



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 111007240 A

(43)申请公布日 2020.04.14

(21)申请号 201911210990.0

(22)申请日 2019.12.02

(71)申请人 中国医学科学院北京协和医院

地址 100730 北京市东城区王府井帅府园1号

(72)发明人 李小刚

(74)专利代理机构 北京慧尚知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 11743

代理人 吉海莲

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统及其方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统,所述系统包括抗小分子特异性抗体的检测试剂R1和R2,所述R1为包含小分子特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系;所述R2包含Cas蛋白-sgRNA复合物和FQreporter;所述系统是通过液体体系中游离的小分子与偶联在小分子特异识别基团上的小分子探针对特异性抗体的结合位点进行竞争原理,实现小分子的定性和定量分析。本发明提供的免疫检测方法具有操作简便、快速、检测结果准确、灵敏度高、探针合成方便快捷、费用低等优势,对于将来进行大面积推广应用,特别是缺乏昂贵仪器的中小医院具有很好的前景。

1. 一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统,其特征在于,所述系统包括抗小分子特异性抗体的检测试剂R1和R2,所述R1为包含小分子特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系;所述R2包含Cas蛋白-sgRNA复合物和FQ reporter;所述系统是通过液体体系中游离的小分子与偶联在小分子特异识别基团上的小分子探针对特异性抗体的结合位点进行竞争原理,实现小分子的定性和定量分析。

2. 一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统,其特征在于,所述系统包括抗小分子特异性抗体的检测试剂R1和R2,所述R1为包含带磁珠的小分子特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系;所述R2包含Cas蛋白-sgRNA复合物和FQ reporter;所述系统是通过液体体系中游离的小分子与偶联在小分子特异识别基团上的小分子探针对特异性抗体的结合位点进行竞争原理,实现小分子的定性和定量分析。

3. 如权利要求1或2所述的均相酶免疫检验系统,其特征在于,所述小分子特异识别基团为小分子修饰DNA/RNA探针,所述小分子修饰的DNA/RNA探针包含Cas蛋白识别所需对应PAM序列的核酸序列。

4. 如权利要求1或2所述的均相酶免疫检验系统,其特征在于,所述小分子为分子量小于2000Da的有机分子;所述小分子包括治疗药物、激素、毒品、农兽药、活体代谢物中的待检小分子。

5. 如权利要求1或2所述的均相酶免疫检验系统,其特征在于,Cas蛋白包括Cas12a, Cas13, Cas14及其他Cas系列蛋白。

6. 一种CRISPR技术的均相酶免疫检验方法,包括如下步骤:

(1) 计算不同浓度标准品反应速度绘制标准曲线

通过自动加样仪器,首先加入标准品,随后加入R1试剂,最后加入R2试剂,测定不同时间点的荧光值,计算不同浓度标准品的反应速率,绘制标准曲线;

(2) 计算样本体系中小分子的浓度

按照步骤(1)的顺序依次向自动加样仪器中加入液体样本、R1试剂、R2试剂,通过样本的反应速率值,并根据标准曲线中反应速率与标准品浓度的关系式得到样本中小分子浓度值。

7. 如权利要求6所述的均相酶免疫检验方法,其特征在于,所述R1为包含小分子特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系;所述R2包含bing buffer, Cas蛋白-sgRNA复合物, FQ reporter,所述R2可以是冻干粉或缓冲体系。

8. 如权利要求6所述的均相酶免疫检验方法,其特征在于,所述R1为包含带磁珠的特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系;所述R2包含bing buffer, Cas蛋白-sgRNA复合物, FQ reporter,所述R2可以是冻干粉或缓冲体系。

9. 如权利要求6所述的均相酶免疫检验方法,其特征在于,所述Cas蛋白-sgRNA复合物的体系如下:

50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100μg/ml BSA, pH 7.9 (25℃);

