



(21) 申請案號：107132800 (22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 18 日
 (51) Int. Cl. : **G01N33/543 (2006.01)** **G01N33/48 (2006.01)**
C12Q1/06 (2006.01) **C12Q1/68 (2018.01)**
 (30) 優先權：2017/09/18 美國 62/560,180
 (71) 申請人：招 彥燾 (香港地區) CHIU, YIN TO (HK)
 香港
 (72) 發明人：招 彥燾 CHIU, YIN TO (HK)
 (74) 代理人：劉法正；尹重君
 申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：5 共 33 頁

(54) 名稱

使用雙液相系統以分離、純化和/或濃縮短核酸片段的方法

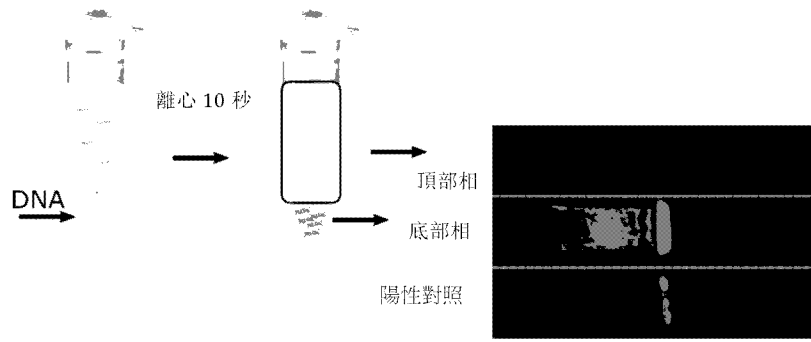
METHOD FOR USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM FOR THE ISOLATION, PURIFICATION AND/OR CONCENTRATION OF SHORT NUCLEIC ACID FRAGMENTS

(57) 摘要

本發明涉及使用雙液相系統 (ATPS) 分離，濃縮和/或純化具有約或少於 250 鹼基對 (bp) 的短鏈核酸片段的方法。在一個實施例中，本發明提供了用於從含有核酸的生物材料中純化具有約或少於 250 個鹼基對的短鏈核酸片段的試劑盒。在另一個實施例中，本發明提供了某些聚合物在雙相系統中的用途，用於從含有核酸的生物材料中純化具有約或少於 250 個鹼基對的短鏈核酸片段。

The present invention relates to methods of using aqueous two-phase system (ATPS) for the isolation, concentration and/or purification of short nucleic acid fragment having about or less than 250 base pairs (bp). In one embodiment, the present invention provides a kit for the purification of short nucleic acid fragments having about or less than 250 base pairs from nucleic acid-containing biological materials. In another embodiment, the present invention provides uses of certain polymers in a two-phase system for the purification of short nucleic acid fragments having about or less than 250 base pairs from nucleic acid containing-biological materials.

指定代表圖：



【圖2】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

使用雙液相系統來分離，純化和/或濃縮短鏈核酸片段的方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM FOR THE ISOLATION, PURIFICATION AND/OR CONCENTRATION OF SHORT NUCLEIC ACID FRAGMENTS

【技術領域】

[0001] 相關申請

本申請要求 2017 年 9 月 18 日提交的美國臨時申請序列號 62 / 560,180 的優先權，這個申請以其全文引用的方式併入本文中。

[0002] 本發明涉及在雙液相系統 (ATPS) 中分離，濃縮和/或純化短鏈核酸片段的方法。特別地，本發明提供了用於從生物材料中分離，濃縮和/或純化短鏈核酸片段的方法，試劑盒和 ATPS 組分。本申請引用了各種出版物，其全部內容通過引用結合到本申請中。

【先前技術】

[0003] 自從 1983 年發現聚合酶鏈式反應 (PCR) 以來，人類已經對全基因組進行了測序，使得許多在生命科學和醫學發展的基礎研究中的發現成為可能。整個技術創新領域的誕生都是為了使 PCR 效率更高，有效性更強，成本更低。並且核酸既是 PCR 的輸入又是輸出，因此科學家們長期致力於使其上游製備和下游分析更準確，更精確，更快速和有更高成本效益的研究。

[0004] 效率的邊際收益隨著規模收益遞減而達到穩定水平。當需要分離長度小於 250 鹼基對 (bp) 的小片段核酸時，這個瓶頸尤為明顯。隨著液體活檢的發展，對小片段核酸 (NA) 進行分離，純化和濃縮的需求應運而生。液體活檢是通過捕獲和擴增循環游離 DNA (cfDNA)，特別是循環腫瘤 DNA (ctDNA)，從而進行腫瘤早期診斷和復發監測。循環腫瘤 DNA (ctDNA) 是一種衍生自腫瘤細胞的 DNA 片段，其大小在 100-300 個鹼基對之間。這些腫瘤細胞釋放的循環游離 DNA (cfDNA) 保留了大量原腫瘤細胞的特異性基因特徵。與常規活體組織切片相比，分析和研究 cfDNA 是一種非侵入性的手段，用於研究腫瘤表觀遺傳學特徵。cfDNA 作為一種非侵入性的快速分析方法，逐漸成為檢測和監測整個疾病過程中基因變異的替代方法。現有的技術可以從不同來源的細胞/組織中提取 DNA。亦有不同的方案，商業“試劑盒”可用於從不同材料 (生物流體，細胞培養物，新鮮或冷凍組織樣品) 中提取核酸。cfDNA 濃度通常非常低，並且高度片段化，具有極多短片段 (例如小於 250bp)。特別是，在尿液中出現的約 160-165bp 的核酸，是用於液體活檢的更理想的樣品類型。因此，從生物樣品中分離 cfDNA 的提取方法可以顯著影響 cfDNA 的產率，這可能進一步影響不同測試的特徵和臨床驗證的程度。

[0005] 這裡的挑戰是針對生物基質的複雜背景分離，純化和濃縮非常稀有和稀疏的核酸片段。通常，目標片段的產量很低，以至於隨後的 PCR 結果可能沒有足夠的診斷靈敏度和特異性。因此，迫切需要開發一種新的更有效的分離，純化和濃縮小於 250bp 的核酸片段的方法。

[0006] 已經開發了多種不同的方法用於從生物樣品中分離核酸，例如，涉及選擇性吸附核酸到基質的方法，以及涉及從可溶性核酸中除去污染物的方法。目前可用的純化方法基於苯酚/氯仿的使用，鹽析，離液鹽和矽樹脂的使用，親和樹脂的使用，離子交換色譜和如美國專利 5,057,426, 4,923,978，EP 專利

0512767 A1 和 EP 0515484B 以及 WO 95/13368，WO 97/10331 和 WO 96/18731 中所述的磁珠的使用。

[0007] 用 WO2004/106516 中描述的已知雙液相系統 (ATPS) 方法來純化 DNA 質粒和通過 *Journal of Chromatography A*，1082 (2005)，176-184 中描述的雙液相萃取和疏水層析來純化 DNA 質粒載體。這兩種方法均公開了 ATPS 用於 DNA 質粒純化的用途，但它們都沒有設計用於分離長度為 250bp 或更短的核酸。人們不期望現有的用於純化大核酸分子的方法能夠純化 250bp 或更短的短鏈核酸- 所得短鏈核酸的純度不足以獲得令人滿意的下游應用表現。

[0008] 製備專門用於分離，純化和濃縮 250bp 或更小的核酸片段的生物樣品的需要在研究和工業領域都是非常重要的，但是現有方法對這種需求基本上無法滿足。儘管已經描述了使用不同化學製劑在雙液相系統中實現物種分離的各種方法，但是沒有方法成功地嘗試使用這種可能性以時間有效，成本有效，簡單，快速的方式分離，純化和濃縮 250bp 或更小的核酸片段，這也提供了優異的產率，本發明已經證明已經實現了這一點。

