



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114015758 B

(45) 授权公告日 2022.06.24

(21) 申请号 202111207256.6

(22) 申请日 2021.10.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114015758 A

(43) 申请公布日 2022.02.08

(73) 专利权人 无锡百泰克生物技术有限公司
地址 214174 江苏省无锡市无锡惠山经济
开发区惠山大道1719-5号四层A区、
1719-3号B区二层、1719-16号一层二
层

(72) 发明人 蔡禹希 李锦锦 周志图

(74) 专利代理机构 深圳市恒程创新知识产权代
理有限公司 44542
专利代理师 赵正琪

(51) Int.Cl.

C12Q 1/686 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 112048545 A, 2020.12.08
JP 2017029010 A, 2017.02.09
EP 1498492 A1, 2005.01.19
CN 110747263 A, 2020.02.04

审查员 马冰

权利要求书1页 说明书15页 附图3页

(54) 发明名称

一种冻干保护剂、荧光PCR检测试剂盒及冻干工艺

(57) 摘要

本发明提供一种冻干保护剂、荧光PCR检测试剂盒及其冻干工艺,其中,冻干保护剂用于荧光PCR试剂的冻干,冻干保护剂包括以下组分:海藻糖、羟乙基淀粉和吐温20。本发明的冻干保护剂通过采用海藻糖、羟乙基淀粉和吐温20,在冻干过程中既维持了蛋白质的活性构象、具有适合的玻璃化温度,又在冻结和脱水过程对蛋白质起到很好的保护作用,并且不会对PCR反应产生抑制作用。该冻干保护剂可以应用于不同厂商的荧光PCR试剂的冻干,产品的通用性强,对荧光PCR试剂性能无抑制作用。

1. 一种荧光PCR检测试剂盒,其特征在于,包括冻干保护剂,所述冻干保护剂包括以下组分:海藻糖、羟乙基淀粉和吐温20。

2. 如权利要求1所述的荧光PCR检测试剂盒,其特征在于,所述荧光PCR检测试剂盒包括混合液,所述混合液包括荧光PCR试剂和所述冻干保护剂;所述混合液中,所述海藻糖的终浓度为1-12% (W/V),所述羟乙基淀粉的终浓度为1-10% (W/V),所述吐温20的终浓度为0.01-1.00%。

3. 如权利要求2所述的荧光PCR检测试剂盒,其特征在于,所述混合液中,所述海藻糖的终浓度为1.5-9.0% (W/V),所述羟乙基淀粉的终浓度为1.2-9.0% (W/V),所述吐温20的终浓度为0.03-0.80%。

4. 如权利要求1所述的荧光PCR检测试剂盒,其特征在于,所述冻干保护剂还包括无菌纯化水。

5. 一种冻干工艺,采用如权利要求1至4任意一项中所述的冻干保护剂对荧光PCR试剂冻干,其特征在于,包括以下步骤:

将冻干保护剂与荧光PCR试剂混合均匀,得到混合液;

将所述混合液装入承载物中,并按照预设冻干程序进行冷冻干燥,得到冻干成品。

6. 如权利要求5所述的冻干工艺,其特征在于,所述预设冻干程序为:

预冻阶段:隔板温度为-45℃--55℃,冷阱温度为-65℃--75℃,保持2.5-4小时;

升华干燥阶段:隔板温度为-40℃--30℃,冷阱温度为-65℃--75℃,开启真空,真空度 $\leq 10\text{Pa}$,保持6-8小时后,温度开始升至-18℃--12℃,保持时间为1-2小时;

再升华干燥阶段:继续保持真空度 $\leq 10\text{Pa}$,冷阱温度为-65℃--75℃,板层温度升至0-10℃,保持时间1-2小时后,板层温度升至15-25℃,保持时间3-6小时。

7. 如权利要求5所述的冻干工艺,其特征在于,所述承载物包括PCR管、西林瓶或微流控芯片。

一种冻干保护剂、荧光PCR检测试剂盒及冻干工艺

技术领域

[0001] 本发明涉及冻干技术领域,特别涉及一种冻干保护剂、荧光PCR检测试剂盒及其冻干工艺。

背景技术

[0002] 荧光PCR试剂在冷冻干燥过程中,必须添加冻干保护剂来保护蛋白的固有结构,防止蛋白类活性物质在冻结和干燥过程中产生损伤。但是,由于各厂商生产的荧光PCR试剂在来源、组分、比例和制备工艺上存在差异,导致不同厂家生产的荧光PCR试剂均需筛选适合的冻干保护剂成分,优化反应体系,整个研究过程周期长,工作量大,成本较高。

发明内容

[0003] 本发明的主要目的是提供一种冻干保护剂、荧光PCR检测试剂盒及其冻干工艺,旨在提供一种通用的冻干保护剂。

[0004] 为实现上述目的,本发明提出的冻干保护剂,所述冻干保护剂用于荧光PCR试剂的冻干,包括以下组分:海藻糖、羟乙基淀粉和吐温20。

[0005] 在一实施例中,所述冻干保护剂还包括无菌纯化水。

[0006] 本发明还提出一种荧光PCR检测试剂盒,所述荧光PCR检测试剂盒包括上述冻干保护剂,所述冻干保护剂用于荧光PCR试剂的冻干,包括以下组分:海藻糖、羟乙基淀粉和吐温20。

[0007] 在一实施例中,所述荧光PCR检测试剂盒包括混合液,所述混合液包括荧光PCR试剂和所述冻干保护剂,所述混合液中,所述海藻糖的终浓度为1-12% (W/V),所述羟乙基淀粉的终浓度为1-10% (W/V),所述吐温20的终浓度为0.01-1.00%。

[0008] 在一实施例中,所述混合液中,所述海藻糖的终浓度为1.5-9.0% (W/V),所述羟乙基淀粉的终浓度为1.2-9.0% (W/V),所述吐温20的终浓度为0.03-0.80%。

[0009] 本发明还提出一种冻干工艺,采用上述冻干保护剂对荧光PCR试剂冻干,其特征在于,包括以下步骤:

[0010] 将冻干保护剂与荧光PCR试剂混合均匀,得到混合液;

[0011] 将所述混合液分装入承载物中,并按照预设冻干程序进行冷冻干燥,得到冻干成品。

[0012] 在一实施例中,所述预设冻干程序为:

[0013] 预冻阶段:隔板温度为-45℃—-55℃,冷阱温度为-65℃—-75℃,保持2.5-4小时;

