



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106596211 A

(43) 申请公布日 2017. 04. 26

(21) 申请号 201510671258. 9

(22) 申请日 2015. 10. 15

(71) 申请人 深圳华大基因研究院

地址 518083 广东省深圳市盐田区北山工业  
区综合楼

(72) 发明人 赵艳敏 易吉 朱家楼

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51) Int. Cl.

G01N 1/28(2006. 01)

权利要求书2页 说明书12页

序列表1页 附图4页

### (54) 发明名称

粪便样本保存液及其制备方法和应用

### (57) 摘要

本发明公开来了粪便样本保存液及其制备方法和应用,其中,该粪便样本保存液包含:45体积%-60体积%的固定剂;0.1质量%-15质量%的固定剂辅助剂;0.01质量%-1.5质量%的抗凝剂;10体积%-15体积%的缓冲液;0.01质量%-1质量%的离子强度维持剂;0.01体积%-0.5体积%的非离子去污剂;以及余量为水。本发明的粪便样本保存液制备容易,成本低,常温下即可保存粪便样本,且能有效抑制粪便样本中DNA降解及细胞受损,维持细胞形态,对样本保存时间长,保存后样本再度利用合格率高。

1. 一种粪便样本保存液,其特征在于,包含:
  - 45 体积% -60 体积%的固定剂;
  - 0.1 质量% -15 质量%的固定剂辅助剂;
  - 0.01 质量% -1.5 质量%的抗凝剂;
  - 10 体积% -15 体积%的缓冲液;
  - 0.01 质量% -1 质量%的离子强度维持剂;
  - 0.01 体积% -0.5 体积%的非离子去污剂;以及余量为水,  
其中,  
所述固定剂为选自甲醇、乙醇、乙二醇和异丙醇的至少一种,  
所述固定辅助剂为选自醋酸和醋酸盐的至少一种,  
所述抗凝剂为选自乙二胺四乙酸和乙二胺四乙酸的水溶性盐的至少一种,  
所述缓冲液为选自磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、ACES 缓冲液、ADA 缓冲液、BIS-TRIS 缓冲液、MES 缓冲液和 PIPES 缓冲液的至少一种,  
所述离子强度维持剂为氯化盐,  
所述非离子去污剂为选自吐温 20、NP-40 和 TritonX-100 的至少一种。
2. 根据权利要求 1 所述的粪便样本保存液,其特征在于,所述缓冲液的 pH 值为 7.4-8.0。
3. 根据权利要求 1 所述的粪便样本保存液,其特征在于,所述粪便样本保存液的 pH 值为 7.4-8.0。
4. 根据权利要求 1 所述的粪便样本保存液,其特征在于,所述离子强度维持剂为选自氯化钠和氯化钾的至少一种,  
任选地,所述抗凝剂为乙二胺四乙酸二钠。
5. 根据权利要求 1 所述的粪便样本保存液,其特征在于,所述固定剂的含量为 50 体积% -60 体积%,  
任选地,所述抗凝剂的含量为 0.1 质量% -1.5 质量%,  
任选地,所述离子强度维持剂的含量为 0.5 质量% -1 质量%。
6. 根据权利要求 5 所述的粪便样本保存液,其特征在于,包含:
  - 50 体积% -60 体积%的甲醇;
  - 0.1 质量% -15 质量%的醋酸;
  - 0.1 质量% -1.5 质量%的乙二胺四乙酸二钠;
  - 10 体积% -15 体积%的磷酸盐缓冲液;
  - 0.5 质量% -1 质量%的氯化钠;
  - 0.01 体积% -0.5 体积%的吐温 -20 ;以及余量为水,  
任选地,1000ml 的粪便样本保存液包含:
  - 500ml 甲醇;
  - 3.5g 醋酸;
  - 1g 乙二胺四乙酸二钠;

100ml 磷酸盐缓冲液；  
10g 氯化钠；  
0.5ml 吐温 -20 ;以及  
399.5ml 水。

7. 根据权利要求 1 所述的粪便样本保存液,其特征在於,1000ml 的粪便样本保存液包含:

450ml 乙醇；  
1g 醋酸；  
3g 乙二胺四乙酸二钠；  
100ml 醋酸盐缓冲液；  
1g 氯化钾；  
0.1ml 吐温 -20 ;以及  
449.9ml 水,

任选地,1000ml 的粪便样本保存液包含:

550ml 乙二醇；  
2.5g 醋酸；  
7g 乙二胺四乙酸二钠；  
150ml PIPES 缓冲液；  
5g 氯化钠；  
2.5ml NP-40 ;以及  
297.5ml 去离子水。

8. 一种制备粪便样本保存液的方法,其特征在於,包括以下步骤:

- 1) 按照权利要求 1-7 任一项所述的粪便样本保存液的配方提供原料；
- 2) 向去离子水中加入离子强度维持剂、缓冲溶液和抗凝剂,并使各成分溶解混匀,以便得到混合物；
- 3) 将所述混合物进行 pH 值调节至 pH 为 7.4-8.0；
- 4) 向经过 pH 值调节的混合物中加入固定剂、固定剂辅助剂和非离子去污剂,混匀后灭菌,以便得到所述粪便样本保存液。

9. 权利要求 1-7 任一项所述的粪便样本保存液在保存粪便样本中的用途。

10. 一种保存粪便样本的方法,其特征在於,包括:

将权利要求 1-7 任一项所述的粪便样本保存液和粪便样本按照体积比 1-3 :1 的比例混匀,于室温下密封避光保存,

任选地,所述粪便样本保存液和所述粪便样本的体积比为 1.5 :1。

## 粪便样本保存液及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及粪便样本保存液及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 粪便、毛发、唾液、尿液等非损伤性样本广泛运用于法医学、野生动物研究、临床研究,其中粪便样本是临床检验的有效手段和普查最常用的,具有简便易行、成本低廉、无创、适合大规模人群筛查的特点。随着分子生物学的发展,肿瘤的发生发展归因于相关基因突变,而粪便中的脱落细胞包含着与大肠癌关系密切的突变基因,粪便中基因检测可望成为筛选诊断胃肠道肿瘤的早期筛查的新方法。据报道,一家美国公司开发了粪便DNA (Stool-basedDNA, sDNA) 筛选试验,用于检测和结肠癌相关的DNA标志物。10000例临床试验数据显示在结肠癌检测的灵敏度上来看是92%,检测癌前息肉的灵敏度为42%,超过2厘米大的息肉的检测灵敏度是66%,所有临床数据的特异性为87%。

