

(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
2020 年 10 月 15 日 (15.10.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/207453 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 21/64 (2006.01) *C12Q 1/6876* (2018.01)
G01N 1/34 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/084111

(22) 国际申请日: 2020 年 4 月 10 日 (10.04.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910285607.1 2019年4月10日 (10.04.2019) CN

(71) 申请人: 华东理工大学(EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。中国科学院微生物研究所(INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE

ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号, Beijing 100101 (CN)。

(72) 发明人: 张立新 (ZHANG, Lixin); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。谭高翼 (TAN, Gaoyi); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。梁敏东 (LIANG, Mindong); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。王为善 (WANG, Weishan); 中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, Beijing 100101 (CN)。刘家坤 (LIU, Jiakun); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。

(74) 代理人: 北京信慧永光知识产权代理有限公司 (BEIJING SUNHOPE INTELLECTUAL

(54) Title: BIOSENSOR AND KIT BASED ON CRISPR/CAS12A SYSTEM, AND USE OF SAME IN SMALL MOLECULE DETECTION

(54) 发明名称: 基于CRISPR/Cas12a系统的生物传感器、试剂盒及其在小分子检测中的用途

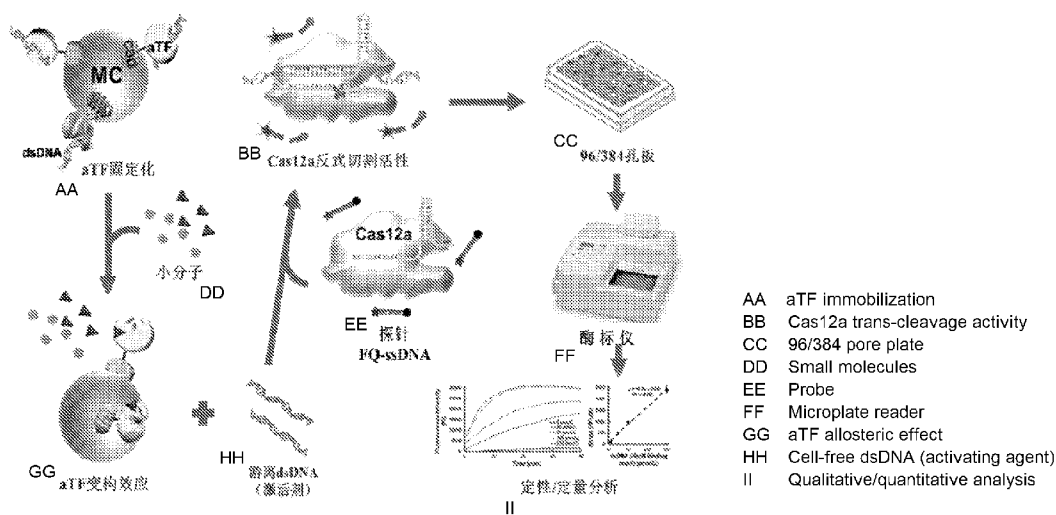


图 1

(57) Abstract: The present invention relates to a biosensor, composition and kit comprising an allosteric transcription factor and a CRISPR/Cas12a system, and an associated method and use of same. The mechanism of the biosensor is to use a small molecule detection tool mediated by the allosteric transcription factor and the CRISPR/Cas12a, combine a target small molecule and the allosteric transcription factor such that the affinity between the allosteric transcription factor and double-stranded DNA is changed, and use the cis-cleavage activity and/or the trans-cleavage activity on single-stranded DNA of the CRISPR/Cas12a to cleave a dsDNA probe and/or an ssDNA probe so as to convert a signal of the target small molecule into a corresponding optical signal. In the in vitro detection of small molecules, the biosensor, composition and kit, and the associated method of the present invention can not only save on time and cost, but are also highly sensitive and have the potential of high-throughput detection.

PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区知春路9号
坤讯大厦1106室, Beijing 100191 (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,
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: 本发明涉及包含别构转录因子和CRISPR/Cas12a系统的生物传感器、组合物、试剂盒及其相关的方法和用途。所述生物传感器的机理在于, 采用别构转录因子与CRISPR/Cas12a介导的小分子检测工具, 通过目标小分子与别构转录因子的结合使得别构转录因子与双链DNA的亲和力发生变化以及采用CRISPR/Cas12a的顺式切割活性和/或反式单链DNA切割活性, 对dsDNA探针和/或ssDNA探针进行切割, 将目标小分子信号转变为相应的光信号。本发明的生物传感器、组合物、试剂盒及其相关的方法在体外检测小分子时不仅能节约时间和成本, 而且灵敏度高并具有高通量检测的潜力。

基于 CRISPR/Cas12a 系统的生物传感器、试剂盒及其在小分子检测中的用途

相关申请的交叉引用

本申请要求于 2019 年 04 月 10 日向中国国家知识产权局提交的第 201910285607.1 号中国专利申请的优先权和权益，所述申请公开的内容通过引用整体并入本文中。

技术领域

本发明属于生物检测领域，涉及借助于别构转录因子（allosteric transcription factor, aTF）与 CRISPR/Cas12a 系统，通过 CRISPR/Cas12a 的顺式切割切割和反式切割活性将小分子信号转化为光信号的生物传感器、组合物和试剂盒，以及使用其的体外（*in vitro*）检测小分子的方法。

背景技术

小分子检测之所以如此重要，主要体现在临床诊断、药物研发、食品安全以及环境监测等各个领域的应用。例如，尿酸作为嘌呤代谢终产物，一般在机体内的生成与排出处于动态平衡，过多积累则影响人体细胞的正常功能。其中，高尿酸血症和痛风肾病等都是尿酸作为指标，是检测方面的生物标志物，在疾病监测领域发挥重要作用。对羟基苯甲酸（*p*-HBA）因其在真菌及细菌方面的抑制作用，广泛应用于食品防腐剂、药物合成及化妆品领域的使用，一旦超标危害同样巨大。因此开发新的小分子检测方法至关重要。

对样品中小分子的有效检测，在环境污染监控、食品质量控制和疾病诊断等领域都极为重要。现有技术中的小分子检测方法主要分为两大类：理化分析方法和生物分析方法。理化分析方法主要通过波谱法、色谱法及其联用技术。这些技术分离效能高、选择性好、定性和定量能力强。然而，其样品制备过程复杂，仪器价格昂贵，耗时长。即便熟练的操作人员也需要较长时间才能得到结果，且不适用于现场分析。

生物分析方法通常借助体内固有的小分子与蛋白/核酸的特异性相互作用，在较小的体系或芯片上实现信号的生成、放大、信号转换和读出。这样的方法能够实现现场、实时检测。特别地，通常通过模拟激动剂/拮抗剂-受体、或者抗原-抗体相互作用对，利用与小分子相互作用的受体或抗体对小分子进行抓取。或者，通过筛选或进化获得能够与小分子特异性相互作用的核酸（例如适体），实现对小分子的特异性识别。随后，通过抗体级联放大、石英晶体微量天平等方式，将此类相互作用的信号转化并放大为光/显色/电化学信号，从而读出小分子的定性或定量的信息。

为了扩大能够分析的小分子的范围，已经提出利用别构转录因子与其靶 DNA 片段以及效应物小分子的相互作用，将小分子的有无或浓度等信息转换为别构转录因子-靶 DNA-小分子三者相互作用的结合信号。目前最新报道的 aTF-NAST（aTF-based nicked DNA-template-assiated signal transduction）等系统进一步提高了尿酸和对羟基苯甲酸的灵敏度，但是样品分析周期长，成本高，难以实现快速，批量检测。因此，目前本领域仍然急需建立一种简单、快速、灵敏度高、特异性强以及适合于高通量体外检测小分子化合物的方法。

CRISPR/Cas 系统是细菌及古细菌在 RNA 引导下利用 Cas 蛋白抵御外源核酸入侵的过程中演化而来的一种获得性免疫防御机制。1978 年首次报道了一种功能未知的成簇的重复 DNA 序列，直至 2001 年正式命名为成簇规律间隔短回文重复序列（Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats, CRISPR）。随着近年来科研工作者的不懈探索，对 CRISPR 系统的分类和作用机制等得到初步解析并且已广泛应用于基因编辑、DNA 组装以及基因表达调控等各个领域。

根据 Cas（CRISPR-associated proteins, CRISPR 相关蛋白）基因的组成和效应蛋白的数量，CRISPR/Cas 系统被分为了 2 类 5 型；1 类 CRISPR/Cas 系统利用多个效应蛋白复合物干扰靶基因；2 类 CRISPR/Cas 系统利用单一的效应蛋白抵御外源核酸的入侵，因其简单高效受到广泛关注。其中，Cas9 和 Cas12a（也称为 Cpf1）作为 2 类 CRISPR/Cas 系统的典型，已成功应用于原核/真核细胞基因编辑和基因调控领域。近期基于 Cas12a 的反式切割活性，Doudna 团队开发的“DETECTR”（DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter）以及赵国屏团队表征的“HOLMES”（an one-HOur Low-cost Multipurpose highly Efficient System）的诊断系统，进一步推进了 CRISPR/Cas12a 系统在核酸检测领域的应用前景。但是目前仍未有将 CRISPR/Cas 系统用于检测小分子化合物的相关报道。

发明内容

在第一方面，本发明提供了一种用于检测小分子的生物传感器，所述生物传感器包含识别元件和换能元件，其中，

A：所述识别元件包含别构转录因子（aTF）和激活双链 DNA（激活 dsDNA），所述激活 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点（即，原型间隔区邻近基序，PAM）以及与向导 RNA 至少部分互补的序列，以及

所述换能元件包含所述 CRISPR/Cas12a 系统以及单链 DNA 探针（ssDNA 探针），所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白和所述向导 RNA（gRNA），所述 ssDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团；

或者

B：所述识别元件包含别构转录因子（aTF）和双链 DNA 探针（dsDNA 探针），所述 dsDNA 探针包含所述别构转录因子的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA（gRNA）至少部分互补的序列，并且所述 dsDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团，以及

所述换能元件包含所述 CRISPR/Cas12a 系统，所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述 gRNA。

在本发明的实施方式中，当所述生物传感器与目标小分子接触后，所述 aTF 与目标小分子的结合使得所述别构转录因子与所述激活 dsDNA 和/或 dsDNA 探针的结合亲和力升高或降低，从而使游离形式的激活 dsDNA 和/或 dsDNA 探针减少或增加；所述游离形式的激活 dsDNA 作为激活剂与 CRISPR/Cas12a 蛋白和所述 gRNA 形成三元复合物，从而激活 CRISPR/Cas12a 蛋白的反式 ssDNA 切割活性，使得 ssDNA 探针被切割并产生可检测的光信号，或者，所述游离形式的 dsDNA 探针被所述 gRNA 识别并被 CRISPR/Cas12a 蛋白通过顺式切割活性进行切割，从而产生可检测的光信号；通过所产生的光信号，可以对所述目标小分子的存在和/或含量进行检测。

在第二方面，本发明提供了一种用于检测小分子的试剂盒，所述试剂盒包含第一方面所述的生物传感器。在一些实施方式中，所述试剂盒还包含用于对光信号进行检测的检测元件。

在第三方面，本发明提供了一种对样品中的小分子进行检测的方法，所述方法包括：将所述样品与第一方面所述的生物传感器接触，以生成光信号，以及对所产生的光信号进行检测，从而检测所述样品中的小分子。

在第四方面，本发明提供了一种用于对小分子进行检测的组合物，所述组合物包含识别试剂和换能试剂，其中，

A：所述识别试剂包含别构转录因子（aTF）和激活双链 DNA（激活 dsDNA），所述激活 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA 至少部分互补的序列，以及

所述换能试剂包含所述 CRISPR/Cas12a 系统和单链 DNA 探针（ssDNA 探针），所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述向导 RNA（gRNA），所述 ssDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团；

或者

B：所述识别试剂包含 aTF 和双链 DNA 探针（dsDNA 探针），所述 dsDNA 探针包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA（gRNA）至少部分互补的序列，并且所述 dsDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团，以及

所述换能试剂包含 CRISPR/Cas12a 系统，所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述 gRNA。

在第五方面，本发明提供了一种用于检测小分子的试剂盒，所述试剂盒包含第五方面所述的组合物。

在第六方面，本发明提供了一种用于对小分子进行检测的方法，所述方法包括使用第五方面所述的组合物或第六方面的试剂盒与待测样品接触，以生成光信号，以及对所产生的光信号进行检测，从而检测所述小分子。

第七方面，本发明提供了第一方面所述的生物传感器、第四方面所述的组合物和第二方面或第五方面所述的试剂盒在检测小分子方面的用途。

有益效果

相比传统的小分子检测方法，本发明采用 aTF 与 CRISPR/Cas12a 介导的小分子检测工具

(**CRISPR/Cas12a- and aTF-mediated small molecule detector**，简称为“CaT-SMelor”)，通过目标小分子与 aTF 的结合使得 aTF 与双链 DNA 的亲和力变化以及 CRISPR/Cas12a 的顺式切割活性和反式单链 DNA 切割活性，对 dsDNA 探针和/或 ssDNA 探针进行切割，将目标小分子信号转变为相应的光信号，而不涉及 aTF-靶 DNA 结合的 DNA 转录调控过程。本发明所述的检测方法不仅操作简便、节约时间（至多 25 分钟，甚至只需要 5-10 分钟）和节约成本（每次反应只需不到 2 元），而且灵敏度高（检测极限降至 nM 级）、准确度高以及反应体系小（例如，血液样品仅需 1 μ L），可于 96 孔板或 384 孔板上进行操作，因此适合于诊断目的和非诊断目的的高通量精确检测。

附图说明

图 1 为根据本发明的一个实施方式，利用本发明的生物传感器进行小分子检测的原理示意图。在本实施方式中，为了便于后续操作和提高检测灵敏度，对 aTF 进行了固定化。具体而言，将 aTF 与纤维素结构域 (CBD) 融合表达，然后将融合蛋白 aTF-CBD 与微晶纤维素 (MC) 混合使其固定在 MC 上；融合蛋白 aTF-CBD 与激活 dsDNA 结合形成 aTF-CBD-DNA 复合物；小分子与 aTF 的结合导致 aTF 变构效应，使得激活 dsDNA 从 aTF 上脱离，得到游离形式的激活 dsDNA（也称为“游离 dsDNA”）；将游离形式的激活 dsDNA 加入 CRISPR/Cas12a 系统和 ssDNA 探针（报告子：FQ 标记的 ssDNA）中，游离的激活 dsDNA 激活 CRISPR/Cas12a 系统并使其反式切割探针，使得发出光信号（荧光信号）；然后对光信号进行检测。根据本发明的实施方式，使用的血液样品需求量较少（~1 μ L），而且反应体系体积小，可在 96/384 孔板上进行操作。使用酶标仪等常用仪器检测光信号，从而实现对小分子的定性/定量分析。

图 2 为说明根据本发明的实施方式，通过凝胶阻滞实验 (EMSA) 对实施例 1-实施例 2 中制备的融合蛋白 CBD-aTF (CBD-HucR、CBD-HosA 和 CBD-TetR) 与 dsDNA 的结合能力，以及在存在特定小分子的情况下 CBD-aTF-dsDNA 的解离的图。图 2A：融合蛋白 CBD-HosA、CBD-HucR 和 CBD-TetR 的结构示意图。别构转录因子 HucR、HosA 和 TetR 与 CBD 之间通过接头连接（所述接头的氨基酸序列可如 SEQ ID NO: 12 所示）；为了便于纯化和识别，融合蛋白上还具有 His 标签。图 2B-图 2C：示出了在不存在或存在尿酸的情况下，融合蛋白 CBD-HucR 与激活 dsDNA (dsDNA_(HucR)) 的结合的图（采用 EMSA 测量）。图 2D-图 2E：示出了在不存在或存在四环素的情况下，融合蛋白 CBD-TetR 与激活 dsDNA (dsDNA_(TetR)) 的结合的图（采用 EMSA 测量）。图 2F-图 2G：示出了在不存在或存在对羟基苯甲酸 (*p*-HBA) 的情况下，融合蛋白 CBD-HosA 与激活 dsDNA (dsDNA_(HosA)) 的结合的图（采用 EMSA 测量）。

