



(21) 申请号 202410820774.2

(22) 申请日 2024.06.24

(71) 申请人 天根生化科技(北京)有限公司

地址 102200 北京市昌平区科技园区双营  
西路86号院5号楼一、三、四、五层和二  
层201

(72) 发明人 崔黎 邹爱兰 关绚丽 吴凡

刘玉方 李晓晨 孙克非

(74) 专利代理机构 深圳维启专利代理有限公司

44827

专利代理师 魏坤宇

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6806 (2018.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒以及利用该试剂盒进行核酸药物提取的方法

(57) 摘要

本申请涉及生物化学与分子生物学的技术领域,具体涉及一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒以及利用该试剂盒进行核酸药物提取的方法。该试剂盒包括:裂解液、结合液增强剂、磁珠悬浮液、去蛋白液、漂洗液与洗脱液;提取方法包括:首先将待测样本与裂解液充分混合,再加入结合液增强剂与磁珠悬浮液,再依次经过去蛋白液和漂洗液的漂洗,最后经过洗脱液的洗脱,即可获得待测样本中的核酸药物。利用本申请提供的试剂盒和提取方法搭配高通量核酸提取仪完成自动化提取,操作简便快速,减少人工操作。另外,利用本申请提供的试剂盒还可以同时提取纯化DNA与RNA分子药物,大大提升了核酸药物的检测效率。

1. 一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:裂解液、结合液增强剂、磁珠悬浮液、去蛋白液、漂洗液与洗脱液;

所述结合液增强剂由一种或多种不同极性的醇或醇的高分子聚合物以及盐类组成;

所述去蛋白液由盐、缓冲液与增强剂组成;所述盐为盐酸胍、异硫氰酸胍、氯化锂中的任意一种或多种;所述缓冲液选择50-100mM pH7.5-9.0的缓冲体系;所述增强剂由不同极性的醇或醇的高分子聚合物以及盐组成;

其中,所述醇为一元醇、二元醇或多元醇;所述盐类为氯化锂、氯化钠、氯化钾中的任意一种或多种。

2. 根据权利要求1所述的适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述结合液增强剂包括50-70%异丙醇、10-30%乙二醇高分子聚合物、1.5-2M氯化钠。

3. 根据权利要求2所述的适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述乙二醇高分子聚合物的分子量在2000-6000之间。

4. 根据权利要求1所述的适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述去蛋白液包括:2-3M异硫氰酸胍、50-100mM pH 8.0 Tris-HCl、5-10%乙二醇高分子聚合物、0.2-1M氯化钠,30-40%无水乙醇。

5. 根据权利要求1所述的适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述裂解液包括:2-4M异硫氰酸胍、质量浓度为1-4%的3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐、质量浓度为1-3%的十二烷基磺酸锂、100-200mM pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、1-2M氯化锂、4-6%的还原剂。

6. 根据权利要求1所述的适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述漂洗液包括:10-20mM pH 8.0 Tris-HCl、50-70% 无水乙醇。

7. 根据权利要求1所述的适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述洗脱液为无核酸酶的水。

8. 根据权利要求1所述的适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述磁珠悬浮液中的磁珠为带有一种或多种修饰基团的磁珠;

可选地,所述磁珠悬浮液中磁珠的粒径范围为0.1-1 $\mu$ m;

可选地,所述磁珠悬浮液包括羟基修饰磁珠、羧基修饰磁珠、氨基化磁珠、高分子聚合物包被磁珠中的任意一种或多种。

9. 根据权利要求1所述的适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒提取涉及的生物学样本包括但不限于:含有核酸药物的全血、血清、血浆或组织;所述核酸药物为DNA药物或RNA药物;所述DNA为质粒DNA或线性的双链DNA;所述RNA为100nt以下的小分子核糖核酸或几百至几千nt的大分子核糖核酸。

10. 一种利用权利要求1-9中任一项所述的试剂盒进行核酸药物提取的方法,其特征在于,所述方法具体包括以下步骤:首先将待测样本与裂解液充分混合,再加入结合液增强剂与磁珠悬浮液,再依次经过去蛋白液和漂洗液的漂洗,最后经过洗脱液的洗脱,即可获得待测样本中的核酸药物。

## 一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒以及利用该试剂盒进行核酸药物提取的方法

### 技术领域

[0001] 本申请涉及生物化学与分子生物学的技术领域,尤其涉及一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒以及利用该试剂盒进行核酸药物提取的方法。

### 背景技术

[0002] 核酸药物作为一种新型的治疗手段,从抑制疾病相关基因表达的根源上进行干预,在研究和应用方面取得了较多进展,已成为生物医学研究的热点之一。

[0003] 核酸药物研发主要分两部分:临床前的药物代谢评价以及临床阶段的安全性与药效评价。由于临床前的药物代谢评价所需实验模型以及涉及到的样本种类繁多,再加上核酸药物的易降解性和微量性,给核酸药物代谢的提取检测带来较多难题。