[0003] 此外,粪便中存在大量微生物菌落,肠道菌群组成是与宿主长期共同进化的结果,并且同宿主的健康和疾病如肥胖、糖尿病、炎症性肠病等密切相关,粪便中肠道总基因组(肠道宏基因组学)研究已成为当今的热点研究领域。

[0004] 但是,粪便成分十分复杂,含有大量的消化残余及细菌产生的各种核酸降解酶如蛋白酶、DNA酶(DNases)和RNA酶(RNases)、各种PCR抑制剂(如胆盐、胆红素、腐殖质和色素),使得粪便样本中的细胞及核酸极易受到破坏和降解。而目前的粪便样本保存方法,可保存时间短,样本再度利用合格率低,保存条件苛刻,成本高。

[0005] 因而,目前的粪便样本液及保存方法仍有待改进。

### 发明内容

[0006] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提出一种保存时间长、样本再度利用合格率高、保存方便的粪便样本保存手段。

[0007] 需要说明的是,本发明是基于发明人的下列发现而完成的:

[0008] 迄今,国内外研究者发展了多种粪便保存的方法,原理包括:1) 低温降低各种降解酶的活性,低温处理即冷冻法,一般保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 下;2) 脱水干燥抑制各种生化反应有硅胶干燥、二氧化硅干燥、微波干燥等;3) 保存液常用的有无水乙醇、70%乙醇、二甲亚砜(DMSO)、二甲亚砜饱和盐溶液(DETs)等抑制降解酶和微生物活性。这些保存方法成分简单,作用单一,随着时间延长保存效果不明显。

[0009] 发明人在长期粪便样本基因研究中尝试过各种保存方法包括以上常见的方法,效果都不理想,低温保存使得异地搜集样本受限制,样本运输成本大大增加,有些经过优化如(保存液运输、保存液加低温长期保存)短期效果还可以,但是样本放置1-3个月就发现仍有明显降解,DNA量不足给课题研究带来很大困扰,也促使发明人进行了多种实验探索,以期提供一种常温、简单、低廉且长效的粪便样本保存方法。

[0010] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种粪便样本保存液。根据本发明的实施

例,该粪便样本保存液包含:45 体积% -60 体积%的固定剂;0.1 质量% -15 质量%的固定剂辅助剂;0.01 质量% -1.5 质量%的抗凝剂;10 体积% -15 体积%的缓冲液;0.01 质量% -1 质量%的离子强度维持剂;0.01 体积% -0.5 体积%的非离子去污剂;以及余量为水,其中,所述固定剂为选自甲醇、乙醇、乙二醇和异丙醇的至少一种,所述固定辅助剂为选自醋酸和醋酸盐的至少一种,所述抗凝剂为选自乙二胺四乙酸和乙二胺四乙酸的水溶性盐的至少一种,所述缓冲液为选自磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、ACES 缓冲液、ADA 缓冲液、BIS-TRIS 缓冲液、MES 缓冲液和 PIPES 缓冲液的至少一种,所述离子强度维持剂为氯化盐,所述非离子去污剂为选自吐温 20、NP-40 和 TritonX-100 的至少一种。

[0011] 发明人惊奇地发现,利用本发明的粪便样本保存液能有效抑制粪便样本中 DNA 降解及细胞受损,维持细胞形态,保证样本质量,从而使得保存的粪便样本中核酸和细胞可达到进一步研究的需要。此外,根据本发明的实施例,本发明的粪便样本保存液制备容易,成本低,常温下即可保存粪便样本,且对样本保存时间长,保存后样本再度利用合格率高。

[0012] 另外,根据本发明上述实施例的粪便样本保存液还可以具有如下附加的技术特征:

[0013] 根据本发明的实施例,所述缓冲液的 pH 值为 7.4-8.0。由此,能够有效维持粪便样本 pH 稳定,维持细胞形态。

[0014] 根据本发明的一些实施例,所述粪便样本保存液的 pH 值为 7.4-8.0。由此,用于保存粪便样本时,样本中 DNA 不易降解断裂。

[0015] 根据本发明的一些具体示例,所述离子强度维持剂为选自氯化钠和氯化钾的至少一种。

[0016] 根据本发明的一些优选实施例,所述抗凝剂为乙二胺四乙酸二钠。

[0017] 根据本发明的一些优选实施例,所述固定剂的含量为 50 体积% -60 体积%。由此,固定蛋白、抑制 DNA 降解的效果好。

[0018] 根据本发明的一些优选实施例,所述抗凝剂的含量为 0.1 质量% -1.5 质量%。由此,抗凝效果好,且成本低。

[0019] 根据本发明的一些优选实施例,所述离子强度维持剂的含量为 0.5 质量% -1 质量%。由此,细胞形态维持效果好。

[0020] 根据本发明的一些实施例,本发明的粪便样本保存液包含:50 体积% -60 体积%的甲醇;0.1 质量% -15 质量%的醋酸;0.1 质量% -1.5 质量%的乙二胺四乙酸二钠;10 体积% -15 体积%的磷酸盐缓冲液;0.5 质量% -1 质量%的氯化钠;0.01 体积% -0.5 体积%的吐温 -20;以及余量为水。由此,粪便样本保存液的保存效果突出。

[0021] 根据本发明的一个具体示例,1000ml 的粪便样本保存液包含:

[0022] 500ml 甲醇;

[0023] 3.5g 醋酸;

[0024] 1g 乙二胺四乙酸二钠;

[0025] 100ml 磷酸盐缓冲液;

[0026] 10g 氯化钠;

[0027] 0.5ml 吐温 -20;以及

[0028] 399.5ml 水。

[0029] 根据本发明的一些实施例,1000ml 的粪便样本保存液包含:

[0030] 450ml 乙醇;

[0031] 1g 醋酸;

[0032] 3g 乙二胺四乙酸二钠;

[0033] 100ml 醋酸盐缓冲液;

[0034] 1g 氯化钾;

[0035] 0.1ml 吐温 -20 ;以及

[0036] 449.9ml 水。

[0037] 根据本发明的另一些实施例,1000ml 的粪便样本保存液包含:

[0038] 550ml 乙二醇;

[0039] 2.5g 醋酸;

[0040] 7g 乙二胺四乙酸二钠;

[0041] 150ml PIPES 缓冲液;

[0042] 5g 氯化钠;

[0043] 2.5ml NP-40 ;以及

[0044] 297.5ml 去离子水。

[0045] 根据本发明的另一方面,本发明还提供了一种制备粪便样本保存液的方法。根据本发明的实施例,该方法包括以下步骤:

[0046] 1) 按照前面所述的粪便样本保存液的配方提供原料;