图 3 为示出了根据本发明的一个实施方式，使用本发明实施例 1-实施例 2 的生物传感器检测靶小分子的图表。图 3A：示出了使用本发明实施例 1-实施例 2 的生物传感器检测小分子的流程图。图 3B：示出了在存在 500 μ M 尿酸及其结构类似物（腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤）的情况下，融合蛋白 CBD-HucR 与激活 dsDNA (dsDNA_(HucR)) 的结合的图（采用 EMSA 测量）。图 3C：示出了以 500 μ M 尿酸 (UA) 及其结构类似物（腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤）作为样品，使用本发明实施例 1 的尿酸生物传感器所检测到的荧光强度的图表，其中，以 40nM 游离的激活 dsDNA (dsDNA_(HucR)) 作为阳性对照 (PC)。图 3D：示出了在存在 1.8mM 对羟基苯甲酸 (*p*-HBA) 及其结构类似物（酪醇 (Tyrosol，也称为“对羟基苯乙醇”)、对氨基苯甲酸 (*p*-ABA)、对羟基苯甲酸甲酯 (*p*-MHB)、对羟基苯甲醇 (*p*-HBnOH)) 的情况下，融合蛋白 CBD-HosA 与激活 dsDNA (dsDNA_(HosA)) 的结合的图（采用 EMSA 测量）。图 3E：示出了以 1.8mM *p*-HBA 及其结构类似物 (Tyrosol、*p*-ABA、*p*-MHB、*p*-HBnOH) 作为样品，使用本发明实施例 2 的 *p*-HBA 生物传感器所检测到的荧光强度的图表，其中，以 40nM 游离的激活 dsDNA (dsDNA_(HosA)) 作为阳性对照 (PC)。

图 4 为示出了根据本发明的实施方式，使用本发明实施例 1-实施例 2 的生物传感器对靶小分子进行检测的图表。图 4A：不同浓度的激活 dsDNA 对荧光强度变化的影响的检测结果，并且取荧光值线性增加区间的斜率，以激活 dsDNA 浓度为横坐标，对应的斜率为纵坐标计算出表示激活 dsDNA 线性检测范围的回归方程。图 4B：不同浓度的尿酸对荧光强度变化的影响的检测结果，并且取荧光值线性增加区间的斜率，

以尿酸浓度为横坐标，对应的斜率为纵坐标计算出尿酸的线性检测范围为 25-500nM。图 4C：不同浓度的 *p-HBA* 对荧光强度变化的影响的检测结果，并且取荧光值线性增加区间的斜率，以 *p-HBA* 浓度为横坐标，对应的斜率为纵坐标计算出 *p-HBA* 的线性检测范围为 9-180nM。

图 5 为示出了根据本发明的实施方式，与传统尿酸浓度测量方法（HPLC 以及 Backman 试剂盒）相比，使用本发明实施例 1 的尿酸生物传感器对人血液样品中的尿酸浓度进行测定的图表。图 5A：示出了使用本发明的尿酸生物传感器与 HPLC 方法检测人血液样品的尿酸的图表。图 5B：示出了使用本发明的尿酸生物传感器与临床上使用的 Backman 试剂盒检测人血液样品中的尿酸的图表。图 5C：示例性地说明了在血液样品分析中使用本发明的生物传感器的流程图。

具体实施方式

以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是，此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明，并不用于限制本发明。在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值，这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说，各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间，以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围，这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

本发明利用本发明采用 CaT-SMclor，通过目标小分子与 aTF 的结合使得 aTF 与双链 DNA 的亲合力变化以及 CRISPR/Cas12a 的顺式切割活性和反式单链 DNA 切割活性，对 dsDNA 探针和/或 ssDNA 探针进行切割，将目标小分子信号转变为相应的光信号，实现对小分子的定性检测。进一步，本发明人发现，对于目标小分子而言，在一定浓度范围内，所产生的荧光曲线斜率的变化与小分子的浓度成正比，因此通过对含有目标小分子的样品的荧光曲线斜率进行测量可实现对样品中目标小分子的精确定量检测。

组合物

本发明提供了一种用于对小分子进行检测的组合物，所述组合物包含识别试剂和换能试剂，其中，

所述识别试剂包含别构转录因子（aTF）和双链 DNA（dsDNA），所述 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA 至少部分互补的序列；以及所述换能试剂包含所述 CRISPR/Cas12a 系统，

其中，所述组合物中还含有发光/生色基团。

在一个实施方式中，所述换能试剂进一步包含单链 DNA（ssDNA）。

具体而言，所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述向导 RNA（gRNA）。

在本发明的具体实施方式中，所述 dsDNA 可作为激活 dsDNA，或 dsDNA 探针。在另一实施方式中，所述 ssDNA 也可作为探针使用。在作为探针使用的情况中，所述 dsDNA 探针或 ssDNA 探针的两端可缀合有发光/生色基团及其淬灭基团。

在一个实施方式中，本发明的组合物包含识别试剂和换能试剂，所述识别试剂包含别构转录因子（aTF）和激活双链 DNA（激活 dsDNA），所述激活 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA 至少部分互补的序列，以及

所述换能试剂包含所述 CRISPR/Cas12a 系统和单链 DNA 探针（ssDNA 探针），所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述向导 RNA（gRNA），所述 ssDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团。

在另一实施方式中，本发明的组合物包含识别试剂和换能试剂，所述识别试剂包含 aTF 和双链 DNA 探针（dsDNA 探针），所述 dsDNA 探针包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA（gRNA）至少部分互补的序列，并且所述 dsDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团，以及

所述换能试剂包含 CRISPR/Cas12a 系统，所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述 gRNA。

在本发明的实施方式中，本发明的组合物可处于生物传感器的形式。

生物传感器

生物传感器 (biosensor) 通常被认为是对生物材料 (如组织、微生物细胞、细胞器、细胞受体、酶、抗体、核酸等) 或生物衍生材料或生物模拟材料进行分析的一类器件, 它将生物材料等与物理化学传感器或传感微系统 (可以是光学的、电化学的、热学的、压电的或磁学的) 密切结合或联系起来, 能够产生间断或连续的信号 (光信号、电信号等), 信号强度与被分析物成比例 (例如线性关系), 从而行使分析功能。在本领域中, 生物传感器具有通用的定义, 通常由两部分构成: 识别元件 (又称为分子识别元件) 和换能元件 (又称为换能器)。在本文中, 术语“生物传感器”即指包含识别元件和换能元件的器件或设备, 也称为“生物传感平台 (biosensing platform)”。不受理论地束缚, 本文所述的生物传感器可包括进一步提高检测灵敏度的放大元件和/或直接进行检测的检测元件。此外, 本文所述的生物传感器并不限于具体的形式, 只要包含下面描述的识别元件和换能元件的任何形式均包含在本文术语“生物传感器”的范围内。

识别试剂或识别元件

识别元件是生物传感器的关键元件, 其识别待分析物, 发生生物学反应, 直接决定传感器的功能与质量。在本文中, 所述识别元件包含 aTF 和激活 dsDNA, 或者 aTF 和 dsDNA 探针。

本发明所使用的术语“别构转录因子”具有本领域公知的含义。为适应外界环境的改变并及时做出应答, 微生物进化出别构蛋白 aTF 作为感知环境的重要输入元件, aTF 通常包含一个 DNA 结合结构域 (DBD) 和效应物结合结构域 (EBD), 其中效应物的结合改变 aTF 与靶基因序列的结合, 从而调控相关基因的表达, 快速响应外界的变化。根据 aTF 序列相似性以及结构和功能的不同, 可分为不同家族如 AraC、LacI、TetR 等, 这些 aTF 往往能够特异性感知各类小分子化合物, 对于维持新陈代谢的稳定发挥重要作用。

别构转录因子包含与效应物 (通常为小分子) 结合的结构域 (EBD) 以及 DNA 结合结构域 (DBD), 其与效应物的结合引起构象改变, 使得该别构转录因子和与其特异性相互作用的 DNA 片段 (天然状态下通常为启动子操纵序列) 的结合亲和力发生改变, 从而增强或减弱由该操纵序列控制的 DNA 序列的转录 (Nat Methods. 2016, 13(2): 177-183), 通过这样的方式使得基因的转录依赖于小分子的浓度。在原核生物中, 操纵序列通常出现在与代谢有关的操纵子或报告基因的上游; 别构转录因子常常起到针对细胞内效应物小分子的传感器的作用, 反馈小分子的浓度信息, 从而对细胞内的生物合成途径进行动态调控。在真核生物中, 此类别构转录因子常存在于控制细胞分化与个体发育的通路中。鉴于本发明中别构转录因子与 DNA 的相互作用发生在体外, 原核和真核来源的别构转录因子均可作为本发明的识别元件。在本发明中, 转录因子结合位点也称为转录因子作用位点、转录因子操作位点或转录因子结合基序。不希望被理论所限制, 转录因子作用位点通常为互补的双链 DNA。此外, 本领域技术人员应当知晓, 转录因子作用位点附近存在单个 3',5'-磷酸二酯键断裂 (缺口) 不影响别构转录因子与其作用位点的结合。

天然转录系统中转录因子作用位点的序列是已知的。不同物种的转录因子结合位点长度略有不同。转录因子结合位点在大肠杆菌中的平均长度为 24.5bp, 在果蝇中为 12.5bp (J Mol Biol. 1998, 284(2): 241-54; Nucleic Acids Res. 2003, 31(1): 374-8)。在本发明中, 转录因子作用位点的长度优选 10-40bp、更优选 15-25bp、最优选 17-19bp。与别构转录因子作用的 DNA 片段并不限于在天然系统中存在的别构转录因子作用位点。通过对作用位点序列进行随机或定向突变, 或者结合计算机模拟选出数条候选序列并验证别构转录因子与各 DNA 片段的结合能力是本领域成熟的技术 (Mol Microbiol. 2005, 55(3): 712-23.)。另外, 也可对别构转录因子的小分子结合结构域和/或 DNA 结合结构域进行突变, 优化别构转录因子与小分子和/或 DNA 的结合亲和力。可通过定向突变和进化, 提高别构转录因子和与该别构转录因子作用的 DNA 片段之间的平衡解离常数和/或降低别构转录因子与小分子之间的平衡解离常数, 进一步提高本发明传感器的灵敏度。

如上所述, 别构转录因子与小分子的结合可使得所述别构转录因子与靶 dsDNA 片段 (即包含别构转录因子作用位点的 DNA 片段, 在本文中也称为“激活 dsDNA”或“dsDNA 探针”) 的结合亲和力升高 (激活系统) 或降低 (阻遏系统)。在一些实施方式中, 本发明的别构转录因子为激活系统的别构转录因子。在该系统中, 别构转录因子与效应物小分子的结合使得其与靶 dsDNA 的结合亲和力增强 (即, 小分子的结合使得别构转录因子能够结合于靶 dsDNA 片段), 从而使游离的靶 dsDNA (即未与别构转录因子结合的靶 dsDNA) 的量减少。优选地, 所述别构转录因子与所述小分子结合后形成的转录因子-小分子复合体与所述靶 dsDNA 片段结合的平衡解离常数大于所述别构转录因子与所述靶 dsDNA 片段结合的平衡解离常

数；优选地，所述别构转录因子-小分子复合体与靶 dsDNA 片段结合的平衡解离常数是所述别构转录因子与所述靶 dsDNA 片段结合的平衡解离常数的 10-10000 倍、优选 20-5000 倍、更优选 50-1000 倍。在一些实施方式中，本发明的别构转录因子为阻遏系统的别构转录因子。在该系统中，别构转录因子与效应物小分子的结合使得其与靶 dsDNA 的结合亲和力减弱（即，小分子的结合使得别构转录因子从其作用位点处脱离，游离的靶 dsDNA 的量增加）。优选地，所述别构转录因子与所述小分子结合的平衡解离常数大于所述别构转录因子与所述靶 dsDNA 片段结合的平衡解离常数；优选地，所述别构转录因子与所述小分子结合的平衡解离常数是所述别构转录因子与本发明的别构转录因子为所述靶 dsDNA 片段结合的平衡解离常数的 10-10000 倍、优选 20-5000 倍、更优选 50-1000 倍。在一些实施方式中，所述别构转录因子和靶 dsDNA 作为组合物或结合成复合体提供。在另一些实施方式中，所述别构转录因子和靶 dsDNA 作为单独的化合物提供。应当特别指出的是，虽然在本发明的具体实施例中仅采用阻遏系统的别构转录因子，但是其仅仅是说明性的，而基于本申请的教导，本领域技术人员可根据实际需要采用不同的别构转录因子（例如其它的阻遏系统的别构转录因子或者激活系统的别构转录因子）来实施本发明。

本发明的生物传感器、组合物、试剂盒和方法可用于诊断用途或非诊断用途、或者非临床用途，例如用于环境污染监控、食品和化妆品质量控制和疾病诊断。在本发明中，作为检测对象的小分子为使得别构转录因子构象变化的效应物。一般而言，小分子的特征在于它具有大于约 50 道尔顿但小于约 5000 道尔顿（5kD）的分子量。优选小分子具有小于 1kD 的分子量。在本发明中，小分子可为例如环境指标、疾病指标或健康指标，包括但不限于重金属离子、毒素、药物、代谢物、污染物或上述物质的分解产物等。小分子可存在于环境中或为细菌、真菌、植物或动物源性，或者为人工合成。甚至对于不存在相对应的别构转录因子的效应物小分子，本领域技术人员能够通过计算机模拟设计将效应物结合结构域添加至 DNA 结合结构域，或改造天然转录因子的效应物结合结构域，构建人工的别构转录因子（Nat Methods. 2016, 13(2): 177-183）。

在本发明中，待检测的小分子可存在于任何液体样品或可通过适当操作转换为液体样品的固体样品中。样品可为环境样品，例如为地下水、中水、海水、废水、采矿废料的样品。或者，样品可为生物样品，特别是来自受试者的样品，例如以下样品中的一种或多种：血液、血清、血浆、痰、脑脊液流体、尿液、泪液、肺泡分离物、胸膜液、囊液、组织、唾液。样品也可来自于食品、饮用水、化妆品或饲料。

在一些实施方式中，可对样品进行预处理，从而对待检测的小分子进行富集和提取，或者去除可能干扰检测的杂质。例如，可通过离心、过滤、超声、匀浆化、加热、冷冻、解冻、机械处理或多种操作方法的组合，和/或加入预处理的试剂。本领域技术人员知晓针对特定样品的常见预处理方法和预处理试剂。例如，常用的预处理试剂包括表面活性剂和洗涤剂、盐、细胞裂解剂、抗凝血剂、降解酶（例如蛋白酶、脂酶、核酸酶、脂肪酶、胶原酶、纤维素酶、淀粉酶等）以及溶液（例如缓冲液）等。

表 1 列出了多种别构转录因子、与其相互作用的 DNA 序列及对应的效应物小分子。本领域技术人员能够理解的是，用于本发明的别构转录因子并不限于所列举的这些。另外，也可对与所列举的别构转录因子相互作用的 DNA 序列的一个或多个碱基进行替换、删除或加入一个或多个碱基，从而改变别构转录因子和与其相互作用的 DNA 序列的结合强度。

表 1：示例性的别构转录因子、与其相互作用的 DNA 序列以及所对应的效应物

别构转录因子	效应物	与别构转录因子作用的天然 DNA 序列	来源[参考文献]
HucR	尿酸	TACTTAGATGTCTACCTA	耐辐射奇球菌 (<i>Deinococcus radiodurans</i>) ^[1]
BetI	胆碱	TTAATTGAACGTTCAATTAA	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) BL21-AI ^[2]
AguR	胍基丁胺	GTCCGATTTTTATCGGAT	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) PAO1 ^[3]
BepR	脱氧胆酸盐	AAAGTAAACTCGTTGGTGTACT	霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholerae</i>) ^[4]

