



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112980924 A

(43) 申请公布日 2021.06.18

(21) 申请号 202110183405.3

(22) 申请日 2021.02.10

(71) 申请人 华南师范大学

地址 510631 广东省广州市天河区中山大道西55号华南师范大学生命科学学院

申请人 广州市第一人民医院(广州消化疾病中心、广州医科大学附属市第一人民医院、华南理工大学附属第二人民医院)

(72) 发明人 周小明 舒博文 乐花花

(74) 专利代理机构 广州骏思知识产权代理有限公司 44425

代理人 卢娟

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6816 (2018.01)

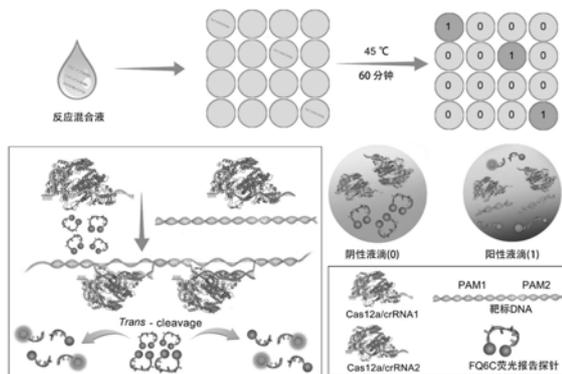
权利要求书1页 说明书8页  
序列表2页 附图14页

(54) 发明名称

一种免扩增的DNA单分子定量检测方法、试剂盒和缓冲液

(57) 摘要

本发明提供一种免扩增的DNA单分子定量检测方法,利用CRISPR-Cas12的机理,优化缓冲溶液组分,并将检测体系分散至微液滴中检测荧光强度,提高了检测的灵敏度,无需扩增、无需内参校正、无需建立标准曲线,实现了单分子水平的DNA定量检测。



1. 一种免扩增的DNA单分子定量检测方法,其特征在于:  
包括以下步骤:  
S1: 针对靶标DNA,设计并制备引导RNA,所述引导RNA用于与Cas12蛋白形成蛋白核酸复合物,并特异性识别靶标DNA;筛选荧光报告探针;  
S2: 配置缓冲液,所述缓冲液包括Tris-HCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、DTT和PEG;所述缓冲液的终浓度为:Tris-HCl终浓度为5-50mM,NaCl终浓度为5-100mM,MgCl<sub>2</sub>终浓度为10-50mM,DTT终浓度为0.5-2mM,PEG终浓度为1%-10%,pH为7.5-10.0;  
S3: 将Cas12蛋白、引导RNA、荧光报告探针和缓冲液混合配置成预混反应液;  
S4: 将包含靶标DNA分子的待测物与所述预混反应液混合形成混合体系,随即分散到一定数量的微反应单元中,使每个微反应单元中包括1个或0个靶标DNA分子;  
S5: 在一定温度下孵育所述微反应单元;  
S6: 测定所述各个微反应单元的荧光信号强度,测算得到靶标DNA分子的数目或原始浓度。
2. 根据权利要求1所述的免扩增的DNA单分子定量检测方法,其特征在于:  
S3中,所述预混反应液中,Cas12蛋白浓度为10-200nM,引导RNA的浓度为20-400nM,荧光报告探针浓度为200-500nM,反应温度为25℃-50℃。
3. 根据权利要求1所述的免扩增的DNA单分子定量检测方法,其特征在于:  
引导RNA数量为一条或一条以上。
4. 根据权利要求1所述的免扩增的DNA单分子定量检测方法,其特征在于:  
所述微反应单元的有效体积不超过10pL;孵育所述微反应单元的时间不少于45分钟。
5. 根据权利要求1所述的免扩增的DNA单分子定量检测方法,其特征在于:  
S6中,检测各个微反应单元的荧光信号强度,设定判定微反应单元阳性或阴性判定信号强度阈值,统计达阳性微反应单元总数或阳性微反应单元总数所占的微反应单元总数的比例,直接计数待测物中靶标DNA的浓度或利用泊松分布原理测算靶标DNA的原始浓度。
6. 根据权利要求1所述的免扩增的DNA单分子定量检测方法,其特征在于:  
所述Cas12蛋白为Cas12a蛋白、Cas12b、Cas12f中的至少一种。
7. 根据权利要求1所述的免扩增的DNA单分子定量检测方法,其特征在于:  
所述荧光探针为FQ6A、FQ6T、FQ6C、FQ6G中的至少一种。
8. 一种试剂盒,其特征在于:包括权利要求1-8任一项所述的预混反应液。
9. 一种缓冲液,其特征在于:包括Tris-HCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、DTT和PEG,Tris-HCl终浓度为5-50mM,NaCl终浓度为5-100mM,MgCl<sub>2</sub>终浓度为10-50mM,DTT终浓度为0.5-2mM,PEG终浓度为1%-10%,pH为7.5-10.0。

## 一种免扩增的DNA单分子定量检测方法、试剂盒和缓冲液

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种免扩增的DNA单分子定量检测方法、试剂盒和缓冲液。

### 背景技术

[0002] 定量检测DNA分子在生物医学研究中具有重要的应用价值,越来越多的研究需要精准检测DNA水平,例如评价抗病毒药物的功效、分析DNA甲基化水平、检测基因突变频率和计数液体活检中非细胞DNA等。在这些研究中,可用于检测的生物样本中的靶标DNA浓度通常极低,往往需要依赖于高灵敏的分子诊断技术来实现定量检测。

[0003] 目前已经建立了一些DNA定量检测方法,使用范围最为广泛的是定量PCR(qPCR)技术,它是通过构建外标曲线对核酸进行定量,是一种简介定量方法。最近发展起来的数字PCR(dPCR)技术无需外标即可实现绝对定量,但仍需要核酸扩增,不可避免地带来一些问题,例如交叉污染,潜在的扩增偏差等。并且,qPCR和dPCR都需要经历升温降温的热循环过程,需要借助特定的控温一起才能完成。近期基于CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas12a蛋白发展起来的数字技术虽然可以在恒温条件下反应,但仍需要结合扩增才能实现定量检测,仍存在交叉污染和扩增偏差导致的检测不准确风险。因此发展一种非扩增的DNA单分子定量检测技术很有必要。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术中的缺点与不足,提供一种免扩增的DNA单分子定量检测方法,提高了检测的灵敏度,无需扩增、无需内参校正、无需建立标准曲线,实现了单分子水平的DNA定量检测。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0006] 一种免扩增的DNA单分子定量检测方法,包括以下步骤:

[0007] S1:针对靶标DNA,设计并制备引导RNA,所述引导RNA用于与Cas12蛋白形成蛋白核酸复合物,并特异性识别靶标DNA;筛选荧光报告探针;

[0008] S2:配置缓冲液,所述缓冲液包括Tris-HCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、DTT和PEG;所述缓冲液的终浓度为:Tris-HCl终浓度为5-50mM,NaCl终浓度为5-100mM,MgCl<sub>2</sub>终浓度为10-50mM,DTT终浓度为0.5-2mM,PEG终浓度为1%-10%,pH为7.5-10.0;

[0009] S3:将Cas12蛋白、引导RNA、荧光报告探针和缓冲液混合配置成预混反应液;

[0010] S4:将包含靶标DNA分子的待测物与所述预混反应液混合形成混合体系,随即分散到一定数量的微反应单元中,使每个微反应单元中包括1个或0个靶标DNA分子;

[0011] S5:在一定温度下孵育所述微反应单元;

[0012] S6:测定所述微反应单元的荧光信号强度,测算得到靶标DNA分子的数目或原始浓度。

[0013] 本发明的免扩增的DNA单分子定量检测方法中,当靶标DNA个数远远低于形成的微

反应单元个数时,每个微反应单元里包含1个或0个靶标DNA分子;Cas12蛋白与引导RNA形成蛋白核酸复合物,当存在靶标DNA分子,所述蛋白核酸复合物能够识别靶标DNA分子并与其结合,并激活Cas12蛋白的Trans-剪切活性,Cas12蛋白特异性切割靶标DNA分子同时非特异性切割微反应单元中的荧光报告探针,在相应激发光照射下,微反应单元发出明显的荧光信号;对于没有靶标DNA的微反应单元,Cas12蛋白与引导RNA形成蛋白核酸复合物之后,Cas12蛋白的Trans-剪切活性不能被激活,微反应单元中的荧光报告探针始终保持淬灭的状态,在相应激发光照射下,微反应单元保持原来的状态,没有荧光信号产生。所述缓冲液为Cas12蛋白的特异性切割反应提供了离子环境并保持了蛋白核酸复合物的稳定性,从而使Cas12蛋白的特异性切割反应在靶标DNA分子仅有1个时仍可发生,提高了检测的灵敏度,无需扩增、无需内参校正、无需建立标准曲线,实现了单分子水平的DNA定量检测。

[0014] 进一步,S3中,所述预混反应液中,Cas12蛋白浓度为10-200nM,引导RNA的浓度为20-400nM,荧光报告探针浓度为200-500nM,反应温度为25℃-50℃。将各组分混合形成预混反应液,Cas12蛋白和引导RNA在缓冲液提供的离子环境下形成稳定的蛋白核酸复合物。

[0015] 进一步,引导RNA数量为一条或一条以上。增加引导RNA的数量,以增加识别位点,确保反应发生,且引导RNA数量大于1时,在同一个微反应单元中可包括与设计的引导RNA数量相同的蛋白核酸复合物复合物,发生若干次切割反应,增强荧光亮度,以提高统计的准确率。

