



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116157519 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 23

(21) 申请号 202180059268.0

(22) 申请日 2021.07.29

(30) 优先权数据

63/058,179 2020.07.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/043769 2021.07.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/039904 EN 2022.02.24

(71) 申请人 精密科学公司

地址 美国威斯康星州

(72) 发明人 E·M·拉格兰 Z·加格拉特

M·J·多马尼科

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 张文辉

(51) Int.Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

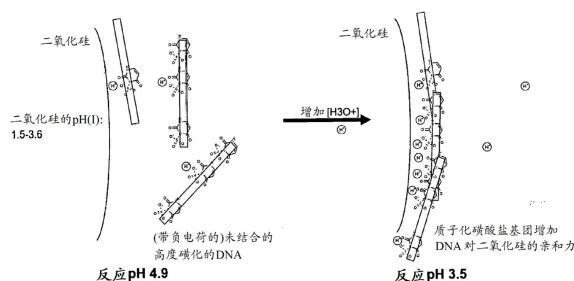
权利要求书4页 说明书28页 附图20页

(54) 发明名称

经磺化DNA的纯化

(57) 摘要

本公开提供了用于纯化经化学修饰的,特别是经磺化的DNA的方法和系统。此外,本公开提供了用于重亚硫酸盐转化的方法和系统,其使用诸如二氧化硅珠粒的二氧化硅载体和用于将经磺化DNA结合到二氧化硅表面的酸性条件来改进经磺化DNA的纯化。



1. 一种方法,其包括将经碘化DNA和二氧化硅载体组合在酸性结合溶液中,其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于所述经碘化DNA的等电点(pH(I)),并且其中所述经碘化DNA结合至所述二氧化硅载体。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述二氧化硅载体包含颗粒、珠粒和纤维中的至少一者。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述二氧化硅载体是磁性的。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述酸性结合溶液的pH小于5。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述酸性结合溶液的pH在2.0和4之间。

6. 如权利要求1所述的方法,其中所述酸性结合溶液包含离液盐。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述离液盐包含盐酸胍(GuHCl)和异硫氰酸胍(GITC)中的至少一者。

8. 如权利要求1所述的方法,所述方法进一步包括将单链非经碘化DNA或经部分碘化DNA与碘化试剂一起温育以产生所述经碘化DNA。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述碘化试剂包含重亚硫酸铵和重亚硫酸钠中的至少一者。

10. 如权利要求1所述的方法,其进一步包括以下中的至少一者:

i) 洗涤与经碘化DNA结合的二氧化硅载体;

ii) 将所述经碘化DNA脱碘化以形成经脱碘化的DNA;以及

iii) 从所述二氧化硅载体上洗脱所述经脱碘化的DNA。

11. 如权利要求8所述的方法,其中将非经碘化DNA与碘化试剂一起温育是在pH等于或高于所述经碘化DNA的pH(I)的碘化反应溶液中进行的。

12. 如权利要求11所述的方法,其中在将所述经碘化DNA和所述二氧化硅载体组合在所述酸性结合溶液中之前,从所述经碘化DNA中除去至少一部分所述碘化反应溶液。

13. 如权利要求12所述的方法,其中在将所述经碘化DNA和所述二氧化硅载体组合在所述酸性结合溶液中之前,从所述经碘化DNA中除去基本上全部的所述碘化反应溶液。

14. 如权利要求12所述的方法,其中通过尺寸排阻过滤从所述经碘化DNA中除去至少一部分所述碘化反应溶液。

15. 如权利要求11所述的方法,其中通过向所述碘化反应溶液中的所述经碘化DNA中添加酸性组分来形成所述酸性结合溶液。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述酸性组分是酸性溶液。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述酸性组分包含酸性乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐溶液中的至少一者。

18. 如权利要求15所述的方法,其中所述酸性组分包含离液盐。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述离液盐包含GuHCl和GITC中的至少一者。

20. 一种制备经脱碘化的DNA的方法,其包括:

i) 将单链非经碘化DNA或经部分碘化的DNA与碘化试剂一起温育以产生在碘化反应混合物中的经碘化DNA;

ii) 将所述碘化反应混合物与以下组合以形成酸性结合溶液:

a) 酸性组分;和

b) 离液盐; 和

c) 二氧化硅载体,

其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于所述经碘化DNA的等电点(pH(I)), 并且其中经碘化DNA结合到所述二氧化硅载体;

iii) 从所述酸性结合溶液中分离结合到所述二氧化硅载体的经碘化DNA;

iv) 在使经分离的经碘化DNA脱碘化的条件下处理所述经分离的经碘化DNA。

21. 如权利要求20所述的方法, 其中所述非经碘化DNA包含一种或多种未甲基化胞嘧啶核苷酸, 并且其中所述经脱碘化的DNA包含一种或多种脱氧尿嘧啶核苷酸。

22. 如权利要求20所述的方法, 其中在使经分离的经碘化DNA脱碘化的条件下处理所述经分离的经碘化DNA包括将经碘化DNA与脱碘化溶液组合。

23. 如权利要求22所述的方法, 其中将所述脱碘化溶液与结合到所述二氧化硅载体的经碘化DNA组合。

24. 一种组合物, 其包含在包含离液盐的酸性结合溶液中的经碘化DNA和二氧化硅载体, 其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于所述经碘化DNA的pH(I), 并且其中所述经碘化DNA结合至所述二氧化硅载体。

25. 如权利要求24所述的方法, 其中所述离液盐包含GuHCl和GITC中的至少一者。

26. 如权利要求24所述的组合物, 其中所述酸性结合溶液包含乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐缓冲液中的至少一者。

27. 如权利要求26所述的组合物, 其中所述酸性结合溶液包含柠檬酸盐缓冲液。

28. 如权利要求24所述的组合物, 其中所述酸性结合溶液包含重亚硫酸盐。

29. 如权利要求28所述的组合物, 其中所述重亚硫酸盐是重亚硫酸铵。

30. 如权利要求24所述的组合物, 其中所述酸性结合溶液的pH小于5。

31. 如权利要求30所述的组合物, 其中所述酸性结合溶液的pH在2.0和4之间。

32. 一种试剂盒, 所述试剂盒包括:

i) 重亚硫酸盐试剂溶液或用于制备重亚硫酸盐试剂溶液的组分;

ii) 二氧化硅载体; 和

iii) pH小于或等于经碘化DNA的pH(I)的酸性组分。

33. 如权利要求32所述的试剂盒, 其中所述重亚硫酸盐试剂溶液具有大于经碘化DNA的pH(I)的pH。

34. 如权利要求32所述的试剂盒, 其中所述酸性组分是酸性溶液。

35. 如权利要求33所述的试剂盒, 其中所述酸性组分包含乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐缓冲液中的至少一者。

36. 如权利要求32所述的试剂盒, 其还包括离液盐。

37. 如权利要求36所述的方法, 其中所述酸性组分包含离液盐。

38. 如权利要求36所述的试剂盒, 其中所述离液盐包含GuHCl和GITC中的至少一者。

39. 如权利要求32所述的试剂盒, 其中所述二氧化硅载体包含颗粒、珠粒和纤维中的至少一者。

40. 如权利要求32所述的试剂盒, 其中所述二氧化硅载体是磁性的。

41. 如权利要求32所述的试剂盒, 其中所述酸性组分的pH小于5。

42. 如权利要求41所述的试剂盒,其中所述酸性组分的pH介于2.0和4之间。

43. 一种方法,其包括将经碘化DNA和二氧化硅载体组合在酸性结合溶液中,其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于所述经碘化DNA的等电点(pH(I)),并且其中经碘化DNA结合至所述二氧化硅载体,其中所述二氧化硅载体优选包含颗粒、珠粒和纤维中的至少一者,其中所述二氧化硅载体优选是磁性的。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述酸性结合溶液的pH小于5,优选小于4,优选在约2.0和4之间。

45. 如权利要求43或权利要求44所述的方法,其中所述酸性结合溶液包含离液盐,其中所述离液盐优选包含盐酸胍(GuHCl)和异硫氰酸胍(GITC)中的至少一者。

46. 如权利要求43-45中任一项所述的方法,所述方法进一步包括将单链非经碘化DNA或经部分碘化DNA与碘化试剂一起温育以产生所述经碘化DNA。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述碘化试剂包含重亚硫酸铵和重亚硫酸钠中的至少一者。

48. 如权利要求43-47中任一者所述的方法,其进一步包括以下中的至少一者:

- i) 洗涤与经碘化DNA结合的二氧化硅载体;
- ii) 将所述经碘化DNA脱碘化以形成经脱碘化的DNA;以及
- iii) 从所述二氧化硅载体上洗脱所述经脱碘化的DNA。

49. 如权利要求48所述的方法,其中将非经碘化DNA与碘化试剂一起温育是在pH等于或高于所述经碘化DNA的pH(I)的碘化反应溶液中进行的。

50. 如权利要求49所述的方法,其中在将所述经碘化DNA和所述二氧化硅载体组合在所述酸性结合溶液之前,从所述经碘化DNA中除去至少一部分所述碘化反应溶液。

51. 如权利要求50所述的方法,其中在将所述经碘化DNA和所述二氧化硅载体组合在所述酸性结合溶液之前,从所述经碘化DNA中除去基本上全部的所述碘化反应溶液。

52. 如权利要求50或51所述的方法,其中通过尺寸排阻过滤从所述经碘化DNA中除去至少一部分所述碘化反应溶液。

53. 如权利要求49-52中任一项所述的方法,其中通过向所述碘化反应溶液中的所述经碘化DNA中添加酸性组分来形成所述酸性结合溶液。

54. 如权利要求53所述的方法,其中所述酸性组分是酸性溶液。

55. 如权利要求53或54所述的方法,其中所述酸性组分包含酸性乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐溶液中的至少一者。

56. 如权利要求53-55中任一项所述的方法,其中所述酸性组分包含离液盐,其中所述离液盐优选包含GuHCl、GITC中的至少一者。

57. 一种制备经脱碘化的DNA的方法,其包括:

i) 将单链非经碘化DNA或经部分碘化的DNA与碘化试剂一起温育以产生在碘化反应混合物中的经碘化DNA;

ii) 将所述碘化反应混合物与以下组合以形成酸性结合溶液:

- a) 酸性组分;
- b) 离液盐;和
- c) 二氧化硅载体,

其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于所述经碘化DNA的等电点(pH(I)),并且其中经碘化DNA结合到所述二氧化硅载体;

iii)从所述酸性结合溶液中分离结合到所述二氧化硅载体的经碘化DNA;

iv)在使经分离的经碘化DNA脱碘化的条件下处理所述经分离的经碘化DNA,

优选地,其中所述非经碘化DNA包含一种或多种未甲基化胞嘧啶核苷酸,并且其中所述经脱碘化的DNA包含一种或多种脱氧尿嘧啶核苷酸。

58.如权利要求57所述的方法,其中在使所述经分离的经碘化DNA脱碘化的条件下处理所述经分离的经碘化DNA包括将碘化DNA与脱碘化溶液组合。

59.如权利要求58所述的方法,其中将所述脱碘化溶液与结合到所述二氧化硅载体的经碘化DNA组合。

60.一种组合物,其包含在包含离液盐的酸性结合溶液中的经碘化DNA和二氧化硅载体,其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于所述经碘化DNA的pH(I),并且其中所述经碘化DNA结合至所述二氧化硅载体,

其中所述离液盐优选包含GuHCl和GITC中的至少一种;并且其中所述酸性结合溶液优选包含乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐缓冲液中的至少一者,优选柠檬酸盐缓冲液。

61.如权利要求60所述的组合物,其中所述酸性结合溶液包含重亚硫酸盐,优选重亚硫酸铵。

62.如权利要求60或权利要求61所述的组合物,其中所述酸性结合溶液的pH小于5,优选在2.0和4之间。

63.一种试剂盒,所述试剂盒包括:

i)重亚硫酸盐试剂溶液或用于制备重亚硫酸盐试剂溶液的组分,其中所述重亚硫酸盐试剂溶液优选具有大于经碘化DNA的pH(I)的pH;

ii)二氧化硅载体;和

iii)酸性组分,优选酸性溶液,所述酸性组分的pH小于或等于经碘化DNA的pH(I),其中所述酸性组分优选包含乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐缓冲液中的至少一者,优选柠檬酸盐缓冲液。

64.如权利要求63所述的试剂盒,其还包括离液盐,其中优选所述酸性组分包含离液盐,并且其中所述离液盐优选包含GuHCl和GITC中的至少一者。

65.如权利要求63或64所述的试剂盒,其中所述二氧化硅载体包含颗粒、珠粒和纤维中的至少一者。

66.如权利要求63-65中任一项所述的试剂盒,其中所述二氧化硅载体是磁性的。

67.如权利要求63-66中任一项所述的试剂盒,其中所述酸性组分的pH小于5,优选地其中所述酸性组分的pH在2.0和4之间。

经磺化DNA的纯化

[0001] 本申请要求2020年7月29日提交的美国临时申请序列号63/058,179的优先权,该美国临时申请通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本公开涉及经磺化DNA的纯化。此外,本公开涉及用于DNA的重亚硫酸盐转化和用载体(例如二氧化硅载体)对经磺化DNA进行的改进纯化的方法和系统,以及用于将经磺化DNA结合至载体的酸性条件的使用。

[0003] 发明背景

[0004] DNA甲基化是一种通过向DNA(特别是DNA的胞嘧啶环)添加甲基,从而改良基因的功能的表观遗传机制。检测和测绘DNA甲基化位点对于了解表观遗传基因调控和检测与牵涉到癌症和其他疾病状态的发展和进展的异常DNA甲基化至关重要。

[0005] 测绘甲基化位点目前是通过Frommer等人描述的用于检测DNA中的5-甲基胞嘧啶(Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:1827-31(1992),其通过引用整体并入本文用于所有目的)或其变体的重亚硫酸盐方法完成的。测绘5-甲基胞嘧啶的重亚硫酸盐方法是基于胞嘧啶而非5-甲基胞嘧啶与重亚硫酸盐反应的观察结果。通常,该反应包括一系列步骤,包括:使胞嘧啶与亚硫酸氢盐反应从而形成经磺化胞嘧啶;经磺化反应中间体的自发脱氨基产生经磺化尿嘧啶;以及在碱性条件下使尿嘧啶脱磺化从而形成尿嘧啶。尿嘧啶和5-甲基胞嘧啶之间的碱基对差异有助于检测-尿嘧啶碱基对与腺嘌呤和5-甲基胞嘧啶碱基对与鸟嘌呤。因此,多种方法能够区分甲基化胞嘧啶和非甲基化胞嘧啶,例如,重亚硫酸盐基因组测序(Grigg G,&Clark S,Bioessays(1994)16:431-36;Grigg G,DNA Seq.(1996)6:189-98)或例如美国专利号5,786,146中所公开的甲基化特异性PCR(MSP)。重亚硫酸盐转化的反应条件、试剂浓度等的大量变化在本领域中是已知的,并且每种变化都可能导致DNA回收率和脱氨水平的差异。

[0006] 一般来说,重亚硫酸盐处理方法包括洗涤步骤和缓冲液更换,以产生用于碱基对分析的经纯化、转化的DNA样本。多种方法促进了这些步骤,例如旋转柱、乙醇纯化和固体载体。然而,使用二氧化硅旋转柱或乙醇纯化的方法通常会导致样本损失,从而损害重亚硫酸盐方法作为胞嘧啶甲基化测量的实用性。尽管已使用固体载体进行了一些改进,但这些方法需要大量DNA作为输入,并且还存在样本丢失和再现性问题。此外,常规方法通常需要数天的时间才能完成,并且不能提供有效的转化和经转化的DNA的回收。因此,传统方法仅提供DNA甲基化的定性测量。

[0007] 在尝试优化DNA的重亚硫酸盐转化时,焦点一般集中在重亚硫酸盐修饰反应本身,即磺化DNA中未甲基化的胞嘧啶的步骤。一些改善所得经磺化DNA回收率的方法已集中于增加离液盐 chaotropic salt) 浓度,从而破坏水与DNA的氢键以促进二氧化硅-DNA相互作用。其他方法通过简化结合缓冲液(其中去除了诸如乙醇和TRIS的添加剂,例如在美国专利号9,315,853中,其通过引用整体并入本文用于所有目的)解决了富含胞嘧啶的DNA回收率降低的问题。

发明内容

[0008] 本文公开的系统和方法增加了重亚硫酸盐转化的DNA回收率(尤其是对于富含胞嘧啶的靶标而言),提高了对重亚硫酸盐处理过程中的变化的稳健性,并增加了广泛范围的样本类型的DNA回收率。除了氢键破坏外,这些方法还包括中和DNA电荷以促进二氧化硅-DNA相互作用。

[0009] 本文公开了方法,该方法包括使经碘化DNA与二氧化硅载体在酸性溶液中结合,其中酸性溶液的pH小于或等于经碘化DNA的等电点pH(I)。在一些实施方案中,pH小于5。在一些实施方案中,pH在2.5和4之间。酸性溶液还可包含离液盐或离液剂。在一些实施方案中,离液盐是盐酸胍(GuHCl)。

[0010] 该方法可进一步包括将变性的、非经碘化DNA与碘化试剂一起温育以产生经碘化DNA。如本文所用,术语“碘化试剂”优选指将未甲基化的胞嘧啶核苷酸选择性地转化为尿嘧啶碘酸盐核苷酸的试剂。在一些实施方案中,碘化试剂是重亚硫酸铵。

[0011] 该方法可以进一步包括以下中的至少一者或全部:洗涤与经碘化DNA结合的二氧化硅载体;将经碘化DNA脱碘化以形成经脱碘化的DNA;以及从二氧化硅载体上洗脱经脱碘化的DNA。在一些实施方案中,洗涤是用醇例如乙醇完成的。在一些实施方案中,脱碘化包括将经碘化DNA在碱性条件下温育,并且在一些实施方案中,将经碘化DNA直接添加到检测测定,例如聚合酶链反应中,以使得经碘化DNA在进行检测测定的条件下脱碘化。在一些实施方案中,洗脱包括用高热量处理。

[0012] 本技术进一步涵盖以下实施方案并由以下实施方案说明:

[0013] 1.一种方法,其包括将经碘化DNA和二氧化硅载体组合在酸性结合溶液中,其中酸性结合溶液的pH小于或等于经碘化DNA的等电点(pH(I)),并且其中经碘化DNA结合至二氧化硅载体。

