



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 111902545 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 06

(21) 申请号 202080000356.9

(22) 申请日 2020.01.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111902545 A

(43) 申请公布日 2020.11.06

(66) 本国优先权数据
PCT/CN2019/070276 2019.01.03 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.03.23

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2020/070292 2020.01.03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/140975 EN 2020.07.09

(73) 专利权人 杭州诺辉健康科技有限公司
地址 310000 浙江省杭州市滨江区长河街
道江二路400号和瑞科技园S1-1层

(72) 发明人 吴扬 刘刚 吕宁 陈一友

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6806 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 107058296 A, 2017.08.18
CN 107267500 A, 2017.10.20

审查员 吴梦琦

权利要求书2页 说明书32页
序列表1页 附图9页

(54) 发明名称

尿液样本保存及DNA提取的组合物及方法

(57) 摘要

本发明提供用于保存生物样本(如尿液样本)的组合物和方法。与本发明的保存试剂混合的生物样本中的DNA分子可以在令人意外的长时间内保持稳定。此外,还提供了从生物样品中提取DNA的组合物和方法,比如尿样。

1. 一种用于保存从受试者获得的尿样的组合物,其中组合物包括pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂,其中所述pH缓冲液配制为将组合物的pH调整到5.0至6.5的范围内,其中所述螯合剂为乙二胺四乙酸且其浓度为10至25 mmol/L,其中所述表面活性剂是十二烷基硫酸钠且其浓度为5%至10% m/v ,其中该组合物不包含防腐剂、细胞固定剂或甲醛猝灭剂。

2. 权利要求1的组合物,其中pH缓冲液包括乙酸和乙酸盐。

3. 权利要求2的组合物,其中乙酸盐为乙酸钠。

4. 权利要求1的组合物,其中组成的pH值为6.0。

5. 权利要求3的组合物,其中乙酸钠的浓度为0.5至1.0 mol/L。

6. 一种用于储存的处理后尿液样品,其中处理后尿液样品包括从受试者采集的尿液样品、pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂,其中所述pH缓冲液配制为将组合物的pH调整到5.0至6.5的范围内,其中所述螯合剂为乙二胺四乙酸且其浓度为1至2.5 mmol/L,其中所述表面活性剂是十二烷基硫酸钠且其浓度为0.5%至1.5% m/v ,其中所述处理过的尿液样本不包含防腐剂、细胞固定剂或甲醛猝灭剂。

7. 权利要求6中用于储存的处理后尿液样品,其中pH缓冲液包括乙酸和乙酸盐。

8. 权利要求7中用于储存的处理后尿液样品,其中乙酸盐为乙酸钠。

9. 权利要求6中用于储存的处理后尿液样品,其中,该组合物的pH值为6.0。

10. 权利要求8中用于储存的处理后尿液样品,其中,处理后的尿样中乙酸钠的浓度为0.05至0.1 mol/L。

11. 一种处理尿液样本以供储存的方法,包括将从受试者采集的尿液样本与权利要求1至5中的任何一种组合物混合。

12. 权利要求11的方法,其中,pH缓冲液是乙酸钠,且处理后的尿液样本中的乙酸钠浓度为0.05至0.1 mol/L。

13. 权利要求11中的方法,其中,处理后尿液样本中的EDTA浓度为1至2.5 mmol/L。

14. 权利要求11的方法,其中,处理后尿液样本中的SDS浓度为0.5% ~ 1.5% m/v 。

15. 一种储存从受试者采集的尿液样本的方法,包括将从受试者采集的尿液样本与pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂混合,以产生准备储存的尿液样本,其中pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂以混合物形式提供,然后与从受试者采集的尿液样本混合,其中pH缓冲液被配制成将组合物的pH调整到为5.0至6.5的范围内,其中螯合剂为乙二胺四乙酸且其浓度为1至2.5 mmol/L,其中表面活性剂是十二烷基硫酸钠且其浓度为0.5%至1.5% m/v ,其中,准备储存的尿液样本不包含防腐剂、细胞固定剂或甲醛猝灭剂。

16. 权利要求15的方法,其中pH缓冲液包括乙酸和乙酸盐。

17. 权利要求16的方法,其中乙酸盐为乙酸钠。

18. 权利要求15的方法,其中该组合物的pH值为6.0。

19. 权利要求16的方法,其中,准备储存的尿液样本中的乙酸钠的浓度为0.05至0.1 mol/L。

20. 在权利要求15的方法中,从受试者采集的尿液样本中含有受试者的细胞和至少一个病毒病原体,在尿液样本准备储存后,细胞和病毒病原体均被裂解。

21. 权利要求20的方法,其中病毒病原体是人乳头瘤病毒。

22. 权利要求15的方法,包括在4°C储存尿液样本以备储存。

23. 权利要求15的方法, 包括在室温下储存尿液样本以备储存。
24. 权利要求22的方法, 其中, 尿液样本中的DNA含量在15天至30天的储存时间后是稳定的。
25. 权利要求23的方法, 其中, 尿液样本中的DNA含量在1周至2周的储存时间后是稳定的。

尿液样本保存及DNA提取的组合物及方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求2019年1月3日提交的PCT申请PCT/CN2019/070276的优先权,这个申请的全文以引用方式并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及尿液样本保存和从尿液样本中提取DNA的组合物和方法。

[0004] 发明背景

[0005] 尿液作为一种方便、简单的生物样本,在分子诊断和疾病监测治疗领域受到越来越多的关注。在目前的临床实践中,尿液样本的储存大多依赖于低温环境,这就需要额外的设备,也导致了较高的成本。本发明提供了用于在相对较高的温度(如室温)下保存尿液样本的组合物和方法,从而有利于尿液样本的保存和运输。

[0006] 常用的尿液DNA提取试剂和方法可分为两大类。第一种方法是离心以沉淀尿液中的细胞,并提取细胞颗粒中的DNA。第二种方法是离心后丢弃细胞沉淀物,但在上清液中提取游离DNA。本发明提供了同时提取尿液中游离DNA和细胞DNA的组合物和方法,从而提高了DNA提取效率

[0007] 传统的DNA提取方法有酚氯仿法、盐析法、NaI法和硅胶固相载体法,但都存在操作复杂的缺点,不适合自动处理或大体积样品。另一方面,尿液样本的组成较为复杂,常用的DNA提取方法从尿液样本中提取的DNA往往含有抑制因子,影响下游PCR的应用。因此,仍然需要开发改进的DNA提取组合物和方法,使其适合于从尿液样本中提取DNA。

发明内容

[0008] 本发明提供用于保存从受试者获得的尿液样本的组合物。在某些实施例中,所述组合物包括、本质上包括或由pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂组成。

[0009] 在某些实施例中,pH缓冲液配制为将组合物的pH值调整到预选范围内。在某些实施例中,pH缓冲液包括乙酸和乙酸盐。在某些实施例中,预先选择的pH值范围约为5.0到6.5。在某些实施例中,该组合物的pH值约为6.0。

[0010] 在某些实施例中,乙酸盐是乙酸钠。在某些实施例中,乙酸钠的浓度约为0.5至1.0mol/L,例如,约为0.5-0.7mol/L,或约为0.6-0.7mol/L。

[0011] 在某些实施例中,螯合剂是氨基聚羧酸。在某些实施例中,螯合剂是乙二胺四乙酸(EDTA)。在某些实施例中,EDTA的浓度约为10至20mmol/L,例如,约为15至20mmol/L,约为16至20mmol/L,或约为16至18mmol/L。

[0012] 在某些实施例中,该表面活性剂为阴离子表面活性剂。在某些实施例中,阴离子表面活性剂是十二烷基硫酸氢盐。在某些实施例中,盐是钠盐,阴离子表面活性剂是十二烷基硫酸钠(SDS)。在某些实施例中,SDS的浓度约为5%到10%(m/v),例如,约为5%-8%,约为5%-7%,约为6%-8%,或约为6%-7%。

[0013] 在某些实施例中,该组合物不包含防腐剂、细胞固定剂或甲醛淬灭剂。

[0014] 本发明还提供了尿液样本的处理方法。尿液样本可以立即用于DNA提取,也可以在储存后进行提取。在某些实施例中,所处理的尿样包括从受试者收集的尿样、pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂。在某些实施例中,pH缓冲液配制为将组合物的pH值调整到预选范围内。在某些实施例中,pH缓冲液包括乙酸和乙酸盐。在某些实施例中,乙酸盐是乙酸钠。

[0015] 在某些实施例中,预先选择的pH值范围约为5.0到6.5。在某些实施例中,该组合物的pH值约为6.0。在某些实施例中,处理后的尿样中的乙酸钠浓度约为0.05至0.1mol/L,例如,约为0.05-0.07mol/L,或约为0.06-0.07mol/L。在某些实施例中,螯合剂是氨基聚羧酸。在某些实施例中,螯合剂为乙二胺四乙酸(EDTA)。在某些实施例中,处理后的尿样中的EDTA的浓度约为1至2.5mmol/L,例如,约为1.5-2mmol/L,约为1.6-2mmol/L,或约为1.6-1.8mmol/L。在某些实施例中,该表面活性剂为阴离子表面活性剂。在某些实施例中,阴离子表面活性剂是十二烷基硫酸氢盐。在某些实施例中,盐是钠盐,阴离子表面活性剂是十二烷基硫酸钠(SDS)。在某些实施例中,处理后的尿样中的SDS的浓度约为0.5%到1.5%(m/v),例如,约为0.5%-0.8%,约为0.5%-0.7%,约为0.6%-0.8%,或约为0.6%-0.7%。在某些实施例中,处理后的尿样不包含防腐剂、细胞固定剂或甲醛猝灭剂。

[0016] 本发明还提供了用于储存的处理尿液样本的方法。在某些实施例中,所述方法包括将从受试者收集的尿液样本与pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂混合,或与本发明的组合物(如本发明所述)混合。

[0017] 本发明还提供了保存从受试者收集的尿液样本的方法。在某些实施例中,所述方法包括将从受试者收集的尿液样本与pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂混合,或与本发明的组合物(如本发明所述)混合,以产生准备保存的尿液样本。在某些实施例中,pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂在与从受试者收集的尿液样本混合之前,在混合物中提供,例如本发明中描述的组合物。在某些实施例中,从受试者采集的尿液样本包含受试者的细胞和至少一种病毒病原体,且在尿液样本准备保存后,细胞和病毒病原体均被裂解。在某些实施例中,病毒病原体是人乳头瘤病毒(HPV)。在某些实施例中,包括将尿液样本保存在预定温度下,如4℃、-20℃、-80℃或室温下,以备保存。在某些实施例中,尿液样本中的DNA含量在经过15天到30天的保存时间后是稳定的。在某些实施例中,尿液样本中的DNA含量在经过1周到2周的保存时间后是稳定的。

[0018] 本发明还提供了检测从受试者采集的尿液样本中存在或不存在一种或多种分析物的方法。在某些实施例中,所述方法包括使用本文所述的经过处理的尿液样本。在某些实施例中,被分析物是病毒或来自该病毒的任何DNA分子。在某些实施例中,病毒是HPV。在某些实施例中,所述分析物的检测包括检测病毒的DNA。

[0019] 本发明还提供了用于从受试者尿液样本中提取DNA的组合物和试剂盒的集合。在某些实施例中,所述组合物或试剂盒主要包括裂解液、磁性纳米颗粒、蛋白酶、第一洗涤缓冲液、第二洗涤缓冲液、洗脱缓冲液、或者以上任何组合。

[0020] 在某些实施例中,裂解液包括异硫氰酸胍、Triton X-100、Tris-HCl、EDTA、异丙醇、或者以上任何组合。在某些实施例中,异硫氰酸胍的浓度约为2至6M。在某些实施例中,Triton X 100的浓度约为1至5%。在某些实施例中,Tris-HCl的浓度约为20~50mM,其中裂解液的pH值约为6.5。在某些实施例中,EDTA的浓度约为10至50mM。在某些实施例中,溶液其它组分都混合后再加入异丙醇。在某些实施例中,异丙醇的用量约为50%至200%(v/v)。

[0021] 在某些实施例中,异硫氰酸胍盐的浓度约为2~6M,Triton X-100的浓度约为1~5%,Tris-HCl的浓度约为20~50mm,裂解液的pH值约为6.5,EDTA的浓度约为10~50mm,或者以上任何组合。在某些实施例中,裂解液包括异硫氰酸胍、Triton X-100、Tris-HCl和EDTA。在某些实施例中,裂解液进一步包括异丙醇。在某些实施例中,异丙醇的用量约为裂解液的50%至200% (v/v)。

[0022] 在某些实施例中,异硫氰酸胍盐的浓度约为1~2M,Triton X-100的浓度约为1~2%,Tris-HCl的浓度约为5~10mM,裂解液的pH值约为6-7,EDTA的浓度约为3~5mM,异丙醇的体积约为裂解液的50%至80% (v/v),或者以上任何组合。在某些实施例中,异硫氰酸胍盐的浓度约为1.67M,Triton X-100的浓度约为1.33%,Tris-HCl的浓度约为8.33mM,裂解液的pH值约为6.5,EDTA的浓度约为3,33mM,异丙醇的体积约为裂解液的66.7% (v/v),或者以上任何组合。

[0023] 在某些实施例中,磁性纳米颗粒具有内芯层和外壳层。在某些实施例中,内芯层由核壳型磁性纳米颗粒构成,其中,外层由SiO₂构成。在某些实施例中,磁性纳米颗粒的直径约为100至1000纳米,浓度约为50mg/ml。在某些实施例中,磁性纳米颗粒的用量约为10-20μL,例如,约为20μL。

[0024] 在某些实施例中,第一洗涤缓冲液包括异硫氰酸胍、Tris-HCl、NaCl和乙醇。在某些实施例中,异硫氰酸胍的浓度约为10mM至100mM。在某些实施例中,Tris-HCl的浓度约为20至50mM,在某些实施例中,第一洗涤缓冲液的pH值约为5.0至6.5。在某些实施例中,NaCl的浓度约为50至200mM。在某些实施例中,乙醇的浓度约为40%至60% (v/v)。

[0025] 在某些实施例中,第二洗涤缓冲液包括Tris-HCl和乙醇。在某些实施例中,第二洗涤缓冲液中的Tris-HCl浓度约为10~50mM,第二洗涤缓冲液的pH值约为6.0~7.0。在某些实施例中,乙醇的浓度约为70%到80% (v/v)。

[0026] 在某些实施例中,所述洗脱缓冲液为pH值约为8.0的Tris-EDTA缓冲液。

[0027] 在某些实施例中,蛋白酶为蛋白酶K。在某些实施例中,蛋白酶K的浓度约为10至20mg/ml。。在某些实施例中,蛋白酶K的用量约为2.5至25μg,例如,约为25μg。

[0028] 本发明还提供了从受试者尿液样本中提取DNA的方法,包括使用本发明所述的用于提取DNA的试剂盒或组合物集合。

[0029] 在某些实施例中,该方法包括、本质上包括:(1)用磁性纳米颗粒和蛋白酶接触尿样以产生预处理尿样;(2)将步骤(1)中得到的预处理尿样在裂解液中裂解,产生裂解尿样;(3)用第一洗涤缓冲液洗涤步骤(2)中获得的含有尿液样本DNA的磁性纳米颗粒;(4)用第二洗涤缓冲液洗涤步骤(3)中获得的含有尿液样本DNA的磁性纳米颗粒;(5)用洗脱缓冲液将步骤(4)所收集的磁性纳米颗粒中的DNA洗脱,以获得提取的DNA。在某些实施例中,本发明所述的裂解液、磁性纳米颗粒、第一洗涤缓冲液、第二洗涤缓冲液、洗脱缓冲液、蛋白酶均如本发明所述。

[0030] 在某些实施例中,用于DNA提取方法的步骤(1)包括(a)将尿液样本与磁性纳米颗粒接触以形成混合物;(b)将混合物离心或利用磁力分离装置形成沉淀和上清;(c)将沉淀物与蛋白酶接触形成反应体系;(d)在适当的条件下,在预定的时间内加热反应系统。

[0031] 在某些实施例中,用于DNA提取的方法中的步骤(3)、(4)和/或(5)包括使用磁力架或自动核酸提取仪器。

[0032] 本发明提供了检测从受试者采集的尿液样本中是否存在分析物的方法。在某些实施例中,方法包括使用本发明所述的试剂盒或组合物集合从尿液样本中提取的DNA。在某些实施例中,被分析物是病毒,如HPV。在某些实施例中,所述分析物的检测包括检测病毒的DNA。

[0033] 在某些实施例中,所述方法包括使用本文所述的经过处理的尿液样本。在某些实施例中,所述方法还包括从处理过的尿液样本中提取DNA。在某些实施例中,从样品中提取DNA的步骤包括:(a)用磁性纳米颗粒和蛋白酶接触尿液样品以产生预处理的尿液样品;(b)将步骤(a)中获得的预处理尿样在裂解液中裂解,以产生裂解尿样;(c)用第一洗涤缓冲液洗涤步骤(b)中获得的含有尿液样本DNA的磁性纳米颗粒;(d)用第二洗涤缓冲液洗涤步骤(c)中获得的含有尿液样本DNA的磁性纳米颗粒;(e)用洗脱缓冲液将步骤(d)中收集到的磁性纳米颗粒中的DNA洗脱,以获得提取的DNA。在某些实施例中,本发明所述的裂解液、磁性纳米颗粒、第一洗涤缓冲液、第二洗涤缓冲液、洗脱缓冲液、蛋白酶均为本发明所述。

