



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109153991 B

(45) 授权公告日 2022.06.17

(21) 申请号 201780031557.3

(22) 申请日 2017.03.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109153991 A

(43) 申请公布日 2019.01.04

(30) 优先权数据

16162349.1 2016.03.24 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.11.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/056782 2017.03.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/162721 EN 2017.09.28

(73) 专利权人 欧洲奥福来克斯简易股份公司

地址 法国维特雷

(72) 发明人 约翰·德·穆勒美斯特

艾玛努尔·乐麦尔

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限

公司 11314

专利代理人 程伟

(51) Int.Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

(54) 发明名称

水性组合物用于溶解组织样本中生物分子
的用途

(57) 摘要

本发明涉及水性组合物溶解组织样本中的
生物分子的用途以及使用水性组合物溶解组织
样本中的生物分子的方法。此外，本发明涉及一
种制备动物组织样本的系统。

(56) 对比文件

US 5989196 A, 1999.11.23

WO 2004/080579 A2, 2004.09.23

WO 2012/054613 A2, 2012.04.26

CN 1196920 C, 2005.04.13

WO 2011/091438 A1, 2011.07.28

CN 102575220 A, 2012.07.11

CN 104471074 A, 2015.03.25

US 2016/0023996 A1, 2016.01.28

王敏强等.保存温度与时间对动物组织DNA
提取质量的影响.《安徽农业科学》.2009,第37卷
(第33期),第16407-16409页.

S. N. KARTHIPAN et al..An assessment
of three noncommercial DNA extraction
methods from dried blood spots for beta-
thalassaemia mutation identification.
《International Journal of Laboratory
Hematology》.2011,第33卷第540-544页.

Michael A. Gray et al..Comparison of
DNA preservation methods for
environmental bacterial community
samples.《FEMS Microbiol Ecol》.2012,第83卷
第468-477页.

审查员 唐亚丽

权利要求书4页 说明书14页 附图1页

1. 水性组合物用于溶解动物组织样本中选自核酸和蛋白质的生物分子的用途,以及用于随后的

- a) 保存所述生物分子或
- b) 进一步处理所述生物分子,

其中所述用途包括以下步骤:

-对动物组织取样以产生所述动物的组织样本,以及

-取样后立即将所述组织样本暴露于水性组合物,通过将所述组织样本与所述水性组合物接触规定的一段时间,所述水性组合物包括:

-缓冲液,能够在25°C时在pH 7-9范围内进行缓冲,其中所述缓冲液是Tris,并且包括pH调节剂,所述pH调节剂是NaOH,

-洗涤剂,其中所述洗涤剂是N-月桂酰肌氨酸钠盐,

-浓度为1-3M的盐,其中所述盐是NaCl,

-螯合剂,其中所述螯合剂是EDTA二钠盐二水合物,

-和水,

-其中,使用组织取样标签来对所述动物组织进行取样,并且其中通过将所述样本引入所述水性组合物而与所述水性组合物接触,其中所述水性组合物包含在容器中,所述容器形成所述组织取样标签的可拆卸部分,并且其中通过将所述样本暴露于所述水性组合物,从所述组织样本中的选自核酸和蛋白质的生物分子会溶解在所述水性组合物中以产生生物分子溶液,

-使用所述生物分子溶液以保存所述生物分子或用于进一步处理所述生物分子,或使用所述生物分子溶液以检测标记蛋白、或标记核酸、药物、激素或代谢物,

-使用部分所述水性组合物来储存所述组织样本供以后使用,其中所述水性组合物不含蛋白酶

所述用途用于非诊断目的。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述核酸是DNA。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述生物分子的所述进一步处理是检测病原体,或基因分型、测序、杂交分析,或定量实时PCR。

4. 如权利要求3所述的用途,其中所述病原体是BVDV。

5. 如权利要求1所述的用途,其中所述组织取样标签是耳标签或组织取样活检针,所述水性组合物包含在容器中,所述容器形成所述组织取样活检针的可拆卸部分。

6. 如权利要求1所述的用途,其中所述盐是NaCl,其浓度为1M至2M。

7. 如权利要求6所述的用途,其中所述NaCl的浓度为1M至1.5M。

8. 如权利要求6所述的用途,其中所述NaCl的浓度为1.3M至1.5M。

9. 如权利要求6所述的用途,其中所述NaCl的浓度为1.4M。

10. 如权利要求1所述的用途,其中所述水性组合物包括以下组分:

Tris 5-20 mM
NaOH 5-20 mM
N-月桂酰肌氨酸钠盐 2-15 mM
EDTA·2 Na·2H₂O 1-5 mM
NaCl 1-3 M

水。

11. 如权利要求1所述的用途,其中所述水性组合物包括以下组分:

Tris 10-15 mM
NaOH 8-10 mM
N-月桂酰肌氨酸钠盐 5-8 mM
EDTA·2 Na·2H₂O 1-3 mM
NaCl 1-2 M

水。

12. 如权利要求1所述的用途,其中所述水性组合物包括以下组分:

Tris 10-15 mM
NaOH 8-10 mM
N-月桂酰肌氨酸钠盐 6-7 mM
EDTA·2 Na·2H₂O 1-3 mM
NaCl 1-1.5 M

水。

13. 如权利要求1所述的用途,其中所述水性组合物包括以下组分:

Tris 10-15 mM
NaOH 8-10 mM
N-月桂酰肌氨酸钠盐 6-7 mM
EDTA·2 Na·2H₂O 1-3 mM
NaCl 1.3-1.5 M

水。

14. 如权利要求1所述的用途,其中所述水性组合物包含指示生物分子存在的染料。

15. 如权利要求14所述的用途,其中所述生物分子是核酸。

16. 如权利要求1所述的用途,其中所述水性组合物包括以下组分:

Tris 13 mM
NaOH 8.5-8.6 mM
EDTA·2 Na·2H₂O 1.9-2.1 mM
N-月桂酰肌氨酸钠盐 6-7 mM
NaCl 1.35-1.45 M, 以及
水。

17. 如权利要求1所述的用途,其中所述水性组合物包括以下组分:

Tris 13 mM
NaOH 8.55 mM
EDTA·2 Na·2H₂O 1.99-2 mM
N-月桂酰肌氨酸钠盐 6.7-6.9 mM
NaCl 1.38-1.42 M, 以及
水。

18. 如权利要求1所述的用途,其中所述水性组合物包括以下组分:

Tris 13 mM
NaOH 8.55 mM
EDTA·2 Na·2H₂O 1.99-2 mM
N-月桂酰肌氨酸钠盐 6.8 mM
NaCl 1.38-1.42 M, 以及
水。

19. 如权利要求1所述的用途,其中所述生物分子溶液用于进一步加工所述生物分子,其中所述进一步加工是检测所述生物分子溶液中的BVDV并因此检测所述组织样品中的BVDV。

20. 如权利要求4所述的用途,其中,检测所述BVDV通过核酸扩增和检测氨基化核酸或通过基于抗体的BVDV蛋白检测来完成。

21. 如权利要求20所述的用途,其中,所述基于抗体的BVDV蛋白检测是BVDV蛋白的ELISA。

22. 一种用于制备动物组织样本的系统,用于随后

- a) 对所述组织进行基因分型,
- b) 检测所述组织中的病原体,或
- c) 储存和保存所述组织样品供以后使用,

所述系统包括组织取样标签和用于从动物组织样本中溶解生物分子的水性组合物,所述水性组合物被包含在容器中,所述容器形成所述组织取样标签的可拆卸部分,所述水性组合物如权利要求1-21中任一项所述的用途定义。

23. 如权利要求22所述的系统,其中所述组织取样标签是耳标签或组织取样活检针,所

述水性组合物包含在容器中,所述容器形成所述组织取样活检针的可拆卸部分。

水性组合物用于溶解组织样本中生物分子的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及水性组合物用于溶解组织样品中生物分子的用途,以及使用水性组合物溶解组织样品中生物分子的方法。此外,本发明涉及一种用于制备动物组织样本的系统。

背景技术

[0002] 目前,组织样本标签常被用于标记家畜并同时从该动物中抽离样本。所述样本随后在实验室中分析特定遗传性状、病原体的存在或缺失或分析该动物基因型。或者,样本被简单地保存和存储,以追踪所取样本的动物的原产地。组织样本可通过使用组织取样标签或如活检针的组织取样单元获得。组织取样标签是众所周知的,并且也可以从市售获得,例如从本申请人安乐福(A11flex)欧洲公司获得。

[0003] 为了进一步分析样本,有必要对其进行进一步的处理。通常从动物中获得的样本会被送往实验室完成分析。WO 99/12475公开了一种耳标签的样本胶囊,其包含用于进一步处理样本的未指明试剂。EP 1 088 212公开了一种耳标签,其包括样本接收容器,其中包含用于失活组织样本蛋白质部分的材料。用于失活组织样本蛋白质部分的材料的实例提及了以下物质:蛋白酶K、强碱性溶液、分子筛和支持失活样本中蛋白质部分的其他组分。根据该方法,组织样本被盛放在失活其蛋白质部分的组织样本接收容器中。样本被运送到实验室,在那里对样本进行实际分析。在现有技术中所公开的过程费力费时。它需要在实验室中的多个处理步骤,并最终可能导致样本的完全损失。

发明内容

[0004] 本发明根据现有技术改进了工艺。因此,本发明的一个目的是提供一种允许更快地处理组织样本的方法。此外,本发明的一个目的是提供一种方法,该方法允许将组织样本存储更长的时间,同时能够根据特定的遗传性状、其基因分型、存在或不存在某些病原体(如BVDV)对样本进行快速分析。

[0005] 所有这些目的都通过使用水性组合物来解决,该水性组合物用于溶解来自动物组织样本中选自核酸,优选DNA和蛋白质的生物分子,以及用于随后的

[0006] a) 保存所述生物分子或

[0007] b) 进一步处理所述生物分子,

[0008] 其中所述使用包括以下步骤:

[0009] - 对动物组织取样以产生所述动物的组织样本,以及

[0010] - 取样后立即将所述组织样本暴露于水性组合物,方法是将所述样本与所述组合物接触规定的一段时间,所述组合物包括

[0011] - 缓冲液,能够在25°C时在pH 7-9范围内进行缓冲,可选的包括pH调节剂,例如酸化剂或碱化剂,

[0012] - 洗涤剂

[0013] - 浓度为5-10wt%的盐

[0014] -螯合剂,和水,

[0015] 其中,所述动物组织使用组织取样标签,优选耳标签,或组织取样活检针来进行取样,并且所述样本通过将所述样本引入所述组合物而与所述组合物接触,并且其中通过将所述样本暴露于所述组合物,从所述组织样本中选自核酸和蛋白质的生物分子会溶解在所述水性组合物中以产生生物分子溶液,

[0016] -使用所述生物分子溶液以保存所述生物分子或进一步处理所述生物分子,例如检测如BVDV的病原体,或基因分型、测序、杂交分析,或定量实时PCR,或使用所述生物分子溶液以检测标记蛋白、或标记核酸、药物、激素或代谢物,

[0017] -可选的使用部分所述水性组合物来储存所述组织样本供以后使用。

[0018] 在一个实施例中,所述水性组合物被盛放在适当的容器中,该容器优选在组织取样之前形成所述组织取样标签或所述组织取样活检针的一部分,然而,其中所述容器是所述组织取样标签或所述组织取样活检针的可拆卸部分,并且在组织取样之后,可和/或将从其上分离。

