



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110904097 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201911374466.7

(22)申请日 2019.12.27

(71)申请人 深圳市海普洛斯生物科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市前海深港合作
区前湾一路1号A栋201室

(72)发明人 许明炎 张晓妮 张生 沈广强

(74)专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有
限公司 44281

代理人 李小焦 彭愿洁

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006.01)

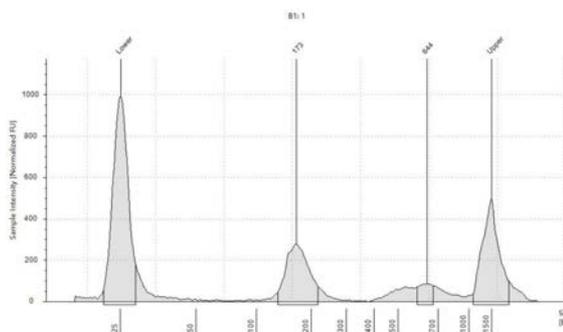
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种用于血液游离DNA提取的试剂盒

(57)摘要

本申请公开了一种用于血液游离DNA提取的试剂盒。本申请试剂盒包括裂解液、结合液、清洗液1和清洗液2；结合液含2-5M异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mM Tris-HCl、10-50mM的EDTA、5-15%的Triton X-100,及20-50%无水乙醇或异丙醇；清洗液1含2-5M异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mM Tris-HCl、10-50mM的EDTA,及5-10%的Triton X-100、SDS或吐温20,及20-50%的无水乙醇或异丙醇。本申请试剂盒,改进结合液,提高提取效率;改进清洗液1,提高磁珠cfDNA结合效率,去除杂质;提高了cfDNA回收效率和纯度,降低材料成本。



1. 一种用于血液游离DNA提取的试剂盒,所述试剂盒采用磁珠法对血液游离DNA进行提取,其特征在于:所述试剂盒包括磁珠、裂解液、结合液、清洗液1和清洗液2;

所述结合液中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,

以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,

以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇;

所述清洗液1中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,

以及5%-10%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,

以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述结合液由3.5mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、12%的Triton X-100和30%的异丙醇组成;

所述清洗液1由2mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、5%的Triton X-100和30%的异丙醇组成。

3. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于:所述裂解液中含有2-6mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸、100-500mmol/L的NaCl,

以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,其特征在于:所述裂解液由4mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、300mmol/L的NaCl和12%的Triton X-100组成。

5. 根据权利要求1或2所述的试剂盒,其特征在于:所述清洗液2中含有1-100mmol/L的Tris-HCl或氯化钠,

以及70%-80%的无水乙醇。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于:所述清洗液2由10mmol/L的Tris-HCl或氯化钠,

以及80%的无水乙醇组成。

7. 一种用于磁珠法提取血液游离DNA的结合液,其特征在于:所述结合液中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,

以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,

以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇;

优选的,所述结合液由3.5mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、12%的Triton X-100和30%的异丙醇组成。

8. 一种用于磁珠法提取血液游离DNA的清洗液,所述清洗液包括清洗液1和清洗液2,其特征在于:所述清洗液1中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,

以及5%-10%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,

以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇;

优选的,所述清洗液1由2mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、5%的Triton X-100和30%的异丙醇组成;

优选的,所述清洗液2中含有1-100mmol/L的Tris-HCl或氯化钠,以及70%-80%的无水乙醇;

优选的,所述清洗液2由10mmol/L的Tris-HCl或氯化钠,以及80%的无水乙醇组成。

9.一种用于磁珠法提取血液游离DNA的裂解液,其特征在于:所述裂解液中含有2-6mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸、100-500mmol/L的NaCl,

以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种;

优选的,所述裂解液由4mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、300mmol/L的NaCl和12%的Triton X-100组成。