HrtR	亚铁血红素	ATGACACAGTGTCA TAA	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>) ^[5]
RutR	尿嘧啶	TGGACTAAACGGTC AA	大肠杆菌 ^[6]
MerR	汞	TATCGCTTGA CTCC GTACATGAGTACGG AAGTAAGGT	假单胞菌转座子 Tn501 ^[7]
ArsR	亚砷酸盐	ACACATTCGTTAAG TCATATATGTTTTG ACTT	大肠杆菌 K12 ^[8]
CadC	锌/镉	CACTCAAATAAATAT TTGAATG	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) ^[9]
CadC1945	铅	TATATTCAAACATAC ACTTGAATAAA	海洋沉积物芽孢杆菌 (<i>Bacillus oceanisediminis</i>) 2691 ^[10]
OtrR	土霉素	TTGACAAGGTCTTG TCGTT	龟裂链霉菌 (<i>Streptomyces rimosus</i>) ^[11]
PmeR	类黄酮	TTACAAACAACCGC AATGTAA	丁香假单胞菌 (<i>Pseudomonas syringae</i>) ^[12]
MphR	红霉素	GAATATAACCGACG TGACTGTTACATTTA G	大肠杆菌 Tf481A ^[13]
Pip	普那霉素	TGTACAGCGTATAG GAAAGC	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>) ^[14]
NalC	氯化酚类	TAAGAACTGTATCG TACAGTACT	铜绿假单胞菌 PAO1 ^[15]
HosA	4-羟基苯甲酸	GTTCGTATACGAAC	大肠杆菌 UMN026 ^[16]
HcaR	羟基肉桂酸; 3,4-二羟基苯甲酸	CAATATCAGTTAAA CTTACATTG	不动杆菌属 <i>ADP1</i> ^[17]
RolR	间苯二酚	TGAACCTTGTTCAT TTTATGAATCATGAT TCA	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ^[18]
SmeT	三氯生	GTTTACAAACAAAC AAGCATGTATGTATA T	嗜麦芽寡养单胞菌 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>) ^[19]
TetR	四环素	TCTATCATTGATAGG	大肠杆菌 ^[20]
AvaR1	avenolide	AAACCGTCTAGTAC GTAT	阿维链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>) ^[21]

在本发明的一些实施方式中,所述识别元件包含可固定在介质上的别构转录因子和/或可固定在介质上的激活 dsDNA 或 dsDNA 探针。在一些实施方式中,所述识别元件包含可固定在介质上的别构转录因子。在一些实施方式中,所述识别元件包含可固定在介质上的激活 dsDNA 或 dsDNA 探针。在一些实施方式中,所述识别元件包含可固定在介质上的别构转录因子和可固定在介质上的激活 dsDNA 或 dsDNA 探针。术语“介质”是指支撑各个元件并为各个元件提供反应空间从而便于携带、运输、包装或操作的物质。本领域技术人员通常通过固定化技术将需要固定的元件固定在介质上,例如吸附法、共价键合法、物理包埋法和交联法等本领域通常使用的方法。介质的实例包括但不限于硝化纤维素膜或尼龙膜、亲和柱层析基质、磁珠、固体填料、微晶纤维素、或可商购的蛋白质固定化介质等。在优选的实施方式中,所述介质为微晶纤

纤维素。在一些优选的实施方式中，本发明所述的识别元件包含可固定在微晶纤维素上的别构转录因子。在进一步优选的实施方式中，所述可固定在微晶纤维素上的别构转录因子是与纤维素结构域（以下简称“CBD”）融合表达的别构转录因子，该融合蛋白通过 CBD 与微晶纤维素之间的吸附作用而可固定在微晶纤维素上。

在本发明的一些实施方式中，所述识别元件包含与 CBD 融合蛋白表达的别构转录因子。如具体实施例所示的，本发明人将纤维素结构域与别构转录因子进行融合表达，从而获得可固定在微晶纤维素上的融合蛋白。例如，此类融合蛋白的结构示意图如图 2A 所示，将别构转录因子（如 HucR、HosA、TetR，其氨基酸序列可分别如 SEQ ID NOs: 1-3 所示）与 CBD（其氨基酸序列可如 SEQ ID NO: 4 所示）以接头连接。所述接头的目的仅仅是将 aTF 与 CBD 连接起来，其氨基酸序列可如图 2A 所示（SEQ ID NO: 12），但并不限于此，本领域技术人员可根据实际需要选择其它接头。本发明人通过实验证实了，结构转录因子以融合蛋白形式表达（CBD-HucR、CBD-HosA 和 CBD-TetR）并没有不利地影响其与激活 dsDNA 的结合能力以及变构活性（如图 2B-图 2G 所示）。并且，比较融合蛋白和单独表达的别构转录因子之间的 DNA 结合能力和变构活性，发现两者之间也没有明显区别。这说明 CBD 仅仅起到将别构转录因子固定至微晶纤维素的目的，而并不对别构转录因子的功能产生影响。将别构转录因子与 CBD 融合表达并纯化的方法是本领域熟知的。例如，将编码氨基酸序列如 SEQ ID NOs: 1-3 所示的别构转录因子的基因和编码氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示的纤维素结构域的基因克隆至表达载体（例如含有 His-标签的 pET23b 载体）上，构建 pET23b-aTF-CBD 质粒；将该质粒转入表达菌（大肠杆菌 BL21），诱导表达即可获得融合蛋白。进一步，可采用亲和柱层析、快速蛋白液相色谱等本领域通常使用的蛋白质纯化方法进行纯化。在本发明中，融合蛋白包含经纯化的融合蛋白。不受具体理论的束缚，也可将本发明的其它元件（例如下文所述的换能元件或检测元件）固定在介质上，本领域技术人员可根据实际需要进行修改或改进，这些改进或修改也包含在本发明的范围内。

本发明所使用的术语“激活 dsDNA”或“激活 dsDNA 片段”为包含别构转录因子作用位点、CRISPR/Cas12a 蛋白识别位点 PAM 的 DNA 片段和与 gRNA 至少部分互补的序列的核苷酸，其至少在别构转录因子作用位点、CRISPR/Cas12a 蛋白识别位点和与 gRNA 至少部分互补的序列处为双链。所述激活 dsDNA 可作为激活剂激活 CRISPR/Cas12a 系统的反式切割活性，因此在本文中将其称为“激活 dsDNA”，也因其介导换能元件启动，也可被称为“换能 DNA”。在本发明中，所述激活 dsDNA 的长度优选为 20-80bp、更优选 55-65bp，最优选 58-60bp。其中，关于别构转录因子结合位点的定义如上所述。

本文所述的 CRISPR/Cas12a 蛋白识别位点 PAM 是指可被 CRISPR/Cas12a 系统识别并因此激活 CRISPR/Cas12a 系统的切割活性的序列，该序列称为原型间隔区邻近基序（PAM），一般富含 T（对于 CRISPR/Cas12a）。

在本发明中，PAM 的长度优选 3-8bp、更优选 3-6bp、最优选 4bp。PAM 序列并不限于在天然系统中存在的 PAM。通过对作用位点序列进行随机或定向突变，或者结合计算机模拟选出数条候选序列并验证 PAM 与 CRISPR/Cas12a 的结合能力是本领域已知的技术。例如，在本发明的实施方式中，所述激活 dsDNA 中的别构转录因子作用位点的核苷酸序列以及 PAM 序列如下所示（SEQ ID NO: 5-7）：

tactgagccatgtatccaggtcattg**TACTTAGATGTCTACCTA**agctctgacagttcca、

tactgagccatgtatccaggtcattg**CGTTCGTATACGAACA**gtagctctgacagttcca、

tgagccatgtatccaggtcattg**TCCCTATCAGTGATAGAGA**agctctgacagttcca（其中，下划线部分为 PAM，黑体部分为别构转录因子结合位点，所述别构转录因子结合位点即为与 gRNA 互补的部分）。

在本发明中，所述与 gRNA “至少部分互补”是指与所述 gRNA 至少 50%以上互补，例如至少 70%以上互补，例如 80%、85%、90%、95%、99%以上或 100%互补的序列。

在本发明的实施方式中，在激活 dsDNA 中，所述与 gRNA 至少部分互补的序列可在转录因子结合位点和 PAM 之前、之后或者之间，或者与转录因子结合位点和/或 PAM 至少部分重叠，或者位于别构转录因子结合位点之内。例如，在激活 dsDNA 中，别构转录因子结合位点即为所述与 gRNA 至少部分互补的序列。因此，在一个优选的实施方式中，激活 dsDNA 中可仅包含 PAM 和别构转录因子结合位点（其中，含有与 gRNA 互补的序列）。因此，激活 dsDNA 的长度可低至 13 或 14bp。

在本发明中，在“激活 dsDNA”中，所述别构转录因子作用位点与 PAM 序列之间可间隔数个核苷酸，例如可间隔 0-20bp、更优选 5-10bp、最优选 6-9bp。在一个实施方式中，所述别构转录因子作用位点与 PAM 序列之间可直接连接，或者可部分或完全重叠。或者，PAM 序列可位于别构转录因子作用位点中。

在本文中，所述“激活 dsDNA”上同时存在别构转录因子作用位点和 CRISPR/Cas12a 蛋白识别位点 PAM，因而可以同时与别构转录因子和 Cas12a 蛋白结合。所述别构转录因子与所述激活 dsDNA 片段结合的平衡解离常数可高于、低于或相似于所述与 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述激活 dsDNA 片段结合的平衡解离常数。在本发明的一些实施方式中，所述别构转录因子与所述激活 dsDNA 片段结合的平衡解离常数低于所述 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述激活 dsDNA 片段结合的平衡解离常数，即相比于别构转录因子，所述激活 DNA 片段更容易结合至 CRISPR/Cas12a 蛋白。因此为了减少别构转录因子和 CRISPR/Cas12a 系统对彼此功能的干扰，降低噪音、提高灵敏度，本发明的别构转录因子和 CRISPR/Cas 系统可以单独的形式提供并且在不同的空间进行反应。在一些实施方式中，所述激活 dsDNA 可通过如下方法制备：例如采用靶向特定别构转录因子作用位点和 CRISPR/Cas 蛋白识别位点的引物对（例如，核苷酸序列如 SEQ ID NOs: 5-18、6-19 或 7-20 所示）通过退火（例如 95℃预变性 5min；95℃变性 30s，每个循环降低 1℃，70 个循环；25℃保存）形成双链 DNA；或者也可通过人工合成，例如人工合成核苷酸序列如 SEQ ID NOs: 5-7 所示的双链 DNA。所述激活 dsDNA 也可通过本领域已知的其它方式进行制备。

在一个实施方式中，为了避免在相同反应体系中 aTF 与 CRISPR/Cas12a 蛋白竞争性结合激活 dsDNA，可通过将 aTF 与不影响其活性的其它蛋白（例如，CBD）融合表达，或者使得激活 dsDNA 中别构转录因子作用位点与 PAM 序列存在重叠。

在本文中可互换使用的“探针”或“DNA 探针”是指与 gRNA 互补，并被所述 CRISPR/Cas12a 系统切割并且具有在被切割后可产生可检测光信号的基团（在本文中也称为“标记”）的核苷酸序列。在一些实施方式中，所述探针具有双链区域，或者为双链 DNA 探针（均称为 dsDNA 探针），所述双链 DNA 区域含有别构转录因子作用位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 和可被 gRNA 和/或 crRNA 识别的特定核苷酸序列，即与 gRNA 和/或 crRNA 至少互补的序列。在一个实施方式中，所述 dsDNA 探针的长度例如为 13-100bp、更优选 20-50bp、最优选 20-30bp。其中，关于别构转录因子结合位点的定义如上所述。在具体的实施方式中，dsDNA 探针的核苷酸序列部分可与所述激活 dsDNA 相同。在本发明中，可被 gRNA 和/或 crRNA 识别的序列长度优选 15-70bp、更优选 15-30bp、最优选 17-24bp。在优选的实施方式中，dsDNA 探针包含与 gRNA 和/或 crRNA 至少 70%以上互补，例如 80%、85%、90%、95%、99%以上或 100%互补的序列。

在本发明中，在“dsDNA 探针”中，所述别构转录因子作用位点与可被 gRNA 和/或 crRNA 识别的序列之间可间隔数个核苷酸，例如可间隔 0-20bp、更优选 5-10bp、最优选 6-9bp。在一个实施方式中，所述别构转录因子作用位点与可被 gRNA 和/或 crRNA 识别的序列之间可直接连接，或者可部分或完全重叠。或者，可被 gRNA 和/或 crRNA 识别的序列可位于别构转录因子作用位点中。

所述在一些实施方式中，所述探针是单链 DNA，所述单链 DNA 可以为任意核苷酸序列，例如长度为约 10-30bp、优选约 20bp 的核苷酸序列，如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列。不受具体理论的限制，在本发明的激活 DNA 是双链 DNA 且可设计成被 gRNA 和/或 crRNA 所识别的情况下，根据本发明的意图和原理，本领域技术人员可将本发明的激活 dsDNA 设计成双链 DNA 探针（例如在激活 DNA 两端进行荧光标记）来实施本发明，这一修改也应包括在本发明的范围内。

换能试剂或换能元件

在本文中，所述“CRISPR/Cas 系统”是指 2 类 CRISPR/Cas 系统，其利用单一的效应蛋白抵御外源核酸的入侵，能够简单高效进行基因编辑和核酸检测。其中，最典型的 2 类 CRISPR/Cas 系统是 CRISPR/Cas12a（Cpf1）系统。在本文中，CRISPR/Cas 系统通常至少包含 CRISPR/Cas 蛋白和向导 RNA。CRISPR（成簇规律间隔短回文重复）是含有短碱基序列重复的原核 DNA 片段。每个重复之后是来自以前暴露于细菌病毒或质粒的“间隔子 DNA”的短片段。Cas（CRISPR 相关蛋白）是一种 RNA（向导 RNA）引导的 DNA 核酸内切酶。向导 RNA（gRNA 或 sgRNA）是引导 CRISPR/Cas 蛋白识别和切割目标核酸分子的特定 RNA 序列，可通过体外转录或者人工化学合成。向导 RNA 可由 CRISPR RNA（crRNA）和反式激活 crRNA

(tracrRNA) 杂交形成, 或者可作为单独的连续 RNA 提供。gRNA 经由 crRNA 部分中的靶特异性序列 (例如, 间隔序列 “间隔子”) 特异性结合至互补靶序列, 而 CRISPR/Cas 蛋白自身结合至 PAM, 然后 Cas 核酸酶介导靶核酸 (例如 DNA 探针) 的切割。然而, 对于 CRISPR/Cas12a, 仅需要 crRNA 引导即可, 而不需要 tracrRNA; 并且 CRISPR/Cas12a 不仅对特定序列的 DNA 双链 (dsDNA, 其含有与 crRNA 互补的序列被 crRNA 所识别) 进行切割而且在被特定序列的 DNA 双链 (如本文的激活 DNA) 激活形成 CRISPR/Cas/dsDNA 三元复合物时可对任意的单链 DNA (ssDNA) 进行切割。这些特性使得 CRISPR/Cas12a 能够提高检测的灵敏性、特异性和速度。因此, 在一些实施方式中, CRISPR/Cas12a 系统是优选的。就本发明人所知, Cas12a 自身并不能用于在疾病诊断、药物研发、食品安全以及环境监测等各个领域对小分子化合物进行检测。而在本发明中, 本发明人借助识别元件 (别构转录因子-激活 dsDNA 复合体), 当激活 dsDNA 上的 PAM 结合 CRISPR/Cas 蛋白激活 CRISPR/Cas 对探针 (靶核酸) 进行切割, 从而产生可检测的光信号, 得以实现对小分子化合物的检测。

