



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114457195 A

(43) 申请公布日 2022.05.10

(21) 申请号 202210159092.2

C12N 15/113 (2010.01)

(22) 申请日 2022.02.21

C12R 1/93 (2006.01)

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所

地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城西路99号

(72) 发明人 曹昊睿 张华 冉芳 徐鹏奇

汤琳 毛康 晏智 钟理

凯文·托马斯

(74) 专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理

有限公司 11758

专利代理师 景鹏 张颖

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

序列表8页 附图3页

(54) 发明名称

基于LAMP和CRISPR的病毒检测试剂盒和方法

(57) 摘要

公开了基于LAMP和CRISPR的病毒检测试剂盒和方法。具体公开了一种用于特异性检测样本中的靶病毒的引物,其特征在于,所述引物包括两种或两种以上的引物组,所述两种或两种以上的引物组分别特异性靶向所述病毒的不同基因或者同一基因的不同区域,且所述两种或两种以上的引物组具有不同的检出限。还公开了使用该引物的试剂盒和检测病毒的方法。

1. 一种用于特异性检测样本中的靶病毒的引物,其特征在于,所述引物包括两种或两种以上的引物组,所述两种或两种以上的引物组分别特异性靶向所述病毒的不同基因或者同一基因的不同区域,且所述两种两种或两种以上的引物组具有不同的检出限。

2. 根据权利要求1所述的引物,其特征在于,所述引物用于环介导恒温扩增反应,优选用于实时环介导恒温扩增反应。

3. 根据权利要求1或2所述的引物,其特征在于,所述引物组各自包括上游外部引物、下游外部引物、上游内部引物和/或下游内部引物,

优选地,所述引物组各自包括上游外部引物、下游外部引物、上游内部引物、下游内部引物、上游环部引物和/或下游环部引物。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的引物,其特征在于,所述靶病毒为严重急性呼吸系统综合征冠状病毒(SARS-CoV-2),优选选自SARS-CoV-2的Wuhan-Hu-1/2019、Alpha、Beta、Gamma、Delta和Omicron毒株中的一种或多种。

5. 根据权利要求4所述的引物,其特征在于,所述引物包括第一引物组、第二引物和第三引物组中的两种或三种,其中所述第一引物组、所述第二引物和所述第三引物组分别特异性靶向所述SARS-CoV-2的S基因、N基因和E基因,

优选地,所述第一引物组包括:

第一上游外部引物,具有如SEQ ID NO.:13所示的序列;

第一下游外部引物,具有如SEQ ID NO.:14所示的序列;

第一上游内部引物,具有如SEQ ID NO.:15所示的序列;和

第一下游内部引物,具有如SEQ ID NO.:16所示的序列,

优选地,所述第二引物组包括:

第二上游外部引物,具有如SEQ ID NO.:1所示的序列;

第二下游外部引物,具有如SEQ ID NO.:2所示的序列;

第二上游内部引物,具有如SEQ ID NO.:4所示的序列;和

第二下游内部引物,具有如SEQ ID NO.:3所示的序列,

优选地,所述第三引物组包括:

第三上游外部引物,具有如SEQ ID NO.:7所示的序列;

第三下游外部引物,具有如SEQ ID NO.:8所示的序列;

第三上游内部引物,具有如SEQ ID NO.:10所示的序列;和

第三下游内部引物,具有如SEQ ID NO.:9所示的序列。

6. 根据权利要求5所述的引物,其特征在于,

所述第一引物组还包括:第一上游环部引物,具有如SEQ ID NO.:17所示的序列;和,第一下游环部引物,具有如SEQ ID NO.:18所示的序列,

所述第二引物组还包括:第二上游环部引物,具有如SEQ ID NO.:5所示的序列;和,第二下游环部引物,具有如SEQ ID NO.:6所示的序列,

所述第三引物组还包括:第三上游环部引物,具有如SEQ ID NO.:11所示的序列;和,第三下游环部引物,具有如SEQ ID NO.:12所示的序列。

7. 一种检测样本中的病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括如权利要求1至6中任一项所述的引物。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括可编程的核酸酶,以及两种或两种以上的gRNA,

优选地,所述可编程的核酸酶选自Cas12、Cas13或Cas14核酸酶,

更优选地,所述可编程的核酸酶Cas12核酸酶。

9. 根据权利要求7或8所述的试剂盒,其特征在于,所述两种或两种以上的gRNA包括第一gRNA、第二gRNA和第三gRNA中的两种或三种,其中所述第一gRNA、所述第二gRNA和所述第三gRNA分别特异性靶向SARS-CoV-2的S、N和E基因,

优选地,所述第一gRNA具有如SEQ ID NO.:21所示的序列;

优选地,所述第二gRNA具有如SEQ ID NO.:19所示的序列;

优选地,所述第三gRNA具有如SEQ ID NO.:20所示的序列。

10. 根据权利要求7至9中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括报告探针,所述报告探针为单链核酸序列;

优选地,所述报告探针包括分别位于所述单链核酸序列的两末端的检测基团和猝灭基团,其中,所述检测基团选自荧光素、6-荧光素、IRDYE 700、TYE 665、Alexa Fluor或ATTO TM633,所述猝灭基团选自Iowa Black RQ、Iowa Black FQ或Black Hole猝灭剂,

优选地,所述报告探针包括生物素。

11. 根据权利要求10所述的试剂盒,其特征在于,所述报告探针包括序列5' - (6-FAM) - TTATT - (BHQ1) - 3', 或者5' - (6-FAM) - TTATTATT - (Bio) - 3'。

12. 根据权利要求7至11中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括纸微流控装置,所述纸微流控装置包括纸芯片和检测板。

13. 一种半定量检测样本中的靶病毒的方法,其特征在于,所述方法包括:

将权利要求1至6中任一项所述的两种或两种以上的引物组,分别与所述样本孵育,进行环介导恒温扩增反应,得到相应的反应产物;在所述反应产物中,分别添加可编程的核酸酶与gRNA复合物和报告探针进行孵育,得到检测产物,其中,当在一个检测产物中检测到信号,则判断所述样本中含有对应于所使用的引物组的检出限的病毒浓度。

## 基于LAMP和CRISPR的病毒检测试剂盒和方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,特别涉及用于半定量检测样本中的病毒的试剂盒及检测方法。

### 背景技术

[0002] 现有的病毒检测,例如对于新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的检测主要采用RT-PCR和血清学方法。RT-PCR方法存在反应时间长、依赖精密仪器设备、反映信息相对滞后的问题。而血清学法检测灵敏度低,且仅适用于临床,不适合场地的原位监测。

[0003] 因此,亟需一种灵敏度高、抗干扰能力强、易于操作、能够进行快速检测,且适用于场地原位检测的病毒检测方法。

### 发明内容

[0004] 为了解决现有技术中存在的上述技术问题之一,本公开提供了能够可视化特异性检测病毒的体系和方法。

[0005] 根据本公开的一个方面,提供了一种用于特异性检测样本中的病毒的引物,所述引物包括两种或两种以上的引物组,所述两种或两种以上的引物组分别特异性靶向所述病毒的不同基因或者同一基因的不同区域,且所述两种或两种以上的引物组具有不同的检出限。

[0006] 在一些实施方式中,所述引物用于环介导恒温扩增(LAMP)反应。在一些实施方式中,所述引物用于实时环介导恒温扩增(RT-LAMP)反应。

[0007] 在一些实施方式中,每一引物组包括上游外部引物、下游外部引物、上游内部引物和/或下游内部引物。

[0008] 在一些实施方式中,每一引物组包括上游外部引物、下游外部引物、上游内部引物、下游内部引物、上游环部引物和/或下游环部引物。

[0009] 在一些实施方式中,所述病毒可以为严重急性呼吸系统综合征冠状病毒(SARS-CoV-2)。例如,所述病毒可以选自SARS-CoV-2的Wuhan-Hu-1/2019、Alpha、Beta、Gamma、Delta和Omicron毒株中的一种或多种。