[0004] 传统的核酸药物代谢检测方法耗时长,对于低浓度的或小分子的样本容易出现漏检。因此,需要开发一种新的核酸药物代谢检测方法。

### 发明内容

[0005] 本申请提供一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒以及利用该试剂盒进行核酸药物提取的方法。利用本申请提供的试剂盒和提取方法能够从根本上解决核酸药物代谢提取检测过程中的易降解、漏检等难题。同时,可以搭配高通量核酸提取仪完成自动化提取,操作简便快速,减少人工操作。另外,利用本申请提供的试剂盒还可以同时提取纯化DNA与RNA分子药物,大大提升了核酸药物的检测效率。

[0006] 第一方面,本申请提供一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,采用如下技术方案:

[0007] 一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:裂解液、结合液增强剂、磁珠悬浮液、去蛋白液、漂洗液与洗脱液;

[0008] 所述结合液增强剂由一种或多种不同极性的醇或醇的高分子聚合物以及盐类组成;

[0009] 所述去蛋白液由盐、缓冲液与增强剂组成;所述盐为盐酸胍、异硫氰酸胍、氯化锂中的任意一种或多种;所述缓冲液选择50-100mM pH7.5-9.0的缓冲体系;所述增强剂由不同极性的醇或醇的高分子聚合物以及盐组成;

[0010] 其中,所述结合液增强剂和所述去蛋白液中,所述醇为一元醇、二元醇或多元醇;所述盐类为氯化锂、氯化钠、氯化钾中的任意一种或多种。

[0011] 本申请提供的试剂盒所提取的生物学样本包括但不限于:全血、血清、血浆、组织、拭子等。这些样本含有丰富的核酸酶,离体后保存不当很容易造成待检测核酸降解。因此,取样后立即向待测样本中加入裂解液,裂解样本的同时抑制核酸酶,保护待检测核酸。

[0012] 为了提升低浓度样本的得率,本申请综合大量实验数据,提出一种新的结合液增强剂。

[0013] 具体地,结合液增强剂包括一种或多种不同极性的醇或醇的高分子聚合物以及一定浓度的盐类,用于满足不同浓度核酸及不同分子量核酸的提取与回收。结合液增强剂通过增加疏水作用,帮助不同大小的核酸分子药物结合在固相支持物上,达到分离与纯化的目的。

[0014] 所涉及的不同极性的醇包括一元醇、二元醇以及多元醇。一元醇,例如无水乙醇、异丙醇,极性较强,加入体系后,会立刻破坏核酸分子周围的水化层,在一定用量下可以促使不同分子量大小的核酸吸附于固相介质上,同时也会使大量杂质结合于固相基质上,导致核酸纯度不高。多元醇或醇的高分子聚合物在一定用量下选择性地吸附核酸分子,同时不吸附杂质,可以提升核酸纯度。因此,依据纯化回收的核酸分子大小及纯度需求,选择一种或几种醇作为结合液增强剂,可以从整体上提升得率与纯度。

[0015] 所涉及的盐类可以是氯化锂、氯化钠、氯化钾中的任意一种或多种。

[0016] 可选地,所涉及的盐类为氯化钠。

[0017] 在一个具体的实施方式中,结合液增强剂包括:50-70%异丙醇、10-30%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量在2000-6000之间)、1.5-2M氯化钠。

[0018] 在一个具体的实施方式中,结合液增强剂的配方中,可以是50%异丙醇、60%异丙醇或70%异丙醇。

[0019] 在一个具体的实施方式中,结合液增强剂的配方中,可以是50-60%异丙醇、60-70%异丙醇。

[0020] 在一个具体的实施方式中,结合液增强剂的配方中,可以是10%乙二醇高分子聚合物、20%乙二醇高分子聚合物或30%乙二醇高分子聚合物。

[0021] 在一个具体的实施方式中,结合液增强剂的配方中,可以是10-20%乙二醇高分子聚合物或20-30%乙二醇高分子聚合物。

[0022] 在一个具体的实施方式中,结合液增强剂的配方中,可以是1.5M氯化钠或2M氯化钠。

[0023] 不同分子量的高分子聚合物对于核酸的固定以及杂质的去除效果不同。本申请中,选择分子量2000-6000范围的乙二醇高分子聚合物。

[0024] 与上述结合液增强剂匹配的固相基质,涉及可以吸附不同分子量的核酸、不吸附或极少吸附杂质的磁性颗粒。因此,可以是不同修饰基团的磁性颗粒混合使用来满足本申请的需求。磁珠悬浮液作为固相支持物在结合液增强剂作用下吸附不同大小的核酸分子药物。

