国家标准《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》

（征求意见稿）

国家标准编制说明

《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》

标准起草组

2025 年 5 月

目录

（一）工作简况，包括任务来源、协作单位、起草过程、国家标准主要起草人及其所做的工作等 3

（二）国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据） 7

（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益： 10

（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况 28

（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因 29

（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系 29

（七） 重大分歧意见的处理经过和依据（附《征求意见汇总处理表》、重大意见分歧的处理结果和依据） 29

（八） 设计专利的有关说明 29

（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议 29

（十）其他应予说明的事项 30

（一）工作简况，包括任务来源、协作单位、起草过程、国家标准主要起草人及其所做的工作等

1. 任务来源

本项目根据全国生化检测标准化技术委员会于 2024 年 5 月 8 日下达的 2024 年第二批推荐性国家标准计划和推荐性国家标准外文版计划(国标委发{2024} 18 号)，本项目计划编号为 20240917-T-469，名称为蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法。

本标准由全国生化检测技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本标准由深圳市第二人民医院、无锡吐露港生物医药科技有限公司等单位联合起草。

2. 目的和意义

具有酶活性的蛋白通常以活性单位浓度来标识蛋白的浓度，以便于确定酶促反应的用量，如聚合酶活性单位浓度通常为 5 U/μL，核酸酶活性单位浓度为 1 U/μL。然而对于 Cas12a 蛋白，由于缺乏统一的反式切割活性单位(*trans*-U)，目前国内外生产厂家及相关研究单位，例如 NEB、百普赛斯、金斯瑞、吐露港、东抗生物等几乎所有在售的产品，仍然以质量浓度或摩尔浓度来标识蛋白浓度，因而对于应用 Cas12a 蛋白的反式切割活性来进行体外检测的相关产品和技术，其准确用量难以推导，造成检测结果往往存在较大偏差。这无疑将限制 CRISPR-Cas 检测技术的应用范围。**因此，亟需制定 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法和定义 CRISPR Cas12a 反式切割活性单位的国家标准，以规范 CRISPR-Cas 检测技术。**

其次，目前中外 CRISPR 检测技术公司不分伯仲，基本处于同一起跑线，当前市场上还未形成绝对垄断的 CRISPR-Cas 通用型检测技术和产品。在此关

键发展时期，我们既需要在技术标准层面上不断优化 CRISPR 检测技术的便捷方法，在技术原研创新中抢占专利优势，也需要在市场产品层面加大产品应用的范围，反过来不断促进技术的发展与进步。可喜的是，在 CRISPR-Cas 检测技术领域，以吐露港为代表的一批中国企业，站在了国际前沿水平上，可与国外企业一较高下。**因此，为抢占国际市场上 CRISPR-Cas 检测技术的商业化和产业化的制高点，亟需制定 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法的国家标准，以优化 CRISPR-Cas 的全链条产业。**

本标准作为规范和有效开展 Cas12a 蛋白反式切割活性的检测方法的技术导则，提出了 CRISPR-Cas12a 蛋白反式切割活性单位的定义，规定了 Cas12a 蛋白反式切割活性检测过程中各环节应遵循的主要原则。本标准明确所用的试剂、仪器以及相关的活性评估方法等内容。

3. 协作单位

本标准起草承担单位为深圳市第二人民医院、无锡吐露港生物医药科技有限公司、中国测试技术研究院生物研究所等单位负责标准的起草工作，同时参与单位负责前期方法结果比对、配合牵头单位收集样本并对样本进行方法适用性研究。本标准测试方法验证单位有深圳大学、江苏析纳生物科技有限公司、淮北师范大学、复旦大学附属华山医院、上海师范大学等 5 家单位。

4. 标准编制过程和主要工作过程

（1）2024 年 01 月至 2024 年 03 月，标准起草单位组织相关技术人员对《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外近百篇 Cas12a 相关诊断技术的标准、文献，了解了国内外相关技术动态，并且明确了工作思路和进程安排。

（2）2024 年 04 月，标准起草单位在收到国家标准化管理委员会（2024）18 号文件《2024 年第二批推荐性国家标准计划的通知》后，提交了项目建议书以及国家标准草案。

（3）2024 年 05 月收到全国生化检测标准化技术委员会（2024）9 号文件《关于下达 2024 年第二批推荐性国家标准计划的通知》以及该标委会转发的国标委发（2024）18 号《2024 年第二批推荐性国家标准计划和推荐性国家标准外文版计划》立项文件，计划编号：20240917-T-469。

（4）2024 年 08 月 31 日，起草小组对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准的起草工作，与会专家就《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准（草案）进行了讨论，提出了宝贵的意见和建议。标准起草小组根据专家意见进行了修改和完善。

（5）2024 年 08 月至 2025 年 05 月，进行《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准的起草研制工作。完成了《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准的编制说明，并对全国生化检测标准化技术委员会汇报了《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准（草案）进一步完善和修改情况，向全国生化检测标准化技术委员会提交了《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准（征求意见稿）和技术说明。

（6）2025 年 06 月 20 日，全国生化检测标准化技术委员会就《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准向全体委员专家（44 位专家）征求意见。共收集 44 位委员专家回函，其中收到 份有意见或建议的单位回函。起草小组已按照专家意见建议进行修改完善。详见“国家标准反馈意见汇总表—《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准征求意见稿。”

（7）2025 年 月 日， ，就《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准（征求意见稿）向行业相关专家征求意见。其中 提出了宝贵意见建议，起草单位已按照 的意见建议进行修改完善。详见

“国家标准反馈意见汇总表）— 《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准征求意见稿。”

（8）　　年　月至　月，标准起草小组根据专家意见，对《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准（征求意见稿）进行修改和晚上，形成送审稿，报全国生化检测标准化技术委员会进行审定。

（9）　　年　月　日至　月　日，全国生化检测标准化技术委员会就《蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法》标准送审稿组织函审。

本 TC 全体委员人数为 75 人，参与投票 XX 人，投票同意本标准通过审查 XX 人，达到 3/4 通过。全体委员中，有 XX 人为起草组成员。

（10）　　年　月　日至　月　日，标准起草小组针对函审专家提出的意见建议进行了汇总整理，主要是单位、格式等一般编辑性的建议，已按专家意见建议修改。有几条技术性意见修改情况如下：

（11）　　年　月　日至　月　日，　　会后起草小组对标准文本进行了进一步修改和完善，形成了报批稿。报全国生化检测标准化技术委员会。

5. 国家标准主要起草人及其所做的工作

主要起草人为： 顾大勇、王金、庄松宽、李捷。起草人员负责标准制定工作的组织、协调，相关资料的查阅、收集，检测方法研究及方法学验证，标准文件及编制说明的起草、撰写，标准制定期间多次组织召开研讨会，通过电子邮件、网站公示等方式，征集、整理和归纳相关的意见和建议。

