



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014114784/10, 14.04.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.04.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.04.2014

(45) Опубликовано: 10.11.2015 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ЕР 1563091 В1, 07.01.2009.RU 2322058
C2, 20.04.2008.RU 2164532 C1, 27.03.2001

Адрес для переписки:
344113, г. Ростов-на-Дону, ул. Королева, 12, кв.
197, Корниенко И.В.

(72) Автор(ы):

Корниенко Игорь Валериевич (RU),
Фалеева Татьяна Георгиевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Корниенко Игорь Валериевич (RU),
Фалеева Татьяна Георгиевна (RU)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ ИЛИ ДНК (ВАРИАНТЫ) И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано для хранения препаратов ДНК в жидком виде. Получают композицию, содержащую буферный раствор, включающий 0,5-4% N-лаурилсаркозина, 5-20 мМ ЭДТА, 30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометана и воду - остальное. Варианты композиции могут содержать 0,04-0,4% NaN₃

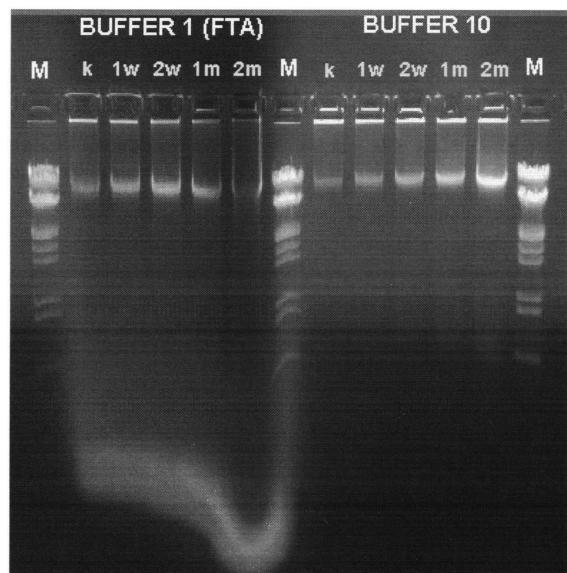
(азида натрия) вместо Трис либо совместно с ним. Полученные композиции применяют для пропитки пористых носителей для хранения и/или транспортировки ДНК-содержащих препаратов или ДНК. Изобретение обеспечивает стабильность ДНК биообразцов в широком диапазоне температур в течение длительных периодов времени. 4 н. и 15 з.п. ф-лы, 4 ил., 6 табл., 4 пр.

R U 2 5 6 7 1 4 5 C 1

R U 2 5 6 7 1 4 5 C 1

R U 2 5 6 7 1 4 5 C 1

R U 2 5 6 7 1 4 5 C 1



ФИГ. 2

R U 2 5 6 7 1 4 5 C 1

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 567 145⁽¹³⁾ C1

(51) Int. Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014114784/10, 14.04.2014

(24) Effective date for property rights:
14.04.2014

Priority:

(22) Date of filing: 14.04.2014

(45) Date of publication: 10.11.2015 Bull. № 31

Mail address:

344113, g.Rostov-na-Donu, ul. Koroleva, 12, kv. 197,
Kornienko I.V.

(72) Inventor(s):

Kornienko Igor' Valerievich (RU),
Faleeva Tat'jana Georgievna (RU)

(73) Proprietor(s):

Kornienko Igor' Valerievich (RU),
Faleeva Tat'jana Georgievna (RU)

(54) COMPOSITION FOR STORING DNA-CONTAINING PREPARATIONS OR DNA (VERSIONS) AND ITS APPLICATION

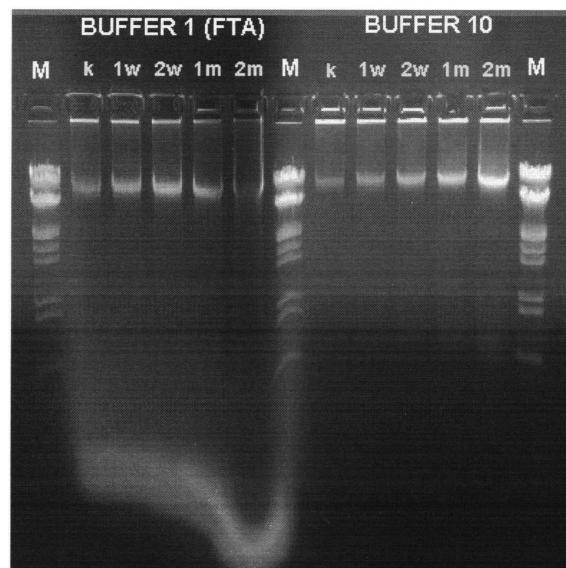
(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to field of biotechnology and can be used for storing DNA preparations in liquid form. Composition, containing buffer solution, including 0.5-4% of N-lauryl sarcosine, 5-20 mM of EDTA, 30-200 mM of Tris(hydroxymethyl) aminomethane and water - the remaining part. Versions of composition can contain 0.04-0.4% of NaN₃ (sodium azide) instead of Tris or in combination with it. Obtained compositions are applied for soaking porous carriers for storage and/or transportation of DNA-containing preparations or DNA.

EFFECT: invention provides stability of DNA biosamples in wide range of temperatures for long periods of time.

19 cl, 4 dwg, 6 tbl, 4 ex



ФИГ. 2

R U 2 5 6 7 1 4 5 C 1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к буферной жидкой композиции, предназначеннной для хранения препаратов ДНК в жидком виде, а также для пропитки пористых носителей, используемых для сбора и хранения биологического материала,
5 обеспечивающей стабильность ДНК биообразцов в широком диапазоне температур в течение длительных периодов времени.

Уровень техники

Сбор и хранение биологического материала, в том числе, осуществляется для прямой и непрямой ДНК-идентификации в молекулярной генетике. Уничтожение биоматериала
10 после его генотипирования представляется нецелесообразным, поскольку на сегодняшний день отсутствует единый российский стандарт генетических маркеров для ДНК-идентификации. Панель локусов имеет неуклонную тенденцию к расширению.

Хранение биологического материала, в частности сухой крови, на бумажном носителе является наиболее простым и экономически выгодным способом, поскольку в таком
15 виде биообразцы могут находиться в условиях комнатной температуры без использования дорогостоящей техники. Бумажные носители с биообразцом должны быть хорошо высушены перед хранением, защищены от действия солнечного света, высокой температуры и влажности воздуха, поскольку наличие влаги, а также возможное развитие микробной флоры, ведет к деградации активной ДНК-матрицы.

20 В судебно-медицинской практике ДНК-анализа широкой популярностью пользуются карточки FTA и FITZCO, Whatman Technology (патенты US 7498133B2 и US 6645717). Фирмы производители этих карт используют специальный FTA-матрикс, позволяющий стабилизировать ДНК и оказывать антимикробный эффект. FTA-матрикс представляет собой смесь растворов (2% SDS (додецилсульфат натрия), 10 mM ЭДТА, 60 mM Трис
25 (гидроксиметил) аминометан): 1 мл 20% SDS, 200 мкл 0,5 M ЭДТА, 600 мкл 1 M Трис довести до 10 мл стерильной деионизованной воды. SDS является мощным детергентом, за счет которого достигается антимикробный эффект. Однако авторами настоящего изобретения экспериментально доказан сильный ингибирующий эффект на ПЦР SDS, входящего в состав FTA-матрикса.

