



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102245770 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 16

(21) 申请号 200980149742. 8

代理人 贾静环

(22) 申请日 2009. 11. 20

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 15/10(2006. 01)

102008061714. 8 2008. 12. 12 DE

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 06. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/065534 2009. 11. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02010/066554 DE 2010. 06. 17

(71) 申请人 西门子保健诊断股份有限公司

地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 海克·尤廷 吉多·亨宁

亚历山大·伊兹梅洛夫

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

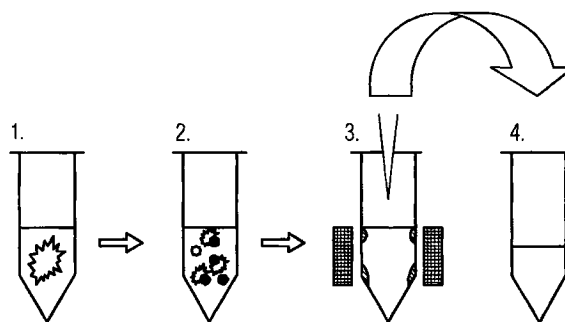
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 3 页

(54) 发明名称

纯化核酸、特别是来自固定组织的核酸的方法

(57) 摘要

本发明涉及纯化核酸的方法、实施本发明方法的试剂盒以及磁性颗粒用于纯化生物试样的新用途。本发明方法包括以下步骤：(a) 将第一试样容器中的试样收集在水溶液中，并在非离液序列高的条件下裂解该试样；将第一磁性颗粒悬浮在该溶液中，并将第一试样容器引入试样容器夹持器中，其中将该试样容器引入与该试样容器夹持器相关联的环形磁铁的环内部空间中；将溶液与磁性颗粒分开；并从溶液中分离核酸。



1. 一种纯化生物试样的核酸的方法,包括下列步骤:
 - (a) 将第一试样容器中的试样收集在水溶液中,并在非离液序列高的条件下裂解该试样;
 - (b) 将第一磁性颗粒悬浮在该溶液中;
 - (c) 将第一试样容器引入试样容器夹持器中,其中将该试样容器引入与该试样容器夹持器相关联的环形磁铁的环内部空间中;
 - (d) 将溶液与磁性颗粒分开;和
 - (e) 从溶液中分离核酸。
2. 根据权利要求1的方法,其中所述磁性颗粒包括含硅涂层。
3. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述试样为血液试样。
4. 根据权利要求1或2的方法,其中所述生物试样为包埋在石蜡中的试样和/或固定的试样。
5. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中在步骤(d)之前将溶液加热到至少50°C、优选至少60°C、更优选60~95°C。
6. 根据权利要求5的方法,其中在步骤(d)之前,在加热所述试样之后,再将试样冷却至低于50°C。
7. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述试样在步骤(a)、(b)和(c)中的至少一步中与疏水性基质接触。
8. 根据权利要求7的方法,其中所述第一试样容器由疏水性材料形成,并且起疏水性基质的作用。
9. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中在步骤(d)中所述溶液通过抽吸而与磁性颗粒分开。
10. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中步骤(e)包括将离液序列高的化合物加入所述试样中。
11. 根据权利要求10的方法,其中步骤(e)还包括将未消耗的、具有含硅涂层的第二磁性颗粒悬浮在溶液中。
12. 根据权利要求11的方法,其中步骤(e)还包括:
 - i) 将试样接收在第二试样容器中,并加入离液序列高的化合物;
 - ii) 将第二磁性颗粒悬浮在溶液中,并将核酸结合至第二磁性颗粒,
 - iii) 将第二试样容器引入试样容器夹持器,其中将所述第二试样容器引入与试样容器夹持器相关联的环形磁铁的环内部空间中;和
 - iv) 将溶液与磁性颗粒分开,并将核酸从磁性颗粒洗脱。
13. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中在将所述第一和/或第二试样容器引入所述与试样容器夹持器相关联的环形磁铁的环内部空间中时,所述各试样容器通过在环轴方向上的运动至少一次从环空间移出和再移入所述各试样容器。
14. 实施根据权利要求1的方法的自动化系统,包括:
 - 用于至少一个试样容器的支架;
 - 可温控装置,其具有至少一个用于试样容器的槽;
 - 试样容器夹持器,用于接收至少一个试样容器;

- 用于将试样容器夹持器从支架输送到可温控装置的设备；
- 用于将液体从试样容器转移出和 / 或转移入试样容器的装置；
- 用于控制输送装置、液体转移装置和用于控制可温控装置的温度控制装置；

其中所述用于接收至少一个试样容器的试样容器夹持器具有至少一个环形磁铁,在该环形磁铁的环内部空间中可以接收试样容器。

15. 试样容器夹持器,用于保持至少一个试样容器,该夹持器具有至少一个环形磁铁,在该环内部空间中可以保持所述试样容器。

16. 根据权利要求 15 的试样容器夹持器,其中所述环形磁铁最狭窄位置处的环内部直径为 4 ~ 20mm,优选 6 ~ 12mm,更优选 8mm。

17. 根据权利要求 15 的试样容器夹持器,其中所述环内部空间具有圆锥形区域。

18. 根据权利要求 15 的试样容器夹持器,具有多个用于试样容器的槽。

纯化核酸、特别是来自固定组织的核酸的方法

[0001] 本发明涉及纯化核酸的方法、实施本发明方法的系统以及用于纯化生物试样的试样容器夹持器。

[0002] 近来,分子诊断学的重要性日益增加。分子诊断学已经开始应用于临床诊断疾病(其中包括检测感染病原体,检测基因变异,发现循环肿瘤细胞和鉴别疾病遗传因素的风险因子等)。但是,分子诊断学的方法同时也应用于兽用药、环境分析和营养物质测试中。另一应用领域为在病理学/细胞学研究所的研究或者在法医询查范围内的研究。同时在保健领域(例如研究库存血的感染病原体-自由度(Infektionserreger-Freiheit))也使用基因诊断学,立法者计划在将来用法律规范这些测试。在临床分子诊断学中应用的方法(如杂交或扩增技术如PCR(聚合酶链式反应),TMA(转录介导的扩增),LCR(连接酶链反应)、bDNA(分支DNA)或NASBA(基于核酸序列的扩增)-技术)在基础科学研究工作中也属于常规方法。

[0003] 特别地,核酸分析通过确定组织中的基因表达在肿瘤疾病的研究和诊断中开启了充满前景的新的可能性。因此,例如,所谓微阵列系统已经开启了在单个反应装置中确定上百或甚至上千个基因表达的可能性。将试样材料、纯化的核酸(如RNA或cDNA)施用至芯片,该芯片包括相应的捕捉寡聚核苷酸,从而该试样中的核酸可以通过杂交而被检测。此外,其他在试样中检测核酸的方法,例如扩增方法如聚合酶链式反应(PCR),也是普遍使用的。

[0004] 核酸分析中的基本问题是试样制备。待研究的试样通常包括含干扰性、部分不可溶的成分(所谓的碎片(Debris))的细胞或组织,这些成分会干扰后续的分离和分析。这些不可溶的成分特别出现在从粪便/排泄物、血液、疣、钙化组织(骨)或其他严重坏死组织中分离核酸时。然而,碎片在其最广泛意义上也包括可溶性成分,例如从红细胞释放的血红蛋白,其严重过量的存在,并且会在分离核酸期间除去。

[0005] 特别是在肿瘤诊断学中这些问题加剧严重,因为此时常常使用甲醛固定的、石蜡包埋的切片(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE-Schnitte)作为试样材料。当如在活组织检查期间从患者取试样时,或者在外科手术中取肿瘤物质的试样时,组织材料用甲醛固定,并包埋入石蜡中,从而可以保存该试样材料。在培育期间,同样之后在组织块(Gewebeblock)中的多年,固定接(Fixantien)造成生物分子的严重交联(核酸与蛋白质,蛋白质彼此之间,或核酸彼此之间)。这些交联结构的内部和外部细胞有助于生成不溶性碎片,或不可裂解或难以裂解的碎片。通常从这些包埋在石蜡中的试样制备切片供病理学家评估;然而,这些切片同样能够用作核酸分析中的起始材料。在这种情况下,细胞碎片和石蜡必须在裂解后的核酸纯化期间被除去。

