

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07H 21/04 (2006.01)

C07H 1/06 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03122396.6

[45] 授权公告日 2008 年 6 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 100395257C

[22] 申请日 2003.5.8 [21] 申请号 03122396.6

[73] 专利权人 慈溪市中鼎生物技术有限公司
地址 315300 浙江省慈溪市浒山东山路金山华联小区 D2 幢

[72] 发明人 陈 辉

[56] 参考文献

US - B1 - 6218531 2001.4.17

US - A - 5342931 1994.8.30

US - A - 5674997 1997.10.7

中国药典 2000 年版(二部) 2000.1.1

审查员 姚 云

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 龙 淳

权利要求书 1 页 说明书 16 页

[54] 发明名称

钾离子酸性水溶液和利用这种溶液的 DNA 提取方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种从其它物质中分离生物材料的方法，特别是核酸，例如 DNA 或者 RNA 或者 DNA 和 RNA 的杂交分子。本发明还提供了一种从生物材料中纯化核酸的方法，特别是 DNA 的方法。该方法使用了一种含硅材料，并结合使用一种新颖的溶液制备高纯度的生物材料，特别是 DNA。其中含硅材料是吸附目标材料的载体，发明的新颖溶液的作用在于促进目标物质与含硅材料的结合，特别是促进 DNA 与含硅材料的结合。该溶液是酸性的含钾离子水溶液。本发明进一步提供了利用这种方法的试剂盒，其中包括适量的含硅材料和这种溶液，以及其它需要的试剂或者溶液。本发明进一步提供了利用这种方法制备的 DNA。由于在制备过程中没有使用离液剂和其它有毒的、或者昂贵的试

剂，这种 DNA 制备物可以用于多种应用中，特别是用于制备食品或者制药工业中。

1. 一种核酸的分离和纯化方法，该方法包括：

(1) 在含有核酸的生物材料中加入适量包括钾盐和酸作为溶质的含钾离子的酸性水溶液或其溶质，混合均匀，使得得到的终溶液中钾离子的浓度范围为 0.3M-饱和，pH 值为 2.0-4.0，所述钾盐选自 K_2SO_4 、 KNO_3 、KCl、醋酸钾和它们的任意混合物，所述酸选自醋酸、丙酸、盐酸、硫酸、硝酸、磷酸和它们的任意混合物；

(2) 向步骤 (1) 所得溶液中加入含硅材料，使所述核酸吸附于所述含硅材料；

(3) 洗脱步骤 (2) 中的吸附有核酸的含硅材料，得到所述的核酸。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述核酸是 DNA。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述终溶液中钾离子的浓度范围是大于等于 1M。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述终溶液中 pH 值为 2.6—3.9。

5. 一种利用权利要求 1 所述的方法的 DNA 的分离和纯化试剂盒，其中所述试剂盒包括：一种包括钾盐和酸作为溶质的含钾离子的酸性水溶液或其溶质，以及其它 DNA 分离和纯化过程中需要的试剂或者物质，其中在通过在含有 DNA 的生物材料中加入适量所述酸性水溶液或其溶质得到的终溶液中，所述钾离子的浓度范围为 0.3M-饱和，pH 值为 2.0-4.0，所述钾盐选自 K_2SO_4 、 KNO_3 、KCl、醋酸钾和它们的任意混合物，所述酸选自醋酸、丙酸、盐酸、硫酸、硝酸、磷酸和它们的任意混合物。

6. 如权利要求 5 所述的 DNA 分离和纯化试剂盒，其中所述终溶液中钾离子的浓度范围是大于等于 1M。

7. 如权利要求 5 所述的 DNA 分离和纯化试剂盒，其中所述终溶液中 pH 值为 2.6—3.9。

钾离子酸性水溶液和利用这种溶液的 DNA 提取方法和试剂盒

技术领域

本发明涉及分子生物学领域。特别来说，本发明涉及一种用于生物材料提取和纯化的溶液以及使用了这种溶液的用于生物材料提取和纯化的方法。尤其是，本发明涉及 DNA 的提取方法，该方法是利用在含有钾离子的酸性水溶液存在的情况下，使含硅材料与一种含有目标生物材料，例如 DNA 作用，将 DNA 吸附到含硅材料上；然后通过进一步处理制备高纯度的 DNA。

背景技术

从各种生物材料中分离和制备高纯度的目标物质是很重要的技术。因为生物材料，不论是天然的生物材料，例如组织细胞、血液，还是人工制备的生物材料，例如多聚酶链式反应的产物，都是复杂的混合物。在研究和应用中，常常有必要对这些材料进行处理，以便分离和纯化目标物质。比如天然的脱氧核糖核酸，即 DNA，依据其来源不同，常常是以混合物的形式与多种其它物质共同存在，例如蛋白质、脂类、和其它成分。如果要研究某个基因，就要获得该基因的 DNA 分子。所以分离和纯化质粒 DNA、噬菌体 DNA、染色体 DNA 的方法在分子生物学领域、基因治疗领域和制药工业有非常重要的应用。