[0014] 升华干燥阶段:隔板温度为-40℃—-30℃,冷阱温度为-65℃—-75℃,开启真空,真空度 $\leq 10\text{Pa}$,保持6-8小时后,温度开始升至-18℃—-12℃,保持时间为1-2小时;

[0015] 再升华干燥阶段:继续保持真空度 $\leq 10\text{Pa}$,冷阱温度为-65℃—-75℃,板层温度升至0-10℃,保持时间1-2小时后,板层温度升至15-25℃,保持时间3-6小时。

[0016] 在一实施例中,所述承载物包括PCR管、西林瓶或微流控芯片。

[0017] 本发明技术方案采用海藻糖对荧光PCR试剂中蛋白质进行有效保护,海藻糖与羟乙基淀粉结合使用可相互弥补不足,避免了玻璃化温度过低或过高,同时可以保持蛋白质的天然构型,提高了蛋白质的冻干活性及储存稳定性。另外,吐温20降低了冻干过程中冰水界面张力所引起的蛋白质冻结和脱水变性,并且在复溶过程中作为润滑剂对蛋白质进行保护。

[0018] 本发明的冻干保护剂通过采用海藻糖、羟乙基淀粉和吐温20,在冻干过程中既维持了蛋白质的活性构象、具有适合的玻璃化温度,又在冻结和脱水过程对蛋白质起到很好的保护作用,并且不会对PCR反应产生抑制作用。该冻干保护剂可以应用于不同厂商的荧光PCR试剂的冻干,产品的通用性强,对荧光PCR试剂性能无抑制作用。

附图说明

[0019] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图示出的结构获得其他的附图。

[0020] 图1为本发明实施例1中不同厂家酶的冻干成品外观图;

[0021] 图2为对比例1的不同厂家酶的冻干成品外观图;

[0022] 图3为对比例2的不同厂家酶的冻干成品外观图;

[0023] 图4为对比例3的不同厂家酶的冻干成品外观图;

[0024] 图5为本发明实施例2中样品在西林瓶中的冻干成品外观图;

[0025] 图6为本发明实施例3中样品4在微流控芯片的冻干成品外观图;

[0026] 图7为本发明实施例3中对比5至7在微流控芯片的冻干成品外观图(由左往右依次是对比5至7)。

具体实施方式

[0027] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0028] 由于荧光PCR技术快速、灵敏、准确的特点,如今已被广泛应用于病原体诊断、癌症精准治疗、单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms,SNP)检测、法医鉴定、食品安全等领域,如新型冠状病毒的核酸检测,其已成为现代医学不可或缺的重要技术之一。现阶段,荧光PCR试剂需要在-20℃以下温度保存才能保持活性,但保存、运输和使用过程中的温度升高、反复冻融都会降低试剂的检测性能,特别是在疫情期间,交通运输受到阻碍,试剂失效的风险及冷链管理成本大大增加,不能适应冷链条件较差的基层医疗机构及国际长途运输中的应用。

[0029] 冷冻干燥技术是一种将溶剂在低温下冷冻,然后将其固态直接升华为气态的干燥方法。其优点为:低温下干燥可减少热敏物质(如蛋白质)变性;冻干后产品性状不变,复溶后仍保留很好的活性。冷冻干燥技术应用于荧光PCR试剂,可使荧光PCR试剂常温保存,适应

长途运输的要求,使用前无需解冻,完全避免了反复冻融对试剂活性的影响。

[0030] 但是,荧光PCR试剂在冷冻干燥过程中必须添加冻干保护剂来保护蛋白类活性物质的固有结构,防止蛋白类活性物质在冻结和干燥过程中产生损伤。而现有的荧光PCR试剂由于各厂商生产的荧光PCR试剂在来源、组分、比例和制备工艺上存在差异,导致不同厂家生产的荧光PCR试剂搭配对应的冻干保护剂,冻干保护剂的通用性能差。

[0031] 本发明提出一种冻干保护剂。

[0032] 在本发明实施例中,该冻干保护剂用于荧光PCR试剂的冻干,包括以下组分:海藻糖、羟乙基淀粉和吐温20。

[0033] 本发明技术方案采用海藻糖对荧光PCR试剂中蛋白质进行有效保护,海藻糖与羟乙基淀粉结合使用可相互弥补不足,避免了玻璃化温度过低或过高,同时可以保持蛋白质的天然构型,提高了蛋白质的冻干活性及储存稳定性。另外,吐温20降低了冻干过程中冰水界面张力所引起的蛋白质冻结和脱水变性,并且在复溶过程中作为润滑剂对蛋白质进行保护。

[0034] 本发明的冻干保护剂通过采用海藻糖、羟乙基淀粉和吐温20,在冻干过程中既维持了蛋白质的活性构象、具有适合的玻璃化温度,又在冻结和脱水过程对蛋白质起到很好的保护作用,并且不会对PCR反应产生抑制作用。该冻干保护剂可以应用于不同厂商的荧光PCR试剂的冻干,产品的通用性强,对荧光PCR试剂性能无抑制作用。

[0035] 具体的,海藻糖既能在冷冻过程中增加蛋白质的自由能,从而阻止蛋白变性,又能在干燥脱水过程中取代蛋白质与水分子间的氢键来稳定蛋白,防止蛋白质脱水效应所带来的活性减少,进而使蛋白质可以维持天然构型,对蛋白质起到保护作用。

[0036] 海藻糖是由两个葡萄糖分子通过半缩醛羟基缩合而成,海藻糖在高温、高寒、高渗透压及干燥失水等条件下,能在表面形成独特的保护膜,有效的保护蛋白分子不变性失活,一方面避免了低温对蛋白质的损伤,另一方面将蛋白质分子支撑包裹起来,使之不易变形。海藻糖的玻璃化温度高,吸湿性低,因此海藻糖溶液更不容易形成冰晶;同时,海藻糖周围的不冻水分子数是糖类最多,能够形成刚性更强的海藻糖/水结构,抗冷冻脱水能力更强。虽然海藻糖的玻璃化温度高于蔗糖,但相对来说,其玻璃化温度偏低,导致整个溶液的玻璃化温度很低,冻干时不易成形,而保持长时间的低温虽可以避免塌陷,但会造成蛋白质活性损失。

[0037] 具体的,羟乙基淀粉是玉米或土豆中支链淀粉的葡萄糖环经羟乙基化形成的高分子复合物,是大分子物质,在提高溶液的玻璃化温度同时,又能很好的保护蛋白质活性,维持蛋白质的稳定性。并且,羟乙基淀粉还是一种很好的冻干赋形剂,利于产品的成形。