[0010] 在一些实施方式中,所述两种或两种以上的引物组分别特异性靶向所述病毒的不同基因,或者靶向同一基因的不同区域。在一些实施方式中,所述两种或两种以上的引物组具有不同的检出限。在具体的实施方式中,所述两种或两种以上的引物组包括第1至第n引物组,其中n为大于2的整数。在具体的实施方式中,所述第1至n引物组分别具有 $L_1$ 至 $L_n$ 的检出限,其中 $L_1$ 至 $L_n$ 的检出限互不相同。

[0011] 在一些实施方式中,所述两种或两种以上的引物组包括第一引物组、第二引物组和第三引物组,其中第一引物组、第二引物组和第三引物组分别特异性靶向SARS-CoV-2的三个不同的基因或者同一基因的不同区域。在具体的实施方式中,所述第一引物组、所述第二引物组和所述第三引物组分别特异性靶向SARS-CoV-2的S基因、N基因和E基因。在一些实施方式

中,所述第一引物组、所述第二引物组和所述第三引物组分别具有检出限 $L_1$ 、 $L_2$ 和 $L_3$ 。

[0012] 在具体的实施方式中,所述第一引物组特异性靶向SARS-CoV-2的S基因。在具体的实施方式中,所述第一引物组包括第一上游外部引物、第一下游外部引物、第一上游内部引物和第一下游内部引物。据本公开的具体实施方式,所述第一引物组包括第一上游外部引物、第一下游外部引物、第一上游内部引物、第一下游内部引物、第一上游环部引物和第一下游环部引物。在具体的实施方式中,所述第一上游外部引物具有如SEQ ID NO.:13所示的序列。在具体的实施方式中,所述第一下游外部引物具有如SEQ ID NO.:14所示的序列。在具体的实施方式中,所述第一上游内部引物具有如SEQ ID NO.:15所示的序列。在具体的实施方式中,所述第一下游内部引物具有如SEQ ID NO.:16所示的序列。在具体的实施方式中,所述第一上游环部引物具有如SEQ ID NO.:17所示的序列。在具体的实施方式中,所述第一下游环部引物具有如SEQ ID NO.:18所示的序列。

[0013] 在具体的实施方式中,所述第二引物组特异性靶向SARS-CoV-2的N基因。在具体的实施方式中,所述第二引物组包括第二上游外部引物、第二下游外部引物、第二上游内部引物和第二下游内部引物。据本公开的具体实施方式,所述第二引物组包括第二上游外部引物、第二下游外部引物、第二上游内部引物、第二下游内部引物、第二上游环部引物和第二下游环部引物。在具体的实施方式中,所述第二上游外部引物具有如SEQ ID NO.:1所示的序列。在具体的实施方式中,所述第二下游外部引物具有如SEQ ID NO.:2所示的序列。在具体的实施方式中,所述第二上游内部引物具有如SEQ ID NO.:4所示的序列。在具体的实施方式中,所述第二下游内部引物具有如SEQ ID NO.:3所示的序列。在具体的实施方式中,所述第二上游环部引物具有如SEQ ID NO.:5所示的序列。在具体的实施方式中,所述第二下游环部引物具有如SEQ ID NO.:6所示的序列。

[0014] 在具体的实施方式中,所述第三引物组特异性靶向SARS-CoV-2的E基因。在具体的实施方式中,所述第三引物组包括第三上游外部引物、第三下游外部引物、第三上游内部引物和第三下游内部引物。据本公开的具体实施方式,所述第三引物组包括第三上游外部引物、第三下游外部引物、第三上游内部引物、第三下游内部引物、第三上游环部引物和第三下游环部引物。在具体的实施方式中,所述第三上游外部引物具有如SEQ ID NO.:7所示的序列。在具体的实施方式中,所述第三下游外部引物具有如SEQ ID NO.:8所示的序列。在具体的实施方式中,所述第三上游内部引物具有如SEQ ID NO.:10所示的序列。在具体的实施方式中,所述第三下游内部引物具有如SEQ ID NO.:9所示的序列。在具体的实施方式中,所述第三上游环部引物具有如SEQ ID NO.:11所示的序列。在具体的实施方式中,所述第三下游环部引物具有如SEQ ID NO.:12所示的序列。

[0015] 根据本公开的另一方面,提供了一种检测样本中的病毒的试剂盒,所述试剂盒包括上述引物。

[0016] 在一些实施方式中,所述试剂盒还可以包括CRISPR体系。在具体的实施方式中,所述试剂盒可以包括可编程的核酸酶,和两种或两种以上的指导RNA (gRNA)。

[0017] 在具体的实施方式中,所述可编程的核酸酶可以选自Cas12、Cas13或Cas14核酸酶。在具体的实施方式中,所述可编程的核酸酶可以为Cas12核酸酶,例如可以为Cas12a核酸酶。在具体的实施方式中,所述Cas12a核酸酶可以具有如SEQ ID NO.:22所示的氨基酸序列。

[0018] 在具体的实施方式中,所述两种或两种以上的gRNA包括第一gRNA、第二gRNA和第三gRNA中的两种或三种。在具体的实施方式中,所述第一gRNA、所述第二gRNA和所述第三gRNA分别特异性靶向所述第一引物组、所述第二引物组和所述第三引物组的扩增产物。在具体的实施方式中,所述第一gRNA特异性靶向SARS-CoV-2的S基因。在具体的实施方式中,所述第一gRNA具有如SEQ ID NO.:21所示的序列。在具体的实施方式中,所述第二gRNA特异性靶向SARS-CoV-2的N基因。在具体的实施方式中,所述第二gRNA具有如SEQ ID NO.:19所示的序列。在具体的实施方式中,所述第三gRNA特异性靶向SARS-CoV-2的E基因。在具体的实施方式中,所述第三gRNA具有如SEQ ID NO.:20所示的序列。

[0019] 在一些实施方式中,所述试剂盒还可以包括报告探针,所述报告探针为单链核酸序列,且带有可检测的基团。在具体的实施方式中,所述报告探针包括至少2、3、4、5、6、7、8、9 或10个核苷酸残基。

[0020] 在一些实施方式中,所述报告探针带有能够产生可检测信号的检测基团。所述报告探针还带有淬灭基团。当报告探针没有被切割前,所述检测基团不产生信号。在一些实施方式中,所述报告探针包括能够产生信号的多肽。信号可以是量热信号、电位信号、电流信号、光学信号(例如荧光信号、发光信号等)或压电信号。在一些实施方案中,检测基团位于所述报告探针的核酸序列的切割位点的一侧。在具体的实施方案中,淬灭基团位于切割位点的另一侧。在一些实施方案中,淬灭基团在切割位点的5'端,检测基团在切割位点的3'端。在其他实施方案中,检测基团在切割位点的5'端并且淬灭基团在切割位点的3'端。在进一步的实施方案中,淬灭基团位于所述报告探针的5'末端。在替代实施方案中,淬灭基团位于所述报告探针的3'末端。在进一步的实施方案中,检测基团位于所述报告探针的5'末端。在替代实施方案中,检测基团位于所述报告探针的3'末端。

[0021] 图1中示出了根据本公开的一些实施方式的检测原理的示意图。

[0022] 在具体的实施方式中,所述检测基团可以选自荧光素、6-荧光素、IRDYE 700、TYE 665、Alexa Fluor或ATTO TM633。所述淬灭基团可以选自Iowa Black RQ、Iowa Black FQ或Black Hole淬灭剂。

[0023] 当所述检测基团产生可检测信号时,表明所述可编程的核酸酶已经进行了切割,也就是说样本中存在靶标核酸。

[0024] 在一些实施方式中,所述报告探针的一侧带有生物素。在进一步的实施方式中,所述报告探针的另一侧带有荧光素、6-FAM荧光素、FITC、IRDYE 700、TYE 665、Alexa Fluor或ATTO TM633。可以使用侧流测定装置进行检测。所述侧流测定装置包括对照线和测试线。当所述报告探针未被切割时,所述报告探针被对照线结合。当所述报告探针被切割后,释放出的生物素越过对照线,被测试线捕获,使其显色。

[0025] 在具体的实施方式中,所述报告探针包括序列5'-(6-FAM)-TTATT-(BHQ1)-3',其中6-FAM为6-荧光素。在具体的实施方式中,所述报告探针包括序列5'-(6-FAM)-TTATTATT-(Bio)-3',其中Bio为生物素。

