



(21) 申请号 202310188098.7

(22) 申请日 2023.03.01

(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 张华 曹昊睿 毛康 钟理 汤琳

(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 康志梅

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6876 (2018.01)

C12Q 1/68 (2018.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页
序列表(电子公布) 附图14页

(54) 发明名称

一种检测土壤样本中hgcA基因丰度的方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种检测土壤样本中hgcA基因丰度的方法,包括如下步骤:(1)设计并合成特异性靶向hgcA基因一个或多个区域的一种或多种crRNA,将可编程的核酸酶分别与所述一种或多种crRNA共同孵育,得到一种或多种核酸酶-crRNA复合物;(2)从待检测土壤样本中获取DNA样本,将所述DNA样本与所述一种或多种核酸酶-crRNA复合物和报告探针共同孵育,得到检测物,其中所述孵育的温度为35℃~60℃;(3)对所述检测物进行信号检测。可以实现对hgcA基因的无扩增高灵敏检测,且检测温度范围宽,无需严格控温,背景信号干扰小,检出限低,可用于现场快速检测土壤中的甲基汞。

1. 一种检测土壤样本中hgcA基因丰度的方法,包括如下步骤:

(1) 设计并合成特异性靶向hgcA基因一个或多个区域的一种或多种crRNA,将可编程的核酸酶分别与所述一种或多种crRNA共同孵育,得到一种或多种核酸酶-crRNA复合物;

(2) 从待检测土壤样本中获取DNA样本,将所述DNA样本、所述一种或多种核酸酶-crRNA复合物和报告探针共同孵育,得到检测物,其中所述孵育的温度为35°C ~ 60°C;

(3) 对所述检测物进行信号检测。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述一种或多种crRNA选自第一gRNA、第二gRNA、第三gRNA中的一种或多种,

其中,所述第一gRNA具有如SEQ ID NO:3所示的序列,

和/或,所述第二gRNA具有如SEQ ID NO:4所示的序列,

和/或,所述第三gRNA具有如SEQ ID NO:5所示的序列。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述可编程的核酸酶选自Cas12、Cas13或Cas14核酸酶,优选地,所述可编程的核酸酶是Cas12核酸酶。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM ~ 45nM。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的方法,其特征在于,步骤(2)中,所述孵育的温度为42°C ~ 57°C,优选47°C ~ 57°C。

6. 根据权利要求2~5任一项所述的方法,其特征在于,所述crRNA包括第一gRNA,步骤(2)中,所述核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM ~ 25nM,所述孵育的温度为47°C ~ 57°C;

和/或,所述crRNA包括第二gRNA,步骤(2)中,所述核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM ~ 45nM,所述孵育的温度为42°C ~ 57°C;

和/或,所述crRNA包括第三gRNA,步骤(2)中,所述核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM ~ 7nM,所述孵育的温度为37°C ~ 57°C。

7. 根据权利要求2~6任一项所述的方法,其特征在于,所述crRNA包括第一gRNA、第二gRNA和第三gRNA,

优选地,步骤(2)中,所述核酸酶与第一gRNA形成的核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM ~ 25nM,所述核酸酶与第二gRNA形成的核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM ~ 45nM,所述核酸酶与第三gRNA形成的核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM ~ 7nM;

更优选地,步骤(2)中,所述孵育的温度为42°C ~ 57°C。

8. 根据权利要求1~7任一项所述的方法,其特征在于,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单链核酸序列的5'末端和3'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、IRDYE700、TYE665、AlexaFluor或ATTOTM633,所述猝灭基团选自IowaBlackRQ、IowaBlackFQ或BlackHole猝灭剂。

9. 根据权利要求1~8任一项所述的方法,其特征在于,所述报告探针包括序列5'-(6-FAM)-TTATTATT-3'-BHQ1。

10. 权利要求1~9任一项所述的方法在检测土壤中汞的应用,优选地,所述汞为甲基汞。

一种检测土壤样本中hgcA基因丰度的方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,具体涉及一种检测土壤样本中hgcA基因丰度的方法及其在检测土壤中汞的应用。

背景技术

[0002] CRISPR是近年来生物科技领域的里程碑技术,Cas12a是其中的代表性技术,仅需在一条crRNA引导下,Cas12a便能够完成对靶DNA的高精度识别并激活其非特异性切割ssDNA的反式切割活性。尽管Cas12a已在检测领域展现其巨大优势,背景信号干扰、灵敏度不足等问题却限制了该方法的进一步推广应用。即使没有靶标存在,Cas12a-crRNA复合物仍具备一定的反式切割活性,从而会产生一定的背景信号。现场检测往往缺乏能够区分背景信号和阳性信号的高分辨率精密设备,背景信号可能会严重干扰现场检测的最终结果。Cas12a检测体系的试剂成本也是其推广应用的另一大阻碍。并且,在没有预扩增等辅助信号放大模块的情况下,Cas12a的灵敏度也难以满足低浓度样本的检测需求。一些研究将其与恒温扩增结合起来以提升灵敏度,然而,这一过程却增加了操作的繁琐程度,尤其是当恒温扩增温度和Cas12a检测温度不同时。因此,在无扩增技术情况下,如何对检测体系进行优化以克服背景信号干扰和灵敏度不足,对Cas12a现场快速低成本检测具有重要意义。

[0003] 研究发现,微生物介导下的汞甲基化过程是稻田中MeHg生成的主要途径,以hgcA基因编码的corrinoide蛋白作为甲基供体将无机汞转换为甲基汞是微生物汞甲基化的关键路径。因此,hgcA能够在一定程度上指示微生物汞甲基化潜在能力,从而反应甲基汞潜在风险。

[0004] 现阶段,hgcA的主要检测方法是测序和荧光定量PCR(qPCR),然而冗长的前处理流程、高昂的检测成本以及对精密设备和专业人员的依赖使其仅能应用于实验室小规模检测。迄今为止,hgcA仍然无法被应用到甲基汞潜在风险现场快速筛查中。因此,开发出一种能够现场快速低成本检测hgcA基因丰度的方法很有必要。

发明内容

[0005] 为了解决现有技术中存在的上述技术问题之一,本发明提供了一种检测土壤样本中hgcA基因丰度的方法,可以实现对hgcA基因的无扩增高灵敏检测,且检测温度范围宽,无需严格控温,背景信号干扰小,检出限低,可用于现场快速检测土壤中的甲基汞。

[0006] 第一方面,本发明提供一种检测土壤样本中hgcA基因丰度的方法,包括如下步骤:

[0007] (1) 设计并合成特异性靶向hgcA基因一个或多个区域的一种或多种crRNA,将可编程的核酸酶分别与所述一种或多种crRNA共同孵育,得到一种或多种核酸酶-crRNA复合物;

[0008] (2) 从待检测土壤样本中获取DNA样本,将所述DNA样本与所述一种或多种核酸酶-crRNA复合物和报告探针共同孵育,得到检测物,其中所述孵育的温度为35℃~60℃;

[0009] (3) 对所述检测物进行信号检测。

[0010] 由于土壤如稻田土壤中hgcA的快速检测常常需要在野外进行,而此前基于基因编

辑的检测技术大多都需要严格的温度控制如37℃,限制了基于基因编辑的hgcA现场检测体系的推广应用。而本发明经研究发现,通过构建特定的核酸酶-crRNA检测体系,可将含有hgcA的DNA样本与Cas12a-crRNA复合物的孵育温度拓宽至35℃~60℃,即本发明的方法可以在较宽的温度范围内进行hgcA基因的检测,不需在精准控温的苛刻环境中即可实施。

[0011] 本发明步骤(2)中,所述孵育的温度为35℃~60℃,例如可以是35℃、37℃、40℃、42℃、45℃、47℃、50℃、52℃、55℃、57℃、59℃、60℃以及它们之间的任意值,在一些具体实施方式中,步骤(2)中,所述孵育的温度为42℃~57℃,优选47℃~57℃。

[0012] 在一些实施方式中,所述一种或多种crRNA包括第一gRNA、第二gRNA、第三gRNA中的一种或多种。在一些实施方式中,所述第一gRNA具有如SEQ ID NO:3所示的序列。在一些具体实施方式中,所述第二gRNA具有如SEQ ID NO:4所示的序列。在一些具体实施方式中,所述第三gRNA具有如SEQ ID NO:5所示的序列。

[0013] 在一些实施方式中,所述可编程的核酸酶选自Cas12、Cas13或Cas14核酸酶,优选地,所述可编程的核酸酶是Cas12核酸酶,例如可以是Cas12a核酸酶。本发明所述Cas12a核酸酶可以是enAsCas12a、AsCas12a、enAsCas12a-HF1中的任意一种。

[0014] 在一些实施方式中,步骤(1)中,所述孵育的温度为36℃~38℃,例如36℃、37℃、38℃或它们之间的任意值。

[0015] 对于低浓度样本,由于激活的核酸酶产生的荧光信号值可能会远低于其背景信号,很容易受到背景信号波动的干扰,更低浓度样本的检测信号甚至可能被过高的背景信号所湮灭。本发明经研究发现,通过选择合适的核酸酶-crRNA复合物浓度,可以大大降低检测中产生的背景信号,进一步降低检测限。

[0016] 在一些实施方式中,步骤(2)中,所述核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM~45nM,例如0.5nM、0.8nM、1nM、3nM、5nM、7nM、10nM、12nM、15nM、18nM、20nM、22nM、25nM、28nM、30nM、32nM、35nM、38nM、40nM、42nM、45nM或它们之间的任意值,优选1nM~30nM。需要说明的是,步骤(2)中,当所述核酸酶-crRNA复合物为多种时,本发明所述核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5M~45nM是指每一种核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5M~45nM。

[0017] 在一些实施方式中,步骤(2)中,所述crRNA包括第一gRNA,所述核酸酶与第一gRNA形成的核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM~25nM,例如0.5nM、0.8nM、1nM、5nM、8nM、10nM、12nM、15nM、18nM、20nM、22nM、25nM或它们之间的任意值,优选1nM~20nM。优选地,步骤(2)中所述孵育的温度为47℃~57℃,例如47℃、48℃、49℃、50℃、51℃、52℃、53℃、54℃、55℃、56℃、57℃或它们之间的任意值,优选47℃~52℃。

[0018] 在一些实施方式中,步骤(2)中,所述crRNA包括第二gRNA,所述核酸酶与第二gRNA形成的核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM~45nM,例如0.5nM、0.8nM、1nM、5nM、8nM、10nM、12nM、15nM、18nM、20nM、25nM、30nM、32nM、35nM、40nM、45nM或它们之间的任意值,优选1nM~30nM。优选地,步骤(2)中所述孵育的温度为42℃~57℃,例如42℃、45℃、47℃、50℃、52℃、55℃、57℃或它们之间的任意值。

[0019] 在一些实施方式中,步骤(2)中,所述crRNA为第三gRNA,所述核酸酶与第三gRNA形成的核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM~7nM,例如0.5nM、0.8nM、1nM、1.5nM、2nM、2.5nM、3nM、3.5nM、4nM、4.5nM、5nM、5.2nM、5.5nM、6nM、6.5nM、7nM或它们之间的任意值,优选1nM~5nM。优选地,步骤(2)中所述孵育的温度为37℃~57℃,例如38℃、40℃、42℃、45℃、47℃、

50℃、52℃、55℃、57℃或它们之间的任意值。

[0020] 本发明经研究还发现,通过将所述第一gRNA、第二gRNA和第三gRNA三条crRNA联用,可以产生协同作用,大幅提高检测灵敏度,降低检测限。在一些实施方式中,所述crRNA包括所述第一gRNA、第二gRNA和第三gRNA。优选地,步骤(2)中,所述核酸酶与第一gRNA形成的核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM~25nM,例如0.5nM、0.8nM、1nM、5nM、8nM、10nM、12nM、15nM、18nM、20nM、22nM、25nM或它们之间的任意值,优选1nM~20nM;所述核酸酶与第二gRNA形成的核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM~45nM,例如0.5nM、0.8nM、1nM、3nM、5nM、7nM、10nM、12nM、15nM、18nM、20nM、22nM、25nM、28nM、30nM、32nM、35nM、38nM、40nM、42nM、45nM或它们之间的任意值,优选1nM~30nM;所述核酸酶与第三gRNA形成的核酸酶-crRNA复合物的浓度为0.5nM~7nM,例如0.5nM、0.8nM、1nM、1.5nM、2nM、2.5nM、3nM、3.5nM、4nM、4.5nM、5nM、5.2nM、5.5nM、6nM、6.5nM、7nM或它们之间的任意值,优选1nM~5nM。更优选地,步骤(2)中,所述孵育的温度为42℃~57℃,例如42℃、45℃、47℃、50℃、52℃、55℃、57℃或它们之间的任意值。