[0038] 羟乙基淀粉具有较高的玻璃化温度,但不能保持蛋白质的天然构型。通过羟乙基淀粉和海藻糖的结合使用,羟乙基淀粉可以提高溶液的玻璃化温度,从而既发挥了海藻糖保护蛋白质的特性,又解决玻璃化温度低导致的冻干不成形的问题,从而提高了蛋白质的冻干活性及储存稳定性。

[0039] 具体的,该吐温20是非离子表面活性剂,可溶于水、乙醇、甲醇等。为降低冻干过程中冰水界面张力所引起的蛋白质冻结和脱水变性,并且在复溶过程中作为润滑剂保护蛋白质,在冻干保护剂中同时加入吐温20。吐温20具有相对较低的临界胶束浓度,在较低浓度下就可满足保护作用,并且,起到增溶作用,提高组分的溶解性能。

[0040] 该冻干保护剂的溶剂有多种,在一实施例中,所述冻干保护剂还包括无菌纯化水,不但减少了溶液对蛋白质等物质的影响,还避免带入细菌或病毒,影响后续的实验结果,减少干扰因素。

[0041] 本发明还提出一种荧光PCR检测试剂盒,该荧光PCR检测试剂盒包括上述冻干保护剂。由于本荧光PCR检测试剂盒采用了上述所有实施例的全部技术方案,因此至少具有上述实施例的技术方案所带来的所有有益效果,在此不再一一赘述。其中,该荧光PCR检测试剂盒可以检测甲型流感病毒、乙型流感病毒、新型冠状病毒等等。

[0042] 在一实施例中,所述荧光PCR检测试剂盒包括混合液,所述混合液包括荧光PCR试剂和所述冻干保护剂,所述混合液中,所述海藻糖的终浓度为1-12% (W/V),羟乙基淀粉的终浓度为1-10% (W/V),吐温20的终浓度为0.01-1.00%。通过特定含量的海藻糖、羟乙基淀粉和吐温,使得溶液具有较高的玻璃化温度,冻干过程中维持蛋白质的活性构象,对荧光PCR试剂中的蛋白质起到很好的保护作用,也不会对后续的PCR反应产生抑制作用,从而在保护蛋白质的同时,不影响荧光PCR试剂性能。需要说明的是,该混合液为冻干前冻干保护剂和荧光PCR试剂相混合形成的混合溶液。

[0043] 进一步地,在一实施例中,所述混合液中,所述冻干保护剂的海藻糖的终浓度为1.5-9.0% (W/V),所述羟乙基淀粉的终浓度为1.2-9.0% (W/V),所述吐温20的终浓度为0.03-0.80%。

[0044] 本发明还提出一种冻干工艺,该冻干工艺采用上述冻干保护剂对荧光PCR试剂进行冻干,包括以下步骤:

[0045] S100、将冻干保护剂与荧光PCR试剂混合均匀,得到混合液;

[0046] S200、将所述混合液分装入承载物中,并按照预设冻干程序进行冷冻干燥,得到冻干成品。

[0047] 通过将混合液按照预设的冻干程序冻干,得到的冻干成品,实现对荧光PCR试剂的冻干,最终获得冻干型的荧光PCR检测试剂盒,从而可以在市场上售卖和运输。

[0048] 在一实施例中,所述预设冻干程序为:

[0049] 预冻阶段:隔板温度为-45℃—-55℃,冷阱温度为-65℃—-75℃,保持2.5-4小时;

[0050] 升华干燥阶段:隔板温度为-40℃—-30℃,冷阱温度为-65℃—-75℃,开启真空,真空度 $\leq 10\text{Pa}$,保持6-8小时后,温度开始升至-18℃—-12℃,保持时间为1-2小时;

[0051] 再升华干燥阶段:继续保持真空度 $\leq 10\text{Pa}$,冷阱温度为-65℃—-75℃,板层温度升至0-10℃,保持时间1-2小时后,板层温度升至15-25℃,保持时间3-6小时。

[0052] 在S100步骤中,先分别制备冻干保护剂和荧光PCR试剂,再将冻干保护剂和荧光PCR试剂混合。具体的,量取海藻糖、羟乙基淀粉和吐温20溶解在溶剂中,得到冻干保护剂。将缓冲液、引物、探针、dNTPs、酶等与溶剂混合均匀,得到荧光PCR试剂。可以理解的是,冻干保护剂的溶剂与荧光PCR试剂的溶剂可以相同,也可以不同,在一实施例中,冻干保护剂的溶剂与荧光PCR试剂的溶剂均为无菌纯化水。

[0053] S200步骤中,混合液分装也可以不分装,为了用户使用时无需配液、分装步骤,减少了试剂损耗和试剂污染的风险,在一实施例中,混合溶液分装入承载物。将承载物及混合液一同放入冷冻干燥机,按照预设的冻干程序冻干,从而获得冻干成品。

[0054] 具体的,该冻干程序包括预冻阶段、升华干燥阶段和再升华干燥阶段,引物、酶等

在低温下冻结成固态,然后在真空下将其中水分直接升华成气态而脱水的干燥过程。再升华干燥阶段的升温,使溶液中的残余水分以定量非共价键形式存在,以维持蛋白质活性的稳定,延长保存时间,对维持蛋白质的活性、产品的外观形态是非常重要的。

[0055] 承载混合液的承载物有多种,在一实施例中,所述承载物包括PCR管、西林瓶或微流控芯片。采用上述的冻干保护剂和冻干工艺,可实现在西林瓶、PCR管、微流控芯片中冻干,进一步提高了该冻干保护剂的通用性,解决了不同承载物其冻干工艺需要重新研究的问题,降低了企业的研发周期和工作量,降低了产品的研发成本。其中,PCR管可以是八连排PCR管。通过采用该预设冻干程序和承载物,获得的冻干成品可在37摄氏度至少保存30天,4℃至少保存8个月,且产品的性能保持不变。

[0056] 下面将结合具体实施例对本发明的实施方案进行详细描述,但是本领域技术人员将会理解,下列实施例仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0057] 实施例1对不同厂家酶原料的冻干保护作用

[0058] (1) 制备2×冻干保护剂:称取海藻糖8g和羟乙基淀粉8g,并加入100μL吐温20,加入无菌纯化水溶解后定容至100mL,备用。

[0059] (2) 制备荧光PCR试剂:购买各试剂厂家的无甘油或甘油含量低(<1%)的可冻干Taq酶、逆转录酶、RNA酶抑制剂三种酶原料进行RT-PCR体系构建,后加入流感病毒检测用引物、探针等。

