



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111979357 A

(43) 申请公布日 2020.11.24

(21) 申请号 202010905632.8

(22) 申请日 2020.09.01

(71) 申请人 石河子大学

地址 832000 新疆维吾尔自治区石河子市
北四路221号石河子大学

(72) 发明人 倪伟 胡圣伟 姚瑞 李村院
李晓悦 徐越仁

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐恒智专利商标代理
事务所(普通合伙) 65102

代理人 李靖

(51) Int.Cl.

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/682 (2018.01)

C12N 15/11 (2006.01)

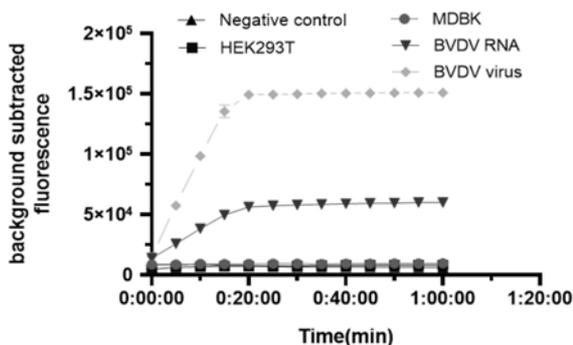
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

基于CRISPR-Cas13a的牛病毒性腹泻病毒的
检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测牛病毒性腹泻病毒的引物、利用该引物制备的检测BVDV的试剂盒,以及基于CRISPR-Cas13a的牛病毒性腹泻病毒的检测方法,引物为:5'-GGGGAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGC CAUCCAACGAACUCACCACUGUUGCU-3';试剂盒中至少包含上述引物,将待测样品加入到试剂盒中进行检测。本发明首次将CRISPR-Cas13a体系成功用于BVDV病毒的核酸检测中,只需加入微量级的样品,就可以鉴定是否含有BVDV病毒。具有良好的特异性、灵敏度。该方法为BVDV的早期诊断提供了广阔的前景。



1. 一种检测牛病毒性腹泻病毒的引物,其特征在于:所述引物为:

5' -GGGGAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGCCAUCCAACGAACUCACCACUGUUGCU-3'。

2. 一种用于检测牛病毒性腹泻病毒的试剂盒,其特征在于:

包含纯化的LwCas13a蛋白45nM、特异性crRNA 22.5nM、淬灭荧光报告分子RNA 125nM、RNase抑制剂2uL和检测缓冲液的总体积40uL;

所述特异性crRNA为权利要求1所述的引物;

所述淬灭荧光报告分子RNA为:5' -GAAGAAGAGUUUUAUCAGAUAGAUUUGU-3' ,

5'端修饰为FAM,3'端修饰为BHQ-1。

3. 如权利要求2所述的用于检测牛病毒性腹泻病毒的试剂盒,其特征在于:

纯化的LwCas13a蛋白纯化步骤如下:先构件LwCas13a原核表达载体,将LwCas13a编码基因克隆至原核表达载体pET-28a⁺上构建pET-28a⁺-LwCas13a重组表达载体,之后将pET-28a⁺-LwCas13a重组表达载体转入Rosetta™ (DE3) 扩大培养,低温诱导其表达LwCas13a蛋白,在通过镍柱亲和层析法获得纯化的LwCas13a蛋白。

4. 一种基于CRISPR-Cas13a的牛病毒性腹泻病毒的检测方法,包括如下步骤:

步骤①、LwCas13a原核表达载体的构建;

步骤②、LwCas13a的诱导表达纯化;

步骤③、特异性crRNA的设计及淬灭荧光报告分子RNA设计;

步骤④、CRISPR-Cas13a检测体系的建立,将步骤②得到的纯化的LwCas13a蛋白、设计的crRNA的序列、淬灭荧光报告分子RNA序列、RNase抑制剂和检测缓冲液混合得到的混合物;

步骤⑤、将待测样品添加到步骤④得到的混合物中,检测到发荧光表示样品含有BVDV病毒,不发荧光表示样品中不含有BVDV病毒;

步骤①和②中:LwCas13a原核表达载体的构建步骤为:将LwCas13a编码基因克隆至原核表达载体pET-28a⁺上构建pET-28a⁺-LwCas13a重组表达载体,所述的pET-28a⁺-LwCas13a重组表达载体转入Rosetta™ (DE3) 扩大培养,低温诱导其表达LwCas13a蛋白,在通过镍柱亲和层析法获得纯化的LwCas13a蛋白;

步骤③中:所述特异性crRNA的序列为:

5' -GGGGAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGCCAUCCAACGAACUCACCACUGUUGCU-3' ;

淬灭荧光报告分子RNA序列为:

5' -GAAGAAGAGUUUUAUCAGAUAGAUUUGU-3' ,5'端修饰为FAM,3'端修饰为BHQ-1;

将待检测样本加入上述试剂盒。

基于CRISPR-Cas13a的牛病毒性腹泻病毒的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其涉及一种基于CRISPR-Cas13a的牛病毒性腹泻病毒的检测方法。

