



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101115833 B

(45) 授权公告日 2012.01.04

(21) 申请号 200680004094.3

(22) 申请日 2006.02.13

(30) 优先权数据

05002932.1 2005.02.11 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.08.06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2006/001274 2006.02.13

(87) PCT申请的公布数据

W02006/084753 DE 2006.08.17

(73) 专利权人 恰根有限公司

地址 德国希尔登

(72) 发明人 M·斯普伦加-豪斯塞尔 G·舒尔特

T·多伊奇曼 S·费勒克

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 徐迅

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1572796 A, 2005.02.02, 权利要求 6; 说

明书第 5 页第 19 行—第 6 页第 1 行, 第 6 页第 24 行—7 页第 2 行, 第 8 页第 7—27 行; 实施例 1—2; 附图 5 和 8.

WO 0204620 A2, 2002.01.17, 全文.

WO 9831840 A1, 1998.07.23, 全文.

Winters MA, et al.. Plasmid DNA purification by selective calcium silicate adsorption of closely related impurities. Biotechnol. Prog. 19 2. 2003, 440-447.

审查员 于婷

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

分离核酸的方法, 该核酸在提高的温度下固定于基质上

(57) 摘要

本发明涉及一种改进的从细菌、植物、动物或人类细胞以及细胞培养物和病毒培养物中分离核酸(如 DNA 和 RNA)的方法。

1. 一种分离和 / 或纯化核酸的方法, 所述方法包括以下步骤:
 - a) 裂解生物样品,
 - b) 在支链或直链烷醇存在的情况下, 将释放出的核酸固定在基于一种或多种硅 - 氧化化合物的基质上,
 - c) 用已知方式分离结合的核酸,其特征在于, 所述核酸的固定是在 36°C 到 75°C 的温度范围内进行的。
2. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 b) 中的固定在离液序列高的化合物存在的情况下进行。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法, 其特征在于, 所述步骤 b) 中的固定的核酸在所述基质上洗涤。
4. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述固定是在 46°C 到 70°C 的温度范围内进行的。
5. 如权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 所述固定是在 50°C 到 65°C 的温度范围内进行的。
6. 如权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述固定是在 56°C 的温度下进行的。
7. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述硅 - 氧化合物为二氧化硅。
8. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述基质为具有二氧化硅表面的磁性颗粒。
9. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述离液序列高的化合物为离液序列高的钠盐或胍盐。
10. 如权利要求 9 所述的方法, 其特征在于, 所述离液序列高的钠盐或胍盐为碘化钠、高氯酸钠、硫氰酸胍、异硫氰酸胍或盐酸胍或两种或多种所述盐的混合物。
11. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述支链或直链烷醇为具有 1 到 5 个碳原子的醇。
12. 如权利要求 11 所述的方法, 其特征在于, 所述醇为甲醇、乙醇、异丙醇、支链或直链丁醇、戊醇、或所述醇的混合物。
13. 如权利要求 11 或 12 所述的方法, 其特征在于, 所述醇以水溶液形式存在, 其浓度为 1 到 100 体积 / 体积%。
14. 如权利要求 13 所述的方法, 其特征在于, 所述浓度为 2 到 80 体积 / 体积%。
15. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述浓度为 5 到 70 体积 / 体积%。
16. 如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于, 所述浓度为 10 到 60 体积 / 体积%。
17. 如权利要求 16 所述的方法, 其特征在于, 所述浓度为 15 到 50 体积 / 体积%。
18. 用权利要求 1 到 17 中任一项所述方法分离的核酸。
19. 一种在存在支链或直链烷醇的情况下将核酸固定在基于硅 - 氧化化合物的基质上的方法, 其特征在于, 所述核酸的固定是在 36°C 到 75°C 的温度范围内进行的。
20. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述固定在离液序列高的化合物存在的情况下进行。
21. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 所述固定在具有二氧化硅表面的基质上是在存在具有 1 到 5 个碳原子的支链或直链烷醇或其水溶液时, 在 46°C 到 70°C 的温度范围内进行的。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其特征在于,所述固定是在存在甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、和 / 或支链或直链丁醇、或戊醇时,或是在存在所述醇或其混合物的水溶液时,在 50°C 到 65°C 的温度范围内进行的。

