



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102046793 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 200980120902.6
 (22)申请日 2009.05.25
 (30)优先权数据
 102008026058.4 2008.05.30 DE
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2010.11.29
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2009/056268 2009.05.25
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02009/144182 DE 2009.12.03
 (73)专利权人 恰根有限公司
 地址 德国希尔登
 (72)发明人 R·法比斯 A·霍曼-维施沁斯基
 T·沃斯 T·汉斯勒
 (74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
 司 31100
 代理人 陶家蓉 张静

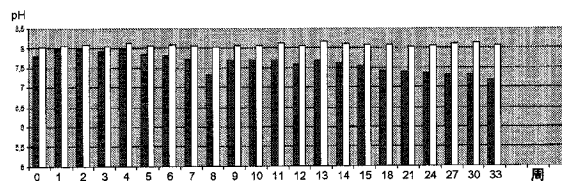
(51)Int.Cl.
 C12N 15/10(2006.01)
 C12Q 1/68(2006.01)
 (56)对比文件
 AU 2005277527 A1,2006.03.02,
 US 2006147944 A1,2006.07.06,
 CN 101017140 A,2007.08.15,
 Fredrik Johansson et al..Brij 58,a
 polyoxyethylene acyl ether,creates
 membrane vesicles of uniform sidedness.A
 new tool to obtain inside-out(cytoplasmic
 side-out) plasma membrane vesicles.《The
 plant journal》.1995,第7卷(第1期),165-173.

审查员 李肖堃

权利要求书2页 说明书15页 附图2页

(54)发明名称
 用于分离和/或纯化核酸的裂解、结合和/或
 洗涤试剂

(57)摘要
 本发明提供了一种用于分离和/或纯化核酸
 的裂解、结合和/或洗涤试剂以及分离和/或纯化
 核酸的方法。



1. 一种裂解、结合和/或洗涤试剂,其是水溶液, $\text{pH} \geq 6$ 至 ≤ 9 , 包含:
 - 至少一种离液化合物,所述离液化合物是胍盐;
 - 至少一种缓冲化合物,所述缓冲化合物是为水溶液提供缓冲或 pH 稳定作用的化合物,和
 - 聚氧乙烯脂肪醇醚,所述聚氧乙烯脂肪醇醚选自聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯硬脂基醚和聚氧乙烯油基醚,以所述试剂的总体积计,其用量从 $\geq 8\%$ 重量/体积到 $\leq 30\%$ 重量/体积。
2. 如权利要求1所述的裂解、结合和/或洗涤试剂,其特征在于,所述缓冲化合物选自:三(羟甲基)氨基甲烷、N-(三(羟甲基)甲基)甘氨酸、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸、3-(N-吗啉代)丙磺酸、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)、哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸)、N-环己基-2-氨基乙磺酸、2-(N-吗啉代)乙磺酸和/或磷酸盐缓冲剂。
3. 如权利要求1所述的裂解、结合和/或洗涤试剂,其特征在于,所述聚氧乙烯脂肪醇醚具有2-150个 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})$ 单元的聚氧乙烯部分。
4. 如权利要求1所述的裂解、结合和/或洗涤试剂,其中,所述聚氧乙烯脂肪醇醚是聚氧乙烯鲸蜡基醚。
5. 如权利要求1所述的裂解、结合和/或洗涤试剂,其特征在于,所述裂解、结合和/或洗涤试剂包含的所述聚氧乙烯脂肪醇醚不是聚氧乙烯月桂基醚。
6. 如权利要求1所述的裂解、结合和/或洗涤试剂,其特征在于,所述的裂解、结合和/或洗涤试剂包含的所述聚氧乙烯脂肪醇醚以所述试剂的总体积计,其用量 $\geq 10\%$ 重量/体积至 $\leq 30\%$ 重量/体积。
7. 如权利要求6所述的裂解、结合和/或洗涤试剂,其特征在于,所述的裂解、结合和/或洗涤试剂包含的所述聚氧乙烯脂肪醇醚以所述试剂的总体积计,其用量是 $\geq 15\%$ 重量/体积至 $\leq 20\%$ 重量/体积。
8. 如权利要求1中所述裂解、结合和/或洗涤试剂,其特征在于,所述胍盐选自:盐酸胍、硫氰酸胍、异硫氰酸胍和/或其中两种或更多种盐的混合物。
9. 如权利要求1中所述的裂解、结合和/或洗涤试剂,其特征在于,所述结合试剂包含支化或非支化的链烷醇。
10. 如权利要求9所述的裂解、结合和/或洗涤试剂,所述结合试剂包含具有1-5个碳原子的支化或非支化的链烷醇。
11. 如权利要求1所述的裂解、结合和/或洗涤试剂,所述结合试剂选自:甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、正丁醇、支化或非支化丁醇或戊醇和/或它们的混合物。
12. 如权利要求1中所述的裂解、结合和/或洗涤试剂在分离和/或纯化核酸中的应用。
13. 一种从含核酸的生物样品分离和/或纯化核酸的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a) 裂解生物样品,
 - b) 在离液化合物和/或支化或非支化链烷醇的存在下,将释放的核酸固定到基于一种或多种氧化硅化合物的基质上,
 - c) 任选地洗涤固定在基质上的核酸,
 - d) 任选地去除结合的核酸,其中,裂解和/或固定在包含以下组分的裂解和/或结合组合物存在下进行:

-至少一种离液化合物,所述离液化合物是胍盐,和

-聚氧乙烯脂肪醇醚,所述聚氧乙烯脂肪醇醚选自聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯硬脂基醚和聚氧乙烯油基醚,以组合物的总体积计,用量从 $\geq 0.1\%$ 重量/体积至 $\leq 50\%$ 重量/体积。

14.如权利要求13所述的方法,其特征在于,所述聚氧乙烯脂肪醇醚具有2-150个(CH₂CH₂O)单元的聚氧乙烯部分。

15.如权利要求13所述的方法,其特征在于,所述聚氧乙烯脂肪醇醚是聚氧乙烯鲸蜡基醚。

16.如权利要求13所述的方法,其特征在于,所述聚氧乙烯脂肪醇醚不是聚氧乙烯月桂基醚。

17.如权利要求13所述的方法,其特征在于,所述裂解和/或结合组合物包含的聚氧乙烯脂肪醇醚以所述裂解和/或结合组合物的总体积计,其用量 $\geq 3\%$ 重量/体积至 $\leq 30\%$ 重量/体积。

18.如权利要求17所述的方法,其特征在于,所述裂解和/或结合组合物包含的聚氧乙烯脂肪醇醚以所述裂解和/或结合组合物的总体积计,其用量是 $\geq 3.2\%$ 重量/体积至 $\leq 10\%$ 重量/体积。

19.一种从含核酸的生物样品分离和/或纯化核酸的试剂盒,该试剂盒包含如权利要求1所述的裂解、结合和/或洗涤试剂。

20.聚氧乙烯脂肪醇醚在溶解生物样品的脂质中的应用,所述聚氧乙烯脂肪醇醚选自聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚。

21.如权利要求20所述的用途,其特征在于,所述聚氧乙烯脂肪醇醚是聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚(Brij58)。

22.聚氧乙烯脂肪醇醚在制备储存稳定的结合、裂解和/或洗涤试剂中的应用,所述聚氧乙烯脂肪醇醚选自聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚。

23.如权利要求22所述的用途,其特征在于,所述聚氧乙烯脂肪醇醚是聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚(Brij58)。

用于分离和/或纯化核酸的裂解、结合和/或洗涤试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及用于分离和/或纯化核酸的裂解、结合和/或洗涤试剂及其方法。所述裂解、结合和/或洗涤试剂及方法尤其适用于分子诊断学目的。

[0002] 发明背景

[0003] 现有技术已经揭示了从细胞、细胞培养物或病毒培养物分离和/或纯化核酸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)的多种方法。

[0004] 在该方面,手动进行的用于分离核酸的许多“经典”方法是一步方法,包括在加入水性缓冲剂和有机萃取剂之后进行萃取。核酸保留在水相中,可在去除包含不良伴随物质的有机相之后分离得到。

[0005] 这些方法首先使用正常无害的有机萃取剂如氯仿或苯酚,然后水溶性污染物保留在包含核酸的水相中并且需要进一步的纯化步骤去除。

[0006] 因此,本领域的替代方法获得的重视,该方法基于使核酸选择性吸附到固体、主要是矿物支持体如二氧化硅上。结合原则是基于在“离液盐”和/或醇的影响下,核酸与二氧化硅表面的可逆结合。在多步方法中,将各种溶液或混合物,通常是裂解、结合、洗涤和/或洗脱溶液或混合物加入含核酸的样品中,并且在最后的方法步骤中,将纯化的核酸从在结合步骤中刚刚加入的支持体上洗脱下来。

