

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

B01L 3/14 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01805250.9

[45] 授权公告日 2007 年 10 月 10 日

[11] 授权公告号 CN 100341625C

[22] 申请日 2001.2.15 [21] 申请号 01805250.9

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 15 [33] DE [31] 10006662.3

[86] 国际申请 PCT/EP2001/001705 2001. 2. 15

[87] 国际公布 WO2001/060517 德 2001. 8. 23

[85] 进入国家阶段日期 2002. 8. 19

[73] 专利权人 普里阿勒蒂克斯有限公司

地址 瑞士赫姆布莱希蒂肯 8634 费尔德巴
赫大街

[72] 发明人 艾尔克·黑尔弗滕本

[56] 参考文献

CN 1321200A 2001. 11. 7

WO 9832877A 1998. 7. 30

EP 0818542A 1998. 1. 14

US 5234809A 1993. 8. 10

审查员 张 丽

[74] 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责任
公司

代理人 卢 宏

权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图 5 页

[54] 发明名称

用于核酸分析的容器

[57] 摘要

此发明与采样容器有关，此容器内装有核酸稳定溶液和核酸连接固相物质。此容器特别适用于采集血样后进行核酸分析。

1. 一种用于核酸分析的系统，包括容器，用于接受标本，其特征在于内装有核酸稳定剂和能连接核酸的固相物质；其中所说的核酸稳定剂为水溶性溶液，含有以下物质：
 - 胍盐 1-8M
 - 缓冲物质
 - 还原物和/或
 - 去污剂
2. 根据权利要求 1 所述的用于核酸分析的系统，其特征在于胍盐可为二硫氰酸胍或氯化胍。
3. 根据权利要求 1 所述的用于核酸分析的系统，其特征在于在加入样本后，溶液的 PH 值为 4—7.5，缓冲物质选自 tris, HEPES, MOBS, MES, 枸橼酸钠和磷酸盐缓冲液。
4. 根据权利要求 1 所述的用于核酸分析的系统，其特征在于固相物质选自羊毛状物，滤器，颗粒，胶，小球，栓子，和/或小棒，和/或直接与容器连接。
5. 根据权利要求 1 所述的用于核酸分析的系统，其特征在于去污剂选自 Triton-X-100, NP-40, Polydocanal 和 Tween20。
6. 根据权利要求 1 所述的用于核酸分析的系统，其特征在于还原剂选自 dithiothreitol, 2-巯基乙醇和 TECP。
7. 根据权利要求 1 所述的容器，其特征在于缓冲物质的浓度为 10—300mM。
8. 根据权利要求 1 所述的容器，其特征在于去污剂浓度为 5—30%

质量体积百分比浓度。

9.根据权利要求 2—10 所述的容器,其特征在于还原剂的浓度为 0.1

—10.0%质量体积百分比浓度。

10. 根据权利要求 1、2、4—6 之一所述的用于核酸分析的系统,其

特征在于溶液的 PH 值为 4.0—7.5。

11.根据权利要求 1 所述之用于核酸分析的系统,其特征在于水溶液

含有以下成分:

—4.5M 二硫氰酸胍

—50mM MES

—15% (w/v) Triton-X-100

—100mM DTT

在加入血标本后 PH 值为 6.0—7.5。

12.根据权利要求 1—9、11 之一所述的用于核酸分析的系统,其特

征在于容器内存在一利于接受标本的低压环境。

13. 根据权利要求 10 所述的用于核酸分析的系统,其特征在于容

器内存在一利于接受标本的低压环境。

14.根据权利要求 1--13 所述的用于核酸分析的系统用于采集全血标

本。

15.一种采血的方法,其特征在于它含有采血后直接注入根据权利

要求 1—13 所述的用于核酸分析的系统内这一步骤。

16.根据权利要求 15 所述的采血方法,其特征在于采血量是容器内

溶液体积的 0.1—4.0 倍。

17.根据权利要求 16 所述的采血方法,其特征在于在采血加入容器

后其胍盐的终浓度为 1.0—5.0M。

- 18.一种从全血标本中稳定和 / 或分离核酸的方法，含有将全血直接导入根据权利要求 1—13 所述的用于核酸分析的系統内这一步骤，
- 19.根据权利要求 18 所述的从全血标本中稳定和 / 或分离核酸的方法，其特征在于还可分离与固相物质连接的核酸。
- 20.根据权利要求 15—19 之一所述的方法，其特征在于加入全血后 PH 值在 4.5—7.5 之间。
- 21.含有胍盐，缓冲物质，去污剂和 / 或还原剂，以及核酸连接固相物质溶液的使用，其特征在于是在标本容器内。
- 22.核酸连接固相物质的使用，其特征在于是在标本容器内。
- 23.根据权利要求 18 所述的溶液、及根据权利要求 23 所述的固相物质的使用，其特征在于是在标本容器内。

用于核酸分析的容器

技术领域

本发明为采集样本的容器，尤其是血液样本，采集的血液样本在此容器内保持稳定，能够用于分离和分析核酸。

背景技术

在常规采集过程中，盛放血液标本的容器一般放有抗凝剂，如：肝素，枸橼酸钠或 EDTA 等，以防血标本凝固。通过此途径采集的血标本在适当的温度下可保存较长时间。然而，此种采集方法在需要进行核酸（如 mRNA 或 DNA）分析时则有较大的局限性。若要进行核酸分析，则样本在采集过程中必须保持核酸的稳定，也就是说，不仅要避免现有核酸的分解，也要抑制新的 mRNA 的合成。

