнал был детектируемым, когда концентрация была выше 1 нМ. Если объединить технологию ПЦР, т. е. амплификацию фрагмента интереса с помощью ПЦР, с последующей реакцией расщепления Cas12a, чувствительность отклика может составить даже всего лишь 10 аМ.

Пример 5. Анализ цели с точечной мутацией с помощью FnCas12a и LbCas12a.

цель-Т1 была выбран в качестве цели, и ее подвергали точечному мутагенезу в области РАМ и позициях 1-18 соответственно, чтобы проверить значения отклика нескольких рргРНК различной длины на дикий тип, и на те же, только после внесения точечной мутации.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем соответствующего отжига T7-ppгРНК-F с синтезированными олигонуклеотидами T7-T1-24-R, T7-T1-15-R, T7-T1-16-R, T7-T1-17-R, и T7-T1-18-R (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная

денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 16 часов). Затем РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до концентрации 10 мкМ и хранили в холодильнике при -80 °C.

2. ПЦР-амплификация: в качестве матрицы использовали плазмиду, содержащую цель-Т1 (pUC18-T1). Полный объем каждой реакционной системы составлял 20 мкл, использовали 0,25 мкМ праймера M13R-48 и каждого из соответствующих праймеров мутагенеза для цель-Т1-F (Таблица 4), и для реакции ПЦР использовали фермент KOD FX высокой точности (ToYoBo). Условия реакции ПЦР были: 95 °C в течение 2 минут, и затем начинались 35 циклов с 98 °C в течение 10 с, 60 °C в течение 15 с, и 68 °C в течение 10 с. После завершения ПЦР продукт прямо использовали для реакции Cas12a.

3. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли очищенную в 1-ом этапе рргРНК (0,5 мкМ), FnCas12a или LbCas12a (0,25 мкМ), 1 мкл ПЦР-продукта, флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ), буферный раствор в виде буфера NEB 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. Реакцию проводили при 37 °C в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °C в течение 2 минут.

4. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Как продемонстрировано на Фиг. 10, когда последовательностью, комплементарной цели, была рргРНК 24 нт (rrgРНК-24нт), точечные мутации в позициях 8-18 не сильно отличались от дикого типа, в то время как значение флуоресценции явно уменьшалось после мутации в РАМ и точечной мутации в позициях 1-7. Когда рргРНК была усечена, а длина комплементарной целевой последовательности составляла 18 нт, значение флуоресценции для мутаций в позициях 8-16 нт было явно снижено по сравнению с 24 нт; когда длина составляла 16 нт или 17 нт, уменьшение значения флуоресценции мутированной целевой последовательности является более очевидным; и когда длина составляла 15 нт, значения флуоресценции как для целевой последовательности, так и для мутированной целевой последовательности были очень слабыми, но интенсивность флуоресценции мутированной целевой последовательности все еще могла быть выше по сравнению с таковыми других целевых последовательностей и, таким образом, могла быть использована для обнаружения. В совокупности, 15 нт, 16 нт и 17 нт рргРНК являются наиболее подходящими для обнаружения ОНП.

Пример 6. Анализ *Escherichia coli* и подобных микроорганизмов в воде из окружающей среды.

Ген *gyrB* *Escherichia coli* был выбран в качестве цели обнаружения для не прямой проверки концентраций *Escherichia coli* и подобных микроорганизмов в воде. Используя

Escherichia coli MG1655 в качестве положительного контроля, обнаруживали содержание микроорганизмов в воде (такой как сточные воды и водопроводная вода) из окружающей среды.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-ppgРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом T7-ppgРНК-gyrB (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 16 часов). Затем РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до концентрации 10 мкМ и хранили в холодильнике при -80 °C.

2. ПЦР-амплификация: когда образец положительного контроля *Escherichia coli* MG1655 при культивировании достигал примерно 0,5 по OD₆₀₀, его разбавляли с 10-кратным градиентом соответственно, и затем использовали в качестве матрицы, и образец представлял собой воду из окружающей среды (включая водопроводную воду и илистую воду из окружающей среды). Полный объем каждой реакционной системы составлял 20 мкл, использовали по 0,25 мкМ праймеров gyrB-F и gyrB-R (Таблица 4), и для реакции ПЦР использовали фермент KOD FX высокой точности (ToYoBo). Условия реакции ПЦР были: 95 °C в течение 2 минут, и затем начинались 35 циклов с 98 °C в течение 10 с, 60 °C в течение 15 с, и 68 °C в течение 10 с. После завершения ПЦР продукт ПЦР прямо использовали для реакции Cas12a.

3. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли очищенную в 1-ом этапе рргРНК (0,5 мкМ), LbCas12a (0,25 мкМ), 1 мкл ПЦР-продукта, флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ), буферный раствор в виде буфера NEB 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. Реакцию проводили при 37 °C в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °C в течение 2 минут.

4. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Как продемонстрировано на Фиг. 13, значение флуоресцентного отклика для *Escherichia coli* MG1655 уменьшается с уменьшением концентрации. Среди них, более явно были обнаружены микроорганизмы в образцах 2, 4, 5 и 6.

Пример 7. Анализ ОНП человека

Для анализа ОНП выбирали 5 сайтов ОНП человека, а именно rs5082, rs1467558, rs2952768, rs4363657 и rs601338, чтобы проверить работоспособность способа HOLMES.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-ppgРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом (Таблица 5). В частности,

комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 16 часов). РНК очищали с использованием набора RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research), количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до концентрации 10 мкМ, и хранили в холодильнике при -80 °C.

2. ПЦР-амплификация: полный объем реакционной системы составлял 20 мкл, использовали 0,25 мкМ каждого праймера (Таблица 4), в качестве матрицы использовали 1 нг геномной ДНК человека (НЕК293Т) или неочищенный образец слизистой оболочки эпителия полости рта, и для реакции ПЦР использовали фермент KOD FX высокой точности (ToYoBo). Условия реакции ПЦР были: 95 °C в течение 2 минут, и затем начинались 35 циклов с 98 °C в течение 10 с, 60 °C в течение 15 с, и 68 °C в течение 10 с. После завершения ПЦР продукт прямо использовали для реакции Cas12a. (Праймеры 1-rs5082-F-T, 2-rs1467558-F-T и 3-rs2952768-R-C прямо применяли к соответствующим мутированным продуктам ОНП)

3. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли соответствующую рргРНК (1 мкМ), LbCas12a (0,5 мкМ), 1 мкл ПЦР-продукта, флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ). Реакцию проводили при 37 °C в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °C в течение 2 минут.

4. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Как продемонстрировано на Фиг. 14, только когда рргРНК соответствовала соответствующей целевой последовательности, тогда наблюдали более высокие значения флуоресцентного отклика, и если имелась точечная мутация, тогда значение отклика было существенно снижено. Генотип соответствующего ОНП мог быть обнаружен по значению флуоресценции, и эти результаты были подтверждены результатами сиквенирования.

Пример 8. Анализ гена, связанного с раком.

Ген TP53 был выбран в качестве тестового гена. Ген TP53 имеет нонсенс-мутацию в клеточной линии T24 человека, что приводит к инактивации гена. Проверяли клетку с нормальным геном в этом сайте (НЕК293Т), отдельно ген и мутантную клетку T24 соответственно.

1. Получение рргРНК: сначала получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-rrгРНК-F с синтезированными олигонуклеотидами T7-rrгРНК-34-TP53-T24-C-16нт и T7-rrгРНК-34-TP53-T24-G-16нт (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°C в

течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 16 часов).РНК очищали с использованием набора RNA Clean &Concentrator™-5 (Zymo Research), количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до концентрации 10 мкМ, и хранили в холодильнике при -80 °C.

2. ПЦР-амплификация: полный объем реакционной системы составлял 20 мкл, использовали 0,25 мкМ каждого праймера 34-TP53-T24-F и 34-TP53-T24-R (Таблица 4), в качестве матрицы использовали 1 нг геномной ДНК человека (HEK293T, T24) или неочищенный образец слизистой оболочки эпителия полости рта, и для реакции ПЦР использовали фермент KOD FX высокой точности (ToYoBo). Условия реакции ПЦР были: 95 °C в течение 2 минут, и затем начинались 35 циклов с 98 °C в течение 10 с, 60 °C в течение 15 с, и 68 °C в течение 10 с. После завершения ПЦР продукт прямо использовали для реакции Cas12a.

3. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли соответствующую рргРНК (1 мкМ), LbCas12a (0,5 мкМ), 1 мкл ПЦР-продукта, флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ). Реакцию проводили при 37 °C в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °C в течение 2 минут.

4. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Как продемонстрировано на Фиг. 15, когда ген TP53, который был нормальным в этом сайте, был матрицей, обнаруженное значение рргРНК-С было значительно выше, чем таковое рргРНК-G, в то время как рргРНК-G мутантной клетки T24 было значительно увеличено.

Пример 9. Анализ ОНП человека (гены, связанные с подагрой).

Для анализа ОНП выбирали 5 сайтов ОНП человека, которые были связаны с риском подагры, а именно rs1014290, rs6449213, rs737267, rs1260326 и rs642803, чтобы проверить способ HOLMES.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-ppгРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 16 часов). РНК очищали с использованием набора RNA Clean &Concentrator™-5 (Zymo Research), количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до концентрации 10 мкМ, и хранили в холодильнике при -80 °C.

2. ПЦР-амплификация: полный объем реакционной системы составлял 20 мкл, использовали 0,25 мкМ каждого праймера (Таблица 4), в качестве матрицы использовали 1 нг геномной ДНК человека (HEK293T) или неочищенный образец слизистой оболочки эпителия полости рта, и для реакции ПЦР использовали фермент KOD FX высокой точности (ToYoBo). Условия реакции ПЦР были: 95 °С в течение 2 минут, и затем начинались 35 циклов с 98 °С в течение 10 с, 60 °С в течение 15 с, и 68 °С в течение 10 с. После завершения ПЦР продукт прямо использовали для реакции Cas12a. (Праймеры 1-rs5082-F-T, 2-rs1467558-F-T и 3-rs2952768-R-C прямо применяли к соответствующим мутированным продуктам ОНП)

3. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли соответствующую рргРНК (1 мкМ), LbCas12a (0,5 мкМ), 1 мкл ПЦР-продукта, флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ). Реакцию проводили при 37 °С в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °С в течение 2 минут.

4. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Как продемонстрировано на Фиг. 16, только когда рргРНК соответствовала соответствующей целевой последовательности, тогда наблюдали более высокие значения флуоресцентного отклика, и если имелась точечная мутация, тогда значение отклика было существенно снижено. Генотип соответствующего ОНП мог быть обнаружен по значению флуоресценции, и эти результаты были подтверждены результатами секвенирования.

Пример 10. Анализ ОНП клинических образцов добровольцев (ген, связанный с подагрой) с помощью набора

Предварительно смешанный раствор добавляли в 96-луночную плашку для подготовки набора, а затем в набор добавляли геномную ДНК 21 добровольца для анализа сайта rs1014290, который был связан с риском подагры.

1. Подготовка набора: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-ppгРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°С в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°С до 20°С с шагом 1°С в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °С (в течение около 16 часов). РНК очищали с использованием набора RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research), количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, и разбавляли до концентрации 10 мкМ.

2. Предварительное смешивание в 96-луночной плашке для ПЦР: в 19 мкл системы добавляли реагенты, необходимые для реакции ПЦР, причем праймеры представляли собой 41-rs1014290-F и 41-rs1014290-R.

3. Предварительное смешивание в 96-луночной плашке для обнаружения

флуоресценции: в 19 мкл системы добавляли рргРНК (1 мкМ), LbCas12a (0,5 мкМ), и флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ), и добавляли в 96-луночную плашку.

4. ПЦР-амплификация: в 96-луночную плашку с подготовленной смесью для ПЦР добавляли геномную ДНК добровольцев, и затем проводили реакцию ПЦР. Условия реакции ПЦР были: 95 °С в течение 2 минут, и затем начинались 35 циклов с 98 °С в течение 10 с, 60 °С в течение 15 с, и 68 °С в течение 10 с.

5. Реакция для Cas12a: брали 1 мкл реакционного раствора ПЦР и добавляли в 96-луночные плашки с подготовленной смесью для обнаружения флуоресценции, реакцию проводили при 37 °С в течение 15 минут, а затем останавливали при 98 °С в течение 2 минут.

6. Обнаружение флуоресценции: ее обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Как продемонстрировано на Фиг. 17, поскольку популяция с генотипом А:А имела более высокий риск подагры, люди, не являющиеся добровольцами № 5, 7 и 9, имеют генотип А:G или G:G, поэтому больше внимания следует уделять риску подагра.

Пример 11. Обнаружение *Escherichia coli* и подобных микроорганизмов в воде из окружающей среды с помощью LAMP в комбинации с белком Cas.

Ген *gyrB* *Escherichia coli* был выбран в качестве цели обнаружения для не прямой проверки присутствия *Escherichia coli* или подобных микроорганизмов в воде.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-ppгРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом T7-ppгРНК-*gyrB* (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигали в реакционном буфере для Taq ДНК-полимеразы (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°С в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°С до 20°С с шагом 1°С в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °С (в течение около 16 часов). Затем РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до конечной концентрации 10 мкМ и хранили в холодильнике при -80°С для дальнейшего использования.

2. Амплификация LAMP: в качестве отрицательного контроля и образца, который должен быть обнаружен, использовали стерильную воду и загрязненную жидкость, содержащую *Escherichia coli*, соответственно. Полный объем каждой реакционной системы составлял 25 мкл, и использовали по 1,6 мкМ каждого праймера LAMP-FIP и LAMP-BIP, по 0,2 мкМ каждого LAMP-F3 и LAMP-B3, по 0,4 мкМ каждого LAMP-петляF и LAMP-петляB, и набор, используемый для реакции LAMP, представлял собой набор LAMP WarmStart® (NEB). Способ для реакции LAMP представлял собой 65°С в течение 30 минут. После завершения LAMP, проводили отжиг при 80 °С в течение 10 минут, и затем продукт прямо использовали для реакции Cas12a.

3. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли очищенную в 1-ом этапе рргРНК (0,5 мкМ), Cas12a (0,25 мкМ), 1 мкл LAMP-продукта, флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ), буферный раствор в виде буфера NEB 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. Реакцию проводили при 37 °С в течение 15 минут.

4. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Результаты были такими, как продемонстрировано на Фиг. 19.

Пример 12. Обнаружение ОНП с использованием амплификации LAMP в комбинации с белком Cas.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига T7-ppгРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом T7-crRNA-rs5082-T/T7-crRNA-rs5082-G/T7-crRNA-rs1467558-T/T7-crRNA-rs14 67558-C (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигали в реакционном буфере для Taq ДНК-полимеразы (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°С в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°С до 20°С с шагом 1°С в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °С (в течение около 16 часов). Затем РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до конечной концентрации 10 мкМ и хранили в холодильнике при -80°С для дальнейшего использования.

2. Амплификация LAMP: в качестве образца был взят геном HEK293T человека. Полный объем каждой реакционной системы составлял 25 мкл, и использовали по 1,6 мкМ каждого праймера LAMP-FIP и LAMP-BIP, по 0,2 мкМ каждого LAMP-F3 и LAMP-V3, по 0,4 мкМ каждого LAMP-петляF и LAMP-петляB, и для реакции LAMP использовали набор WarmStart[®] LAMP Kit (NEB). Способ для реакции LAMP представлял собой 65°С в течение 30 минут. После завершения LAMP, проводили отжиг при 80 °С в течение 10 минут, и затем продукт прямо использовали для реакции Cas12a.

3. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли очищенную в 1-ом этапе рргРНК (0,5 мкМ), Cas12a (0,25 мкМ), 1 мкл LAMP-продукта, флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ), буферный раствор в виде буфера NEB 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. Реакцию проводили при 37 °С в течение 15 минут.

4. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Результаты были такими, как продемонстрировано на Фиг. 20.

Пример 13. Обнаружение Escherichia coli и подобных микроорганизмов в воде из окружающей среды с помощью амплификации RPA в комбинации с белком Cas.

Ген *gyrB* *Escherichia coli* был выбран в качестве цели обнаружения для не прямой проверки присутствия *Escherichia coli* и подобных микроорганизмов в воде.

1. Получение рргРНК: сперва получали транскрипционную матрицу путем отжига Т7-ppгРНК-F с синтезированным олигонуклеотидом Т7-ppгРНК-*gyrB* (Таблица 5). В частности, комплементарный олигонуклеотид (4 мкМ) отжигался в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 50 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера. рргРНК синтезировали с использованием набора транскрипции Т7 высокой производительности, и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 16 часов). Затем РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до конечной концентрации 10 мкМ, и хранили в холодильнике при -80°C для дальнейшего использования.

2. Амплификация RPA: в качестве отрицательного контроля и образца, который должен быть обнаружен, использовали стерильную воду и загрязненную жидкость, содержащую *Escherichia coli*, соответственно. Полный объем каждой реакционной системы составлял 25 мкл, использовали по 0,5 мкМ каждого праймера RPA-*gyrB*-F (или RPA-*gyrB*-F2) и RPA-*gyrB*-R2, и использовали набор TwistAmp® Basic kit (TwistDX) для реакции RPA. Способ для реакции RPA представлял собой 37°C в течение 30 минут. После завершения RPA, проводили отжиг при 80 °C в течение 10 минут, и затем продукт прямо использовали для реакции Cas12a.

