



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105120986 B

(45)授权公告日 2019.03.12

(21)申请号 201480014153.X

(22)申请日 2014.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105120986 A

(43)申请公布日 2015.12.02

(30)优先权数据

61/789622 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/028518 2014.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/144209 EN 2014.09.18

(73)专利权人 雅培分子公司

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 G.J.冈林

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李唐 吕彩霞

(51)Int.Cl.

B01D 57/02(2006.01)

C07H 1/06(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

G01N 27/447(2006.01)

C07H 21/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 1617938 A, 2005.05.18,

US 2009277791 A1, 2009.11.12,

US 2005208510 A1, 2005.09.22,

US 2005106577 A1, 2005.05.19,

US 5898071 A, 1999.04.27,

审查员 郝振兴

权利要求书2页 说明书9页 附图4页

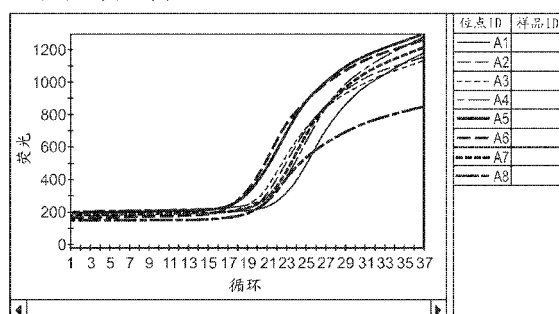
(54)发明名称

用于核酸纯化的一步程序

(57)摘要

本发明是用于改进且简化的核酸纯化的新的非显而易见的方法。核酸纯化通常由下述组成:从样品中释放核酸的裂解步骤,核酸与固体基质的结合,洗涤基质以去除污染物质,和在缓冲液中从基质洗脱核酸。

IICT扩增曲线的曲线图



1. 一种从核酸样品中去除裂解缓冲液组分的方法,所述方法包括:
 - a) 提供包含或怀疑包含核酸的样本,
 - b) 使所述样本与一种或多种裂解试剂接触以产生裂解的样本,
 - c) 在适合于所述样本中的核酸与固体基材结合的条件下,使所述样本与所述固体基材接触一段时间以产生具有固体基材结合的核酸的裂解的样本,其中所述固体基材是磁性微粒,
 - d) 将所述具有固体基材结合的核酸的裂解的样本置于容器中,将水基分离凝胶在所述具有固体基材结合的核酸的裂解的样本上分层,和进一步将缓冲液在所述水基分离凝胶上分层,和
 - e) 如果核酸存在于所述样本中,则使结合有核酸的所述固体基材经过水基分离凝胶进入缓冲液。
2. 权利要求1的方法,其中所述裂解缓冲液含有浓度大于1摩尔的盐。
3. 权利要求1的方法,其中所述固体基材是直径0.1 nm至5 nm的微粒。
4. 权利要求3的方法,其中所述固体基材是直径0.8 nm至5 nm的微粒。
5. 权利要求1的方法,其中在经过水基分离凝胶后,使与所述固体基材结合的所述核酸与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液从所述固体基材中洗脱核酸。
6. 权利要求5的方法,其中所述方法不包括所述核酸在有机溶剂中的沉淀。
7. 权利要求5的方法,其中所述方法的确包括所述核酸在有机溶剂中的沉淀,并且所述有机溶剂为乙醇。
8. 权利要求1的方法,其中在经过水基分离凝胶后,使与所述固体基材结合的所述核酸与酶接触。
9. 权利要求8的方法,其中所述酶为DNA聚合酶或逆转录酶。
10. 权利要求8的方法,其中所述核酸在所述固体基材上进行测序,而无需稀释。
11. 权利要求1的方法,其中在经过水基分离凝胶后,使与所述固体基材结合的所述核酸与重亚硫酸盐接触,使得将未甲基化的胞嘧啶脱氨基。
12. 权利要求11的方法,其进一步包括测定所述核酸中的至少一个核碱基是否具有表观遗传修饰。
13. 权利要求1的方法,其中所述核酸经由选自下述的实体与所述固体基材结合:核酸杂交、适体、抗体、抗体片段、生物素、抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白。
14. 一种用于从样品中富集核酸的方法,所述方法包括:
 - a) 提供:
 - i) 怀疑包含核酸的样品,
 - ii) 适合于结合核酸的磁性微粒,和
 - iii) 水基分离凝胶,
 - b) 在适合于样品中的任何核酸与磁性微粒结合的条件下,使所述样品与所述磁性微粒接触一段时间,以产生装载的磁性微粒;
 - c) 将所述装载的磁性微粒置于容器中,将水基分离凝胶在所述装载的磁性微粒上分层,和进一步将缓冲液在所述水基分离凝胶上分层;和
 - d) 用磁场将所述装载的磁性微粒拉动通过所述水基分离凝胶进入缓冲液。

15. 权利要求14的方法,其中所述水基分离凝胶包含琼脂糖。
16. 权利要求15的方法,其中所述琼脂糖为0.10 %至1.0 %的浓度。
17. 权利要求15的方法,其中所述水基分离凝胶还包含乙醇和甘油中的一种或多种。
18. 权利要求14的方法,其中所述磁性微粒包含适合于结合核酸的官能团。
19. 权利要求14的方法,其中所述磁性微粒至少部分涂布有二氧化硅和玻璃中的一种或多种。
20. 权利要求14的方法,其中所述磁性微粒是球状体。
21. 权利要求14的方法,其中所述样品包含裂解缓冲液。
22. 权利要求1的方法,其中在所述水基凝胶上分层的所述缓冲液是洗脱缓冲液。
23. 权利要求14的方法,其中在所述水基凝胶上分层的所述缓冲液是洗脱缓冲液。
24. 权利要求1的方法,其中步骤b) - e) 在相同的容器中进行。
25. 权利要求14的方法,其中步骤b) - d) 在相同的容器中进行。