在本发明中, gRNA 的长度优选 20-70bp、更优选 30-50bp、最优选 38-45bp。gRNA 可基于使用者的需求进行设计。优选结合生物信息学软件来进行设计。在一些实施方式中, 所述光信号包括荧光信号或吸收光信号。本领域技术人员应当理解, 为了量化在分析中出现的颜色变化, 通常采用特定波长的光进行激发后检测吸收光强度。因此, 在本发明中, 术语 “吸收光信号” 也可指产生的颜色变化 (比色分析)。在一些实施方式中, 所述探针可携带标记从而在被 CRISPR/Cas 切割后产生可检测的光信号。标记的实例包括但不限于: 发光有机化合物 (如荧光素、萝卜素)、发光无机化合物 (例如, 化学染料)、荧光团 (如 FAM 荧光团) 等; 纳米颗粒和量子点等; 或者生色团等。利用上述物质对核酸序列进行标记使其产生可检测的光信号的技术是本领域技术人员熟知的, 并且可根据实际需要进行选择和改进, 这一点并不会对本发明进行限制。在一些优选的实施方式中, 所述光信号为荧光信号。在进一步优选的实施方式中, 所述标记为发光团和淬灭团, 分别标记在探针的两端 (3'端或 5'端)。优选地, 所述发光团为 FAM 荧光团, 所述淬灭团为 BHQ 荧光淬灭团。在另一些优选的实施方式中, 所述光信号为吸收光信号。在进一步优选的实施方式中, 所述标记为生色团和淬灭团, 分别标记在探针的两端 (3'端或 5'端)。

检测元件

在本发明中, 利用各种检测设备对上述光信号进行检测是本领域技术人员所熟知的。

检测方法

在本发明的实施方式中, 使用本发明所述的生物感受器或本发明所述的组合物对样品中的小分子进行检测。在本发明中, 可对样品中的小分子进行定性或定量检测。

本发明提供了一种对待测样品中的小分子进行检测的方法, 所述方法包括:

将待测样品与识别试剂进行混合并孵育; 从所得的混合物中分离游离的 dsDNA 片段; 将分离的游离 dsDNA 加入换能试剂中, 并检测所产生的光信号; 以及, 基于所产生的信号来检测所述小分子的存在或含量。

在一个实施方式中, 本发明提供了一种对待测样品中的小分子进行检测的方法, 所述方法包括:

(1) 将待测样品、aTF 和 dsDNA 进行混合并孵育; (2) 从所得的混合物中分离游离的 dsDNA 片段; (3) 将分离的游离 dsDNA 加入 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA 中, 并检测所产生的光信号; 以及 (4) 基于所产生的信号来检测所述小分子的存在或含量。

在一个方面, 本发明提供了一种对待测样品中的小分子进行检测的方法, 所述方法包括:

(1) 将待测样品、aTF 和激活 dsDNA 片段进行混合并孵育;
(2) 从步骤 (1) 中的混合物分离游离的激活 dsDNA 片段;
(3) 向步骤 (2) 中分离的游离激活 DNA 片段中加入 CRISPR/Cas12a 蛋白、向导 RNA 和 ssDNA 探针, 并检测所产生的光信号; 以及
(4) 基于所产生的信号, 对所述小分子的存在或含量进行检测。

在另一方面, 本发明提供了一种对待测样品中的小分子进行检测的方法, 所述方法包括:

- (1) 将待测样品、aTF 和 dsDNA 探针进行混合并孵育；
- (2) 从步骤(1)中的混合物分离游离的 dsDNA 探针；
- (3) 向步骤(2)中分离的游离 dsDNA 探针中加入 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA，并检测所产生的光信号；以及
- (4) 基于所产生的信号，对所述小分子的存在或含量进行检测。

其中，步骤(1)中进行混合和孵育的具体条件可由本领域技术人员根据实际需要选择，只要保证别构转录因子和激活 dsDNA 或 dsDNA 探针能充分结合成复合体并且待测样品中的特定小分子化合物可以与别构转录因子-激活 dsDNA 或 dsDNA 探针复合物充分结合即可，例如在室温下反应 1min 以上，例如 15-20min（但不限于此）。对于别构转录因子和激活 dsDNA 或 dsDNA 探针的比例，根据实际需求可以进行调整。在本发明的一些实施方式中，别构转录因子和激活 dsDNA 或 dsDNA 探针的摩尔比 $\geq 5:1$ 是优选的，此时，别构转录因子可与激活 dsDNA 或 dsDNA 探针完全结合形成蛋白-DNA 复合物。

在一些实施方式中，所述别构转录因子为阻遏系统的别构转录因子（即，当小分子与别构转录因子结合时，别构转录因子与靶 dsDNA 的结合亲和力减弱，使得靶 dsDNA 从 aTF-DNA 复合体脱离），当加入待测样品后，游离的 dsDNA 含量增加。因此，在一个优选实施方式中，为了减少背景噪音，提高本发明的灵敏度，先将别构转录因子与 dsDNA 混合形成 aTF-dsDNA 复合体，然后移除未结合的 dsDNA，再加入待测样品。在这一实施方式中，由于加入待测样品之前，别构转录因子与 dsDNA 完全结合成 aTF-dsDNA 复合体，而基本上不存在游离的 dsDNA，则加入待测样品后游离出来的 dsDNA 直接反映待测样品中的小分子的存在或含量。

在另一些实施方式中，所述别构转录因子为激活系统的别构转录因子（即，当小分子与别构转录因子结合时，别构转录因子与 dsDNA 的结合亲和力增强，使得 dsDNA 与别构转录因子结合成更多的 aTF-dsDNA 复合体），当加入待测样品后，游离的 dsDNA 含量减少。本领域技术人员应理解的是，在这样的实施方式中，在步骤(1)之前应确定加入的 dsDNA 的量，由计算出减少的游离 dsDNA 间接反映待测样品中的小分子的存在或含量。在一些实施方式中，可在将 dsDNA 与别构转录因子混合之前、同时或之后加入待测样品。

在一个优选的实施方式中，所述别构转录因子是可固定在介质上的别构转录因子。因此，在步骤(1)中可进一步包括加入介质，例如，当所述可固定在介质上的别构转录因子是与纤维素结构域融合表达的别构转录因子时，所述介质为微晶纤维素。优选地，在加入待测样品和 dsDNA 之前，使别构转录因子与介质预先结合，将别构转录因子固定在介质上，便于后续操作。例如，将可商购的介质（例如微晶纤维素）与可固定在介质上的别构转录因子（例如与纤维素结构域融合表达的别构转录因子）混合并孵育，进行混合和孵育的具体条件可由本领域技术人员根据实际需要选择，只要保证与可固定在介质上的别构转录因子可充分固定在所述介质上即可，例如室温反应 5-15min（但不限于此）。优选地，在加入待测样品和 dsDNA 之前，将未固定的别构转录因子除去。进一步，可对固定在介质上的别构转录因子的含量或浓度进行测定，例如使用本领域已知的蛋白质浓度检测方法（如使用 Bradford 分析试剂盒）。

步骤(2)中将游离 dsDNA 与步骤(1)中的蛋白质、小分子化合物和核酸混合物分离的方法是本领域熟知的，例如包括但不限于离心、沉降、磁珠法、层析法、亲和柱法等等。本领域技术人员可以根据实际情况选择具体的分离方法和参数，这一点并不会对本发明进行限制。在所述别构转录因子是可固定在介质上的别构转录因子的实施方式中，仅仅通过过滤或离心（例如室温下，7000rpm）即可将游离的 dsDNA 片段分离，操作简单、节约时间和成本，在经济上是可行的。也可省略步骤(2)的分离步骤，直接在步骤(1)的混合物中加入 CRISPR/Cas12a 系统和任选的 ssDNA 探针。

步骤(3)中，采用本领域中常用的检测荧光信号或吸收光信号的方法和仪器来检测产生的光信号。例如，当产生的信号为荧光信号时，采用酶标仪来测量。应当指出的是，当对所需检测的样品或小分子化合物进行定性分析时，产生的颜色变化（如上文所述，包括在“吸收光信号”的范围内）可不进行量化分析，而仅仅进行比色分析，这一点也在本发明请求保护的范围内。

步骤(4)中，可基于参比水平，对所产生的信号进行分析，从而对所述小分子的存在或含量进行检测。所述“参比水平”在本发明中与“参比样品”、“参照水平”可互换使用，是指条件的对照。例如，在

对小分子进行定性检测（检测存在或不存在）的上下文中，参比水平可以是不含所述小分子的样品的水平。在对小分子进行定量检测（检测含量）的上下文中，参比水平可以是含有已知量的小分子的样品的水平。就对包含小分子的样本的存在和含量进行确定而言，参比水平是参照值，能够将样品归一化至合适的标准，以推断样品中小分子的存在、不存在或含量。在一些实施方式中，参比水平可以是之前确定的水平，例如可以是预先确定的数量或比例，而不需要以本文所述的检测方法的相同的物理迭代进行确定。

在本发明中，所述样品以及所述试剂可处于溶液形式，所述溶液只要不影响 aTF 与效应物/dsDNA 结合和 CRISPR/Cas12a 的切割即可。本领域技术人员可根据实际应用或需求对其进行选择或调整。

试剂盒

本发明还提供了一种检测小分子的试剂盒，所述试剂盒包含本发明所述的生物传感器以及检测元件。在本文中，所述检测元件是指对本发明的生物传感器产生的光信号进行检测的元件、设备或系统。在一些实施方式中，所述检测元件用于通过荧光分析或吸收光分析（包括比色分析）对所述 DNA 探针产生的光信号进行分析，从而获得对小分子的定性或定量检测结果。

另一方面，本发明还提供了一种检测小分子的试剂盒，所述试剂盒包含本发明所述的试剂以及检测试剂。在本发明中，所述检测试剂是指对使用本发明的试剂所产生的光信号进行检测的试剂。在一些实施方式中，所述检测试剂用于通过荧光分析或吸收光分析（包括比色分析）对所述 DNA 探针产生的光信号进行分析，从而获得对小分子的定性或定量检测结果。

在一些实施方式中，本发明所述的试剂盒进一步包含使用本发明的生物传感器和/或试剂检测小分子的递送工具或装置（例如移液枪）、洗涤缓冲液、稀释缓冲液、终止缓冲液（例如，用于终止显色）、微滴定板（例如 96 孔或 384 孔，用于进行反应和检测）、一个或多个容器、记载使用说明的数据载体（例如说明书或计算机可读介质）、标准品（例如含有已知量的小分子的样品），以及它们的组合等等。

本文所述各方面的实施方式可由如下编号的段落说明：

1. 一种用于检测小分子的组合物，所述组合物包含识别试剂和换能试剂，其中，所述识别试剂包含别构转录因子（aTF）和双链 DNA（dsDNA）；以及所述换能试剂包含 CRISPR/Cas12a 系统，其中，所述 CRISPR/Cas12a 系统具有向导 RNA，其中，所述 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、所述 CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与所述向导 RNA 至少部分互补的序列，其中，所述组合物中还含有发光/生色基团，所述发光/生色基团连接至能够被所述 CRISPR/Cas12a 系统切割的核酸。
2. 如段落 1 所述的组合物，其中，所述换能试剂进一步包含单链 DNA（ssDNA）。
3. 如段落 1 或 2 所述的组合物，其中，所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述向导 RNA（gRNA）。
4. 如段落 1-3 任一段所述的组合物，其中，所述 dsDNA 为激活 dsDNA。
5. 如段落 1-4 任一段所述的组合物，其中，所述 dsDNA 为 dsDNA 探针，并具有发光/生色基团及其淬灭基团。
6. 如段落 2 所述的组合物，其中，所述 ssDNA 为 ssDNA 探针，并具有发光/生色基团及其淬灭基团。
7. 如段落 5 或 6 所述的组合物，其中，所述 dsDNA 探针或所述 ssDNA 探针的两端缀合有发光/生色基团及其淬灭基团。
8. 如段落 1-7 中任一段所述的组合物，其中，所述小分子具有 50-5000 道尔顿、优选 50-1000 道尔顿的分子量。
9. 如段落 1-8 中任一段所述的组合物，其中，所述小分子为重金属离子、毒素、药物、代谢物、污染物或上述物质的分解产物。
10. 如段落 1-9 中任一段所述的组合物，其中，所述小分子的存在通过所述 aTF 与所述 dsDNA 触发 CRISPR/Cas12a 的切割活性。

11. 如段落 1-10 中任一段所述的组合物,其中,所述转录因子结合位点的长度为 10-40bp、优选 15-25bp、更优选 17-19bp。

12. 如段落 1-11 中任一段所述的组合物,其中,所述识别试剂包含可固定在介质上的别构转录因子和/或可固定在介质上的 dsDNA。

13. 如段落 1-12 中任一段所述的组合物,其中,所述识别试剂包含可固定在介质上的别构转录因子。

14. 如段落 1-13 中任一段所述的组合物,其中,所述介质选自由如下所组成的组:硝化纤维素膜或尼龙膜、亲和柱层析基质、磁珠、固体填料、微晶纤维素、或可商购的蛋白质固定化介质。

15. 如段落 13 所述的组合物,其中,所述识别试剂包含可固定在微晶纤维素上的与微晶纤维素结构域融合表达的别构转录因子。

16. 如段落 1-15 中任一段所述的组合物,其中,所述 dsDNA 的长度为 20-80bp、更优选 55-65bp,最优选 58-60bp。

17. 如段落 1-16 中任一段所述的组合物,其中,所述识别试剂和所述换能试剂以单独的形式提供并且在不同的空间进行反应。

18. 如段落 6-17 中任一段所述的组合物,其中,所述 ssDNA 探针是长度为 10-30bp 任意单链 DNA

19. 如段落 6-17 中任一段所述的组合物,其中,所述 ssDNA 探针是长度为 20bp 的任意单链 DNA。

20. 如段落 1-12 中任一段所述的组合物,其中,所述发光/生色基团选自由如下所组成的组:发光有机化合物、发光无机化合物、荧光团、纳米颗粒、量子点和生色团,以及它们的组合。

21. 如段落 1 所述的组合物,其中,所述组合物包含识别试剂和换能试剂,其中:

所述识别试剂包含别构转录因子(aTF)和激活双链 DNA(激活 dsDNA),所述激活 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA 至少部分互补的序列,以及

所述换能试剂包含所述 CRISPR/Cas12a 系统和单链 DNA 探针(ssDNA 探针),所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述向导 RNA(gRNA),所述 ssDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团;

22. 如段落 1 所述的组合物,其中,所述组合物包含识别试剂和换能试剂,其中:

所述识别试剂包含 aTF 和双链 DNA 探针(dsDNA 探针),所述 dsDNA 探针包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA(gRNA)至少部分互补的序列,并且所述 dsDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团,以及

所述换能试剂包含 CRISPR/Cas12a 系统,所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述 gRNA。

23. 如段落 1 所述的组合物,其中,所述组合物处于生物传感器的形式。

24. 如段落 23 所述的组合物,其中,所述生物传感器包含识别元件和换能元件,其中,

所述识别元件包含别构转录因子(aTF)和双链 DNA(dsDNA),所述 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA 至少部分互补的序列;以及所述换能元件包含所述 CRISPR/Cas12a 系统,

其中,所述生物传感器中还含有发光/生色基团。

25. 如段落 24 所述的组合物,其中,所述换能元件进一步包含单链 DNA(ssDNA)。

26. 如段落 24 或 25 所述的组合物,其中,所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述向导 RNA(gRNA)。

