



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108103057 B

(45) 授权公告日 2021.09.03

(21) 申请号 201810057015.X

菲利普·贝尔格雷德尔

(22) 申请日 2013.08.27

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理有限公司 11129

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108103057 A

代理人 张涛

(43) 申请公布日 2018.06.01

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C12N 15/10 (2006.01)

61/693,963 2012.08.28 US

C12M 1/00 (2006.01)

61/697,116 2012.09.05 US

C12M 1/12 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

审查员 范英程

201380055076.8 2013.08.27

(73) 专利权人 阿科尼生物系统公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 丽贝卡·霍尔姆伯格

A·艾琳·吉德史伯格

T·珍娜·斯托克

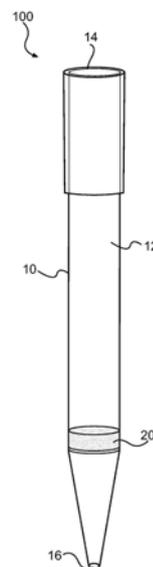
权利要求书2页 说明书35页 附图22页

(54) 发明名称

用于纯化核酸的方法和试剂盒

(57) 摘要

公开了用于核酸的自动化提取的方法。还公开了用于从产妇的血浆样品中分离胎儿核酸的方法和试剂盒。所述方法包括使所述血浆样品在允许胎儿核酸和母系核酸结合至第一过滤器的条件下流动通过所述第一过滤器；洗脱结合至所述第一过滤器的所述胎儿核酸和母系核酸以制得经浓缩的核酸样品；使所述经浓缩的核酸样品在允许所述母系核酸优先结合至第二过滤器的条件下流动通过所述第二过滤器；以及从流动通过所述第二过滤器的所述经浓缩的核酸样品中回收所述胎儿核酸。



1. 一种用于将血浆样品中的低分子量 (LMW) 核酸与高分子量 (HMW) 核酸分开和分离的方法, 所述方法包括:

(a) 使包含 LMW 核酸和 HMW 核酸的血浆样品在允许所述 LMW 核酸和 HMW 核酸特异性地结合至第一过滤器的条件下流动通过所述第一过滤器;

(b) 将结合的 LMW 核酸和 HMW 核酸从所述第一过滤器中洗脱, 从而形成包含 LMW 核酸和 HMW 核酸的经浓缩的核酸样品;

(c) 使所述经浓缩的核酸样品在允许 HMW 核酸结合至第二过滤器并且所述 LMW 核酸流动通过所述第二过滤器的条件下流动通过所述第二过滤器; 和

(d) 从所述第二过滤器收集所述流动通过组分, 其中, 来自所述第二过滤器的所述流动通过组分含有 LMW 核酸。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 步骤 (a) 中的允许 LMW 核酸和 HMW 核酸与所述第一过滤器特异性地结合的所述条件包括形成第一结合混合物, 所述第一结合混合物包含所述血浆样品、范围为 17 体积% 至 25 体积% 的脂肪醇和浓度范围为 0.5M 至 4.0M 的离液序列高的盐。

3. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 步骤 (c) 中的用于使所述 HMW 核酸与第二过滤器结合的所述条件包括形成第二结合混合物, 所述第二结合混合物包含所述经浓缩的核酸样品、范围为 0 体积% 至 10 体积% 的脂肪醇和浓度范围为 1M 至 4.0M 的离液序列高的盐。

4. 根据权利要求 1 所述的方法, 所述方法进一步包括如下步骤:

(e1) 将结合的 HMW 核酸从所述第二过滤器中洗脱以制得再生的第二过滤器;

(f1) 使来自所述第二过滤器的所述流动通过组分在允许 LMW 核酸与所述第二过滤器结合的条件下流动通过所述再生的第二过滤器; 和

(h1) 将结合的 LMW 核酸从步骤 (f1) 中的所述第二过滤器洗脱。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中, 步骤 (f1) 中的用于使所述 LMW 核酸与所述第二过滤器结合的所述条件包括形成第三结合混合物, 所述第三结合混合物包含来自所述第二过滤器的所述流动通过组分、范围为 10 体积% 至 25 体积% 的脂肪醇和浓度范围为 1M 至 5.0M 的离液序列高的盐。

6. 根据权利要求 1 所述的方法, 所述方法进一步包括如下步骤:

(e2) 在允许 LMW 核酸与所述第一过滤器结合的条件下使来自所述第二过滤器的所述流动通过组分流动通过所述第一过滤器; 和

(f2) 从步骤 (e2) 中的所述第一过滤器洗脱所结合的 LMW 核酸。

7. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述第一过滤器和第二过滤器是自支持玻璃熔块。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中, 所述玻璃熔块是烧结玻璃熔块。

9. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中, 所述第一过滤器具有 16 微米至 40 微米的孔隙尺寸, 并且所述第二过滤器具有 4 微米至 10 微米的孔隙尺寸。

10. 根据权利要求 1 所述的方法, 所述方法进一步包括如下步骤:

(e3) 在允许所述 LMW 核酸与第三过滤器结合的条件下使来自所述第二过滤器的所述流动通过组分流动通过所述第三过滤器; 和

(f3) 从所述第三过滤器洗脱结合的 LMW 核酸。

11. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 第一过滤器和第二过滤器中的一个或者两个包括玻璃熔块, 所述玻璃熔块包含具有第一孔隙尺寸的第一区段和具有第二孔隙尺寸的第二区段, 其中, 所述第一孔隙尺寸与所述第二孔隙尺寸不同。

12. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述第一过滤器和所述第二过滤器是相同的过滤器。

13. 一种用于将血浆样品中的LMW核酸与HMW核酸分离的试剂盒, 所述试剂盒包括:

移液器吸头, 所述移液器吸头包括自支持玻璃熔块过滤器, 其中, 所述玻璃熔块过滤器具有2微米至220微米的孔隙尺寸, 并且没有使用改善核酸与所述玻璃熔块过滤器的结合的试剂处理或者包被过,

第一结合缓冲液, 所述第一结合缓冲液被配制或准备与血浆样品混合并且提供具有17体积%至25体积%的脂肪醇和浓度为0.5M至4.0M的离液序列高的盐的第一结合混合物; 和

第二结合缓冲液, 所述第二结合缓冲液被配制或准备与经浓缩的核酸样品混合并且提供具有0体积%至10体积%的脂肪醇和浓度为1M至4.0M的离液序列高的盐的第二结合混合物。

14. 根据权利要求13所述的试剂盒, 其中, 所述移液器吸头具有0.5ml至50ml的吸头体积。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒, 所述试剂盒进一步包括另外的移液器吸头, 所述另外的移液器吸头包括自支持玻璃熔块过滤器, 其中, 所述另外的移液器吸头具有0.5ml至50ml的吸头体积。

16. 根据权利要求15所述的试剂盒, 其中, 所述玻璃熔块过滤器具有16微米至40微米的孔隙尺寸, 并且所述另外的移液器吸头中的所述玻璃熔块过滤器具有4微米至10微米的孔隙尺寸。

17. 根据权利要求14所述的试剂盒, 其中, 所述玻璃熔块过滤器包括熔融玻璃熔块, 所述熔融玻璃熔块包括具有第一孔隙尺寸的第一区段和具有第二孔隙尺寸的第二区段。

18. 根据权利要求17所述的试剂盒, 其中, 所述第一区段具有100微米至160微米的孔隙尺寸并且所述第二区段具有16微米至40微米的孔隙尺寸, 或者其中, 所述第一区段具有16微米至40微米的孔隙尺寸并且所述第二区段具有4微米至10微米的孔隙尺寸。

用于纯化核酸的方法和试剂盒

[0001] 本发明是申请号为201380055076.8,申请日为2013年08月27日,申请名称为用于纯化核酸的方法和试剂盒的分案申请。

[0002] 本申请要求在2012年8月28日提交的美国临时申请No.61/693,963和在2012年9月5日提交的美国临时申请No.61/697,116的优先权。

技术领域

[0003] 本发明主要涉及用于分离和/或纯化核酸的方法,特别是涉及使用固体单块过滤器从样品分离和/或纯化核酸的方法,所述固体单块过滤器易于自动化。

背景技术

[0004] 核酸纯化对于大多数只是进行分子诊断和研究使用的用途是需要的,包括非侵入性产前诊断(NIPD)的胎儿DNA的纯化。提取过程已经通过利用基于磁珠和膜的形式进行流水线化和自动化。虽然有效,但是当面对具有挑战性的临床基质(clinical matrice)时,颗粒和膜具有已知的局限性。例如,基于膜和珠子的柱子具有依从性,具有小的孔隙尺寸,并且需要某一类型的支持物以受到离心机或者真空系统的处理。膜和珠子柱的物理特性导致显著的流体阻力,这限制了能够有效地受到处理而没有堵塞耗材的样品类型和/或能够通过流动路径单向处理的总(输入)样品体积。相反,磁性颗粒必须通过搅拌而遍布样品分布。需要在溶液内均一地分布磁性颗粒限制了能够采用大多数磁珠耗材进行处理的总输入样品体积。临床样品属性(例如粘性或者复杂度)可能导致在管子或者棒材的侧部上的没有效率的磁性颗粒浓度。并且硅粉能够在提取过程中使珠子破碎,从而失去它们的磁性并且污染最终的样品。

[0005] 对用于筛查和诊断两种目的的分子测试存在高的需要提高了实验室中的样品生产能力的要求。从提取一直到检测的处理步骤的自动化对于减轻这些样品处理负担是至关重要的。上述提及的其他提取技术存在固有限制,对于适应于自动化的简单且低价格的核酸纯化系统仍然存在需要。

发明内容

[0006] 本申请的一个方面涉及一种用于从液体样品中纯化核酸的自动化方法,所述方法包括:(a)向机器人平台加载多个移液器吸头,每个吸头包括限定位于第一开口和第二开口之间的通路的壳体和占据所述通路的一部分的过滤器,其中,所述过滤器特异性地结合核酸,并且其中所述自动化机器人平台能够自动地分配试剂、取出样品内容物,并且移动移液器吸头和/或样品管;(b)使包含核酸的液体样品的至少一部分经移液器吸头的所述第一开口流动进入,使得所述核酸通过所述移液器吸头并且结合至其中的所述过滤器;(c)经由所述第一开口将所述部分的液体样品从所述移液器吸头排出,其中所述部分的液体样品在离开所述移液器吸头的同时第二次通过所述过滤器;以及(d)通过使洗脱缓冲液经所述移液器吸头的所述第一开口流动进入并且经由所述第一开口从所述移液器吸头排出所述洗脱

缓冲液来将所述核酸从所述过滤器洗脱,其中,所述洗脱缓冲液在进入和离开所述移液器吸头的同时通过所述过滤器。

[0007] 本申请的另一个方面涉及一种用于将血浆样品中的胎儿核酸与母系(maternal)核酸分开和分离的方法,所述方法包括:(a)使包含胎儿核酸和母系核酸的血浆样品在允许所述胎儿核酸和母系核酸特异性地结合至第一过滤器的条件下流动通过所述第一过滤器;(b)将结合的胎儿核酸和母系核酸从所述第一过滤器中洗脱,从而形成包含胎儿核酸和母系核酸的经浓缩的核酸样品;(c)使所述经浓缩的核酸样品在允许所述母系核酸结合至第二过滤器并且所述胎儿核酸流动通过所述第二过滤器的条件下流动通过所述第二过滤器;和(d)从所述第二过滤器收集流动通过组分,其中,来自所述第二过滤器的所述流动通过组分含有胎儿核酸。

[0008] 本申请的另一个方面涉及一种用于将血浆样品中的胎儿核酸与母系核酸分离的试剂盒,所述试剂盒包括:移液器吸头,所述移液器吸头包括自支持玻璃熔块过滤器,其中所述玻璃熔块过滤器具有2微米至220微米的孔隙尺寸,并且没有使用改善核酸与所述玻璃熔块过滤器的结合的试剂处理或者包被过;第一结合缓冲液,所述第一结合缓冲液被配制成准备与血浆样品混合并且提供第一结合混合物,所述第一结合混合物具有约17体积%至25体积%的脂肪醇和浓度为约0.5M至约4.0M的离液序列高的盐(chaotropic salt);和第二结合缓冲液,所述第二结合缓冲液被配制成准备与血浆样品混合并且提供第一结合混合物,所述第一结合混合物具有约0体积%至10体积%的脂肪醇和浓度为约1M至约4.0M的离液序列高的盐。

[0009] 当结合如下附图阅读下文的具体实施方式时将会清楚这些和其他方面和优点。

附图说明

[0010] 图1A至1D是根据本申请的移液器吸头装置的各种实施方式的示意图,所述移液器吸头包括空腔室和用于纯化核酸的过滤器。

[0011] 图2A至2D是根据本申请的用于纯化胎儿核酸的例示性方法的示意性图示。

[0012] 图3示出了操作台(Worktable)(B)上的艾本德(Eppendorf)epMotion5070样品板布局图(A)和试剂/消耗品的布置。所述样品板可以被构造成用于多达24个样品(分别为第1、5和9列),不过epMotion将只是同时处理8个样品。

[0013] 图4示出了来自混合在鼻咽抽吸物(nasopharyngeal aspirate, NPA)中的流感病毒的自动化提取的实时PCR结果。输入NPA体积=100 μ L,洗脱体积=50 μ L。结果是来自每个洗脱水平和流感标靶5个不同NPA背景的3次重复提取(n=15)的平均值。qPCR是在LightCycler 480系统上进行。

[0014] 图5示出了用于从全血纯化基因组DNA的汉密尔顿(Hamilton)STAR面板(deck)布局图(不按比例)。面板位置1=汉密尔顿1ml过滤式吸头;2=汉密尔顿1ml非过滤式吸头;3=爱康尼(Akonni)/汉密尔顿1ml LPT2mm过滤器吸头;4=输入血液样品载体(血液收集管或者微型离心管);5-9=290ml试剂槽,它们分别用于裂解缓冲液F(Lysis Buffer F)、乙醇、洗涤缓冲液J、洗涤缓冲液K和洗脱缓冲液A2。10=96深孔结合板;11=96深孔洗涤J;12=96深孔洗涤K;13=96深孔洗脱板;14=汉密尔顿HHS2加热器/摇动器,其具有Nunc 96深孔温育板;15=50ml试剂槽,其含有蛋白酶K。

[0015] 图6A至6G显示了各种基因组DNA (gDNA) 提取的结果。图6A显示了来自NanoDrop 1000 (赛默飞世尔 (ThermoFisher)) 的UV-可见痕迹,其来自于从全血提取的人类gDNA的10个随机选择重复。图6B显示了从全血提取的过滤器吸头纯化的人类gDNA的1%琼脂糖凝胶。M=飞世尔24kb Max DNA Ladder。泳道1-4= \sim 100ng来自四个随见选择重复的纯化gDNA。图6C显示了从每轮收集200 μ L的8轮的gDNA收率的可重复性,全血输入根据本发明进行处理。图6D显示了在来自1ml TruTip[®]过滤器(左侧)处理(各8轮)的100 μ l、200 μ l和300 μ l的全血输入体积和来自5ml TruTip[®]过滤器(中间和右侧)的1000 μ l和2000 μ l全血体积的范围,来自全血的平均gDNA收率呈线性。图6E显示了其中对48个400 μ l样品(24个唾液和24个空白)进行qPCR分析的交叉污染研究的结果。图6F显示了来自使用凯杰(Qiagen)手动旋转柱方法(Qiagen's manual spin column method)(右侧柱/对)和根据本发明的自动化提取方法(左侧柱/对)提取的7个独立的盲选唾液样品(样品A-G;400 μ l输入/100 μ l洗脱)的平均gDNA收率的比较的UV(紫外线)吸光度结果。图6G显示了TruTip[®]过滤器处理的200 μ l全血(柱1)与五个其他竞争物提取系统(柱2至6)相比的处理时间。

[0016] 图7是显示了根据本发明的用于纯化胎儿核酸的方法的一个实施方式的流程图。

[0017] 图8A是琼脂糖凝胶的图,其显示了通过超声处理进行片段化以模拟在实际母系样品中所见到的长度的女性和男性基因组DNA(女性=母系DNA,男性=胎儿DNA)。图8B是显示了在不同稀释度的胎儿DNA的回收的图。实时PCR结果来自分别针对TruTip(实心菱形和实心矩形)和凯杰(空心三角形和X)的每个样品含有100至1ng的片段化男性DNA和包括200ng片段化女性DNA的总DNA的提取样品,n=3提取,每次提取n=3/用于PCR的样品。误差线指示 \pm 一个标准误差。

[0018] 图9是显示了采用或者不采用本申请的富集步骤的胎儿DNA(ChromY)和总DNA(Chrom 1)回收。母系血清有四个重复,每个5ml。CHY量化男性胎儿DNA,而CH1量化所存在的总DNA(胎儿的和母系的)。qPCR在采用先前公开的测试靶向CHY和CH1的LightCycler 480系统上进行。

[0019] 图10示出了用于从大体积血清样品纯化DNA的汉密尔顿STARplus面板布局图(不按比例)。该系统装配有8 \times 5ml通道和8 \times 1ml通道。面板位置1=汉密尔顿4ml过滤式吸头;2=爱康尼/汉密尔顿5ml过滤器吸头;3=来源血清样品;4=50ml锥形管;5=120ml试剂槽,其装有CN-W1、CN-W2和CN-W4试剂;6=小体积试剂槽,其装有蛋白酶K、CN-B2、CN-B3、EBA2、EBB和CN-W3试剂;7=290ml试剂槽,其装有CN-L1试剂;8=290ml试剂槽,其装有CN-B1试剂;9=96深孔板,其用于步骤1;10=96深孔板,其用于步骤2;11=样品载体,其用于经纯化的最终产物;12=汉密尔顿1ml非过滤式吸头;13=爱康尼/汉密尔顿1ml LPT 4mm过滤器吸头。

[0020] 图11A示出了来自使用大体积过滤器吸头程序处理的合并母系血清样品的8个重复样品的qPCR结果。全部程序(包括离线蛋白酶K预处理)在约2小时内完成。胎儿男性(CHY)和总(CH1)DNA的所有重复的平均Ct值分别为 34.58 ± 0.66 和 29.76 ± 0.50 ,这展示了自动化提取方法的优异的可重复性。总DNA池(为基因组等分试样)中的胎儿DNA的浓度根据与标准物比较的拟合点分析进行计算,所有样品的所得平均胎儿DNA%为2.8%。这个样品的胎儿DNA的真实%是未知的,因为这些样品在进行提取之前合并。图11B显示了从根据上述提取

程序使用采用爱康尼 TruTip[®] 过滤器的自动化系统(左侧柱/对)和凯杰手动循环核酸试剂盒(Qiagen's manual Circulating Nucleic Acid Kit)(右侧柱/对)从11个独特的重复母系血清样品回收的胎儿DNA的百分比的比较。

具体实施方式

[0021] 本申请提供了用于从测试样品中纯化核酸的方法和装置。具体地说,本申请提供了一种简单的核酸提取技术,由此将单块核酸结合基质(matrix)插入到移液器吸头或类似的装置中。核酸提取使用样品制备形式进行,该样品制备形式与大多数操作仪器相容并且因此适合于自动化和适用于很多培养基到高通量临床应用和样品基质。在一些实施方式中,本申请涉及一种使用带有多个移液器吸头的机器人平台从液体样品纯化核酸的自动化方法。

[0022] 本申请进一步提供了适合于从具有较高的分子量(HMW)DNA(例如母系DNA)的背景中优先选择低分子量(LMW)DNA片段(例如胎儿DNA)的方法。所述方法增加了样品中存在的LMW DNA的百分比,而不管所存在的HMW DNA的量如何,并且提供了处理大样品体积例如多达20ml的大体积的能力,以符合某些临床应用的灵敏性要求。在一些实施方式中,本申请涉及一种用于使用一种或者多种过滤器将血浆样品中的胎儿核酸与母系核酸分开和分离的方法,所述一种或者多种过滤器允许所述胎儿核酸和/或母系核酸与所述一种或者多种过滤器特异性地结合。本申请还提供了用于将血浆样品中的胎儿核酸与母系核酸分离的试剂盒。

[0023] 本文使用的术语“测试样品”或者“样品”是指可能包含核酸的任何材料。测试样品的示例包括但不限于生物样品、环境样品和非天然样品。生物样品的示例包括但不限于组织样品、生物流体样品、细胞样品、细菌样品和病毒样品。组织样品包括从任何动物或植物分离的组织。生物流体样品包括但不限于血液、血浆、尿液、唾液、痰液、脑脊液、鼻咽分泌物、空腔分泌物、灌洗液(如支气管的)和白细胞提取样品。细胞样品包括但不限于培养的细胞或从任何来源分离的细胞。病毒样品包括但不限于培养的病毒或分离的病毒。环境样品包括但不限于空气样品、水样品、土样品、岩石样品和从自然环境中获得的任何其他样品。人工样品包括在自然环境中不存在的任何样品。“人工样品”的例子包括但不限于纯化或分离的材料、培养的材料、合成的材料和任何其他人造材料。在一些实施方式中,测试样品包括痰液、NALC处理痰液、全血或血液培养物、血浆、脑脊液、鼻咽擦拭物和抽吸物、支气管灌洗液、新鲜的或冷冻的细胞和组织、FFPE样品、血沉棕黄层、血卡、唾液、口腔抹拭物、粪便、固体或液体细菌培养物、NPA、再生加工用水(recreational water)和土壤。