[0007] 两种方法的基本原则基于在第一步中裂解的细胞,尤其是植物、动物、人、细菌和病毒细胞。为此,首先将细胞与破坏细胞的裂解缓冲液一起孵育。

[0008] 现有技术揭示了用于裂解生物样品细胞材料的缓冲剂和方法。已知的裂解缓冲剂常常包含表面活性剂聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温®20)。使用该表面活性剂是为了将细胞裂解期间的污染转化为可溶或者稳定化状态,将它们从核酸中去除。不幸的是,包含聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温®20)的裂解缓冲剂储存不稳定。例如,pH降低。一个具体的缺点在于,如果使用这些裂解缓冲剂,则储存后分离的核酸的产量降低。另一个缺点在于,包含核酸的洗脱液不透明,表明存在可能干扰分离核酸的进一步应用的污染。

[0009] 因此,本发明的目的是提供克服至少一种上述现有技术的缺点的方法,该方法具有尽可能优异或更好的裂解、结合和/或洗涤性质。

[0010] 如权利要求1所述的裂解、结合和/或洗涤试剂实现的本发明的目的。因此,提供了一种裂解、结合和/或洗涤试剂,其包含:

[0011] -至少一种离液化合物,

[0012] -至少一种缓冲化合物,优选选自:三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、N-(三(羟甲基)甲基)甘氨酸(TRICINE)、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸(BICINE)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸)(PIPES)、N-环己基-2-氨基乙磺酸(CHES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)和/或磷酸盐缓冲剂,和

[0013] -至少一种基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂,选自聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,以试剂的总体积计,其用量从 $\geq 8\%$ 重量/体积到 $\leq 50\%$ 重量/体积。

[0014] 出于本发明的目的,术语“裂解、结合和/或洗涤试剂”表示裂解试剂、结合试剂或洗涤试剂的试剂,或者可用作裂解试剂也可用作结合试剂也可用作洗涤试剂的试剂。更具体说,出于本发明的目的,术语“裂解、结合和/或洗涤试剂”也可表示本发明的裂解试剂、结合试剂和/或洗涤试剂的混合物。

[0015] 出于本发明的目的,术语“试剂”表示裂解、结合和/或洗涤试剂。

[0016] 出于本发明的目的,术语“离液化合物”表示以变性方式作用于蛋白质的化合物,具体是破坏基于氢键形成的液态水的常规结构。

[0017] 出于本发明的目的,术语“缓冲化合物”表示可以为水溶液提供缓冲或pH稳定作用的化合物。

[0018] 出于本发明的目的,术语“磷酸盐缓冲剂”表示磷酸盐,例如磷酸二氢盐如磷酸二氢钾(KH_2PO_4)或磷酸二氢钠(NaH_2PO_4),和磷酸氢盐如磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)或磷酸氢二钾。类似地,可使用磷酸盐的混合物。另一种常用的磷酸盐缓冲剂是包含氯化钠、 Na_2HPO_4 、氯化钾和 KH_2PO_4 的PBS(磷酸盐缓冲盐水)。

[0019] 出于本发明的目的,术语“核酸”表示但不限于:天然,优选分离的、线性、支化或环状核酸如RNA,具体是mRNA、siRNA、miRNA、snRNA、tRNA、hnRNA或核酶,DNA,质粒DNA等,合成或修饰的核酸,体外转录物,例如寡核苷酸,更具体是引物、探针或PCR可用的标准品,地高辛配基(digoxigenin)、生物素或荧光染料标记的核酸,甲基化核酸或“PNA”(“肽核酸”)。

[0020] 出于本发明的目的,术语“表面活性剂”表示界面活性和/或表面活性物质。

[0021] 出于本发明的目的,术语“脂肪醇”表示链长6-22个碳原子,优选8-20个碳原子,优选10-18个碳原子,更优选12-18个碳原子的醇。尤其优选具有12、14、16或18个碳原子的醇。虽然脂肪醇可以是单或多不饱和的,它们优选是饱和脂肪醇。

[0022] 出于本发明的目的,“聚氧乙烯”表示 $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 单元, n 优选是2-150的整数,更优选4-120,甚至更优选8-80,最优选是选自下组的整数:2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149和150。

[0023] 出于本发明的目的,“聚氧丙烯”表示 $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 单元, n 优选是10-90的整数,更优选20-80,甚至更优选30-70,最优选 n 是选自下组的整数:10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89和90。

[0024] 出于本发明的目的,信息“%重量/体积”、“%(重量/体积)”或“%(w/v)”表示例如每100毫升的试剂或组合物中表面活性剂的克数的信息。

[0025] 意外地,发现本发明的裂解、结合和/或洗涤试剂在储存期间具有改良的稳定性。因此,例如,本发明的裂解、结合和/或洗涤试剂在室温下储存3个月,优选6个月,更优选至

少8个月具有稳定的pH。更具体说,在升高的温度下,例如在50°C储存几周,优选几个月,本发明的裂解、结合和/或洗涤试剂也可具有稳定的pH。

[0026] 这对于裂解、结合和/或洗涤试剂是有益的,因为怀疑pH不稳定可能与分离后获得的包含核酸的洗脱液中污染的发生有关。

[0027] 根据本发明,优选的基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂是聚氧乙烯脂肪醇醚。

[0028] 合适的聚氧乙烯脂肪醇醚的例子是聚乙氧基化月桂基、鲸蜡基、油基或硬脂基醇,它们可以单独使用或作为混合物使用。

[0029] 根据本发明优选的实施方式,聚氧乙烯脂肪醇醚包括具有6-22个碳原子的脂肪醇部分和具有2-150个(CH₂CH₂O)单元的聚氧乙烯部分。

[0030] 根据本发明一个尤其优选的实施方式,聚氧乙烯脂肪醇醚选自:聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚,聚氧乙烯硬脂基醚,和/或聚氧乙烯油基醚。

[0031] 基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂,特别是聚氧乙烯脂肪醇醚对于本发明内的广泛应用是有益的。具体是在包含优选选自下组的缓冲化合物的裂解、结合和/或洗涤试剂中观察到改善的储存稳定性,这些缓冲组分优选选自:三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、N-(三(羟甲基)甲基)甘氨酸(TRICINE)、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸(BICINE)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸)(PIPES)、N-环己基-2-氨基乙磺酸(CHES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)和/或磷酸盐缓冲剂。

[0032] 发现以裂解、结合和/或洗涤试剂的总体积计,基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂含量在≥8%(重量/体积)到≤50%(重量/体积)的范围内,本发明的裂解、结合和/或洗涤试剂尤其具有有益效果,所述基于聚氧乙烯的非离子表面活性剂选自:聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。

[0033] 如果使用表面活性剂的混合物,以试剂的总体积计,浓度信息优选表面活性剂总含量,例如从≥8%(重量/体积)到≤50%(重量/体积)。

[0034] 这对于本发明的裂解试剂尤其有益。

[0035] 优选的聚氧乙烯脂肪醇醚是乙氧基化月桂基、鲸蜡基、油基或硬脂基醇,选自:聚氧乙烯月桂基醚,聚氧乙烯鲸蜡基醚,聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚。

[0036] 优选的聚氧乙烯脂肪醇醚选自下组:聚氧乙烯(4)月桂基醚、聚氧乙烯(23)月桂基醚、聚氧乙烯(2)鲸蜡基醚、聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚、聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚、聚氧乙烯(2)硬脂基醚、聚氧乙烯(10)硬脂基醚、聚氧乙烯(20)硬脂基醚、聚氧乙烯(2)油基醚、聚氧乙烯(10)油基醚、聚氧乙烯(20)油基醚和/或聚氧乙烯(100)硬脂基醚。数字表述环氧乙烷单元的平均数量。

[0037] 尤其适合本发明的是例如由ICI表面活性剂公司(ICI Surfactants)以商品名Brij®销售的聚氧乙烯脂肪醇醚。

[0038] 合适的聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯油基醚或聚氧乙烯硬脂基醚的例子优选选自:聚氧乙烯(4)月桂基醚(Brij®30)、聚氧乙烯(23)月桂基醚(Brij®35)、聚氧乙烯(2)鲸蜡基醚(Brij®52)、聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚(Brij®56)、聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚(Brij®58)、聚氧乙烯(2)硬脂基醚(Brij®72)、聚氧乙烯(10)硬脂基醚(Brij®76)、聚氧乙烯(20)硬脂基醚(Brij®78)、聚氧乙烯(2)油基醚(Brij®92)、聚氧乙烯(10)油基醚(Brij®97)、聚氧乙烯(20)油基醚(Brij®98)和/或聚氧乙烯(100)硬脂基醚(Brij®