[0014] 2.如实施方案1所述的方法,其中所述二氧化硅载体包含颗粒、珠粒和纤维中的至少一者。

[0015] 3.如实施方案1所述的方法,其中所述二氧化硅载体是磁性的。

[0016] 4.如实施方案1所述的方法,其中所述酸性结合溶液的pH小于5。

[0017] 5.如实施方案4所述的方法,其中所述酸性结合溶液的pH在2.0和4之间。

[0018] 6.如实施方案1所述的方法,其中所述酸性结合溶液包含离液盐。

[0019] 7.实施方案6所述的方法,其中所述离液盐包含盐酸胍(GuHCl)和异硫氰酸胍(GITC)中的至少一者。

[0020] 8.如实施方案1所述的方法,所述方法进一步包括将单链非经碘化DNA或经部分碘化DNA与碘化试剂一起温育以产生经碘化DNA。

[0021] 9.如实施方案8所述的方法,其中所述碘化试剂包含重亚硫酸铵和重亚硫酸钠中的至少一者。

[0022] 10.如实施方案1所述的方法,其进一步包括以下中的至少一者:

[0023] i) 洗涤与经碘化DNA结合的二氧化硅载体;

[0024] ii) 将经碘化DNA脱碘化以形成经脱碘化的DNA;以及

[0025] iii) 从二氧化硅载体上洗脱经脱碘化的DNA。

[0026] 11.如实施方案8所述的方法,其中将非经碘化DNA与碘化试剂一起温育是在pH等

于或高于所述经碘化DNA的pH(I)的碘化反应溶液中进行的。

[0027] 12. 如实施方案11所述的方法, 其中在将所述经碘化DNA和所述二氧化硅载体组合在所述酸性结合溶液中之前, 从所述经碘化DNA中除去至少一部分所述碘化反应溶液。

[0028] 13. 如实施方案12所述的方法, 其中在将所述经碘化DNA和所述二氧化硅载体组合在所述酸性结合溶液中之前, 从所述经碘化DNA中除去基本上全部的所述碘化反应溶液。

[0029] 14. 如实施方案12所述的方法, 其中通过尺寸排阻过滤从所述经碘化DNA中除去至少一部分所述碘化反应溶液。

[0030] 15. 如实施方案11所述的方法, 其中通过向所述碘化反应溶液中的所述经碘化DNA中添加酸性组分来形成酸性结合溶液。

[0031] 16. 如实施方案15所述的方法, 其中所述酸性组分是酸性溶液。

[0032] 17. 如实施方案16所述的方法, 其中所述酸性组分包含酸性乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐溶液中的至少一者。

[0033] 18. 如实施方案15所述的方法, 其中所述酸性组分包含离液盐。

[0034] 19. 如实施方案18所述的方法, 其中所述离液盐包含GuHCl和GITC中的至少一者。

[0035] 20. 一种制备经脱碘化的DNA的方法, 其包括:

[0036] i) 将单链非经碘化DNA或经部分碘化的DNA与碘化试剂一起温育以产生在碘化反应混合物中的经碘化DNA;

[0037] ii) 将所述碘化反应混合物与以下组合以形成酸性结合溶液:

[0038] a) 酸性组分; 和

[0039] b) 离液盐; 和

[0040] c) 二氧化硅载体,

[0041] 其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于所述经碘化DNA的等电点(pH(I)), 并且其中经碘化DNA结合到所述二氧化硅载体;

[0042] iii) 从所述酸性结合溶液中分离结合到所述二氧化硅载体的经碘化DNA;

[0043] iv) 在使经分离的经碘化DNA脱碘化的条件下处理经分离的经碘化DNA。

[0044] 21. 如实施方案20所述的方法, 其中所述非经碘化的DNA包含一种或多种未甲基化胞嘧啶核苷酸, 并且其中所述脱碘化的DNA包含一种或多种脱氧尿嘧啶核苷酸。

[0045] 22. 如实施方案20所述的方法, 其中在使经分离的经碘化DNA脱碘化的条件下处理所述经分离的经碘化DNA包括将经碘化DNA与脱碘化溶液组合。

[0046] 23. 如实施方案22所述的方法, 其中将所述脱碘化溶液与结合到所述二氧化硅载体上的经碘化DNA组合。

[0047] 24. 一种组合物, 其包含在包含离液盐的酸性结合溶液中的经碘化DNA和二氧化硅载体, 其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于经碘化DNA的pH(I), 并且其中所述经碘化DNA结合至所述二氧化硅载体。

[0048] 25. 如实施方案24所述的方法, 其中所述离液盐包含GuHCl和GITC中的至少一者。

[0049] 26. 如实施方案24所述的组合物, 其中所述酸性结合溶液包含乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐缓冲液中的至少一者。

[0050] 27. 如实施方案26所述的组合物, 其中所述酸性结合溶液包含柠檬酸盐缓冲液。

[0051] 28. 如实施方案24所述的组合物, 其中所述酸性结合溶液包含重亚硫酸盐。

- [0052] 29.如实施方案28所述的组合物,其中所述重亚硫酸盐是重亚硫酸铵。
- [0053] 30.如实施方案24所述的组合物,其中所述酸性结合溶液的pH小于5。
- [0054] 31.如实施方案30所述的组合物,其中所述酸性结合溶液的pH在2.0和4之间。
- [0055] 32.一种试剂盒,所述试剂盒包括:
- [0056] i) 重亚硫酸盐试剂溶液或用于制备重亚硫酸盐试剂溶液的组分;
- [0057] ii) 二氧化硅载体;和
- [0058] iii) pH小于或等于经碘化DNA的pH(I)的酸性组分。
- [0059] 33.如实施方案32所述的试剂盒,其中所述重亚硫酸盐试剂溶液具有大于经碘化DNA的pH(I)的pH。
- [0060] 34.如实施方案32所述的方法,其中所述酸性组分是酸性溶液。
- [0061] 35.如实施方案33所述的试剂盒,其中所述酸性组分包含乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐缓冲液中的至少一者。
- [0062] 36.如实施方案32所述的试剂盒,其进一步包括离液盐。
- [0063] 37.如实施方案36所述的试剂盒,其中所述酸性组分包含离液盐。
- [0064] 38.如实施方案36所述的试剂盒,其中所述离液盐包含GuHCl和GITC中的至少一者。
- [0065] 39.如实施方案32所述的试剂盒,其中所述二氧化硅载体包含颗粒、珠粒和纤维中的至少一者。
- [0066] 40.如实施方案32所述的试剂盒,其中所述二氧化硅载体是磁性的。
- [0067] 41.如实施方案32所述的试剂盒,其中所述酸性组分的pH小于5。
- [0068] 42.如实施方案41所述的试剂盒,其中所述酸性组分的pH介于2.0和4之间。
- [0069] 43.一种方法,其包括将经碘化DNA和二氧化硅载体组合在酸性结合溶液中,其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于经碘化DNA的等电点(pH(I)),并且其中经碘化DNA结合至二氧化硅载体,其中所述二氧化硅载体优选包含颗粒、珠粒和纤维中的至少一者,其中所述二氧化硅载体优选是磁性的。
- [0070] 44.如实施方案43所述的方法,其中所述酸性结合溶液的pH小于5,优选小于4,优选在约2.0和4之间。
- [0071] 45.如实施方案43或实施方案44所述的方法,其中所述酸性结合溶液包含离液盐,其中所述离液盐优选包含盐酸胍(GuHCl)和异硫氰酸胍(GITC)中的至少一者。
- [0072] 46.如实施方案43-45中任一项所述的方法,所述方法进一步包括将单链非经碘化DNA或经部分碘化DNA与碘化试剂一起温育以产生所述经碘化DNA。
- [0073] 47.如实施方案46所述的方法,其中所述碘化试剂包含重亚硫酸铵和重亚硫酸钠中的至少一者。
- [0074] 48.如实施方案43-47中任一者所述的方法,其进一步包括以下中的至少一者:
- [0075] i) 洗涤与经碘化DNA结合的二氧化硅载体;
- [0076] ii) 将经碘化DNA脱碘化以形成经脱碘化的DNA;以及
- [0077] iii) 从二氧化硅载体上洗脱经脱碘化的DNA。
- [0078] 49.如实施方案48所述的方法,其中将非经碘化DNA与碘化试剂一起在pH等于或高于所述经碘化DNA的pH(I)的碘化反应溶液中温育。

[0079] 50.如实施方案49所述的方法,其中在将所述经碘化DNA和所述二氧化硅载体组合在所述酸性结合溶液之前,从所述经碘化DNA中除去至少一部分所述碘化反应溶液。

[0080] 51.如实施方案50所述的方法,其中在将所述经碘化DNA和所述二氧化硅载体组合在所述酸性结合溶液之前,从所述经碘化DNA中除去基本上全部的所述碘化反应溶液。

[0081] 52.如实施方案50或51所述的方法,其中通过尺寸排阻过滤从所述经碘化DNA中除去至少一部分所述碘化反应溶液。

[0082] 53.如实施方案49-52中任一项所述的方法,其中通过向所述碘化反应溶液中的所述碘化DNA中添加酸性组分来形成所述酸性结合溶液。

[0083] 54.如实施方案53所述的方法,其中所述酸性组分是酸性溶液。

[0084] 55.如实施方案53或54所述的方法,其中所述酸性组分包含酸性乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐溶液中的至少一者。

[0085] 56.如实施方案53-55中任一项所述的方法,其中所述酸性组分包含离液盐,其中所述离液盐优选包含GuHCl、GITC中的至少一者。

[0086] 57.一种制备经脱碘化的DNA的方法,其包括:

[0087] i)将单链非经碘化DNA或经部分碘化的DNA与碘化试剂一起温育以产生在碘化反应混合物中的经碘化DNA;

[0088] ii)将所述碘化反应混合物与以下组合以形成酸性结合溶液:

[0089] a)酸性组分;

[0090] b)离液盐;和

[0091] c)二氧化硅载体,

[0092] 其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于所述经碘化DNA的等电点(pH(I)),并且其中经碘化DNA结合到所述二氧化硅载体;

[0093] iii)从所述酸性结合溶液中分离结合到所述二氧化硅载体的经碘化DNA;

[0094] iv)在使经分离的经碘化DNA脱碘化的条件下处理所述经分离的经碘化DNA,

[0095] 优选地,其中所述非经碘化DNA包含一种或多种未甲基化胞嘧啶核苷酸,并且其中所述经脱碘化的DNA包含一种或多种脱氧尿嘧啶核苷酸。

[0096] 58.如实施方案57所述的方法,其中在使经分离的经碘化DNA脱碘化的条件下处理所述经分离的经碘化DNA包括将经碘化DNA与脱碘化溶液组合。

[0097] 59.如实施方案58所述的方法,其中将所述脱经碘化溶液与结合到所述二氧化硅载体上的经碘化DNA组合。

[0098] 60.一种组合物,其包含在包含离液盐的酸性结合溶液中的经碘化DNA和二氧化硅载体,其中所述酸性结合溶液的pH小于或等于经碘化DNA的pH(I),并且其中所述经碘化DNA结合至所述二氧化硅载体,

[0099] 其中所述离液盐优选包含GuHCl和GITC中的至少一种;并且其中所述酸性结合溶液优选包含乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐缓冲液中的至少一者,优选柠檬酸盐缓冲液。

[0100] 61.如实施方案60所述的组合物,其中所述酸性结合溶液包含重亚硫酸盐,优选重亚硫酸铵。

[0101] 62.如实施方案60或实施方案61所述的组合物,其中所述酸性结合溶液的pH小于

5,优选在2.0和4之间。

[0102] 63.一种试剂盒,所述试剂盒包括:

[0103] i) 重亚硫酸盐试剂溶液或用于制备重亚硫酸盐试剂溶液的组分,其中所述重亚硫酸盐试剂溶液优选具有大于经碘化DNA的pH(I)的pH;

[0104] ii) 二氧化硅载体;和

[0105] iii) 酸性组分,优选酸性溶液,所述酸性组分的pH小于或等于经碘化DNA的pH(I),其中所述酸性组分优选包含乙酸盐、甘氨酸、苹果酸盐、甲酸盐或柠檬酸盐缓冲液中的至少一者,优选柠檬酸盐缓冲液。

[0106] 64.如实施方案63所述的试剂盒,其还包括离液盐,其中优选所述酸性组分包含离液盐,并且其中所述离液盐优选包含GuHCl和GITC中的至少一者。

[0107] 65.如实施方案63或64所述的试剂盒,其中所述二氧化硅载体包含颗粒、珠粒和纤维中的至少一者。

[0108] 66.如实施方案63-65中任一项所述的试剂盒,其中所述二氧化硅载体是磁性的。

[0109] 67.如实施方案63-66中任一项所述的试剂盒,其中所述酸性组分的pH小于5,优选地其中所述酸性组分的pH在2.0和4之间。

[0110] 在本文描述的任何实施方案的某些优选实施方案中,单链DNA是从样本,例如生物样本分离的。例如,在一些优选的实施方案中,单链DNA是从来自人受试者(诸如患有或怀疑患有癌症的受试者)的样本,例如从来自受试者的血浆样本、粪便样本或其他样本分离的。在其他实施方案中,单链DNA是合成的。在优选的实施方案中,单链DNA是通过将双链DNA暴露于变性条件(例如碱性条件、高温等)而形成,在该变性条件下碱基配对的DNA链分离从而形成单链。在一些实施方案中,测量经脱碘化的DNA,例如以测量DNA中的一种或多种甲基化DNA标记(MDM)。例如,本文中提及的任何DNA(例如,在实验部分或附图中,包括表1-7、图3、图7-13、图15A和图15B、图16和图18中公开的MDM)可以单独地或以组合,或以2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16个等的任何子组合从任何类型的样本(例如,血浆、粪便、组织等)中被检测或测量。

[0111] 根据以下详细描述和附图,本公开的其他方面和实施方案将是显而易见的。

附图说明

[0112] 图1是包括本文公开的方法的重亚硫酸盐处理方法的一个实施方案的概览。

[0113] 图2是所提出的结合机制的示意图。

[0114] 图3提供了针对六种不同标记DNA的结合pH与回收的链的对数的关系的曲线图。

[0115] 图4是转化的胞嘧啶百分比与最大结合pH的关系图。将每条DNA链的转化的胞嘧啶百分比(尿嘧啶磺酸盐核苷酸/总核苷酸)相对于最大链回收率所需的最高估计结合pH作图。示出了这些点的线性拟合。

[0116] 图5是使用相同引物/探针组合的DNA链的转化的胞嘧啶百分比与最大结合pH的关系的曲线图。所述DNA中的三种DNA(BMP3、 β -肌动蛋白("BTACT")和NDRG4链)被修饰为产生这样的DNA的集合,该DNA保留了特定DNA的每个变体的相同引物和探针结合序列,但含有位于该DNA链的其他区域中的不同数目的未甲基化C。为了进一步说明这种相关性的强度,将线拟合到每个序列集合。

[0117] 图6A和6B示出了使用未经调节的结合pH(图6A)或低结合pH(图6B)进行转化和净化后的总DNA的曲线图。

[0118] 图7是四种不同DNA序列(LASS4、PPP2R5C、LRRC4和ZDHHC1)的粪便样本体积(mL)与针对未经调节的结合pH(顶行)或低结合pH(底行)回收的链的曲线图。ZDHHC1DNA被测试了两次。

[0119] 图8A提供了示出来自在低pH和未经调节的pH下执行的结合反应下的不同批号的重亚硫酸铵的链回收率的表格。

[0120] 图8B提供了示出来自在低pH和未经调节的pH下执行的结合反应下的不同浓度的重亚硫酸铵的链回收率的表格。

[0121] 图9提供了示出存在于在低pH和未经调节的pH下执行的结合反应中的污染物的影响的表格。

[0122] 图10提供示出使用未经调节的pH结合反应使用各种二氧化硅珠粒回收的链的对数的表格。

[0123] 图11提供了示出使用实施例1中描述的低pH结合反应使用各种二氧化硅珠粒回收的链的对数的表格。

[0124] 图12提供了示出使用调节到范围为从4.85到2.13的酸性pH(“BND pH”)的结合反应回收的链的表格。

[0125] 图13提供了示出使用未经调节的或低的pH结合反应针对不同尺寸的DNA分子和针对不同浓度的DNA分子回收的链的表格。

[0126] 图14示出了比较方案1、方案2和方案3提供的反应条件的表格。

[0127] 图15A和15B示出了比较使用方案1、方案2和方案3时的链回收率的表格。

[0128] 图16示出对图15A-15B中针对使用方案1、方案2和方案3的不同甲基化标记DNA示出的链回收率进行成对比较的表格。

[0129] 图17示出了比较图16中针对不同甲基化标记DNA示出的链回收率的曲线图,该图示出为方案2回收率与使用方案1或方案3时的回收率的比率。每个数据点的“方案X”表示用于该数据点的方案1或方案3。

[0130] 图18示出了表格,该表格比较了在结合步骤期间使用未经调节的pH时,或在使指示的经碘化DNA结合到二氧化硅珠粒期间使用甘氨酸、柠檬酸盐、苹果酸盐或甲酸盐缓冲液降低pH时不同DNA的回收率。

[0131] 定义

[0132] 本章节中使用的章节标题和本文的全部公开内容仅用于组织目的,并且不旨在进行限制。

[0133] 为促进对本发明的理解,以下定义多个术语和短语。附加的定义阐述在整个详细描述中。

[0134] 在整个专利说明书和权利要求书中,以下术语采用与本文明确关联的含义,除非上下文另有明确规定。如本文使用的短语“在一个实施方案中”不一定指代同一实施方案,尽管它可能指代同一实施方案。此外,如本文使用的短语“在另一个实施方案中”不一定指代不同的实施方案,尽管它可能指代不同的实施方案。因此,如下所述,在不脱离本技术的范围或精神的情况下,可以容易地组合本技术的各种实施方案。

[0135] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“具备”、“具有”、“可以”、“含有”及其变体旨在是不排除附加行为或结构的可能性的开放式的过渡性短语、术语或词语。此外,如本文所用,术语“或”是包含性的“或”连接词并且等同于术语“和/或”,除非上下文另有明确规定。术语“基于”不是排他性的并且允许基于未描述的额外因素,除非上下文另有明确规定。

