

提取血浆中游离 DNA 的试剂组合、试剂盒和方法

相关申请交叉引用

本申请要求于 2023 年 11 月 28 日提交的中国专利申请第 202311611763.5 号的优先权，所述中国专利申请的全部内容通过引用明确并入本文。

技术领域

本发明涉及液体活检领域，特别是涉及提取血浆中游离 DNA 的试剂组合、包含该试剂组合的试剂盒以及利用该试剂组合或试剂盒提取血浆中游离 DNA 的方法。

10

背景技术

液体活检，是指从体液中获得来源于组织的生物标志物，并通过对所得的生物标志物进行分析得到其来源组织的相关信息的非侵入性检测手段，已被用于产前诊断和癌症等疾病的诊断、筛查、监控等。液体活检领域目前最常用到的生物标志物是血浆中游离于细胞外的遗传物质脱氧核糖核酸，简称游离 DNA(cell-free DNA, cfDNA)，其中可能含有来源于胚胎或癌症组织的遗传信息。

血浆中游离 DNA 的含量通常极低（健康人血浆平均游离 DNA 浓度约 4ng/mL）且通常为小片段（富集于 170bp），因此，为从有限的样本体积中获得足够的游离 DNA 用于下游检测，需要核酸提取方法有尽可能高的 DNA 提取得率。同时，为了提高下游检测的灵敏度，也需要核酸提取方法提取的 DNA 产物有尽可能高的纯度。此外，为了更便于大规模的临床检测应用，易于实现高通量自动化操作的提取方法也是本领域技术人员所期望的。

目前核酸提取方法主要分为有机溶剂抽提法、离心柱法和磁珠法。有机溶剂抽提方法利用苯酚、氯仿等有机溶剂对蛋白质等杂质进行变性和去除，再利用醇类对核酸进行沉淀分离。但此类方法需要用到具有高毒性、致癌性的挥发有机溶剂，且操作步骤繁琐、对操作者技术要求高，故难于实现自动化操作，不适用于大规模临床检测。离心柱法利用在特定水溶液条件下核酸对固相材料（如硅胶膜等）的吸附和在另一种特定水溶液条件下核酸与固相分离的原理实现样本中核酸的分离提纯。但此类方法的成本高，依赖特定的抽滤装置和高速离心装置，难于实现自动化操作，不适用于大规模临床检测。磁珠法核酸提取技术是离心柱法的变体，其采用超顺磁性纳米颗粒（磁珠）作为固相材料，利用在特定溶液条件下核酸对磁珠的吸附以及外加磁场将吸附有核酸的磁珠从溶液中分离的原理对样本中的核酸进行分离提纯。此类方法只需磁场的作用即可快速实现核酸从液相到固相的分离，易于实现高通量自动化操作，可用于大规模临床检测。但是，传统磁珠法的核酸提取得率不如离心柱法。并且，传统磁珠法

30

在提取核酸过程中通常需要偏离中性的 pH 值环境（例如，样本裂解和 DNA 结合阶段），而偏离中性的 pH 值环境不利于 DNA 的稳定，这导致 DNA 产物质量较差，DNA 产物纯度不高，不利于开展下游检测。而且，由于血浆中游离 DNA 含量较低，磁珠法通常无法提取血浆中游离 DNA。

5 因此，为了在大规模的临床检测中提取血浆中游离 DNA 时能够应用于易于实现高通量自动化操作的磁珠法，本领域技术人员一直寻求解决如何改善磁珠法的 DNA 得率和 DNA 产物纯度。

发明内容

10 本发明提供一种提取血浆中游离 DNA 的试剂组合、包含该试剂组合的试剂盒以及利用该试剂组合或试剂盒提取血浆中游离 DNA 的方法，该试剂组合、试剂盒和方法适用于大规模的临床检测，且有着较高的 DNA 得率和 DNA 产物纯度。

 在一个方面，本发明提供一种提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其包含结合液和第一洗涤液，所述结合液包含第一离液剂和第一醇，所述第一洗涤液包含第二离液剂和第二醇。在一种实施方式中，所述第一离液剂、第二离液剂为相同的离液剂。

15 在一种实施方式中，所述第一离液剂、第二离液剂为不相同的离液剂。

 在一种实施方式中，所述第一醇、第二醇为相同的醇。

 在一种实施方式中，所述第一醇、第二醇为不相同的醇。

 在一种实施方式中，所述试剂组合包含能够结合 DNA 的磁珠，其通过其表面的官能团与 DNA 结合，所述官能团可以为，例如，羧基、羟基或其组合。在一种优选的

20 实施方式，所述能够结合 DNA 的磁珠为表面修饰硅羟基的纳米磁珠。

 在一种实施方式中，对于 1mL 血浆样本，需要约 15 μ L-30 μ L 磁珠(25mg/mL)。

 在一种实施方式中，所述结合液含有表面活性剂。

25 在一种实施方式中，所述结合液含有缓冲液。在一种优选的实施方式中，缓冲液包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

 在一种实施方式中，所述结合液包含 EDTA 溶液。

 在一种实施方式中，所述第一洗涤液含有表面活性剂。

 在一种实施方式中，所述第一洗涤液含有缓冲液。在一种优选的实施方式中，缓冲液包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

30 在一种实施方式中，所述第一洗涤液包含 EDTA 溶液。

 在一种实施方式中，所述试剂组合包含裂解液组合。

 裂解液组合可以为能够使得 DNA 与其他杂质分离的任意试剂组合。

 在一种实施方式中，所述裂解液组合包含消化酶溶液。在一种优选的实施方式中，所述裂解液组合包含蛋白酶溶液。在一种优选的实施方式中，所述裂解液组合包含丝

氨酸蛋白酶溶液。在一种优选的实施方式中，所述消化酶溶液包括蛋白酶 K 溶液。

在一种实施方式中，所述裂解液组合包含消化液。

消化液可以为能够使得 DNA 与其他杂质分离的任意试剂、能够防止 DNA 降解的任意试剂或其组合。

5 在一种实施方式中，所述消化液包含蛋白质变性剂。

在一种实施方式中，所述消化液包含表面活性剂。

在一种实施方式中，所述消化液包含 EDTA 溶液。

在一种实施方式中，所述消化液包含缓冲液。在一种优选的实施方式中，缓冲液包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

10 在一种实施方式中，所述消化液、结合液、第一洗涤液包含的表面活性剂可以不同，也可以相同。

在一种实施方式中，所述消化液、结合液、第一洗涤液、第二洗涤液、洗脱液包含的缓冲液可以不同，也可以相同。

在一种实施方式中，消化酶溶液的体积与血浆样本的体积比率为 0.01-0.08，例如，
15 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，消化液的体积与血浆样本的体积比率为 0.05-0.20，例如，0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