30 Применение в качестве твердого носителя бумаги зарубежного производства с FTA-матриксом (Whatman FTA Technology) позволяет хранить архивные образы крови и очищать ДНК от примесей белков и железосодержащих соединений. Связанная с FTA-матриксом ДНК освобождается от гема и других ингибиторов ПЦР простым отмыванием, после чего FTA-бумага с иммобилизованной на ней ДНК вводится
35 непосредственно в соответствующую амплификационную смесь.

Однако проведенные авторами настоящего изобретения исследования показали, что очистка FTA-реагентом 15-летних образцов сухой крови на FTA-картах происходила гораздо хуже по сравнению с 2-дневными образцами. В 18% случаях после стандартной очистки FTA очищающим реагентом (FTA Purification Reagent (Fitzco, Inc), приготовление
40 500 мл: 0,29 г NaCl; 5 мл 1 M Трис pH 7,5; 1 мл 0,5 M ЭДТА; 2,5 мл Тритона-X-100 (t-Detylphenoxypolyethoxyethanol)) (патент US 6645717) 15-летних FTA-карт с кровью получены неполные генетические профили, в которых наблюдали не только отсутствие ПЦР-продуктов ряда локусов и выпадение аллелей, но и включение лишних аллелей.

Фирма производитель гарантирует срок хранения сухой крови на FTA-картах не
45 менее 22 лет с сохранением качества ДНК. С другой стороны, ряд исследователей показал малую эффективность FTA-карт при длительном хранении биологических образцов. Так, Margaret C. Kline (2005) показала, что при 7-летнем хранении цельной крови на FTA-картах при +37°C происходит деградация высокомолекулярных STR-

локусов. Alice J. Sigurdson и соавторы показали, что ДНК bukkального эпителия после его 7-летнего хранения при комнатной температуре на обработанных бумажных носителях не сохраняет свои качественные и количественные характеристики. При этом успешные амплификации фрагмента гена β-глобина размером 268 н.п. удалось

5 осуществить в 92,9% случаев, тогда как ПЦР-продукт того же гена, но размером 536 н.п., удалось получить только в половине случаев. Steven Wilkinson и соавторы также показали малую эффективность FTA-карт для длительного хранения ДНК.

По результатам исследований ряда авторов деградация высокомолекулярной ДНК-матрицы пятен крови, которым уже более 15 лет, на FTA-картах может препятствовать 10 не только NGS-анализу (Next Generation Sequencing) (Sigurdson A.J., Ha M., Cosentino M., Franklin T., Haque K.A., Qi Y., Glaser C, Reid Y., Vaught J.B., Bergen A.W. Long-term storage and recovery of buccal cell DNA from treated cards // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006. Vol. 15. P. 385-388.), (Lee S.B., Crouse C.A., Kline M.C. Optimizing Storage and Handling of DNA Extracts // Forensic Science Review. 2010. Vol. 22. N 2. P. 131-144.) - будущему судебно-15 медицинскому «золотому стандарту», позволяющему одновременно исследовать большое количество ДНК-маркеров (Roewer L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future // Investig. Genet. 2013. Vol. 4. N 1. P. 22-31).

В патенте RU 2322058 предлагается способ консервации биологических образцов, обеспечивающий сохранность нуклеиновых кислот. Представляет собой способ 20 выделения нуклеиновых кислот, включающий получение лизата смешиванием биологического материала с консервирующим раствором, содержащим соединение гуанидина. Консервирующий раствор стабилен при +20°C только в течение 2 месяцев, однако при понижении температуры ниже +20°C из раствора выпадают кристаллы, которые растворимы нагреванием. Образование кристаллов и необходимое нагревание 25 раствора способствует разрушению активной ДНК-матрицы.

В заявках RU 2006139643 и RU 2006139035 предлагаются способ сбора, хранения и транспортировки биологических образцов и устройство для его осуществления и объединение процессов хранения образцов и управление образцами в медико-биологических науках, включающие в себя этап регистрация биологического образца 30 на матрице с помощью восстанавливающего буфера, который содержит одинократный физиологический раствор с фосфатным буфером (PBS) или воду без нуклеазы, куда может быть добавлен азид натрия. Однако такой восстанавливающий буфер может ингибировать ПЦР, образуя нерастворимый в воде фосфат магния ($Mg_3(PO_4)_2$), либо 35 малорастворимый гидроортфосфат магния ($MgHPO_4$). Фосфатные соли магния растворимы только в сильных неорганических кислотах, что неизбежно приведет к деградации ДНК. Предлагается объединение процессов хранения образцов и управление образцами в медико-биологических науках (патент RU 2008126716 А), представляя 40 собой способ хранения биологического материала только в сухом виде. Матрица содержит различные ингибиторы, поливиниловый спирт.

Предлагаются композиции и способ для выделения нуклеиновых кислот из любых комплексных исходных материалов и последующий комплексный генный анализ (патент RU 2001118287), что представляет собой способ экстракции ДНК, не обеспечивая ее длительного хранения.

45 Раскрытие изобретения

В настоящем изобретении предложены:

(1) Композиция для хранения ДНК-содержащих препаратов или ДНК, содержащая буферный раствор, включающий 0,5-4% N-лаурилсарказин, 5-20 мМ ЭДТА, 30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан, вода - остальное.

(2) Композиция (1), где буферный раствор представляет собой смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозина, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, доведенную до 10 мл стерильной деионизованной водой.

(3) Композиция (1), где ДНК-содержащий препарат представляет собой биообразец.

5 (4) Композиция (1), где соотношение буфера к биообразцу составляет 10:1.

(5) Композиция (1), где биообразец представляет собой жидкую кровь или слону.

(6) Композиция для хранения ДНК-содержащих препаратов или ДНК, содержащая буферный раствор, включающий 0,5-4% N-лаурилсаркозин, 5-20 мМ ЭДТА, 30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан, 0,04-0,4% NaN₃ (азид натрия), вода - остальное.

10 (7) Композиция (6), где буферный раствор представляет собой смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, 1 мл 10 мг/мл NaN₃ (азид натрия), доведенную до 10 мл стерильной деионизованной водой.

15 (8) Композиция (7), где ДНК-содержащий препарат представляет собой биообразец.

(9) Композиция (7), где соотношение буфера к биообразцу составляет 10:1.

(10) Композиция (7), где биообразец представляет собой жидкую кровь или слону.

(11) Композиция для хранения ДНК-содержащих препаратов или ДНК, содержащая буферный раствор, включающий 0,5-4% N-лаурилсаркозин, от 5 мМ до 20 мМ ЭДТА, 0,04-0,4% NaN₃ (азид натрия), вода - остальное.

20 (12) Композиция (11), где буферный раствор представляет собой смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 1 мл 10 мг/мл NaN₃ (азид натрия), доведенную до 10 мл стерильной деионизованной водой.

25 (13) Композиция по (12), где ДНК-содержащий препарат представляет собой биообразец.

(14) Композиция (12), где соотношение буфера к биообразцу составляет 10:1.

(15) Композиция по (12), где биообразец представляет собой жидкую кровь или слону.

30 (16) Применение композиций (1)-(15) для пропитки пористых носителей для хранения и/или транспортировки ДНК-содержащих препаратов или ДНК.

(17) Применение (16), где пористый носитель представляет собой бумагу.

(18) Применение (16), где ДНК-содержащий препарат представляет собой жидкий биообразец.

35 (19) Применение (16), где ДНК-содержащий препарат или ДНК находятся в сухом виде.

I. Объекты настоящего изобретения представляет собой композиции для пропитки пористых носителей, например бумаги, сохраняющие ДНК биообразцов в сухом виде в широком диапазоне температур (вплоть до +70°C) в течение длительных периодов времени.

40 Знак «%», как используется в настоящем изобретении, означает процентное содержание по массе указанного компонента в указанной композиции, буфере.

