



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118421404 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 02

(21) 申请号 202410509691.1

C11D 3/39 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.26

C11D 3/48 (2006.01)

(71) 申请人 苏州博雷兹生物科技有限公司

C11D 11/00 (2006.01)

地址 215300 江苏省苏州市昆山开发区章
基路135号013幢604室

B08B 3/08 (2006.01)

(72) 发明人 王占奎 杨云华 王敏 陈明
陶源

(74) 专利代理机构 南京国润知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 32696

专利代理师 徐博

(51) Int. Cl.

C11D 1/14 (2006.01)

C11D 1/62 (2006.01)

C11D 3/04 (2006.01)

C11D 3/33 (2006.01)

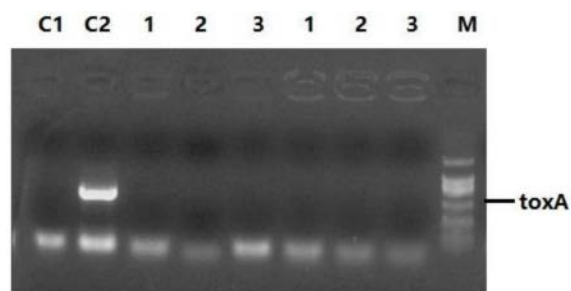
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种核酸、核酸酶污染清除剂及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种核酸、核酸酶污染清除剂及其制备方法和应用,属于生物技术领域,包括如下含量的成分:碱性剂0.5-1.0%,去垢剂0.2-1.0%,氧化剂0.11-0.15%,螯合剂1-15mM。制备方法为先混合碱性剂水溶液和耐碱性的去垢剂,然后加入螯合剂水溶液,最后加入氧化剂混合均匀即可。应用于仪器设备和耗材器皿污染物的清除,还应用于实验台面、墙面、地面及空气中污染物的清除。本发明中核酸、核酸酶污染清除剂可同时清除核酸和核酸酶的污染,该清除剂所含成分简单,配制方便,为即用型单一溶液,使用前不需要进行额外的配制过程,方便使用;且酸碱性为碱性,相对于酸性溶液对金属表面腐蚀性小,无毒安全。



1. 一种核酸、核酸酶污染清除剂,其特征在于:包括如下含量的成分:碱性剂0.5-1.0%,去垢剂0.2-1.0%,氧化剂0.11-0.15%,螯合剂1-15mM。

2. 根据权利要求1所述的一种核酸、核酸酶污染清除剂,其特征在于:所述碱性剂为氢氧化钠、氢氧化钾的一种或两种。

3. 根据权利要求1所述的一种核酸、核酸酶污染清除剂,其特征在于:所述去垢剂为十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸锂、十六烷基三甲基溴化铵、脂肪醇醚类盐中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的一种核酸、核酸酶污染清除剂,其特征在于:所述氧化剂为次氯酸、含有次氯酸根的化合物、过氧化氢、三氯异氰尿酸钠中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的一种核酸、核酸酶污染清除剂,其特征在于:所述螯合剂为EDTA盐、EGTA盐、PDTA盐、HDTA盐、谷氨酸二乙酸钠中的至少一种。

6. 根据权利要求1所述的一种核酸、核酸酶污染清除剂及其制备方法和应用,其特征在于:所述碱性剂为氢氧化钠,去垢剂为十二烷基硫酸钠,氧化剂为次氯酸钠,螯合剂为EDTA- Na_2 。

7. 一种权利要求1-6任一项所述的核酸、核酸酶污染清除剂的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 将碱性剂溶于水后,慢慢加入去垢剂,搅拌至溶解完全,得到第一混合液;

(2) 将螯合剂溶于少量水后,慢慢加入第一混合液中,得到第二混合液;

(3) 量取氧化剂慢慢加入第二混合液中,并在室温条件下搅拌至均匀,即得到核酸、核酸酶污染清除剂。

8. 一种权利要求1-6任一项所述的核酸、核酸酶污染清除剂的应用方法,其特征在于:所述核酸、核酸酶污染清除剂应用于仪器设备和耗材器皿污染物的清除,还应用于实验台面、墙面、地面及空气中污染物的清除。