FQ reporter: 包括

a. /56-FAM/TTATT/3IABKFQ/; b. /56-FAM/TTATT/3-BHQ-1/。

10. 权利要求1~5任意一项所述检验系统、权利要求6~9任意一项所述检验方法在治疗药物、激素、毒品、农兽药或活体代谢物中小分子检测中的应用。

一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统及其方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物分子检测技术领域,具体涉及一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统及其方法和应用。

背景技术

[0002] 临床上药物、激素、代谢物及食品中非法添加,运动员体检兴奋剂,毒品的快速检测需要现成快速检测。

[0003] 目前的检测方法主要分为生物学测试方法和化学分析法,早期应用广泛且较为成熟的有小鼠测试法、免疫分析法等生物学测试法。气相色谱法、薄层色谱法及液相色谱法等化学分析方法也有一定的报道。仪器分析方法如高效液相色谱法HPLC和LC/MS-MS是应用广泛的方法。这些方法准确、稳定、可靠,可以作为标准方法。但仪器分析法价格昂贵,费时较长,且造成有机溶剂污染,需要大型仪器设备,需要专门的技术人员。

[0004] 酶联免疫检测法(ELISA)提供了一种极好的检测手段。该法具有快速,准确,简易,不需要专门人员操作等优点,但需要对本标进行复杂的前处理,时间长,费用高。

[0005] 均相酶免疫测定包括酶扩大免疫测定技术和克隆酶供体免疫测定两种。

[0006] 1.酶增强免疫测定技术(EMIT):EMIT的基本原理是半抗原与酶结合成酶标半抗原,保留半抗原和酶的活性。当酶标半抗原与抗体结合后,所标的酶与抗体密切接触,使酶的活性中心受到影响而活性被抑制。反应后酶活力大小与标本中的半抗原量呈一定的比例,从酶活力的测定结果就可推算出标本中半抗原的量。

[0007] 2.克隆酶供体免疫分析:DNA重组技术可分别合成某种功能酶(如 β -D 半乳糖苷酶)分子的两个片段,大片段称为酶受体(EA),小分子称作酶供体(ED),两者单独均无酶活性,一定条件下结合形成四聚体方具酶活性。克隆酶供体免疫测定(CDEIA)的反应模式为竞争法,测定原理为:标本中的抗原和酶供体(ED)标记的抗原与特异性抗体竞争结合,形成两种抗原抗体复合物。ED标记的抗原与抗体结合后由于空间位阻,不再能与酶受体(EA)结合,而游离的ED标记的抗原上的ED可和EA结合,形成具有活性的酶,加入底物测定酶活性,酶活力的大小与标本中抗原含量成正比。

[0008] 目前研究小分子特异性检测是食品、药品、毒品、酶活等测定的迫切需求。例如6-MP广泛用于多种重要疾病的治疗,包括:急性白血病、器官移植和一些自身免疫疾病等,但此药物如果使用不当可产生严重的甚至危及生命的血液毒性,Mardini建议在使用6-MP时通过测定其代谢物6-MMP在病人血液中的浓度来决定6-MP的用药剂量,该文献结果显示,当血液中的6-MMP浓度 $<0.6\mu\text{g/mL}$ 时,用药剂量达不到相关疗效;而当6-MMP浓度 $>5.0\mu\text{g/mL}$ 时,则会对肝脏造成毒性。因此,一般需要将代谢物6-MMP的浓度控制在 $0.6\mu\text{g/mL} \sim 5.0\mu\text{g/mL}$ 之内。

[0009] 环孢霉素是一种西药,分子式是 $\text{C}_{62}\text{H}_{111}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$,是一种被广泛用于预防器官移植排斥的免疫抑制剂。它借由抑制T细胞的活性跟生长而达到抑制免疫系统的活性。环孢素于1969年由挪威Sandoz制药公司科学家于土壤样本中的真菌——多孔木霉(*Tolypocladium*

inflatum) 中首次分离出来。适用于 预防同种异体肾、肝、心、骨髓等器官或组织移植所发生的排斥反应;预防 及治疗骨髓移植时发生的移植物抗宿主反应。本品常与肾上腺皮质激素等免疫抑制剂联合应用,以提高疗效。环孢素的血药浓度和免疫抑制的强度相关,也与肝肾毒性反应相关,药物的毒性反应和器官移植的排异反应临床表现有时不易鉴别,环孢素的有效浓度与中毒浓度又很接近(不足2倍),加之不同病人都有不同的药代动力学改变,因此在环孢素的临床应用过程中,必须进行血药浓度监测,这有利于提高移植器官的存活率,减轻不良反应。