Одним из постоянных составляющих буферных композиций является 0,5-3% N-лаурилсаркозин, являющийся наиболее мягким детергентом, не приводящим к ингибированию ПЦР.

45 Также постоянным составляющим композиций является 5-20 мМ ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат). В животных тканях в больших количествах присутствуют ионы Fe²⁺ и Fe³⁺ в составе гемоглобина и высвобождающиеся при его

денатурации. Константа связывания ЭДТА с ионами железа составляет $\approx 10^{-14} \text{ M}^{-1}$ (Fe^{2+}) и $\approx 10^{-24} \text{ M}^{-1}$ (Fe^{3+}) (Sillen, L.G., Martell, A.E. Stability Constants of Metalloc Complexes. The Chemical Society, London, 1964). Таким образом, благодаря наличию ЭДТА в составе буфера устраняется ингибиторный эффект ионов железа, оказываемый на ПЦР.

Слабощелочная среда наиболее оптимальна для хранения препаратов ДНК. Поэтому для создания буферной емкости и поддержания слабощелочного значения pH использовался раствор Триса (30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан).

0,04-0,4% NaN_3 (натрия азид), входящий в состав буферных композиций, оказывает

10 выраженный антимикробный и антимикотический эффект без ингибирования ПЦР.

Настоящее изобретение представляет собой комбинации вышеперечисленных компонентов в буфере:

1. Буферная жидккая композиция (9) представляет собой смесь растворов (0,5-4% N-лаурилсарказин, предпочтительно 2%, 5-20 мМ ЭДТА, предпочтительно 10 мМ, 30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан), предпочтительно 60 мМ. Например, смесь 1 мл 20% N-лаурилсарказина, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, доведенную до 10 мл стерильной десионизированной водой.

2. Буферная жидккая композиция (10) представляет собой смесь растворов (0,5-4% N-лаурилсарказин, предпочтительно 2%, 5-20 мМ ЭДТА, предпочтительно 10 мМ, 30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан, предпочтительно 60 мМ, 0,04-0,4% NaN_3 (азид натрия), предпочтительно 0,1%). Например, смесь 1 мл 20% N-лаурилсарказина, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, 1 мл 10 мг/мл NaN_3 (азид натрия), доведенную до 10 мл стерильной десионизированной водой.

25 3. Буферная жидккая композиция (11) представляет собой смесь растворов (0,5-4% N-лаурилсарказин, предпочтительно 2%, 5-20 мМ ЭДТА, предпочтительно 10 мМ, 0,04-0,4% NaN_3 (азид натрия), предпочтительно 0,10%). Например, смесь 1 мл 20% N-лаурилсарказина, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 1 мл 10 мг/мл NaN_3 (азид натрия), доведенную до 10 мл стерильной десионизированной водой.

30 35 Пористый предмет-носитель замачивается в одной из трех вышеуказанных буферных жидкких композициях путем полного погружения на 3 минуты, после чего высушивается при комнатной температуре. На предмет-носитель наносится биологическая жидкость (кровь, слюна и т.д.) в количестве 50-100 мкл в пересчете на площадь от 3 cm^2 до 12 cm^2 при толщине бумажного носителя от 0,15 до 1,0 мм, после чего также подвергается высушиванию при комнатной температуре.

Таким образом, настоящее изобретение относится к композициям, сохраняющим стабильной ДНК биообразцов на пористых носителях, обеспечивая наиболее длительное хранение препаратов ДНК в широком температурном диапазоне (не менее 40 лет хранения при температуре до +20°C).

40 II. Еще одним объектом настоящего изобретения является способ хранения препаратов ДНК в стабильной форме в жидкой композиции для хранения, включающий в себя:

(i) добавление буферной жидккой композиции по настоящему изобретению в качестве разбавителя на заключительном этапе выделения ДНК;

45 (ii) смешивание очищенного образца ДНК и буферного раствора по настоящему изобретению в соотношении 1:10; и

(iii) хранение препарата ДНК.

Объекты настоящего изобретения представляет собой жидкие буферные композиции

для хранения препаратов ДНК в жидким виде в широком диапазоне температур (до +70°C) в течение длительных периодов времени.

Настоящее изобретение представляет собой комбинации вышеперечисленных компонентов в буфере:

5 1. Буферная жидккая композиция (9) представляет собой смесь растворов (0,5-4% N-лаурилсаркозин, предпочтительно 2%, 5-20 мМ ЭДТА, предпочтительно 10 мМ, 30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан, предпочтительно 60 мМ): 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, доведенную до 10 мл стерильной деионизованной водой.

10 2. Буферная жидккая композиция (10) представляет собой смесь растворов (0,5-4% N-лаурилсаркозин, предпочтительно 2%, 5-20 мМ ЭДТА, предпочтительно 10 мМ, 30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан, предпочтительно 60 мМ, от 0,04% до 0,4% NaN₃ (азид натрия), предпочтительно 0,1%): 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин- N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, 1 мл 10 мг/мл NaN₃ (азид натрия), доведенную до 10 мл стерильной деионизованной водой.

15 3. Буферная жидккая композиция (11) представляет собой смесь растворов (0,5-4% N-лаурилсаркозин, предпочтительно 2%, 5-20 мМ ЭДТА, предпочтительно 10 мМ, 0,04-0,4% NaN₃ (азид натрия), предпочтительно 0,1%): 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 1 мл 10 мг/мл NaN₃ (азид натрия), доведенную до 10 мл стерильной деионизованной водой.

20 Таким образом, настоящее изобретение относится к жидкой композиции, сохраняющей стабильной ДНК, содержащей ДНК и один из трех вышеперечисленных буферных растворов в соотношении 1:10, обеспечивая наиболее длительное хранение 25 препаратов ДНК в широком температурном диапазоне.

25 Дополнительные объекты и преимущества изобретения указаны в следующем далее разделе описания и частично становятся очевидными из описания или могут быть изучены при применении изобретения. Объекты и преимущества изобретения понимают и реализуют при помощи подробно перечисленных в прилагаемой формуле изобретения 30 элементов и сочетаний.

35 Следует понимать, что в рамках заявленного изложенное выше общее описание и следующее далее подробное описание являются лишь иллюстративными и поясняющими и не ограничивают объем изобретения. Дополняющие включенные и составляющие часть данного описания Фигуры иллюстрируют некоторые варианты преимущества изобретения и вместе с описанием помогают объяснить принципы изобретения.

Краткое описание чертежей

На Фиг. 1 показана ингибиторная активность буферов 1 и 10. Верхние четыре линии представляют собой кривые контрольных образцов, средние три линии - буфера 10, нижние линии - буфера 1.

40 На Фиг. 2 показаны результаты электрофореза препаратов ДНК в жидких буферных композициях 1 и 10 в 1%-ном геле агарозы.

На Фиг. 3 и Фиг. 4 показаны результаты сравнительного исследования антибиотической активности жидкых буферов.

Осуществление изобретения

45 Пример 1.

Проводили сравнительное исследование деградации ДНК в жидких буферных композициях: используемой производителем FTA-карт (Whatman FTA Technology) (буфер 1) и предлагаемых в настоящем изобретении (буфера 9, 10, 11).

Состав жидкой буферной композиции 1 (2% SDS (додецилсульфат натрия), 10 мМ ЭДТА, 60 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан): смесь растворов 1 мл 20% SDS, 200 мкл 0,5 М ЭДТА, 600 мкл 1 М Трис, доведенная до 10 мл стерильной дейонизованной водой.

