(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108070583 B
(45)授权公告日 2021.03.30

(21)申请号 201610977454.3
(22)申请日 2016.11.07
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108070583 A
(43)申请公布日 2018.05.25
(73)专利权人 中国动物疫病预防控制中心
地址 102618 北京市大兴区天贵大街17号
(72)发明人 王传彬 于雷 刘洋 顾小雪 刘玉良
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 关畅 任凤华
(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)
C12Q 1/6806(2018.01)

(56)对比文件
CN 102317472 A,2012.01.11
CN 105463125 A,2016.04.06
CN 105349529 A,2016.02.24
CN 102317472 A,2012.01.11
WO 2016165831 A1,2016.10.20

审查员 艾超仁

权利要求书3页 说明书8页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

羟丙基-β-环糊精在制备核酸冷冻干燥保护剂中的用途

(57)摘要

本发明公开了羟丙基-β-环糊精在制备核酸冷冻干燥保护剂中的用途。将羟丙基-β-环糊精或羟丙基-β-环糊精水溶液作为DNA冷冻干燥保护剂对DNA具有良好的保护效果、将组合物H和溶液H作为RNA冷冻干燥保护剂对RNA具有良好的保护效果，且对核酸定量分析、后续DNA酶切、PCR/RT-PCR扩增、荧光定量PCR/RT-PCR扩增等操作无任何影响。将RNA与羟丙基-β-环糊精和DEPC混合后冻干，常温保存6个月内的变异系数为5.90%，明显优于-70℃液态保存(变异系数为13.33%)，而且该保存条件无需如-70℃超低温冰箱等复杂设备，有利于RNA样品远距离运输与保存。

CN 108070583 B

1.组合物H在制备RNA冷冻干燥保护剂中的应用,所述组合物H由羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯组成。

2.根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为1-500:1。

3.根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为50-500:1。

4.根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为1-50:1。

5.根据权利要求4所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为5-50:1。

6.根据权利要求5所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为10-50:1。

7.根据权利要求6所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为20-50:1。

8.根据权利要求7所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为50:1。

9.根据权利要求5所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为5-20:1。

10.根据权利要求9所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为10-20:1。

11.根据权利要求9所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为5-10:1。

12.根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述组合物H中,所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比为1-5:1。

13.溶液H在作为RNA冷冻干燥保护剂中的应用;所述溶液H是由溶质和溶剂组成的溶液,所述溶质为羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯,所述溶剂为水。

14.根据权利要求13所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为1mg/mL-500mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

15.根据权利要求14所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为50mg/mL-500mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

16.根据权利要求14所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为1mg/mL-50mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

17.根据权利要求16所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为5mg/mL-50mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

18.根据权利要求17所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为10mg/mL-50mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

19.根据权利要求18所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为20mg/mL-50mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

20.根据权利要求19所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度

为50mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

21.根据权利要求17所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为5mg/mL-20mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

22.根据权利要求21所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为10mg/mL-20mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

23.根据权利要求21所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为5mg/mL-10mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

24.根据权利要求14所述的应用,其特征在于:所述溶液H中,羟丙基-β-环糊精的浓度为1mg/mL-5mg/mL,焦碳酸二乙酯的浓度为1mg/ml。

25.RNA冷冻干燥保护剂,为a或b,所述a为权利要求1-12中任一权利要求中所述的组合物H,所述b为权利要求13-24中任一权利要求中所述的溶液H。

26.羟丙基-β-环糊精或羟丙基-β-环糊精水溶液在制备核酸冷冻干燥保护剂中的应用。

27.根据权利要求26所述的应用,其特征在于:所述核酸为DNA和/或RNA。

28.根据权利要求26或27所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为1mg/mL-500mg/mL。

29.根据权利要求28所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为50mg/mL-500mg/mL。

30.根据权利要求28所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为1mg/mL-50mg/mL。

31.根据权利要求30所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为5mg/mL-50mg/mL。

32.根据权利要求31所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为10mg/mL-50mg/mL。

33.根据权利要求32所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为20mg/mL-50mg/mL。

34.根据权利要求33所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为50mg/mL。

35.根据权利要求31所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为5mg/mL-20mg/mL。

36.根据权利要求35所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为10mg/mL-20mg/mL。

37.根据权利要求35所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为5mg/mL-10mg/mL。

38.根据权利要求28所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为1mg/mL-5mg/mL。

39.羟丙基-β-环糊精或羟丙基-β-环糊精水溶液在作为DNA冷冻干燥保护剂中的应用。

40.根据权利要求39所述的应用,其特征在于:所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为1mg/mL-500mg/mL。

41.根据权利要求40所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为50mg/mL-500mg/mL。

42.根据权利要求40所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为1mg/mL-50mg/mL。

43.根据权利要求42所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为5mg/mL-50mg/mL。

44.根据权利要求43所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为10mg/mL-50mg/mL。

45.根据权利要求44所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为20mg/mL-50mg/mL。

46.根据权利要求45所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为50mg/mL。

47.根据权利要求43所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为5mg/mL-20mg/mL。

48.根据权利要求47所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为10mg/mL-20mg/mL。

49.根据权利要求47所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为5mg/mL-10mg/mL。

50.根据权利要求40所述的应用，其特征在于：所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度为1mg/mL-5mg/mL。