背景技术

[0002] 牛病毒性腹泻(粘膜病)是由牛病毒性腹泻病毒(Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV)引起的一种接触性传染病,主要感染牛,也感染猪、羊、骆驼等其他生物,宿主范围较广。BVDV是一种正义的核糖核酸(RNA)病毒,属于黄病毒科和瘟病毒属。感染后可导致多种临床表现,包括呼吸道,消化道和生殖(多种形式)的病症(Scharnböck B,Roch F F,Richter V,et al.A meta-analysis of bovine viral diarrhoea virus(BVDV) prevalences in the global cattle population[J].Scientific reports,2018,8(1):1-15.)。其中,以牛、羊的急性或慢性黏膜病、腹泻、生长繁殖障碍、免疫抑制和持续性感染等症状为主,一旦感染,直接影响牛的生长发育和繁殖,部分会出现免疫力下降等情况,这就可以诱发其他病原体的感染。由于BVDV的宿主极其广泛,包括多数野生动物均可感染BVDV,并可携毒、排毒,这就加大了散养动物感染BVDV的概率。因此,BVDV严重威胁我国甚至全球的畜牧业发展,造成全球极大的经济损失。所以BVDV的检测及预防有着十分重要的意义(Garoussi M T,Mehrzad J,Nejati A.Investigation of persistent infection of bovine viral diarrhoea virus(BVDV) in Holstein dairy cows[J].Tropical animal health and production,2019,51(4):853-858.)。目前,检测BVDV病毒的方法很多,包括传统的血清中和试验,免疫组化法,ELISA和最近的荧光PCR技术。然而,传统的BVDV方法几乎都需要精密的仪器和较高的成本很难应对现场和大规模检测,假阳性的概率也比较高(Adams M J,Hendrickson R C,Dempsey D M,et al.Tracking the changes in virus taxonomy[J].Archives of virology,2015,160(5):1375-1383.)。因此迫切需要建立一种快速,准确,高效的方法来检测BVDV。

[0003] 近几年发展起来的CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats,规律成簇的间隔短回文重复)是出色的基因组编辑工具,其层出不穷的科研进展及其应用更新给生物学界造成革命性风暴,这也给病毒检测方面带来了巨大的应用前景。2015年,C2c2(Cas13a)结构被发现:包含一个识别结构域和两个HEPN核糖核酸酶结构域(Shmakov,S.,Abudayyeh,O.O.,Makarova,K.S.,Wolf,Y.I.,Gootenberg,J.S.,Semenova,E.,...Koonin,E.V.(2015).Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2CRISPR-Cas Systems.Molecular Cell,60(3),385-397.)。随后,又有研究发现这两个结构域具有两种不同的RNA酶活性,一种作用于引导RNA(gRNA),另一种作用于靶RNA(East-Seletsky,Alexandra,et al."Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection."Nature 538.7624(2016):270-273.)。

[0004] 进一步探索发现,crRNA与靶标RNA互补形成双链后可与核酸叶(NUC)结合,结合使

Cas13a发生显著的构象变化。RNA双链的形成触发HEPN1向HEPN2结构域移动,激活Cas13a蛋白的HEPN催化位点,使其以非特性方式裂解单链靶标和其它RNA (Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, Verdine V, Donghia N, Daringer NM, Freije CA, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science. 2017;356:438-42.)。这种特异性识别核酸后出现的非靶标(附带效应)切割活性表明CRISPR/Cas生物学有望成为快速,准确和便携式的诊断工具。有报道,Gootenberg等发现,Leptotrichia wadei Cas13a (LwCas13a) 激活的RNase活性可以检测样品中的寨卡病毒和登革热病毒 (Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Kellner MJ, Joung J, Collins JJ, Zhang F. Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. Science. 2018;360:439-44.)。Yafei等也利用CRISPR-Cas13a特异性检测PRRS (Chang Y, Deng Y, Li T, et al. Visual detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using CRISPR-Cas13a. [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2020, 67 (2) :564-571.)。随着检测技术的不断发展,利用CRISPR-Cas13a检测方法的优越性也逐渐凸显出来。CRISPR-Cas13a检测平台开发成为了RNA病毒病的检测的一种新的策略。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于CRISPR-Cas13a的特异性好、灵敏度高,可以快速检测BVDV的方法。

[0006] 本发明针对背景技术中提到的问题,采用的技术方案为:

[0007] 一种基于CRISPR-Cas13a的牛病毒性腹泻病毒的检测方法,包括LwCas13a原核表达载体的构建、LwCas13a的诱导表达纯化、特异性crRNA的设计、BVDV病毒RNA的提取、CRISPR-Cas13a检测体系的建立、结果判断,其具体步骤如下:

[0008] LwCas13a原核表达载体的构建:LwCas13a全长基因通过PCR获得并通过酶切连接的方法克隆到pET-28a⁺载体上,构建pET-28a⁺-LwC13a重组表达载体;