DNA 的纯化方式分为二类：一类是构建物 DNA 的纯化，如重组质粒或噬菌体在宿主中繁殖后的纯化，这一技术是分子克隆及分子生物学实验常用技术的基础。第二类在从原核或真核生物中纯化染色体基因组 DNA，该技术的应用使得复杂基因的研究更加容易、简便，特别使得代表不同种类的基因组 DNA 库的构建成为可能。

随着分子生物学和其它领域的快速研究进展，需要更加安全、有效甚至能够实现工业化和自动化的新方法。其中引人注目的是利用含硅材料的吸附性能，在结合剂(binding agent)，也叫结合增强剂(binding enhancer)的存在下，使其与含有目标物质的材料作用，发生吸附作用；

去除其它物质，对吸附有目标物质的含硅材料洗脱获得目标物质。在 1998 年 6 月 25 日提出申请的美国专利 6,218,531 中公开了使用二氧化硅基质，从添加了离液剂的裂解的生物材料中分离 RNA。

含硅材料对于核酸，包括 DNA、RNA 和 DNA 与 RNA 的杂交分子，具有的可逆性吸附作用是这种分离方法的基础。在结合剂中，最重要的是离液剂 (chaotrope, chaotropic agent)，包括离液盐 (chaotropic salt)。常用的离液剂包括碘化钠 (NaI)、尿素、盐酸胍 (Gu·HCl)、高氯酸钠 (NaClO₄) 和溴化钾 (KBr)。也有使用醇类作为结合剂的，例如 100% 的乙醇，参见欧洲专利申请 0 512 676 A1，或者参见美国专利 5,783,686 的背景技术部分。

但是已知的作为结合剂的化合物多数是有毒的，具有危害性，所以已经有不少研究试图减少或者不使用上述的结合剂。例如参见美国专利 5,342,931 (申请日为 1993 年 4 月 23 日)；美国专利 5,503,816 (申请日为 1993 年 9 月 27 日)；美国专利 5,693,785 (申请日为 1994 年 11 月 17 日)；和美国专利 5,674,997 (申请日为 1995 年 5 月 10 日)。

在美国专利 5,342,931 中，公开了一种 DNA 纯化方法，其中使用了水合二氧化硅。该方法是在水或者生理缓冲溶液中，将 DNA 结合到水合二氧化硅上；分离和洗涤结合了 DNA 的水合二氧化硅；在热的生理缓冲溶液中或者在热水中，从水合二氧化硅上洗脱 DNA。

在美国专利 5,503,816 中，公开了多种具有亲水性和正电性的含硅材料，优选的含硅材料包括硅酸硼、硅酸铝、磷酸硅酸、羰基硅、磺基硅和膦酰基硅。其中一些材料可以在不使用离液剂，仅仅使用水的情况下回收 DNA。但是所有这些材料要在特定的条件下制备。

在美国专利 5,693,785 中，公开了分离或者纯化 DNA 的组合物和方法。该组合物是羟化二氧化硅聚合物，是用二氧化硅与碱性溶液反应，然后经过酸化制备。用这种方法产生的羟化二氧化硅聚合物可以在水溶液中结合 DNA，不需使用结合剂，例如醇类或者离液剂。被结合的 DNA 可以从溶液中分离，并通过加热洗脱到水中或者缓冲液中。

在美国专利 5,674,997 中，公开了纯化 DNA 的方法。其中所用的几种含硅材料具有在只使用水的情况下结合和洗脱 DNA 的能力，这些材料是硅酸硼、硅酸铝、磷酸硅酸和膦酰基硅。但是这些材料要在特

定条件下形成。

在上述这些美国专利 5,342,931, 5,503,816, 5,693,785 和 5,674,997 中,公开了减少或者不使用结合剂的 DNA 分离或者纯化方法,但是都涉及对含硅材料的特殊处理,即修饰改性,或者要求在特定的条件下用特定反应制备,所以不便于方便应用和降低成本。

因此,在使用含硅材料通过可逆的吸附作用分离和纯化生物物质,特别是 DNA 时,传统的结合剂,特别是离液剂应该予以减少或者避免。特别是离液剂或者离液盐被禁止应用于制药工业。因为即使是微量的离液剂或者离液盐的残留也是对人体有害。但是,迄今为止的努力没有很好的解决这个问题,现有技术将注意力放在了寻求含硅材料的特定制备方法和修饰改性上。这就限制了这种分离和纯化方法的应用范围,需要对特定材料进行性质研究,无疑带来了种种不便,而且增加了成本。

本发明的目的就是针对上述问题,在使用普通常见的含硅材料作为吸附载体的前提下,寻找新颖的结合剂。

发明简述

第一个方面,本发明涉及一种溶含有钾离子的酸性水溶液,其具有如下特征:

1. K^+ 离子浓度范围是 0.3M-饱和;
2. pH 2.0-4.0

其中 K^+ 离子来源于钾盐溶解,合适的钾盐有,但不仅限于, K_2SO_4 、 KNO_3 、 KCl 、醋酸钾等,也可以是钾盐的任意混合物。无论使用何种钾盐或者钾盐混合物,条件是钾离子的浓度只要满足大于或者等于 0.3M;同时用酸将含有钾离子溶液的酸度进行调节,使其 pH 在 2.0 到 4.0 之间。酸可以是弱酸或者强酸。优选弱酸,例如醋酸。

第二个方面,本发明涉及该溶液的用途。发明人发现该溶液可以用于生物物质的分离和纯化,例如核酸的分离和纯化,包括 DNA 和 RNA。例如,将这种溶液适量加入含有 DNA 的混合物中,可以促进含

硅材料吸附其中的 DNA；除去未吸附的其它物质，洗脱吸附有 DNA 的含硅材料就可以实现 DNA 的分离和纯化。必要时，也可以加入一定量的该溶液的溶质促进含硅材料吸附其中的 DNA。

第三个方面，本发明涉及生物物质的分离和纯化方法，该方法包括在含有目标生物物质的生物材料中加入适量本发明的溶液，以及使用含硅材料吸附上述所得溶液中的目标生物物质，经过洗脱得到目标生物物质。

第四个方面，本发明涉及核酸的分离和纯化方法，该方法包括在含有目标核酸的生物材料中加入本发明的溶液，以及使用含硅材料吸附其中的目标核酸，洗脱得到目标核酸。

第五个方面，本发明涉及 DNA 的分离和纯化方法，该方法包括在含有目标 DNA 的生物材料中加入本发明的溶液，以及使用含硅材料结合其中的目标 DNA，洗脱得到目标 DNA。

第六个方面，本发明涉及 DNA 的分离和纯化试剂盒，该试剂盒包括本发明的溶液，或者适量钾盐或者钾盐混合物和适量的某种酸的溶液，以及其它 DNA 分离和纯化过程中需要的试剂或者物质。该试剂盒可以包括所有需要用到的试剂和物质，也可以包括主要的试剂和物质，其余则由使用者自己提供。试剂盒中进一步可以包括试剂盒使用说明书。

第七个方面，本发明涉及用本发明所述方法制备的 DNA。该 DNA 纯度高，不含有结合剂残留，例如有毒的离液剂残留，可以应用于多个方面。例如，用于制药工业，作为食品添加剂，作为化妆品的添加剂等。

发明详述

采用吸附介质对于生物材料中的目标物质进行可以吸附和解吸附的可逆过程可以进行目标物质的分离和纯化。含硅材料具有这种吸附和解吸附的特性，所以在 DNA 分离和纯化中广泛用到含硅材料。例如含硅材料，象二氧化硅、玻璃粉、玻璃、硅藻土等，一般需要高浓度的离液剂或者醇类，才能实现在其表面结合水溶液中的 DNA。但是离液剂等传统结合剂会带来种种不利因素，所以尽量要少用或者不用这

些结合剂。一种已知的解决办法是对含硅材料本身进行化学修饰或者化学改性，另一种方法是采用特定条件制备具有特殊性能的含硅材料。总之这增加了操作的复杂性，并且对于吸附基质具有严格的限制。本发明提供的溶液不仅避免了使用传统的结合剂，而且可以使用各种含硅材料。本发明的溶液不含有对人体有害的物质，克服了传统结合剂的缺点，而且成本低廉，取材广泛，配制方便，可以看作新颖的结合剂，是传统结合剂的替代物。

本发明的溶液是含有钾离子的酸性水溶液，其中 K^+ 离子浓度范围至少为 0.3M，pH 为 2.0-4.0。典型地，这种酸性水溶液是用醋酸调节的氯化钾溶液，其中氯化钾的浓度为 0.3/L-饱和；醋酸的浓度为 1-7mol/L。合适的钾盐还有 K_2SO_4 、 KNO_3 、醋酸钾。也可以使用几种钾盐任意混合物，例如氯化钾和硫酸钾。可以使用的酸包括弱酸和强酸，优选弱酸。弱酸选自醋酸、丙酸等，强酸选自盐酸、硫酸、硝酸或磷酸等。由于在用强酸调节 pH 值时操作比较困难，所以优选弱酸，尤其优选醋酸。

其中钾离子浓度和 pH 值是最为关键的技术特征。

对于不同钾盐，其在水中的饱和度不同，所以本发明所述钾盐溶液的浓度的上限是各种钾盐在水中达到饱和。但是饱和度是随着温度变化而变化的，所以在加热的情况下，饱和度会有所变化。本发明虽然是在室温下讨论钾盐的饱和度的，但是并不意味着本发明不可以在其它温度下进行。实际上，在特定的温度下进行本发明也是可以。在此情况下，钾盐的饱和度自然有所变化。所以，钾盐溶液中的钾盐在加热等条件下的变化也包含在本发明的范围之内。