51.权利要求25所述的RNA冷冻干燥保护剂在制备核酸制品中的应用。

羟丙基-β-环糊精在制备核酸冷冻干燥保护剂中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域中羟丙基-β-环糊精的用途，特别涉及羟丙基-β-环糊精在制备核酸冷冻干燥保护剂中的用途。

背景技术

[0002] 核酸作为生命最基本物质之一，是生命科学研究和生物学检测的重要对象，也是生物核酸制品、核酸试剂的重要组成，根据其化学组成的不同，分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)两类。

[0003] 核酸作为生物大分子，在自然条件下容易降解，其稳定保存技术对于研制和生产核酸样品、核酸标准物质、核酸试剂盒、核酸疫苗具有重要作用。因此，先进的核酸保存技术在医学生物学诊断检测、动植物检验检疫等领域具有广泛应用前景。

[0004] 国内外目前常用于存储DNA的方式主要有两种，一种是采用TE溶解DNA后以液态的形式超低温冷冻保存，另一种是将DNA样品冻干成固体后进行储存或运输。但是，DNA体积较小，冷冻干燥后肉眼几乎无法分辨，容易在使用中造成丢失，进而影响后续试验。至于RNA，由于RNA酶几乎无处不在，因此RNA提取后不易保存，一般多采用现用现提或者-70℃短期保存的方法。这一方面需要配备如-70℃冰箱这样的复杂设备，另一方面也不利于核酸的远途运输，给实验操作带来极大的不便。因此需要一种冷冻干燥保护剂，在不影响后续试验的前提下，在为核酸提供固相支撑同时，延长核酸在常规温度下的保存时间。

[0005] 羟丙基-β-环糊精(Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin，HP-β-CD)，分子式为$C_{63}H_{112}O_{42}$，CAS号128446-35-5。羟丙基-β-环糊精是羟丙基取代环糊精2、3和6位羟基的氢原子得到的一类无定型β-环糊精衍生物。羟丙基的引入打破了β-环糊精的分子内环状氢键，在保持环糊精空腔的同时克服了β-环糊精水溶性差的主要缺点，是目前研究最为深入，应用最广泛的环糊精衍生物之一，主要应用于食品、药品、化妆品行业作为包合剂。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是如何使冷冻干燥的核酸在常温下长期储存，并使微观不可见的核酸宏观化，增强实验操作的可视性。

[0007] 为了解决以上技术问题，本发明提供了羟丙基-β-环糊精或羟丙基-β-环糊精水溶液在制备核酸冷冻干燥保护剂中的应用。

[0008] 上述应用中，所述核酸可为DNA和/或RNA。

[0009] 羟丙基-β-环糊精或羟丙基-β-环糊精水溶液在作为DNA冷冻干燥保护剂中的应用也属于本发明的保护范围。

[0010] 上述两种应用中，所述羟丙基-β-环糊精水溶液的浓度本领域技术人员可以根据核酸冷冻干燥的效果确定，具体可为50mg/mL、1mg/mL-50mg/mL、5mg/mL-50mg/mL、10mg/mL-50mg/mL、20mg/mL-50mg/mL、1mg/mL-5mg/mL、5mg/mL-10mg/mL、5mg/mL-20mg/mL、10mg/mL-20mg/mL、50mg/mL-500mg/mL或1mg/mL-500mg/mL。

[0011] 本发明还提供了组合物H在制备RNA冷冻干燥保护剂中的应用，所述组合物H由羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯(DEPC)组成。

[0012] 所述组合物H中，所述羟丙基-β-环糊精和焦碳酸二乙酯的质量比本领域技术人员可以根据核酸冷冻干燥的效果确定，具体可为50:1、1-50:1、5-50:1、10-50:1、20-50:1、1-5:1、5-10:1、5-20:1、10-20:1、50-500:1或1-500:1。

[0013] 本发明还提供了溶液H在作为RNA冷冻干燥保护剂中的应用；所述溶液H是由溶质和溶剂组成的溶液，所述溶质为羟丙基-β-环糊精和DEPC，所述溶剂为水。

[0014] 所述溶液H中，所述羟丙基-β-环糊精和DEPC的浓度本领域技术人员可以根据核酸冷冻干燥的效果确定，羟丙基-β-环糊精的浓度具体可为50mg/mL、1mg/mL-50mg/mL、5mg/mL-50mg/mL、10mg/mL-50mg/mL、20mg/mL-50mg/mL、1mg/mL-5mg/mL、5mg/mL-10mg/mL、5mg/mL-20mg/mL、10mg/mL-20mg/mL、50mg/mL-500mg/mL或1mg/mL-500mg/mL，DEPC的浓度具体可为1mg/ml。