3. Реакция Cas12a: в 20 мкл реакционной системы добавляли очищенную в 1-ом этапе рргРНК (0,5 мкМ), Cas12a (0,25 мкМ), 1 мкл RPA-продукта, флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (0,5 мкМ), буферный раствор в виде буфера NEB 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз. Реакцию проводили при 37 °C в течение 15 минут.

4. Обнаружение флуоресценции: 20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и затем сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). Результаты были такими, как продемонстрировано на Фиг. 21.

Пример 14. Cas12b, имеющий сопутствующую расщепляющую активность

1. Приготовление направляющей РНК (енРНК)

Сперва, конструировали плазмиду рUC18-направляющая РНК-T1, с использованием рUC18 в качестве каркаса плазмиды. В плазмиду рUC18 встраивали промотор Т7 и матричную ДНК-последовательность для транскрипции направляющей РНК (примечание: направляющую РНК, транскрибированную с этой матрицы, нацеленную на последовательность, называют в этом исследовании Т1). Выполнение способа сперва начинали с раунда ПЦР с использованием плазмиды рUC18 в качестве матрицы, и PUC18-1-F и рUC18-1-R в качестве праймеров; соединения продуктов ПЦР с помощью ДНК-лигазы Т4, превращения продукта в DH10b, и сиквенирования для получения правильного клона, который был назван рUC18-направляющая РНК-T1-pre.

Затем выполняли второй раунд ПЦР с использованием рUC18-направляющей РНК-T1-pre в качестве матрицы, и рUC18-2-F и рUC18-2-R в качестве праймеров, соединяя и трансформируя продукты ПЦР тем же способом, чтобы в итоге получить плазмиду рUC18-направляющая РНК-T1, которая имела правильную последовательность.

Затем, с использованием плазмиды рUC18-направляющая РНК-T1 в качестве матрицы, синтезировали направляющую РНК с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности (Thermo), и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 12-16 часов).

В конце, в систему транскрипции добавляли ДНКазу I (добавляли 2 мкл ДНКазы I на каждые 50 мкл транскрипционной системы), держали на водяной бане при 37 °C в течение 30 минут для удаления плазмидной ДНК, и РНК очищали с использованием набора для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, разбавляли до концентрации 10 мкМ и хранили в холодильнике при -80°C для дальнейшего использования.

2. Приготовление целевой ДНК

(1) Если целевая ДНК представляла собой одну цепь, то сразу синтезировали олигонуклеотид длиной 66 п.о. в качестве целевой ДНК (цель-T1-R), который содержал целевую последовательность из 20 п.о. (T1), распознаваемую направляющей РНК.

(2) Если целевая ДНК была двухцепочечной, то сразу синтезировали два комплементарных олигонуклеотида длиной 66 п.о. (цель-T1-F; цель-T1-R), которые содержали целевую последовательность из 20 п.о. (T1), распознаваемую направляющей РНК. Два олигонуклеотида отжигали для получения короткой целевой ДНК. В частности, комплементарный олигонуклеотид (1 мкМ) отжигали в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 20 мкл, с последующей процедурой отжига: начальная денатурация при 95 °C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера.

3. Реакция Cas12b

(1) отжиг направляющей РНК: направляющую РНК разбавляли до соответствующей концентрации (10 мкМ) и отжигали в приборе для ПЦР. Процедура отжига: денатурация при 75 °C в течение 5 мин, и последующее охлаждение с 75°C до 20°C с шагом снижения 1°C в минуту.

(2) инкубация направляющей РНК с C2c1: отоженную направляющую РНК смешивали с C2c1 в равной молярной концентрации, и оставляли при 30°C на 20-30 мин.

(3) Реакция Cas12b: в 20 мкл реакционной системы добавляли смесь направляющей РНК и C2c1, проинкубированных на этапе (2) (их конечная концентрация составляла 250 мкМ или 500 мкМ), целевую ДНК (с конечной концентрацией 50 нМ), FAM-меченный олигонуклеотид (цель-ДНМТ1-3-R-FAM-5') или зонд гашения флуоресценции (HEX-N12-BHQ1 с конечной концентрацией 500 нМ), 2 мкл 10 X NEB Buffer 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз (40 Ед/мкл). После смешивания до гомогенности, реакцию проводили при 48 °C в течение 30 минут. После этого ее останавливали нагреванием при 98 °C в

течение 5 минут в приборе для ПЦР.

4. Обнаружение транс-расщепляющей активности Cas12b с помощью денатурирующего гель-электрофореза с мочевиной: 20 мкл инаktivированного реакционного раствора разделяли с помощью способа денатурирующего гель-электрофореза с мочевиной, и затем визуализировали с помощью системы визуализации флуоресценции ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare). Результаты были такими, как продемонстрировано на Фиг. 22.

5. Обнаружение транс-расщепляющей активности Cas12b с помощью способа считывания флуоресценции устройством для микроплашек: 20 мкл инаktivированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нм и излучением света при 556 нм). Результаты были такими, как продемонстрировано на Фиг. 23.

Пример 15. Анализ чувствительности реакции Cas12b (транс-расщепление).

Посредством обнаружения интенсивности возбужденной флуоресценции флуоресцентного зонда (HEX-N12-BHQ1) обнаруживали концентрацию целевой ДНК, необходимую для Cas12b, чтобы проявлять транс-расщепляющую активность, т. е. чувствительность транс-расщепляющей реакции Cas12b.

1. Приготовление направляющей РНК

Сперва, при использовании рUC18-направляющая РНК-T1 в качестве матрицы, и направляющая РНК-ДНMT1-3-F и направляющая РНК-ДНMT1-3-R в качестве праймеров, 20 оснований направляющей РНК, которая нацелена на целевую ДНК T1, были заменены с помощью направляющей РНК, нацеленной на ДНMT1-3, посредством ПЦР, чтобы получить другую плазмиду рUC18-направляющая РНК-ДНMT1-3.

Затем, с использованием плазмиды рUC18-направляющая РНК-ДНMT1-3 в качестве матрицы, синтезировали направляющую РНК с использованием набора транскрипции T7 высокой производительности (Thermo), и реакцию проводили в течение ночи при 37 °C (в течение около 12-16 часов).

В конце, в систему транскрипции добавляли ДНКазу I (добавляли 2 мкл ДНКазы I на каждые 50 мкл транскрипционной системы), держали на водяной бане при 37 °C в течение 30 минут для удаления плазмидной ДНК, и РНК очищали, используя набор для очистки и концентрирования РНК, количественно обнаруживали с помощью NanoDrop 2000C, и хранили в холодильнике при -80°C для дальнейшего использования.

2. Приготовление целевой ДНК

Что касается целевой ДНК, первое заключается в том, что целевую ДНК прямо добавляли в реакционную систему Cas12b без амплификации. Способ был следующим:

(1) Если целевая ДНК представляла собой одну цепь, то сразу синтезировали олигонуклеотид длиной 50 п.о. в качестве целевой ДНК (ДНMT1-3 (TTC PAM)-R), который содержал целевую последовательность из 20 п.о. (ДНMT1-3), распознаваемую направляющей РНК.

(2) Если целевая ДНК была двухцепочечной, то сразу синтезировали два комплементарных олигонуклеотида длиной 50 п.о. (ДНМТ1-3 (ТТС РАМ)-F; ДНМТ1-3 (ТТС РАМ)-R), которые содержали целевую последовательность из 20 п.о. (ДНМТ1-3), распознаваемую направляющей РНК. Два олигонуклеотида отжигали для получения короткой целевой ДНК. В частности, комплементарный олигонуклеотид (2 мкМ) отжигали в 1X ПЦР-буфере (Transgen Biotech) при полном объеме 20 мкл, с последующей процедурой отжига: денатурация при 95°C в течение 5 минут, и последующее охлаждение с 95°C до 20°C с шагом 1°C в минуту с использованием термоциклера.

(3) одноцепочечную или двухцепочечную целевую ДНК разводили в виде градиента до 2 мкМ, 0,2 мкМ, 0,02 мкМ, 0,002 мкМ и 0,0002 мкМ для последующего использования.

Второе заключалось в вставке фрагмента, содержащего целевую последовательность (ДНМТ1-3), в плазмидный вектор для амплификации с помощью реакции LAMP.

(1) фрагмент, содержащий целевую последовательность (ДНМТ1-3), вставляли в вектор клонирования pEasy-Blunt Zero с использованием набора для клонирования pEasy-Blunt Zero от Transgen, чтобы получить правильный клон после проверки путем секвенирования.

(2) Реакция экспансии LAMP

Используя вышеуказанную плазмиду в качестве матрицы, проводили реакцию амплификации LAMP. Матрицы добавляли соответственно в концентрации 0 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ, и разводили с 10-кратным градиентом до 10^{-11} нМ. Полный объем каждой реакционной системы составлял 25 мкл, и использовали по 1,6 мкМ каждого праймера LAMP-DNM-FIP и LAMP-DNM-BIP, по 0,2 мкМ каждого LAMP-DNM-F3 и LAMP-DNM-B3, по 0,4 мкМ каждого LAMP-DNM-петляF и LAMP-DNM-петляB, и набор, используемый для реакции LAMP, представлял собой набор LAMP WarmStart® (NEB). Способ для реакции LAMP представлял собой 65°C в течение 30 минут. После завершения LAMP, выполняли инактивацию при 80 °C в течение 10 минут, и затем продукт прямо использовали для реакции Cas12a.

3. Реакция Cas12b

(1) отжиг направляющей РНК: направляющую РНК разбавляли до соответствующей концентрации (5 мкМ) и отжигали в приборе для ПЦР. Процедура отжига: денатурация при 75 °C в течение 5 мин, и последующее охлаждение с 75°C до 20°C с шагом снижения 1°C в минуту.

(2) инкубация направляющей РНК с Cas12b: отоженную направляющую РНК смешивали с Cas12b в равной молярной концентрации, и оставляли при 30°C на 20-30 мин.

(3) Реакция Cas12b: в 20 мкл реакционной системы добавляли смесь направляющей РНК и Cas12b, проинкубированных на этапе (2) (конечная концентрация для направляющей РНК и Cas12b составила 250 мкМ для обеих), 1 мкл целевой ДНК или 1

мкл продукта LAMP, флуоресцентный зонд (HEX-N12-BHQ1) (с конечной концентрацией 500 нМ), 2 мкл 10X NEB Buffer 3.1, и 0,5 мкл ингибитора РНКаз (40 Ед/мкл). После смешивания до гомогенности, реакцию проводили при 48 °С в течение 30 минут. После этого ее останавливали нагреванием при 98 °С в течение 5 минут в приборе для ПЦР.

4. Обнаружение транс-расщепляющей активности Cas12b с помощью способа считывания флуоресценции устройством для микроплашек:

20 мкл инактивированного реакционного раствора добавляли в 96-луночную плашку, и сигнал обнаруживали с помощью устройства для считывания микроплашек (с поглощением света при 535 нМ и излучением света при 556 нМ). В сочетании с LAMP-амплификацией, Cas12b может показывать значительную сопутствующую транс-расщепляющую активность одноцепочечной ДНК для концентрации целевой ДНК, составляющей всего лишь 10 мкМ. Результаты были такими, как продемонстрировано на Фиг. 24.

Характеристики цис-расщепления Cas12a при расщеплении целевой одноцепочечной ДНК:

Сперва, для проверки характеристик расщепления одноцепочечной ДНК Cas12a были спроектированы несколько рргРНК, нацеленных на короткую одноцепочечную ДНК (ДНМТ1-3) (Таблица 1), которые пометили 5(6)-карбоксифлуоресцеином (FAM) на 3'-конце. После расщепления с помощью FnCas12a продукт реакции анализируют с помощью денатурирующего гель-электрофореза с мочевиной (мочевина-ПААГ электрофорез). Установлено, что расщепление Cas12a одноцепочечной ДНК управляемо. Таким образом, сайт расщепления находится вблизи 22-го основания (с 21-го по 23-е основание) целевой последовательности, отсчитывая с 3'-концевого основания до 5'-концевого первой целевой последовательности, спаренной с направляющей последовательностью рргРНК, как продемонстрировано на Фиг. 1А и 1С. Для расщепления Cas12a двухцепочечной ДНК требуется последовательность РАМ, тогда как для расщепления Cas12a одноцепочечной ДНК не требуется последовательность РАМ (Фиг. 1А, 1В и 2), что аналогично расщеплению одноцепочечной ДНК, опосредованному Cas9. Однако расщепляющая активность одноцепочечной ДНК, опосредованная Cas12a, зависит от структуры «петля-на-стебле» в рргРНК, как продемонстрировано на Фиг. 1А, тогда как Cas9 все еще проявляет слабую расщепляющую активность для одноцепочечной ДНК с только 20-нт комплементарной последовательностью РНК. Структура «петля-на-стебле» рргРНК важна для стабилизации структуры Cas12a, что является причиной, по которой кольцевая структура рргРНК необходима для расщепления Cas12a одноцепочечной ДНК. Дополнительно проверялось, может ли более короткая последовательность направляющей рргРНК проходить через сайт расщепления одноцепочечной ДНК Cas12a таким образом, что расщепление происходит за пределами распознаваемого сайта. Когда длина направляющей последовательности составляет 16 нт, 18 нт и 20 нт, все эти рргРНК приводят к Cpf1-расщеплению вблизи 22-го основания, как продемонстрировано на Фиг. 1В и 1D, и это означает, что сайт расщепления находится в

позиции 4 нт, 2 нт или 0 нт вне сайта узнавания. Затем проверяли расщепляющую эффективность Cas12a на разных субстратах, с использованием субстратов двухцепочечной ДНК и одноцепочечной ДНК соответственно, как продемонстрировано на Фиг. 1F. Как и в случае Cas9-расщепления, расщепление одноцепочечной ДНК происходит медленнее, чем расщепление двухцепочечной ДНК, как продемонстрировано на Фиг. 1E до 1G. Эти результаты указывают на то, что механизм распознавания и расщепления Cas12a одноцепочечной ДНК может отличаться от такового для двухцепочечной ДНК, который является малоэффективным способом распознавания и расщепления, независимым от РАМ; и последовательность РАМ ускоряет распознавание и/или расщепление Cas12a целевой двухцепочечной ДНК.

Характеристики транс-расщепления Cas12a при расщеплении одноцепочечной ДНК:

Когда целевую одноцепочечную ДНК метят на 3'-конце, Cas12a расщепляет вблизи 22-го основания, как продемонстрировано на Фиг. 1. Однако, когда ее метят на 5'-конце, полоса расщепленного продукта прогнозируемого размера отсутствует, но получают короткий (<6 нт) FAM-меченный продукт, как продемонстрировано на Фиг. 3B. В ходе углубленных экспериментов, когда формируется тройной комплекс Cas12a/rrgРНК/целевая одноцепочечная ДНК, целевая одноцепочечная ДНК (ДНМТ1-3) (Таблица 1), меченная на 5'-конце, расщепляется, и продуцируется короткий FAM-меченный продукт, как продемонстрировано на Фиг. 3C. Кроме того, тройной комплекс также расщепляет одноцепочечную ДНК, которая не имеет последовательности, комплементарной rrgРНК (т. е. сопутствующую одноцепочечную ДНК), в любой другой реакционной системе, как продемонстрировано на Фиг. 3C и 3D. Это явление расщепления называется транс-расщеплением, которое отличается от программируемого цис-расщепления. Когда целевую одноцепочечную ДНК метят на 3'-конце, также наблюдается транс-расщепление, но остается много продуктов цис-расщепления, как продемонстрировано на Фиг. 3B. Это может быть связано с комплексом, сформированным Cas12a/rrgРНК/целевая одноцепочечная ДНК, и целевая одноцепочечная ДНК является защищенной, поскольку ее меченный 3'-конец является защищенным от экспонирования активному нуклеазному сайту тройного комплекса. Эти процессы расщепления могут быть такими, как продемонстрировано на Фиг. 3A.

В дополнение к FnCas12a, протестированному выше, также тестировались 9 типов Cas12a из других видов источников (Таблица 2 и Фиг. 4A). За исключением Lb4Cas12a, все типы Cas12a обладают достаточной эндонуклеазной активностью по отношению к плазмидной ДНК (как продемонстрировано на Фиг. 4B), и все тройные комплексы Cas12a проявляют цис- и транс-расщепляющую активность на одной цепи (как продемонстрировано на Фиг. 4C и 4D). Это демонстрирует, что цис- и транс-активность Cas12a на одноцепочечной ДНК представляет собой обычное явление.

Цис- и транс-ключевые сайты, и механизм для расщепления Cas12a одноцепочечной ДНК.

Чтобы обнаружить ключевые аминокислотные остатки, связанные с цис- и транс-активностями в отношении одноцепочечной ДНК, в Cas12a, несколько остатков-кандидатов Cas12a подвергали мутации для проведения испытания активности. Сначала очищали и тестировали три мутанта FnCas12a с единичной аминокислотной мутацией (H843A, K852A и K869A), и их остатки оказались связанными с РНКазной активностью. Результаты исследования транс-активности на одноцепочечной ДНК показывают, что не обнаружено явного различия в цис- и транс-расщепляющей активностях в отношении одноцепочечной ДНК между FnCas12a дикого типа и тремя мутантами, как продемонстрировано на Фиг. 5А и 5С.

Затем, когда подвергали мутации сайты эндонуклеазной активности в FnCas12a, т.е. подвергали мутации сайты домена RuvC (D917A, E1006A или D1255A) и домена Nuc (R1218A), затрагивались обе цис- и транс-расщепляющая активности этих мутированных Cas12a в отношении одноцепочечной ДНК, как продемонстрировано на Фиг. 5В и 5D. Эти результаты указывают на то, что ключевой сайт Cas12a для расщепления целевой двухцепочечной ДНК тесно связан с цис- и транс-расщепляющей активностями в отношении одноцепочечной ДНК.