从采集标本时样本内核酸就要保持稳定的状态，要达到这一目的似乎不太可能。从现有的血液采集及贮存的角度来看有以下几点原因：

细胞内含有的核酸酶（一种生物酶）可在接触底物（如 RNA，DNA）的同时马上破坏核酸。细胞在正常人体环境中，细胞内外的核酸酶处于生理调控下。血液的采集过程或多或少会导致细胞内的核酸变化，故核酸酶在细胞内和/或细胞未溶解时，其核酸酶被释放出来。另外，核酸的合成会增多或减少。特别是长时间保存血

标本更会导致细胞的老化或破坏。

用常规方法采集的血标本经过长期保存后的另一个问题是样本物质剧烈变化。这些变化包括细胞的溶解可导致分离核酸的标准方法达不到满意的效果，核酸也无法再生。

除开标本内核酸的稳定保存问题外，常规的采血方法还存在其他问题。在核酸分离过程中，常规的抗凝剂分离的纯度不够，故对后续的核酸分析如 PCR 扩增（多聚酶链反应）造成一定的影响。例如，肝素即是一种普遍了解的 PCR 的抑制剂。

最后，核酸的容量分析还引发了一个问题，那就是从样本采集到核酸分析这整个过程中如何才能进行标准化控制。最理想的是一种在质量和数量上都已确定的标准化核酸，在采集标本过程中就已被加入样本物质中，所以其存在于从采集到检测样本的整个过程中。而常规采集方法也达不到此目的。

常规采血方法的另一个缺点是有传染样本的危险，而且分离核酸需手工进行。与潜在传染的细菌接触是不可避免的。

以下以现有的例子来讲述一种方法。从病人（EP0818542A1）体内采血后直接将血样本与胍酸盐混合。运用此方法时，胍酸盐本来为粉末状以保持其更高的稳定性。然而，此方法有较大的缺陷。如，胍酸盐必须首先在血标本中进行溶解。此溶解过程受环境特别是温度的影响，不能在用过的非透明样本中进行控制。故

用于诊断/医疗目的的相应产品则存在很大的问题。

核酸酶的活性非常高，仅在高度变性状态下才能抑制其活性。其变性依赖于溶解的胍酸盐的浓度。根据在EP0818542中描述的方法，并未在一开始就提供具有抑制浓度的已溶解的胍酸盐。因此，在胍酸盐溶解的过程中核酸的降解无法控制。此外，上述方法中无还原性物质加入，无该物质的加入则有效的抑制，特别是RNA酶，通常无法得到保证。

常规方法采集的样本不能直接用于固相分离核酸。胍酸盐的应用不符合内部核酸标准。而这些标准对控制分析过程和准确的容量来说是必不可少的。

发明内容

此项发明是在技术物质的基础上提供一种容器，该容器避免了以前了解的一些缺陷。放入容器的样本可以直接用现行核酸分析方法进行分析，而无须对样本进行额外的处理。

这一发明提供了一种标本接收容器，内装有一种溶液，能使核酸保持稳定，并提供可连接核酸的固相物质。

此发明有以下优点：1. 样本，特别是血样本，在采集时就已溶解，因为此容器内已盛有相应样本溶解液，同时此溶解液也是核酸稳定剂。2. 核酸稳定剂有以下作用：样本物质，特别是其内的核酸在接触此溶液后就可稳定保存下来。3. 核酸稳定剂是选择性的，用其处理的标本在其下的分离方法中可直接运用。4. 核酸稳定剂溶解能在后面分离过程中被有效的除去，故不

会对，如 PCR 等过程产生抑制。5. 核酸稳定剂中可加入内标物质，从而可以控制从采集样本到检测核酸的整个过程。6. 容器内的固相物质对于连接其上的核酸物质特别适合其后期的分离。而且，核酸结合到固相物质上后易化了后续的分​​离过程，因为在容器内即已完成分离样本核酸和其他物质的第一步。

核酸稳定剂可有选择性，故在细胞溶解后核酸可直接与相应的层向进行连接，或在添加其他物质后进行连接。前者如预先用胍酸盐提供一层光滑固相层。后者如预先提供一种生物素包被的表面，而后加一种能结合核酸的链霉素。

此容器在外形上类似于常规的采血标本容器（如小试管），其内盛有一定体积的核酸抑制剂和固相的核酸连接物质。这种小试管内有少量气体，造成低压状态，故其内仅可采集一定量的血样本。用普通的采集方法即能用于此小试管。其内盛有的溶液含有以下物质，故有上述优点。一种胍酸盐，如：二巯基；及合适的缓冲系统，如：枸橼酸盐，tris, MES 或 HEPES。含有以上成分的溶液被装入小的真空管中，此溶液能在此管中保存而不会丧失其保持核酸稳定的性能，特别是对于供血者，此系统在采血过程中一般没问题，非常安全。

此溶液中含有胍酸盐，其作用为溶解细胞，并保持核酸稳定，而核酸连接固相物质，缓冲系统，还原剂和去污剂，在贮存中是稳定的，此溶液将新鲜采集的血标本转化成为一种物质，此物质能稳定保存，并且能直接

用于其他的分析，如核酸分离。

硫氢酸胍和/或氯化胍是胍酸盐中较为常用的物质。

胍盐的推荐浓度为 1—8.0 M。

Tris 或枸橼酸钠可用于缓冲液系统，其 PH 值用 HCl 来调节。其他可能的缓冲液有 HEPES, MOPS, MES, 枸橼酸盐和磷酸盐缓冲液，如 PBS。

