



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX-XXXX

蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法

Protein Detection: A Method for Measuring CRISPR Cas12a trans-cleavage Activity

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 录

前 言 II

1 范围 - 1 -

2 规范性引用文件 - 1 -

3 术语和定义 - 1 -

4 原理 - 2 -

5 试剂和材料 - 2 -

6 仪器设备 - 3 -

7 试验步骤 - 3 -

8 试验数据处理 - 5 -

9 精密度 - 9 -

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法

1 范围

本文件描述了 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法的原理、试剂或材料、仪器设备、试剂样品制备、实验步骤和数据处理。

本文件适用于 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 无核酸酶的一级水、分子级水

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

簇状规律间隔的短回文重复序列 clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CRISPR 序列是由感染原核生物的噬菌体 DNA 片段衍生来的一段规律的、间隔的短回文序列，由富含 AT 的前导序列与被短重复序列隔开的间隔序列所组成。前导序列包含启动子，用来启动短重复序列和间隔序列的转录。短重复序列一般由 28-37 个碱基对组成，间隔序列一般由 32-38 个碱基对组成，用来锚定目的外源 DNA 片段。

3.2

Cas12a 蛋白 Cas12a protein

Cas12a 蛋白属于 CRISPR Cas 蛋白家族中第 2 类第 V 型，其包含 RuvC 核酸酶结构域，能酶切靶标双链 DNA 和靶标单链 DNA，并能够反式切割非靶标单链 DNA。

3.3

CRISPR 来源 RNA CRISPR-derived RNA

crRNA 是一段能够和外源目的片段序列互补，引导 Cas12a 蛋白剪切外源目的片段的 RNA 序列。

3.4

Cas12a 蛋白反式切割活性 trans-cleavage activity of Cas12a protein

Cas12a 蛋白与 crRNA、靶标 DNA 形成三元复合体后，该复合物就会显示出不依赖于靶标核酸序列的核酸酶活性，可将体系中任意序列的单链 DNA 切成碎片，该酶切活性被称为 Cas12a 蛋白反式切割活性。

3.5

Cas12a 蛋白反式切割单位 trans-cleavage unit of Cas12a protein

Cas12a 蛋白反式切割单位指在 20 μ L 反应体系中，温度为 37 $^{\circ}$ C 条件下，1 分钟内切割 1 pmol 单链 DNA 荧光报告探针所需 Cas12a 蛋白的量为 1 个 Cas12a 蛋白反式切割单位，简写为(trans-U)。

4 原理

CRISPR Cas12a 蛋白与 crRNA、靶标 DNA 形成三元复合物后, 能将反应体系中的单链 DNA 报告探针切碎。由于该报告探针的两端分别用荧光基团和淬灭基团标记, 当报告探针完整时, 荧光信号会被淬灭基团淬灭; 而当报告探针被切碎后, 淬灭基团与荧光基团的距离会增大而失去淬灭作用, 进而产生荧光信号。在此反应中, 由于低浓度的 CRISPR Cas12a 蛋白的反式切割活性与荧光信号的增长速率成正比, 因此通过收集 30 分钟内反式切割反应体系中的荧光信号值的变化量, 并利用荧光标准曲线方程转化为 Cas12a 反式切割反应的最大反应速率值, 然后将不同浓度的 Cas12a 蛋白和与之对应的最大反应速率值进行线性拟合, 最终实现通过检测反应体系荧光值变化量来定量计算出其中的 Cas12a 蛋白浓度以及对应的 Cas12a 蛋白反式切割活性单位。

5 试剂和材料

5.1 水

符合 GB/T 6882 规定的无核酸酶的一级水、分子级水。

5.2 10×活性检测缓冲液

用万分之一电子天平精密称取 0.29 g 亚精胺, 6.30 g 三羟甲基氨基甲烷, 0.57 g 氯化镁, 0.15 g 二硫苏糖醇, 3.00 g 甘氨酸, 5.08 g 聚乙二醇 20000, 用 0.5-10 μL 量程的移液器量取 10 μL Triton® X-100, 溶于无核酸酶的一级水中, 用稀盐酸调至温度为 25℃时 pH 8.5, 混匀后, 定容至 100 mL。

