



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105792907 B

(45)授权公告日 2018.01.05

(21)申请号 201480065567.5

(22)申请日 2014.12.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105792907 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(30)优先权数据

13005603.9 2013.12.02 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.31

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/076301 2014.12.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/082495 EN 2015.06.11

(73)专利权人 拜奥卡蒂斯股份有限公司

地址 比利时梅赫伦

(72)发明人 埃娃·塞尔沃利

帕特里克·范德博高

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 张英 宫传芝

(51)Int.Cl.

B01D 15/38(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

(56)对比文件

TW 201114467 A, 2011.05.01,

WO 2007140417 A2, 2007.12.06,

US 2003092045 A1, 2003.05.15,

CN 102725423 A, 2012.10.10,

WO 2005021748 A1, 2005.03.10,

审查员 朱芳萍

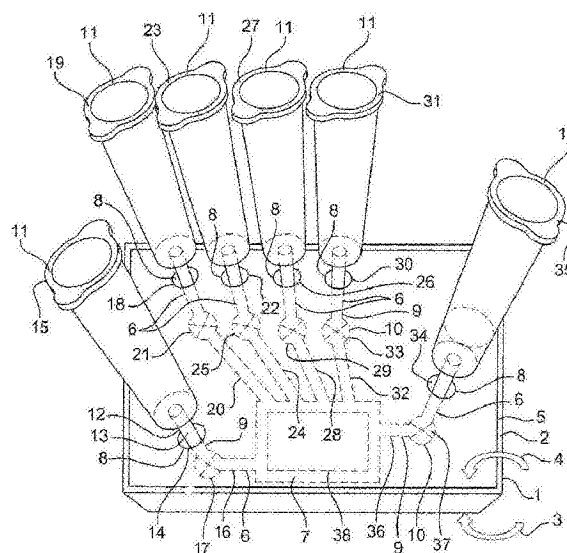
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

循环核酸的提取

(57)摘要

本发明涉及从生物流体中提取循环核酸的方法。所述方法包含以下的连续步骤：提供假定含有所述循环核酸的生物流体。然后使所述生物流体接触包含至少一种离液剂的裂解溶液、包含设计用于与所述循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液、其中所述结合溶液不含乙醇和异丙醇、和能够捕获所述循环核酸的至少一部分的固体载体。最后，从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所述固体载体。



1. 一种用于从生物流体中提取循环核酸的方法,所述方法包含以下连续步骤:
 - a. 提供假定含有所述循环核酸的生物流体;
 - b. 使所述生物流体接触:
 - 包含至少一种离液剂的裂解溶液;
 - 包含设计用于配合所述循环核酸的至少一部分的至少一种PEG衍生物的结合溶液,其中所述结合溶液不含乙醇和异丙醇;
 - 能够捕获所述循环核酸的至少一部分的固体载体;
 - c. 从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所述固体载体;其中,所述方法进一步包含使用冲洗溶液的冲洗步骤,从而冲洗所述固体载体,其中,所述冲洗溶液不含醇。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述循环核酸包含短链循环核酸和长链循环核酸。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述固体载体能够捕获所述短链循环核酸的至少一部分。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,进一步包括在步骤a和步骤b之间的过滤步骤,以弃去存在于所述生物流体中的碎片的至少一部分。
5. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,进一步包括在步骤c之后的释放步骤,从而释放被所述固体载体捕获的所述循环核酸的至少一部分,以便回收包含在所述生物流体中的所述循环核酸的至少一部分。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中通过使用加热器与流体运动结合从所述固体载体中释放被所述固体载体捕获的所述循环核酸的所述至少一部分。
7. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,进一步包括在步骤c之后的核酸扩增步骤,以扩增存在于所述生物流体中的所述循环核酸。
8. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其中,通过所述固体载体与所述循环核酸之间的静电相互作用,所述固体载体能够捕获存在于所述生物流体中的所述循环核酸的至少一部分。
9. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其中,所述固体载体包含至少一种膜。
10. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法,其中,所述固体载体包含多个颗粒。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述颗粒选自自由硅烷化颗粒、氧化物颗粒和磁性颗粒组成的组。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述固体载体包含多个磁性颗粒。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中,在步骤c中,通过使用孔隙度低于所述颗粒的最小尺寸的至少一种过滤器(38),从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所述颗粒的至少一部分。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中,在步骤c中,通过磁致动从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所述颗粒的至少一部分。
15. 根据权利要求13所述的方法,其中,通过使用能够保留颗粒并且不结合核酸的至少一种过滤器的过滤来进行从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所述固体载体的步骤c。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中, 所述过滤器是聚醚砜PES过滤器、硼硅酸盐玻璃微纤维过滤器、纤维素过滤器、或不对称的聚砜过滤器。

17. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法, 其中, 所述方法是在夹座(1)中进行的自动化方法, 所述夹座(1)设计成通过仪器进行操作。

18. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法, 其中, 所述PEG衍生物具有6000Da至10000Da之间的分子量。

19. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法, 其中, 所述循环核酸包含循环DNA。

20. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法, 其中, 所述冲洗溶液不含乙醇和异丙醇。

21. 根据权利要求1~3中任一项所述的方法, 其中, 所述方法与包含对乙醇和/或异丙醇类溶剂敏感的组分的一次性夹座兼容。

循环核酸的提取

技术领域

[0001] 本发明涉及从生物流体中提取循环核酸(circulating nucleic acid)的方法。

背景技术

[0002] 准确且早期诊断疾病(诸如癌症)的非侵入性方法的引入,代表了提高患者预期寿命的有前景的解决方案。在这一点上,对包含在生物样品中的循环肿瘤核酸的分析是一种公认诊断工具,用于在早期阶段检测癌症或在疾病的早期阶段监测恶性肿瘤的发展。据报道,与健康的个体相比,患有某些癌症的患者的血液中的循环核酸(ciNAs)浓度是五至十倍更高,然而他们中仅有一小部分可呈现出恶性突变并因此是诊断相关的。

