

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

A61B 5/15



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99811245.3

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1196796C

[22] 申请日 1999.8.12 [21] 申请号 99811245.3

[30] 优先权

[32] 1998.8.12 [33] DE [31] 19836559.4

[86] 国际申请 PCT/EP1999/005857 1999.8.12

[87] 国际公布 WO2000/009746 德 2000.2.24

[85] 进入国家阶段日期 2001.3.22

[71] 专利权人 安蒂根尼生物技术有限公司

地址 德国莱恩费尔登

[72] 发明人 E·赫尔芬贝恩

审查员 刘玉玲

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 周中琦

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 5 页

[54] 发明名称 用于抽血的系统

[57] 摘要

本发明涉及一种含有包括胍鎓盐，缓冲物质，还原剂和/或去污剂的溶液的用于血液采样的容器。该容器特别在用于检测核酸的血液取样。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于抽血的系统,其中在抽血容器中含有具有下面成分的水溶液:

- 1-8.0M 胍鎧盐;
- 10-300mM 缓冲物质;
- 0.1-10wt%还原剂;和/或
- 5-30wt%去污剂。

2. 根据权利要求1的系统,特征在于胍鎧盐选自硫氰酸胍鎧和氯化胍鎧。

3. 根据权利要求1或2的系统,特征在于胍鎧盐以2.5-8.0M的浓度存在。

4. 根据权利要求1的系统,特征在于缓冲物质选自Tris,HEPES,MOPS,柠檬酸盐和磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求1的系统,特征在于去污剂选自Triton-X-100,NP-40,polydocanol和Tween20。

6. 根据权利要求1的系统,特征在于还原剂选自二硫苏糖醇, β -巯基乙醇和TCEP。

7. 根据权利要求1的系统,特征在于所述溶液的pH在4.0和7.5之间。

8. 根据权利要求7的系统,特征在于所述溶液的pH在4.0和6.5之间。

9. 根据权利要求1的系统,特征在于所述溶液含有下面的成分:

- 4M 硫氰酸胍鎧;
- 45mM Tris/HCl;
- 15% (w/v) Triton-X-100;
- 0.8%(w/v) DTT,

其中pH是6.0。

10. 根据权利要求1的系统,特征在于其用来接收血液的腔中具有

真空度。

11. 根据权利要求1的系统,特征在于其含有抽出的血液。

12. 一种稳定和/或分离血液中核酸的方法,包括将血液导入根据权利要求1-11任一项的系统中的步骤,并且任选地,使用常规方法分离核酸。

13. 含有1-8.0M胍鎧盐,10-300mM缓冲物质,5-30wt%去污剂和/或0.1-10wt%还原剂的溶液用于制备稳定血液样本中的核酸的试剂的用途。

14. 通过将全血引入权利要求1-11任一项的系统中而获得的稳定化的血液样品。

15. 根据权利要求14的血液样品,特征在于其具有4.0-7.5的pH。

16. 根据权利要求15的血液样品,特征在于其具有6.6-7.0的pH。

17. 根据权利要求14-16任一项的血液样品,特征在于其从人血液产生。

用于抽血的系统

本发明涉及用于抽血的容器，抽取的血液应该特别用于稳定和分
析核酸。

当抽取血液时，通常收集在已经含有抗凝剂例如肝素，柠檬酸盐或
EDTA 的容器中。从而防止血液凝结。这样获得的血液样品可以在合适
的温度下贮存很长时间。但是当要分析核酸例如(m)RNA 或 DNA 时，这
种获得血液的方法具有很大的缺陷。为了这样的目的，应该在抽取时就
已经最适当地将样品中含有的核酸稳定化了，就是即应该防止存在的
核酸的降解也要防止新的 mRNA 的合成。

实际上还没有实现自抽取时样品材料中含有的核酸的稳定贮存目
的是由于下面的原因：

细胞含有核酸酶，酶，它们一旦接触它们的底物就破坏核酸
(RNA, DNA)。只要细胞处于它们正常的环境中，则细胞和细胞外核酸酶
一般处于生理调控下。抽取血液更强或更弱地影响细胞中含有的核酸
的变化。然后细胞内释放核酸酶和/或通过细胞裂解至胞外。此外，更
强或更弱地合成核酸。特别是血液的长期贮存导致细胞的老化和破坏。

根据标准抽血方法获得的血液样品长期贮存产生的另一个问题是
样品材料的相当大的变化。这样的变化，例如细胞的强烈裂解，可能具
有一定作用使得分离核酸的标准方法在足够地有效的方法中不再有效。