Недавние структурные исследования Cas12b (т. е. C2c1) (включая комплексы с удлинённой целевой ДНК или удлинённой нецелевой ДНК) показывают, что обе цепи располагаются в кармане RuvC, как продемонстрировано на Фиг. 6А и 6В. Путём сравнения эндонуклеазных каталитических остатков Cas12b (т. е. C2c1) и Cas12a, выяснено, что эти сайты, скорее всего, играют сходные роли в расщеплении и функциях Cas12b (т. е. C2c1) и Cas12a. Результаты *in vitro* эксперимента мутации одной аминокислоты показывают, что это согласуется с приведенной выше гипотезой. То есть Cas12a, вероятно расщепит две цепи только в одном каталитическом кармане RuvC.

Транс-расщепляющая активность комплекса Cas12a: в структуре комплекса Cas12b (т. е., C2c1) с дополнительной одноцепочечной ДНК, одноцепочечная ДНК, независимо от последовательности, также располагается на поверхности каталитического кармана, как продемонстрировано на Фиг. 6С, что аналогично подобному для сопутствующего субстрата-одноцепочечной ДНК в Cas12a. В сочетании с экспериментом точечной аминокислотной мутации это предполагает то, что целевая ДНК, нецелевая ДНК и сопутствующая одноцепочечная ДНК расщепляются в единственном кармане RuvC в Cas12a, как продемонстрировано на Фиг. 6D, 6Е и 6F. Тройной комплекс Cas12a обладает транс-расщепляющей активностью сопутствующей одноцепочечной ДНК, в то время как причина, по которой мономер или двойной комплекс не обладает транс-расщепляющей активностью сопутствующей одноцепочечной ДНК, может быть объяснена путём сравнения структур мономерного, двойного и тройного комплексов. Структура мономера Cas12a неупорядочена, двойной комплекс Cas12a/ppgРНК имеет треугольную структуру, как продемонстрировано на Фиг. 6G, в то время как тройной комплекс Cas12a/ppgРНК/целевая ДНК превращается в двулистную структуру, тем самым открывая каталитический карман для осуществления транс-расщепления сопутствующей

одноцепочечной ДНК (как продемонстрировано на Фиг. 6Н).

Внедрение способа обнаружения нуклеиновых кислот

Исходя из характеристик Cas12a был разработан способ обнаружения специфической молекулы нуклеиновой кислоты, который получил название HOLMES (одночасовой недорогой многоцелевой эффективный простой анализ). Как и название технологии, он характеризуется простым способом проверки, который составляет один час и имеет низкую стоимость, многоцелевое применение и высокую эффективность.

Для полной реакционной системы способ можно разделить на два основных этапа: один - амплификация матричной нуклеиновой кислоты, и другой - специфическое обнаружение нуклеиновой кислоты белком Cas12a. Здесь, способ ПЦР используется для амплификации нуклеиновых кислот, но на самом деле любой способ амплификации может быть скомбинирован с обнаружением нуклеиновых кислот на втором этапе, например с способом изотермической амплификации RPA и т. д. Исходная нуклеиновая кислота не ограничивается двухцепочечной ДНК, но также может быть одноцепочечной ДНК; или даже все еще может быть обнаружена РНК после обратной транскрипции, поэтому этот способ подходит для различных типов молекул нуклеиновой кислоты. Для фазы обнаружения нуклеиновой кислоты три компонента, а именно Cas12a, рргРНК и нуклеиновая кислота-зонд являются ключевыми для эксперимента. В дополнение к 10 Cas12, упомянутым в примере (эти 10 белков выбраны случайным образом), другие белки Cas12a также подходят для этого способа. Кроме того, другие типы белков Cas (например, белок C2c1) также пригодны для заявленного объема данного изобретения: как показывают экспериментальные результаты, Cas12b *Alicyclobacillus acidoterrestris* (т. е. C2c1) также имеет сопутствующую транс-расщепляющую активность одноцепочечной ДНК, сходную с таковой Cas12a, и его комплекс с рргРНК/целевая ДНК также может расщеплять сопутствующую одноцепочечную ДНК.

Что касается рргРНК, выступающей в качестве направляющей, она будет более стабильной в системе после ее конструирования, например, после ручной модификации. Что касается выбора нуклеиновых кислот-зондов, в данном изобретении выбирают короткую одноцепочечную ДНК, меченную HEX и BHQ1, и теоретически применим любой другой способ детектируемого мечения до тех пор, пока нуклеиновая кислота-зонд расщепляется с получением обнаруживаемых различий. В альтернативном варианте, нуклеиновая кислота-зонд также может быть сконструирована так, чтобы флуоресцировать после связывания с соединением, чтобы обнаруживать, расщепляется ли зонд.

Кроме того, следует понимать, что после прочтения вышеуказанных методик данного изобретения, специалисты в данной области техники могут вносить различные изменения или модификации в данное изобретение, и эти эквивалентные формы также попадают в объем, определенный прилагаемой формулой данного изобретения.

Таблица 1. Последовательности субстратов, характерно расщепляемые Cas12a в эксперименте

Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')	SEQ ID No:
цель-ДНМТ1-3-F	aatgttttctgatgggtccatgtctgttactcge ctgtcaagtggegtgac	1
цель-ДНМТ1-3-R	gtcaegceacttgacaggegagtaacagacatg gaccateaggaaacatt	2
цель-ДНМТ1-3-R-FAM-3'	gtcaegceacttgacaggegagtaacagacatg gaccateaggaaacatt-FAM	3
цель-ДНМТ1-3-R-FAM-5'	FAM-gtcaegceacttgacaggegagtaacaga catggaccateaggaaacatt	4
цель-T1-F	tttctgtttgttategcaactttctactgaatt caagettttactctagaaagaggagaaaggatcc	5
цель-T1-R	ggatecttttctctcttttctagagtaaagettg aattcagtagaaagttgcgataacaaacagaaa	6
цель-T1-F-FAM	FAM tttctgtttgttategcaactttctactg aattcaagettttactctagaaagaggagaaagg atcc	7
цель-T1-R-FAM	ggatecttttctctcttttctagagtaaagettg aattcagtagaaagttgcgataacaaacagaaa -FAM	8
цель-T1-F-FAM-3'-F	tttctgtttgttategcaactttctactgaatt caagettttactctagaaagaggagaaaggatcc -FAM	9
цель-T1-R-FAM-5'-R	FAM-ggatecttttctctcttttctagagtaaag ettgaattcagtagaaagttgcgataacaaaca	10

	gaaa	
цель-ДНМТ1-3-R-TTT-FAM-3'	gtcagcccacttgacaggegagtaacagacatg gaccatcaggTTTcatt-FAM	11
цель-ДНМТ1-3-R-CCC-FAM-3'	gtcagcccacttgacaggegagtaacagacatg gaccatcaggCCCcatt-FAM	12
цель-ДНМТ1-3-R-GGG-FAM-3'	gtcagcccacttgacaggegagtaacagacatg gaccatcaggGGGcatt-FAM	13
цель-ДНМТ1-3-F-AAA	aatgAAAcctgatgggtccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	14
цель-ДНМТ1-3-F-GGG	aatgGGGcctgatgggtccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	15
цель-ДНМТ1-3-F-CCC	aatgCCCcctgatgggtccatgtctgttactcgc ctgtcaagtggcgtgac	16
цель-T1-1-R	acaaaacagaaa	17
цель-T1-6-R	cga taacaaaacagaaa	18
цель-T1-12-R	aagttgcgataacaaaacagaaa	19
цель-T1-18-R	agtagaaagttgcgataacaaaacagaaa	20
цель-T1-24-R	gaattcagtagaaagttgcgataacaaaacagaa a	21
цель-T1-24-только-R	gaattcagtagaaagttgcgataa	22
цель-T1-18-только-R	agtagaaagttgcgataa	23
цель-T1-12-только-R	aagttgcgataa	24
цель-T1-6-только-R	cgataa	25
N25-5' FAM	FAM-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAN	26
N25-3' FAM	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-FAM	27

Таблица 2. Названия и номера GI белка Cas12a и белка Cas12b (т. е. C2c1)

Название	Номер GI	Вид
FnCas12a	489130501	<i>Francisella tularensis</i>
AsCas12a	545612232	<i>Acidaminococcus</i> sp. BV3L6
LbCas12a	917059416	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium ND2006
Lb5Cas12a	652820612	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium NC2008
HkCas12a	491540987	<i>Helcococcus kunzii</i> ATCC 51366
OsCas12a	909652572	<i>Oribacterium</i> sp. NK2B42
TsCas12a	972924080	<i>Thiomicrospira</i> sp. XS5
BbCas12a	987324269	<i>Bacteroidales</i> bacterium KA00251
BoCas12a	496509559	<i>Bacteroidetes</i> oral taxon 274 str. F0058
Lb4Cas12a	769130406	<i>Lachnospiraceae</i> bacterium MC2017
C2c1	1076761101	<i>Aliicyclobacillus acidoterrestris</i>

Таблица 3. Информация о плазмидах

Плазмиды или Штамы	Соответствующие свойства и генотипы	Источники
Плазмиды		
pET28a-TEV	pET28 с сайтом расщепления тромбина изменен на сайт расщепления протеазы TEV	(Carneiro, Silva et al. 2006)
pET28a-TEV-FnCas12a	pET28a-TEV содержащая FnCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
pET28a-TEV-AsCas12a	pET28a-TEV содержащая AsCas12a	(Li, Zhao et al. 2016)
pET28a-TEV-LbCas12a	pET28a-TEV содержащая LbCas12a	(Lei, Li et al. 2017)
pET28a-TEV-Lb5Cas12a	pET28a-TEV содержащая Lb5Cas12a	Данное изобретение
pET28a-TEV-HkCas12a	pET28a-TEV содержащая HkCas12a	Данное изобретение
pET28a-TEV-0sCas12a	pET28a-TEV содержащая 0sCas12a	Данное изобретение
pET28a-TEV-TsCas12a	pET28a-TEV содержащая TsCas12a	Данное изобретение
pET28a-TEV-BbCas12a	pET28a-TEV содержащая BbCas12a	Данное изобретение
pET28a-TEV-BoCas12a	pET28a-TEV содержащая BoCas12a	Данное изобретение
pET28a-TEV-Lb4Cas12a	pET28a-TEV содержащая Lb4Cas12a	Данное изобретение

Таблица 4. Праймеры, использованные в анализе по способу HOLMES

Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')	SEQ ID No:
цель-T1-R	ggatccctttctccctctttctagagtaange ttgaa ttcagtagaaaagttgcgataacaaaacagaaa	28
M13F 47	cacaattccacacaacatacgagccgga	29
M13R 48	tgtagccgtagttagggcaccacttc	30
Цель-T1-F	agttttgttategeaaatttctactgaattc	31
Цель-T1-F-1A	agttttgAtategeaaatttctactgaattc	32
Цель-T1-F-2A	agttttgtAategeaaatttctactgaattc	33
Цель-T1-F-3T	agttttgttTtegeaaatttctactgaattc	34
Цель-T1-F-4A	agttttgttAegeaaatttctactgaattc	35
Цель-T1-F-5G	agttttgttatGgeaaatttctactgaattc	36
Цель-T1-F-6C	agttttgttateCaaatttctactgaattc	37
Цель-T1-F-7G	agttttgttategGaaatttctactgaattc	38

Цель-T1-F-8T	agttttggttategcTacttttetaactgaattc	39
Цель-T1-F-9T	agttttggttategcaTettttetaactgaattc	40
Цель-T1-F-10G	agttttggttategcaaGttttetaactgaattc	41
Цель-T1-AAAN-F	aaaagtttategcaacttttetaactgaattc	42
Цель-T1-F-11A	agttttggttategcaacAttetactgaattcgggc atag	43
Цель-T1-F-12A	agttttggttategcaactAtetactgaattcgggc atag	44
Цель-T1-F-13A	agttttggttategcaacttActactgaattcgggc atag	45
Цель-T1-F-14G	agttttggttategcaactttGtactgaattcgggc atag	46
Цель-T1-F-15A	agttttggttategcaactttcAactgaattcgggc atag	47
Цель-T1-F-16T	agttttggttategcaactttctTctgaattcgggc atag	48
Цель-T1-F-17G	agttttggttategcaactttctaGtgaattcgggc atag	49
Цель-T1-F-18A	agttttggttategcaactttctacAgaattcgggc atag	50
Цель-T1-PAM1A-F	agtttAgttategcaacttttetaactgaattc	51
Цель-T1-PAM2A-F	agttAtggttategcaacttttetaactgaattc	52
Цель-T1-PAM3A-F	agtAttggttategcaacttttetaactgaattc	53
gyrB-F	AGTTGTCGTTCCCTCAACTCCGGCGTTTC	54
gyrB-R	TCGACGCCAATACCGTCTTTTTCAGTGG	55
1-5082-F	CTGCCTTTGCTTCTACCTTTGCCTGT	56
1 5082 F T	TTGCTTCTACCTTTGCCTGTTCTGG	57
1 5082 R	TTTTCTGGCTGGGGATGGCCGATGG	58
2 rs1467558 F	AGCAATAACACTAATATTGATTCCCTTCAGATATGG ACTCCTTTCATAGTA	59

2-rs1467558-F-T	TTGATTCCCTTCAGATATGGACTCCTTTCATAGTAT AACG	60
2 rs1467558 R	TGAGCATCGTTATTCTTACGCGTTGTCATTGAAAG AG	61
3-rs2952768-F	AGCCTGGGCAACGAGTGAAACTCTG	62
3 rs2952768 R	ACAGGAGGGACAAAGGCCTAAGTGCTCC	63
3-rs2952768-R-C	CATCATAGGATTGGGAAAAGGACATTCAGTCATT CAG	64
4-rs4363657-F	AGAGTCCTTCTTTCTCAATTTTTCAGAATAATTTA GTACTTTGGGTAC	65
4 rs4363657 R	CAGTACTGAAAAAACCTGCCTATCAATAAAAGCCC TAGAC	66
5-rs601338-F	GCTTCACCGGCTACCTTTGCTCCT	67
5-rs601338-R	TTCACCTGCAGGCCCCGCAGG	68
34-TP53-T24-F	CCTGACTTTCAACTCTGTCTCCTTCCTCTTTTAC AGTA	69
34-TP53-T24-R	TGCTGTGACTGCTTGTAGATGGCCATGG	70
41-rs1014290-F	AGTTTCCAGACCTCAGTGCACAAGATACTTTTCTA C	71
41-rs1014290-F-G	ACCTCAGTGCACAAGATACTTTTCTACGTCATCCA C	72
41-rs1014290-R	AGCTCCAGTGGATGGAAGATCTTTGAGATCCAG	73
42-rs6449213-F	AGTCAAAGAGATTTCATGCCTGGGACTTTAATCACA TTTAT	74
42-rs6449213-F-C	ATGCCTGGGACTTTAATCACATTTATCGGAAGG	75
42-rs6449213-R	CAAATCTGTCTCCACCTCTCAGCTCACCTTG	76
43-rs737267-F	TTCTTGAACCCAACTCACCTGGCATTTAAACTG	77
43-rs737267-F-A	AAACTCACCTGGCATTTAAACTGACTCTGTAAAG	78
43-rs737267-F-T	AAACTCACCTGGCATTTAAACTGTCTCTGTAAAG	79
43-rs737267-R	TGCCGAGGCTGAGTTCAGCTACTCTCC	80

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

Таблица 5. Матричные последовательности для транскрипции ррРНК

Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')	SEQ ID No:
T7-pprPHK-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	90
T7-T1-24-R	gaattcagtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGA AATCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	91
T7-T1-15-R	agaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTC	92
T7-T1-16-R	tagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTC	93
T7-T1-17-R	gtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCT TATAGTGAGTCGTATTAATTTC	94
T7-T1-18-R	agtagaaagttgcgataaATCTACAACAGTAGAAATTCCT CTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	95
T7-pprPHK-ДНМТ-23нт-R	GAGTAACAGACATGGACCATCAGATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	96
T7-pprPHK-ДНМТ-(-8)-R	gacatggaccatcaggaaacattATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	97
T7-pprPHK-ДНМТ-(+4)-R	aggegagtaacagacatggaccaATCTACAACAGTAGAA ATTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTC	98
T7-pprPHK-ДНМТ	tgacaggegagtaacagacatggATCTACAACAGTAGAA	99

-(+8)-R	ATTCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	
T7-pprPHK-ДНМТ -16нт-R	agacatggaccateagATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	100
T7-pprPHK-ДНМТ -18нт-R	acagacatggaccateagATCTACAACAGTAGAAATTC CTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	101
T7-pprPHK-ДНМТ -20нт-R	taacagacatggaccateagATCTACAACAGTAGAAATT CCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	102
T7-ДНМТ-(-8) -нет петли-R	gacatggaccateaggaacatLCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC	103
T7-ДНМТ-(+4) -нет петли-R	aggcgagtaacagacatggaccaCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC	104
T7-ДНМТ-(+8) -нет петли-R	tgacaggcgagtaacagacatggCCCTATAGTGAGTCGT ATTAATTTTC	105
T7-pprPHK-rs50 82-T	CCTCTTCCCAGAACAGGATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	106
T7-pprPHK-rs50 82-G	CCTCTTCCCAGCACAGGATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	107
T7-pprPHK -rs1467558-T	CTGAAGCGTTATACTATATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	108
T7-pprPHK -rs1467558-C	CTGAAGCGTTGTACTATATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	109
T7-pprPHK-rs29 52768-T-16нт	TTTTATCTGAATGATTATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	110
T7-pprPHK-rs29 52768-C-16нт	TTTTATCTGAATGACTATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	111
T7-pprPHK- rs4363657-T	AAAAAAGAGTGAGTACCATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	112
T7-pprPHK -rs4363657-C	AAAAAAGAGTGGGTACCATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	113
T7-pprPHK-rs60	GGTAGAAGGTCCAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCT	114