23. 如权利要求 22 所述的方法,其特征在于,所述固定是在存在浓度范围从 1 到 100 体积 / 体积%的甲醇、乙醇、丙醇和 / 或异丙醇的水溶液时,在温度为 56°C 时进行的。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其特征在于,所述浓度为 2 到 80 体积 / 体积%。

25. 如权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述浓度为 5 到 70 体积 / 体积%。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述浓度为 10 到 60 体积 / 体积%。

27. 如权利要求 26 所述的方法,其特征在于,所述浓度为 15 到 50 体积 / 体积%。

28. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述离液序列高的化合物为离液序列高的钠盐或胍盐。

29. 如权利要求 28 所述的方法,其特征在于,所述离液序列高的钠盐或胍盐为碘化钠、高氯酸钠、硫氰酸胍、异硫氰酸胍或盐酸胍或两种或多种所述盐的混合物。

30. 如权利要求 19、28 或 29 中任一项所述的方法,其特征在于,所述固定是在 46°C 到 70°C 的温度范围内,在具有二氧化硅表面的基质上进行的。

31. 如权利要求 30 所述的方法,其特征在于,所述固定是在 50°C 到 65°C 的温度范围内进行的。

32. 如权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述固定是在温度为 65°C 时进行的。

33. 如权利要求 32 所述的方法,其特征在于,所述基质为具有二氧化硅表面的磁性颗粒。

分离核酸的方法, 该核酸在提高的温度下固定于基质上

[0001] 本发明涉及一种改进的分离核酸的方法。

[0002] 通常根据如下统一的基本模式从植物细胞、动物细胞或人类细胞以及细胞培养物或病毒培养物中分离核酸(如 DNA 和 RNA): 首先部分地采用蛋白降解酶类消化含有核酸的原材料。各个组分即可以在随后步骤中通过多种不同方法进行分离。

[0003] 不可避免地存在于每种细胞裂解液中的蛋白质片段的分离是一个尤其重要的步骤。该分离可以通过, 例如, 使蛋白质 / 核酸混合物接触苯酚和 / 或氯仿 / 异戊醇来进行。还可以通过添加诸如盐酸胍或异硫氰酸胍的变性盐类将蛋白质片段从水相中沉淀出来。还可以通过添加蛋白酶并随后除去以降解该蛋白质。最终通过选择性添加 DNA 酶或 RNA 酶来除去不想要的核酸, 并得到各自所需的核酸。然而, 为了防止核酸在分离过程中遭受不必要的酶性降解, 必须在无菌和无核酸酶的条件下进行操作。核酸的分离也可以通过超速离心来实现。

[0004] 大部分现有技术的方法均基于以下两种分离原理之一:

[0005] “传统方法”是基于一种单阶段过程, 其中, 在添加缓冲液(其在大多情况下包含胍盐)和有机提取剂(大多为氯仿或苯酚)之后进行提取。不需要的附带材料然后与有机相一起被除去。留在水相中的核酸然后可通过相分离分开并分离。

[0006] 该方法的主要缺点是, 除了使用有毒和有害健康的物质(如异硫氰酸胍、苯酚或氯仿)之外, 作为杂质留在核酸水溶液中的水溶性材料必须在额外的、非常耗时的纯化步骤中分离。该问题让使用此方法从植物中分离核酸变得复杂, 例如, 这是因为这些植物中大多含有相当量的多糖和此类水溶性物质。

[0007] 考虑到这些缺点, 现有技术中还有一种可选的方法, 该方法基于将核酸选择性吸附到固态(通常为矿物质)载体上(如二氧化硅)。在这种多阶段过程中, 不同的缓冲液(裂解、结合、洗涤和洗脱缓冲液)被依次加入细胞或病毒裂解液; 最后步骤中, 从载体上将纯化的核酸洗脱下。

[0008] 同时, 专家圈已经研究过在存在离液盐时核酸结合到矿物质载体的物理化学原理。他们认为核酸结合到矿物质载体表面是基于水环境高度有序的结构破坏, 核酸因此才吸附到矿物质材料(尤其是玻璃颗粒和二氧化硅颗粒)表面。

[0009] 上述方法的一个特别不利之处在于, 当使用由特别高比例的伪二级原料(spurious secondary material)增强的样品时, 为了得到期望的高纯度, 必须考虑合理的得率损失。