[0026] 在CRISPR-Cas效应子家族中,Cas12是一种RNA引导的DNase,属于II类V-A类系统,可在靶标识别后诱导非特异性的单链DNA(ssDNA)侧链切割。这会导致ssDNA报告探针的降解,这些报告探针在切割时发出荧光信号,或者可以在纸条上(通过侧向流动)以便携方式检测到。因此,基于CRISPR-Cas12的试剂盒具有快速、原位检测SARS-CoV-2病毒的潜力。

[0027] 根据本公开的又一方面,提供了检测样本中的靶病毒的方法,所述方法包括:将本公开的两种或两种以上的引物组与样本孵育,进行环介导恒温扩增(LAMP)反应,得到反应产物;在所述反应产物中,添加可编程的核酸酶与引导RNA(gRNA)复合物和报告探针进行孵育。如果检测到信号,则表明所述可编程的核酸酶切割所述报告探针,且所述反应产物中包括所述病毒的扩增产物,即所述样本包括待检测的病毒。如果没有检测到信号,则表明所述可编程的核酸酶没有切割所述报告探针,且所述反应产物中不包括所述病毒的扩增产物,即所述样本中不含待检测的病毒。当在一个检测产物中检测到信号,则判断所述样本中含有对应于所使用的引物组的检出限的病毒浓度。

[0028] 在一些实施方式中,所述LAMP反应在约62~65℃进行20~40min。

[0029] 在一些实施方式中,所述方法中使用两种或两种以上的引物组同时检测,其中所述两种或两种以上的引物组具有不同的检出限。所述两种或两种以上的引物组包括1至n个引物组,其中n为大于1的整数。在具体的实施方式中,所述1至n个引物组分别具有 $L_1$ 至 $L_n$ 的检出限,其中 $L_1$ 至 $L_n$ 的检出限互不相同。通过使用这些具有不同检出限的引物组,本公开的方法能够对样本中的待测病毒进行半定量检测。

[0030] 以三种引物组为例,第一引物组的检出限为 $L_1$ ,第二引物组的检出限为 $L_2$ ,第三引物组的检出限为 $L_3$ ,且 $L_1 < L_2 < L_3$ 。当三种引物组的扩增产物通过上述方法均不能检测到,则判断样本中所含待测病毒的量小于 $L_1$ 。当通过上述方法能够检测到第一引物组的扩增产物,而不能检测到第二引物组和第三引物组的扩增产物时,则判断样本中所含待测病毒的量在 $L_1 \sim L_2$ 之间( $L_1 \leq \text{病毒} < L_2$ )。当通过上述方法能够检测到第一引物组和第二引物组的扩增产物,而不能检测到第三引物组的扩增产物时,则判断样本中所含待测病毒的量在 $L_2 \sim L_3$ 之间( $L_2 \leq \text{病毒} < L_3$ )。当三种引物组的扩增产物通过上述方法均能检测到,则判断样本中所含待测病毒的量达到 $L_3$ (病毒 $\geq L_3$ )。

[0031] 因此,可以根据待检测的病毒和要求,来设置具有不同检出限的引物组组合,以对不同样本进行半定量检测,得出相应的检测结果。

[0032] 在本公开的具体实施方式中,检测社区污水样本中的SARS-CoV-2的量。通过使用靶向S基因的检出限约为10拷贝/mL的第一引物组,靶向N基因的检出限约为25拷贝/mL的第二引物组,和靶向E基因的检出限约为310拷贝/mL的第三引物组,可以半定量检测社区污水样本中的SARS-CoV-2浓度。当污水中SARS-CoV-2浓度低于10拷贝/mL时,针对三种基因的信号均为阴性,指示社区处于低风险状态;当污水中浓度介于10~25拷贝/mL时,针对S基因的信号为阳性,针对N基因和E基因的信号为阴性,指示社区可能存在零星患者并处于中等风险状态;当污水浓度介于25~310拷贝/mL时,针对S基因和N基因的信号均为阳性,社区处于高风险;当污水浓度大于310拷贝/mL时,针对三种基因的信号均为阳性,社区处于极高风险。

[0033] 总体来看,本公开涉及了多种引物组组合,且进一步与CRISPR体系组合(HF-RT-LAMP),在可视化方面具有巨大的灵活性,另一方面,本公开的检测方法操作简便,适合进行原位定性和半定量的检测,能够实现在实验室外对SARS-CoV-2引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)进行精细化风险预警。

[0034] 为了进一步简化检测步骤,本公开的试剂盒还可以包括纸微流控装置,所述纸微流控装置包括纸芯片和检测板。所述纸芯片利用石蜡浸染和加热盘制备,通过石蜡浸染在

定性滤纸上形成疏水区和亲水区从而控制流体的流向。

[0035] 下面提供实施例和附图以帮助理解本发明。但应理解,这些实施例和附图仅用于说明本发明,但不构成任何限制。本发明的实际保护范围在权利要求书中进行阐述。应理解,在不脱离本发明精神的情况下,可以进行任何修改和改变。

### 附图说明

[0036] 图1中示出了根据本公开的一些实施方式的检测原理的示意图。

[0037] 图2示出了RT-LAMP测试SARS-CoV-2的N、E、S基因的结果。图2a~2c示出了N、E、S基因的RT-LAMP扩增子电泳图,其中a、b、c的第1泳道为标记物,第2泳道阴性对照;图2a的第3~12泳道为按照浓度十倍递增顺序放置的从 $1.5 \times 10^0$ 到 $1.5 \times 10^9$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 的样品扩增子;图2b的第3~12泳道为按照浓度十倍递增顺序放置的 $2.6 \times 10^0$ 到 $2.6 \times 10^9$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 的样品扩增子;图2c的第3~12泳道为按照浓度十倍递增顺序放置的 $5 \times 10^{-1}$ 到 $5 \times 10^8$ 拷贝/ $\mu\text{L}$ 的样品扩增子。图2d~2f示出了不同浓度的N、E、S基因通过RT-LAMP扩增的正态化终点荧光信号变化图。图2g~2i示出了N、E、S基因的RT-LAMP定量曲线图。

[0038] 图3示出了HF-RT-LAMP的可视化检测及ImageJ提取数据的正态化分布图。图3a~3c是利用RT-LAMP同CRISPR/Cas12a结合采用荧光探针检测不同浓度新冠病毒的可视化结果,和利用ImageJ提取的强度信息图。图3d~3f是利用RT-LAMP同CRISPR/Cas12a结合采用生物素探针检测不同浓度新冠病毒的可视化结果,和利用ImageJ提取的强度信息图。

[0039] 图4示出了纸芯片的设计及检测示意图。图4a示出了纸芯片设计示意图,图4b示出了利用纸芯片纯化RNA示意图,图4c示出了利用纸芯片可视化检测SARS-CoV-2示意图,图4d示出了测流法检测结果示意图,图4e示出了荧光法检测结果示意图。

[0040] 图5示出了双盲实验测试结果。

### 具体实施方式

[0041] 为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步的详细说明。此处所描述的具体实施例仅用于解释本发明,并不用于构成对本发明的任何限制。此外,在以下说明中,省略了对公知结构和技术的描述,以避免不必要地混淆本公开的概念。这样的结构和技术在许多出版物中也进行了描述。

[0042] 定义

[0043] 除非另有定义,否则本发明使用的所有技术术语和科技术语都具有如在本发明所属领域中通常使用的相同含义。出于解释本说明书的目的,将应用以下定义,并且在适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,反之亦然。

[0044] 除非上下文另有明确说明,否则本文所用的表述“一种”和“一个”包括复数指代。例如,提及“一个细胞”包括多个这样的细胞及本领域技术人员可知晓的等同物等等。

[0045] 本文所用的术语“约”表示其后的数值的 $\pm 20\%$ 的范围。在一些实施方式中,术语“约”表示其后的数值的 $\pm 10\%$ 的范围。在一些实施方式中,术语“约”表示其后的数值的 $\pm 5\%$ 的范围。

[0046] 本文所用的术语“检出限”是指,使用引物组能检测到的样本中靶标物的最低浓度。

[0047] 各实施例中所用的主要试剂的信息如下:

[0048] HiScribe T7 Quick High Yield RNA合成试剂盒 (E2050S), NEB WarmStart LAMP 2X Master Mix (E1700L), Buffer 2.1 (B7202S) 均购自NEB公司; 无酶无菌水 (10977023), TAE缓冲液 (B49), Evagreen, RiboLock RNase抑制剂 (E00381) 购自赛默飞; 胶回收试剂盒 (D4002) 购自Zymo Research; VAHTS RNA Clean Beads (N412-01) 购自Vazyme Biotech; 含N或E基因的质粒 (SARS-CoV-2-5) 由金唯智合成; 含S基因的质粒 (2019-nCovS) 由上海生工合成; 定性方形滤纸 (1001-917), 玻璃纤维 (1825-047) 购自whatman; 石蜡购买自Xerox; 引物, DNA探针, gRNA均由上海生工合成, 具体序列见表1。

[0049] 表1. 引物及gRNA序列

引物	序列
F3-N-基因	AACACAAGCTTTCGGCAG (SEQ ID NO.: 1)
B3-N-基因	GAAATTTGGATCTTTGTCATCC (SEQ ID NO.: 2)
BIP-N-基因	TGCGGCCAATGTTTGTAAATCAGCCAAGGAAATTTGGGGAC (SEQ ID NO.: 3)
FIP-N-基因	CGCATTGGCATGGAAGTCACTTTGATGGCACCTGTGTAG (SEQ ID NO.: 4)
LF-N-基因	TTCCTGTCTGATTAGTTC (SEQ ID NO.: 5)
LB-N-基因	ACCTTCGGGAACGTGGTT (SEQ ID NO.: 6)
F3-E-基因	CCGACGACGACTACTAGC (SEQ ID NO.: 7)
B3-E-基因	AGAGTAAACGTAAAAAGAAGTT (SEQ ID NO.: 8)
BIP-E-基因	ACCTGTCTCTCCGAAACGAATTTGTAAGCACAAAGCTGATG (SEQ ID NO.: 9)
FIP-E-基因	CTAGCCATCCTTACTGCGCTACTCACGTTAACAATATTGCA (SEQ ID NO.: 10)
LF-E-基因	TCGATTGTGTGCGTACTGC (SEQ ID NO.: 11)
LB-E-基因	TGAGTACATAAGTTCGTAC (SEQ ID NO.: 12)
F3-S-基因	TCTATTGCCATACCCACAA (SEQ ID NO.: 13)
B3-S-基因	GGTGTTTTGTAATTTGTTTGAC (SEQ ID NO.: 14)
FIP-S-基因	CATTCAGTTGAATCACCACAAATGTGTGTTACCACAGAAATTCTACC (SEQ ID NO.: 15)
BIP-S-基因	GTTGCAATATGGCAGTTTTTTGTACATTGGGTGTTTTTGTCTTGTT (SEQ ID NO.: 16)
LF-S-基因	ACTGATGTCTTGGTCATAGACT (SEQ ID NO.: 17)
LB-S-基因	TAAACCGTGCTTAACTGGAATAGC (SEQ ID NO.: 18)
N基因-Cas12a gRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUCSCCAGCGCUUCAGCGUUC (SEQ ID NO.: 19)
E基因-Cas12a gRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUGUGGUAUUCUUGCUAGUUAC (SEQ ID NO.: 20)
S基因-Cas12a gRNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUactggaatagctgttgaaca (SEQ ID NO.: 21)

[0050]

[0051]	Cas12a 荧光探针	5'-(6-FAM)-TTATT -(BHQ1) -3'
	Cas12a 生物素探针	5'-(6-FAM)-TTATTATT-(Bio)-3'

[0052] 实施例1. 靶向SARS-Cov-2的N、E、S三个基因片段的RT-LAMP反应

[0053] 通过体外转录制备N、E、S基因的RNA。简单来讲,分别使用含N、E和S基因的质粒作为模板进行PCR扩增,分别扩增出含N、E和S基因的片段,采用胶回收试剂盒提取纯化 PCR扩增子。然后,各取0.5 $\mu$ g PCR扩增子作为模板,利用HiScribe T7 Quick High Yield RNA 合成试剂盒进行体外转录,利用DNase I除去转录体系中的DNA,利用VAHTS RNA Clean Beads 纯化RNA。纯化后的RNA稀释分装后保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中。

[0054] RT-LAMP反应采用20 $\mu$ L体系,包含0.1 $\mu$ M F3、0.1 $\mu$ M B3、0.8 $\mu$ M FIP、0.8 $\mu$ M BIP、0.6 $\mu$ M LF、0.6 $\mu$ M LB,10 $\mu$ LNEB WarmStart LAMP 2X Master Mix,2 $\mu$ L RNA样本,1 $\mu$ L 20 $\times$  Evagreen (为了避免对FAM荧光信号产生干扰,在DETECTOR反应中不加入荧光染料),4 $\mu$ L 无酶无菌水,65 $^{\circ}$ C条件下孵育30min。

[0055] 对通过体外转录制备的RNA样本进行了十个数量级的逐级稀释,N基因的RNA样本浓度为 $1.5 \times 10^0$ 到 $1.5 \times 10^9$ 拷贝/ $\mu$ L十倍递增;E基因的RNA样本浓度为 $2.6 \times 10^0$ 到 $2.6 \times 10^9$ 拷贝/ $\mu$ L 十倍递增;S基因的RNA样本浓度为 $5 \times 10^{-1}$ 到 $5 \times 10^8$ 拷贝/ $\mu$ L十倍递增。利用ABI7500实时读取扩增荧光数据,同时采用琼脂凝胶电泳进一步确认了扩增产物,结果示于图2中。

[0056] 由于RT-LAMP扩增子为大小不同的一组扩增子混合物,其电泳条带呈现出阶梯状,如图 2a~2c所示。N、E、S三个基因扩增子分别第4泳道(图2a)、第5泳道(图2b)、第4泳道(图2c)出现阶梯状条带,其分别对应于含15拷贝/ $\mu$ L的N基因样本、含260拷贝/ $\mu$ L 的E基因样本和含5拷贝/ $\mu$ L的S基因样本。因此,这一结果可以得出,本实施例中所使用的 LAMP体系对于这三种基因的检出限分别为15拷贝/ $\mu$ L、260拷贝/ $\mu$ L和5拷贝/ $\mu$ L,均达到aM 级灵敏度。

[0057] 进一步比对了LAMP扩增反应的终点荧光信号强度,结果如图2d~2f所示。从图2d~2f 的结果可以看出,荧光信号强度不会随着样本中靶基因浓度的增加而增大。从结合反应的实时荧光曲线来看,反应到终点时,各浓度组均已达到饱和。因此,RT-LAMP仅可以进行终点定性而不能进行终点定量。

[0058] 为了进一步探讨是否可以利用实时荧光进行定量,以25%最大荧光强度作为阈值,将达到阈值的时间同对应靶标浓度的对数进行拟合, $R^2$ 达到0.99以上,E和S甚至达到了0.999,表明RT-LAMP具有卓越的实时定量能力,并且线性范围可以达到6-8个数量级,结果参见图 2g~2i。

[0059] 然而,在场地定性检测方面,非特异性扩增引发的假阳性问题却会对检测带来干扰。如图 2a~2c所示,第2泳道的阴性对照和第3泳道的低于检出限样本,其也会出现类似于二聚体的扩增条带,图2b的第4泳道更是存在较严重的非特异性扩增,实时荧光曲线也证明了假阳性的存在。

[0060] 实施例2. 构建纸微流控装置的构建

[0061] 为了简化在实验室外进行样本的病毒检测,引入了纸微流控装置,其包括纸芯片和检测板。该纸芯片和检测板的设置和检测流程如图4a~4c所示。

[0062] 简单来讲,通过以下步骤来制备纸芯片:

[0063] (1) 利用石蜡打印机Colorqube 8570在定性滤纸上打印出相应的图案,留出亲水

的吸附区(图4a和4b中白色区);

[0064] (2) 利用加热盘在120℃下烘烤滤纸1~2min,使石蜡完全浸染滤纸;

[0065] (3) 在特定位置上加入玻璃纤维(图4a和4b中箭头所示),然后折叠,折叠方式见图4a;