钾盐在水中溶解，形成了钾离子。钾离子的来源既可以是一种钾盐溶解，也可以是两种或者更多种钾盐溶解。所以本发明所述含有钾离子的水溶液的溶质可以是一种钾盐，也可以是多种钾盐的混合物。溶液中的钾离子浓度是其中溶质溶解形成的钾离子的总浓度。钾离子的浓度至少为 0.3mol/L，可以高至该盐的溶解达到饱和。如前所述，这里的讨论是指室温条件下。但是也可以在加热等条件下进行，钾盐的溶解饱和度可以预见会有所变化。

适用于本发明的钾盐包括 KCl 、 K_2SO_4 、 KNO_3 、醋酸钾等，以及

它们的任意混合物。优选在水中饱和度较大的钾盐。在本发明中优选氯化钾。

本发明的钾盐溶液是酸性的水溶液，是用酸调节其酸度的。合适的酸是醋酸、硫酸、硝酸、磷酸等。注意这里的例举并非穷尽，只要能够实现本发明的目的，任何调节酸度的物质都是可以使用的。这些酸可以分为弱酸和强酸。优选弱酸，这是因为操作上的便利。在调节pH值时，使用弱酸容易达到目标酸度范围。在弱酸中，最优选醋酸。

在本发明的一个实施方案中，钾盐是氯化钾，酸是醋酸。典型地，醋酸调节的氯化钾溶液中的氯化钾的浓度为0.3-2.5mol/L；醋酸的浓度为1-7mol/L。优选氯化钾的浓度为1.5-2.5mol/L；醋酸的浓度为3-5mol/L；更优选氯化钾的浓度为2-2.5mol/L；醋酸的浓度为3-4mol/L。

本发明使用的含硅材料可以是任何一种含硅材料。实例包括，但不限于二氧化硅、玻璃、硅藻土。它们可以具有多种形态，例如玻璃可以是玻璃粉、玻璃纤维等，只要它们具有一定的表面积，满足吸附DNA等目标物质的需要即可。优选的含硅材料具有足够的亲水性和正电性的含硅材料，如玻璃粉或者玻璃纤维、硅藻土等。当然，本发明也可以使用美国专利5,342,931，5,503,816，5,693,785和5,674,997中公开的特殊的含硅材料。在本发明的实施中，含硅材料可以是粉末形式，通过在溶液中吸附目标生物物质，从溶液中分离和纯化目标生物物质，例如DNA。也可以将含硅材料装柱使用，通过吸附柱分离和纯化目标生物物质。

实验表明本发明的含有钾离子的酸性水溶液可以促进目标生物材料，特别是DNA与各种含硅材料结合。分离或者纯化的效果良好，所得产品可以满足多种需要，尤其可以应用于制药工业中。在本发明的分离和纯化中，对于含硅材料没有特殊要求，可以使用各种含硅材料，包括未经修饰或者改性的含硅材料，也包括经过修饰或者改性的含硅材料，以及用特殊方法制备的含硅材料。在此所用，“含硅材料”是指所有的含硅材料，例如二氧化硅、玻璃、硅藻土等以及水合二氧化硅等材料。由于修饰或者改性对本发明的含硅材料不是必需的，为了叙述的方便，在本发明中对于吸附载体，即各种含硅材料不加详细区分，通称为含硅材料。

本发明的分离和纯化方法的特点在于本发明的溶液的使用免除了对含硅材料的特殊性能要求，避免了离液剂等结合剂的使用。对于从溶液中提取目标物质，本发明分离和纯化方法的大致过程包括：在含有目标生物物质的混合物中加入适量本发明所述溶液，混合均匀；然后，向其中加入含硅材料，使目标生物物质结合在含硅材料上；分离出吸附有目标物质的含硅材料。该方法可以进一步包括对吸附有吸附有目标物质的含硅材料的洗涤和洗脱过程。在此所用，目标生物物质可以是蛋白质、核酸等，其中核酸是指 DNA、RNA 以及它们的杂交体，前提是加入适量的本发明的溶液时，混合物中的目标物质可以选择性地与含硅材料结合。本发明优选用于 DNA 的分离和纯化。本发明人发现在含有 DNA 的溶液中加入适量的本发明的溶液，含硅材料能选择性可逆地吸附 DNA。在本发明的方法中，优选加入含有钾离子的酸性水溶液，这是出于方便和操作的考虑；必要时，也可以加入该溶液的适量溶质。发明人发现含硅材料也可以在钾盐溶解达到饱和的条件下，吸附目标生物物质，特别是 DNA。