用于核酸纯化的一步程序

[0001] 背景

[0002] 核酸纯化通常由下述组成：从样品中释放核酸的裂解步骤，核酸与固体基质的结合，洗涤基质以去除污染物质，和在缓冲液中从基质洗脱核酸。该过程是复杂的，特别是在污染物去除的基质洗涤中。溶液必须加入基质中，其将去除污染物而不是核酸，并且随后这些溶液必须在从基质中洗脱核酸之前去除。如果磁性颗粒用作固体基质，则它们通常必须在结合步骤后进行捕获，通过从溶液中捕获和去除颗粒或通过固定颗粒和去除裂解结合溶液而与裂解结合溶液分开，并且随后释放到洗涤溶液内。在洗涤后，颗粒必须再次被捕获且与洗涤溶液分开。参见例如，Alderton, R. P. 等人, Anal. Biochem. (1992) 201:166-169 和 WO 91/00212。一些方案需要使用几种不同洗涤溶液的几个洗涤步骤。在颗粒已洗涤后，它们必须重悬浮于洗脱缓冲液中，以从颗粒中释放核酸。进一步地，这些程序通常对于核酸不是选择性的。相反，各种固体和溶解的物质同样凝集。

[0003] 其他方案需要用例如乙醇使核酸沉淀。沉淀的核酸随后必须进行洗涤和重新溶解。也存在用于分离核酸的层析程序（参见例如 EP 0 658 164），但这些程序也需要多个步骤和洗涤。

[0004] 通过 Boreal Genomics, Inc. (Los Altos, CA) 的现有技术 SCODA (Synchronous Coefficient of Drag Alteration) 系统使用脉冲电场将核酸集中到一个点，但这通常是可能非常稀释的预纯化材料。由在 Northwestern University 的 Kelso (Sur 等人, Immiscible Phase Nucleic Acid Purification Eliminates PCR Inhibitors with a Single Pass of Paramagnetic Particle through a Hydrophobic Liquid, J. Mol. Diag. 2012 12(5):620-628) 开发的油-门系统 (oil-gate system) 拉动颗粒通过油，以尝试消除洗涤，但该方法导致大量的盐遗留，因为油在颗粒周围留下大滴裂解溶液，这导致很多盐遗留。因此，当使用该系统时，需要另外的处理。

[0005] 可见现有技术考虑的用于核酸分离/纯化的方法具有某些缺点。此类缺点涉及例如纯度、选择性、回收率、实验室安全和便利性、以及分离/纯化过程的速度。换言之，已有的现有技术程序需要多个步骤，且通常导致由于众多步骤的靶核酸丧失和/或靶核酸改变（例如由于重复的苛刻处理条件的修饰基团丧失）。

[0006] 因此，待解决的问题是提供用于从样品中分离核酸的更简单程序，其节省时间和试剂，并且帮助阻止在处理期间的靶的丧失和/或靶的修饰。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及使用凝胶从洗脱缓冲液中分离裂解-结合溶液。颗粒用于捕获裂解-结合溶液中的核酸。颗粒是磁性的，并且使用磁场进行集中。具体地，颗粒通过磁场拉动穿过去除污染物的凝胶，并且将集中的颗粒重悬浮于洗脱缓冲液中。该过程非常简单。凝胶使裂解-结合溶液与洗脱缓冲液分开，并且限制或消除两者之间的混合。颗粒通过凝胶的移动去除污染物和盐。污染物通过经过凝胶而被去除（即它们被“刷(squeegeed)”掉）。盐通过经过凝胶被稀释。颗粒随后直接传递到在其中释放核酸的洗脱缓冲液中。磁性颗粒可以随后拉回到凝胶内，或者通过离心或沉降（重力）与洗脱缓冲液分开。这个过程已显示成功纯化来

自血浆样品的HCV病毒RNA,使用实时PCR测定以检测丙型肝炎病毒(HCV病毒)RNA。

[0009] 本发明考虑了从核酸样品中去除裂解缓冲液组分的方法,该方法包括:提供包含或怀疑包含核酸的样本,使样本与一种或多种裂解试剂接触,在适合于样本中的核酸与固体基材结合的条件下,使样本与固体基材接触一段时间,并且如果核酸存在于样本中,则使结合有核酸的所述固体基材经过水基分离凝胶(aqueous-based separation gel)。当裂解缓冲液含有浓度大于约1摩尔的盐时,本方法是有用的。固体基材可以是微粒,并且微粒可以为直径约0.1 nm至约5 nm或直径约0.8 nm至约5 nm。进一步地,微粒可以是磁性的。

[0010] 本发明进一步考虑了在经过含水凝胶后,使与所述固体基材结合的核酸与洗脱缓冲液接触,所述洗脱缓冲液从所述固体基材中洗脱核酸。再进一步地,核酸不在有机溶剂中沉淀,或核酸可以在有机溶剂中沉淀,并且有机溶剂可以是乙醇或任何其他合适的有机溶剂。

[0011] 本发明进一步考虑了在经过含水凝胶后,在从固体基材洗脱前或后,使与固体基材结合的核酸与酶接触。酶可以是DNA聚合酶或逆转录酶。再进一步地,核酸可以在固体基材上进行测序,而无需稀释。

[0012] 本发明进一步考虑了可以在经过含水凝胶后使与固体基材结合的核酸与重亚硫酸盐接触,使得将未甲基化的胞嘧啶脱氨基。本发明进一步考虑了核酸中的至少一个核碱基可以具有表观遗传修饰。

[0013] 本发明再进一步考虑了核酸可以经由选自下述的实体与固体基材结合:核酸杂交、适体、抗体、抗体片段、生物素、抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白。

[0014] 本发明考虑了用于从样品中富集核酸的方法,该方法包括:提供怀疑包含核酸的样品、适合于结合核酸的微粒和水基分离凝胶,在适合于样品中的任何核酸与磁性微粒结合的条件下,使样品与微粒接触一段时间,以产生装载的磁性微粒;用磁场将装载的微粒拉动通过水基分离凝胶。凝胶可以是琼脂糖凝胶。琼脂糖凝胶可以为约0.10%至约1.0%的浓度。分离凝胶还可以包含乙醇和甘油中的一种或多种。颗粒还可以包含适合于结合核酸的官能团。