【發明內容】

[0009] 本發明涉及在雙液相系統 (ATPS) 中分離，濃縮和/或純化短鏈核酸片段。在一個實施例中，本發明提供了使用 ATPS 分離，濃縮和/或純化具有約或少於 250 個鹼基對 (bp) 的短鏈核酸片段的方法。在一個實施例中，本發明提供了用於從含有核酸的生物材料中純化具有約或少於 250 個鹼基對的短鏈核酸片段的試劑盒。在另一個實施例中，本發明提供某些聚合物在 ATPS 中用於從含有核酸的生物材料中純化具有約或少於 250 個鹼基對的短鏈核酸片段的用途。

【圖式簡單說明】

[0010] 圖 1A 和 1B 顯示了通過添加聚合物和鹽誘導的相分離。圖 1A 中的試管由兩個分離的相組成，頂部/底部相體積比為 1：1。圖 1B 中的試管顯示兩個分離的相，其頂部/底部相體積比為 9：1。通過調節 APTS 組分，頂部相與底部相的體積比可以從 1：1 變為 9：1，並且可以進一步改變以將靶標分子濃縮到具有較小體積的相中。圖 1B 顯示了典型的情況，其中靶標分子在底部相濃縮 (以較深的顏色顯示)。

[0011] 圖 2 顯示了通過本發明的一個實施例來純化的 DNA 的凝膠電泳圖像。

[0012] 圖 3 顯示了根據本發明的一個實施例，不同大小的核酸片段分配到兩個不同相的凝膠電泳圖像。

[0013] 圖 4 顯示了根據本發明的一個實施例來提取的不同大小的 DNA 的回收百分率。

[0014] 圖 5 比較了由本發明的一個實施例和 QIAamp Blood DNA mini 試劑盒提取的不同大小的 DNA 的回收百分率。

【實施方式】

[0015] 在下面的描述中，描述了本發明的幾個實施例。為解釋起見，提出了具體的配置和細節，以便對實施例提供透徹的理解。此外，對於一個詞的複數或單數形式，以及說明實施例的方向程度被描述為“頂部”，“底部”，“前面”“後面”，“左”，“右”之類的，這些字眼是幫助讀者理解實施例，並不意味著要限制本發明。對於本領域的技術人員來說，本發明可以在沒有具體細節的情況下被實踐。以下的實施例讓本發明更容易理解，本領域技術人員將很容易明白，具體的例子只是為了說明目的，而不應被隨後的申請專利範圍所限制。應當指出的是，“包含”或“包括”這一過渡性術語是“包容性的”或“特徵在於”，是包容性的或開放式的，並且不排除額外的、未列舉的元素或方

法步驟。

[0016] 在本發明中，雙液相系統 (ATPS) 已經適用於從各種生物材料中分離，濃縮和/或純化具有約或少於 250 個鹼基對 (bp) 的短鏈核酸片段。

[0017] 在一個實施例中，本發明提供了使用雙液相系統 (ATPS) 分離，濃縮和/或純化具有約或少於 250 個鹼基對 (bp) 的短鏈核酸片段的方法。在一個實施例中，該方法包括以下步驟

- (a) 提供 ATPS 組分；和
- (b) 將所述 ATPS 組分與包含核酸的樣品溶液接觸或混合，
- (c) 使所述 ATPS 和樣品溶液的混合物分離成第一相和第二相，

其中短鏈核酸片段分配到第一相或第二相中，從而分離和濃縮短鏈核酸片段。

[0018] 在一個實施例中，本發明提供了一種用於從樣品中分離和濃縮 250bp 或更小的核酸片段的組合物，該組合物包含第一組分和第二組分，當組分在水溶液中溶解時能夠形成雙液相系統 (ATPS)。在一個實施例中，第一組分是聚合物，鹽或膠束溶液中的一種或多種。在一個實施例中，第二組分是聚合物，鹽或膠束溶液中的一種或多種。在一個實施例中，第一組分是聚合物，第二組分是鹽。在一個實施例中，250bp 或更小的核酸片段在一個相中濃縮。

[0019] 在一個實施例中，本發明提供了從樣品中分離和濃縮 250bp 或更小的核酸片段的方法，該方法將本文所述的組合物與包含短鏈核酸片段的樣品溶液混合，從而分離和濃縮短鏈核酸片段。

[0020] 在一個實施例中，短鏈核酸片段是編碼 DNA、非編碼 DNA、信使 RNA、核糖體 RNA、微 RNA 或轉移 RNA。在一個實施例中，短鏈核酸片段是循環游離 DNA 或循環腫瘤 DNA。

ATPS (雙液相系統)

[0021] 類似於油-水系統，ATPS 由兩個不同的液相組成，其比例可以很容易地控制。懸浮在 ATPS 系統中的生物分子基於它們的物理化學性質（例如，親水性和兩相的界面張力）被分配到兩個水相中的其中一個，藉此濃縮目標生物分子。

[0022] 在一個實施例中，本發明提供雙液相系統 (ATPS)，用於從樣品中分離/濃縮/純化/回收一種或多種短鏈核酸片段或靶標分子（例如核酸分子）。由於它們的不同性質，混合物中的不同分子將在兩相之間差異地分佈，並且可以使用 ATPS 以最小的設置和人為干預來分離和濃縮靶標分子。在一個實施例中，不需要動力或設備來實現相分離，因為流體流動完全依賴於基於等溫動力學原理的毛細管作用。

[0023] 本發明的優點是可以以簡單的方式獲得高純度和濃度的靶標分子並且與下游應用相容，包括但不限於擴增（例如通過 PCR）、測序、標記或檢測（例如通過雜交或橫向流動免疫分析法 (LFA)），且無需進一步純化或濃縮步驟。

[0024] 本發明提供的方法和設備是穩健、價格低廉、簡單、易於處理、安全、方便使用、快捷的。本方法能夠純化和濃縮一個或多個短鏈核酸片段或靶標分子，而且可以確保應用在下游的分析結果不會受到原樣品中雜質的影響。

[0025] 由於本發明的獨特功能，本發明可以方便快捷地純化和濃縮靶標分子，而無需使用額外電源或複雜儀器，並且適用於含一個或多個短鏈核酸片段或靶標分子量非常低或體積小的樣品。此外，本方法易用於自動化上，包含高通量篩選體系。

使用 ATPS (雙液相系統) 來分離和/或濃縮小的核酸片段

[0026] 在一個實施例中，本發明用於從樣品中分離、純化、回收和濃縮一種或多種短鏈核酸片段或靶標分子。在一個實施例中，本發明能夠將一種或多種短鏈核酸片段或靶標分子與非靶標分子分離，並同時濃縮靶標核酸分子。

[0027] 在本發明的一個實施例中，短鏈核酸片段或靶標分子保留在嵌入 ATPS 的多孔材料上，而非靶標材料留在液體系統中 (即原始樣品加上任何非 ATPS 組分)。在一個實施例中，非靶標物質保留在嵌入 ATPS 的多孔材料上，而短鏈核酸片段或靶標分子留在液體系統中 (即原始樣品加上任何非 ATPS 組分)。

[0028] 在本發明中，雙液相系統 (ATPS) 已經適用於從各種生物材料中分離、濃縮和/或純化具有約或少於 250 個鹼基對的短鏈核酸片段。

[0029] 在一個實施例中，本發明提供了使用雙液相系統 (ATPS) 分離、濃縮和/或純化具有約或少於 250 個鹼基對的短鏈核酸片段的方法。在一個實施例中，該方法包括以下步驟

