

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880021555.7

[51] Int. Cl.

C12N 1/00 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12N 1/04 (2006.01)

[43] 公开日 2010年3月31日

[11] 公开号 CN 101688170A

[22] 申请日 2008.4.23

[21] 申请号 200880021555.7

[30] 优先权

[32] 2007.4.24 [33] US [31] 60/913,781

[86] 国际申请 PCT/US2008/061332 2008.4.23

[87] 国际公布 WO2009/009210 英 2009.1.15

[85] 进入国家阶段日期 2009.12.23

[71] 申请人 生物马特里卡公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 罗尔夫·穆勒 朱蒂·穆勒-科恩

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 柳春琦

权利要求书 10 页 说明书 52 页 序列表 1 页
附图 10 页

[54] 发明名称

用于生命科学的样品存储

[57] 摘要

公开了用于在恢复基本全部生物活性和不冷藏条件下液体存储生物样品的组合物和方法。还公开了用于自动化存储、跟踪、提取以及分析这类可液体存储的生物样品，包括核酸和蛋白(包括酶)的组合物和方法。公开了以液体基质为特征的 RFID - 标记的可液体存储生物样品的存储装置，还公开了用于管理样品数据的计算机执行的系统和方法。

1. 可液体存储的生物样品，包括：
 - (a)生物样品；
 - (b)液体基质，其包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；和
 - (c)至少一种稳定剂，其中(a), (b)和(c)在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天，且其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。
2. 权利要求 1 的可液体存储的生物样品，其包括至少 2 种稳定剂。
3. 权利要求 1 的可液体存储的生物样品，其中至少一种稳定剂包括海藻糖酶抑制剂。
4. 权利要求 1 的可液体存储的生物样品，其中所述基质物质包括聚乙烯醇。
5. 权利要求 1 的可液体存储的生物样品，其中所述至少一种稳定剂包括糖苷酶抑制剂，所述糖苷酶抑制剂选自由以下各项组成的组：
 - (i)海藻糖酶抑制剂，
 - (ii)几丁质酶抑制剂，
 - (iii) α -葡糖苷酶抑制剂，
 - (iv)糖原磷酸化酶抑制剂，
 - (v)神经氨酸酶抑制剂，
 - (vi)神经酰胺葡糖基转移酶抑制剂，和
 - (vii)溶酶体糖苷酶抑制剂。
6. 按照权利要求 3 或权利要求 5 的可液体存储的生物样品，其中所述海藻糖酶抑制剂选自由以下各项组成的组：suidatrestin，有效霉素 A，井冈羟胺 A，MDL 26537，海藻唑啉，salbostatin 和 casuarine-6-O- α -D-吡喃葡糖苷。
7. 按照权利要求 1-5 中任一项的可液体存储的生物样品，其中所述基质物质溶解在所述生物相容溶剂中。
8. 按照权利要求 1-5 中任一项的可液体存储的生物样品，其中至少一

种稳定剂包括抑制剂，所述抑制剂是生物抑制剂或生物化学抑制剂。

9. 按照权利要求 1-3 和 5 中任一项的可液体存储的生物样品，其中所述基质物质包括聚乙烯醇。

10. 按照权利要求 1-5 中任一项的可液体存储的生物样品，其中所述液体基质包括含有约 0.1%-约 10%重量/体积的聚乙烯醇的溶液。

11. 权利要求 10 的可液体存储的生物样品，其中所述液体基质包括含有约 0.5%-约 5%重量/体积的聚乙烯醇的溶液。

12. 权利要求 10 的可液体存储的生物样品，其中所述液体基质包括含有约 1%-约 5%重量/体积的聚乙烯醇的溶液。

13. 权利要求 10 的可液体存储的生物样品，其中所述液体基质包括含有约 0.5%-约 1.5%重量/体积的聚乙烯醇的溶液。

14. 权利要求 10 的可液体存储的生物样品，其中所述液体基质包括选自以下各项组成的组中的溶液：

- (i) 含有约 1%重量/体积的聚乙烯醇的溶液，
- (ii) 含有约 3%重量/体积的聚乙烯醇的溶液，
- (iii) 含有约 5%重量/体积的聚乙烯醇的溶液，
- (iv) 含有约 1%重量/体积的聚乙烯醇和约 5%重量/体积的海藻糖的溶液，
- (v) 含有约 1%重量/体积的聚乙烯醇和约 5%重量/体积的有效霉素的溶液，
- (vi) 含有约 1%重量/体积的聚乙烯醇、约 5%重量/体积的海藻糖和约 5%重量/体积的有效霉素的溶液。

15. 权利要求 10 的可液体存储的生物样品，其中所述液体基质包括选自以下各项组成的组中的溶液：

- (i) 含有约 1%重量/体积-约 5%重量/体积的聚乙烯醇和约 5%重量/体积的海藻糖酶抑制剂的溶液，
- (ii) 含有约 1%重量/体积的聚乙烯醇和约 1%-约 10%重量/体积的海藻糖酶抑制剂的溶液，和
- (iii) 含有约 1%重量/体积的聚乙烯醇、约 5%重量/体积的海藻糖和约 5%重量/体积的海藻糖酶抑制剂的溶液。

16. 按照权利要求 15 的可液体存储的生物样品, 其中所述海藻糖酶抑制剂选自由以下各项组成的组: suidatrestin, 有效霉素 A, 井冈羟胺 A, MDL 26537, 海藻唑啉, salbostatin 和 casuarine-6-O- α -D-吡喃葡萄糖苷。

17. 按照权利要求 1-3 和 5 中任一项的可液体存储的生物样品, 其中所述基质物质包括至少一种选自由以下各项组成的组中的物质: 聚乙二醇, 琼脂糖, 聚-N-乙基乙酰胺, 聚乙烯醇, 羧甲基纤维素, 2-羟乙基纤维素, 聚(2-乙基-2-噁唑啉), 聚(乙基-吡咯烷酮), 聚(4-乙基吡啶), 聚苯醚, 交联的丙烯酰胺, 聚甲基丙烯酸酯, 碳纳米管, 聚丙交酯, 丙交酯/乙交酯共聚物, 羟基甲基丙烯酸酯共聚物, 果胶酸钙, 羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯, 硫酸肝素蛋白聚糖, 透明质酸, 葡糖醛酸, 血小板反应蛋白-1 N-端肝素结合结构域, 纤连蛋白, 肽/水溶性聚合改性剂缀合物和胶原蛋白。

18. 权利要求 3 和 5 中任一项的可液体存储生物样品, 其中所述海藻糖酶抑制剂包括有效霉素。

19. 权利要求 1-5 中任一项的可液体存储的生物样品, 其中所述生物样品包括下列各项的至少一种:

(i) 分离的生物分子, 其选自由 DNA, RNA, 蛋白质, 多肽, 脂质, 碳水化合物, 糖缀合物, 寡糖和多糖组成的组,

(ii) 生物物质, 其选自由哺乳动物细胞, 非哺乳动物细胞, 植物细胞, 动物细胞, 细菌, 微生物, 酵母细胞, 病毒, 疫苗, 血液, 尿液, 生物流体, 环境样品, 和口腔拭子组成的组, 和

(iii) 生物活性小分子。

20. 可液体存储的生物样品, 包括:

(a) 生物样品;

(b) 液体基质, 其包括在生物相容溶剂中溶解的聚乙烯醇; 和

(c) 至少一种稳定剂, 所述稳定剂包括有效霉素,

其中(a), (b)和(c)在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天, 且其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后, 可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。

21. 按照权利要求 1-5 和 20 中任一项的可液体存储的生物样品, 还包括能够维持理想 pH 的缓冲液。

22. 权利要求 21 的可液体存储的生物样品, 其中所述缓冲液包括化合物, 所述化合物选自由 Tris, 柠檬酸盐, 乙酸盐, 磷酸盐, 硼酸盐, HEPES, MES, MOPS, PIPES, 碳酸盐和碳酸氢盐组成的组。

23. 权利要求 8 的可液体存储的生物样品, 其中所述生物抑制剂或生物化学抑制剂选自由有效霉素 A, TL-3, 原钒酸钠, 氟化钠, N- α -甲苯磺酰基-Phe-氯甲基酮, N- α -甲苯磺酰基-Lys-氯甲基酮, 抑肽酶, 苯甲基磺酰氟和二异丙基氟-磷酸酯(盐) 组成的组。

24. 权利要求 8 的可液体存储的生物样品, 其中所述生物抑制剂或生物化学抑制剂选自由激酶抑制剂, 磷酸酶抑制剂, 胱天蛋白酶抑制剂, 粒酶抑制剂, 细胞粘附抑制剂, 细胞分裂抑制剂, 细胞周期抑制剂, 脂质信号传导抑制剂和蛋白酶抑制剂组成的组。

25. 权利要求 8 的可液体存储的生物样品, 其中所述生物抑制剂或生物化学抑制剂选自由还原剂, 烷化剂和抗微生物剂组成的组。

26. 按照权利要求 1-5 和 20 中任一项的可液体存储的生物样品, 其包括至少一种可检测的指示剂。

27. 权利要求 26 的可液体存储的生物样品, 其中所述可检测的指示剂包括比色指示剂。

28. 权利要求 26 的可液体存储的生物样品, 其中所述可检测的指示剂包括一种或多种 GCMS 标记化合物。

29. 权利要求 26 的可液体存储的生物样品, 其中所述可检测的指示剂选自由荧光指示剂, 发光指示剂, 发磷光指示剂, 放射指示剂, 染料, 酶, 酶的底物, 能量转移分子和亲和性标记组成的组。

30. 权利要求 26 的可液体存储的生物样品, 其中所述可检测的指示剂能够可检测地指示下列至少一种的存在: 胺, 醇, 醛, 硫醇, 硫化物, 亚硝酸盐, 抗生物素蛋白, 生物素, 免疫球蛋白, 寡糖, 核酸, 多肽, 酶, 细胞骨架蛋白, 活性氧类别, 金属离子, pH, Na⁺, K⁺, Cl⁻, 氰化物, 磷酸盐和硒。

31. 权利要求 26 的可液体存储的生物样品, 其中所述可检测的指示剂选自由酚红, 溴化乙锭, DNA 聚合酶, 限制性内切核酸酶, 氯化钴, Reichardt's 染料和荧光蛋白酶底物组成的组。

32. 权利要求 1-5 和 20 中任一项的可液体存储的生物样品，其中在不冷藏条件下存储一段期间后，所述可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复，所述一段期间选自由(i) 至少一周, (ii) 至少 1 个月, (iii) 至少 6 个月, (iv) 至少 9 个月, (v) 至少 12 个月, (vi) 至少 18 个月和(vii) 至少 24 个月组成的组。

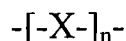
33. 可液体存储的生物样品，其包括

- (a) 生物样品；
- (b) 液体基质，包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；和
- (c) 至少一种稳定剂，

其中(a), (b)和(c)在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天，且

其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复，其中：

(I) (b)的基质物质不共价自组装，并且具有下列结构：



其中 X 是 $-CH_3$, $-CH_2-$, $-CH_2CH(OH)-$, 取代的 $-CH_2CH(OH)-$, $-CH_2CH(COOH)-$, 取代的 $-CH_2CH(COOH)-$, $-CH=CH_2$, $-CH=CH-$, C_1-C_{24} 烷基或取代的烷基, C_{2-24} 烯基或取代的烯基, 聚氧乙烯, 聚氧丙烯, 或其无规或嵌段共聚物；

并且其中 n 是值为约 1-100, 101-500, 501-1000, 1001-1500, 或 1501-3000 的整数；

并且其中

(II)稳定剂没有共价连接于聚合物并且包括海藻糖, 海藻糖酶抑制剂或选自由以下各项组成的组中的化合物: D-(+)-棉子糖, β -龙胆二糖, ectoine, D-(+)-棉子糖五水合物, 肌醇, hydroxyectoine, D-葡萄糖酸镁, 2-酮-D-葡萄糖酸半钙盐水合物, D(+)-松三糖, 乳糖酸钙一水合物, β -乳糖, 松二糖, 和 D-麦芽糖。

34. 权利要求 33 的可液体存储的生物样品，其中所述聚合物能够非共价连接至少一种稳定剂。

35. 权利要求 33 的可液体存储的生物样品，其中所述聚合物能够非共价连接核酸分子和多肽中的至少一种。

36. 存储生物样品的方法，其包括：

(a) 使生物样品与液体基质相接触，所述液体基质包含 (i) 在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质和 (ii) 至少一种稳定剂，从而获得可液体存储的生物样品；和

(b) 在不冷藏的条件下维持所述可液体存储的生物样品至少一天的期间，

其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。

37. 权利要求 36 的方法，其中在不冷藏条件下存储所述期间后，所述生物样品的降解相对于对照生物样品的降解减少，所述对照生物样品在不冷藏，缺乏所述基质物质条件下，保持在生物相容溶剂中一段期间。

38. 权利要求 36 的方法，其中在不冷藏条件下存储所述期间后，所述生物样品的降解相对于对照生物样品的降解减少，所述对照生物样品在不冷藏，缺乏基质物质和稳定剂中至少一种的条件下，保持在生物相容溶剂中一段期间。

39. 权利要求 36 的方法，其中接触步骤包括同时在所述溶剂中溶解或解离基质物质。

40. 权利要求 36 的方法，其中在接触步骤前，在所述溶剂中溶解或解离基质物质。

41. 权利要求 36 的方法，其中在接触步骤后，在所述溶剂中溶解或解离基质物质。

42. 制备用于一种或多种可液体存储的生物样品的可液体存储的生物样品存储装置的方法，包括：

(a) 将液体基质施用于生物样品存储装置的一个或多个样品孔中，其中 (1) 所述生物样品存储装置包括 (i) 盖，和 (ii) 包括一个或多个能够容纳生物样品的样品孔的样品平板，和其中 (2) 所述液体基质包括 (i) 在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；和 (ii) 至少一种稳定剂，

(b) 与步骤 (a) 同时或顺序和以任一顺序，将生物样品施用于一个或多个样品孔中；和

(c) 在步骤 (b) 后，在不冷藏的条件下，维持容纳液体基质和生物样品的

生物样品存储装置至少一天的一段期间,所述可液体存储的生物样品的基本全部生物学活性在所述期间后可恢复,并且由此制备可液体存储的生物样品存储装置。

43. 权利要求 42 的方法,其中施用步骤包括施用包含所述基质物质和所述溶剂的液体溶液或液体混悬液。

44. 权利要求 42 的方法,其中至少一个孔包含至少一种可检测的指示剂。

45. 权利要求 44 的方法,其中所述可检测的指示剂包括比色指示剂。

46. 权利要求 44 的方法,其中所述可检测的指示剂包括一种或多种 GCMS 标记化合物。

47. 权利要求 44 的方法,其中所述可检测的指示剂选自由荧光指示剂,发光指示剂,发磷光的指示剂,放射指示剂,染料,酶,酶的底物,能量转移分子和亲和性标记组成的组。

48. 权利要求 44 的方法,其中所述可检测的指示剂能够可检测地指示下列各项的至少一种的存在:胺,醇,醛,硫醇,硫化物,亚硝酸盐,抗生物素蛋白,生物素,免疫球蛋白,寡糖,核酸,多肽,酶,细胞骨架蛋白,活性氧类别,金属离子, pH, Na^+ , K^+ , Cl^- , 氰化物,磷酸盐和硒。

49. 权利要求 44 的方法,其中可检测的指示剂选自由酚红,溴化乙锭, DNA 聚合酶,限制性内切核酸酶,氯化钴, Reichardt's 染料和荧光蛋白酶底物组成的组。

50. 权利要求 42 的方法,其中至少一个孔包括至少一种稳定剂,所述稳定剂是生物抑制剂或生物化学抑制剂。

51. 回收存储的生物样品的方法,包括:

(a)同时或顺序并且以任一顺序在生物样品存储装置中,将一种或多种生物样品与用于存储生物样品的液体基质接触,从而获得一种或多种可液体存储的生物样品,其中(1)所述生物样品存储装置包括(i)盖,和(ii)包括一个或多个能够容纳生物样品的样品孔的样品平板,并且其中(2)所述基质包括 (i)在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质,和(ii)至少一种稳定剂;

(b)在接触步骤后,在不冷藏条件下维持生物样品存储装置至少一天的期间;和

(c)从生物样品存储装置中移出一种或多种可液体存储的生物样品，其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，所述可液体存储的生物样品的基本所有生物学活性可恢复，且由此回收所述存储的生物样品。

52. 权利要求 51 的方法，其中所述样品在保持步骤后的生物活性与所述样品在接触步骤前的生物活性基本相同。

53. 权利要求 51 的方法，其中所述生物相容溶剂是活性缓冲液。

54. 可液体存储的生物样品，包括：

(a) 生物样品；

(b) 液体基质，包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；

(c) 至少一种稳定剂；和

(d) 活性缓冲液，

其中(a),(b),(c)和(d)在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天，且其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。

55. 权利要求 54 的可液体存储生物样品，其中所述活性缓冲液包括选自由 pH 缓冲液、自由基捕获剂、和病原体中和剂组成的组中的组合物。

56. 存储生物样品的方法，包括：

(a)使生物样品和液体基质相接触以获得可液体存储的生物样品，所述液体基质包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；和

(b)在不冷藏的条件下维持所述可液体存储的生物样品至少一天的期间，

其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。

57. 权利要求 56 的方法，其中所述生物样品的降解相对于对照生物样品的降解减少，所述对照生物样品保持在不冷藏，缺乏所述基质物质的生物相容溶剂中。

58. 权利要求 56 的方法，其中接触步骤包括同时在所述溶剂中溶解或解离基质物质。

59. 权利要求 56 的方法，其中在接触步骤前，在所述溶剂中溶解或解离基质物质。

60. 权利要求 56 的方法，其中在接触步骤后，在所述溶剂中溶解或解离基质物质。

61. 制备用于一种或多种可液体存储的生物样品的可液体存储的生物样品存储装置的方法，包括：

(a)将液体基质施用于生物样品存储装置的一个或多个样品孔中，其中(1)所述生物样品存储装置包括(i)盖，和(ii)包括一个或多个能够容纳生物样品的样品孔的样品平板，和其中(2)所述基质包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；和

(b)与步骤(a)同时或顺序和以任一顺序，将生物样品施用于一个或多个样品孔中；和

(c)在步骤(b)后，在不冷藏的条件下，维持容纳液体基质和生物样品的生物样品存储装置至少一天的一段期间，其中所述可液体存储的生物样品的基本全部生物学活性在所述期间后可恢复，由此制备可液体存储的生物样品存储装置。

62. 权利要求 61 的方法，其中所述施用步骤包括施用包含所述基质物质和所述溶剂的液体溶液。

63. 回收存储的生物样品的方法，包括：

(a)同时或顺序并且以任一顺序在生物样品存储装置中，将一种或多种生物样品与用于存储生物样品的液体基质接触，从而获得一种或多种可液体存储的生物样品，其中(1)所述生物样品存储装置包括(i)盖，和(ii)包括一个或多个能够容纳生物样品的样品孔的样品平板，并且其中(2)所述基质包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；

(b)在接触步骤后，在不冷藏的条件下维持装有液体基质和生物样品的生物样品存储装置至少一天的期间；和

(c)从生物样品存储装置中移出一种或多种可液体存储的生物样品，其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，所述可液体存储的生物样品的基本所有生物学活性可恢复，由此回收所述存储的生物样品。

64. 权利要求 63 的方法，其中所述样品在保持步骤后的生物活性与所述样品在接触步骤前的生物活性基本相同。

65. 权利要求 63 的方法，其中所述生物相容溶剂包括活性缓冲液。

66. 权利要求 36, 42, 51, 56, 61 和 63 中任一项的方法, 其中所述基质物质包括聚乙烯醇。

67. 可液体存储的生物样品, 包括:

(a) 生物样品;

(b) 液体基质, 包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质; 和

(c) 样品处理组合物,

其中(a), (b)和(c)在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天, 且

其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后, 可液体存储的生物样品的基本全部可恢复。

68. 权利要求 67 的可液体存储的生物样品, 其中所述样品处理组合物包括选自由以下各项组成的组中的组合物: 活性缓冲液、细胞裂解缓冲液, 自由基捕获剂, 样品变性剂和病原体中和剂。

69. 按照权利要求 1, 20, 33 和 54 和 67 中任一项的可液体存储的生物样品, 其被配制为等渗的、高渗的或低渗的。

70. 权利要求 36, 42, 51, 56, 61 和 63 中任一项的方法, 其中所述可液体存储的生物样品被配制为等渗的、高渗的或低渗的。

71. 鉴别生物样品的稳定剂的方法, 包括:

(a) 在不冷藏的条件下将生物样品存储在液体基质中至少一天, 所述液体基质包括基质物质, 所述基质物质溶解或解离在存在候选试剂的生物相容溶剂中;

(b) 回收所述生物样品;

(c) 比较所述生物样品的生物学活性和对照样品的生物学活性, 所述对照样品在不冷藏的条件下在缺乏所述候选试剂的液体基质中存储至少一天, 其中由在存在所述候选试剂的条件下存储的生物样品的基本所有生物活性的保持和由在缺少所述候选试剂的条件下存储的对照样品的生物活性的缺失说明所述候选试剂是生物抑制剂或生物化学抑制剂, 且由此鉴别生物样品的稳定剂。

72. 权利要求 71 的方法, 其中所述稳定剂是生物抑制剂或生物化学抑制剂。

用于生命科学的样品存储

相关申请的交叉参考

本申请根据 35 U.S.C. § 119(e) 要求于 2007 年 4 月 24 日提交的美国临时专利申请号 No. 60/913,781, 名称为“用于生命科学的样品存储”的权益, 其通过参考完全结合在本文中。

