



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105431536 B

(45) 授权公告日 2021.01.01

(21) 申请号 201480045324.5

(73) 专利权人 通用电气公司

(22) 申请日 2014.08.14

地址 美国纽约州

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 E.L.克瓦姆 B.李 B.C.贝尔斯

申请公布号 CN 105431536 A

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(43) 申请公布日 2016.03.23

代理人 罗文锋 林森

(30) 优先权数据

(51) Int.Cl.

13/968497 2013.08.16 US

C12N 15/09 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

审查员 王婷

2016.02.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/067453 2014.08.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/022410 EN 2015.02.19

权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

用于提取和储存核酸的方法和组合物

(57) 摘要

本公开提供了用于提取、稳定和储存核酸的固体基质。至少一种蛋白变性剂和至少一种酸或酸-滴定的缓冲试剂以干燥状态漫布于基质中；并且所述基质配置为当水化时提供酸性pH。所述基质配置为从样品提取核酸和在环境条件下以干燥形式稳定所提取的核酸，特别地RNA，达很长的时间。还描述了用于收集和回收所述干燥固体基质中储存的核酸的方法。

1. 一种固体基质，其包含：
至少一种蛋白变性剂，和
至少一种酸或酸-滴定的缓冲试剂，其以干燥状态漫布 (impregnated) 于所述固体基质中，其中所述酸-滴定的缓冲试剂产生3-6范围内的pH；
其中所述基质是干燥固体基质；和
其中所述基质配置为当水化时提供3-6范围内的pH、从样品中提取核酸和在环境温度下以基本上干燥的状态保存所述核酸，其中所述提取和保存的核酸包含RNA。
2. 权利要求1的基质，其为固相提取基质。
3. 权利要求1的基质，其中所述提取和保存的RNA具有至少4的RNA完整性数值 (RIN)。
4. 权利要求1的基质，其中所述至少一种酸包括乙酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、盐酸、三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP-HCl)、氧化的三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP-O-HCl)、硫酸、硝酸、香草酸、3-(N-吗啉代)丙磺酸或其组合。
5. 权利要求1的基质，进一步包含UV保护剂、自由基清除剂、螯合剂或其组合。
6. 权利要求5的基质，其中所述UV保护剂或自由基清除剂选自氢醌单甲醚 (MEHQ)、氢醌 (HQ)、甲苯氢醌 (toluhydroquinone, THQ) 和抗坏血酸。
7. 权利要求1的基质，进一步包含RNA酶抑制剂。
8. 权利要求7的基质，其中所述RNA酶抑制剂包括三磷酸盐、焦磷酸盐或其组合。
9. 权利要求7的基质，其中所述RNA酶抑制剂包括市售可得的RNA酶抑制剂。
10. 权利要求9的基质，其中所述市售可得的RNA酶抑制剂为氧钒基核糖核苷复合物 (VRC) 或焦磷酸钠。
11. 权利要求7的基质，其中所述RNA酶抑制剂包括三磷酸钠。
12. 权利要求1的基质，进一步包含至少一种还原剂。
13. 权利要求12的基质，其中所述至少一种还原剂选自二硫苏糖醇 (DTT)、2-巯基乙醇 (2-ME)、三(2-羧乙基)膦 (TCEP)、三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP-HCl) 及其组合。
14. 权利要求1的基质，其中所述基质包括纤维素、醋酸纤维素、硝酸纤维素、玻璃纤维或其任何组合。
15. 权利要求1的基质，其中所述基质为多孔的。
16. 权利要求1的基质，其中所述蛋白变性剂选自盐酸胍、硫氰酸胍、硫氰酸钠、硫氰酸钾、精氨酸、十二烷基硫酸钠 (SDS)、尿素及其组合。
17. 权利要求1的基质，其中所述样品为生物样品。
18. 一种RNA提取基质，包含：
包括离液剂、去污剂或其组合在内的蛋白变性剂；和
酸或酸-滴定的缓冲试剂，其以干燥状态漫布于所述提取基质中，其中所述酸-滴定的缓冲试剂产生3-6范围内的pH，
其中所述基质为多孔的干燥固体基质，其配置为当水化时提供3-6范围内的pH，用于提取RNA和稳定所提取的RNA以在环境温度下以基本上干燥的状态储存，所述提取的RNA具有至少4的RNA完整性数值 (RIN)。
19. 权利要求18的基质，其进一步包含选自氢醌单甲醚 (MEHQ)、氢醌 (HQ)、甲苯氢醌 (THQ)、抗坏血酸及其组合的UV保护剂或自由基清除剂。

20. 一种RNA提取基质,其包含:

包括离液剂、去污剂或其组合在内的蛋白变性剂;

酸或酸-滴定的缓冲试剂,其中所述酸-滴定的缓冲试剂产生3-6范围内的pH;和

包括三磷酸盐或焦磷酸盐在内的RNA酶抑制剂,其以干燥状态漫布于所述提取基质中,其中所述基质包括多孔的干燥固体基质,其配置为当水化时提供3-6的pH并稳定RNA以在环境温度下以基本上干燥的状态储存,该RNA具有至少4的RNA完整性数值(RIN)。

21. 用于从样品提取和储存核酸的方法,所述方法包括:

在包含蛋白变性剂和酸或酸-滴定缓冲试剂的干燥固体基质上提供所述样品,其中所述酸-滴定的缓冲试剂产生3-6范围内的pH;

当水化时产生3-6范围内的pH以用于从所述样品提取核酸;

干燥包含所提取的核酸的基质;和

在环境温度下以基本上干燥的状态在基质上储存所提取的核酸,其中所述提取的核酸包含RNA。

22. 权利要求21的方法,进一步包括从所述基质回收所述核酸。

23. 权利要求22的方法,其中从所述基质回收所述核酸包括在水溶液、缓冲剂或有机溶液中再水化该基质。

24. 权利要求22的方法,其中从所述基质回收所述核酸包括电洗脱。

25. 权利要求21的方法,其中所述样品为生物样品。

26. 权利要求25的方法,其中所述生物样品包括血液、血清、组织、唾液或细胞。

27. 权利要求25的方法,其中所述样品为细胞提取物、组织培养细胞制备物、不纯的核酸或纯化的核酸。

28. 权利要求21的方法,其中所述提取的RNA具有至少4的RIN。

29. 权利要求21的方法,其中所述基质进一步包含UV保护剂、自由基清除剂、螯合剂或其组合。

30. 权利要求29的方法,其中所述UV保护剂或自由基清除剂选自氢醌单甲醚(MEHQ)、氢醌(HQ)、甲苯氢醌(THQ)和抗坏血酸。

31. 权利要求21的方法,其中所述基质进一步包含RNA酶抑制剂。

32. 权利要求21的方法,其中所述基质包括纤维素、醋酸纤维素、玻璃纤维或其组合。

33. 权利要求21的方法,其中所述基质包括多孔纤维素纸。

34. 权利要求21的方法,其中所述蛋白变性剂选自盐酸胍、硫氰酸胍、硫氰酸钠、硫氰酸钾、精氨酸、十二烷基硫酸钠(SDS)、尿素及其组合。

35. 权利要求21的方法,其中所述基质进一步包含选自二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇(2-ME)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP-HCl)及其组合的还原剂。