[0019] 在一个实施例中,所述暴露步骤在取样后0.1s到10s的时间周期内发生,优选在取样后0.1s到5s。

[0020] 在一个实施例中,所述水性组合物还包括碱化剂,诸如碱金属氢氧化物,更优选NaOH或KOH。

[0021] 在一个实施例中,所述盐是NaCl,其存在的浓度是1M至2M,优选1M至1.5M,更优选1.3M至1.5M,甚至更优选1.4M。

[0022] 在一个实施例中,所述水性组合物不包含蛋白酶K,优选完全不含蛋白酶。

[0023] 在一个实施例中,所述组合物中的所述洗涤剂是N-月桂酰肌氨酸,优选N-月桂酰肌氨酸钠盐。

[0024] 在一个实施例中,所述缓冲液是Tris和/或所述螯合剂是EDTA,优选EDTA二钠盐二水合物。

[0025] 在一个实施例中,所述水性组合物包括,优选由以下组分组成:

Tris 5-20 mM, 优选 10-15 mM

NaOH 5-20 mM, 优选 8-10 mM

N-月桂酰肌氨酸钠盐 2-15 mM, 优选 5-8 mM, 更优选 6-7 mM

[0026] EDTA·2 Na·2H₂O 1-5 mM, 优选 1-3 mM

NaCl 1-3 M, 优选 1-2 M, 更优选 1-1.5 M, 更优选 1.3-1.5 M,

水,

[0027] 以及,可选的,指示生物分子(优选核酸)存在的染料。

[0028] 在一个实施例中,所述水性组合物包括,优选由以下组分组成:

	Tris	13 mM
[0029]	NaOH	8.5-8.6 mM, 优选 8.55 mM
	EDTA·2 Na·2H2O	1.9-2.1 mM, 优选 1.99-2 mM
	N-月桂酰肌氨酸钠盐	6-7 mM, 优选 6.7-6.9 mM, 更优选 6.8 mM
[0030]	NaCl	1.35-1.45 M, 优选 1.38-1.42 M, 和
	水。	

[0031] 在一个实施例中,所述生物分子溶液用于进一步处理所述生物分子,其中所述进一步处理是在所述生物分子溶液中并因此在所述组织样本中检测BVDV,其中,优选地,所述BVDV的检测通过核酸扩增和检测所述扩增核酸或通过基于抗体的BVDV蛋白检测诸如BVDV蛋白的酶联免疫吸附测定法来完成。

[0032] 本发明的目的还通过用于制备后续动物的组织样本的系统来解决,以用于随后的
[0033] a) 所述组织的基因分型,

[0034] b) 在所述组织中检测病原体,或

[0035] c) 存放和保存所述组织样本供以后使用,

[0036] 所述系统包括组织取样标签,优选为组织取样耳标签,或组织取样活检针,和用于从动物组织样本中溶解生物分子的水性组合物,所述组合物盛放于容器内,所述组合物如上所定义。

[0037] 在一个实施例中,所述水性组合物盛放于适当的容器中,该容器优选在组织取样之前形成所述组织取样标签或所述组织取样活检针的一部分,然而,其中所述容器是所述组织取样标签或所述组织取样活检针的可拆卸部分,并且在组织取样之后,可和/或将其从其上分离。

[0038] 本文所使用的术语“制备动物组织样本的系统”是指可彼此可操作地连接的产品的组合。该系统中包括的产品是组织取样标签,优选是组织取样耳标签,或者,代替组织取样标签的组织取样活检针,以及可操作的相互连接的根据本发明用于从组织样本中溶解生物分子的水性组合物。本文所用术语“可操作地连接的”一方面指组织取样标签或组织取样耳标签之间的物理连接,另一方面指水性组合物,或可指一种安排,其中在组织样本取样之后,提供根据本发明的水性组合物,使得该组织样本可立即与根据本发明的水性组合物接触,且该组合物与组织取样标签或其部分物理没有接触。例如,在一个实施例中,所述水性组合物可盛放于适当的容器中,该容器优选在组织取样之前形成所述组织取样标签或所述组织取样活检针的一部分,然而,其中所述容器是所述组织取样标签或所述组织取样活检针的可拆卸部分,并且在组织取样之后,可和/或将其从中拆除。本文在样本与组合物接触情况下所用术语“与...接触”指指组织样本与水性组合物物理连接的一种活动。该物理活动可以是漂洗、浸湿、吸收、浸没、沐浴、浸入、浸渍或用所述水性组合物完全或部分覆盖组织样本。本文所用术语“组织取样标签”指一种装置,其能够向动物提供标签或标记(其保持在该动物中、在其上或以任何其它方式附着于该动物),同时从该动物获得组织样本以供随后使用。本文使用的“组织取样单元”或同义词“组织取样活检针”是指一种仪器,这里使用的“组织取样单元”或同义词“组织取样活检针”是指一种仪器,通过该仪器,例如,通过刮擦,冲孔,撕裂或其他动作,可以从动物身上获得组织样本,然而,不需要向所述动物附上标

签或标记,诸如由塑料、金属或木头制成的标签。

[0039] 本发明的目的也可通过使用水性组合物从动物组织样本中溶解选自核酸,优选DNA和蛋白质的生物分子,以及随后的方法来解决:

[0040] a) 保存所述生物分子或

[0041] b) 进一步处理所述生物分子,

[0042] 其中所述方法包括以下步骤:

[0043] - 动物组织取样以产生所述动物的组织样本,以及

[0044] - 取样后立即将所述组织样本暴露于水性组合物,方法是将所述样本与所述组合物接触规定的一段时间,所述组合物包括

[0045] - 一种缓冲液,能够在25°C时在pH 7-9范围内进行缓冲,可选的包括pH调节剂,例如酸化剂或碱化剂,

[0046] - 洗涤剂,

[0047] - 浓度为5-10wt%的盐,

[0048] - 融合剂,和水,

[0049] - 其中,所述动物组织使用组织取样标签,优选耳标签,或组织取样活检针来进行取样,并且所述样本通过将所述样本引入所述组合物而与所述组合物接触,并且其中通过将所述样本暴露于所述组合物,从所述组织样本中选自核酸和蛋白质的生物分子会溶解在所述水性组合物中以产生生物分子溶液,

[0050] - 使用所述生物分子溶液以保存所述生物分子或进一步处理所述生物分子,例如检测如BVDV的病原体,或基因分型、测序、杂交分析,或定量实时PCR,或使用所述生物分子溶液以检测标记蛋白、或标记核酸、药物、激素或代谢物,

[0051] - 可选的使用部分所述水性组合物来储存所述组织样本供以后使用。

[0052] 在一个实施例中,所述水性组合物被盛放在适当的容器中,该容器优选在组织取样之前形成所述组织取样标签或所述组织取样活检针的一部分,然而,其中所述容器是所述组织取样标签或所述组织取样活检针的可拆卸部分,并且在组织取样之后,可和/或将从其上分离。

[0053] 本发明人惊奇地发现可以从动物获得组织样本后,通过将组织样品立即暴露于根据本发明的适当的水性组合物中,可以在从动物获得组织样品后立即开始处理组织样品。根据本发明的实施例,该适当的水性组合物的特征是至少5-10wt%或至少1M的高盐浓度,存在洗涤剂\融合剂和缓冲液。从动物中获得组织样本后,将样本立即暴露于根据本发明的水性组合物中。本文所用术语“立即”指从0.5秒至2分钟范围的一段时间,优选0.5秒至20秒,更优选0.5秒至5秒。后续的样本暴露于所述水性组合物之后的暴露时间可以是从5分钟至几小时的任意时期,如1、2、3、...12、...24、...48、...72、...120、...168、...、336、...、720小时。所述根据本发明实施例的水性组合物不仅帮助储存和/或保存样本,也可帮助从该样本向组合物中溶解选自核酸和蛋白质的生物分子,其随后不需进一步的工作步骤可直接使用。根据本发明的实施例,所述水性组合物包括可以在25°C从7至9的pH范围内缓冲的缓冲液、洗涤剂、浓度至少为5-10wt%或至少为1M的盐、融合剂和水以及可选的pH调节剂,例如酸化剂或碱化剂。在一个实施例中,所述盐的浓度在从5-10wt%或从1M-3M,优选1-2M,更优选1-1.5M的范围内。适当的缓冲液是多种的。一个很好的例子是Tris。

[0054] 本文所用术语“缓冲液”指的是如本领域技术人员所理解的缓冲液的概念。更具体的，它指的是弱酸和它的共轭碱或弱碱和它的共轭酸的组合，当溶于水中时，这种组合能够将pH值保持在限定的范围内。这种“缓冲液”也可以称为“缓冲系统”。可以在本发明的实施例中使用的适当缓冲液包括但不限于TAPS、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸、Tris、N-三(羟甲基)甲基甘氨酸、TAPSO、HEPES、TES和MOPS。

[0055] 在不希望受任何理论束缚的情况下，本发明人认为已经发现根据本发明的水性组合物能够在所述组织样本暴露于所述水性组合物时吸收来源于动物组织样本的生物分子。可能是这些生物分子由于组织取样作用，诸如穿孔、撕或刮擦，导致组织样本中的一些细胞机械裂解/破裂而从组织样本中泄漏出来，或者是由于在根据本发明的水性组合物中存在洗涤剂，一些生物分子从组织样本中释放出来。根据本发明的水性组合物中加入的“生物分子”，优选溶解于其中的，可以是来自所述组织样本的核酸、蛋白质或二者。它们也可以或替代的是包含在组织样本中的代谢产物或外来物质，诸如药物。“生物分子”可以是取自组织样本的动物的生物分子，或者它们可能是源于影响动物的病原体的生物分子。在优选实施例中，在根据本发明的水性组合物中吸收的生物分子是核酸。在另一个实施例中，该生物分子是蛋白质。在另一个实施例中，该生物分子是核酸和蛋白质的组合。

[0056] 本文所用“核酸”是DNA、RNA或二者的混合物。

[0057] 作为所述组合物的洗涤剂，可以使用不同的洗涤剂。合适的实例包括SDS或N-月桂酰肌氨酸，优选其钠盐。螯合剂也有许多实例，一个合适的是EDTA，优选EDTA • 2Na • 2H₂O。发明者惊奇地发现，该水性组合物允许组织尽可能保持完整以备将来使用，同时因为该组合物溶解来自样本的生物分子，可促进在实验室中的进一步分析工作。这些生物分子以足够高的浓度存在于水性组合物中，以使得能够在水性组合物中进一步处理这种(液体)生物分子溶液。因此，例如，动物的核酸和/或蛋白质以及影响所述动物的病原体，例如如BVDV的病毒，可以在样本暴露于水性组合物时从组织中浸出。这可以在几分钟内迅速发生，即，当样本在从农场运输到实验室途中时。本文所用术语“动物”指任何家畜或农场动物，优选牛、羊、猪、马和其他合适的家畜。

[0058] 根据本发明实施例的水性组合物也适用于保存溶解在其中的生物分子。因此，根据本发明实施例的水性组合物不仅可用于立即进一步处理溶解在其中的生物分子，而且可用于长期储存在其中浸泡的组织样本，或者用于长期储存已溶解在水性组合物中的生物分子。发明人惊奇地发现，溶解在所述水性组合物中的生物分子可以在其中长时间存储，例如数周至数月。同样地，组织样本可以长时间存储在根据本发明的水性组合物中，例如数周至数月。示例性的生物分子或组织样本的这种储存的周期为1周至12个月，例如2、3、4周，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月。