[0003] 已知ciNA是片段化核酸,包含各种长度的片段,大多数是低于三百个碱基对的短片段。通常,用于提取ciNA的提取方案是基于最初为核酸长片段(诸如基因组DNA(gDNA))设计的步骤,并且该步骤被修改以进一步允许提取包含在ciNA中的短片段。为此,通常向生物样品中加入在乙醇/异丙醇溶剂混合物中含有胍鎓盐的结合增强剂溶液。

[0004] 现今的趋势是在由聚合材料制成的一次性夹座(cartridge)上进行诊断测定。然而,形成此种夹座的不同部件的装配需要使用由可溶于乙醇和/或异丙醇类溶剂的聚合材料制成的组分,如粘合剂。因此,现存的使用粘合增强剂溶液的ciNAs提取方案不与一次性夹座兼容,因为会迅速发生脱层(delamination),由此在尝试在此种一次性夹座上实施提取方案时会产生问题。

[0005] 因此,需要可与一次性塑料夹座相兼容的用于提取循环核酸的方法。

发明内容

[0006] 本发明的目的是弥补上述缺点的全部或一部分。

[0007] 本发明通过提供从生物流体中提取循环核酸的方法而实现了这些目的,所述方法包含以下连续步骤:

[0008] a.提供假定含有循环核酸的生物流体;

[0009] b.使所述生物流体接触:

[0010] i.包含至少一种离液剂(chaotropic agent)的裂解溶液;

[0011] ii.包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液;

[0012] iii.能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体;

[0013] b.从裂解溶液、从结合溶液和从生物液体中分离所述固体载体。

[0014] 可替代地,本发明涉及从生物流体中提取循环核酸的方法,所述方法包含以下连续步骤:

[0015] a.提供假定含有循环核酸的生物流体;

[0016] b.使所述生物流体接触:

[0017] i.含有至少一种离液剂的裂解溶液;

- [0018] ii.能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体；
- [0019] iii.包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合至少一种PEG衍生物的结合溶液；
- [0020] c.从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所述固体载体。
- [0021] 因此,本文所教导的方法的步骤b)中,使生物流体接触裂解溶液、结合溶液和固体载体的顺序可以颠倒。
- [0022] 优选地,本发明涉及从生物流体中提取循环核酸的方法,该方法包含以下连续步骤:
- [0023] a.提供假定含有循环核酸的生物流体;
- [0024] b.使所述生物流体接触:
- [0025] i.包含至少一种离液剂的裂解溶液;
- [0026] ii.包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液,其中所述结合溶液不含乙醇和异丙醇;
- [0027] iii.能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体;
- [0028] c.从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述固体载体。
- [0029] 可替代地,本发明涉及从生物流体中提取循环核酸的方法,该方法包含以下连续步骤:
- [0030] a.提供假定含有循环核酸的生物流体;
- [0031] b.使所述生物流体接触:
- [0032] i.包含至少一种离液剂的裂解溶液;
- [0033] ii.能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体;
- [0034] iii.包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液,其中所述结合溶液不含乙醇和异丙醇;
- [0035] c.从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述固体载体。
- [0036] 优选地,本发明涉及从生物流体中提取循环核酸的方法,该方法包含以下连接步骤:
- [0037] a.提供假定含有循环核酸的生物流体;
- [0038] b.使所述生物流体接触:
- [0039] i.包含至少一种离液剂的裂解溶液;
- [0040] ii.包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液;
- [0041] iii.能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体,其中所述固体载体包含多个颗粒;
- [0042] c.通过使用能够保留颗粒并且不结合核酸的至少一种过滤器的过滤从所述裂解溶液、从结合溶液和从生物流体中分离出所述颗粒。
- [0043] 可替代地,本发明涉及从生物流体中提取循环核酸的方法,该方法包含以下连续步骤:
- [0044] a.提供假定含有循环核酸的生物流体;
- [0045] b.使所述生物液体接触:

[0046] i. 包含至少一种离液剂的裂解溶液；
[0047] ii. 能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体；
[0048] iii. 包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液；

[0049] c. 通过使用能够保留颗粒并且不结合核酸的至少一种过滤器的过滤从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所述固体载体。

[0050] 因此，本发明通过提供与假定含有ciNA的生物液体接触的结合溶液而解决了所述问题，所述结合溶液包含至少一种PEG衍生物。所述PEG衍生物被设计用于与所述ciNA的至少一部分配合，以便促进所述ciNA的至少一部分的捕获。为此，所述PEG衍生物诱发脱水效果，导致ciNA的至少一部分的沉淀，由此促进相互作用，诸如接触生物液体的固体载体和ciNA之间的疏水相互作用。因此，与现有技术所述的ciNA提取方法相反，根据本发明所述的结合溶液不含已知诱发脱层的乙醇和异丙醇。因此，根据本发明所述的方法可与包含对乙醇和/或异丙醇类溶剂敏感的组分的一次性夹座兼容。

[0051] 另外，据报道，乙醇和/或异丙醇抑制基于提取的循环核酸的某些下游应用。当涉及到监测疾病的演变时，PCR检测的甚至部分抑制也会在监测的循环肿瘤核酸的定量中引入偏差，从而提供不准确的信息。因此，在进行下游应用之前，必须仔细地蒸发乙醇和异丙醇，但是当ciNA的提取在封闭的容器（诸如一次性夹座）中进行时，此种蒸发步骤难以实现。有利地是，根据本发明所述的结合溶液是不含乙醇和异丙醇的，从而防止了下游应用的抑制，诸如与存在乙醇和/或异丙醇有关的PCR扩增。

[0052] 根据一个实施方式，循环核酸包含短链循环核酸和长链循环核酸。ciNA是例如ciDNA或ciRNA，ciDNA特别地适合用于根据本发明所述的方法。在本发明中，短链循环核酸是低于约一千个碱基对的ciNA，优选低于约三百个碱基对，更优选在约一千个碱基对和约十八个碱基对之间，更优选在约三百个碱基对和约十八个碱基对之间。

[0053] 在一个实施方式中，所述固体载体能够捕获短链循环核酸的至少一部分。从现有技术已知，与长链ciNA相比，短链ciNA更不倾向于被捕获在固体载体上，原因在于短链ciNA为固体载体提供的结合区域有限。因此，在这一实施方式中，所述固体载体被设计用于促进短链循环核酸的捕获。