700)。

[0039] 合适的聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯油基醚或聚氧乙烯硬脂基醚也可以粉末形式使用,例如聚氧乙烯(21)硬脂基醚粉末Brij®721P)。

[0040] 本发明裂解、结合和/或洗涤试剂的另一个优点在于,用于分离和/或纯化核酸时,裂解、结合和/或洗涤试剂显示始终如一的分离核酸的优良产量,即使裂解、结合和/或洗涤试剂已在室温或在升高的温度下(例如最高达50°C)储存几周或者几个月,而现有技术的缓冲剂,尤其是包含吐温®20的缓冲剂在储存后显示核酸产量较低。

[0041] 使用本发明裂解、结合和/或洗涤试剂的一个具体优点在于,即使储存几周或几个月后,包含核酸的洗脱液不会混浊或者仅稍许混浊。因此,洗脱液不含污染物或者至少明显较少的污染物的优点使得包含核酸的洗脱液的进一步应用显著更加有益,因为可省去降低核酸产量的耗时的进一步纯化步骤。次优选包含聚氧乙烯月桂醇醚,例如聚氧乙烯(4)月桂基醚(Brij®30)或聚氧乙烯(23)月桂基醚(Brij®35)的裂解、结合和/或洗涤试剂。因此,在优选实施方式中,裂解、结合和/或洗涤试剂不含任何这些物质。在尤其优选的实施方式中,裂解、结合和/或洗涤试剂的聚氧乙烯脂肪醇醚不是聚氧乙烯月桂基醚。

[0042] 在本发明一优选的实施方式中,聚氧乙烯脂肪醇醚选自:聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚。

[0043] 优选聚氧乙烯鲸蜡醇醚、聚氧乙烯油醇醚或聚氧乙烯硬脂醇醚,选自:聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚(Brij®56)、聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚(Brij®58)、聚氧乙烯(20)硬脂基醚(Brij®78)和/或聚氧乙烯(20)油基醚(Brij®98)。

[0044] 尤其优选聚氧乙烯鲸蜡醇醚或聚氧乙烯油醇醚,优选选自:聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚(Brij®56)、聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚(Brij®58)和/或聚氧乙烯(20)油基醚(Brij®98)。

[0045] 更具体说,通过比较,本发明包含聚氧乙烯脂肪醇醚,具体是聚氧乙烯鲸蜡醇醚或聚氧乙烯油醇醚的裂解、结合和/或洗涤试剂具有尤其优良的分离核酸,特别是病毒DNA的产量。更具体说,与包含吐温®20的裂解缓冲剂相比,使用新鲜制备的包含聚氧乙烯鲸蜡醇醚的裂解和/或结合试剂以及在50°C储存几周、甚至几个月后使用来分离乙型肝炎病毒(HBV),均意外地发现产生显著升高的病毒DNA产量。这具体提供了本发明裂解和/或结合试剂的特别优点,因为已知乙型肝炎病毒(HBV)难以裂解。本发明的裂解试剂尤其适用于分离病毒DNA。

[0046] 而且,合适的有聚乙氧基化月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇或油醇,它们分别以INCI名称月桂醇聚醚(laureth)、鲸蜡醇聚醚(ceteth)、硬脂醇聚醚(steareth)或油酰基醇聚醚(oleth)可得。

[0047] 尤其合适的乙氧基化十二烷醇、月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇或油醇的例子可以选自下组的名称获得:月桂醇聚醚-9、月桂醇聚醚-4、月桂醇聚醚-23、鲸蜡醇聚醚-2、鲸蜡醇聚醚-20、硬脂醇聚醚-2、硬脂醇聚醚-10、硬脂醇聚醚-20、油酰基醇聚醚-2、油酰基醇聚醚-10和/或油酰基醇聚醚-20。

[0048] 进一步优选的基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂是聚氧乙烯烷基苯基醚。优选的聚氧乙烯烷基苯基醚具有包含5-15个碳原子、优选6-10个碳原子的烷基。更优选支化或非支化C₇-至C₁₀-烷基,更优选支化或非支化C₈-和C₉-烷基,更优选异辛基和壬基。

[0049] 在本发明一优选的实施方式中,聚氧乙烯烷基苯基醚选自:聚氧乙烯壬基苯基醚

和/或聚氧乙烯异辛基苯基醚。合适的聚氧乙烯壬基苯基醚和聚氧乙烯异辛基苯基醚例如以商品名Igepal®从巴斯夫公司(BASF)获得。

[0050] 合适的聚氧乙烯壬基苯基醚和聚氧乙烯异辛基苯基醚的例子优选选自:聚氧乙烯(2)壬基苯基醚(Igepal®C0-210)、聚氧乙烯(2)异辛基苯基醚(Igepal®CA-210)、聚氧乙烯(5)壬基苯基醚(Igepal®C0-520)、聚氧乙烯(5)异辛基苯基醚(Igepal®CA-520)、聚氧乙烯(9)壬基苯基醚(Igepal®C0-630)、聚氧乙烯(9)异辛基苯基醚(Igepal®CA-630)、聚氧乙烯(12)壬基苯基醚(Igepal®C0-720)、聚氧乙烯(12)异辛基苯基醚(Igepal®CA-720)和/或聚氧乙烯(100)壬基苯基醚(Igepal®C0-990)。

[0051] 更优选的基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂是聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物也称为“泊洛沙姆”。优选经验公式 $H_0(C_2H_4O)_a(C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_aH$ 的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,其中“a”表示聚氧乙烯单元的数目,“b”表示聚氧丙烯单元的数目,a/b重量比优选在0.1至3的范围内。

[0052] “a”更优选为2-150,优选4-120,更优选8-80,甚至更优选“a”是选自下组的整数:2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149和150,最优选“a”是选自2、4、10、20、23、40、55、70和100的整数。

[0053] “b”更优选为10-90,优选20-80,更优选30-70,甚至更优选“b”是选自下组的整数:10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89和90,最优选“b”是选自15、18、23、40、55、67和75的整数。

[0054] 更优选具有不同长度的聚氧乙烯和聚氧丙烯嵌段的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,其中具有15-67个聚氧丙烯单元的聚氧丙烯嵌段被各自相互独立具有2-130个聚氧乙烯单元的两个聚氧乙烯嵌段所包围。

[0055] 合适的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物可以商品名Pluronic®或Synperonic®例如从巴斯夫公司获得。

[0056] 合适的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物的例子优选选自:Pluronic®PE6200、Pluronic®PE6400、Pluronic®PE6800、Pluronic®PE10300、Pluronic®PE10500、Pluronic®F127、Pluronic®F108、Synperonic®F108、Synperonic®F127和/或Synperonic®F68。

[0057] 根据本发明一优选的实施方式,裂解、结合和/或洗涤试剂包含非离子型表面活性剂,以试剂的总体积计,其用量从 $\geq 9\%$ (重量/体积)至 $\leq 40\%$ (重量/体积),优选 $\geq 10\%$ (重量/体积)至 $\leq 30\%$ (重量/体积),优选 $\geq 15\%$ (重量/体积)至 $\leq 20\%$ (重量/体积)。

[0058] 根据本发明一优选的实施方式,离液化合物是钠盐或胍盐,优选选自:碘化钠、高氯酸钠、盐酸胍、硫氰酸胍、异硫氰酸胍和/或两种或更多种盐的混合物。离液化合物优选是

胍盐,优选选自:盐酸胍、硫氰酸胍和/或异硫氰酸胍。

[0059] 具体说,上述离液化合物和基于聚乙烯的非离子型表面活性剂的组合有利于裂解病毒细胞和从病毒细胞分离核酸。

[0060] 离液化合物的合适浓度和用量可根据样品类型或裂解参数而变化,以试剂的总体积计,离液化合物的浓度一般优选 $\geq 0.1M$ 至 $\leq 10M$ 。裂解、结合和/或洗涤试剂中离液化合物的浓度优选 $\geq 0.5M$ 至 $\leq 8M$,优选 $\geq 0.9M$ 至 $\leq 6M$ 。