(a) 提供包含第一組分和第二組分的 ATPS 組合物; 和

(b) 使所述 ATPS 組分與包含短鏈核酸片段的樣品溶液接觸; 和

允許短鏈核酸片段分配到第一相或第二相中，從而分離、濃縮和/或純化短鏈核酸片段。

[0030] 在一個實施例中，ATPS 組合物是包含聚合物，鹽和表面活性劑的 ATPS 組分的混合相溶液。在一個實施例中，組合物在與樣品溶液接觸後分離成第一相和第二相，從而引發相分離。

[0031] 在一個實施例中，核酸是循環游離 DNA (cfDNA)。如本文所用，“循環游離 DNA” (cfDNA) 是存在於細胞外的 DNA，例如存在於受試者的血液、血漿、血清或尿液中的 DNA。不受任何特定理論或機制的束縛，人們相信 cfDNA 是從細胞釋放或源自細胞，例如通過細胞凋亡。如本文所用，“天然 cfDNA”或“受試者的 cfDNA”是指釋放自或源自受試者的細胞 (例如，非癌細

胞) 的循環游離 DNA。如本文所用，“非天然 cfDNA”或“cfDNA 不是受試者天然的”是指來自非天然來源的循環游離 DNA，其在序列方面不同於受試者的 cfDNA，例如一個或多個基因座的序列同一性差異，包括但不限於本文所述的那些。非天然 DNA 的實例包括但不限於移植供體 DNA 和癌症/腫瘤 DNA。非天然 cfDNA 的實例包括但不限於移植供體 cfDNA (在本文中 also 稱為供體特異性 cfDNA) 和腫瘤 cfDNA (在本文中 also 稱為癌症特異性 cfDNA)。非天然 cfDNA 的來源取決於受試者。作為另一個例子，非天然 cfDNA 包括細菌，真菌和病毒 DNA。例如，如果受試者是移植受體，則可以從捐贈的移植器官 (供體特異性 cfDNA) 中脫落非天然 cfDNA，並且可以通過來自宿主/受試者 (宿主 cfDNA) 的細胞脫落天然 cfDNA。如果受試者患有癌症，則可以例如通過腫瘤和/或轉移 (癌症特異性 cfDNA) 脫落非天然 cfDNA，並且天然的 cfDNA 可以例如通過受試者的非癌細胞脫落。

[0032] 在一個實施例中，核酸是存在於癌症患者的血漿或血清中的循環腫瘤 DNA (ctDNA)。

[0033] 在一個實施例中，本發明的短鏈核酸片段的大小等於或小於 250bp。在另一個實施例中，短鏈核酸片段的大小為 160-165bp。在另一個實施例中，短鏈核酸片段為約 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 或 250 bp 的大小。

[0034] 在一個實施例中，將短鏈核酸片段分配到第一相中。在另一個實施例中，將短鏈核酸片段分配到第二相中。在另一個實施例中，將短鏈核酸片段分配到第一相溶液和第二相溶液的界面中。

[0035] 在一個實施例中，樣品溶液是含核酸的樣品或含核酸的生物材料。本發明的重要性在於含有核酸的樣品和含核酸的生物材料的處理和製備，所述生物材料包括但不限於組織，血液，血漿，血清，腦脊髓液 (CSF)，尿液，

唾液，糞便，排出淚液，痰液，鼻咽粘液，陰道分泌物，陰莖分泌物等。

[0036] 在本發明中可以使用各種 ATPS 系統，包含但不限於聚合物-鹽 (如 PEG-鹽)，聚合物-聚合物 (如 PEG-右旋糖酐、PEG-聚丙烯酸酯)、膠束 (如 Triton X-114)、鹽-膠束 (如 鹽-Triton X-114) 或聚合物-膠束 (如 PEG- Triton X-114)。

[0037] 在一個實施例中，第一和/或第二組分包含聚合物。在一個實施例中，所述聚合物包含但不限於聚乙二醇，如疏水改性聚亞烷基二醇，聚 (氧化烯) 聚合物，聚 (氧化烯) 共聚物，如疏水改性的聚 (氧化烯) 共聚物，聚乙烯醇吡咯烷酮、聚乙烯醇 (PVA)、聚乙烯醇己內醯胺、聚乙烯基甲基醚、烷氧基化表面活性劑、烷氧基化澱粉、烷氧基化纖維素、烷基羥烷基纖維素、有機矽改性聚醚和聚 N-異丙基丙烯酰胺。在另一個實施例中，第一個聚合物包含聚乙二醇、聚丙烯乙二醇或右旋糖酐。在一個實施例中，聚合物是 UCON™ 聚合物 (Dow Chemical Company) 或 Ficoll™ 聚合物 (Sigma-Aldrich)。

[0038] 在一個實施例中，第一相溶液或第二相溶液的聚合物濃度在大約 0.01% 到大約 90% 的範圍內 (w/w) (按水溶液的總重量)。在各實施例中，聚合物溶液的濃度是約 0.01% w/w，約 0.05% w/w，約 0.1% w/w，約 0.15% w/w，約 0.2% w/w，約 0.25% w/w，約 0.3% w/w，約 0.35% w/w，約 0.4% w/w，約 0.45% w/w，約 0.5% w/w，約 0.55% w/w，約 0.6% w/w，約 0.65% w/w，約 0.7% w/w，約 0.75% w/w，約 0.8% w/w，約 0.85% w/w，約 0.9%) w/w，約 0.95% w/w，或約 1% w/w。在某些實施例中，聚合物溶液的濃度是約為 1% w/w，約 2% w/w，約 3% w/w，約 4% w/w，約 5% w/w，約 6% w/w，約 7% w/w，約 8% w/w，約 9% w/w，約 10% w/w，約 11% w/w，約 12% w/w，約 13% w/w，約 14% w/w，約 15% w/w，約 16% w/w，約 17% w/w，約 18% w/w，約 19% w/w，約 20% w/w，約 21% w/w，約 22% w/w，約 23% w/w，

約 24% w/w，約 25% w/w，約 26% w/w，約 27% w/w，約 28% w/w，約 29% w/w，約 30% w/w，約 31% w/w，約 32% w/w，約 33% w/w，約 34% w/w，約 35% w/w，約 36% w/w，約 37% w/w，約 38% w/w，約 39% w/w，約 40% w/w，約 41% w/w，約 42% w/w，約 43% w/w，約 44% w/w，約 45% w/w，約 46% w/w，約 47% w/w，約 48% w/w，約 49% w/w，約 50% w/w。在一個實施例中，聚合物濃度大約從 0.01% 到 40% w/w。在一個實施例中，聚合物濃度大約從 6% 到 35% w/w。在一個實施例中，聚合物濃度大約從 10% 到 30% w/w。

[0039] 在一個實施例中，第一和/或第二相溶液包含鹽，從而形成鹽溶液。在一個實施例中，鹽包含但不限於親液鹽、離液鹽和無機鹽，所述無機鹽的陽離子為直鏈或支鏈三甲基銨、三乙基銨、三丙基銨、三丁基銨、四甲基銨、四乙基銨、四丙基銨或四丁基銨，所述無機鹽的陰離子為磷酸根、硫酸根、硝酸根、氯離子或碳酸氫根。在另一實施例中，鹽選自氯化鈉、磷酸鈉、磷酸二氫鈉、磷酸一氫鈉、磷酸鉀、磷酸二氫鉀、磷酸氫二鉀、硫酸鈉、硫酸氫鈉、檸檬酸鉀、硫酸銨、檸檬酸鈉、醋酸鈉和其組合。其他鹽，例如醋酸銨，也可以使用。在一個實施例中，兩種或多種鹽用於調節 pH 值或改變相之間的界面張力。