关于序列表的声明

与本申请相关的序列表以文本格式代替纸件提供, 且通过参考于此引入本说明书。包含该序列表的文本文件名称为 150079_402PC_SEQUENCE_LISTING.txt。该文本文件是 1KB, 于 2008 年 4 月 23 日创建, 且在提交本说明书的同时通过 EFS-Web 电子递交。

发明背景

技术领域

本发明一般涉及应用于生物样品存储的组合物和方法。本发明还涉及所述生物物质和样品的应用、组织、存储、跟踪、提取以及分析, 并且涉及这些方法的自动化。

相关技术的描述

生命科学领域的研究是基于生物物质和样品以及矿物质或化学物质的分析, 所述生物物质和样品诸如 DNA, RNA, 血, 尿, 口腔拭子 (buccal swabs), 细菌, 古细菌, 病毒, 噬菌体, 植物, 藻类, 酵母, 微生物, PCR 产物, 克隆的 DNA, 蛋白质, 酶, 肽, 朊病毒, 真核细胞 (例如, protoctisca, 真菌类, 植物类和动物类), 原核细胞, 细胞和组织, 生殖细胞 (如精子和卵母细胞), 干细胞。这样的样品典型地从适当来源收集或获得, 并且放入存储和详细目录中, 以备进一步的处理和分析。经常, 需要运输样品, 且需要注意保持它们的完整、无菌和稳定。生物样品利用冰、干冰或其他

冷冻设备在冷藏环境中运输。然而，足够低的温度经常不能便利地维持一段延长的期间，诸如在国家或洲之间运输所需的期间，特别是在缺乏冷藏装置的能量来源时。

用于所述样品的存储容器包括瓶，管，小瓶，袋，盒，架，多孔器皿以及多孔平板，其典型地通过单独的螺旋盖(screw caps)或按盖(snap caps)，按扣(snap)或密封(seal closures)，盖，粘合条或带，或者多盖条密封。对于高通量样品存储的介质，用于处理和生物学工艺的自动化的标准容器形式为 96-，384-或 1536-孔平板或阵列。所述容器以及包含在其内的样品存储在各种温度下，例如在环境温度下或者在 4℃ 或者在低于 0℃ 的温度下，典型地在约 -20℃ 或在 -70℃ - -80℃。放置并且存储在装置中的样品大多数经常地包含在液体培养基或者缓冲溶液中，并且它们要求在这样的零度以下的存储(例如， -20℃ 或 -70 - -80℃)。在一些情形中，首先将样品干燥，然后存储在环境温度下(例如，WO 2005/113147, US 2005/0276728, US 2006/0099567)，或者在 4℃，在 -20℃ 或在 -70 - -80℃ 下。

例如，目前，核酸以液体形式在低温下保存。对于短期存储，核酸可以保存在 4℃。对于长期存储，温度一般降低至 -20 - -70℃，以防止遗传物质的降解，特别在基因组 DNA 和 RNA 的情形中。核酸还保存在室温下、在诸如纤维素膜的固体基质上。两种存储系统都有相关缺点。低温下存储需要昂贵的设备，诸如冷室，冷冻机，备用发电机系统；在意外的电力断供期的情形中，这样的设备可能是不可靠的，或者可能很难用在没有现成的电力来源或者具有不可靠的电力系统的区域。由于所述核酸被截留并且因此与纤维素纤维缔合，而不能在数量上再回收，所以在再水合处理过程中，核酸在纤维素纤维上的存储还导致大量的物质损失。另外，由于纤维素纤维污染生物样品，所以核酸在纤维素上的干存储还需要随后将纤维素与生物物质分离。所述核酸与纤维素纤维的分离需要额外的处理，其包括将样品移取、转移到新的管或容器中，以及离心的步骤，所有这些步骤都可能导致减少回收产率和/或增加引入不必要的污染物和/或暴露于促进样品降解的条件机会，并且所述这些步骤还是成本和劳动密集型的。

目前，蛋白主要在典型地从 -20℃ 到液氮存储的范围的冷却或冷冻环境中在液体形式如溶液中(例如，在包含盐和/或缓冲液的相容性水溶液)或

混悬液中（例如，在饱和硫酸铵浆中）处理(Wang 等, 2007 *J. Pharm. Sci.* (药物科学杂志) 96(1):1-26; Wang, 1999 *Inter. J. of Pharm.* (国际药理学杂志) 185: 129-188)。在一些例外中，在海藻糖存在下，蛋白可以是冻干的，或者在室温干燥并且直接应用到未处理的表面。(Garcia de Castro 等., 2000 *Appl. Environ. Microbiol.* (应用环境微生物学)66:4142; Manzanera 等., 2002 *Appl. Environ. Microbiol.* (应用环境微生物学) 68:4328) 即使在冷却(4°C)，或冷冻(-20°C或-80°C)下保存时，蛋白经常降解和/或失去活性。蛋白的冻结-解冻压力减少了生物活性(例如，酶活性，对关联配体的特异性结合，等等)，特别如果需要将蛋白样品的等分试样反复冻结-解冻时。由此导致的可能为生物测定所需要的蛋白活性的损失典型地需要重新调整蛋白浓度，以便在相继的测定中获得可供比较的测定结果，并经常导致由这样的样品产生的试验结果的受损害的可靠性。

由于缺乏确定的标准和可靠的方法，定量和功能性质的恢复困难，各种缓冲液和溶剂的相容性和耐受性，以及处理核酸和蛋白的需要引起的其它困难，所以科学的、生物医学的、生物技术的研究团体和其它工业商业团体必须普遍采用蛋白和核酸的干燥。同样的问题适用于其它生物物质，诸如病毒，噬菌体，细菌，细胞和多细胞生物体的处理，存储和应用。已经描述将例如二糖如海藻糖或乳糖醇用作含蛋白质样品的干燥存储的添加剂（例如，美国专利号 No. 4,891,319; 美国专利号 5,834,254; 美国专利号 6,896,894; 美国专利号 5,876,992; 美国专利号 5,240,843; WO 90/05182; WO 91/14773），但是这些化合物在所述背景中的有效性被它们作为不需要的微生物污染物的能源，被它们当如所述使用时受限的稳定作用，被它们缺乏在广泛种类的生物样品中的一般适用性以及被其它因素所损害。

生物样品的高度不稳定性使得非常难于长时间保持它们的生物活性。尽管在冷冻干燥条件下（例如，如冻干法）存储核酸和蛋白可以延长样品的存储期限（保存期），但是随后在液体中复原时活性的损失使得冷冻干燥（例如，冻干法）成为不够理想的存储技术。而且，干燥方法不能有效用于其他生物物质，诸如大量收集的那些，或作为用于生物膜收集或用于一些病毒、细菌、或多细胞生物体的表面拭子。例如，在无选择生长条件下维持液体细菌培养物的能力在长期运输过程中应该是特别理想的，

特别是在减缓细菌生长速度和保持细菌存活的环境中，但是目前不存在这样的能力。类似地，在环境或环境温度（例如，约 23°C-37°C）下在液体或半液体环境中稳定和长期存储样品从而避免极端温度（例如，约 0°C—-80°C）的能力应该高度有利于维持完全功能性和完整的生物样品，因为这些是许多生物分子的天然条件。然而这样的能力目前尚未知。

由遥远的地方，如外国、外洲、海下或太空收集的生物样品的降解也是当前成问题的，因为所述样品的适当分析和测试被随后损害和/或延迟。同样地，目前可获得的用于生物样品的存储技术不够，特别是关于制备或收集大量蛋白或其他类型的可能不能按照干存储处理的生物分子，和/或关于对于具有在保持基本恒定生物活性的同时存储超过一年或更长期间的能力所需的生物样品特征。例如，在疾病发作或生物恐怖行动调查的情形中，这种保持生物样品完整性的能力可能是需要的，特别是如果样品是在极端环境条件下收集并然后经历漫长运输到达合适的分析机构。因此，不需要耗时、不切实际、不方便和/或昂贵的保存方法，特别是需要冷藏的那些的长期存储生物样品的能力应该是高度有利的。

因此，本领域中明显存在对用于以液体形式长期（例如，超过一个月、六个月、九个月、一年、或更长），特别是超过长期存储生物样品同时维持生物活性、无需复杂制备和存储条件的组合物和方法的需要，例如，在极端环境条件（例如，条件包括，但不限于，极端的温度（例如，零度以下或炎热的）、大气条件诸如增高的压力（例如海下）或低重力（例如，太空）、UV 辐射、潮湿等）下收集的样品。本发明公开了解决这些需要的实施方案并提供其他有关的优势。

发明概述

根据本文所述的一些实施方案，提供可液体存储的生物样品，其包括 (a) 生物样品； (b) 液体基质，包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质和 (c) 至少一种稳定剂，其中 (a), (b) 和 (c) 在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天，且其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。在另一个实施方案中，可液体存储的生物样品包括至少两种稳定剂，其中至少一种稳定剂包括海藻糖酶抑

制剂，且其中基质物质包括聚乙烯醇。在另一个实施方案中，可液体存储的生物样品包括糖苷酶抑制剂，所述糖苷酶抑制剂选自海藻糖酶抑制剂，几丁质酶抑制剂， α -葡糖苷酶抑制剂，糖原磷酸化酶抑制剂，神经氨酸酶抑制剂，神经酰胺葡糖基转移酶抑制剂，和溶酶体糖苷酶抑制剂。在另一个实施方案中，海藻糖酶抑制剂选自 *suidatrestin*，有效霉素 A，井冈羟胺 A, MDL 26537, 海藻唑啉, *salbostatin* 和 *casuarine-6-O- α -D-吡喃葡糖苷*。

在另一个实施方案中，提供可液体存储的生物样品，其中所述基质物质溶解在生物相容溶剂中并且其中至少一种稳定剂包括一种抑制剂，所述抑制剂是生物学抑制剂或生物化学抑制剂，且所述基质物质包括聚乙烯醇，约 0.1%-约 10%重量/体积的聚乙烯醇，约 0.5%-约 5%重量/体积的聚乙烯醇，约 1%-约 5%重量/体积的聚乙烯醇，或约 0.5%-约 1.5%重量/体积的聚乙烯醇。

在某些其他实施方案中，提供可液体存储的生物样品，其中所述液体基质包括一种溶液，所述溶液选自包含约 1%重量/体积的聚乙烯醇的溶液，包含约 3%重量/体积的聚乙烯醇的溶液，包含约 5%重量/体积的聚乙烯醇的溶液，包含约 1%重量/体积的聚乙烯醇和约 5%重量/体积的海藻糖的溶液，包含约 1%重量/体积的聚乙烯醇和约 5%重量/体积的有效霉素的溶液，和包含约 1%重量/体积的聚乙烯醇，约 5%重量/体积的海藻糖和约 5%重量/体积的有效霉素的溶液。

在其它实施方案中，提供可液体存储的生物样品，其中所述液体基质包括一种溶液，所述溶液选自包含约 1%重量/体积的-约 5%重量/体积的聚乙烯醇和约 5%重量/体积的海藻糖酶抑制剂的溶液，包含约 1%重量/体积的聚乙烯醇和约 1% -约 10%重量/体积的海藻糖酶抑制剂的溶液，和包含约 1%重量/体积的聚乙烯醇，约 5%重量/体积的海藻糖和约 5%重量/体积的海藻糖酶抑制剂的溶液。在某些其他实施方案中，海藻糖酶抑制剂选自 *suidatrestin*，有效霉素 A，井冈羟胺 A, MDL 26537, 海藻唑啉, *salbostatin* 和 *casuarine-6-O- α -D-吡喃葡糖苷*。

在其他实施方案中，本文中提供的是可液体存储的生物样品，其中所述基质物质包括至少一种选自下列各项的物质：聚乙二醇，琼脂糖，聚-N-乙基乙酰胺，聚乙烯醇，羧甲基纤维素，2-羟乙基纤维素，聚(2-乙基-2-

噁唑啉), 聚(乙烯基-吡咯烷酮), 聚(4-乙烯基吡啶), 聚苯醚, 交联的丙烯酰胺, 聚甲基丙烯酸酯, 碳纳米管, 聚丙交酯, 丙交酯/乙交酯共聚物, 羟基甲基丙烯酸酯共聚物, 果胶酸钙, 羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯, 硫酸肝素蛋白聚糖, 透明质酸, 葡糖醛酸, 血小板反应蛋白-1 N-端肝素结合结构域, 纤连蛋白, 肽/水溶性聚合改性剂缀合物和胶原蛋白。在某些其他的实施方案中, 可液体存储的生物样品包括海藻糖酶抑制剂, 所述海藻糖酶抑制剂包括有效霉素。

在某些优选的实施方案中, 提供可液体存储的生物样品, 其中所述生物样品包括下列各项的至少一种: (i)分离的生物分子, 其选自DNA, RNA, 蛋白质, 多肽, 脂质, 碳水化合物, 糖缀合物(glyconconjugate)和寡糖和多糖, (ii)生物物质, 其选自哺乳动物细胞, 非哺乳动物细胞, 植物细胞, 动物细胞, 细菌, 微生物, 酵母细胞, 病毒, 疫苗, 血液, 尿液, 生物流体, 环境样品, 和口腔拭子, 和(iii)生物活性小分子。

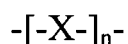
根据某些此处所述的实施方案, 提供可液体存储的生物样品, 其包括: (a)生物样品; (b)液体基质, 其包括在生物相容溶剂中溶解的聚乙烯醇; 和 (c)至少一种稳定剂, 所述稳定剂包括有效霉素, 其中(a), (b)和(c)在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天, 且其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后, 可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。

在其他实施方案中, 提供可液体存储的生物样品, 其包括能够维持理想 pH 的缓冲液。在其他实施方案中, 所述缓冲液包括化合物, 所述化合物选自 Tris, 柠檬酸盐, 乙酸盐, 磷酸盐, 硼酸盐, HEPES, MES, MOPS, PIPES, 碳酸盐和碳酸氢盐。在其它实施方案中, 提供可液体存储的生物样品, 其中所述生物抑制剂或生物化学抑制剂选自有效霉素 A, TL-3, 原钒酸钠, 氟化钠, N- α -甲苯磺酰基-Phe-氯甲基酮, N- α -甲苯磺酰基-Lys-氯甲基酮, 抑肽酶, 苯甲基磺酰氟和二异丙基氟-磷酸酯(盐)。在某些实施方案中, 所述生物抑制剂或生物化学抑制剂选自激酶抑制剂, 磷酸酶抑制剂, 胱天蛋白酶抑制剂, 粒酶抑制剂, 细胞粘附抑制剂, 细胞分裂抑制剂, 细胞周期抑制剂, 脂质信号传导抑制剂和蛋白酶抑制剂。在其他某些实施方案中, 所述生物抑制剂或生物化学抑制剂选自还原剂, 烷化剂和抗微生物剂。

至于另一个实施方案，提供可液体存储的生物样品，其包括至少一种可检测的指示剂。在另一个实施方案中，所述可检测的指示剂包括比色指示剂。在另一个实施方案中，所述可检测的指示剂包括一种或多种 GCMS 标记化合物。在某些其他实施方案中，所述可检测的指示剂选自荧光指示剂，发光指示剂，发磷光指示剂，放射指示剂，染料，酶，酶的底物，能量转移分子和亲和性标记。在另外其他的实施方案中，所述可检测的指示剂选自酚红，溴化乙锭，DNA 聚合酶，限制性内切核酸酶，氯化钴，Reichardt's 染料和荧光蛋白酶底物。本文中在某些实施方案中还提供可液体存储的生物样品，其中所述可检测的指示剂能够可检测地指示下列至少一种的存在：胺，醇，醛，硫醇，硫化物，亚硝酸盐，抗生物素蛋白，生物素，免疫球蛋白，寡糖，核酸，多肽，酶，细胞骨架蛋白，活性氧类别，金属离子，pH, Na⁺, K⁺, Cl⁻, 氰化物，磷酸盐和硒。

根据某些本文中所述的实施方案，提供可液体存储的生物样品，其中在不冷藏条件下存储一段期间后，所述可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复，所述一段期间选自(i) 至少一周, (ii) 至少 1 个月, (iii) 至少 6 个月, (iv) 至少 9 个月, (v) 至少 12 个月, (vi) 至少 18 个月和(vii) 至少 24 个月。

至于另一个实施方案，本文中提供可液体存储的生物样品，其包括(a) 生物样品；(b) 液体基质，包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；和(c)至少一种稳定剂，其中(a), (b)和(c)在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天，且其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复，其中(I) (b)的基质物质不共价自组装，并且具有下列结构：



其中 X 是 -CH₃, -CH₂-, -CH₂CH(OH)-, 取代的 -CH₂CH(OH)-, -CH₂CH(COOH)-, 取代的 -CH₂CH(COOH)-, -CH=CH₂, -CH=CH-, C₁-C₂₄ 烷基或取代的烷基, C₂₋₂₄ 烯基或取代的烯基, 聚氧乙烯, 聚氧丙烯, 或其无规或嵌段共聚物；并且其中 n 是值为约 1-100, 101-500, 501-1000, 1001-1500, 或 1501-3000 的整数；并且其中(II)稳定剂没有共价连接于聚合物并且包括海藻糖，海藻糖酶抑制剂或选自以下各项的化合物：D-(+)-棉

子糖, β -龙胆二糖, ectoine, D-(+)-棉子糖五水合物, 肌醇, hydroxyectoine, D-葡萄糖酸镁, 2-酮-D-葡萄糖酸半钙盐水合物, D(+)-松三糖, 乳糖酸钙一水合物, β -乳糖, 松二糖, 和 D-麦芽糖。

在某些其他实施方案中, 所述聚合物能够非共价连接至少一种稳定剂。在某些其他实施方案中, 所述聚合物能够非共价连接核酸分子和多肽中的至少一种。

在其他实施方案中, 本文中提供存储生物样品的方法, 其包括: (a) 使生物样品与液体基质相接触, 所述液体基质包含 (i) 在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质和 (ii) 至少一种稳定剂, 从而获得可液体存储的生物样品; 和 (b) 在不冷藏的条件下维持所述可液体存储的生物样品至少一天的期间, 其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后, 可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。在其他实施方案中, 提供一种方法, 其中在不冷藏条件下存储所述期间后, 所述生物样品的降解相对于对照生物样品的降解减少, 所述对照生物样品在不冷藏, 缺乏基质物质条件下, 保持在生物相容溶剂中一段期间。在另一个优选的实施方案中, 提供一种方法, 其中在不冷藏条件下存储所述期间后, 所述生物样品的降解相对于对照生物样品的降解减少, 所述对照生物样品在不冷藏, 缺乏基质物质和稳定剂中至少一种的条件下, 保持在生物相容溶剂中一段期间。

在某些实施方案中, 提供一种方法, 其中接触步骤包括同时在溶剂中溶解或解离基质物质, 或在接触步骤前在溶剂中溶解或解离基质物质, 或在接触步骤后在溶剂中溶解或解离基质物质。

根据本文中所述的某些实施方案, 提供制备用于一种或多种可液体存储的生物样品的可液体存储的生物样品存储装置的方法, 包括(a)将液体基质施用于生物样品存储装置的一个或多个样品孔中, 其中(1)所述生物样品存储装置包括(i)盖, 和(ii)包括一个或多个能够容纳生物样品的样品孔的样品平板, 和其中(2)所述液体基质包括(i) 在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质; 和(ii) 至少一种稳定剂, (b)与步骤(a)同时或顺序和以任一顺序, 将生物样品施用于一个或多个样品孔中; 和(c)在步骤(b)后, 在不冷藏的条件下, 维持容纳液体基质和生物样品的生物样品存储装置至少一天的一段期间, 其中所述可液体存储的生物样品的基本全部生物学活性在所述期间

后可恢复，并且由此制备可液体存储的生物样品存储装置。

在其它实施方案中，提供方法，其中施用步骤包括施用包含基质物质和溶剂的液体溶液或液体混悬液。在其它实施方案中，提供一种方法，其中至少一个孔包含至少一种可检测的指示剂，其中所述指示剂包括比色指示剂，或其中所述指示剂包括一种或多种 GCMS 标记化合物。

在某些优选的实施方案中，提供方法，其中可检测的指示剂选自荧光指示剂，发光指示剂，发磷光的指示剂，放射指示剂，染料，酶，酶的底物，能量转移分子和亲和性标记。在其它实施方案中，提供方法，其中可检测的指示剂能够可检测地指示下列各项的至少一种的存在：胺，醇，醛，硫醇，硫化物，亚硝酸盐，抗生物素蛋白，生物素，免疫球蛋白，寡糖，核酸，多肽，酶，细胞骨架蛋白，活性氧类别，金属离子，pH, Na⁺, K⁺, Cl⁻, 氰化物，磷酸盐和硒。在其它实施方案中，提供一种方法，其中可检测的指示剂选自酚红，溴化乙锭，DNA 聚合酶，限制性内切核酸酶，氯化钴，Reichardt's 染料和荧光蛋白酶底物。在某些其它实施方案中，提供方法，其中至少一个孔包括至少一种稳定剂，其是生物抑制剂或生物化学抑制剂。