[0015] 进一步考虑微粒可以是磁性的,并且磁性微粒任选至少部分涂布有二氧化硅和玻璃中的一种或多种。磁性微粒可以是球状体,尽管任何形状均被考虑为在本发明中是合适的。

[0016] 进一步考虑样品可以包含裂解缓冲液。

[0017] 附图描述

[0018] 图1(A - F)显示了如实施例中所所述的本发明方法的例示。

[0019] 图2显示了(A)如实施例2中详述的通过本发明的方法纯化的靶核苷酸序列的DNA扩增曲线和(B)内部对照。

[0020] 图3显示了(A)如实施例2中详述的通过本发明的方法纯化的靶核苷酸序列的DNA扩增曲线和(B)内部对照。

[0021] 发明详述

[0022] 本方法涉及核酸的一步分离和纯化方法。该方法是简单的且容易由本领域普通技术人员执行。该方法涉及加入裂解溶液(裂解溶液是本领域普通技术人员已知的)和结合核酸的固体基材(例如氧化铁颗粒,磁性颗粒,至少部分地涂布有玻璃、二氧化硅等的磁性颗

粒等)。存在的核酸将结合颗粒。在磁性颗粒的情况下,颗粒随后用置于测定容器外的磁源(即磁体)拉动通过含水凝胶(例如琼脂糖凝胶,尽管与核酸相容的任何凝胶例如SDS丙烯酰胺凝胶也将是合适的)。拉动颗粒通过凝胶的动作去除(即“刷去”)不溶性污染物,且稀释可溶性污染物(例如盐)。颗粒在离开凝胶后进入洗脱缓冲液。核酸在洗脱缓冲液中被释放。磁性颗粒随后可以被拉回到凝胶内,或允许沉降出来(或在从凝胶表面去除洗脱缓冲液后离心出来)。该方法通常在管中执行,其中凝胶在裂解缓冲液上分层,并且洗脱缓冲液在凝胶上分层。任选地,非洗脱缓冲液可以在凝胶上分层,并且需要时,在以后的时间,从颗粒中洗脱核酸。洗脱缓冲液可以包含或不包含有机溶剂(例如乙醇)。

[0023] 通常的裂解缓冲液包含盐。在裂解缓冲液中通常发现的盐包括但不限于硫氰酸胍(GITC)(通常范围为0.5 M至4.0 M)、NaCl(通常范围高达0.1 M至10.5 M)。裂解缓冲液还通常含有缓冲剂(例如Tris-HCl;通常浓度为约25 mM,约pH 7至约pH 8,或本领域普通技术人员已知的其他合适缓冲剂)和去污剂(例如NP-40、TweenTM、TritonTM-X、聚山梨醇酯、脱氧胆酸盐、脱氧胆酸钠和十二烷基硫酸钠(SDS);通常使用的浓度范围为约0.1%至约2.0%)。

[0024] 本发明并不限于任何具体样品或样品类型。例如,样品材料可以包括体液包括血浆、血清、血液、脊髓液、精液、阴道分泌液、痰和唾液、脑脊髓液、淋巴液和消化液。其他样品材料可以包括经分离的或富集的细胞群体和组织。样品可以是新鲜的或固定的(保存的)。固定的样品可以是包埋的(例如石蜡包埋的)。进一步地,样品可以得自考古发掘,即史前组织例如骨可以产生可以通过本发明的方法富集或分离的核酸。某些样品类型可能需要预处理,以例如使样品浓缩(通过例如悬浮细胞的离心)或使大的样品源破碎(break apart)(例如骨的研磨或组织的消化分解)。此类预处理主要是获得可通过本发明的方法更容易工作的原材料。

[0025] 在本发明中使用的凝胶可以为约0.1%至约1.0%、约0.15%至约0.75%、约0.2%至约0.50%的浓度。

[0026] 在本说明书中,应当理解术语“核酸”指示至少一种核酸。此外,术语“核酸”还可以指示核酸的混合物。术语“核酸”包括RNA、DNA或两者。进一步地,如本文使用的,“核酸”或“NA”指脱氧核糖核酸和核糖核酸两者。如本文使用的,“核酸序列”指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸沿着链的次序或顺序。它们可以是天然或人工序列,并且特别是基因组DNA(gDNA)、互补DNA(cDNA)、信使RNA(mRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、杂交序列或合成或半合成序列或其为修饰的或含有经修饰的碱基的寡核苷酸。这些核酸可以具有人、动物、植物、细菌或病毒起源等。它们可以通过本领域技术人员已知的任何技术获得,且特别是通过细胞裂解、文库筛选、通过化学合成或通过包括通过文库筛选获得的序列的化学或酶促修饰的混合方法。它们可以是化学修饰的,例如它们可以是假核酸(PNA)、通过各种化学键(例如硫代磷酸酯或甲基磷酸酯)修饰的寡核苷酸、或可替代地其为官能化的,例如其用具有不同特征特性的一种或多种分子偶联的寡核苷酸。

[0027] 本发明的方法可以改变,以特异性分离或富集DNA或RNA。例如,使用无涂层的氧化铁作为捕获颗粒对于RNA将是选择性的。二氧化硅颗粒或二氧化硅涂布的颗粒例如对于DNA将是选择性的。然而,如果使裂解缓冲液具有33%乙醇,则二氧化硅颗粒例如将结合DNA和RNA两者,用于总核酸分离或富集。

