

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 8 月 25 日 (25.08.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/174663 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6844 (2018.01) *C12R 1/93* (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2021/138141
- (22) 国际申请日: 2021 年 12 月 15 日 (15.12.2021)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110192084.3 2021年2月19日 (19.02.2021) CN
- (71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市

南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

- (72) 发明人: 赵维 (ZHAO, Wei); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。龙飞 (LONG, Fei); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。杨晓楠 (YANG, Xiaonan); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。赵国屏 (ZHAO, Guoping); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

- (74) 代理人: 北京中巡通大知识产权代理有限公司 (BEIJING ZHONG XUN TONG DA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国北京市

(54) Title: SYSTEM AND METHOD FOR INSTANTLY DETECTING NUCLEIC ACID OF PATHOGEN

(54) 发明名称: 一种病原体核酸的即时检测系统及方法

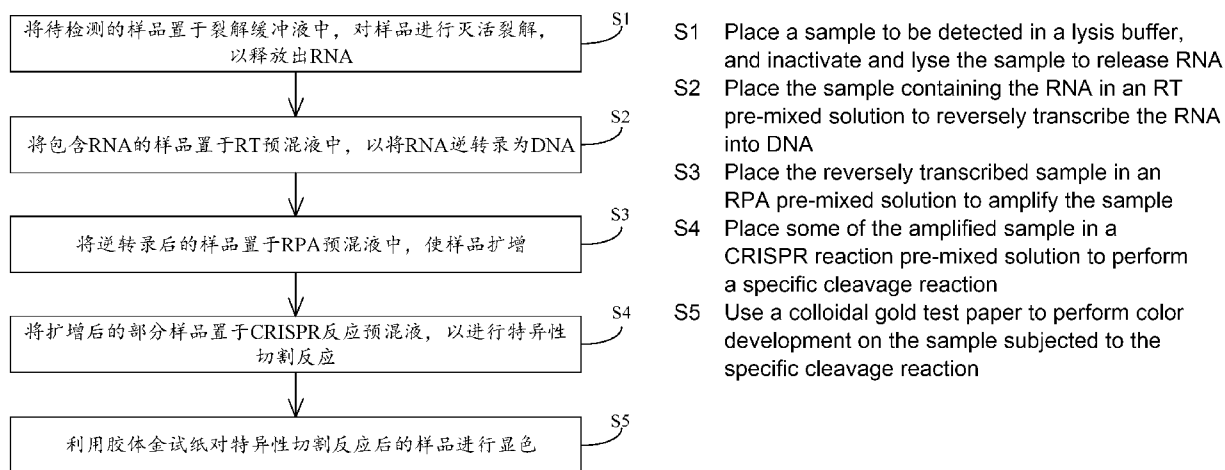


图 1

(57) Abstract: A system and a method for instantly detecting nucleic acid of a pathogen. The system comprises a lysis buffer, which is used for inactivating and lysing a sample to be detected, so as to release RNA; an RT pre-mixed solution, which is used for reversely transcribing the RNA in the sample into DNA; an RPA pre-mixed solution, which is used for performing an RPA reaction on the sample treated with the RT pre-mixed solution, so as to realize amplification of the DNA in the sample; a CRISPR reaction pre-mixed solution, which is used for performing a specific cleavage reaction on the sample treated with the RPA pre-mixed solution; and colloidal gold test paper, which is used for performing color development on the sample treated with the CRISPR reaction pre-mixed solution, to confirm whether the sample contains the nucleic acid of the pathogen. According to the above-mentioned design scheme, the RPA method, the CRISPR method and the colloidal gold method are coupled, so that the instant-detection system has the advantages of simplicity, sensitivity and specificity, instruments and equipment are not required, and same can be used to quickly obtain a result by means of simple operation at room temperature.

西城区榆树馆胡同东口1层106, Beijing
100195 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要: 一种病原体核酸的即时检测系统及方法, 所述系统包括: 裂解缓冲液, 用于对待检测的样品进行灭活裂解, 以释放出RNA; RT预混液, 用于将样品中的RNA逆转录为DNA; RPA预混液, 用于对经RT预混液处理后的样品进行RPA反应, 使样品中的DNA扩增; CRISPR反应预混液, 用于对经过RPA预混液处理后的样品进行特异性切割反应; 胶体金试纸, 用于对经过CRISPR反应预混液处理后的样品进行显色, 以确认样品中是否包含病原体核酸。通过上述设计方案, 将RPA, CRISPR和胶体金三种方法偶联, 能够同时拥有简便性、灵敏性和特异性三个优点, 无需仪器设备, 是室温下简单操作即可快速获取结果的即时检测系统。

一种病原体核酸的即时检测系统及方法

技术领域

本申请属于核酸检测的技术领域，具体涉及一种病原体核酸的即时检测系统及方法。

背景技术

目前所使用的病原体核酸的检测方法通常为逆转录实时定量聚合酶链式反应技术（RT-qPCR），该方法灵敏度较高、交叉污染较小，是一线医院最常用的检测方法。RT-qPCR 技术先将病毒 RNA 逆转录为 cDNA，再进行聚合酶链式反应，它的信号产生一般有两种不同方式：（1）特异性荧光标记法，其需要设计一段和靶标 DNA 互补的 TaqMan 探针，探针两端分别带有荧光基团和淬灭基团；（2）非特异性荧光标记法，其需要使用 SYBR Green 等荧光染料，SYBR Green 可以和双链 DNA 结合产生荧光。第一种方法中，荧光产生依赖于探针和靶标 DNA 结合，探针需要精心设计，如若模版不完整或者扩增效率低，容易出现假阴性的问题，第二种方法需要对靶标 DNA 大量扩增，如若样品有 DNA 污染和非特异的探针结合，则极易产生假阳性。而且，RT-qPCR 以及其他常见的核酸检测技术严重依赖各种精密设备，不适用于普通大众自检或在资源有限的贫困或偏远地区使用。

发明内容

本申请主要解决的技术问题是提供一种病原体核酸的即时检测系统及方法，可以降低出现假阳性或假阴性的概率。

为解决上述技术问题，本申请采用的一个技术方案是：提供一种病原体核酸的即时检测系统，包括：裂解缓冲液，用于对待检测的样品进行灭活裂解，以释放出 RNA；RT 预混液，用于将所述样品中的 RNA 逆转录为 DNA；RPA 预混液，用于对经所述 RT 预混液处理后的样品进行

RPA 反应,使所述样品中的 DNA 扩增;CRISPR 反应预混液,用于对经过所述 RPA 预混液处理后的样品进行特异性切割反应;胶体金试纸,用于对经过 CRISPR 反应预混液处理后的样品进行显色,以确认所述样品中是否包含所述病原体核酸。

其中,所述 CRISPR 反应预混液包括 Cas12a 蛋白、crRNA 以及探针;其中,所述探针包括 FB-ssDNA 探针、FQ-ssDNA 探针中任意一种;所述 FB-ssDNA 探针由单链 DNA 以及标记在所述单链 DNA 端部的第一基团组成,所述第一基团包括异硫氰酸荧光素 FITC、6-羧基荧光素 FAM、生物素 Biotin 中任意一种,且所述第一基团能够与胶体金结合;所述 FQ-ssDNA 探针由单链 DNA 以及标记在所述单链 DNA 端部的第二基团和第二基团组成,所述第二基团包括异硫氰酸荧光素 FITC、6-羧基荧光素 FAM 中任意一种,所述第三基团包括黑洞淬灭基团 BHQ1,且所述第三基团用于吸收荧光。

其中,所述病原体核酸包括 SARS-CoV2、SARS-CoV、MERS-CoV、H1N1 中至少一种;其中,所述 SARS-CoV2 的检测基因为 SARS-CoV2 N 基因,对应的所述 crRNA 的序列为:5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ccaga cauuu ugcuc uca-3';和/或,所述 SARS-CoV2 的检测基因为 SARS-CoV2 E 基因,对应的所述 crRNA 的序列为:5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU caaga cucac guuaa caa-3';和/或,所述 SARS-CoV 的检测基因为 SARS-CoV2 N 基因,对应的所述 crRNA 的序列为:5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ccaga aacuu ugcuc uca-3';和/或,所述 MERS-CoV 的检测基因为 MERS-CoV N 基因,对应的所述 crRNA 的序列为:5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ccaga cucaa gggcu ugu-3';和/或,所述 H1N1 的检测基因为 H1N1 HA1 基因,对应的所述 crRNA 的序列为:5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU caguu gcuuc gaaug uua-3';和/或,所述 H1N1 的检测基因为 H1N1 NA1 基因,对应的所述 crRNA 的序列为:5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ggucg cccuc ugauu agu-3'。

其中,所述 CRISPR 反应预混液还包括反应缓冲液和超纯水;其中,所述 CRISPR 反应预混液和部分经过所述 RPA 预混液后的样品所形成混

合物中 crRNA 的浓度为 0.5 uM-1 uM, 所述 FB-ssDNA 探针的浓度为 0.5 nM-2.0 nM, 所述 FQ-ssDNA 探针的浓度为 1 nM-10 nM, Cas12a 蛋白的浓度为 0.1 uM-0.5 uM。

其中, 所述 RT 预混液和所述 RPA 预混液中均分别包括 RT-RPA 引物 F 和 RT-RPA 引物 R。

其中, 所述病原体核酸包括 SARS-CoV2、SARS-CoV、MERS-CoV、H1N1 中一种; 其中, 所述 SARS-CoV2 的扩增位点为 SARS-CoV2 N 基因, 对应的所述 RT-RPA 引物 F 的序列为: 5'-CAAGA AATTC AACTC CAGGC AGCAG TAGGG GAAC-3'; 所述 RT-RPA 引物 R 的序列为: 5'-CTTTA GTGGC AGTAC GTTTT TGCCG AGGCT TCT-3'; 和/或, 所述 SARS-CoV2 的扩增位点为 SARS-CoV2 E 基因, 对应的所述 RT-RPA 引物 F 的序列为: 5'-TACTC ATTCG TTTCG GAAGA GACAG GTACG TT-3'; 所述 RT-RPA 引物 R 的序列为: 5'-CAGAT TTTA ACACG AGAGT AAACG TAAAA AGAA-3'。

其中, 所述 SARS-CoV 的扩增位点为 SARS-CoV N 基因, 所述 MERS-CoV 的扩增位点为 MERS-CoV N 基因, 所述 H1N1 的扩增位点为 H1N1 的 HA1 基因和 H1N1 NA1 基因; 所述 SARS-CoV N 基因、所述 MERS-CoV 基因、所述 H1N1 HA1 基因以及所述 H1N1 NA1 基因分别连入质粒 pUC18, 对应的 PCR 引物 F 的序列为: 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3', PCR 引物 R 的序列为: 5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'。

其中, 所述 RT 预混液还包括: 反应缓冲液、RNA 酶抑制剂、dNTP、逆转录酶和超纯水; 其中, 所述 RT-RPA 引物 F 的浓度为 0.3 uM-0.6 uM; 所述 RT-RPA 引物 R 的浓度为 0.3 uM-0.6 uM。

其中, 所述 RPA 预混液还包括: 反应缓冲液、MgOAc 和超纯水; 其中, 所述 RT-RPA 引物 F 的浓度为 0.5 uM-1.0 uM; 所述 RT-RPA 引物 R 的浓度为 0.5 uM-1.0 uM。