[0009] LwCas13a的诱导表达纯化:取上述原核表达载体转入RosettaTM (DE3) 后扩大培养,通过IPTG在低温(18℃)诱导表达。收集细胞沉淀,过夜裂解后进行超声破碎,取超声后的上清液通过镍柱亲和层析法按照说明书步骤GE获得LwCas13a蛋白,SDS-PAGE验证,测定蛋白浓度后-80℃储存备用;

[0010] 特异性crRNA的设计:登录NCBI,根据GenBank中的基因序列(序列号:KF501393.1、U63479.1、AJ133738.1)选取5' UTR保守区域进行筛选,寻找高度保守的位点,设计crRNA。序列为:

[0011] 5'-GGGGAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGCCAUCCAACGAACUCACCACUGUUGCU-3' ;

[0012] 淬灭荧光报告分子RNA序列为:

[0013] 5'-GAAGAAGAGUUUUAUCAGAUAGAUUGU-3', 5'端修饰为FAM, 3'端修饰为BHQ-1;

[0014] BVDV病毒RNA的提取:首先对MDBK细胞进行培养,当细胞融合度达到接近70%时感染BVDV病毒,之后继续培养72h-96h,待MDBK细胞病变接近80%时,收集BVDV病毒液。最后使用QIAamp Viral RNA Mini Kit提取BVDV病毒RNA,提取的RNA经琼脂糖凝胶电泳和微量核

酸蛋白检测仪 (ND2000) 检测以确定其纯度, 将其置于 -20°C 的环境中保存备用;

[0015] CRISPR-Cas13a检测体系的建立: 取上述45nM纯化的LwCas13a蛋白、22.5nM特异性crRNA、125nM淬灭荧光报告分子RNA以及2uLRNase抑制剂、检测缓冲液的总体积40uL, 在96孔板内混合均匀得到混合物, 在Synergy HTX多功能微孔板检测仪上进行检测。如下条件测量荧光:FAM通道(λ_{ex} 485nm, λ_{em} 518nm), 37°C 动力学测定1h, 每5min测量一次。

[0016] 结果判断: 将待测样品加入到上述混合物中, 当待测样品中含有BVDV病毒的RNA时, 由crRNA序列可与指定的靶标RNA结合, 被Cas13a识别并改变其构象激活RNase酶切割活性, 同时进入一种酶促“激活”状态, 非特异的切割体系中的淬灭荧光报告分子RNA, 释放荧光。该方法特异性高、灵敏度、重复性好, 同时简单快速, 具有较高的应用价值和推广前景。

[0017] CRISPR-Cas13a检测体系只需要微量级的样本就可以在1个小时内得出结果, 所以与其它分子生物学基因诊断方法相比, 具有特异、快速、准确、简便的特点。该体系利用Cas13a附属活性, 在该系统中引入淬灭荧光报告分子RNA, 一般它不会发出荧光, 但是体系中若含有靶标RNA, crRNA与靶标位置结合, 引导Cas13a识别并切割由crRNA序列指定的靶标RNA。同时激活Cas13a的附属活性——暴露的HEPN催化位点可切割体系中其他的非靶标的RNA, 这时体系中的淬灭荧光RNA报告分子就会被切割, 释放出荧光, 表明此样本中含有BVDV。

[0018] 与现有技术相比, 本发明的有益效果为:

[0019] 1) 本发明检测方法特异性好、灵敏度高、重复性好, 准确度高, 可快速地检测BVDV, 检测成本低, 具有较高的应用价值和推广前景;

[0020] 2) 本发明检测方法设计了BVDV特异性crRNA, 可与BVDV保守序列特异性形成互补双链, 与其他病毒或细胞不存在交叉反应, 提高了BVDV检测的特异性。

[0021] 3) 本发明检测方法在体系中引入了淬灭荧光报告分子RNA, 利用Cas13a的附属RNA酶活性, 可以放大体系中的检测信号, 使得检测体系中的灵敏度达到 10^3pM 。

附图说明

[0022] 图1重组表达载体pET-28a⁺-LwCas13a酶切电泳图。

[0023] 图2低温诱导LwCas13a蛋白表达结果。

[0024] 图3LwCas13a蛋白纯化。

[0025] 图4为利用本发明方法检测不同的病毒和细胞, 即本发明方法特异性的检测。

[0026] 图5为利用本发明方法检测梯度稀释后的BVDV RNA所获得的测试图片, 即本发明方法灵敏度的检测, 本发明方法的灵敏度为 10^3pM 。

具体实施方式

[0027] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细叙述, 给出的实施例仅为了阐明本发明, 而不是为了限制本发明的范围。

[0028] 本发明人以LwCas13a为研究中心, 表达和纯化LwCas13a蛋白, 同时, 根据已报道的BVDV基因序列的5'UTR保守区设计了一段特异性crRNA。用获得BVDV的RNA验证了Cas13a在体外也具有RNA酶切活性, 可以特异的、准确的检测出BVDV, 在此基础上完成了发明。

