



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105985904 A

(43) 申请公布日 2016. 10. 05

(21) 申请号 201510088419. 1

(22) 申请日 2015. 02. 26

(71) 申请人 付士明

地址 100037 北京市西城区北礼士路甲 98
号阜成大厦 B 座 226

(72) 发明人 付士明

(51) Int. Cl.

C12M 1/24(2006. 01)

C12N 15/10(2006. 01)

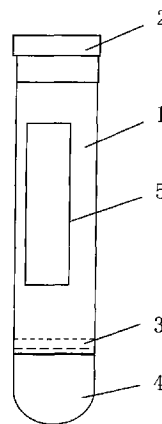
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

循环游离 DNA 真空采集管

(57) 摘要

本发明是一种血液采集管,特别是一种可以在常温条件下采集和保存血样的循环游离 DNA 真空采集管,由原管和胶塞组成,原管内设有添加剂和血液分离胶,按 5ml 容量的原管计,将 0. 6-1. 2g 血液分离胶 4 加入到原管 1 的底部,然后加入 0. 05-6ml 混合添加剂,再将原管抽成真空用胶塞密接于原管的管口上,原管外面贴有标签;所述胶塞的外面设有保护帽;所述胶塞可以用铝塑膜替代。本发明可以使采集的血样在常温条件下保持初始状态 14 天检测结果不受影响;离心后血液分离胶可将血液中的有形成分与血浆隔开,有效防止保存过程中白细胞、红细胞和血小板对游离循环 DNA 的影响,分离后的血浆仍可保持初始状态 14 天以上;本发明降低了血样采集后的储存和运输条件,提高了工作效率。



1. 一种循环游离 DNA 真空采集管,由原管和胶塞组成,其特征在于:所述循环游离 DNA 真空采集管,由原管和胶塞组成,原管内设有混合添加剂和血液分离胶,按 5-10ml 容量的原管计,将 0.6-1.2g 血液分离胶 4 加入到原管 1 的底部,然后加入 0.05-6ml 混合添加剂,再将原管抽成真空用胶塞密接于原管的管口上,原管外面贴有标签。

2. 根据权利要求 1 所述的循环游离 DNA 真空采集管,其特征在于:所述胶塞的外面设有保护帽。

3. 根据权利要求 1 所述的循环游离 DNA 真空采集管,其特征在于:所述胶塞可以用铝塑膜替代。

4. 根据权利要求 1 所述的循环游离 DNA 真空采集管,其特征在于:所述原管为玻璃管或塑料管,玻璃管采用硼硅玻璃或石英玻璃制造;塑料管采用 PE、PP、PET、PEN 或 PBT 塑料制造;所述胶塞,采用卤化丁基橡胶即氯化丁基橡胶和溴化丁基橡胶制造。

5. 根据权利要求 1 所述的循环游离 DNA 真空采集管,其特征在于:所述混合添加剂由血液抗凝剂及其缓冲液与防腐剂、核酸酶抑制剂、糖代谢抑制剂、细胞膜保护剂混合而成;所述血液分离胶为硅烷类分离胶、树脂类分离胶或丙烯酸酯类分离胶的一种,无论哪种分离胶其比重限定在 1.04-1.075 之间,按 5-10ml 容量的原管计其添加量为 0.6-1.2g。

6. 根据权利要求 5 所述的循环游离 DNA 真空采集管,其特征在于:所述血液抗凝剂为乙二胺四乙酸盐、柠檬酸钠及其缓冲液、肝素盐或血液保存液;其中:乙二胺四乙酸盐即 EDTA 盐为 EDTAK2、EDTAK3 或 EDTANa2,其按 1ml 血液 1.5-2.2mg 添加;柠檬酸钠与缓冲液配制成浓度为 3.2%或 3.8%的溶液,其按与血液的体积比为 1:6-1:11 添加,优选 1:9;肝素盐为肝素钠、肝素锂、肝素钙或肝素胺,其按 1ml 血液 15-30 酶活性单位添加;血液保存液为血液保存液 I、II 或 III,其按 1ml 血液添加 0.05-2ml。