9. 根据权利要求8所述的核酸、核酸酶污染清除剂的应用方法,其特征在于:包括如下步骤:通过浸泡或喷洒的方式将核酸、核酸酶污染清除剂作用于被污染的器皿后,室温静置10-15min,随后采用水淋洗或干净湿布擦拭或75%酒精浸湿纸巾擦拭的方式去除残留的清除剂即可。

一种核酸、核酸酶污染清除剂及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明主要涉及生物技术领域,具体为一种核酸、核酸酶污染清除剂及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 在核酸操作过程中易受到其他残留核酸分子污染导致的假阳性结果,严重影响了试验准确性。核酸污染是核酸检测实验室中常见的问题,它可能由多种因素引起,包括样本污染、试剂污染、环境污染、设备污染等。在分子生物学实验室中,环境污染和设备污染尤其需要通过彻底的消毒清洁来解决,传统方法中采用酒精和消毒剂进行擦拭的方式需要作用时间较长,效果较差,而采用紫外照射的方法仅能对核酸分子进行一定程度的变性,并不能完全消除污染物。

[0003] 在生物制品生产、分子生物学实验等过程中,由于内源性或外源性的原因,导致核酸酶(如RNA酶和DNA酶)存在于实验样品或环境中,核酸酶能够分解DNA或RNA,导致实验失败或产生假性结果,从而可能对核酸样品造成破坏或干扰实验结果。核酸酶污染的来源多样,包括生物样品自身携带的内源性RNase/DNase污染,以及环境中的水、缓冲液、耗材表面和实验人员引入的外源性污染,在传统方法中采用高温高压灭菌的方式去除枪头及离心管等表面的DNA酶,或者采用DEPC水浸泡处理后高温高压灭菌的方式去除器皿表面的RNA酶,来保障操作核酸过程中不引入核酸酶的污染,然而对于很多试验设备及物体表面很难进行高温高压灭菌的方式去除核酸酶污染,同时,常规使用的DEPC是强致癌物,可引起眼睛和呼吸道黏膜的强烈刺激,严重威胁到实验人员的健康。

[0004] 现有公开专利文献CN115181616A、CN116790327A中均采用添加一定量核酸酶方式来降解核酸污染,但同时会二次导致新的难以消除的残留核酸酶污染,影响后期的核酸操作准确性;现有公开专利文献CN113186037A、CN115820343A、CN116731791A、CN116762823A中涉及到核酸清除剂的制备和/或应用,但其并没有涉及到对核酸酶的消除效果;现有公开专利文献CN116042326A中提及的一种核酸污染清除剂成分复杂,实施过程中存在一定难度。为了保证实验室的安全和提高实验人员的工作效率,确保实验环境的清洁,有必要发明一种无毒无害、省时省力、能够同时去除核酸和核酸酶污染清除剂,以用于净化或清除实验环境,解决核酸、核酸酶残留污染的问题。

发明内容

[0005] 本发明技术方案针对现有技术解决方案过于单一的技术问题,提供了显著不同于现有技术的解决方案,主要提供了一种核酸、核酸酶污染清除剂及其制备方法和应用,用以解决上述背景技术中提出的现有清除剂不能同时去除核酸、核酸酶污染的技术问题。

[0006] 本发明解决上述技术问题采用的技术方案为:

[0007] 一种核酸、核酸酶污染清除剂,包括如下含量的成分:碱性剂0.5-1.0%,去垢剂0.2-1.0%,氧化剂0.11-0.15%,螯合剂1-15mM。

[0008] 具体地,所述碱性剂为氢氧化钠、氢氧化钾的一种或两种。

[0009] 具体地,所述去垢剂为耐碱性物质,为十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸锂、十六烷基三甲基溴化铵、脂肪醇醚类盐中的至少一种。

[0010] 具体地,所述氧化剂为次氯酸、含有次氯酸根的化合物、过氧化氢、三氯异氰尿酸钠中的至少一种。

[0011] 具体地,所述螯合剂为EDTA(乙二胺四乙酸)盐、EGTA(乙二醇-双(2-氨基乙基醚)-N,N,N',N'-四乙酸)盐、PDTA(1,3-二氨基丙烷-N,N,N',N'-四乙酸)盐、HDTA(1,6-二氨基己烷-N,N,N',N'-四乙酸)盐、谷氨酸二乙酸钠中的至少一种。