20 在一种实施方式中，结合液的体积与血浆样本的体积比率为 1.00-1.75，例如，1.00、1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.10、1.11、1.12、1.13、1.14、1.15、1.16、1.17、1.18、1.19、1.20、1.21、1.22、1.23、1.24、1.25、1.26、1.27、1.28、1.29、1.30、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、1.39、1.40、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.50、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、
25 1.57、1.58、1.59、1.60、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.70、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，所述试剂组合包含第二洗涤液。

在一种实施方式中，所述第二洗涤液中含有第三醇。

在一种实施方式中，所述第三醇与所述第一醇或第二醇相同。

30 在一种实施方式中，所述第三醇与所述第一醇和第二醇均不相同。

在一种实施方式中，所述第二洗涤液中含有缓冲液。在一种优选的实施方式中，缓冲液包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

在一种实施方式中，所述第二洗涤液中含有 EDTA 溶液。

在一种实施方式中，所述试剂组合包含洗脱液。

洗脱液可以为能够将 DNA 从固相材料（例如，表面修饰硅羟基的纳米磁珠）上洗脱下来的任意试剂。

在一种实施方式中，所述洗脱液包括缓冲液。在一种优选的实施方式中，所述洗脱液包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

- 5 离液剂可以为在水溶液中破坏水分子之间的氢键网络（即发挥离液活性）的任意物质。这通过削弱疏水效应而影响溶液中其他分子（主要是大分子（蛋白质、核酸））的天然稳定性。例如，离液剂可以减少由水分子形成的蛋白质结构顺序的量，无论是在本体中还是在疏水性氨基酸周围的水合壳中，导致它们变性。

- 在一种实施方式中，所述第一离液剂或第二离液剂包括高氯酸盐、六氟磷酸盐、
10 四氟硼酸盐、氨基化合物、铵盐、钾盐、钠盐、锂盐或其组合，例如，高氯酸钠、高氯酸钾、盐酸胍、异硫氰酸胍、尿素或其组合。

在一种实施方式中，所述第一醇、第二醇或第三醇包括一元醇、多元醇或其组合，例如，甲醇、聚乙二醇、乙醇、异丙醇、丙三醇、异戊醇、丁醇或其组合。

- 在一种实施方式中，所述表面活性剂包括离子型表面活性剂、非离子型表面活性
15 剂、两性表面活性剂或其组合。

在一种实施方式中，离子型表面活性剂包括阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂或其组合。

- 在一种实施方式中，阴离子表面活性剂包括羧酸盐（如，脂肪酸的钾、钠、铵盐以及三乙醇铵盐）、磺酸盐（如，烷基苯磺酸钠（LAS 或 ABS）、 α -烯烃磺酸盐（AOS）、
20 烷基磺酸盐（AS 和 SAS）以及 α -磺基单羧酸及其衍生物（MES））、硫酸盐/酯（如，脂肪醇硫酸酯盐、仲烷基硫酸酯盐、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸酯盐、脂肪醇衍生物的硫酸酯盐以及不饱和醇的硫酸酯盐）、磷酸盐/酯（如，烷基/芳基磷酸酯）或其组合。

在一种实施方式中，阳离子表面活性剂包括胺（如，烷基胺、烷氧基化胺、氧化胺以及链烷醇酰胺）、烷基铵盐（如，烷基三甲基铵盐）或其组合。

- 25 在一种实施方式中，非离子型表面活性剂包括聚氧乙烯型非离子表面活性剂、多元醇型非离子表面活性剂或其组合。

- 在一种实施方式中，聚氧乙烯型非离子表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯脂肪醇酯或聚氧乙烯糖醇或其组合。例如，通式为 $RO(CH_2CH_2O)_nH$ 的脂肪醇聚氧乙烯醚，R 可以为饱和的或不饱和的，直链或带支链的（例如， $C_{10}\sim C_{18}$ ，优选 $C_{12}\sim C_{16}$ ）
30 烷基； n 是环氧乙烷的加成数， $n \geq 1$ ，例如， $n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ 或更大的自然数，或其组合，其具体实例包括聚乙二醇十六烷基醚、鲸蜡硬脂醇聚氧乙烯醚-10 或其组合。又例如，聚氧乙烯山梨糖醇（例如，吐温，比如，吐温 20、40、60、80 或 85）、聚氧乙烯失水山梨糖醇（例如，司盘，比如，司盘 20、40、60、80 或 85）或其组合。

在一种实施方式中，多元醇型非离子表面活性剂包括脂肪酸甘油酯。

在一种实施方式中，两性表面活性剂包括氨基酸型（如，十二烷基氨基丙酸）、甜菜碱型（如，烷基二甲基甜菜碱、烷基二甲基磺乙基甜菜碱以及烷基二甲基羟丙基磷酸脂甜菜碱）或其组合。

5 在一种实施方式中，表面活性剂的具体实例包括十二烷基硫酸钠（SDS）、脱氧胆酸钠（NaDOC）、曲拉通 X-100、NP-40、吐温 20、聚乙二醇十六烷基醚、鲸蜡硬脂醇聚氧乙烯醚-10 或其组合。

在一种实施方式中，蛋白质变性剂包括离子型表面活性剂、氨基化合物或其组合。

10 在一种实施方式中，离子型表面活性剂包括阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂或其组合。

在一种实施方式中，阴离子表面活性剂包括羧酸盐（如，高级脂肪酸的钾、钠、铵盐以及三乙醇铵盐）、磺酸盐（如，烷基苯磺酸钠（LAS 或 ABS）、 α -烯烴磺酸盐（AOS）、烷基磺酸盐（AS 和 SAS）以及 α -磺基单羧酸及其衍生物（MES））、硫酸盐/酯（如，脂肪醇硫酸酯盐、仲烷基硫酸酯盐、脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸酯盐、15 脂肪酸衍生物的硫酸酯盐以及不饱和醇的硫酸酯盐）、磷酸盐/酯（如，烷基/芳基磷酸酯）或其组合。

在一种实施方式中，阳离子表面活性剂包括胺（如，烷基胺、烷氧基化胺、氧化胺以及链烷醇酰胺）、烷基铵盐（如，烷基三甲基铵盐）或其组合。

20 在一种实施方式中，氨基化合物包括尿素、胍盐（如，盐酸胍、异硫氰酸胍）或其组合。

在一种实施方式中，所述消化酶溶液浓度为 10-30mg/mL，例如，10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30mg/mL，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

25 在一种实施方式中，所述蛋白质变性剂的浓度为 4.0-6.0M，例如，4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0 M，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