[0025] 可选地,所述磁珠悬浮液中,磁珠可以是带有不同修饰基团的混合磁珠,也可以是不同粒径大小的混合磁珠。

[0026] 可选地,所述磁珠悬浮液中磁珠的粒径范围为0.1-1 $\mu$ m。

[0027] 可选地,所述磁珠悬浮液包括羟基修饰磁珠、羧基修饰磁珠、氨基化磁珠、高分子聚合物包被磁珠中的任意一种或多种。

[0028] 可选地,选择硅羟基与羧基修饰的磁珠。

[0029] 同时,去蛋白液漂洗的步骤同样重要。在纯化过程中将核酸药物吸附于固相支持物上,其它杂质被漂洗去除。本申请中,所涉及的去蛋白液包括盐、缓冲液、增强剂。

[0030] 其中,盐通常选择2-3M的离液盐。具体地,离液盐选择盐酸胍、异硫氰酸胍、氯化

锂。盐可以是不同强度的离液盐,使核酸吸附在固相支持物上而不被漂洗掉。

[0031] 其中,缓冲液通常选择50-100mM pH7.5-9.0的缓冲体系。

[0032] 其中,增强剂由不同极性的醇或醇的高分子聚合物以及盐组成。

[0033] 通常选择极性不同的结合液增强剂组合作用达到去除杂质、吸附核酸的目的。可选地,增强剂可以选择乙醇或丙醇结合乙二醇高分子聚合物的混合溶液。

[0034] 在一个具体的实施方式中,去蛋白液包括:2-3M异硫氰酸胍、50-100mM pH 8.0Tris-HCl、5-10%乙二醇高分子聚合物、0.2-1M氯化钠,30-40%无水乙醇。

[0035] 具体地,裂解液包括缓冲液、离液盐、表面活性剂、螯合剂、还原剂。其中,离液盐与表面活性剂主要用于裂解生物学样本、变性蛋白质;螯合剂用于螯合金属离子,抑制核酸酶活性;还原剂用于还原二硫键,抑制核酸酶,保护待检测核酸不被降解。

[0036] 可选地,还原剂为硫醇类还原剂。

[0037] 可选地,硫醇类还原剂可以是巯基乙醇、二硫苏糖醇或三(2-羧乙基)膦。

[0038] 在一个具体的实施方式中,裂解液包括:2-4M异硫氰酸胍、质量浓度为1-4%的3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐、质量浓度为1-3%的十二烷基磺酸锂、100-200mM pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、1-2M氯化锂、4-6%的还原剂。

[0039] 可选地,所述漂洗液包括:10-20mM pH 8.0Tris-HCl、50-70%无水乙醇。

[0040] 可选地,所述洗脱液为无核酸酶的水。

[0041] 可选地,所述试剂盒提取涉及的生物学样本包括但不限于:含有核酸药物的全血、血清、血浆或组织。

[0042] 可选地,所述核酸药物为DNA药物或RNA药物。

[0043] 可选地,所述DNA为质粒DNA或线性的双链DNA。

[0044] 可选地,所述RNA为100nt (nt,核糖核苷酸)以下的小分子核糖核酸或几百至几千nt的大分子核糖核酸。

[0045] 在一个具体的实施方式中,当目标为针对50bp小片段回收时,结合液增强剂包括:70%异丙醇、10%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量在2000-6000之间)、2M氯化钠,回收效果更佳。

[0046] 在一个具体的实施方式中,当目标为针对血液中分子较大的核酸药物的提取时,结合液增强剂包括:60%异丙醇、10%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量在2000-6000之间)、2M氯化钠,回收效果更佳。

[0047] 第二方面,本申请提供了一种利用上述试剂盒进行核酸药物提取的方法,采用如下技术方案:

[0048] 一种利用上述试剂盒进行核酸药物提取的方法,所述方法具体包括以下步骤:

[0049] 首先将待测样本与裂解液充分混合,再加入结合液增强剂与磁珠悬浮液,再依次经过去蛋白液和漂洗液的漂洗,最后经过洗脱液的洗脱,即可获得待测样本中的核酸药物。

[0050] 综上所述,本申请包括以下至少一种有益技术效果:

[0051] 1.利用本申请提供的试剂盒和提取方法能够从根本上解决核酸药物代谢提取检测过程中的易降解、漏检等难题。同时,可以搭配高通量核酸提取仪完成自动化提取,操作简便快速,减少人工操作。另外,利用本申请提供的试剂盒还可以同时提取纯化DNA与RNA分子药物,大大提升了核酸药物的检测效率。

[0052] 2. 本申请利用裂解液、结合液增强剂、磁珠悬浮液、去蛋白液、漂洗液与洗脱液,可以快捷、高效地分离纯化血清、血浆、全血以及组织等生物学样本中不同分子量的核酸药物,能够满足不同丰度核酸药物的检测与回收需求。