[0016] 进一步,所述微反应单元的有效体积不超过10pL;孵育所述微反应单元的时间不少于45分钟。在保证单个微反应单元可被检测的基础上,在一定范围内减小为微反应单元体积有利于提高定量精度。保证孵育时间,以保证Cas12蛋白与引导RNA形成的蛋白核酸复合物识别靶标DNA序列,并触发Cas12蛋白的Trans-剪切活性持续切割荧光报告探针。

[0017] 进一步,S6中,检测各个微反应单元的荧光信号强度,设定判定微反应单元阳性或阴性判定信号强度阈值,统计达阳性微反应单元总数或阳性微反应单元总数所占的微反应单元总数的比例,直接计数待测物中靶标DNA的浓度或利用泊松分布原理测算靶标DNA的原始浓度。此为一个具体实施例中的计算方法。

[0018] 进一步,所述Cas12蛋白为Cas12a蛋白、Cas12b、Cas12f中的至少一种,均可实现本发明所述的免扩增的DNA单分子定量检测方法。

[0019] 进一步,所述荧光探针为FQ6A、FQ6T、FQ6C、FQ6G中的至少一种。选取活性较高的荧光探针,有利于加强灵敏度。

[0020] 本发明还提供一种试剂盒,包括上述的预混反应液。将包括靶标DNA分子的待测物加入试剂盒中形成混合体系,通过微反应单元发生装置形成大量微反应单元,将所述混合体系分散到微反应单元中,可应用于免扩增的单分子水平的DNA浓度检测。

[0021] 本发明还提供一种缓冲液,包括Tris-HCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、DTT和PEG,Tris-HCl终浓度为5-50mM,NaCl终浓度为5-100mM,MgCl<sub>2</sub>终浓度为10-50mM,DTT终浓度为0.5-2mM,PEG终浓度为1%-10%,pH为7.5-10.0。。

[0022] 所述缓冲液为Cas12蛋白的特异性切割反应提供了Mg<sup>2+</sup>,促进形成Cas12蛋白与引导RNA形成蛋白核酸复合物,通过Tris-HCl调节pH,通过酶稳定剂DTT保持了蛋白核酸复合物的稳定性,从而使Cas12a蛋白的特异性切割反应在靶标DNA分子仅有1个时仍可发生,提高了检测的灵敏度,实现了单分子水平的DNA定量检测。

[0023] 为了更好地理解和实施,下面结合附图详细说明本发明。

### 附图说明

[0024] 图1是本发明免扩增DNA单分子定量检测的基本原理。

[0025] 图2是本发明DNA分子浓度与荧光信号强度的关系曲线。

[0026] 图3是本发明恒温孵育时间与信号/背景的关系曲线。

[0027] 图4是实施例1中检测纯化的ASFV DNA标准样品的结果图;其中图4A是不同ASFV DNA 浓度水平下的典型终点荧光检测图像,图4B为ASFV DNA定量分析标准曲线图,图4C为特异性检测ASFV DNA的典型终点荧光检测图像;图4D为特异性检测ASFV DNA的定量结果图。

[0028] 图5是实施例1中检测未提纯的血清样本中ASFV DNA,并与PCR扩增检测结果的对比图;其中图5A是不同样品的典型终点荧光检测图像,图B为定量结果与PCR结果的对比图。

[0029] 图6(A)-图6(G)为对缓冲液中各参数的优化实验结果;图6(A)荧光探针优化;图6(B)为温度优化;图6(C)为Na<sup>+</sup>浓度优化;图6(D)为Mg<sup>2+</sup>浓度优化;图6(E)为DTT 浓度优化;图6(F)为PEG-200浓度优化;图6(G)为pH优化。

[0030] 图7为将Cas12b应用到本发明免扩增的DNA单分子定量检测方法的荧光强度。

[0031] 图8为将Cas12f应用到本发明免扩增的DNA单分子定量检测方法的荧光强度。

[0032] 图9为现有缓冲液与本发明缓冲液的反应速率对比。

[0033] 图10为现有缓冲液与本发明缓冲液进行预实验的荧光强度。

[0034] 图11为现有缓冲液与缓冲液分别应用到本发明免扩增的DNA单分子定量检测方法的检测结果。

### 具体实施方式

[0035] 本发明提供一种免扩增的DNA单分子定量检测方法,包括以下步骤:

[0036] S1:针对靶标DNA,设计并制备引导RNA,所述引导RNA用于与Cas12蛋白形成蛋白核酸复合物,并特异性识别靶标DNA;筛选荧光报告探针;

[0037] S2:配置缓冲液,所述缓冲液包括Tris-HCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、DTT和PEG;所述缓冲液的终浓度为:Tris-HCl终浓度为5-50mM,NaCl终浓度为5-100mM,MgCl<sub>2</sub>终浓度为10-50mM,DTT终浓度为0.5-2mM,PEG终浓度为1%-10%,pH为7.5-10.0;

[0038] S3:将Cas12蛋白、引导RNA、荧光报告探针和缓冲液混合配置预混反应液;

[0039] S4:将包含靶标DNA分子的待测物与所述预混反应液混合形成混合体系,随即分散到一定数量的微反应单元中,使每个微反应单元中包括1个或0个靶标DNA分子;

[0040] S5:在一定温度下孵育所述微反应单元;

[0041] S6:测定所述微反应单元的荧光信号强度,测算得到靶标DNA分子的数目或原始浓度。

[0042] 本发明的免扩增的DNA单分子定量检测方法中,当靶标DNA个数远远低于形成的微反应单元个数时,每个液滴里包含1个或0个靶标DNA分子;如图1所示,以Cas12a蛋白为例,Cas12a蛋白与引导RNA形成蛋白核酸复合物,如图1所示,当存在靶标DNA分子,所述蛋白核酸复合物能够识别靶标DNA分子并与之结合,并激活Cas12a蛋白的Trans-剪切活性,Cas12a

蛋白特异性切割靶标DNA分子同时非特异性切割微反应单元中的荧光报告探针,在相应激发光照射下,微反应单元发出明显的荧光信号;对于没有靶标DNA的微反应单元,Cas12a蛋白与引导RNA形成蛋白核酸复合物之后,Cas12a蛋白的Trans-剪切活性不能被激活,微反应单元中的荧光报告探针始终保持淬灭的状态,在相应激发光照射下,微反应单元保持原来的状态,没有荧光信号产生。所述缓冲液为Cas12a蛋白的特异性切割反应提供了离子环境并保持了蛋白核酸复合物的稳定性,从而使Cas12a蛋白的特异性切割反应在靶标DNA分子仅有1个时仍可发生,提高了检测的灵敏度,无需扩增、无需内参校正、无需建立标准曲线,实现了单分子水平的DNA定量检测。

[0043] 如图2所示,将系列不同浓度的靶标DNA分子与靶标DNA分子浓度为0的样品(NTC)进行荧光信号强度检测,在引导RNA的引导下,实施检测靶标DNA的灵敏度,由图2可得,对靶标DNA浓度的检测下限可达100fM。

[0044] S1中,分析靶标DNA的基因序列,并根据Cas12a蛋白的识别机理设计出多条相应的引导RNA,在优化的体系下进行CRISPR-Cas12体外荧光报告探针切割实验,进行实时荧光检测,通过比较荧光信号的强弱,筛选出活性相对较高的引导RNA。优选地,引导RNA数量为一条或一条以上,增加引导RNA的数量,以增加识别位点,确保反应发生,且引导RNA数量大于1时,在同一个微反应单元中可包括与设计的引导RNA数量相同的蛋白核酸复合物复合物,发生若干次切割反应,增强荧光亮度,以提高统计的准确率。所述荧光报告探针包括FQ6A、FQ6T、FQ6C、FQ6G中的至少一种。选取活性较高的荧光探针,有利于加强灵敏度。FQ6A核苷酸序列如SEQ ID No.9所示,具体为FAM-AAAAAA-BHQ1;FQ6T核苷酸序列如SEQ ID No.10所示,具体为FAM-TTTTTT-BHQ1;FQ6C核苷酸序列如SEQ ID No.11所示,具体为FAM-CCCCC-BHQ1。

[0045] S2中,在一个优选的实施例中,Tris-HCl终浓度为10mM,NaCl终浓度为10mM,MgCl<sub>2</sub>终浓度为15mM,DTT终浓度为1mM,PEG终浓度为5%,pH为9.0。优选地,PEG为PEG-200。

[0046] S3中,将Cas12蛋白、引导RNA、荧光报告探针和缓冲液在低温指示冰盒上混合配置预混反应液。所述预混反应液中,Cas12蛋白浓度为10-200nM,引导RNA的浓度为20-400nM,荧光报告探针浓度为200-500nM,反应温度为25℃-50℃。在一个优选的实施例中,Cas12蛋白浓度为100nM,引导RNA的浓度为200nM,荧光报告探针浓度为400nM,反应温度为45℃。

[0047] S4中,将所述混合体系分散到大量体积均一的微反应单元反应单元中,可通过微腔室阵列方式和微液滴乳化方式中的一种实现。微反应单元形成的方式包括被动反应单元形成方式和主动反应单元形成方式中的至少一种,所述被动反应单元形成方式包括岔流、共流、流聚焦、分步乳化、微通道乳化、膜乳化等,所述主动反应单元形成方式包括基于外力(例如磁力、电场力、离心力、重力等)调控或基于流体力学参数(例如表面润湿、表面张力、流体密度、流体速度等)调控。

[0048] 优选地,所述微反应单元的有效体积不超过10pL。在保证单个微反应单元可被检测的基础上,在一定范围内减小为微反应单元体积有利于提高定量精度。将包含靶标DNA分子的待测物与所述预混反应液混合形成混合体系并将所述混合体系分散到一定数量的微反应单元中的延迟时间不超过10分钟,优选地,所述延迟时间不超过3分钟。