[0029] 第一步: 基于CRISPR-Cas13a的牛病毒性腹泻病毒检测方法的引物设计

[0030] 1.LwCas13a基因引物设计

[0031] 在addgene上获得pC013-Twinstrep-SUMO-LwCas13a的基因序列全长,用Premier 5软件设计LwCas13a蛋白全长引物。引物序列为,

[0032] 正向引物F:5'-CATGCCATGGGCAGCAGCATGAAAAGTGACCAAGGTCGACG-3',

[0033] 反向引物R:5'-GGCGAGCTCCCTTCCAGGGCCTTGACTCGA-3',

[0034] 预期扩增片段大小为3491bp。

[0035] 2.crRNA的设计

[0036] 登录NCBI,根据GenBank中的基因序列(序列号:M31182、KF501393.1、U63479.1、AJ133738.1)选择包含5' UTR区高度保守区域基因的序列进行比对,寻找高度保守的位点,设计crRNA。序列为:

[0037] 5'-GGGGAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGCCAUCCAACGAACUCACCACUGUUGC U-3'。

[0038] 3.BVDV引物设计

[0039] 根据BVDV基因序列设计检测引物,在BVDV的保守区设计一对特异性鉴定引物,引物序列为,

[0040] 正向引物F:5'-ATGCCCTTAGTAGGACTAGCA-3';

[0041] 反向引物R:5'-TCAACTCCATGTGCCATGTAC-3',预期扩增片段大小为288bp。

[0042] 4.淬灭荧光报告分子RNA序列

[0043] 参考文献(Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Lee, J.W., Essletzbichler, P., Dy, A.J., Joung, J., Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science, 356 (6336), 438-442.)。

[0044] 序列为:5'-GAAGAAGAGUUUUAUCAGAUAGAUUUGU-3', 5'端修饰为FAM, 3'端修饰为BHQ-1。

[0045] 第二步:原核系统中LwCas13a蛋白的表达与纯化

[0046] 1.LwCas13a原核表达载体的构建

[0047] 根据LwCas13a全长基因设计合成的特性引物,通过PCR获得LwCas13a全长基因序列并将其与载体pET-28a⁺(ThermoFisher Scientific, Invitrogen)用NcoI (Takara, Dalian, China)和Xho I (Takara, Dalian, China)分别进行性双酶切,纯化回收,利用DNA连接酶在16℃下进行连接,转化DH5α感受态。酶切鉴定后,将获得的重组载体命名为pET-28a⁺-LwCas13a。

[0048] 2.LwCas13a蛋白的表达

[0049] 将步骤1获得的重组质粒pET-28a⁺-LwCas13a转化到Rosetta™ (DE3) pLysS感受态中。筛选鉴定后在LB液体培养中扩大培养,然后转接到TB培养基中,37℃、200rpm下生长至OD600为0.5。此时,通过补充IPTG (500uM异丙基-1-硫代-β-D-吡喃半乳糖苷)至终浓度为500uM在18℃低温诱导表达20h。

[0050] 3.LwCas13a蛋白的纯化

[0051] 将步骤2获得的菌液经4℃、8000g离心15min收集细胞沉淀,在用裂解缓冲液(20mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、10mM咪唑PH 8.0)重悬细胞沉淀,过夜裂解。将裂解好的细胞液在液氮和37℃恒温水浴锅反复冻融三次,然后使用超声波细胞粉碎机(宁波新芝Scienz-IID)超声

处理(超声条件:开3s,关2s,功率60%)直至细胞液清亮。而后,在4℃、12000g离心机离心40min来分离裂解物,获得上清和沉淀。沉淀用8M脲重悬,通过SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色测试蛋白表达在上清中。

[0052] 将上清液用0.22um的过滤器过滤后,加载到5mL HisTrap™ FF crud (GE Healthcare Life Sciences)上,按照说明书上的操作方法操作,最后得到蛋白洗脱缓冲液。通过SDS-PAGE测试所得级分中目的蛋白的纯化,并通过超滤离心管(Millipore)浓缩至在蛋白储存缓冲液(600mM NaCl,50mM Tris-HCl pH 7.5,5%甘油,2mM DTT)中,用BCA (Bicinchoninic Acid)蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后在-80℃下冷冻存储。

[0053] 第三步:病毒培养以及RNA准备

[0054] 1.细胞及病毒的培养

[0055] 将MDBK细胞和HEK293T细胞复苏在补充有10%胎牛血清FBS的DMEM细胞培养液中,晃至均匀置于37℃、5%CO₂培养箱进行培养。待细胞铺满整个培养板后弃掉培养液,用PBS清洗2遍后,加入胰酶(含0.02%EDTA-2Na和0.25%的胰蛋白酶)消化1min后收集细胞,-80℃保存备用。另取对数生长期的MDBK细胞用于传代,待细胞融合度至~70%左右,弃掉培养液,用PBS清洗后,加入新的培养液和BVDV病毒悬浮液(NADL株),吸附2h后,在加2%FBS的DMEM培养液,继续常规培养直至80%以上的细胞发生病理变化,收毒:将病变的细胞培养板反复冻融3-5次,震摇使细胞完全脱落,收集培养液,离心后收集上清-80℃保存备用。