提供核酸结合的物质为固相，最适合的是采用玻璃颗粒，核酸结合多聚物，包被有核酸结合物质的颗粒，或包被氧化硅的颗粒。另外，核酸结合的固相物质的表面可包被特异性结合分子（如：链霉素，寡聚核苷酸，核酸肽链（PNAS）等，它们可与核酸分子的标志分子或直接与核酸结合。这类物质的形状与采血系统和后续的分选方法有关。采血后核酸进行额外处理，此后能直接应用的外形尤为合适。适用于常规分离方法的表面也特别合适，如磁珠分选。

合适的固相物质可以购得，如包被氧化硅的磁性颗粒，在血/骨髓标本 mRNA 分离试剂盒中即含有此颗粒。

缓冲剂的离子浓度为 10—300M，最合浓度为 10—100M。

去污剂最好选择 Triton-X-100，还可选择 NP-40, Tween20, Polydocanol 或其他去污剂。

去污剂浓度一般为 5—30% (w/v)，最好为 10—20% (w/v)。

还原剂用 DTT 较好，然而，亦可应用 β -巯基乙醇，

TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) 或其他还原剂。

还原剂的浓度一般为 0.1-10%(w/v), 最好为 0.5-2% (w/v)。

溶液的 PH 值为 3.0-9.0, 最佳为 4.0-7.5。

溶液的 PH 值要特别选择, 故加入样本物质后。调节的 PH 值为 5.0-7.5。由于试管内存在一个低气压环境, 故样本采集容器有限, 在采集样本前加入一定浓度的缓冲液, 并保持一定溶液体积, 采集一定体积样本后即可得到相应的 PH 值环境。采集样本后 PH 最佳值为 6.3-6.9。

溶液内含有 4.5M 二硫氰酸胍, 50mM tris/HCl, 15% Triton-X-100, 100mM DTT, 玻璃珠或包被氧化硅的磁珠作为固相物质, 采血后 PH 值调节为 6-7.5, 这是最适合的环境。

此容器的另一优点为采学时其内有一低压, 在对血管穿刺后, 固定体积的血液可被采集入此容器内, 血液体积可根据能力进行调节。相应的抽真空容器均能在市面上买到。

此容器装入血标本后能迅速用来作其他的分析, 或为保持较长时间 (最多为数天或数周) 而不会影响标本的质量。

此方法的创新之处在于新鲜采集标本可直接注入上述的血液采集容器的溶液中, 所以防止了一切可能造成核酸物质改变的过程。容器内核酸已直接与固相物质连接, 或在后续反应步骤中与固相物质结合。

后续核酸分析所证实的核酸数据就真实反映了采集血液时期核酸的量和核酸的种类。

容器内采集的血量最佳为溶液量的 0.1-4 倍，后者量通常为 0.5-5.0 ml。因此，加入血液后胍盐的最终浓度为 1.0-5.0 M，最好为 1.0-3.0 M。

如果血标本是用于作核酸分析的话，所发明的容器则最宜用于采血。

上述采血系统的溶液部分可保证细胞的迅速溶解和通过抑制样本核酸酶的活性而保持样本的稳定性。用此法采得的血样甚至能在室温下保持数天。此系统在从采血到核酸的分离和分析过程中均能保证无污染操作，排除污染样本的可能。对于传统的核酸分离系统，其他的操作步骤（如将血样本转移到核酸分离体系中等）是必要的，这有可能会造成样本污染。

即使保存较长时间，核酸结合到固相上以后仍能非常容易地从标本中分离出来。溶解标本时，由于固相物质的存在可使核酸立即结合到其表面上，这样就能避免由于保存较长时间而形成沉淀造成的损失，并且结合有核酸的固相表面能容易地从此系统中被分离出来。

用此采血系统采集的标本能用常规的方法进行核酸分离。若用的是包被有氧化硅的磁性颗粒，可用现有标准方法分离核酸（磁性分选，洗涤，提纯核酸）。

现有的发明包括样本接收系统，它的构造可使其达到以下目的： 1. 控制采样和自动稳定标本中的核酸（DNA，RNA）。 2. 采集标本过程中无需应用抗凝剂。

3. 使核酸与系统中的固相物质结合（直接或在另一步骤后）。4. 用此采样系统采集后的标本可完整转入分离核酸系统中进行处理。5. 包括采样后的此系统在储存时是稳定的。

此外，用上述的采集系统采集并保存的样本令人惊奇的能保存较长时间而保证核酸无降解。

附图说明

图 1:

有核酸稳定剂（N-sS）3，一定的真空2，核酸连接固相物质4和隔膜封口1的标本采集容器。

图 2:

凝胶分析（1%琼脂糖）28S和18S rRNA在样本采集系统中保存不同的时间后的图形示例。栏1：采样后立即分离纯化RNA（无贮存期）。栏2：在-20°C保存一个月后。栏3：在4°C保存6天后。其RNA的量为采血量120μl获得的量。

图 3:

在采样系统中保存不同时期后的DNA用凝胶（1%琼脂糖）分析的图示。栏1：采样后立即分离（无贮存期）。栏2：在-20°C保存一个月后。栏3：在4°C保存6天后。DNA的量为采集量10μl获得的量。

图 4:

分离出的MS2-RNA在与血清/稳定剂（含或不含DTT），在40°C下，孵育180分钟后，对其进行凝胶分析的图示。栏1：阳性对照：MS-2RNA；栏2：DNA

marker; 栏 3-栏 5: 与含有 DTT 的稳定剂 (3 倍浓度) 孵育后 MS-2RNA; 栏 6-栏 8: 与不含 DTT 的稳定剂孵育后的 MS-2RNA (3 倍浓度)。

图 5:

MS2-RNA 分离出后, 与血清/稳定剂在 40° C 下孵育 3 天后用凝胶分析的图示。加入血清后 (RNA 即在其中孵育) 稳定剂中二硫氰酸盐含量 (GTC 含量) 在相应的栏中的标本。栏 1: 2.70 M GTC, 栏 2: 2.5 M GTC, 栏 3: 2.36 M GTC, 栏 4: 2.2 M GTC, 栏 5: 2.08 M GTC, 栏 6: 1.94 M GTC, 栏 7: 1.80 M GTC, 栏 8: 1.66 M GTC。

图 6:

MS2-RNA 在分离后, 与血清/稳定剂在 40° C 下孵育 1-8 天后, 经 PCR 扩增后的产物的凝胶分析图示。栏 1: 1 天后分离的 RNA 扩增产物, 栏 2: 8 天后分离出的 RNA 的扩增产物, 栏 3: DNA marker, 栏 4: MS2-RNA 阳性, 对照: 0.8 μ g 溶于 10 μ l RT (1: 50 倍稀释), 取 1 μ l 进行扩增。

图 7:

在血清/稳定剂中在常温下保存 6 天 (栏 2-12) 和 13 天 (栏 14-19) 后分离 MS2-RNA 进行凝胶分析的图示。在混合血清和稳定剂后其 PH 值在每栏中均有标记。栏 1, 13, 20: DNA marker, 栏 2: PH 8.0, 栏 3: PH 7.7, 栏 4: PH 7.5, 栏 5: PH 7.35, 栏 6: PH 7.18, 栏 7, 14: PH 7.07, 栏 8, 15: PH 6.94, 栏 9, 16: PH 6.8, 栏 10, 17: PH 6.72, 栏 11, 18: PH 6.68, 栏 12, 19:

PH 6.7。栏 12, 19 中的稳定剂中的 RNA 与栏 11 中的 RNA 有相同的 PH 值, 然而, 前者的 GTC 含量为 5M, 后者为 4M。

图 8:

标准凝胶分析 (1%琼脂糖) 证实 RNA 和 DNA 存在的图示。栏 1: 分子量标记, 栏 2-4: 分离后的核酸, 栏 2: 含 MS2 RNA (7 天) 的全血 lysate 中分离的核酸, 栏 3: 含 MS2 RNA (0 天, 对照) 的全血 lysate 中分离的核酸, 栏 4: 全血 lysate 的核酸 (7 天), 栏 5: 全血 lysate (0 天, 对照) 的核酸。上层带显示 DNA (在 4 个标本中均容易辨别), 栏 2, 3 中低位条件显示为添加的和分离后的 MS2 RNA。

下面的例子将解释本发明

例 1.

血液采集系统

要有以上的优点, 血液采集系统应由以下组成: 一根盛有体积固定的核酸稳定液的小试管, 其内还有核酸连接固相物质和一定体积的真空, 并用隔膜封口。构建此隔膜应与目前的样本采集试剂盒相容 (cannula 等)。用已有的例示: 预先备好 2.2ml 试剂, 调整真空体积使得采集样本的过程中恰好流入 2.2ml 血液, 血液流入试管后其中的核酸立即转化为稳定的形式。

对以下示例给予评估:

如果没有特别提到, 在所有示例中核酸稳定物质 (N-sS) 由以下物质组成: 45mM tris, 5M 二硫氰酸胍,

0.8% (w/v) dithriothreitol, 18% (w/v) Triton-X-100, PH6.0。

在所有提到的示例中，核酸固定物质与样本以 1:1 的比例混合（1 体积 N-sS 加 1 体积样本物质）

在所有示例的采集过程中，通过直接采集血液注入小试管中而使其保持稳定。

例 2.

样本与 N-sS 混合后核酸的稳定性

用二氧化硅衍生颗粒从样本裂解物中分离 DNA 和 RNA。

材料和方法

样本物质采集后，在 4℃ 下储存 6 天，-20℃ 下储存 1 月，然后进行 DNA 和 RNA 的分离。可用高纯度 RNA 分离试剂盒（Boehringer Mannheim, Cat-No1808665）来进行 RNA 的分离。内说明书所述的步骤的修改如下：2.4 毫升样本裂解物加入 4 个等量的 600ul 的柱上，这样 2.4ml 样本裂解物都得到运用，RNA 最后用 100ul 洗脱缓冲液进行洗脱。

用 QiaAmp Blood 试剂盒（Qiagen-Cat-No 29104）来分离 DNA（图示 3），在说明书所述的标准步骤在不同点进行修改：400ul 样本直接上柱，未予使用试剂盒中的结合剂，加入 25ul 蛋白酶 K 消化液，室温下孵育 10 分钟，然后将柱子转入收集皿中，按说明书进行离心。除开乙醇的使用外，所有其它的步骤均按说明书上所述进行，洗脱液的体积为 200ul。

例 3.

用于 RNA 的长时间稳定的稳定剂中的还原剂（例如 DTT）的重要性

材料和方法

可用的稳定溶液：

4.0MGTC； 13.5% Triton-X-100， 45mM tris/HCl， 120mMDTT(亦可不加)，700ul 血清与 700ul 稳定液混合，孵育 2 分钟后加入 MS2-RNA (0.8ug/ul，从 Roche Diagnostics 购得)，在 40° C 孵育 180 分钟，然后根据实验 1 将其分成 400ul 一等分与高纯度 RNA 试剂盒 (Roche) 反应，将样本以 50ul 洗脱液洗脱，冷冻于 -20° C，经琼脂糖凝胶分析证明有效。

结论：在稳定剂中不加入还原剂不能获得 RNA 长时间的稳定。

例 4.