27. 如段落 24-26 任一段所述的组合物,其中,所述 dsDNA 为激活 dsDNA。

28. 如段落 24-26 任一段所述的组合物,其中,所述 dsDNA 为 dsDNA 探针,并具有发光/生色基团及其淬灭基团。

29. 如段落 25 所述的组合物, 其中, 所述 ssDNA 为 ssDNA 探针, 并具有发光/生色基团及其淬灭基团。

30. 如段落 28 或 29 所述的组合物, 其中, 所述 dsDNA 探针或所述 ssDNA 探针的两端缀合有发光/生色基团及其淬灭基团。

31. 如段落 24 所述的组合物, 其中, 所述识别元件包含别构转录因子 (aTF) 和激活双链 DNA (激活 dsDNA), 所述激活 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 (即, 原型间隔区邻近基序, PAM) 以及与向导 RNA 至少部分互补的序列, 以及

所述换能元件包含所述 CRISPR/Cas12a 系统以及单链 DNA 探针 (ssDNA 探针), 所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述向导 RNA (gRNA), 所述 ssDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团;

32. 如段落 24 所述的组合物, 其中, 所述识别元件包含别构转录因子 (aTF) 和双链 DNA 探针 (dsDNA 探针), 所述 dsDNA 探针包含所述别构转录因子的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA (gRNA) 至少部分互补互补的序列, 并且所述 dsDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团, 以及

所述换能元件包含所述 CRISPR/Cas12a 系统, 所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述 gRNA。

33. 如段落 1-32 中任一段所述的组合物, 其中, 所述识别试剂和所述换能试剂以单独的形式提供并且在不同的空间进行反应。

34. 如段落 21 所述的组合物, 其中, 所述别构转录因子和 dsDNA, 所述 CRISPR/Cas12a 蛋白、向导 RNA (gRNA) 和 ssDNA 探针作为单一试剂提供; 或者

所述别构转录因子和激活 dsDNA, 所述 CRISPR/Cas12a 蛋白、向导 RNA (gRNA) 和 ssDNA 探针作为单独的试剂提供。

35. 如段落 22 所述的组合物, 其中, 所述别构转录因子和 dsDNA 探针, 所述 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA (gRNA) 作为单一试剂提供; 或者

所述别构转录因子和 dsDNA 探针, 所述 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA (gRNA) 作为单独的试剂提供。

36. 一种用于检测小分子的试剂盒, 所述试剂盒包含如段落 1-35 中任一段所述的组合物。

37. 如段落 36 所述的试剂盒, 其中, 所述试剂盒还包含用于对光信号进行检测的检测装置。

38. 如段落 38 或 39 所述的试剂盒, 其中, 所述试剂盒还包含操作如段落 1-35 中任一段所述的生物传感器时所用的递送工具或装置、洗涤缓冲液、稀释缓冲液、终止缓冲液、记载使用说明的数据载体、标准品或容器, 以及它们的组合。

39. 一种对待测样品中的小分子进行检测的方法, 所述方法包括用段落 1-35 中任一段所述的组合物或如段落 36-38 中任一段所述的试剂盒对所述待测样品中的小分子进行检测。

40. 如段落 39 所述的方法, 其中, 所述方法包括:

(1) 将所述待测样品与识别试剂进行混合并孵育; (2) 从所得的混合物中分离游离的 dsDNA 片段; (3) 将分离的游离 dsDNA 加入换能试剂中, 并检测所产生的光信号; 以及, (4) 基于所产生的信号来检测所述小分子的存在或含量。

41. 如段落 39 或 40 所述的方法, 其中, 所述方法包括:

(1) 将所述待测样品、aTF 和 dsDNA 进行混合并孵育; (2) 从所得的混合物中分离游离的 dsDNA 片段; (3) 将分离的游离 dsDNA 加入 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA 中, 并检测所产生的光信号; 以及 (4) 基于所产生的信号来检测所述小分子的存在或含量。

42. 如段落 39 或 40 所述的方法, 其中, 所述方法包括:

(1) 将所述待测样品、aTF 和激活 dsDNA 片段进行混合并孵育;

- (2) 从步骤(1)中的混合物分离游离的激活 dsDNA 片段;
- (3) 向步骤(2)中分离的游离激活 DNA 片段中加入 CRISPR/Cas12a 蛋白、向导 RNA 和 ssDNA 探针,并检测所产生的光信号;以及
- (4) 基于所产生的信号,对所述小分子的存在或含量进行检测。
43. 如段落 39 或 40 所述的方法,其中,所述方法包括:
- (1) 将所述待测样品、aTF 和 dsDNA 探针进行混合并孵育;
- (2) 从步骤(1)中的混合物分离游离的 dsDNA 探针;
- (3) 向步骤(2)中分离的游离 dsDNA 探针中加入 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA,并检测所产生的光信号;以及
- (4) 基于所产生的信号,对所述小分子的存在或含量进行检测。
44. 如段落 42 或 43 所述的方法,其中,在步骤(1)中,所述别构转录因子和所述激活 dsDNA 的摩尔比为 $\geq 5:1$;所述别构转录因子和所述 dsDNA 探针的摩尔比为 $\geq 5:1$ 。
45. 如段落 42 或 43 所述的方法,其中,在步骤(1)中,先将所述别构转录因子与所述激活 dsDNA 混合形成复合体,然后移除未结合的激活 DNA,再加入所述待测样品;或者,先将所述别构转录因子与所述 dsDNA 探针混合形成复合体,然后移除未结合的是所述 dsDNA 探针,再加入所述待测样品。
46. 如段落 40-45 中任一段所述的方法,其中,在步骤(1)中,所述混合是在室温下 1min 以上。
47. 如段落 40-46 中任一段所述的方法,其中,在步骤(1)中,所述别构转录因子是可固定在介质上的别构转录因子。
48. 如段落 47 所述的方法,其中,在步骤(1)之前,加入介质使所述可固定在介质上的别构转录因子固定至介质上。
49. 如段落 39-48 中任一段所述的方法,其中,所述待测样品来自环境、受试者、食品、饮用水、化妆品或饲料。
50. 如段落 49 所述的方法,其中,所述待测样品选自以下中的一种或多种:地下水、中水、海水、废水、采矿废料;血液、血清、血浆、痰、脑脊液流体、尿液、泪液、肺泡分离物、胸膜液、囊液、组织、唾液。
51. 如段落 40-50 所述的方法,其中,在步骤(1)之前,对所述待测样品进行富集、提取和/或纯化的预处理。
52. 如段落 40-51 中任一段所述的方法,其中,在步骤(2)中,通过过滤、离心、沉降、磁珠法、层析法、亲和柱法进行分离。
53. 如段落 40-52 中任一段所述的方法,其中,在步骤(3)中,通过荧光分析或比色分析进行检测。
54. 如段落 40-53 中任一段所述的方法,其中,在步骤(4)中,基于参比水平,对所述光信号进行分析,所述参比水平为不含所述小分子的样品的水平或含有已知量的小分子的样品的水平。
55. 段落 1-35 中任一段所述的组合物在制备检测小分子的试剂盒中的用途。
56. 如段落 55 所述的用途,其中,所述试剂盒用于环境污染监控、食品和化妆品质量控制和疾病诊断。

表 1 中的参考文献

- 1 S. P. Wilkinson, A. Grove, J. Biol. Chem., 2004, 279, 51442-51450.
- 2 K. Ike, Y. Arasawa, S. Koizumi, S. Mihashi, S. Kawai-Noma, K. Saito, D. Umeno, ACS Synth. Biol., 2015, 4, 1352-1360.
- 3 Y. Nakada, Y. Jiang, T. Nishijyo, Y. Itoh, C. D. Lu, J. Bacteriol., 2001, 183, 6517-6524.
- 4 F. A. Cerda-Maira, G. Kovacicova, et.al., 2013, 195, 307-317.
- 5 D. Lechardeur, B. Cesselin, et.al., J. Biol. Chem., 2012, 287, 4752-4758.
- 6 T. Shimada, A. Ishihama, S. J. Busby, D. C. Grainger, Nucleic Acids Res., 2008, 36, 3950-3955.

- 7 H. B. Guo, A. Johs, et.al., J. Mol. Biol., 2010, 398, 555-568.
- 8 C. Xu, W. Shi, B. P. Rosen, J. Biol. Chem., 1996, 271, 2427-2432.
- 9 K. P. Yoon, T. K. Misra, S. Silver, J. Bacteriol., 1991, 173, 7643-7649.
- 10 H. J. Kim, J. W. Lim, et.al., Biosens. Bioelectron., 2016, 79, 701-708.
- 11 W. Wang, T. Yang, et.al., ACS Synth. Biol., 2016, 5, 765-773.
- 12 P. Vargas, A. Felipe, et.al., Mol. Plant Microbe Interact., 2011, 24, 1207-1219.
- 13 N. Noguchi, K. Takada, et.al., J. Bacteriol., 2000, 182, 5052-5058.
- 14 M. Folcher, R. P. Morris, et.al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 1479-1485.
- 15 S. Ghosh, C. M. Cremers, et.al., Mol. Microbiol., 2011, 79, 1547-1556.
- 16 A. Roy, A. Ranjan, Biochemistry, 2016, 55, 1120-1134.
- 17 Y. Kim, G. Joachimiak, et.al., J. Biol. Chem., 2016, 291, 13243-13256.
- 18 T. Li, K. Zhao, Y. Huang, et.al., Appl. Environ. Microb., 2012, 78, 6009-6016.
- 19 A. Hernández, F. M. Ruiz, A. Romero, J. L. Martínez, PLoS Pathog., 2011, 7, e1002103.
- 20 L. Cuthbertson & J. R. Nodwell, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2013 77, 440-475.
- 21 S. Kitani et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011, 108, 16410-16415.

实施例 1

以下实施例中使用的 dsDNA 片段(如 SEQ ID NOs: 5-7 所示的核苷酸序列)、向导 RNA(如 SEQ ID NOs: 9-11 所示的核苷酸序列)、引物(表 2 所示)以及探针(如 SEQ ID NO: 8 所示的核苷酸序列, 5'端标记有 FAM, 3'端标记有 BHQ)均由金斯瑞公司人工合成。

以下实施例中所使用的培养基和试剂如下:

LB 培养基: 1% NaCl、1%蛋白胨、0.5%酵母粉

LB 平板: 1% NaCl、1%蛋白胨、0.5%酵母粉、1.5%琼脂粉

结合缓冲液: 50mM Tris-HCl (7.4)、500mM NaCl、20mM 咪唑, 2mM DTT、5%甘油

洗杂缓冲液: 50mM Tris-HCl (7.4)、500mM NaCl、40mM 咪唑, 2mM DTT、5%甘油

洗脱缓冲液: 50mM Tris-HCl (7.4)、500mM NaCl、500mM 咪唑, 2mM DTT、5%甘油

透析缓冲液: 50mM Tris-HCl (7.4)、500mM NaCl、2mM DTT、5%甘油

离子交换平衡缓冲液: 50mM Tris-HCl (7.4)、2mM DTT、5%甘油

离子交换洗脱缓冲液: 50mM Tris-HCl (7.4)、1 M NaCl、2mM DTT、5%甘油

Tris-HCl 缓冲液: 50mM Tris-HCl (7.4)、200mM NaCl

表 2 实施例 1-实施例 2 中使用的引物

引物	序列 (5'-3')	SEQ ID NOs:
通用引物 CBD-F	gtggtggtggtggtgctcgagtggtgctgtaccaagaactt	13
hucR-CBD-R	tgtgaaagtgggtctctcgagtcctggcgcgcgcggtctggcgcgcgcggtctggcggc ggcgcatgtcagttgaattttaca	14
HosA-linker- CBD-R	ctcgaaacagggtgttctcgagtcctggcgcgcgcggtctggcgcgcgcggtctggcggc ggcgcatgtcagttgaattttaca	15
TetR-linker- CBD-R	tgtgaaagtgggtctctcgagtcctggcgcgcgcggtctggcgcgcgcggtctggcggc ggcgcatgtcagttgaattttaca	16
T7	GAAATTAATACGACTCACTATAGGG	17
dsDNA _{HucR-1}	tactgagccatgtatccaggtcattgTACTTAGATGTCTACCTAagctctgaca gttcca	5

dsDNA _{HucR} -2	tggaactgtcagagctTAGGTAGACATCTAAGTAcaatgacctggatacatg gctcagta	18
dsDNA _{HosA} -1	tactgagccatgtatccaggtcattgCGTTCGTATACGAACAgtagctctgaca gttcca	6
dsDNA _{HosA} -2	tggaactgtcagagctACTGTTCGTATACGAACGcaatgacctggatacatg gctcagta	19
dsDNA _{TetR} -1	tgagccatgtatccaggtcattgTCCCTATCAGTGATAGAGaagctctgaca gttcca	7
dsDNA _{TetR} -2	tggaactgtcagagcttCTCTATCACTGATAGGGAcaaatgacctggatacat ggctca	20
M13-F	GTTGTAAAACGACGGCCAGT	21
M13-R	ACACAGGAAACAGCTATGAC	22
crRNA-HucR	TAGGTAGACATCTAAGTAATCTACAACAGTAGAAATTCCC TATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	23
crRNA-HosA	acTGTTTCGTATACGAACGATCTACAACAGTAGAAATTCCCT ATAGTGAGTCGTATTAATTTTC	24
crRNA-TetR	ctctatcactgatagggaATCTACAACAGTAGAAATTCCCTATAGTG AGTCGTATTAAT	25

实施例 1 尿酸生物传感器

在本实施例中，利用别构转录因子 HucR 和激活 dsDNA 片段 (dsDNA_{HucR}；其中，包含 HucR 结合位点 (与 gRNA 互补的序列包含在其中) 和 CRISPR/Cas12a 识别位点 (PAM)) 作为识别元件，以 CRISPR/Cas12a、gRNA 和单链 DNA (ssDNA；两端标记有 FAM 荧光团和 BHQ 荧光淬灭团，作为探针) 作为换能元件，构建能够感应尿酸的生物传感器平台。

HucR 蛋白为来源于耐辐射奇球菌 (*Deinococcus radiodurans*) 的阻遏蛋白，其氨基酸序列可如 SEQ ID NO: 1 所示。如图 1 所示，在无尿酸 (UA) 时，HucR 能结合 dsDNA_{HucR} 上的 HucR 作用位点形成 HucR-dsDNA_{HucR} 复合物。当存在尿酸时，尿酸特异性地结合 HucR，使 dsDNA_{HucR} 从 HucR 释放获得游离形式的 dsDNA_{HucR}，游离形式的 dsDNA_{HucR} 激活 CRISPR/Cas12a 系统，引起 DNA 探针切割，产生荧光信号。因此，可通过监控荧光信号确定样品中的尿酸浓度。

1. HucR-CBD 融合蛋白的克隆、表达和纯化

以含有 CBD 基因 (编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示) 的 pET35b 质粒 (武汉淼灵生物科技有限公司) 为模版，用引物 CBD-F/HucR-CBD-R 扩增获得 CBD 片段；使用 Xho I 单酶切 (反应体系：10x cutsmart buffer 2 μ L；质粒 1 μ g；Xho I 1 μ L；H₂O 补充至 20 μ L；37°C 反应 1h) 对 pET23b-HucR 质粒 (预先构建：使用 Nde I 和 xho I 对 pET23b 质粒和 HucR 基因片段进行双酶切 (反应体系：10x cutsmart buffer 2 μ L；质粒/HucR 基因片段 1 μ g；Xho I 1 μ L；Nde I 1 μ L；H₂O 补充至 20 μ L；37°C 反应 1h)，纯化回收后通过 T4 DNA 连接酶连接 (反应体系：10x T4 ligase buffer 1 μ L；质粒 50-100 ng；HucR 基因片段 50-100 ng；H₂O 补充至 10 μ L；22°C 反应 1h) 所得) 进行线性化处理；使用无缝克隆 (单片段连接) 试剂盒 (Tolo Biotechnology, 上海)，根据制造商提供的说明书用 Exmax 将 CBD 片段和线性化的 pET23b-hucR 进行组装，获得 pET23b-HucR-CBD 质粒，进行 PCR 和测序，确认为阳性质粒。采用钙转法将 10ng 质粒 pET23b-HucR-CBD 转入大肠杆菌 BL21 (天根生化科技有限公司，北京)，Amp 抗性筛选阳性克隆。挑取单克隆菌落接种于 100mL LB (Amp⁺) 培养基中，37°C，200rpm 摇床培养过夜 (~12h)。取 2.5 mL (1v/v%接种量) 培养液转接至 250 mL LB (Amp⁺) 培养基，加入终浓度为 0.2mM 的 IPTG，16°C、180rpm 低温诱导过夜，随后在 4°C、9,000rpm 离心 15min，收集菌体并用洗杂缓冲液洗涤菌体。每 2L 菌体用 50mL 预冷的结合缓冲液悬浮。将悬浮液置于冰上，超声裂解菌体 (超声波细胞粉碎机，超声 3s，间歇 5s，30W，20min)，4°C、