[0024] 本文使用的术语“核酸”是指单独的核酸和聚合链核酸,包括DNA和RNA,不管是天然存在的还是人工合成的(包括其类似物),还是它们的修饰物,特别是已知在自然中发生的那些修饰物,具有任意的长度。符合本申请的核酸长度的示例包括但不限于适合于PCR产物(例如约30至3000个碱基对(bp),约30至2000bp,约30至1000bp)、长度为50至600bp的DNA片段、长度为100至350bp的DNA片段、以及人类基因组DNA(例如从约数十个千碱基对(Kb)至十亿个碱基对(Gb)的级别)的长度。因此,应当理解的是,术语“核酸”涵盖单个核酸以及核苷酸、核苷(天然的或者人工的以及它们的组合)的小片段的链,例如表达序列标签或者基因组片段以及较大的链例如基因组材料,包括个体基因和甚至是整个染色体。本文使用的

术语“低分子量 (LWM) DNA”是指各种不同实施方式中的具有小于约20kb、15kb、10kb、5kb、3kb、2kb、1kb、900bp、800bp、700bp、600bp、500bp、400bp、350bp或300bp的长度的DNA片段。本文使用的术语“高分子量 (HMW) DNA”是指各种不同实施方式中的具有大于约300bp、350bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1kb、2kb、3kb、5kb、10kb、15kb、20kb、50kb、或100kb的长度的DNA片段。在一些实施方式中，术语“高分子量DNA”是指大小范围为等于或者大于3000bp、等于或者大于2000bp、等于或者大于1000bp、等于或者大于800bp、等于或者大于600bp、等于或者大于500bp、等于或者大于400bp、或者等于或者大于350bp的DNA；而术语“低分子量DNA”是指大小范围为小于或者等于3000bp、小于或者等于2000bp、小于或者等于1000bp、小于或者等于800bp、小于或者等于600bp、小于或者等于500bp、小于或者等于400bp、小于或者等于350bp、或者小于或者等于300bp的DNA。在一些实施方式中，术语低分子量DNA是指在母亲循环（例如血液）中存在的胎儿DNA，而术语“高分子量DNA”是指母系DNA。

[0025] 本文使用的术语“整体 (monolith) 吸附剂”或者“整体吸附材料”是指呈单件形式的具有连续的相互连接的孔隙结构的多孔性三维吸附材料，其可以包括刚性、自支持的基本为整体的结构。整体是例如通过将前体铸造、烧结或聚合成具有所需形状的模式品来制备。术语“整体吸附剂”或“整体吸附材料”意指区别于被填充成床形式或者嵌合到多孔性基质中的各个吸附颗粒的集合，其中终产品包括各个吸附颗粒。术语“整体吸附剂”或“整体吸附材料”还意指区别于吸附性纤维或被吸附剂涂覆的纤维的集合，例如过滤纸或者涂覆有吸附剂的过滤纸。

[0026] 过滤器和移液器吸头

[0027] 本发明的过滤器吸头系统提供了一种核酸提取技术，利用该技术可以将整体结合基质过滤器插入到移液器吸头中。多孔性整体材料特异性地结合核酸并且由刚性的自支持的基本为整体的结构组成。在一些实施方式中，所述多孔性整体材料不包括提供核酸亲和性的额外材料。在一些优选的实施方式中，所述多孔性整体材料是玻璃基整体材料，例如玻璃熔块。在一些实施方式中，所述玻璃熔块是烧结玻璃熔块。所述多孔性整体材料例如玻璃熔块或烧结玻璃熔块的孔隙度取决于用途。一般来说，所述多孔性整体材料应当具有这样的孔隙度，该孔隙度允许具有用于特定用途的所需样品流速，并且能够保留具有所需尺寸范围的核酸。在一些实施方式中，所述多孔性整体材料是具有范围为2-400微米、2-300微米、2-220微米、2-200微米、2-180微米、2-160微米、2-140微米、2-120微米、2-100微米、2-80微米、2-60微米、2-40微米、2-20微米、2-16微米、2-10微米、2-5.5微米、4-400微米、4-300微米、4-220微米、4-200微米、4-180微米、4-160微米、4-140微米、4-120微米、4-100微米、4-80微米、4-60微米、4-40微米、4-20微米、4-16微米、4-10微米、4-5.5微米、10-400微米、10-300微米、10-220微米、10-200微米、10-180微米、10-160微米、10-140微米、10-120微米、10-100微米、10-80微米、10-60微米、10-40微米、10-20微米、10-16微米、16-400微米、16-300微米、16-220微米、16-200微米、16-180微米、16-160微米、16-140微米、16-120微米、16-100微米、16-80微米、16-60微米、16-40微米、40-400微米、40-300微米、40-220微米、40-200微米、40-180微米、40-160微米、40-140微米、40-120微米、40-100微米、40-80微米、40-60微米、100-400微米、100-300微米、100-220微米、100-200微米、100-180微米、100-160微米、100-140微米、100-120微米、160-400微米、160-300微米、160-220微米、160-200微米、160-180微米、

200-400微米、200-300微米或200-220微米的孔隙度(即平均孔隙尺寸)的玻璃熔块或烧结玻璃熔块。在其他一些实施方式中,所述多孔性整体材料是具有孔隙度不同的两个区段的玻璃熔块或烧结玻璃熔块。每个区段可以具有处在上述范围的孔隙度,(例如4-10微米区段和16-40微米区段,或者16-40微米区段和100-160微米区段)。

[0028] 在一些实施方式中,所述过滤器具有如下范围的厚度:1-30mm、1-25mm、1-20mm、1-15mm、1-10mm、1-8mm、1-6mm、1-4mm、2-30mm、2-25mm、2-20mm、2-15mm、2-10mm、2-8mm、2-6mm、2-4mm、4-30mm、4-25mm、4-20mm、4-15mm、4-10mm、4-8mm、4-6mm、6-30mm、6-25mm、6-20mm、6-15mm、6-10mm、6-8mm、8-30mm、8-25mm、8-20mm、8-15mm、8-10mm、10-30mm、10-25mm、10-20mm、10-15mm、15-30mm、15-25mm、15-20mm、20-30mm、20-25mm、或25-30mm。

[0029] 在一些实施方式中,所述多孔性整体材料可以使用具有核酸亲和性的一种或者多种材料进行改性。

[0030] 在一些实施方式中,所述过滤器由整块多孔性玻璃、多孔性玻璃陶瓷或者多孔性整体聚合物制得。在一些实施方式中,所述多孔性整体材料使用在美国专利No. 4,810,674和4,765,818(在此通过参引反式将它们引入本文)中描述的溶胶-凝胶法制得。多孔性玻璃陶瓷可以通过整块多孔性玻璃的控制结晶来制得。在一些优选的实施方式中,多孔性玻璃整块、多孔性玻璃陶瓷、或者多孔性整体聚合物没有涂覆有或者嵌合有任何额外的材料例如多核苷酸或抗体以改善其对核酸的亲合性。

[0031] 多孔性整体材料是近十年期间发展起来的新型材料。与由非常小的珠子组成的聚合物不同,整体是使用简单模制工艺制得的单个连续聚合物部件。

[0032] 在一些实施方式中,所述过滤器由精细多孔性玻璃熔块制得,液体样品可以经所述多孔性玻璃熔块通过。所述多孔性玻璃熔块没有为改善其对核酸的亲合性而涂覆或者嵌合有任何额外的材料例如多核苷酸或抗体。适用于纯化核酸的基体包括由烧结玻璃制得的多孔性玻璃熔块,它们通过在加热过程中粉碎珠子来形成,从而形成单个整体结构。所述熔块的均一结构提供了在所述熔块内部的可预见的液体流并且允许洗脱液具有与样品流类似的流体动力学。所述可预见的流体流提供了洗脱工艺过程中的高回收率。

[0033] 在一些实施方式中,所述过滤器被放置在移液器吸头中。所述过滤器还可以配合到柱子、注射器或者具有不同体积和形状的其他壳体中。本文描述的所述方法可以使用各种不同的装置来进行,包括手动或者自动的移液器、注射器泵、手持注射器或者用于移动液体穿过所述过滤器的其他类型自动或者手动方法来进行。

[0034] 在一些实施方式中,所述过滤器被设计成将核酸与样品中的外来物质基本分开。本文使用的术语“外来物质”是指样品中不同于核酸的所有材料。这些外来物质的示例包括但不限于蛋白、淀粉、脂质、金属离子和较大的细胞结构例如膜碎片和其他细胞物质。本文使用的表述“基本分开”是指这样的分开,在一些实施方式中,提供相对于所述外来物质为至少30%的纯度的核酸,在更具体的一些实施方式中,提供了相对于所述外来物质为至少50%或60%的纯度的核酸,在更具体的一些实施方式中,提供了相对于所述外来物质为至少70%或80%的纯度的核酸,在更加具体的一些实施方式中,提供了相对于所述外来物质为至少90%或95%的纯度的核酸,在更加具体的一些实施方式中,提供了相对于所述外来物质为至少97%或99%的纯度的核酸。如本文使用的,相对于所述外来物质为至少30%的纯度的核酸是指这样的核酸制备物,其中所述核酸与外来物质的重量比为30:70或者更高。

类似的,相对于所述外来物质为至少99%的纯度的核酸是指这样的核酸制备物,其中所述核酸与外来物质的重量比为99:1或者更高。

[0035] 现在参照图1A,移液器吸头装置100的一个实施方式包括壳体10和整体多孔性过滤器20,所述多孔性过滤器20能够从含有核酸的液体中基本移除所述核酸。在一些实施方式中,所述过滤器20是具有均一孔隙度的玻璃熔块或者烧结玻璃熔块。在其他一些实施方式中,所述过滤器20是具有孔隙度不同的两个区段的玻璃熔块或者烧结玻璃熔块。其中,具有较大孔隙尺寸的区段被放置成比具有较小孔隙尺寸的区段更加靠近移液器入口。在所有这些实施方式中,所述玻璃熔块没有为改善其对核酸的亲水性而涂覆或者嵌合有任何额外的材料如多核苷酸或者抗体。

[0036] 所述移液器吸头100包括用于使来自样品来源的核酸物质流动从中通过的移液器吸头入口或者开口16。所述壳体10由位于适合于收容移液装置的远端开口14和所述入口16之间的空腔室12所限定。所述壳体10的形状和尺寸不受特别限制。优选的壳体构造是大体圆筒形,使得操作过程中的流动向量(flow vector)大致笔直,由此使非圆筒形构造可能发生的稀释洗涤(dilutional washing)最小化或者得以避免。在一些实施方式中,所述壳体10具有如下体积:约0.1 μ l至约50ml、约10 μ l至约50ml、约100 μ l至约50ml、约1ml至约50ml、约2ml至约50ml、约5ml至约50ml、约10ml至约50ml、约20ml至约50ml、约0.1 μ l至约20ml、约10 μ l至约20ml、约100 μ l至约20ml、约1ml至约20ml、约2ml至约20ml、约5ml至约20ml、约10ml至约20ml、约0.1 μ l至约10ml、约10 μ l至约10ml、约100 μ l至约10ml、约1ml至约10ml、约2ml至约10ml、约0.1 μ l至约5ml、约10 μ l至约5ml、约100 μ l至约5ml、约1ml至约5ml、约0.1 μ l至约2ml、约10 μ l至约2ml、约100 μ l至约2ml、约1ml至约2ml、约0.1 μ l至约1ml、约10 μ l至约1ml、约100 μ l至约1ml、约0.1 μ l至约100 μ l或者约10 μ l至约100 μ l。在其他一些实施方式中,所述壳体10具有如下体积:约0.1ml、约0.2ml、约0.5ml、约1ml、约2ml、约5ml、约10ml、约20ml、约30ml、约40ml或者50ml。本文使用的壳体10的体积也指“吸头体积”。

[0037] 适合用于壳体10的材料不受特别限制,并且包括塑料(例如聚乙烯、聚丙烯和聚苯乙烯)、玻璃和不锈钢。

[0038] 样品过滤器20可以被放置在壳体10内的任何位置。在一些实施方式中,所述样品过滤器20紧密靠近入口16放置,使得样品在经入口16吸入到所述壳体10中之后马上被过滤。在一个实施方式中,所述样品过滤器20邻近入口16。在另一个实施方式中,所述样品过滤器20与入口16分开0-60mm、0-40mm、0-30mm、0-20mm、0-10mm、5-60mm、5-40mm、5-30mm、5-20mm、5-10mm、10-60mm、10-40mm、10-30mm、10-20mm、20-60mm、20-40mm、20-30mm、30-60mm或40-60mm的距离。在其他一些实施方式中,所述样品过滤器20与入口16分开60-120mm、60-100mm、60-80mm、80-120mm、80-100mm或100-120mm的距离。在还有其他一些的实施方式中,所述样品过滤器20与入口16分开60-80mm,例如约75mm的距离。所述样品过滤器20可以具有适合于分离感兴趣的核酸的孔隙度。在一些实施方式中,所述样品过滤器20具有4-5.5微米、4-16微米、16-40微米、40-100微米、100-160微米、或2-220微米的平均孔隙尺寸。

[0039] 在一些实施方式中,过滤器20包括两个或者更多个子过滤器。图1B显示了具有过滤器20的移液器吸头100的一个实施方式,所述过滤器20具有子过滤器22和24。在一些实施方式中,子过滤器22和24具有不同的孔隙度并且串联放置且两个子过滤器之间具有空间。在其他一些实施方式中,子过滤器22和24彼此相邻地放置且在子过滤器之间没有任何空间

(图1B)。在其他另外一些实施方式中,子过滤器22和24彼此融合以形成具有孔隙度不同的两个区段(22和24)的整体结构20。典型的是,具有较大孔隙尺寸的过滤器或过滤器区段被布置为更靠近移液器吸头入口16。据信将具有较大孔隙尺寸的过滤器布置成更加靠近移液器吸头有助于提供预过滤器以避免较小孔隙被样品材料所堵塞。

[0040] 在一些实施方式中,子过滤器22具有约80至200微米优选为100至160微米的孔隙尺寸,并且子过滤器24具有约8至80微米优选为16至40微米的孔隙尺寸。在一些实施方式中,子过滤器22具有约8至80微米优选为16至40微米的孔隙尺寸,并且子过滤器24具有约2至16微米、4至10微米或者4.5.5微米的孔隙尺寸。

[0041] 在一个实施方式中,过滤器20具有约1mm至约20mm的厚度。在另一个实施方式中,过滤器20具有约2mm至约10mm的厚度。在又一些实施方式中,过滤器20具有约2mm至约6mm的厚度。在又一些实施方式中,所述过滤器20具有约4mm的厚度。

[0042] 在一些实施方式中,移液器吸头100进一步容纳有预过滤器30,该预过滤器30放置在第二开口16和样品过滤器20之间(图1C)。预过滤器30具有比样品过滤器20的孔隙尺寸大的孔隙尺寸,并且不会特异性地结合核酸。在又一个实施方式中,移液器吸头100容纳有靠近第一开口14的气溶胶过滤器40,以防止受到泵送装置的污染(图1D)。

[0043] 样品制备、结合、洗涤和洗脱条件

[0044] 样品制备步骤一般包括裂解步骤以将感兴趣的核酸从原宿主例如细胞、细菌或病毒中释放。细胞或病毒结构的裂解可以通过化学方式(例如NaOH或硫氰酸胍)、机械方式(例如玻璃珠或超声处理)或者物理方式(例如冻融循环)来实现。对于组织样品,可以在裂解步骤之前使用酶消化步骤。经裂解的样品然后被加载到本申请的用于分离核酸的整体过滤器上。图2A至2D显示了使用本申请的移液器吸头100纯化核酸的典型方法。首先,使样品材料经过过滤器20朝向移液仪器通过(或流过),过滤该内容物使得样品中的核酸保留在过滤器20上。优选的是,样品材料往后朝向入口16通过过滤器20,然后往后和往前经过过滤器20通过多次(例如2-5次、2-10次、2-25次、2-20次、5-10次、5-15次、5-20次、10-15次、10-20次、或15-20次),以改善结合效率。在一些情况中,使样品材料往后和往前经过过滤器20通过至少2次、5次、至少10次、至少15次或者至少20次或者更多次。通常,流体在第一方向上横跨过滤器流动,然后在与第一方向相反的方向上横跨相应的过滤器流动,得到经过过滤器通过至少两次的流动通过组分(图2A)。

[0045] 可以使用适当的结合缓冲液使核酸结合至过滤器。取决于用于结合的靶标(例如HMW DNA、LMW DNA或者两者),可以通过调节一种或者多种离液序列高的试剂和/或其离液序列高的盐的浓度来实现适当的结合条件。例示性的离液序列高的试剂包括但不限于离液序列高的盐,例如尿素、硫脲、十二烷基硫酸钠(SDS)、异硫氰酸胍、盐酸胍、氯化钠、氯化镁、碘化钠、碘化钾和高氯酸钠;脂肪醇,如丁醇、乙醇、丙醇和异丙醇;酚和其他酚类化合物;精氨酸;和氯化镁。例示性的离液序列高的盐包括硫氰酸胍盐、盐酸胍盐、碘化钠、高氯酸钠、高氯酸锂、尿素和硫脲。

[0046] 在一些实施方式中,使用结合缓冲液来促进HMW和LMW DNA两者与第一步骤中所选择的过滤器的结合,其中,脂肪醇如异丙醇以约17%至约25%,优选以约20%至约24%(理想地为22.5%)提供,并且离液序列高的盐如异硫氰酸胍和/或盐酸胍以约0.5M至约4.0M,优选为约1.0M至约2.5M(理想地为1.8M)提供。为了促进HMW DNA与所选择的过滤器的选择

性结合,脂肪醇如异丙醇可以以约0%至约10%,优选为约4%至约6%(理想地为4.7%)提供,并且离液序列高的盐如异硫氰酸胍和/或盐酸胍以约1.0M至约4.0M,优选为约3.0M至约4M提供。为了促进回收的LMWDNA与所选择的过滤器的结合(和浓缩),脂肪醇如异丙醇可以以约10%至约25%,优选为约15%至约20%(理想地为17.7%)提供,并且离液序列高的盐如异硫氰酸胍和/或盐酸胍以约1.0M至约5.0M,优选为约2.0M至约4M(理想地为3.3M)提供。

[0047] 在下一个步骤(图2B)中,使用洗涤缓冲液洗涤过滤器20以移除没有特异性地结合至过滤器的材料。与步骤1中的情况类似,使洗涤缓冲液往后和往前经过过滤器20通过至少1次、5次、至少10次、至少15次或者至少20次或者更多。在一些实施方式中,在下一个步骤之前使用单种洗涤缓冲液洗涤过滤器20。在其他一些实施方式中,在下一个步骤之前使用两种或者更多种洗涤缓冲液洗涤过滤器20。这个步骤是可选的步骤,其在一些实施方式中可能是不需要的。

[0048] 洗涤步骤移除核酸提取物或组分中存在的外来的未结合的材料。洗涤缓冲液的示例包括但不限于:含有胍、乙酸钠和乙醇的缓冲液、含有Tris和乙醇的缓冲液、丙酮、乙醇、丙酮和乙醇的混合物、以及容易蒸发以使过滤器干燥的其他溶剂。

[0049] 在下一个步骤(图2C)中,通过使空气经过过滤器通过10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或者更多次而使过滤器20干燥。该步骤从过滤器20移除过量的液体并且允许以较小体积洗脱结合的核酸。该步骤还将来自结合和/或洗涤步骤的残留溶剂移除,因为所述残留溶剂可能会对随后的反应如PCR产生负面的影响。该步骤是一个可选的步骤,其在一些实施方式中可能是不需要的。

[0050] 在下一个步骤(图2D)中,利用洗脱缓冲液将结合至过滤器20的核酸从该过滤器洗脱。洗脱缓冲液可以经过过滤器20往后和往前通过至少2次、5次、至少10次、至少15次或者至少20次或者更多次。

[0051] 可以使用适当的洗脱缓冲液从过滤器将核酸洗脱。适当的洗脱条件可以通过添加洗脱缓冲液来实现。洗脱缓冲液的示例包括但不限于1mM NaOH、10mM TrisHCl或者任意低盐缓冲液或水,优选的是pH为大于6.5。

[0052] 在一些实施方式中,本文描述的方法允许1)从大体积的样品分离一系列的DNA片段长度;和2)选择性地分离处在某些尺寸范围的DNA片段。

[0053] 通过将整体结合基质嵌合到移液器吸头中,从困难的样品类型纯化核酸所需要的提取方法和仪器得到大大的简化。将结合基质的几何形状和孔隙度定制成使流体阻抗或者堵塞最小化,同时为总体积为0.1ml至50ml的移液器吸头内的核酸结合提供大的表面积。因此,基质是微流体友好的,因为可以使用低压来驱使样品经其通过。样品抽吸和分配过程中的双向流动允许样品提取物和结合基质之间停留时间延长以优化核酸回收率和洗脱,并且能够处理相对较大的样品体积而没有堵塞在单个过滤器吸头内。移液器吸头形式对于泵送液体的从可用于样品数量少或来源有限的环境中的手持移液器到能够同时处理很多样品的大的液体处理系统的任何装置都是通用的。

[0054] 低分子量核酸与高分子量核酸的分开

[0055] 在一个方面,本发明提供了一种用于使用特异性地结合LMW核酸和/或HMW核酸的一个或者多个过滤器从同时含有LMW核酸和HMW核酸的样品中浓缩和分开低分子量(LMW)核酸(例如胎儿核酸)和/或高分子量(HMW)核酸(例如母系核酸)的方法。所述方法包括如下步