在另一个实施方案中，提供回收存储的生物样品的方法，包括(a)同时或顺序并且以任一顺序在生物样品存储装置中，将一种或多种生物样品与用于存储生物样品的液体基质接触，从而获得一种或多种可液体存储的生物样品，其中(1)所述生物样品存储装置包括(i)盖，和(ii)包括一个或多个能够容纳生物样品的样品孔的样品平板，并且其中(2)所述基质包括 (i)在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质，和(ii)至少一种稳定剂；(b)在接触步骤后，在不冷藏条件下维持生物样品存储装置至少一天的期间；和(c)从生物样品存储装置中移出一种或多种可液体存储的生物样品，其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，所述可液体存储的生物样品的基本所有生物学活性可恢复，且由此回收所述存储的生物样品。在某种优选的实施方案中，提供一种方法，其中在保持步骤后样品的生物活性与在接触步骤前样品的生物活性基本相同。在某些其它实施方案中，提供一种方法，其中生物相容溶剂是活性缓冲液。

在另一个实施方案中，本文中提供可液体存储的生物样品，包括：(a)

生物样品；(b) 液体基质，包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；(c)至少一种稳定剂；和(d)活性缓冲液，其中(a), (b),(c)和(d)在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天，且其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。在某些其他实施方案中，活性缓冲液包括选自由 pH 缓冲液、自由基捕获剂、和病原体中和剂组成的组中的组合物。

在另一个实施方案中，提供存储生物样品的方法，包括：(a)使生物样品和液体基质相接触以获得可液体存储的生物样品，所述液体基质包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；和(b)在不冷藏的条件下维持所述可液体存储的生物样品至少一天的期间，其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。在某些优选的实施方案中，提供一种方法，其中生物样品的降解相对于对照生物样品的降解减少，所述对照生物样品保持在不冷藏，缺乏基质物质的生物相容溶剂中。

在其他实施方案中，提供一种方法，其中接触步骤包括同时在溶剂中溶解或解离基质物质，或其中在接触步骤前在溶剂中溶解或解离基质物质，或其中在接触步骤后在溶剂中溶解或解离基质物质。

在另一个实施方案中，提供制备用于一种或多种可液体存储的生物样品的可液体存储的生物样品存储装置的方法，包括(a)将液体基质施用于生物样品存储装置的一个或多个样品孔中，其中(1)所述生物样品存储装置包括(i)盖，和(ii)包括一个或多个能够容纳生物样品的样品孔的样品平板，和其中(2)所述基质包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；和(b)与步骤(a)同时或顺序和以任一顺序，将生物样品施用于一个或多个样品孔中；和(c)在步骤(b)后，在不冷藏的条件下，维持容纳液体基质和生物样品的生物样品存储装置一段至少一天的期间，其中所述可液体存储的生物样品的基本全部生物学活性在所述期间后可恢复，并且由此制备可液体存储的生物样品存储装置。还提供一种方法，其中施用步骤包括施用包含基质物质和所述溶剂的液体溶液。

至于另一个实施方案，提供回收存储的生物样品的方法，包括：(a)同时或顺序并且以任一顺序在生物样品存储装置中，将一种或多种生物样

品与用于存储生物样品的液体基质接触，从而获得一种或多种可液体存储的生物样品，其中(1)所述生物样品存储装置包括(i)盖，和(ii)包括一个或多个能够容纳生物样品的样品孔的样品平板，并且其中(2)所述基质包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；(b)在接触步骤后，在不冷藏的条件下维持装有液体基质和生物样品的生物样品存储装置至少一天的期间；和(c)从生物样品存储装置中移出一种或多种可液体存储的生物样品，其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，所述可液体存储的生物样品的基本所有生物学活性可恢复，且由此回收所述存储的生物样品。在某些实施方案中，提供一种方法，其中在保持步骤后样品的生物活性与在接触步骤前样品的生物活性基本相同。其中生物相容溶剂包括活性缓冲液，且其中基质物质包括聚乙烯醇。

根据本文中所述某些实施方案，提供可液体存储的生物样品，包括：

(a) 生物样品；(b) 液体基质，包括在生物相容溶剂中溶解或解离的基质物质；和(c) 样品处理组合物，其中(a), (b)和(c)在不冷藏的条件下彼此流体接触至少一天，且其中在不冷藏条件下存储至少一天的期间后，可液体存储的生物样品的基本全部生物活性可恢复。

在其他实施方案中，提供可液体存储的生物样品，其中所述样品处理组合物包括选自以下各项的组合物：活性缓冲液、细胞裂解缓冲液，自由基捕获剂，样品变性剂和病原体中和剂。在某些其他实施方案中，将可液体存储的生物样品配制为等渗的、高渗的或低渗的。

在另一个实施方案中，提供鉴别生物样品的稳定剂的方法，包括：(a) 在不冷藏的条件下将生物样品存储在液体基质中至少一天，所述液体基质包括基质物质，所述基质物质溶解或解离在存在候选试剂的生物相容溶剂中；(b) 回收所述生物样品；(c) 比较所述生物样品的生物学活性和对照样品的生物学活性，所述对照样品在不冷藏的条件下在缺乏所述候选试剂的液体基质中存储至少一天，其中由在存在所述候选试剂的条件下存储的生物样品引起的对基本所有生物活性的保持力和由在缺少所述候选试剂的条件下存储的对照样品引起的生物活性的缺失说明所述候选试剂是生物抑制剂或生物化学抑制剂，且由此鉴别生物样品的稳定剂。在某些其他实施方案中，所述稳定剂是生物抑制剂或生物化学抑制剂。

参考以下详细说明和附图，本发明的这些和其他方面将变得清楚。本文中公开的所有参考文献于此通过参考作为整体引入，如同分别将其引入一样。

若干附图视图简述

图 1 显示从室温下存储在液体存储基质中的全血提取的基因组 DNA 的完整性。(图 1, 左柱) QPCR 分析用于测量在 1%PVA 基础液体存储基质中以环境温度存储 4 个月的全血提取的基因组 DNA 的完整性。作为对照, 全血在无液体存储基质的条件下以 -20°C 存储(图 1, 右柱)。基因组 DNA 的完整性, 在将全血以室温存储在液体存储基质中时, 得到维持, 而在源自冷冻存储的全血的样品中显著降低。

图 2 显示在液体存储基质中室温存储的 RNA 防止降解。在 1%PVA 基础液体存储基质中以室温存储 6 天后 (SM, 泳道 3) 分离 RNA 片段之后, 显示用溴化乙锭染色的 0.8%琼脂糖凝胶。与冷冻(-20°C , 泳道 1) 存储的相同样品相比时, 基本上没有检测到显著的降解。RNA 还室温存储在水中 (无 SM, 泳道 2)。与存储在 1%PVA 基础液体基质中并在室温或 -20°C 保持 6 天的样品相比, 存储在水中的 RNA 显著变性。

图 3 显示在不冷藏条件下存储在液体存储基质中的质粒 DNA (pDNA) 保持完整。1ng pUC19 样品存储在 1%PVA 基础液体存储基质或水中。样品以 70°C 加热 3 天。对照 pDNA 以 -20°C 存储在水中 (C 泳道)。然后将样品用作 PCR 扩增反应中的模板, 并将 10 μl 各种扩增产物在 0.8%琼脂糖凝胶上跑电泳, 并然后用溴化乙锭染色以进行分析。存储在液体存储基质 (SM 泳道) 中的质粒 DNA 显示出与冷冻对照 (C 泳道) 相似的强扩增, 而存储在水中的 DNA 不能扩增 (H_2O 泳道)。NC: 无模板对照 (NC 泳道)。

图 4 显示在不冷藏条件下存储在液体存储基质中的 Taq 聚合酶保持酶活性。将 Taq 聚合酶 (2.5U) 在室温 (25°C) 或 50°C 下存储在液体存储基质 (SM) 中 21 天。相同的样品还存储在水中。作为阳性对照, 将 Taq 聚合酶存储在 -20°C (C)。然后, 将存储的酶的等分试样用于以 50 ng pUC19 作为模板的 PCR 反应中。将 10 μl 各种反应产物在 0.8%琼脂糖凝胶上跑电泳, 然后用溴化乙锭染色该凝胶。以 25°C (泳道 1-4) 或 50°C (泳道 5-6) 存储在液体

存储基质中 21 天的 Taq 聚合酶显示出强 PCR 扩增。模板的扩增与冷冻对照(C: 泳道 C)相似。存储在水中的 Taq 聚合酶仅未能扩增(H₂O: 泳道 H₂O)。NC: 无模板对照 (NC:泳道 NC)。这些结果说明当将聚合酶存储在液体存储基质中时, 即使在升高的温度下 21 天后, 酶功能仍保持。

图 5 显示以室温存储在液体存储基质中的大肠杆菌保持存活且质粒 DNA 保持完整。含有 pFIV-C 质粒的大肠杆菌细胞在液体存储基质 (SM) 或液体 Luria 培养液 (LB) 中室温存储 2 个月。然后将存储样品的等分试样用于生长过夜培养物, 随后提取质粒 DNA, 再用 *EcoRI* 消化该质粒 DNA。将消化的 DNA 样品在 0.8%琼脂糖凝胶上跑电泳, 然后用溴化乙锭染色。对照 DNA 用作关于质粒完整性的参考(+: 泳道 3)。以室温存储在液体存储基质的大肠杆菌保持质粒 DNA, 该质粒 DNA 可以用限制酶消化 (SM: 泳道 1), 而存储在 LB 中的细菌不再包含该质粒(LB: 泳道 2)。

图 6 是已知无线电频率通讯系统的示意图。

图 7 是根据本发明的一个实施方案形成的系统的示意图。

图 8 是根据本发明另一方面形成的计算机-执行系统构造的方框图。

图 9 显示根据某些发明实施方案的计算机-执行系统构造。

图 10 显示根据某些实施方案的计算机-执行系统构造。

详细说明

本发明在本文所述的某些实施方案中涉及组合物和方法, 其用于充分液体存储生物样品, 基于这样的令人惊奇的发现, 即在存在某些基质物质和, 在某些其他实施方案中, 一种或多种稳定剂的情况下, 生物样品可以在环境温度下以液体或半液体形式存储延长的期间, 从而使该样品的所有的生物活性基本得到恢复。如本文所述, 某些实施方案部分涉及由选择与保持生物样品结构和/或活性相容的基质物质提供的益处, 且部分涉及由选择稳定剂诸如具有抗微生物活性的海藻糖酶抑制剂提供的出乎意料的益处, 所述益处用于长期环境温度液相存储。

这些和相关实施方案容许广泛种类的生物样品的有效的、方便的和经济的存储, 所述生物样品包括, 但不限于, 多核苷酸、酶和其它蛋白质和细胞, 而无需冷藏或冷冻存储。样品可以以环境温度存储在液体基质中

并且在存储后，该样品可以在不需要与该基质物质分离的条件下立即使用，这不干扰所述样品的生物活性。本发明提供的实施方案有利地提供存储的生物样品的较好回收，包括研究样品(interrogating samples)的提高了的检测敏感性，所述研究样品包含小量的目的生物分子，并且可以发现在临床，保健和诊断背景，在生物医学研究，生物研究和法医科学和在生物产品和其它设置中的应用，在所述设置中可能需要用于生命科学的样品存储和管理。

本发明可以用于存储液体或非液体样品和用于以环境温度存储，并且还可以用于存储不同的生物物质和生物样品，诸如但不限于 DNA，RNA，血，尿，其它生物流体（例如，血清，浆膜液，血浆，淋巴，脑脊髓液，唾液，分泌组织和器官的粘膜分泌物，阴道分泌物，腹水，胸膜液、心包液、腹膜液、腹部以及其它体腔液，包括细胞或器官条件培养基的细胞和器官培养基，灌洗液等等），口腔拭子，细菌，病毒，改造的病毒载体，酵母细胞，疫苗(例如，在完整的生物颗粒情形中天然的或合成的，活的或减毒的如病毒或其它微生物疫苗，或天然、合成的或人工物质的提取物，包括遗传改造的产物)，细胞和组织，细胞或组织裂解物，细胞或组织匀浆或提取物等，或其它生物样品。

生物样品可以因此还包括来自受试者或者生物来源的血样，活检样本，组织移植物，器官培养物，生物流体或者任何其它组织或细胞制剂，或者其级分或衍生物或者其分离物。所述受试者或生物来源可以是人或者非人类的动物，包括哺乳动物和非哺乳动物，脊椎动物和无脊椎动物，并且也可以是任何其它多细胞生物体或单细胞生物体如真核(包括植物和藻类)或原核生物体或古细菌 (archaeon)，微生物（例如，细菌，古细菌 (archaea)，真菌，原生生物，病毒)，水生浮游生物，土壤，生物膜，微生物团或群，初级细胞培养物或者培养适应性细胞系，其包括但不限于，可以含有染色体整合或附加型重组核酸序列或人工染色体的遗传改造细胞系，无限增殖或有限增殖化细胞系，体细胞杂交细胞系，分化的或可分化的细胞系，干细胞，生殖细胞（例如，精子，卵母细胞），转化的细胞系，等等。

当前使用的术语“生物样品”、“生物学分子 (biological molecule)”

和“生物分子 (biomolecule)”包括基本生物起源的任何物质和化合物，其具有科学、诊断和/或制药应用范围内相关的特性。不仅包括天然分子，诸如可从天然来源分离的那些，还包括源自其的形式、片段和衍生物，以及重组形式和人工分子，条件是存在该天然分子的至少一种特性。优选的生物样品是可以应用于分析、诊断和/或制药目的的那些，诸如，但不仅限于，核酸及其衍生物（例如，寡核苷酸，DNA，cDNA，PCR 产物，基因组 DNA，质粒，染色体，人工染色体，基因转移载体，RNA，mRNA，tRNA，siRNA，miRNA，hnRNA，核酶，肽核酸(PNA)），多肽和蛋白质（例如，酶，受体蛋白，蛋白复合物，肽激素，抗体，脂蛋白，糖蛋白，内含肽，朊病毒），及其生物活性片段，碳水化合物及其衍生物（例如，糖脂质，糖基化蛋白，糖苷，寡糖，单糖和多糖，和葡胺聚糖），和脂质及其衍生物（例如，脂肪，脂肪酸，甘油酯，甘油三酯，磷脂，类固醇，前列腺素，和白三烯）。

基于本发明的公开内容，对本领域技术人员应该清楚的是，按照本发明所包括的实施方案的组合物和方法还可以应用于细胞组织和完整细胞，及其部分（例如，细胞器、膜和膜片段、匀浆、提取物、亚细胞级分、裂解物等），条件是这样的延伸部分是上述生物分子的载体。由于该原因，组织、细胞及其部分等基本包含在术语“生物样品”的范围内。

因此，术语“生物样品”可以以其最广泛的含义看待，例如，指脊椎动物或无脊椎动物细胞或组织，例如在脊椎动物细胞的情形中，指鱼细胞（例如，斑马鱼细胞，或河豚细胞，等），两栖动物细胞（例如，青蛙细胞），鸟类细胞，爬行动物细胞，哺乳动物细胞，等。哺乳动物的实例包括人或非人类哺乳动物，诸如猴、猿、母牛、绵羊、山羊、野牛、羚羊、公牛、马、驴、骡、鹿、麋鹿、驯鹿、水牛、骆驼、美洲驼、羊驼、兔、猪、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、狗、猫，等。其他实施方案中还设想了这样的生物样品，其可以包括非哺乳动物的动物或其来源的器官，包括，例如，环节动物、软体动物、海绵、刺胞动物、节肢动物、两栖动物、鱼、鸟和爬行动物。

在某些其他实施方案中，生物样品可以指源自上述水生浮游生物的微生物、动物组织和器官、微生物团、群、块、絮、或生物膜。“水生”浮

游生物的微生物包括细菌浮游生物、古浮游生物、病毒和浮游植物、以及浮游动物。

根据其他实施方案，术语“生物样品”可以包括由任何来源（动物、植物、细菌、病毒等）诸如受试者或生物来源，以及由生物和环境样品获得样本或培养物。生物样品可以获自任何脊椎动物或无脊椎动物并可以包括流体、固体、组织和气体。环境样品包括环境物质，诸如表面物质、土壤、水、生物膜、微生物团、工业样品等。

用于本文中时，“土壤”是地质学和生物学过程作用于堆积在地球表面上的无机矿物质和生物质的复杂产物。其包含地球上起作用以循环和生物矿物化有机物质的大多数生物多样性状态(Whitman 等, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (美国国家科学院学报) 95(12,6578-83)), 并起支持和营养较高植物的底土作用。

生物膜是“水性环境”中表面上的微生物聚集，其中微生物包埋在水合多聚体基质中。该基质起胶水的作用，将微生物保持在一起，使它们附着在表面上并保护它们以避免有害的外部影响。它们可以包括若干分类学上不同的物质（例如，细菌、真菌、藻类、和原生动物），并可以形成在不同组合物，诸如金属、玻璃、塑料、组织、矿物质、和土壤颗粒的固体或液体表面上。微生物团和群是与组合物中的生物膜类似的微生物聚集/集合，但不必须向固体表面一样牢固附着。

某些实施方案涉及这样的生物样品，其可以包括分离的生物分子，其中术语“分离的”意味着将所述物质从其来源环境分离(例如，天然环境，如果其是天然存在的)。例如，在完整的细胞或在活动物中存在的天然存在的核酸或多肽不是分离的，但是从在天然系统中一些或全部共存的物质中分离的相同的核酸或多肽是分离的。这些核酸可以是载体的部分和/或这些核酸或多肽可以是组合物的部分，并且因为所述载体或组合物不是其天然环境的部分所以也是分离的。

某些本文中所述的实施方案涉及生物样品的稳定和/或保存，其包括维持、保持或重建生物样品的结构和/或功能（包括分子的、多分子的或低聚的、细胞器的、亚细胞的、细胞的、多细胞的、或较高组织水平的生物结构和/或功能）和基于其上的生物学特性的完整性。在具体实施方案中包括

高分子或生物聚合物等诸如多肽或多核苷酸的生物样品的生物学活性可以包括,例如,广泛维持其一级、二级和/或三级结构。核酸探针的生物学活性包括,例如,其以序列特异性方式与对该探针互补的核酸靶标形成杂交复合物(例如,双链体)的特性。抗体的生物学活性包括,例如,与其同族抗原特异性结合相互作用。

如本文中所述,物质的生物学活性意指可以影响生物学系统、途径、分子或涉及生物体的相互作用的任何物理或生物化学特性的任何活性,所述生物体包括例如,但不仅限于,病毒、细菌、噬菌体、朊病毒、昆虫、真菌、植物、动物、和人。具有生物学活性的物质的实例包括,但不仅限于,多核苷酸,肽,蛋白质,酶,抗体,小分子(例如,生物活性小分子),药物组合物(例如,药物),疫苗,碳水化合物,脂质,类固醇,激素,趋化因子,生长因子,细胞因子,脂质体,和毒素,脂质体。熟悉相关领域的人应该公认用于确定影响生物学系统的物理或生物化学特性的物质的生物学活性的合适测定和方法,所述生物学活性例如一种或多种生物学活性,其可以包括但不仅限于基因表达(参见,例如,Asubel, FM等(编). 2007. *Current Protocols in Molecular Biology* (当前分子生物学方案), Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ), 受体-配体相互作用(参见例如, Coligan 等 (编). 2007. *Current Protocols in Immunology* (当前免疫学方案), Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ), 酶活性(参见, 例如, Eisenthal 和 Hanson (编), *Enzyme Assays* (酶测定), Second Edition. *Practical Approaches* series, No. 257. 2002, Oxford University Press (大学出版社), Oxford (牛津), 英国; Kaplan 和 Colowick (编), *Preparation and Assay of Enzymes, Methods in Enzymology* (酶的制备和测定, 酶学方法), (卷 1, 2 和 6). 1955 和 1961, Academic Press, Ltd. (科学出版社公司), Oxford (牛津), 英国), 细胞因子, 激素和生物活性肽活性和其他细胞增殖(例如, 促有丝分裂)和/或分化活性(参见例如, Coligan 等 (编). 2007 *Current Protocols in Immunology* (当前免疫学方案), Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ), 信号转导(参见例如, Bonifacino 等 (编) 2007 *Current Protocols in Cell Biology* (当前细胞生物学方案), Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ)和细胞毒性(例如, 细胞毒性, 兴奋性神经毒性)(参见例如, Bus JS 等 (Eds) 2007 *Current Protocols in Toxicology* (当

前毒理学方案), Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ), 凋亡和坏死(Green 和 Reed, 1998 *Science* (科学) 281(5381):1309-12; Green DR, 1998 *Nature* (自然)12月17日: 629; Green DR, 1998 *Cell*(细胞)94(6):695-69; Reed, JC (Ed.), 2000 *Apoptosis, Methods in Enzymology* (凋亡, 酶学方法) (vol. 322), (科学出版社公司), Oxford (牛津), 英国)。

在某些实施方案中, 本发明涉及生物的、化学的和生物化学的物质在基本液体条件下和以可立即备用的方式的长期存储。如本文所述, 提供实施方案, 其包括 a) 液体存储基质, b) 使用增加长期存储条件的持久性的组合物制备并且最优化所述液体样品基质, 包括在某些实施方案中, 例如使用可以作为生物或生物化学抑制剂的稳定剂, 例如稳定剂如具有抗微生物活性的海藻糖酶抑制剂, 和 c) 通过应用液体存储基质简化生物活性物质的复杂生物化学过程的方法。

因此, 这些以及相关实施方案提供了与在不冷藏条件下以液体或半液体存储生物样品有关的优点, 其包括改善了生物样品中的生物活性的稳定性和保存性, 减少了在室温下以液体或半液体形式(例如水凝胶)(以及特别通过应用保护性基质)存储过程中生物样品的降解, 以及通过减少或消除对于耗费时间的重新校准和所述样品的整分的需要以及通过消除样品与存储介质物理分离的需要而简化制备用于其它应用的生物样品的方法。如本文所述的发明实施方案还通过减少或消除这样的因素提供较好的生物样品回收, 所述因素否则可以减少样品回收率, 如不理想的样品变性和/或由于样品吸附到样品容器表面上而引起的样品损失。