在血清/稳定剂中 MS2-RNA 的稳定：对 GTC 浓度的依赖

材料和方法：

可用的稳定液：3-5M GTC； 13.5mM Triton-X-100， 50mM DTT， 42mM tris/HCl；

溶液的 PH 值：大约 4.0；

加入血清后的溶液 PH 值大约为 6.7。

2ml 血清与 2ml 稳定液混合，孵育 2-5 分钟，加入 90ul MS2-RNA (0.8ug/ul，Roche) 并在 40° C 孵育。根据实验 1 按常规间歇采集 400ul 样本，应用高纯度 RNA

试剂盒 (Roche), 按样本 50ul 洗脱液洗脱后冷冻于 -20°C, 取 20ul 洗脱液加入 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析 RNA 完整性, 通过腺病毒逆转录和 PCR 分析证明有效。通过腺病毒逆转录 (Roche) 对 10ul 的洗脱液进行逆转录, 然后在子循环上通过量化 PCR 进行分析。

逆转录混合液:	4.0ul	腺病毒逆转录缓冲液
	2.0ul	dNTP' s (终浓度 10mM)
	0.5ul	RNA 酶抑制剂 (Roche, 20 单位)
	1.0ul	引物 2827 (终浓度 1uM)
	1.9ul	DMPC 水
	0.6ul	逆转录腺病毒 (Roche, 15 单位)
	10ul	模板 RNA

20ul

在子循环机上运行 PCR 程序, 其退火温度为 61°C, 采用 SYBR-Green 作为检测系统。所有在 20 个循环后的样本为阴性, 因为所有检测到的信息均是由于引物二聚体产生的。此结论可被子循环机上的溶解曲线证实。逆转录产物以 1:50 的双蒸水稀释, 取 1ul 进行 PCR 操作, 体系为 10ul, 如下:

PCR 体系:	1.6ul	MgCl ₂ (储存浓度为 25mM)
	5.9ul	DMPC 水
	0.25ul	引物 2827 (储存浓度

20mM)

0.25ul 引物 2335 (储存浓度

20mM)

1.0 ul SYBR - Green - Mastermix

(Roche)

1.0 ul 逆转录混合物

10ul

PCR 扩增产物完全用 2%琼脂糖凝胶进行分析 (见图 6)

结论:

图示 5 示 40° C 孵育 30 天后琼脂糖凝胶能检测到的纯化的 MS2-RNA, 所有的 RNA 样本在 40° C 经过 8 天后, 仍可被扩增和检测到产物, 但与 GTC 反应的 RNA 完整性在三天后就有明显的差异。相应的血清/温度剂中盐的浓度小于 2M 对 RNA 的完整性有帮助。

MS2-RNA 在血清中加入 RNA 酶后 2 分钟可被完全降解, 不能被检测出, 此资料未提供。而加入稳定剂后 RNA 的降解可被明显延迟也证实了这一点。40° C 下 8 天后, 保存在血清/稳定剂中的 MS2-RNA 仍能用 PCR 检测出。(图示 6)

例 5:

血清稳定剂中 MS₂-RNA 的稳定性, 决定于含稳定剂的样品的 PH 值。

材料和方法

所用的试剂:	4M (5M)	GTC
	14.4%	Triton-x-100
	50mM	DTT
	45mM	trisHcl

加入血清后 PH 值在 6.7—8.0 之间

2.0ml 血清于 2.5ml 稳定剂混匀，加入 90ulMS₂RNA(0.8ug/ml, Roche)后样品在室温下孵育。500ul 样品中的 RNA 用 Roche viral RNA kit 提取 50ul 洗脱液洗脱（按例 4 进行）。20ul 洗脱液用琼脂糖凝胶检测（见图 7）

结论：

血清稳定剂的 PH 值和稳定剂的缓冲范围决定了 RNA 的稳定性，当 PH 为 8.0 时，2 天后完整 RNA 不能检测到，而 PH6.6 至 7.0 时，室温下孵育 13 天仍可检测到完整的 RNA。

除了 PH 值，GTC 的最佳浓度也很重要（见例 4）。GTC 的终浓度为 2.2M 时比 2.8M 时更能使 RNA 长期保持稳定。

例 6：

通过应用包被了二氧化硅的磁性颗粒可显示稳定剂中核酸连接表面的稳定性。

材料和方法

	4.5M	GTC
所用溶液	15%	Triton-X-100

100mM DTT

50mM MES

血/骨髓的 mRNA 分离试剂盒中取出以二氧化硅包被的磁性颗粒，颗粒的量约为 35mg/ml。血液采集系统包括小采样管，内装有已在室温下保存 14 天的稳定剂和磁性颗粒。

然后，用上述系统采集全血，另外用一个新鲜制成的采样系统（小试管，稳定剂，磁性颗粒）用来做对照。样本内核酸分离在上述两种系统中均可行。用磁场将磁性颗粒分离出后去除余下物质，然后将磁性颗粒重新悬浮于 50% 的乙醇，10mM Tris, PH7.0，以同种液体洗涤数次后，最后将磁性颗粒在 10mM Tris/HCl (PH7.0) 中加热至 70° C，此时核酸可从磁性颗粒上分离下来。将颗粒从磁场中分离出来，而其余含有核酸的物质用标准琼脂糖凝胶进行分析，

结论：

	样本（14 天， 逆转录）	对照（0 天）
核酸（经凝胶 证实）	+	+

表 1 在保存 14 天后，固相物质的核酸连接能力未受损，样本以及对照显示了相同的核酸结合能力。

例 7：

DNA 和 RNA 在与包被有二氧化硅的磁性颗粒连接后 7 天，其稳定性以及可分离纯化的证据。

材料和方法

	4.5 M	GTC
	15%	Triton-X-100
所用体系	100mM	DTT
	50mM	MES
	35mg/ml	颗粒

共有 4 种血液采集系统（小试管）均含有 1ml 上述液体，均与 1ml 全血混合。其中 2 小管加有 25ugMS2-RNA（全血裂解物），均在分离核酸后立即加入（例 6 示）另外 2 管则先在室温下储存 7 天后在提取核酸。洗脱后的体积为 200ul/200ul 全血。用标准琼脂糖凝胶进行核酸分析。