[0010] 但如何实现小分子更好的与均相酶免疫检测方法和酶联免疫吸附剂检测方法相结合实现快速检测,目前还没有报道。

发明内容

[0011] 为了实现小分子特异性快速检测,本发明的目的在于提供一种基于 CRISPR技术的均相酶免疫检测系统及其应用。

[0012] 麻省理工学院(MIT)和哈佛的Broad Institute的张峰团队开发了 CRISPR-Cas13分子诊断技术。Cas13蛋白不像用于基因编辑的Cas9蛋白,它在切割靶序列后会不加选择地切割碰到的RNA(collateral cleavage);这一特性使其不能被用于基因编辑,但对诊断来说却是个福音,该切割能增加检测信号的灵敏度。2018年,他们把这种诊断技术命名为SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing),该系统包含Cas13、对应的靶向待检测病毒的sgRNA/CrRNA和包含一个切割后可发出荧光的报告RNA链;当这些Cas13蛋白识别到靶向RNA链时会切割相应的模板,随后激活了它的collateral cleavage活性,进而切割报告RNA并释放可检测的荧光信号。

[0013] 加州大学伯克利分校的Doudna团队发现当Cas12a蛋白在剪切靶向的 dsDNA后能高效地切割非特异性单链DNA(ssDNA),基于此开发了 DETECTR (DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter)技术;该系统包含Cas12a、靶向特定序列的sgRNA和非特异性ssDNA荧光报告序列(FQ-labeled reporter)。一旦Cas12a检测到目的DNA序列便会切割靶序列,接着荧光报告序列也会被切割,从而释放出荧光信号。

[0014] 本发明提供的方法是基于CRISPR技术,通过液体体系中游离的小分子与偶联在小分子特异识别基团上的小分子探针对特异性抗体的结合位点进行竞争原理,实现小分子的均相酶联免疫分析。所述小分子包括治疗药物、激素、毒品、农兽药、活体代谢物等分子量小于2000Da的有机分子;小分子的特异性抗体包括但不限于多克隆抗体,单克隆抗体,适配体等。

[0015] 本发明的方法基于分子诊断原理,提供更为便捷的新方法,不依赖于大型仪器和实验场所,此技术转化检测产品将实现即时便携的小分子检测。

[0016] 具体地,本发明提供了一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统,所述系统包括抗小分子特异性抗体的检测试剂R1和R2,所述R1为包含小分子特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系;所述R2包含Cas蛋白-sgRNA复合物和FQ reporter;所述系统是通过液体体系中游离的小分子与偶联在小分子特异识别基团上的小分子探针对特异性抗体的结合位点进行竞争原理,实现小分子的定性和定量分析。

[0017] 本发明还提供了另外一种检测方案,即在R2试剂不变的情况下,R1试剂包含带磁

珠的分子特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系。

[0018] 优选的,所述小分子特异识别基团为小分子修饰DNA/RNA探针,所述小分子修饰的DNA/RNA探针包含Cas蛋白识别所需对应PAM序列的核酸序列。

[0019] 在一优选实施中,所述小分子修饰DNA/RNA探针的碱基序列如SEQ No.2所示。优选的,所述小分子修饰DNA/RNA探针的结合位点为GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAA,更优选TAAA及其附近,一般T好修饰。

[0020] 优选的,所述小分子为分子量小于2000Da的有机分子;所述小分子包括治疗药物、激素、毒品、农兽药、活体代谢物中的待检小分子。

[0021] 优选的,Cas蛋白包括Cas12a,Cas13,Cas14及其他Cas系列蛋白。

[0022] 进一步,本发明提供了一种CRISPR技术的均相酶免疫检验方法,包括如下步骤:

[0023] (1) 计算不同浓度标准品反应速度绘制标准曲线

[0024] 通过自动加样仪器,首先加入标准品,随后加入R1试剂,最后加入R2试剂,测定不同时间点的荧光值,计算不同浓度标准品的反应速率,绘制标准曲线;

[0025] 实际操作过程中需要不断调整R1试剂和R2试剂的比例,得到较理想的反应标准曲线。

[0026] (2) 计算样本体系中小分子的浓度

[0027] 按照步骤(1)的顺序依次向自动加样仪器中加入液体样本、R1试剂、R2试剂,通过样本的反应速率值,并根据标准曲线中反应速率与标准品浓度的关系式得到样本中小分子浓度值。

[0028] 优选的,所述R1为包含小分子特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系;所述R2包含bing buffer,Cas蛋白-sgRNA复合物,FQ reporter,所述R2可以是冻干粉或缓冲体系。

[0029] 优选的,所述R1为包含带磁珠的特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系;所述R2包含bing buffer,Cas蛋白-sgRNA复合物,FQ reporter,所述R2可以是冻干粉或缓冲体系。

[0030] 本发明可以在远段甚至延长核酸序列之后末端修饰小分子,因为抗体距离较远,不会影响探针和sgRNA结合,这种可以用磁珠修饰的抗体捕获之后,分离,再把上清加入到R2中。

[0031] 所述Cas蛋白-sgRNA复合物的体系如下:

[0032] 50mM NaCl,10mM Tris-HCl,10mM MgCl₂,100μg/ml BSA,pH 7.9 (25℃);

[0033] FQ reporter:包括

[0034] a./56-FAM/TTATT/3IABKFQ/;b./56-FAM/TTATT/3-BHQ-1/。

[0035] 本发明提供的检测方法是一种竞争性反应,反应体系中与抗体结合的小分子如治疗药物、激素、毒品、农兽药、活体代谢物等分子量小于2000的有机分子和游离的小分子修饰探针不需要通过固相来分离,其基本原理是:液体样本中游离的小分子与偶联在DNA探针上的小分子对特异性抗体的结合位点进行竞争。液体样本中的小分子竞争性的取代与抗体结合的小分子,并使其从抗体的结合位点上释放出来,从而使Cas酶复合物结合激活非特异性切割单链核酸(DNA/RNA)活性。因此,液体样本中小分子的含量越多,游离的小分子DNA探针激活的Cas酶复合物就越多,从而能得到更强的信号。因此可以通过制作标

准曲线来定量样本中的小分子浓度。

[0036] 更进一步地,本发明还提供了一种均相酶免疫检验试剂盒,所述试剂盒包括抗小分子特异性抗体的检测试剂R1和R2,所述R1为包含小分子特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系;所述R2包含Cas蛋白-sgRNA复合物和FQ reporter。

[0037] 还进一步地,本发明提供了所述方法和系统在食品、药品、毒品或酶活测定中的应用。

[0038] 本发明的有益效果如下:

[0039] 本发明提供的检测方法的优势在于:(1)测试无需大型仪器,定量测定时采用常规荧光分光光度计即可;(2)操作简单,均相测试,无需酶标记和分离;(3)方法灵敏,且样品处理简单。(4)通用方法,仅需将探针修饰为对应检测小分子,合成高效。

[0040] 总之,本发明提供的免疫检测方法具有操作简便、快速、检测结果准确、灵敏度高、探针合成方便快捷、费用低等优势,对于将来进行大面积推广应用,特别是缺乏昂贵仪器的中小医院具有很好的前景。

附图说明

[0041] 图1:本发明苯甲酸钠的标准曲线图。

[0042] 图2:本发明苯甲酸钠与其他物质的交叉反应结果。

[0043] 图3:本发明带磁珠分离苯甲酸钠的标准曲线图。

图4:本发明苯甲酸体系探针的特异性检测结果。

具体实施方式

[0044] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别说明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用的试剂可以商业购买得到。

