



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112626175 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(21) 申请号 202011567881.7

(22) 申请日 2020.12.26

(71) 申请人 杭州百迈生物股份有限公司
地址 311228 浙江省杭州市大江东产业聚集区临江高新区纬五路3688号

(72) 发明人 丁佳女 郑宜文 余霞 陈亮

(51) Int. Cl.
C12Q 1/6806 (2018.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种SNP检测试剂的冻干保护剂及应用

(57) 摘要

本发明涉及一种SNP检测试剂的冻干保护剂及保护方法。所述冻干保护剂包括海藻糖,葡聚糖和明胶。本发明所述保护剂实现了SNP检测试剂的常温运输和常温保存的目的,大幅度降低运输成本。操作简单,避免了试剂的反复冻融以及液体SNP检测试剂反复使用中带来的污染。

1. 一种SNP检测试剂的冻干保护剂,其特征在于,包括糖类和/或多元醇,以及高分子化合物。

2. 根据权利要求1所述的冻干保护剂,其特征在于,所述糖类和/或多元醇选自以下的一种或多种:海藻糖、葡聚糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、果糖、棉子糖、山梨醇、甘露醇、环糊精。

3. 根据权利要求1所述的冻干保护剂,其特征在于,所述高分子化合物选自以下的一种或多种:明胶,聚乙烯吡咯烷酮、牛血清蛋白、人血清白蛋白、胎牛血清、聚乳酸-羟基乙酸共聚物。

4. 根据权利要求1至3之一所述的冻干保护剂,其特征在于,包括海藻糖,葡聚糖和明胶。

5. 根据权利要求4所述的冻干保护剂,其特征在于,包括2-12% (w/v) 海藻糖,2-10% (w/v) 葡聚糖和0.2-5% (w/v) 明胶。

6. 一种保护冻干的SNP检测试剂的保护方法,包括以下步骤:

(1) 提供一种权利要求1至5之一所述的冻干保护剂;

(2) 将所述冻干保护剂与引物,野生型探针,突变型探针,缓冲液,dNTP,DNA聚合酶配制成液态SNP检测试剂;

(3) 将步骤2中所述液态SNP检测试剂分装至保存管中,放入冷冻干燥机中进行冷冻干燥。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述冷冻干燥步骤包括:

(1) 预冻:-50℃,保持3-6小时

(2) 一次升华:-30℃~-45℃,保持10~20小时;-15℃~-25℃,保持2-5小时;0℃~-5℃,保持2-5小时

(3) 二次升华:20℃~25℃,保持5-10小时。

一种SNP检测试剂的冻干保护剂及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种SNP检测试剂的冻干保护剂及应用。

背景技术

[0002] SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) 全称单核苷酸多态性,是指在基因组上单个核苷酸的变异。SNP是人类可遗传的变异中最常见的一种。占有已知多态性的90%以上。SNP在人类基因组中广泛存在,平均每500~1000个碱基对中就有1个,估计其总数可达300万个甚至更多。作为第三代遗传标志,人体许多表型差异、对药物或疾病的易感性等等都可能与SNP有关。因此,对SNP的检测具有重要的生物学及医学意义。

[0003] 目前,SNP检测试剂大多数为液体,其组分DNA聚合酶,dNTP,引物,探针等需要低温保存,并且这些组分反复冻融后,生物活性会大幅度降低。此外,SNP检测试剂在运输中需要冷链运输,运输成本较高。

[0004] 真空冷冻干燥简称冻干,是将含水物质降温冻结成固体,然后在真空条件下,使水直接从固体中升华出来,以除去水分而保存物料的方法。采用真空冷冻干燥的方式保存SNP检测试剂可以克服低温保存方式的不足。但是SNP检测试剂中的DNA聚合酶在真空冷冻干燥过程中会因为低温效应、冻结效应、脱水效应等导致其活性下降甚至丧失。

[0005] 因此,急需一种能够解决现有问题的SNP检测试剂的冻干保护剂。

发明内容

[0006] 为克服现有技术的不足,本发明的目的在于提供了一种SNP检测试剂的冻干保护剂。

[0007] 本发明所述的一种SNP检测试剂的冻干保护剂,包括:2-12% (w/v) 海藻糖,2-10% (w/v) 葡聚糖和0.2-5% (w/v) 明胶。

[0008] 所述海藻糖和葡聚糖可以用糖类/多元醇中的一种或多种代替:蔗糖、乳糖、半乳糖、果糖、棉子糖、山梨醇、甘露醇、环糊精等。

[0009] 所述明胶可以用高分子化合物的一种或多种代替:PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、BSA(牛血清蛋白)、HSA(人血清白蛋白)、FBS(胎牛血清)、PLGA(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)等。