[0012] 优选地,所述碱性剂为氢氧化钠,去垢剂为十二烷基硫酸钠,氧化剂为次氯酸钠,螯合剂为EDTA- Na_2 。

[0013] 本发明还提供了一种上述核酸、核酸酶污染清除剂的制备方法,包括如下步骤:

[0014] (1) 将碱性剂溶于水后,慢慢加入去垢剂,搅拌至溶解完全,得到第一混合液;

[0015] (2) 将螯合剂溶于少量水后,慢慢加入第一混合液中,得到第二混合液;

[0016] (3) 量取氧化剂慢慢加入第二混合液中,并在室温条件下搅拌至均匀,即得到核酸、核酸酶污染清除剂。

[0017] 本发明还提供了一种上述核酸、核酸酶污染清除剂的应用方法,所述核酸、核酸酶污染清除剂应用于仪器设备和耗材器皿污染物的清除,还应用于实验台面、墙面、地面及空气中污染物的清除。

[0018] 进一步地,所述核酸、核酸酶污染清除剂的应用形态为易于与污染物表面或空间接触的液体,其应用方式包括液体浸泡、液滴喷雾喷洒、浸泡布擦拭;具体的应用方法包括如下步骤:通过浸泡或喷洒的方式将核酸、核酸酶污染清除剂施加于被污染的器皿后,室温静置10-15min,随后采用水淋洗或干净湿布擦拭或75%酒精浸湿纸巾擦拭的方式去除残留的清除剂即可。

[0019] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0020] (1) 本发明中核酸、核酸酶污染清除剂包括碱性剂、去垢剂、氧化剂和螯合剂,应用时,通过碱性剂赋予清除剂碱性性能,可以降解在碱性条件下敏感的RNA成分,并能够促使DNA分子内氢键的断裂导致变性为单链,这将加速氧化剂对单链DNA和RNA的降解作用,同时,呈碱性的清除剂可作用于核酸酶蛋白分子,使之变性失去活性。氧化剂的作用主要为利用其强氧化性破坏核酸的化学结构来实现降解DNA和RNA,同时,氧化剂利用其强氧化性还能够破坏核酸酶蛋白质的结构和功能使其失去活性。去垢剂的作用主要为通过改变蛋白质的结构和稳定性来间接影响核酸酶的活性。螯合剂的作用主要是螯合维持核酸酶活性必需的金属离子(如 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} ,大多数核酸酶在发挥作用时需要这些金属离子的参与),形成稳定的螯合物,从而减少相关金属离子的含量,促使核酸酶失去其活性。由此可知,本发明通过氧化剂和碱性剂协同作用于核酸分子,能够快速破坏分子内部结构,并进一步降解为小分子,实现对核酸污染的高效清除;同时,通过碱性剂、氧化剂、去垢剂和螯合剂协同作用于核酸酶,从破坏蛋白分子结构本身、破坏蛋白质稳定性、减少维持活性必需金属离子等多方面降低核酸酶的活性,从而高效使核酸酶失活。则本发明不同于已有公开专利文献中侧重于清除核酸的方面,通过氧化剂、碱性剂、去垢剂、螯合剂四种物质功效相互协同,侧重于能够达到有效同时清除核酸和核酸酶污染的目的。

[0021] (2) 本发明的四种成分中碱性剂主要用来降解核酸中的RNA成分,次之,变性酶蛋白进而灭活核酸酶;氧化剂主要用来降解核酸中的DNA成分,次之,抑制破坏核酸酶活性;去垢剂主要用来破坏酶蛋白结构稳定性进而灭活或抑制核酸酶活性;螯合剂主要用来灭活依赖金属离子的核酸酶种类,通过螯合金属离子来破坏酶活性中心。四种成分重点作用的对象是不同的,缺失任何一种,都达不到全面清除核酸及核酸酶种类的效果。