7. 根据权利要求 5 所述的循环游离 DNA 真空采集管,其特征在于:所述防腐剂是 2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇、双咪唑烷基脲、季铵盐、酒精、羟甲基甘氨酸钠、乙内酰脲、甲醛及其衍生物、咪唑烷基脲、二羟甲基脲、恶唑烷或甲醇的一种或几种;其合计量按 1ml 血液添加 1-50mg。

8. 根据权利要求 5 所述的循环游离 DNA 真空采集管,其特征在于:所述核酸酶抑制剂为硅藻土、膨润土、乙醇、金精三羧酸 (ATA)、甲酰胺、氧钒核糖核苷复合物、二硫赤藓糖醇、焦碳酸二乙酯、乙二胺四乙酸盐 (EDTA)、蛋白酶 K、肝素、 β -巯基乙醇、羟胺氧铜离子、硫酸铵、二硫苏糖醇 (DTT) 或半胱氨酸的一种或几种;其合计量按 1ml 血液添加 1-15mg。

9. 根据权利要求 5 所述的循环游离 DNA 真空采集管,其特征在于:所述糖代谢抑制剂包括甘露糖及其衍生物、甘油醛 3-磷酸、磷酸二羟丙酮、1,3-二磷酸甘油酸、甘油、甘油醛、丁酮、氟化钠、磷酸烯醇式丙酮酸或丙酮酸的一种或几种;其合计量按 1ml 血液添加 0.1-30mg。

10. 根据权利要求 5 所述的循环游离 DNA 真空采集管,其特征在于:所述细胞膜保护剂为丝氨酸、半胱氨酸或谷氨酰胺、甘氨酸及其同系物或衍生物、络氨酸、天冬氨酸或天冬酰胺的一种或几种,其合计量按 1ml 血液添加 0.1-30mg。

循环游离 DNA 真空采集管

技术领域

[0001] 本发明是一种血液采集管,特别是一种可以在常温条件下采集和保存血样的循环游离 DNA 真空采集管。

背景技术

[0002] 游离循环 DNA 主要由单链或双链或单双链混合物组成,以 DNA-蛋白质复合物或游离 DNA 形式存在。目前已经在外周血浆、血清、其他体液和胆汁、粪便等样本中检测到游离循环 DNA。游离循环 DNA 的检测可以应用于外伤、中风、糖尿病及自身性免疫等疾病的诊断,所以游离循环 DNA 的提取及检测将奠定其在医学诊断领域,特别是基因分子生物学水平检测的基础。

[0003] 目前游离循环 DNA 的检测主要应用于产前诊断和肿瘤早期诊断及存活率判断等领域,样本主要来源于血液及其他体液,但临床及科研单位一般是用注射器或普通真空采血管采集血样,采集到的血样需要及时离心检测,因为检测循环游离 DNA 需要 QPCR 等分子生物学技术,并非每个医疗单位都能检测,所以不具备此项检测技术的医疗单位需要将采集到的样本邮寄或快递到具备此项检测技术的单位进行检测,为此必须对血样的采集、保存和运输给以特殊的条件,如低温,如此才能满足临床及科研的需要。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了克服现有循环游离 DNA 的检测必须对血样给以特殊条件的缺陷,发明一种可以在常温下采集和保存血样的循环游离 DNA 真空采集管。

[0005] 本发明的目的是按如下的方式来实现的:所述循环游离 DNA 真空采集管,由原管和胶塞组成,原管内设有混合添加剂和血液分离胶,按 5-10ml 容量的原管计,将 0.6-1.2g 血液分离胶 4 加入到原管 1 的底部,然后加入 0.05-6ml 混合添加剂,再将原管抽成真空用胶塞密接于原管的管口上,原管外面贴有标签。

[0006] 所述胶塞的外面设有保护帽。

[0007] 所述胶塞可以用铝塑膜替代。

[0008] 所述原管为玻璃管或塑料管,玻璃管采用硼硅玻璃或石英玻璃制造;塑料管采用 PE、PP、PET、PEN 或 PBT 塑料制造;所述胶塞,采用卤化丁基橡胶即氯化丁基橡胶和溴化丁基橡胶制造。