[0136] 除非上下文中另外明确指定,否则单数形式“一个”、“一种”和“该/所述(the)”包括复数指代物。本公开还考虑了,其他实施方案“包括”本文呈现的实施方案或要素、“由本文呈现的实施方案或要素组成”和“基本上由本文呈现的实施方案或要素组成”,无论是否被明确阐述。

[0137] 如在本申请的权利要求中使用的过渡短语“基本上由.....组成”将权利要求的范围限制为具体指定的材料或步骤“以及那些不会实质性影响所要求保护的发明的一个或多个基本和新颖特征的材料或步骤”,如In re Herz, 537F.2d 549, 551-52, 190USPQ 461, 463 (CCPA 1976)中所讨论的。例如,“基本上由所列举的要素组成”的组合可能含有未列举的污染物,该污染物的水平使得该污染物尽管存在,但不会使所列举的组合物的功能与纯组合物(即“由所列举的组分组成”的组合物)相比发生改变。

[0138] 针对本文中数字范围的列举,明确考虑了具有相同精确度的介于其间的每个居间数字。例如,对于6至9的范围,除了6和9之外,还考虑了数字7和8,而对于6.0至7.0的范围,明确考虑了数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0139] 除非本文另有定义,否则与本公开结合使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。例如,本文所述的与分子生物学以及蛋白质和核酸化学以及杂交结合使用以及用在分子生物学以及蛋白质和核酸化学以及杂交中的任何术语是本领域公知和通常使用的那些。该术语的含义和范围应该是清楚的;然而,如果存在任何潜在的歧义,则本文提供的定义优先于任何词典或外部定义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。

[0140] 如本文所用,“DNA片段”或“小DNA”或“短DNA”意指由长度不超过大约200个碱基对或核苷酸组成的DNA。

[0141] 如本文所用,如在提及例如CpG基因座中的胞嘧啶的甲基化状态时使用的“甲基化”或“经甲基化的”通常是指在胞嘧啶碱基的5位存在或不存在甲基基团(即,特定的胞嘧啶是否为5-甲基胞嘧啶)。甲基化可直接测定,例如,如通过分析胞嘧啶的甲基化状态的常规方法所证实,例如通过测定由重亚硫酸盐处理所引起的特定C残基向尿嘧啶转化的灵敏性(或灵敏性的缺乏)来测定。例如,样本中的胞嘧啶残基在下面的情况下时一般可被视为“甲基化的”:当将该样本用重亚硫酸盐以预计将会转化该胞嘧啶残基(如果未甲基化)的方式处理(例如在使样本中的大部分或全部未甲基化的胞嘧啶转化成尿嘧啶的条件下)时,该胞嘧啶残基未转化成尿嘧啶。

[0142] 如本文所用,术语“甲基胞嘧啶”、“甲基C”、“甲基化胞嘧啶”、“甲基化C”和“meC”可互换使用并且涵盖5-甲基胞嘧啶(5mC)和5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)。

[0143] 术语“重亚硫酸盐试剂”是指包含如本文所公开的可用于区分甲基化和未甲基化的CpG二核苷酸序列的重亚硫酸盐、二亚硫酸盐、亚硫酸氢盐或它们的组合的试剂。所述治疗的方法是本领域已知的(例如,PCT/EP2004/011715和W02013/116375,其中每一个都通过引用整体并入)。在一些实施方案中,重亚硫酸盐处理在变性溶剂(诸如但不限于正亚烷基

二醇或二甘醇二甲醚(DME))的存在下,或在二噁烷或二噁烷衍生物的存在下进行。在一些实施方案中,变性溶剂以介于1%与35%(v/v)之间的浓度使用。在一些实施方案中,重亚硫酸盐反应在清除剂存在下进行,该清除剂为诸如但不限于色满衍生物,例如,6-羟基-2,5,7,8,-四甲基色满2-羧酸或三羟基苯甲酸以及它们的衍生物,例如没食子酸(参见:PCT/EP2004/011715,其通过引用整体并入)。在某些优选的实施方案中,重亚硫酸盐反应包括用亚硫酸氢铵(也称为重亚硫酸铵)处理,例如,如WO 2013/116375中所述。

[0144] 如本文所用,“经碘化DNA”是指包含由于用碘化试剂(例如重亚硫酸盐试剂)处理而被碘化的胞嘧啶或尿嘧啶的DNA。经碘化DNA可以是部分碘化的,因此该DNA包含一种或多种尚未被碘化形成尿嘧啶碘酸盐的未甲基化胞嘧啶,或者该DNA可以是完全碘化的,因此每个未甲基化的(或未以其他方式受保护的)胞嘧啶均已经被碘化从而形成尿嘧啶碘酸盐。经碘化DNA也可以是合成的DNA,例如,使用标准核酸合成化学合成以模拟已经用重亚硫酸盐试剂处理的DNA的DNA。例如,可以从核苷酸单体合成DNA链以形成包含一个或多个尿嘧啶碘酸盐核苷酸的链,

[0145] 如本文所用,“未经碘化DNA”是指未在使胞嘧啶转化为尿嘧啶碘酸盐核苷酸的条件下用碘化试剂(例如重亚硫酸盐试剂)处理的DNA。未经碘化DNA可包含一个或多个未甲基化的胞嘧啶核苷酸。在优选的实施方案中,未经碘化DNA不含尿嘧啶碘酸盐核苷酸。

[0146] 如本文在提及用于将DNA结合到固体载体的溶液或条件时所用,术语“低pH”是指结合溶液或条件,其pH等于或低于DNA(例如经碘化DNA)将被结合至的固体载体的pH(I)。在一些实施方案中,低pH结合条件是通过使用包含结合剂(例如离液盐如盐酸胍)的结合溶液与酸性组分(例如具有酸性pH的缓冲液)的组合来提供。在一些实施方案中,在将结合混合物与经碘化DNA组合之前将酸性组分与结合剂预混合,而在一些实施方案中,在将结合剂与经碘化DNA组合之前或之后将酸性组分与经碘化DNA组合。

[0147] 如本文在提及用于使经碘化DNA结合到固体载体的溶液或条件时使用的术语“未经调节的pH”、“标准pH”和“高pH”可互换使用,并且是指这样的结合反应溶液或条件,该结合反应溶液或条件不包含用于使该结合溶液或条件的pH相对于仅包含经碘化DNA和结合剂(例如GuHCl)的结合溶液的pH降低的酸性组分。通常,未经调节的pH结合溶液的pH等于或高于固体载体,尤其是二氧化硅载体的pH(I)。在一些实施方案中,未经调节的pH结合溶液是包含用于碘化DNA样本的碘化试剂、经碘化DNA和结合剂(例如GuHCl)中的一些或全部的混合物。在一些实施方案中,未经调节的结合溶液的pH等于或接近单独碘化试剂的pH。

[0148] 术语“样本”以其最广泛的含义使用。例如,怀疑含有人基因或染色体或与人染色体相关的序列的样本可以包括细胞、从细胞分离的染色体(例如中期染色体的扩散)、基因组DNA(在溶液中或结合到固体载体,如用于Southern印迹分析)、RNA(在溶液中或结合到固体载体,如用于Northern印迹分析)、cDNA(在溶液中或结合到固体载体)、无细胞DNA(例如,来自血浆的循环无细胞DNA;来自体液(诸如血浆、尿液、粪便等)的片段化DNA);从外来体或其他微泡,例如从体液中分离的DNA,等。在一些实施方案中,它意味着包括标本或培养物(例如,微生物培养物),而在其他实施方案中,它意味着包括生物和环境样本(例如,怀疑包含靶序列、基因或模板的生物和环境样本)。在一些实施方案中,样本可包括合成起源的标本。样本可以是未纯化的或者可以是经部分或完全纯化的或经其他方式加工的。“怀疑含有”核酸的样本可能含有或不含靶核酸分子。

[0149] 本技术不受使用或分析的生物样本类型的限制。本技术可与多种生物样本一起使用,该生物样本包括但不限于组织(例如,器官(例如,心脏、肝脏、脑、肺、胃、肠、脾、肾、胰腺和生殖器官)、腺体、皮肤和肌肉)、细胞(例如血细胞(例如淋巴细胞或红细胞)、肌肉细胞、肿瘤细胞和皮肤细胞)、气体、体液(例如血液或其部分、血清、血浆、尿液、精液、唾液等),或从人(如成人、婴儿或胚胎)或动物(如牛、家禽、小鼠、大鼠、狗、猪、猫、马等)获得的固体(如粪便)样本等。在一些实施方案中,生物样本可以是固体食物和/或饲料产品和/或成分,诸如乳制品、蔬菜、肉类和肉类副产品以及废物。生物样本可以从所有的各种家养动物科,以及野性或野生动物(包括但不限于诸如有蹄类动物、熊、鱼、兔类动物、啮齿动物、鳍足类动物等)获得。

[0150] 生物样本还包括活检物和组织切片(例如,活检物或肿瘤切片、生长切片、皮疹切片、感染切片或石蜡包埋切片)、医学或医院样本(例如,包括但不限于血液样本、唾液、颊拭子、脑脊液、胸膜液、乳、初乳、淋巴液、痰、呕吐物、胆汁、精液、卵母细胞、宫颈细胞、羊膜液、尿液、粪便、毛发和汗液)、实验室样本(例如亚细胞级分),以及法医样本(例如,血液或组织(例如,飞溅物或残留物)、含有核酸的毛发和皮肤细胞)和考古学样本(例如,石化生物体、组织或细胞)。

[0151] 环境样本包括但不限于环境材料,诸如地表物质、土壤、水(例如,淡水或海水)、藻类、地衣、地质样本、含核酸的含空气材料、晶体和工业样本,以及为从食品和乳制品加工仪器、器具、设备、器皿、一次性和非一次性物品中获取的样本。

[0152] 样本可通过任何所需或合适的方法制备。在一些实施方案中,使用美国专利号9,000,146和10,047,390中描述的方法和系统直接从体液、粪便或其他样本中分析核酸,这些美国专利中的每一篇均通过引用整体并入本文用于所有目的。

[0153] 然而,上面描述的实例不应解读为限制适用于本技术的样本(例如,怀疑包含靶序列、基因或模板(例如,其存在或不存在可使用本技术的组合物和方法来确定))类型。

[0154] 术语“靶(标)”,当在提及核酸检测或分析方法时被使用时,是指具有待检测或分析的特定核苷酸序列的核酸,例如,在怀疑含有该靶核酸的样本中。在一些实施方案中,靶(标)是这样的核酸,该核酸具有甲基化状态需要被确定的特定序列。当在提及聚合酶链反应时被使用时,“靶(标)”通常是指被用于聚合酶链反应的引物结合的核酸区域。因此,“靶标”是试图从样本中可能存在的其他核酸序列中分选出来的。“区段”定义为靶序列内的核酸区域。术语“样本模板”是指起源自针对“靶标”的存在进行分析的样本的核酸。

[0155] 如在提及瓣状结构(例如侵入性切割结构)的核酸链时使用的术语“模板”是指与上游和下游核酸或核酸区域杂交从而形成侵入性切割结构的链。虽然模板链可以例如在PCR瓣状核酸内切酶测定中充当供聚合酶延伸引物用的模板,但是该术语的使用不限于聚合测定或反应。

[0156] 如本文所用,术语“核酸分子”是指任何含有核酸的分子,包括但不限于DNA或RNA。该术语涵盖了包含DNA和RNA的任何已知碱基类似物的序列,所述碱基类似物包括但不限于4-乙酰胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、氮丙啶基-胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧羟甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿嘧啶、5-羧基甲基-氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基-鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞

嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶、5-甲酰基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基-氨基-甲基-2-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基Q核苷(mannosylqueosine)、5'-甲氧羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫基-N-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、氧丁氧苷(oxybutoxosine)、假尿嘧啶、Q核苷(queosine)、2-硫基胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧乙酸、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫基胞嘧啶以及2,6-二氨基嘌呤。

[0157] 核酸序列或分子可以是基因组或合成起源的DNA或RNA,其可以是单链或双链的并且代表正义链或反义链。因此,核酸序列可以是dsDNA,ssDNA,混合ssDNA,混合dsDNA,由dsDNA制成的ssDNA(例如,通过解链、变性、解旋酶等),A-DNA,B-DNA或Z-DNA,三链DNA,RNA,ssRNA,dsRNA,混合ss和dsRNA,由dsRNA制成的ssRNA(例如,经由解链、变性、解旋酶等)、信使RNA(mRNA),核糖体RNA(rRNA),转移RNA(tRNA),催化RNA,snRNA,微RNA,或蛋白质核酸(PNA)。

[0158] 本技术不受所用核酸(例如,序列或分子(例如,靶序列和/或寡核苷酸))的类型或来源的限制。例如,核酸序列可以是经扩增或创建的序列(例如,通过以下来扩增或创建核酸序列:合成(例如,聚合(例如,引物延伸(例如,RNA-DNA杂交引物技术)) and 逆转录(例如,RNA变成DNA的逆转录)) and/或扩增(例如,聚合酶链反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、基于核酸序列的扩增(NASBA)、转录介导的扩增(TMA)、连接酶链反应(LCR)、循环探针技术、Q- β 复制酶、链置换扩增(SDA)、支化DNA信号放大(bDNA)、杂交捕获和解旋酶依赖性扩增)。

[0159] 如本文所用,术语“过程对照”是指外源分子,例如,在提取目标DNA之前添加到样本中的外源核酸,其可以在提取后被测量以评估过程的效率并且能够确定成功或失败模式。所用过程对照核酸的性质通常取决于测定类型和被测量的材料。例如,如果所使用的测定是用于检测和/或定量双链DNA或其中的突变,则通常在提取前将双链DNA过程对照掺入到样本中。类似地,对于监测mRNA或微RNA的测定,所使用的过程对照通常是RNA转录本或合成RNA。过程对照通常有助于评估过程的效率以及确定过程和过程步骤的成功或失败。

[0160] 如本文在提及非靶DNA时使用的术语“外源”是指从不同于含有靶DNA的来源或样本的来源分离和纯化的非靶DNA。例如,纯化的鱼DNA相对于包含人靶DNA的样本是外源DNA,例如,如通过引用并入本文的美国专利号9,212,392中所述。外源DNA不需要来自与靶DNA不同的生物体。例如,如果将商业上获得的纯化的鱼DNA添加到配置为检测来自特定鱼的样本中的靶核酸的反应中,则该鱼DNA将是外源的。在优选的实施方案中,外源DNA被选择为不能被配置为检测和/或定量加入有该外源DNA的反应中的靶核酸的测定检测到。

[0161] 如本文所用,术语“鱼DNA”是指从鱼中分离的大量(例如,基因组)DNA,例如,如美国专利号9,212,392中所述。大量纯化的鱼DNA是可商购获得的,例如,例如以鳕鱼和/或鲱鱼精子DNA(Roche Applied Science,Mannheim,Germany)或鲑鱼DNA(USB/Affymetrix)的形式提供。“鱼DNA”不同于来自鱼的呈经分离的形式(例如,单独合成的或已与鱼基因组的其他DNA分离)的任何特定基因。

[0162] 如本文所用,术语“斑马鱼DNA”是指从斑马鱼分离,或在体外(例如,酶法、合成)产生的具有在斑马鱼DNA中发现的核苷酸序列的DNA。在优选的实施方案中,斑马鱼DNA是作为可检测对照DNA(例如,用于通过样本加工步骤验证DNA回收率的过程对照)添加的甲基化

DNA。特别地,包含至少一部分RASSF1基因的斑马鱼DNA可用作过程对照,例如,用于人样本的过程对照,如WO 2018/017710A1中所描述,其通过引用并入本文并且描述了斑马鱼DNA作为用于人样本的过程对照的用途。如本文所用,“ZFRASSF1”是指包含至少一部分斑马鱼RASSF1基因的过程对照。

[0163] 如在提及核酸链时使用的术语“回收率”和“回收的”是指在过程(例如,完全重亚硫酸钠转化过程)之后或在一个或多个过程步骤(例如,核酸的基质结合以及随后的结合的链的洗脱)之后在样本中测得的DNA链的量或数目。在一些实施方案中,将回收的链与参考值,例如,在加工之前添加到样本中或预期存在于样本中的链的量或数目,或在参考样本中测得的或预期存在于参考样本中的量进行比较。

[0164] 如本文所用,术语“试剂盒”是指用于递送材料的任何递送系统。在核酸纯化系统和反应测定的背景下,此类递送系统包括允许储存试剂和装置(例如合适的容器中的离液盐、颗粒、缓冲液、变性剂、寡核苷酸、过滤器等)和/或支持材料(例如,样本加工或样本储存容器、执行程序的书面说明书等),并允许将它们从一个位置运输或递送到另一个位置的系统。例如,试剂盒包括含有相关反应试剂和/或支持材料的一个或多个外壳(例如,盒)。如本文使用,术语“零散试剂盒”是指包括两个或更多个单独容器的递送系统,每个容器含有全部试剂盒组件的子部分。这些容器可被共同或单独递送至预定接受者。例如,第一容器可以含有用于样本收集的材料和缓冲液,而第二容器含有捕获寡核苷酸和变性剂。术语“零散试剂盒”旨在涵盖含有联邦食品、药品和化妆品法案(Federal Food, Drug, and Cosmetic Act)第520(e)节规定的分析物专用试剂(ASR)的试剂盒,但不限于此。事实上,包括各自含有全部试剂盒组件的子部分的两个或更多个单独容器的任何递送系统都包括在术语“零散试剂盒”中。相比之下,“组合式试剂盒”是指将反应测定的所有组件包含于单一容器(例如,容纳每个所需组件的单一盒)的递送系统。术语“试剂盒”包括零散试剂盒和组合式试剂盒。

[0165] 如本文使用的术语“系统”是指用于特定目的的物品的集合。在一些实施方案中,该物品包括作为在例如物品上、纸上、在线(例如,在网站或网址上)在可记录介质(例如,软盘、CD、DVD、闪存驱动器等)上提供的信息的使用说明书。在一些实施方案中,说明书将用户引导到在线位置,例如用于观看、收听和/或下载说明书的网站。在一些实施方案中,说明书或其他信息是作为例如,用于计算机或移动装置(例如智能电话)的应用程序(“app”)提供的。