[0047] 2) 向去离子水中加入离子强度维持剂、缓冲溶液和抗凝剂,并使各成分溶解混匀,以便得到混合物;

[0048] 3) 将所述混合物进行 pH 值调节至 pH 为 7.4-8.0 ;

[0049] 4) 向经过 pH 值调节的混合物中加入固定剂、固定剂辅助剂和非离子去污剂,混匀后灭菌,以便得到所述粪便样本保存液。

[0050] 由此,能够高效地制备获得本发明的粪便样本保存液,且成本低,获得的粪便样本保存液质量好,能够有效用于粪便样本的常温长期保存,保存后样本 DNA 降解和细胞受损少,样本再度利用合格率高。

[0051] 根据本发明的再一方面,本发明还提供了前面所述的粪便样本保存液在保存粪便样本中的用途。根据本发明的实施例,利用本发明的粪便样本保存液,能够有效地对粪便样本进行常温长期保存,且保存成本低,效果好,样本再度利用合格率高。

[0052] 根据本发明的又一方面,本发明还提供了一种保存粪便样本的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:将前面所述的粪便样本保存液和粪便样本按照体积比 1-3:1 的比例混匀,于室温下密封避光保存。发明人发现,利用本发明的保存粪便样本的方法,能够有效地实现对粪便样本的常温长期保存,且操作简单,保存成本低,效果好,保存时间长,样本再度利用合格率高。

[0053] 根据本发明的一些优选实施例,所述粪便样本保存液和所述粪便样本的体积比为 1.5:1。由此,保存成本低,且保存效果突出。

[0054] 此外,需要说明的是,根据本发明实施例的粪便样本保存液及保存方法具有下列优点的至少之一:

[0055] 1) 本发明的粪便样本保存液能够抑制粪便中细菌产生的大量消化酶对 DNA 的降解作用,同时还可以维持细胞形态,利于细胞分离形态学观察。

[0056] 2) 现有的粪便样本保存液成分都较单一,有的只适合短时间保存,如无水乙醇保存,粪便脱水,分散不均一,与溶液接触不全;有的需要低温冷藏,对仪器和运输条件都苛刻要求,虽样本降解有所减慢,但是粪便样本的质量下降,保存时间都不长。而利用本发明的粪便样本保存液常温即可保存样本,其各种成分利于粪便在保存液中均质化,使粪便能够与溶液充分接触,保存时间长,且各成分对后续提取核酸及酶促反应不会造成影响。

[0057] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

### 附图说明

[0058] 本发明的上述和 / 或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0059] 图 1 为实施例 4 中不同保存条件下粪便样本 DNA 提取量随保存时间变化的 OD 值法比较结果;

[0060] 图 2 为实施例 4 中不同保存条件下粪便样本 DNA 提取量随保存时间变化的凝胶电泳法比较结果;

[0061] 图 3 为实施例 5 中粪便样本中人的 DNA 提取量随保存时间变化的实时荧光定量法比较结果;以及

[0062] 图 4 为实施例 6 中粪便样本中上皮细胞形态随保存时间变化的观察比较结果(40x)。

### 具体实施方式

[0063] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0064] 根据本发明的一个方面,本发明提供了一种粪便样本保存液。根据本发明的实施例,该粪便样本保存液包含:45 体积% -60 体积%的固定剂;0.1 质量% -15 质量%的固定剂辅助剂;0.01 质量% -1.5 质量%的抗凝剂;10 体积% -15 体积%的缓冲液;0.01 质量% -1 质量%的离子强度维持剂;0.01 体积% -0.5 体积%的非离子去污剂;以及余量为水,其中,所述固定剂为选自甲醇、乙醇、乙二醇和异丙醇的至少一种,所述固定辅助剂为选自醋酸和醋酸盐的至少一种,所述抗凝剂为选自乙二胺四乙酸和乙二胺四乙酸的水溶性盐的至少一种,所述缓冲液为选自磷酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、ACES 缓冲液、ADA 缓冲液、BIS-TRIS 缓冲液、MES 缓冲液和 PIPES 缓冲液的至少一种,所述离子强度维持剂为氯化盐,所述非离子去污剂为选自吐温 20、NP-40 和 TritonX-100 的至少一种。

[0065] 发明人惊奇地发现,利用本发明的粪便样本保存液能在较长时间内有效抑制粪便样本中 DNA 降解及细胞受损,维持细胞形态,保证样本质量,从而使得保存的粪便样本中核酸和细胞可达到进一步研究的需要。此外,根据本发明的实施例,本发明的粪便样本保存液制备容易,成本低,常温下即可保存粪便样本,且对样本保存时间长,保存后样本再度利用合格率高。

[0066] 需要说明的是,在本发明的粪便样本保存液中,固定剂的主要作用为维持粪便样本中 DNA 和蛋白完整性,使得蛋白酶变性,防止酶对蛋白的降解作用,固定细胞结构。发明人发现,粪便样本保存液中固定剂含量在 45 体积%以下,虽可固定蛋白,但效果差,会导致 DNA 降解;而固定剂含量在 60 体积%以上则会导致细胞严重变形凝聚,影响后续样本利用时对细胞形态的观察及判读,同时使得 DNA 提取增加难度。根据本发明的一些优选实施例,所述固定剂的含量为 50 体积% -60 体积%。由此,固定蛋白、抑制 DNA 降解的效果好。

[0067] 粪便样本保存液中固定辅助剂的作用是使得细胞扩张,减小固定剂对细胞的收缩作用。但固定辅助剂含量超过 15 质量%时会使细胞过度膨胀,细胞形态会受影响。

[0068] 在本发明的粪便样本保存液中,抗凝剂的主要作用为去除络合重金属离子,防止粪便样本中细胞凝结。根据本发明的一些优选实施例,所述抗凝剂为乙二胺四乙酸二钠。此外,现有技术中含抗凝剂较多,常达 15% -50% (w/w),然而,发明人发现,实际粪便样本保存液中抗凝剂的用量减至 0.01% -1.5% (w/w),优选 0.1-1.5% (w/w) 时,在成本降低的基础上,仍能保证同样的抗凝效果。这是因为粪便样品中的细胞数较少,游离蛋白较少,则游离蛋白结合的合重金属离子也少。因而,根据本发明的一些优选实施例,所述抗凝剂的含量为 0.1 质量% -1.5 质量%。

[0069] 在本发明的粪便样本保存液中,离子强度维持剂的主要作用为保持细胞渗透压,维持细胞形态,防止细胞破裂致 DNA 释放入保存液中。根据本发明的一些具体示例,所述离子强度维持剂为选自氯化钠和氯化钾的至少一种。根据本发明的一些优选实施例,所述离子强度维持剂的含量为 0.5 质量% -1 质量%。