[0006] 此外,涉及干扰性的、部分不溶性成分(碎片)的问题也会在纯化来自粪便试样(排泄物、粪便(Kot))期间发生。粪便试样不仅包括食物的难消化成分(粗粮),还包括未消化的剩余物,如脂肪、淀粉、结缔组织纤维和肌肉纤维和水,它们在大肠的上部不被吸收。存在的内源物质包括:脱落的肠细胞、消化酶的剩余物和粘液。此外,少量的胆汁本身、以及也会从胆囊排出以保护肠粘膜的少量的卵磷脂以及少量的其他磷脂会随动物粪便一起排

出。

[0007] 为了降低成本并保持从试样制备到测定分析结果的时间尽可能短,重要的目的是使纯化核酸的方法尽可能有效,并且尽可能通过自动化手段实施该方法。这特别适用于诊断学。高度适于自动化的方法是那些能够在尽可能少的不同反应容器中进行的并可以以标准化形式(例如,96孔板形式)进行的方法,因为可以在该方法中使用高效的移液自动装置。因此,在现有技术中存在对简单、高效和高度自动化的试样制备方法的需求。

[0008] 常见的核酸纯化方法包括在离液序列高的条件下裂解试样、提取纯化、沉降和从液相例如苯酚-氯仿提取液纯化(参见 Sambrook 等人, *Molecular cloning—a laboratory manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, 2001, ISBN-13 :978-0879695774),或基于柱的纯化方法,如在 WO 2003040364-A1 中记载的。

[0009] 常见的分离核酸的方法已经披露于 Chomczynski (US 5,346,994) 中,并且包括基于使用苯酚和离液序列高的化合物异硫氰酸胍从液相分离而从组织材料纯化核酸的方法。该试样必须在水溶液中被匀浆化,在加入异硫氰酸胍(GTC)和苯酚/氯仿后进行离心。蛋白质存在于有机相中,DNA 存在于相间, RNA 存在于水相中。RNA 可以从水相中沉淀出来。然而,该方法不能可靠地从 FFPE 组织试样纯化 RNA。

[0010] 其他已知的 DNA 或 RNA 分离方法通常使用离液序列高的盐或苯酚提取液。

[0011] EP0819696 公开了一种纯化核酸的方法,其基于在离液序列高的条件下将核酸结合至氧化硅(Silika)或其他二氧化硅衍生物。该试样在离液序列高的裂解缓冲液中发生裂解,并且核酸结合至二氧化硅基质(Silikamatrix)。

[0012] 现有技术中已知的由石蜡切片(Paraffinschnitten)纯化核酸的方法首先需要繁琐的去石蜡化,其中,石蜡通常通过二甲苯除去,并且接着繁琐的用二甲苯/乙醇稀释序列进行再水化作用(Rehydratisierung)。

[0013] 例如,WO 200146402A1 记载了一种从固定的石蜡切片纯化 RNA 的方法,其中首先将石蜡切片置于 Eppendorf 反应容器中,并用二甲苯去石蜡。接着切片必须用二甲苯/乙醇稀释系列(Verdünnungsreihe)进行再水化作用。接着,将试样在离液序列高的溶液中长时间(5至120分钟)加热以纯化 RNA。尽管该方法实现了有效的去石蜡化,但是其为繁琐的,并且由于需要多次离心步骤,不是非常适用于自动化。

[0014] 此外,EP1510577 还披露了一种方法,其中在离液序列高的条件下核酸结合至磁性颗粒,并且能够通过施加磁场从试样上清液中分离。WO 1990014891A1 披露了一种磁性试样夹持器,其可以用于该目的。然而,在该方法中,不存在在非离液序列高的条件下预先纯化试样中的细胞碎片或去石蜡化。但是,在纯化核酸时,碎片在试样中的存在具有不利的作用,在自动化方法中是特别不利的,因为碎片会堵塞移液管尖、抽吸管等,并且还会损坏用于监控移液步骤的压力传感器。

[0015] 因此,考虑到现有技术,存在对改进的纯化核酸方法的需要,特别是对适于自动化的方法的需要。

[0016] 定义

[0017] 术语“生物试样”是指包含细胞或细胞材料的任何试样,特别是细胞,冻干细胞,固定细胞,排泄物/粪便,暗黄覆盖层(buffy coat,血液的白细胞部分),腹水,棉签(Abstriche),特别是颊棉签或咽喉棉签,但是更优选是颈棉签,痰,器官斑点

(Organpunktate), 精子, 组织试样, 固定组织试样, 固定或未固定组织试样的组织切片, 特别是冻干切片和石蜡切片, 特别是甲醛固定的石蜡切片, 肿瘤材料、活组织检查试样、血液试样, 特别是全血或血液部分, 细胞悬液, 以及就最广义而言所有包含细胞成分的试样, 其中所谓细胞成分应当指完整细胞和细胞成分。

[0018] 此外, 术语“生物试样”还包括其他含核酸的生物材料, 例如血清或血浆, 特别是含病毒的血清或血浆, 特别优选 HIV- 和 HCV- 感染的血清试样, 分泌物, CSF (Liquor), 胆汁, 淋巴液, 尿液。类似地, 其可以为源自生物化学或生物技术方法并且要经过后续纯化的含核酸生物材料。

[0019] 术语“细胞(的)”是指原核细胞和真核细胞。

[0020] 术语“裂解试样”包括使试样中的细胞或细胞结构破裂。其特别包括机械裂解方法(如超声)、热裂解(如冻融循环, 加热试样)和化学裂解(如使用洗涤剂(Detergentien))。然而, 术语“裂解试样”并不局限于细胞, 并且可以表示通过使用记载的方法从非细胞生物结构或复合物中释放核酸。

[0021] 术语“核酸”包括链长大于 10 个单体单元的寡聚或多聚核糖核苷酸或 2' - 脱氧核糖核苷酸。核酸中的单体单元在邻接单体单元的 3' 和 5' 羟基之间经由磷酸二酯键连接, 并且杂环碱(heterocyclische Base)以糖苷键连接至各个糖类成分的 1' 原子。核酸可以通过形成分子间氢键而形成双链和三链。这也表示包括蛋白质/核酸复合物, 以及核酸与合成核苷酸, 如吗啉类(Morpholinos)、LNAs 或 PNAs。

[0022] 术语“离液序列高的条件”是指在离液序列高的试剂或化合物存在下的溶剂条件。离液序列高的试剂或化合物为改变或干扰蛋白质、核酸、蛋白质-核酸复合物的二级结构、三级结构和四级结构的化合物, 同时保持一级结构是完整的。在溶液中, 在离液序列高的条件下, 生物分子, 特别是蛋白质、蛋白质-核酸复合物和核酸的分子内相互作用被干扰, 这是因为离液序列高的化合物干涉了生物分子内的稳定化分子内相互作用, 例如氢键、范德华力和疏水性作用。离液序列高的化合物通常具有大体积离子, 其由于它们的尺寸会干涉分子内相互作用并且因此减少溶剂的极性。由此干扰了分子间氢键和分子内氢键。因此, 尽管许多蛋白质发生沉淀, 但是仍保持双链核酸片段的螺旋结构。通过将离液序列高的化合物加入细胞裂解物或细胞悬液中, 蛋白质可以被沉淀, 同时核酸保持在溶液中。在离液序列高的条件下, 核酸与基于二氧化硅的基质的结合得到很大程度的支持。离液序列高的化合物包括, 例如, 高分子量的脲溶液(例如 6 至 8mol/l 脲), 胍盐溶液(Guanidinium-salzlösungen)(例如, 6mol/l 氯化胍), 高分子量锂盐(例如 4.5mol/l 高氯酸锂)。离液序列高的阴离子包括以下阴离子: F^- 、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 CH_3COO^- 、 Cl^- , 特别是 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 SCN^- 和 Cl_3CCOO^- 。离液序列高的阳离子包括以下阳离子: Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} , 特别是胍阳离子(Guanidiniumkation), $[CH_6N_3]^+$ 。对于核酸分离优选的离液序列高的化合物为异氰酸胍($[CH_6N_3]^+SCN^-$)和氯化胍。