[0059] 在一个实施例中，水性组合物不含蛋白酶K，优选不含蛋白酶。发明人惊奇地发现，尽管没有蛋白酶K，甚至没有任何蛋白酶，仍有可能获得足够高和纯浓度的核酸以用于进一步处理，例如基因分型或诸如BVDV的病原体检测。

[0060] 在一个实施例中，根据本发明实施例的水性组合物中的盐以高浓度存在，优选从1M至3M的浓度范围，优选1M至2M，更优选1-1.5M，更优选1.3至1.5M，甚至更优选1.4M左右。在一个实施例中此盐是NaCl。

[0061] 本发明人惊奇地发现，在水性组合物中结合组织取样标签或组织取样活检针使用

高浓度盐可处理组织样本，并且如果需要，可以没有很大困难地长期存储/保存组织样本。特别地，一旦组织样本暴露根据本发明的含高浓度盐的水性组合物，则组合物本身可用于进一步分析。对于许多下游加工应用，高浓度盐的存在不干扰对包含在这种高盐水性组合物中的生物分子的进一步分析。在水性组合物中高浓度盐的存在确实干扰后续应用的情况下，可以通过简单的脱盐步骤或透析步骤轻易地去除这种高浓度盐，而不影响组合物中生物分子的含量。例如，脱盐可以通过市售合适的脱盐柱，例如通用电气医疗集团的PD-10脱盐柱轻易地实现。

[0062] 在本发明的水性组合物中可以存在多种不同的洗涤剂。优选的洗涤剂是N-月桂酰肌氨酸，优选其钠盐。N-月桂酰肌氨酸似乎特别适合于存在于所述水性组合物中的高浓度盐。根据本发明的实施例，优选的缓冲液是Tris，优选的螯合剂是EDTA，优选其二钠盐二水合物。

[0063] 根据本发明，根据本发明的水性组合物可用于长期保存生物分子或组织样本，和/或用于进一步处理所述生物分子和/或组织样本。这种进一步的处理可以是对来自动物的组织样本的基因组DNA的诊断测试，其可能涉及对这种组织样本进行基因分型，即检测特定遗传性状的存在与否。这种基因分型可以包括鉴定限制性片段长度多态性(RFLP)、基因组DNA的随机扩增多态性检测(RAPD)、扩增片段长度多态性检测(AFLP)、聚合酶链式反应(PCR)、DNA测序、等位基因特异性寡核苷酸(ASO)探针，与核酸微阵列或珠子杂交。在一些实施例中，进一步的处理还可以或可选地包括病原体的检测。这种病原体可能是病毒、细菌或真核单细胞或多细胞生物，诸如寄生虫。可以通过其核酸或蛋白质检测这些病原体。如前所述，使用适当的核酸技术来检测核酸，例如适当的扩增/检测方法，例如杂交实验、实时PCR、在固定适当核酸探针的微阵列或芯片或珠上杂交。蛋白质的检测可能通过诸如涉及适当的抗体的免疫吸附试验发生。这种免疫吸附试验的一个典型例子是酶联免疫吸附试验(ELISA)。以BVDV为例，通过检测其特异性核酸或其特有的蛋白质，可以检测它们。在一个实施例中，BVDV的蛋白质的检测是通过任何适合于在BVDV中出现的蛋白质，例如选自Npor的蛋白质、衣壳蛋白、诸如ERNS、E1或E2的包膜糖蛋白、诸如p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B等的非结构蛋白实现。

[0064] 在另一个实施例中，根据本发明的水性组合物中的生物分子溶液还可以进一步用于检测其他试剂，例如特定标记的存在或缺失、先前或假定施用于动物的药物的存在或缺失、组织样品中因此也是动物中特定激素的存在或缺失和/或代谢产物的存在或缺失。

[0065] 根据本发明的一个实施例，所述水性组合物的用途是用于检测动物组织样本中的病原体，特别是BVDV。这种检测可以使用从所述组织样本获得的生物分子溶液的任何适当方法进行，并在其上实行任何适当的扩增/检测方法，例如杂交实验、定量实时PCR、固定适当核酸探针的微阵列或芯片或珠子上的杂交、流式细胞术、免疫组化及其他合适的方法学。合适的组织取样标签或组织取样单元/活检针可从包括本申请者安乐福公司在内的各种制造商市售获得。根据本发明的水性组合物可以包括在适当的容器中，并且获得的任何组织样本将在这种合适的容器中暴露于这种水性组合物。在一个实施例中，这种合适的容器可以与组织取样标签或组织取样活检针或组织取样系统操作性地连接。例如，容器可以是所述组织取样标签或组织取样活检针或组织取样系统的可拆卸部分，这种容器允许在获得/取样组织样本之后立即将组织样本引入所述容器，然后，容器可从所述组织取样标签或组

织取样活检针或所述系统中拆卸或断开或释放或移除,以便随后进一步处理或处理或存储所述组织样本。在使用所述水性组合物期间,如上所述,在取样之后立即将组织样本暴露于所述水性组合物中。

附图说明

[0066] 此外,参考附图,其中

[0067] 图1示出了从牛获得的组织样本暴露于根据本发明的水性组合物并随后在凝胶电泳中分析的结果。

[0068] 图2显示了从牛身上提取的组织样本的结果,这些组织样本被保存在根据本发明的水性组合物中两周(即样本存档),其中随后使用根据本发明示例1的新制备的水性组合物重新暴露样本,然后分析该重新暴露的结果溶液。