[0056] 2.细胞与病毒RNA的提取

[0057] 将MDBK细胞和HEK293T细胞用RNA simple总RNA提取试剂盒(QIAGEN,Duesseldorf, Germany)根据说明书提取总RNA。BVDV病毒液用QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN,Duesseldorf,Germany)试剂盒按照说明书提取RNA,分别放-80℃备用。

[0058] 第四步:CRISPR-Cas13a检测体系的建立

[0059] CRISPR-Cas13a检测体系由实施例1、2、3获得crRNA(22.5nM)、淬灭荧光报告分子RNA(125nM)、LwCas13a蛋白(45nM)、病毒RNA(100ng)以及RNase抑制剂(New England Biolabs)(2uL)、检测缓冲液(40mM Tris-HCl,60mM NaCl,6mM MgCl₂,pH7.3)构成。将上述组分(总体积40μL)加入96孔板(corning 3915)混匀后在Synergy HTX多功能微孔板检测仪(BioTek)如下条件测量荧光:激发光波长485nm,发射光波长518nm,37℃下进行1小时,每5分钟测量一次荧光动力学,每个处理重复三次。

[0060] 第五步:本发明方法特异性及灵敏度的检测

[0061] 1.本发明方法特异性的检测

[0062] 选取实施例3获得的MDBK细胞、HEK293T细胞的RNA以及BVDV病毒液做为检测的对象,加入无RNA酶H₂O作阴性对照,BVDV的RNA做阳性对照,验证该方法的特异性。加入BVDV RNA和BVDV病毒液的随着时间的增加荧光信号增强,后者增加的速度显著高于前者,而阴性对照以及其他则无显著性差异。说明本发明检测方法用于识别BVDV病毒RNA的crRNA具有良好的特异性,可以区分出BVDV的RNA或者是BVDV病毒液。

[0063] 2.本发明方法灵敏度的检测

[0064] 选取实施例3获得的BVDV病毒液,用QIAamp Viral RNA Mini Kit试剂盒提取BVDV病毒RNA为样本。使用反转录荧光定量PCR对BVDV的标准RNA做标准曲线,对比标准曲线检测提取的BVDV病毒样本的RNA浓度。按照10倍梯度稀释法稀释检测样本,设置8组标准品,每组

3个复孔,评估本实验方法的灵敏度。证明本方法可检测到的BVDV RNA浓度为 10^3 PM。

[0065] 上述的CRISPR-Cas13a检测方法可以在1h内得出结果,与其他传统的生物学诊断相比,具有简便、快速、准确、特异的特点。其原理是:利用LwCas13a酶的活性。Cas13a包含一个REC域和一个核酸酶识别区NUC域,前者负责pre-crRNA的加工成熟,后者可与crRNA结合后发生构象变化。当在体系中加入BVDV病毒RNA时,crRNA与BVDV靶标位置结合形成双链结构时,Cas13a可以识别并切割由crRNA序列指定的靶标RNA,同时进入一种酶促“激活”状态,这时它可以结合并切割体系中其他的非靶标的RNA,这使得在体系中存在的淬灭荧光RNA报告分子被切割,发出荧光。

[0066] 以上所述的实施例对本发明的技术方案进行了详细说明,应理解的是以上所述仅为本发明的具体实施例,并不用于限制本发明,凡在本发明的原则范围内所做的任何修改、补充或类似方式替代等,均应包含在本发明的保护范围之内。