用于本文中时, 不认为“水凝胶”局限于含有水的凝胶, 而是一般扩展到所有亲水性凝胶和凝胶合成物, 包括在缺水条件下含有有机非聚合成分的那些。凝胶是物质的状态, 即固体和液体之间的中间状态, 且其由三维网络内的溶剂组成。

根据某些实施方案, 本发明容许 DNA、RNA、蛋白质和其他生物分子、细胞、细胞成分和源自生物样品或其他生命科学相关样品的其他生物物质、矿物质、化学物质、或组合物的纯化和尺寸分馏。在某些实施方案中, 本发明因此容易地允许, 例如, 在一个统一的、综合的和易于使用的平台上, 在分子生物学程序, 包括但不限于, 聚合酶链反应或 PCR (包

括 RT-PCR)、生物聚合物(例如,多核苷酸、多肽、寡糖或其它生物聚合物)测序、寡核苷酸引物延长、单元型测定(例如, DNA 单元型测定)和限制性图谱中使用一种或多种生物物质和/或生物样品。本发明还容易地允许,例如且在某些实施方案中,为了进行蛋白质结晶使用一种或多种生物样品和/或生物物质。在其他实施方案中,提供用于使用、测试或检测(包括诊断应用)抗体或小分子(无论是天然存在的或人工的,诸如生物活性小分子)或其他生物学分子(例如,“生物分子”),例如,蛋白质、多肽、肽、氨基酸、或其衍生物;脂质、脂肪酸等,或其衍生物;碳水化合物、糖类等或其衍生物,核酸、核苷酸、核苷、嘌呤、嘧啶或相关分子、或其衍生物,等;由生物样品组成的其他生物学分子的平台。

生物样品的液体存储

本文所述的组合物和方法涉及液体和/或基本液体存储生物样品并且可以包括使用任何适合的容器,包括例如液体存储装置。液体存储装置是本文公开的生物样品存储装置的应用,其包含用作液体或基本液体(例如,水凝胶)样品基质的基质物质,在某些优选实施方案中,包括溶解或解离在如本文所述的溶剂中的基质物质,用于生物样品或生物物质的长期存储,所述生物样品或生物物质诸如但不限于,血,尿和其他生物流体,细菌,寄生生物,细胞,组织,病毒和病毒载体,化学化合物(不管是天然存在还是人工生产的),质粒 DNA, DNA 片段,寡核苷酸,肽,荧光底物,基因组 DNA, PCR 产物,克隆的 DNA,人工染色体, RNA, 蛋白质,酶,多肽,朊病毒,疫苗,植物和藻类,矿物质和化学制品,以及如本文公开的其它生物样品。

这些和相关的实施方案源自这样的观察,即,当将所述样品或物质在基质物质,诸如本文所述的那些,包括液体基质物质中存储时,在无需冷藏的条件下可以实现生物样品或生物物质的稳定的、长期的液体存储。根据非限制性理论,在生物样品中存在的生物物质可以通过特异性或非特异性结合或其它连接机制,包括涉及形成非共价和/或共价化学键的那些和或分子间缔合相互作用如疏水和/或亲水性相互作用,氢键形成,静电相互作用等与基质物质相互作用。因此,本发明提供装置,所述装置用于生物样

品在常规室内环境室温下（例如，典型地 20-27°C，但是作为地理、季节和自然植物的函数而变化，从约 15-19°C或约 28-23°C到约 22-29°C或约 28-32°C）的稳定的、长期液体或半液体保存，以用在本文所述的样品数据处理方法和系统中。

优选的实施方案涉及如本文中所述的样品存储装置的应用，其包括能够在无需冷藏的条件下，例如，在环境室温下，液体或半液体存储生物样品或生物物质的液体基质物质。在某些优选的实施方案中，几乎不存在或不存在生物相容溶剂（例如，水）的蒸发，所述生物相容溶剂容许在维持可液体存储的生物样品的条件下蒸发。样品优选在液体或基本液体的条件下存储，根据应该随被存储样品的性质的因素而变化且应该在任何情形中被相关领域技术人员所熟悉的标准，所述条件稳定样品，即几乎没有或没有发生样品的可检测的（例如，具有统计学显著性）降解或不理想的化学或物理修饰。同样地，由本发明内容应该可以理解，根据某些优选实施方案，一种或多种所述样品、基质物质和稳定剂应该彼此液体接触，例如，存在于共同的液相，诸如生物相容溶剂中。

样品存储装置的非限制性实例可以包括，瓶、管、小瓶、袋子、盒子、架子、多孔皿和多孔板，其典型地通过单独的螺帽或锁帽、锁扣和封条扣、盖、胶条或胶带、或多帽条进行密封。适合于如本文中所述的可液体存储生物样品的其他容器和器皿是熟悉本领域的人员已知的，诸如例如，样本收集容器。在某些实施方案中，用于中-高通量样品存储、处理和自动生物处理的标准容器规格是 96-、384-、或 1536-孔板或阵列。关于生物样品存储装置的其他信息一般可见于，例如，US/20050276728 和 US/20060099567 中，包括其中引用的参考文献。

某些优选的实施方案提供用于将生物物质（例如，基因组 DNA、质粒 DNA、DNA 片段、RNA、寡核苷酸、蛋白质、肽、荧光底物，细胞、病毒、细菌、化学化合物、疫苗等）或本文中提供的其他生物样品存储在包括溶解或解离在溶剂中的物质的基质上的组合物和方法，所述溶剂容许完全恢复或基本恢复（例如，恢复至少 50%，优选至少 60%，更优选至少 70%，更优选至少 80%，和典型地在更优选的实施方案中，至少 85%，更优选至少 90，91，92，93 或 94%，更优选至少 95%，甚至更优选大于 96，97，98 或

99%) 样品物质。例如, 液体基质可以基于基质物质和/或样品的特性选择, 其取决于所采用的特定方法并以允许恢复样品的一种或多种理想结构或功能特性(例如, 生物活性)的方式进行。类似地, 作为另一个实例, 基质物质可以解离在合适的溶剂中并可以, 但不需要, 变为完全溶解的, 从而获得分散液、混悬液、胶体、凝胶、水凝胶、液汁(sap)、浆(slurry)、浆液(syrup)等。

在某些优选的实施方案中, 用于本文所述的组合物和方法的至少一种溶剂应该是水性的, 例如生物相容溶剂如生物流体, 生理溶液或被选择支持生物分子的生物结构和/或功能的水性生物缓冲溶液, 所述支持是通过为该生物分子保持有利于结构和/或功能的有利的化学环境而进行的。所述生物相容溶剂的非限制性实例包括生理盐水(例如约 145 mM NaCl), Ringer's 溶液, Hanks' 平衡盐溶液, Dulbecco's 磷酸盐缓冲液, Erle's 平衡盐溶液和其他的缓冲液和溶液等, 如熟悉本领域的那些技术人员所了解, 包括包含可为特定目的生物分子所需要的添加剂的那些。

然而根据其他的实施方案, 本发明不需受此限制并且例如, 应用 Catalan 等的系统(例如, 1995 *Liebigs Ann.* 241; 还参见 Catalan, 2001 在 *Handbook of Solvents (溶剂手册)*, Wypych (编), Andrew Publ. (安德鲁出版社), NY, 以及其中引用的参考文献)可以基于溶剂极性/可极化性(SPP)标度值选择其他溶剂, 例如, 按照所述系统, 水具有 0.962 的 SPP 值, 甲苯具有 0.655 的 SPP 值, 以及 2-丙醇具有 0.848 的 SPP 值。已经描述了基于 2-N,N-二甲基-7-硝基苄/2-氟代-7-硝基苄探针/全型对的紫外测量值来确定溶剂的 SPP 值的方法(Catalan 等., 1995)。基于具体的基质物质的溶解度特性, 具有理想 SPP 值的溶剂(不管作为纯的单一组分溶剂还是作为 2 种, 3 种, 4 种或更多种溶剂的溶剂混合物; 关于溶剂可混合性参见, 例如, Godfrey 1972 *Chem. Technol.* (化学技术) 2:359)可以容易地被熟悉关于本公开内容的领域的那些人所识别。

液体基质

按照非限制性理论, 本文中所述的液体基质, 在优选的实施方案中, 可以包括溶解或解离在生物相容溶剂中的基质物质, 可以包括多聚体结

构，其通过形成基质（例如，空间组织的支持物或支架）产生允许生物样品的生物物质与所述基质缔合的三维空间。进一步按照非限制性理论，所述可溶或可解离的基质物质，在某些预期的实施方案中，还可以用于空间组织稳定剂，诸如盐、糖、抑制剂、缓冲剂和/或其他稳定剂的引入。所述基质还允许包括用于调节 pH 和其它参数以获得最佳存储条件的组分（例如缓冲剂），并且可以任选地包括一种或多种如本文所提供的可检测的指示剂，诸如基于颜色的 pH 指示剂，和/或其它化学指示剂。

在某些优选实施方案中，所述基质物质包括聚乙烯醇(PVA)，一种可溶的基质物质。PVA 可以获自多种商业来源（例如，西格玛-奥尔德里奇（Sigma-Aldrich），圣路易斯, MO; Fluka, 密尔沃基, WI），以特定的不连续分子量存在，或备选地作为基于聚合的不同程度在一些指定分子量范围内的聚合物的多分散制剂存在。例如，Mowiol®系列的 PVA 产物可以获自 Fluka，其分子量范围约为 16, 27, 31, 47, 55, 61, 67, 130, 145, 或 195 kDa，并且已知其他的 PVA 产物如具有 30-70 kDa 的平均分子量的制剂（西格玛号. P 8136），如在后附的实施例中所用。基于本发明的公开内容，技术人员应该理解，根据如本文所述存在于液体条件下的生物样品中的目的特定生物分子的物理化学性质（例如，分子量，疏水性，表面电荷分布，溶解性等），可以容易地并且不需要过度实验地鉴定在溶剂中溶解或解离的这些或其他 PVA 产物，或其他适合的基质物质，以根据本发明的组合物和方法进行使用。

如本文所述，根据某些实施方案，用于基本液体存储生物样品的基质可以由溶液制备，所述溶液包含约 0.1%到约 10% 重量/体积的 PVA，其在某些相关的实施方案中，可以包含约 0.5%到约 5%，约 1%到约 5%，约 0.5%到约 1.5%，约 1%，约 3%，或约 5%重量/体积 PVA，其中“约”可以理解为代表量变，其可以多于或少于所述数量，少于 50%，更优选地少于 40%，更优选地少于 30%和更优选地少于 20%，15%，10%或 5%。在至少一些不同的实施方案中，类似的重量/体积比率和耐受性可以适合于其它液体基质物质，其中所述基质物质不是 PVA。

根据某些其他的实施方案，液体基质物质可以是任何这样的适合的物质，其具有以令人满意地保持理想结构和/或功能性质的方式存储特定类型

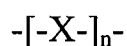
的生物样品的相容特性,所述特性包括在目的生物分子沉积的间隙内形成基质的能力,并且由此,所述基质分子不干扰样品中的一种或多种目的生物活性。

液体基质物质的另外的非限制性实例包括聚乙烯吡咯烷酮,羧甲基纤维素,2-羟基乙基纤维素 $(C_2H_6O_2)_x$,聚(2-乙基-2-咪啉) $[-N(COC_2H_5)CH_2CH_2-]_n$,聚乙烯醇,海藻糖,聚乙二醇,琼脂糖,聚-N-乙烯基乙酰胺,聚乙烯吡咯烷酮,聚(4-乙烯基吡啶),聚苯醚,可逆交联的丙烯酰胺,聚甲基丙烯酸酯,碳纳米管(例如, Dyke 等, 2003 *JACS* 125:1156; Mitchell 等, 2002 *Macromolecules* (生物大分子) 35:8825; Dagani, 2003 *C&EN* 81:5), 聚丙交酯, 丙交酯/乙交酯共聚物, 羟基甲基丙烯酸酯共聚物, 果胶酸钙, 羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯(例如, Langer, 1990 *Science* (科学) 249:1527; Langer, 1993 *Accounts Chem. Res.* (化学研究报告) 26:537-542), 硫酸肝素蛋白聚糖, 透明质酸, 葡糖醛酸(例如, Kirn-Safran 等, 2004 *Birth Defects Res. C. Embryo Today* (今日出生缺陷研究部分 C: 胚胎) 72:69-88), 血小板反应蛋白-1 N-端肝素结合结构域(例如, Elzie 等, 2004 *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (国际生物化学细胞生物学杂志) 36:1090; Pavlov 等, 2004 *Birth Defects Res. C. Embryo Today* (今日出生缺陷研究部分 C: 胚胎) 72:12-24), 纤连蛋白(例如, Wierzbicka-Patynowski 等, 2003 *J Cell Sci.* (细胞科学杂志) 116(Pt 16):3269-76), 肽/水溶性聚合改性剂缀合物(例如, Yamamoto 等, 2002 *Curr Drug Targets* (当前药物目标) 3(2):123-30), 和胶原蛋白或胶原蛋白片段, 包括基质膜胶原蛋白肽(例如, Ortega 等, 2002 *J Cell Sci.* (细胞科学杂志) 115(Pt 22):4201-14)。

本发明的某些实施方案意欲清楚地排除液体基质物质如可溶性阳离子聚合物(例如, DEAE-葡聚糖), 或阴离子聚合物(例如硫酸葡聚糖)或琼脂糖, 当使用时, 缺乏本文所述实施方案的其他成分, 与如对于干燥蛋白质存储所公开的二糖或三糖稳定剂(例如, 海藻糖, 乳糖醇, 乳糖, 麦芽糖, 麦芽糖醇, 蔗糖, 山梨糖醇, 纤维二糖, 肌醇, 或脱乙酰壳多糖), 例如在下列各项的一个或多个中: 美国专利号 5,240,843, 美国专利号 5,834,254, 美国专利号 5,556,771, 美国专利号 4,891,319, 美国专利号 5,876,992, WO 90/05182, 和 WO 91/14773, 但是本发明的某些其他实施方案意欲组合使

用液体基质物质和至少一种这样的第一二糖或三糖稳定剂, 以及包括生物或生物化学抑制剂的第二稳定剂, 所述生物或生物化学抑制剂可以是如本文所述的海藻糖酶抑制剂并具有抗微生物活性(例如, 有效霉素 A, suidatrestin, 井冈羟胺 A, MDL 26537, 海藻唑啉, salbostatin, 和/或 casuarine-6-O- α -D-吡喃葡萄糖苷), 所述组合所引用的文献没有显示。本发明的某些其他的实施方案意欲组合使用可溶或可解离基质物质和至少一种用于基本液体存储除蛋白质之外的生物样品的所述二糖或三糖稳定剂, 所述除蛋白质之外的生物样品例如多核苷酸如 DNA, RNA, 合成寡核苷酸, 基因组 DNA, 天然和重组核酸质粒和构建体等。

在本文公开的某些实施方案中, 用于液体或基本液体存储生物样品的基质, 包括至少一种这样的基质物质, 其包括聚合物和稳定剂, 其中所述聚合物非共价地自组装并具有下列结构:



其中 X 是 $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})-$, 取代的 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})-$, 取代的 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOH})-$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CH}-$, C_1 - C_{24} 烷基或取代的烷基, C_{2-24} 烯基或取代的烯基, 聚氧乙烯, 聚氧丙烯, 或其无规或嵌段共聚物; 并且其中 n 是值约 1-100, 101-500, 501-1000, 1001-1500, 或 1501-3000 的整数。合成这些聚合物可以使用可商购的试剂进行(例如, 如上述讨论的 PVA 或来自西格玛奥尔德里奇 (SigmaAldrich) 或 Fluka 的其他试剂, 或来自 Noveon, Inc., 克利夫兰, OH 的 Carbopol® 聚合物, 等) 并且根据已建立的方法, 如在 *Fiesers' Reagents for Organic Synthesis* (T.-L. Ho (Ed.), Fieser, L.F. 和 Fieser, M., 1999 John Wiley & Sons, NY) 中所述的那些方法。

“烷基”指包含 1-10 个碳原子的直链或支链, 非环状或环状, 不饱和或饱和脂族烃。代表性的饱和直链烷基包括甲基, 乙基, 正丙基, 正丁基, 正戊基, 正己基等; 而饱和的支链烷基包括异丙基, 仲丁基, 异丁基, 叔丁基, 异戊基等。代表性的饱和环状烷基包括环丙基, 环丁基, 环戊基, 环乙基等; 而不饱和环状烷基包括环戊烯基和环己烯基等。环烷基在本文

也称为“碳环”或“碳环的环”。不饱和的烷基在邻近的碳原子之间包含至少一个双键或三键(分别称为“烯基”或“炔基”)。代表性的直链和支链烯基包括乙烯基, 丙烯基, 1-丁烯基, 2-丁烯基, 异丁烯基, 1-戊烯基, 2-戊烯基, 3-甲基-1-丁烯基, 2-甲基-2-丁烯基, 2,3-二甲基-2-丁烯基等; 而代表性的直链和支链炔基包括乙炔基, 丙炔基, 1-丁炔基, 2-丁炔基, 1-戊炔基, 2-戊炔基, 3-甲基-1-丁炔基等。

“烷氧基”指通过氧桥键连接的烷基部分(即, --O--烷基), 如甲氧基, 乙氧基等。

“烷硫基”指通过硫桥键连接的烷基部分(即, --S-烷基), 如甲硫基, 乙硫基等。

“烷基磺酰基”指通过磺酰基桥键连接的烷基部分(即--SO₂-烷基), 如甲基磺酰基, 乙基磺酰基, 等。

“烷基氨基”和“二烷基氨基”指通过氮桥键连接的一个或两个烷基部分(即, --N-烷基), 如甲基氨基, 乙基氨基, 二甲基氨基, 二乙基氨基, 等。

“芳基”指芳香族碳环部分如苯基或萘基。

“芳烷基”指具有至少一个被芳基部分取代的烷基氢原子的烷基如苄基, --(CH₂)₂ 苯基, --(CH₂)₃ 苯基, --CH(苯基)₂, 等。

“杂芳基”指这样的芳香族杂环, 其是 5-10 元环, 具有至少一个选自氮, 氧和硫的杂原子, 并且包含至少一个碳原子, 包括单环和二环系统, 代表性的杂芳基是呋喃基, 苯并呋喃基, 噻吩基, 苯并噻吩基, 吡咯基, 吲哚基, 异吲哚基, 氮杂吲哚基, 吡啶基, 喹啉基, 异喹啉基, 噁唑基, 异噁唑基, 苯并噁唑基, 吡唑基, 咪唑基, 苯并咪唑基, 噻唑基, 苯并噻唑基, 异噻唑基, 哒嗪基, 嘧啶基, 吡嗪基, 三嗪基, 噌啉基, 2,3-二氮杂萘基和喹唑啉基。

“杂芳基烷基”指至少一个烷基氢原子被杂芳基部分取代的烷基, 如 --CH₂ 吡啶基, --CH₂ 嘧啶基等。

“卤素”指氟, 氯, 溴和碘。

“卤代烷基”指这样的烷基, 其至少一个氢原子被卤素取代, 如三氟甲基等。

“杂环(heterocycle)”(也被称为“杂环(heterocyclic ring)”)指 4-7 元单环, 或 7-10 元二环杂环, 其是饱和, 不饱和或芳香族的并且其包含 1-4 个杂原子, 所述杂原子独立地选自氮, 氧和硫, 并且其中氮和硫杂原子可以任选地被氧化, 并且氮杂原子可以任选地被季铵化, 包括二环, 其中上述杂环的任一个与苯环稠合。所述杂环可以通过任何杂原子或碳原子连接。杂环包括如上定义的杂芳基。因此, 除了上述列出的杂芳基, 杂环还包括吗啉基, 吡咯烷酮基, 吡咯烷基, 哌啶基, 乙内酰脲基(hydantoinyl), 戊内酰胺基(valerolactamyl), 环氧乙烷基, 氧杂环丁烷基(oxetanyl), 四氢呋喃基, 四氢吡喃基, 四氢吡啶基, 四氢嘧啶基, 四氢噻吩基, 四氢噻喃基, 四氢嘧啶基, 四氢噻吩基, 四氢噻喃基等。

“杂环烷基”指这样的烷基, 其至少一个烷基氢原子被杂环取代, 如 --CH₂ 吗啉基等。

“碳环(homocycle)”(在本文也称为“碳环(homocyclic ring)”)指包含 3-7 个碳原子的饱和或不饱和(但是不是芳香族的)碳环的环, 如环丙烷, 环丁烷, 环戊烷, 环己烷, 环庚烷, 环己烯等。

用于本文时, 术语“取代的”指上述基团(例如, 烷基, 烯基, 炔基, 碳环)的任一个, 其中至少一个氢原子被取代基所取代。在酮取代基("-C(=O)-")的情形中, 两个氢原子被取代。当取代的一个或多个上述基团被取代时, 在本发明上下文中的“取代基”包括卤素, 羟基, 氰基, 硝基, 氨基, 烷基氨基, 二烷基氨基, 烷基, 烷氧基, 烷硫基, 卤代烷基, 芳基, 芳烷基, 杂芳基, 杂芳基烷基, 杂环和杂环烷基, 以及 --NR_aR_b, --NR_aC(=O)R_b --, NR_aC(=O)NR_aNR_b, --NR_aC(=O)OR_b --NR_aSO₂R_b, --C(=O)R_a, --C(=O)OR_a, --C(=O)NR_aR_b, --OC(=O)NR_aR_b, --OR_a, --SR_a, --SOR_a, --S(=O)₂R_a, --OS(=O)₂R_a 和 --S(=O)₂OR_a。此外, 上述取代基可以进一步被一个或多个上述取代基取代, 从而使所述取代基是取代的烷基, 取代的芳基, 取代的芳烷基, 取代的杂环或取代的杂环烷基。在上下文中, R_a 和 R_b 可以是相同或不同的并且独立地是氢, 烷基, 卤代烷基, 取代的芳基, 芳基, 取代的芳基, 芳烷基, 取代的芳烷基, 杂环, 取代的杂环, 杂环烷基或取代的杂环烷基。