⁵ Состав жидкой буферной композиции 9 (2% N-лаурилсаркозин, 10 мМ ЭДТА, 60 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан): смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис раствор, доведенная до 10 мл стерильной дейонизованной водой.

Состав жидкой буферной композиции 10 (2% N-лаурилсаркозин, 10 мМ ЭДТА, 60 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан, 0,1% NaN₃ (азид натрия)): смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, 1 мл 10 мг/мл NaN₃ (азид натрия), доведенная до 10 мл стерильной дейонизованной водой.

¹⁵ Состав жидкой буферной композиции 11 (2% N-лаурилсаркозин, 10 мМ ЭДТА, 0,1% NaN₃ (азид натрия)): смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин- N,N,N',N'-тетраацетат), 1 мл 10 мг/мл NaN₃ (азид натрия), доведенная до 10 мл стерильной дейонизованной водой.

В отдельные стерильные 1,5 мл пробирки типа Эппendorф помещали по 250 мкл ²⁰ соответствующего буфера (1, 9, 10 или 11), как указано в табл. 1.

25

30

35

40

45

Таблица 1

Номер пробирки	Буфер	Срок инкубации
1	1	Контроль (-20°C)
2	1	1 неделя
3	1	2 недели
4	1	1 месяц
5	1	2 месяца
6	9	Контроль (-20°C)
7	9	1 неделя
8	9	2 недели
9	9	1 месяц
10	9	2 месяца
11	10	Контроль (-20°C)
12	10	1 неделя
13	10	2 недели
14	10	1 месяц
15	10	2 месяца
16	11	Контроль (-20°C)
17	11	1 неделя
18	11	2 недели
19	11	1 месяц
20	11	2 месяца

В качестве генетического материала использовали стандартную ДНК K562 (Promega) в концентрации 550 нг/мкл. В пробирку с каждым буфером добавили по 25 мкл ДНК K 562, создавая, тем самым, конечную концентрацию ДНК 50 нг/мкл. Смеси тщательно перемешивали на вортексе при низких оборотах (примерно 500-1.200 rpm) 5 секунд, затем кратко центрифугировали. Контрольные препараты (номера пробирок 1, 6, 11, 16) сразу помещали на -20°C. Следует отметить, что при понижении температуры ниже +20°C, из раствора буфера 1 выпадают кристаллы, которые растворимы при нахождении буфера в условиях комнатной температуры. Остальные смеси инкубировали при +70°C в термостате Циклотемп 303 с нагревающейся до +105°C крышкой, что исключало образование конденсата на внутренних поверхностях крышек пробирок, в течение 1 недели (номера пробирок 2, 7, 12, 17), 2 недель (номера пробирок 3, 8, 13, 18), 1 месяца (номера пробирок 4, 9, 14, 19) и 2 месяцев (номера пробирок 5, 10, 15, 20).

Проводили оценку количества выделенной ДНК при помощи полимеразной цепной реакции «в реальном времени» в соответствии с инструкцией производителя. С этой целью использовали термоциклер с мультиканальным детектором для оценки ПЦР-продуктов в режиме реального времени iQ5 (США) Bio-Rad.

Для энзиматической амплификации локуса гена HBG (Human beta globin), длиной 120 нуклеотидных пар, использовали следующую пару праймеров (Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR // Nucleic Acids Research. 2002. Vol. 30. N 10. e47.):

HBG1: 5'-GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC-3'

HBG2: 5'-CACCAACTTCATCCACGTTCACC-3'

Регистрацию накопления ампликонов в РВ и построение калибровочных кривых проводили по технологии выполнения ПЦР в реальном времени, основанной на связывании фрагментов двухцепочечной ДНК с интеркалирующим красителем EVA Green. Для этого использовали набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (Синтол).

Перед проведением ПЦР все жидкие буферные композиции разбавляли в 200 раз с целью устранения возможного ингибирования ПЦР.

В табл. 2 представлены объемы компонентов, используемые при приготовлении реакционной смеси в расчете на одну пробирку.

Таблица 2

№	Наименование	Объем, мкл
15	1 2,5x Реакционная смесь, содержащая ионы магния, ДНК-полимеразу и интеркалирующий краситель EVAGreen	10
	Прямой праймер HBG 1 (1 оптическая единица)	1
	Обратный праймер HBG 2 (1 оптическая единица)	1
20	3 Деионизованная вода	8
	4 Образец ДНК	5

Перед проведением ПЦР в пробирки с 20 мкл готовой реакционной смесью (конечная концентрация M_d^{++} - 2,5 мМ) добавляли по 5 мкл выделенной ДНК и стандартных препаратов ДНК с известной концентрацией: 0,008, 0,04, 0,2, 1,0 и 5,0 нг/мкл.

Проводили амплификацию в следующем режиме:

95°C	3 мин	
95°C	10 сек	
55°C	30 сек	40 циклов
55-95°C	15 сек	Плавление с шагом 0,5°C (81 цикл)

Анализ данных ПЦР «в реальном времени» проводили с помощью программы “iQ5 Optical System Software” (версия 2.0, 2006). Температура плавления искомого ПЦР-продукта составляла 84,5-85°C.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы STADIA (Кулайчев А.П. Методы и средства анализа данных в среде Windows. Stadia 6.0. - М.: Информатика и компьютеры, 1996. 257 с.). О достоверности отличий показателей судили по величине t-критерия Стьюдента для прямых разностей сопряженных данных (Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 350 с).

Статистическими достоверными считали отличия соответствующие оценки ошибки вероятности $p < 0,05$. Наличие линейной корреляции между признаками оценивали с использованием коэффициентов корреляции, достоверность которых проверяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Концентрация ДНК в контрольных и опытных образцах буферов 1, 9, 10, 11 представлена в табл. 3.

Таблица 3

Буферы	Срок инкубации				
	Контроль (-20°C)	1 неделя	2 недели	1 месяц	2 месяца
1	0,209794	0,334651	0,371783	0,456227	0
9	0,344488	0,388733	0,404166	0,403102	0,694462
10	0,388621	0,42812	0,444365	0,498007	0,703437
11	0,345218	0,27923	0,327528	0,403667	0,612308

Концентрация ДНК контрольных образцов буферов 9, 10, 11 выше, чем в буфере 1, что можно объяснить большей деградацией ДНК в буфере 1 за счет образования кристаллов SDS (додецилсульфата натрия) в процессе заморозки и оттаивания.

Повышение значения концентраций с течением времени объясняется увеличением количества низкомолекулярной ДНК, что отражается за счет длины используемых праймеров (длина праймеров HBG 1 и HBG 2 составляет 120 нуклеотидных пар). Однако спустя 2 месяца инкубации в опытных образцах с буфером 1 уже отсутствует активная ДНК-матрица, в отличие от буферов 9, 10, 11.

Согласно правилу Вант-Гоффа при повышении температуры на каждые 10 градусов константа скорости гомогенной элементарной реакции увеличивается в два-четыре раза. Т.е. в среднем этот коэффициент равен $3((2+4)/2)$. Температура инкубации буферных жидкокомпозиций, содержащих стандартную ДНК человека (K562), составляла +70°C. Учитывая, что комнатная температура - это температура от +15°C до +25°C (в среднем +20°C), можно рассчитать, что скорость химической реакции (неферментативный гидролиз фосфодиэфирных связей в ДНК) при температуре +70°C возрастает в 243 раза по сравнению с условиями комнатной температуры. Расчет проводился по следующему алгоритму:

$$1) 70-20=50;$$

$$2) 50/10=5;$$

$$3) 3^5=243.$$

Продолжительность инкубации буферных жидкокомпозиций со стандартной ДНК человека (K562) составила 2 месяца или 60 суток. Умножив 60 на 243, мы получим значение 14580. Т.е. концентрация продуктов неферментативной химической реакции гидролиза фосфодиэфирных связей в ДНК при инкубации в буферных жидкокомпозициях в течение 60 суток при температуре +70°C будет такой же, если бы мы проводили эту инкубацию при температуре +20°C, но в течение 14580 суток, или около 40 лет (14580/365).