[0060] 其中,各试剂厂家为市面上常见的荧光PCR试剂厂家酶原料厂家,包括罗氏诊断产品(上海)有限公司、Takara Bio Inc.、南京诺唯赞生物科技有限公司、Meridian Bioscience、翌圣生物科技(上海)股份有限公司、珠海宝锐生物科技有限公司、武汉爱博泰克生物科技有限公司。

[0061] (3) 制备试验混合液:将上述2×冻干保护剂与荧光PCR试剂混合,得到PCR反应体系。其中,该海藻糖终浓度为4%(W/V)、羟乙基淀粉终浓度为4%(W/V)、吐温20终浓度为0.05%,其它组分见表1。

[0062] 表1PCR反应体系中各组分浓度

[0063]

成分	浓度
Taq酶(可冻干)	0.06U/μL
逆转录酶(可冻干)	1.5U/μL
RNA酶抑制剂(可冻干)	0.5U/μL
MgCL ₂	2.5mM
Tris-Hcl (PH8.3)	20mM
KCL	80mM
dNTPs	200nM
FluA-F(甲型流感病毒上游引物)	200nM
FluA-R(甲型流感病毒下游引物)	200nM
FluA-P(甲型流感病毒FAM荧光探针)	200nM
FluB-F(乙型流感病毒上游引物)	300nM

FluB-R(乙型流感病毒下游引物)	300nM
FluB-P(乙型流感病毒VIC荧光探针)	300nM
RnaseP-F(人源性内标基因上游引物)	100nM
RnaseP-R(人源性内标基因下游引物)	100nM
RnaseP-P(人源性内标基因ROX荧光探针)	100nM
2×冻干保护剂	1×
灭菌纯化水	每人份补足至20μL

[0064] 将各厂家酶原料配制好的上述体系分装20μL至八连排PCR管的管底,转移至八连管冻干模具中并放入冷冻干燥机板层中,冷冻干燥机中按以下冻干程序进行冻干:

[0065] 表2冻干程序各步骤参数

步骤序号	温度 (°C)	时间 (h)	真空度
1	-50	3	无
2	-35	6	10pa 以下
3	-18	1	
4	10	1	10pa 以下
5	25	3	
6	25	2	极限真空

[0066] (4) 性能评价:冻干结束后,分别对各厂家酶冻干后的冻干成品进行外观、扩增性能、加速稳定性的评价。

[0068] 1) 外观评价:请参照图1,通过外观观察,各厂家酶冻干后的冻干成品外观均成形良好、光滑完整、无空洞塌陷情况。

[0069] 2) 扩增性能评价:检测Ct值,其结果见表3。

[0070] 表3不同厂家酶的PCR反应体系的Ct值

冻干试剂所用酶厂家	检测限浓度样本扩增 Ct 值 (重复 3 次)			中阳性样本扩增 Ct 值 (重复 3 次)		
	罗氏	36.421	36.791	36.421	32.484	32.692
Takara	37.858	37.707	37.858	32.556	32.489	32.452
诺唯赞	36.823	36.762	36.823	32.982	32.567	32.037
Meridian	36.406	36.255	36.406	32.986	32.965	32.333
翌圣	36.396	36.966	36.396	33.051	32.680	32.004
宝锐	36.737	38.618	36.737	32.418	32.961	32.489
爱博泰克	35.903	37.733	35.903	32.868	32.854	32.871
液体 PCR 试剂对照	37.157	37.983	37.195	32.314	32.912	32.404

[0071] 根据表3,各厂家酶冻干后PCR反应体系试剂性能与液体PCR试剂对照扩增效果相

比,检测限样本可以100%检出。中阳性样本扩增与液体对照相比,平均Ct值相差均在1以内。上述实验结果表明采用本发明中利用该冻干保护剂和冻干工艺可以维持冻干成品的扩增性能不变。

[0073] 3) 加速稳定性评价:将以上各组别冻干试剂放入37℃存放,每隔10天进行一次扩增性能评价,结果见表4。

[0074] 表4不同厂家酶的PCR反应体系扩增性能评价结果

酶厂家名称	第0天 Ct值	第10天 Ct值	第20天 Ct值	第30天 Ct值	第40天 Ct值	第50天 Ct值
罗氏	32.5	32.4	32.7	32.5	33.0	34.0
Takara	32.5	31.9	32.5	32.6	32.9	33.0
诺唯赞	32.5	32.0	32.6	32.8	33.2	34.0
Meridian	32.8	32.3	33.0	32.5	32.8	32.6
翌圣	32.6	32.7	32.7	32.6	32.3	34.0
宝锐	32.6	32.5	33.0	33.0	32.4	33.4
爱博泰克	32.9	32.6	32.9	33.0	32.0	33.9
液体对照	32.5	/	/	/	/	/

[0075] 根据表4可知,各厂家酶所冻干后的冻干成品在37℃放置40天内Ct值变化均在1以内,液体对照在37℃放置10天后靶标扩增失败。该结果表明,采用本发明中的冻干保护剂和冻干工艺可以维持冻干成品在37℃放置40天内,扩增性能保持不变。

[0076] 综上,采用本发明的冻干保护剂可在八连排耗材中形成冻干成品,冻干保护剂对不同厂家酶原料组成的荧光PCR试剂均可起到很好的保护作用,冻干后成形较好,冻干前后未损伤试剂的扩增性能,37℃加速稳定性可达40天。

[0077] (5) 为了验证本发明冻干保护剂的作用,制备对比混合液:制备对比冻干保护剂,并与上述荧光PCR试剂混合,得到PCR反应体系。将得到的PCR反应体系分装20μL至八连排PCR管管底,按照表2的冻干程序在冷冻干燥机中冻干。

[0078] 对比例1:海藻糖终浓度为4% (W/V)、不含羟乙基淀粉、吐温20终浓度为0.05%,其它组分与表1相同。

[0079] 对比例2:海藻糖终浓度为4% (W/V)、羟乙基淀粉终浓度为4% (W/V)、不含吐温20,其它组分与表1相同。

[0080] 对比例3:不含海藻糖、羟乙基淀粉终浓度为4% (W/V)、吐温20终浓度为0.05%,其它组分与表1相同。

[0081] (6) 性能评价:冻干结束后,分别对各厂家酶冻干后的冻干成品进行外观、扩增性能、加速稳定性的评价。

[0082] 1) 外观评价:请参照图2至4,通过外观观察,对比例1的各厂家酶冻干后大多均无法成型,存在空洞显著的情况;对比例2的各厂家酶冻干后外观均良好,与实施例1无较大差异;对比例3的各厂家酶冻干后外观也存在成型不佳的状况,冻干粉底部可观察到明显空洞。

