



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103911367 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 09

(21) 申请号 201410106550. 1

(22) 申请日 2014. 03. 20

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

(72) 发明人 吴文学 刘旭 徐威

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书1页 说明书20页 附图1页

(54) 发明名称

一种核酸扩增反应试剂的冻干保护剂及冻干方法

(57) 摘要

本发明涉及一种核酸扩增反应试剂的冻干保护剂及冻干方法。本发明提供的一种用于冻干保护的组合物,为如下 1) 或 2): 1) 所述组合物由海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白和水组成,所述海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白和所述水的配比为 4.0—25g:1—7g:1.0—7g:49—50ml; 2) 所述组合物由海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白、吐温、Tris-HCl 和水组成,所述海藻糖、所述甘露醇、所述牛血清白蛋白、所述吐温、所述 Tris-HCl 和所述水的配比为 4.0—25g:1—7g:1.0—7g:0.1—0.25ml:2.5×10⁻³—5.0×10⁻³mol:49—50ml。本发明所用到的冻干保护剂采用的原料成本低,操作简单,可以大规模生产,降低了生产成本,可有效延长核酸扩增反应试剂的保存期限。

1. 一种用于冻干保护的组合物,为如下1)或2):

1) 所述组合物由海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白和水组成,所述海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白和所述水的配比为 4.0—25g:1—7g:1.0—7g:49—50ml;

2) 所述组合物由海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白、吐温、Tris-HCl 和水组成,所述海藻糖、所述甘露醇、所述牛血清白蛋白、所述吐温、所述 Tris-HCl 和所述水的配比为 4.0—25g:1—7g:1.0—7g:0.1—0.25ml:2.5×10⁻³—5.0×10⁻³mol:49—50ml。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于:

1) 所述的组合物中,所述海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白和水的配比为 5.26—25g:1.32—6.25g:1.32—6.25g:49—50ml;

2) 所述的组合物中,所述海藻糖、所述甘露醇、所述牛血清白蛋白、所述吐温、所述 Tris-HCl 和所述水的配比为 4.0—25g:1.32—6.25g:1.32—6.25g:0.1—0.25ml:2.5×10⁻³—5.0×10⁻³mol:49—50ml。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其特征在于:

所述甘露糖和所述牛血清白蛋白为等质量比。

4. 一种制备权利要求1-3中任一所述组合物的方法,包括如下步骤:将权利要求1-3中任一所述组合物的各物质按照对应的质量比混匀,即得到用于冻干保护的组合物。

5. 权利要求1-3中任一所述用于冻干保护的组合物在冻干核酸扩增反应试剂中的应用。

6. 一种冻干核酸扩增反应试剂的方法,包括如下步骤:

1) 将权利要求1-3中任一所述用于冻干保护的组合物和核酸扩增反应试剂混匀,干燥,得到干燥产物;

2) 将所述干燥产物冻干,即得到核酸扩增反应试剂冻干制品。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:

步骤1)中,所述组合物和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 2.81—10.33:8.75—22.1;所述核酸扩增反应试剂为环介导等温扩增反应试剂、反转录环介导等温扩增反应试剂、滚环扩增反应试剂、依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂、聚合酶链式反应试剂、反转录PCR反应试剂或实时荧光定量PCR反应试剂。

8. 根据权利要求6或7所述的方法,其特征在于:

步骤1)中,所述干燥采用冷冻真空干燥;

步骤2)中,所述冻干的条件为:预冻阶段经过 40min—1h,隔板温度下降到 -42℃—-40℃、预冻时低温保持时间为 3h—4h;主干燥阶段,首先用 10min—30min 抽真空至 0.1mbar、再用 2h—4h 将搁板温度升至 -25℃—-15℃,然后保持 4h—6h,此阶段共 6h10min—10h30min;终末干燥阶段,首先用 10min—30min 抽真空至 0.01mbar,再用 2h—3h 将搁板温度升至 15℃—25℃,然后保持 3h—5h,此阶段共 5h10min—8h30min。

9. 根据权利要求6-8中任一所述的方法,其特征在于:

若所述核酸扩增反应试剂中含有吐温和 Tris-HCl,则所述组合物为 1)所述组合物;

若所述核酸扩增反应试剂中不含有吐温和 Tris-HCl,则所述组合物为 2)所述组合物。

一种核酸扩增反应试剂的冻干保护剂及冻干方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种核酸扩增反应试剂的冻干保护剂及冻干方法。

背景技术

[0002] 环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)是2000年开发的一种新颖的恒温核酸扩增方法,该技术不同于常规PCR思路,其依赖于针对靶序列上的特异区域设计几组特异引物和一种具有链置换特性Bst DNA聚合酶,在等温条件下通过引物自身独特的反转结合,Bst DNA聚合酶进行链的自动循环置换DNA的经典扩增反应,具有简单、快速、特异性强的特点。目前,已有多种环介导等温扩增试剂盒上市,广泛应用于各种病毒、细菌、寄生虫等引起的疾病检测、食品化妆品安全检查及进出口快速诊断中。

[0003] 反转录环介导等温扩增技术(RT loop-mediated isothermal amplification,RT-LAMP)是将RNA的逆转录(RT)和cDNA的环介导等温扩增技术(LAMP)相结合的技术。RT-LAMP技术有较高的灵敏度、操作方便。目前,已有多种反转录环介导等温扩增试剂盒用于RNA病原的定性和定量检测中。

[0004] 滚环扩增技术(rolling circle amplification,RCA)是新近发展起来的一种恒温核酸扩增方法。以环状DNA为模板,通过一个短的DNA引物(与部分环状模板互补),在酶催化下将dNTPs转变成单链DNA,此单链DNA包含成百上千个重复的模板互补片段。这种方法不仅可以直接扩增核酸,还可以实现对靶核酸的信号放大,灵敏度较高,因此在核酸检测中具有很大的应用价值和潜力。

[0005] 依赖于核酸序列恒温扩增技术(nucleic acid sequence—based amplification,NASBA)是一种扩增RNA的新技术,是由一对引物介导的、连续均一的、体外特异核苷酸序列等温扩增的酶促反应过程。该技术具有操作简单、特异性强、灵敏度高、不易被污染等优点,目前已广泛应用于病毒、细菌、霉菌、寄生虫和细胞因子等的检测。在动物疫病预防控制方面,NASBA方法已成为诊断禽流感病毒的国家诊断标准方法之一。同时,在植物病害防疫检查等方面也有重要用途。

[0006] 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)是一种分子生物学技术,用于放大扩增特定的DNA片段。利用DNA在体外高温时变性会变成单链,低温时引物与单链按碱基互补配对的原则结合,再调温度至DNA聚合酶最适反应温度,DNA聚合酶沿着磷酸到五碳糖(5'-3')的方向合成互补链。PCR的特点是:特异性强、灵敏度高、简便快速、纯度要求低,广泛用于疾病和肿瘤等的检测。

[0007] 反转录PCR(Reverse Reaction,RT-PCR)又称为逆转录PCR,是将RNA的逆转录(RT)和cDNA的聚合酶链式扩增反应(PCR)相结合的技术。能够使RNA检测的灵敏性提高几个数量级,使一些极为微量RNA样品分析成为可能。RT-PCR技术灵敏而且用途广泛,可用于检测细胞/组织中基因表达水平,细胞中RNA病毒的含量和直接克隆特定基因的cDNA序

列等。

[0008] 实时荧光定量 PCR 技术 (Real-time PCR) 于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出。指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。由于该技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,而且与常规 PCR 相比,它具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点,目前已得到广泛应用。

[0009] 目前,多种核酸扩增方法被广泛应用在病原体的检测上,但是核酸扩增反应试剂在常温环境下保存不稳定,仅一个月就失效,在 2 ~ 8℃ 条件下保存,保存期也只有三个月左右,而且在 -20℃ 条件下的保存期也较不理想。这就要求等温扩增反应试剂在保存、运输和使用过程中尽可能在低温条件下进行,否则诊断试剂容易失效,因此试剂盒的长期保存和长途运输将会受到很大的限制,容易因诊断试剂保存温度不当而使其敏感性下降甚至完全失效,最终导致疫病的检测不及时而造成疫病流行。

[0010] 目前,针对核酸扩增反应试剂缺少能在 4℃ 或室温长期保存的方法。

[0011] 冻干疫苗,即利用致病微生物经传代或基因改造的方式,在不破坏原有免疫原性的基础上使该致病微生物无致病性,将失去致病性的病原微生物经扩增后将培养液放入冻干机中,经低温,增加冻干机内真空度的方法,使培养液中的水分以升华的方式分离,制成保持原有微生物免疫原性的干粉,即为冻干疫苗。疫苗经冻干后,排除了 95-99% 以上的水份,使干燥后产品能长期保存而不致变质,由于在低温下进行,蛋白质、微生物之类不会发生变性或失去生物活力,而易氧化的物质也得到了保护。例如:冻干人用狂犬病疫苗系,用狂犬病病毒固定毒株 (CTN-1V 株) 接种 Vero 细胞,培养后,收获病毒液,经灭活病毒、浓缩、纯化,加入适量明胶、蔗糖保护剂冻干制成,为白色疏松体,重溶后为澄明液体,无异物,保存期限长达三年。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供一种用于冻干保护的组合物。