[0028] 术语“基材”指示在水溶液中基本上不可溶,并且当加入物质时,水溶液(具有高离

子强度)中的核酸可以在其上吸附的物质。术语“基材”包括可磁性吸引的颗粒例如无涂层的氧化铁,以及用例如二氧化硅、玻璃、石英或沸石涂布的可磁性吸引的颗粒。然而,基材无需是磁性的。进一步地,颗粒可以包含适合于结合核酸的官能团。此类官能团的实例包括但不限于蛋白质(或其功能部分)、抗体(或其功能部分)、化学接头(例如抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、经由核酸杂交、适体、生物素等)。因此,核酸无需直接与基材结合,而是可以经由一种或多种实体结合,如本文描述的或如本领域普通技术人员已知的。进一步地,通过例如离心(例如低速离心),可以使非磁性颗粒经过水基凝胶。在该实施方案中,考虑洗脱缓冲液(或盐水等)将处于管的底部,而凝胶在洗脱缓冲液上分层,并且裂解缓冲液在凝胶顶部上。离心力拉动颗粒向下通过凝胶进入洗脱缓冲液内。在另一个实施方案中,设置管如同使用磁力(裂解缓冲液在底部,洗脱缓冲液在顶部),并且将管盖上且在离心前倒转。进一步地,考虑了用于移动微粒通过凝胶的其他方法。例如,带电荷的颗粒可以通过电泳类型方法拉动通过凝胶。再进一步地,如果允许颗粒沉降(或离心至凝胶水平)且去除裂解缓冲液,则微粒可以用类似于弗氏压碎器(French press)的装置推动通过凝胶。

[0029] 基材可以具有任何形状,包括但不限于球形、椭圆形、长方形、棒状、螺旋形和无定形的。本发明的基材不受大小限制,但在最大直径中优选为约0.2 mm 或更少、0.02 mm 或更少、2.0 μm 或更少、200 nm 或更少、20 nm 或更少和2 nm 或更少。本发明的基材还可以为直径约0.1 nm至约5 nm,并且可以为直径约0.8 nm至约5 nm。进一步地,应当理解当分散在液相例如水溶液中时,基材可以产生悬浮液或可以从溶液沉降出来。

[0030] 术语“高离子强度”和“高浓度”意指起因于浓度等于或大于约1 M的溶解的盐的水溶液中的离子强度或浓度。通常,盐以1至10 M的浓度存在于水溶液中。更通常为浓度1至8 M的离液序列高的盐。在一个优选实施方案中,本发明的裂解缓冲液具有大于约1 M的盐浓度。

[0031] 术语“低离子强度”和“低浓度”意指起因于浓度小于约1 M的溶解的盐的水溶液中的离子强度或浓度。

[0032] 术语“磁性的”和“磁性颗粒”应指由带磁力和/或产生其自身持续磁场的材料制成的物体。尽管如本领域普通技术人员已知的任何合适材料均考虑用于本发明中,但最常考虑基于铁的材料(例如氧化铁)或其中包含氧化铁的材料。在本发明中,磁性颗粒(多功能磁性颗粒;MMP)形成基材,并且虽然不受大小限制,但在最大直径中优选为约0.2 mm 或更少、0.02 mm 或更少、2.0 μm 或更少、200 nm 或更少、20 nm 或更少和2 nm 或更少。在本发明的一个优选实施方案中,本发明的磁性颗粒至少部分涂布有玻璃、二氧化硅或者本领域普通技术人员已知结合核酸的一种或多种物质。微米和纳米大小(Micro- and nano-sized)的磁性颗粒对于本领域普通技术人员是商购可得的(例如Promega Corp.,Madison,WI; Life Technologies,Grand Isle,NY;Bangs Laboratories,Fishers,IN)。进一步地,颗粒可以通过本领域普通技术人员在实验室中合成,参见例如Starmans LW等人,Iron Oxide Nanoparticle-Micelles (ION-Micelles) for Sensitive (Molecular) Magnetic Particle Imaging and Magnetic Resonance Imaging, PLoS One, Epub 2013 Feb 20.; 8(2) e57335; Heitsch, Andrew T. 等人, Multifunctional Particles: Magnetic Nanocrystals and Gold Nanorods Coated with Fluorescent Dye-Doped Silica Shells, Solid State Chem. 2008 July; 181(7): 1590-1599。

[0033] 用于裂解细胞和组织用于提取核酸的方法和试剂是本领域技术人员或普通技术人员众所周知的,并且不破坏样品的核酸的任何方法均适合由本发明使用。进一步地,适合于通过本方法分离和纯化的核酸可以得自固定的样品(例如福尔马林或戊二醛固定的样品)、包埋的样品(例如石蜡包埋的样品)和含有合成核酸的溶液或悬浮液的反应容器。

[0034] 通过本发明的方法富集、分离或纯化的核酸可以用于本领域普通技术人员已知的任何常规方法中,因为本发明的方法不以可能对其后续使用有害的任何方式改变核酸。例如,核酸可以进行测序,通过PCR扩增,用于表达载体中等。在这点上,在经过含水凝胶后,核酸可以与酶例如DNA聚合酶或逆转录酶接触。进一步地,本发明考虑了核酸在固体基材上进行测序,而无需稀释。进一步地,本发明考虑了在经过含水凝胶后使与固体基材结合的核酸与重亚硫酸盐接触,使得将未甲基化的胞嘧啶脱氨基。进一步地,本发明考虑了核酸中的至少一个核碱基具有表观遗传修饰。

[0035] 试剂盒

[0036] 本发明还考虑了试剂盒,其中所述试剂盒含有凝胶溶液和/或凝胶成分(如下文例示的或如可以通过本领域普通技术人员确定的等价物,而无需过度实验)、适合于结合核酸的磁性颗粒和说明书。任选地,小瓶、反应溶液及其他物品可以在本发明的试剂盒中提供,用于特殊用途(例如RNA的分离)和/或在执行程序方面帮助用户。

[0037] 说明书中提及的所有专利、专利申请公开、期刊论文、教科书及其他出版物指示公开内容所属领域的技术人员的水平。所有此类出版物均通过引用并入本文,其程度与每个个别出版物具体且个别指出通过引用并入相同。

[0038] 本文举例说明性描述的本发明可以适当地在不存在本文未具体公开的任何要素或限制的情况下进行实践。因此,例如术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”中任一种在本文中的每种情况可以替换为其他两个术语中任一。同样地,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数参考。因此,例如,提及“方法”包括一种或多种方法和/或类型的步骤,其在本文中描述和/或在阅读公开内容后,对于本领域普通技术人员变得显而易见。

[0039] 已采用的术语和表达用作描述性而不是限制性术语。在这点上,当某些术语在本文中定义且在“详述”中的其他地方或本说明书中的其他地方以其他方式定义、描述或讨论时,所有此类定义、描述和讨论均预期归于此类术语。还不预期此类术语和表达的使用排除所示和所述特点或其部分的任何等价物。

