



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106687601 A

(43)申请公布日 2017.05.17

(21)申请号 201580040520.8

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(22)申请日 2015.05.28

代理人 王永伟 赵蓉民

(30)优先权数据

10-2014-0064526 2014.05.28 KR

(51)Int.Cl.

G12Q 1/68(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 33/574(2006.01)

2017.01.25

G01N 33/53(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2015/005383 2015.05.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/183025 K0 2015.12.03

(71)申请人 株式会社图尔金

地址 韩国首尔

申请人 基础科学研究院

(72)发明人 金晋秀 金素贞 李承桓 金奭中

权利要求书4页 说明书18页

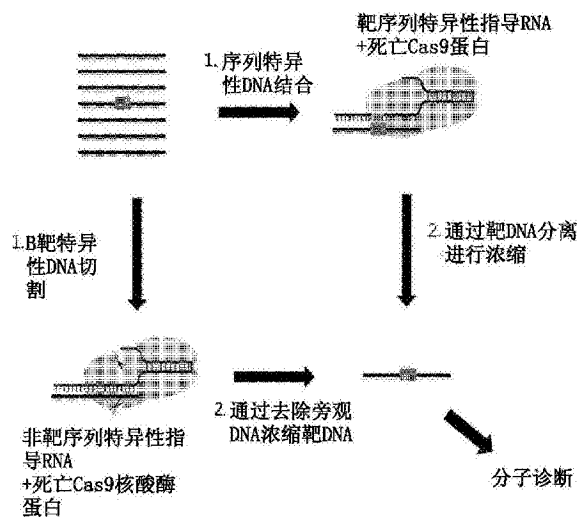
序列表16页 附图15页

(54)发明名称

使用靶特异性核酸酶灵敏检测靶DNA的方法

(57)摘要

本发明涉及使用靶特异性核酸酶分析基因型的方法,具体地,涉及通过使用靶特异性核酸酶或其变体去除野生型DNA或特定基因型DNA以仅扩增或浓缩少量具有变异(如突变)或基因型差异的DNA来诊断癌症或分析基因型的方法,以及涉及使用靶特异性核酸酶或其变体分离靶DNA的方法。这种方法是与用于正常基因型和致癌基因型的PCR后识别的现有简单的靶特异性核酸酶相反的新型范例方法,并且可以有利地用于癌症的早期诊断或相似基因型的分析。



1. 分析基因型的方法,其包括:
 - (i) 通过使用对特定基因型DNA特异的核酸酶切割所述特定基因型DNA而其中混合两种或更多种DNA基因型的分离样品中的特定基因型DNA去除;和
 - (ii) 分析存在于其中所述特定基因型DNA已被去除的所述分离样品中的其它基因型DNA。
2. 根据权利要求1所述的方法,其包括:
 - (a) 通过使用对所述特定基因型DNA特异的核酸酶切割所述特定基因型DNA而将其中混合两种或更多种DNA基因型的所述分离样品中的所述特定基因型DNA去除;
 - (b) 扩增存在于其中所述特定基因型DNA已被去除的所述分离样品中的其它基因型DNA;和
 - (c) 分析扩增的其它基因型DNA。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述核酸酶选自锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 和RNA指导的工程化核酸酶 (RGEN)。
4. 根据权利要求1所述的方法,所述方法用于癌症的诊断,其中:
 - 步骤 (i) ——其中所述特定基因型DNA是野生型DNA——是通过使用对所述分离样品中的所述野生型DNA特异的核酸酶切割所述野生型DNA来去除所述野生型DNA;和
 - 步骤 (ii) ——其中其它基因型DNA是具有癌症特异性突变的DNA——是分析其中所述野生型DNA被去除的所述分离样品中的所述癌症特异性突变DNA。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述癌症的诊断是癌症的早期诊断。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述癌症的诊断是预测癌症预后。
7. 根据权利要求4所述的方法,其中在其中混合两种或更多种DNA基因型的所述分离样品是从疑似患有癌症的受试者中分离的血液样品。
8. 根据权利要求1所述的方法,所述方法用于预测已经接受细胞或器官移植的受试者的预后,其中:
 - 步骤 (i) ——其中所述特定基因型DNA是已经接受细胞或器官移植的受试者DNA——是通过使用对所述受试者DNA特异的核酸酶切割所述受试者DNA来去除从已经接受细胞或器官移植并且包含两种或更多种DNA基因型的所述受试者中分离的样品中的所述受试者DNA;和
 - 步骤 (ii) ——其中其它基因型DNA是移植细胞或器官的DNA——包括分析其中所述受试者DNA已被去除的所述样品中的所述移植细胞或器官的DNA。
9. 根据权利要求1所述的方法,所述方法是收集关于犯罪现场的信息,其中:
 - 步骤 (i) ——其中所述特定基因型DNA是受害者DNA——是通过使用对所述受害者DNA特异的核酸酶切割所述受害者DNA来去除源自所述犯罪现场并且包含两种或更多种DNA基因型的分离DNA样品中的所述受害者DNA;和
 - 步骤 (ii) ——其中其它基因型DNA是攻击者DNA——包括分析其中所述受害者DNA已被去除的所述样品中的所述攻击者DNA。
10. 根据权利要求1所述的方法,所述方法用于收集关于犯罪现场的信息,其中:
 - 步骤 (i) ——其中所述特定基因型DNA是攻击者DNA——是通过使用对所述攻击者DNA特异的核酸酶切割所述攻击者DNA来去除源自所述犯罪现场并且包含两种或更多种DNA基

因型的分离DNA样品中的所述攻击者DNA;和

步骤(ii)——其中其它基因型DNA是受害者DNA——包括分析其中所述攻击者DNA已被去除的所述样品中的所述受害者DNA。

11. 分析基因型的方法,其包括:

(i) 通过使用对特定基因型DNA特异的指导RNA (gRNA) 和失活Cas核酸酶蛋白 (dCas) 切割其它基因型DNA同时掩蔽其中混合两种或更多种DNA基因型的分离样品中的特定基因型DNA以保护其免受能够识别其它基因型DNA的RGEN的切割而去除所述其它基因型DNA;和

(ii) 分析存在于其中所述其它基因型DNA已被去除的所述样品中的所述特定基因型DNA。

12. 根据权利要求11所述的方法,其包括:

(a) 通过使用对特定基因型DNA特异的指导RNA (gRNA) 和失活Cas核酸酶蛋白 (dCas) 切割其它基因型DNA同时掩蔽其中混合两种或更多种DNA基因型的分离样品中的所述特定基因型DNA以保护其免受能够识别其它基因型DNA的RGEN的切割而去除所述其它基因型DNA;

(b) 扩增其中所述其它基因型DNA已被去除的样品中的所述特定基因型DNA;和

(c) 分析扩增的特定基因型DNA。

13. 根据权利要求11所述的方法,所述方法用于诊断癌症,其中:

步骤(i)——其中其它基因型DNA是野生型DNA,并且特定DNA是具有癌症特异性突变的DNA——是通过使用能够特异性结合具有癌症特异性突变的特定DNA的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白 (dCas) 切割所述野生型DNA同时掩蔽所述特定基因型DNA以保护其免受对所述野生型DNA特异的RGEN的切割而去除分离样品中的所述野生型DNA;和

步骤(ii) 是分析存在于其中所述野生型DNA已被去除的所述分离样品中的具有癌症特异性突变的DNA。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述诊断癌症是癌症的早期诊断。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述诊断癌症是预测癌症预后。

16. 根据权利要求13所述的方法,其中在其中混合两种或更多种DNA基因型的所述分离样品是从疑似患有癌症的受试者中分离的血液样品。

17. 根据权利要求11所述的方法,所述方法用于预测已经接受细胞或器官移植的受试者的预后,其中:

步骤(i)——其中其它基因型DNA是已经接受细胞或器官移植的受试者DNA,并且所述特定基因型DNA是移植细胞或器官的DNA——是通过使用能够特异性结合所述移植细胞或器官的DNA的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白 (dCas) 切割所述已经接受细胞或器官移植的受试者DNA同时掩蔽所述特定基因型DNA以保护其免受对已经接受细胞或器官移植的受试者DNA特异的RGEN的切割而去除分离样品中所述已经接受细胞或器官移植的受试者DNA;和

步骤(ii) 是分析存在于其中所述已经接受细胞或器官移植的受试者DNA已被去除的所述样品中的移植细胞或器官的DNA。

18. 根据权利要求11所述的方法,所述方法用于收集关于犯罪现场的信息,其中:

步骤(i)——其中其它基因型DNA是受害者DNA,并且所述特定基因型DNA是攻击者DNA——是通过使用能够特异性结合攻击者DNA的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白 (dCas) 切割所述受害者DNA同时掩蔽所述特定基因型DNA以保护其免受对受害者DNA特异的RGEN的切

割而去除分离样品中的所述受害者DNA;和

步骤(ii)是分析存在于其中所述受害者DNA已被去除的所述样品中的所述攻击者DNA。

19. 根据权利要求11所述的方法,所述方法用于收集关于犯罪现场的信息,其中:

步骤(i)——其中其它基因型DNA是攻击者DNA,并且所述特定基因型DNA是受害者DNA——是通过使用能够特异性结合所述受害者DNA的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白(dCas)切割所述攻击者DNA同时掩蔽所述特定基因型DNA以保护其免受对所述攻击者DNA特异的RGEN的切割而去除分离样品中的所述攻击者DNA;和

步骤(ii)是分析存在于其中所述攻击者DNA已被去除的所述样品中的所述受害者DNA。

20. 根据权利要求11所述的方法,其中所述失活Cas蛋白缺少Cas蛋白的DNA切割活性。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述失活Cas蛋白是具有D10A、H840A或D10A/H840A突变的Cas9蛋白的变体。

22. 分析分离样品中的DNA基因型的方法,其包括:

(i) 在具有细菌或病毒的DNA的分离样品中,通过用对非致病性细菌或病毒的DNA特异的核酸酶处理所述非致病性细菌或病毒的DNA切割所述非致病性细菌或病毒的DNA来去除所述分离样品中的所述非致病性细菌或病毒的DNA;和

(ii) 分析其中所述非致病性细菌或病毒的DNA已被去除的所述分离样品中的致病性细菌或病毒的DNA。

23. 根据权利要求22所述的方法,其包括:

(a) 在具有细菌或病毒的DNA的所述分离样品中,通过用对所述非致病性细菌或病毒的DNA特异的核酸酶处理所述非致病性细菌或病毒的DNA切割所述非致病性细菌或病毒的DNA来去除所述非致病性细菌或病毒的DNA;

(b) 扩增其中所述非致病性细菌或病毒的DNA已被去除的所述分离样品中的所述致病性细菌或病毒的DNA;和

(c) 分析扩增的所述致病性细菌或病毒的DNA。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述核酸酶选自锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和RNA指导的工程化核酸酶(RGEN)。

25. 分析分离样品中的DNA基因型的方法,其包括:

(i) 通过使用对致病性细菌或病毒特异性的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白(dCas)切割非致病性细菌或病毒的DNA同时掩蔽致病性细菌或病毒的DNA以保护其免受对所述非致病性细菌或病毒特异的RGEN的切割而去除所述分离样品中的所述非致病性细菌或病毒的DNA;和

(ii) 分析其中所述非致病性细菌或病毒的DNA已被去除的所述分离样品中的所述致病性细菌或病毒的DNA。

26. 根据权利要求25所述的方法,其包括:

(a) 通过使用对所述致病性细菌或病毒的DNA特异的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白(dCas)切割所述非致病性细菌或病毒的DNA同时掩蔽所述致病性细菌或病毒的DNA以保护其免受对所述非致病性细菌或病毒特异的RGEN的切割而去除所述分离样品中的所述非致病性细菌或病毒的DNA;

(b) 扩增其中所述非致病性细菌或病毒的DNA已被去除的所述分离样品中的所述致病

性细菌或病毒的DNA;和

(c) 分析扩增的所述致病性细菌或病毒的DNA。

使用靶特异性核酸酶灵敏检测靶DNA的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及使用靶特异性核酸酶分析基因型的方法,并且具体地,本发明涉及诊断癌症的方法或通过使用靶特异性核酸酶或其变体去除野生型DNA或特定基因型DNA以扩增或浓缩少量具有变异(如突变)或基因型差异的DNA来分析基因型的方法,以及涉及使用靶特异性核酸酶或其变体分离所需DNA的方法。

背景技术

[0002] 血浆DNA具有源自体内多种细胞的DNA片段。尽管所有人类细胞都具有相同的遗传信息,但当应用外部细胞(细胞疗法或器官移植等)时或者当内部细胞发生突变时,人类细胞可变为异质。

[0003] 这种情况的实例包括:1) 癌症(癌症是由多种突变引起的)、2) 妊娠(胎儿DNA与母亲DNA不同)、3) 细胞和器官移植(供体DNA与受体DNA不同)等。在每种情况中,相同基因的略有不同的序列片段可存在于血浆DNA中——即便以非常低的比例。因此,通过分子诊断方法灵敏观察差异的技术是重要的。

[0004] 具体而言,由于在样品中(如在癌症患者的血液中)混合了过量的正常DNA和少量的其中突变被诱导的源自癌症的DNA,需要分析DNA的方法。然而,现有的诊断方法(如PCR-RFLP等)主要是用于通过PCR扩增样品DNA,然后通过用对突变特异的限制酶切割DNA来检测切割(Hum.Mut.2002五月;21(5):535-41)。此类方法具有能够在各种情况下容易地进行诊断的优点,但仍存在缺点:癌症的早期诊断导致检查的假阳性/阴性等,因而对所提供的信息的准确性存在限制。

[0005] 另一方面,现有的分子诊断方法(如PCR或等温链式扩增(isothermal chain amplification;ICA)等)在分析具有相似序列的相似物种基因型方面有困难。例如,当致病性细菌/病毒具有与非致病性细菌/病毒非常相似的序列时,则需要在特定位点具有不同序列的相同物种或相似物种(类似于本地韩国牛(Hanwoo)和进口牛)中特异性检测不同受试者的基因组的方法。若现有的分子诊断方法不完全区分相似的序列,则可能发生假阳性/阴性。

[0006] 公开内容

[0007] 技术问题

[0008] 作为致力于找出用于诊断和分析基因型的更准确方法的结果,本发明人意想不到地证实,与现有的诊断方法或基因分型方法的范例相反,可以通过使用对所需DNA特异的指导RNA和失活Cas9蛋白复合物切割不需要的DNA同时掩蔽所需DNA免受切割而将不需要的DNA去除,或者通过使用靶特异性核酸酶切割不需要的DNA而主要地去除不需要的DNA来浓缩少量的具有变异(如突变)或基因型差异的所需DNA。此外,证实了,可以通过使用对所需DNA特异的指导RNA和失活Cas9蛋白复合物分离和纯化所需DNA来浓缩少量的所需DNA。具体地,证实了,可以使用失活Cas蛋白和靶向源于细胞的DNA的指导RNA,以非共价键分离所需DNA。通过证实以下来完成本发明:经分子检测或分离和纯化而浓缩的所需DNA可以被用于