[0021] 在一些实施方式中,所述第一gRNA与核酸酶形成的复合物、所述第二gRNA与核酸酶形成的复合物、所述第三gRNA与核酸酶形成的复合物具有不同的检出限。

[0022] 在一些实施方式中,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。

[0023] 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。

[0024] 在一些实施方式中,所述检测基团选自荧光素、6-荧光素、IRDYE 700、TYE 665、Alexa Fluor或ATTO TM633,所述淬灭基团选自Iowa BlackRQ、Iowa BlackFQ或BlackHole淬灭剂。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hgcA基因。

[0025] 在一些实施方式中,所述报告探针包括序列5'-(6-FAM)-TTATTATT-3'-BHQ1。其中6-FAM为6-荧光素。核酸酶例如Cas12是一种RNA引导的DNase,属于II类V-A类系统,可在靶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,或者直接利用便携光源激发显色进行可视化检测。因此,本发明的方法具有快速、原位检测hgcA基因的潜力。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,且所述检测物中包括所述hgcA基因,即所述土壤样本中含有hgcA基因。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,且所述检测物中不包括所述hgcA基因,即所述土壤样本中不含hgcA基因。

[0026] 第二方面,本发明提供第一方面所述的方法在检测土壤中汞的应用。

[0027] 优选地,本发明所述汞为甲基汞。

[0028] hgcA的丰度与甲基汞浓度存在正相关关系,因此,通过检测hgcA基因丰度,可以实现对具有汞甲基化基因的微生物进行检测,在一定程度上指示微生物汞甲基化潜在能力,从而反应甲基汞潜在风险。

[0029] 本发明的有益效果是:本发明的检测方法可在较宽的温度范围内进行,具有极强的抗干扰能力,极高的灵敏度,优异的定量性能和卓越的稳定性,对检测设备和条件要求低,检测结果还可利用便携光源进行可视化,可应用于各类偏远场地的快速筛查。此外,本发明的方法中,核酸酶-crRNA复合物用量极低,测试成本远低于经典Cas12a-crRNA检测方法,具有广泛的市场应用前景。

附图说明

[0030] 图1示出了实施例3中hgcA检出限测试实时荧光曲线及终点荧光信号图,其中图a、c和e分别是基于Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3的hgcA检出限测试实时荧光曲线图,图b、d和f分别是基于Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3的hgcA检出限测试终点荧光信号图。

[0031] 图2示出了实施例4中不同浓度Cas12a-crRNA检测效果示意图,其中图a和图g是不同浓度的Cas12a-crRNA1复合物检测1nM hgcA终点荧光信号柱状图;图b和图h是不同浓度的Cas12a-crRNA2复合物检测1nM hgcA终点荧光信号柱状图;图c和图i是不同浓度的Cas12a-crRNA3复合物检测1nM hgcA终点荧光信号柱状图;图d、e和f分别是不同浓度的Cas12a-crRNA1复合物、Cas12a-crRNA2复合物和Cas12a-crRNA3复合物检测1nM hgcA荧光信号变化速率柱状图。

[0032] 图3示出了实施例4中利用不同浓度Cas12a-crRNA检测hgcA荧光曲线图,其中图a、b和c分别是0.1nM Cas12a-crRNA1复合物、0.1nM Cas12a-crRNA2复合物和0.1nM Cas12a-crRNA3复合物检测1nM hgcA实时荧光曲线图;图d、e和f分别是1nM Cas12a-crRNA1复合物、1nM Cas12a-crRNA2复合物和1nM Cas12a-crRNA3复合物检测1nM hgcA实时荧光曲线图;图g、h、i分别是10nM Cas12a-crRNA1复合物、10nM Cas12a-crRNA2复合物和10nM Cas12a-crRNA3复合物检测1nM hgcA实时荧光曲线图;图j、k、l分别是100nM Cas12a-crRNA1复合物、100nM Cas12a-crRNA2复合物和100nM Cas12a-crRNA3复合物检测1nM hgcA实时荧光曲线图。

[0033] 图4示出了实施例5中,不同温度条件下Cas12a-gRNA检测终点荧光信号图;其中图a:32-62℃条件下Cas12a-gRNA1检测终点荧光信号图;图b:32-62℃条件下Cas12a-gRNA2检测终点荧光信号图;图c:32-62℃条件下Cas12a-gRNA3检测终点荧光信号图。

[0034] 图5示出了实施例5中,荧光强度-底物切割浓度线性拟合曲线;其中图a、b、c、d、e分别是37℃、42℃、47℃、52℃和57℃条件下荧光强度-底物切割浓度线性拟合曲线。

[0035] 图6示出了实施例5中,37℃条件下Cas12a-gRNA的活性评估;其中a、c、e分别是Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3底物切割实时曲线;d、b、f分别是Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3切割速率-底物浓度拟合曲线。

[0036] 图7示出了实施例5中,42℃条件下Cas12a-gRNA的活性评估;其中a、c、e分别是

Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3底物切割实时曲线;d、b、f分别是Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3切割速率-底物浓度拟合曲线。

[0037] 图8示出了实施例5中,47℃条件下Cas12a-gRNA的活性评估;其中a、c、e分别是Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3底物切割实时曲线;d、b、f分别是Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3切割速率-底物浓度拟合曲线。

[0038] 图9示出了实施例5中,52℃条件下Cas12a-gRNA的活性评估;其中a、c、e分别是Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3底物切割实时曲线;d、b、f分别是Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3切割速率-底物浓度拟合曲线。

[0039] 图10示出了实施例5中,57℃条件下Cas12a-gRNA的活性评估;其中a、c、e分别是Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3底物切割实时曲线;d、b、f分别是Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3切割速率-底物浓度拟合曲线。

[0040] 图11示出了实施例5中,Cas12a-crRNA K_m 、 K_{cat} 及 K_{cat}/K_m 温度变化曲线及柱状图;其中a、b、c分别是Cas12a-crRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3 K_m 温度变化柱状图;d、e、f分别是Cas12a-crRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3 K_{cat} 温度变化柱状图;g、h、i分别是Cas12a-crRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3 K_{cat}/K_m 温度变化柱状图。

[0041] 图12示出了实施例6中,微剂量-热稳定检测系统中Cas12a-crRNA检出限及终点荧光信号-hgcA浓度线性拟合图,其中a、c、e分别是Cas12a-crRNA1、Cas12a-crRNA2、Cas12a-crRNA3检出限测试终点荧光信号柱状图;b、d、f分别是Cas12a-crRNA1、Cas12a-crRNA2、Cas12a-crRNA3终点荧光信号-hgcA浓度线性拟合图。

[0042] 图13示出了实施例7中,微剂量-热稳定的crRNA偶联检测系统检出限测试终点荧光信号柱状图和终点荧光定量曲线图,其中,图a为终点荧光信号柱状图,图b为终点荧光定量曲线图。

[0043] 图14显示了实施例7中检出限测试实时荧光曲线;其中a、b、c分别为Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3单独使用时的检出限测试荧光曲线,d为Cas12a-gRNA1、Cas12a-gRNA2和Cas12a-gRNA3联用的MTC检出限测试荧光曲线。

[0044] 图15显示了实施例8中汞污染稻田土壤hgcA检测过程和检测机理示意图。

[0045] 图16显示了实施例8中MTC测试加标样本效果评估;其中图a为MTC测试不同浓度加标样本终点荧光信号柱状图;图b为MTC测试加标样本定量标准曲线;图c为MTC测试不同浓度加标样本可视化结果及灰度值柱状图。

具体实施方式

[0046] 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。

[0047] 本文所用的术语“检出限”是指,使用crRNA能检测到的样本中hgcA的最低浓度。

[0048] 本发明各实施例中所用的主要试剂的信息如下:

[0049] NEB Buffer2.1 (B7202S) 购自New England Biolabs (USA),crRNA合成于广州博莱斯(中国),HgcA质粒由金唯智(USA)构建,HgcA序列见表1。

[0050] 感受态细胞DH5 α (B528413-0010)、IPTG (A100487)、TCEP (A600974)、ssDNA探针购自上海生工(中国)。

[0051] UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (10977023) 购自赛默飞(USA)。

[0052] Cas12a核酸酶为enAsCas12a-HF1。

[0053] enAsCas12a-HF1表达质粒(P8766)来自淼灵生物(中国)。

[0054] 硫酸卡那霉素(K8020)购自索莱宝(中国)。

[0055] Cocktail蛋白酶抑制剂(S25910)、1M HEPES (R20072) 购自源叶生物(中国)。

[0056] 表1

名称	序列
[0057] <i>HgcA</i>	GINVWCAAGKGTFGTGEIVRRIASSRLDEVVSHRRLILPILGAPGVS AHEVAQRSGFSVSYATIRAADLPVYLDNDMVTTEAMREMSFNLYER LVLLPVELVLALKSAALAGVVIFLLFAVSDGPHAGVTALFGWLGACL SGIVAGPLLLPWFPGRSFALKGAMAGLVWSALFYMLAGGPAWNMW LSVAVFLTLAASSFYTLNFTGCTPYT (氨基酸序列, SEQ ID NO: 1) GGCATCAACGTCTGGTGCCTGCAGGCAAGGGGACCTTCGGCAC TGGGGAAGTGGTGCAGCGGATCGCATCCAGCAGACTGGATGAGG TCGTCAGCCACCGCAGGCTGATTCTGCCAATCCTGGGGGCACCGG GTGTATCGGCCCATGAGGTGGCCCAACGCAGCGGCTTTTCGGTCA GTTACGCGACCATCAGAGCCGCGGACCTGCCGGTATACTGGACA ACGACATGGTGACGACAGAAGCGATGCGGGAGATGAGCTTCAAC CTCTACGAGCGGTTGGTGCTGCTGCCGGTGGAGTTGGTGCTGGCG CTCAAGTCGGCCGCATTGGCTGGTGTAGTGATTTTTCTGTTGTTTG CCGTTTCAGACGGCCCTCATGCCGGAGTTACGGCATTATTCGGCTG GCTGGGCGCTTGTCTGTCCGGAATTGTCGCAGGGCCGCTCCTGCT TCCCTGGTTTCCCGGCCGGAGTTTTGCCTTAAAGGGAGCCATGGC CGGGCTGGTGTGGAGCGCCTTGTCTATATGTTGGCAGGGGGACC GGCATGGAACATGTGGCTGTCCGTCGCCGTTTTTTTGACATTGTGCG GCGGCAAGCTCCTTCTACACCCTCAACTTCACCGGCTGCACCCCC TACACC (核苷酸序列, SEQ ID NO: 2)
[0058] gRNA1	UAAUUUCUACUCUUGUAGAUAAGGGAGCCAUGGCCGGGCU (SEQ ID NO: 3)
gRNA2	UAAUUUCUACUCUUGUAGAUCGGCAUUAUUCGGCUGGCUG (SEQ ID NO: 4)
gRNA3	UAAUUUCUACUCUUGUAGAUGGCUGGCUGGGCGCUUGUCU (SEQ ID NO: 5)
ssDNA 探针	5'-FAM/TTATTATT/3'-BHQ1

[0059] 实施例1:制备enAsCas12a-HF1

[0060] 制备过程中,使用如下缓冲液:

[0061] 缓冲液A:20mM HEPES,pH 7.5,300mM NaCl,2mM MgCl₂,20mM咪唑,0.5mM TCEP,0.1% Triton X-100,0.25mg/mL溶菌酶,1:100蛋白酶抑制剂(S25910);

[0062] 缓冲液B:50mM Tris-HCl,pH=8.0,20mM咪唑,300mM NaCl,0.5mM TCEP;

[0063] 缓冲液C:50mM Tris-HCl,pH=8.0,300mM咪唑,300mM NaCl,0.5mM TCEP;

[0064] 缓冲液D:20mM Tris-HCl,pH 7.5,200mM NaCl,10% (v/v) 丙三醇。

[0065] 首先通过热激转化将pET-28b-T7-henAsCas12a-HF1质粒导入Rosetta 2(DE3)感受态细胞。然后将其接种到含卡那霉素和氯霉素的双抗琼脂LB培养基,37°C过夜培养后,选择合适的菌落并将其接种到100mL液体双抗LB培养基中37°C,220RPM过夜培养至饱和。取25mL饱和菌液加入到1L双抗LB液体培养基中,37°C培养至对数生长中期($OD_{600}=0.4-0.6$)后加入IPTG(终浓度0.1mM),18°C过夜表达。最后4°C,5000rpm离心十分钟,弃去上清,并将菌体保存于-80°C备用。