[0013] 本发明提供的用于冻干保护的组合物,为如下 1) 或 2):

[0014] 1) 所述组合物由海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白和水组成,所述海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白和所述水的配比为 4.0—25g:1—7g:1.0—7g:49-50ml;

[0015] 2) 所述组合物由海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白、吐温、Tris-HCl 和水组成,所述海藻糖、所述甘露醇、所述牛血清白蛋白、所述吐温、所述 Tris-HCl 和所述水的配比为 4.0—25g:1—7g:1.0—7g:0.1—0.25ml:2.5×10⁻³—5.0×10⁻³mol:49-50ml。

[0016] 上述组合物中,

[0017] 1) 所述组合物中,所述海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白和水的配比为 5.26—25g:1.32—6.25g:1.32—6.25g:49-50ml;

[0018] 2) 所述的组合物中,所述海藻糖、所述甘露醇、所述牛血清白蛋白、所述吐温、所述 Tris-HCl 和所述水的配比为 4.0—25g:1.32—6.25g:1.32—6.25g:0.1—0.25ml:2.5×10⁻³—5.0×10⁻³mol:49-50ml。

[0019] 在实施例中,

[0020] 上述 1) 所述组合物(冻干保护剂)中,所述海藻糖、甘露醇和牛血清白蛋白的终浓

度分别依次为 21.55g/50ml、5.4g/50ml:5.4g/50ml；

[0021] 或所述海藻糖、甘露醇和牛血清白蛋白的终浓度分别依次为 11.9g/50ml:2.98g/50ml:2.98g/50ml；

[0022] 或所述海藻糖、甘露醇和牛血清白蛋白的终浓度分别依次为 22.22g/50ml:5.56g/50ml:5.56g/50ml；

[0023] 或所述海藻糖、甘露醇和牛血清白蛋白的终浓度分别依次为 6.25g/50ml:1.56g/50ml:1.56g/50ml；

[0024] 或所述海藻糖、甘露醇和牛血清白蛋白的终浓度分别依次为 25.0g/50ml:6.25g/50ml:6.25g/50ml；

[0025] 或所述海藻糖、甘露醇和牛血清白蛋白的终浓度分别依次为 5.26g/50ml:1.32g/50ml:1.32g/50ml；

[0026] 或所述海藻糖、甘露醇和牛血清白蛋白的终浓度分别依次为 5.55g/50ml:1.39g/50ml:1.39g/50ml。

[0027] 上述组合中，

[0028] 所述甘露糖和所述牛血清白蛋白为等质量比。

[0029] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述组合物的方法。

[0030] 本发明提供的方法，包括如下步骤：将上述组合物的各物质按照对应的质量比混匀，即得到用于冻干保护的组合物。

[0031] 上述用于冻干保护的组合物在冻干核酸扩增反应试剂中的应用也是本发明保护的范畴。

[0032] 本发明的第三个目的是提供一种冻干核酸扩增反应试剂的方法。

[0033] 本发明提供的方法，包括如下步骤：

[0034] 1) 将上述用于冻干保护的组合物和核酸扩增反应试剂混匀，干燥，得到干燥产物；

[0035] 2) 将所述干燥产物冻干，即得到核酸扩增反应试剂冻干制品。

[0036] 上述方法中，

[0037] 步骤 1) 中，所述组合物和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 2.81-10.33:8.75-22.1；

[0038] 所述核酸扩增反应试剂为环介导等温扩增反应试剂、反转录环介导等温扩增反应试剂、滚环扩增反应试剂、依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂、聚合酶链式反应试剂、反转录 PCR 反应试剂或实时荧光定量 PCR 反应试剂。

[0039] 在实施例中，

[0040] 所述组合物(冻干保护剂)和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 2.9:22.1；

[0041] 或所述组合物(冻干保护剂)和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 4.57:20.43；

[0042] 或所述组合物(冻干保护剂)和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 2.81:22.19；

[0043] 或所述冻干保护剂和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 10:8.75；

[0044] 或所述组合物(冻干保护剂)和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 10:15；

[0045] 或所述组合物(冻干保护剂)和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 10.33:14.67；

[0046] 或所述组合物(冻干保护剂)和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 9.8:15.2；

[0047] 或所述组合物(冻干保护剂)和所述核酸扩增反应试剂的体积比为 10.33:14.67。

[0048] 步骤 1) 中,所述干燥采用冷冻真空干燥;

[0049] 步骤 2) 中,所述冻干的条件为:预冻阶段经过 40min—1h,隔板温度下降到 -42°C — -40°C 、预冻时低温保持时间为 3h—4h;主干燥阶段,首先用 10min—30min 抽真空至 0.1mbar、再用 2h—4h 将搁板温度升至 -25°C — -15°C ,然后保持 4h—6h,此阶段共 6h10min—10h30min;终末干燥阶段,首先用 10min—30min 抽真空至 0.01mbar,再用 2h—3h 将搁板温度升至 15°C — 25°C ,然后保持 3h—5h,此阶段共 5h10min—8h30min。

[0050] 所述核酸扩增反应试剂为环介导等温扩增反应试剂(实施例 1 的方法配制)、反转录环介导等温扩增反应试剂(实施例 2 的方法配制)、滚环扩增反应试剂(实施例 3 的方法配制)、依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂(实施例 4 的方法配制)、聚合酶链式反应试剂(实施例 5 的方法配制)、反转录 PCR 反应试剂(实施例 6 的方法配制)或实时荧光定量 PCR 反应试剂(实施例 7 的方法配制),也可以为其他类核酸扩增反应试剂。

[0051] 其中核酸扩增反应试剂是一种水溶液,可包含如下溶质且不限于这些溶质:KCl、 MgCl_2 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgSO_4 、Tris-HCl、Tween20、甘油、二硫苏糖醇、二甲基亚砜、核苷酸、脱氧核苷酸、Taq DNA 聚合酶、Taq DNA 连接酶、AMV 逆转录酶、Phi29DNA 聚合酶、T7RNA 聚合酶、RNaseH、RNase 抑制剂、引物混合物等。

[0052] 在所述方法中,在所述混匀后还包括如下步骤:将混匀产物过滤除菌;所使用的微孔滤膜孔径为 $0.22\ \mu\text{m}$ 。

[0053] 上述方法中,

[0054] 若所述核酸扩增反应试剂中含有吐温和 Tris-HCl,则所述冻干保护剂为 1) 所述冻干保护剂;

[0055] 若所述核酸扩增反应试剂中不含有吐温和 Tris-HCl,则所述冻干保护剂为 2) 所述冻干保护剂。

[0056] 上述保护剂采用具有如下特点的组分:

[0057] 1、海藻糖:特殊双糖分子构成的非还原糖,具有较高的玻璃化转变温度;内部氢键少,有利于与蛋白质分子之间形成氢键;化学活性非常低;长期储藏过程中易于形成二水化合物,避免了蛋白质的变性。

[0058] 2、甘露醇:性质稳定,作为填充剂,为活性组分提供支撑结构,同时,不会与活性组分发生反应。

[0059] 3、牛血清白蛋白:白色粉末,对生物材料的低温保存和冷冻干燥,都是很好的保护剂;可以抑制冻干过程中系统的 pH 降低。

[0060] 4、吐温 20 (Tween20):一种表面活性剂,在冷冻干燥的全过程中,既能在冻结和脱水过程中降低冰-水界面张力所引起的冻结和脱水变形,又能在复水过程中对活性组分起到润湿剂和重褶皱剂的作用。

[0061] 5、Tris-HCl (pH8.8):缓冲剂,在蛋白质冻结过程中,溶液的 pH 会发生改变,严重情况会导致蛋白质变性失活。缓冲剂可以维持溶液 pH 的稳定。

[0062] 本发明的实验证明,本发明提供了用于冻干保护的组合物(冻干保护剂),采用的原料成本低,操作简单,可以大规模生产,降低了生产成本,利用其和核酸扩增反应试剂混匀后冻干得到核酸扩增反应试剂制品,可以使核酸扩增反应试剂能够在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 或室温下

长期保存,而不影响其反应效率,能最大限度地减少制品在分装及冻干过程中各种理化因素对于酶和核酸等活性物质的损伤,可有效提高核酸扩增反应试剂的稳定性,延长其保存期限。冻干保护剂不仅具有保护制品生物活性的作用,而且具有赋形剂和抗氧化剂的作用,可在冻干过程中维持制品的稳定性。本发明的核酸扩增冻干反应试剂,在 37°C 耐老化 7 日后,敏感性仍保持稳定,因此特别适于基层现场进行疫病的检测。

附图说明

- [0063] 图 1 为实施例 1 的灵敏度结果图。
[0064] 图 2 为实施例 2 的灵敏度结果图。
[0065] 图 3 为实施例 5 的灵敏度结果图。
[0066] 图 4 为实施例 6 的灵敏度结果图。

具体实施方式

[0067] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0068] 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。

