



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113056291 B

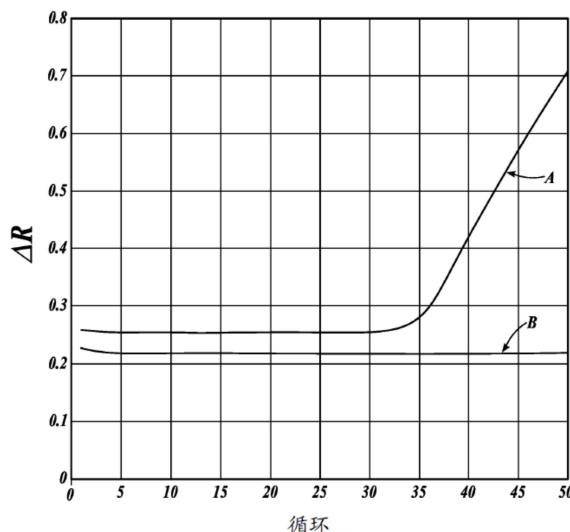
(45) 授权公告日 2023.05.30

(21) 申请号 201980065427.0
 (22) 申请日 2019.08.16
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 113056291 A
 (43) 申请公布日 2021.06.29
 (30) 优先权数据
 62/765,014 2018.08.17 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2021.04.02
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2019/046925 2019.08.16
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02020/037270 EN 2020.02.20
 (73) 专利权人 塞弗德公司
 地址 美国加利福尼亚州
 (72) 发明人 A·I·库蒂亚文 K·P·伦德
 O·Z·纳纳西 A·A·高尔
 威廉·布拉班特
 (74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理
 有限公司 11280
 专利代理人 郭广迅

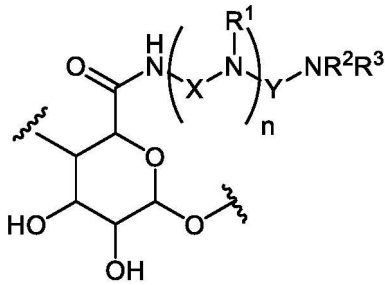
(51) Int.Cl.
 A61L 2/16 (2006.01)
 A61L 9/01 (2006.01)
 A01N 33/08 (2006.01)
 A61L 2/00 (2006.01)
 C11D 3/22 (2006.01)
 C08L 5/06 (2006.01)
 C11D 17/04 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 101232807 A, 2008.07.30
 CN 107141369 A, 2017.09.08
 US 2015093755 A1, 2015.04.02
 AU 2002306077 A1, 2002.11.18
 US 2005163825 A1, 2005.07.28
 AU 2015201538 A1, 2015.04.16
 EP 1613733 A2, 2006.01.11
 石浩宇;刘毅;范鹏程.PCR实验室核酸污染
 监测及排除.中国医疗器械信息.2018,(第07
 期),全文.
 审查员 郭秋艳

权利要求书3页 说明书16页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称
 核酸去污方法
 (57) 摘要
 提供了使用改性果胶减少表面上、空气中和
 溶液中的核酸污染的方法和清洁组合物。



1. 一种减少表面上的核酸污染的方法,包括:使被核酸污染的表面与包含改性果胶的组合物接触,其中所述改性果胶包含多个氨基,其中所述改性果胶是酰胺化果胶,其中所述酰胺化果胶包含一个或多个由下式表示的单体单元,或其异构体或盐:



其中:

n为0、1、2或3;

R1为H或C1-C3烷基;

X在每次出现时独立地为C2-C4亚烷基或C4-C6杂亚烷基;

Y为C2-C3亚烷基或C4-C6杂亚烷基;和

R2和R3独立地为H或C1-C3烷基。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述酰胺化果胶的分子量为0.5kDa至500kDa。

3. 权利要求1所述的方法,其中所述酰胺化果胶的分子量为100kDa至300kDa。

4. 权利要求1所述的方法,其中包含所述酰胺化果胶的组合物是所述酰胺化果胶的溶液。

5. 权利要求4所述的方法,其中所述酰胺化果胶在溶液中的重量浓度为0.01%至5%。

6. 权利要求4所述的方法,其中所述酰胺化果胶在溶液中的重量浓度为0.1%至0.5%。

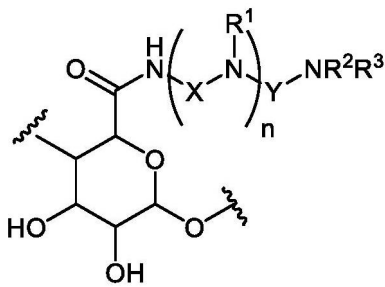
7. 权利要求4所述的方法,其中所述酰胺化果胶在溶液中的浓度为1 μ g/mL至1000 μ g/mL。

8. 权利要求1所述的方法,其中所述酰胺化果胶是酰胺化柑橘果胶或酰胺化苹果果胶。

9. 权利要求1所述的方法,其中所述组合物存在于拭子、揩巾、布、过滤器或海绵上。

10. 权利要求1所述的方法,其中所述表面是仪器表面或实验室工作台表面。

11. 一种减少溶液中核酸污染的方法,包括:使被核酸污染的溶液与固体载体接触,所述固体载体包含与其共价结合的改性果胶,其中所述改性果胶包含多个氨基,其中所述改性果胶是酰胺化果胶,其中所述酰胺化果胶包含一个或多个由下式表示的单体单元,或其异构体或盐:



其中

n为0、1、2或3;

R1为H或C1-C3烷基；

X在每次出现时独立地为C2-C4亚烷基或C4-C6杂亚烷基；

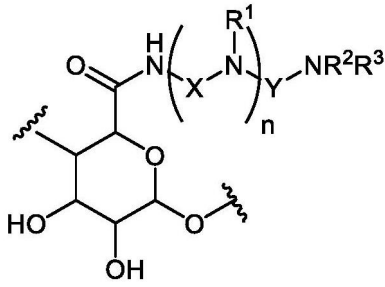
Y为C2-C3亚烷基或C4-C6杂亚烷基；和

R2和R3独立地为H或C1-C3烷基。

12. 权利要求11所述的方法，其中所述固体载体是磁珠、玻璃珠、聚苯乙烯珠、聚苯乙烯过滤器或玻璃过滤器。

13. 权利要求11所述的方法，其中所述固体载体是拭子、揩巾、布、过滤器或海绵。

14. 一种减少空气中雾化的核酸污染的方法，包括使被雾化的核酸污染的空气与包含改性果胶的组合物接触，其中所述改性果胶包含多个氨基，其中所述改性果胶是酰胺化果胶，其中所述酰胺化果胶包含一个或多个由下式表示的单体单元，或其异构体或盐：



其中

n为0、1、2或3；

R1为H或C1-C3烷基；

X在每次出现时独立地为C2-C4亚烷基或C4-C6杂亚烷基；

Y为C2-C3亚烷基或C4-C6杂亚烷基；和

R2和R3独立地为H或C1-C3烷基。

15. 权利要求14所述的方法，其中使被雾化的核酸污染的空气接触包括使所述空气通过包含所述酰胺化果胶的溶液。

16. 权利要求14所述的方法，其中使被雾化的核酸污染的空气接触包括使所述空气通过包含所述酰胺化果胶的过滤器。

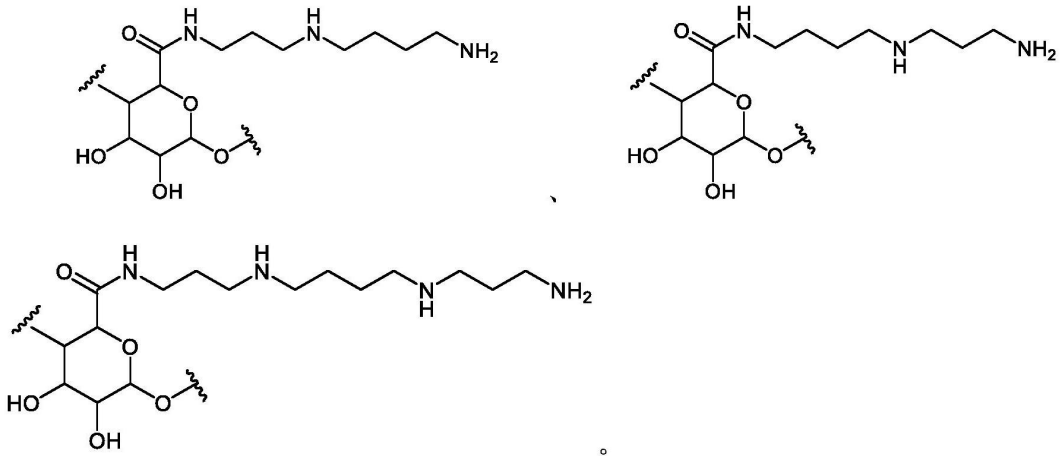
17. 权利要求16所述的方法，其中所述酰胺化果胶共价结合到所述过滤器。

18. 权利要求14所述的方法，其中使被雾化的核酸污染的空气接触包括在包含与其共价结合的酰胺化果胶的表面以上使所述空气通过。

19. 权利要求1至18中任一项所述的方法，其中所述核酸是核酸扩增反应的产物。

20. 权利要求19所述的方法，其中所述扩增反应是聚合酶链式反应。

21. 权利要求1至18中任一项所述的方法，其中所述改性果胶是包含一个或多个由下式表示的单体单元或其异构体或盐的酰胺化果胶：



核酸去污方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年8月17日提交的美国临时申请第62/765,014号的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关联的序列列表以文本格式代替纸质副本提供,并且通过引用并入本说明书中。包含序列列表的文本文件的名称为70134_Seq_Final_2019-08-14.txt。文本文件为2.23KB;创建于2019年8月14日;并在提交说明书时通过EFS-Web提交。