[0066] (4) 向纸芯片加入50μL ddH<sub>2</sub>O测试不同孔径下的流速并进行优化。

[0067] 检测板利用激光切割机(Shandong leapion machine co.ltd;LC-1390)打印,板材选用黑色亚克力材质,板材厚度为5mm,切割功率为94%最大功率,切割速率为0.48mm/s。孔径同纸芯片亲水孔径相同。

[0068] 将样本加载到纸芯片的吸附区上,使得样本中的核酸被玻璃纤维吸附,向吸附区中注入洗涤液,洗脱掉杂质。然后,通过吸附区向玻璃纤维注入洗脱液,使得玻璃纤维上吸附的核酸被洗脱下来,从纸芯片底层的孔中流入检测板对应的孔中,进行检测。

[0069] 当使用荧光探针时,可以在纸微流控芯片的检测板中直接进行显色反应。当使用生物素探针时,可以将测流检测试纸放入检测板中的反应液中进行显色反应。

[0070] 实施例3.RT-LAMP反应与CRISPR-Cas12a体系组合来进行可视化检测

[0071] 本实施例中,引入了CRISPER-Cas12a体系,与实施例1中的LAMP组合而构建了 HF-RT-LAMP。由于非特异性扩增产物与特异性扩增产物的序列不同,通过引入Cas12a以识别特异性扩增产物,从而排除非特异性扩增带来的干扰。简单来讲,首先选取靶向扩增区段的gRNA,构建Cas12a酶切体系,然后与RT-LAMP进行联用,从而完成HF-RT-LAMP反应的构建。具体方法如下:

[0072] 各取约10mL样本,通过膜吸附-洗脱法进行了浓缩。简单来讲,首先利用3μm滤膜过滤除去样本中的大颗粒物,然后将pH调节至中性,加入Mg<sup>2+</sup>并使其终浓度为25mM,然后利用0.45μm滤膜过滤,再在滤膜上加入40μLGuSCN裂解液,常温孵育10min。然后,吸取裂解液并将裂解液加载至纸芯片上进行纯化,并利用10μL无酶无菌水进行洗脱,然后利用打孔器将纸芯片加入到微流控板反应孔中进行反应。阴性对照为无酶无菌水,阳性对照则采用样本加标的方法。

[0073] 将终浓度为100nM Cas12a、125nM gRNA、500nMCas12a荧光探针在1×NEBuffer2.1缓冲液中,37℃,孵育10min,形成酶切预混液。然后,取2μL实施例1中获得的RT-LAMP扩增子加入到18μL预混液中,37℃孵育30min。利用ABI7500记录480nm蓝光激发的荧光信号(阴性对照无色,阳性样本呈现亮绿色),并利用ImagineJ提取颜色信息,结果如图3a~3c所示。

[0074] 从图3a~3c中所显示的荧光结果可以看出,Cas12a酶的引入可以是样本的检测可视化。阳性样本中由于含有gRNA靶向的扩增产物,从而激活Cas12a酶。被激活的Cas12a酶剪切 Cas12a荧光探针,释放出荧光分子,从而在蓝光激发下看到亮绿色的荧光信号。

[0075] 实施例4.采用带有FAM/生物素的探针进行HF-RT-LAMP的可视化检测

[0076] 本实施例中,采用探针的5'端和3'端分别带有FAM和生物素的探针(称为“Cas12a生物素探针”),替代了实施例3中的Cas12a荧光探针,分别对N、E、S基因进行了HF-RT-LAMP检测。取2μL实施例3中获得的纯化样本,加入到18μL预混液中,再加入80μL1×NEBuffer2.1,37℃孵育30min。然后,将测流检测试纸(MileniaHybridetect 1, TwistDx)插入到反应管中,约两分钟后,当试纸只有一个靠近上样侧的条带时,则说明为阴性;当样品有两个条带或者只有一个靠近试纸顶部的条带(生物素)时,则说明为阳性。利用

ImagineJ提取条带信息,结果如图3d~3f。

[0077] 从图3d~3f可以看出,本实施例使用Cas12a生物素探针的检测方法具有同使用Cas12a荧光探针类似的效果。由于测流检测试纸中检测线(靠近试纸顶部)本身会存在非常微弱的条带,可以借助ImageJ,很好的判断是试纸条自身的背景条带还是扩增子产生的条带。而且,还有效解决了假阳性问题。根据阴性的ImageJ提取结果计算出阴性样本的侧流法灰度值阈值为 150,从而规避了侧流法本身产生的背景色。另外,从图3的结果,换算成样本的原始体积 (10mL),可以看到所示,对S、N、E基因的检出限分别可以达到10拷贝/mL,25拷贝/mL 和310拷贝/mL,均达到接近单分子水平的zM量级。

[0078] 实施例5. 使用纸芯片结合HF-RT-LAMP的检测效果评估

[0079] 本实施例中,采用污水加标的方式,使用纸芯片与HF-RT-LAMP结合,进行了污水随机加标的双盲实验,对SARS-CoV-2进行定性和半定量检测。

[0080] 将采集自贵州将军山医院的SARS-CoV-2样本添加到不含SARS-CoV-2的污水中。为了尽可能真实模拟处于疫情不同发展阶段的社区污水,制备了浓度介于0~500拷贝/mL的50个不同浓度的污水样本。利用纸芯片与HF-RT-LAMP结合,测试了由44个加标污水样本和6个阴性样本随机编组构成的样本组合。

[0081] 测试结果如表2和图5所示,44个加标样本中有43个成功检测到SARS-CoV-2病毒且没有假阳性出现,41个样本的半定量结果与真实样本一致,具有100%的特异性。这些结果证明了,使用三组检测引物,在纸芯片上进行HF-RT-LAMP不仅能够抵御污水复杂介质的干扰,成功区分加标污水和未加标污水,而且能够检测出低至10拷贝/mL的加标污水,并且在10~310 拷贝/mL浓度范围内具备半定量能力。

[0082] 表2. 双盲实验测试结果

[0083]

样本	浓度 (拷贝/mL)	S 基因	N 基因	E 基因
1	10	P	N	N
2	30	P	P	N
3	15	P	P	N
4	50	P	P	N
5	0	N	N	N
6	5	N	N	N
7	35	P	P	N
8	350	P	P	P
9	120	P	P	N
10	180	P	P	N
11	40	P	P	N
12	20	P	P	N
13	80	P	P	P
14	0	N	N	N
15	25	P	P	N
16	220	P	P	N
17	310	P	P	P
18	0	N	N	N
19	60	P	P	N
20	70	P	P	N
21	90	P	P	N
22	110	P	P	P
23	95	P	P	N
24	55	P	P	N
25	45	P	P	N
26	65	P	P	N
27	95	P	P	N
28	130	P	P	N
29	30	P	N	N
30	0	N	N	N
31	100	P	P	N
32	75	P	P	N

[0084]	33	25	P	P	N
	34	20	P	N	N
	35	15	P	N	N
	36	0	N	N	N
	37	310	P	P	P
	38	370	P	P	P
	39	280	P	P	P
	40	250	P	P	N
	41	290	P	P	P
	42	125	P	P	N
	43	0	N	N	N
	44	105	P	P	N
	45	50	P	P	N
	46	5	P	N	N
	47	500	P	P	P
	48	360	P	P	P
	49	320	P	P	N
	50	55	P	P	N

[0085] 注:P表示阳性结果,N表示阴性结果。

[0086] 综上所述,纸芯片不仅成功解决了场地条件下核酸提取纯化的难题,而且借助于其多通道检测,成功克服了半定量难题,实现了从病原体快速检测到风险快速可视化评估的革命性跨越,也为快检设备实现半定量提供了新方法。

[0087] 本发明的技术方案不限于上述具体实施例的限制,凡是根据本发明的技术方案做出的技术变形,均落入本发明的保护范围之内。

## 序列表

<110>	中国科学院地球化学研究所	
<120>	基于LAMP和CRISPR的病毒检测试剂盒和方法	
<160>	22	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	1	
	aacacaagct ttcggcag	18
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	2	
	gaaatttgga tctttgcat cc	22
<210>	3	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	3	
	tgccgccaat gtttgaatc agccaaggaa atttgggga c	41
<210>	4	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	4	
	cgcattggca tggaagtcac tttgatggca cctgtgtag	39
<210>	5	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<400>	5	
	ttccttgtct gattagttc	19
<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 6	
accttcggga acgtggtt	18
<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 7	
ccgacgacga ctactagc	18
<210> 8	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 8	
agagtaaacg taaaaagaag gtt	23
<210> 9	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 9	
acctgtctct tccgaaacga atttgtaagc acaagctgat g	41
<210> 10	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 10	
ctagccatcc ttactgcgct actcacgta acaatattgc a	41
<210> 11	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 11	
tcgatttgtg gcgtactgc	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<400> 12	
tgagtacata agttcgtac	19