[0069] 海藻糖购自 AMRESCO 公司,甘露醇购自国药集团化学试剂有限公司,牛血清白蛋白购自北京博奥拓达科技有限公司,吐温 20 (Tween20) 购自 Sigma 公司,Tris-HCl (pH8.8) 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

[0070] 下面对本发明的核酸扩增反应试剂冻干制品的制备工艺进行详细描述。

[0071] 实施例 1、耐热冻干保护剂的制备

[0072] 耐热冻干保护剂组分的选择和对比对诊断试剂的成型和保存效果有显著的影响。为了使此核酸扩增反应试剂冻干制品的外观和成型较好,以及延长其保存期限,对耐热冻干保护剂的组分进行了长期的分析和研究,经过一系列的试验,优化了各种组分的种类以及含量,选用如下组分:海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白。

[0073] 一、冻干保护剂的配制

[0074] 称取海藻糖 21.55g、甘露醇 5.4g、牛血清白蛋白 5.4g;将以上成分加入到 50ml 事先预热至 37°C 的注射用水中,充分溶解后混匀,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌,得到冻干保护剂,置于 4°C 冰箱中保存备用。

[0075] 二、环介导等温扩增反应试剂的配制

[0076] 1) 反应缓冲液的配制:称取 KCl 0.0423g、MgSO₄ 0.1109g、(NH₄)₂SO₄ 0.0733g 加入至 20ml 注射用水中,量取 1M Tris-HCl (pH8.8) 1.125ml、Tween20 0.05625ml 加入上述溶液中,补充注射用水定容至 25ml 后摇匀,4°C 冰箱中保存备用。

[0077] 2) dNTP 混合液的配制:取等体积的 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 四种核苷酸溶液混合,4°C 冰箱中保存备用。

[0078] 3) 引物混合液的配制:取等体积的内侧引物对 (BIP、FIP)、外侧引物对 (F3、B3) 和环引物 (LB) 五种引物溶液混合,4°C 冰箱中保存备用。

[0079] 以牛支原体 (HB-1 株) 菌的扩增引物为例提供各引物的序列:

[0080] BIP

[0081] (5' -TCGCTATGGAATATTAATCAACAAGAATTCAACTCTAAGTGATTCATCAACAC-3')

[0082] FIP

[0083] (5' -CGTCTGTTTTATAAGCAAATACGTCGAATTCAAGAAAGTCAAATTATAGAGCTAAG-3')

[0084] F3 (5' -ATTTTTGCGTGATGGCTT-3')

[0085] B3 (5' -TCTCATAGAATTGTTCAAAGA-3')

[0086] LB (5' -GTTAATTTAACAATTCCACTAGGTTTA)-3'

[0087] 4) 环介导等温扩增反应试剂的配制:取上述反应缓冲液 16.65ml、上述 dNTP 混合液 2.1ml、上述引物混合液 3.125ml 和 Bst DNA 聚合酶(120000U/ml) 0.225ml,混合均匀,4℃冰箱中保存备用。

[0088] 三、环介导等温扩增反应试剂冻干制品的制备

[0089] 1)环介导等温扩增冻干反应试剂的配制:取上述步骤一制备的冻干保护剂 2.9ml 和环介导等温扩增反应液 22.1ml,混匀,得到 25ml 的溶液。定量分装至西林瓶中,每瓶 500 μl (20 μl 为一个反应体系,每瓶共 25 个反应体系),迅速进行冷冻真空干燥。

[0090] 2)冻干:将装有环介导等温扩增反应试剂的西林瓶放入冻干机体腔内,按照以下程序进行冻干:预冻阶段经过 40min,隔板温度下降到 -42℃、预冻时低温保持时间为 3h30min;主干燥阶段,首先用 20min 抽真空至 0.1mbar、再用 3h 将搁板温度升至 -20℃,然后保持 6h,此阶段共 9h20min;终末干燥阶段,首先用 20min 抽真空至 0.01mbar,再用 2h 将搁板温度升至 20℃,然后保持 4h,此阶段共 6h20min。冻干全过程为 19h50min,轧盖、出箱,得到环介导等温扩增反应试剂的冻干制品。

[0091] 四、敏感性检测

[0092] 出箱当天,将上述步骤三获得的冻干制品溶解得到环介导等温扩增反应试剂,进行敏感性试验,并设置对照组(未经冻干的环介导等温扩增冻干反应试剂)。具体步骤如下:

[0093] (1)称取甜菜碱(4℃保存)0.0703g,加入到 1 瓶装有冻干产品的西林瓶中,再加入 400 μl 注射用水,将冻干产品溶解后,混合均匀。分装至反应管中,每管 20 μl,4℃冰箱中保存备用。

[0094] (2)对照组为新鲜配制的环介导等温扩增反应液(包含甜菜碱),成分和浓度与冻干试剂中的反应液相同,仅不含有冻干保护剂。每管 20 μl,4℃冰箱中保存备用。

[0095] (3)模板 DNA 的提取:将已知浓度(1.0×10^9 CFU/ml)的牛支原体(HB-1 株,《牛支原体的环介导等温扩增快速检测技术研究》,《农业生物技术学报》,2012,20(2):218 ~ 224;公众可从中国农业大学获得)用双蒸水依次倍比稀释到 1.0×10^1 CFU/ml,用磁珠基因提取试剂盒(来自东洋纺生物科技有限公司),进行 DNA 的提取。

[0096] (4)环介导的等温扩增:向上述装有 20 μl 环介导等温扩增反应液的反应管中分别加入上述方法提取的不同浓度的 DNA,每管加入 10 μl 的模板,总反应体积为 30 μl;将反应管置于水浴锅或金属恒温加热器上 58℃,60min 后取出。

[0097] (5)反应结果判定:通过显色检测判断结果。在反应管中加入荧光显色剂(成分为 SYBR GREEN I 和羟基萘酚蓝),在紫外灯照射下观察颜色变化。装有阳性对照的反应管颜色为绿色,装有阴性对照的反应管为紫褐色。如果装有待检样品的反应管颜色为绿色,则说明检测结果为阳性。如果装有待检样品的反应管颜色为紫褐色,则说明检测结果为阴性。可以检测为阳性的最低浓度,即为敏感性。

[0098] 上述步骤三获得的冻干制品的结果如图 1 所示,P 为阳性对照,N 为阴性对照,1-8

分别为浓度是 10^8-10^1 CFU/ml 的菌液。

[0099] 而对照组的结果与其一致,灵敏度也为 102CFU/ml。

[0100] 总结如表 1:

[0101] 表 1 为环介导等温扩增反应试剂冻干制品和对照组的敏感性结果

[0102]

| 组别 | 敏感性 |
|---------------------------|-----------|
| 环介导等温扩增反应试剂冻干制品(实施例 1 制备) | 102CFU/ml |
| 对照组(未经冻干) | 102CFU/ml |

[0103] 对比试验结果说明:环介导等温扩增反应液经过冷冻干燥后,其敏感性和对照组相同,未受影响。产品经冻干后,可用于牛支原体的检测。

[0104] 五、保质期试验

[0105] 将上述步骤三获得的冻干制品和对照组(未经冻干的反应试剂),置于 37℃ 进行耐老化,测定其性状和敏感性。敏感性试验如上所述进行。

[0106] 结果如表 2 所示:

[0107] 表 2 为环介导等温扩增反应试剂冻干制品和对照组在 37℃ 保存不同时间的性状和敏感性结果

[0108]

| 组别 | | 出箱当天 | 耐老化 1 日 | 耐老化 7 日 |
|---------------|-----|---------------|---------------|---------------|
| 实施例 1 | 性状 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 |
| | 敏感性 | 10^2 CFU/ml | 10^2 CFU/ml | 10^2 CFU/ml |
| 对照组 (未经冻干) | 性状 | 液态 | 液态 | 液态 |
| | 敏感性 | 10^2 CFU/ml | 10^4 CFU/ml | 失效 |

[0109] 上表说明,用冻干保护剂的环介导等温扩增试剂,置于 37℃ 耐老化 7 日,其敏感性未发生变化,即产品未受温度的影响;而对照组的未经冻干的环介导等温扩增试剂,耐老化仅 1 日,其敏感性就降低了 2 个数量级,7 日后完全失活,无法进行病原的检测。

[0110] 因此,用冻干保护剂的环介导等温扩增试剂的保存效果明显好于未经冻干的产品。将冻干技术应用在环介导等温扩增试剂中,可有效保护诊断试剂,在长期保存、长途运输和使用过程中保持其敏感性不受影响。

[0111] 实施例 2、反转录环介导等温扩增反应试剂冻干制品的制备工艺

[0112] 一、冻干保护剂的配制

[0113] 称取海藻糖 11.9g、甘露醇 2.98g、牛血清白蛋白 2.98g;将以上成分按顺序加入到 50ml 事先预热至 37℃ 的注射用水中,充分溶解后混匀,用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌,得到冻干保护剂,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