30 在一种实施方式中，所述消化液中的表面活性剂的质量百分比为 8.0-12.0wt%，例如，8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、10.1、10.2、10.3、10.4、10.5、10.6、10.7、10.8、10.9、11.0、11.1、11.2、11.3、11.4、11.5、11.6、11.7、11.8、11.9、12.0 wt%，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，所述结合液中的表面活性剂的质量百分比为 6.0-10.0wt%，例如，6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、

9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，所述第一洗涤液中的表面活性剂的质量百分比为3.0-7.0wt%，例如，3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、
5 4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0 wt%，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，消化液中缓冲液的浓度为20-30mM，例如，20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30mM，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

10 在一种实施方式中，消化液中缓冲液的pH值为6.5-8.5，例如，6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，结合液中缓冲液的浓度为15-25mM，例如，15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25mM，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

15 在一种实施方式中，结合液中缓冲液的pH值为6.5-8.5，例如，6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，第一洗涤液中缓冲液的浓度为15-25mM，例如，15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25mM，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

20 在一种实施方式中，第一洗涤液中缓冲液的pH值为6.5-8.5，例如，6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，第二洗涤液中缓冲液的浓度为45-55mM，例如，45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55mM，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

25 在一种实施方式中，第二洗涤液中缓冲液的pH值为6.5-8.5，例如，6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，洗脱液中缓冲液的浓度为5-15mM，例如，5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15mM，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

30 在一种实施方式中，洗脱液中缓冲液的pH值为6.5-8.5，例如，6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，消化液中EDTA溶液的浓度为0.8-1.8mM，例如，0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8mM，或由这些范围中的任意值组成的子

范围。

在一种实施方式中，结合液中 EDTA 溶液的浓度为 1.00-1.10mM，例如，1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.10mM，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

5 在一种实施方式中，第一洗涤液中 EDTA 溶液的浓度为 1.5-2.5mM，例如，1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5mM，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，第二洗涤液中 EDTA 溶液浓度为 0.3-0.8mM，例如，0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8mM，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

10 在一种实施方式中，结合液中的第一离液剂浓度为 4.00-5.00M，例如，4.00、4.01、4.02、4.03、4.04、4.05、4.06、4.07、4.08、4.09、4.10、4.11、4.12、4.13、4.14、4.15、4.16、4.17、4.18、4.19、4.20、4.21、4.22、4.23、4.24、4.25、4.26、4.27、4.28、4.29、4.30、4.31、4.32、4.33、4.34、4.35、4.36、4.37、4.38、4.39、4.40、4.41、4.42、4.43、4.44、4.45、4.46、4.47、4.48、4.49、4.50、4.51、4.52、4.53、4.54、4.55、4.56、4.57、15 4.58、4.59、4.60、4.61、4.62、4.63、4.64、4.65、4.66、4.67、4.68、4.69、4.70、4.71、4.72、4.73、4.74、4.75、4.76、4.77、4.78、4.79、4.80、4.81、4.82、4.83、4.84、4.85、4.86、4.87、4.88、4.89、4.90、4.91、4.92、4.93、4.94、4.95、4.96、4.97、4.98、4.99、5.00M，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，第一洗涤液中的第二离液剂浓度为 2.5-3.5M，例如，2.5、2.6、20 2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5M，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，结合液中含有的第一醇的体积百分比为 15.0-60.0%，例如，15.0、15.1、15.2、15.3、15.4、15.5、15.6、15.7、15.8、15.9、16.0、16.1、16.2、16.3、16.4、16.5、16.6、16.7、16.8、16.9、17.0、17.1、17.2、17.3、17.4、17.5、17.6、17.7、25 17.8、17.9、18.0、18.1、18.2、18.3、18.4、18.5、18.6、18.7、18.8、18.9、19.0、19.1、19.2、19.3、19.4、19.5、19.6、19.7、19.8、19.9、20.0、20.1、20.2、20.3、20.4、20.5、20.6、20.7、20.8、20.9、21.0、21.1、21.2、21.3、21.4、21.5、21.6、21.7、21.8、21.9、22.0、22.1、22.2、22.3、22.4、22.5、22.6、22.7、22.8、22.9、23.0、23.1、23.2、23.3、23.4、23.5、23.6、23.7、23.8、23.9、24.0、24.1、24.2、24.3、24.4、24.5、24.6、24.7、30 24.8、24.9、25.0、25.1、25.2、25.3、25.4、25.5、25.6、25.7、25.8、25.9、26.0、26.1、26.2、26.3、26.4、26.5、26.6、26.7、26.8、26.9、27.0、27.1、27.2、27.3、27.4、27.5、27.6、27.7、27.8、27.9、28.0、28.1、28.2、28.3、28.4、28.5、28.6、28.7、28.8、28.9、29.0、29.1、29.2、29.3、29.4、29.5、29.6、29.7、29.8、29.9、30.0、30.1、30.2、30.3、30.4、30.5、30.6、30.7、30.8、30.9、31.0、31.1、31.2、31.3、31.4、31.5、31.6、31.7、

31.8、31.9、32.0、32.1、32.2、32.3、32.4、32.5、32.6、32.7、32.8、32.9、33.0、33.1、
33.2、33.3、33.4、33.5、33.6、33.7、33.8、33.9、34.0、34.1、34.2、34.3、34.4、34.5、
34.6、34.7、34.8、34.9、35.0、35.1、35.2、35.3、35.4、35.5、35.6、35.7、35.8、35.9、
36.0、36.1、36.2、36.3、36.4、36.5、36.6、36.7、36.8、36.9、37.0、37.1、37.2、37.3、
5 37.4、37.5、37.6、37.7、37.8、37.9、38.0、38.1、38.2、38.3、38.4、38.5、38.6、38.7、
38.8、38.9、39.0、39.1、39.2、39.3、39.4、39.5、39.6、39.7、39.8、39.9、40.0、40.1、
40.2、40.3、40.4、40.5、40.6、40.7、40.8、40.9、41.0、41.1、41.2、41.3、41.4、41.5、
41.6、41.7、41.8、41.9、42.0、42.1、42.2、42.3、42.4、42.5、42.6、42.7、42.8、42.9、
43.0、43.1、43.2、43.3、43.4、43.5、43.6、43.7、43.8、43.9、44.0、44.1、44.2、44.3、
10 44.4、44.5、44.6、44.7、44.8、44.9、45.0、45.1、45.2、45.3、45.4、45.5、45.6、45.7、
45.8、45.9、46.0、46.1、46.2、46.3、46.4、46.5、46.6、46.7、46.8、46.9、47.0、47.1、
47.2、47.3、47.4、47.5、47.6、47.7、47.8、47.9、48.0、48.1、48.2、48.3、48.4、48.5、
48.6、48.7、48.8、48.9、49.0、49.1、49.2、49.3、49.4、49.5、49.6、49.7、49.8、49.9、
50.0、50.1、50.2、50.3、50.4、50.5、50.6、50.7、50.8、50.9、51.0、51.1、51.2、51.3、
15 51.4、51.5、51.6、51.7、51.8、51.9、52.0、52.1、52.2、52.3、52.4、52.5、52.6、52.7、
52.8、52.9、53.0、53.1、53.2、53.3、53.4、53.5、53.6、53.7、53.8、53.9、54.0、54.1、
54.2、54.3、54.4、54.5、54.6、54.7、54.8、54.9、55.0、55.1、55.2、55.3、55.4、55.5、
55.6、55.7、55.8、55.9、56.0、56.1、56.2、56.3、56.4、56.5、56.6、56.7、56.8、56.9、
57.0、57.1、57.2、57.3、57.4、57.5、57.6、57.7、57.8、57.9、58.0、58.1、58.2、58.3、
20 58.4、58.5、58.6、58.7、58.8、58.9、59.0、59.1、59.2、59.3、59.4、59.5、59.6、59.7、
59.8、59.9、60.0%，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，第一洗涤液中含有的第二醇的体积百分比为 10-35%，例如，
10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、
29、30、31、32、33、34、35%，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