[0166] 如本文所用,术语“信息”是指任何事实或数据的集合。在提及使用一个或多个计算机系统(包括但不限于互联网)存储或加工的信息时,该术语是指以任何格式(例如,模拟、数字、光学等)存储的任何数据。如本文所用,术语“与受试者有关的信息”是指与受试者(例如,人、植物或动物)有关的事实或数据。术语“基因组信息”是指与基因组有关的信息,包括但不限于核酸序列、基因、等位基因频率、RNA表达水平、蛋白质表达、与基因型有关的表现型等。“等位基因频率信息”是指与等位基因频率有关的事实或数据,包括但不限于等位基因身份、等位基因的存在与受试者(例如人受试者)的特征之间的统计相关性、个体或群体中等位基因的存在或不存在、在具有一种或多种特定特征的个体中存在等位基因的可能性百分比等。

具体实施方式

[0167] 下面描述了优选的方法和材料,但是可以在本公开的实践或测试中使用与本文所述的方法和材料类似或等同的方法和材料。本文中提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均以引用的方式整体并入。本文公开的材料、方法和实施例仅仅是说明性的而不是旨在作为限制性的。

[0168] 本文提供的技术涉及改进已经用碘化试剂处理的DNA的修饰后回收率的方法。特别地,本技术提供了将经碘化DNA结合至带电荷的表面,例如结合至二氧化硅表面或载体,例如测定孔或载玻片、纤维、颗粒、珠粒等的表面的方法。虽然本技术是参考某些材料和载体形式(例如珠粒形式的二氧化硅)进行讨论的,但应理解本技术适用于其他载体材料,以及任何形式或构造的载体,包括纤维、颗粒、管等。

[0169] 该方法提供了促进经碘化DNA与珠粒高度稳定结合的条件。这促进了经重亚硫酸盐处理的DNA的高效回收,尽管本领域技术人员预计脱碘化的高碱性反应条件将会破坏DNA与珠粒的相互作用。通过组合本文提供的创新步骤,本技术提供了用于以改善的输入DNA回收率制备经重亚硫酸盐转化的DNA的方法。

[0170] 本技术与下述实验发现相关,并在实验实施例中得到开发。这些实施例描述了用于分析核酸甲基化状态的试剂的开发和测试。特别是,本技术涉及具有酸性pH的结合溶液,使得结合缓冲液的pH低于二氧化硅和富含尿嘧啶碘酸盐的DNA的等电点pH(I),从而促进经碘化DNA与二氧化硅的结合。

[0171] 常用的碘化试剂包括重亚硫酸钠和重亚硫酸铵。在下面的实施例中,使用了重亚硫酸铵,但本技术的原理很容易适用于以在整个分子中产生电荷(例如,高度负电荷)的方式被处理的任何DNA。例如,用其他碘化试剂例如重亚硫酸钠处理的DNA可与本技术一起使用。

[0172] 在不添加酸的情况下,碘化反应的pH主要由重亚硫酸铵决定,重亚硫酸铵的pH通常高于二氧化硅的pH(I)(如图2中示意性示出),并且等于或高于经碘化DNA的pH(I)。然而,当结合反应的pH高于二氧化硅(或其他支持材料)和/或DNA的pH(I)时,静电排斥可能会阻止DNA与二氧化硅的完全结合。虽然不将本技术限制于任何特定的作用机制,但观察到在酸性pH下(例如,通过向经碘化DNA-二氧化硅珠粒混合物中添加酸)进行结合反应可以中和二氧化硅并使DNA的尿嘧啶碘酸盐基团质子化,从而减少静电排斥并促进二氧化硅-经碘化DNA相互作用。

[0173] 适合与本技术一起使用的DNA不限于通过任何特定方法分离的DNA,并且可以通过多种方式(包括通过使用商业试剂盒、柱等)制备合适的DNA。下文描述从样本例如从受试者分离DNA的示例性方法。

[0174] 粪便DNA分离

[0175] 在一些实施方案中,DNA可从粪便样本中分离。适合与本技术一起使用的从粪便中分离DNA的示例性实施方案可见于美国专利号9,000,146,该专利通过引用并入本文。简言之,将粪便样本与缓冲液一起匀质化,例如通过离心去除固体,并使用包含与一种或多种靶DNA互补的寡核苷酸的颗粒或珠粒从所得澄清化的上清液中捕获特定靶DNA。从溶液中分离(例如通过使用磁场收集磁性珠粒来分离)与捕获寡核苷酸结合的靶DNA,并且在例如使用变性条件从捕获寡核苷酸洗脱之前任选地用缓冲液洗涤捕获的DNA。

[0176] 细胞系和细胞培养基DNA

[0177] 对于细胞系,可以使用例如“Maxwell® RSC ccfDNA血浆试剂盒 (Promega Corp.,Madison,WI)从细胞条件培养基中分离无细胞基因组DNA。按照试剂盒方案,使用1mL细胞条件培养基(CCM)代替血浆,并根据试剂盒程序对该培养基进行加工。洗脱体积为100μL,其中的70μL一般用于重亚硫酸盐转化。

[0178] 血液或血浆DNA

[0179] 从4mL血浆样本(例如人血液样本)中分离DNA的示例性程序如下:

[0180] ●向4mL血浆样本中加入300μL蛋白酶K(20mg/mL)并混合。

[0181] ●将3μL的1μg/μL鱼DNA添加到血浆蛋白酶K混合物中。

[0182] ●向血浆中加入2mL的血浆裂解缓冲液。

[0183] 血浆裂解缓冲液是:

[0184] -4.3M硫氰酸胍

[0185] -10% IGEPAL CA-630(具支链的辛基苯氧基聚(乙烯氧基)乙醇)

[0186] (与45mL 4.8M硫氰酸胍组合在一起的5.3g IGEPAL CA-630)

[0187] ●将混合物在55℃下以500rpm振荡下温育1小时。

[0188] ●添加并混合:

[0189] ○3mL血浆裂解缓冲液

[0190] ○200μL磁性二氧化硅结合珠粒(16μg珠粒/μL)

[0191] ○添加2mL的100%异丙醇

[0192] (任选地在每次添加后混合并且/或者任选地在添加到混合物中之前,预先混合裂解缓冲液和异丙醇)

[0193] ●在30℃下以500rpm振荡下温育30分钟。

[0194] ●将一个或多个管放在磁体上并让珠粒聚集起来。吸出并丢弃上清液。

[0195] ●将750μL GuHCl-EtOH添加到含有结合珠粒的容器中并进行混合。

[0196] GuHCl-EtOH洗涤缓冲液是:

[0197] -3M GuHCl(盐酸胍)

[0198] -57% EtOH(乙醇)

[0199] ●以400rpm振荡1分钟。

[0200] ●将样本转移到深孔板或2mL微量离心管中。

[0201] ●将管放在磁体上,并让珠粒聚集起来,持续10分钟。吸出并丢弃上清液。

[0202] ●向珠粒中加入1000μL洗涤缓冲液(10mM Tris HCl,80%EtOH),并在30℃下振荡下温育3分钟。

[0203] ●将管放在磁体上并让珠粒聚集起来。吸出并丢弃上清液。

[0204] ●向珠粒中加入500μL洗涤缓冲液,并在30℃下振荡下温育3分钟。

[0205] ●将管放在磁体上并让珠粒聚集起来。吸出并丢弃上清液。

[0206] ●加入250μL洗涤缓冲液,并在30℃下振荡下温育3分钟。

[0207] ●将管放在磁体上并让珠粒聚集起来。吸出并丢弃剩余的缓冲液。

[0208] ●加入250μL洗涤缓冲液,并在30℃下振荡下温育3分钟。

[0209] ●将管放在磁体上并让珠粒聚集起来。吸出并丢弃剩余的缓冲液。

[0210] ●将珠粒在70℃下振荡干燥15分钟。

[0211] ●向珠粒中加入125μL洗脱缓冲液(10mM Tris HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA), 并在65℃下振荡温育25分钟。

[0212] ●将管放在磁体上, 并让珠粒聚集起来, 持续10分钟。

[0213] ●吸出含有DNA的上清液并将其转移到新的容器或管中。

[0214] DNA磺化和纯化

[0215] 在典型的重亚硫酸盐处理方法中, 在重亚硫酸盐处理步骤中, 未甲基化的胞嘧啶碱基经历脱氨和磺化反应, 变成带负电荷的尿嘧啶磺酸盐(图1)。为了除去转化试剂, 可以将经磺化DNA样本用醇沉淀或例如通过凝胶过滤分离。经磺化DNA还可以通过添加离液盐, 例如胍盐, 诸如盐酸胍(GuHCl)或异硫氰酸胍(GITC), 以约例如6至7M的浓度结合到载体, 诸如二氧化硅, 例如反应容器的涂有二氧化硅的表面、二氧化硅颗粒或纤维、顺磁性二氧化硅珠粒等。其他促进变性DNA与固体基质结合的离液结合剂包括碘化物、高氯酸盐和三氯乙酸盐。

[0216] DNA的重亚硫酸盐处理的典型方法(没有本技术的低pH结合步骤)如下:

[0217] I. 使用亚硫酸氢铵磺化DNA

[0218] 1. 在每个管中, 组合64μL DNA、7μL 1N NaOH和9μL含有0.2mg/mL BSA和0.25mg/mL 鱼DNA的载体溶液。

[0219] 2. 在42℃下温育20分钟。

[0220] 3. 添加120μL的45%亚硫酸氢铵, 并在66℃下温育75分钟。

[0221] 4. 在4℃下温育10分钟。

[0222] II. 使用磁性珠粒脱磺化

[0223] 材料

[0224] ●磁性珠粒(Promega MagneSil Paramagnetic Particles, Promega目录号AS1050, 16μg/μL)。

[0225] ●结合缓冲液: 6.5-7M盐酸胍。

[0226] ●转化后洗涤缓冲液: 80%乙醇和10mM Tris HCl (pH 8.0)。

[0227] ●脱磺化缓冲液: 70%异丙醇、0.1N NaOH被选择用于脱磺化缓冲液。

[0228] 使用任何适当的装置或技术混合样本以在基本如下所述的温度和混合速度下混合或温育样本。例如, Thermomixer (Eppendorf) 可被用于样本的混合或温育。示例性脱磺化如下:

[0229] 1. 通过涡旋瓶1分钟彻底混合珠粒母液。

[0230] 2. 将50μL珠粒等分到2.0mL管(例如, 来自USA Scientific)中。

[0231] 3. 将750μL的结合缓冲液添加到珠粒中。

[0232] 4. 添加来自步骤I的150μL经磺化DNA。

[0233] 5. 混合(例如, 在30℃下以1000RPM混合30分钟)。

[0234] 6. 将子管放在磁力架上并保持在原位5分钟。将管放在该架上, 取出并丢弃上清液。

[0235] 7. 添加1,000μL的洗涤缓冲液。混合(例如, 在30℃下以1000RPM混合3分钟)。

[0236] 8. 将管放在磁力架上并保持在原位5分钟。将管放在该架上, 取出并丢弃上清液。

- [0237] 9. 添加250μL的洗涤缓冲液。混合(例如,在30℃下以1000RPM混合3分钟)。
- [0238] 10. 将管置于磁力架上;在1分钟后移出并丢弃上清液。
- [0239] 11. 添加200μL的脱磺化缓冲液。混合(例如,在30℃下以1000RPM混合5分钟)。
- [0240] 12. 将管置于磁力架上;在1分钟后移出并丢弃上清液。
- [0241] 13. 添加250μL的洗涤缓冲液。混合(例如,在30℃下以1000RPM混合3分钟)。
- [0242] 14. 将管置于磁力架上;在1分钟后移出并丢弃上清液。
- [0243] 15. 向管中加入250μL的洗涤缓冲液。混合(例如,在30℃下以1000RPM混合3分钟)。
- [0244] 16. 将管置于磁力架上;在1分钟后移出并丢弃上清液。
- [0245] 17. 将所有管在30℃下在盖子打开的情况下温育15分钟。
- [0246] 18. 将管从磁力架上取下,并将70μL洗脱缓冲液直接添加到珠粒中。
- [0247] 19. 将珠粒与洗脱缓冲液一起温育(例如,在40℃下以1000RPM温育45分钟)。
- [0248] 20. 将管放在磁力架上约一分钟;移出并保存上清液。
- [0249] 然后将转化的DNA用于检测测定,例如,如下所述的预扩增和/或瓣状核酸内切酶测定。

[0250] 磁性二氧化硅珠粒

[0251] 本文提供的技术涉及用于定量测量DNA甲基化的DNA的重亚硫酸盐处理和分离。在一些实施方案中,磁性珠粒被用于处理和分离DNA,例如包含磁性芯和二氧化硅涂层的珠粒。二氧化硅涂层结合DNA,并且磁性芯提供了使用磁体浓缩和分离珠粒(和结合的DNA)的有效方式。在一些实施方案中,涂有二氧化硅的磁性珠粒是MagneSil顺磁颗粒(Promega, Madison, WI; 目录号AS1220或AS640A, promega.com)。

[0252] 本技术不限于任何特定类型的磁性珠粒。本文描述的技术的实施方案利用对核酸具有亲和力的任何磁性珠粒(例如,顺磁性珠粒)。在一些实施方案中,磁性珠粒具有磁体矿(例如,Fe₃O₄)芯和包含二氧化硅(SiO₂)的涂层。其中核酸与珠粒结合的溶液的珠粒结构(例如,尺寸、孔隙率、形状)和组成可以被改变成选择性地结合不同类型(例如,呈单链、双链或其他形式的或构象的DNA或RNA;源自天然来源的核酸、化学合成、酶促合成(例如,通过PCR合成)的核酸)和尺寸的核酸(例如,例如由200个或更少的碱基组成的小寡聚体、引物、基因组、质粒、片段)。珠粒的这些特性影响核酸与珠粒的结合和洗脱。相关技术描述于例如美国专利号6,194,562、6,270,970、6,284,470、6,368,800、6,376,194,每篇均通过引用并入本文。还考虑了涂有以下的磁性珠粒:例如有机硅烷(如美国专利号4,554,088中所述);羧化聚丙烯酸酯(如美国专利号5,648,124中所述);纤维素(如美国专利申请序列号10/955,974中所述);羟基硅烷(如美国专利申请序列11/459,541中所述);和疏水脂肪族配体(如美国专利申请序列号12/221,750号中所述),每一者均通过引用并入本文用于所有目的。

[0253] 本技术不限于特定尺寸的磁性珠粒。因此,本技术的实施方案使用许多不同尺寸的磁性珠粒。较小的珠粒提供更大的用于吸附的表面积(以每重量单位计),但相对于较大的珠粒,较小的珠粒在可掺入在珠粒芯中的磁性材料的量方面受到限制。在一些实施方案中,颗粒分布在具有适用于使用珠粒的技术的限定的平均或中值尺寸的尺寸范围内。在一些实施方案中,颗粒具有相对窄的单峰粒度分布。

[0254] 在一些实施方案中,可用于本技术的珠粒具有可从颗粒外部进入的孔。这样的孔具有受控的尺寸范围,该尺寸范围大到足以允许核酸(例如DNA片段)进入颗粒内部并结合

到该孔的内表面。该孔被设计成提供能够结合核酸的大表面积。此外,一方面,本技术不限于任何特定的核酸(例如,DNA)结合和/或分离方法。因此,在一些实施方案中,与重亚硫酸盐反应相关的技术方面与其他合适的DNA分离方法(例如,沉淀、柱层析(例如,旋转柱)等)被组合在一起。

[0255] 使用磁场从混合物中去除珠粒(和结合的材料)。在一些实施方案中,除了磁场之外,还使用其他形式的外力来分离根据本技术的生物靶物质。例如,合适的额外形式的外力包括但不限于重力过滤、真空过滤和离心。

[0256] 本技术的实施方案运用外部磁场从介质中去除复合物。可以使用许多不同的已知方式中的任何一种方式在介质中适当地产生这样的磁场。例如,可以将磁体放置在含有珠粒的溶液的容器的外表面上,使颗粒迁移通过溶液并聚集在容器的靠近磁体的内表面上。然后可以将磁体固持在容器的外表面上的适当位置,以使得颗粒被由磁体产生的磁场固持在容器中,同时将溶液从容器中倒出并丢弃。然后可以将第二溶液添加到容器中,并且移除磁体以使得颗粒迁移到第二溶液中。替代地,可将可磁化探针插入到溶液中并将该探针磁化,以使得颗粒沉积在浸入溶液中的探针末端。然后可以将探针从溶液中取出,同时使其保持磁化状态,将其浸入到第二溶液中,并且停止磁场以允许颗粒进入第二溶液中。对于设计用于在上述一般术语中描述的这两种类型的磁性去除和转移技术中使用的磁体,存在商业来源。参见,例如,MagneSphere Technology Magnetic Separation Stand或PolyAtract Series 9600TM Multi-Magnet,均可从Promega Corporation获得;Magnetight Separation Stand(Novagen,Madison,Wis.);或Dynal Magnetic Particle Concentrator(Dynal,Oslo,Norway)。一些实施方案包括根据美国专利序列号13/089116的磁性装置的使用,该美国专利通过引用整体并入本文出于所有目的。此外,一些实施方案考虑使用“喷射通道”或移液管尖端磁体分离(例如,如美国专利号5,647,994和5,702,950中所述)。一些实施方案考虑使用浸入式探针方法(例如,如美国专利号6,447,729和6,448,092中所述),例如,由如以可从Thermo Scientific购买的KingFisher系统为例。

[0257] DNA链的定量

[0258] 在本文所述的实施方案中,使用瓣状核酸内切酶测定测量链回收率。用于从例如血液中提取样本核酸以及用于对经重亚硫酸盐转化的DNA和未转化的DNA的链进行定量的示例性方法描述于例如美国专利号10,648,025中,该美国专利通过引用并入本文用于所有目的。

[0259] QuARTS测定

[0260] 对根据本技术产生的DNA链进行定量的示例性方法是QuARTS瓣状测定技术。QuARTS技术组合了基于聚合酶的目标DNA扩增过程和基于侵入性切割的信号放大过程。本技术例如在美国专利号8,361,720、8,715,937、8,916,344和9,212,392,以及美国专利申请号15/841,006中有描述,其中的每一篇均通过引用并入本文。由QuARTS反应产生的荧光信号以类似于实时PCR的方式进行监测,并允许对样本中目标核酸的量进行定量。