Таким образом, продолжительность хранения препаратов ДНК в предлагаемых нами буферах (9, 10, 11) в жидком виде при комнатной температуре составляет не менее 40 лет без существенного снижения концентрации высокомолекулярных фракций ДНК. В сухом виде, при пропитке пористых носителей, в том числе бумаги, предлагаемыми нами буферами (9, 10, 11), срок хранения будет значительно выше. Т.к. в этом случае будет крайне низкое содержание (либо отсутствие) одного из ключевых компонентов реакции гидролиза внутримолекулярных фосфодиэфирных связей - воды.

Пример 2.

Проводили сравнительное исследование ингибирующего влияния на ПЦР жидких буферных композиций: используемой производителем FTA-карт (Whatman FTA

Technology) (буфер 1) и предлагаемой нами (буфер 10).

Состав жидкой буферной композиции 1 (2% SDS (додецилсульфат натрия), 10 мМ ЭДТА, 60 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан): смесь растворов 1 мл 20% SDS, 200 мкл 0,5 М ЭДТА, 600 мкл 1 М Трис, доведенная до 10 мл стерильной деионизованной водой.

Состав жидкой буферной композиции 10 (2% N-лаурилсаркозин, 10 мМ ЭДТА, 60 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан, 0,1% NaN₃ (азид натрия)): смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, 1 мл 10 мг/мл NaN₃ (азид натрия), доведенная до 10 мл стерильной деионизованной водой.

В качестве пористого предмета-носителя использовали FTA-карты (Whatman FTA Technology) и фильтровальную бумагу (GE Healthcare Life Sciences Whatman™ Filter papers 3 Qualitative Diameter 110 mm 100 Circles Cat №1003-110) толщиной 0,33-0,36 мм или 330-360 мкм, которую однократно замачивали в буфере 1, либо в буфере 10 путем полного погружения в соответствующий буфер на 3 минуты, а затем сушили при комнатной температуре. Из FTA-карты (Whatman FTA Technology) и из фильтровальной бумаги (после высушивания) вырезали при помощи панчера (Premier Swiss Made) диски диаметром 1,2 мм, которые помещали в ПЦР-пробирки.

В табл. 4 представлены объемы компонентов, используемые при приготовлении реакционной смеси в расчете на одну пробирку.

Таблица 4.

№	Наименование	Объем, мкл
1	2,5x Реакционная смесь, содержащая ионы магния, ДНК-полимеразу и интеркалирующий краситель EVAGreen	10
	Прямой праймер HBG 1 (1 оптическая единица)	1
	Обратный праймер HBG 2 (1 оптическая единица)	1
3	Деионизованная вода	8
4	Образец ДНК	5

В качестве количественного стандарта концентрации ДНК использовали стандартную ДНК K562 (Promega) в концентрации 2 нг/мкл. Смесь тщательно перемешивали на вортексе при низких оборотах (примерно 500-1.200 rpm) 5 секунд, затем кратко центрифугировали. В каждую ПЦР-пробирку добавляли по 25 мкл смеси.

Исследовали концентрацию ДНК в пробирках с дисками FTA-карт, фильтровальной бумагой, пропитанной буфером 1, буфером 10, а также контрольные смеси, состоящие из реакционной смеси и ДНК K562 (Promega). Каждый образец исследовали в четырех параллелях. Для контроля использовали стандартные препараты ДНК с известными концентрациями: 0,008, 0,04, 0,2, 1,0 и 5,0 нг/мкл.

Проводили оценку количества выделенной ДНК при помощи полимеразной цепной реакции «в реальном времени» в соответствии с инструкцией производителя. С этой целью использовали термоциклер с мультиканальным детектором для оценки ПЦР-продуктов в режиме реального времени iQ5 (США) Bio-Rad.

Для энзиматической амплификации локуса гена HBG (Human beta globin), длиной 120 нуклеотидных пар, использовали следующую пару праймеров (Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR // Nucleic Acids Research. 2002. Vol. 30. N 10. e47.):

HBG1: 5'-GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC-3'

HBG2: 5'-CACCAACTTCATCCACGTTCACC-3'

Регистрацию накопления ампликонов в РВ и построение калибровочных кривых проводили по технологии выполнения ПЦР в реальном времени, основанной на связывании фрагментов двухцепочечной ДНК с интеркалирующим красителем EVA Green. Для этого использовали набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green (Синтол).

Проводили амплификацию в следующем режиме:

95°C	3 мин	
95°C	10 сек	
55°C	30 сек	40 циклов
55-95°C	15 сек	Плавление с шагом 0,5°C (81 цикл)

Анализ данных ПЦР «в реальном времени» проводили с помощью программы «iQ5 Optical System Software* (версия 2.0, 2006). Температура плавления искомого ПЦР-продукта составляла $84,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы STADIA (Кулайчев А.П. Методы и средства анализа данных в среде Windows. Stadia 6.0. - М.: Информатика и компьютеры, 1996. 257 с.). О достоверности отличий

показателей судили по величине t-критерия Стьюдента для прямых разностей сопряженных данных (Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа. 1990. 350 с.).

Статистически достоверными считали от差异ия, соответствующие оценки ошибки вероятности $p < 0,05$. Наличие линейной корреляции между признаками оценивали с использованием коэффициентов корреляции, достоверность которых проверяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты сравнительного исследования ингибирующего влияния на ПЦР жидких буферных композиций 1 и 10 представлены в табл. 5 и на Фиг. 1.

Таблица 5.

Буфер	C _t	ΔC _t
FTA_1диск	N/A	N/A
буфер1_1диск	N/A	N/A
буфер10_1диск	27,17825	3,2018
контроль-K562_2нг	23,97645	

где C_t - пороговый цикл,

ΔC_t - разница между контрольным и опытным пороговыми циклами,

N/A - ПЦР-продукт отсутствует.

На Фиг. 1 на 24-м цикле виден подъем кривых контрольных образцов ДНК (без добавления потенциальных ингибиторов ПЦР), на 27-м - проб с бумагой, пропитанной буфером 10 (диаметром 1,2 мм). В образцах, содержащих диски FTA-карты (Whatman FTA Technology) и пропитанных буфером 1 (диаметром 1,2 мм), отсутствовал подъем кривых, что отражает полное ингибирование ПЦР компонентами FTA-буфера.

Пример 3.

Проводили качественную и количественную сравнительную оценку препаратов ДНК в жидких буферных композициях 1 и 10 при помощи электрофореза в 1%-ном геле агарозы. Состав жидких буферных композиций 1 и 10 указан в примере 2.

Использовались указанные в примере 2 жидкие буферные композиции, инкубировавшиеся при +70°C в течение 1 недели, 2 недель, 1 месяца, 2 месяцев, и контрольные образцы, находившиеся при -20°C.