1338-G	ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	
T7-pprPHK-rs60 1338-A	GGTAGAAGGTCTAGGAGATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	115
T7-pprPHK-34-TP53 -T24-C-16HT	GGGCAGGGGAGTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	116
T7-pprPHK-34- TP53-T24-G-16HT	GGGCAGGGGACTACTGATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	117
T7-pprPHK-41- rs1014290-A-15HT	TCAGTGGATGATGTAATCTACAACAGTAGAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	118
T7-pprPHK-41 -rs1014290-G-15HT	TCAGTGGATGACGTAATCTACAACAGTAGAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	119
T7-pprPHK-42- rs6449213-C	GGAAATTCTCCTTCCGAATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	120
T7-pprPHK-42 -rs6449213-T	GGAAATTCTCCTTCCAAATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	121
T7-pprPHK-43 -rs737267-A-16HT	TCTTACAGAGTCAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	122
T7-pprPHK-43 -rs737267-G-16HT	TCTTACAGAGCCAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCTA TAGTGAGTCGTATTAATTTTC	123
T7-pprPHK-43 -rs737267-T	GTCTTACAGAGACAGTTATCTACAACAGTAGAAATTCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	124
T7-pprPHK-44 -rs1260326-C-15HT	CTGGACTCTCACCGGATCTACAACAGTAGAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	125

T7-pprPHK-44- rs1260326-T-15нт	CTGGACTCTCACCAGATCTACAACAGTAGAAATTCCTAT AGTGAGTCGTATTAATTTTC	126
T7-pprPHK-45- rs642803-C	CACAGACAGGCAATTCTATCTACAACAGTAGAAATTCCTT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	127
T7-pprPHK-45- rs642803-T	CACAGACAGACAATTCTATCTACAACAGTAGAAATTCCTT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	128
T7-pprPHK-gyrB	TCGCGCTTGTCGCGCAGACGAATGATCTACAACAGTAGAA ATTCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	129

Праймеры, используемые для обнаружения путем амплификации ДНК с помощью LAMP в комбинации с Cas12a:

Таблица 6. Праймеры, использованные для амплификации gyrB-1

Название	Последовательность	SEQ ID No:
LAMP-gyrB-1-F3	CATGGTGCGTTTCTGGCC	130
LAMP-gyrB-1-B3	CGGCGTTTTGTTCTTGTTC	131
LAMP-gyrB-1-FIP	ACAACCTCACGCAGACGTTTCGCAACCTTCA CCAATGTGACCG	132
LAMP-gyrB-1-BIP	GTTCCCTCAACTCCGGCGTTTCCGATGCCGC CTTCATAGTGG	133
LAMP-gyrB-1-петляF	CAGAATTTTCATATTCGAACT	134
LAMP-gyrB-1-петляB	GACCGCAAAGAAGACCACTT	135

Таблица 7. Праймеры, использованные для амплификации gyrB-2

Название	Последовательность	SEQ ID No:
LAMP gyrB 2 F3	CGACGGCAAAGAAGACCA	136
LAMP-gyrB-2-B3	AGCCTGCCAGGTGAGTAC	137
LAMP-gyrB-2-FIP	CGGGTGGATCGGCGTTTGTTCACATATGAA GGCGGCATCA	138
LAMP-gyrB-2-BIP	GTATTGGCGTCGAAAGTGGCGTTCGCTGCCG AATGTTGTTG	139
LAMP-gyrB-2-петляF	TTGTTTCAGATATTCAACGAACG	140
LAMP-gyrB-2-петляB	GTGGAACGATGGCTTCCAGG	141

Таблица 8. Праймеры, использованные для амплификации сайта rs1467558

Название	Последовательность	SEQ ID No:
LAMP-rs1467558-F3	CAGCTGTAGACCATAAGCC	142
LAMP-rs1467558-B3	GTGGCTGAGCATCGTTAT	143
LAMP-rs1467558-F1P	ACTATGAAAGGAGTCCATATCTGAAGGAAT TCAGGTAGTGGTTTGGGA	144
LAMP-rs1467558-B1P	GCTTCAGCCTACTGCAAAATCCTACGCGTTG TCATTGAAAG	145
LAMP-rs1467558-петляF	TCAATATTAGTGTATTGCTTG	146
LAMP-rs1467558-петляB	TGGTGGAAAGATTTGGACAGGAC	147

Таблица 9. Праймеры, использованные для амплификации сайта rs5082

Название	Последовательность	SEQ ID No:
LAMP-rs5082-F3	GCTGGAAAGGTCAAGGGAC	148
LAMP-rs5082-B3	GGGGTTTGTTCACAGTCC	149
LAMP-rs5082-F1P	CAAAGGTAGAAGCAAAGGCAGGAGGTTTGC CCAAGGTCACACAG	150
LAMP-rs5082-B1P	CTGGGAAGAGGGAGGGCTCAGTGTGCCAC ACTTTCAGTGG	151
LAMP-rs5082-петляF	GTGAGCCGGTGGGGTGCT	152
LAMP-rs5082-петляB	TCTAAGTCTTCCAGCACGGGATC	153

Таблица 10. Праймеры, использованные для обнаружения с помощью амплификации RPA в комбинации с Cas12

Название	Последовательность	SEQ ID No:
RPA gyrB 1 F	ATATGAAATTCTGGCGAAACGTCTGCGTGAGTTG	154
RPA-gyrB-2-F	AAACGTCTGCGTGAGTTGTCGTTCCCTCAACTCC	155
RPA-gyrB-R	ACTTCGACGCCAATACCGTCTTTTTCAGTGGAG	156

Таблица 11. Праймеры, использованные для обнаружения у Cas12b транс-расщепляющей активности:

Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')	SEQ ID No:
pUC18-1-F	ATCTGAGAAGTGGCACTTATCGCAACTTTCTACTGAGGTC ATAGCTGTTTCCTGTGTGA	157
pUC18-1-R	GTCCTCTAGACCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCAT GATTACGAATTCGAGCTCGGT	158
pUC18-2-F	CCACTTTCCAGGTGGCAAAGCCCGTTGAGCTTCTCAAA TCTGAGAAGTGGCACTTATC	159
pUC18-2-R	TGGAAAGTGGCCATTGGCACACCCGTTGAAAAATTCTG TCCTCTAGACCCCTATAGTGA	160
T7-pprPHK-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	161
ZL-енPHK-T1-R	TCAGTAGAAAAGTTGCCGATAAGTGC	162
ZL-енPHK-ДНMT1-3-R	AACAGACATGGACCATCAGGGTG	163
цель-T1-F	TTTCTGTTTGTTATCGCAACTTTCTACTGAATTCAAGC TTTACTCTAGAAAGAGGAGAAAAGGATCC	164
цель-T1-R	GGATCCTTTCTCCTCTTTCTAGAGTAAAGCTTGAATTC AGTAGAAAAGTTGCCGATAACAAACAGAAA	165
цель-ДНMT1-3-R-FAM-5'	GTCACGCCACTTGACAGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGAAACATT	166
цель-T1-R	GGATCCTTTCTCCTCTTTCTAGAGTAAAGCTTGAATTC AGTAGAAAAGTTGCCGATAACAAACAGAAA	167
цель-T1-F	TTTCTGTTTGTTATCGCAACTTTCTACTGAATTCAAGC TTTACTCTAGAAAGAGGAGAAAAGGATCC	168

Таблица 12. Праймеры, использованные для анализа чувствительности транс-реакции Cas12b

Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')	SEQ ID No:
енРНК-ДНМТ1-3-F	CCTGATGGTCCATGTCTGTTGGTCATAGCTGTTTCCTGTG TG	169
енРНК-ДНМТ1-3-R	TGGACCATCAGGGTGCCACTTCTCAGATTTGAGAAG	170
T7-pppРНК-F	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	171
ZLenРНК-ДНМТ1-3-R	AACAGACATGGACCATCAGGGTG	172
ДНМТ1-3 (TTC PAM)-F	AATGTTCCCTGATGGTCCATGTCTGTTACTCGCCTGTC AAGTGGCGTGAC	173
ДНМТ1-3 (TTC PAM)-R	GTCACGCCCACTTGACAGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGGAACATT	174
LAMP-DNM-F3	gtgaaegt tceet ttagcaet	175
LAMP-DNM-B3	gggagggcagaac tag tee	176
LAMP-DNM-F1P	egceae ttgacaggegagtaac tgecaet tat tgggta age	177
LAMP DNМ В1P	gegtgt tccccagagtgaet ttagcaget tce tce tce t t	178
LAMP-DNM-петляF	aggaaacattaaegtaetgatg	179
LAMP-DNM-петляB	ttectttttatttceetteage	180
DNMT1-3 (TTC PAM) -R	GTCACGCCCACTTGACAGGCGAGTAACAGACATGGACCA TCAGGGAACATT	181
DNMT1-3 (TTC PAM) -F	AATGTTCCCTGATGGTCCATGTCTGTTACTCGCCTGTC AAGTGGCGTGAC	182

Таблица 13. Другие последовательности, использованные в данном изобретении

Название	Последовательность	SEQ ID No:
AacCas12b Последовательность енРНК	GTCTAGAGGACAGAATTTTTCAACGGGTGTGCCAATGG CCACTTTCCAGGTGGCAAAGCCCGTTGAGCTTCTCAAA TCTGAGAAAGTGGCACcctgatgggccatgtctgtt	183
Направляющая последовательность, нацеленная на цель ДНМТ-1-3	cctgatgggccatgtctgtt	184
Однопочечная целевая последовательность	gtcagccac ttgacaggcgag taacagacatggacca tcagggaacatt	185
Двухпочечная целевая последовательность	gtcagccac ttgacaggcgag taacagacatggacca tcagggaacatt	186
Аминокислотная последовательность белка AacCas12b	MAVKSIKVKLRLLDDMPEIRAGLWKLHKEVNAGVRYYTE WLSLLRQENLYRRSPNGDGEQECDKTAECKAEELERL RARQVENGHIRGPAGSDDELLQLARQLYELLVPQAIGAK GDAQQLARKFLSPLADKDAVGGLGIAKAGNKPRWVRMR EAGEPGWEEKEKAETRKSADRTADVLRALADFGKPL MRVYTDSEMSSVEWKPLRKGGQAVRTWDRDMFQQATERM MSWESWNQRVGQEYAKLVEQKNRFEQKNFVGQEHVHL VNQLQQDMKEASPGLESKEQTANYVTGRALRGSDKVFE KWGKLAPDAPFDLYDAEIKNVQRRNTRRFSGHDLFAKL AEPEYQALWREDASFLTRYAVYNSILRKLNHAKMFATF TLPDATAHPITWTRFDKLGGLHQYTFLENEFGERRHAI RFHKLLKVENGVAREVDDVTVPISMSEQLDNLLPRDPN EPIALYFRDYGAEQHFTGEFGGAKIQCRRDQLAHMHRR RGARDVYLVNSVRVQSQSEARGERRPPYAAVFRLVGDN HRAFVHFDKLSDYLAEHPDDGKLGSEGLISGLRVMSVD LGLRTSASISVFRVARKDELKPNSKGRVPFFFPKGN	187

Все документы, упомянутые в данном изобретении, тем самым включены посредством ссылки так, как если бы каждый документ был отдельно включен посредством ссылки. Кроме того, следует понимать, что после прочтения вышеуказанных методик данного изобретения, специалисты в данной области техники могут вносить

различные изменения или модификации в данное изобретение, и эти эквивалентные формы также попадают в объем, определенный прилагаемой формулой данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, включающий в себя добавление направляющей РНК, белка Cas, нуклеиновой кислоты-зонда и буферного раствора в систему, содержащую целевую молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена, и последующее обнаружение нуклеиновой кислоты-зонда.

2. Способ обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающийся тем, что белок Cas представляет собой белок Cas12a или белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления сопутствующей одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a;

Cas12a предпочтительно представляет собой один из FnCas12a, AsCas12a, LbCas12a, Lb5Cas12a, HkCas12a, OsCas12a, TsCas12a, BbCas12a, BoCas12a или Lb4Cas12a; и Cas12a предпочтительно представляет собой LbCas12a.

3. Способ обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающийся тем, что направляющая РНК относится к РНК, которая направляет белок Cas для специфического связывания с целевой ДНК.

4. Способ обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающийся тем, что, нуклеиновая кислота-зонд представляет собой одноцепочечную ДНК; одноцепочечная ДНК предпочтительно представляет собой флуоресцентно меченную одноцепочечную ДНК; одноцепочечная ДНК предпочтительно представляет собой флуоресцентный зонд, который метят флуоресцентной группой HEX на 5'-конце, и метят гасящей группой BHQ1 на 3'-конце; предпочтительно,

способ для обнаружения нуклеиновой кислоты-зонда представляет собой предпочтительно способ обнаружения флуоресценции; и способ обнаружения флуоресценции представляет собой предпочтительно способ обнаружения с использованием считывающего устройства для микроплашек или флуоресцентного спектрофотометра.

5. Способ для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что целевую молекулу нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена в реакционной системе целевой молекулы нуклеиновой кислоты, которая должна быть обнаружена, получают путем амплификации.

6. Способ обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты по п. 5, отличающийся тем, что способ обнаружения может обнаружить патогенный микроорганизм, генную мутацию или специфическую целевую ДНК.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что белок Cas содержит Cas12b (т. е. C2c1).

8. Применение белка Cas в способе обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

9. Применение по п. 8, отличающееся тем, что целевая ДНК, направляющая РНК и белок Cas формируют тройной комплекс, указанный комплекс расщепляет другие молекулы одноцепочечной ДНК в системе; и предпочтительно, направляющая РНК

относится к РНК, которая направляет белок Cas для специфического связывания с целевой ДНК.

10. Набор для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, содержащий направляющую РНК, белок Cas и нуклеиновую кислоту-зонд.

11. Система обнаружения для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, содержащая:

(а) белок Cas, который представляет собой белок Cas12a или белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a;

(b) направляющая РНК, которая направляет белок Cas для специфического связывания с целевой молекулой нуклеиновой кислоты; и

(с) нуклеиновая кислота-зонд, которая является одноцепочечной ДНК;

при этом целевая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой целевую ДНК.

12. Система обнаружения по п. 11, отличающаяся тем, что белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a, выбирают из группы, состоящей из Cas12b (т. е., C2c1).

13. Система обнаружения по п. 11, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота-зонд содержит одноцепочечную ДНК, несущую детектируемую метку.

14. Набор для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, содержащий:

i) первый контейнер и белок Cas в первом контейнере, причем указанный белок Cas представляет собой Cas12a или белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a;

ii) необязательный второй контейнер и направляющую РНК во втором контейнере, причем указанная направляющая РНК направляет белок Cas для специфического связывания с целевой молекулой нуклеиновой кислоты;

iii) третий контейнер и нуклеиновую кислоту-зонд в третьем контейнере;

iv) необязательный четвертый контейнер и буферный раствор в четвертом контейнере;

при этом целевая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой целевую ДНК.