[0023] 术语“非离液序列高的条件”是指在不存在离液序列高的试剂的水性和/醇性溶液中的溶剂条件。

[0024] 术语“纯化核酸”表示从含有核酸的试样中不完全或完全除去非核酸成分。该术语并不受限于实现一定的纯度等级。

[0025] 术语“自动化纯化”包括在所有步骤中或仅在部分步骤中代替人员的手工操作的

方法,特别用于用特定缓冲液干扰生物试样体的步骤、加入磁性颗粒或备选结合手段的步骤、在特定温度培育的步骤、除去未被吸收的试样成分的步骤、洗涤步骤、在特定温度从固相基质例如磁性颗粒洗脱结合核酸的步骤和从颗粒悬浮液分离洗脱物的步骤。

[0026] 术语“分离”包括尽可能除去所有的不是真实分离目标的生物物质或化学物质或成分,即,基本上都不是核酸。具体地,分离出这些物质可以在实际结合、富集、纯化和后续检测目标分子期间避免干扰或干涉。

[0027] 术语“细胞碎片”包括所有的生物成分,其不为核酸分离的主要目标,并且要通过纯化或负选择步骤与真实目标分子分离。在裂解细胞试样后,所述细胞试样包括(特别是在水溶液中)不溶或难裂解的细胞成分,例如引起坏死的组织成分、骨或石灰结构(Kalkstrukturen),特别是微钙化,以及破裂或形貌变化的红细胞,肉瘤样和乳头状瘤样组织结构,和特殊的细菌,其具有复杂的、难裂解的糖衣(如分枝杆菌)。此外,这包括蛋白质、膜成分,特别是固化交联的结构。但是在一些情况中,其可以为水溶性成分,其可以根据上述裂解过程释放并被分离。一个实例是在裂解(例如通过低渗缓冲条件)红细胞后大量释放并相对于核酸摩尔过量的血红蛋白,要在继续处理试样体之前将其分离。此外,特别地,“细胞碎片”表示在粪便/排泄物中的不为核酸的成分。粪便不仅包括食物(粗粮)的难消化部分,还包括未消化的剩余物,其在大肠的上部不被吸收,例如脂肪、淀粉、结缔组织纤维和肌肉纤维以及水。存在的内源物质包括:含有要分离核酸的脱落肠细胞,消化酶和粘液的剩余物。此外,少量的胆汁酸本身、以及也会从胆囊排出以保护肠粘膜的少量的卵磷脂以及少量的其他磷脂会随动物粪便一起排出。

[0028] 术语“磁性颗粒”包括有机磁性颗粒和无机磁性颗粒。

[0029] 术语“氧化硅(Silika)”包括二氧化硅和二氧化硅衍生物,特别是 SiO_2 晶体和其他形式的 SiO_2 ,例如由 SiO_2 构成的硅藻土、沸石类、无定形二氧化硅、玻璃粉末、硅酸、水玻璃以及硅酸铝和活性硅酸盐。

[0030] 术语“疏水性基质”是指固相,其表面由疏水性材料制成,特别是由疏水合成材料制成,例如聚烯烃,如聚丙烯(PP)、聚乙烯(PE)、卤化聚烯烃,如PTFE(聚四氟乙烯)等。该基质可以任何合适的形式存在,例如以颗粒、纤维、平面等形式存在。特别地,该基质可以容器内壁(Gefäßinnenwand)的形式存在。

[0031] 术语“裂解缓冲液系统”包括如下的缓冲系统,其包括至少一种能够引起或促进细胞、细胞系统、细胞成分或其他生物复合物或结构的干扰的物质。特别地,该物质常常选自洗涤剂(Detergenzien)(Triton X-100、SDS等)或酶试剂如特别是蛋白酶K。还包括使用选自水溶液、缓冲溶液或无缓冲的溶液(最简单的情况为水)的试剂。在裂解缓冲液系统中,可以混合选自一类或多类的一种或多种,或彼此混合。在本发明的范围中,包含离液序列高的物质的试剂不表示在纯化第一步骤中的裂解缓冲液系统的成分。

[0032] 本发明中使用的其他术语具有常见的、本领域技术人员已知的含义。

发明内容

[0033] 本发明涉及一种纯化生物试样的核酸的方法,包括下列步骤:

[0034] a) 将第一试样容器中的试样收集在水溶液中,并在非离液序列高(nicht-chaotropen)的条件下裂解该试样;

- [0035] b) 将第一磁性颗粒悬浮在该溶液中；
- [0036] c) 将第一试样容器引入试样容器夹持器中，其中将该试样容器引入与该试样容器夹持器相关联 (assozierten) 的环形磁铁的环内部空间中；
- [0037] d) 将溶液与磁性颗粒分开；和
- [0038] e) 从溶液中分离核酸。
- [0039] 本发明还涉及一种实施该方法的自动化系统和实施该方法的试样容器夹持器。
- [0040] 本发明基于以下认识：细胞碎片可以通过磁性颗粒有效地从溶液中除去。通过该应用产生多种优势：通过在磁铁的环内部空间收集试样容器将试样容器特别稳定在该夹持器内。磁力均匀地作用于磁性颗粒，并且在试样容器壁上形成环形的边缘样的磁性颗粒和细胞碎片的沉积。颗粒的环状沉积形成的凸部特别小，并且碎片以环状分布沉积在试样容器壁上，使得可以有效地提取液体试样，例如通过使用移液装置，同时最小化了因接触移液管尖而造成污染的风险。更特别地，避免了以刺猬样或钉满钉子那样发散形成磁性颗粒结构沉积，特别如在磁场作用于一侧的棒状磁铁情况中所观察到的那样。因此，该方法特别适合于自动化方法。
- [0041] 特别地，使用环形磁铁还提供以下优势：
- [0042] 环形磁铁具有平行于环对称轴的磁场方向，这产生了最密集的颗粒沉降，而不是如在条形磁铁时观察的沿着场线形成线状结构（所谓“刺猬结构 (Igelstrukturen)”）。
- [0043] 环形磁铁最小化了自动化移液系统（所谓的移液自动装置）中试样容器可能存在的错误定位，并因此最小化了自动化移液设备的错位排列。
- [0044] 环形磁铁最小化了颗粒损耗或移液自动装置中污染的风险。
- [0045] 本发明还基于以下知识：具有环形磁铁的试样容器夹持器能够在在一个材料单元中连接自动化纯化的多个功能步骤：a) 在试样容器夹持器中通过读取试样容器上的条形码鉴定试样；b) 添加试剂，如裂解缓冲液和 / 或蛋白酶 K 以及磁性颗粒；c) 裂解和加入磁性颗粒以后，通过试样容器夹持器中的环形磁铁的磁化除去试样容器中的碎片。在此，本发明方法的特征特别在于在步骤 a-c 中不需要自动装置针尖抽吸液体。抽吸和相关的转移液体进入第二试样容器仅在非离液序列高的条件下用磁性颗粒除去碎片或干扰性成分之后进行。
- [0046] 根据本发明的一个方面，该磁性颗粒的平均尺寸 $< 50 \mu\text{m}$ ，优选 $< 10 \mu\text{m}$ ，特别优选 $< 0.5 \mu\text{m}$ ，不排除 $< 0.1 \mu\text{m}$ ，其中该尺寸通过透射电子显微方法确定。
- [0047] 根据本发明的一个方面，这些颗粒具有含硅的涂层，特别是包含二氧化硅的涂层。这些磁性颗粒例如从 EP 1468430 可知。
- [0048] 该磁性颗粒优选具有氧化硅涂层，即，涂覆有 SiO_2 的磁性颗粒。表述“ SiO_2 -涂覆的磁性颗粒”包括磁性核，其由至少 90% 重量的 Fe_3O_4 构成，并且其表面涂覆有硅酸盐。
- [0049] 磁性颗粒是可悬浮的颗粒，其通过施加外部磁场可以固定在磁场中。
- [0050] 在通过磁场固定颗粒后，将磁性颗粒从溶液中分离出来；然后可以任何合适的方式分离溶液与颗粒，例如通过滗析、吸取等进行。
- [0051] 根据步骤 (e) 从试样分离核酸可以任何合适方式实施，例如提取方法、基于柱的方法、沉淀法等。步骤 (e) 的分离核酸不受到分离核酸的任何特定纯度的限制。
- [0052] 在步骤 (a) 中，在水溶液中收集试样。这可以通过混合、悬浮、乳化或溶出起作用。该试样可以在收集在水溶液之前或之后通过机械方式减少尺寸，例如通过机械作用（如切