发明领域

[0005] 本发明涉及用于减少表面上、空气中和溶液中的核酸污染的方法和清洁组合物。

[0006] 背景

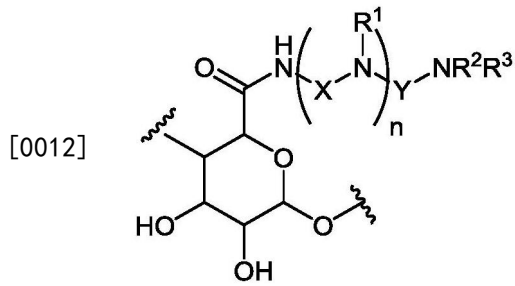
[0007] 基于核酸扩增的技术,例如聚合酶链式反应(PCR)的使用已经在各种分子生物学应用和临床诊断中得到广泛应用。不幸的是,这些技术的高灵敏度使其容易受到污染。实验室中的核酸交叉污染为基于高灵敏度扩增的分析带来严重的问题。在实验室环境中,靶序列本身的重复扩增,导致扩增产物或所谓的扩增子的积累,是造成交叉污染的最大来源。在分子生物学和诊断应用中,通过破坏扩增子或使它们不适合扩增来防止扩增子残留和/或对产生的扩增子灭菌是至关重要的。

[0008] 先前报道的去污方法通常使用难以处理的腐蚀性试剂,例如次氯酸钠或补骨脂素的溶液。在许多情况下,还需要涉及清洁去污试剂残留物的额外步骤。适用于敏感环境中的扩增子去污溶液和方法并不总是能产生可靠的结果。(Fischer M.等人,Efficacy Assessment of Nucleic Acid Decontamination Reagents Used in Molecular Diagnostics Laboratories,PLOS One,July 13,2016)。建议的是许多通常可获得的组合物,例如果胶裂解酶(Eliminase)和DNA AwayTM,某些情况下的漂白剂,不能始终且有效地降解可扩增的核酸,只能从表面部分去除污染的核酸。此外,当期望保持其他生物分子完整时,漂白剂和类似试剂不足以选择性地从溶液中除去核酸。因此,需要一种改进的、廉价的核酸去污方法,该方法采用易于使用的、稳定的试剂,并且与多种基质和表面相容。

[0009] 发明概述

[0010] 一方面,本文提供了减少表面上的核酸污染的方法,包括使被核酸污染的表面与包含改性果胶的组合物接触,其中所述改性果胶包含多个氨基。

[0011] 在一些实施方案中,所述改性果胶是酰胺化果胶。在一些实施方案中,所述改性果胶包含一个或多个由下式表示的单体单元,其互变异构体、异构体或盐:



[0013] 其中：

[0014] n为0、1、2或3；

[0015] R¹为H或C₁-C₃烷基；

[0016] X在每次出现时独立地为C₂-C₄亚烷基或C₄-C₆杂亚烷基；

[0017] Y是C₂-C₃亚烷基或C₄-C₆杂亚烷基；和

[0018] R²和R³独立地为H或C₁-C₃烷基。

[0019] 在一些实施方案中，所述酰胺化果胶的分子量为约0.5kDa至约500kDa或约100kDa至约300kDa。

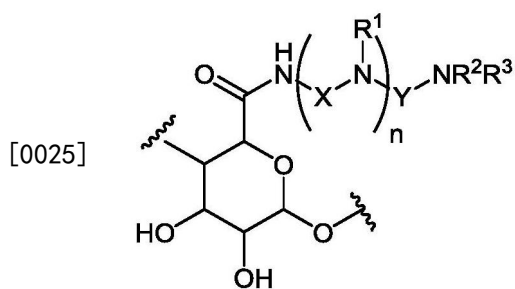
[0020] 在一些实施方案中，所述酰胺化果胶在溶液中的浓度为约0.001%至约5%、约0.01%至约1%或约0.1%至约0.5%。在一些实施方案中，所述酰胺化果胶在溶液中的浓度为约0.1μg/mL至约1,000μg/mL、约1μg/mL至约500μg/mL或约1μg/mL至约100μg/mL。

[0021] 在一些实施方案中，所述酰胺化果胶是酰胺化柑橘果胶或酰胺化苹果果胶。

[0022] 在一些实施方案中，所述组合物存在于拭子、揩巾、布、过滤器、垫或海绵上。在一些实施方案中，所述表面是仪器表面或实验室工作台表面。

[0023] 另一方面，本文提供了减少溶液中核酸污染的方法，包括：使被核酸污染的溶液与固体载体接触，所述固体载体包含与其共价结合的改性果胶，其中所述改性果胶包含多个氨基。

[0024] 在一些实施方案中，所述改性果胶是酰胺化果胶。在一些实施方案中，所述改性果胶，例如酰胺化果胶，包含一个或多个由下式表示的单体单元，其互变异构体、异构体或盐：



[0026] 其中

[0027] n为0、1、2或3；

[0028] R¹为H或C₁-C₃烷基；

[0029] X在每次出现时独立地为C₂-C₄亚烷基或C₄-C₆杂亚烷基；

[0030] Y为C₂-C₃亚烷基或C₄-C₆杂亚烷基；和

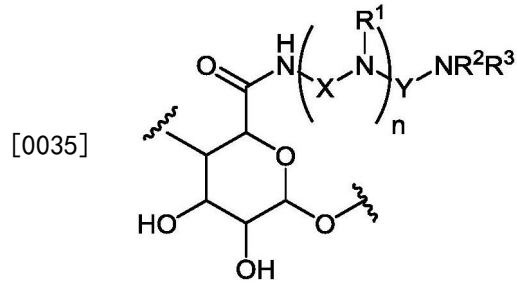
[0031] R²和R³独立地为H或C₁-C₃烷基。

[0032] 在一些实施方案中，所述固体载体是磁珠、玻璃珠、聚苯乙烯珠、聚苯乙烯过滤器

或玻璃过滤器。在一些实施方案中,所述固体载体是拭子、揩巾、布、过滤器或海绵。

[0033] 另一方面,本文提供了减少空气中雾化的核酸污染的方法,包括使被雾化的核酸污染的空气与包含改性果胶的组合物接触,其中所述改性果胶包含多个氨基。

[0034] 在一些实施方案中,所述改性果胶是酰胺化果胶。在一些实施方案中,所述改性果胶,例如酰胺化果胶,包含一个或多个由下式表示的单体单元,其互变异构体、异构体或盐:



[0036] 其中

[0037] n为0、1、2或3;

[0038] R¹为H或C₁-C₃烷基;

[0039] X在每次出现时独立地为C₂-C₄亚烷基或C₄-C₆杂亚烷基;

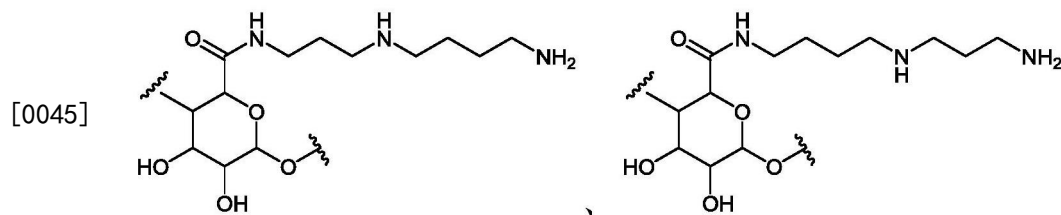
[0040] Y为C₂-C₃亚烷基或C₄-C₆杂亚烷基;和

[0041] R²和R³独立地为H或C₁-C₃烷基。

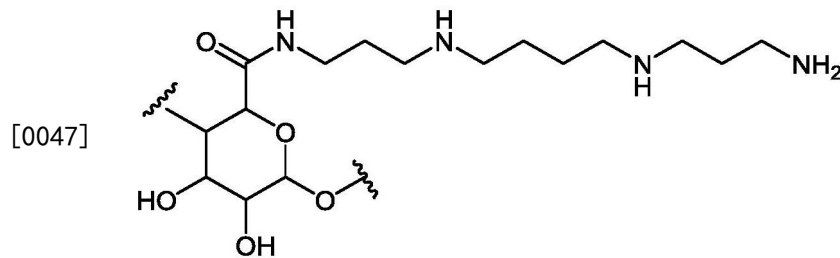
[0042] 在一些实施方案中,所述接触包括使所述污染的空气通过包含所述改性果胶的水性组合物,例如,所述酰胺化果胶在水中的溶液或悬浮液。在一些实施方案中,所述接触包括使污染的空气通过包含所述酰胺化果胶的过滤器。在一些实施方案中,所述酰胺化果胶共价结合到所述过滤器。

[0043] 在一些实施方案中,所述核酸是核酸扩增反应的产物。在一些实施方案中,所述扩增反应是聚合酶链式反应。

[0044] 在一些实施方案中,所述酰胺化果胶是包含一个或多个由下式表示的单体单元,其异构体、盐或互变异构体的果胶:



[0046] 在一些实施方案中,所述酰胺化果胶包含一个或多个由下式表示的单体单元,其异构体、盐或互变异构体:



附图说明

[0048] 当结合附图时,本发明的前述方面和许多附带的优点将变得更加容易理解,因为通过参考以下详细描述,本发明的前述方面和许多附带的优点将得到更好的理解,其中:

[0049] 图1是用各种量的示例性多胺改性的多糖(精胺-果胶)处理后的扩增子DNA的扩增图。

[0050] 图2显示污染物DNA与示例性的多胺改性的多糖(精胺-果胶)的结合,然后是靶DNA的扩增。

[0051] 图3显示当用1 μ g示例性精胺改性的多糖处理1000万拷贝的dsDNA(126bp)时,扩增被完全抑制(B)。向精胺-果胶-DNA混合物中添加更多拷贝(1.9×10^{10})后,扩增恢复(C),并且与未处理的DNA的扩增(A)相当。这显示了精胺-果胶缀合物可以如何用于结合少量的DNA污染物,然后允许进行靶标的扩增。