[0040] 应认识到各种修饰在本发明的范围内是可能的。因此,应当理解,尽管本发明已具体公开于优选实施方案和任选特点的上下文中,但本领域技术人员可以采用本文公开的概念的修饰和变化。此类修饰和变化视为在如通过所附权利要求限定的本发明的范围内。

[0041] 范例

[0042] 实施例1

[0043] 本发明的概念是通过使核酸与磁性颗粒结合,且随后拉动颗粒通过粘稠、含水凝胶或凝胶溶液,可以容易地从例如细胞裂解产物或其他细胞样品中纯化核酸。第一测试是察看凝胶是否可以降低无核酸样品中的盐水平。

[0044] 如下制备1%凝胶。将50 ml水(无DNA酶且无RNA酶水)与0.5 g Agarose-LE(Ambion #9040,尽管任何商购可得的琼脂糖均应是可行的)混合。将琼脂糖在微波炉(尽管任何合适

的热源将可行) 在水中熔化, 以制备1%琼脂糖溶液, 并且置于设为55℃的温度块(即加热块) 上, 以使凝胶保持熔化。

[0045] 如使用70 ml 含有硫氰酸胍(GITC) 的裂解缓冲液(裂解缓冲液具有大于3M GITC、大于1%非离子型去污剂且具有高于7.0的pH; 或保存核酸的适合于待处理的组织或样品的任何裂解缓冲液) 和35 ml 95%乙醇制备裂解-乙醇溶液。

[0046] 将1 ml 裂解缓冲液-乙醇溶液连同0.5 ml 水一起加入12 mm X 75 mm聚丙烯管, 以代表样品添加。还将50微升二氧化硅涂布的磁性微粒(Abbott laboratories, Abbott Park, IL, microparticlesDNA) 加入裂解混合物中。

[0047] 2 ml 熔化的琼脂糖在裂解缓冲液顶部上轻轻浮动, 且晾凉以放置(set)。在变硬后, 通过将500微升水(上文) 加入凝胶表面, 且随后去除洗涤物, 来洗涤凝胶表面, 以去除可能在凝胶顶部上的任何残留的胍。随后将200微升水(上文) 加入凝胶上方, 以代表洗脱缓冲液。

[0048] 通过将磁体置于管侧面上在裂解缓冲液区域中, 用磁体捕获磁性颗粒(MMP)。替代方法是将更大的磁源直接置于管上。磁体随后沿管侧面缓慢向上拉动, 用磁场一起拉动磁性颗粒。磁性颗粒在经过凝胶时略微涂抹开。收集的颗粒在管的侧面上, 并且随着大团颗粒在管中上升, 凝胶被颗粒移位。在颗粒移动通过凝胶处形成通道。可能可以这样放置磁体, 使得颗粒被直接向上拉动通过凝胶中心, 但基于获得的结果, 磁体的位置似乎并不重要。

[0049] 磁性颗粒移动通过凝胶层至水层, 并且通过将磁体从一侧移动到另一侧来回混合。这完成几次以混合水中的颗粒。颗粒随后通过将磁体置于管的侧面进行捕获, 并且拉回到凝胶内, 使得它们从顶部水层移除。参见图1 A - F。取出水层且置于微量离心管内。吸收读数在Beckman DU-640分光光度计上在A 230、260、280和400处获得, 尽管任何商业分光光度计将可行。该仪器用水设置空白, 并且将样品读数。

[0050] 读数在A 230处获得。未稀释的样品给出2.8194的读数, 这对于该特定分光光度计的准确读数而言太高。将样品用水1/40稀释且重新读数。读数对于40 X 稀释为1.7268。0.6 X 的因子用于将A230转换为mM GITC。 $1.7268 \times 40 \times 0.6 = 41.4$ mM GITC。样品中的该GITC浓度将是可接受的。已测试几种测定且显示对反应中高达50 mM的GITC的耐受。目的测定使用1:1样品体积: 测定混合物比, 并且样品中的41.4 mM GITC将等于测定中的约20 mM GITC。

[0051] 将测试重复, 并且这次在使凝胶旋转的同时, 将MMP向上拉动通过凝胶, 增加颗粒行进的距离。分光光度计测量使用样品在水中的1/50稀释进行。在A230处的吸光度为0.8792。 $0.8792 \times 50 \times 0.6 =$ 样品中的26.4 mM GITC, 这是可接受的范围。该方法接下来用含有核酸的样品进行测试。

[0052] 实施例2

[0053] 在本实验中, 已知数量的核酸用于样品中。测试的核酸是来自Abbott RealTime™ HCV测定的校准物B和测定提取中使用的HCV内部对照。校准物B是在人血浆中含有大约10,000,000 IU/ml (国际单位/毫升) 浓度的HCV序列的RNA样品。内部对照也是用于测试样品制备系统的提取性能的RNA分子, 所述样品制备系统用于提取HCV用于测试。还测试在凝胶中甘油和乙醇的存在, 以测定它们是否可能对提取具有任何作用。乙醇的存在可以帮助使核酸保留在颗粒上, 并且甘油可以改变凝胶的密度。

[0054] 凝胶如下使用Ambion Agarose-LE #9040批次064P80B进行制备。各自具有25 ml水的三个试剂瓶用于制备不同凝胶。水为无DNA酶且无RNA酶水。琼脂糖(Ambion Agarose-LE #9040批次064P80B)如下加入每个瓶中。

[0055] 0.05 gm琼脂糖至瓶1,以制备0.2%凝胶。

[0056] 0.10 gm琼脂糖至瓶2,以制备0.4%凝胶。

[0057] 0.15 gm琼脂糖至瓶3,以制备0.6%凝胶。

[0058] 使琼脂糖在微波炉中熔化,且随后将瓶置于加热至55℃的温度块顶部上,以保持熔化。

[0059] 丙型肝炎病毒校准物B(Abbott Laboratories,Abbott Park,IL;这是在阴性人血清中的已知数量的HCV核酸)和内部对照(Abbott Laboratories,Abbott Park,IL)首先用裂解缓冲液乙醇混合物提取,并且如下在磁性颗粒上捕获。实施例1中讨论的裂解乙醇混合物用作裂解缓冲液。