割、搅拌),通过加热作用,或通过超声处理等类似方式。然而,还可以将完整的组织试样例如组织切片直接悬浮在水溶液中。

[0053] 根据本发明的一个方面,该试样为血液试样。在全血裂解的情况下,血红蛋白以及红细胞和白细胞膜成分大量地以及相对核酸摩尔过量地被释放出来,并且可以在步骤(d)中分离。然后,步骤(e)用于目的性地从剩余水相中纯化核酸。

[0054] 或者,如技术上已经描述的那样,可以实施选择性裂解红细胞,在例如低渗缓冲条件下。这大量地释放血红蛋白和红细胞膜,它们可以在步骤(d)中被分离。在这种情况下,仍然需求的白细胞裂解以及核酸的释放将会在步骤(e)中在添加离液序列高的缓冲液和可能的蛋白质酶K时实现。该方法实现了简单的和完全自动化的从血液特别是白细胞中提取核酸,并可以避免繁琐的方法步骤,如离心和移液白细胞以及弃去上清液。

[0055] 根据本发明的另一方面,该试样为排泄物/粪便试样。粪便的裂解将健康的或病理学上发生变化的、排出的肠上皮细胞(Darmepithelzellen)中的核酸释放在细胞残余物、粗粮、未消化食物剩余物(如脂肪、淀粉、结缔组织纤维和肌肉纤维、消化酶和粘液的残余物、胆汁酸、卵磷脂和其他磷脂)的复杂基质中。

[0056] 试样中不为核酸的所有成分可以在步骤(d)中被完全地或部分地分离。然后,步骤(e)特别用于目的性地纯化剩余水相中的核酸。

[0057] 根据本发明的一个方面,生物试样是包埋入石蜡的试样,特别是石蜡切片,和/或固定试样,特别是甲醛固定的石蜡切片。

[0058] 本发明方法特别适于加工固定试样,因为固定试样特别包含大量的碎片,这是由于例如蛋白质和核酸的交联。

[0059] 根据本发明的一个优选方面,在步骤(d)之前将溶液加热到至少50°C,优选50-95°C,优选至少60°C,更优选60-80°C。该加热的一个优势是实现了在水溶液中的更好的悬浮以及细胞试样的改进的裂解。为了更有效地裂解,优选加入蛋白酶,特别是蛋白酶K。

[0060] 根据本发明的一个方面,在步骤(d)之前,将试样再次冷却至低于50°C。在试样中存在石蜡的情况中,冷却至低于50°C具有以下额外的优势:石蜡再次固化,例如呈现为容器壁上的石蜡环形式。试样或裂解物可以然后使用移液管尖非常容易和精确地抽吸,而不产生任何堵塞问题,并且石蜡以所述石蜡环的形式保留在反应容器中。

[0061] 根据本发明的另一方面,试样或裂解液通过例如收集在包括疏水合成材料的容器中而与疏水性基质接触。这在处理含石蜡试样时是特别优选的。适于用作此目的的疏水性基质,例如,为熟知的含聚烯烃(如聚丙烯和聚乙烯)的Eppendorf或Sarstedt反应容器。特别优选的是在步骤(d)之前将与疏水性基质接触的含石蜡试样加热至超过50°C,因为石蜡会因此而溶解并有利地在冷却时在基质的液体表面上沉降为环,基质的液体表面例如合成反应容器情况中的容器边缘。该现象的发生是由于液化石蜡在疏水性基质上的吸收过程。因此,液体试样然后可以在后续步骤中有利地、精确地被抽吸,而不堵塞移液管尖,同时石蜡环保留在反应容器中。

[0062] 根据本发明的另一方面,所述方法的纯化效率如此之高,以至于对于大多数应用,足够使用单个3~20 μm石蜡切片,非常特别优选单个10 μm石蜡切片,从而实现非常高产率的核酸。因此,石蜡的用量低于防止或干涉环形成的临界量。

[0063] 根据本发明的一个方面,步骤(d)中的溶液通过抽吸与磁性颗粒分离。

[0064] 根据本发明的一个方面,步骤(e)进一步包括向溶液中加入离液序列高的化合物。这可以包括在步骤(e)中首次或反复加入蛋白酶(如果蛋白酶K已经用于步骤(a)中),即,在加入离液序列高的溶液之前或之后。

[0065] 根据本发明的一个方面,步骤(e)还包括向溶液中加入未使用(新鲜)的具有含硅涂层的磁性颗粒。

[0066] 对于分离RNA,优选将生物有效量的DNase加入试样中。这造成DNA被“消化”并进入溶液中,同时未消化的RNA可以从溶液中分离出来。DNase的消化可以在提取期间的不同时间点实施,最早在裂解后以及最晚在纯化终点的洗脱后。

[0067] 对于纯化DNA,优选将生物有效量的RNase加入至试样中,由此RNA可以被消化,并且完整的DNA可以从试样分离。RNase消化可以在提取期间的不同时间点实施,最早在裂解后以及最晚在纯化终点的洗脱后。然而,优选在共纯化RNA的存在下检测DNA,即,通过省略RNase步骤或通过使用缓冲条件,这实现了选择性分离DNA并排除RNA。

[0068] 根据另一方面,当将试样容器引入与试样容器夹持器相关联的环形磁铁的环内部空间中时,各试样容器通过在环轴方向上的运动至少一次从环空间移出和再移入所述各试样容器。因此,沉积的磁性颗粒与碎片和可能存在的石蜡残余物一起特别有效地沉积并呈环状分布在试样容器壁上,进一步最小化沉积物的任何凸起。与常规的棒状磁铁(其磁场作用于一侧)相比,环形磁铁特别地防止特殊的、宏观可见的针状或刺猬状磁性颗粒结构的形成。

[0069] 在常规的核酸纯化方法中,试样材料在离液序列高的缓冲液中收集或裂解。本发明是基于以下出人意料的发现,即,当在从试样中分离出核酸之前在非离液序列高的条件下除去细胞碎片时,核酸纯化会带来改进的结果。这可以通过例如离心或过滤实现。根据本发明的一个实施方式,在非离液序列高的条件下,借助磁性颗粒除去碎片。优选地,这些颗粒具有含硅的涂层,特别是含二氧化硅的涂层。这些颗粒从EP 1468430中是已知的,将该文献引入本文作为参考。这些颗粒的制备将在下文中进一步详细描述。

[0070] 从清除了碎片的裂解物中分离核酸可以已知的方法实施。例如,合适的是基于从离液序列高的溶液进行纯化的提取实验方案,例如通过在离液序列高的条件下沉积核酸和/或吸收至含硅的基质。在已知的基于柱的方法中,在高浓度离液序列高的盐的存在下核酸从裂解物中结合至氧化硅膜,并在清洁步骤后从膜中洗脱。合适的装置可以从Fa. QIAGEN GmbH, Hilden, Bundesrepublik Deutschland购得。