[0070] 在本发明的粪便样本保存液中,缓冲液可自行调节粪便样本中细胞细菌释放的自溶副产物所导致的 pH 变化,维持 pH 稳定,维持细胞形态,同时减少样本中的 DNA 由于 pH 过高或过低的自然降解断裂情况。根据本发明的实施例,所述缓冲液的 pH 值为 7.4-8.0。根据本发明的一些实施例,所述粪便样本保存液的 pH 值为 7.4-8.0。

[0071] 在本发明的粪便样本保存液中,非离子去污剂的主要作用为解离粪便的粘液,增加粪便样本的分散率。

[0072] 根据本发明的一些实施例,本发明的粪便样本保存液包含:50 体积% -60 体积% 的甲醇;0.1 质量% -15 质量% 的醋酸;0.1 质量% -1.5 质量% 的乙二胺四乙酸二钠;10 体积% -15 体积% 的磷酸盐缓冲液;0.5 质量% -1 质量% 的氯化钠;0.01 体积% -0.5 体积% 的吐温 -20;以及余量为水。由此,粪便样本保存液的保存效果突出。

[0073] 根据本发明的一个具体示例,1000ml 的粪便样本保存液包含:

[0074] 500ml 甲醇;

[0075] 3.5g 醋酸;

[0076] 1g 乙二胺四乙酸二钠;

[0077] 100ml 磷酸盐缓冲液;

[0078] 10g 氯化钠;

[0079] 0.5ml 吐温 -20;以及

[0080] 399.5ml 水。

[0081] 根据本发明的一个具体示例,1000ml 的粪便样本保存液包含:

[0082] 450ml 乙醇;



- [0083] 1g 醋酸；
- [0084] 3g 乙二胺四乙酸二钠；
- [0085] 100ml 醋酸盐缓冲液；
- [0086] 1g 氯化钾；
- [0087] 0.1ml 吐温 -20；以及
- [0088] 449.9ml 水。
- [0089] 根据本发明的一个具体示例，1000ml 的粪便样本保存液包含：
- [0090] 550ml 乙二醇；
- [0091] 2.5g 醋酸；
- [0092] 7g 乙二胺四乙酸二钠；
- [0093] 150ml PIPES 缓冲液；
- [0094] 5g 氯化钠；
- [0095] 2.5ml NP-40；以及
- [0096] 297.5ml 去离子水。

[0097] 根据本发明的另一方面，本发明还提供了一种制备粪便样本保存液的方法。根据本发明的实施例，该方法包括以下步骤：

- [0098] 1) 按照前面所述的粪便样本保存液的配方提供原料；
- [0099] 2) 向去离子水中加入离子强度维持剂、缓冲溶液和抗凝剂，并使各成分溶解混匀，以便得到混合物；
- [0100] 3) 将所述混合物进行 pH 值调节至 pH 为 7.4-8.0；
- [0101] 4) 向经过 pH 值调节的混合物中加入固定剂、固定剂辅助剂和非离子去污剂，混匀后灭菌，以便得到所述粪便样本保存液。

[0102] 由此，能够高效地制备获得本发明的粪便样本保存液，且成本低，获得的粪便样本保存液质量好，能够有效用于粪便样本的常温长期保存，保存后样本 DNA 降解和细胞受损少，样本再度利用合格率高。

[0103] 根据本发明的再一方面，本发明还提供了前面所述的粪便样本保存液在保存粪便样本中的用途。由此，利用本发明的粪便样本保存液，能够有效地对粪便样本进行常温长期保存，且保存成本低，效果好，样本再度利用合格率高。

[0104] 根据本发明的又一方面，本发明还提供了一种保存粪便样本的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：将前面所述的粪便样本保存液和粪便样本按照体积比 1-3:1 的比例混匀，于室温下密封避光保存。根据本发明的实施例，利用本发明的保存粪便样本的方法，能够有效地实现对粪便样本的常温长期保存，且操作简单，保存成本低，效果好，保存时间长，样本再度利用合格率高。

[0105] 根据本发明的一些优选实施例，所述粪便样本保存液和所述粪便样本的体积比为 1.5:1。由此，保存成本低，且保存效果突出。

[0106] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的，按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

[0107] 一般方法：

[0108] 下面各实施例中涉及的粪便样本保存液的制备方法，一般包括以下步骤：

[0109] 1) 按照前面所述的粪便样本保存液的配方提供原料；

[0110] 2) 向去离子水中加入离子强度维持剂、缓冲溶液和抗凝剂，并使各成分溶解混匀，以便得到混合物；

[0111] 3) 将所述混合物进行 pH 值调节至 pH 为 7.4-8.0；

[0112] 4) 向经过 pH 值调节的混合物中加入固定剂、固定剂辅助剂和非离子去污剂，混匀后灭菌，以便得到所述粪便样本保存液。

[0113] 实施例 1

[0114] 根据前面所述的一般方法，按照下表所示的配方，制备粪便样本保存液。具体如下：

[0115] 取去离子水 (Milli-Q 超纯水)，加入离子强度维持剂、缓冲溶液和抗凝剂，将 pH 调整至 8.0 后，再加入固定剂、固定剂辅助剂及非离子去污剂，混匀后灭菌，即得。

[0116] 表 1

[0117]

组分名称	加入量
甲醇	500ml
醋酸	3.5g

[0118]

乙二胺四乙酸二钠	1g
磷酸盐缓冲液	100ml
氯化钠	10g
吐温 -20	0.5ml
去离子水	399.5ml

[0119] 其中，磷酸盐缓冲液的配方为：100ml 去离子水中加入磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) 0.9g，磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 24.97g。

[0120] 实施例 2

[0121] 参照实施例 1 所述的方法，按照下表 2 所示的配方，制备粪便样本保存液。其中，醋酸盐缓冲液的配方为：100ml 去离子水中加入 12.89g 乙酸 ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) 0.32g，乙酸钠 ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )。

[0122] 表 2

[0123]

组分名称	加入量

乙醇	450ml
醋酸	1g
乙二胺四乙酸二钠	3g
醋酸盐缓冲液	100ml
氯化钾	1g
吐温 -20	0. 1ml
去离子水	449. 9ml

[0124] 实施例 3

[0125] 参照实施例 1 所述的方法,按照下表 3 所示的配方,制备粪便样本保存液。其中, PIPES 缓冲液的配方为 :150ml 去离子水中加入 3. 02g 哌嗪 -1, 4- 二乙磺酸 (PIPES)。

[0126] 表 3

[0127]