[0084] 2) 扩增性能评价:检测Ct值,其结果见表5至表7。

[0085] 表5对比例1中不同厂家酶的PCR反应体系的Ct值

PCR 冻干试剂所用酶 厂家	检测限浓度样本扩增 Ct 值			中阳性样本扩增 Ct 值		
	罗氏	/	/	/	/	/
Takara	/	/	/	/	/	/
诺唯赞	/	/	/	/	/	/
Meridian	/	/	/	/	/	/
翌圣	/	/	/	/	/	/
宝锐	/	/	/	/	/	/
爱博泰克	/	/	/	/	/	/
液体 PCR 试剂对照	37.157	37.983	37.195	32.314	32.912	32.404

[0087] 表6对比例2中不同厂家酶的PCR反应体系的Ct值

PCR 冻干试剂所用酶 厂家	检测限浓度样本扩增 Ct 值			中阳性样本扩增 Ct 值		
	罗氏	37.250	/	/	32.868	32.746
Takara	36.110	/		33.303	32.698	32.723
诺唯赞	/	36.035	37.535	32.342	33.225	32.457
Meridian	36.402	/	36.730	33.152	33.157	33.055
翌圣	36.421	37.840	/	32.810	32.518	32.250
宝锐	36.812	37.730	36.305	32.600	32.461	33.015
爱博泰克	/	37.973	36.275	32.491	33.222	32.615
液体 PCR 试剂对照	37.157	37.983	37.195	32.314	32.912	32.404

[0090] 表7对比例3中不同厂家酶的PCR反应体系的Ct值

PCR 冻干试剂所用酶 厂家	检测限浓度样本扩增 Ct 值			中阳性样本扩增 Ct 值		
	罗氏	/	37.543	/	33.194	33.547
Takara	/	/	38.545	33.657	34.192	33.426
诺唯赞	/	/	/	33.859	33.626	33.681
Meridian	37.622	/	38.187	33.761	33.768	33.847
翌圣	37.588	/	/	33.803	33.333	33.367
宝锐	/	37.799	37.545	34.239	33.981	34.200
爱博泰克	/	/	/	33.356	33.413	33.732
液体 PCR 试剂对照	37.157	37.983	37.195	32.314	32.912	32.404

[0092] 根据表5至表7,对比例1至3对各厂家酶冻干过程中保护效果不佳,检测限浓度样本无法稳定地检出。从而表明本发明所述冻干保护剂对不同厂家酶原料组成的荧光PCR试剂均可起到很好的保护作用,通用性强,并且冻干前后未损伤试剂,产品的稳定性良好。

[0093] 3) 加速稳定性评价:由于对比例1-3冻干后试剂的扩增性能均不达标,后续未进行37℃加速稳定性评价。

[0094] 实施例2使用西林瓶为承载物的冻干实验

[0095] (1) 制备5×冻干保护剂:称取海藻糖40g和羟乙基淀粉10g,并加入1.5mL吐温20,加入无菌纯化水溶解后定容至100mL,备用。

[0096] (2) 制备荧光PCR试剂:选用南京诺唯赞生物科技有限公司的无甘油可冻干Taq酶、逆转录酶、RNA酶抑制剂三种酶原料进行PCR体系构建,后加入流感病毒检测用引物、探针等。

[0097] (3) 制备试验混合液:将上述5×冻干保护剂与荧光PCR试剂混合,得到PCR反应体系。其中,冻干保护剂的各组分终浓度见表8,其它组分见表9。

[0098] 表8冻干保护剂的各组分终浓度

组分	海藻糖终浓度	羟乙基淀粉终浓度	吐温20终浓度	明胶终浓度
样品1	8%	2%	0.3%	/
样品2	2%	6%	0.05%	/
样品3	4%	4%	0.1%	/
对比1	8%	/	0.3%	/
对比2	8%	2%	/	/
对比3	/	6%	0.1%	/
对比4	3%	4%	/	5%

[0100] 表9PCR反应体系中各组分浓度

	成分	浓度
	Taq 酶 (可冻干)	0.06U/ μ L
	逆转录酶 (可冻干)	1.5U/ μ L
	RNA 酶抑制剂 (可冻干)	0.5U/ μ L
	MgCL ₂	2.5mM
	Tris-Hcl (PH8.3)	20mM
	KCL	80mM
	dNTPs	200nM
[0101]	FluA-F (甲型流感病毒上游引物)	200nM
	FluA-R (甲型流感病毒下游引物)	200nM
	FluA-P (甲型流感病毒 FAM 荧光探针)	200nM
	FluB-F (乙型流感病毒上游引物)	300nM
	FluB-R (乙型流感病毒下游引物)	300nM
	FluB-P (乙型流感病毒 VIC 荧光探针)	300nM
	RnaseP-F (人源性内标基因上游引物)	100nM
	RnaseP -R (人源性内标基因下游引物)	100nM
	RnaseP-P (人源性内标基因 ROX 荧光探针)	100nM
[0102]	5 \times 冻干保护剂	1 \times
	灭菌纯化水	补足 500 μ L

[0103] 将上述配制好的混合液分装500 μ L至2mL西林瓶,放入冷冻干燥机板层中,冷冻干燥机中按表10的冻干程序进行冻干,冻干后对西林瓶进行压塞轧盖。

[0104] 表10冻干程序各步骤参数

步骤序号	温度 (°C)	时间 (h)	真空度
1	-50	3	无
2	-35	6	10pa 以下
3	-18	1	
4	10	1	10pa 以下
5	25	3	
6	25	2	极限真空

[0106] (4) 性能评价:冻干结束后,进行外观、扩增性能、加速稳定性的评价。

[0107] 1) 外观评价:请参照图5,通过外观观察,样品1至3冻干后粉体蓬松光滑,成形良好、无空洞塌陷情况;对比1无法成型,对比2外观正常,对比3和4冻干粉体上存在较多裂纹。

[0108] 2) 扩增性能评价:检测Ct值,其结果见表11。

[0109] 表11样品1至3、对比1至4的PCR反应体系的Ct值

组别(第0天)	检测限浓度样本扩增 Ct 值			中阳性样本扩增 Ct 值		
	样品 1	36.872	36.694	36.889	32.051	32.393
样品 2	36.945	36.522	37.317	32.988	32.363	32.066
样品 3	35.979	35.356	36.484	32.955	32.911	32.663
对比 1	/	/	/	/	/	/
对比 2	36.467	/	/	33.830	33.133	32.556
对比 3	37.274	/	37.841	33.094	32.941	32.489
对比 4	/	/	37.479	33.577	33.303	33.518

