



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112760360 A

(43) 申请公布日 2021.05.07

(21) 申请号 202110302602.2

(22) 申请日 2021.03.22

(71) 申请人 洛阳赛奥生物工程技术有限公司

地址 471000 河南省洛阳市中国(河南)自由贸易试验区洛阳片区华夏路6号洛阳中科科技园2幢YF2006室

(72) 发明人 王进产

(74) 专利代理机构 郑州芝麻知识产权代理事务所(普通合伙) 41173

代理人 李悦

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6806 (2018.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

一种RNA保护剂及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种RNA保护剂,该保护剂中的 β -巯基乙醇、硫脲、乙二醇四乙酸二钠与盐酸胍共同作用可对RNase产生强烈的抑制作用,有效减弱核糖核酸酶对RNA的分解,有助于延长保持样本中RNA稳定性的时间。本发明还公开了一种RNA保护剂在保持样本中RNA稳定性的应用。经本发明得到的RNA保护剂保存的样本,其所含的RNA可用于所有关于RNA的后续实验,避免了液态保存RNA样本反复冻融对样本造成的损伤。本发明得到的RNA保护剂不影响RNA的完整性和活性,对RNA的保存、反复使用和长途运输具有重要的应用价值。

1. 一种RNA保护剂,其特征在于,包括以下组分:盐酸胍、柠檬酸钠、 β -巯基乙醇、硫脲、乙二胺四乙酸二钠、十二烷基肌酸钠、海藻糖、吐温80、Proclin 300、溶剂。

2. 如权利要求1所述的RNA保护剂,其特征在于,所述各组分的含量分别为:盐酸胍1~6mol/L、柠檬酸钠22~28mmol/L、 β -巯基乙醇0.05-0.3mol/L、硫脲45~54mmol/L、乙二胺四乙酸二钠8~12mmol/L、十二烷基肌酸钠0.2~0.8wt%、海藻糖0.6~1.2wt%、吐温80 (v/v) 0.02~0.1%、Proclin 300 (v/v) 0.05~0.5%。

3. 如权利要求2所述的RNA保护剂,其特征在于,所述各组分的含量分别为:盐酸胍4mol/L、柠檬酸钠25mmol/L、 β -巯基乙醇0.1mol/L、硫脲50mmol/L、乙二胺四乙酸二钠10mmol/L、十二烷基肌酸钠0.5wt%、海藻糖1wt%、吐温80 (v/v) 0.05%、Proclin 300 (v/v) 0.1%。

4. 如权利要求1所述的RNA保护剂,其特征在于,所述溶剂为水。

5. 如权利要求1-4任一项所述的RNA保护剂在保持样本中RNA稳定性的应用。

6. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述样本为病毒、细胞、细菌、组织、分泌物、拭子中的一种。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述样本的保存温度为-80℃~37℃。

8. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述拭子选自血拭子、鼻拭子、口腔拭子中的一种。

9. 如权利要求5所述的应用,其特征在于,所述保护剂的使用方法为将含RNA的样本浸没于RNA保护剂中。

一种RNA保护剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种RNA保护剂及其应用。

背景技术

[0002] 核糖核酸(Ribonucleic acid, RNA)存在于生物细胞以及部分病毒、类病毒中的遗传信息载体。由于至少几十个核糖核苷酸通过磷酸二酯键连接而成的一类核酸,因含核糖而得名。每个RNA分子都由核苷酸单元长链组成,每个核苷酸氮源含有一个含氮碱基、一个核糖和一个磷酸基。RNA为细胞的主要成分之一,参与细胞的各种功能活动,是生物学、医学和药学等生命有关学科的重要研究对象, RNA检测更是分子生物学研究的一个重要技术,包括生物芯片、基因表达矩阵分析和定量RT-PCR检测、分子诊断等。RNA检测在病原体感染临床诊断上具有下列优势:1.靶标为RNA,扩增启示模板数量高,检测灵敏度高;2.病原体死亡后, RNA降解速度快,检测结果可有效区分是否为一过性感染,有助于临床判愈及治疗方案选择,避免无效治疗。