[0045] 然而,应当理解的是,这些仅仅是示例性的,并不意图限制本发明,与如下试剂和仪器的类型、型号、品质、性质或功能相同或相似的材料均可以用于实施本发明。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0046] 本发明中所用缓冲液如下:

[0047] 1X bing buffer:

[0048] Tris-HCL 20mM, KCL 100mM, MgCl₂ 50mM, DTT 1mM, 甘油5%, 肝素50μg/ML。

[0049] 1X buffer Cas蛋白-sgRNA复合物:

[0050] 50mM NaCl,

[0051] 10mM Tris-HCl,

[0052] 10mM MgCl₂,

[0053] 100μg/ml BSA,

[0054] pH 7.9 (25℃)。

[0055] FQ reporter:

[0056] a./56-FAM/TTATT/3IABKFQ/

- [0057] b./56-FAM/TTATT/3-BHQ-1/
- [0058] 3'端淬灭基团可3-BHQ-1或3IABKFQ及其他淬灭基团。
- [0059] 5'端荧光基团可替换为荧光基团,如以下
- [0060] 5'-FAM and 3'-BHQ-1
- [0061] 5'-FAM and 3'-BHQ-2
- [0062] 5' ROX and 3'-BHQ-2
- [0063] 5' Cy3 and 3'-BHQ-1
- [0064] 5' Cy3 and 3'-BHQ-2
- [0065] 5' Cy5 and 3' DABCYL
- [0066] 5' Cy5 and 3'-BHQ-2
- [0067] Quasar-570and 3'-BHQ-2
- [0068] Quasar-570and 3'-BHQ-2
- [0069] 5'-HEX and 3'-BHQ-1
- [0070] 5'-HEX and 3'-TAMRA
- [0071] 5'-TET and 3'-BHQ-1
- [0072] 5'-TET and 3'-TAMRA
- [0073] 5' Phos and 3' FAM
- [0074] 5' TAMRA and 3' Phos
- [0075] 5'-FAM and 3'-MGB。
- [0076] 鲑鱼精DNA,Thermo或其他品牌的商品化的,用来防止非特异性吸附。
- [0077] 实施例1苯甲酸钠标准曲线的制备
- [0078] 苯甲酸钠样品用1Xbuffer梯度稀释,配制成浓度为0,100,200,400, 500,600, 1000ng/ml的苯甲酸钠溶液。
- [0079] 冻存版的制备
- [0080] 1. 鲑鱼精DNA200 μ l (浓度1mg/ml) 加入96孔黑板中,37℃孵育2 小时,之后去离子水200 μ l冲洗3次。
- [0081] 2. 配制Cas蛋白-sgRNA复合物:用1Xbuffer配置Cas12a 50nM,sgRNA 62.5nM的溶液,37℃孵育0.5小时,之后96孔板每孔加50 μ l,-20℃冷冻 2小时,之后冷冻干燥4℃保存。所述sgRNA的碱基序列如SEQ ID No.1 所示。
- [0082] 3. 使用时每孔加入50 μ l去离子水,复溶,37℃孵育振荡0.5小时。
- [0083] 4.1制备苯甲酸钠修饰的DNA探针:采用定制合成的方式,生工定制,提供定制合成的苯甲酸NHS活化酯,由生工负责合成。
- [0084] 4.2配制R1溶液:稀释后的各苯甲酸钠溶液样本10 μ l与苯甲酸钠修饰的DNA探针形成混合溶液,(所述DNA探针碱基序列如SEQ ID No.2所示),所述小分子修饰的DNA探针浓度为100pM,混合溶液体积为25 μ l。
- [0085] 苯甲酸单克隆抗体,武汉优博生物技术有限公司(Unibiotest),用 1Xbuffer稀释10000倍使用。
- [0086] 将苯甲酸抗体溶液50 μ l加入到上述混合溶液中,形成苯甲酸钠的R1溶液,孵育30分钟。