骤:使样品经结合LMW核酸和HMW核酸两者的第一过滤器通过,从第一过滤器回收结合的核酸,在允许HMW核酸结合至第二过滤器的条件下使所回收的核酸经第二过滤器通过,从而生成流动通过组分,其中,所述流动通过组分含有LMW核酸。在一些实施方式中,所述方法进一步包括如下步骤:将HMW核酸从第二过滤器洗脱,然后在允许LMW核酸结合至第二过滤器的条件下使含有LMW核酸的所述流动通过组分经所述第二过滤器通过,以及从所述第二过滤器洗脱所述LMW核酸。作为替代方式,所述方法可以进一步包括如下步骤:在允许LMW核酸结合至第三过滤器的条件下使含有LMW核酸的所述流动通过组分经所述第三过滤器通过,以及从所述第三过滤器洗脱所述LMW核酸。在一些实施方式中,所述第一过滤器和第二过滤器是同一过滤器。在其他一些实施方式中,所述第一过滤器和/或所述第二过滤器各自包括具有不同孔隙度的两个子过滤器。在一些实施方式中,所述子过滤器彼此间隔开放置。在其他一些实施方式中,子过滤器彼此邻近放置而在所述子过滤器之间没有任何空间。在又一些实施方式中,所述子过滤器被彼此融合以形成带有孔隙度不同的两个区段的单个整体结构。在一些实施方式中,所述第一过滤器和第二过滤器是带有具有不同孔隙度的两个区段的同一过滤器。

[0056] 在一些实施方式中,上文描述的方法(即,基于尺寸排阻或富集的DNA分开)被用于从临床样品分离没有细胞的DNA,所述临床样品通常具有大的体积。这些临床样品的示例包括但不限于来自孕妇的样品(用于将母系DNA与胎儿DNA分开)、来自癌症患者的样品(用于将正常DNA与肿瘤DNA分开)、来自移植患者的样品(用于使宿主DNA与供体DNA分开)。在一些其他的实施方式中,上述方法被用于文库制备程序,然后进行下一步的生成测序或者用于将传染的疾病与肾脏样品分离。

[0057] 在一些实施方式中,所述方法用于分开和分离血浆样品中的胎儿核酸与母系核酸。特别是,所述方法采用带有限定的孔隙尺寸的过滤器来捕获和浓缩HMW核酸(例如母系核酸)和LMW核酸(例如胎儿核酸)两者。此后,捕获(并且排阻)HMW核酸并且保留和浓缩LMW胎儿核酸。

[0058] 在一些优选的实施方式中,将过滤器放置在移液器吸头中,使得可以将样品加载到过滤器上,并经所述移液器吸头吸打样品而将样品从所述过滤器洗脱。移液器吸头形式适合于在各种不同液体操作仪器上实现自动化,以提供高通量处理能力。

[0059] 在一个具体的实施方式中,所述方法包括:(a)在允许胎儿核酸和母系核酸两者结合到第一整体玻璃熔块的条件下,使包含胎儿核酸和母系的血浆样品经包括所述第一整体玻璃熔块的移液器吸头的内部体积流动通过;(b)使第一洗脱缓冲液经所述第一整体玻璃熔块流动通过以洗脱结合的核酸,(c)在有利于所述母系核酸结合至第二整体玻璃熔块的条件下,使被洗脱的核酸经包括所述第二整体玻璃熔块的第二移液器吸头流动通过,并且收集所述被洗脱的核酸的流动通过组分,(d)将结合的母系核酸从所述第二移液器吸头上洗脱,(e)在有利于所述胎儿核酸结合至所述第二整体玻璃熔块的条件下,使所述流动通过组分再次经所述第二吸头流动通过,以及(f)将所述胎儿核酸洗脱到所述第二整体玻璃熔块。

[0060] 所述样品可以是含有不同尺寸的核酸的任意液体样品。所述方法可以被优化成允许将一种尺寸范围(例如50bp至600bp)的核酸与另一个尺寸范围(例如大于600bp)的核酸分开。在一些实施方式中,所述样品是体液样品,例如血液、血浆、尿液、唾液、淋巴液或脊髓

液。在一个具体的实施方式中,所述样品是来自于孕妇的血浆样品。

[0061] 当在从母系血液或者血浆提取胎儿DNA的背景下使用时,术语“LMW核酸”和“HMW核酸”是指在两个不同尺寸组中的核酸。在“LMW核酸”组中的核酸具有比在“HMW核酸”组中的核酸的尺寸小的尺寸。在一些实施方式中,术语“LMW核酸”是指等于或者小于1000bp的核酸,而术语“HMW核酸”是指大于1000bp的核酸。在其他一些实施方式中,术语“LMW核酸”是指等于或者小于800bp的核酸,而术语“HMW核酸”是指大于800bp的核酸。在其他一些实施方式中,术语“LMW核酸”是指等于或者小于600bp的核酸,而术语“HMW核酸”是指大于600bp的核酸。

[0062] 在一些例示性的实施方式中,所述方法被用来分离血浆样品中的胎儿DNA(通常小于600bp)与母系核酸DNA(通常大于600bp)。该方法的第一步利用容纳第一玻璃熔块的1ml至50ml的第一移液器吸头,所述第一玻璃熔块具有允许较浓的血浆样品经基质流动通过而没有堵塞的孔隙度和允许较小片段的最优结合的厚度。在一些实施方式中,第一移液器吸头具有约20ml、约10ml、约5ml、约2ml、约1ml、约0.5ml或约0.1ml的吸头体积。适当的血浆样品体积为约1ml至约20ml。在一些情况中,样品可以分布在多个移液器吸头(例如2至4个)以增加所处理的样品的体积。吸头可以供马达驱动的移液器过滤器使用,本文描述的方法可以使用各种装置包括注射器泵、手持注射器或者用于将液体横跨玻璃熔块或者其他类型过滤器移动的其他类型的自动或手段方法来实施。还可以采用用于具有不同体积和设计的过滤器的柱子、注射器或其他壳体,只要尺寸适合于足够大的过滤器。在一些实施方式中,第一玻璃熔块过滤器具有16微米至40微米的孔隙尺寸。在其他一些实施方式中,第一玻璃熔块过滤器是融合过滤器,该融合过滤器具有孔径尺寸为100微米至160微米的第一区段和孔隙尺寸为16微米至40微米的第二区段。在又一个实施方式中,第一玻璃熔块过滤器是融合过滤器,该融合过滤器具有孔径尺寸为16微米至40微米的第一区段和孔隙尺寸为4微米至5.5微米或者4微米至10微米的第二区段。第一玻璃熔块过滤器可以具有2mm至6mm优选为4mm的厚度和5mm至10mm优选为7mm至8mm的直径。在一个实施方式中,吸头使用接头附接至马达驱动的移液器过滤器。这种设置可以使用上述结合、洗涤、干燥和洗脱步骤而被用来从10ml至20ml血浆中提取胎儿核酸。

[0063] 用于第一玻璃熔块过滤器的结合条件可以针对胎儿DNA和母系DNA两者与过滤器的结合进行优化。在一些实施方式中,结合混合物包括血浆;用于将存在于血浆中的细胞材料和其他蛋白消化、增溶和变性的试剂,包括诸如蛋白酶K等酶、诸如Triton、SDS和Tween等去污剂、以及诸如胍等变性剂;和/或促进具有所需尺寸范围的DNA与过滤器的结合的试剂,如胍、异丙醇和醋酸钠。在一些实施方式中,结合混合物包含终浓度为17体积%至25体积%优选为约22.5体积%的异丙醇或乙醇、以及终浓度为0.5M至4M优选为1.8M的异硫氰酸胍和/或盐酸胍。这种结合混合物允许结合混合物中的胎儿DNA和母系DNA两者结合至第一玻璃熔块过滤器。在使结合混合物在两个方向(即,在一个方向上通过过滤器以进入移液器吸头以及在另一个方向上通过所述过滤器以从移液器吸头出来)经第一玻璃熔块过滤器通过一轮或者多轮以使胎儿DNA和母系DNA结合至过滤器之后,使用洗脱缓冲液将所结合的DNA从第一过滤器洗脱。在一些实施方式中,使用洗涤缓冲液洗涤第一过滤器一次或者多次。洗脱被结合的DNA,其含有胎儿DNA和母系DNA。在一些实施方式中,以如下体积洗脱被结合的DNA:0.01ml至5ml、0.01ml至2.5ml、0.01ml至1ml、0.01ml至0.5ml、0.01ml至0.25ml、0.01ml

至0.1ml、0.01ml至0.05ml、0.05ml至5ml、0.05ml至2.5ml、0.05ml至1ml、0.05ml至0.5ml、0.05ml至0.25ml、0.1ml至5ml、0.1ml至2.5ml、0.1ml至1ml、0.1ml至0.5ml、0.1ml至0.25ml、0.25ml至5ml、0.25ml至2.5ml、0.25ml至1ml、0.25ml至0.5ml、0.5ml至5ml、0.5ml至2.5ml、0.5ml至1ml、1ml至5ml、1ml至2.5ml或2ml至5ml。在一些实施方式中,在约0.05ml至约1ml或者约0.25ml至约0.5ml的体积中洗脱被结合的DNA以浓缩胎儿DNA和母系DNA。在不需要富集DNA亚群的应用中,这个步骤是DNA提取方法的最后步骤,并且DNA通常以50 μ l至100 μ l的体积洗脱。

[0064] 所述方法的第二步骤包括从洗脱自第一过滤器的DNA样品移除母系DNA。在一些实施方式中,这个步骤使用0.2ml至2ml优选为1ml的包含第二玻璃熔块过滤器的移液器吸头来完成。在一些实施方式中,第二玻璃熔块过滤器具有16微米至40微米的孔隙尺寸。在其他一些实施方式中,第二玻璃熔块过滤器具有4微米至10微米的孔隙尺寸。在其他一些实施方式中,第二玻璃熔块过滤器是融合过滤器,具有孔隙尺寸为100微米至160微米的第一区段和孔隙尺寸为16微米至40微米的第二区段。在另外一些实施方式中,第二玻璃熔块过滤器是融合过滤器,具有孔隙尺寸为16微米至40微米的第一区段和孔隙尺寸为4微米至10微米的第二区段。第二玻璃过滤器可以具有2mm至6mm优选为4mm的厚度和约2mm至6mm优选为约4mm的直径。

[0065] 针对母系DNA与第二玻璃熔块过滤的结合但不针对胎儿DNA与第二玻璃熔块过滤的结合优化这个步骤中的结合混合物。在一些实施方式中,所述结合混合物含有终浓度为0体积%至10体积%优选为约4.7体积%的异丙醇或乙醇、以及终浓度为约1.0M至4.0M优选为3.4M的异硫氰酸胍和/或盐酸胍。在使结合混合物在两个方向(即,在一个方向上通过过滤器以进入移液器吸头以及在另一个方向上通过所述过滤器以从移液器吸头出来)经第二玻璃熔块过滤器通过一轮或者多轮以使母系DNA结合至该过滤器之后,收集该结合混合物用于下一步骤。所收集的结合混合物此时称为来自所述第二过滤器的流动通过组分,其含有胎儿DNA并且母系DNA被耗尽。

[0066] 所述方法的第三步骤包括将胎儿DNA从来自所述第二过滤器的所述流动通过组分分离。在一些实施方式中,这个步骤使用与在所述第二步骤中使用的相同移液器吸头来完成。在这些实施方式中,来自第二步骤的所述移液器吸头首先使用洗脱缓冲液洗涤以移除在第二步骤中结合至所述第二过滤器的母系DNA。然后使用经洗涤的没有母系DNA的第二过滤器在有利于胎儿DNA与所述第二过滤器结合的条件下分离胎儿DNA。然后使用体积为0.01ml至0.1ml的洗脱缓冲液将所结合的胎儿DNA从所述第二过滤器洗脱。在其他一些实施方式中,在第三步骤中使用具有0.2ml至2ml优选具有1ml的第三移液器吸头,该第三移液器吸头装有第三玻璃熔块过滤器。在一些实施方式中,所述第三玻璃熔块过滤器具有16微米至40微米的孔隙尺寸。在其他一些实施方式中,所述第三玻璃熔块过滤器具有4微米至5.5微米或者4微米至10微米的孔隙尺寸。在其他一些实施方式中,所述第三玻璃熔块过滤器是融合过滤器,具有孔隙尺寸为100微米至160微米的第一区段和孔隙尺寸为16微米至40微米的第二区段。在其他一些实施方式中,所述第三玻璃熔块过滤器是融合过滤器,具有孔隙尺寸为16微米至40微米的第一区段和孔隙尺寸为4微米至5.5微米或者4微米至10微米的第二区段。所述第三玻璃过滤器可以具有2mm至6mm优选为4mm的厚度和约2mm至6mm优选为约4mm的直径。

[0067] 在一些实施方式中,胎儿DNA纯化中的上述步骤使用单个过滤器(即,单个吸头)来进行。通过结合缓冲液的组成(例如结合缓冲液1允许胎儿DNA和母系DNA两者与过滤器结合,结合缓冲液2仅允许母系DNA与所述过滤器结合,并且结合缓冲液3仅允许胎儿DNA与所述过滤器结合)来控制胎儿DNA和/或母系DNA的结合。在一些实施方式中,所述单个过滤器是带有孔隙度不同的两个区段的过滤器。

[0068] 试剂盒

[0069] 本申请的另一个方面提供了一种用于将血浆样品中的胎儿核酸与母系核酸分开和分离的试剂盒。所述试剂盒可以包括上述元素的任意组合。在一个实施方式中,所述试剂盒包括:一个或者多个移液器吸头,所述移液器吸头具有截头圆锥形并且尺寸被设计成配合在吸移仪器的末端上。所述一个或者多个移液器吸头包括包括过滤器的吸头,所述吸头包括刚性的自支持的基本为整体的烧结玻璃结构,所述烧结玻璃结构具有约16微米至约40微米的孔隙尺寸。在一些实施方式中,所述试剂盒进一步包括被配制成提供用于使母系核酸结合至过滤器的条件的至少一种结合缓冲液,其中所述条件包括大于0%至小于约10%的醇和约1.0M至约4.0M的胍;和被配制成提供用于使胎儿核酸结合至过滤器的条件的至少一种结合缓冲液,其中,所述条件包括约10%至25%的醇和约1.0M至约5.0M的胍。在一些实施方式中,所述试剂盒进一步包括被适当地配制成将DNA从所述烧结玻璃结构洗脱的至少一种洗脱缓冲液和被适当地配制成移除没有结合至所述烧结玻璃结构的外部物质的至少一种洗涤缓冲液。在一些实施方式中,所述一个或者多个移液器吸头包括具有放置在其中的两个或者更多个过滤器的吸头。在一个实施方式中,所述一个或者多个移液器吸头包括具有玻璃整体过滤器的吸头,所述玻璃整体过滤器带有孔隙度不同的两个区段。在其他一些实施方式中,所述一个或者多个移液器吸头包括具有孔隙度不同的两个过滤器的吸头,其中一个过滤器的末端被融合至另一个过滤器的末端。

[0070] 自动化过滤器吸头系统

[0071] 可以采用执行根据本申请的所述方法的任何模式。然而,所述过滤器吸头的属性、适应性、简化性和工作流程允许其容易地适用、自动化并且有效地用于大量的临床样品基质、输入样品体积和液体操作系统。因此,在一个优选的实施方式中,操作模式包括一些类型的自动化。

[0072] 在一些实施方式中,本申请提供了一种用于使用本申请的过滤器从液体样品纯化核酸的自动化方法。所述方法包括:(a)提供能够自动地分配试剂、取出样品内容物并移动移液器吸头和/或样品管的自动化机器人平台;(b)向机器人平台加载多个本申请的移液器吸头,每个吸头包括限定位于第一开口和第二开口之间的通路的壳体和占据所述通路的一部分的过滤器,所述过滤器包括特异性地结合核酸的整体过滤器材料;(c)使包含核酸的液体样品的至少一部分流动进入移液器吸头,其中所述部分的液体样品经由所述第一开口抽取进入到所述壳体中,使得所述部分中的核酸通过并且结合至所述过滤器材料;(d)将所述部分的液体样品经由所述第一开口从所述移液器吸头排出,其中所述部分的液体样品在离开所述移液器吸头的同时第二次经所述过滤器通过;(e)通过使洗脱缓冲液经所述第一开口流入经过所述移液器吸头并将所述洗脱缓冲液经所述第一开口从所述移液器吸头排出来将核酸从所述过滤器洗脱,其中,所述洗脱缓冲液在进入和离开所述移液器吸头的同时经所述过滤器通过;和(f)在所述多个移液器吸头中的每一个中重复步骤(c)至(e)。

[0073] 在另一个实施方式中,包括洗涤步骤,其中,通过如下方式洗涤所述过滤器:使洗涤缓冲液经由所述第一开口流入通过所述移液器吸头,经由所述第一开口从所述移液器吸头排出所述洗涤缓冲液,使得所述洗涤缓冲液在进入和离开所述移液器吸头的同时通过所述过滤器。优选的是,在所述多个移液器吸头中的每一个中重复所述洗涤步骤多次。

[0074] 在另一个实施方式中,包括干燥步骤,其中,通过使空气通过所述过滤器多次而对所述过滤器进行干燥。在一些实施方式中,通过使空气通过所述过滤器10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或者更多次而对所述过滤器进行干燥。

[0075] 在一些实施方式中,所述过滤器材料包括烧结玻璃熔块,所述烧结玻璃熔块具有约2微米至约220微米的孔隙尺寸和/或约2mm至6mm的厚度。在某些实施方式中,所述移液器吸头包括孔隙度不同的两个或者更多个过滤器,其中,所述两个或者更多个过滤器中的每一个特异性地结合核酸。

[0076] 在某些实施方式中,所述液体样品是包含母系核酸和胎儿核酸的血浆样品,并且使从所述第一过滤器中释放的包含母系核酸和胎儿核酸的洗脱核酸的一部分经第二移液器吸头流动通过,所述第二移液器吸头包括所述第二过滤器,所述第二过滤器包括第二过滤器材料,其中,使洗脱核酸向上和向下经所述第二移液器吸头的第一开口流动通过,使得母系核酸经所述移液器吸头流动通过并且结合至所述第二过滤器材料,并且所述胎儿核酸经所述第二移液器吸头的所述第二过滤器材料和所述第一开口流动通过而从中将它们回收。

[0077] 所述系统、装置和方法可以通过可编程逻辑进行全自动化或半自动化。在一个操作模式中,所述方法在多孔板(例如24孔、96孔等)中进行。优选的是,通过使用自动化液体操作来混合混合物,因为这将减少制备待研究的混合物所需要进行的工作量。还可以通过机器人使用本领域已知的装配和方法进行自动化采样程序。

[0078] 可以使用任何适当的机器或者装备来将样品移动通过所述自动化纯化系统机器及其各种处理步骤。例如,本文采用的系统可以使用各种本领域已知的机器人来自动地移动样品、试剂和其他系统组分。例示性的机器人系统具有在一个、两个或者三个轴线上移动样品的能力和/或者使样品围绕一个、两个或者三个轴线旋转的能力。例示性的机器人在可能位于工件的上方、下方或者侧方的轨道上移动。通常,机器人部件包括功能部件,例如能够抓持和/或移动工件、插入移液器、分配试剂、抽吸物等的机器人臂。本文使用的“机器人臂”是指以物理方式将样品、管或者含有样品的板从一个位置转移到另一个位置的装置,该装置优选受微处理器控制。每个位置都可以是所述自动化纯化系统中的一个单元。用于控制机器人臂的软件通常可以从机器人臂制造商获得。

[0079] 机器人可以在例如工作区域的顶部、底部或者侧部上的轨道上平移,和/或可以包括铰接部,该铰接部允许机器人臂到达所述工作区域的不同位置。机器人可以由本领域已知的马达驱动,所述马达可以是例如通过电动方式、气动方式或者液压方式供能。可以使用任何适当的驱动控制系统来控制机器人,例如本领域已知的标准PLC编程或者其他方法。可选的是,所述机器人包括位置反馈系统,所述位置反馈系统通过光学方式或者机械方式测量位置和/或力,并且允许所述机器人被引导至需要的位置。可选的是,机器人还包括允许重复获得特定位置的位置保证机构,例如机械式止逆件,光学标记或者激光引导件。

[0080] 例示性的自动化采样程序可以利用例如艾本德epMotion 5070、epMotion 5075、

汉密尔顿STARlet、STAR和STARplus液体处理机器人。这些程序可以适用于从全血进行的RNA分离、基因组DNA分离和从母系血浆进行的胎儿DNA提取和富集，如下文进一步描述的那样。

[0081] 然而，应当认识到的那样，每个临床样品都是唯一的，并且这一个样品到下一个样品在粘度、颗粒、粘液、表面污染物、微生物和/或人类基因组背景上是有变化的。由于考虑到所预期的临床样品组成和自动化过滤器吸头样品直奔程序的目标用途上的变化，因此改变过滤器吸头程序中的某些步骤以实现所需要的结果可能是有必要的。例如，来自本文描述的过滤器吸头的核酸纯度和/或回收率可能受到很多参数的影响，所述参数例如为(1)与裂解缓冲液(以及醇)的样品混合和均质化；(2)流速；(3)样本数量；(4)洗涤的数量和类型和(5)干燥。

[0082] 例如，关于(1)，虽然本文描述的过滤器吸头具有相对较大的孔隙尺寸，但是对于有效的细胞裂解以及随后的与过滤器吸头基质的结合步骤而言，样品均质化和液化是非常重要的。使用均质的并且液化良好的裂解物，还可以以较高的流速使样品通过过滤器吸头，这降低了总的样品处理时间。如下文结合大体积血浆程序所展示的那样，使用为使用者提供彻底均质化和液化困难样品的机会(在线或者离线)的过滤器吸头可以有效地处理大的输入样品体积，在输入样品体积上仅存在次要问题。