组分名称	加入量
乙二醇	550ml
醋酸	2. 5g
乙二胺四乙酸二钠	7g
PIPES 缓冲液	150ml
氯化钠	5g
NP-40	2. 5ml
去离子水	297. 5ml

[0128] 实施例 4

[0129] 将健康人一次排便量约 10g 粪便装入 60ml 的无菌粪便采集杯 (约 1/4 采集杯的量) 中,并平均分为平行的 8 份样本,然后进行粪便保存验证实验,具体如下:

[0130] 实验设 5 个处理组:无水乙醇组、保存液 1 组、保存液 2 组、冷藏组、室温组。其中,无水乙醇组,采用粪便样本的 1.5 倍体积的无水乙醇进行室温保存;保存液 1 组,采用粪便样本的 1.5 倍体积的 DETs 缓冲液 (其配比为 :20% DMSO, 0. 25M EDTA-Na<sub>2</sub>) 进行室温保存;保存液 2 组,采用粪便样本的 1.5 倍体积的实施例 1 制备获得的本发明的粪便样本保存液进行室温保存;冷藏组,仅将粪便样本进行 -20℃ 冷藏保存;室温组,仅将粪便样本进行室温保存。并且,无水乙醇组、保存液 1 组和保存液 2 组均设 2 个重复 (即 2 个样本)。

[0131] 针对各处理组,均在保存 0h、24h、72h 的不同时间点,分别提取粪便 DNA,然后利用

OD 值法和凝胶电泳法比较各处理样本的 DNA 质量。

[0132] 其中,粪便 DNA 样本提取采用 QIAGEN 公司 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒,每次取 200mg 粪便,提取步骤如下:

[0133] 1) 取样:去尖枪头吸取 1.5ml 均质样本,1200rpm 离心去上清,取 180-220mg 粪便于 2ml 离心管中,放置冰上;

[0134] 2) 消化:加入 1.6ml Buffer ASL,震荡直到样本成均质;12000rpm 离心 1min,取 1.4ml 上清至新的 2ml 离心管;每管加入 1 片 InhibitEX Tablet,震荡 1min 至完全溶散,再静置 1min,12000rpm 离心 3min,将上清转至新的 1.5ml 离心管,12000rpm 离心 3min;取上清 600  $\mu$ l 至 2ml 离心管,加入 25  $\mu$ l proteinase K,混匀后,加入 600  $\mu$ l Buffer AL,震荡 15s;70 $^{\circ}$ C 水浴 10min,短离,加入 600 微升无水乙醇,混匀;

[0135] 3) 过柱吸附:取 600  $\mu$ l 加入标记 QIAamp spincolumn 管,12000rpm 离心 1min,去下液体,步骤 5) 液体分两次过柱,去离心液体;

[0136] 4) 漂洗:加 500  $\mu$ l Buffer AW1,12000rpm 离心 1min,去离心液体;加 500  $\mu$ l Buffer AW2,12000rpm 离心 3min,去离心液体,再 12000rpm 空甩 1min;

[0137] 5) 洗脱:QIAamp spincolumn 离心管至于新的 1.5ml 离心管,小心开盖晾 3min,加入 50  $\mu$ l Buffer AE 于柱中央,室温放置 3min,12000rpm 离心 1min;再重复加入 50  $\mu$ l Elution Buffer 洗脱,去柱,离心所得液体为提取的 DNA,-20 度保存,标记时间和样品名。

[0138] OD 值法的步骤为:取 1  $\mu$ l DNA 溶液采用 NanoDrop<sup>®</sup> 紫外分光光度计进行紫外吸收检测,Elution Buffer 做空白对照,读数单位为 ng/ $\mu$ l。8 份样本不同时间点 OD 值结果见表 4 和图 1。

[0139] 表 4

[0140]

保存时间 保存条件	0h(ng/ $\mu$ l)	24h(ng/ $\mu$ l)	72h(ng/ $\mu$ l)
无水乙醇	452	327	311
	438	319	304
保存液 1	529	445	423
	564	460	409
保存液 2	626	600	538
	531	613	550
-20 $^{\circ}$ C 冷藏	603	300	280
室温	557	50	20

[0141] 凝胶电泳法的步骤为:提取 DNA 后,采用 RNAase 酶消化 1h,再 1% 琼脂糖凝胶,160V 电泳 45min,染色观察,8 份样本不同时间的电泳结果为图 2。在图 2 中,A 图为 8 份平行样本 0h 提取 DNA 电泳图,B 为保存 24h 后各样本的 DNA 电泳图,C 图为保存 72h 后各样本提取的 DNA 电泳图。且如图 2 所示,各图中的条带从左至右分别为:无水乙醇组样本 1、无

水乙醇组样本 2、保存液 1 组样本 3、保存液 1 组样本 4、保存液 2 组样本 5、保存液 2 组样本 6、冷藏组样本 7、室温组样本 8；各图中 M 表示 Mark，最大片段 12K。

[0142] 图 1、图 2 的结果显示：保存 0h（采样保存后立即）提取出 DNA，各处理组 OD 值得浓度及电泳条带显示差别不大，条带单一，主带在 12K 以上，为人基因组 DNA，存在蛋白和 RNA 去除不彻底，测得 OD 值偏大；在放置 24h 后，冷藏组及室温组的样本 DNA 条带明显减弱，降解严重，而其他处理组（即其他条件下）的 DNA 条带亮度减弱，浓度降低，说明存在降解；保存 72h 后，各处理组中样本降解速度都相对减慢，室温放置样本 DNA 条带微弱，RNA 及蛋白杂带有所降低，OD 值检测及电泳检测结果显示保存液 2 组 24 小时内降解速度最快，之后降解很慢，DNA 浓度趋于稳定，保存液 2 组（即实施例 1 制备获得的本发明的粪便样本保存液）中 DNA 一直变化不大，保存效果明显。

[0143] 并且，实验中发现，样本在收集后至于不同的保存条件下（不同处理组）后，无水乙醇组中，无水乙醇保存粪便样本脱水紧缩不易取样，取样误差较大；冷藏组中，冷藏样本，表面降温快，通常要 2-3h 样本内部才冷冻；室温组中，室温放置的样本极易发生生化反应，颜色变深，产生刺鼻恶臭，严重影响操作；保存液 2 组中的样本比较容易分散成均质，颜色变化不大，无特殊气味。

[0144] 进一步，对实施例 2-3 制备获得的粪便样本保存液进行上述实验验证，同样地，结果显示相对于其他处理组，本发明的粪便样本保存液保存的样本 DNA 质量变化最小，保存效果最好。

