



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118086458 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 28

(21) 申请号 202410273963.2

(22) 申请日 2024.03.11

(71) 申请人 杭州联川生物技术股份有限公司
地址 310018 浙江省杭州市杭州经济技术开发区6号大街260号16幢四层

(72) 发明人 刘宇翔 宋志游 郑逸婷 李振

(74) 专利代理机构 杭州信与义专利代理有限公司 33450

专利代理师 万景旺

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6806 (2018.01)

C12Q 1/686 (2018.01)

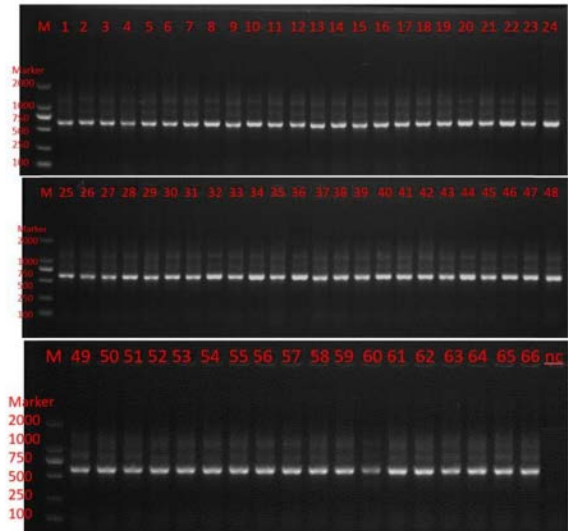
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种扩增用预混液预制板的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种扩增用预混液预制板的制备方法,包括如下步骤:准备预制板,向预制板的微孔中加入PCR反应所需的扩增试剂;再向微孔中添加BSA缓冲液和/或海藻糖溶液;采用压敏铝膜对预制板进行封膜保存。采用该方法制备的预制板,在-15~-25℃条件长期存放的情况下,不会降低酶活性,又能减少因反复冻融带来的Taq酶性能损失,压敏铝膜密封保存效果更好,蒸发损失量更低。



1. 一种扩增用预混液预制板的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - (1) 准备预制板,向预制板的微孔中加入PCR反应所需的扩增试剂;
 - (2) 再向微孔中添加BSA缓冲液和/或海藻糖溶液;
 - (3) 采用压敏铝膜对预制板进行封膜保存。
2. 根据权利要求1所述的一种扩增用预混液预制板的制备方法,其特征在于:所述BSA缓冲液的浓度为5-20mg/mL。
3. 根据权利要求1所述的一种扩增用预混液预制板的制备方法,其特征在于:所述海藻糖溶液的浓度为25-80mg/mL。
4. 根据权利要求1所述的一种扩增用预混液预制板的制备方法,其特征在于:BSA缓冲液和海藻糖溶液的混合液中,BSA缓冲液与海藻糖溶液体积比为1:1。
5. 根据权利要求1所述的一种扩增用预混液预制板的制备方法,其特征在于:保存条件为:-15~-25℃条件下保存。
6. 根据权利要求1所述的一种扩增用预混液预制板的制备方法,其特征在于:所述扩增试剂包括引物、引物稀释溶液以及2×DNA聚合酶MIX。
7. 根据权利要求6所述的一种扩增用预混液预制板的制备方法,其特征在于:所述引物稀释溶液为10mM Tris-HCl溶液。
8. 根据权利要求6所述的一种扩增用预混液预制板的制备方法,其特征在于:所述引物浓度为2.5 μ M。

一种扩增用预混液预制板的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物技术领域,具体涉及一种扩增用预混液预制板的制备方法。

背景技术

[0002] 聚合酶链式反应(PCR)是一种用于放大扩增特定的DNA片段的分子生物学技术,它可看作是生物体外的特殊DNA复制,PCR的最大特点是能将微量的DNA大幅增加。

[0003] 聚合酶链式反应要求体系中由缓冲液、模板核酸、dNTP、DNA聚合酶和引物组成,这些试剂需要的保存条件各不相同,若DNA聚合酶在多次使用中反复冻融会影响其活性,使得反应无法有效进行。但每次实验取用的样本量不一致,导致无法避免的反复冻融DNA聚合酶。而每次实验都需要配制一次聚合酶链式反应体系十分费时费力,且不利于试剂的存放和保证试剂的有效性,各种试剂每取用一次都会多一分污染的风险。且DNA聚合酶和引物混合后的体系,酶活性会受到存放时间影响,整体保质期会缩短。