（二）国家标准编制原则、主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）及其确定依据（包括试验、统计数据）

1. 标准编制原则

本标准的起草是在对国内外资料分析、研究及整理的基础上，遵循“实用性、协调性、科学性、先进性”的原则，并注重标准的可操作性和广泛的适用性，按照标准的制定及《国家标准管理办法》的程序与基本要求进行。在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写规则及表述依据 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和编写规则》的要求编写，在标准制定过程中力求做到：技术内容表述科学严谨；文本语言精炼明确；层次编排、章节划分清晰，符合逻辑与规定。

1.1 实用性原则

根据市场应用和行业技术的实际情况出发，坚持先进性与实用性相结合、统一性与灵活性相结合的原则，以标准化为引领，最大限度的促进我国 Cas12a 蛋白生产、建立 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性的检测标准等方面的创新与发展。本标准对 Cas12a 蛋白反式切割的活性检测进行规范统一，为 Cas12a 蛋白酶相关产品的活性评价提供技术依据。

1.2 协调性原则

本标准与现行相关法律法规、标准等协调一致。

1.3 科学性原则

根据样品检测结果和实际需求，在确定本标准所用的仪器、试剂以及相关的活性评估方法等内容时，综合考虑行业的需求、科学研究需要和用户的利

益，寻求最大经济社会效益，充分体现了标准在技术上的先进性和经济上的合理性，使标准内容更加完善、全面，且易于实施和应用。

1.4 先进性原则

根据国情，本标准制订坚持面向市场、服务产业的原则。结合我国 Cas12a 蛋白应用领域的实际现状，并以引领和促进 Cas12a 蛋白应用质量水平的提升为目标而制定。制定标准时同时要考虑适应市场需求，满足行业发展，为科研开发、企业生产、质量检验提供技术指导，有助于引导本行业采用标准进行规范化生产，具有一定的先进性。

2. 标准主要内容

2.1 标准编写遵循 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和编写规则》的有关要求。

2.2 标准编写内容参考的相关标准包括：GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

2.3 本标准主要定义了 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性单位（*trans*-U），规定了 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法的检测流程。本标准为首次制定的国家标准。

2.4 本标准的重要内容包括有：范围、规范性引用文件、术语和定义、原理、试剂和材料、仪器和设备、试验步骤、试验数据处理共 8 项内容如表 1 所示。

表 1 本标准的主要内容

章条	名称
1	**范围**
2	**规范性引用文件**

3	**术语和定义**
4	**原理**
5	**试剂和材料**
6	**仪器和设备**
7	**试验步骤**
8	**试验数据处理**

3. 检测方法确定依据

由于 Cas12a 蛋白与 crRNA、靶标 DNA 形成三元复合体后，该复合物就会显示出不依赖于靶标核酸序列的核酸酶活性，可将体系中任意序列的单链 DNA 切成碎片，该酶切活性被称为 Cas12a 蛋白反式切割活性。从国内外文献检测方法来看，检测 Cas12a 蛋白的反式切割活性的反应体系中常见的报告系统主要有荧光报告法、电化学法、比色法。其中荧光报告法使用荧光基团和淬灭基团双标记的单链 DNA 分子探针为底物，经 Cas12a 蛋白切割后会释放荧光信号，其荧光强度与 Cas12a 蛋白的反式切割活性在一定浓度范围内成正相关性，具有灵敏度高、操作简便、反应快速、适用于多种场景等优点而作为当前检测 Cas12a 蛋白反式切割活性的主流报告系统。基于以上所述，鉴于目前我国并未制定关于 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性的检测方法，同时目前尚未对反式切割单位（*trans*-U）这一术语作出明确定义，属于该领域的空缺。因此，亟需制定 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法和定义 CRISPR Cas12a 反式切割单位（*trans*-U）的国家标准，以规范 CRISPR-Cas 检测技术。

（三）主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益：

1. Cas12a 蛋白反式切割活性的检测原理

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

2. 试剂和材料

2.1 符合 GB/T 6882 规定的无核酸酶的一级水、分子级水

2.2 LbCas12a 蛋白（CataLog No.#32108）的纯化制备流程

LbCas12a 蛋白的纯化制备的核心流程包括菌体培养与诱导表达、菌体裂解与初步亲和层析纯化、精细纯化与脱盐处理、制剂分装与冷冻保存等关键步骤。首先将编码 LbCas12a 蛋白的基因序列（如图 1 所示）克隆进入 pET-28a 质粒，构建重组质粒表达载体。接着将其转入大肠杆菌 BL21(DE3)菌株，接种至含卡那霉素的 LB 培养基中，37 ℃振荡培养至 OD 600 值位于 0.6-0.8 之间。此时加入终浓度为 1 mM 诱导剂 IPTG，16℃低温诱导 12-16 小时。接着采用高压匀浆或超声波破碎等裂解工艺裂解菌体，15000 rpm 离心 1 小时。收集上清液通过Ni-NTA 亲和层析（His 标签捕获）进行初步纯化，此步骤要注意洗脱缓冲液

的 pH 值、梯度洗脱咪唑浓度、His-Trap HP 柱效等关键参数。然后通过离子交换层析去除杂蛋白，或使用凝胶层析柱进一步精细纯化。最终收集目标蛋白进行浓缩操作与缓冲液置换。同时进行纯度测定和活性验证，将其按一定摩尔浓度分装后置于-80 ℃保存。