[0069] 如图1所示,图2的结果显示为溶解的核酸凝胶的照片。

[0070] 图3示出了在根据实施例1制备的组合物中储存12个月的样本基因组DNA凝胶电泳分离的结果。

实施例

[0071] 此外,参考下面给出的例子进行说明,而并非限制本发明。

[0072] 实施例1:根据本发明实施例的水性组合物

[0073] 通过混合以下物质来制备1升根据本发明的实施方案的水性组合物:

[0074] 1.576克TRIS

[0075] 0.342克NaOH颗粒

[0076] 0.744克EDTA.2Na.2H₂O

[0077] 2克N-月桂酰肌氨酸钠盐

[0078] 81.82克NaCl

[0079] 用超纯水加满至1升

[0080] 摩尔浓度:

[0081] Tris MS 121.14-1.576g/L \equiv 13mM

[0082] NaOH MW 39.997-0.342g/L \equiv 8.55mM

[0083] EDTA 2Na 2H₂O MW 372,24-0.744g/L \equiv 1.999mM

[0084] N-月桂酰肌氨酸钠盐MW 293,38-2g/L \equiv 6.81mM

[0085] NaCl MW 58.44 81,82g/1 \equiv 1.4M

[0086] 用超纯水补足至1L

[0087] 实施例2:用安乐福(Allflex)的组织样本标签(TST)和组织样本单元(TSU)对根据实施例1的水性组合物的试验

[0088] 组织样本标签(TST)和组织样本单元(TSU)可从本申请者安乐福欧洲公司市售获得。

[0089] 这个实施例中研究的目的是测试安乐福的组织样本标签(TST)和组织样本单元(TSU)(=组织取样活检针)能够通过仅使用保存在样本中的示例1的水性组合物而不是组织样本本身来产生足够多的DNA用于微珠芯片(Illumina公司,美国加利福尼亚州圣地亚

哥)分析。

[0090] 材料和方法

[0091] 从屠宰场接收六只完整的耳朵进行测试。对所有样本进行多次穿孔,包括阳性和阴性对照,以确认测试结果。TST和TSU均为研究的一部分,并进行独立测试。

[0092] 在0、3、19、24、48、72、168、336、720小时后,从样本中取出根据本发明的组合物(实施例1)的等分试样。为了测试该组合物的稳定性,进行了补充研究,其中连续5周向6个样本中加入新的水性组合物,丢弃管中剩余的缓冲液。

[0093] 所有样本在GGP LD牛微珠芯片(GeneSeek,美国内布拉斯加州林肯市)上进行测试。生成的得率(call rate)被用来确定数据的质量。>0.85的得率被认作是有效的测试结果。

[0094] 结果

[0095] 共156个样本成功地进行基因分型。三个样本未达到得率>0.85的标准。未对样本进行再测试。平均而言,除去失败的样本,观察到的得率为0.985。

[0096] 稳定性研究的结果给出了TSU系统的平均得率为0.993,TST样本的平均得率为0.953。补充研究显示,在对TSU和TST样本进行第四次成分补充后,得率略有下降。然而,所有样本仍符合得率>0.85的纳入标准。

[0097] 结论

[0098] 这项研究显示在安乐福的取样组织取样技术(TSU和TST)中使用根据本发明的水性组合物作为DNA源可以在实践中成功的用于Illumina的微珠芯片基因分型。当用于Illumina分析时,TSU和TST两种系统都产生可比较的得率。

[0099] 0-720小时后分析的样本间无显著性差异。直接在耳朵取样后,本发明的水性组合物可用于下游应用。这使得该系统极大地适用于直接遗传性状和疾病检测。

[0100] 实施例3:核酸提取、存档和基因分型试验

[0101] 根据其从组织样本中溶解和/或提取和/或保存核酸的适用性来评估本发明的水性组合物。选取使用安乐福组织取样单元(=组织取样活检针)(TSU)从牛身上获得的组织样本,通过在取样后立即将相应的组织样本放入根据实施例1(“TSU缓冲液”)的水性组合物中,将组织样本暴露于该组合物。获得了以下结果:

案例号	样本号	处理	QUBIT浓度 ng/pl	Nanodrop浓度 ng/pl	Nanodrop A260/280
470003	3954	仅用TSU缓冲液	5.09	22.66	1.87
470004	3970	仅用TSU缓冲液	6.7	34	2.06
470005	3971	仅用TSU缓冲液	6.81	32.31	1.92
470006	3995	仅用TSU缓冲液	7.99	58.99	1.67
470007	4208	仅用TSU缓冲液	6.24	33.93	1.82
470008	4214	仅用TSU缓冲液	9.44	54.02	1.79
470009	4247	仅用TSU缓冲液	12.4	53.11	1.85
平均值			7.81	41.29	1.85

[0102]

[0103] 从表格和图1可见获得了足够高浓度的核酸。“Qubit浓度”指使用Qubit[®]定量(赛默飞世尔)测定的核酸浓度。暴露的结果也可以在附图1中看到,其中在凝胶上清晰地示出了样本中(基因组)核酸的条带。(M=标记DNA)。条带上方的数字表示样本号。

[0104] 此外,选用使用组织取样单元(TSU)获得的组织样本,将其在根据示例1的水性组合物中储存两周。此后,交换组合物,然后将这些组织重新暴露于根据实施例1新制备的组合物。这种再暴露的结果可以总结在下表和图2中:

案例号	样本号	处理	QUBIT浓度 ng/pl	Nanodrop浓度 ng/pl	Nanodrop A260/280
[0105]	470010	仅用TSU缓冲液	15.59	1.72	
	470011	仅用TSU缓冲液	15.75	2.25	
	470012	仅用TSU缓冲液	24.72	2.05	
	470013	仅用TSU缓冲液	94.9	1.47	
	470014	仅用TSU缓冲液	37.57	1.79	
	470015	仅用TSU缓冲液	45.3	1.59	
	470016	仅用TSU缓冲液	17.27	1.72	
平均值			35.87	1.80	