[0114] 二、反转录环介导等温扩增反应试剂的配制

[0115] 1) 反应缓冲液的配制:称取 KCl 0.0423g、 MgSO_4 0.1109g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.0733g 加入至 20ml 注射用水中,量取 1M Tris-HCl (pH8.8) 1.125ml、Tween20 0.05625ml 加入上述溶液中,补充注射用水定容至 25ml 后摇匀,4℃冰箱中保存备用。

[0116] 2) dNTP 混合液的配制:取等体积的 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 四种核苷酸溶液混合,4℃冰箱中保存备用。

[0117] 3) 引物混合液的配制:取等体积的内侧引物对 (FIP、BIP)、外侧引物对 (F3、B3) 和环引物对 (LF、LB) 六种引物溶液混合,4℃冰箱中保存备用。

[0118] 以禽流感病毒 (H9 亚型) 的扩增引物为例提供各引物的序列:

[0119] BIP

[0120] (5' -GACAGAAAATAGAGGGGGTCAAGCTTTTCAGTCGAATAAATGGTGAGG-3')

[0121] FIP (5' -ACTTCCTCCTGTTGTAGTCCCTTTCCACAAATGTGATGACCAGTG-3')

[0122] F3 (5' -GGAAAGGATGTTTCGAGCT-3')

[0123] B3 (5' -ATCACAAGATGAGGCG-3')

[0124] LB (5' -TGGAGTCTGAAGGAAGTAC-3')

[0125] LF (5' -CATCCGAATTGTCTCCATG-3')

[0126] 4) 反转录环介导等温扩增反应试剂的配制:取上述反应缓冲液 12.07ml、上述 dNTP 混合液 1.52ml、上述引物混合液 6.52ml、Bst DNA 聚合酶 (120000U/ml) 0.16ml 和 AMV 反转录酶 (10000U/ml) 0.16ml,混合均匀,4℃冰箱中保存备用。

[0127] 三、反转录环介导等温扩增反应试剂冻干制品的制备

[0128] 1) 反转录环介导等温扩增冻干反应试剂的配制:取上述步骤一制备的冻干保护剂 4.57ml 和反转录环介导等温扩增反应液 20.43ml,混匀,得到 25ml 的溶液。定量分装至西林瓶中,每瓶 575 μl (23 μl 为一个反应体系,每瓶共 25 个反应体系),迅速进行冷冻真空干燥。

[0129] 2) 冻干:将装有反转录环介导等温扩增冻干反应试剂的西林瓶放入冻干机腔内,按照以下程序进行冻干:预冻阶段经过 40min,隔板温度下降到 -42℃、预冻时低温保持时间为 3h30min;主干燥阶段,首先用 20min 抽真空至 0.1mbar、再用 3h 将搁板温度升至 -20℃,然后保持 6h,此阶段共 9h20min;终末干燥阶段,首先用 20min 抽真空至 0.01mbar,再用 2h 将搁板温度升至 20℃,然后保持 4h,此阶段共 6h20min。冻干全过程为 19h50min,轧盖、出箱,得到反转录环介导等温扩增反应试剂的冻干制品。

[0130] 四、敏感性检测

[0131] 出箱当天,将上述步骤三获得的冻干制品溶解得到反转录环介导等温扩增反应试剂,进行敏感性试验,并设置对照组(未经冻干的反应试剂)。具体步骤如下:

[0132] (1) 称取甜菜碱 (4℃保存) 0.0808g,加入到 1 瓶装有冻干产品的西林瓶中,再加入 470 μl 注射用水,将冻干产品溶解后,混合均匀。分装至反应管中,每管 23 μl ,4℃冰箱中保存备用。

[0133] (2) 对照组为新鲜配制的反转录环介导等温扩增反应液(包含甜菜碱),成分和浓度与冻干试剂中的反应液相同,仅不含有冻干保护剂各成分。每管 23 μl ,4℃冰箱中保存备用。

[0134] (3) 模板 RNA 的制备:禽流感病毒 (H9 亚型禽流感病毒) 记载在如下文献中:《H9

亚型禽流感病毒环介导等温扩增检测方法的建立与荧光指示剂的应用》，《农业生物技术学报》，2011年，第19卷，第1期，第191-196页；公众可从中国农业大学获得。

[0135] 禽流感病毒(H9亚型)的阳性质粒：使用禽流感病毒H9亚型的cDNA，根据PCR方法扩增得到H9亚型毒株的EU644482序列中自5'端第1414位至1610位的核苷酸序列，其与pEASY-T1Simple(北京全式金生物技术有限公司，产品目录号：CT111)克隆载体连接，得到质粒拷贝数为 1×10^{10} copies/ μ l，用双蒸水依次倍比稀释到 1×10^1 copies/ μ l， -80°C 保存。

[0136] (4) 反转录环介导的等温扩增：向上述装有 23μ l反转录环介导等温扩增反应液的反应管中分别加入上述方法制备的不同浓度的质粒，每管加入 2μ l的模板，总反应体积为 25μ l；将反应管置于水浴锅或金属恒温加热器上 63°C ，60min后取出。

[0137] (5) 反应结果判定：通过显色检测判断结果。在反应管中加入荧光显色剂(成分为SYBR GREEN I和羟基萘酚蓝)，在紫外灯照射下观察颜色变化。装有阳性对照的反应管颜色为绿色，装有阴性对照的反应管为紫褐色。如果装有待检样品的反应管颜色为绿色，则说明检测结果为阳性。如果装有待检样品的反应管颜色为紫褐色，则说明检测结果为阴性。

[0138] 可以检测为阳性的最低浓度，即为敏感性。

[0139] 上述步骤三获得的冻干制品的结果如图2所示，P为阳性对照，N为阴性对照，1-8分别为浓度是 1×10^9 - 1×10^2 copies/ μ l的质粒拷贝数。

[0140] 而对对照组的结果与其一致，灵敏度也为 10^3 copies/ μ l。

[0141] 总结如表3：

[0142] 表3为反转录环介导等温扩增反应试剂冻干制品和对对照组的敏感性结果

[0143]

| 组别 | 敏感性 |
|----------------------------|------------------------|
| 反转录环介导等温扩增反应试剂冻干制品(实施例2制备) | 10^3 copies/ μ l |
| 对照组(未经冻干) | 10^3 copies/ μ l |

[0144] 对比试验结果说明：反转录环介导等温扩增反应试剂经过冷冻干燥后，其敏感性和对照组相同，未受影响。产品经冻干后，可用于禽流感病毒的检测。

[0145] 五、保质期试验

[0146] 将上述步骤三获得的冻干制品和对照组(未经冻干的反应试剂)，置于 37°C 进行耐老化，测定其性状和敏感性。敏感性试验如上所述进行。

[0147] 结果如表4所示：

[0148] 表4为反转录环介导等温扩增反应试剂冻干制品和对照组在 37°C 保存不同时间的性状和敏感性结果

[0149]

| 组别 | | 出箱当天 | 耐老化 1 日 | 耐老化 7 日 |
|---------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|
| 实施例 2 | 性状 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 |
| | 敏感性 | 10^3 copies/ μ l | 10^3 copies/ μ l | 10^3 copies/ μ l |
| 对照组 (未经冻干) | 性状 | 液态 | 液态 | 液态 |
| | 敏感性 | 10^3 copies/ μ l | 10^5 copies/ μ l | 失效 |

[0150] 上表说明,用冻干保护剂的反转录环介导等温扩增试剂,置于 37℃耐老化 7 日,其敏感性未发生变化,即产品未受温度的影响;而对照组的未经冻干的反转录环介导等温扩增试剂,耐老化仅 1 日,其敏感性就降低了 2 个数量级,7 日后完全失活,无法进行病原的检测。

[0151] 因此,用冻干保护剂的反转录环介导等温扩增试剂的保存效果明显好于未经冻干的产品。将冻干技术应用在反转录环介导等温扩增试剂中,可有效保护诊断试剂,在长期保存、长途运输和使用过程中保持其敏感性不受影响。

[0152] 实施例 3 滚环扩增反应试剂冻干制品的制备工艺

[0153] 一、冻干保护剂的配制

[0154] 称取海藻糖 22.22g、甘露醇 5.56g、牛血清白蛋白 5.56g;将以上成分按顺序加入到 50ml 事先预热至 37℃的注射用水中,充分溶解后混匀,用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌,得到冻干保护剂,置于 4℃冰箱中保存备用。

[0155] 二、滚环扩增反应试剂的配制

[0156] 1) dNTP 混合液的配制:取等体积的 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 四种核苷酸溶液混合,4℃冰箱中保存备用。

[0157] 2) 引物溶液的配置:取设计好的引物溶液 RCA1,4℃冰箱中保存备用。

[0158] RCA1 (5' -GTGTAGGAACGGCTGACATTCTGG-3')

[0159] 3) 滚环扩增反应试剂的配制:取 1×Phi29DNA 聚合酶缓冲液(包含 50mM Tris-HCl,10mM MgCl₂,10mM (NH₄)₂SO₄,4mM DTT) 12.5ml、上述 dNTP 混合液 1.25ml、上述引物溶液 0.625ml 和 Phi29DNA 聚合酶 7.81ml,混合均匀,4℃冰箱中保存备用。