[0066] 冰上解冻菌体,按照1:5比例向菌体中加入裂解缓冲液A并进行超声破碎。裂解完成后,4°C下,40000×g离心1h 30min。将上清液加载到Histrap HP,然后在AKTApure 25M(Cytiva,USA)利用缓冲液B和缓冲液C进行线性洗脱并收集洗脱峰。然后利用脱盐柱将缓冲液置换为缓冲液D并利用Qubit 4.0测试蛋白浓度,利用液氮速冻蛋白,置于-80°C保存待用。

[0067] 实施例2:制备HgcA质粒

[0068] 将编码HgcA的核酸序列插入到pUC57-Kan载体中制备HgcA表达质粒通过热激转化导入到感受态细胞DH5 α 中,然后将其接种到卡那霉素抗性的琼脂LB培养基中。37°C过夜培养后,挑选合适菌落并将其接种到100mL卡那霉素抗性的液体LB培养基中,37°C过夜培养至饱和,然后收集菌体,利用天根质粒小提试剂盒(DP103)提取质粒,提取过程按照说明书进行。提取完成后,利用Qubit 4.0测试DNA浓度,分装后保存于-80°C。

[0069] 实施例3:Cas12a-crRNA体系构建

[0070] 配置含1 μ M Cas12a、1.25 μ M crRNA、1XNEB buffer2.1的预组装复合物母液,37°C孵育10min,以制备终浓度为1 μ M的Cas12a-crRNA1复合物,Cas12a-crRNA2复合物和Cas12a-crRNA3复合物。然后分别取2 μ L母液加入到16 μ L含有不同浓度hgcA质粒的1X NEB buffer2.1的溶液中,每个浓度设置4个平行,37°C孵育10min后,加入2 μ L探针,探针终浓度为500nM,37°C孵育60min,并利用ABI7500记录荧光数据,结果如图1所示。其中图中背景信号= $AVE_{NC}+3STD_{NC}$,NC=阴性对照。

[0071] 实验结果:如图1b所示,Cas12a-crRNA1具有高达58万的背景信号和较低的S/N比值,同时,其检出限也仅有250pM。考虑到即便是500pM浓度的样本,其信号值扣除背景后也仅有15万左右,因此,对于更低浓度样本,激活的Cas12a产生的荧光信号值可能会远低于其背景信号,因而很容易受到背景信号波动的干扰。基于此,Cas12a-crRNA1体系的灵敏度可能远低于250pM,但是更低浓度的检测信号却被过高的背景信号所湮灭。

[0072] 如图1d和图1f所示,相比于Cas12a-crRNA1,Cas12a-crRNA2和Cas12a-crRNA3的背景信号相对较低,但其绝对值仍高达10-20万AU左右,类似的,背景信号可能同样严重干扰了低浓度样本的检测。此外,如图1a、图1c和图1e所示,Cas12a-crRNA2和Cas12a-crRNA3的检出限要低于Cas12a-crRNA1,这可能也并不能说明其灵敏度存在差异,造成这一现象的原因很可能是前两者背景信号低于后者,因而125pM和62.5pM的检测信号未被湮灭所致。

[0073] 实施例4:微剂量检测体系构建

[0074] 配置含1 μ M Cas12a、1.25 μ M crRNA、1XNEB buffer2.1的预组装复合物母液,37°C孵育10min,以制备Cas12a-crRNA1复合物,Cas12a-crRNA2复合物和Cas12a-crRNA3复合物。然后稀释10、100、1000倍后,各取2 μ L加入到16 μ L含有1.25nM hgcA质粒的1X NEB buffer2.1的溶液中,每个梯度设置4个平行,37°C孵育20min后加入2 μ L探针,探针终浓度为

500nM, 37°C 孵育60min, 并利用ABI7500记录荧光数据, 结果如图2和图3所示。

[0075] 实验结果:

[0076] 三种Cas12a-crRNA复合物的浓度在100nM时, 均具有较高的背景信号。然而, 靶标浓度实际上不超过500pM, 复合物过剩两百倍或更高。因此, 大量过剩的复合物可能是引发极高背景信号的原因。基于这一设想, 发明人设计了以复合物浓度为唯一变量的实验。如图2和图3所示, 当Cas12a-crRNA1浓度低于30nM例如20nM时、Cas12a-crRNA2浓度低于50nM例如30nM时, 空白组荧光信号均降至0左右, 指示此时背景反应已经被彻底抑制, 即未被靶标激活的Cas12a-crRNA复合物不会产生信号。而在加入hgcA的实验组中, Cas12a-crRNA1和Cas12a-crRNA2复合物浓度均为10nM时, 终点荧光强度和反应速率未出现大幅度降低。但是当复合物浓度进一步下降到1nM时, 加入hgcA的实验组的终点荧光信号强度和反应速率均有明显下滑, 当浓度下降至0.1nM时, 荧光信号和反应速率均降至0。因此, Cas12a-crRNA1在高于0.1nM且低于30nM的浓度下, 尤其是1nM~20nM的浓度下进行检测, Cas12a-crRNA2在高于0.1nM且低于50nM的浓度下, 尤其是1nM~30nM的浓度下进行检测, 可消除背景信号干扰且仍可维持较高的反应速率。

[0077] 对于Cas12a-crRNA3, 其整体变化规律与Cas12a-crRNA1和Cas12a-crRNA2较为类似, 但是, 从图2和图3中可以看出, Cas12a-crRNA3复合物浓度需要低于8nM例如1nM、3nM、5nM时, 才能够彻底抑制其背景信号。虽然浓度为1nM时其反应速率有较大幅度的下降, 但是, 考虑到其终点荧光信号强度等仍然完全可以满足检测需求, 适当牺牲反应速率以换取0背景信号无疑具有更大收益。因此Cas12a-crRNA3更适合采用1nM~5nM浓度。这一结果也表明, 不同的crRNA最适反应浓度会有一定差异, 因此, 在构建针对不同靶标的CRISPR/Cas12a检测体系时, 进行Cas12a-crRNA复合物剂量探讨是非常重要的。然而, 目前CRISPR/Cas12a检测体系的构建往往缺少这一过程。这可能也是造成部分检测未能取得理想效果的重要原因。

[0078] 值得注意的是, 由于靶标终浓度为1nM, Cas12a-crRNA复合物从100nM降至1nM时仍处于饱和或过剩状态, 激活的Cas12a-crRNA复合物浓度并未发生变化, 所以, 其终点荧光信号和反应速率的变化主要是由于复合物反应活性变化所致。因此, 当复合物浓度从过剩100倍降低至过剩10倍时, 其反应活性几乎没有发生变化, 然而, 当进一步降低复合物浓度时, 其反应活性却会出现明显下滑。这一现象说明, 适当过量的Cas12a-crRNA复合物能够显著提升靶标激活的Cas12a-crRNA复合物的反应活性, 但进一步提升复合物用量却不仅不会进一步有效提高反应效率, 反而会造成高昂的背景信号。因此, 选取合适的复合物浓度对于构建CRISPR/Cas12a检测体系至关重要。

[0079] 实施例5: 热稳定性评估

[0080] 探究不同温度对Cas12a活性的影响, 具体操作如下:

[0081] 配置含1 μ M Cas12a、1.25 μ M crRNA、1X NEB buffer 2.1的预组装复合物母液, 37°C 孵育10min, 其中crRNA分别为crRNA1 (gRNA1)、crRNA2 (gRNA2) 和crRNA3 (gRNA3)。稀释100倍后, 取2 μ L加入到16 μ L含有1.25nM质粒的1X NEB buffer 2.1溶液中, 37°C 孵育20min后分别加入2 μ L不同浓度的探针, 其终浓度分别为1000nM、500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM、15.63nM。分别在32°C、37°C、42°C、47°C、52°C、57°C、62°C孵育60min, 并利用ABI7500记录荧光数据, 结果如图4所示。

[0082] 从图4中可以看出,该亚型Cas12a(即enAsCas12a-HF1)在37°C至57°C之间反应活性较强,降低至32°C或升高至62°C时,反应活性则会出现明显降低,指示该反应适宜的温度区间为37°C-57°C。

[0083] 接着,将荧光变化曲线转换为底物切割曲线(图5-图10)以探讨 K_m 、 K_{cat} 等关键反应参数的变化, K_m 、 K_{cat} 的结果如图11所示,Cas12a-crRNA1、Cas12a-crRNA2和Cas12a-crRNA3 K_m 均呈现出先升后降再升高的趋势,并均在47°C拥有较小的 K_m 值,指示该条件下复合物和底物亲和性较高,当温度从52°C升高至57°C时, K_m 值急剧升高,说明温度超过52°C后,复合物和底物的亲和性急剧下降。Cas12a-crRNA1的 K_{cat} 变化趋势同 K_m 存在一定差异,仅37°C升高至42°C时略有降低,从42°C升高至57°C时,其活性不断升高,并在57°C取得最大值。而对于Cas12a-crRNA2和Cas12a-crRNA3,其 K_{cat} 变化趋势与其 K_m 一致,均表现出先升高在降低再升高的规律。在37°C和47°C条件下 K_{cat} 较低,指示此时Cas12a-crRNA催化底物切割效率不足。当温度进一步升高时,尤其是52°C升至57°C时, K_{cat} 值急剧升高,并在57°C时拥有最大 K_{cat} 值,其绝对值甚至可达37°C条件下10倍以上。整体来说,enAsCas12a-HF1在温度较低时具有较高底物亲和性,在温度较高时,具有较高催化效率。

[0084] 从亲和性和催化效率两方面的 K_{cat}/K_m 参数综合来看,Cas12a-crRNA1、Cas12a-crRNA2和Cas12a-crRNA3整体变化规律较为类似,呈现出先升后降的趋势。Cas12a-crRNA2和Cas12a-crRNA3均在47°C底物亲和性取得最大值,并在较宽的温度范围内(分别为42-57°C和37-57°C)具有较高 K_{cat}/K_m 值;而Cas12a-crRNA1在52°C底物亲和性取得最大值,并在47-52°C具有较高 K_{cat}/K_m 值。

[0085] 综上所述,enAsCas12a-HF1体系具有宽达20°C的适宜温度区间以及5-20°C的较佳温度区间,因此利用该体系检测时并不需要精准控温,进一步降低了对场地检测条件的要求。此外,与传统方法中的将反应温度设置在37°C相比,本发明的方法可以将反应温度提高至47°C且47°C条件下,Cas12a-crRNA1-3 K_{cat}/K_m 分别为37°C时的2.85、2.37和1.64倍,说明将温度从37°C调高到47°C后会显著提升复合物反式切割活性。

[0086] 实施例6:构建微剂量-热稳定的检测系统

[0087] 配置3 μ M Cas12a、1.25 μ M crRNA、1X NEB buffer2.1的预组装复合物母液,37°C孵育10min,以制备Cas12a-crRNA1复合物,Cas12a-crRNA2复合物和Cas12a-crRNA3复合物。将Cas12a-crRNA1复合物和Cas12a-crRNA2复合物均稀释十倍,将Cas12a-crRNA3稀释100倍,然后各取2 μ L加入到18 μ L含有不同浓度质粒的1XNEB buffer2.1溶液中,探针浓度为500nM,47°C孵育60min,并利用ABI7500记录荧光数据,结果如图12所示。

[0088] 实验结果:Cas12a-crRNA1、Cas12a-crRNA2和Cas12a-crRNA3的检出限和线性范围测试结果如图12所示,其灵敏度分别达到3.9pM,1.95pM和15.63pM,较传统方法分别降低64倍,32和4倍;其线性范围分别为3.9pM-125pM,1.95pM-125pM,15.63pM-125pM。这一结果表明,通过微剂量体系降低背景信号是提升灵敏度的有效策略,这也为后续高灵敏无扩增Cas12a检测提供了重要参考。

[0089] 实施例7:构建微剂量-热稳定的crRNA偶联(Microdose and Thermal-Stability Coupling crRNA,MTC)检测系统

[0090] 考虑到稻田土壤系统可能存在低丰度的hgcA,需要进一步改进以提高检测灵敏度,降低检测限。本发明在温度和复合物用量优化的基础上构建了3条crRNA联用的微剂量-