结论：

染色体 DNA 和 MS2RNA 的稳定性在样本采集系统（溶液，固相物质）保存 7 天后仍被证实（图 8）

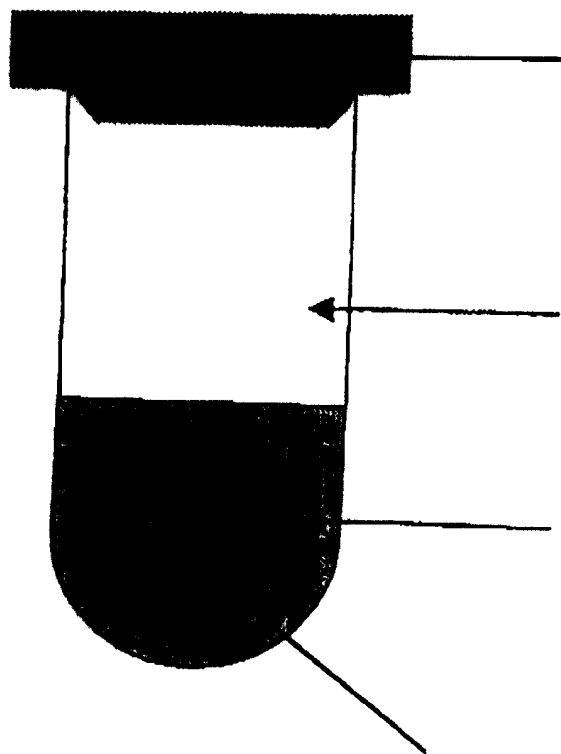


图 1

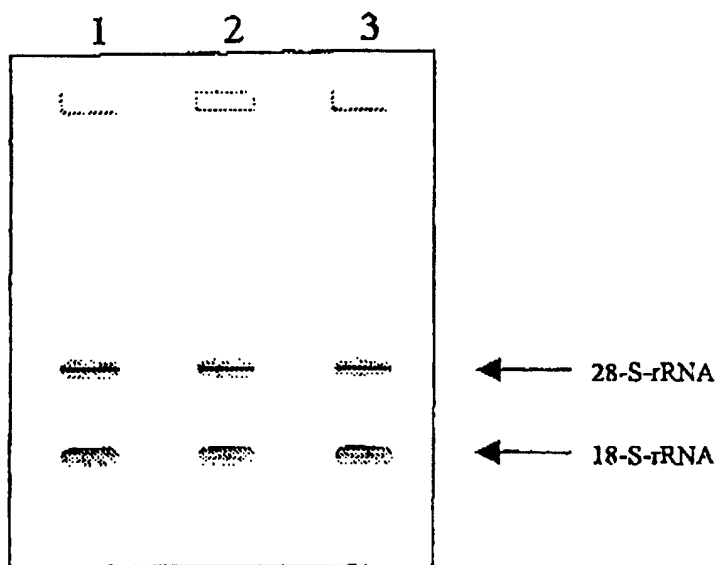