[0111] 根据表11,样品1至3的检测限样本检出率为100%,而冻干后对比1无法正常扩增,对比2至4虽然中阳性样本仍可检出,但最低检测限均不能稳定检出

[0112] 3) 加速稳定性评价:将样品1至3、对比2至4放入37°C存放30天后,检测其加速稳定性,检测结果见表12。

[0113] 表12样品1至3、对比2至4的PCR反应体系的Ct值

组别 (37°C30 天)	检测限浓度样本扩增 Ct 值			中阳性样本扩增 Ct 值		
	样品 1	36.676	36.751	36.917	32.259	32.051
样品 2	36.389	36.490	37.278	32.433	32.618	32.510
样品 3	35.901	35.823	36.861	32.325	32.976	32.480
对比 2	/	/	/	34.097	34.274	33.723
对比 3	/	/	/	34.282	34.683	33.927
对比 4	/	/	/	34.756	34.189	34.772

[0114] 从表12可知,样品1至3冻干在西林瓶中的冻干成品在37°C存放30天后,检测限浓度样本仍可100%检出,中阳性样本扩增Ct值与第0天相比变化在1以内,说明扩增性能无变化。对比2至4所用的组分不在本专利保护范围内,37°C储存30天后最低检测限浓度样本已无法检出,中阳性样本扩增Ct值与第0天相比差值均在1以上,说明该冻干保护剂配方稳定性较差,无法长期保存。

[0115] 将样品1至3在4°C环境下储存8个月后,检测其Ct值,检测结果见表13。

[0116] 表13样品1至3的PCR反应体系的Ct值

组别 (4°C8 个月)	检测限浓度样本扩增 Ct 值			中阳性样本扩增 Ct 值		
	样品 1	36.584	36.701	36.576	32.760	32.649
样品 2	36.531	36.169	37.087	32.080	32.013	32.599
样品 3	37.835	36.355	36.205	32.602	32.292	32.162

[0117] 根据表13,样品1至3在4°C储存8个月后,检测限浓度样本仍可100%检出,中阳性样本扩增Ct值与第0天相比变化在1以内,仍保持性能无变化,表明采用本发明冻干保护剂采用西林瓶冻干的冻干成品稳定性能好。

[0118] 实施例3使用微流控芯片为承载物的冻干实验

[0119] (1) 制备2.5×冻干保护剂:称取海藻糖5g和羟乙基淀粉10g,并加入125mL吐温20,加入无菌纯化水溶解后定容至100mL,备用。

[0120] (2) 制备荧光PCR试剂:选用珠海宝锐生物科技有限公司的无甘油可冻干Taq酶、逆转录酶、RNA酶抑制剂三种酶原料进行PCR体系构建,后加入流感病毒检测用引物、探针等。共配制以下8个体系,其中,体系1至6均为荧光RT-PCR体系;体系7和体系8为DNA扩增体系,未加入逆转录酶及RNA酶抑制剂。

[0121] (3) 制备试验混合液:将上述2.5×冻干保护剂与荧光PCR试剂混合,得到PCR反应体系。其中,冻干保护剂的各组分终浓度见表14,其它组分见表15。

[0122] 表14冻干保护剂的各组分终浓度

组分	海藻糖终浓度	羟乙基淀粉终浓度	吐温20终浓度
----	--------	----------	---------

样品4	2%	4%	0.05%
对比5	2%	/	0.05%
对比6	2%	4%	/
对比7	/	4%	0.05%

[0126] 表15不同PCR反应体系中各组分浓度

体系 1 组成	体系 2 组成	体系 3 组成	体系 4 组成	体系 5 组成	体系 6 组成	体系 7 组成	体系 8 组成	浓度
Taq 酶 (可冻干)								0.1U/μL
逆转录酶 (可冻干)						/		1.5U/μL
RNA 酶抑制剂 (可冻干)						/		1U/μL
MgCl ₂								4mM
Tris-Hcl (PH8.3)								10mM
KCL								80mM
dNTPs								200nM

[0127]

甲型流感病毒上游引物	乙型流感病毒上游引物	呼吸道合胞病毒上游引物	人副流感 1 型上游引物	人副流感 2 型上游引物	人副流感 3 型上游引物	腺病毒上游引物	肺炎支原体上游引物	200nM
甲型流感病毒下游引物	乙型流感病毒下游引物	呼吸道合胞病毒下游引物	人副流感 1 型下游引物	人副流感 2 型下游引物	人副流感 3 型下游引物	腺病毒下游引物	肺炎支原体下游引物	200nM
甲型流感病毒荧光探针	乙型流感病毒荧光探针	呼吸道合胞病毒荧光探针	人副流感 1 型荧光探针	人副流感 2 型荧光探针	人副流感 3 型荧光探针	腺病毒荧光探针	肺炎支原体荧光探针	200nM
2.5×冻干保护剂								1×
灭菌纯化水								每人份 补足 10μL

[0128]

[0129] 将上述配制好的8个体系混合液分装10 μ L至微流控芯片各个扩增孔位,孔位1对应体系1,以此类推。放入冷冻干燥机中,按表16的冻干程序进行冻干,冻干后对微流控芯片封膜并抽真空塑封保存。

[0130] 表16冻干程序各步骤参数

步骤序号	温度 (°C)	时间 (h)	真空度
1	-50	3	无
2	-35	6	10pa 以下
3	-18	1	
4	10	1	10pa 以下
5	25	3	
6	25	2	极限真空

[0132] (4) 性能评价:进行外观、扩增性能、加速稳定性的评价。

[0133] 1) 外观评价:请参照图6,通过外观观察,样品4的冻干粉与微流控芯片贴合良好,表面光滑,无裂纹掉渣现象。请参照图7,对比5中试剂无法成型,对比6的成型较为正常,与样品4较为相似;对比7虽也可成型,但冻干粉的结构松散,易掉渣。

[0134] 2) 扩增性能评价:对冻干在微流控芯片中的冻干成品(样品4)进行扩增性能检测,其结果见表17。

[0135] 表17样品4、对比5至7的PCR反应体系Ct值

检测参考品	甲型流感病毒核酸	乙型流感病毒核酸	呼吸道合胞病毒核酸	人副流感病毒1型核酸	人副流感病毒2型核酸	人副流感病毒3型核酸	腺病毒核酸	肺炎支原体核酸
样品4	29.23	26.71	28.77	25.74	25.02	25.82	32.70	31.83
对比5	/	/	/	/	/	/	/	/
对比6	30.89	27.23	30.12	26.79	25.55	26.74	34.22	33.50
对比7	31.25	28.37	30.86	27.59	26.98	27.84	34.74	33.83