热稳定-crRNA联合检测系统(MTC)。

[0091] 配置 $3\mu\text{M}$ Cas12a、 $1.25\mu\text{M}$ crRNA、1X NEB buffer2.1的预组装复合物母液, 37°C 孵育10min, 其中crRNA包括crRNA1(gRNA1)、crRNA2(gRNA2)和crRNA3(gRNA3)三条crRNA, 得到Cas12a-crRNA1、Cas12a-crRNA2和Cas12a-crRNA3三种复合物的混合物。取 $0.67\mu\text{L}$ 孵育后的复合物母液加入到 $18\mu\text{L}$ 含有不同浓度质粒的1X NEB buffer2.1溶液中, 探针浓度为 500nM , Cas12a-crRNA1浓度为 10nM , Cas12a-crRNA2浓度为 10nM , Cas12a-crRNA3浓度为 1nM , 47°C 孵育60min, 并利用ABI7500记录荧光数据。

[0092] 实验结果:图13a和图13b分别为微剂量-热稳定的crRNA偶联检测系统检出限测试终点荧光信号柱状图和终点荧光定量曲线图。从图13可以看出, MTC可检测到低至 0.49pM 的hgcA, 比非联用条件下最为灵敏的Cas12a-crRNA2体系还要低四倍, 其线性范围为 $0.98-125\text{pM}$, 超过三个数量级。并且, 如图14所示, 相同浓度条件下, 三条crRNA联用的体系其信号值也显著高于Cas12a-crRNA1(浓度为 10nM)、Cas12a-crRNA2(浓度为 10nM)和Cas12a-crRNA3(浓度为 1nM)单独检测时信号值之和, 而与此同时, 其背景信号仍然为0。这表明联用并非三个体系的简单叠加, 而是起到了 $1+1+1>3$ 的效果。因为假设联用体系是简单叠加, 考虑到Cas12a-crRNA1和Cas12a-crRNA3的灵敏度相对较差, 联用的检出限应当与Cas12a-crRNA2类似, 即 1.95pM 附近, 然而联用的灵敏度达到了 0.49pM 。此外, 如果是单纯叠加, 联用体系的信号值应当是Cas12a-crRNA1、Cas12a-crRNA2与Cas12a-crRNA3信号值之和, 然而, 联用体系的荧光信号比单独使用Cas12a-crRNA1、Cas12a-crRNA2与Cas12a-crRNA3荧光信号之和还要高出50%。这说明结合不同crRNA的复合物在识别靶标的过程中可能出现了协同效应, 提升了反式切割效率和灵敏度。

[0093] 虽然目前没有关于hgcA快速检测方法的报道, 但是通过对比以基因编辑为原理的其他目标检测技术方法进行比较, 相比于其他检测方法, 该体系展现出了极高的灵敏度和较宽的线性范围, 特别值得一提的是检测限甚至低于一些恒温扩增与Cas联用的方法。

[0094] 实施例8:实际样本验证与加标测试

[0095] 铜仁是世界汞都, 含有丰富的汞矿资源, 汞矿资源的开采, 使得当地稻田系统具有较高的汞污染风险。因此, 拟在铜仁采集稻田土壤系统进行验证。汞污染稻田土壤hgcA检测过程和检测机理如图15所示。汞污染稻田土壤hgcA检测过程为: 首先取汞污染稻田表层土壤, 然后利用土壤DNA提取试剂盒裂解和纯化土壤微生物DNA, 接下来将纯化后的DNA加入到CRISPR/Cas12a检测体系中, 孵育一段时间后, 即可产生具有浓度效应的荧光信号, 这一荧光信号还可以通过蓝光灯进行可视化。汞污染稻田土壤hgcA检测分子机制为: 含有hgcA的微生物经过裂解后会释放出相应的基因片段, Cas12a-crRNA复合物会特异性识别hgcA基因中与crRNA识别区域互补的区段并进行顺式切割。然后, Cas12a的反式切割活性会被激活, 进而会非特异性切割单链DNA探针, 探针两端的FAM荧光基团和猝灭基团BHQ-1分离, FAM荧光信号恢复。

[0096] 采集贵州铜仁($E 109^\circ 12' 18.36''$, $N 27^\circ 30' 38.12''$)水稻表层土, 除去水稻根系等杂质后, 利用Qiagen Power Soil Kit提取土壤样本中的DNA, 详细操作步骤如下:

[0097] 1. 加入 0.25g 土壤样品到一个PowerBead Tubes中并涡旋混匀;

[0098] 2. 加入Solution C1并颠倒混匀然后固定在涡旋仪适配器上, 最大转速震荡10min;

[0099] 3.10000g离心30s后取上清液转移至2ml Collection Tube并加入250 μ L Solution C2;

[0100] 4.10000g离心1min取上清液,并加入Solution C3,4度孵育后离心1min;

[0101] 5.取上清液,加入C4,混匀后降溶液加载到硅胶柱上,离心后弃掉废液;

[0102] 6.加入C5,离心后弃去滤液,重复3次;

[0103] 7.加入洗脱液,离心后收集洗脱液待用。

[0104] 按照上述操作提取土壤样本中的DNA后,采用与实施例7中相同的方法,向土壤DNA样本中加入不同浓度质粒,然后利用MTC检测系统测试不同浓度的加标样本,每个浓度测试4个平行,具体实验操作见实施例7,并利用ABI7500记录荧光数据,然后根据荧光数据和标准曲线换算出样本浓度和加标回收率,结果如图16所示。

[0105] 实验结果:考虑到Cas12a的识别区段仅有20个碱基左右,而稻田土壤微生物众多,MTC能否不被土壤环境中大量存在的其他类型DNA干扰尚不清楚。基于此,不同浓度的质粒被加入到不含靶标片段的土壤样本中,以评估MTC在实际样本中的测试能力。

[0106] 如图16所示,尽管土壤微生物DNA浓度很高,裂解液中DNA浓度达到31.8ng/ μ L,MTC仍完全能够抵抗土壤中各类微生物基因组和质粒的干扰,未加标样本均无任何信号。同时,MTC的灵敏度没有受到任何影响,仍然可以检测到低至0.49pM浓度的质粒,并且,其定量能力也未受到太大影响,线性范围仍为0.98-125pM,线性拟合R²高达0.99以上。如表2所示,检测范围内,其回收率介于90-110%,可实现对土壤加标样本的精准定量。

[0107] 表2

[0108]

加入HgcA (pM)	样本量	平均值 (pM)	RSD (%)	回收率 (%)
0.98	4	1.07	13.76	109.05
1.95	4	2.03	4.94	103.70
3.91	4	3.75	3.80	96.00
7.81	4	7.53	2.43	96.33
15.63	4	16.68	5.31	106.73
31.25	4	33.13	7.52	106.03
62.5	4	57.76	2.23	92.42
125	4	120.37	4.55	96.30

[0109] 此外,针对部分偏远地区现场检测缺乏荧光读取设备的问题,本研究进一步开发了MTC现场可视化测试方法。完成反应孵育后,测试结果可直接利用480nm便携光源激发显色,如图16所示,该方法灵敏度达0.49pM,与荧光读取装置灵敏度基本一致,通过ImageJ提取显色数据后还可进一步实现半定量分析,从而为偏远地区hgcA现场快速检测和甲基汞潜在风险筛查提供了关键方法。