为解决上述技术问题, 本申请采用的一个技术方案是: 提供一种病原体核酸的即时检测方法, 所述方法利用上述任一实施例所提及的系统,

所述方法包括：将待检测的样品置于裂解缓冲液中，对所述样品进行灭活裂解，以释放出 RNA；将包含 RNA 的所述样品置于 RT 预混液中，以将所述 RNA 逆转录为 DNA；将逆转录后的样品置于 RPA 预混液中，使所述样品扩增；将扩增后的部分样品置于 CRISPR 反应预混液，以进行特异性切割反应；利用胶体金试纸对特异性切割反应后的样品进行显色。

本申请的有益效果是：本申请中将 RPA，CRISPR 和胶体金三种方法偶联，在新冠等病原体的核酸检测上有巨大优势：RPA 技术的高灵敏度可以高效扩增微量核酸，解决了常规 CRISPR 灵敏度低（假阴性）的问题；CRISPR 方法中 crRNA 靶向目标核酸，其高特异性消除了 RPA 带来的假阳性问题；CRISPR 反式效应切割探针数量级扩大了信号，解决了传统胶体金试纸技术灵敏度低（假阴性）的问题；胶体金试纸呈现的检测结果显示简单易懂，即时可见。上述体系同时拥有简便性、灵敏性和特异性三个优点，无需仪器设备，是室温下简单操作即可快速获取结果的即时检测系统。

附图说明

为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案，下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本申请的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其它的附图，其中：

图 1 是本申请病原体核酸的即时检测方法一实施方式的流程示意图；

图 2 是 SARS-CoV2 病毒基因检测位点示意图；

图 3 是 SARS-CoV2 病毒 N 基因和 E 基因 RT-RPA 产物电泳图；

图 4 是 CRISPR-Cas12 顺式切割 RT-RPA 产物电泳图；

图 5 是 CRISPR-Cas12a 蛋白反式切割 ssDNA 探针胶体金检测结果图；

图 6 是 E 质粒 RPA 产物及其被 CRISPR-Cas12a 蛋白反应体系顺式切割产物电泳图；

图 7 是 CRISPR-Cas12a 蛋白反应体系反式切割 FQ-ssDNA 探针荧光检测图；

图 8 是特异性检测 crRNA 序列及结合位点示意图；

图 9 是 SARS-CoV2 N 基因 crRNA 特异性结合效果示意图；

图 10 是 SARS-CoV2 N 基因 crRNA 特异性测试反式切割 FQ-ssDNA 探针荧光检测图；

图 11 是 crRNA 特异性顺式切割效果示意图；

图 12 是 crRNA 特异性反式切割 FQ-ssDNA 探针荧光检测图。

具体实施方式

下面将结合本申请实施例中的附图，对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本申请的一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例，都属于本申请保护的范围。

请参阅图 1，图 1 是本申请病原体核酸的即时检测方法一实施方式的流程示意图。上述方法具体包括：

S1：将待检测的样品置于裂解缓冲液中，对样品进行灭活裂解，以释放出 RNA。

S2：将包含 RNA 的样品置于 RT 预混液中，以将 RNA 逆转录为 DNA。

具体而言，将待检测样品中的 RNA 先逆转录为 DNA 更能保证靶标核酸的稳定性。

S3：将逆转录后的样品置于 RPA 预混液中，使样品扩增。

具体地，通过这种有限程度的预扩增，有利于在提高灵敏度的同时降低出现假阳性的概率。

S4：将扩增后的部分样品置于 CRISPR 反应预混液，以进行特异性切割反应。

具体而言，CRISPR 反应预混液在 37℃ 的情况下 30 分钟就可以充分

完成切割反应，有利于提高检测过程的效率。

S5：利用胶体金试纸对特异性切割反应后的样品进行显色。

通过上述设计方案，将 CRISPR 反应与胶体金试纸法进行偶联，可以随时进行即时检测，并且能够很好的分辨出阳性样本和阴性样本，大大增加了胶体金试纸法的灵敏度。

在一个实施方式中，上述方法利用病原体核酸的即时检测系统。病原体核酸的即时检测系统具体包括裂解缓冲液、RT 预混液、RPA 预混液，CRISPR 反应预混液以及胶体金试纸。其中，裂解缓冲液用于对待检测的样品进行灭活裂解，以释放出 RNA。

表 1 裂解缓冲液配方表

成分	终浓度
盐酸胍	5 M -6 M
三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 Tris-HCl	50 mM-150 mM
乙二胺四乙酸 EDTA	25 mM-100 mM
氯化钠 NaCl	100 mM-200 mM
二硫苏糖醇 DTT	0.5 mM

具体而言，裂解缓冲液的配方表如表 1 所示。具体地，盐酸胍的终浓度为 5 M-6 M，例如，5 M、5.5 M、6 M 等，本申请对此不作限定。三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 Tris-HCl 的终浓度为 50 mM-150 mM，例如，50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM、110mM、120mM、130 mM、140 mM、150 mM 等，本申请对此不作限定。乙二胺四乙酸 EDTA 的终浓度为 25 mM-100 mM，例如，25 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM 等，本申请对此不作限定。氯化钠 NaCl 的终浓度为 100 mM-200 mM，例如，100 mM、120 mM、140 mM、160 mM、180 mM、200 mM 等，本申请对此不作限定。二硫苏糖醇 DTT 的终浓度为 0.5 mM。其中，裂解缓冲液还包括聚乙二醇辛基苯基醚 Triton X-100，其体积百分数的范围为 0.5%-5.0%，例如，0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%等，本申请对此不作限定。

具体地，在本实施例中，RT 预混液用于将待检测样品中的 RNA 逆转录为 DNA。具体而言，RT 预混液在 37°C 的情况下 10 分钟就可以完成逆转录反应，有利于提高检测过程的效率。

具体地，在本实施例中，RPA 预混液用于对经 RT 预混液后的样品进行 RPA 反应，以将样品中的 DNA 进行扩增。具体地，RPA 反应的时间可以为 30 分钟，本申请对此不作限定。通过这种有限程度的预扩增，有利于在提高灵敏度的同时降低出现假阳性的概率。

具体地，在本实施例中，CRISPR 反应预混液用于对经过 RPA 预混液后的样品进行特异性切割反应。

具体地，在本实施例中，胶体金试纸用于对经过 CRISPR 反应预混液的样品进行显色，以确认样品中是否包含病原体核酸。

通过这种方式，将 CRISPR 反应与胶体金试纸法进行偶联，能够很好的分辨出阴性样本和阳性样本，大大增加了胶体金试纸法的灵敏度。

表 2 CRISPR 反应预混液配方表

成分	用量 (ul)
crRNA (50 uM)	1.0-2.0
探针 (100 nM)	0.5-2.0
反应缓冲液	8.0-12.0
Cas12a 蛋白 (10 uM)	1.0-5.0
RT-RPA 产物	2.5-10
超纯水	补充体系至 100
总体积	100

在一个实施方式中，如表 2 所示，CRISPR 反应预混液具体包括 Cas12a 蛋白、crRNA 以及探针。具体而言，探针包括 FB-ssDNA 探针、FQ-ssDNA 探针中任意一种。

具体地，就 FB-ssDNA 探针而言，FB-ssDNA 探针由单链 DNA 以及标记在单链 DNA 端部的第一基团组成，其中，标记在单链 DNA 端部的第一基团包括异硫氰酸荧光素 FITC、6-羧基荧光素 FAM、生物素 Biotin 等能适用于胶体金的任意一种基团。其中，单链 DNA 可以为多种形式，

例如, SEQ ID NO1: GCTAATCG、SEQ ID NO2: GATTA GCGTA CGCAC GTTAC 等。例如, 当标记在所述单链 DNA 端部的第一基团为异硫氰酸荧光素 FITC 和生物素 Biotin, FB-ssDNA 探针完整的序列为: 5'-FITC-GATTA GCGTA CGCAC GTTAC-Biotin-3'。当然, 第一基团可以替换为其他适用基团, 只要能与胶体金质控线和/或检测线结合即可, 基团连接的位置也可以调整。探针可以根据胶体金实验设计来决定, 本申请对此不作限定。

具体地, 就 FQ-ssDNA 探针而言, FQ-ssDNA 探针由单链 DNA 以及标记在单链 DNA 端部的所述第二基团和第三基团组成, 其中, 标记在所述单链 DNA 端部的第二基团包括异硫氰酸荧光素 FITC、6-羧基荧光素 FAM 中任意一种, 第三基团包括 BHQ1 (Black Hole Quencher1)、TAMARA 等, 且所述第三基团用于吸收荧光。单链 DNA 可以为多种形式, 例如, SEQ ID NO1: GCTAATCG、SEQ ID NO2: GATTA GCGTA CGCAC GTTAC 等。例如, 当标记在所述单链 DNA 端部的第二基团为 6-羧基荧光素 FAM, 第二基团为黑洞淬灭基团 BHQ1, FQ-ssDNA 探针完整的序列为: 5'-FAM-GCTAATCG-BHQ1-3'。当然, 第二基团和第三基团可以替换为其他适用基团, 满足探针完整时检出不到荧光, 探针不完整时能检出到荧光即可, 基团连接的位置也可以调整。探针可以根据荧光实验设计来决定, 本申请对此不作限定。

具体地, 在本实施例中, 当 CRISPR 体系没有检测到样品中的靶标核酸时, 体系不能将探针切割, 完整的探针同时标记有两种基团; 而当 CRISPR 体系检测到样品中的靶标核酸时, 会行使反式切割活力将探针切割成两段或多段, 从而将两种基团分割开来。通过这种方式, 可以提高检测结果的准确性和有效性。

具体而言, 当 FB-ssDNA 探针完整时, 即 CRISPR 体系没有检测到样品中的靶标核酸时, 探针上的生物素 Biotin 将通过链霉亲和素 Streptavidin 与胶体金试纸中的胶体金 Au 结合, 泳动到第一条检测带(T带), 被上面的抗荧光素抗体 Anti-F 截流显色, 而多余游离的 Au-Streptavidin 能与第二条质控带(C带)上的生物素 Biotin 继续结合,

进而显色，样品呈阴性。当探针被切割后，即检测到样品中有靶标核酸时，带有生物素 Biotin 或异硫氰酸荧光素 FITC 标记的片段会被分割开来，此时，只有生物素 Biotin 标记的片段能与胶体金试纸中的胶体金结合，被抗荧光素抗体（Anti-F）截流的异硫氰酸荧光素 FITC 标记的片段由于没有与胶体金结合，此时第一条检测带（T 带）并不能显色，同样，游离的 Au-Streptavidin 能与第二条质控带（C 带）上的生物素 Biotin 继续结合，进而显色，样品呈阴性。具体地，胶体金试纸的显色时间为 5 分钟左右。

通过这种方式，将 CRISPR 反应与胶体金试纸法进行偶联，CRISPR 反应将常规检测的信号特异性放大后为胶体金试纸法提供起始检测样品，将检测信号反向读取在试纸的 T 带上，可以随时进行即时检测，能够很好的分辨出阳性样本和阴性样本，降低出现假阳性和假阴性的概率，大大增加胶体金试纸法的灵敏度，提高检测的准确度和灵活性。