聚合物优选地包括多个氢键键合部分，其可以是相同或不同的，每个氢键键合部分具有一个或多个能够与相同或不同部分形成氢键的基团，所述相同或不同部分如可以在生物样品的目的生物分子上存在。每个氢键键合部分可以具有氢键供体和/或受体基团。优选地每个氢键键合部分具有供体和受体基团两者。然而，对于氢键键合部分可能的是仅具有供体或受体基团。因此，例如，具有只有供体基团的氢键键合部分的聚合物可以与具有只带有受体基团的氢键键合部分的聚合物一起使用。此外，例如，一种聚合物可以包括只具有供体基团的氢键键合部分和只具有受体基团的氢键键合部分两者。

优选的聚合物另外具有一些仅有一个氢键键合基团的单体单元。所述单官能单体作为链终止物存在并且可以用于控制聚合物的分子量。如果这些单官能单体以包含单体物质的聚合物的总量的10%或更少存在是优选的，更优选地以少于5%的量存在。根据本发明的包含一个或多个氢键键合基团的聚合物也指“能够形成至少一个氢键”并且能够与其他的聚合物分子，与至少一种稳定剂和/或存在于生物样品的至少一种目的生物分子例如核酸分子或多肽分子形成至少一个氢键。每个氢键的强度优选在1-40 kcal/mol 范围内变化，其取决于所涉及的供体和受体的性质和功能性。优选能够与相同或不同的部分形成氢键的氢键结合部分中的基团以“取代的X”部分的形式提供并可以适当地选自，例如，>C=O, -COO-, -COOH, -O-, -O-H, -NH₂, >N-H, >N-, -CONH-, -F, -C=N-基团及其混合物。优选地，该基团选自>C=O, -O-H, -NH₂, >NH, -CONH-, -C=N-及其混合物。

优选地，聚合物分子可以能够与生物样品的成分形成至少一个氢键，其方式是优先形成聚合物-聚合物氢键，但是本发明的这些实施方案并不受限于此，只要聚合物不是共价自组装的。根据非限制性的理论，在生物样品、基质和/或稳定剂之间的稳定相互作用由氢键键合相互作用所导致。然而，其他的非共价力也有助于键合，如例如离子键，静电力，范德华力，金属配位，疏水相互作用和当氢键键合部分包含一个或多个芳香环时，pi-pi stacking (Russell, JB. 1999. *General Chemistry*. (普通化学) 第二版, McGraw-Hill, Columbus, OH; Lodish 等 (编) 2000. *Molecular Cell Biology*. (分子细胞生物学) 第四版, W. H. Freeman)。

如本文中所述, 根据某些实施方案, 所述聚合物能够与一种或多种稳定剂非共价结合, 且根据某些其他的非限制性实施方案, 所述聚合物能够与可液体存储的生物样品中的且具有受试者或生物来源(例如, 生物分子, 诸如多肽、多核苷酸、天然存在的寡糖、天然存在的脂质, 等)起源的一种或多种物种非共价结合。考虑到本发明公开内容, 用于确定所述成分之间的非共价结合的方法学和仪器应该是熟悉本领域的人员已知的, 且可以包括这样的技术, 诸如电喷雾离子化质谱测量法(Loo 等, 1989 *Anal. Biochem.* Jun;179(2):404-412; Di Tullio 等 2005 *J. Mass Spectrom.* Jul;40(7):845-865), 漫射 NMR 光谱法(Cohen 等, 2005 *Angew Chem Int Ed Engl.* Jan 14;44(4):520-554), 或其他可以容易地且无需过度实验证明目的分子物种之间的非共价结合的方法(例如, 圆二色光谱法、扫描探针显微镜法、分光光度测定法和分光荧光测定法, 和生物大分子核磁共振; 参见, 例如, Schalley CA 等 (编) *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry* (超分子化学分析法), 2007, Wiley Publishers, Hoboken, NJ; Sauvage 和 Hosseini (编), *Comprehensive Supramolecular Chemistry* (综合超分子化学), 1996 Elsevier Science, Inc. (Elsevier 科学公司), 纽约, 伦敦, 东京; Cragg, PJ (编), *A Practical Guide to Supramolecular Chemistry* (超分子化学的实践指导), 2005 Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, 英国; James 等 (编), 2001 和 2005, *Nuclear Magnetic Resonance of Macromolecules: Methods in Enzymology* (超分子核磁共振: 酶学方法) (卷 338, 399 和 394) Academic Press, Ltd. (科学出版社), 伦敦, 英国)。

稳定剂

根据某些优选的实施方案, 液体样品基质还可以(例如, 在样品存储装置中)以这样的方式制备从而使一个或多个孔包含至少一种稳定剂和在某些实施方案中, 至少两种稳定剂, 其可以包括任何试剂, 所述试剂可以需要被包含以保持, 稳定, 维持, 保护或另外有助于生物样品(例如, 从生物样品存储装置中)回收, 所述生物样品的生物活性与将所述样品与液体基质接触步骤前的生物活性基本相同。在某些实施方案中, 稳定剂可以包括这样的试剂, 其是如本文提供的生物抑制剂或生物化学抑制剂。因此,

在某些优选的实施方案中，液体基质包括至少一种稳定剂，所述稳定剂是这样的抑制剂，例如抗微生物剂如(但不限于)能够在长期存储过程中，抑制或阻遏细菌或真菌生长，存活力和/或定居，抑制存储的样品的微生物污染的抗真菌剂和/或抗细菌剂。还可以有效用于本发明的方法中的稳定剂包括聚阳离子(参见例如 Slita 等, *J Biotechnol.* (生物技术杂志) 2007 年 1 月 20 日;127(4):679-93. Epub 2006 年 7 月 27 日), 还原剂 (例如, 二硫苏糖醇; Scopes, R.K. 1994 *Protein Purification: Principals and Practices* (蛋白质纯化: 原理和实践). 第三版, Springer, Inc., 纽约), 空间稳定剂 (诸如烷基基团, PEG 链, 多糖, 烷基胺; 美国专利号 7,098,033), 小分子, 和氨基酸 (参见例如 美国专利号 7,011,825), 和缓冲液(Scopes, R.K. 1994 *Protein Purification: Principals and Practices* (蛋白质纯化: 原理和实践). 第三版, Springer, Inc., 纽约; Current Protocols (当前方案), Protein Sciences (蛋白质科学), Cell Biology (细胞生物学), Wiley and Sons, 2003)。在某些实施方案中，稳定剂可以包括盐、甘油、清洁剂、多元醇、等渗剂、离液剂 (chaotrope)、有机溶剂、电静电试剂、金属离子、配体、抑制剂、辅助因子或底物、陪伴蛋白、氧化还原缓冲剂、二硫化异构酶或蛋白酶抑制剂，其可以促进某些生物样品，诸如蛋白的分解(参见例如美国专利 6,057,159; Scopes, R.K. 1994 *Protein Purification: Principals and Practices* (蛋白质纯化: 原理和实践). 第三版, Springer, Inc., 纽约; Current Protocols (当前方案), Protein Sciences (蛋白质科学), Cell Biology (细胞生物学), Wiley and Sons, 2003)。

根据本文所述的某些实施方案的优选的稳定剂包括生物或生物化学抑制剂，其是糖苷酶抑制剂，如海藻糖酶抑制剂 (例如, suidatrestin, 有效霉素 A, 井冈羟胺 A, MDL 26537, 海藻唑啉, salbostatin, casuarine-6-O- α -D-吡喃葡萄糖苷), 描述于 Asano(2003 *Glycobiol.*(糖生物) 13(10):93R-104R), Knuesel 等 (1998 *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 120:639), Dong 等 (2001 *J. Am. Chem. Soc.* 123(12):2733)和 Kameda 等 (1980 *J. Antibiot. (Tokyo)* 33(12):1573)。在这些发明实施方案中与这些抑制剂的使用相关的出人意料的益处来自这些抑制剂的抗微生物性质，此外，根据非限制性理论，据信它们的生物分子稳定作用来自非共

价相互作用，如在抑制剂和生物样品中一种或多种生物分子，基质物质和/或溶剂之间的氢键键合。

在其他的实施方案中，稳定剂可以是另外的糖苷酶抑制剂，如几丁质酶抑制剂(例如，allosamidin, argifin, argadin), α -糖苷酶抑制剂(例如，valiolamine, 伏格列波糖, 野尻霉素, 1-脱氧野尻霉素, 米格列醇, salacinol, kotalanol, NB-DNJ, NN-DNJ, glycovir, 澳粟精胺), 糖原磷酸酶抑制剂(例如，D-ABI, isofagomine, fagomine), 神经氨酸苷酶抑制剂(例如，DANA, FANA, 4-氨基-4-脱氧-DANA, 扎那米韦, BCX 140, GS 4071, GS 4104, peramivir), 神经酰胺葡萄糖基转移酶抑制剂或溶酶体糖苷酶抑制剂, 所述全部糖苷酶抑制剂的非限制性实例由 Asano (2003 *Glycobiol.* 13(10):93R-104R)所述。

在某些相关实施方案中，包括生物抑制剂或生物化学抑制剂的稳定剂可以是还原剂，烷化剂，抗微生物剂，激酶抑制剂，磷酸酶抑制剂，胱天蛋白酶抑制剂，粒酶抑制剂，细胞粘附抑制剂，细胞分裂抑制剂，细胞周期抑制剂，小分子抑制剂，脂质信号传导抑制剂和/或蛋白酶抑制剂。本领域技术人员了解广泛种类容易获得的抑制剂可以根据生物样品的性质和特定的目的生物活性进行选择。见，例如，Calbiochem® 抑制剂 SourceBook™ (2004(第一版)和 2007 (第二版), EMD Biosciences(EMD 生物科学), La Jolla, CA)。对于抗微生物剂，见例如 Pickering, LK, 编 2003 *Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases, 26th edition*(*Red Book: 感染性疾病委员会报告, 第 26 版*). Elk Grove Village, IL, 695-97 页.; American Academy of Pediatrics(美国小儿科研究院), 1998, *Pediatrics* (小儿科), 101(1), 增刊; *Disinfection Sterilization and Preservation* (消毒灭菌和防腐), Seymour S. Block (编), 2001 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; *Antimicrobial inhibitors*(抗微生物抑制剂), A.I. Laskin 和 H. A. Lechevalier, (编), 1988 CRC Press, Boca Raton, FL; *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*(消毒, 防腐和灭菌的原理和实践), A.D. Russell 等, (编), 1999, Blackwell Science, Malden, MA; *Antimicrobial/ anti-infective materials*(抗微生物/抗感染物质), S.P. Sawan 等, (编), 2000 Technomic Pub. Co., Lancaster, PA; *Development of novel*

antimicrobial agents: emerging strategies(新的抗微生物剂的发展:出现的策略), K. Lohner, (编), 2001 Wymondham, Norfolk, UK; Conte, J.E. *Manual of antibiotics and infectious diseases* (第9^版)(抗生素和感染性疾病手册), 2001, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia。

如上指出,在某些优选的实施方案中,稳定剂可以是海藻糖酶抑制剂,如杀真菌剂有效霉素 A (例如, Kameda 等, 1980 *J. Antibiot. (Tokyo)* (抗生素杂志(东京))33(12):1573; Dong 等, 2001 *J. Am. Chem. Soc.* (美国化学协会杂志)123(12):2733; 获自研究产品国际公司(Research Products International Corp.), Mt. Prospect, IL, 批号 V21020), 并且在某些其他实施方案中,稳定剂,例如包括作为生物抑制剂或生物化学抑制剂的抑制剂的稳定剂,可以是蛋白酶抑制剂如 TL-3 (Lee 等, 1998 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (美国国家科学院学报)95:939; Lee 等, 1999 *J. Amer. Chem. Soc.* (美国化学协会杂志) 121:1145; Buhler 等, 2001 *J. Virol.*(病毒学杂志) 75:9502), N- α -甲苯磺酰基-Phe-氯甲基酮, N- α -甲苯磺酰基-Lys-氯甲基酮, 抑肽酶, 苯甲基磺酰氟或二异丙基氟-磷酸酯(盐), 或磷酸酶抑制剂如原钒酸钠或氟化钠。

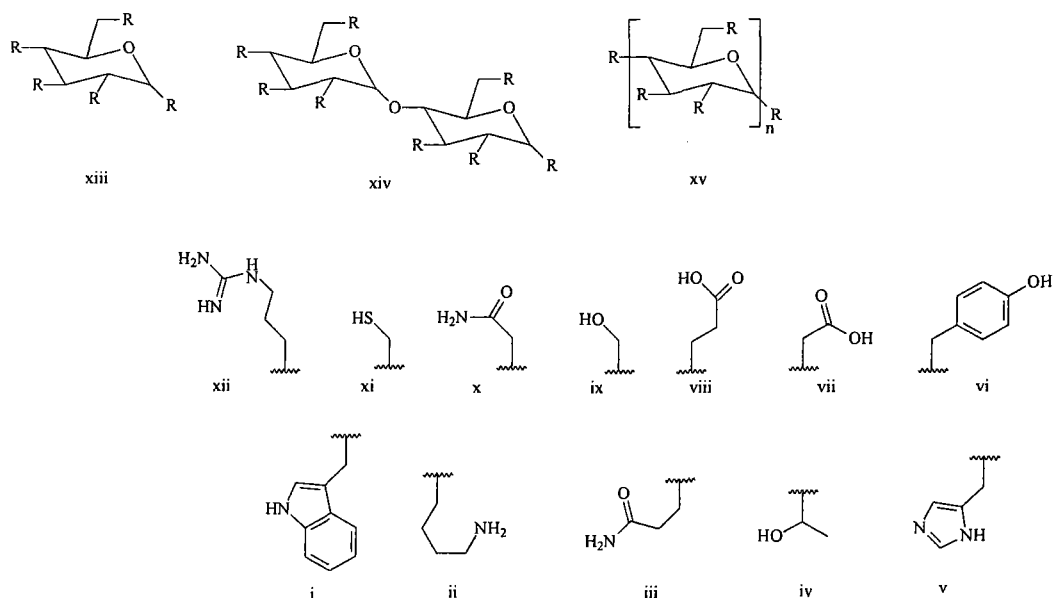
如本文所述,液体基质的另外的益处是存储容器可以直接用作反应室。液体形式的蛋白质的稳定性和活性可以取决于活性需求如 pH, 盐浓度, 和辅助因子。

生物样品中提供或来源的生物物质可以与处于液体形式的液体基质结合地加入到与孔或管中(例如,通过使样品孔与样品和溶解或解离在溶剂中的基质同时接触)。液体基质,在优选的实施方案中,在样品存储装置的孔中,不干扰生物化学反应,从而使得在进一步处理样品前,例如,在进行生物化学反应,诸如测定等前,可以不需要纯化步骤将基质与生物样品分开。然而,如果需要纯化,则液体基质可以利用本领域中技术人员公知的技术,诸如过滤、离心、离子交换、尺寸排阻、层析法、或相分离、或在相关领域中受训的人员已知的其他纯化方法从样品中除去。

因此,本发明的某些实施方案特别地意欲生物样品存储装置,其不包括海藻糖作为样品孔或基质物质的成分并且类似地某些实施方案可以清楚地从样品孔或基质物质排除聚苯乙烯和/或 hydroxyectoine 的存在。然而,考虑到本文公开的涉及它们包含作为生物样品存储装置中的抑制剂的海

藻糖酶抑制剂如有效霉素(例如,有效霉素 A,或本文所述的海藻糖酶抑制剂)的出乎意料的益处,本文意欲的某些其他实施方案可以包括第一稳定剂,其可以是海藻糖,乳糖醇,乳糖,麦芽糖,麦芽糖醇,甘露糖醇,蔗糖,山梨糖醇,纤维二糖,肌醇,脱乙酰壳多糖, hydroxyectoine, 和/或聚苯乙烯中的一种或多种,条件是第二稳定剂也存在,所述第二稳定剂是如本文提供的海藻糖酶抑制剂,例如选自 suidatrestin, 有效霉素 A, 井冈羟胺 A, MDL 26537, 海藻唑啉, salbostatin, 和 casuarine-6-O- α -D-吡喃葡萄糖苷的海藻糖酶抑制剂。根据非限制性理论,已知属于作为杀真菌剂(例如,有效霉素 A)的农业领域的海藻糖酶抑制剂,当在生物样品存储装置中与液体基质一起使用时,提供令人惊奇的稳定作用,如本文公开。备选地或另外地使用本文公开的有效霉素(或另一种海藻糖酶抑制剂)与可溶性基质的情形中,可以有效地将具有海藻糖酶抑制剂或激活剂的活性的其他小分子包括在存储装置中,作为基质物质和/或样品另外的稳定剂或添加剂,包括天然二糖,假糖(pseudo-sugar),还已知其是碳酰糖(carba sugar),和/或海藻糖酶的其他抑制剂/激活剂。此外,根据本文公开的某些实施方案,海藻糖酶抑制剂如有效霉素提供有益效果,因为它们保护长期存储介质免于真菌,细菌或其他类型的不需要的微生物污染。

意欲根据本发明的某些其他实施方案使用的另外的稳定剂可以存在于液体样品基质中,但是非共价连接于如本文公开的聚合物基质物质,并且可以包括包含结构(i)-(xv)的小分子,其包括一些已知的氨基酸侧链和单糖,二糖和多糖如



其中 R 选自 -H, -OH, -CH₂OH, -NHAc 和 -OAc。所述组合物是本领域已知的并且容易获自商业供应者。意欲根据本发明的某些其他实施方案使用的另外的稳定剂还可以包括 D-(+)-棉子糖, β-龙胆二糖, ectoine, D-(+)-棉子糖五水合物, 肌醇, hydroxyectoine, D-葡萄糖酸镁, 2-酮-D-葡萄糖酸半钙盐水合物, D(+)-松三糖, 乳糖酸钙一水合物, β-乳糖, 松二糖, 和 D-麦芽糖。

可检测的指示剂

可检测的指示剂包括这样的组合物, 即, 其允许任何可检测的参数的检测 (例如, 相对于适当的对照, 具有统计学显著性, 如本领域技术人员已知的那样) 或者相似的确定, 所述参数与生物样品中的条件、过程、路径、诱导、活化、抑制、调节、动力学结构、状态、污染、降解或其它活性或功能或结构变化直接相关, 所述参数包括但不限于, 生物样品中改变的酶促的 (包括蛋白水解的和/或溶核的), 呼吸的, 代谢的, 分解代谢的, 结合的, 催化的, 别构的, 构象的, 或其它生物化学的或生物物理的活性, 并且还包括由于这样的活性可能形成的中间体之间的相互作用, 所述中间体包括代谢物, 分解代谢物, 底物, 前体, 辅助因子等。

广泛种类的可检测的指示剂为本领域公知, 并且可以选择用于包含在目前公开的组合物和方法中, 这取决于特定的一种或多种参数, 该参数可

能为具体的样品存储应用中的具体生物样品的目的。可以被所述可检测的指示剂检测的参数的非限制性实例包括检测一种或多种下列物质的存在：胺，醇，醛，硫醇，硫化物，亚硝酸盐，抗生物素蛋白，生物素，免疫球蛋白，寡糖，核酸，多肽，酶，细胞骨架蛋白，活性氧类别，金属离子，pH，Na⁺，K⁺，Cl⁻，氰化物，磷酸盐，硒，蛋白酶，核酸酶，激酶，磷酸酶，糖苷酶，和微生物污染物，以及其它物质。

在 Haugland, 2002 *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*(荧光探针和研究产物手册)-第 9 版, Molecular Probes(分子探针), Eugene, OR; 在 Mohr, 1999 *J. Mater. Chem.* (材料化学杂志), 9: 2259-2264; 在 Suslick 等., 2004 *Tetrahedron* (四面体) 60:11133-11138; 以及在美国专利号 6,323,039 中描述了可以选择用于特殊目的的广泛范围的可检测的指示剂的实例(包括比色指示剂)。(还参见, 例如, Fluka Laboratory Products Catalog(Fluka 实验室产品目录), 2001 Fluka, 密尔沃基, WI; 和 Sigma Life Sciences Research Catalog(西格玛生命科学研究目录), 2000, 西格玛, 圣路易斯, MO.) 可检测的指示剂可以为荧光指示剂, 发光指示剂, 发磷光指示剂, 放射性指示剂, 染料, 酶, 酶的底物, 能量转移分子, 或者亲和标记。在特定的优选实施方案中, 所述可检测的指示剂可以是下列各项的一种或多种: 酚红, 溴化乙锭, DNA 聚合酶, 限制性内切核酸酶(例如, 用作限制性核酸酶的限制性酶, 诸如位点或序列特异性限制性内切核酸酶), 氯化钴(一种湿度指示剂, 当水存在时其变成蓝色, 当干燥时变为粉红色), Reichardt's 染料(Aldrich Chemical(奥尔德里奇化学))和荧光蛋白酶底物。