25 在一种实施方式中，第二洗涤液中含有的第三醇的体积百分比为 75-85%，例如，
75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85%，或由这些范围中的任意值组成的
子范围。

在一种实施方式中，在裂解液组合与血浆的混合体系中，浓度为 0.32-1.2M（例
如，0.32、0.33、0.34、0.35、0.36、0.37、0.38、0.39、0.40、0.41、0.42、0.43、0.44、
30 0.45、0.46、0.47、0.48、0.49、0.50、0.51、0.52、0.53、0.54、0.55、0.56、0.57、0.58、
0.59、0.60、0.61、0.62、0.63、0.64、0.65、0.66、0.67、0.68、0.69、0.70、0.71、0.72、
0.73、0.74、0.75、0.76、0.77、0.78、0.79、0.80、0.81、0.82、0.83、0.84、0.85、0.86、
0.87、0.88、0.89、0.90、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、0.97、0.98、0.99、1.00、
1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.10、1.11、1.12、1.13、1.14、

1.15、1.16、1.17、1.18、1.19、1.20M，或由这些范围中的任意值组成的子范围）的蛋白质变性剂和/或所占质量分数为 0.64-2.4%（例如，0.64、0.65、0.66、0.67、0.68、0.69、0.70、0.71、0.72、0.73、0.74、0.75、0.76、0.77、0.78、0.79、0.80、0.81、0.82、0.83、0.84、0.85、0.86、0.87、0.88、0.89、0.90、0.91、0.92、0.93、0.94、0.95、0.96、5 0.97、0.98、0.99、1.00、1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.10、1.11、1.12、1.13、1.14、1.15、1.16、1.17、1.18、1.19、1.20、1.21、1.22、1.23、1.24、1.25、1.26、1.27、1.28、1.29、1.30、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、1.39、1.40、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.50、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.60、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、10 1.66、1.67、1.68、1.69、1.70、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.80、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、1.90、1.91、1.92、1.93、1.94、1.95、1.96、1.97、1.98、1.99、2.00、2.01、2.02、2.03、2.04、2.05、2.06、2.07、2.08、2.09、2.10、2.11、2.12、2.13、2.14、2.15、2.16、2.17、2.18、2.19、2.20、2.21、2.22、2.23、2.24、2.25、2.26、2.27、2.28、2.29、2.30、2.31、2.32、2.33、2.34、2.35、15 2.36、2.37、2.38、2.39、2.40%，或由这些范围中的任意值组成的子范围）的表面活性剂，能够使得游离 DNA 与蛋白质等杂质充分分离的同时，还抑制了 DNA 酶的活性，并避免了消化酶的失活。

在一种实施方式中，在体系中，浓度为 2.1-3.5M（例如，2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5M，或由这些范围中的任意值组成的子范围）的离液剂和/或所占体积百分比为 10-35%（例如，10、11、12、13、14、20 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35%，或由这些范围中的任意值组成的子范围）的醇能够使得 DNA 与磁珠有效结合。所述体系可以是储备体系（例如，储备液），例如，对于第一洗涤液而言。所述体系也可以是工作体系（例如，包含离液剂和/或醇以及其他物质（例如，血浆、25 裂解液等）的混合液），例如，对于结合液而言。

在一种优选的实施方式中，在包含结合液的工作体系中，第一离液剂的浓度为 2.1-3.0M（例如，2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0M，或由这些范围中的任意值组成的子范围）和/或第一醇所占体积百分比为 10-25%（例如，10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25%，或由这些范围中的30 任意值组成的子范围）。

在一种优选的实施方式中，在第一洗涤液中第二离液剂的浓度为 2.1-3.5M（例如，2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5M，或由这些范围中的任意值组成的子范围）和/或第二醇所占体积百分比为 10-35%（例如，10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、

29、30、31、32、33、34、35%，或由这些范围中的任意值组成的子范围）。

在一种实施方式中，表面活性剂的存在可以有效避免杂质与磁珠的非特异性结合，例如，聚氧乙烯型非离子表面活性剂（例如，聚乙二醇十六烷基醚）。

在一种优选的实施方式中，提取血浆中游离 DNA 的试剂组合包括结合液；所述
5 结合液包括 4.00-5.00M 的第一离液剂、体积百分比为 15.0-60.0%的第一醇。优选地，所述结合液还可以包括表面活性剂。进一步优选地，所述表面活性剂所占质量百分比为 6.0-10.0%。更优选地，所述表面活性剂可以包括聚氧乙烯型非离子表面活性剂（例如，聚乙二醇十六烷基醚）。

在一种优选的实施方式中，提取血浆中游离 DNA 的试剂组合包括第一洗涤液；
10 所述第一洗涤液包括 2.5-3.5M 的第二离液剂、体积百分比为 10.0-35.0%的第二醇。优选地，所述第一洗涤液还可以包括表面活性剂。进一步优选地，所述表面活性剂所占质量百分比为 3.0-7.0%。更优选地，所述表面活性剂可以包括聚氧乙烯型非离子表面活性剂（例如，聚乙二醇十六烷基醚）。

在一种优选的实施方式中，提取血浆中游离 DNA 的试剂组合包括结合液和第一
15 洗涤液；所述结合液包括 4.00-5.00M 的第一离液剂、体积百分比为 15.0-60.0%的第一醇，所述第一洗涤液包括 2.5-3.5M 的第二离液剂、体积百分比为 10.0-35.0%的第二醇。优选地，所述结合液和/或第一洗涤液还可以包括表面活性剂。进一步优选地，在所述结合液中所述表面活性剂所占质量百分比为 6.0-10.0%和/或在所述第一洗涤液中所述表面活性剂所占质量百分比为 3.0-7.0%。更优选地，所述结合液和/或第一洗涤液中的
20 所述表面活性剂可以包括聚氧乙烯型非离子表面活性剂（例如，聚乙二醇十六烷基醚）。