就荧光检测具体而言，当 FQ-ssDNA 探针完整时，即 CRISPR 体系没有检测到样品中的靶标核酸时，荧光基团发出的荧光被淬灭基团吸收，荧光检测呈阴性结果；当探针被切割后，即检测到样品中有靶标核酸时，荧光基团远离淬灭基团，发出的荧光不能被淬灭基团吸收，荧光检测呈阳性结果。

在一个实施方式中，病原体核酸可以包括 SARS-CoV2、SARS-CoV、MERS-CoV、H1N1 中的至少一种。当然，在其他实施例中，病原体核酸也可以包括其他冠状病毒或其他流感病毒中的至少一种，本申请在此不作限定。

具体地，在本实施例中，如表 3 所示。SARS-CoV2 的检测基因为 SARS-CoV2 N 基因，其对应的 crRNA 的序列为 SEQ ID NO3；和/或，SARS-CoV2 的检测基因为 SARS-CoV2 E 基因，其对应的 crRNA 的序列为 SEQ ID NO4；和/或，SARS-CoV 的检测基因为 SARS-CoV N 基因，其对应的 crRNA 的序列为 SEQ ID NO5；和/或，MERS-CoV 的检测基因为 MERS-CoV N 基因，其对应的 crRNA 的序列为 SEQ ID NO6；和/或，H1N1 的检测基因为 H1N1 HA1，其对应的 crRNA 的序列为 SEQ ID

NO7；和/或，H1N1 的检测基因为 H1N1 NA1，其对应的 crRNA 的序列为 SEQ ID NO8。其中，N 基因为核壳蛋白基因（Nucleoprotein gene），E 基因为包膜糖基因（Envelope glycoprotein gene），HA1 基因为血球凝集素基因（Hemagglutinin gene, group 1），NA1 基因为神经氨酸酶基因（Neuraminidase gene, subtype 1）。

表 3 crRNA 序列表

检测基因	crRNA 序列
SARS-CoV2 N	SEQ ID NO3: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ccaga cauuu ugcuc uca-3'
SARS-CoV2 E	SEQ ID NO4: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU caaga cucac guuaa caa-3'
SARS-CoV N	SEQ ID NO5: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ccaga aacuu ugcuc uca-3'
MERS-CoV N	SEQ ID NO6: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ccaga cucaa gggcu ugu-3'
H1N1 HA1	SEQ ID NO7: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU caguu gcuuc gaaug uua-3'
H1N1 NA1	SEQ ID NO8: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ggucg cccuc ugauu agu-3'
pUC18-LacZ	SEQ ID NO9: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU caacg ucgug acugg gaa-3'

具体地，请继续参阅表 3，阳性参照物 pUC18-LacZ 的基因对应的 crRNA 的序列为 SEQ ID NO9。

在另一个实施方式中，请继续参阅表 2，CRISPR 反应预混液还包括反应缓冲液和超纯水。具体地，以 CRISPR 反应预混液的总体积为 100 ul 为例，反应缓冲液的体积为 8.0 ul-12.0 ul，例如，8.0 ul、8.5 ul、9.0 ul、9.5 ul、10.0 ul、10.5 ul、11.0 ul、11.5 ul、12.0 ul 等，本申请在此不作限定。CRISPR 反应预混液和部分经过 RPA 预混液后的样品所形成混合物中 crRNA 的原始浓度为 50 uM，用量为 1.0 ul-2.0 ul，例如，1.0 ul、1.2 ul、1.4 ul、1.6 ul、1.8 ul、2.0 ul 等，本申请在此不作限定。探针的原始浓度为 100 nM，用量为 0.5 ul-2.0 ul，例如，0.5 ul、0.7 ul、0.9 ul、1.0 ul、1.2 ul、1.4 ul、1.6 ul、1.8 ul、2.0 ul 等，本申请在此不作限定。Cas12a

蛋白的原始浓度为 10 uM, 用量为 1.0 ul-5.0 ul, 例如, 1.0 ul、1.5 ul、2.0 ul、2.5 ul、3.0 ul、3.5 ul、4.0 ul、4.5 ul、5.0 ul 等, 本申请在此不作限定。其余体积用超纯水补足。当然, 在其他实施例中, CRISPR 反应预混液的总体积以及其中各成分的用量均可以改变, 只需要按照各成分的浓度比例进行调整即可, 本申请对此不作限定。具体地, 在本实施例中, CRISPR 反应预混液和部分经过 RPA 预混液后的样品所形成混合物中 crRNA 的浓度为 0.5 uM-1.0 uM, 例如, 0.5 uM、0.6 uM、0.7 uM、0.8 uM、0.9 uM、1.0 uM 等, 本申请在此不作限定。FB-ssDNA 探针的浓度为 0.5 nM-2.0 nM, 例如, 0.5 nM、0.6 nM、0.7 nM、0.8 nM、0.9 nM、1 nM、1.2 nM、1.4 nM、1.6 nM、1.8 nM、2 nM 等, 本申请在此不作限定。FQ-ssDNA 探针的浓度为 1 nM-10 nM, 例如, 1 nM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、7 nM、8 nM、9 nM、10 nM 等, 本申请在此不作限定。Cas12a 蛋白的浓度为 0.1 uM-0.5 uM, 例如, 0.1 uM、0.2 uM、0.3 uM、0.4 uM、0.5 uM 等, 本申请在此不作限定。在又一个实施方式中, 如表 5 和表 6 所示, RT 预混液和 RPA 预混液中均分别包括 RT-RPA 引物 F 和 RT-RPA 引物 R。具体地, 在本实施例中, 病原体核酸包括 SARS-CoV2、SARS-CoV、MERS-CoV、H1N1 中的至少一种。当然, 在其他实施例中, 病原体核酸也可以包括其他冠状病毒或其他流感病毒中的至少一种, 本申请在此不作限定。

具体而言, 如表 4 所示, SARS-CoV2 的扩增位点为 SARS-CoV2N 基因, 其对应的 RT-RPA 引物 F 的序列为 SEQ ID NO10, RT-RPA 引物 R 的序列为 SEQ ID NO11; 和/或, SARS-CoV2 的扩增位点为 SARS-CoV2E 基因, 其对应的 RT-RPA 引物 F 的序列为 SEQ ID NO12, RT-RPA 引物 R 的序列为 SEQ ID NO13; 和/或, SARS-CoV 的扩增位点为 SARS-CoV N 基因; 和/或, MERS-CoV 的扩增位点为 MERS-CoV N 基因; 和/或, H1N1 的扩增位点为 H1N1 HA1 基因和/或 H1N1 NA1 基因, SARS-CoV N 基因、MERS-CoV N 基因、H1N1 HA1 基因和/或 H1N1 NA1 基因应的 PCR 引物 F 的序列为 SEQ ID NO14: 5'-CCCAG TCACG

ACGTT GTAA AACG-3', PCR 引物 R 的序列为 SEQ ID NO15: 5'-AGCGG ATAAC AATTT CACA CAGG-3'。

表 4 RT-RPA 引物序列表

扩增位点	引物序列
SARS-CoV2 N	SEQ ID NO10:F: 5'-CAAGA AATTC AACTC CAGGC AGCAG TAGGG GAAC-3'
	SEQ ID NO11:R: 5'-CTTTA GTGGC AGTAC GTTTT TGCCG AGGCT TCT-3'
SARS-CoV2 E	SEQ ID NO12:F: 5'-TACTC ATTCG TTTCG GAAGA GACAG GTACG TT-3'
	SEQ ID NO13:R: 5'-CAGAT TTTTA ACACG AGAGT AAACG TAAAA AGAA-3'
pUC18-LacZ	SEQ ID NO16:F: 5'-AAGGG CGATC GGTGC GGGCC TCTTC GCTAT TAC-3'
	SEQ ID NO17:R: 5'-CGGCT CGTAT GTTGT GTGGA ATTGT GAGCG GAT-3'

具体地, 请继续参阅表 4, pUC18-LacZ 对应的 RT-RPA 引物 F 的序列为 SEQ ID NO16, RT-RPA 引物 R 的序列为 SEQ ID NO17。

在一个实施方式中, 如表 5 所示, RT 预混液还包括反应缓冲液、RNA 酶抑制剂、dNTP、逆转录酶和超纯水。具体地, 以 RT 预混液的总体积为 16 ul 为例, 反应缓冲液的体积为 3.2 ul-4.8 ul, 例如, 3.2 ul、3.3 ul、3.4 ul、3.5 ul、3.6ul、3.7ul、3.8 ul、3.9 ul、4.0 ul、4.1 ul、4.2 ul、4.3 ul、4.4 ul、4.5 ul、4.6 ul、4.7 ul、4.8 ul 等, 本申请在此不作限定。

具体地, RNA 酶抑制剂的原始浓度为 40 U/ul, 用量为 0.3 ul-0.5 ul, 例如, 0.3 ul、0.35 ul、0.4 ul、0.45 ul、0.5 ul 等, 本申请在此不作限定。将 RNA 酶抑制剂加入到 RT 预混液中, 浓度为 12 U/ul-20 U/ul, 例如, 12 U/ul、13 U/ul、14 U/ul、15 U/ul、16 U/ul、17 U/ul、18 U/ul、19 U/ul、20 U/ul 等, 本申请对此不作限定。dNTP 的原始浓度为 10mM, 用量为 1.5 ul-2.0 ul, 例如, 1.5 ul、1.55 ul、2.0 ul 等, 本申请在此不作限定。将 dNTP 加入到 RT 预混液中, 浓度为 1.5×10^{-8} mM- 2.0×10^{-8} mM, 例如, 1.5×10^{-8} mM、 1.6×10^{-8} mM、 1.7×10^{-8} mM、 1.8×10^{-8} mM、 1.9×10^{-8} mM、

2.0x10⁻⁸mM 等, 在此不作限定。逆转录酶的原始浓度为 200 U/ul, 用量为 0.8 ul-1.2 ul, 例如, 0.8 ul、0.9 ul、1.0 ul、1.1 ul、1.2 ul 等, 本申请在此不作限定。将逆转录酶加入到 RT 预混液中, 浓度为 160 U/ul-240 U/ul, 例如, 160 U/ul、165 U/ul、170 U/ul、175 U/ul、180 U/ul、185 U/ul、190 U/ul、195 U/ul、200 U/ul、210 U/ul、215 U/ul、220U/ul、225U/ul、230U/ul、235 U/ul、240 U/ul 等, 本申请对此不作限定。其余体积用超纯水补足。

表 5 RT 预混液配方表

成分	用量 (ul)
RT-RPA 引物 F (25uM)	0.2-0.4
RT-RPA 引物 R (25uM)	0.2-0.4
反应缓冲液	3.2-4.8
RNA 酶抑制剂 (40U/ul)	0.3-0.5
dNTP (10mM)	1.5-2.0
逆转录酶 (200U/ul)	0.8-1.2
超纯水	补充体系至 16
总体积	16