[0009] 所述混合添加剂由血液抗凝剂及其缓冲液与防腐剂、核酸酶抑制剂、糖代谢抑制剂、细胞膜保护剂混合而成;所述血液分离胶为硅烷类分离胶、树脂类分离胶或丙烯酸酯类分离胶的一种,无论哪种分离胶其比重限定在 1.04-1.075 之间,按 5-10ml 容量的原管计其添加量为 0.6-1.2g。

[0010] 所述血液抗凝剂为乙二胺四乙酸盐、柠檬酸钠及其缓冲液、肝素盐或血液保存液;其中:乙二胺四乙酸盐即 EDTA 盐为 EDTAK2、EDTAK3 或 EDTANa2,其按 1ml 血液 1.5-2.2mg 添加;柠檬酸钠与缓冲液配制成浓度为 3.2% 或 3.8% 的溶液,其按与血液的体积比为

[0026] 所述混合添加剂 3 由血液抗凝剂及其缓冲液与防腐剂、核酸酶抑制剂、糖代谢抑制剂、细胞膜保护剂混合而成；所述血液分离胶为硅烷类分离胶、树脂类分离胶或丙烯酸酯类分离胶的一种，无论哪种分离胶其比重限定在 1.04-1.075 之间，按 5-10ml 容量的原管计其添加量为 0.6-1.2g。

[0027] 所述血液抗凝剂为乙二胺四乙酸盐、柠檬酸钠及其缓冲液、肝素盐或血液保存液；其中：乙二胺四乙酸盐即 EDTA 盐为 EDTAK2、EDTAK3 或 EDTANa2，其按 1ml 血液 1.5-2.2mg 添加；柠檬酸钠与缓冲液配制成浓度为 3.2% 或 3.8% 的溶液，其按与血液的体积比为 1 : 6-1 : 11 添加，优选 1 : 9；肝素盐为肝素钠、肝素锂、肝素钙或肝素胺，其按 1ml 血液 15-30 酶活性单位添加；血液保存液为血液保存液 I、II 或 III，其按 1ml 血液添加 0.05-2ml。

[0028] 所述防腐剂是 2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇、双咪唑烷基脲、季铵盐、酒精、羟甲基甘氨酸钠、乙内酰脲、甲醛及其衍生物、咪唑烷基脲、二羟甲基脲、恶唑烷或甲醇的一种或几种；其合计量按 1ml 血液添加 1-50mg。

[0029] 所述核酸酶抑制剂为硅藻土、膨润土、乙醇、金精三羧酸 (ATA)、甲酰胺、氧钒核糖核苷复合物、二硫赤藓糖醇、焦碳酸二乙酯、乙二胺四乙酸盐 (EDTA)、蛋白酶 K、肝素、 β -巯基乙醇、羟胺氧铜离子、硫酸铵、二硫苏糖醇 (DTT) 或半胱氨酸的一种或几种；其合计量按 1ml 血液添加 1-15mg。

[0030] 所述糖代谢抑制剂包括甘露糖及其衍生物、甘油醛 3-磷酸、磷酸二羟丙酮、1,3-二磷酸甘油酸、甘油、甘油醛、丁酮、氟化钠、磷酸烯醇式丙酮酸或丙酮酸的一种或几种；其合计量按 1ml 血液添加 0.1-30mg。

[0031] 所述细胞膜保护剂为丝氨酸、半胱氨酸或谷氨酰胺、甘氨酸及其同系物或衍生物、络氨酸、天冬氨酸或天冬酰胺的一种或几种，其合计量按 1ml 血液添加 0.1-30mg。

[0032] 添加剂的配制：

[0033] 添加剂需预先配制，配制添加剂时，首先将抗凝剂称重后加入烧杯中，然后加入溶剂水，用磁力搅拌器搅拌均匀，然后按上述加量分别将防腐剂、核酸酶抑制剂、糖代谢抑制剂及细胞膜保护剂按顺序加入到上述烧杯中，然后混合搅拌均匀，待完全溶解装入试剂瓶密封高压蒸汽灭菌即可。