15. Способ для обнаружения того, находится ли целевая молекула нуклеиновой кислоты в образце, включающий в себя следующие этапы:

(а) предоставление системы обнаружения для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты по п. 11, при этом система обнаружения дополнительно содержит образец для обнаружения; и

(b) обнаружение того, расщепляется ли нуклеиновая кислота-зонд белком Cas в системе обнаружения, причем расщепление представляет собой сопутствующее транс-расщепление одноцепочечной ДНК;

при этом, если нуклеиновая кислота-зонд расщепляется белком Cas, то это указывает на присутствие целевой молекулы нуклеиновой кислоты в образце; и если нуклеиновая кислота-зонд не расщепляется белком Cas, то это указывает на отсутствие целевой молекулы нуклеиновой кислоты в образце.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что способ амплификации нуклеиновой кислоты выбирают из группы, состоящей из: амплификации ПЦР, амплификации LAMP, амплификации RPA, лигазной цепной реакции, амплификации разветвленной ДНК, NASBA, SDA, транскрипционно-опосредованной амплификации, амплификации по типу катящегося кольца, HDA, SPIA, NEAR, TMA, и SMAP2.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что когда выше и ниже (в диапазоне от -20 нт до +20 нт, предпочтительно в диапазоне от -15 нт до +15 нт, и более предпочтительно в диапазоне от -10 нт до +10 нт) целевого сайта отсутствует последовательность РАМ, амплификацию нуклеиновой кислоты проводят с использованием РАМ-вводящего праймера.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что РАМ-вводящий праймер имеет структуру по формуле I в 5'-3':

P1-P2-P3 (I)

при этом,

P1 представляет собой последовательность 5'-сегмента, которая расположена на 5'-конце и является комплементарной или некомплементарной последовательности целевой молекулы нуклеиновой кислоты;

P2 представляет собой последовательность РАМ; и

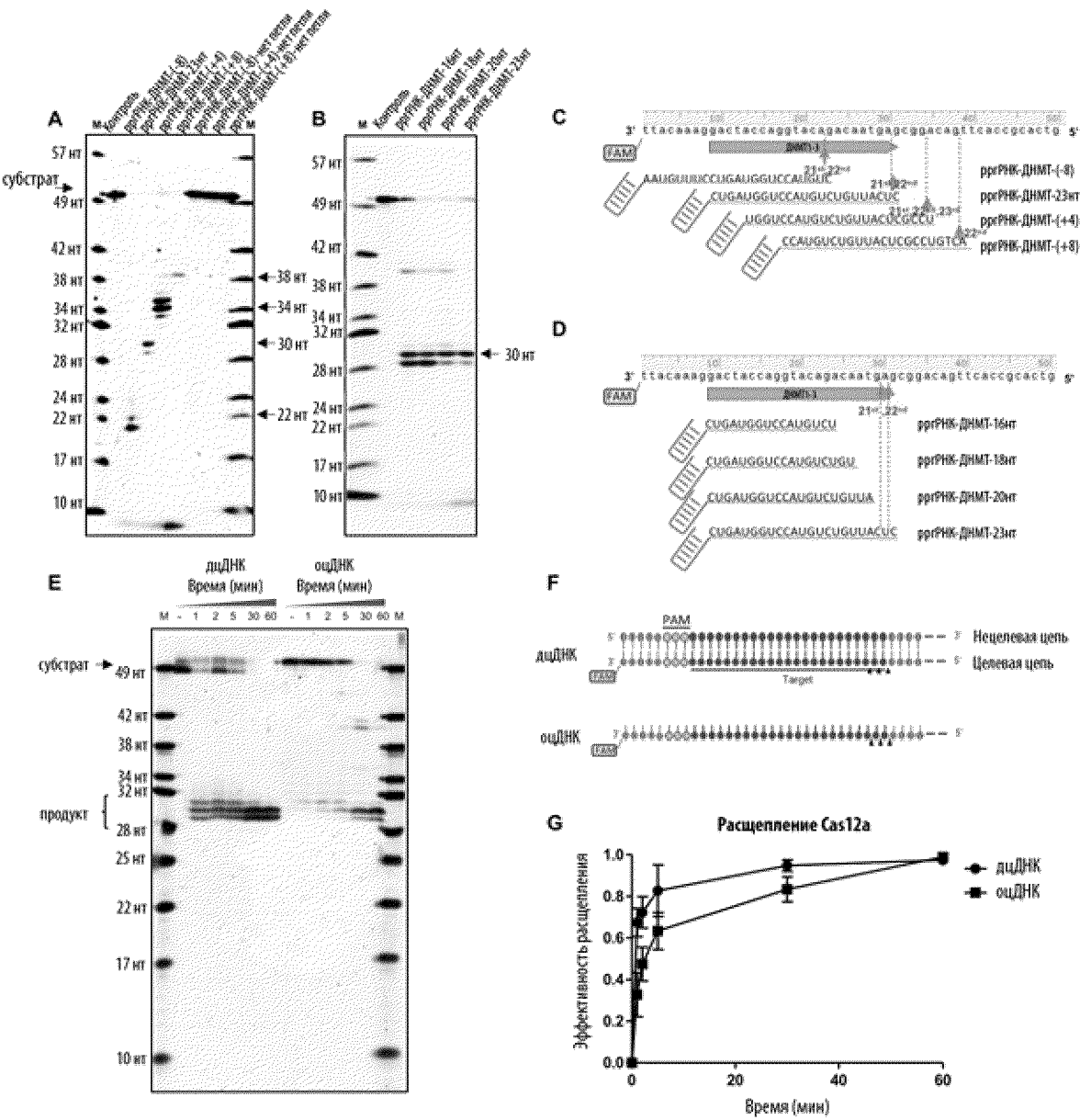
P3 представляет собой последовательность 3'-сегмента, которая расположена на 3'-конце и является комплементарной последовательности целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

19. Способ по п. 15, отличающийся тем, что когда выше и ниже (в диапазоне от -20 нт до +20 нт, предпочтительно в диапазоне от -15 нт до +15 нт, и более предпочтительно в диапазоне от -10 нт до +10 нт) целевого сайта содержится последовательность РАМ, тогда может быть использован праймер, содержащий или не содержащий последовательность РАМ, и амплифицированный продукт амплификации содержит последовательность РАМ.

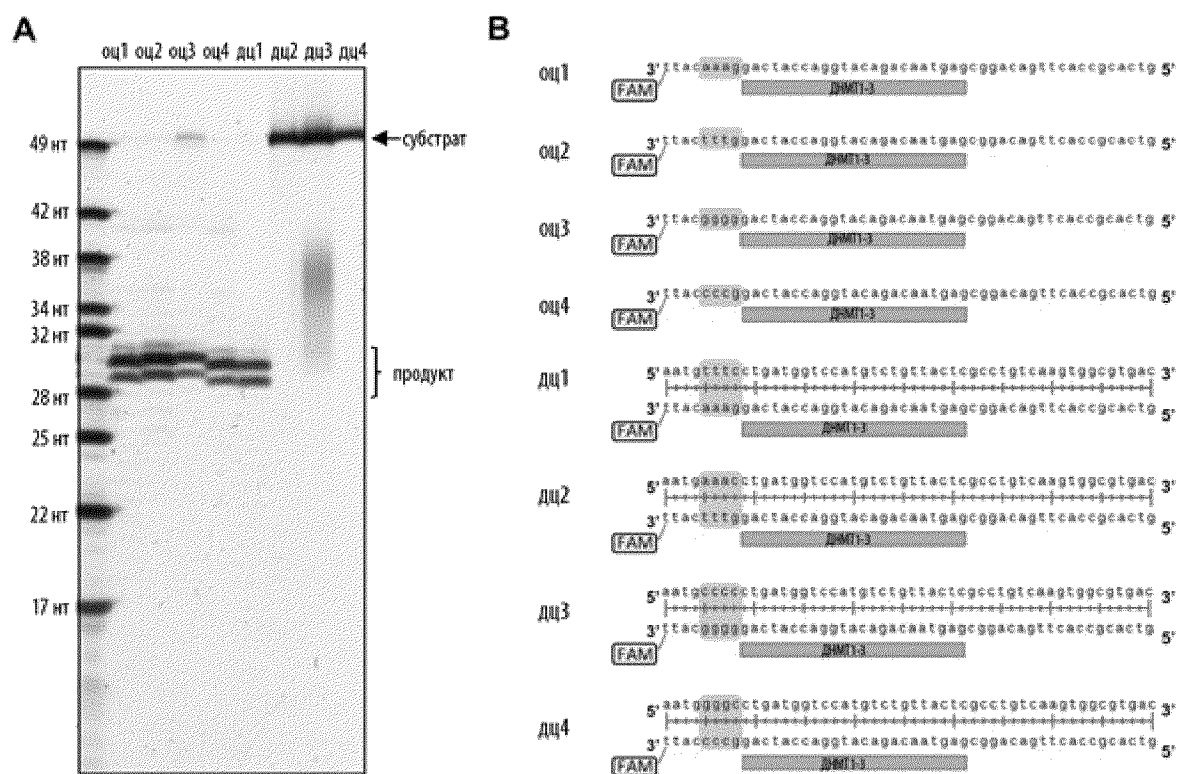
20. Применение белка Cas для приготовления реагента обнаружения или набора для обнаружения целевой молекулы нуклеиновой кислоты, на основе сопутствующего расщепления одноцепочечной ДНК, при этом белок Cas представляет собой Cas12a или белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a.

21. Применение по п. 20, отличающееся тем, что белок Cas, обладающий сопутствующей активностью расщепления одноцепочечной ДНК, сходной с таковой Cas12a, выбирают из группы, состоящей из Cas12b (или C2c1).