[0010] 本发明的另一个目的提供SNP检测试剂的冻干保护剂的应用,具体步骤如下:

[0011] 1、将含有2-12% (w/v) 海藻糖,2-10% (w/v) 葡聚糖和0.2-5% (w/v) 明胶的冻干保护剂与引物,野生型探针,突变型探针,缓冲液,dNTP,DNA聚合酶配制成液态SNP检测试剂;

[0012] 2、所述液态SNP检测试剂分装至PCR八联管中,放入冷冻干燥机中进行冷冻干燥;

[0013] 3、所述冷冻干燥包括以下阶段:

阶段	温度	保持时间
预冻	-50℃	3-6 小时
[0014] 一次升华	-30℃~-45℃	10~20 小时
	-15℃~-25℃	2-5 小时
	0℃~-5℃	2-5 小时
二次升华	20℃~25℃	5-10 小时

[0015] 4、冻干程序结束后,考察制品外观和性能。

[0016] 本发明的有益效果是:

[0017] 本发明提供了一种SNP检测试剂的冻干保护剂,液体SNP检测试剂与冻干保护剂混合经过冷冻干燥变成了冻干型SNP分型检测试剂,以冻干粉的形式能更稳定的保存,达到目前SNP检测试剂无法达到的常温运输和常温保存的目的,大幅度降低运输成本。

[0018] 本发明提供了一种SNP检测试剂的冻干保护剂,应用于SNP检测试剂中,使用时仅需加入去离子水和待测样本,操作简单,避免了试剂的反复冻融以及液体SNP检测试剂反复使用中带来的污染。

附图说明

[0019] 图1:冻干型CYP3A5分型检测试剂(不加保护剂)。

[0020] 图2:冻干型CYP3A5分型检测试剂(9组保护剂:A-I)。

[0021] 图3:冻干型CYP3A5分型检测试剂(不加保护剂),37℃加速7天外观

[0022] 图4:冻干型CYP3A5分型检测试剂(3组保护剂:A-C),37℃加速7天外观。

具体实施方式

[0023] 为了使本发明的技术方法、优势及目的更加清晰易懂,下面结合具体实施例及相关附图,对本发明进行详细的说明。此处描述的实施例仅用于解释本发明,并不用于限制本发明。

[0024] 以下结合具体实施例进一步说明,但本发明并不仅限于这些实施例。

[0025] 下面提供本发明的SNP检测试剂的冻干保护剂的配方,具体见下表1所示:

[0026] 表1

[0027]

分组	冻干保护剂配方
A	3%海藻糖+4%葡聚糖+5%明胶
B	5%海藻糖+8%葡聚糖+1%明胶
C	12%海藻糖+2%葡聚糖+0.2%明
D	3%蔗糖+7%葡聚糖+0.5%PEG
E	5%蔗糖+5%葡聚糖+0.7%PEG
F	7%蔗糖+3%葡聚糖+1%PEG
G	3%海藻糖+5%明胶+0.5%PVP

H	5%乳糖+3%明胶+0.8%PVP
I	7%乳糖+2%明胶+1%PVP

[0028] 实施例1

[0029] 1、配制CYP3A5基因分型检测试剂,组成如表2;

[0030] 表2

组分	浓度
缓冲液 (PH8.0-9.0)	20mM
dNTP	0.2-0.4mM
MgCl ₂	0-3 mM
CYP3A5 上游引物	0.2-0.8 μ M
CYP3A5 下游引物	0.2-0.8 μ M
CYP3A5 野生型探针	0.2-0.8 μ M
CYP3A5 突变型探针	0.2-0.8 μ M
Taq 酶	1-2.5U

[0033] 2、将表1中9组保护剂(A-I)分别与CYP3A5基因分型检测试剂制备成预混液,以不加保护剂的CYP3A5基因分型检测试剂作为对照;

[0034] 3、其中CYP3A5上游引物序列为CGTATGTACCACCCAGCTTA,CYP3A5下游引物序列为GGTGTGACACACAGCAAGAG,CYP3A5野生型探针为TCTTTCAGTATCTCTTC,CYP3A5突变型探针序列为TCTTTCAATATCTCTT;