图 2

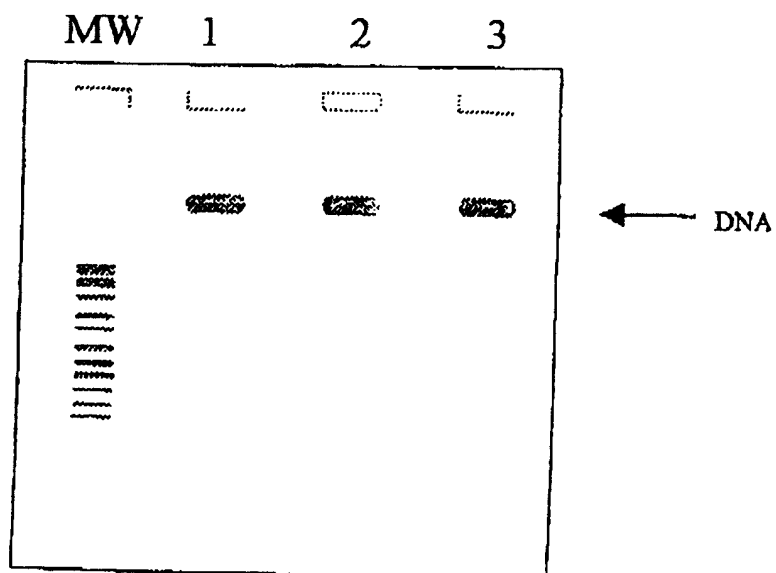


图 3

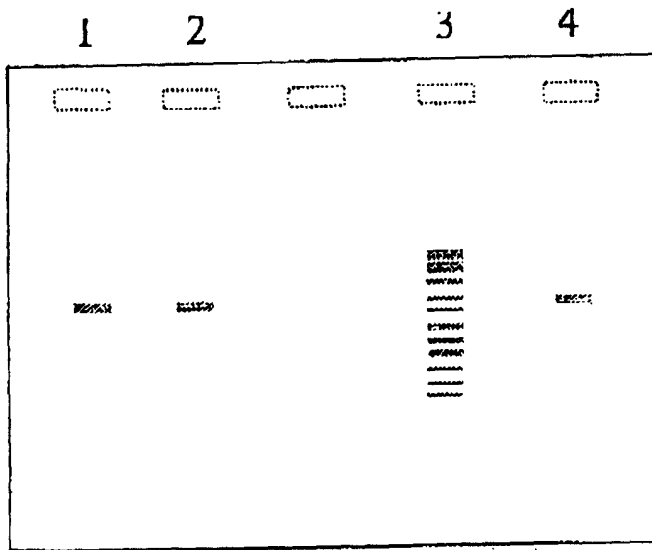


图 6

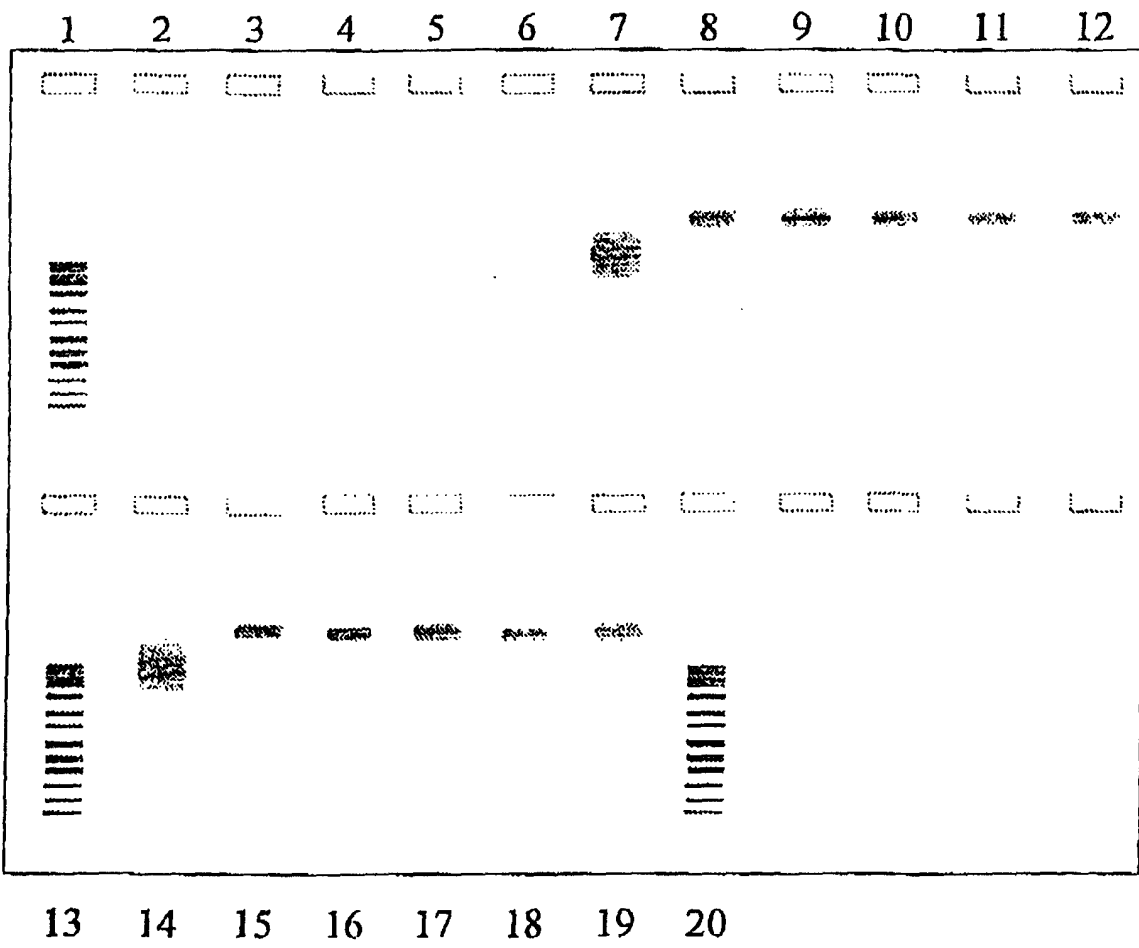