[0052] 图4比较了在用于扩增子处理过的表面上方3cm处在24h内收集的两组空气样品的八次PCR运行的平均值。图(A)是未经处理的表面上的扩增子,而图(B)是用示例性精胺-改性的多糖的0.1%溶液喷雾的具有扩增子的干燥表面。

[0053] 发明详述

[0054] 一方面,本发明提供了一种通过使待去污的表面与去污剂接触而减少表面上的核酸污染的方法,所述去污剂包含含有多个氨基的改性果胶,例如酰胺化果胶。优选地,所述酰胺化果胶包含衍生自多胺的基团。在一些实施方案中,所述酰胺化果胶是被多胺酰胺化的果胶。不受机理或理论的束缚,认为本文公开的酰胺化果胶化合物促进核酸的絮凝,通过该过程,当核酸的单个分子与改性果胶,例如酰胺化果胶结合时,核酸的单个分子聚集或沉淀成小颗粒,从而使核酸不适合扩增。去污剂可以以溶液、悬浮液的形式使用,或者可以结合到固体载体,例如揩巾或海绵。

[0055] 如本文所使用,“去污”或“减少核酸污染”是指以如下方式改变核酸:使其与未改变的核酸相比不再能够或不太能够在扩增反应中充当模板。去污通常使核酸不能够或不太能够干扰其他扩增反应。在一些实施方案中,去污还意味着使待去污的表面基本上不含核酸污染物。如本文所使用的“基本上不含核酸污染物”是指污染性核酸是不可扩增的和/或以基于扩增的核酸检测方法不能检测到的浓度存在。

[0056] 如本文所使用,除非另外指出,否则当提及去污组合物时,“剂(agent)”和“试剂(reagent)”可以互换使用。

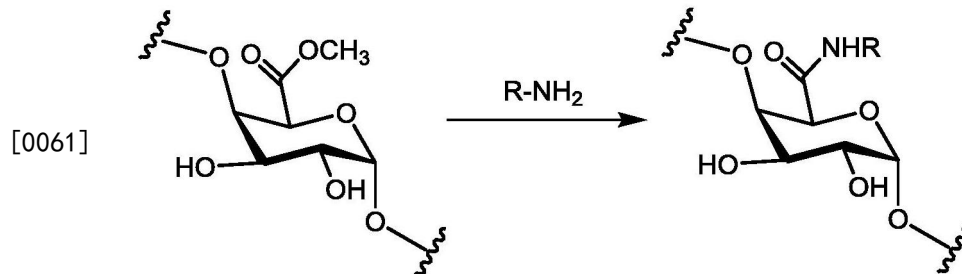
[0057] 在一些实施方案中,“减少污染”或“去污”是指降低或阻止核酸结合于另一种核酸、蛋白质或其他生物物质的能力。减少核酸污染或核酸去污还指阻止或使核酸不太能够充当酶的底物。如本文所使用,减少核酸污染或核酸去污并不指发生污染减少或去污的任何特定机制。

[0058] 改性果胶

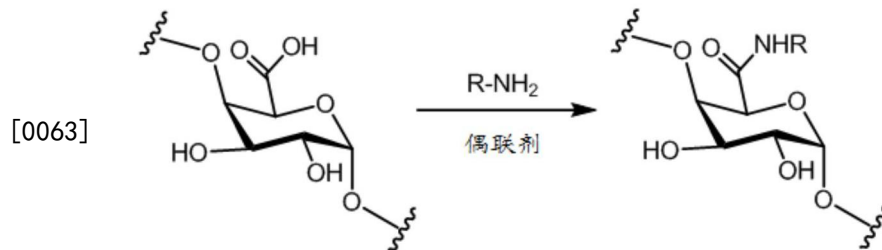
[0059] 在一些实施方案中,本文公开的去污剂包含改性多糖。在一些实施方案中,多糖是果胶。果胶是通常在植物细胞壁中发现的天然存在的复合多糖。果胶包含由鼠李糖残基插入并经中性糖侧链和非糖组分例如乙酰基、甲基和阿魏酸基团改性的 α 1-4连接的聚半乳糖醛酸主链。果胶中的半乳糖醛酸残基被部分酯化并作为甲酯存在。酯化度定义为被酯化的羧基的百分比。具有例如高于50%的酯化度的果胶被分类为高甲酯(“HM”)果胶或高酯果

胶,酯化度低于50%的果胶被称为低甲酯(“LM”)果胶或低酯果胶。在水果和蔬菜中发现的大多数果胶是HM果胶。

[0060] 如本文所使用,“酰胺化果胶”是指已经通过例如化学、物理或生物学(包括酶促)手段或其某种组合进行结构改性的任何天然存在的果胶,其中一些酯或酸基已经被转化为酰胺基。酰胺化果胶可以通过使未改性果胶与合适的胺的溶液接触,从而将未改性果胶的酯基转化为酰胺来制备。

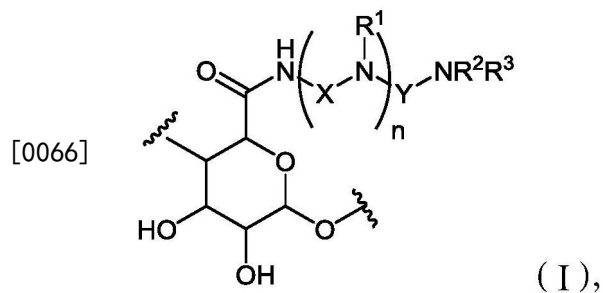


[0062] 供选择地,未改性果胶或水解果胶,包括部分水解果胶,可以在合适的偶联剂存在下与胺反应以形成酰胺化果胶。合适的偶联剂的非限制性实例包括碳二亚胺偶联剂,例如EDC和EDCI,磷和亚铵类试剂,例如BOP、PyBOP、PyBrOP、TBTU、HBTU、HATU、COMU和TFFH。



[0064] 可以通过本文所述的任何方法获得改性果胶,例如酰胺化果胶。用于合成改性果胶的特别有用的起始原料包括水果果胶,例如苹果和柑橘果胶。在一些实施方案中,前体(未改性)果胶具有约5kDa至约1,100kDa、约10kDa至约500kDa、约10kDa至约300kDa、约20kDa至约200kDa或约20kDa至约100kDa的相对分子量。在一些实施方案中,多糖试剂具有约120kDa至约300kDa、约150kDa至约300kDa或约120kDa至约175kDa的相对分子量。在一些实施方案中,酰胺化果胶的相对分子量可以通过尺寸排阻色谱法,使用分子量标准物(例如Pululan系列标准物)作为参考来确定。

[0065] 在一些实施方案中,本文公开的去污试剂包含酰胺化果胶,所述酰胺化果胶包含被至少一个氨基取代的一个或多个单体单元。在一些实施方案中,所述酰胺化果胶包含一个或多个具有式I的结构单体单元:



[0067] 其中:

[0068] n为0、1、2或3;

[0086] 在一些实施方案中,改性多糖是通过高碘酸盐氧化未改性果胶,然后进行还原性胺化,例如用多胺进行还原性胺化而获得的果胶。碳水化合物的高碘酸盐氧化和还原胺化的方法是本领域已知的。

[0087] 如本文所使用,术语“烷基”、“烯基”和“炔基”包括直链、支链和环状单价烃基及其组合,当它们未被取代时仅包含C和H。实例包括甲基、乙基、异丁基、环己基、环戊基乙基、2-丙烯基、3-丁炔基等。有时在本文中描述每个这样的基团中的碳原子总数,例如,当该基团可以包含最多十个碳原子时,可以表示为1-10C、C1-C10、 C_1-C_{10} 、 C_{1-10} 或C1-10。本文所使用的术语“杂烷基”、“杂烯基”和“杂炔基”是指其中一个或多个链碳原子已被杂原子替代的相应的烃。示例性的杂原子包括N、O、S和P。当允许杂原子替代碳原子时,例如在杂烷基中,描述该基团的数字尽管仍然书写为例如C3-C10,表示所述环或链中碳原子的数目加上作为所描述的环或链中碳原子的替代而被包括的这样的杂原子的数目之和。

[0088] 单个基团可以包含多于一种类型的多重键,或多于一个多重键;当这些基团包含至少一个碳-碳双键时,它们被包括在术语“烯基”的定义内,并且当这些基团包含至少一个碳-碳三键时,它们被包括在术语“炔基”内。

[0089] 烷基、烯基和炔基可以任选地被取代至这样的取代在化学上有意义的程度。典型的取代基包括但不限于卤素(F、Cl、Br、I)、=O、=NCN、=NOR、=NR、OR、NR₂、SR、SO₂R、SO₂NR₂、NRSO₂R、NRCONR₂、NRC(O)OR、NRC(O)R、CN、C(O)OR、C(O)NR₂、OC(O)R、C(O)R和NO₂,其中每个R独立地为H、C1-C8烷基、C2-C8杂烷基、C1-C8酰基、C2-C8杂酰基、C2-C8烯基、C2-C8杂烯基、C2-C8炔基、C2-C8杂炔基、C6-C10芳基或C5-C10杂芳基,并且每个R任选地被卤素(F、Cl、Br、I)、=O、=NCN、=NOR'、=NR'、OR'、NR'₂、SR'、SO₂R'、SO₂NR'₂、NR'SO₂R'、NR'CONR'₂、NR'C(O)OR'、NR'C(O)R'、CN、C(O)OR'、C(O)NR'₂、OC(O)R'、C(O)R'和NO₂取代,其中每个R'独立地为H、C1-C8烷基、C2-C8杂烷基、C1-C8酰基、C2-C8杂酰基、C6-C10芳基或C5-C10杂芳基。烷基、烯基和炔基也可以被C1-C8酰基、C2-C8杂酰基、C6-C10芳基或C5-C10杂芳基取代,其各自可以被适合于特定基团的取代基取代。