[0083] 另外，应当理解的是，在核酸结合或者洗脱的过程中较慢的流速通常导致较高的核酸收率，虽然以牺牲总处理时间为代价。较慢的流速还使DNA剪切的程度最小化。

[0084] 最优的抽吸和分配循环的数量取决于样品的类型、总样品体积和流速。图2A中的步骤1通常是循环数量(和流速)可能需要一些经验优化的点，诸如鼻咽抽吸物等样品是对于优化更具有挑战性的裂解物之一，这是因为来自不同患者的NPA粘度范围的缘故。

[0085] 建议对过滤器吸头基质进行完全干燥以防止残留的有机溶剂与所纯化的核酸样品共洗脱并抑制下游的处理或测试。由于通过离心或者真空过滤没有使过滤吸头干燥，因此使干燥步骤过程中的流速和循环数量两者最大化是也重要的。有时候在干燥循环完成之后在所述过滤器吸头的终端上有残留的洗涤溶液液滴。汉密尔顿机器人具有在孔的侧部上进行“吸头触摸”以释放所述液滴的能力，由此确保无溶剂洗脱。epMotion系统不具有这个特征，但是在洗脱缓冲液中进行的过滤器吸头终端的预冲洗能够程序化以实现相同的效果。

[0086] 由于对于每个仪器制造商而言，几何形状、移液器吸头材料和附接方法到机器人通道臂是唯一的，因此每个液体处理系统需要不同的过滤器吸头。过滤器吸头基质尺寸(直径、厚度和孔径尺寸)确实与核酸结合性能(和洗脱效率)有关，如任意固相提取技术所预期的那样。虽然可以将厚的(大于4mm)的基质嵌合到1ml过滤器吸头中来增加大体积样品的核酸结合能力和/或使横跨具体的过滤器吸头形式的基质结合能力一致，但是存在过滤器吸头厚度和最初结合步骤(在存在粗制裂解物的情况下)过程中的流速之间的折衷。因此，对于自动化程序的最初步骤，将较大直径的基质嵌合到较大体积的移液器吸头有时候是有利的(例如用于大体积提取的5ml汉密尔顿/爱康尼TruTips[®])。然而，考虑到液体处理机器人的制造商所规定的具体的过滤器吸头构造，期望来自不同的制造商的液体处理平台或者不同的过滤器吸头尺寸都具有相同的过滤器吸头核酸收率是不合理的。自动化过滤器吸头程序的临床评价和与可商购获得的自动化系统的直接比较将在别处进行详细报告。

[0087] (根据限定的)临床样品将含有显著量的人类基因组DNA,除非它们采集自天然就没有的部位(例如脑脊液)。有时候希望有人类基因组DNA,但是在其他应用中,人类DNA是不合乎需要的基因组背景。其他时候如果所希望的目标核酸以痕量存在的话其可能用作载体。背景DNA的存在一般不是问题,只要样品中的核酸总量没有超过基质的结合能力。

[0088] 在下文所述的高体积的血浆提取程序的情况(图9)中,目的是在存在10至20倍过量的母系DNA的情况下分离(片段化的)胎儿DNA,这类似于传染性疾病预防测试的样品制备目的,不同之处在于序列是高度一致的,并且只能通过高度特异性分子测试和/或尺寸辨别来区分。在一些实施方式中,使用5ml过滤器吸头分离总循环DNA,并且通过改变结合缓冲液条件而随后结合和洗脱至1ml过滤器吸头来使随后的高分子量和低分子量的胎儿DNA分开。目标核酸基于它们与二氧化硅整体的结合和洗脱性能的选择性尺寸分开和富集是显著不同于通过膜或尺寸排阻旋转柱实现的作用模式。微生物DNA与人类基因组DNA的尺寸分开和富集可以类似地通过定制过滤器吸头结合和洗脱缓冲液来实现。

[0089] 在验证自动化过滤吸头程序之后,向方法中引入误差的方式相对较少。尽管如此,可能设置带有不正确的过滤器吸头或者将试剂放置在不正确的试剂槽中的液体处理机器人。在一些实施方式中,提供预填充的箔密封的试剂板来避免这些错误。该预填充板可以显著地简化自动程序的复杂度,降低移液器吸头和耗材的数量,并且使进行提取所需要的面板空间最小化。此后,提取结果通常指示初始样品的质量,其中差的回收率常常与(在运输或者储藏的过程中的)样品降解有关,而不是与提取方法中的误差有关。

[0090] 本文进一步展示的自动化程序强调过滤器吸头基质本身用于处理不同临床样品的用途以及其如何能够适用于大体积和特定的液体处理机器人。本申请的过滤器吸头系统的简单性还为有兴趣购买新的自动化核酸纯化系统的那些人提供了一些成本益处,因为使过滤器吸头程序自动化所需要的主要硬件是移液器通道臂本身而不是磁杆、真空系统或者板上离心机(on-board centrifuge)。使用过滤器吸头程序使面板空间最小化还能够让高级用户将上游或下游自动化方法与本发明的过滤器吸头系统一体化。例如,能够将用于将全血分级的汉密尔顿的easyBlood解决方案与自动化过滤器吸头提取方法整合,这将显著地简化生物建库过程。诸如核酸定量和归一化、PCR设置和DNA测序等后提取过程也容易地与使用较大的液体处理平台的过滤器吸头一体化。

[0091] 本发明的一个方面涉及一种用于从液体样品纯化核酸的自动化方法,所述方法包括:(a)向机器人平台加载多个移液器吸头,每个吸头包括限定位于第一开口和第二开口之间的通路的壳体和占据所述通路的一部分的过滤器,其中,所述过滤器特异性地结合核酸,并且其中所述自动化机器人平台能够自动地分配试剂、取出样品内容物并且移动移液器吸头和/或样品管;(b)使包含核酸的液体样品的至少一部分经移液器吸头的所述第一开口流动进入,使得所述核酸经所述移液器吸头通过并且结合至其中的所述过滤器;(c)经由所述第一开口将所述部分的液体样品从所述移液器吸头排出,其中所述部分的液体样品在离开所述移液器吸头的同时第二次经所述过滤器通过;以及(d)通过使洗脱缓冲液经所述移液器吸头的所述第一开口流动进入并且经由所述第一开口从所述移液器吸头排出所述洗脱缓冲液来将所述核酸从所述过滤器洗脱,其中,所述洗脱缓冲液在进入和离开所述移液器吸头的同时经所述过滤器通过。在一些实施方式中,在所述多个移液器吸头中的每一个中进行步骤(b)至(d)。

[0092] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括通过使洗涤缓冲液经由所述第一开口流入通过所述移液器吸头并且经由所述第一开口从所述移液器吸头排出所述洗涤缓冲液来洗涤所述过滤器的步骤,其中所述洗涤缓冲液在进入和离开所述移液器吸头的同时经所述过滤器通过。在一个相关的实施方式中,所述洗涤步骤被重复两次或者更多次。

[0093] 在一些实施方式中,重复样品流动和排出步骤直到所有的所述液体样品经所述过滤器通过至少一次。

[0094] 在一些实施方式中,所述过滤器包括自支持玻璃熔块。在一些相关的实施方式中,所述玻璃熔块是烧结玻璃熔块,该烧结玻璃熔块还没有使用改善核酸的结合的试剂处理或包被过。在另一些相关的实施方式中,所述玻璃熔块具有约2微米至约220微米的孔隙尺寸,并且具有约2mm至约20mm的厚度。

[0095] 在一些实施方式中,所述液体样品包含含有母系核酸和胎儿核酸的血浆。在一个相关的实施方式中,所述移液器吸头包括具有不同孔隙度的两个或者更多个过滤器,其中所述两个或者更多个过滤器中的每一个过滤器都特异性地结合核酸。

[0096] 本申请的另一个方面涉及一种用于将血浆样品中的胎儿核酸与母系核酸分开和分离的方法,所述方法包括:(a)使包含胎儿核酸和母系核酸的血浆样品在允许所述胎儿核酸和母系核酸特异性地结合至第一过滤器的条件下流动通过所述第一过滤器;(b)将结合的胎儿核酸和母系核酸从所述第一过滤器中洗脱,从而形成包含胎儿核酸和母系核酸的经浓缩的核酸样品;(c)使所述经浓缩的核酸样品在允许所述母系核酸结合至第二过滤器并且所述胎儿核酸流动通过所述第二过滤器的条件下流动通过所述第二过滤器;和(d)收集来自所述第二过滤器的流动通过组分,其中,来自所述第二过滤器的所述流动通过组分含有胎儿核酸。

[0097] 在一些实施方式中,步骤(a)中的允许所述胎儿核酸和母系核酸与所述第一过滤器特异性地结合的所述条件包括形成第一结合混合物,所述第一结合混合物包含血浆样品、范围为约17体积%至25体积%的脂肪醇、和浓度范围为约0.5M至约4.0M的离液序列高的盐。

[0098] 在一些实施方式中,步骤(c)中的用于使所述母系核酸与所述第二玻璃熔块过滤器结合的条件包括形成第二结合混合物,所述第二结合混合物包含经浓缩的核酸样品、范围为约0体积%至10体积%的脂肪醇、和浓度范围为约1M至约4.0M的离液序列高的盐。

[0099] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括如下步骤:(e1)将结合的母系核酸从所述第二过滤器中洗脱以制得再生的第二过滤器;(f1)使来自所述第二过滤器的所述流动通过组分在允许胎儿核酸与所述第二过滤器结合的条件下流动通过所述再生的第二过滤器;和(h1)将所结合的胎儿核酸从步骤(f1)中的所述第二过滤器洗脱。在一个相关的实施方式中,步骤(f1)中的用于使所述胎儿核酸与所述第二过滤器结合的条件包括形成第三结合混合物,所述第三结合混合物包含来自所述第二玻璃熔块过滤器的所述流动通过组分、范围为约10体积%至25体积%的脂肪醇、和浓度范围为约1M至约5.0M的离液序列高的盐。在一些实施方式中,所述方法进一步包括如下步骤:(e2)在允许胎儿核酸与所述第一过滤器结合的条件下使来自所述第二过滤器的所述流动通过组分流动通过所述第一过滤器;和(f2)将结合至步骤(e2)中的所述第一过滤器的胎儿核酸洗脱。

[0100] 在一些实施方式中,所述第一过滤器和第二过滤器是自支持玻璃熔块。在一个相

关的实施方式中,所述玻璃熔块是烧结玻璃熔块。在另一个相关的实施方式中,所述第一玻璃熔块过滤器具有16微米至40微米的孔隙尺寸,并且所述第二玻璃熔块过滤器具有4微米至10微米的孔隙尺寸。

[0101] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括如下步骤:(e3)在允许所述胎儿核酸与第三过滤器结合的条件下使来自所述第二过滤器的所述流动通过组分流动通过所述第三过滤器;和(f3)从所述第三过滤器洗脱结合的胎儿核酸。

[0102] 在一些实施方式中,所述第一过滤器和第二过滤器中的一个或者两个包括玻璃熔块,所述玻璃熔块包括具有第一孔隙尺寸的第一区段和具有第二孔隙尺寸的第二区段,其中所述第一孔隙尺寸与所述第二孔隙尺寸不同。

[0103] 在一些实施方式中,所述第一过滤器和所述第二过滤器是相同的过滤器。

[0104] 本申请的另一个方面涉及一种用于将血浆样品中的胎儿核酸与母系核酸分离的试剂盒,所述试剂盒包括:移液器吸头,所述移液器吸头包括自支持玻璃熔块过滤器,其中所述玻璃熔块过滤器具有2微米至220微米的孔隙尺寸,并且没有使用改善核酸与所述玻璃熔块过滤器的结合的试剂处理或者包被过;第一结合缓冲液,所述第一结合缓冲液被配制成准备与血浆样品混合并且提供第一结合混合物,所述第一结合混合物具有约17体积%至25体积%的脂肪醇和浓度为约0.5M至约4.0M的离液序列高的盐;和第二结合缓冲液,所述第二结合缓冲液被配制成准备与血浆样品混合并且提供第一结合混合物,所述第一结合混合物具有约0体积%至10体积%的脂肪醇和浓度为约1M至约4.0M的离液序列高的盐。

[0105] 在一些实施方式中,所述试剂盒包括第一移液器吸头,该第一移液器吸头包括第一玻璃熔块过滤器并且具有0.5ml至50ml的吸头体积;和第二移液器吸头,该第二移液器吸头包括第二玻璃熔块过滤器并且具有0.5ml至50ml的吸头体积。在一个相关的实施方式中,所述第一玻璃熔块过滤器具有16微米至40微米的孔隙尺寸,并且所述第二玻璃熔块过滤器具有4微米至10微米的孔隙尺寸。在一些实施方式中,所述玻璃熔块过滤器包括熔融玻璃熔块,所述熔融玻璃熔块包括具有第一孔隙尺寸的第一区段和具有第二孔隙尺寸的第二区段。在一个相关的实施方式中,所述第一区段具有100微米至160微米的孔隙尺寸并且所述第二区段具有16微米至40微米的孔隙尺寸,或者其中所述第一区段具有16微米至40微米的孔隙尺寸并且所述第二区段具有4微米至10微米的孔隙尺寸。

[0106] 实施例

[0107] 提供如下实施例以阐述本发明的某些方面并帮助本领域技术人员实践本发明。这些实施例无论如何都不应被视为限制本发明的范围。

[0108] 实施例1:从鼻咽抽吸物自动化地提取RNA

[0109] 结合带有嵌合在1.2ml艾本德移液器吸头中的大孔隙爱康尼 TruTip[®] 基质、2ml深孔板(美国科学(USA Scientific))、爱康尼 TruTip[®] 提取试剂和作为样品基质的鼻咽抽吸物使用艾本德epMotion 5070液体处理机器人。epMotion 5070液体处理机器人仅同时保持不超过8个吸头,因此基线自动化程序针对8个平行提取进行描述。然而,在一个深孔96孔样品板中的单个程序过程中可以处理多达24个样品。为了处理16或者24个样品,独立的epMotion程序是可以获得的(并且是需要的)。下文概述的程序用于8样品自动化脚本(script)。

[0110] 设置:

[0111] 1.1将鼻咽样品带到室温,然后开始提取。

[0112] 1.2.将100 μ L鼻咽抽吸物加上150 μ L无核酸酶的水等份试样加到样品板的第1列中;图3A)。

[0113] 1.3将样品板放置到epMotion工作台上的位置B1(图2B)。

[0114] 1.4将移液器吸头、过滤器吸头和30ml试剂槽放置到它们各自的epMotion工作台位置上(图3B)。

[0115] 1.5打开艾本德epBlue软件,选择由爱康尼提供的用于8个样品的运行文件,并且通过点击RUN标签上的RUN按钮来加载所述方法。

[0116] 1.6在水平传感器设置下,选自水平和吸头并且点击RUN按钮。

[0117] 1.7将样品体积输入到软件中并且点击RUN。

[0118] 1.8epMotion脚本将提示用户将提取和洗脱试剂添加到位于工作台上的位置B2的试剂储存装置中。将建议体积的每一种试剂添加至各自的槽中。对于8个样品,在表1中示出最小的试剂体积:

[0119] 表1

| 试剂 | 体积(ml) | 槽位置 |
|-----------|--------|-----|
| 95%乙醇 | 3.5 | 2 |
| 洗涤缓冲液D | 9.0 | 3 |
| 洗涤缓冲液E | 9.0 | 4 |
| 洗脱缓冲液A2 | 1.3 | 5 |
| 裂解和结合缓冲液D | 11.0 | 6 |

[0121] 1.9在来自上述步骤1.8的提示过程中将试剂体积输入到由epMotion软件提供的表中。由用户分配到各相应的试剂储存装置中的缓冲液的体积必须大于或者等于上文记录的最小体积。如果实际的缓冲液体积显著大于来自步骤1.8所建议的体积的话,则将各储存装置中的大致体积输入到epMotion软件表中。不正确的体积输入可能导致不正确的由epMotion软件输送至96孔板的每个管或者孔的等分试样体积。

[0122] 自动化程序

[0123] 1.10选择RUN以启动自动化方法。自动化脚本将移动通过如下步骤(即1.11至1.23)而无需用户介入。

[0124] 样品裂解和试剂等分

[0125] 1.11将375 μ L的裂解缓冲液D分配到列1中并且混合10个循环(抽吸+分配=1个循环)。这个步骤开始裂解温育程序,同时将余下的试剂等分。

[0126] 1.12将1.6ml洗涤缓冲液D分配到列2。

[0127] 1.13将1.6ml洗涤缓冲液E分配到列3。

[0128] 1.14将50 μ l洗脱缓冲液A分配到列4。

[0129] 1.15停顿6分钟以完成在裂解缓冲液D中的10分钟样品温育。

[0130] 1.16将375 μ L乙醇添加到列1中的每个孔中,通过10个吸打循环将每个样品与乙醇混合。

[0131] 提取:

[0132] 1.17从位置A2将8个过滤器吸头加载到工作台上,并且开始在图3A和3B概述的提取过程。

[0133] 1.18从列1样品板抽取并分配样品/裂解缓冲液/乙醇混合物7个循环以使核酸结合至 TruTip[®] 基质。虽然通过 TruTip[®] 基质的样品流可能变化(因为临床样品粘度差异的缘故),但是不会影响核酸的收率。用于改善样品流动的选项在讨论部分说明。

[0134] 1.19将过滤器吸头移动到样品板列2,并且使洗涤缓冲液D在基质上循环5次以移除残留的裂解缓冲液和样品基质。

[0135] 1.20将过滤器吸头移动至样品板列3,并且使洗涤缓冲液E在基质上循环5次以从所结合的核酸移除蛋白和其他污染物。

[0136] 1.21将过滤器吸头移动至空的试剂储存装置位置1(在工作台位置B2中)并且循环80次(以快的流速)以将基质干燥。将过滤器吸头彻底干燥是重要的,因为洗脱的核酸制备物中的残留溶剂会对酶如逆转录酶和Taq聚合酶造成负面的影响。

[0137] 1.22将过滤器吸头移动到样品板列4并且在洗脱缓冲液A中循环5次。此时经提取并纯化的核酸在样品板第4列的孔中的洗脱缓冲液中。

[0138] 1.23将过滤器吸头喷射到epMotion垃圾桶中。

[0139] 当程序结束时,从仪器中手动移除样品板并且将经纯化的核酸转移到新的管中以长期保存或者进一步的使用。如果需要的话,高级epMotion用户能够将命令添加到运行文件中以将洗脱样品转移到独立的保存管或者PCR板中。用于总共16个样品的程序将使用样品板列5至8重复步骤1.11至1.16。对于24个样品程序,分别使用样品板列5至8和9至12再重复两次步骤1.11至1.16。

[0140] 表2提供了在实施例1中使用的试剂和装备的列表:

[0141] 表2. 实施例1中使用的试剂和装备

| | 试剂/材料 | 公司 | 产品目录号 |
|--------|--|---|-------------|
| | TruTip 流感提取试剂盒(EPM TruTips) | 爱康尼生物系统 (Akonni Biosystems) | 300 - 11120 |
| | 95%乙醇 | Acros Organics/飞世 尔科技 (Fisher Scientific) | AC615110040 |
| [0142] | 99%丙酮 | 西格玛奥德里奇 (Sigma-Aldrich) | 270725-4L |
| | DEPC 处理水 | 生命科技 (Life Technologies) | AM9906 |
| | 试剂储存装置, 30 ml | 艾本德 | 960050100 |
| | 深孔板 96/2000 μ L | 美国科学 | 30502302 |
| | epT.I.P.S. 运动过滤器吸头 (Motion Filtertip), 1000 μ L | 艾本德 | 960050100 |
| | 装备 | 公司 | 产品目录号 |
| | epMotion 5070 系统 | 艾本德 | |
| [0143] | 分配工具 TM1000-8 | 艾本德 | 960001061 |
| | 储存架 | 艾本德 | 960002148 |

[0144] 代表性结果:

[0145] 用于从鼻咽抽吸物提取流感RNA的实时PCR数据显示在图4中。在 10^4 至 10^6 基因拷贝/ml流感的范围内观察到平均 C_t 值的线性反应(对于流感A和B, R^2 分别等于0.99和0.98), 平均 C_t 值的标准偏差小于1个循环。8、16和24个样品的总样品处理时间分别为16、28和40分钟。因为典型的鼻咽抽吸物或者擦拭样品将含有大于 10^4 TCID₅₀/ml流感A或B, 代表大于 10^7 基因拷贝/ml (假设1000病毒粒子/TCID₅₀), 因此预期自动化epMotion程序对大部分临床NPA样本是有效的。

[0146] 实施例2:基因组DNA的自动化提取

[0147] 使用汉密尔顿STAR液体处理机器人来展示同时从全血进行96个样品的自动化提取。汉密尔顿STAR不同于epMotion系统之处在于在面板上有可选的加热器/振荡器单元, 这对于某些临床基质如全血的酶促消化是重要的。因为该系统可以与96通道移液器头部配合, 因此有专门的96孔板用于过滤器吸头步骤和试剂中的每一个。

[0148] 设置:

[0149] 2.1开启STAR仪器和计算机。

[0150] 2.2打开汉密尔顿运行控制软件。

[0151] 2.3打开由爱康尼提供的用于96个样品的运行文件。

[0152] 2.4将实验室器具放置在STAR面板上,如图5所示。

[0153] 2.5根据表3将试剂分配到它们对应的槽中(体积表示处理96个样品所需要的最小量):