[0003] 但是,大多数情况下,由于各种各样的原因, RNA从生物样本中提取出来后并不能立刻得到检测。含RNA的生物样品一旦从体内采集分离,它的RNA会变得非常不稳定,极易被降解。造成RNA降解的外界物理因素如温度、湿度、紫外线灯;化学因素如pH值、水解反应、氧化反应等;生物因素如酶解及微生物侵染等。且RNA是单链结构,在提取过程或保存过程中都极易发生降解。

[0004] 因此, RNA的提取和保存过程需要进行严格的处理,防止RNA发生特异或非特异的降解,以便于后续的研究使用。RNA保存过程中的质量和完整性对检测结果的准确性和可靠性有着重大影响。在生物样品中广泛存在并极度稳定的核糖核苷酸酶对RNA的水解作用很强,许多核糖核苷酸酶对RNA的降解作用不需要任何辅助因子,为RNA的纯化、储存和使用带来极大阻碍。针对组织样品,目前保存样品的方式主要为样品采集后直接低温保存,例如普遍应用的液氮保存。但是这种方法有较大的局限性,一是采用低温保存成本较高;二是对保存设备的有较高要求(例如液氮罐),如果不能将新鲜采集的样品立刻置于液氮中, RNA分子可能发生降解,也可能有其他影响因素使RNA状态发生改变,给后续的实验带来操作误差。因此,提供能够有效防止RNA降解、不影响后续检测结果的RNA保护剂对RNA的分子生物学检测非常重要,也是目前RNA保存迫切需要解决的技术问题。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术的不足,本发明的目的之一在于提供一种RNA保护剂,该保护剂可有效保持运输、保存样本中RNA稳定性。

[0006] 本发明的目的之二在于RNA保护剂在保持样本中RNA稳定性的应用。

[0007] 本发明的目的之一采用如下技术方案实现:

[0008] 一种RNA保护剂,包括以下组分:盐酸胍、柠檬酸钠、 β -巯基乙醇、硫脲、乙二胺四乙酸二钠、十二烷基肌酸钠、海藻糖、吐温80、Proclin 300、溶剂。

[0009] 进一步地,所述各组分的含量分别为:盐酸胍1~6mol/L、柠檬酸钠22~28mmol/L、 β -巯基乙醇0.05-0.3mol/L、硫脲45~54mmol/L、乙二胺四乙酸二钠8~12mmol/L、十二烷基肌酸钠0.2~0.8wt%、海藻糖0.6~1.2wt%、吐温80(v/v) 0.02~0.1%、Proclin 300(v/v) 0.05~0.5%。

[0010] 进一步地,所述各组分的含量分别为:盐酸胍4mol/L、柠檬酸钠25mmol/L、 β -巯基乙醇0.1mol/L、硫脲50mmol/L、乙二胺四乙酸二钠10mmol/L、十二烷基肌酸钠0.5wt%、海藻糖1wt%、吐温80(v/v) 0.05%、Proclin 300(v/v) 0.1%。

[0011] 进一步地,所述溶剂为水。

[0012] 本发明的目的之二采用如下技术方案实现:

[0013] RNA保护剂在RNA保护剂在保持样本中RNA稳定性的应用。

[0014] 进一步地,所述样本为病毒、细胞、细菌、组织、分泌物、拭子中的一种。

[0015] 进一步地,所述样本的保存温度为所述温度为-80℃~37℃。

[0016] 进一步地,所述拭子选自血拭子、鼻拭子、口腔拭子中的一种。

[0017] 进一步地,所述保护剂的使用方式为将含RNA的样本浸没于RNA保护剂中。

[0018] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0019] 1.本发明提供了一种RNA保护剂,其中盐酸胍作为离液盐,对RNA酶具有抑制作用; β -巯基乙醇、硫脲作为抗氧化剂降低酶类的生物活性,乙二胺四乙酸二钠可以螯合二价金属离子从而抑制核糖核酸酶的活性, β -巯基乙醇、硫脲、乙二胺四乙酸二钠与盐酸胍共同作用可对RNase产生强烈的抑制作用,有效减弱核糖核酸酶对RNA的分解,有助于延长保持RNA稳定性的时间。