具体而言, 如表 5 所示, RT-RPA 引物 F 的原始浓度为 25 uM, 其用量为 0.2 ul-0.4 ul, 例如, 0.2 ul、0.25 ul、0.3 ul、0.35 ul、0.4 ul 等, 本申请在此不作限定。将 RT-RPA 引物 F 加入到 RT 预混液中, 浓度为 0.3 uM-0.6 uM, 例如, 0.3 uM、0.35 uM、0.4 uM、0.45 uM、0.5 uM、0.55 uM、0.6 uM 等, 本申请在此不作限定。RT-RPA 引物 R 的原始浓度为 25 uM, 其用量为 0.2 ul-0.4 ul, 例如, 0.2 ul、0.25 ul、0.3 ul、0.35 ul、0.4 ul 等, 本申请在此不作限定。将 RT-RPA 引物 R 加入到 RT 预混液中, 浓度为 0.3 uM-0.6 uM, 例如, 0.3 uM、0.35 uM、0.4 uM、0.45 uM、0.5 uM、0.55 uM、0.6 uM 等, 本申请在此不作限定。当然, 在其他实施例中, RT 预混液的总体积以及其中各成分的用量均可以改变, 只需要按照各成分的浓度比例进行调整即可, 本申请对此不作限定。

在另一个实施方式中, 如表 6 所示, RPA 预混液还包括反应缓冲液、MgOAc 和超纯水。具体地, 以 RPA 预混液的总体积为 50 ul 为例, 反应

缓冲液的体积为 25 ul-30 ul, 例如, 25 ul、26 ul、27 ul、28 ul、29 ul、30 ul 等, 本申请在此不作限定。

表 6 RPA 预混液配方表

成分	用量 (ul)
RT-RPA 引物 F (25uM)	0.8-1.5
RT-RPA 引物 R (25uM)	0.8-1.5
反应缓冲液	25-30
MgOAc (280nM)	2.0-3.0
超纯水	补充体系至 50
总体积	50

具体地, MgOAc 的原始浓度为 280 nM, 用量为 2.0 ul-3.0 ul, 例如, 2.0 ul、2.25 ul、2.5 ul、2.55 ul、2.7 ul、2.75 ul、2.8 ul、2.85 ul、2.9 ul、2.95 ul、3.0 ul 等, 本申请在此不作限定。将 MgOAc 加入到 RPA 预混液中, 浓度为 5.4×10^{-7} nM- 8.4×10^{-7} nM, 例如, 5.4×10^{-7} nM、 5.6×10^{-7} nM、 5.8×10^{-7} nM、 6.0×10^{-7} nM、 6.2×10^{-7} nM、 6.4×10^{-7} nM、 6.6×10^{-7} nM、 6.8×10^{-7} nM、 7.0×10^{-7} nM、 7.2×10^{-7} nM、 7.4×10^{-7} nM、 7.6×10^{-7} nM、 7.8×10^{-7} nM、 8.0×10^{-7} nM、 8.2×10^{-7} nM、 8.4×10^{-7} nM 等, 本申请在此不作限定。其余体积用超纯水补足。

具体而言, 如表 6 所示, RT-RPA 引物 F 的原始浓度为 25 uM, 其用量为 0.8 ul-1.5 ul, 例如, 0.8 ul、0.9 ul、1.0 ul、1.2 ul、1.4 ul、1.5 ul 等, 本申请在此不作限定。将 RT-RPA 引物 F 加入 RPA 预混液中, 浓度为 0.5 uM-1.0 uM, 例如, 0.5 uM、0.55 uM、0.6 uM、0.65 uM、0.7 uM、0.75 uM、0.8 uM、0.85 uM、0.9 uM、0.95 uM、1.0 uM 等, 本申请在此不作限定。RT-RPA 引物 R 的原始浓度为 25 uM, 其用量为 0.8 ul-1.5 ul, 例如, 0.8 ul、0.9 ul、1.0 ul、1.2 ul、1.4 ul、1.5 ul 等, 本申请在此不作限定。将 RT-RPA 引物 R 加入 RPA 预混液中, 浓度为 0.5 uM-1.0 uM, 例如, 0.5 uM、0.55 uM、0.6 uM、0.65 uM、0.7 uM、0.75 uM、0.8 uM、0.85 uM、0.9 uM、0.95 uM、1.0 uM 等, 本申请在此不作限定。当然,

在其他实施例中，RT 预混液的总体积以及其中各成分的用量均可以改变，只需要按照各成分的浓度比例进行调整即可，本申请对此不作限定。

具体而言，经过 RPA 预混液后的样品所形成的 RT-RPA 产物的体积与 CRISPR 反应预混液的总体积的比值为 0.02-0.10，例如，0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10 等，对此不作限定。例如，在总体积为 100ul 的 CRISPR 反应预混液中 RT-RPA 产物的体积为 2.5ul，对此不作限定。

具体地，在本实施例中，RT 预混液的总体积与 RPA 预混液的总体积的比值为 0.32，RPA 预混液的总体积与 CRISPR 反应预混液的总体积的比值为 0.2，例如，RT 预混液的总体积为 16ul，RPA 预混液的总体积为 50ul，CRISPR 反应预混液的总体积为 100ul，只需满足以上比例即可，本申请对此不作限定。

总而言之，区别于现有技术的情况，本申请将 RPA，CRISPR 和胶体金三种方法偶联，在新冠等病原体的核酸检测上有巨大优势：RPA 技术的高灵敏度可以高效扩增微量核酸，解决了常规 CRISPR 灵敏度低（假阴性）的问题；CRISPR 方法中 crRNA 靶向目标核酸，其高特异性消除了 RPA 带来的假阳性问题；CRISPR 反式效应切割探针数量级扩大了信号，解决了传统胶体金试纸技术灵敏度低（假阴性）的问题；胶体金试纸呈现的检测结果显示简单易懂，即时可见。上述体系同时拥有简便性、灵敏性和特异性三个优点，无需仪器设备，是室温下简单操作即可快速获取结果的即时检测系统。

实施例（以 SARS-CoV2 病毒为例）：

1、选定 SARS-CoV2 病毒基因组上特异的检测位点和 RT-RPA 引物

本实施例选取 SARS-CoV2 病毒基因组中的 E 基因和 N 基因作为检测位点。RT 和 RPA 两个步骤共用一套引物，用于单链 RNA 样本的逆转录和扩增。

请参阅图 2，图 2 是 SARS-CoV2 病毒基因检测位点示意图。本实施例中 RT-RPA 扩增子包含了 E 基因的热点区，crRNA 的结合位点与多家机构采用的反向引物序列部分重合，完全包含了中国疾控中心选取的

位点，crRNA 的结合位点与中国疾控中心采用的反向引物序列部分重合。

2、制备 SARS-CoV2 病毒待测样本

以单链 RNA 样本及其阴性对照进行逆转录反应（反应体系具体见表 4）。逆转录反应由 37°C 孵育 10 分钟完成，逆转录产物混合液全部进入 RPA 预混液，37°C 再孵育 30 分钟完成进行扩增。单链 RNA 产物经 RT-RPA 反应可以获得对应大小的 SARS-CoV2 病毒扩增分子，请参阅图 3，图 3 是 SARS-CoV2 病毒 N 基因和 E 基因 RT-RPA 产物电泳图。如图 3 所示，其中 A. 泳道 1. N 基因单链 RNA 经 RT-RPA 反应后得到 219 bp 的产物；泳道 2. 阴性对照经 RT-RPA 反应没有产物生成。B. 泳道 1. E 基因单链 RNA 经 RT-RPA 反应后得到 192 bp 的产物；泳道 2. 阴性对照经 RT-RPA 反应没有产物生成。C. 泳道 1. lacZ 基因单链 RNA 经 RT-RPA 反应后得到 256 bp 的产物；泳道 2. 阴性对照经 RT-RPA 反应没有产物生成。其中，逆转录实验可用常规试剂盒，RPA 采用 TwistDX™ 公司的 TwistAmp Basic Kit (INTABAS v3.0)。

3、设计合成 crRNA 和 ssDNA 探针

在本实施例中，crRNA 片段由位于 5' 端的 Scaffold 片段和位于 3' 端的 Spacer 片段两部分组成：Scaffold 用于结合 Cas12a 蛋白，Spacer 用于结合模板 DNA 双链上的目标序列。目标序列均位于上文所述检测热点范围内，如图 2 所示。crRNA 序列采用 T7 体外转录获得，原理和方法与上文所述 SARS-CoV2 病毒 RNA 制备类似。crRNA 序列见表 2。FQ-ssDNA 探针与 FB-ssDNA 探针序列分别为 SEQ ID NO2 和 SEQ ID NO1。

4、CRISPR 反应预混液顺式切割 RT-RPA 产物，琼脂糖凝胶电泳检测结果

在本实施例中，将获得的 SARS-CoV2 病毒的扩增分子（即 RT-RPA 产物）加入 CRISPR-Cas12 蛋白反应体系，其中的目标位点被对应 crRNA 特异识别后，体系的顺式切割效应能在 crRNA 结合位点 3' 端附近将双链 DNA 切开。请参阅图 4，图 4 是 CRISPR-Cas12 顺式切割 RT-RPA 产物电泳图。如图 4 所示，N 基因、E 基因及阳性对照 lacZ 的 RT-RPA 产

物被对应的 crRNA 识别后, 均被 CRISPR-Cas12 蛋白反应体系特异性切割为两条短片段。将图 3 获得的阴性产物作为空白对照(模拟临床阴性样本), 将任意其他 RT-RPA 产物作为非特异对照(模拟临床中非 SARS-CoV2 病毒的核酸样本)进行同样反应, 结果空白对照无可见条带, 非特异对照中的核酸不能被反应体系切开。其中, A. 泳道 1. 219 bp 的 N 基因 RT-RPA 产物被切割成 100 bp 和 119 bp 的片段(如箭头所示, 两条片段在胶图中难以分开); 泳道 2. 加入 N 基因 RT-RPA 阴性产物的反应液; 泳道 3. N-crRNA 未切开 256 bp 的 lacZ 的 RT-RPA 产物; 泳道 4. N 基因 RT-RPA 产物。B. 泳道 1. 192 bp 的 E 基因 RT-RPA 产物被切割成 56 bp 和 136 bp 的两条片段; 泳道 2. 加入 E 基因 RT-RPA 阴性产物的反应液; 泳道 3. E-crRNA 未切开 167 bp 的 S 基因 RT-RPA 产物; 泳道 4. E 基因的 RT-RPA 产物。C. 泳道 1. 256 bp 的 lacZ 的 RT-RPA 产物被切割成 94 bp 和 162 bp 的两条片段; 泳道 2. 加入 lacZ RT-RPA 阴性产物的反应液; 泳道 3. lacZ-crRNA 未切开 219 bp 的 N 基因 RT-RPA 产物; 泳道 4. lacZ 基因的 RT-RPA 产物。本反应体系采用 New England Biolabs® 的 EnGen® Lba Cas12a (Cpf1) 试剂盒。