[0061] 裂解试剂中离液化合物的浓度优选 $\geq 3M$ 至 $\leq 7M$,更优选 $\geq 4M$ 至 $\leq 6M$ 。结合试剂中离液化合物的浓度优选 $\geq 0.5M$ 至 $\leq 7M$,更优选 $\geq 1M$ 至 $\leq 6M$ 。洗涤试剂中离液化合物的浓度优选 $\geq 0.5M$ 至 $\leq 3.5M$,更优选 $\geq 0.9M$ 至 $\leq 3M$ 。

[0062] 根据另一优选的实施方式,裂解、结合和/或洗涤试剂包含至少一种选自下组的缓冲化合物:三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)和/或磷酸盐缓冲剂。

[0063] 根据一尤其优选的实施方式,裂解、结合和/或洗涤试剂包含至少一种选自下组的缓冲化合物:三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)和/或N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)。

[0064] 裂解、结合和/或洗涤试剂优选水溶液。

[0065] 根据进一步优选的实施方式,裂解、结合和/或洗涤试剂的pH从 ≥ 4 至 ≤ 12 ,更优选 ≥ 6 至 ≤ 11 ,优选 ≥ 7 至 ≤ 10 ,更优选 ≥ 8 至 ≤ 9 。

[0066] 在优选实施方式中,裂解、结合和/或洗涤试剂,尤其是裂解试剂还可包含酶,例如裂解酶,具体说,例如蛋白酶K,蛋白酶(例如QIAGEN蛋白酶),消解酶,溶细胞酶,无色肽酶,溶葡萄球菌酶,溶菌酶以及根据应用,核酸酶,例如DNA酶和/或RNA酶。

[0067] 本发明的裂解、结合和/或洗涤试剂可以是裂解试剂,结合试剂或洗涤试剂,或者本发明裂解试剂、结合试剂和/或洗涤试剂的混合物。

[0068] 在离液化合物的存在下,优选支化或非支化链烷醇的存在下,将核酸固定到基于一种或多种二氧化硅化合物的基质上。因此,优选包含至少一种支链或支链链烷醇的结合试剂。

[0069] 优选有用的是具有1-5个碳原子的短链支化或非支化链烷醇。根据本发明一优选的实施方式,支化或非支化链烷醇是具有1-5个碳原子的醇,优选选自:甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、支化或非支化丁醇或戊醇、和/或它们的混合物。

[0070] 除非另有说明,定义“支化或非支化链烷醇”,具体是丙醇、丁醇和戊醇包括任何可消耗的具体基团的异构体形式。因此,例如,支化或非支化丙醇包括正丙醇和异丙醇,支化或非支化丁醇包括异丁醇、仲丁醇和叔丁醇,支化或非支化戊醇包括例如正戊醇和异戊醇。优选使用选自下组的醇:甲醇、乙醇、异丙醇和/或其混合物,尤其优选使用选自下组的醇:乙醇、异丙醇和/或其混合物。

[0071] 根据本发明一优选的实施方式,以结合试剂的总体积计,结合试剂包含体积含量从 $\geq 20\%$ 至 $\leq 80\%$,优选 $\geq 40\%$ 至 $\leq 70\%$,优选 $\geq 50\%$ 至 $\leq 60\%$ 的支化或非支化链烷醇。

[0072] 当涉及体积和/或重量含量时,本领域技术人员容易明白选择各组分的所述体积和/或重量含量,使得组分的总体积或总重量不超过100体积%或100重量%。

[0073] 本发明还涉及本发明裂解、结合和/或洗涤试剂在分离和/或纯化核酸中的应用。

[0074] 本发明还涉及从包含核酸的生物样品分离和/或纯化核酸的方法,该方法包括以下步骤:

[0075] a)裂解生物样品,

[0076] b)在离液化合物和/或支化或非支化链烷醇的存在下,将释放的核酸固定到基于一种或多种二氧化硅化合物的基质上,

[0077] c)任选地洗涤固定在基质上的核酸,

[0078] d)任选地去除结合的核酸,

[0079] 其中,裂解和/或固定在包含以下组分的裂解和/或结合组合物的存在下进行:

[0080] -至少一种离液化合物,和

[0081] -至少一种基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂,选自聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,以组合物的总体积计,用量从 $\geq 0.1\%$ 重量/体积至 $\leq 50\%$ 重量/体积。

[0082] 出于本发明的目的,术语“组合物”表示裂解和/或结合组合物。

[0083] 在本发明方法优选的实施方式中,使用本发明的裂解试剂裂解样品。使裂解试剂与要裂解的生物样品相接触。根据应用,在各时间点相互独立地加入一种或多种酶。样品可以是液态,例如在液态临床样品的情况下。通常,将包含固体组分的临床样品,例如粪便样品或拭子样品,悬浮在合适的水性溶液中,然后进一步分析。通常裂解之前从培养基获取细胞培养物,但大多数情况下避免完全干燥样品。在完全干燥的样品的情况下,例如冻干样品,要先在水性溶液中重建样品再作进一步处理,例如病毒标准品的冻干品。因此需要裂解的样品通常包含一些液体。使样品中存在的液体与裂解试剂相接触。在这方面,用于从样品分离和/或纯化核酸的方法通常涉及包含裂解试剂以及样品的或已经加入所述样品的溶液的其他液体的裂解组合物。

[0084] 出于本发明的目的,术语“裂解和/或结合组合物”表示从样品分离和/或纯化核酸的方法中使用的裂解和/或结合试剂,除裂解、结合和/或洗涤试剂外还可包含液体。裂解和/或结合组合物优选包含本发明的裂解和/或结合试剂。

[0085] 根据所述方法另一优选的实施方式,在本发明结合组合物存在下,使释放的核酸固定到基于一种或多种二氧化硅化合物的基质上。

[0086] 优选使本发明的裂解和/或结合试剂与裂解的样品相接触。在样品与结合试剂接触之前可去除裂解组合物或另一种进行裂解的溶液。优选不去除裂解组合物。优选地,使结合试剂与包含裂解组合物的样品相接触。

[0087] 根据所述方法尤其优选的实施方式,在裂解组合物的存在下进行裂解,在结合组合物的存在下进行固定。因此,固定优选在裂解组合物和结合组合物的混合物的存在下进行。

[0088] 任选地,裂解试剂同时也可用作结合试剂。任选地,结合试剂同时也可用作裂解试剂。任选地,结合试剂也可用作洗涤试剂。

[0089] 裂解和/或结合组合物包含至少一种离液化合物和至少一种基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂,选自聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,以组合物的总体积计,所述基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂从 $\geq 0.1\%$ (重量/体积)至 $\leq 50\%$ (重量/体积)。如果使用表面活性剂的混合物,以组合物的总体积计,

优选表面活性剂总含量例如从 $\geq 0.1\%$ (重量/体积)至 $\leq 50\%$ (重量/体积)。

[0090] 从含核酸的生物样品分离和/或纯化核酸的此类方法的优点在于,如果使用包含至少一种离液化合物和至少一种基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂的裂解和/或结合组合物,即使在室温或升高的温度(例如 50°C)储存几周或者几个月后,包含核酸的洗脱液不会混浊或者仅稍许混浊,所述至少一种基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂选自聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,以组合物的总体积计,用量从 $\geq 0.1\%$ (重量/体积)至 $\leq 50\%$ (重量/体积)。因此,有益地,洗脱液不含污染物或者包含至少明显较少的污染物。这使得该包含核酸的洗脱液的进一步使用显著更加有益,因为省去了降低核酸产量的耗时的进一步纯化步骤。

[0091] 用于从含核酸的生物样品分离和/或纯化核酸的此类方法的另一个优点在于,例如,分离的核酸,特别是病毒DNA,例如乙型肝炎病毒(HBV)DNA的尤其优良产量成为可能。

[0092] “生物样品”可理解为表示基于颗粒或分子的材料,具体是病毒、噬菌体和细胞如细菌细胞、酵母或霉菌细胞或人、动物或植物细胞。所述方法尤其适用于从人或动物来源的样品材料分离核酸如DNA或RNA,例如临床样品如血液、血浆、血清、口、喉、鼻冲洗液、支气管肺泡灌洗液、尿、脑脊液、痰、唾液、粪便、抽吸物、涂片/拭子、例如鼻腔涂片/拭子、口颊涂片/拭子、颈部涂片/拭子、阴道涂片/拭子、尿道涂片/拭子、咽部涂片/拭子、会阴涂片/拭子和直肠涂片/拭子、粪便、抽吸物、上皮涂片/拭子、活检和其他组织或骨髓样品、以及这些样品材料在合适的营养培养基中的培养物。