[0087] 4.3配制R2溶液:R2溶液包含Cas蛋白-sgRNA复合物(625nM),FQ reporter(500nM)的1Xbing buffer溶液100ul。

[0088] 4.4取10ul所述苯甲酸钠的R1溶液加入到R2溶液中进行显色反应。

[0089] 5.酶标仪持续检测4.4混合溶液的荧光,37℃孵育振荡0.5小时,激发光495nm,发射光520nm。(也可以用QPCR仪器监测,会比酶标仪更灵敏些)

[0090] 各浓度苯甲酸钠样品对应的荧光值如表1所示。根据浓度值和荧光值绘制标准曲线,如图1所示。

[0091] 表1各浓度苯甲酸钠样品的荧光值

[0092]	浓度	荧光值	荧光值	荧光值	均值
	100	100	110	105	105
	200	220	230	210	220
	400	380	390	410	393.3
	500	530	520	500	516.7
	600	550	580	600	576.7
	1000	1000	1050	1030	1026.7

[0093] 本实施例制备苯甲酸钠标准曲线用的是冻存版,制作冻存版是为了预分装用,实际工作中根据需要还可以制备普通版,操作步骤2中没有冻存和干燥的步骤。

[0094] 实施例2苯甲酸钠与其他物质的交叉反应特异性检测

[0095] 操作步骤同实施例1,将检测物分别换成PBS、乙酸钠、山梨酸钾、丙酸钙,分别检测各物质的荧光强度如表2所示。

[0096] 表2各检测物的荧光值

[0097]	物质名称	荧光强度
	PBS	20
	乙酸钠	50
	山梨酸钾	40
	丙酸钙	30
	苯甲酸钠	1500

[0098] 由表2和图2可以看出本发明的苯甲酸钠检测体系特异性非常强。

[0099] 实施例3带磁珠分离的苯甲酸钠标准曲线的制备

[0100] 苯甲酸钠样品用1Xbuffer梯度稀释,配制成浓度为0,100,200,400,500,600,1000ng/ml的苯甲酸钠溶液。

[0101] 普通版的制备

[0102] 1.鲑鱼精DNA200μl(浓度1mg/ml)加入96孔黑色板中,37℃孵育2小时,之后去离子水200ul冲洗3次。

[0103] 2.配制Cas蛋白-sgRNA复合物:用1Xbuffer配置Cas12a 50nM,sgRNA 62.5nM的溶液,37℃孵育0.5小时。所述sgRNA的碱基序列如SEQ ID No.1所示。

[0104] 3.1制备苯甲酸钠修饰的DNA探针:采用定制合成的方式,生工定制,提供定制合

成的苯甲酸NHS活化酯,由生工负责合成

[0105] 3.2配制R1溶液:稀释后的各苯甲酸钠溶液样本10ul与苯甲酸钠修饰的DNA探针形成混合溶液,(所述DNA探针碱基序列如SEQ ID No.2所示),所述小分子修饰的DNA探针浓度为100pM,混合溶液体积为25ul。

[0106] 苯甲酸单克隆抗体,武汉优博生物技术有限公司(Unibiotest),自己使用商品化磁珠-聚苯乙烯磁性微球,天津市倍思乐色谱技术开发中心生产,进行偶联。用1Xbuffer稀释20000倍使用。

[0107] 将磁珠苯甲酸抗体溶液25ul加入到上述混合溶液中,形成苯甲酸钠的R1溶液,37度孵育30分钟,进行磁分离架分离,取上清10ul。

[0108] 3.3配制R2溶液:R2溶液包含Cas蛋白-sgRNA复合物(625nM),FQ reporter(500nM)的1Xbing buffer溶液100ul。

[0109] 3.4将3.2的10ul上清溶液加入到R2溶液中进行显色反应。

[0110] 4.酶标仪持续检测3.4混合溶液的荧光,37℃孵育振荡0.5小时,激发光495nm,发射光520nm。(也可以用QPCR仪器监测,会比酶标仪更灵敏些)