[0004] 为此,本领域需要开发一种扩增用预制板,预制板为了保存酶的活性,需要存放在-20℃,这样预制板的密封保存条件也显得尤为重要,不同的封膜材料及方式,也可能对酶的稳定性造成影响,不同材料不同封膜方式对试剂的蒸发会有影响,为此,本申请对如何在长期存放的情况下,不会降低酶活性,又能减少因反复冻融带来的Taq酶性能损失进行了探究。

发明内容

[0005] 为了解决上述问题中的至少一种,本发明提供了一种扩增用预混液预制板的制备方法。采用该方法制备的预制板,在长期存放的情况下,不会降低酶活性,又能减少因反复冻融带来的Taq酶性能损失。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用了如下技术手段:

[0007] 本发明的第一方面提供了一种扩增用预混液预制板的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 准备预制板,向预制板的微孔中加入PCR反应所需的扩增试剂;

[0009] (2) 再向微孔中添加BSA缓冲液和/或海藻糖溶液;

[0010] (3) 采用压敏铝膜对预制板进行封膜保存。

[0011] 海藻糖(Trehalose)是一种双糖,能够在高温、高寒、干燥失水等恶劣的条件下在细胞表面形成特殊的保护膜,有效的保护生物分子结构不被破坏,从而维持生命体的生命过程和生物特征。海藻糖具有热稳定性和热激活特性。海藻糖在蛋白热变性过程中可维持蛋白的骨架,保持其天然结构。海藻糖可作为PCR增强剂。通过降低DNA双链融解温度,维持Taq DNA聚合酶稳定性,提高PCR反应效率。

[0012] BSA即牛血清白蛋白,是酶的稳定剂,防止酶的分解和非特异性吸附;BSA能减轻有些酶的变性,能减轻有些不利环境因素如加热,表面张力及化学因素引起的变性的,可能是因为它结构中有17个二硫键,和一个巯基,巯基的化学反应很活泼,二硫键有抗氧化还原的作用,因此可与多种阳离子,阴离子和小分子结合;BSA还能防止酶吸附到管壁而损失。在

PCR预混液中加入一定量的BSA即牛血清白蛋白可以延长保存时间,增强酶活性,提高PCR反应效率。

[0013] 在本发明的一些实施方案中,所述BSA缓冲液的浓度为5-20mg/mL。优选地,BSA缓冲液的浓度为10mg/mL。

[0014] 在本发明的一些实施方案中,所述海藻糖溶液的浓度为25-80mg/mL。优选地,海藻糖溶液的浓度为50mg/mL。

[0015] 在本发明的一些实施方案中,BSA缓冲液和海藻糖溶液的混合液中,BSA缓冲液与海藻糖溶液体积比为1:1。

[0016] 在本发明的一些实施方案中,保存条件为:-15~-25℃条件下保存。进一步地,保存时长不超过12个月效果最佳。

[0017] 在本发明的一些实施方案中,所述扩增试剂包括引物、引物稀释溶液以及2×DNA聚合酶MIX。

[0018] 在本发明的一些实施方案中,所述引物稀释溶液为10mM Tris-HCl溶液。

[0019] 使用引物稀释溶液稀释引物:对于浓溶液引物,将一定体积的原溶液转移至合适的新容器中,然后向新容器加入相应体积的稀释溶液;对于干粉引物,先使用少量稀释溶液复溶,转移至合适的新容器中,然后补足稀释溶液。

[0020] 在本发明的一些实施方案中,所述引物浓度为2.5μM。

[0021] 在本发明的一些实施方案中,采用本发明的制备方法制备得到的预制板在PCR扩增试剂盒中的应用。

[0022] 本发明的有益效果

[0023] 相对于现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0024] 本发明方法使用到的试剂耗材简单易得,不需要额外准备特殊的试剂及耗材;操作简单,不需要在实验中增加多余的操作步骤;可以根据反应量取用需要的试剂,不会反复冻融试剂影响其活性;不需要每次实验都进行繁琐的扩增体系配制,减少试剂污染的风险。

[0025] 加入BSA溶液延长了预混液保存时间,且加强了酶活性。BSA是酶的稳定剂,防止酶的分解和非特异性吸附;BSA能减轻有些酶的变性,能减轻有些不利环境因素如加热,表面张力及化学因素引起的变性的,可能是因为它结构中有17个二硫键,和一个巯基,巯基的化学反应很活泼,二硫键有抗氧化还原的作用,因此可与多种阳离子,阴离子和小分子结合;BSA还能防止酶吸附到管壁而损失。