[0035] 4、将上述冻干预混液充分混匀并离心;

[0036] 5、上述冻干预混液分装至PCR管中,分装体积为19 μ L,放入冷冻干燥机(型号:LGJ-15E)中;

[0037] 6、设定冻干程序:隔板温度下降到-50 $^{\circ}$ C,预冻4h;第一次干燥阶段,隔板温度上升到-40 $^{\circ}$ C,低温保持16h;隔板温度上升到-20 $^{\circ}$ C,低温保持2h;隔板温度上升到0 $^{\circ}$ C,低温保持2h;第二次干燥阶段,隔板温度上升到25 $^{\circ}$ C,低温保持6h。

[0038] 7、冻干程序结束后压盖、出箱、得到SNP检测试剂冻干制品。

[0039] 8、上述冻干制品进行形态观察和复水时间观察,结果如表3所示;

[0040] 表3

分组	外观	复水时间
[0041] CYP3A5 基因分型检测试剂, 无保护剂	没有形成可见的团块 (见图 1)	3s
CYP3A5 基因分型检测试剂 +A 组保护剂	海绵状疏松团块 (见 图 2-A)	3s
CYP3A5 基因分型检测试剂	海绵状疏松团块 (见	3s
+B 组保护剂	图 2-B)	
CYP3A5 基因分型检测试剂 +C 组保护剂	海绵状疏松团块 (见 图 2-C)	3s
CYP3A5 基因分型检测试剂 +D 组保护剂	海绵状疏松团块 (见 图 2-D)	3s
CYP3A5 基因分型检测试剂 +E 组保护剂	海绵状疏松团块 (见 图 2-E)	3s
[0042] CYP3A5 基因分型检测试剂 +F 组保护剂	海绵状疏松团块 (见 图 2-F)	3s
CYP3A5 基因分型检测试剂 +G 组保护剂	海绵状疏松团块 (见 图 2-G)	3s
CYP3A5 基因分型检测试剂 +H 组保护剂	海绵状疏松团块 (见 图 2-H)	3s
CYP3A5 基因分型检测试剂+I 组保护剂	海绵状疏松团块 (见 图 2-I)	3s

[0043] 9、上述冻干制品复水后,进行CYP3A5基因分型检测,样本选择野生型样本(G/G),突变型样本(A/A),杂合型样本(G/A),扩增程序如表4;

[0044] 表4

步骤	温度	时间	备注
1	95°C	5min	预变性
2	95°C	15s	40 个循环, 设置 FAM 及 VIC 荧光采集信号, 其中*为信号采集点
3	60°C	34s*	

[0046] 10、CYP3A5基因分型判断标准, 如表5;

[0047] 表5

结果情况	Ct (FAM)	Ct (VIC)	CYP3A5基因型
1	≤35	>35或“Undetermined”	野生型 (G/G)
2	>35或“Undetermined”	≤35	突变型 (A/A)
3	≤35	≤35	杂合型 (G/A)

[0049] 11、扩增结束后, 根据扩增曲线, 选择合适荧光阈值 (一般将阈值线划定在扩增曲线对数形式下指数增长期的中间), 并将基线调整为3-15个循环, 得到不同通道的Ct值。CYP3A5基因分型结果, 如表6所示;

[0050] 表6

实验分组	野生型样本 (G/G)			杂合型样本 (G/A)			突变型样本 (A/A)		
	Ct(FAM)	Ct(VIC)	检测结果	Ct(FAM)	Ct(VIC)	检测结果	Ct(FAM)	Ct(VIC)	检测结果
CYP3A5 分型检测试剂 (液体, 不冻干)	25.43	Undet.	G/G	25.43	25.67	G/A	Undet.	27.39	A/A
CYP3A5 分型检测试剂 (无保护剂, 冻干)	34.65	Undet.	G/G	35.44	35.69	阴性	Undet.	36.22	阴性
CYP3A5 分型检测试剂+A 组保护剂 (冻干)	26.53	Undet.	G/G	26.39	26.47	G/A	Undet.	27.91	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+B 组保护剂 (冻干)	25.36	Undet.	G/G	25.54	26.88	G/A	Undet.	28.44	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+C 组保护剂 (冻干)	26.44	Undet.	G/G	25.74	25.44	G/A	Undet.	27.22	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+D 组保护剂 (冻干)	27.12	Undet.	G/G	26.38	27.14	G/A	Undet.	28.21	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+E 组保护剂 (冻干)	27.44	Undet.	G/G	26.88	26.94	G/A	Undet.	29.41	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+F 组保护剂 (冻干)	26.75	Undet.	G/G	27.51	27.93	G/A	Undet.	27.35	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+G 组保护剂 (冻干)	27.53	Undet.	G/G	26.58	26.72	G/A	Undet.	28.41	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+H 组保护剂 (冻干)	26.31	Undet.	G/G	26.21	26.87	G/A	Undet.	28.51	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+I 组保护剂 (冻干)	27.42	Undet.	G/G	27.49	28.46	G/A	Undet.	27.35	A/A