5.3 10×退火缓冲液

用万分之一电子天平精密称取 0.13 g 硫酸铵, 0.15 g 氯化钾, 0.02 g 硫酸镁, 0.32 g 三羟甲基氨基甲烷, 溶于无核酸酶的一级水中, 用稀盐酸调至温度为 25℃时 pH 8.3, 混匀后, 定容至 100 mL。

5.4 1 $\mu\text{mol/L}$ Cas12a 蛋白工作溶液

用 0.5-10 μL 量程的移液器精密量取 10 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ Cas12a 蛋白溶液, 溶于 90 μL 1×活性检测缓冲液中, 充分混匀。

5.5 1 $\mu\text{mol/L}$ crRNA 溶液

用 0.5-10 μL 量程的移液器精密量取 2 μL 100 $\mu\text{mol/L}$ crRNA 溶液, 溶于 198 μL 无核酸酶的一级水中。crRNA 序列为 5'-AAUUUCUACUCUUGUAGAUUUAUCGCAACUUUCUACUGAAUU-3'。

5.6 100 nmol/L 靶标双链 DNA 溶液

用 0.5-10 μL 量程的移液器精密量取 50 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 正向引物, 10 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 反向引物, 在 1×退火缓冲液中退火, 95℃反应 2 分钟, 以 0.1℃/秒的速率缓慢降到 25℃, 用无核酸酶的一级水稀释成 100 nmol/L。

正向引物序列 5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGT TTTGTTATCGCAACTTTCTACTGAATTCGG-3';
反向引物序列 5'-CCGAATTCAGTAGAAAGTTGCGATAACAAAAC TGGCCGTCGTTTACAAC-3'。

5.7 5 $\mu\text{mol/L}$ 单链 DNA 荧光报告探针溶液

用 0.5-10 μL 量程的移液器精密量取 10 μL 100 $\mu\text{mol/L}$ 单链 DNA 荧光报告探针溶液, 溶于 190 μL 无核酸酶的一级水中。

单链 DNA 荧光报告探针序列为 5'(6)-FAM-CCCCCCCC-3'-BHQ1。

6 仪器设备

实时荧光定量 PCR 检测仪（FQD-96A，博日，中国）、旋涡混匀器（VORTEX3 S025，IKA，德国）、掌式离心机（S1010E，SCILOGEX，美国）、万分之一电子天平（ME403，METTLER TOLEDO，瑞士）、0.5-10 μL 移液器（Research plus，Eppendorf，德国）、10-100 μL 移液器（Research plus，Eppendorf，德国）、20-200 μL 移液器（Research plus，Eppendorf，德国）、100-1000 μL 移液器（Research plus，Eppendorf，德国）。

7 试验步骤

7.1 建立 Cas12a 蛋白反式切割活性的标准曲线

7.1.1 根据表 1 的配制方法将单链 DNA 荧光报告探针母液进行连续 2 倍梯度稀释，得到 2500.00 nmol/L、1250.00 nmol/L、625.00 nmol/L、312.50 nmol/L、156.25 nmol/L、78.13 nmol/L、39.06 nmol/L 和 19.53 nmol 的 8 个浓度梯度工作液，以相同体积的无 RNA 酶超纯水作为空白对照。

表 1 单链 DNA 荧光报告探针工作液浓度梯度稀释表

单链 DNA 荧光报告探针溶液浓度 (1 nmol/L, 代码)	配制方法
2500.00(S ₁)	取 100 μL 5 μmol/L 单链 DNA 荧光报告探针溶液，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
1250.00(S ₂)	取 100 μL S ₁ ，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
625.00(S ₃)	取 100 μL S ₂ ，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
312.50(S ₄)	取 100 μL S ₃ ，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
156.25(S ₅)	取 100 μL S ₄ ，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
78.13(S ₆)	取 100 μL S ₅ ，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
39.06(S ₇)	取 100 μL S ₆ ，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
19.53(S ₈)	取 100 μL S ₇ ，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
0(NC)	无核酸酶的一级水