[0049] S5中,如图3所示,孵育所述微反应单元的时间不少于45分钟,以保证Cas12蛋白与引导RNA形成的蛋白核酸复合物识别靶标DNA序列,并触发Cas12蛋白的Trans-剪切活性持续切割荧光报告探针。

[0050] S6中,检测各个微反应单元的荧光信号强度,设定判定微反应单元阳性或阴性判定信号强度阈值,统计达阳性微反应单元总数或阳性微反应单元总数所占的微反应单元总数的比例,直接计数待测物中靶标DNA的浓度或利用泊松分布原理测算靶标DNA的原始浓度。此为一个具体实施例中的计算方法。在荧光报告探针对应的激发光照射下,可通过扫描成像方式或流式计数测定完成孵育的微反应单元的荧光信号强度。

[0051] 本发明还提供一种试剂盒,包括上述的预混反应液。将包括靶标DNA分子的待测物加入试剂盒中形成混合体系,将所述混合体系分散到微反应单元中,可应用于免扩增的单分子水平的DNA浓度检测。

[0052] 本发明还提供一种缓冲液,所述缓冲液包括Tris-HCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、DTT和PEG, Tris-HCl 终浓度为5-50mM,NaCl终浓度为5-100mM,MgCl<sub>2</sub>终浓度为10-50mM,DTT终浓度为0.5-2mM, PEG终浓度为1%-10%,pH为7.5-10.0。

[0053] 所述缓冲液为Cas12蛋白的特异性切割反应提供了Mg<sup>2+</sup>,促进形成Cas12蛋白与引导RNA 形成蛋白核酸复合物,通过Tris-HCl调节pH,通过酶稳定剂DTT保持了蛋白核酸复合物的稳定性,从而使Cas12蛋白的特异性切割反应在靶标DNA分子仅有1个时仍可发生,提高了检测的灵敏度,实现了单分子水平的DNA定量检测。

[0054] 优选地,PEG为PEG-200。在一个优选的实施例中,Tris-HCl浓度为10mM,NaCl浓度为10mM,MgCl<sub>2</sub>浓度为15mM,DTT浓度为1mM,PEG-200浓度为5%,pH为9.0。

#### [0055] 实施例1

[0056] 靶标DNA为非洲猪瘟病毒(ASFV)的B646L基因。

[0057] S1:针对ASFV基因组DNA序列中的B646L基因,设计多条引导CRISPR-Cas12a蛋白特异性结合的引导RNA,Cas12a蛋白对应的引导RNA为crRNA,筛选出效率较高的crRNA1和crRNA2。crRNA1核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,对应的B646L基因核苷酸序列如SEQ ID No.7所示; crRNA2核苷酸序列如SEQ ID No.2所示,对应的B646L基因核苷酸序列如SEQ ID No.8所示。选用的荧光报告探针为FQ6C,核苷酸序列为FAM-CCCCC-BHQ1。

[0058] S2:配置缓冲液,所述缓冲液包括10mM Tris-HCl,10mM NaCl,15mM MgCl<sub>2</sub>,1mM DTT, 5%PEG-200,pH=9.0。

[0059] S3:将400nM Cas12a蛋白、400nM crRNA1、400nM crRNA2,500nM FQ6C和所述缓冲液混合配置预混反应液。

[0060] S4:将包含ASFV DNA的样品与所述预混反应液混合,形成大量直径为20μm的油包水离散微液滴,所述微液滴的数目不少于1×10<sup>5</sup>个,每个微液滴里包括1个或者0个ASFV DNA 分子。用于形成油包水的微液滴的油相主要成分为包含3% (v/v) 的ABIL EM90和0.1% (w/w) Troton X-100的矿物油。将所述微液滴平铺在容器中,在垂直重力方向的微液滴堆叠层数不超过2层,以构建微液滴阵列。

[0061] S5:将所述微液滴阵列置于控温加热装置上,所使用的加热装置可以是金属浴设备、水浴锅、温箱或核酸扩增仪,优选为金属浴设备。维持温度为45℃,时间为1小时。

[0062] S6:将承载所述微液滴的容器置于荧光显微镜下扫描成像并测量液滴直径D。

[0063] 设定液滴信号判定阈值为S/N≥2,其中S为微液滴的荧光信号强度,N为平均背景信号。根据微液滴的荧光强度阈值将微液滴荧光信号二值化,荧光强度高于判定阈值即为阳性(记为“1”),低于判定阈值即为阴性(记为“0”)。统计微液滴总数和阳性微液滴总数,阳

性微液滴在微液滴总数中的占比记为 $p$ ,计算ASFV DNA的含量 $C$ ,计算公式如下:

$$[0064] \quad C = -\frac{\ln(1-p)}{V}$$

[0065] 其中 $V = \frac{1}{6}\pi D^3$ 。

[0066] 在本实施例1中,单个ASFV DNA分子可以被对应的crRNA1和crRNA2同时识别并触发 Cas12a的Trans-剪切活性,Cas12a特异性切割ASFV DNA的同时持续非特异性切割FQ6C,产生的荧光信号强度高于平均背景信号强度,将包含ASFV DNA分子的微液滴与无ASFV DNA分子的微液滴区别开,实现了单分子水平的DNA定量检测。

[0067] 如图4所示,检测不同浓度的ASFV DNA标准样本,由图4A和图4B可得,随着ASFV DNA 浓度与荧光信号强度呈正比例关系。如图4C和图4D所示,添加了引导Cas12a蛋白识别ASFV DNA分子的crRNA,Cas12a特异性切割ASFV DNA分子,将ASFV DNA与其它DNA分子区分开。

[0068] 如图5所示为本实施例1的定量检测结果,其中p1-p6为不同浓度的靶标DNA的样品, N1-N3为不包含靶标DNA的样品。与现有的PCR检测结果对比,本实施例1的方法可达到与 PCR检测效果相同的定性检测,并进一步做定量检测。

#### [0069] 实施例2

[0070] 本实施例2提供一种免扩增的DNA单分子定量检测方法,与实施例1的免扩增的DNA单分子定量检测方法基本相同,其区别在于:

[0071] 所述缓冲液包括Tris-HCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、DTT和PEG,Tris-HCl终浓度为5mM,NaCl终浓度为5mM,MgCl<sub>2</sub>终浓度为10mM,DTT终浓度为0.5mM,PEG终浓度为1%,pH为7.5。

#### [0072] 实施例3

[0073] 本实施例3提供一种免扩增的DNA单分子定量检测方法,与实施例1的免扩增的DNA单分子定量检测方法基本相同,其区别在于:

[0074] 所述缓冲液包括Tris-HCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、DTT和PEG,Tris-HCl终浓度为50mM,NaCl终浓度为100mM,MgCl<sub>2</sub>终浓度为50mM,DTT终浓度为2mM,PEG终浓度为10%,pH为10.0。

[0075] 图6(A)-图6(G)为对缓冲液中各参数的优化实验结果。由图6(A)-图6(G)可得,所述缓冲液中,分别控制变量为温度为45℃、荧光探针为FQ6C,Na<sup>+</sup>终浓度10nM、Mg<sup>2+</sup>终浓度15nM、DTT终浓度1mM、PEG-200终浓度5%、Tris-HCl调节pH为9.0时,将所述缓冲液应用于实施例1的免扩增的DNA单分子定量检测方法中,可达到最佳检测效果。

#### [0076] 实施例4

[0077] 设计Cas12b靶标序列并制备,Cas12b靶标序列如SEQ ID No.4所示,并设计引导Cas12b 蛋白与靶标序列结合的引导RNA,与Cas12b对应的引导RNA为sgRNA,sgRNA核苷酸序列如 SEQ ID No.3所示。

[0078] 配置缓冲液,所述缓冲液包括10mM Tris-HCl,10mM NaCl,15mM MgCl<sub>2</sub>,1mM DTT,5%PEG-200, pH=9.0。

[0079] 将400nM Cas12b蛋白、400nM sgRNA、500nM FQ6C和所述缓冲液混合配置预混反应液。

[0080] 将靶标序列与上述预混反应液混合,靶标序列终浓度为1nM,形成大量油包水离散

微液滴,每个微液滴里包括1个或者0个靶标序列。测定所述微液滴中的荧光强度。结果如图7所示,Cas12b与sgRNA形成蛋白核酸复合物,识别并切割靶标序列同时持续非特异性切割荧光探针,产生荧光信号。

[0081] 实施例5

[0082] 设计Cas12f靶标序列并制备,Cas12f靶标序列如SEQ ID No.6所示,并设计引导Cas12f蛋白与靶标序列结合的引导RNA,与Cas12f对应的引导RNA为sgRNA,sgRNA核苷酸序列如SEQ ID No.5所示。

[0083] 配置缓冲液,所述缓冲液包括10mM Tris-HCl,10mM NaCl,15mM MgCl<sub>2</sub>,1mM DTT,5%PEG-200,pH=9.0。

[0084] 将400nM Cas12f蛋白、400nM sgRNA、500nM FQ6C和所述缓冲液混合配置预混反应液。

[0085] 将靶标序列3与所述预混反应液混合,靶标序列终浓度为1nM,形成大量油包水离散微液滴,每个微液滴里包括1个或者0个靶标序列。测定所述微液滴中的荧光强度。结果如图8所示,Cas12f与sgRNA形成蛋白核酸复合物,识别并切割靶标序列同时持续非特异性切割荧光探针,产生荧光信号。

[0086] 对比例1

[0087] 取系列现有技术中的缓冲液进行对比实验,用于对比实验的缓冲液包括缓冲液1(Buffer 1)、缓冲液2(Buffer 2)、缓冲液3(Buffer 3)和缓冲液4(Buffer 4),成分如表2所示。