[0034] 在某些实施例中,检测受试者尿液样本中是否存在分析物的方法还用于根据尿液样本中是否存在分析物对受试者进行治疗。

[0035] 本发明还提供了从受试者尿液样本中提取DNA的方法。在某些实施例中,所述方法包括使用一种本发明所述的试剂盒。在某些实施例中,所述方法包括:(1)用磁性纳米颗粒和蛋白酶与尿样接触以对尿液样本进行预处理;(2)将步骤(1)中得到的预处理尿样在裂解液中裂解,产生裂解后的尿样;(3)用第一洗涤缓冲液洗涤步骤(2)中获得的含有尿液样本DNA的磁珠;(4)用第二洗涤缓冲液洗涤步骤(3)中得到的含有尿液样本DNA的磁珠;(5)收集步骤(4)中获得的含有尿液样本的磁性纳米颗粒;(6)用洗脱缓冲液将收集到的磁性纳米颗粒中的DNA洗脱,以获得提取的DNA。

[0036] 在某些实施例中,裂解液包括异硫氰酸胍、Triton X-100、Tris-HCl、EDTA和异丙醇。在某些实施例中,异硫氰酸胍的浓度约为1~2M。在某些实施例中,Triton X 100的浓度约为1~2%。在某些实施例中,Tris-HCl的浓度约为5~10mM。在某些实施例中,裂解液的pH约为6~7。在某些实施例中,EDTA的浓度约为3~5mM。在某些实施例中,异丙醇的体积约为裂解液的50%至80%(v/v)。

[0037] 在某些实施例中,磁性纳米颗粒有一个内核层和外壳层。在某些实施例中,内核层由磁性纳米颗粒构成。在某些实施例中,外壳层由SiO₂构成。在某些实施例中,磁性纳米颗粒的直径大约是100到1000纳米。在某些实施例中,磁性纳米颗粒的浓度约为50mg/ml。

[0038] 在某些实施例中,第一洗涤缓冲液包括异硫氰酸胍、Tris-HCl、氯化钠和乙醇。在某些实施例中,异硫氰酸胍的浓度约为50~100mm。在某些实施例中,Tris-HCl的浓度约为20~50mM。在某些实施例中,第一洗涤缓冲液的pH值约为5.0。在某些实施例中,NaCl的浓度约为50~200mm。在某些实施例中,乙醇浓度约为40%~60%(v/v)。

[0039] 在某些实施例中,第二洗涤缓冲液包括Tris-HCl和乙醇。在某些实施例中,第二洗涤缓冲液中的Tris-HCl浓度约为10~50mM。在某些实施例中,第二洗涤缓冲液pH值约为6.0。在某些实施例中,乙醇的浓度约为70%~80%(v/v)。

[0040] 在某些实施例中,洗脱缓冲液为pH值约为8.0的Tris-EDTA缓冲液。

[0041] 在某些实施例中,蛋白酶是蛋白酶K,其中蛋白酶K的浓度约为10至20mg/ml。

[0042] 在某些实施例中,本发明所述的从尿液样本中提取DNA的方法的第(1)步(“用磁性

纳米颗粒和蛋白酶与尿样接触以对尿液样本进行预处理”)步骤包括:(a)将尿液样本与磁性纳米颗粒接触形成混合物;(b)将混合物离心或利用磁力分离装置形成沉淀和上清;(c)将上述沉淀与蛋白酶接触形成反应体系;并且(d)将上述反应体系在适当的条件下加热预定的时间。

[0043] 在某些实施例中,本发明所述的方法中洗涤和/或收集磁性纳米颗粒的步骤包括使用磁力架或自动核酸提取仪。

[0044] 本发明还提供了用于检测从受试者采集的尿液样本中是否存在被分析物的方法。在某些实施例中,所述方法包括使用本发明所述的试剂盒从尿液样本中提取DNA。在某些实施例中,被分析物是病毒。在某些实施例中,病毒是人乳头瘤病毒。在某些实施例中,被分析物的检测包括检测病毒的DNA。

[0045] 本发明还提供了用于检测从受试者采集的尿液样本中是否存在被分析物的方法。在某些实施例中,所述方法包括:(1)使用16至30项权利要求中任何一项中处理后的尿液样本;并且(2)从处理过的尿液样本中提取DNA,包括:(a)用蛋白酶消化含有磁珠的预处理后尿样;(b)将步骤(a)中得到的预处理尿样及磁珠在裂解液中进行裂解及DNA结合;(c)用第一洗涤缓冲液洗涤步骤(b)中获得的含有尿液样本DNA的磁珠;(d)用第二洗涤缓冲液洗涤步骤(c)中获得的含有尿液样本DNA的磁珠;(e)收集步骤(d)所得尿液样本中的磁性纳米粒子;并且(f)用洗脱缓冲液洗脱步骤(e)中收集的磁性纳米颗粒中的DNA,以获得提取的DNA。

[0046] 在某些实施例中,裂解液包括异硫氰酸胍、Triton X-100、Tris-HCl、EDTA、异丙醇。在某些实施例中,异硫氰酸胍的浓度约为1~2M。在某些实施例中,Triton X 100的浓度约为1~2%。在某些实施例中,Tris-HCl的浓度约为5~10mM。在某些实施例中,裂解液的pH约为6~7。在某些实施例中,EDTA的浓度约为3~5mM。在某些实施例中,异丙醇的体积约为裂解液的50%至80%(v/v)。

[0047] 图表简要说明

[0048] Figure 1描述了使用或未使用本发明中保存液处理的尿液样本中 β -actin基因荧光定量PCR扩增曲线

[0049] Figure 2描述了4°C存储条件下尿液保存试剂处理的尿液样品中 β -actin内参的变化,在与尿液保存试剂混合后0~4周内。

[0050] Figure 3描述了室温存储条件下尿液保存试剂处理的尿液样品中 β -actin内参的变化,在与尿液保存试剂混合后0~4周内。

[0051] Figure 4描述了4°C存储条件下尿液保存试剂处理的尿液样品中HPV基因的变化,在与尿液保存试剂混合后0~4周内。

[0052] Figure 5描述了室温存储条件下尿液保存试剂处理的尿液样品中HPV基因的变化,在与尿液保存试剂混合后0~4周内。

[0053] Figures 6A to Figure 6D描述使用不同方法/试剂从尿液样本中提取的DNA中 β -actin或HPV基因扩增曲线。Figures 6A和6B比较了本发明的试剂和方法与Quick-DNA Urine Kit(ZYMO RESEARCH,D3061)。Figures 6C and 6D比较了本发明的试剂和方法与磁珠法尿液基因组DNA提取试剂盒(英芮诚生物技术,UDE-5005),及大体积磁珠法血浆游离DNA提取试剂(济凡生物,FM107)。

[0054] 发明详细描述

[0055] 样品保存的组分和方法

[0056] 本发明在某些实施例中提供了用于保存生物样品的组合物和方法。非限制性生物样本包括：血液、汗液、眼泪、尿液、唾液、精液、血清、血浆、脑脊液 (CSF)、粪便、阴道液或组织、痰、鼻咽吸液或拭子、泪液、粘液或上皮拭子 (颊拭子)、组织、器官、骨骼、牙齿或肿瘤等。

[0057] 在某些实施例中，生物样本是从受试者收集的尿液样本。尿样中含有受试者的细胞、感染受试者的病原体或细胞和病原体的片段和分子，被广泛应用于分子诊断。然而，如何在保持尿液样本中潜在重要分子稳定性的同时，以一种具有成本效益的方式保存收集到的尿液样本，一直是一个挑战。例如，如果尿液样本没有在相对较低的温度下被储存，来自细胞和病原体的DNA分子可能在收集尿液样本数小时或数天内迅速降解。即使尿液样本被储存在低于4°C的冰箱中，如果尿液样本不添加任何东西，在几周内，尿液样本中的DNA分子也不再适合诊断。

[0058] 本发明提供的组合物和方法能够保护生物样品中的DNA不被降解。在某些实施例中，该组合物还可以破坏样品中的细胞，以释放细胞中的DNA和可能存在于样品中的病原体中的DNA，从而便于随后的DNA提取和基于DNA的诊断。在某些实施例中，DNA从病原体中释放。在某些实施例中，DNA是样品中的无细胞DNA。在某些实施例中，DNA是泌尿循环肿瘤DNA (ctDNA)。

[0059] 在某些实施例中，本应用中的组合物在与尿液样品混合和稀释之前可以处于浓缩状态，如 $2\times$ 、 $3\times$ 、 $4\times$ 、 $5\times$ 、 $6\times$ 、 $7\times$ 、 $8\times$ 、 $9\times$ 、 $10\times$ 、 $15\times$ 、 $20\times$ 、 $25\times$ 、 $30\times$ 、 $40\times$ 、 $50\times$ 、 $60\times$ 、 $70\times$ 、 $80\times$ 、 $90\times$ 、 $100\times$ ，甚至更多，这取决于稀释比例。在某些实施例中，稀释比例也可以是 $10:1$ 、 $9:1$ 、 $8:1$ 、 $7:1$ 、 $6:1$ 、 $5:1$ 、 $4:1$ 、 $2:1$ 、 $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 、 $1:5$ 、 $1:6$ 、 $1:7$ 、 $1:9$ 、 $1:10$ 、 $1:15$ 、 $1:20$ 、 $1:25$ 、 $1:30$ 、 $1:40$ 、 $1:50$ 、 $1:60$ 、 $1:80$ 、 $1:90$ 、 $1:99$ ，以此类推。在某些实施例中，根据稀释比例，将组合物与尿样混合并由尿样稀释，从而达到处理后尿样中的最终工作浓度 ($1\times$)。

[0060] 本发明用于保存尿液样本的组合物包括pH缓冲液。在某些实施例中，PH缓冲液是适用于生物系统的缓冲液。在某些实施例中，PH缓冲液包含ACES N-(2-乙酰氨基)-氨基乙磺酸、AMP (2-氨基-2-甲基-1-丙醇)、ADA (N-(2-乙酰氨基)-亚氨基二乙酸)、BES (N,N-双-(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸)、碳酸氢盐、bicine (N,N-双(2-羟乙基)-甘氨酸)、Bis-Tris ([双-(2-羟乙基)-亚氨基]-三-(羟甲基甲烷))、Bis-Tris-Propane (1,3-双[三(羟甲基)-甲胺基]丙烷)、硼酸、甲次砷酸盐 (二甲基砷化酸)、CAPSO (3-(环己基氨基)-丙磺酸)、CAPSO 3-((环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸)、碳酸盐 (碳酸钠)、CHS (环己基氨基乙烷磺酸)、柠檬酸盐、DIPSO (3-[N-bis(羟乙基)氨基]-2-羟基丙磺酸)、甲酸盐、甘氨酸、甘氨酸、HEPES (N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-乙磺酸)、HEPPS、EPPS (N-(2-羟乙基)-哌嗪-N-3-丙磺酸)、HEPPOS (N-(2-羟乙基)-哌嗪-N'-2-羟基丙磺酸)、咪唑、马来酸、MES (2-(N-吗啉诺)-乙磺酸)、MPOS (3-(N-吗啉基)-丙磺酸)、POPSO (哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙磺酸))、磷酸盐 (磷酸盐)、管道 (哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸))、POPSO (哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙磺酸))、TAPS (3-[三(羟甲基)-甲基]-氨基-丙磺酸)、TAPSO (3-[N-三(羟甲基)-甲氨基]-2-羟基丙磺酸)、TEA (三乙醇胺)、TES (2-[Tris(羟甲基)-甲氨基]-乙磺酸)、Tricine (N-[Tris(羟甲基)-甲基]-甘氨酸)、Tris(羟甲基)-氨基甲烷和乙酸盐 (乙酸盐)。在某些实施例中，PH缓冲液是乙酸-乙酸钠系统。

[0061] 在某些实施例中，pH缓冲液能够在与尿液样本混合后将pH保持在预定范围内。在

某些实施例中,预定的pH值约为4.5到6.5,例如约4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5,以及给定范围内的任何间隔。

[0062] 在某些实施例中,pH缓冲液是醋酸-醋酸钠系统。在某些实施例,该组合物中乙酸钠的浓度可根据预先确定的稀释比例预先测定,最终工作浓度约为0.05M~0.1M,当该成分与尿样混合时,比如约0.05M、0.06M、0.07M、0.08M、0.09M、0.1M。例如,10×组合物,醋酸钠的浓度大约是0.5M到1.0M,如0.5M、0.6M、0.7M、0.8M、0.9M、1.0M,可以用尿液样本按1:9的比例稀释。

[0063] 本发明用于保存尿液样本的组成还包括螯合剂。如本文所用,螯合剂是指其分子可与单个金属离子形成多个键的物质。螯合剂包括但不限于1,1,1-三氟乙酰丙酮、1,4,7-三甲基-1,4,7-三氮杂环壬烷、2,2'-联吡啶、乙酰丙酮、茜素、酰胺肟、酰胺肟基、氨基乙基乙醇胺、氨基甲基膦酸、氨基聚羧酸、ATMP、BAPTA、浴铜灵、BDTH2、苯并三唑、双钩物、联吡啶、2吡啶,双(二环己基膦)乙烷,1,2-双(二甲基砷)苯,1,2-双(二甲基膦)乙烷,1,4-双(二苯基膦)丁烷,1,2-双(二苯基膦)乙烷,环芳烃,肉桂醛,盒状配体、儿茶酚,空穴配体,螯合树脂,Chellex 100,柠檬酸盐,柠檬酸,笼状螯合物,卟咯,穴醚,2.2.2-穴醚,杂环十四烷,大环多胺,环糊精、地拉罗司、去铁酮、去铁胺、右丙亚胺、二乙酰单肟、反式-1,2-二氨基环己烷、1,2-二氨基丙烷、1,5-二氮杂-3,7-二磷环辛烷、1,4-二氮杂环庚烷、二苯甲酰甲烷、二乙烯三胺、二甘醇二甲醚、2,3-二羟基苯甲酸,二巯基丙醇,2,3-二巯基-1-丙磺酸,二巯基琥珀酸,1,2-二甲基乙二胺,1,1-二甲基乙二胺,丁二酮肟,DIOP,二苯乙二胺,1,5-二硫环辛烷,软骨藻酸,DOTA(螯合剂),DOTA-TATE,DTPMP,EDDHA,EDDS,EDTA,EDTMP,EGTA、1,2-乙二醇,乙二胺,乙二胺二乙酸,乙二胺四乙酸,羟乙二磷酸,Fluo-4,Fura-2,没食子酸,葡萄糖酸,谷氨酸,乙二醛双(均三亚胺),草甘膦,六氟乙酰丙酮,高柠檬酸,亚氨基二乙酸,吡啶-1,异己糖酸,红藻氨酸,配体,苹果酸,金属乙酰基丙酮、金属二硫杂合物、金属冠醚、氮基三乙酸、草酸、肟、Pendetide、三胺五乙酸、戊二酸、Phanephos、菲啰啉、邻苯二胺、膦酸盐、酞菁、植物螯合素、吡啶酸、聚天冬氨酸、卟啉、3-吡啶基烟酰胺、4-吡啶基烟酰胺、邻苯三酚、水杨酸C酸、石棺碱、柠檬酸钠、二乙基二硫代氨基甲酸钠、聚天冬氨酸钠、三联吡啶、四甲基乙二胺、四苯基卟啉、三氟乙酰丙酮、巯基乙酸、TPEN、1,4,7-三氮杂环壬、磷酸三丁酯、三乙烯四胺、三磷酸钠、柠檬酸三钠、1,4,7-三噻环壬酮、TTFA、功能其变体及其任何组合。

[0064] 如本文所用,术语EDTA是指乙二胺四乙酸或其任何功能性衍生物。在某些实施例中,组合物中的EDTA浓度可以根据预先确定的稀释比例预先确定,最终工作浓度约为1至2.5mM,例如约1.0mM、1.1mM、1.2mM、1.3mM、1.4mM、1.5mM、1.6mM、1.7mM、1.8mM、1.9mM、2.0mM、2.1mM、2.2mM、2.3mM、2.4mM、2.5mM。例如,对于10×组分,EDTA的浓度约为10到25mM,例如约10mM、11mM、12mM、13mM、14mM、15mM、16mM、17mM、18mM、19mM、20mM、21mM、22mM、23mM、24mM、25mM,然后用尿液样品以1:9的比例稀释。

[0065] 本发明用于保存尿液样本的组成还包括表面活性剂。如本文所用,表面活性剂是指降低两种液体之间、气体和液体之间或液体和固体之间的表面张力(或界面张力)的化合物。在某些实施例中,表面活性剂是阳离子表面活性剂。在某些实施例中,所述表面活性剂是一种两性离子表面活性剂。在某些实施例中,表面活性剂是阴离子表面活性剂。阴离子表面活性剂的非限制性示例包括在其头部含有阴离子官能团的分子,例如硫酸盐、磺酸盐、磷酸盐、羧酸盐等。在某些实施例中,表面活性剂是十二烷基硫酸铵、十二烷基硫酸钠(十二烷

基硫酸钠、SLS或SDS)、相关的烷基醚硫酸盐、月桂酸钠(十二烷基醚硫酸钠或SLES)、肉豆蔻硫酸钠、二十二酸钠、全氟辛烷磺酸盐(PFOS)、全氟丁烷磺酸盐、烷基芳基醚磷酸盐、烷基醚磷酸盐、硬脂酸钠、TritonTMX-100、壬氧基醇-9、聚山梨酸酯、SPAN[®]、泊洛沙单体、tergitolTM、antarox[®]、pentex[®]99(二辛基磺基琥珀酸钠(DOSS))、PFOS、CalSoft[®](线性烷基苯磺酸盐)、Texapon[®](月桂基醚硫酸钠)、Darvan[®](木质素磺酸盐)或其任何组合。

[0066] 在某些实施例中,表面活性剂为SDS。该组合物中的SDS浓度可根据预先确定的稀释比例预先测定,当该组合物与尿液样品混合稀释后,最终工作浓度约为0.4~1.5%(m/v),如约0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%等。例如,对于一个10X的组分,SDS的浓度大约是4%到15%(m/v),比如4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%等,然后用尿样按1:9的比例稀释。

[0067] 在某些实施例中,本发明用于保存尿液样本的组合物不包含EDTA以外的防腐剂、细胞固定剂或甲醛猝灭剂,因此降低了总成本,并将对下游诊断的潜在抑制降到最低。