[0145] 实施例 5

[0146] 将健康人一次排便量约 10g 粪便装入 60ml 的无菌粪便采集杯（约 1/4 采集杯的量）中，并平均分为平行的 4 份样本，然后进行粪便保存验证实验，以进一步检测本发明的粪便样本保存液的时效性，具体如下：

[0147] 实验设 2 个处理：处理 1，样本 1-3 采用粪便样本 1.5 倍体积的实施例 2 制备获得的本发明的粪便样本保存液室温保存；处理 2，样本 4 采用粪便样本 1.5 倍体积的 DETs 缓冲液（其配比为：20% DMSO, 0.25M EDTA-Na<sub>2</sub>）室温保存。然后，针对各处理的样本，在保存的第 1、3、7、15、60 天提取样本中的 DNA，以人的保守基因  $\beta$ -actin 为参照，采用荧光定量 PCR 比较样本中人 DNA 的含量变化情况。

[0148] 其中，粪便 DNA 样本提取采用 QIAGEN 公司 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒，每次取 200mg 粪便，提取步骤如实施例 3 中所述。

[0149] 荧光定量 PCR 采用保守基因  $\beta$ -actin 定量，利用引物  $\beta$ -actin-F 和  $\beta$ -actin-R（目的产物 175bp），SYBR 荧光定量试剂盒（Takara 公司），反应体系 25  $\mu$ l，上下游引物用量 0.5  $\mu$ l（浓度 10  $\mu$ M/L），退火温度为 64 $^{\circ}$ C，45 个循环，阴性对照为 H<sub>2</sub>O，阳性对照为人 AGS 细胞系 DNA，结果取扩增曲线 CT 值，具体结果见图 3。

[0150] 其中，引物序列如下：

[0151]  $\beta$ -actin-F：

[0152] 5'-TGGTGATGGAGGAGGCTCAGCAAGT-3' (SEQ ID NO:1)；

[0153]  $\beta$ -actin-R：

[0154] 5'-AGCCAATGGGACCTGCTCCTCCCTTGA-3' (SEQ ID NO:2)。

[0155] 图 3 的荧光定量结果证实保存时间至 60 天，本发明的粪便样本保存液保存的粪便

样本 1-3 中人 DNA 的浓度变化不大,长时间的效果远远强于 DETs 缓冲液常温保存(样本 4)效果,而方便程度更是优于无水乙醇及低温冷藏。

[0156] 进一步,对实施例 1、3 制备获得的粪便保存液进行上述实验验证,同样地,结果显示保存时间至 60 天时,相对于其他处理组,本发明的粪便保存液保存的样本 DNA 浓度变化最小,保存效果最好。

[0157] 实施例 6 细胞形态保存验证实验

[0158] 将健康人一次排便量约 20g 粪便装入 60ml 的无菌粪便采集杯(约 1/3 采集杯的量)中,加入 1.5 倍体积的实施例 3 制备获得的本发明的粪便样本保存液,加入约  $5.0 \times 10^5$  个人口腔上皮细胞(混合以制备含有一定量脱落细胞的测试粪便样本),混匀至粪便均质化,阴凉室温静置。然后,收集并观察样本中的脱落细胞,具体如下:

[0159] 1) 细胞分离

[0160] 在保存的第 1、7、15 天分别用 SCSR™ Fecal Cell Isolation Kit 试剂盒分离粪便样本中的细胞,具体步骤如下:

[0161] 前期粗分:去尖枪头吸取 4 次,取均质化样本约 3ml(约含原粪便 1g,按 20g 粪便加入 30ml 保存液等比例换算)至于  $330 \mu\text{m}$  尼龙网的塑料袋中,加入 10ml 预冷的 PBS,外力挤压袋使得样本进一步细化,将通过尼龙网的悬液转至配备的 50ml 离心管中(此管上端是可摘取的  $40 \mu\text{m}$  细筛),去细筛,用预冷 PBS 将离心管中滤液补至 25ml;

[0162] 离心细分:在离心管底部缓慢加入 10ml 分离液(提前放至室温),避免气泡及与好管中滤液混合,可见两溶液的界面清晰;200g 室温离心 10min,缓慢吸去上清,留 3ml 左右余液悬浮底部细胞;

[0163] 洗细胞:细胞悬液加入预冷 PBS(PH = 7.2)至 40ml,混匀,4℃下 900g 离心 10min,吸去上清,15ml PBS(PH = 7.2)重复一遍,小心去上清,留 2.5ml 余液重悬底部细胞,悬液至冰上。

[0164] 2) 细胞染色观察

[0165] 按照以下步骤进行细胞染色观察:

[0166] 涂片,取  $1 \mu\text{l}$  细胞悬液制备涂片(推片法),迅速干燥;

[0167] 固定,甲醇固定标本 5-10min(另有资料为 3-5min),蒸馏水漂洗干净(或者自然干燥);

[0168] 染色,稀释染液(取磷酸盐缓冲液 9 份,吉姆萨染液 1 份充分混合),将染液滴在组织或细胞上,滴染 10-15min,蒸馏水漂洗干净,紧急时可趁湿加盖片 20X、40X 镜检,结果见图 4。

[0169] 如图 4 所示,图 A 为保存第 1 天的细胞形态,图 B 为保存 7 天的细胞形态,图 C 为保存 15 天的细胞形态,周边黑色颗粒多为大肠杆菌及粪便微小杂质;图 D 和图 E 为口腔上皮细胞的最初形态,周边黑色颗粒为杂质。

[0170] 由图 4 可知:图 D 显示最初口腔上皮细胞染色核呈紫红色,细胞质浅红色,有的细胞膜成不规则褶皱装;由图 A-C 可以看出,粪便样本中的细胞随着保存时间的增加,在显微镜下观察到的细胞核的颜色逐渐加深,细胞形态受外界作用影响变化不大,细胞膜完好,很容易辨识。另外, $1 \mu\text{l}$  细胞悬液涂片观察到的细胞数量没有规律,最好的一次结果共观察到 10 个细胞,与理论值  $(5.0 \times 10^5 \text{个} / 30\text{ml}) * 3\text{ml} = 10$  个相同,3 次结果不存在减少的趋势,

可能是因为取样中本身带有的细胞数浮动很大及操作过程的损失不同,或实验次数太少原因。

[0171] 进一步,对实施例 1-2 制备获得的粪便保存液进行上述实验验证,同样地,结果显示,本发明的粪便保存液保存的粪便样本中的细胞随着保存时间的增加,细胞形态受外界作用影响变化不大,细胞膜完好。

[0172] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0173] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