各种领域(如癌症诊断、癌症的预后预测、妊娠诊断和细胞/器官移植)。

[0009] 技术方案

[0010] 本发明的目的是提供分析基因型的方法,其包括:(i)通过使用对特定基因型DNA特异的核酸酶切割特定基因型DNA来去除其中混合有两种或更多种DNA基因型的分离样品中的特定基因型DNA;和(ii)分析存在于其中特定基因型DNA已被去除的样品中的其它DNA。

[0011] 本发明的另一目的是提供分析基因型的方法,其包括:(i)通过使用对特定基因型DNA特异的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白切割其中混合有两种或更多种DNA基因型的分离样品中的其它基因型DNA同时掩蔽特定基因型DNA以保护其免受能够识别其它基因型DNA的RGEN的切割而去除其它基因型DNA;和(ii)分析其中其它基因型DNA已被去除的样品中的特定基因型DNA。

[0012] 本发明的另一目的是提供分析分离样品中的DNA基因型的方法,其包括:(i)通过处理对具有细菌或病毒DNA的样品中的非致病性细菌或病毒DNA特异的核酸酶,切割非致病性细菌或病毒DNA来从样品中去除非致病性细菌或病毒DNA;和(ii)分析其中非致病性细菌或病毒DNA已被去除的样品中的致病性细菌或病毒DNA。

[0013] 本发明的另一目的是提供分析分离样品中的DNA基因型的方法,其包括:(i)通过使用对致病性细菌或病毒DNA特异的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白(dCas)切割非致病性细菌或病毒DNA同时掩蔽致病性细菌或病毒DNA以保护其免受对非致病性细菌或病毒特异的RGEN的切割而去除样品中的非致病性细菌或病毒DNA;和(ii)分析其中非致病性细菌或病毒的DNA已被去除的样品中的致病性细菌或病毒DNA。

[0014] 本发明的另一目的是提供使用对所需DNA特异的失活核酸酶从含有两种或更多种DNA基因型的分离样品中分离所需DNA的方法。

[0015] 本发明的另一目的是提供使用对所需DNA特异的失活核酸酶从含有基因组DNA的分离样品中分离所需DNA的方法。

[0016] 本发明的另一目的是提供分析基因型的方法,其包括:(i)使用对特定基因型DNA特异的失活核酸酶,在其中混合两种或更多种DNA基因型的分离样品中分离特定基因型DNA;和(ii)分析分离的特定基因型DNA。

[0017] 有利效果

[0018] 本发明——其以与用于诊断或分析基因型的现有方法相反的概念为基础——提供了通过(i)在扩增样品中的所需DNA之前,使用靶特异性核酸酶如ZFN、TALEN和RGEN切割不需要的DNA,例如正常DNA,或(ii)使用失活Cas9:gRNA复合物分离所需DNA而浓缩所需DNA来诊断癌症或分析基因型的方法。在本发明的方法中,在其检测之前通过浓缩所需DNA的方法来去除假阳性/阴性信号等,其使得癌症的早期诊断成为可能,并且提供了用于癌症患者预后的准确诊断的新范例的方法。此外,通过该方法,癌细胞的早期诊断、癌症预后的预测、和在手术和化疗后对转移性癌症发生的监测是可能的。

[0019] 附图简述

[0020] 图1显示了根据本发明的使用RGEN浓缩靶DNA的两种方法的示意图。

[0021] 图2显示了增加由基因剪刀(gene scissor)诱导的突变率的方法的示意图。

[0022] 图3证实了在切割前后突变率为0.0054%至54%的基因组DNA混合物中的突变率的变化。

[0023] 图4显示了示例通过应用本发明的新范例来确认是否可以进行对致癌基因中的突变的诊断的方法的示意图。

[0024] 图5显示了用于检测致癌基因突变的RFLP的RGEN的研发和结果。

[0025] 图6显示了示例通过使用用于检测致癌基因突变的RFLP的RGEN证实的结果的图。

[0026] 图7显示了示例使用CUT-PCR的突变基因扩增和检测方法的示意图。

[0027] 图8显示了示例使用质粒检测KRAS突变基因的实验结果的图。右侧图显示了含有野生型和突变KRAS的质粒。WT:野生型正常基因;MT:突变基因。

[0028] 图9显示了示例正常与突变KRAS基因的比例(左)和突变KRAS基因的增长率(右)的图。

[0029] 图10显示了示例使用从处于不同进展阶段的结肠癌患者和正常个体的血浆中获得的无细胞DNA进行CUT-PCR两轮的结果的图。在从血浆中获得的无细胞DNA的每个中,通过靶向具有高发生频率的KRAS的c.35G>A和c.35G>T突变基因,在第一和第二轮中扩增的突变基因数目(%)被显示。RGEN 1st:对正常基因特异的RGEN被处理一次,并进行PCR;RGEN 2nd:对正常基因特异的RGEN被处理两次,并进行PCR。

[0030] 图11显示了示例使用dCas9的靶DNA片段纯化实验的步骤的示意图。

[0031] 图12显示了示例使用dCas9纯化质粒片的实验步骤的示意图。

[0032] 图13显示了用一个sgRNA或两个sgRNA纯化每一种靶DNA的结果。输入是用限制酶切割的预纯化质粒DNA的样品。

[0033] 图14显示了示例纯化三种靶DNA中的两种靶DNA的结果的图。输入是用限制酶切割的预纯化质粒DNA的样品。

[0034] 图15显示了示例靶DNA纯化后观察到的每种靶DNA的琼脂糖凝胶带的强度(%)的图。

[0035] 图16显示了示例对HeLa细胞和SW 480细胞的TP53基因外显子进行纯化并进行实时qPCR的结果的图。

[0036] 图17显示了示例诊断和鉴定具有相似序列的致病性细菌DNA的方法的示意图。

[0037] 最佳方式

[0038] 作为实现上述目的的一方面,本发明提供了通过去除其中混合两种或更多种DNA基因型的分离样品中的特定基因型DNA来分析其它基因型DNA的方法。

[0039] 具体地,可进行分析基因型的方法,其包括:(i)通过使用对特定基因型DNA特异的核酸酶切割特定基因型DNA来去除其中混合两种或更多种DNA基因型的分离样品中的特定基因型DNA;和(ii)分析所需的其它基因型DNA。

[0040] 可以通过经PCR或本领域已知的其它方法的扩增来检测其它基因型DNA。

[0041] 具体地,可以利用PCR、测序(例如,深度测序,Sanger测序和NGS)和使用靶特异性核酸酶的RFLP(例如,RGEN RFLP)来分析其它基因型DNA。

[0042] 上述“去除”包括特定基因型DNA不能通过PCR等进行扩增——由于特定基因型DNA已被切割的概念,以及包括样品中全部或部分去除的概念。

[0043] 更具体地,该方法可以提供可进行的分析DNA基因型的方法,其包括:(a)通过使用对特定基因型DNA特异的核酸酶切割特定基因型DNA来去除其中混合两种或更多种DNA基因型的分离样品中的特定基因型DNA;(b)扩增存在于其中特定基因型DNA已被去除的样品中

的其它基因型DNA;和(c)分析扩增的其它基因型DNA。

[0044] 此外,当其它基因型DNA源自癌症的DNA时,分析基因型的方法可以是分析提供用于诊断癌症的信息的基因型的方法。

[0045] 具体地,诊断癌症的方法可以是提供用于诊断癌症的信息的方法,包括:通过使用对野生型DNA特异的核酸酶切割野生型DNA来去除分离样品中的野生型DNA的步骤(a),其中特定基因型DNA是野生型DNA;扩增其中野生型DNA已被去除的样品中的具有癌症特异性突变的DNA的步骤(b),其中其它基因型DNA是具有癌症特异性突变的DNA;和分析序列的步骤(c)。

[0046] 本发明人通过证实以下来完成本发明:当使用与现有诊断方法或分析基因型的现有方法的范例相反的新方法——其包括1)通过用对正常DNA特异的核酸酶切割正常DNA来去除样品中的正常DNA,和2)仅扩增少量的源自癌症的DNA并进行RFLP或序列分析——时,使无假阳性/假阴性的诊断成为可能。在通过PCR扩增之前将正常DNA而不是突变DNA切割并去除的概念是本发明人最初研发的概念。

[0047] 如本文所使用的,术语“靶特异性核酸酶”是能够识别并切割靶基因组中DNA特异性位点的核酸酶。核酸酶可包括其中融合切割结构域和识别基因组中特异性靶序列的结构域的核酸酶,例如大范围核酸酶(meganuclease);其中融合切割结构域和能够识别基因组中特异性靶序列的转录激活因子样效应物(TAL)结构域(其是源自植物致病基因的转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN))的融合蛋白;锌指核酸酶;或RNA指导的工程化核酸酶(RGEN),但并不限于此。为了本发明的目的,使用RGEN的方法可以实现简单还更有利的结果。

[0048] 作为本发明的另一个实施方式,核酸酶可以是锌指核酸酶(ZFN)。ZFN包含经工程化以与所选基因结合并与切割结构域或切割半结构域中的靶位点结合的锌指蛋白。锌指结合结构域可以被工程化以与所选序列结合。例如,可以参考Beerli等人.(2002) Nature Biotechnol. 20:135-141;Pabo等人.(2001) Ann.Rev.Biochem. 70:313-340;Isalan等人., (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660;Segal等人.(2001) Curr.Opin.Biotechnol. 12:632-637;和Choo等人.(2000) Curr.Opin.Struct.Biol. 10:411-416。与天然存在的锌指蛋白相比,经工程化的锌指结合结构域可以具有新颖的结合特异性。操作方法包括对各种类型的合理设计和选择,但并不限于此。合理设计包括使用包含例如三联(或四联)核苷酸序列和单个锌指氨基酸序列的数据库,其中每个三联或四联核苷酸序列与结合特定三联或四联序列的一个或多个锌指序列组合。

[0049] 靶序列的选择以及融合蛋白(和编码融合蛋白的多核苷酸)的设计和构建是本领域技术人员所熟知的,并且详细描述于美国专利申请公开号2005/0064474和2006/0188987中,其全部内容通过引用并入本文。此外,如这些及其它参考文献中所公开的,锌指结构域和/或多指锌指蛋白可以通过包括任何合适的连接体序列的连接体(例如长度为5个或更多个氨基酸的连接体)进行连接。在美国专利号6,479,626、6,903,185和7,153,949中公开了长度为6个或更多个氨基酸的连接体序列的实例。本文所述的蛋白质可包括蛋白质的每个锌指之间的合适连接体的任意组合。

[0050] 此外,核酸酶(如ZFN和/或大范围核酸酶)包含切割结构域或切割半结构域。如上所述,切割结构域可以与DNA结合结构域异源,诸如例如来自包括不同类型的锌指DNA结合

结构域的核酸酶的切割结构域、来自包括不同类型的大范围核酸酶DNA结合结构域的核酸酶的切割结构域。异源切割结构域可以从任何核酸内切酶或核酸外切酶获得。切割结构域可以源于其中的示例性核酸内切酶可包括限制性核酸内切酶或大范围核酸酶,但并不限于此。

[0051] 类似地,如上所述,切割半结构域可以源自需要对切割活性二聚化的任何核酸酶或其部分。当融合蛋白包含切割半结构域时,通常需要两个融合蛋白用于切割。或者,可以使用包含两个切割半结构域的单个蛋白。两个切割半结构域可以源自相同的核酸内切酶(或其功能片段),或每个切割半结构域可以源自不同的核酸内切酶(或其功能片段)。此外,两个融合蛋白的靶位点优选被定位,以便切割半结构域可以通过例如二聚化形成功能性切割结构域,其中切割半结构域通过两个融合蛋白及其各自的靶位点的结合在空间上彼此定向地进行定位。因此,在一个实施方式中,5至8个核苷酸或15至18个核苷酸的靶位点的相邻边缘被分开。然而,可在两个靶位点之间插入任何整数个核苷酸或核苷酸对(例如,2至50个核苷酸对或更多)。通常,切割位点位于靶位点之间。

[0052] 限制性核酸内切酶(限制酶)存在于许多物种中,并且可以序列特异性地结合DNA(在靶位点处)以在结合位点处或其周围直接切割DNA。一些限制酶(例如IIS型)在远离识别位点的位点处切割DNA,并且具有可分离结合结构域和可切割结构域。例如,II型酶FokI催化来自一条链上的识别位点的9个核苷酸处和来自另一条链上的识别位点的13个核苷酸处的双链切割(double strand cleavage)。因此,在一个实施方式中,融合蛋白包括至少1个IIS型限制酶的切割结构域(或切割半结构域)和一个或多个锌指结合结构域(其可以进行工程化或可以不进行工程化)。

[0053] 如本文所使用的,术语“TALEN”是指能够识别并切割DNA靶区域的核酸酶。TALEN是指包含TALE结构域和核苷酸切割结构域的融合蛋白。在本发明中,术语“TAL效应物核酸酶”和“TALEN”是可互换的。当多种植物物种被黄单胞菌(*Xanthomonas bacteria*)感染时,TAL效应物是由黄单胞菌的III型分泌系统分泌的蛋白质。蛋白质可结合宿主植物中的启动子序列以激活有助于细菌感染的植物基因的表达。蛋白质通过包含可变数目的多达34个的氨基酸重复的中央重复结构域来识别植物DNA序列。因此,TALE可以是用于基因组工程中的工具的新平台。然而,为了制备具有基因组编辑活性的功能性TALEN,迄今未知的几个关键参数应被定义如下:(i) TALE的最小DNA结合结构域,(ii) 在构成一个靶区域的两个半空间(half-space)之间的间隔区长度,和(iii) 将FokI核酸酶结构域连接至dTALE或融合接点的连接体。

[0054] 本发明的TALE结构域是指通过一个或多个TALE-重复模块以序列特异性方式结合至核苷酸的蛋白质。TALE结构域包括至少一个TALE-重复模块,优选1至30个TALE-重复模块,但并不限于此。在本发明中,术语“TAL效应物结构域”和“TALE结构域”是可互换的。TALE结构域可包括TALE-重复模块的一半。

[0055] 本文所使用的,术语“RGEN”是指由对靶DNA特异的核酸酶和Cas蛋白组成的核酸酶。

[0056] 如本文所使用的,术语“Cas蛋白”是指CRISPR/Cas系统的主要蛋白质组分,并与CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA)形成复合物,以形成激活的核酸内切酶或切口酶。

[0057] Cas蛋白可以是但不限于Cas9蛋白。此外,Cas9蛋白可以源自化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*),但并不限于此。