[0060] 裂解混合物含有

[0061] 10 ml裂解乙醇混合物

[0062] 5 ml HCV校准物B

[0063] 350 µl HCV内部对照

[0064] 500 µl MMP(多功能磁性颗粒)

[0065] 将混合物置于在室温下的摇板上12分钟。

[0066] 在裂解产物温育期间,九个15 ml管如下设置。

[0067]	管	琼脂糖	水	乙醇	甘油	最终琼脂糖浓度
[0068]	1	4 ml 0.2%	1 ml	0	0	0.16%
[0069]	2	4 ml 0.4%	1 ml	0	0	0.32%
[0070]	3	4 ml 0.6%	1 ml	0	0	0.48%
[0071]	4	4 ml 0.2%	0	1 ml	0	0.16%
[0072]	5	4 ml 0.4%	0	1 ml	0	0.32%
[0073]	6	4 ml 0.6%	0	1 ml	0	0.48%
[0074]	7	9 ml 0.2%	0	0	1 ml	0.18%
[0075]	8	9 ml 0.4%	0	0	1 ml	0.36%
[0076]	9	9 ml 0.6%	0	0	1 ml	0.54%。

[0077] 甘油含量设为10%。在20%甘油时,琼脂糖比裂解缓冲液更稠密,且下沉到管的底部。

[0078] 在裂解温育完成后,使用凝胶技术如下提取样品。将1.5 ml裂解产物放入9个管(12 mm X 75 mm聚丙烯)各自中。将2 ml每种琼脂糖混合物轻轻放到上方且允许变硬(约4℃持续~10分钟)。将1 ml水放到所有管顶部上(was out on top of all tubes),以去除任何痕量的裂解物(any trace of lysis)。具有最低量的琼脂糖和乙醇的条件开始在水洗涤物上浮动,并且样品(#2)未进一步测试。从凝胶顶部去除水,并且将200 µl水加入所有凝胶顶部用于洗脱。磁性颗粒使用磁体在管侧面上捕获,并且向上拉动通过凝胶至洗脱缓冲液,如实施例1中所述。使用磁体以将它们从管一侧拉到另一侧,磁性颗粒随后将颗粒在洗脱缓冲液中来回移动约20次。颗粒如上所述拉回到凝胶内。随后取出洗脱缓冲液且放入微量离

心管内。

[0079] 从每种条件取10 μ l样品,并且用490 μ l水稀释。吸收在分光光度计(Beckman DU-640)中在230 nm处读数,以测定GITC遗留,如实施例1中所述。

[0080] 仪器用水设置空白,并然后将样品读数。

[0081]	样品	A230	mM GITC	稀释	最终GITC (mM)
[0082]	1	0.3693	0.210919	50	10.54595
[0083]	2	未测试			
[0084]	3	0.4904	0.282627	50	14.13134
[0085]	4	0.3316	0.188595	50	9.429773
[0086]	5	0.4461	0.256395	50	12.81975
[0087]	6	0.8110	0.472466	50	23.62328
[0088]	7	0.5354	0.309273	50	15.46364
[0089]	8	0.5223	0.301516	50	15.07579
[0090]	9	0.5418	0.313063	50	15.65313

[0091] 所有样品均具有低于25 mM的GITC浓度。

[0092] 随后使用Abbott RealTime™ HCV测定,就HCV和内部对照序列的存在测试样品。使用Abbott RealTime™ HCV测定代码4J86-90的三个组分,制备主混合物。将320微升激活物(Activator)和948微升寡核苷酸混合物(Oligo mix)加入预装载的酶瓶,且通过吸打轻轻混合。随后使25微升主混合物与25微升每种稀释样品在PCR板的孔中混合。随后将25微升该混合物转移至Cepheid管,并且使用Cepheid (Sunnyvale, CA) SmartCycler® 用下述程序进行循环。

[0093] 温度C 时间秒

[0094] 步骤1共1个循环

[0095] 55 1200

[0096] 步骤2共4个循环

[0097] 温度 时间

[0098] 95 20

[0099] 46 30

[0100] 68 20

[0101] 步骤3共6个循环

[0102] 温度 时间

[0103] 92 20

[0104] 60 30

[0105] 68 20

[0106] 步骤4共37个循环

[0107] 温度 时间

[0108] 90 20

[0109] 56 40

[0110] 68 20

[0111] 35 40

[0112] 随后将每个样品读数。

[0113] 扩增曲线如下,且显示HCV和内部对照两者均由洗脱物扩增。图2显示了扩增曲线(A)和内部对照(B)的曲线图。

[0114] 测定混合物各自的第二个25微升也使用不同程序进行扩增,同样在Cepheid SmartCycler中。

[0115] 温度C 时间秒

[0116] 步骤1共1个循环

[0117] 温度 时间

[0118] 55 1800

[0119] 步骤2共4个循环

[0120] 温度 时间

[0121] 95 40

[0122] 46 30

[0123] 68 20

[0124] 步骤3共6个循环

[0125] 温度 时间

[0126] 92 40

[0127] 60 30

[0128] 68 20

[0129] 步骤4共37个循环

[0130] 温度 时间

[0131] 90 30

[0132] 56 40

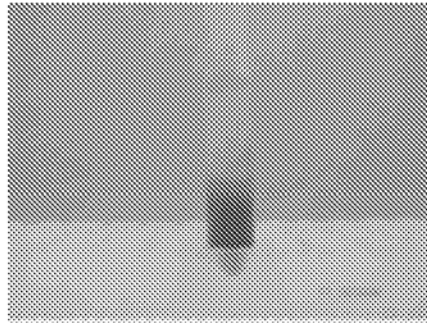
[0133] 68 20

[0134] 35 40

[0135] 将每个样品读数。

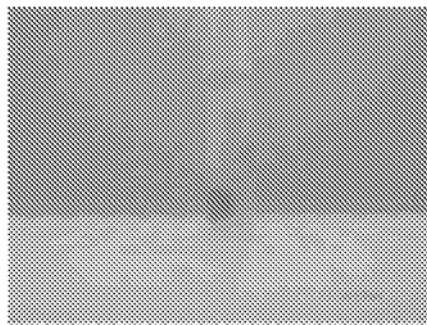
[0136] 图3显示了扩增曲线(A)和内部对照(B)的曲线图。

[0137] 这些实验证实能够在磁性微粒上捕获HCV,向上拉动颗粒通过凝胶(这去除高水平的GITC及其他污染物)进入洗脱缓冲液,洗脱样品且在PCR测定中使用洗脱的样品,而无需核酸的进一步纯化。提取方案不使用任何分开的洗涤步骤。