Готовили однократный ТВЕ-буфер в объеме, достаточном для заполнения камеры

- 5 электрофореза и приготовления геля. Добавляли к однократному ТВЕ-буферу порошок агарозы (Agarose helicon) в количестве, необходимом для получения 1% раствора, и нагревали в микроволновой печи до полного ее расплавления. Полученный жидкий раствор охлаждали до 50-60°C, добавляли бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл и осторожно перемешивали, избегая появления в геле пузырьков воздуха.
- 10 Теплую агарозу выливали в соответствующую форму и следили за тем, чтобы она равномерно распределилась по форме. Вертикально вставляли гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1 мм. Оставляли кювету с агарозным гелем на 30 минут, затем осторожно удаляли гребенку. Кювету с гелем помещали в электрофорезную камеру, содержащую необходимое количество однократного ТВЕ-буфера.
- 15 Подготавливали к электрофорезу исследуемые образцы, смешивая их с шестикратным буфером для нанесения (5:1, о/о), содержащим бромфеноловый синий и ксиленцианол в 30% растворе глицерина. Аккуратно вносили образцы в соответствующие лунки геля. В лунки, обозначенные как «М», вносили маркер молекулярных масс λ/EcoRI+HindIII. Электрофорез проводили при постоянном напряжении (5-7 В/см) в течение 40 минут
- 20 (до тех пор пока бромфеноловый синий не дойдет до конца геля). Помещали гель в УФ-трансиллюминатор и фотографировали. Сравнивали интенсивность свечения опытных препаратов ДНК с интенсивностью свечения проб с контрольными образцами, определяется количество ДНК в исследуемой пробе (Корниенко И.В., Харlamov С.Г. Методы исследования ДНК человека. Выделение ДНК и ее количественная оценка в
- 25 аспекте судебно-медицинского исследования вещественных доказательств биологического происхождения: Учебно-методическое пособие. - Ростов-на-Дону. ЮФУ, 2012. - 216 с.).

Результаты электрофореза препаратов ДНК в жидких буферных композициях 1 и 10 в 1%-ном геле агарозы представлены на Фиг. 2.

- 30 В качестве размерного стандарта использовали ДНК фага А, обработанную рестриктазами EcoRI и HindIII (дорожки М).

К - контрольные образцы, находившиеся при -20°C;

1w - инкубация при +70°C в течение 1 недели;

2w - инкубация при +70°C в течение 2 недель;

- 35 1m - инкубация при +70°C в течение 1 месяца;

2m - инкубация при +70°C в течение 2 месяцев.

Отмечается заметное снижение концентрации ядерной ДНК, которое наиболее выражено в образцах с буфером 1 (FTA-буфер) спустя 2 месяца инкубации при +70°C. Отмечается выраженная деградация высокомолекулярной ДНК, представленная в виде «шмера» низкомолекулярной ДНК. В то же время инкубация ДНК K562 в буфере 10 при +70°C в течение 2 месяцев не привела к заметной деградации ДНК (в районе между полосами 21226 и 5148 отчетливо видна фракция митохондриальной ДНК (мтДНК) размером 16569 нуклеотидных пар, а в лунках геля отчетливо видны полосы высокомолекулярной ядерной ДНК).

- 45 Пример 4.

Для проведения эксперимента использовали модификацию стандартного дисковидиффузационного метода, использующегося для оценки степени подавляющего влияния антибиотиков на микроорганизмы (Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности

определения чувствительности микроорганизмов диско диффузионным методом // Клин, микробиол. и антимикробная химиотерапия. - 2001. - Т. 3. - №. 4. - С. 348-355).

В данном исследовании использовали среду МПА («Биоконт», г. Махачкала) с добавлением аутолизата дрожжей для обеспечения быстрого роста всех исследуемых штаммов. Для всех чашек использовали среду, приготовленную в одном флаконе для обеспечения постоянства состава среды на всех чашках. Агар разливали в пластиковые чашки диаметром 90 мм, по 20 мл агара в чашку, согласно рекомендациям.

Противомикробный эффект буферов (1, 10) оценивали по зоне подавления роста бактериальных штаммов: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Sarcina flava*, а также грибов *Aspergillus niger* и *Penicillium* sp. и их спорообразующей способности. Для приготовления суспензии использовали суточные культуры бактерий и полностью спорулировавшие культуры плесневых грибов. В случае бактерий, одну петлю культуры размешивали в ампуле с 5 мл стерильного физиологического раствора, что приводило к получению достаточно плотной опалесцирующей суспензии. В случае плесневых грибов, споры смывались 5 мл стерильного физиологического раствора с поверхности культуры на склоненном агаре. На чашку вносили 0,05 мл суспензии клеток или спор и равномерно распределяли по всей поверхности чашки стерильным шпателем.

4.1. В качестве пористого предмета-носителя использовали фильтровальную бумагу

(GE Healthcare Life Sciences Whatman™ Filter papers 3 Qualitative Diameter 110 mm 100 Circles Cat №1003-110) толщиной 0,34 мм или 340 мкм, которую замачивали в буфере 1, либо в буфере 10 путем полного погружения в соответствующий буфер на 3 минуты. Сравнительную оценку противомикробного эффекта предлагаемой нами буферной жидкой композиции (10) ((2% N-лаурилсарказин, 10 mM ЭДТА, 60 mM Трис

(гидроксиметил) аминометан, 0,1% NaN₃ (азид натрия)) проводили наряду с буферной жидкой композицией, используемой производителем FTA-карт (Whatman FTA Technology) (1) ((2% SDS (додецилсульфат натрия), 10 mM ЭДТА, 60 mM Трис (гидроксиметил) аминометан). После высушивания из фильтровальной бумаги вырезали диски диаметром 6 мм, которые помещали стерильным пинцетом на поверхность засеянных чашек непосредственно после посева.

4.2. Для сравнительного исследования антимикробной активности жидких буферов (1, 10) использовали стандартные целлюлозные диски диаметром 8 мм и толщиной 2 мм (страна-производитель - Южная Корея). Диски погружали в растворы буферов и выдерживали в них 8 часов для достижения полной и равномерной диффузии раствора.

Далее диски извлекали стерильным пинцетом и помещали на поверхность сухой стерильной чашки Петри для удаления избытка жидкости, после чего переносили на поверхность засеянных чашек Петри.

Чашки с нанесенными дисками помещали в термостат и инкубировали в течение 48 часов при +27°C (срок был увеличен с 24 ч до 7 суток в связи с относительно медленным ростом грибов и некоторых бактериальных штаммов). По истечении срока инкубации произвели измерение диаметров зон подавления роста и фотографирование чашек.

Диаметры зон подавления роста культур микроорганизмов спустя 2 суток буфером 1 и буфером 10 представлены в табл. 6.

Таблица 6.

Штамм	Диаметр зоны подавления роста (мм) (сухой/влажный)	
	Буфер 1	Буфер 10
<i>Aspergillus niger</i>	9 / 18	8 / 12
<i>Penicillium sp.</i>	13 / 22	9 / 14
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	16 / 21	13 / 17
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	18 / 28	19 / 28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Нет / нет	Нет / 9-10
<i>Escherichia coli</i>	Нет / нет	Нет / нет
<i>Sarcina flava</i>	14 / 20	9 / 16

Через двое суток оба исследованных буфера (1, 10) проявляют антимикробную активность средней силы против грамположительных бактерий, слабую антимикробную активность против грибов. Буфер 1 не проявляет активности по отношению к грамотрицательным бактериям (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*), в то время как у буфера 10 отмечается антимикробная активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Антимикробная активность буфера 1 в отношении грамположительных бактерий несколько выше, чем у буфера 10, что объясняется наличием в составе буфера 1 SDS. Входящие в состав 10 буфера компоненты (2% N-лаурилсарказин, 10 мМ ЭДТА и 0,1% азид натрия) оказывают достаточный антимикробный эффект без ингибирования ПЦР.

Результаты показаны на Фиг. 3 и Фиг. 4.