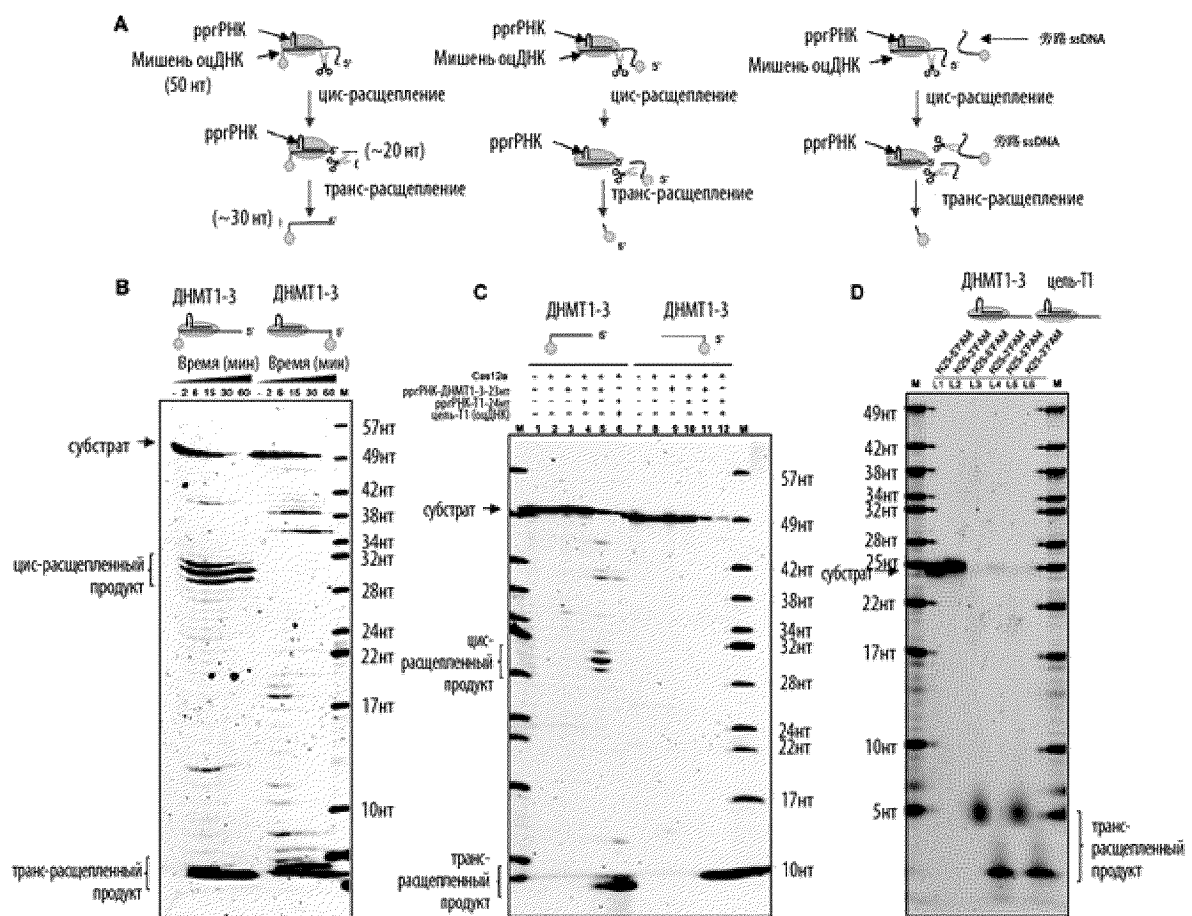
По доверенности



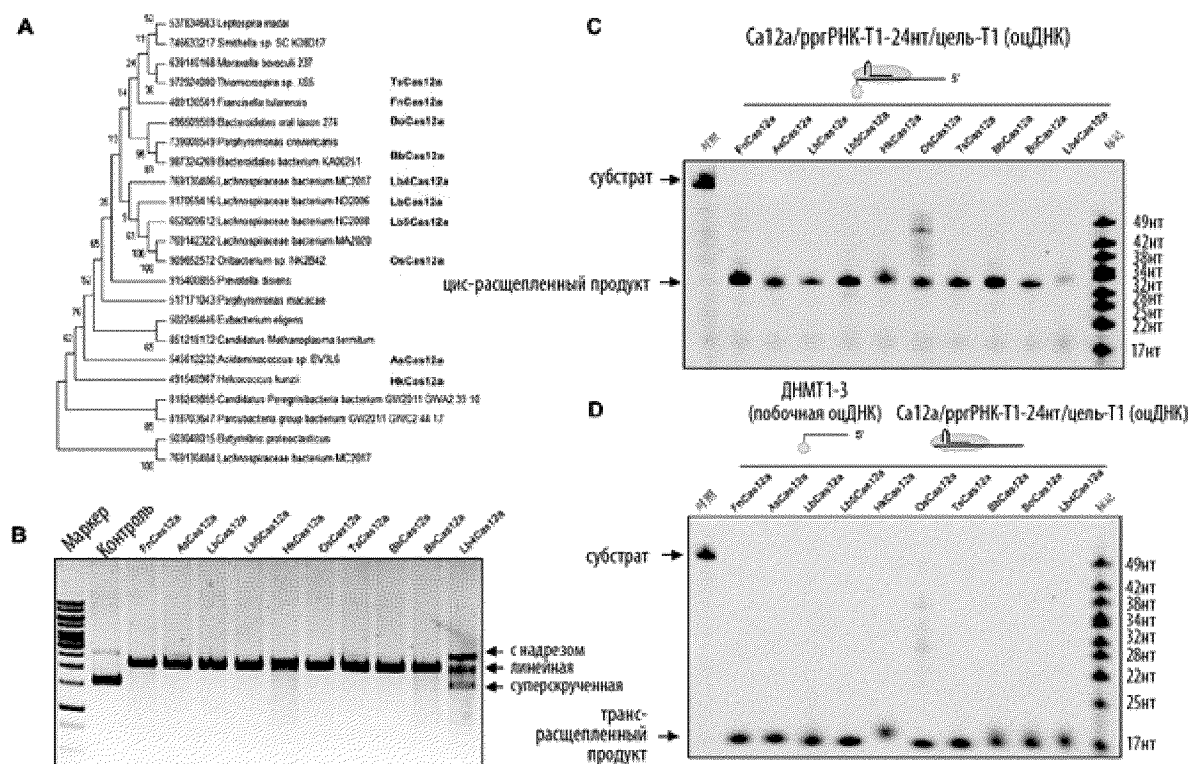
Фиг. 1



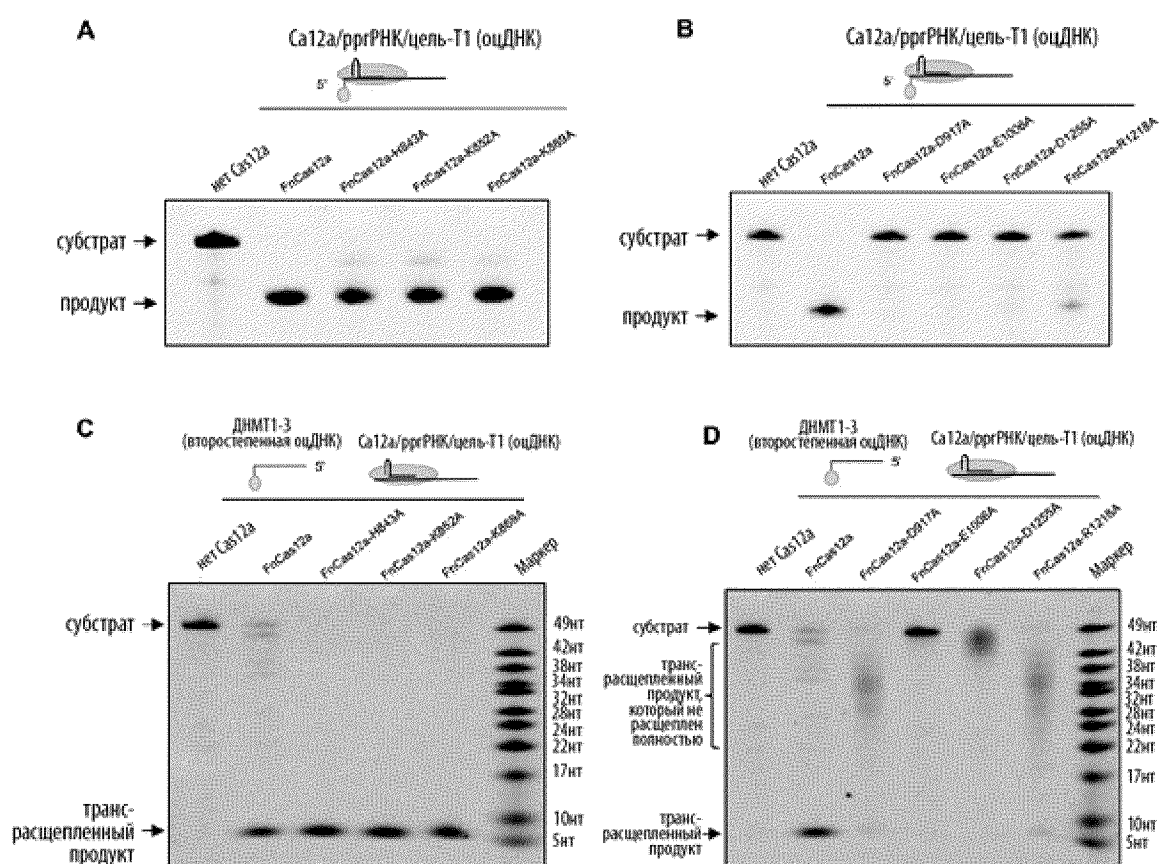
Фиг. 2



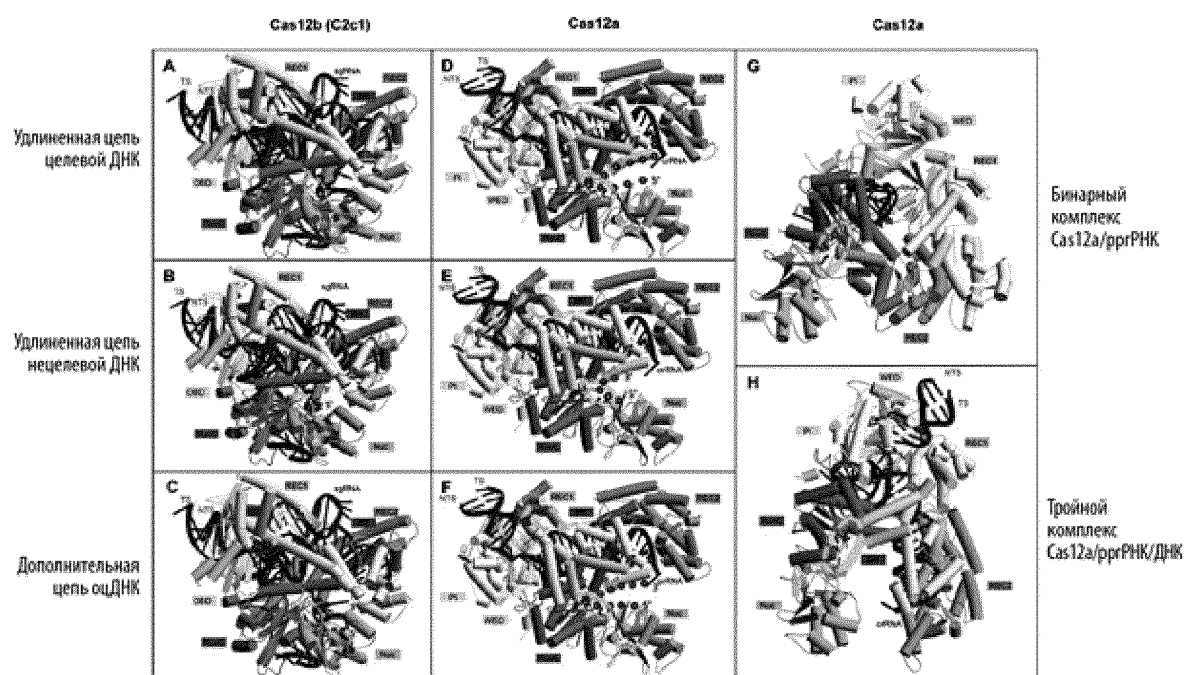
Фиг. 3



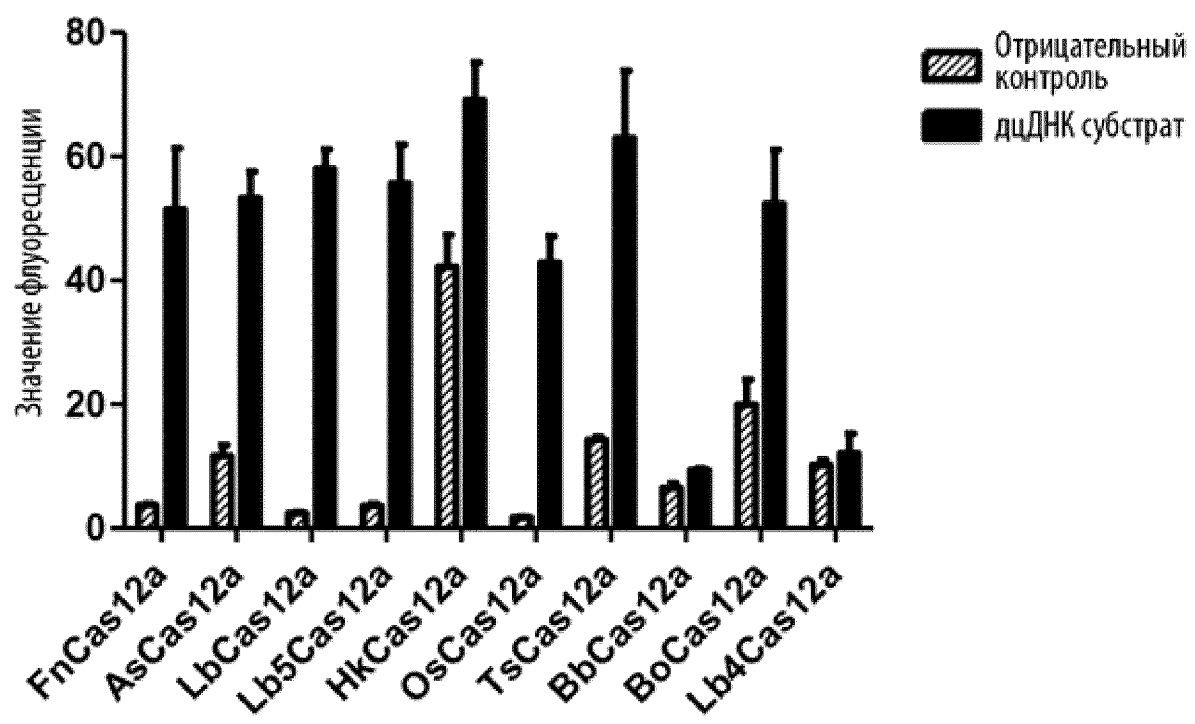
Фиг. 4



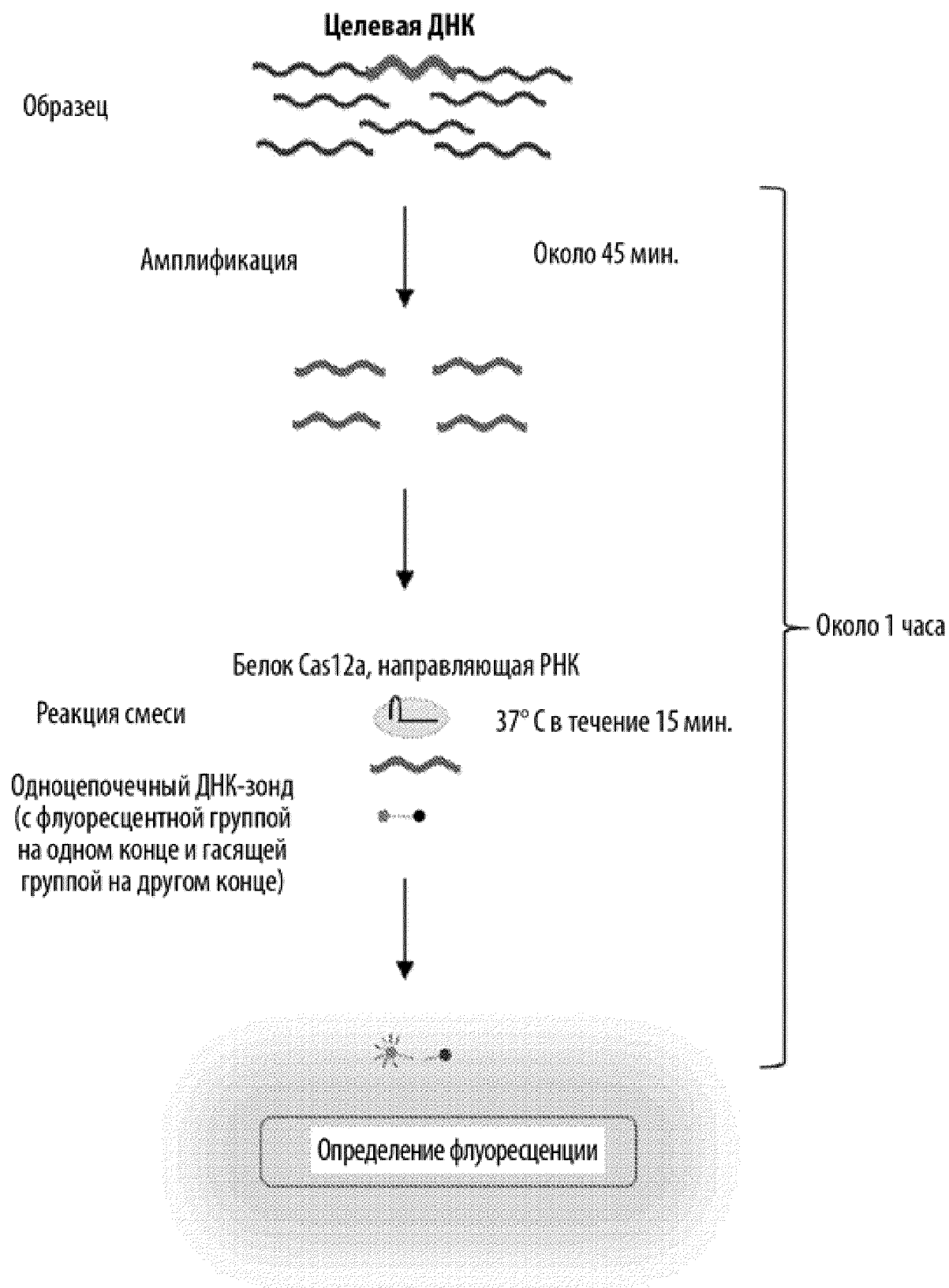
Фиг. 5



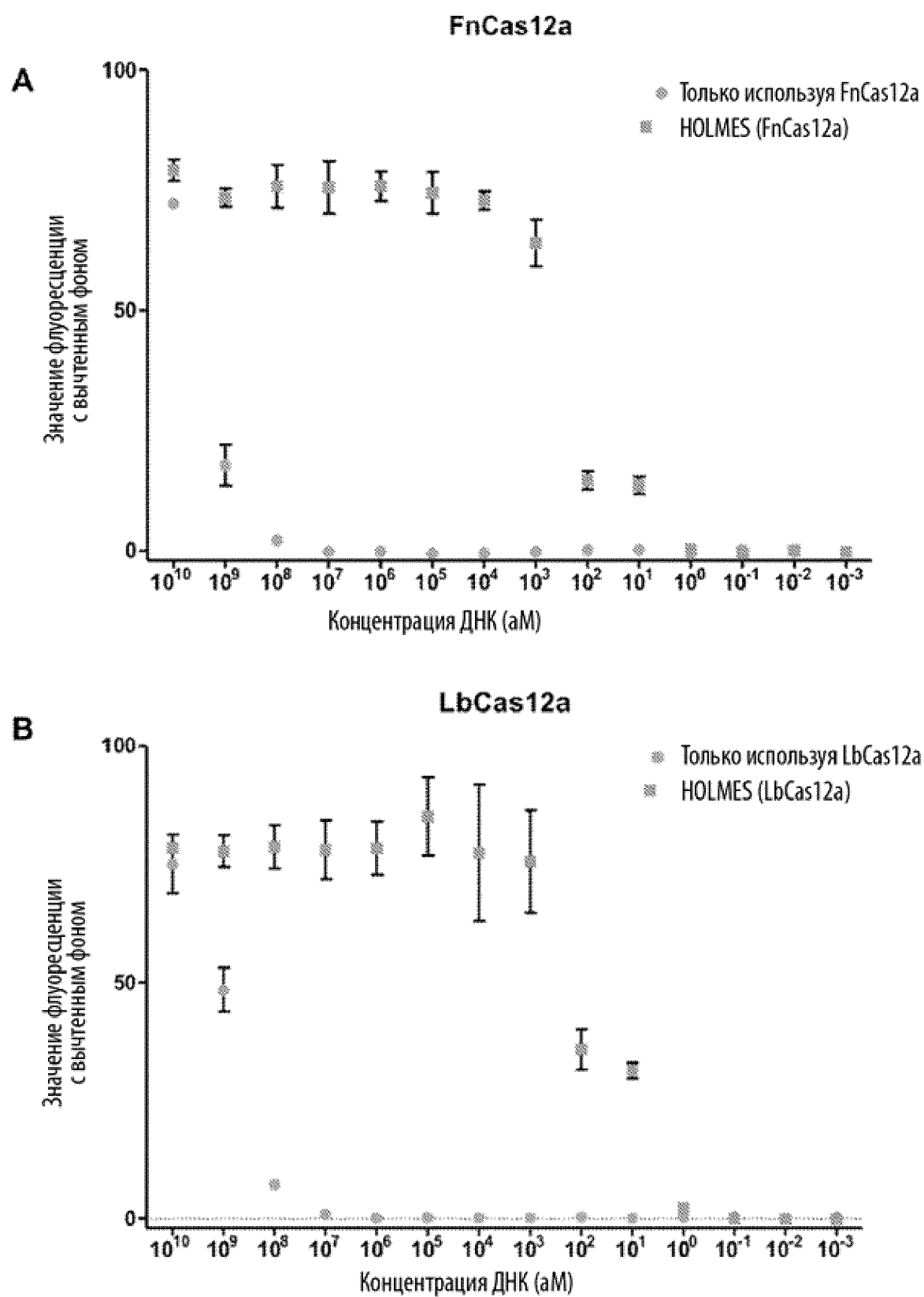
Фиг. 6



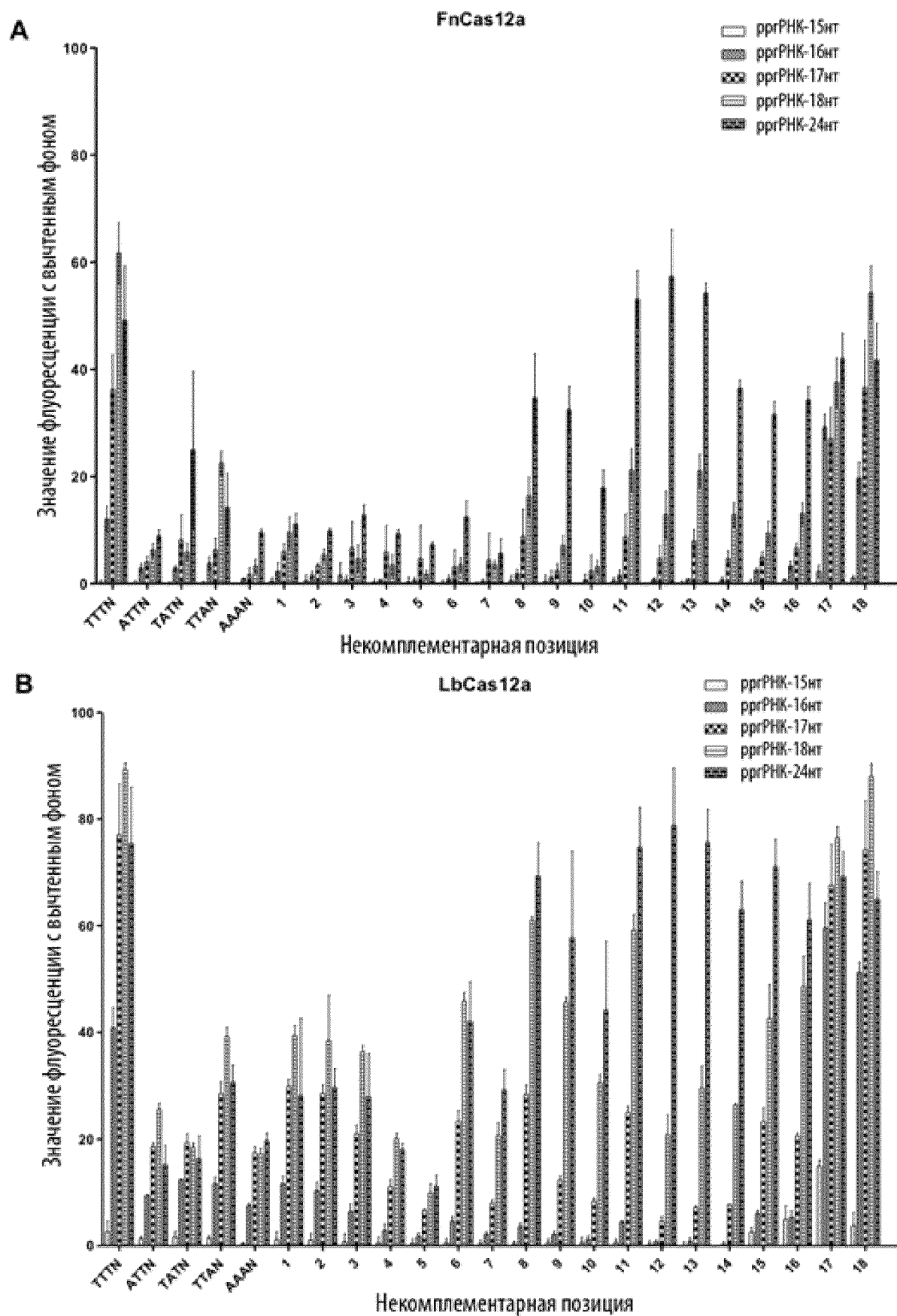