10.根据权利要求1-6任一项所述的试剂盒、权利要求7所述的结合液、权利要求8所述的清洗液或权利要求9所述的裂解液在血液或血浆的游离DNA的提取中的应用。

一种用于血液游离DNA提取的试剂盒

技术领域

[0001] 本申请涉及血液游离DNA提取技术领域,特别是涉及一种用于血液游离DNA提取的试剂盒。

背景技术

[0002] 血液游离DNA(cell free DNA, cfDNA)是指循环血中游离于细胞外的部分降解了的机体内源性DNA。cfDNA是包含良性细胞、白细胞、病原体核酸在内的复杂混合物,其中胎儿游离DNA(cell free fetal DNA, cffDNA)和肿瘤游离DNA(cell free tumor DNA, ctDNA)只占其中很小的一部分。健康人血浆中含有少量的cfDNA,主要来源于细胞凋亡,片段主要在160-200bp或其整数倍。血液中循环的肿瘤细胞(CTC)也可以释放出游离DNA,片段主要在20-200bp,大的可以达到1000bp以上。

[0003] cfDNA最早由Mandel和Metais于1947年发现。随着对cfDNA研究的深入,发现其在疾病早期诊断、预后、检测等领域发挥着重要的作用,尤其在产前筛查、免疫性疾病诊疗、癌症筛查与治疗等方面。而且与组织样本相比,无创、易获得是cfDNA检测的显著优势,比如对晚期癌症患者进行基因检测、药效评估等均可用cfDNA进行检测。由此可见,cfDNA在临床医疗方面有着不可替代的地位。

[0004] 随着cfDNA在临床医疗中的广泛应用,这也对cfDNA的提取提出了更高的要求。与基因组DNA提取不同,现有的cfDNA提取方案普遍存在回收效率低、纯度低等问题。

发明内容

[0005] 本申请的目的是提供一种改进的用于血液游离DNA提取的试剂盒。

[0006] 为了实现上述目的,本申请采用了以下技术方案:

[0007] 本申请的第一方面公开了一种用于血液游离DNA提取的试剂盒,该试剂盒采用磁珠法对血液游离DNA进行提取,该试剂盒包括磁珠、裂解液、结合液、清洗液1和清洗液2;其中,结合液中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸(EDTA),以及5%-15%的TritonX-100、SDS和Tween-20中的至少一种,以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇;清洗液1中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,以及5%-10%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇。

[0008] 需要说明的是,磁珠法提取DNA的基本步骤包括,使用裂解液进行裂解,使用结合液使磁珠与核酸结合,使用清洗液1进行第一次清洗,使用清洗液2进行第二次清洗,然后采用洗脱液洗脱获得DNA。本申请的试剂盒通过对结合液和清洗液1进行优化改进,在磁珠与核酸结合时,采用本申请的结合液可以在结合的同时进一步进行裂解,保证裂解充分,而且本申请优化了结合液中无水乙醇或异丙醇的用量,使得cfDNA结合效率得到提升;清洗液1的优化,尤其是其中无水乙醇或异丙醇的用量优化,使磁珠能更有效地结合目的片段的cfDNA,并有效去除蛋白质、盐离子等其他杂质。本申请通过对试剂盒中结合液和清洗液1的

优化,不仅能有效结合目的片段的cfDNA,而且能排除基因组DNA等其他核酸的污染,提高了cfDNA的回收效率和纯度。

[0009] 还需要说明的是,本申请的关键之一即结合液和清洗液1的优化改进,至于其它组分,例如磁珠、裂解液和清洗液2,都可以参考现有的磁珠法试剂或试剂盒;但是,为了获得更好的cfDNA提取效果,本申请的优选方案中,分别对裂解液和清洗液2进行了限定,详见以下技术方案。

[0010] 另外,可以理解,本申请的试剂盒除了磁珠、裂解液、结合液、清洗液1和清洗液2以外,还可以包含其它磁珠法常规使用的试剂,例如蛋白酶K、洗脱液等。其中,蛋白酶K可以组合到本申请的试剂盒中,也可以市售购买。至于洗脱液,一般DNA提取采用的洗脱液为TE溶液或者直接采用无核酸酶的灭菌去离子水,TE溶液可以自行配制或者市售购买获得,灭菌去离子水也是实验室常规使用的溶剂。因此,蛋白酶K和洗脱液可以根据需要选择性的组合在本申请的试剂盒中,在此不作具体限定。