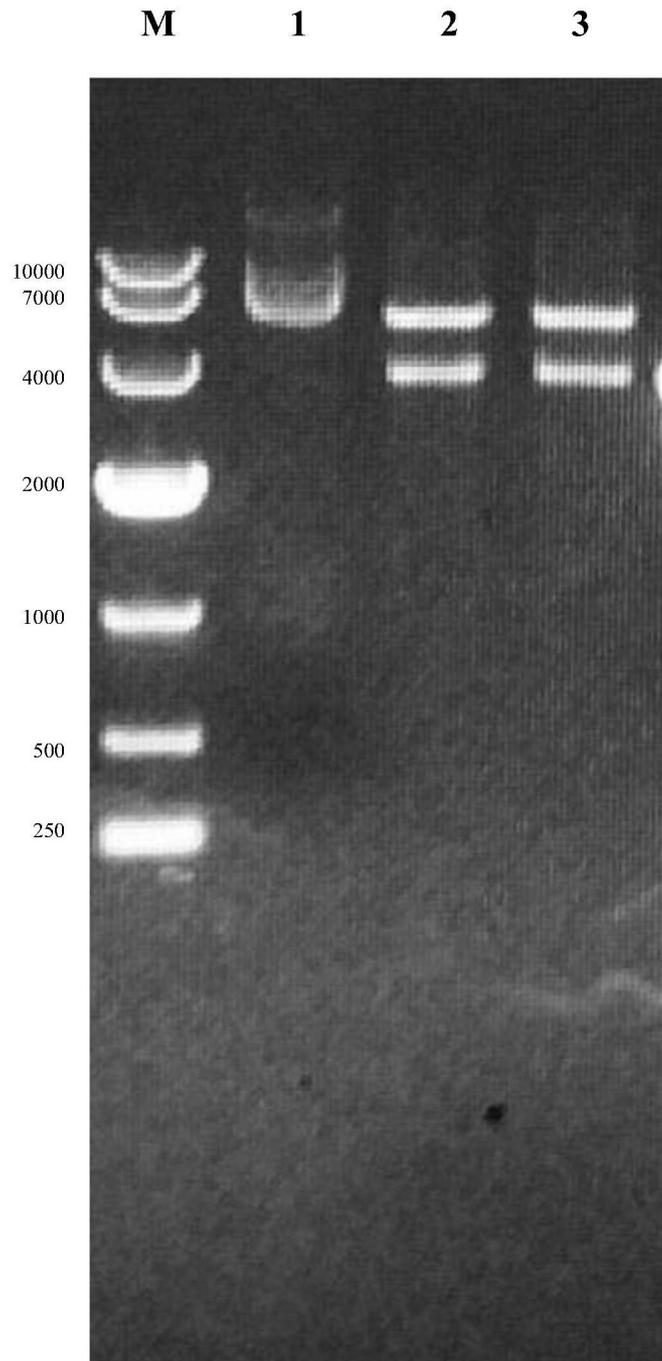


图1

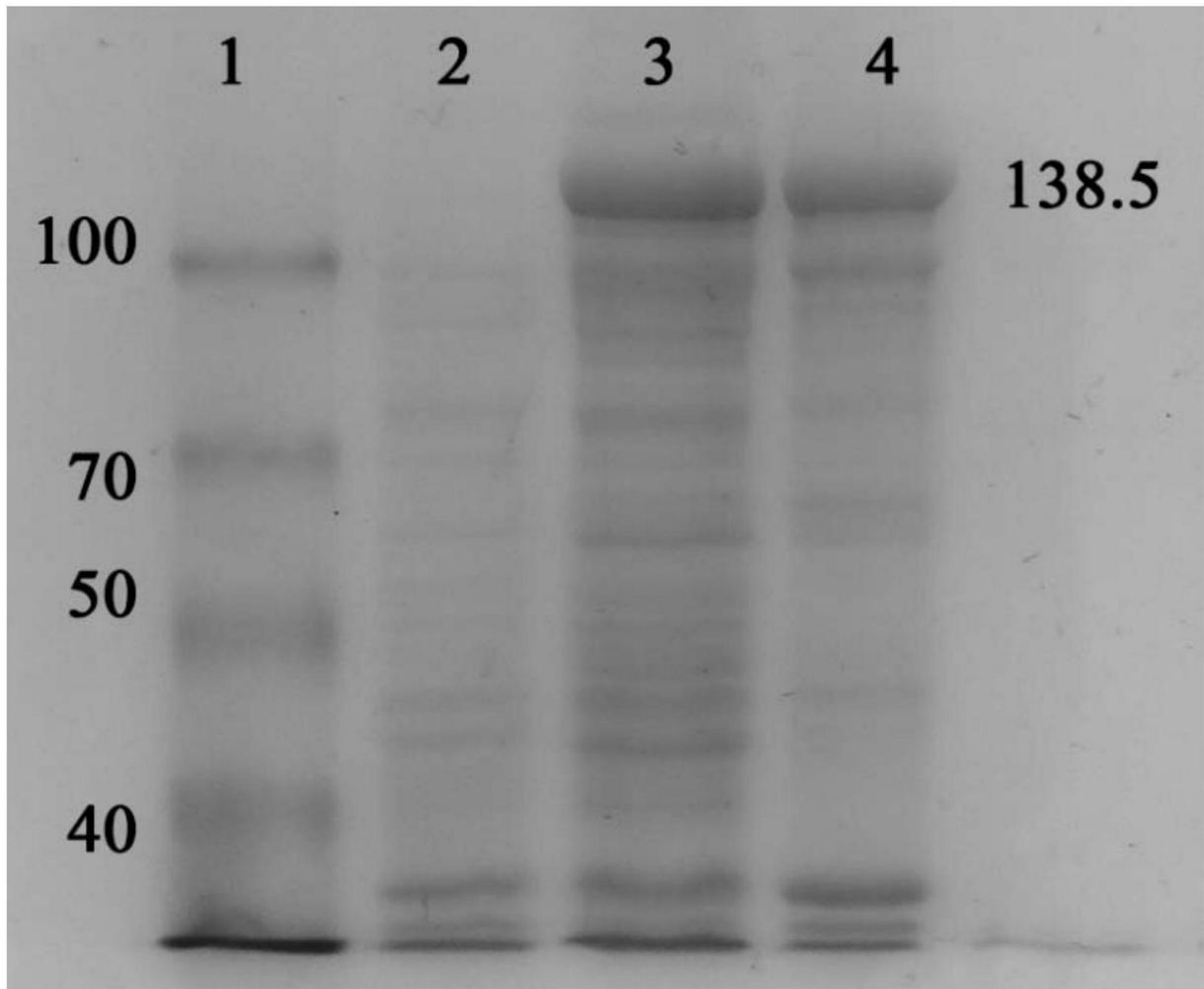