36. 权利要求21的方法,其中所述酸包括乙酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、盐酸、三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP-HCl)、氧化的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP-O-HCl)、硫酸、硝酸、香草酸、3-(N-吗啉代)丙磺酸或其组合。

用于提取和储存核酸的方法和组合物

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请为于2012年4月30日提交的标题为“用于提取和储存核酸的方法和组合物”的美国专利申请号13/460076和于2012年12月20日提交的标题为“用于在固体基质上稳定核酸的配方”的美国专利申请号13/721948的部分继续；所述两个申请通过引用结合到本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于以干燥形式从生物样品环境提取和稳定核酸的固体基质和方法。还描述了用于收集、提取、保存和从干燥固体基质回收核酸的方法。

【0004】发明背景

[0005] 从生物样品分离或纯化期间保持生物分子的结构和功能完整性对各种下游应用至关重要。纯化的生物分子的下游应用可包括分析物检测、传感、法医、诊断或治疗应用、测序、扩增等。这些下游应用的成功可依赖于维持靶生物分子的完整结构和功能。多种因素，例如温度、压力、pH、化学或酶水解或污染物的存在可引起生物分子例如DNA、RNA或蛋白质的降解。

[0006] 由于化学自我水解和酶介导的降解，RNA为最不稳定的生物分子之一。衍生自生物样品的RNA的提取和稳定对许多环境因素敏感，包括，但不限于，用于提取或收集RNA的缓冲剂、溶液pH、温度，和特别地无处不在的强健的核糖核酸酶(RNA酶)。RNA通常以纯化和未纯化的形式二者在冷冻下(例如4°C、-20°C或-80°C)储存以防止水解和酶降解，并因此保持RNA样品的完整性。为了避免与用于维持RNA样品完整性的冷冻相关的费用和空间需求，用于在环境温度下提取和稳定RNA的方法和物品是必需的。

[0007] 当前用于在环境温度下稳定RNA的方法学集中于在过量，例如，去污剂、离液化合物、还原剂、过渡金属、有机溶剂、螯合剂、蛋白酶、RNA酶肽抑制剂和抗-RNA酶抗体的液体溶液中灭活RNA酶。另外的尝试集中于RNA的化学修饰以限制酯交换和自我水解。要求以干燥形式成功收集和保存RNA的干燥-状态技术通常需要RNA在RNA储存前从样品“预先纯化”和浓缩。其它用于以干燥形式保存RNA的干燥-状态技术需要另外的干燥设施(例如强制空气流、冻干或热处理)。因此这些方法在无显著的样品处理下不可执行(not conductive to)从样品(例如，生物样品)直接收集RNA。

[0008] 因此，需要使在单个处理步骤内于环境条件下从生物样品的干燥-状态RNA提取和稳定成为可能的组合物和方法。此外，在环境温度下将干燥的生物样品储存相当长一段时间和其后回收完整的RNA用于进一步分析的能力是非常合乎需要的。

【0009】发明概述

[0010] 固体基质的一个实施方案包含至少一种蛋白变性剂和至少一种酸或酸-滴定的缓冲试剂，其以干燥状态漫布于其中；其中所述基质配置为当水化时提供酸性pH、从样品提取核酸和在环境温度下以基本上干燥的状态储存核酸。

[0011] 在另一个实施方案中，RNA提取基质包含包括离液剂、去污剂或其组合在内的蛋白

变性剂;和酸或酸-滴定的缓冲试剂,其以干燥状态漫布于其中,其中所述基质为多孔的不可溶性干燥材料,其配制为当水化时提供2-7的pH,用于提取RNA和稳定所提取的RNA,所述提取的RNA具有至少4的RNA完整性数值(RIN)。

[0012] 在一个实施方案中, RNA提取基质包含包括离液剂、去污剂或其组合在内的蛋白变性剂;酸或酸-滴定的缓冲试剂;和包括三磷酸盐或焦磷酸盐在内的RNA酶抑制剂,其以干燥状态漫布于其中,其中所述基质包括多孔的不可溶性干燥材料,其配制为当水化时提供2-7的pH,和稳定RNA,该RNA具有至少4的RNA完整性数值(RIN)。

[0013] 用于从样品提取和储存核酸的方法的一个实例包括以下步骤:向包含蛋白变性剂和酸或酸滴定的缓冲试剂的干燥固体基质提供样品;当水化时产生酸性pH用于从样品提取核酸;干燥包含所提取的核酸的基质;和在环境温度下以基本上干燥的状态在基质上储存提取的核酸。

[0014] 附图

[0015] 当参考附图阅读下列详述时将更好地理解本发明的这些及其它特征、方面和优点,在整个附图中相似的字符代表相似的部分,其中:

[0016] 图1为P³¹ NMR谱,其显示三(2-羧乙基)膦(TCEP)的氧化和TCEP氧化物(TCEP-O)的制备。

[0017] 图2显示衍生自TCEP和TCEP-O对纤维素样品的还原活性的5,5'-二硫双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB)比色测定法的条形图。

[0018] 图3显示在包含TCEP或TCEP-O的化学处理的纤维素纸上收集的干燥血斑的RNA完整性数值(RIN)。

[0019] 图4显示在多种化学处理的纤维素基质上收集并在Agilent 2100 Bioanalyzer上分析RNA之前于环境温度下储存5、6或12天的干燥血斑的RNA完整性数值(RIN)。

[0020] 发明详述

[0021] 本发明的实施方案提供用于环境提取和保存核酸,例如RNA的合适的基质和方法。RNA一般被认为是难以以完整形式保存的不稳定分子。本发明的一个或多个实施方案涉及一种核酸提取基质,其中所述基质配置为在单个处理步骤内从生物样品收集、提取和储存核酸达很长的时间,随后在各种应用中使用。所述基质配置为在环境温度下以基本上干燥的状态储存核酸和基本上保留核酸的完整性。

[0022] 为了更清楚和简明地描述所要求发明的主题,针对在下面的描述和所附权利要求中使用的特殊术语提供下列定义。在整个说明书中,特殊术语的例示应被视为非-限制性的实例。

[0023] 单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数提及物,除非上下文另外清楚指示。近似的语言,如本文遍及说明书和权利要求所使用的,可应用于修饰任何数量表述,所述数量表述可在不导致与其相关的基本功能的改变的情况下获准变化。相应地,由术语例如“约”所修饰的值不限于所指定的精确值。在一些情况下,近似的语言可相当于用于测量该值的仪器的精密度。必要时,提供范围,并且那些范围包含其间的所有亚范围。