在另一个方面，本发明提供一种提取血浆中游离 DNA 的试剂盒，其包括前述方面中的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合。

在又一个方面，本发明提供一种用前述方面中的试剂组合或试剂盒提取血浆中游离
25 DNA 的方法，其包含如下步骤：

a) 消化样本；b) 使得游离 DNA 与磁珠结合；c) 清洗磁珠；d) 洗脱 DNA。

在一种实施方式中，步骤 a) 中，用包含消化酶溶液和消化液的裂解液组合消化样本。

在一种实施方式中，步骤 a) 中，消化酶溶液的体积与血浆样本的体积比率为
30 0.01-0.08，例如，0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，步骤 a) 中，消化液的体积与血浆样本的体积比率为 0.05-0.20，例如，0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，步骤 a) 中，包括孵育过程。

在一种实施方式中，步骤 a) 中，孵育温度为 55-65°C，例如，55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65°C，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，步骤 a) 中，孵育时间为至少 1 分钟，例如，至少 1 分钟、
5 至少 2 分钟、至少 3 分钟、至少 4 分钟、至少 5 分钟、至少 6 分钟、至少 7 分钟、至少 8 分钟、至少 9 分钟、至少 10 分钟、至少 11 分钟、至少 12 分钟、至少 13 分钟、至少 14 分钟、至少 15 分钟、至少 16 分钟、至少 17 分钟、至少 18 分钟、至少 19 分钟、至少 20 分钟、至少 21 分钟、至少 22 分钟、至少 23 分钟、至少 24 分钟、至少 25 分钟，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

10 在一种实施方式中，步骤 b) 中，加入磁珠和结合液。

在一种实施方式中，步骤 b) 中，加入的结合液的体积与血浆样本的体积比率为 1.00-1.75，例如，1.00、1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.10、1.11、1.12、1.13、1.14、1.15、1.16、1.17、1.18、1.19、1.20、1.21、1.22、1.23、1.24、1.25、1.26、1.27、1.28、1.29、1.30、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、
15 1.39、1.40、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.50、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.60、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.70、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，步骤 b) 中，包括孵育过程。

20 在一种实施方式中，步骤 b) 中，孵育温度为室温，例如，10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35°C，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，步骤 b) 中，孵育时间为至少 1 分钟，例如，至少 1 分钟、至少 2 分钟、至少 3 分钟、至少 4 分钟、至少 5 分钟、至少 6 分钟、至少 7 分钟、至少 8 分钟、至少 9 分钟、至少 10 分钟、至少 11 分钟、至少 12 分钟、至少 13 分钟、
25 至少 14 分钟、至少 15 分钟，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，步骤 b) 中，孵育期间对样本充分混合避免磁珠沉降。

在一种实施方式中，步骤 b) 中，通过例如外加磁场吸附的方式来分离磁珠。

在一种实施方式中，步骤 c) 中，包括用第一洗涤液清洗磁珠。

30 在一种实施方式中，步骤 c) 中，用第一洗涤液清洗磁珠后，用第一洗涤液清洗磁珠至少一次，例如，至少一次、至少两次、至少三次，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，步骤 c) 中，包括用第二洗涤液清洗磁珠。

在一种实施方式中，步骤 c) 中，用第二洗涤液清洗磁珠后，用第二洗涤液清洗

磁珠至少一次，例如，至少一次、至少两次、至少三次，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，步骤 c) 中，通过例如外加磁场吸附的方式来分离磁珠。

在一种实施方式中，步骤 d) 中，用洗脱液洗脱磁珠上的 DNA。

5 在一种实施方式中，步骤 d) 中，包括孵育过程。

在一种实施方式中，步骤 d) 中，孵育温度为室温，例如，10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35°C，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

10 在一种实施方式中，步骤 d) 中，孵育时间为至少 1 分钟，例如，至少 1 分钟、至少 2 分钟、至少 3 分钟、至少 4 分钟、至少 5 分钟、至少 6 分钟、至少 7 分钟、至少 8 分钟、至少 9 分钟、至少 10 分钟，或由这些范围中的任意值组成的子范围。

在一种实施方式中，步骤 d) 中，孵育期间对样本充分混合避免磁珠沉降。

在一种实施方式中，步骤 d) 中，通过例如外加磁场吸附的方式来分离磁珠。

15 本发明中，包含结合液的混合体系和/或第一洗涤液中离液剂的浓度和/或醇的所占体积百分比能够使得游离 DNA 与纳米磁珠高效结合，同时表面活性剂的存在能够避免杂质与磁珠的非特异性结合，从而使得磁珠法能够适用于从血浆中提取高得率和高纯度的 DNA；在裂解液组合与血浆的混合体系中，蛋白质变性剂和表面活性剂的浓度能够使得游离 DNA 与蛋白质等杂质充分分离的同时，还抑制了 DNA 酶活性，并避免了消化酶的失活，有利于同时提升 DNA 提取的得率和纯度；此外，本发明的
20 试剂组合中的各成分浓度实现了在中性 pH 值条件下提取 DNA，克服了传统磁珠法依赖于偏离中性的 pH 值环境来提取 DNA 的缺点，这有利地保证了所提取的 DNA 质量，便于下游检测。

本发明所述“室温”是指 10-35°C 的温度。

本发明所述“中性 pH 值”是指 pH 值为 6.5-8.5。

25 除非另有说明，对于醇，本发明所述百分比、比例、浓度，是指体积百分比；对于其他物质，本发明所述百分比、比例，是指重量百分比。

除非另有说明，本发明在描述某一体系中的具体成分的百分比、比例、浓度时，所述百分比、比例、浓度是指该具体成分在当前体系中的百分比、比例、浓度。所述体系可以是储备体系（例如，储备液（例如，消化酶溶液、消化液、结合液、第一洗涤液、第二洗涤液或洗脱液））。所述体系也可以是工作体系（例如，包含离液剂和/或醇以及其他物质（例如，血浆、裂解液等）的混合液）。在某些情况下，储备体系也可以是工作体系，例如，对于第一、第二洗涤液或洗脱液而言。
30

本发明所述“工作浓度”是指工作体系（例如，包含离液剂和/或醇以及其他物质（例如，血浆、裂解液等）的混合液）中某一具体成分（例如，离液剂、醇）的百分

比、比例、浓度。

附图说明

图 1 为实施例 1、实施例 2、对比例 1 和对比例 2 从 1mL 血浆样本中所提取的游离 DNA 的产量（取两组重复的平均值，并保留一位小数）的对比示意图。