[0106] 因此,从这些数据中可以清楚地看出,根据本发明的水性组合物不仅适合在取样后立即溶解样本中的核酸,而且适合于将组织样本储存在其中,并随后使用这种样本在本发明的新鲜水性组合物中进一步再暴露。

[0107] 实施例4:在根据本发明在水性组合物中长期保存组织样本

[0108] 使用安乐福手术钳系统和安乐福组织取样活检针(TSU),从刚屠宰的牛的两只耳朵中采集100个耳穿孔样本。样本被冲压进填充有根据实施例1的水性组合物的塑料容器中。这种根据本发明的水性组合物有时在此实施例4中也被称为“液体D”或“防腐剂液体D”(参见下文)。安乐福负责样本的收集、样本容器的标签、以及每批快递服务的即时装运。一天之后,样本在完全无可挑剔的条件下到达了实验室。在收到后,这些样本按照表1中的样本标签和信息所反映的进行分类,并在黑暗中储存在实施例1的水性组合物中。

[0109] 表1:样本标签和样本储存概览

储存		存放时间					
		0 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	
[0110]	溶液 D	24°C	D101-D105	D201-D205	D301-D305	D401-D405	D501-D505
		4°C	D106-D110	D206-D210	D306-D310	D406-D410	D506-D510
		-20°C	D111-D115	D211-D215	D311-D315	D411-D415	D511-D515

[0111] 如表1所示,5份样本的第一轮制备和检查是在收到样本的第二天(时间表“0个月”)进行的,所有随后的检查是在3个月间隔(时间表“3、6、9和12个月”)之后进行的。

[0112] 从组织样本中抽提DNA并检测质量和产量

[0113] 所有实验室程序和检查均按标准化方法进行。

[0114] 在提取DNA前约30分钟,从储存容器(24°C、4°C、-20°C)中取出5个样本,在室温下进行平衡。通常,每一耳穿孔样本的一小部分(约1/3)用于DNA提取。

[0115] 在中等裂解条件下,使用NaOH和/或蛋白酶裂解,按照传统方法从组织样本中分离

基因组DNA。分离得到的DNA溶解于100 μ l Tris缓冲液(10mM)中。

[0116] 应用样本材料的产量

[0117] 在项目开始时,比较了实验室程序的样本产量的两个变体。

[0118] 变体1利用整个耳穿孔样本,变体2基于耳穿孔样本的一小部分(大约耳穿孔样本的三分之一)。这种比较显得很重要,因为在常规程序中样本的处理必须是可靠的连续和可重复的。可以想象,全部的耳穿孔样本可以一次性实施,从而进行更快地处理,同时将DNA浓度保持在更窄的浓度范围内,由此排除主观效应。与之相反,在此实施例中使用的常规步骤中,仅使用了原始探针的一小部分以便保持备份。

[0119] DNA浓度和纯度的光度测定

[0120] 所有样本用Nanodrop光度法进行测量。每个样本显示出DNA的清晰的光谱,其最大吸收波长为260nm,稀疏杂质由蛋白质、溶剂和盐(230nm,280nm)所引起。表2概述了两种储存变体条件下产量变体2,时间表“0个月”的Nanodrop值。

[0121] 表2:DNA浓度和纯度的光度测定-储存0个月

储存剂液体 D				
	样本号	ng/ μ l	260/280	260/230
24°C	D101	181,9	2,21	2,35
	D102	240,9	2,10	2,10
	D103	179,1	2,16	1,40
	D104	320,6	1,98	1,44
	D105	323,1	1,99	1,49
	MW	249,1	2,09	1,76
	STDV	70,8	0,10	0,44
<hr/>				
4°C	D106	282,3	2,03	1,97
	D107	83,3	2,62	0,69
	D108	238,7	2,01	1,07
	D109	295,7	2,03	2,03
	D110	288,6	2,03	1,88
	MW	237,7	2,14	1,53
	STDV	89,1	0,27	0,61
<hr/>				
-20°C	D111	288,7	1,98	1,80
	D112	287,0	2,58	2,22
	D113	315,8	2,00	1,62
<hr/>				
[0123]	D114	55,5	4,12	1,76
	D115	280,7	1,86	1,76
	MW	245,5	2,51	1,83
	STDV	107,1	0,94	0,23

[0124] 使用全耳穿孔样本的产量变体1的DNA浓度范围为191-829ng/ μ l(数据未示出),使用大约三分之一耳穿孔样本的产量变体2的DNA浓度范围为55-323ng/ μ l。这显示了使用所有样本具有显著更高的DNA产率,但也有较高的测量值扩展。因此,决定仅使用样本一小

部分(1/3)用于所有进一步的分析。

[0125] 表3至6示出3个月、6个月、9个月和12个月后组织样本储存的相应数据。每个样本产生了足够产量的基因组DNA。DNA浓度显示出了如下范围：分别为59-213ng/ μ l(3个月)，204-663ng/ μ l(6个月)，98-524ng/ μ l(9个月)，以及70-654ng/ μ l(12个月)。

[0126] 表3:DNA浓度和纯度的光度测定-储存3个月

储存剂液体 D				
	样本号	ng/ μ l	260/280	260/230
24°C	D201	109,65	1,87	1,19
	D202	118,36	1,85	0,81
	D203	58,9	1,9	1,58
	D204	182,7	1,86	1,2
	D205	204,0	1,86	1,16
	MW	134,7	1,87	1,19
	STDV	58,6	0,02	0,27
4°C	D206	185,2	1,84	0,98
	D207	213,4	1,77	1,03
	D208	133,1	1,88	0,96
	D209	117,38	1,82	0,86
	D210	142,5	1,85	0,89
	MW	158,3	1,83	0,94
	STDV	39,7	0,04	0,07
-20°C	D211	173,7	1,87	1,06
	D212	174,3	1,85	1
	D213	107,74	1,84	0,86
	D214	127,19	1,85	0,88
	D215	177,2	1,9	1,4
	MW	152,0	1,86	1,04
	STDV	32,3	0,02	0,22