[0054] 在根据本发明所述的方法中，包含离液剂的裂解缓冲液被设计用于除去易于连接到生物流体中可能存在的循环核酸的循环生物分子的至少一部分。ciNA易于连接到循环生物分子诸如蛋白质和/或囊泡（vesicle），由此干扰固体载体对所述ciNA的捕获。因此，所述裂解缓冲液促进固体载体捕获ciNA。

[0055] 在一个实施方式中，所述方法进一步包括在步骤a) 和步骤b) 之间的过滤步骤，以丢弃生物流体中存在的碎片的至少一部分。已知碎片会干扰ciNA至固体载体的捕获。因此，过滤步骤允许防止碎片妨碍生物流体中可能存在的ciNA的提取。

[0056] 在一个实施方式中，所述方法进一步包括在步骤c) 之后的释放步骤，从而释放被所述固体载体捕获的循环核酸的至少一部分，以便回收所述生物流体中包含的循环核酸的至少一部分。

[0057] 在一个实施方式中，通过使用加热器与流体运动结合从所述固体载体释放被所述固体载体捕获的所述循环核酸的所述至少一部分。

[0058] 根据一个实施方式,所述方法进一步包括在步骤c)之后核酸扩增步骤,以扩增生物液体中存在的循环核酸。

[0059] 在一个实施方式中,通过所述固体载体和所述循环核酸之间的静电相互作用,所述固体载体能够捕获生物液体中存在的所述循环核酸的至少一部分。因此,所述ciNA的捕获或释放取决于固体载体的静电荷。

[0060] 根据一个实施方式,固体载体包含至少一种膜。在一个实施方式中,固体载体包含能够捕获循环核酸的至少一部分的至少一种膜。在一个实施方式中,固体载体包含至少一种二氧化硅膜。在一个实施方式中,固体载体包含能够捕获循环核酸的至少一部分的至少一种二氧化硅膜。如果固体载体是二氧化硅膜,那么本发明的方法中的接触步骤b)的顺序优选为:

[0061] b.使所述生物液体接触:

[0062] i.包含至少一种离液剂的裂解溶液;

[0063] ii.能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体;

[0064] iii.包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液。

[0065] 在一个替代性实施方式中,固体载体包含多个颗粒。在一个实施方式中,固体载体包含多个二氧化硅颗粒。在一个实施方式中,固体载体包含多个磁性颗粒。如果固体载体是多个颗粒,那么本发明的方法中接触步骤b)的顺序优选是:

[0066] b.使所述生物流体接触:

[0067] i.包含至少一种离液剂的裂解溶液;

[0068] ii.包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液;

[0069] iii.能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体。

[0070] 根据一个实施方式,在步骤c)中,通过使用孔隙度低于所述颗粒的最小尺寸的至少一种过滤器的过滤,从所述结合溶液和从所述生物液体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0071] 在一个实施方式中,在步骤c)中,通过磁致动(magnetic actuation),从所述结合溶液和从所述生物液体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0072] 根据一个实施方式,所述方法是在夹座中进行的自动化的方法,所述夹座被设计成通过仪器进行操作。

[0073] 在一个实施方式中,所述PEG衍生物具有约6000Da至约10000Da之间的分子量。

[0074] 根据一个实施方式,所述循环核酸包含循环DNA。

[0075] 在一个实施方式中,所述生物流体选自血液、血清、血浆、尿、痰或它们的混合物。

[0076] 在一个实施方式中,从生物流体中提取循环核酸的方法包含如下连续步骤:

[0077] a.提供假定含有循环核酸的生物流体;

[0078] b.使所述生物流体依次接触:

[0079] i.包含至少一种离液剂的裂解溶液;

[0080] ii.能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体;

[0081] iii.包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶

液；

[0082] b.从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所述固体载体。

[0083] 下文描述了本文所公开的方法或夹座的声明(特征)和实施方式。除非明确有相反的指示,所定义的本发明的声明和实施方式的每一个均可以与任何其它声明和/或实施方式组合。具体地,被指示为优选的或有利的任何特征或多个特征或声明可以与被指示为优选的或有利的任何其它特征或多个特征或声明组合。至此,本发明特别地被以下编号的方面和实施方式1~55的任何一个、或者其一个或多个与任何其它声明和/或实施方式的组合所获得。

[0084] 本申请中公开的编号的声明是：

[0085] 1.一种从生物流体中提取循环核酸的方法,该方法包含如下连续步骤：

[0086] a.提供假定含有循环核酸的生物流体；

[0087] b.使所述生物流体接触：

[0088] i.包含至少一种离液剂的裂解溶液；

[0089] ii.包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液；

[0090] iii.能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体；

[0091] c.从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所

[0092] 述固体载体。

[0093] 2.根据声明1所述的方法,其中,所述循环核酸包含短链循环核酸和长链循环核酸。

[0094] 3.根据声明3所述的方法,其中,所述固体载体能够捕获所述短链循环核酸的至少一部分。

[0095] 4.根据声明1~3任一项所述的方法,进一步包括在步骤a)和步骤b)之间的过滤步骤,以弃去所述生物流体中存在的碎片的至少一部分。

[0096] 5.根据声明1~4任一项所述的方法,进一步包括在步骤c)之后的释放步骤,从而释放被所述固体载体捕获的循环核酸的至少一部分,以便回收所述生物流体中包含的循环核酸的至少一部分。

[0097] 6.根据声明5所述的方法,其中,通过使用加热器与流体运动结合从所述固体载体中释放被所述固体载体捕获的循环核酸的所述至少一部分。

[0098] 7.根据声明1~6中任一项所述的方法,进一步包括在步骤c)之后的核酸扩增步骤,以扩增所述生物液体中存在的循环核酸。

[0099] 8.根据声明1~7中任一项所述的方法,其中,通过所述固体载体和所述循环核酸之间的静电相互作用,所述固体载体能够捕获生物流体中存在的所述循环核酸的至少一部分。