在特定实施方案中, 可检测的指示剂可以包括多聚核苷酸聚合酶和/或适宜的寡核苷酸, 其任何一种或两种可以用作指示剂, 或者在特定的其它实施方案中, 作为本文所述的组合物和方法的基于核酸的其它应用的组分。按照本发明的特定实施方案有用的聚合酶(包括 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶)包括, 但不限于, 嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*, (Tth)) DNA 聚合酶, 水生栖热菌(*Thermus aquaticus*, (Taq)) DNA 聚合酶, 那不勒斯栖热袍菌(*Thermotoga neopolitana*, (Tne)) DNA 聚合酶, 海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*, (Tma)) DNA 聚合酶, 海岸热球菌(*Thermococcus*

litoralis, (Tli 或 VENTTM) DNA 聚合酶, 激烈热球菌 (*Pyrococcus furiosus*, (Pfu)) DNA 聚合酶, DEEPVENTTM DNA 聚合酶, 沃氏热球菌 (*Pyrococcus woosii*, (Pwo)) DNA 聚合酶, 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus sterothermophilus*, (Bst)) DNA 聚合酶, 嗜热芽孢杆菌 (*Bacillus caldophilus*, (Bca)) DNA 聚合酶, 嗜酸热硫化叶菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*, (Sac)) DNA 聚合酶, 嗜酸热原体 (*Thermoplasma acidophilum*, (Tac)) DNA 聚合酶, 黄栖热菌 (*Thermus flavus*, (Tfl/Tub)) DNA 聚合酶, 红栖热菌 (*Thermus ruber*, (Tru)) DNA 聚合酶, 布氏栖热菌 (*Thermus brockianus*, (DYNAZYMETM)) DNA 聚合酶, 嗜热碱甲烷杆菌 (*Methanobacterium thermoautotrophicum*, (Mth)) DNA 聚合酶, 分枝杆菌属 (*mycobacterium*) DNA 聚合酶 (Mtb, Mlep), 以及其突变体, 和变体和衍生物。按照本发明, 还可以应用 RNA 聚合酶, 诸如 T3, T5 和 SP6 以及其突变体, 和变体和衍生物。

按照本发明应用的聚合酶可以是能够从核酸模板典型地以 5'-3'方向合成核酸分子的任何酶。本发明所用的核酸聚合酶可以是嗜温的或嗜热的, 并且优选嗜热的。优选的嗜温 DNA 聚合酶包括 T7 DNA 聚合酶, T5 DNA 聚合酶, DNA 聚合酶 Klenow 片段, DNA 聚合酶 III 等。可以用于本发明的方法的优选的嗜热 DNA 聚合酶包括 Taq, Tne, Tma, Pfu, Tfl, Tth, Stoffel 片段, VENTTM 和 DEEPVENTTM DNA 聚合酶, 以及其突变体, 和变体和衍生物 (美国专利号 5,436,149; 美国专利号 4,889,818; 美国专利号 4,965,188; 美国专利号 5,079,352; 美国专利号 5,614,365; 美国专利号 5,374,553; 美国专利号 5,270,179; 美国专利号 5,047,342; 美国专利号 5,512,462; WO 92/06188; WO 92/06200; WO 96/10640; Barnes, W. M., Gene 112:29-35 (1992); Lawyer 等., *PCR Meth. Appl.* (PCR 方法应用) 2:275-287 (1993); Flaman 等., *Nucl. Acids Res.* (核酸研究) 22(15):3259-3260 (1994))。

用于本文预期的特定实施方案中的其它可检测的指示剂包括亲和试剂, 诸如抗体, 凝集素, 免疫球蛋白 Fc 受体蛋白 (例如, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureas*) 蛋白 A, 蛋白 G 或其它 Fc 受体), 抗生物素蛋白, 生物素, 其它配体, 受体或反受体或其类似物或模拟物, 等等。对于这样的亲和方法, 可以制备用于免疫测定的试剂, 诸如适当标记的抗体或凝集素, 例如, 包括用放射性核素, 用荧光团, 用亲和标记, 用生物素或

生物素模拟序列标记的那些，或者作为抗体-酶缀合物制备的那些（参见，例如，Weir, D.M., *Handbook of Experimental Immunology*(实验免疫学手册), 1986, Blackwell Scientific, 波士顿；Scouten, W.H., 1987 *Methods in Enzymology*（酶学方法）135:30-65; Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*,(抗体：实验室手册) 1988 冷泉港实验室, 冷泉港, NY; Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*(荧光探针和研究产物手册)-第9版, 2002 Molecular Probes(分子探针), Eugene, OR; Scopes, R.K., *Protein Purification: Principles and Practice*, (蛋白质纯化：原理和实践)1987, Springer-Verlag, NY; Hermanson, G.T.等., *Immobilized Affinity Ligand Techniques*(免疫亲和性配体技术), 1992, Academic Press, Inc., NY; Luo 等., 1998 *J. Biotechnol.*(生物技术杂志) 65:225 以及其中引用的参考文献)。

本发明的特定其他实施方案涉及用于液体存储生物样品的组合物和方法，其中基质包含至少一种并且在某些相关实施方案中，包含两种，三种，四种，五种，六种，七种，八种，九种，十种或更多可检测的指示剂，其每个包含独特的并且容易鉴定的气相色谱/质谱分析法(GCMS)标记分子。许多这样的 GCMS 标记分子是本领域已知的并且可以为单独或组合作为可检测的鉴定部分使用而进行选择，例如编码不同样品存储装置孔中的分开的存储基质的独特的 GCMS 光谱测定模式。举例但非限制地，一种，两种或更多种所述 GCMS 标记的各种不同组合可以以容许每个孔基于其内含物的 GCMS“特征”进行鉴定的方式加入每个孔中，由此使随后从存储装置孔移出的任何样品被追溯回其起始孔以进行鉴定目的。GCMS 标记的实例包括 α,α,α -三氟甲苯， α -甲基苯乙烯，*o*-茴香胺，在限定条件下具有容易鉴定的 GCMS 特征的许多不同的可卡因类似物或其他 GCMS 标记化合物，例如如从 SPEX CertiPrep Inc. (Metuchen, NJ)获得或从西格玛奥尔德里奇(圣路易斯, MO)获得，包括在 Supelco® 2005 气相色谱法目录所述的 Supelco®产品并且可从西格玛奥尔德里奇获得。

可以将所述可溶的（或可解离的）基质应用到用于生物样品的存储容器，例如，通过将溶剂中溶解或解离的基质物质接触或施用到本文所描述的存储装置的1个或多个样品孔实现。生物样品中提供或来源的生物物

质可以与处于液体形式的存储基质结合地加入到与孔或管中（例如，通过使用样品孔与样品和溶解或解离在溶剂中的基质同时接触）。可溶解的基质，在优选的实施方案中，在样品存储装置的孔中，不干扰生物化学反应，从而使得在进一步处理样品前，例如，在进行生物化学反应，诸如测定等前，可以不需要纯化步骤将基质与生物样品分开。

可以调整在可溶基质中的缓冲条件，以使得保持生物样品的大于至少90%，优选地大于95%，更加优选地大于96, 97, 98 或99%的生物活性（例如，如本文所述和本领域已知的，酶促或亲和活性，或结构完整性或其它生物活性），这消除了费力地将所述样品从存储容器移出并且转移到分离的容器中的反应缓冲液中的需要。因此，这样特定的发明实施方案提供出乎意料的优势，即，消除了当每次要检测存储样品时，分离等分试样和/或校准特定的生物试剂的需要。

可以处理所述基质物质用于生物物质的存储和保存。很好地证明了调整缓冲条件以及添加化学制品和酶和其它试剂可以稳定DNA和RNA（例如，Sambrook, J., Fritsch, E. F.和Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆：实验室手册), Cold Spring Harbor Laboratory Press (冷泉港实验室出版社), 纽约; *Current Protocols* (当前方案), *Nucleic Acid Chemistry*(核酸化学), *Molecular Biology*(分子生物学), Wiley 和 Sons, 2003) 和/或蛋白，酶和/或其它生物物质（例如，血，组织，体液）抵抗酶、蛋白酶和环境因子的降解（例如，*Current Protocols*(目前的方法), *Protein Sciences* (蛋白质科学), *Cell Biology*(细胞生物学), Wiley 和 Sons, 2003)。还预期用于液体存储的基质组合物和组合某些化学成分以提供对生物样品的有益效果的它们的应用方法并且可以根据具体的样品和其应用改变。

各种这样的化学成分可以包括，但不限于能够维持需要的pH水平的缓冲液，如可以由熟悉本领域的技术人员所选择的，例如缓冲液包括Tris，柠檬酸盐，乙酸盐，磷酸盐，硼酸盐，HEPES, MES, MOPS, PIPES, 碳酸盐和/或碳酸氢盐或其他缓冲液(见，例如，Calbiochem® *Biochemicals & Immunochemicals Catalog* (生物化学和免疫化学目录)2004/2005, 68-69 页及其引用页, EMD Biosciences, La Jolla, CA)和用于维持，保持，增强，保护或另外有助于一种或多种生物样品成分(例如生物分子)的适合的溶质如

盐(例如, KCl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂, 等), 或活性缓冲液, 其可以针对具体生物分子的特定活性进行选择并进行优化, 如核酸杂交, 或酶, 抗体或其他蛋白质的活性, 或其他缓冲液, 例如 Tris 缓冲液(THAM, 氨丁三醇(Trometanol), 2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙二醇), Tris-EDTA 缓冲液(TE), 氯化钠/柠檬酸钠缓冲液(SSC), MOPS/乙酸钠/EDTA 缓冲液(MOPS), 乙二胺四乙酸(EDTA), 在生理 pH 下的乙酸钠缓冲液等。

可以有益地提高从可液体存储的生物样品恢复生物活性的另外的化学成分还包括但不仅限于含有液体基质(连同基质物质)的生物相容溶剂中所包含的溶质, 其中如可以由熟悉本领域的人员所述选择地, 所述溶质提供理想的等渗、高渗或低渗环境, 例如防止细胞膜破裂的等渗盐溶液。因此, 如本领域中技术人员考虑本发明公开内容应该可以理解地, 根据待以液体形式存储的具体生物样品和待由所述样品恢复的具体生物活性, 可以理想地制备具有生物相容溶剂的液体基质, 所述溶剂相对于样品是等渗、高渗或低渗的。

通过背景, 渗透休克由使细胞暴露于不同渗透压的溶液引起, 其中渗透作用涉及水穿越选择性可渗透膜的净扩散, 所述膜对于水是可双向渗透的, 但对于溶质是可变化渗透的, 其中水从一种溶液扩散到另一种较低水压中。溶液的渗透压是为了防止蒸馏水穿过半透膜(即, 对于所有溶质是不可渗透的, 但对于溶剂是可自由渗透的膜)进入其中而必须对其施加的压力, 并经常以帕斯卡测量(1 Pa=1 牛顿/m²)。相反地, 水压是任何系统将水弃至到其周围的净趋势。由于通过定义, 纯水在大气压下的水压是 0 压力单位, 所以溶质向纯水中的任何添加降低其水压并使其数值成为负值。因此, 水的运动是从具有较高(即, 较少负值)水压的系统到具有较低(即, 较大负值)水压的系统。

因此, 根据某些本文中公开的实施方案, 可液体存储的生物样品可以包括在高渗液体基质, 诸如用具有这样的溶质浓度的生物相容溶剂配制的高渗液体基质中的细胞混悬液, 所述溶质浓度高于液体溶液中存在的细胞内部的溶质浓度, 由此导致水从细胞中扩散出来。在这些和相关实施方案中, 提供具有与膜边界液体室诸如细胞内的那些的溶质浓度相比时相对更高的溶质浓度的高渗液体基质(例如, 细胞溶胶相对于液体基质是低渗

的)。这样的高渗溶液具有比对其低渗的溶液更低的水压，且具有相应更高的渗透压。因此，例如，低渗溶液具有比该溶液中混悬的细胞内部的溶质浓度更低的溶质浓度，且因此导致水扩散进入细胞。低渗溶液具有比另一种溶液相对更低的溶质浓度（即，更高的水压）。某些其他实施方案涉及可以是等渗溶液的液体基质制剂，其具有与细胞内溶质浓度相等的溶质浓度（即，如它们的渗透压所示）。通过选择可渗透膜（例如，细胞膜）分离等渗溶液导致水以任一方向穿过细胞膜的零净流量，这是因为该溶液具有相同的水压。

液体存储基质中可以包含的其他化学成分包括乙二胺四乙酸(EDTA)，人胎盘核糖核酸酶抑制剂，牛核糖核酸酶抑制剂，猪核糖核酸酶抑制剂，焦磷酸二乙酯，乙醇，甲酰胺，硫氰酸胍，氧钒-核苷复合物，硅藻土，蛋白酶 K，肝素，羟胺-氧-铜离子，硼润土，硫酸铵，二硫苏糖醇(DTT)， β -巯基乙醇或特异性抑制抗体。

因此，本发明某些实施方案意欲用于液体存储生物样品的基质，其包括在溶剂中溶解或解离的基质物质，至少一种稳定剂和样品处理组合物。所述样品处理组合物可以包括如下文所述的活性缓冲液，和/或样品处理组合物可以包括一种或多种细胞裂解缓冲液，自由基捕获剂，样品变性剂和病原体中和剂。如这些实施方案所提供，液体存储基质可以因此包括一组被制备以当样品被引入基质时影响对生物样品上的需要的处理的成分，例如在实施方案中，其中将样品与基质接触的步骤与在缓冲液中溶解或解离基质物质同时发生，或紧随其后发生。

活性缓冲液可以包括液体形式的溶剂或溶液，其包括浓缩液，其适合于存储在液体基质中的生物样品的需要用途，诸如用于所述样品的一种或多种组分的功能或结构表征。

所述应用的非限制性实例可以包括确定一种或多种酶活，确定分子间结合相互作用，检测特异的多聚核苷酸或氨基酸序列的存在，或者免疫定义的表位的存在，或者定义的寡糖结构的存在，检测具体的病毒或者微生物细胞或者人或动物细胞，确定具体的代谢物或分解代谢物，等等，其全部可以应用相关领域的技术人员清楚和已知的条件实现，其包括可以通过将所述样品与适当的活性缓冲液接触提供的适宜条件。

细胞裂解缓冲液可以是被选择用于裂解(即,破坏细胞或细胞器的边缘膜)细胞或细胞器的任何组合物,并且许多这样的制剂是本领域已知的,其基于渗透休克(例如,低渗休克)的原理和/或破坏细胞膜如质膜,其通过使用表面活性剂如去垢剂(例如, Triton® X-100, Nonidet® P-40, 十二烷基硫酸钠, 脱氧胆酸盐, 辛基-吡喃葡萄糖苷, 甜菜碱等)和/或溶质(例如, 脲, 盐酸胍, 异硫氰酸胍, 高盐浓缩物)系统进行。许多细胞裂解缓冲液是已知的并且可以适合地作为生物样品和生物分子的性质、需要恢复的生物活性或生物结构的函数进行选择, 在某些实施方案中其还可以包括选择适合的 pH 缓冲剂, 生物或生物化学抑制剂和可检测的指示剂。

样品变性剂类似地可以作为生物样品和液体存储基质的函数变化, 并且可以包括非共价改变(例如, 关于适合的对照如未处理的样品具有统计学显著性)样品中目的生物分子的三维构象, 四级, 三级和/或二级结构, 溶剂化的程度, 表面电荷模式, 表面疏水性模式或氢键形成能力至少之一的试剂。样品变性剂的实例包括离液剂(例如, 脲, 胍, 硫氰酸盐), 变性剂(例如, 十二烷基硫酸钠), 高盐条件或促进变性条件的其他试剂或试剂的组合。

用于特定实施方案的自由基捕获试剂可以包括能够从反应性化合物稳定吸附不成对游离自由基电子的任何试剂, 如反应氧种类(ROS), 例如, 过氧化物, 过氧亚硝酸盐或羟基基团, 并且潜在地其他反应种类, 并且抗氧化剂代表例性的自由基捕获剂。因此广泛种类的已知自由基捕获剂是可商购的并且可以被选择用于包含在本发明公开的组合物和方法的某些实施方案中。实例包括抗坏血酸盐, β -胡萝卜素, 维生素 E, 番茄红素, 叔-亚硝基丁烷, α -苯基叔丁基硝酮, 5,5-二甲基吡咯啉-N-氧化物, 和其他, 如在例如 Halliwell 和 Gutteridge (*Free Radicals in Biology and Medicine*, (在生物和药学中的自由基) 1989 Clarendon 出版社, 牛津, UK, 5 和 6 章); Vanin (1999 *Meth. Enzymol*(酶学方法). 301:269); Marshall (2001 *Stroke*(中风)32:190); Yang 等 (2000 *Exp. Neurol.* 163:39); Zhao 等 (2001 *Brain Res.* 909:46); 和及其它中所述。

如上指出, 某些实施方案意欲将病原体中和剂包含在本发明公开的组合物和方法中, 其包括能够完全或部分, 但在任何情况下以相对于适当的

对照具有统计学显著性的方式，中和，损害，阻抗，抑制，阻遏，防止，抵消，减少，降低或另外封闭任何病原体如细菌，病毒，真菌，寄生虫，朊病毒，酵母，原生动物，病原体或任何其他导致人或脊椎动物的疾病或病症的微生物病原体的病理作用的任何试剂。熟悉相关领域的人将意识到根据本发明的公开内容使用的适合的病原体中和剂。示例性的试剂包括叠氮化钠，硼酸盐，次氯酸钠，过氧化氢或其他氧化剂，二氯异氰尿酸钠，乙醇，异丙醇，抗生素，杀真菌剂，核苷类似物，抗病毒化合物和其他杀菌剂；这些或其他可以根据特定的目的生物样品的性质进行选择。

本文中提供的是涉及试剂盒的实施方案，所述试剂盒包括本文所述的生物样品存储装置，以及可以选择用于所需用途的一种或多种辅助试剂。任选地，所述试剂盒还可以包括盒，罩，罐，桶，抽屉，橱，纸板，载体，把手，架，托盘，盘，箱，袋，封套，套，壳等，诸如任何其它适合的容器。辅助试剂可以包括如本文所述并为本领域已知的一种或多种溶剂或缓冲液，并且在特定的实施方案中，可以包括活性缓冲液。

预期本发明将在高通量的筛选中有主要用途；即，在大量的生物样品的自动化检测或筛选中。例如，它在筛选合成或天然产物文库寻找活性化合物中具有特别的用途。因此，本发明的设备和方法易于进行自动化的、经济的高通量的生物样品检测或者药物筛选，并且在广泛的制药学药物开发程序中具有直接的应用。典型地，并且在诸如用于高通量药物筛选的特定的优选实施方案中，候选试剂作为化合物、组合物或分子的“文库”或集合提供。这样的分子典型地包括在本领域已知为“小分子”并且具有小于 10^5 道尔顿，优选地小于 10^4 道尔顿并且更优选地小于 10^3 道尔顿的分子量的化合物。候选试剂还可以作为组合文库的成员提供，其优选地包括按照在多种反应容器中完成的多种预定的化学反应制备的合成试剂，所述反应容器可以作为在按照本公开的存储装置中的孔提供。例如，应用一种或多种固相合成，已记录的随机混合方法和已记录的反应分裂技术可以制备各种起始化合物，所述方法和技术允许假定的组分可追踪地经历多种反应条件的置换和/或组合。由此获得的产物包括可以接着进行重复选择和合成流程进行筛选的文库，诸如肽（参见，PCT/US91/08694 和 PCT/US91/04666）或者可以包含本文提供的小分子的其它组合物（参见，例如，

PCT/US94/08542, EP 0774464, U.S. 5,798,035, U.S. 5,789,172, U.S. 5,751,629) 的合成组合文库。

用于保存, 跟踪和检索与生物物质相关的数据的系统

在上述各种实施方案中的前述存储装置可以与其它技术组合, 以提供用于生命科学应用的样品存储和样品管理的综合。本发明的这一实施方案能够综合生物样品存储, 定位, 跟踪, 处理以及样品数据管理。通过将数据与样品存储装置的直接物理联合, 关于样品的数据可以与样品的定位相关。所述存储的信息可以用附加数据更新, 所述数据源于存储目录以及在与多步骤生物研究协议, 生产方法, 筛选, 生物检测, 病史, 临床试验数据, 以及其它来源的研发信息的组合中对样品的跟踪。与样品相关的数据可以通过安全的分等级软件和网络结构进行传输和共享, 所述等级软件和网络结构能够连接多用户, 多网点的环境。

理想地, 通过联合的电子接口、优选地通过诸如射频识别(RFID) 应答器之类的无线接口将关于样品的信息与样品存储装置整合。尽管条形码在过去就已经用来识别样品, 但是这一技术具有局限性, 使其不适合用于本发明。这些局限性包括需要的视线 (line-of-sight) 通向条形码以便信息传输、有限的信息容量、和诸如灰尘, 湿气的环境因素的干扰, 等等。射频识别技术克服了这些缺点。

应用无线设备的远端通信典型地依赖射频(RF)技术, 其应用在许多行业中。RF 技术的一种应用是定位、识别和跟踪目标如动物、存储目录以及交通工具。公开 RF 识别标记系统的出版物的实例包括美国专利号 6,696,028; 6,380,858; 和 5,315,505 的公开内容。