[0261] 示例性QuARTS反应通常包括大约400-600nmol/L(例如,500nmol/L)的每个引物和检测探针、大约100nmol/L的侵入性寡核苷酸、大约600-700nmol/L的每个FRET盒(FAM,例如,如由Hologic,Inc.商业供应;HEX,例如,如由BioSearch Technologies商业供应;和Quasar 670,例如,如由BioSearch Technologies商业供应)、6.675ng/ μ L FEN-1核酸内切酶

(例如, Cleavase® 2.0, Hologic, Inc.)、在30μL反应体积中的1单位Taq DNA聚合酶(例如, GoTaq® DNA聚合酶, Promega Corp., Madison, WI)、10mmol/L 3-(n-吗啉代)丙磺酸(MOPS)、7.5mmol/L MgCl₂和250μmol/L的每个dNTP。示例性QuARTS循环条件如下表所示。在一些应用中,定量循环(C_q)的分析提供了对样本中目标DNA链的初始数目(例如,拷贝数目)的度量。

[0262]	阶段	温度/时间	循环数
	变性	95°C / 3'	1
	放大 1	95°C / 20"	10
		67°C / 30"	
		70°C / 30"	
	放大 2	95°C / 20"	37
		53°C / 1'	
		70°C / 30"	
	冷却	40°C / 30"	1

[0263] 经大体积重亚硫酸盐转化的DNA的多重靶向预扩增

[0264] 为了预扩增来自输入样本的大部分或全部经重亚硫酸盐处理的DNA,可将大量经处理的DNA用于单个大体积多重扩增反应。例如,如上所述,使用例如Maxwell Promega血液试剂盒#AS1400从细胞系(例如DFCI032细胞系(腺癌)、H1755细胞系(神经内分泌))提取DNA。例如,如上所述,对DNA进行重亚硫酸盐转化。

[0265] 预扩增例如在含有以下的反应混合物中进行:7.5mM MgCl₂、10mM MOPS、0.3mM Tris-HCl(pH 8.0)、0.8mM KCl、0.1μg/μL BSA、0.0001% Tween-20、0.0001% IGEPAL CA-630、250μM每种dNTP、寡核苷酸引物(例如,对于12个靶标,12个引物对/24个引物,以等摩尔量(包括但不限于例如每个引物200-500nM的范围),或者单个引物浓度被调节用于平衡不同靶区域的扩增效率)、0.025单位/μL HotStart GoTaq浓缩物,以及按体积计20%至50%的经重亚硫酸盐处理的靶DNA(例如,将10μL靶DNA加入到50μL反应混合物中,或将50μL靶DNA加入到125μL反应混合物中)。热循环时间和温度被选择为适合于反应体积和扩增容器。例如,反应可以如下循环

[0266]	阶段	温度/时间	循环数
	预温育	95°C / 5'	1
	放大 1	95°C / 30"	10-12
		64°C / 30"	
		72°C / 30"	
	冷却	4°C / 保持	1

[0267] 热循环后,将预扩增反应的等分试样(例如10μL)在10mM Tris、0.1mM EDTA(含或不含鱼DNA)中稀释至500μL。例如,如上所述,将稀释的预扩增DNA的等分试样(例如,10μL)用于QuARTS PCR-瓣状测定中。还可参见2015年10月30日提交的美国专利申请序列号62/

249,097;2016年10月26日提交的美国专利申请序列号15/335,096,以及2016年10月26日提交的PCT/US16/58875,以及美国专利号US 10,648,025,其中的每一篇均通过引用整体并入本文用于所有目的。

[0268] 本技术不限于使用瓣状核酸内切酶测定,并且在不同的实施方案中,可以使用分析经重亚硫酸盐转化的DNA的任何方法。例如,在一些实施方案中,该分析包括直接测序、焦磷酸测序、甲基化敏感的单链构象分析(MS-SSCA)、高分辨率解链分析、甲基化敏感的单核苷酸引物延伸(MS-SnuPE)、碱基特异的切割/质谱光谱法(例如,通过MALDI-TOF)、甲基化特异性PCR(MSP)、微阵列分析、限制性消化分析)、INVADER测定、组合的重亚硫酸盐限制性分析或甲基化DNA免疫沉淀(MeDIP)。这些和其他方法在例如以下中有更详细的综述:Fraga MF&Esteller M(2002),“DNA methylation:a profile of methods and applications”,*BioTechniques* 33(3):632,634,636-49;El-Maarri O(2003),“Methods:DNA methylation”,*Advances in Experimental Medicine and Biology* 544:197-204;Laird PW(2003),“The power and the promise of DNA methylation markers”,*Nat.Rev.Cancer* 3(4):253-66;Callinan PA&Feinberg AP(2006),“The emerging science of epigenomics”,*Hum Mol Genet* 15(90001):R95-101,这些参考文献全部通过引用并入本文用于所有目的。

[0269] 实验

[0270] 实施例1

[0271] 结合pH对经重亚硫酸盐转化的DNA的回收率的影响

[0272] 在下面描述的实施例中,如上文在示例性磺化步骤中所述的那样将单链DNA模板用重亚硫酸铵(ABS)磺化。在DNA磺化后,通过尺寸排阻过滤去除磺化反应溶液,并将经磺化DNA与低(19mM K⁺)、中间(228mM K⁺)和高(474mM K⁺)浓度的乙酸钾(KOAc)组合。作为对照,将一部分经磺化DNA模板放回到重亚硫酸盐溶液而不是乙酸钾中。

[0273] 随后将每个样本与离液剂和二氧化硅珠粒一起温育以促进结合。下表1证实了重亚硫酸盐溶液由于每个模板的高盐浓度而抑制了结合反应。结合pH为4.8至4.9。

[0274] 表1:DNA链和结合盐

盐	阳离子	阴离子	FAM_NDRG4		HEX_BMP3		Quasar_BTACT		N
			中值	CV	中值	CV	中值	CV	
[0275] KOAc	19 mM	29 mM	2617	17	1053	12	11106	33	12
	228 mM	610 mM	1229	14	535	12	7837	16	12
	474 mM	2118 mM	71	14	17	33	530	21	12
ABS	940 mM	940 mM	1772	9	659	9	10997	15	12

[0276] 对六种具有不同的胞嘧啶含量的DNA模板(标记)(见下表2)进行重亚硫酸盐处理,然后使用pH为5.0至3.4的结合溶液使该模板与二氧化硅结合。

[0277] 表2:6种不同的甲基化标记DNA链的转化的胞嘧啶百分比

[0278]	测试DNA链	转化的胞嘧啶 %
	LASS4-反义	33
	PPP2R5C-反义	20
	ZDHHC1-反义	22
	NDRG4-正义	37
	BMP3-正义	36
	BTACT-正义	16

[0279] 结果示出在图3中。最大对数链回收率(log strand recovery)所需的pH因每种标记而异,并且似乎与转化的胞嘧啶百分比(即,在处理前为未甲基化胞嘧啶核苷酸,并且在结合步骤中为尿嘧啶磺酸盐核苷酸的总核苷酸在链中的百分比)相关。具有高含量的未甲基化胞嘧啶并且因此在结合步骤中具有高含量的转化为尿嘧啶磺酸盐的碱基的DNA需要较低的pH来实现最大链回收率。

[0280] 以与上面相同的方式测试了总共十七个不同的DNA序列。将每个DNA的转化的胞嘧啶百分比与最大链回收率所需的最高估计结合pH作图。这些点的线性拟合(图4)的 R^2 为0.76,表明转化的胞嘧啶百分比与结合pH之间的关系很强。

[0281] 为了进一步说明转化的胞嘧啶百分比与结合pH之间的相关性的强度,将图3中的DNA链中的三个(BMP3、 β -肌动蛋白(经重亚硫酸盐处理的肌动蛋白,或“BTACT”)和NDRG4)修饰成产生这样的DNA的集合,该DNA保留了每个测试序列的相同引物和探针结合序列,但具有位于该序列的其他区域中的不同数目的未甲基化C。针对每个序列集合的捕获的链测量值对线进行拟合(图5)。所有四种拟合(图4和5)的斜率和截距都相似。

[0282] DNA样本类型比较

[0283] 对以下的多种样本类型:单链126聚体链比较了在低pH(柠檬酸盐缓冲液)下和在未经调节的pH(标准条件)下进行的结合反应的链回收率:合成的DNA(“126”)、从掺入有纯化的细胞系DNA的粪便样本中分离的DNA(“ECLD”),以及从之前被表征为发出高甲基化DNA信号的粪便样本中分离出的DNA(“HMS”),其中针对样本类型和结合条件的每种组合重复6次,下表3给出链回收率结果。利用上述捕获过程分离来自粪便样本的所有DNA,并将合成的126聚体DNA链与作为载体的外源鱼类DNA组合在一起。

[0284] 表3

[0285]	转化的 C: (126 聚 体) %		15			17			23		
			链_LASS4			链_LRRC4			链_SDC2		
	样本 类型	结合 pH	中值	低/ 标准	CV	中值	低/ 标准	CV	中值	低/ 标准	CV
	126	标准	1081	0.94	6	3366	0.89	3	2179	1.38	19
	126	低	1020		11	2996		4	3001		6
	粪便+ ECLD	标准	1034	0.96	10	6307	0.92	3	1809	1.18	11
	粪便+ ECLD	低	988		9	5817		9	2137		7
	HMS	标准	97	1.12	11	143	1.09	9	97	1.23	16
	HMS	低	109		9	156		8	119		3

[0286]	转化的 C: (126 聚体) %		37			21		
			链_PPP2R5C			链_ZDHC1		
	样本 类型	结合 pH	中值	低/ 标准	CV	中值	低/ 标准	CV
	126	标准	590	2.71	26	6398	1.15	19
	126	低	1599		5	7354		7
	粪便+	标准	525	5.00	9	2707	1.82	30

[0287]	ECLD						
	粪便+ ECLD	低	2623		7	4931	13
	HMS	标准	43	2.43	19	12891	1.30
	HMS	低	104		8	16698	

[0288] 表3中的结果表明,对于这些样本类型中的每一种样本类型,低pH结合反应的使用都产生了相似或增强的链回收率。

[0289] 制备了包含低(1x)或高(10x)核小体基质的替代血液样本。使用Active Motif Nucleosome Kit(Active Motif,目录号53504)从HCT116细胞制备核小体DNA。为了模拟甲基化DNA标记(MDM)阳性血浆样本,将核小体DNA掺入到汇集的使用LBgard®血液管(Exact Sciences, Inc.)从健康供者收集的 plasma 中,或掺入到SERACON阴性稀释剂中。使用核小体基质制备物可确保MDM阳性DNA具有与来自癌症阳性患者的样本中预期的尺寸分布相似的尺寸分布。

[0290] 使用上述血浆提取程序或使用QIASYMPHONY DSP Circulating DNA试剂盒(Qiagen, Inc.)处理样本以提取DNA。然后对提取的DNA样本进行重亚硫酸盐处理,并使该DNA样本在如上所述的标准(未经调节的pH)结合反应(向ABS反应中添加7M GuHCl结合缓冲液)和在低pH结合反应(7M GuHCl和133mM柠檬酸盐缓冲液, pH 2.2结合缓冲液)中结合。

[0291] 14种DNA的比较显示15/34条件的链回收率与t检验比较时增加(下表4、5、6和7)。总体而言,低结合pH增加了各种样本类型的链回收率。

[0292] 表4:10X核小体

标记	N	低 pH 平均链	高 pH 平均链	低 pH CV 链	高 pH CV 链	差异%	p 值
ANKRD13B	16	71137	69161	11.01	9.9	2.8	0.45
CHST2	16	91324	80004	4.97	7.5	13.2	0.00
CNNM1	16	74580	70714	11.51	9.3	5.3	0.16
DTX1	16	52188	39531	9.19	5.6	27.6	0.00
FER1L4	16	84883	78712	8.73	11.1	7.5	0.04
GRIN2D	16	13132	12499	8.50	11.1	4.9	0.17
JAM3	16	88788	86144	7.93	9.4	3.0	0.33
PDGFD	16	32517	29745	9.49	11.4	8.9	0.02
SFMBT2	16	79580	47298	8.34	10.2	50.9	0.00
ZNF568	16	65277	61019	6.61	6.7	6.7	0.01
ZNF671	16	48629	42437	10.87	9.8	13.6	0.00

[0295] 表5:1X核小体

标记	N	低 pH 平均链	高 pH 平均链	低 pH CV 链	高 pH CV 链	差异%	p 值
ANKRD13B	16	7927	7756	12.02	10.9	2.2	0.5949
CHST2	16	12553	11796	14.64	18.2	6.2	0.2922
CNNM1	16	10242	8732	10.61	9.4	15.9	0.0001
DTX1	16	5933	4768	12.14	15.3	21.8	0.0001
FER1L4	16	9949	9123	10.50	10.6	8.7	0.0271
GRIN2D	16	1599	1547	22.97	17.3	3.3	0.6472
JAM3	16	10363	9786	8.71	7.7	5.7	0.0585
PDGFD	16	4301	4039	21.10	18.6	6.3	0.3814
SFMBT2	16	9965	5531	11.83	20.9	57.2	0.0001
ZNF568	16	7891	7369	13.06	12.3	6.8	0.1391
ZNF671	16	6366	5414	15.13	17.4	16.2	0.0082

[0297] 表6:10X核小体—两种提取方法

标记	提取	N	低 pH 平均链	高 pH 平均链	低 pH CV 链	高 pH CV 链	差异%	p 值
QKI	EXAS	8	22711	22547	9.8	4.1	0.7	0.8499
VAV3	EXAS	8	42778	47275	10.5	10.4	10.0	1.000
ZFRASSF1	EXAS	8	81016	77035	6.9	7.5	5.0	0.185
QKI	QIAS	8	30742	29806	9.8	11.8	3.1	0.5767
VAV3	QIAS	8	69105	63961	16.2	12.9	7.7	0.3144
ZFRASSF1	QIAS	8	104780	95303	10.5	12.3	9.5	0.1179

[0299] 表7:1X核小体—两种提取方法

[0300]	标记	提取	N	低 pH 平均链	高 pH 平均链	低 pH CV 链	高 pH CV 链	差异%	p 值
	QKI	EXAS	8	2731	2764	10.8	13.3	1.2	1.000
[0301]	VAV3	EXAS	8	6181	6973	24.8	22.8	12.0	1.000
	ZFRASSF1	EXAS	8	94813	83699	9.8	8.1	12.5	0.016
	QKI	QIAS	8	3616	3398	14.4	11.4	6.2	0.3574
	VAV3	QIAS	8	10329	7984	14.1	14.3	25.6	0.003
	ZFRASSF1	QIAS	8	113563	91078	7.7	10.5	22.0	0.0002

[0302] 从来自粪便样本的澄清化上清液中分离出的DNA

[0303] 对样本输入体积范围为4至14mL (标准) 的掺入有细胞系DNA的粪便样本进行处理以捕获细胞系DNA, 然后使用标准pH (图6A) 和低结合pH结合 (图6B) 溶液对该细胞系DNA进行重亚硫酸盐处理和分离。图6A和6B的比较示出在低结合pH下总DNA和链回收率的线性改善。用于未经调节 (标准) 的pH和低结合pH的样本具有掺入在其中的不同数量的DNA模板, 因此, 不应直接在结合条件之间比较示出的总链回收率。

[0304] 使用未经调节的pH或低pH结合条件从每个体积的粪便样本 (mL) 中回收的DNA量示出在图7的八个图中。

[0305] 重亚硫酸铵的不同批号的影响

[0306] 利用未经调节的pH和低结合pH条件并行测试四个重亚硫酸铵 (56%) 批号。该ABS批号在年数上不相同; 最老的批号只有9年并且具有最低的pH值, 重亚硫酸铵每年可降解多达两个百分点。在没有pH调节的情况下, 链回收率在各批号之间各不相同, 其中最老的材料具有最高的回收率 (图8A)。在低结合pH的情况下, 回收率一致性得到改善。

[0307] 重亚硫酸铵浓度的影响

[0308] 将重亚硫酸铵的浓度从57%滴定至43%, 然后用在低结合pH (柠檬酸缓冲液) 情况下或在无pH调节的情况下结合的合成DNA模板对该重亚硫酸铵进行测试。以56.6%为参考值, 针对指示的标记DNA中的每个标记DNA计算在较低ABS浓度下的结合的差异%。结果示于图8B中的表中。各ABS浓度之间的链回收率一致性 (一致性) 在低结合pH情况下得到改善。

[0309] 发现在制造过程中引入的未知结合溶液 (7M盐酸胍) 污染物会抑制选定标记的回收率。当在存在污染物和不存在污染物的情况下对低结合pH和未经调节的链回收率进行比较时, 低结合pH条件与未经调节的结合条件相比降低了回收率的下降 (图9)。

[0310] 使用不同制造商的珠粒时的回收率

[0311] 在未经调节的结合pH或较低的结合pH下测试了来自多个供应商的二氧化硅珠粒在重亚硫酸盐转化中的使用, 结果分别在图10和11中示出。一些珠粒在未经调节的结合pH下没有表现出链回收 (图10), 但在降低的结合pH下表现出改善的回收 (图11)。在图10的初始筛选中, 珠粒浓度没有调节为相等, 但在图11所示的测试中, 珠粒浓度是一致的。

[0312] 整个pH范围内的DNA回收率

[0313] 由于DNA模板的酸水解, 酸性条件会导致链回收率损失。当检查4.9至2.1范围内的结合pH时, 链回收率在约pH 3.9至约2.5范围内最一致 (参见图12)。

[0314] DNA尺寸和浓度的影响

[0315] DNA的尺寸和浓度在样本类型 (诸如组织、血液和粪便) 之间和内部可能会有所不

同。在该实验中,小牛胸腺DNA在200bp、3.6个反应和20kbp尺寸下被滴定至300、2700和5400ng/ran。在DNA样本中掺入126bp的合成目标分子,并在未经调节的结合pH和低结合pH下用重亚硫酸盐处理该DNA样本以捕获经碘化DNA。结果在图13中示出。

[0316] 随着DNA尺寸的减小和浓度的增加,在未经调节的结合pH化学的情况下链回收率显著降低。与未经调节的结合pH(高达374%)相比,在低结合pH化学的情况下的链回收率大大提高。此外,变异系数(CV)在低结合pH化学的情况下得到改善。