[0088] 表2

	Component
Enhanced Buffer	10mM Tris-HCl (pH 9.0), 10 mM NaCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, 5% PEG-200
Buffer 1	20 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% glycerin,0.5 mM DTT
Buffer 2	10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> ,100 μg/mL BSA
Buffer 3	20 mM HEPES (pH 6.8), 60 mM NaCl, 6 mM MgCl <sub>2</sub>
Buffer 4	10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> ,100 μg/mL BSA

[0090] 将Buffer 1、Buffer 2、Buffer 3和Buffer 4与本发明所述的缓冲液(Enhanced Buffer)进行预实验,靶标DNA为非洲猪瘟病毒(ASFV)的B646L基因,设计引导Cas12a蛋白与靶标DNA结合的引导RNA,与Cas12a对应的引导RNA为crRNA。

[0091] 配置缓冲液,所述缓冲液包括10mM Tris-HCl,10mM NaCl,15mM MgCl<sub>2</sub>,1mM DTT,5%PEG-200,pH=9.0。

[0092] 将400nM Cas12b蛋白、400nM crRNA、500nM FQ6C和所述缓冲液混合配置预混反应液。

[0093] 将靶标序列与所述预混反应液混合,靶标序列终浓度为100pM,形成大量油包水离散微液滴,每个微液滴里包括1个或者0个靶标序列。测定所述微液滴中的荧光强度。如图9

和图10所示,本发明所述的缓冲液的荧光强度最大,且反应速率最快。

[0094] 选取预实验中反应速率较快的Buffer 4和本发明所述的缓冲液,均应用到实施例1所述的免扩增的DNA单分子定量检测方法。对比实验结果图11所示,使用Buffer 4为优化前的体系,使用本发明所述的缓冲液为优化后的体系。由图11可得,本发明所述的缓冲液优化了离子浓度和成分,可精准识别靶标DNA,提高检测效率。

[0095] 本发明并不局限于上述实施方式,如果对本发明的各种改动或变形不脱离本发明的精神和范围,倘若这些改动和变形属于本发明的权利要求和等同技术范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变形。

## SEQUENCE LISTING

<110> 华南师范大学

<120> 一种免扩增的DNA单分子定量检测方法、试剂盒和缓冲液

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 41

<212> RNA

<213> 人工合成

<400> 1

uaauuucuaac uaaguguaga ugggguuuga gguccauuac a 41

<210> 2

<211> 41

<212> RNA

<213> 人工合成

<400> 2

uaauuucuaac uaaguguaga uccugcuguu uggauauugu g 41

<210> 3

<211> 111

<212> RNA

<213> 人工合成

<400> 3

gucuagagga cagaauuuuu caacgggugu gccaauggcc acuuuccagg uggcaaagcc 60

cguugagcuu cucaaaucug agaaguggca cacacgcacg cgagcacgug c 111

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 4

ccgtccccgg cacgtgctcg cgtgcgtgtc gggtgattaa 40

<210> 5

<211> 180

<212> RNA

<213> 人工合成

<400> 5

uucacugaua aaguggagaa ccgcuucacc aaaagcuguc ccuuaggga uuagaacuug 60

agugaaggug ggcugcuugc aucagccuaa ugucgagaag ugcuuucuc ggaaaguaac 120

ccucgaaaca aaaucauuug aaagaaugaa ggaaugcaac caguuuggcc cgcccaaaau 180

<210> 6  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> 人工合成  
<400> 6  
tttttttttt attttgggcg ggccaaactt tttttttttt tttt 44  
<210> 7  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 非洲猪瘟病毒种(African Swine fever virus,ASFV)  
<400> 7  
gccgaaggga atggatactg agggaatagc aa 32  
<210> 8  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 非洲猪瘟病毒种(African Swine fever virus,ASFV)  
<400> 8  
tcccgagaac tctcacaata tccaaacagc ag 32  
<210> 9  
<211> 6  
<212> DNA  
<213> 人工合成  
<400> 9  
aaaaaa 6  
<210> 10  
<211> 6  
<212> DNA  
<213> 人工合成  
<400> 10  
tttttt 6  
<210> 11  
<211> 6  
<212> DNA  
<213> 人工合成  
<400> 11  
cccccc 6