[0058] Cas蛋白或遗传信息可以从已知的数据库获得,如国家生物技术信息中心(NCBI)的GenBank,但并不限于此。

[0059] Cas蛋白可以连接至蛋白质转导结构域。蛋白转导结构域可以是聚精氨酸或源自HIV的TAT蛋白,但并不限于此。

[0060] Cas蛋白可以根据目标被连接至对分离和/或纯化有利的标签。根据目标,可以被连接的标签的实例包括His标签、Flag标签、S标签、谷胱甘肽S-转移酶(GST)标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)标签、几丁质结合蛋白(CBP)标签、Avi标签、钙调蛋白标签、聚谷氨酸标签、E标签、HA标签、myc标签、SBP标签、softag 1、softag 3、strep标签、TC标签、Xpress标签、生物素羧基载体蛋白(BCCP)标签或绿荧光蛋白(GFP)标签等,但并不限于此。

[0061] 如本文所使用的,术语“指导RNA”是指对靶DNA特异的RNA,其可与Cas蛋白结合以将Cas蛋白导向至靶DNA。靶DNA可与所需DNA互换使用。

[0062] 在本发明中,指导RNA可以由两种RNA(即CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA))组成。或者指导RNA可以通过crRNA和tracrRNA的主要部分的融合制备的单链RNA(sgRNA)。

[0063] 指导RNA可以是包含crRNA和tracrRNA的二元RNA(dualRNA)。

[0064] crRNA可以与靶DNA结合。

[0065] RGEN可以由Cas蛋白和二元RNA组成,或者可以由Cas蛋白和sgRNA组成。指导RNA可以在sgRNA或二元RNA的crRNA的5'端包含一个或多个额外的核苷酸。

[0066] 指导RNA可以以RNA或编码RNA的DNA的形式递送到细胞中。

[0067] 诊断癌症的方法可以是癌症的早期诊断。

[0068] 诊断癌症的方法可以是预测癌症预后的方法。

[0069] 具有突变的DNA可以来源于癌症细胞。

[0070] 其中混合有两种或更多种DNA基因型的分离样品可以从疑似患有癌症的受试者中分离的血液样品。

[0071] 分析基因型的方法可以被用于提供用于预测已经接受细胞或器官移植的受试者的预后的信息,其中:步骤(i)——其中特定基因型DNA是已经接受细胞或器官移植的受试者的DNA——通过使用对受试者DNA特异的核酸酶切割受试者DNA而去除从已接受细胞或器官移植的受试者中分离的其中混合有两种或更多种DNA基因型的样品中的已接受细胞或器官移植的受试者的DNA;和步骤(ii)——其中其它基因型DNA是移植细胞或器官的DNA——包括分析已去除受试者的DNA的样品中的移植细胞或器官的DNA。

[0072] 分析基因型的方法可以用于收集关于犯罪现场的信息,其中:步骤(i)——其中特定基因型DNA是受害者DNA——通过使用对受害者DNA特异的核酸酶切割受害者DNA而去除来自犯罪现场的其中混合有两种或更多种DNA基因型的DNA样品中的受害者DNA;和步骤(ii)——其它基因型DNA是攻击者DNA——包括分析其中已去除受害者DNA的样品中的攻击者DNA;或方法可以包括步骤(i)(其中特定基因型DNA是攻击者DNA):通过使用对攻击者DNA特异的核酸酶切割攻击者DNA将来自犯罪现场的其中混合有两种或更多种DNA基因型的DNA样品中的攻击者DNA去除;和步骤(ii)(其中其它基因型DNA是受害者DNA):包括分析其中已

去除攻击者DNA的样品中的受害者DNA。

[0073] 作为另一方面,本发明提供了使用对特定基因型DNA特异的指导RNA和失活核酸酶蛋白(dCas)来分析基因型的方法。

[0074] 具体地,分析基因型的方法可以包括:(i)通过使用对特定基因型DNA特异的指导RNA(gRNA)和失活Cas核酸酶蛋白切割其它基因型DNA同时掩蔽分离样品(其中混合有两种或更多种DNA基因型)中的特定基因型DNA以保护其免受能够识别其它基因型DNA的RGEN的切割来去除其它基因型DNA;和(ii)分析其中已去除其它基因型DNA的样品中所存在的特定基因型。

[0075] 更具体地,方法提供可以进行的分析基因型的方法,其包括:(a)通过使用对特定基因型DNA特异的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白切割分离样品(其中混合了两种或更多种DNA基因型)中的其它基因型DNA同时掩蔽特定基因型DNA以保护其免受能够识别其它基因型DNA的RGEN切割来去除其它基因型DNA;(b)扩增其中已去除其它基因型DNA的样品中的特定基因型DNA;和(c)分析扩增的特定基因型DNA。

[0076] 此外,当其它基因型DNA是源自癌症的DNA时,分析基因型的方法可以是分析用于提供诊断癌症的信息的基因型的方法。

[0077] 具体地,诊断癌症的方法可以是提供用于诊断癌症的信息的方法,包括:步骤(a)(其中其它基因型DNA是野生型DNA,以及特定DNA是具有癌症特异性突变的DNA),通过使用由能够特异性结合至具有突变的特定DNA的指导RNA和失活Cas核酸酶蛋白(dCas)组成的失活RGEN(dCas9:gRNA复合物)切割野生型DNA同时掩蔽特定基因型DNA以保护其免受对野生型DNA特异的RGEN的切割来去除分离样品中的野生型DNA;步骤(b),扩增其中已去除野生型DNA的样品中的具有癌症特异性突变的DNA;和步骤(c),分析扩增的具有突变的DNA。

[0078] 诊断癌症的方法可以是癌症的早期诊断。

[0079] 诊断癌症的方法可以是预测癌症预后的方法。

[0080] 具有突变的DNA可以源自癌症。

[0081] 其中混合有两种或更多种DNA基因型的分离样品可以源自疑似患有癌症的受试者。具体地,其可以是包含cfDNA或cfDNA样品的分离血液样品。

[0082] 如本文所使用的,术语“失活RGEN”是指包含Cas核酸酶蛋白的RGEN,其中核酸酶的全部或部分功能被失活。失活Cas蛋白也称为dCas。Cas蛋白可以是Cas9蛋白。失活Cas9核酸酶蛋白的制备包括但不限于使核酸酶的活性失活的任何方法,例如通过将D10A和H840A变异引入Cas9核酸酶蛋白。D10A Cas9和H840A Cas9核酸酶蛋白(即,通过在Cas9核酸酶蛋白中存在的仅一个活性位点处引入变异而各自制备的Cas9核酸酶蛋白)在与指导RNA结合时可以起到切口酶(nickase)的作用。

[0083] 这种切口酶包括在RGEN类别中——因为当使用两种切口酶时可导致通过切割两侧上的两条DNA链而引起的双链断裂(DBS)。

[0084] 在另一个实例中,通过将所有D10A和H840A突变引入Cas9核酸酶蛋白,D10A/H840ACas9蛋白(即,通过在Cas9核酸酶的两个活性位点引入突变而制备的dCas9蛋白)可以起到DNA结合复合物的作用,其在与指导DNA结合时不切割DNA。

[0085] 分析基因型的方法可以被用于提供用于预测已经接受细胞或器官移植的受试者的预后的信息,其中:步骤(i)(其中特定基因型DNA是已经接受细胞或器官移植的受试者

DNA) 通过使用对受试者DNA特异的核酸酶切割受试者DNA来去除从已接受细胞或器官移植的受试者分离的其中混合有两种或更多种DNA基因型的样品中的受试者DNA; 和步骤 (i i) (其中其它基因型DNA是移植细胞或器官的DNA) 包括分析其中受试者DNA已被去除的样品中的移植细胞或器官的DNA。

[0086] 分析基因型的方法可以被用于收集关于犯罪现场的信息, 其中: 步骤 (i) (其中特定基因型DNA是受害者DNA) 通过使用对受害者DNA特异的核酸酶切割受害者DNA来去除源自犯罪现场的其中混合有两种或更多种DNA基因型的DNA样品中的受害者DNA; 和步骤 (i i) (其中其它基因型DNA是攻击者DNA) 包括分析已去除受害者DNA的样品中的攻击者DNA; 或方法可以包括: 步骤 (i) (其中特定基因型DNA是攻击者DNA), 通过使用对攻击者DNA特异的核酸酶切割攻击者DNA来去除源自犯罪现场的其中混合有两种或更多种DNA基因型的DNA样品中的攻击者DNA; 和步骤 (i i) (其中其它基因型DNA是受害者DNA), 包括分析已去除攻击者DNA的样品中的受害者DNA。

[0087] 作为另一方面, 本发明提供了分析分离样品中的DNA基因型的方法, 包括: (i) 在具有细菌或病毒DNA的样品中, 通过用对非致病性细菌或病毒的DNA特异的核酸酶处理非致病性细菌或病毒的DNA切割非致病性细菌或病毒的DNA来去除样品中的非致病性细菌或病毒的DNA; 和 (i i) 分析其中非致病性细菌或病毒的DNA已被去除的样品中的致病性细菌或病毒的DNA。

[0088] 具体地, 本发明提供了可以进行的分析分离样品中的DNA基因型的方法, 其包括: (a) 在具有细菌或病毒DNA的样品中, 通过用对非致病性细菌或病毒的DNA特异的核酸酶处理非致病性细菌或病毒的DNA切割非致病性细菌或病毒的DNA来去除样品中的非致病性细菌或病毒的DNA; (b) 扩增其中非致病性细菌或病毒的DNA已被去除的样品中的致病性细菌或病毒的DNA; 和 (c) 分析扩增的致病性细菌或病毒的DNA。

[0089] 核酸酶可以选自锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 和RNA指导的工程化核酸酶 (RGEN), 但并不限于此。

[0090] 作为另一方面, 本发明提供了分析分离样品中的DNA基因型的方法, 其包括: (i) 通过使用对致病性细菌或病毒特异的指导RNA和由失活Cas9核酸酶蛋白组成的失活RGEN (dCas9:gRNA复合物) 切割非致病性细菌或病毒的DNA同时掩蔽致病性细菌或病毒的DNA以保护其免受对非致病性细菌或病毒的DNA特异的RGEN的切割来去除样品中的非致病性细菌或病毒的DNA; 和 (i i) 分析其中非致病性细菌或病毒的DNA已被去除的样品中的致病性细菌或病毒的DNA。

[0091] 具体地, 方法提供了可以进行的分析分离样品中的DNA基因型的方法, 包括: (a) 使用对致病性细菌或病毒的DNA特异的指导RNA和由失活Cas9核酸酶蛋白组成的失活RGEN (dCas9:gRNA复合物) 切割非致病性细菌或病毒的DNA同时掩蔽致病性细菌或病毒的DNA以保护其免受对非致病性细菌或病毒的DNA特异的RGEN的切割来去除样品中的非致病性细菌或病毒的DNA; (b) 扩增其中非致病性细菌或病毒的DNA已被去除的样品中的致病性细菌或病毒的DNA; 和 (c) 分析扩增的致病性细菌或病毒的DNA。

[0092] 作为另一方面, 本发明提供了分离所需DNA的方法, 包括使用对所需DNA特异的失活核酸酶分离在含有两种或更多类型的DNA的分离样品中的所需DNA。

[0093] 具体地, 可以进行分离所需DNA的方法, 包括: 由能够特异性结合所需DNA的指导

RNA (gRNA)、失活Cas蛋白 (dCas) 和所需DNA形成dCas-gRNA-所需DNA复合物;并从样品中分离该复合物。

[0094] 所需DNA可以通过PCR扩增或通过已知方法检测。

[0095] 分离方法可以在体外应用于无细胞DNA,并且可以在没有形成DNA、gRNA和dCas蛋白之间的交联共价键的情况下进行。

[0096] 分离方法可进一步包括从复合物中分离所需DNA。

[0097] 为了分离所需DNA,失活Cas蛋白可以包含用于分离的亲合和标签,例如,亲合和标签可以是His标签、Flag标签、S标签、谷胱甘肽S-转移酶 (GST) 标签、麦芽糖结合蛋白 (MBP) 标签、几丁质结合蛋白 (CBP) 标签、Avi标签、钙调蛋白标签、聚谷氨酸标签、E标签、HA标签、myc标签、SBP标签、softag 1、softag 3、strep标签、TC标签、Xpress标签、生物素羧基载体蛋白 (BCCP) 标签或绿色荧光蛋白 (GFP) 标签,但并不限于此。

[0098] 失活Cas蛋白可能缺少Cas蛋白的DNA切割活性,并且具体地,失活Cas蛋白可以是具有D10A、H840A或D10A/H840A突变的Cas9蛋白的变体,但并不限于此。

[0099] Cas9蛋白可以源自化脓链球菌。

[0100] 方法可以使用与标签结合的亲合柱或磁珠来分离所需DNA。例如,用于分离的亲合和标签可以是His标签,并且可以使用与His标签结合的金属亲合柱或磁珠来分离所需DNA,并且磁珠可以是例如Ni-NTA磁珠,但并不限于此。

[0101] 可以使用核糖核酸酶和蛋白酶进行所需DNA与复合物的分离。

[0102] 利用分离所需DNA的方法,可以在混合有两种或更多种DNA基因型的分离样品中分离特定基因型DNA,并且可以分离两种或更多种类型的所需DNA。当分离两种或更多种类型的所需DNA时,可以使用对每种类型的所需DNA特异的指导RNA分离所需DNA。

[0103] 指导RNA可以是单链指导RNA (sgRNA),或者可以是包含crRNA和tracrRNA的二元RNA。此外,指导RNA可以是分离的RNA的形式,或者可以是质粒中的编码形式。

[0104] 作为另一方面,本发明提供了分离所需DNA的方法,包括:使用对所需DNA特异的失活核酸酶分离含有基因组DNA的分离样品中的所需DNA。

[0105] 具体地,可以进行这样的方法,其包括:由能够特异性结合所需DNA的指导RNA (gRNA)、失活Cas蛋白 (dCas) 和所需DNA形成dCas-gRNA-所需DNA复合物;和从样品中分离复合物。

[0106] 分离所需DNA的方法的每个步骤的构成如上所述。

[0107] 作为另一方面,本发明提供了分析基因型的方法,包括:(i) 通过使用对特定基因型DNA特异的核酸酶切割特定基因型DNA来去除其中混合有两种或更多种DNA基因型的分离样品中的特定基因型DNA;和(ii) 分析分离的特定基因型DNA。

[0108] 具体地,可以进行这样的方法,其包括:(a) 通过使用对特定基因型DNA特异的核酸酶切割特定基因型DNA来分离其中混合有两种或更多种DNA基因型的分离样品中的特定基因型DNA;(b) 扩增分离的特定基因型DNA;和(c) 分析扩增的特定基因型DNA。

[0109] 此外,当特定基因型DNA是源自癌症的DNA时,分析基因型的方法可以是分析用于提供诊断癌症的信息的基因型的方法。

[0110] 具体地,诊断癌症的方法可以通过分析特定基因型DNA而提供用于诊断癌症的信息的方法,其中特定基因型DNA是具有癌症特异性突变的DNA。

[0111] 本发明人通过证实以下来完成本发明：在使用对特定基因型特异的失活核酸酶纯化特定基因型DNA之后，当仅纯化少量源自癌症的DNA并进行RFLP或序列分析时，可以使无假阳性/假阴性的诊断成为可能。