[0154] 表3

| | 试剂 | 体积 (ml) | 槽位置 |
|--------|---------------------------------|---------|-----|
| | 裂解和结合缓冲液 F | 75 | 5 |
| [0155] | 95%乙醇 | 100 | 6 |
| | 洗涤缓冲液 J | 175 | 7 |
| | 洗涤缓冲液 K | 175 | 8 |
| [0156] | 洗脱缓冲液 A2 | 12 | 9 |
| | 蛋白酶 K (20 mg ml ⁻¹) | 8 | 15 |

[0157] 2.6允许等分试样平衡至室温。

[0158] 2.7将样品管放置到样品载体支架(carrier rack)(图5中的面板位置4)中。将样品1放置在最左边载体的后部中并且依次向下移动每个载体,样品96结束于右前位置。

[0159] 自动化程序:

[0160] 2.8选择运行文件窗口的左上方的PLAY按钮。自动化脚本将移动通过如下步骤而无需用户介入:Ppp

[0161] 预处理:

[0162] 2.9从每个样品管将200μL转移到加热器/振荡器模块上的位置14处的温育板(图5)。

[0163] 2.10将80μL蛋白酶K分配到温育板的每个样品孔中。

[0164] 2.11将600μL的裂解缓冲液F分配到温育板的每个孔中。

[0165] 2.12通过过滤器吸头混合溶液10个循环,然后在70℃和500rpm(转/分钟)温育20分钟。在温育样品的同时,液体处理系统通过将试剂分配到它们对应的板和孔中而继续运行:

[0166] ●将800μL乙醇分配到位置10的深孔板的每个孔中。

[0167] ●将1.6ml洗涤缓冲液J分配到位置11的深孔板的每个孔中。

[0168] ●将1.6ml洗涤缓冲液K分配到位置12的深孔板的每个孔中。

[0169] ●将100μL洗脱缓冲液A分配到位置13的深孔板的每个孔中。

[0170] 2.13在温育20分钟之后,将样品混合物从温育板转移到位置10的深孔板,并且通过12个吸打循环进行混合。

[0171] 2.14将试剂吸头喷射到垃圾桶中。

[0172] 提取:

[0173] 这个部分的gDNA血液程序非常类似于epMotion流感程序,不同之处在于洗涤试剂的组成和循环次数。汉密尔顿 TruTips[®]吸头经渗碳而允许用于液面感测,因此通过TruTip的液体流对于用户而言不容易看到。

[0174] 2.15从面板位置3加载96 TruTips®。

[0175] 2.16将样品/裂解缓冲液/乙醇混合物抽吸并分配到位置10中循环10次以使核酸结合至TruTips®基质。

[0176] 2.17将过滤器吸头移动至位置11并且使洗涤缓冲液J在基质上循环5次以移除残留的裂解缓冲液和样品基质。

[0177] 2.18将过滤器吸头移动至位置12,并且使洗涤缓冲液K循环5次以从所结合的核酸移除蛋白和其他污染物。

[0178] 2.19高速循环过滤器吸头40次以进行空气干燥。

[0179] 2.20将过滤器吸头移动到位置13并且在洗脱缓冲液A2中循环5次。此时经提取并纯化的核酸在深孔板的洗脱缓冲液中。

[0180] 2.21将过滤器吸头喷射到垃圾桶中。

[0181] 当程序结束时,从仪器中移除洗脱板并且将所提取的样品转移到适当的管中以用于保存或者下游使用。

[0182] 表4提供了在实施例2中使用的试剂和装备的列表:

[0183] 表4. 实施例2中使用的试剂和装备。

| | 试剂/材料 | 公司 | 产品目录号 |
|--------|-------------------------------------|----------------------|--------------|
| | TruTip gDNA 血液提取试剂盒 (汉密尔顿 TruTips®) | 爱康尼生物系统 | 300-20341 |
| | 95%乙醇 | Acros Organics/飞世尔科技 | AC615110040 |
| | 蛋白酶 K | Amresco | E195 |
| | 1 ml 汉密尔顿过滤式 CO-RE 96 吸头支架 | 汉密尔顿 | 235905 |
| [0184] | 1 ml 汉密尔顿非过滤式 CO-RE 96 吸头支架 | 汉密尔顿 | 235904 |
| | 50 ml 试剂槽 | 汉密尔顿 | 187297 |
| | 深孔 2 ml 板 | 美国科学 | 1896-2800 |
| | Nunc 96 DWP-2ml | 赛默飞世尔 | 27874 |
| | 试剂槽 | 飞世尔 | 14-222-412 |
| | | | |
| | 装备 | 公司 | 产品目录号 |

| | | | |
|--------|----------------------------------|------|----------------|
| [0185] | 汉密尔顿 STAR 系统 | 汉密尔顿 | |
| | 8-通道液体处理器 | 汉密尔顿 | 173027 |
| | 96-通道头部 | 汉密尔顿 | 199090 |
| | 吸头载体 (TIP_CAR_480BC) | 汉密尔顿 | 182085 |
| | 样品载体 (SMP_CAR_32_EPIL) | 汉密尔顿 | 173400 (用于载体) |
| | | 汉密尔顿 | 182238 (用于插入物) |
| | 板载体 (PLT_CAR_L5AC) | 汉密尔顿 | 182090 |
| | 多路复用载体 | 汉密尔顿 | 188039 |
| | HHS2 单元 | 汉密尔顿 | 199033 |
| | 支架载体 (rackformfx_car_L5_rgt5) | 汉密尔顿 | 188047 |

[0186] 代表性结果:

[0187] 考虑到一系列的分子测试是对人类基因组DNA进行,从全血提取核酸的主要目的是制得纯的高分子量的基因组DNA。用于96个样品的自动化程序在1个小时内完成。图6A显示了在汉密尔顿STAR程序上同时处理的45个阳性血液样品和45个试剂空白的UV/Vis吸光度曲线,平均 $A_{260}/_{280}$ 比为1.96并且平均 $A_{260}/_{230}$ 比为1.93。 $A_{260}/_{280}$ 比为1.7-2.0并且 $A_{260}/_{230}$ 为 >1.7 通常指示非常纯的DNA,没有残留的盐、蛋白或溶剂,并且对于大多数下游分子应用而言是可以接受的。图6B中的1%琼脂糖凝胶显示,所得的gDNA具有高分子量($>24Kb$),剪切最小。来自全组45个阳性样品的人类DNA都是在LightCycler[®] 480系统上采用Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit(生命科技)进行定量,得到 $5.26 \pm 0.46\mu g$ 人类DNA/200uL全血的平均收率。

[0188] 表5显示了来自全血、血沉棕黄层、唾液、口腔擦拭物、大鼠肺部、大鼠肝脏、大鼠脾脏和大鼠肾脏的自动化纯化gDNA的平均 $A_{260}/_{280}$ 比。

[0189] 表5. 来自各种样品类型的基因组DNA质量

| 样品类型 | 平均 $A_{260}/_{280}$ |
|------|---------------------|
| 全血 | 1.92 |

| | | |
|--------|------------|------|
| [0191] | 血沉棕黄层 | 1.88 |
| | Oragene 唾液 | 1.78 |
| | 口腔擦拭样品 | 1.90 |
| | 大鼠肺部 | 1.86 |
| | 大鼠肝脏 | 2.06 |
| | 大鼠脾脏 | 2.10 |
| | 大鼠肾脏 | 2.12 |

[0192] 图6C显示了每轮合并200 μ l的8轮的实时qPCR结果,全血输入使用1ml TruTip[®] filter进行处理并且以100 μ l的体积洗脱。结果显示,在3个不同的天数由不同的操作员分离的人类DNA的平均收率具有高度可重复性。图6D显示,来自全血的平均gDNA收率在处理自1ml TruTip[®]过滤器(左侧)的100 μ L、200 μ L和300 μ L的全血输入体积和处理自5ml TruTip[®]过滤器的1000 μ L和2000 μ L全血体积(中间和右侧)的范围上是线性的。图6E显示了交叉污染研究的结果,其中对含有24个唾液孔和24PBS孔的板进行自动化DNA提取过程。来自每个孔的提取DNA然后使用qPCR进行扩增。如图6E所示,各孔之间没有交叉污染。图6F显示来自使用凯杰的手动旋转柱法(右侧柱子/对)和根据本发明的自动化提取方法(左侧柱子/对)提取的7个单个盲选唾液样品(样品A至G;400 μ l输入/100 μ l洗脱)的平均gDNA收率的比较的UV吸光度结果。数据表明本申请的自动化方法提供了比凯杰方法更好的样品gDNA回收率。图6G显示了处理自 TruTip[®]过滤器(柱子1)的200 μ l全血的处理时间与5个其他竞争提取系统(柱子2至6)相比。

[0193] 实施例3:用于纯化胎儿核酸的程序

[0194] 非介入性产前诊断(NIPD)是重要并且快速增长的市场,由于其具有取代存在很多风险包括胎儿畸形和流产的标准产前诊断方法的能力而提供了突破性的医学进步。相反,用于存在于母亲的血浆中的胎儿DNA的基因异常的测试仅需要简单的抽血。虽然这种方法为产前诊断提供了较低风险的方法,但是需要特殊的处理技术的样品类型还存在很多挑战。首先,怀孕时胎儿DNA早期在母系血浆中以低浓度存在,因此具有处理大的样品体积并且将它们浓缩以获得足够的量以用于分析的能力是重要的。然而,目前在市场上能够获得的试剂盒仅允许250 μ l至5ml的输入体积以及分离总核酸。其次,胎儿循环DNA在高的母系循环DNA背景下存在于母系血浆中(Lo1997)。如果血液样品没有以及时的方式进行处理(小于24小时),那么母系DNA的背景会随时间加大,从而导致所存在的胎儿DNA%的进一步降低(Barrett 2011)。这种低比率使得难以精确地量化对胎儿DNA特异的基因的不同拷贝数。而且,母系血浆样品可能含有凝血因子和其他蛋白以及导致旋转柱结合材料堵塞的凝结剂,这取决于处理它们有多快。第三,现有的试剂盒使用不容易进行自动化的二氧化硅旋转柱方法,而自动化在审批许可的情况下转向临床诊断测试时是一个重要的能力。

[0195] 根据本发明的用于使血浆样品中的胎儿核酸与母系核酸分开并分离的例示性程序提供如下。

- [0196] 3.1.0设置
- [0197] 3.1.1将615 μ l蛋白酶K等分到每个5ml样品管(每个样品2个5ml的样品管)。
- [0198] 3.1.2将1 μ g载体RNA(5 μ L,0.2 μ g/ μ l)添加至每个样品管。
- [0199] 3.1.3将6.2ml裂解缓冲液CN-L1添加至每个样品管。
- [0200] 3.1.4将5ml血浆样品添加至每个样品管。
- [0201] 3.1.5以最大速度使样品涡旋振动30秒钟。
- [0202] 3.1.6在水浴中在60 $^{\circ}$ C温育30分钟。
- [0203] 3.1.7将12ml结合缓冲液CN-B1添加至每个样品管。
- [0204] 3.1.8将10 μ l BSA(20mg/ml)添加至每个样品管。
- [0205] 3.1.9以最大速度使样品管涡旋振动15秒钟。
- [0206] 3.1.10在冰上温育样品管5分钟。
- [0207] 3.2.0提取:
- [0208] 3.2.1使胎儿DNA和母系DNA结合至过滤器。
- [0209] 3.2.1.1将20ml移液器吸头附接至马达驱动的移液器填充装置。
- [0210] 3.2.1.2吸打样品管A中的液体18个循环(循环=抽吸+分配)。
- [0211] 3.2.1.3对样品管B重复步骤3.2.1.2。
- [0212] 3.2.1.4弃掉样品管(含有液体样品)但是保留移液器吸头。
- [0213] 此时核酸结合至移液器吸头过滤器。
- [0214] 3.2.2洗涤
- [0215] 3.2.2.1使用马达驱动的移液器填充装置,通过移液器吸头吸打洗涤缓冲液1个循环。
- [0216] 3.2.2.2弃掉洗涤缓冲液但是保留移液器吸头。
- [0217] 3.2.2.3再重复步骤3.2.2三次。
- [0218] 核酸仍然结合至移液器吸头过滤器。
- [0219] 3.2.3干燥
- [0220] 3.2.3.1使用马达驱动的移液器填充装置,使空气通过移液器吸头过滤器15个循环。如果留下可看到的量的洗涤缓冲液的话,则不时地轻柔敲打移液器吸头。
- [0221] 这个步骤是为了避免由于洗涤缓冲液过量而可能发生的PCR抑制。
- [0222] 3.2.3.2等待1分钟以允许移液器吸头过滤器彻底干燥。
- [0223] 核酸仍然结合至移液器吸头过滤器。
- [0224] 3.2.4从移液器吸头洗脱纯化的母系核酸和胎儿核酸。
- [0225] 3.2.4.1经移液器吸头向上抽取洗脱缓冲液并且等待1分钟以允许洗脱缓冲液在过滤器上温育。
- [0226] 3.2.4.2将液体吸打到洗脱1管中并重复总共5个循环。
- [0227] 3.2.4.3使用洗脱2管重复步骤3.2.4.1和3.2.4.2。
- [0228] 3.2.4.4对管进行旋转沉降并且合并来自洗脱管1和2的样品。
- [0229] 3.2.4.5测量包含在洗脱管中的总体积并且使用洗脱缓冲液A2将体积增加至450 μ l。
- [0230] 此时提取的核酸处在洗脱管中。

- [0231] 3.2.4.6弃掉移液器吸头。
- [0232] 纯化的核酸此时准备好用于排阻和浓缩。
- [0233] 3.3.0 HMW核酸的排阻
- [0234] 3.3.1设置：
- [0235] 3.3.1.1将来自步骤3.2.4.5的洗脱样品转移至使用适当样品数标记的2ml微型离心管。
- [0236] 3.3.1.2添加495 μ l结合缓冲液CN-B2。
- [0237] 3.3.1.3使样品涡旋振动10秒钟并且进行脉冲旋转。
- [0238] 3.3.2将HMW核酸选择性地结合至移液器吸头。
- [0239] 3.3.2.1将1ml 4mm移液器吸头附接至电子移液器。
- [0240] 3.3.2.2吸打来自样品管的液体20个循环(循环=抽吸+分配)。
- [0241] 3.3.2.3封闭样品管并且放在一旁。
- [0242] 不要弃掉；样品管含有胎儿DNA。
- [0243] 3.3.2.4保留移液器吸头。
- [0244] 此时高MW核酸(母系DNA)结合至移液器吸头过滤器。
- [0245] 3.3.3冲洗移液器吸头
- [0246] 3.3.3.1在冲洗管中吸打液体5个循环。
- [0247] 3.3.3.2弃掉冲洗管但是保留移液器吸头。
- [0248] 核酸从过滤器释放。
- [0249] 3.4.0LMW核酸的浓缩
- [0250] 3.4.1设置：
- [0251] 3.4.1.1将575 μ l的结合缓冲液CN-B3添加至样品管。
- [0252] 3.4.1.2使样品管涡旋振动10秒钟并且脉冲旋转。
- [0253] 3.4.2结合LMW核酸
- [0254] 3.4.2.1吸打样品管中的液体20个循环。
- [0255] 3.4.2.2弃掉样品管但是保留移液器吸头。
- [0256] 此时核酸结合至过滤器。
- [0257] 3.4.3洗涤LMW核酸
- [0258] 3.4.3.1在Rainin移液器上保持上述的相同设置。
- [0259] 3.4.3.2在洗涤1管中吸打液体1个循环。
- [0260] 3.4.3.3弃掉洗涤1管但是保留移液器吸头。
- [0261] 3.4.3.4使用洗涤2管重复步骤3.4.3.2和3.4.3.3。
- [0262] 核酸仍然结合至过滤器。
- [0263] 3.4.4干燥
- [0264] 3.4.4.1使用在空的干燥管中的移液器吸头,使空气通过移液器吸头15个循环。如果留下可看到的量的洗涤缓冲液,则不时地轻柔敲打移液器吸头。
- [0265] 这个步骤是为了避免因过量洗涤缓冲液而可能发生的PCR抑制。
- [0266] 3.4.4.2等待1分钟以允许过滤器彻底干燥。
- [0267] 核酸仍然结合至移液器吸头过滤器。

[0268] 3.4.5洗脱

[0269] 3.4.5.1经移液器吸头向上抽取洗脱管中的液体并且等待1分钟以允许洗脱缓冲液在过滤器上温育。

[0270] 3.4.5.2吸打洗脱管中的液体总共10个循环。

[0271] 3.4.5.3将洗脱样品保持在洗脱管中。

[0272] 此时提取的核酸处在洗脱管中。

[0273] 3.4.5.4弃掉移液器吸头。

[0274] 纯化的核酸此时准备好用于PCR扩增或者在-20℃保存(长期保存则在-80℃)。

[0275] 上述纯化程序总结在图7中。在一些实施方式中,在整个纯化程序中(即步骤3.1.0至3.4.5.4)仅使用单个移液器吸头从而降低程序的成本。使用不同的结合缓冲液可以实现胎儿DNA和/或母系DNA与移液器吸头过滤器的选择性结合。在一些实施方式中,单个移液器吸头装有玻璃熔块过滤器,该玻璃熔块过滤器带有孔隙度不同的两个区段。在其他一些实施方式中,单个移液器吸头装有烧结玻璃熔块过滤器,该烧结玻璃熔块过滤器带有孔隙度不同的两个区段。在其他一些实施方式中,单个移液器吸头装有孔隙度不同的两个过滤器,并且这些过滤器被融合至彼此。在其他一些实施方式中,单个移液器吸头装有两个或者更多个孔隙度不同的过滤器。

[0276] 在一些实施方式中,上文描述的方法(即基于尺寸排阻或富集的胎儿DNA的分开)被用于分离来自癌症患者样品的没有其他细胞的DNA(用于使正常DNA与肿瘤DNA分开)或者来自移植患者样品(用于宿主与供体DNA分开)。程序的尺寸排阻/浓缩部分还可以被用于文库制备程序,然后进行下一步生成测序。来自大体积的样品的DNA的小片段的分离(没有必要包括富集)也是用于从肾脏样品分离感染性疾病的常规应用。

[0277] 实施例4:胎儿DNA提取程序的表征

[0278] DNA回收的效率

[0279] 使用角型超声发生器(horn sonicator)在带有玻璃珠的PCR管的侧壁上对全长男性和女性基因组DNA(Promega)进行片段化,对女性和男性DNA的超声处理时间进行优化以产生所需要的片段范围来研究和展示辨别用于程序的排阻步骤的不同尺寸。结果显示在图8A中。男性DNA被片段化成小于600bp的尺寸范围(集中在约150bp)以模拟血浆样品中的循环胎儿DNA。将女性DNA片段化成约400bp至约1200bp的尺寸范围(集中在约800bp)以模拟血浆样品中的母系DNA。使用实施例3中所描述的DNA提取程序制备并提取含有200ng的片段化的女性DNA和各种量的片段化的男性DNA(1、3、10、30和100ng)的混合物的样品。图8B显示了片段化男性DNA(Chrom Y)DNA和总的DNA(Chrom 1,)的回收率的qPCR结果。所示数据是三次提取的平均值。每个提取样品都进行两次qPCR。结果证明,在受检浓度范围内实现了有效的男性DNA回收率,并且回收率与使用凯杰循环核酸试剂盒(Qiagen Circulating Nucleic Acids Kit)的回收率相当。与凯杰法相比,TruTip回收的总DNA的量较低,这证明TruTip程序中的富集步骤的效果。

[0280] 在另一组实验中,测试了具有不同尺寸和基质孔隙度的玻璃熔块过滤器的胎儿DNA和母系DNA的回收率。简而言之,使用具有不同尺寸和基质孔隙度的玻璃熔块过滤器处理加入有10ng男性片段化DNA的10ml女性血浆,然后进行实施例3的步骤3.2.0中所描述的程序(仅提取步骤),将所提取的DNA回收在250 μ l的洗脱缓冲液中并且使用qPCR分析胎儿

DNA (CHY) 和总的DNA (CH1)。结果总结在表6中。

[0281] 表6

| 样品名称 | 吸头类型 | CHY (男性 DNA) | | | | | | CH1 (总 DNA) | | | | | | |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | Cp1 | 浓度 1 | Cp2 | 浓度 2 | 平均 Cp | 平均浓度 | Cp1 | 浓度 1 | Cp2 | 浓度 2 | 平均 Cp | 平均浓度 | |
| [0282] E1 | 4mm/8mm (16-40um 孔隙度) | 26.93 | 3.51E-01 | 26.82 | 3.77E-01 | | | 24.99 | 2.59E+00 | 24.93 | 2.68E+00 | | | |
| | | | | | | 26.92 | 3.55E-01 | | | | | 25.00 | 2.57E+00 | |
| | | | | | | | | 25.05 | 2.49E+00 | 25.04 | 2.50E+00 | | | |
| E2 | 4mm/8mm (16-40um 孔隙度) | 26.98 | 3.40E-01 | 26.94 | 3.50E-01 | | | | | | | | | |
| E3 | 4mm/7mm (16-40um 孔隙度) | 27.57 | 2.34E-01 | 27.63 | 2.25E-01 | 27.19 | 3.08E-01 | 25.77 | 1.60E+00 | 25.85 | 1.53E+00 | 25.34 | 2.18E+00 | |
| [0283] E4 | 4mm/7mm (16-40um 孔隙度) | 26.79 | 3.84E-01 | 26.78 | 3.87E-01 | | | 24.87 | 2.77E+00 | 24.86 | 2.80E+00 | | | |
| | E5 | 4mm/7mm (双重过滤器)* | 26.94 | 3.51E-01 | 26.95 | 3.48E-01 | | | 25.07 | 2.47E+00 | 25.06 | 2.47E+00 | | |
| | | | | | | 26.91 | 3.57E-01 | | | | | 25.05 | 2.49E+00 | |
| | E6 | 4mm/7mm (双重过滤器)* | 26.8 | 3.82E-01 | 26.95 | 3.48E-01 | | | 25.02 | 2.54E+00 | 25.06 | 2.48E+00 | | |
| | E7 | 4mm/7mm (40-60um 孔隙度) | 28.53 | 1.21E-01 | 28.35 | 1.39E-01 | | | 26.86 | 8.29E-01 | 26.8 | 8.58E-01 | | |
| | | | | | | | 28.79 | 1.04E-01 | | | | | 26.97 | 7.81E-01 |
| E8 | 4mm/7mm (40-60um 孔隙度) | 29.22 | 7.22E-02 | 29.05 | 8.22E-02 | | | 27.09 | 7.23E-01 | 27.11 | 7.14E-01 | | | |