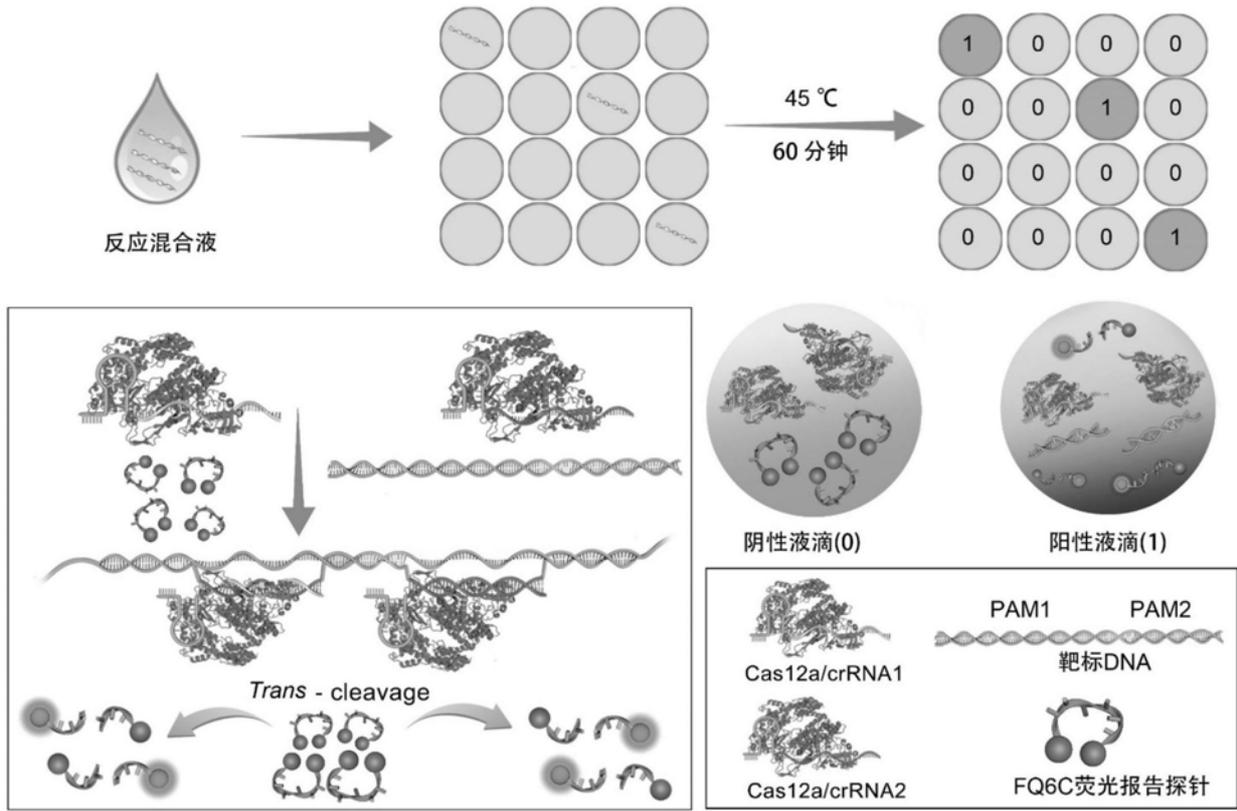


图1

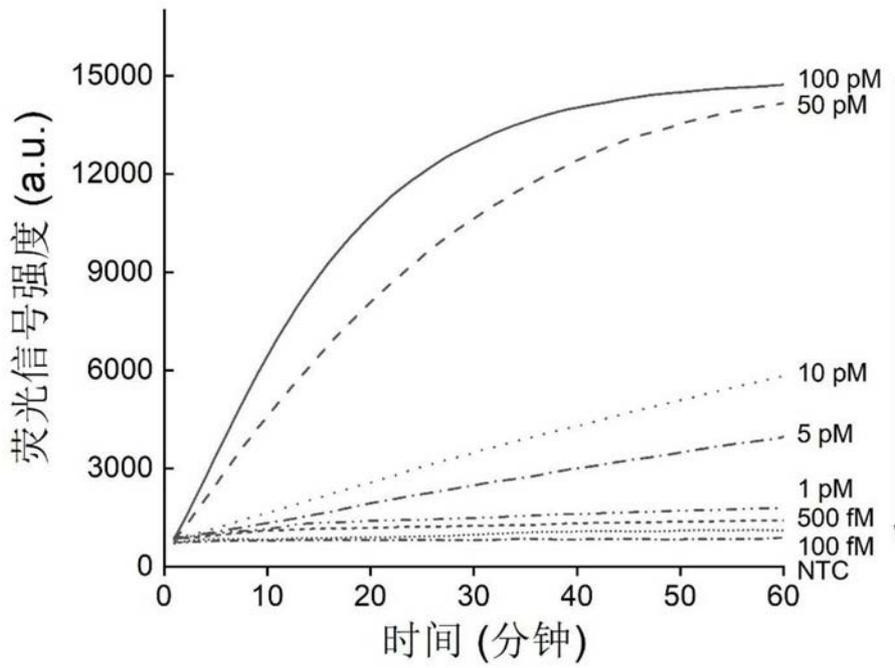


图2

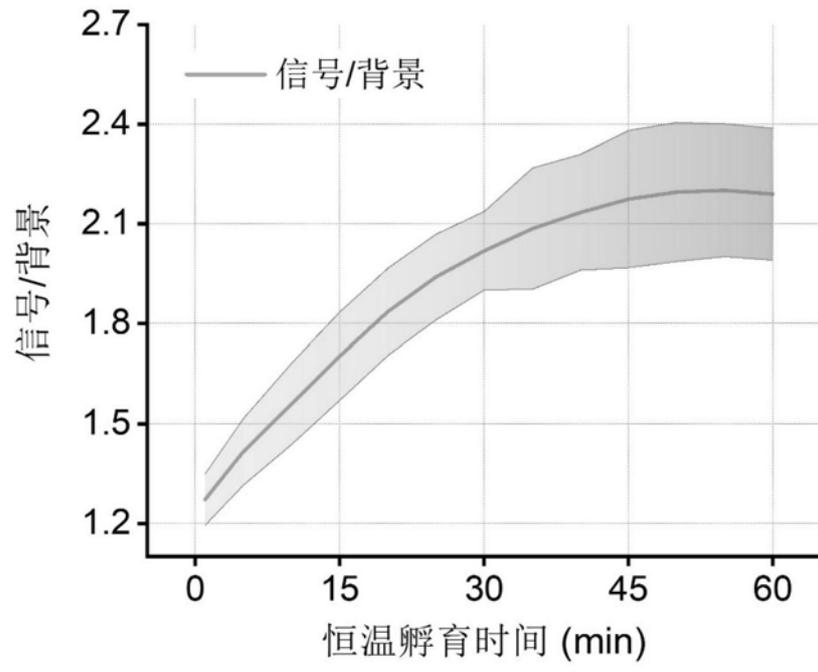


图3

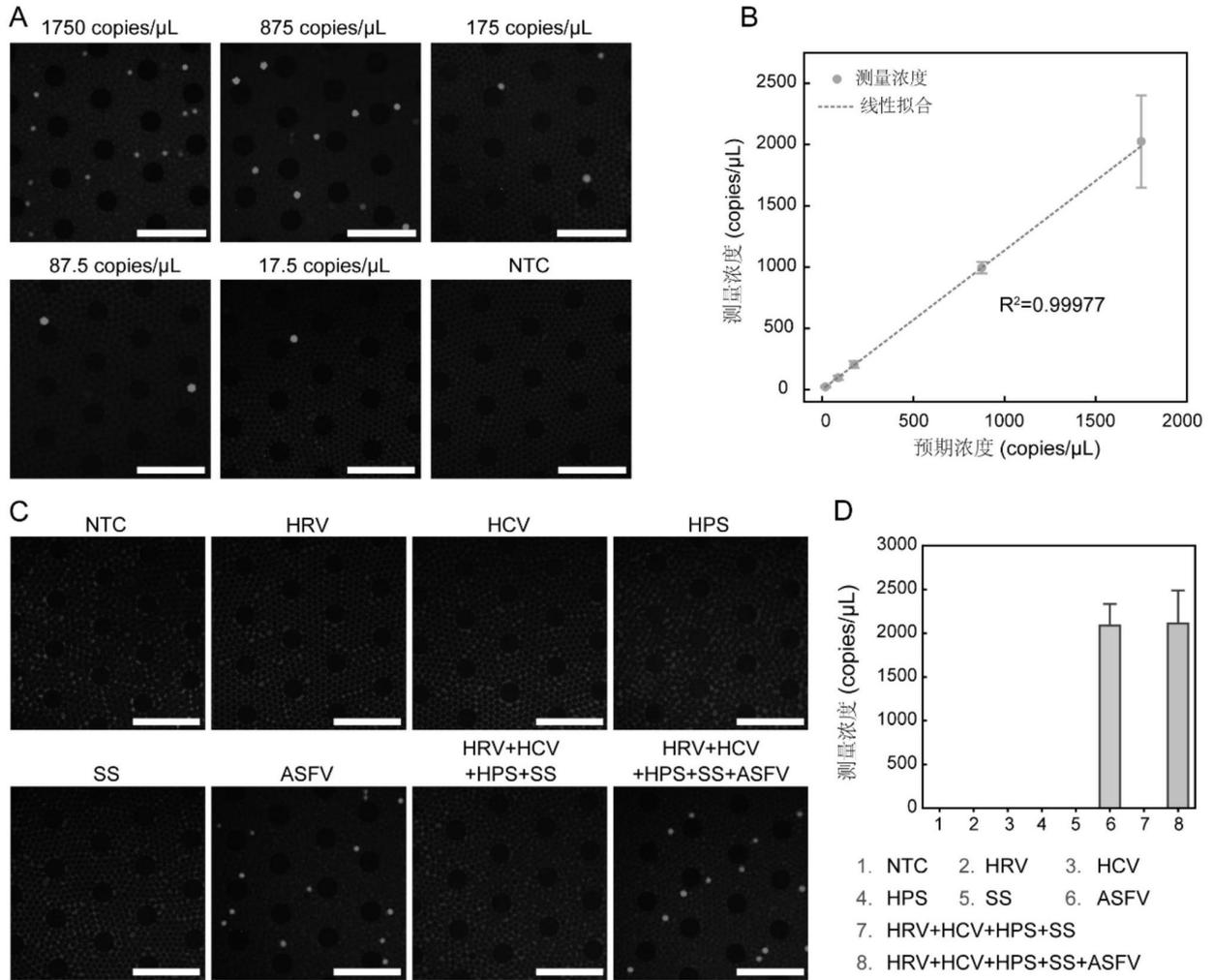


图4

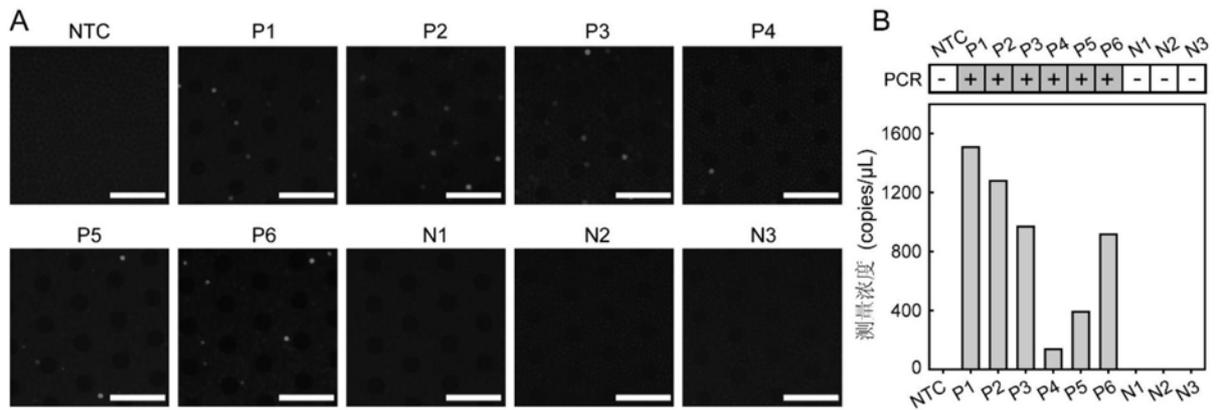


图5

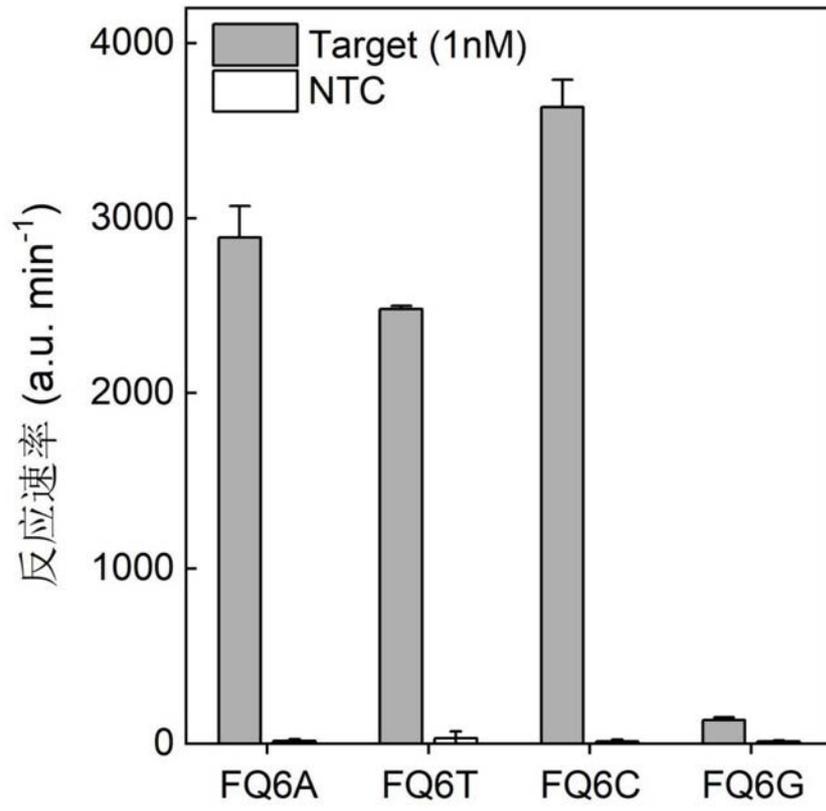


图6 (A)