<110> 深圳华大基因研究院

<120> 粪便样本保存液及其制备方法和应用

<130> PIDC147299

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 1

tgggatgga ggagetcag caagt

25

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 引物

<400> 2

agccaatggg acctgetcct ceettga

27



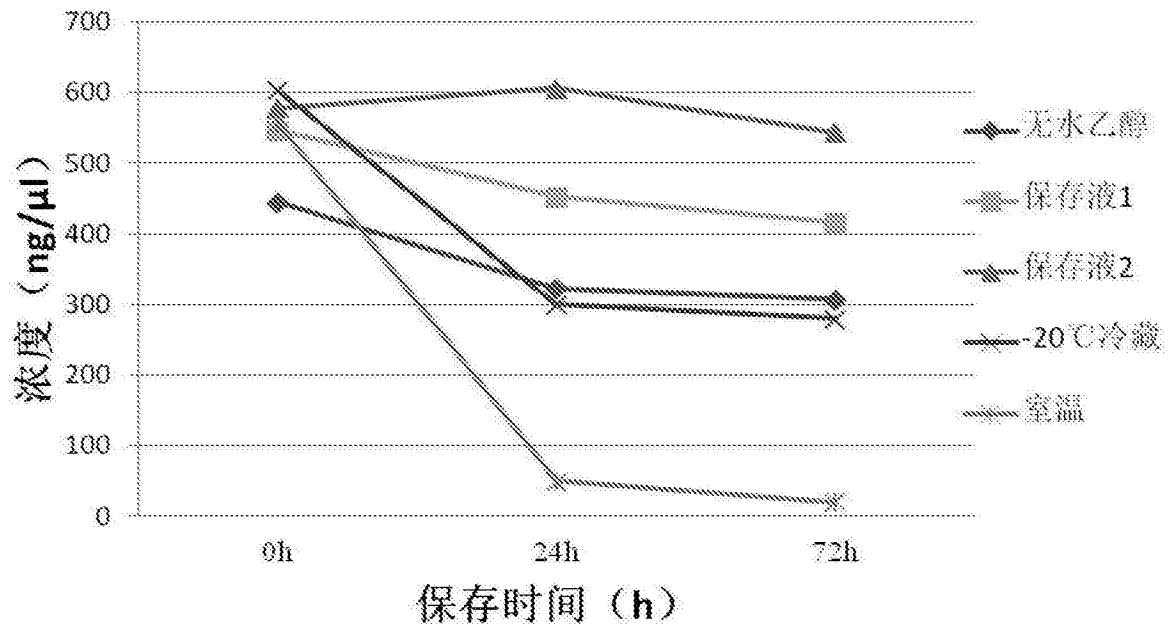
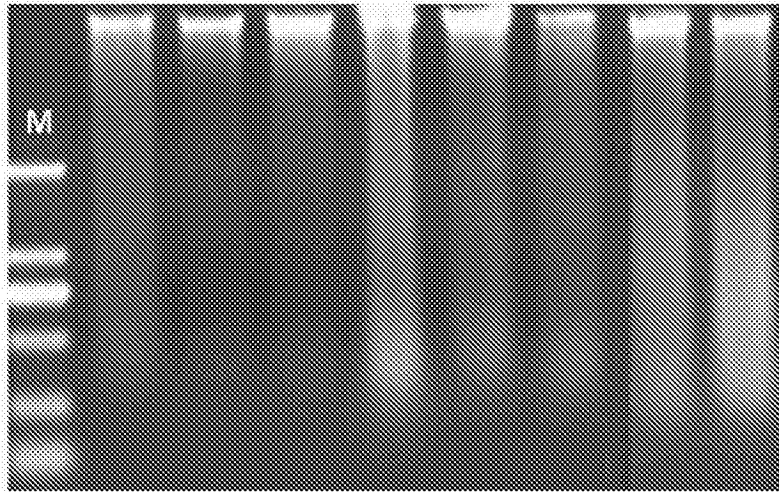
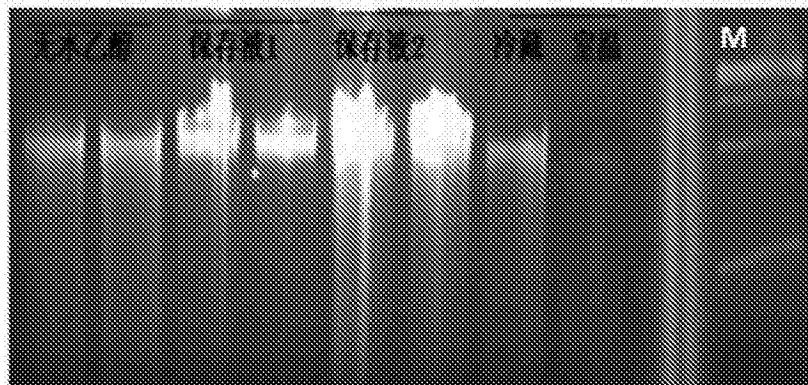