图 2 为测试例 1、测试例 2、测试对比例 1 和测试对比例 2 的内参基因（ALU 元件）的荧光定量 PCR（qPCR）检测结果（取两组重复的平均值，并保留一位小数）对比示意图。

10 具体实施方式

为了更好地理解本发明，下面结合实施例进一步阐述本发明的内容，但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。下述实施例中所述实验操作，如无特殊说明，均为常规操作；所述试剂和材料，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

取 Streck BCT 采血管保存的人全血样本，经过 1600g、4℃ 离心 10 分钟后取上清无细胞血浆后，再次通过 16000g、4℃ 离心 10 分钟去除细胞碎片等杂质得到血浆样本。分别取 1mL 该血浆用于实施例 1、实施例 2、对比例 1 和对比例 1。实施例 1、实施例 2、对比例 1 和对比例 1，以及后续的测试例 1、测试例 2、测试对比例 1 和测试对比例 2 分别在相同条件下重复一次。

实施例 1

a) 向前述 1mL 血浆样本中分别加入 40μL 的 20mg/mL 的蛋白酶溶液和 0.1mL 的消化液（5.5M 异硫氰酸胍，1.3mM EDTA，10.4wt% 聚乙二醇十六烷基醚，26mM Tris-HCl pH7.5）。各成分具体工作浓度为：0.5M 异硫氰酸胍，0.1mM EDTA，0.9wt% 聚乙二醇十六烷基醚，2.3mM Tris-HCl pH7.5；

b) 向消化后的样本中加入 15 μL 表面修饰硅羟基的磁珠(25mg/mL)和 1.25mL 结合液（4.44M 异硫氰酸胍，1.05mM EDTA，8.0wt% 聚乙二醇十六烷基醚，19.3% (v/v) 异丙醇，21mM Tris-HCl pH7.5）。具体工作浓度为：2.6M 异硫氰酸胍，0.6mM EDTA，5% 聚乙二醇十六烷基醚，10.6% (v/v) 异丙醇，12.3mM Tris-HCl pH7.5；充分混合后，在室温下孵育 10 分钟，期间对样本充分混合避免磁珠沉降；孵育完成后，外加磁场，分离磁珠，弃去溶液；

c) 将磁珠重悬于 1mL 第一洗涤液（3M 异硫氰酸胍，4.9wt% 聚乙二醇十六烷基醚，2mM EDTA，30%(v/v) 异丙醇，20mM Tris-HCl pH7.5）中；充分混合后，外加磁场，分离磁珠，弃去溶液；重复该步骤 c) 一次；

d) 将磁珠重悬于 1mL 第二洗涤液（80% (v/v) 乙醇，50mM Tris-HCl pH8.0，0.5mM EDTA）中；充分混合后，分离磁珠；重复该步骤 d) 一次；

e) 将磁珠重悬于 30 μ L 洗脱液 (10mM Tris-HCl pH8.0) 中; 在室温下孵育 5 分钟, 期间对样本充分混合避免磁珠沉降; 所得溶液即为提取的血浆中的游离 DNA。

实施例 2

5 a) 向前述 1mL 血浆样本中分别加入 40 μ L 的 20mg/mL 的蛋白酶溶液和 0.2mL 的消化液 (5.52M 异硫氰酸胍, 8wt% 曲拉通 X-100, 26mM Tris-HCl pH7.5)。各成分工作浓度为: 0.9M 异硫氰酸胍, 1.3% 曲拉通 X-100, 4.3mM Tris-HCl pH7.5;

b) 向消化后的样本中加入 15 μ L 表面修饰硅羟基的磁珠(25mg/mL)和 1.25mL 结合液 (4.44M 异硫氰酸胍, 6wt% 曲拉通 X-100, 25% (v/v) 异丙醇, 20mM Tris-HCl pH7.5)。各成分工作浓度为: 2.7M 异硫氰酸胍, 3.7% 曲拉通 X-100, 12.7% (v/v) 异丙醇, 12.3mM Tris-HCl pH7.5; 充分混合后, 在室温下孵育 10 分钟, 期间对样本充分混合避免磁珠沉降; 孵育完成后, 外加磁场, 分离磁珠, 弃去溶液;

c) 将磁珠重悬于 1mL 第一洗涤液 (3M 异硫氰酸胍, 5wt% 吐温 20, 30% (v/v) 异丙醇, 20mM Tris-HCl pH7.5) 中; 充分混合后, 外加磁场, 分离磁珠, 弃去溶液; 重复该步骤 c) 一次;

15 d) 将磁珠重悬于 1mL 第二洗涤液 (80% (v/v) 乙醇, 50mM Tris-HCl pH8.0) 中; 充分混合后, 分离磁珠; 重复该步骤 d) 一次;

e) 将磁珠重悬于 30 μ L 洗脱液 (10mM Tris-HCl pH8.0) 中; 在室温下孵育 5 分钟, 期间对样本充分混合避免磁珠沉降; 所得溶液即为提取的血浆中的游离 DNA。

对比例 1

20 如前所述, 取 1mL 血浆样本。用商购的磁珠法抽提试剂盒 (厂家: ApostleBio; 型号: MiniMax cfDNA Isolation kit), 根据厂家的说明书, 对该血浆样本进行提取血浆 DNA 的操作, 并最终用 30 μ L 的洗脱液进行洗脱, 以获得与实施例 1、2 相同体积的血浆 DNA 产物溶液。利用 Invitrogen™ Qubit™ dsDNA 定量试剂盒检测产物中 DNA 浓度以计算得到所提取的血浆中的游离 DNA 产量 (参见图 1)。

25 对比例 2

如前所述, 取 1mL 血浆样本。对该血浆样本进行提取血浆 DNA 的操作, 具体为:

a) 向前述 1mL 血浆样本中分别加入 40 μ L 的 20mg/mL 的蛋白酶溶液和 0.65mL 的消化液 (5M 异硫氰酸胍, 25mM EDTA, 25wt% 吐温 20, 40mM Bis-Tris pH6.0)。各成分具体工作浓度为: 2M 异硫氰酸胍, 10mM EDTA, 10wt% 吐温 20, 15mM Bis-Tris pH6.0;

30 b) 向消化后的样本中加入 15 μ L 表面修饰硅羟基的磁珠(25mg/mL)和 3.3mL 结合液 (3.5M 异硫氰酸胍, 1mM EDTA, 2.5wt% 吐温 20, 45% (v/v) 异丙醇, 40mM Bis-Tris pH6.0)。各成分具体工作浓度为: 3M 异硫氰酸胍, 4mM EDTA, 5wt% 吐温 20, 30% (v/v) 异丙醇, 31mM Bis-Tris pH6.0; 充分混合后, 在室温下孵育 10 分钟, 期间对样