[0024] 如本文所提及的术语“核酸”包括所有形式的RNA(例如,mRNA、miRNA、rRNA、tRNA、piRNA、ncRNA)、DNA(例如基因组DNA、mtDNA),以及重组RNA和DNA分子或使用核苷酸类似物产生的DNA或RNA的类似物。核酸可为单链的或双链的。核酸可包含编码或非编码链。该术语

还包括核酸的片段，例如可使用所公开的提取方法回收的天然存在的RNA或DNA。“片段”指核酸(例如, RNA或DNA)的一部分。

[0025] 如本文所提及的术语“生物样品”包括,但不限于,从任何生物体,包括人,获得的血液、血清、组织和唾液。生物样品可由经受自我-诊断测试(例如,血糖监测)的个体或由受过培训的医学专业人员通过包括,例如,使用针吸血或刮或拭抹特定区域如患者皮肤上的损伤在内的多种技术获得。用于收集各种生物样品的方法为本领域所熟知。术语“样品”包括如上所定义的生物样品,但还包括,例如,组织培养的细胞和纯化的核酸。

[0026] 如本文所提及的术语“还原剂”包括向另一种化学物类提供电子的任何化学物类。本领域已知多种还原剂。示例性的还原剂包括二硫苏糖醇 (DTT)、2-巯基乙醇 (2-ME) 和三(2-羧乙基) 脲 (TCEP)。此外,可使用这些或其它还原剂的任何组合。在具体的实施方案中,还原剂为TCEP。

[0027] 如本文所使用的术语“缓冲剂”包括,例如2-氨基-2-羟甲基-丙烷-1,3-二醇 (Tris)、2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES)、3-(N-吗啉代) 丙磺酸 (MOPS)、柠檬酸盐缓冲剂、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES), 和磷酸盐缓冲剂。该潜在的缓冲剂的列表仅用于说明性目的。选择用于本文所公开组合物和方法的缓冲剂的pH通常经酸滴定在2-7的范围内。

[0028] 固体基质的一个或多个实施方案包含至少一种蛋白变性剂和至少一种酸或酸-滴定的缓冲试剂,其以干燥状态漫布于其中,其中所述基质配置为当水化时提供酸性pH。所述基质还配置为从样品提取核酸和在环境温度下以基本上干燥的状态保存核酸。如本文所使用的,术语“基本上干燥的状态”指进一步干燥样品至具有约小于2%的水含量。

[0029] 用于从样品提取和储存核酸的固体基质包含呈干燥状态的至少一种酸或酸-滴定的缓冲剂和蛋白变性剂。术语“基质”在本文中与“提取基质”可交换地使用。如本文所使用的术语“固体基质”指不可溶的基质。所述基质使得能够不溶解基质材料而收集、提取和储存核酸。所述固体基质包括,但不限于,诸如纤维素、醋酸纤维素、硝酸纤维素、玻璃纤维或其组合等材料。组合物至基质中的“掺入”包括,但不限于,下文所述的“浸渍”程序。在一些实施方案中,这样的方法实现组合物至干燥固体基质中的掺入。将组合物掺入干燥固体基质后,使用任何适当的方法干燥固体基质。

[0030] 如所指出的,所述固体基质包含呈干燥状态的组合物并且还在干燥条件下保存提取的核酸。用于提取和储存的干燥固体基质的使用相对于液基提取具有优势,因为干燥基质保证了施用于基质的样品的最小体积稀释。本领域技术人员将理解的是液基提取在过量体积的稳定试剂中稀释样品的浓度。用于收集、提取和保存样品的干燥固体基质的使用维持样品的浓度并消除与样品在液体保存剂中不当稀释有关的问题,例如样品降解。另外,固体基质包含固定的干燥试剂的组合物,这使在水化时有效提取核酸,例如RNA,然后在环境温度下稳定提取的RNA成为可能。

[0031] 术语“环境条件”或“环境温度”在后文中可交换地使用。如本文所使用的,术语“环境温度”指0°C-60°C范围内的温度。在一个或多个实施方案中,环境温度为室温。在一些实施方案中,所述基质配置为以干燥状态在环境温度下储存或保存核酸。

[0032] 如所指出的,所述固体基质配置为在干燥状态下储存或保存核酸达很长的时间。术语“配置为”或“配置用于”在本文中是指使基质能够在环境温度提取和储存核酸达一段时间的基质结构或组成。术语“储存”或“保存”在本文中关于以适于进一步分析的形式维持

提取的核酸可交换地使用。更特别地，核酸可储存或保存在固体核酸提取基质中，其中所述基质确保维持分子的完整性。

[0033] 在一些实施方案中，所述核酸提取基质为固相提取基质。使用固相提取方法的基质在本文中被称为固相提取基质。固相提取(SPE)技术已经被用来(leveraged)减少用于测序或其它应用的高纯度核酸的提取时间。固相提取为使用固相和液相从材料分离同一类型或不同类型的一种或多种分子的提取方法。固相提取基质用于，例如，在色谱或其它分析方法上游纯化样品。该方法的一个实例包括将样品(例如生物样品)装载到固相提取基质上，在环境温度下储存基质以达到基本上干燥的状态和用合适的缓冲剂再水化基质以从基质有差别地提取RNA。

[0034] 术语“提取”指用于从样品，更具体地生物样品分离或隔离核酸的任何方法。核酸如RNA和DNA可，例如，通过细胞裂解释放。在一个实施方案中，核酸可在蒸发性细胞-裂解(evaporative cell-lysis)期间释放。在另一个实施方案中，当与包含细胞裂解试剂的基质接触时细胞被裂解。使包含细胞的生物样品接触基质，例如通过使用FTA™ Elute纤维素纸，导致细胞裂解，其释放核酸。

[0035] 所述固体基质可为多孔的。在一个实施方案中，所述固体基质为多孔纤维素纸，例如来自Whatman™的纤维素基质。在一个实例中，来自Whatman™的纤维素基质包括903-纤维素、FTA™或FTA™ Elute。

[0036] 在一个或多个实例中，所述提取基质漫布有一种或多种试剂。如所指出的，在一个示例性实施方案中，所述基质包含以干燥状态漫布的一种或多种蛋白变性剂。在一个实施方案中，所述基质进一步包含一种或多种酸或酸-滴定的缓冲试剂。在另一个实施方案中，所述基质进一步包含一种或多种还原剂。在一些实施方案中，漫布的试剂包括裂解试剂、核酸稳定试剂、核酸储存化学品及其组合。