通常，“分离”是指从目标物质所存在的原始混合物中提取目标物质。对于分离质粒 DNA 来说，就是经过菌体培养、质粒扩增和收集菌体后，从菌体中提取质粒的 DNA 分子。“纯化”是指将所得纯度不符合要求的目标物质进一步处理，使其纯度得以提高。由于两个过程的区分仅仅是起始材料不同，其本质是得到某种目标物质，实现物质由混合态向单一态的转化，有时两个过程具有重叠。所以，在本申请中，对于“分离”和“纯化”不加严格区分，一般写为“分离和纯化”，它们也可以相当于“提取”，“制备”等词语的涵义。

用本发明的方法提取质粒 DNA 时，先从菌体培养物中分离出细胞；用碱变性裂解法，采用 NaOH-SDS 裂解细胞；加入适量的本发明的溶液，混匀；加入含硅材料，进行吸附；分离吸附了质粒 DNA 的含硅材料；洗涤除去其它物质；洗脱吸附了质粒 DNA 的含硅材料，得到 DNA。

在这个提取过程中，改进体现在：加入适量的本发明的溶液到含有 DNA 的裂解液中；含硅材料在本发明的溶液存在的条件下有选择地吸附 DNA。

换句话说，在这个提取过程中，改进体现在：加入适量含钾离子的酸性水溶液到含有 DNA 的裂解液中；含硅材料在钾离子和酸性条件下有选择地吸附 DNA。

含钾离子的酸性水溶液的作用在于创造一个促进目标生物物质，特别是 DNA 与含硅材料的结合条件。所以它是在含硅材料吸附 DNA 等目标物质之前加入混合物溶液中的，其添加量，例如添加体积，和浓度除了取决于该溶液本身的浓度和酸度以外，在具体应用中还应该根据起始混合物的原始酸度和其中是否已经含有钾离子以及所含钾离子的浓度进行相应的调整。所以当本发明的溶液使用于具体的目标生物物质的分离和纯化时，依据具体情况该溶液的浓度和 pH 值可以有所不同，这些改变也是没有背离本发明的精神和宗旨，属于本发明的范围之内。在这一点上，为了清楚起见，有关本发明的溶液在目标生物物质的分离和纯化中使用时的技术指标是使用以下指标：就是在添加了本发明的溶液后，在与含硅材料作用之前，含有目标物质的溶液中钾离子浓度和溶液的 pH 值。必要时，可以添加本发明溶液的溶质满足上述的条件。实际上，本发明从另外一个方面而言，就是有关含有目标物质的溶液究竟在什么样的条件下可以与含硅材料作用，发生目标物质的吸附，从而实现一定的分离纯化目的。

对于从溶液混合物中分离和纯化 DNA 而言，在与含硅材料作用之前，使用含有钾离子的酸性水溶液调节时应该满足：在调节后的溶液混合物中，钾离子的终浓度大于等于 0.3mol/L，pH 值在 2.0-4.0 之间。由于发明人还发现在吸附作用发生之前，含有 DNA 的溶液混合物中的钾离子可以很浓，直至达到相应钾盐的饱和度。所以这里所述条件的上限是相应钾盐的饱和。也就是，在本发明的方法中可以加入相应钾盐的溶质。考虑到方便性，优选使用含钾离子的酸性水溶液。

因此，本发明的一个方面就是提供了含硅材料吸附目标生物物质的条件，也即，含有目标生物物质的混合物溶液中的钾离子浓度大于等于 0.3mol/L，pH 值在 2.0-4.0 之间时，会发生含硅材料选择性吸附目标生物物质，特别是 DNA。

本发明的方法包括在使所述样品溶液与含硅材料作用之前，调节样品溶液中的钾离子浓度和酸度。合适的做法是添加一定量的含有钾

离子的酸性水溶液。但是可以对于这种调节方式有各种变通，比如原料物质本身的钾离子浓度和酸度满足了上述条件，那么就可以略去本步骤。本发明的核心在于使用上述条件使含硅材料吸附目标生物物质，特别是 DNA。所以，任何实质上使用了上述条件和含硅材料的方法均是本发明的变通，自然包括在本发明的范围之内。

换言之，本发明的方法是利用含硅材料吸附钾离子浓度大于等于 0.3mol/L，pH 值在 2.0-4.0 之间的溶液混合物中的目标生物物质，特别是 DNA。

具体而言，在本发明的一个实施方案中，从大肠杆菌中分离了质粒 DNA。先从菌体培养物中分离出细胞；采用 NaOH-SDS 裂解细胞；调节含有目标物质的混合物溶液中的钾离子浓度和酸度，达到本发明所述吸附条件；加入含硅材料，进行吸附；分离吸附了质粒 DNA 的含硅材料。本方案中，还可以进一步包括洗涤除去其它物质；洗脱吸附了质粒 DNA 的含硅材料，得到质粒 DNA；以及冻干等步骤。

在另一个实施方案中，本发明从 DNA 水溶液中回收了其中的 DNA。是在 DNA 水溶液中加入适量本发明的含有钾离子的酸性溶液，调节至本发明所述吸附条件；加入含硅材料，进行吸附；离心获得吸附了质粒 DNA 的含硅材料；再通过洗涤和洗脱，回收 DNA 分子。