Следует отметить то, что на вторые сутки после внесения влажного диска с буфером 1 на среду с *Microbacterium phyllosphaerae* отмечалось подавление роста культуры до 28 мм в диаметре (Фиг. 3 (1)), а в случае с буфером 10 - зона подавления роста была слабо различима (Фиг. 3 (2)). Однако через неделю по периферии агара с дисками, пропитанными буфером 10, стал отмечаться слабый рост бактерий. Таким образом, буфер 10 оказал сильный бактериостатический эффект и зона подавления роста культуры составила 28 мм (Фиг. 3 (3)).

На вторые сутки не отмечалось заметных изменений в чашках с культурами *Aspergillus niger*. На седьмые же сутки отмечалось выраженное спорообразование (визуализируется как образования черного цвета) грибов *Aspergillus niger* в чашках с буфером 1 (Фиг. 4 (4), (5)), в то время как в чашках с буфером 10 спорообразование было выражено незначительно (Фиг. 4 (6), (7)).

Таким образом, видно, что противогрибковая и противоспоробобразующая активность буфера 10 значительно выше, чем буфера 1. Буфер 10 проявляет незначительно большую антимикробную активность в отношении грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa*) и достаточную антимикробную активность против грамположительных бактерий, в частности выраженный бактериостатический эффект в отношении *Microbacterium phyllosphaerae*.

Формула изобретения

1. Композиция для хранения ДНК-содержащих препаратов или ДНК, содержащая буферный раствор, включающий 0,5-4% N-лаурилсарказин, 5-20 мМ ЭДТА, 30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан, вода - остальное.

2. Композиция по п. 1, где буферный раствор представляет собой смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозина, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, доведенную до 10 мл стерильной дейонизованной водой.

⁵ 3. Композиция по п. 1, где ДНК-содержащий препарат представляет собой биообразец.

4. Композиция по п. 1, где соотношение буфера к биообразцу составляет 10:1.

5. Композиция по п. 1, где биообразец представляет собой жидкую кровь или слону.

6. Композиция для хранения ДНК-содержащих препаратов или ДНК, содержащая

¹⁰ буферный раствор, включающий 0,5-4% N-лаурилсаркозин, 5-20 мМ ЭДТА, 30-200 мМ Трис (гидроксиметил) аминометан, 0,04-0,4% NaN₃ (азид натрия), вода - остальное.

7. Композиция по п. 6, где буферный раствор представляет собой смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 600 мкл 1 М Трис, 1 мл 10 мг/мл NaN₃ (азид натрия), доведенную до 10 мл стерильной дейонизованной водой.

¹⁵ 8. Композиция по п. 7, где ДНК-содержащий препарат представляет собой биообразец.

9. Композиция по п. 7, где соотношение буфера к биообразцу составляет 10:1.

²⁰ 10. Композиция по п. 7, где биообразец представляет собой жидкую кровь или слону.

11. Композиция для хранения ДНК-содержащих препаратов или ДНК, содержащая буферный раствор, включающий 0,5-4% N-лаурилсаркозин, от 5 мМ до 20 мМ ЭДТА, 0,04-0,4% NaN₃ (азид натрия), вода - остальное.

²⁵ 12. Композиция по п. 11, где буферный раствор представляет собой смесь растворов 1 мл 20% N-лаурилсаркозин, 200 мкл 0,5 М ЭДТА (этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат), 1 мл 10 мг/мл NaN₃ (азид натрия), доведенную до 10 мл стерильной дейонизованной водой.

13. Композиция по п. 12, где ДНК-содержащий препарат представляет собой биообразец.

³⁰ 14. Композиция по п. 12, где соотношение буфера к биообразцу составляет 10:1.

15. Композиция по п. 12, где биообразец представляет собой жидкую кровь или слону.

16. Применение композиции по любому из пп. 1-15 для пропитки пористых носителей для хранения и/или транспортировки ДНК-содержащих препаратов или ДНК.

³⁵ 17. Применение по п. 16, где пористый носитель представляет собой бумагу.

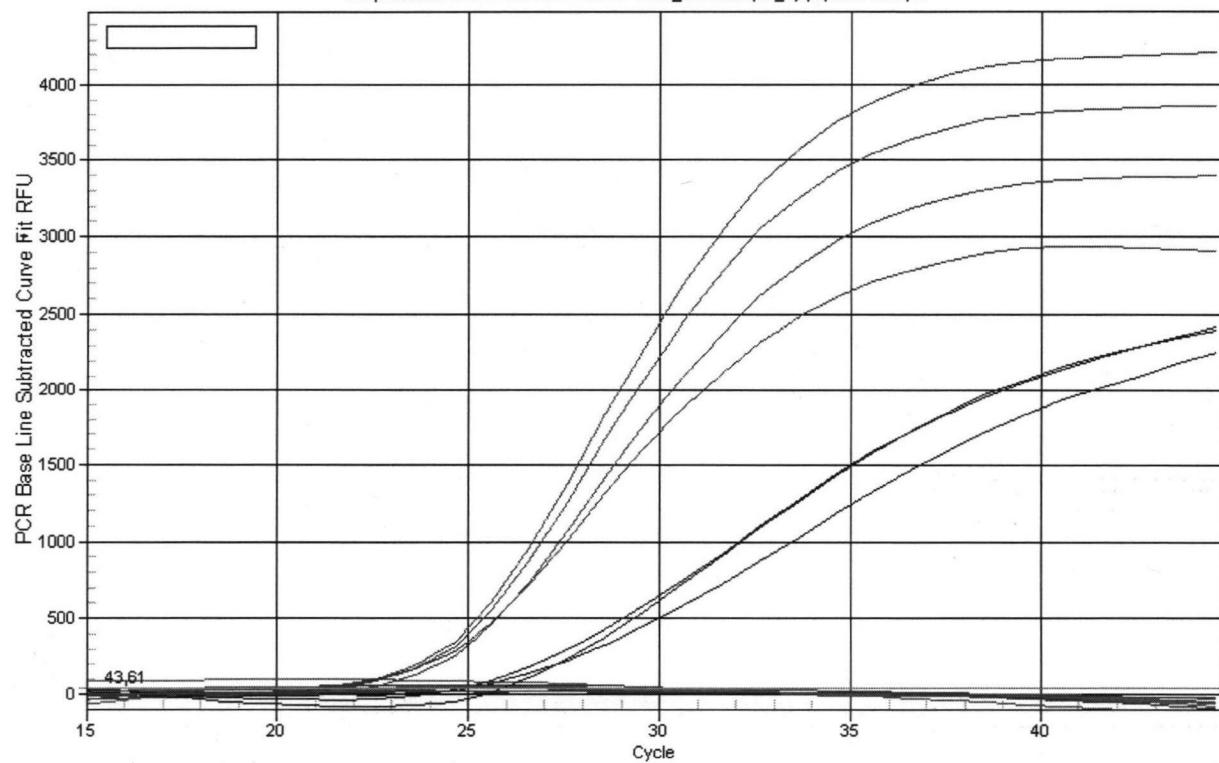
18. Применение по п. 16, где ДНК-содержащий препарат представляет собой жидкий биообразец.

19. Применение по п. 16, где ДНК-содержащий препарат или ДНК находятся в сухом виде.