7.1.2 按照表 2 所示各组分用量进行冰上操作，在 PCR 管中配置反式切割活性测定反应体系。分为两组：切割组，均含有靶标双链 DNA 溶液，下设各单链 DNA 荧光报告探针梯度工作液的反应以及空白对照反应；不切割组，均不含有靶标双链 DNA 溶液，下设各单链 DNA 荧光报告探针梯度工作液的反应以及空白对照反应，每个浓度做 3 个平行重复。配制完成后在旋涡混匀器混匀 10 秒，在掌上离心机上离心数秒使反应液全部聚于底部。

表 2 Cas12a 蛋白反式切割标准曲线反应体系中各组分含量表

组分	规格	切割反应体系 1 个反应用量/ μL	不切割对照体系 1 个反应用量/ μL
活性检测缓冲液	10×	2	2
crRNA 母液	1 $\mu\text{mol/L}$	0.8	0.8
Cas12a 母液	1 $\mu\text{mol/L}$	0.4	0.4
靶标双链 DNA 母液	0.1 $\mu\text{mol/L}$	8	0
单链 DNA 荧光报告探针工作液	多个浓度	8	8
无核酸酶的一级水	——	0.8	8.8
总体积	——	20	20

7.1.3 将装有反应液的 PCR 管置于荧光定量 PCR 仪中，设置反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，每隔 15 秒采集一次荧光信号，连续收集 30 分钟。

7.2 Cas12a 蛋白反式切割活性测定

7.2.1 根据表 3 的配制方法用 1×活性检测缓冲液将 Cas12a 蛋白进行连续 2 倍梯度稀释，得到 10.000 nmol/L、5.000 nmol/L、2.500 nmol/L、1.250 nmol/L、0.625 nmol/L、0.313 nmol/L 的 6 个浓度梯度，每个浓度做 3 个平行重复，以相同体积的无核酸酶的一级水作为空白对照。

表 3 蛋白量稀释梯度表

工具酶量(nmol/L,代码)	配置方法
10.000(E ₁)	取 2 μL 1 $\mu\text{mol/L}$ Cas12a 蛋白工作溶液，加入 198 μL 1×活性检测缓冲液，与旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
5.000(E ₂)	取 100 μL E ₁ ，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，与旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
2.500(E ₃)	取 100 μL E ₂ ，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，与旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
1.250(E ₄)	取 100 μL E ₃ ，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，与旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
0.625(E ₅)	取 100 μL E ₄ ，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，与旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
0.313(E ₆)	取 100 μL E ₅ ，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，与旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
0(NC)	无核酸酶的一级水

7.2.2 按照表 4 所示各组分用量进行冰上操作，在 PCR 管中配置反式切割活性测定反应体系。

表 4 切割反应液配比

切割反应液组分	规格	1 个反应用量/ μL
活性检测缓冲液	10 \times	2
crRNA 母液	1 $\mu\text{mol/L}$	0.04
Cas12a 母液	多个浓度	8
靶标双链 DNA 母液	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.4
单链 DNA 荧光报告探针工作液	10 $\mu\text{mol/L}$	2
无核酸酶的一级水	——	7.56
总体积	——	20

7.2.3 将装有反应液的 PCR 管置于荧光定量 PCR 仪中，设置反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，每隔 15 秒采集一次荧光信号，连续收集 30 分钟。

8 试验数据处理

8.1 Cas12a 蛋白反式切割活性的标准曲线制作

8.1.1 已发生反式切割反应实验组的标准曲线制作

- 8.1.1.1 将含有靶标双链 DNA 的实验组称为已发生反式切割反应的实验组，选取不同浓度梯度单链 DNA 荧光报告探针和空白对照的平台期的荧光值，并计算空白对照组的平均荧光值。
- 8.1.1.2 将各浓度梯度已被切割的单链 DNA 荧光报告探针的荧光值减掉空白对照的平均荧光值，得到各浓度梯度已被切割的单链 DNA 荧光报告探针的净荧光值。
- 8.1.1.3 计算各浓度梯度已被切割的单链 DNA 荧光报告探针净荧光值的平均值 F_{cl} 。
- 8.1.1.4 以各浓度梯度已被切割的单链 DNA 荧光报告探针的浓度值(nmol/L)为 X 轴，以各浓度梯度已被切割的单链 DNA 荧光报告探针的净荧光值的平均值 F_{cl} 为 Y 轴绘制散点图，并做线性拟合，制作标准曲线，得到如下图 1 所示的已发生反式切割反应实验组标准曲线图，其中 $R^2\geq 0.99$ 。