[0020] 2.本发明还提供了一种RNA保护剂保持样本中RNA稳定性的应用,该保护剂可延长不同温度下含RNA样本的保存时间。使用该RNA保护剂可使RNA样本在37℃下保存3日、18~25℃下保存7日、2~8℃保存4周、-20℃或-80℃下可长期保存。虽然反复冻融的方法保存样本仍能使RNA具有很高的生物活性,但是经本发明得到的RNA保护剂保存的样本,其所含的RNA可用于所有关于RNA的后续实验,避免了液态保存RNA样本反复冻融对样本造成的损伤。本发明得到的RNA保护剂不影响RNA的完整性和活性,对RNA的保存、反复使用和长途运输具有重要的应用价值。

具体实施方式

[0021] 下面,结合具体实施方式,对本发明做进一步描述,需要说明的是,在不相冲突的前提下,以下描述的各实施例之间或各技术特征之间可以任意组合形成新的实施例。

[0022] 实施例1

[0023] 一种RNA保护剂,包含以下组分:

[0024] 盐酸胍4mol/L、柠檬酸钠25mmol/L、 β -巯基乙醇0.1mol/L、硫脲50mmol/L、乙二胺四乙酸二钠10mmol/L、十二烷基肌酸钠0.5wt%、海藻糖1wt%、吐温80(v/v) 0.05%、Proclin300(v/v) 0.1%,溶剂为水。

[0025] 配制完成得到的RNA保护剂为澄清透明的液体。

[0026] 将得到的RNA保护剂用于保护病毒中RNA的稳定性:取-70℃保存的 $10^{4.0}$ TCID₅₀/mL猪瘟疫病毒液和蓝耳病毒液各24支,每支0.5mL。实验按照不同保存温度-时间分为8组,其中

每组3支,其中实验组每支分别添加0.5mL的实施例1得到的RNA保护剂,分别置于如表1所述温度下保存一段时间。

[0027] 实施例2

[0028] 一种RNA保护剂,包含以下组分:

[0029] 盐酸胍1mol/L、柠檬酸钠22mmol/L、 β -巯基乙醇0.05mol/L、硫脲45mmol/L、乙二醇四乙酸二钠8mmol/L、十二烷基肌酸钠0.2wt%、海藻糖0.6wt%、吐温80(v/v)0.02%、Proclin300(v/v)0.05%,溶剂为水。

[0030] 配制完成得到的RNA保护剂为澄清透明的液体。

[0031] 将得到的RNA保护剂用于保护细胞中RNA的稳定性:将待保存的293T细胞样品进行常规细胞培养2-3天后,吸取培养液上清,转移至离心管中,1500r/min离心10min,收集细胞,弃上清;然后用冰浴的缓冲液PBS洗涤收集到的细胞,将细胞悬浮在少量缓冲液中。加入5-10倍体积的实施例2得到的RNA保护剂混匀,存放于收集管中。实验按照不同保存温度-时间分为8组,其中每组3个样品,置于如表1所述温度-时间条件下进行保存测试。

[0032] 实施例3

[0033] 一种RNA保护剂,包含以下组分:

[0034] 盐酸胍6mol/L、柠檬酸钠28mmol/L、 β -巯基乙醇0.3mol/L、硫脲54mmol/L、乙二醇四乙酸二钠12mmol/L、十二烷基肌酸钠0.8wt%、海藻糖1.2wt%、吐温80(v/v)0.1%、Proclin300(v/v)5%,溶剂为水。

[0035] 配制完成得到的RNA保护剂为澄清透明的液体。

[0036] 将得到的RNA保护剂用于保护细菌中RNA的稳定性:将待保存的嗜热链球菌Cas9样品转移至离心管中,1500r/min离心10min,收集细菌,弃上清;然后用冰浴的缓冲液PBS洗涤收集到的细菌,将细菌悬浮在少量缓冲液中。加入5-10倍体积的实施例3得到的RNA保护剂混匀,存放于收集管中。实验按照不同保存温度-时间分为8组,其中每组3个样品,置于如表1所述温度-时间条件下进行保存测试。