5、CRISPR-Cas12a 蛋白反应体系反式切割 FB-ssDNA 探针, 胶体金试纸显色检测结果

在顺式切割 RT-RPA 产物的同时, 激活的 CRISPR-Cas12a 蛋白反应体系也可以反式切割体系中无关的 FB-ssDNA 探针。原理如上文所述, 探针被切割与否由胶体金检测。如图 5 所示, 图 5 是 CRISPR-Cas12a 蛋白反式切割 FB-ssDNA 探针胶体金检测结果图。其中, A. 1. N 基因的 RT-RPA 产物被其 crRNA 特异识别后, 体系反式切割 FB-ssDNA 探针, 在胶体金上出现 C 带, 为阳性结果; 2. 体系中没有 N 基因的 RT-RPA 产物, 体系无法切割 FB-ssDNA 探针, 在胶体金上出现 T 和 C 带, 为阴性结果; 3. 体系中有非特异的 lacZ RT-RPA 产物, 体系同样无法切割 FB-ssDNA 探针, 为阴性结果。B. 1. E 基因的 RT-RPA 产物被其 crRNA 特异识别后, 体系反式切割 FB-ssDNA 探针, 在胶体金上出现 C 带, 为阳性结果; 2. 体系中没有 E 基因的 RT-RPA 产物, 体系无法切割

FB-ssDNA 探针，在胶体金上出现 T 和 C 带，为阴性结果；3. 体系中有非特异的 S RT-RPA 产物，体系同样无法切割 FB-ssDNA 探针，为阴性结果。C. 1. lacZ 的 RT-RPA 产物被其 crRNA 特异识别后，体系反式切割 FB-ssDNA 探针，在胶体金上出现 C 带，为阳性结果；2. 体系中没有 lacZ 的 RT-RPA 产物，体系无法切割 FB-ssDNA 探针，在胶体金上出现 T 和 C 带，此时为阴性结果；3. 体系中有非特异的 N 基因的 RT-RPA 产物，体系同样无法切割 ssDNA 探针，此时为阴性结果。

在 CRISPR-Cas12a 蛋白反应体系中，如果样本中有 SARS-CoV2 病毒目的基因，体系反式切断 FB-ssDNA 探针，在胶体金上只出现 C 带（反向显示）。如果体系中没有 SARS-CoV2 病毒目的基因，或者体系中为非特异的核酸基因，体系不能切断 FB-ssDNA 探针，因此在胶体金上出现 T 和 C 两条带。

灵敏度检测

本实验使用含有 E 基因片段的 DNA 测试灵敏度。请参阅图 6，图 6 是 E 质粒 RPA 产物及其被 CRISPR-Cas12a 蛋白反应体系顺式切割产物电泳图。将 E 基因原液稀释成浓度梯度直接进行 RPA 扩增，电泳检测 RPA 反应成功与否及产物多少，如图 6 中 A 所示。将 RPA 产物进一步进行 CRISPR-Cas12a 蛋白反应，通过琼脂糖凝胶电泳检测反应的顺式切割效率，如图 6 中 B 所示。本实验采用上文所述 FQ-ssDNA 探针精确测试体系的最小检测限。本实施例对 E 基因片段测得的最小检测限为 10 copy/ul。CRISPR-Cas12a 蛋白反应体系在酶标仪中 37°C 恒温反应 1 小时，每隔半分钟设置一个检测点。请参阅图 7，图 7 是 CRISPR-Cas12a 蛋白反应体系反式切割 FQ-ssDNA 探针荧光检测图。如图 7 所示，探针被反式切割产生绿色荧光且能与阴性对照明显区分，则表示反应成功。本实验选取在图 6 中 A 的电泳中明显可见的 RPA 产物进行 CRISPR-Cas12a 蛋白反式切割反应。即是，选取 E 质粒终浓度梯度为 80、60、40、20、10 copy/ul 的 RPA 产物为阳性样本，以超纯水为阴性对照。如图 7 所示，阳性样本的荧光曲线在反应发生 15 分钟左右时快速上升，能与阴性对照的荧光曲线完全区分开来，而阳性样本之间的荧光曲线没有明显区别。

特异性检测

表 7 特异性检测片段序列

位点	序列
SARS-CoV N 基因	SEQ ID NO18: gatcactaatacgactcactatagggcatcacgtagtcgcggttaattcaagaaattcaactc ctggcagcagtaggggaaattctctgctcgaatggctagcggaggtggtgaaactgcc ctgcgctattgctgctagacagattgaaccagcttgagagcaaagtttctggtaaaggcc aacaacaacaaggccaaactgtcactaagaaatctgctgctgaggcatctaaaaagcctc gccaaaaacgtactgccacaaaacagtacaacgtcactcaagcatttgggagacgtggt ccagaacaaaccaaggaaatttcggggaccaagacctaatacagacaaggaaactgatta caaacattggccgcaaattgcacaatttgctccaagtgcctctgcattctttggaatgtcacg cat
MERS-CoV N 基因	SEQ ID NO19: gatcactaatacgactcactataggggcagaaactctccagatctagttcacaaggtcaa gatcaggaaactctaccgcggcacttctccaggtccatctggaatcggagcagtagga ggtgatctactttaccttgatcttctgaacagactacaagcccttgagctggcaaagtaaa gcaatcgagccaaaagtaatacctaagaaagatgctgctgctgtaaaaaataagatgcg ccacaagcgcacttccacaaaagttcaacatggtgcaagcttttggtcttcgaggacca ggagacctccagggaactttggtgatcttcaattgaataaactcggcactgaggacca cgttggcccaaattgctgagcttgctcctacagccagtgttttatgggtatgtcgcaatt
H1N1 HA 基因	SEQ ID NO20: gatcactaatacgactcactataggggtcaagatacagcaagaagttcaagccggaaatag caataagacccaaagtgagggatcaagaaggagaaatgaactattactggacactagta gagccgggagacaaaataacattcgaagcaactggaaatctagtgtaccgagatatgc attcgcaatggaagaaatgctggatctggtattatcatttcagatacaccagtccacgatt gcaatacaactgtcaaacaccaagggtgctataaacaccagcctccatttcagaatat acatccgatcacaattggaaaatgtccaaaatatgtaaaagcacaaaattgagactggcc acaggattgaggaatatcccgctattcaatctagaggcctatttggggccattgccggttt ca
H1N1 NA 基因	SEQ ID NO21: gatcactaatacgactcactatagggagtatcgtctaattggagcaaatggagttaaagggt ttcatcacaatacggcaatggtgtttggatagggaactaaaagcattagtcaagaaac gggtttgagatgatttgggatccgaacggatggactgggacagacaataacttctcaataa agcaagatatcgtaggaataaatgagtggcaggatatacgggagttttgtcagcatcc agaactaacagggtggtgtataagaccttgcttctgggttgaactaatcagagggcga cccaaagagaacacaatctggactagcgggagcagcatatcctttgtggtgtaaacagt gacactgtgggttggcttggccagacgggtgctgagttgccattaccattgacaagtaa

本实验能特异检测 SARS-CoV2 病毒上的 N 基因和 E 基因片段, 而且, 能够有效分辨出 SARS-CoV2 病毒上与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 高度同源的基因片段。

本实验以 SARS-CoV, SARS-CoV2 和 MERS-CoV 病毒上的 N 基因检测为例测试了体系的特异性。同时, 还选取了症状类似的其他呼吸道疾病如甲型流感病毒 H1N1 的 HA 和 NA 基因片段作为特异性检测的对照样本。基因检测片段序列如图 8 和表 7 所示, 图 8 是特异性检测 crRNA 序列及结合位点示意图。插入于质粒 pUC18 的 Sma I 酶切位点。利用 pUC18 的通用引物 M13 进行普通 PCR 扩增即可获得目标片段, 无需特定试剂盒。

分析 SARS-CoV2 N 基因 crRNA 结合位点的序列, SARS-CoV 与 SARS-CoV2 两者序列只有 2 个碱基的差异, MERS-CoV 与其有 10 个碱基的差异, H1N1 的 HA 基因和 NA 基因与 SARS-CoV2 的序列没有同源性。

在 CRISPR-Cas12a 蛋白反应体系, 如果 crRNA 与核酸片段结合, 则会激活顺式切割效应。SARS-CoV2 N 基因的 crRNA 只能切开对应 SARS-CoV2 的病毒片段, 而不能切开其他如 SARS-CoV 和 MERS-CoV 病毒的 N 基因片段, 因此, 其特异性可以得到证实。

而且, 在含有其他四种病毒 crRNA 的 CRISPR/Cas12a 蛋白反应体系中分别加入 SARS-CoV2 的 N 基因片段, N 基因片段也不会被切割, 而这些 crRNA 能特异切割各自对应的片段, 请参阅图 10, 图 10 是 SARS-CoV2 N 基因 crRNA 特异性测试反式切割 FQ-ssDNA 探针荧光检测图。如图 10 所示, 本实验以检测 CRISPR-Cas12 体系是否能反式切割 FQ-ssDNA 探针的方法来证实 crRNA 特异性结合的效果。实验设置如图 9 所示。当基因片段与 crRNA 特异结合时才能激活反式切割效应, FQ-ssDNA 探针被切割产生荧光。检测发现, 只有当体系中同时具有 SARS-CoV2 N 基因片段及其 crRNA 时才有荧光产生。

请参阅图 11, 图 11 是 crRNA 特异性顺式切割效果示意图。本实验以检测 CRISPR-Cas12 体系是否能顺式切割模板片段来证实 crRNA 特异

性结合的效果。如图 11 所示,泳道 1. 体系里只有 563 bp 的 SARS-CoV N 基因片段,以超纯水替代 crRNA;泳道 2.563 bp 的 SARS-CoV N 基因片段被切割成了 336 bp 和 227 bp 的两条短片段;泳道 3.长度为 465 bp 的 SARS-CoV2 N 基因片段没有被切割。以上结果表明, SARS-CoV N 基因的 crRNA 特异性良好,不会切断 SARS-CoV2 N 基因。泳道 4-6. 同理证实 MERS-CoV N 基因的 crRNA 的特异性良好,各片段大小与泳道 1-3 一致;泳道 7. 体系里只有 563 bp 的 H1N1 HA 基因片段,以超纯水替代 crRNA;泳道 8. 563 bp 的 H1N1 HA 基因片段被切割成了 357 bp 和 206 bp 的两条短片段;泳道 9. SARS-CoV2 N 基因片段没有被切割。泳道 10-12. 同理证实 H1N1 NA 基因的 crRNA 的特异性良好, 563 bp 的 H1N1 NA 基因片段被切割成了 326 bp 和 237 bp 的两条短片段, SARS-CoV2 N 基因片段没有被切割。

请参阅图 12,图 12 是 crRNA 特异性反式切割 FQ-ssDNA 探针荧光检测图。本实验以检测 CRISPR-Cas12 体系是否能反式切割 FQ-ssDNA 探针的方法来证实 crRNA 特异性结合的效果。实验设置如图 11 所示。如图 12 所示,当基因片段与 crRNA 特异结合时才能激活反式切割效应, FQ-ssDNA 探针被切割产生荧光。检测发现,只有当体系中片段与其 crRNA 两两对应时才有荧光产生。上述四种 crRNA 与 SARS-CoV2 N 基因片段不能特异结合,不会有假阳性产生。

由上述结果可知,将 RPA, CRISPR 和胶体金三种方法偶联,在新冠等病原体的核酸检测上有巨大优势: RPA 技术的高灵敏度可以高效扩增微量核酸,解决了常规 CRISPR 灵敏度低(假阴性)的问题; CRISPR 方法中 crRNA 靶向目标核酸,其高特异性消除了 RPA 带来的假阳性问题; CRISPR 反式效应切割探针数量级扩大了信号,解决了传统胶体金试纸技术灵敏度低(假阴性)的问题;胶体金试纸呈现的检测结果显示简单易懂,即时可见。