[0011] 优选的,结合液由3.5mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、12%的Triton X-100和30%的异丙醇组成;清洗液1由2mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、5%的Triton X-100和30%的异丙醇组成。

[0012] 需要说明的是,以上组分和具体浓度是本申请的一种实现方式中具体采用的,证实具有较好cfDNA提取效果的配方,不排除可以在本申请的优选配方基础上进行化学剂量允许的调整,例如本申请剂量正负5%左右偏差,都能够基本达到本申请的效果。

[0013] 优选的,裂解液中含有2-6mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸、100-500mmol/L的NaCl,以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种。

[0014] 需要说明的是,本申请的试剂盒,通过对裂解液进行优化,可以提高裂解效率,并且,在裂解时,有效的使蛋白变性、抑制DNase活性、有利于蛋白质与DNA分离以及DNA沉淀,便于后续与磁珠结合。

[0015] 优选的,裂解液由4mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、300mmol/L的NaCl和12%的Triton X-100组成。

[0016] 可以理解,以上组分和具体浓度也是本申请的一种实现方式中具体采用的,证实具有较好裂解效果的配方,不排除可以在本申请的优选配方基础上进行化学剂量允许的调整,例如本申请剂量正负5%左右偏差,都能够基本达到本申请的效果。

[0017] 优选的,清洗液2中含有1-100mmol/L的Tris-HCl或氯化钠,以及70%-80%的无水乙醇。

[0018] 优选的,清洗液2由10mmol/L的Tris-HCl或氯化钠,以及80%的无水乙醇组成。

[0019] 需要说明的是,本申请对清洗液2的优化,可以进一步有效的去除盐离子等杂质,从而提高cfDNA的提取纯度。

[0020] 需要说明的是,本申请的试剂盒,实际上对裂解液、结合液、清洗液1和清洗液2都分别有改进,因此,在要求较低的情况下,或者一些特殊使用情况下,本申请的裂解液、结合液、清洗液1和清洗液2都可以分别单独与现有的磁珠法试剂组合使用,从而具备相应的效果。例如,采用本申请的结合液与现有的磁珠法试剂组合,进一步保证裂解充分,提升cfDNA

与磁珠的结合效率;采用本申请的裂解液与现有的磁珠法试剂组合,可以提高裂解效率、使蛋白质与DNA分离,便于后续与磁珠结合;而本申请的清洗液1和清洗液2与现有的磁珠法试剂组合,可以使磁珠能更有效地结合目的片段的cfDNA,并有效去除蛋白质、盐离子等杂质。

[0021] 因此,本申请的第二方面公开了一种用于磁珠法提取血液游离DNA的结合液,该结合液即本申请试剂盒中的结合液,其中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇。

[0022] 优选的,本申请的结合液由3.5mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、12%的Triton X-100和30%的异丙醇组成。

[0023] 本申请的第三方面公开了一种用于磁珠法提取血液游离DNA的清洗液,该清洗液即包括本申请试剂盒的清洗液1和清洗液2。

[0024] 本申请的第四方面公开了一种用于磁珠法提取血液游离DNA的裂解液,该裂解液即本申请试剂盒中的裂解液,其中含有2-6mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸、100-500mmol/L的NaCl,以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种。

[0025] 优选的,本申请的裂解液由4mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、300mmol/L的NaCl和12%的Triton X-100组成。

[0026] 本申请的第五方面公开了本申请的试剂盒、本申请的结合液、本申请的清洗液或本申请的裂解液在血液或血浆的游离DNA的提取中的应用。

[0027] 可以理解,本申请的试剂盒是针对血液中的cfDNA提取而研发的,因此,其中的各试剂,例如结合液、清洗液、裂解液等都可以用于血液或血浆游离DNA的提取。

[0028] 由于采用以上技术方案,本申请的有益效果在于:

[0029] 本申请用于血液游离DNA提取的试剂盒,通过结合液的改进和优化,提高了cfDNA的提取效率;通过清洗液1的优化,使磁珠能更有效地结合目的片段的cfDNA,并有效去除蛋白质、盐离子等杂质,排除基因组DNA等其他核酸的污染。本申请的试剂盒,通过各组分的优化改进,不仅提高了cfDNA的回收效率和提取纯度,而且各组分能够充分有效的发挥作用,降低了材料成本。