[0317] 实施例2

[0318] 三种结合方案的比较

[0319] 在以下实施例中,比较了用于将经碘化DNA与二氧化硅结合的三种不同程序。

[0320] 方案1是标准方案,其中将碘化反应与7M盐酸胍(GuHCl)的结合溶液组合,但不添加酸来降低pH。

[0321] 在方案2中,将碘化反应混合物与7M GuHCl、133mM柠檬酸盐(pH 2.2)的结合溶液组合。

[0322] 在方案3中,将碘化反应混合物与7M GuHCl的结合溶液组合,但不添加酸来降低pH。

[0323] 在所描述的程序中的每个程序中,珠粒结合的经碘化DNA均是在固体载体上被脱碘化,如例如美国专利号9,315,853中所述,该专利通过引用整体并入本文。

[0324] 下面针对在Hamilton STARlet自动移液系统上的表现描述了转化方案,但可以使用等效设备手动执行该转化方案。

[0325] 方案1

[0326] 该程序描述了对使用包含与靶DNA互补的捕获寡核苷酸的序列特异性捕获珠粒从样本(例如粪便样本)中捕获的DNA的加工。

[0327] 变性:

[0328] 1.为了洗涤捕获珠粒球团,添加20μL的90ng/μL BSA、10mM Tris pH 8.0、1mM EDTA和160μL 100mM NaOH。

[0329] 2.在43℃下以1500RPM混合温育45秒。

[0330] 3.在43℃下在不混合的情况下再温育19分钟15秒(总共20分钟)。

[0331] 4.在磁体上结合5分钟。

[0332] 5.将80μL变性样本转移到新的深孔板中。

[0333] 碘化:

[0334] 1.将120μL的57%wt/wt重亚硫酸铵(ABS)添加到变性样本中。

[0335] 2.放置于65.5℃的加热振荡器上,以1200RPM混合3分钟。

[0336] 3.在不混合的情况下再温育72分钟(总共75分钟)。

[0337] 经碘化DNA结合:

[0338] 1.将750μL的7M GuHCl结合溶液添加到样本中。

[0339] 2.经由移液器将珠粒原液混合5个循环并且将50μL 16mg/mL顺磁性二氧化硅珠粒添加到每个样本中。

[0340] 3.在30.5℃下以1200RPM混合温育30分钟。

[0341] 4.放置于磁体上5分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

- [0342] 醇洗涤1和2:
- [0343] 1.将1mL 80%乙醇(EtOH)、10mM Tris pH 8.0转化洗涤液添加到珠粒球团中。
- [0344] 2.以1200RPM混合3分钟。
- [0345] 3.放置于磁体上5分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。
- [0346] 4.将250μL 80% EtOH、10mM Tris pH 8.0转化洗涤液添加到珠粒球团中。
- [0347] 5.以1200RPM混合3分钟。
- [0348] 6.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。
- [0349] 脱磺化:
- [0350] 1.将200μL的70%异丙醇(IPA)、105mM NaOH添加到珠粒球团中。
- [0351] 2.在30.5℃下以1200RPM混合温育7分钟。
- [0352] 3.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。
- [0353] 醇洗涤3和4:
- [0354] 1.将250μL 80% EtOH、10mM Tris pH 8.0转化洗涤液添加到珠粒球团中。
- [0355] 2.以1200RPM混合3分钟。
- [0356] 3.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。
- [0357] 4.将250μL 80% EtOH、10mM Tris pH 8.0转化洗涤液添加到珠粒球团中。
- [0358] 5.以1200RPM混合3分钟。
- [0359] 6.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。
- [0360] 干燥珠粒和洗脱DNA:
- [0361] 1.在71.5℃下以1200RPM混合温育珠粒球团15分钟以进行干燥。
- [0362] 2.将70μL的10mM Tris pH 8.0、0.1mM EDTA添加到干珠粒中。
- [0363] 3.在66.5℃下以1200RPM混合温育25分钟。
- [0364] 4.放置于磁体上8分钟以冷却并结合珠粒。
- [0365] 5.经转化的DNA已准备好用于测定。
- [0366] 方案2
- [0367] 该程序描述了对使用包含与靶DNA互补的捕获寡核苷酸的序列特异性捕获珠粒从样本(例如粪便样本)中捕获的DNA的加工。
- [0368] 变性:
- [0369] 1.为了洗涤捕获珠粒球团,添加50μL的36ng/μL BSA、10mM Tris pH 8.0、1mM EDTA和50μL 160mM NaOH。
- [0370] 2.在32.5℃下以1500RPM混合温育3分钟。
- [0371] 3.在磁体上结合5分钟。
- [0372] 4.将80μL变性样本转移到新的深孔板中。
- [0373] 磺化:
- [0374] 1.将120μL的52%wt/wt ABS添加到变性样本中。
- [0375] 2.放置于62.5℃的加热振荡器上,以1200RPM混合3分钟。
- [0376] 3.在不摇动的情况下再温育85分钟(总共88分钟)。
- [0377] 经磺化DNA结合:
- [0378] 1.将750μL的7M GuHCl、133mM柠檬酸盐(pH 2.2)结合溶液添加到样本中。

[0379] 2.经由移液器将珠粒原液混合5个循环并且将50 μ L 16mg/mL顺磁性二氧化硅珠粒添加到每个样本中。

[0380] 3.在32.5℃下以1200RPM混合下温育15分钟。

[0381] 4.放置于磁体上5分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0382] 醇洗涤1和2:

[0383] 1.将1mL 75% IPA、20mM Tris pH 7.8转化洗涤液添加到珠粒球团中。

[0384] 2.以1200RPM混合3分钟。

[0385] 3.放置于磁体上5分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0386] 4.将250 μ L 75% IPA、20mM Tris pH 7.8转化洗涤液添加到珠粒球团中。

[0387] 5.以1200RPM混合3分钟。

[0388] 6.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0389] 脱磺化:

[0390] 1.将200 μ L的70% IPA、30mM NaOH添加到珠粒球团中。

[0391] 2.在32.5℃下以1200RPM混合温育3分钟。

[0392] 3.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0393] 醇洗涤3和4:

[0394] 1.将250 μ L 75% IPA、20mM Tris pH 7.8转化洗涤液添加到珠粒球团中。

[0395] 2.以1200RPM混合3分钟。

[0396] 3.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0397] 4.将250 μ L 75% IPA、20mM Tris pH 7.8转化洗涤液添加到珠粒球团中。

[0398] 5.以1200RPM混合3分钟。

[0399] 6.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0400] 干燥珠粒和洗脱DNA:

[0401] 1.在71.5℃下以1200RPM混合温育珠粒球团15分钟以进行干燥。

[0402] 2.将70 μ L的3mM Tris pH 7.8、0.1mM EDTA添加到干珠粒中。

[0403] 3.在66.5℃下以1200RPM混合温育25分钟。

[0404] 4.放置于磁体上25分钟以冷却并结合珠粒。

[0405] 5.经转化的DNA已准备好用于测定。

[0406] 方案3

[0407] 这个程序描述了对使用离液剂介导的与二氧化硅载体的结合从样本(例如从血浆)中提取的DNA的加工。在下面的变性步骤之前,将DNA从载体上洗脱下来。

[0408] 变性:

[0409] 1.向75 μ L提取的DNA样本中添加11 μ L的90ng/ μ L BSA、10mM Tris pH 8.0、1mM EDTA和11 μ L 1.0M NaOH。

[0410] 2.在RT下以1200RPM混合温育1分钟。

[0411] 磺化:

[0412] 1.将120 μ L的52%wt/wt ABS添加到变性样本中。

[0413] 2.放置于65.5℃的加热振荡器上,以1200RPM混合3分钟。

[0414] 3.在不混合的情况下再温育72分钟(总共75分钟)。

[0415] 经磺化DNA结合:

[0416] 1.将750 μ L的7M GuHCl结合溶液添加到样本中。

[0417] 2.经由移液器将珠粒原液混合5个循环并且将50 μ L 16mg/mL顺磁性二氧化硅珠粒添加到每个样本中。

[0418] 3.在30.5℃下以1200RPM混合温育30分钟。

[0419] 4.放置于磁体上5分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0420] 醇洗涤1和2:

[0421] 1.将1mL 80% EtOH、10mM Tris pH 8.0转化洗涤液添加到珠粒球团中。

[0422] 2.以1200RPM混合3分钟。

[0423] 3.放置于磁体上5分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0424] 4.将250 μ L 80% EtOH、10mM Tris pH 8.0转化洗涤液添加到珠粒球团中。

[0425] 5.以1200RPM混合3分钟。

[0426] 6.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0427] 脱磺化:

[0428] 1.向珠粒球团中添加200 μ L的75% IPA、87.5mM NaOH。

[0429] 2.在30.5℃下以1200RPM混合温育7分钟。

[0430] 3.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0431] 醇洗涤3和4:

[0432] 1.将250 μ L 80% EtOH、10mM Tris pH 8.0转化洗涤液添加到珠粒球团中。

[0433] 2.以1200RPM混合3分钟。

[0434] 3.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0435] 4.将250 μ L 80% EtOH、10mM Tris pH 8.0转化洗涤液添加到珠粒球团中。

[0436] 5.以1200RPM混合3分钟。

[0437] 6.放置于磁体上2分钟以结合珠粒,吸出上清液至废液。

[0438] 干燥珠粒和洗脱DNA:

[0439] 1.在71.5℃下以1200RPM混合温育珠粒球团15分钟以进行干燥。

[0440] 2.将80 μ L的4mM Tris pH 8.0、0.1mM EDTA添加到干珠粒中。

[0441] 3.在66.5℃下以1200RPM混合温育25分钟。

[0442] 4.放置于磁体上20分钟以冷却并结合珠粒。

[0443] 5.经转化的DNA已准备好用于测定。

[0444] 上述条件在图14的表格中进行了总结和比较。

[0445] 为了比较上述治疗方案,使用MAXWELL系统(Promega Corp.,Fitchburg,WI)和RSC Blood DNA Kit(Promega Corp.,Cat#ASB1400)从细胞系OE33细胞(食管癌)中提取基因组DNA,这两者均是根据制造商说明书进行。将制备的DNA用于所有3个方案,并不存在中间的DNA捕获步骤的情况下直接添加到每个方案的变性步骤中。在浓度为26.7、17.8、11.87、7.91、5.27、3.52ng/ μ L的DNA上测试方案1、2和3中每个方案的链回收率。测试了每种条件的四次重复。在制备的DNA中测试的序列是甲基化标记基因ZNF568、BMP3、B3GALT6、NDRG4、VAV3和ZNF682。详细数据示于图15A和图15B中。

[0446] 图16示出了表格,该表格具有基于图15A-15B中针对不同甲基化标记DNA示出的数

据对来自方案2(使用低pH结合)的链回收率与方案1以及与方案3(方案1和3两者都不存在针对结合的pH调节)相比的成对比较。

[0447] 图17显示出示出在指示的DNA浓度下使用方案2与方案1或方案3(统称为“方案X”)时的百分比变化的曲线图。虚线表示100%,即,使用方案2和方案X时的回收率相等。在使用方案2方法(使用低pH结合条件)时观察到的链回收率水平与其他两种方案(都使用标准的未经调节的pH结合条件)相比有所增加,但在测试的较低DNA浓度下的VAV3标记DNA除外,对于该标记DNA,方案1产生了较高的链回收率。

[0448] 缓冲液比较

[0449] 如上所述的那样使用方案2,但是经碘化DNA结合步骤被改良为在GuHCl结合溶液中使用甘氨酸、柠檬酸盐、苹果酸盐或甲酸盐缓冲液。无缓冲的对照反应使用GuHCl,在结合步骤没有添加缓冲液。结果在图18中示出。

[0450] 本申请中引用的所有文献和类似材料(包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、论文、制造商说明书、产品附件和互联网网页)均以引用方式全部并入用于任何目的。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本文描述的各种实施方案所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。当并入的参考文献中的术语定义与本教导中提供的定义不同时,以本教导中提供的定义为准。

[0451] 在不脱离所描述的技术的范围和精神的情况下,所描述的组合物、方法和技术的使用的各种修改和变化对于本领域技术人员来说是显而易见的。尽管已结合具体示例性实施方案对本技术进行了描述,但是应当理解所要求保护的本发明不应当不适当地限定于此类具体实施方案。实际上,用于进行本发明的所描述的方式的各种修改对于分子生物学、诊断学、药理学、生物化学、医学或相关领域技术人员而言是明显的,并且旨在落在所附权利要求书的范围内。