[0100] 9.根据声明1~8中任一项所述的方法,其中,所述固体载体包含至少一种膜。

[0101] 10.根据声明1~9中任一项所述的方法,其中,所述固体载体包含多个磁性颗粒。

[0102] 11.根据声明10所述的方法,其中,在步骤c)中,通过使用孔隙度低于所述颗粒的最小尺寸的至少一种过滤器(38),从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0103] 12. 根据声明10或11所述的方法, 其中, 在步骤c) 中, 通过磁致动从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0104] 13. 根据声明1~12中任一项所述的方法, 其中, 所述方法是在夹座(1) 中进行的自动化的方法, 所述夹座(1) 被设计成通过仪器来操作。

[0105] 14. 根据声明1~13中任一项所述的方法, 其中, 所述PEG衍生物具有约6000Da至约10000Da之间的分子量。

[0106] 15. 根据声明1~14中任一项所述的方法, 其中, 所述循环核酸包含循环环DNA。

[0107] 16. 一种从生物流体中提取循环核酸的方法, 该方法包含如下的连续步骤:

[0108] a. 提供假定含有循环核酸的生物流体;

[0109] b. 使所述生物流体接触:

[0110] i. 包含至少一种离液剂的裂解溶液;

[0111] ii. 包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液;

[0112] iii. 能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体, 其中该固体载体包含多个颗粒;

[0113] c. 通过使用能够保留颗粒并且不结合核酸的至少一种过滤器的过滤, 从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述颗粒。

[0114] 17. 根据声明16所述的方法, 其中, 所述过滤器是聚醚砜(PES) 过滤器。

[0115] 18. 根据声明16或17所述的方法, 其中, 所述循环核酸包含短链循环核酸和长链循环核酸。

[0116] 19. 根据声明18所述的方法, 其中, 所述固体载体能够捕获所述短链循环核酸的至少一部分。

[0117] 20. 根据声明16~19中任一项所述的方法, 进一步包括在步骤a) 和步骤b) 之间的过滤步骤, 以弃去所述生物流体中存在的碎片的至少一部分。

[0118] 21. 根据声明16~20中任一项所述的方法, 进一步包括在步骤c) 之后的释放步骤, 从而释放被所述固体载体捕获的循环核酸的至少一部分, 以便回收包含在所述生物流体中的循环核酸的至少一部分。

[0119] 22. 根据声明21中任一项所述的方法, 其中, 通过使用加热器与流体运动结合, 从所述固体载体中释放被所述固体载体捕获的循环核酸的所述至少一部分。

[0120] 23. 根据声明16~22中任一项所述的方法, 进一步包括在步骤c) 之后的核酸扩增步骤, 以扩增存在于生物流体中的循环核酸。

[0121] 24. 根据声明16~23中任一项所述的方法, 其中, 通过所述固体载体和所述循环核酸之间的静电相互作用, 所述固体载体能够捕获存在于所述生物流体中的所述循环核酸的至少一部分。

[0122] 25. 根据声明16~24中任一项所述的方法, 其中, 所述颗粒选自于由硅烷化颗粒、氧化物颗粒和磁性颗粒组成的组。

[0123] 26. 根据声明16~25中任一项所述的方法, 其中, 所述固体载体包含多个磁性颗粒。

[0124] 27. 根据声明26所述的方法, 其中, 在步骤c) 中, 通过使用孔隙度低于所述颗粒的

最小尺寸的至少一种过滤器(38),从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0125] 28.根据声明26或27所述的方法,其中,在步骤c)中,通过磁致动从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0126] 29.根据16~28中任一项所述的方法,其中,所述方法是在夹座(1)中进行的自动化的方法,所述夹座(1)被设计成通过仪器进行操作。

[0127] 30.根据声明16~29中任一项所述的方法,其中,所述PEG衍生物具有约6000Da至约10000Da之间的分子量。

[0128] 31.根据声明16~30中任一项所述的方法,其中,所述循环核酸包含循环DNA。

[0129] 32.根据声明16~31中任一项所述的方法,其中,所述方法可与包含对乙醇和/或异丙醇类溶剂敏感的组分的一次性夹座兼容。

[0130] 33.根据声明16~32中任一项所述的方法,其中,所述结合溶液不含乙醇和异丙醇。

[0131] 34.根据声明16~33中任一项所述的方法,其中,所述方法进一步包含使用冲洗溶液进行冲洗的步骤,从而冲洗所述固体载体,其中所述冲洗溶液不含醇,优选地,其中所述冲洗溶液不含乙醇和异丙醇。

[0132] 35.一种从生物流体中提取循环核酸的方法,该方法包含如下连续步骤:

[0133] a.提供假定含有循环核酸的生物流体;

[0134] b.使所述生物流体接触:

[0135] -包含至少一种离液剂的裂解溶液;

[0136] -包含设计用于与循环核酸的至少一部分配合的至少一种PEG衍生物的结合溶液,其中所述结合溶液不含乙醇和异丙醇;

[0137] -能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体;

[0138] c.从所述裂解溶液、从结合溶液和从生物流体中分离出所述固体载体。

[0139] 36.根据声明35所述的方法,其中,所述循环核酸包含短链循环核酸和长链循环核酸。

[0140] 37.根据声明36所述的方法,其中,所述固体载体能够捕获所述短链循环核酸的至少一部分。

[0141] 38.根据声明35~37中任一项所述的方法,进一步包括在步骤a)和步骤b)之间的过滤步骤,以弃去存在于生物流体中的碎片的至少一部分。

[0142] 39.根据声明35~38中任一项所述的方法,进一步包括在步骤c)之后的释放步骤,从而释放被所述固体载体捕获的循环核酸的至少一部分,以便回收包含在所述生物流体中的循环核酸的至少一部分。

[0143] 40.根据声明39中任一项所述的方法,其中,通过使用加热器与流体运动结合,从所述固体载体释放被所述固体载体捕获的循环核酸的所述至少一部分。

[0144] 41.根据声明35~40中任一项所述的方法,进一步包括在步骤c)之后的核酸扩增步骤,以扩增存在于生物流体中的循环核酸。

[0145] 42.根据声明35~41中任一项所述的方法,其中,通过所述固体载体和所述循环核酸之间的静电相互作用,所述固体载体能够捕获所述生物流体中存在的所述循环核酸的至少