[0090] 虽然本文所使用的“烷基”包括环烷基和环烷基烷基,但是术语“环烷基”在本文中用于描述经由环碳原子连接的碳环非芳族基团,而“环烷基烷基”用于描述通过烷基接头连接到分子的碳环非芳族基团。类似地,“杂环基”用于表示包含至少一个杂原子作为环成员并且经由环原子(可以是C或N)连接到分子的非芳族环状基团;“杂环基烷基”可以用于描述通过亚烷基接头连接到另一个分子的基团。如本文所使用,这些术语还包括含有一个或两个双键的环,只要该环不是芳族的。

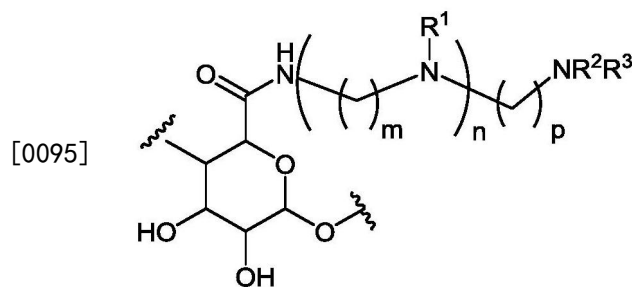
[0091] “芳族”或“芳基”取代基或部分是指具有众所周知的芳香性的单环或稠合双环部分;芳基的实例包括苯基和萘基。类似地,“杂芳族”和“杂芳基”是指这样的单环或稠合双环体系,其含有一个或多个杂原子作为环成员。合适的杂原子包括N、O和S,包含其允许在5元环以及6元环中具有芳香性。典型的杂芳族体系包括单环C5-C6芳族基团,例如吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、噁吩基、呋喃基、吡咯基、吡唑基、噻唑基、噁唑基和咪唑基,以及通过这些单环基团之一与苯基环或与任何杂芳族单环基团稠合以形成C8-C10双环基团而形成的稠合双环部分,例如吲哚基、苯并咪唑基、吲唑基、苯并三唑基、异喹啉基、喹啉基、苯并噻唑基、苯并呋喃基、吡唑并吡啶基、喹啉基、喹喔啉基、噌啉基等。在整个环系统中,就电子分布而言,具有芳香性特征的任何单环或稠合双环系统都包括在该定义中。它还包括双环基团,

其中至少直接与分子其余部分连接的环具有芳香性特征。通常，环系统包含5-14个环成员原子。通常，单环杂芳基包含5-6个环成员，而双环杂芳基包含8-10个环成员。

[0092] 芳基和杂芳基部分可以被多种取代基取代，包括C1-C8烷基、C2-C8烯基、C2-C8炔基、C5-C12芳基、C1-C8酰基以及它们的杂化形式 (heteroform)，其各自可以本身被进一步取代；芳基和杂芳基部分的其他取代基包括卤素 (F、Cl、Br、I)、OR、NR₂、SR、SO₂R、SO₂NR₂、NRSO₂R、NRCONR₂、NRC(O)OR、NRC(O)R、CN、C(O)OR、C(O)NR₂、OC(O)R、C(O)R和NO₂，其中每个R独立地为H、C1-C8烷基、C2-C8杂烷基、C2-C8烯基、C2-C8杂烯基、C2-C8炔基、C2-C8杂炔基、C6-C10芳基、C5-C10杂芳基、C7-C12芳基烷基或C6-C12杂芳基烷基，并且每个R如上文针对烷基所述的那样任选地被取代。芳基或杂芳基上的取代基还可以被本文所述的基团进一步取代，所述基团适用于每种类型的这样的取代基或取代基的每种组分。因此，例如，芳基烷基取代基可以在芳基部分上被本文描述的用于芳基的典型取代基取代，并且其可以在烷基部分上被本文描述的用于烷基的典型的或适合的取代基进一步取代。

[0093] 如本文所使用的，“任选取代的”表示所描述的特定基团可以具有一个或多个被非氢取代基替代的氢取代基。在一些任选取代的基团或部分中，所有氢取代基均被非氢取代基替代 (例如，多氟烷基，如三氟甲基)。如果没有另外说明，则可以存在的这样的取代基的总数等于在所述基团的未取代形式上存在的H原子的数目。在任选的取代基通过双键，例如羰基氧或氧代 (=O) 连接的情况下，该基团占据两个可用化合价，因此，可以包括的取代基总数根据可用化合价的数目减少。

[0094] 在一些实施方案中，去污试剂包含具有一个或多个由下式表示的单体单元，其互变异构体、其异构体或盐的酰胺化果胶的溶液：



[0096] 其中：

[0097] n为0、1、2或3；

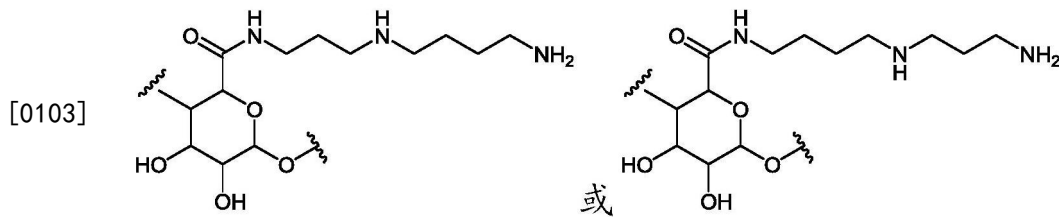
[0098] m为2、3或4；

[0099] p为2、3或4；和

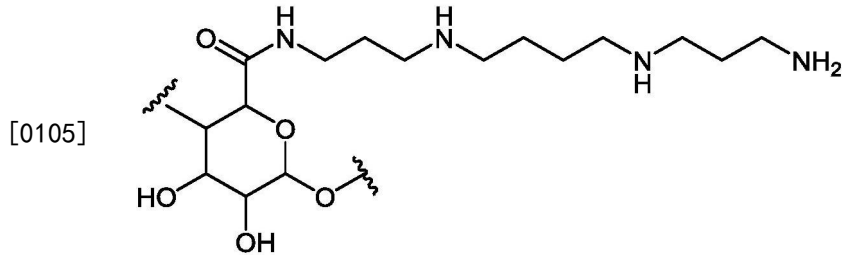
[0100] R¹、R²和R³独立地为H或C₁-C₃烷基。

[0101] 在一些实施方案中，所述酰胺化果胶包含一个或多个伯氨基。在一些实施方案中，所述酰胺化果胶用多胺酰胺化。在一些实施方案中，多胺选自精胺、亚精胺、尸胺、乙二胺和腐胺。

[0102] 在一些实施方案中，所述酰胺化果胶包含一个或多个由下式表示的单元，其互变异构体、异构体、盐或其组合：



[0104] 在一些实施方案中,所述酰胺化果胶包含一个或多个由下式表示的单体单元,其异构体、盐或互变异构体:



[0106] 在一些实施方案中,所述酰胺化果胶包含多个由如上所示的结构式表示的单体单元。如本文所使用,术语“多个”是指多于一个。例如,多个单体单元是指至少两个单体单元、至少三个单体单元或至少单体单元等。如果本发明的实施方案包括多于一种单体单元,它们也可以被称为第一单体单元、第二单体单元、第三单体单元等。

[0107] 去污方法

[0108] 一方面,本文公开了用于减少表面上的核酸污染的方法,包括:使待去污的表面与包含溶解的或悬浮的含有多个氨基的改性果胶,例如酰胺化果胶的溶液接触。在一些实施方案中,所述改性果胶是酰胺化果胶,其中所述酰胺化果胶包含一个或多个具有式I-V的结构单体单元。在其他实施方案中,去污溶液中的酰胺化果胶的浓度为约0.01%至约5%、约0.01%至约1%、约0.01%至约0.1%、约0.1%至约5%、约0.1%至约1%、约0.5%至约5%或约0.5%至约2%。在一些实施方案中,去污溶液中的酰胺化果胶的浓度为约0.1 μ g/mL至约10,000 μ g/mL、约0.1 μ g/mL至约5,000 μ g/mL、约0.1 μ g/mL至约1,000 μ g/mL、约0.1 μ g/mL至约100 μ g/mL、约0.1 μ g/mL至约5 μ g/mL。本领域技术人员可以根据待去除的核酸污染物的量来选择去污果胶的合适量和/或浓度。

[0109] 在一些实施方案中,本文公开的去污组合物,例如酰胺化果胶的溶液或悬浮液,在室温下储存时是稳定的。

[0110] 在一些实施方案中,去污组合物还可以包含添加剂,例如肥皂、洗涤剂、消毒剂和/或其他合适的化学物质。合适的消毒剂的实例可以包括,例如,季铵化合物、胶体银、乙酸、过氧化氢或其组合。

[0111] 在一些实施方案中,去污溶液存在于拭子、揩巾、布、过滤器或海绵上。在具体实施方案中,待去污的表面是仪器的表面或实验室工作台表面。在其他实施方案中,该溶液用于对实验室移液器去污。

[0112] 在一些实施方案中,本文公开的去污方法还包括用水或不包含酰胺化果胶的另一种溶液冲洗或擦拭待去污的表面。

[0113] 在一些实施方案中,所述方法还包括使待从核酸污染物中去污的表面或溶液与包含可与果胶形成水凝胶的金属离子的溶液接触,从而沉淀、捕获、复合或以其他方式使核酸

或使核酸与本文公开的去污溶液的酰胺化果胶的复合物不溶。合适的金属离子包括Ca²⁺和Mg²⁺离子。可以交联果胶或酰胺化果胶的任何金属都适合包含在本文公开的去污组合物中。

[0114] 另一方面,本文提供了减少溶液中的核酸污染的方法,包括:使待去污的溶液与包含共价结合到固体载体的酰胺化果胶的组合物接触,其中所述酰胺化果胶包含多个单体残基,所述单体残基具有如上所示的式I-V的结构。如本文所使用,术语“固体载体”是指任何基质,包括顺磁性颗粒、凝胶、可控孔径玻璃、磁珠、微球、纳米球、毛细管、滤膜、柱、布、揩巾、纸、平面载体、多孔板、多孔膜、多孔整料、晶片、梳状物(comb)或其任何组合。固体载体可以包含任何合适的材料,包括但不限于玻璃、二氧化硅、氧化钛、氧化铁、烯基主链聚合物、聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、陶瓷、纤维素、硝化纤维素和二乙烯基苯。