[0112] 核酸酶可以是，例如，锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN)、或RNA指导工程化核酸酶 (RGEN)，但并不限于此。

[0113] 诊断癌症的方法可以是癌症的早期诊断，或者可以是用于预测癌症预后的方法。

[0114] 方法可具体包括：(i) 通过用能够特异性结合特定基因型DNA的指导RNA (gRNA) 和失活Cas蛋白 (dCas) 处理样品而形成dCas-gRNA-特定基因型DNA复合物；和(ii) 分析从该复合物中分离的特定基因型DNA。

[0115] 失活Cas蛋白可以包含用于分离的亲合标签，其实例如上所述。

[0116] 如上所述，失活Cas蛋白可能缺少Cas蛋白的切割活性。

[0117] 方法可以使用与标签结合的亲和柱或磁珠来分离特定基因型DNA。

[0118] 可以使用核糖核酸酶和蛋白酶进行特定基因型DNA与复合物的分离。

[0119] 发明方式

[0120] 在下文中，将结合示例性实施方式对本发明进行详细描述。然而，本文所公开的示例性实施方式仅用于说明目的，而不应被解释为限制本发明的范围。

[0121] 实施例1：使用靶特异性核酸酶对靶DNA浓度的确认

[0122] 为了确认是否可以使用靶特异性核酸酶浓缩靶DNA，使用RNA指导的工程化核酸酶 (RGEN) (其为靶特异性核酸酶的代表性实例) 确定靶DNA的浓度。

[0123] 其示意图如图1所示。

[0124] 即，如图1所示，确认了使含有突变DNA序列 (方框部分) ——其为非正常DNA——的基因组经历以下两种方法以浓缩靶DNA。

[0125] 1) 通过掩蔽捕获突变DNA的方法

[0126] 通过使用由靶序列特异性指导RNA (gRNA) 和失活Cas9核酸酶蛋白 (死亡的Cas9蛋白或失活的Cas9蛋白) 组成的RGEN，掩蔽突变DNA以保护其免受限制酶的随机切割或捕获突变DNA，经扩增浓缩靶DNA的方法。

[0127] 2) 去除正常DNA后的扩增方法

[0128] 在用由非靶序列特异性指导RNA和Cas9核酸酶蛋白组成的RGEN切割以去除正常DNA之后，通过扩增浓缩靶DNA的方法。

[0129] 实施例2：观察经基因剪刀诱导的非常少量的突变

[0130] 当在细胞内靶点或相似靶序列处的经RGEN诱导的突变率非常低时，为了进行检测，增加突变DNA与正常DNA的比例的过程是必要的。为此，在从用RGEN处理的细胞中分离基因组DNA之后，通过用仅识别正常靶序列的RGEN处理，仅切除正常的基因组DNA，留下突变的基因组DNA (图2)。随后，通过PCR扩增靶点周围的序列，由未切除的突变基因组DNA扩增的PCR产物与由切除的正常基因组DNA扩增的PCR产物的比率相对增加。

[0131] 具体地，在通过用切割VEGFA基因的RGEN处理细胞内部来诱导突变后，分离细胞的基因组DNA，并使用对应于与待观察突变存在的靶点相似的序列的每种RGEN切除正常DNA。在通过PCR扩增切除序列的邻近区域之后，通过测序仪读取序列，并观察正常DNA与突变DNA的比例。结果，与不用RGEN切割的情况相比，观察到突变率增加达到1.4至30倍 (表1)。

[0132] [表1]

[0133]

序列号	RGEN 靶序列	靶名称	模拟未切割 (Mock_uncut) 突变(%)	模拟切割 (Mock_cut) 突变 (%)	RGEN 未切割 (uncut) 突变(%)	RGEN 切割 (cut) 突变 (%)	突变增加的比例
序列号 1	GGGGAGGGGAA GTTTGCTCCTGG	VEGFA_O ff3	0.04%	0.00%	69.15%	95.04%	1.4
序列号 2	CGGGGGAGGGA GTTTGCTCCTGG	VEGFA_O ff5	0.00%	0.01%	2.20%	35.10%	26.9
序列号 3	GGAGGAGGGGA GTCTGCTCCAGG	VEGFA_O ff27	0.00%	0.00%	5.99%	79.88%	13.3
序列号 4	GGTGGGGGTGG GTTTGCTCCTGG	VEGFA_O ff16	0.00%	0.00%	1.16%	29.98%	29.7
序列号 5	GAGTGGGTGGA GTTTGCTACAGG	VEGFA_O ff15	0.00%	0.00%	2.30%	17.12%	7.4
序列号 6	AAGTAAGGGAA GTTTGCTCCTGG	VEGFA_O ff72	0.00%	0.00%	2.92%	54.73%	18.7

[0134] (模拟未切割 (Mock_uncut) : 正常细胞的gDNA未被切割的样品; 模拟切割 (Mock_cut) : 正常细胞的gDNA被切割的样品; RGEN未切割 (RGEN-uncut) : 其中突变诱导细胞的gDNA未被RGEN切割的样品; 和RGEN切割 (RGEN_cut) : 突变诱导细胞的gDNA被RGEN切割的样品)

[0135] 接下来, 为了确定在非常低突变率的突变序列中多少增加可以被看到, 将对应于FANCF基因的RGEN施加至细胞, 并获得含有54%突变的基因组DNA混合物。

[0136] 此外, 在将突变基因组DNA混合物与一定量的正常基因组DNA混合后 (以10的幂 (即, 10、100、1000等) 递增增加), 获得含有比例为0.0054%至54%的突变体的基因组DNA混合物, 然后用仅切割FANCF基因的正常序列的RGEN进行切割。结果, 在突变率的所有范围内, 突变率在切割后增加到520倍 (2.8%/0.0054%), 并证实了该增加效果 (图3)。

[0137] 上述实验中使用的靶碱基序列和sgRNA序列总结在表2中。

[0138] [表2]

[0139]

靶名称	靶碱基序列	RNA 碱基序列 (5' -> 3')
VEGF-A_Off 3	GGGGAGGGGAAGT TTGCTCCTGG(序列号 7)	5'GGGGAGGGGAAGTTTGCTCCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUUU 3' (序列号 15)
VEGF-A_Off 5	GGAGGAGGGGAGT CTGCTCCAGG(序列号 8)	5'GGAGGAGGGGAGTCTGCTCCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUUU 3' (序列号 16)
VEGF-A_Off 27	GGTGGGGGTGGGTT TGCTCCTGG(序列号 9)	5'GGTGGGGGTGGGTTTGCTCCGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUUU 3' (序列号 17)
VEGF-A_Off 16	GAGTGGGTGGAGTT TGCTACAGG(序列号 10)	5'GAGTGGGTGGAGTTTGCTACGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUUU 3' (序列号 18)
VEGF-A_Off 15	AGGTGGTGGGAGCT TGTTCCTGG(序列号 11)	5'GAGGTGGTGGGAGCTTGTTCGGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUUU 3' (序列号 19)
VEGF-A_Off 56	GGGCAAGGGGAGG TTGCTCCTGG(序列号 12)	5'GGGCAAGGGGAGGTTGCTCCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUUU 3' (序列号 20)
VEGF-A_Off 72	AAGTAAGGGAAGTT TGCTCCTGG(序列号 13)	5'GAAGTAAGGGAAGTTTGCTCCGUUUUAGA GCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUUU 3' (序列号 21)
FANCF	GGAATCCCTTCTGC AGCACCTGG(序列号 14)	5'GGAATCCCTTCTGCAGCACCGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUG CUUUUU 3' (序列号 22)

[0140] 实施例3:对致癌基因中高频发生的突变的诊断的确定

[0141] 常见致癌基因具有不同于正常DNA的突变,其都是野生型。具有这种致癌基因突变的片段难以观察——因为片段是以小于1%,通常小于0.01%至0.1%的比例混合在样品中,因此难以进行癌症的早期诊断。

[0142] 作为应对,通过应用本发明的新范例来确定是否可以进行这种致癌基因的突变诊断的方法作为示意图显示在图4中。

[0143] 也就是说,为了证实用于检测致癌基因(其中存在被检测患者的血浆DNA中的突变)存在的本发明新范例的方法的优越性,使用正常DNA未被切割的对照组(浓缩前)和在用RGEN切割正常DNA后仅扩增具有突变的突变致癌基因片段的测试组(浓缩后),进行限制性片段长度多态性(RFLP)和序列分析。在RFLP分析中,证实了在对照组中难以观察以小于1%

的比例混合的靶DNA片段。然而,在测试组中,作为靶DNA片段的突变致癌基因可以被容易地检测。

[0144] 此外,虽然来自序列分析的结果表明在对照组中难以观察到以小于0.01%至0.1%的比例混合的靶DNA片段,但证实了由于在测试组中,仅可以对靶DNA片段精确地进行序列分析,而容易进行观察。

[0145] 实施例4:用于检测致癌基因突变的RFLP的RGEN的制备

[0146] 本发明人尝试制备用于检测致癌基因突变的RFLP的RGEN。

[0147] 例如,研发了对正常DNA特异的RGEN和在对第12位氨基酸位置(其是在多种癌症中以高频率突变的K-RAS致癌基因的突变热点)处的突变特异的突变特异性RGEN(图5)。

[0148] 图6显示了通过实验证实实施例1的两种方法是否可以应用于具有K-RAS G123突变的癌症患者的血浆DNA的结果。如图6所示,证实了在没有假阴性等的情况下精确检测K-RAS G12S突变。

[0149] 实施例5:研发使用RGEN的非常少量的ctDNA突变的高灵敏观察技术

[0150] 接下来,靶向作为癌症特异性标志的循环肿瘤DNA(ctDNA),用于癌症的早期诊断。由于早期癌症患者中的ctDNA与正常基因混合并且以非常少的量存在于血液中,所以扩增和检测了在体液中循环的非常少量的无细胞DNA中存在的ctDNA。制备并应用仅对正常基因特异性起作用的RNA指导的工程化核酸酶(RGEN),以便仅切除正常基因,并通过PCR相对于正常基因扩增突变基因,留下含有致癌基因中频繁发生变异的DNA。之后,通过使用由进行Index PCR和靶深度测序获得的碱基序列信息,可以计算突变基因与正常基因的增加率(图7)。

[0151] 首先,为了证实通过CUT-PCR检测与高浓度正常基因混合的突变基因的可能性,各自制备含有KRAS基因的突变基因(KRAS c.35G>A,c.35G>T)(在结肠癌中具有高发生频率)的质粒和含有正常基因(KRAS c.35G)的质粒并以各种比例进行混合,而与正常基因相比,将突变基因稀释至较小比例(高达1/1000水平),进行CUT-PCR(用对正常基因特异的RGEN处理后的PCR)。切割正常KRAS基因,并计算扩增的正常KRAS基因与内部对照的比例。此外,在将高频率发生的致癌突变基因稀释至关于正常基因的1/1000比例后,并在其浓度下计算通过CUT-PCR的突变基因的增加比例。对正常基因特异的RGEN的靶碱基序列和sgRNA的碱基序列显示在下表3中。

[0152] [表3]

[0153]

标签名称	靶碱基序列	RNA 碱基序列 (5' → 3')
KRAS 野生型	AAACTTGTGGTAGT TGGAGCTGG (序列号 23)	5'GGAAACTTGTGGTAGTTGGAGCGUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGU CGGUGCUUUUU 3' (序列号 24)

[0154] 结果,与用对照组引物扩增的产物相比,当扩增KRAS基因时,证实了针对正常基因特异性制备的RGEN对正常基因适当地起作用(图8)。此外,当通过深度测序分析发生的扩增产物变异的区域时,KRAS突变基因——尽管稀释至与正常基因1/1000的比例——被扩增达30至40倍,并且被准确检测(图9,表4)。

[0155] [表4]

[0156] RGEN处理前后变异率(%)的比较

[0157]

RGEN 靶序列	变异类型	RGEN 处理前的变异基因 (%)	RGEN 处理后的变异基因 (%)	变异的增加比例
AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT GG (序列号 25)	KRAS 野生型	0%	0%	~
AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>G</u>A (序列号 26)	KRAS c.35G>A	0.27%	8.02%	13.71
AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>G</u>T (序列号 27)	KRAS c.35G>T	0.14%	8.53%	14.64
AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>T</u>G (序列号 28)	KRAS c.34G>T	0.96%	21.19%	35.78
AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>G</u>C (序列号 29)	KRAS c.35G>C	0.62%	15.08%	26.69
AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>C</u>G (序列号 30)	KRAS c.34G>C	0.93%	21.57%	37.41

[0158] <显示出结肠癌变异中具有最高发生频率的前5个单碱基置换变异的碱基序列信息,以及使用识别为PAM的区域的变异仅能够切割正常基因的sgRNA的靶碱基序列信息。计算在处理对正常基因特异的RGEN前后每个变异的增加率。粗体:PAM碱基序列;下划线:由置换引起的变异>

[0159] 质粒确认后,同样在从人血浆中获得的无细胞DNA (cfDNA) 中进行用于检测含有癌症特异性基因变异的ctDNA的实验。由于血浆中含有的ctDNA的量非常少,所以通过重复CUT-PCR过程(对正常基因特异的RGEN的处理(表5)和PCR扩增)来扩增突变基因。结果,与从正常个体获得的样品相比,在从结肠癌患者获得的样品中检测到高频率发生的KRAS变异(c.35G>A(高达192倍)和c.35G>T(高达79倍))(图10)。与通过现有的焦磷酸测序法测量的那些结果相比,CUT-PCR扩增的结果显示出显著增加的灵敏度(表5)。

[0160] [表5]

[0161]

样品编号	ID 编号	类型	疾病期	检测的变异类型 (CUT-PCR)	检测的变异类型 (焦磷酸测序)
1	01-1 40707-1	结肠癌	IIIB	GGT>GTT:p.G12V	野生型 GGT
2	01-1 40707-3	结肠癌	I	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	野生型 GGT
3	01-1 40708-5	结肠癌	IIIA	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	野生型 GGT
4	01-1 40717-2	结肠癌	IIIB	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	GGT>GCT:p.G12A
5	01-1 40718-1	结肠癌	IIIC	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	野生型 GGT
6	01-1 40827-3	结肠癌	IIIB	GGT>GTT:p.G12V	野生型 GGT
7	01-1 40811-3	结肠癌	IIIB	GGT>GTT:p.G12V, GGT>GAT:p.G12D	野生型 GGT
8	01-1 40812-5	结肠癌	IIA	野生型 GGT	野生型 GGT
9	01-1 41016-1	正常个体	无	野生型 GGT	野生型 GGT
10	01-1 41016-9	正常个体	无	野生型 GGT	野生型 GGT