[0160] 三、滚环扩增反应试剂冻干制品的制备

[0161] 1) 滚环扩增冻干反应试剂的配制:取上述步骤一制备的冻干保护剂 2.81ml 和滚环扩增反应试剂 22.19ml,混匀,得到 25ml 的溶液。定量分装至西林瓶中,每瓶 487.5 μ l (19.5 μ l 为一个反应体系,每瓶共 25 个反应体系),迅速进行冷冻真空干燥。

[0162] 2) 冻干:将装有滚环扩增反应试剂的西林瓶放入冻干机体腔内,按照以下程序进行冻干:预冻阶段经过 40min,隔板温度下降到 -42℃、预冻时低温保持时间为 3h30min;主干燥阶段,首先用 20min 抽真空至 0.1mbar、再用 3h 将搁板温度升至 -20℃,然后保持 6h,此阶段共 9h20min;终末干燥阶段,首先用 20min 抽真空至 0.01mbar,再用 2h 将搁板温度升至 20℃,然后保持 4h,此阶段共 6h20min。冻干全过程为 19h50min,轧盖、出箱,得到滚环扩增反应试剂的冻干制品。

[0163] 四、敏感性检测

[0164] 出箱当天,将上述步骤三获得的冻干制品溶解得到滚环扩增反应试剂,进行敏感

性试验,并设置对照组(未经冻干的反应试剂)。具体步骤如下:

[0165] (1)向1瓶装有冻干产品的西林瓶加入400 μ l注射用水,将冻干产品溶解后,混合均匀。分装至反应管中,每管19.5 μ l,4 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

[0166] (2)对照组为新鲜配制的滚环扩增反应液,成分和浓度与冻干试剂中的反应液相同,仅不含有冻干保护剂各成分。每管19.5 μ l,4 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

[0167] (3)模板DNA的提取:将已知浓度的牛支原体(HB-1株)菌液作倍比稀释(菌液的初始浓度为 1.0×10^9 CFU/ml,用双蒸水依次倍比稀释到 1.0×10^1 CFU/ml),分别用磁珠基因提取试剂盒(来自东洋纺生物科技有限公司),进行DNA的提取。

[0168] (4)连接反应:连接反应体积10 μ L,即10 \times Taq DNA连接酶缓冲液1 μ L,200pmol/L的锁式探针(5'-AGCCATCACGCAAAAATTTCCCAATAGGTCCAGAATGTCAGCCG TTC-CTCACACCAGACTGCCCTGAGAAATAATCTAAGAATTTTTATATTGACTTAGC-3')0.2 μ L,40U/ μ L Taq DNA连接酶0.15 μ L,双蒸水6.65 μ L,检测模板2 μ L。采用热循环连接法连接:94 $^{\circ}$ C 4min;94 $^{\circ}$ C 30s,65 $^{\circ}$ C 5min,15个循环;95 $^{\circ}$ C 15min灭活Taq DNA连接酶。反应结束后立即将反应管冰浴5min,并向管中加入10 μ L核酸外切酶I混合液(10 \times 核酸外切酶I缓冲液2 μ L;5U/ μ L核酸外切酶I2 μ L;双蒸水H206 μ L),37 $^{\circ}$ C保温2.5h以彻底消化未环化的线型锁式探针,再于80 $^{\circ}$ C反应15min以灭活核酸外切酶I。

[0169] (5)滚环扩增:向上述装有19.5 μ l滚环扩增反应液的反应管中分别加入上述方法制备的连接产物,每管加入0.5 μ l,总反应体积为20 μ l;将反应管置于水浴锅或金属恒温加热器上30 $^{\circ}$ C,2h后取出。

[0170] (6)反应结果判定:扩增产物经0.6%琼脂糖凝胶电泳。阳性对照出现目的条带,阴性对照无目的条带。因此,若待检样品出现目的条带即为阳性,未出现目的条带即为阴性。

[0171] 可以检测为阳性的最低浓度,即为敏感性。

[0172] 结果如表5所示:

[0173] 表5为滚环扩增冻干反应试剂和对照组的敏感性结果

[0174]

| 组别 | 敏感性 |
|--------------------|---------------|
| 滚环扩增冻干反应试剂(实施例3制备) | 10^4 CFU/ml |
| 对照组(未经冻干) | 10^4 CFU/ml |

[0175] 对比试验结果说明:滚环扩增反应试剂经过冷冻干燥后,其敏感性和对照组相同,未受影响。产品经冻干后,可用于牛支原体的检测。

[0176] 五、保质期试验

[0177] 将上述步骤三获得的冻干制品和对照组(未经冻干的反应试剂),置于37 $^{\circ}$ C进行耐老化,测定其性状和敏感性。敏感性试验如上所述进行。

[0178] 结果如表6所示:

[0179] 表6为滚环扩增冻干反应试剂和对照组在37 $^{\circ}$ C保存不同时间的性状和敏感性结果

[0180]

| 组别 | | 出箱当天 | 耐老化 1 日 | 耐老化 7 日 |
|---------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|
| 实施例 3 | 性状 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 |
| | 敏感性 | 10 ⁴ CFU/ml | 10 ⁴ CFU/ml | 10 ⁴ CFU/ml |
| 对照组 (未经冻干) | 性状 | 液态 | 液态 | 液态 |
| | 敏感性 | 10 ⁴ CFU/ml | 10 ⁷ CFU/ml | 失效 |

[0181] 上表说明,用冻干保护剂的滚环扩增试剂,置于 37℃耐老化 7 日,其敏感性未发生变化,即产品未受温度的影响;而对照组的未经冻干的滚环扩增试剂,耐老化仅 1 日,其敏感性就降低了 3 个数量级,7 日后完全失活,无法进行病原的检测。

[0182] 因此,用冻干保护剂的滚环扩增试剂的保存效果明显好于未经冻干的产品。将冻干技术应用在滚环扩增试剂中,可有效保护诊断试剂,在长期保存、长途运输和使用过程中保持其敏感性不受影响。

[0183] 实施例 4、依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂冻干制品的制备工艺

[0184] 一、冻干保护剂的配制

[0185] 1) 冻干保护剂 A 的配制:称取海藻糖 6.25g、甘露醇 1.56g、牛血清白蛋白 1.56g;将以上成分按顺序加入到 50ml 事先预热至 37℃的注射用水中,充分溶解后混匀,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌,得到冻干保护剂 A,置于 4℃冰箱中保存备用。

[0186] 2) 冻干保护剂 B 的配制:称取海藻糖 25.0g、甘露醇 6.25g、牛血清白蛋白 6.25g;将以上成分按顺序加入到 50ml 事先预热至 37℃的注射用水中,充分溶解后混匀,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌,得到冻干保护剂 B,置于 4℃冰箱中保存备用。

[0187] 二、依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂的配制

[0188] 1) 反应缓冲液 A 的配制:称取 KCl 0.1863g、MgCl₂ 0.0119g、二硫苏糖醇 0.0193g 加入至 20ml 注射用水中,量取 1M Tris-HCl (pH8.8) 1.0ml 加入上述溶液中,补充注射用水定容至 25ml 后摇匀,4℃冰箱中保存备用。

[0189] 2) 反应缓冲液 B 的配制:称取 KCl 0.1863g、MgCl₂ 0.0286g、二硫苏糖醇 0.0193g 加入至 20ml 注射用水中,量取 1M Tris-HCl (pH8.8) 1.0ml 加入上述溶液中,补充注射用水定容至 25ml 后摇匀,4℃冰箱中保存备用。

[0190] 3) dNTP 混合液的配制:取等体积的 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 四种核苷酸溶液混合,4℃冰箱中保存备用。

[0191] 4) NTP 混合液的配制:取等体积的 ATP、TTP、CTP、GTP 四种核苷酸溶液混合,4℃冰箱中保存备用。

[0192] 5) 引物混合液的配制:取等体积的上游引物 (F) 和下游引物 (R) 两种引物溶液混合,4℃冰箱中保存备用。

[0193] F (5' -GATGCAAGGTCGCATATGAGGTGACAATGAATGCATGGAA-3')

[0194] R (5' -AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCCAIAAAGACAGACCAGCTA-3') (下划线部分表示 T7DNA 依赖的 RNA 聚合酶启动子序列)

[0195] 6) 依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂 A 的配制:取上述反应缓冲液 A 2.5ml、上述 dNTP 混合液 0.625ml、上述 NTP 混合液 1.25ml、上述引物混合液 1.25ml 和二甲基亚砷

3. 125ml, 混合均匀, 4℃冰箱中保存备用。

[0196] 7) 依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂 B 的配制: 取上述反应缓冲液 B2. 5ml、T7RNA 聚合酶 (50000U/ml) 4. 0ml、AMV 反转录酶 (10000U/ml) 4. 0ml、RNase 抑制剂 (40000U/ml) 2. 5ml 和 RNaseH (500U/ml) 2. 0ml, 混合均匀, 4℃冰箱中保存备用。