[0010] 因此, 本发明的目的是提供一种不存在上述从现有技术中得知的缺点的分离 RNA 或 DNA 的方法, 并提供高得率和高纯度的核酸。

[0011] 我们激动地发现, 如果含有核酸的溶液在结合之前或结合时被加热, 那么在存在离液剂和 / 或醇时, 尤其当存在离液剂和醇时, 核酸与二氧化硅颗粒(优选磁性二氧化硅颗粒)的结合便能得到改进。所述改进对病毒 RNA、DNA 和人工合成的 RNA, 以及其它核酸种类均特别有效。

[0012] 本发明的生物材料应该理解为粒子或分子基原料。尤其包括病毒、噬菌体和细胞

(例如,细菌细胞、以及人类细胞、动物细胞(如白细胞)或植物细胞)。尤其地,本发明的方法优选地适合于从人或动物来源(例如,临床样品如血液、血浆、血清、漱口水、尿液、脑脊髓液、痰、粪便、穿刺(punctates)上皮、涂片、活检和其它组织或骨髓样品)的样品原料中分离核酸(如DNA或RNA)。

[0013] 样品还可以来源于环境分析、食品分析或分子生物学研究中,例如,来自细菌培养物、病毒培养物、噬菌体裂解液、气体或水过滤物和扩增产物(如PCR)。

[0014] 天然或修饰的生物材料可以用本发明的方法进行分离。天然生物材料应该理解为与自然发生的生物材料相比,其结构未经不可逆地修饰的材料。然而,并不排除样品的其它组分的修饰。例如,当需要分离细胞时,需要真正改变细胞周围的介质,而非细胞本身。当需要分离核酸时,其也应该是天然形式,即未经切割或通过在其上偶联反应性基团而修饰。因此,定义的天然生物材料尤其不含生物素化的核酸。其中,病毒DNA、病毒RNA或来自人或动物样品材料的细胞核酸是天然生物材料的具体例子。

[0015] 修饰的生物材料包括不天然发生的材料,例如通过附加反应性、可检测的或稳定化基团或固定基团进行修饰的核酸,例如生物素化的核酸;此外还有合成的DNA和RNA,例如‘武装(armored)RNA’。

[0016] 某些情况下,样品可未经预处理便用于本发明的方法。然而多数情况下,样品需要通过适当手段进行消化以释放样品中所含的生物材料。消化样品的方法被本领域技术人员所熟知,本质上其可以是化学的、酶的或物理的方法。还可能是这些方法的组合。

[0017] 本文中,对不同生物材料采用不同方法似乎更加有利,然而在另一方面,下述任何一种方法在原理上都是适当的:裂解,在离子和非离子表面活性剂(例如,溶于适当缓冲液的SDS、LiDS或Sarcosyl)的帮助下采用离液盐(例如盐酸胍(GHCl)、硫氰酸胍(GTC)、碘化钠、高氯酸钠等)进行;机械崩解,通过例如弗氏压碎器、超声、用玻璃球研磨、用铝研磨、或在液氮中研磨进行;酶促裂解,例如采用溶菌酶、蛋白酶、链霉菌蛋白酶或纤维素酶,或其它能通过商业渠道购买到的裂解酶;通过噬菌体或病毒感染裂解细胞;冷冻干燥;渗透压休克;微波处理;温度处理,如加温、加热、或冷冻(如在干冰或液氮)和解冻;碱裂解。

[0018] 如上所述,所有上述方法代表了本领域熟知的标准裂解方法,可以使用任何一种方法或其组合。

[0019] 因此,离液剂和表面活性剂的组合对裂解细菌细胞特别有效。用于裂解的示例用的适当的试剂因此包括离液剂(例如,GTC或GHCl)和去污剂(例如SDS或Sarcosyl)。这些裂解剂可以存在于水溶液或缓冲液溶液(即所谓的裂解缓冲液)。任何适当的缓冲液均可用作缓冲液,例如,Tris、Bicin、Tricin或磷酸盐缓冲液。可选地,裂解剂还可以分别添加。裂解剂的合适浓度和含量随各系统、细胞类型等变化,并且可以由本领域技术人员决定,其中,例如,可以采用浓度范围在2M到7M的离液剂(例如,GTC、GHCl或碘化钠或高氯酸钠),0.1M到1M的碱试剂(如,NaOH),和0.1到50wt%(重量/体积)的去污剂。此类裂解缓冲液的例子有4M GTC和1%(重量/体积)Sarcosyl的水溶液。