[0022] (3) 本发明通过将四种有效成分合理配比,使得各个组分在浓度限定范围内能够达到对应的作用效果;并采用有效的配制方法配制,既可以发挥各个组分的作用,能防止含量过低导致核酸、核酸酶清除效果不好;又能防止其中组分(主要是去垢剂和螯合剂)含量过高导致溶液出现溶解不充分和防止出现沉淀析出的问题,即能够有效发挥成分作用,达到预期效果。

[0023] (4) 本发明提供的核酸、核酸酶污染清除剂的制备方法中先混合碱性剂水溶液和耐碱性的去垢剂,然后加入螯合剂水溶液,最后加入氧化剂,在该方法中,先混合的碱性剂和去垢剂创造了一个碱性溶液环境,随后加入预先溶解的螯合剂,可以防止螯合剂沉淀析出,从而有利于促进螯合剂融合到液态的清除剂中,并有利于保障螯合剂的功效;因为氧化剂遇水后容易发生水解,尤其是提前加入时,因为体积小浓度高,水解反应速率高,导致最终氧化剂浓度降低而影响清除剂的清除效果,所以氧化剂最后加入,可防止溶液局部浓度太高,影响其他成分(主要是氧化剂局部浓度高水解作用加剧,水解产物对碱性剂和去垢剂会产生影响,水解产物能中和部分碱性剂,也能导致析出去垢剂沉淀),从而能保障发挥各个组分的作用效果。

[0024] (5) 本发明中核酸、核酸酶污染清除剂主要包括碱性剂、去垢剂、氧化剂和螯合剂四种物质,即本发明清除剂所含成分简单;本发明提供的核酸、核酸酶污染清除剂的制备方法为先混合碱性剂水溶液和耐碱性的去垢剂,然后加入螯合剂水溶液,最后加入氧化剂混合均匀即可,即在室温条件下通过简单的混合操作就能将能够清除核酸(包括DNA和RNA)和核酸酶(包括DNA酶和RNA酶)的有效成分以合适比例组合在方便使用的同一溶液中,则本发明清除剂配制方便。

[0025] (6) 本发明中清除剂为即用型单一溶液,使用前不需要进行额外的配制过程,方便使用。另外,清除剂为碱性,相对于酸性溶液对金属器具表面腐蚀性小,安全无毒。

[0026] 以下将结合附图与具体的实施例对本发明进行详细的解释说明。

附图说明

[0027] 图1为本发明中核酸清除能力验证结果图;

[0028] 图2为本发明中DNA酶清除能力验证结果图;

[0029] 图3为本发明中RNA酶清除能力验证结果图;

[0030] 图4为本发明中物体表面核酸清除能力验证结果图。

具体实施方式

[0031] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更加全面的描述,附图中给出了本发明的若干实施例,但是本发明可以通过不同的形式来实现,并不限于文本所描述的实施例,相反的,提供这些实施例是为了使对本发明公开的内容更加透彻全面。

[0032] 需要说明的是,除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常连接的含义相同,本文中在本发明的说明书中所使用的术语知识为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明,本文所使用的术语“及/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0033] 实施例一:本实施例中提供了一种核酸、核酸酶污染清除剂,包含如下含量的成分:

[0034] 表1实施例一中种核酸、核酸酶污染清除剂成分表

[0035]	氢氧化钠	0.5%
	十二烷基硫酸钠	0.2%
	次氯酸钠	0.11%
	EDTA- Na_2	1mM

[0036] 上述核酸、核酸酶污染清除剂的制备方法为:

[0037] (1) 将氢氧化钠(碱性剂)溶于水后,慢慢加入十二烷基硫酸钠(去垢剂),搅拌至溶解完全,得到第一混合液;

[0038] (2) 将EDTA- Na_2 (螯合剂)溶于少量水后,慢慢加入第一混合液中,得到第二混合液;

[0039] (3) 量取适量次氯酸钠(氧化剂)慢慢加入第二混合液中,并在室温条件下搅拌至均匀,即得到核酸、核酸酶污染清除剂。

[0040] 实施例二:本实施例中提供了一种核酸、核酸酶污染清除剂,包含如下含量的成分:

[0041] 表2实施例二中种核酸、核酸酶污染清除剂成分表

[0042]	氢氧化钠	1.0%
	十二烷基硫酸钠	1.0%
	次氯酸钠	0.15%
	EDTA- Na_2	15mM

[0043] 上述核酸、核酸酶污染清除剂的制备方法同实施例一。

[0044] 实施例三:本实施例中提供了一种核酸、核酸酶污染清除剂,包含如下含量的成分:

[0045] 表3实施例三中种核酸、核酸酶污染清除剂成分表

[0046]	氢氧化钾	0.8%
	十六烷基三甲基溴化铵	0.5%
	过氧化氢	0.11%
	EDTA- Na_2	10mM

[0047] 上述核酸、核酸酶污染清除剂的制备方法同实施例一。

[0048] 通过如下实验对实施例一至三中的核酸、核酸酶污染清除剂进行性能验证:

[0049] 一、核酸清除能力验证:

[0050] 结合表4,分别取三份2 μL (1.0 μg) 的DNA样品和2 μL (0.5 μg) 的RNA样品于DNase/RNase-free管中,向三个管中分别加入4 μL 实施例一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂,

另外取一份2 μ L (1.0 μ g)的DNA样品和2 μ L (0.5 μ g)的RNA样品于DNase/RNase-free管中,并加入ddH₂O (双蒸水)作为对照组,四根试管同步在室温下反应10min后,反应产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,结果如图1所示。

[0051] 表4核酸清除能力实验参数表

[0052]		实施例一 (泳道 1)	实施例二 (泳道 2)	实施例三 (泳道 3)	对照 (C)
	DNA+RNA (4 μ L)	+	+	+	+
	清除剂 (4 μ L)	+	+	+	-

[0053] 图1中泳道M为DL2000 DNA Marker,泳道1-3分别为样品中分别加入实施例一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂的实验组,泳道C为以ddH₂O替代核酸、核酸酶清除剂的对照组,从图中结果可以看出在对照组(泳道C)中,DNA和RNA电泳条带均保持完整、很亮的条带,表明核酸未被清除;在实验组(泳道1-3)中,观察到分子量很小的DNA和RNA降解产物且成弥散条带,表明核酸分子已被降解,因此实施例一至三中制得的核酸、核酸酶污染清除剂能够有效的降解核酸,消除核酸污染。

[0054] 二、核酸酶清除能力验证:

[0055] 结合表5,分别取三份2 μ L (4mU) DNase样品于DNase/RNase-free管中,向三个管中分别加入4 μ L实施例一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂,室温反应10min后,再分别依次加入10 $\times$ Reaction Buffer (反应缓冲液)和2 μ L (1.0 μ g)的DNA;同时,以加入ddH₂O为阳性对照,以不加入核酸、核酸酶污染清除剂为阴性对照,再次室温反应10min后,反应产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,结果如图2所示。

[0056] 图2中泳道M为DL2000 DNA Marker,泳道1-3分别为样品中加入实施例一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂的实验组,泳道C1为阳性对照组,泳道C2为阴性对照组,从图中结果可以看出在阳性对照组(泳道C1)中,DNA电泳条带均保持完整、较亮的条带,表明DNA未被清除,而在阴性对照组(泳道C2)中,DNA电泳条带消失,表明DNA样品已经被DNA酶降解;在实验组(泳道1-3)中,观察到DNA电泳条带仍然保持完整状态,表明试验中DNA酶被实施例一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂灭活,因此实施例一至三中制得的核酸、核酸酶污染清除剂能够有效的灭活DNA酶,消除DNA酶污染。

[0057] 表5核酸酶清除能力实验参数表

[0058]		实施例一 (泳道 1)	实施例二 (泳道 2)	实施例三 (泳道 3)	阳性对照 (泳道 C1)	阴性对照 (泳道 C2)
	DNase/RNase (2 μ L)	+	+	+	-	+
	清除剂 (4 μ L)	+	+	+	-	-
	DNA/RNA (2 μ L)	+	+	+	+	+

[0059] 结合表5,分别取三份2 μ L (10ng) RNase样品于DNase/RNase-free管中,向三个管中分别加入4 μ L实施例一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂,室温反应10min后,再分别依次加入10 $\times$ Reaction Buffer和2 μ L (0.5 μ g)的RNA;同时,以加入ddH₂O为阳性对照,以不加入核酸、核酸酶污染清除剂为阴性对照,再次室温反应10min后,反应产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,结果如图3所示。