[0111] 各浓度苯甲酸钠样品对应的荧光值如表3所示。根据浓度值和荧光强度值绘制标准曲线,如图3所示。

[0112] 表3各浓度苯甲酸钠样品的荧光值

	浓度	荧光值	荧光值	荧光值	均值
[0113]	100	120	120	125	121.7
	200	250	250	240	246.7
	400	480	490	500	490
[0114]	500	600	630	600	610
	600	715	725	725	721.7
	1000	1200	1200	1300	1233.3

[0115] 实施例4苯甲酸钠样品的检测

[0116] 2.1取样

[0117] 样品处理:检测食品为酱油和醋,均购买于当地超市。经超纯水稀释1000倍或2000倍后用0.22μm微孔滤膜过滤,滤液作为样品。

[0118] R1试剂的制备各物质用量同实施例1:均相R1缓冲液包含苯甲酸特异识别基团,PBS缓冲液或其他适合发生抗原抗体结合的缓冲体系和小分子修饰DNA/RNA探针。

[0119] R2各物质用量同实施例1包含bing buffer,Cas蛋白-sgRNA复合物,FQ reporter等,可以是冻干粉或缓冲体系。

[0120] 2.2检测

[0121] 本发明苯甲酸钠的均相酶免疫检验方法,检测时通过全自动生化分析仪,加入样品,再加入R1试剂,最后加入R2试剂,测定不同时间点的OD340吸光值,计算不同浓度标准品的反应速率。实际操作过程中需要不断调整R1试剂和R2试剂的比例,得到较理想的反应标准曲线。通过样本的反应速率值,并根据标准曲线中反应速率与标准品浓度的关系式得

到样 本的浓度值。

[0122] 2.3HPLC检测:按照高效液相色谱法常规方法进行检测。

[0123] 2.3结果

[0124] 如表5所示,苯甲酸钠样品利用本发明的方法检测结果与大型仪器 HPLC的检测结
果相当,说明本发明的提供的检测方法准确度和灵敏度都非 常高。

[0125] 表5苯甲酸钠样品的检测结果

[0126]	实际体系	稀释倍数	HPLC (ng mL ⁻¹)	本法 (ng mL ⁻¹)
	醋	1000	1005.2	960
[0127]	酱油	2000	563	552
		1000	852	838
		2000	456	460

[0128] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描 述,但在
本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员 而言是显而易见的。因
此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或 改进,均属于本发明要求保护的范
围。

序列表

<110>	中国医学科学院北京协和医院	
<120>	一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统及其方法和应用	
<130>	p190363	
<141>	2019-12-02	
<160>	3	
<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	0	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统及其方法和应用)	
<400>	1	
<210>	2	
<211>	55	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统及其方法和应用)	
<400>	2	
	gccggggtgg tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagc	55
<210>	3	
<211>	41	
<212>	RNA	
<213>	人工序列(一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统及其方法和应用)	
<400>	3	
	uaauuucuac uaaguguaga ucgucgccgu ccagcucgac c	41