[0128] 表4:DNA浓度和纯度的光度测定-储存6个月

储存剂液体 D				
	样本号	ng/μl	260/280	260/230
24°C	D301	259.9	1.80	1.80
	D302	594.6	1.80	1.92
	D303	472.6	1.71	1.50
	D304	508.2	1.80	1.77
	D305	398.2	1.79	1.83
	MW	446.7	1.78	1.76
	STDV	126.1	0.04	0.16
<hr/>				
[0129] 4°C	D306	592.7	1.76	1.63
	D307	662.7	1.78	1.47
	D308	549.2	1.77	1.76
	D309	271.1	1.68	1.33
	D310	213.0	1.66	1.16
	MW	457.7	1.73	1.47
	STDV	202.0	0.06	0.24
<hr/>				
-20°C	D311	271.4	1.76	1.44
	D312	334.5	1.76	1.53
	D313	204.3	1.75	1.31
	D314	655.3	1.88	1.73
	D315	272.4	1.84	1.47
	MW	347.6	1.80	1.50
	STDV	178.1	0.06	0.15

[0130] 表5:DNA浓度和纯度的光度测定-储存9个月

储存剂液体 D				
	样本号	ng/μl	260/280	260/230
24°C	D401	152,8	1,98	2,39
	D402	324,6	1,89	2,21
	D403	445,8	1,86	2,08
	D404	330,7	1,90	2,26
	D405	98,4	2,01	1,40
	MW	270,5	1,93	2,07
	STDV	142,1	0,06	0,39
<hr/>				
4°C	D406	505,9	1,83	2,01
	D407	363,0	1,79	1,42
	D408	283,3	1,83	1,87
	D409	150,2	1,97	2,20

	D410	125,3	1,97	1,80
	MW	285,6	1,88	1,86
	STDV	157,0	0,09	0,29
<hr/>				
[0132]	D411	248,1	1,96	2,13
	D412	320,3	1,88	2,04
	D413	312,7	1,84	1,49
	D414	311,3	1,87	2,02
	D415	524,3	1,84	1,98
	MW	343,4	1,88	1,93
	STDV	105,3	0,05	0,25

[0133] 表6:DNA浓度和纯度的光度测定-储存12个月

储存剂液体 D				
	样本号	ng/μl	260/280	260/230
[0134]	D501	234,3	1,84	1,75
	D502	164,0	1,81	1,86
	D503	212,9	1,66	1,32
	D504	239,1	1,78	1,84
	D505	202,6	1,77	1,73
	MW	210,6	1,77	1,70
	STDV	30,1	0,07	0,22
<hr/>				
[0134]	D506	245,7	1,69	1,24
	D507	653,5	1,75	1,39
	D508	82,5	1,76	1,20
	D509	70,1	1,84	1,24
	D510	276,1	1,72	1,40
	MW	265,6	1,75	1,29
	STDV	236,0	0,06	0,09
<hr/>				
[0135]	D511	479,6	1,78	1,87
	D512	649,0	1,73	1,40
	D513	203,9	1,75	1,54
	D514	567,9	1,72	1,51
	D515	437,4	1,74	1,58
	MW	467,6	1,74	1,58
	STDV	168,5	0,02	0,18

[0135] 所获得的样本,在0、3、6、9和12个月后如上所述进行处理(即裂解),并进行凝胶电泳分离和分析。这种凝胶电泳分析的示例性结果如图3所示,其示出了本发明的水性组合物中已储存12个月的样本的基因组DNA的凝胶电泳分离。很显然,这些样本显示出清晰可见的高分子DNA条带,表明为基因组DNA,从而得出如下结论:即使经过12个月的储存期,储存在任何被测试的储存变体中的样本仍能产生非常好的DNA质量,因此,根据本发明的含水组合

物也适合于组织样品的长期储存,然后可以在储存后用于随后的进一步加工和分析。

[0136] 在说明书、权利要求和/或附图中公开的本发明的特征可以是单独的和以它们的任何组合用于以各种形式实现本发明的材料。

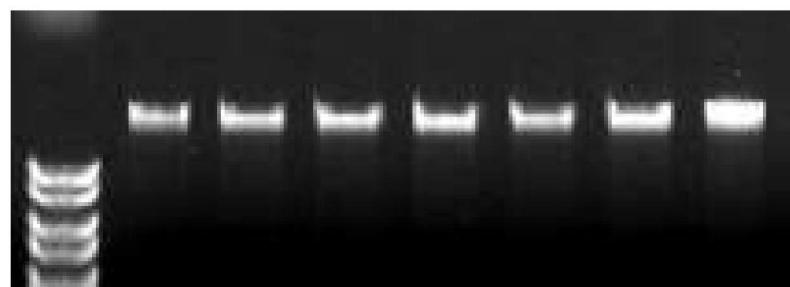
M**样本 3954-4247**

图1

样本 3954-4247**M**

图2

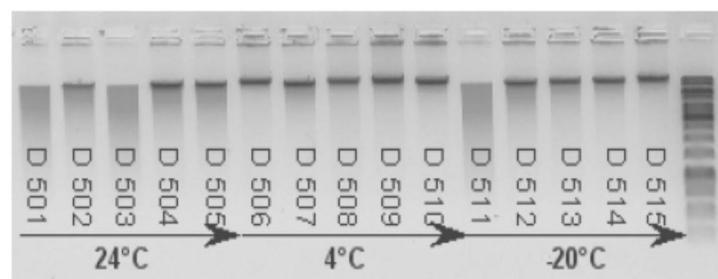


图3