[0060] 图3中泳道M为DL2000 DNA Marker,泳道1-3分别为样品中加入实施例一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂的实验组,泳道C1为阳性对照组,泳道C2为阴性对照组,从图中结果可以看出在阳性对照组(泳道C1)中,RNA电泳条带均保持完整、较亮的条带,表明RNA未被清除,而在阴性对照组(泳道C2)中,RNA完整的电泳条带已消失,只能观察到降解产物,表明RNA样品已经被RNA酶降解;在实验组(泳道1-3)中,观察到RNA电泳条带仍然保持完整状态,且未观察到降解产物,表明试验中RNA酶被实施例一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂灭活,因此实施例一至三中制得的核酸、核酸酶污染清除剂能够有效的灭活RNA酶,消除RNA酶污染。

[0061] 三、物体表面核酸清除能力验证:

[0062] 用试剂盒提取铜绿假单胞杆菌(铜绿假单胞菌)的基因组DNA,用灭菌水稀释至100ng/mL,在物体表面滴加10uL,室温晾干后,再将实施例一至三中清除剂10uL滴加在物体表面的同一位置处,室温反应10min,随后用洁净纸巾擦拭干净,用棉拭子涂拭污染区,浸泡入0.2mL蒸馏水,以其为模板进行PCR检测铜绿假单胞杆菌外毒素A调控基因—ETA基因(toxA),鉴定不同试剂对于固体表面核酸残留的清除效果。试验组重复两次,同时,设以灭菌水(其中没有基因组DNA)为模板作为阴性对照组,设一个不做任何清洁处理的为阳性对照组。ETA基因(toxA)特异性引物序列为toxA-1F:AGATGGGCGACGAGTTGCTG,toxA-1R:GACTGATGACCGTGGGCTTGAT,采用南京博雷兹生物科技有限公司的2×FastTaq Premix(with dye)(Cat:PC0802)按照说明书描述进行PCR扩增反应,反应产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,结果如图4所示。

[0063] 图4中泳道M为DL2000 DNA Marker,泳道1-3分别为样品中加入实施一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂的实验组,泳道C1为阴性对照组,泳道C2为阳性对照组,从图中结果可以看出在阴性对照组(泳道C1)中,因为没有基因组DNA为模板,所以没有观察到PCR扩增条带,而在阳性对照组(泳道C2)中,因为被基因组DNA污染过的物体表面没有被清洁而残留着模板,所以观察到明显的PCR扩增条带;在实验组(泳道1-3)组中,没有观察到特异的PCR扩增条带,表明试验中被基因组DNA污染的物体表面被实施例一至三制得的核酸、核酸酶污染清除剂彻底清除干净,因此实施例一至三中制得的核酸、核酸酶污染清除剂能够有效地对物体表面核酸进行清除。

[0064] 上述结合附图对本发明进行了示例性描述,显然本发明具体实现并不受上述方式的限制,只要采用了本发明的方法构思和技术方案进行的这种非实质改进,或未经改进将本发明的构思和技术方案直接应用于其他场合的,均在本发明的保护范围之内。