### 附图说明

[0053] 图1为50bp (base pair) 核酸分子药物提取检测峰图 (左图为传统方法提取结果,右图为本申请提取结果)。

[0054] 图2为50bp核酸分子药物成库峰图。

### 具体实施方式

[0055] 在详细描述本申请的实施方案之前,应当理解,本文所用术语仅用于描述特定实施方案的目的。除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语与该术语所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。

[0056] 在本申请中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0057] 在本申请中,术语“包含”或“包括”为开放式表达,即包括本申请所指明的内容,但并不排除其他方面的内容。

[0058] 本申请提供一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒。

[0059] 该试剂盒包括裂解液、结合液增强剂、磁珠悬浮液、去蛋白液、漂洗液与洗脱液。

[0060] 其中,裂解液包括:2-4M异硫氰酸胍、质量浓度为1-4%的3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐、质量浓度为1-3%的十二烷基磺酸锂、100-200mM pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、1-2M氯化锂、4-6%的还原剂。

[0061] 其中,结合液增强剂包括:50-70%异丙醇、10-30%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量倾向于2000-6000之间)、1.5-2M氯化钠。

[0062] 其中,磁珠悬浮液包含硅羟基与羧基修饰的磁珠颗粒,粒径范围为0.1-1 $\mu$ m,浓度为100mg/ml。

[0063] 其中,去蛋白液包括:2-3M异硫氰酸胍、50-100mM pH 8.0 Tris-HCl、5-10%乙二醇高分子聚合物、0.2-1M氯化钠,30-40%无水乙醇。

[0064] 其中,漂洗液包括:10-20mM pH 8.0 Tris-HCl、50-70%无水乙醇。

[0065] 其中,洗脱液为无核酸酶的水。

[0066] 本申请还提供了利用该试剂盒进行核酸药物提取的方法。

[0067] 该方法具体包括以下步骤:

[0068] (1) 样本裂解:取待测样本200-300 $\mu$ l,按照样本2-4倍体积加入裂解液以及20 $\mu$ l蛋白酶,充分混匀后,在65 $^{\circ}$ C金属浴上孵育10min。

[0069] 样本裂解之前需要根据具体的样本类型情况选择相应的样本处理方式。具体如下:当样本为血清、血浆以及全血等液体样本时,无需进行样本前处理,可以直接将样本进行裂解;当样本为组织样本时,进行裂解后需要转入均质管中进行均质匀浆处理;当样本为

粘稠的痰液样本时,需要加入还原剂进行液化处理,再进行裂解。

[0070] (2) 核酸结合:继续加入300 $\mu$ l结合液增强剂以及15 $\mu$ l磁珠悬浮液,进行核酸结合。

[0071] 在待测样本中加入裂解液后,样本中的核酸释放,在合适的结合液增强剂条件下,搭配磁珠颗粒,使核酸结合于磁珠上,完成初步纯化。

[0072] (3) 去蛋白液漂洗:磁珠颗粒吸附核酸后,将样本管置于磁力架上进行磁珠吸附,待磁珠颗粒完全吸附于管壁后,将溶液上清弃掉,加入900 $\mu$ l去蛋白液,涡旋混匀2min,充分清洗吸附于磁珠上的杂质;之后将样本管置于磁力架上进行磁珠吸附,待磁珠颗粒完全吸附于管壁后,将溶液上清弃掉,重复此步骤1遍。

[0073] (4) 漂洗液漂洗:加入900 $\mu$ l漂洗液,涡旋混匀2min,充分清洗吸附于磁珠上的杂质,之后将样本管置于磁力架上进行磁珠吸附,待磁珠完全吸附于管壁后,将溶液上清弃掉,重复此步骤1遍。

[0074] (5) 洗脱:将样本管敞口晾干5min,观察磁珠斜面处于潮湿状态,但不干裂即可,加入56 $^{\circ}$ C预热的洗脱液,充分混匀5min,置于磁力架上,静置2min,将洗脱液转入新管中,冻存于-20 $^{\circ}$ C或直接进行下游应用。

[0075] 为使本申请的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。基于本申请的实施例,本领域技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本申请保护的范围。

[0076] 实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0077] 以下结合实施例、附图、对比例以及检测试验对本申请作进一步详细说明。

[0078] 实施例

[0079] 实施例1

[0080] 本实施例提供一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒。并利用该试剂盒对50bp小分子核酸药物进行提取、纯化回收。

[0081] 待测样本为200 $\mu$ l全血或血浆,包含400ng 50bp的核酸分子药物(双链DNA、dsDNA)。

[0082] 具体包括以下步骤:

[0083] (1) 样本裂解:取待测样本200 $\mu$ l,按照样本2-4倍体积加入裂解液以及20 $\mu$ l蛋白酶,充分混匀后,在65 $^{\circ}$ C金属浴上孵育10min。