[0110] 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。

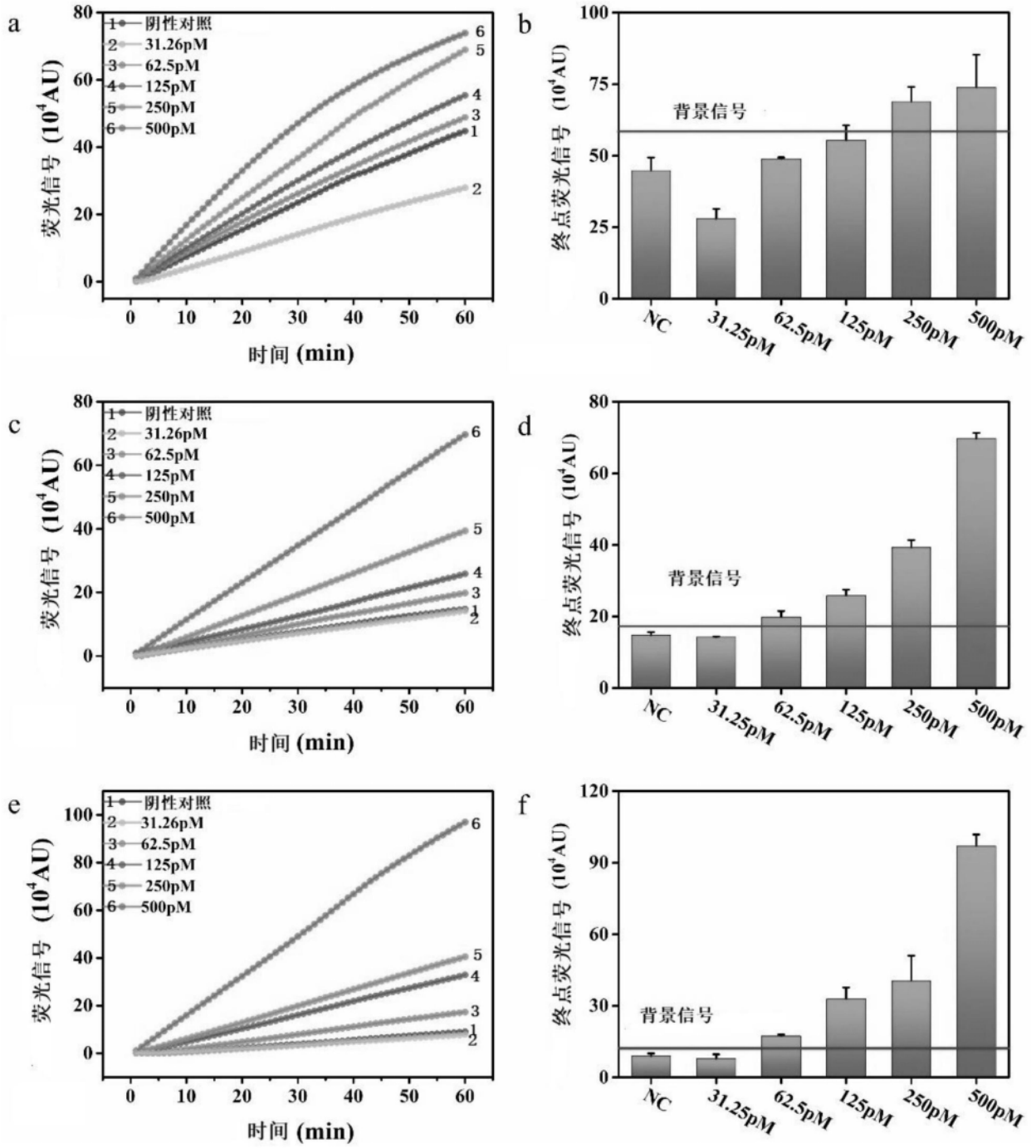


图1

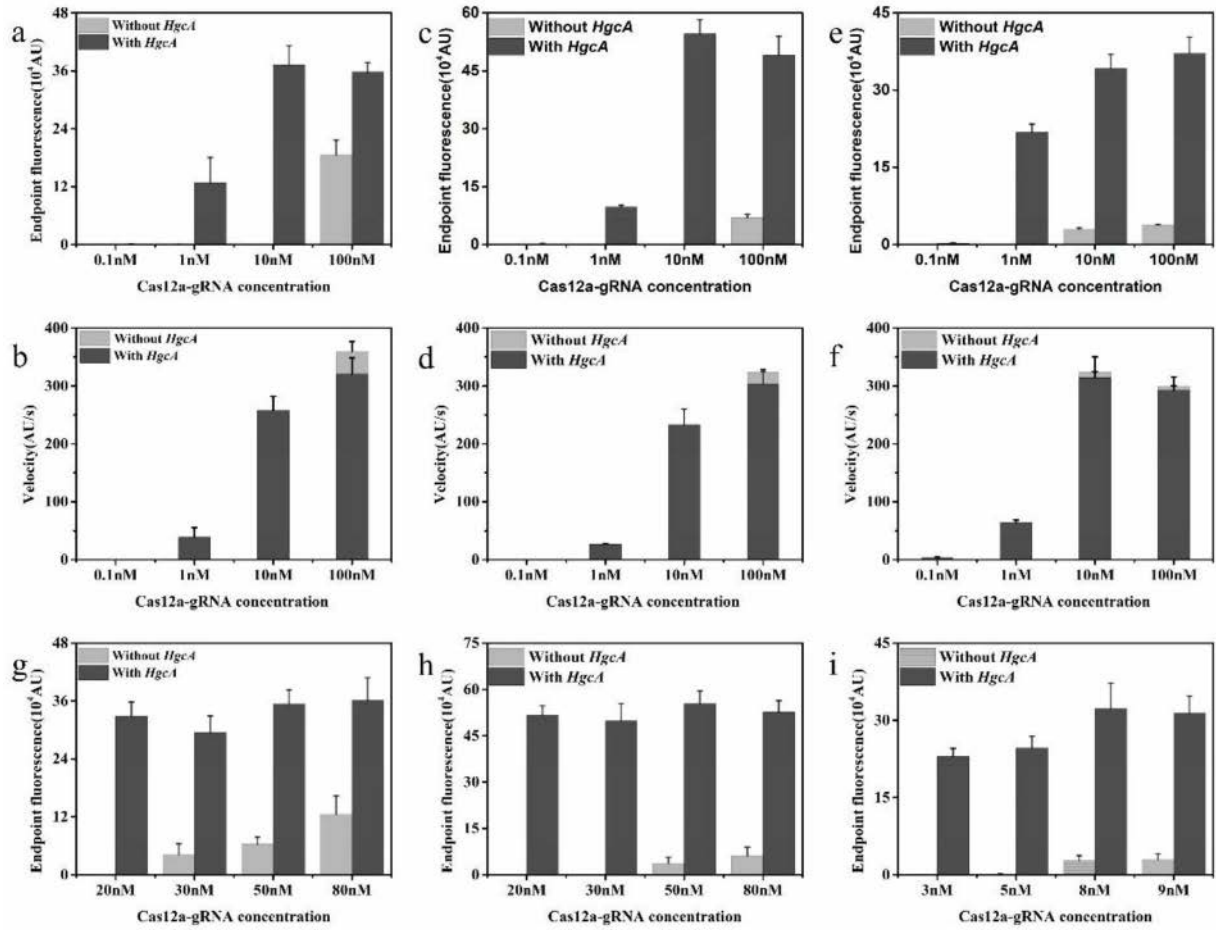


图2

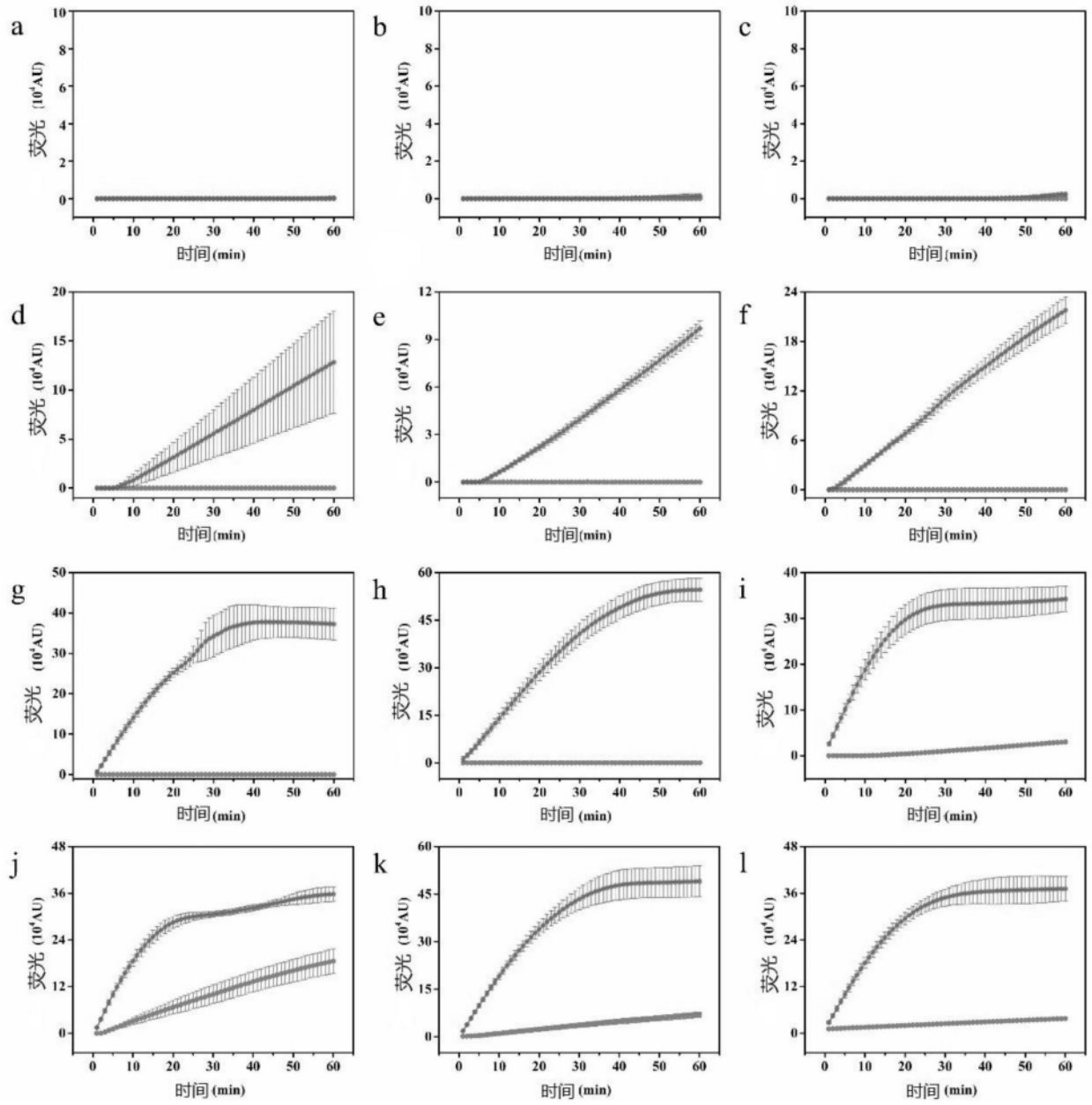


图3