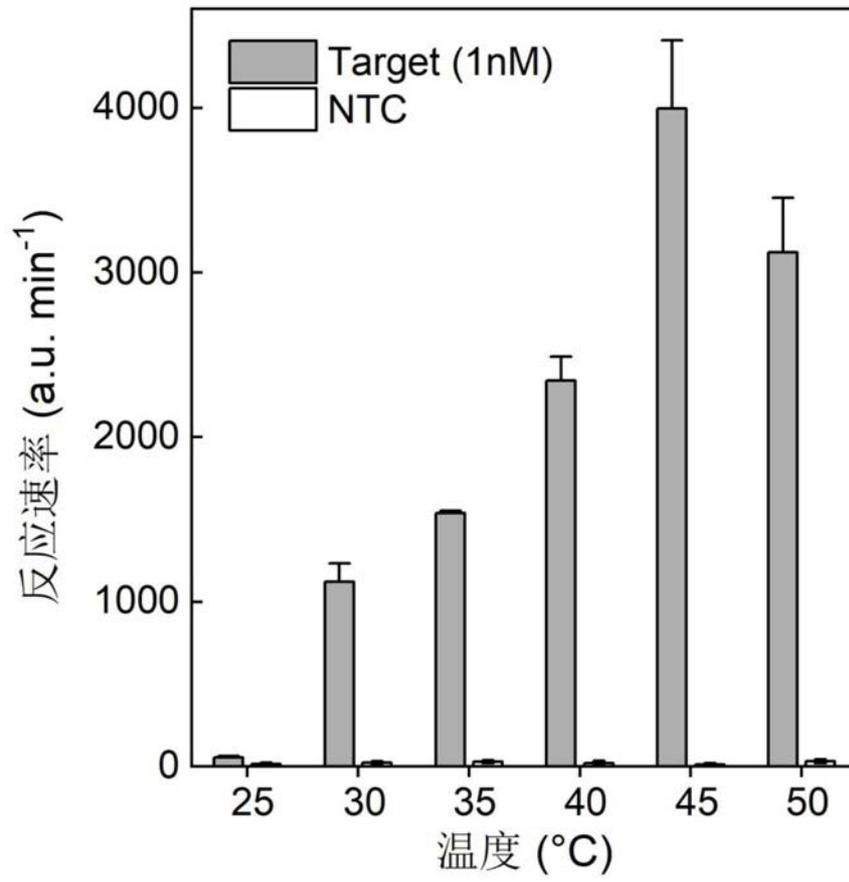


图6 (B)

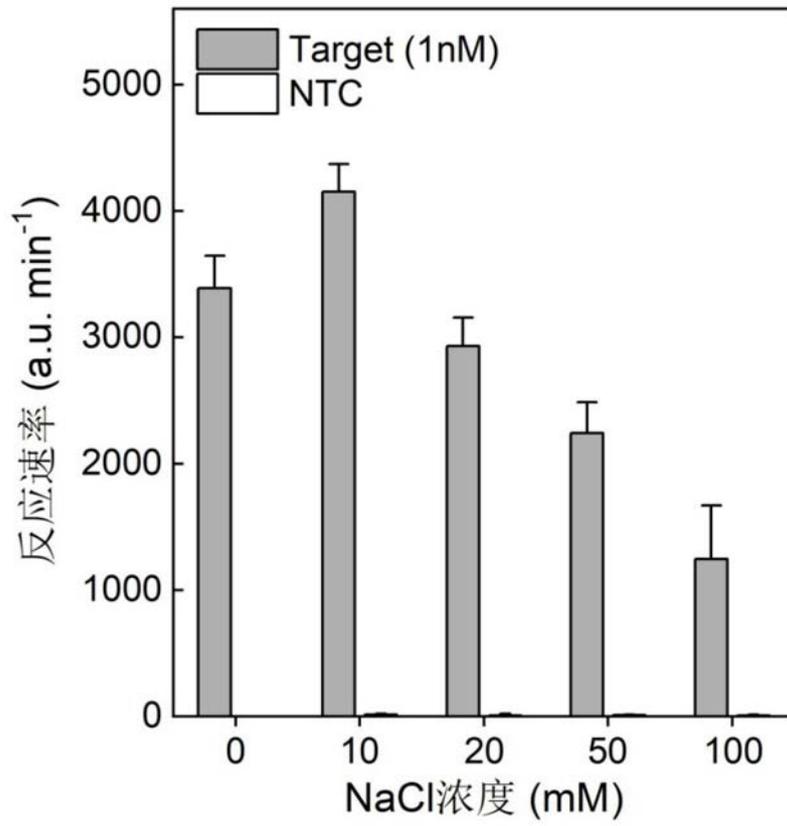


图6 (C)

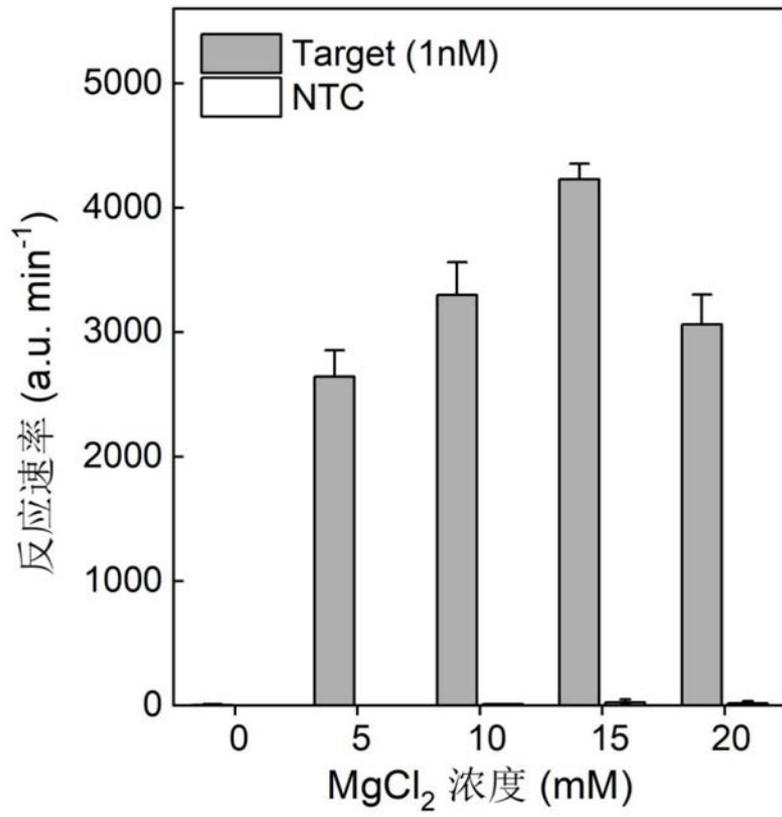


图6 (D)

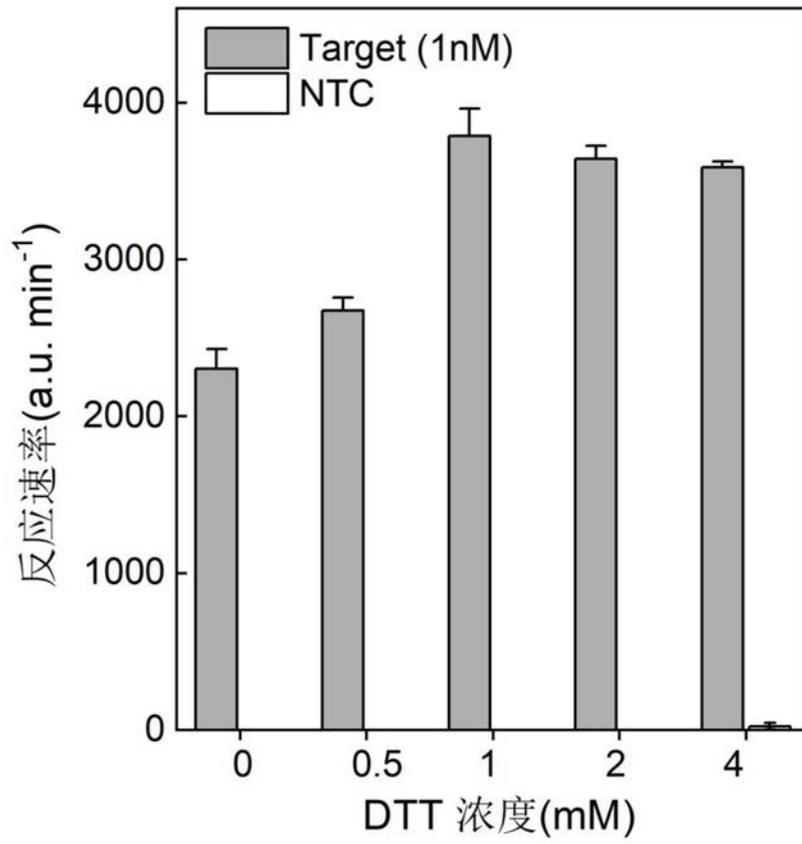


图6 (E)

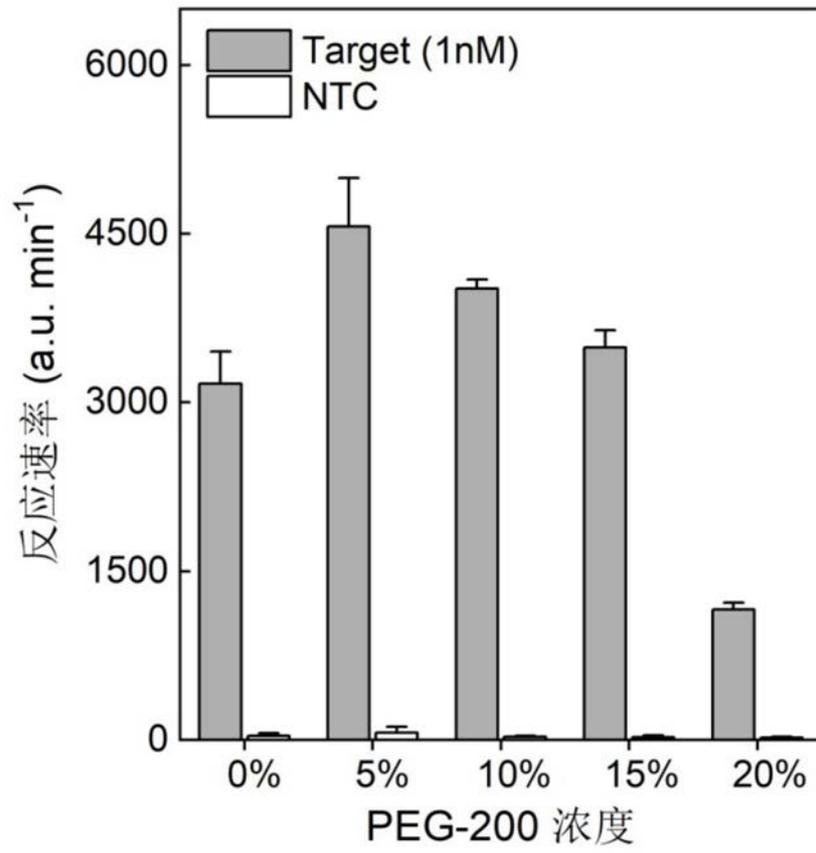


图6 (F)