[0115] 通过使果胶与包含胺反应性基团例如环氧化物、醛、酮或活化酯的固体载体反应,可以以任何合适的方式实现改性果胶例如酰胺化果胶与固体载体的共价连接。

[0116] 在一些实施方案中,本公开内容的酰胺化果胶经由酰胺键共价连接到固体载体,所述酰胺键例如在固体载体的羧基和酰胺化果胶的氨基之间形成的酰胺键。酰胺键的形成可以通过任何合适的方法进行。例如,可以在合适的偶联剂存在下使包含一个或多个伯氨基的酰胺化果胶与包含一个或多个羧酸基团的基质反应。合适的偶联剂的非限制性实例包括碳二亚胺偶联剂,例如DCC和EDCI,磷和亚胺类试剂,例如BOP、PyBOP、PyBrOP、TBTU、HBTU、HATU、COMU和TFFH。在一些优选的实施方案中,可以将固体基质的羧酸基团转化为活化酯,然后与酰胺化果胶的氨基反应。

[0117] 在一些实施方案中,固体载体包含共价连接到固体载体的式I-V中任一个的化合物。

[0118] 在一些实施方案中,通过用所述酰胺化果胶浸渍或涂覆布、海绵、垫或揩巾,将所述酰胺化果胶掺入到布、海绵、垫或揩巾中。实例包括但不限于通常用于实验室目的的棉拭子、纺织纤维垫或揩巾,例如Kimberly-Clark Corporation制造的KimWipes™。

[0119] 另一方面,本文提供了减少空气中雾化的核酸污染的方法,包括使被雾化的核酸污染的空气与包含改性果胶的组合物接触,所述组合物例如包含一个或多个式I-V中任一个的单体单元或其组合的酰胺化果胶。在一些实施方案中,使被雾化的核酸污染的空气接触包括使空气通过酰胺化果胶的溶液或悬浮液。在一些实施方案中,使被雾化的核酸污染的空气接触包括使空气通过包含酰胺化果胶的过滤器。在一些实施方案中,所述酰胺化果胶共价结合到所述过滤器。在一些实施方案中,使被雾化的核酸污染的空气接触包括在包含酰胺化果胶的表面以上使所述空气通过,所述酰胺化果胶与所述表面共价结合。在一些实施方案中,酰胺化果胶是用精胺酰胺化的果胶,例如通过NHS/EDC偶联,或通过用高碘酸盐对果胶进行顺序氧化并用胺例如精胺和硼氢化钠进行还原性胺化。

[0120] 核酸污染物也可以气雾剂形式存在或在尘粒上存在。因此,包含本发明的酰胺化果胶的空气过滤器可用于去除这样的污染物。在一些实施方案中,这样的过滤器可以例如通过将过滤器材料浸入包含本发明的酰胺化果胶的溶液中然后干燥过滤器来制备。在其他实施方案中,过滤材料可以用所述酰胺化果胶共价涂覆。

[0121] 在一些实施方案中,从溶液中去掉核酸污染物是有利的。在这样的实施方案中,可以用包含本发明的酰胺化果胶的组合物处理包含污染物的溶液,所述组合物例如包含共价连接到固体载体的酰胺化果胶的固体载体。在一些实施方案中,这样的处理包括使要去污

的溶液通过过滤器、整料、膜等。在其他实施方案中,将待去污的溶液与固体载体例如磁珠接触。

[0122] 在一些实施方案中,核酸污染物是扩增子。在一些实施方案中,包含所述酰胺化果胶的组合物用于去除扩增子污染和/或防止分子诊断实验室表面、仪器和设备的所述污染。这样的表面、仪器或设备的去污可以以任何合适的方式进行,例如使用上述的任何方法进行。在一些实施方案中,在扩增反应完成并检测扩增产物之后,将本文公开的去污溶液添加到扩增反应,从而使扩增产物例如扩增子基本上不可扩增。在一些实施方案中,在扩增后将去污溶液添加到自动化药筒中的扩增反应中。本文公开的去污剂具有某些优点,因为与可与分子诊断测试的某些组分反应并释放有毒副产物的漂白剂或其他氧化剂不同,该去污剂不与这些组分反应。

[0123] 可以使用任何合适的方法,例如揩巾测试来测试本文公开的组合物的去污性能。在一些实施方案中,可以使用文献中公开的去污剂功效评估的任何方法(参见,例如, Fischer M.等人, Efficacy Assessment of Nucleic Acid Decontamination Reagents Used in Molecular Diagnostics Laboratories, PLOS One, July 13, 2016)。

[0124] 本文描述了本发明的优选实施方案,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳方式。在阅读前述描述后,那些优选实施方案的等价方案的变化、改变、修改和替换对于本领域普通技术人员将变得显而易见。发明人期望本技术人员适当地采用这样的等价方案的变化、改变、修改和替换,并且发明人希望以不同于本文具体描述的方式来实践本发明。本领域技术人员将容易地认识到可以改变、变化或修改以产生基本相似结果的各种非关键参数。因此,本发明包括适用法律所允许的所附权利要求中记载的主题的所有修改和等价方案。此外,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖上述要素在其所有可能的变化中的任何组合。

[0125] 尽管已经示出和描述了示例性实施方案,但是应当理解,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下作出各种改变。尽管本发明的每个要素在本文中被描述为包含多个实施方案,但是应理解的是,除非另外指出,否则本发明给定要素的每个实施方案都能够与本发明的其他要素的每个实施方案一起使用,并且每种这样的使用均旨在形成本发明的不同实施方案。

[0126] 本文引用的参考专利、专利申请和科学文献通过引用整体并入本文,就如同每个单独的出版物、专利或专利申请均被明确地和单独地指出通过引用并入。本文所引用的任何参考文献与本说明书的具体教导之间的任何冲突均应以后者为准。同样地,在技术上理解的词语或短语的定义与本说明书中具体教导的词语或短语的定义之间的任何冲突都应以后者为准。

[0127] 从以上公开内容可以理解,本发明具有各种各样的应用。通过以下实施例进一步说明本发明,这些实施例仅是说明性的,并不以任何方式限制本发明的定义和范围。

实施例

[0128] 实施例1酰胺化果胶的制备

[0129] 精胺-果胶缀合物化合物1的合成

[0130] 将苹果果胶(10.0g)添加到1L的Milli-Q过滤水中,并搅拌1小时。加入5M NaOH

(10mL),再搅拌20分钟,然后加入1N HCl (30mL) (pH=4.2)。将N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC,10.08g,52.59mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,3.026g,52.59mmol)添加到该溶液,并在室温下搅拌1h。加入精胺(80mL,368mmol),并将溶液在室温下搅拌22h。然后将溶液倒入快速搅拌的MeOH(2L)中并搅拌20分钟。通过将溶液经由中度烧结玻璃漏斗过滤来收集固体,然后用MeOH洗涤两次。固体在50°C下真空干燥40小时。使用电动咖啡研磨机将固体研磨成细粉,并将其悬浮在500mL的酸洗液(55%的异丙醇、34.5%的水和10.5%的浓盐酸)中,并搅拌4.5小时。滤出溶液,并将固体再用酸洗液洗涤两次,然后在50°C下真空干燥过夜。将固体悬浮在750mL去离子水中,并使用50mL离心管以4200rpm离心10分钟。收集上清液并合并。合并沉淀并悬浮在350mL去离子水中,并使用50mL离心管在4200rpm下离心17小时。将上清液与第一上清液合并。所有合并的上清液均通过2微米过滤器过滤。通过冻干干燥过滤的溶液,得到7.78g的精胺-果胶缀合物。 $C_{16}H_{32}N_4O_5$ (半乳糖醛酸单体加精胺)的分析计算值:C,53.3;H,8.95;N,15.5。实测值:N,7.21。

[0131] 通过氧化裂解果胶,然后还原胺化合成精胺缀合物化合物2

[0132] 在该实施例中,提供了通过氧化然后还原胺化用各种多胺改性多糖聚合物的通用程序。

[0133] (A)氧化。在磁力搅拌下,将苹果果胶(2.5g)分批添加到250mL去离子水中,直至全部溶解。在搅拌下向其中分批加入高碘酸钾2.43g,并搅拌18小时。然后在三天内将反应混合物通过8kd MWC0透析管用水透析。随后将所得的脱盐聚合物冻干,得到氧化果胶,为松脆的灰白色固体。可以通过羟胺滴定容易地测量醛的浓度(参见Zhao,H.;Heindel,N.D.J.Pharm.Res.8(3),400-402.)。醛含量测定为4.9mmol/g(每个聚合物单元约1当量醛)。

[0134] (B)还原胺化。将来自步骤A的氧化果胶(1.0g)悬浮在100mL去离子水中,添加精胺(1.32g,1.25当量),并在室温下搅拌18小时。向反应物中加入1g硼氢化钠沉淀,并搅拌18小时。然后在三天内将反应混合物通过8kd MWC0透析管用水透析,随后冻干,得到200mg化合物2,为灰白色蓬松固体。

[0135] 精胺-果胶缀合物溶液的制备

[0136] 通过将1.0g冻干的精胺-果胶缀合物化合物1或化合物2溶解在100mL Milli-Q过滤水中并通过使用离心机除去任何不溶性颗粒,制备精胺-果胶缀合物化合物1和化合物2的溶液(1%,w/w)。