tcagtgtttcacgctggtctgagcatactccagccactccttgttgctgatggcgatcttcaccttgtccagcttctcgtcctcggccttctta
aactggccgatggcccaaagcacctttctggcgatgttgtaagcgccgttagcatcggcattcttgggcaggatagcattctcctgggcc
tcgtagtttctgctgtcgtagaagatgccgtcgctgtttttcacggggctgataaggaagtccacgtcggttctgccggtgatgctgtttctc
atctgcagcatcaggctcatcagggccatgaagctgctgtagaaggccttgtcgctctgttcgcacagcagggctctaatgtcgccctg
ctggtagttgatgccgtacttgttgaacagctccttgtaggcgcttgtcagacacacctcctcccagtcgaacacgttgttcttcttggggtt
tctgaagattctgattctgttgccgtagctgtacagcttccacttcttgatgtagtcggcgtcggttctgctgaagttcttgtagtccagggca
aattcaaacaggtcctcctcgggcacgtacatgattctgtcgaagctgctgatgaacttcttgctgtcggcgatgctggtgtacttggtctt
cagcaggttcacaaagccggtgctagggtcgatcttagatgtcagccaggcggggatgtagaagatgaagccgttctgggtgctcatg
ctcttgaagctctcgaacttgttggtgatctggtatcccttcagagctccgcctgtagcacaggggttgctcttcttgtccaccatgtagttc
agcttgtcgatcagcatcttctcgaacttctggtacacctgcttctccaccttcactctgctgttcttgaagccgctgttcagatcctccagag
cgatcacggcatcgtacttctccaccagctcgcagatcttgtgcaccacctggctaatgtagccggccttcagctccttgatgttctcgat
gctggtccagttctgtctggcctcgaatctctccttctccttcttgtccagcaggctgtggtagtcggtcttgattctgatgccgttgaagttg
ttgatgatctcgttcaggctgtactgctccacgatgtttcccttgccgtccaccaccacgatgtacagcaggtttctctcgcctctgtcaatg
ccgatcacgtaggggttgtcgtcgtgcttcagcagcactctcacctcggtgttgatcttgaagatgttcttggggcacttgttgatggcgat
ggggatatgcagctcgtactggtcctcgctgaatctcttgtccttgtacacgtcgtagctcagggtggtggttttcttggggttgtcggggt
tcttgttagcgatggggctattggcaggatgcaccaccagctcttccttcttcaggctggctcttctcatgaacagttcagcgcctccagaa
agtctgatctggccgtggttgttctcgtcgaacagcagcttgaagtacatggtgtgcagattgggggttccgtgagacttgtcgctgaagt
ccttgttgtagatctggaacatgtacagcttgccctcttccaccagcttgtccacctccttcttgctggcgctctcgaagctcaccttgtatcc
ctgctcctccacttctctgtagaagccggcgatgtccttgtacttctcggtctcgctgaagttgaagtcgtaggcgttgctccacttggggt
atctgctgatgctgtccttgaagaagtcgatcagcttgtggcagtcgttcaggttgaacatgtcgcccttcttgaaggtgccgttcttgtag
atcttctggatgtcctcgctggggttgtagtaggccatccacttcttgctgaagaacaccttgggcagcattttattagggccgggcagca
gcttgtagttgatcttctcgtagttgccgttcacgtcgtccttgtcgatcttctgcaggcacttggcgtacttcttgtccatgatggccaggta
gtacttgctgccgtatctca

图 1 LbCas12a 蛋白的基因序列

2.3 10×活性检测缓冲液

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

2.4 10×退火缓冲液

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

2.5 1 μmol/L Cas12a 蛋白工作溶液

精密量取 10 μL 10 μmol/L Cas12a 蛋白溶液，溶于 90 μL 1×活性检测缓冲液中，充分混匀。

2.6 1 μmol/L crRNA 溶液

精密量取 2 μL 100 μmol/L crRNA 溶液，溶于 198 μL 无核酸酶的一级水中。

crRNA 序列为 5'-AAUUUCUACUCUUGUAGAUUUAUCGCAACUUUCUACUGAAUU-3'。

2.7 100 nmol/L 靶标双链 DNA 溶液

精密量取 50 μL 10 μmol/L 正向引物，10 μL 10 μmol/L 反向引物，在 1×退火缓冲液中退火，95 ℃反应 2 分钟，以 0.1 ℃/秒的速率缓慢降到 25 ℃，用无核酸酶的一级水稀释成 100 nmol/L。

其正向引物序列为：

5'-GTTGTAAAACGACGGCCAGTTTTGTTATCGCAACTTTCTACTGAATTCG-3'。

反向引物序列为：

5'-CCGAATTCAGTAGAAAGTTGCGATAACAAAACTGGCCGTCGTTTTACAAC-3'。

2.8 5 μmol/L 单链 DNA 荧光报告探针溶液

精密量取 10 μL 100 μmol/L 单链 DNA 荧光报告探针溶液，溶于 190 μL 无核酸酶的一级水中。

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

3. 仪器和设备

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

4. 试验步骤和试验数据处理

4.1 已发生反式切割反应的实验组的标准曲线制定

4.1.1 不同浓度的单链 DNA 荧光报告探针溶液梯度稀释

取 9 个无菌的 1.5 mL 离心管并标记，按表 2 的配制方法将单链 DNA 荧光报告探针母液进行连续 2 倍梯度稀释，得到 8 个不同浓度梯度工作液，同时以相同体积的无 RNA 酶超纯水作为空白对照。

表 2 单链 DNA 荧光报告探针溶液稀释梯度表

单链 DNA 荧光报告探针溶液浓度（1 nmol/L，代码）	配制方法
2500.00(S_1)	取 100 μL 5 μmol/L 单链 DNA 荧光报告探针溶液，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
1250.00(S_2)	取 100 μL S_1，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
625.00(S_3)	取 100 μL S_2，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
312.50(S_4)	取 100 μL S_3，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。

续表 2 第 2 页/共 2 页

156.25(S_5)	取 100 μL S_4，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
78.13(S_6)	取 100 μL S_5，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
39.06(S_7)	取 100 μL S_6，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
19.53(S_8)	取 100 μL S_7，加入 100 μL 无核酸酶的一级水中，于旋涡混匀器混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
0(NC)	无核酸酶的一级水

4.1.2 加入靶标双链 DNA 的 Cas12a 蛋白实验组的反式切割反应

取 9 个无菌的 1.5 mL 离心管编号，按照表 3 配制 Cas12a 蛋白反式切割反应体系，不同编号的离心管中单链 DNA 荧光报告探针的浓度不同。将配制完成的混合体系在旋涡混匀器混匀 10 秒并离心使反应液全部聚于离心管底部，再以 20 μL/管分装于 PCR 八连管内，每个浓度做 3 个平行重复。将装有反应液的 PCR 八连管置于荧光定量 PCR 仪中，设置反应温度为 37 ℃，每隔 15 秒采集一次荧光信号，连续收集 30 分钟。

表 3 加入双链 DNA 靶标的 Cas12a 蛋白反式切割反应体系

序号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
单链 DNA 荧光报告探针工作液（μL）	NC	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8
					8				
10×活性检测缓冲液（μL）					2				
1 μmol/L crRNA 母液（μL）					0.8				
1 μmol/L Cas12a 母液（μL）					0.4				
0.1 μmol/L 靶标双链 DNA 母液（μL）					8				
水					0.8				