<210> 13	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 13	
tctattgcc a taccacaa	19
<210> 14	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 14	
ggtgttttgt aaatttg ttt gac	23
<210> 15	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 15	
cattcagttg aatcaccaca aatgtgtgtt accacagaaa ttctacc	47
<210> 16	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 16	
gttgcaatat ggcagttttt gtacattggg tgtttttgtc ttgtt	45
<210> 17	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 17	
actgatgtct tggatcataga cact	24
<210> 18	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 18	
taaaccgtgc ttaactgga atagc	25
<210> 19	
<211> 41	
<212> DNA/RNA	



145	150	155	160
Met Phe Ser Glu Glu	Ala Lys Ser Thr Ser	Ile Ala Phe Arg Cys Ile	
	165	170	175
Asn Glu Asn Leu Thr	Arg Tyr Ile Ser Asn Met Asp	Ile Phe Glu Lys	
	180	185	190
Val Asp Ala Ile Phe	Asp Lys His Glu Val Gln Glu Ile	Lys Glu Lys	
	195	200	205
Ile Leu Asn Ser Asp	Tyr Asp Val Glu Asp Phe Phe	Glu Gly Glu Phe	
	210	215	220
Phe Asn Phe Val Leu	Thr Gln Glu Gly Ile Asp Val Tyr	Asn Ala Ile	
225	230	235	240
Ile Gly Gly Phe Val	Thr Glu Ser Gly Glu Lys Ile	Lys Gly Leu Asn	
	245	250	255
Glu Tyr Ile Asn Leu	Tyr Asn Gln Lys Thr Lys Gln Lys	Leu Pro Lys	
	260	265	270
Phe Lys Pro Leu Tyr	Lys Gln Val Leu Ser Asp Arg	Glu Ser Leu Ser	
	275	280	285
Phe Tyr Gly Glu Gly	Tyr Thr Ser Asp Glu Glu Val	Leu Glu Val Phe	
	290	295	300
Arg Asn Thr Leu Asn	Lys Asn Ser Glu Ile Phe Ser Ser	Ile Lys Lys	
305	310	315	320
Leu Glu Lys Leu Phe	Lys Asn Phe Asp Glu Tyr Ser Ser	Ala Gly Ile	
	325	330	335
Phe Val Lys Asn Gly	Pro Ala Ile Ser Thr Ile Ser	Lys Asp Ile Phe	
	340	345	350
Gly Glu Trp Asn Val	Ile Arg Asp Lys Trp Asn Ala Glu	Tyr Asp Asp	
	355	360	365
Ile His Leu Lys Lys	Lys Ala Val Val Thr Glu Lys Tyr	Glu Asp Asp	
	370	375	380
Arg Arg Lys Ser Phe	Lys Lys Ile Gly Ser Phe Ser	Leu Glu Gln Leu	
385	390	395	400
Gln Glu Tyr Ala Asp	Ala Asp Leu Ser Val Val Glu Lys	Leu Lys Glu	
	405	410	415
Ile Ile Ile Gln Lys	Val Asp Glu Ile Tyr Lys Val Tyr	Gly Ser Ser	
	420	425	430
Glu Lys Leu Phe Asp	Ala Asp Phe Val Leu Glu Lys Ser	Leu Lys Lys	
	435	440	445
Asn Asp Ala Val Val	Ala Ile Met Lys Asp Leu Leu Asp	Ser Val Lys	
450	455	460	

Ser Phe Glu Asn Tyr Ile Lys Ala Phe Phe Gly Glu Gly Lys Glu Thr  
 465 470 475 480  
 Asn Arg Asp Glu Ser Phe Tyr Gly Asp Phe Val Leu Ala Tyr Asp Ile  
 485 490 495  
 Leu Leu Lys Val Asp His Ile Tyr Asp Ala Ile Arg Asn Tyr Val Thr  
 500 505 510  
 Gln Lys Pro Tyr Ser Lys Asp Lys Phe Lys Leu Tyr Phe Gln Asn Pro  
 515 520 525  
 Gln Phe Met Gly Gly Trp Asp Lys Asp Lys Glu Thr Asp Tyr Arg Ala  
 530 535 540  
 Thr Ile Leu Arg Tyr Gly Ser Lys Tyr Tyr Leu Ala Ile Met Asp Lys  
 545 550 555 560  
 Lys Tyr Ala Lys Cys Leu Gln Lys Ile Asp Lys Asp Asp Val Asn Gly  
 565 570 575  
 Asn Tyr Glu Lys Ile Asn Tyr Lys Leu Leu Pro Gly Pro Asn Lys Met  
 580 585 590  
 Leu Pro Lys Val Phe Phe Ser Lys Lys Trp Met Ala Tyr Tyr Asn Pro  
 595 600 605  
 Ser Glu Asp Ile Gln Lys Ile Tyr Lys Asn Gly Thr Phe Lys Lys Gly  
 610 615 620  
 Asp Met Phe Asn Leu Asn Asp Cys His Lys Leu Ile Asp Phe Phe Lys  
 625 630 635 640  
 Asp Ser Ile Ser Arg Tyr Pro Lys Trp Ser Asn Ala Tyr Asp Phe Asn  
 645 650 655  
 Phe Ser Glu Thr Glu Lys Tyr Lys Asp Ile Ala Gly Phe Tyr Arg Glu  
 660 665 670  
 Val Glu Glu Gln Gly Tyr Lys Val Ser Phe Glu Ser Ala Ser Lys Lys  
 675 680 685  
 Glu Val Asp Lys Leu Val Glu Glu Gly Lys Leu Tyr Met Phe Gln Ile  
 690 695 700  
 Tyr Asn Lys Asp Phe Ser Asp Lys Ser His Gly Thr Pro Asn Leu His  
 705 710 715 720  
 Thr Met Tyr Phe Lys Leu Leu Phe Asp Glu Asn Asn His Gly Gln Ile  
 725 730 735  
 Arg Leu Ser Gly Gly Ala Glu Leu Phe Met Arg Arg Ala Ser Leu Lys  
 740 745 750  
 Lys Glu Glu Leu Val Val His Pro Ala Asn Ser Pro Ile Ala Asn Lys  
 755 760 765  
 Asn Pro Asp Asn Pro Lys Lys Thr Thr Thr Leu Ser Tyr Asp Val Tyr

770	775	780
Lys Asp Lys Arg Phe Ser Glu Asp Gln Tyr Glu Leu His Ile Pro Ile		
785	790	795
Ala Ile Asn Lys Cys Pro Lys Asn Ile Phe Lys Ile Asn Thr Glu Val		
	805	810
Arg Val Leu Leu Lys His Asp Asp Asn Pro Tyr Val Ile Gly Ile Asp		
	820	825
Arg Gly Glu Arg Asn Leu Leu Tyr Ile Val Val Val Asp Gly Lys Gly		
	835	840
Asn Ile Val Glu Gln Tyr Ser Leu Asn Glu Ile Ile Asn Asn Phe Asn		
850	855	860
Gly Ile Arg Ile Lys Thr Asp Tyr His Ser Leu Leu Asp Lys Lys Glu		
865	870	875
Lys Glu Arg Phe Glu Ala Arg Gln Asn Trp Thr Ser Ile Glu Asn Ile		
	885	890
Lys Glu Leu Lys Ala Gly Tyr Ile Ser Gln Val Val His Lys Ile Cys		
	900	905
Glu Leu Val Glu Lys Tyr Asp Ala Val Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asn		
915	920	925
Ser Gly Phe Lys Asn Ser Arg Val Lys Val Glu Lys Gln Val Tyr Gln		
930	935	940
Lys Phe Glu Lys Met Leu Ile Asp Lys Leu Asn Tyr Met Val Asp Lys		
945	950	955
Lys Ser Asn Pro Cys Ala Thr Gly Gly Ala Leu Lys Gly Tyr Gln Ile		
	965	970
Thr Asn Lys Phe Glu Ser Phe Lys Ser Met Ser Thr Gln Asn Gly Phe		
	980	985
Ile Phe Tyr Ile Pro Ala Trp Leu Thr Ser Lys Ile Asp Pro Ser Thr		
995	1000	1005
Gly Phe Val Asn Leu Leu Lys Thr Lys Tyr Thr Ser Ile Ala Asp Ser		
1010	1015	1020
Lys Lys Phe Ile Ser Ser Phe Asp Arg Ile Met Tyr Val Pro Glu Glu		
1025	1030	1035
Asp Leu Phe Glu Phe Ala Leu Asp Tyr Lys Asn Phe Ser Arg Thr Asp		
	1045	1050
Ala Asp Tyr Ile Lys Lys Trp Lys Leu Tyr Ser Tyr Gly Asn Arg Ile		
	1060	1065
Arg Ile Phe Arg Asn Pro Lys Lys Asn Asn Val Phe Asp Trp Glu Glu		
1075	1080	1085