[0037] 在一些实施方案中，基质中漫布的干燥试剂通过加入缓冲剂、水或样品水化。在一个实施方案中，漫布的干燥试剂被布置在用于提取或储存核酸的基质上的样品，更特别地生物样品水化。在一些其它的实施方案中，除了样品外，加入水或缓冲剂水化基质并重建或活化嵌入基质中的试剂。在一些实施方案中，基质的水化在基质上产生酸性pH。在一些实施方案中，水化进一步导致在基质中以干燥形式存在的试剂，例如蛋白变性剂、酸或酸滴定的缓冲试剂的重建。

[0038] 在一个或多个实施方案中，所述基质包含蛋白变性剂。所述蛋白变性剂可包括离液剂或去污剂。不意在限于具体的变性剂，蛋白变性剂可根据其生物物理性质和完全抑制生物酶(例如RNA酶)活性的能力分类为弱变性剂或强变性剂。在一些实施方案中，弱蛋白变性剂(例如去污剂)可用于裂解细胞和破坏蛋白-蛋白相互作用而不变性核酸。在进一步的实施方案中，除了变性细胞和蛋白之外，强蛋白变性剂(例如离液盐)的使用还可变性核酸二级结构。多种蛋白变性剂是本领域已知的并且可选择用于本文所述的组合物和方法。不意在限于具体的蛋白变性剂，示例性的蛋白变性剂包括硫氰酸胍、盐酸胍、硫氰酸钠、硫氰酸钾、精氨酸、十二烷基硫酸钠(SDS)、尿素或其组合。示例性的去污剂可分类为离子型去污剂、非离子型去污剂或兼性离子去污剂。离子型去污剂可包括阴离子型去污剂例如，十二烷基硫酸钠(SDS)或阳离子型去污剂，例如乙基三甲基溴化铵。用于细胞裂解的非离子型去污剂的非限制性实例包括TritonX-100、NP-40、Brij 35、吐温20、辛基葡萄糖苷、辛基硫代葡萄

糖昔或洋地黄皂昔。一些兼性离子去污剂可包括3-[(3-胆酰胺基丙基) 二甲基铵基]-1-丙磺酸盐 (CHAPS) 和3-[(3-胆酰胺基丙基) 二甲基铵基]-2-羟基-1-丙磺酸盐 (CHAPSO)。

[0039] 在一个或多个实施方案中,蛋白变性剂包括硫氰酸盐。所述基质的一个或多个实施方案包含以干燥状态漫布的酸-滴定的硫氰酸盐。示例性的硫氰酸盐包括,但不限于,硫氰酸胍、硫氰酸钠、硫氰酸钾或其组合。

[0040] 从生物样品提取RNA之后所述提取基质以期需的水平维持RNA的稳定性和完整性。在一个实施方案中,所述基质漫布有核酸稳定试剂。这些稳定试剂可包括RNA酶抑制剂、酸-滴定的缓冲剂或螯合剂(例如EDTA)。所述组合物可进一步包含紫外线(UV)抑制剂或自由基清除剂。

[0041] 如所指出的,所述基质进一步包含RNA酶抑制剂,其中所述RNA酶抑制剂包括氯钒基核糖核昔复合物(VRC),一种核昔酸类似物,或市售可得的RNA酶抑制剂(例如,SUPERase-In™)。RNA酶抑制剂可进一步包括焦磷酸盐化合物。在一个实施方案中,焦磷酸二钠可用作RNA酶抑制剂。RNA酶抑制剂的一个或多个实施方案可进一步包括三磷酸盐,例如三磷酸钠。在一个实施方案中,向酸-滴定的缓冲剂中加入焦磷酸钠增强液体状态和干燥形式二者的RNA稳定性。

[0042] 所述基质的实施方案包含呈干燥状态的酸或酸-滴定的缓冲试剂,其可在核酸提取期间再水化。酸的实例包括,但不限于,乙酸、柠檬酸、酒石酸、磷酸、盐酸、三(2-羧乙基)膦-盐酸(TCEP-HCl)、氧化的三(2-羧乙基)膦-盐酸(TCEP-O-HCl)、硫酸、硝酸、香草酸、3-(N-吗啉代)丙磺酸或其组合。如所指出的,所述基质在水化时提供酸性pH,该酸性pH提取和稳定所提取的核酸,其中水化可通过加入样品、水或任何其它溶液(例如缓冲溶液)达到。所述基质的一个或多个实施方案在水化时提供2-7范围内的pH。在一些实施方案中,所述基质在水化时提供3-6范围内的pH。

[0043] 提取的核酸,特别地RNA,在酸性条件下稳定,如表IV中所示。在一个实施方案中,酸-滴定的缓冲剂包括硫氰酸胍。在2-7的酸性pH时,更特别地在3-6的pH时,干燥固体基质上酸性范围内的硫氰酸胍和焦磷酸钠的干燥状态混合物在环境温度下稳定干燥血斑中的高质量RNA,如图4中由RIN分值所显示的。在一个实施方案中,酸-滴定的缓冲剂包括硫氰酸胍,其中在2-7的酸性pH下,更特别地在3-6的pH下,干燥固体基质中三磷酸钠的存在稳定高质量的RNA,如图4中由RIN分值所显示的。

[0044] 如所指出的,在一些实施方案中,所示基质进一步包含UV保护剂、自由基清除剂、螯合剂或其组合。不意在限于任何具体的UV保护剂,示例性的抗氧化剂包括,例如,氢醌单甲醚(MEHQ)、氢醌(HQ)、甲苯氢醌(THQ)和抗坏血酸。在一些实施方案中,抗氧化剂为THQ。

[0045] 在一些实施方案中,所示基质进一步包含至少一种还原剂,其中所述还原剂选自二硫苏糖醇(DTT)、2-巯基乙醇(2-ME)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)及其组合。

[0046] 提取的核酸包含核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)或其组合。在一个实施方案中,提取的核酸包含RNA。所述RNA可为mRNA、tRNA、rRNA、小RNA、siRNA、miRNA、非编码RNA、动物RNA、植物RNA、病毒RNA或细菌RNA。

[0047] 所述基质配置为在基本上完整的情况下于环境温度以干燥形式储存核酸。RNA的情况是指RNA的质量或RNA的完整性。RNA的稳定性和质量可基于以下评估:mRNA靶的定量RT-PCR扩增;28s:18s核糖体RNA(rRNA)的比率,其折中(compromise)总细胞RNA的量,和

Agilent 2100 Bioanalyzer上的RIN分析。如所指出的, RNA质量作为28S与18S核糖体RNA强度值的比率测定, 其中该比率通过经由所提取rRNA的凝胶电泳接着溴化乙锭染色获得28S和18S rRNA的强度计算。高质量细胞RNA一般显示大于1的28s:18s rRNA比率。此外, 高质量细胞RNA支持低丰度和大(例如, 大于1 kB) mRNA二者的有效扩增。为方便起见, rRNA信号强度和28s:18s rRNA的比率经常用于通过凝胶电泳快速筛查和鉴定具有强健RNA储存性质的样品。