[0037] 实施例4

[0038] 实施例4与实施例1的区别在于:将保护对象改为组织病料,采集新鲜的含有蓝耳病病毒的肝脏组织病料,用剪刀裁取每边不超过0.5cm的碎块,将组织碎块完全浸没于含2-3倍体积的本发明得到的RNA保护剂的收集管中,置于如表1所述温度-时间条件下进行保存测试。其余与实施例1相同。

[0039] 实施例5

[0040] 实施例5与实施例1的区别在于:将保护对象改为分泌物,采取含有蓝耳病病毒的新鲜的唾液,直接加入含有等体积的本发明的RNA保护剂的容器中,置于如表1所述温度-时间条件下进行保存测试。其余与实施例1相同。

[0041] 实施例6

[0042] 实施例6与实施例1的区别在于:将保护对象改为拭子类,采集新鲜的含有蓝耳病病毒的的血拭子,立即浸入含有适量本发明RNA保护剂的容器中,置于如表1所述温度-时间条件下进行保存测试。其余与实施例1相同。

[0043] 对比例1

[0044] 对比例1与实施例1的区别在于添加等量PBS代替RNA保护剂作为阴性对照,其余与

实施例1相同。

[0045] 对比例2

[0046] 对比例2与实施例1的区别在于RNA保护剂中不添加硫脲和乙二胺四乙酸二钠,其余与实施例1相同。

[0047] 对比例3

[0048] 对比例3与实施例1的区别在于RNA保护剂中不添加 β -巯基乙醇和乙二胺四乙酸二钠,其余与实施例1相同。

[0049] 对比例4

[0050] 对比例4与实施例1的区别在于用乙二胺四乙酸替代乙二胺四乙酸二钠、异硫氰酸胍替代盐酸胍,其余与实施例1相同。

[0051] 实验例1

[0052] 为了检测本发明得到的RNA保护剂对含RNA样本的保护作用,将实施例1至实施例6、对比例1至4保存的样本按照下表所示的温度-时间保存后,分别使用商品化试剂盒(洛阳爱森生物科技有限公司,货号AS201)提取RNA,使用猪蓝耳病病毒通用型(PRRSV-U)核酸检测试剂盒(荧光-PCR法,广州维伯鑫生物科技股份有限公司,货号SD-R-0211)进行荧光定量RT-PCR检测,保存后样本中的RNA稳定性以Ct值呈现,Ct值变化率((保存相应温度-时间后测定的Ct值/相应温度下保存0天Ct值-1) $\times$ 100%)越高表示RNA降解越严重,表中所示为每个温度-时间条件下保存样品的Ct值变化率的平均值。

[0053] 本发明的RNA保护剂用于保护猪瘟疫病毒和蓝耳病毒中RNA的稳定性,具体性能表现如表1所示:

[0054] 表1

温度/时间	37 °C/ 3 日	37 °C/ 5 日	25 °C / 3 日	25 °C/ 7 日	4 °C/2 周	4 °C/4 周	-20 °C/长 期	-80 °C/长 期
猪瘟疫病毒液	1.28%	2.38%	0.91%	1.35%	0.31%	0.56%	0.38%	0.29%
蓝耳病毒液	1.15%	2.42%	0.85%	1.32%	0.29%	0.55%	0.34%	0.26%

[0056] 本发明的RNA保护剂用于保护293T细胞中RNA的稳定性,具体性能表现如表2所示:

[0057] 表2

温度/时间	37 °C/ 3 日	37 °C/ 5 日	25 °C / 3 日	25 °C/ 7 日	4 °C/2 周	4 °C/4 周	-20 °C/长 期	-80 °C/长 期
239T 细胞	1.98%	2.42%	0.95%	1.44%	0.44%	0.61%	0.41%	0.35%

[0059] 本发明的RNA保护剂用于保护嗜热链球菌Cas9中RNA的稳定性,具体性能表现如表3所示:

[0060] 表3

温度/时间	37 °C/ 3 日	37 °C/ 5 日	25 °C / 3 日	25 °C/ 7 日	4 °C/2 周	4 °C/4 周	-20 °C/长 期	-80 °C/长 期
Cas9 细菌	1.96%	2.58%	1.01%	1.48%	0.49%	0.65%	0.43%	0.36%