[0084] 裂解液包括:2M异硫氰酸胍、质量浓度为2%的3-[(3-胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐、质量浓度为2%的十二烷基磺酸锂、150mM pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、1.5M氯化锂、质量浓度为5%的巯基乙醇。

[0085] (2) 核酸结合:继续加入300 $\mu$ l结合液增强剂以及15 $\mu$ l磁珠悬浮液,进行核酸结合。

[0086] 结合液增强剂包括:70%异丙醇、10%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量在2000-6000之间)、2M氯化钠。

[0087] 磁珠悬浮液为硅羟基与羧基修饰的磁珠,粒径范围为0.1-1 $\mu$ m,浓度为100mg/ml。

[0088] (3) 去蛋白液漂洗:磁珠颗粒吸附核酸后,将样本管置于磁力架上进行磁珠吸附,待磁珠颗粒完全吸附于管壁后,将溶液上清弃掉,加入900 $\mu$ l去蛋白液,涡旋混匀2min,充分

清洗吸附于磁珠上的杂质;之后将样本管置于磁力架上进行磁珠吸附,待磁珠颗粒完全吸附于管壁后,将溶液上清弃掉,重复此步骤1遍。

[0089] 去蛋白液包括:2M异硫氰酸胍、100mM pH 8.0Tris-HCl、10%乙二醇高分子聚合物、1M氯化钠,30%无水乙醇。

[0090] (4) 漂洗液漂洗:加入900 $\mu$ l漂洗液,涡旋混匀2min,充分清洗吸附于磁珠上的杂质,之后将样本管置于磁力架上进行磁珠吸附,待磁珠完全吸附于管壁后,将溶液上清弃掉,重复此步骤1遍。

[0091] 漂洗液包括:10mM pH 8.0Tris-HCl、50%无水乙醇。

[0092] (5) 洗脱:将样本管敞口晾干5min,观察磁珠斜面处于潮湿状态,但不干裂即可,加入56 $^{\circ}$ C预热的洗脱液,充分混匀5min,置于磁力架上,静置2min,将洗脱液转入新管中,冻存于-20 $^{\circ}$ C或直接进行下游应用。

[0093] 洗脱液为无核酸酶的水。

[0094] 实施例2

[0095] 本实施例提供一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒。并利用该试剂盒对50bp小分子核酸药物进行提取、纯化回收。待测样本与实施例1的样本一致。

[0096] 本实施例与实施例1的不同之处在于:结合液增强剂的配方不同,具体如表1所示,其余操作步骤均与实施例1保持一致。

[0097] 对比例

[0098] 对比例1

[0099] 本对比例利用传统方法对实施例1的待测样本进行提取。该方法与实施例1的区别之处在于:结合液增强剂的配方不同,具体如表1所示,其余操作步骤均与实施例1保持一致。

[0100] 对比例2-5

[0101] 对比例2-5分别提供一种适用于核酸药物代谢提取检测的试剂盒。并利用该试剂盒对50bp小分子核酸药物进行提取、纯化回收。待测样本与实施例1的样本一致。

[0102] 上述对比例与实施例1的不同之处在于:结合液增强剂的配方不同,具体如表1所示,其余操作步骤均与实施例1保持一致。

[0103] 检测试验一

[0104] 分别取1 $\mu$ l实施例1以及对比例1-5获得的洗脱产物,用安捷伦高灵敏度DNA芯片检测提取效果。实施例1和对比例1对比的检测结果如图1所示。实施例1以及对比例1-5的提取效果如表1所示。

[0105] 图1为经安捷伦高灵敏度DNA芯片检测的50bp核酸分子药物回收效果。横坐标代表不同的DNA片段大小(用bp,碱基数目表示),纵坐标代表不同片段DNA的信号值,利用已知片段大小的Ladder,生成迁移时间与片段大小的标准曲线,即可通过不同迁移时间来确定样品的片段大小。通过样品峰面积对已知浓度的Marker或Ladder面积的比值来对样品进行定量。待检测片段的峰越高越宽,表示回收率越高。

[0106] 由图1可知,左图为传统方法的提取结果,显示50bp处核酸分子药物峰很低,几乎检测不到;右图为本实施例的试剂盒的提取结果,显示50bp处核酸分子药物回收率很高。