[0052] 12、综上所述, 不加保护剂的CYP3A5分型检测试剂在冻干后, 外观很差, 3种基因型样本的Ct值普遍增大, 杂合型样本和突变型样本不能正确分型, 说明不加保护剂的CYP3A5分型检测试剂冻干后试剂性能下降甚至丧失。

[0053] 实施例2

[0054] 1、选择A保护剂, B保护剂, C保护剂制备的冻干型CYP3A5分型检测试剂进行热稳定性实验, 对试剂的稳定性进行初步评价, 同时设置2组对照组, 其中一组对照组为液体的CYP3A5基因分型检测试剂 (未加保护剂), 另一组对照组为冻干型CYP3A5基因分型检测试剂 (未加保护剂), 放在生化培养箱中37°C处理7天;

[0055] 2、加速结束后进行外观考察 (见图3和图4), 测试样本选择野生型样本 (G/G), 杂合

型样本 (G/A), 突变型样本 (A/A), 扩增程序同表4;

[0056] 3、扩增结束后, 根据扩增曲线, 选择合适荧光阈值 (一般将阈值线划定在扩增曲线对数形式下指数增长期的中间), 并将基线调整为3-15个循环, 得到不同通道的Ct值;

[0057] 4、CYP3A5基因分型判断标准同表5, CYP3A5基因分型试验结果, 如表7所示;

[0058] 表7

实验分组	野生型样本 (G/G)			杂合型样本 (G/A)			突变型样本 (A/A)		
	Ct(FAM)	Ct(VIC)	检测结果	Ct(FAM)	Ct(VIC)	检测结果	Ct(FAM)	Ct(VIC)	检测结果
[0059] CYP3A5 分型检测试剂+A 组保护剂 (冻干)	26.94	Undet.	G/G	27.44	26.47	G/A	Undet.	28.41	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+B 组保护剂 (冻干)	25.76	Undet.	G/G	26.91	27.33	G/A	Undet.	28.53	A/A
CYP3A5 分型检测试剂+C 组保护剂 (冻干)	27.38	Undet.	G/G	27.64	28.95	G/A	Undet.	29.42	A/A
CYP3A5 分型检测试剂 (无保护剂, 冻干)	Undet.	Undet.	阴性	Undet.	Undet.	阴性	Undet.	Undet.	阴性
CYP3A5 分型检测试剂 (液体, 不冻干)	26.87	Undet.	G/G	28.63	28.74	G/A	Undet.	28.63	A/A

[0060] 5、综上所述, 加入A组保护剂, B组保护剂, C组保护剂的冻干型CYP3A5分型检测试剂在37℃加速7天后, 试剂性能与对照试剂 (液体, 不冻干) 差异不明显, 不加保护剂的冻干型CYP3A5分型检测试剂不能正确分型, 说明冻干后的CYP3A5分型检测试剂稳定性较好。