[0040] 在一個實施例中，鹽總濃度在 0.001 至 100mM 的範圍內。本領域的技術人員會明白，在 ATPS 中所需的鹽的量會受到聚合物分子量、濃度和物理狀態的影響。

[0041] 在各種實施例中，鹽相選自鹽溶液，濃度約為 0.001% 到 90% w/w。在各種實施例中，鹽溶液濃度約 0.01% w/w，約 0.05% w/w，約 0.1% w/w，約 0.15% w/w，約 0.2% w/w，約 0.25% w/w，約 0.3% w/w，約 0.35% w/w，約 0.4% w/w，約 0.45% w/w，約 0.5% w/w，約 0.55% w/w，約 0.6% w/w，約

0.65% w/w，約 0.7% w/w，約 0.75% w/w，約 0.8% w/w，約 0.85% w/w，約 0.9%) w/w，約 0.95% w/w，或約 1% w/w。在某些實施例中，鹽溶液濃度約為 1% w/w，約 2% w/w，約 3% w/w，約 4% w/w，約 5% w/w，約 6% w/w，約 7% w/w，約 8% w/w，約 9% w/w，約 10% w/w，約 11% w/w，約 12% w/w，約 13% w/w，約 14% w/w，約 15% w/w，約 16% w/w，約 17% w/w，約 18% w/w，約 19% w/w，約 20% w/w，約 21% w/w，約 22% w/w，約 23% w/w，約 24% w/w，約 25% w/w，約 26% w/w，約 27% w/w，約 28% w/w，約 29% w/w，約 30% w/w，約 31% w/w，約 32% w/w，約 33% w/w，約 34% w/w，約 35% w/w，約 36% w/w，約 37% w/w，約 38% w/w，約 39% w/w，約 40% w/w，約 41% w/w，約 42% w/w，約 43% w/w，約 44% w/w，約 45% w/w，約 46% w/w，約 47% w/w，約 48% w/w，約 49% w/w，約 50% w/w。在一個實施例中，鹽濃度約 2% 到 40% w/w。在一個實施例中，鹽濃度約 3% 到 30% w/w。在一個實施例中，鹽濃度約 5% 到 20% w/w。

[0042] 在一個實施例中，第一組分和/或第二組分包含與水不相容的溶劑。在某些實施例中，溶劑包含非極性有機溶劑。在某些實施例中，溶劑包含油。在某些實施例中，溶劑選自戊烷、環戊烷、苯、1,4-二惡烷、乙醚、三氯甲烷、氯仿、甲苯和己烷。

[0043] 在一個實施例中，第一相溶液和/或第二相溶液包含膠束溶液。在某些實施例中，膠束溶液包含非離子表面活性劑。在某些實施例中，膠束溶液包含洗滌劑。在某些實施例中，膠束溶液包含 Triton-X。在某些實施例中，膠束溶液包含類似於 Triton-X 的聚合物，如 Igepal CA-630 和 Nonidet P-40。在某些實施例中，膠束溶液主要由 Triton-X 組成。

[0044] 在一個實施例中，第一相溶液包含膠束溶液，第二相溶液包含聚合物。在一個實施例中，第二相溶液包含膠束溶液，第一相溶液包含聚合物。在一

個實施例中，第一相溶液包含膠束溶液，第二相溶液包含鹽。在一個實施例中，第二相溶液包含膠束溶液，第一相溶液包含鹽。在一個實施例中，膠束溶液為 Triton-X 溶液。在一個實施例中，第一相溶液包含第一聚合物，第二相溶液包含第二聚合物。在一個實施例中，第一/第二聚合物從聚乙二醇和右旋糖酐中選擇。在一個實施例中，第一相溶液包含聚合物，第二相溶液包含鹽。在一個實施例中，第二相溶液包含聚合物，第一相溶液包含鹽。在某些實施例中，第一相溶液包含聚乙二醇，第二相溶液包含磷酸鉀。在某些實施例中，第二相溶液包含聚乙二醇，第一相溶液為磷酸鉀。在一個實施例中，第一相溶液包含鹽，第二相溶液包含鹽。在一個實施例中，第一相溶液包含親液鹽，第二相溶液包含離液鹽。在某些實施例中，第二相溶液包含親液鹽和第一相溶液包含離液鹽。

[0045] 在一個實施例中，第一相與第二相溶液的比率在 1:1 到 1:1000 之間。在某些實施例中，第一相與第二相溶液的比率選自大約 1:1，約 1:2，約 1:3，約 1:4，約 1:5，約 1:6，約 1:7，約 1:8，約 1:9，約 1:10。在某些實施例中，第一相與第二相溶液的比率選自大約 1:20，約 1:30，約 1:40，約 1:50，約 1:60，約 1:70，約 1:80，約 1:90，約 1:100。在某些實施例中，第一相與第二相溶液的比率選自大約 1:200，約 1:300，約 1:400，約 1:500，約 1:600，約 1:700，約 1:800，約 1:900，約 1:1000。

[0046] 在一個實施例中，第二相與第一相的溶液比率選自大約 1:1，約 1:2，約 1:3，約 1:4，約 1:5，約 1:6，約 1:7，約 1:8，約 1:9，約 1:10。在某些實施例中，第二相與第一相溶液的比率選自大約 1:20，約 1:30，約 1:40，約 1:50，約 1:60，約 1:70，約 1:80，約 1:90，約 1:100。在某些實施例中，第二相與第一相溶液的比率選自大約 1:200，約 1:300，約 1:400，約 1:500，約 1:600，約 1:700，約 1:800，約 1:900，約 1:1000。

[0047] 在一個實施例中，在 ATPS 和樣品的混合物的相分離之後，第一相或第二相溶液的聚合物濃度在約 0.01% 至約 90% 的範圍內 (w/w) (按水溶液的總重量)。在各實施例中，濃度是約 0.01% w/w，約 0.15% w/w，約 0.2% w/w，約 0.25% w/w，約 0.3% w/w，約 0.35% w/w，約 0.4% w/w，約 0.45% w/w，約 0.5% w/w，約 0.55% w/w，約 0.6% w/w，約 0.65% w/w，約 0.7% w/w，約 0.75% w/w，約 0.8% w/w，約 0.85% w/w，約 0.9% w/w，約 0.95% w/w，或約 1% w/w。在某些實施例中，鹽溶液選自聚合物溶液約為 1% w/w，約 2% w/w，約 3% w/w，約 4% w/w，約 5% w/w，約 6% w/w，約 7% w/w，約 8% w/w，約 9% w/w，約 10% w/w，約 11% w/w，約 12% w/w，約 13% w/w，約 14% w/w，約 15% w/w，約 16% w/w，約 17% w/w，約 18% w/w，約 19% w/w，約 20% w/w，約 21% w/w，約 22% w/w，約 23% w/w，約 24% w/w，約 25% w/w，約 26% w/w，約 27% w/w，約 28% w/w，約 29% w/w，約 30% w/w，約 31% w/w，約 32% w/w，約 33% w/w，約 34% w/w，約 35% w/w，約 36% w/w，約 37% w/w，約 38% w/w，約 39% w/w，約 40% w/w，約 41% w/w，約 42% w/w，約 43% w/w，約 44% w/w，約 45% w/w，約 46% w/w，約 47% w/w，約 48% w/w，約 49% w/w，約 50% w/w。在一個實施例中，第一相中的聚合物濃度為約 10% 至 50% w/w，而第二相中的濃度為約 0.01% 至 6% w/w。在另一個實施例中，第一相中的聚合物濃度為約 22% 至 45% w/w，而另一相中的濃度為約 0.01% 至 4% w/w。