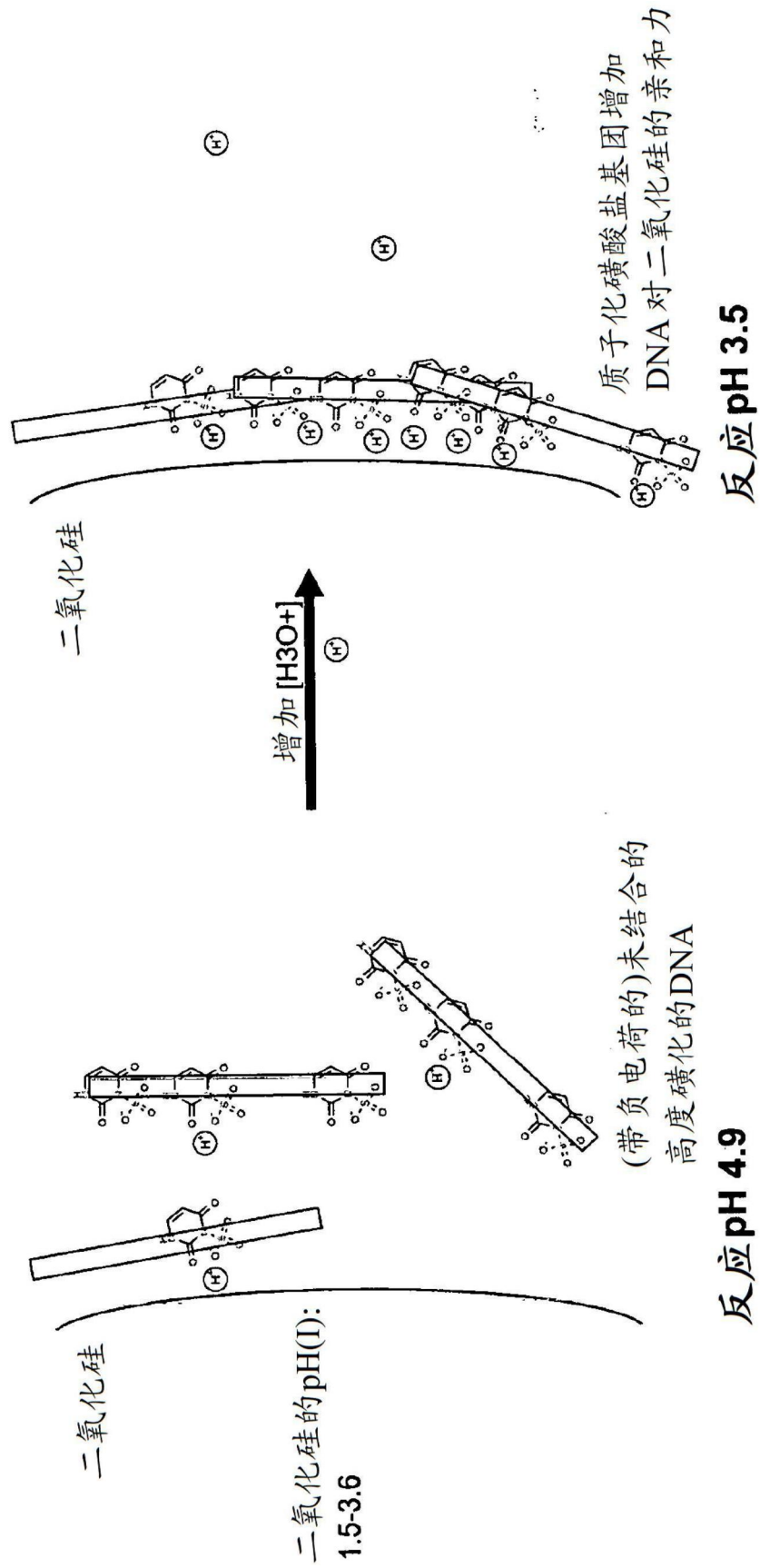


图2

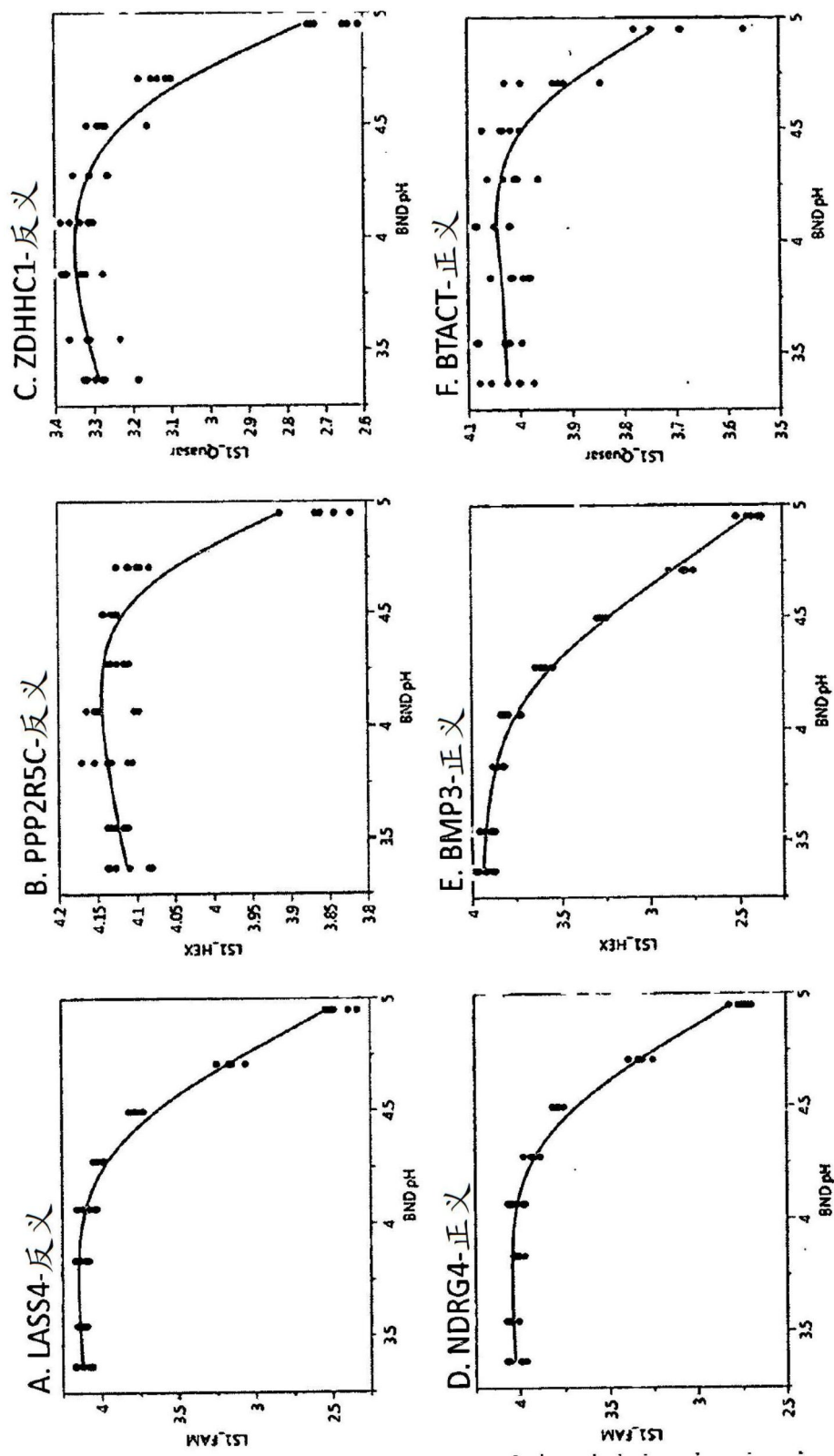


图3

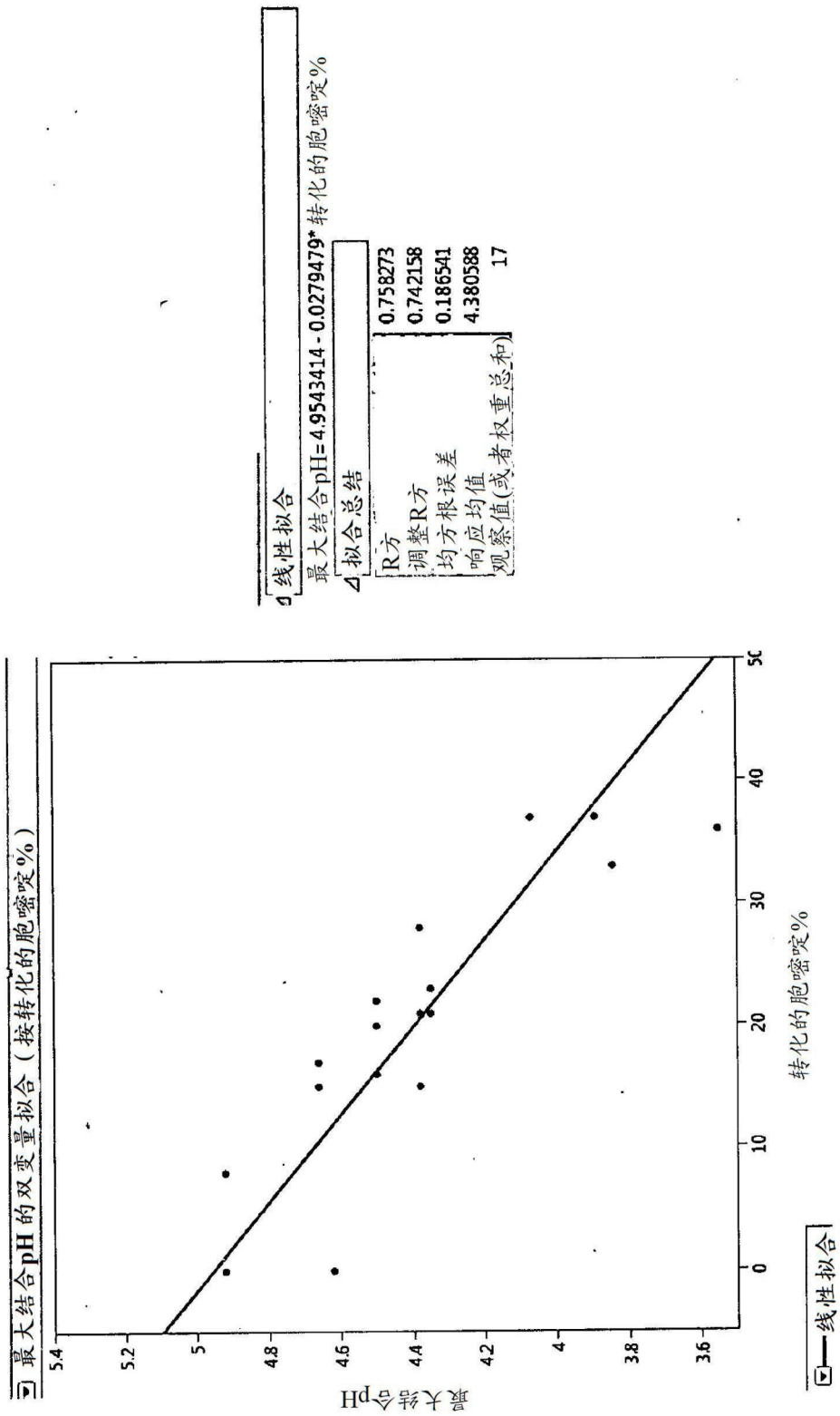


图4

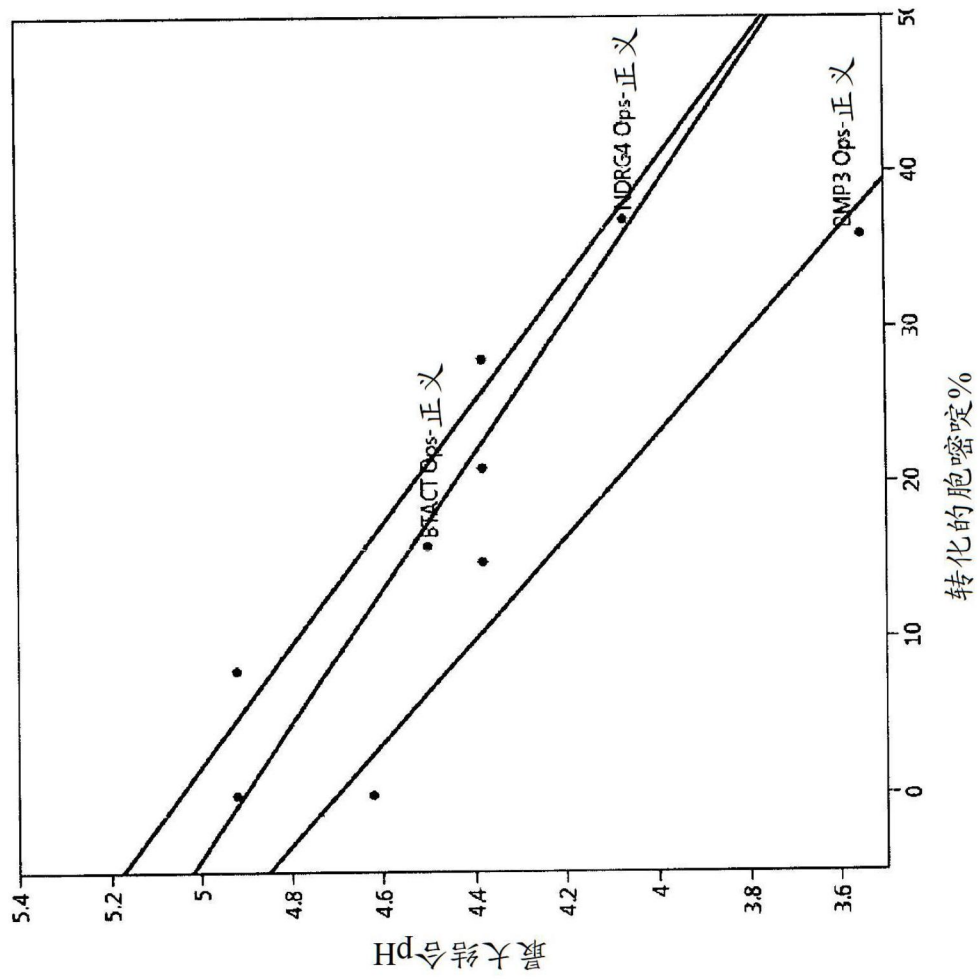


图5

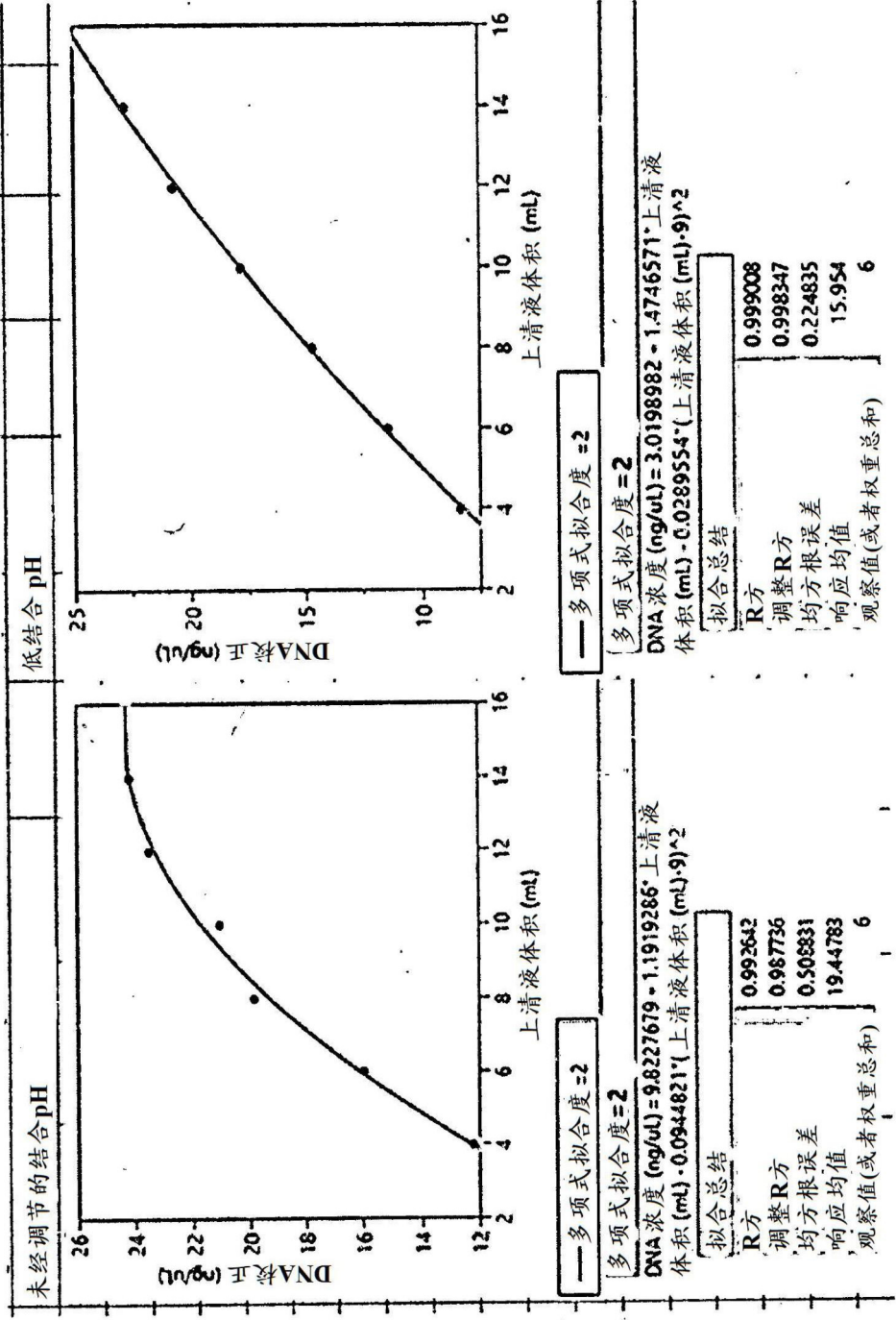


图 6A

图 6B

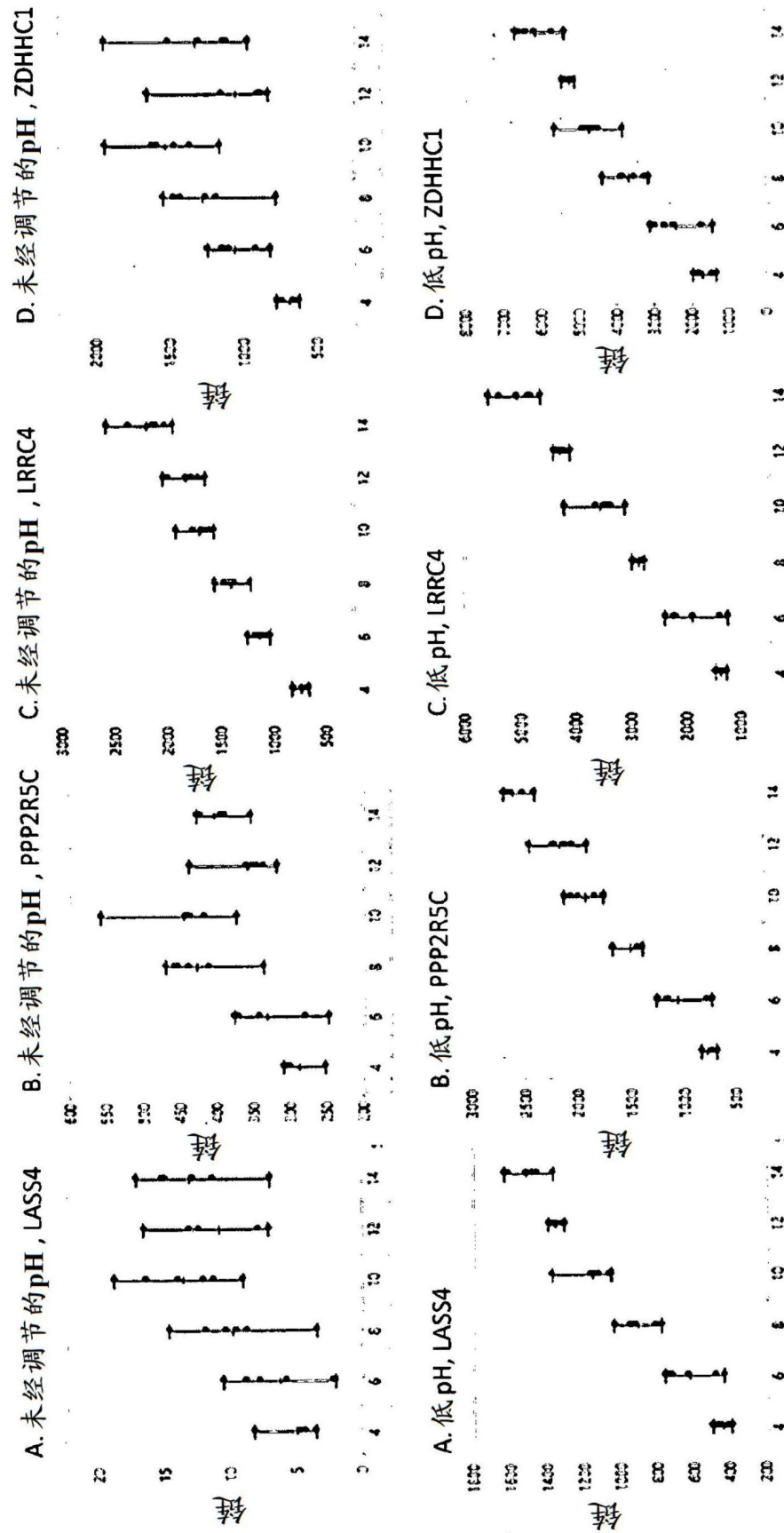


图7

BND SLN	ABS 批号	生产日期	ABS pH	IASS4-S 链		LURC4-AS 链		SDC2-S 链		PPP2R5C-S 链		ZDHC1-AS 链	
				中值	CV	中值	CV	中值	CV	中值	CV	中值	CV
未经调节	2278	2010年10月31日	4.74	1294	7	1711	8	4878	7	5111	74	9819	7
	5600010116	2018年1月31日	5.37	1250	5	1738	5	2443	12	394	6	6663	14
	5600010134	2018年4月30日	5.37	1217	9	1731	8	2192	6	359	10	5752	7
	5600010173	2018年10月31日	5.37	1271	12	1736	7	1488	10	276	16	4640	9
pH ~3	2278	2010年10月31日	4.74	1137	5	1571	8	4643	8	14171	17	8376	6
	5600010116	2018年1月31日	5.37	1264	9	1751	5	4851	8	15320	9	9726	9
	5600010134	2018年4月30日	5.37	1290	7	1721	7	5069	5	15993	6	9592	11
	5600010173	2018年10月31日	5.37	1301	6	1681	7	4927	7	15113	6	9387	7

图8A

结合条件	ABS原液%	链_LASS4			链_LRRC4			链_ZDHC1			链_PPP2R5C			链_ZDHC1			N
		中值	差异%	CV	中值	差异%	CV	中值	差异%	CV	中值	差异%	CV	中值	差异%	CV	
未经调节	56.6	1224	NA	11	4538	NA	8	4547	NA	9	2784	NA	9	5275	NA	8	8
	50	1346	10	9	4453	-2	6	6110	34	8	3229	16	7	7243	37	10	8
	43	1409	15	7	3845	-15	3	6786	49	10	3069	10	11	8371	59	7	7
柠檬酸缓冲液	56.6	1167	NA	8	4058	NA	6	5675	NA	9	2843	NA	10	6759	NA	9	8
	50	1272	9	9	4115	1	6	6169	9	10	3080	8	9	7014	4	11	8
	43	1277	9	8	3576	-12	8	6162	9	12	2885	1	8	7110	5	8	7