续表 3 第 2 页/共 2 页

总体积	20

4.1.3 结果分析计算

选取不同浓度梯度单链 DNA 荧光报告探针平台期的荧光值，减去空白对照平台期的荧光值得到的平均值即为净荧光值F_{cl}。以各浓度梯度已被切割的单链 DNA 荧光报告探针的浓度值(nmol/L)为 X 轴，以各浓度梯度已被切割的单链 DNA 荧光报告探针的净荧光值F_{cl}为 Y 轴绘制散点图，并做线性拟合，制作标准曲线，得到如下图 2 所示的已发生反式切割反应实验组标准曲线图，其中R^2≥0.99。

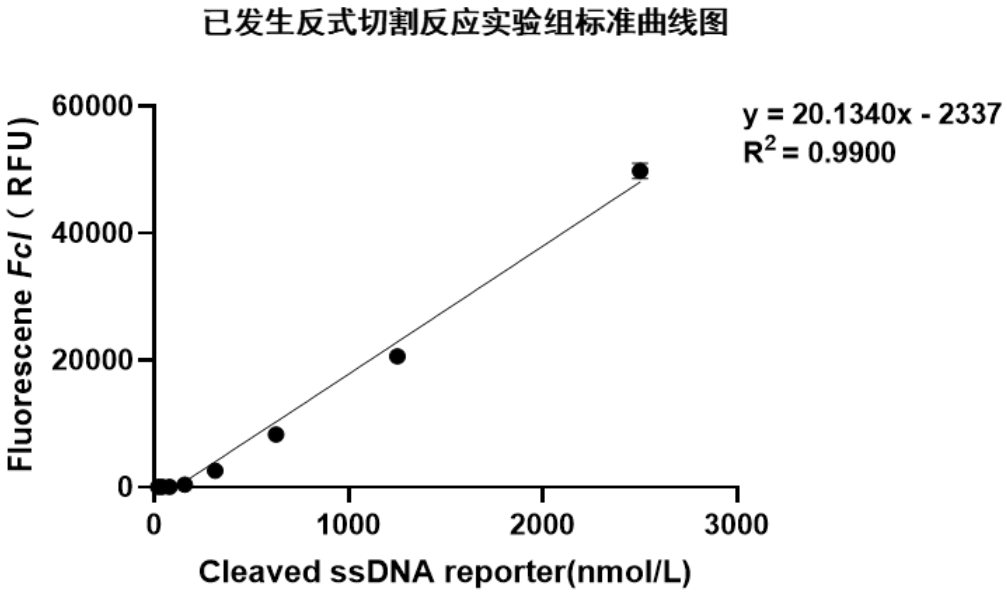

图 2

由图 2 所得，已发生反式切割反应的实验组线性方程拟合曲线的斜率S_{cl}=20.1340。

4.2 未发生反式切割反应的实验组的标准曲线制定

4.2.1 不同浓度的单链 DNA 荧光报告探针溶液梯度稀释

按照表 2 的配制方法将单链 DNA 荧光报告探针母液进行连续 2 倍梯度稀释，得到 8 个不同浓度梯度工作液，同时以相同体积的无 RNA 酶超纯水作为空白对照。

4.2.2 未加入靶标双链 DNA 的 Cas12a 蛋白实验组的反式切割反应

取 9 个无菌的 1.5 mL 离心管编号，按照表 4 配制未加入靶标双链 DNA 的 Cas12a 蛋白反式切割反应体系，不同编号的离心管中单链 DNA 荧光报告探针的浓度不同。将配制完成的混合体系在旋涡混匀器混匀 10 秒并离心使反应液全部聚于离心管底部，再以 20 μL/管分装于 PCR 八连管内，每个浓度做 3 个平行重复。将装有反应液的 PCR 八连管置于荧光定量 PCR 仪中，设置反应温度为 37 ℃，每隔 15 秒采集一次荧光信号，连续收集 30 分钟。

表 4 未加入双链 DNA 靶标的 Cas12a 蛋白反式切割反应体系

序号	0	1	2	3	4	5	6	7	8
单链 DNA 荧光报告探针工作液（μL）	NC	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6	S_7	S_8
					8				
10× 活性检测缓冲液（μL）					2				
1 μmol/L crRNA 母液（μL）					0.8				
1 μmol/L Cas12a 母液（μL）					0.4				
水					8.8				
总体积					20				

4.2.3 结果分析计算

选取不同浓度梯度单链 DNA 荧光报告探针平台期的荧光值，减去空白对照平台期的荧光值得到的平均值即为净荧光值F_{ucl}。以各浓度梯度未被切割的单链 DNA 荧光报告探针的浓度值(nmol/L)为 X 轴，以各浓度梯度未被切割的单链 DNA 荧光报告探针的净荧光值F_{ucl}为 Y 轴绘制散点图，并做线性拟合，制作标准曲线，得到如下图 3 所示的未发生反式切割反应实验组标准曲线图，其中R^2≥0.99。

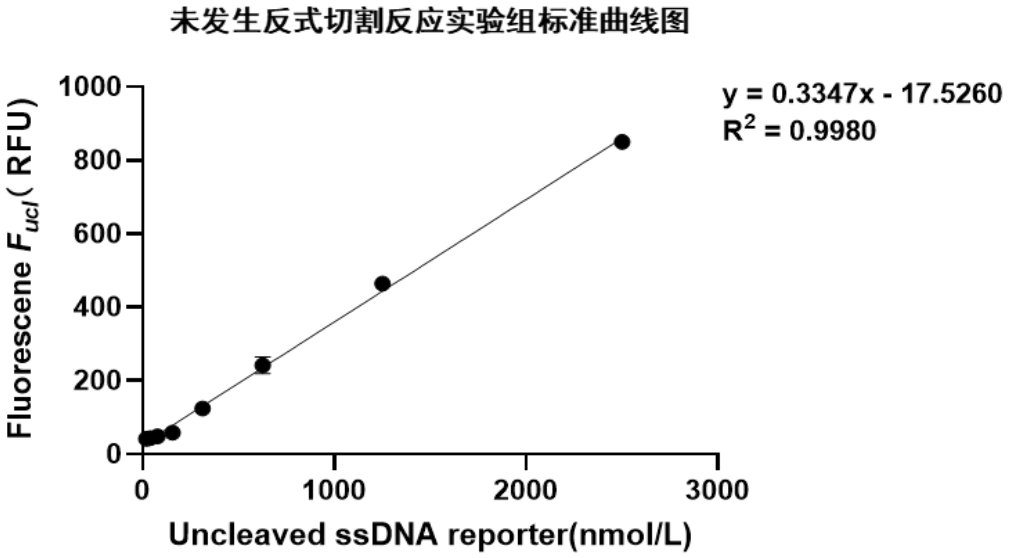

图 3

由图 3 所得，未发生反式切割反应的实验组线性方程拟合曲线的斜率S_{ucl}=0.3347。

4.3 不同浓度 Cas12a 蛋白反式切割活性的测定和计算

4.3.1 不同浓度 Cas12a 蛋白梯度稀释

取 7 支无菌的 1.5mL 离心管并标记，根据表 5 的配制方法用 1×活性检测缓冲液将 Cas12a 蛋白进行连续 2 倍梯度稀释，得到 6 个不同浓度梯度 Cas12a 蛋白工作液，同时以相同体积的无 RNA 酶超纯水作为空白对照。