[0034] 制做成真空采血管应在十万级净化车间环境中生产，必要时应在万级净化车间生产。制造时应先将分离胶加入到原管管底，然后加入上述配制的混合添加剂，再按一般采血管工艺抽真空压塞。

[0035] 第一实施例

[0036] 原管选用容量为 7ml 的 PET 管，胶塞选用溴化丁基橡胶塞，将 0.8g 分离胶加入管底，然后加入 0.1ml 添加剂，添加剂含 2.2mg EDTAK3，10mg 咪唑烷基脲，10mg 甘氨酸，2mg 氟化钠，2mg TAT，真空预置量为 5ml，抽真空压塞后抽取静脉血 5ml 离心，离心条件为离心力 1600g，离心时间 10 分钟，分别在抽血当日，抽血后 3 日，抽血后 7 日，抽血后 14 日显微镜观察离心前后全血细胞破裂和白细胞死亡情况（台盼蓝染色）及血浆中残存血细胞和血细胞破碎后碎片情况，结果如下：

[0037]

		0 天	3 天	7 天	14 天
全血	细胞碎片	0	0	0	0
	死亡白细胞	0	0	0	0
血浆	细胞碎片	0	0	0	0
	死亡白细胞	0	0	0	0

[0038] 上述结果证明,离心前后全血和血浆没有血细胞破裂和白细胞死亡的情况,说明血细胞不会对血浆 DNA 造成污染和干扰。

[0039] 在上述实验的基础上,将所提取的适量血浆采用 12000-16000g 再次离心,用 QPCR 方法测试游离 DNA 浓度。测试原理:抽取成年男性外周血常温放置后,通过 QPCR- 探针法对不同时间分离的血浆中 Y 染色体上 DYS 基因定量,来确定血浆游离 DNA 浓度的变化趋势, QPCR 的 CT 值反映了游离 DNA 的浓度,CT 值升高 1,浓度减半,CT 值降低 1 则浓度升高一倍,CT 值的增减幅度小于 0.2 为可接受的状态。选择 3 名成年男性抽取外周血,本实验选用目前普遍采用的 EDTAK2 采血管作为 0 天对照管,每人抽取 6 支管,其中每人抽取 EDTAK2 采血管 1 支作为 0 天对照,另外 5 支分别在抽血后 0 天,3 天,5 天,7 天,14 天测试。CT 测试结果见下表:

[0040]

	0	3	5	7	14
受试者 1 实验	28.31778	28.28455	28.27079	28.29312	28.27356
受试者 2 实验	28.68077	28.77015	28.67996	28.67581	28.67382
受试者 3 实验	27.88546	27.82434	27.69376	27.87639	27.69835
受试者 1 对照	28.41239				
受试者 2 对照	28.86819				
受试者 3 对照	27.889				

[0041] 结果显示采血后 3 天,5 天,7 天,14 天 CT 值与 0 天的增减幅度均小于 0.2,说明本产品保持循环 DNA 比较平稳。

[0042] 第二实施例

[0043] 原管选用容量为 10ml 的 PET 管,胶塞选用溴化丁基橡胶塞,将 1.2g 分离胶加入管底,然后加入 0.2ml 添加剂,添加剂含 4.4mgEDTAK3,20mg 双咪唑烷基脲,20mg 谷氨酰胺,2mg 甘油醛,4mgTAT,真空预置量为 10ml,抽真空压塞后抽取静脉血 10ml 离心,离心条件为离心力 1600g,离心时间 10 分钟,分别在抽血当日,抽血后 3 日,抽血后 7 日,抽血后 14 日显微镜观察离心前后全血血细胞破裂和白细胞死亡情况(台酚蓝染色)及血浆中残存血细胞和血细胞破碎后碎片情况,结果如下:

[0044]