除了有关样品材料中含有的核酸的稳定贮存的问题外，抽血的常
规方法中还有其它困难。在分离核酸期间，常规的抗凝剂通常不会足够
有效地被分离并且干扰下面的核酸分析，例如在利用 PCR(聚合酶链反
应)的扩增的情况下。例如肝素是一种普遍公知的 PCR 的抑制剂。

最后，核酸定量分析产生的问题，即从取样至核酸的测定的全部方
法怎样在标准化条件下可以控制。理想的是，定性和定量确定的标准核

酸应该在抽取期间就已经被加入到样品材料中了并且应该使进行取样和测定的整个过程。这也可以使用常规抽取系统来完成。

常规抽血的另一个缺陷是有转移感染材料的危险,因为迄今为止分离核酸需要人工处理步骤。不能排除与潜在的感染病菌接触。

在文献中描述了一种方法,其中血液样品在从患者抽取后直接与胍镱盐混合(EP0818542A1)。在该方法中,胍镱盐以粉末形式存在从而发挥胍镱盐的增强的稳定性。但是该方法具有严重的缺陷,因为该盐例如必须首先溶解于加入的血液中。该溶解方法特别取决于温度并且因为使用了不透明的样品材料而不能控制。因此用于诊断医学目的的相应的产物的使用是非常有问题的。

此外,核酸酶是极具活性的酶,其只有在极端变性条件下才可能被抑制。变性取决于溶液中胍镱盐的浓度。溶液中胍镱盐的抑制浓度在一开始引述的方法中并不存在。因此,在溶解过程中存在不可控制的核酸的降解。此外,在该方法中省去了加入还原剂,没有还原剂不会保证有效的抑制作用,特别是RNA酶的抑制作用(参见实施例5)。

此外,用这种方法制备的样品不能直接用于在玻璃表面上进一步的核酸分离。此外,胍镱盐粉末的使用不允许加入核酸内标物。这样的标准物对于工艺控制和精确定量分析是必须的。

本发明以提供不具有现有技术缺陷的抽血用容器的技术问题为基础。特别地,可以使用该容器取出的样品直接进行用于分析核酸的标准方法而不需要进一步的样品制备步骤。

根据本发明,通过用于抽血的容器解决该问题,所述容器含有包括下面成分的水溶液:

- 胍镱盐(guanidinium salt);
- 缓冲物质;
- 还原剂;和/或
- 去污剂。

本发明的容器具有下面的优点:1.在抽取时血液已经溶解,抽血容器中已经含有在溶液中的稳定核酸的物质。2.该稳定核酸的物质的组

成使得样品材料特别是其中含有的核酸在接触该溶液时直接被稳定化。3. 与所有的以前的标准抽血系统例如含有 EDTA 或肝素的抽血系统相反, 经稳定的样品不再需要当作传染性材料来处理。4. 该稳定核酸的物质的组成使得样品材料可以直接在下面的分离方法中使用。5. 在下面的分离中可以如此有效地分离该稳定核酸的物质使得没有发现 PCR 的抑制作用。6. 可以将内标物加入该稳定核酸的物质。这允许从取样开始至检测核酸时止控制整个方法。

第 1 项中提到的抽血容器是常规的抽血容器(小试管), 其中加入了一定体积的稳定核酸的物质。然后优选地将该小试管设定一定的真空度, 这保证只有特定体积的血液可以在抽血期间流入其中。可以通过常规的取血方法控制小试管。在一个特别优选的实施方案中, 该试管中含有的溶液含有下面的试剂: 硫氰酸胍, Triton-X-100, 二硫苏糖醇和合适的缓冲系统, 例如柠檬酸盐, Tris 或 HEPES。在描述的组合物中, 该溶液与真空试管可相容。该溶液可以贮存在该真空试管中没有任何问题并且没有任何期望的稳定功能的破坏。整个系统不存在问题, 特别是对于供血者不存在问题, 并且在取样期间是安全的。

含有胍盐, 缓冲物质, 还原剂和/或去污剂的溶液在贮存时是稳定的并且将供应的刚抽取的血液转化为在贮存时也稳定的物质并且可以直接用于标准核酸分析试剂盒(例如 Roche 或 Qiagen 的那些试剂盒)。