[0197] 三、依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂冻干制品的制备

[0198] 1) 依赖于核酸序列恒温扩增冻干反应试剂 A 的配制: 取上述步骤一制备的冻干保护剂 A10. 0ml 和依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂 A8. 75ml, 混匀, 得到 18. 75ml 的溶液。定量分装至西林瓶中, 每瓶 375 μ l (15 μ l 为一个体系, 每瓶共 25 个反应体系), 迅速进行冷冻真空干燥。

[0199] 2) 依赖于核酸序列恒温扩增冻干反应试剂 B 的配制: 取上述步骤一制备的冻干保护剂 B10. 0ml 和依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂 B15. 0ml, 混匀, 得到 25ml 的溶液。定量分装至西林瓶中, 每瓶 500 μ l (5 μ l 为一个体系, 每瓶共 100 个反应体系), 迅速进行冷冻真空干燥。

[0200] 3) 冻干: 将装有依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂 A/B 的西林瓶放入冻干机体腔内, 按照以下程序进行冻干: 预冻阶段经过 40min, 隔板温度下降到 -42℃、预冻时低温保持时间为 3h30min; 主干燥阶段, 首先用 20min 抽真空至 0. 1mbar、再用 3h 将搁板温度升至 -20℃, 然后保持 6h, 此阶段共 9h20min; 终末干燥阶段, 首先用 20min 抽真空至 0. 01mbar, 再用 2h 将搁板温度升至 20℃, 然后保持 4h, 此阶段共 6h20min。冻干全过程为 19h50min, 轧盖、出箱, 得到依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂 A/B 的冻干制品。

[0201] 四、敏感性检测

[0202] 出箱当天, 将上述步骤三获得的冻干制品溶解得到依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂 A/B, 进行敏感性试验, 并设置对照组 (未经冻干的反应液)。具体步骤如下:

[0203] (1) 分别向 1 瓶装有冻干产品 A/B 的西林瓶中加入 300/400 μ l 注射用水, 将冻干产品溶解后, 混合均匀。分装至反应管中, 反应试剂 A 每管 15 μ l, 反应试剂 B 每管 5 μ l, 4℃冰箱中保存备用。

[0204] (2) 对照组为新鲜配制的依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂 A/B, 成分和浓度与冻干试剂中的反应液相同, 仅不含有冻干保护剂各成分。反应试剂 A 每管 15 μ l, 反应试剂 B 每管 5 μ l, 4℃冰箱中保存备用。

[0205] (3) 模板 RNA 的提取: Trizol 法提取禽流感病毒 (H5 亚型禽流感病毒) (文献) 《H5 亚型禽流感病毒 HA 基因的克隆、表达及其生物学活性的初步分析》, 《农业生物技术学报》, 2005, 13(6): 739-742; 公众可从中国农业大学获得) 的 RNA, 用分光光度计测量 RNA 溶液的浓度为 $5.0 \times 10^3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 用双蒸水依次倍比稀释到 $5.0 \times 10^1 \text{pg}/\mu\text{l}$, -80℃保存备用。

[0206] (4) 依赖于核酸序列恒温扩增: 将上述装有 15 μ l 反应试剂 A 的反应管置于 65℃水浴中孵育 5min, 然后将上述 5 μ l 的反应试剂 B 迅速加入反应试剂 A 中, 小心混匀, 置于 41℃水浴中孵育 90min。

[0207] (5) 反应结束后, 加入 RNA 保护剂 RNA Maid 1. 5 μ l 和 3' 端标记 FITC 的探针 T (序列为 5' -GCAAGTTCCTAGCACTGGCAAT-3') ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μ l, 混匀, 94℃变性 3min, 55℃退火 2min, 用通用型核酸扩增物快速检测板检测产物。

[0208] (6) 根据通用型核酸扩增快速检测板 (请提供出售公司及产品目录号杭州优思达

生物技术有限公司,批号 20101026-2) 的检测结构确定阴阳性。

[0209] 可以检测为阳性的最低限度,即为敏感性。

[0210] 结果如表 7 所示:

[0211] 表 7 为依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂冻干制品和对照组的敏感性结果

[0212]

| 组别 | 敏感性 |
|-------------------------------|-------|
| 依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂冻干制品(实施例 4 制备) | 500pg |
| 对照组(未经冻干) | 500pg |

[0213] 对比试验结果说明:依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂经过冷冻干燥后,其敏感性和对照组相同,未受影响。产品经冻干后,可用于禽流感的检测。

[0214] 五、保质期试验

[0215] 将上述步骤三获得的冻干制品和对照组(未经冻干的反应试剂),置于 37℃ 进行耐老化,测定其性状和敏感性。敏感性试验如上所述进行。

[0216] 结果如表 8 所示:

[0217] 表 8 为依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂冻干制品和对照组在 37℃ 保存不同时间的性状和敏感性结果

[0218]

| 组别 | | 出箱当天 | 耐老化 1 日 | 耐老化 7 日 |
|---------------|-----|---------|---------|---------|
| 实施例 4 | 性状 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 |
| | 敏感性 | 500pg | 500pg | 500pg |
| 对照组 (未经冻干) | 性状 | 液态 | 液态 | 液态 |
| | 敏感性 | 500pg | 50ng | 500μg |

[0219] 上表说明,用冻干保护剂的依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂,置于 37℃ 耐老化 7 日,其敏感性未发生变化,即产品未受温度的影响;而对照组的未经冻干的依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂,耐老化仅 1 日,其敏感性就降低了 2 个数量级,7 日后敏感性降低了 6 个数量级,无法有效进行病原的检测。

[0220] 因此,用冻干保护剂的依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂的保存效果明显好于未经冻干的产品。将冻干技术应用在依赖于核酸序列恒温扩增反应试剂中,可有效保护诊断试剂,在长期保存、长途运输和使用过程中保持其敏感性不受影响。

[0221] 实施例 5 聚合酶链式反应(PCR) 试剂冻干制品的制备工艺

[0222] 一、冻干保护剂的配制

[0223] 称取海藻糖 5.26g、甘露醇 1.32g、牛血清白蛋白 1.32g;将以上成分按顺序加入到 50ml 事先预热至 37℃ 的注射用水中,充分溶解后混匀,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌,得到冻干保护剂,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

[0224] 二、PCR 反应试剂的配制

[0225] 1)引物混合液的配制:取等体积的上游引物(F)和下游引物(R)两种引物溶液混合,4℃冰箱中保存备用。

[0226] F(5' -ACAAAATGCATCAAGCAGCC-3')

[0227] R(5' -TGTTGTATACCGCCATCAGC-3')

[0228] 2)PCR反应试剂的配制:取2×EasyTaq PCR SuperMix试剂(包含Taq DNA聚合酶、dNTPs和反应缓冲液)13.59ml和上述引物混合液1.08ml,混合均匀,4℃冰箱中保存备用。

[0229] 三、PCR反应试剂冻干制品的制备

[0230] 1)PCR冻干反应试剂的配制:取上述步骤一制备的冻干保护剂10.33ml和PCR反应试剂14.67ml,混匀,得到25ml的溶液。定量分装至西林瓶中,每瓶575 μ l(23 μ l为一个反应体系,每瓶共25个反应体系),迅速进行冷冻真空干燥。

[0231] 2)冻干:将装有PCR冻干反应试剂的西林瓶放入冻干机体腔内,按照以下程序进行冻干:预冻阶段经过40min,隔板温度下降到-42℃、预冻时低温保持时间为3h30min;主干燥阶段,首先用20min抽真空至0.1mbar、再用3h将搁板温度升至-20℃,然后保持6h,此阶段共9h20min;终末干燥阶段,首先用20min抽真空至0.01mbar,再用2h将搁板温度升至20℃,然后保持4h,此阶段共6h20min。冻干全过程为19h50min,轧盖、出箱,得到PCR反应试剂的冻干制品。

[0232] 四、敏感性检测

[0233] 出箱当天,将上述步骤三获得的冻干制品溶解得到PCR反应试剂,进行敏感性试验,并设置对照组(未经冻干的反应试剂)。具体步骤如下:

[0234] (1)向1瓶装有冻干产品的西林瓶中加入500 μ l注射用水,将冻干产品溶解后,混合均匀。分装至反应管中,每管23 μ l,4℃冰箱中保存备用。

[0235] (2)对照组为新鲜配制的PCR反应试剂,成分和浓度与冻干试剂中的反应液相同,仅不含有冻干保护剂各成分。每管23 μ l,4℃冰箱中保存备用。

[0236] (3)模板DNA的提取:将已知浓度的牛支原体(HB-1株)菌液作倍比稀释(菌液的初始浓度为 1.0×10^9 CFU/ml,依次倍比稀释到 1.0×10^1 CFU/ml),分别用磁珠基因提取试剂盒(来自东洋纺生物科技有限公司),进行DNA的提取。

[0237] (4)PCR反应:向上述装有23 μ l PCR反应液的反应管中分别加入上述方法提取的不同浓度的DNA,每管加入2 μ l的模板,总反应体积为25 μ l;将反应管置于PCR仪内,按照下列反应条件进行:94℃预变性5min;94℃变性1min;53℃退火30sec;72℃延伸1min;退回变性阶段,共40个循环;72℃延伸10min。