本充分混合避免磁珠沉降；孵育完成后，外加磁场，分离磁珠，弃去溶液；

c) 将磁珠重悬于 1mL 第一洗涤液 (4M 异硫氰酸胍, 10wt%吐温 20, 40% (v/v) 异丙醇, 40mM Bis-Tris pH 6.0) 中；充分混合后，外加磁场，分离磁珠，弃去溶液；重复该步骤 c) 一次；

5 d) 将磁珠重悬于 1mL 第二洗涤液 (80% (v/v) 乙醇, 50mM Tris-HCl pH8.6) 中；充分混合后，分离磁珠；重复该步骤 d) 一次；

e) 将磁珠重悬于 30 μ L 洗脱液 (10mM Tris-HCl pH8.6) 中；在室温下孵育 5 分钟，期间对样本充分混合避免磁珠沉降；所得溶液即为提取的血浆中的游离 DNA。

利用 Invitrogen™ Qubit™ dsDNA 定量试剂盒检测产物中 DNA 浓度以计算得到所提取的血浆中的游离 DNA 产量 (参见表 1 和图 1)。

参见表 1 和图 1，比较上述结果发现，较之对比例 1 和对比例 1，实施例 1 和实施例 2 所获得的游离 DNA 产量更高，即实施例 1 和实施例 2 的 DNA 得率更高。

表 1 实施例 1-2 和对比例 1-2 的游离 DNA 产量

编号	游离 DNA 产量 (ng) -重复 1	游离 DNA 产量 (ng) -重复 2
实施例 1	5.70	5.76
实施例 2	5.34	5.31
对比例 1	4.92	4.83
对比例 2	3.72	3.48

15 测试例 1

取 2 μ L 实施例 1 中获得的游离 DNA 溶液。用商购的荧光定量 PCR 试剂盒 (厂家: Vazyme; 型号: Q112)，根据厂家的说明书，对该游离 DNA 溶液进行荧光定量 PCR 检测，检测人基因组内参基因 (ALU 元件) 的水平。所得的 Ct 值结果示于表 2 和图 2 中。

20 测试例 2

取 2 μ L 实施例 2 中获得的游离 DNA 溶液。用商购的荧光定量 PCR 试剂盒 (厂家: Vazyme; 型号: Q112)，根据厂家的说明书，对该游离 DNA 溶液进行荧光定量 PCR 检测，检测人基因组内参基因 (ALU 元件) 的水平。所得的 Ct 值结果示于表 2 和图 2 中。

25 测试对比例 1

取 2 μ L 对比例 1 中获得的游离 DNA 溶液。用商购的荧光定量 PCR (qPCR) 试剂盒 (厂家: Vazyme; 型号: Q112)，根据厂家的说明书，对该游离 DNA 溶液进行

荧光定量 PCR 检测，检测人基因组内参基因（ALU 元件）的水平。所得的 Ct 值结果示于表 2 和图 2 中。

测试对比例 2

取 2 μL 对比例 2 中获得的游离 DNA 溶液。用商购的荧光定量 PCR（qPCR）试剂盒（厂家：Vazyme；型号：Q112），根据厂家的说明书，对该游离 DNA 溶液进行
5 荧光定量 PCR 检测，检测人基因组内参基因（ALU 元件）的水平。所得的 Ct 值结果示于表 2 和图 2 中。

参见图 2，比较上述结果发现，较之测试对比例 1 和测试对比例 1，测试例 1 和测试例 2 检测到了更高的内参基因水平（更低的 Ct 值），这说明实施例 1 和实施例 2
10 的 DNA 产物纯度适用于 qPCR 检测流程，可提升下游检测的灵敏度。

表 2 测试例 1-2 和测试对比例 1-2 检测人基因组内参基因（ALU 元件）水平的 Ct 值结果

编号	Ct 值 - 重复 1	Ct 值 - 重复 2
测试例 1	16.96	16.82
测试例 2	17.03	16.97
测试对比例 1	17.13	17.18
测试对比例 2	17.57	17.63

权利要求书

1. 一种提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其特征在于，其包含结合液和第一洗涤液，所述结合液包含第一离液剂和第一醇，所述第一洗涤液包含第二离液剂和第二醇。

5

2. 根据权利要求 1 所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，
所述结合液还含有表面活性剂、缓冲液、EDTA 溶液或其组合；优选地，表面活性剂包括阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子型表面活性剂、两性表面活性剂或其组合；优选地，表面活性剂包括十二烷基硫酸钠 (SDS)、脱氧胆酸钠 (NaDOC)、
10 曲拉通 X-100、NP-40、吐温 20、聚氧乙烯型非离子表面活性剂或其组合；优选地，表面活性剂包括聚氧乙烯型非离子表面活性剂；优选地，缓冲液包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

3. 根据前述任一项权利要求所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组

15

合，其中，所述第一洗涤液还含有表面活性剂、缓冲液、EDTA 溶液或其组合；优选地，表面活性剂包括阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、非离子型表面活性剂、两性表面活性剂或其组合；优选地，表面活性剂包括十二烷基硫酸钠 (SDS)、脱氧胆酸钠 (NaDOC)、曲拉通 X-100、NP-40、吐温 20、聚氧乙烯型非离子表面活性剂或其组合；优选地，表面活性剂包括聚氧乙烯型非离子表面活性剂；优选地，缓冲液
20 包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

4. 根据前述任一项权利要求所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述试剂组合包含裂解液组合；优选地，所述裂解液组合包含消化酶溶液、消化液或其组合；更优选地，所述消化酶溶液包括蛋白酶 K 溶液；更优选地，所述消化液包括蛋白质变
25 性剂、表面活性剂、EDTA 溶液、缓冲液或其组合；更优选地，所述蛋白质变性剂包括阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、氨基化合物或其组合；更优选地，所述蛋白质变性剂包括尿素、胍盐；更优选地，所述蛋白变性剂包括异硫氰酸胍；更优选地，表面活性剂包括十二烷基硫酸钠 (SDS)、脱氧胆酸钠 (NaDOC)、曲拉通 X-100、NP-40、吐温 20、聚氧乙烯型非离子表面活性剂或其组合；更优选地，表面活性剂包
30 括聚氧乙烯型非离子表面活性剂；更优选地，缓冲液包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

5. 根据前述任一项权利要求所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述试剂组合包含第二洗涤液；优选地，所述第二洗涤液包含醇、缓冲液、EDTA 溶液或其

组合；优选地，所述醇包括一元醇、多元醇或其组合；优选地，所述醇包括甲醇、丁醇、聚乙二醇、乙醇、异丙醇、异戊醇、丙三醇或其组合；优选地，所述醇包括乙醇；优选地，缓冲液包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