[0093] 样品也可来自环境分析、食物分析或分子生物研究领域,例如来自细菌培养物、酵母或真菌培养物、病毒培养物、噬菌体裂解物或扩增过程的产物,例如聚合酶链反应(PCR)的产物。

[0094] 本发明方法尤其适用于从全血分离和/或纯化基因组DNA、线粒体DNA、质粒DNA、病毒DNA和病毒RNA,用于从全血分离和纯化胞内RNA,例如用于逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),也可用于分离和/或纯化无细胞样品材料中存在的自由循环的核酸。本发明的方法尤其适用于分离和/或纯化病毒DNA。

[0095] 生物样品在所述方法的步骤a)中裂解。原则上,下面所列的方法适用于裂解生物样品,所述方法选自:在离子和非离子型表面活性剂,例如十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基硫酸锂(LiDS)或月硅酰基肌氨酸钠(肌氨酰)的帮助下,在合适的试剂或缓冲剂中,使用离液盐,机械撕裂,例如通过超声方式,“弗氏细胞压碎器”,用颗粒如玻璃球、陶瓷球或金属颗粒研磨,或者在液氮中,通过反复冻融,或者通过煮沸,酶裂解,冻干裂解,渗透压休克裂解,微波和/或温度处理,和/或它们的组合。裂解优选在离液盐的存在下进行。

[0096] 优选在裂解组合物的存在下裂解生物样品,所述裂解组合物包含至少一种离液化合物和至少一种基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂,选自聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,以裂解组合物的总体积计,所述基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂从 $\geq 0.1\%$ (重量/体积)至 $\leq 50\%$ (重量/体积)。

[0097] 更具体说,离液剂和选自下组的基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂的组合对于病毒细胞的裂解尤其有效:聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。

[0098] 裂解和/或结合组合物包含至少一种离液化合物和至少一种选自下组的基于聚氧

乙烯的非离子型表面活性剂：聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。

[0099] 关于基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂，在这里参见说明书的全部内容。

[0100] 合适的乙氧基化脂肪醇的例子是乙氧基化十二烷基醇、月桂醇、鲸蜡醇、油醇或硬脂醇，它们可单独使用或作为混合物使用。优选的聚氧乙烯脂肪醇醚是乙氧基化月桂醇醚、鲸蜡醇醚、油酰基醇醚或硬脂醇醚，选自：聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚。

[0101] 优选的聚氧乙烯脂肪醇醚选自：聚氧乙烯(4)月桂基醚、聚氧乙烯(23)月桂基醚、聚氧乙烯(2)鲸蜡基醚、聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚、聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚、聚氧乙烯(2)硬脂基醚、聚氧乙烯(10)硬脂基醚、聚氧乙烯(20)硬脂基醚、聚氧乙烯(2)油基醚、聚氧乙烯(10)油基醚、聚氧乙烯(20)油基醚和/或聚氧乙烯(100)硬脂基醚。数字表述环氧乙烷单元的平均数量。

[0102] 合适的聚氧乙烯月桂醇醚、聚氧乙烯鲸蜡醇醚、聚氧乙烯油醇醚或聚氧乙烯硬脂醇醚的例子优选选自：聚氧乙烯(4)月桂基醚(Brij®30)、聚氧乙烯(23)月桂基醚(Brij®35)、聚氧乙烯(2)鲸蜡基醚(Brij®52)、聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚(Brij®56)、聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚(Brij®58)、聚氧乙烯(2)硬脂基醚(Brij®72)、聚氧乙烯(10)硬脂基醚(Brij®76)、聚氧乙烯(20)硬脂基醚(Brij®78)、聚氧乙烯(2)油基醚(Brij®92)、聚氧乙烯(10)油基醚(Brij®97)、聚氧乙烯(20)油基醚(Brij®98)和/或聚氧乙烯(100)硬脂基醚(Brij®700)。

[0103] 根据本发明优选的实施方式，聚氧乙烯脂肪醇醚包括具有6-22个碳原子的脂肪醇组分和具有2-150个(CH₂CH₂O)单元的聚氧乙烯组分。

[0104] 在所述方法一个尤其优选的实施方式中，聚氧乙烯脂肪醇醚选自：聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚，聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚。

[0105] 在所述方法一优选的实施方式中，聚氧乙烯脂肪醇醚选自：聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚。在该实施方式中，次优选包含聚氧乙烯月桂醇醚，例如聚氧乙烯(4)月桂基醚(Brij®30)或聚氧乙烯(23)月桂基醚(Brij®35)的裂解和/或结合试剂。因此，优选裂解和/或结合组合物不含任何这些物质。在尤其优选的实施方式中，裂解和/或结合试剂的聚氧乙烯脂肪醇醚不是聚氧乙烯月桂基醚。

[0106] 优选聚氧乙烯鲸蜡醇醚、聚氧乙烯油醇醚或聚氧乙烯硬脂醇醚，优选选自聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚(Brij®56)、聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚(Brij®58)、聚氧乙烯(20)硬脂基醚(Brij®78)和/或聚氧乙烯(20)油基醚(Brij®98)。尤其优选聚氧乙烯鲸蜡醇醚或聚氧乙烯油醇醚，优选选自：聚氧乙烯(10)鲸蜡基醚(Brij®56)、聚氧乙烯(20)鲸蜡基醚(Brij®58)和/或聚氧乙烯(20)油基醚(Brij®98)。

[0107] 而且，合适的有聚乙氧基化月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇或油醇，它们分别可以INCI名称月桂醇聚醚(laureth)、鲸蜡醇聚醚(ceteth)、硬脂醇聚醚(steareth)或油酰基醇聚醚(oleth)获得。

[0108] 进一步优选的基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂是聚氧乙烯烷基苯基醚。优选烷基包含5-15个碳原子、优选6-10个碳原子的聚氧乙烯烷基苯基醚。更优选支化或非支化C₇-至C₁₀-烷基，更优选支化或非支化C₈-和C₉-烷基，特别优选异辛基和壬基。在所述方法一

优选的实施方式中,聚氧乙烯烷基苯基醚选自:聚氧乙烯壬基苯基醚和/或聚氧乙烯异辛基苯基醚。合适的聚氧乙烯壬基苯基醚和聚氧乙烯异辛基苯基醚例如以商品名Igepal®从巴斯夫公司获得。

[0109] 更优选的基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂是聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物也称为“泊洛沙姆”。优选经验公式 $H_0(C_2H_4O)_a(C_3H_6O)_b(C_2H_4O)_aH$ 的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,其中“a”表示聚氧乙烯单元的数目,“b”表示聚氧丙烯单元的数目,a/b重量比优选在0.1至3的范围内。

[0110] “a”更优选为2-150,优选4-120,更优选8-80,甚至更优选“a”是选自下组的整数:2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149和150,最优选“a”是选自2、4、10、20、23、40、55、70和100的整数。

[0111] “b”更优选为10-90,优选20-80,更优选30-70,甚至更优选“b”是选自下组的整数:10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89和90,最优选“b”是选自15、18、23、40、55、67和75的整数。

[0112] 更优选具有不同长度的聚氧乙烯和聚氧丙烯嵌段的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,其中具有15-67个聚氧丙烯单元的聚氧丙烯嵌段被各自相互独立具有2-130个聚氧乙烯单元的两个聚氧乙烯嵌段包围。

[0113] 合适的聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物可以商品名Pluronic®或Synperonic®例如从巴斯夫公司获得。

[0114] 根据所述方法一优选的实施方式,以组合物的总体积计,裂解和/或结合组合物包含 $\geq 0.2\%$ (重量/体积)至 $\leq 30\%$ (重量/体积)的非离子型表面活性剂,优选 $\geq 3\%$ (重量/体积)至 $\leq 10\%$ (重量/体积),优选 $\geq 3.2\%$ (重量/体积)至 $\leq 8\%$ (重量/体积)。

[0115] 这对于裂解组合物以及裂解和结合组合物的混合物尤其有益。

[0116] 根据所述方法一优选的实施方式,裂解和/或结合组合物的离液化合物是钠盐或胍盐,优选选自:碘化钠、高氯酸钠、盐酸胍、硫氰酸胍、异硫氰酸胍和/或两种或更多种盐的混合物。离液化合物优选是胍盐,优选选自:盐酸胍、硫氰酸胍和/或异硫氰酸胍。

[0117] 具体说,上述离液化合物和基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂的组合有利于裂解病毒细胞和从病毒细胞分离核酸。