[0048] 如所指出的, 在一个实施方案中, RNA质量经由所提取RNA的毛细管电泳通过生物分析仪测定。照例, RNA质量作为RIN定量, 其中RIN通过所提取RNA中存在的各种RNA的量的算法评估计算。高质量的细胞RNA一般显示接近10的RIN值。在一个或多个实施方案中, 从干燥基质提取的RNA具有至少4的RIN值。在一些实施方案中, 所述基质提供生物样品的环境提取和稳定并且产生RIN值在4-10范围内的完整、高质量的RNA, 或在一个实施方案中, RIN值在5-8的范围内。

[0049] 用于从样品提取和储存核酸的方法的一个实例包括以下步骤: 将样品提供至包含蛋白变性剂和酸或酸-滴定的缓冲试剂的固体基质上, 当用样品或任何外部加入的液体水化固体基质时产生酸性pH用于从样品提取核酸, 干燥包含所提取的核酸的基质, 和在环境温度下以基本上干燥的状态在基质上储存提取的核酸。术语“提供样品”的非限制性实例包括, 使用吸量管、导管、注射器或管道将样品施用于提取基质上或将样品布置在提取基质上。样品可请到在基质上。

[0050] 所述方法包括在环境温度时以干燥状态在基质上储存提取的核酸。在一些实施方案中, 核酸可储存超过一个月的时期。在一些实施方案中, 核酸可储存超过六个月的时期。由于RNA一般易于降解, 使用该基质提取和保存RNA是有用的并且可进一步用于各种下游应用。

[0051] 所述方法的一个或多个实施方案包括通过固相提取技术从基质回收核酸。在一个或多个实施方案中, 通过在水溶液、缓冲剂或有机溶液中再水化基质从固体基质回收核酸, 并且其中所述核酸经受进一步的分析。可采用导致核酸, 特别地RNA从样品(例如, 未纯化的生物样品)提取的任何方法。上述方法可任选包括在从固体基质回收核酸用于进一步分析之前洗涤基质的步骤。例如, 基质可用合适的缓冲剂或水洗涤一次或多次, 然后回收核酸。可通过在水溶液、如上所定义的缓冲溶液或有机溶液中再水化固体基质(例如, 纤维素纸)回收核酸。在一些实施方案中, 通过电洗脱从固体基质回收核酸。

[0052] 在一个实施方案中, 用于提取和保存核酸(例如, RNA、DNA或其组合)的方法包括以下步骤: 提供固体基质, 其中组合物包含以干燥形式掺入在固体基质中的至少一种蛋白变性剂、酸或酸-滴定的缓冲试剂和任选自由基清除剂; 将样品(例如, 生物样品)施用于固体基质以在酸性pH下提取核酸; 干燥固体基质; 和在环境温度下以基本上干燥的状态在固体基质上储存核酸。

[0053] 在所述方法的某些实施例中, 基质允许在环境温度下以干燥形式(例如, 在固体基质上)储存核酸, 特别地众所周知对于储存是不稳定生物分子的RNA。该方法中利用的样品包括, 但不限于, 生物样品例如从任何生物体包括人获得的血液、血清、组织和唾液。

实施例

[0054] 试剂:31-ETF来自GE Healthcare。TCEP来自Soltec Bio Science (Beverly MA, USA),MOPS购自Aldrich (MO, USA)。

[0055] 实施例1 通过氧化TCEP制备TCEP-O

[0056] 将TCEP氧化为TCEP-O以分析还原活性对干燥生物样品中RNA保存的贡献。将约1克TCEP溶解在25mL 30%的过氧化氢中并使用氢氧化钠将溶液pH调节至8.0。孵育该反应混合物3小时以完成氧化反应并在烘箱中干燥产物用于后续分析。 P^{31} NMR证实了与TCEP参考物相比反应产物中TCEP的丧失。在抗氧化剂THQ的存在下重复该氧化反应,结果相似。结果在图1中列出。

[0057] 实施例2 涂渍TCEP-O的干燥基质上还原活性的丧失的确认

[0058] 使用简单浸涂过程在包含TCEP或TCEP-O的溶液中制备纸样品。简言之,如表I中所述制备涂渍溶液。由于对照样品,25-1,导致具有pH 3.5的终溶液,用HCl将所有其它样品调节至pH 3.5。将31-ETF纤维素纸浸泡在每种涂渍溶液中,并在完全饱和后,使纸通过轧辊以去除过剩的溶液。然后在烘箱中干燥纸样品,与干燥剂一起包装在Mylar箔袋中,并在4°C下储存直至使用。

[0059] 表I 包含TCEP或TCEP-O的纸样品的制备

| [0060] | 样品 | MOPS (mg/mL) | GuSCN (mg/mL) | TCEP (mg/mL) | TCEP-O (mg/mL) | THQ (mg/mL) | 过程 |
|--------|------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|----------------|------------------------------------|
| | 25-1 | 20 | 300 | 10 | | 5 | 制备pH 7的MOPS缓冲剂,加入其它组分,终pH为3.5 |
| | 25-3 | 20 | 300 | | 10 | 5 | 制备pH 7的MOPS缓冲剂,加入其它组分,用HCl调节pH至3.5 |
| | 27-5 | | 300 | 10 | | | 在水中溶解GuSCN和TCEP,用HCl调节pH至3.5 |
| | 27-6 | | 300 | | 10 | | 在水中溶解GuSCN和TCEP-O,用HCl调节pH至3.5。 |

[0061] 样品制备之后,使用DTNB比色测定法分析纸的还原活性。从在水中的2.5 mM原液在PBS中制备1 mM的DTNB工作液。从表I中所述的每种纸上挖去(cored)样品冲孔(punch)(直径3 mm),浸入5 mL DTNB工作液中,并摇动30分钟。然后通过412 nm处的UV吸光度测量所得溶液中的TNB(硫双-(2-硝基苯甲酸)),其在图2中列出。包含TCEP-O的样品25-3和27-6显示无DTNB还原为TNB,表明还原力丧失。包含TCEP的样品25-1和27-5通过使用DTNB比色测定法将DTNB转化为TNB显示强还原活性。这些结果确认了先前实施例1中的NMR分析。

[0062] 实施例3 来自干燥血斑的RNA稳定性分析

[0063] 用全血在如表I中所述的实施例2的样品上点斑,检验室温下稳定RNA的能力。从检验动物的尾静脉收集50 μ L大鼠全血并在样品25-1、25-3、27-5和27-6上点斑。将血斑空气干燥并在受控的湿度(~20% RH)下环境室温储存5天(25-1、25-3)或12天(27-5、27-6)。RNA使用用 β -巯基乙醇强化的RLT裂解缓冲剂(Qiagen)从7 mm的中心冲孔(center punch)提取,并使用常规二氧化硅-膜离心柱按照本领域已知的方案(例如Qiagen QIAamp RNA血液试剂盒)纯化。用无核酸酶的水从离心柱洗脱纯化的RNA,并使用RNA 6000 Pico Lab Chips在Agilent 2100 Bioanalyzer上测量每个样品的RIN。按照惯例,RIN > 6指示高质量的RNA并且为定量下游分析例如RT-PCR或微阵列应用所高度期需的。