[0107] 表1实施例与对比例的提取效果



	编号	结合液增强剂的配方	检测结果 安捷伦 2100 检测 50bp (pg/ $\mu$ l)
[0108]	1	70%异丙醇、10%乙二醇高分子聚合物（聚合物分子量 4000）、 2M 氯化钠。	1098
	2	60%异丙醇、10%乙二醇高分子聚合物（聚合物分子量 4000）、 2M 氯化钠。	549
	1	200 $\mu$ l 异丙醇	176
对比例	2	50%丁二醇、10%乙二醇高分子聚合物（聚合物分子量 4000）、 2M 氯化钠	450
	3	60%丁二醇、10%乙二醇高分子聚合物（聚合物分子量 4000）、 2M 氯化钠	921
[0109]	4	70%丁二醇、10%乙二醇高分子聚合物（聚合物分子量 4000）、 2M 氯化钠	833
	5	30%丁二醇、30%异丙醇、10%乙二醇高分子聚合物（聚合物分子量 4000）、2M 氯化钠	684

[0110] 由表1可知,本申请实施例1提供的结合液增强液为50bp小片段回收的最佳方案。

[0111] 实施例3

[0112] 本实施例利用实施例1所得的包含核酸药物的提取产物进行二代测序建库。

[0113] 建库过程为本领域通用的方法,此处不再赘述。

[0114] 建库后经安捷伦高灵敏度DNA芯片检测,文库峰图如图2所示。

[0115] 图2为经安捷伦高灵敏度DNA芯片检测的50bp核酸分子药物成库峰图。提取产物包含50bp核酸分子药物,经过接头连接、分选以及PCR(聚合酶链式反应)富集等一系列二代测序文库构建步骤后,芯片检测可以看到如图2中箭头所示小分子核酸在文库中的分布结果。50bp小分子核酸片段经过建库后(连接二代测序接头序列120bp),最终以170bp的片段呈现在文库中。

[0116] 由上述可知,小分子核酸药物提取后,成功应用于下游二代测序文库构建,对于药物本身的代谢及与其相关的宏组学研究都有着深刻的意义。

[0117] 实施例4

[0118] 本实施例将核酸分子药物标准品DNA或质粒注入实验动物体内,进行动物组织与血液DNA提取与检测,确定核酸药物的代谢丰度,进而对药物进行临床前的评价。

[0119] 本实施例以鼠为实验动物,建立核酸分子药物(DNA)加标回收模型。首先,制作标准曲线,将标准品进行一系列稀释后,与样本同样进行后续操作。

[0120] 具体过程如下:

[0121] (1) 样本裂解:

[0122] 取100 $\mu$ l全血样本直接与380 $\mu$ l裂解液充分混匀,后加入20 $\mu$ l蛋白酶,充分混匀后,在65 $^{\circ}$ C金属浴上孵育10min。

[0123] 取5-100mg不同部位的组织匀浆液(组织样本需要加入380 $\mu$ l裂解液进行研磨,研磨条件:适宜粒径的钢珠或铅珠,55HZ,2个循环),后加入20 $\mu$ l蛋白酶,充分混匀后,在65 $^{\circ}$ C金属浴上孵育10min。

[0124] 裂解液包括:2M异硫氰酸胍、质量浓度为2%的3-[ (3-胆酰胺丙基) 二甲氨基]丙磺

酸内盐、质量浓度为2%的十二烷基磺酸锂、150mM pH 8.0的Tris-HCl缓冲液、1.5M氯化锂、质量浓度为5%的巯基乙醇。

[0125] (2) 核酸结合:待冷却到室温后,取处理好的样本450 $\mu$ l,加入300 $\mu$ l结合液增强剂以及15 $\mu$ l磁珠悬浮液,进行核酸结合。也可以搭配合适的耗材进行自动化提取。每组做两个平行。

[0126] 结合液增强剂包括:60%异丙醇、10%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量3000)、2M氯化钠。

[0127] 磁珠悬浮液为硅羟基与羧基修饰的磁珠,粒径范围为0.1-1 $\mu$ m,浓度为100mg/ml。

[0128] (3) 去蛋白液漂洗:磁珠颗粒吸附核酸后,将样本管置于磁力架上进行磁珠吸附,待磁珠颗粒完全吸附于管壁后,将溶液上清弃掉,加入900 $\mu$ l去蛋白液,涡旋混匀2min,充分清洗吸附于磁珠上的杂质;之后将样本管置于磁力架上进行磁珠吸附,待磁珠颗粒完全吸附于管壁后,将溶液上清弃掉,重复此步骤1遍。

[0129] 去蛋白液包括:2M异硫氰酸胍、100mM pH 8.0Tris-HCl、10%乙二醇高分子聚合物、1M氯化钠,30%无水乙醇。

[0130] (4) 漂洗液漂洗:加入900 $\mu$ l漂洗液,涡旋混匀2min,充分清洗吸附于磁珠上的杂质,之后将样本管置于磁力架上进行磁珠吸附,待磁珠完全吸附于管壁后,将溶液上清弃掉,重复此步骤1遍。