一部分。

[0146] 43. 根据声明35~42中任一项所述的方法,其中,所述固体载体包含至少一种膜,优选二氧化硅膜。

[0147] 44. 根据声明35~43中任一项所述的方法,其中,所述固体载体包含多个颗粒。

[0148] 45. 根据声明35~44中任一项所述的方法,其中,所述颗粒选自于由硅烷化颗粒、氧化物颗粒和磁性颗粒组成的组。

[0149] 46. 根据声明35~45中任一项所述的方法,其中,所述固体载体包含多个磁性颗粒。

[0150] 47. 根据声明46所述的方法,其中,在步骤c)中,通过使用孔隙度低于所述颗粒的最小尺寸的至少一种过滤器(38),从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0151] 48. 根据声明46或47所述的方法,其中,在步骤c)中,通过磁致动从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0152] 49. 根据声明44~48中任一项所述的方法,其中,通过使用能够保留颗粒并且不结合核酸的至少一种过滤器的过滤,进行步骤c)的从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述固体载体。

[0153] 50. 根据声明49所述的方法,其中,所述过滤器是聚醚砜(PES)过滤器、硼硅酸盐玻璃微纤维过滤器、纤维素过滤器或不对称的聚砜过滤器,优选其中所述过滤器是PES过滤器。

[0154] 51. 根据声明35~50中任一项所述的方法,其中,所述方法是在夹座(1)中进行的自动化的方法,所述夹座(1)被设计成通过仪器进行操作。

[0155] 52. 根据声明35~51中任一项所述的方法,其中,所述PEG衍生物具有约6000Da至约10000Da之间的分子量。

[0156] 53. 根据声明35~52中任一项所述的方法,其中,所述循环核酸包含循环DNA。

[0157] 54. 根据声明35~53中任一项所述的方法,其中,所述方法进一步包含使用冲洗溶液冲洗的步骤,从而冲洗所述固体载体,其中所述冲洗溶液不含醇,优选其中所述冲洗溶液不含乙醇和异丙醇。

[0158] 55. 根据声明35~54中任一项所述的方法,其中,所述方法可与包含对乙醇和/或异丙醇类溶剂敏感的组分的一次性夹座兼容。

[0159] 在本文中可互换使用的术语“循环核酸”和“不含细胞的核酸”是指在生物流体中发现的核酸,诸如DNA的片段和/或RNA的片段。典型地,其是指从血流或者不含或不再含有细胞的生物流体(诸如血浆或血清)中的细胞释放的核酸。

[0160] 在一个实施方式中,所述生物流体可以是血浆、血清或尿液。优选地,所述生物流体是血浆或血清。

[0161] 术语“血清”是指血液的组分,其既非血细胞也非凝血因子,该术语是指除去了纤维蛋白原的血浆。

[0162] 术语“血浆”定义了不含细胞的血液的无色水状流体,但是其中悬浮有血细胞(红细胞、白细胞、血小板等),含有营养物质、糖、蛋白质、矿物质、酶等。

[0163] 术语“二氧化硅”是指SiO₂晶体和任何其它形式的二氧化硅,特别是非晶氧化硅和

玻璃粉末、烷基二氧化硅、硅酸铝(沸石)或者用-NH₂活化的二氧化硅。

[0164] 优选地,本发明涉及从生物流体中提取循环核酸的方法,该方法包含以下步骤:a)提供假定含有循环核酸的生物流体;b)使所述生物流体接触:包含至少一种离液剂的裂解溶液;包含设计用于配合循环核酸的至少一部分的至少一种PEG衍生物的结合溶液,其中该结合溶液不含乙醇和异丙醇;能够捕获循环核酸的至少一部分的固体载体;和c)从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述固体载体。

[0165] 在一个实施方式中,可以通过任何顺序使所述生物流体与裂解溶液、结合溶液和固体载体接触来进行步骤b)。

[0166] 在一个实施方式中,所述结合溶液可进一步包含至少一种表面活性剂。该表面活性剂可以是例如聚山梨酯20 (polysorbaat 20) (Tween®20、PEG (20)脱水山梨醇单月桂酸酯 (PEG (20) sorbitaan monolauraat)、或聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯 (polyoxyethyleen sorbitaan monolauraat))。

[0167] 在一个实施方式中,循环核酸可以包含短链循环核酸和长链循环核酸。

[0168] 在一个实施方式中,固体载体能够捕获短链循环核酸的至少一部分。

[0169] 在一个实施方式中,所述方法可进一步包括在步骤a)和步骤b)之间的过滤步骤,以弃去存在于生物流体中的碎片的至少一部分。

[0170] 在一个实施方式中,所述方法可以进一步包括在步骤c)之后的释放步骤,从而释放被所述固体载体捕获的循环核酸的至少一部分,以便回收包含在所述生物流体中的循环核酸的至少一部分。

[0171] 在一个实施方式中,可以通过使用加热器与流体运动结合从所述固体载体释放被所述固体载体捕获的循环核酸的至少一部分。

[0172] 在一个实施方式中,所述方法可进一步包括在步骤c)之后的核酸扩增步骤,以扩增存在于所述生物流体中的循环核酸。

[0173] 在一个实施方式中,通过所述固体载体和所述循环核酸之间的静电相互作用,所述固体载体能够捕获存在于所述生物流体中的所述循环核酸的至少一部分。

[0174] 在一个实施方式中,固体载体可以包含至少一种膜。在一个实施方式中,固体载体可以包含能够捕获循环核酸的至少一部分的至少一种膜。在一个实施方式中,固体载体可以包含至少一种二氧化硅膜。在一个实施方式中,固体载体可以包含能够捕获循环核酸的至少一部分的至少一种二氧化硅膜。在这些实施方式中,在步骤b)中,所述生物流体可以先与裂解溶液和固体载体接触,以便将循环核酸的至少一部分捕获在所述固体载体上,然后可以使生物流体接触结合溶液以便除去蛋白质的至少一部分。

[0175] 在一个可替代性的实施方式中,固体载体可以包含多个颗粒。在一个实施方式中,固体载体可以包含能够捕获循环核酸的至少一部分的多个颗粒。在这些实施方式中,在步骤b)中,所述生物流体可首先与裂解溶液和结合溶液接触,然后可以使生物流体与固体载体接触,以便将循环核酸的至少一部分捕获在固体载体上。