[0068] 在某些实施例中,不将上述各组分预混合形成包含各组分混合物的试剂,只要达到各组分所需的最终工作浓度,即可将上述各组分直接与尿样逐一混合。

[0069] 因此,本发明还提供用于保存和/或下游DNA提取和诊断的经处理的尿液样本。所述经处理的尿液样品包括从需要的受试者收集的尿液,以及如本文所述的pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂。

[0070] 经处理的尿液样本与从同一受试者采集的未经处理的尿液样本相比,具有更长的贮存期。在某些实施例中,诊断包括检测尿液样本中是否存在DNA分子。在某些实施例中,本发明的处理后尿液样本中的DNA分子足够稳定,可用于长时间的下游诊断。如本文所用,如果与同一受试者刚刚采集的尿液样本中的DNA分子相比没有明显降解,那么在一定时间内储存的尿液样本中的DNA分子是稳定的,因此尿液样本中的DNA分子质量和数量足以进行基于DNA的诊断,如PCR诊断。在某些实施例中,保存给定时间后的尿液样本中的DNA分子约为90%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更多来自同一个体的尿液样本中的DNA分子。

[0071] 在某些实施例中,当处理过的尿液样品在约-20℃下储存时,处理过的尿液样品中的DNA分子在约10天、20天、30天、40天、50天、60天、70天、80天、90天、100天、200天、300天、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年或更长时间后是稳定的,在用本发明的组合物处理尿液样本后。

[0072] 在某些实施例,当处理过的尿液样本在大约-20℃下储存时,处理过的尿液样品中的DNA分子在约10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23日、24日、25天、26天、27天、28天、29天、30天、35天、40天、45天、50天、55天、60天、65天、70天、75天、80天、85天、90天、95天、100天、110天、120天、130天、140天、150天、200天、250天、300天、1年、2年、3年、4年、5年或更长时间后是稳定的,在使用本发明的组合物处理尿液样本后。

[0073] 在某些实施例,当处理过的尿液样本在大约4℃储存时,处理过的尿液样品中的DNA分子在约10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23日、24日、25天、26天、27天、28天、29天、30天、35天、40天、45天、50天、55天、60天或更长时间后是稳定的,在使用本发明的组合物处理尿液样本后。

[0074] 在某些实施例,当处理过的尿液样本在室温储存时,处理过的尿液样品中的DNA分子在约3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16日、17日、18天、19天、20天,或更长时间后是稳定的,在使用本发明的组合物处理尿液样本后。这里所说的“室温”是指约15°C至25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)

[0075] 相应的,本发明还提供了在相对较低的温度(如约4°C、约-20°C或约-80°C)下或在相对较高的温度(如室温)下生产用于储存的加工尿液样本的方法。在某些实施例中,所述方法包括将从受试者收集的尿液样本与pH缓冲液、螯合剂和本发明所述的表面活性剂混合。在某些实施例中,所述方法包括将从受试者收集的尿液样本与本发明所述的组合物混合。

[0076] 本发明还提供了在相对较低的温度(如约4°C、约-20°C或约-80°C)下或在相对较高的温度(如室温)下保存从受试者收集的尿液样本的方法。在某些实施例中,所述方法包括将从受试者收集的尿样与本发明所述的pH缓冲液、螯合剂和表面活性剂混合,并将处理后的尿样保存预定的时间。在某些实施例中,所述方法包括将从受试者收集的尿液样本与本发明所述的组合物在预定的时间内混合。在某些实施例,预定的时间大约是10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23日、24日、25天、26天、27天、28天、29天、30天、35天、40天、45天、50天、55天、60天、70天、80天、90天、100天、150天、200天、250天、300年、一年、两年、三年,或者更久在相对较低的温度下(例如,大约4C、约-20、约-80摄氏度)。在某些实施例,时间大约是在室温下3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天。

[0077] 因此,在某些实施例中,本发明的加工后尿液样本可在室温下保存至少2周,或在4°C下保存至少1个月,而不发生任何显著降解。经过处理的样品在-20°C或-80°C下可以保存更长的时间。

[0078] DNA提取的组成和方法

[0079] 本发明还提供了从从受试者采集的生物样本中提取DNA的组合物和方法。在某些实施例中,生物样本取自哺乳动物受试者,例如人类。在某些实施例中,生物样本是尿液样本。非限制性生物样本包括:血液、汗液、眼泪、尿液、唾液、精液、血清、血浆、脑脊液(CSF)、粪便、阴道液或组织、痰、鼻咽吸液或拭子、粘液或上皮拭子(颊拭子)、组织、器官、骨骼、牙齿或肿瘤等。

[0080] 本发明的组合物和方法提供了一种从生物样本(如尿液样本)中提取DNA的简单而经济有效的方法。特别地,本发明的组合物和方法能够同时从生物样品中的脱落细胞和从样品中的一个或多个病原体中提取DNA。例如,在某些实施例中,本发明的DNA提取组合物和方法可以更有效地提取尿液样本中的DNA。此外,本发明的组合物和方法使自动提取DNA成为可能,从而降低了劳动强度,提高了处理通量。

[0081] 本发明提供的尿液磁珠提取方法能较好地去除PCR抑制剂,易于实现DNA自动提取。本发明的磁珠核酸提取方法产生纯度高的核酸,操作简单,易于实现自动化。在某些实施例中,这些方法在处理大体积尿液样本时更有用,从而使得基于尿液样本中DNA分子的诊断具有更高的检测灵敏度。

[0082] 在某些实施例中,本发明提供了用于从生物样本中提取DNA的试剂。在某些实施例中,生物样本是尿液样本。在某些实施例中,这些试剂包括磁性颗粒。在某些实施例中,试剂

包括蛋白酶。在某些实施例中,这些试剂还包括裂解溶液。在某些实施例中,这些试剂进一步包括第一洗涤缓冲液。在某些实施例中,这些试剂还包括第二洗涤缓冲液。在某些实施例中,所述试剂进一步包括所述洗脱缓冲液。在某些实施例中,所述试剂可以作为试剂盒提供,也可以在使用前单独提供。

[0083] 在某些实施例中,磁性颗粒和蛋白酶用于对尿液样本进行预处理并使其为DNA提取做好准备。

[0084] 在某些实施例中,使用裂解液、第一洗涤缓冲液、第二洗涤缓冲液和洗脱缓冲液从预处理尿液样本中提取DNA。

[0085] 在某些实施例中,本发明的DNA提取基于磁性颗粒,例如磁性纳米颗粒(例如,纳米磁珠)。

[0086] 在某些实施例中,磁性粒子具有磁芯,由涂层保护。该涂层防止了磁性粒子的不可逆聚集,并允许通过连接配体进行功能化以吸附DNA。在某些实施例中,磁性粒子在样品中孵育足够长的时间,以实现最佳吸附。在某些实施例中,磁性粒子包含氧化铁,例如Fe₃O₄或Fe₂O₃。在某些实施例中,通过将氧化铁材料的尺寸减小到几纳米,将其加工成磁性“颜料”,然后将磁性“颜料”封装在非磁性基质中,例如二氧化硅、聚乙烯醇(PVA)、葡聚糖、琼脂糖、琼脂糖凝胶和聚苯乙烯,这些基质可以被生物功能化并用于生命科学应用。

[0087] 在某些实施例中,磁性颗粒具有核-壳结构。在某些实施例中,磁性颗粒具有嵌入结构。

[0088] 对于核-壳结构,磁性颗粒由具有聚合物或二氧化硅表面涂层的单一超顺磁性核组成,如被SiO₂外壳包围的磁性核。在其他某些实施例中,磁性颗粒由聚苯乙烯或聚乙烯醇(PVA)核组成,核被超顺磁性颗粒包围,并由表面涂层保护。在某些实施例中,磁性颗粒具有超顺磁性颗粒与封装材料多层交替。

[0089] 对于嵌入式结构,超顺磁珠可以由单分散基体组成,如聚苯乙烯、琼脂糖或琼脂糖凝胶,这些单分散基体浸渍有多个氧化铁纳米颗粒(“磁性颜料”)。这些珠子通常直径数百纳米,用一种防止磁性颜料丢失的材料密封

[0090] 用于DNA提取的磁性粒子的非限制性例子可在美国专利号:6514688,6673631,6027945,8710211,6033878,6368800,8324372,8729252,美国专利公开号:20030087286,20150141258,20160102305,20130096292,20020086326,20050287583,20100009351,20110171640,20110008797,20180195035,20080132694,20040002594,20090131650,20160369263,20140288398,20030224366,and WO/2001/037291A1,WO/2001/045522A1,WO/1998/031840A1,WO/2005/021748A1,WO/2017/051939A1,WO/2017/137192A1,WO/2010/005444A1,WO/1992/008805A1,WO/2013/164319A1,WO/2015/126340A1,WO/2017/156336A1,WO/2009/102632A3,WO/2009/102632A2,WO/2009/012185A1,WO/2009/012185A9,WO/2009/115335A1,WO/2015/120445A1,WO/2015/123433A2,WO/2007/050327A2,WO/2007/050327A3,及WO/2013/028548A2,中找到。在此,为了所有的目的,每一个都被完整地引用合并在一起。

[0091] 在某些实施例中,磁性颗粒是羟基磁珠,涂有二氧化硅。

[0092] 在某些实施例,磁性粒子是平均直径约50nm,60nm,70nm、80nm、90nm,100nm、150nm、200nm,250nm、300nm、350nm,400nm、450nm、500nm,550nm、600nm、650nm,700nm、750nm、800nm,850nm、900nm、950nm,1000nm,或者更大的磁珠

[0093] 还提供了含有磁性颗粒的溶液。可以根据需要预先确定溶液中磁性粒子的浓度。在某些实施例中,浓度约为5mg/ml至100mg/ml,约100mg/ml至200mg/ml,约200mg/ml至300mg/ml,约300mg/ml至400mg/ml,约400mg/ml至500mg/ml或更多。在某些实施例中,浓度约为10mg/ml、约20mg/ml、约30mg/ml、约40mg/ml、约50mg/ml、约60mg/ml、约70mg/ml、约80mg/ml、约90mg/ml、约100mg/ml、约200mg/ml、约400mg/ml、约500mg/ml或更多。

[0094] 在某些实施例中,包含磁性颗粒的溶液与包含DNA的样品混合。在某些实施例中,根据样品中DNA的潜在或实际数量,预先确定了与样品混合后磁性颗粒的最终浓度。在某些实施例中,与含有DNA的样品混合后,磁性颗粒的最终工作浓度约为0.01至0.5mg/ml。在某些实施例中,最终工作浓度约为0.01mg/ml、0.02mg/ml、0.03mg/ml、0.04mg/ml、0.05mg/ml、0.06mg/ml、0.07mg/ml、0.08mg/ml、0.09mg/ml、0.1mg/ml、0.15mg/ml、0.2mg/ml、0.25mg/ml、0.3mg/ml、0.35mg/ml、0.4mg/ml、0.45mg/ml、0.5mg/ml或更多。

[0095] 在某些实施例中,在将磁性颗粒与含有DNA的样品混合后,对混合物进行预定时间的振动。在某些实施例中,可选的将混合物在混合后的一段时间内保持静止。然后以预定的速度离心混合物以沉淀磁性颗粒。在某些实施例中,除去上清液并进一步处理沉淀的磁性颗粒以提取DNA。

[0096] 在某些实施例中,沉淀的磁性颗粒由蛋白酶处理。在某些实施例中,蛋白酶是一种广谱蛋白酶。在某些实施例中,蛋白酶是丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、天冬酰胺肽裂解酶。

[0097] 在某些实施例中,丝氨酸蛋白酶是蛋白酶K (EC 3.4.21.64,蛋白酶K,内肽酶K,腐生真菌碱性蛋白酶,白色念球菌丝氨酸蛋白酶,白色念球菌蛋白酶K)。在某些实施例中,术语蛋白酶K还包括天然蛋白酶K的任何功能变体。

[0098] 还提供了一种含有蛋白酶的溶液,如蛋白酶k。可以根据需要预先确定溶液中蛋白酶的浓度。在某些实施例中,浓度约为1mg/ml到100mg/ml。在某些实施例中,浓度是1mg/ml、大约2mg/ml、大约3mg/ml、大约4mg/ml、大约5mg/ml、大约6mg/ml、大约7mg/ml、约8mg/ml、大约9mg/ml、大约10mg/ml、大约11mg/ml、大约12mg/ml、约13mg/ml、大约14mg/ml、大约15mg/ml、约16mg/ml、大约17mg/ml、大约18mg/ml、大约19mg/ml、20mg/ml、大约30mg/ml、约40mg/ml、大约50mg/ml、大约60mg/ml、约70mg/ml、约80mg/ml、约90mg/ml、约100mg/ml,或者更多。

[0099] 在某些实施例中,沉淀的磁性颗粒与包含蛋白酶的溶液混合,如蛋白酶k。在某些实施例中,混合后蛋白酶的最终浓度是预先确定的。在某些实施例中,蛋白酶与沉淀磁颗粒混合后的最终工作浓度约为5~500 μ g/ml。在某些实施例中,最终工作浓度约为5 μ g/ml、6 μ g/ml、7 μ g/ml、8 μ g/ml、9 μ g/ml、10 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml、150 μ g/ml、200 μ g/ml、250 μ g/ml、300 μ g/ml、350 μ g/ml、400 μ g/ml、450 μ g/ml、500 μ g/ml或更多。

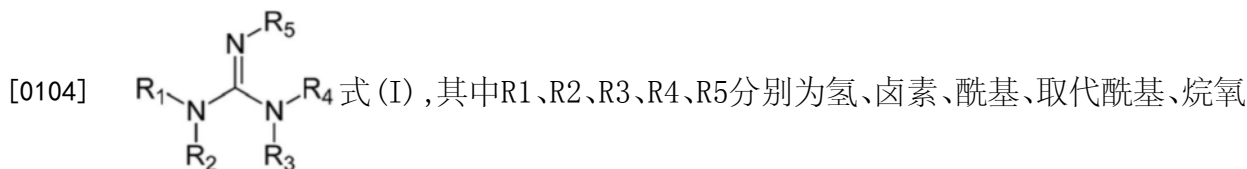
[0100] 在某些实施例中,沉淀磁颗粒和蛋白酶的混合物可以在预定的时间内保持在所需的温度下。在某些实施例中,所需温度是蛋白酶的首选酶反应温度。在某些实施例中,蛋白酶为蛋白酶K,温度约为20 $^{\circ}$ C至60 $^{\circ}$ C。在某些实施例中,温度约为50 $^{\circ}$ C至60 $^{\circ}$ C。在某些实施例中,温度约为55 $^{\circ}$ C ($\pm$ 2 $^{\circ}$ C)。

[0101] 在某些实施例中,沉淀磁性颗粒和蛋白酶的混合物可以在预定的时间内保持静止。在某些实施例中,时间大约是5分钟、大约10分钟、大约15分钟、大约20分钟、大约25分钟、大约30分钟、大约35分钟、大约40分钟、大约45分钟、大约50分钟、约55分钟、约60分钟、

约1.5小时、约2小时、3小时、大约4小时、大约5小时,或者更多。

[0102] 在某些实施例中,尿液样本经过磁性颗粒和蛋白酶的预处理后,被带到下一个阶段进行DNA提取。在某些实施例中,依次使用裂解液、第一洗涤缓冲液、第二洗涤缓冲液和洗脱缓冲液。

[0103] 在某些实施例中,裂解溶液包括具有结构式(I)的化合物:



羰基、取代烷氧羰基、芳基、取代芳基、烃基、取代烃基、芳基、取代芳基、取代芳基、异芳基、取代异芳基、杂芳基、取代杂芳基、芳烷基、取代芳烷基、杂烷基。

[0105] 在某些实施例中,该化合物包括胍。在某些实施例中,该化合物包括异硫氰酸胍或其功能衍生物。

[0106] 在某些实施例中,裂解液还包括表面活性剂、pH缓冲液、螯合剂和醇(例如,羟基官能团(OH)与碳结合的有机化合物)。在某些实施例中,表面活性剂为Triton X 100。在某些实施例中,pH缓冲液为Tris-HCl。在某些实施例中,螯合剂为EDTA。在某些实施例中,醇是异丙醇。

[0107] 在某些实施例中,裂解液的pH值约为6.2~6.8,如约6.2、约6.3、约6.4、约6.5、约6.6、约6.7或约6.8。

[0108] 在某些实施例,目前披露的裂解液可以是浓缩状态在其添加到含有DNA的样本之前(如液体样本),如2x、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、15x、20x、25x、30x、40x、50x、60x、70x、80x、90x、100x等等。根据稀释比例,在某些实施例中,稀释比例可以是10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15、1:20、1:25、1:40、1:50、1:60、1:80、1:90、1:99,等等。根据稀释比例,将裂解液与含有DNA的样品混合,最终工作浓度为1X。

[0109] 在某些实施例中,稀释比例为3:1(例如,将裂解液的3体积添加到含有DNA的样品的1体积中)。在这种情况下,裂解液的配置方法为,先配置包括约2-6M异硫氰酸胍,约1%至约5% Triton X 100、约20mM到50mM Tris-HCl、大约10到50mM EDTA的溶液,再向该溶液中加入约50%至约200% (v/v) 用量的异丙醇。

[0110] 在某些实施例中,裂解液与含有DNA的样品混合后,各组分的工作浓度(1X)为:

[0111] (a) 异硫氰酸胍约1.0M~5.0M,如约1.0M、约1.5M、约2.0M、约2.5M、约3.0M、约3.5M、约4.0M、约4.5M、约5.0M或更多;

[0112] (b) 大约0.5%到4%的Triton X-100,比如约0.5%,约0.75%,约1.0%,约1.25%,约1.75%,约2.25%,约2.55,约2.75%,约3.255,约3.5%,约3.75%,约3.75%,约4%,或更多。

[0113] (c) 大约5mM到大约30mM Tris-HCl,比如约5mM、约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM,或更多;