[0162] 实施例6:使用dCas9:gRNA复合物浓缩靶DNA

[0163] 在本发明中,为了纯化特定基因型DNA,使用由指导RNA和失活Cas9核酸酶蛋白组成的失活RGEN (dCas9:gRNA复合物)。Cas9蛋白具有用于纯化的组氨酸标签 (His标签),并通过使用选择性结合His标签的Ni-NTA磁珠,可以仅选择性纯化dCas9蛋白。此外,通过利用dCas9-蛋白-sgRNA复合物 (不具有能够特异性结合DNA碱基序列的核酸酶活性) 的性质可以仅选择性地纯化所需靶DNA (图11)。

[0164] 实施例6-1:质粒片段的分离

[0165] 为了证实可以通过由指导RNA和失活Cas9核酸酶蛋白组成的失活RGEN (dCas9:gRNA复合物) 来仅分离所需靶DNA,用限制酶 (SpeI、XmaI和XhoI) 消化质粒 (pUC19),从而可以通过大小来区分质粒,并制备出大小为4134bp、2570bp和1263bp的质粒DNA片段。

[0166] 此外,针对上述程序中切割的每一种质粒DNA片段制备两种sgRNA (4134bp_sg#1、4134bp_sg#2、2570bp_sg#1、2570bp_sg#2、1263bp_sg#1和1263bp_sg#2),并使用对应于每一种靶DNA的每一种sgRNA或其组合 (4134bp_sg#1+2、2570bp_sg#1+2和1263bp_sg#1+2) 进行纯化过程。每一种sgRNA碱基序列显示在下表6中。

[0167] [表6]

[0168]

sgRNA	靶碱基序列	PAM 碱基序列
4134bp_sg#1	GAGAACCAGACCACCCAGAA(序列号 31)	GGG
4134bp_sg#2	GGCAGCCCCGCCATCAAGAA(序列号 32)	GGG
2570bp_sg#1	GTAAGATGCTTTTCTGTGAC(序列号 33)	TGG
2570bp_sg#2	GATCCTTTGATCTTTTCTAC(序列号 34)	GGG
1270bp_sg#1	GCCTCCAAAAAAGAAGAGAA(序列号 35)	AGG
1270bp_sg#2	TGACATCAATTATTATACAT(序列号 36)	CGG

[0169] *除了T为U,sgRNA序列与靶碱基序列完全相同。

[0170] 然后,将总共200 μ L的摩尔浓度比为DNA:dCas9蛋白:sgRNA=1:20:100的混合溶液进行混合并制备,随后在37 $^{\circ}$ C下反应1小时30分钟。然后将该溶液与50 μ L能够特异性结合组氨酸标签的Ni-NTA磁珠混合,并用200 μ L洗涤缓冲液洗涤两次后,使用200 μ L洗脱缓冲液(Bioneer,K-7200)纯化dCas9-sgRNA-靶DNA复合物。

[0171] 然后,以0.2mg/mL的浓度添加核糖核酸酶A(Amresco,E866),随后在37 $^{\circ}$ C下反应2小时,并以0.2mg/mL的浓度添加蛋白酶K(Bioneer,1304G),随后在55 $^{\circ}$ C下反应45分钟。在除去sgRNA和dCas9蛋白后,通过乙醇纯化仅纯化靶DNA。

[0172] 结果,当分别使用对应于靶蛋白的每一种sgRNA时,并且当混合并使用用于靶蛋白的两种类型的sgRNA时,在所有情况下,证实了从3种DNA片段通过大小仅分离所需靶DNA片段(图13)。

[0173] 此外,当使用总共四种sgRNA(两种sgRNA对应于两种靶DNA中的每一种)一起纯化多种靶DNA时,证实了对应于所使用的sgRNA的靶DNA被混合并纯化(图14)。

[0174] 纯化每种质粒DNA片段的结果显示在图15中。由此,证实了每种靶DNA被纯化为95%以上的纯度。

[0175] 实施例6-2.目标外显子的选择性分离的确认

[0176] 接下来,为了确认通过由指导RNA和失活Cas9核酸酶蛋白组成的失活RGEN(dCas9:sgRNA复合物)能够纯化实际细胞的基因组DNA(gDNA)上的外显子,提取HeLa细胞和SW480细胞gDNA并切割成大小为400bp的片段,并进行纯化靶外显子的实验。

[0177] 具体地,靶向癌细胞的TP53基因的外显子,并将三种sgRNA用于每种靶外显子。每种sgRNA的序列显示在下表7中。在与实施例6-1相同的条件下纯化靶DNA。

[0178] [表7]

[0179]

sgRNA	靶碱基序列	PAM
外显子 1_sg#1	GGGACACTTTGCGTTCGGGC (序列号 37)	TGG
外显子 1_sg#2	AACTCTAGAGCCACCGTCCA (序列号 38)	GGG
外显子 1_sg#3	AGCGCCAGTCTTGAGCACAT (序列号 39)	GGG
外显子 2&3_sg#1	GATCCACTCACAGTTTCCAT (序列号 40)	AGG
外显子 2&3_sg#2	GTGGGAAGCGAAAATCCAT (序列号 41)	GGG
外显子 2&3_sg#3	CTCAGAGGGGGCTCGACGCT (序列号 42)	AGG
外显子 4_sg#1	CTTCCCACAGGTCTCTGCTA (序列号 43)	GGG
外显子 4_sg#2	TGGTGGGCCTGCCCTTCCAA (序列号 44)	TGG
外显子 4_sg#3	CTTCCGGGTCACTGCCATGG (序列号 45)	AGG
外显子 5_sg#1	AGAGTTGGCGTCTACACCTC (序列号 46)	AGG
外显子 5_sg#2	GAATCAACCCACAGCTGCAC (序列号 47)	AGG
外显子 5_sg#3	CGGCACCCGCGTCCGCGCCA (序列号 48)	TGG
外显子 6_sg#1	CTCGGATAAGATGCTGAGGA (序列号 49)	GGG
外显子 6_sg#2	CACTTTTCGACATAGTGTTG (序列号 50)	TGG
外显子 6_sg#3	AAATTTGCGTGTGGAGTATT (序列号 51)	TGG
外显子 7_sg#1	GGAGTCTTCCAGTGTGATGA (序列号 52)	TGG
外显子 7_sg#2	CATGTAGTTGTAGTGGATGG (序列号 53)	TGG
外显子 7_sg#3	GCATGGGCGGCATGAACCGG (序列号 54)	AGG
外显子 8_sg#1	ACTGGGACGGAACAGCTTTG (序列号 55)	AGG
外显子 8_sg#2	GATTCCTTCCCTCTGTGCGC (序列号 56)	CGG
外显子 8_sg#3	GGTGAGGCTCCCTTTCTTG (序列号 57)	CGG
外显子 9_sg#1	GTGAAATATTCTCCATCCAG (序列号 58)	TGG
外显子 9_sg#2	GGGAGAGGAGCTGGTGTGT (序列号 59)	TGG
外显子 10_sg#1	TCTCGAAGCGCTCACGCCCA (序列号 60)	CGG
外显子 10_sg#2	GAACTCAAGGATGCCAGGC (序列号 61)	TGG
外显子 11_sg#1	CAATCAGCCACATTCTAGGT (序列号 62)	AGG

[0180]

外显子 11_sg#2	CTAGAACTTGACCCCCTTGA (序列号 63)	GGG
外显子 11_sg#3	GATGAAATCCTCCAGGGTGT (序列号 64)	GGG

[0181] *除了T为U,sgRNA序列与靶碱基序列完全相同。

[0182] 然后,为了证实靶外显子是否被纯化,进行实时定量PCR,以测量样品中靶DNA的量。结果,证实了每个外显子实际上被扩增,并证实与其它外显子相比,靶外显子区域被扩增高达约2至20倍(图16)。

[0183] 实施例7:通过分类相似序列的致病性细菌DNA的诊断的确认

[0184] 本发明人尝试证实是否能对难以根据现有分子诊断方法通过分类来诊断的高等同性(equivalence)的序列进行分类。例如,由于致病性细菌/病毒和非致病性细菌/病毒具有非常相似的序列,图17中作为示意图说明了通过应用本发明的新范例来确认是否可以通

过分类致病性和非致病性细菌来进行诊断的方法。

[0185] 也就是说,当一起简单扩增非致病性细菌DNA和致病性细菌DNA时,由于序列相似性而发生非特异性扩增,从而不能区分非致病性细菌DNA和致病性细菌DNA(图17顶部)。

[0186] 然而,通过使用对非致病性细菌DNA特异的指导RNA(其引起对受试者的正常反应);和Cas9核酸酶蛋白切割后进行扩增,并且通过使用由对致病性细菌DNA特异的指导RNA和失活Cas9核酸酶蛋白(死亡Cas9蛋白)组成的RGEN,当进行通过捕获致病性细菌DNA的扩增时,证实可以特异性地仅扩增由于具有相似序列而不容易区分的致病性细菌DNA(图17下部)。

[0187] 上述结果表明,本发明的分析基因型的新方法——具体地,其中与现有的分析基因型的方法不同,RGEN通过切割正常DNA除去样品中的正常DNA,然后仅扩增靶DNA,或仅捕获并扩增靶DNA——可以在无假阳性/阴性的情况下进行准确分析,不同于现有PCR方法等。

[0188] 由前述内容,本发明所属的本领域技术人员将能够理解,在不改变本发明的技术概念或本质特征的情况下,可以以其它具体形式体现本发明。在这方面,本文所公开的示例性实施方式仅用于说明性目的,并且不应被解释为限制本发明的范围。相反,本发明旨在不仅覆盖示例性实施方式,而且覆盖可以包括在由所附权利要求限定的本发明的精神和范围内的各种取代、修饰、等价物和其它实施方式。

[0001]

Z16111408CPCN-squence.txt

<110> 株式会社图尔金
基础科学研究院

<120> 使用靶特异性核酸酶灵敏检测靶DNA的方法

<130> OPA15082-PCT

<150> KR 10-2014-0064526

<151> 2014-05-28

<160> 64

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VEGFA_Off3

<400> 1

ggggagggga agtttgetcc tgg

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VEGFA_Off5

<400> 2

cgggggaggg agtttgetcc tgg

23

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> VEGFA_Off27

<400> 3

ggaggagggg agtctgetcc agg

23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

[0002]

- <213> 人工序列
 <220>
 <223> VEGFA_Off16

 <400> 4
 ggtgggggtg ggtttgctcc tgg 23

 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> VEGFA_Off15

 <400> 5
 gagtgggtgg agtttgctac agg 23

 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> VEGFA_Off72

 <400> 6
 aagtaaggga agtttgctcc tgg 23

 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> VEGFA_Off3

 <400> 7
 ggggagggga agtttgctcc tgg 23

 <210> 8
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> VEGFA_Off5

[0003]

<400> 8
ggaggagggg agtttgctcc agg 23

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VEGFA_Off27

<400> 9
ggtaggggtg agtttgctcc tgg 23

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VEGFA_Off16

<400> 10
gagtaggttg agtttgctcc agg 23

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VEGFA_Off15

<400> 11
agtaggtggg agtttgctcc tgg 23

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> VEGFA_Off56

<400> 12
gggcaagggg agtttgctcc tgg 23

[0004]

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VEGFA_Off72

<400> 13
 aagtaaggga agtttgetcc tgg 23

<210> 14
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FANCF

<400> 14
 ggaatccett ctgcagcacc tgg 23

<210> 15
 <211> 101
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VEGF-A_Off3

<400> 15
 ggggagggga agtttgctcc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu u 101

<210> 16
 <211> 101
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VEGF-A_Off5

<400> 16
 ggaggagggg agtctgetcc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu u 101

[0005]

<210> 17
 <211> 101
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VEGF-A_Off27

<400> 17
 ggtgggggtg ggtttgctcc guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu u 101

<210> 18
 <211> 101
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VEGF-A_Off16

<400> 18
 gagggggtgg agtttgctac guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu u 101

<210> 19
 <211> 102
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VEGF-A_Off15

<400> 19
 gagggtgggtg gagcttgctc cguuuuagag cuagaaaauag caaguuaaaa uaaggcuagu 60
 ccguuaucac cuagaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uu 102

<210> 20
 <211> 101
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VEGF-A_Off56

[0006]

<400> 20
 gggcaagggg aggttgctcc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu u 101

<210> 21
 <211> 102
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> VEGF-A_Off72

<400> 21
 gaagtaaggg aagtttgctc cguuuuagag cuagaaauag caaguuaaaa uaaggcuagu 60
 ccguuaucac cuugaaaaag uggcaccgag ucggugcuuu uu 102

<210> 22
 <211> 101
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> FANCF

<400> 22
 ggaatccett ctgcagcacc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc 60
 cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu u 101

<210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> KRAS 野生型

<400> 23
 aaacttgtgg tagttggagc tgg 23

<210> 24
 <211> 103
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> KRAS 野生型

[0007]

<400> 24
 ggaaacttgt ggtagttgga gcguuuuaga gcuagaaaaua gcaaguuaaa auaaggcuag 60
 uccguuauca acungaaaaa guggcaccga gucggugcuu uuu 103

<210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> KRAS 野生型

<400> 25
 aaacttgtgg tagttggagc tgg 23

<210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> KRAS c. 35G>A

<400> 26
 aaacttgtgg tagttggagc tga 23

<210> 27
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> KRAS c. 35G>T

<400> 27
 aaacttgtgg tagttggagc tgt 23

<210> 28
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> KRAS c. 34G>T

[0008]

<400>	28		
		aaacttgtgg tagttggagc ttg	23
<210>	29		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	KRAS c. 35G>C		
<400>	29		
		aaacttgtgg tagttggagc tgc	23
<210>	30		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	KRAS c. 34G>C		
<400>	30		
		aaacttgtgg tagttggagc tcg	23
<210>	31		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	4134bp_sg#1		
<400>	31		
		gagaaccaga ccaccagaa	20
<210>	32		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	4134bp_sg#2		
<400>	32		
		ggcagccccg ccatcaagaa	20

[0009]

<210>	33	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	2570bp_sg#1	
<400>	33	
	gtaagatgct tttctgtgac	20
<210>	34	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	2570bp_sg#2	
<400>	34	
	gatcctttga tcttttctac	20
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	1270bp_sg#1	
<400>	35	
	gcctccaaaa aagaagagaa	20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	1270bp_sg#2	
<400>	36	
	tgacatcaat tattatacat	20
<210>	37	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0010]

<220>

<223> 外显子1_sg#1

<400> 37

gggacacttt gcgttcgggc

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子1_sg#2

<400> 38

aactctagag ccaccgteca

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子1_sg#3

<400> 39

agegccagtc ttgagcaat

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子2&3_sg#1

<400> 40

gatccaetca cagttteat

20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子2&3_sg#2

[0011]

<400> 41
gtgggaagcg aaaattccat 20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外显子2&3_sg#3

<400> 42
ctcagagggg gctcgacgct 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外显子4_sg#1

<400> 43
cttcccacag gtctctgcta 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外显子4_sg#2

<400> 44
tggtgggect gcccttcaa 20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外显子4_sg#3

<400> 45
cttccgggtc actgcatgg 20

[0012]