[0048] 在 ATPS 的第一組分和第二組分是鹽的各個實施例中，在 ATPS 和樣品的混合物的相分離之後，第一相或第二相的鹽濃度在約 0.01% 至約 90% 的範圍內 (w/w) (按水溶液的總重量)。在各實施例中，鹽的濃度是約 0.01% w/w，約 0.15% w/w，約 0.2% w/w，約 0.25% w/w，約 0.3% w/w，約 0.35% w/w，約 0.4% w/w，約 0.45% w/w，約 0.5% w/w，約 0.55% w/w，約 0.6% w/w，

約 0.65% w/w，約 0.7% w/w，約 0.75% w/w，約 0.8% w/w，約 0.85% w/w，約 0.9%) w/w，約 0.95% w/w，或約 1% w/w。在某些實施例中，鹽溶液選自聚合物溶液約為 1% w/w，約 2% w/w，約 3% w/w，約 4% w/w，約 5% w/w，約 6% w/w，約 7% w/w，約 8% w/w，約 9% w/w，約 10% w/w，約 11% w/w，約 12% w/w，約 13% w/w，約 14% w/w，約 15% w/w，約 16% w/w，約 17% w/w，約 18% w/w，約 19% w/w，約 20% w/w，約 21% w/w，約 22% w/w，約 23% w/w，約 24% w/w，約 25% w/w，約 26% w/w，約 27% w/w，約 28% w/w，約 29% w/w，約 30% w/w，約 31% w/w，約 32% w/w，約 33% w/w，約 34% w/w，約 35% w/w，約 36% w/w，約 37% w/w，約 38% w/w，約 39% w/w，約 40% w/w，約 41% w/w，約 42% w/w，約 43% w/w，約 44% w/w，約 45% w/w，約 46% w/w，約 47% w/w，約 48% w/w，約 49% w/w，約 50% w/w。在一個實施例中，第一相中的鹽濃度為約 0.01% 至 10% w/w，而第二相中的鹽濃度為約 20% 至 40% w/w。在另一個實施例中，第一相中的鹽濃度為約 0.01% 至 6% w/w，而另一相中的鹽濃度為約 22% 至 35% w/w。

[0049] 在一個實施例中，本發明提供用於分離和/或濃縮短鏈核酸片段的組合物，該組合物包含能夠形成雙液相系統 (ATPS) 的組分。

[0050] 在一個實施例中，本發明的組合物包含混合相溶液，其包含第一相相溶液和第二相溶液，包括前述說明書中描述的那些。

[0051] 在一個實施例中，用於分離和/或濃縮短鏈核酸片段的本發明組合物包含聚乙二醇 (PEG) 6000 和磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4)。在一個實施例中，用於分離和/或濃縮短鏈核酸片段的本發明組合物包含約 5-12% 的聚乙二醇 (PEG) 6000 和 20-25% 的 K_2HPO_4 。在另一個實施例中，用於分離和/或濃縮短鏈核酸片段的本發明組合物包含 8% 聚乙二醇 (PEG) 6000 和 22% K_2HPO_4 。

[0052] 在一個實施例中，用於分離和/或濃縮短鏈核酸片段的本發明組合物包含聚乙二醇 (PEG) 1000 和 K_2HPO_4 。在一個實施例中，用於分離和/或濃縮短鏈核酸片段的本發明組合物包含約 12-18% 聚乙二醇 (PEG) 1000 和 12-18% 的 K_2HPO_4 。在另一個實施例中，用於分離和/或濃縮短鏈核酸片段的本發明組合物包含 15% 聚乙二醇 (PEG) 1000 和 15% K_2HPO_4 。

[0053] 在一個實施例中，本發明用於分離和/或濃縮短鏈核酸片段的組合物包含聚乙二醇 (PEG) 1000 和磷酸氫二鉀 (K_2HPO_4) 和磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 的混合物。

調整濃縮倍數

[0054] 舉例來說，在一些實施例中，靶標短鏈核酸片段在第一相中濃縮 10 倍，例如，通過使用第一相與第二相溶液的體積比為 1：9。

[0055] 在一個實施例中，多孔材料中的 ATPS 組分的相對量可以調整。對 ATPS 的兩個相的體積比進行了調控，使短鏈核酸片段或靶標分子在一個相中優先分離/純化/濃縮/回收。

[0056] 為了更好地量化與本發明相關的發明，本發明開發了一種分析方法，以評估嵌入在多孔材料上的 ATPS 組分的相對量與所能達到的結果 (例如，濃縮/分離/恢復的效率) 之間的關係。通過調整 ATPS 兩個組分的相對量，可以選擇和微調濃縮倍數，分離效率和回收率。

[0057] 在一個實施例中，通過改變 ATPS 組分的濃度可以容易地控制 ATPS 中兩相之間的比例。圖 1A-B 顯示了通過向溶液中加入不同的 ATPS 組分 (例如聚合物和鹽) 誘導的相分離濃度。ATPS 組分和样品以 1：1 混合。通過調節 ATPS 組分，混合物相分離並且靶標分子分配到兩相之一。圖 1B 顯示靶標分

子在底部相中以 9：1 的體積比濃縮。可以進一步改變頂部相與底部相的體積比以將靶標分子濃縮在具有較小體積的相中。

[0058] 在另一個實施例中，通過調節 ATPS 組分 (例如，向混合物中添加額外的相同或不同類型的 ATPS 組分，或在製備最終溶液時，改變要添加到混合物中的 ATPS 組分的相對體積或濃度，或在製備最終溶液時，調整要加入系統的樣品溶液的體積) 可以改變最終混合物中 ATPS 相的相對體積或濃度。在一個實施例中，頂部相與底部相的體積比可以是從 1：1 變為 9：1 或更高的比率。可以利用這種現象來濃縮靶標分子而無需電力，設備或培訓。在一種簡單的介質中，如水或鹽溶液，這是很容易重現的；然而，考慮到具有高可變性和可能的其他干擾物質的複雜介質 (例如唾液，血液，尿液，血漿，血清，腦脊髓液 (CSF)，糞便物質和排出物，例如眼淚，痰，鼻咽粘液，陰道分泌物和陰莖分泌物)，更難以實現有用的體積比。從複雜介質中去除干擾物質可能會有所幫助。例如，檸檬酸可用於從尿液中除去尿素，或者在本發明的一些實施例中，三氯乙酸可用於從唾液中除去蛋白質。

設計嵌入 ATPS 的多孔材料

[0059] 在一個實施例中，本發明提供了一種嵌入 ATPS 組分的多孔材料。在一個實施例中，當樣品經過嵌有 ATPS 組分的多孔材料時，可以分離和濃縮短鏈核酸片段。在一個實施例中，從多孔材料中直接收集分離和濃縮的短鏈核酸片段用於隨後的分析或儲存。

[0060] 多孔材料可以使用任何可以吸收和轉移液體的合適的多孔材料。本發明適用的多孔材料包含但不限於玻纖紙、棉基紙、其他類型的紙張、聚合物泡沫塑膠、纖維素泡沫塑膠、其他類型的泡沫塑膠、人造絲織物、棉織物、其他類型的織物、木材、石材和任何其他能吸收和轉移液體的材料。

[0061] 在一個實施例中，ATPS 包含混合相溶液。其包含第一相溶液和第二相溶液，其中第一相溶液和第二相溶液的組分被嵌入在所述多孔材料中，當混合相溶液流過多孔材料時，他們的濃度或量足於進行相分離。

[0062] 在一個實施例中，當混合相溶液流過多孔材料時，嵌入在所述多孔材料中的 ATPS 組分的濃度或量足以進行相分離。

[0063] 在一個實施例中，將一些 ATPS 組分嵌入在多孔材料中，然後脫水，然後將含有靶標核酸片段的樣品加到所述多孔材料。

[0064] 在一個實施例中，一些 ATPS 組分嵌入多孔材料中然後脫水（“預處理的多孔材料”），而剩餘的 ATPS 組分先與含有靶標核酸片段的樣品混合，然後通過預處理的多孔材料的相分離進行分離和濃縮。