[0114] (d) 大约2mM到大约20mM EDTA、比如约2mM、约5mM、约8mM、约11mM、约14mM、约17mM、约20mM,或更多;

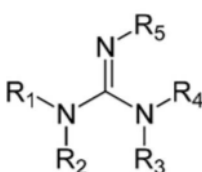
[0115] (e) 大约30%到大约150%的异丙醇用量(v/v), 比如约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约100%、约105%、约110%、约115%、约120%、约125%、约130%、约135%、约140%、约145%、约150%, 或更多。

[0116] 在某些实施例中, 将含有磁性颗粒的样品与裂解液混合后, 将容纳该混合物的容器摇动预定时间。在某些实施例中, 将容器摇晃约10至20分钟, 如约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约16分钟、约17分钟、约18分钟、约19分钟、约20分钟或更多。

[0117] 在某些实施例中, 在本发明的裂解液裂解含有磁性颗粒的样品后, 通过使用磁性物体(如磁性框架或自动核酸提取仪)收集样品中的磁性颗粒。

[0118] 在某些实施例, 收集到的磁性粒子在第一洗涤缓冲液中洗涤(洗涤液I)。

[0119] 在某些实施例中, 第一洗涤缓冲液包括具有式(I)结构的化合物

[0120]  式(I), 其中R1、R2、R3、R4、R5分别为氢、卤素、酰基、取代酰基、烷氧

羰基、取代烷氧羰基、芳基、取代芳基、烃基、取代烃基、芳基、取代芳基、取代芳基、异芳基、取代异芳基、杂芳基、取代杂芳基、芳烷基、取代芳烷基、杂烷基。

[0121] 在某些实施例中, 第一洗涤缓冲液还包括pH缓冲液、盐和醇(例如, 羟基官能团(-OH)与碳结合的有机化合物)。

[0122] 在某些实施例中, pH缓冲液为Tris-HCl。在某些实施例中, 盐是钠盐, 例如NaCl。在某些实施例中, 醇是乙醇。

[0123] 在某些实施例中, 第一洗涤缓冲液的pH值约为4.5到5.5, 如约4.5、约4.6、约4.7、约4.8、约4.9、约5.0、约5.0、约5.1、约5.2、约5.3、约5.4、约5.5。

[0124] 在某些实施例, 目前披露的第一洗涤缓冲液可以是浓缩状态在其用于洗涤磁性粒子前, 如2x、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、15x、20x、25x、30x、40x、50x、60x、70x、80x、90x、100x, 甚至更多, 这取决于稀释比例。在某些实施例中, 稀释比例可以是10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15、1:20、1:25、1:40、1:50、1:60、1:80、1:90、1:99, 以此类推。根据稀释比例, 用合适的溶剂稀释洗涤缓冲液, 达到最终的工作浓度。

[0125] 在某些实施例中, 各组分的工作浓度为:

[0126] (a) 异硫氰酸胍约50~100mM, 如约50mM、约55mM、约60mM、约65mM、约70mM、约75mM、约80mM、约85mM、约90mM、约95mM、约100mM或更多;

[0127] (b) 约20mM至约50mM的Tris-HCl, 如约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM或更多;

[0128] (c) 大约50mM到200mM NaCl, 如约50mM, 约55mM, 约60mM, 约65mM, 约70mM, 约75mM, 约80mM, 约85mM, 约90mM, 约95mM, 约100mM, 约105mM, 约110mM, 约115mM, 约120mM, 约125mM, 约130mM, 约135mM, 约140mM, 约145mM, 约150mM, 约155mM, 约160mM, 约165mM, 约170mM, 约175mM, 约180mM, 约185mM, 约190mM, 约195mM, 约200mM, 或更多;

[0129] (d) 约40%至约60% (v/v) 乙醇, 如约40%、约45%、约50%、约55%、约60%或更多。

[0130] 在某些实施例, 每0.1mg至1mg磁性粒子, 使用大约500到1000 μ l第一洗涤缓冲液。

[0131] 在某些实施例中, 样品中的磁性颗粒被清洗一段预定的时间。在某些实施例中, 将磁颗粒清洗约1~10分钟, 如约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟或更多。

[0132] 磁性颗粒在第一洗涤缓冲液中洗涤后, 利用磁性物体, 如磁力架或自动核酸提取仪, 再次收集磁性颗粒

[0133] 在某些实施例, 收集到的磁性粒子在第二洗涤缓冲液(洗涤液II)中洗涤。

[0134] 在某些实施例中, 第二洗涤缓冲液还包括pH缓冲液和醇(例如, 羟基官能团(-OH)与碳结合的有机化合物)。

[0135] 在某些实施例中, pH缓冲液为Tris-HCl。在某些实施例中, 醇是乙醇。

[0136] 在某些实施例中, 第二洗涤缓冲液的pH值约为5.5~6.5, 如约5.5、约5.6、约5.7、约5.8、约5.9、约6.0、约6.1、约6.2、约6.3、约6.4、约6.5。

[0137] 在某些实施例, 披露的第二洗涤缓冲液可以是浓缩状态, 在用于洗磁性粒子前, 如2x、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、15x、20x、25x、30x、40x、50x、60x、70x、80x、90x、100x、甚至更多, 根据稀释比例。在某些实施例中, 稀释比例可以是10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15、1:20、1:25、1:40、1:50、1:60、1:80、1:90、1:99, 等等。根据稀释比例, 用合适的溶剂稀释洗涤缓冲液, 达到最终的工作浓度。

[0138] 在某些实施例中, 各组分的工作浓度为:

[0139] (a) 约10mM至约50mM的Tris-HCl, 如约10mM、约15mM、约20mM、约25mM、约30mM、约35mM、约40mM、约45mM、约50mM或以上;

[0140] (b) 大约70%到80%的乙醇, 比如大约71%、大约72%、大约72%、大约73%、大约74%、大约75%、大约76%、大约77%、大约78%、大约79%、大约80%。

[0141] 在某些实施例, 每0.1mg到1mg磁性粒子, 使用大约500到1000 μ l第二洗涤缓冲液。

[0142] 在某些实施例中, 样品中的磁颗粒在第二洗涤缓冲液中洗涤预定的时间。在某些实施例中, 将磁颗粒清洗约1~10分钟, 如约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟或更多。

[0143] 在某些实施例中, 用第二洗涤缓冲液洗涤后, 通过使用磁性物体(如磁力架或自动核酸提取仪)再次收集磁性颗粒。

[0144] 在某些实施例中, 收集到的磁性颗粒在洗脱缓冲液中处理, 以释放分离的DNA分子。

[0145] 在某些实施例中, 洗脱缓冲液是TE缓冲液。在某些实施例中, TE缓冲液是一个1X TE缓冲液, 包括约10mM Tris和约1mM EDTA。在某些实施例中, 使用盐酸将TE缓冲液的pH值提高到8.0左右。

[0146] 在某些实施例中, 在磁颗粒被洗脱缓冲液处理之前, 它们需要在预定的温度下静置预定的时间。

[0147] 在某些实施例中, 预定时间约为1~10分钟, 如约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟或更多。

- [0148] 在某些实施例中,预选温度可以是室温、较高或较低的温度,如约-80°C到约37°C。
- [0149] 在某些实施例,洗脱步骤包括在相对较高的温度下加热包含磁性粒子的洗脱缓冲液,如约50°C到75°C,如约50°C、约55°C、约60°C、约65°C、约70°C、约75°C、或者更高。
- [0150] 尿液样本储存和/或DNA提取的试剂盒
- [0151] 本发明还提供了用于尿液样本保存和/或用于从尿液样本中提取DNA的试剂盒。
- [0152] 在某些实施例中,这些试剂盒可以包括、包含或基本上包含本文描述的一个或多个成分,这些成分可用于保存生物样本,例如尿液样本。在某些实施例中,该试剂盒包含pH缓冲液、螯合剂和/或表面活性剂。在某些实施例中,pH缓冲液为乙酸-乙酸钠;螯合剂为EDTA;表面活性剂是SDS。上述描述了用于保存尿液样本的试剂盒中各组分的浓度。在某些实施例中,试剂盒的一个或多个或所有成分以液体形式呈现。在某些实施例中,试剂盒的一个或多个或所有组分以固体形式呈现。在某些实施例中,一个或多个成分处于浓缩状态,在使用前必须稀释。在某些实施例中,一个或多个成分处于工作浓度,可以直接使用。在某些实施例中,该试剂盒包含用于制造溶液的溶剂。在某些实施例中,这些试剂盒包括用于收集尿液样本的容器。在某些实施例中,试剂盒包括一个或多个测量容器。在某些实施例中,测量容器用于测量尿液样本的体积。在某些实施例中,该试剂盒包括用于在尿液样本与试剂盒中的组分混合后保存该尿液样本的容器。
- [0153] 在某些实施例中,该试剂盒可包括、包含或基本上包含本发明中描述的用于DNA提取的一个或多个组分,如裂解液、磁性纳米颗粒、蛋白酶、第一洗涤缓冲液、第二洗涤缓冲液和/或洗脱缓冲液。在某些实施例中,裂解液包括异硫氰酸胍、Triton X 100、Tris-HCl、EDTA和异丙醇。在某些实施例中,磁性纳米颗粒具有内芯层和外壳层,其中内芯层由核壳型磁性纳米颗粒组成,其中外壳层由SiO₂组成。在某些实施例中,第一洗涤缓冲液包括异硫氰酸胍、Tris-HCl、NaCl和乙醇。在某些实施例中,第二洗涤缓冲器包括Tris-HCl和乙醇。在某些实施例中,蛋白酶为蛋白酶k。在某些实施例中,洗脱缓冲液为1×TE缓冲液,pH值约为8.0。在某些实施例中,上述描述了试剂盒中的组分浓度。在某些实施例中,试剂盒的一个或多个或所有组分以液体形式呈现。在某些实施例中,试剂盒的一个或多个或所有组分以固体形式呈现。在某些实施例中,一个或多个组分处于浓缩状态,在使用前必须稀释。在某些实施例中,一个或多个组分处于工作浓度,可以直接使用。在某些实施例中,该组分包含用于制造溶液的溶剂。在某些实施例中,这些试剂盒包括用于DNA提取的一个或多个容器。在某些实施例中,该容器适用于自动核酸提取系统。在某些实施例中,容器是多孔装置,例如48孔装置、96孔板或384孔板。在某些实施例中,这些试剂盒包括用于保存从样本中提取的DNA的容器。
- [0154] 在某些实施例中,该试剂盒可包括、包含或基本上包含本发明所述的一个或多个组分,用于保存生物样本(例如尿液样本)和从所述生物样本中提取DNA。
- [0155] 此外,本发明的试剂盒可包括指导(例如,技术操作规程)本发明所述方法的实践的教学材料。
- [0156] 疾病诊断
- [0157] 本发明还提供了检测生物样品(如从受试者采集的尿液样本)中存在或不存在或一种或多种分析物的水平的方法。在某些实施例中,所述方法包括使用本发明所述的组合物和方法从样品中提取DNA,并检测生物样品中存在或不存在一种或多种分析物。在某些实

施例中,所述生物样品已由本发明的组合物处理,其保存时间更长。在某些实施例中,经过处理的尿液样本在进行分析之前已经保存了一段时间。在某些实施例中,至少有一个分析物是样品中的DNA分子。在某些实施例中,DNA分子是疾病的生物标记物

[0158] 本发明的组合物和方法适用于许多疾病的诊断和/或治疗。在某些实施例中,疾病与泌尿生殖系统的一个或多个器官或组织相关联。在某些实施例中,疾病与病原体感染和/或癌症相关。本发明的组合物和方法提供了一种方便、无侵入性和廉价的方法来保存尿样和从尿样中提取DNA。该组合物和方法还使从同一受试者的多个样本或多个受试者的样本中提取DNA在技术和经济上成为可能。此外,本发明公开的组合物和方法适用于大规模自动尿样处理和DNA提取。尤其是成分和方法适用于分析收集自同一受试者在很长一段时间(例如,几个星期到几个月)不使用低温保存设备的有相对较大的体积(例如,约1至10毫升)的尿液样本,这使得它可以重复的以较低的成本进行分析,并监测受试者的疾病。由于所分析尿液样本的体积相对较大(与以往通常处理体积小于1ml尿液样本的方法相比),本发明的组合物和方法以较低的成本提供了更稳定可靠的诊断结果

[0159] 因此,本发明中处理过的样本可用于诊断、监测和/或治疗目的。在某些实施例中,诊断、监测和/或治疗涉及受试者中的一个或多个疾病。在某些实施例中,疾病包括但不限于疼痛障碍;体温的改变(例如发烧);神经系统功能障碍(如晕厥、肌痛、运动障碍、麻木、感觉丧失、谵妄、痴呆、记忆力丧失或睡眠障碍);与眼睛、耳朵、鼻子和喉咙有关的疾病;与循环和/或呼吸功能有关的情况(例如,脊柱疾患、肺水肿、咳嗽、咯血、高血压、心肌梗塞、缺氧、发绀、心血管衰竭、充血性心力衰竭、水肿或休克);与胃肠功能有关的情况(如吞咽困难、腹泻、便秘、胃肠道出血、黄疸、腹水、消化不良、鼻塞、呕吐);与肾脏和尿路功能相关的疾病(如酸中毒、碱中毒、液体和电解质失衡、无氮血症或尿路异常);与性功能和生殖有关的情况(如勃起功能障碍、月经紊乱、多毛、阳刚之气增多、不育、妊娠相关障碍和标准测量);与皮肤有关的情况(如湿疹、牛皮癣、痤疮、酒渣鼻、皮肤感染、免疫性皮肤病或光敏性皮肤病);与血液有关的情况(例如血液学);基因(例如,遗传疾病);与药物反应有关的情况(例如药物不良反应);以及营养(如肥胖、饮食失调或营养评估)。本发明实施例具有实用价值的其他医学领域包括肿瘤学(例如,肿瘤、恶性肿瘤、血管生成、副肿瘤综合征或肿瘤急诊);血液学(如贫血、血光病、巨细胞性贫血、溶血性贫血、再生障碍性贫血、骨髓增生异常、骨髓衰竭、真性红细胞增多症、增生性肌增生性疾病、急性髓系白血病、慢性髓系白血病、淋巴恶性肿瘤、浆细胞疾病、输血生物学或移植);止血(如凝血和血栓形成障碍,或血小板和血管壁障碍);感染性疾病(如败血症、感染性休克、不明原因发热、心内膜炎、咬伤、烧伤、骨髓炎、脓肿、食物中毒、盆腔炎、细菌(如革兰氏阳性、革兰氏阴性、杂菌(革兰氏阳性、肌动蛋白阳性、混合)、支原体、螺旋体、立克次体或支原体);衣原体;病毒(DNA、RNA)、真菌和藻类感染;原生动物和蠕虫感染;内分泌疾病;营养疾病;和代谢疾病

[0160] 在某些实施例中,疾病与泌尿生殖系统相关。在某些实施例中,疾病与男性或女性泌尿生殖系统相关联。在某些实施例中,医疗条件与组织、器官或男性泌尿生殖系统的一部分有关,如脊柱、直肠、精囊、射精管、肛门、附睾、睾丸、阴囊、输尿管、膀胱、输精管、勃起组织、阴茎、尿道、阴茎、肾脏等。在某些实施例中,疾病与组织、器官或女性泌尿生殖系统的一部分有关,如肾脏、输尿管、膀胱、尿道、子宫、输卵管、卵巢和阴道。

[0161] 在某些实施例中,疾病包括,但不限于急性肾小球肾炎、肾病综合征、慢性肾炎,肾

炎,肾病,急性肾功能衰竭、慢性肾功能衰竭,肾感染,肾盂肾炎,肾盂积水,微积分的肾脏和输尿管,降低尿路感染,膀胱炎,尿道炎,尿道炎,尿道狭窄,前列腺增生,前列腺的炎症性疾病,积水,睾丸炎,附睾炎,包皮过长、包茎过多、不孕、阴茎功能障碍、乳腺良性病变、卵巢、输卵管、盆腔细胞组织炎性疾病、腹膜炎性疾病、子宫炎性疾病(宫颈除外)、宫颈、阴道、外阴炎性疾病、子宫内膜异位症、生殖器脱垂、子宫功能障碍、性传播疾病等。

[0162] 在某些实施例中,疾病与一个或多个病原体相关联。

[0163] 在某些实施例中,病原体是病毒。在某些实施例中,病毒包括但不限于,人类免疫缺陷病毒(HIV),乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV),人类乳头状瘤病毒(HPV),单纯疱疹病毒(HSV),人类巨细胞病毒(HCMV)、人类疱疹病毒(HHV),人类内源性逆转录病毒(HERV) Zika病毒、登革热病毒,基孔肯雅病毒、埃博拉病毒,人类T淋巴细胞病毒,淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LMCV),EB病毒、水痘一带状疱疹病毒,JC病毒,细小病毒,流感、轮状病毒、人腺病毒、风疹病毒、人肠病毒、水痘病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、埃可病毒、柯萨奇病毒、天花病毒、牛痘病毒、风疹病毒、汉坦病毒或任何其他经肾病毒。在某些实施例中,病毒是HPV。

[0164] 在某些实施例中,HPV是一种高危型HPV,如HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、26、53和66。在某些实施例中,HPV是一种低危型HPV,例如HPV 6、11、42、43和44。

[0165] 在某些实施例中,qPCR用于确定给定HPV亚型的存在或不存在。在某些实施例中,通过荧光信号的累积检测到阳性反应。循环阈值(Ct)定义为荧光信号与阈值相交(如超过背景水平)所需的循环次数。在某些实施例中,阈值由qPCR仪器的软件或其他合适的方法自动确定。在某些实施例中,阈值仅设置在超过阴性对照样本中终点荧光值(例如,约0.01%、0.1%、1%、5%或10%更高)。在某些实施例中,当与HPV亚型扩增关联的Ct值在测试样本不超过($\leq$)大约35、34、33、32、31、30、或者更少,则该样本被确定包含HPV亚型(阳性结果),否则样本被确定不包含HPV亚型(阴性结果)。对于内参基因的扩增,当与内参基因扩增关联的Ct值不超过($\leq$)大约35、34、33、32、31、30、29、或者更少,则内参基因被确定为阳性的,否则内参基因扩增被确定为阴性的。当内参基因扩增结果为阴性时,且HPV基因扩增结果也为阴性时,检测结果无效。