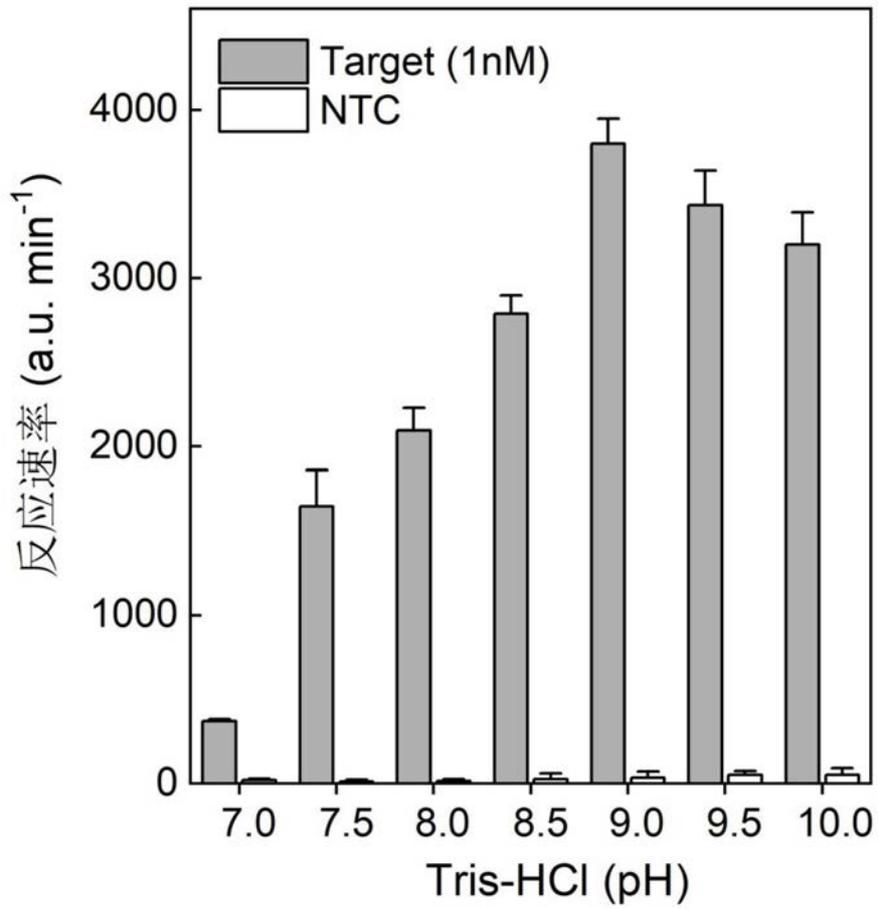


图6 (G)