[0176] 在一个实施方式中,所述颗粒可以是硅烷化珠粒、氧化物珠粒或磁珠粒。在一个实施方式中,所述颗粒可以选自于由硅烷化颗粒、氧化物颗粒和磁性颗粒组成的组。

[0177] 如本文中所使用的术语“颗粒”是指具有0.5~5.0μm尺寸的颗粒,优选1.0~5.0μm,优选2.0~4.0μm。此类颗粒在核酸纯化技术中是已知的。示例性的颗粒可以具有3μm的颗

粒尺寸。颗粒(优选硅烷化颗粒、氧化物颗粒或磁性颗粒)的尺寸可以使用激光衍射来确定,例如使用Mastersizer (Malvern, Worcestershire, UK)。颗粒的尺寸可以视为平均尺寸。颗粒的尺寸可以是横跨最大宽度的尺寸。

[0178] 术语“颗粒”和“珠粒”在本文中可以互换使用。

[0179] 术语“硅烷化颗粒”是包含SiO₂或任何其它形式的二氧化硅(特别是非晶氧化硅或玻璃粉末、烷基二氧化硅、硅酸铝(沸石)或者用-NH₂活化的二氧化硅)的颗粒。

[0180] 术语“硅烷化颗粒”和“二氧化硅颗粒”在本文中可以互换使用。

[0181] 术语“氧化物颗粒”是指氧化硅(SiO₂)颗粒或金属氧化物颗粒,诸如优选氧化铁颗粒。

[0182] 术语“磁性颗粒”是指易于被磁力吸引的颗粒。

[0183] 所述颗粒可以是包覆的颗粒。

[0184] 在一个实施方式中,固体载体可以包含多个磁性颗粒。在一个实施方式中,固体载体可以包含多个超顺磁性颗粒。

[0185] 在一个实施方式中,在步骤c)中,通过使用孔隙度低于所述颗粒的最短尺寸的至少一种过滤器(38),从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0186] 在如本文所教导的方法的进一步实施方式中,在步骤c)中,通过磁致动从所述结合溶液和从所述生物流体中分离出所述颗粒的至少一部分。

[0187] 在一个实施方式中,所述固体载体(特别是所述颗粒)从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体的分离,可以通过使用能够保留所述颗粒的过滤器的过滤来进行。

[0188] 在一个实施方式中,所述固体载体(特别是所述颗粒)从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体的分离,可以通过使用不结合核酸的过滤器的过滤来进行。

[0189] 在一个实施方式中,步骤c)的从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物流体中分离所述固体载体可以通过使用能够保留颗粒并且不结合核酸的至少一种过滤器的过滤来进行。

[0190] 此种过滤器有利地允许保留所有所述颗粒并且不结合任何DNA。

[0191] 在一个实施方式中,所述过滤器可以由亲水性材料组成。

[0192] 在一个实施方式中,过滤器可以是聚醚砜(PES)过滤器、硼硅酸盐玻璃微纤维过滤器、纤维素过滤器、或不对称的聚砜过滤器。

[0193] 不对称的聚砜过滤器的一个例子是Vivid™血浆分离膜(Pall Corporation)。

[0194] 在一个实施方式中,过滤器可以基本上由聚醚砜(PES)组成或基本上由聚醚砜(PES)制成。优选地,所述过滤器是PES过滤器。PES过滤器有利地允许保留所有的颗粒,同时不会结合任何核酸(例如,DNA)或蛋白质。与此相反,许多现有技术材料诸如聚四氟乙烯(PTFE)过滤器会吸收蛋白质或核酸。PES过滤器有利地允许毫升体积的液体的容易过滤(诸如超过30毫升的液体)。PES过滤器有利地允许所有液体通过而不会存在显著的压力增加。此种PES过滤器还是有利的,因为其对于在如本文所教导的方法中所使用的化学品和温度是惰性的。

[0195] 在一个实施方式中,PES过滤器可以具有0.45μm的孔径。此种孔径能够确保完全捕获所述颗粒。在一个实施方式中,PES过滤器可以是非对称的,借此该过滤器的一侧具有的

孔的孔径小于该过滤器的另一侧的孔的孔径。例如, PES过滤器可以在该过滤器的一侧具有约20 μm 的孔径, 在该过滤器的另一侧上其减少至0.45 μm 孔径。此种PES过滤器有利地允许在低跨膜压力下实现高体积流量。

[0196] 在一个实施方式中, 所述方法可以是在夹座(1)中进行的自动化的方法, 所述夹座(1)被设计成通过仪器进行操作。

[0197] 在一个实施方式中, 所述PEG衍生物可以具有在约6000Da至约10000Da之间的分子量。

[0198] 在一个实施方式中, 所述循环核酸可以包含循环DNA。

[0199] 在一个实施方式中, 结合溶液不含醇。在一个实施方式中, 结合溶液可以不包含醇。

[0200] 如本文中使用的术语“醇”是指其中羟基官能团($-\text{OH}$)结合至饱和碳原子的任何有机化合物。优选地, 所述醇是一元醇, 诸如甲醇(CH_3OH); 乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$); 异丙基醇, 2-丙醇、或异丙醇($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$); 丁基醇或丁醇($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$); 戊醇($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$); 或十六烷-1-醇($\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{OH}$)。

[0201] 在优选的实施方式中, 所述醇是乙醇和/或异丙醇。

[0202] 在一个实施方式中, 所述方法可以进一步包含使用冲洗溶液冲洗的步骤, 以便冲洗所述固体载体。例如, 可以在从所述裂解溶液、从所述结合溶液和从所述生物液体中分离出所述固体载体后, 冲洗所述固体载体。在一个实施方式中, 所述方法可以进一步包括在步骤c)之后使用冲洗溶液冲洗的步骤, 以便冲洗所述固体载体。

[0203] 在一个实施方式中, 所述一种或多种冲洗溶液可以不含醇。在一个实施方式中, 所述一种或多种冲洗溶液可以不包含醇。优选地, 所述一种或多种冲洗溶液不含乙醇和异丙醇。

[0204] 在一个实施方式中, 所述结合溶液和一种或多种冲洗溶液可以不含醇。在一个实施方式中, 所述结合溶液和一种或多种冲洗溶液可以不包含醇。优选地, 所述结合溶液和一种或多种冲洗溶液不含乙醇和异丙醇。