[0026] 保存预混液的预制板使用压敏膜比热敏膜在-15~-25℃保存时,保存效果更好,同时,添加5μL 10mg/mL BSA稳定剂的预制板保存时间最久,在储存12个月后还能保持83%的有效率。

附图说明

[0027] 图1示出了本发明实施例1中预制板对同一样本进行PCR扩增产物凝胶电泳结果。

具体实施方式

[0028] 以下例子在此用于示范本发明的优选实施方案。本领域内的技术人员会明白,下述例子中披露的技术代表发明人发现的可以用于实施本发明的技术,因此可以视为实施本

发明的优选方案。但是本领域内的技术人员根据本说明书应该明白,这里所公开的特定实施例可以做很多修改,仍然能得到相同的或者类似的结果,而非背离本发明的精神或范围。

[0029] 除非另有定义,所有在此使用的技术和科学的术语,和本发明所属领域内的技术人员所通常理解的意思相同,在此公开引用及他们引用的材料都将以引用的方式被并入。那些本领域内的技术人员将意识到或者通过常规试验就能了解许多这里所描述的发明的特定实施方案的许多等同技术。这些等同将被包含在权利要求书中。

[0030] 下面结合具体实施方式对本专利的技术方案作进一步详细地说明。

[0031] 实施例1

[0032] (1) 核对引物COA,确认引物信息,确认方式包括但不限于:引物名称、引物物质的量(nmol数)、原始状态(干粉或溶液浓度)。

[0033] (2) 配制10mg/mL BSA溶液,加100mg的牛血清蛋白于9.5mL水中,盖好盖后,轻轻摇动,直至牛血清蛋白完全溶解为止,不要涡旋混合。加水定容到10mL。如果所需稀释溶液大于10mL,配制量可以等比放大。

[0034] (3) 配制50mg/mL海藻糖溶液,加500mg的牛血清蛋白于9.5mL水中,盖好盖后,轻轻摇动,直至牛血清蛋白完全溶解为止,不要涡旋混合。加水定容到10mL。如果所需稀释溶液大于10mL,配制量可以等比放大。

[0035] (4) 计算将各引物稀释至理论浓度2.5 μ M所需的稀释溶液:

[0036] 干粉计算方式:稀释液体积(μ L) = 400 \times 物质的量(nmol)。

[0037] 溶液计算方式:稀释液体积(μ L) = [0.4 \times 浓度(μ M) - 1] \times 引物体积(μ L)。

[0038] (5) 配制引物稀释溶液:用量筒量取99mL无核酸酶水,向其加入1mL 1MTris-HCl (pH 8.0),充分混匀即可。如果所需稀释溶液大于100mL,配制量可以等比放大。

[0039] (6) 使用引物稀释溶液稀释引物:对于浓溶液引物,将一定体积的原溶液转移至合适的新容器中,然后向新容器加入相应体积的稀释溶液;对于干粉引物,先使用少量稀释溶液复溶,转移至合适的新容器中,然后补足稀释溶液。

[0040] (7) 将添加稀释溶液后的引物短暂离心处理后,置于超级恒温混匀仪上,以1400rpm混匀速度混匀2分钟,然后再次短暂离心,使引物溶液集中在容器底部。

[0041] (8) 制作两块检验专用预制板,提交检验,检验专用预制板使用的预制板为96孔板,需在96孔板中添加相应的64个F系列引物与66个R系列引物各2.5 μ L,“稀释溶液”孔中添加5 μ L稀释溶液,“空”孔中不添加任何液体。

[0042] 然后向每个非空孔位添加12.5 μ L 2 \times DNA聚合酶,封膜。标识出该预制板的系列名称,并标明装载有试剂的孔位区域,预制板信息如表1所示。