[0020] 不同培养条件可能适合于不同的裂解系统并且可从现有技术中得知。对含有去污剂和/或离液剂的裂解缓冲液而言,可在例如室温或升高的温度(例如在37到65°C的范围内)下进行培育。

[0021] 同样地,培养时间也可在几分钟到最多达24小时之间变化,例如,从5分钟到2小

时。对 GTC/Sarcosyl 裂解缓冲液和细菌细胞而言,在例如 65°C 培育 10 到 20 分钟被证明是最有利的,但也可根据需要而改变。对用例如蛋白酶 K 等进行的酶裂解而言,需要更长的处理时间,例如,超过 12 小时。

[0022] 裂解优选在存在离液盐时进行,其中这类盐的浓度在 2 和 8mol/l 之间,优选地为 4 到 6mol/l。离液盐为,例如,碘化钠、高氯酸钠、硫氰酸胍、异硫氰酸胍或盐酸胍。然而结合不限于此类化合物。优选地,结合发生于醇环境下。优选具有 1 到 5 个碳原子的短链、支链或直链烷醇,如,甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇或戊醇。烷醇的浓度范围从 1 到 100% (体积 / 体积),优选从 2 到 80%,更优选从 5 到 70%,还更优选从 10 到 60%,最优选从 15 到 50% 变化。激动人心的是,试验显示尤其在离液剂和醇条件下加热含有核酸的溶液对病毒 RNA 和 DNA 以及对合成的 RNA 和其它核酸种类的结合均有类似的影响。

[0023] 为了分离核酸,使样品与支持材料接触,优选的支持材料为上述颗粒,并培养一段时间,使样品足以结合到支持材料上。对核酸而言,适当的培养时间为 10 秒和 30 分钟之间。实际上被证明最有利的培养时间的范围在 11+/-10 分钟。

[0024] 优选采用粒度在 5 到 25 μm , 优选地从 6 到 15 μm , 尤其优选地从 6 到 10 μm 和非常现在的粒度分布的珠形或球形硅烷化磁性颗粒来分离核酸。能在本发明的方法中有利地使用的磁性二氧化硅颗粒描述于国际专利申请 W001/71732 第 6 页第 29 行到第 8 页第 22 行,且对其所有方面进行参考。本发明中的结合发生于 36 到 75°C 的温度范围内,优选地 46 到 70°C,尤其优选地 50 到 65°C 和最优选地在 56°C。变性剂(如二甲基亚砜)对核酸的结合显示出类似的效果。

[0025] 继培养之后,要从样品液中分离生物材料(优选地为核酸)。在本发明中,这通常需要在磁场帮助下,使用磁性二氧化硅颗粒,通过分离结合到颗粒的核酸而实现。例如,所述磁性颗粒可以被吸附到发生培养的容器的壁上。接下来除去含有未与磁性颗粒结合的样品内容物的液体。

[0026] 所述去除根据发生培养的容器的类型而定。适当的除去液体的方法步骤为,例如,用移液管移除或用吸管吸除液体。

[0027] 如果需要,负载的磁性颗粒可以用洗涤液纯化一次或多次。选择适当的洗涤液以使生物材料(如核酸)优选地不会从颗粒表面释放,或者至少不以任何显著量释放,但尽可能洗去任何杂质。所述洗涤步骤优选地通过将洗涤溶液与负载的颗粒进行培养而实现,其中,优选地,例如通过摇晃或施加不同于第一磁场的磁场来重悬颗粒。被污染的洗涤溶液优选地以与核酸结合结束时除去裂解液同样的方式除去。

[0028] 可以采用任何常规的洗涤缓冲液或任何其它适当的介质作为洗涤溶液。通常优选具有低或中等离子强度的缓冲液,例如,pH 为 8 的 10mM Tris-HCl、0-10mM NaCl。然而,还可以采用具有较高盐浓度的洗涤缓冲液,例如,3M 盐酸胍。同样地,可以采用其它用于进行洗涤步骤的标准介质,如含醇介质,例如具有 1 到 5 个碳原子的低级烷醇的溶液,优选乙醇水溶液,特别优选 70% 的乙醇水溶液。