[0137] 由1%溶液制备0.1%、0.01%、0.001%和0.0001%的稀释水溶液。

[0138] 实施例2官能化珠的制备

[0139] 精胺-果胶缀合物的合成

[0140] 将苹果果胶(2.45g)缓慢添加到250mL快速搅拌的Milli-Q过滤水中。搅拌溶液直到果胶被完全润湿(1.5小时)。加入2.5M NaOH(~5mL)直到溶液的pH为12。将溶液搅拌30分钟,然后加入1N HCl(~7mL)直到pH 9。将N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(2.45g,12.8mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(1.45g,12.6mmol)加入溶液中,并将混合物在室温下搅拌1.25小时。加入精胺(25.0g,124mmol),并将溶液在室温下搅拌过夜。然后将溶液倒入快速搅拌的MeOH(1.5L)中,并搅拌45分钟。通过将溶液经由中度烧结玻璃漏斗过滤来收集固体,然后用MeOH洗涤三次。将固体在50°C下真空干燥过夜。使用研钵和研杵将固体研磨

成细粉,然后将该细粉放入50mL酸洗液(55%异丙醇、34.5%水和10.5%浓盐酸)中,然后搅拌1小时。滤出固体,并用更多的酸洗液(5x)和中性洗液(59%异丙醇和41%水)洗涤五次。然后将固体用MeOH(5x)洗涤,并在高真空下干燥,得到2.20g的精胺-果胶缀合物。 $C_{16}H_{32}N_4O_5$ (半乳糖醛酸单体加精胺)的分析计算值:C,53.3;H,8.95;N,15.5。实测值:C,39.0;H,6.58;N,4.07。

[0141] B珠的改性

[0142] 用上述果胶改性以下珠:

[0143] 二氧化硅微球,羧基,1.0 μ m(Polysciences,Warrington,PA,24754-1)

[0144] 羧基-聚苯乙烯颗粒,5.11 μ m(Spherotec,德国,CP-50-10)

[0145] NHS活化的琼脂糖凝胶4Fast Flow(琼脂糖凝胶珠,GE healthcare,Chicago,IL,17-0906-01)

[0146] 对于琼脂糖凝胶珠,使用NHS活化的珠形式,因此未进行EDC/NHS活化。水解的NHS-琼脂糖凝胶珠用作非改性的珠对照。在该实施例中,提供了用含胺的果胶聚合物,例如上述的改性果胶,将羧基改性的珠官能化的程序。

[0147] 将用羧基(Spherotec,CP-50-10)改性的聚苯乙烯珠(约5微米,2mL5%重量的悬浮液)用去离子水(4mL)稀释并超声处理15分钟。向珠悬浮液中加入40mg EDC.HCl和40mg NHS。将悬浮液搅拌24小时以活化,以4000rpm短暂离心5分钟,并倾析上清液。将珠重悬于5ml去离子水中,并向其中加入1%的胺聚合物溶液(5mL)。通过在去离子水中搅拌胺果胶聚合物18小时,然后以9000rpm离心30分钟以除去任何未溶解的物质,来制备胺果胶聚合物溶液。将悬浮液搅拌18小时,然后以9000rpm离心30分钟,用45mL水稀释并以相同方式冲洗。用0.1M NaOH(1x)、0.1M HCl(1x)和去离子水(2x)重复该过程。将珠重悬于5ml DI H₂O中,超声处理30分钟,并通过Speedvac称量150ul等分试样中珠的量来测量浓度。

[0148] 实施例3核酸的去污

[0149] 实验A

[0150] 准备了七个单独的样品瓶,每个样品瓶包含在100 μ L水中的2.5ng鲑鱼dsDNA(126bp)扩增子模板序列。第一小瓶中未添加精胺-果胶缀合物。将在10uL水中的精胺-果胶缀合物添加到其余的每个小瓶中(0.5、2、3、4、5和6 μ g)。在室温下静置1小时后,从每个小瓶中取出5 μ L,然后添加到PCR反应溶液(15 μ L)中。使用以下条件在PCRmax Eco 48上进行实时qPCR。将热循环编程为在95 $^{\circ}$ C下60秒,接着是在95 $^{\circ}$ C下10秒和在60 $^{\circ}$ C下60秒的40个循环。PCR反应溶液:25mM KCl、50mM MgCl₂、4.2mM HEPES、0.1%Tween、0.2mM dNTP、1.5U/uL热启动Taq酶、400nM探针和400nM引物。

[0151] 正向引物:5'-AGCCTGGATGACAATGACTCT-3' SEQ ID NO:1

[0152] 反向引物:5'-CTTATGCAT GTCCTTCTTG-3' SEQ ID NO:2

[0153] 探针:用FAM(5')和BHQ(3')修饰的5'-CGACGGCAACG(T-Dabcyl)CAGGAGGAACCTACGA-3' SEQ ID NO:3。

[0154] 来自鲑鱼基因组序列的双链DNA(126bp)购自Integrated DNA Technologies,是PCR的扩增子产物的模型。

[0155] 扩增子模板序列(126聚体):

[0156] 5'AGCCTGGATGACAATGACTCTCAGCATCTGCCCCCTACGGGAACCTACTTCCAGAACCTGGGGGGC

GACGGCAACGTCAGGAGGAACCTACGAACTGTTGGCCTGCTTCAAGAAGGACATGCATAAG-3' SEQ ID NO:4

[0157] 图1显示了PCR曲线,其中用精胺缀合的果胶处理了2.5ng的模板dsDNA(126bp)。每条曲线代表一个实验,其中将0.5至6.0ng的精胺果胶添加到2.5ng的dsDNA中。左侧的第一条曲线的Ct为12.2,代表无精胺-果胶对照。随着更多的果胶被添加到单独的反应中,Ct变得更长,直到加入6ug的精胺果胶时,才没有观察到Ct。这是所有模板均被精胺-果胶缀合物结合且模板不能在PCR反应中扩增的浓度。

[0158] 实验B

[0159] 准备两个单独的小瓶,每个小瓶包含在60μL水中的6μg精胺-果胶缀合物。向一个小瓶中加入在20μL水中的4μg hgDNA,并允许在室温下静置1h。然后将100ul中的2.5ng鲑鱼dsDNA(126bp)模型扩增子添加到两个小瓶中。从每个小瓶中取出5μL等分试样,如下所述用于PCR。

[0160] 当用6ug的精胺-果胶缀合物处理2.5ng的鲑鱼dsDNA(126bp)时,没有发生PCR扩增(图2)。但是,如果先用4μg的hgDNA处理6μg的精胺果胶,以代表DNA污染物,然后加入2.5ng的鲑鱼dsDNA,则获得的PCR信号与2.5ng的单独的鲑鱼DNA对照相同(图2)。该实施例表明,精胺-果胶缀合物可以首先结合污染的DNA,并且在精胺-果胶污染物DNA复合物的存在下,仍会发生期望的靶DNA的扩增。

[0161] 实验C

[0162] 将鲑鱼dsDNA(126bp)模型扩增子稀释至每1毫升水1000万个拷贝的浓度。将1mL的DNA溶液分别添加到三个单独的小瓶中。一个小瓶用作无精胺-果胶对照样品。向另外两个小瓶中加入在10μL水中的1μg精胺-果胶缀合物。仅向这些小瓶中的一个中加入在100μL水中的2.5ng鲑鱼dsDNA(126bp)模型扩增子。静置1小时后,如下所述从每个小瓶中取5μL进行PCR反应。

[0163] 图3显示当用1ug的精胺-果胶缀合物处理1000万拷贝的dsDNA(126bp)时,扩增被完全抑制(B)。向精胺-果胶-DNA混合物中添加更多拷贝(1.9×10^{10})后,扩增恢复(C),与未处理的DNA的扩增(A)相当。这显示了精胺-果胶缀合物可以如何用于结合少量的DNA污染物,然后允许进行靶标的扩增。

[0164] 实施例4:从扩增子的表面去污

[0165] 扩增子溶液的制备

[0166] 通过上述方法进行鲑鱼DNA靶标的PCR而不使用探针。40个PCR循环后,将PCR管的内容物稀释1000倍,得到“扩增子溶液”,具有约400B拷贝的DNA/mL。通过与标准10K拷贝的鲑鱼DNA靶标的PCR平行比较证实了扩增能力和拷贝数/mL。扩增子溶液用于以下实验。

[0167] 表面上干燥扩增子的制备

[0168] 使用P150(非常细)砂纸使31x23cm的聚丙烯板粗糙化。用水清洁表面,测试润湿性并干燥。对于某些实验,在该表面上标记7.5cmx1.8cm宽松分隔节段的网格,以测试各种处理和运行对照。将10mL扩增子溶液沉积在干燥的表面上,并使用棉拭子将其均匀铺展在整个表面上。将板放置在水平表面上,并使其干燥4小时。对包含干燥扩增子的表面进行以下去污和对照实验。

[0169] 用各种浓度的化合物1溶液处理表面扩增子

[0170] 向含有扩增子的表面上的八组13.5cm²节段上施加2mL 1%的化合物1的溶液。用

棉拭子将溶液均匀地铺展在所有四个节段之间,并在水平表面上干燥过夜。将从每个节段收集的湿拭子放入0.5mL水中,一式三份进行PCR分析。

[0171] 使用0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%的化合物1溶液和0%的对照(水)进行相同的实验。剩下的八个节段留作未经处理的对照。表1列出了拭子和添加了10K DNA靶标的相同样品的平均Ct值。

[0172] 表1通过化合物1溶液灭活扩增子

[0173]

样品	Ct	添加10K DNA的Ct
0.1%	ND	ND
0.01%	ND	ND
0.001%	17	16
0.0001%	16	16
水	16	16

[0174] 气溶胶形式的可扩增的扩增子的灭活

[0175] 使用安装在表面上方3cm的直径7cm的聚丙烯漏斗,在包含干燥分析物的粗糙的31x23cm聚丙烯表面的表面上方收集气溶胶。漏斗通过柔性导管连接到包含30mL水的聚丙烯撞击器。撞击器的出口连接到速率设置为5L/min的抽吸泵。在24小时内收集空气传播的颗粒,并将溶液样品提交PCR分析。未经处理的表面扩增子在Ct 35处产生PCR信号。通过喷涂0.1%的化合物1溶液处理然后干燥过夜的表面显示未检测到扩增子(图4)。类似地,0.01%的化合物1溶液显示扩增子的完全抑制,并且使用0.001%的化合物1显示部分抑制(表2)。在所有情况下,添加到PCR样品中的10K拷贝的靶DNA显示出与对照相同的Ct,表明在气溶胶状态下没有产生PCR抑制剂。