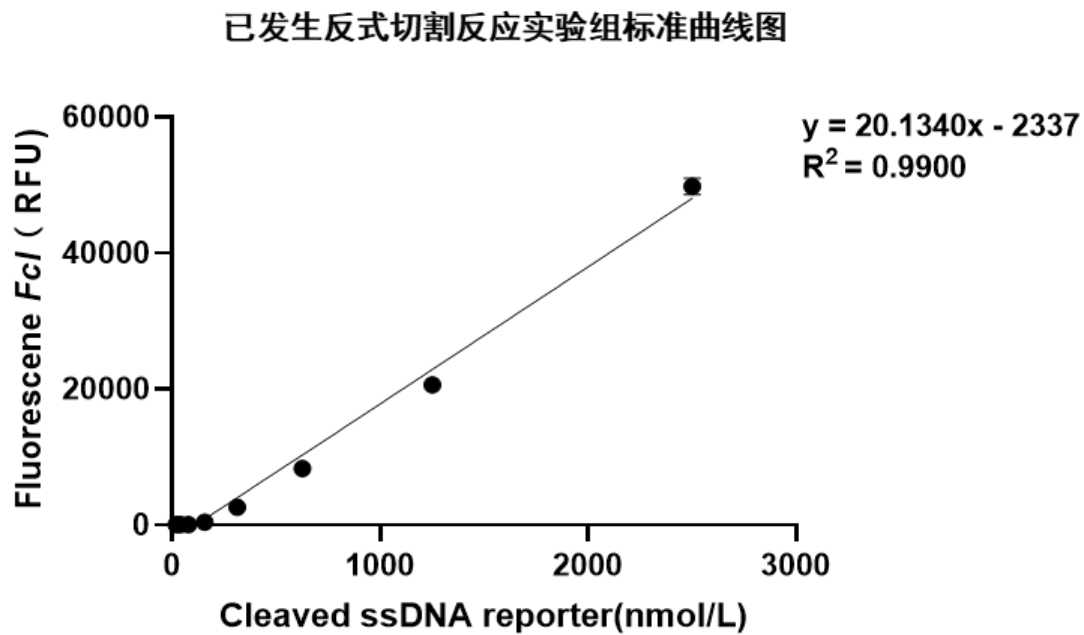


图 1

由图 1 所得，已发生反式切割反应的实验组线性方程拟合曲线的斜率 S_{cl} =20.1340。

8.1.2 未发生反式切割反应实验组的标准曲线制作

8.1.2.1 将不含有靶标双链 DNA 的实验组称为未发生反式切割反应的实验组，选取不同浓度梯度单链 DNA 荧光报告探针和空白对照的平台期的荧光值，并计算空白对照组的平均荧光值。

8.1.2.2 将各浓度梯度未切割的单链 DNA 荧光报告探针的荧光值减掉空白对照的平均荧光值，得到各浓度梯度未切割的单链 DNA 荧光报告探针的净荧光值。

8.1.2.3 计算各浓度梯度未切割的单链 DNA 荧光报告探针净荧光值的平均值 F_{ucl} 。

8.1.2.4 以各浓度梯度未切割的单链 DNA 荧光报告探针的浓度值（nmol/L）为 X 轴，以各浓度梯度未切割的单链 DNA 荧光报告探针的净荧光值的平均值 F_{ucl} 为 Y 轴绘制散点图，并做线性拟合，制作标准曲线，得到如下图 2 所示的未发生反式切割反应实验组的标准曲线，其中 $R^2 \geq 0.99$ 。