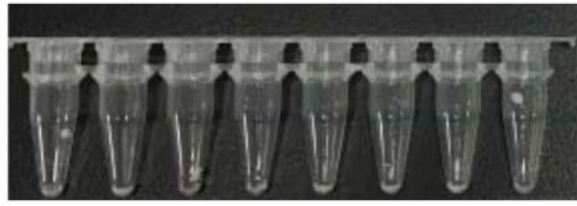


图1

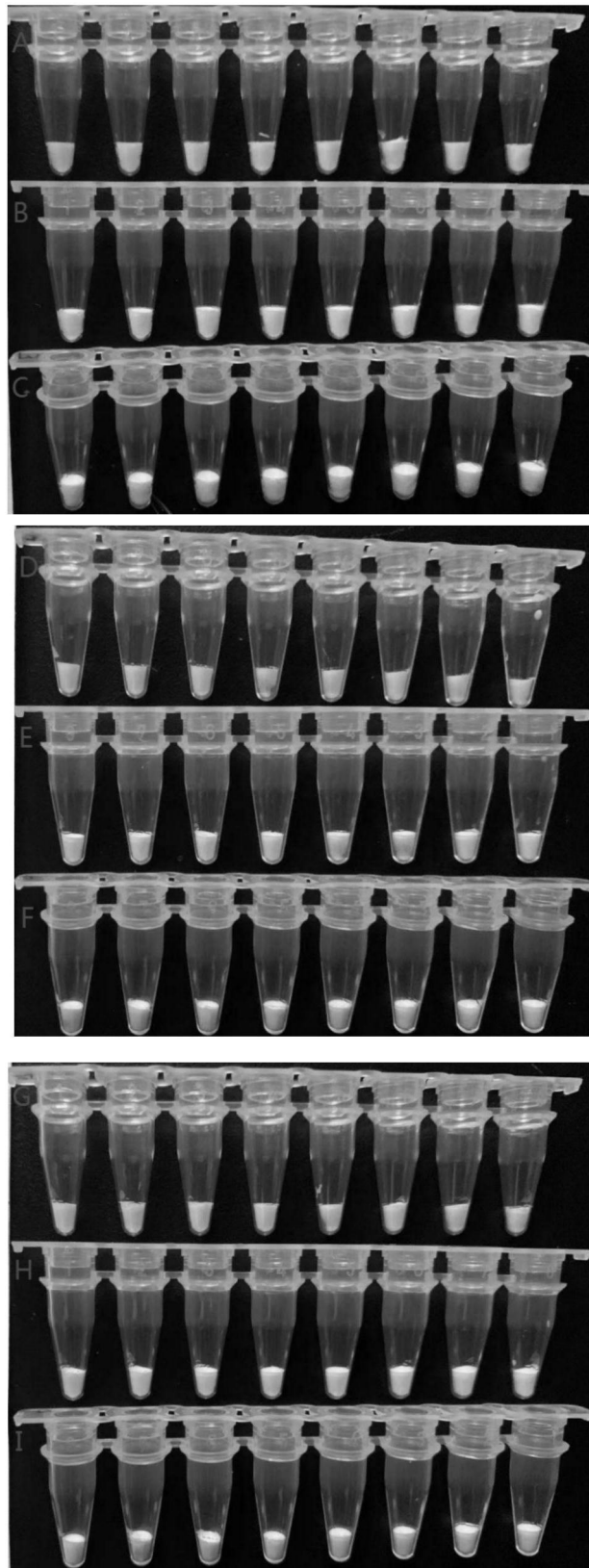


图2

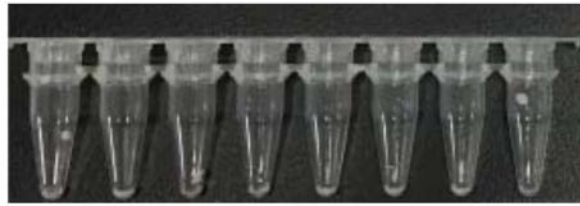


图3

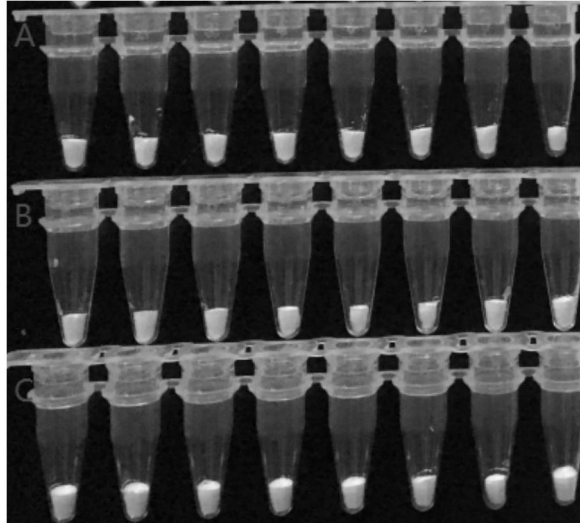


图4