[0015] 本发明还提供了RNA冷冻干燥保护剂，为a或b，所述a为所述组合物H，所述b为所述溶液H。

[0016] 上述任一种应用或上述核酸冷冻干燥保护剂在制备核酸制品中的应用也属于本发明的保护范围。

[0017] 所述核酸制品为含有核酸的产品，如核酸样品、核酸标准物质、核酸探针、引物、核酸检测试剂盒或核酸分子诊断试剂盒等。

[0018] 所述核酸可为离体的(分离的)核酸。所述水可为超纯水。

[0019] 试验结果表明，将羟丙基-β-环糊精或羟丙基-β-环糊精水溶液作为DNA冷冻干燥保护剂对DNA具有良好的保护效果、将组合物H和溶液H作为RNA冷冻干燥保护剂对RNA具有良好的保护效果，且对核酸定量分析、后续DNA酶切、PCR/RT-PCR扩增、荧光定量PCR/RT-PCR扩增等操作无任何影响。将RNA与羟丙基-β-环糊精和DEPC混合后冻干，常温保存6个月内的变异系数为5.90％，明显优于-70℃液态保存(变异系数为13.33％)，而且该保存条件无需如-70℃超低温冰箱等复杂设备，有利于RNA样品远距离运输与保存。本发明的羟丙基-β-环糊精和DEPC价格低廉、易于获得，可广泛应用于核酸冷冻干燥和长期保存的生产制造以及科研实践当中。

附图说明

[0020] 图1为不同浓度羟丙基-β-环糊精溶液冷冻干燥后的状态。

[0021] 从左到右分别为100ng/μL DNA溶液冻干样品；1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL、20mg/mL、50mg/mL、100mg/mL和500mg/mL羟丙基-β-环糊精溶液冷冻干燥后的状态。

[0022] 图2为500mg/mL羟丙基-β-环糊精溶液全波长扫描图。

[0023] 图3为不同浓度羟丙基-β-环糊精对质粒DNA酶切的影响。

[0024] 泳道1，未经酶切的质粒样品；泳道2，0mg/mL HP-β-CD体系经EcoRI酶切后的酶切产物；泳道3，10mg/mL HP-β-CD体系经EcoRI酶切后的酶切产物；泳道4，50mg/mLHP-β-CD体系经EcoRI酶切后的酶切产物；泳道5，100mg/mL HP-β-CD体系经EcoRI酶切后的酶切产物；泳道M，TAKARA 5K Marker。

[0025] 图4为含有不同浓度羟丙基-β-环糊精和1mg/ml DEPC的鸭坦布苏病毒荧光定量反

应扩增曲线。

具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0027] 下述实施例中的TE缓冲液：溶剂为超纯水，溶质是10mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)和1mmol/L EDTA(pH 8.0)。

[0028] 下述实施例中的羟丙基-β-环糊精(HP-β-CD)为北京百灵威科技有限公司产品。

[0029] 下述实施例中的鸭瘟病毒(DVEV)毒株是VR-684，为ATCC产品。

[0030] 下述实施例中的鸭坦布苏病毒(DTMUV)毒株为jxsp(duck TMUV-jxsp)(DuckTembusu virus exhibits neurovirulence in BALB/c mice.Li et al.VirologyJournal 2013,10:260)公众可从申请人获得该生物材料，该生物材料只为重复本发明的相关实验所用，不可作为其它用途使用。

[0031] 本申请中，冷冻干燥是将含水物料冷冻到冰点以下，使水转变为冰，然后在较高真空下将冰转变为蒸气而除去的干燥方法。下述实施例中，冷冻干燥在真空度为0.001MPa的环境中进行。

[0032] 实施例1、羟丙基-β-环糊精在制备核酸冷冻干燥保护剂中的应用

[0033] 1、不同浓度羟丙基-β-环糊精冷冻干燥后体积变化研究

[0034] 取羟丙基-β-环糊精粉末，用超纯水配制成1mg/mL、5mg/mL、10mg/mL、20mg/mL、50mg/mL、100mg/mL和500mg/mL的溶液，分别取0.8mL溶液装入1.5mL离心管中，-20℃进行冷冻干燥，观察溶液冷冻干燥后固体成分的形态，同时以100ng/μL DNA溶液(溶剂为TE缓冲液)冻干样品为对照。

[0035] 结果表明，将DNA溶液(溶剂为TE缓冲液)直接冻干后形成的固体粉末，肉眼完全无法观察到，而羟丙基-β-环糊精溶液冷冻干燥后则有明显的固体形态。当羟丙基-β-环糊精溶液浓度大于5mg/mL时，即在5mg/mL至500mg/mL时，冷冻干燥后的固体成分体积基本不变，与原0.8mL溶液的体积也无明显变化；当羟丙基-β-环糊精溶液浓度为1mg/mL时，冷冻干燥后的固体成分体积相比原0.8mL溶液的体积有明显的缩小，但仍可明显观察到，可用于后续的溶解等操作(图1)。用超纯水复溶冻干后的1mg/mL-500mg/mL羟丙基-β-环糊精溶液，均能在15秒时间内迅速溶解。

[0036] 2、羟丙基-β-环糊精对核酸定量的影响

[0037] 取羟丙基-β-环糊精粉末，用超纯水配制成500mg/mL的溶液，通过NanodropND1000进行全波长扫描。结果如图2所示，在220nm-750nm范围内，羟丙基-β-环糊精没有明显特征的吸收峰，吸收值呈递减趋势，在260nm处的吸收值小于0.1，对于核酸的紫外分光光度定量影响有限。

[0038] 各取1mg/mL DNA溶液(溶剂为超纯水)和1mg/mL RNA溶液(溶剂为超纯水，分别用超纯水和500mg/mL羟丙基-β-环糊精溶液(溶剂为超纯水)稀释成10ng/mL、50ng/mL和100ng/mL的DNA或RNA溶液，通过Nanodrop ND1000测定OD260，结果如表1所示。