[0166] 在某些实施例中,病原体是细菌。在某些实施例中,细菌是大肠杆菌、淋病奈瑟菌、钩端螺旋体病或结核分枝杆菌。

[0167] 在某些实施例中,病原体是沙眼衣原体、生殖支原体、阴道毛滴虫或解脲支原体

[0168] 在某些实施例中,疾病是癌症。在某些实施例中,癌症包括但不限于膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、泌尿系癌、肾癌、睾丸癌、尿路上皮癌、结直肠癌、胰腺癌和胃癌。

[0169] 在某些实施例中,本发明中处理过的样本,例如本发明中处理过的尿液样本,可用于诊断本受试者的一个或多个疾病。在某些实施例中,确定样品中与一个或多个疾病相关的一个或多个生物标记物的存在或不存在,或其水平。

[0170] 膀胱癌生物标志物包括但不限于CA9、CCL18、MMP12、TMEM45A、MMP9、SEMA3D、ERBB2、CRH、和MXRA FIXA1、载脂蛋白A1(APOA1)、载脂蛋白A2(APOA2)、酶类2(PRD2)、肝素辅因子2前体(HCII)、血清淀粉样蛋白4(SAA4)、半胱氨酸蛋白酶抑制物B、选择自启动子区域集合GDF15启动子区域、HSPA2启动子区域和TMEFF2启动子区域、ABCC13、ABCC6、ABCC8、

ALX4、APC、BCAR3、BCL2、BMP3B、BNIP3、BRCA1和BRCA2、CBR1、CBR3、CCNA1、CDH1、CDH13、CDKN1C、CFTR、COX2、DAPK1、DRG1、DRM、EDNRB、FADD、GALC、GSTP1、HNF3B、HPP1、HTERT、ICAM1、ITGA4、LAMA3、LITAF、MAGEA1、MDR1、MGMT、MINT1、MINT2、MT1GMT、MINT1、MINT2、MT1A、MTSS1、MYOD1、OCLN、p14ARF、p16INK4a、RASSF1A、RPRM、RUNX3、SALL3、SERPINB5、SLC29A1、STAT1、TMS1、TNFRSF10A、TNFRSF10C、TNFRSF10D、TNFRSF21、WWOX的启动子区域甲基化CpG岛,这些描述在美国发明专利号:20140303001和20140303001,在此,为了所有的目的,每一个都被完整地引用合并在一起。

[0171] 前列腺癌的生物标志物包括,但不限于,前列腺特异抗原(PSA)、前列腺癌抗原3(PC A3)、 α -methylacyl-CoA消旋酶、膜联蛋白A3、TMPRSS2:ERG、个人炎性细胞因子(例如,IL-1-6, IL-8, TGF- β 1)、c反应蛋白(CRP)、toll样受体(TLRs)、Neutrophil-to-lymphocyte比率,PD-1/PD-L1(B7-H1),CD276(B7-H3)CD73,肿瘤相关巨噬细胞(TAMs),细胞毒性CD8肿瘤浸润淋巴细胞(TILs),Treg肿瘤浸润淋巴细胞(TILs),以及那些描述在美国专利号:8518650、8784795、10048265、和美国实用型专利号。20100292331、20170058352、20140094380、20140106369、20130217647、20130116142、20150116133、2017001161303、201301161303、20100216131313、201401154169、20130184169、201401824961、20140041173、201404117773、20160218655、20160218682、20160176443、20160206443、2016025255887、2016025258958、2016025898500、20150276746、20130331279、201402747894、20140184169、20150024961、20080254481、20070009970、20110045053、和20140051082,在此,为所有目的,每一个都被完整地引用。

[0172] 卵巢癌生物标记物包括但不限于Cyr61、ApoA1、beta 2微球蛋白、CA125、及这些描述在美国专利号:5769074、7666583、8053198、8288110、8206934、9816995、美国实用型专利号US20090068690、20090075307、20090081685、20140274787、20130267439、20070212721、20150080229、20180196054、20080286814、20110256560、20100197561、20150168414、20070054329、20100221752、20100086948、20060029956、20180074063、20100105067、20160047815、20090087849、20100055690、20150147823、20130096022、20120027276680、20150362497、20050214760、2011027172902、20110272172902、201302171559、201300229958、20150126384、20120171694、20100227335、20150198600、20080254048、20140121127、20100227343、20140221240、20090004687,在此,为了所有的目的,每一个都被完整地引用合并在一起。

[0173] 结直肠癌生物标志物包括但不限于,BMP3、TFPI1、NDRG4、Septin9、TFPI2、OPLAH、FLI1、PDGFD、SFMBT2、CHST2、VAV3、DTX1、这些描述的美国专利号:9095549、9835626、8426150、10042983、和美国实用型专利号:20090142332、20180282815、20050014165、20170205414、20130345322、20130323253、20120040383、20080020940、20100304410、20150072341、20120264131、20170176441、20120207856、20150212088、20080286801、20160160296、20180094322、20180164320、20140045180、20140113882、201401121215、201401121215、20170108501、20170234874在此,为了所有的目的,每一个都被完整地引用合并在一起。

[0174] 肾癌生物标志物包括但不限于山梨糖醇、果糖、6磷酸山梨醇、豆蔻酸、棕榈酸和硬脂酸、aquaporin-1(AQP1)adipophilin(ADFP)、以及那些描述于美国发明专利号:8426150、

8335550、8211653、美国实用型专利号：20160245814、20140343865、20100261224、20150198600、20060084126、20110237450、20170108501、20070054282、20170240971、20110151460、20170234884、20140213475、20180068083、20160305947、20150017638、20160215349、20120207856、20080139402、20030190602、20030199685、20100233080、20110020836、20170166685、20160166685、20180171022、20070026415、20150124329、201000226344、2016002263838、20090299154，在此，为了所有的目的，每一个都被完整地引用合并在一起。。

[0175] 移行细胞癌生物标志物包括但不限于、SLC2A1、S100A13、GAPDH、KRT17、GPR C5A、P4HA1、HSD17B2、ubiquilin 2、EGF、IL1 β 、sTNFR、VEGF、CK18、vWF、FAS

[0176] 定义

[0177] 提及“一个实施例”、“某个实施例”、“一个例子”和“某个例子”表明，所述实施例或例子可以包括特定特征、结构、特征、性质、要素或限制，但并非每个实施例或例子都必须包括该特定特征、结构、特性、属性、要素或限制。此外，重复使用短语“在一个实施例中”并不一定指同一实施例，尽管它可以。

[0178] 这里所使用的术语“约”是指所参考数字的正负10%或5%。

[0179] “核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”，如这里所使用的是指至少两个核苷酸共价连接在一起。单链的描述也定义了互补链的序列。因此，核酸也包含所述单链的互补链。核酸的许多变体可用于与给定核酸相同的目的。因此，核酸还包括实质上相同的核酸及其补充物。单链提供了一种探针，可以在严格的杂交条件下与目标序列杂交。因此，核酸还包括在严格杂交条件下杂交的探针。核酸可以是单链或双链，也可以包含双链和单链序列的一部分。核酸可以是DNA，包括基因组DNA和cDNA、RNA，或其混合物，核酸可能包含脱氧核糖核苷酸及核糖核苷酸组合，和碱基的组合包括尿嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶，胞嘧啶，鸟嘌呤、肌苷、黄嘌呤次黄嘌呤，异胞嘧啶和异鸟嘌呤核酸，可以通过化学合成或重组的方法获得。

[0180] 本发明中所指的核酸“变体”是指(i)所述核苷酸序列的一部分；(ii)参考核苷酸序列或其部分的互补链；(iii)与所述参考核酸或其互补链实质上相同的核酸；或(iv)在严格条件下与所述参考核酸、其互补链或其实质上相同的序列杂交的核酸。

[0181] 这里用的术语“诊断”是指对病理或症状进行分类，确定病理的严重程度(例如，分级或分期)，监测病理进展，预测病理结果和/或康复前景。

[0182] 短语“本质上由…组成”的意思是，该组合物或方法可以包括额外的成分和/或步骤，但仅当额外的成分和/或步骤不会实质性地改变所述组合物或方法的基本和新特性时。

[0183] 这里使用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数引用，除非上下文另有明确规定。例如，术语“化合物”或“至少一个化合物”可以包括多个化合物，包括其混合物。

[0184] 在本文中“可选的”一词用于表示“在某些实施例中提供而在其他实施例中不提供”。本发明的任何具体实施例可包括多个“可选”特征，除非这些特征冲突。

[0185] 在本文中“异丙醇的用量(V/V)”是指配制混合溶液时，加入的异丙醇的体积与包含其它所有物质的溶液的体积之比。例如，“异丙醇的用量约为50%至200%(v/v)”是指将约0.5倍至两倍体积的异丙醇加入每一倍体积的包含其它所有物质的溶液。

[0186] 在本文中“Ct值”表示循环阈值，是指荧光信号与阈值相交(如超过背景水平)所需的循环次数。Ct值与样本中的目标核苷酸含量成反比。

[0187] 本发明的某些实施例将在下面的示例中进一步描述。应该理解的是,这些例子只是作为说明。通过以上讨论和这些例子,一个熟练的技术人员可以确定本发明的本质特征,并且在不偏离其精神和范围的情况下,可以对本发明的实施例进行各种更改和修改,使其适应各种用途和条件。因此,本发明实施例的各种修改,除了在本发明中显示和描述的修改外,对于那些从上述描述中熟练掌握该技术的人来说是显而易见的。这些修改也将属于所附权利要求的范围

实施例

[0188] 实施例1尿液样本保存液的制备

[0189] 醋酸-醋酸钠缓冲液(2mol/L, pH=6.0), SDS溶液(10%(M/V)) and EDTA溶液(0.5mol/L, pH 8.4)以10:20:1的比例按体积混合,以制备尿液样本保存液。例如,若需310mL溶液,取100ml醋酸-醋酸钠缓冲液,200ml SDS溶液,和10ml EDTA溶液进行混合。

[0190] 实施例2:尿液样本DNA提取试剂的制备

[0191] 为从尿液样本中提取DNA,以下试剂需要提供:

[0192] 磁珠:商品化硅羟基磁珠,粒径为300纳米,浓度为50mg/ml

[0193] 蛋白酶K:商品化20mg/ml蛋白酶K,用去离子水稀释至10mg/ml

[0194] 裂解液:先配置包括5M异硫氰酸胍,4% Triton X 100,25mM Tris-HCl (pH 6.5), 10mM EDTA的溶液,再向该溶液中加入200%(V/V)用量的异丙醇并且调整其pH至6.5。最终的裂解液包括1.67M异硫氰酸胍,1.33% Triton X 100,8.33mM Tris-HCl,3.33mM EDTA,以及占裂解液体积66.7%的异丙醇(v/v)。

[0195] 洗涤液I:50mM异硫氰酸胍,50mM Tris-HCl (pH 5.0),100mM NaCl,60%乙醇并且调整其pH至5.0。

[0196] 洗涤液II:10mM Tris-HCl (pH 6.0)和70%乙醇并且调整其pH至6.0。

[0197] 洗脱液:1x TE (pH 8.0)。

[0198] 实施例3:验证尿液样本保存试剂的有效性

[0199] 人类尿液样本采集自多个人类受试者。每个尿液样本被分成两部分。第一部分以10:1的比例(尿液:储存液)加入实施例1中制备的保存液中,第二部分加入等量的无菌去离子水作为对照组。所有的样品都放置在37摄氏度的温度下进行热加速实验。

[0200] 分别于第0天、第4天和第7天取样。使用例2中制备的尿液DNA提取试剂提取采集样本中的DNA。提取的DNA中的 β -actin基因进行定量PCR扩增。检测 β -actin基因的引物和探针序列:CGTGCTCAGGGCTTCTTGTC(上游引物,SEQ ID NO:1),CTCGTCGCCCACATAGGAATC,(下游引物,SEQ ID NO:2),and 5'-FAM-TGACCCATGCCCACCATCACGCCC-3'BHQ1(探针,SEQ ID NO:3)。采用荧光定量PCR结果测定经过热加速后样品的DNA质量。结果如下面的表1和图1所示。

[0201] 表1:尿液样本保存试剂的验证

[0202]

	0 天					4 天					7 天				
	β-actin Ct 值					β-actin Ct 值					β-actin Ct value				
对照组 (无保存试剂)	29.67	29.83	29.8	29.68	29.58	36.9	36.58	38.04	37.29	36.79	37.41	41.04	36.34	37.04	38.07
测试组 (有保存试剂)	29.18	29.5	29.2	29.08	29.29	30.63	30.26	30.89	30.58	30.7	29.34	28.94	29.3	28.97	28.85

[0203] 结果表明,将混合尿液保存试剂的尿液样本与第0天采集的尿液样本进行比较时, β -actin基因数量和质量没有显著差异,即使在尿液样本保存在37度7天,通过qPCR Ct值进行验证。在第0天采集的尿液样本与在没有保存试剂的情况下仅在37c保存4天的尿液样本有显著差异。结果表明,该尿液保存试剂即使在高温条件下也能有效地保存尿液样品中的DNA。

[0204] 实施例4:尿样贮存试剂稳定性验证

[0205] 本实验采用例1所示的尿样保存试剂对尿液样本进行处理后,检测尿液样本的DNA稳定性。

[0206] 选取12例高危hpv阳性尿样作为研究对象。将每个尿液样本与例1中生成的尿液保存试剂按10:1的比例混合。每种混合物的等分分别在4°C和室温下保存。

[0207] 在混合物制成后的0、1、2、3和4周,使用例2中生产的DNA提取试剂从这些试样中提取DNA。采用高危人乳头瘤病毒检测试剂盒(hybribio Bio)检测HPV DNA,以确定尿液样本中DNA的稳定性。

[0208] 表2和图2证明 β -actin基因的DNA的稳定性,在4°C保存0、1、2、3、4周后,如荧光定量PCR中 β -actin基因Ct值所示。

[0209] 表3和图3证明 β -actin基因的DNA的稳定性,在室温保存0、1、2、3、4周后,如荧光定量PCR中 β -actin基因Ct值所示。

[0210] 表2:在4°C条件下含有尿液样本保存试剂的尿液样本中 β -actin稳定性。

[0211] (0至4周,如qPCR Ct值所示)

[0212]

	0 周 (ct 值)	1 周 (ct 值)	2 周 (ct 值)	3 周 (ct 值)	4 周 (ct 值)
样本 1	19.92	19.88	20.21	19.56	19.54
样本 2	17.57	21.01	19.30	19.08	19.09
样本 3	19.70	19.63	19.85	19.41	19.06
样本 4	17.57	17.83	17.55	17.71	17.36
样本 5	18.41	18.66	18.28	18.28	18.14
样本 6	17.75	18.58	18.62	18.21	18.30
样本 7	20.17	20.12	19.91	20.04	19.78
样本 8	21.76	22.13	22.01	21.85	21.85
样本 9	20.99	21.23	21.19	21.16	20.82
样本 10	17.74	18.68	18.05	18.22	17.61
样本 11	23.05	21.05	21.10	21.26	21.09
样本 12	20.66	20.71	20.72	20.64	20.27

[0213] 表3:在室温条件下含有尿液样本保存试剂的尿液样本中 β -actin稳定性。

[0214] (0至4周,如qPCR Ct值所示)

[0215]

	0 周 (ct 值)	1 周 (ct 值)	2 周 (ct 值)	3 周 (ct 值)	4 周 (ct 值)
样本 1	19.92	20.04	19.56	19.82	20.58
样本 2	17.57	17.82	17.87	17.88	17.95
样本 3	19.70	19.43	19.67	19.25	19.04
样本 4	17.57	18.57	18.13	18.36	17.19
样本 5	18.41	19.61	19.49	20.05	18.83
样本 6	17.75	19.44	18.98	20.46	18.30
样本 7	20.17	20.86	20.56	40.00	40.00
样本 8	21.76	21.95	22.13	22.07	23.43
样本 9	20.99	21.35	22.00	22.20	40.00
样本 10	17.74	18.31	18.29	18.60	18.64
样本 11	23.05	21.56	20.87	21.60	21.92
样本 12	20.66	21.26	19.84	21.01	20.76

[0216] 表4和图4证明在4℃条件下,在0、1、2、3、4周后HPV标记基因的DNA稳定性,如荧光定量PCR中 β -actin基因Ct值所示。

[0217] 表5和图5证明在室温条件下,在0、1、2、3、4周后HPV标记基因的DNA稳定性,如荧光定量PCR中 β -actin基因Ct值所示。

[0218] 表4:在4℃条件下含有尿液样本保存试剂的尿液样本中HPV基因稳定性。

[0219] (0至4周,如qPCR Ct值所示)

[0220]

	0 周 (ct 值)	1 周 (ct 值)	2 周 (ct 值)	3 周 (ct 值)	4 周 (ct 值)
样本 1	27.95	28.14	27.32	25.97	28.28

[0221]

样本 2	18.62	19.19	18.54	18.96	18.99
样本 3	20.30	20.18	20.49	20.20	20.03
样本 4	18.33	18.61	18.22	18.47	18.11
样本 5	25.11	25.27	25.11	25.29	25.16
样本 6	26.07	26.08	25.89	26.26	25.84
样本 7	22.83	22.59	22.48	21.77	22.69
样本 8	27.33	27.46	27.98	27.57	26.98
样本 9	27.30	27.30	27.15	27.52	26.39
样本 10	22.85	23.38	23.23	23.49	22.88
样本 11	24.46	23.75	24.14	24.31	24.16
样本 12	24.58	23.83	24.58	24.52	24.10