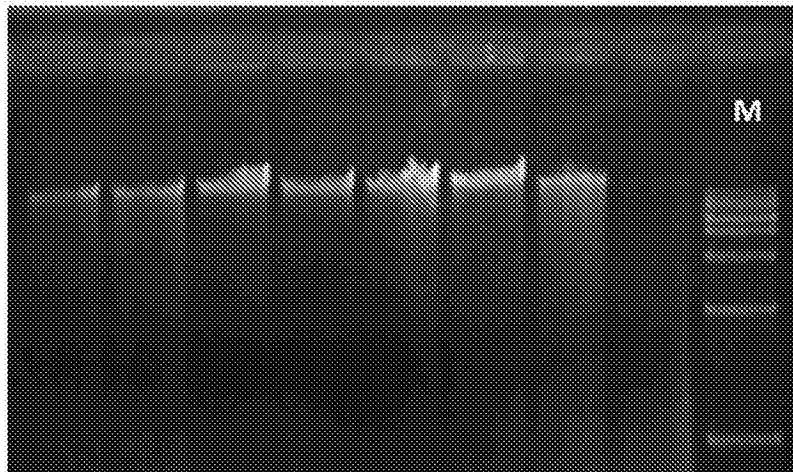
图 1



A



B



C

图 2

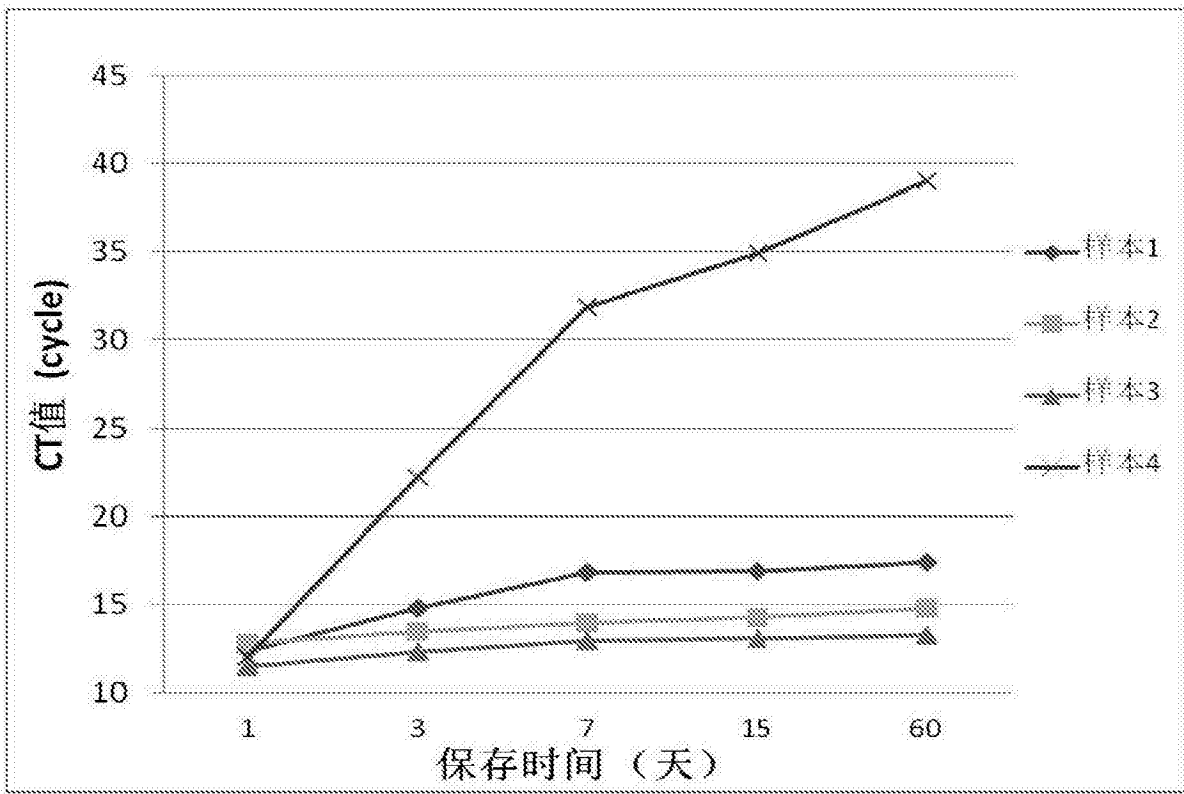


图 3

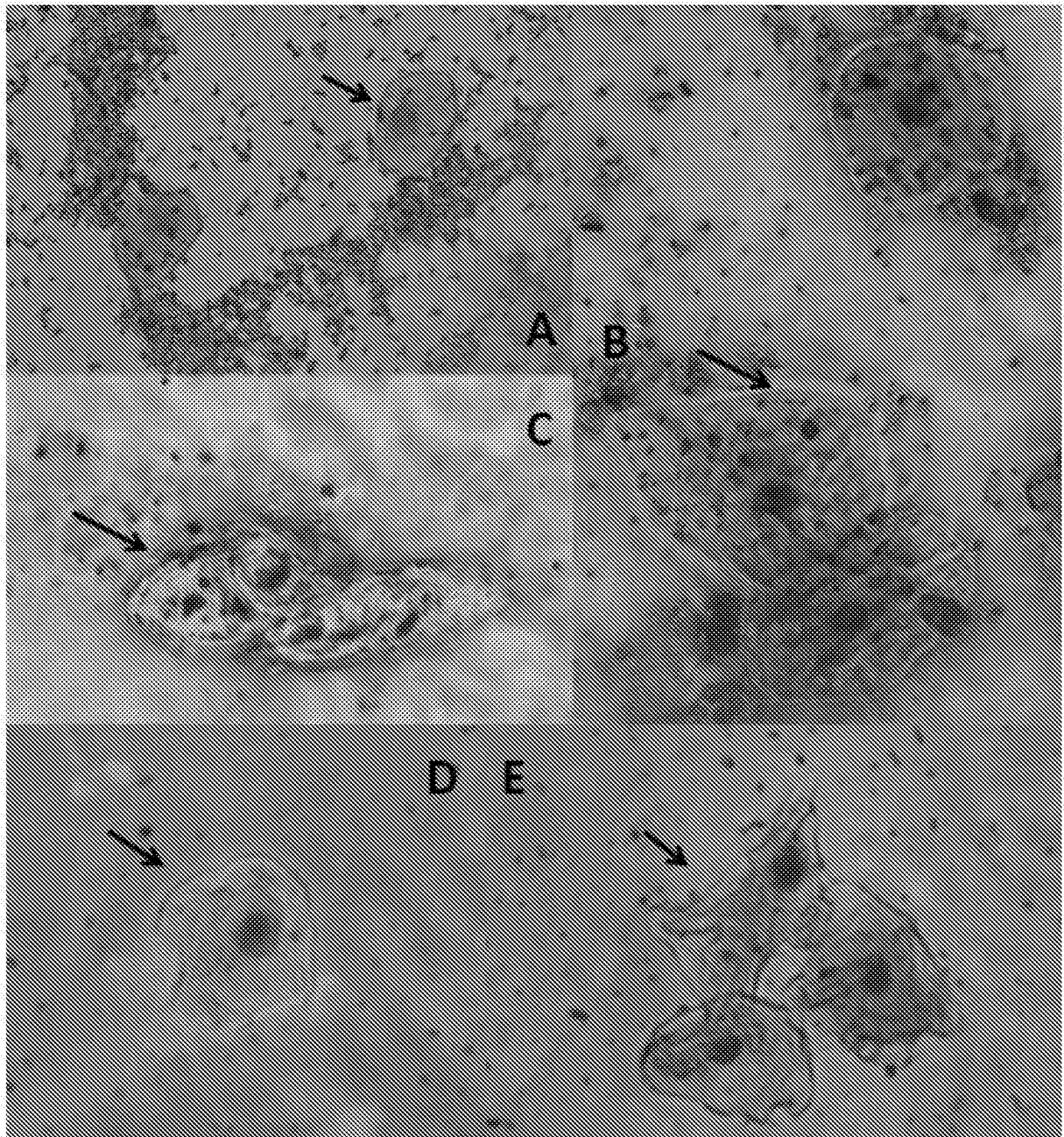


图 4