- 5 6. 根据前述任一项权利要求所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述试剂组合包含洗脱液；优选地，所述洗脱液包括缓冲液；更优选地，所述洗脱液包括 Tris-HCl 缓冲液、Bis-Tris 缓冲液、甘氨酸缓冲液或其组合。

- 10 7. 根据前述任一项权利要求所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述第一或第二离液剂包括高氯酸盐、六氟磷酸盐、四氟硼酸盐、氨基化合物、铵盐、钾盐、钠盐、锂盐或其组合；优选地，所述第一或第二离液剂包括高氯酸钠、高氯酸钾、盐酸胍、异硫氰酸胍、尿素或其组合。

- 15 8. 根据前述任一项权利要求所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述结合液和第一洗涤液中的醇各自分别包括一元醇、多元醇或其组合；优选地，所述结合液和第一洗涤液中的醇各自分别包括甲醇、丁醇、聚乙二醇、乙醇、异丙醇、异戊醇、丙三醇或其组合；更优选地，所述结合液和第一洗涤液中的醇各自分别包括异丙醇。

- 20 9. 根据权利要求 4-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述消化酶溶液浓度为 10-30mg/mL；优选地，所述消化酶溶液浓度为 15-25mg/mL。

10. 根据权利要求 4-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述蛋白质变性剂的浓度为 4.0-6.0M；优选地，所述蛋白质变性剂的浓度为 4.3-5.8M。

- 25 11. 根据权利要求 4-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述消化液中的表面活性剂的质量百分比为 8.0-12.0wt%；优选地，所述消化液中的表面活性剂的质量百分比为 9.0-11.0wt%。

- 30 12. 根据权利要求 2-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述结合液中的表面活性剂的质量百分比为 6.0-10.0wt%；优选地，所述结合液中的质量百分比为 7.0-9.0wt%。

13. 根据权利要求 3-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述第一洗涤液中的表面活性剂的质量百分比为 3.0-7.0wt%；优选地，所述第一洗涤液中

的质量百分比为 4.0-6.0wt%。

14. 根据权利要求 4-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述消化液中缓冲液的浓度为 20-30mM，且其 pH 值为 6.5-8.5；优选地，所述消化液中缓冲液的浓度为 23-28mM，且其 pH 值为 7.3-7.8。

15. 根据权利要求 2-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述结合液中缓冲液的浓度为 15-25mM，且其 pH 值为 6.5-8.5；优选地，所述结合液中缓冲液的浓度为 18-23mM，且其 pH 值为 7.3-7.8。

16. 根据权利要求 3-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述第一洗涤液中缓冲液的浓度为 15-25mM，且其 pH 值为 6.5-8.5；优选地，所述第一洗涤液中缓冲液的浓度为 18-23mM，且其 pH 值为 7.3-7.8。

17. 根据权利要求 5-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述第二洗涤液中缓冲液的浓度为 45-55mM，且其 pH 值为 6.5-8.5；优选地，所述第二洗涤液中缓冲液的浓度为 48-53mM，且其 pH 值为 7.7-8.0。

18. 根据权利要求 6-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述洗脱液中缓冲液的浓度为 5-15mM，且其 pH 值为 6.5-8.5；优选地，所述洗脱液中缓冲液的浓度为 8-13mM，且其 pH 值为 7.7-8.0。

19. 根据权利要求 4-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述消化液中 EDTA 溶液的浓度为 0.8-1.8mM；优选地，所述消化液中 EDTA 溶液的浓度为 1.1-1.6mM。

20. 根据权利要求 2-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述结合液中 EDTA 溶液的浓度为 1.00-1.10mM；优选地，所述结合液中 EDTA 溶液的浓度为 1.03-1.08mM。

21. 根据权利要求 3-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合，其中，所述第一洗涤液中 EDTA 溶液的浓度为 1.5-2.5mM；优选地，所述第一洗涤液中 EDTA 溶液的浓度为 1.8-2.3mM。

22. 根据权利要求 5-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合, 其中, 所述第二洗涤液中 EDTA 溶液的浓度为 0.3-0.8mM; 优选地, 所述第二洗涤液中 EDTA 溶液的浓度为 0.4-0.6mM。
- 5 23. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合, 其中, 所述结合液中的第一离液剂浓度为 4.00-5.00M; 优选地, 所述结合液中的第一离液剂浓度为 4.20-4.80M。
24. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合, 其中, 所述
10 第一洗涤液中的第二离液剂浓度为 2.5-3.5M; 优选地, 所述第一洗涤液中的第二离液剂浓度为 2.8-3.3M。
25. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合, 其中, 所述
15 结合液中含有的第一醇的体积百分比为 15.0-60.0%; 优选地, 所述结合液中含有的第一醇的体积百分比为 20.0-50.0%。
26. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合, 其中, 所述
第一洗涤液中含有的第二醇的体积百分比为 10-35%; 优选地, 所述第一洗涤液中含有的第二醇的体积百分比为 15-33%。
- 20 27. 根据权利要求 5-8 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合, 其中, 所述第二洗涤液中含有的第三醇的体积百分比为 75-85%; 优选地, 所述第二洗涤液中含有的第三醇的体积百分比为 78-83%。
- 25 28. 一种提取血浆中游离 DNA 的试剂盒, 其包括权利要求 1-27 中任一项所述的提取血浆中游离 DNA 的试剂组合。
29. 一种用权利要求 1-27 中任一项所述的试剂组合或权利要求 28 所述的试剂盒提取血浆中游离 DNA 的方法, 其包含如下步骤:
- 30 a) 消化样本; b) 使得游离 DNA 与磁珠结合; c) 清洗磁珠; d) 洗脱 DNA。
30. 根据权利要求 29 所述的方法, 其中, 步骤 a) 中, 用包含消化酶溶液和消化液的裂解液组合消化样本; 优选地, 消化酶溶液的体积与血浆样本的体积比率为 0.01-0.08, 消化液的体积与血浆样本的体积比率为 0.05-0.20; 更优选地, 消化酶溶液的体积与血

浆样本的体积比率为 0.04-0.08，消化液的体积与血浆样本的体积比率为 0.08-0.20。

31. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中，步骤 b) 中，加入磁珠和结合液；优选地，加入的结合液的体积与血浆样本的体积比率为 1.00-1.75；更优选地，加入的结合液的体积与血浆样本的体积比率为 1.20-1.50。

32. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中，步骤 c) 中，包括用第一洗涤液清洗磁珠；优选地，步骤 c) 中，用第一洗涤液清洗磁珠后，用第一洗涤液清洗磁珠至少一次。

10

33. 根据权利要求 29 或 30 所述的方法，其中，步骤 c) 中，包括用第二洗涤液清洗磁珠；优选地，用第二洗涤液清洗磁珠后，用第二洗涤液清洗磁珠至少一次。