[0176] 为了证明没有产生雾化形式的PCR抑制剂,将1%的化合物1施加到干净的粗糙聚丙烯表面并干燥过夜。在24小时内用30mL水捕获气溶胶,并在添加10K靶DNA的情况下通过PCR检测样品。与纯水中的10K靶DNA对照样品相比,PCR未显示Ct差异(表2)。

[0177] 表2. 化合物1的溶液喷雾的雾化形式扩增子的灭活

[0178]

样品	Ct	添加 10K DNA 的 Ct
无处理对照	36	13
0.1%化合物 1	ND	14
0.1%化合物 1	ND	17

[0179]	0.01%化合物 1	ND	ND
	0.001%化合物 1	46	16
	1%化合物 1; 无扩增子 24 小时	ND	16
	1% 化合物 1; 无扩增子 72 小时	ND	16

[0180] 实施例5:用于去除扩增子的空气去污的洗涤器

[0181] 使用安装在表面上方3cm的直径7cm的聚丙烯漏斗,在包含干燥扩增子的粗糙的31x23cm聚丙烯表面的表面上方收集气溶胶。漏斗通过柔性导管连接到包含30mL水的聚丙烯撞击器A。将另一个装有30mL水的撞击器B与撞击器A串联连接。撞击器B的出口连接到速率设置为5L/min的抽吸泵。在24小时内在撞击器A中收集空气传播的颗粒,然后在撞击器B中收集空气传播的颗粒,并将来自A和B的溶液样品提交PCR分析。来自A的表面扩增子的气溶胶在Ct 35处产生PCR信号,来自B的在Ct 42处产生PCR信号。该实验证明水不是有效的洗涤物质:扩增子仍从撞击器A逸出,导致在撞击器B中检测到扩增子。

[0182] 使用两个串联连接的撞击器A和B进行了另一个类似的实验,例外之处是A中装有30mL的0.1%化合物1。PCR分析显示,任一撞击器中均无活性扩增子(ND),而来自B的样品也未显示PCR抑制。

[0183] 表3.通过使用包含化合物1的洗涤器去除扩增子来纯化空气

设置	撞击器 A	A + 10K DNA	撞击器 B	B + 10K DNA
A 和 B 中为水	35	19	42	19
A 中为 0.1% 化合物且 B 中为水	ND	17	ND	16

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 塞弗德公司 (CEPHEID)
- [0003] <120> 核酸去污方法
- [0004] <130> FIC21210014P
- [0005] <150> US 62/765014
- [0006] <151> 2018-08-17
- [0007] <160> 4
- [0008] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 21
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> Artificial sequence
- [0013] <220>
- [0014] <221> misc_feature
- [0015] <222> (1) .. (21)
- [0016] <223> 合成的
- [0017] <400> 1
- [0018] agcctggatg acaatgactc t 21
- [0019] <210> 2
- [0020] <211> 19
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> Artificial sequence
- [0023] <220>
- [0024] <221> misc_feature
- [0025] <222> (1) .. (19)
- [0026] <223> 合成的
- [0027] <400> 2
- [0028] cttatgcatg tccttcttg 19
- [0029] <210> 3
- [0030] <211> 27
- [0031] <212> DNA
- [0032] <213> Artificial sequence
- [0033] <220>
- [0034] <221> misc_feature
- [0035] <222> (1) .. (27)
- [0036] <223> 合成的
- [0037] <220>
- [0038] <221> misc_feature

- [0039] <222> (12) .. (12)
- [0040] <223> 12位的N为Dabcy1-标记的胞嘧啶
- [0041] <400> 3
- [0042] cgacggcaac gncaggagga actacga 27
- [0043] <210> 4
- [0044] <211> 126
- [0045] <212> DNA
- [0046] <213> Salmo
- [0047] <400> 4
- [0048] agcctggatg acaatgactc tcagcatctg cccccctacg ggaactactt ccagaacctg 60
- [0049] gggggcgacg gcaacgtcag gaggaactac gaactgttgg cctgcttcaa gaaggacatg 120
- [0050] cataag 126