12000 rpm 离心 30 min, 取上清重复上述离心操作至澄清。将裂解物流经 HisTrap FF 柱 (GE Healthcare) 上, 使用洗脱缓冲液进行洗脱。收集峰值级分并且进行透析 (透析膜来自上海生工; 透析缓冲液)。然后将透析后的溶液上样至 HiTrap QHP 柱 (GE Healthcare), 用洗脱缓冲液进行洗脱。收集峰值级分并使用超滤管 (milibore) 进行浓缩。将浓缩液上样至 HiLoad 16/600 Superdex 200pg 柱进行快速蛋白液相色谱 (FPLC; AKTA Exporer 100, GE Healthcare)。通过 SDS-PAGE 对纯化的 HucR-CBD 蛋白进行验证并且使用 Bradford 方法测定其浓度为 3mg/mL。

2. HucR-CBD 融合蛋白的活性分析

因 CBD 结构域与 HucR 分子量相近, 为了分析 CBD 结构域对 HucR 蛋白的活性影响, 利用凝胶阻滞实验 (EMSA) 对 HucR-CBD 与 dsDNA_{HucR} 的结合进行分析。使用引物 dsDNA_{HucR}-1 和 dsDNA_{HucR}-2 退火 (95°C 预变性 5min; 95°C 变性 30s, 75 个循环, 每个循环降低 1°C) 得到 60bp 大小的 dsDNA_{HucR}, 用于 EMSA 分析。EMSA 的实验条件和数据采集方法均根据 Wang 等, Molecular Microbiology, 2011, 82(1): 236-250。将 0、25、50、100、200nM 的 HucR-CBD 与 40nM dsDNA_{HucR} 混匀 (处于 20mL 的缓冲液中: 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM KCl, 1mM EDTA, 0.1mM DTT, 5%v/v 甘油, 0.01mg/ml 牛血清白蛋白, dsDNA 与 aTF 的结合以及效应物与 dsDNA 和 aTF 的作用均在此种缓冲液中进行), 在室温下避光反应 15min, 1.5%琼脂糖胶进行电泳, 检测融合蛋白 HucR-CBD 与 dsDNA_{HucR} 的结合。

结果如图 2B 所示, 当 HucR-CBD:dsDNA_{HucR}=200nM:40nM (即 5:1) 时, dsDNA_{HucR} 可被 HucR-CBD 完全结合, 可见与 CBD 结构域融合表达不影响 HucR 的功能。

3. HucR-CBD 融合蛋白对尿酸的识别与响应

为了分析效应物尿酸对 HucR-CBD-dsDNA_{HucR} 复合物的解离作用, 向 HucR-CBD:dsDNA_{HucR}=5:1 的孵育体系中加入不同浓度的尿酸 (0、0.05、0.5、5、50、500μM), 通过 EMSA 检测 dsDNA_{HucR} 的解离。结果如图 2C 所示, 随着尿酸浓度的增加, 游离的 dsDNA_{HucR} 不断增加。

4. Cas12a 蛋白和 gRNA 的制备

构建 pET28TEV-Cas12a 质粒 (LbCas12a, 吐露港公司), 以与表达和纯化 HucR-CBD 融合蛋白步骤的相同的步骤, 将 pET28TEV-Cas12a 质粒转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 0.2 mM IPTG 诱导蛋白表达后, 离心收集菌体并经超声波破碎仪超声破碎后收集细胞裂解物, 进行纯化和浓缩, 得到浓度为 1mg/mL 的 Cas12a 纯化蛋白。

在 Taq DNA 聚合酶缓冲液中使 T7 引物与 crRNA-HucR 引物退火 (20 μL 体系: 10x Taq DNA 聚合酶缓冲液 2 μL; T7 引物 9 μL; crRNA-HucR 引物 9 μL; PCR 程序: 95°C 预变性 5min; 95°C 变性 30s, 每个循环降低 1°C, 70 个循环) 合成 crRNA (即 gRNA) 的模板。然后用 HiScribe™ T7 快速高效 RNA 合成试剂盒 (NEB) 转录成 crRNA 并用 RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research) 进行纯化。使用 NanoDrop2000 分光光度仪 (Thermo Fisher Scientific) 测量所得的 crRNA 的浓度, 为 2000-3000ng/μL。

5. 对尿酸的检测

取 2mg 微晶纤维素 (上海生工; 货号 9004-34-6) 用 Tris-HCl 缓冲液洗涤两次, 与融合蛋白 HucR-CBD (200nM) 混合于 NEB CutSmart® 缓冲液, 室温混合孵育 10 分钟。室温、7000rpm 离心后弃上清, 使用 NEB CutSmart® 缓冲液洗涤 3 次除去未结合的蛋白, 使用 Bradford 分析试剂盒 (天根生化科技公司) 对固定化的蛋白质进行定量; 加入 100nM dsDNA_{HucR}, 室温反应~9 分钟, 室温、7000rpm 离心弃上清, 洗涤≥1 次除去未结合的 dsDNA_{HucR}; 在所得到的 dsDNA-蛋白-纤维素复合物中各加入 500μM 尿酸及其类似物 (腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤), 室温反应 15min, 室温、7000rpm 离心取上清。将上清液 (其中可能包含游离形式的 dsDNA_{HucR}, 以 40nM 游离形式的 dsDNA_{HucR} 作为阳性对照) 加入 Cas12a、gRNA 以及经 FAM/BHQ 修饰的 ssDNA (序列如 SEQ ID NO: 9 所示) 的混合物 (50 nM Cas12a、50nM gRNA 以及 250nM ssDNA, 处于 20μL NEB CutSmart® 缓冲液中), 混合后立即置于 BMG CLARIOstar 酶标仪 (BMG Labtech, 英国) 中 37°C 反应, 在 480 nm 激发光和 520 nm 发射光下测定并记录反应体系的荧光强度。结果如图 3C 所示, 阳性对照 (即游离形式的 dsDNA_{HucR}) 和尿酸组获得了最强的荧光强度, 而尿酸类似物 (腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤) 组的荧光强度小于阳性对照组的 5%。并且该结果与 EMSA 的结果 (图 3B) 类似, 说明本发明的尿酸生物传感器能够准确地对小分子进行识别并且进行检测。

6. 对生物传感器性能的分析

6.1 dsDNA 线性检测范围

为了探究不同浓度的 dsDNA 对荧光强度变化的影响, 取不同浓度的 dsDNA_{HucR} (1、5、10、25、50、100 pM) 加入 Cas12a、gRNA 以及经 FAM/HQ 修饰的 ssDNA (序列如 SEQ ID NO: 9 所示) 的混合物 (50 nM Cas12a、50nM gRNA 以及 250nM ssDNA, 处于 20 μ L NEB CutSmart[®]缓冲液中), 混合后立即置于 BMG CLARIOstar 酶标仪 (BMG Labtech, 英国) 中 37 $^{\circ}$ C 反应, 在 480nm 激发光和 520nm 发射光下测定并记录反应体系的荧光强度。结果如图 4A (左栏) 所示, 随着 dsDNA 的浓度不断增加, 反应体系的荧光强度也随之增加。为分析 dsDNA 与反应体系荧光强度变化之间的线性关系, 取荧光值线性增加区间的斜率, 以 dsDNA 浓度为横坐标, 对应的斜率为纵坐标作图 4A (右栏), 由此可知 dsDNA 的线性检测范围 1-25 pM。

6.2 尿酸的线性检测范围

为了探究不同浓度的尿酸对荧光强度变化的影响, 取不同浓度的尿酸以如上的方法进行检测, 测定并记录反应体系荧光强度, 结果如图 4B (左栏) 所示, 随着尿酸浓度的增加, 游离的 dsDNA 含量随之增多, 荧光强度也随之提高。反应体系的荧光强度的变化随着尿酸的增加而逐渐增加, 为分析尿酸浓度与反应体系荧光强度变化间的线性关系, 取荧光值线性增加区间的斜率, 以尿酸浓度为横坐标, 对应的斜率为纵坐标作图 4B (右栏), 可知尿酸的线性检测范围 25-500 nM, 回归方程为: $y=10.7x+1289.8$, $R^2=0.992$ 。本实施例传感器对尿酸的检测极限为 nM 级, 而现有的尿酸生物传感器通常为 μ M 级 (如专利 201810224843.8 中所记载的尿酸生物传感器, 1.71 μ M), 可见本发明的生物传感器具有出色的检测灵敏度 (可低至 25nM)。

6.3 对临床血液样品的分析

取等量的血清和氯仿混合并且剧烈震荡, 室温、10,000g 离心 10 分钟, 收集上清液。使用如上的方法采用本实施例的尿酸生物传感器对血清样品中的尿酸进行检测。为了避免吸取的时候的误差, 用水将血清样品上清液稀释 10 倍, 使用 1 μ L 稀释液进行检测。由于 HPLC 能够非常精确的检测血清中的尿酸含量, 将样品进行 HPLC 作为对照。HPLC 条件: Agilent SB-Aq 柱 (4.6mm $\times$ 150mm, 5 μ m, 1mL/min); 水作为洗脱液, 在 284nm 处检测 (UV 检测器; Agilent 1260 infinity II LC 系统)。将由 HPLC 测得的尿酸浓度为纵坐标, 本实施例的生物传感器检测方法得到的尿酸浓度为纵坐标做图 (图 5A), 可见两种方法测得的结果线性相关 ($y=0.978x$, $R^2=0.993$), 这说明本发明的检测方法具有较高的可信度。

进一步, 将本实施例的检测方法与临床上使用的 Backman 尿酸检测试剂盒进行对比, 同样将 Backman 测得的尿酸浓度为纵坐标, 本实施例的生物传感器检测方法得到的尿酸浓度为纵坐标做图 (图 5B), 可见两种方法测得的结果线性相关 ($y=1.023x$, $R^2=0.983$), 也说明了本发明的检测方法具有较高的可信度。

人体血清中尿酸的正常范围为 166.4 μ M-546.7 μ M, 而由于本发明的生物传感器非常灵敏, 只需要非常少量的血液样品 (约 1 μ L) 即可得到准确的结果 (图 5C), 使得反应体系体积较小, 可以在 96 孔板甚至 384 孔板上进行该检测。并且, 本发明的方法仅需 15-25 分钟, 至多 25 分钟即可得到结果, 不仅节约时间, 而且成本低、操作简便, 非常适合用于对血液等样品中的尿酸进行高通量检测。

6.4 与其它检测方法的比较

为了进一步评估本实施例的尿酸生物传感器的优点, 将其与现有技术中已报道的各种检测方法进行对比, 并且将结果汇总与表 3 中。

表 3. 不同小分子检测方法的比价

检测方法	检测极限	微孔板(Y/N)	时间/min	成本/\$	参考文献
RT-qPCR	~ nM	Y	> 120	NA	Li, S.-Y. et al.
RCA	~ nM	Y	> 120	NA	Li, S.-Y. et al.
RPA	~ pM	N	> 120	NA	Li, S.-Y. et al.
PGM	~ nM	N	> 15	NA	Esvelt, K.M. et al.
ISDA	~ nM	Y	> 120	NA	Chen, J.S. et al.
临床方法*	>50 μ M	Y	>30	2	Backman Coulter.Inc

CaT-SMelor	~ nM	Y	15 ~ 25	< 0.3	本研究
------------	------	---	---------	-------	-----

RT-qPCR: 实时荧光定量 PCR; RCA: 滚环扩增; RPA: 重组酶聚合酶扩增; PGM: 血糖仪; ISDA: 等温链置换扩增; 临床方法: Backman 试剂盒; CaT-SMelor: 本发明的生物传感器; Y: 可适用; N: 不可适用; NA: 未获得。

而且, 对于本实施的尿酸生物传感器, 由于荧光信号相对稳定, 因此该生物传感器的荧光半衰期超过 200min, 这为研究员或其他使用者提供更多的时间记录和分析实验结果。

综上所述, 本发明的尿酸生物传感器具有出色的检测灵敏度、较高的可信度、节约时间和成本, 操作简单, 非常适合于需要高通量、高速、高灵敏度的小分子体外检测, 在实验室以及医疗、工业应用中均具有广阔的应用前景。

实施例 2 四环素生物传感器和对羟基苯甲酸 (*p*-HBA) 传感器

为了验证本发明传感器和方法的普适性, 采用实施例 1 的理念, 设计了分别响应于四环素和 *p*-HBA 的传感器。响应于四环素的生物传感器利用别构转录因子 TetR 和双链激活 DNA 片段 (dsDNA_{TetR}; 其中包含 TetR 结合位点和 CRISPR/Cas12a 识别位点 (PAM)) 作为识别元件, 以 CRISPR/Cas12a、gRNA 和单链 DNA (ssDNA; 两端标记有 FAM 荧光团和 BHQ 荧光淬灭团, 作为探针) 作为换能元件。响应于 *p*-HBA 的生物传感器利用别构转录因子 HosA 和双链激活 DNA 片段 (dsDNA_{HosA}; 其中包含 HosA 结合位点和 CRISPR/Cas12a 识别位点 (PAM)) 作为识别元件, 以 CRISPR/Cas12a、gRNA 和单链 DNA (ssDNA; 两端标记有 FAM 荧光团和 BHQ 荧光淬灭团, 作为探针) 作为换能元件。

根据实施例 1 的方法和步骤, 制备 TetR-CBD 融合蛋白和 HosA-CBD 融合蛋白, 构建四环素生物传感器和 *p*-HBA 传感器, 并对 *p*-HBA 传感器的性能进行分析。

1. 对 *p*-HBA 传感器性能的分析

1.1 HosA-CBD 融合蛋白活性分析

将不同浓度 (0、25、50、100、200nM) 的 HosA-CBD 与 40nM 的 dsDNA_{HosA} (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示) 混合, 室温反应 15 min, 进行 EMSA 检测 HosA-CBD 与 dsDNA_{HosA} 的结合。结果如图 2D 所示, 当 HosA-CBD:dsDNA_{HosA}=5:1 时, dsDNA_{HosA} 可被 HosA-CBD 完全结合, 与 CBD 结构域融合表达不影响 HosA 的功能活性。

1.2 融合蛋白 HosA-CBD 对 *p*-HBA 的识别与响应

为了分析效应物 *p*-HBA 对 HosA-CBD 和 dsDNA_{HosA} 复合物的解离作用, 向 HosA-CBD:dsDNA_{HosA}=5:1 的反应体系中加入不同浓度 (0、0.18、1.8、18、180、1800μM) 的 *p*-HBA 通过 EMSA 检测 dsDNA_{HosA} 的解离。结果如图 2E 所示, 随着 *p*-HBA 浓度的增加, 游离的 dsDNA_{HosA} 不断增加。