为了得到纯度更高的 DNA 分子，可以重复本发明的方法。例如，用含有钾离子的酸性溶液调节待分离溶液，吸附，分离吸附有 DNA 分子的含硅材料；洗涤和洗脱。再将洗脱得到的 DNA 溶液重复上述步骤，直到需要的纯度。

如前所述，本发明首先是提供了一种特殊的溶液，即酸性含钾离子的水溶液。这种溶液配制简单，材料容易获得，价格低廉，并且这种溶液的成分不含有对人体有害的成分。该溶液的使用使目标生物分子和含硅材料可以结合，并且对于含硅材料可以没有特殊的要求。使用本发明的溶液进行分离和纯化方法包括如下步骤：在含有 DNA 的材料中加入适量发明溶液，有时需要离心取出上清；将溶液或者上清与含硅材料作用；然后将吸附有 DNA 的含硅材料洗脱获得 DNA 溶液。

如前所述，本发明其次是提供了一种分离和纯化方法，该方法包括在含有目标生物物质的混合物溶液中的钾离子浓度大于等于

0.3mol/L, pH 值在 2.0-4.0 之间时, 用含硅材料选择性吸附目标生物物质, 特别是 DNA。在本发明的方法中, 如果必要, 钾离子浓度和 pH 值的调节都是简便易行的。并且上述方法所得产品可以满足制药工业的需要。

本发明的方法不需使用特殊的含硅材料, 所以基质取材更加广泛; 而且这些含硅材料相对于改性含硅材料更加稳定, 吸附和解吸附特性不易受环境和分离材料中的杂质成分的影响; 另外本发明所述溶液所含化学试剂对人体无害, 价格相对便宜; 所以适用于大规模提取 DNA。

本发明的再一个优点在于分离纯化效率高, 对于原材料中的目标物质的损失较小。

本发明的溶液的溶质可以以混合物的形式做成小分装的产品, 提供使用者使用。由使用者用水溶解, 并用醋酸等酸调节溶解后溶液的 pH 值, 用于分离纯化过程。也可以与相关试剂和物质制成 DNA 提取或者其它用途的试剂盒。也可以将本发明的溶液组合进现有的试剂盒中, 形成新的试剂盒, 它们也在本发明的范围之内。比如一种试剂盒, 用于大肠杆菌中质粒的分离和纯化, 其中包括: 碱裂解试剂, 本发明的溶液, 以及其它必要的试剂。当然视情况而言, 它们可以分别装入小瓶或者其它容器中, 也可以进行适当的合并。在试剂盒中, 可以进一步包括使用说明书等。

本发明的溶液, 本发明的含硅材料的吸附条件可以进一步与已有的仪器整合, 这些整合也是在本发明的范围之内。

通过本发明所述方法制备的 DNA 或者其它满足纯度要求的物质, 由于不含有被禁止应用于制药工业的离液剂残留, 所以可以在多种应用中予以应用。广泛应用于生物学实验, 制药工业, 食品、化妆品、营养品等方面。

具体实施方式

以下为本发明所述方法的具体实施方案, 主要是例举性说明本发明的溶液、所述分离和纯化方法以及所述试剂盒。正如本技术领域的技术人员所理解的那样, 这里的描述仅仅是例举性的, 本发明的范围仅受所附权利要求的限制。

实施例 1 pH 值对于分离纯化的影响

大肠杆菌中质粒 DNA 的提取纯化：

- 1) 取 1.5ml 大肠杆菌(HB101, 含 pUC19 质粒)过夜培养液于 1.5ml 离心管 (共 7 管编号 1-7)。12000g 离心 30 秒, 丢弃上清液;
- 2) 向沉淀物加入溶液 A 200 μ l, 充分混悬细胞;
- 3) 加入溶液 B 200 μ l, 上下颠倒试管, 使之充分混匀, 室温静置 3 分钟;
- 4) 加入溶液 C 250 μ l, 上下颠倒试管, 使之混匀, 4 $^{\circ}$ C, 15000g 离心 10 分钟;
- 5) 小心吸取上清液至一底部放有 50mg 玻璃粉 (或玻璃纤维) 的离心柱, 将离心柱放入 2 ml 离心管中, 15000g 离心 1 分钟, 弃去离心管中溶液;
- 6) 吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱, 15000g 离心 30 秒, 弃去离心管中溶液;
- 7) 再吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱, 15000g 离心 2 分钟;
- 8) 将离心柱小心从 2ml 离心管中取出, 放入一洁净 1.5ml 离心管中, 加入 100 μ l 溶液 E, 放置 1-2 分钟, 15000g 离心 1 分钟。质粒 DNA 即被洗脱。

其中

溶液 A: 20 μ g/ml RNase A, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 10mM EDTA(pH8.0)