硫氰酸胍和/或氯化胍优选作为胍盐。

优选地, 胍盐以 2.0 至 8.0M 的浓度存在。Tris 或柠檬酸盐优选作为缓冲物质, 优选用 HCl 调节精确的 pH。然而, 其它可能的缓冲液是 HEPES, MOPS, 柠檬酸盐和磷酸盐缓冲液, 例如 PBS。

缓冲液浓度优选在 10 和 300mM 之间, 特别优选在 10 和 100mM 之间。

Triton-X-100 优选作为去污剂。其它可能的去污剂是 NP-40, Tween 20, polydocanol 或者其它去污剂。

去污剂浓度优选是 5-30% (w/v), 特别优选是 10-20% (w/v)。

DTT 优选作为还原剂, 但是也可以使用 β -巯基乙醇, TCEP (三(2-

羧乙基)膦)或者其它还原剂。

还原剂优选的浓度是 0.1-10%(w/v), 特别优选是 0.5-2%(w/v)。

溶液的 pH 优选是 3.0-9.0, 特别优选是 4.0-7.5, 特别优选是 5-6。

特别选择溶液的 pH 使得在加入样品材料后 pH 范围是 5.0-7.6。特别优选的是 6.3-6.9 之间的 pH(参见实施例 8)。

特别优选的溶液优选含有 4M 硫氰酸胍, 45mM Tris/HCl, 18%, 优选 15%(w/v) Triton-X-100, 0.8%(w/v) DTT 并且具有 6.0 的 pH。

在另一个优选的实施方案中, 接收血液样品的体积具有负压, 其可以被调节使得将先前确定的血液体积在血液容器被穿孔后吸到容器中。相应地, 真空的容器在市场上是可购得的。

然后可以使含有抽取的血液的容器立刻进行进一步的分析, 或者, 可以贮存很长时间(多达几天)而没有任何样品品质的不利因素。

在本发明的方法中, 新采取的血液在抽血容器中直接与上述溶液接触使得立刻终止可能改变样品的核酸模式的所有过程。因此, 在稍后时间测定的关于测定的核酸的数据非常精确地代表抽血时的实际状态, 即关于核酸的量和类型两者。

优选地, 采取的血液的量是加入到容器中的溶液的 0.1-4 倍。所述溶液优选是 0.5-5.0ml。因此, 加入血液后胍盐的终浓度是 1.0-5M, 优选是 1-3M, 特别优选是 2-3M(参见实施例 7)。

根据本发明的容器优选用于当血液样品要用来分析核酸时的血液抽取。

上述溶液作为描述的抽血系统的成分的用途只是保证细胞的立刻溶解, 同时通过立刻灭活核酸酶而稳定样品。令人惊奇的是, 这样获得的血液样品甚至在室温下或者更高温度下也可以贮存几天。此外, 该抽血系统保证在通过核酸分离至分析的样品处理中没有污染和非传染性处理。在常规的核酸分离方法中, 目前还要求另外的处理步骤(例如将采取的血液样品转移到用于核酸分离的试剂中等等), 这必然伴有另外的感染的危险。

用该抽血系统获得的样品与所有的常规标准核酸分离方法相匹

配。这里应该特别注意以核酸结合玻璃表面为基础的方法,以及特定序列与互补核酸结合和以溶剂为基础的提取方法。

因此,描述的本发明包括一种抽血系统,表达其满足下面的条件。

1. 控制取样并且同时稳定样品材料中含有的核酸(DNA, RNA)。2. 取样,其中可以完全省略使用抗凝剂。3. 利用上述抽血系统获得的样品可以用于所有的用于分离核酸的公知的系统中的通用的方式。4. 该抽血系统在贮存中是稳定的。

另外,出人意料地发现利用描述的抽血系统获得的样品可以在容器中贮存很长时间而没有核酸的降解(参见实施例 2, 3, 7, 8)。

下面的实施例将解释本发明:

实施例 1:

在优选的实施方案中,所述抽血系统可以包括如下(见图 1):装有一定体积的稳定核酸的物质的小试管,并且提供有一定的真空度,并且用隔膜密封。制备该隔膜使得其与标准的取样附件(插管等)相匹配。在本实施例中提供 2.2ml 试剂,调节真空度使得精确地 2.2ml 血液可以在取样期间流入。流动的血液中含有的核酸立刻转化为稳定形式。

关于下面的实施例的一般的初步说明。

在下面描述的所有的实施例中,除非另有说明,稳定核酸的物质(N-sS)具有下面的成分:

45mM Tris, 5M 硫氰酸胍(GTC), 0.8%(w/v)二硫苏糖醇(DTT), 18%(w/v) Triton-X-100, pH 6.0。

在描述的所有的实施例中,除非另有说明,所述稳定核酸的物质与样品以 1:1 的比例(1 体积 N-sS 加 1 体积样品材料)混合。低浓度的 N-sS, 例如 1 体积 N-sS 加 5 体积样品,可以影响 RNA 的降解。

对于所有的实施例,通过在抽血时直接将血液加入混合有 N-sS 的小试管中来稳定血液。

实施例 2:

混合样品材料和 N-sS 后核酸的稳定性。用二氧化硅衍生化表面从样品裂解物中分离 RNA 和 DNA。

材料和方法:

抽血后直接使用,4℃下贮存6天后使用,和-20℃下贮存1个月后使用用于DNA和RNA分离的样品材料。

使用高纯度RNA分离试剂盒(Boehringer Mannheim, cat. no. 1828665)来分离RNA(图2)。如下改变包装散页中给出的说明书:以600微升一份分4等份向柱子加入2.4ml体积的样品裂解物,使得总共提供2.4ml裂解物的样品材料。所有其它步骤根据包装散页进行。最后用100微升洗脱缓冲液洗脱RNA。

对于分离DNA(图3),使用了QiaAmp Blood Kit(Qiagen cat. no. 29104)。在几点上改变了包装散页中描述的标准程序:将400微升样品直接加给柱子;没有使用试剂盒中含有的结合试剂。加入25微升蛋白酶-K母液,并且该样品在室温下温育10分钟。接着,将该柱子放到收集容器中并且根据包装散页所述离心。所有其它步骤根据包装散页进行,除了使用乙醇。洗脱体积是200微升。

实施例3:

使用包被链霉抗生物素的磁性颗粒和生物素标记的寡脱氧胸苷酸(Oligocdt)从样品裂解物分离mRNA(图4):

材料和方法:

向容器中加入20ml样品裂解物。根据下面的方法分离mRNA:首先向裂解物加入30ml杂交缓冲液(20mM Tris-HCl, 300mM NaCl, 6mM生物素标记的寡脱氧胸苷酸, pH7.4)。然后加入3mg链霉抗生物素磁性颗粒(Boehringer Mannheim)。混合该样品并且在室温下温育5分钟。借助于磁体分离磁性颗粒;弃除上清液。然后将颗粒再悬浮于洗涤缓冲液1(10mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 1%Triton-X-100, pH7.5)并且用洗涤缓冲液2(10mM Tris-HCl, 200mM NaCl, pH7.5)洗涤三次(洗涤步骤:再悬浮,磁性分离,去除上清液)。最后洗涤步骤之后完全去除上清液,并且颗粒再悬浮于20微升蒸馏水中。样品被加热到70℃维持5分钟。分离磁性颗粒,利用凝胶电泳分析含有mRNA的上清液。

实施例4:

利用修改的根据 Chomczynski 和 Sacchi 的规则(分析生物化学 162, 156-159(1987))分离 DNA 和 RNA(以溶剂萃取为基础的方法的实施例)(图 5):

材料和方法:

从抽血容器转移 2ml 样品体积到小试管中。然后加入 0.2ml 2M 乙酸钠溶液, pH4, 2ml 苯酚(水饱和的)和 0.4ml 氯仿-异戊醇混合物(49:1), 加入各溶液后充分混合该样品。将该完全溶液剧烈振荡 10 秒钟并且在冰上温育 15 分钟。该样品在 4℃ 下以 10000g 离心 20 分钟。离心后 RNA 在水相中; DNA 和蛋白质在界面和苯酚相中。将水相转移到新的容器中并且与 1ml 异丙醇混合。为了沉淀 RNA, 将该样品在 -20℃ 贮存 1 小时。在 4℃ 下以 10000g 再次离心之后沉积出 RNA。将该沉积物再次悬浮于 0.3ml 缓冲液(4M 硫氰酸胍, 25mM 柠檬酸钠, pH7.0, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, 0.1M 2-巯基异丙醇), 转移到新的 1.5ml Eppendorf 容器中并且与 1 体积的异丙醇混合。在 -20℃ 下温育 1 小时后, 在 Eppendorf 离心机中在 4℃ 下将溶液离心 10 分钟。将 RNA 沉积物回收到 75% 乙醇中并且通过离心(Speed vac)浓缩并干燥。对于进一步处理, 将样品溶解于 100 微升 10mM Tris-HCl, pH6.5。