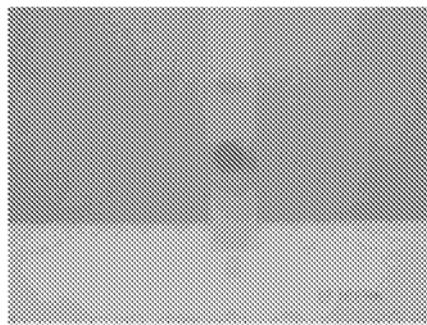
裂解物(lysis)与凝胶和在顶部的洗脱液(elution)

图 1A



捕获的颗粒

图 1B



使颗粒沿管侧面向上滑动

图 1C



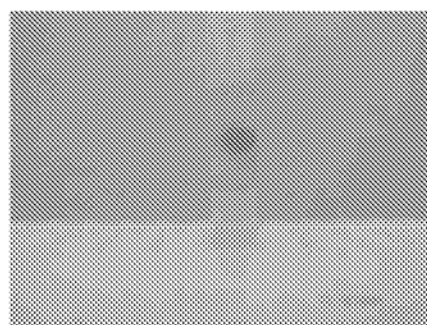
使颗粒向上滑动进入洗脱缓冲液

图 1D



通过使用磁体移动颗粒通过
洗脱缓冲液的洗脱

图 1E



在移除洗脱物前，使颗粒向下
移动回到凝胶内

图 1F