Val Cys Leu Thr Ser Ala Tyr Lys Glu Leu Phe Asn Lys Tyr Gly Ile			
1090	1095	1100	
Asn Tyr Gln Gln Gly Asp Ile Arg Ala Leu Leu Cys Glu Gln Ser Asp			
1105	1110	1115	1120
Lys Ala Phe Tyr Ser Ser Phe Met Ala Leu Met Ser Leu Met Leu Gln			
	1125	1130	1135
Met Arg Asn Ser Ile Thr Gly Arg Thr Asp Val Asp Phe Leu Ile Ser			
	1140	1145	1150
Pro Val Lys Asn Ser Asp Gly Ile Phe Tyr Asp Ser Arg Asn Tyr Glu			
	1155	1160	1165
Ala Gln Glu Asn Ala Ile Leu Pro Lys Asn Ala Asp Ala Asn Gly Ala			
	1170	1175	1180
Tyr Asn Ile Ala Arg Lys Val Leu Trp Ala Ile Gly Gln Phe Lys Lys			
1185	1190	1195	1200
Ala Glu Asp Glu Lys Leu Asp Lys Val Lys Ile Ala Ile Ser Asn Lys			
	1205	1210	1215
Glu Trp Leu Glu Tyr Ala Gln Thr Ser Val Lys His			
	1220	1225	