[0284] 排阻步骤 (实施例3的步骤3.3) 和浓缩步骤 (实施例3的步骤3.4) 与单独的浓缩步骤 (实施例3的步骤3.4) 的效果

[0285] 在进行步骤3.3或者不进行步骤3.3的情况下使用实施例3的基本程序提取片段化的男性和女性DNA的混合物 (输入)。如图9所示,在不进行排阻步骤3.3的情况下,浓缩步骤3.4能够回收80%的男性DNA,与所述输入相比稍微富集 (约2.4%)。当与浓缩步骤一起包括排阻步骤3.3时,结果显示男性DNA (CHY) 的回收率稍有下降,但是显著降低了女性DNA的回收率,在该情况中得到约8%的胎儿DNA%的总增长 (表7)。

[0286] 表7

| 样品名称 | CHY (男性 DNA) | | | | | CH1 (总 DNA) | | | | | 胎儿 (%) |
|---------------------------|--------------|-----------|---------------|--------------|---------|-------------|-----------|---------------|--------------|---------|--------|
| | 平均 Cp | 标准偏差 (CP) | 平均浓度 (GES/uL) | 平均浓度 (ng/uL) | 回收率 (%) | 平均 Cp | 标准偏差 (CP) | 平均浓度 (GES/uL) | 平均浓度 (ng/uL) | 回收率 (%) | |
| [0287] 输入 | 26.21 | | 5.76 E +01 | 3.80 E -01 | | 24.07 | | 5.38 E +02 | 3.55 E +00 | | 10.7 % |
| TruTip 排阻&浓缩 (n=4) | 26.75 | 0.17 | 3.99 E +01 | 2.63 E -01 | 69.24 | 25.38 | | 2.16 E +02 | 1.43 E +00 | 40.15 | 18.5 % |
| 输入 | 26.53 | | 4.61 E +01 | 3.04 E -01 | | 24.52 | | 3.93 E +02 | 2.59 E +00 | | 11.7 % |
| [0288] 单独 TruTip 浓缩 (n=4) | 26.78 | 0.20 | 3.90 E +01 | 2.57 E -01 | 84.62 | 25.04 | 0.23 | 2.77 E +02 | 1.83 E +00 | 70.54 | 14.1 % |

[0289] GES=基因组当量 (genome equivalent)。

[0290] 实施例5:用于从大体积血浆样品中提取胎儿核酸的自动化程序

[0291] 使用汉密尔顿STARplus仪器开发和展示用于从5ml的母系血浆提取自由循环胎儿DNA的自动化程序。STARplus系统能够支持两个自动化移液器通道臂,一个带有8×5ml通道,一个带有8×1ml通道。这些臂能够用于每批次8个样品的多批次的交错处理进行平行操作。5ml过滤器吸头可以被用于初始大体积提取,而1ml过滤器吸头可以被用于经提取的核酸的尺寸分开并且进一步的浓缩。

[0292] 设置:

[0293] 5.1接通STARplus仪器和计算机。

[0294] 5.2打开汉密尔顿运行控制软件。

[0295] 5.3打开由爱康尼提供的用于8个大体积血浆样品的运行文件。

[0296] 5.4将实验室器具放在STARplus面板上,如图10所示。

[0297] 5.5根据表8将试剂分配到它们对应的储存装置中。

[0298] 表8

| | 试剂 | 体积 (ml) | 槽位置 |
|--------|---------------------------------|---------|-----|
| | CN-W1 | 17 | 5A |
| | CN-W2 | 17 | 5B |
| | CN-W2 | 21 | 5C |
| [0299] | 蛋白酶 K (20 mg ml ⁻¹) | 5 | 6A |
| | EBB | 17 | 6B |
| | EBA2 | 5 | 6C |
| | CN-W3 | 5 | 6D |
| | CN-B2 | 5 | 6E |
| | CN-B3 | 5 | 6F |
| [0300] | CN-L1 | 175 | 7 |
| | CN-B1 | 52 | 8 |

[0301] 5.6允许样品平衡至室温。

[0302] 5.7将样品管放置到样品载体支架中(图10A中的面板位置3)。将样品1放置在最后,并且依次向面板的前部移动。

[0303] 自动化程序:

[0304] 由于输入样品体积大,因此必须在汉密尔顿STARplus仪器外的水浴中进行预处理步骤。在自动化程序中需要用户介入的步骤在句子的开始出使用星号(*)指示并且为黑体字。

[0305] 预处理:将样品与蛋白酶K和裂解缓冲液温育以使样品和裂解细胞均质化从而释放DNA。

[0306] 5.8选择运行文件窗口的左上方的PLAY按钮。

[0307] 5.9自动化脚本将5ml血浆、615ul蛋白酶K和6.3ml裂解缓冲液CN-L1添加至每个50ml锥形管中,然后暂停。

[0308] 5.10*从样品面板取下50ml锥形管,高速涡旋振动30秒钟,并且在水浴或者热块中于60℃离线温育30分钟。在从汉密尔顿面板取下锥形管之后,重启自动化脚本以继续将试剂分配到它们各自的板和孔中(图10B和10C):

[0309] ●将2ml CN-W1添加至位置9列1的每隔一个的孔中。

[0310] ●将2ml CN-W2添加至位置9列2的每隔一个的孔中。

[0311] ●将2ml CN-W4添加至位置9列3的每隔一个的孔中。

[0312] ●将250μl EA2添加至位置9列4和5的每隔一个的孔中。

[0313] ●将1ml EBB添加至位置10列2的每隔一个的孔中。

[0314] ●将500μl CN-W3添加至位置10列3的每隔一个的孔中

[0315] ●将500μl CN-W4添加至位置10列4的每隔一个的孔中。

[0316] ●将50μl EBA2添加至位置10列5的每隔一个的孔中。

[0317] 由于5ml通道太宽,难以将相邻的孔用于每个样品,因此自动化程序将试剂分配到

深孔板的面板位置9的每隔一个的孔中。

[0318] 分配试剂后,将暂停程序。

[0319] 5.11*在30分钟、60℃温育之后,将50ml锥形管放置在冰上5分钟。

[0320] 5.12*将50ml锥形管返回到它们在样品载体支架内的面板位置4的原先位置,并且重启自动化脚本。

[0321] 5.13将12ml结合缓冲液CN-B1添加至每个样品管中并且混合10次。

[0322] 大体积提取:可以使用5ml过滤器吸头来从经裂解的血浆样品中提取总DNA。

[0323] 5.14从位置2拾取5ml过滤器吸头用于大体积的核酸提取。

[0324] 5.15使样品混合物在50ml锥形管中循环15次,从管子的底部开始,并且在每次吸打循环之后移高3mm。该步骤使总核酸结合至结合基质。

[0325] 5.16将过滤器吸头移动到深孔板位置6列1处,并且在洗涤缓冲液CN-W1中循环1次。

[0326] 5.17将过滤器吸头移动到位置9列2处,并且在洗涤液CN-W2中循环1次。

[0327] 5.18将过滤器吸头移动到位置9列3处,并且在洗涤液CN-W4中循环2次。

[0328] 5.19将过滤器吸头移动到位置9列4处,并且高速循环40次以使结合基质干燥。

[0329] 5.20将过滤器吸头移动到位置9列5处,并且循环10次以从5ml过滤器吸头洗脱结合的核酸。这是大体积洗脱#1。

[0330] 5.21将过滤器吸头移动至列6并且使用第二个等分试样的洗脱缓冲液重复该步骤。这是大体积洗脱#2。

[0331] 5.22将洗脱#2转移到位置9列5以将其与洗脱#1合并,并且弃掉过滤器吸头。

[0332] 排阻和浓缩:从所提取的样品中移除高分子量DNA,并且分离和浓缩留下的DNA。

[0333] 5.23将来自步骤5.22的合并洗脱液添加至位置10列1并且彻底混合10次。

[0334] 5.24从位置13拾取1ml过滤器吸头并且循环20次以将高分子量DNA结合至基质。

[0335] 5.25将过滤器吸头移动到位置10列2处,并且循环5次以冲洗吸头。保留过滤器吸头并且将其放回到位置13处的吸头支架中。

[0336] 5.26利用来自位置12的试剂吸头将575 μ l的结合缓冲液CN-B3添加至位置10列1的样品中并且混合10次。

[0337] 5.27从步骤5.25拾取过滤器吸头,并返回到位置10列1,并且循环20次以将来自样品的留下DNA结合至1ml过滤器吸头。

[0338] 5.28将过滤器吸头移动至位置10列4处,并且在洗涤液CN-W3中循环1次以移除任何留下的抑制剂。

[0339] 5.29将移液器吸头移动至位置10列5处,并且在洗涤液CN-W4中循环1次以冲洗残留的来自CN-W3的胍。

[0340] 5.30将过滤器吸头升到位置10列5上方,并且使空气循环通过吸头35次以使基质干燥。

[0341] 5.31将过滤器吸头移动至位置10列6处,并且在EBA2中循环10次以洗脱经纯化、尺寸选择和浓缩的核酸。

[0342] 5.32弃掉过滤器吸头。

[0343] 5.33将来自列6的洗脱样品转移至位置11的1.5ml管中。提取的样品准备好用于保

存或者下游处理。

[0344] 表9提供了在实施例5中使用的试剂和装备的列表。

[0345] 表9

[0346]

| 试剂/材料 | 公司 | 产品目录号 |
|---|--------------------------|-------------|
| TruTip R+D 循环 DNA 提取试剂盒 (汉密尔顿 TruTips®) | 爱康尼生物系统 | |
| 100%乙醇 | 西格玛奥德里奇 | 459828-1L |
| 异丙醇 | Acros Organics/ 飞世尔科技 | AC327270010 |
| 过滤式 4 ml 吸头 | 汉密尔顿 | 184022 |
| 非过滤式 1 ml 吸头 | 汉密尔顿 | 235939 |
| 96 深孔板 | 美国科学 | 1896-2800 |

| | | | |
|--------|---|-------------------------|---|
| [0347] | 50 ml 锥形管 | 康宁 (Corning) / 飞世尔科技 | 05-526B |
| | 50 ml 试剂槽 | 汉密尔顿 | |
| | 120 ml 试剂槽 | 汉密尔顿 | 182703 |
| | 大体积 96 位置试剂槽 (96-Pos Reagent Troughs) | 飞世尔科技 | 14-222-412 |
| | 装备 | 公司 | 产品目录号 |
| | 汉密尔顿 STARplus 系统 | 汉密尔顿 | |
| | 吸头载体 | 汉密尔顿 | 182085 |
| | 50 ml 管载体 | 汉密尔顿 | 182245 |
| | 24 位置样品载体 | 汉密尔顿 | |
| | 32 位置样品载体 | 汉密尔顿 | 173410 |
| | Multiflex 载体 (7 轨道宽 度) | 汉密尔顿 | 位置 1: CPAC 或 HHS, 带有圆 底板接头 (adapter) |
| | | 汉密尔顿 | 位置 2: MFX_Rgt 模块 (PN 188047), 带有轨道 (7 à 6) 接头 |
| | | 汉密尔顿 | 位置 3: MFX_DWP 模块 (PN 188042), 带有轨道 (7 à 6) 接头 |
| | | 汉密尔顿 | 位置 4: MFX_DWP 模块 (PN 188042), 带有轨道 (7 à 6) 接头 |

[0348] 代表性结果:

[0349] 来自使用大体积过滤器吸头程序处理的合并的母系血浆样品的8个重复样品的实时结果显示在图11A中。全部程序(包括离线蛋白酶K预处理)在约2小时内完成。胎儿男性DNA (CHY) 和总的DNA (CH1) 的所有重复的平均Ct值分别为 34.58 ± 0.66 和 29.76 ± 0.50 , 这展示了自动化提取方法的优异的可重复性。总DNA池(为基因组等分试样)中的胎儿DNA的浓度根据与标准物比较的拟合点分析进行计算, 所有样品的所得平均胎儿DNA%为2.8%。这个样品的真实胎儿DNA%是未知的, 因为这些样品在进行提取之前合并。

[0350] 图11B显示了使用采用爱康尼TruTip®过滤器的自动化系统从根据上述提取程序(左侧柱/对)和凯杰手动循环核酸试剂盒(Qiagen's manual Circulating Nucleic Acid Kit)(右侧柱/对)从11个独特的重复母系血清样品回收的胎儿DNA百分比的比较。

[0351] 不受任何特定理论或作用的束缚,本发明通过采用刚性、自支持基质结构满足了上述需要,所述刚洗、自支持基质结构相对较厚以具有高度结合性能,含有相对较大的孔隙度以具有低流体阻抗、较快的流速、并且对临床和环境样品中颗粒具有较高的容差,且由非松散材料(例如二氧化硅凝胶、硅藻土、玻璃珠)制得。

[0352] 结合基质和吸头形式提供了在现有技术没有实现的很多优点,包括i)用于增加提取效率和浓度的高表面积,ii)用于大样品体积和脏样品的大孔隙度,iii)避免需要离心或者真空歧管的简单理念;和iv)提取产物与任何下游扩增检测系统所具有的相容性。本文所述的系统避免使用脆弱而精密的材料(例如纤维过滤器、膜过滤器、硅微结构)来提供粗放操作和简化制造,这得到良好的表征并且容易在机器人液体处理系统上扩大规模以实现较高的通量处理。

[0353] 本文使用的术语和说明仅通过例证方式提供,并且没有作为限制的意思。本领域技术人员将认识到的是,在所附权利要求和它们的等同方式限定的本发明的精神和范围内进行很多变化是可能的,除非另有说明,否则其中所有术语以它们最宽的可能意义理解。