实施例 5

还原剂(例如 DTT)在用于 RNA 的长期稳定性的稳定溶液中的重要性

材料和方法:

使用的稳定溶液: 4.0M GTC; 13.5% Triton X100; 45mM Tris/HCl; 有或没有 120mM DTT。700 微升的血清与 700 微升的稳定溶液混合。温育 2 分钟后加入 20 微升 MS2-RNA (0.8 微克/微升的 Roche)。该样品在 40℃ 温度下温育 180 分钟, 然后以 400 微升一份用 Roche 高纯度总 RNA 试剂盒处理。一步将样品施加给柱子而不加入试剂盒的结合剂并且根据说明进行离心。根据说明进行下面的洗涤步骤和在 50 微升洗脱缓冲液中洗脱 RNA。

利用琼脂糖凝胶进行分析(见图 6)。

结果:不向稳定溶液中加入还原剂不能实现 RNA 的长期稳定。

实施例 6:

血清中游离的 MS2-RNA 的稳定性。样品成分对 RNA 降解的动力学材料和方法:

使用 10 微升 MS2-RNA(0.8 微克/微升, Roche)添加 (spike) 250 微升血清并且在室温下温育。加入 RNA 后立即, 2 分钟至 50 分钟之后, 通过加入 250 微升稳定溶液终止血清中的自然 RNA 降解。所有批次的样品分析两次。作为标准物, 在向血清加入稳定溶液后一个样品只与 MS2-RNA 混合并且平行处理。

用 Roche 高纯度病毒 RNA 试剂盒平行处理所有的样品。一步将样品加给柱子而不加入试剂盒的结合剂并且根据说明书离心。根据说明书进行下面的洗涤步骤并且在 50 微升洗脱缓冲液中洗脱 RNA。

利用 1.2%天然琼脂糖凝胶分离 20 微升的洗出液并且分析(见图 7)。

结果: MS2-RNA 在血清中不稳定。向血清中加入 RNA 之后 2 分钟, RNA 完全降解。通过以 1:1 的比例向血清中加入稳定溶液可以立即终止该过程, 并且在加入稳定溶液时(=抽血)可以实现 RNA 的稳定作用。

实施例 7:

血清/稳定溶液中 MS2-RNA 的稳定性。取决于 GTC 浓度

材料和方法

使用的稳定溶液:3-5M GTC;13.5%Triton X100; 50mM DTT ;42mM Tris/HCl;

溶液的 pH:大约 4.0

加入血清后溶液的 pH:大约 6.7。

2ml 血清与 2.5ml 的各稳定溶液混合。温育 2-5 分钟后加入 90 微升 MS2-RNA(0.8 微克/微升, Roche)并且在 40℃下温育。以有规律的间隔取 400 微升样品并且根据实施例 5 用 Roche 高纯度总 RNA 试剂盒平行处理。洗脱出 50 微升样品并且在-20℃下冷冻。对于 RNA 完整性

分析, 将 20 微升洗出液施加给 1.5%琼脂糖凝胶(见图 8)。

对于样品的 PCR 分析, 利用 AMV-RT(Roche) 逆转录 10 微升洗出液并且接着利用 Lightcycler 上的 PCR 进行分析:

RT 批:	4.0 微升	AMV-RT 缓冲液
(42°C, 1 小时)	2.0 微升	dNTP's (终浓度 10mM)
	0.5 微升	RNA 酶抑制剂 (Roche, 20 单位)
	1.0 微升	引物 2827 (终浓度 1 μM)
	1.9 微升	DMPC 水
	0.6 微升	AMV-RT (Roche, 15 单位)
	10 微升	模板 RNA
	Σ 20 微升	

使用 SYBR-Green 作为检测系统在 61°C 退火温度下在 Lightcycler 上进行 PCR。PCR 的批:

1.6 微升	氯化镁 (分批溶液 25mM)
5.9 微升	DMPC 水
0.25 微升	引物 2827 (分批溶液 20mM)
0.25 微升	引物 2335 (分批溶液 20mM)
1.0 微升	SYBR-Green-Mastermix (Roche)
1.0 微升	RT 批次 (1:50 稀释)
Σ 10 微升	

PCR 扩增产物完全施加于 2%琼脂糖凝胶(见图 9)。

结果:

40°C 3 天后的 RNA 完整性。

图 8 中的琼脂糖凝胶表示 40°C 温育 3 天后 20 微升洗脱的 MS2-RNA。该时期后, 根据 GTC 含量可以得出 RNA 完整性的显著差异。因此, 血清/稳定溶液中小于 2M 的盐含量有利于 RNA 的完整性。

40°C 8 天后 RNA 的扩增性。

尽管已经检测到 40°C 3 天后 RNA 开始降解, 40°C 温育 8 天后所有的

RNA 样品可能扩增并且被清楚地检测。

PCR 的扩增产物完全施加给 2%的琼脂糖凝胶(见图 9)。

实施例 8

血清/稳定溶液中 MS2-RNA 的稳定性。取决于与稳定溶液混合的样品的 pH

材料和方法

使用的溶液: 4M(5M) GTC
 14.4% Triton X100
 50mM DTT
 45mM Tris/HCl

加入血清后的 pH 在 6.7 和 8.0 之间

2.5ml 稳定溶液与 2.0ml 血清混合。加入 90 微升 MS2-RNA(0.8 微克/微升, Roche)之后在室温下培养样品。根据实施例 6 使用 Roche 病毒 RNA 试剂盒以有规律间隔处理来自 500 微升样品中的 RNA 并且在 50 微升洗脱缓冲液中分离。利用琼脂糖凝胶分析 20 微升洗出液(见图 10)。

结果:

血清/稳定溶液的 pH 以及稳定溶液的 pH 和缓冲液范围对于 RNA 的长期稳定性是决定性的。在 pH8.0 下 2 天后已经不再能检测到完整 RNA, 而室温下温育 13 天后在 6.6 和 7.0 之间的 pH 范围内仍然可检测到完整的 RNA。

然而,除了 pH 外,优化调节的 GTC 浓度对于 RNA 的长期稳定性也是重要的(也见实施例 7)。例举的实施例证明 2.2M GTC 的稳定样品中的 GTC 终浓度对于 RNA 的长期稳定性比 2.78 更好。

附图说明

图 1:

含有 N-Ss, 确定的真空, 用隔膜密封的取样容器。

图 2:

在取样容器中贮存不同时间的 RNA 的凝胶分析(1%琼脂糖)。1 柱: 取样

后直接分离(没有贮存), 2 柱: 在 -20°C 下贮存一个月, 3 柱: 在 4°C 下贮存 6 天。施加的 RNA 量相当于 120 微升血液体积。

图 3:

在取样容器中贮存不同时间的 DNA 的凝胶分析(1%琼脂糖)。1 柱: 取样后直接分离(没有贮存), 2 柱: 在 -20°C 下贮存一个月, 3 柱: 在 4°C 下贮存 6 天。施加的 RNA 量相当于 10 微升血液体积。

图 4:

从 10ml 血液中分离的 mRNA 的凝胶分析(1%琼脂糖)(2 柱)。分子量标记(1 柱)。除了 mRNA 外, 可见 rRNA 泳带。泳带边界清晰的形状证明核酸的完整性。

图 5:

从 120 微升血液中分离的 RNA 的凝胶分析(1%琼脂糖)。

图 6:

有/没有 DTT 下在 40°C 下在血清/稳定溶液中温育 180 分钟后分离的 MS2-RNA 的凝胶分析。

1 柱: 正对照: MS2-RNA, 2 柱: DNA 标记, 3, 4, 5 柱: 与含有 DTT 的稳定溶液温育之后的 MS2-RNA, 6, 7, 8 柱: 与没有 DTT 的稳定溶液温育之后的 MS2-RNA。

图 7:

在血清中温育 0-50 分钟后分离的 MS2-RNA 的凝胶分析。

10, 17 柱: MS2-RNA 标准物, 9, 16 柱: DNA 标记, 7, 8 柱: 温育 0 分钟, 5, 6 柱: 温育 2 分钟, 3, 4 柱: 温育 5 分钟, 1, 2 柱: 温育 10 分钟, 11, 12 柱: 温育 15 分钟, 13, 14 柱: 温育 30 分钟, 15 柱: 温育 50 分钟。

图 8:

在 40°C 下在血清/稳定溶液中温育 3 天后分离的 MS2-RNA 的凝胶分析。相应的柱中指示其中温育相关的 RNA 样品的加入血清后的稳定溶液的 GTC 含量。