附图说明

[0030] 图1是本申请实施例中样本1提取的cfDNA的安捷伦4200分析结果图;

[0031] 图2是本申请实施例中样本2提取的cfDNA的安捷伦4200分析结果图。

具体实施方式

[0032] 现有的磁珠法试剂或试剂盒,由于缺乏对cfDNA的针对性,使得cfDNA的提取回收效率普遍较低、纯度也较低。针对这些问题,本申请采用磁珠法,且对结合液、清洗液1的优化改良,使结合、清洗过程在提供游离DNA稳定存在环境的基础上,进一步去除蛋白、盐离子等杂质,并通过对异丙醇占比的优化,高效地结合目的片段大小的游离DNA;使结合、清洗的同时也可完成结合和片段筛选,使得cfDNA的提取效率和纯度均得到显著提高。

[0033] 具体的,本申请的试剂盒包括磁珠、裂解液、结合液、清洗液1和清洗液2;其中,结

合液中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇;清洗液1中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,以及5%-10%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇。

[0034] 结合液中,异硫氰酸胍和盐酸胍为高离液盐,能够破坏细胞结构,使蛋白变性;Tris-HCl缓冲体系,起稳定反应体系的pH作用;EDTA为金属离子螯合剂,可以抑制DNase活性;TritonX-100、SDS、Tween-20等为非离子型表面活性剂,能够溶解细胞膜蛋白,有利于蛋白质与DNA分离;无水乙醇和异丙醇为易溶于水的有机试剂,可以沉淀DNA。本申请对结合液的优化,使得在结合的同时进一步进行裂解,保证裂解充分,而且异丙醇比例的优化,使得游离DNA结合效率得到提升。

[0035] 清洗液1中,异硫氰酸胍和盐酸胍为高离液盐,能够破坏细胞结构,使蛋白变性;Tris-HCl缓冲体系,起稳定反应体系的pH作用;EDTA为金属离子螯合剂,可以抑制DNase活性;Triton X-100、SDS、Tween-20等为非离子型表面活性剂,能够溶解细胞膜蛋白,有利于蛋白质与DNA分离;无水乙醇和异丙醇为易溶于水的有机试剂,可以沉淀DNA。本申请对清洗液1的优化,尤其是异丙醇比例的优化,使磁珠能更有效地结合目的片段的游离DNA,并有效去除蛋白质、盐离子等其他杂质;本申请通过对结合液、清洗液1中异丙醇占比的优化,不仅能有效结合目的片段的游离DNA,而且能排除基因组DNA等其他核酸的污染。

[0036] 进一步的改进方案中,本申请还对裂解液进行了优化,本申请的裂解液中含有2-6mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸、100-500mmol/L的NaCl,以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种。

[0037] 本申请的裂解液中,异硫氰酸胍和盐酸胍为高离液盐,能够破坏细胞结构,使蛋白变性;Tris-HCl缓冲体系,起稳定反应体系的pH作用;EDTA为金属离子螯合剂,可以抑制DNase活性;NaCl,提供高盐环境,使DNA充分溶于液相,与蛋白沉淀分离,在乙醇环境中,更容易形成DNA钠盐沉淀;Triton X-100、SDS、Tween-20等为非离子型表面活性剂,能够溶解细胞膜蛋白,有利于蛋白质与DNA分离。

[0038] 本申请进一步的改进方案中,还对清洗液2进行了改进,本申请的清洗液2中含有1-100mmol/L的Tris-HCl或氯化钠,以及70%-80%的无水乙醇。其中,Tris-HCl或氯化钠,作为缓冲体系,起到稳定反应体系pH的作用,无水乙醇可进一步去除盐离子等杂质。

[0039] 采用本申请优化改进的试剂盒,不仅能够提高cfDNA的提取效率和纯度,而且,本申请的试剂盒经核算,其提取1例样本的成本约为5.6元,仅为同类型市售产品的约1/10,大大降低了cfDNA的提取成本。