[0238] (5)反应结果判定:扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳。阳性对照在757bp处出现目的条带,阴性对照无目的条带。因此,若待检样品在757bp处出现目的条带即为阳性,未出现目的条带即为阴性。

[0239] 可以检测为阳性的最低浓度,即为敏感性。

[0240] 上述步骤三获得的冻干制品的结果如图3所示,P为阳性对照,N为阴性对照,1-9分别为浓度是 10^{10} - 10^2 CFU/ml的菌液。

[0241] 而对对照组的结果与其一致,灵敏度也为 10^4 CFU/ml。

[0242] 总结如表9:

[0243] 表 9 为 PCR 冻干反应试剂和对照组的敏感性结果

[0244]

| 组别 | 敏感性 |
|----------------------|---------------|
| PCR 冻干反应试剂(实施例 5 制备) | 10^4 CFU/ml |
| 对照组(未经冻干) | 10^4 CFU/ml |

[0245] 对比试验结果说明:PCR 反应试剂经过冷冻干燥后,其敏感性和对照组相同,未受影响。产品经冻干后,可用于牛支原体的检测。

[0246] 五、保质期试验

[0247] 将上述步骤三获得的冻干制品和对照组(未经冻干的反应液),置于 37°C 进行耐老化,测定其性状和敏感性。敏感性试验如上所述进行。

[0248] 结果如表 10 所示:

[0249] 表 10 为 PCR 冻干反应试剂和对照组在 37°C 保存不同时间的性状和敏感性结果

[0250]

| 组别 | | 出箱当天 | 耐老化 1 日 | 耐老化 7 日 |
|---------------|-----|---------------|---------------|------------------|
| 实施例 5 | 性状 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 |
| | 敏感性 | 10^4 CFU/ml | 10^4 CFU/ml | 10^4 CFU/ml |
| 对照组 (未经冻干) | 性状 | 液态 | 液态 | 液态 |
| | 敏感性 | 10^4 CFU/ml | 10^5 CFU/ml | 10^{10} CFU/ml |

[0251] 上表说明,用冻干保护剂的 PCR 反应试剂,置于 37°C 耐老化 7 日,其敏感性未发生变化,即产品未受温度的影响;而对照组的未经冻干的 PCR 反应试剂,耐老化仅 1 日,其敏感性就降低了 1 个数量级,7 日后敏感性降低了 6 个数量级,无法有效进行病原的检测。

[0252] 因此,用冻干保护剂的 PCR 反应试剂的保存效果明显好于未经冻干的产品。将冻干技术应用在 PCR 反应试剂中,可有效保护诊断试剂,在长期保存、长途运输和使用过程中保持其敏感性不受影响。

[0253] 实施例 6 反转录 PCR 反应试剂冻干制品的制备工艺

[0254] 一、冻干保护剂的配制

[0255] 称取海藻糖 5.55g、甘露醇 1.39g、牛血清白蛋白 1.39g;将以上成分按顺序加入到 50ml 事先预热至 37°C 的注射用水中,充分溶解后混匀,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的滤膜过滤除菌,得到冻干保护剂,置于 4°C 冰箱中保存备用。

[0256] 二、反转录 PCR 反应试剂的配制

[0257] 1) 引物混合液的配制:取等体积的上游引物 (F) 和下游引物 (R) 两种引物溶液混合, 4°C 冰箱中保存备用。

[0258] F (5' -GAATCCAGATCTTCCAGAC-3')

[0259] R (5' -CCATACCATGGGGCAATTAG-3')

[0260] 4) 反转录 PCR 反应试剂的配制:取 $2\times$ TranTagTM HiFi SuperMix 试剂 (包含 Taq

DNA 聚合酶、高保真 Pfu DNA 聚合酶、dNTPs 和反应缓冲液) 13.59ml、EasyScript™ One-Step RT/RI Enzyme Mix 试剂(包含 AMV 反转录酶、dNTPs 和反应缓冲液) 0.54ml 和上述引物混合液 1.09ml, 混合均匀, 4℃冰箱中保存备用。

[0261] 三、反转录 PCR 反应试剂冻干制品的制备

[0262] 1) 反转录 PCR 冻干反应试剂的配制: 取上述步骤一制备的冻干保护剂 9.8ml 和反转录 PCR 反应试剂 15.2ml, 混匀, 得到 25ml 的溶液。定量分装至西林瓶中, 每瓶 575 μl (23 μl 为一个反应体系, 每瓶共 25 个反应体系), 迅速进行冷冻真空干燥。

[0263] 2) 冻干: 将装有反转录 PCR 冻干反应试剂的西林瓶放入冻干机体腔内, 按照以下程序进行冻干: 预冻阶段经过 40min, 隔板温度下降到 -42℃、预冻时低温保持时间为 3h30min; 主干燥阶段, 首先用 20min 抽真空至 0.1mbar、再用 3h 将搁板温度升至 -20℃, 然后保持 6h, 此阶段共 9h20min; 终末干燥阶段, 首先用 20min 抽真空至 0.01mbar, 再用 2h 将搁板温度升至 20℃, 然后保持 4h, 此阶段共 6h20min。冻干全过程为 19h50min, 轧盖、出箱, 得到反转录 PCR 反应试剂的冻干制品。

[0264] 四、敏感性检测

[0265] 出箱当天, 将上述步骤三获得的冻干制品溶解得到反转录 PCR 反应试剂, 进行敏感性试验, 并设置对照组(未经冻干的反应试剂)。具体步骤如下:

[0266] (1) 向 1 瓶装有冻干产品的西林瓶中加入 500 μl 注射用水, 将冻干产品溶解后, 混合均匀。分装至反应管中, 每管 23 μl, 4℃冰箱中保存备用。

[0267] (2) 对照组为新鲜配制的反转录 PCR 反应试剂, 成分和浓度与冻干试剂中的反应液相同, 仅不含有冻干保护剂各成分。每管 23 μl, 4℃冰箱中保存备用。

[0268] (3) 模板 RNA 的制备: 构建禽流感病毒 (H9 亚型) 的阳性质粒(与上述制备方法相同) 拷贝数为 1×10^{11} copies/μl, 用双蒸水依次倍比稀释到 1×10^1 copies/μl, -80℃保存。

[0269] (4) 反转录 PCR: 向上述装有 23 μl 反转录 PCR 反应试剂的反应管中分别加入上述方法制备的不同浓度的质粒, 每管加入 2 μl 的模板, 总反应体积为 25 μl; 将反应管置于 PCR 仪内, 按照下列反应条件进行: 94℃预变性 5min; 94℃变性 30sec; 48℃退火 30sec; 72℃延伸 45sec; 退回变性阶段, 共 35 个循环; 72℃延伸 10min。

[0270] (5) 反应结果判定: 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。阳性对照在 403bp 处出现目的条带, 阴性对照无目的条带。因此, 若待检样品在 403bp 处出现目的条带即为阳性, 未出现目的条带即为阴性。

[0271] 可以检测为阳性的最低浓度, 即为敏感性。

[0272] 上述步骤三获得的冻干制品的结果如图 4 所示, P 为阳性对照, N 为阴性对照, 1-9 分别为浓度是 1×10^{11} - 1×10^3 copies/μl 的质粒拷贝数。

[0273] 而对对照组的结果与其一致, 灵敏度也为 10^4 copies/μl。

[0274] 总结如表 11:

[0275] 表 11 为反转录 PCR 冻干反应试剂和对照组的敏感性结果

[0276]

| | |
|--------------------------|------------------------|
| 组别 | 敏感性 |
| 反转录 PCR 冻干反应试剂(实施例 6 制备) | 10^4 copies/ μ l |
| 对照组(未经冻干) | 10^4 copies/ μ l |

[0277] 对比试验结果说明:反转录 PCR 反应试剂经过冷冻干燥后,其敏感性和对照组相同,未受影响。产品经冻干后,可用于禽流感病毒的检测。

[0278] 五、保质期试验

[0279] 将上述步骤三获得的冻干制品和对照组(未经冻干的反应试剂),置于 37℃ 进行耐老化,测定其性状和敏感性。敏感性试验如上所述进行。

[0280] 结果如表 12 所示:

[0281] 表 12 为反转录 PCR 冻干反应试剂和对照组在 37℃ 保存不同时间的性状和敏感性结果

[0282]

| 组别 | | 出箱当天 | 耐老化 1 日 | 耐老化 7 日 |
|---------------|-----|------------------------|------------------------|---------------------------|
| 实施例 6 | 性状 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 |
| | 敏感性 | 10^4 copies/ μ l | 10^4 copies/ μ l | 10^4 copies/ μ l |
| 对照组 (未经冻干) | 性状 | 液态 | 液态 | 液态 |
| | 敏感性 | 10^4 copies/ μ l | 10^6 copies/ μ l | 10^{10} copies/ μ l |

[0283] 上表说明,用冻干保护剂的反转录 PCR 反应试剂,置于 37℃ 耐老化 7 日,其敏感性未发生变化,即产品未受温度的影响;而对照组的未经冻干的反转录 PCR 反应试剂,耐老化仅 1 日,其敏感性就降低了 2 个数量级,7 日后完全失活,敏感性降低了 6 个数量级,无法有效进行病原的检测。