1 柱: 2.70M GTC, 2 柱: 2.5M GTC, 3 柱: 2.36M GTC, 4 柱: 2.20M GTC, 5 柱: 2.08M GTC, 6 柱: 1.94M GTC, 7 柱: 1.80M GTC, 8 柱: 1.66M GTC。

图 9:

在 40℃ 下在血清/稳定溶液中分别温育 1 天和 8 天之后分离的 MS2-RNA 的 PCR 扩增产物的凝胶分析。

1 柱:1 天后分离的 RNA 的扩增产物, 2 柱:8 天后分离的 RNA 的扩增产物, 3 柱:DNA 标记, 4 柱: MS2-RNA 正对照: 10 微升 RT 中 0.8 微克, 1:50 稀释的 1 微升的扩增。

图 10:

室温下在血清/稳定溶液中分别温育 6 天(2-12 柱)和 13 天(14-19 柱)之后分离的 MS2-RNA 的凝胶分析。相应的柱后面写明了血清和稳定溶液混合后获得的 pH。

1, 13, 20 柱: DNA 标记, 2 柱:pH8.0, 3 柱:pH7.7, 4 柱:pH7.5, 5 柱:pH7.35, 6 柱:pH7.18, 7, 14 柱:pH7.07, 8, 15 柱:pH6.94, 9, 16 柱:pH6.8, 10, 17 柱:pH6.72, 11, 18 柱:pH6.68 和 12, 19 柱:pH6.7。