以上所述仅为本申请的实施例,并非因此限制本申请的专利范围,凡是利用本申请说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其它相关的技术领域,均同理包括在本申请的专利保

护范围内。

权 利 要 求 书

1、一种病原体核酸的即时检测系统，其特征在于，包括：

裂解缓冲液，用于对待检测的样品进行灭活裂解，以释放出 RNA；

5 RT 预混液，用于将所述样品中的 RNA 逆转录为 DNA；

RPA 预混液，用于对经所述 RT 预混液处理后的样品进行 RPA 反应，
使所述样品中的 DNA 扩增；

CRISPR 反应预混液，用于对经过所述 RPA 预混液处理后的样品进
行特异性切割反应；

10 胶体金试纸，用于对经过 CRISPR 反应预混液处理后的样品进行显
色，以确认所述样品中是否包含所述病原体核酸。

2、根据权利要求 1 所述的系统，其特征在于，所述 CRISPR 反应预
混液包括 Cas12a 蛋白、crRNA 以及探针；

其中，所述探针包括 FB-ssDNA 探针、FQ-ssDNA 探针中任意一种；

15 所述 FB-ssDNA 探针由单链 DNA 以及标记在所述单链 DNA 端部的第一
基团组成，所述第一基团包括异硫氰酸荧光素 FITC、6-羧基荧光素 FAM、
生物素 Biotin 中任意一种，且所述第一基团能够与胶体金结合；所述
FQ-ssDNA 探针由单链 DNA 以及标记在所述单链 DNA 端部的第二基团
和第三基团组成，所述第二基团包括异硫氰酸荧光素 FITC、6-羧基荧光
20 素 FAM 中任意一种，所述第三基团包括黑洞淬灭基团 BHQ1，且所述第
三基团用于吸收荧光。

3、根据权利要求 2 所述的系统，其特征在于，

所述病原体核酸包括 SARS-CoV2、SARS-CoV、MERS-CoV、H1N1
中至少一种；

25 其中，所述 SARS-CoV2 的检测基因为 SARS-CoV2 N 基因，对应的
所述 crRNA 的序列为：5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ccaga cauuu
ugcuc uca-3'；

和/或，所述 SARS-CoV2 的检测基因为 SARS-CoV2 E 基因，对应
的所述 crRNA 的序列为：5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU caaga

cucac guuaa caa-3';

和/或,所述 SARS-CoV 的检测基因为 SARS-CoV2 N 基因,对应的所述 crRNA 的序列为: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ccaga aacuu ugcuc uca-3';

5 和/或,所述 MERS-CoV 的检测基因为 MERS-CoV N 基因,对应的所述 crRNA 的序列为: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ccaga cucaa gggcu ugu-3';

和/或,所述 H1N1 的检测基因为 H1N1 HA1 基因,对应的所述 crRNA 的序列为: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU caguu gcuuc gaaug uua-3';

10 和/或,所述 H1N1 的检测基因为 H1N1 NA1 基因,对应的所述 crRNA 的序列为: 5'-AAUUU CUACU GUUGU AGAU ggucg cccuc ugauu agu-3'。

4、根据权利要求 2 所述的系统,其特征在于,

所述 CRISPR 反应预混液还包括反应缓冲液和超纯水;

其中,所述 CRISPR 反应预混液和部分经过所述 RPA 预混液后的样品所形成混合物中 crRNA 的浓度为 0.5 uM-1 uM,所述 FB-ssDNA 探针的浓度为 0.5 nM-2.0 nM,所述 FQ-ssDNA 探针的浓度为 1 nM-10 nM, Cas12a 蛋白的浓度为 0.1 uM-0.5 uM。

5、根据权利要求 1 所述的系统,其特征在于,

所述 RT 预混液和所述 RPA 预混液中均分别包括 RT-RPA 引物 F 和
20 RT-RPA 引物 R。

6、根据权利要求 5 所述的系统,其特征在于,

所述病原体核酸包括 SARS-CoV2、SARS-CoV、MERS-CoV、H1N1 中一种;

其中,所述 SARS-CoV2 的扩增位点为 SARS-CoV2 N 基因,对应的
25 所述 RT-RPA 引物 F 的序列为: 5'-CAAGA AATTC AACTC CAGGC AGCAG TAGGG GAAC-3'; 所述 RT-RPA 引物 R 的序列为: 5'-CTTTA GTGGC AGTAC GTTTT TGCCG AGGCT TCT-3';

和/或,所述 SARS-CoV2 的扩增位点为 SARS-CoV2E 基因,对应的所述 RT-RPA 引物 F 的序列为: 5'-TACTC ATTCG TTTCG GAAGA

GACAG GTACG TT-3'; 所述 RT-RPA 引物 R 的序列为: 5'-CAGAT TTTTAACACG AGAGT AAACG TAAAA AGAA-3'。

7、根据权利要求 5 所述的系统, 其特征在于,

所述 SARS-CoV 的扩增位点为 SARS-CoV N 基因, 所述 MERS-CoV 的扩增位点为 MERS-CoV N 基因, 所述 H1N1 的扩增位点为 H1N1 的 HA1 基因和 H1N1 NA1 基因; 所述 SARS-CoV N 基因、所述 MERS-CoV 基因、所述 H1N1 HA1 基因以及所述 H1N1 NA1 基因分别连入质粒 pUC18, 对应的 PCR 引物 F 的序列为: 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3', PCR 引物 R 的序列为: 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'。

8、根据权利要求 5 所述的系统, 其特征在于, 所述 RT 预混液还包括: 反应缓冲液、RNA 酶抑制剂、dNTP、逆转录酶和超纯水;

其中, 所述 RT-RPA 引物 F 的浓度为 0.3 uM-0.6 uM; 所述 RT-RPA 引物 R 的浓度为 0.3 uM-0.6 uM。

9、根据权利要求 5 所述的系统, 其特征在于, 所述 RPA 预混液还包括: 反应缓冲液、MgOAc 和超纯水;

其中, 所述 RT-RPA 引物 F 的浓度为 0.5 uM-1.0 uM; 所述 RT-RPA 引物 R 的浓度为 0.5 uM-1.0 uM。

10、一种病原体核酸的即时检测方法, 其特征在于, 所述方法利用权利要求 1-9 中任一项所述的系统, 所述方法包括:

将待检测的样品置于裂解缓冲液中, 对所述样品进行灭活裂解, 以释放出 RNA;

将包含 RNA 的所述样品置于 RT 预混液中, 以将所述 RNA 逆转录为 DNA;

将逆转录后的样品置于 RPA 预混液中, 使所述样品扩增;

将扩增后的部分样品置于 CRISPR 反应预混液, 以进行特异性切割反应;