<210>	46	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	外显子5_sg#1	
<400>	46	
	agagttggcg tctacacctc	20
<210>	47	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	外显子5_sg#2	
<400>	47	
	gaatcaacce acagetgcac	20
<210>	48	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	外显子5_sg#3	
<400>	48	
	cggcaccegc gtccgcgcca	20
<210>	49	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	外显子6_sg#1	
<400>	49	
	ctcggataag atgctgagga	20
<210>	50	
<211>	20	
<212>	DNA	

[0013]

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子6_sg#2

<400> 50

eacttttcga catagtgtgg

20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子6_sg#3

<400> 51

aaatttgcgt gtggagtatt

20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子7_sg#1

<400> 52

ggagtcttcc agtgtgatga

20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子7_sg#2

<400> 53

catgtagttg tagtggatgg

20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子7_sg#3

[0014]

<400> 54
gcatgggcgg catgaaccgg 20

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外显子8_sg#1

<400> 55
actgggacgg aacagctttg 20

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外显子8_sg#2

<400> 56
gattctcttc ctctgtgcgc 20

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外显子8_sg#3

<400> 57
ggtgaggctc ccctttcttg 20

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 外显子9_sg#1

<400> 58
gtgaaatatt ctccatccag 20

[0015]

<210>	59	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	外显子9_sg#2	
<400>	59	
	gggagaggag ctggtgttgt	20
<210>	60	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	外显子10_sg#1	
<400>	60	
	tctcgaagcg ctcacgccca	20
<210>	61	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	外显子10_sg#2	
<400>	61	
	gaactcaagg atgcccaggc	20
<210>	62	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	外显子11_sg#1	
<400>	62	
	caatcagcca cattctaggt	20
<210>	63	
<211>	20	

[0016]