[0039] 表1分别采用超纯水和羟丙基-β-环糊精溶液稀释DNA溶液后的测定结果

[0040]

溶液	OD260 测定值（单位：ng/mL）			平均值（单位：ng/mL）	*P*值
10 ng/mL DNA（含 HP-β -CD）	10.1	10.1	10.0	10.1	*P*>0.05
10 ng/mL DNA（不含 HP-β -CD）	10.2	10.1	10.0	10.1	*P*>0.05
50 ng/mL DNA（含 HP-β -CD）	50.3	50.2	50.0	50.2	*P*>0.05
50 ng/mL DNA（不含 HP-β -CD）	50.2	50.1	49.8	50.0	*P*>0.05
100 ng/mL DNA（含 HP-β -CD）	100.3	100.1	99.8	100.1	*P*>0.05
100 ng/mL DNA（不含 HP-β -CD）	99.7	100.1	100.2	100.0	*P*>0.05
10 ng/mL RNA（含 HP-β -CD）	10.1	9.9	10.0	10.0	*P*>0.05
10 ng/mL RNA（不含 HP-β -CD）	9.9	10.1	10.0	10.0	*P*>0.05
50 ng/mL RNA（含 HP-β -CD）	49.9	50.2	50.0	50.0	*P*>0.05
50 ng/mL RNA（不含 HP-β -CD）	50.2	49.9	49.8	50.0	*P*>0.05
100 ng/mL RNA（含 HP-β -CD）	100.3	100.2	99.8	100.1	*P*>0.05
100 ng/mL RNA（不含 HP-β -CD）	99.7	100.1	100.3	100.0	*P*>0.05

[0041] 从表1中可以看出，含羟丙基-β-环糊精和不含羟丙基-β-环糊精的核酸溶液，无论是DNA或者RNA，在测定其浓度时，并没有显著差异(P＞0.05)。

[0042] 3、羟丙基-β-环糊精对DNA限制性内切酶酶切的影响

[0043] 为了解羟丙基-β-环糊精对环状DNA酶切反应的影响，采用上游引物atcaaaagataacatgcatt和下游引物tagatgatttctgcaccatc，PCR扩增禽流感病毒NA6基因，获得目的片段1360bp，其序列为序列表中的序列1。

[0044] 将目的片段回收后连接至pEASY T3载体(北京全式金生物技术有限公司产品)获得重组质粒pEASY T3-NA6，经测序确证序列无误。该质粒全长为4.4kb，其中包含两个EcoRI(位于T载体内)和一个BamHI(位于插入片段内)酶切位点。配制4个相同的EcoRI酶切反应体系(第一个至第四个EcoRI酶切反应体系)，每个EcoRI酶切反应体系均由以下成分组成：10×H Buffer 2μl，EcoRI酶0.7μl(TaKaRa公司产品)，灭菌纯水15.3μl，质粒2μl。将第一个EcoRI酶切反应体系命名为0mg/mL HP-β-CD体系。在第二个EcoRI酶切反应体系中加入羟丙基-β-环糊精，羟丙基-β-环糊精的含量为10mg/mL，将得到的体系命名为10mg/mL HP-β-CD体系。在第三个EcoRI酶切反应体系中加入羟丙基-β-环糊精，羟丙基-β-环糊精的含量为50mg/mL，将得到的体系命名为50mg/mL HP-β-CD体系。在第四个EcoRI酶切反应体系中加入羟丙基-β-环糊精，羟丙基-β-环糊精的含量为100mg/mL，将得到的体系命名为100mg/mLHP-β-CD体系。将0mg/mL HP-β-CD体系、10mg/mL HP-β-CD体系、50mg/mL HP-β-CD体系和100mg/mL HP-β-CD体系均在37℃过夜酶切。终止反应后，取5μL酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳。结果表明酶切体系中含有羟丙基-β-环糊精对环状DNA的酶切反应并无影响(图3)。

[0045] 为了解羟丙基-β-环糊精对线性DNA酶切反应的影响，将重组质粒pEASY T3-NA6先采用BamHI进行酶切，回收BamHI酶切产物后，配制4个相同的EcoRI酶切反应体系(第一个至第四个EcoRI酶切反应体系)，每个EcoRI酶切反应体系均由以下成分组成：10×H Buffer 2μl，EcoRI酶0.7μl(TaKaRa公司产品)，灭菌纯水15.3μl，酶切产物2μl。将第一个EcoRI酶切反应体系命名为0mg/mL HP-β-CD体系。在第二个EcoRI酶切反应体系中加入羟丙基-β-环糊

精,羟丙基-β-环糊精的含量为10mg/mL,将得到的体系命名为10mg/mL HP-β-CD体系。在第三个EcoRI酶切反应体系中加入羟丙基-β-环糊精,羟丙基-β-环糊精的含量为50mg/mL,将得到的体系命名为50mg/mL HP-β-CD体系。在第四个EcoRI酶切反应体系中加入羟丙基-β-环糊精,羟丙基-β-环糊精的含量为100mg/mL,将得到的体系命名为100mg/mL HP-β-CD体系。将0mg/mL HP-β-CD体系、10mg/mL HP-β-CD体系、50mg/mL HP-β-CD体系和100mg/mLHP-β-CD体系均在37℃过夜酶切。终止反应后,取5μL EcoRI酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳。结果显示酶切体系中含有羟丙基-β-环糊精对线性DNA的酶切反应亦无影响。