[0131] 漂洗液包括:10mM pH 8.0Tris-HCl、50%无水乙醇。

[0132] (5) 洗脱:将样本管敞口晾干5min,观察磁珠斜面处于潮湿状态,但不干裂即可,加入56 $^{\circ}$ C预热的洗脱液,充分混匀5min,置于磁力架上,静置2min,将洗脱液转入新管中,冻存于-20 $^{\circ}$ C或直接进行下游应用。

[0133] 洗脱液为无核酸酶的水。

[0134] 加标回收结果如表2所示。

[0135] 表2DNA加标回收率

样本类型	检测浓度1	检测浓度2	标准品	回收率(%)
肝	2.20E+07	2.32E+07	4.00E+07	113
心	2.35E+07	2.25E+07	4.00E+07	115
脾	2.15E+07	2.19E+07	4.00E+07	108
肾	2.45E+07	2.50E+07	4.00E+07	123
全血	1.89E+07	2.00E+07	4.00E+07	97

[0137] 注:回收率(%)=样本加标实测值 $\times$ 2/标品理论值 $\times$ 100。

[0138] 由于本实验最终洗脱体积为100 $\mu$ L,而加标体积为50 $\mu$ L,故需将样本加标实测值乘以2。

[0139] 通过实验鼠不同组织部位以及血液标准品回收结果可以看出,本申请所涉及的试剂盒与提取方法可以获得较高的回收效率,满足临床前新药研发的需求。回收率在50-150%之间,符合行业标准。

[0140] 由于血液和组织样本杂质较多,为了获得纯度更好的核酸药物,便于下游检测。本实施例所用的结合液增强剂为60%异丙醇,10%乙二醇高分子聚合物,2M氯化钠。

[0141] 对比例6-7

[0142] 对比例6-7将核酸分子药物标准品DNA或质粒注入实验动物体内,进行动物组织与血液DNA提取与检测,确定核酸药物的代谢丰度,进而对药物进行临床前的评价。

[0143] 待测样本为全血样本。上述对比例与实施例4的不同之处在于:结合液增强剂的配方不同,具体如表3所示,其余操作步骤均与实施例4保持一致。

[0144] 检测试验二

[0145] 分别取实施例4以及对比例6、7获得的洗脱产物,用Nanodrop2000测定浓度与纯度。结果如表3所示。

[0146] 表3实施例4与对比例6、7的提取效果

编号		样本类型	结合液增强剂的配方	浓度 (ng/ $\mu$ l)	260/280	260/230	
[0147]	实施 例	4	全血样 本	60%异丙醇、10%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量3000)、2M氯化钠	195.3	1.9	0.93
	对比 例	6		2.5 倍体积异丙醇	151.7	1.39	0.26
		7		70%异丙醇, 20%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量3000), 2.5M氯化钠	113	1.63	0.24

[0148] 表3中,260/280反应核酸蛋白质残留量,260/230反应杂质残留量,值越高,核酸纯度越高。由表3的检测结果可知,利用本申请的结合液增强剂配方的试剂盒提取所得核酸得率最高,纯度最好。由上述可知,针对血液中分子较大的核酸药物的提取,利用本申请实施例4提供的结合液增强剂效果更佳。

[0149] 对比例8-9

[0150] 对比例8-9将核酸分子药物标准品DNA注入实验动物体内,进行动物组织与血液DNA提取与检测,确定核酸药物的代谢丰度,进而对药物进行临床前的评价。

[0151] 待测样本为全血样本。上述对比例与实施例4的不同之处在于:去蛋白液的配方不同,具体如表4所示,其余操作步骤均与实施例4保持一致。

[0152] 检测试验三

[0153] 分别取实施例4以及对比例8、9获得的洗脱产物,用Nanodrop2000测定浓度与纯度。结果如表4所示。

[0154] 表4实施例4与对比例8、9的提取效果

编号		样本类型	去蛋白液的配方	浓度 (ng/ $\mu$ l)	260/280	260/230	
[0155]	实施 例	4	全血样 本	2M 异硫氰酸胍、100mM pH 8.0 Tris-HCl、10%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量3000)、1M氯化钠, 30%无水乙醇	195.3	1.9	0.93
	对比 例	8		2M 异硫氰酸胍、100mM pH 8.0 Tris-HCl、40%无水乙醇	171.4	1.2	0.4
		9		2M 异硫氰酸胍、100mM pH 8.0 Tris-HCl、40%异丙醇、5%乙二醇高分子聚合物(聚合物分子量3000)、0.5M氯化钠	142.2	1.39	0.6

[0156] 由表4的检测结果可知,利用本申请的去蛋白液配方的试剂盒提取所得核酸得率最高,纯度最好。

[0157] 实施例5

[0158] 本实施例将核酸分子药物标准品RNA或病毒蛋白包裹的RNA注入实验动物体内,定期进行动物组织与血液RNA提取与检测,检测药物的代谢丰度,对药物研发阶段做出评判。