图8B

标记	结合pH	ABS浓度	结合溶液	链		受污染-标称差异%	N
				均值	CV		
LASS4_4482	未经调节	57%	标称	1622	5	-3	11
			受污染	1569	3		10
	低	50%	标称	1670	7	-2	11
			受污染	1635	6		11
LRRC4	未经调节	57%	标称	3534	4	-4	11
			受污染	3405	4		10
	低	50%	标称	3107	9	0	11
			受污染	3092	6		11
PPP2R5C	未经调节	57%	标称	53495	4	-18	11
			受污染	43960	10		10
	低	50%	标称	54868	5	4	11
			受污染	56908	7		11
ZDHHC1	未经调节	57%	标称	4567	13	-46	11
			受污染	2478	11		10
	低	50%	标称	5522	6	-5	11
			受污染	5233	12		11
	未经调节	57%	标称	4256	8	-36	11
			受污染	2726	8		10
	低	50%	标称	5159	9	8	11
			受污染	5549	9		11

图9

结合珠粒	FAM NDRG4		HEX BMP3		Quasar BTACT			每通道的N
	链对数		链对数		链对数			
	平均值	对照变化	平均值	对照变化	平均值	对照变化		
						平均值	对照变化	
对照	3.48		3.01		4.70		16	
珠粒B	0.0	-3.48	0.00	-3.01	0.00	-4.70	16	
珠粒F	0.0	-3.48	0.00	-3.01	0.00	-4.70	14	
对照	3.39		3.06		4.59		22	
珠粒G	3.29	-0.11	2.95	-0.11	4.46	-0.13	24	
对照	3.90		3.53		5.15		76	
珠粒E	3.91	0.01	3.50	-0.02	4.96	-0.20	16	
对照	3.139		3.025		4.573		22	
珠粒C	3.110	-0.03	2.965	-0.06	4.496	-0.08	22	
对照	2.739		2.054		3.789			
珠粒A	2.761	0.02	2.042	-0.01	3.658	-0.13		

图10

结合珠粒	链 LASS4 对数		链 LRRC4 对数		链 SDC2 对数		链 PPP2R5C 对数		链 ZDHC1 对数		N
	中值	对照差异	中值	对照差异	中值	对照差异	中值	对照差异	中值	对照差异	
对照	3.14	NA	3.21	NA	3.65	NA	4.01	NA	3.80	NA	6
珠粒 A	3.09	-0.05	3.20	-0.01	3.64	-0.01	4.06	0.05	3.79	-0.01	6
珠粒 B	3.23	0.09	3.06	-0.15	3.27	-0.38	3.07	-0.93	3.28	-0.52	6
珠粒 C	3.10	-0.04	3.20	-0.01	3.58	-0.07	3.64	-0.36	3.78	-0.02	6
珠粒 D	3.94	0.80	3.10	-0.11	3.81	0.16	4.31	0.30	3.44	-0.36	6
珠粒 E	3.09	-0.05	3.20	-0.01	3.65	0.00	4.07	0.06	3.80	-0.01	6
珠粒 F	3.45	0.31	3.17	-0.04	3.55	-0.10	3.57	-0.44	3.35	-0.46	5
珠粒 G	3.14	0.00	3.20	-0.01	3.45	-0.20	3.00	-1.01	3.73	-0.07	5

图11

	链_LASS4		链_LRRC4		链_SDC2		链_PPP2R5C		链_ZDHHHC1		
	中值	CV	中值	CV	中值	CV	中值	CV	中值	CV	
结合 pH											
4.85	1010	9	2366	11	2024	13	551	17	3995	10	8
3.87	980	5	2155	6	4491	7	18167	8	7478	7	8
2.94	970	6	2236	7	4523	7	19119	9	6970	7	8
2.79	963	4	2146	6	4155	7	18468	8	6823	7	8
2.51	922	4	2161	7	4148	8	18820	9	6373	6	7
2.13	914	5	2035	4	4002	5	16316	9	6087	6	7

图12

[DNA] ng/rxn	DNA 大小(bp)	BST 化学	链_LASS4			链_PP2R5C			链_LRRC4			链_ZDHHC1		
			中值	差异% 化学	CV	中值	差异% 化学	CV	中值	差异% 化学	CV	中值	差异% 化学	CV
300	200	未经调节的pH	22997	4	6	18248	1	9	16362	-1	7	17501	23	10
		低pH	23845		10	18399		6	16184		6	21561		9
	3600	未经调节的pH	22770	3	8	17564	5	9	17356	-6	9	20366	14	20
		低pH	23354		7	18470		6	16390		9	23205		8
	20000	未经调节的pH	22446	1	9	18590	0	7	17821	-9	18	22591	6	19
		低pH	22559		6	18598		9	16144		14	23839		9
2700	200	未经调节的pH	23949	10	7	13889	33	16	19566	-8	14	11369	132	20
		低pH	26328		7	18530		11	17925		13	26383		10
	3600	未经调节的pH	23897	9	8	15967	18	11	20561	-11	15	12909	114	25
		低pH	26126		9	18779		9	18351		11	27644		10
	20000	未经调节的pH	23474	6	4	17913	10	11	19850	-6	9	17312	76	5
		低pH	24897		7	19707		4	18658		9	30533		8
5400	200	未经调节的pH	18431	36	7	7240	118	37	14427	22	8	4547	374	25
		低pH	25066		12	15768		9	17611		7	21535		4
	3600	未经调节的pH	17965	35	8	8037	105	33	15166	18	9	5461	351	27
		低pH	24284		7	16448		9	17946		5	24641		5
	20000	未经调节的pH	21441	11	5	12797	37	13	19266	-5	6	13472	138	18
		低pH	23710		8	17552		5	18350		5	32042		6

图13

步骤	方案 1		方案 2		反应配置	方案 3	
	试剂 [rxn]	温度参数	试剂 [rxn]	温度参数		试剂 [rxn]	温度参数
变性	89mM NaOH, 10 ng/ μ L BSA	20 min @ 42°C	80mM NaOH, 18 ng/ μ L BSA	3 min @ 32.5°C 混合	75 μ L 样本 + 9 μ L NaOH + 11 μ L CAR SLN = 95 μ L	94mM NaOH, 10.4 ng/ μ L BSA	1 min 混合
重亚硫酸盐	34% ABS	75 min @ 65.5°C	31% ABS	88 min @ 62.5°C	95 μ L + 120 μ L ABS = 215 μ L	29% ABS	75 min @ 65.5°C
DNA 结合	5.25M GuHCl, 0.8 mg/mL 二氧化硅珠粒	30 min @ 30.5°C 混合	5.25M GuHCl, 100mM 柠檬酸盐, pH 3.7, 0.8 mg/mL 二氧化硅珠粒	15 min @ 32.5°C 混合	215 μ L + 750 μ L BND SLN + 50 μ L BND BDS = 1015 μ L	5.17M GuHCl, 0.79 mg/mL 二氧化硅珠粒	30 min @ 30.5°C 混合
2X 醇洗涤	80% EtOH, 10mM Tris, pH 8.0	3 min 混合	75% IPA, 20mM Tris, pH 7.8	3 min 混合	洗涤1 = 1 mL 洗涤2 = 250 μ L	80% EtOH, 10mM Tris, pH 8.0	3 min 混合
变性	105mM NaOH, 70% IPA	7 min @ 30.5°C 混合	30mM NaOH, 70% IPA	3 min @ 32.5°C 混合	200 μ L	87.5mM NaOH, 75% IPA	7 min @ 30.5°C 混合
2X 醇洗涤	80% EtOH, 10mM Tris, pH 8.0	3 min 混合	75% IPA, 20mM Tris, pH 7.8	3 min 混合	250 μ L	80% EtOH, 10mM Tris, pH 8.0	3 min 混合
干燥	N/A	15 min @ 71.5°C 混合	N/A	15 min @ 71.5°C 混合	仅珠粒	N/A	15 min @ 71.5°C 混合
洗脱	10mM Tris, pH 8.0, 0.1mM EDTA	25 min @ 66.5°C 混合, 8 min 冷却	3mM Tris, pH 7.8, 0.1mM EDTA	25 min @ 66.5°C 混合, 25 min 冷却	80 μ L	4mM Tris, pH 8.0, 0.1mM EDTA	25 min @ 66.5°C 混合, 20 min 冷却

图14

DNA 浓度 (ng/ μ L)	ZNF568 方案 1	ZNF568 方案 3	ZNF568 方案 2	BMP3 方案 1	BMP3 方案 3	BMP3 方案 2	B3GALT6 方案 1	B3GALT6 方案 3	B3GALT6 方案 2
26.7	39,626	71,018	48,450	43,079	72,235	50,490	34,338	51,796	37,904
	56,602	32,350	40,639	61,384	31,153	44,642	43,878	25,573	32,888
	41,582	28,539	42,777	43,943	29,736	46,500	30,895	25,509	34,818
	43,044	37,082	48,245	46,255	38,629	52,040	34,662	29,768	40,594
17.8	32,248	35,915	47,662	34,498	39,031	54,563	29,143	31,895	45,336
	53,938	15,347	33,690	63,749	15,051	38,963	49,199	13,677	31,703
	25,725	28,515	40,330	28,208	29,235	47,893	23,727	25,594	38,256
	36,763	31,608	40,455	41,355	33,161	46,938	33,535	28,455	37,481
11.87	19,156	33,522	34,265	22,045	36,571	42,594	18,444	30,656	33,161
	28,941	17,138	22,290	33,582	18,274	28,252	28,112	15,989	22,800
	22,520	13,659	48,385	26,234	14,060	56,816	22,114	12,514	45,903
	37,025	16,420	45,946	43,599	17,467	57,314	34,477	15,205	44,608
7.91	13,998	23,168	17,087	15,528	27,367	21,598	13,806	22,619	16,480
	19,546	9,023	15,566	24,312	9,837	19,206	19,722	8,913	14,702
	16,848	9,686	35,074	19,306	10,965	44,319	16,141	9,284	34,327
	19,108	19,899	30,456	23,996	24,318	36,382	18,995	18,732	27,818
5.27	10,208	11,458	17,292	12,249	13,008	22,539	10,322	11,771	16,705
	11,543	5,666	12,572	14,894	6,223	16,820	12,419	5,787	13,143
	10,895	8,245	10,728	13,390	8,975	14,668	11,050	8,122	10,295
	12,132	11,157	10,595	14,775	13,350	14,181	12,153	11,251	10,107
3.52	5,493	8,189	6,193	6,378	9,532	8,313	5,666	8,156	6,473
	6,483	4,635	6,008	7,627	4,669	8,175	7,033	4,755	6,112
	7,550	6,583	7,017	8,553	7,281	9,411	7,550	6,718	6,758
	8,166	8,414	6,536	9,591	9,684	8,850	7,983	8,124	6,282

图15A

DNA 浓度 (ng/ μ L)	NDRG4 方案 1	NDRG4 方案 3	NDRG4 方案 2	VAV3 方案 1	VAV3 方案 3	VAV3 方案 2	ZNF682 方案 1	ZNF682 方案 3	ZNF682 方案 2
26.7	54,579	71,401	84,365	7,763	4,241	9,267	23,879	36,389	44,687
	74,463	113,450	96,567	10,761	7,981	11,048	33,525	58,351	51,426
	82,988	87,382	91,486	12,601	6,305	11,373	39,963	41,870	49,000
	65,865	103,912	103,795	9,450	8,234	13,014	28,852	52,389	58,478
17.8	45,640	41,100	66,471	7,007	2,793	8,193	21,341	22,056	36,258
	83,030	63,222	74,197	12,708	4,974	9,131	41,076	32,005	40,385
	63,791	90,962	79,613	9,711	6,380	10,931	28,248	45,886	46,723
	50,725	85,837	81,241	8,132	6,824	11,271	23,668	44,426	46,846
11.87	34,977	39,872	41,211	5,423	3,092	5,210	16,034	22,526	23,643
	49,292	64,382	41,126	9,046	5,772	5,684	25,562	36,649	23,967
	54,883	32,217	57,932	9,851	2,601	8,679	27,027	16,778	34,467
	49,077	38,279	62,665	8,596	3,489	9,115	23,621	20,947	38,354
7.91	24,897	26,435	28,998	4,434	2,337	3,598	13,115	17,499	16,340
	40,522	40,971	29,016	7,804	3,798	3,958	22,691	25,529	18,359
	36,154	36,757	35,206	6,398	3,344	5,369	19,488	21,577	22,049
	24,530	39,001	31,904	4,737	4,029	4,720	13,923	22,328	20,384
5.27	19,926	16,987	18,182	3,975	1,463	2,395	11,302	10,661	11,007
	35,761	18,291	21,551	7,560	2,158	3,096	21,628	12,226	13,944
	20,371	25,714	20,705	4,320	2,753	2,909	12,725	16,002	13,540
	17,815	18,417	21,115	3,668	2,154	3,149	10,768	11,647	14,569
3.52	12,505	11,598	12,458	2,641	1,276	1,777	7,944	8,399	8,434
	17,011	18,760	12,803	3,799	2,213	1,987	10,974	13,331	9,013
	11,844	18,533	14,125	2,698	2,037	2,075	8,366	12,423	9,619
	8,860	12,245	13,889	2,161	1,438	2,150	5,849	8,400	9,601

图15B

DNA 浓度 (ng/ μ L)	方案 2/ 方案 1 或者 3	B3GALT6	BMP3	NDRG4	VAV3	ZNF568	ZNG682
3.52	方案 2:1	91%	108%	106%	71%	93%	111%
3.52	方案 2:3	92%	112%	87%	115%	93%	86%
5.27	方案 2:1	109%	123%	87%	59%	114%	94%
5.27	方案 2:3	136%	164%	103%	135%	140%	105%
7.91	方案 2:1	136%	146%	99%	75%	141%	111%
7.91	方案 2:3	157%	168%	87%	131%	159%	89%
11.87	方案 2:1	142%	147%	108%	87%	140%	131%
11.87	方案 2:3	197%	214%	116%	192%	187%	124%
17.8	方案 2:1	113%	112%	124%	105%	109%	149%
17.8	方案 2:3	153%	162%	107%	188%	146%	118%
26.7	方案 2:1	102%	99%	135%	110%	100%	161%
26.7	方案 2:3	110%	113%	100%	167%	107%	108%

图16

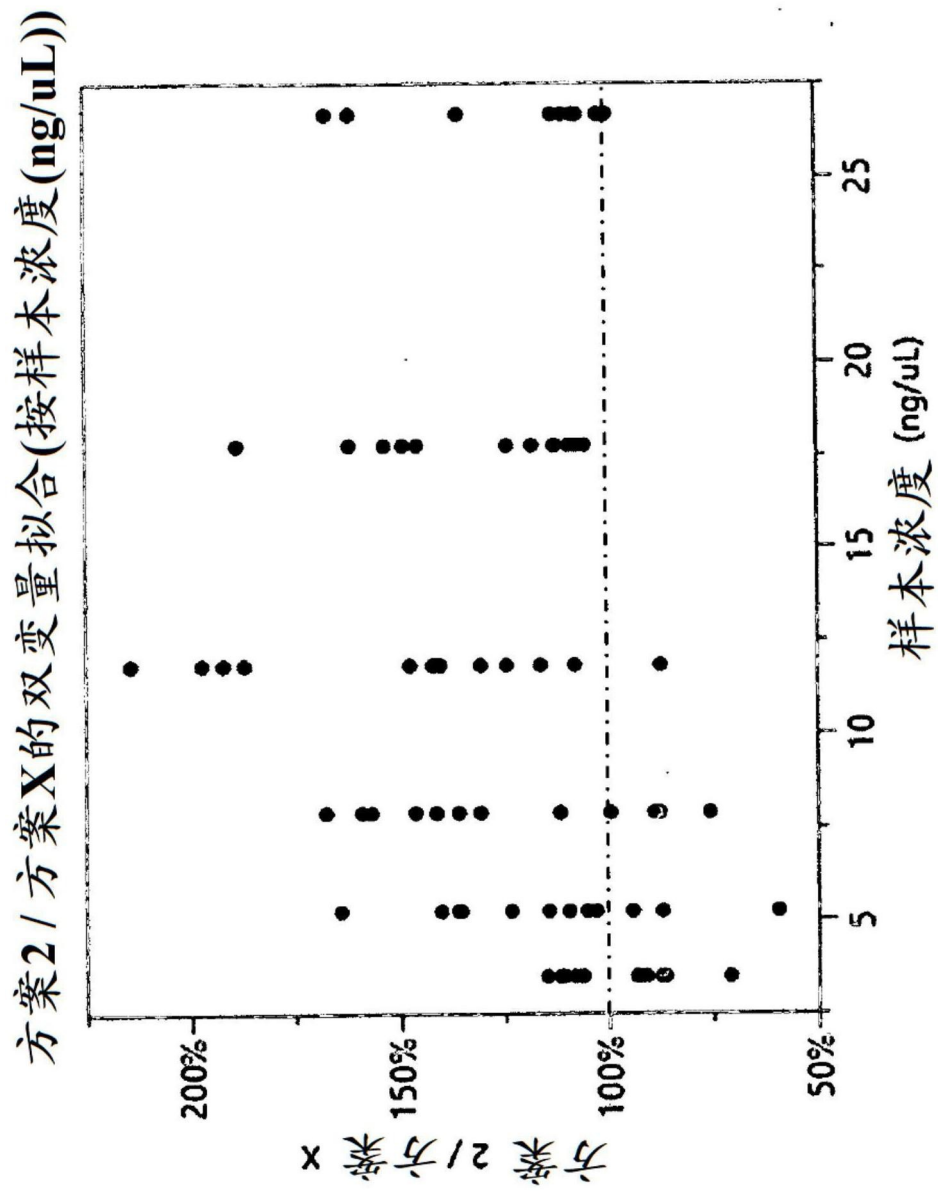


图17

添加的 缓冲液	pKa/ pK1	pH缓冲范围	mM Rxn	链 LASS4		链 LRRC4		链 PPP2R5C		链 ZDHC1	
				中值	CV	中值	CV	中值	CV	中值	CV
无	NA	NA	NA	998	6	2139	5	1818	16	4341	11
甘氨酸	2.35	2.2-3.6	126	942	10	2035	7	16819	8	5875	10
柠檬酸盐	4.76	3.0-6.2	85	953	9	1959	7	10712	6	5369	12
苹果酸盐	3.4	2.7-4.2	128	945	7	1949	9	8958	10	4977	17
甲酸盐	3.75	3.0-4.5	203	978	7	1984	9	2856	9	4575	17

图18