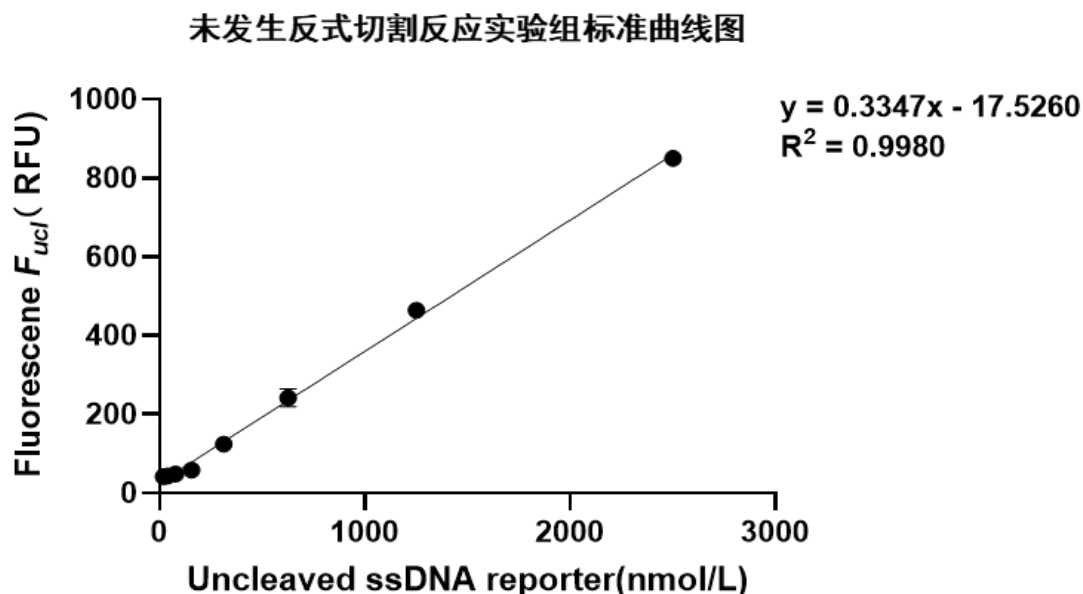


图 2

由图 2 所得，未发生反式切割反应的实验组线性方程拟合曲线的斜率 $S_{ucl}=0.3347$ 。

8.2 Cas12a 蛋白反式切割活性的测定和计算

8.2.1 被切割的单链 DNA 荧光报告探针浓度 $C_{cl}(t)$ 的计算

在不同浓度 Cas12a 蛋白反式切割活性反应中，初始浓度为 1000 nmol/L 的单链 DNA 荧光报告探针，某个时间 t 对应的荧光信号值与被反式切割的单链 DNA 荧光报告探针的浓度的数据关系公式(1)如下：

$$C_{cl}(t) = \frac{F(t) - C_0 S_{ucl}}{S_{cl} - S_{ucl}} = \frac{F(t) - 334.70}{19.7993} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

$C_{cl}(t)$ ——某个时间点 t 时被切割的单链 DNA 荧光报告探针的浓度，单位为纳摩尔每升(nmol/L)；

$F(t)$ ——某个时间点 t 时的荧光信号值，单位为相对荧光单位(RFU)；

C_0 ——单链 DNA 荧光报告探针的初始浓度，即为 1000 纳摩尔每升(nmol/L)；

S_{cl} ——已发生反式切割反应的实验组线性方程拟合曲线的斜率，其值为 20.1340；

S_{ucl} ——未发生反式切割反应的实验组线性方程拟合曲线的斜率，其值为 0.3347。

8.2.2 Cas12a 蛋白反式切割活性的计算

8.2.2.1 根据公式（1）将所得原始荧光信号值换算为底物即单链 DNA 荧光报告探针的消耗量，并依据公式（2）计算不同浓度单链 DNA 荧光报告探针的荧光曲线的最大反应速度作为初速度 V_0 ：

$$V_0 = \max \left[\frac{C_p(n+1) - C_p(n)}{\Delta T} \right] \dots \dots \dots (2)$$

式中:

V_0 ——初速度, 这里取不同浓度单链 DNA 荧光报告探针荧光曲线的最大速度作为初速度, 单位为皮摩尔每分钟(pmol/min);

n ——采样次数, 共 120 次采样, 但第 120 个点无法计算速度, 只取到 $n=119$;

$C_p(n)$ ——第 n 个循环时底物消耗量, 即 n 个循环时单链 DNA 荧光报告探针的消耗量, 单位为皮摩尔(pmol);