图 7

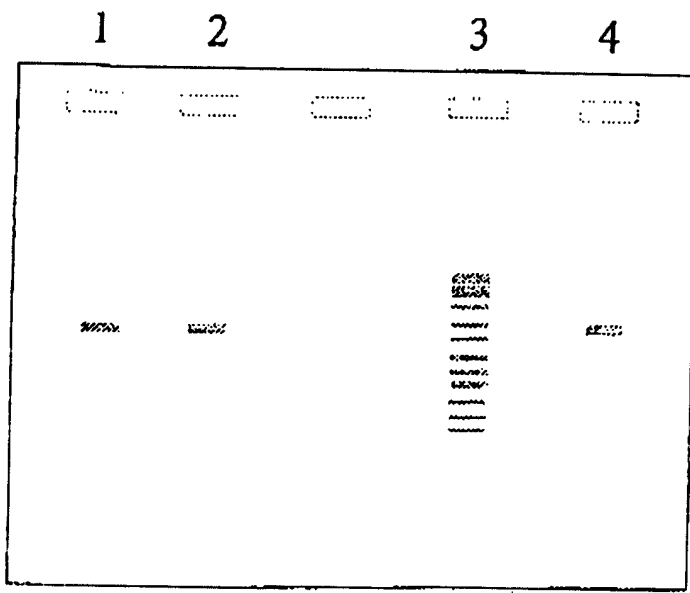


图 6

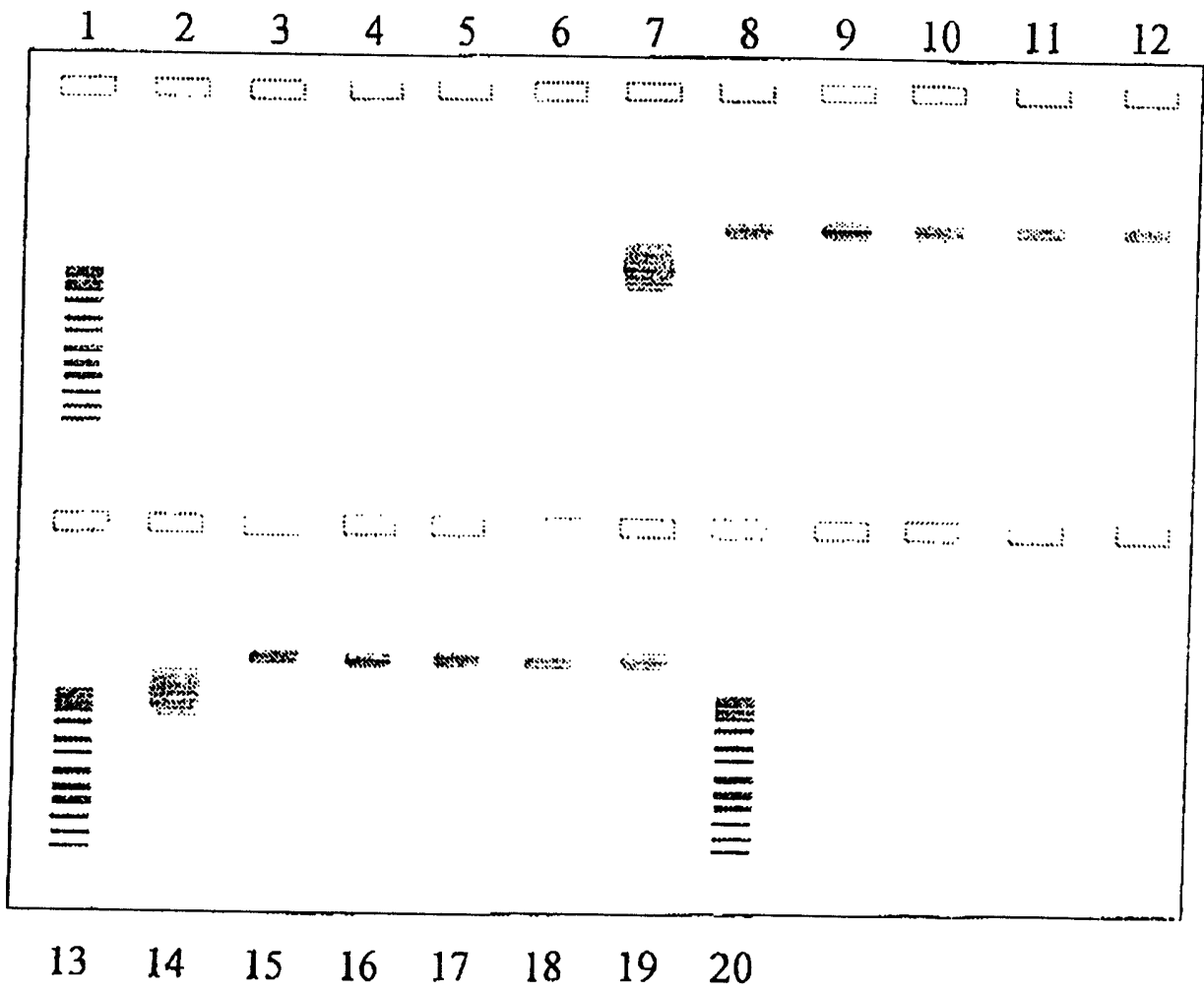


图 7

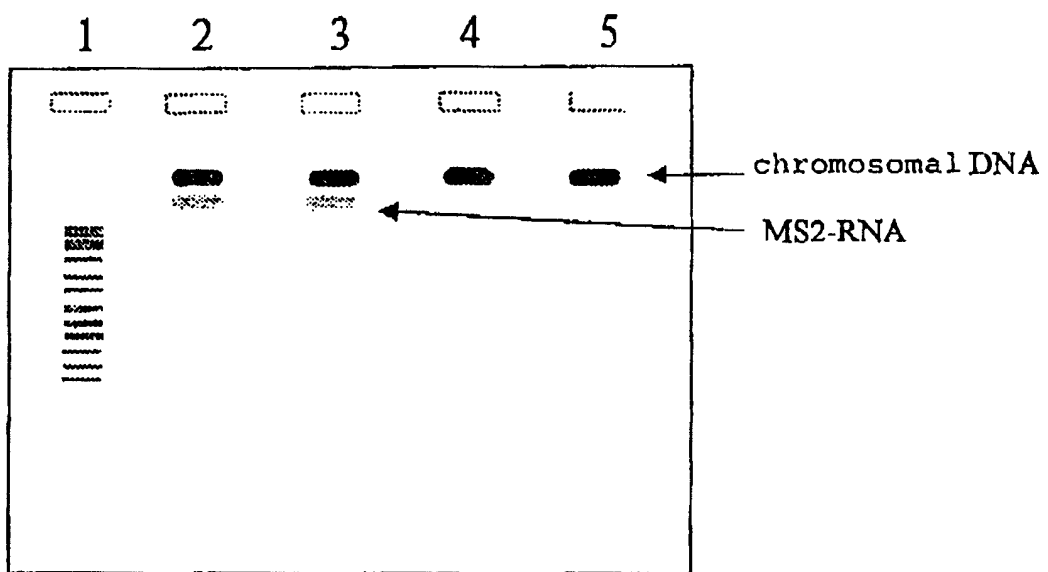


图 8