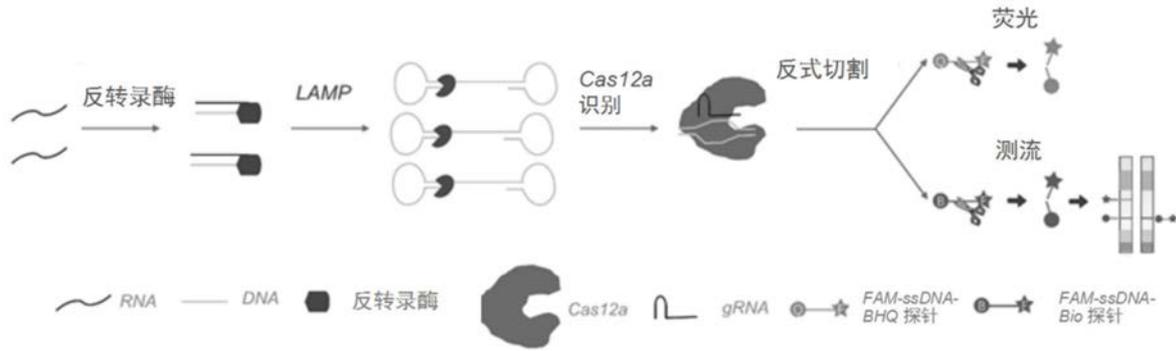


图1

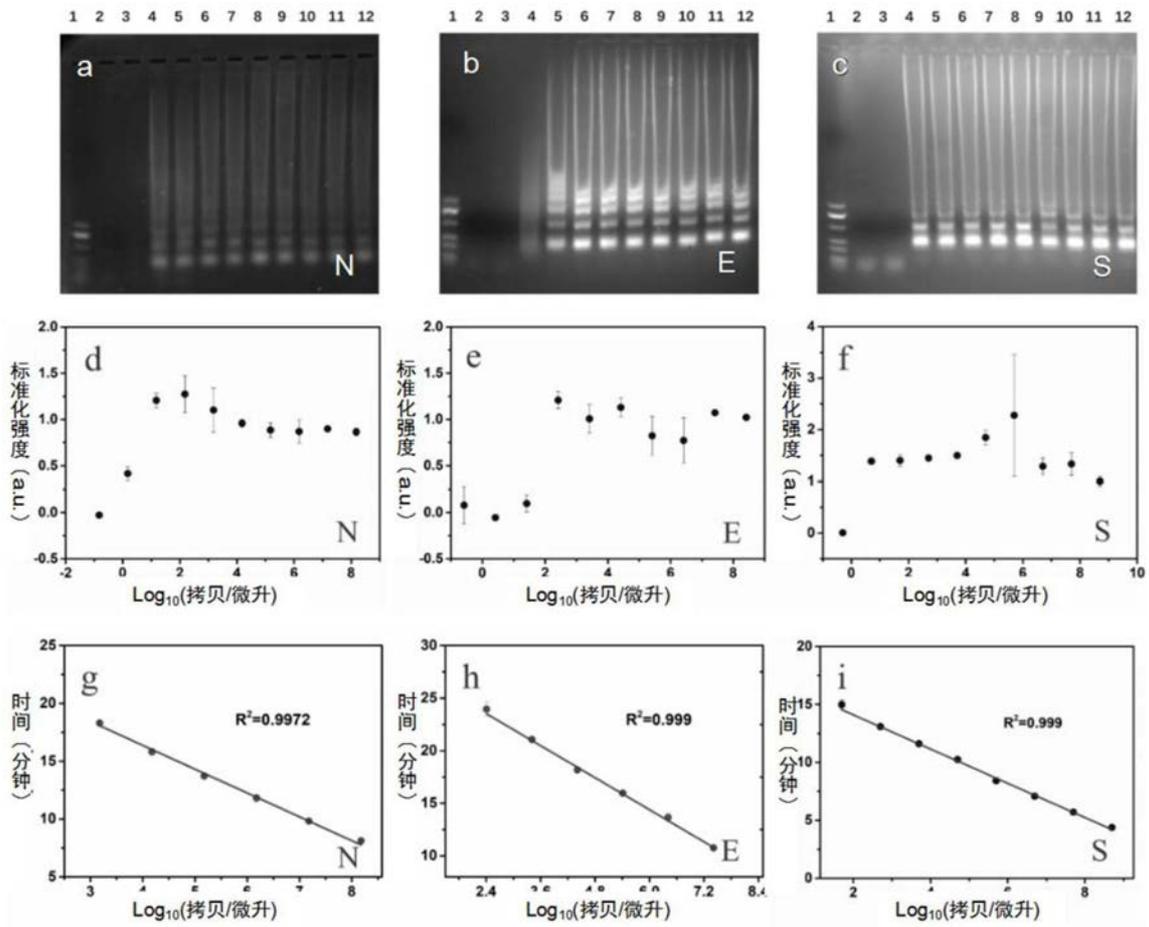


图2

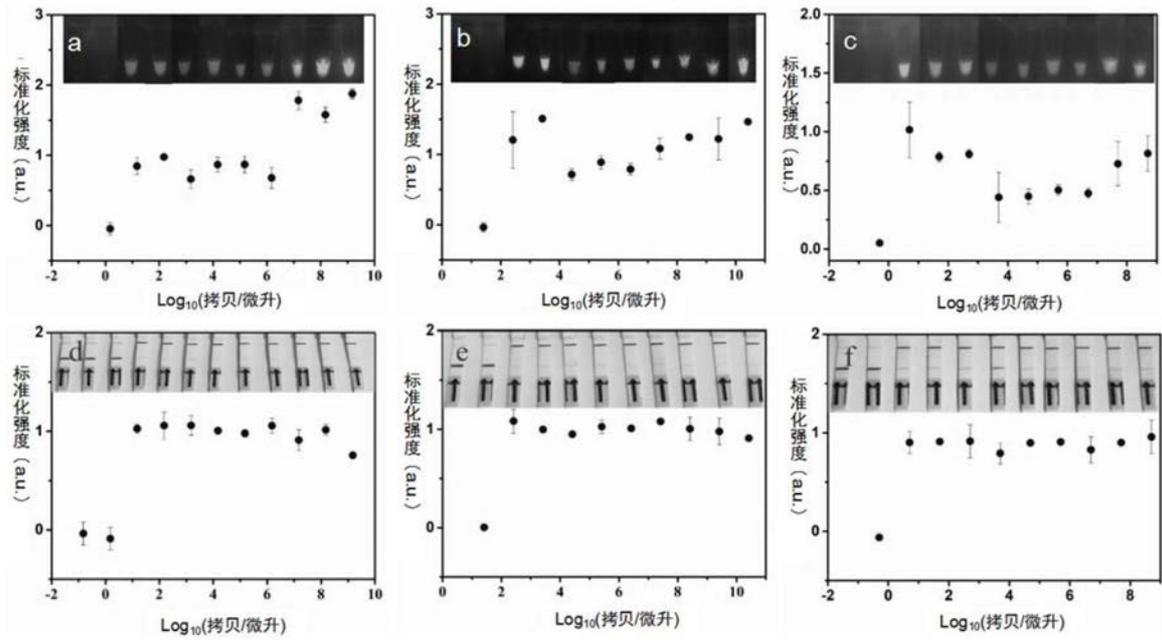


图3

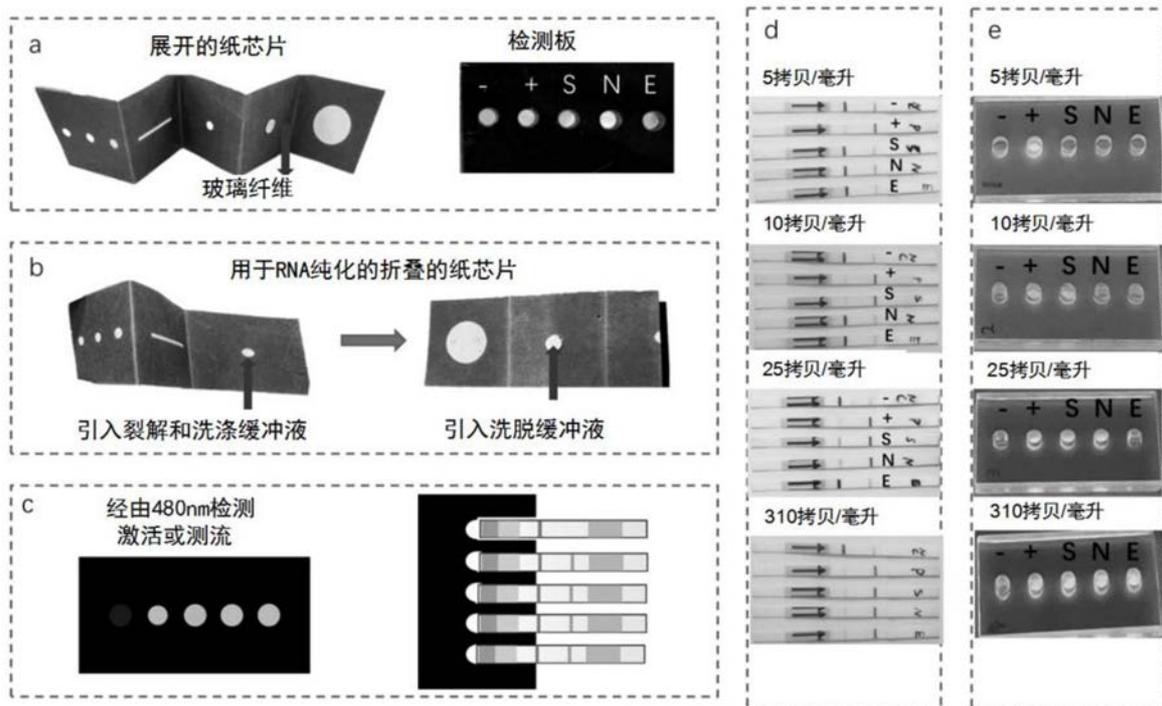


图4

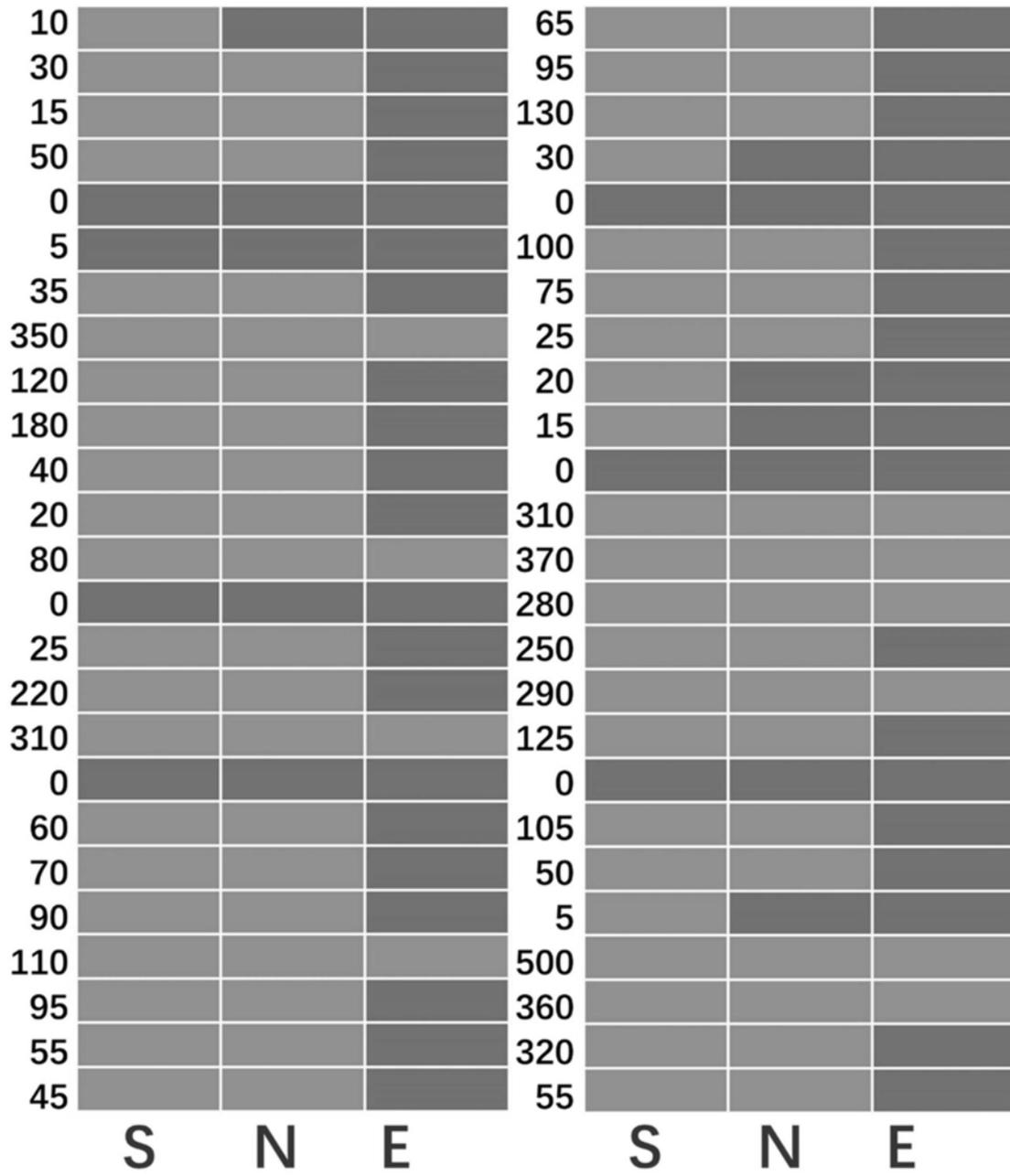


图5