ΔT ——采样间隔时间, 单位为分钟(min)。

8.2.2.2 以所用不同浓度的 Cas12a 蛋白用量[E] (pmol)为横坐标 X 轴, 对应浓度的 Cas12a 反式切割反应荧光曲线的初速度 V_0 (pmol/min)为纵坐标绘制散点图。并选取 Cas12a 蛋白用量为 0.0800 pmol、0.0400 pmol、0.0200 pmol、0.0100 pmol、0.0050 pmol、0.0025 pmol 共 6 组数据进行线性拟合, 其 $R^2 \geq 0.99$ 。该线性拟合的斜率值为 k_{cat} , 即 $V_0 = k_{cat} \times [E]$ 。结果如图 3 所示:

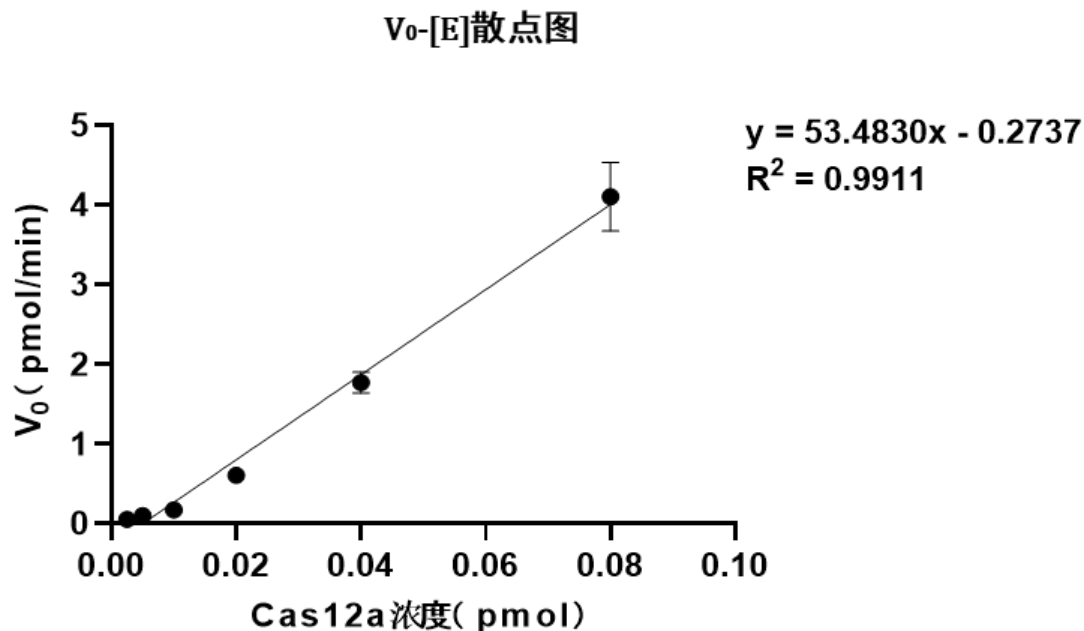


图 3

8.2.2.3 根据 Cas12a 蛋白反式切割单位的定义, 被测样品的酶活性按公式 (3) 计算: $A(trans-U/pmol)$

$$A(trans-U/pmol) = \frac{k_{cat}}{1 \text{ pmol/min}} \dots \dots \dots (3)$$

式中:

$A(trans-U/pmol)$ ——Cas12a 蛋白酶反式切割活性单位, 单位为反式切割单位每皮摩尔($trans-U/pmol$);

k_{cat} ——Cas12a 蛋白酶的催化常数, 由图 3 可得其值为 53.4830;

1 pmol/min——定义 Cas12a 蛋白酶反式切割活性单位时对应的速度, 即当 $V_{max}=1$ pmol/min 时, 示例中, 所测样品最终反式切割活性应为 53.4830 $trans-U/pmol$ 。

8.2.2.4 Cas12a 蛋白反式切割单位(*trans*-U): 在 20 μL 反应体系中, 温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 1 分钟内切割 1 pmol 单链 DNA 荧光报告探针所需的 Cas12a 蛋白量为 $\frac{1}{k_{cat}}$ 即 0.0187, 其单位为皮摩尔(pmol)。故所测 Cas12a 蛋白样本的 1 个反式切割单位(*trans*-U)对应 0.0187 pmol Cas12a 蛋白。

9 精密度

在重复性条件下, 获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。