[0137] 根据表17,样品4对甲型流感病毒核酸、乙型流感病毒核酸、呼吸道合胞病毒核酸、人副流感病毒1型核酸、人副流感病毒2型核酸、人副流感病毒3型核酸、腺病毒核酸以及肺炎支原体核酸均可扩增。

[0138] 对比5无法正常扩增各参考品,试剂失效;对比6及对比7虽仍可扩增各参考品,但其扩增Ct值明显大于样品4的Ct值,大多数差值均在1以上,说明该对比5至7中使用的冻干保护剂对荧光PCR试剂的保护效果不佳。

[0139] 3) 加速稳定性评价:由于冻干后首次效能检验对比5至7就未达到较好的扩增性能,故未继续进行37℃加速稳定性评价。故仅对样品4进行37℃加速稳定性评价。将冻干后的芯片放置于37℃,每15天进行一次性能检测,检测参考品Ct值与第0天相比差值在1以内则认为性能无变化。检测用参考品为甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、副流感病毒1、2、3型、腺病毒、肺炎支原体的灭活培养物提取核酸,检测结果见表18。

[0140] 表18样品4的PCR反应体系Ct值

检测参考品	甲型流感病毒核酸	乙型流感病毒核酸	呼吸道合胞病毒核酸	人副流感病毒1型核酸	人副流感病毒2型核酸	人副流感病毒3型核酸	腺病毒核酸	肺炎支原体核酸
第0天	29.23	26.71	28.77	25.74	25.02	25.82	32.70	31.83
第15天	29.41	26.53	28.06	25.02	25.36	25.06	32.56	31.20
第30天	29.39	26.92	28.25	25.30	25.18	25.64	32.40	31.60
第45天	29.73	27.04	28.91	25.42	25.06	25.93	32.55	31.09
第60天	30.21	27.28	29.50	26.09	25.76	25.52	33.94	32.93

[0142] 从表17和18可知,冻干于芯片中的冻干成品(样品4)扩增性能良好,各参考品均可正常检出;37℃存放45天内检测各个参考品的Ct值与第0天相比差值均在1以内,扩增性能仍无任何下降,表明采用本发明冻干保护剂采用微流控芯片冻干的冻干成品稳定性能好。

[0143] 综上所述,根据实施例1可以看出,本发明的冻干保护剂可以用于与不同厂家酶原料组成的荧光PCR试剂,对蛋白质起到很好的保护作用,通用性强,对荧光PCR试剂性能无抑制作用且冻干成品的扩增性能和稳定性能好。实施例1至实施例3分别采用八连排PCR管、西林瓶和微流控芯片作为承载物进行冻干,冻干成品的外观、扩增性能、加速稳定性均满足要求,表明本发明的冻干保护剂可以应用于不同的承载物,进一步说明该冻干保护剂的通用性好。

[0144] 以上所述仅为本发明的可选实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是在本发明的发明构思下,利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构变换,或直接/间接运用在其他相关的技术领域均包括在本发明的专利保护范围内。