[0118] 裂解和/或结合组合物中离液化合物的浓度从 $\geq 0.1M$ 至 $\leq 10M$ 是有益的。优选离液化合物的浓度从 $\geq 1M$ 至 $\leq 8M$,优选 $\geq 3M$ 至 $\leq 7M$,尤其优选 $\geq 4M$ 至 $\leq 6M$ 。

[0119] 根据所述方法一优选的实施方式,裂解和/或结合组合物包含至少一种缓冲化合物,所述缓冲化合物选自:三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、N-(三(羟甲基)甲基)甘氨酸

(TRICINE)、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸(BICINE)、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、哌嗪-1,4-双(2-乙磺酸)(PIPES)、N-环己基-2-氨基乙磺酸(CHES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)和/或磷酸盐缓冲剂。

[0120] 根据所述方法一尤其优选的实施方式,裂解和/或结合组合物包含至少一种缓冲化合物,所述缓冲化合物选自:三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)和/或N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)和/或磷酸盐缓冲剂。根据所述方法又一更优选的实施方式,裂解和/或结合组合物包含至少一种缓冲化合物,所述缓冲化合物选自:三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)和/或N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)。

[0121] 生物样品可以在室温,例如在15°C至25°C裂解,或者在升高的温度,例如从 $\geq 37^\circ\text{C}$ 至 $\leq 75^\circ\text{C}$ 的温度进行裂解。

[0122] 在优选实施方式中,裂解组合物还可包含酶,例如蛋白酶K,蛋白酶(例如QIAGEN蛋白酶),消解酶,溶细胞酶,无色肽酶,溶葡萄球菌酶,溶菌酶以及根据应用,核酸酶,例如DNA酶和/或RNA酶。

[0123] 在离液化合物和/或支化或非支化链烷醇的存在下,将释放的核酸固定到基于一种或多种二氧化硅化合物的基质上。

[0124] 优选包含支化或非支化链烷醇的结合组合物。根据一优选的实施方式,支化或非支化链烷醇是具有1-5个碳原子的醇,优选选自:甲醇、乙醇、异丙醇、正丙醇、正丁醇、异丁醇、仲丁醇、叔丁醇、正戊醇、异戊醇和/或它们的混合物。

[0125] 根据一优选的实施方式,以结合组合物的总体积计,结合组合物包含体积含量从 $\geq 1\%$ 至 $\leq 80\%$ 的支化或非支化链烷醇,优选 $\geq 5\%$ 至 $\leq 70\%$,优选 $\geq 10\%$ 至 $\leq 60\%$,更优选 $\geq 15\%$ 至 $\leq 50\%$ 。

[0126] 根据本发明一优选的实施方式,以混合物的总体积计,结合组合物的混合物包含裂解试剂和任选地一种或多种其他添加剂,优选支化或非支化链烷醇,所述支化或非支化链烷醇的体积含量从 $\geq 1\%$ 至 $\leq 80\%$,优选 $\geq 5\%$ 至 $\leq 70\%$,优选 $\geq 15\%$ 至 $\leq 50\%$ 。

[0127] 使样品与基于一种或多种二氧化硅化合物如二氧化硅、硅酸盐、玻璃和/或硅胶的基质接触并孵育足以实现结合的时间,从而分离核酸。基质可以是现有技术已知的常规设计,例如颗粒形式,膜形式或滤器形式。为便于去除,优选具有磁性的颗粒。10秒到30分钟之间的孵育时间对于核酸是方便的。从1分钟到20分钟,具体约为10分钟的孵育时间是有益的。

[0128] 优选采用具有胶状二氧化硅涂层的磁性颗粒来分离核酸。优选采用具有胶状二氧化硅涂层并且平均粒度从 $\geq 1\mu\text{m}$ 至 $\leq 25\mu\text{m}$,优选 $\geq 5\mu\text{m}$ 至 $\leq 15\mu\text{m}$,尤其优选 $\geq 6\mu\text{m}$ 至 $\leq 10\mu\text{m}$,优选粒度分布窄的磁性颗粒来分离核酸。更优选地,采用具有胶状二氧化硅涂层并且平均粒度从 $\geq 1\mu\text{m}$ 至 $\geq 5\mu\text{m}$,优选粒度分布窄的磁性颗粒来分离核酸。

[0129] 在又一优选的实施方式中,磁性或有磁力吸引的颗粒是具有基于氧化铁的磁心的颗粒,优选选自磁铁矿(Fe_3O_4),磁赤铁矿($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)和/或铁氧体。

[0130] 能够以有益方式使用的磁性二氧化硅颗粒可参见例如国际申请WO 01/71732,其内容被纳入本文作为参考。

[0131] 在优选实施方式中,可使用具有二氧化硅表面的磁性或磁力吸引力颗粒形式的基于一种或多种二氧化硅化合物的基质。

[0132] 优选在 $\geq 15^{\circ}\text{C}$ 至 $\leq 75^{\circ}\text{C}$ 的温度进行结合, 优选 $\geq 20^{\circ}\text{C}$ 至 $\leq 70^{\circ}\text{C}$, 尤其优选 $\geq 46^{\circ}\text{C}$ 至 $\leq 65^{\circ}\text{C}$, 最优选 $\geq 50^{\circ}\text{C}$ 至 $\leq 60^{\circ}\text{C}$ 。结合也可以是室温进行, 例如 $\geq 15^{\circ}\text{C}$ 至 $\leq 28^{\circ}\text{C}$ 。

[0133] 孵育后, 从裂解和/或结合组合物中去除结合到基于一种或多种二氧化硅化合物的基质的核酸。当使用磁性二氧化硅颗粒时, 这可以在磁场的帮助下实现。例如, 可通过施加磁场将磁性颗粒拖曳至在其中进行孵育的容器的壁, 以合适的吸管尖端收集, 或者固定到塑料涂层保护的磁棒上。用于去除裂解和/或结合组合物的合适方法步骤的例子是通过吸液或抽吸液体或者使磁性颗粒在吸管尖端或者磁棒上升起, 或者降低裂解和/或结合混合物进行去除, 其中分离的磁性颗粒保持同一水平。

[0134] 任选地, 固定到基质上的核酸可以在去除之前进行洗涤。洗涤步骤优选通过孵育洗涤溶液与加载的颗粒来进行, 优选涉及所述颗粒的重悬, 例如通过震荡或应用磁场。优选去除污染的洗涤溶液, 即结合后留下的裂解和/或结合组合物, 具体是裂解组合物和/或结合组合物的混合物。

[0135] 使用的洗涤试剂可以是常规洗涤缓冲剂或者任何其他合适的介质。通常, 优选具有低到中度离子强度的洗涤试剂, 例如 10mM 三(羟甲基)氨基甲烷 (TRIS) 的溶液。还可使用具有较高盐浓度的洗涤缓冲剂, 例如 4-6M 盐酸胍的溶液。如上所述, 本发明的洗涤试剂类似地是合适的洗涤试剂。

[0136] 而且, 也可使用含醇的洗涤试剂, 例如具有 1-5 个碳原子的醇的水溶液, 优选乙醇的水溶液, 具体是 50-100% 强度乙醇的水溶液。

[0137] 优选将固定到基质的核酸洗涤几次, 例如 2-4 次, 优选用不同的洗涤试剂。在优选实施方式中, 洗涤首先用具有低到中度离子强度的洗涤试剂进行, 然后用 70-100% 强度的乙醇水溶液。

[0138] 更具体说, 利用磁性颗粒, 由于颗粒的磁性聚集而便于进行分离和/或洗涤步骤。

[0139] 最后的洗涤步骤或水洗之后, 可干燥优选的磁性颗粒, 例如真空干燥或者通过蒸发液体或者让液体蒸发。

[0140] 根据所述方法的步骤 d), 可从基质去除结合的核酸。去除核酸也成为洗脱。

[0141] 也优选使用结合到基质(具体是磁性颗粒)上的核酸, 无需去除步骤, 例如用于 PCR 或其他扩增方法, DNA 检测方法或 DNA 鉴定方法。

[0142] 结合的核酸可借助低盐含量的洗脱试剂从颗粒去除。更具体说, 可使用盐含量小于 0.1 摩尔/升的试剂作为低盐含量的洗脱试剂。尤其优选包含缓冲化合物三(羟甲基)氨基甲烷 (TRIS) 的洗脱试剂。尤其适用于洗脱的还有软化水, 任选地包含一种或多种添加剂, 例如络合剂如乙二胺四乙酸 (EDTA)、叠氮化合物和/或缓冲化合物如三(羟甲基)氨基甲烷 (TRIS)。