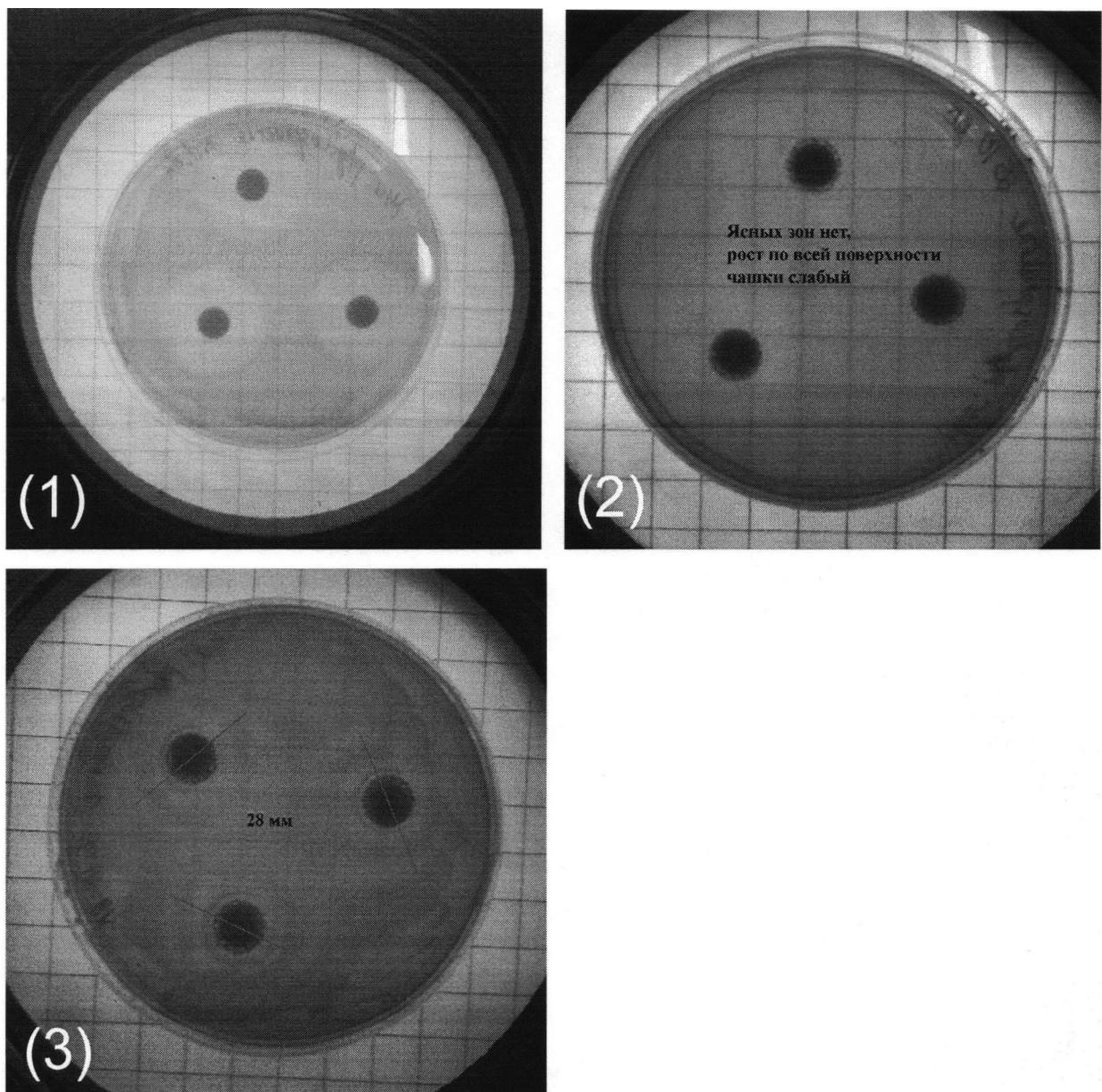
⁴⁰

⁴⁵

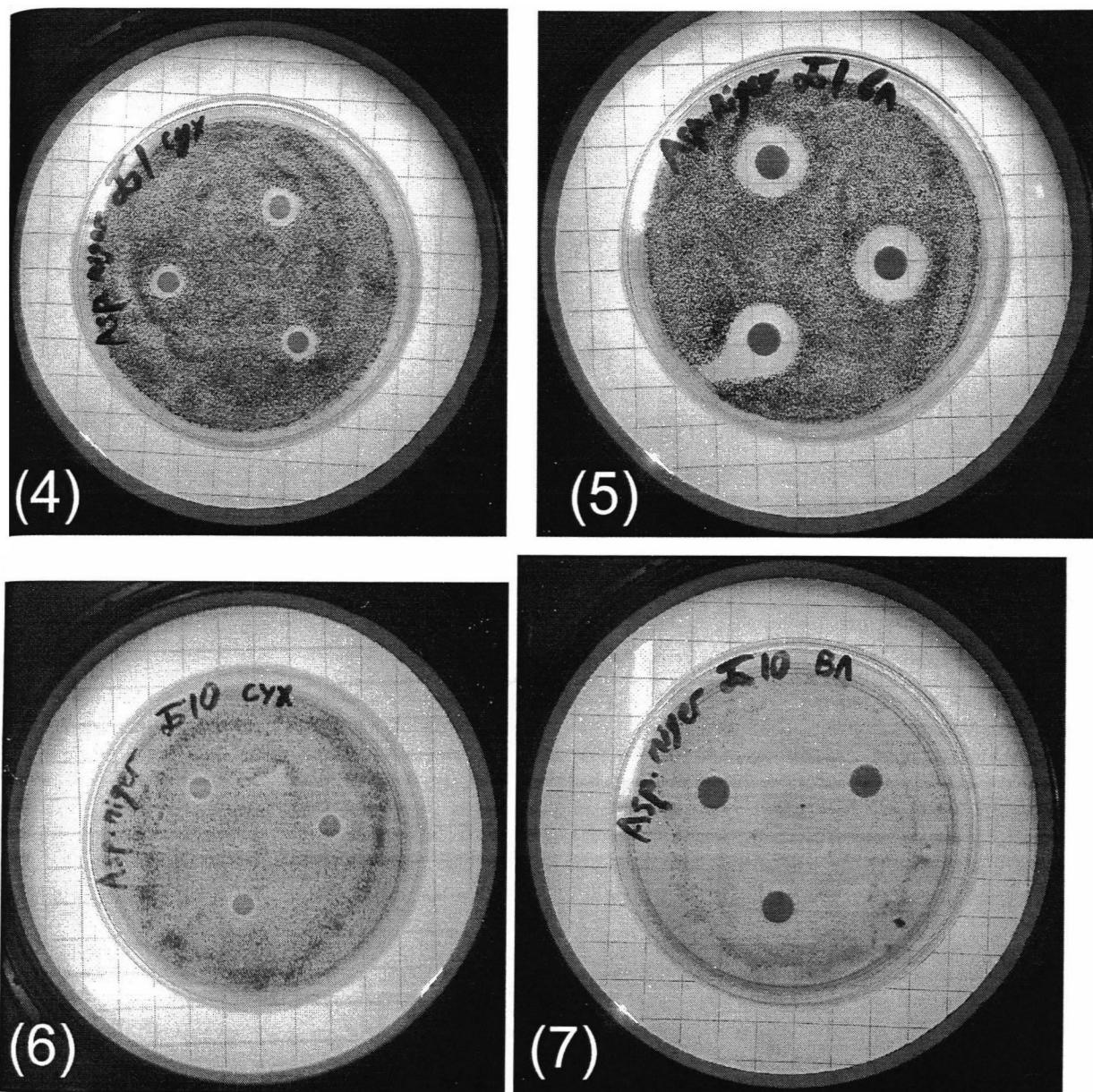
Amplification Chart : Data 2014-02-21 1630_ингибиторы_буфер10иFTA.opd



ФИГ. 1



ФИГ. 3



ФИГ. 4