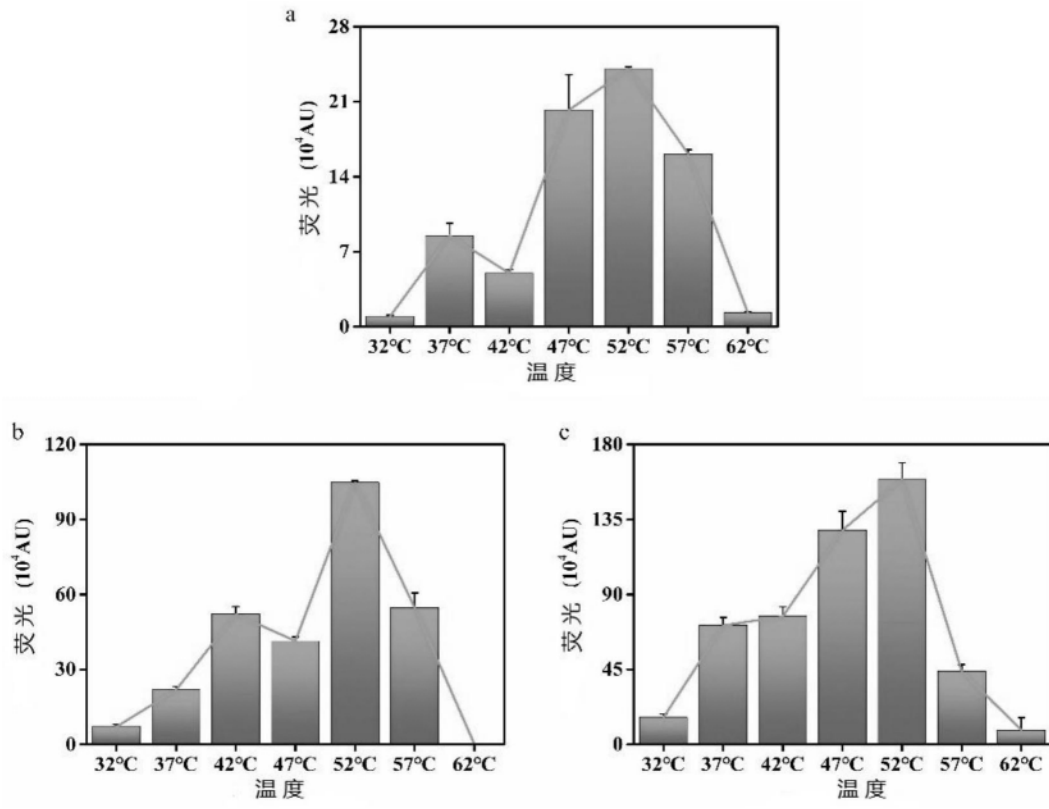


图4

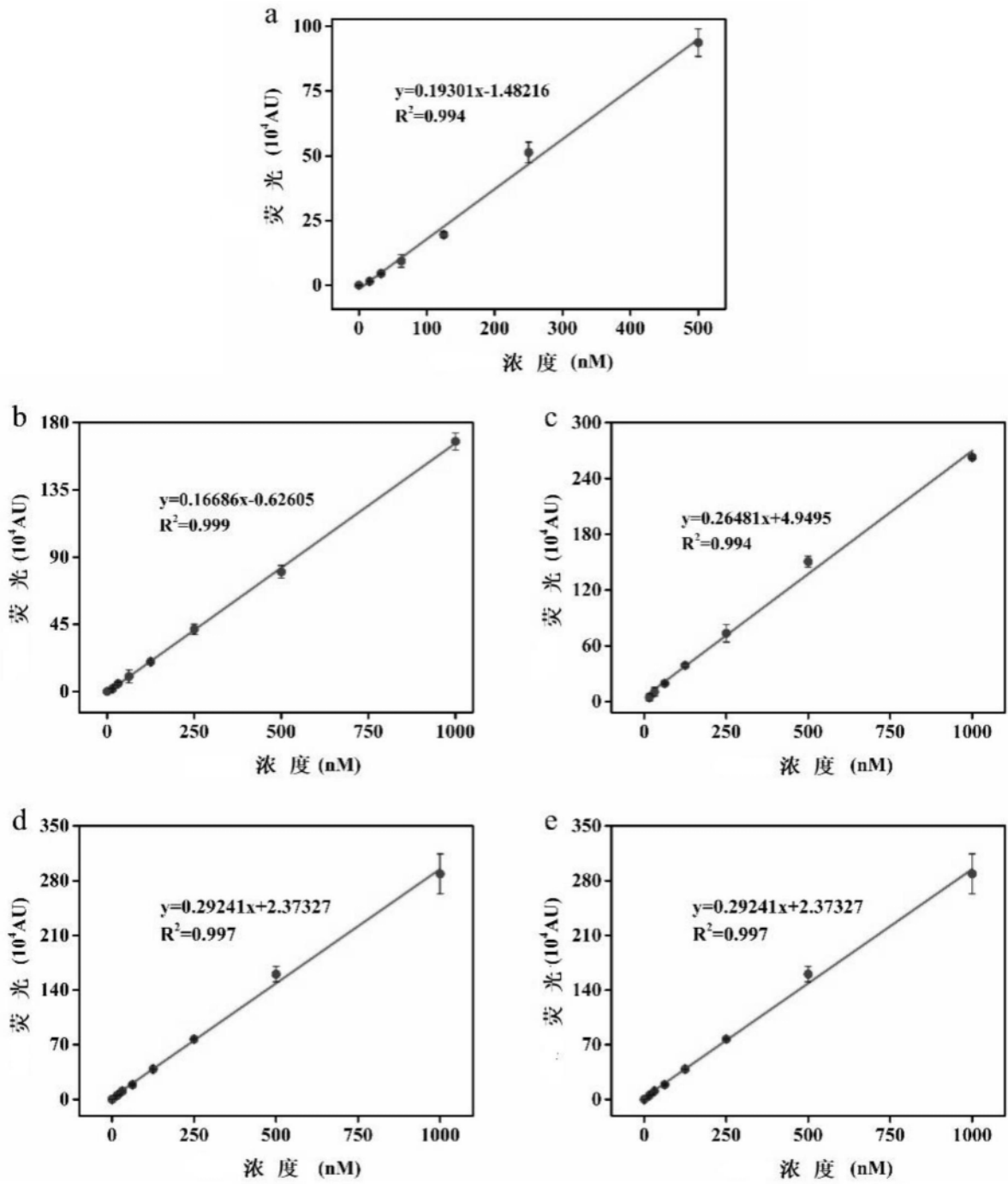


图5

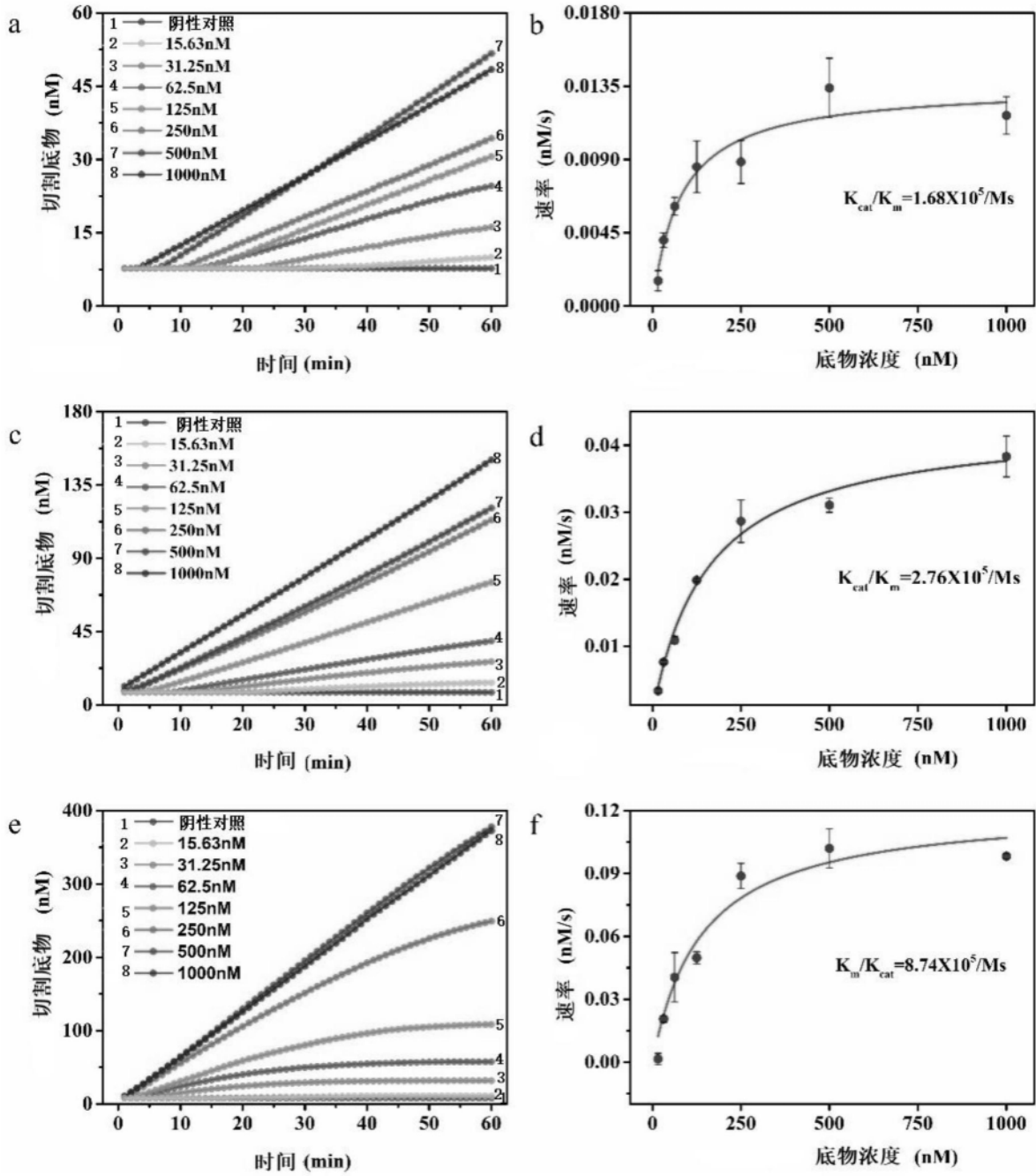


图6

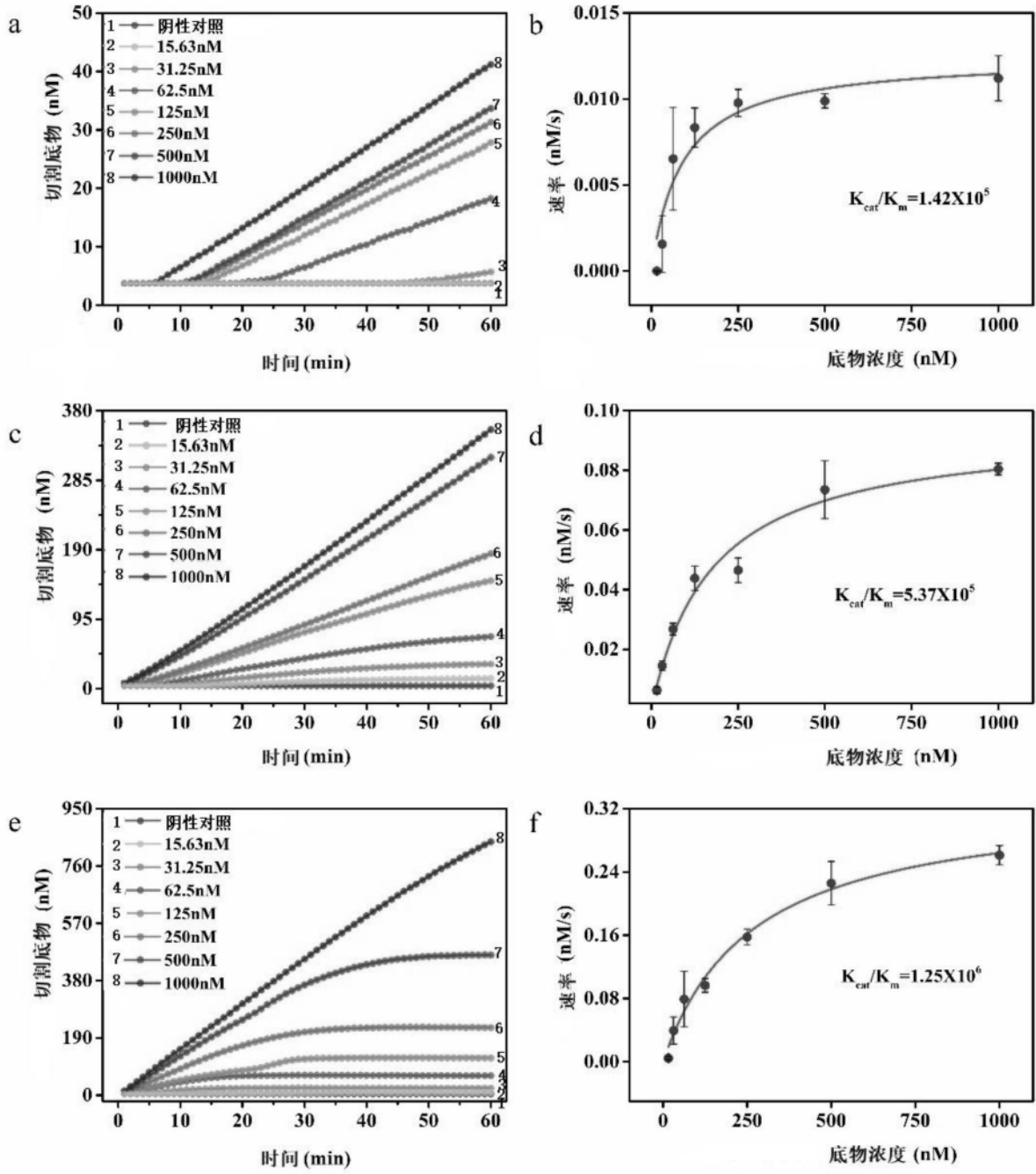


图7