[0064] 如所指出的,对于表I中列出的每种组合物使用RNA 6000 Pico Lab Chips通过Agilent 2100 Bioanalyzer测定RIN值,数据在图3中示出。出乎意料地包含TCEP-O的样品

提供与包含TCEP的那些相当的RNA完整性。TCEP存在下(样品25-1、27-5)的RIN分值仅轻微高于完全氧化的TCEP(样品25-3、27-6)的RIN分值。该现象可能依赖于酸性pH,因为所有样品均从滴定至终pH为3.5的涂渍溶液制备,以便复制包含TCEP-HCl的对照配方,25-1,的天然pH终点。

[0065] 实施例4处于酸性或碱性pH谱的备选化学品的基质制备

[0066] 设计实施例4以调查酸、抗氧化剂、离液盐、去污剂和焦磷酸盐或多磷酸盐的不同混合物在不同溶液pH时的作用。使用上述简单浸涂过程制备纸样品。简言之,如表II中所述制备涂渍溶液。将31-ETF纤维素纸浸入各涂渍溶液中,完全饱和后使纸通过轧辊以去除过剩的溶液。然后在烘箱中干燥纸样品并与干燥剂一起包装在Mylar箔袋中直至使用。

[0067] 表II 处于酸性或碱性pH谱的纸样品的制备:酸

[0068]

| 样品 | MOPS (mg/ml) | GuSCN (mg/ml) | SDS (mg/ml) | 对香豆酸 (mg/ml) | 香草酸 (mg/ml) | 乙酸 (mg/ml) | 柠檬酸 (mg/ml) | 酒石酸 (mg/ml) | 磷酸 (mg/ml) | 过程 |
|------|-----------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|---------------|--------------------------------------|
| 26-8 | 20 | 300 | | | 5.5 | | | | | 制备pH 7.0的MOPS缓冲剂,加入其它组分,用HCl调节pH至3.5 |
| 26-7 | 20 | 300 | | 3.5 | | | | | | 制备pH 7.0的MOPS缓冲剂,加入其它组分,用HCl调节pH至3.5 |
| 27-2 | 20 | 300 | | | | | | | | 制备pH 7.0的MOPS缓冲剂,加入其它组分,用HCl调节pH至3.5 |
| 28-9 | 20 | | 20 | | 5.5 | | | | | 制备pH 7.0的MOPS缓冲剂,加入其它组分,用HCl调节pH至3.5 |
| 27-8 | | 300 | | | 5.5 | | | | | 在水中溶解GuSCN和香草酸,用HCl调节pH至3.5 |
| 27-7 | | 300 | | 3.5 | | | | | | 在水中溶解GuSCN和对香豆酸,用HCl调节pH至3.5 |
| 28-2 | | 300 | | | | 20 | | | | 在水中溶解GuSCN和乙酸,用NaOH调节pH至3.5 |
| 28-5 | | 300 | | | | | | 20 | | 在水中溶解GuSCN 和酒石酸,用NaOH调节pH至3.5 |
| 28-4 | | 300 | | | | | 20 | | | 在水中溶解GuSCN 和柠檬酸,用NaOH调节pH至3.5 |
| 28-3 | | 300 | | | | | | | 20 | 在水中溶解GuSCN 和磷酸,用NaOH调节pH至3.5 |

[0069] 表III 处于酸性或碱性pH谱的纸样品的制备:多磷酸盐和焦磷酸盐

[0070]

| 样品 | GuSCN (mg/ml) | NaSCN (mg/ml) | 三磷酸钠 (mg/ml) | 焦磷酸钠 (mg/ml) | 过程 |
|-------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------------------|
| 27-10 | 300 | | 20 | | 在水中溶解GuSCN和三磷酸钠,用HCl调节pH至3.5 |
| 27-11 | 300 | | | 20 | 在水中溶解GuSCN和焦磷酸钠,用HCl调节pH至3.5 |
| 26-11 | 300 | | 20 | | 在水中溶解GuSCN和三磷酸钠,用HCl调节pH至7.2 |
| 26-12 | 300 | | | 20 | 在水中溶解GuSCN和焦磷酸钠,用HCl调节pH至7.2 |
| 28-6 | | 206 | 20 | | 在水中溶解NaSCN和三磷酸钠,用HCl调节pH至3.5 |
| 28-7 | | 206 | 20 | | 在水中溶解NaSCN和三磷酸钠,用HCl调节pH至7.2 |

[0071] 实施例5 来自备选化学品上的干燥血斑的RNA稳定性分析

[0072] 用全血在如表II和表III中所述的实施例4的样品上点斑,检验在环境温度下稳定RNA的能力。从检验动物的尾静脉收集50 μL大鼠全血并直接在纸样品上点斑。将血斑干燥并在环境温度但在受控的湿度(~20% RH)下储存5、6或12天环境温度。将RNA从7 mm中心冲孔提取进入裂解缓冲液并通过二氧化硅-膜离心柱按照本领域已知的方案纯化。纯化和洗脱后,使用RNA 6000 Pico Lab Chips在Agilent 2100 Bioanalyzer上测量RIN。RIN > 6意

味着高质量的RNA并且为定量下游分析例如RT-PCR或微阵列应用所必需的。

[0073] 实施例5的结果在图4中列出。发现酸-滴定的离液盐或去污剂组合物从干燥血斑产生合理质量的RNA,不过基于RIN分值某些配方对于其它是优选的。例如,样品28-2和28-5包含硫氰酸胍(GuSCN)并且在乙酸和在酒石酸中于pH 3.5下分别显示7.8和7.0的RIN值。乙酸(7.8)和酒石酸(7.0)的RIN值高于pH 3.5时在柠檬酸(样品28-4,RIN 5.8)和磷酸(样品28-3,RIN 4.9)中的同种组合物。特别地,焦磷酸盐或三磷酸盐的功效对于在离液剂存在下稳定RNA显示清楚的pH-依赖性,总体上酸性pH提供非常高的RIN值。滴定至中性pH的相同的配方导致严重的RNA降解。例如,与包含pH 7.2的相同试剂的样品26-11和28-7相比,用在pH 3.5的硫氰酸胍(GuSCN)或硫氰酸钠(NaSCN)和三磷酸钠涂渍的样品27-10和28-6分别显示7.1和7.0的高RIN值。相似地,样品27-11和26-12包含GuSCN和焦磷酸钠并且分别显示在pH 3.5时6.7的RIN值和pH 7.2时1.6的RIN值。焦磷酸盐和三磷酸盐部分一般理解为小分子的RNA酶抑制剂,对于所述小分子的RNA酶抑制剂在干燥状态下pH-依赖性的作用机制是不直观的。