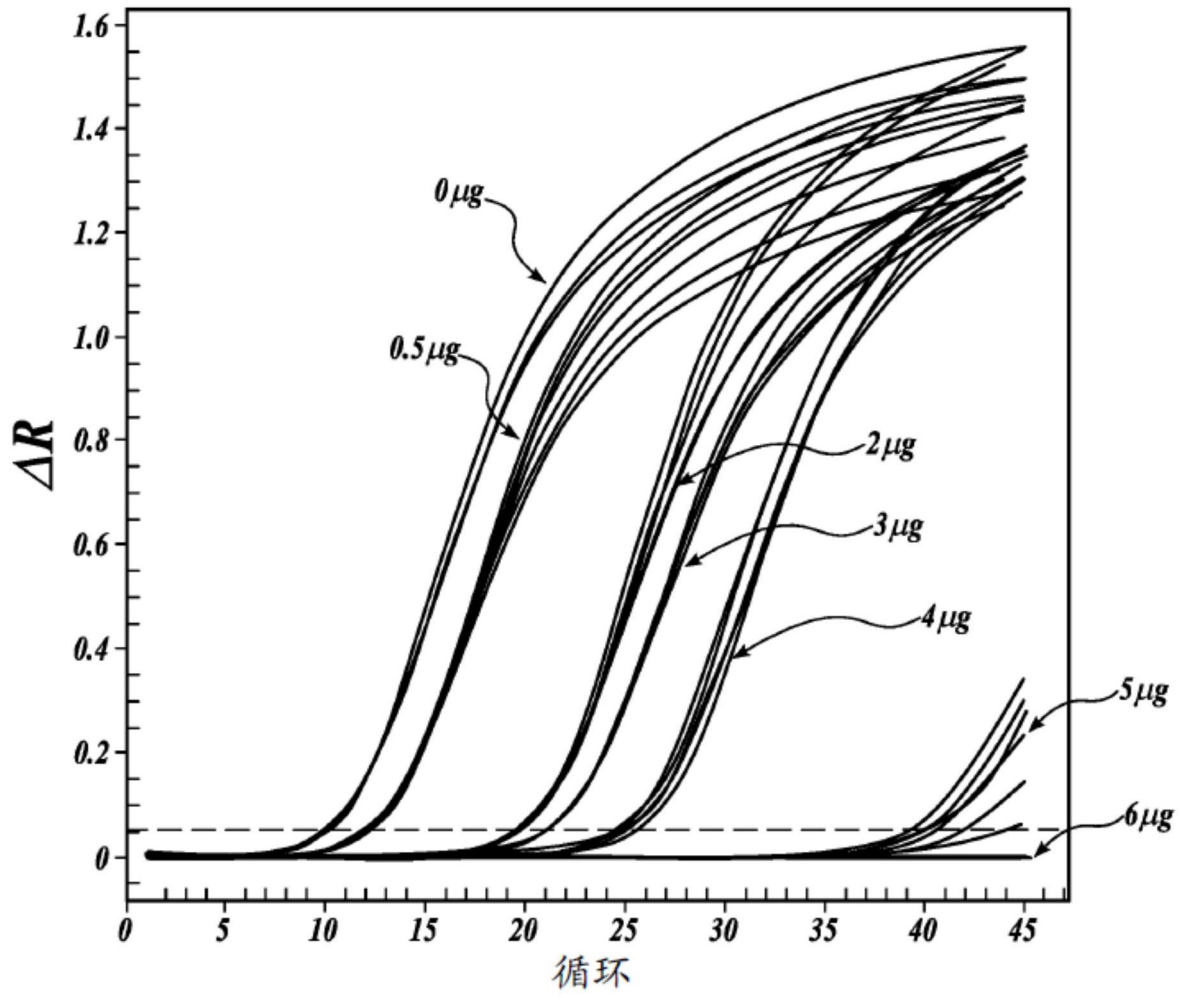


图1

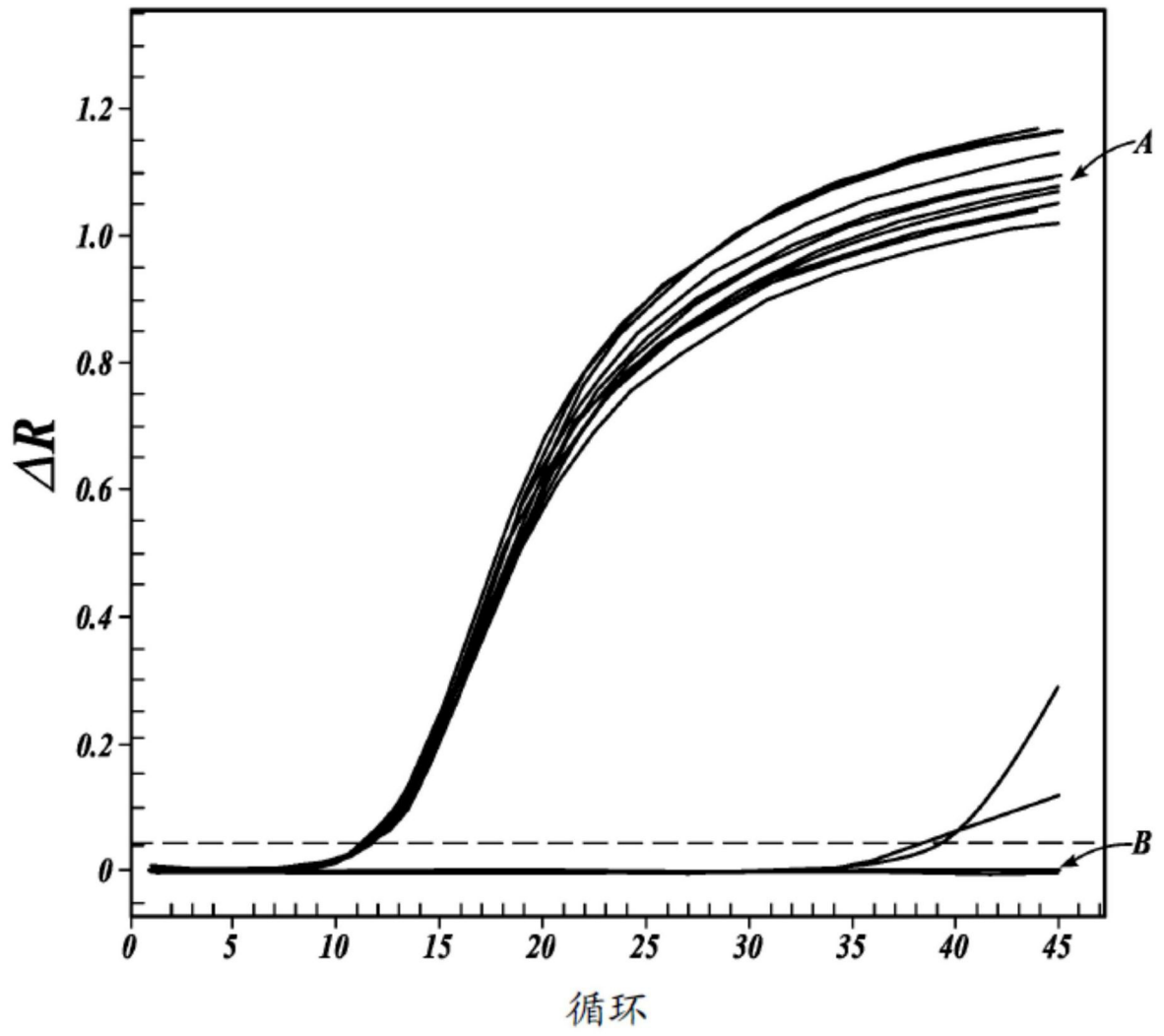


图2

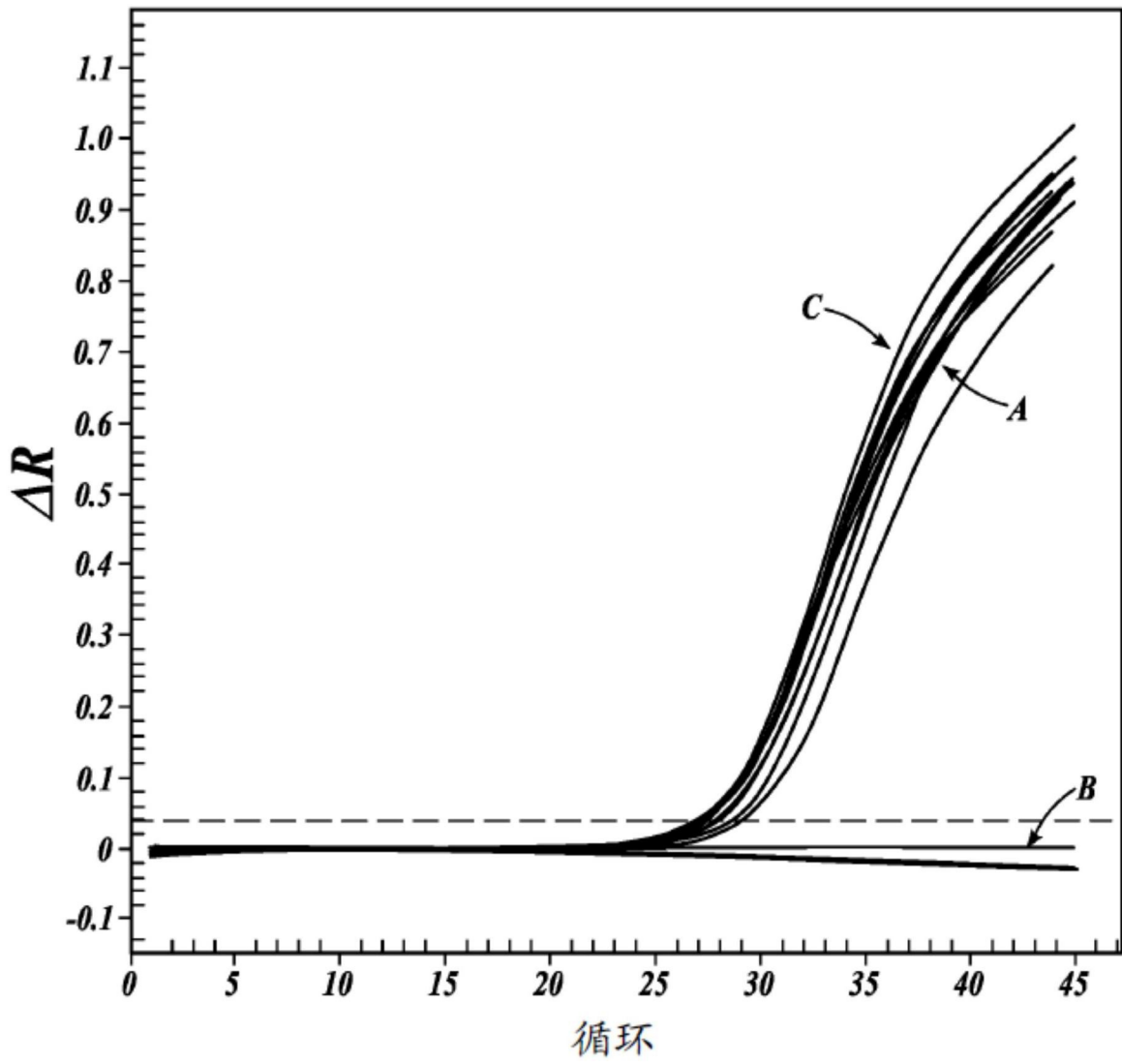


图3

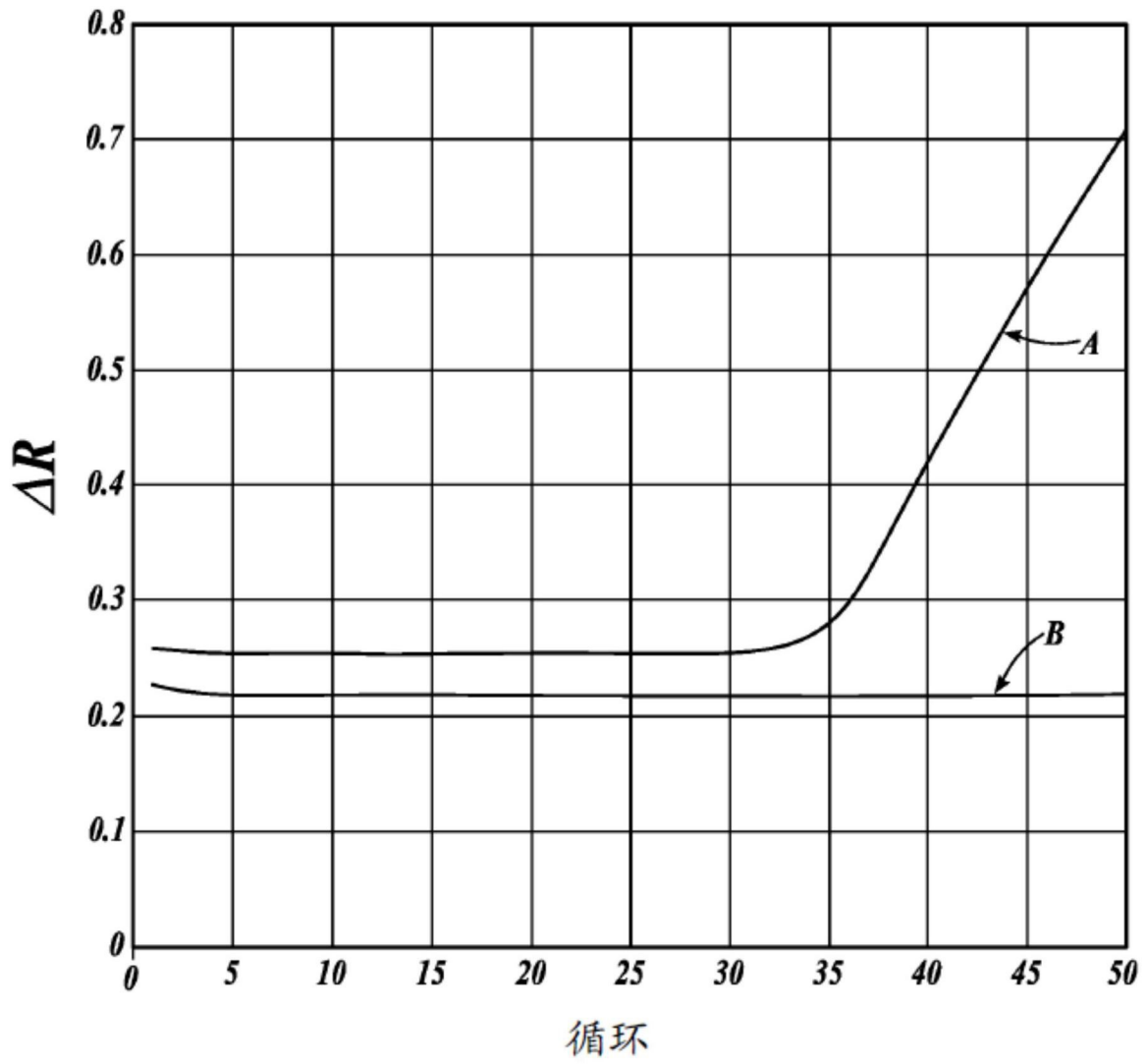


图4