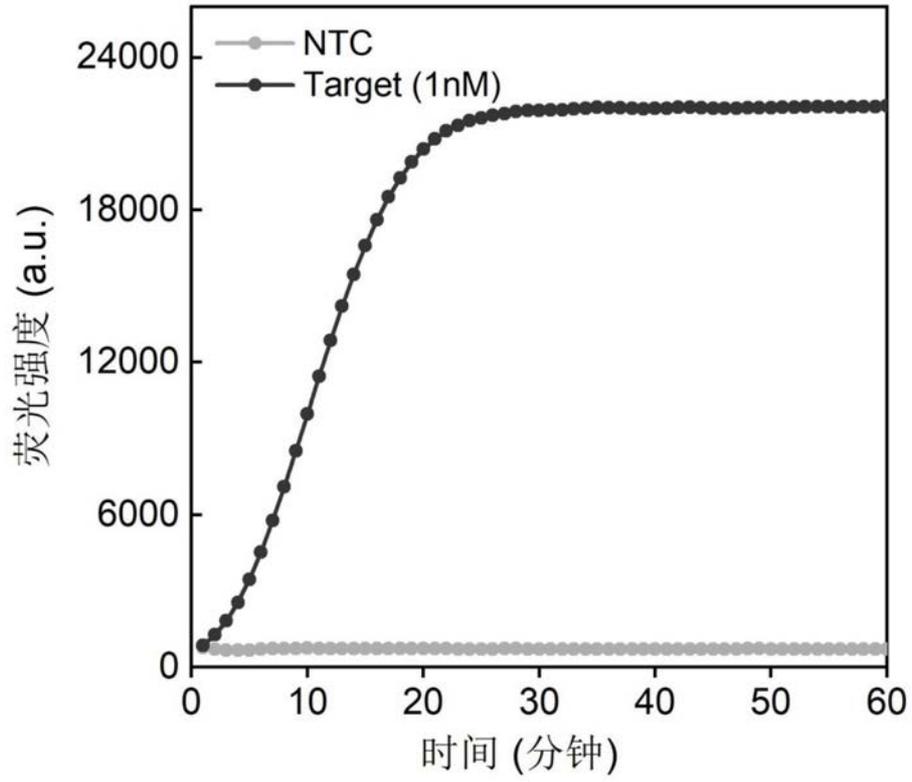


图7

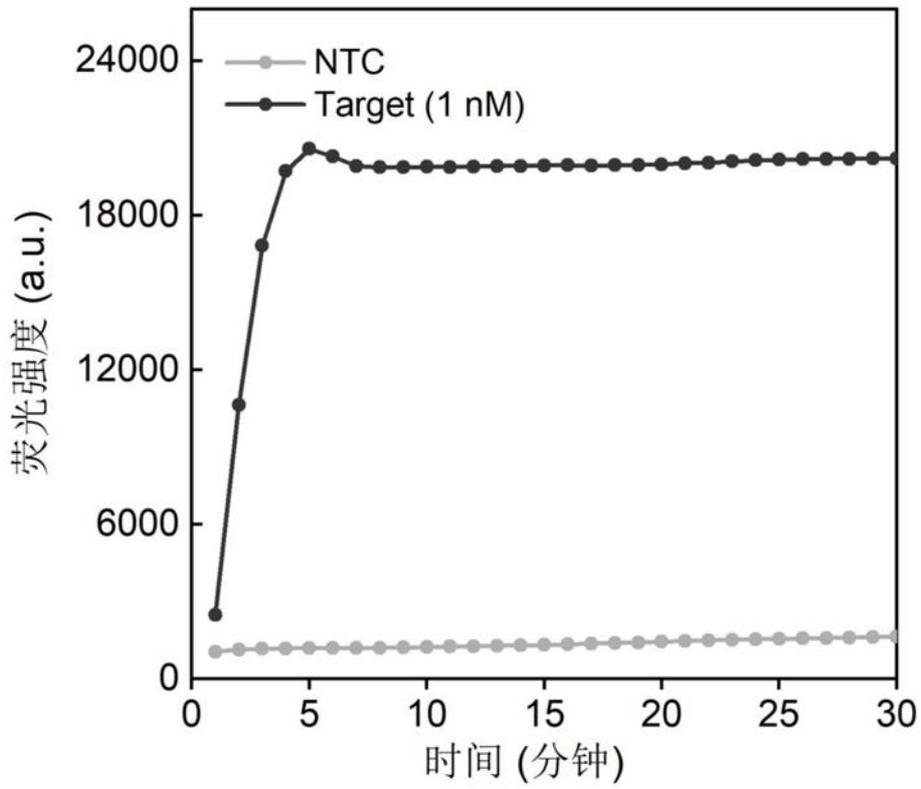


图8

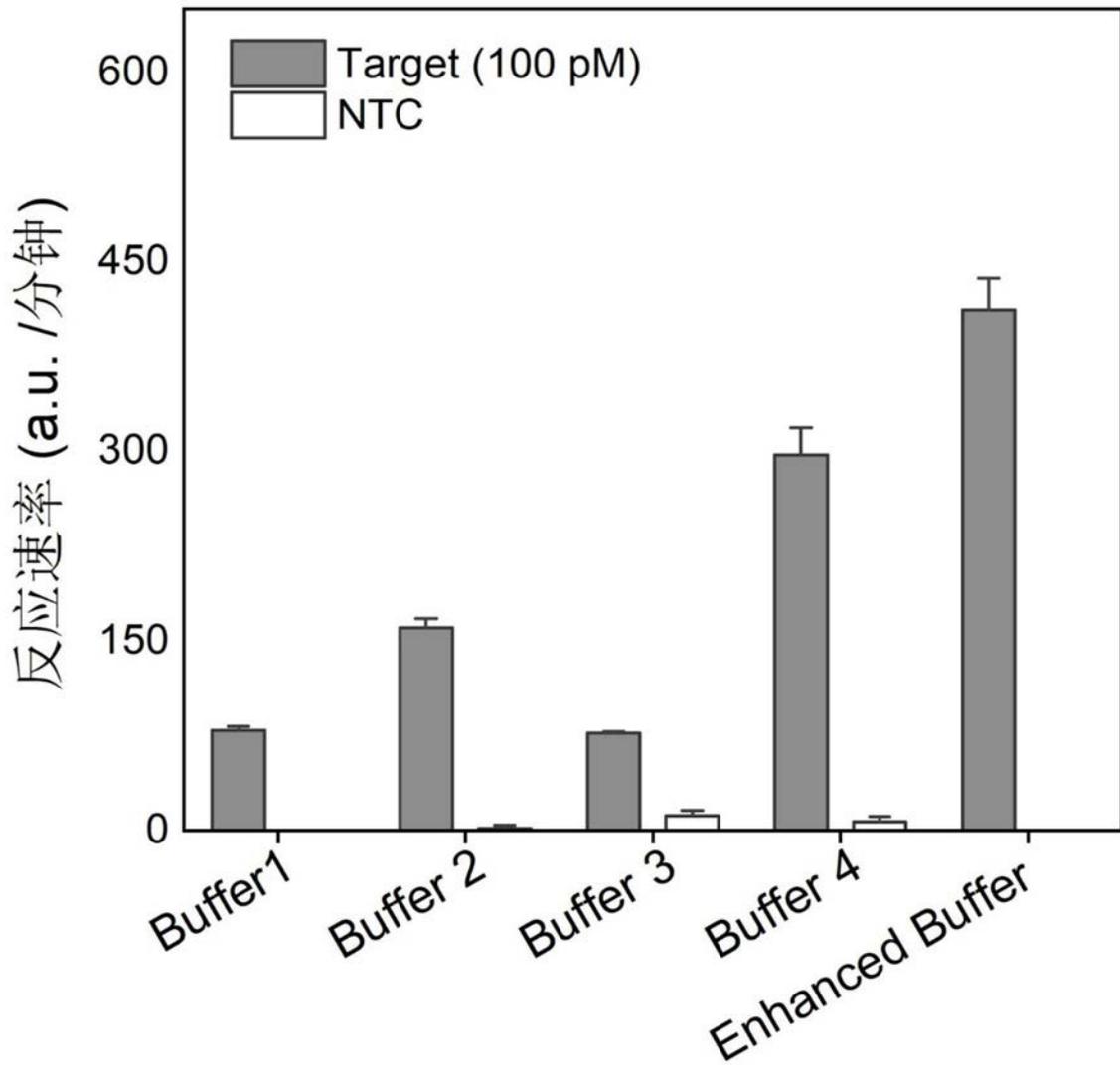


图9

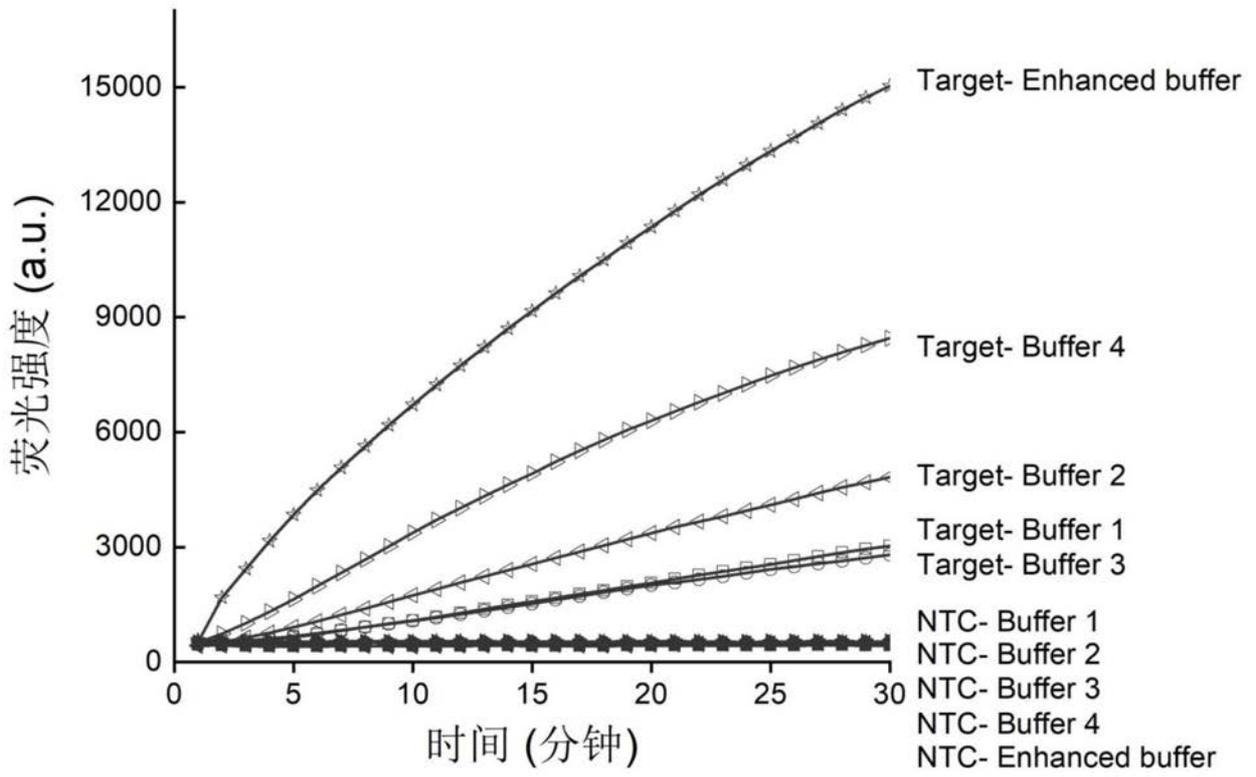


图10

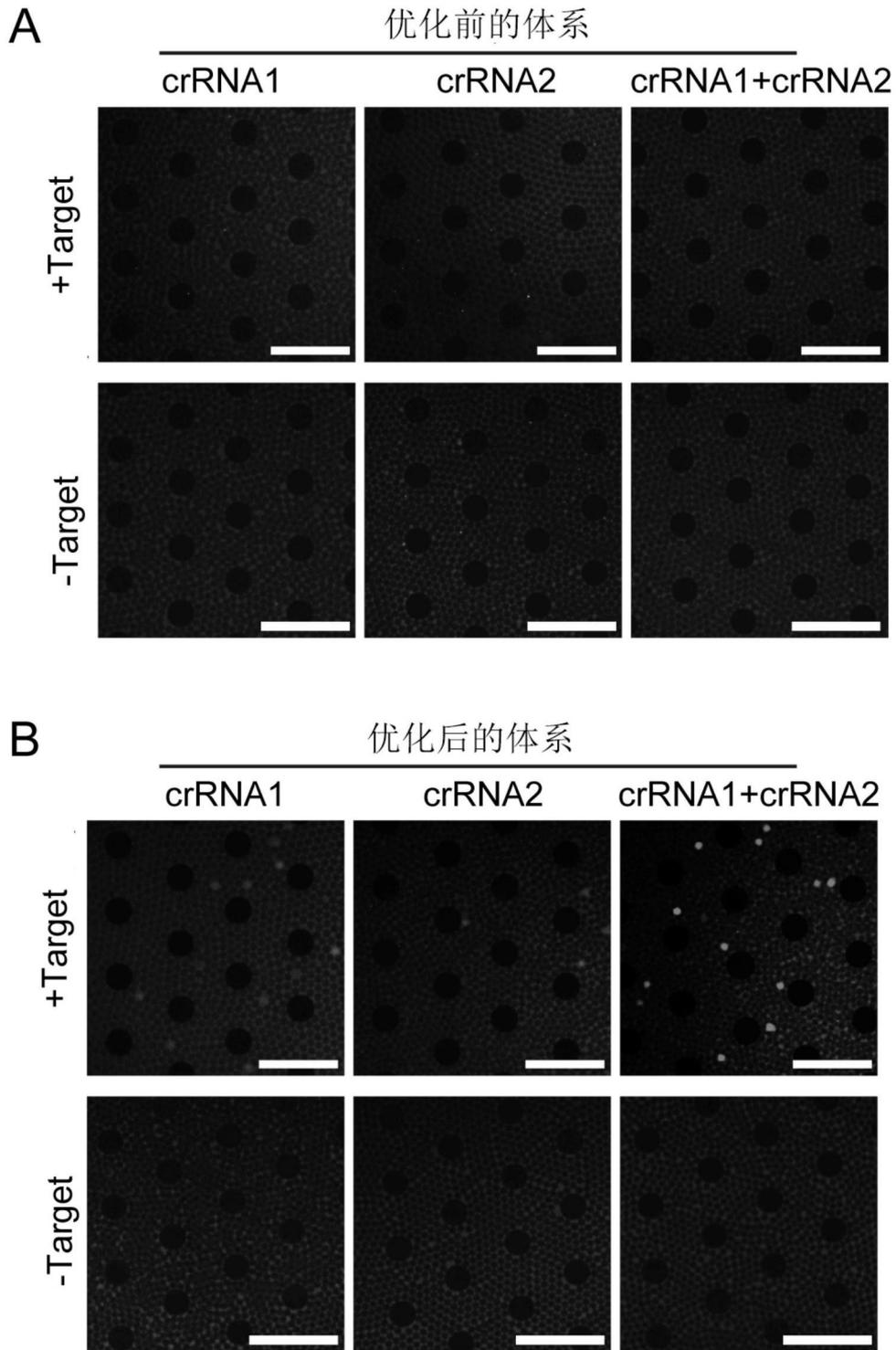


图11