[0043] 表1引物检验预制板信息

引物检验专用预制板

| | | | | | | | | | |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | F01-R01 | F09-R09 | F17-R17 | F25-R25 | F33-R33 | F41-R41 | F49-R49 | F57-R57 | F01-R65 |
| | F02-R02 | F10-R10 | F18-R18 | F26-R26 | F34-R34 | F42-R42 | F50-R50 | F58-R58 | F02-R66 |
| | F03-R03 | F11-R11 | F19-R19 | F27-R27 | F35-R35 | F43-R43 | F51-R51 | F59-R59 | 稀释溶液 |
| [0044] | F04-R04 | F12-R12 | F20-R20 | F28-R28 | F36-R36 | F44-R44 | F52-R52 | F60-R60 | 空 |
| | F05-R05 | F13-R13 | F21-R21 | F29-R29 | F37-R37 | F45-R45 | F53-R53 | F61-R61 | 空 |
| | F06-R06 | F14-R14 | F22-R22 | F30-R30 | F38-R38 | F46-R46 | F54-R54 | F62-R62 | 空 |
| | F07-R07 | F15-R15 | F23-R23 | F31-R31 | F39-R39 | F47-R47 | F55-R55 | F63-R63 | 空 |
| | F08-R08 | F16-R16 | F24-R24 | F32-R32 | F40-R40 | F48-R48 | F56-R56 | F64-R64 | 空 |

[0045] (9) 使用上述检验专用预制板对同一样本:细菌16SDNA阳性标准品,10ng/ μL ,添加量50ng;进行PCR扩增。

[0046] (10) 建库完成后,取5 μL 扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,电泳条件以120V、25分钟为宜,使用可以指示500bp附近条带的Marker(如Takara公司生产的DL 2 000等)。

[0047] (11) 电泳结束后在透射紫外下拍照,琼脂糖凝胶电泳结果如图1所示。

[0048] 结果显示:各添加引物的文库在对应目的区域存在显著的目标条带,“稀释溶液”对应的文库不存在该条带。

[0049] (12) Barcode交叉污染检验:

[0050] (13) 将检验专用预制板建库所得的文库进行等物质的量混合,进行二代测序。

[0051] (14) 测序返回的结果按照64 \times 66进行拆分。

[0052] (15) 按照如下方法计算每个引物的交叉率:(1-合理reads数/总reads数) \times 1000%。以F01引物为例,如果测序结果中F01-R01的reads数为20000,F01-R65的reads数为19000,包含F01序列的总reads数为40000,则其交叉率为2.5%。

[0053] (18) 每个引物的交叉率不应超过5.0%。

[0054] 结果显示:经NGS测序返回的结果计算,每条引物的交叉率均在1-3%区间。

[0055] 实施例2

[0056] 将制备预制板所需的引物、聚合酶MIX从冰箱取出,置于室温平衡至少30分钟,确保已经完全融化。

[0057] 使用颠倒、涡旋等手段将原料混匀,然后以2000rpm,瞬离的方式使原料集中在容器底部。

[0058] 根据预制板对应的引物组合进行引物,聚合酶MIX的分装A、B、C、D四块相同的预制板,分装好的预制板分别采用压敏塑封膜、热敏塑封膜、压敏铝膜、热敏铝膜4种方式进行封膜。

[0059] 将封膜好的预制板一同在-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下存放。

[0060] 在存放3个月、6个月、9个月以及12个月后分别进行酶活性的有效性检测,方法如下:

[0061] (1) 取10ng/ μL ,50ng的细菌16SDNA阳性标准品进行PCR扩增;

[0062] (2) 建库完成后,取5 μL 进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,电泳条件以120V、25分钟为宜,使用可以指示500bp附近条带的Marker(Takara公司生产的DL 2,000)。

[0063] (3) 电泳结束后在透射紫外下拍照,观察各添加引物的文库在对应目的区域存在

显著的目标条带,统计各个储存时间段不同处理方式后,预制板有效情况如表2所示。

[0064] 表2不同封膜方式预制板的有效情况

| 储存时间 | 封膜类型 | 剩余 MIX 体积 μL | 抽查个数 | 扩增成功个数 | 合格率 |
|-------|-------|-------------------------|------|--------|------|
| 3 个月 | 压敏塑封膜 | 24.7 | 24 | 23 | 96% |
| | 热敏塑封膜 | 23.8 | 24 | 20 | 83% |
| | 压敏铝膜 | 24.9 | 24 | 24 | 100% |
| | 热敏铝膜 | 24.9 | 24 | 23 | 96% |
| 6 个月 | 压敏塑封膜 | 23.8 | 24 | 20 | 83% |
| | 热敏塑封膜 | 21.5 | 24 | 17 | 71% |
| | 压敏铝膜 | 24.4 | 24 | 23 | 96% |
| | 热敏铝膜 | 23.9 | 24 | 21 | 88% |
| 9 个月 | 压敏塑封膜 | 22.4 | 24 | 16 | 67% |
| | 热敏塑封膜 | 20.1 | 24 | 12 | 50% |
| | 压敏铝膜 | 23.8 | 24 | 20 | 83% |
| | 热敏铝膜 | 22.2 | 24 | 17 | 71% |
| 12 个月 | 压敏塑封膜 | 20.8 | 24 | 13 | 54% |
| | 热敏塑封膜 | 18.6 | 24 | 10 | 42% |
| | 压敏铝膜 | 22.5 | 24 | 18 | 75% |
| | 热敏铝膜 | 20.4 | 24 | 15 | 63% |