[0071] 根据本发明的一个优选方面,分离核酸通过在离液序列高的条件下重新应用(新鲜的)氧化硅涂覆的磁性颗粒而实施。

[0072] 根据本发明的一个优选方面,分离碎片或干扰物质也可以增加纯化效率、再现性和稳固性,并减少核酸分析中的异常值和模糊或不清楚的结果(“飘移”的结果,“geflagte”的结果)。除了用于研究,这些方法也用于临床诊断,这与重复测试或反射测试相关,并涉及额外的和不可避免的成本。

[0073] 根据另一方面,本发明包括实施本发明方法的自动化系统,包括:

[0074] - 用于至少一个试样容器的支架(Ablage);

[0075] - 可温控装置,其具有至少一个用于试样容器的槽(Aufnahme);

[0076] - 试样容器夹持器,用于接收至少一个试样容器;

- [0077] - 用于将试样容器夹持器从支架输送到可温控装置的设备；
- [0078] - 用于将液体从试样容器转移例如进入另一试样容器或清理装置（废料）中的装置；
- [0079] - 用于控制输送装置、液体转移装置和用于控制可温控装置的温度的控制装置；
- [0080] 其中所述用于接收至少一个试样容器的试样容器夹持器具有至少一个环形磁铁，在该环形磁铁的环内部空间中可以接收试样容器。
- [0081] 本发明还涉及用于容纳至少一个试样容器的试样容器夹持器，该夹持器具有至少一个环形磁铁，在该环内部空间中可以容纳所述试样容器。
- [0082] 优选地，所述环形磁铁最狭窄位置处的环内部直径为 4 ~ 50mm、4 ~ 20mm、5 ~ 15mm，优选 6 ~ 12mm，更优选 8mm。
- [0083] 所述环内部空间具有圆锥形区域，其优选与各试样容器的形状和几何尺寸相匹配。
- [0084] 该试样容器夹持器可以包括多个用于试样容器的槽，例如 2 ~ 1600 个，优选 2 ~ 96 个，优选 2、4、6、8 或 12 个。这些槽可以排的方式或正交矩形的方式排列，特别是以 2x2、2x3、4x6、6x8、8x12、16x24 或 32x48 的方式排列，如通常在体外诊断中使用的那样。
- [0085] 下面，借助详细的实施例和附图进一步说明本发明，在附图中：
- [0086] 图 1 显示了根据现有技术的具有固定的棒状磁铁的试样夹持器
- [0087] 的示意图，该棒状磁铁具有作用于一侧的磁场。
- [0088] 图 2 显示了用于本发明方法的试样夹持器的俯视图。
- [0089] 图 3 显示了用于本发明方法的试样夹持器的截面图。
- [0090] 图 4 和 5 显示了在现有技术的试样夹持器（图 4）以及用于本发明方
- [0091] 法的试样夹持器（图 5）中颗粒沉积的不同形式的示意图。
- [0092] 图 6 显示了本发明方法的进展的示意图。
- [0093] 图 7 显示了本发明方法的示意图。
- [0094] 图 1 示意性显示了根据现有技术的试样容器 10 和磁铁 20 的设置。该设置已经例如公开于 W01990014891A1 中。
- [0095] 图 2 和 3 显示了根据本发明使用的试样容器 10 和环形磁铁 22 的设置。磁铁 22 可以为例如由 K&J Magnetics Inc., Jamison, PA 18929, USA 销售的环形磁铁，有多种型号。优选地，使用强钕磁铁，例如包括含钕合金（如 NdFeB）的磁铁。特别适合用于诊断学中广泛使用的 Eppendorf 反应容器（容积 / 尺寸为 1.5-2.5ml）的环形磁铁的尺寸为外径 1 ~ 2cm，例如 12mm，内径 5 ~ 12mm，例如 8mm。1.5ml Eppendorf 反应容器在圆柱状部分具有外径 11mm，并且当使用内径为 8mm 的环形磁铁时，该反应容器可以经由反应容器的锥形部分容纳在磁铁的环内部空间，并可以由此稳固或保持。常见的试样容器在开口具有衬垫，使得可以选择或量取磁铁从而使得内径小于衬垫直径，但是大于试样容器衬垫下方的圆柱形区域的直径。以这种方式，试样容器可以通过环形磁铁保持。
- [0096] 环内部空间还可以为圆锥形或部分圆锥形的，与试样容器的圆锥形区域互补，从而可以适当容纳该容器。
- [0097] 图 4 显示了使用根据现有技术的试样夹持器引起了磁性颗粒的沉积 30 的剧烈凸起，而使用根据本发明的试样夹持器引起了较小凸起的环形沉积（图 5）。可以进一步看出

这里的磁力彼此消除,而在图 4 显示的情况中,试样容器向磁铁 20 的箭头方向偏移,并且这特别在自动化方法中是不利的,因为抽吸移液管(未示出)与沉积 30 或与试样容器 10 的不期望的接触的风险会增加。此外,使用如图 5 所示的环形磁铁,特别避免了以刺猬样或针样方式发散的磁性颗粒结构的形成,而这特别在与图 4 类似的棒状磁铁(具有沿一个方向排列的磁场)中会观察到。

[0098] 如图 6 所示,当将试样容器置入与试样容器夹持器相关联的环形磁铁的环内部空间中时,试样容器 10 可以通过在环轴方向上运动从环状空间移出和再次移入至少一次。因此,沉积的磁性颗粒 30 与碎片和可能存在的石蜡残余物一起被特别有效地沉积,并呈环状的分布在试样容器壁上,从而进一步最小化任何可能的沉积凸起。这在所述纯化石蜡切片的情况下是特别有利的,因为此时石蜡被“涂抹”并分布在容器壁上,并且最小化堵塞抽吸装置的风险。

[0099] 图 7 示意性显示本发明方法。所述方法可以手动或以自动化方式进行。

[0100] 实施例:

[0101] 材料和方法:

[0102] 在所有以下实施例中使用下列材料和方法:

[0103] 起始材料为来自临床病理学实验室的肿瘤试样,其在收集时固定在甲醛中并接着包埋入石蜡中。这些固定和包埋方法对于本领域技术人员而言是已知的,并且不在此详细讨论。使用切片机,从试样获得厚度例如为 5 ~ 10 μm 的组织切片,并将其转移至 1.5ml 试样容器中,例如 1.5ml 聚丙烯试样容器(如已知的“Eppendorf 容器”)。或者,也可以将已经施用至载玻片的试样使用刮刀或其他合适的方式(如,用乙醇/二甲苯去石蜡化)从上面剥离或刮下来,并转移至试样容器中。

[0104] 除了从 Siemens Healthcare Diagnostics GmbH(Erlangen, Deutschland) 购得的“Versant kPCR Sample Preparation Reagents”(由蛋白酶 K 溶液,结合缓冲液(含离液剂,例如 59% 的硫氰酸胍和 10% 的辛基苯氧基聚乙氧基乙醇),二氧化硅涂覆的磁性颗粒(例如由 EP 1468430 已知的),洗涤缓冲液 1(含离液剂,例如 36% 的硫氰酸胍和 30% 的乙醇,洗涤缓冲液 2(含 80% 乙醇),洗涤缓冲液 3(含 5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮和 2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(3:1)) 和洗脱缓冲液(含叠氮化钠)之外,使用以下缓冲液:

[0105] 1. FFPE 裂解缓冲液

[0106] 10mM Tris-HCl

[0107] 0.1mM EDTA

[0108] 2% SDS

[0109] pH 8.0

[0110] 2. 不含 DNA 的 DNase 溶液(Ambion, Cat#A 1906, Ambion, Foster City, CA 94404, USA)