[0074] 实施例6 RIN表现与固体基质pH的相关性

[0075] 测量了使用实施例1的样品(表I中描述)和实施例4的样品(表II和表III中描述)的固体基质的pH并与生物RIN表现相比。为了测量固体基质pH,从每种纸上挖去9个冲孔(7 mm的圆形)并浸入1 mL水中。使用高剪切的实验室均质器将冲孔均质化为纸浆,用pH测试条测定水相的pH。

[0076] 实施例6的结果在表IV中列出。各干燥固体基质的pH一般维持在涂渍固体基质的溶液的原始pH,不过某些配方对于其它为优选的。不受具体理论限制,该结果证实具有酸性pH的固体基质从干燥血斑产生合理质量的RNA,因为环境储存若干天后衍生自酸性pH下的组合物的RNA样品的RIN值大于或等于4。

[0077] 表IV:酸性或碱性pH时和在环境条件下的不同基质组合物的RIN值

| 样品 编码 | 组合物 | | | | | pH | | RIN | 环境 储存 |
|----------|-------|------|------------|------|------|------|-----|-----|----------|
| | 变性剂 | 缓冲剂 | 酸 | 抗氧化剂 | 磷酸盐 | 浸渍溶液 | 纸 | | |
| 25-1 | GuSCN | MOPS | TCEP-HCL | THQ | | 3.6 | 4 | 6.5 | 5 天 |
| 25-3 | GuSCN | MOPS | TCEP-O-HCL | THQ | | 3.6 | 4.5 | 6.3 | 5 天 |
| 27-5 | GuSCN | | TCEP-HCL | | | 3.5 | 4 | 5.3 | 12 天 |
| 27-6 | GuSCN | | TCEP-O-HCL | | | 3.5 | 4 | 5.3 | 12 天 |
| 26-8 | GuSCN | MOPS | 香草酸 | | | 3.3 | 4 | 5.7 | 5 天 |
| 26-7 | GuSCN | MOPS | 对香豆酸 | | | 3.5 | 4.5 | 5.3 | 5 天 |
| 27-2 | GuSCN | MOPS | HCl | | | 3.5 | 5.5 | 4.9 | 5 天 |
| 28-9 | SDS | MOPS | 香草酸 | | | 3.3 | 4 | 4.3 | 6 天 |
| 27-8 | GuSCN | | 香草酸 | | | 3.5 | 4 | 4.1 | 5 天 |
| 27-7 | GuSCN | | 对香豆酸 | | | 3.5 | 4.5 | 3.3 | 5 天 |
| 28-2 | GuSCN | | 乙酸 | | | 3.5 | 5.5 | 7.8 | 6 天 |
| 28-5 | GuSCN | | 酒石酸 | | | 3.5 | 4.5 | 7 | 6 天 |
| 28-4 | GuSCN | | 柠檬酸 | | | 3.4 | 4.5 | 5.8 | 6 天 |
| 28-3 | GuSCN | | 磷酸 | | | 3.6 | 5 | 4.9 | 6 天 |
| 27-10 | GuSCN | | HCl | | 三磷酸钠 | 3.5 | 5 | 7.1 | 12 天 |
| 27-11 | GuSCN | | HCl | | 焦磷酸钠 | 3.5 | 5 | 6.7 | 12 天 |
| 26-11 | GuSCN | | HCl | | 三磷酸钠 | 7.2 | 8 | 1.9 | 6 天 |
| 26-12 | GuSCN | | HCl | | 焦磷酸钠 | 7.2 | 8 | 1.6 | 6 天 |
| 28-6 | GuSCN | | HCl | | 三磷酸钠 | 3.5 | 5 | 7 | 6 天 |
| 28-7 | GuSCN | | HCl | | 三磷酸钠 | 7.3 | 8.5 | 2.6 | 6 天 |

[0078] 尽管本文中仅说明和描述了本发明的某些特征,然而本领域技术人员将想到许多修饰和改变。因此,应理解的是所附权利要求意在涵盖所有这些落入本发明范围内的修饰和改变。