[0205] 在一个实施方式中, 所述结合溶液、所述裂解溶液、所述一种或多种冲洗溶液、和所述洗脱溶液可以不含醇。在一个实施方式中, 所述结合溶液、所述裂解溶液、所述一种或多种冲洗溶液和所述洗脱溶液可以不包含醇。优选地, 所述结合溶液、所述裂解溶液、所述一种或多种冲洗溶液、和所述洗脱溶液不含乙醇和异丙醇。

[0206] 在一个实施方式中, 所述方法可以与包含对乙醇和/或异丙醇类溶剂敏感的组分的一次性夹座兼容。

附图说明

[0207] 参考附图通过以下阐明的详细说明来进一步说明本发明, 所述附图代表从生物流体中提取循环核酸的方法的示例性和说明性的实施方式, 其中:

[0208] 图1是设计用于实施根据本发明的实施方式的方法的夹座的示意图。

具体实施方式

[0209] 在本实施方式中, 根据本发明所述的从生物流体中提取ciNA的方法是使用一次性夹座1进行的, 如图1所示, 其设计成由仪器(未示出)进行操作。夹座1由容器2形成, 容器2包

含界定容器2的宽度的两个矩形的主面(第一主面3和第二主面4),如图1所示。第一主面3设计成与仪器相对放置。第二主面4包含设计成由操作者功能化的提取区5。

[0210] 夹座1包含六个回路(circuit)6,所述回路6与定位在第一主面3和第二主面4之间的一个收集室7流体连接。每个回路6包含:

[0211] -在一侧与提取表面5流体连接并且在相对侧与通道9流体连接的端口8;

[0212] -进一步包含阀10的通道9。

[0213] 每个端口8被设计用于接收一个管11。为此,每个管11包含定位在所述管的一个末端并且设计成当所述管11与夹座1的提取区5垂直定位时被插入到一个端口8中的尖端12。尖端12进一步包含通到所述管11的内体积的通孔13。关于阀10,每个阀10由仪器操作以控制一个端口8和收集室7之间的流体连接。

[0214] 在这一方面,功能化所述夹座1的所述六个回路6是:

[0215] -样品回路,其包含设计成接收样品管15的样品端口14,所述样品端口14与包含样品阀17的样品通道16流体连接;

[0216] -第一冲洗回路,其包含设计成接收第一冲洗管19的第一冲洗端口18,所述第一冲洗端口18与包含第一冲洗阀21的第一冲洗通道20流体连接;

[0217] -第二冲洗回路,其包含设计成接收第二冲洗管23的第二冲洗端口22,所述第二冲洗端口22与包含第二冲洗阀25的第二冲洗通道24流体连接;

[0218] -洗脱回路,其包含设计成接收冲洗管27的洗脱端口26,所述洗脱端口26与包含洗脱阀29的洗脱通道28流体连接;

[0219] -核酸回路,其包含设计成接收核酸管31的核酸端口30,所述核酸端口30与包含核酸阀33的核酸通道32流体连接;

[0220] -废料回路,其包含设计成接收废料管35的废料端口34,所述废料端口34与包含废料阀37的废料通道36流体连接。

[0221] 根据本发明的方法通过提供包含ciNA的生物流体为起始。所述生物流体由包含待确定浓度的ciDNA的5ml血浆组成,所述ciDNA进一步包含短链ciDNA和长链ciDNA。

[0222] 在本案例中,收集室7配备有聚醚砜(PES)过滤器38,其设计成收集能够捕获ciDNA的至少一部分的固体载体。在本案例中,所述固体载体包含多个磁性颗粒(未示出)。为此,过滤器38具有低于所述磁性颗粒的最短尺寸的孔隙度。另外,收集室7接触包含在仪器中的加热器(未示出)以加热收集室7。

[0223] 在本实施方式中,所述磁性颗粒是磁性二氧化硅珠粒,其设计成通过静电相互作用捕获并然后释放ciDNA的至少一部分。所述磁性二氧化硅珠粒在酸性介质中带正电荷,由此允许捕获带负电荷ciDNA的至少一部分。在碱性介质中,所述磁性二氧化硅珠粒转变成带负电荷,由此促进捕获的ciDNA的释放。有利地,此种磁性二氧化硅珠粒还可以通过放置在收集室7附近的磁石由磁致动来收集。在此处未示出的另一个实施方式中,所述固体载体包含膜,优选二氧化硅膜。

[0224] 在开始提取包含在血浆中的ciDNA之前,由操作者制备根据本发明所述的提取方法所需的两种溶液,第一溶液和第二溶液。第一溶液是结合溶液,其包含4mL的PEG 8000(CAS号25322-68-3)、100 μ l的Tweeen® 20(CAS号9005-64-5)和裂解缓冲液(量足够至40ml)。第二溶液是冲洗溶液,其包含在pH 3下在水(分子生物学等级)中释稀六倍的柠檬酸

钠20nM。然后,将夹座1装在仪器上,并且将样品管15、第一冲洗管19、第二冲洗管23、洗脱管27、核酸管31和废料管35插入到它们相应的端口8中。因此,在本实施方式中,当阀10处于打开位置时,每个管11与收集室7流体连接。另外,将1ml裂解溶液加载在第一冲洗管19中,将1ml冲洗溶液加载在第二冲洗管23中,将1100μl Tris缓冲液加载到洗脱溶液管27中。所述裂解溶液包括包含胍鎧盐的至少一种离液剂(在本案例中)。

[0225] 在本实施方式的第一步骤中,通过额外的过滤器(未示出)过滤血浆以弃去血浆中存在的碎片的至少一部分,然后将过滤的血浆加载到样品管15中。

[0226] 然后,在第二步骤中,分别使用10ml裂解溶液和200μl二氧化硅珠粒溶液将包含在样品管15中过滤的血浆在室温下培育10分钟。在本实施方式中,裂解溶液的目的在于除去结合到血浆中存在的ciDNA的蛋白质和囊泡的至少一部分。该第二步骤是初始捕获步骤,其允许固体载体捕获血浆中存在的长链ciDNA的至少一部分。