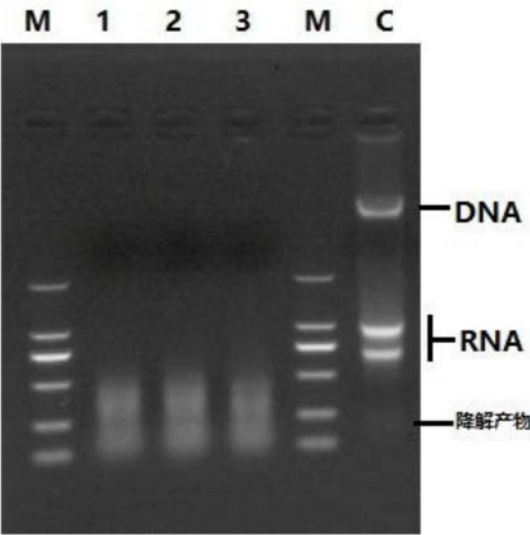


图1

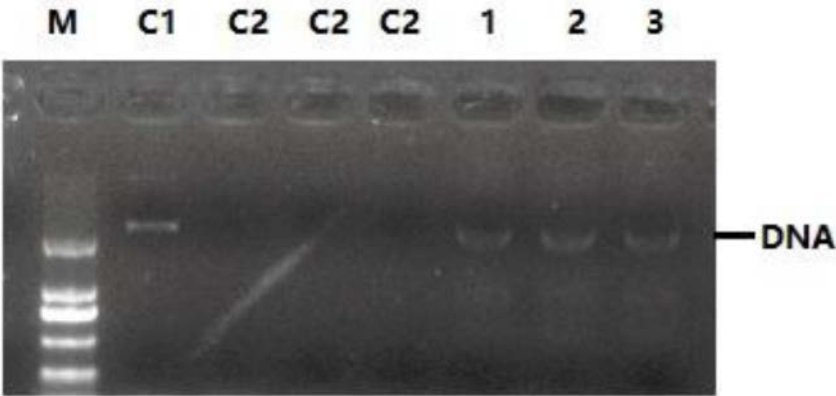


图2

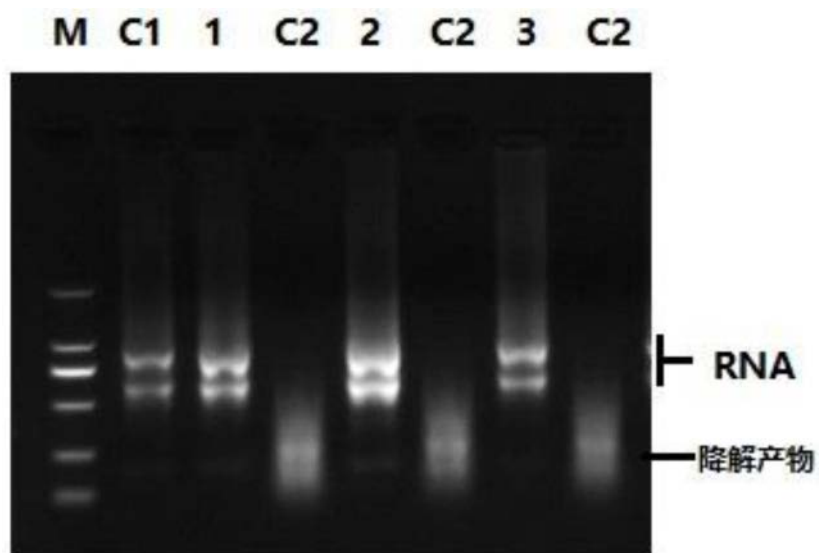


图3

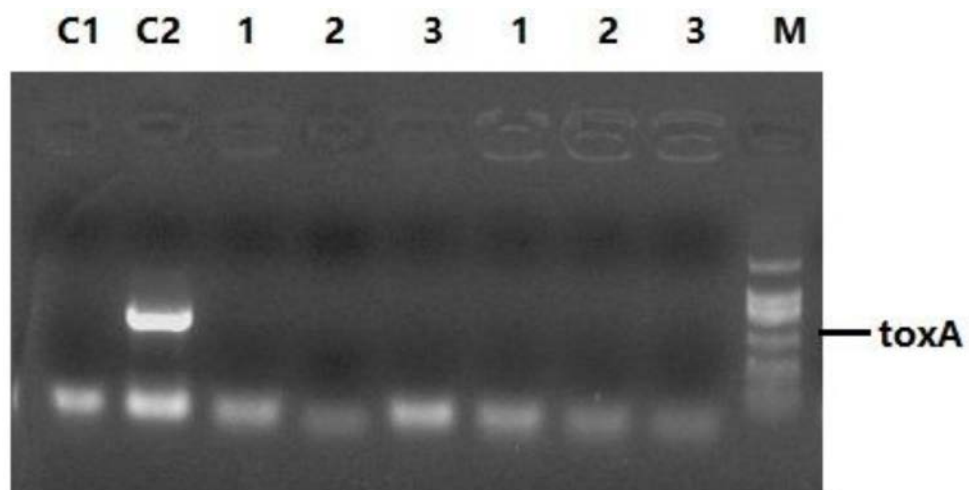


图4