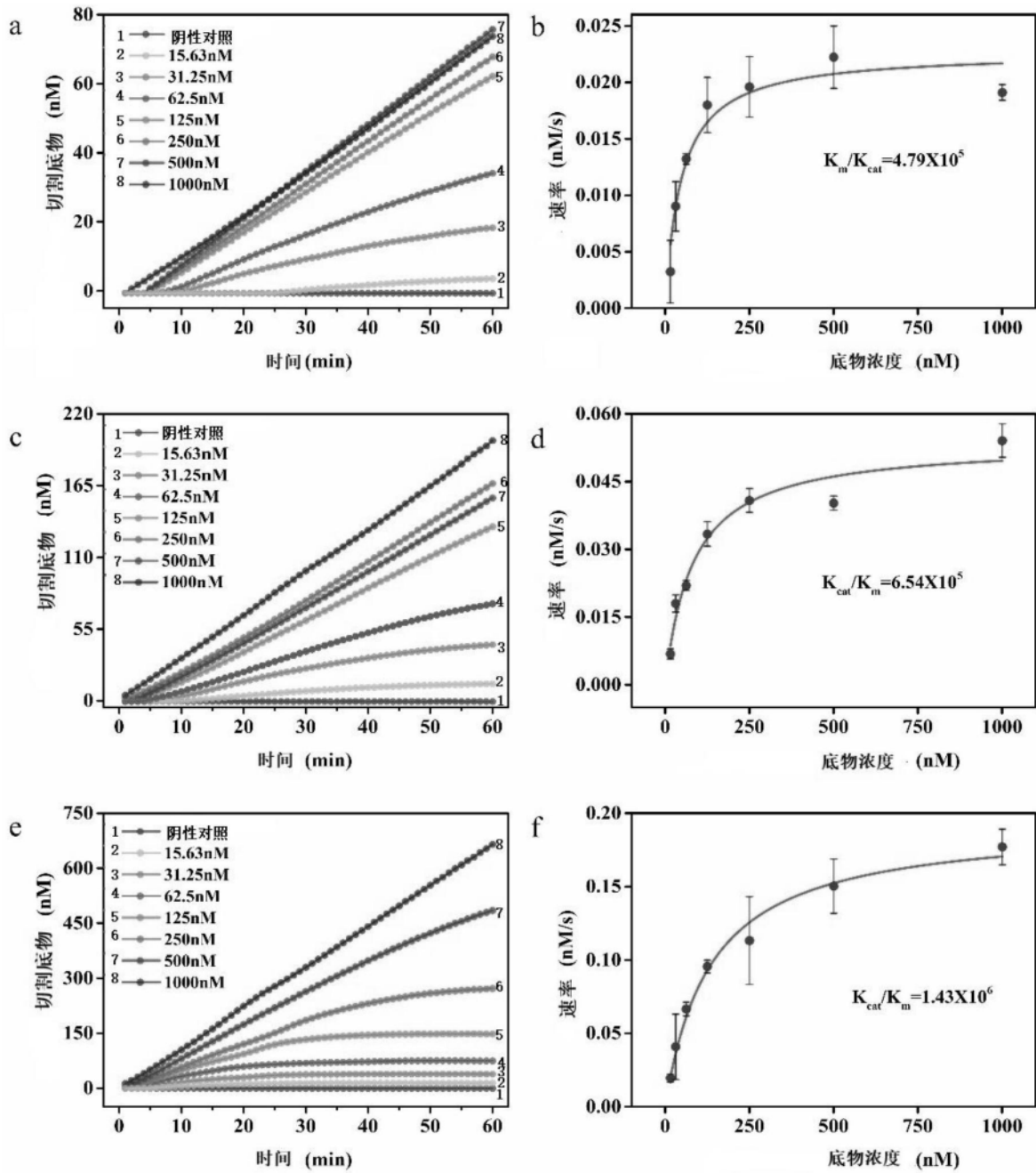


图8

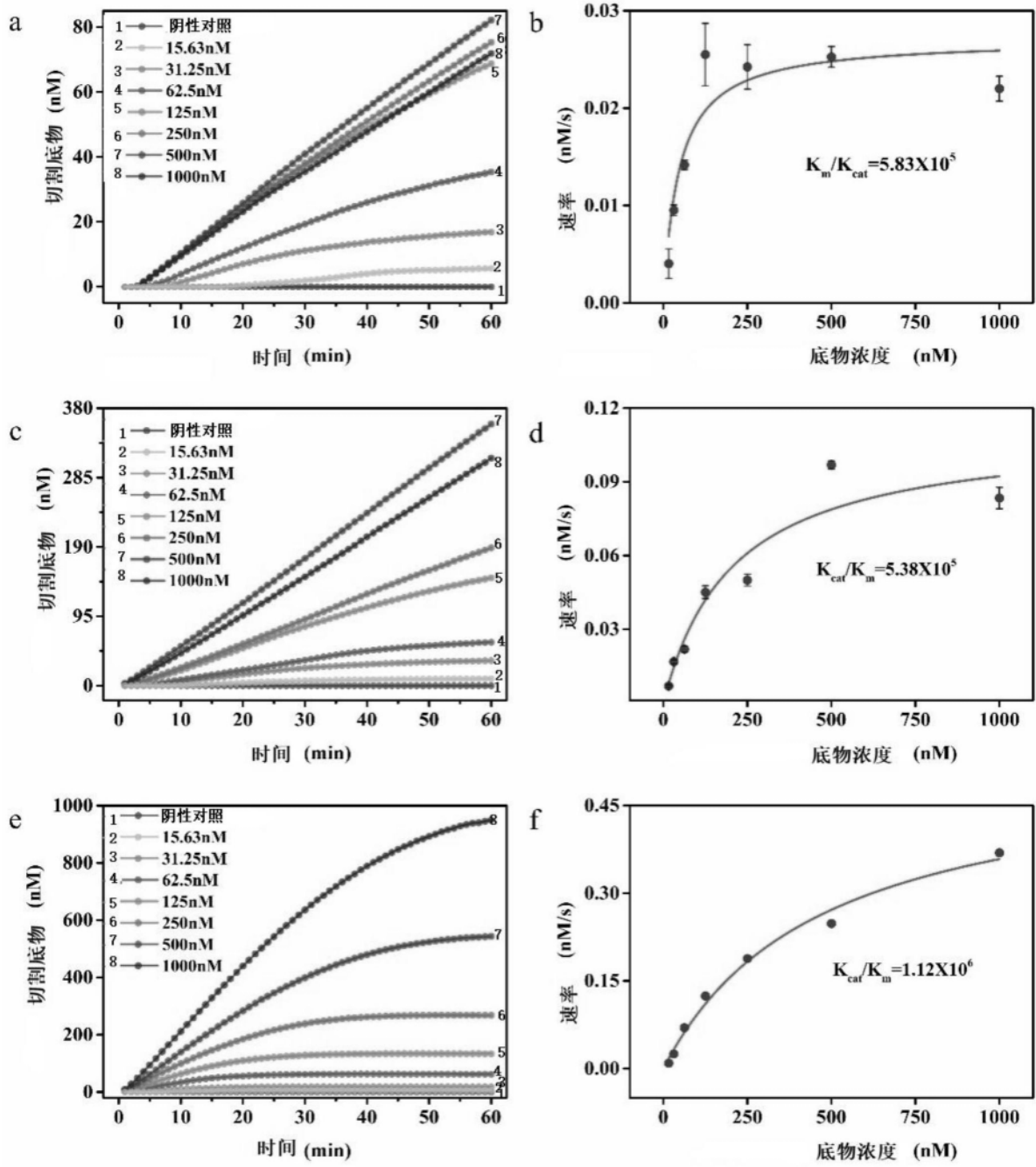


图9

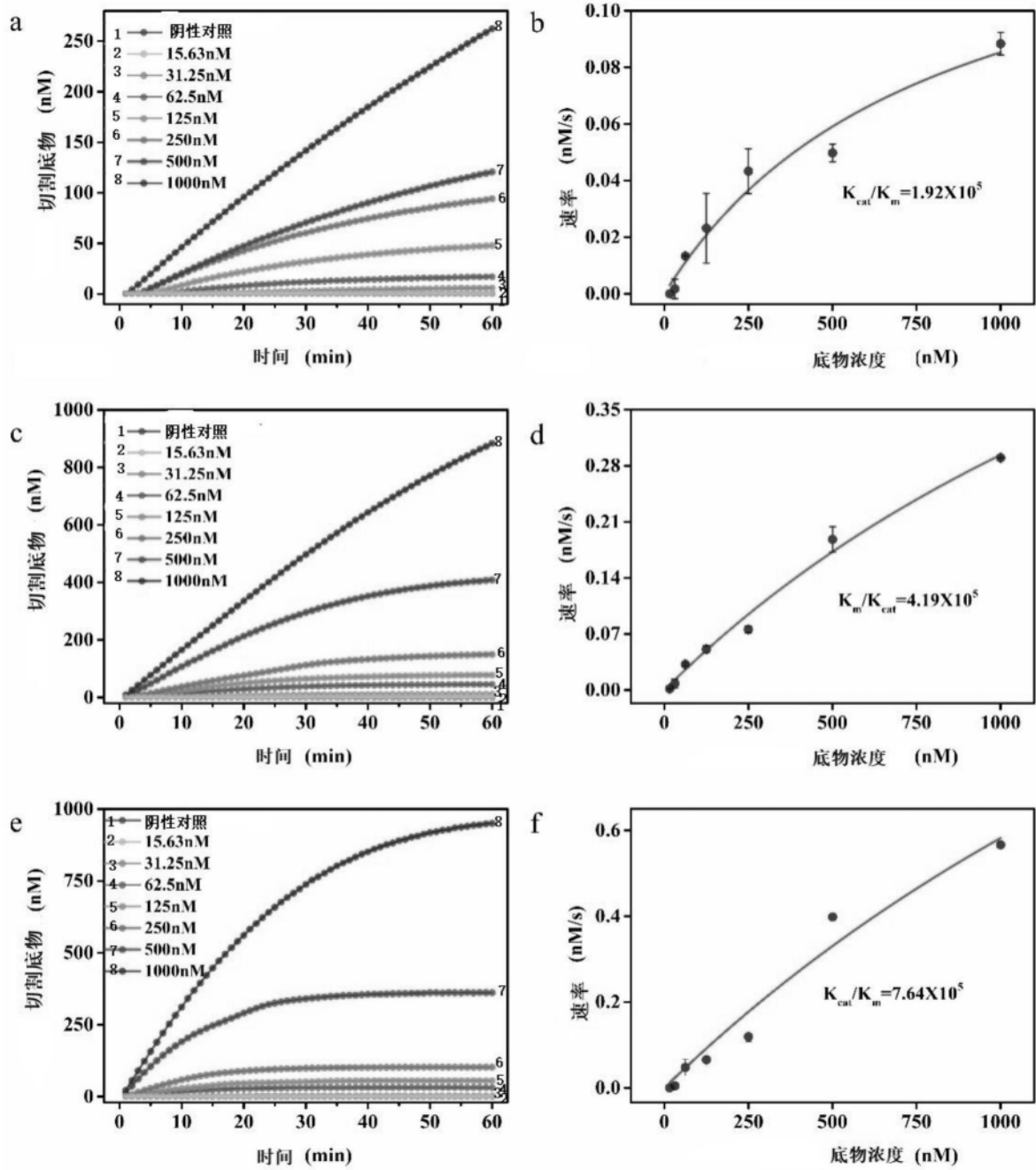


图10

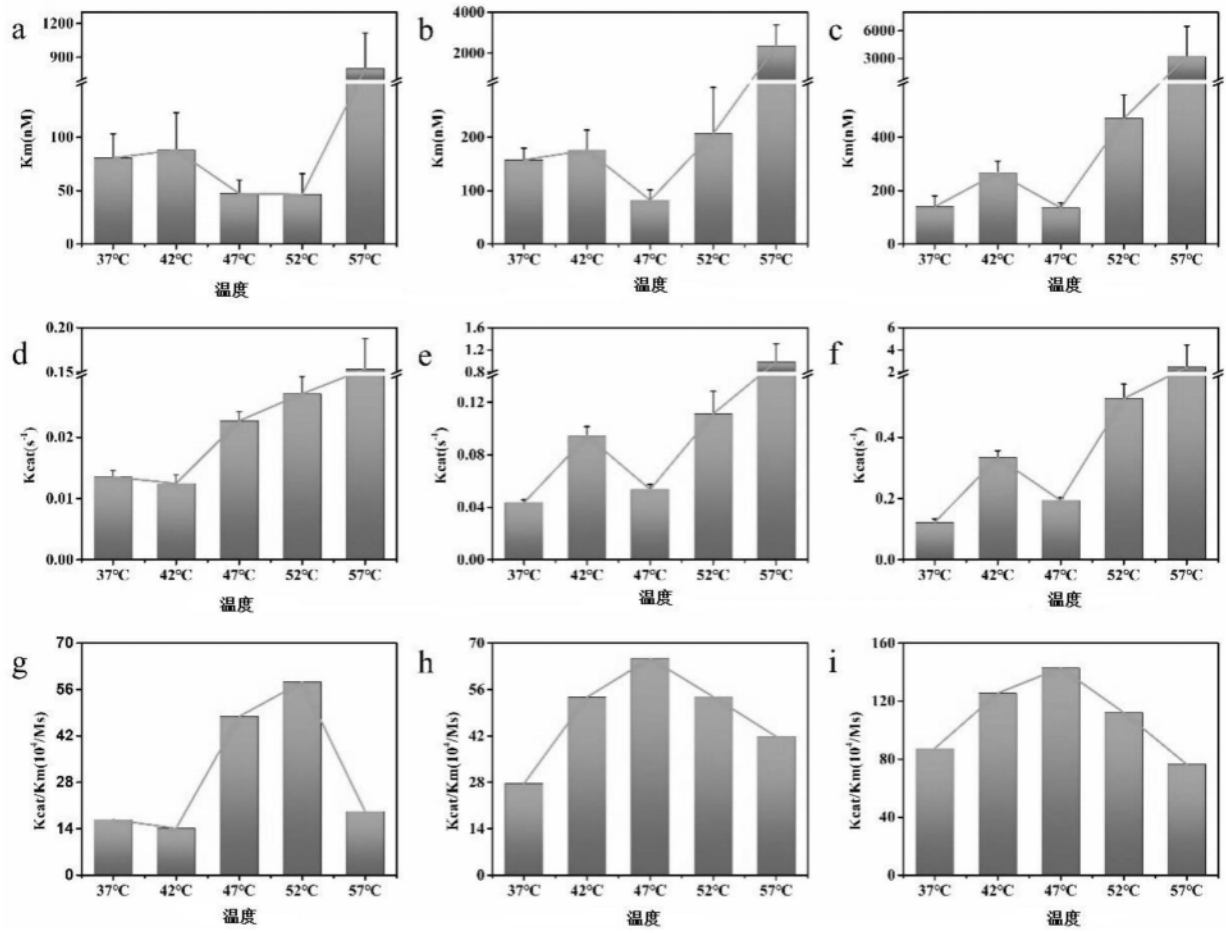


图11

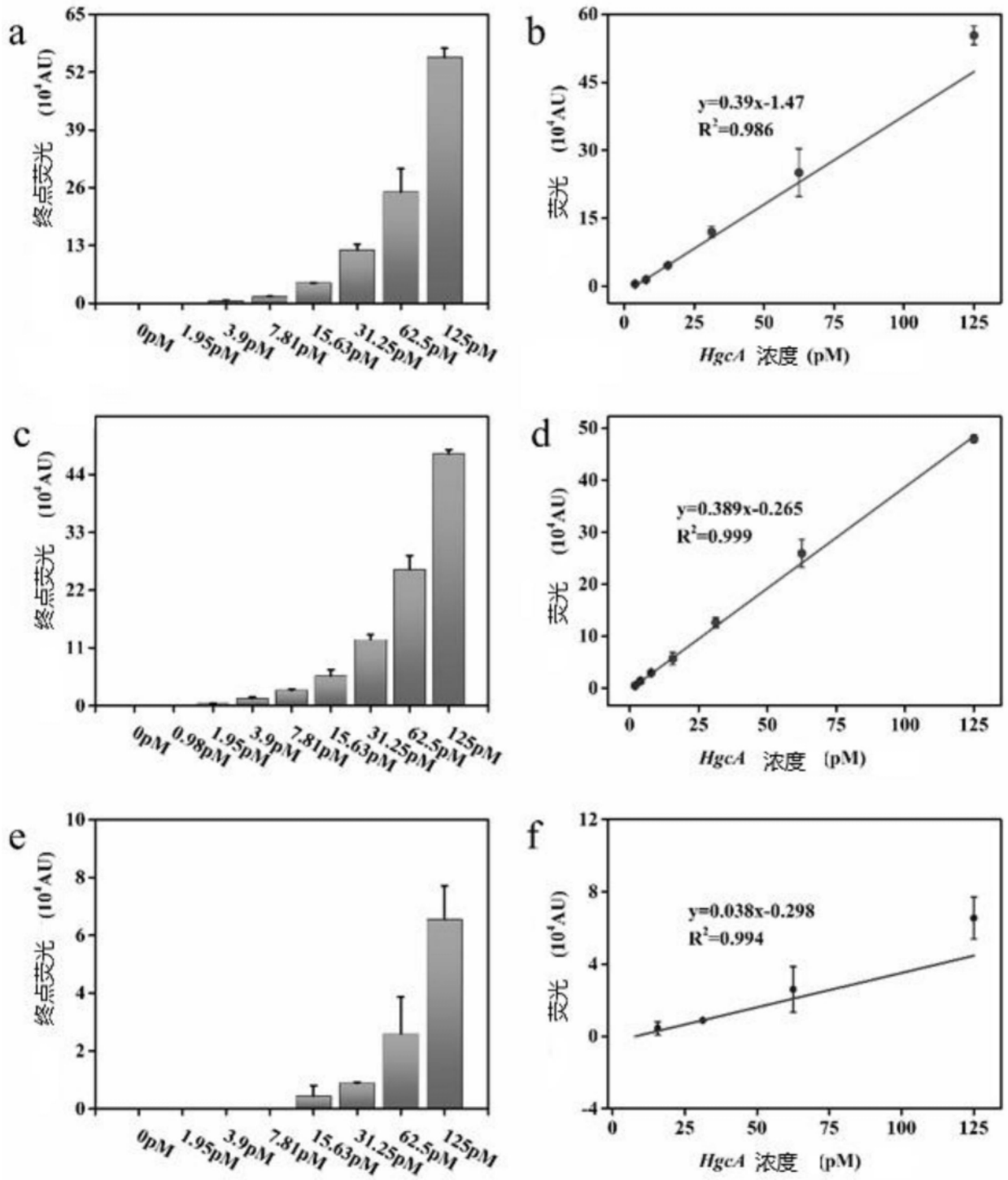