表 5 Cas12a 蛋白酶稀释梯度表

工具酶量(nmol/L，代码)	配置方法
10.000(E_1)	取 2 μL 1 μmol/L Cas12a 蛋白工作溶液，加入 198 μL 1×活性检测缓冲液，于旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
5.000(E_2)	取 100 μL E_1，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，于旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
2.500(E_3)	取 100 μL E_2，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，于旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
1.250(E_4)	取 100 μL E_3，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，于旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
0.625(E_5)	取 100 μL E_4，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，于旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
0.313(E_6)	取 100 μL E_5，加入 100 μL 1×活性检测缓冲液，于旋涡混匀器上轻微混匀 10 秒后，在掌上离心机上离心数秒。
0(NC)	无核酸酶的一级水

4.3.2 Cas12a 蛋白反式切割活性测定

取 7 个无菌的 1.5 mL 离心管编号，按照表 6 配制 Cas12a 蛋白反式切割活性的反应体系，不同编号的离心管中所需的 Cas12a 蛋白浓度不同。将配制完成的混合体系在旋涡混匀器混匀 10 秒并瞬时离心使反应液全部聚于离心管底部，再以 20 μL /管分装于 PCR 八连管内，每个浓度做 3 个平行重复。将装有反应液的 PCR 八连管置于荧光定量 PCR 仪中，设置反应温度为 37 ℃，每隔 15 秒采集一次荧光信号，连续收集 30 分钟。

表 6 Cas12a 蛋白反式切割活性反应体系

序号	0	1	2	3	4	5	6
Cas12a 酶工作液（μL）	NC	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6
				8			
10× 活性检测缓冲液（μL）				2			
1 μmol/L crRNA 母液（μL）				0.04			
0.1 μmol/L 靶标双链 DNA 母液（μL）				0.4			

续表 6 第 2 页/共 2 页

10μmol/L 单链 DNA 荧光报告探针工作液（μL）	2
水	7.56
总体积	20

4.4 Cas12a 蛋白反式切割活性计算

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

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

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

式中：

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

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

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

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

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

4.4.2 初速度V_0计算

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

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

式中：

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

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

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

ΔT——采样间隔时间，单位为分钟(min)。

4.4.3 Cas12a 蛋白反式切割活性 A(trans-U/pmol)计算：

以所用不同浓度的 Cas12a 蛋白用量[E] (pmol)为横坐标 X 轴，对应浓度的 Cas12a 反式切割反应荧光曲线的初速度 V_0 (pmol/min)为纵坐标绘制散点图，并选取 Cas12a 蛋白用量为 0.0800 pmol、0.0400 pmol、0.0200 pmol、0.0100 pmol、0.0050 pmol、0.0025 pmol 共 6 组数据进行线性拟合，其 R^2≥0.99。该线性拟合的斜率值为 k_{cat}，即 $V_0 = k_{cat} \times [E]$。结果如图 4 所示：

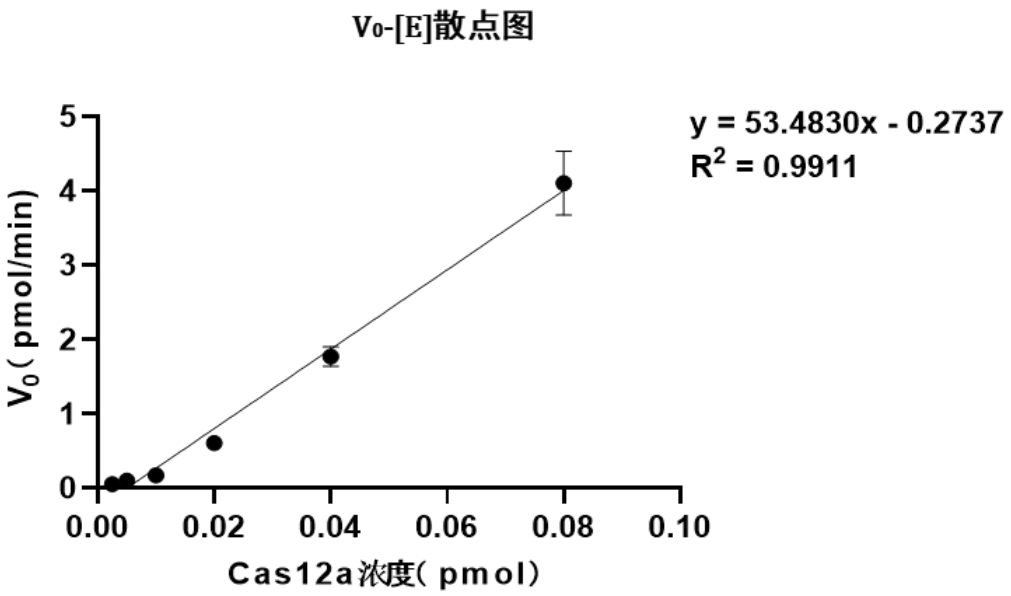

图 4

根据 Cas12a 蛋白反式切割活性单位的定义，被测样品的酶活性按公式（3）计算：

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

式中：

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

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

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

4.4.4 Cas12a 蛋白反式切割单位(trans-U)：

由图 4 示例可得，在 20 μL 反应体系中，温度为 37 ℃条件下，1 分钟内切割 1 pmol 单链 DNA 荧光报告探针所需的 Cas12a 蛋白量为$\frac{1}{k_{cat}}$即 0.0187，其单位为皮摩尔(pmol)。故所测 Cas12a 蛋白样本的 1 个反式切割单位(*trans*-U)对应 0.0187 pmol Cas12a 蛋白。

5. CRISPR Cas12a 反式切割活性测定方法的优化

由于酶的活性会受到反应体系中温度、pH 值、所用缓冲液及其组成成分、底物报告探针序列碱基组成及长度、反应时间等多种参数的影响，针对 CRISPR Cas12a 反式切割活性的测定方法的优化，采用以下系统化实验设计方案，对上述的关键参数进行充分测试，从中筛选出测定 Cas12a 蛋白反式切割活性方法对应的最优条件参数。