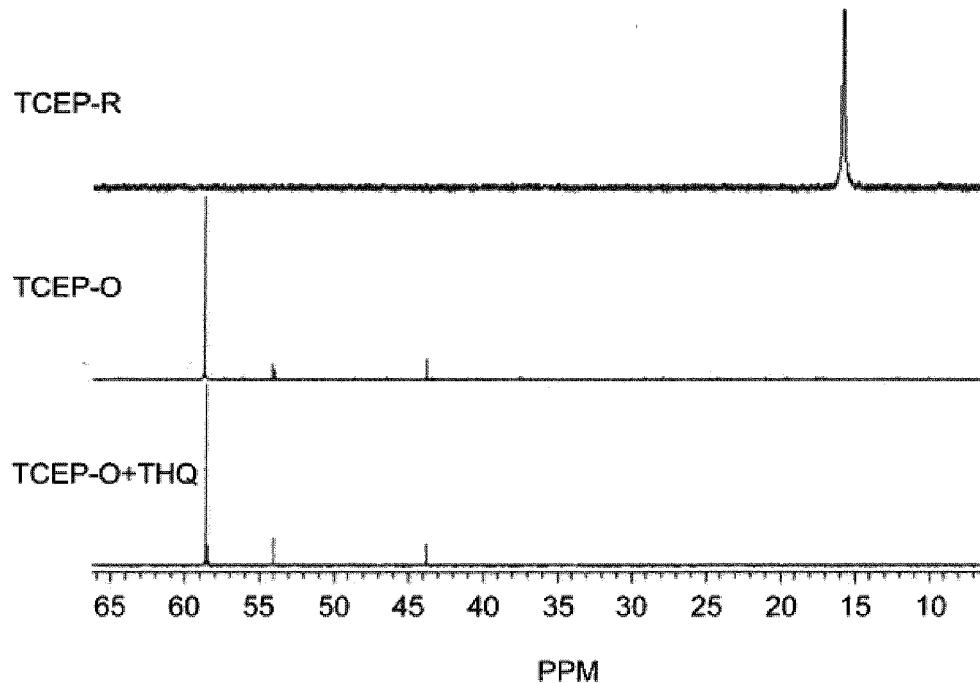


图 1

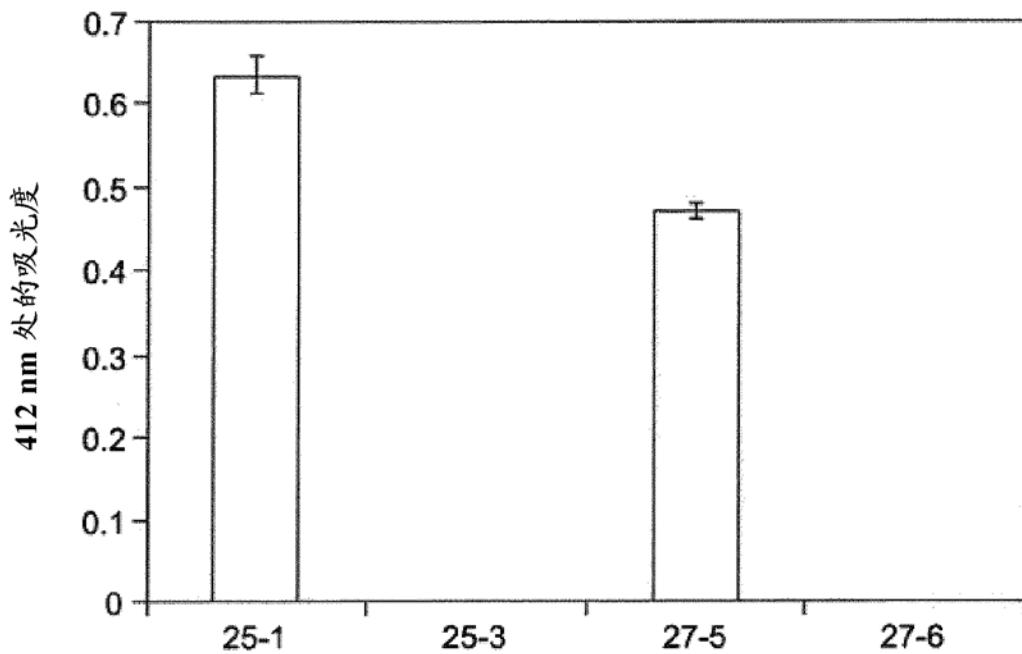


图 2

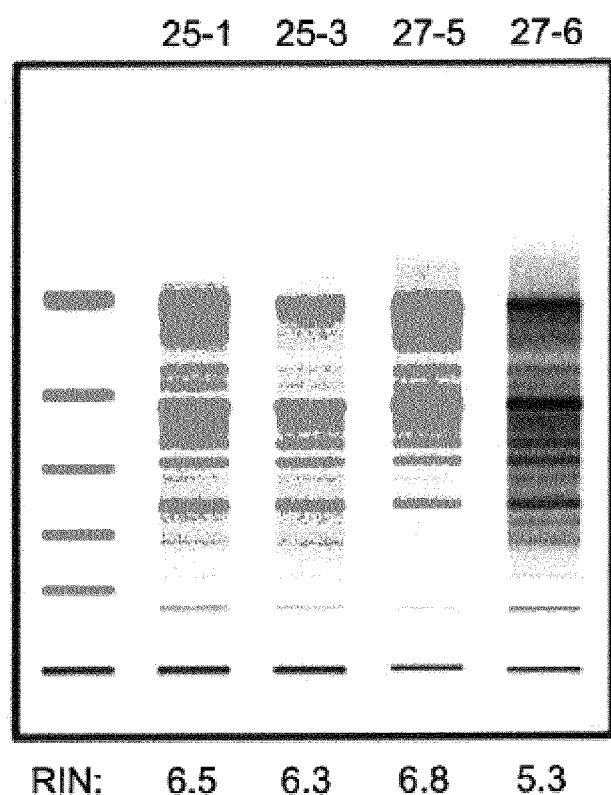


图 3

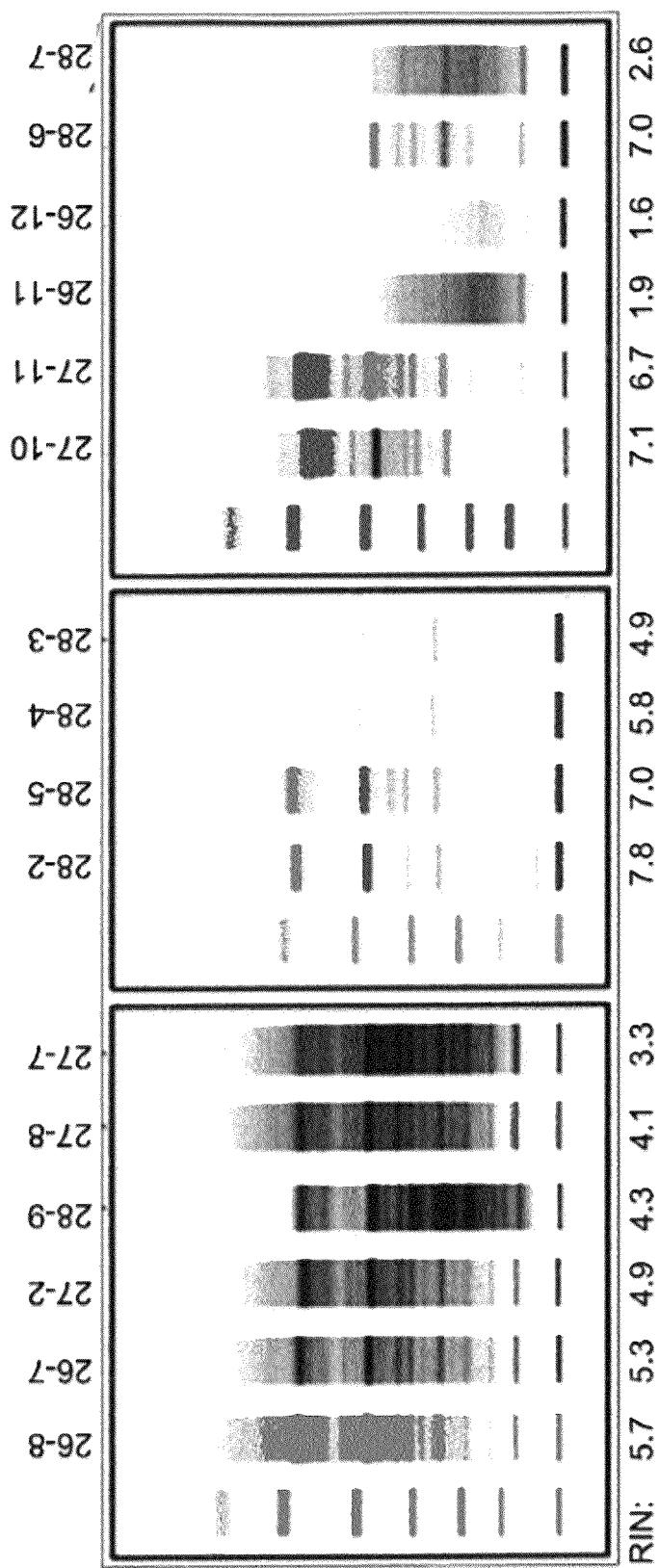


图 4