[0111] 代替从 Siemens Healthcare Diagnostics GmbH 购得的“Versant kPCR Sample Preparation Reagents”,还可以使用本领域技术人员已知的其他常见缓冲组合物。含洗涤剂 and / 或低渗的缓冲液是特别适合的 FFPE 裂解缓冲液。合适的洗涤缓冲液类似地从现有技术中是已知的,并且可以购买获得。可用于后续使用氧化硅-涂覆的磁珠从裂解液分离

核酸的结合缓冲液为离液序列高的缓冲组合物,例如 4.5M 胍 HCl,6M 异氰酸胍等。合适的洗涤缓冲液必须仅符合确保核酸不从氧化硅基质剥离的要求。一般而言,高醇含量和任选的弱碱性 pH 对于防止 DNA 的自溶是足够的。含离液序列高的化合物的洗涤缓冲液也是适合的,只要它们满足上述条件。可能的洗脱缓冲液也为本领域技术人员已知的缓冲组合物,例如 TE 缓冲液 (10mM Tris-HCl,0.1mMEDTA, pH 8.0)。

[0112] 应当指出,在该纯化以及类似纯化的实验方案中, RNA 会破碎成 100 至 500 碱基对长的片段,但是对于使用现有方法进行的表达分析 (RT-PCR, 微阵列等) 而言,片段化的 RNA 也是非常合适的。

[0113] (相对) 定量 RNA 产率通过一步动态实时反转录酶聚合酶链式反应 (one-step kRT-PCR) 借助 TaqMan 探针实现。对于分析 RNA 产率,确定对照或 housekeeping gene RPL37A (即,核糖体蛋白 L37a 的人基因的 mRNA, GenBank 登录号 NM_000998) 的 CT 值 (循环阈值,即,扩增循环的值,其首先超过确定的阈值)。使用“SuperScript™ 一步用 Platinum® Taq kit” (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) 和使用引物和探针 (Eurogentec, Cologne, Deutschland) 实施 qRT-PCR。为了实施 kRT-PCR 表达分析 RPL37A,将 1 μl 的纯化 RNA 加入 9 μl 的母体混合物中,其包含 400nM 正向引物、400nM 反向引物、200nM TaqMan 探针 (FAM/TAMRA- 标记),反应混合物各含有 0.2mM dNTP 和 1.2mM 硫酸镁以及 1 μl Platinum® Taq Mix。反应在 ABI7900 设备 (Applied Biosystems, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) 使用以下温度曲线进行:

[0114] -50°C, 30 分钟

[0115] -95°C, 2 分钟

[0116] -95°C, 15 秒

[0117] -60°C, 30 秒, 40 个循环

[0118] 为了确立 CT 值,根据操作说明使用软件 SDS 2.0 (Applied Biosystems)。CT 值相应于扩增循环次数,高于该次数,则扩增信号超过设定的阈值,例如测量阈值。存在于试样中的核酸或 RNA 或 DNA 越多,则相应的 CT 值越低。在一些情况中, RPL37A 的 CT 值给出为附图中的 40-CT,用于更好呈现的目的。以这种方式,取该值的倒数,更高的 40-CT 值相应于更高表达水平的 RPL37A。除非另有详细说明,否则表示直接测量的 CT 值。

[0119] 实施例 1:在非离液序列高的条件下通过添加磁性颗粒除去碎片从甲醛固定的石蜡切片分离 RNA

[0120] 该方法相应于图 7 中示意的方法。

[0121] 来自 FFPE 组织切片的 RNA 将根据以下措施手工纯化:

[0122] - 以最大速率将在 Eppendorf 试样容器中的 FFPE 组织切片离心 1 分钟;

[0123] - 加入 150 μl FFPE 裂解缓冲液和 50 μl 蛋白酶 K

[0124] - 在 65°C 振荡培育 2 小时 (相应于图 7 的步骤 1);

[0125] - 加入 50 μl 磁性颗粒;

[0126] - 通过 2 分钟的震动进行混合 (相应于图 7 中的步骤 2);

[0127] - 将试样容器引入磁铁的环形空间中,任选进一步上下移动该试样容器 (相应于图 7 中的步骤 3);

[0128] - 例如通过移液小心地将上清液移入新的容器中 (细胞碎片和石蜡残余物保留在

原来的容器中)(相应于图 7 中的步骤 4)。

[0129] 下面可以从上清液中分离核酸,例如通过以下步骤进行:

[0130] - 加入 800 μ l 结合缓冲液(离液剂);

[0131] - 加入 50 μ l 磁性颗粒;

[0132] - 在室温振荡培育 15 分钟;

[0133] - 施加磁场,抽吸并弃去上清液;

[0134] - 除去磁场。将该磁性颗粒(与上面结合的核酸一起)收集并悬浮在 850 μ l 洗涤缓冲液 1 中;

[0135] - 施加磁场,抽吸并弃去上清液;

[0136] - 除去磁场。将该磁性颗粒(与上面结合的核酸一起)收集并悬浮在 450 μ l 洗涤缓冲液 2 中;

[0137] - 施加磁场,抽吸并弃去上清液;

[0138] - 除去磁场。将该磁性颗粒(与上面结合的核酸一起)收集并悬浮在 450 μ l 洗涤缓冲液 3 中;

[0139] - 用洗涤缓冲液 3 反复洗涤;

[0140] - 在施加磁场并除去上清液后,将试样收集在 100 μ l 洗脱缓冲液中,在热混合器中在 70°C 振荡培育 10 分钟;

[0141] - 施加磁场,并将洗脱液转移至新鲜的试样容器中;

[0142] - 加入 10 μ l 10x DNase 缓冲液和 1 μ l DNase I;

[0143] - 在 37°C 培育 30 分钟;

[0144] - 冷冻试样和/或进一步分析洗脱液。

[0145] 在图 7 中示意性表示本发明方法。其可以手动或自动化运行。

[0146] 实施例 2:在非离液序列高的条件下使用与磁性颗粒额外结合的步骤以分离细胞碎片从甲醛固定的组织切片自动化纯化 RNA

[0147] 使用以下自动化实验方案在 Siemens 平台, VERSANT kPCR(提取单元)上纯化来自甲醛固定的石蜡切片的 RNA。可以在一次运行中纯化最多 48 个组织切片。

[0148] 试样准备

[0149] 通过室温离心使组织切片(5~10 μ m)成球状,并置于 Siemens 分子平台 VERSANT kPCR 的试样载体上,在这里所有的硬件模块(带有环形磁铁的试样容器夹持器、加热器/振荡器、磁铁等)、试样容器、缓冲液和移液管尖都设置在其设计位置上。

[0150] 纯化程序开始:

[0151] - 加载具有一个或多个试样容器的自动装置,将试样容器引入具有环形磁铁的试样容器夹持器中

[0152] - 开始纯化程序;

[0153] - 将试样容器夹持器引入自动装置空间中;

[0154] - 在试样容器夹持器中通过读取固定在试样容器上的条形码鉴定试样容器并追踪

[0155] - 在具有环形磁铁的试样容器夹持器中将 150 μ l 裂解缓冲液加入试样容器中的试样中;

[0156] - 加入 50 μ l 蛋白酶 K- 溶液;