[0227] 然后,将如上所述制备的结合溶液9ml加载到样品管15中以组成反应混合物,所述反应混合物在样品管15中仍然在室温下培育5分钟。随后,仪器打开与样品管15流体连接的样品通道16的样品阀17,由此允许反应混合物转移到收集室7中。然后,通过能够收集磁性二氧化硅珠粒的至少一部分的聚醚砜(PES)过滤器38过滤所述反应混合物,仪器打开废料阀37将流过的流体转移到废料管35中。

[0228] 在下一步骤中,仪器依次操作第一冲洗阀21和第二冲洗阀25,以冲洗收集在过滤器38上的磁性二氧化硅珠粒。因此,首先,包含在第一冲洗管19中的裂解溶液接触收集在过滤器38上的磁性二氧化硅珠粒,并且其次,包含在第二冲洗管23中的冲洗溶液接触收集在过滤器38上的磁性二氧化硅珠粒,仪器打开废料阀37将流过的流体转移到废料管35中。

[0229] 在两步骤过程中操作捕获在磁性二氧化硅珠粒上的ciDNA的释放。首先,仪器操作洗脱阀29以使收集在过滤器38上的磁性二氧化硅珠粒与包含在洗脱管27中的1000μl Tris缓冲液接触,以中和带正电荷的磁性二氧化硅珠粒,再次通过仪器打开废料阀37将流过的流体转移到废料管35中。其次,仪器接通加热器在70℃下加热含有磁性二氧化硅珠粒的收集室7,然后打开核酸阀31和洗脱阀29,以从洗脱管27到核酸管31通过含有磁性二氧化硅珠粒的过滤器28来回泵送100μl Tris缓冲液10分钟。因此,通过使用加热器结合Tris缓冲液的流体运动,被磁性二氧化硅珠粒捕获的ciDNA的至少一部分被释放。10分钟后,将所得到的洗脱缓冲液确定地转移在核酸管31中,以储存包含提取自血浆的ciDNA的Tris溶液。

[0230] 有利地是,在包含在核酸管中的溶液上进行核酸扩增步骤诸如PCR扩增,以扩增存在于血浆中的ciDNA。

[0231] 考虑到本文所公开的本发明的说明书和实践,本发明的其它实施方式对于本领域技术人员将变得显而易见。本文的意图在于所述说明书和实施例仅视为是示例性的,本发明的真正范围和精神由随附权利要求书来指示。

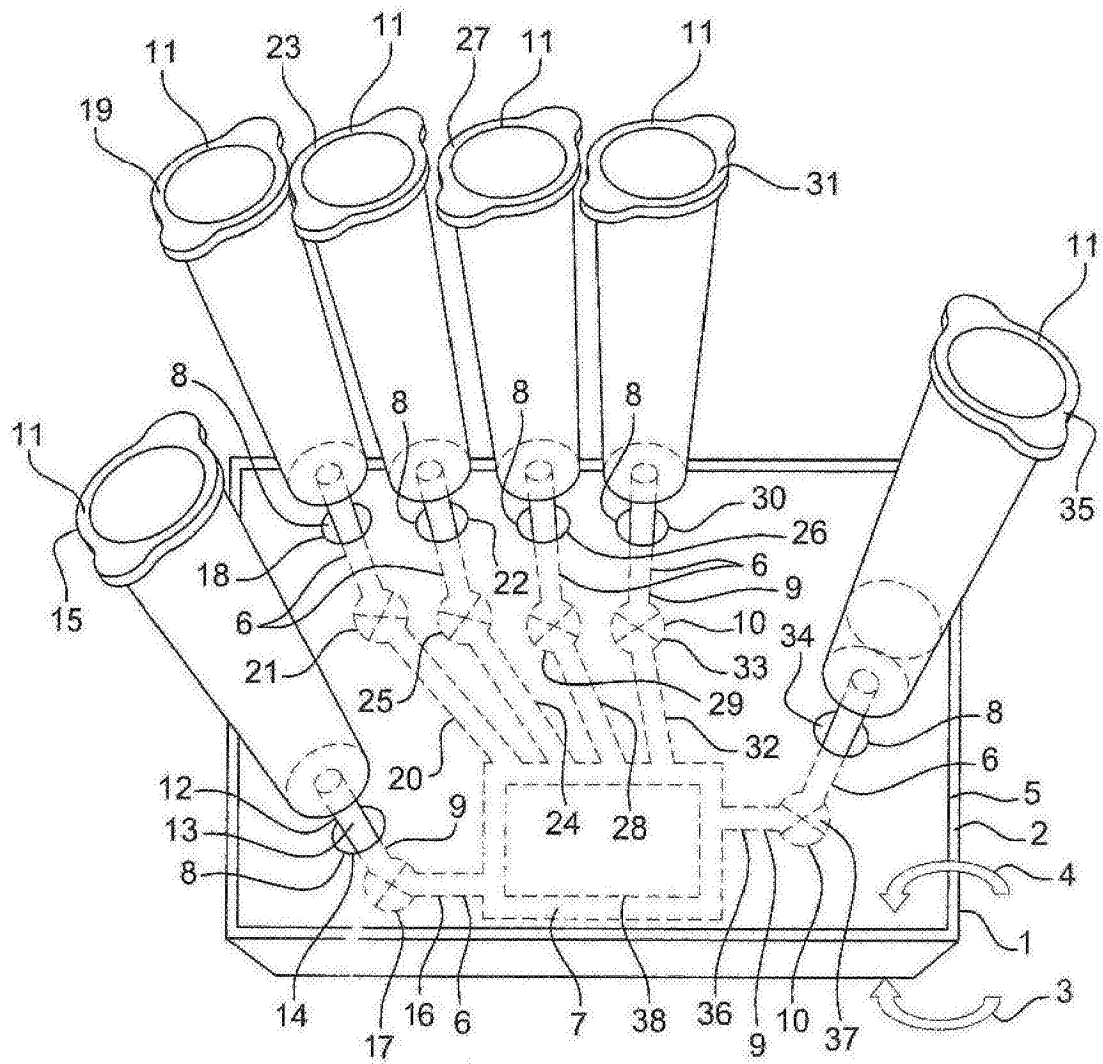


图1