[0065] 在一個實施例中，首先將一些 ATPS 組分與含有短鏈核酸片段的樣品混合，然後將所得混合物嵌入在多孔材料中；然後將剩餘的 ATPS 組分加入到多孔材料中，隨後通過多孔材料內的相分離進行分離/濃縮。

[0066] 在一個實施例中，短鏈核酸片段與 ATPS 組分混合物或與 ATPS 組分混合，在第一相中，第二相中或第一相和第二相的交界面（相交界）分配。

[0067] 在一個實施例中，本發明提供一種在多孔材料中的兩個組分的 ATPS（雙液相系統）用於分離樣品中的短鏈核酸片段和長鏈核酸分子。在一個實施例中，當 ATPS 在多孔材料內進行相分離時，短鏈核酸片段和長鏈核酸分子分配到 ATPS 的不同相中。

[0068] 在一個實施例中，多孔材料和 ATPS 經過選擇，使第一相溶液以第一速度流經多孔材料以及第二相溶液以第二速度流經多孔材料。第一速度和第二速度不同。

[0069] 在一個實施例中，多孔材料是商用的或由內部製造的。

[0070] 在一個實施例中，為了將 ATPS 組分整合到多孔材料中，將 ATPS 組分溶解在水（或合適的緩衝液）中並以一定比例和/或濃度施加在多孔材料上。然後將多孔材料置於凍乾機中以除去水，導致 ATPS 組分直接嵌入到多孔材料中。在將樣品引入多孔材料後，ATPS 組分立即進行補液再水合化，從而分離樣品中的短鏈核酸片段或靶標分子。在一個實施例中，短鏈核酸片段在流體流動的前沿濃縮。在一個實施例中，沒有外部電源或設備用於提供驅動力。

使用橫向流動免疫分析法 (LFA) 改善診斷

[0071] 通過本發明方法獲得的短鏈核酸片段可以使用橫向流動免疫分析法 (LFA) 進行檢測或分析。

[0072] 橫向流動免疫分析 (LFA) 方法和設備已經在以前被廣泛地描述了，例如，Gordon 和 Pugh 的美國專利-4,956,302；H. Buck, 等人的專利 WO 90/06511；T. Wang 的專利 US-6,764,825；W. Brown 等人的美國專利 5,008,080；Kuo 和 Meritt 的美國專利-6,183,972 和歐洲專利 EP00987551A3。這些分析包含檢測和定量分析物，它是由配體和受體組成的特定結合中的其中一個組分。受體特定地與配體結合，能夠從樣品的其他具有相似特徵的成分區分出對應的配體。免疫分析涉及抗體和抗原之間的反應是一個特定結合的例子。其他的例子包含 DNA 和 RNA 雜交反應以及含有激素和其他生物受體的結合反應。

[0073] 在一個實施例中，本發明能夠濃縮受試者中存在的疾病的短鏈核酸片段，所獲得的產物經歷下游診斷處理，需要檢測或定量短鏈核酸片段。由於短鏈核酸片段的濃度增加，因此預期本發明可降低信噪比並增強橫向流動免疫分析 (LFA) 中的陽性信號。因此，也可以降低假陽性率和假陰性率。濃度

可以提高，因此可以檢測到因其低豐度或樣品中的雜質干擾而無法檢測的分子。

[0074] 如果短鏈核酸片段的濃度極低，則可能產生假陰性結果。在一個實施例中，由於短鏈核酸片段的濃度增加，LFA 的檢測極限提高。結果，增加了測試的再現性。

[0075] 在一個實施例中，本發明提供組合物用於從樣品中分離和濃縮 250bp 或更小的核酸片段，包含第一相組分和第二相組分，兩種組分均溶解在含有所述樣品的水溶液中，形成雙液相系統 (ATPS)，其中第一相組分是以 5-18wt% 的濃度溶解在第一相中的聚合物，第二相組分是以 15-25wt% 的濃度溶解在第二相中的鹽，和當核酸片段與 ATPS 混合時，所述片段在兩相中的一相中被濃縮。

[0076] 本發明組合物的一個實施例中，聚合物是聚乙二醇，聚(氧化烯)聚合物，聚(氧化烯)共聚物，聚乙炔醇吡咯烷酮、聚乙炔醇、聚乙炔醇己內醯胺、聚乙炔基甲基醚、烷氧基化表面活性劑、烷氧基化澱粉、烷氧基化纖維素、烷基羥烷基纖維素、有機矽改性聚醚、聚 N-異丙基丙烯酰胺、聚乙二醇、聚丙炔乙二醇和右旋糖酐，UCON™ 聚合物或 Ficoll™ 聚合物。

[0077] 本發明組合物的一個實施例中，鹽是親液鹽、離液鹽和無機鹽，所述無機鹽的陽離子為直鏈或支鏈三甲基銨、三乙基銨、三丙基銨、三丁基銨、四甲基銨、四乙基銨、四丙基銨或四丁基銨，所述無機鹽的陰離子為磷酸根，硫酸根，硝酸根，氯離子或碳酸氫根。在另一實施例中，鹽選自氯化鈉、磷酸鈉、磷酸鉀、硫酸鈉、檸檬酸鉀、硫酸銨、檸檬酸鈉、醋酸鈉和醋酸銨。

[0078] 本發明組合物的一個實施例中，聚合物是分子量為 100-10,000Da 的聚乙二醇。

[0079] 本發明組合物的一個實施例中，鹽是磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、氯化鈉、硫酸鈉和磷酸鈉中的一種或多種。

[0080] 本發明組合物的一個實施例中，當樣品與組合物混合時，所得混合物進行相分離，並且所述核酸片段被分配到兩相之一。

[0081] 本發明組合物的一個實施例中，核酸片段是編碼 DNA、非編碼 DNA、信使 RNA、核醣體 RNA、微 RNA 和轉移 RNA。

[0082] 本發明組合物的一個實施例中，樣品是血液、血漿、血清、腦脊髓液、尿液、唾液、糞便物質、淚液、痰液、鼻咽粘液、陰道分泌物和陰莖分泌物。

[0083] 在一個實施例中，本發明提供一種從樣品中分離和濃縮 250bp 或更小的核酸片段的方法，包括：

- a) 製備本發明中描述的組合物;
- b) 將來自步驟 a) 的組合物與含有樣品的水溶液混合，允許混合物分配成兩個相，並將所述核酸片段濃縮在兩相中的一相中; 和
- c) 從兩相中的其中一相中分離核酸片段。

[0084] 在一個實施例中，本發明提供一種從樣品中分離和濃縮 250bp 或更小的核酸片段的方法，包括：

- a) 製備包含第一相組分和第二相組分的組合物，當組分溶解在水溶液中時能夠形成雙液相系統 (ATPS)，其中第一相組分是在第一相中以 5-20wt% 的濃度溶解的聚合物，第二相組分是在第二相中以 15-25wt% 的濃度溶解的鹽;
- b) 將步驟 a) 的組合物與含有所述樣品的水溶液混合，允許混合物分配成兩個相，並將所述核酸片段濃縮在兩相中的一相中; 和
- c) 從兩相中的其中一相中分離濃縮的核酸片段。