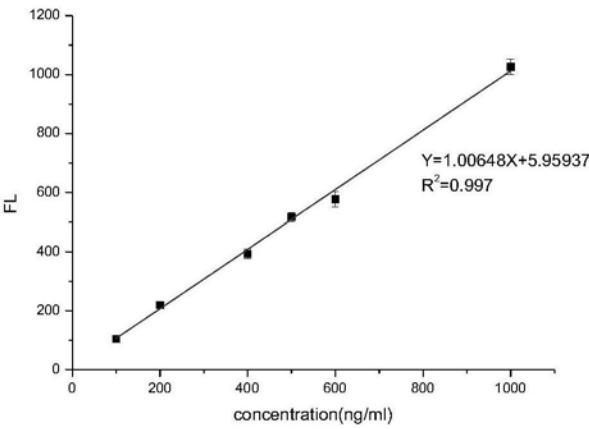


图1

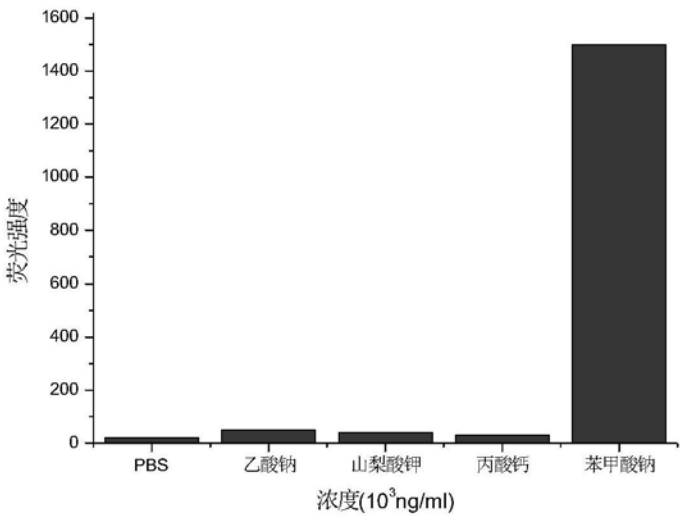


图2

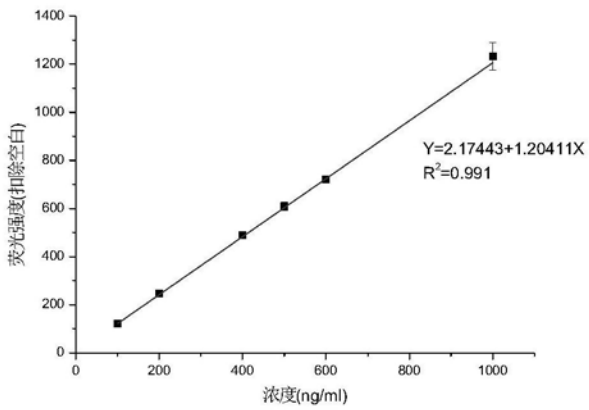


图3

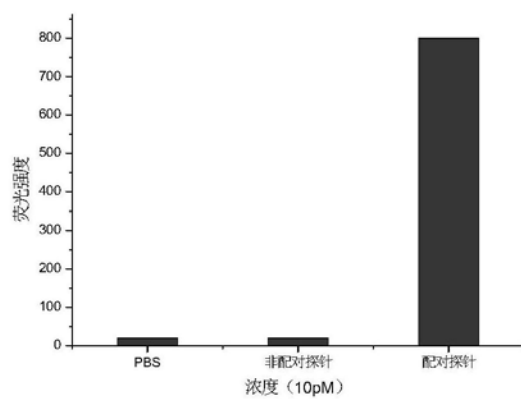


图4

专利名称(译)	一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统及其方法和应用		
公开(公告)号	CN111007240A	公开(公告)日	2020-04-14
申请号	CN201911210990.0	申请日	2019-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院北京协和医院		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院北京协和医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院北京协和医院		
[标]发明人	李小刚		
发明人	李小刚		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于CRISPR技术的均相酶免疫检验系统，所述系统包括抗小分子特异性抗体的检测试剂R1和R2，所述R1为包含小分子特异性抗体和小分子特异识别基团的缓冲体系；所述R2包含Cas蛋白-sgRNA复合物和FQreporter；所述系统是通过液体体系中游离的小分子与偶联在小分子特异识别基团上的小分子探针针对特异性抗体的结合位点进行竞争原理，实现小分子的定性和定量分析。本发明提供的免疫检测方法具有操作简便、快速、检测结果准确、灵敏度高、探针合成方便快捷、费用低等优势，对于将来进行大面积推广应用，特别是缺乏昂贵仪器的中小医院具有很好的前景。

浓度	荧光值	荧光值	荧光值	均值
100	100	110	105	105
200	220	230	210	220
400	380	390	410	393.3
500	530	520	500	516.7
600	550	580	600	576.7
1000	1000	1050	1030	1026.7