[0062] 本发明的RNA保护剂用于保护含有蓝耳病病毒的肝脏组织病料,具体性能表现如表4所示:

[0063] 表4

温度/时间	37 °C/ 3 日	37 °C/ 5 日	25 °C / 3 日	25 °C/ 7 日	4 °C/2 周	4 °C/4 周	-20 °C/长 期	-80 °C/长 期
含蓝耳病毒 的肝脏组织	1.85%	2.65%	0.96%	1.43%	0.49%	0.72%	0.41%	0.35%

[0065] 本发明的RNA保护剂用于保护含有蓝耳病病毒的肝脏组织病料,具体性能表现如表4所示:

[0066] 表5

温度/时间	37 °C/ 3 日	37 °C/ 5 日	25 °C / 3 日	25 °C/ 7 日	4 °C/2 周	4 °C/4 周	-20 °C/长 期	-80 °C/长 期
含蓝耳病毒 的唾液	1.72%	2.68%	0.93%	1.42%	0.45%	0.78%	0.46%	0.39%

[0068] 本发明的RNA保护剂用于保护含有蓝耳病病毒的肝脏组织病料,具体性能表现如表4所示:

[0069] 表6

温度/时间	37 °C/ 3 日	37 °C/ 5 日	25 °C / 3 日	25 °C/ 7 日	4 °C/2 周	4 °C/4 周	-20 °C/长 期	-80 °C/长 期
含蓝耳病毒 的血拭子	1.99%	2.83%	1.12%	1.48%	0.52%	0.78%	0.43%	0.41%

[0071] 将本发明对比例1至4得到的RNA保护剂用于保护猪瘟疫病毒中RNA的稳定性,具体性能表现如表7所示:

[0072] 表7

温度/时间	对比例1	对比例2	对比例3	对比例4
37°C/3日	15.38%	10.51%	11.13%	7.56%
37°C/5日	20.02%	21.35%	20.38%	18.96%
25°C/3日	6.93%	5.68%	5.23%	3.09%
25°C/7日	9.21%	4.23%	4.68%	3.85%
4°C/2周	10.01%	5.98%	5.21%	2.63%
4°C/4周	13.49%	10.59%	9.38%	5.26%
-20°C/长期	0.67%	0.66%	0.60%	0.65%
-80°C/长期	0.59%	0.55%	0.51%	0.61%

[0074] 由表1可知,RNA保护剂的添加可有效延长RNA样本的保存时间,本发明的RNA保护剂可使含RNA样本在37°C保存3日、25°C保存7日、8°C保存4周,-20°C条件下可长期保存。对比例1至对比例4与实施例1相比,-20°C和-80°C条件下保存无明显差异,随着保存温度的升

高,差异逐渐变大。样品在较高温度保存时,样品中的核糖核酸酶活性高,本发明实施例中添加的 β -巯基乙醇、硫脲、乙二胺四乙酸二钠与盐酸胍可有效抑制其活性,减缓其对样品中RNA的降解速度,有助于保持样品中RNA的生物活性,延长样品的保存时间。

[0075] 综上,RNA保护剂是一种无毒的可直接使用的样品保存液,其原理是抑制核糖核酸酶活性,保护新鲜样本中的RNA免受降解。本发明的得到的RNA保护剂可有效使RNA样本在37℃下保存3日、18~25℃下保存7日、2~8℃保存4周、-20℃或-80℃下可长期保存。虽然反复冻融的方法保存样本仍能使RNA具有很高的生物活性,但是经本发明得到的RNA保护剂保存的样本,其所含的RNA可用于所有关于RNA的后续实验,避免了液态保存RNA样本反复冻融对样本造成的损伤。本发明得到的RNA保护剂不影响RNA的完整性和活性,对RNA的保存、反复使用和长途运输具有重要的应用价值。

[0076] 上述实施方式仅为本发明的优选实施方式,不能以此来限定本发明保护的范围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的变化及替换均属于本发明所要求保护的范围。