[0222] 表5:在室温条件下含有尿液样本保存试剂的尿液样本中HPV基因稳定性。

[0223] (0至4周,如qPCR Ct值所示)

[0224]

	0 周 (ct 值)	1 周 (ct 值)	2 周 (ct 值)	3 周 (ct 值)	4 周 (ct 值)
样本 1	27.95	27.15	27.03	40.00	40.00
样本 2	18.62	18.48	18.67	18.76	18.86
样本 3	20.30	20.08	20.11	20.16	20.03
样本 4	18.33	19.26	18.72	18.94	17.25
样本 5	25.11	25.71	25.65	25.96	25.19
样本 6	26.07	26.55	26.48	25.38	40.00
样本 7	22.83	22.76	23.19	23.45	22.73
样本 8	27.33	27.12	27.22	27.01	27.02
样本 9	27.30	27.05	27.23	27.80	27.37

[0225]

样本 10	22.85	23.30	22.66	23.60	23.84
样本 11	24.46	24.06	23.68	24.13	24.39
样本 12	24.58	24.95	21.09	25.16	23.89

[0226] 上述实验结果表明,将尿液样本与本发明的尿液储存试剂混合后,人类 β -actin基

因的DNA分子和尿液中的高危HPV DNA样本保存在4℃为1周,2周,3周,4周与DNA在收集尿液样本在0周,DNA以qPCR数量和质量没有显著改变。将常温保存的尿液样品与本发明的尿液储存试剂混合后,与第0周采集的尿液样品相比,1~2周后无明显变化,但3~4周后开始变得不稳定。结果表明,本发明的尿液保存试剂在处理后的样品在4℃下保存至少4周,或在室温下保存至少2周时,尿液样本中的DNA保持稳定。

[0227] 实施例5:验证尿液样本DNA提取试剂的有效性

[0228] 使用不同方法或试剂盒提取含有高危型HPV的尿液样本中的DNA。所述方法或试剂盒包括Quick-DNA Urine Kit (ZYMO RESEARCH, D3061), 磁珠法尿液基因组DNA提取试剂盒(英芮诚生化, UDE-5005), FineMag磁珠法大体积血浆游离DNA提取试剂(济凡生物科技, FM107), 以及本发明的尿液DNA提取试剂。在DNA提取之后, 使用凯普高危型人乳头瘤病毒检测试剂进行实时荧光定量PCR检测HPV。按照每一种试剂的说明书进行操作。

[0229] 使用本发明的DNA提取试剂从尿液样本中提取DNA, 采取了以下步骤:

[0230] 1. 尿液样本预处理: 将10ml尿液样本加入50ml离心管中。加入20μl羟基磁珠至样本中并涡旋混匀。试管以10000rpm离心5min。之后小心弃去上清, 将500μl沉淀加入新的1.5ml离心管。加入2.5μl蛋白酶K至上述沉淀中。将离心管在56℃金属浴孵育30min。

[0231] 2. 分装提取试剂: 裂解液、洗液I、洗液II及洗脱液分别以750μl, 600μl, 600μl, and 50μl, 加入96孔深孔提取板中。

[0232] 表6展示了一个可能的样本加载计划。其中从A到H的8行中, 每一行可以对2个样本进行DNA提取。对于一个96孔板, 可以从16个样本中提取DNA。

[0233] 表6. 在96孔板上提取DNA的样品装载计划

[0234]

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

[0235]

A	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液
B	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液
C	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液
D	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液
E	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液
F	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液
G	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液
H	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液	裂解液	裂解液	洗液 I	洗液 II		洗脱液

[0236] 在第1,2,7,and 8列的每一孔,750 μ l裂解液和250 μ l上述处理后的尿液样品进行混合。600 μ l洗液I加入至第3和9列的每一孔。600 μ l洗液II加入至第4和10列的每一孔。50 μ l洗脱液加入至第6和12列的每一孔。

[0237] 3.使用自动DNA提取设备提取DNA:上述含有样品的96孔板被放入自动DNA提取设备中(西安天隆,NP968-S)。按照操作说明书,使用如下程序:

[0238] Table 7:自动DNA提取设备程序

[0239]	步骤	混匀时间	磁吸时间	体积	混匀速度	温度	孔位	描述	等待时间
	1	10 min	60s	1000 μ l	Level 7		1	裂解结合	
	2	5 min	60s	1000 μ l	Level 7		2	裂解结合	
[0240]	3	3 min	60s	600 μ l	Level 7		3	洗涤	
	4	2 min	60s	600 μ l	Level 7		4	洗涤	
	5	5 min	60s	50 μ l	Level 7	65 $^{\circ}$ C	6	洗脱	5 分钟
	6	2 min		50 μ l	Level 6		4	弃磁珠	

[0241] 使用不同的方法/试剂盒从尿液样本中提取DNA分子后,使用荧光定量PCR方法检测HPV基因,以确定这些方法/试剂盒的DNA提取效率。每一种DNA提取方法或试剂盒使用等量的尿液,并且每一种提取方法或试剂盒使用相同体积的DNA进行PCR以便做出有意义的比较。结果如图6A至图6D。

[0242] 结果表明,与现有的商业产品相比,本发明的试剂和方法提供了一种从尿液样本中提取DNA更有效的方法。

[0243] 实施例6.尿液DNA提取试剂各组分最佳配方优化

[0244] 为了提高尿液中DNA提取纯化的提取纯化效率,对本提取试剂的裂解液成分、洗涤液I成分、洗涤液II成分、磁珠用量、蛋白酶k用量进行了优化。

[0245] 裂解液配方优化:在5M异硫氰酸胍浓度不变及异丙醇用量为200% (V/V) 的情况下,分别对4% TritonX-100搭配5mM、10mM、25mM、50mM、100mM共5个不同浓度的EDTA的裂解液配方,以及10mM EDTA搭配1%、2%、4%、6%、8%共5个不同浓度的TritonX-100的裂解液配方进行了优化;使用上述不同配方的裂解液(见表8)对同一份尿液样本进行DNA提取。在这里的描述中,“浓度”是指溶液中各组分在加入异丙醇之前的浓度。洗涤液采用75%乙醇,洗脱液采用1*TE,磁珠采用300nm羟基磁珠,蛋白酶K浓度为10mg/ml,尿液DNA提取方法使用本发明中实施例3中的方法。对经不同配方裂解液提取的尿液DNA中的 β -actin基因进行定量PCR扩增检测,通过 β -actin基因的含量(与测得的Ct值呈反比)来判断不同配方裂解液的提取效率。检测 β -actin基因的引物和探针序列:CGTGCTCAGGGCTTCTTGTC(上游引物,SEQ ID NO:1),CTCGTCGCCCACATAGGAATC,(下游引物,SEQ ID NO:2),and 5'-FAM-TGACCCATGCCCACCATCACGCCC-3'BHQ1(探针,SEQ ID NO:3)。结果如下表9所示。

[0246] 表8:裂解液配方

[0247]		异硫氰酸胍	Triton X-100	Tris-HCl	EDTA	异丙醇 (V/V)	pH
	配方1	5M	4%	25mM	5mM	200%	6.5

配方2	5M	4%	25mM	10mM	200%	6.5
配方3	5M	4%	25mM	25mM	200%	6.5
配方4	5M	4%	25mM	50mM	200%	6.5
配方5	5M	4%	25mM	100mM	200%	6.5
配方6	5M	1%	25mM	10mM	200%	6.5
配方7	5M	2%	25mM	10mM	200%	6.5
配方8	5M	4%	25mM	10mM	200%	6.5
配方9	5M	6%	25mM	10mM	200%	6.5
配方10	5M	8%	25mM	10mM	200%	6.5

[0248] 表9:不同配方裂解液提取尿液样本后 β -actin基因检测结果

[0249]

配方	检测次数	β -actin C _T	C _T 平均值	配方	检测次数	β -actin C _T	C _T 平均值
配方 1	第 1 次	32.09	31.74	配方 6	第 1 次	31.96	31.84
配方 1	第 2 次	31.86		配方 6	第 2 次	31.65	
配方 1	第 3 次	31.88		配方 6	第 3 次	32.00	
配方 1	第 4 次	31.49		配方 6	第 4 次	31.86	
配方 1	第 5 次	31.40		配方 6	第 5 次	31.72	
配方 2	第 1 次	32.57	31.21	配方 7	第 1 次	32.96	32.13
配方 2	第 2 次	25.56		配方 7	第 2 次	31.75	
配方 2	第 3 次	33.15		配方 7	第 3 次	32.06	
配方 2	第 4 次	32.21		配方 7	第 4 次	32.13	
配方 2	第 5 次	32.57		配方 7	第 5 次	31.74	
配方 3	第 1 次	31.79	31.83	配方 8	第 1 次	32.18	32.22

[0250]	配方 3	第 2 次	32.06		配方 8	第 2 次	32.13	
	配方 3	第 3 次	31.91		配方 8	第 3 次	32.00	
	配方 3	第 4 次	31.93		配方 8	第 4 次	32.54	
	配方 3	第 5 次	31.48		配方 8	第 5 次	32.26	
	配方 4	第 1 次	31.60	31.94	配方 9	第 1 次	31.98	32.04
	配方 4	第 2 次	32.23		配方 9	第 2 次	31.96	
	配方 4	第 3 次	31.67		配方 9	第 3 次	32.49	
	配方 4	第 4 次	31.98		配方 9	第 4 次	32.11	
	配方 4	第 5 次	32.22		配方 9	第 5 次	31.63	
	配方 5	第 1 次	32.29	31.81	配方 10	第 1 次	31.88	31.80
	配方 5	第 2 次	32.44		配方 10	第 2 次	31.98	
	配方 5	第 3 次	31.62		配方 10	第 3 次	31.73	
	配方 5	第 4 次	未确定		配方 10	第 4 次	31.62	
	配方 5	第 5 次	30.91		配方 10	第 5 次	31.77	

[0251] 由上述结果可知配方2裂解液提取得到的DNA中 β -actin基因含量最高(Ct值最小),故裂解液中的Triton X-100及EDTA浓度应优选4%及10mM。

[0252] 采用类似的方法对于裂解液中异硫氰酸胍浓度设置2M、3M、4M、5M浓度梯度,对Tris-HCL设置10mM、25mM、50mM、100mM浓度梯度,对异丙醇用量(V/V)设置50%、100%、150%、200%用量梯度、对裂解液PH值设置5.5、6.0、6.5、7.0PH梯度,分别进行优化,最终得到本发明中裂解液各组分的最佳配方为:5M异硫氰酸胍、4% TritonX-100、25mM Tris-HCl、10mM EDTA、pH=6.5。在本实施例的描述中,“浓度”是指溶液中各组分在加入异丙醇之前的浓度。

[0253] 洗涤液I配方优化:配制8种不同配方的洗涤液I,洗涤液I具体配方见表10。洗液I搭配尿液DNA提取试剂其他组分,提取同一份尿液样本,用qPCR检测其中 β -actin基因(方法同“裂解液优化”)。测试结果见表11。

[0254] 表10:8种不同洗液I配方

[0255]

	异硫氰酸胍 (M)	50mM Tris-HCl PH	NaCl (M)	CTAB (%)	PVP40 (%)	乙醇 (%)
配方 1	0.5	6.0	0.10	0.01		40
配方 2	0.5	6.0	0.10	/	0.1	40
配方 3	0.05	6.0	0.10	/	0.1	40
配方 4	0.05	6.0	0.10	/	0.1	50
配方 5	0.05	5.0	0.10	/	0.1	60
配方 6	/	5.0	0.10	/		40
配方 7	/	5.0	0.10	/		60
配方 8	0.5	6.0	0.15	/	0.2	40

[0256] 表11:不同洗液I提取效果

[0257]

洗液 I 配方	检测次数	β -actin C _T
配方 1	第 1 次	21.66
	第 2 次	21.6
	第 3 次	21.56
配方 2	第 1 次	21.84
	第 2 次	21.95
	第 3 次	21.89
配方 3	第 1 次	22.64
	第 2 次	22.65
	第 3 次	22.44
配方 4	第 1 次	21.63
	第 2 次	21.53
	第 3 次	21.57
配方 5	第 1 次	21.52
	第 2 次	21.57
	第 3 次	21.56

[0258]	配方 6	第 1 次	22.6
		第 2 次	22.63
		第 3 次	22.6
	配方 7	第 1 次	21.59
		第 2 次	21.62
		第 3 次	21.6
	配方 8	第 1 次	21.72
		第 2 次	21.73
		第 3 次	21.79

[0259] 从上表数据分析可得:配方5洗液I提取效果最好,且提取过程中磁珠不出现聚团现象,洗涤效果更佳。最终确定洗液I配方为0.05M异硫氰酸胍,0.1%PVP40,50mM Tris-HCl,60%乙醇,100mM NaCl,pH=5.0。

[0260] 洗涤液II配方优化:配制含10mM Tris-HCl的75%乙醇 (PH6.0) (新配方),搭配尿液DNA提取试剂裂解液、磁珠等其余组分与原75%乙醇洗液(原配方)对比,分别提取尿液样本3份。

[0261] 用qPCR检测其中 β -actin基因(方法同“裂解液优化”),看是否能减少洗涤时DNA丢失,结果如下表12。

[0262] 表12.不同洗液II检测结果对比

[0263]	配方	检测次数	β -actin C _T
	原配方洗液II	第 1 次	23.50
		第 2 次	24.25
		第 3 次	24.52
	新配方洗液II	第 1 次	23.63
		第 2 次	23.72
		第 3 次	23.63

[0264] 从上表数据分析可得:将75%乙醇的PH值调整至PH6.0的确可减轻洗涤时的DNA损失,所以确定洗液II配方为75%乙醇,10mM Tris-HCl,PH=6.0。

[0265] 磁珠用量优化:磁珠用量设置10ul、15ul、20ul三个梯度,搭配尿液DNA提取试剂其余组分,提取尿液样本各2份并进行 β -actin基因qPCR检测(方法同“裂解液优化”)。结果如下表13:

[0266] 表13.不同磁珠量检测效果对比

[0267]	磁珠用量	检测次数	β -actin C _T
	15ul	第1次	22.54
	15ul	第2次	22.49
	10ul	第1次	22.66
	10ul	第2次	22.64

20u1	第1次	21.98
20u1	第2次	22.14

[0268] 从上表数据分析可得:增加磁珠用量至20u1,提取效率略有提高,且提取过程中可消除磁珠聚团现象。因此磁珠用量最终确定为20μL。

[0269] 蛋白酶K用量优化:蛋白酶K用量设置0μg、2.5μg、25μg三个梯度,搭配尿液DNA提取试剂其余组分提取尿液样本各3份并进行β-actin基因qPCR检测(方法同“裂解液优化”)。结果如下表14:

[0270] 表14.不同蛋白酶K用量检测效果对比

蛋白酶 K 用量	检测次数	β-actin C _T
0 μ g	第 1 次	23.48
	第 2 次	23.24
	第 3 次	23.61
2.5 μ g	第 1 次	21.33
	第 2 次	21.53
	第 3 次	21.54
25 μ g	第 1 次	21.49
	第 2 次	20.9
	第 3 次	21.16

[0273] 从上表数据分析可得:增加蛋白酶K用量至25μg,提取效率有提高。因此蛋白酶K用量最终确定为25μg。

[0274] 样本用量优化及确定:选3份临床尿液样本,样本用量设置400μl、1000μl、8000μl三种不同体积,使用本发明所述尿液DNA提取试剂及方法进行DNA提取及β-actin基因qPCR检测(方法同“裂解液优化”),以确定最佳样本用量。检测结果见表15。

[0275] 表15:不同样本量检测效果对比

样本用量	样本	β-actin C _T
400μl	临床样本1	-
1000μl	临床样本1	-
8000μl	临床样本1	37.23
400μl	临床样本2	39.23
1000μl	临床样本2	36.97
8000μl	临床样本2	33.8
400μl	临床样本3	33.28
1000μl	临床样本3	33
8000μl	临床样本3	29.5

[0277] 从上表数据分析可得,样本量增加能显著提高检测效果,且8ml样本量最佳。为了便于操作,样本使用量最终取整数10mL。

[0278] 本文引用的所有参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请全部以引

用的方式合并。然而,提及任何参考,文章,出版,专利,发表专利,专利申请引用在此并不是,也不应该,被视为承认或任何形式的建议,它们构成有效的现有技术,或构成世界上任何国家的一般常识的一部分。

[0279] 除另有定义外,本发明中的所有技术和科学术语均具有与本发明所属的技术领域中的一种普通技能所理解的相同的含义。尽管与本文描述的方法和材料相似或等效的任何方法和材料都可以用于本发明的实践或测试,但本文描述了首选的方法和材料。所有引用的出版物、专利和专利出版物在本文中被完整地引用,用于所有目的。

[0280] 本文所讨论的出版物仅供在本申请提交日期之前披露。此处的任何内容均不应被解释为承认本发明不应因先前的发明而提前发表。

[0281] 虽然本发明已就其具体实施例进行了描述,但应理解本发明可进行进一步修改,本应用程序旨在涵盖本发明的任何变体、使用或适配,一般而言,本发明的原则,包括在本发明所涉及的技术范围内的已知的或习惯的做法,以及可能适用于上述所述的和所附权利要求范围内的基本特征的偏离本发明的原则。

[0282] 序列表

[0283] SEQ ID NO:1, β -actin上游引物

[0284] CGTGCTCAGGGCTTCTTGTC,

[0285] SEQ ID NO:2, β -actin下游引物

[0286] CTCGTCGCCCACATAGGAATC,

[0287] SEQ ID NO:3, β -actin qPCR探针

[0288] 5'-FAM-TGACCCATGCCACCATCACGCC-3'BHQ1

[0001] 序列表

[0002] <110> HANGZHOU NEW HORIZON HEALTH TECHNOLOGY CO. LTD.