[0040] 下面通过具体实施例和附图对本申请作进一步详细说明。以下实施例仅对本申请进行进一步说明,不应理解为对本申请的限制。

[0041] 实施例一

[0042] 本例的试剂盒具体包括裂解液、蛋白酶K、磁珠悬浮液、结合液、清洗液1、清洗液2和洗脱液。

[0043] 其中,裂解液由4M的异硫氰酸胍、50mM的Tris-HCl、25mM的EDTA、300mM的NaCl和12%的Triton X-100组成。

[0044] 蛋白酶K购自天根生化科技,磁珠悬浮液购自为度生物。

[0045] 结合液由3.5M的异硫氰酸胍、50mM的Tris-HCl、25mM的EDTA、12%的Triton X-100和30%的异丙醇组成。

[0046] 清洗液1由2M的异硫氰酸胍、50mM的Tris-HCl、25mM的EDTA、5%的TritonX-100和30%的异丙醇组成。

[0047] 清洗液2由10mM的Tris-HCl和80%的无水乙醇组成。

[0048] 洗脱液为无核酸酶的灭菌去离子水。

[0049] 本例试剂盒的使用方法如下:

[0050] (1) 向10mL离心管中依次加入40 μ L蛋白酶K、1mL血浆、100 μ L裂解液,震荡混匀后于60 $^{\circ}$ C金属浴中孵育20min;

[0051] (2) 冷却至室温,依次加入1.25mL结合液、20 μ L磁珠悬浮液,震荡结合10min;

[0052] (3) 置于磁力架上2-5min,弃掉液体,加入1mL清洗液1,震荡混匀30s;

[0053] (4) 将液体转移至1.5mL离心管中,并上架磁吸2min,取清澈的清洗液重新涮洗10mL离心管后,再转移至1.5mL离心管中;

[0054] (5) 弃掉液体,加入1mL清洗液1,震荡混匀30s,瞬离后,上架磁吸2min,弃掉上清;

[0055] (6) 加入1mL清洗液2,震荡混匀30s,瞬离后,上架磁吸2min,弃掉上清;

[0056] (7) 重复清洗液2清洗1次;

[0057] (8) 室温晾干3-5min,加入40 μ L洗脱液,涡旋震散磁珠,于56 $^{\circ}$ C金属浴中孵育5min;

[0058] (9) 瞬离后上架磁吸,将洗脱液转移到新的离心管中,-20 $^{\circ}$ C保存,即获得提取的cfDNA。

[0059] 本例按照以上试剂盒和方法,对两个血浆样本进行了cfDNA提取,并对提取的cfDNA进行质量检测。具体的,本例检测了提取的两个cfDNA的A260、A280和A230;并计算A260/280,A260/230,以此表征cfDNA的纯度。采用QUBIT测定提取的两个cfDNA的浓度,并采用安捷伦4200分析提取的两个cfDNA的主片段大小和主片段的含量。各项检测结果如表1所示;安捷伦4200的分析结果如图1和图2所示,图1为样本1的分析结果图,图2为样本为的分析结果图。

[0060] 表1提取的cfDNA质量检测结果

样本编号	QUBIT 浓度 (ng/ μ L)	总量 (ng)	A260/280	A260/230	主片段 (bp)	主片段含量 (pg/ μ L)
[0061] 1	0.392	13.72	1.96	0.01	173	194
2	0.474	16.59	1.62	0.02	169	210

[0062] 表1和图1、图2的结果显示,本例的试剂盒能够有效的提取主片段20-200bp的血浆游离DNA,并且,提取的cfDNA纯度和浓度较高,能够很好的满足后续使用需求。

[0063] 实施例二

[0064] 本例在实施例一的基础上,对裂解液、结合液、清洗液1和清洗液2的组分和各组分浓度进行了试验,详细如下:

[0065] 1. 裂解液配方试验

[0066] 本例对裂解液中各组分不同浓度进行了试验,具体如表2所示。

[0067] 表2裂解液配方试验

编号	裂解液配方				
[0068] 试验 1	2M 异硫氰酸胍	10mM Tris-HCl	10mM EDTA	100mM NaCl	5% Triton X-100
试验 2	4M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	250mM NaCl	10% Triton X-100
试验 3	6M 异硫氰酸胍	100mM Tris-HCl	50mM EDTA	500mM NaCl	15% Triton X-100
[0069] 试验 4	4M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	300mM NaCl	10% SDS
试验 5	4M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	300mM NaCl	10% 吐温 20
试验 6	4M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	300mM NaCl	12% Triton X-100
试验 7	2M 盐酸胍	10mM Tris-HCl	10mM EDTA	100mM NaCl	5% Triton X-100
试验 8	6M 盐酸胍	100mM Tris-HCl	50mM EDTA	500mM NaCl	15% Triton X-100

[0070] 本例按照表2配制了试验1至试验8的八种配方的裂解液,其余试剂,例如蛋白酶K、结合液、清洗液1和清洗液2等都与实施例一相同,采用实施例一相同的方法,对实施例一的血浆样本1进行cfDNA提取。并按照实施例一的方法测量所提取的cfDNA的浓度和纯度。结果显示,本例的八种配方的裂解液,最终都能够提取获得符合使用需求的cfDNA的浓度和纯度,尤其是试验2、4和6的效果相对较好,与实施例一接近。

[0071] 2. 结合液配方试验

[0072] 本例对结合液中各组分的不同浓度进行了试验,具体如表3所示。

[0073] 表3结合液配方试验

编号	结合液配方				
[0074] 试验 1	2M 异硫氰酸胍	10mM Tris-HCl	10mM EDTA	5% Triton X-100	20% 异丙醇
试验 2	3.5M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	12% Triton X-100	30% 异丙醇
试验 3	5M 异硫氰酸胍	100mM Tris-HCl	50mM EDTA	15% Triton X-100	50% 异丙醇
试验 4	3.5M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	10% SDS	30% 异丙醇
试验 5	3.5M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	10% 吐温 20	30% 无水乙醇
试验 6	3.5M 盐酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	12% Triton X-100	30% 异丙醇

[0075] 本例按照表3配制了试验1至试验6的六种配方的结合液,其余试剂,例如蛋白酶K、裂解液、清洗液1和清洗液2等都与实施例一相同,采用实施例一相同的方法,对实施例一的血浆样本1进行cfDNA提取。并按照实施例一的方法测量所提取的cfDNA的浓度和纯度。结果显示,本例的六种配方的结合液,最终都能够提取获得符合使用需求的cfDNA的浓度和纯度,尤其是试验2、4和6的效果相对较好,与实施例一接近。

[0076] 3. 清洗液1配方试验

[0077] 本例对清洗液1中各组分的不同浓度进行了试验,具体如表4所示。

[0078] 表4清洗液1配方试验

编号	清洗液 1 配方				
试验 1	2M 异硫氰酸胍	10mM Tris-HCl	10mM EDTA	5% Triton X-100	20% 异丙醇
试验 2	3.5M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	10% Triton X-100	30% 异丙醇
[0079] 试验 3	5M 异硫氰酸胍	100mM Tris-HCl	50mM EDTA	15% Triton X-100	50% 异丙醇
试验 4	2M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	5% 吐温 20	30% 异丙醇
试验 5	2M 异硫氰酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	5% SDS	30% 无水乙醇
试验 6	2M 盐酸胍	50mM Tris-HCl	25mM EDTA	5% Triton X-100	30% 异丙醇

[0080] 本例按照表4配制了试验1至试验6的六种配方的清洗液1,其余试剂,例如蛋白酶K、裂解液、结合液和清洗液2等都与实施例一相同,采用实施例一相同的方法,对实施例一的血浆样本1进行cfDNA提取。并按照实施例一的方法测量所提取的cfDNA的浓度和纯度。结果显示,本例的六种配方的清洗液1,最终都能够提取获得符合使用需求的cfDNA的浓度和纯度,尤其是试验4和6的效果相对较好,与实施例一接近。