- [0157] - 将试样容器转移至加热振荡器上,并在 65℃振荡培育 2 小时;
- [0158] - 加入 50 μ l 磁性颗粒悬浮液;
- [0159] - 在 65℃振荡培育 10 分钟;
- [0160] - 不施加振荡培育 5 分钟;
- [0161] - 将试样容器从加热振荡器转移回试样容器夹持器中,并将试样容器引入磁铁的环形空间中,任选进一步上下移动试样容器(相应于图 7 步骤 3);
- [0162] - 磁化试样 3 分钟;
- [0163] - 将上清液转移至试样板的深孔(DWP);
- [0164] - 加入 600 μ l 结合缓冲液(离液剂);
- [0165] - 向 DWP 中加入 50 μ l 磁性颗粒悬浮液;
- [0166] - 室温振荡培育 10 分钟;
- [0167] - 将 DWP 转移至磁铁;
- [0168] - 在磁场中室温培育 5 分钟;
- [0169] - 抽吸并弃去上清液;
- [0170] - 将 DWP 从磁铁转移至加热振荡器;
- [0171] - 加入 850 μ l 洗涤缓冲液 1;
- [0172] - 室温振荡 10 秒钟;
- [0173] - 将 DWP 转移至磁铁;
- [0174] - 室温磁化 2 分钟;
- [0175] - 抽吸并弃去上清液;
- [0176] - 将 DWP 从磁铁转移至加热振荡器;
- [0177] - 加入 450 μ l 洗涤缓冲液 2;
- [0178] - 室温振荡 10 秒钟;
- [0179] - 将 DWP 转移至磁铁;
- [0180] - 室温磁化 2 分钟;
- [0181] - 抽吸并弃去上清液;
- [0182] - 将 DWP 从磁铁转移至加热振荡器;
- [0183] - 加入 850 μ l 洗涤缓冲液 3;
- [0184] - 室温振荡 10 秒钟;
- [0185] - 将 DWP 转移至磁铁;
- [0186] - 室温磁化 2 分钟;
- [0187] - 抽吸并弃去上清液;
- [0188] - 加入 100 μ l 洗脱缓冲液;
- [0189] - 将 DWP 从磁铁转移至加热振荡器;
- [0190] - 在 70℃振荡培育 10 分钟;
- [0191] - 将 DWP 转移至磁铁;
- [0192] - 加入 12 μ l DNase-Mix(10 μ l 10x DNase- 缓冲液;2 μ l DNase 1);
- [0193] - 将 DWP 从磁铁转移至加热振荡器(冷却至 37℃);
- [0194] - 在 37℃无振荡培育 30 分钟;

[0195] - 将 DWP 转移至磁铁；

[0196] - 将 DNase- 消化的试样转移至 1.5ml 试样容器中；

[0197] 纯化程序结束

[0198] - 冻干试样和 / 或进一步分析 RNA 产率。

[0199] 从中可以看出,与细胞碎片没有除去的试样相比,通过根据本发明除去细胞碎片进行的纯化获得了显著更高的产率。产率通过 housekeeping gene RPL37A 的定量 PCR 进行比较,转录量设为 40-CT (CT = 循环阈值,即,扩增循环的数量,在此超过系统的测量阈值)。这引起了改进的产率,差异从 RPL37A 的 3 到 5CT 值。这相应于在全部 RNA 中改进倍数为从 8 至 32。由此得出结论,首先,未裂解的组织或细胞碎片损害了有效并定量纯化核酸,特别是 RNA,可能在离液序列高的条件下干扰了核酸结合至氧化硅-涂覆的磁性颗粒。还可以看出在非离液序列高的条件下对裂解试样进行离心以除去细胞碎片可以用额外的在非离液序列高的条件下使用氧化硅-涂覆的磁性颗粒进行的纯化步骤代替。因此,这给该方法带来了非常容易实现自动化的相当大的优势,这是因为不再需要进一步的离心步骤。

[0200] 还可以看出,在非离液序列高的条件下的额外磁性纯化步骤以除去碎片还在组织试样的连续切片之间引起了更可重复的结果(从相同石蜡块制备的不同 RNA 制剂之间差异性更低)。

[0201] Siemens 的 VERSANT kPCR 系统,包括来自 Hamilton 的移液自动装置,实现控制所有的抽吸和分配步骤用于各个单个的移液步骤。通过各个移液通道中所含的压力传感器作液体移动曲线图。在各移液步骤期间这些压力比率的变化随时间记录 (= TADM,全部抽吸和分配监控)。对于各移液步骤,可以对压力比率的变化定义一定的允许范围。一旦 TADM 曲线超出限定范围,就可以直接注意到试样的移液步骤未适当进行,其由管尖堵塞、缺乏液体、液体中的泡沫形成或其他副作用形成的。试样可以接着标记用于后续分析,或者在一定情况中还可以从后续分析中排除。在临床诊断中,该信息在许多情况下将会引起反射测试或重复测试,要么在同一系统中要么为另一可选方法。

[0202] 可以看出,除去细胞碎片改进了可移液性(如,抽吸裂解液体)和自动化纯化的效率,这是由于更少因 TADM 曲线糟糕而排除试样。这显著地降低了临床诊断中反射测试(再次实施该测试得到结果)的数量,从而降低了成本。

[0203] 实施例 3:从血液试样纯化核酸

[0204] 本发明方法还特别适合于从全血试样纯化核酸,因为其改进了从血液除去血红蛋白或红细胞片段。根据该方法,首先在非离液序列高的条件下,有效地从试样除去可以干涉后续方法步骤的红细胞、红细胞片段以及还有释放的血红蛋白。

[0205] 根据第一方案,将 400 μ l 的裂解缓冲液(如 10mmol Tris-HCl, 0.1mmol EDTA, 2% SDS, pH 8.0)加入血液试样(如 100 μ l 的 EDTA, 全血试样)中。接着,将 50 μ l 的磁性颗粒悬浮液(如,未涂覆的或氧化硅-涂覆的磁性颗粒)加入试样中,接着室温培育 10 分钟,并通过施加磁场分离颗粒。然后如上所述,可以在离液序列高的条件下从除去的试样中分离核酸。

[0206] 根据第二方案,血液试样收集在低渗裂解缓冲液(如,25mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM KCl, 5mM MgCl₂)中,直接培育以裂解红细胞,接着将磁性颗粒悬浮液(如,未涂覆或氧化硅-涂覆的磁性颗粒)加入试样中,接着室温培育 10 分钟,并通过施加磁场分离颗粒以

及红细胞片段和血红蛋白。接着在离液序列高的条件下裂解白细胞,即,释放核酸,并将其结合至新鲜添加的氧化硅-涂覆的磁性颗粒上。可以任选在离液序列高的试剂之前或同时添加蛋白酶 K。

[0207] 实施例 4:氧化硅-涂覆的磁性颗粒的制备

[0208] 氧化硅-涂覆的磁性颗粒可以通过例如用氧化硅涂覆磁铁矿颗粒来制备。使用的磁铁矿优选亲水性、可购买获得的铁氧化物 (Fe_3O_4), 优选其呈粒径分布窄, 并且具有球形形貌。磁铁矿颗粒是购买可获得的, 这类产品由例如 Fa. Bayer AG 以商品名 BAYOXIDE E 制备。合适类型可以商品名 BAYOXIDE E8706、E8707、E8709 和 E8710 获得。类似的产品也由 BASF 以商品名“Magnetic Pigment 340”或“345”销售。尽管使用所有这些所述的产品都可以获得好的结果, 但是优选使用 BAYOXIDE E 8707 或 E 8706 类型。该磁性涂料 (Pigment) 具有球形形貌, 平均颗粒直径为 $0.2 \mu\text{m}$, 粒径分布窄 (约 0.1 至 $0.7 \mu\text{m}$)。作为引入硅酸盐类的起始材料, 可以使用碱硅酸盐 (钠水玻璃或钾水玻璃) (Alkali-silikate (Natron-oder Kali- Wassergläser)) 和硅胶。合适的水玻璃, 其通常具有非常高的 pH 值 (13-14), 由多个公司提供, 例如 Merck 或 Cognis。要涂覆的材料, 例如 Bayoxide E 8707, 可以搅拌加入至稀释的、例如 1% 浓度的水玻璃溶液中。在培育约 30 分钟后, 过滤材料, 并用水洗涤, 干燥。根据示例性实验方案, 将 50g 的 Bayoxide E 8707 搅拌加入 1000ml 的 0.25% 浓度的水玻璃水溶液中 (HK30 ;Cognis), 接着在室温再搅拌 30 分钟。过滤颗粒, 并用水洗涤 5 次, 用乙醇洗涤 1 次, 接着在 80C 干燥 5 小时。