[0046] 4、羟丙基-β-环糊精对荧光定量PCR的影响

[0047] 为了解羟丙基-β-环糊精对荧光定量PCR的影响,采用表2的引物及探针对鸭瘟病毒(DVEV)进行荧光定量PCR反应。荧光定量PCR反应体系为:水6.8μL,2×GoTaqProbe qPCR Master Mix 10μL,引物对0.8μL,探针0.4μL,病毒核酸(模板)2μL,羟丙基-β-环糊精,反应总体积为20μL。

[0048] 设置四种荧光定量PCR反应体系:0mg/mL HP-β-CD反应体系、5mg/mL HP-β-CD反应体系、10mg/mL HP-β-CD反应体系和50mg/mL HP-β-CD反应体系。这四种荧光定量PCR反应体系除了羟丙基-β-环糊精的浓度不同外,其它均相同(表2)。0mg/mLHP-β-CD反应体系、5mg/mL HP-β-CD反应体系、10mg/mL HP-β-CD反应体系和50mg/mL HP-β-CD反应体系中羟丙基-β-环糊精的浓度分别为0mg/mL、5mg/mL、10mg/mL和50mg/mL。

[0049] 置于ABI 7500fast型实时荧光定量PCR仪中进行检测。上述荧光定量PCR检测方法的荧光定量PCR反应程序为:95℃2min;95℃15s,60℃1min,40个循环。

[0050] 表2荧光定量PCR引物、探针、毒株及反应体系

[0051]

上游引物	AggATTTgCggAAgATggATATgA
下游引物	CAgAggATggTTTgTCCCgTAAT
探针	HEX-TCCgAACCgCTTgAgTACCgCCgT-BHQ
毒株	DVEV ATCC VR-684
反应体系(20μL)	2×GoTaq Probe qPCR Master Mix 10μL, 10pmol 引物对 0.8μL, 10pmol 探针 0.4μL, water 6.8μL, 模板 2μL。 0 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL 或 50 mg/mL 羟丙基-β-环糊精

[0052] 结果显示,加入上述几种浓度的羟丙基-β-环糊精对荧光定量PCR反应的Ct值和荧光强度均无明显影响,变异系数小于0.2%(表3)。

[0053] 表3含有不同浓度羟丙基-β-环糊精鸭瘟病毒荧光定量反应Ct值

[0054]

羟丙基-β-环糊精浓度(mg/mL)	Ct1	Ct2	Ct3	Ct均值	变异系数
0	20.659	20.556	20.533	20.583	0.14%
5	20.615	20.619	20.405	20.546	
10	20.603	20.598	20.396	20.532	
50	20.583	20.643	20.321	20.515	

[0055] 注:0、5、10和50分别表示0mg/mL HP-β-CD反应体系、5mg/mL HP-β-CD反应体系、10mg/mL HP-β-CD反应体系和50mg/mL HP-β-CD反应体系。

[0056] 5、羟丙基-β-环糊精对荧光定量RT-PCR的影响

[0057] 为了解羟丙基-β-环糊精对荧光定量RT-PCR的影响，采用表4的引物及探针对鸭坦布苏病毒进行荧光定量RT-PCR反应。RT-PCR反应体系为：水8.6μL、dNTP312.5μmol/L，5×Colorless GoTaq Reaction Buffer 4μL，上游引物和下游引物均为0.7μM，探针0.35pmol/μL，GoTaq DNA聚合酶0.075U/μL，AMV 0.1U/μL，RNA酶抑制剂0.6U/μL，病毒核酸(模板)2μL，羟丙基-β-环糊精和1mg/ml DEPC，反应总体积为20μL。设置四种荧光定量RT-PCR反应体系：0mg/mL HP-β-CD反应体系、5mg/mL HP-β-CD反应体系、10mg/mL HP-β-CD反应体系和50mg/mL HP-β-CD反应体系。这四种荧光定量RT-PCR反应体系除了羟丙基-β-环糊精的浓度不同外，其它均相同(表5)。0mg/mL HP-β-CD反应体系、5mg/mL HP-β-CD反应体系、10mg/mLHP-β-CD反应体系和50mg/mL HP-β-CD反应体系中羟丙基-β-环糊精的浓度分别为0mg/mL、5mg/mL、10mg/mL和50mg/mL。

[0058] 上述荧光定量RT-PCR检测方法的反应体系置于ABI 7500fast型实时荧光定量PCR仪中进行检测。上述荧光定量RT-PCR检测方法的荧光定量RT-PCR反应程序为：45℃10min；95℃10min；95℃15s，60℃45s，40个循环。

[0059] 表4荧光定量RT-PCR引物、探针

[0060]

组分	序列(5'-3')
上游引物	CAGTTTTCATACATGGTTCCACG
下游引物	CGGTACCATAATCCTCCATCTCAGC
探针	FAM-AGCCCAGCAGTCGC-MGB

[0061] 表5荧光定量RT-PCR反应体系

[0062]

反应成分	原液浓度	体积（μL）	体系中终浓度
5×Colorless GoTaq Reaction Buffer	5×	4	1×
dNTP	2.5mM	2.5	312.5μ mol/L
AMV	10U/μ L	0.2	0.1U/μ L
GoTaq	5U/μ L	0.3	0.075 U/μ L
RNA 酶抑制剂	40U/μ L	0.3	0.6 U/μ L
10pmol 引物对	10μ M/each	1.4	0.7μ M/each
10pmol 探针	10pmol/μ L	0.7	0.35 pmol/μ L
ddH2O		8.6	---
模板		2	---
羟丙基-β -环糊精和 1mg/ml DEPC			