5.1 反应温度的确定

温度变化对 Cas12a 蛋白的反式切割活性产生显著性影响，一方面提高温度可以增加酶促反应的速度，另一方面酶的化学本质是蛋白质，温度过高可引起蛋白质变性，导致酶的失活。不同反应温度（17 ℃、27 ℃、37 ℃、47 ℃）对 Cas12a 蛋白的反式切割活性的影响如图 5 所示，综合初始反应速率 V_g 与达

到平台期的荧光信号增量两方面因素考虑，选取 37 ℃作为检测 Cas12a 蛋白反式切割活性的测定温度。

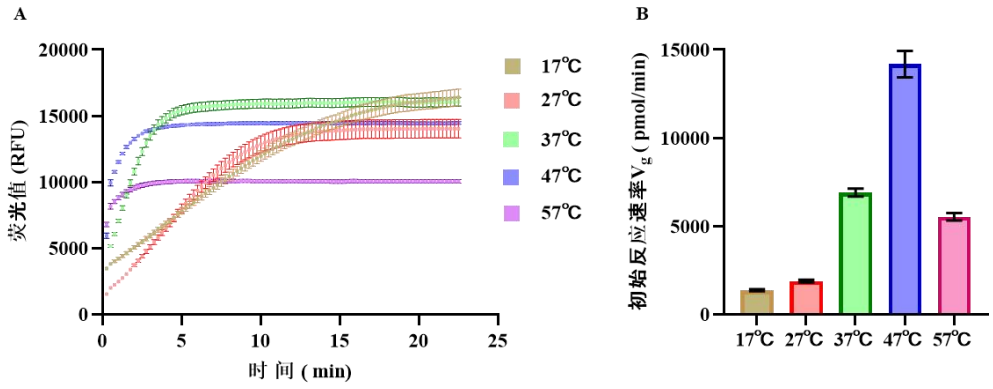

图 5 不同反应温度条件下的荧光曲线图和速率图

5.2 反应缓冲液的确定

确定 Cas12a 反式切割活性的反应缓冲液组分需结合其特异性、离子依赖性和反应动力学特性。反应体系中亚精胺作为带正电荷的多胺类化合物，能够通过静电作用中和 DNA 的负电荷，增强 DNA 与蛋白质的相互作用。Mg^{2+}作为核心辅助因子，直接影响酶活性、靶标识别效率和反应特异性。NaCl 作为离子强度稳定剂，维持缓冲液体系的渗透压和电导率。DTT 作为还原剂，维持 Cas12a 蛋白活性中心的巯基处于还原状态，防止其氧化失活。而反应体系中的甘油或 BSA 作为稳定剂和辅助因子，起增强 Cas12a 溶解性和热稳定性的作用。因此我们选择市场上成熟的含有以上相关组分的两种缓冲液 F(RNAPol Reaction Buffer， #B9012，其组分为 40 mM Tris-HCl；6 mM $MgCl_2$；1 mM DTT；2 mM spermidine；pH 7.9@25 ℃)与缓冲液 L(NEBuffer™ 3.1，#B7203，其组分为 100 mM NaCl；50 mM Tris-HCl；10 mM $MgCl_2$；100 μg/mL BSA；pH 7.9@25 ℃)与自研的 HOLMES 缓冲液作比较，由图 6 所示，选取 HOLMES 缓冲液为 Cas12a 蛋白反式切割活性测定时的反应缓冲液。

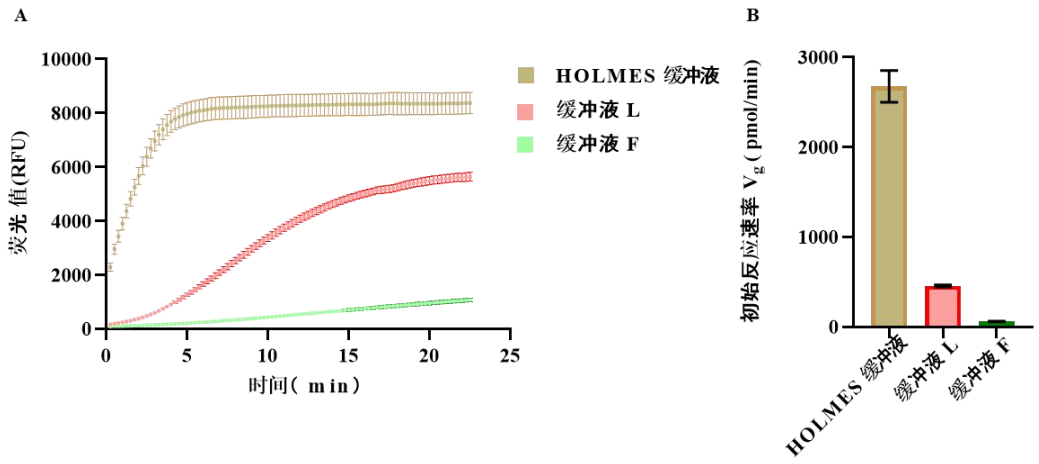

图 6 不同反应缓冲液下的荧光曲线图和速率图

5.3 反应 pH 的确定

反应体系中 pH 值对 Cas12a 蛋白反式切割活性具有显著影响，pH 值较低时会增强 Cas12a 蛋白的带电性，降低其稳定性，抑制其与靶标 DNA 结合。pH 值较高时又会降低反应体系中 Mg^{2+}的游离浓度，破坏活性位点的电荷分布，导致切割效率下降。因此选取上述的 HOLMES Buffer 1 作为缓冲液，用稀盐酸调整 pH 值分别为 1.5、3.0、6.0、8.0、8.5。结果如图 7 所示，8.5 是测定 Cas12a 蛋白反式切割活性的最适 pH 值。