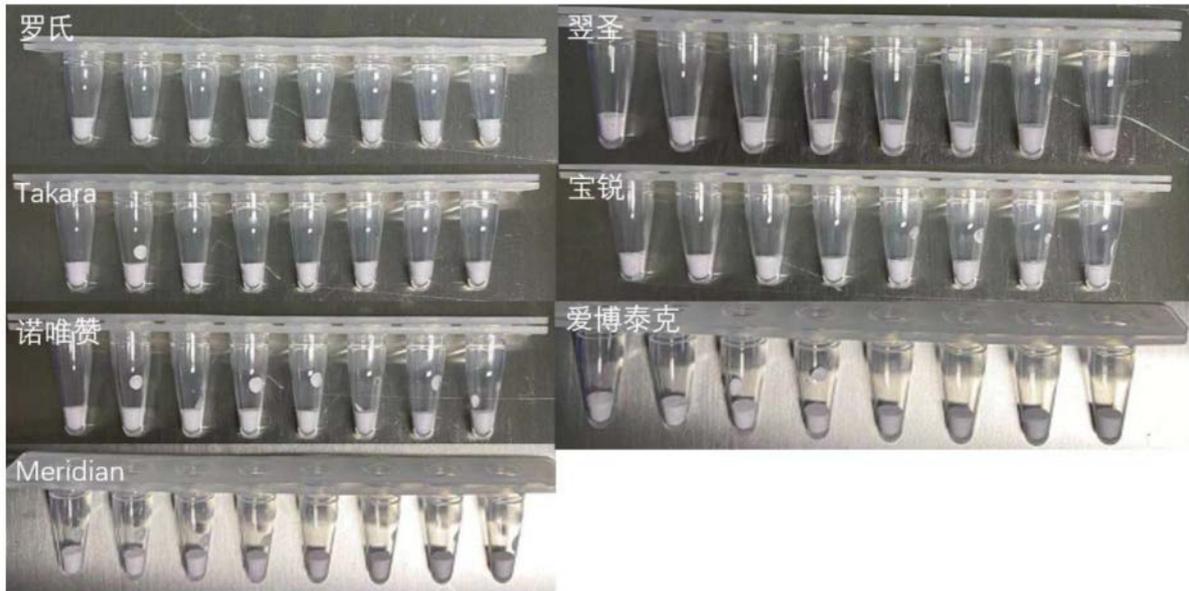


图1



图2

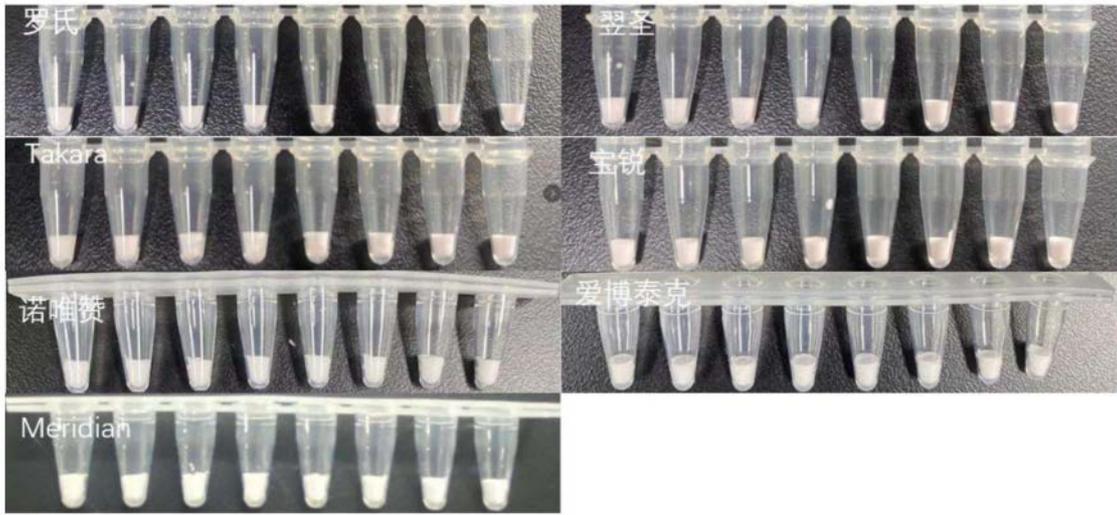


图3

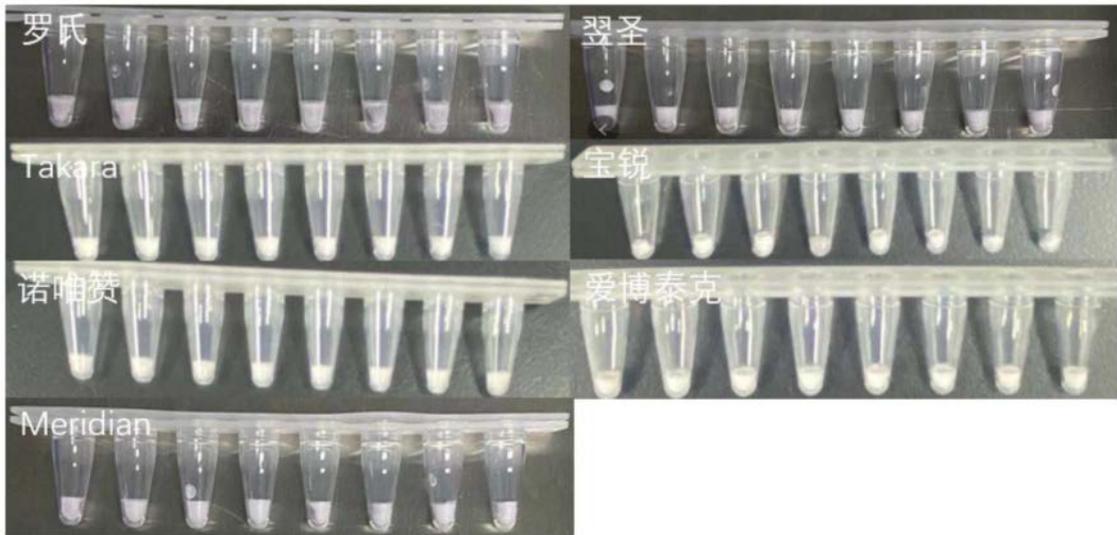


图4

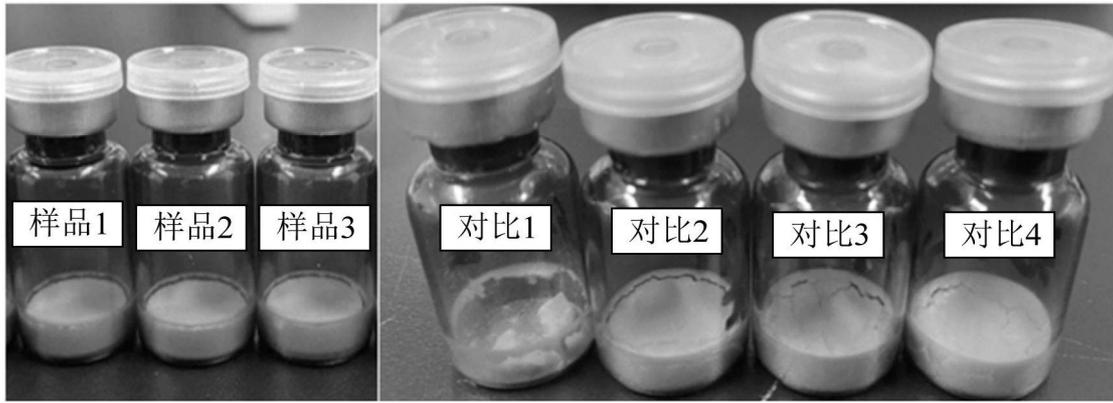


图5

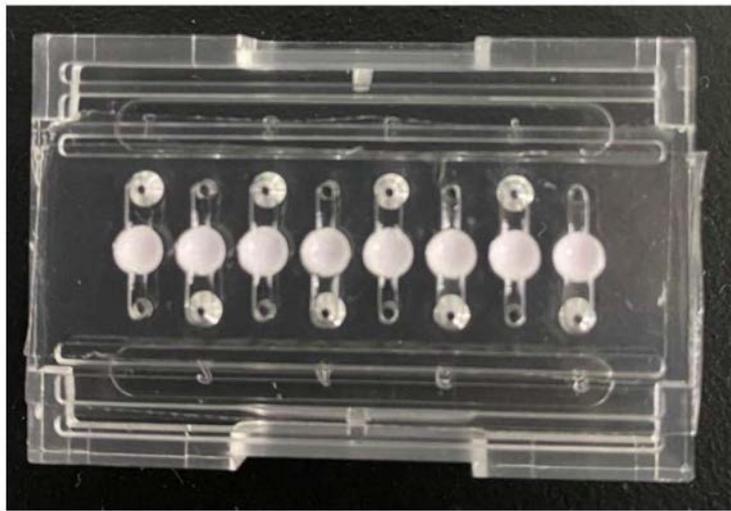


图6

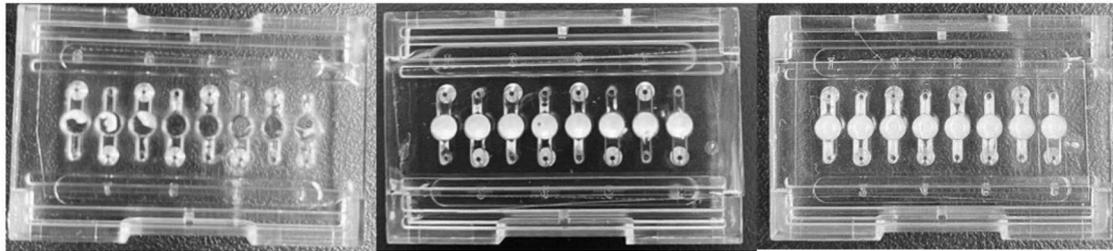


图7