[0066] 结果显示:压敏膜比热敏膜在 $-15 \sim -25^{\circ}\text{C}$ 保存时,保存效果更好,推测是热敏膜封膜后在低温状态下封膜效果减弱。铝膜比塑封膜保存效果更好,蒸发损失量更低。由于试剂蒸发损失会影响PCR扩增的有效性,塑封膜保存预制板时间最好不要超过6个月,铝膜预制板保存时间最好不要超过9个月,低温保存的试剂最好不要用热敏膜。

[0067] 实施例3

[0068] 将制备预制板所需的引物、聚合酶MIX、BSA溶液以及海藻糖溶液从冰箱取出,置于室温平衡至少30分钟,确保已经完全融化。

[0069] 使用颠倒、涡旋等手段将原料混匀,然后以2000rpm,瞬离的方式使原料集中在容器底部。

[0070] 根据预制板对应的引物组合进行引物,聚合酶MIX的分装A、B、C、D四块相同的预制板,向分装好的B预制板中加入了 $5\mu\text{L}$ BSA溶液,C预制板中加入了 $5\mu\text{L}$ 海藻糖溶液,D预制板中加入了海藻糖溶液与BSA溶液按1:1的混合液 $5\mu\text{L}$ 。

[0071] 分别采用压敏铝膜的方式进行封膜。

[0072] 将封膜好的预制板一同在 -20°C 条件下存放。

[0073] 分别在存放3个月、6个月、9个月以及12个月后进行酶活性的有效性检测,方法如下:

[0074] (1) 取 $10\text{ng}/\mu\text{L}$, 50ng 的细菌16SDNA阳性标准品进行PCR扩增;

[0075] (2) 建库完成后,取 $5\mu\text{L}$ 进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,电泳条件以120V、25分钟为宜,使用可以指示500bp附近条带的Marker(Takara公司生产的DL 2,000)。

[0076] (3) 电泳结束后在透射紫外下拍照,观察各添加引物的文库在对应目的区域存在显著的目标条带,统计各个储存时间段不同处理方式后,预制板有效情况如表3所示。

[0077] 表3不同添加剂的预制板的有效情况

| 储存时间 | 添加剂类型 | 抽查个数 | 扩增成功个数 | 合格率 |
|----------------|---------|------|--------|------|
| [0078] 3 个月 | 无 | 24 | 23 | 96% |
| | BSA | 24 | 24 | 100% |
| | 海藻糖 | 24 | 24 | 100% |
| | BSA+海藻糖 | 24 | 24 | 100% |
| 6 个月 | 无 | 24 | 20 | 83% |
| | BSA | 24 | 24 | 100% |
| | 海藻糖 | 24 | 22 | 92% |
| [0079] 9 个月 | BSA+海藻糖 | 24 | 23 | 96% |
| | 无 | 24 | 16 | 67% |
| | BSA | 24 | 23 | 96% |
| | 海藻糖 | 24 | 19 | 79% |
| | BSA+海藻糖 | 24 | 21 | 88% |
| | 无 | 24 | 13 | 54% |
| 12 个月 | BSA | 24 | 20 | 83% |
| | 海藻糖 | 24 | 16 | 67% |
| | BSA+海藻糖 | 24 | 18 | 75% |

[0080] 结果显示:添加5 μ L 10mg/mL BSA溶液的预制板保存时间最久,在储存12个月后还能保持83%的有效率,添加5 μ L海藻糖溶液和BSA溶液按1:1的混合液的保存时间次之在储存12个月后保持75%的有效率,添加海藻糖溶液的保存效果较差仅为67%,但都显著高于不添加酶稳定剂的54%有效率。