已经开发了有助于监测远端目标的 RF 识别(RFID)标记系统。如在图 6 中所示, 基本的 RFID 系统 10 包括 2 个组件: 询问器或阅读器 12, 和应答器 (通常叫作 RF 标记) 14。询问器 12 和 RF 标记 14 包括各自的天线 16, 18。在操作中, 询问器 12 通过其天线 16 将射频询问信号 20 传输到 RF 标记 14 的天线 18。响应接收到询问信号 20, RF 标记 14 产生调幅响应信号 22, 其通过标记天线 18 经过被称为背向散射的过程被传输回到询问器 12。

常规 RF 标记 14 包括调幅器 24，其具有连接在标记天线 18 和地面之间的开关 26，诸如 MOS 晶体管。当 RF 标记 14 被询问信号 20 激活时，基于一种信号码，典型是一种标识码，驱动器（未显示）产生调制开/关信号 27，其存储在 RF 标记 14 的非暂时性存储器（未显示）中。将调制信号 27 施加到开关 26 的控制终端，其引起开关 26 交替地开和关。当开关 26 打开时，标记天线 18 将一部分询问信号 20 作为响应信号 22 的一部分 28 反射回到询问器 12。当开关 26 闭合时，询问信号 20 通过开关 26 传播到地面，不被反射，由此产生响应信号 22 的零讯号部分 29。换句话说，通过依据调制信号 27 交替地反射和吸收询问信号 20，对询问信号 20 进行幅度调制，以产生响应信号 22，所述响应信号 22 的特征在于存储的信息码。RF 标记 14 还可以被改进，从而当开关 26 闭合时询问信号被反射，当开关 26 打开时，询问信号被吸收。当接收到响应信号 22 时，询问器 12 将响应信号 22 解调，以解码由所述响应信号代表的信息码。因此，常规的 RFID 系统在单频振荡器上操作，所述单频振荡器中 RF 标记 14 调制 RF 载波频率，以向询问器 12 提供 RF 标记 14 存在的指示。

RFID 系统的主要优势是非接触、非视线技术能力。询问器 12 发射具有 1 英寸-100 英尺或更远的射程的询问信号 20，这取决于其功率输出和所用的射频。标记可以通读各种物质，诸如气味，雾，冰，颜料，污垢，以及其它条形码或其它视觉阅读技术将失去效用的视觉上和环境上的严酷条件。RF 标记还可以以显著的速度读取，在大部分情形中在少于 100 毫秒内做出响应。

典型的 RF 标记系统 10 通常包含许多 RF 标记 14 和询问器 12。RF 标记分成 3 个主要种类。这些种类为束动力（beam-powered）被动标记，电池动力半被动标记，和主动标记。每一种类以基本上不同的方式运转。

由于所述束动力 RF 标记从定向于其的询问信号获得对于其运转所需的能量，所以束动力 RF 标记通常被称为被动装置。所述标记校正场（field）并且改变标记本身的反射特征，产生询问器可见的反射率变化。电池动力的半被动 RF 标记以相似的方式运转，为了将增量（delta）反射到询问器，发生通信连接，调制其 RF 截面。这里，电池是标记的操作电力源。最终，在主动 RF 标记中，发射机用于产生由电池提供动力的、其本身射频。

在本发明优选的实施方案中，所述系统由 3 部分组成，可消耗的（consumable）硬件装置，存储目录和管理软件，和在所述硬件装置和软件之间的 RFID 接口。参考图 7，其中显示按照本发明的一个实施方案制成的系统 100，其包含上文描述的存储装置 102、优选在计算机系统 106 中实现的存储目录和管理软件组件 104、以及与存储装置 102 和软件 106 相连的射频识别接口 108。优选地，RFID 接口 108 包括与存储装置 102 联合（associate with）的应答器 100 和与计算机执行系统 106 相连的询问器 112。

在这一实施方案中，应答器 110 与样品存储装置 102 联合，诸如通过将应答器 110 黏附到存储装置 102 的外表面实现。然而，应该理解应答器 110 可以黏附于或者联合于管，平板，架，或者甚至是存储装置 102 在其中保持的场所。尽管优选单个应答器 110 应该与单个存储装置 102 联合，但是可能地，保存在存储装置 102 中的每个具体的样品可以使得应答器 110 与其联合。

可以在存储装置 102 制备过程中获得联合，以致将应答器 110 嵌入存储装置 102 中，或者在存储装置 102 已经制备完成后，诸如通过粘合附着于存储装置 102 上。在其各种实施方案中，由于磁力是用于样品存储装置 102 的优选连接机制，本技术领域的普通技术人员应该理解，可以需要适当的屏蔽以防止无意中改变存储在应答器 110 中的信息，并且防止干扰应答器 110 与询问器 112 之间的射频通信。

可以预先利用关于存储装置 102 和保持在存储装置 102 中的样品的数据对应答器 110 编程，所述数据包括所有权信息，定位信息，分析信息，生产方法，临床试验实施，合成方法，样品收集，以及对本领域的技术人员已知的在管理样品中有用的其它信息。除了预先编程所述数据，可以设置应答器 110，以允许对其存储区的数据进行改进和更新。另外，应答器 110 将包含安全结构，其精确说明了每种类型的数据的访问条件，由此限制读，写和更新。例如，可以将 RFID 接口 108 组件设置成接收控制信号，所述控制信号来自并且响应具体的计算机执行数据处理系统，诸如下文所述的软件应用。另外，可以将写入应答器 110 的数据加密，用于认证和安全目的。

RFID 应答器或者芯片的应用提供了较宽的温度范围 (-25℃-+85℃)、而没有功能性损失的益处。另外,可以应用应答器 110 来控制远端装置,诸如信号灯或者音响发生器,用于警告和定位与应答器 110 相关的目标。如果在计算机执行系统 106 中的数据被破坏或者丢失,在应答器 110 中的信息存储还提供额外的文件备份。

询问器 112 是一种常规的射频识别阅读器,其连接到计算机执行系统 106 上。命令和控制信号由系统 106 产生,以发起 1 个或多个应答器 110 的问询,和接收由此产生的响应,所述响应由计算机执行系统 106 中的软件 104 处理。在一种配置中,可以通过来自询问器 112 的通信来重新编程应答器 110,以取代或者更新存储在其中的数据。

在一个执行中,将 1 个或多个询问器 112 定位在足够距离处的一个装置内,以便通过射频信号、诸如微波信号,与应答器 110 通信。多个询问器 112 可以用于多种种类的应答器 110 或者用于单个的应答器 110。备选地,一种应用已知技术的问询机可以与多种应答器 110 以连续的方式或者同时在多频上进行通信。在处理样品存储装置 102 或者单个样品的应用中,位于结构内的不同位置的或者沿着传播路径放置的多个询问器,可以用于跟踪样品的定位和状况,其中所述传播路径诸如输送机系统或者运送系统例如货运航线、火车等。这包括校验标本或者存储装置 102 位于其中的环境因素,诸如温度,湿度,压力,等等。

因此,可以扩展 RFID 接口 108,以监测和处理与样品或者存储装置 102 的运转和分析相关的数据,所述样品或者存储装置 102 位于实验室内,由实验室机器人操作,等等,诸如在生物生产过程中或者在实行实验步骤过程中。通过自动化或者半自动化的研究流程,这还在质量控制中和在生物样品处理中有帮助。

如上文提及的,通过应用本文所述的在样品存储装置上的 RF 应答器与计算机执行系统之间的 RF 接口放置样品,有助于样品存储和跟踪,这通过标记和监测诸如存储架,存储室,冷冻库,实验台,桌面或书架的存储位置来实现。

为了跟踪具体的存储装置 102 或者样品,设置应答器 110 以激活远端装置,诸如位于存储装置上的闪光灯,与存储装置联合的音响装置,或者

存储装置的颜色改变,其可以被人或者被自动化系统识别,从而能够快速检索到所述样品。另外,当环境条件超过预定的环境范围时,设置应答器 110 以激活远端警告器,所述环境条件包括但不限于,温度,压力和湿度。在一个实施方案中,应答器 110 为被动装置,其由问询信号激活,其从所述问询信号汲取运行动力 (operating power)。当应答器 110 用于激活远端装置或者增加通信射程时,如上文所述,所述应答器可以是半主动的。备选地,当要从应答器 110 读取或者写入大量的数据或者增加的射程是需要的时,可以应用主动的应答器。射程还被频率影响,其在本领域内已知,并且普通技术人员依据环境和功能目标选择适当的频率射程。例如,特定的样本可能对特殊频率的无线电信号敏感,并且这样的频率需要避免,或者当设计系统 100 时适当地将样本屏蔽。

将存储目录和管理软件 104 定制成适用于无线通信系统和与生命科学相关的数据的处理。在一个实施方案中,它由定制的用户接口和一套预先确定的数据库表格组成。用户可以输入样品相关数据或者输入外部来源信息。在数据库中提供预先确定的表格有助于系统设置,但是用户可以在所述表格内选择定制区域。有关数据库可以包括用于 DNA 样品,克隆,寡核苷酸,PCR 片段,cDNA,化学化合物,蛋白,代谢物,脂质,细胞级分,诸如病毒、细菌、或者多细胞生物体的不同生物体的生物样品,诸如血、尿和口腔拭子的患者样品的表格。将详细的样品信息和样品相关数据编程输入所述表格中。例如,样品信息可以包括样品来源,克隆名称,基因插入物名称,插入物大小,插入物序列,修饰,载体名称,载体大小,抗生素选择,诱导,终止子,克隆区域 (sight),5'-标记,3'-标记,纯化标记,寡核苷酸名称,纯化,质量控制,正向引物,反向引物, T_m 值,以及大小选择。临床患者信息可以是,例如,年龄,性别,居所,种族,身体质量指数 (body mass index),家族史,药物治疗,症状发作数据,疾病持续时间,以及医学测试。样品相关的数据可以由不同来源的研究数据组成,诸如,例如,来自 DNA 测序仪的序列信息,来自微阵列芯片的转录图谱信息,来自蛋白质印迹法或者原位杂交的蛋白数据,用于药物发现的生物测定数据,高通量输入药物筛选数据,化学制品文库合成数据,等等。数据可以以文本,数字,表格或者图像形式提供。

所述软件还可以连接其它数据来源并且综合来自公共领域的信息，诸如 GenBank, SwissProt, 以及其它相似的领域或者私人拥有的来源。理想地，所述软件能够与机器人设备相接，以在处理过程中跟踪样品，并且处理过程的跟踪可以显示为针对在样品装置中存储器以及数据库的累积样品史，诸如在 RFID 应答器 110 内的存储。

设计所述软件，以便产生信息学下层结构 (informatics infrastructure)，其中单个用户产生它们的数据和信息集合，其最初被存储在局部数据库形式的本地工作站。然而，在分等级环境中，所述软件能够连接多个用户。最好可以将单个用户积累的信息上载到服务器上的中央数据库系统。网络环境的相互作用还可以是网络浏览器接口。可以将多用户环境扩展为多网点环境，并且可以将软件和数据库定位在个人计算机上，内部网内的服务器上，或者在互联网上，诸如电子商务(e-commerce)网点。访问控制和登录 (log) 控制系统也提供在软件中。

在图 8 中显示了计算机执行系统结构 114, 通过 1 个或多个询问器 120 将局域网 116 与应用程序处理器 118 相接，所述询问器 120 与 1 个或多个远端 RFID 标记 122 通信。应用程序处理器 118 与数据库 124 耦合。应该理解所述局域网可以替代地为全球网，诸如互联网，在所述情形中，将应用基于网络的应用程序。

理想地，在一个实施方案中，存储目录和管理软件 104 具有 3 个组件，前端软件组件，中间设备组件，和后端软件组件。

可以预想应用所述前端软件产生“用户接口”。例如，这可以为网络浏览器或者 Microsoft Excel 或类似的网格成分。所述网络浏览器软件将用于基于网络的系统 100，而 Microsoft Excel 软件将用于桌面系统。基于网络的选项为多用户提供网络，并且可以进行扩展以容纳数千用户。对于不期望通过网络共享数据和样品信息的单个用户，所述桌面选项是足够的。

所述中间设备可以包括 Microsoft Excel 宏或网格成分，其开发用作桌面选项，或者定制的软件，其通过适用于基于网络的系统应用的程序设计语言，诸如 PHP 产生。将中间设备设置成为程序包，其能够接收用户输入和询问，并且通过已知的输出，诸如打印机，显示器或音响输出，向用户返回数据库信息。

所述后端软件优选地为 Microsoft Access，其为私人所有的（proprietary）数据库软件，由美国微软公司（Microsoft Corporation）提供并且由 Microsoft Excel 所有。这一特别的程序提供足够的数据库容量，足以支持达到 50,000 个记录，并且随着性能降解（performance degradation）水平的增大达到最大量 100,000 个记录。另一个选择是 MySQL，其是一种协作开发的免费数据库软件，并且无需付费即可应用，其在所有主要服务器上运行，包括那些基于 Windows 和 Linux 平台的服务器。这一数据库能够处理数百万的记录，并且适用于巨大组成机构的用户，诸如政府机构，大学和跨国机构。

配置软件 104 以向 RFID 接口 108 提供控制信号，并且接受来自接口 108 的数据和信息。另外，当将信息提供给应答器时，设置软件 104 以启动通过询问器 112 向应答器 110 的数据写入，其应用本领域已知的方法和设备，并且其可以商购。

图 9 举例说明另一个系统结构 128，其中数据库 130 通过网络服务器 134 与多个桌面计算机 132 链接。在服务器 134 上驻留的是提供了用户、数据库 130 和台式计算机 132 上驻留的桌面软件 136 之间的通信层的软件。使用网络浏览器接口 138，用户可以通过标准的 USB 连接 140 连接 RFID 阅读器 142。然后，利用由射频通信提供的无线连接 146，用户可以控制 RFID 阅读器 142 和远端 RFID 标记 144 的读和写操作。

接着参考图 10，其中显示的是本发明的另一个实施方案，其应用 3 层结构 148，所述 3 层结构 148 具有桌面计算机 150，其通过网络服务器 152 上的网络服务器中间设备 156，将前端网络浏览器 158 连接到后端数据库 154 上。所述中间设备对用户具有搜索，检索和显示的能力。更具体地，商业逻辑（business logic）包含在网络服务器 152 上的中间设备程序 156 上。另外，存在（任选地）RFID 阅读器 160，其通过 USB 连接 162 连接到桌面计算机 150 上的客户端程序 164。从网络浏览器 158 发射通过阅读器 160 读取和写入 RFID 标记 166 的所述客户端应用程序。

在这一结构 148 的备选的 2 层排列中，在台式计算机 150 上存在 Excel 前端程序，其直接与后端的数据库 154 通信。这里的商业逻辑体现为 Excel 宏程序。对于将数据（例如，与平板中的每个孔对应的 96 排数据）加载

到数据库，以便有效利用 Excel 功能，诸如复制，下拉（dragging down）等，该方法是特别有效的。

在结构 148 的其它备选 2 层排列中，前端处的单机客户应用程序 170 直接与后端处的数据库 154 通信。商业逻辑包含在单机的客户应用程序内，并且用于从 RFID 标记 166 读取和写入的模块还可以包含在这种应用程序 170 内。这里的优势是所述应用程序是编译的（源代码不可见），并且不需要第三方软件（Excel，网络服务器）。缺点是其不如上述 3 层结构那样网络兼容。

下述实施例通过举例说明并且不限制的方式进行描述。

实施例

实施例 1

血液的存储

本实施例描述可液体存储的生物样品的制备和表征。在这个和以下实施例中，基本按照已知的方法学使用了标准细胞和分子生物学技术(例如, Sambrook, J., Fritsch, E. F.和 Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆: 实验室手册), Cold Spring Harbor Laboratory Press (冷泉港实验室出版社), 纽约; *Current Protocols* (当前方案), *Nucleic Acid Chemistry* (核酸化学), *Molecular Biology* (分子生物学), Wiley and Sons, 2003; *Current Protocols* (当前方案), *Protein Sciences* (蛋白质科学), *Cell Biology* (细胞生物学), Wiley and Sons, 2003)。除非另外说明，这个和以下实施例中的所有试剂来自西格玛-奥尔德里奇 (Sigma-Aldrich) (圣路易斯, MO)。

为了室温存储血液，使用 10mM Tris pH 8.0 制备 1% 聚乙烯醇(PVA, 西格玛-奥尔德里奇 (Sigma-Aldrich) 号. P8136)基础(basic)存储基质。检测聚合物的浓度在 0.1%-10% (w/v) 范围内。检测所述基质的 pH 在 pH 5-8 范围内。为了方便的检测生物样品，将酚红以 0.002 % (w/v) 添加到液体基质中。将 20 μ l 全血的样品与 50 μ l 1% PVA 基础液体存储基质混合、密封并以环境温度（室温）存储在聚丙烯 96 孔板中。等体积全血在无基质的条件下，以 -20°C 存储在密封的聚丙烯 96 孔板中。4 个月后，利用苯酚/

氯仿从冷冻和室温存储的样品中提取基因组 DNA。提取的 DNA 的 5 μ l 等分试样用于定量 PCR (QPCR)，重复三次。QPCR 利用 SYBR green (Applied Biosystems, Inc. (应用生物系统公司), Foster City, CA; “ABI”) 技术，在 ABI 7300 序列检测系统(ABI)上进行，并用引物快递 3.0 (Primer Express 3.0) 设计关于人 β -肌动蛋白的引物。关于人 β -肌动蛋白的正向引物的序列是 5' ACCGAGCGCGGCTACAG [SEQ ID NO: 1]，且人 β -肌动蛋白的反向引物的序列是 5' CTTAATGTCACGCACGATTTCC [SEQ ID NO: 2]。每份样品含有 5 μ l 模板，6.5 μ l Power SYBR green PCR 标准混合物(ABI) 和 0.5 μ l 各种引物 (10 μ M 的终浓度)，其总最终体积为 25 μ l。所用的循环参数是最初在 95°C 变性 10 分钟，随后 95°C，15s 和 60°C，1 分钟循环 40 次。结果显示在图 1 中。如通过 QPCR 所测定地，与无存储基质条件下冷冻存储的血液相比，源自以室温存储在液体存储基质中的血液的基因组 DNA 保持显著量的完整基因组 DNA。

实施例 2

RNA 的存储

将 1 μ g ssRNA 序列梯样品(New England Biolabs, Inc. (新英格兰生物实验室公司), Beverly, MA; “NEB”)混悬在 10 μ l 1% PVA 基础液体存储基质 (如以上实施例 1 中所述制备的) 中并将等量对照样品混悬在水中并将这两种制剂在环境温度 (室温) 下存储在实验室台面上。另外的处于基础液体存储基质中的样品冷冻存储在 -20°C。6 天后，对样品增补 10 μ l RNA 凝胶加样染料(NEB)并在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离，然后用溴化乙锭对其进行染色，以显现 RNA。结果显示在图 2 中。与保持在 -20°C 或室温下的处于液体存储基质中的样品相比时，存储在水中的 RNA 显著降解。

实施例 3

质粒 DNA 的存储

将 1 ng pDNA (pUC19)样品(NEB)重新混悬在 1% PVA 基础液体存储基质 (如以上实施例 1 中所述制备的) 或水中。将样品置于 70°C 烤箱中 3 天。将对照样品以 -20°C 存储在水中。为了 PCR 分析，每个反应物包含 2.5

U Taq DNA 聚合酶(New England Biolabs, Inc.(新英格兰生物实验室公司)), 3 μl 10x 反应缓冲液(NEB), 0.5 μl dNTPs (10 μM 各种核苷酸), pUC19 正向引物(5'-ACCGCACAGATGCGTAAGGAG) [SEQ ID NO: 3]和 pUC19 反向引物(5'-TTCATTAATGCAGCTGGCACG) [SEQ ID NO: 4], 每种引物在 30 μl 的最终体积中的终浓度是 0.2 μM 。循环参数是最初在 94°C 变性 5 分钟, 随后 94°C, 15 秒, 55°C, 30 秒和 72°C, 30 秒循环 30 次。PCR 反应物(10 μl)通过 0.8%琼脂糖凝胶电泳分析, 随后进行溴化乙锭染色。结果显示在图 3 中。室温存储在水中的质粒 DNA 的完整性明显受损, 因为物质不能被扩增。然而, 保持在液体存储基质中的质粒 DNA 的完整性足以使得存储的物质可以以与对照样品相比不显著损失的扩增效率被扩增。

实施例 4 酶的存储

将 2.5 U Taq 聚合酶(NEB)的样品加入到 10 μl 1% PVA 基础液体存储基质(如以上实施例 1 中所述制备的)中, 或 10 μl 水中, 并在 25°C 或 50°C 存储 21 天(加快的熟化条件)。另外的 Taq 聚合酶样品存储在 -20°C, 作为阳性对照。为了 PCR 分析, 每个反应物包含 50 ng pUC19 质粒 DNA, 3 μl 10x 反应缓冲液(NEB), 0.5 μl dNTPs (10 μM 各种核苷酸), pUC19 正向引物(5'-ACCGCACAGATGCGTAAGGAG) [SEQ ID NO: 3]和 pUC19 反向引物(5'-TTCATTAATGCAGCTGGCACG) [SEQ ID NO: 4], 每种引物在 30 μl 的最终体积中的终浓度是 0.2 μM 。循环参数是最初在 94°C 变性 5 分钟, 随后 94°C, 15 秒, 55°C, 30 秒和 72°C, 30 秒循环 30 次。10 μl 的每种 PCR 反应物通过 0.8%琼脂糖凝胶电泳分析, 随后用溴化乙锭染色该凝胶。结果显示在图 4 中。以室温(25°C)或 50°C 存储在液体存基质中的 Taq 聚合酶在 PCR 反应中能够具有酶活性, 而存储在水中的酶不能扩增核酸, 这说明损失了酶功能和完整性。