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子11_sg#2

<400> 63

ctagaacttg aceccettga

20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 外显子11_sg#3

<400> 64

gatgaaatcc tccaggtgt

20

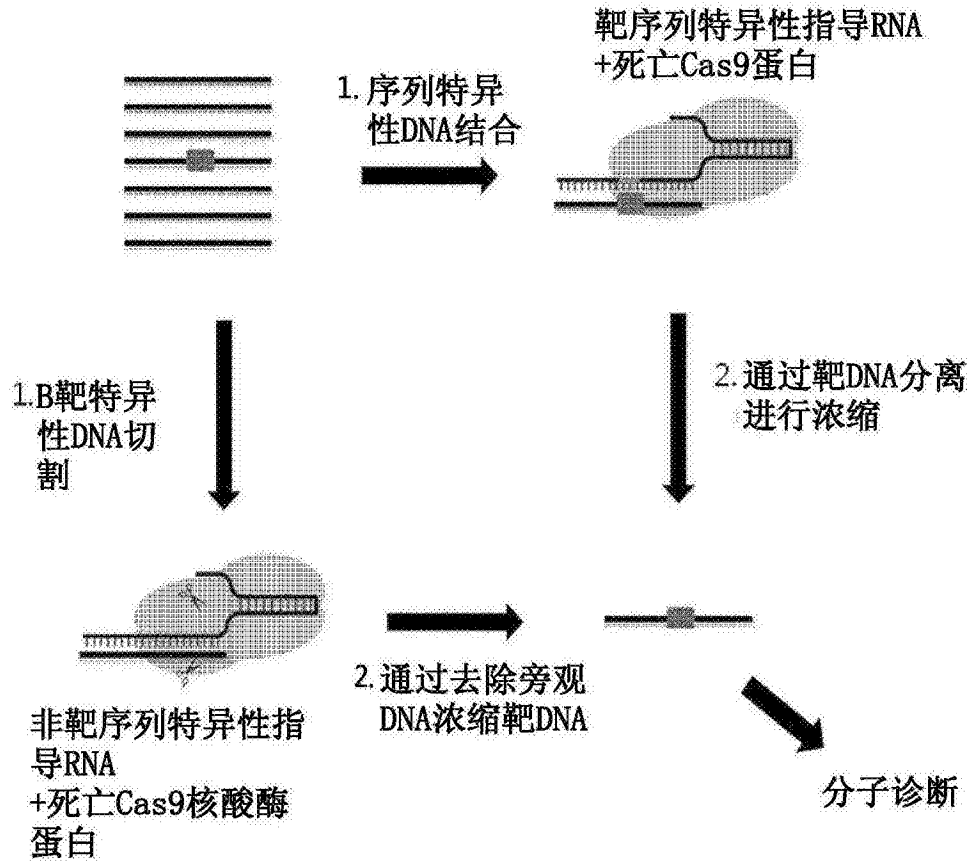


图1

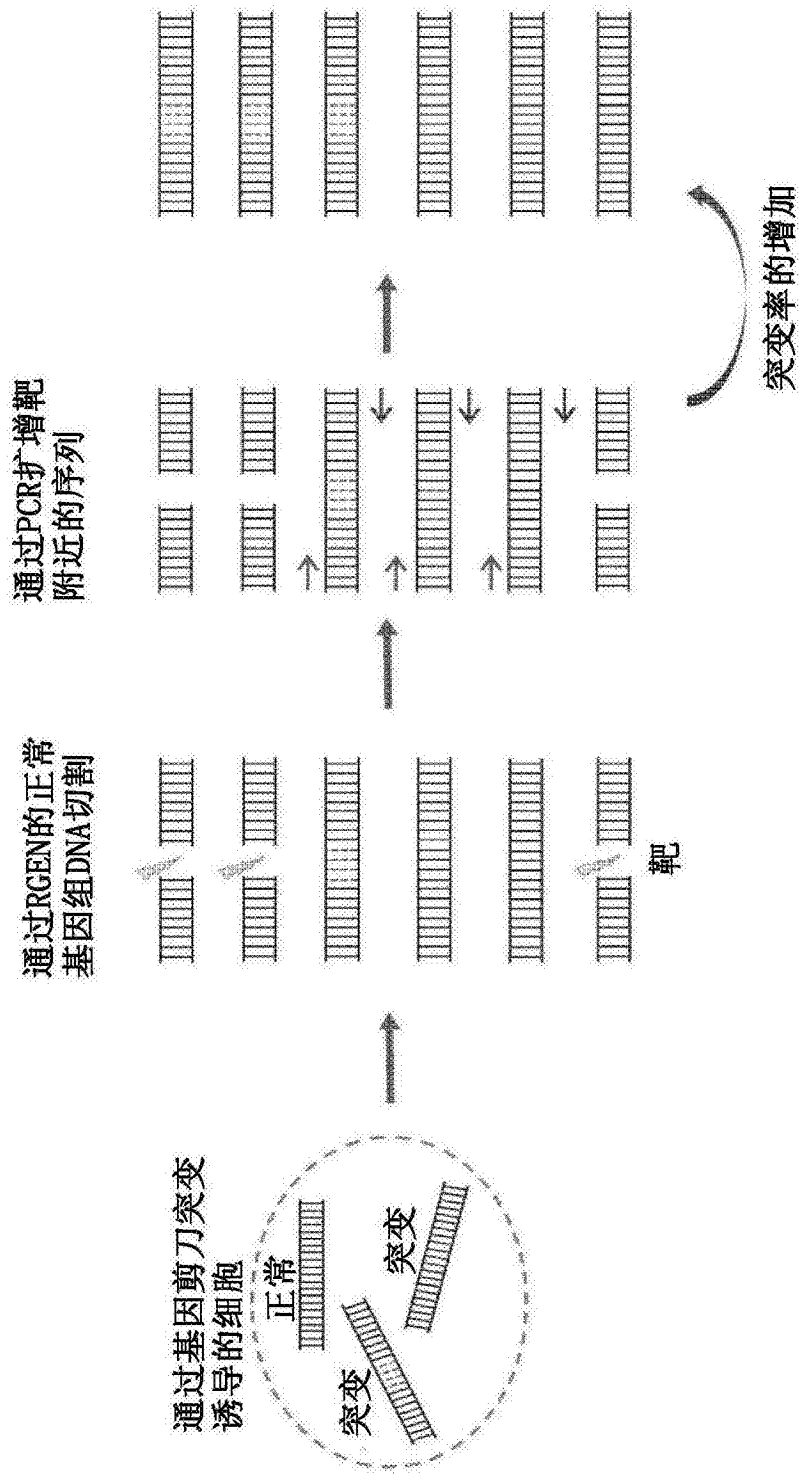


图2

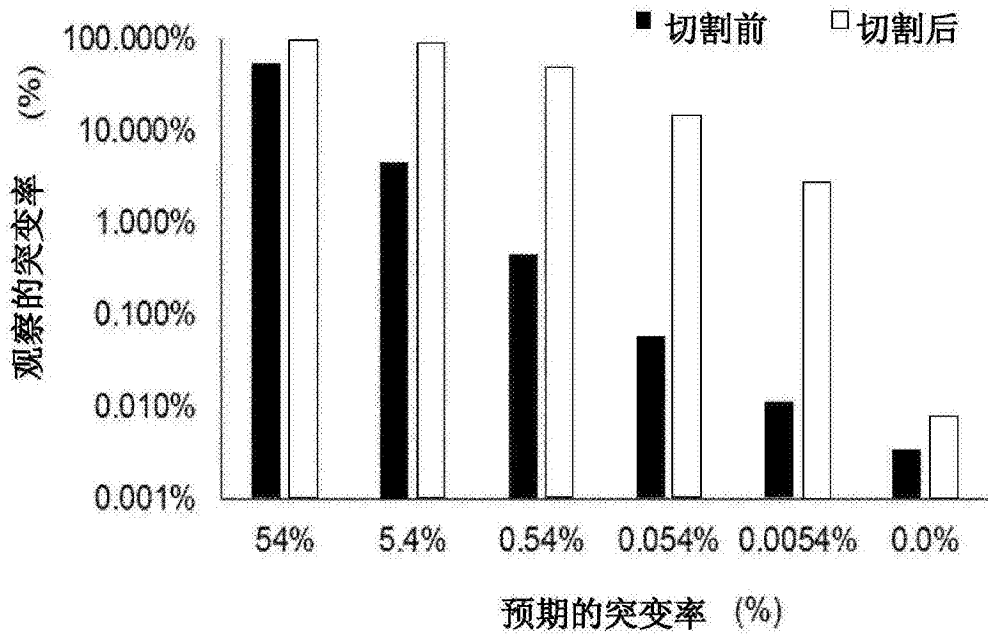


图3

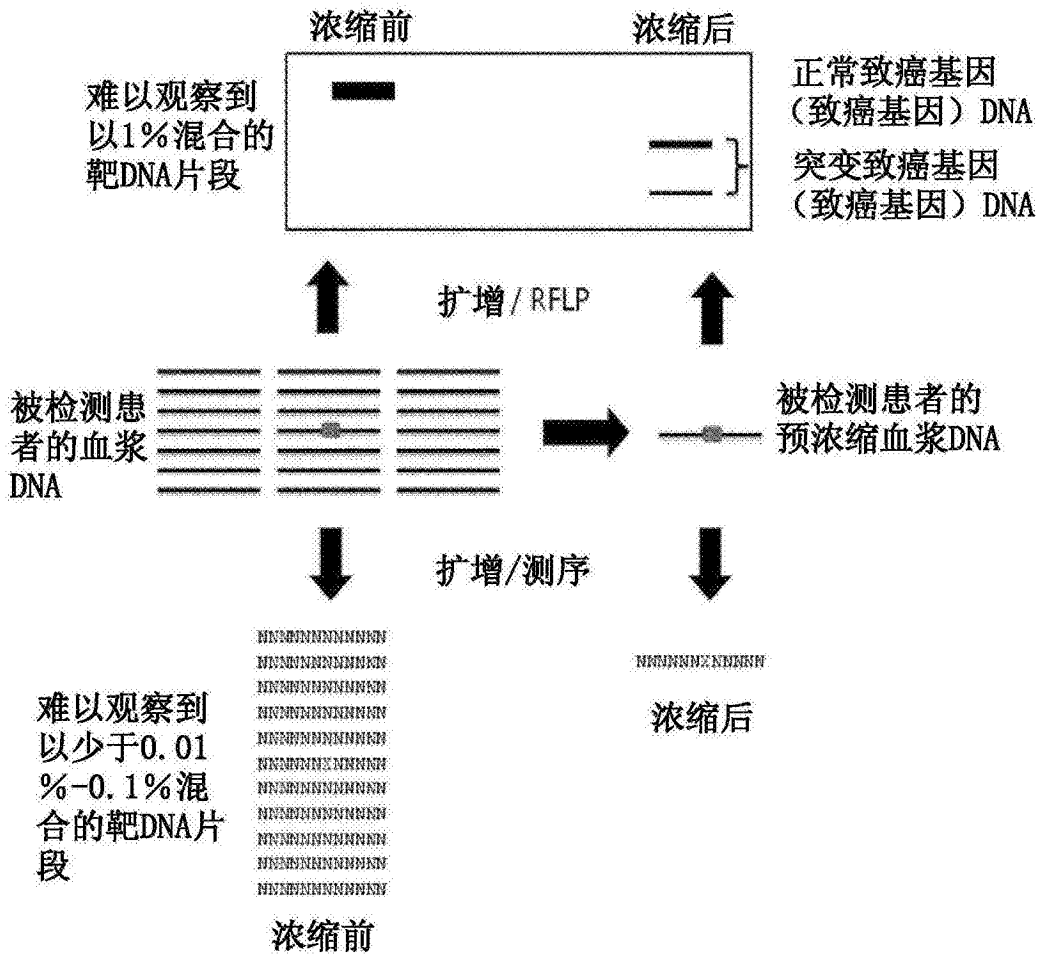


图4

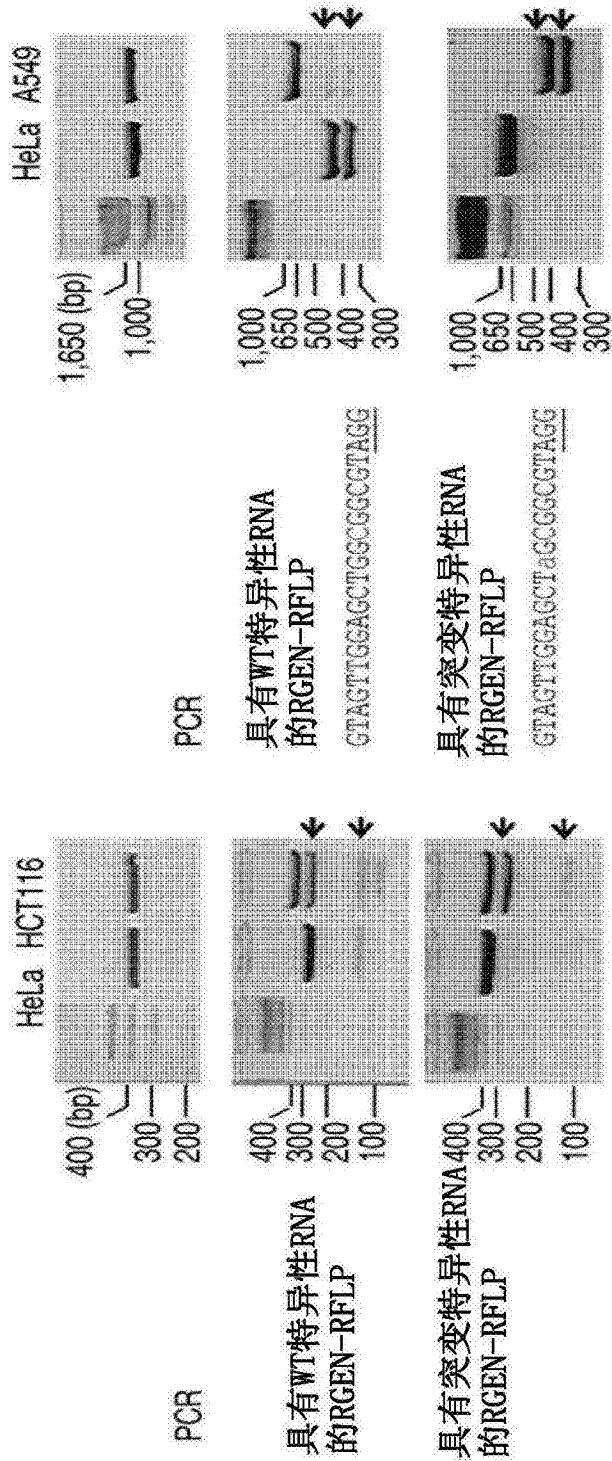


图5

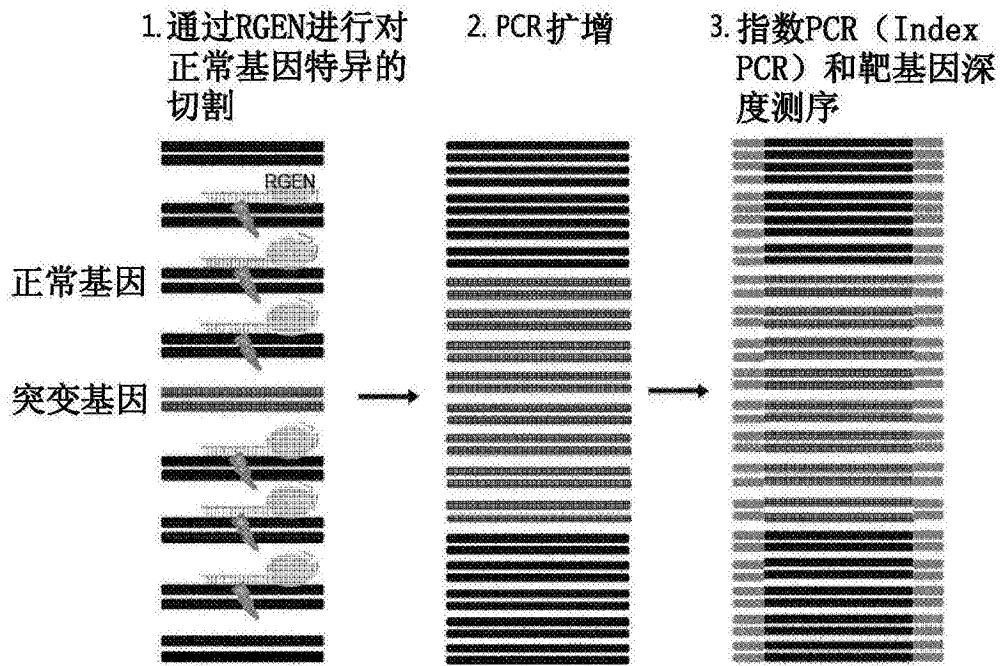


图7

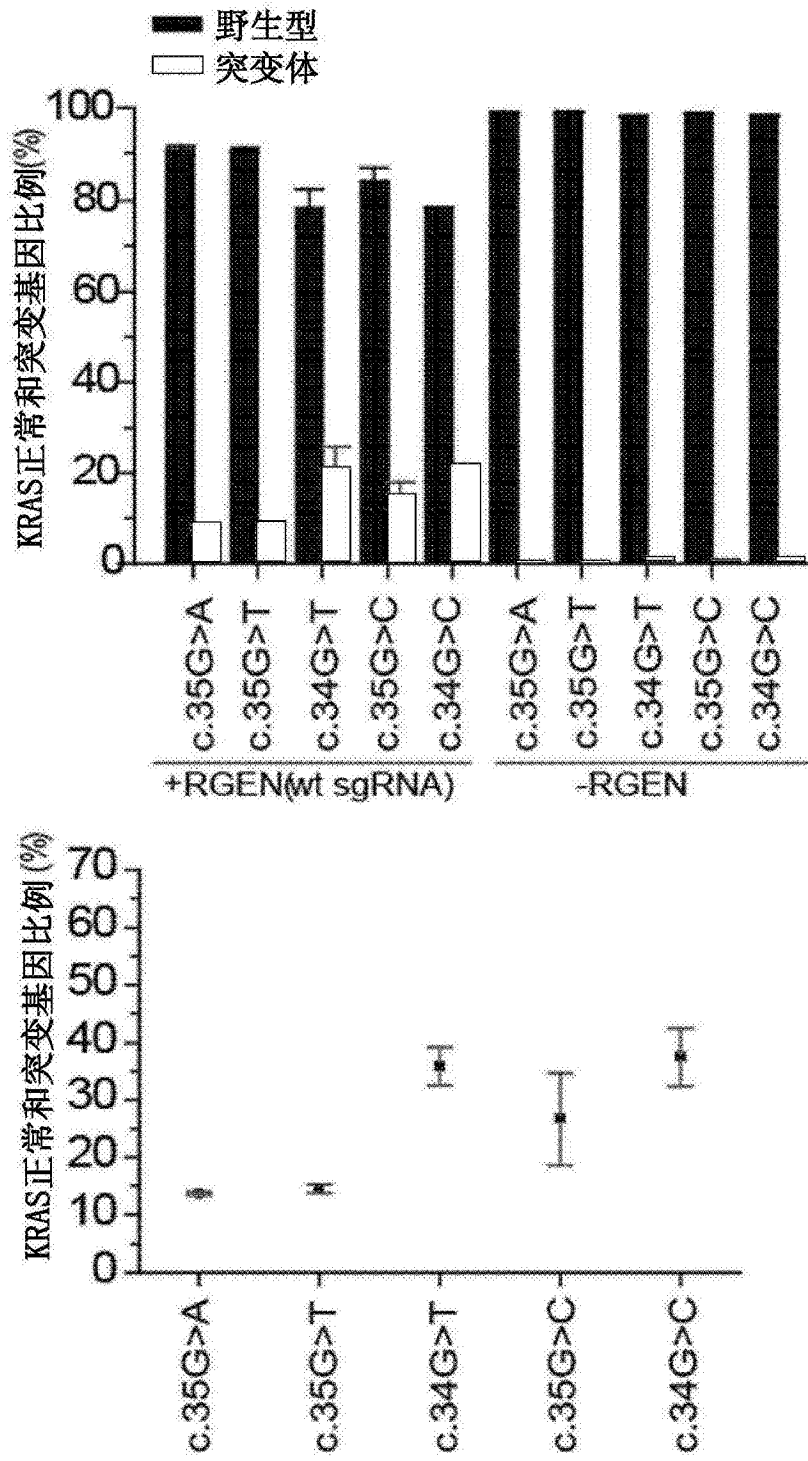


图9

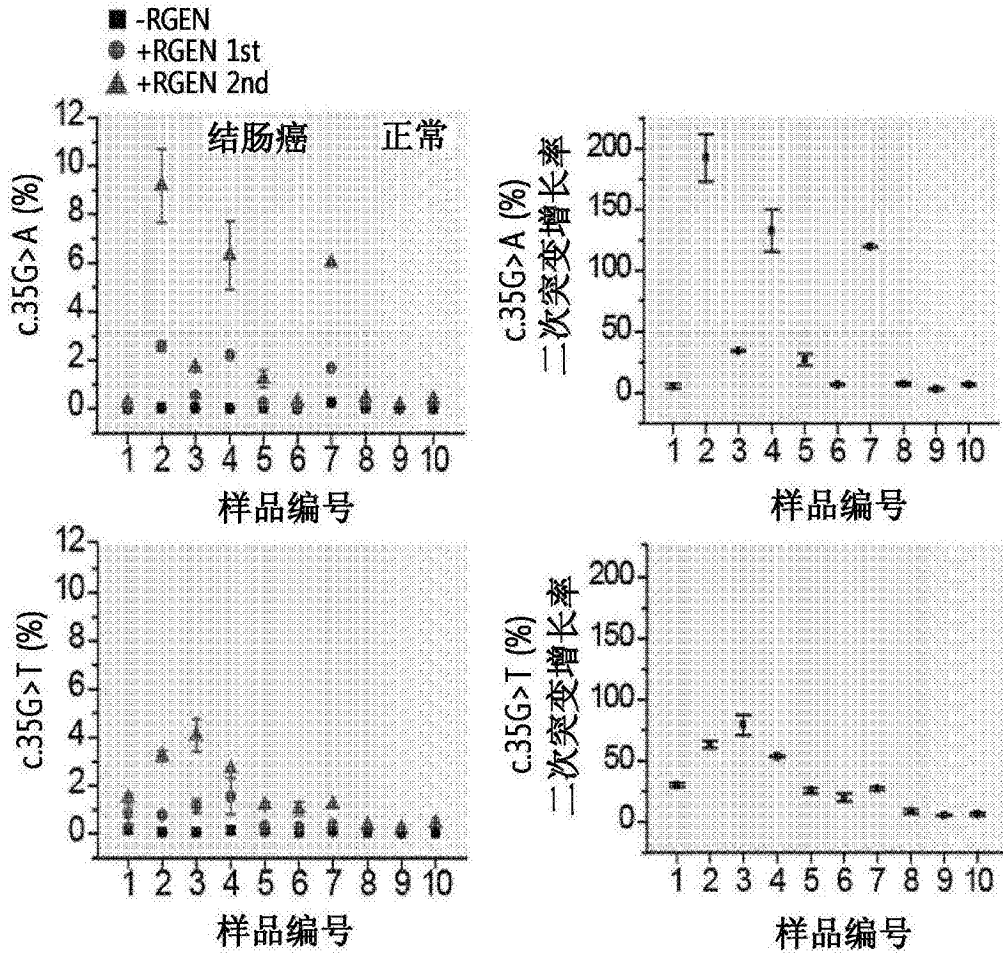


图10

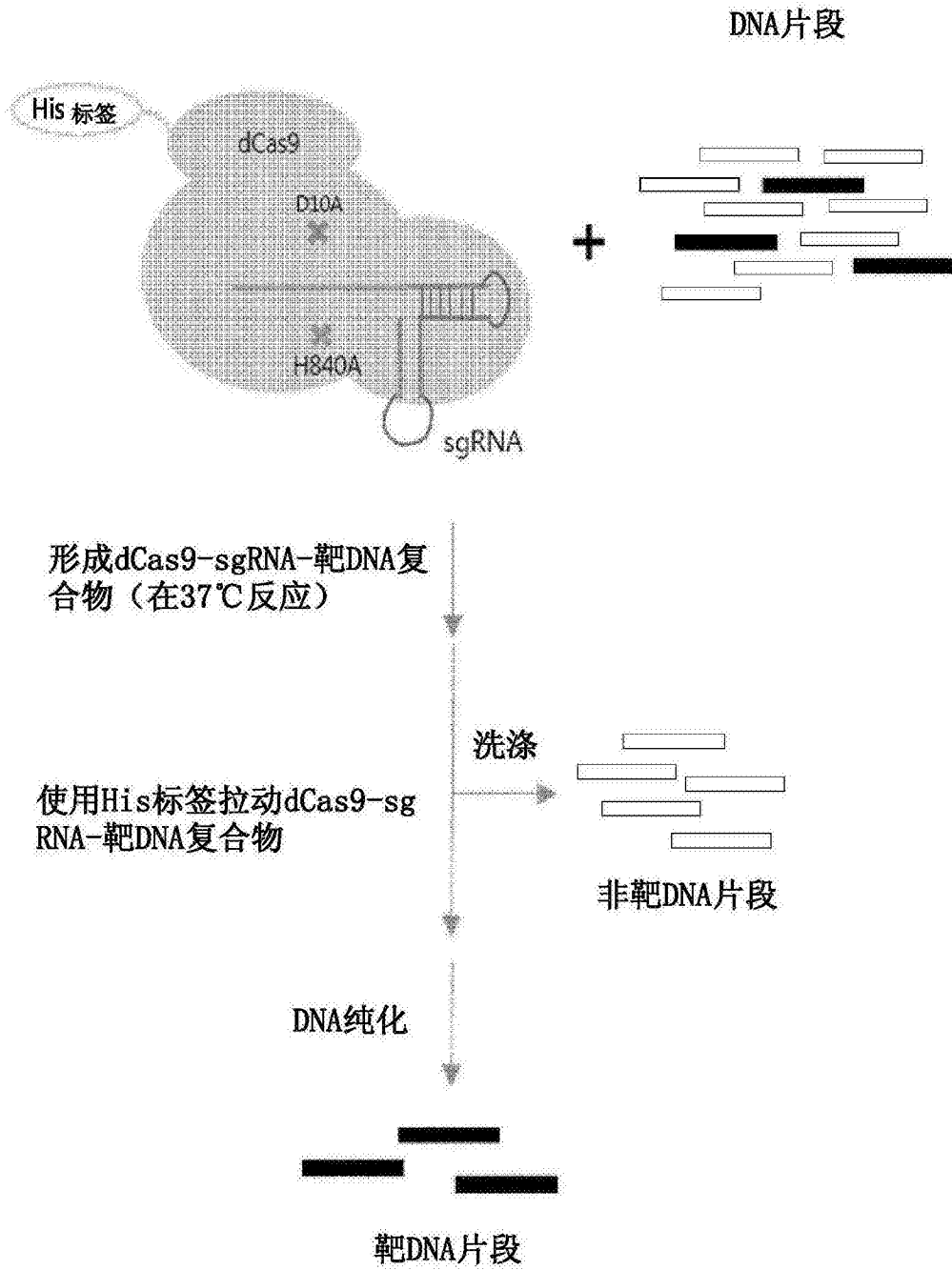


图11

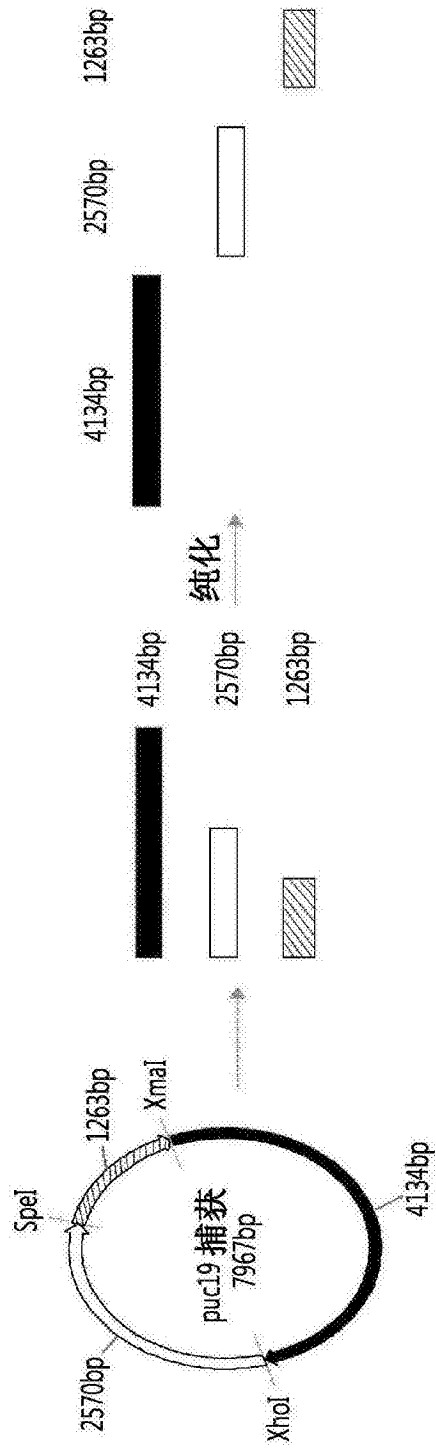


图12

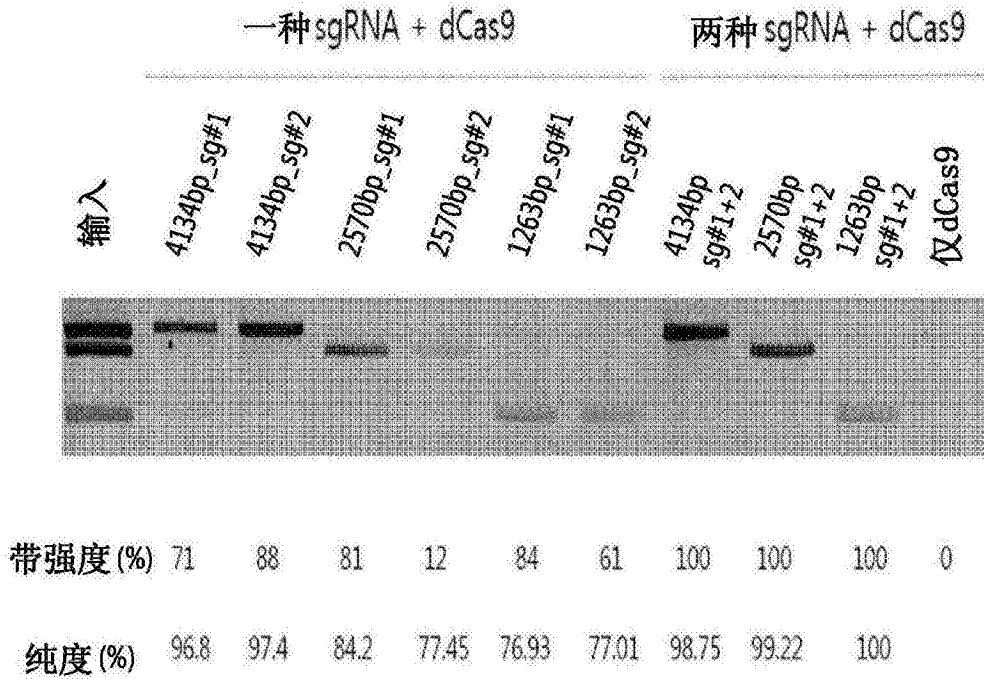


图13

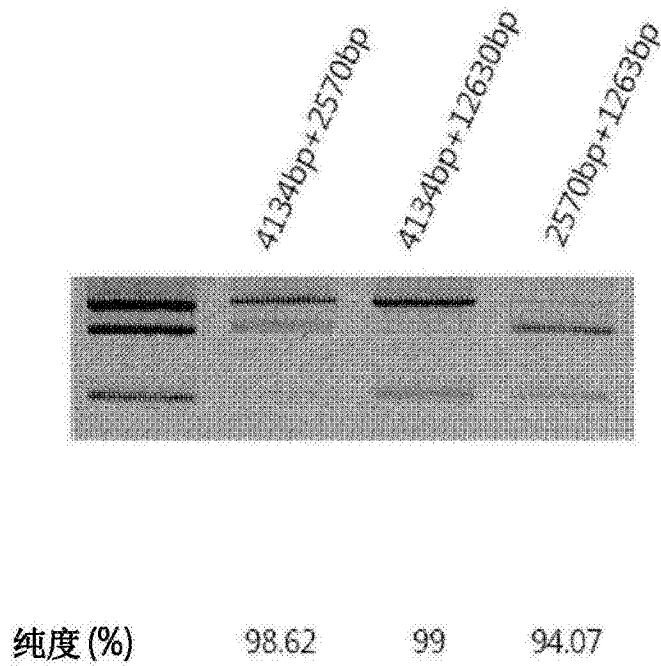


图14

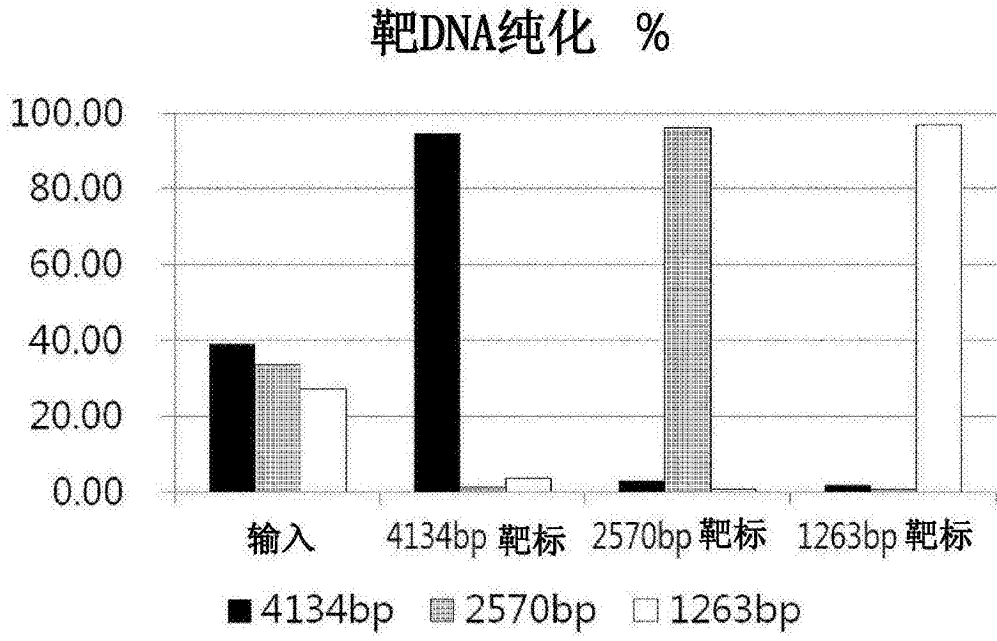