[0063] 结果如图4和表6所示，上述几种浓度的羟丙基-β-环糊精和1mg/ml DEPC对荧光定量RT-PCR反应的Ct值和荧光强度均无明显影响，变异系数小于1.6％。

[0064] 表6含有不同浓度羟丙基-β-环糊精和1mg/ml DEPC的鸭坦布苏病毒荧光定量反应Ct值

[0065]

羟丙基-β -环糊精浓度（mg/mL）	Ct1	Ct2	Ct3	Ct 均值	变异系数
0	20.006	20.341	19.986	20.111	1.51%
5	21.280	18.832	20.952	20.355	
10	20.260	20.996	21.296	20.851	
50	20.487	19.921	20.971	20.460	

[0066] 注:0、5、10和50分别表示0mg/mL HP-β-CD反应体系、5mg/mL HP-β-CD反应体系、10mg/mL HP-β-CD反应体系和50mg/mL HP-β-CD反应体系。

[0067] 6、羟丙基-β-环糊精对核酸标准物质稳定性的影响

[0068] 目前常用的存储核酸的方式主要有两种,一种是采用TE复溶后以液态的形式超低温冷冻保存,另一种是通过将液态的核酸冻干成固体后常温储存或运输。但这两种方式都存在一定的缺陷,液态存储核酸时间过长容易造成核酸降解,尤其是RNA样品,严重影响后续试验定值;而直接冻干核酸,肉眼几乎无法分辨,容易在后续试验中造成一定程度的丢失,而且一次一管必须完全复溶,每管样品无法重复利用。采用羟丙基-β-环糊精溶液复溶核酸后冻干,由于羟丙基-β-环糊精的固相支撑作用,使得核酸肉眼可见,一方面不会造成丢失,另一方面可以通过定量称取的手段随用随取,因此有利于后期试验的顺利开展。

[0069] 为了解羟丙基-β-环糊精对核酸溶液稳定性的影响,本实施例中鸭瘟病毒核酸(DNA)溶液(溶剂为TE)和鸭坦布苏病毒核酸(RNA)溶液(溶剂为TE),分别采用上述三种保存方式进行稳定性试验。具体如下:

[0070] 实验分组如下:

[0071] 环糊精冻干常温:向鸭瘟病毒核酸(DNA)溶液中加入羟丙基-β-环糊精,至羟丙基-β-环糊精的含量为50mg/mL,真空冷冻干燥(真空度0.001MPa)后室温(24-26℃)保存;

[0072] 向鸭坦布苏病毒核酸(RNA)溶液中加入羟丙基-β-环糊精和DEPC,至羟丙基-β-环糊精的含量为50mg/mL和DEPC的含量为1mg/ml,真空冷冻干燥(真空度0.001MPa)后室温(24-26℃)保存;

[0073] 冻干常温:将鸭瘟病毒核酸(DNA)溶液和鸭坦布苏病毒核酸(RNA)溶液分别真空冷冻干燥(真空度0.001MPa)(直接冻干),室温(24-26℃)保存;

[0074] 液态-70℃:将鸭瘟病毒核酸(DNA)溶液和鸭坦布苏病毒核酸(RNA)溶液于-70℃保存。

[0075] 采用步骤4中鸭瘟病毒荧光定量PCR反应分别在保存3天、1周、2周、1个月、3个月、6个月和12个月时对三种保存形式的样品进行DNA含量测定;采用步骤5中鸭坦布苏病毒荧光定量RT-PCR反应分别在保存3天、1周、10天、2周、1个月、3个月和6个月时对三种保存形式的样品进行RNA含量测定。测定时,每个样品设计三个重复,取平均值后进行不同保存时间的比较,结果如表7所示。

[0076] 上述结果显示,三种保存条件对DNA稳定性的影响均不大,并且无明显差异,12个月内的变异系数在6.1%以内,但由于含有环糊精的DNA冻干后呈现出明显的固体形态,有利于后续实验操作和观察。然而,三种保存条件对于RNA稳定性的影响则明显不同,将RNA冻干后常温保存3个月即无法检出相应目的片段,半年内变异系数超过31%,说明该条件并不利于RNA地稳定保存。将RNA与羟丙基-β-环糊精和DEPC混合后冻干,常温保存6个月内的变异系数为5.90%,明显优于-70℃液态保存(变异系数为13.33%),而且该保存条件无需如-

70℃超低温冰箱等复杂设备，有利于RNA样品远距离运输与保存。

[0077] 表7三种不同保存条件对核酸标准物质稳定性的影响

样品名称 / Ct值 / 时间	鸭瘟病毒核酸（DNA）			鸭坦布苏病毒核酸（RNA）		
	环糊精冻干常温	冻干常温	液态 -70℃	环糊精冻干常温	冻干常温	液态 -70℃
3天	20.41	19.86	20.24	16.04	17.94	16.24
1周	19.87	21.31	20.18	15.36	20.97	16.33
10天	-	-	-	16.68	22.56	17.10
2周	19.63	20.11	20.32	16.01	22.16	16.55
1月	20.08	20.13	20.87	16.98	27.53	17.49
2月	-	-	-	17.32	33.45	18.32
3月	20.57	21.32	21.05	17.89	>40	19.74
6月	21.39	21.95	21.55	18.25	>40	23.38
12月	22.07	23.47	22.79	-	-	-
变异系数	4.24%	6.06%	4.45%	5.90%	>31.05%	13.33%