[0029] 采用磁性颗粒能简化洗涤步骤的操作,其利用了颗粒的磁性聚集作用,分离核酸结合介质,除去洗涤介质并在每当本领域技术人员认为必要时加入新鲜洗涤介质。

[0030] 核酸分离步骤以及任何任选的洗涤步骤之后,载有核酸的载体被转移(如重悬或浸没)到任何适当的介质内(如水或低离子强度缓冲液)。

[0031] 在最后一次洗涤步骤之后可在真空下或通过分离 (stripping) 液体对磁性颗粒进行短时干燥。

[0032] 当然显然的是,上述洗涤和干燥步骤不仅适用于纯化和 / 或分离核酸,也适用于纯化和 / 或分离其它上述生物材料。

[0033] 根据载体和后续工作的性质来选择是否要将核酸从载体上洗脱下来。对特定的固态载体如上述磁性颗粒而言,在多数情况下它们可以直接使用,例如用于 PCR 或其它扩增方法,此时就不需要将核酸从载体上洗脱下来。而且,对许多 DNA 检测方法或 DNA 鉴定方法而言,尽管 DNA 偶尔会与球形的表面接触并可能通过氢键、离子键或其它作用力结合到许多位置上,仍然有足够长的 DNA 可用于与寡核苷酸杂交和扩增,因此洗脱同样是不必要的。

[0034] 当所述生物材料为天然核酸时,根据本发明,需要用低盐含量的洗脱缓冲液将核酸从磁性颗粒上除去。此类缓冲液从现有技术中获知 [Analytical Biochemistry 175, 196-201 (1988)]。盐浓度低于 0.1 mol/l 的缓冲液特别适合作为低盐含量的洗脱缓冲液。尤其优选的洗脱缓冲液含有 Tris-HCl。

[0035] 去离子水也特别适用于洗脱。

[0036] 如果需要,还可以将 RNA 与 DNA 分离并除去,这可以通过在 DNA 分离步骤之前破坏 RNA 来实现,例如,通过添加 RNA 酶或碱,如 NaOH。

[0037] 通过将本发明上文所述的细胞分离与本发明其它地方所述的核酸分离相结合,优选在本发明所述的升高的结合温度下以它们的天然形式结合到优选为颗粒形式的磁性载体材料上,提供一种尤其有利的从细胞样品中分离核酸的方法。该实施方案的优势不仅在于它的简单与高灵敏度,还在于它通过在升高的温度下根据本发明将核酸结合到二氧化硅表面以易于自动化地却特别地获得高得率。

[0038] 作为本发明的方法的结果,分离的生物材料可以任何所需方式进一步使用。例如,它可用来作为各种酶反应的底物。就以实施例的方式提到的核酸而言,可用于测序、放射性或非放射性标记、含有所述核酸的单或多序列的扩增、转录、与标记有探针的核酸杂交、翻译或结合。本发明方法的一中优势在于,从液体中分离生物材料,特别是核酸,不仅仅简单,而且具有高得率和高通过率。

[0039] 图 1 显示了实时 (RT)-PCR 之后 HCV-RNA 的 Ct 值的平均数与结合温度的关系。该图进一步的描述在实施例 1 中。

[0040] 图 2 显示了实时 (RT)-PCR 之后 HCV-RNA (图 2a)、HBV-DNA (图 2b) 和 ‘武装 HIV’ (图 2c) 的 Ct 值的平均数与结合温度的关系。该图进一步的描述在实施例 2 中。

[0041] 实施例 1

[0042] 提取病毒 RNA 和病毒 DNA (采用 MagAttract Virus Mini M48Kit (QIAGEN, Hilden, 德国))。

[0043] 400 μ l 血浆、血清或 CSF (液态) 用市售裂解缓冲液如含有 3 μ g 载体 RNA 的 435 μ l QIAGEN 裂解缓冲液 AL 和蛋白酶如 80 μ l 重悬于 QIAGEN 蛋白酶重悬缓冲液的冻干的 QIAGEN 蛋白酶处理,并混匀。混合物在 56 $^{\circ}$ C 下培养 15 分钟。

[0044] 然后加入磁性二氧化硅颗粒如 30 μ l MagAttract Suspension B (QIAGEN, Hilden, 德国) 和 525 μ l 异丙醇。然后在 8 $^{\circ}$ C、18 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C、36 $^{\circ}$ C、46 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C 或 75 $^{\circ}$ C 培养 5 分钟 (见下文),其间核酸结合到磁性二氧化硅颗粒上。分离颗粒之后丢弃液相,颗粒