[0081] 4. 清洗液2配方试验

[0082] 本例对清洗液2中各组分的不同浓度进行了试验,具体如表5所示。

[0083] 表5清洗液2配方试验

编号	清洗液 2 配方	
试验 1	1mM Tris-HCl	70% 无水乙醇
试验 2	10mM Tris-HCl	80% 无水乙醇
[0084] 试验 3	20mM Tris-HCl	75% 无水乙醇
试验 4	50mM Tris-HCl	80% 无水乙醇
试验 5	100mM Tris-HCl	80% 无水乙醇
试验 6	10mM NaCl	80% 无水乙醇

[0085] 本例按照表5配制了试验1至试验6的六种配方的清洗液2,其余试剂,例如蛋白酶K、裂解液、结合液和清洗液1等都与实施例一相同,采用实施例一相同的方法,对实施例一的血浆样本1进行cfDNA提取。并按照实施例一的方法测量所提取的cfDNA的浓度和纯度。结果显示,本例的六种配方的清洗液2,最终都能够提取获得符合使用需求的cfDNA的浓度和纯度,尤其是试验2和6的效果相对较好。

[0086] 以上试验结果显示,本例的试剂盒中,裂解液中含有2-6mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸、100-500mmol/L的NaCl,以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种;结合液中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,以及5%-15%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇;清洗液1中含有2-5mol/L的异硫氰酸胍或盐酸胍、10-100mmol/L的Tris-HCl、10-50mmol/L的乙二胺四乙酸,以及5%-10%的Triton X-100、SDS和Tween-20中的至少一种,以及20%-50%的无水乙醇或异丙醇;清洗液2中含有1-100mmol/L的Tris-HCl或氯化钠,以及70%-80%的

无水乙醇;都可以基本满足本申请的cfDNA提取需求。其中,结合实施例一的结果,裂解液由4mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、300mmol/L的NaCl和12%的Triton X-100组成;结合液由3.5mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、12%的Triton X-100和30%的异丙醇组成;清洗液1由2mol/L的异硫氰酸胍、50mmol/L的Tris-HCl、25mmol/L的乙二胺四乙酸、5%的Triton X-100和30%的异丙醇组成;清洗液2由10mmol/L的Tris-HCl或氯化钠,以及80%的无水乙醇组成;效果最佳,作为本例优选的试剂盒方案。

[0087] 以上内容是结合具体的实施方式对本申请所作的进一步详细说明,不能认定本申请的具体实施只局限于这些说明。对于本申请所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本申请构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换。