[0143] 具体说, 使用裂解和/或结合组合物产生了从生物样品分离核酸, 具体是分离病毒 DNA 的尤其有益的方法。

[0144] 即使在储存之后, 裂解和/或结合试剂的优点尤其在于可获得优良产量。

[0145] 本发明还涉及从含核酸的生物样品分离和/或纯化核酸的试剂盒, 该试剂盒包含本发明的裂解、结合和/或洗涤试剂。

[0146] 在优选实施方式中, 试剂盒还包含基于一种或多种二氧化硅化合物的基质, 具体是具有二氧化硅表面的磁性或磁力吸引力颗粒形式的基于一种或多种二氧化硅化合物的

基质。优选包含在所述试剂盒中的磁性二氧化硅颗粒的例子参见国际申请WO 01/71732,其全部内容被纳入本文作为参考。

[0147] 在又一优选的实施方式中,试剂盒还可包含合适的洗涤和/或洗脱试剂,具体是本发明的洗涤试剂。

[0148] 在另一优选的实施方式中,试剂盒可包含除磁性二氧化硅颗粒之外的硅烷化载体材料,优选具有二氧化硅膜的离心柱。

[0149] 本发明还涉及基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂在溶解生物样品的脂质中的应用,所述基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂选自:聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,具体是选自聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚的聚氧乙烯脂肪醇醚。

[0150] 出于本发明的目的,术语“脂质”表示不溶于水或者至少大部分不溶于水的天然物质。出于本发明的目的,术语“脂质”包括甘油三酯类,包括脂肪和油、蜡、磷脂、鞘脂、脂质糖,以及类异戊烯类,包括类固醇和类胡萝卜素。更具体说,术语“脂质”表示有机体细胞膜的脂质组分或结构组分,例如磷脂和鞘酯。

[0151] 从含核酸的生物样品分离和/或纯化核酸的方法中,优选使用基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂来溶解生物样品的脂质,所述基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂选自:聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物。

[0152] 关于基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂,在这里参见说明书的全部内容。

[0153] 从含核酸的生物样品分离和/或纯化核酸的方法中,尤其优选使用聚氧乙烯脂肪醇醚来溶解生物样品的脂质,所述聚氧乙烯脂肪醇醚选自聚氧乙烯月桂基醚,聚氧乙烯鲸蜡基醚,聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚。

[0154] 在利用基于一种或多种二氧化硅化合物的基质,优选具有二氧化硅表面的磁性或磁力吸引力颗粒形式的基质来分离和/或纯化核酸的方法中,优选使用基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂,具体是聚氧乙烯脂肪醇醚来溶解生物样品的脂质。

[0155] 有益地,在利用基于一种或多种二氧化硅化合物的基质,优选具有二氧化硅表面的磁性或磁力吸引力颗粒形式的基质来分离和/或纯化核酸的方法中,当使用基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂,具体是聚氧乙烯脂肪醇醚时,发现洗脱液不含污染物或者包含至少明显较少的污染物。

[0156] 此外,本发明涉及基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂在制备储存稳定的结合、裂解和/或洗涤试剂中的应用,所述基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂选自:聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯基醚和/或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,优选聚氧乙烯脂肪醇醚,选自聚氧乙烯月桂基醚、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯硬脂基醚和/或聚氧乙烯油基醚。

[0157] 关于基于聚氧乙烯的非离子型表面活性剂,在这里参见说明书的全部内容。

[0158] 出于本发明的目的,“储存稳定”在这里优选表示与具体应用相关,在3个月,优选6个月,更优选至少8个月的储存期间不以显著破坏所述应用的方式发生改变的裂解、结合或洗涤试剂的性质。在优选实施方式中,储存稳定性在室温下展示,更优选在例如50°C的升高温度下展示。

[0159] pH是与应用相关的试剂的性质之一。因此,优选地,试剂的储存期间pH不会显著变化,试剂储存期间pH优选降低不到1。

[0160] 本发明主题的进一步细节、特征和优点可参见从属权利要求及以下附图说明和实施例部分,这些内容通过实施例阐述了本发明的示例性实施方式。

[0161] 图1a、1b分别描绘了在25°C(图1a)和50°C(图1b)储存33周期间,本发明的裂解试剂B(空白柱表示)和包含吐温20®的裂解试剂A(实心柱表示)的pH变化。

[0162] 图2描绘了用本发明的裂解试剂B和包含吐温®20的裂解试剂A制备病毒DNA之后,针对HBV-DNA进行HBV特异性实时PCR后的CT均值。

[0163] 图3描绘了使用在50°C储存10周后的本发明的裂解试剂B和包含吐温®20的裂解试剂A制备病毒DNA之后,针对HBV-DNA进行HBV特异性实时PCR后的CT均值。在这里,使用室温储存约4周的裂解试剂A作为参比。在每种情况下,使用6μl和24μl洗脱液进行实时PCR,6μl洗脱液的结果以空白柱表示,24μl洗脱液的结果以实心柱表示。

[0164] 下面将基于实施例阐述本发明。应理解,以下实施例仅仅是阐述的方式而不应限制本发明。

[0165] 实施例1:稳定性测试

[0166] 用双蒸水新鲜制备包含20%(w/v)吐温®20(弗鲁卡公司(Fluka)),异硫氰酸胍,三(羟甲基)氨基甲烷的裂解试剂A和用20%(w/v)Brij®58(西格玛公司(Sigma))代替吐温®20的裂解试剂B,将它们各自在密封容器中于25°C和50°C储存33周。

[0167] 在储存开始时和每周间隔,于20°C-28°C的温度用pH计(Metrohm)测定各个溶液的pH。

[0168] 图1a绘制的柱形图表明,在25°C储存33周期间的裂解试剂A的pH从约pH 7.8稍微降低至pH 7.2,而图1b显示在50°C储存33周期间pH从约pH 7.8降至约pH 5.9。不同的是,在25°C和50°C储存33周期间,裂解试剂B的pH保持稳定,约为pH 8。

[0169] 实施例2:病毒DNA的提取

[0170] 将阴性,即不含HBV病毒的人血浆与 10^4 sgU/ml乙型肝炎病毒(HBV)混合。采用市售的自动化平台QIASymphony®(恰根公司(Qiagen)),通过从血浆样品纯化病毒核酸的自动化方案,从各自1000μl血浆样品提取病毒DNA。

[0171] 根据所采用的方案,使样品与方案规定体积的包含异硫氰酸胍、三(羟甲基)氨基甲烷和20%(w/v)Brij®58(西格玛公司)和蛋白酶K的裂解试剂B以及包含载体RNA的溶液AVE相接触。然后在65°C进行孵育以裂解样品。然后向样品混合物中加入方案规定体积的包含异硫氰酸胍、三(羟甲基)氨基甲烷和9%(w/v)Brij®58(西格玛公司)和异丙醇的结合试剂C。再孵育3分钟后,如方案所指定的那样,加入包含磁性二氧化硅颗粒的MagAttract悬浮液并混合。在此期间,核酸结合到二氧化硅颗粒。然后分离磁性氧化硅颗粒,去除液相。然后,向二氧化硅颗粒加入方案规定体积的包含硫氰酸胍和乙醇的洗涤溶液,颗粒悬浮在洗涤溶液中。再次去除上清液,加入方案规定体积的包含Tris、NaCl和乙醇的洗涤溶液,进行第二洗涤步骤。分离和去除液相之后,用方案规定体积的水性80%强度乙醇洗涤颗粒。分离颗粒之后,去除上清液,颗粒空气干燥8分钟。为洗脱DNA,加入方案规定体积的洗脱溶液E,颗粒悬浮其中3分钟。然后取出颗粒,获得洗脱液。

[0172] 根据所述方案,再从1000μl血浆样品提取病毒DNA,改变在于使用包含20%(w/v)吐温®20(弗鲁卡公司)的裂解试剂A和包含9%(w/v)吐温®20(弗鲁卡公司)的结合试剂D。

[0173] 对所得洗脱液各自进行HBV-特异性实时(RT-)PCR,各自使用24μl洗脱液。如图2所

示,描述荧光开始对数增加时的循环的CT值(阈值循环数)的平均值表明,使用本发明的裂解试剂B和结合试剂C提取实现了较高的产量。

[0174] 实施例3:裂解试剂储存之后提取病毒DNA

[0175] 包含异硫氰酸胍、三(羟甲基)氨基甲烷和20%(w/v)Brij®58(西格玛公司)的裂解试剂B和用20%(w/v)吐温®20(弗鲁卡公司)代替Brij®58的裂解试剂A各自在密封容器中于50°C储存10周。