用洗涤缓冲液如 500 μ l 用乙醇重建的 QIAGEN 洗涤缓冲液 AW2 洗涤。重复后面的洗涤步骤。颗粒然后用 500 μ l 乙醇洗涤。分离颗粒之后丢弃乙醇相,并在室温下干燥颗粒。接下来用市售的洗脱缓冲液如 100 μ l QIAGEN AVE 洗脱缓冲液洗脱核酸,丢弃磁性二氧化硅颗粒,所述洗出液在 75°C 加热超过 5 分钟。

[0045] 按照上述方法处理 HCV (RNA 病毒) 阴性的人血浆。样品分成同样的 12 份,先回火,然后每份分别在 8°C、18°C、26°C、36°C、46°C、56°C、65°C 和 75°C 进行结合。每份获得的洗出液进行 HCV- 特异性实时 (RT)-PCR。从对应于结合温度的 Ct 值的平均数来看 (图 1),清楚地知道采用本发明的方法,温度范围从 36°C 到 75°C 时进行的结合,令人印象深刻地解决了作为本发明的基础的目标。

[0046] 实施例 2

[0047] 在另一个试验中, HCV (单链 RNA 病毒)、HBV (双链 RNA 病毒) 和 ‘武装 HIV’ (包装入蛋白铠甲内的合成的 RNA) 阴性的人血浆根据上述实施例中描述的方法进行处理。

[0048] 每种条件下对 6 份同样的样品分别进行 6 轮试验,一方面用标准 QIAGEN MagAttract Virus Mini M48 试验方法 (实施例 1 中的试验方法,但在 8°C 时结合核酸),另外采用修改的 MagAttract Virus Mini M48 试验方法,即裂解产物在结合前先于 56°C 回火。每种条件下获得的洗出液进行针对 HCV、HBV 和 HIV 的实时 (RT)-PCR。从对应于结合温度的 Ct 值的平均数 (如图 2a 到图 2c 所示) 可以很明显看出,采用本发明的方法,在升高的温度下结合核酸显著增加了得率。

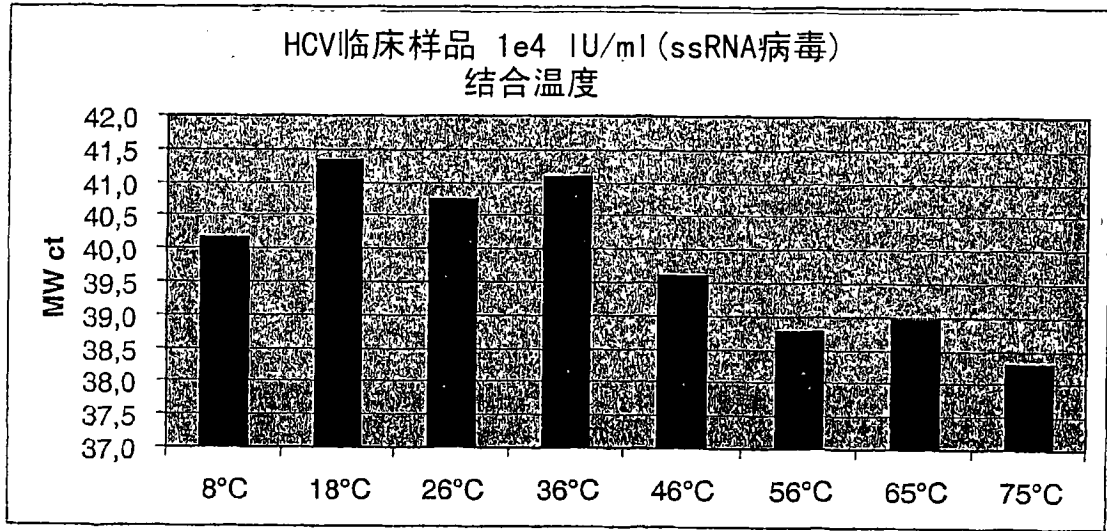


图 1

图2a)