1.3 对 *p*-HBA 的检测

取 2mg 微晶纤维素 (上海生工; 货号 9004-34-6) 用 Tris-HCl 缓冲液洗涤两次, 与融合蛋白 HosA-CBD (200nM) 混合于 NEB CutSmart® 缓冲液, 室温混合孵育 10 分钟。室温、7000rpm 离心后弃上清, 使用 NEB CutSmart® 缓冲液洗涤 3 次除去未结合的蛋白, 使用 Bradford 分析试剂盒 (天根生化科技公司) 对固定化的蛋白质进行定量; 加入 100nM dsDNA_{HosA}, 室温反应 10 分钟, 室温、7000rpm 离心弃上清, 洗涤 3 次除去未结合的 dsDNA_{HosA}; 在所得到的 dsDNA-蛋白-纤维素复合物中各加入 1.8mM *p*-HBA 及其类似物 (对羟基苯乙醇、对氨基苯甲酸 (*p*-ABA)、对羟基苯甲酸甲酯 (*p*-MHB)、对羟基苯甲醇 (*p*-HBnOH), 室温反应 15min, 室温、7000rpm 离心取上清。将上清液 (其中可能包含游离形式的 dsDNA_{HosA}, 以 1.8mM 游离形式的 dsDNA_{HosA} 作为阳性对照) 加入 Cas12a、gRNA (核苷酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示) 以及经 FAM/BHQ 的 ssDNA (序列如 SEQ ID NO: 9 所示) 的混合物 (50 nM Cas12a、50nM gRNA 以及 250nM ssDNA, 处于 20μL NEB CutSmart® 缓冲液中), 混合后立即置于 BMG CLARIOstar 酶标仪 (BMG Labtech, 英国) 中 37℃ 反应, 在 480nm 激发光和 520nm 发射光下测定并记录反应体系的荧光强度。结果如图 3E 所示, 阳性对照 (即游离形式的 dsDNA_{HosA}) 和 *p*-HBA 组获得了最强的荧光强度, 而 *p*-HBA 类似物 (对羟基苯乙醇、*p*-ABA、*p*-MHB、*p*-HBnOH) 组的荧光强度小于阳性对照组的 5%。并且该结果与 EMSA 的结果 (图 3D) 类似, 说明本发明的 *p*-HBA 生物传感器能够准确地对小分子进行识别并且进行检测。

1.4 *p*-HBA 的线性检测范围

为了探究不同浓度的 *p*-HBA 对荧光强度变化的影响,取不同浓度(1.8、9、18、90、180、900、1800nM)的 *p*-HBA 进行检测,测定并记录反应体系荧光强度,结果如图 4C(左栏)所示,随着 *p*-HBA 浓度的增加,游离的 dsDNA_{HosA} 含量随之增多,荧光强度的变化也随之提高。为分析 *p*-HBA 浓度与反应体系荧光强度变化之间的线性关系,取荧光值线性增加区间的斜率,以 *p*-HBA 浓度为横坐标,对应的斜率为纵坐标作图 4C(右栏),可知 dsDNA 的线性检测范围 9-180 nM,回归方程分别为: $y=6.3x+656.6$, $R^2=0.992$ 。因此,根据本发明的 PHBA 传感器性能也具有出色的检测极限(可低至 1.8nM)。

因此,本发明的传感器和方法具有普适性,可借助多种别构转录因子对特定小分子化合物进行高灵敏度、高速、高通量的检测,不仅操作简单,而且成本低廉,在实验室以及工业应用中均具有广阔的应用前景。

权利要求书

1. 一种用于检测小分子的组合物，所述组合物包含识别试剂和换能试剂，其中，
所述识别试剂包含别构转录因子（aTF）和双链 DNA（dsDNA）；以及
所述换能试剂包含 CRISPR/Cas12a 系统，其中，所述 CRISPR/Cas12a 系统具有向导 RNA，
其中，所述 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、所述 CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与所述向导 RNA 至少部分互补的序列，
其中，所述组合物还含有发光/生色基团，所述发光/生色基团连接至能够被所述 CRISPR/Cas12a 系统切割的核酸。
2. 如权利要求 1 所述的组合物，其中，所述能够被所述 CRISPR/Cas12a 系统切割的核酸为所述 dsDNA，所述 dsDNA 作为 dsDNA 探针，并具有发光/生色基团及其淬灭基团。
3. 如权利要求 1 所述的组合物，其中，所述能够被所述 CRISPR/Cas12a 系统切割的核酸为单链 DNA（ssDNA），所述 ssDNA 作为 ssDNA 探针，并具有发光/生色基团及其淬灭基团；其中，所述 dsDNA 为激活 dsDNA。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的组合物，其中，所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 Cas12a 蛋白与所述向导 RNA（gRNA）。
5. 如权利要求 2 或 3 所述的组合物，其中，所述 dsDNA 探针或所述 ssDNA 探针的两端缀合有发光/生色基团及其淬灭基团。
6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的组合物，其中，所述小分子具有 50-5000 道尔顿、优选 50-1000 道尔顿的分子量。
7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的组合物，其中，所述 dsDNA 中与所述向导 RNA 至少部分互补的序列与所述 RNA 具有至少 70% 以上的互补性。
8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的组合物，其中，所述别构转录因子选自来源于以下的别构转录因子中的一种或多种：耐辐射奇球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、霍乱弧菌、乳酸乳球菌、假单胞菌转座子、金黄色葡萄球菌、海洋沉积物芽孢杆菌、龟裂链霉菌、丁香假单胞菌、天蓝色链霉菌、不动杆菌属、谷氨酸棒状杆菌、嗜麦芽寡养单胞菌、和阿维链霉菌。
9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的组合物，其中，所述小分子为重金属离子、毒素、药物、代谢物、污染物或上述物质的分解产物。
10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的组合物，其中，所述小分子的存在通过所述 aTF 与所述 dsDNA 来触发 CRISPR/Cas12a 系统的切割活性。
11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的组合物，其中，所述转录因子结合位点的长度为 10-40bp、优选 15-25bp、更优选 17-19bp。
12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的组合物，其中，所述别构转录因子和/或 dsDNA 固定在介质上。
13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的组合物，其中，所述别构转录因子固定在介质上。
14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的组合物，其中，所述介质选自由如下所组成的组：硝化纤维素膜或尼龙膜、亲和柱层析基质、磁珠、固体填料、微晶纤维素、或可商购的蛋白质固定化介质。
15. 如权利要求 13 所述的组合物，其中，所述别构转录因子与纤维素结构域（CBD）融合表达，并借由所述纤维素结构域固定在微晶纤维素上。
16. 如权利要求 1-15 中任一项所述的组合物，其中，所述 dsDNA 的长度为 20-80bp、更优选 55-65bp，最优选 58-60bp。
17. 如权利要求 1-16 中任一项所述的组合物，其中，所述识别试剂和所述换能试剂以单独的形式提供并且在不同的空间进行反应。
18. 如权利要求 4-17 中任一项所述的组合物，其中，所述 ssDNA 探针是长度为 10-30bp 任意单链 DNA。
19. 如权利要求 4-17 中任一项所述的组合物，其中，所述 ssDNA 探针是长度为 20bp 的任意单链 DNA。
20. 如权利要求 1-12 中任一项所述的组合物，其中，所述发光/生色基团选自由如下所组成的组：发

光有机化合物、发光无机化合物、荧光团、纳米颗粒、量子点和生色团，以及它们的组合。

21. 如权利要求 3 所述的组合物，其中，所述组合物包含识别试剂和换能试剂，其中：

所述识别试剂包含别构转录因子（aTF）和激活双链 DNA（激活 dsDNA），所述激活 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA 至少部分互补的序列，以及

所述换能试剂包含所述 CRISPR/Cas12a 系统和单链 DNA 探针（ssDNA 探针），所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述向导 RNA（gRNA），所述 ssDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团。

22. 如权利要求 2 所述的组合物，其中，所述组合物包含识别试剂和换能试剂，其中：

所述识别试剂包含 aTF 和双链 DNA 探针（dsDNA 探针），所述 dsDNA 探针包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA（gRNA）至少部分互补的序列，并且所述 dsDNA 探针两端分别缀合有发光/生色基团及其淬灭基团，以及

所述换能试剂包含 CRISPR/Cas12a 系统，所述 CRISPR/Cas12a 系统包含 CRISPR/Cas12a 蛋白与所述 gRNA。

23. 如权利要求 1-22 中任一项所述的组合物，其中，所述组合物处于生物传感器的形式。

24. 如权利要求 23 所述的组合物，其中，所述生物传感器包含识别元件和换能元件，其中，

所述识别元件包含别构转录因子（aTF）和双链 DNA（dsDNA），所述 dsDNA 包含所述 aTF 的结合位点、CRISPR/Cas12a 系统的识别位点 PAM 以及与向导 RNA 至少部分互补的序列；以及所述换能元件包含所述 CRISPR/Cas12a 系统，

其中，所述生物传感器中还含有发光/生色基团，所述发光/生色基团连接至能够被所述 CRISPR/Cas12a 系统切割的核酸。

25. 如权利要求 21 所述的组合物，其中，所述别构转录因子和 dsDNA，所述 CRISPR/Cas12a 蛋白、向导 RNA（gRNA）和 ssDNA 探针作为单一试剂提供；或者

所述别构转录因子和激活 dsDNA，所述 CRISPR/Cas12a 蛋白、向导 RNA（gRNA）和 ssDNA 探针分别作为单独的试剂提供。

26. 如权利要求 22 所述的组合物，其中，所述别构转录因子和 dsDNA 探针，所述 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA（gRNA）作为单一试剂提供；或者

所述别构转录因子和 dsDNA 探针，所述 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA（gRNA）分别作为单独的试剂提供。

27. 一种用于检测小分子的试剂盒，所述试剂盒包含如权利要求 1-26 中任一项所述的组合物。

28. 如权利要求 27 所述的试剂盒，其中，所述试剂盒还包含用于对光信号进行检测的检测装置。

29. 如权利要求 27 或 28 所述的试剂盒，其中，所述试剂盒还包含操作如权利要求 1-26 中任一项所述的生物传感器时所用的递送工具或装置、洗涤缓冲液、稀释缓冲液、终止缓冲液、记载使用说明的数据载体、标准品或容器，以及它们的组合。

30. 一种对待测样品中的小分子进行检测的方法，所述方法包括用权利要求 1-26 中任一项所述的组合物或如权利要求 27-29 中任一项所述的试剂盒对所述待测样品中的小分子进行检测。

31. 如权利要求 30 所述的方法，其中，所述方法包括：

（1）将所述待测样品与识别试剂进行混合并孵育；（2）从步骤（1）所得的混合物中分离游离的 dsDNA 片段；（3）将分离的游离 dsDNA 加入换能试剂中，并检测所产生的光信号；以及，（4）基于所产生的信号来检测所述小分子的存在或含量。

32. 如权利要求 30 或 31 所述的方法，其中，所述方法包括：

（1）将所述待测样品、aTF 和 dsDNA 进行混合并孵育；（2）从所得的混合物中分离游离的 dsDNA 片段；（3）向步骤（2）中分离得到的游离 dsDNA 加入 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA 中，并检测所产生的光信号；以及（4）基于所产生的信号来检测所述小分子的存在或含量。

33. 如权利要求 30 或 31 所述的方法，其中，所述方法包括：

- (1) 将所述待测样品、aTF 和激活 dsDNA 片段进行混合并孵育；
 - (2) 从步骤(1)所得的混合物中分离游离的激活 dsDNA 片段；
 - (3) 向步骤(2)中分离得到的游离的激活 dsDNA 片段中加入 CRISPR/Cas12a 蛋白、向导 RNA 和 ssDNA 探针，并检测所产生的光信号；以及
 - (4) 基于所产生的信号，对所述小分子的存在或含量进行检测。
34. 如权利要求 30 或 31 所述的方法，其中，所述方法包括：
- (1) 将所述待测样品、aTF 和 dsDNA 探针进行混合并孵育；
 - (2) 从步骤(1)中的混合物分离游离的 dsDNA 探针；
 - (3) 向步骤(2)中分离的游离 dsDNA 探针中加入 CRISPR/Cas12a 蛋白和向导 RNA，并检测所产生的光信号；以及
 - (4) 基于所产生的信号，对所述小分子的存在或含量进行检测。
35. 如权利要求 33 或 34 所述的方法，其中，在步骤(1)中，所述别构转录因子和所述激活 dsDNA 的摩尔比为 $\geq 5:1$ ；或者，所述别构转录因子和所述 dsDNA 探针的摩尔比为 $\geq 5:1$ 。
36. 如权利要求 33 或 34 所述的方法，其中，在步骤(1)中，先将所述别构转录因子与所述激活 dsDNA 混合形成复合体，然后移除未结合的激活 DNA，再加入所述待测样品；或者，先将所述别构转录因子与所述 dsDNA 探针混合形成复合体，然后移除未结合的是所述 dsDNA 探针，再加入所述待测样品。
37. 如权利要求 30-36 中任一项所述的方法，其中，在步骤(1)中，所述混合在室温下进行 1min 以上。
38. 如权利要求 30-37 中任一项所述的方法，其中，在步骤(1)中，所述别构转录因子固定在介质上。
39. 如权利要求 38 所述的方法，其中，在步骤(1)之前，加入介质使所述别构转录因子固定至介质上。
40. 如权利要求 30-39 中任一项所述的方法，其中，所述待测样品来自环境、受试者、食品、饮用水、化妆品或饲料。
41. 如权利要求 40 所述的方法，其中，所述待测样品选自以下中的一种或多种：地下水、中水、海水、废水、采矿废料；血液、血清、血浆、痰、脑脊液流体、尿液、泪液、肺泡分离物、胸膜液、囊液、组织、唾液。
42. 如权利要求 30-41 所述的方法，其中，在步骤(1)之前，对所述待测样品进行富集、提取和/或纯化的预处理。
43. 如权利要求 30-42 中任一项所述的方法，其中，在步骤(2)中，通过过滤、离心、沉降、磁珠法、层析法、亲和柱法进行分离所述游离的 dsDNA。
44. 如权利要求 30-43 中任一项所述的方法，其中，在步骤(3)中，通过荧光分析或比色分析进行检测。
45. 如权利要求 40-44 中任一项所述的方法，其中，在步骤(4)中，基于参比水平，对所述光信号进行分析，所述参比水平为所测定的不含所述小分子的样品的水平或含有已知量的小分子的样品的水平。
46. 权利要求 1-26 中任一项所述的组合物在制备检测小分子的试剂盒中的用途。
47. 如权利要求 46 所述的用途，其中，所述试剂盒用于环境污染监控、食品和化妆品质量控制和疾病诊断。