实施例 5 细菌细胞的存储

使用含有 pFIV-C 质粒(13kb)的 Stb12 大肠杆菌(Invitrogen, Carlsbad,

CA)的液体过夜培养物。将该培养物的 5 μ l 样品与 20 μ l 1% PVA 基础液体存储基质（如以上实施例 1 中所述制备的）或液体 Luria 培养液（LB）在管中混合并室温存储 2 个月。样品然后用于接种 3 ml LB/氨苄青霉素(10 mg/ml)并在摇动器上以 37°C 过夜生长 18h。利用碱裂解法提取质粒 DNA(Sambrook, J., Fritsch, E. F.和 Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆: 实验室手册), Cold Spring Harbor Laboratory Press (冷泉港实验室出版社), 纽约)。然后用 *Eco*RI (NEB)消化纯化的质粒 DNA, 并与对照质粒 DNA 并排在 0.8%琼脂糖凝胶上跑电泳, 然后用溴化乙锭染色该凝胶。结果显示在图 5 中。从源自甘油储液的细菌（阳性对照）或以室温保持在液体基质存储物中的细胞中检测到具有预期尺寸的质粒 DNA。源自以室温存储在 LB 中的细胞的样品中缺少正确尺寸的条带, 这说明当以这样的条件保持细菌时, 损失质粒。

从前文, 应该理解, 尽管为了举例说明的目的本文已经描述了本发明的具体的实施方案, 但是在不背离本发明的精神和范围下, 可以进行各种修改。因此, 除了所附权利要求外, 本发明不受限制。

<110> 生物马特里卡公司 罗尔夫·穆勒 朱蒂·穆勒-科恩	
<120> 用于生命科学的样品存储	
<130> 150079.402PC	
<140> PCT	
<141> 2003-04-23	
<150> US 60/913,781	
<151> 2007-04-24	
<160> 4	
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0	
<210> 1	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物	
<400> 1 accgagcgcg gctacag	17
<210> 2	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物	
<400> 2 cttaatgtca cgcacgattt cc	22
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物	
<400> 3 accgcacaga tgcgtaagga g	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物	
<400> 4 ttcattaatg cagctggcac g	21

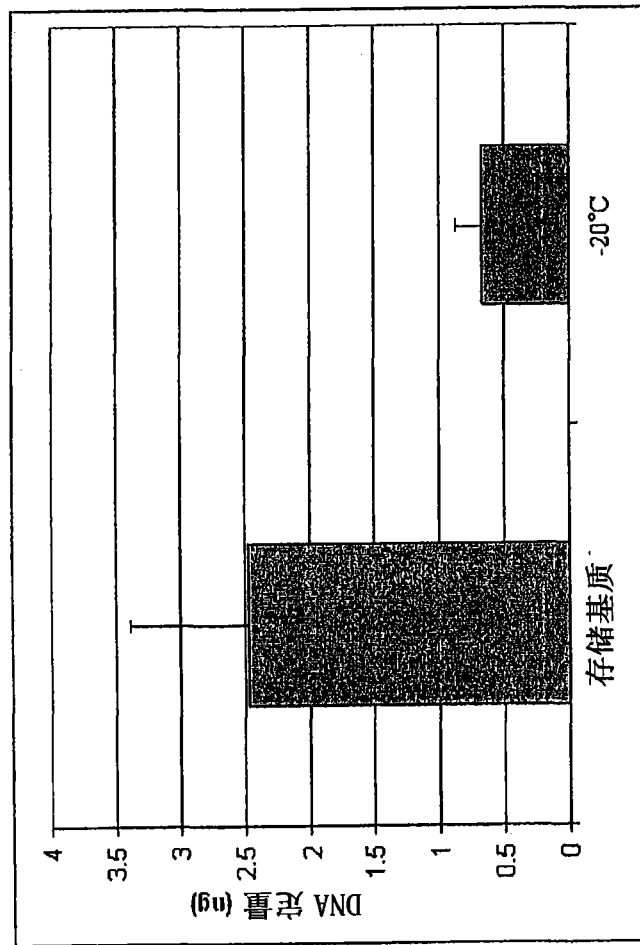


图 1

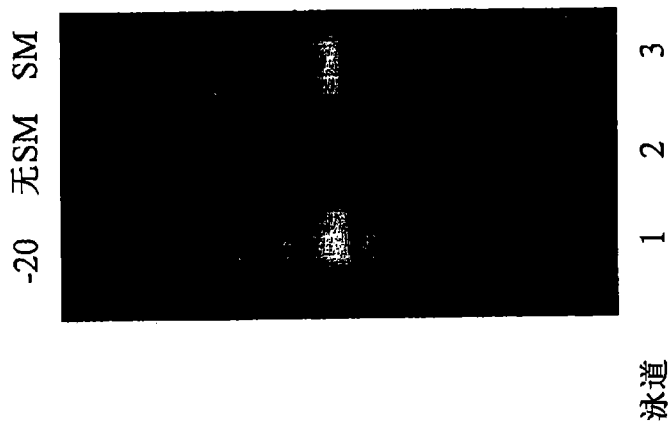


图 2

NC: 阴性对照 (无 DNA)
C: 冷冻存储在水中的 1ng DNA 对照
SM: 处于 70°C 液体存储基质中的 1ng DNA
H₂O: 处于 70°C 水中的 1ng DNA

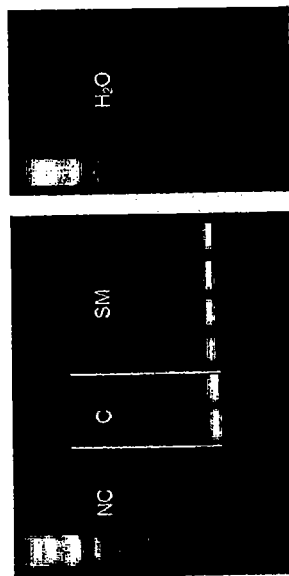


图 3

Taq 聚合酶的稳定性 (加快的熟化)
(在 25°C 或 50°C 存储 21 天)

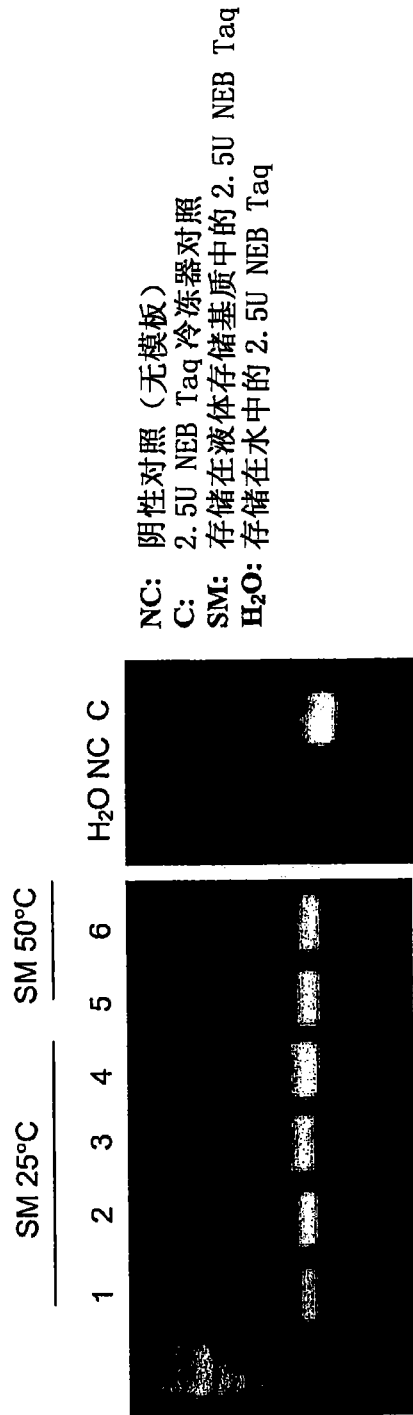


图 4

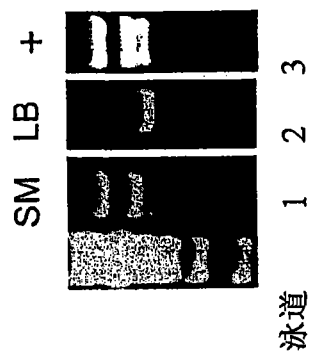


图 5

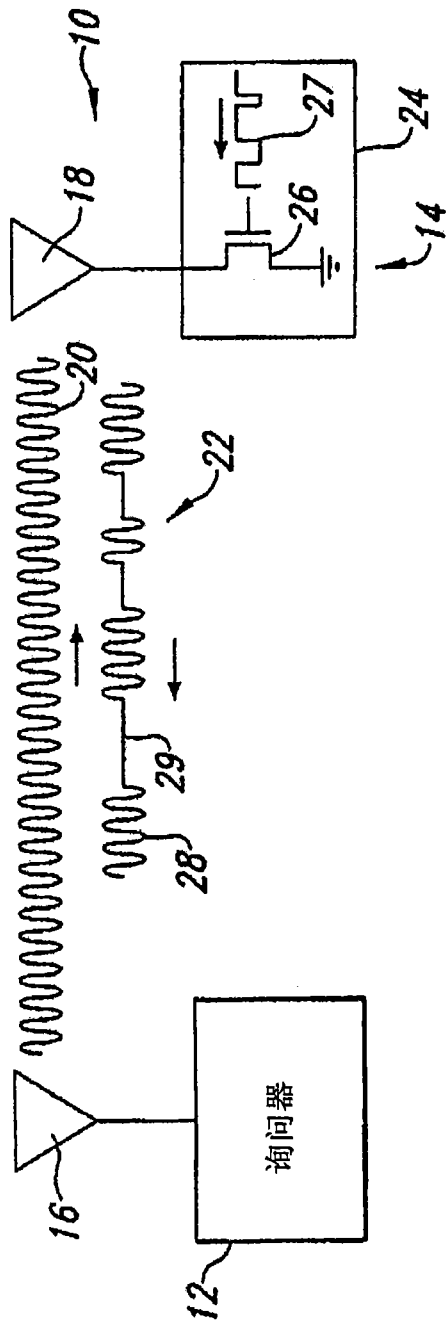


图 6

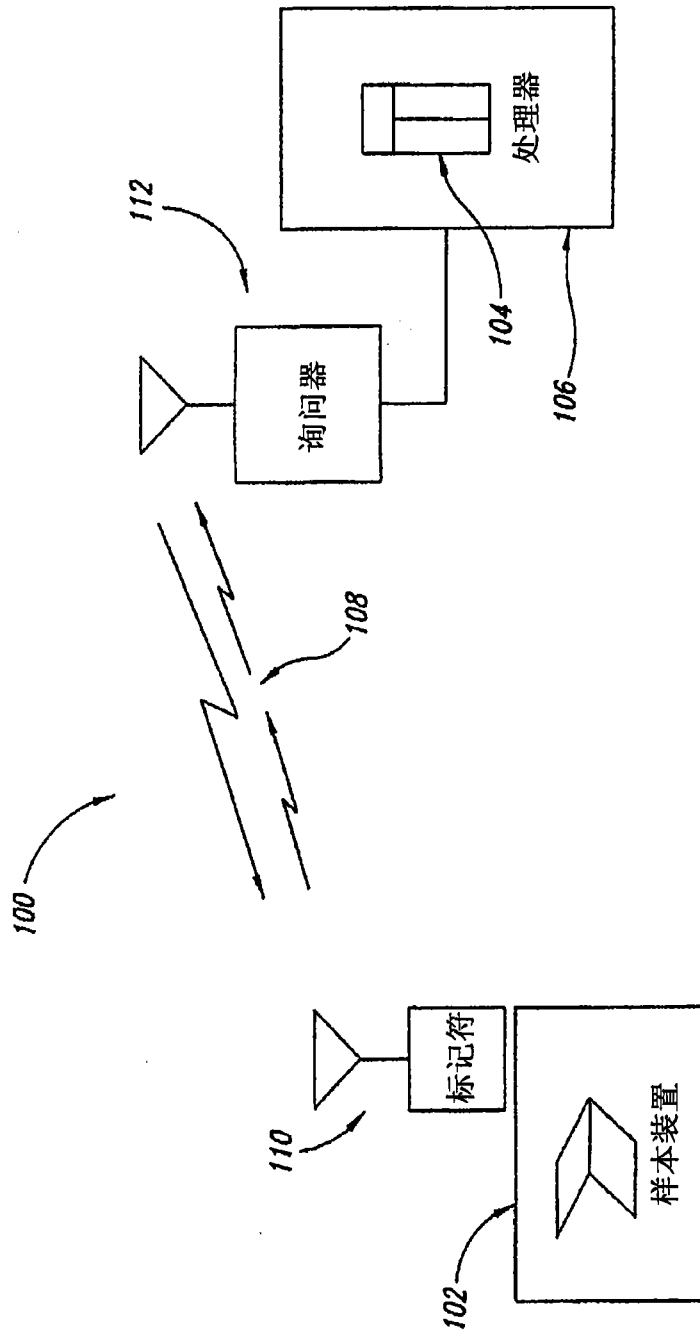


图 7

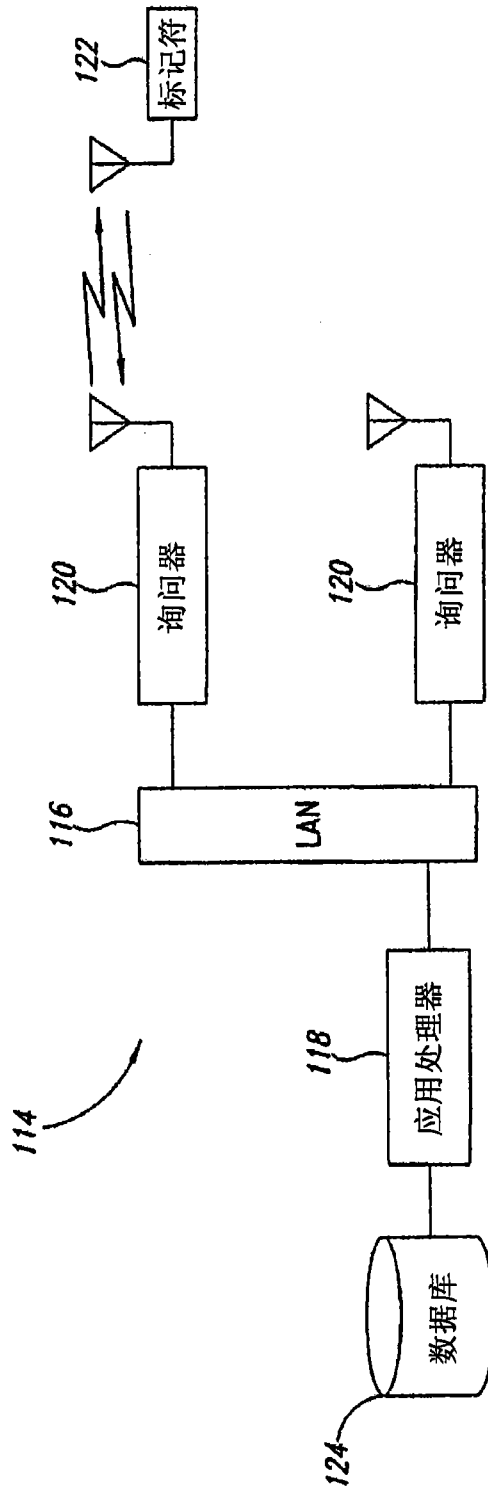


图 8

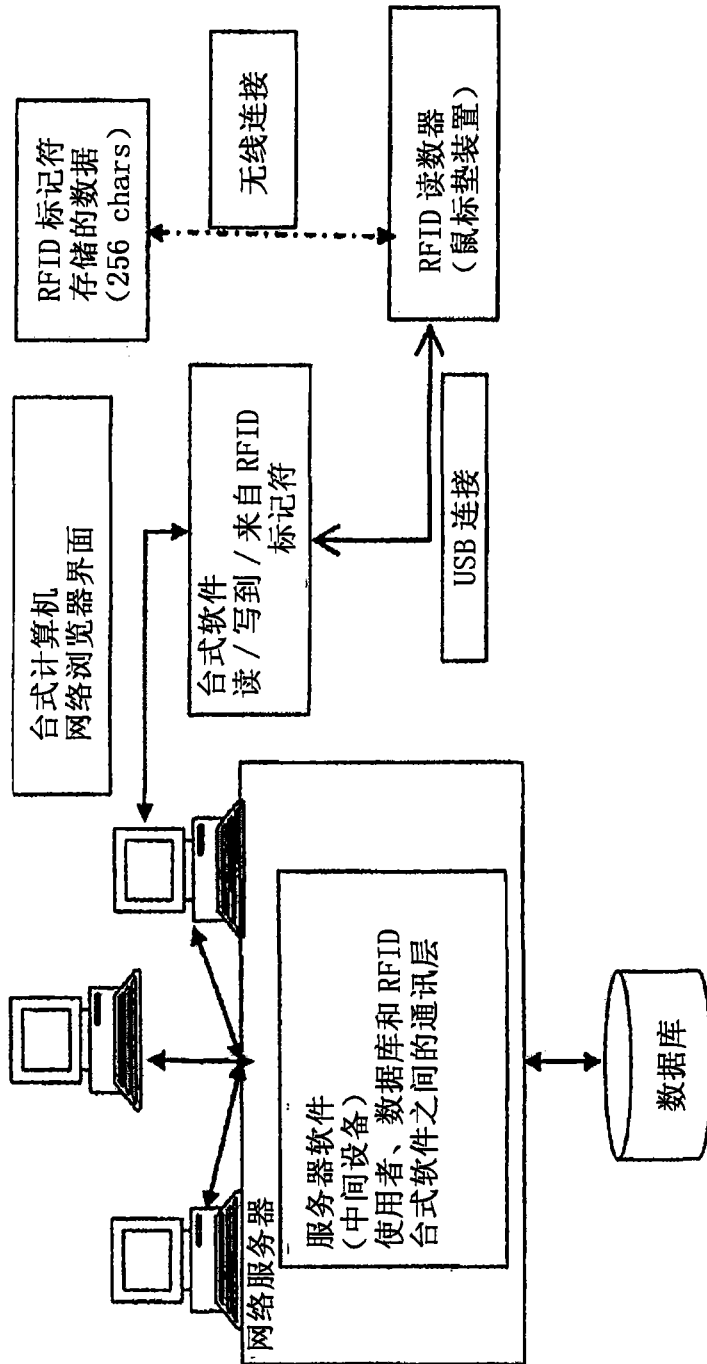


图 9

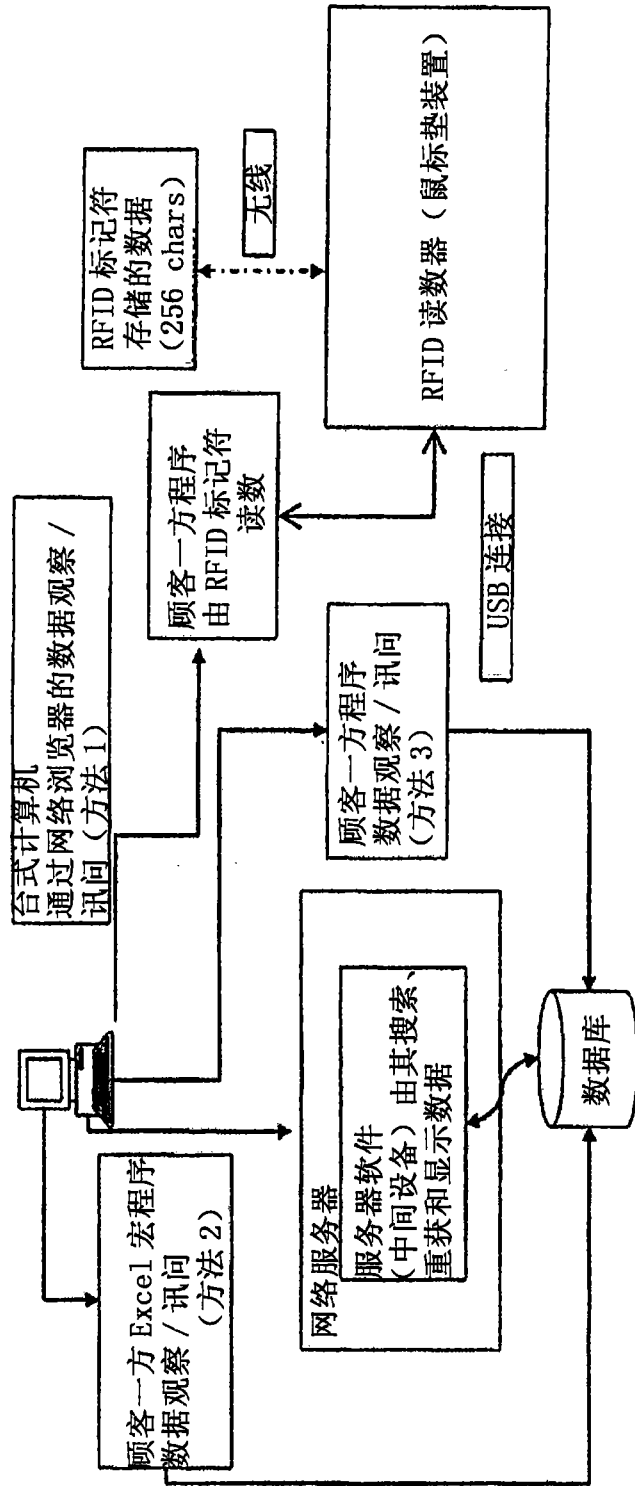


图 10