[0078]

[0001] <110> 中国动物疫病预防控制中心

[0002] <120> 羟丙基-β-环糊精在制备核酸冷冻干燥保护剂中的用途

[0003] <160> 1

[0004] <170> PatentIn version 3.5

[0005] <210> 1

[0006] <211> 1360

[0007] <212> DNA

[0008] <213> 人工序列

[0009] <220>

[0010] <223>

[0011] <400> 1

[0012] atcaaaagat aacatgcatt tcagcaacag gagtaacact atcggtagta agcctgctaa 60

[0013] taggaatcgc caatttgggc ctaaatatcg gactacacta caaagtgagt gattcaacaa 120

[0014] ctataaacat tccaaacatg aatgagacca acccaacaac aacaaacatc actaacatta 180

[0015] tagtgaataa gaacgaagaa agaacatttc tcaacttgac caagccgcta tgtgaagtca 240

[0016] actcatggca cattctatcg aaagacaatg caataagaat aggtgaggat gctcatatac 300

[0017] tggtcacaag ggaaccttac ttgtcctgtg atccacaagg atgcaggatg tttgctctga 360

[0018] gtcaaggcac aacactcaga gggcgacatg cgaatggaac catacatgat aggagcccat 420

[0019] ttcgagctct tataagttgg gaaatgggtc aggcacccag tccatataat actagggtcg 480

[0020] aatgcatagg atggtcaagc acgtcatgcc atgatggcat atcaaggatg tcaatatgca 540

[0021] tatcaggacc gaataacaat gcatcggcag tggtgtggta caggggggaga ccagtaacag 600

[0022] aaatcccatc atgggcaggg aacattctta ggactcaaga atcagaatgt gtgtgccata 660

[0023] aaggaatctg cccagtggtc atgacagatg gtccagcaaa caacaaggca gcaactaaga 720

[0024] taatctactt caaagaggga aagatacaga aaattgaaga actgcaaggg aacgctcaac 780