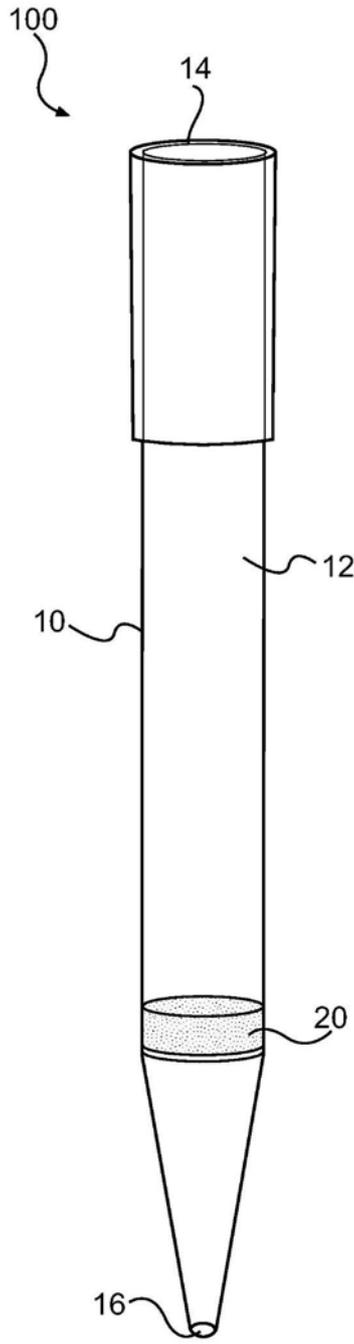


图1A

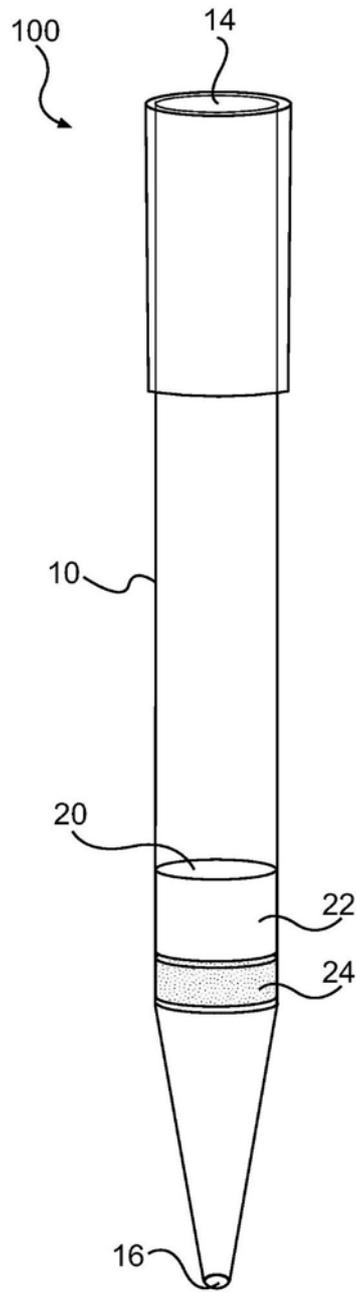


图1B

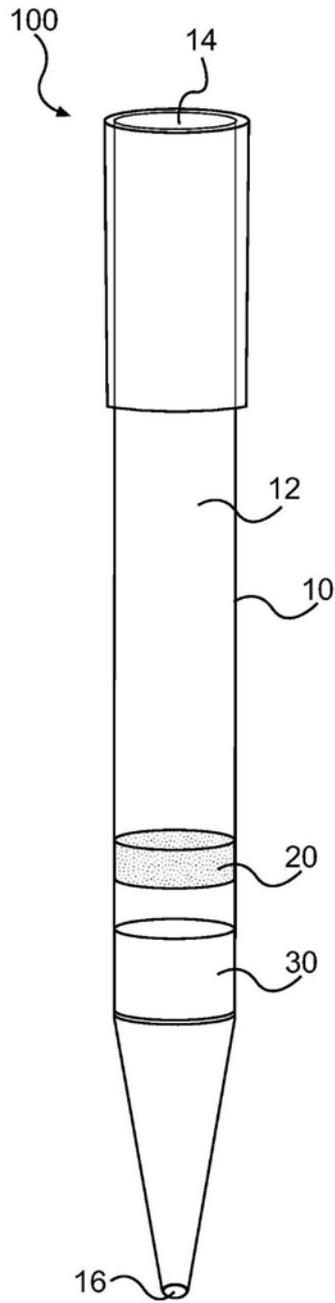


图1C

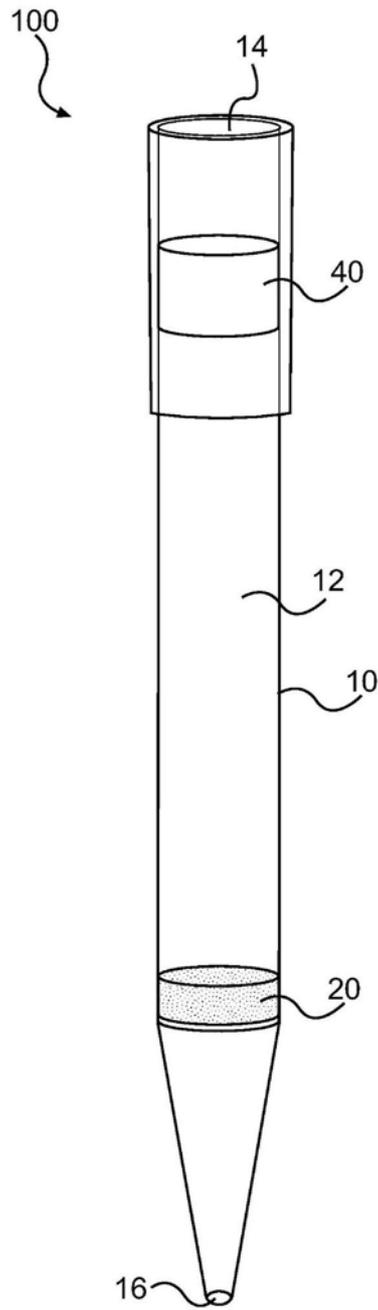


图1D

步骤1 使酸与基质结合

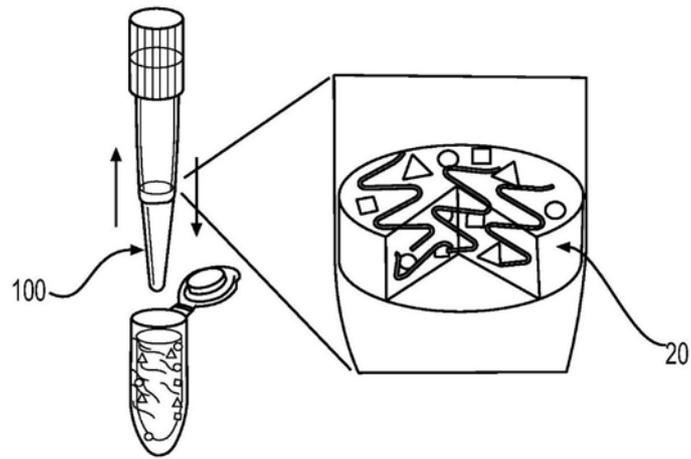


图2A

步骤2 洗掉杂质

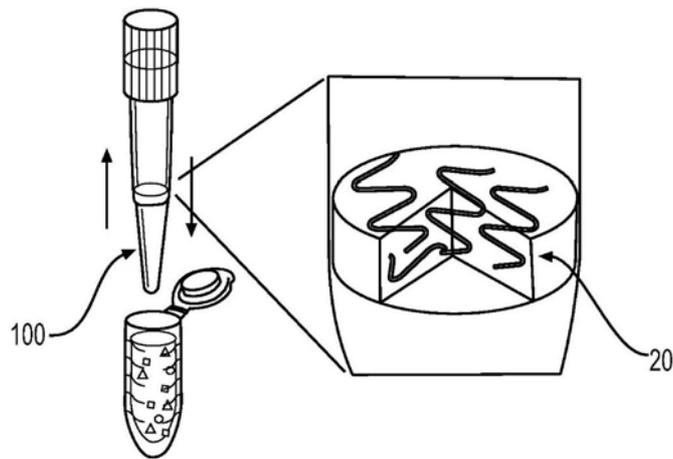


图2B

步骤3 空气干燥

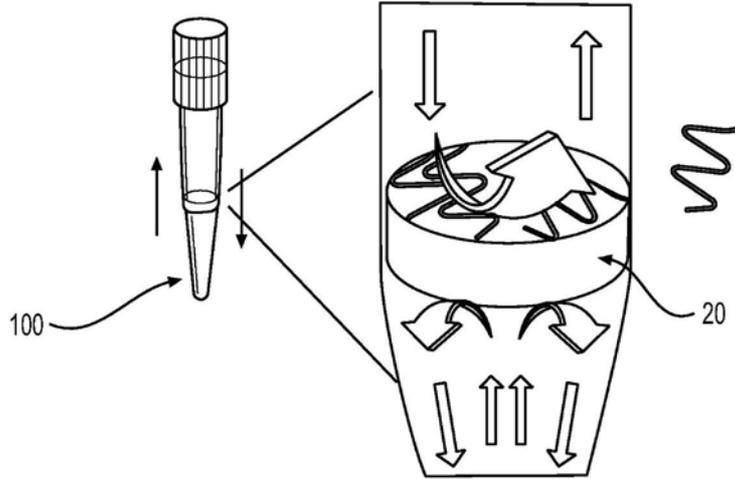


图2C

步骤4 洗脱

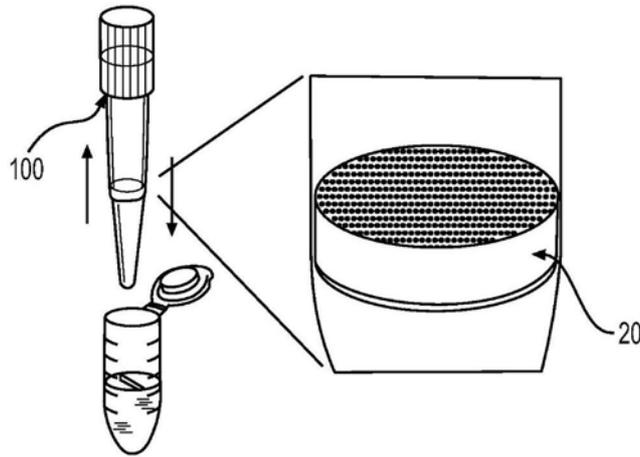


图2D

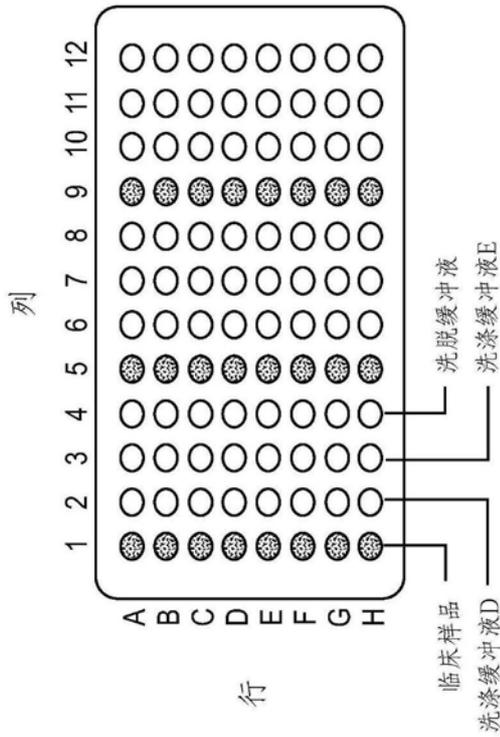


图3A

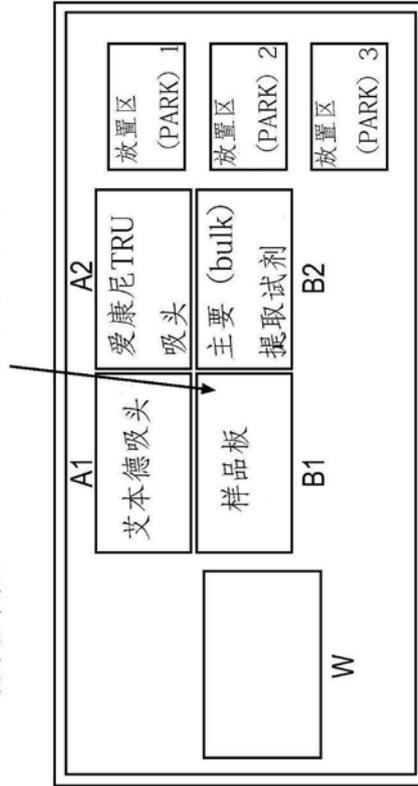


图3B

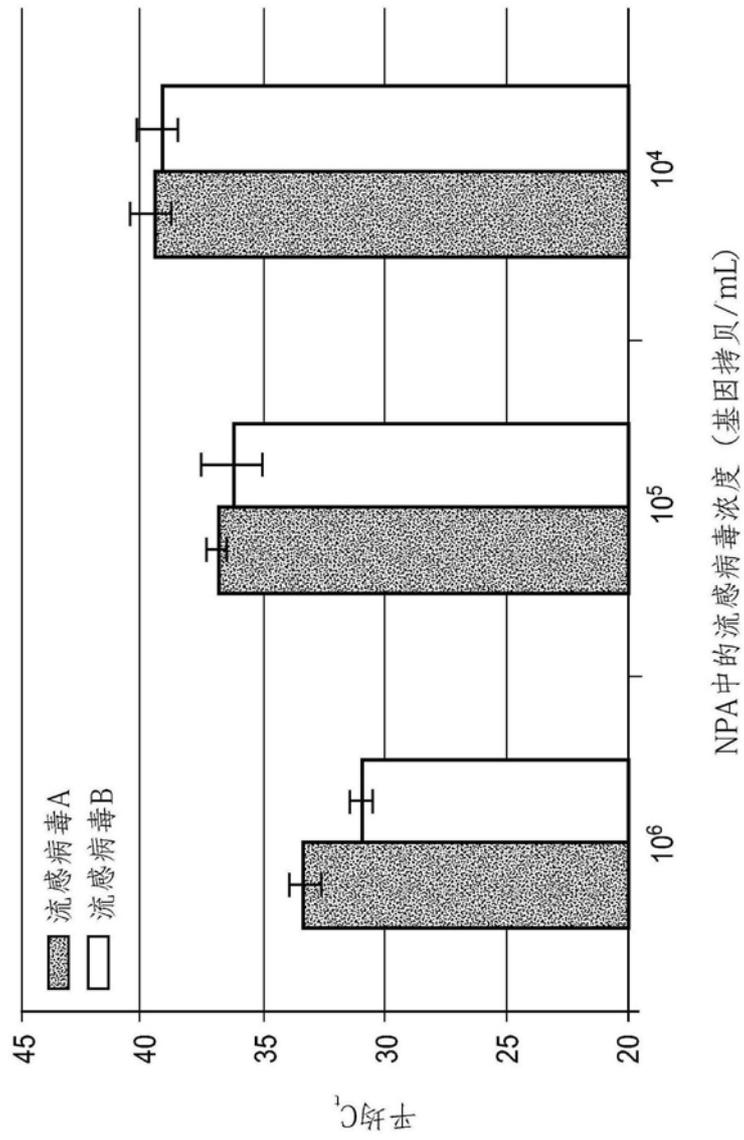


图4

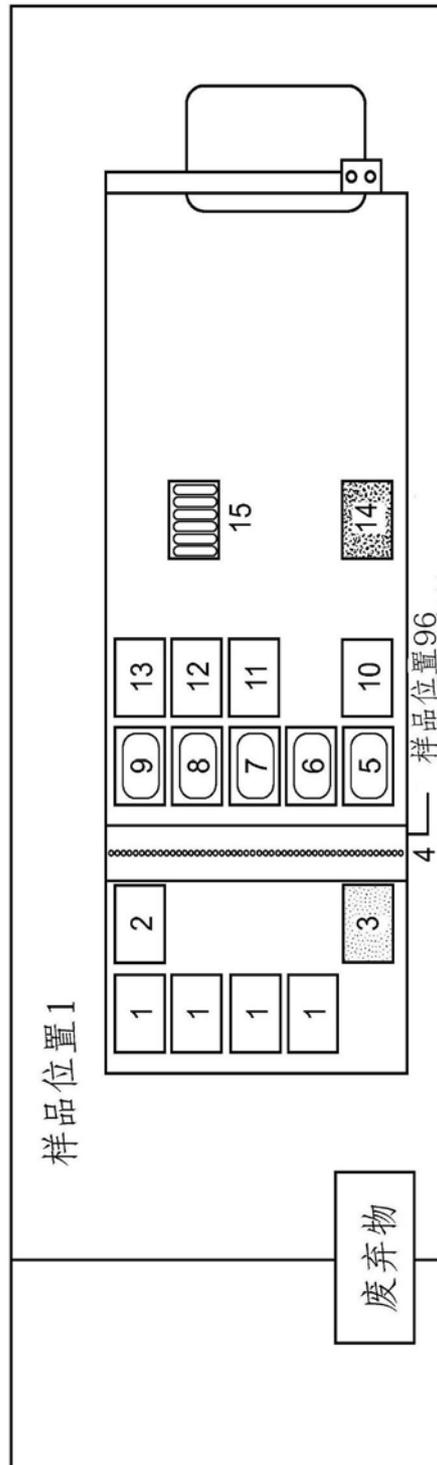


图5

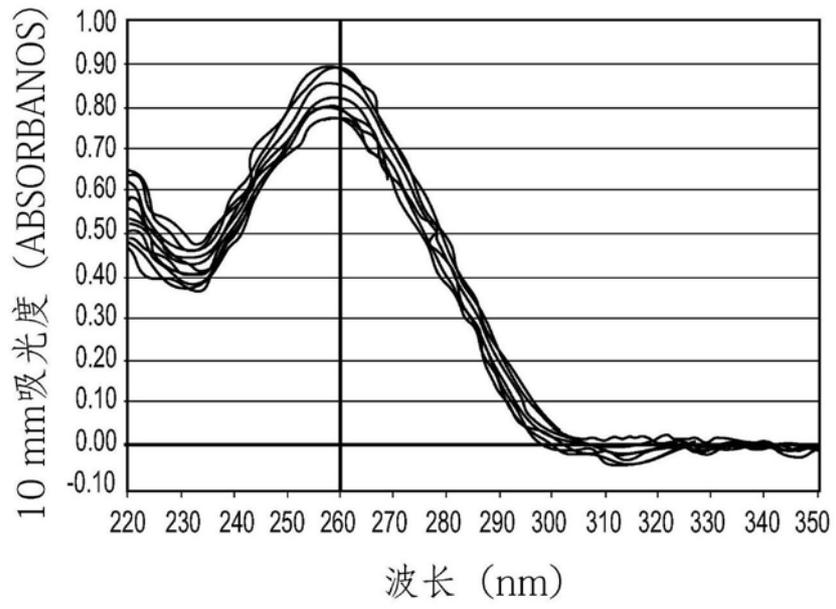


图6A

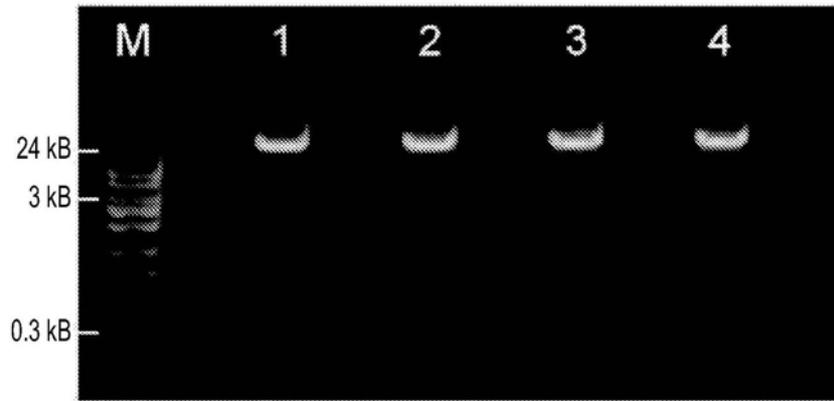