12, 19 柱中 RNA 的稳定溶液具有和 11 柱中 RNA 的相同的 pH, 但是含有 5m GTC 而不是 4M。

图 1

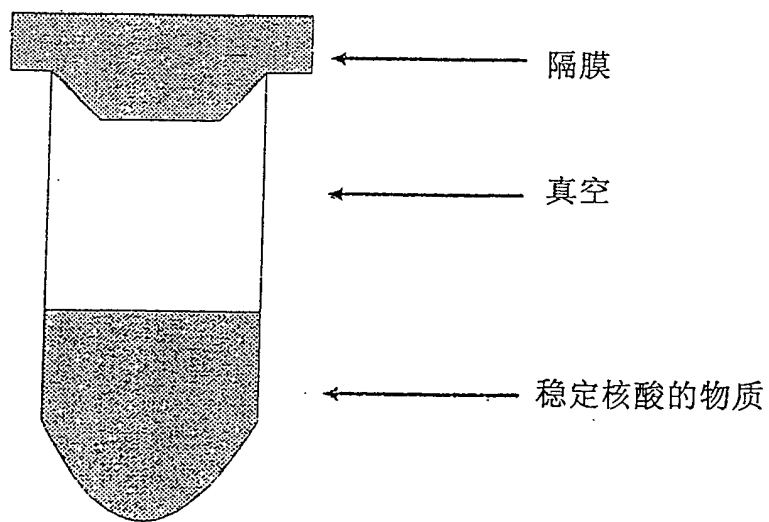


图 2

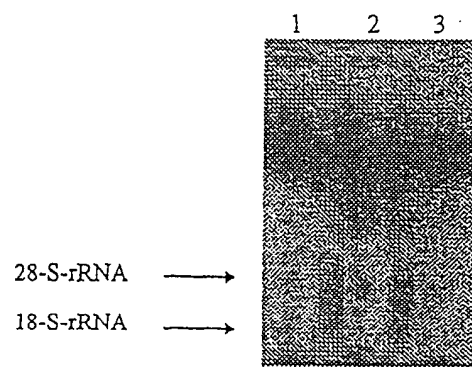


图 3

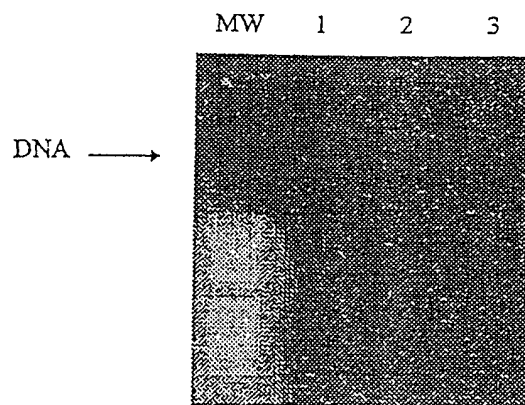


图 4

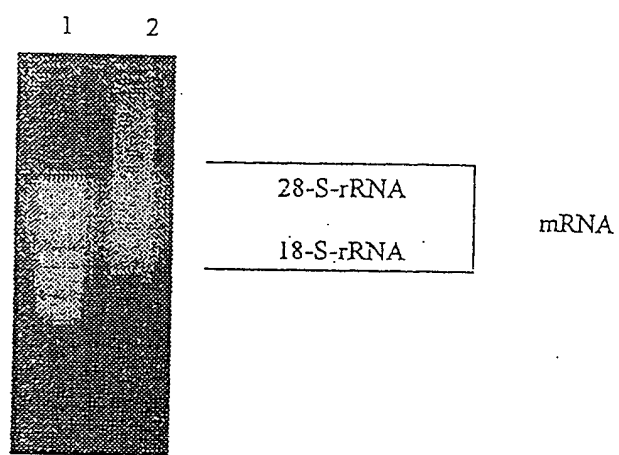


图 5

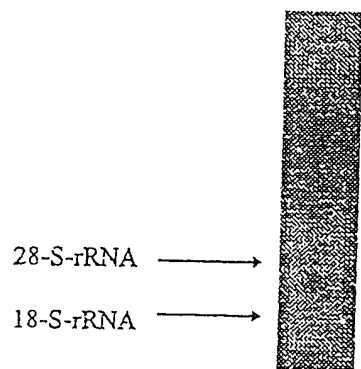
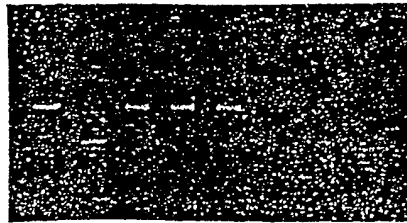
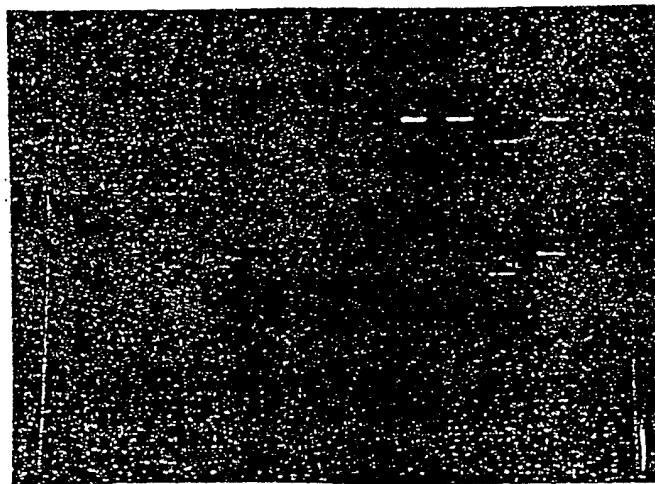


图 6



1 2 3 4 5 6 7 8

图 7



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

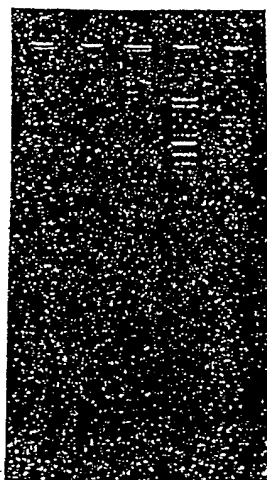
11 12 13 14 15 16 17

图 8



1 2 3 4 5 6 7 8

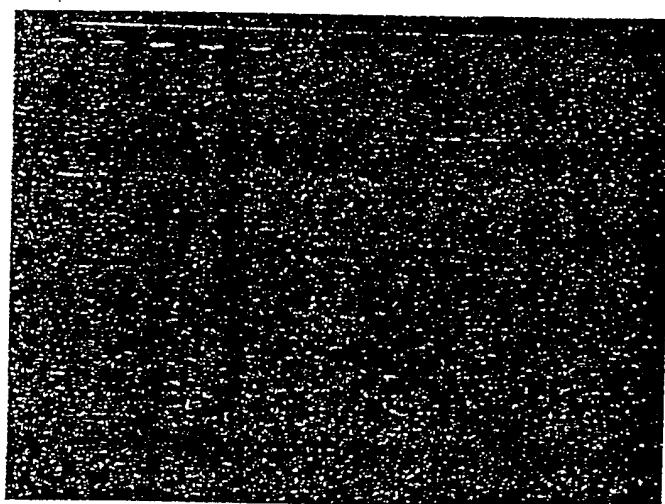
图 9



1 2 3 4

图 10

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



13 14 15 16 17 18 19 20