[0081] 在选择压敏塑封膜的情况下,添加BSA溶液可以在-15~-25 $^{\circ}$ C保存12个月较为稳定,添加海藻糖溶液可以在-15~-25 $^{\circ}$ C保存9个月较为稳定。

[0082] 综上所述,采用添加5 μ L 10mg/mL BSA同时使用压敏铝膜的封膜方式制备得到的预制板,在-15~-25 $^{\circ}$ C保存条件下保存时间更久。

[0083] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请限定的范围。

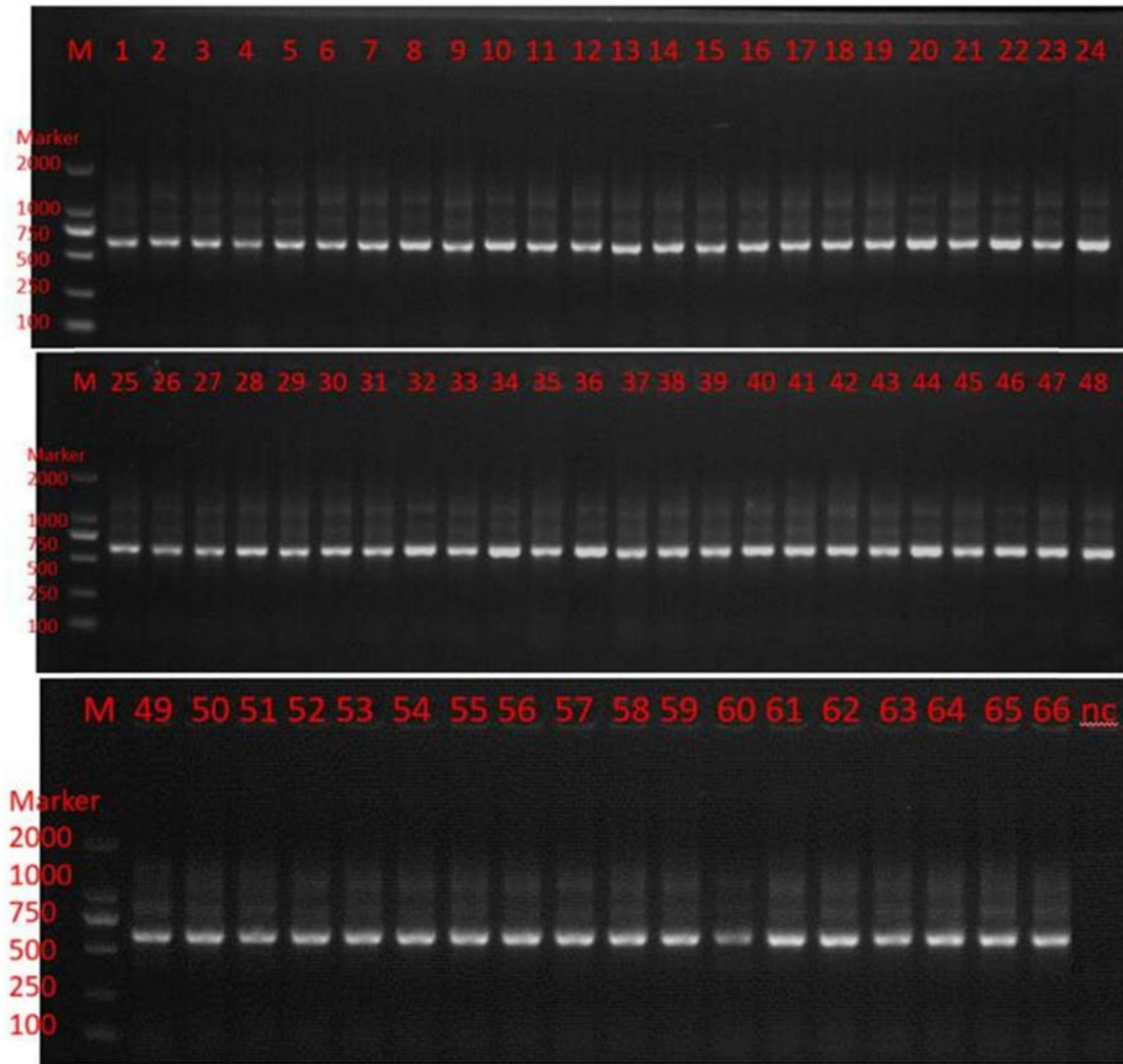


图1