		0 天	3 天	7 天	14 天
全血	细胞碎片	0	0	0	0
	死亡白细胞	0	0	0	0
血浆	细胞碎片	0	0	0	0
	死亡白细胞	0	0	0	0

[0045] 上述结果证明离心前后全血和血浆没有血细胞破裂和白细胞死亡的情况,说明体细胞不会引起血浆 DNA 的污染和干扰。

[0046] 实验原理同第一实施例,即用 QPCR 方法测试游离 DNA 浓度,即抽取成年男性外周血常温放置后,通过 QPCR- 探针法对不同时间分离的血浆中 Y 染色体上 DYS 基因定量,来确定血浆游离 DNA 浓度的变化趋势, QPCR 的 CT 值反映了游离 DNA 的浓度, CT 值升高 1, 浓度减半, CT 值降低 1 则浓度升高一倍, CT 值的增减幅度小于 0.2 为可接受的状态。选择 3 名成年男性抽取外周血,本实验依然选用目前普遍采用的 EDTAK2 采血管作为 0 天对照管,每人抽取 6 支管,其中每人抽取 EDTAK2 采血管 1 支作为 0 天对照,另外 5 支分别在抽血后 0 天,3 天,5 天,7 天,14 天测试。CT 测试结果见下表:

[0047]

	0	3	5	7	14
受试者 1 实验	27.32678	27.28545	27.26875	27.30478	27.26989
受试者 2 实验	28.581695	28.57116	28.57739	28.57511	28.46836
受试者 3 实验	27.87659	27.79228	27.69569	27.67689	27.76986
受试者 1 对照	27.33237				
受试者 2 对照	28.56728				
受试者 3 对照	27.87685				

[0048] 结果显示采血后 3 天,5 天,7 天,14 天 CT 值与 0 天的增减幅度均小于 0.2,说明第二实施例保持循环 DNA 也比较平稳。

[0049] 总之,本发明作为循环 DNA 真空血样采集管有如下特点:1) 在采集血样后由于组合添加剂的加入,避免了循环 DNA 的降解和血细胞破裂释放基因组 DNA 污染血浆中的循环 DNA,使循环 DNA 检测结果更加准确。2) 分离胶的使用有效的将血细胞和血浆隔离开,避免无核血细胞破裂溶血影响检测结果。3) 避免了目前普遍采用的 EDTA 采血管采集血样不能常温放置保存和运输的问题。

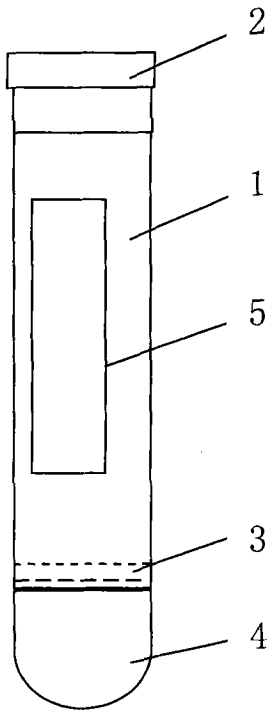


图 1

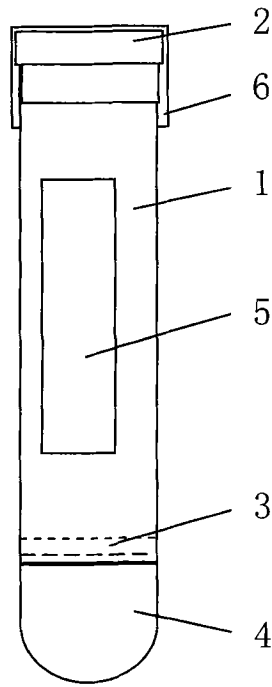


图 2

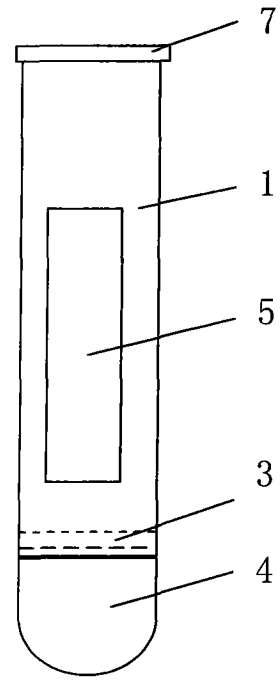


图 3