Фиг. 7



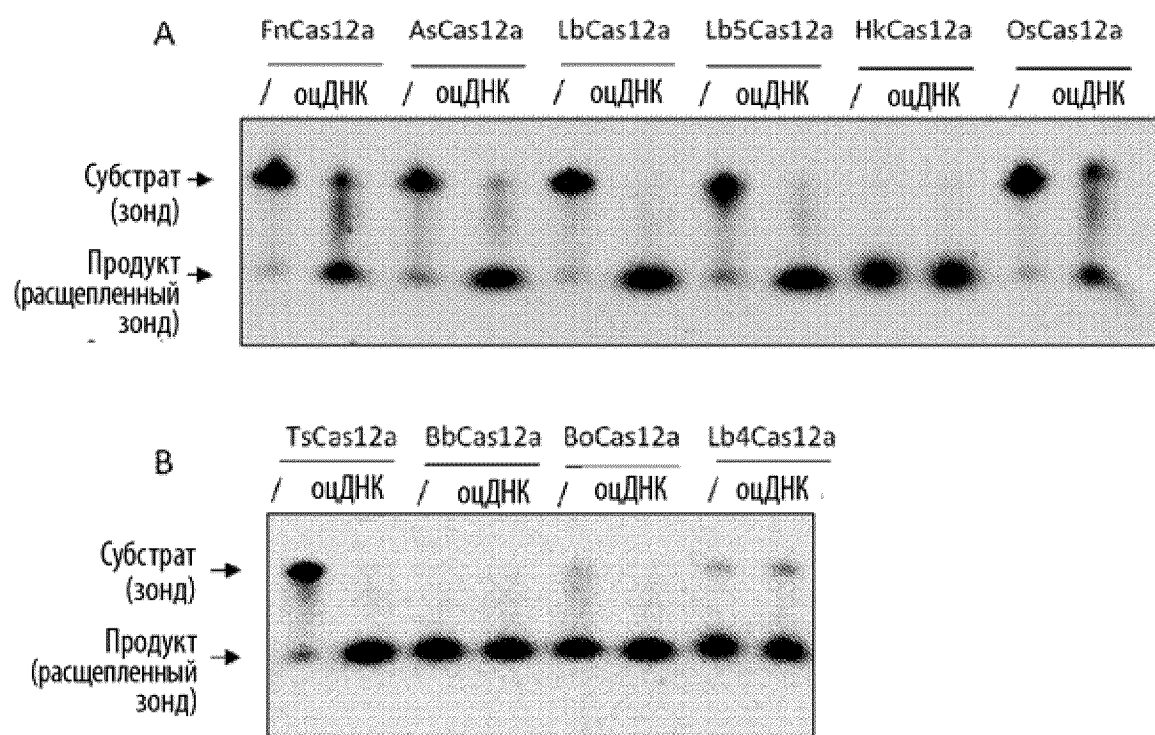
Фиг. 8



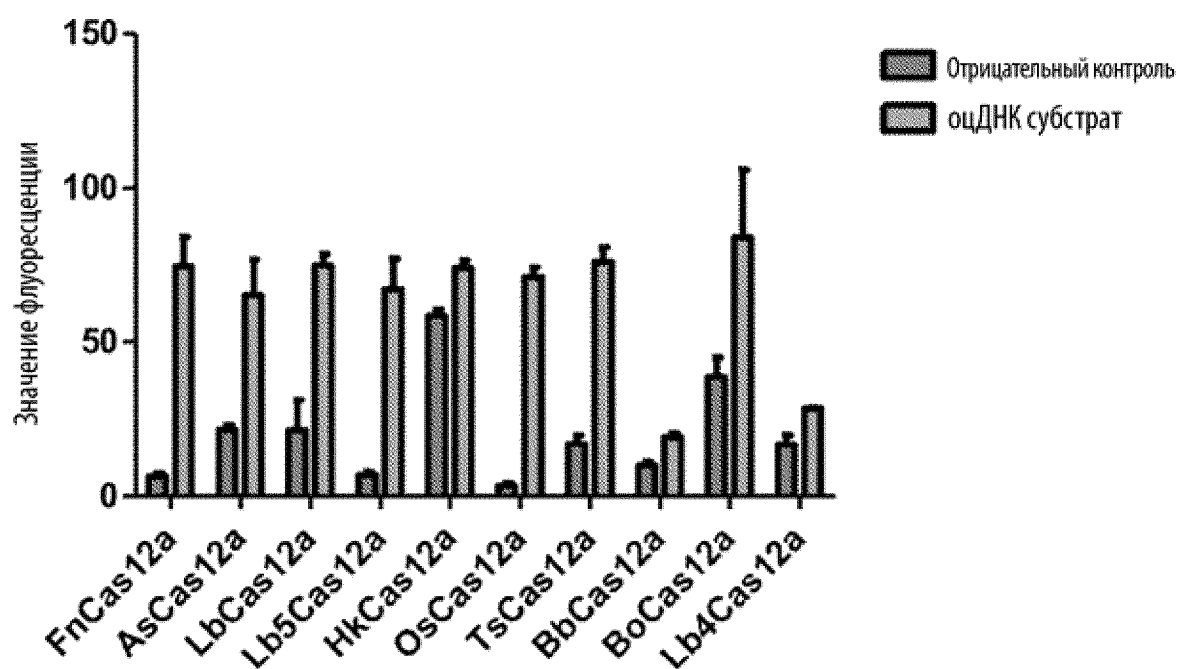
Фиг. 9



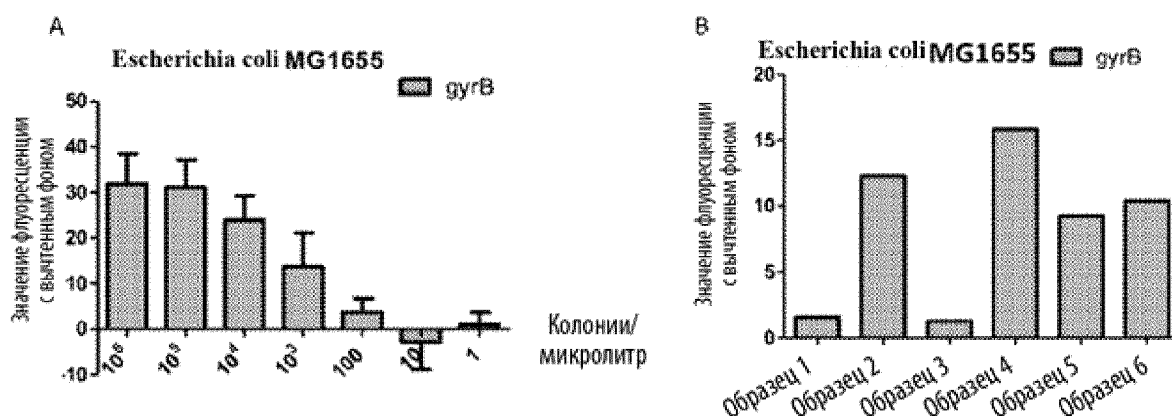
Фиг. 10



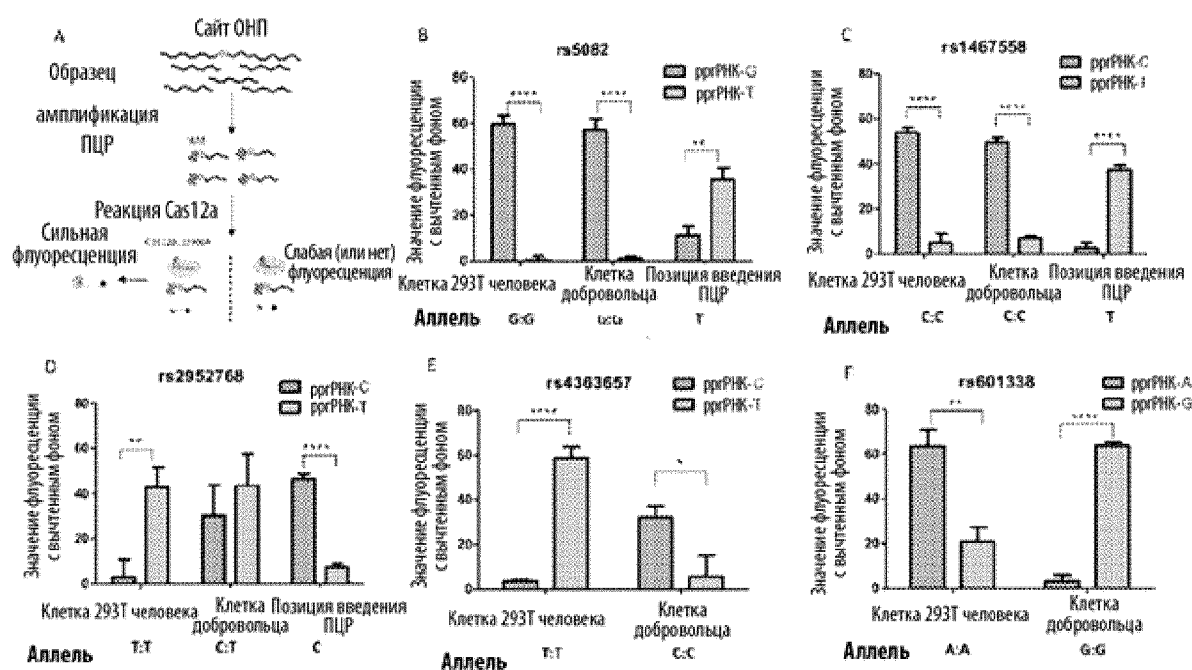
Фиг. 11



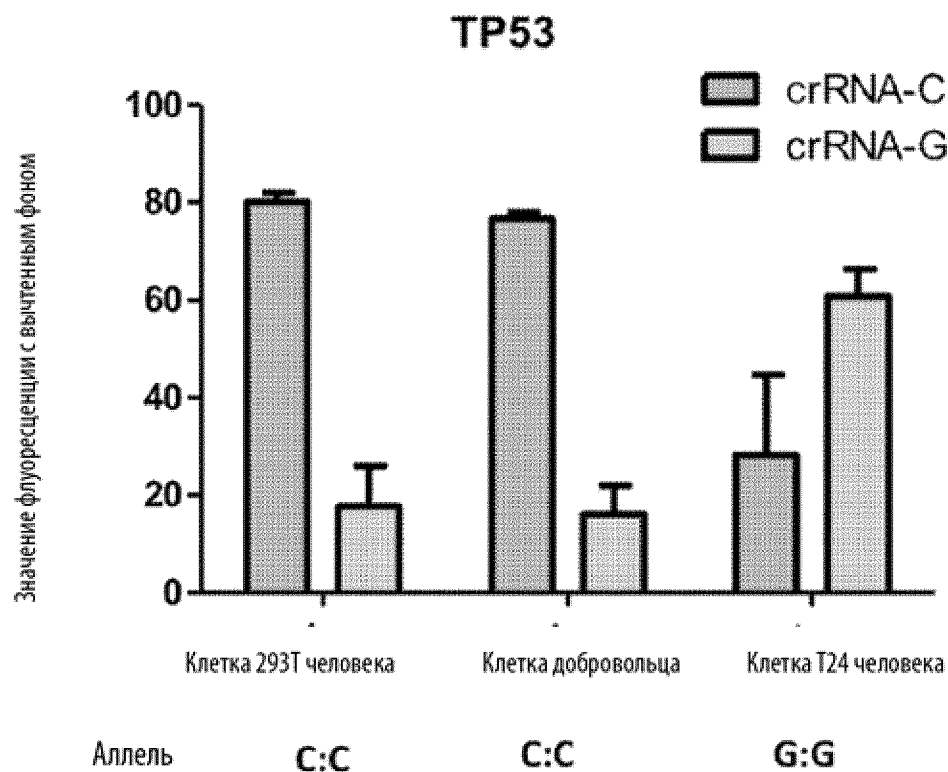
Фиг. 12



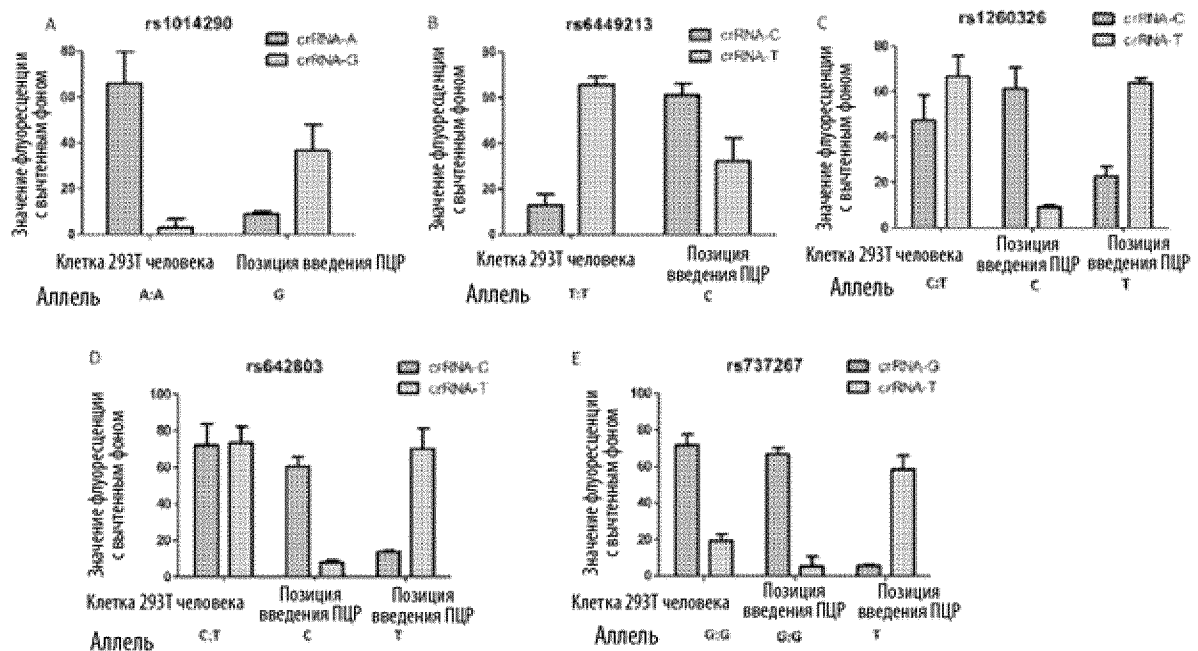
Фиг. 13



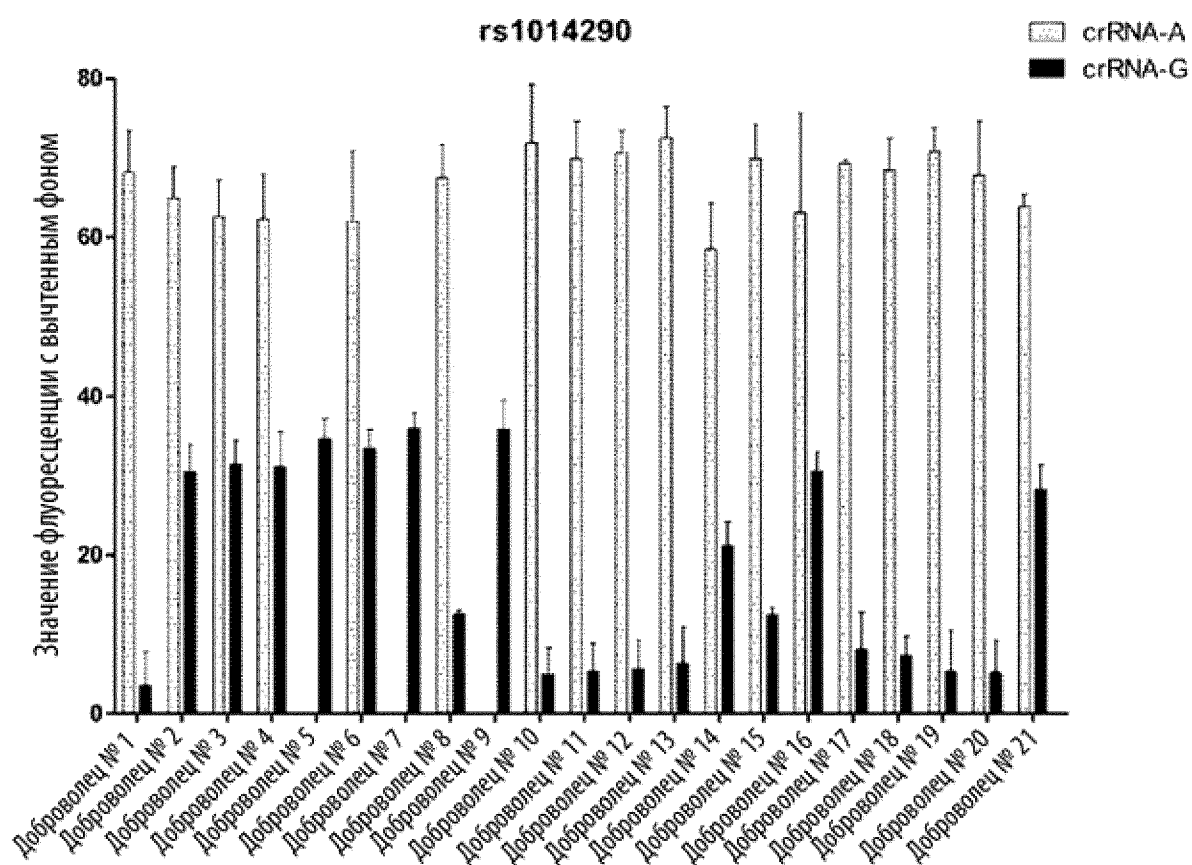
Фиг. 14