图15

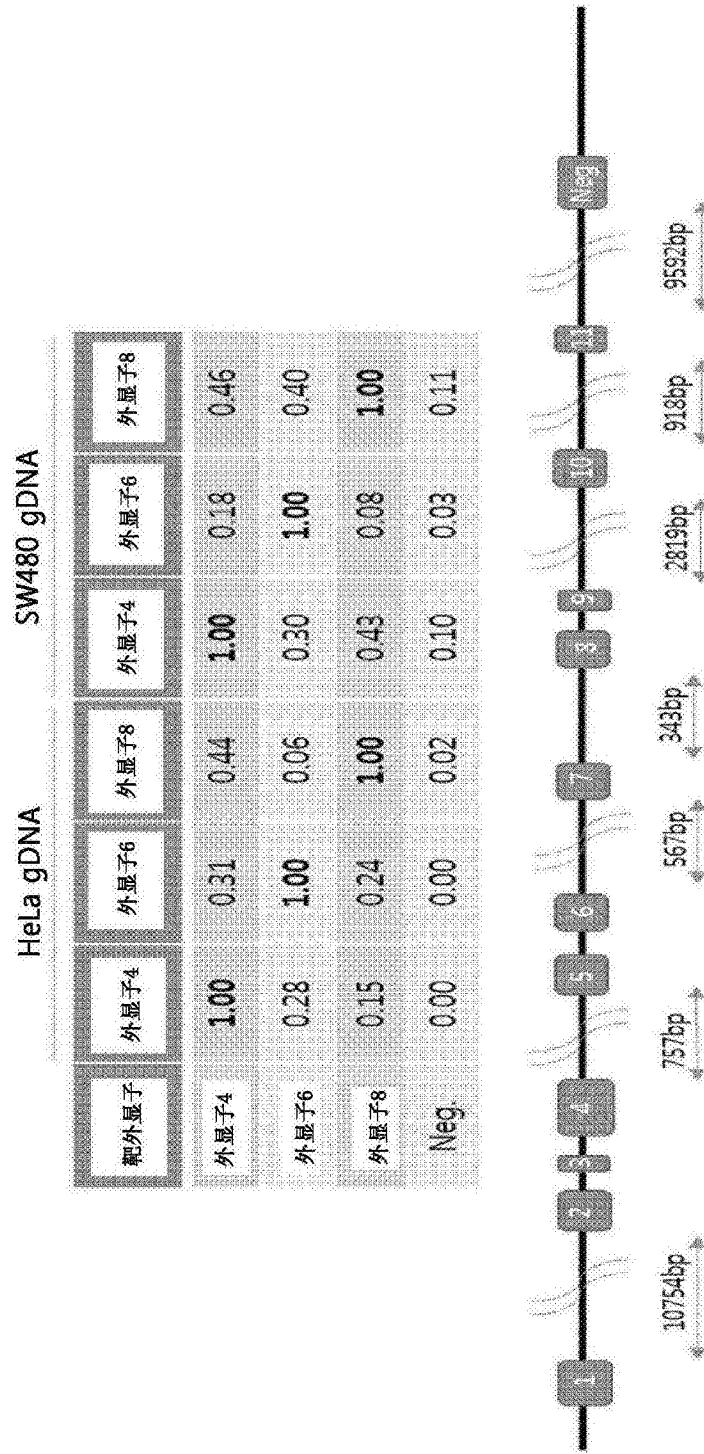


图16

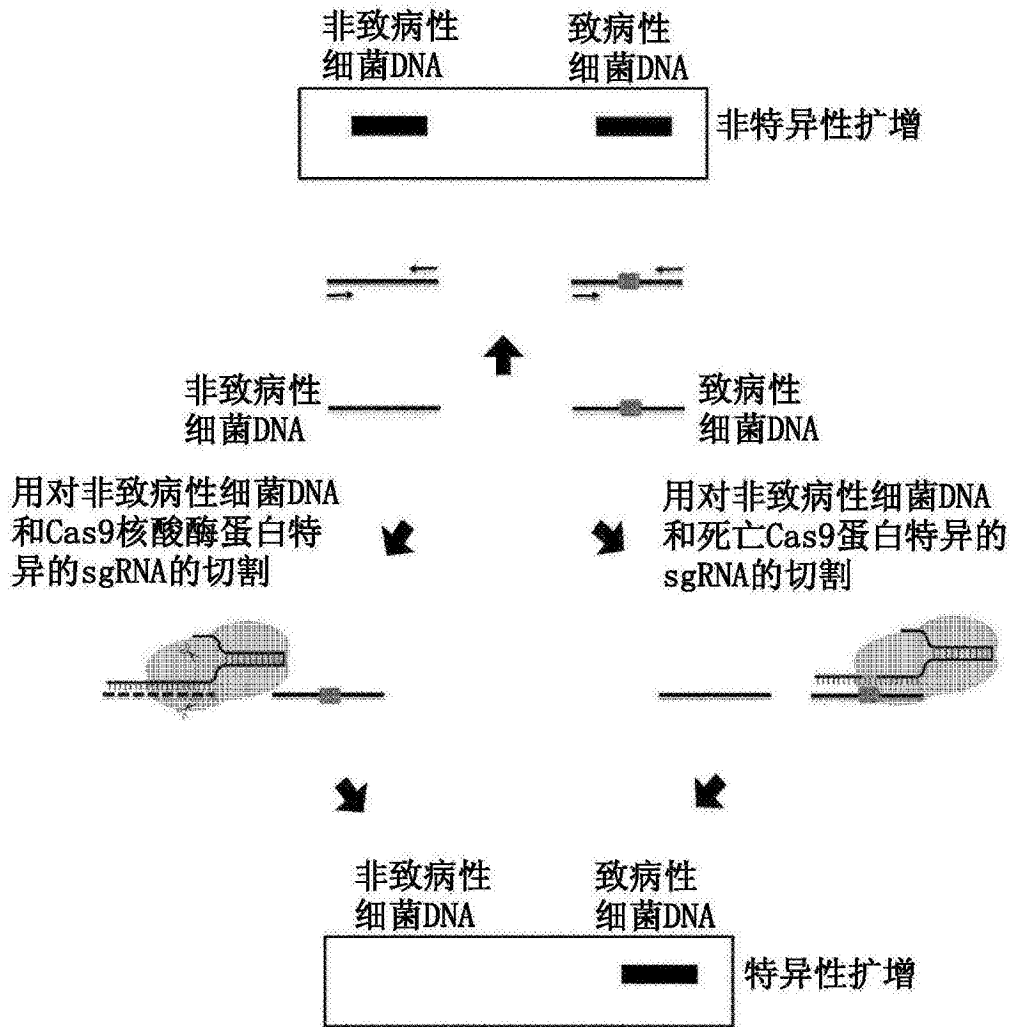


图17

专利名称(译)	使用靶特异性核酸酶灵敏检测靶DNA的方法		
公开(公告)号	CN106687601A	公开(公告)日	2017-05-17
申请号	CN201580040520.8	申请日	2015-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社图尔金 基础科学研究院		
申请(专利权)人(译)	株式会社图尔金 基础科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社图尔金 基础科学研究院		
[标]发明人	金晋秀 金素贞 李承桓 金奭中		
发明人	金晋秀 金素贞 李承桓 金奭中		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574 C12Q1/6844 C12Q2521/301		
代理人(译)	王永伟		
优先权	1020140064526 2014-05-28 KR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及使用靶特异性核酸酶分析基因型的方法，具体地，涉及通过使用靶特异性核酸酶或其变体去除野生型DNA或特定基因型DNA以仅扩增或浓缩少量具有变异(如突变)或基因型差异的DNA来诊断癌症或分析基因型的方法，以及涉及使用靶特异性核酸酶或其变体分离靶DNA的方法。这种方法是与用于正常基因型和致癌基因型的PCR后识别的现有简单的靶特异性核酸酶相反的新型范例方法，并且可以有利地用于癌症的早期诊断或相似基因型的分析。

非靶序列特异性指导RNA
+死亡Cas9核酸酶蛋白