(现有技术)

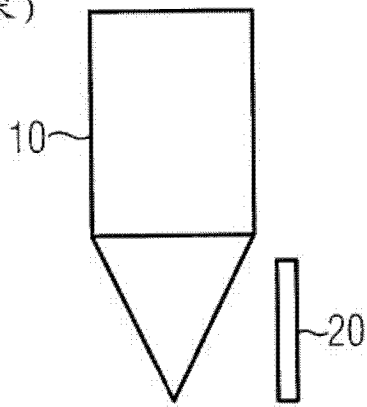


图 1

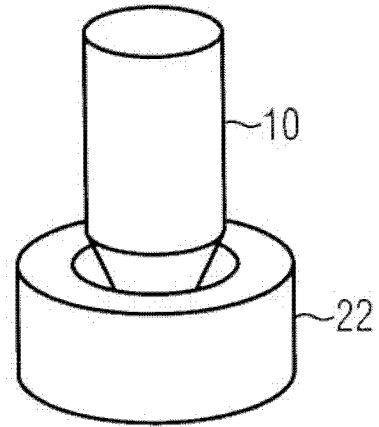


图 2

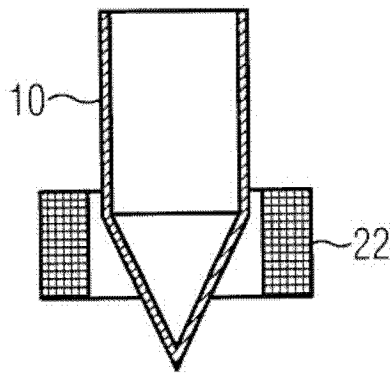


图 3

(现有技术)

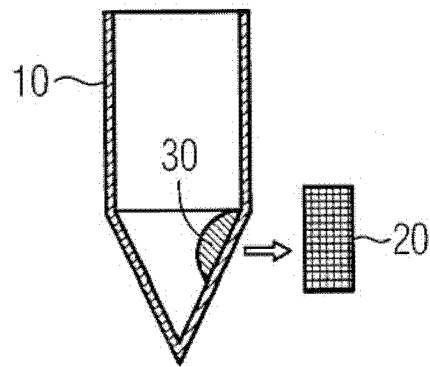


图 4

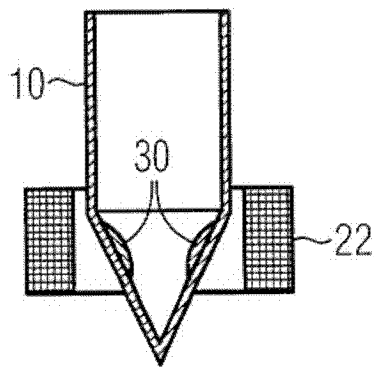


图 5

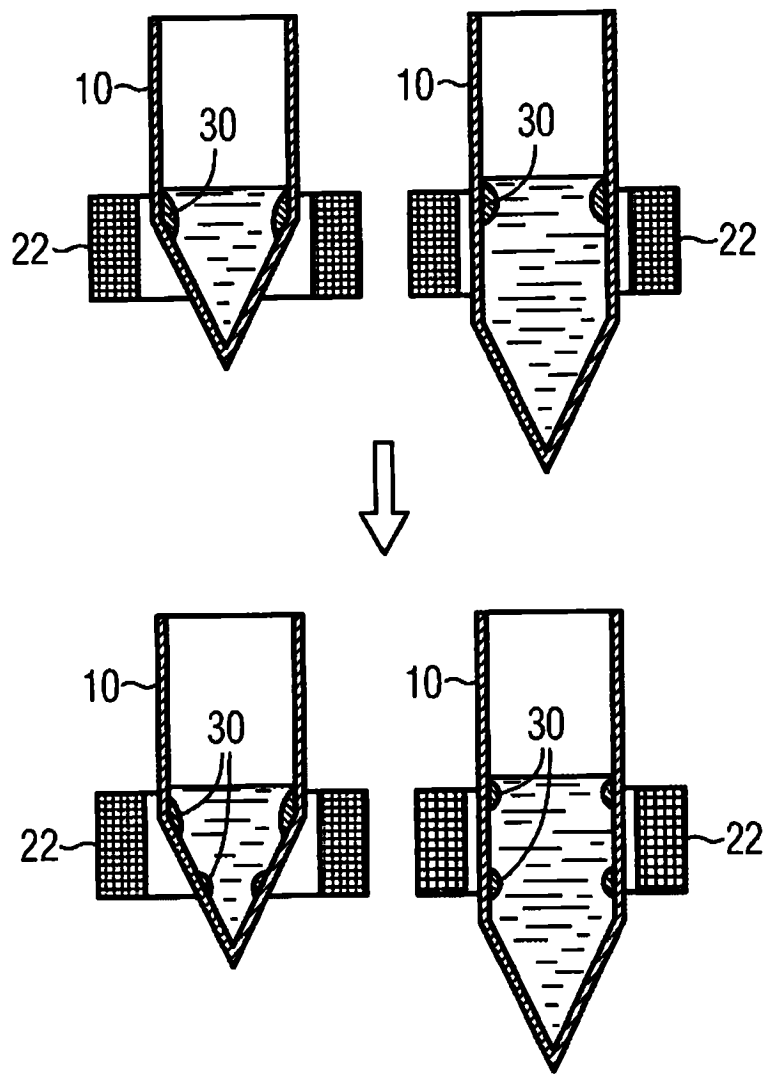


图 6

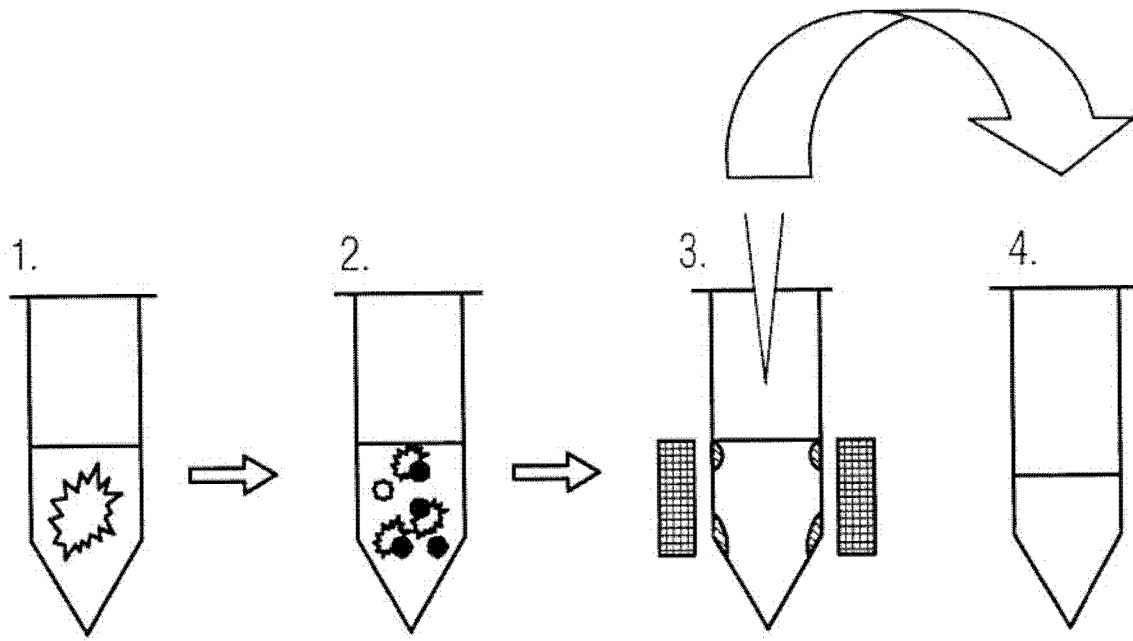


图 7