[0159] 本实施例分别以SD大鼠与恒河猴为实验动物,建立核酸分子药物(RNA)加标回收

模型。

[0160] 具体过程如下：

[0161] 首先，制备标准曲线，分别用SD大鼠肝脏与恒河猴空白全血RNA稀释液将标准品储备液进行一系列稀释。

[0162] 其次，准备待测样本，用稀释液将标准品储备液 ( $2.00 \times 10^9$  copies/ $\mu$ L) 配制成高 ( $2.00 \times 10^7$  copies/ $\mu$ L)、低 ( $2.00 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L) 两个浓度阳性溶液作为待测样本，再分别按1:4比例加入到SD大鼠与恒河猴空白全血裂解液(全血:裂解液=1:4)中制备成高、低浓度的提取样品，每个浓度平行制备3套，每套需进行3个分析批的RNA提取。

[0163] 标准品与待检样本分别取200 $\mu$ L，加入450 $\mu$ L裂解混合液和20 $\mu$ L蛋白酶K至2.0mL离心管或96孔深孔板(可以搭配自动化提取仪完成实验)，涡旋混匀，室温静置5min。裂解后取500 $\mu$ L进行RNA提取。

[0164] 提取方法及试剂同实施例4中的提取方法和试剂。

[0165] 在同一分析批进行RT-PCR检测，得出提取回收率，回收率计算公式如下：

[0166] 回收率(Recovery%) = [(提取样品实测浓度) × 洗脱体积] / [(未提取样品实测浓度) × 提取时实际上样体积] × 100%。回收率的合格标准：各浓度质控样品回收率精密度(%CV)应 $\leq$ 30.0%。

[0167] 回收率计算如表5所示。

[0168] 表5RNA加标回收率

方案	标准品投入量	SD 鼠回收率		猴回收率	
1	2 $\times$ 10 <sup>7</sup>	55.10%	55.20%	85.20%	66.80%
2		52.60%	49.60%	92.80%	70.50%
3		63.70%	73.80%	92.70%	84.00%
1	2 $\times$ 10 <sup>5</sup>	89.00%	100.20%	96.70%	116.40%
2		89.70%	101.10%	125.50%	136.70%
3		87.90%	95.90%	84.40%	107.20%

[0170] 由表5的回收率结果显示，在核酸分子药物检测RNA加标回收模型中，本申请所涉及的试剂盒与提取方法可以达到高效回收RNA药物标准，对于高低不同浓度的标准品回收率均可以满足行业标准。

[0171] 在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本申请的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0172] 最后应说明的是：以上实施例仅用以说明本申请的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述实施例对本申请进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本申请各实施例技术方案的精神和

范围。

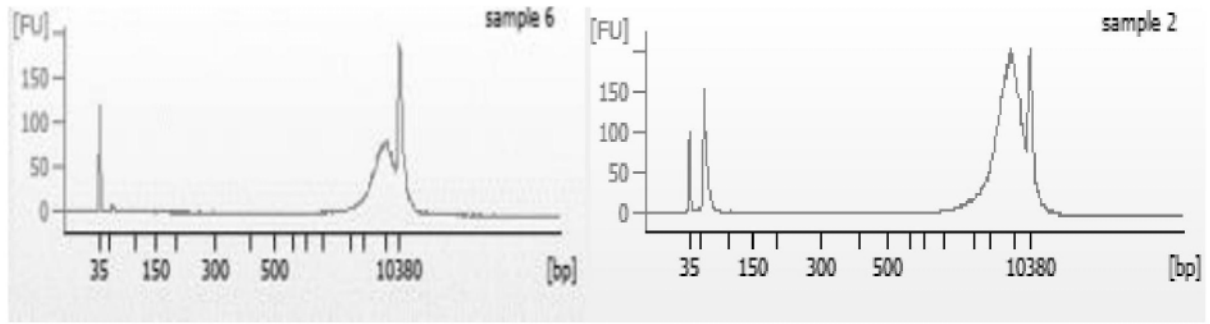


图1

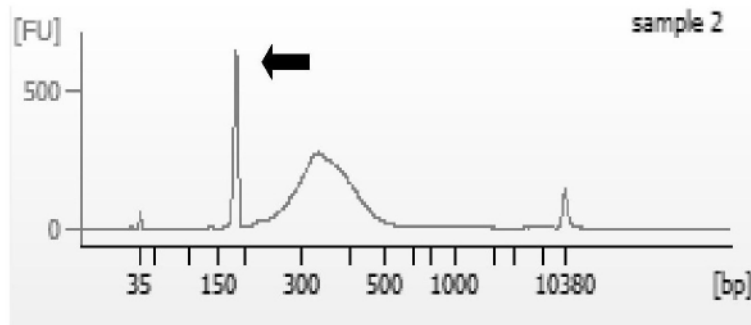


图2