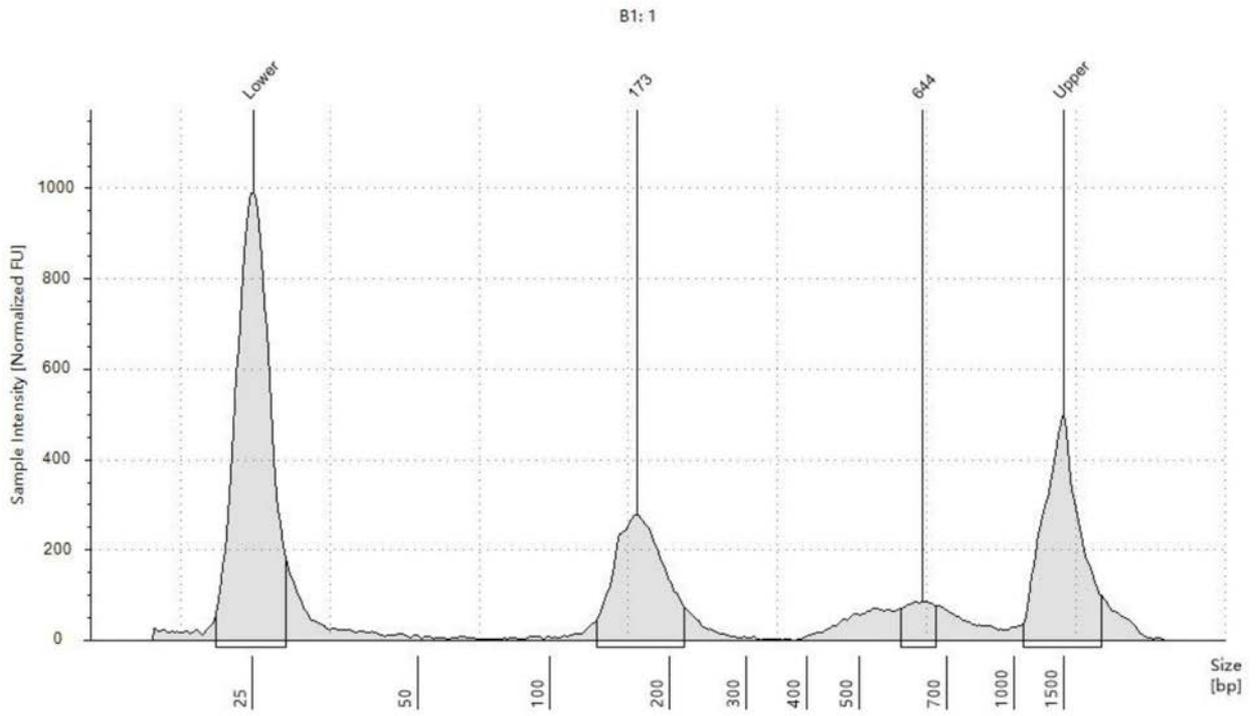


图1

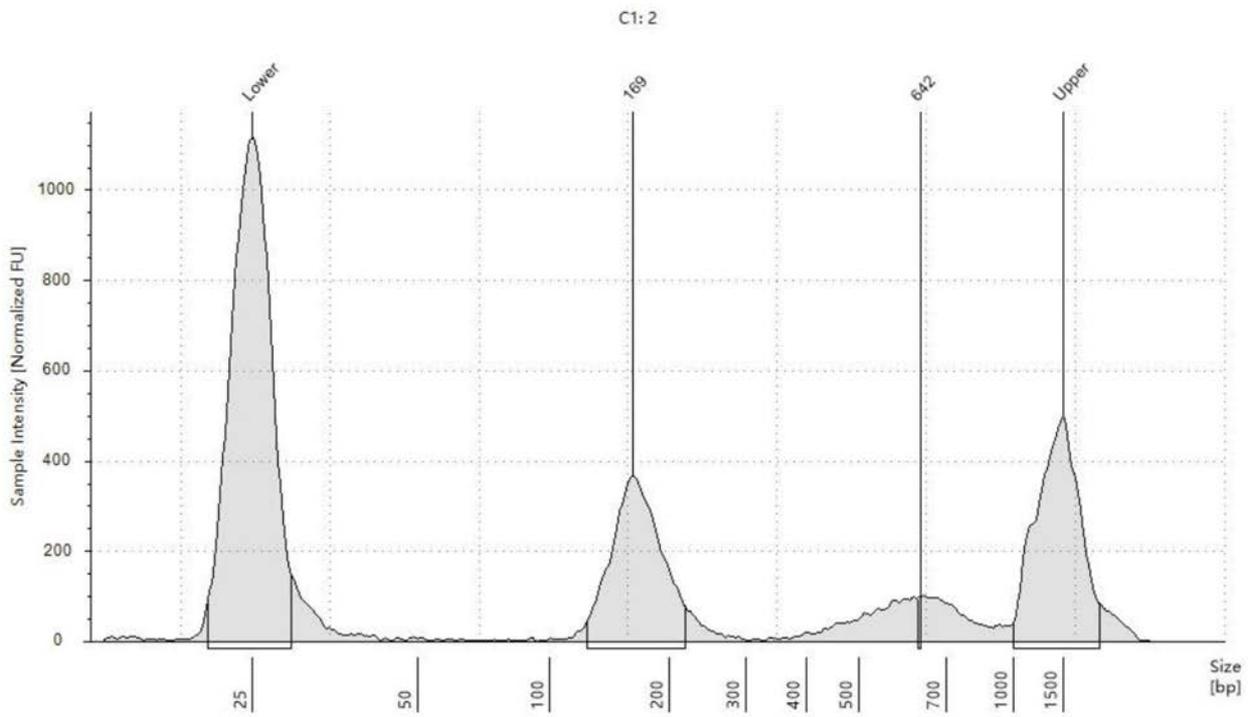


图2