[0003] <120> 尿液样本保存及DNA提取的组合物及方法

[0004] <130> NEWH-006/01WO 333709-2024

[0005] <150> PCT/CN2019/070276

[0006] <151> 2019-01-03

[0007] <160> 3

[0008] <170> PatentIn版本 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 20

[0011] <212> DNA

[0012] <213> 智人

[0013] <400> 1

[0014] cgtgctcagg gcttcttgtc 20

[0015] <210> 2

[0016] <211> 21

[0017] <212> DNA

[0018] <213> 智人

[0019] <400> 2

[0020] ctcgtcgccc acataggaat c 21

[0021] <210> 3

[0022] <211> 24

[0023] <212> DNA

[0024] <213> 智人

[0025] <220>

[0026] <221> misc_feature

[0027] <222> (1) .. (1)

[0028] <223> 连接有FAM荧光染料

[0029] <220>

[0030] <221> misc_feature

[0031] <222> (24) .. (24)

[0032] <223> 连接有非荧光染料BHQ1

[0033] <400> 3

[0034] tgacctatgc ccacctcac gccc 24

荧光定量PCR扩增曲线-β-肌动蛋白

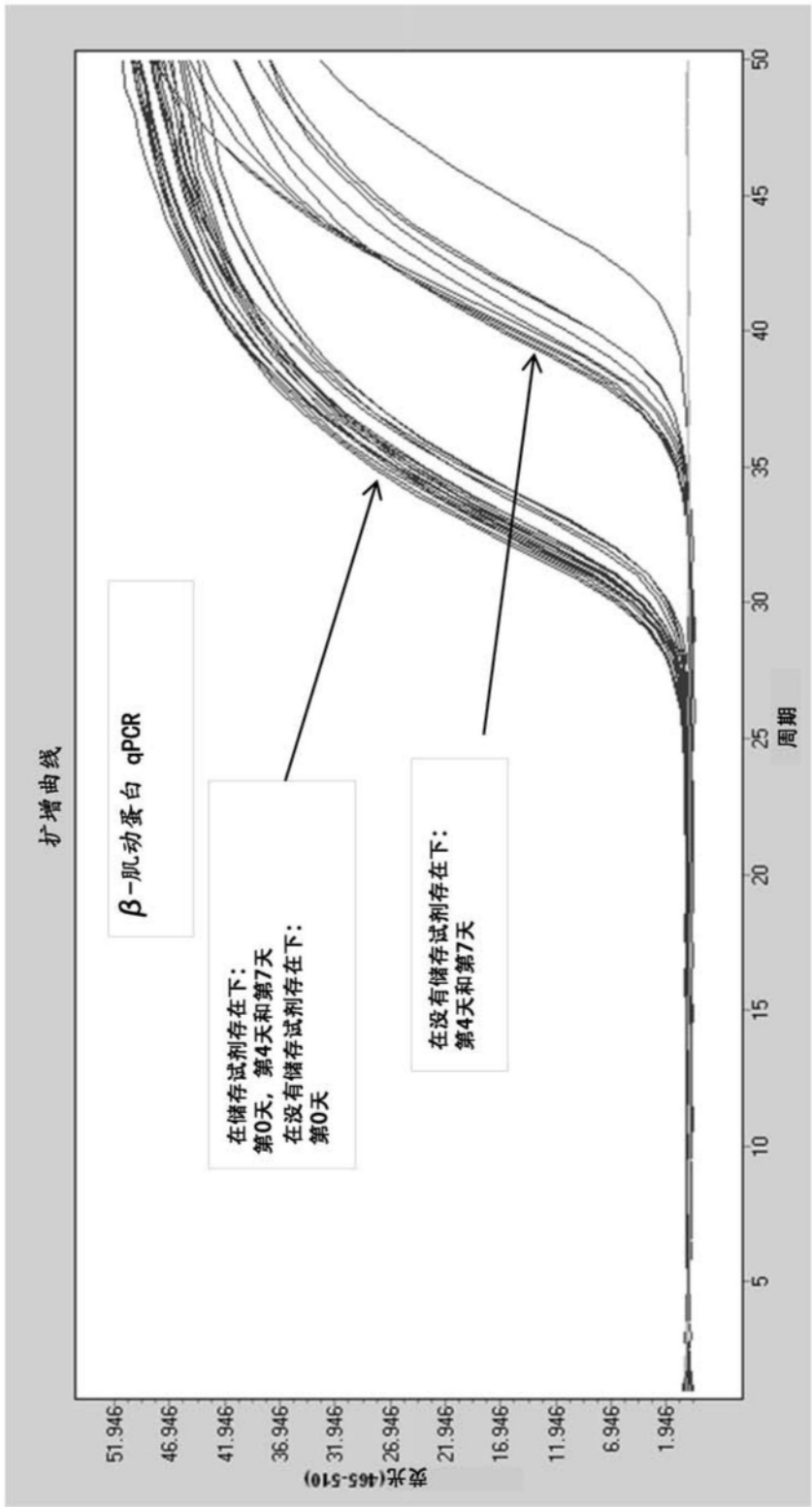


图1

在4℃由尿液储存试剂处理的尿液样品中β-肌动蛋白内标的变化

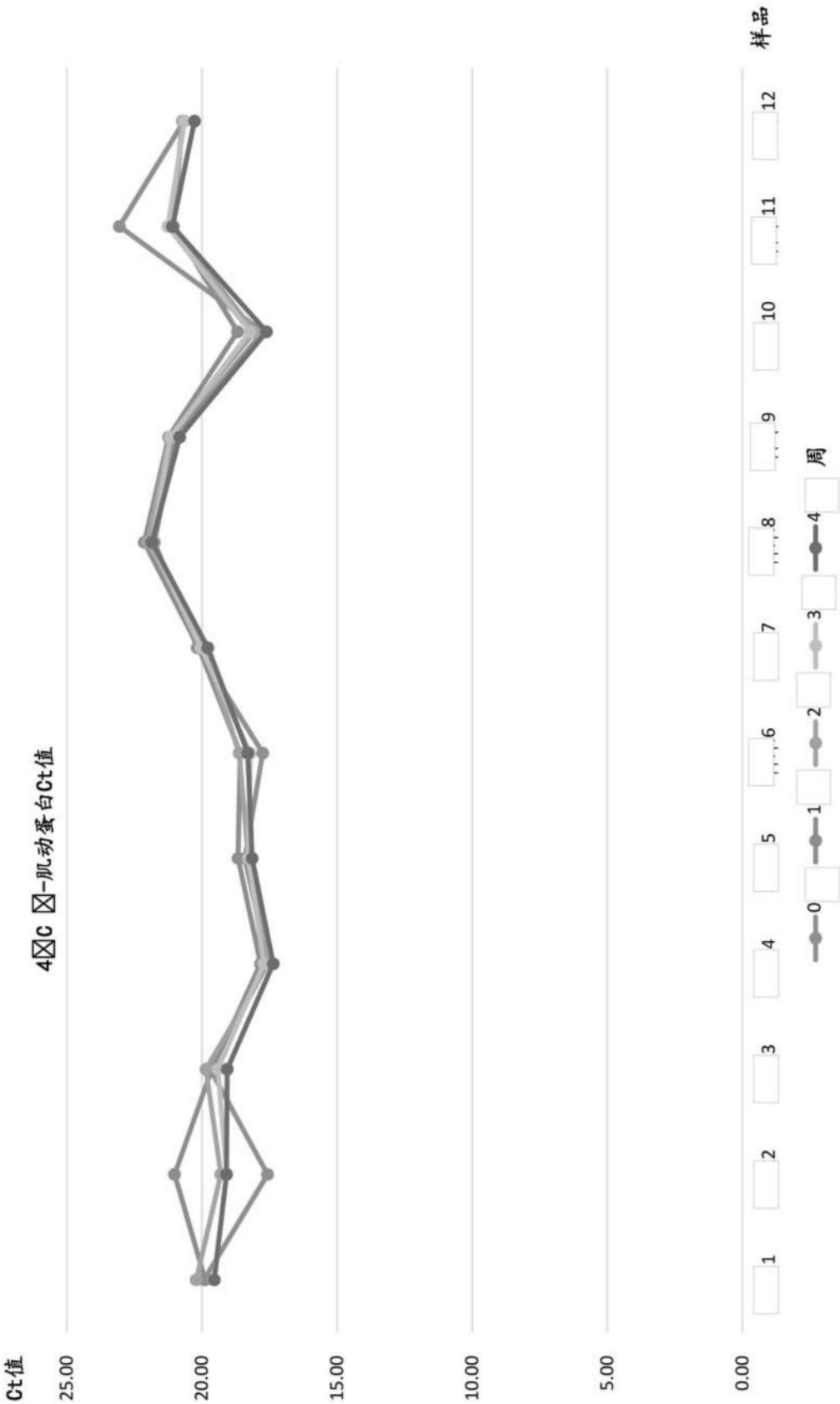


图2

在室温下由尿液储存试剂处理的尿液样品中β-肌动蛋白内标的变化

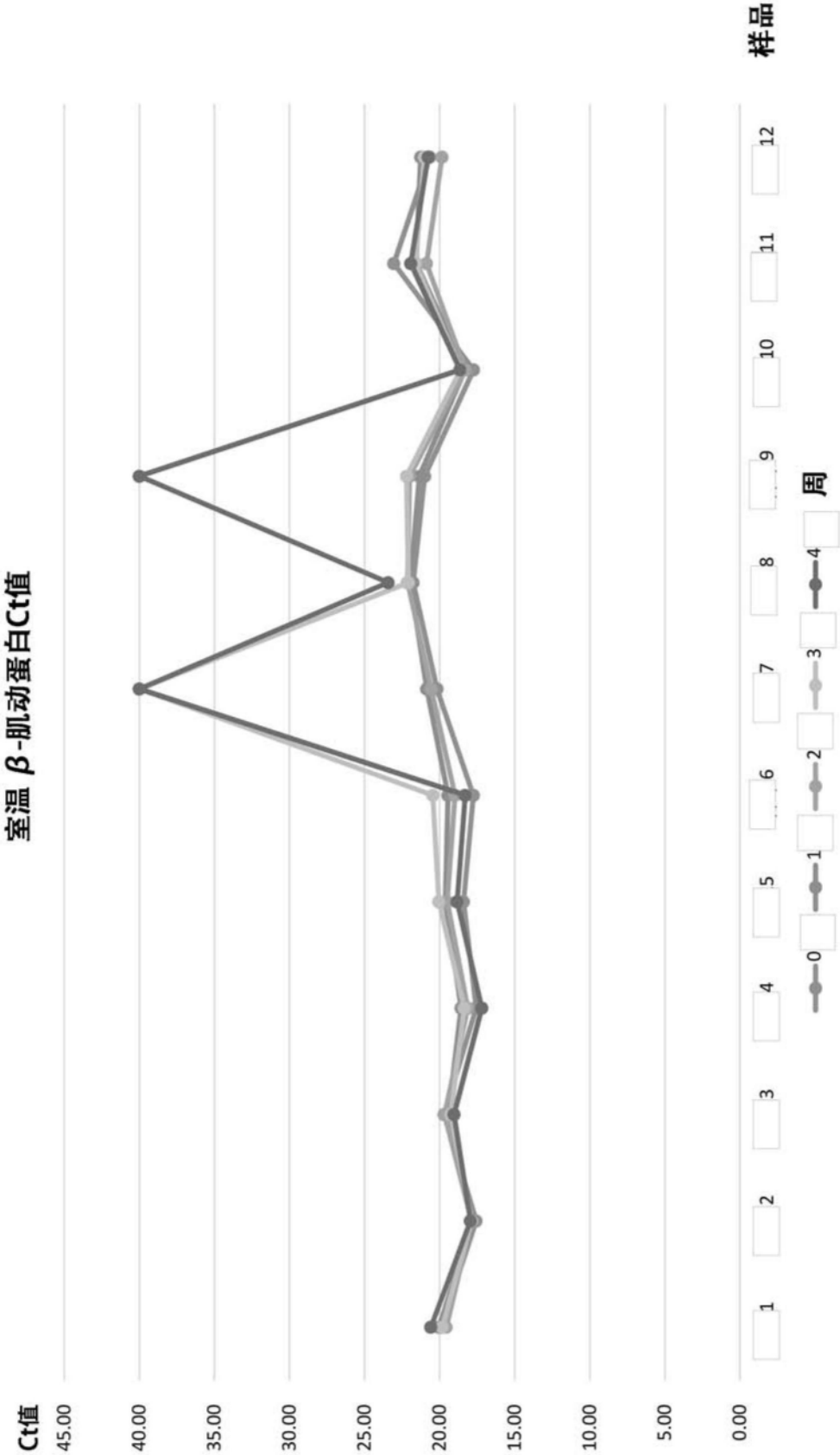


图3

在4°C由尿液储存试剂处理的尿液样品中HPV4的变化

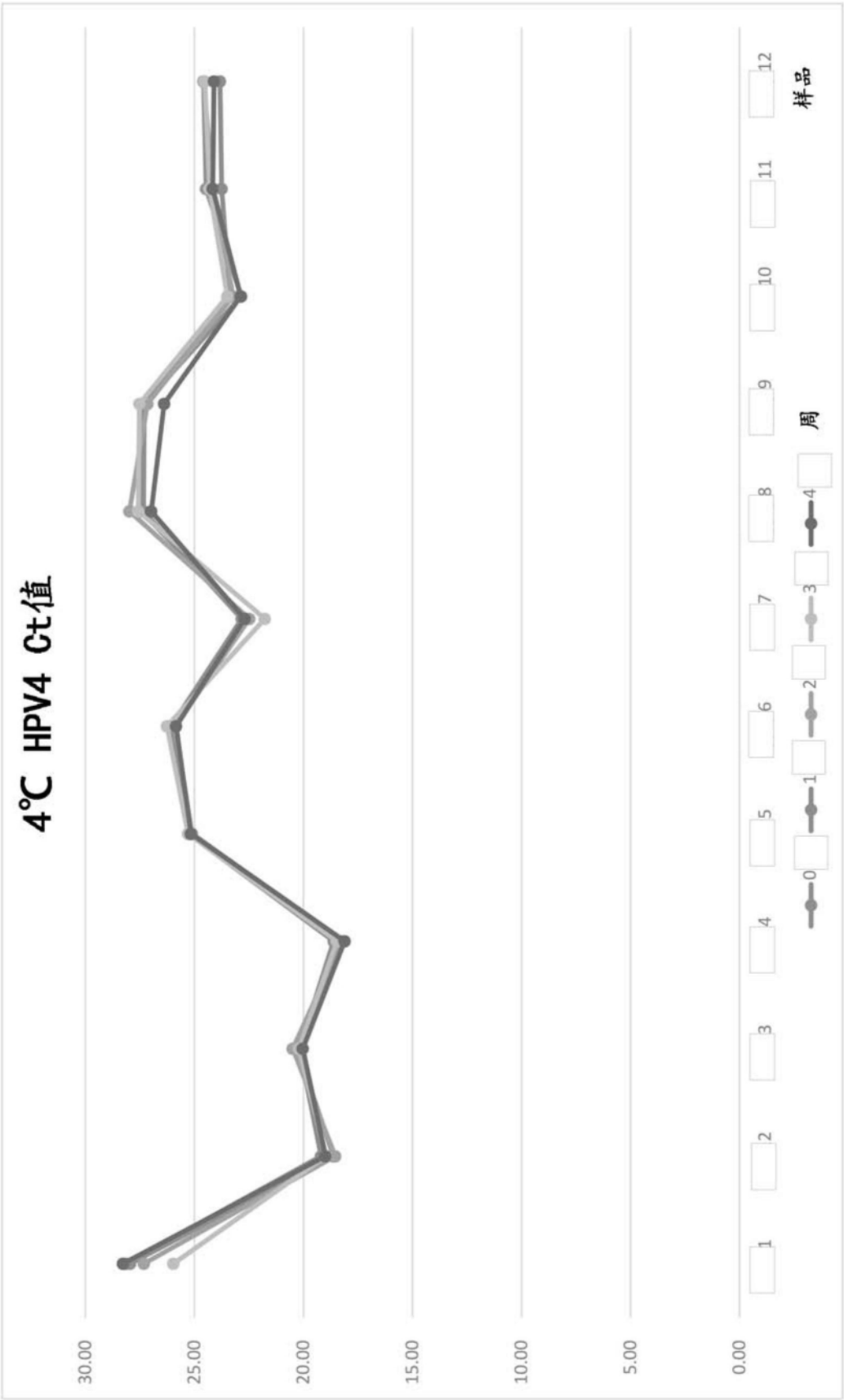


图4

在室温下由尿液储存试剂处理的尿液样品中HPV4的变化

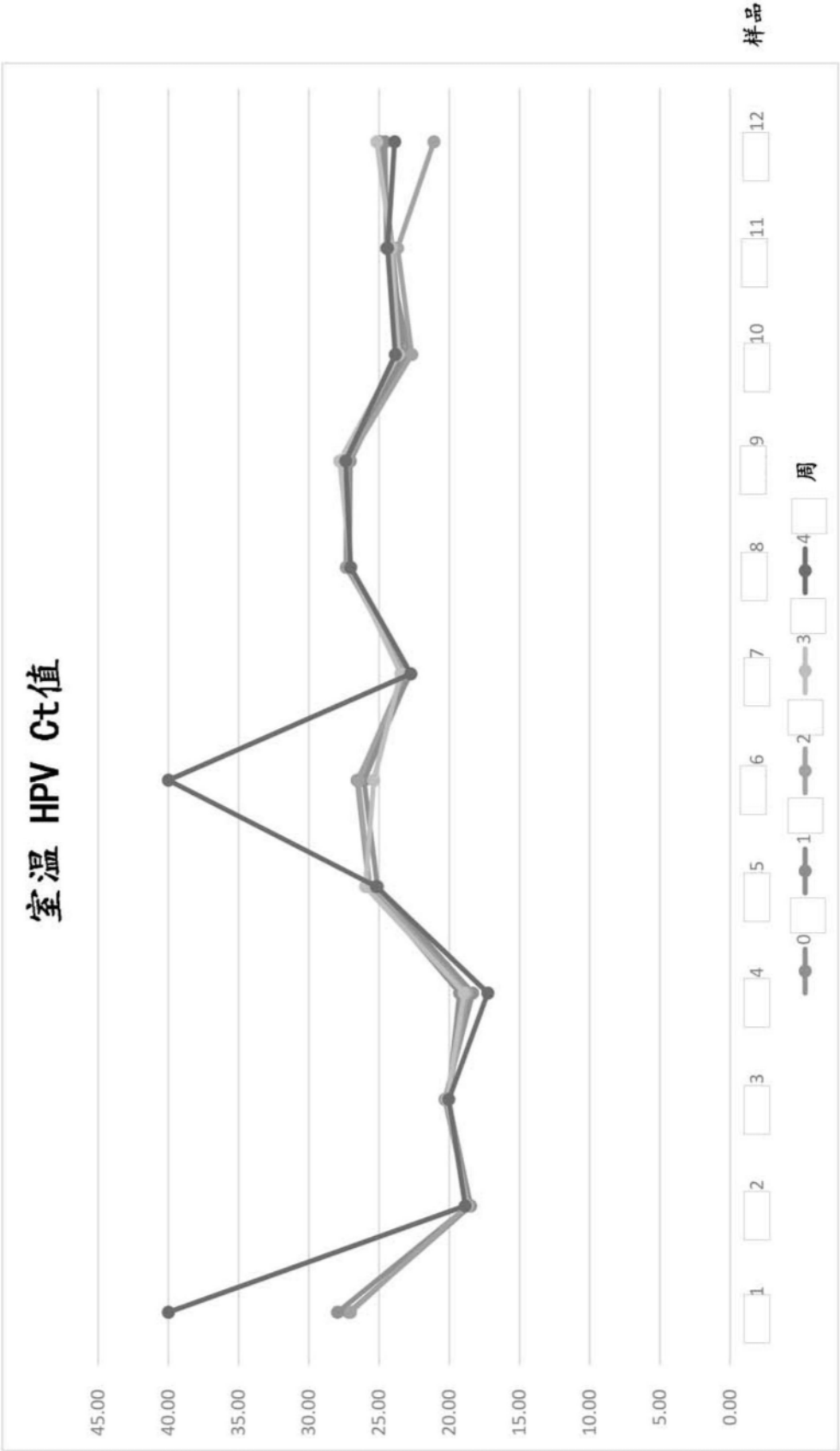


图5

荧光定量PCR扩增曲线-HPV

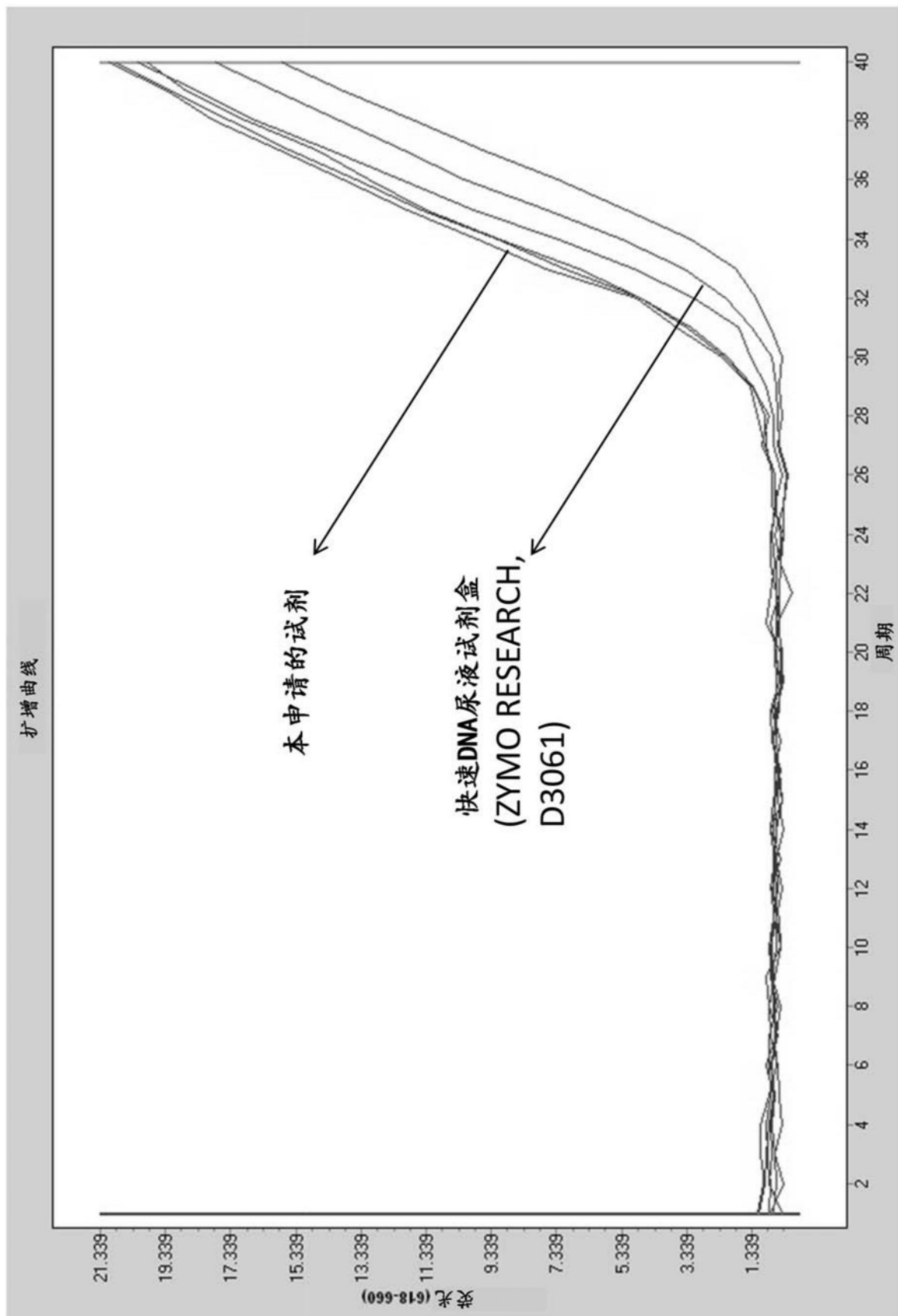


图6A

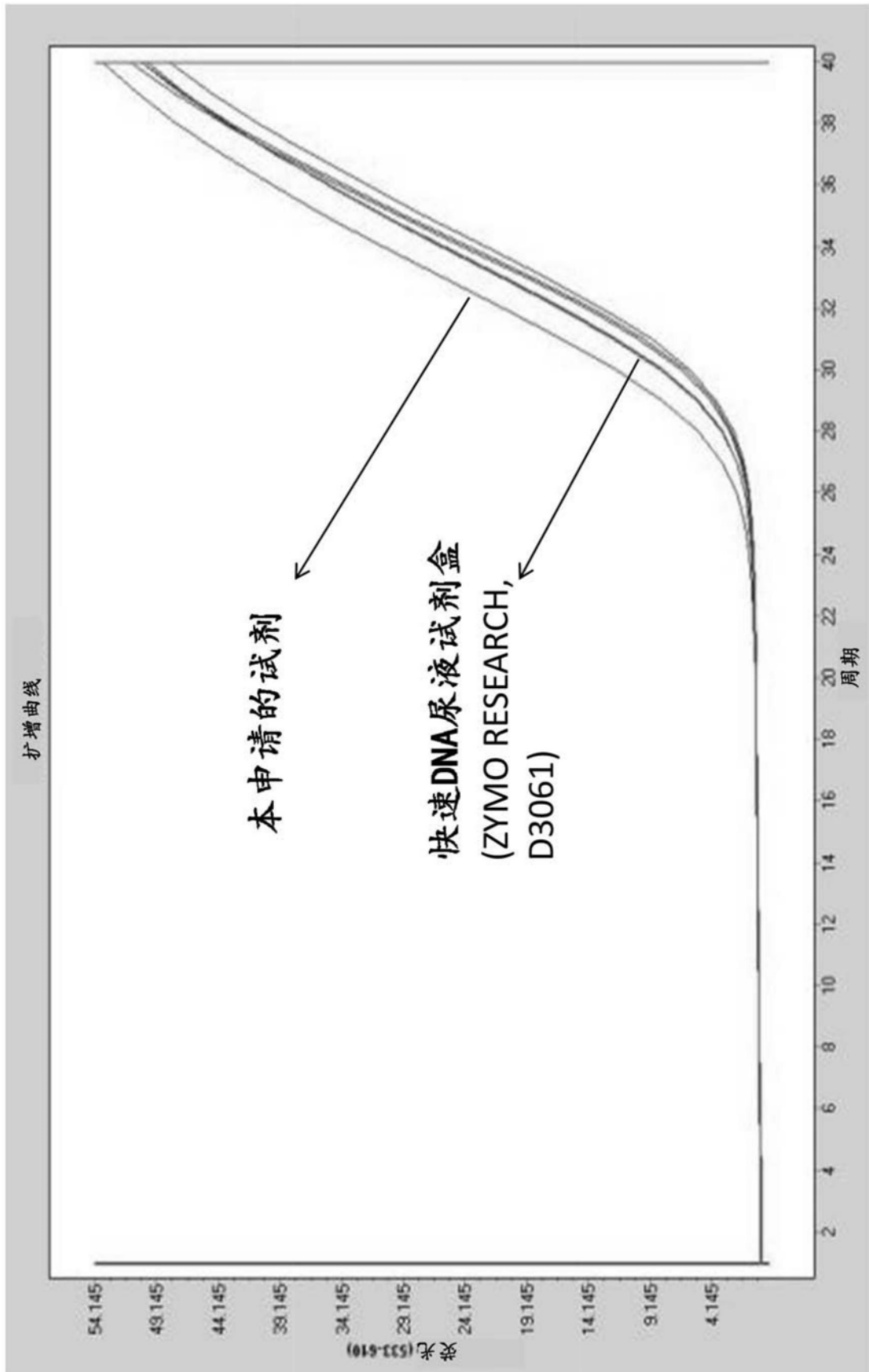
荧光定量PCR扩增曲线- β -肌动蛋白

图6B

荧光定量PCR扩增曲线-HPV

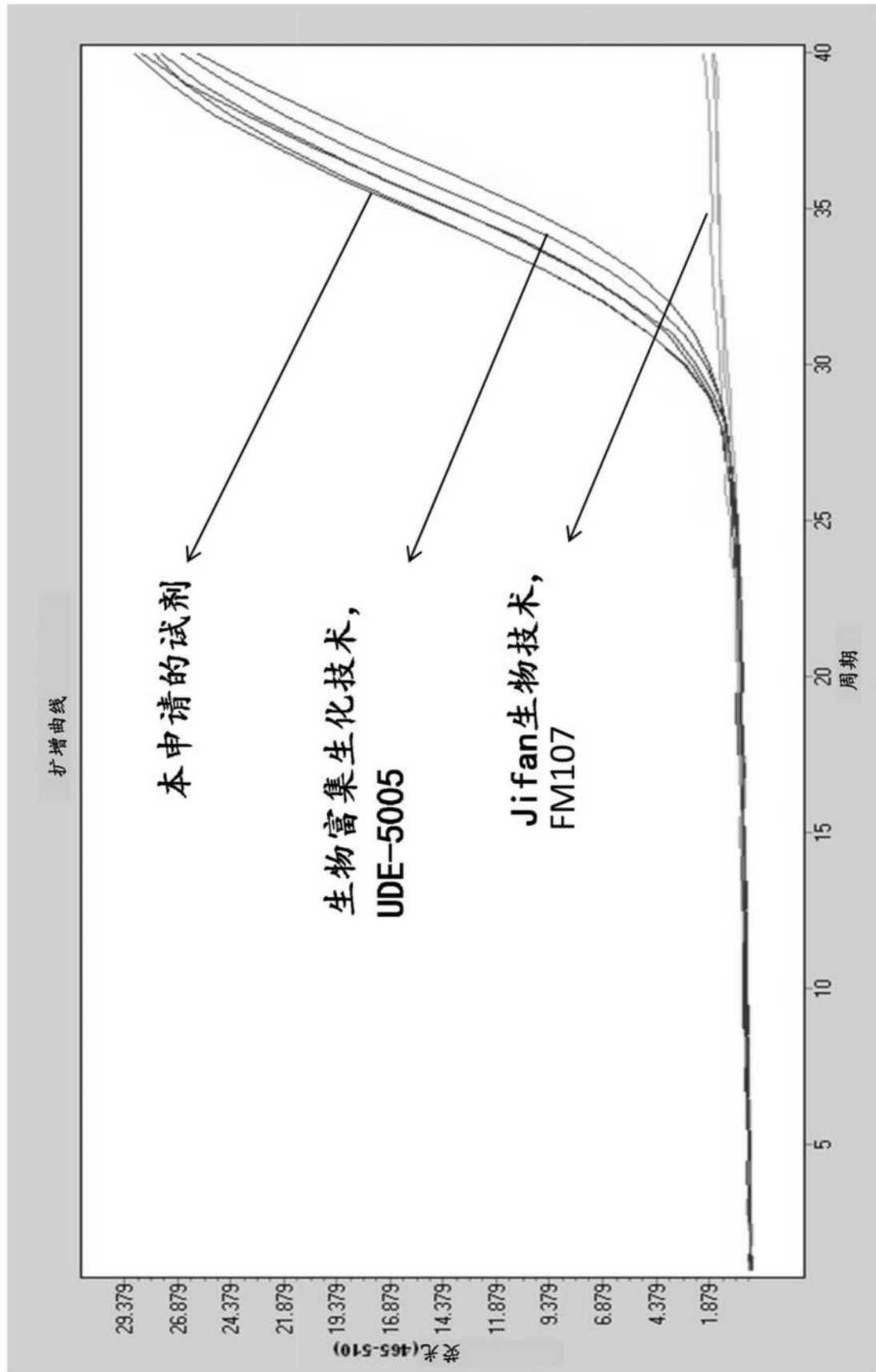


图6C

荧光定量PCR扩增曲线-β-肌动蛋白

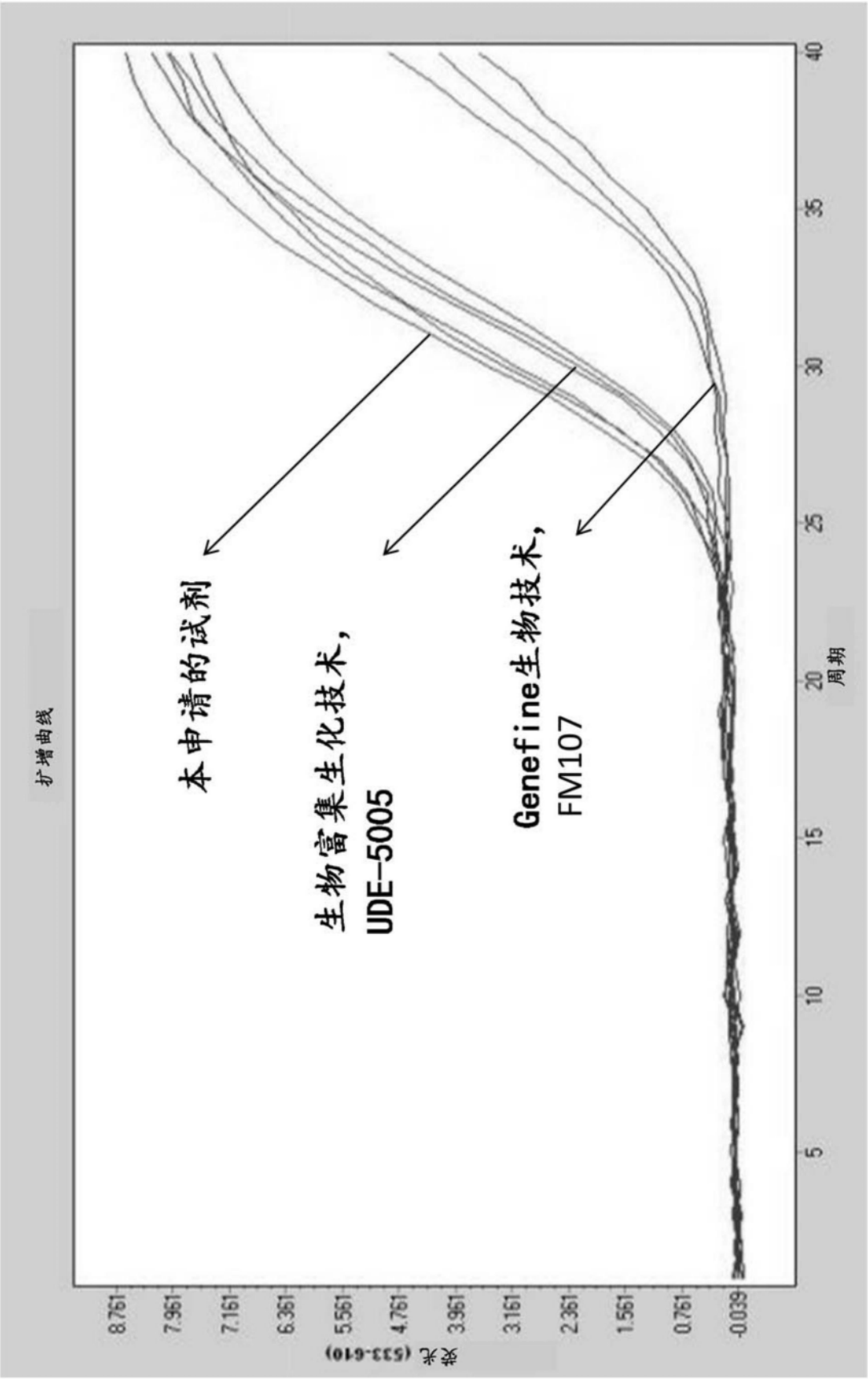


图6D