溶液 B: 0.2 M NaOH, 1%SDS

溶液 C: 2.5M KCl, HAC 浓度见下表 1

溶液 D: 70%乙醇

溶液 E: 10mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH 8.0

表 1

样品编号	溶液 C 中 HAC 浓度 (M)	溶液 C 中 KCl 浓度 (M)	溶液 A, B, C 混合后体系 pH	DNA 得率 (μ g)
1	1	2.5	3.9	10.0
2	2	2.5	3.6	15.9

3	3	2.5	3.3	27.1
4	4	2.5	3.1	33.8
5	5	2.5	3.0	29.1
6	6	2.5	2.8	25.3
7	7	2.5	2.6	20.2

备注：溶液 A, B, C 混合后体系 pH 是指在添加了本发明的溶液后，在与含硅材料作用之前，含有目标物质的溶液中的 pH 值。

表 1 说明在钾离子浓度不变的情况下，溶液 C 中的醋酸含量的变化导致吸附作用前溶液中的 pH 值的改变。这种改变对于 DNA 的得率有显著影响。上述实验结果表明在溶液 C 中的 K 离子浓度为 2.5M，醋酸含量为 4M 时，可以得到较高的提取量；对应地，当吸附前含有 DNA 的溶液中的 K 离子浓度为 0.89M，pH 为 3.1 时，有较高的 DNA 的得率。

实施例 2 钾离子浓度对于分离纯化的影响

大肠杆菌中质粒 DNA 的提取纯化：

1) 取 1.5ml 大肠杆菌 (HB101, 含 pUC19 质粒) 过夜培养液于 1.5ml 离心管 (共 7 管编号 1-7)。12000g 离心 30 秒，丢弃上清液；

2) 向沉淀物加入溶液 A 200 μ l，充分混悬细胞；

3) 加入溶液 B 200 μ l，上下颠倒试管，使之充分混匀，室温静置 3 分钟；

4) 加入溶液 C 500 μ l，上下颠倒试管，使之混匀，4 $^{\circ}$ C，15000g 离心 10 分钟；

5) 小心吸取上清液至一底部放有 50mg 玻璃粉 (或玻璃纤维) 的离心柱，将离心柱放入 2ml 离心管中，15000g 离心 1 分钟，弃去离心管中溶液；

6) 吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱，15000g 离心 30 秒，弃去离心管中溶液；

7) 再吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱，15000g 离心 2 分钟；

8) 将离心柱小心从 2ml 离心管中取出，放入一洁净 1.5ml 离心管中，加入 100 μ l 溶液 E，放置 1-2 分钟，15000g 离心 1 分钟。质粒 DNA

即被洗脱。

其中：溶液 A、溶液 B、溶液 D 和溶液 E 同实施例 1；

溶液 C：2M HAC（醋酸），KCl 浓度见下表 2 推算

表 2

编号	溶液 A、B、C 混合后 体系 pH	溶液 A、B、C 混合后 体系 KCl 浓度(M)	DNA 得率 (μg)
1	3.1	0.25	9.0
2	3.1	0.50	13.2
3	3.1	0.75	22.3
4	3.1	1.00	32.1
5	3.1	1.25	33.4
6*	3.1	1.75	32.7
7*	3.1	2.5	33.1

* 6、7 中需加入固体氯化钾才能使溶液 A、B、C 混合后体系 KCl 浓度分别达到 1.75M 和 2.5M。

表 2 说明在 pH 值保持不变的情况下，溶液 C 中的 K 离子含量的变化导致吸附作用前溶液中的 K 离子含量的改变。这种改变对于 DNA 的得率有显著影响。上述实验结果表明当吸附前含有 DNA 的溶液中的 pH 被调节为 3.1 时，K 离子含量大于等于 1M 时，有较高的 DNA 的得率，而且得率不随 K 离子浓度升高有显著的变化，所以较佳的 K 离子浓度为 1M。根据混合后体系中的 K 离子浓度可以容易计算出溶液 C 中的浓度，在此就不给出。

实施例 3 钾盐种类对于分离纯化的影响

大肠杆菌中质粒 DNA 的提取纯化：

- 1) 取 1.5ml 大肠杆菌(HB101, 含 pUC19 质粒)过夜培养液于 1.5ml 离心管（共 3 管编号 1-3）。12000g 离心 30 秒，丢弃上清液；
- 2) 向沉淀物加入溶液 A 200 μl ，充分混悬细胞；
- 3) 加入溶液 B 200 μl ，上下颠倒试管，使之充分混匀，室温静置 3 分钟；
- 4) 加入溶液 C₁、C₂、C₃ 各 500 μl ，上下颠倒试管，使之混匀，4

℃，15000g 离心 10 分钟；

5) 小心吸取上清液至一底部放有 50mg 玻璃粉（或玻璃纤维）的离心柱，将离心柱放入 2ml 离心管中，15000g 离心 1 分钟，弃去离心管中溶液；

6) 吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱，15000g 离心 30 秒，弃去离心管中溶液；