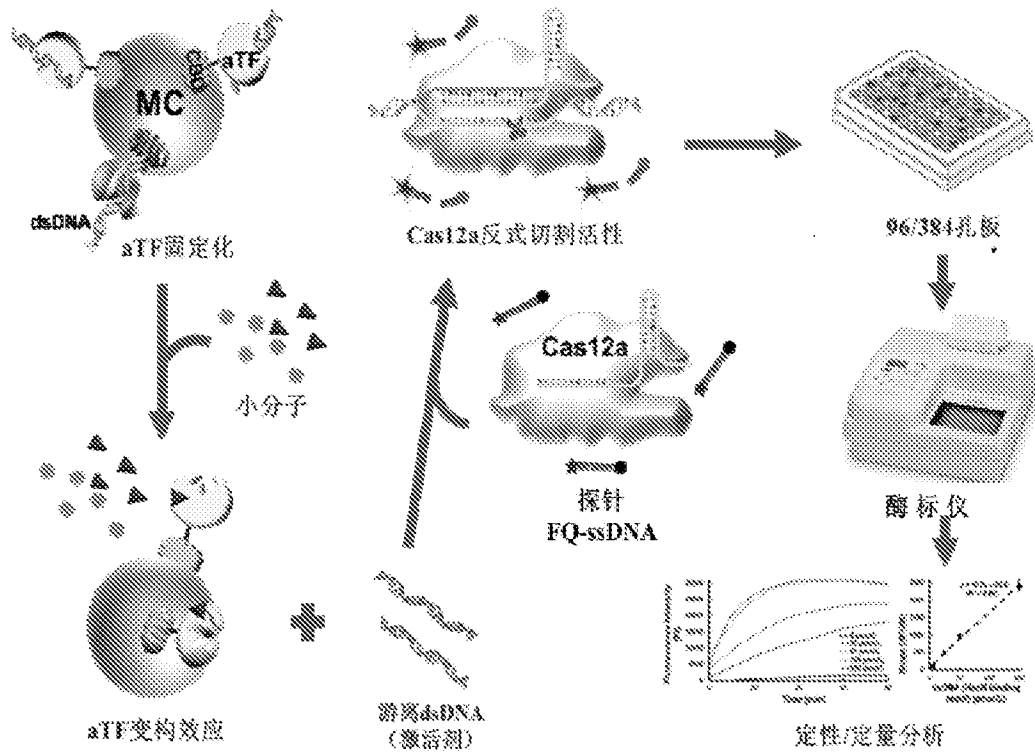


图 1

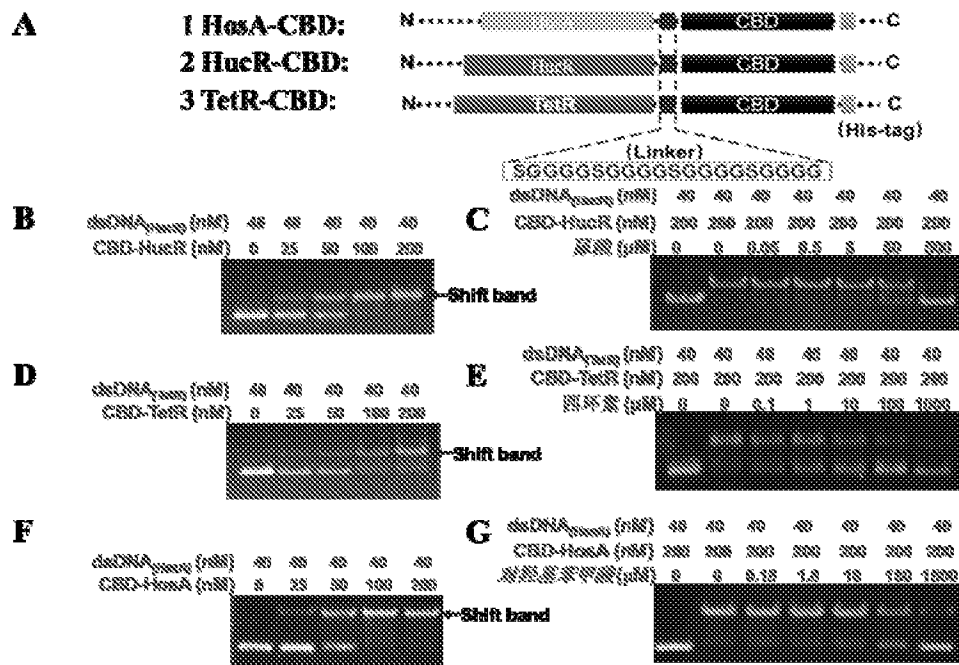


图 2

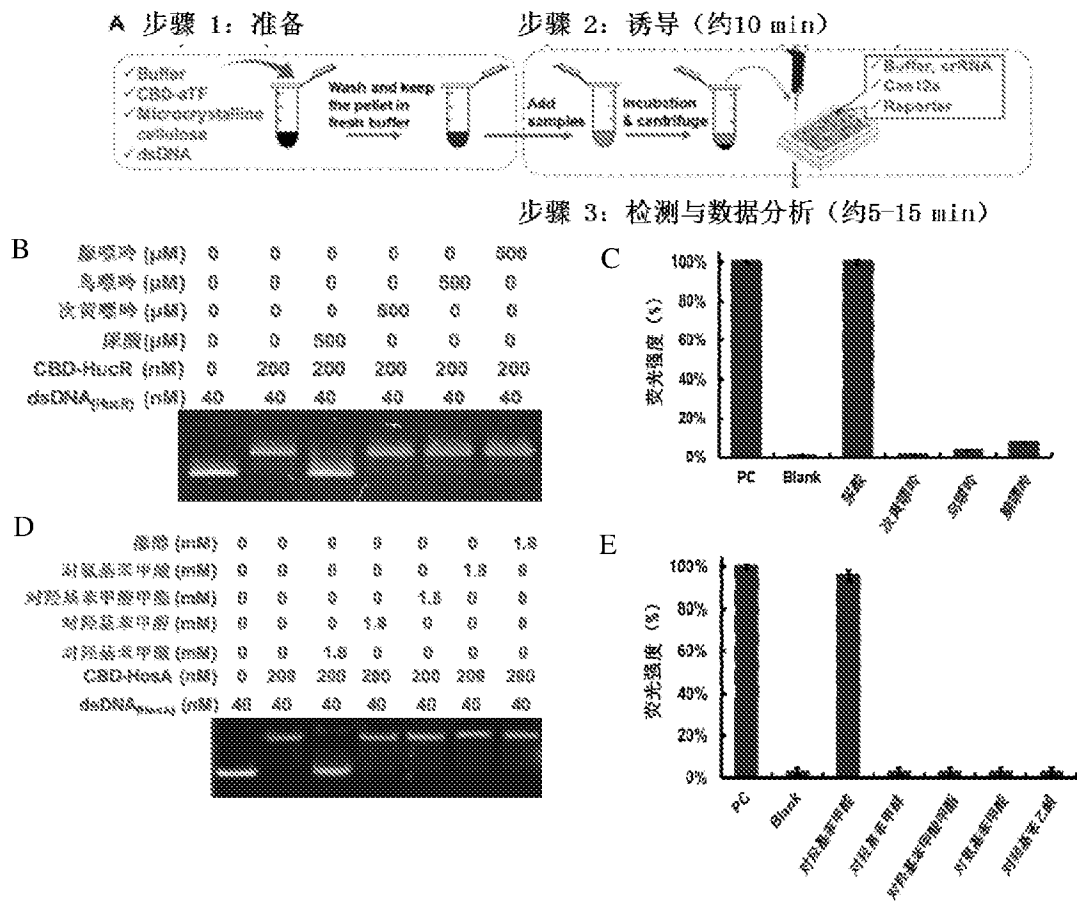


图 3

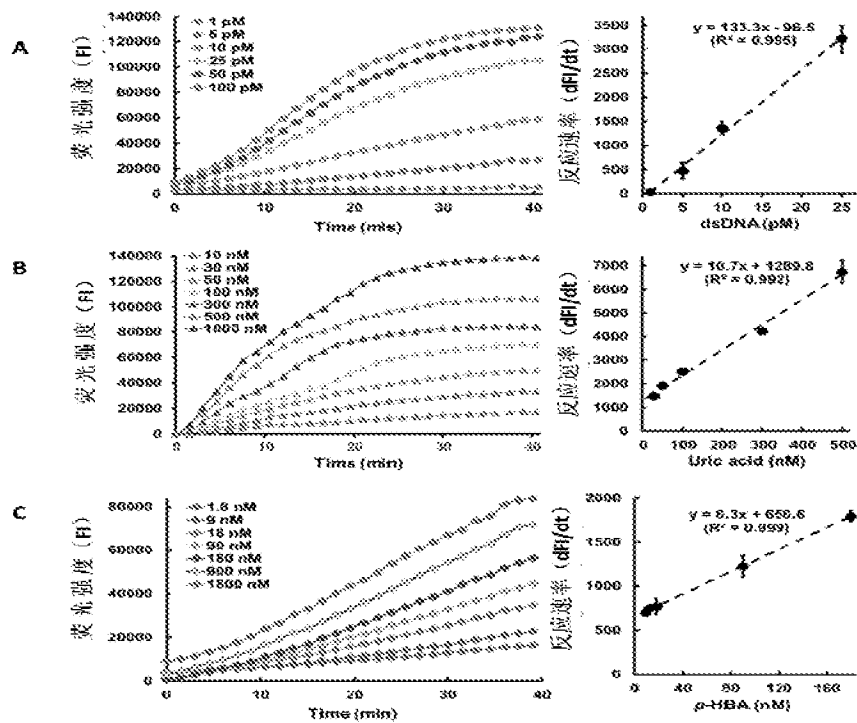


图 4

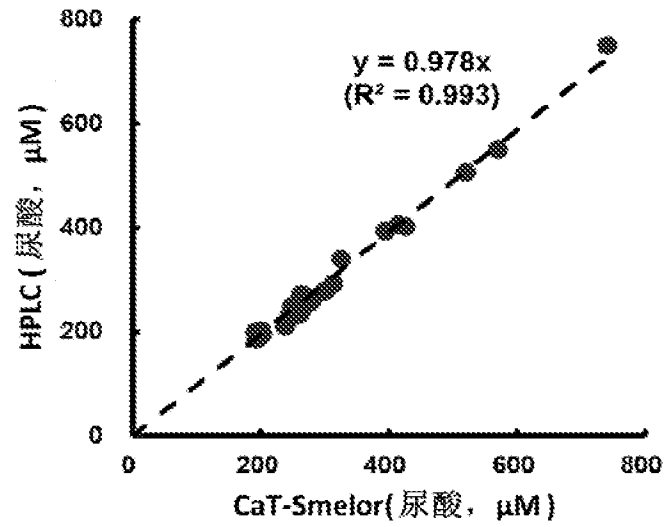


图 5A

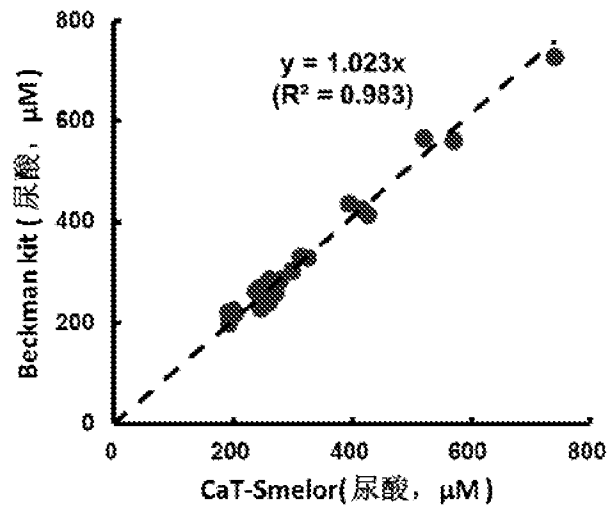


图 5B

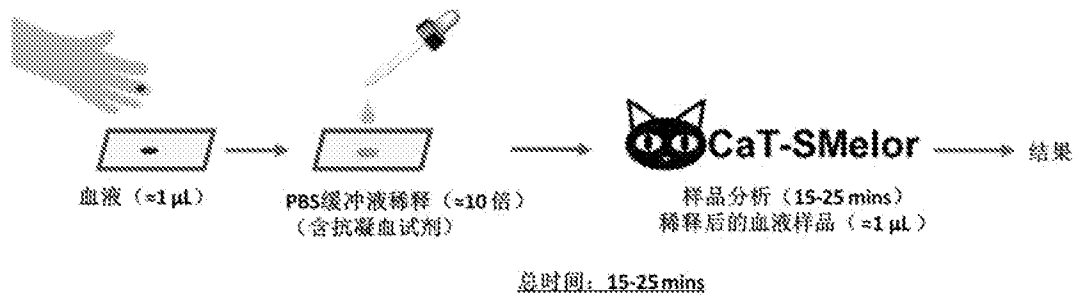


图 5C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/084111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/64(2006.01)i; G01N 1/34(2006.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)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)

G01N; C12Q

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)

CNABS; CPRSABS; CNTXT; SIPOABS; DWPI; USTXT; WOTXT; EPTXT; CNKI; ISI web of Science; 读秀; 万方; 华东理工大学, 中国科学院微生物研究所, 张立新, 谭高翼, 梁敏东, 王为善, 刘家坤, 别构转录因子, 别构因子, 检测, East China University of Science and Technology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, ZHANG Lixin, TAN Gaoyi, LIANG Mindong, WANG Weishan, LIU Jiakun, aTF, allosteric transcription factor, allosteric factor, Cpf1, PAM, gRNA, CRISPR, CAS12A, detect

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	LIANG, Mindong et al. "A CRISPR-Cas12a-derived Biosensing Platform for the Highly Sensitive Detection of Diverse Small Molecules" <i>Nature Communications</i> , Vol. 10, 14 August 2019 (2019-08-14), pp. 1-9	1-47
A	CN 107976411 A (THE INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 01 May 2018 (2018-05-01) claims 1-8	1-47
A	US 10253365 B1 (The Regents of the University of California) 09 April 2019 (2019-04-09) entire description	1-47
A	CAO, Jiaqian et al. "Harnessing a Previously Unidentified Capability of Bacterial Allosteric Transcription Factors for Sensing Diverse Small Molecules in vitro" <i>Science Advances</i> , Vol. 4, No. 11, 28 November 2018 (2018-11-28), pp. 1-11	1-47



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

23 May 2020

Date of mailing of the international search report

30 June 2020

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/CN2020/084111

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI, Shi-Yuan et al. "CRISPR-Cas12a-assisted Nucleic Acid Detection" <i>Cell Discovery</i> , Vol. 4, No. 20, 24 April 2018 (2018-04-24), pp. 1-4	1-47
A	LI, Shi-Yuan et al. "CRISPR-Cas12a Has both cis- and trans-cleavage Activities on Single-stranded DNA" <i>Cell Research</i> , Vol. 28, No. 4, 12 March 2018 (2018-03-12), pp. 1-3	1-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/084111

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/CN2020/084111

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107976411	A	01 May 2018	None			
US	10253365	B1	09 April 2019	WO	2019104058	A1	31 May 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/084111

A. 主题的分类

G01N 21/64(2006.01)i; G01N 1/34(2006.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)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)

G01N; C12Q

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))

CNABS;CPRSABS;CNTXT;SIPOABS;DWPI;USTXT;WOTXT;EPTXT;CNKI;ISI web of Science;读秀;万方: 华东理工大学, 中国科学院微生物研究所, 张立新, 谭高翼, 梁敏东, 王为善, 刘家坤, 别构转录因子, 别构因子, 检测, East China University of Science and Technology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, ZHANG Lixin, TAN Gaoyi, LIANG Mindong, WANG Weishan, LIU Jiakun, aTF, allosteric transcription factor, allosteric factor, Cpf1, PAM, gRNA, CRISPR, CAS12A, detect

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	LIANG, Mindong 等. "A CRISPR-Cas12a-derived Biosensing Platform for the Highly Sensitive Detection of Diverse Small Molecules" Nature Communications, 第10卷, 2019年 8月 14日 (2019 - 08 - 14), 第1-9页	1-47
A	CN 107976411 A (中国科学院微生物研究所) 2018年 5月 1日 (2018 - 05 - 01) 权利要求1-8	1-47
A	US 10253365 B1 (The Regents of the University of California) 2019年 4月 9日 (2019 - 04 - 09) 说明书全文	1-47
A	CAO, Jiaqian 等. "Harnessing a Previously Unidentified Capability of Bacterial Allosteric Transcription Factors for Sensing Diverse Small Molecules in vitro" Science Advances, 第4卷, 第11期, 2018年 11月 28日 (2018 - 11 - 28), 第1-11页	1-47

☒ 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

2020年 5月 23日

国际检索报告邮寄日期

2020年 6月 30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

授权官员

孙尚瑜

电话号码 (86-512)88996410

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	LI, Shi-Yuan 等. "CRISPR-Cas12a-assisted Nucleic Acid Detection" Cell Discovery, 第4卷, 第20期, 2018年 4月 24日 (2018 - 04 - 24), 第1-4页	1-47
A	LI, Shi-Yuan 等. "CRISPR-Cas12a Has both cis- and trans-cleavage Activities on Single-stranded DNA" Cell Research, 第28卷, 第4期, 2018年 3月 12日 (2018 - 03 - 12), 第1-3页	1-47

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/CN2020/084111

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	107976411	A	2018年 5月 1日	无			
US	10253365	B1	2019年 4月 9日	W0	2019104058	A1	2019年 5月 31日