[0025] acatcgaaga gtgttcatgc tacggagcag cagggatgat caaatgtgta tgcagagaca 840

[0026] attggaaggg ggcaaataga ccaataatca ctatagatcc cgaaatgatg acccacacaa 900

[0027] gcaaatactt gtgttcaaaa atcttaaccg acacaagtcg tcctaatgac cccaccaatg 960

[0028] ggaactgcga tgcgccaata acaggaggga gcccagaccc aggggtaaaa gggtttgcat 1020

[0029] tcctagacgg ggagagttca tggcttggaa ggacaattag caaagactcc agatcaggct 1080

[0030] acgaaatgtt aaaggtccca aatgcagaaa ccgacactca atcagggcca acctcatacc 1140

[0031] agctgattgt caacaaccaa aattggtcag ggtactcagg ggcattcata gactactggg 1200

[0032] caaccaagga atgcttcaat ccttgttttt atgtggagct aatcagaggg agacccaaag 1260

[0033] agagtgatgt actgtggact tccaatagca tggtagctct ctgtggatcc agggagcgat 1320

[0034] tgggatcatg gtcctggcat gatggtgcag aaatcatcta 1360

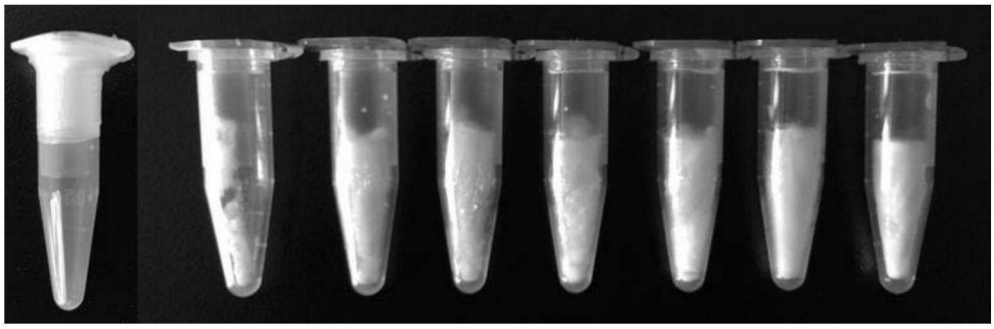

图1

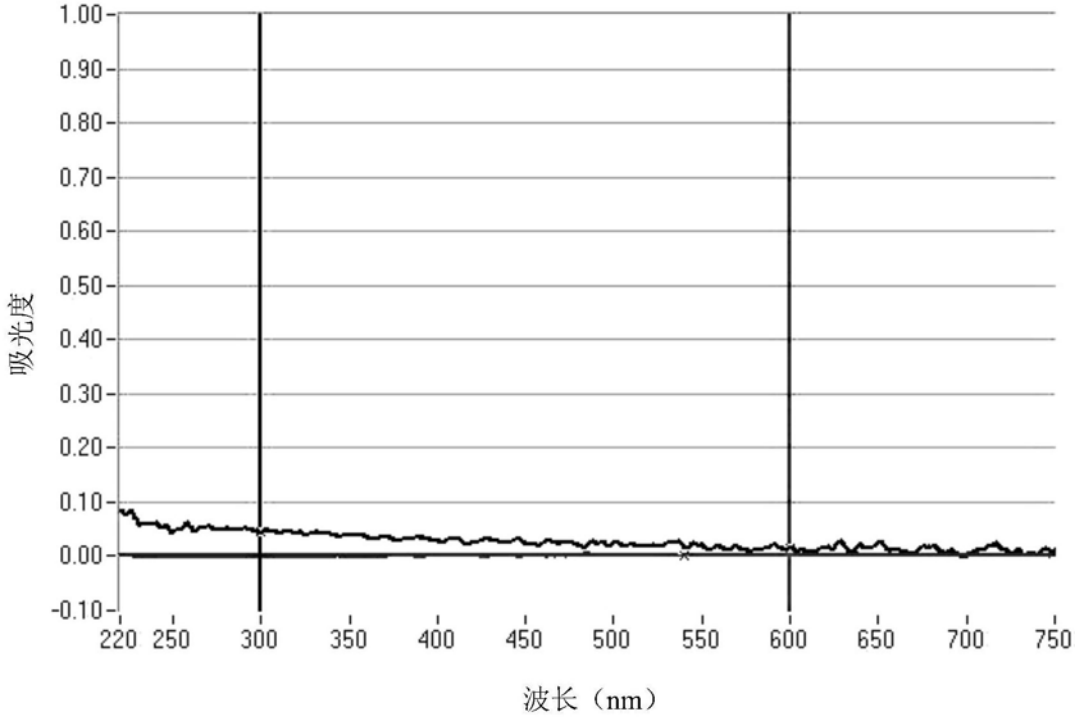
1.00
0.90
0.80
0.70
0.60
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
-0.10
吸光度
220 250 300 350 400 450 500 550 600 650 700 750
波长（nm）

图2

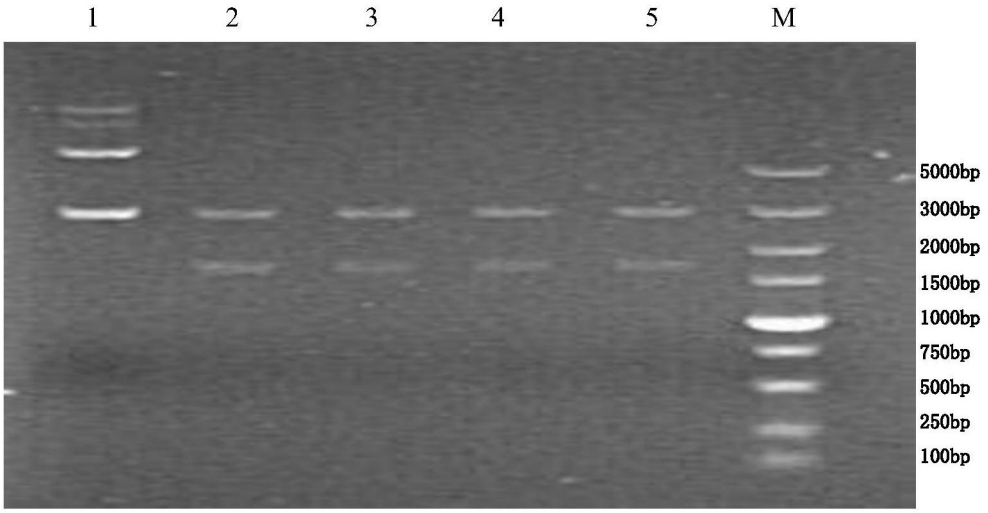
1
2
3
4
5
M
5000bp
3000bp
2000bp
1500bp
1000bp
750bp
500bp
250bp
100bp

图3

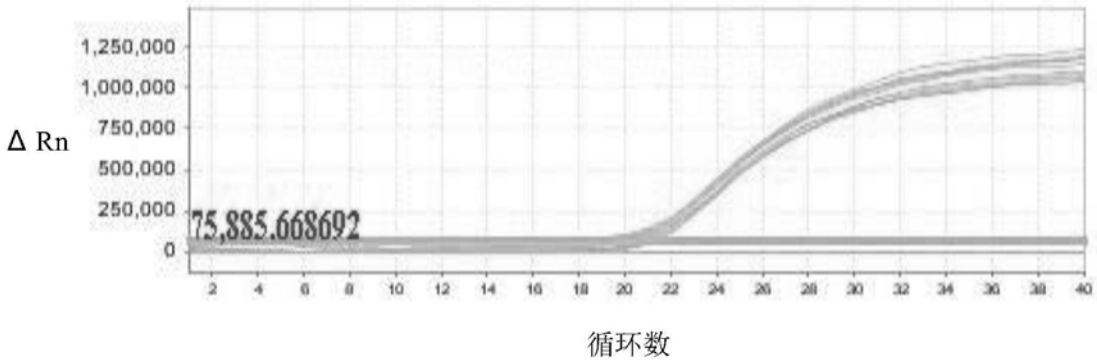
1,250,000
1,000,000
750,000
500,000
250,000
0
Δ Rn
75,885.668692
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
循环数

图4