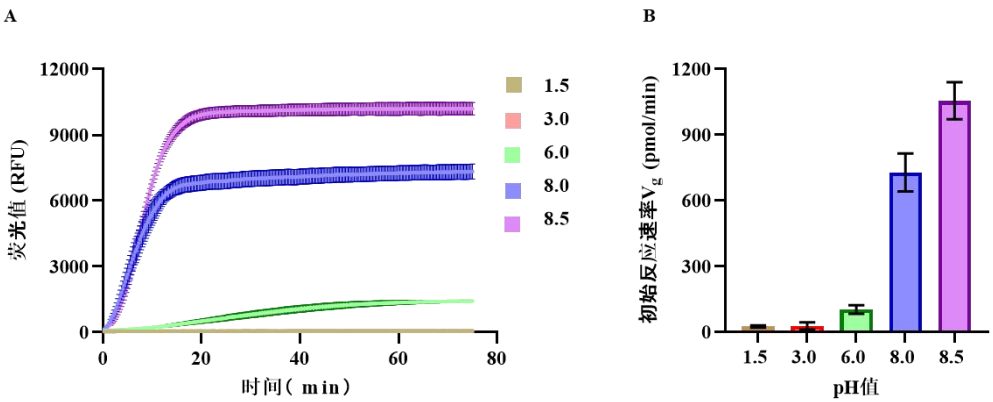

图 7 不同 pH 值下的荧光曲线图和速率图

5.4 单链报告探针的碱基组成和长度确定

未配对的单链 DNA 报告探针作为 LbCas12a 酶反式切割反应中的底物，其序列长度和碱基组成会影响反式切割效率。首先我们合成长度为 6 个碱基的均聚物单链报告探针，5’端修饰 FAM 荧光基团，3’端修饰 BHQ1 淬灭基团分别为 6A-FQ、6C-FQ、6G-FQ、6T-FQ。由图 8 可得，实验发现 6C-FQ 探针对应的反式切割反应速率为最大值。进一步我们合成了不同长度的 poly-C 单链报告探针，由图 9 所示，8 个碱基长度与 13 个碱基长度的 poly-C 单链报告探针的初始反应速率值相似，同时考虑到合成固定数量的单链 DNA 报告探针底物的经济成本，最终选择 8 个碱基长度的 poly-C 单链报告探即 8C-FQ 为检测 Cas12a 蛋白的反式切割活性的最佳底物。

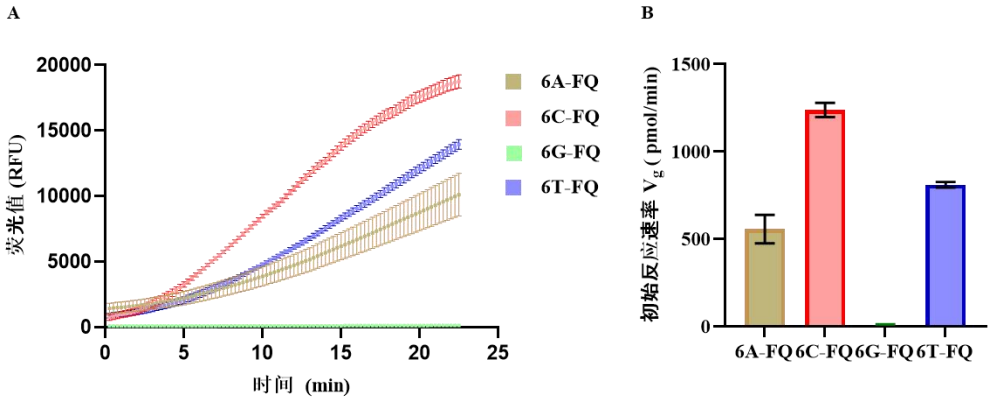

图 8 不同碱基组成的单链报告探针下的荧光曲线图和速率图

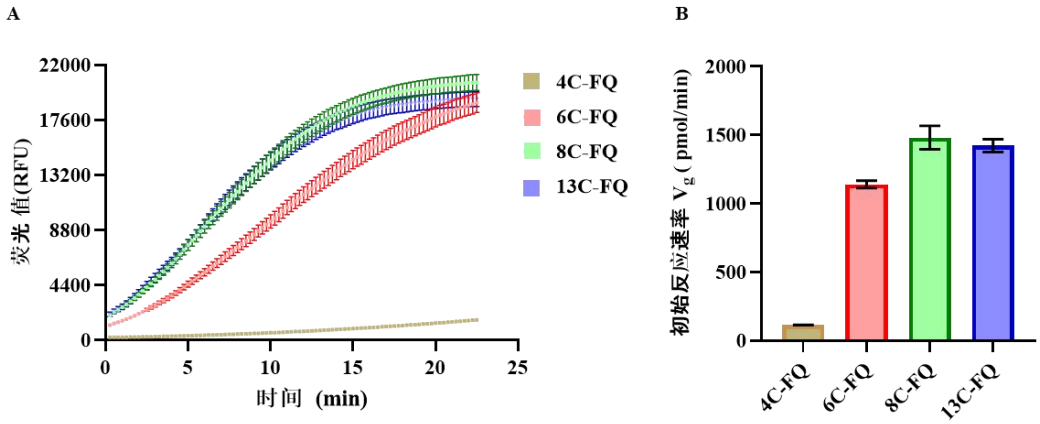

图 9 不同长度的 poly-C 单链报告探针下的荧光曲线图和速率图

5.5 反应时间的确定

针对切割组和未切割组的标准曲线而言，为了使所有不同浓度的 ssDNA-FQ 报告探针都达到荧光信号饱和值，考虑到使用不同品牌、不同仪器型号的荧光 PCR 仪，我们制作标曲的反应时间延长为 30 分钟。针对不同浓度梯度 Cas12a 蛋白的反式切割反应实验，我们设置 10 分钟、20 分钟、30 分钟、40 分钟、50 分钟五个不同的反应时间点，以其中 *trans*-U 值为 52.2730 的 Cas12a 蛋白进行重复性实验，收集不同时间点的数据进行计算整理。由图 10 和表 7 证明，30 分钟为测定不同浓度 Cas12a 蛋白反式切割活性的最佳反应时间。