[0176] 然后,使用市售自动化平台QIAasympy®(恰根公司),通过从血浆样品纯化病毒核酸的自动化方案来提取病毒核酸。

[0177] 根据实施例2所述的方案,使用市售自动化平台QIAasympy®(恰根公司)从各自1000µl的血浆样品提取病毒DNA,对于不同的混合物,包含异硫氰酸胍、三(羟甲基)氨基甲烷和20%(w/v)Brij®58(西格玛公司)的裂解试剂B以及Brij®58被20%(w/v)吐温®20(弗鲁卡公司)代替的裂解试剂A各自在50°C储存10周。所用参比是在室温储存约4周的裂解试剂A。

[0178] 我们发现,使用于50°C储存的裂解试剂A获得的洗脱液非常混浊,而使用裂解试剂B获得的洗脱液澄清。

[0179] 在每种情况下,对获得的6µl和24µl洗脱液进行HBV-特异性实时(RT-)PCR。如图3所示,CT值的平均值表明,用本发明的裂解试剂B和结合试剂C提取实现了较高的产量。

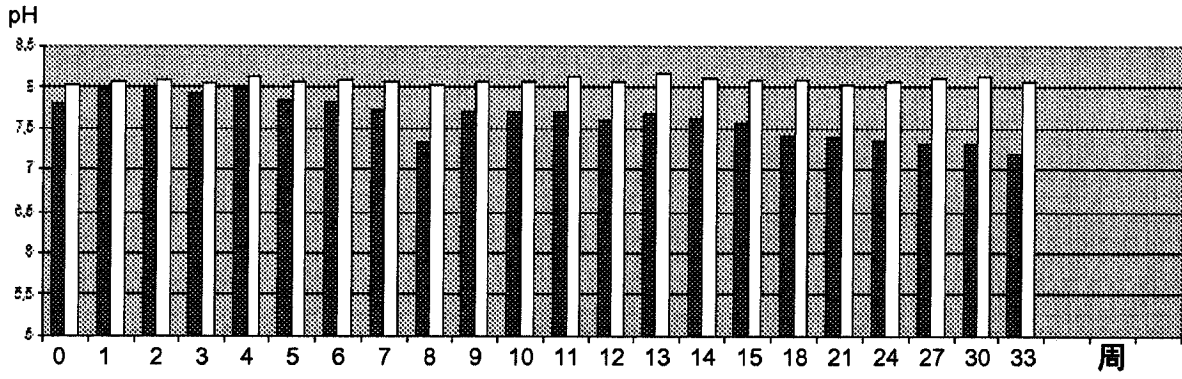


图1a

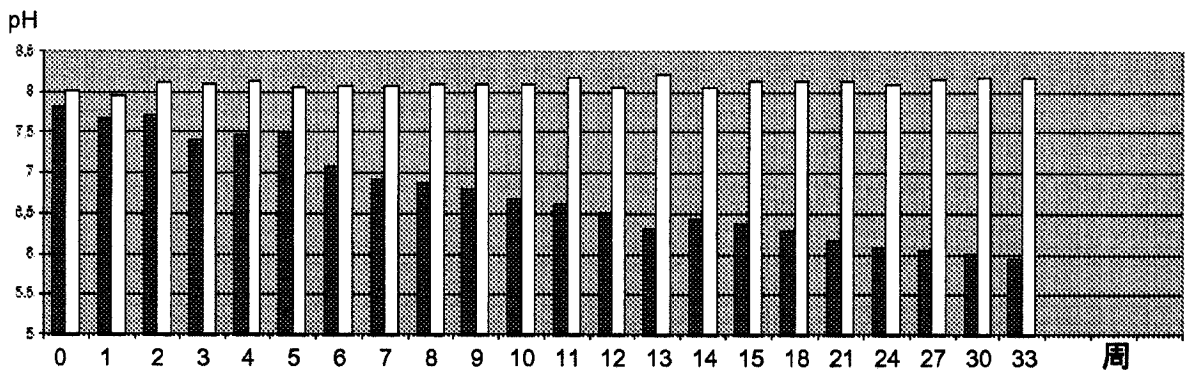


图1b

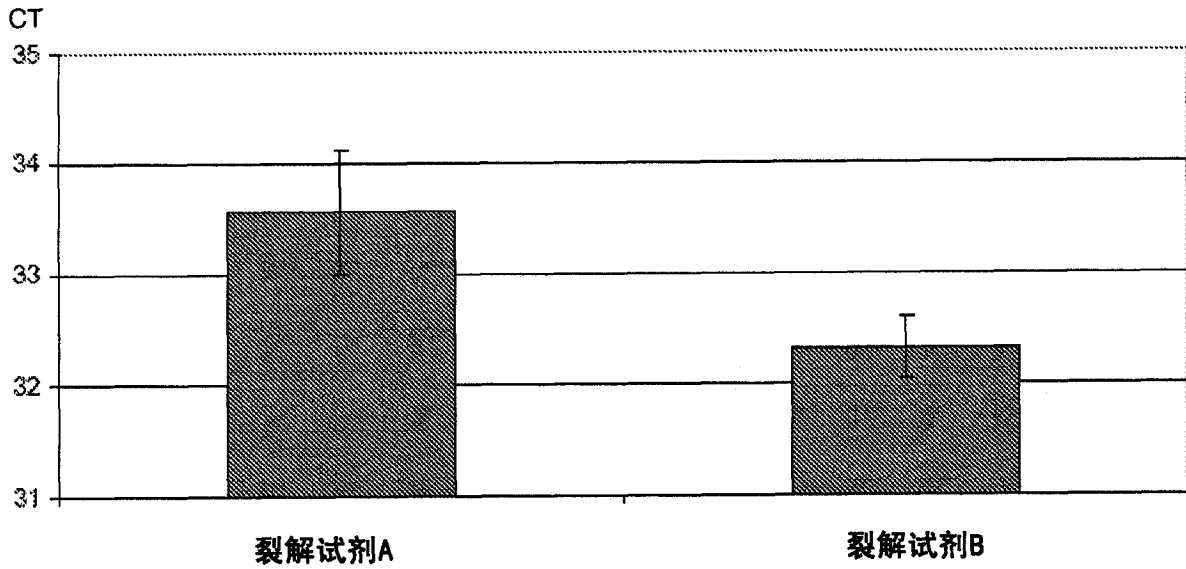


图2

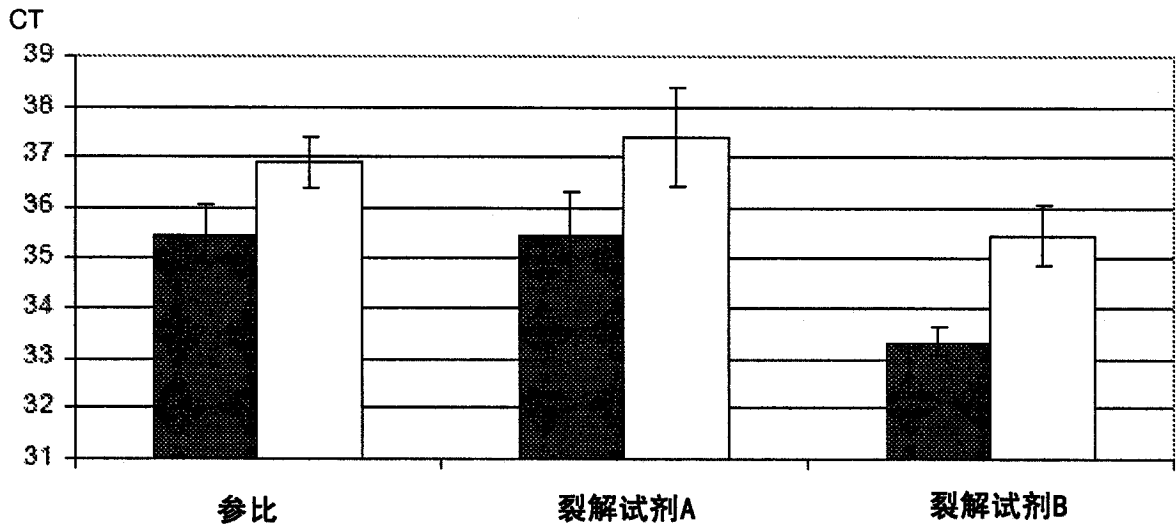


图3