[0284] 因此,用冻干保护剂的反转录 PCR 反应试剂的保存效果明显好于未经冻干的产品。将冻干技术应用在反转录 PCR 反应试剂中,可有效保护诊断试剂,在长期保存、长途运输和使用过程中保持其敏感性不受影响。

[0285] 实施例 7 实时荧光定量 PCR 反应试剂冻干制品的制备工艺

[0286] 一、冻干保护剂的配制

[0287] 称取海藻糖 5.26g、甘露醇 1.32g、牛血清白蛋白 1.32g;将以上成分按顺序加入到 50ml 事先预热至 37℃ 的注射用水中,充分溶解后混匀,用 0.22 μ m 的滤膜过滤除菌,得到冻干保护剂,置于 4℃ 冰箱中保存备用。

[0288] 二、实时荧光定量 PCR 反应试剂的配制

[0289] 1) 引物混合液的配制:取等体积的上游引物(F)和下游引物(R)两种引物溶液混合,4℃ 冰箱中保存备用。

[0290] F(5' -ACAAAATGCATCAAGCAGCC-3')

[0291] R(5' -TGTTGTATACCGCCATCAGC-3')

[0292] 2) 实时荧光定量 PCR 反应试剂的配制:取 2×SYBR Premix Ex Taq 试剂(包含

ExTaq DNA 聚合酶、dNTPs、 Mg^{2+} 和 SYBR Green I) 13.59ml、和上述引物混合液 1.09ml, 混合均匀, 4℃冰箱中保存备用。

[0293] 三、实时荧光定量 PCR 反应试剂冻干制品的制备

[0294] 1) 实时荧光定量 PCR 冻干反应试剂的配制: 取上述步骤一制备的冻干保护剂 10.33ml 和实时荧光定量 PCR 反应试剂 14.67ml, 混匀, 得到 25ml 的溶液。定量分装至西林瓶中, 每瓶 575 μ l (23 μ l 为一个反应体系, 每瓶共 25 个反应体系), 迅速进行冷冻真空干燥。

[0295] 2) 冻干: 将装有实时荧光定量 PCR 冻干反应试剂的西林瓶放入冻干机体腔内, 按照以下程序进行冻干: 预冻阶段经过 40min, 隔板温度下降到 -42℃、预冻时低温保持时间为 3h30min; 主干燥阶段, 首先用 20min 抽真空至 0.1mbar、再用 3h 将搁板温度升至 -20℃, 然后保持 6h, 此阶段共 9h20min; 终末干燥阶段, 首先用 20min 抽真空至 0.01mbar, 再用 2h 将搁板温度升至 20℃, 然后保持 4h, 此阶段共 6h20min。冻干全过程为 19h50min, 轧盖、出箱, 得到实时荧光定量 PCR 反应试剂的冻干制品。

[0296] 四、敏感性检测

[0297] 出箱当天, 将上述步骤三获得的冻干制品溶解得到实时荧光定量 PCR 反应试剂, 进行敏感性试验, 并设置对照组(未经冻干的反应液)。具体步骤如下:

[0298] (1) 向 1 瓶装有冻干产品的西林瓶中加入 475 μ l 注射用水, 将冻干产品溶解后, 混合均匀。分装至反应管中, 每管 23 μ l, 4℃冰箱中保存备用。

[0299] (2) 对照组为新鲜配制的实时荧光定量 PCR 反应试剂, 成分和浓度与冻干试剂中的反应液相同, 仅不含有冻干保护剂各成分。每管 23 μ l, 4℃冰箱中保存备用。

[0300] (3) 模板 DNA 的提取: 将已知浓度的牛支原体(HB-1 株) 菌液作倍比稀释, 菌液的初始浓度为 2.0×10^9 CFU/ml, 用双蒸水依次倍比稀释到 2.0×10^1 CFU/ml 分别用磁珠基因提取试剂盒(来自东洋纺生物科技有限公司), 进行 DNA 的提取。

[0301] (4) 实时荧光定量 PCR: 向上述装有 23 μ l 实时荧光定量 PCR 反应试剂的反应管中分别加入上述方法提取的不同浓度的 DNA, 每管加入 2 μ l 的模板, 总反应体积为 25 μ l; 将反应管置于 CFX96Real-Time PCR 仪中, 按照下列程序进行反应: 94℃预变性 3min; 94℃变性 30sec; 53℃退火 30sec; 72℃延伸 40sec; 在 72℃采集荧光, 退回变性阶段, 共 50 个循环。

[0302] (5) 反应结果判定: 通过观察实时荧光定量 PCR 扩增曲线进行结果判定。待测样品的循环阈值(Ct 值) 在 40 个循环以前的判定为阳性, 而待测样品的循环阈值(Ct 值) 在 40 个循环以后判定为阴性。

[0303] 可以检测为阳性的最低浓度, 即为敏感性。

[0304] 结果如表 13 所示

[0305] 表 13 为实时荧光定量 PCR 冻干反应试剂和对照组的敏感性结果

[0306]

| 组别 | 敏感性 |
|-----------------------------|------------------------|
| 实时荧光定量 PCR 冻干反应试剂(实施例 7 制备) | 2×10^3 CFU/ml |
| 对照组(未经冻干) | 2×10^3 CFU/ml |

[0307] 对比试验结果说明：实时荧光定量 PCR 反应试剂经过冷冻干燥后，其敏感性和对照组相同，未受影响。产品经冻干后，可用于牛支原体的检测。

[0308] 五、保质期试验

[0309] 将上述步骤三获得的冻干制品和对照组（未经冻干的反应试剂），置于 37℃ 进行耐老化，测定其性状和敏感性。敏感性试验如上所述进行。

[0310] 结果如表 14 所示，

[0311] 表 14 为实时荧光定量 PCR 冻干反应试剂和对照组在 37℃ 保存不同时间的性状和敏感性结果

[0312]

| 组别 | | 出箱当天 | 耐老化 1 日 | 耐老化 7 日 |
|---------------|-----|------------------------|------------------------|------------------------|
| 实施例 7 | 性状 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 | 海绵状疏松团块 |
| | 敏感性 | 2×10^3 CFU/ml | 2×10^3 CFU/ml | 2×10^3 CFU/ml |
| 对照组 (未经冻干) | 性状 | 液态 | 液态 | 液态 |
| | 敏感性 | 2×10^3 CFU/ml | 2×10^4 CFU/ml | 2×10^9 CFU/ml |

[0313] 上表说明，用冻干保护剂的实时荧光定量 PCR 反应试剂，置于 37℃ 耐老化 7 日，其敏感性未发生变化，即产品未受温度的影响；而对照组的未经冻干的实时荧光定量 PCR 反应试剂，耐老化仅 1 日，其敏感性就降低了 1 个数量级，7 日后敏感性降低了 6 个数量级，无法有效进行病原的检测。

[0314] 因此，用冻干保护剂的实时荧光定量 PCR 反应试剂的保存效果明显好于未经冻干的产品。将冻干技术应用在实时荧光定量 PCR 反应试剂中，可有效保护诊断试剂，在长期保存、长途运输和使用过程中保持其敏感性不受影响。

[0315] 若扩增反应试剂中不含有吐温和 Tris-HCl，则采用如下冻干保护剂：冻干保护剂由海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白、吐温、Tris-HCl 和水组成，海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白、吐温、Tris-HCl 的配比为 4.0—25g:1—7g:1.0—7g:0.1—0.25ml: 2.5×10^{-3} — 5.0×10^{-3} mol；或海藻糖、甘露醇、牛血清白蛋白、吐温、Tris-HCl 的配比也可以为 4.0—25g:1.32—6.25g:1.32—6.25g:0.1—0.25ml: 2.5×10^{-3} — 5.0×10^{-3} mol，其中 Tris-HCl 可以用浓度为 1M pH 值 8.8 的 Tris-HCl 缓冲液。

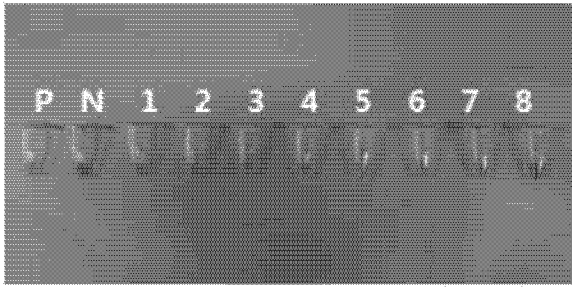


图 1

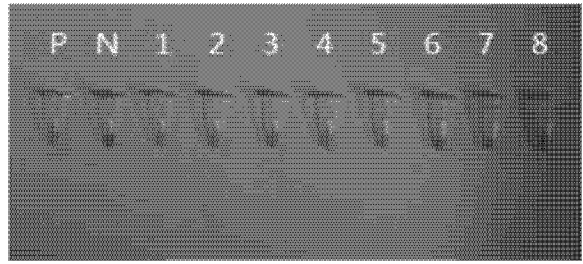


图 2



图 3



图 4