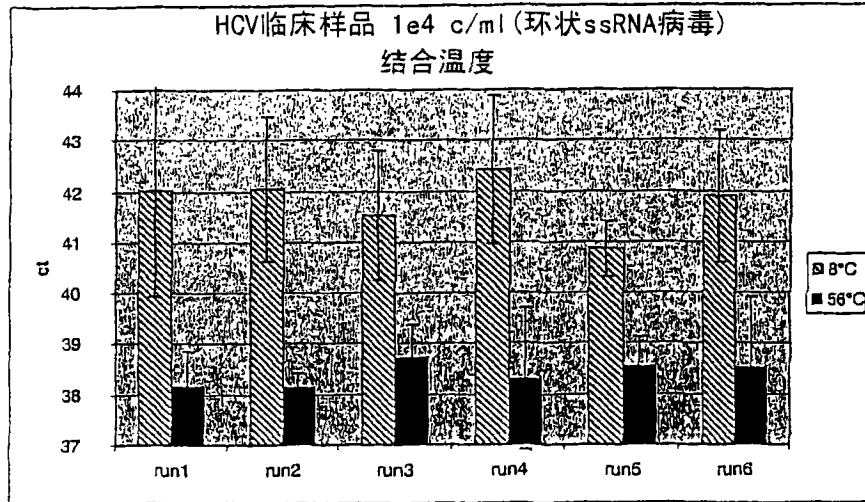


图2b)

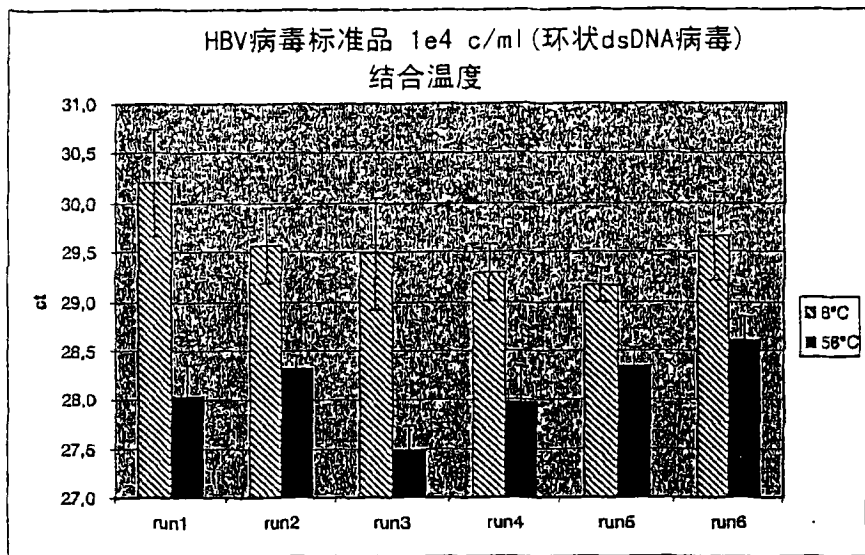


图2c)

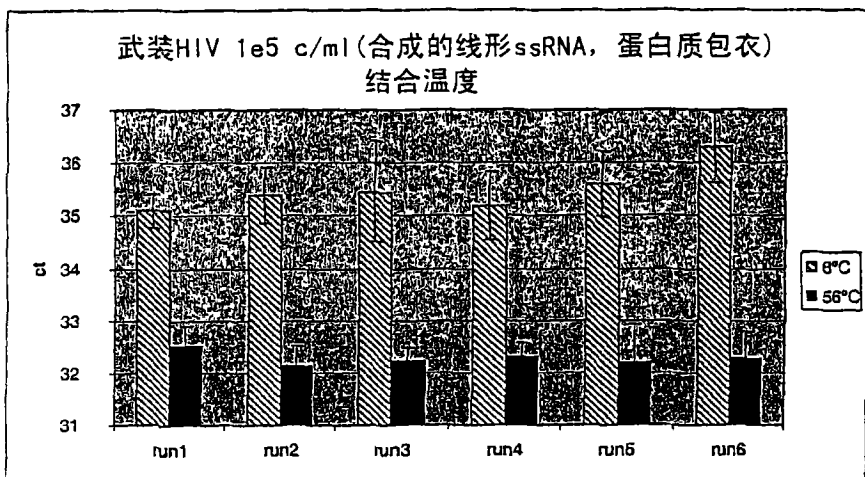


图 2