7) 再吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱，15000g 离心 2 分钟；

8) 将离心柱小心从 2ml 离心管中取出，放入一洁净 1.5ml 离心管中，加入 100 μ l 溶液 E，放置 1-2 分钟，15000g 离心 1 分钟。质粒 DNA 即被洗脱。

其中：溶液 A、溶液 B、溶液 D 和溶液 E 同实施例 1；

溶液 C₁、C₂、C₃：HAC 2M，K₂SO₄、KNO₃、KCl 浓度见下表 3

表 3

溶液 C				DNA 得率
编号	HAC	钾盐	K ⁺ 离子浓度(M)	
C ₁	HAC 2M	K ₂ SO ₄	1.4	21.5
C ₂	HAC 2M	KNO ₃	1.4	22.4
C ₃	HAC 2M	KCl	1.4	20.9

从表 3 可以看出，来自不同钾盐的钾离子，在形成酸性钾离子水溶液时，其中钾盐种类，或者钾盐溶解产生的其它离子对于 DNA 的得率没有显著影响。所以钾离子浓度是本发明的溶液和分离纯化方法的关键所在。

实施例 4 水溶液中 DNA 回收

1) 取含 7 μ g DNA 水溶液 200 μ l；

2) 加入溶液 C 100 μ l，上下颠倒试管，使之混匀；

3) 将溶液移至一底部放有 50mg 玻璃粉（或玻璃纤维）的离心柱，将离心柱放入 2ml 离心管中，15000g 离心 1 分钟，弃去离心管中溶液；

4) 吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱，15000g 离心 30 秒，弃去离心管中溶液；

5) 再吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱，15000g 离心 2 分钟；

6)将离心柱小心从 2ml 离心管中取出,放入一洁净 1.5ml 离心管中,加入 100 μ l 溶液 E,放置 1-2 分钟,15000g 离心 1 分钟。DNA 即被洗脱;

7) 260nm 测定 DNA 回收量为 5.1 μ g。

其中:溶液 D 和溶液 E 同实施例 1;

溶液 C: 1M HAC, 2.5M KCl

本实施例表明回收率达到了 73%。且所使用的溶液 C 中两种成分的含量并非最优选的形式,参见实施例 1 和表 1。所以,这说明本发明的方法在分离和纯化 DNA 时,对于原始物质中的 DNA 能够较好的予以回收。这对于提取混合物中微量 DNA 而言,十分重要。也说明本发明的又一优点,即原材料中 DNA 损失较小。

实施例 5 使用不同酸调节含钾离子的水溶液对于分离纯化的影响 大肠杆菌中质粒 DNA 的提取纯化:

1)取 1.5ml 大肠杆菌(HB101,含 pUC19 质粒)过夜培养液于 1.5ml 离心管(共 4 管编号 1-4)。12000g 离心 30 秒,丢弃上清液;

2)向沉淀物加入溶液 A 200 μ l,充分混悬细胞;

3)加入溶液 B 200 μ l,上下颠倒试管,使之充分混匀,室温静置 3 分钟;

4)加入溶液 C₁、C₂、C₃、C₄各 200 μ l 左右(使溶液 A、B、C 混合后 pH 为 3.1),上下颠倒试管,使之混匀,4 $^{\circ}$ C,15000g 离心 10 分钟;

5)小心吸取上清液至一底部放有 50mg 玻璃粉(或玻璃纤维)的离心柱,将离心柱放入 2ml 离心管中,15000g 离心 1 分钟,弃去离心管中溶液;

6)吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱,15000g 离心 30 秒,弃去离心管中溶液;

7)再吸取 450 μ l 溶液 D 于离心柱,15000g 离心 2 分钟;

8)将离心柱小心从 2ml 离心管中取出,放入一洁净 1.5ml 离心管中,加入 100 μ l 溶液 E,放置 1-2 分钟,15000g 离心 1 分钟。质粒 DNA 即被洗脱。

其中:溶液 A、溶液 B、溶液 D 和溶液 E 同实施例 1;

溶液 C₁: 0.2M HCl, 2.5M KCl; C₂: 0.2M HNO₃, 2.5M KCl; C₃: 0.1M H₂SO₄, 2.5M KCl; C₄: 4M HAC 2.5M KCl

结果:

溶液 C 编号	酸	DNA 得率(μg)
C ₁	HCl	26.5
C ₂	HNO ₃	28.1
C ₃	H ₂ SO ₄	24.9
C ₄	HAC	26.9

本实施例表明溶液 C 中的酸的作用是调节含钾离子水溶液的 pH 值, 它们的种类对于本发明所述方法的效果没有很大的影响。这一点特别在使用强酸盐酸、硝酸和硫酸时, 十分明显。可以看出只要使用的 H⁺ 当量浓度相当, 实验效果差异不大。所以在本发明的溶液中, 两种成分中的酸主要在于提供氢离子, 使参与吸附作用的溶液在吸附前达到一定的酸度。