利用胶体金试纸对特异性切割反应后的样品进行显色。

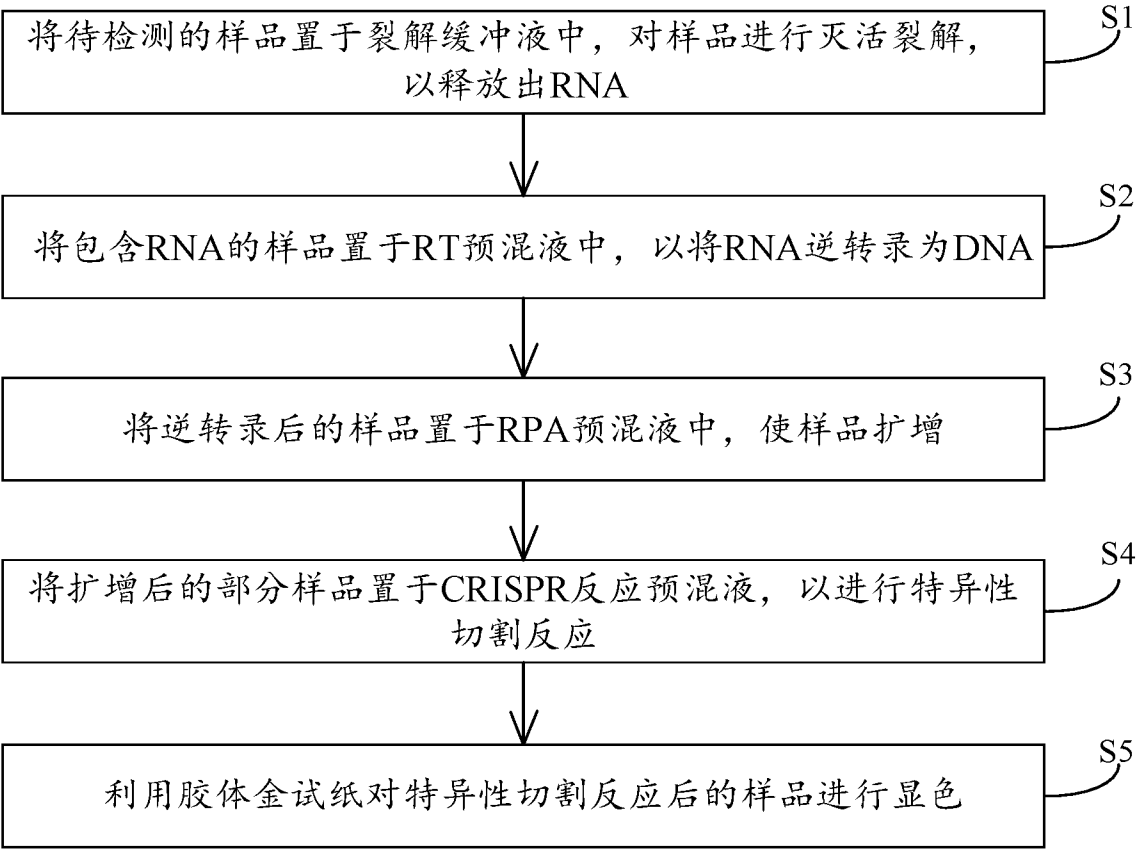


图 1

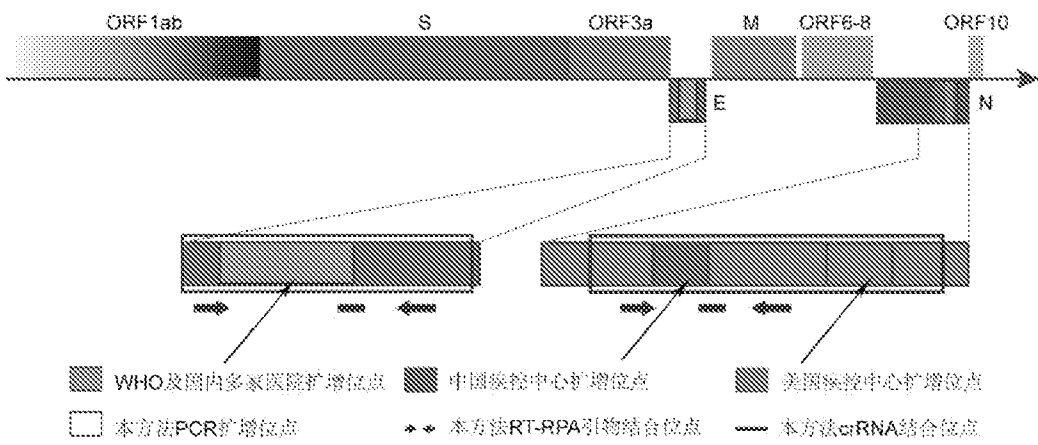


图 2

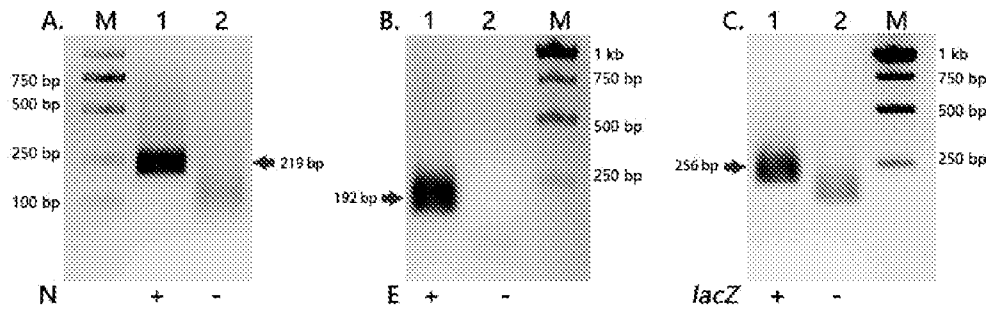


图 3

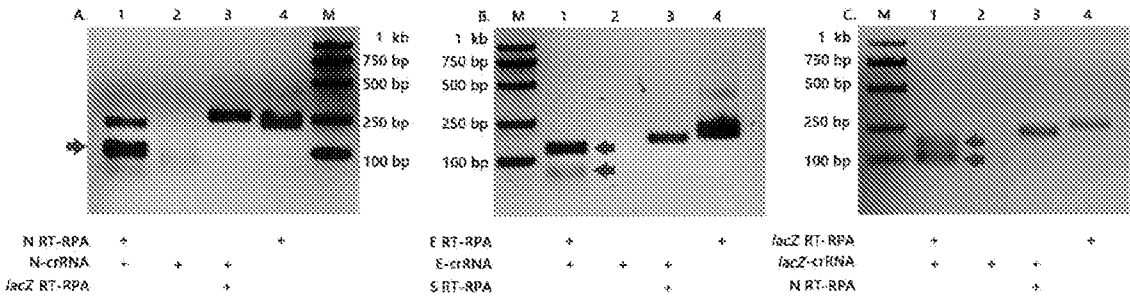


图 4

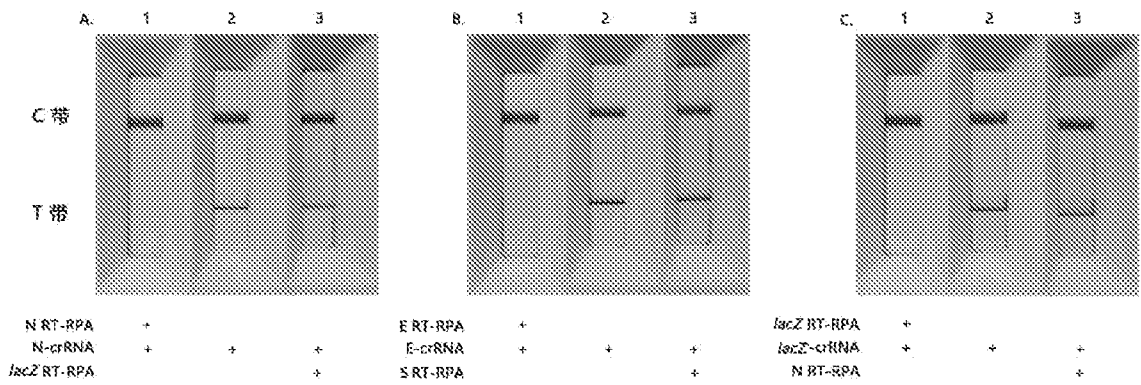


图 5

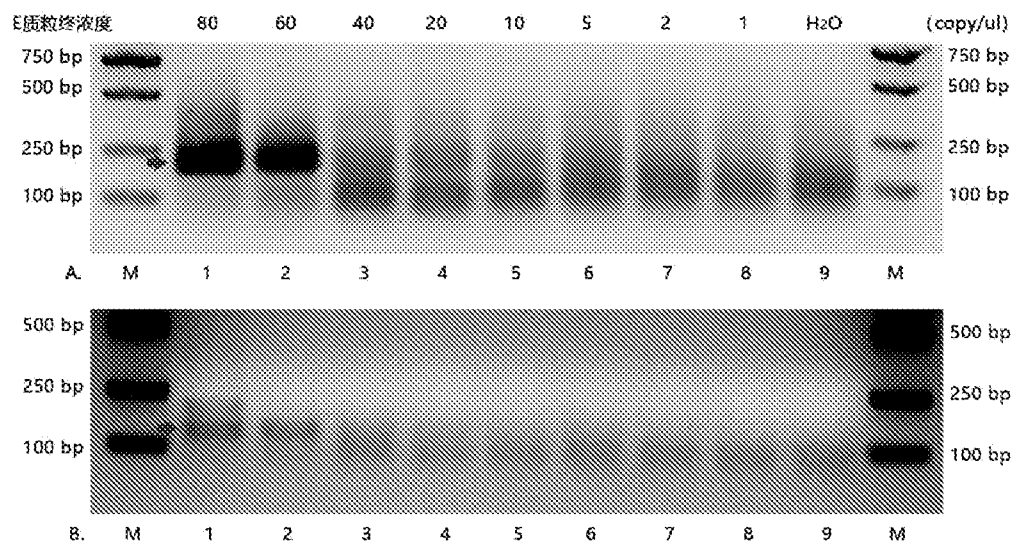


图 6

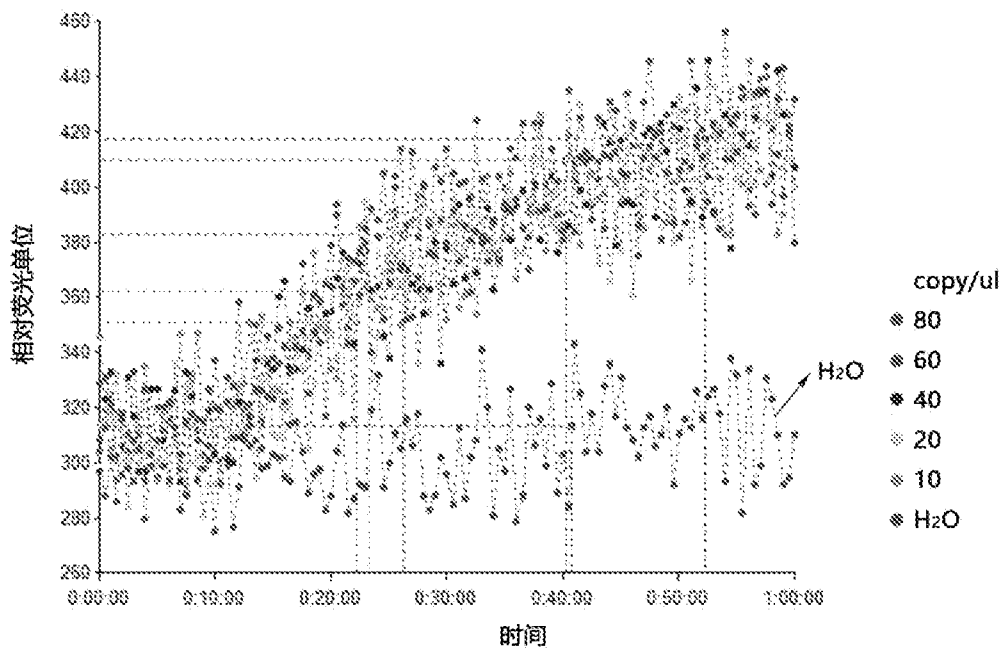


图 7

N基因

SARS-CoV acagattgaaccagcttgagagcaaaagtctctggtaaaggccaacaacaagaaggccaaa

SARS-CoV2 acagattgaaccagcttgagagcaaaaatgtctggtaaaggccaacaacaagaaggccaaa

MERS-CoV atcttctgaacagactacaagcccttgagctctggcaaagtaaagcaatcgagccaaaag

HA基因 H1 aaaataacattcgaagcaactggaaatctagtggtagccgagatatgcattcgcaatggaa

NA基因 N1 gctggattgtataagaccttgcttctgggttgaactaatcagagggcgacccaaagagaa

crRNA结合位点 结合位点中基因序列一致的碱基

图 8

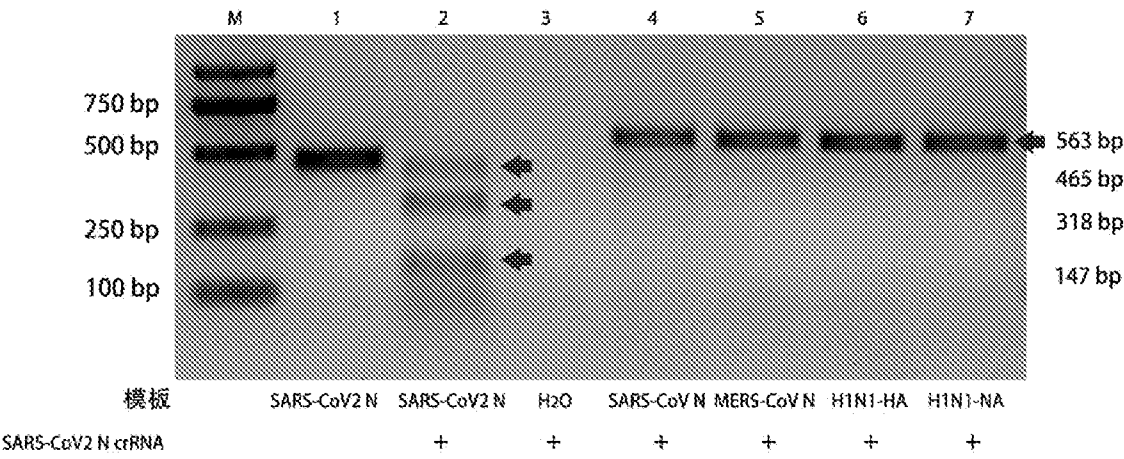


图 9

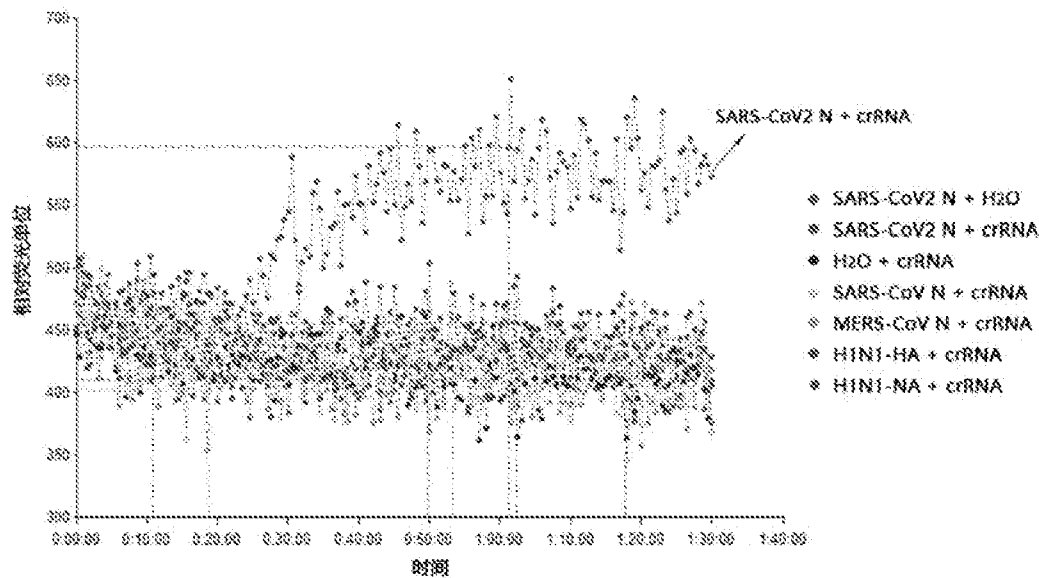


图 10

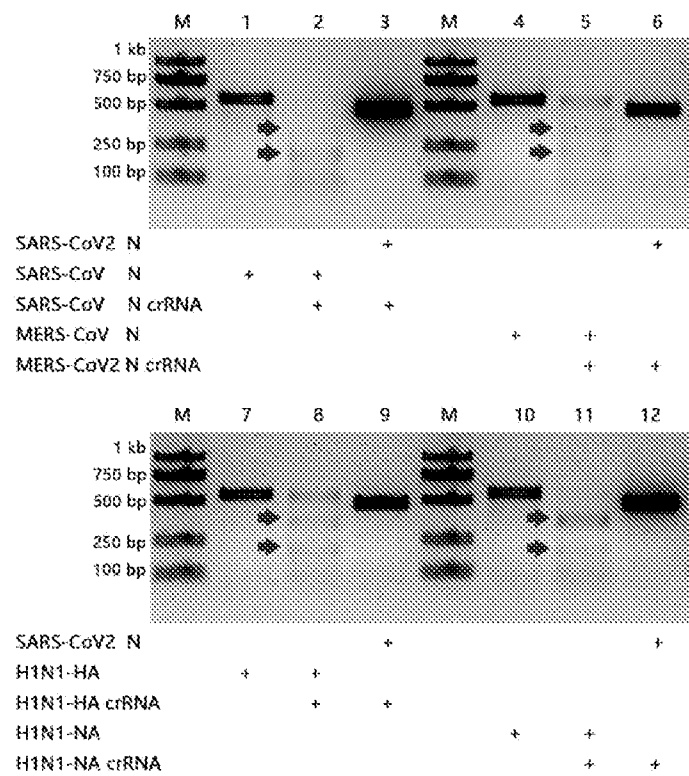


图 11

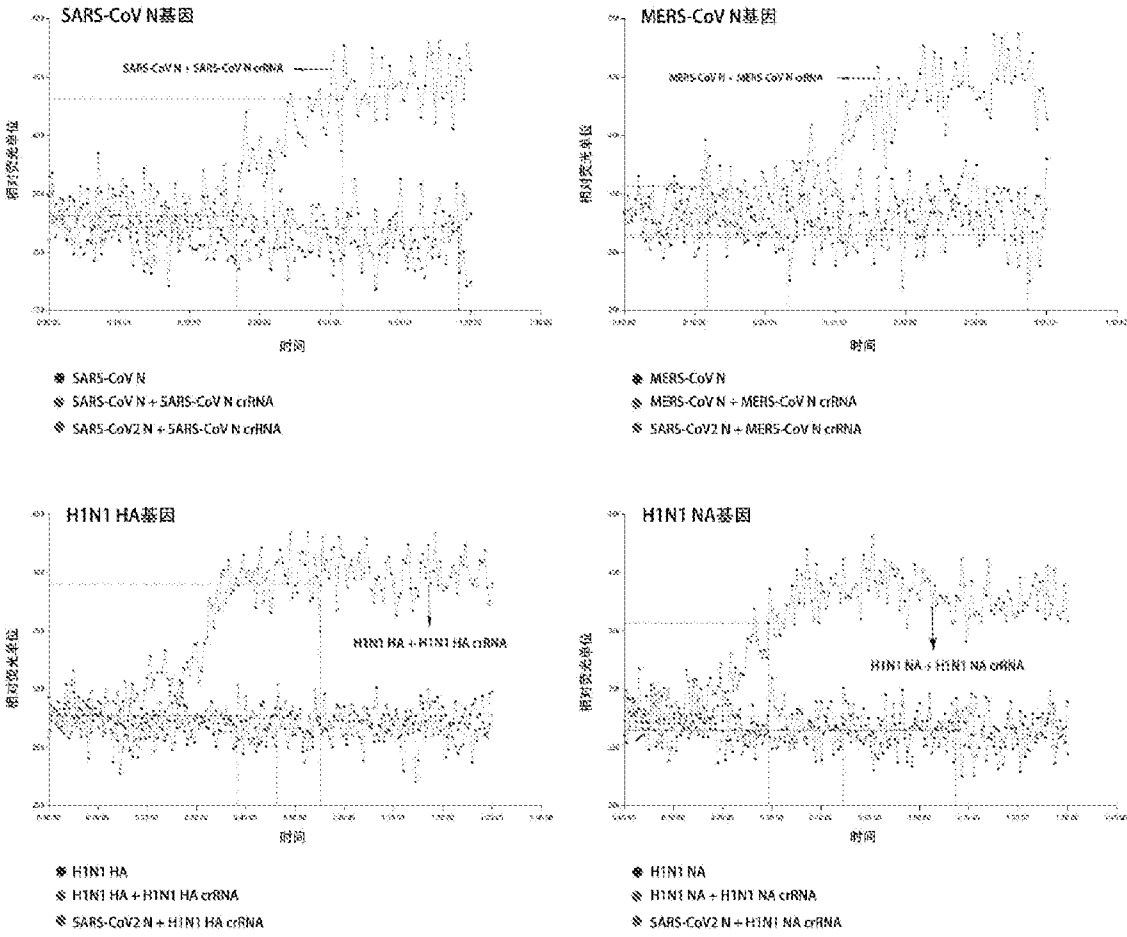


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/138141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/70(2006.01)i; C12R 1/93(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN, CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, Patents, China Patents Biological Sequence Search System, NCBI Genbank, EBI, STN: APPLICANT, INVENTOR, 核酸, 检测, RT, RPA, CRISPR, 胶体金, colloidal gold, 裂解, lysis, Cas12a, crRNA, 引物, primer, nucleic acid, sequences 1-18

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113061650 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 02 July 2021 (2021-07-02) claims 1-10	1-10
X	CN 110184329 A (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 30 August 2019 (2019-08-30) claims 1-10	1-10
X	CN 111560482 A (YANENG BIOSCIENCE (SHENZHEN) CO., LTD.) 21 August 2020 (2020-08-21) abstract, and claims 1-10	1-10
X	CN 112239795 A (FUDAN UNIVERSITY) 19 January 2021 (2021-01-19) abstract, and claims 1-10	1-10
A	CN 111593141 A (SHANGCHENG BEINA CHUANGLIAN BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 28 August 2020 (2020-08-28) entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2022

Date of mailing of the international search report

09 March 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/138141

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111363860 A (WUJIANG JINAN PROTEIN TECH CO., LTD.) 03 July 2020 (2020-07-03) entire document	1-10
A	WO 2020256553 A1 (WAGENINGEN UNIVERSITY) 24 December 2020 (2020-12-24) entire document	1-10
A	WO 2020245808 A1 (SIMON FRASER UNIVERSITY) 10 December 2020 (2020-12-10) entire document	1-10