图2

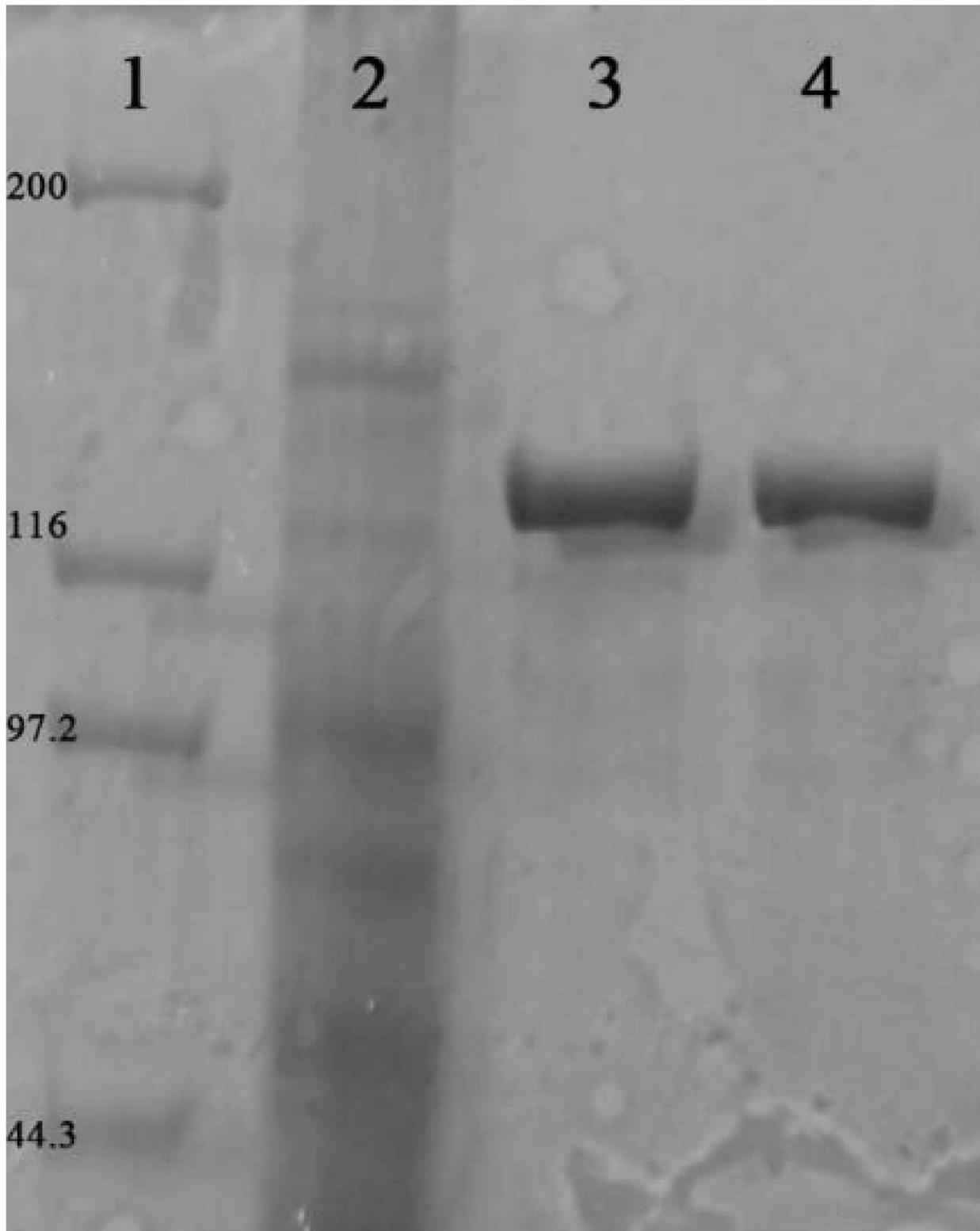


图3