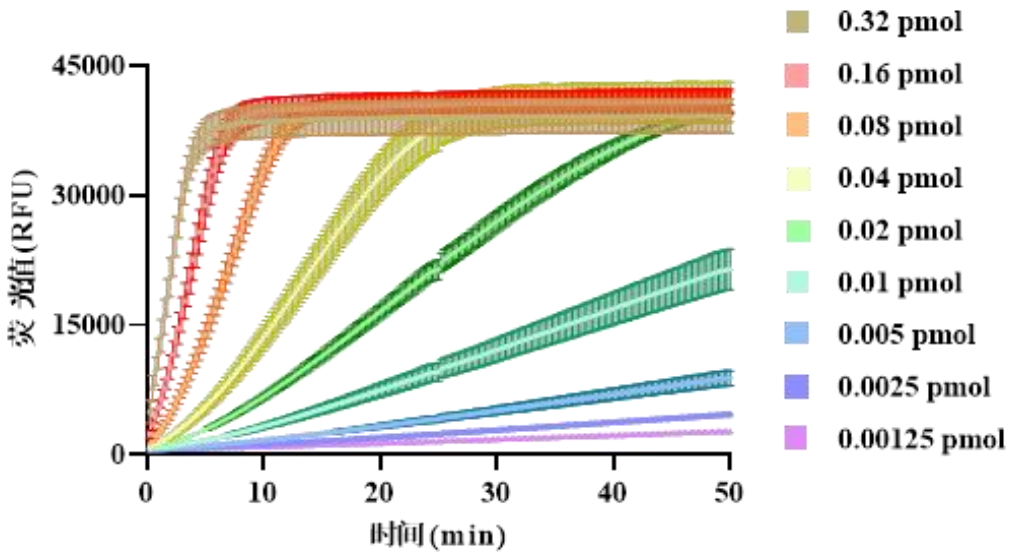

图 10 不同反应时间下的荧光曲线图

由表 7 可得，30 分钟、40 分钟、50 分钟三个不同反应时间点下取得的数据计算整理得到的 *trans*-U 值是一样的。

表 7 不同反应时间下的 *trans*-U 值

反应时间（分钟）	10	20	30	40	50
trans-U	55.8230	55.4577	52.2733	52.2733	52.2733

6. 精密度

取同一批次的 LbCas12a 蛋白，相同条件下连续测定 10 次，结果如表 8 所示，在重复性条件下获得的 10 次独立测定结果的绝对差值不应超过算数平均值的 10%，满足要求。

表 8 重复性条件下的 LbCas12a 蛋白反式切割活性测定数据

序号	1	2	3	4	5	平均值	RSD(%)
trans-U	12.4523	13.9406	12.8144	12.9055	12.8632	13.1570	3.8776
序号	6	7	8	9	10		
trans-U	12.629	13.9607	13.5931	12.9756	13.4351		

7.主要试验方法验证

7.1 不同单位对同一批次 Cas12a 蛋白的反式切割活性的检测结果

根据标准要求，标准起草小组对同一批次 Cas12a 蛋白的反式切割单位（*trans*-U）等关键指标参数进行了验证，实验验证样品由本标准起草单位提供，将验证样品分别委托至深圳大学、江苏析纳生物科技有限公司、淮北师范大学、复旦大学附属华山医院、上海师范大学等 5 家单位，使用本文件规定的方法进行检测，结果见表 9。从表 9 可知，本标准提出的 CRISPR Cas12a 反式切割活性的检测方法稳定可靠。

表 9 不同单位实验室同一批次 Cas12a 蛋白检测结果

序号	机构 A	机构 B	机构 C	机构 D	机构 E	平均值	RSD(%)
trans-U	53.4830	50.2090	52.2981	50.7675	52.6768	51.8869	2.3460

7.2 不同厂家的 Cas12a 蛋白的反式切割活性的检测结果

标准起草组依据标准草案中拟定的 Cas12a 蛋白的反式切割活性检测方法开展了验证实验。收集了市场上七个不同厂家的 Cas12a 蛋白，按照本标准的方法对其反式切割活性进行了测定。所得结果如表 10 所示，结果表明，该方法对于用统一的反式切割活性单位 *trans*-U 来评价 Cas12a 的酶活力，具有较强的普遍适用性。而由于现在市面上不同厂家仍然以质量浓度或摩尔浓度来标识蛋白浓度，其准确用量难以推导，造成检测结果往往存在较大偏差，这无疑将限制 CRISPR-Cas 检测技术的应用范围。这也进一步说明建立统一的以反式切割单位 *trans*-U 值为基础的测定方法具有重要意义。

表 10 不同厂家的 Cas12a 反式切割活性测定

厂家	标称摩尔浓度（μM）	反式切割活性 *trans*-U
a	1	33.0117
b	1	18.4910
c	27.40	37.1520
d	16.67	126.2132
e	10	20.8273
f	10	64.9053
g	10	10.3764

7.3 经济与社会效益

CRISPR-Cas12a 反式切割活性检测方法国家标准的建立，解决了该技术产业化的核心瓶颈——酶活性量化与质控的统一性问题，为产业规范化发展奠定了基础。通过定义标准化的检测流程、反式切割活性单位（*trans*-U）和数据计

算方法，该标准显著提升了检测结果的可靠性和跨平台可比性，有效降低了因酶活性差异导致的检测偏差。

从产业影响看，本标准文件将加速 CRISPR 检测技术在分子诊断、农业检疫、食品安全等领域的商业化进程，推动市场规模扩容。据预测，全球 CRISPR-Cas 市场将以超 30%的年复合增长率扩张，标准化生产将显著降低原材料成本（降幅可达 40-50%）和试剂盒开发周期（缩短 30%以上），使技术普惠成为可能。

社会效益方面，以本标准文件为基础的 CRISPR 检测技术将增强重大传染病应急能力，推动肿瘤早筛和遗传病诊断普及，提升新发疫情响应速度。在农业领域，该技术已实现对常见农作物病毒的高灵敏现场检测，为保障粮食安全和药材供应提供技术支持。

这一标准的成功制定，彰显了我国在 CRISPR 诊断领域的国际领先地位。未来应持续推进技术创新与标准迭代的双向促进机制，强化产学研用融合生态，同时布局国际标准化工作，将国内标准转化为全球共识，最终实现“技术-标准-产业”的协同发展和全球引领。

（四）与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

无。

（五）以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

检索国内外关于 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性的检测方法，未找到相关检测标准。

（六）与有关的现行法律、行政法规及相关标准的关系

本标准与现行的相关法律、法规、规章与相关标准保持一致。

（七）重大分歧意见的处理经过和依据（附《征求意见汇总处理表》、重大意见分歧的处理结果和依据）

标准编制过程中广泛征集了专家意见，所有意见均按照标准编制程序进行了采纳，不存在重大分歧意见。

（八）设计专利的有关说明

无。

（九）实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期建议等措施建议

为了贯彻实施本国家标准，建议开展本国家标准应用技术的培训工作。

1）首先应在实施前保证实时荧光定量 PCR 仪的正常运行，使得设备背景信噪比维持在较低区间，使研究单位及检测机构等都能正常检测样本，这是保证新标准贯彻实施的基础。

2）本次制定的标准，与研究院所、检测机构、生产企业等相关。对于标准使用过程中容易出现的疑问，起草单位有义务进行必要的解释。

3）可以针对标准使用的不同对象，如生产企业、质量监管等相关部门，有侧重地进行标准的培训和宣贯，以保证标准的有序贯彻执行。

4）建议本标准批准发布及实施。

（十）其他应予说明的事项

无。

蛋白检测 CRISPR Cas12a 蛋白反式切割活性检测方法标准起草组

2025 年 5 月