图12

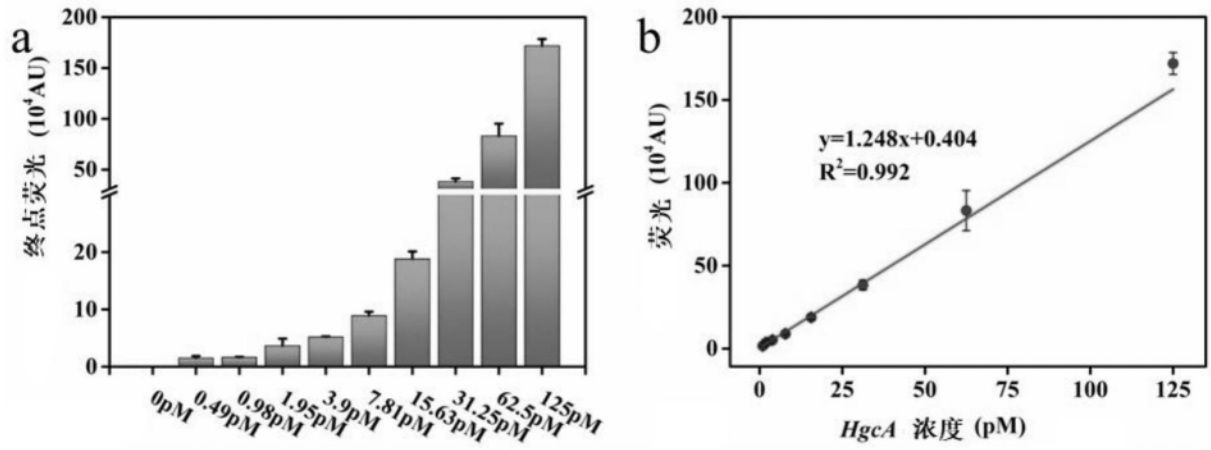


图13

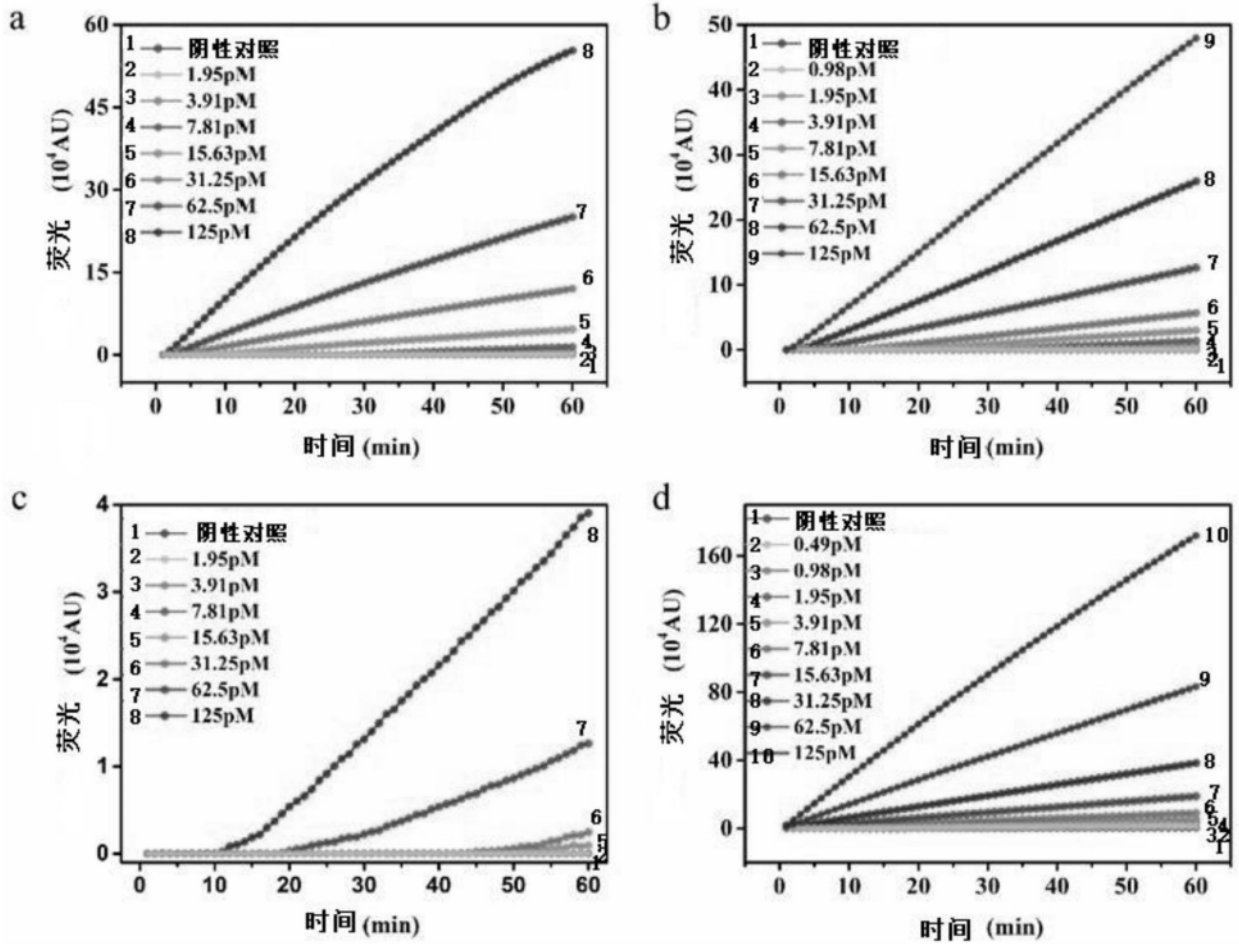


图14

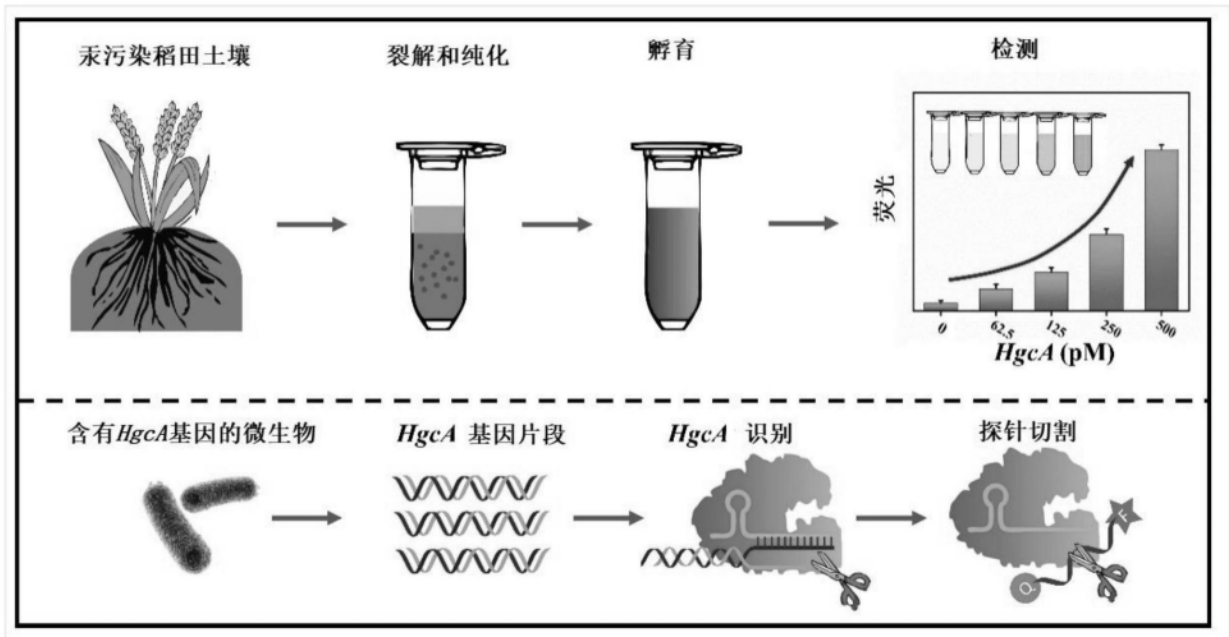


图15

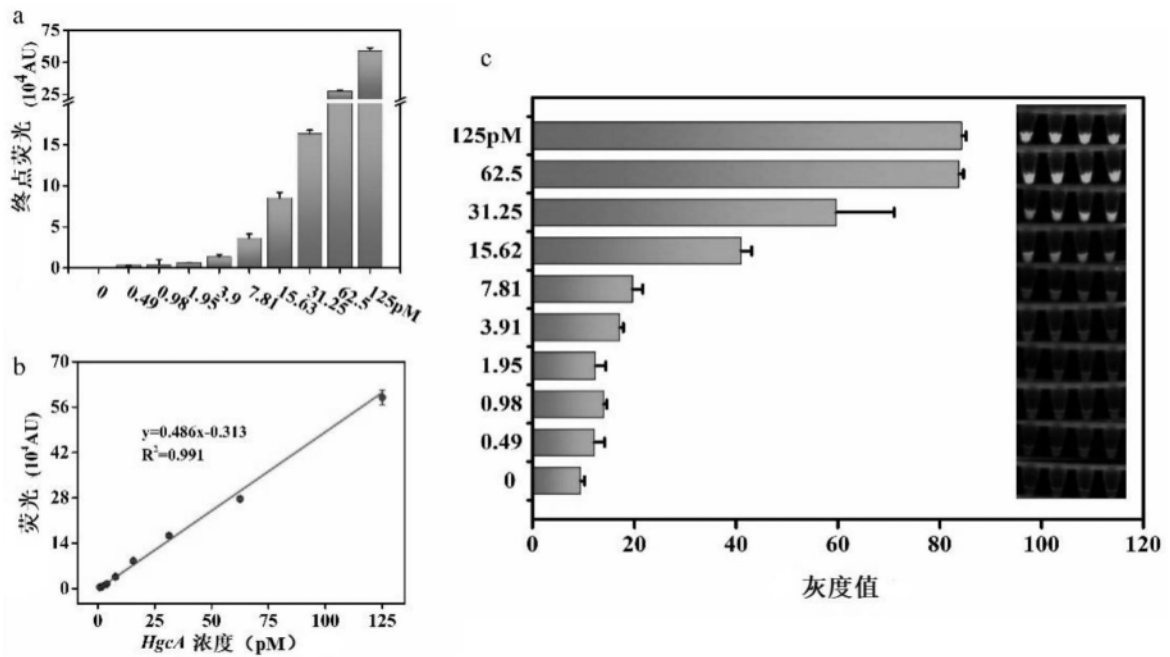


图16