[0085] 本發明方法的一個實施例中，該方法還包括從步驟 c) 中的相中回收核酸片段。

[0086] 本發明方法的一個實施例中，聚合物是聚乙二醇，聚(氧化烯)聚合物，聚(氧化烯)共聚物，聚乙烯醇吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙烯醇己內醯胺、聚乙烯基甲基醚、烷氧基化表面活性劑、烷氧基化澱粉、烷氧基化纖維素、烷基羥烷基纖維素、有機矽改性聚醚、聚 N-異丙基丙烯酰胺、聚乙二醇、聚丙稀乙二醇和右旋糖酐、UCON™ 聚合物或 Ficoll™ 聚合物。

[0087] 本發明方法的一個實施例中，鹽是親液鹽、離液鹽和無機鹽，所述無機鹽的陽離子為直鏈或支鏈三甲基銨、三乙基銨、三丙基銨、三丁基銨、四甲基銨、四乙基銨、四丙基銨或四丁基銨，所述無機鹽的陰離子為磷酸根、硫酸根、硝酸根、氯離子或碳酸氫根。在另一實施例中，鹽為氯化鈉、磷酸鈉、磷酸鉀、硫酸鈉、檸檬酸鉀、硫酸銨、檸檬酸鈉、醋酸鈉或醋酸銨。

[0088] 本發明方法的一個實施例中，聚合物是分子量為 100-10,000Da 的聚乙二醇。

[0089] 本發明方法的一個實施例中，鹽是磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、氯化鈉、硫酸鈉和磷酸鈉中的一種或多種。

[0090] 本發明方法的一個實施例中，在步驟 b) 中，大於 250bp 的核酸片段和 250bp 或更小的片段在 ATPS 的不同相中濃縮。

[0091] 本發明方法的一個實施例中，核酸片段是編碼 DNA、非編碼 DNA、信使 RNA、核糖體 RNA、微 RNA 和轉移 RNA。

[0092] 本發明方法的一個實施例中，樣品是血液、血漿、血清、腦脊髓液、尿液、唾液、糞便物質、淚液、痰液、鼻咽粘液、陰道分泌物和陰莖分泌物。

[0093] 本發明方法的一個實施例中，與樣品相比，核酸片段濃縮至少 10 倍。

[0094] 通過參考下面的實施例可以更好地理解本發明。本領域技術人員將很

容易理解，所提供的例子僅僅是為了說明目的，而不意味著限制本發明的範圍。本發明由隨後的申請專利範圍作界定。

[0095] 應注意，在本申請中，“包括”，“含有”或“特徵在於”同義的過渡術語“包括”是包含性的或開放性的，並且不排除另外的，未列舉的元素或方法步驟。

實施例

實施例 1 使用雙液相系統从 PBS 溶液中選擇性分離和濃縮短鏈核酸片段 (<250bp)

[0096] 將 DNA 分子量標準品 (GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) 加入到 1mL 由 11% (w/w) 聚乙二醇 (PEG) 6000 和 20% (w/w) K_2HPO_4 的 PBS 溶液組成的雙液相系統中，其最終 DNA 濃度為 $1\mu\text{g/mL}$ 。徹底渦旋後，將混合物在 10000rcf 下離心 10 秒以進行相分離。頂部相與底部相的體積比約為 1 : 3。萃取頂部相和底部相並分別轉移到新試管中。對萃取的相進行乙醇沉澱，並通過凝膠電泳分離沉澱物，以便顯示每個相中的 DNA 大小分配，如圖 3 所示。大多數大於 250bp 的核酸分配到底部相 (右側泳道)，而小於 250bp 的核酸分配到頂部相 (左側泳道)。由於頂部相與底部相的體積比為約 1 : 3，因此從較長的核酸片段中分離較短的核酸片段，隨後濃縮成較小體積的溶液。

[0097] 從上述步驟獲得的短鏈核酸片段通過 LFA 進一步分析，其中未經 ATPS 濃縮的 DNA 樣品作為對照。測試線的強度如下：

表格 1 測試線的強度

	DNA 經 ATPS 濃縮	對照
測試線的強度	60x	1x

實施例 2 使用雙液相系統從血漿樣品中選擇性分離和濃縮短鏈核酸片段 (<250bp)

[0098] 將 DNA 分子量標準品 (GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) 加入到 500ul 血漿樣品中。將加了標樣的血漿樣品加入到 500 μ l 由 15% (w/w) 聚乙二醇 (PEG) 1000 和 15% (w/w) K_2HPO_4 的 milliQ 水溶液組成的雙液相系統中，其最終 DNA 濃度為 1 μ g/ mL。徹底渦旋後，將混合物在 10000rcf 下離心 10 秒以進行相分離。頂部相與底部相的體積比約為 1 : 1。

[0099] 萃取底部相並加入另一種由 11% (w/w) 聚乙二醇 (PEG) 6000 和 20% (w/w) K_2HPO_4 milliQ 水溶液組成的 ATPS 溶液中。徹底渦旋後，將混合物在 10000rcf 下離心 10 秒以進行相分離。頂部相與底部相的體積比約為 1 : 3。萃取頂部相和底部相並分別轉移到新試管中。對萃取的相進行乙醇沉澱，並通過凝膠電泳分離沉澱物，以顯示每個區域中的 DNA 大小分佈 (如圖 3 所示)。大於 250bp 的核酸分配到底部相 (右側泳道)，而小於 250bp 的核酸分配到頂部相 (左側泳道)，因此，從樣品溶液中分離出較小大小的核酸並濃縮成較小體積的溶液。

[00100] 如本實施例中所述，通過 ATPS 分離和濃縮後，比較不同大小的 DNA 分子量標準品的回收率 (如圖 4 所示，其中回收百分比 = 回收的 DNA 的絕對量/樣品中的標樣的 DNA 量)。發現小於 250bp 的 DNA 以高百分比回收，而大於 250bp 的 DNA 顯著減少。它證明了本發明是特定於捕獲小於 250bp 的 DNA。

實施例 3 雙液相系統與 QIAamp Blood DNA mini 試劑盒 (Qiagen) 的比較

[00101] 將不同大小 (250, 200, 150, 100, 75, 50, 25bp) 的已消化的 DNA 質粒加

入到血漿樣品中，最終 DNA 濃度為 100ng/mL。將 1mL 加料的血漿樣品加入到 1mL 15% (w/w) 聚乙二醇 (PEG) 1000 和 15% (w/w) K_2HPO_4 的雙液相系統的 milliQ 水溶液中。徹底渦旋後，將混合物在 10000rcf 下離心 10 秒以進行相分離。頂部相與底部相的體積比約為 1：1。

[00102] 萃取底部相並加入另一種由 8% (w/w) 聚乙二醇 (PEG) 6000 和 22% (w/w) K_2HPO_4 組成的 ATPS 溶液中。徹底渦旋後，將混合物在 10000rcf 下離心 10 秒以進行相分離。頂部相與底部相的體積比約為 1：5。萃取頂部相並轉移至新試管中。

[00103] 使用 QIAamp Blood DNA mini 試劑盒 (Qiagen)，用 1mL 加了標樣的血漿樣品進行另一次萃取。通過用 Agilent Bioanalyzer 對分離所得的核酸進行的電泳分析，比較兩種不同方法的分離效果。結果如圖 5 所示。如圖 5 所示，當使用本發明時，超過 50-80% 的短於 250bp (25-200bp) 的核酸被提取，同時約 80% 的 150-200bp 的核酸被提取。相反，結果發現，QIAamp Blood DNA mini 試劑盒不能提取任何 25bp 的 DNA。因此，與 QIAamp Blood DNA mini Kit 相比，本發明的性能更優越。

【發明摘要】**【中文發明名稱】**

使用雙液相系統來分離，純化和/或濃縮短鏈核酸片段的方法

【英文發明名稱】

METHOD FOR USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM FOR THE ISOLATION, PURIFICATION AND/OR CONCENTRATION OF SHORT NUCLEIC ACID FRAGMENTS

【中文】

本發明涉及使用雙液相系統 (ATPS) 分離，濃縮和/或純化具有約或少於 250 鹼基對 (bp) 的短鏈核酸片段的方法。在一個實施例中，本發明提供了用於從含有核酸的生物材料中純化具有約或少於 250 個鹼基對的短鏈核酸片段的試劑盒。在另一個實施例中，本發明提供了某些聚合物在雙相系統中的用途，用於從含有核酸的生物材料中純化具有約或少於 250 個鹼基對的短鏈核酸片段。

【英文】

The present invention relates to methods of using aqueous two-phase system (ATPS) for the isolation, concentration and/or purification of short nucleic acid fragment having about or less than 250 base pairs (bp). In one embodiment, the present invention provides a kit for the purification of short nucleic acid fragments having about or less than 250 base pairs from nucleic acid-containing biological materials. In another embodiment, the present invention provides uses of certain polymers in a two-phase system for the purification of short nucleic acid fragments having about or less than 250 base pairs from nucleic acid containing-biological materials.