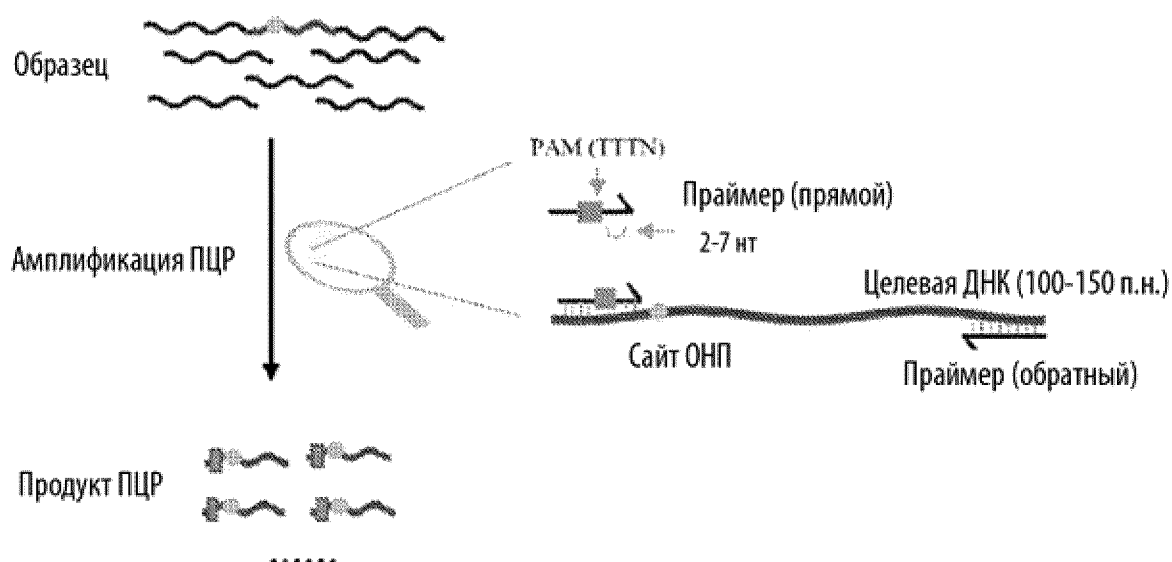
Фиг. 15



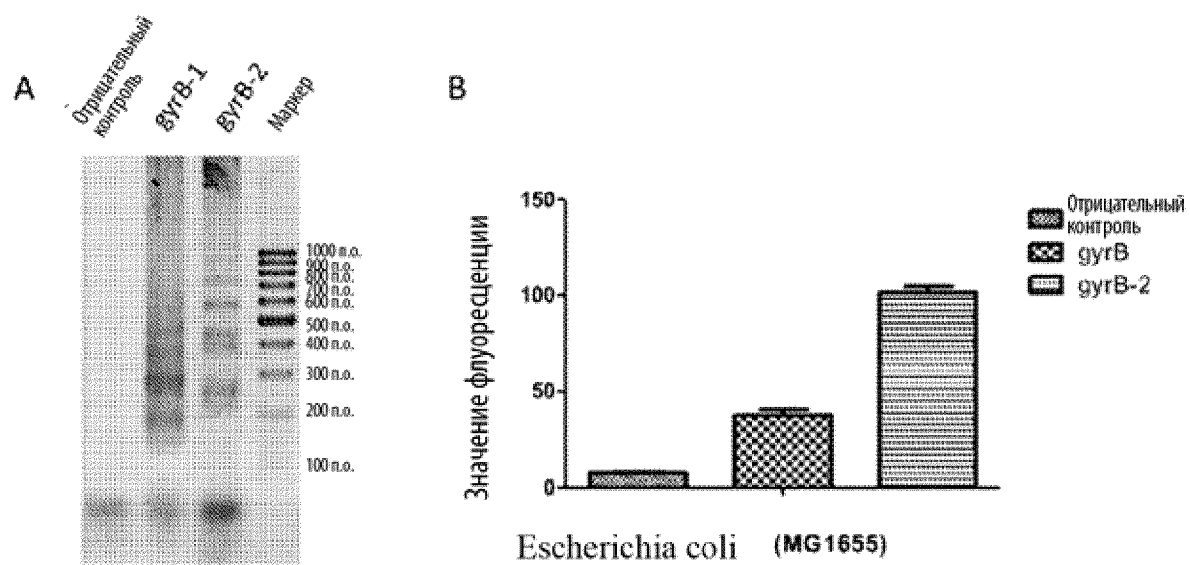
Фиг. 16



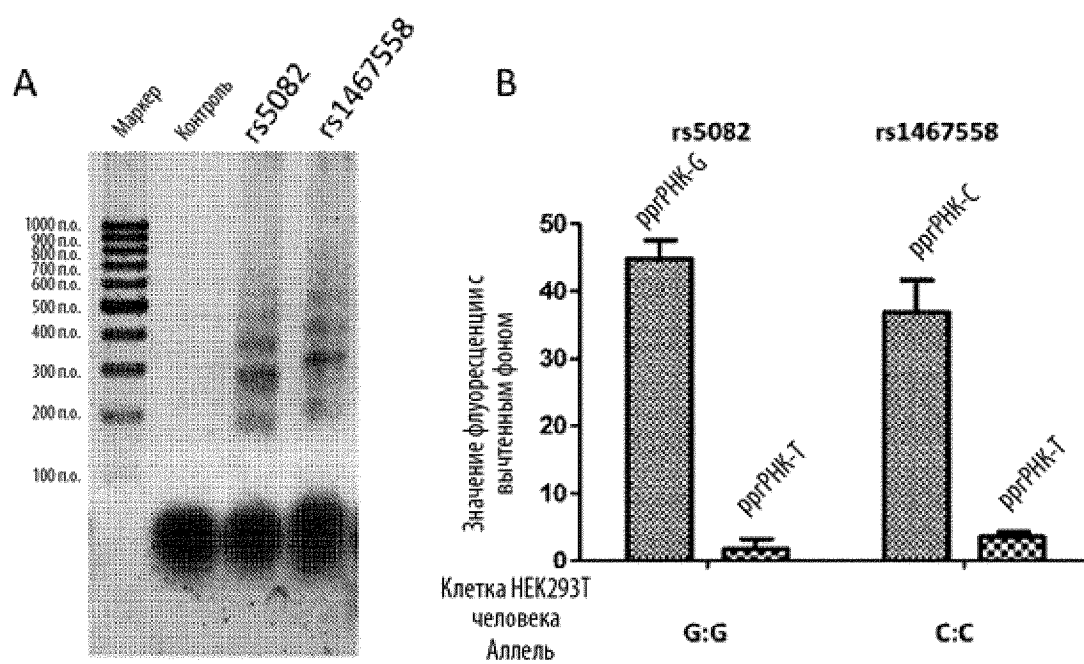
Фиг. 17



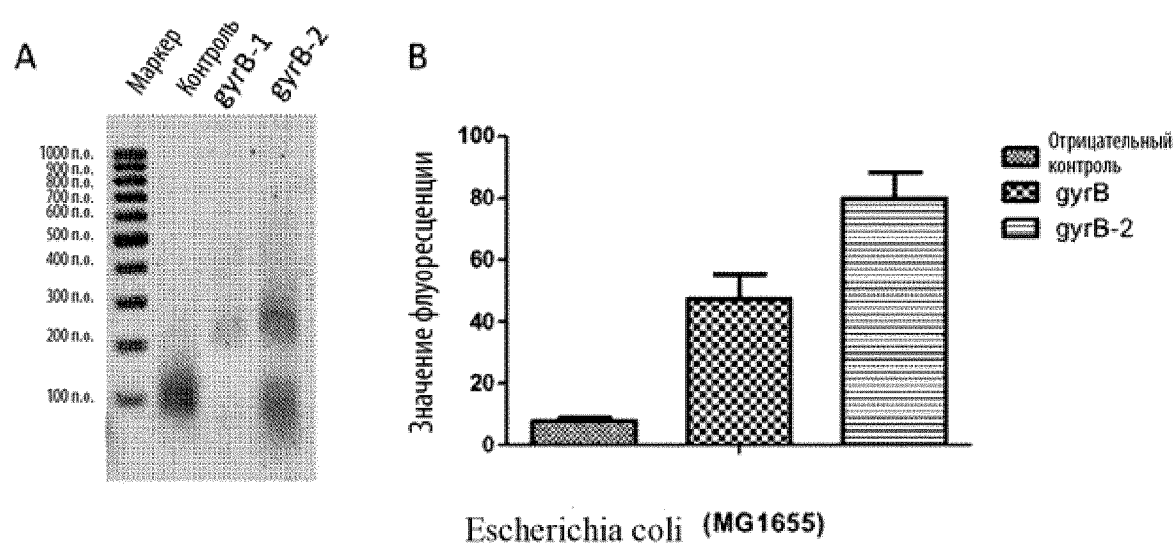
Фиг. 18



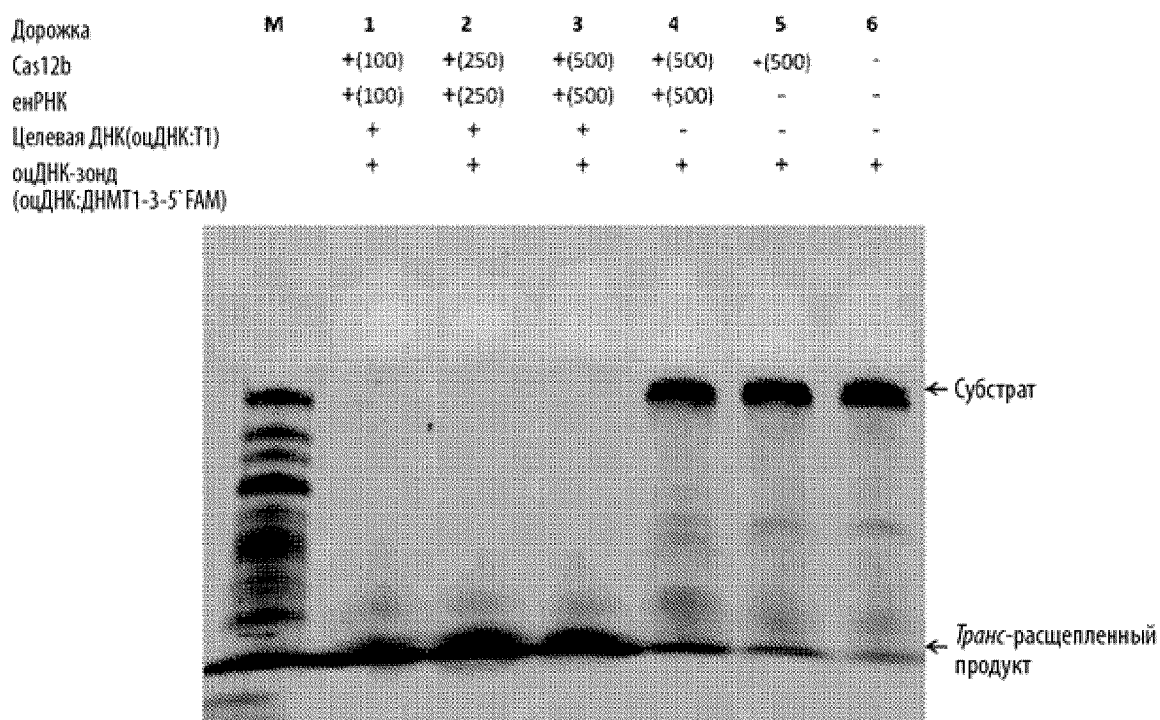
Фиг. 19



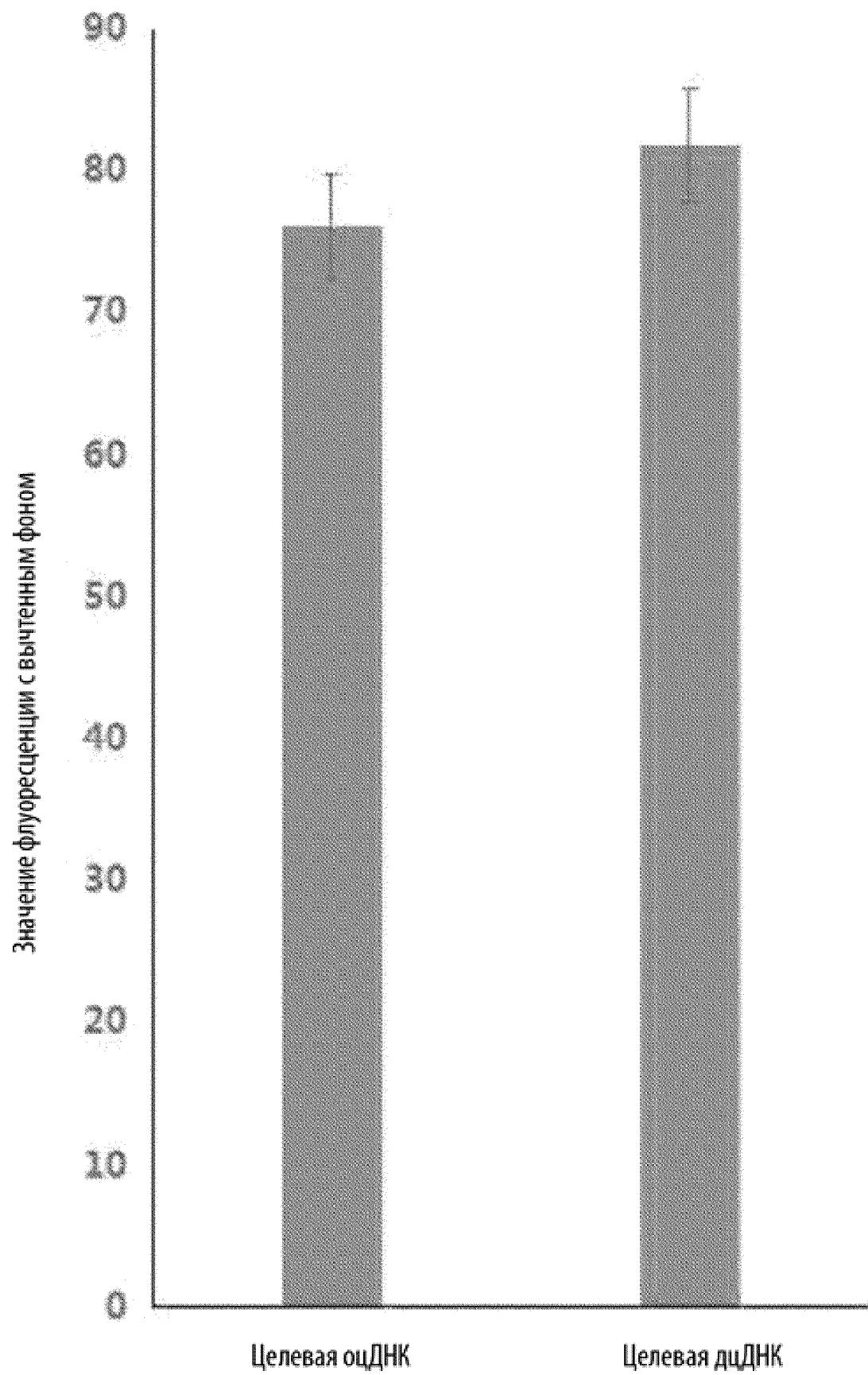
Фиг. 20



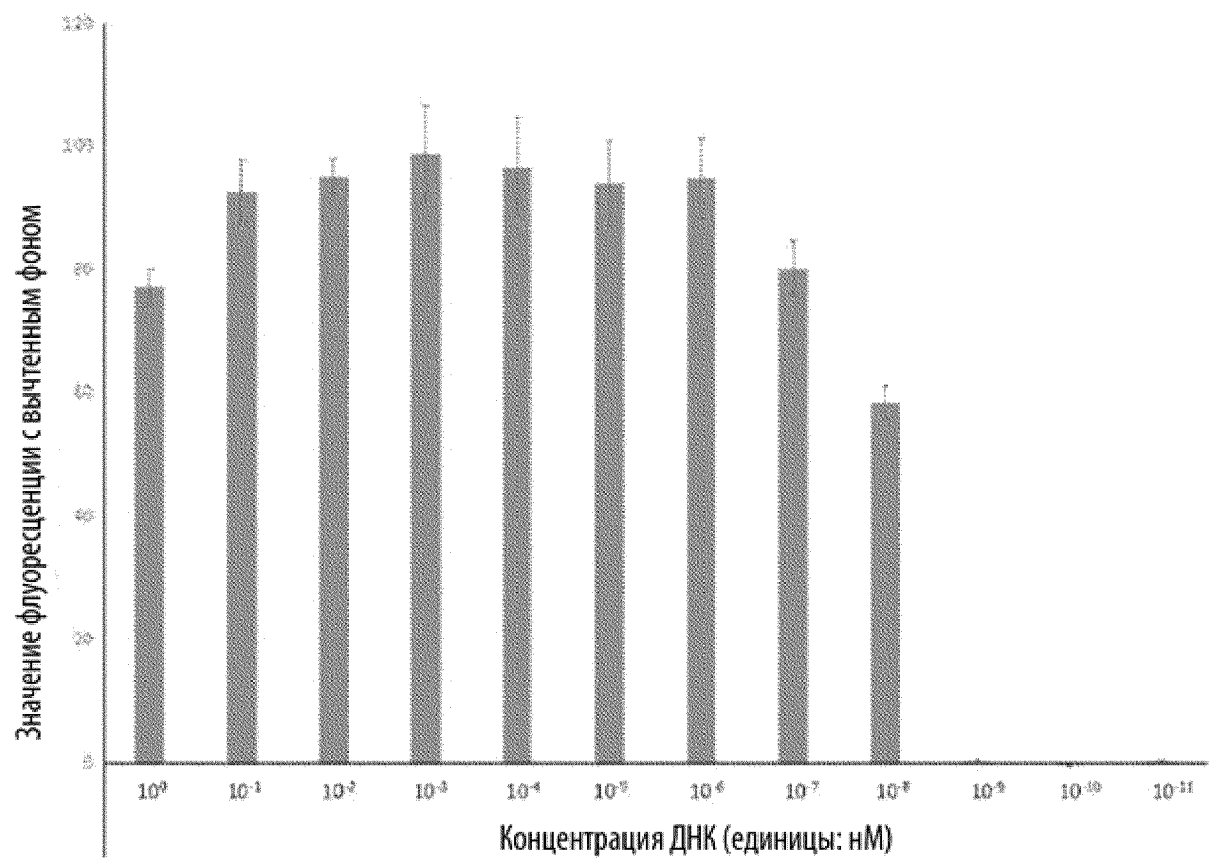
Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23



Фиг. 24