图6B

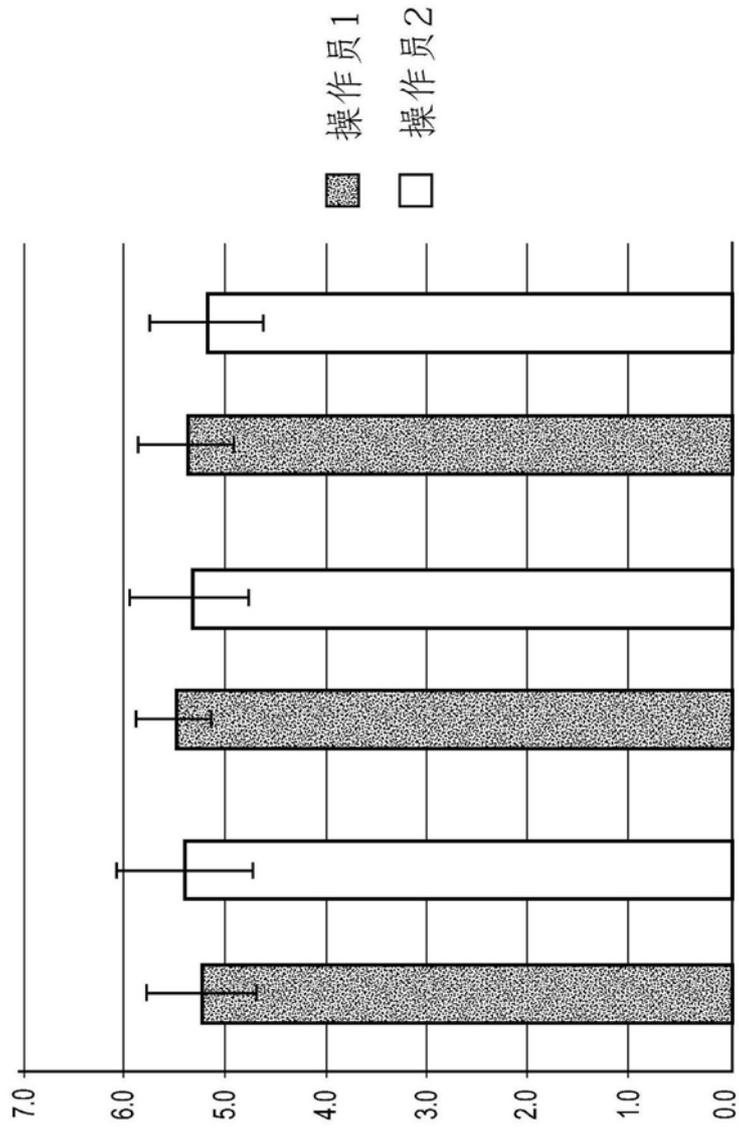


图6C

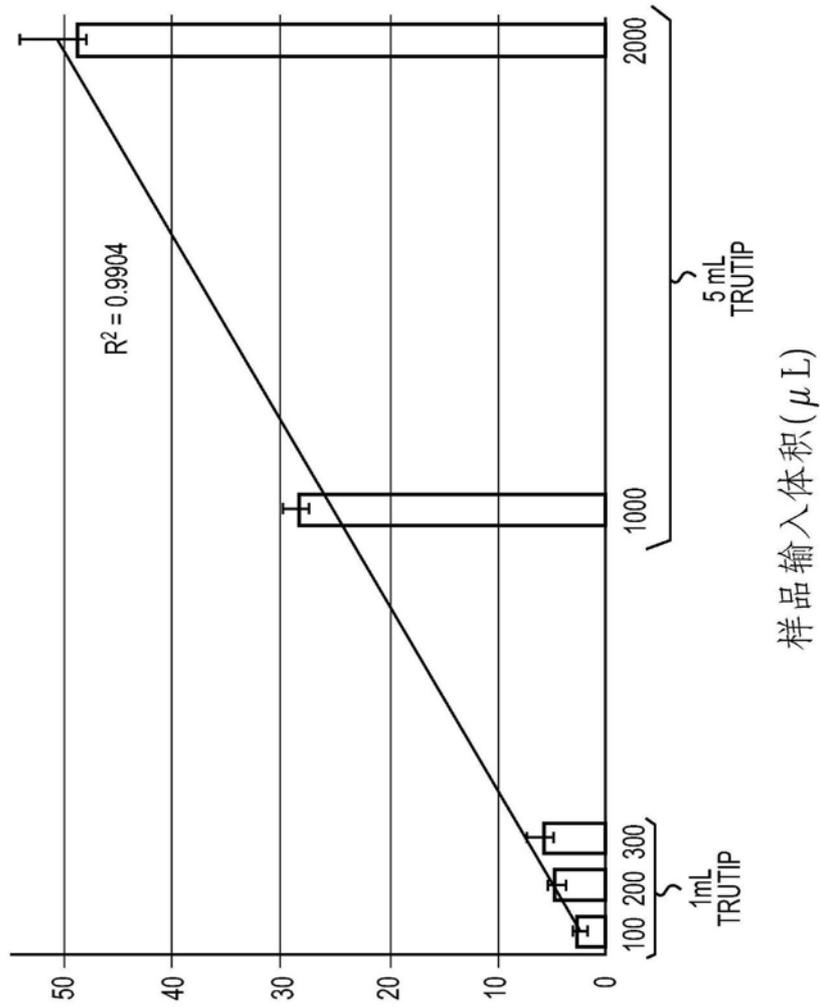


图6D

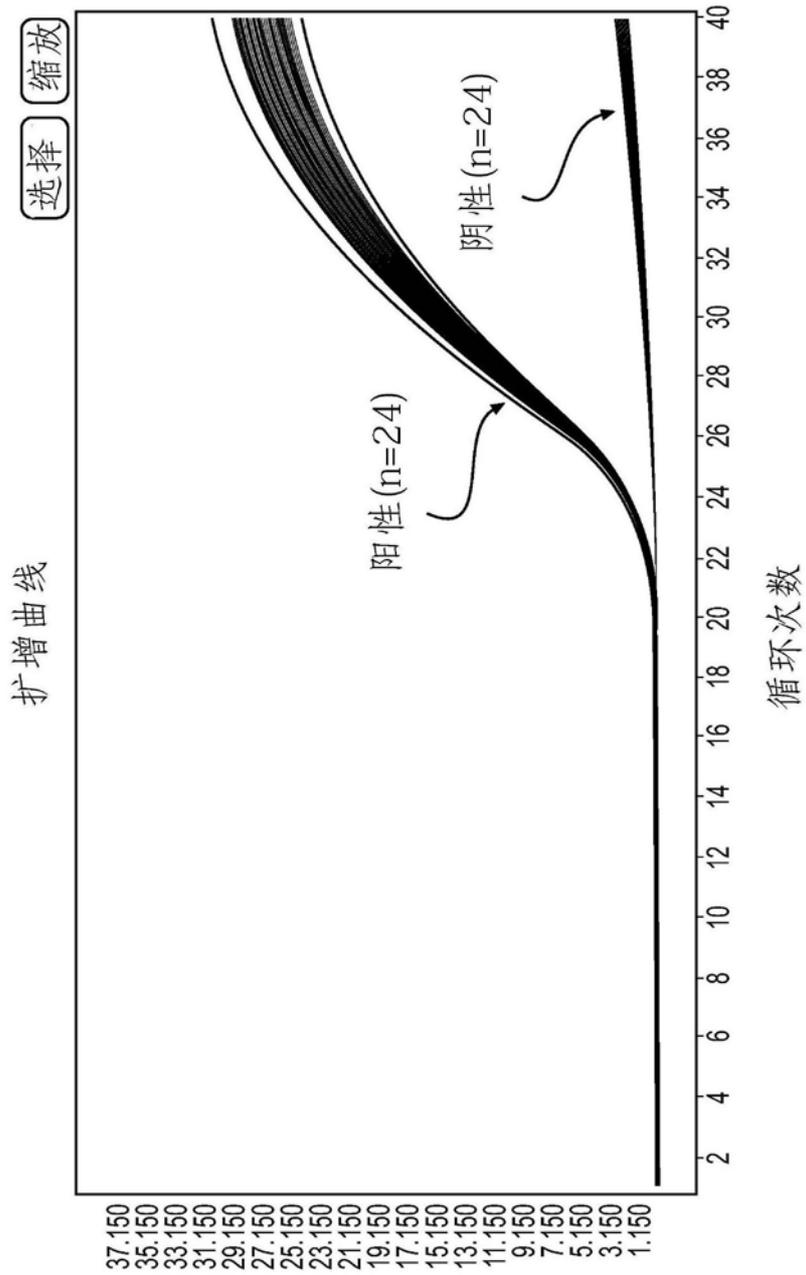


图6E

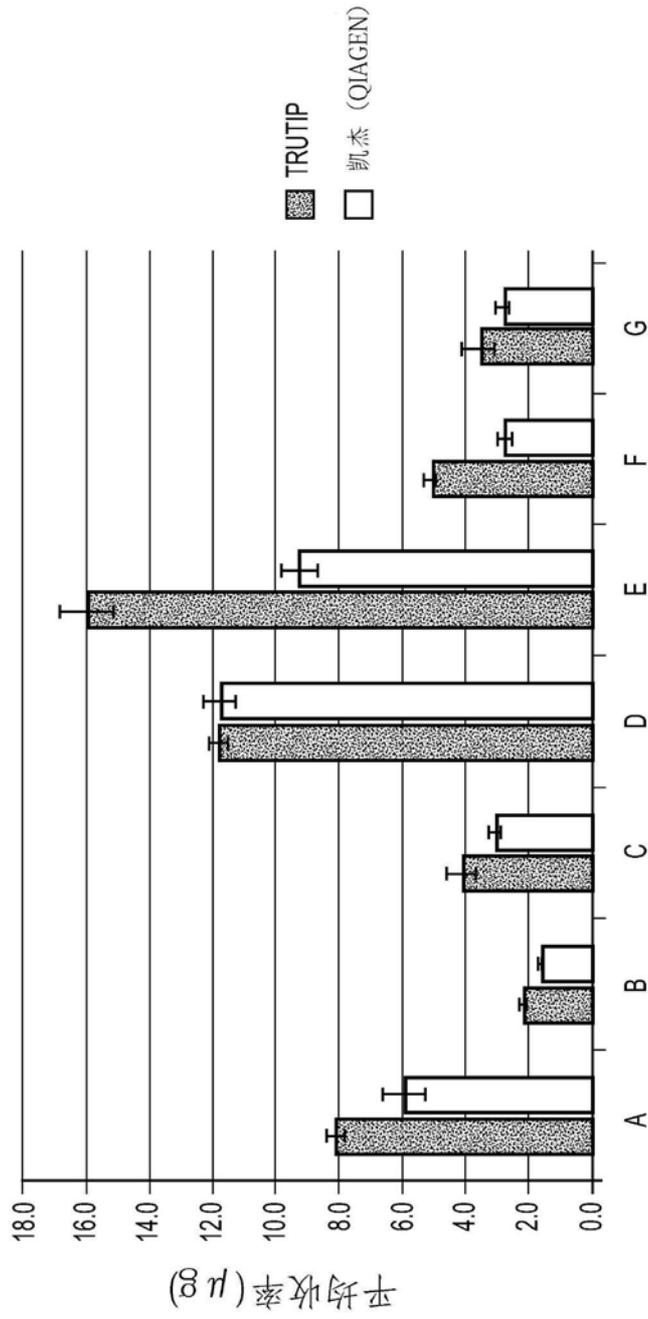


图6F

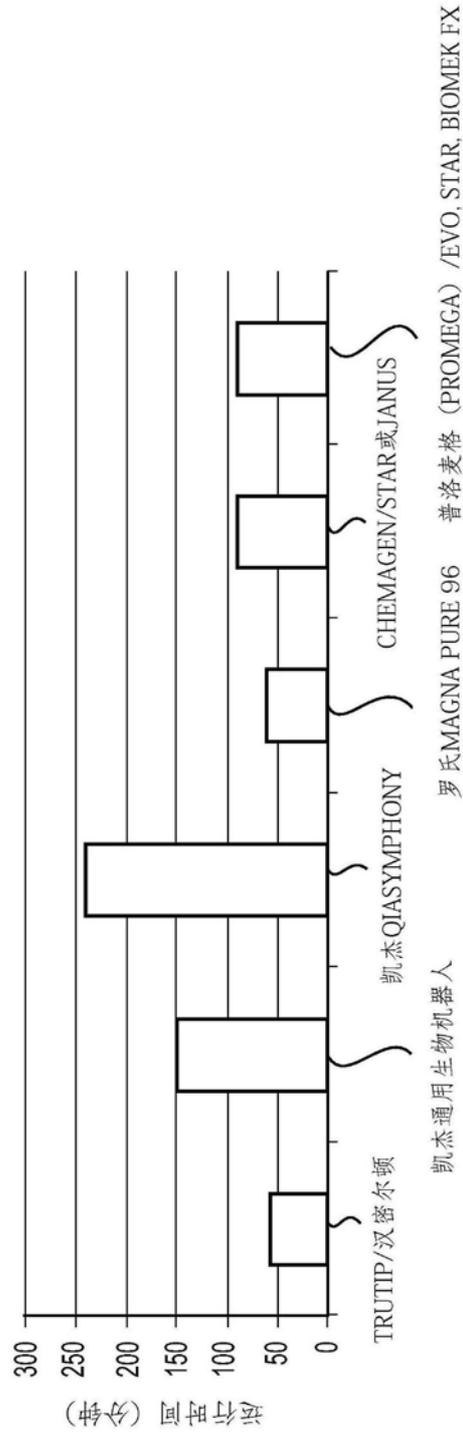


图6G

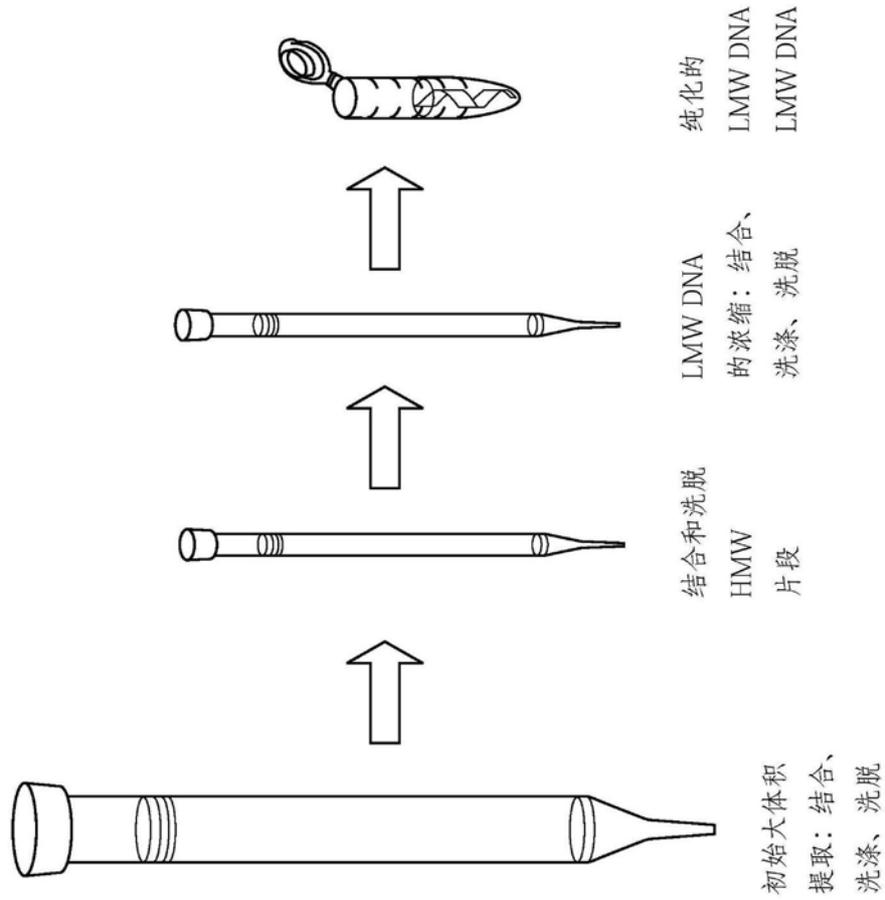


图7

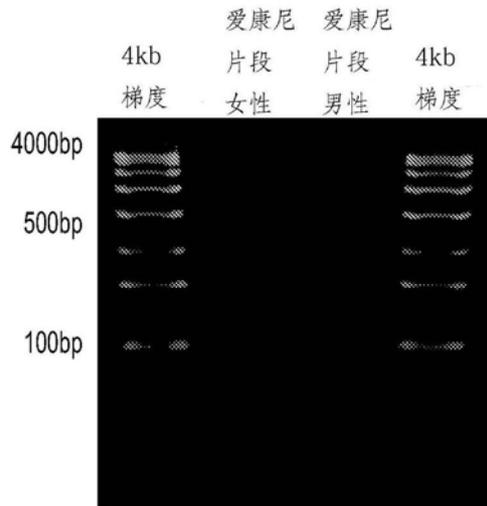


图8A

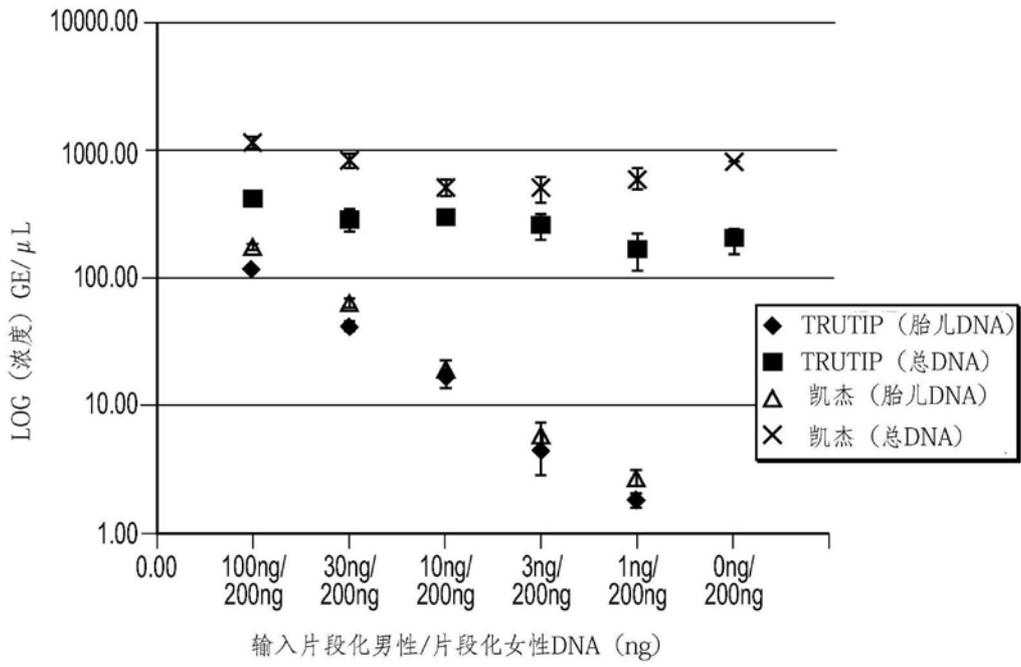


图8B

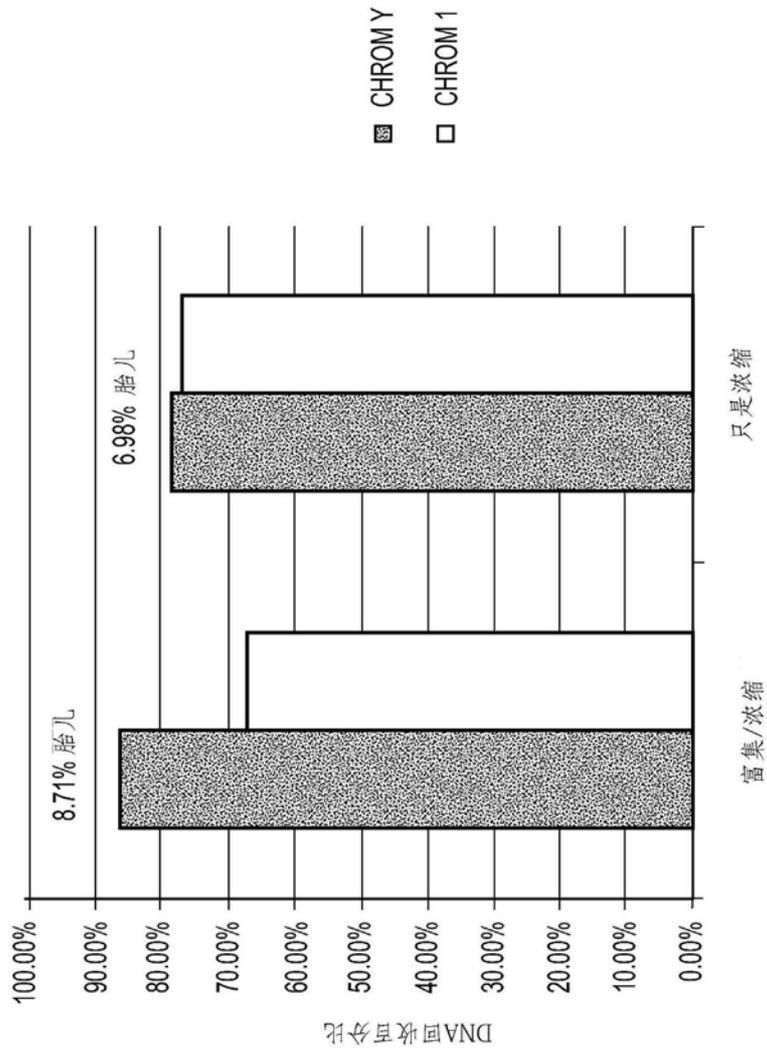


图9

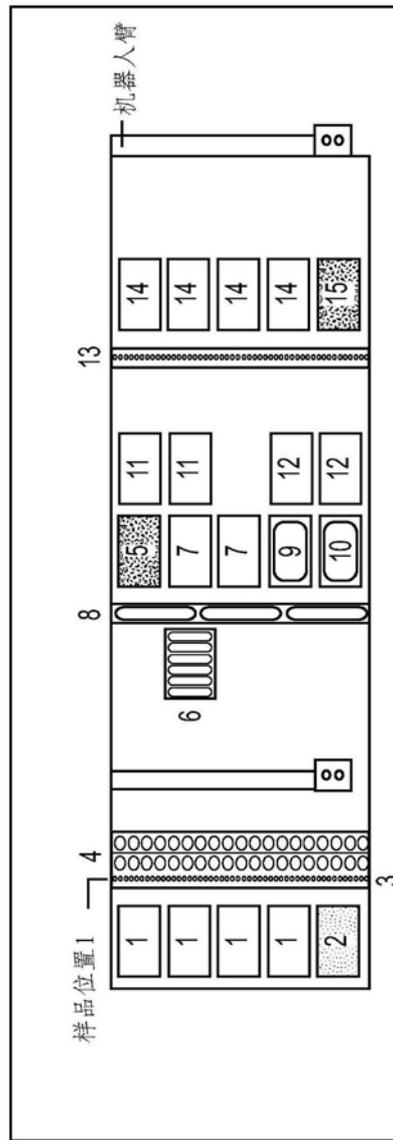


图10A

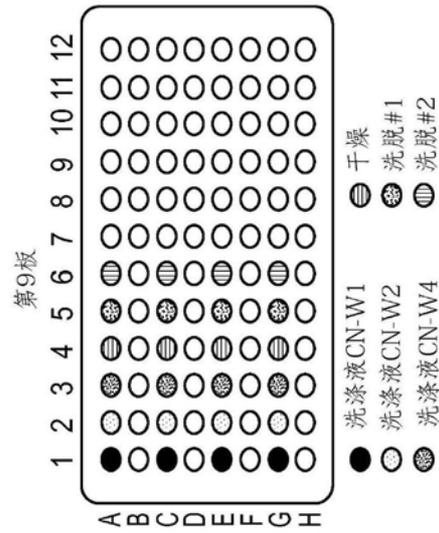


图10B

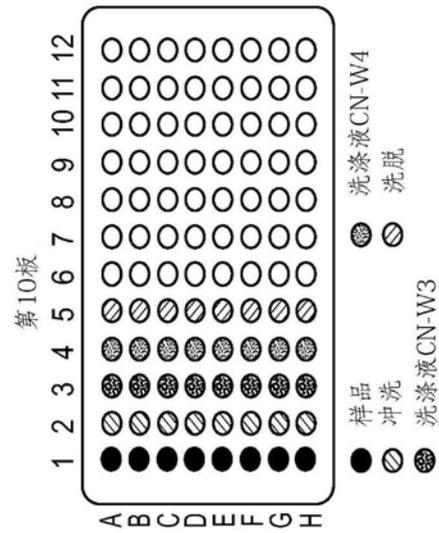


图10C

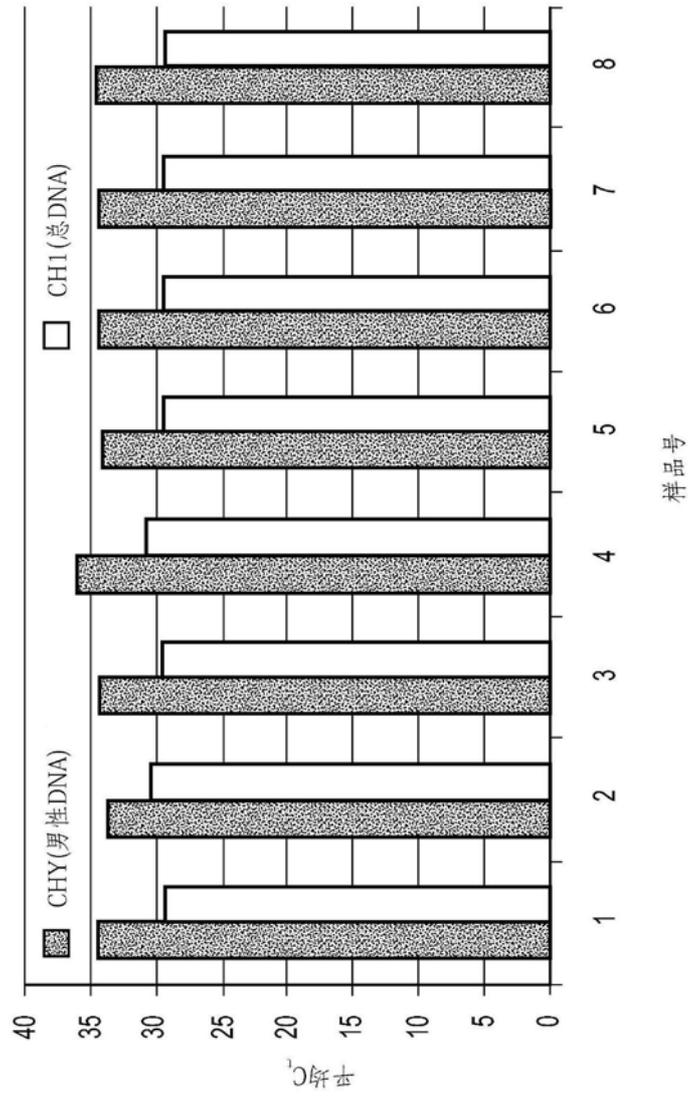


图11A

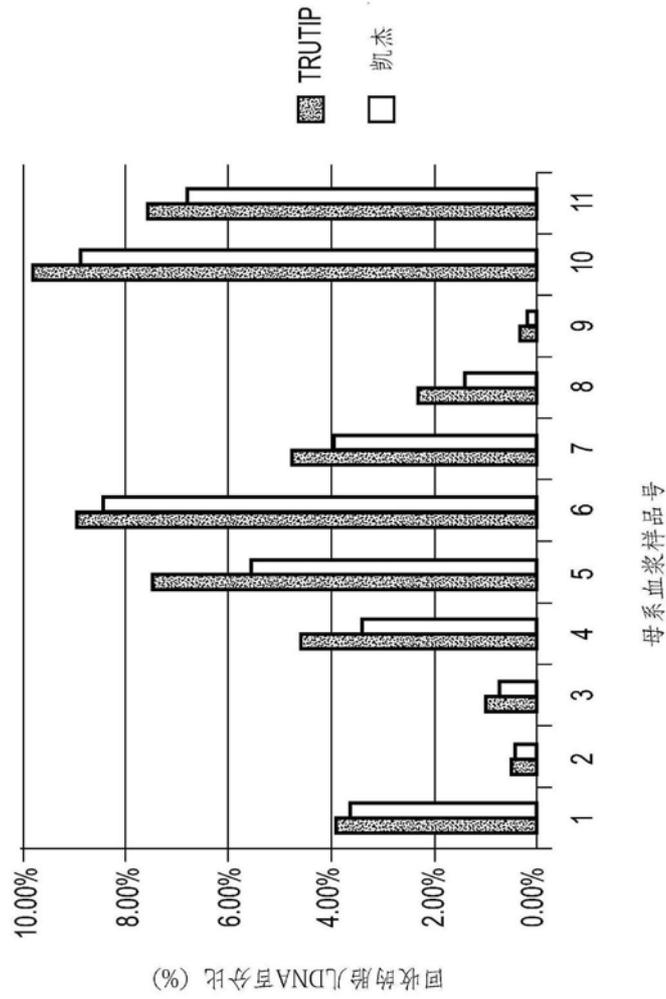


图11B