【指定代表圖】 圖 2

【代表圖之符號簡單說明】

(無)

【特徵化學式】

(無)

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種用於從樣品中分離和濃縮250bp或更小的核酸片段的組合物，包含第一相組分和第二相組分，當組分溶解在水溶液中時能夠形成雙液相系統 (ATPS)，其中第一相組分是在第一相中以5-20wt% 的濃度溶解的聚合物，第二相組分是在第二相中以5-35wt% 的濃度溶解的鹽，其中當所述核酸時將片段與所述ATPS混合，將所述片段濃縮在兩相中的其中一相中。

【第2項】 如請求項1所述的組合物，其中所述聚合物選自聚乙二醇，聚(氧化烯)聚合物，聚(氧化烯)共聚物，聚乙烯醇吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙烯醇己內醯胺、聚乙基甲基醚、烷氧基化表面活性劑、烷氧基化澱粉、烷氧基化纖維素、烷基羥烷基纖維素、有機矽改性聚醚、聚N-異丙基丙烯酰胺、聚乙二醇、聚丙稀乙二醇和右旋糖酐、UCON™ 聚合物 或 Ficoll™ 聚合物。

【第3項】 如請求項1或2所述的組合物，其中所述鹽選自親液鹽、離液鹽、氯化鈉、磷酸鈉、磷酸鉀、硫酸鈉、檸檬酸鉀、硫酸銨、檸檬酸鈉、醋酸鈉、醋酸銨和無機鹽，所述無機鹽的陽離子為直鏈或支鏈三甲基銨、三乙基銨、三丙基銨、三丁基銨、四甲基銨、四乙基銨，四丙基銨或四丁基銨，所述無機鹽的陰離子為磷酸根，硫酸根，硝酸根，氯離子或碳酸氫根。

【第4項】 如請求項1-3中任一項所述的組合物，其中所述聚合物是分子量為100-10,000Da的聚乙二醇。

【第5項】 如請求項1-4中任一項所述的組合物，其中所述鹽是磷酸

氫二鉀、磷酸二氫鉀、氯化鈉、硫酸鈉和磷酸鈉中的一種或多種。

【第6項】 如請求項1-5中任一項所述的組合物，其中當樣品與組合物混合時，所得混合物進行相分離，並且250bp或更小的核酸片段在兩相之一中濃縮。

【第7項】 如請求項6所述的組合物，其中所述大於250bp的核酸片段和250bp或更小的片段在ATPS的不同相中濃縮。

【第8項】 如請求項1-7中任一項所述的組合物，其中所述核酸片段選自編碼DNA、非編碼DNA、信使RNA、核糖體RNA、微RNA和轉移RNA。

【第9項】 如請求項1-7中任一項所述的組合物，其中所述核酸片段是循環游離DNA或循環腫瘤DNA。

【第10項】 如請求項1-9中任一項所述的組合物，其中所述樣品選自血液，血漿，血清，腦脊髓液，尿液，唾液，糞便物質，淚液，痰液，鼻咽粘液，陰道分泌物和陰莖分泌物。

【第11項】 一種從樣品中分離和濃縮250bp或更小的核酸片段的方法，包括：

- a) 製備請求項 1-7 中任一項的組合物;
- b) 將步驟 a) 的組合物與含有所述樣品的水溶液混合，允許混合物分配成兩個相，並將核酸片段濃縮在兩相中的一相中; 和
- c) 從兩相中的其中一相中分離核酸片段。

【第12項】 一種從樣品中分離和濃縮250bp或更小的核酸片段的方法，包括：

- a) 製備包含第一相組分和第二相組分的組合物，當組分溶解在水溶液中時能夠形成雙液相系統 (ATPS)，其中第一相組分是在第一相中以 5-20wt% 的濃度溶解的聚合物，第二相組分是在第二相中以 15-25wt% 的濃度溶解的鹽；
- b) 將步驟 a) 的組合物與含有所述樣品的水溶液混合，允許混合物分配成兩個相，並將核酸片段濃縮在兩相中的一相中；和
- c) 從兩相中的其中一相中分離濃縮的核酸片段。

【第13項】 如請求項12所述的方法，進一步包括從步驟c) 中的相中回收所述核酸片段。

【第14項】 如請求項12或13所述的方法，其中所述聚合物選自聚乙二醇，聚(氧化烯) 聚合物，聚(氧化烯) 共聚物，聚乙烯醇吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙烯醇己內醯胺、聚乙烯基甲基醚、烷氧基化表面活性劑、烷氧基化澱粉、烷氧基化纖維素、烷基羥烷基纖維素、有機矽改性聚醚、聚N-異丙基丙烯酰胺、聚乙二醇、聚丙烯乙二醇、右旋糖酐、UCON™ 聚合物和 Ficoll™ 聚合物。

【第15項】 如請求項12-14中任一項所述的方法，其中所述鹽選自親液鹽、離液鹽、氯化鈉、磷酸鈉、磷酸鉀、硫酸鈉、檸檬酸鉀、硫酸銨、檸檬酸鈉、醋酸鈉、醋酸銨和無機鹽，所述無機鹽的陽離子為直鏈或支鏈三甲基銨、三乙基銨、三丙基銨，三丁基銨，四甲基銨，四乙基銨，四丙基銨或四丁基銨，所述無機鹽的陰離子為磷酸根，硫酸根，硝酸根，氯離子或碳酸氫根。

【第16項】 如請求項12-15中任一項所述的方法，其中所述聚合物是分子量為100-10,000Da的聚乙二醇。

【第17項】 如請求項12-16中任一項所述的方法，其中所述鹽是磷酸氫二鉀、磷酸二氫鉀、氯化鈉、硫酸鈉和磷酸鈉中的一種或多種。

【第18項】 如請求項12-17中任一項所述的方法，其中在步驟 (b) 中，大於250bp的核酸片段和250bp或更小的片段在ATPS的不同相中濃縮。

【第19項】 如請求項12-18中任一項所述的方法，其中所述核酸片段選自編碼DNA、非編碼DNA、信使RNA、核糖體RNA、微RNA和轉移RNA。

【第20項】 如請求項12-18中任一項所述的方法，其中所述核酸片段是循環游離DNA或循環腫瘤DNA。

【第21項】 如請求項12-20中任一項所述的方法，其中所述樣品選自血液、血漿、血清、腦脊髓液、尿液、唾液、糞便物質、淚液、痰液、鼻咽粘液、陰道分泌物和陰莖分泌物。

【第22項】 如請求項12-21中任一項所述的方法，所述核酸片段，與樣品相比，得以濃縮至少10倍。