A	张永江 等 (ZHANG, Yongjiang et al.). "一步法逆转录重组酶聚合酶常温扩增(RT-RPA)技术检测菜豆荚斑驳病毒 (One-Step Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA) Technology for detection of BPMV)" <i>江苏农业科学 (Jiangsu Agricultural Sciences)</i> , Vol. 46, No. 21, 31 December 2018 (2018-12-31), ISSN: , pp. 96-98	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/138141

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/138141

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113061650	A	02 July 2021	None			
CN	110184329	A	30 August 2019	None			
CN	111560482	A	21 August 2020	None			
CN	112239795	A	19 January 2021	None			
CN	111593141	A	28 August 2020	None			
CN	111363860	A	03 July 2020	None			
WO	2020256553	A1	24 December 2020	None			
WO	2020245808	A1	10 December 2020	CA	3142670	A1	10 December 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/138141

A. 主题的分类

C12Q 1/6844(2018.01)i; C12Q 1/70(2006.01)i; C12R 1/93(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q; C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

VEN, CNABS, PubMed, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, Patentics, 中国生物序列检索系统, NCBI Genbank, EBI, STN: 申请人, 发明人, 核酸, 检测, RT, RPA, CRISPR, 胶体金, colloidal gold, 裂解, lysis, Cas12a, crRNA, 引物, primer, nucleic acid, 序列1-18

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 113061650 A (中国科学院深圳先进技术研究院) 2021年7月2日 (2021 - 07 - 02) 权利要求1-10	1-10
X	CN 110184329 A (华南理工大学) 2019年8月30日 (2019 - 08 - 30) 权利要求1-10	1-10
X	CN 111560482 A (亚能生物技术深圳有限公司) 2020年8月21日 (2020 - 08 - 21) 摘要, 权利要求1-10	1-10
X	CN 112239795 A (复旦大学) 2021年1月19日 (2021 - 01 - 19) 摘要, 权利要求1-10	1-10
A	CN 111593141 A (商城北纳创联生物科技有限公司) 2020年8月28日 (2020 - 08 - 28) 全文	1-10
A	CN 111363860 A (吴江近岸蛋白质科技有限公司) 2020年7月3日 (2020 - 07 - 03) 全文	1-10
A	WO 2020256553 A1 (WAGENINGEN UNIVERSITY) 2020年12月24日 (2020 - 12 - 24) 全文	1-10

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年2月27日

国际检索报告邮寄日期

2022年3月9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

奚静

电话号码 86-(10)-53961974

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	W0 2020245808 A1 (SIMON FRASER UNIVERSITY) 2020年12月10日 (2020 - 12 - 10) 全文	1-10
A	张永江等. “一步法逆转录重组酶聚合酶常温扩增(RT-RPA)技术检测菜豆荚斑驳病毒” 江苏农业科学, 第46卷, 第21期, 2018年12月31日 (2018 - 12 - 31), ISSN: , 第96-98页	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/138141

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	113061650	A	2021年7月2日	无	
CN	110184329	A	2019年8月30日	无	
CN	111560482	A	2020年8月21日	无	
CN	112239795	A	2021年1月19日	无	
CN	111593141	A	2020年8月28日	无	
CN	111363860	A	2020年7月3日	无	
WO	2020256553	A1	2020年12月24日	无	
WO	2020245808	A1	2020年12月10日	CA 3142670 A1	2020年12月10日