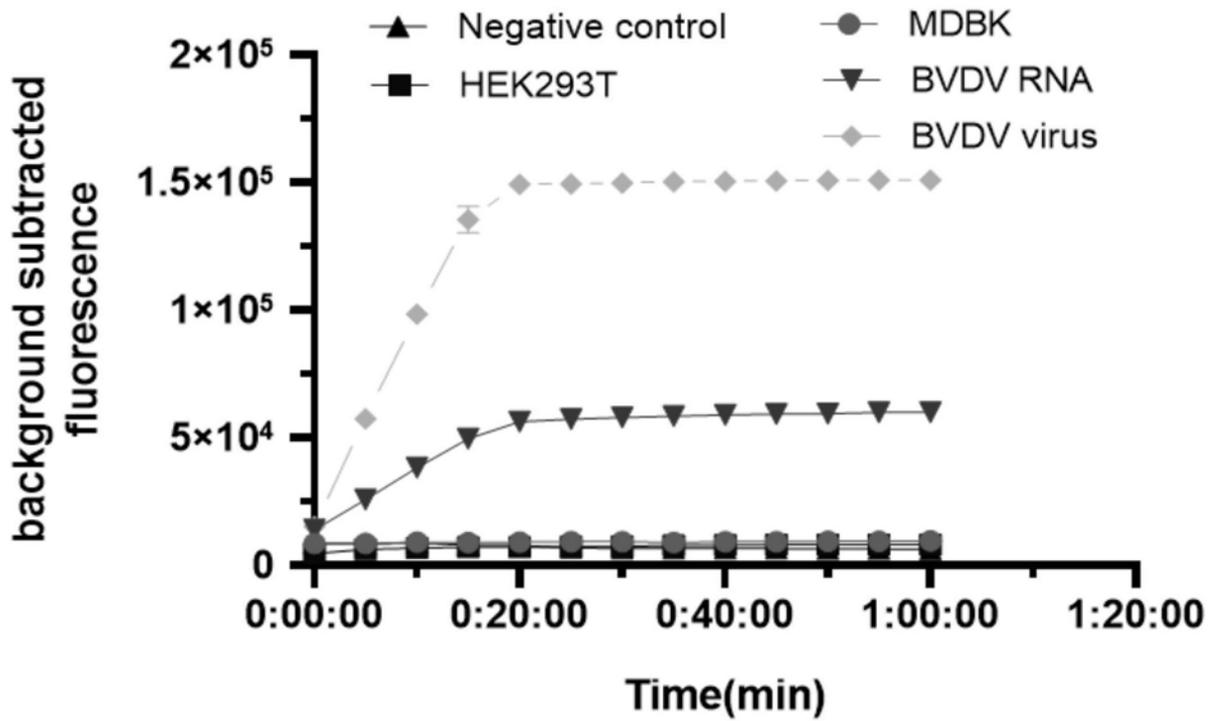


图4

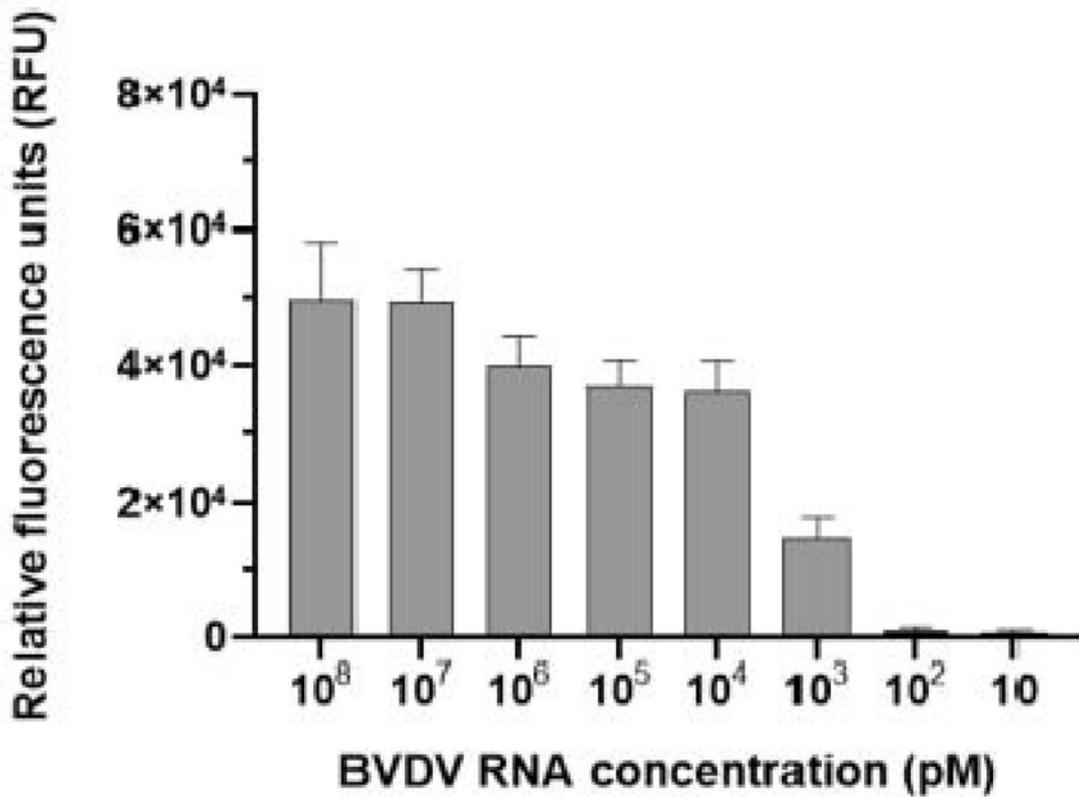


图5