HCV扩增曲线的曲线图

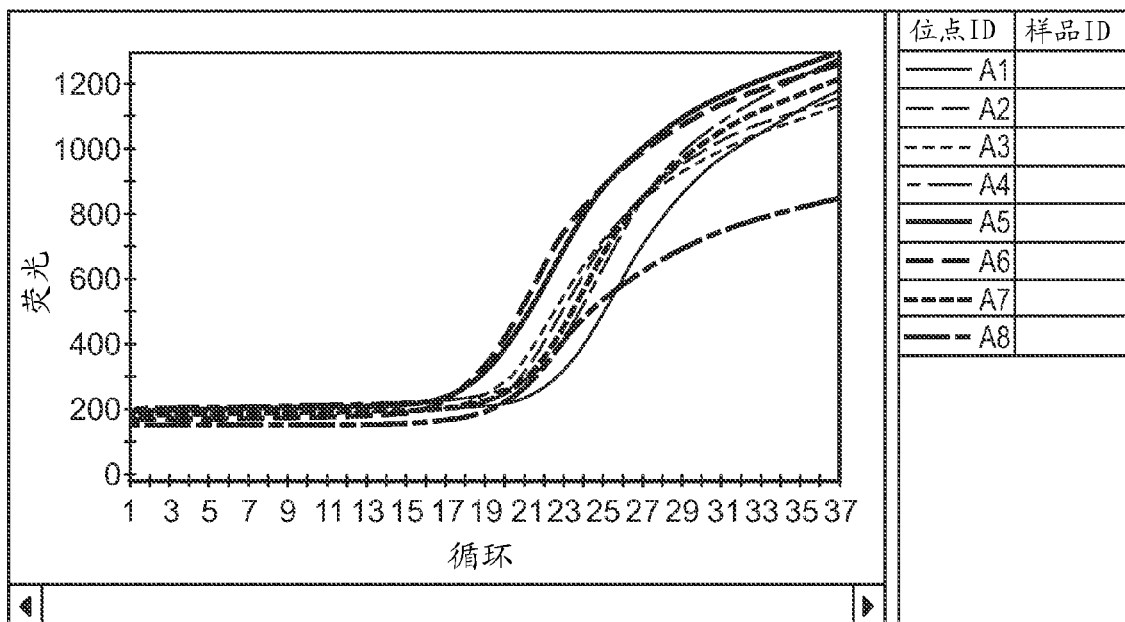


图 2A

IC (内部对照) 的曲线图

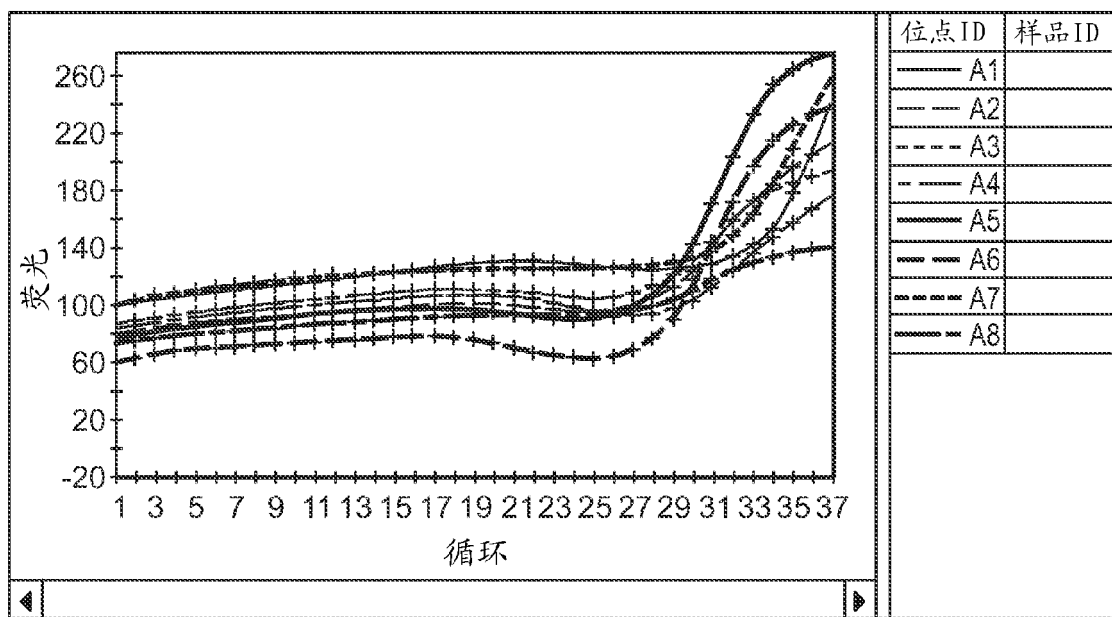


图 2B

HCV扩增曲线

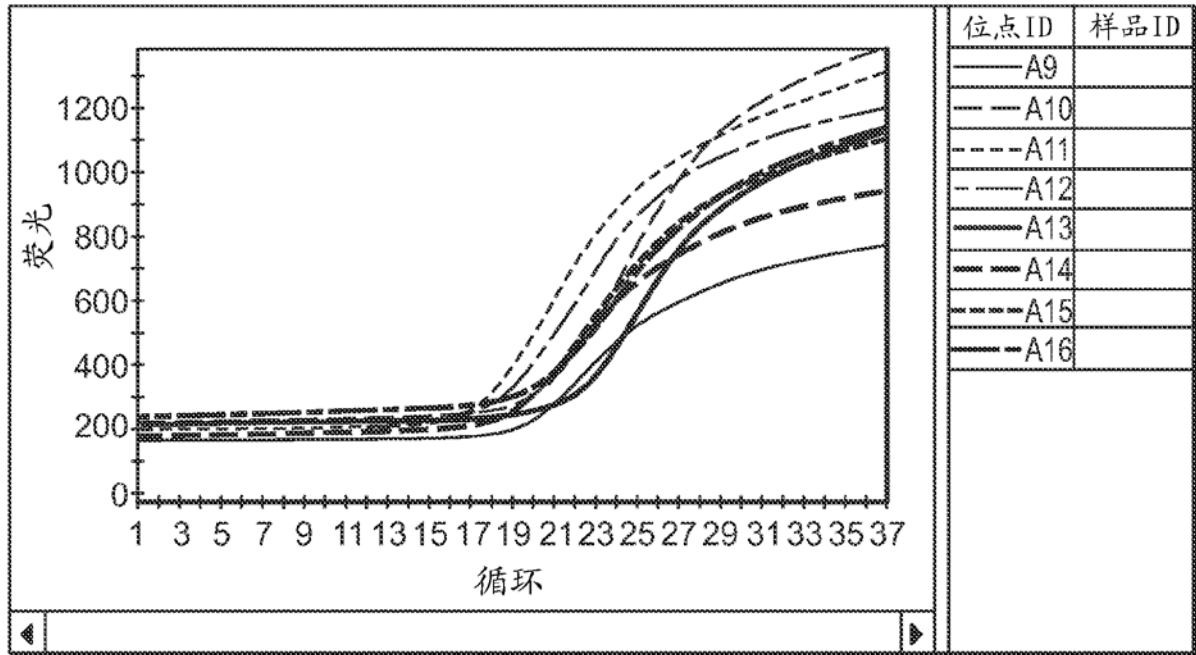


图 3A

内部对照扩增曲线

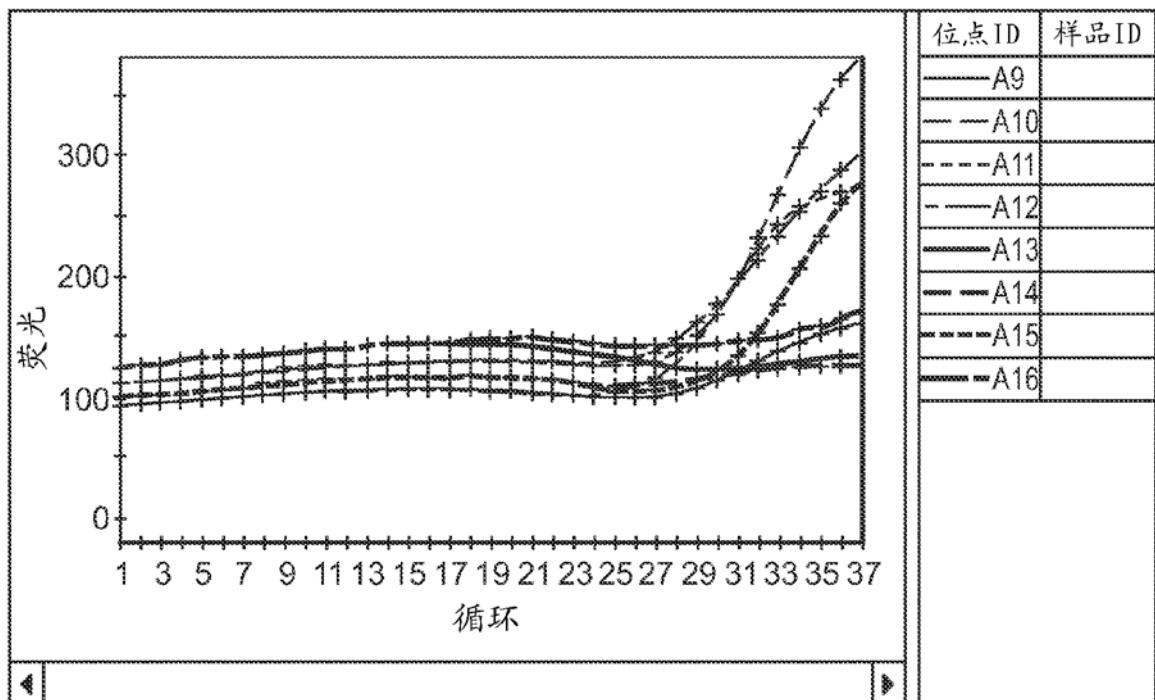


图 3B